

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7588586号
(P7588586)

(45)発行日 令和6年11月22日(2024.11.22)

(24)登録日 令和6年11月14日(2024.11.14)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46 Z N A
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
		請求項の数 21 (全89頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2021-535639(P2021-535639)	(73)特許権者	597160510
(86)(22)出願日	令和1年12月18日(2019.12.18)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2022-515611(P2022-515611 A)		REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(43)公表日	令和4年2月21日(2022.2.21)		アメリカ合衆国1 0 5 9 1-6 7 0 7 ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード 7 7 7 番
(86)国際出願番号	PCT/US2019/067109	(74)代理人	100127926
(87)国際公開番号	WO2020/132024		弁理士 結田 純次
(87)国際公開日	令和2年6月25日(2020.6.25)	(74)代理人	100140132
審査請求日	令和4年12月9日(2022.12.9)		弁理士 竹林 則幸
(31)優先権主張番号	62/782,142	(72)発明者	アンドリュー・ジェイ・マーフィー
(32)優先日	平成30年12月19日(2018.12.19)		アメリカ合衆国ニューヨーク州1 0 5 9 1. タリータウン、オールドソーミルリ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	62/815,861		
(32)優先日	平成31年3月8日(2019.3.8)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 二重特異性抗MUC 1 6 ×抗CD 2 8 抗体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された二重特異性抗原結合分子であって、

(a) ヒトCD 2 8 に結合し、それぞれ、配列番号 2 0、2 2 および 2 4 のアミノ酸配列を含むHCDR 1、HCDR 2 およびHCDR 3 ドメインを含む重鎖可変領域(HCVR)、ならびに、それぞれ、配列番号 1 2、1 4 および 1 6 のアミノ酸配列を含むLCDR 1、LCDR 2 およびLCDR 3 ドメインを含む軽鎖可変領域(LCVR)、を含む、第 1 の抗原結合ドメインと；

(b) ヒトムチン 1 6 膜抗原(MUC 1 6) に特異的に結合し、それぞれ、配列番号 4、6 および 8 のアミノ酸配列を含むHCDR 1、HCDR 2 およびHCDR 3 ドメインを含むHCVR、ならびに、それぞれ、配列番号 1 2、1 4 および 1 6 のアミノ酸配列を含むLCDR 1、LCDR 2 およびLCDR 3 ドメインを含むLCVR、を含む、第 2 の抗原結合ドメインと；

を含む、前記単離された二重特異性抗原結合分子。

【請求項 2】

(a) 第 1 の抗原結合ドメインは、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含むHCVR、および配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含むLCVRを含み、

(b) 第 2 の抗原結合ドメインは、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むHCVR、および配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含むLCVRを含み、

請求項 1 に記載の単離された二重特異性抗原結合分子。

【請求項 3】

二重特異性抗体である、請求項 1 または 2 に記載の単離された二重特異性抗原結合分子。

【請求項 4】

前記二重特異性抗体が、ヒト I g G 重鎖定常領域を含む、請求項 3 に記載の単離された二重特異性抗原結合分子。

【請求項 5】

前記二重特異性抗体のヒト I g G 重鎖定常領域が、アイソタイプ I g G 1 または I g G 4 である、請求項 4 に記載の単離された二重特異性抗原結合分子。

【請求項 6】

第 1 の C H 3 ドメインを含む第 1 の重鎖、および第 2 の C H 3 ドメインを含む第 2 の重鎖を含み、前記第 1 の C H 3 ドメインまたは前記第 2 の C H 3 ドメインは、H 4 3 5 R 修飾（E U 番号付与による）および Y 4 3 6 F 修飾（E U 番号付与による）を、両方ではないが、含む、請求項 3 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の単離された二重特異性抗原結合分子。

10

【請求項 7】

前記二重特異性抗体が、同じアイソタイプの野生型ヒンジと比較して F c γ 受容体結合が減少するヒンジを含む、請求項 3 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の単離された二重特異性抗原結合分子。

【請求項 8】

請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の二重特異性抗原結合分子、および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む、薬学的組成物。

20

【請求項 9】

請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の二重特異性抗原結合分子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子、または、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の二重特異性抗原結合分子の、それぞれ、第 1 の抗原結合ドメインの H C V R、第 2 の抗原結合ドメインの H C V R、ならびに、第 1 および第 2 の抗原結合ドメインの L C V R をコードする、ヌクレオチド配列を含む 3 つの異なる核酸分子。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の核酸分子を含む発現ベクター、または、それぞれ、請求項 9 に記載の 3 つの異なる核酸分子のうちの 1 つを含む 3 つの異なる発現ベクター。

【請求項 11】

30

請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の二重特異性抗原結合分子、請求項 9 に記載の核酸分子もしくは 3 つの異なる核酸分子、または、請求項 10 に記載の発現ベクターもしくは 3 つの異なる発現ベクター、を含む宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の宿主細胞を、前記二重特異性抗原結合分子の産生を可能にする条件下で培養すること、および、そうして産生された二重特異性抗原結合分子を回収することを含む、抗 C D 2 8 × 抗 M U C 1 6 二重特異性抗原結合分子を産生する方法。

【請求項 13】

前記二重特異性抗原結合分子を、好適な担体とともに薬学的組成物として製剤化することを含む、請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 14】

請求項 12 に記載の方法によって取得可能な、抗 C D 2 8 × 抗 M U C 1 6 二重特異性抗原結合分子。

【請求項 15】

患者における M U C 1 6 発現腫瘍を治療するための、請求項 8 に記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

前記 M U C 1 6 発現腫瘍が、卵巣癌である、請求項 15 に記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

第 2 の治療薬と組み合わせて、M U C 1 6 発現腫瘍を治療するための、請求項 15 または 16 に記載の薬学的組成物。

50

【請求項 18】

前記第2の治療薬が、抗腫瘍剤、放射線療法、抗体薬物複合体、抗腫瘍剤と複合化された二重特異性抗体、チェックポイント阻害剤、またはそれらの組み合わせを含む、請求項17に記載の薬学的組成物。

【請求項 19】

前記第2の治療薬が、抗PD-1抗体である、請求項17に記載の薬学的組成物。

【請求項 20】

前記抗PD-1抗体が、セミプリマブである、請求項19に記載の薬学的組成物。

【請求項 21】

前記第2の治療薬が、抗MUC16×抗CD3二重特異性抗体である、請求項17に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、2018年12月19日に提出された米国仮特許出願第62/782,142号、および2019年3月8日に提出された米国仮特許出願第62/815,861号に関し、それらの優先権を主張する。前述の出願の内容全体は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2019年12月18日に作成された上記のASCIIコピーは、名称が10493WO01__118003__49320__SeqLst.txt、サイズが38,372バイトである。

【0003】

本発明はまた、CD28およびMUC16などの標的分子に結合する二重特異性抗原結合分子、ならびにそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

【0004】

CD28は、I型膜貫通タンパク質であり、これは、ホモ二量体として組み立てられた単一の細胞外Ig-V様ドメインを有し、T細胞の表面上で発現される。CD28は、CD80(B7.1)およびCD86(B7.2)タンパク質の受容体であり、抗原提示細胞(APC)上で発現されるCD80またはCD86によって活性化される。CD28のCD80またはCD86への結合は、T細胞の活性化および生存に重要な共刺激シグナルを提供する。T細胞受容体(TCR)に加えてCD28を介したT細胞刺激は、様々なインターロイキンの産生に強力なシグナルを提供する。CD28はまた、TCR活性化後、NFκB転写因子によって制御される経路などの細胞シグナルを増強する。CD28共シグナルは、T細胞の分化、増殖、サイトカイン放出、および細胞死などの効果的なT細胞活性化に重要である。

【0005】

抗CD28抗体は、T細胞の活性化を含む治療目的のために提案されている。1つの特定の抗CD28抗体であるTGN1412(抗CD28スーパーアゴニスト)が、2006年の臨床試験で使用された。6人の健康なボランティアに、0.1mg/kgの用量でTGN1412(抗CD28スーパーアゴニスト)を静脈内投与した。2時間以内に、6人の患者全員が重大な炎症反応(サイトカインストーム)を有し、全患者が16時間以内に多臓器不全に陥った。対象をコルチコステロイドで治療したところ、サイトカインは、2~3日以内に正常に戻った。第1相試験での0.1mg/kgの開始用量は、カニクイザルにおける50mg/kgの無毒性量(「NOAEL」)の500倍量に基づいた(非特許文献1)。残念ながら、TGN1412によって誘発されたサイトカインストームは

10

20

30

40

50

、カニクイザルの毒物学研究またはエキスピボでのヒトPBM C研究では予測されなかった。

【0006】

癌抗原125、細胞癌抗原125、炭水化物抗原125、またはCA-125としても既知であるムチン16 (MUC16) は、高度にグリコシル化された膜内在性糖タンパク質である。MUC16は、3つの主要ドメイン、すなわち細胞外N末端ドメイン、ウニ精子、エンテロキナーゼ、アグリリン (SEA) ドメインが点在する大きな縦列反復ドメイン、ならびに膜貫通領域のセグメントおよび短い細胞質テールを含むカルボキシル末端ドメインを含む。タンパク質分解的切断により、MUC16の細胞外部分が血流に流出するようになる。MUC16は、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、肝内胆管癌-腫瘍形成型、子宮頸部腺癌、および胃腸腺癌を含む癌、ならびに炎症性腸疾患、肝硬変、心不全、腹膜感染症および腹部手術を含む疾患および病態において過剰発現する。(非特許文献2) 。MUC16の癌細胞上での発現は腫瘍細胞を免疫系から保護することが示されている。(非特許文献3) 。

10

【0007】

MUC16に対する抗体を使用して卵巣癌を治療するための方法が研究されている。しかしながら、モノクローナル抗体であるオレゴボマブおよびアブゴボマブの成功は限定的であった。(前出の非特許文献4) 。したがって、癌を治療するための改良されたMUC16抗体が当該技術分野で必要とされている。

【0008】

さらに、CD28とMUC16などの標的抗原との両方に結合する二重特異性抗原結合分子は、標的抗原を発現する腫瘍細胞の特異的標的化およびT細胞媒介性殺滅が望まれる治療環境において有用である。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【文献】Suntharalingam, et al., Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412, NEJM 355:1018-1028 (2006)

30

【文献】Haridas, D. et al., 2014, FASEB J., 28:4183-4199

【文献】Felder, M. et al., 2014, Molecular Cancer, 13:129

【文献】Felder, Das, S. and Batra, S. K. 2015, Cancer Res. 75:4660-4674

【発明の概要】

【0010】

第1の態様では、本発明は、CD28およびMUC16に結合する二重特異性抗原結合分子を提供し、これは、本明細書において「抗CD28/抗MUC16二重特異性分子」とも呼ばれる。抗CD28/抗MUC16二重特異性分子の抗MUC16部分は、MUC16を発現する腫瘍細胞(例えば、卵巣腫瘍細胞)を標的化するのに有用であり、二重特異性分子の抗CD28部分は、T細胞を活性化するのに有用である。腫瘍細胞上のMUC16およびT細胞上のCD28の同時結合は、活性化T細胞によって標的腫瘍細胞の直接死滅(細胞溶解)を促進する。したがって、本発明の抗CD28/抗MUC16二重特異性分子は、とりわけ、MUC16発現腫瘍(例えば、卵巣癌)に関連するかまたはそれによって引き起こされる疾患および障害を治療するために有用である。

40

【0011】

本発明のこの態様による二重特異性抗原結合分子は、ヒトCD28に特異的に結合する第1の抗原結合ドメイン、およびMUC16に特異的に結合する第2の抗原結合ドメイン

50

を含む。本発明は、各抗原結合ドメインが、軽鎖可変領域（LCVR）と対をなす重鎖可変領域（HCVR）を含む、抗CD28／抗MUC16二重特異性分子（例えば、二重特異性抗体）を含む。本発明のある特定の例示的实施形態において、抗CD28抗原結合ドメインおよび抗MUC16抗原結合ドメインはそれぞれ、共通のLCVRと対をなす異なる別個のHCVRを含む。

【0012】

本発明は、抗CD28／抗MUC16二重特異性分子を提供し、CD28に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、表3に記載されるHCVRアミノ酸配列のうちのいずれかを含む。CD28に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインはまた、表3に記載されるLCVRアミノ酸配列のうちのいずれかを含んでもよい。ある特定の实施形態によると、CD28に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、表3に記載されるHCVR／LCVRアミノ酸配列対のうちのいずれかを含む。本発明はまた、抗CD28／抗MUC16二重特異性分子を提供し、CD28に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、表3に記載される重鎖CDR1－CDR2－CDR3アミノ酸配列のうちのいずれか、および／または表3に記載される軽鎖CDR1－CDR2－CDR3アミノ酸配列のうちのいずれかを含む。

10

【0013】

ある特定の实施形態によると、本発明は、抗CD28／抗MUC16二重特異性分子を提供し、CD28に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、配列番号18および42からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（HCVR）、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

20

【0014】

本発明はまた、抗CD28／抗MUC16二重特異性分子を提供し、CD28に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、配列番号10および34からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（LCVR）、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

【0015】

本発明はまた、抗CD28／抗MUC16二重特異性分子を提供し、CD28に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、配列番号18／10および42／34からなる群から選択されるHCVRおよびLCVR（HCVR／LCVR）アミノ酸配列対を含む。

30

【0016】

本発明はまた、抗CD28／抗MUC16二重特異性分子を提供し、CD28に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、配列番号24および48からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR3（HCDR3）ドメイン、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、配列番号16および40からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3（LCDR3）ドメイン、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列とを含む。

40

【0017】

ある特定の实施形態では、CD28に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、配列番号24／16および48／40からなる群から選択されるHCDR3／LCDR3アミノ酸配列対を含む。

【0018】

本発明はまた、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を提供し、CD28に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、配列番号20および44からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR1（HCDR1）、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有す

50

るその実質的に類似の配列、配列番号 22 および 46 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖 CDR2 (HCDR2) ドメイン、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、配列番号 12 および 36 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR1 (LCDR1) ドメイン、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、ならびに配列番号 14 および 38 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR2 (LCDR2) ドメイン、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

10

【0019】

本発明のある特定の非限定的で例示的な抗 CD28 / 抗 MUC16 二重特異性抗原結合分子は、それぞれ配列番号 20-22-24-12-14-16 および 44-46-48-36-38-40 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 ドメインを含む、CD28 に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインを含む。

【0020】

本発明はまた、抗 CD28 / 抗 MUC16 二重特異性分子を提供し、MUC16 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインは、配列番号 2 および 26 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 (HCVR)、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

20

【0021】

本発明はまた、抗 CD28 / 抗 MUC16 二重特異性分子を提供し、MUC16 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインは、配列番号 10 および 34 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (LCVR)、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

【0022】

本発明はまた、抗 CD28 / 抗 MUC16 二重特異性分子を提供し、MUC16 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインは、配列番号 2 / 10 および 26 / 34 からなる群から選択される HCVR および LCVR (HCVR / LCVR) のアミノ酸配列対を含む。

30

【0023】

本発明はまた、抗 CD28 / 抗 MUC16 二重特異性分子を提供し、MUC16 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインは、配列番号 8 および 32 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖 CDR3 (HCDR3) ドメイン、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、配列番号 16 および 40 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR3 (LCDR3) ドメイン、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列とを含む。

40

【0024】

特定の実施形態において、MUC16 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインは、配列番号 8 / 16 および 32 / 40 からなる群から選択される HCDR3 / LCDR3 アミノ酸配列対を含む。

【0025】

本発明はまた、抗 CD28 / 抗 MUC16 二重特異性抗原結合分子を提供し、MUC16 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインは、配列番号 4 および 28 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖 CDR1 (HCDR1)、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有す

50

るその実質的に類似の配列、配列番号6および30からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR2（HCDR2）ドメイン、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、配列番号12および36からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1（LCDR1）ドメイン、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、ならびに配列番号14および38からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2（LCDR2）ドメイン、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

10

【0026】

本発明のある特定の非限定的で例示的な抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子は、配列番号4-6-8-12-14-16および28-30-32-36-38-40からなる群から選択されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3を含む、MUC16に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインを含む。

【0027】

関連する実施形態では、本発明は、MUC16に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインが、配列番号2／10および26／34からなる群から選択される重鎖および軽鎖可変領域（HCVR／LCVR）配列内に含有される重鎖および軽鎖CDRドメインを含む、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を含む。

20

【0028】

別の態様では、本発明は、本明細書に開示される抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子のHCVR、LCVR、またはCDR配列のうちのいずれかをコードする核酸分子を提供し、本明細書の表2および／または表4に記載されるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子、ならびに表2および／または表4に記載されるポリヌクレオチド配列のうちの2つ以上をその任意の機能的組み合わせまたは配置で含む核酸分子を含む。本発明の核酸を保有する組換え発現ベクター、およびそのようなベクターが導入された宿主細胞もまた、抗体の産生を可能にする条件下で宿主細胞を培養することによって、および産生された抗体を回収することによって、抗体を産生する方法と同様に本発明に含まれる。

30

【0029】

本発明は、CD28に特異的に結合する前述の抗原結合ドメインのうちのいずれかが、MUC16に特異的に結合する前述の抗原結合ドメインのいずれかと組み合わせられ、連結され、または他の方法で関連付けられて、CD28およびMUC16に結合する二重特異性抗原結合分子を形成する、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を含む。

【0030】

本発明は、修飾グリコシル化パターンを有する抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を含む。いくつかの用途において、望ましくないグリコシル化部位を除去するための修飾、または例えば抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）機能を増大させるためのオリゴ糖鎖上に存在するフコース部分を欠失している抗体が有用であり得る（Shield et al. (2002) JBC 277:26733を参照）。他の用途では、補体依存性細胞傷害作用（CDC）を修飾するために、ガラクトシル化の修飾を行うことができる。

40

【0031】

別の態様では、本発明は、本明細書に開示される抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子と、薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。関連する態様では、本発明は、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子と、第2の治療薬との組み合わせである組成物を特徴とする。一実施形態では、第2の治療薬は、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子と有利に組み合わせられる任意の薬剤である。抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子と有利に組み合わせることができる例示

50

的な薬剤は、本明細書の他所に詳細に論じられている。

【0032】

さらに別の態様では、本発明は、本発明の抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を使用してMUC16を発現する腫瘍細胞を標的化し／死滅させるための治療方法を提供し、本治療方法は、本発明の抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を含む治療有効量の薬学的組成物をそれを必要とする対象に投与することを含む。

【0033】

本発明はまた、MUC16発現に関連するかまたはそれによって引き起こされる疾患または障害の治療のための薬剤の製造における本発明の抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子の使用を含む。

【0034】

さらに別の態様では、本発明は、本発明の抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を使用してMUC16を発現する腫瘍細胞を標的化／殺滅するための治療方法を提供し、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子は、CD3に結合する他の抗腫瘍二重特異性抗原結合分子と組み合わせられる（例えば、抗CD28／抗MUC16は抗CD3／抗MUC16抗体と組み合わせられる）。

【0035】

さらに別の態様では、本発明は、本発明の抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を使用してMUC16を発現する腫瘍細胞を標的化／殺滅するための治療方法を提供し、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子は、例えば、PD-1、PDL-1、またはCTLA-4を標的とするチェックポイント阻害剤と組み合わせられる（例えば、抗CD28／抗MUC16は抗PD-1抗体と組み合わせられる）。ある特定の実施形態では、本発明の抗CD28／抗MUC16抗体は、ペンブロリズマブ（Keytruda（登録商標））、ニボルマブ（Opdivo（登録商標））、またはセンプリマブ（Libtayo（登録商標））などのPD-1を標的とする薬剤と組み合わせてもよいことが想定される。ある特定の実施形態では、本発明の抗CD28／抗MUC16抗体は、アテゾリズマブ（Tecentriq（登録商標））、アベルマブ（Bavencio（登録商標））、またはデュルバルマブ（Imfinzi（登録商標））などのPDL-1を標的とする薬剤と組み合わせてもよいことが想定される。ある特定の実施形態では、本発明の抗CD28／抗MUC16抗体は、イピリムマブ（Yervoy（登録商標））などのCTLA-4を標的とする薬剤と組み合わせてもよいことが想定される。

【0036】

さらに別の態様では、本発明は、本発明の抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を使用してMUC16を発現する腫瘍細胞を標的化／殺滅するための治療方法を提供し、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子は、CD3に結合する他の抗腫瘍二重特異性抗原結合分子（例えば、抗CD28／抗MUC16は抗CD3／抗MUC16二重特異性抗体と組み合わせられる）およびPD-1、PDL-1、またはCTLA-4を標的とするチェックポイント阻害剤と組み合わせられる（例えば、抗CD28／抗MUC16は抗PD-1抗体と組み合わせられる）。

【0037】

他の実施形態は、後述の詳細な説明の精査から明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】共刺激リガンド発現を導入した操作細胞株における腫瘍成長阻害を示すグラフである。3つの腫瘍細胞株、B16F10.9、EL4、およびMC38を、共刺激リガンド、またはGFP、または空ベクターを対照として発現するように操作した。操作された腫瘍細胞をC57BL/6マウスに注射した。データは平均±SEMを表す。データは、群あたり5匹のマウスを用いた少なくとも1つの実験を表す。グラフは、次のように計算した対照のパーセンテージとして腫瘍成長を示す。

10

20

30

40

50

【表 1】

腫瘍体積
対照の腫瘍体積 $\times 100$

【図 2 A】図 2 A～2 I は、本発明の例示的な抗 MUC 16 x CD 28 が、抗 MUC 16 x CD 3 および内在性 MUC 16 を有する癌細胞株（PEO 1）による TCR 刺激の存在下で T 細胞作用を増強することを示す、概略図およびグラフである。図 2 B～2 E は、ヒト PBMC のデータを示すグラフである。図 2 F～2 H は、カニクイザル PBMC のデータを示すグラフである。ヒト T 細胞（図 2 B～2 E の場合）を、内在性 MUC 16 発現を伴う癌標的細胞（卵巣癌株 PEO-1）および示された二重特異性抗体とともに 96 時間培養した。図 2 A は、アッセイ設定の概略図である。

10

【図 2 B】図 2 A～2 I は、本発明の例示的な抗 MUC 16 x CD 28 が、抗 MUC 16 x CD 3 および内在性 MUC 16 を有する癌細胞株（PEO 1）による TCR 刺激の存在下で T 細胞作用を増強することを示す、概略図およびグラフである。図 2 B～2 E は、ヒト PBMC のデータを示すグラフである。図 2 F～2 H は、カニクイザル PBMC のデータを示すグラフである。ヒト T 細胞（図 2 B～2 E の場合）を、内在性 MUC 16 発現を伴う癌標的細胞（卵巣癌株 PEO-1）および示された二重特異性抗体とともに 96 時間培養した。図 2 B は、腫瘍細胞の殺滅を示すグラフである。Y 軸の値は、生存 PEO 1 細胞のパーセンテージを指す。

20

【図 2 C】図 2 A～2 I は、本発明の例示的な抗 MUC 16 x CD 28 が、抗 MUC 16 x CD 3 および内在性 MUC 16 を有する癌細胞株（PEO 1）による TCR 刺激の存在下で T 細胞作用を増強することを示す、概略図およびグラフである。図 2 B～2 E は、ヒト PBMC のデータを示すグラフである。図 2 F～2 H は、カニクイザル PBMC のデータを示すグラフである。ヒト T 細胞（図 2 B～2 E の場合）を、内在性 MUC 16 発現を伴う癌標的細胞（卵巣癌株 PEO-1）および示された二重特異性抗体とともに 96 時間培養した。図 2 C は、IFN γ 放出を示すグラフである。

【図 2 D】図 2 A～2 I は、本発明の例示的な抗 MUC 16 x CD 28 が、抗 MUC 16 x CD 3 および内在性 MUC 16 を有する癌細胞株（PEO 1）による TCR 刺激の存在下で T 細胞作用を増強することを示す、概略図およびグラフである。図 2 B～2 E は、ヒト PBMC のデータを示すグラフである。図 2 F～2 H は、カニクイザル PBMC のデータを示すグラフである。ヒト T 細胞（図 2 B～2 E の場合）を、内在性 MUC 16 発現を伴う癌標的細胞（卵巣癌株 PEO-1）および示された二重特異性抗体とともに 96 時間培養した。図 2 D は、CD 4⁺ T 細胞中の CD 25⁺ のパーセンテージとして表した、CD 4⁺ T 細胞の数および CD 25⁺ 細胞の頻度を示すグラフである。

30

【図 2 E】図 2 A～2 I は、本発明の例示的な抗 MUC 16 x CD 28 が、抗 MUC 16 x CD 3 および内在性 MUC 16 を有する癌細胞株（PEO 1）による TCR 刺激の存在下で T 細胞作用を増強することを示す、概略図およびグラフである。図 2 B～2 E は、ヒト PBMC のデータを示すグラフである。図 2 F～2 H は、カニクイザル PBMC のデータを示すグラフである。ヒト T 細胞（図 2 B～2 E の場合）を、内在性 MUC 16 発現を伴う癌標的細胞（卵巣癌株 PEO-1）および示された二重特異性抗体とともに 96 時間培養した。図 2 E は、CD 8⁺ T 細胞中の CD 25⁺ のパーセンテージとして表した、CD 8⁺ T 細胞の数および CD 25⁺ 細胞の頻度を示すグラフである。

40

【図 2 F】図 2 A～2 I は、本発明の例示的な抗 MUC 16 x CD 28 が、抗 MUC 16 x CD 3 および内在性 MUC 16 を有する癌細胞株（PEO 1）による TCR 刺激の存在下で T 細胞作用を増強することを示す、概略図およびグラフである。図 2 B～2 E は、ヒト PBMC のデータを示すグラフである。図 2 F～2 H は、カニクイザル PBMC のデータを示すグラフである。ヒト T 細胞（図 2 B～2 E の場合）を、内在性 MUC 16 発現を伴う癌標的細胞（卵巣癌株 PEO-1）および示された二重特異性抗体とともに 96 時間培養した。図 2 F は、腫瘍細胞の殺滅を示すグラフである。Y 軸の値は、生存 PEO 1 細胞のパーセンテージを指す。

50

胞のパーセンテージを指す。

【図 2 G】図 2 A～2 I は、本発明の例示的な抗 MUC 16 x CD 28 が、抗 MUC 16 x CD 3 および内在性 MUC 16 を有する癌細胞株（PEO 1）による TCR 刺激の存在下で T 細胞作用を増強することを示す、概略図およびグラフである。図 2 B～2 E は、ヒト PBMC のデータを示すグラフである。図 2 F～2 H は、カニクイザル PBMC のデータを示すグラフである。ヒト T 細胞（図 2 B～2 E の場合）を、内在性 MUC 16 発現を伴う癌標的細胞（卵巢癌株 PEO-1）および示された二重特異性抗体とともに 96 時間培養した。図 2 G は、CD 4⁺ T 細胞中の CD 25⁺ のパーセンテージとして表した、CD 4⁺ T 細胞の数および CD 25⁺ 細胞の頻度を示すグラフである。

【図 2 H】図 2 A～2 I は、本発明の例示的な抗 MUC 16 x CD 28 が、抗 MUC 16 x CD 3 および内在性 MUC 16 を有する癌細胞株（PEO 1）による TCR 刺激の存在下で T 細胞作用を増強することを示す、概略図およびグラフである。図 2 B～2 E は、ヒト PBMC のデータを示すグラフである。図 2 F～2 H は、カニクイザル PBMC のデータを示すグラフである。ヒト T 細胞（図 2 B～2 E の場合）を、内在性 MUC 16 発現を伴う癌標的細胞（卵巢癌株 PEO-1）および示された二重特異性抗体とともに 96 時間培養した。図 2 H は、CD 4⁺ T 細胞および CD 8⁺ T 細胞中の CD 25⁺ のパーセンテージとして表した、CD 4⁺ T 細胞の数および CD 8⁺ T 細胞の数、ならびに CD 25⁺ 細胞の頻度を示すグラフである。

【図 2 I】図 2 A～2 I は、本発明の例示的な抗 MUC 16 x CD 28 が、抗 MUC 16 x CD 3 および内在性 MUC 16 を有する癌細胞株（PEO 1）による TCR 刺激の存在下で T 細胞作用を増強することを示す、概略図およびグラフである。図 2 B～2 E は、ヒト PBMC のデータを示すグラフである。図 2 F～2 H は、カニクイザル PBMC のデータを示すグラフである。ヒト T 細胞（図 2 B～2 E の場合）を、内在性 MUC 16 発現を伴う癌標的細胞（卵巢癌株 PEO-1）および示された二重特異性抗体とともに 96 時間培養した。図 2 I は、フローサイトメトリーによって測定した細胞標的への抗体結合を示すグラフを提供する。

【図 3 A】図 3 A～3 C は、本発明の例示的な抗 MUC 16 x CD 28 二重特異性抗体が、抗 MUC 16 x CD 3 誘発性 T 細胞活性化によって抗腫瘍免疫を強化することを示すグラフである。図 3 A は、平均放射輝度（平均放射輝度 [$p/s/cm^2/sr$]) により測定した腫瘍組織量を経時的に示すグラフである。値は、群の中央値および範囲を表す。p 値は、各時点についてマンホイットニー検定を用いて計算した。MUC 16 x CD 3 と EGFRvIII x CD 3 との比較について、* は $p < 0.05$ 、または ** は $p < 0.01$ である。MUC 16 x CD 3 + MUC 16 x CD 28 と EGFRvIII x CD 3 との比較について、## は $p < 0.01$ である。ヒト PBMC を生着させた NSG マウスに、OVCA R3-Luc を腹腔内注射により移植した。5 日目および 8 日目に、マウスに IV を投薬した（矢印）。マウスは、2.5 μg の MUC 16 x CD 3 または 2.5 μg の EGFRvIII x CD 3 のいずれかを受けた。一部のマウスには、100 μg の MUC 16 x CD 28 も投与した。腫瘍組織量を、経時的に生物発光を監視することによって、腫瘍移植後 4、8、12、15、20、および 25 日目に評価した。N = 5 匹のマウス／群。

【図 3 B】図 3 A～3 C は、本発明の例示的な抗 MUC 16 x CD 28 二重特異性抗体が、抗 MUC 16 x CD 3 誘発性 T 細胞活性化によって抗腫瘍免疫を強化することを示すグラフである。図 3 B は、図 3 A に示したものと同一実験からの初回投薬の 4 時間後に取得した血液からの血清サイトカインレベルを示すグラフを提供する。p 値は一元配置分散分析で計算した。MUC 16 x CD 3 + MUC 16 x CD 28 と EGFRvIII x CD 3 との比較について、## は $p < 0.01$ 、または ### は $p < 0.0001$ である。MUC 16 x CD 3 + MUC 16 x CD 28 と MUC 16 x CD 3 との比較について、@@@ は $p < 0.005$ である。MUC 16 x CD 3 + MUC 16 x CD 28 と EGFRvIII x CD 3 + MUC 16 x CD 28 との比較について、^ は $p < 0.01$ 、^^ は $p < 0.005$ 、^^^ は $p < 0.0001$ である。

【図 3 C】図 3 A～3 C は、本発明の例示的な抗 MUC 16 x CD 28 二重特異性抗体が、抗 MUC 16 x CD 3 誘発性 T 細胞活性化によって抗腫瘍免疫を強化することを示すグラフである。図 3 C は、26 日目の腫瘍組織量および血清中の CA-125 レベルとの相関関係を示すグラフを提供する。図 3 A に示されているものと同じ実験からの群あたり N = 5 匹のマウス。

【図 4 A】平均放射輝度（平均放射輝度 [$p/s/cm^2/sr$]）により測定した腫瘍組織量を経時的に示すグラフである。値は、群の中央値および範囲を表す。p 値は、各時点についてマンホイットニー検定を用いて計算した。MUC 16 x CD 3 と EGFRvIII x CD 3 との比較について、**は $p < 0.01$ である。MUC 16 x CD 3 + MUC 16 x CD 28 と EGFRvIII x CD 3 との比較について、##は $p < 0.01$ である。MUC 16 x CD 3 + MUC 16 x CD 28 と MUC 16 x CD 3 との比較について、@は $p < 0.05$ である。ヒト PBMC を生着させた NSG マウスに、OVCAR3-Luc を腹腔内注射により移植した。マウスを、 $0.5mg/kg$ の MUC 16 x CD 3 または $0.5mg/kg$ の EGFRvIII x CD 3 で IV 処理した。一部のマウスには、5 日目および 8 日目（矢印）に $0.2mg/kg$ の MUC 16 x CD 28 も投与した。腫瘍組織量を、経時的に生物発光を監視することによって、4、8、11、14、21、28、および 34 日目に BL によって評価した。N = 5 または 6 匹のマウス/群。

【図 4 B】図 4 A に示したものと同一実験からの初回投薬の 4 時間後に取得した血液からの血清サイトカインレベルを示すグラフを提供する。p 値は一元配置分散分析で計算した。MUC 16 x CD 3 および EGFRvIII x CD 3 との比較について、*は $p < 0.05$ 、MUC 16 x CD 3 + MUC 16 x CD 28 と EGFRvIII x CD 3 との比較について、##は $p < 0.01$ 、または###は $p < 0.001$ 、または####は $p < 0.0001$ である。MUC 16 x CD 3 + MUC 16 x CD 28 と MUC 16 x CD 3 との比較について、@は $p < 0.05$ 、または@@@は $p < 0.0001$ である。MUC 16 x CD 3 + MUC 16 x CD 28 と EGFRvIII x CD 3 + MUC 16 x CD 28 との比較について、^^は $p < 0.001$ 、または^^^P < 0.001、または^^^は $P < 0.0001$ である。

【図 5】経時的な生存率を示すグラフである。ID8-VEGF/hMUC 16 細胞を、hCD3/hCD28/hMUC 16 についてヒト化したマウスの腹腔に移植した。矢印で示すように、EGFRvIII x CD 3 または MUC 16 x CD 3 を、 $1mg/kg$ で、または腫瘍移植後 3、6、および 10 日目に用いて、マウスを静脈内処理した。一部のマウスには、 $1mg/kg$ の MUC 16 x CD 28 も投与した。p 値は、各時点についてマンテルコックス検定を用いて計算した。MUC 16 x CD 3 と EGFRvIII x CD 3 との比較について、**は $p < 0.01$ である。MUC 16 x CD 3 + MUC 16 x CD 28 と EGFRvIII x CD 3 との比較について、##は $p < 0.01$ である。MUC 16 x CD 3 + MUC 16 x CD 28 と MUC 16 x CD 3 との比較について、@は $p < 0.05$ である。

【図 6 A】経時的な腫瘍体積を示すグラフである。MC38/hMUC 16 腫瘍細胞を、hCD3/hMUC 16 ヒト化マウスの皮下に移植した。マウスを、 $0.01mg/kg$ の抗 MUC 16 x CD 3、 $0.5mg/kg$ の本発明の例示的な抗 MUC 16 x mCD 28 二重特異性抗体で、0 日目に開始して週に 2 回（矢印）示されるように処理した。腫瘍体積を、経時的にキャリパー測定によって監視した。示す値は平均 $\pm$ SEM である。データは 3 回の実験を表す。N = 7 匹/群。p 値を、アイソタイプ対照と比較して二元配置分散分析を用いて計算した（MUC 16 x CD 3 + MUC 16 x mCD 28 とアイソタイプ対照との比較について、**は $p < 0.01$ 、および****は $P < 0.0001$ であり、MUC 16 x CD 3 とアイソタイプ対照との比較について、#は $p < 0.05$ であり、MUC 16 x mCD 28 とアイソタイプ対照との比較について、\$は $p < 0.05$ である）。

【図 6 B】図 6 A に示したものと同一実験からの示す時点で取得した血液からの血清サイトカインレベルを示すグラフを提供する。

【図6C】サイトカインレベルを示すグラフである。7日目の投与後4時間で、血清サイトカインのためにマウスから採血した。統計的有意性を、アイソタイプ** $p < 0.01$ および**** $p < 0.0001$ と比較して一元配置分散分析を用いて計算した。 $n = 7$ 匹のマウス/群。データは、代表的な3回の実験である。

【図6D】サイトカインレベルを示すグラフである。7日目の投与後4時間で、血清サイトカインのためにマウスから採血した。統計的有意性を、アイソタイプ** $p < 0.01$ および**** $p < 0.0001$ と比較して一元配置分散分析を用いて計算した。 $n = 7$ 匹のマウス/群。データは、代表的な3回の実験である。

【図7】ドライコーティングまたはウェットコーティング法を使用してアッセイプレートにMUC16×CD28を固定しても、CD28スーパーアゴニストとは対照的に、CD3刺激の非存在下ではT細胞の活性化が誘発されないことを示すグラフである。

【図8A】単独または併用療法でのMUC16×CD28が全身性T細胞活性化を誘発しないことを示すグラフである。カニクイザルに、1または10mg/kgのいずれか（括弧内に示す）で二重特異性抗体の単回用量を与えた。追加の群には、反復投与として示す合計4用量を与えた。示される投与後の時間（時間）に採血した。図8Aが血清サイトカイン、図8Bが相対T細胞数、図8CがKi67+およびICOS+T細胞の頻度（CD3の%）を示す。データは、平均±SEMを表す。 $N = 3$ 匹の動物/群。 p 値は、アイソタイプ対照と比較して二元配置分散分析で計算された。（**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ 、および****は $p < 0.0001$ である）。

【図8B】単独または併用療法でのMUC16×CD28が全身性T細胞活性化を誘発しないことを示すグラフである。カニクイザルに、1または10mg/kgのいずれか（括弧内に示す）で二重特異性抗体の単回用量を与えた。追加の群には、反復投与として示す合計4用量を与えた。示される投与後の時間（時間）に採血した。図8Aが血清サイトカイン、図8Bが相対T細胞数、図8CがKi67+およびICOS+T細胞の頻度（CD3の%）を示す。データは、平均±SEMを表す。 $N = 3$ 匹の動物/群。 p 値は、アイソタイプ対照と比較して二元配置分散分析で計算された。（**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ 、および****は $p < 0.0001$ である）。

【図8C】単独または併用療法でのMUC16×CD28が全身性T細胞活性化を誘発しないことを示すグラフである。カニクイザルに、1または10mg/kgのいずれか（括弧内に示す）で二重特異性抗体の単回用量を与えた。追加の群には、反復投与として示す合計4用量を与えた。示される投与後の時間（時間）に採血した。図8Aが血清サイトカイン、図8Bが相対T細胞数、図8CがKi67+およびICOS+T細胞の頻度（CD3の%）を示す。データは、平均±SEMを表す。 $N = 3$ 匹の動物/群。 p 値は、アイソタイプ対照と比較して二元配置分散分析で計算された。（**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ 、および****は $p < 0.0001$ である）。

【図9A】MUC×CD28およびMUC16×CD3の二重特異性抗体が可溶性CA-125の存在下でMUC発現細胞に結合できることを示す。OVCA-3細胞を、フローサイトメトリー緩衝液（PBS+1%FBS）中4℃で30分間、漸増濃度の可溶性CA-125（図9A）またはMUC16小塊（図9B）の存在下で、Alexa647で標識した8nMの示す抗体中でインキュベートした。インキュベーション後、細胞をフローサイトメトリー緩衝液で洗浄し、フローサイトメトリーによって分析した。

【図9B】MUC×CD28およびMUC16×CD3の二重特異性抗体が可溶性CA-125の存在下でMUC発現細胞に結合できることを示す。OVCA-3細胞を、フローサイトメトリー緩衝液（PBS+1%FBS）中4℃で30分間、漸増濃度の可溶性CA-125（図9A）またはMUC16小塊（図9B）の存在下で、Alexa647で標識した8nMの示す抗体中でインキュベートした。インキュベーション後、細胞をフローサイトメトリー緩衝液で洗浄し、フローサイトメトリーによって分析した。

【図10】T細胞/抗原提示細胞ベースのレポーターバイオアッセイの概略図である。

【図11A】bs24963D（REGN5668とも言及される）が、MUC16を発現する刺激性抗原提示細胞の存在下で、操作されたT細胞におけるNF-κBシグナル伝

10

20

30

40

50

達を強化することを示す。端的に言えば、J. RT3. T3. 5 / NF- κ B-Luc / 1G4AB / hCD8 $\alpha\beta$ / hCD28レポーター細胞を、3.33 : 1のレポーター細胞と刺激性3T3細胞との比での、3T3 / h β 2M / HLA-A2 / NYESO1p / hMUC16 (図11A) および3T3 / h β 2M / HLA-A2 / NYESO1p細胞 (図11B) の存在下で、抗体なしの対照を含むある範囲の濃度 (39 pM ~ 10 nM) のbs24963DまたはCD28非架橋対照二重特異性抗体 (非TAA $\times$ CD28) とともにインキュベートした。NF- κ Bシグナル伝達を、ルシフェラーゼ活性として検出し、発光シグナルの定量化によって測定し、これを相対光単位 (RLU) として報告する。重複ウェルで行ったアッセイからのデータを、平均 $\pm$ SDとしてプロットする。

【図11B】bs24963D (REGN5668とも言及される) が、MUC16を発現する刺激性抗原提示細胞の存在下で、操作されたT細胞におけるNF- κ Bシグナル伝達を強化することを示す。端的に言えば、J. RT3. T3. 5 / NF- κ B-Luc / 1G4AB / hCD8 $\alpha\beta$ / hCD28レポーター細胞を、3.33 : 1のレポーター細胞と刺激性3T3細胞との比での、3T3 / h β 2M / HLA-A2 / NYESO1p / hMUC16 (図11A) および3T3 / h β 2M / HLA-A2 / NYESO1p細胞 (図11B) の存在下で、抗体なしの対照を含むある範囲の濃度 (39 pM ~ 10 nM) のbs24963DまたはCD28非架橋対照二重特異性抗体 (非TAA $\times$ CD28) とともにインキュベートした。NF- κ Bシグナル伝達を、ルシフェラーゼ活性として検出し、発光シグナルの定量化によって測定し、これを相対光単位 (RLU) として報告する。重複ウェルで行ったアッセイからのデータを、平均 $\pm$ SDとしてプロットする。

【図12】bs24963D (REGN5668としても参照される) が、OVCA R-3およびPEO1標的細胞を用いたREGN4018 (WO2017 / 053856A1、REGN4018であるBSMUC16 / CD3-001を参照) の存在下で、ヒト初代T細胞からの濃度依存的なIL-2放出を媒介することを示す。端的に言えば、富化したヒト初代T細胞を、エフェクター対標的細胞比それぞれ10 : 1または4 : 1での固定濃度 (5 nM) のREGN4018またはCD3非架橋対照二重特異性抗体 (非TAA $\times$ CD3) のいずれかとヒト卵巣癌細胞株OVCA R-3またはPEO1との存在下で、抗体なしの対照を含むある範囲 (7.6 pM ~ 500 nM) のbs24963DまたはCD28非架橋対照二重特異性抗体 (非TAA $\times$ CD28) とともにインキュベートした。データは、三重ウェルで行ったアッセイからのものであり、平均 $\pm$ SDとしてプロットする。IL-2放出を、製造業者のプロトコルに従ってヒトIL-2イムノアッセイを使用して測定した。

【図13】bs24963D (REGN5668としても参照される) が、OVCA R-3およびPEO1標的細胞を用いたREGN4018の存在下で、ヒト初代T細胞の増殖の濃度依存的な強化を媒介することを示す。端的に言えば、富化したヒト初代T細胞を、エフェクター対標的細胞比それぞれ10 : 1または4 : 1での固定濃度 (5 nM) のREGN4018またはCD3非架橋対照二重特異性抗体 (非TAA $\times$ CD3) のいずれかとヒト卵巣癌細胞株OVCA R-3およびPEO1との存在下で、抗体なしの対照を含むある範囲 (7.6 pM ~ 500 nM) のbs24963DまたはCD28非架橋対照二重特異性抗体 (非TAA $\times$ CD28) とともにインキュベートした。データは、三重ウェルで行ったアッセイからのものであり、平均 $\pm$ SDとしてプロットする。T細胞の増殖を、トリチウム崩壊 (分裂細胞に組み込まれたトリチウム化チミジンから) の検出を介して測定し、CPMとして報告した。

【図14】bs24963D (REGN5668とも言及される) が濃度依存的IL-2放出を媒介し、セミプリマブの添加がSW1990およびSW1990 / hPD-L1標的細胞を伴うヒト初代T細胞からのIL-2放出を多少増加させることを示す。端的に言えば、富化したヒト初代T細胞を、エフェクター対標的細胞比2 : 1での固定濃度 (20 nM) のセミプリマブまたはIgG4^P対照とSW1990およびSW1990 / hPD-L1ヒト膵臓癌細胞株との存在下で、抗体なしの対照を含むある範囲 (7.6 pM ~ 500 nM) のbs24963DまたはCD28非架橋対照二重特異性抗体 (非TAA

10

20

30

40

50

× C D 2 8) とともにインキュベートした。データは、三重ウェルで行ったアッセイからのものであり、平均± S Dとしてプロットする。I L - 2 放出を、製造業者のプロトコルに従ってヒト I L - 2 イムノアッセイを使用して測定した。統計的分析を、2 元配置分散分析を使用して行った。p < 0 . 0 5 の場合、差異を統計的に有意であると見なした。b s 2 4 9 6 3 D + セミプリマブは、S W 1 9 9 0 / h P D - L 1 細胞における R E G N 5 6 6 8 + I g G 4 ^P 対照と比較して、I L - 2 放出の統計的に有意な増加 (p < 0 . 0 0 0 1) を示した。

【図 1 5】 b s 2 4 9 6 3 D (R E G N 5 6 6 8 としても言及される) が増殖の濃度依存的強化を媒介し、セミプリマブの添加が S W 1 9 9 0 および S W 1 9 9 0 / h P D - L 1 を伴うヒト初代 T 細胞の増殖を多少増加させることを示す。端的に言えば、富化したヒト初代 T 細胞を、エフェクター対標的細胞比 2 : 1 での固定濃度 (2 0 n M) のセミプリマブまたは I g G 4 ^P 対照と S W 1 9 9 0 および S W 1 9 9 0 / h P D - L 1 ヒト脾臓癌細胞株との存在下で、抗体なしの対照を含むある範囲 (7 . 6 p M ~ 5 0 0 n M) の b s 2 4 9 6 3 D または C D 2 8 非架橋対照二重特異性抗体 (非 T A A × C D 2 8) とともにインキュベートした。データは、三重ウェルで行ったアッセイからのものであり、平均± S Dとしてプロットする。T 細胞の増殖を、トリチウム崩壊 (分裂細胞に組み込まれたトリチウム化チミジンから) の検出を介して測定し、C P M として報告した。統計的分析を、2 元配置分散分析を使用して行った。p < 0 . 0 5 の場合、差異を統計的に有意であると見なした。b s 2 4 9 6 3 D + セミプリマブは、S W 1 9 9 0 / h P D - L 1 細胞における b s 2 4 9 6 3 D + I g G 4 ^P 対照と比較して、増殖の統計的に有意な増加 (p < 0 . 0 0 0 1) を示した。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 9 】

本発明を説明する前に、説明される特定の方法および実験条件が異なり得るため、本発明がかかる方法および条件に限定されないことを理解されたい。本明細書で使用される用語が、特定の実施形態のみを説明するためのものであり、本発明の範囲が添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、限定するようには意図されていないことも理解されたい。

【 0 0 4 0 】

別段定義されない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語は全て、本発明が属する当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書で使用される場合、「約」という用語は、特定の列挙された数値に関して使用されるとき、その値が列挙された値から 1 % 以下だけ変動し得ることを意味する。例えば、本発明で使用する場合、「約 1 0 0」との表現は、9 9 および 1 0 1、ならびにその間の全値 (例えば、9 9 . 1、9 9 . 2、9 9 . 3、9 9 . 4 など) を含む。

【 0 0 4 1 】

本明細書に記載されるものと同様または同等のいずれの方法および材料も本発明の実施または試験に使用され得るが、好ましい方法および材料をこれから説明する。本明細書で言及される特許、出願、および非特許刊行物は全て、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 0 4 2 】

定義

本明細書で使用される「C D 2 8」という表現は、共刺激受容体として T 細胞上に発現される抗原を指す。ヒト C D 2 8 は、配列番号 5 0 に記載されているアミノ酸配列を含み、かつ／または N C B I 受託番号 N P _ 0 0 6 1 3 0 . 1 に記載されているアミノ酸配列を有する。マウス F c を有するヒト C D 2 8 外部ドメイン (N 1 9 - P 1 5 2) が配列番号 5 2 に示される。m y c - m y c - h i s タグを有するヒト C D 2 8 外部ドメイン (N 1 9 - P 1 5 2) が配列番号 5 3 に示される。本明細書におけるタンパク質、ポリペプチド、およびタンパク質フラグメントへの全ての言及は、非ヒト種由来であると明確に特定されない限り、それぞれのタンパク質、ポリペプチド、またはタンパク質フラグメントの

ヒトバージョンを指すよう意図されている。したがって、「CD28」という表現は、非ヒト種、例えば、「マウスCD28」、「サルCD28」などに由来すると特定されない限り、ヒトCD28を意味する。myc-myc-hisタグを有するマウスCD28（受託番号NP_031668.3）外部ドメインが配列番号54に示される。

【0043】

本明細書で使用される場合、「CD28に結合する抗体」または「抗CD28抗体」は、単量体CD28を特異的に認識する抗体およびその抗原結合フラグメント、ならびに二量体CD28を特異的に認識する抗体およびその抗原結合フラグメントを含む。本発明の抗体および抗原結合フラグメントは、可溶性CD28および／または細胞表面発現CD28に結合することができる。可溶性CD28には、天然CD28タンパク質、ならびに膜貫通ドメインを欠くかまたはそうでなければ細胞膜と会合していない、例えば単量体および二量体CD28構築物などの組換えCD28タンパク質変異体が含まれる。

【0044】

本明細書で使用される場合、「細胞表面発現CD28」という表現は、インビトロまたはインビボで細胞表面上に発現される1つ以上のCD28タンパク質（複数可）を意味し、CD28タンパク質の少なくとも一部分は、細胞膜の細胞外の側に曝され、抗体の抗原結合部分に接近可能である。「細胞表面発現CD28」としては、細胞膜内の機能的T細胞共刺激受容体の文脈に含まれるCD28タンパク質が挙げられる。「細胞表面発現CD28」という表現は、細胞の表面上のホモ二量体の一部として発現されるCD28タンパク質を含む。「細胞表面発現CD28」は、通常はCD28タンパク質を発現する細胞の表面上に発現されるCD28タンパク質を含み得るか、またはそれからなり得る。あるいは、「細胞表面発現CD28」は、通常はその表面上にヒトCD28を発現しないが、その表面上にCD28を発現するように人工的に操作されている細胞の表面上に発現されるCD28タンパク質を含み得るか、またはそれからなり得る。

【0045】

本明細書で使用される場合、「抗CD28抗体」という表現は、単一特異性を有する一価抗体、ならびにCD28に結合する第1のアームおよび第2の（標的）抗原に結合する第2のアームを含む二重特異性抗体の両方を含み、抗CD28アームは、本明細書の表3に記載されているHCVR/LCVRまたはCDR配列のうちのいずれかを含む。抗CD28二重特異性抗体の例は、本明細書の他の場所に記載されている。「抗原結合分子」という用語は、例えば、二重特異性抗体を含む、抗体および抗体の抗原結合フラグメントを含む。

【0046】

本発明で使用する場合、「MUC16」という用語は、非ヒト種由来であると特定されない限り、ヒトMUC16タンパク質を指す（例えば、「マウスMUC16」、「サルMUC16」など）。ヒトMUC16タンパク質は、配列番号49に示されるアミノ酸配列を有し、かつ／またはNCBI受託番号NP_078966に記載されるアミノ酸配列を有する。myc-myc-hisタグを有するヒトMUC16膜近位ドメイン（P13810-P14451）が配列番号51として示される。

【0047】

本明細書で使用される場合、「MUC16に結合する抗体」または「抗MUC16抗体」は、可溶性MUC16および／または細胞表面に発現されたMUC16に結合し得る抗体およびその抗原結合フラグメントを含む。可溶性MUC16には、天然MUC16タンパク質、ならびに膜貫通ドメインを欠くか、または細胞膜と会合していない組換えMUC16タンパク質変異体、例えば、MUC16構築物などが含まれる。

【0048】

本明細書で使用される場合、「抗MUC16抗体」という表現は、単一特異性を有する一価抗体、ならびにMUC16に結合する第1のアームおよび第2の（標的）抗原に結合する第2のアームを含む二重特異性抗体の両方を含み、抗MUC16アームは、本明細書の表1に記載されているHCVR/LCVRまたはCDR配列のうちのいずれかを含む。

抗MUC16二重特異性抗体の例は、本明細書の他の場所に記載されている。「抗原結合分子」という用語は、例えば、二重特異性抗体を含む、抗体および抗体の抗原結合フラグメントを含む。

【0049】

「抗原結合分子」という用語は、例えば、二重特異性抗体を含む、抗体および抗体の抗原結合フラグメントを含む。

【0050】

本発明で使用される場合、「抗体」という用語は、特定の抗原（例えば、CD28）に特異的に結合するかまたはそれと相互作用する少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）を含む、任意の抗原結合分子または分子複合体を意味する。「抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互連結された4本のポリペプチド鎖、2本の重（H）鎖および2本の軽（L）鎖を含む免疫グロブリン分子、ならびにそれらの多量体（例えば、IgM）を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではHCVRまたはVHと略される）および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2、およびCH3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではLCVRまたはVLと略される）および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1つのドメイン（CL1）を含む。VH領域およびVL領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれるより保存された領域が点在する相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域にさらに細分され得る。VHおよびVLは各々、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順にアミノ末端からカルボキシ末端に配置された3つのCDRおよび4つのFRからなる。本発明の異なる実施形態では、抗CD28および／または抗MUC16抗体（またはその抗原結合部分）のFRは、ヒト生殖系列配列と同一であってもよく、または天然に修飾されていても人工的に修飾されていてもよい。アミノ酸コンセンサス配列は、2つ以上のCDRの並列分析に基づいて定義され得る。

【0051】

本明細書で使用される「抗体」という用語はまた、完全抗体分子の抗原結合フラグメントを含む。抗体の「抗原結合部分」、抗体の「抗原結合フラグメント」および同様の用語は、本明細書で使用される場合、天然の、酵素処理で入手可能な、合成の、または遺伝子操作された、抗原を特異的に結合して複合体を形成するポリペプチドまたは糖タンパク質を含む。抗体の抗体結合フラグメントは、例えば、抗体可変ドメインおよび場合により定常ドメインをコードするDNAの操作および発現に関連するタンパク質消化技術または組換え遺伝子操作技術などの任意の適切な標準的技術を用いて、完全抗体分子から誘導され得る。かかるDNAは既知であり、かつ／または例えば、商業的供給源、DNAライブラリ（例えば、ファージ抗体ライブラリを含む）から容易に入手可能であるか、または合成され得る。DNAは、化学的に、または分子生物学技法を使用することによって配列決定および操作されて、例えば、1つ以上の可変ドメインおよび／もしくは定常ドメインを好適な立体配置に配置するか、またはコドンを導入し、システイン残基を作成し、アミノ酸を修飾、付加、もしくは欠失などすることができる。

【0052】

抗体結合フラグメントの非限定例としては、(i) Fabフラグメント、(ii) Fab' 2フラグメント、(iii) Fdフラグメント、(iv) Fvフラグメント、(v) 一本鎖Fv (scFv) 分子、(vi) dAbフラグメント、および(vii) 抗体の超可変領域（例えば、CDR3ペプチドなどの単離された相補性決定領域（CDR））を模倣するアミノ酸残基、または拘束FR3-CDR3-FR4ペプチドからなる最小認識単位が挙げられる。ドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ（例えば、一価ナノボディ、二価ナノボディなど）、小型モジュール型免疫医薬品（SMIP）、およびサメ可変IgNARDドメインなどの他の操作された分子も、本明細書で使用する「抗原結合フラグメント」という表現に包含される。

【0053】

抗体の抗原結合フラグメントは、典型的には、少なくとも1つの可変ドメインを含むであろう。可変ドメインは、任意のサイズまたはアミノ酸組成のものであり得、一般に、1つ以上のフレームワーク配列に隣接しているか、またはそれとインフレームである少なくとも1つのCDRを含む。V_HドメインがV_Lドメインに結合した抗原結合フラグメントでは、V_HドメインおよびV_Lドメインは、任意の好適な配置で互いに対して位置付けられてもよい。例えば、可変領域は二量体であり、V_H-V_H、V_H-V_L、またはV_L-V_L二量体を含んでもよい。あるいは、抗体の抗原結合フラグメントは、単量体のV_HドメインまたはV_Lドメインを含んでもよい。

【0054】

ある特定の実施形態では、抗体の抗原結合フラグメントは、少なくとも1つの定常ドメインに共有結合された少なくとも1つの可変ドメインを含んでもよい。本発明の抗体の抗原結合フラグメント内に見られ得る可変ドメインおよび定常ドメインの非限定的な例示的な立体配置には、(i) V_H-C_{H1}、(ii) V_H-C_{H2}、(iii) V_H-C_{H3}、(iv) V_H-C_{H1}-C_{H2}、(v) V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}、(vi) V_H-C_{H2}-C_{H3}、(vii) V_H-C_L、(viii) V_L-C_{H1}、(ix) V_L-C_{H2}、(x) V_L-C_{H3}、(xi) V_L-C_{H1}-C_{H2}、(xii) V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}、(xiii) V_L-C_{H2}-C_{H3}、および(xiv) V_L-C_Lが挙げられる。上に列記される例示的な立体配置のうちのいずれかを含む、可変ドメインおよび定常ドメインのいずれの立体配置でも、可変ドメインおよび定常ドメインは、互いに直接連結されているか、または完全もしくは部分的ヒンジ領域もしくはリンカー領域によって連結されているかのいずれかであり得る。ヒンジ領域は、単一のポリペプチド分子において隣接する可変ドメインおよび／または定常ドメイン間の可撓性または半可撓性の結合をもたらす少なくとも2つの（例えば、5、10、15、20、40、60またはそれより多数の）アミノ酸からなり得る。そのうえ、抗原結合フラグメントは、互いとのおよび／または1つ以上の単量体V_HドメインもしくはV_Lドメインとの（例えば、ジスルフィド結合（複数可）による）非共有結合において、先に列挙した可変ドメイン立体配置および定常ドメイン立体配置のうちのいずれかのホモ二量体またはヘテロ二量体（または他の多量体）を含み得る。

【0055】

完全抗体分子と同様に、抗体結合フラグメントは、単一特異性または多重特異性（例えば、二重特異性）であり得る。抗体の多重特異性抗原結合フラグメントは、典型的には、少なくとも2つの異なる可変ドメインを含み、各可変ドメインは、別個の抗原に、または同じ抗原上の異なるエピトープに特異的に結合することができる。本明細書に開示される例示的な二重特異性抗体フォーマットを含む任意の多重特異性抗体フォーマットは、当該技術分野で利用可能な通例の技術を使用して、本発明の抗体の抗原結合フラグメントとの関連で使用に適合し得る。

【0056】

本発明の抗体は、補体依存性細胞傷害（CDC）または抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）を介して機能してもよい。「補体依存性細胞傷害」（CDC）は、補体の存在下における本発明の抗体による抗原発現細胞の溶解を指す。「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」（ADCC）は、Fc受容体（FcR）を発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）が標的細胞上の結合抗体を認識し、それによって標的細胞の溶解をもたらす、細胞媒介性反応を指す。CDCおよびADCCは、当該技術分野において周知であり利用可能なアッセイを用いて測定することができる。（例えば、米国特許第5,500,362号および第5,821,337号、ならびにClynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656を参照）。抗体の定常領域は、補体を固定して細胞依存性細胞傷害性を媒介する抗体の能力において重要である。したがって、抗体のアイソタイプは、その抗体が細胞傷害性を媒介することが望ましいかに基づいて選択され得る。

10

20

30

40

50

【0057】

本発明のある特定の実施形態では、本発明の抗CD28および／またはMUC16抗体（単一特異性または二重特異性）は、ヒト抗体である。「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むことが意図される。本発明のヒト抗体は、例えば、CDR、特にCDR3における、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的変異誘発によってまたはインビボでの体細胞突然変異によって導入された変異）によってコードされないアミノ酸残基を含み得る。しかしながら、「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、別の哺乳類種（例えば、マウス）の生殖系列に由来するCDR配列が、ヒトフレームワーク配列へと移植された抗体を含むことを意図するものではない。

10

【0058】

本発明の抗体は、いくつかの実施形態では、組換えヒト抗体であり得る。「組換えヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを用いて発現される抗体など組換え手段によって調製、発現、作成、または単離される全てのヒト抗体（後述）、組換え型コンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離された抗体（後述）、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである動物（例えばマウス）から単離された抗体（例えば、Taylor et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20:6287-6295）、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを含む任意の他の手段によって調製、発現、作成、または単離される抗体を含むことを意図する。そのような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。しかしながら、ある特定の実施形態では、そのような組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発（または、ヒトIg配列についてトランスジェニック動物が使用される場合は、インビボ体細胞変異誘発）を受け、したがって、組換え抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V_HおよびV_L配列に由来し関連してはいるが、インビボでヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然には存在し得ない配列である。

20

【0059】

ヒト抗体は、ヒンジの不均一性に関連する2つの形態で存在することができる。第1の形態では、免疫グロブリン分子は、二量体が鎖間重鎖ジスルフィド結合によって一緒に保持されているおよそ150～160 kDaの安定した四鎖構築体を含む。第2の形態では、二量体は鎖間ジスルフィド結合によって連結されておらず、共有結合した軽鎖および重鎖から成る約75～80 kDaの分子が形成される（半抗体）。これらの形態は、親和性精製後でさえも分離することが極めて困難とされている。

30

【0060】

様々な無傷のIgGアイソタイプにおける第2の形態の出現頻度は、抗体のヒンジ領域アイソタイプに関連する構造上の相違によるが、それに限定されない。ヒトIgG4ヒンジのヒンジ領域における単一アミノ酸置換は、ヒトIgG1ヒンジを用いて典型的に観察されるレベルまで第2の形態の出現を有意に減少させることができる（Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105）。本発明は、ヒンジ、CH2またはCH3領域に1つ以上の突然変異を有する抗体を包含し、例えば産生において、所望の抗体形態の収率を改善するのに望ましい場合がある。

40

【0061】

本発明の抗体は、単離された抗体であってもよい。「単離された抗体」は、本明細書で使用される場合、その天然環境の少なくとも1つの成分から同定され、分離および／または回収された抗体を意味する。例えば、生物の少なくとも1つの成分から、または抗体が天然に存在するかもしれない天然に産生される組織または細胞から分離または除去された抗体は、本発明の目的のための「単離された抗体」である。単離された抗体は、組換え細胞内の原位置の抗体も含む。単離された抗体は、少なくとも1つの精製または単離ステップを受けた抗体である。ある特定の実施形態によると、単離された抗体は、他の細胞性物質

50

および／または化学物質を実質的に含まない場合がある。

【0062】

本発明はまた、CD28および／またはMUC16に結合するワンアーム抗体も含む。本明細書中で使用される場合、「ワンアーム抗体」は、単一の抗体重鎖および単一の抗体軽鎖を含む抗原結合分子を意味する。本発明のワンアーム抗体は、表1および表3に記載されるHCVR／LCVRまたはCDRアミノ酸配列のうちのいずれかを含んでもよい。

【0063】

本明細書の抗CD28および／もしくはMUC16抗体またはその抗原結合ドメインは、抗原結合タンパク質または抗原結合ドメインが由来した対応する生殖系列配列と比較して、重鎖および軽鎖可変ドメインのフレームワークおよび／またはCDR領域に1つ以上のアミノ酸置換、挿入、および／または欠失を含んでもよい。そのような突然変異は、本明細書に開示されるアミノ酸配列を、例えば、公共の抗体配列データベースから入手可能な生殖系列配列と比較することによって容易に確認することができる。本発明は、本明細書に開示されるアミノ酸配列のうちのいずれかに由来する抗体、およびその抗原結合ドメインを含み、ここで、1つ以上のフレームワーク領域および／またはCDR領域内の1つ以上のアミノ酸は、抗体が由来した生殖系列配列の対応する残基（複数可）に、もしくは別のヒト生殖系列配列の対応する残基（複数可）に、または対応する生殖系列残基（複数可）の保存的アミノ酸置換に突然変異する（そのような配列変化は、本明細書では集合的に「生殖系列突然変異」と称される）。当業者は、本明細書に開示される重鎖および軽鎖可変領域配列から出発して、1つ以上の個々の生殖系列突然変異またはそれらの組み合わせを含む多くの抗体および抗体結合フラグメントを容易に産生することができる。ある特定の実施形態では、V_Hおよび／またはV_Lドメイン内のフレームワークおよび／またはCDR残基は全て、抗体が由来した元の生殖系列配列において見出される残基へと再び突然変異する。他の実施形態では、ある特定の残基のみが元の生殖系列配列に戻り突然変異し、例えば、突然変異した残基が、FR1の最初の8つのアミノ酸内またはFR4の最後の8つのアミノ酸内にのみ見られるか、または突然変異した残基が、CDR1、CDR2、またはCDR3内にのみ見られる。他の実施形態では、フレームワークおよび／またはCDR残基（複数可）のうちの1つ以上は、異なる生殖系列配列（すなわち、抗体が本来由来した生殖系列配列とは異なる生殖系列配列）の対応する残基（複数可）へ突然変異する。さらに、本発明の抗体またはその抗原結合ドメインは、フレームワークおよび／またはCDR領域内に2つ以上の生殖系列突然変異の任意の組み合わせを含有してもよく、例えば、ある特定の個々の残基は、特定の生殖系列配列の対応する残基へ突然変異するのに対し、元の生殖系列配列とは異なるある特定の他の残基は、維持されるか、または異なる生殖系列配列の対応する残基へ突然変異する。いったん得られれば、1つ以上の生殖系列突然変異を含有する抗原結合ドメインは、結合特異性の改善、結合親和性の増大、アンタゴニストまたはアゴニストの生物学的特性の改善または強化（場合によって）、免疫原性の低減などの1つ以上の所望の特性について容易に試験することができる。この一般的な方法で得られた抗体またはその抗原結合フラグメントは、本発明の範囲内に包含される。

【0064】

本発明はまた、本明細書に開示されるHCVR、LCVR、および／またはCDRアミノ酸配列のうちのいずれかの変異体を含む、抗CD28および／またはMUC16抗体ならびに抗原結合分子を含む。本発明のこの態様に含まれる例示的な変異体には、1つ以上の保存的置換を有する、本明細書に開示されるHCVR、LCVR、および／またはCDRアミノ酸配列のうちのいずれかの変異体が含まれる。例えば、本発明は、本明細書の表3に記載されるHCVR、LCVR、および／またはCDRアミノ酸配列のうちのいずれかに対して、例えば10個以下、8個以下、6個以下、または4個以下などの保存的アミノ酸置換を有するHCVR、LCVR、および／またはCDRアミノ酸配列を有する抗CD28抗体および抗原結合分子を含む。

【0065】

「エピトープ」という用語は、パラトープとして既知の抗体分子の可変領域における特

10

20

30

40

50

異的抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を指す。単一の抗原は、1つ超のエピトープを有してもよい。したがって、異なる抗体は抗原上の異なる領域に結合してもよく、異なる生物学的効果を有してもよい。エピトープは、立体配座であっても直鎖状であってもよい。立体配座エピトープは、直鎖状ポリペプチド鎖の異なるセグメント由来の空間的に並置されたアミノ酸によって産生される。直鎖状エピトープは、ポリペプチド鎖内の隣接するアミノ酸残基によって産生されたものである。ある特定の状況では、エピトープは、抗原上の糖類、ホスホリル基、またはスルホニル基の部分を含んでもよい。

【0066】

「実質的な同一性」または「実質的に同一である」という用語は、核酸またはそのフラグメントを指す場合、別の核酸（またはその相補鎖）との適切なヌクレオチド挿入または欠失と最適に整列した場合、以下に考察するように、FASTA、BLASTまたはGapなど、配列同一性の任意の周知のアルゴリズムによって測定される場合に、ヌクレオチド塩基の少なくとも約95%、より好ましくは少なくとも約96%、97%、98%、または99%のヌクレオチド配列同一性があることを示す。参照核酸分子と実質的な同一性を有する核酸分子は、ある特定の状況では、参照核酸分子によってコードされるポリペプチドと同じまたは実質的に類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができる。

【0067】

ポリペプチドへ適用される場合、「実質的な類似性」または「実質的に類似の」という用語は、2つのペプチド配列が、既定のギャップ重みを用いてプログラムGAPまたはBESTFITなどによって最適に整列した場合、少なくとも95%の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも98%または99%の配列同一性を共有する。好ましくは、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換が異なる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を備えた側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されたものである。概して、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させない。2つ以上のアミノ酸配列の保存的置換が互いに異なる場合、配列同一性パーセントまたは類似性の程度は、置換の保存的性質を補正するために上向きに調整され得る。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331を参照されたい。類似の化学的特性を備えた側鎖を有するアミノ酸の基の例としては、(1) 脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン、(2) 脂肪族-ヒドロキシル側鎖：セリンおよびトレオニン、(3) アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン、(4) 芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、(5) 塩基性側鎖：リジン、アルギニン、およびヒスチジン、(6) 酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸、ならびに(7) 含硫側鎖：システインおよびメチオニンが挙げられる。好ましい保存的アミノ酸置換基は、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸-アスパラギン酸、およびアスパラギン-グルタミンである。あるいは、保存的な置換とは、Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-1445に開示されるPAM250対数尤度行列において正值を有する任意の変化である。「適度に保存的な」置換とは、PAM250対数尤度マトリックスにおいて負以外の値を有する任意の変化である。

【0068】

ポリペプチドに対する配列類似性は、配列同一性とも呼ばれ、典型的には配列分析ソフトウェアを使用して測定される。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む様々な置換、欠失、および他の修飾に割り当てられた類似性の測定値を使用して類似の配列を一致させる。例えば、GCGソフトウェアは、異なる種の生物由来の相同ポリペプチドなどの密接に関連するポリペプチド間または野生型タンパク質とその変異タンパク質との間の配列相同性または配列同一性を決定するための既定パラメータとともに使用され得るGapおよびBestfitなどのプログラムを含む。例えば、GCGバージョン

10

20

30

40

50

6. 1を参照されたい。ポリペプチド配列は、G C Gバージョン6. 1のプログラムである既定パラメータまたは推奨パラメータを用いたF A S T Aを使用して比較することもできる。F A S T A（例えば、F A S T A 2およびF A S T A 3）は、問い合わせ配列と検索配列との間の最良重複領域の整列および配列同一性パーセントを提供する（P e a r s o n（2000）（上記参照））。本発明の配列を、異なる生物由来の多数の配列を含むデータベースと比較する際の別の好ましいアルゴリズムは、既定パラメータを使用するコンピュータプログラムB L A S T、特にB L A S T PまたはT B L A S T Nである。例えば、A l t s c h u l e t a l .（1990）J . M o l . B i o I . 215：403－410およびA l t s c h u l e t a l .（1997）N u c l e i c A c i d s R e s . 25：3389－402を参照されたい。

10

【0069】

二重特異性抗原結合分子

本発明の抗体は、単一特異性、二重特異性、または多重特異性であってもよい。多重特異性抗体は、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であり得るか、または2つ以上の標的ポリペプチドに特異的な抗原結合ドメインを含有してもよい。例えば、T u t t e t a l . , 1991, J . I m m u n o l . 147：60－69、K u f e r e t a l . , 2004, T r e n d s B i o t e c h n o l . 22：238－244を参照されたい。本発明の抗C D 28および／またはM U C 16抗体は、別の機能性分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質に連結するか、またはそれと同時に発現させることができる。例えば、抗体またはそのフラグメントは、別の抗体または抗体フラグメントなどの1つ以上の他の分子実体に（例えば、化学結合、遺伝的融合、非共有結合、もしくは他の方法により）機能的に連結されて、第2の結合特異性を有する二重特異性抗体または多重特異性抗体を産生することができる。

20

【0070】

本明細書における「抗C D 28抗体」および／または「抗M U C 16抗体」という表現の使用は、単一特異性抗C D 28抗体および／または抗M U C 16抗体と、C D 28結合アームまたはM U C 16結合アームおよび標的抗原に結合する第2のアームを含む二重特異性抗体との両方を含むことを意図している。したがって、本発明は、免疫グロブリンの一方のアームがヒトC D 28またはM U C 16に結合し、免疫グロブリンの他方のアームが標的抗原に特異的である、二重特異性抗体を含む。C D 28またはM U C 16二重特異性抗体のもう一方のアームが結合する標的抗原は、細胞、組織、器官、微生物、またはウイルス上またはその近傍で発現される、標的免疫応答が望まれる任意の抗原であり得る。C D 28結合アームは、本明細書の表3に記載されるH C V R／L C V RまたはC D Rアミノ酸配列のうちのいずれかを含み得る。M U C 16結合アームは、本明細書の表1に記載のH C V R／L C V RまたはC D Rアミノ酸配列のいずれかを含み得る。ある特定の実施形態では、C D 28結合アームは、ヒトC D 28に結合し、ヒトT細胞増殖を誘発する。

30

【0071】

抗体の一方のアームがC D 28に結合し、もう一方のアームが標的抗原に結合する本発明の二重特異性抗体の文脈において、標的抗原は、M U C 16などの腫瘍関連抗原であり得る。

40

【0072】

ある特定の例示的な実施形態によると、本発明はC D 28およびM U C 16に特異的に結合する二重特異性抗原結合分子を含む。そのような分子は、本明細書では、例えば、「抗C D 28／抗M U C 16」もしくは「抗C D 28×M U C 16」もしくは「C D 28×M U C 16」もしくは「抗M U C 16／抗C D 28」もしくは「抗M U C 16×C D 28」もしくは「M U C 16×C D 28」二重特異性分子、または他の同様の用語として言及されてもよい。

【0073】

図に示されるある特定の例示的な実施形態によると、二重特異性抗原結合分子（例えば、二重特異性抗体）は、エフェクターアームおよび標的化アームを有してもよい。エフェ

50

クターアームは、エフェクター細胞（例えば、T細胞）上の抗原に結合する最初の抗原結合ドメイン（例えば、抗CD28抗体）であってもよい。標的化アームは、標的細胞（例えば、腫瘍細胞）上の抗原に結合する第2の抗原結合ドメイン（例えば、抗MUC16抗体）であってもよい。ある特定の例示的な実施形態によると、エフェクターアームは、CD28に結合し、標的化アームは、MUC16に結合する。二重特異性抗CD28/MUC16は、エフェクター細胞（例えば、T細胞）に共刺激シグナルを提供することができる。エフェクターアームは、クラスター化せずにT細胞を刺激する効果はない。クラスター化すると、エフェクターアームだけでは、T細胞を刺激する効果がほとんどない。標的化アームと組み合わせて、エフェクターアームは、T細胞を刺激する。腫瘍標的化アームは、腫瘍特異性が不完全である可能性がある。標的化アームの標的である抗原（例えば、MUC16）は、腫瘍細胞の一部に発現されてもよい。腫瘍標的化アームの特異性は、抗CD3二重特異性抗原結合分子（例えば、抗CD3/MUC16二重特異性抗体）との組み合わせと重複することによって増加してもよい。

10

【0074】

本明細書で使用される場合、「抗原結合分子」という表現は、単独で、または特定の抗原に特異的に結合する、1つ以上のさらなるCDRおよび／またはフレームワーク領域（FR）と組み合わせて少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）を含むまたはそれからなるタンパク質、ポリペプチド、または分子複合体を意味する。ある特定の実施形態では、抗原結合分子は、それらの用語が本明細書の他所で定義されているように、抗体または抗体のフラグメントである。

20

【0075】

本明細書で使用される場合、「二重特異性抗原結合分子」という表現は、少なくとも第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインを含むタンパク質、ポリペプチド、または分子複合体を意味する。二重特異性抗原結合分子内の各抗原結合ドメインは、単独で、または1つ以上の追加のCDRおよび／またはFRと組み合わせて、特定の抗原に特異的に結合する少なくとも1つのCDRを含む。本発明の文脈において、第1の抗原結合ドメインは第1の抗原（例えばCD28）に特異的に結合し、第2の抗原結合ドメインは第2の異なる抗原（例えばMUC16）に特異的に結合する。

【0076】

本発明のある特定の例示的な実施形態では、二重特異性抗原結合分子は、二重特異性抗体である。二重特異性抗体の各抗原結合ドメインは、重鎖可変ドメイン（HCVR）および軽鎖可変ドメイン（LCVR）を含む。第1および第2の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗原結合分子（例えば、二重特異性抗体）の文脈において、第1の抗原結合ドメインのCDRは、接頭辞「D1」を付けて指定され、第2の抗原結合ドメインのCDRは、接頭辞「D2」を付けて指定されてもよい。したがって、第1の抗原結合ドメインのCDRは、本明細書においてD1-HCDR1、D1-HCDR2、およびD1-HCDR3と称されてもよく、第2の抗原結合ドメインのCDRは、本明細書においてD2-HCDR1、D2-HCDR2、およびD2-HCDR3と称されてもよい。

30

【0077】

第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインは、互いに直接的または間接的に結合して、本発明の二重特異性抗原結合分子を形成してもよい。あるいは、第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインは各々、別々の多量体化ドメインに連結されていてよい。1つの多量体化ドメインと別の多量体化ドメインとの会合は、2つの抗原結合ドメイン間の会合を促進し、それによって二重特異性抗原結合分子を形成する。本明細書で使用される場合、「多量体化ドメイン」は、同一または類似の構造または構成の第2の多量体化ドメインと会合する能力を有する任意の高分子、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、またはアミノ酸である。例えば、多量体化ドメインは、免疫グロブリンCH3ドメインを含むポリペプチドであってもよい。多量体化成分の非限定的な例は、免疫グロブリンのFc部分（CH2-CH3ドメインを含む）、例えばアイソタイプIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4から選択されるIgGのFcドメイン、ならびに各

40

50

アイソタイプ群内の任意のアロタイプである。

【0078】

本発明の二重特異性抗原結合分子は、典型的には2つの多量体化ドメイン、例えば、それぞれ別々の抗体重鎖の一部である2つのFcドメインを含む。第1および第2の多量体化ドメインは、例えば、IgG1/IgG1、IgG2/IgG2、IgG4/IgG4などの同じIgGアイソタイプであってもよい。あるいは、第1および第2の多量体化ドメインは、例えば、IgG1/IgG2、IgG1/IgG4、IgG2/IgG4などの異なるIgGアイソタイプであってもよい。

【0079】

ある特定の実施形態では、多量体化ドメインは、Fcフラグメントまたは少なくとも1つのシステイン残基を含有する長さが1～約200アミノ酸のアミノ酸配列である。他の実施形態では、多量体化ドメインは、システイン残基、または短いシステイン含有ペプチドである。他の多量体化ドメインには、ロイシンジッパー、ヘリックスループモチーフ、またはコイルドコイルモチーフを含むか、またはそれからなるペプチドまたはポリペプチドが含まれる。

【0080】

任意の二重特異性抗体フォーマットまたは技術を使用して、本発明の二重特異性抗原結合分子を作製することができる。例えば、第1の抗原結合特異性を有する抗体またはそのフラグメントは、第2の抗原結合特異性を有する別の抗体または抗体フラグメントなどの1つ以上の他の分子実体に（例えば、化学結合、遺伝的融合、非共有結合などにより）機能的に連結されて、二重特異性抗原結合分子を産生することができる。本発明の文脈において使用できる特定の例示的な二重特異性フォーマットには、例えば、scFv系フォーマットまたはダイアボディ二重特異性フォーマット、IgG-scFv融合、二重可変ドメイン(OVO)-Ig、Quadroma、ノブ・イントゥ・ホール(knobs-into-holes)、共通の軽鎖（例えば、ノブ・イントゥ・ホールを備えた共通の軽鎖など）、CrossMab、CrossFab、(SEEO)体、ロイシンジッパー、Oubody、IgG1/IgG2、二重作用型Fab(OAF)-IgG、およびMab²二重特異性フォーマットが含まれるが、これらに限定されない（上述のフォーマットの総説については、例えば、Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11、およびそこに引用されている参考文献を参照）。

【0081】

本発明の二重特異性抗原結合分子との関連で、多量体化ドメイン、例えば、Fcドメインは、野生型の、天然に存在するFcドメインと比較して、1つ以上のアミノ酸変化（例えば、挿入、欠失、または置換）を含んでもよい。例えば、本発明は、FcとFcRnとの間の修飾された結合相互作用（例えば、強化または減少）を有する修飾Fcドメインをもたらす、Fcドメイン中の1つ以上の修飾を含む二重特異性抗原結合分子を含む。一実施形態では、二重特異性抗原結合分子は、CH2またはCH3領域に修飾を含み、この修飾は酸性環境（例えば、pH範囲約5.5～約6.0のエンドソーム内）において、FcRnに対するFcドメインの親和性を高める。そのようなFc修飾の非限定的な例には、例えば、250位（例えば、EもしくはQ）、250位および428位（例えば、LもしくはF）、252位（例えば、LN/FIWもしくはT）、254位（例えば、SもしくはT）、および256位（例えば、S/R/Q/EIDもしくはT）での修飾、あるいは428位および/または433位（例えばUR/S/P/QもしくはK）および/または434位（例えばH/FもしくはV）での修飾、あるいは250位および/または428位の修飾、あるいは307位または308位（例えば、308F、V308F）および434位での修飾が含まれる。一実施形態において、修飾は、428L（例えば、M428L）および434S（例えば、N434S）の修飾；428L、2591（例えば、V2591）、および308F（例えば、V308F）の修飾；433K（例えば、H433K）および434（例えば、434Y）の修飾；252、254、および256（例えば、252Y、254T、および256E）の修飾、250Qおよび428Lの修飾（例え

ば、T 2 5 0 QおよびM 4 2 8 L)、ならびに3 0 7および／または3 0 8の修飾(例えば、3 0 8 Fまたは3 0 8 P)を含む。

【0082】

本発明は、第1のC_H3ドメインおよび第2のI g C_H3ドメインを含む二重特異性抗原結合分子も含み、第1および第2のI g C_H3ドメインは、少なくとも1つのアミノ酸が互いに異なり、少なくとも1つのアミノ酸の差により、そのアミノ酸の差を欠く二重特異性抗体と比較して、プロテインAへの二重特異性抗体の結合が減少する。一実施形態では、第1のI g C_H3ドメインは、プロテインAに結合し、第2のI g C_H3ドメインは、H 9 5 R修飾(I M G Tエクソン番号付けによるもの、E U番号付けによるH 4 3 5 R)などのプロテインA結合を減少または消失させる突然変異を含む。第2のC_H3は、Y 9 6 F修飾(I M G Tによるもの、E UによるY 4 3 6 F)をさらに含んでもよい。第2のC_H3内に見出され得るさらなる修飾には、I g G 1抗体の場合、D 1 6 E、L 1 8 M、N 4 4 S、K 5 2 N、V 5 7 M、およびV 8 2 I(I M G Tによるもの；E UによるD 3 5 6 E、L 3 5 8 M、N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、V 3 9 7 M、およびV 4 2 2 I)、I g G 2抗体の場合、N 4 4 S、K 5 2 N、およびV 8 2 I(I M G T；E UによるN 3 8 4 S、K 3 9 2 N、およびV 4 2 2 I)、ならびにI g G 4抗体の場合、Q 1 5 R、N 4 4 S、K 5 2 N、V 5 7 M、R 6 9 K、E 7 9 Q、およびV 8 2 I(I M G Tによるもの；E UによるQ 3 5 5 R、N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、V 3 9 7 M、R 4 0 9 K、E 4 1 9 Q、およびV 4 2 2 I)が含まれる。

【0083】

ある特定の実施形態では、F cドメインは、2つ以上の免疫グロブリンアイソタイプに由来するF c配列を組み合わせたキメラであってもよい。例えば、キメラF cドメインは、ヒトI g G 1、ヒトI g G 2、またはヒトI g G 4 C_H2領域に由来するC_H2配列の一部または全部、およびヒトI g G 1、ヒトI g G 2、またはヒトI g G 4に由来するC_H3配列の一部または全部を含み得る。キメラF cドメインは、キメラヒンジ領域も含み得る。例えば、キメラヒンジは、ヒトI g G 1ヒンジ領域、ヒトI g G 2ヒンジ領域、またはヒトI g G 4ヒンジ領域に由来する「下部ヒンジ」配列と組み合わせた、ヒトI g G 1ヒンジ領域、ヒトI g G 2ヒンジ領域、またはヒトI g G 4ヒンジ領域に由来する「上部ヒンジ」配列を含むことができる。本明細書に記載される抗原結合分子のうちのいずれかに含まれ得るキメラF cドメインの特定の例は、N末端からC末端に、[I g G 4 C_H1] - [I g G 4 上部ヒンジ] - [I g G 2 下部ヒンジ] - [I g G 4 C_H2] - [I g G 4 C_H3]を含む。本明細書に記載される抗原結合分子のうちのいずれかに含まれ得るキメラF cドメインの別の例は、N末端からC末端に、[I g G 1 C_H1] - [I g G 1 上部ヒンジ] - [I g G 2 下部ヒンジ] - [I g G 4 C_H2] - [I g G 1 C_H3]を含む。本発明の抗原結合分子のうちのいずれかに含めることができるキメラF cドメインのこれらおよび他の例は、WO 2 0 1 4 / 0 2 2 5 4 0 A 1に記載されており、これらの一般的な構造配置を有するキメラF cドメイン、およびその変異体は、F c受容体結合を変えてしまうことができ、そのことがF cエフェクター機能に影響を及ぼす。

【0084】

配列変異体

本明細書の抗体および二重特異性抗原結合分子は、個々の抗原結合ドメインが由来した対応する生殖系列配列と比較して、重鎖および軽鎖可変ドメインのフレームワークおよび／またはC D R領域に1つ以上のアミノ酸置換、挿入、および／または欠失を含んでもよい。そのような突然変異は、本明細書に開示されるアミノ酸配列を、例えば、公共の抗体配列データベースから入手可能な生殖系列配列と比較することによって容易に確認することができる。本発明の抗原結合分子は、本明細書に開示される例示的なアミノ酸配列のうちのいずれかに由来する抗原結合フラグメントを含んでもよく、ここで、1つ以上のフレームワーク領域および／またはC D R領域内の1つ以上のアミノ酸は、抗体が由来した生殖系列配列の対応する残基(複数可)に、または別のヒト生殖系列配列の対応する残基(複数可)に、または対応する生殖系列残基(複数可)の保存的アミノ酸置換に突然変異す

る（そのような配列変化は、本明細書では集合的に「生殖系列突然変異」と称される）。当業者は、本明細書に開示される重鎖および軽鎖可変領域配列から出発して、1つ以上の個々の生殖系列突然変異またはそれらの組み合わせを含む多くの抗体および抗体結合フラグメントを容易に産生することができる。ある特定の実施形態では、V_Hおよび／またはV_Lドメイン内のフレームワークおよび／またはCDR残基は全て、抗原結合ドメインが本来由来した元の生殖系列配列において見出される残基へと再び突然変異する。他の実施形態では、ある特定の残基のみが、元の生殖系列配列へと再び突然変異し、例えば、突然変異した残基のみが、FR1の最初の8個のアミノ酸内に、もしくはFR4の最後の8個のアミノ酸内に認められるか、または突然変異した残基のみが、CDR1、CDR2、もしくはCDR3内に見出される。他の実施形態では、フレームワークおよび／またはCDR残基（複数可）のうちの1つ以上は、異なる生殖系列配列（すなわち、抗原結合ドメインが本来由来した生殖系列配列とは異なる生殖系列配列）の対応する残基（複数可）へ突然変異する。さらに、抗原結合ドメインは、フレームワークおよび／またはCDR領域内に2つ以上の生殖系列突然変異の任意の組み合わせを含有してもよく、例えば、ある特定の個々の残基は、特定の生殖系列配列の対応する残基へ突然変異するのに対し、元の生殖系列配列とは異なるある特定の他の残基は、維持されるか、または異なる生殖系列配列の対応する残基へ突然変異する。いったん得られれば、1つ以上の生殖系列突然変異を含有する抗原結合ドメインは、結合特異性の改善、結合親和性の増大、アンタゴニストまたはアゴニストの生物学的特性の改善または強化（場合によって）、免疫原性の低下などの1つ以上の所望の特性について容易に試験することができる。この一般的な方法で得られた1つ以上の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗原結合分子は、本発明の範囲内に含まれる。

【0085】

本発明はまた、一方または両方の抗原結合ドメインが、1つ以上の保存的置換を有する本明細書に開示するHCVRアミノ酸配列、LCVRアミノ酸配列、および／またはCDRアミノ酸配列のいずれかの変異体を含む、抗原結合分子を含む。例えば、本発明は、本明細書に開示するHCVRアミノ酸配列、LCVRアミノ酸配列、および／またはCDRアミノ酸配列のいずれかに対して、例えば10個以下、8個以下、6個以下、または4個以下などの保存的アミノ酸置換を有するHCVRアミノ酸配列、LCVRアミノ酸配列、および／またはCDRアミノ酸配列を有する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子を含む。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を備えた側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されたものである。概して、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させない。類似の化学的特性を備えた側鎖を有するアミノ酸の基の例としては、（1）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン、（2）脂肪族-ヒドロキシル側鎖：セリンおよびトレオニン、（3）アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン、（4）芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、（5）塩基性側鎖：リジン、アルギニン、およびヒスチジン、（6）酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸、ならびに（7）含硫側鎖：システインおよびメチオニンが挙げられる。好ましい保存的アミノ酸置換基は、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸-アスパラギン酸およびアスパラギン-グルタミンである。あるいは、保存的置換は、参照により本明細書に組み込まれるGonnert et al. (1992) Science 256:1443-1445に開示されるPAM250対数尤度行列において正值を有する任意の変化である。「適度に保存的な」置換とは、PAM250対数尤度マトリックスにおいて負以外の値を有する任意の変化である。

【0086】

本発明はまた、本明細書に開示されるHCVR、LCVR、および／またはCDRアミノ酸配列のうちのいずれかと実質的に同一であるHCVR、LCVR、および／またはCDRアミノ酸配列を有する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子を含む。アミノ酸配列意

味する場合、「実質的な同一性」または「実質的に同一の」という用語は、2つのアミノ酸配列が、既定のギャップ重みを使用してプログラムGAPまたはBESTFITなどによって最適に整列した場合、少なくとも95%の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも98%、または99%の配列同一性を共有する。好ましくは、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換が異なる。2つ以上のアミノ酸配列の保存的置換が互いに異なる場合、配列同一性パーセントまたは類似性の程度は、置換の保存的性質を補正するために上向きに調整され得る。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24:307-331を参照されたい。

【0087】

ポリペプチドに対する配列類似性は、配列同一性とも呼ばれ、典型的には配列分析ソフトウェアを用いて測定される。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む様々な置換、欠失、および他の修飾に割り当てられた類似性の測定値を使用して類似の配列を一致させる。例えば、GCGソフトウェアは、異なる種の生物由来の相同ポリペプチドなどの密接に関連するポリペプチド間または野生型タンパク質とその変異タンパク質との間の配列相同性または配列同一性を決定するための既定パラメータとともに使用され得るGapおよびBestfitなどのプログラムを含む。例えば、GCGバージョン6.1を参照されたい。ポリペプチド配列は、GCGバージョン6.1のプログラムである既定パラメータまたは推奨パラメータを用いたFASTAを使用して比較することもできる。FASTA（例えば、FASTA2およびFASTA3）は、問い合わせ配列と検索配列との間の最良重複領域の整列および配列同一性パーセントを提供する（Pearson (2000)（上記参照））。本発明の配列を、異なる生物由来の多数の配列を含むデータベースと比較する際の別の好ましいアルゴリズムは、既定パラメータを使用するコンピュータプログラムBLAST、特にBLASTPまたはTBLASTNである。例えば、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410およびAltschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402を参照されたい。

【0088】

pH依存性結合

本発明は、pH依存性結合特性を有する、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を含む。例えば、本発明の抗抗CD28抗体は、中性pHと比較して酸性pHでCD28への結合の低減を呈し得る。あるいは、本発明の抗MUC16抗体は、中性pHと比較して酸性pHでMUC16への強化された結合を示してもよい。「酸性pH」という表現は、約6.2未満、例えば、約6.0、5.95、5.9、5.85、5.8、5.75、5.7、5.65、5.6、5.55、5.5、5.45、5.4、5.35、5.3、5.25、5.2、5.15、5.1、5.05、5.0、またはそれ以下のpH値を含む。本明細書で使用される場合、「中性pH」との表現は、約7.0～約7.4のpHを意味する。「中性pH」という表現は、約7.0、7.05、7.1、7.15、7.2、7.25、7.3、7.35、および7.4のpH値を含む。

【0089】

場合によっては、「中性pHと比較して、酸性pHで...結合の低下」は、中性pHでその抗原に結合する抗体のK_D値に対する酸性pHでその抗原に結合する抗体のK_D値の比に関して、表される（またはその逆）。例えば、抗体またはその抗原結合フラグメントが、約3.0以上の酸性／中性K_D比を呈する場合、本発明の目的のために、抗体またはその抗原結合フラグメントは、「中性pHと比較して酸性pHでCD28への結合の低減」を呈すると見なされ得る。ある特定の例示的实施形態では、本発明の抗体または抗原結合フラグメントの酸性／中性K_D比は、約3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、20.0、25.0、30.0、40.0、50.0、60.0

、70.0、100.0以上であってもよい。

【0090】

pH依存性結合特性を有する抗体は、例えば、中性pHと比較して酸性pHで特定の抗原への結合の低減（または強化）について抗体の集団をスクリーニングすることによって得ることができる。さらに、アミノ酸レベルでの抗原結合ドメインの修飾は、pH依存性的特徴を有する抗体を産生し得る。例えば、抗原結合ドメイン（例えばCDR内）の1つ以上のアミノ酸をヒスチジン残基で置換することにより、中性pHに対して酸性pHで抗原結合が低減した抗体を得ることができる。

【0091】

Fc変異体を含む抗体

本発明のある特定の実施形態によると、例えば、中性pHと比較して酸性pHで、FcRn受容体への抗体結合を強化または減少させる1つ以上の突然変異を含むFcドメインを含む、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子が提供される。例えば、本発明は、FcドメインのCH2またはCH3領域に突然変異を含む抗体および抗原結合分子を含み、この突然変異（複数可）は、酸性環境（例えば、pH範囲約5.5～約6.0のエンドソーム内）において、FcRnに対するFcドメインの親和性を高める。そのような突然変異は、動物に投与されたときに抗体の血清半減期の増加をもたらす得る。そのようなFc修飾の非限定的な例には、例えば、250位（例えば、EまたはQ）での、250位および428位（例えば、LまたはF）での、252位（例えば、L／Y／F／WまたはT）、254位（例えば、SまたはT）、および256位（例えば、S／R／Q／E／DまたはT）での修飾、あるいは428位および／または433位（例えばH／L／R／S／P／QまたはK）および／または434位（例えばH／FまたはY）での修飾、あるいは250位および／または428位での修飾、あるいは307位もしくは308位（例えば、308F、V308F）、および434位での修飾が含まれる。一実施形態において、修飾は428L（例えばM428L）および434S（例えばN434S）の修飾、428L、259I（例えば、V259I）、および308F（例えば、V308F）の修飾、433K（例えば、H433K）および434（例えば、434Y）の修飾、252、254、および256（例えば、252Y、254T、および256E）の修飾、250Qおよび428Lの修飾（例えば、T250QおよびM428L）、307および／または308の修飾（例えば、308Fまたは308P）を含む。

【0092】

例えば、本発明は、250Qおよび248L（例えば、T250QおよびM248L）；252Y、254Tおよび256E（例えば、M252Y、S254TおよびT256E）；428Lのおよび434S（例えば、M428LおよびN434S）；ならびに433Kおよび434F（例えば、H433KおよびN434F）からなる群から選択される、1つ以上の突然変異の対または群を含むFcドメインを含む、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を含む。前述のFcドメイン突然変異、および本明細書に開示される抗体可変ドメイン内の他の突然変異の全ての可能な組み合わせが、本発明の範囲内で熟慮される。

【0093】

抗体および抗原結合分子の生物学的特性

本発明は、ヒトCD28および／またはMUC16に高い親和性で結合する抗体およびその抗原結合フラグメントを含む。本発明はまた、治療状況および所望される特定の標的化特性に応じて、中程度または低度の親和性でヒトCD28および／またはMUC16に結合する抗体およびその抗原結合フラグメントを含む。例えば、一方のアームがCD28に結合し、別のアームが標的抗原（例えば、MUC16）に結合する二重特異性抗原結合分子の文脈では、標的抗原結合アームが標的抗原に高い親和性で結合することが望ましい場合があるが、抗CD28アームは、中程度または低度の親和性でのみCD28に結合する。このようにして、標的抗原を発現する細胞への抗原結合分子の優先的標的化は、一般的／非標的化CD28結合およびそれに付随する結果として生じる有害な副作用を回避し

10

20

30

40

50

ながら達成され得る。

【0094】

ある特定の実施形態によると、本発明は、例えば、本明細書の実施例4に定義されるようなアッセイフォーマットを使用して、表面プラズモン共鳴により測定して、約165 nM未満の K_D でヒトCD28に（例えば、37℃で）結合する抗体および抗体の抗原結合フラグメントを含む。ある特定の実施形態では、本発明の抗体または抗原結合フラグメントは、例えば、本明細書の実施例4に定義されるようなアッセイフォーマット、または実質的に類似のアッセイを使用して、表面プラズモン共鳴により測定して、約150 nM未満、約130 nM未満、約120 nM未満、約100 nM未満、約50 nM未満、約80 nM未満、約60 nM未満、約40 nM未満、または約30 nM未満の K_D でCD28に結合する。

10

【0095】

本発明はまた、例えば、本明細書の実施例4に定義されるようなアッセイフォーマット、または実質的に類似のアッセイを使用して、37℃での表面プラズモン共鳴により測定して、約2.1分超の解離半減期（ $t_{1/2}$ ）でCD28に結合する抗体およびその抗原結合フラグメントを含む。ある特定の実施形態では、本発明の抗体または抗原結合フラグメントは、例えば、本明細書の実施例4に定義されるようなアッセイフォーマット、または実質的に類似のアッセイを使用して、25℃または37℃での表面プラズモン共鳴により測定して、約5分超、約10分超、約20分超、約30分超、約40分超、約50分超、約60分超、約70分超、約80分超、約90分超、約100分超、約200分超、約300分超、約400分超、約500分超、約600分超、約700分超、約800分超、約900分超、約1000分超、または約1200分超の $t_{1/2}$ でCD28に結合する。

20

【0096】

本発明は、ヒトCD28およびヒトMUC16に同時に結合することができる二重特異性抗原結合分子（例えば、二重特異性抗体）を含む。ある特定の実施形態によると、本発明の二重特異性抗原結合分子は、CD28および／またはMUC16を発現する細胞と特異的に相互作用する。二重特異性抗原結合分子がCD28および／またはMUC16を発現する細胞と結合する程度は、本明細書の実施例5に示すように、蛍光標示細胞分取（FACS）によって評価することができる。例えば、本発明は、CD28を発現するがMUC16を発現しないヒトまたはカニクイザル細胞（例えば、T細胞）、およびMUC16を発現するがCD28を発現しないヒト卵巢癌細胞株（例えば、OVCA-R-3またはPEO1）に特異的に結合する二重特異性抗原結合分子を含む。本発明は、実施例4に記載されるようなFACSアッセイまたは実質的に類似のアッセイを使用して決定して、約 9.2×10^{-6} ～約 2.8×10^{-10} 、またはそれ以下の EC_{50} 値で、前述の細胞および細胞株のうちのいずれかに結合する二重特異性抗原結合分子を含む。

30

【0097】

本発明はまた、腫瘍細胞のT細胞媒介性殺滅を誘発または増加させる抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を提供する。例えば、本発明は、本明細書の実施例7に定義されるようなアッセイフォーマット（例えば、抗CD28×MUC16抗体の存在下でのヒトまたはカニクイザルPBMCによるPEO1腫瘍細胞殺滅の程度を評価する）または実質的に類似のアッセイを使用して、インビトロT細胞媒介性腫瘍細胞殺滅アッセイにおいて測定して、約392 pM未満の EC_{50} で腫瘍細胞のT細胞媒介性殺滅を誘発するまたは増加させる抗CD28×MUC16抗体を含む。ある特定の実施形態では、本発明の抗体または抗原結合フラグメントは、本明細書の実施例7に定義されるようなアッセイフォーマットまたは実質的に類似のアッセイを使用して、インビトロT細胞媒介性腫瘍細胞殺滅アッセイにより測定して、約200 pM未満、約150 pM未満、約100 pM未満、約75 pM未満、約50 pM未満、約25 pM未満、約10 pM未満、約5.0 pM未満、約4.0 pM未満、約3.0 pM未満、約2.5 pM未満、約2.0 pM未満、約1.5 pM、または約1.45 pM未満の EC_{50} 値で、T細胞媒介性腫瘍細胞殺滅（

40

50

例えば、PEO1細胞のPBMC媒介性殺滅)を誘発する。

【0098】

本発明はまた、1.0 pM~10 μMの間のEC₅₀値でCD28発現ヒトおよび／またはカニクイザルT細胞に結合する抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を含む。ある特定の実施形態では、抗CD28／抗PSMA二重特異性抗原結合分子は、9.2 μM~120 nMの間のEC₅₀値でCD28発現ヒトおよび／またはカニクイザルT細胞に結合する。例えば、本発明は、約1 pM、約10 pM、約100 pM、約500 pM、約1 nM、約2 nM、約5 nM、約10 nM、約20 nM、約30 nM、約40 nM、約50 nM、約60 nM、約70 nM、約80 nM、約90 nM、約100 nM、約200 nM、約300 nM、約500 nM、約800 nM、約1000 nM、約2 μM、約4 μM、約6 μM、約8 μM、約10 μM、またはそれ以上のEC₅₀値でCD28発現ヒトT細胞に結合する、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を含む。

10

【0099】

本発明はまた、(a) T細胞を活性化し、IL-2放出、ならびにヒトPBMCにおけるCD25+およびPD-1の上方調節を誘発する(例えば、本明細書の実施例6および7を参照)、(b) MUC16発現細胞株に対するヒトまたはカニクイザルT細胞媒介性細胞傷害性を増加させる(例えば、本明細書の実施例7を参照)、(c) MUC16発現細胞株に対してナイーブ型長寿T細胞媒介細胞傷害性を誘発する(例えば、本明細書の実施例7を参照)、(e) マウスにおける腫瘍細胞を枯渇させる(例えば、本明細書の実施例8)、(f) マウスにおける腫瘍クリアランスを強化する(例えば、本明細書の実施例8)、(g) カニクイザルにおいて全身性T細胞活性化を誘発しない、からなる群から選択される1つ以上の特性を呈する、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を含む。

20

【0100】

本発明は、対象の腫瘍細胞を枯渇させることができる抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を含む(例えば、実施例9を参照)。例えば、ある特定の実施形態によると、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子が提供され、対象への二重特異性抗原結合分子の二重投与(例えば、約5.0 mg/kg、約2.5 mg/kg、約1.0 mg/kg、約0.5 mg/kg、約0.2 mg/kg、約0.1 mg/kg、約0.05 mg/kg、約0.02 mg/kg、約0.01 mg/kg、またはそれ以下の用量)は、対象における腫瘍細胞の数の低減を引き起こす。ある特定の実施形態によると、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子が提供され、対象への二重特異性抗原結合分子の二重投与(例えば、約2500 mg、約1000 mg、約500 mg、約200 mg、約100 mg、約50 mg、約25 mg/kg、またはそれ以下の用量)は、対象における腫瘍細胞の数の低減を引き起こす。

30

【0101】

エピトープマッピングおよび関連技術

本発明の抗原結合分子が結合するCD28またはMUC16上のエピトープは、CD28タンパク質またはMUC16タンパク質の3つ以上(例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上)のアミノ酸の単一連続配列からなってもよい。あるいは、エピトープは、CD28またはMUC16の複数の非連続アミノ酸(またはアミノ酸配列)からなってもよい。本発明の抗体は、CD28単量体内に含まれるアミノ酸と相互作用してもよく、またはCD28二量体の2つ以上の異なるCD28鎖上のアミノ酸と相互作用してもよい。「エピトープ」という用語は、本発明で使用される場合、パラトープとして既知の抗体分子の可変領域における特異的抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を指す。単一の抗原は2つ以上のエピトープを有してもよい。したがって、異なる抗体は抗原上の異なる領域に結合し得、異なる生物学的効果を有し得る。エピトープは、立体配座または直鎖状のいずれかであり得る。立体配座エピトープは、直鎖状ポリペプチド鎖の異なるセグメント由来の空間的に並置されたアミノ酸によって産生される。直鎖状エピトープは、ポリペプチド

40

50

鎖内の隣接するアミノ酸残基によって産生されたものである。ある特定の状況では、エピトープは、抗原上のサッカリド、ホスホリル基、またはスルホニル基の部分を含み得る。

【0102】

当業者に既知の種々の技法を用いて、抗体の抗原結合ドメインがポリペプチドまたはタンパク質内にある「1つ以上のアミノ酸と相互作用する」かどうかを判定することができる。特定の抗体または抗原結合ドメインのエピトープまたは結合ドメインを決定するために使用できる例示的な技法には、例えば、Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY) に記載されるものなどのルーチン交差遮断アッセイ、点突然変異誘発（例えば、アラニン走査突然変異誘発、アルギニン走査突然変異誘発など）、ペプチドブロット分析 (Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248: 443-463)、プロテアーゼ保護、およびペプチド切断分析が含まれる。加えて、エピトープ切除、エピトープ抽出、および抗原の化学修飾などの方法を採用することができる (Tomer, 2000, Protein Science 9: 487-496)。抗体が相互作用するポリペプチドの内部にあるアミノ酸を同定するために用いることができる別の方法は、質量分析によって検出される水素／重水素交換である。一般的に言えば、水素／重水素交換法は、関心対象のタンパク質を重水素標識した後、抗体を重水素標識タンパク質へ結合させることを包含する。次に、タンパク質／抗体複合体を水に移して、抗体によって保護されている残基（重水素標識されたままである）を除く全ての残基で水素－重水素交換を生じさせる。抗体の解離後、標的タンパク質をプロテアーゼ切断および質量分析へ供し、それにより、抗体が相互作用する特異的アミノ酸に対応する重水素標識残基を明らかにする。例えば、Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267 (2): 252-259、Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265Aを参照されたい。X線結晶構造解析を使用して、抗体が相互作用するポリペプチド内のアミノ酸を同定することもできる。

【0103】

本発明はさらに、本明細書に記載される特定の例示的な抗体のうちのいずれかと同じエピトープに結合する、抗CD28および抗MUC16抗体（本明細書の表1および3に記載されるようなアミノ酸配列のうちのいずれかを含む抗体）を含む。同様に、本発明はまた、CD28および／またはMUC16への結合について、本明細書に記載の特定の例示的な抗体のいずれかと競合する抗CD28および／または抗MUC16抗体（例えば、本明細書の表1に記載のアミノ酸配列のいずれかを含む抗体）も含む。

【0104】

本発明はまた、ヒトCD28に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、ヒトMUC16に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗原結合分子を含み、第1の抗原結合ドメインは、本明細書に記載される特定の例示的なCD28特異的抗原結合ドメインのうちのいずれかと同じCD28上のエピトープに結合し、かつ／または第2の抗原結合ドメインは、本明細書に記載される特定の例示的なMUC16特異的抗原結合ドメインのうちのいずれかと同じMUC16上の同じエピトープに結合する。

【0105】

同様に、本発明はまた、ヒトCD28に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、ヒトMUC16に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗原結合分子を含み、第1の抗原結合ドメインは、本明細書に記載される特定の例示的なCD28特異的抗原結合ドメインのうちのいずれかと同じCD28への結合について競合し、かつ／または第2の抗原結合ドメインは、本明細書に記載される特定の例示的なMUC16特異的抗原結合ドメインのうちのいずれかと同じMUC16への結合について競合する。

【0106】

特定の抗原結合分子（例えば、抗体）またはその抗原結合ドメインが、本発明の参照抗原結合分子と同じエピトープに結合するか、または結合について本発明の参照抗原結合分子と競合するかどうかは、当該技術分野で既知の常法を用いて容易に判定できる。例えば

、試験抗体が本発明の参照二重特異性抗原結合分子と同じCD28（またはMUC16）上のエピトープに結合するかどうかを決定するために、参照二重特異性分子をまずCD28タンパク質（またはMUC16タンパク質）に結合させる。次に、CD28（またはMUC16）分子へ結合する試験抗体の能力を評価する。試験抗体が参照二重特異性抗原結合分子と飽和結合後にCD28（またはMUC16）に結合することができる場合、試験抗体は参照二重特異性抗原とは異なるCD28（またはMUC16）のエピトープに結合すると結論することができる。その一方で、試験抗体が、参照二重特異性抗原結合分子に飽和結合後にCD28（またはMUC16）分子へ結合できない場合、試験抗体は、本発明の参照二重特異性抗原結合分子によって結合したエピトープと同じCD28（またはMUC16）のエピトープへ結合してもよい。次に、試験抗体の結合の観察された欠失が、実際に、参照二重特異性抗原結合分子と同じエピトープへの結合によるものであるか、それとも立体遮断（または別の現象）が、観察された結合の欠失の原因であるのかを確認するために、さらなる通例の実験（例えば、ペプチド変異および結合分析）を実施することができる。この種の実験は、ELISA、RIA、Biacore、フローサイトメトリ、または当該技術分野で利用可能な任意の他の定量的もしくは定性的な抗体結合アッセイを用いて行うことができる。本発明のある特定の実施形態によると、例えば、1倍、5倍、10倍、20倍、または100倍過剰量の一方の抗原結合タンパク質が、競合結合アッセイにおいて測定して、もう一方の結合を少なくとも50%、しかし好ましくは75%、90%、またはさらに99%阻害する場合、2つの抗原結合タンパク質は、同じ（または重複する）エピトープに結合する（例えば、Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502を参照）。あるいは、一方の抗原結合タンパク質の結合を低減または排除する抗原における本質的に全てのアミノ酸変異が、もう一方の結合を低減または排除する場合、2つの抗原結合タンパク質は同じエピトープと結合すると見なされる。一方の抗原結合タンパク質の結合を減少または排除するアミノ酸変異のサブセットのみが他方の結合を減少または排除する場合、2つの抗原結合タンパク質は「重複エピトープ」を有するとみなされる。

【0107】

抗体またはその抗原結合ドメインが、結合について、参照抗原結合分子と競合するかどうかを決定するために、上述の結合方法を2つの方向性で実施する。第1の方向性において、参照抗原結合分子を飽和条件下でCD28タンパク質（またはMUC16タンパク質）へ結合させた後、CD28（またはMUC16）分子への試験抗体の結合を評価する。第2の方向性において、試験抗体を飽和条件下でCD28（またはMUC16）分子に結合させた後、参照抗原結合分子のCD28（またはMUC16）分子への結合を評価する。両方向において、第1の（飽和）抗原結合分子のみがCD28（またはMUC16）分子に結合することができる場合、試験抗体および参照抗原結合分子は、CD28（またはMUC16）への結合について、競合すると結論される。当業者によって認識されるように、参照抗原結合分子との結合について競合する抗体は、必ずしも参照抗体と同一のエピトープへ結合するわけではないが、重複しているまたは隣接しているエピトープに結合することによって、参照抗体の結合を立体的に遮断し得る。

【0108】

抗原結合ドメインの調製および二重特異性分子の調製

特定の抗原に特異的な抗原結合ドメインは、当該技術分野で既知の任意の抗体産生技術によって調製することができる。いったん得られれば、2つの異なる抗原（例えば、CD28およびMUC16）に特異的な2つの異なる抗原結合ドメインを互いに適切に配置して、常法を使用して本発明の二重特異性抗原結合分子を産生することができる。（本発明の二重特異性抗原結合分子を構築するために使用できる例示的な二重特異性抗体フォーマットの考察は、本明細書の他所に提供される）。ある特定の実施形態では、本発明の多重特異性抗原結合分子の1つ以上の個々の構成要素（例えば、重鎖および軽鎖）は、キメラ抗体、ヒト化抗体または完全ヒト抗体に由来する。そのような抗体を作製するための方法は当該技術分野において周知である。例えば、本発明の二重特異性抗原結合分子の1つ以

上の重鎖および／または軽鎖は、VELOCIMMUNE（商標）技術を使用して調製することができる。VELOCIMMUNE（商標）技術（または任意の他のヒト抗体産生技術）を使用して、特定の抗原（例えば、CD28またはMUC16）に対する高親和性キメラ抗体が、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有して最初に単離される。抗体を、親和性、選択性、エピトープなどを含む望ましい特徴について特徴付けし、選択する。マウス定常領域は、所望のヒト定常領域と置換されて、本発明の二重特異性抗原結合分子に組み込まれ得る完全ヒト型重鎖および／または軽鎖を生成する。

【0109】

遺伝子操作された動物を、ヒト二重特異性抗原結合分子を作製するために使用してもよい。例えば、内在性マウス免疫グロブリン軽鎖可変配列を再編成および発現することができない、遺伝子改変マウスを使用することができ、マウスは、内在性マウスカッパ遺伝子座のマウスカッパ定常遺伝子に作動可能に連結されているヒト免疫グロブリン配列によってコードされる1つまたは2つのヒト軽鎖可変ドメインのみを発現する。そのような遺伝子改変マウスを使用して、2つの異なるヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントのうちの1つに由来する可変ドメインを含む同一の軽鎖と会合する2つの異なる重鎖を含む完全ヒト型二重特異性抗原結合分子を産生することができる。（そのような操作されたマウスおよび二重特異性抗原結合分子を産生するためのその使用の詳細な議論については、例えば、US2011/0195454を参照）。

【0110】

生物学的等価物

本発明は、記載される抗体のものとは異なるが、CD28および／またはMUC16に結合する能力を保持するアミノ酸配列を有する抗原結合分子を包含する。そのような変異体抗体は、親配列と比較して、アミノ酸の1つ以上の付加、欠失、または置換を含むが、記載された抗原結合分子のものと本質的に同等である生物学的活性を呈する。同様に、本発明の抗体結合分子をコードするDNA配列は、開示された配列と比較して、ヌクレオチドの1つ以上の付加、欠失、または置換を含むが、本発明の記載された抗原結合分子と本質的に生物学的同等性である配列を包含する。そのような変異体アミノ酸およびDNA配列の例は、上で議論されている。

【0111】

本発明は、本明細書に記載の例示的な抗原結合分子のいずれかと生物学的に等価な抗原結合分子を含む。2つの抗原結合タンパク質または抗体は、例えば、それらが類似の実験条件下で単回用量または複数回用量のいずれかで同じモル用量で投与された場合に、吸収速度および吸収の程度が有意差を示さない医薬的等価物または医薬的選択肢である場合、生物学的等価物とみなされる。いくつかの抗体は、これらの吸収の程度は等価であるが吸収速度は等価ではなく、吸収速度のこのような差が意図的であり、標識することに反映されているので生物学的に等価とみなされ得る場合、等価物または薬学的選択肢とみなされることになっており、例えば長期使用に及ぼす有効な身体薬剤濃度の達成に必須ではなく、研究した特定の薬剤製品にとって医学的に有意ではないとみなされる。

【0112】

一実施形態では、2つの抗原結合タンパク質は、これらの安全性、純度、または有効性において臨床的に有意性のある差がない場合、生物学的に等価である。

【0113】

一実施形態では、2つの抗原結合タンパク質は、免疫原性の臨床的に有意な変化または有効性の減退を含む有害作用のリスクの期待される上昇なしで参照生成物と生物学的生成物の間での切り替えなしで持続される療法と比較して、患者が1回以上切り替えられることができる場合、生物学的に等価である。

【0114】

一実施形態では、2つの抗原結合タンパク質は、これらが両方とも、条件または使用条件についての共通の機序または作用機序によって、このような機序が既知である程度まで作用する場合、生物学的に等価である。

10

20

30

40

50

【0115】

生物学的等価性は、インビボおよびインビトロの方法によって実証され得る。生物学的等価性測定法には、例えば、(a) 抗体またはその代謝産物の濃度が血液、血漿、血清、または他の生物学的流体中で時間の関数として測定される、ヒトまたは他の哺乳類におけるインビボでの試験、(b) ヒト生物学的利用能データと関連した、このデータを合理的に予測しているインビトロ試験、(c) 抗体（またはその標的）の適切な急性薬理学的効果が時間の関数として測定されるヒトまたは他の哺乳類におけるインビボ試験、および(d) 抗体の安全性、効能、または生物学的利用能もしくは生物学的等価性を確立する、十分に管理された臨床試験が含まれる。

【0116】

本明細書に示す例示的な二重特異性抗原結合分子の生物学的に等価な変異体は、例えば、残基もしくは配列の種々の置換を生じること、または生物活性に必要とされない末端もしくは内部の残基もしくは配列を欠失することによって構築され得る。例えば、生物学的活性にとって必須ではないシステイン残基は、再生の際の不必要または不正確な分子内ジスルフィド架橋の形成を防止するために、欠失または他のアミノ酸で置換することができる。他の文脈において、生物学的に等価な抗体は、抗体のグリコシル化特性を修飾するアミノ酸変化、例えば、グリコシル化を排除または除去する突然変異を含む、本明細書に記載される例示的な二重特異性抗原結合分子の変異体を含み得る。

【0117】

種の選択性および種の交差反応性

本発明は、ある特定の実施形態によると、ヒトCD28に結合するが、他の種からのCD28には結合しない抗原結合分子を提供する。本発明はまた、ヒトMUC16に結合するが、他の種からのMUC16には結合しない抗原結合分子を提供する。本発明はまた、ヒトCD28および1つ以上の非ヒト種由来のCD28に結合する抗原結合分子、ならびに／またはヒトMUC16および1つ以上の非ヒト種由来のMUC16に結合する抗原結合分子を含む。

【0118】

本発明のある特定の例示的な実施形態によると、ヒトCD28および／またはヒトMUC16に結合し、場合によってはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、スナネズミ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、カニクイザル、マーモセット、アカゲザル、またはチンパンジーのCD28および／またはMUC16のうちの1つ以上に結合するか、または結合しない抗原結合分子が提供される。例えば、本発明の特定の例示的な実施形態において、ヒトCD28およびカニクイザルCD28に結合する第1の抗原結合ドメインと、ヒトMUC16に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

【0119】

免疫複合体

本発明は、細胞毒素、化学療法薬、免疫抑制剤、または放射性同位元素などの治療部分（「免疫結合体」）に複合体化された抗原結合分子を包含する。細胞傷害性薬剤には、細胞に有害な任意の薬剤が含まれる。免疫複合体を形成するために好適な細胞傷害性薬剤および化学療法剤の例は、当該技術分野で知られている（例えば、WO05/103081を参照）。

【0120】

治療用製剤および投与

本発明は、本発明の抗原結合分子を含む薬学的組成物を提供する。本発明の薬学的組成物は、好適な担体、賦形剤、および改善された移動、送達、耐性などを提供する他の薬剤とともに製剤化される。多くの適切な製剤は、薬剤師全員に既知の処方集：Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PAにおいて認めることができる。これらの製剤には、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ワックス、油、脂質、ベシクル（L I

10

20

30

40

50

POFECTIN (商標) など、Life Technologies, Carlsbad, CA) を含有する脂質 (カチオン性またはアニオン性)、DNA 複合体、無水吸収ペースト、水中油エマルジョンおよび油中水エマルジョン、エマルジョンカーボワックス (種々の分子量のポリエチレングリコール)、半固体ゲル、ならびにカーボワックスを含有する半固体混合物が含まれる。Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311 も参照されたい。

【0121】

患者に投与される抗原結合分子の用量は、患者の年齢および大きさ、標的疾患、病態、投与経路などに応じて変動し得る。好ましい用量は、典型的には体重または体表面積に従って計算される。本発明の二重特異性抗原結合分子が成人患者の治療目的に使用される場合、本発明の二重特異性抗原結合分子を通常約 0.01 ~ 約 20 mg / kg 体重の単回投与で、より好ましくは約 0.02 ~ 約 7、約 0.03 ~ 約 5、または約 0.05 ~ 約 3 mg / kg 体重の単回投与で静脈内投与することが有利であり得る。容態の重症度に応じて、治療の頻度および期間を調整することができる。二重特異性抗原結合分子を投与するための有効投与量およびスケジュールは経験的に決定され、例えば、患者の経過を定期的な評価によって監視し、それに応じて用量を調整することができる。さらに、投与量の種間スケールリングは、当該技術分野において周知の方法を用いて実施することができる (例えば、Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351)。

【0122】

種々の送達系、例えば、リボソームにおける封入、微粒子、マイクロカプセル、突然変異体ウイルスを発現することができる組換え細胞、受容体媒介性エンドサイトーシスが知られており、本発明の薬学的組成物を投与するために使用され得る (例えば、Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432 を参照)。導入方法には、皮内経路、経皮経路、筋肉内経路、腹腔内経路、静脈内経路、皮下経路、鼻腔内経路、硬膜外経路および経口経路が含まれるが、これらに限定されない。組成物は、例えば、注入もしくはボーラス注射による、上皮または粘膜皮膚の内層 (lining) (例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜など) を介した吸収による任意の好都合な経路によって投与することができ、他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与することができる。投与は全身または局所であり得る。

【0123】

本発明の薬学的組成物は、標準的な針および注射器を用いて皮下にまたは静脈内に送達することができる。加えて、皮下送達に関して、ペン型送達デバイスは、本発明の薬学的組成物を送達する際の適用を容易にする。このようなペン型送達デバイスは、再利用可能または使い捨て可能であり得る。再利用可能なペン型送達デバイスは、概して、薬学的組成物を含む交換可能なカートリッジを利用する。一度、カートリッジ内の薬学的組成物が全て投与され、カートリッジが空になると、この空のカートリッジは容易に廃棄することができ、薬学的組成物を含む新しいカートリッジと容易に交換することができる。次に、ペン型送達デバイスは再利用することができる。使い捨てのペン型送達デバイスにおいて、交換可能なカートリッジは存在しない。むしろ、使い捨てペン型送達デバイスは、このデバイス内の貯蔵器の中に保持された薬学的組成物が事前に充填されている。貯蔵器から薬学的組成物が空になると、デバイス全体が廃棄される。

【0124】

数多くの再利用可能なペン型送達デバイスおよび自動注射送達デバイスは、本発明の薬学的組成物の皮下送達の用途を有する。例としては、ほんの数例を挙げると、AUTOPEN (商標) (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC (商標) ペン (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25

(商標) ペン、HUMALOG (商標) ペン、HUMALIN 70/30 (商標) ペン (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEN (商標) I、II、およびIII (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEN JUNIOR (商標) (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD (商標) ペン (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN (商標)、OPTIPEN PRO (商標)、OPTIPEN STARLET (商標)、ならびにOPTICLIK (商標) (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany) が含まれるが、これらに限定されない。本発明の薬学的組成物の皮下送達における用途を有する使い捨てペン送達デバイスの例としては、ほんの数例を挙げると、SOLOSTAR (商標) ペン (Sanofi-Aventis)、FLEXPEN (商標) (Novo Nordisk)、およびKWIKPEN (商標) (Eli Lilly)、SURECLICK (商標) 自動注射器 (Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLET (商標) (Haselmeier, Stuttgart, Germany)、EPIPEN (Dey, L. P.)、およびHUMIRA (商標) ペン (Abbott Labs, Abbott Park IL) が含まれるが、これらに限定されない。

【0125】

ある特定の状況において、薬学的組成物は、徐放系で送達することができる。一実施形態では、ポンプを使用することができる (Langer, 上記、Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201を参照されたい)。別の実施形態では、ポリマー材料を使用することができ、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Floridaを参照されたい。さらに別の実施形態では、徐放系を組成物の標的の近傍に配置することができ、それによって全身用量の一部のみが必要となる (例えば、Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, 上記, vol. 2, pp. 115-138を参照)。他の徐放系は、Langer, 1990, Science 249:1527-1533による総説で考察されている。

【0126】

注射可能な調製物には、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、および筋肉内注射、点滴注入などのための剤形が含まれてもよい。これらの注射可能な調製物は、公に知られている方法によって調製され得る。例えば、注射可能な調製物は、例えば、注射用に従来通り使用される滅菌水性媒体または油性媒体中に上述の抗体またはその塩を溶解、懸濁または乳化させることによって調製されてもよい。注射用水性媒体としては、例えば、生理食塩水、グルコース含有等張液、および他の補助剤などがあり、これらは、アルコール (例えば、エタノール)、ポリアルコール (例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤 [例えば、ポリソルベート80、HCO-50 (水素化ヒマシ油のポリオキシエチレン (50mol) 付加物)] などの適切な可溶化剤と組み合わせて使用してもよい。油性媒体として、例えば、ゴマ油、ダイズ油などが使用され、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどの可溶化剤と組み合わせて使用してもよい。このように調製された注射は、好ましくは適切なアンプルに充填される。

【0127】

有益なことに、上記に記載される経口または非経口での使用のための薬学的組成物は、有効成分の用量に適合するために好適な単位用量の投薬形態へと調製される。このような単位用量の剤形には、例えば、錠剤、ピル、カプセル、注射 (アンプル)、坐薬などが含まれる。前述の含有される抗体の量は概して、単位用量の剤形あたり約5~約500mgであり、特に注射の形態では、前述の抗体は、約5~約100mgで、他の剤形については約10~約250mgで含有されることが好ましい。

【0128】

抗原結合分子の治療的使用

本発明は、抗CD28抗体またはCD28および標的抗原（例えば、MUC16）に特異的に結合する二重特異性抗原結合分子を含む治療用組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む方法を含む。治療用組成物は、本明細書に開示される抗体または二重特異性抗原結合分子のいずれかと薬学的に許容される担体または希釈剤とを含み得る。本明細書で使用される場合、「それを必要とする対象」という表現は、癌の1つ以上の症状または徴候を示すヒトまたは非ヒト動物（例えば、腫瘍を発現する対象または本明細書で後述される癌のいずれかを患う対象）、あるいは、そうでなければMUC16活性の阻害もしくは減少またはMUC16+細胞の枯渇から利益を得る者を意味する。

【0129】

本発明の抗体および二重特異性抗原結合分子（およびそれを含む治療用組成物）は、とりわけ、免疫応答の刺激、活性化、および／または標的化が有益である任意の疾患または障害の治療に有用である。特に、本発明の抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子は、MUC16発現もしくは活性、またはMUC16+細胞の増殖に関連するかまたはそれによって媒介される任意の疾患または障害の治療、予防、および／または改善に使用され得る。本発明の治療方法が達成される作用機序は、エフェクター細胞、例えば、T細胞の存在下での、MUC16を発現する細胞の殺滅を含む。本発明の二重特異性抗原結合分子を使用して阻害または殺滅することができるMUC16を発現する細胞には、例えば、腫瘍原性卵巣細胞が含まれる。

【0130】

本発明の抗原結合分子は、例えば、結腸癌、肺癌、乳癌、腎癌、および膀胱癌のサブタイプで生じる原発性および／または転移性腫瘍を治療するために使用され得る。ある特定の例示的な実施形態によると、本発明の二重特異性抗原結合分子は、卵巣癌を治療するために使用される。

【0131】

本発明はまた、対象における残存癌を治療するための方法も含む。本明細書で使用される場合、「残存癌」という用語は、抗癌療法による治療後の対象における1つ以上の癌性細胞の存在または持続を意味する。

【0132】

ある特定の態様によると、本発明は、対象が他の種類の抗癌療法に対して非応答性であることが示された後、本明細書の他所に記載される二重特異性抗原結合分子のうちの1つ以上を対象に投与することを含む、MUC16発現に関連する疾患または障害（例えば、卵巣癌などのMUC16発現癌）を治療するための方法を提供する。例えば、本発明は、対象が癌、例えば、卵巣癌に罹患している患者のための標準治療を受けてから1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間、もしくは4週間、2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月、8ヶ月、1年、またはそれ以上後に、抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子を患者に投与することを含む、卵巣癌を治療するための方法を含む。他の態様では、IgG4 Fcドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子（抗CD28／抗MUC16二重特異性抗原結合分子）は、最初に、1つ以上の時点で対象に投与され（例えば、卵巣癌細胞のロバストな初期枯渇を提供するため）、その後の時点で、IgG1 Fcドメインなどの異なるIgGドメインを含む等価の二重特異性抗原結合分子が投与される。本発明の抗CD28／抗MUC16抗体は、抗PSMA／抗MUC16二重特異性抗体などの他の二重特異性抗原結合分子と併せて使用されることが想定される。本発明の二重特異性抗体は、チェックポイント阻害剤、例えば、PD-1およびCTLA-4を標的とするもの、および他の標的と併せて使用されることも想定されている。同じ腫瘍抗原（例えば、MUC16）を標的とする2つの二重特異性抗体を組み合わせることが有利であり得るが、二重特異性抗体のうちの一方は、T細胞上のCD3を標的とし、もう一方の二重特異性抗体は、CD28のような共刺激分子を標的とする。この組み合わせは、腫瘍細胞殺滅を強化するために単独で使用するができるか、またはチェックポイント阻害剤と組み合わせ使用することができる。

10

20

30

40

50

【0133】

例示的なMUC16発現癌には、卵巣癌、乳癌、子宮内膜癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、肝内胆管細胞癌腫瘍形成型、子宮頸部の腺癌、および胃腸管の腺癌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0134】

併用療法および製剤

本発明は、本明細書に記載される例示的な抗体および二重特異性抗原結合分子のうちのいずれかを、1つ以上の追加の治療活性成分と組み合わせて含む組成物および治療用製剤、ならびにそのような組み合わせを、それを必要とする対象に投与することを含む治療方法を含む。

【0135】

本発明の抗原結合分子と組み合わせることができるか、またはそれと組み合わせて投与することができる例示的な追加の治療薬には、例えば、化学療法、放射線療法、PD-1を標的とするチェックポイント阻害剤（例えば、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、またはセンプリマブなどの抗PD-1抗体、US9,987,500を参照）、CTLA-4、LAG3、TIM3など、GITR、OX40、4-1BBなどの分子を標的とする共刺激アゴニスト二価抗体、CD3×二重特異性抗体（例えば、WO2017/053856A1、WO2014/047231A1、WO2018/067331A1、およびWO2018/058001A1を参照）、MUC16×CD3を標的とする他の抗体（例えば、WO2017/053856A1を参照）および他の共刺激CD28×二重特異性抗体が含まれる。

【0136】

本発明の抗体と組み合わせて有益に投与され得る他の薬剤には、例えば、タモキシフェン、アロマターゼ阻害剤、ならびに小分子サイトカイン阻害剤およびIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18などのサイトカイン、またはそれらそれぞれの受容体に結合する抗体を含むサイトカイン阻害剤が含まれる。本発明の薬学的組成物（例えば、本明細書に開示される抗CD28/抗MUC16二重特異性抗原結合分子を含む薬学的組成物）はまた、「ICE」：イホスファミド（例えば、Ifex（登録商標））、カルボプラチン（例えば、Paraplatin（登録商標））、エトポシド（例えば、Etopophos（登録商標）、Toposar（登録商標）、VePesid（登録商標）、VP-16）、「DHAP」：デキサメタゾン（例えば、Decadron（登録商標））、シタラビン（例えば、Cytosar-U（登録商標）、シトシンアラビノシド、ara-C）、シスプラチン（例えば、Platinol（登録商標）-AQ）、および「ESHAP」：エトポシド（例えば、Etopofos（登録商標）、Toposar（登録商標）、VePesid（登録商標）、VP-16）、メチルプレドニゾン（例えば、Medrol（登録商標））、高用量シタラビン、シスプラチン（例えば、Platinol（登録商標）-AQ）から選択される1つ以上の治療薬の組み合わせを含む治療レジメンの一部として投与され得る。

【0137】

本発明はまた、本明細書で言及される抗原結合分子のうちのいずれか、およびVEGF、Ang2、DLL4、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFRvII、cMet、IGF1R、Braf、PDGFR- α 、PDGFR- β 、FOLH1、PRLR、STEAP1、STEAP2、TMPRSS2、MSLN、CA9、ウロプラキンのうちの1つ以上の阻害剤、または前述のサイトカインのうちのいずれかを含む治療薬の組み合わせを含み、その阻害剤は、アプタマー、アンチセンス分子、リボザイム、siRNA、ペプチボディ、ナノボディ、または抗体フラグメント（例えば、Fabフラグメント；F(ab')₂フラグメント；Fdフラグメント；Fvフラグメント；scFv；dAbフラグメント；もしくはダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、および最小認識ユニットなどの他の操作された分子）である。本発明の抗原結合分

10

20

30

40

50

子は、抗ウイルス薬、抗生物質、鎮痛薬、コルチコステロイドおよび／またはNSAIDと組み合わせて投与および／または同時製剤することもできる。本発明の抗原結合分子はまた、放射線治療および／もしくは従来の化学療法、またはチェックポイント阻害剤もしくは他の二重特異性抗体を含む生物学的薬剤による治療も含む、治療計画の一部として投与してもよい。

【0138】

本発明は、1つ以上の化学療法剤と組み合わせて、本明細書に記載される抗原結合分子のうちのいずれかを含む組成物および治療用製剤を含む。化学療法剤の例には、チオテパおよびシクロホスファミド (Cytosan (商標)) などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、およびピポスルファンなどのアルキルスルホネート；ベンゾドールパ、カルボクオン、メツレドールパ、およびウレドールパなどのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスファオラミド、およびトリメチルオロメラミンを含むエチレンイミンおよびメチルアメラミン；クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソウレア；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オートラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ- ϵ -ノルロイシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、マイコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、プロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルビシンなどの抗生物質；メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル (5-FU) などの代謝拮抗剤；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジンなどのピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストトラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎；フロリン酸などの葉酸補充剤；アセグラトン；アルドホスファミド配糖体；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート (edatraxate)；デフォファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エフロルニチン；酢酸エリブチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK (商標)；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2'-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン；アラビノシド (「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキサン、例えばパクリタキセル (Taxol (商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.) およびドセタキセル (Taxotere (商標)；Aventis Antony, France)；クロラムブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチンおよびカルボプラチンなどの白金類似体；ビンブラスチン；白金；エトポシド (VP-16)；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ビノレルビン；ナベルピン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT-11；トポイソメラーゼ阻

10

20

30

40

50

害剤 R F S 2 0 0 0 ; ジフルオロメチルオルニチン (D M F O) ; レチノイン酸 ; エスペラミシン ; カペシタビン ; および上記のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。この定義には、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害 4 (5) - イミダゾール、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストン、およびトレミフェン (F a r e s t o n) を含む抗エストロゲンなどの腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤 ; フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンなどの抗アンドロゲン ; ならびに上記のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体も含まれる。

【 0 1 3 9 】

追加の治療活性成分 (複数可) は、本発明の抗原結合分子の投与の直前、同時に、または直後に投与してもよい。(本開示の目的のために、このような投与計画は、追加の治療活性成分と「組み合わせる」抗原結合分子を投与することとみなされる。

【 0 1 4 0 】

本発明は、本発明の抗原結合分子が、本明細書の他所に記載される追加の治療活性成分 (複数可) のうちの 1 つ以上と同時に製剤された薬学的組成物を含む。

【 0 1 4 1 】

投与レジメン

本発明のある特定の実施形態によると、複数回用量の抗原結合分子 (例えば、M U C 1 6 および C D 2 8 に特異的に結合する抗 C D 2 8 抗体または二重特異性抗原結合分子) を所定の期間にわたって対象に投与することができる。本発明のこの態様による方法は、本発明の抗原結合分子の複数回用量を対象へ連続的に投与することを含む。本明細書で 사용되는場合、「連続的に投与すること」は、抗原結合分子の各用量が、異なる時点、例えば、所定の間隔 (例えば、数時間、数日間、数週間または数か月間) によって分けられた異なる日に対象へ投与されることを意味する。本発明には、抗原結合分子の単回の初回用量と、それに続く抗原結合分子の 1 回以上の二次用量、次いで場合により抗原結合分子の 1 回以上の三次用量を患者へ連続的に投与することを含む方法が含まれる。

【 0 1 4 2 】

「一次用量」、「二次用量」、および「三次用量」という用語は、本発明の抗原結合分子の投与の時系列を指す。したがって、「一次用量」とは、治療様式の開始時に投与される用量 (「ベースライン用量」とも呼ばれる) であり、「二次用量」とは、一次用量後に投与される用量であり、「三次用量」とは、二次用量後に投与される用量である。一次用量、二次用量、および三次用量は全て、同じ量の抗原結合分子を含有し得るが、概して、投与頻度に関して互いに異なり得る。しかしながら、ある特定の実施形態では、一次用量、二次用量、および / または三次用量に含有される抗原結合分子の量は、治療経過の間、互いに異なる (例えば、適宜上下に調整される) 。ある特定の実施形態では、2 回以上 (例えば、2 回、3 回、4 回、または 5 回) の用量が治療レジメンの開始時において「負荷用量 (l o a d i n g d o s e) 」として投与され、続いてより低い頻度に基づいて投与される後続用量 (例えば、「維持用量」) が投与される。

【 0 1 4 3 】

本発明のある例示的な実施形態では、各二次用量および / または三次用量は、直前の用量の 1 ~ 2 6 (例えば、1、1 と 1 / 2、2、2 と 1 / 2、3、3 と 1 / 2、4、4 と 1 / 2、5、5 と 1 / 2、6、6 と 1 / 2、7、7 と 1 / 2、8、8 と 1 / 2、9、9 と 1 / 2、1 0、1 0 と 1 / 2、1 1、1 1 と 1 / 2、1 2、1 2 と 1 / 2、1 3、1 3 と 1 / 2、1 4、1 4 と 1 / 2、1 5、1 5 と 1 / 2、1 6、1 6 と 1 / 2、1 7、1 7 と 1 / 2、1 8、1 8 と 1 / 2、1 9、1 9 と 1 / 2、2 0、2 0 と 1 / 2、2 1、2 1 と 1 / 2、2 2、2 2 と 1 / 2、2 3、2 3 と 1 / 2、2 4、2 4 と 1 / 2、2 5、2 5 と 1 / 2、2 6、2 6 と 1 / 2、またはそれ以上) 週間後に投与される。「直前の用量」という句は、本明細書で 사용되는場合、一連の複数回投与において、抗原結合分子の用量を意味し、これは、介入用量のない直後の用量の投与の前に患者へ投与される。

10

20

30

40

50

【0144】

本発明のこの態様による方法は、抗原結合分子（例えば、MUC16およびCD28に特異的に結合する抗CD28抗体または二重特異性抗原結合分子）の二次用量および／または三次用量の任意の回数を患者に投与することを含んでもよい。例えば、ある特定の実施形態では、単回の二次用量のみが患者に投与される。他の実施形態では、2回以上（例えば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回またはそれ以上）の二次用量が患者に投与される。同様に、ある特定の実施形態では、単回の三次用量のみが患者に投与される。他の実施形態では、2回以上（例えば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回またはそれ以上）の三次用量が患者に投与される。

【0145】

複数回の二次用量を伴う実施形態では、各二次用量は、他の二次用量と同じ頻度で投与され得る。例えば、各二次用量は、直前の用量の1～2週間後に患者に投与されてもよい。同様に、複数の三次用量を含む実施形態では、各三次用量は、他の三次用量と同じ頻度で投与されてもよい。例えば、各三次用量は、直前の用量の2～4週間後に患者に投与されてもよい。あるいは、二次用量および／または三次用量が患者へ投与される頻度は、治療計画の経過にわたって変動し得る。投与頻度はまた、臨床検査後の個々の患者の必要性に応じて、医師によって治療経過の間に調整され得る。

【0146】

一実施形態では、抗原結合分子（例えば、MUC16およびCD28に特異的に結合する二重特異性抗原結合分子）は、体重に基づく用量として対象に投与される。「体重に基づく用量」（例えば、mg/kg単位の用量）は、対象の体重に応じて変化することになる抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは二重特異性抗原結合分子の用量である。

【0147】

別の実施形態では、抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは二重特異性抗原結合分子は、固定用量として対象に投与される。「固定用量」（例えば、mg単位の用量）は、抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは二重特異性抗原結合分子の1用量が、体重などのいずれの特定の対象関連因子にも関係なく、全ての対象に使用されることを意味する。ある特定の実施形態では、本発明の抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは二重特異性抗原結合分子の固定用量は、所定の重量または年齢に基づく。

【0148】

概して、本発明の抗原結合分子の好適な用量は、レシピエントの体重1キログラムあたり約0.001～約200.0ミリグラムの範囲、概して体重1キログラムあたり約1～50mgの範囲であり得る。例えば、抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは二重特異性抗原結合分子は、単回用量あたり約0.1mg/kg、約0.2mg/kg、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約1.5mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約40mg/kg、約50mg/kgで投与され得る。列挙した値の中間の値および範囲も本発明の一部であることを意図している。

【0149】

いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合分子は、約25mg～約2500mgの固定用量として投与される。いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合分子は、約25mg、約30mg、約50mg、約75mg、約100mg、約125mg、約150mg、約175mg、200mg、約225mg、約250mg、約275mg、約300mg、約325mg、約350mg、約375mg、約400mg、約425mg、約450mg、約475mg、約500mg、約525mg、約550mg、約575mg、約600mg、約625mg、約650mg、約675mg、約700mg、約725mg、約750mg、約775mg、約800mg、約825mg、約850mg、約875mg、約900mg、約925mg、約950mg、約975mg、約1000mg、約1500mg、約2000mg、または約2500mgの固定用量として投与される。列挙した値の中間の値および範囲も本発明の一部であることを意図している。

【0150】

抗体の診断的使用

本発明の二重特異性抗体はまた、例えば、診断目的のために、試料中のCD28もしくはMUC16またはCD28発現細胞もしくはMUC16発現細胞を検出および／または測定するために使用することができる。例えば、抗CD28抗体×MUC16抗体、またはそのフラグメントを使用して、CD28またはMUC16の異常な発現（例えば、過剰発現、過少発現、発現の欠如など）を特徴とする病態または疾患を診断してもよい。CD28またはMUC16についての例示的な診断アッセイは、例えば、患者から得られた試料を本発明の抗体と接触させることを含んでもよく、抗体は、検出可能な標識またはレポーター分子で標識されている。あるいは、標識されていない抗体は、それ自体が検出可能に標識された二次抗体と組み合わせて診断用途において使用することができる。検出可能な標識またはレポーター分子は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、もしくは ^{125}I などの放射性同位体、フルオレセインイソチオシアナートもしくはローダミンなどの蛍光部分もしくは化学発光部分、またはアルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、もしくはルシフェラーゼなどの酵素であり得る。試料中のCD28またはMUC16を検出または測定するために使用することができる具体的な例示的なアッセイには、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、および蛍光活性化細胞選別（FACS）が含まれる。本発明によるCD28またはMUC16診断アッセイにおいて使用することができる試料には、正常条件または病理学的条件下で、検出可能な量のCD28もしくはMUC16タンパク質またはそのフラグメントを含有する、患者から得ることのできる任意の組織または体液試料が含まれる。一般に、健常な患者（例えば、異常なCD28もしくはMUC16のレベルもしくは活性と関連した疾患もしくは病態に罹患していない患者）から得られた特定の試料中のCD28またはMUC16のレベルを測定して、CD28またはMUC16のベースラインレベルまたは標準レベルを最初に確立する。次いで、このCD28またはMUC16のベースラインレベルを、CD28またはMUC16に関連する疾患または病態を有することが疑われる個体から得られた試料において測定されたCD28またはMUC16のレベルと比較することができる。

【実施例】

【0151】

以下の実施例は、本発明の方法および組成物をどのように作製および使用するかに関する完全な開示および説明を当業者に提供するために提示されており、本発明者らが本発明とみなすことの範囲を限定することを企図するものではない。使用される数値（例えば、量、温度など）に関して正確性を確保するための努力はしてきたが、いくつかの実験上の誤差および偏差が考慮されるべきである。別段示されない限り、部は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏度であり、圧力は大気圧またはそれに近い圧力である。

【0152】

背景

T細胞の活性化は、T細胞受容体（TCR）／CD3複合体がペプチド-MHC複合体に結合すると開始される（「シグナル1」）。次に、活性化は、標的細胞上の同族のリガンド（複数可）に結合するT細胞上のCD28受容体などの第2の「共刺激」受容体の係合によって強化される（「シグナル2」）。最近記載されたCD3ベースの「二重特異性」は、従来のシグナル1を置き換え、腫瘍特異的抗原（TSA）を二重特異性の一方のアームに結合してT細胞を腫瘍細胞に結合し、もう一方のアームでTCR／CD3にブリッジすることによって作用する。これらのいわゆるTSA×CD3二重特異性抗体のうちのいくつかは、癌患者において有望な抗腫瘍効果を示したが、それらの活性は、まだ最適化されていない。本明細書の他所に記載されるように、本発明において導入されるのは、第2のTSAをT細胞上の共刺激CD28受容体に架橋することによってシグナル2を模倣する新規クラスの二重特異性抗体である。これらの二重特異性抗体は、TSA×CD28二重特異性抗体と呼称された。本明細書に記載されるように、本発明の1つの例示的な抗

体は、卵巣癌抗原（例えば、MUC16）に特異的である。T細胞を広く活性化し、初期の臨床試験で重篤な毒性をもたらしたCD28スーパーアゴニストとは異なり、これらのTSA×CD28二重特異性抗体は、遺伝的にヒト化された免疫担当マウスモデルまたは霊長類において単独で使用した場合、限られた活性を示し、毒性はない。しかしながら、TSA×CD3二重特異性抗体と組み合わせると、本発明の例示的な抗体は、T細胞とその標的細胞との間の人工シナプスを強化し、T細胞活性化を増強し、様々な異種および同系腫瘍モデルにおけるCD3二重特異性抗体の抗腫瘍活性を著しく改善した。この新規クラスのCD28共刺激二重特異性抗体を、新たなクラスのTSA×CD3二重特異性抗体と組み合わせると、耐容性の高い「既製の」抗体療法が提供され、抗腫瘍効果が強化される可能性がある。

10

【0153】

ウイルスに感染した細胞または腫瘍細胞などの細胞標的を認識して殺滅するT細胞の能力は、相互作用の調整されたセットに依存する。これらの中で最も重要なのは、TCR複合体（関連するCD3 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 鎖を含む）による標的細胞の認識および結合である。この相互作用は、T細胞活性化の「シグナル1」と称されている。TCRは、標的細胞の表面上で発現されるMHCタンパク質の溝に存在するウイルスまたは腫瘍ペプチドを認識することができる。この結合は通常、親和性が低くなり、したがって、シグナル1のトリガーを成功させるには、T細胞とその標的細胞との間のインターフェースに沿って多くのTCR複合体をクラスター化することが必要とされ、このインターフェースは、免疫シナプスと称されている（J. B. Huppa, M. M. Davis, T-cell antigen recognition and the immunological synapse. Nat Rev Immunol 3, 973–983 (2003)）。次いで、T細胞の活性化および増殖は、CD28（「シグナル2」）などの共刺激受容体との追加の相互作用によってさらに促進される（J. H. Esensten, Y. A. Helou, G. Chopra, A. Weiss, J. A. Bluestone, CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. Immunity 44, 973–988 (2016)）。T細胞がTCR複合体を介して標的細胞を認識し、プロフェッショナル抗原提示細胞または標的細胞上のその同族リガンド（複数可）（CD80/B7.1および/もしくはCD86/B7.2）に結合するCD28を介してシグナル2と係合する場合、T細胞の活性化が強化される。シグナル1と同様に、CD28を介したシグナル2は、免疫シナプスでの共クラスター化を介して発生すると考えられている。

20

30

【0154】

腫瘍特異的抗原（TSA）を標的とする従来のモノクローナル抗体は、過去20年間にわたって抗腫瘍治療薬として使用されてきた（G. Salles et al., Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. Adv Ther 34, 2232–2273 (2017)、M. V. Mateos et al., Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. N Engl J Med 378, 518–528 (2018)；W. Eiermann, G. International Herceptin Study, Trastuzumab combined with chemotherapy for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer: pivotal trial data. Ann Oncol 12 Suppl 1, S57–62 (2001)、J. M. Connors et al., Brentuximab Vedotin with Chemotherapy for Stage III or IV Hodgkin's Lymphoma. N Engl J Med 378, 331–344 (2018)、V. Dieras et al., Trastuzumab emtansine versus capecitabine pl

40

50

us lapatinib in patients with previously treated HER2-positive advanced breast cancer (EMILIA): a descriptive analysis of final overall survival results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18, 732-742 (2017)). しかしながら、このクラスの抗体は、T細胞媒介性細胞傷害を誘発する能力が限られており、代わりに抗体依存性細胞傷害 (ADCC) および／もしくは補体依存性細胞傷害 (CDC) を促進するか、または腫瘍細胞に毒素を送達することによって作用した。最近、T細胞を腫瘍細胞に結合し、代理機序を介して (通常はCD3のe鎖を介して) CD3/TCR複合体を活性化し、したがってシグナル1を模倣することによって、腫瘍細胞のT細胞を介した殺滅を効率的に誘発できる新しいクラスの二重特異性抗体 (TSA×CD3) が出現した。そのような二重特異性抗体の初期バージョン (一方のアームは白血病細胞上のCD19に結合し、もう一方のアームはCD3に結合する) は最近、B細胞急性リンパ芽球性白血病に対して規制当局の承認を受けた (R. Bargou et al., Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell engaging antibody. *Science* 321, 974-977 (2008)、H. Kantarjian et al., Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 376, 836-847 (2017))。最近、より高度なバージョンの二重特異性抗体が、非ホジキンリンパ腫に対して良好な活性を有し、これらのリンパ腫上のCD20を標的とすることを示した (E. J. Smith et al., A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys. *Sci Rep* 5, 17943 (2015)、L. L. Sun et al., Anti-CD20/CD3 T cell-dependent bispecific antibody for the treatment of B cell malignancies. *Sci Transl Med* 7, 287ra270 (2015)、M. Bacac et al., CD20-TCB with Obinutuzumab Pretreatment as Next-Generation Treatment of Hematologic Malignancies. *Clin Cancer Res* 24, 4785-4797 (2018)、R. Bannerji et al., Emerging Clinical Activity of REGN1979, an Anti-CD20×Anti-CD3 Bispecific Antibody, in Patients with Relapsed/Refractory Follicular Lymphoma (FL), Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL), and Other B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (B-NHL) Subtypes. *American Society of Hematology*, (2018)、L. Budde et al., Mosunetuzumab, a Full-Length Bispecific CD20/CD3 Antibody, Displays Clinical Activity in Relapsed/Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (NHL): Interim Safety and Efficacy Results from a Phase 1 Study. *American Society of Hematology*, (2018))。しかしながら、TSA×CD3二重特異性抗体は、血液悪性腫瘍における重要な新しいクラスの免疫療法として浮上しているが、横断研究の比較 (E. A. Zhukovsky, R. J. Morse, M. V. Maus, Bispecific antibodies and CARs: generalized immunot

10

20

30

40

50

herapeutics harnessing T cell redirection. *Curr Opin Immunol* 40, 24–35 (2016)) は、場合によっては、個別化されたキメラ抗原受容体T細胞(CAR-T)療法で見られるレベルの有効性を達成できない可能性があることを示唆している。

【0155】

CAR-T療法の強力な有効性の理由のうちの1つは、キメラ抗原受容体(CAR)が、腫瘍細胞上のその標的に結合する際に、シグナル1(CD3ζ細胞ドメインの一部を介して)およびシグナル2(例えば、CD28細胞ドメインの一部を介して)の両方を提供するように操作されていることである。2つのCAR-T細胞療法は最近、B細胞悪性腫瘍についてFDAの承認を受け、どちらも抗原CD19に結合して標的化することによって作用する(S. S. Neelapu et al., *Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B Cell Lymphoma*. *N Engl J Med* 377, 2531–2544 (2017)、S. J. Schuster et al., *Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas*. *N Engl J Med* 377, 2545–2554 (2017))。CAR-T細胞アプローチは、サイトカイン放出症候群(CRS)および神経毒性などの重篤な有害作用(S. S. Neelapu et al., *Chimeric antigen receptor T-cell therapy—assessment and management of toxicities*. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 47–62 (2018)、J. Gust et al., *Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells*. *Cancer Discov* 7, 1404–1419 (2017)、A. Shimabukuro-Vornhagen et al., *Cytokine release syndrome*. *J Immunother Cancer* 6, 56 (2018))、ならびに高度に個別化された製造プロセスおよび化学療法レジメンを事前調整するための要件に起因して関連付けることができ(S. S. Neelapu et al., *Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B Cell Lymphoma*. *N Engl J Med* 377, 2531–2544 (2017)、S. J. Schuster et al., *Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas*. *N Engl J Med* 377, 2545–2554 (2017)、P. Salmikangas, N. Kinsella, P. Chamberlain, *Chimeric Antigen Receptor T-Cells (CART-Cells) for Cancer Immunotherapy—Moving Target for Industry?* *Pharm Res* 35, 152 (2018))、多くの患者は適切な候補とは見なされない。

【0156】

TSA×CD3二重特異性抗体の、より広い患者集団に対する比較的耐容性が高く「既製の」治療ソリューションとしての利点は、抗腫瘍活性をさらに最適化できれば、特に耐容性を犠牲にすることなく実行できれば、さらに向上するか、または恐らく正常細胞とは対照的に、腫瘍細胞に対する特異性がさらに高まる。この目的に向けて、TSA×CD3二重特異性抗体を、シグナル2を独立して活性化する新規クラスの二重特異性抗体と対合すると、可能性のある有効性の向上と特異性の強化の機会がもたらされる可能性があるとの仮説が立てられた。したがって、第2のクラスの二重特異性抗体が設計された。これらの二重特異性抗体は、T細胞上で発現される共刺激受容体CD28(TSA×CD28二重特異性抗体)とともに、同じ腫瘍特異的抗原上の第2のエピトープまたは第2の別個の腫瘍抗原のいずれかに係合する可能性がある。TSA1×CD3とTSA2×CD28と

を組み合わせると、シグナル1およびシグナル2の両方をトリガーすることによって、T細胞の誘導され強化された代理活性化が可能になり、特異性は両方のエピトープまたは両方の抗原を発現する腫瘍細胞のみを標的とし、特異性を高める機会とともに、より大きな抗腫瘍活性を可能にするはずであると考えられた。

【0157】

卵巣癌を標的とするTSA×CD28共刺激二重特異性抗体（ケラチン癌において高レベルで発現される大型の膜内糖タンパク質であるMUC16に結合し（H. Suh, K. Pillai, D. L. Morris, Mucins in pancreatic cancer: biological role, implications in carcinogenesis and applications in diagnosis and therapy. Am J Cancer Res 7, 1372-1383 (2017)）、切断されて卵巣腫瘍バイオマーカーCA-125を放出する（I. Mylonas et al., Immunohistochemical expression of the tumour marker CA-125 in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue. Anticancer Res 23, 1075-1080 (2003)）MUC16×CD28）の生成および試験が本明細書に記載される。遺伝的にヒト化された免疫担当マウスおよびカニクイザルにおける毒性学研究は、これらの二重特異性抗体に限られた活性を呈し、単剤として毒性を呈しないことを実証する。しかしながら、これらの新規共刺激二重特異性抗体は、TSA×CD3二重特異性抗体の新しいクラスと効果的に組み合わせ、異種腫瘍モデルと同系腫瘍モデルとの両方における抗腫瘍反応を増強することができる。まとめると、これらのデータは、この新規クラスのCD28ベースの二重特異性抗体（TSA×CD28）をCD3ベースの二重特異性抗体（TSA×CD3）と組み合わせると、著しく強化された相乗的な抗腫瘍活性を備えた、相容性の高い「既製の」生物製剤ソリューションを提供できることを示唆している。

【0158】

実施例1. 抗MUC16×CD28抗体の構築

抗CD28抗体の生成

抗CD28抗体は、VELOCIIMMUNE（登録商標）マウス（すなわち、ヒト免疫グロブリン重鎖およびκ軽鎖可変領域をコードするDNAを含む操作されたマウス）を、マウスIgG2aのFc部分に融合されたヒトCD28で免疫するか、またはCD28を発現する細胞またはCD28をコードするDNAで免疫することによって得た。抗体免疫応答を、CD28特異的イムノアッセイによって監視した。所望の免疫応答が達成されたとき、脾細胞を採取し、マウス骨髄腫細胞と融合させて、それらの生存率を維持し、ハイブリドーマ細胞株を形成した。ハイブリドーマ細胞株をスクリーニングおよび選択して、CD28特異的抗体を産生する細胞株を同定した。この技法を使用して、いくつかの抗CD28キメラ抗体（すなわち、ヒト可変ドメインおよびマウス定常ドメインを有する抗体）を得た。さらに、US2007/0280945A1に記載されるように、いくつかの完全ヒト抗CD28抗体を、骨髄腫細胞に融合させることなく抗原陽性B細胞から直接単離した。

【0159】

本実施例の方法に従って生成された例示的な抗CD28抗体のある特定の生物学的特性を、以下に記載される実施例において詳細に説明する。

【0160】

抗MUC16抗体の生成

抗MUC16抗体は、遺伝子改変マウスをヒトMUC16抗原で免疫することによって、またはヒト免疫グロブリン重鎖およびκ軽鎖可変領域をコードするDNAを含む操作されたマウスをヒトMUC16抗原で免疫することによって得た。

【0161】

遺伝子改変マウスをhMUC16.nub（ムチン16（配列番号49）の最後の5つ

の S E A ドメイン包含する切断型形態) で免疫するか、または O V C A R - 3 細胞などの h M U C 1 6 発現細胞株で免疫した。免疫後、各マウスから脾細胞を採取して、(1) マウス骨髄腫細胞と融合してそれらの生存率を維持し、ハイブリドーマ細胞を形成して M U C 1 6 特異性についてスクリーニングし、または(2) 反応性抗体(抗原陽性 B 細胞) に結合して同定する選別試薬としてヒト M U C 1 6 フラグメントを用いて、B 細胞を選別した(U S 2 0 0 7 / 0 2 8 0 9 4 5 A 1 に記載のとおり)。

【0162】

ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する M U C 1 6 2 に対するキメラ抗体を最初に単離した。抗体を、親和性、選択性などを含む望ましい特徴について特徴付けし選択する。必要ならば、マウス定常領域を所望のヒト定常領域、例えば野生型または改変 I g G 1 または I g G 4 定常領域と置き換えて、完全ヒト型抗 M U C 1 6 抗体を産生した。選択される定常領域は特異的用途に応じて変化し得るが、高親和性抗原結合特徴および標的特異性特徴は、可変領域に存在する。

【0163】

本実施例の方法に従って産生された例示的な抗 M U C 1 6 抗体の特定の生物学的特性を、以下に示す実施例において詳細に説明する。

【0164】

C D 2 8 および M U C 1 6 に結合する二重特異性抗体の生成

抗 M U C 1 6 特異的結合ドメインおよび抗 C D 2 8 特異的結合ドメインを含む二重特異性抗体を、標準的な方法を用いて構築し、ここで、抗 M U C 1 6 抗原結合ドメインおよび抗 C D 2 8 抗原結合ドメインはそれぞれ、共通の L C V R と対をなす異なる別個の H C V R を含む。場合によっては、二重特異性抗体は、抗 C D 2 8 抗体からの重鎖、抗 M U C 1 6 抗体からの重鎖、および共通の軽鎖を利用して構築した(表 5 を参照)。

【0165】

本実施例に従って作成された二重特異性抗体は、2つの別個の抗原結合ドメイン(すなわち、結合アーム)を含む。第1の抗原結合ドメインは、抗 C D 2 8 抗体(「C D 2 8 - V H」)に由来する重鎖可変領域を含み、第2の抗原結合ドメインは、抗 M U C 1 6 抗体(「M U C 1 6 - V H」)に由来する重鎖可変領域を含む。抗 M U C 1 6 および抗 C D 2 8 の両方が、共通の軽鎖を共有する。C D 2 8 - V H / M U C 1 6 - V H 対合は、T 細胞上の C D 2 8 および腫瘍細胞上の M U C 1 6 を特異的に認識する抗原結合ドメインを作成する。

【0166】

実施例 2 . 重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列および核酸配列

表 1 は、選択された本発明の抗 M U C 1 6 抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域ならびに C D R のアミノ酸配列識別子を示す。対応する核酸配列識別子を表 2 に記載する。

【表 2】

表 1 : M U C 1 6 抗体のアミノ酸配列識別子

抗体名	配列番号:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb8799P2	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb8794P2	26	28	30	32	34	36	38	40

【表 3】

表 2 : M U C 1 6 抗体の核酸配列識別子

抗体名	配列番号:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb8799P2	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb8794P2	25	27	29	31	33	35	37	39

【0167】

表 3 は、本発明の選択された抗 C D 2 8 抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域（H C V R および L C V R）ならびに C D R のアミノ酸配列識別子を示す。対応する核酸配列識別子を表 4 に示す。

【表 4】

表 3：C D 2 8 抗体のアミノ酸配列識別子

抗体名	配列番号:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb14226P2	18	20	22	24	10	12	14	16
mAb14216P2	42	44	46	48	34	36	38	40

10

【表 5】

表 4：C D 2 8 抗体の核酸配列識別子

抗体名	配列番号:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb14226P2	17	19	21	23	9	11	13	15
mAb14216P2	41	43	45	47	33	35	37	39

【0 1 6 8】

構築した様々な抗 M U C 1 6 × C D 3 二重特異性抗体の構成部分の要約を表 5 に示す。表 6 および 7 に、二重特異性抗体の H C V R、L C V R、C D R、ならびに重鎖および軽鎖の配列識別子を列挙する。

20

【表 6】

表 5：抗 M U C 1 6 × 抗 C D 2 8 二重特異性抗体の構成要素の要約

二重特異性 抗体識別子	抗 MUC16	抗 CD28	共通 軽鎖可変領域
	抗原結合ドメイン	抗原結合ドメイン	
	重鎖可変領域	重鎖可変領域	
bs24963D	mAb8799P2	mAb14226P2	ULC3-20
bs32897D	mAb8794P2	mAb14216P2	ULC1-39

30

【0 1 6 9】

表 6 は、本明細書に例示される二重特異性抗 M U C 1 6 × 抗 C D 2 8 抗体のアミノ酸配列識別子を示す。対応する核酸配列識別子を表 7 に記載する。

【表 7】

表 6：抗 M U C 1 6 × 抗 C D 2 8 二重特異性抗体のアミノ酸配列

二重特異性 抗体識別子	抗 CD28 第 1 の抗原結合ドメイン(D1)				抗 MUC16 第 2 の抗原結合ドメイン(D2)				共通 軽鎖可変領域			
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
bs24963D	18	20	22	24	2	4	6	8	10	12	14	16
bs32897D	42	44	46	48	26	28	30	32	34	36	38	40

40

50

【表 8】

表 7：抗MUC16×抗CD28二重特異性抗体の核酸配列

二重特異性 抗体識別子	抗 CD28 第 1 の抗原結合ドメイン(D1)				抗 MUC16 第 2 の抗原結合ドメイン(D2)				共通 軽鎖可変領域			
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
bs24963D	17	19	21	23	1	3	5	7	9	11	13	15
bs32897D	41	43	45	47	25	27	29	31	33	35	37	39

10

【0170】

実施例 3．CD28 は強力な共刺激受容体である

T 細胞の活性化に重要な共刺激シグナルを提供するのにどの共刺激受容体が効果的であるかを決定するために、同系腫瘍のパネル上で共刺激リガンドの強制発現によって実施される共刺激経路のブラインドスクリーン（表 8 および図 1）が、4-1BB とともに最も強力な共刺激受容体の 1 つとして CD28 を再度確立した。表 8 は、ブラインドスクリーンでの無腫瘍マウス数を要約したものである。アッセイは、7 つの異なる共刺激リガンドを発現するように操作された 3 つの異なる腫瘍細胞株で実施した。各昇目の数は、合計 5 匹のマウスのうち無腫瘍マウス数を表す。

20

【表 9】

表 8：共刺激リガンドを導入した操作された細胞株における腫瘍成長阻害

共刺激 リガンド	共刺激受容体	リンパ腫 (EL4)	癌腫 (MC38)	黒色腫 (B16F10.9)
4-1BBL	4-BB	3	4	1
CD80 (B7.1)	CD28	2	2	2
CD86 (B7.2)	CD28	1	0	2
CD70	CD27	5	0	
OX40L	OX40	0	0	2
CD40	CD40L	0	1	0
ICOSL	ICOS	0	0	0
空ベクター		0	0	0
トランスフェクト されていない親細胞		0	0	

30

【0171】

実施例 4．抗MUC16×CD28二重特異性抗体の表面プラズモン共鳴由来の結合親和力および速度定数

本発明の例示的な抗MUC16×CD28二重特異性モノクローナル抗体の結合速度論を決定するために、抗MUC16×CD28二重特異性抗体のMUC16および／またはCD28に対する表面プラズモン共鳴により導出した結合親和性および速度定数を決定した。

40

【0172】

精製した本発明の例示的な抗MUC16×CD28二重特異性モノクローナル抗体に対するhMUC16・mmh（配列番号51）、hCD28・mmh（配列番号53）、およびmCD28・mmh（マウスCD28・mmh、配列番号54）の結合についての平衡解離定数（ K_D 値）を、Biacore T-200機器を使用したリアルタイム表面プラズモン共鳴バイオセンサーを使用して決定した。CM5 Biacoreセンサー表面は、精製された本発明の例示的な抗MUC16×CD28二重特異性抗体を捕捉するように、モノクローナルマウス抗ヒトFc抗体とのアミンカップリングによって誘導体化した

50

。2つの例示的な二重特異性抗体 $b s 2 4 9 6 3 D$ および $R E G N 4 6 1 5$ を試験した。 $R E G N 4 6 1 5$ は、ヒト $M U C 1 6$ およびマウス $C D 2 8$ を認識する抗体／ $s c F v$ であり、抗 $M U C 1 6 \times m s C D 2 8$ 抗体と称されることがある。 $R E G N 4 6 1 5$ の $M U C 1 6$ アームは、 $m A b 8 7 9 4 P 2$ について上記の表 1 に示すように、 $V H$ および $V K-U L C 1 \sim 3 9$ 配列を利用する。 $m C D 2 8 (P V-1)$ は、配列番号 11 の軽鎖 ($U S 2 0 0 4 / 0 1 1 6 6 7 5$ の図 15 A も参照) および配列番号 13 の重鎖 (図 15 を参照) とともに、 $U S 2 0 0 4 / 0 1 1 6 6 7 5$ に記載されているものであり、これを、本明細書に記載の実験のために $s c F v$ として再フォーマットした。

【0173】

この $S P R$ 結合研究は、 $0.01 M$ の $H E P E S (p H 7.4)$ 、 $0.15 M$ の $N a C l$ 、 $0.05 \% v / v$ の界面活性剤 $P 2 0$ で構成される $p H 7.4$ の緩衝液 ($H B S-E T$ 泳動緩衝液) 中で行った。異なる濃度の C 末端 $m y c-m y c-6 \times H i s$ タグを伴う $h M U C 1 6 (h M U C 1 6 . m m h)$ 、 C 末端 $m y c-m y c-6 \times H i s$ タグを伴う $h C D 2 8 (h C D 2 8 . m m h)$ 、および $m C D 2 8 C$ 末端 $m y c-m y c-6 \times H i s$ タグ ($m C D 2 8 . m m h$) を、抗 $M U C 1 6 \times C D 2 8$ 二重特異性抗体および抗 $M U C 1 6 \times m C D 2 8$ 二重特異性抗体に対する親和性決定のために、3 倍段階希釈として、 $3.33 n M \sim 90 n M (h M u c 1 6$ について) または $22.2 n M \sim 600 n M (h C D 2 8$ または $m C D 2 8$ について) の範囲の $H B S-E T$ 泳動緩衝液中で調製した。

【0174】

$M A S S-2$ 大容量アミンセンサー表面は、約 $500 \sim 900 R U$ の抗 $M U C 1 6 \times C D 2 8$ または抗 $M U C 1 6 \times m C D 2 8$ 二重特異性モノクローナル抗体を捕捉するために、まずモノクローナルマウス抗ヒト $F c$ 抗体とのアミンカップリングによって誘導体化した。製造元によって定義されたように、 $1 R U$ (応答ユニット) は、 $1 m m^2$ あたり $1 p g$ のタンパク質を表す。異なる濃度の C 末端 $m y c-m y c-6 \times H i s$ タグを伴う $h M U C 1 6 (h M U C 1 6 . m m h)$ 、 C 末端 $m y c-m y c-6 \times H i s$ タグを伴う $h C D 2 8 (h C D 2 8 . m m h)$ 、および $m C D 2 8 C$ 末端 $m y c-m y c-6 \times H i s$ タグ ($m C D 2 8 . m m h$) を、抗 $M U C 1 6 \times C D 2 8$ 二重特異性抗体および抗 $M U C 1 6 \times m C D 2 8$ 二重特異性抗体に対する親和性決定のために、3 倍段階希釈として、 $3.33 n M \sim 90 n M (h M u c 1 6$ について) または $22.2 n M \sim 600 n M (h C D 2 8$ または $m C D 2 8$ について) の範囲の $H B S-E T$ 泳動緩衝液中で調製し、抗ヒト $F c$ で捕捉した抗 $M U C 1 6 \times C D 2 8$ または抗 $M U C 1 6 \times m C D 2 8$ 二重特異性モノクローナル抗体表面上に、 $50 \mu L /$ 分の流量で 5 分間かけて注射した。結合した $h M U C 1 6$ 、 $h C D 2 8$ 、および $m C D 2 8$ 試薬の解離を、 $H B S-E T$ 泳動緩衝液中で 10 分間監視した。会合 (k_a) および解離 (k_d) 速度の定数は、 $S c r u b b e r$ 評価ソフトウェアバージョン 2.0 c を使用して、リアルタイム結合センサーグラムを、物質移動限界 ($m a s s t r a n s p o r t l i m i t a t i o n$) を有する 1:1 結合モデルにあてはめることにより決定した。結合解離平衡定数 (K_D) および解離半減期 ($t_{1/2}$) を、動的速度定数から以下のように計算した。

【数 1】

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \quad \text{および} \quad t_{1/2} (\text{分}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

【0175】

$37^\circ C$ での精製した $h M U C 1 6$ 、 $h C D 2 8$ 、 $m C D 2 8$ 組換えタンパク質に結合する例示的な二重特異性抗体の結合速度論的パラメータを以下の表 9～12 に示す。

10

20

30

40

50

【表 10】

表 9 : hMUC16 に対する抗MUC16×CD28 抗体のB i a c o r e 結合親和性

AbPID	mAB 捕捉 (RU)	90nM の hMUC16.mmh の 結合 (RU)	Ka (1/ミリ 秒)	Kd (1/秒)	K _D (M)	T1/2 (分)
bs24963D (実験 1)	987.1±9.9	365.0	4.41E+05	4.12E-04	9.33E-10	28.0
bs24963D (実験 2)	211.7±1.2	120.0	2.38E+05	2.18E-04	9.12E-10	53.1

10

【表 11】

表 10 : hCD28 に対する抗MUC16×CD28 抗体のB i a c o r e 結合親和性

AbPID	mAB 捕捉 (RU)	600nM の hCD28.mmh の 結合 (RU)	Ka (1/ミリ秒)	Kd (1/秒)	K _D (M)	T1/2 (分)
bs24963D	985.4±2.7	88.9	3.27E+04	5.38E-03	1.65E-07	2.1

【表 12】

表 11 : hMUC16 に対する抗MUC16×msCD28 抗体のB i a c o r e 結合親和性

AbPID	mAB 捕捉 (RU)	90nM の hMUC16.mmh の 結合 (RU)	Ka (1/ミリ秒)	Kd (1/秒)	K _D (M)	T1/2 (分)
REGN4615	1041.0±10.0	513.3	6.29E+05	4.72E-04	7.49E-10	24.5

20

【表 13】

表 12 : mCD28 に対する抗MUC16×msCD28 抗体のB i a c o r e 結合親和性

AbPID	mAB 捕捉 (RU)	90nM の hMUC16.mmh の 結合 (RU)	Ka (1/ミリ秒)	Kd (1/秒)	K _D (M)	T1/2 (分)
REGN4615	1021.8±4.0	25.8	2.07E+04	7.77E-05	3.76E-09	148.6

30

【0176】

実施例 5 . 抗MUC16×CD28 二重特異性抗体のT細胞および標的細胞への結合

ヒトおよびカニクイザルT細胞および標的細胞に対する本発明の例示的な二重特異性抗体の結合を決定するために、フローサイトメトリー分析を利用して、MUC16×CD28 二重特異性抗体のOVACR-3、PEO1、陰性対照Raji細胞、ヒトおよびカニクイザルT細胞への結合を決定した後、フィコエリトリン (PE) 標識またはAlexa-647 標識した抗ヒトIgG抗体で検出した。簡単に説明すると、 1×10^5 細胞/ウェルを、例示的なMUC16×CD28 二重特異性抗体、またはヒトもしくはカニクイザルCD28との交差反応性なしにヒト抗原に結合するIgG4アイソタイプ対照の段階希釈物とともに4℃で30分間インキュベートし、この希釈物は、ヒトおよびカニクイザルT細胞については133nM~32.6pMの範囲、およびMuc16発現細胞および陰性対照Raji細胞については133nM~8.14pMの範囲であった。インキュベーション後、細胞を、1%濾過FBSを含有する冷PBSで2回洗浄し、PE複合体化またはAlexa647複合体化抗ヒト二次抗体をそれぞれMUC16発現細胞またはヒト/カニクイザルT細胞に添加し、さらに30分間インキュベートした。Live/dead色素を、ヒトおよびカニクイザルT細胞のインキュベーションに添加した。抗体なしまたは二次抗体のみを含有するウェルを対照として使用した。

40

【0177】

MUC16発現細胞とのインキュベーション後、細胞を洗浄し、1%の濾過したFBS

50

を含有する200 μ Lの冷PBSに再懸濁し、BD FACS Canto II上でフローサイトメトリーにより分析した。

【0178】

ヒトまたはカニクイザルT細胞とのインキュベーション後、細胞を洗浄し、Brilliant Stain Buffer中の抗CD2、抗CD16、抗CD4、および抗CD8抗体のカクテルを用いてさらなる20分間のインキュベーションの間4℃で染色した。洗浄後、細胞を、1%の濾過したFBSを含有する200 μ Lの冷PBS中に再懸濁し、Live/CD2+/CD4+/CD16またはLive/CD2+/CD8+/CD16ゲートにゲートし、BD FACS LSR-Fortessa-X20上でフローサイトメトリーにより分析した。

【0179】

例示的なMUC16 $\times$ CD28二重特異性抗体の、ヒトT細胞の表面への結合をフローサイトメトリーによって試験した。bs24963Dは、CD4+T細胞に 2.61×10^{-7} MのEC₅₀値で結合した。これは、CD8+T細胞に 2.53×10^{-7} MのEC₅₀値で結合した。bs32897Dは、CD4+T細胞に 9.16×10^{-6} MのEC₅₀値で弱く結合した。これは、CD8+T細胞にも 7.58×10^{-6} MのEC₅₀値で弱く結合した。結果を表13に要約した。

【表14】

表13：抗MUC16 $\times$ CD28のヒトT細胞への結合

抗体 PiD	EC ₅₀ ヒト CD4+T 細胞 FACS[M]	EC ₅₀ ヒト CD8+T 細胞 FACS[M]
bs24963D	2.61E-07M	2.53E-07M
bs32897D	9.16E-06M	7.58E-06M
アイソタイプ対照	結合なし	結合なし

【0180】

例示的なMUC16 $\times$ CD28二重特異性抗体のカニクイザルT細胞の表面への結合をフローサイトメトリーによって試験した。例示的なbs24963Dは、CD4+T細胞に 2.03×10^{-7} MのEC₅₀値で結合した。これは、CD8+T細胞に 1.22×10^{-7} MのEC₅₀値で結合した。例示的なbs32897Dは、OVCA R-3およびPEO1細胞に、それぞれ、 2.87×10^{-10} Mおよび 5.96×10^{-10} MのEC₅₀値で結合した。例示的なbs24963Dは、MUC16陰性対照RAJI細胞へのいずれの結合も呈しなかった。結果を表14に要約した。

【表15】

表14：抗MUC16 $\times$ CD28のカニクイザルT細胞への結合

抗体 PiD	EC ₅₀ カニクイザル CD4+T 細胞 FACS[M]	EC ₅₀ カニクイザル CD8+T 細胞 FACS[M]
bs24963D	2.03E-07M	1.22E-07M
bs32897D	5.70E-06M	3.02E-06M
アイソタイプ対照	結合なし	結合なし

【0181】

MUC16を発現する細胞株の表面への例示的なMUC16 $\times$ CD28二重特異性抗体の結合を、フローサイトメトリーによって試験した。bs24963Dは、OVCA R-3およびPEO1細胞に、それぞれ、 6.09×10^{-10} Mおよび 4.67×10^{-10} MのEC₅₀で結合した。bs32897Dは、MUC16陰性対照RAJI細胞へのいずれの結合も呈しなかった。bs24963Dは、OVCA R-3およびPEO1細胞に、それぞれ、 2.87×10^{-10} Mおよび 5.96×10^{-10} MのEC₅₀値で結合した。bs24963Dは、MUC16陰性対照RAJI細胞へのいずれの結合も呈しなかった。アイソタイプ対照抗体は、ヒトまたはカニクイザルのT細胞へのいずれの結合も呈

せず、MUC 16を発現する細胞株にも結合しなかった。結果を表15に要約した。

【表16】

表15：MUC 16発現細胞への抗MUC 16×CD 28の結合

抗体 PiD	EC ₅₀ OVCAR-3 細胞 FACS[M]	EC ₅₀ PEO1 細胞 FACS[M]	EC ₅₀ Raji 細胞 FACS[M]
bs24963D	6.09E-10M	4.67E-10M	結合なし
bs32897D	2.87E-10M	5.96E-10M	結合なし
アイソタイプ対照	結合なし	結合なし	結合なし

【0182】

実施例6．MUC 16×CD 28二重特異性抗体の一次バイオアッセイ

T細胞の活性化は、抗原提示細胞（APC）上の主要組織適合性複合体クラスⅠまたはⅡ（MHCⅠまたはMHCⅡ）タンパク質によって提示される特定のペプチドを認識するT細胞受容体（TCR）を刺激することによって達成される（Goldrath et al., *Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire*, *Nature* 402, 255–262 (1999)）。活性化されたTCRは、順にシグナル伝達事象のカスケードを開始し、これはアクチベータータンパク質1（AP-1）、活性化T細胞の核因子（NFAT）、または活性化B細胞の核因子κ軽鎖エンハンサー（NFκB）などの様々な転写因子によって駆動される、レポーター遺伝子によって監視することができる。T細胞応答は次いで、CD 28、CTLA-4（細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4）、PD-1（プログラム細胞死タンパク質1）、LAG-3（リンパ球活性化遺伝子3）、または他の分子などのT細胞上に構成的または誘発的のいずれかで発現した共受容体の関与を介してさらに精製される（Sharpe et al., *The B7-CD28 Superfamily*, *Nat. Rev. Immunol.*, 2 (2) : 116–26 (2002)）。共刺激分子であるCD 28は、APC上で発現する内在性リガンドCD 80またはCD 86によって活性化される。CD 28は、TCR活性化後、NFκB転写因子によって制御される経路などの細胞シグナルを増強する。CD 28共シグナルは、T細胞の分化、増殖、サイトカイン放出、および細胞死などの効果的なT細胞活性化に重要である（Smeets et al., *NFκB activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-θ*, *PNAS*, 97 (7) : 3394–3399 (2012)）。

【0183】

一次刺激およびMUC 16標的発現の両方の存在下でT細胞活性を強化する抗体を同定するために、本発明の例示的な抗MUC 16×CD 28二重特異性抗体を、ヒト初代T細胞を使用した細胞ベースのアッセイにおいて特徴付けた。これらのアッセイは、一次刺激の存在下および非存在下、ならびに標的発現の存在下および非存在下での抗MUC 16／CD 28二重特異性抗体の挙動を評価するものである。

【0184】

初代ヒトCD 4⁺T細胞を使用したIL-2機能アッセイ：

初代CD 4⁺T細胞／APC機能アッセイは、抗MUC 16×CD 28二重特異性抗体との係合によるIL-2産生に対するCD 28活性化の影響を評価するために開発された。

【0185】

a) ヒト初代CD 4⁺T細胞の単離：

ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を、健康なドナー白血球パックから単離した。PBMCの単離は、製造元の推奨プロトコルに従って、50mLのSepMate（商標）チューブを使用した密度勾配遠心分離によって達成した。簡単に説明すると、15mLのFicoll Paque PLUSを50mLのSepMateチューブに重層し、続いてD-PBSで1：2に希釈した30mLの白血球を添加した。その後のステップは、Sep

10

20

30

40

50

Matte 製造元のプロトコルに従った。続いて、CD4⁺T細胞を、製造元のプロトコルに従ってMiltenyi Biotec製のヒトCD4マイクロビーズキットを使用して、PBMCから単離した。単離したCD4⁺T細胞を、1バイアルあたり 5×10^6 細胞の濃度で10%のDMSOを含むFBS中で凍結させた。

【0186】

b) CD28抗体で処理された初代CD4⁺T細胞からのIL-2放出：

このアッセイでは、ヒト初代CD4⁺T細胞を、細胞表面にMuc16を発現するヒト標的細胞OVCAR3またはPEO-1とともにインキュベートした α Muc16 $\times\alpha$ CD3二重特異性抗体(REGN4018)を使用して、T細胞受容体(TCR)と複合体形成したCD3分子の架橋を介して活性化する。Muc16を発現する標的細胞へのREGN4018のMuc16アームの結合により、CD3分子のクラスター化が促進され、同種応答の非存在下のまたはその追加に対するT細胞刺激に必要な最初のシグナルが提供される。しかしながら、このアッセイでは、T細胞活性化を完了し、IL-2放出のレベルを増加させるために、CD28分子の架橋によって提供される共刺激が必要とされる。ここで、二重特異性抗CD28抗体は、CD4⁺T細胞上のCD28およびOVCAR3またはPEO-1細胞上のMuc16と相互作用し、共刺激分子であるCD28のクラスター化-活性化を促進する。組み合わせられたTCRとCD28との係合により、IL-2産生が強化され、これが細胞培養培地中に放出される。IL-2は、均質な洗浄なしのPerkinElmer製AlphaLISAキットを使用して細胞上澄から検出および定量する。

【0187】

以前に単離し、凍結したドナー104由来のヒトCD4⁺T細胞を、50U/mLのベンゾナーゼヌクレアーゼを含む刺激培地(10%FBS、HEPES、NaPyrr、NEAA、および0.01mM BMEを補充したX-VIVO 15細胞培養培地)中でアッセイの日に解凍した。細胞を、1200rpmで10分間遠心分離し、刺激培地中に再懸濁し、 1×10^5 細胞/ウェルの濃度で96ウェル丸底プレート中にプレートした。OVCAR3およびPEO-1細胞は、OVCAR3には25 μ g/mLのマイトマイシンC、PEO-1細胞には10 μ g/mLを使用して、一次刺激培地中でマイトマイシンCにより処理した。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で1時間インキュベートした後、標的細胞を、洗浄緩衝液(PBS+2%FBS)で3回洗浄し、ウェルあたり 1×10^4 のOVCAR3または 2.5×10^4 のPEO-1細胞の最終濃度で、CD4⁺T細胞を含有するウェルに添加した。続いて、3pM~200nMの範囲の1:4で段階希釈したCD28二重特異性抗体または対照抗体を、一定5nMのREGN4018(α Muc16 $\times\alpha$ CD3)または陰性対照抗体(hIgG4アイソタイプ対照=H4sH)の存在下でウェルに添加した。10点希釈の最終点には、バックグラウンドシグナルであるCD28抗体は含まなかった。プレートを37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で72時間インキュベートした後、それらを遠心分離して細胞をペレット化し、20 μ Lの培地上清を収集した。このことから、製造元のプロトコルに従い、ヒトIL-2AlphaLISAアッセイにおいて、5 μ Lを試験した。測定値をマルチラベルプレートリーダーEnvisionで取得し、原RLU(相対光単位)値をプロットした。全ての段階希釈物を二重に試験した。

【0188】

抗体のEC₅₀値は、GraphPad Prism(商標)ソフトウェアを使用して、10点用量応答曲線上の4パラメータロジスティック方程式にデータを適合させることによって決定した。最大倍率誘発を、次の方程式を使用して計算した。

【表17】

$$\text{倍率誘発} = \frac{\text{試験した用量範囲内の最高平均RLU値}}{\text{平均IL-2値(バックグラウンド)}}$$

【0189】

CD4⁺T細胞の活性化（IL-2放出により測定）は、一次刺激（抗MUC16×CD3）および標的細胞上で発現されたMUC16の存在下でhMUC16×hCD28によって強化された。

【0190】

c) 初代ヒトCD4⁺T細胞を使用したIL-2機能アッセイの結果：

抗Muc16×抗CD28二重特異性抗体がTCR刺激二重特異性抗体（REGN4018＝抗Muc16×抗CD3）の非存在下または存在下で単離されたCD4⁺T細胞上のCD28をとおした共刺激を提供する能力を、細胞表面に内因的にMuc16を発現する標的細胞（OVAR3およびPEO-1細胞）とともにインキュベートした単離されたヒトCD4⁺T細胞を使用した機能的IL-2放出アッセイにおいて評価した。

10

【0191】

一定5 nMのhIgG4H4sHアイソタイプ対照またはREGN4018抗Muc16×抗CD3のいずれかに加えてOVCAR3またはPEO-1細胞とともに共培養したCD4⁺T細胞の倍率誘発値を、表16および17に要約する。

【0192】

単離されたCD4⁺T細胞を、一定量のH4sHアイソタイプ対照を使用したREGN4018を介した有向TCR刺激の非存在下でOVCAR3またはPEO-1標的細胞とともにインキュベートすると、検出されたIL-2量は、CD28親抗体、二重特異性抗Muc16×抗CD28抗体（bs32897Dおよびbs24963D）、および陰性H4sHアイソタイプ対照抗体の間で類似する。（表16）

20

【0193】

対照的に、IL-2レベルの上昇が、抗Muc16×抗CD3（REGN4018）で処理した試料中で検出される。これらの条件下で、ヒトCD4⁺T細胞をOVCAR3またはPEO-1細胞とともに共培養した場合、両方のCD28二重特異性抗体は、それぞれの親CD28抗体よりもIL-2レベルを増加させる。予想どおり、アイソタイプ対照では最小限のIL-2放出は観察されない。（表17）

【0194】

OVCAR3を標的細胞として使用すると、両方のCD28二重特異性抗体（bs32897D：5.63×およびEC₅₀=606 pM）ならびにbs24963D：5.32×およびEC₅₀=401 pM）について、類似の用量依存性IL-2放出が測定される。一方、PEO-1細胞では、IL-2レベルの倍率誘発の差異が両方の二重特異性分子間で観察された。ここで、bs24963D（10.94×およびEC₅₀=996 pM）は、bs32897Dよりも高いIL-2値をもたらす（用量応答曲線が飽和に達しなかったため、5.22×およびEC₅₀を決定することはできなかった）。

30

【0195】

同種応答をとおしたまたは抗MUC16×CD3によって促進されるTCR刺激の非存在下において、OVCAR3またはPEO-1細胞の存在下で一定量のアイソタイプ対照を含むウェルのCD28抗体では、測定可能なIL-2放出は観察されない（表16）。表16は、OVCAR3またはPEO-1および一定5 nMのアイソタイプ対照とともに共培養したCD4⁺T細胞からのIL-2放出のEC₅₀値および倍率誘発を要約する。

40

【表 18】

表 16：5 nM のヒト IgG4 アイソタイプ対照の存在下での初代ヒト CD4⁺T 細胞からの IL-2 放出についての EC₅₀ および倍率誘発の結果

抗体	OVCAR3		PEO-1	
	EC ₅₀ [M]	倍率 誘発	EC ₅₀ [M]	倍率 誘発
bs32897D	N/C	1.06	N/C	1.12
bs24963D	N/C	1.33	N/C	1.12
親 1hCD28 (bs32897D について)	N/C	1.10	N/C	1.30
親 2hCD28 (bs24963D について)	N/C	1.12	N/C	1.03
H4sH アイソタイプ対照	N/C	1.12	N/C	1.48

表 16. OVCAR3 または PEO-1 および一定 5 nM の H4sH アイソタイプ対照とともに共培養した CD4⁺T 細胞からのバックグラウンドシグナルに対する IL-2 放出の EC₅₀ 値および最大倍率誘発の表集計。

N/C = 計算せず

【0196】

対照的に、測定可能な IL-2 レベル (RLU) が、抗 MUC16 × CD3 で処理した試料中で検出された。これらの条件下で、ヒト CD4⁺T 細胞を OVCAR3 または PEO-1 細胞とともに共培養した場合、両方の CD28 二重特異性抗体は、その親 CD28 抗体よりも IL-2 レベルを増加させる。予想どおり、アイソタイプ対照では IL-2 放出は観察されない (表 17)。表 17 は、OVCAR3 または PEO-1 および一定 5 nM の 5 nM 抗 MUC16 × CD3 とともに共培養した CD4⁺T 細胞からの IL-2 放出の EC₅₀ 値および倍率誘発を要約する。

【表 19】

表 17：5 nM の REGN4018 (抗 Muc16 × 抗 CD3) の存在下での初代ヒト CD4⁺T 細胞からの IL-2 放出についての EC₅₀ および倍率誘発の結果

抗体	OVCAR3		PEO-1	
	EC ₅₀ [M]	倍率 誘発	EC ₅₀ [M]	倍率 誘発
bs32897D	6.07E-10	5.63	N/D	5.22
bs24963D	4.01E-10	5.32	9.96E-10	10.94
親 1hCD28 (bs32897D について)	N/D	1.58	N/D	1.42
親 2hCD28 (bs24963D について)	N/D	2.46	1.07E-10	2.05
H4sH アイソタイプ対照	N/C	1.09	N/C	1.11

表 17. OVCAR3 または PEO-1 および一定 5 nM の REGN4018 (抗 Muc16 × 抗 CD3) とともに共培養した CD4⁺T 細胞からのバックグラウンドシグナルに対する IL-2 放出の EC₅₀ 値および最大倍率誘発の表集計。略語：N/D = 決定せず (用量応答曲線が飽和に達しなかったか、または鐘形状を示したことを理由とする)、N/C = 計算せず

【0197】

実施例 7. 抗 MUC16 × CD28 二重特異性抗体は、抗 MUC16 × CD3 による TCR 刺激の存在下で、卵巣腫瘍細胞に対する T 細胞の活性化および細胞傷害性を増強すると結論した。

本発明の例示的な抗 MUC16 × CD28 二重特異性抗体が卵巣腫瘍細胞に対する抗 MUC16 × CD3 媒介性 T 細胞活性化および細胞傷害性を強化できたかどうかを調査する

ために、FACSを使用して、漸増用量の単独のまたはMUC16×CD28と組み合わせたMUC16×CD3とともにインビトロで共培養した後の腫瘍細胞および表現型T細胞の生存を調査した(図2A)。T細胞を含むヒト末梢血単核(PBMC)細胞を、内在レベルのMUC16を発現するPEO-1卵巣癌細胞とともに培養した(Coscia, F. et al, Nat. Commun. (2016), August 26; 7:12645)。

【0198】

2つのFACSベースの細胞傷害性研究を実施した。第1の研究では、抗MUC16×CD28刺激の存在下または非存在下、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)および抗MUC16×CD3の存在下で、MUC16+細胞に対してFACSベースの細胞傷害性を実施した(MUC16細胞+ヒトPBMC+/-MUC16×CD28刺激に対するFACSベースの細胞傷害性(MUC16×CD28とMuc16×CD3とのマトリックス設定))。第2の研究は、ヒトPBMCの代わりにカニクイザルPBMCを使用することを除いて、第1の研究と同じである(MUC16細胞+カニクイザルPBMC+/-MUC16×CD28刺激に対するFACSベースの細胞傷害性(MUC16×CD28とMUC16×CD3とのマトリックス設定))。

【0199】

実験手順

本発明の抗MUC16×CD3抗体および例示的な抗MUC16×CD28抗体の組み合わせの存在下でのMUC16+細胞の死滅を監視するために、MUC16を内在的に発現する細胞株(PEO1、MUC16+)を1μMのViolet Cell Trackerで標識し、37℃で一晩プレATINGした。別に、ヒトPBMC(New York Blood Center)またはカニクイザルPBMC(Covance, Cranford NJ)を、 1×10^6 細胞/mLで補充RPMI培地に播種し、付着マクロファージ、樹状細胞、およびいくつかの単球を枯渇させることによってリンパ球を濃縮するために37℃で一晩インキュベートした。翌日、標的細胞を、接着細胞が枯渇したナイーブヒトPBMC(エフェクター/標的細胞4:1比)、および単独の、または固定濃度(2.5μg/mL)の例示的な抗MUC16×CD28二重特異性抗体と組み合わせた抗MUC16×CD3または非標的CD3ベース二重特異性抗体(bs17664D)のいずれかの段階希釈物とともに、96時間、37℃で共インキュベートした。インキュベーション後、トリプシン-EDTA解離緩衝液を使用して、細胞を細胞培養プレートから取り出し、フローサイトメトリー(FACS)により分析した。

【0200】

FACS分析の場合、細胞を生存率の遠赤細胞トラッカー(Invitrogen)で染色し、抗体をCD2、CD4、CD8、およびCD25(BD)に直接複合体化した。試料は、細胞カウント用のキャリブレーションビーズとともに泳動させた。殺滅の特異性を評価するために、標的細胞を、バイオレット細胞トラッカー陽性集団としてゲートした。生きた標的細胞のパーセントは、次のように計算した: 生細胞のパーセンテージ = $(R1/R2) \times 100$ (ここで、R1 = 抗体の存在下での生きた標的細胞のパーセンテージ、およびR2 = 試験抗体の非存在下での生きた標的細胞のパーセンテージ)。T細胞の活性化は、CD2+/CD4+またはCD2+/CD8+ T細胞のうちの活性化(CD25+) T細胞のパーセントによって測定した。PD-1マーカーの上方調節は、CD2、CD4、CD8、CD25、およびPD-1に対して直接複合体化した抗体とともに細胞をインキュベートし、全T細胞(CD2+)のうちのPD-1+ T細胞のパーセントを報告することによって評価した。T細胞数は、キャリブレーションビーズあたりの生きたCD4+またはCD8+細胞の数を計算することによって測定した。培地に蓄積されたサイトカインのレベルは、BDサイトメトリービーズアレイ(CBA)ヒトTh1/Th2/Th17サイトカインキットを使用して、製造元のプロトコルに従って分析した。

【0201】

結果、要約、および結論:

抗MUC16×CD3二重特異性抗体を、単剤としてまたは共刺激抗MUC16×CD28抗体の存在下で、ナイーブヒトT細胞を誘発して、ヒトMUC16を発現するPEO1標的細胞を殺滅する能力について試験した。ヒトT細胞を活性化し、PEO1細胞を枯渇させるように、抗MUC16×CD3二重特異性抗体を誘導した。さらに、MUC16×CD3単独では、PEO-1癌細胞の中程度のT細胞死滅が誘導され、それにより、それらの生存率が約60%まで用量依存的に低下した(図2Bおよび表18)。抗MUC16×CD3二重特異性抗体の存在下で標的細胞の殺滅が観察され、PEO1細胞は、ピコモル(pM)レベルのEC₅₀で用量依存的に殺滅された(表2B)。抗MUC16×CD3が存在しない場合、標的細胞の殺滅は観察されなかった(図2B)。観察された標的細胞溶解は、再びピコモル(pM)レベルのEC₅₀でのCD2+T細胞上のCD25+およびPD-1+細胞の上方調節と関連付けられた(表18)。

【0202】

抗MUC16×CD3は、ヒトサイトカインの放出を誘発した。単剤としての抗MUC16×CD3二重特異性抗体で観察された細胞傷害活性は、本発明の例示的な抗MUC16×CD28共刺激分子bs24963Dおよびbs32897Dの存在下で強化された。

【0203】

本発明の例示的な抗MUC16×CD28の添加により、MUC16×CD3によって誘発される細胞傷害性の効力および深さが増加し、その結果、PEO-1癌細胞の生存が20%未満(T細胞殺滅の3倍超の増加)にさらに低下することが見出された(図2B)。さらに、本発明の例示的な抗MUC16×CD28により、MUC16×CD3によって誘発されるIFN γ 放出のレベルが10倍以上増加した(図2C)。MUC16×CD28とMUC16×CD3との組み合わせにより、CD4およびCD8 T細胞が増殖し、活性化マーカーCD25の発現レベルが増加した(図2D~E)。注目すべきことに、非標的化CD3二重特異性抗体と組み合わせたMUC16×CD28は、T細胞の細胞傷害性も活性化も誘発しなかった(図2B)。

【0204】

要約すると、共刺激は、抗MUC16×CD3を単剤として用いて観察されたものと比較した場合、T細胞活性化、PD-1上方調節、およびサイトカイン放出を増加させた。表18および19ならびに図2A~2E)は、ヒトPBMCを使用した実験結果を要約する。

【表20】

表18：ヒトPBMCの存在下でのPEO1細胞に対する抗MUC16×CD3の細胞傷害性に対する抗MUC16×CD28の効果

PiD	PEO1 殺滅 EC ₅₀ [M]	PEO1 最小生存%	T細胞活性化 EC ₅₀ [M](CD8+/CD25+)	PD-1 上方調節 最大%(CD4+/PD1+)
MUC16×CD3	1.27E-10	57%	2.94E-10	27.2%
MUC16×CD3+bs24963D	1.07E-10~ 5.31E-11	9.8%	1.86E-10~3.94E-11	65.7%
MUC16×CD3+bs32897D	2.6E-10~ 7.40E-11	17.7%	4.82E-10~4.42E-11	58.4%

【0205】

抗MUC16×CD3二重特異性抗体は、単剤としてまたは共刺激性抗MUC16×CD28二重特異性抗体の存在下で、ナイーブカニクイザルT細胞を誘発して、ヒトMUC16を発現する標的細胞を殺滅する能力についても試験した。カニクイザルのPBMCを使用して同じアッセイを実施すると、類似の結果が得られた(図2F~H)。図2Iは、本発明の例示的な抗MUC16×CD28二重特異性抗体が、フローサイトメトリーによって測定して、細胞標的に結合することを示している。これらの結果は、本発明の抗MUC16×CD28二重特異性抗体が、増殖およびサイトカイン放出だけでなく細胞傷害性によっても、MUC16×CD3媒介性T細胞活性化を強力に強化できることを実証した。選択した抗体滴定で、抗MUC16×CD3二重特異性抗体は、ヒトT細胞を活性化し

たが、T細胞にPEO1細胞を枯渇させるようには誘導しなかった（表19）。本発明の例示的な抗MUC16×CD28抗体との共刺激により、T細胞の活性化が増加し、細胞傷害活性が強化され、T細胞上のPD-1マーカーが上方調節された（表19）。

【表21】

表19：カニクイザルPBMCの存在下でのPEO1細胞に対する抗MUC16×CD3の細胞傷害性に対する抗MUC16×CD28の効果

PiD	PEO1 殺滅 EC50[M]	PEO1 最小生存%	T細胞活性化 EC50[M](CD8+/CD25+)	PD-1 上方調節 最大%(CD4+/PD1+)
MUC16×CD3	2.09E-10	69%	1.59E-10	24.4%
MUC16×CD3+bs24963D	1.29E-10~ 3.34E-11	18.1%	1.04E-10~9.07E11	44.3%
MUC16×CD3+bs32897D	3.92E-10~ 1.09E-10	29.7%	2.81E-10~7.67E-11	40.3%

10

【0206】

実施例8．抗MUC16×CD28抗体のインビボ研究

腫瘍抗原を標的とする抗CD3×MUC16と抗CD28×MUC16二重特異性抗体とを組み合わせることにより、マウスモデルにおける腫瘍クリアランスが強化された。以下に詳細に示すように、OVCA-R-3腫瘍成長は、抗CD3×MUC16のみ、または対照アイソタイプを投与したマウスと比較して、本発明の例示的な抗CD3×MUC16および例示的な抗CD28×MUC16を投与したマウスで有意に阻害された。

20

【0207】

MUC16×CD28がインビボでMUC16×CD3の抗腫瘍効果を強化できるかどうかを調査するために、以下に詳述するように、2つの異なる腫瘍モデル、腫瘍異種腹水モデル、および腫瘍同系マウスモデルを使用した。

【0208】

腫瘍異種腹水モデル

腫瘍異種腹水モデルにおいて、内在性の高レベルのMUC16を発現するヒト起源の高悪性度漿液性癌腫OVCA-R-3卵巣癌細胞を、ヒトPBMCを事前に生着させたNSGマウスに腹腔内移植する（Crawford A, Haber L, Kelly MP, Vazzana K, Canova L, Ram P, Pawashe A, Finney J, Jalal S, Chiu D, Colleton CA, Garnova E, Makonnen S, Hickey C, Krueger P, Delfino F, Potocky T, Kuhnert J, Godin S, Retter MW, Duramad P, MacDonald D, Olson WC, Fairhurst J, Huang T, Martin J, Lin JC, Smith E, Thurston G, Kirshner JR. A Mucin 16 bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer. Science Translational Medicine 19 Jun 2019: Vol11, Issue497, eaau7534）。OVCA-R-3細胞を、ルシフェラーゼレポーターを用いて操作し、インビボ生物発光（BLI）を使用して腫瘍の成長を経時的に追跡した。

30

40

【0209】

実験手順

実験は、（Crawford A, Haber L, Kelly MP, Vazzana K, Canova L, Ram P, Pawashe A, Finney J, Jalal S, Chiu D, Colleton CA, Garnova E, Makonnen S, Hickey C, Krueger P, Delfino F, Potocky T, Kuhnert J, Godin S, Retter MW, Duramad P, MacDonald D, Olson WC, Fairhurst J, Huang T, Mart

50

in J, Lin JC, Smith E, Thurston G, Kirshner J R. A Mucin 16 bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer. Science Translational Medicine 19 Jun 2019: Vol 11, Issue 497, eaau7534)に記載されているとおりに行った。端的に言えば、マウスに、PBS中に懸濁したルシフェラーゼ基質のD-ルシフェリン (Perkin Elmer) 150mg/kgをIP注射した。10分後、マウスのBLIイメージングを、Xenogen IVISシステム (Perkin Elmer) を用いてイソフルラン麻酔下で行った。Dでの視野、1.5cmの被写体の高さ、および0.5分間の露光時間の中程度のビニングレベルで、画像取得を行った。BLIシグナルはLiving Imageソフトウェア (Xenogen; Alameda, CA) を用いて抽出した。目的の領域を各腫瘍量の周囲に描き、光子強度を $p/s/cm^2/sr$ (ステラジアンあたり平方センチメートルあたり秒あたりの光子) として記録した。OVCA R-3/Luc細胞を与えなかったマウスは、BLI活性のベースライン読取り値として機能した。腫瘍のないこれらのベースラインマウス (N=3) を各日撮像し、検出下限 (LOD) を、撮像した全ての無腫瘍マウスにわたる平均BLI読取り値として計算した。

【0210】

8~10週齢のNSG (NOD SCIDガンマ鎖ノックアウト) マウス (Jackson Laboratory, MD) に 5×10^6 のヒトPBMC (ReachBio, Seattle, WA) を注射した。10~14日後、マウスの尾静脈から採血して、ヒトT細胞の生着を測定した。PBMC移行の2週間以内に、予めインビボで継代培養したOVCA R-3/Luc細胞株からの 2×10^6 腹水細胞を、2週以内 (0日目) に腹腔内 (IP) 投与した。マウスをフローサイトメトリーによってT細胞の生着についてチェックした後、類似の腫瘍組織量を確保するためにBLIを使用して群に割り当てた。腫瘍移植の4日後、マウスを、2つの研究のために、 1.49×10^5 または 3.03×10^5 $p/s/cm^2/sr$ の中央値BLIで、各5匹の群に分けた。5日目および8日目に、示す二重特異性抗体または対照抗体でマウスを治療した。マウスに、抗MUC16×CD3またはCD3結合対照を、本発明の例示的な抗MUC16×CD28 (bs24963D) を伴ってまたは伴わずに、静脈内 (IV) 注射により2回投与した。腫瘍の成長を追跡するために、研究全体を通して複数回の撮像を行った。

【0211】

血液からの血清サイトカインレベルも、示す時点で取得した。示す時点で、顎下腺穿刺によってマイクロテイナー血清チューブ (BD365967) に血液を収集した。サイトカインレベルは、V-plex Human ProInflammatory-10 Plexキットを使用して、製造元の指示 (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MA) に従って分析した。

【0212】

全ての手順は、アメリカ国立衛生研究所 (NIH) の実験動物の管理と使用に関する指針に従って実施した。プロトコルは、Regeneron Pharmaceuticalsの動物実験委員会によって承認された。群あたり5匹のマウスを用いた合計2つの研究を完了した。

【0213】

結果、要約、および結論

異種腫瘍研究では、2つのモデルを使用した。第1の異種モデルについては、NSGマウスに、ヒトPBMC生着の13日後に予めインビボで継代培養した (0日目) OVCA R-3/Luc細胞を腹腔内 (IP) 注射した。5日目および8日目にマウスをIV治療した。マウスに、 $12.5 \mu g$ の抗MUC16×CD3または $12.5 \mu g$ のCD3結合対照 (hIgG4^{P-PVA}アイソタイプ) のいずれかを与えた。一部のマウスには、本発明の例示的な抗MUC16×CD28 (bs24963D) も $100 \mu g$ で投与した。腫

瘍組織量を、腫瘍移植後4、8、12、15、20、および25日目にBLIによって評価した。例示的なbs24963Dを抗MUC16×CD3なしで投与すると、BLIで明らかな腫瘍の減少は観察されなかった。対照的に、12.5 μgの抗MUC16×CD3を用いた処理により、BLIで明らかな腫瘍が有意に減少した一方、本発明の例示的な抗MUC16×CD28により、抗MUC16×CD3単独よりも有意に有効性が強化された(表20～22)。

【0214】

表20は、第1のOVCAR-3/Luc異種モデルにおける腫瘍移植後4日目の生物発光レベルを要約する。

【表22】

表20：OVCAR-3/Lucモデル。腫瘍移植後4日目の生物発光レベル

抗体(μg)	移植後4日の平均放射輝度[p/s/cm ² /sr] (中央値±SEM)
CD3 結合対照(12.5)	$1.51 \times 10^5 \pm 2.81 \times 10^4$
抗MUC16×CD3 (12.5)	$1.5 \times 10^5 \pm 1.05 \times 10^4$
CD3 結合対照(12.5)+ 抗MUC16×CD28 (100)	$1.53 \times 10^5 \pm 2.01 \times 10^4$
抗MUC16×CD3 (12.5)+ 抗MUC16×CD28 (100)	$1.27 \times 10^5 \pm 2.29 \times 10^4$

【0215】

表21は、第1のOVCAR-3/Luc異種モデルにおける腫瘍移植後25日目の生物発光レベルを要約する。

【表23】

表21：OVCAR-3/Lucモデル。腫瘍移植後25日目の生物発光レベル

抗体(μg)	移植後25日の平均放射輝度[p/s/cm ² /sr] (中央値±SEM)
CD3 結合対照(12.5)	$7.71 \times 10^6 \pm 1.07 \times 10^6$
抗MUC16×CD3 (12.5)	$7.44 \times 10^3 \pm 3.11 \times 10^3$
CD3 結合対照(12.5)+抗 MUC16×CD28 (100)	$6.04 \times 10^6 \pm 8.32 \times 10^5$
抗MUC16×CD3 (12.5)+抗 MUC16×CD28 (100)	$1.31 \times 10^3 \pm 3.05 \times 10^1$

【0216】

表22は、第1のOVCAR-3/Luc異種モデルにおける腫瘍移植後4日目から25日目間のBLIの倍率変化を要約する。

【表24】

表22：OVCAR-3/Lucモデル。腫瘍移植後4日目から25日目間のBLIの倍率変化

抗体(μg)	移植後4日目からD25までの平均放射輝度 [p/s/cm ² /sr]の倍率変化(平均±SD)
CD3 結合対照(12.5)	50.72 ± 29.67
抗MUC16×CD3 (12.5)	-0.94 ± 0.05
CD3 結合対照(12.5)+ 抗MUC16×CD28 (100)	35.38 ± 8.18
抗MUC16×CD3 (12.5)+ 抗MUC16×CD28 (100)	-0.99 ± 0.00

【0217】

第2の異種モデルについては、NSGマウスに、ヒトPBMCを移植した10日後に予めインビボで継代培養した(0日目)OVCAR-3/Luc細胞を注射した。マウスを、5日目および8日目に、0.5mg/kgの抗MUC16×CD3でIV処理するか、または0.5mg/kgのCD3結合対照を投与した。4、8、11、14、21、28、および34日目に、BLIによって腫瘍組織量を評価した。一部のマウスには、本発明の例示的な抗MUC16×CD28(b s 2 4 9 6 3 D)も、0.2mg/kg、1mg/kg、または5mg/kgで投与した。例示的なb s 2 4 9 6 3 Dは、抗MUC16×CD3なしで投与した場合、腫瘍組織量を減少させなかった。対照的に、0.5mg/kgの抗MUC16×CD3を用いた処理により、BLIで明らかな腫瘍が有意に減少した一方、例示的な抗MUC16×CD28により、抗MUC16×CD3単独よりも有効性が強化された(表23～25および図4A)。

【0218】

表23は、第2のOVCAR-3/Luc異種モデルにおける腫瘍移植後4日目の生物発光レベルを要約する。

【表25】

表23：OVCAR-3/Lucモデル。腫瘍移植後4日目の生物発光レベル

抗体(mg/kg)	移植後4日の平均放射輝度[p/s/cm ² /sr] (中央値±SEM)
CD3 結合対照(0.5)	$3.65 \times 10^5 \pm 5.50 \times 10^4$
抗 MUC16×CD3 (0.5)	$3.76 \times 10^5 \pm 2.40 \times 10^4$
CD3 結合対照(0.5)+ 抗 MUC16×CD28 (5)	$2.71 \times 10^5 \pm 2.65 \times 10^4$
抗 MUC16×CD3 (0.5)+抗 MUC16×CD28 (5)	$3.18 \times 10^5 \pm 4.45 \times 10^4$
抗 MUC16×CD3 (0.5)+抗 MUC16×CD28 (1)	$3.07 \times 10^5 \pm 4.37 \times 10^4$
抗 MUC16×CD3 (0.5)+抗 MUC16×CD28 (0.2)	$2.86 \times 10^5 \pm 4.95 \times 10^4$

【0219】

表24は、第2のOVCAR-3/Luc異種モデルにおける腫瘍移植後25日目の生物発光レベルを要約する。

【表26】

表24：OVCAR-3/Lucモデル。腫瘍移植後34日目の生物発光レベル

抗体(mg/kg)	移植後34日の平均放射輝度[p/s/cm ² /sr] (中央値±SEM)
CD3 結合対照(0.5)	$1.79 \times 10^7 \pm 2.17 \times 10^6$
抗 MUC16×CD3 (0.5)	$9.60 \times 10^4 \pm 4.55 \times 10^4$
抗 MUC16×CD3 (0.5)+抗 MUC16×CD28 (5)	$2.34 \times 10^7 \pm 1.12 \times 10^6$
抗 MUC16×CD3 (0.5)+抗 MUC16×CD28 (5)	$2.45 \times 10^3 \pm 4.49 \times 10^3$
抗 MUC16×CD3 (0.5)+抗 MUC16×CD28 (1)	$1.62 \times 10^3 \pm 2.32 \times 10^3$
抗 MUC16×CD3 (0.5)+抗 MUC16×CD28 (0.2)	$1.29 \times 10^3 \pm 4.77 \times 10^1$

【0220】

表25は、第2のOVCAR-3/Luc異種モデルにおける腫瘍移植後4日目から34日目の間のBLIの倍率変化を要約する。

10

20

30

40

50

【表 27】

表 25 : O V C A R - 3 / L u c モデル。腫瘍移植後 4 日目から 34 日目の間の B L I の倍率変化

抗体(mg/kg)	移植後 4 日目から D34 までの平均放射輝度 [p/s/cm ² /sr]の倍率変化(平均±SD)
CD3 結合対照(0.5)	51.35 ± 27.59
抗 MUC16×CD3 (0.5)	-0.64 ± 0.31
抗 MUC16×CD3 (0.5)+抗 MUC16×CD28 (5)	64.62 ± 36.38
抗 MUC16×CD3 (0.5)+抗 MUC16×CD28 (5)	-0.97 ± 0.04
抗 MUC16×CD3 (0.5)+抗 MUC16×CD28 (1)	-0.99 ± 0.02
抗 MUC16×CD3 (0.5)+抗 MUC16×CD28 (0.2)	-1.00 ± 0.00

【0221】

異なる投薬量を使用した第 2 の異種モデルの他の結果を図 3 A に示す。腫瘍移植後 5 日目および 8 日目に 2.5 μg の MUC16×CD3 で処理したマウスは、CD3 結合対照抗体 (EGFRvIII×CD3) で処置したマウスと比較して腫瘍組織量を有意に減少させたが、O V C A R - 3 / L u c 腫瘍細胞を完全には除去しなかった (図 3 A)。100 μg の MUC16×CD28 と組み合わせた 2.5 μg の MUC16×CD3 により、腫瘍成長がさらに阻害され、腫瘍細胞が経時的により持続して拒絶された (図 3 A)。同じ実験で、血清サイトカインレベルも得た。図 3 B は、異なる抗体および／または抗体の組み合わせで処理したマウスのサイトカインレベル (pg/ml) を示す。図 3 C は、26 日目の腫瘍組織量および血清中の CA-125 レベルとの相関関係を示す。

【0222】

インビボで腫瘍殺滅を助長する CD28 および CD3 二重特異性抗体の能力を試験するために、十分に確立された異種腹腔内卵巣 O V C A R - 3 腫瘍モデルを使用した。このモデルでは、腫瘍細胞を、ヒト PBMC で再構成した免疫不全マウスに導入する。他の卵巣癌細胞株と同様に、O V C A R - 3 細胞は MUC16 を発現する。移植前に、O V C A R - 3 細胞をルシフェラーゼレポーターで操作して、生物発光 (B L I) を使用した経時的な腫瘍成長のインビボ追跡を可能にした。移植した O V C A R - 3 腫瘍は、EGFRvIII×CD3 二重特異性抗体、これらの細胞に結合しなかった対照 CD3 二重特異性抗体で処理したマウス、および MUC16×CD28 二重特異性抗体のみで処理したマウスにおいて、衰えることなく成長した (図 3 A)。MUC16×CD3 二重特異性抗体単独は、有意な抗腫瘍活性を示したが、O V C A R - 3 腫瘍を完全に除去することはなく (図 3 A)、一方で、MUC16×CD28 二重特異性を MUC16×CD3 二重特異性抗体に追加すると、MUC16×CD3 単独よりもインビボの抗腫瘍効果が強化された (図 3 A)。増強された抗腫瘍活性と一致して、両方の二重特異性抗体の組み合わせにより、循環サイトカインの分泌も増加した (図 3 B)。

【0223】

MUC16 二重特異性抗体は、タンパク質分解的切断により予後卵巣癌バイオマーカー CA-125 が放出された後、卵巣癌細胞表面上の MUC16 の残りの「小塊」(CA-125 の切断および放出後の細胞表面の残骸) に結合するが (I. Mylonas et al., Immunohistochemical expression of the tumour marker CA-125 in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue. Anticancer Res 23, 1075-1080 (2003))、可溶性 CA-125 には結合しない (図 9 A および 9 B)。MUC16×CD28 二重特異性抗体が CA-125 を卵巣腫瘍組織量のバイオマーカーとして使用する能力を障害したかどうかを決定するために、マウスの CA-125 レベルを測定した。CA-125 レベルは、処理に関係なく

腫瘍組織量と相関した。最も低いCA-125レベルは、MUC16×CD3二重特異性抗体について以前に示されたように、二重特異性抗体の組み合わせで処理したマウスにおいて見られた（図3C）。

【0224】

同系腫瘍モデル

実験手順

以前に説明されているように、VelociGene（登録商標）技術を使用してMC38研究のためにCD3およびヒトMUC16の一部を発現するように遺伝子修飾したマウスにおいて、同系研究を実行した（Valenzuela et al., (2003) Nat. Biotechnol. June; 21 (6): 652-9）、（Crawford A, Haber L, Kelly MP, Vazzana K, Canova L, Ram P, Pawashe A, Finney J, Jalal S, Chiu D, Colleton CA, Garnova E, Makonnen S, Hickey C, Krueger P, Delfino F, Potocky T, Kuhnert J, Godin S, Retter MW, Duramad P, MacDonald D, Olson WC, Fairhurst J, Huang T, Martin J, Lin J C, Smith E, Thurston G, Kirshner JR. A Mucin 16 bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer. Science Translational Medicine 19 Jun 2019: Vol 11, Issue 497, eaau7534）。ヒトCD3、ヒトCD28、およびヒトMUC16の一部を発現するマウスを、ID8-VEGF研究に使用した。CD3のヒト化のために、マウスCD3遺伝子の細胞外部分（ $\gamma\delta\epsilon$ ）を遺伝子の対応するヒト領域で置き換える標的化ベクターの操作を行った。CD28のヒト化には、マウスCD28遺伝子の細胞外部分を遺伝子の対応するヒト領域で置き換える標的化ベクターの操作を行った。MUC16については、マウスのSEA反復13~17を、ヒトSEA反復12~16で置き換えた。各ヒト化マウスについて、F1H4（C57BL/6×129ハイブリッド）胚性幹（ES）細胞クローンにおける正しい遺伝子標的化は、以前に記載されているように対立遺伝子喪失アッセイによって同定された（Poueymiro et al (2007), Nat. Biotechnol. January; 25 (1): 91-9）。標的ES細胞を、8細胞期のスイスウェブスター胚に注入して、C57BL/6Nマウス（Taconic, Rensselaer, NY）とホモ接合性で繁殖させるための完全にF0世代のヘテロ接合マウスを産生した。次に、CD3のヒト細胞外部分（ $\gamma\delta\epsilon$ ）、CD28のヒト細胞外部分、およびヒトMUC16の一部を発現するマウスを、ホモ接合性に繁殖させた（hCD3/hMuc16またはhCD3/hCD28/hMUC16ヒト化マウスと称する）。

【0225】

免疫担当モデルでの有効性を調査するために、ノックインマウスを作成した。このマウスのT細胞はヒトCD3を発現し、マウスMUC16の代わりに、本発明の例示的な二重特異性抗体が結合するヒトMUC16の一部を含むキメラ分子が発現される。したがって、抗MUC16×CD3分子をこの研究で使用する事ができる。標的化CD28二重特異性分子の添加によりこれらのマウスにおける有効性を強化することができるかどうかを調査するために、代理二重特異性抗体も生成した。代理抗体は、CD28共刺激の効果を検査するために、ヒトMUC16を認識するが、マウスCD28は認識しなかったものであり、抗MUC16×mCD28と称されることがある。同系腫瘍モデルでは、ヒトMUC16の一部を発現するように操作されたMC38細胞株を使用した。マウスにMC38/huMUC16細胞を皮下（SC）移植し、移植日に0.01mg/kgの抗MUC16×CD3で週2回21日目まで処理した。0.01mg/kgの抗MUC16×CD3を用いた処理により、有意な抗腫瘍効果が生じ、MUC16×mCD28を添加することで、この効果は強化された。（図6A、6B、6C、および6Dを参照）。同系腫瘍の移

10

20

30

40

50

植および測定

【0226】

対応するマウス遺伝子座においてヒトCD3およびMUC16のヒトマウスキメラを発現するマウスに 1×10^6 個のMC38/huMUC16細胞を皮下(SC)移植した。マウスに、抗MUC16×CD3またはアイソタイプ対照を、ヒトMUC16およびマウスCD28を認識する代理二重特異性抗体を伴ってまたは伴わずに、21日目まで研究をとおして週2回、腹腔内(IP)投与し。処理は移植日に開始した。腫瘍増殖を、キャリパーを用いて週2回測定した。腫瘍移植後50日目にマウスを殺処分した。

【0227】

同系腫瘍の成長および阻害の計算

外部キャリパーで腫瘍体積を決定するために、最大長径(長さ)および最大横径(幅)を決定した。キャリパー測定値に基づいて、腫瘍体積を式: 体積 = (長さ × 幅²) / 2により計算した。XおよびY直径のキャリパー測定を使用して、腫瘍の成長を経時的に監視した。腫瘍サイズが2000mm³を超えたとき、マウスを安楽死させた。統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマンホイットニー-t検定を用いて決定した。

【0228】

結果

異なる処理下でのMC38/huMUC16モデルの腫瘍サイズを表26に要約した。

【表28】

表26: MC38/huMUC16モデル。21日目の腫瘍サイズ (mm³)

抗体(μg)	腫瘍サイズ(mm ³)(平均±SEM)
アイソタイプ対照(0.5)	1191 ± 424
抗MUC16×CD3 (0.01)	639.5 ± 186.8
抗MUC16×mCD28 (0.5)	648.5 ± 129.7
抗MUC16×CD3 (0.01)+抗MUC16×mCD28 (0.5)	167.3 ± 71.9

【0229】

本発明の例示的な抗MUC16×CD28二重特異性抗体が、完全に無傷の免疫系を有するマウスの同系マウスモデルにおいてMUC16×CD3の抗腫瘍効果を強化したかどうかを試験した。マウスを、Velocigene技術を使用してマウス遺伝子の代わりにヒトCD3およびヒトMUC16を発現するように遺伝子操作した(Crawford A, Haber L, Kelly MP, Vazzana K, Canova L, Ram P, Pawashe A, Finney J, Jalal S, Chiu D, Colleton CA, Garnova E, Makonnen S, Hickey C, Krueger P, Delfino F, Potocky T, Kuhnert J, Godin S, Retter MW, Duramad P, MacDonald D, Olson W C, Fairhurst J, Huang T, Martin J, Lin JC, Smith E, Thurston G, Kirshner JR. A Mucin 16 bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer. Science Translational Medicine 19 Jun 2019: Vol11, Issue497, eaau7534)。MC38結腸癌細胞株を、ヒトMUC16(pLVX.EF1a.MUC16、MC38/huMUC16)を発現するように操作し、皮下移植した。マウスに、移植日(0日目)から開始して週2回の腹腔内注射により、アイソタイプ対照(Iso Ctrl)、0.01mg/kgのMUC16×CD3、0.5mg/kgのMUC16×mCD28、またはそれらの組み合わせを投与した。腫瘍成長を経時的に監視した(図6A)。MUC16×CD3またはMUC16×CD28の単剤療法により、腫瘍成長が顕著に阻害された。腫瘍成長は、MUC16×CD3とMUC16×CD28と

の併用治療によってさらに顕著に阻害された（表 2 6）。同じ実験で、血清サイトカインレベルも得た。図 6 B は、異なる抗体および／または抗体の組み合わせで処理したマウスのサイトカインレベルを示す。

【0230】

適切なヒト化マウス M C 3 8 / h M U C 1 6 に、移植された腫瘍細胞を与え、対照、個々の C D 3 もしくは C D 2 8 二重特異性抗体、またはそれらの組み合わせで処理した（図 6 A、6 C、および 6 D）。M U C 1 6 腫瘍モデルにおいて、C D 3 および C D 2 8 二重特異性抗体の組み合わせにより、サイトカイン産生のアッセイ（図 6 C および 6 D）でも指摘されたように、最良の抗腫瘍応答がもたらされた（図 6 A）。

【0231】

M U C 1 6 × C D 2 8 リードの標的化の追加により同系モデルにおける有効性が強化され得るかどうかを調査するために、マウス M U C 1 6 の代わりにヒト C D 3、マウス C D 2 8 の代わりにヒト C D 2 8、および本発明の例示的な二重特異性抗体が結合するヒト M U C 1 6 の一部を含むキメラ分子を発現するマウスを使用した。I D 8 - V E G F 細胞株を、ヒト M U C 1 6 (I D 8 - V E G F / h M U C 1 6) を発現するように操作し、腹腔内移植した。マウスに、腫瘍移植後 3、6、および 10 日目に、1 m g / k g の E G F R v I I I × C D 3 または M U C 1 6 × C D 3 を単独でまたは M U C 1 6 × C D 2 8 と組み合わせて投薬した。体重増加を使用して腫瘍成長を監視した（図 5）。腫瘍成長は M U C 1 6 × C D 3 によって阻害され、M U C 1 6 × C D 2 8 との併用により、腫瘍成長はさらに遅延した。

【0232】

注目すべきことに、C D 2 8 二重特異性抗体が非常に限られた単剤活性を有していた以前のインビトロおよびインビボ分析（上記参照）とは異なり、この同系 M C 3 8 / M U C 1 6 モデルの C D 2 8 二重特異性抗体は、単剤としてより顕著な活性を有した。これは、これらの M C 3 8 モデルでは「シグナル 1」が既にある程度活性化されていることを示唆した。これと一致して、M C 3 8 腫瘍細胞は、p 1 5 E などの再活性化された内在性レトロウイルスタンパク質を高レベルで発現し、C 5 7 B L 6 マウスは、このネオエピトープを認識して応答する内在性 T 細胞を生成できることが以前に示されている（J. C. Yang, D. Perry-Lalley, The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors. J Immunother 23, 177-183 (2000)、H. J. Zeh, 3rd, D. Perry-Lalley, M. E. Dudley, S. A. Rosenberg, J. C. Yang, High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. J Immunol 162, 989-994 (1999)）。実際、本発明の M C 3 8 モデルでは、この p 1 5 E ネオ抗原に応答する腫瘍内 T 細胞を容易に検出できることが確認された（データ割愛）。したがって、この M U C 1 6 同系腫瘍モデルの C D 2 8 二重特異性抗体は、内在性 T C R / C D 3 依存性 T 細胞応答を促進することができ、C D 3 二重特異性抗体を介して追加の「シグナル 1」活性化を提供することでさらに強化することができる。

【0233】

T C R 複合体を介した T 細胞の活性化（「シグナル 1」）は、T 細胞上の C D 2 8 受容体が、標的細胞上のそのリガンド（C D 8 0 / B 7 . 1 および C D 8 6 / B 7 . 2）に係合するときに媒介されるような共刺激シグナル（「シグナル 2」）によって著しく強化されることが長い間認識されてきた（J. H. Esensten, Y. A. Helou, G. Chopra, A. Weiss, J. A. Bluestone, CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. Immunity 44, 973-988 (2016)）。発明者らのデータと一致して、T 細胞の

10

20

30

40

50

抗腫瘍活性を強化するCD28共刺激の可能性は、B7リガンドが腫瘍細胞上で過剰発現された研究によって最初に実証され(R. H. Schwartz, Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. Cell 71, 1065-1068 (1992)、L. Chen et al., Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. Cell 71, 1093-1102 (1992))、そのようなB7発現腫瘍のT細胞拒絶反応の改善を示した。この可能性が、ヒト治験においてCD28活性化抗体を評価する取り組みの動機付けとなった。残念なことに、そのような抗体(TGN1412)の2006年の試験は、大量サイトカイン放出症候群(CRS)に起因する多臓器不全により、6人のヒトボランティア全員に生命を脅かす合併症をもたらした(G. Suntharalingam et al., Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. N Engl J Med 355, 1018-1028 (2006))。この大惨事は、ヒトにおけるCD28活性化抗体のさらなる試験の中止につながった。

【0234】

腫瘍細胞表面上にクラスター化されない限り、CD28を直接活性化しないCD28二重特異性抗体により、従来のCD28活性化抗体の全身毒性を伴わずに、腫瘍部位でのみ共刺激を助長する可能性がもたらされた。このようなCD28二重特異性抗体の初期バージョンは、1990年代に提案され、評価された(C. Renner et al., Cure of xenografted human tumors by bispecific monoclonal antibodies and human T cells. Science 264, 833-835 (1994)、G. Jung et al., Local immunotherapy of glioma patients with a combination of 2 bispecific antibody fragments and resting autologous lymphocytes: evidence for in situ t-cell activation and therapeutic efficacy. Int J Cancer 91, 225-230 (2001)、M. Brandl, L. Grosse-Hovest, E. Holler, H. J. Kolb, G. Jung, Bispecific antibody fragments with CD20 X CD28 specificity allow effective autologous and allogeneic T-cell activation against malignant cells in peripheral blood and bone marrow cultures from patients with B-cell lineage leukemia and lymphoma. Exp Hematol 27, 1264-1270 (1999))。しかしながら、当時利用可能であった初期の技術では、提案されたバイオ医薬品を創出するために化学的架橋またはハイブリッド/ハイブリドーマ融合が必要とされ、腫瘍細胞上のクラスター化とは無関係に独自に大規模な活性を有する、最適とは言えない試薬がもたらされた(恐らくこれらの二重特異性抗体の非特異的凝集に起因して、従来のCD28抗体に似ているもの)。さらに、これらの初期のアプローチでは、いずれの抗腫瘍活性であってもそれをインビボで観察するためには、T細胞をインビトロで事前に活性化する必要もあった。これらを併せて、TGN1412 CD28活性化抗体による壊滅的な臨床結果、およびこれらの初期のCD28二重特異性抗体アプローチの限界により、これらのアプローチのさらなる探索が断念された。

【0235】

共刺激「シグナル2」を提供することによって抗腫瘍活性を顕著かつ安全に助長することができる新規クラスのCD28共刺激二重特異性抗体が、本明細書に記載される。これ

らのCD28二重特異性抗体は、それら自体では（「シグナル1」がない場合）限られた活性しかないが、これらのCD28二重特異性抗体を新たなクラスのCD3二重特異性抗体と対合することによって提供され得る場合（またはこれらのCD28二重特異性が、腫瘍特異的T細胞の内在性集団がすでに存在する状況で使用される場合）、「シグナル1」の状況において抗腫瘍活性を顕著に強化し得る。この新たなCD28二重特異性抗体アプローチの作成、試験、および成功は、（1）CD3二重特異性抗体を産生するために最初に開発され、これらのCD3二重特異性抗体について、技術（E. J. Smith et al., A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys. Sci Rep 5, 17943 (2015)）および臨床（A. Crawford et al., REGN4018, a novel MUC16xCD3 bispecific T-cell engager for the treatment of ovarian cancer. Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018, (2018)）両方の面で最近検証され（Clinicaltrials.gov:NCT02290951、Clinicaltrials.gov:NCT03564340）、その後、特異的「シグナル1」の非存在下で最低限の活性を示すCD28二重特異性抗体を効率的に産生するように適合された、新規の二重特異性プラットフォームの利用、（2）これらのCD28二重特異性を単独でおよびCD3二重特異性抗体と組み合わせて評価するための、複数の異種および同系の遺伝的にヒト化された（D. M. Valenzuela et al., High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nat Biotechnol 21, 652-659 (2003)、W. T. Poueymirou et al., F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. Nat Biotechnol 25, 91-99 (2007)）動物腫瘍モデルの開発、（3）サイトカイン放出症候群およびその臨床的発達に関するはるかに深い知識（A. Shimabukuro-Vornhagen et al., Cytokine release syndrome. J Immunother Cancer 6, 56 (2018)、D. W. Lee et al., Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. Blood 124, 188-195 (2014)、C. L. Bonifant, H. J. Jackson, R. J. Brentjens, K. J. Curran, Toxicity and management in CAR T-cell therapy. Mol Ther Oncolytics 3, 16011 (2016)）と併せて、これらのCD28二重特異性抗体のいずれの可能性がある毒性も従来のCD28活性化抗体の毒性と比較することができるサルモデルの検証、によって決まった。

【0236】

卵巣癌のTSAを標的とするTSA×CD28共刺激二重特異性抗体（MUC16×CD28）の生成および試験が本明細書に記載される。「シグナル1」の非存在下で、これらのCD28二重特異性抗体は、インビトロまたはインビボで最小限の活性を有することが示された。しかしながら、これらのCD28二重特異性は、CD3二重特異性抗体と対合して、腫瘍抗原ならびにTCRおよびCD28の複合体を含む人工的な「免疫シナプス」を形成することができる。さらに、インビトロで適切なCD3二重特異性抗体と対合すると、これらのCD28二重特異性抗体は、T細胞の活性化および腫瘍細胞の殺滅を、抗原依存的に効率的かつ特異的に助長することができる。さらに、これらのCD28二重特

10

20

30

40

50

異性抗体はまた、異種および同系腫瘍モデルにおいて、CD3二重特異性抗体の抗腫瘍活性を、腫瘍抗原特異的な方法で、インビボで効率的に強化する。そのようなモデルでは、腫瘍特異的T細胞がすでに存在しない限り、CD28二重特異性抗体は、最小限の単剤活性を有し、そのような設定では、腫瘍抗原依存的にこの特異的活性を強化すると思われる。さらに、TSA×CD28とTSA×CD3との併用療法により、腫瘍内活性化／メモリーT細胞表現型の拡張がインビボで大幅に促進される。最後に、遺伝的にヒト化された免疫担当マウスおよびカニクイザルにおける毒性学研究は、これらの二重特異性抗体が、従来のCD28活性化抗体と直接比較して、単剤として限られた活性を呈し、毒性を呈しないことを実証する。

【0237】

多くの場合、免疫腫瘍学の分野におけるヒト特異的臨床候補の特徴付けは、生着したヒト免疫細胞を用いた異種腫瘍モデルでの試験に限定されている。これらの異種モデル（利用されたOVCA R3モデルなど）は非常に便利であるが、制限がある。そのような異種モデルで使用されるマウスは、それらの正常組織においてヒト腫瘍標的を発現せず、それにより、標的の正常組織発現の状況における試験薬剤の評価を妨げる。実際、標的が通常正常組織でも高レベルで発現される場合、これは試験薬を腫瘍からそらすことによって抗腫瘍効果を制限する可能性があり、かつこれらの正常組織に毒性をもたらす可能性があるため、これらのいずれも異種モデルにおいて評価することができなかった。追加の制限は、免疫不全マウスに移された生着したヒト末梢血単核細胞（PBMC）の活性を伴う可能性があり、これは免疫担当系に見られる正常な宿主T細胞の活性とは異なる可能性がある。これらの制限を克服し、ヒト固有の臨床候補を試験するためのより良いモデルを提供するために、ダブルおよびトリプル遺伝的にヒト化されたマウスを作成した。これらのモデルでは、腫瘍抗原を、適切な宿主組織での正常な発現を可能にするために遺伝的にヒト化し（MUC16について）、CD3および／またはCD28成分を、免疫担当宿主細胞がヒト特異的臨床候補に応答できるように、遺伝的にヒト化した。これらの遺伝的にヒト化した免疫担当同系動物モデルにおいて、異種動物モデルのように、MUC16腫瘍標的のCD28二重特異性抗体より、それらの適切なCD3二重特異性抗体の抗腫瘍活性が強化されることが見出された。複数の前臨床モデルにわたる異なるTSA×CD28二重特異性抗体（例えば、MUC16およびPSMA（データ割愛））による抗腫瘍効果の同様の強化は、この治療法がロバストであり、特定の腫瘍モデルに限定されず、免疫療法の新規組み合わせ標的クラスとしてより広い有用性を有し得ることを示唆する。全体として、調査結果は、TSA×CD28二重特異性抗体が、TSA×CD3二重特異性と相乗作用し得、十分に研究されたTSA×CD3二重特異性抗体の有効性を、合理的に安全で耐受性の高い方法で顕著に強化し、ヒト治験での試験を正当化できる生物製剤ソリューションを提供する可能性があることを強調している。

【0238】

TSA×CD3二重特異性抗体は、有望な新しいクラスの免疫療法を表すが、多くの場合、抗腫瘍活性のさらなる最適化が確実に必要となる。CAR-Tアプローチが、「シグナル1」および「シグナル2」の両方を人工的に活性化して抗腫瘍活性を改善するキメラ受容体を採用したように（E. A. Zhukovsky, R. J. Morse, M. V. Maus, Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection. Curr Opin Immunol 40, 24-35 (2016)、S. L. Maude et al., Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med 378, 439-448 (2018)）、CD3特異性抗体（「シグナル1」を提供する）とCD28二重特異性抗体（「シグナル2」を提供する）とを組み合わせる抗腫瘍活性を強化することの可能性がある利点をここに示す。そのようなアプローチが、CAR-T療法に勝る実際的な利点に加えて、各患者に個別にカスタマイズする必要のある面倒な細胞療法の準備

10

20

30

40

50

を必要とせず、患者が毒性化学療法を介して先制的に「リンパ球枯渇」する必要なく、それにより、しばしば副作用を伴うこの細胞療法を受け入れることができる (A. Shimabukuro-Vornhagen et al., Cytokine release syndrome. J Immunother Cancer 6, 56 (2018)、C. H. June, R. S. O'Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, M. C. Milone, CAR T cell immunotherapy for human cancer. Science 359, 1361-1365 (2018)) 一発明による二重特異性アプローチは、有効性の向上ならびに作用の安全性および特異性の向上の可能性を提供する。すなわち、1つの抗原のCD3二重特異性抗体を第2の抗原に特異的なCD28二重特異性抗体と対合することによって、「コンビナトリアル標的化」を利用することが可能であり、有効性の向上は、両方の抗原を発現する腫瘍細胞でのみ発生しであり、したがって両方の抗原を発現する腫瘍細胞のみに対するT細胞殺滅に焦点を当てる一方で、抗原のうちの1つのみを発現する正常組織における「オフターゲット毒性」を制限する。まとめると、本明細書に提示されるデータは、CD28ベースの二重特異性抗体をCD3ベースの二重特異性抗体と組み合わせると、顕著に強化され相乗的な抗腫瘍活性を有する耐容性の高い「既製の」生物製剤ソリューションを提供し得ることを示す。ヒト治験におけるこの可能性に関する最初の試験は、今年行われる。

【0239】

実施例9. 単独または併用療法でのTSA×CD28は、カニクイザルのCD28スーパーアゴニストと比較して全身性T細胞活性化を誘発しない

本発明の例示的なMUC16×CD28抗体は、カニクイザルからのT細胞のMUC16×CD3活性化を増強する(図2F~2H)。単独のまたは抗MUC16×CD3との組み合わせた本発明の例示的な抗MUC16×CD28二重特異性抗体の安全性および耐容性を決定するために、カニクイザルにおいて単回投与毒性学研究を行った。表27に示されるように、雌または雄のカニクイザルを治療群に割り当てた。

【0240】

カニクイザルの研究は、IACUCガイドラインに従って実施した。雄のカニクイザル(3匹/群)は、およそ30分間の静脈内注入を介して各試験品の単回投与を受けた(併用処置は、合計1時間の個別注入として投与した)。毒性の評価は、臨床観察、定性的な食物消費、体重、神経学的検査、バイタルサイン(体温、心拍数、パルスオキシメトリ、および呼吸数)、ならびに臨床的および解剖学的病理学に基づいた。サイトカイン分析、免疫表現型分析、組織病理学、および毒物動態評価のために、血液および組織試料を収集した。CRPレベルは、Roche Modular P800システムで分析した。サイトカインは、Meso Scale Diagnostics(MSD, Rockville, MD)によって測定した。末梢血フローサイトメトリーでは、血液をカリウムEDTAチューブに収集し、溶解し、抗CD3、抗Ki67、および抗ICOS(BD Biosciences)で染色し、FACS Canto IIで分析した。

【0241】

動物に、およそ30分間の静脈内注入を介して各試験品の単回投与を与えた(併用処置は、合計1時間の個別注入として投与した)。毒性の評価は、臨床観察、定性的な食物消費、体重、神経学的検査、バイタルサイン(体温、心拍数、パルスオキシメトリ、および呼吸数)、ならびに臨床的および解剖学的病理学に基づいた。サイトカイン分析、FACS免疫表現型分析、および毒物動態評価のために、血液試料を収集した。本発明の例示的な抗MUC16×CD28を1または10mg/kgで、MUC16×CD3を1または10mg/kgで、または併用治療を、単回で投与した後、有意なサイトカイン放出も、T細胞辺縁趨向も、T細胞活性化マーカーの上方制御も観察されなかった。表27は、絶対T細胞数、T細胞活性化マーカー(ki67)、CRP、および個々の動物から示す時点で得られた血液からの血清サイトカインレベルを含む様々な読取り値を要約する。さらに、これらの発見は、ドライコーティングおよびウェットコーティングしたヒトT細胞増殖アッセイを使用して検証され、これにより、ドライコーティングまたはウェットコーテ

イング法を使用してアッセイプレートにMUC16×CD28を固定しても、CD28スーパーアゴニスト抗体とは対照的に、CD3刺激の非存在下ではT細胞の活性化が誘導されないことが実証された（図7）。実際、本発明の例示的な抗MUC16×CD28二重特異性抗体ならびに親二価CD28抗体が、CD28スーパーアゴニスト抗体と比較して、ヒトT細胞増殖の誘発に失敗したことが見出された。全体として、サルにおける探索的単回投与毒性学研究およびインビトロヒトT細胞ベースのアッセイは、本発明の例示的な抗MUC16×CD28二重特異性抗体が安全であり、忍容性が良好であることを示唆している。

【表29】

分子	説明	用量 (mg/kg)	動物#	1日目- 臨床 観察	何らかの	(E3)(μL)		T細胞		CRP (mg/dL)	投与後5時間の血漿サイトカイン(pg/mL)							
					観察						24時間	IL-6	IL-8	IL-10	IFN-γ	TNF-α	IL-2	IL-4
					2-4日目	事前 試験	5時間	事前 試験	72時間									
REGN4018	抗 Muc16 × CD3(hIgG4)	1	1501	-	-	2.28	1.67	0.11	0.10	13.8	10	2	3	BLQ	BLQ	7	BLQ	
			1502	-	-	3.12	1.71	0.25	0.29	7.9	24	2	4	BLQ	4	BLQ	BLQ	
			1503	-	-	3.84	1.58	0.21	0.17	6	5	2	BLQ	BLQ	BLQ	3	BLQ	
bs24963D	抗 Muc16 × CD28(hIgG4)	1	2501	-	-	3.07	2.40	0.13	0.20	0.4	3	3	BLQ	BLQ	4	3	BLQ	
			2502	-	-	1.97	2.73	0.10	0.15	0.1	4	3	3	BLQ	4	4	BLQ	
			2503	-	-	1.64	3.05	0.10	0.19	0.2	7	3	4	46	6	4	BLQ	
REGN4018 + bs24963D	抗 Muc16 × CD3 + 抗 Muc16 × CD28	1+1	3501	-	-	2.89	1.98	0.19	0.10	13.3	24	3	4	47	4	13	BLQ	
			3502	-	-	1.62	1.18	0.10	0.06	13.3	22	3	BLQ	80	5	7	BLQ	
			3503	-	-	1.80	1.37	0.10	0.09	9.8	7	BLQ	BLQ	BLQ	4	9	BLQ	
REGN4018	抗 Muc16 × CD3(hIgG4)	10	4501	-	-	2.48	0.89	0.13	0.12	14.2	11	4	4	28	4	3	BLQ	
			4502	-	-	1.16	0.52	0.10	0.12	7.6	7	4	4	31	BLQ	6	BLQ	
			4503	-	-	3.75	1.01	0.23	0.21	2.5	5	4	4	38	4	4	BLQ	
bs24963D	抗 Muc16 × CD28(hIgG4)	10	9501	-	-	1.86	2.91	0.09	0.17	0.1	4	4	4	BLQ	5	3	BLQ	
			9502	-	-	0.57	0.96	0.04	0.07	0.2	9	4	4	BLQ	BLQ	4	BLQ	
			9503	-	-	1.49	2.98	0.18	0.19	0.5	7	4	5	BLQ	4	3	BLQ	
REGN4018 + bs24963D	抗 Muc16 × CD3 + 抗 Muc16 × CD28	10+10	6501	-	-	3.58	0.75	0.21	0.09	14.3	31	5	3	BLQ	BLQ	7	BLQ	
			6502	-	-	3.98	1.29	0.31	0.29	14.6	73	5	3	BLQ	BLQ	38	BLQ	
			6503	-	-	2.01	0.79	0.17	0.10	5.3	7	3	3	BLQ	4	BLQ	BLQ	
REGN4018 + bs24963D	抗 Muc16 × CD3 + 抗 Muc16 × CD28	1+10	5501	-	-	1.70	1.37	0.14	0.23	14.2	6	4	4	36	BLQ	6	BLQ	
			5502	-	-	3.11	3.24	0.18	0.17	5.5	7	5	4	BLQ	BLQ	4	BLQ	
			5503	-	-	2.38	1.85	0.20	0.19	6.2	31	4	4	BLQ	BLQ	2	BLQ	
REGN4018 + bs24963D	抗 Muc16 × CD3 + 抗 Muc16 × CD28	1+1、 繰返し 投与	8501	-	-	3.36	1.04	0.26	0.05	14.4	12	4	4	BLQ	3	11	BLQ	
			8502	-	-	2.49	2.09	0.14	0.06	11.7	9	4	5	BLQ	5	7	BLQ	
			8503	-	-	5.93	4.73	0.31	0.15	14.6	25	4	4	BLQ	4	4	BLQ	

BLQ: 定量限界以下
LLOQ (定量下限): IFN-γ = 37 pg/mL; TNF-α = 3 pg/mL; IL-2 = 2.4 pg/mL; IL-6 = 2 pg/mL; IL-8 = 1.7 pg/mL; IL-4 = 1.8 pg/mL; IL-10 = 3 pg/mL

【0242】

サイトカインおよびフローサイトメトリー免疫表現型分析のために血液試料を収集した。サルに投与したCD28-SAは、有意なサイトカイン放出、リンパ球辺縁趨向、およびT細胞活性化を誘発したが、MUC16×CD28の投与後には、サイトカイン放出も、T細胞辺縁趨向も、T細胞活性化も観察されなかったことは注目に値する（図8A～8Cおよび表27）。全体として、これらの予備観察により、TSA×CD28二重特異性抗体が霊長類における忍容性が良好であり、CD28-SAで見られるようにサイトカイン放出およびT細胞活性化を誘発しないことが示唆される（データ割愛）。サルにおけるCD28-SAを用いた以前の研究では、ヒトに見られる大規模なサイトカイン放出およびT細胞活性化を予測できなかったことに留意すべきであり（Tegenaro AG, www.circare.org/foia5/tgn1412investigatorbrochure.pdf）、これは、サルにおけるより低いCD28発現に起因していた（D. Eastwood et al., Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells. Br J Pharmacol 161, 512-526 (2010)）。カニクイザルの忍容性研究はヒトのCRSを予測するものではないとしても、サルのCD28-SAで示された強いシグナルは、Tegenaroらが、単にこれらの応答をロバストに観察できる適切な早期の時点进行调查しなかったために、これを見落とししたことを示唆する。

【0243】

実施例10: bs24963D (REGN5668とも言及されるMUC16×CD28Ab) およびREGN4018 (MUC16×CD3) の、ヒトまたはカニクイザルMUC16を発現する細胞株、ヒトまたはカニクイザルPBMCからの初代細胞、およびT細胞株への結合

材料および方法－実験手順の要約

フローサイトメトリー分析を利用して、ヒトMUC16を内因的に発現するヒト卵巣癌細胞株 (OVCA R-3 およびPEO1) へのbs24963Dの結合と、ヒトまたはカニクイザルMUC16を発現するように操作されたマウスID8細胞への、ヒトおよびカニクイザルT細胞への、ならびに操作されたレポーターT細胞株へのbs24963DおよびREGN4018の結合とを決定した。

【0244】

端的に言えば、 1×10^5 細胞/ウェルを、bs24963D、REGN4018、および対照抗体 (IgG4^{P-PVA} 非結合対照mAb、CD28 非架橋対照二重特異性抗体、または親CD28もしくはCD3対照) を含む抗体の段階希釈物とともに4℃で30分間インキュベートした。

【0245】

抗体の希釈は、ヒトおよびカニクイザルの初代T細胞ならびに操作されたレポーターT細胞には12.2 pM~200 nMの範囲であり、一方でMUC16⁺ 標的細胞には8.1 pM~133 nMを選択した。

【0246】

インキュベーション後、細胞を1%濾過FBS含有する冷PBSで2回洗浄し、続いてフィコエリトリン (PE) 標識抗ヒトIgG (MUC16⁺細胞) またはAlexa647標識抗ヒトIgG (CD28⁺細胞) を用いて検出した。

【0247】

近赤外線 (IR) 反応性LIVE/DEAD色素を、ヒトおよびカニクイザルT細胞に添加した。抗体または2次抗体を含有しないウェルのみを対照として使用した。

【0248】

MUC16⁺細胞またはJ. RT3. T3. 5/NF-κB-Luc/1G4AB/hCD8αβ/hCD28細胞株を用いたインキュベーション後、細胞を洗浄し、200 μLのFACS緩衝液 (1%濾過FBSおよび1mMのEDTAを含有する冷PBS) に再懸濁し、BD FACS Canto IIでフローサイトメトリーによって分析した。

【0249】

ヒトまたはカニクイザルT細胞とのインキュベーション後、細胞を洗浄し、FACS緩衝液中の抗CD2、抗CD16、抗CD4、および抗CD8抗体のカクテルを用いて、20分間4℃で染色した。洗浄後、細胞を、FACS緩衝液中に再懸濁し、Live/CD2⁺/CD4⁺/CD16⁻またはLive/CD2⁺/CD8⁺/CD16⁻にゲートし、BD LSRFortessa X-20上でフローサイトメトリーにより分析した。

【0250】

EC₅₀ 決定のため、測定したMFIを、GraphPad Prismを使用する9点応答曲線上の4パラメータロジスティック方程式を使用して分析した。最大MFIの倍率増加を、検出された最高のMFIと二次抗体のみを含むウェルのMFIとの比率をとることによって決定した。

【0251】

フローサイトメトリーを使用して、bs24963Dおよび市販の抗PD-L1抗体の、MUC16⁺ヒト膀胱癌細胞、SW1990およびSW1990/hPD-L1細胞への結合を決定した。端的に言えば、 2×10^5 個の細胞を、5 μL (66.7 nM) のbs24963D、抗PD-L1 (2.5 μL)、またはAlexaFluor647 (bs24963D) もしくはAPC (抗PD-L1) と複合体化した非結合対照抗体とともにインキュベートし、30分間氷上でインキュベートした。細胞を、染色緩衝液で1回洗浄し、遠心分離し、D-PBSで洗浄した。細胞を、100 μLの1:1000希釈の

10

20

30

40

50

L I V E / D E A D F i x a b l e V i o l e t 生死判定色素で染色し、室温で15分間インキュベートした。細胞を、染色緩衝液中で3回洗浄し、100 μ L の1:1の染色緩衝液およびc y t o f i x 溶液中に再懸濁し、C y t o f l e x サイトメーターを使用するフローサイトメトリーにより分析した。生存に対する倍率結合を、目的の抗体のM F I を生存のみのM F I で割ることによって計算した。

【0252】

材料および方法

N F - κ B ルシフェラーゼレポーターバイオアッセイ

図10に示すように、T C R を介したシグナル伝達を強化するb s 2 4 9 6 3 D の能力を、操作されたT細胞／抗原提示細胞ベースのレポーターアッセイにおいて評価した。T C R は特定のM H C / ペプチド複合体を認識し、活性化タンパク質1 (A P - 1)、活性化されたT細胞の核因子(N F A T)、または活性化されたB細胞の核因子カップ軽鎖エンハンサー(N F - κ B)などの多数の転写因子を介してT細胞を活性化する(G o l d r a t h, 1999; N a t u r e 402:255-62)(S h a p i r o, 1998; J. I m m u n o l o g y; 161(12):6455-8)。T細胞応答は、C D 28などの共刺激受容体の関与を介してさらに精緻化され、これが今後は内在性リガンドであるC D 80またはC D 86によって活性化され、続いて、T C R 活性化後にN F - κ B 転写因子によって制御される経路などの細胞シグナルを増強する。

【0253】

このアッセイでは、操作されたT細胞は、ヒトM H C クラスI分子H L A - A 2および操作された抗原提示3 T 3細胞上に示されるh β 2 M と複合体を形成したN Y - E S O - 1 157-165ペプチド(N Y E S O 1 p)を認識する、1 G 4 T C R (I G 4 A B)を介して直接活性化される(R o b b i n s, 2008; J. o f I m m u n o l o g y; 180(9):6116-31)。T C R 活性化により、ルシフェラーゼが産生され、これは、操作されたレポーターT細胞のN F - κ B 転写因子によって促進される。C D 8は、リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ(L c k)をT C R / C D 3複合体に動員することにより、T C R / M H C 相互作用を容易にし、T細胞活性化を助長することで、細胞内免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(I T A M)のリン酸化をとおしてT C R シグナル伝達を強化する(C o l e, 2012; I m m u n o l o g y; 137(2):139-48)(G u i r a d o, 2002; B i o c h e m. B i o p h y s . R e s. C o m m. 291(3):574-81)。

【0254】

非架橋対照であるb s 2 4 9 6 3 D (非T A A $\times$ C D 28二重特異性抗体)または非結合対照の2倍段階希釈物(39 p M ~ 10 n M)を、M U C 16⁻(3 T 3 / h β 2 M / H L A - A 2 / N Y E S O 1 p)またはM U C 16⁺(3 T 3 / h β 2 M / H L A - A 2 / N Y E S O 1 p / h M U C 16)のいずれかであった1.5 $\times$ 10⁴個の抗原提示細胞の存在下で、ウェルあたり5 $\times$ 10⁴個の操作されたレポーターT細胞(J. R T 3. T 3. 5 / N F - κ B - L u c / 1 G 4 A B / h C D 8 α β / h C D 28)に繰り返して添加した。抗体希釈およびバイオアッセイは、完全培地(10% F B S を補充したR P M I、ならびにペニシリン、ストレプトマイシン、およびL - グルタミンのカクテル)中で行った。いずれの抗体も含まないウェルを、追加の対照として含め、活性およびE C 50 値の倍率増加を計算するために使用した。プレートに37 $^{\circ}$ C および5% C O 2 で5時間インキュベートした後、O N E - G l o ルシフェラーゼ基質(100 μ L)を各ウェルに添加した。ルシフェラーゼ活性を、E N V I S I O N プレートリーダーを使用して発光シグナルとして記録し、相対光単位(R L U)として表した。検出されたR L U を、G r a p h P a d P r i s m を使用して10点応答曲線上の4パラメータロジスティック方程式によって分析した。

【0255】

最大活性化シグナルを、試験した抗体濃度範囲内で検出された平均最大R L U 応答として決定した。活性の倍率増加を、抗体の非存在下で記録された平均R L U 値に対する、試

験した抗体濃度範囲内で記録された最高の平均RLU値の比率として計算した。

【0256】

T細胞増殖およびIL-2放出についてのT細胞活性化アッセイ

一定濃度のREGN4018（ヒト卵巣癌細胞株OVCAR-3およびPEO1で評価）の存在下または一定濃度のセミプリマブ（ヒト膵臓癌細胞株[SW1990およびSW1990/hPD-L1]で評価）の存在下でIL-2放出およびT細胞増殖を媒介するbs24963Dの資質を、それぞれ3人または2人のドナーからの富化したヒト初代T細胞を用いたT細胞活性化アッセイを使用して決定した。

【0257】

ヒト初代T細胞の分離

ヒトPBMCを、4人の健康なドナーの白血球パックから単離した。ドナー555014および555109については、PBMCを、密度勾配遠心分離を使用して末梢血から単離した。端的に言えば、15mLのFicoll Plusを50mLコニカルチューブに加え、続いて2%FBSを含有するPBSで1:1に希釈した30mLの血液を上重ねた。ブレーキをオフにして400×gで30分間遠心分離した後、単核細胞層を新しいチューブに移し、2%FBSを含有するPBSで5倍に希釈し、300×gで8分間遠心分離した。ドナー555131および555129については、PBMCを、Stem Cell TechnologiesのEasySep Direct Human PBMC Isolation Kitを使用し、製造業者のプロトコルに従って、健康なドナーの末梢血から単離した。単離したPBMCを10%DMSOを含有するFBS中で凍結させた。CD3⁺T細胞を単離するため、凍結させたPBMCのバイアルを、37℃の水槽中で解凍し、50U/mLのBenzonase（登録商標）Nucleaseを含有する刺激培地（10%FBS、HEPES、NaPyr、NEAA、および0.01mMのβ-メルカプトエタノール[BME]で補充したX-VIVO 15細胞培養培地）中で希釈した。細胞を1200rpmで10分間遠心分離し、EasySep緩衝液に再懸濁し、Stem Cell TechnologiesのEasySep T-Cell Isolation kitを製造業者のプロトコルに従って使用して単離した。

【0258】

ヒトOVCAR-3、PEO1、SW1990、SW1990/hPD-L1細胞、およびヒト初代T細胞を用いたT細胞活性化アッセイ

刺激培地（10%FBS、HEPES、NaPyr、NEAA、および0.01mMのBMEで補充したX-VIVO 5細胞培養培地）に再懸濁したCD3⁺T細胞を、 1×10^5 細胞/ウェルの濃度で96ウェル丸底プレートにプレATINGした。OVCAR-3、PEO1、SW1990、またはSW1990/hPD-L1細胞を、25μg/mL（OVCAR-3）、10μg/mL（PEO1）、または30μg/mL（SW1990およびSW1990/hPD-L1）のマイトマイシンCで処理して、増殖を阻止した。37℃、5%CO₂で1時間インキュベートした後、マイトマイシンCで処理した細胞を2%FBSを含有するD-PBSで3回洗浄し、続いて刺激培地での最後の再懸濁を行った。OVCAR-3、PEO1、SW1990、およびSW1990/hPD-L1細胞を、OVCAR-3、PEO1、および両SW1990細胞について、それぞれ、 1×10^4 、 2.5×10^4 細胞、または 5×10^4 細胞の最終濃度で、CD3⁺T細胞を含むウェルに添加した。一定濃度のREGN4018またはCD3非架橋対照二重特異性抗体（5nM）、またはセミプリマブもしくは非結合IgG4^P対照（20nM）を、OVCAR-3、PEO1、SW1990、またはSW1990/hPD-L1細胞を含むウェルに添加した。続いて、bs24963D、非TAA×CD28対照、または非結合対照の抗体を、1:4希釈系列で7.6pMから500nMまで滴定し、ウェルに添加した。10点濃度曲線の最終点には抗体が含まれず、これを活性の倍率増加を計算するために使用した。プレートを、37℃、5%CO₂で72（OVCAR-3およびPEO1）または96（SW1990およびSW1990/hPD-L1）時間インキュベートした後、50μLの培地上清を収集して、増殖を定量化するため[メチル-³H]-チミジン

10

20

30

40

50

での処置の前にIL-2放出を測定した。

【0259】

IL-2放出について、5 μ L (OVCA-R-3およびPEO1細胞を使用するアッセイの場合) または20 μ L (SW1990およびSW1990/hPD-L1細胞を使用するアッセイの場合) の上清を、製造業者のプロトコルに従ってヒトIL-2 AlphaLISAキットを使用して試験した。IL-2測定値を、Perkin ElmerのマルチラベルプレートリーダーEnvisionで取得し、相対蛍光単位(RFU)として報告した。

【0260】

増殖アッセイについて、刺激培地中で2mCi/mLに希釈した50 μ Lの[メチル-³H]-チミジンウェルに添加し、プレートを、6時間(OVCA-R-3およびPEO1細胞を使用するアッセイの場合) または16時間(SW1990およびSW1990/hPD-L1細胞を使用するアッセイの場合) のいずれかの間インキュベートした。[メチル-³H]-チミジンは、より高量で分裂細胞に組み込まれることになる。インキュベーション後、細胞をフィルタープレートに採取し、Microplate Scintillation & Luminescence Counter TopCount NXT計器での測定のために準備した。

【0261】

全ての段階希釈を、IL-2の放出および増殖について三重で試験した。抗体のEC₅₀値は、GraphPad Prism (商標) ソフトウェアを使用して、10点用量応答曲線上の4パラメータロジスティック方程式から決定した。IL-2放出および増殖の最大レベルを、試験した用量範囲内で検出された平均最大応答として付与する。bs24963Dによって媒介される最大IL-2放出またはT細胞増殖の倍率増加は、いずれの抗体によっても媒介されない最大IL-2放出または増殖に対して計算した。

【0262】

T細胞を活性化するbs24963Dの能力を、刺激性抗原提示細胞がシグナル1を提供するアッセイにおいて評価した。このアッセイでは、ヒトCD8、ヒトCD28、HLA-A2と複合体を形成したNY-ESO-1ペプチド(NY-ESO1p)を認識する文献に記載されているTCR(1G4)、およびNF- κ B-ルシフェラーゼレポーターを発現するように操作されたJ. RT3.T3.5レポーターT細胞を使用した。シグナル1を提供する刺激性抗原提示細胞は、HLA-A2、h β 2M、およびNY-ESO1pを、ヒトMUC16(hMUC16)の有無にかかわらず発現するように操作された3T3細胞であった。CD28非架橋対照二重特異性抗体(非TAA $\times$ CD28)および非結合対照mAb(IgG4^{P-PVA})をbs24963Dと並行して試験した。NF- κ Bシグナル伝達を、ルシフェラーゼレポーター活性を検出するために発光試薬を使用して測定した。結果を表28に要約する。

【0263】

抗原この試験システムでは、bs24963Dにより、MUC16⁺抗原提示細胞の存在下でのレポーターT細胞におけるNF- κ Bシグナル伝達の濃度依存的な増加が媒介され、MUC16発現を欠く細胞を使用した場合、活性は見られなかった(図11Aおよび11B)。CD28非架橋対照二重特異性抗体では、NF- κ Bシグナル伝達の増加は観察されなかった。

10

20

30

40

50

【表 30】

表 28 : bs24963D 媒介性 NF- κ B-ルシフェラーゼ活性化の要約

抗体	抗原提示細胞(±MUC16)					
	3T3/h β 2M/HLA-A2/NYESO1p/hMUC16			3T3/h β 2M/HLA-A2/NYESO1p		
	EC ₅₀ (M)	最大 RLU ^a	倍率増加	EC ₅₀ (M)	最大 RLU ^a	倍率増加
bs24963D	2.88×10 ⁻¹⁰	254,300	2.11	ND	65,920	1.00
非 TAA×CD28	ND	133,220	1.24	ND	64,740	1.02

^a最大 RLU は、試験した抗体濃度範囲 (3.9 pM ~ 1.0 nM) 内で観察された最も高い平均 RLU 値である。

^bbs24963D または 非 TAA×CD28 によって媒介される最大 RLU の倍率増加は、いずれの抗体によっても媒介されていない最大 RLU に対して計算した。

略語 : ND、ルシフェラーゼ活性の濃度依存的増加が観察されなかったため決定せず

10

【0264】

実施例 11. REGN4018 (抗 MUC16×抗 CD3) または セミプリマブ (PD-1 アンタゴニスト抗体) の存在下または非存在下での bs24963D (抗 MUC16×抗 CD28) を介した IL-2 放出および ヒト初代 T 細胞の増殖の評価

IL-2 放出および T 細胞増殖によって決定した、ヒト初代 T 細胞を活性化する bs24963D の能力を、2 つの異なる MUC16⁺ ヒト卵巣癌細胞株 (OVCA-R-3 および PEO1) の存在下で評価した。これらの細胞は同種応答からの十分なシグナル 1 を提供しないため、シグナル 1 を提供するために固定濃度の REGN4018 (MUC16×CD3 二重特異性抗体) を含めた。OVCA-R-3 および PEO1 細胞の結果を、IL-2 の放出については表 29 に、増殖については表 30 に要約する。

20

【0265】

IL-2 放出および T 細胞増殖によって決定した、ヒト初代 T 細胞を活性化する bs24963D の能力を、MUC16⁺ ヒト膵臓癌細胞株 (SW1990) および ヒト PD-L1 を過剰発現するように操作した SW1990 (SW1990/hPD-L1) の存在下で評価した。両方の細胞株が、シグナル 1 として機能するのに十分な同種応答を提供する。加えて、固定濃度の セミプリマブ (20 nM) が bs24963D の効果を増補する能力も評価した。SW1990 および SW1990/hPD-L1 細胞の結果を、IL-2 放出については表 31 に、増殖については表 32 に要約する。

30

【0266】

OVCA-R-3 および PEO1 標的細胞による REGN4018 の存在下または非存在下での ヒト初代 T 細胞からの IL-2 放出および それらの増殖を強化する bs24963D (REGN5668) の能力

OVCA-R-3 および PEO1 癌細胞とともに インキュベートした場合、bs24963D は、REGN4018 の存在下でのみ、ヒト T 細胞からの IL-2 放出 (図 12) および それらの増殖 (図 13) の濃度依存的な強化を媒介した。CD3 および CD28 非架橋対照二重特異性抗体は、REGN4018 の存在下でも非存在下でも、IL-2 放出を増強しなかった。

40

【0267】

このアッセイ中、5 nM の REGN4018 単独では、非結合対照と比べて、IL-2 放出は増加しなかったが、T 細胞増殖の中程度の強化が示された。

50

【表 3 1】

表 2 9 : O V C A R - 3 および P E O 1 標的細胞による R E G N 4 0 1 8 の存在下または非存在下でのヒト初代 T 細胞からの I L - 2 放出の b s 2 4 9 6 3 D を介した強化の要約

標的細胞株	ドナー	固定濃度の Ab (5nM)	様々な濃度で試験した抗体 (7.6pM~500nM)	ヒト初代 T 細胞からの IL-2 放出		
				EC ₅₀ (M)	最大 IL-2 ^a (RFU)	倍率増加 ^b (IL-2)
OVCAR-3	ドナー 555014	REGN4018	bs24963D	7.07×10 ⁻¹⁰	46,931	20.01
			非 TAA×CD28	NC	4,741	1.89
		非 TAA×CD3	bs24963D	NC	1,361	2.75
			非 TAA×CD28	NC	3,033	6.62
	ドナー 555109	REGN4018	bs24963D	1.22×10 ⁻⁹	36,725	32.10
			非 TAA×CD28	NC	1,638	1.38
		非 TAA×CD3	bs24963D	ND	893	1.82
			非 TAA×CD28	NC	1,403	2.84
	ドナー 555131	REGN4018	bs24963D	5.90×10 ⁻¹⁰	46,209	13.08
			非 TAA×CD28	NC	4,443	1.33
		非 TAA×CD3	bs24963D	NC	1,814	2.71
			非 TAA×CD28	NC	3,136	5.95
PEO1	ドナー 555014	REGN4018	bs24963D	1.95×10 ⁻⁹	31024	30.30
			非 TAA×CD28	NC	2312	2.16
		非 TAA×CD3	bs24963D	NC	2490	5.56
			非 TAA×CD28	NC	2776	6.12
	ドナー 555109	REGN4018	bs24963D	3.10×10 ⁻⁹	16,421	20.03
			非 TAA×CD28	ND	897	1.33
		非 TAA×CD3	bs24963D	NC	2,039	4.36
			非 TAA×CD28	NC	1,360	2.35
	ドナー 555014	REGN4018	bs24963D	2.42×10 ⁻⁹	29,217	25.70
			非 TAA×CD28	NC	2,175	1.82
		非 TAA×CD3	bs24963D	NC	2,911	5.77
			非 TAA×CD28	NC	2,443	4.42

^a 最大 I L - 2 濃度は、試験した抗体濃度範囲内で記録された最も高い平均 I L - 2 濃度値である。

^b R E G N 4 0 1 8 の存在下または非存在下での b s 2 4 9 6 3 D によって媒介される最大 I L - 2 放出の倍率増加は、いずれの抗体によっても媒介されていない最大 I L - 2 放出に対して計算した。

略語 : N C 、データが 4 パラメータロジスティック方程式に適合しなかったため計算せず、 I L - 2 放出の濃度依存的増加が観察されなかったため決定せず。

10

20

30

40

50

【表 3 2】

表 3 0 : O V C A R - 3 および P E O 1 標的細胞による R E G N 4 0 1 8 の存在下または非存在下でのヒト初代 T 細胞からの増殖の b s 2 4 9 6 3 D を介した強化の要約

標的細胞株	ドナー	固定濃度の Ab (5nM)	様々な濃度で試験した抗体 (7.6pM~500nM)	T 細胞増殖		
				EC ₅₀ (M)	最大増殖 ^a (CPM)	倍率増加 ^b (増殖)
OVCAR-3	ドナー 555014	REGN4018	bs24963D	8.89×10 ⁻¹¹	13,968	2.03
			非 TAA×CD28	NC	11,260	1.59
		非 TAA×CD3	bs24963D	NC	336	1.38
			非 TAA×CD28	NC	579	1.60
	ドナー 555109	REGN4018	bs24963D	9.45×10 ⁻¹¹	14,818	3.18
			非 TAA×CD28	4.61×10 ⁻⁸	8,141	1.66
		非 TAA×CD3	bs24963D	ND	416	1.37
			非 TAA×CD28	ND	475	1.33
	ドナー 555131	REGN4018	bs24963D	2.47×10 ⁻¹¹	13,607	1.66
			非 TAA×CD28	NC	10,154	1.16
		非 TAA×CD3	bs24963D	NC	622	1.82
			非 TAA×CD28	NC	562	1.68
PEO1	ドナー 555014	REGN4018	bs24963D	1.73×10 ⁻¹⁰	9,605	3.27
			非 TAA×CD28	NC	6,953	2.26
		非 TAA×CD3	bs24963D	NC	603	2.58
			非 TAA×CD28	NC	551	3.09
	ドナー 555109	REGN4018	bs24963D	4.04×10 ⁻¹⁰	10,304	8.42
			非 TAA×CD28	NC	4,888	4.62
		非 TAA×CD3	bs24963D	NC	733	2.84
			非 TAA×CD28	NC	419	1.72
	ドナー 555014	REGN4018	bs24963D	2.22×10 ⁻¹⁰	10,335	3.69
			非 TAA×CD28	4.22×10 ⁻⁸	5,631	2.06
		非 TAA×CD3	bs24963D	NC	835	4.44
			非 TAA×CD28	NC	523	2.29

^a 最大増殖は、試験した抗体濃度範囲内で記録された最も高い平均 CPM 値である。

^b R E G N 4 0 1 8 の存在下または非存在下での b s 2 4 9 6 3 D によって媒介される最大 T 細胞増殖の倍率増加は、b s 2 4 9 6 3 D または非 T A A × C D 2 8 対照の非存在下で媒介される最大増殖に対して計算した。

略語：NC、データが 4 パラメータロジスティック方程式に適合しなかったため計算せず；ND、増殖の濃度依存的増加が観察されなかったため決定せず

【0 2 6 8】

S W 1 9 9 0 および S W 1 9 9 0 / h P D - L 1 標的細胞によるセミプリマブの存在下または非存在下でのヒト初代 T 細胞からの I L - 2 放出およびそれらの増殖を強化する b s 2 4 9 6 3 D (R E G N 5 6 6 8) の能力

S W 1 9 9 0 および S W 1 9 9 0 / h P D - L 1 M U C 1 6 ⁺ ヒト膵臓癌細胞とともにインキュベートした場合、b s 2 4 9 6 3 D は、セミプリマブの存在下および非存在下で、ヒト T 細胞からの I L - 2 放出 (図 1 4) およびそれらの増殖 (図 1 5) の濃度依存的な増強を媒介した。S W 1 9 9 0 細胞におけるヒト P D - L 1 の過剰発現は、b s 2 4 9 6 3 D の存在下で I L - 2 および T 細胞の増殖を抑制し、これらはセミプリマブの添加によって多少増加した。高濃度では、C D 2 8 非架橋対照二重特異性抗体は、S W 1 9 9 0 および S W 1 9 9 0 / h P D - L 1 細胞の存在下でいくらかの I L - 2 放出を媒介した。b s 2 4 9 6 3 D の非存在下では、セミプリマブは C D 2 8 非架橋対照二重特異性抗体と比べて I L - 2 放出も T 細胞増殖も増加させなかった。

10

20

30

40

50

【表 3 3】

表 3 1 : SW1990 および SW1990/hPD-L1 標的細胞によるセミプリマブの存在下または非存在下でのヒト初代 T 細胞からの IL-2 放出の bs24963D を介した強化の要約

標的細胞株	ドナー	固定濃度の Ab (20nM)	様々な濃度で試験した抗体 (7.6pM~500nM)	ヒト初代 T 細胞からの IL-2 放出		
				EC ₅₀ (M)	最大 IL-2 ^a (RFU)	倍率増加 ^b (IL-2)
SW1990	ドナー 555109	セミプリマブ	bs24963D	2.98×10 ⁻⁹	3,773	3.31
			非 TAA×CD28	ND	1,415	1.98
		IgG4 ^P 対照	bs24963D	2.31×10 ⁻⁹	2,922	4.83
			非 TAA×CD28	ND	944	1.31
	ドナー 555129	セミプリマブ	bs24963D	8.60×10 ⁻¹⁰	4,833	3.39
			非 TAA×CD28	NC	2,927	2.28
		IgG4 ^P 対照	bs24963D	1.21×10 ⁻⁹	3,589	2.89
			非 TAA×CD28	NC	2,027	1.51
SW1990/hPD-L1	ドナー 555109	セミプリマブ	bs24963D	1.01×10 ⁻⁹	1,692	2.73
			非 TAA×CD28	NC	1,102	1.60
		IgG4 ^P 対照	bs24963D	2.55×10 ⁻⁹	1,053	1.70
			非 TAA×CD28	ND	616	1.23
	ドナー 555129	セミプリマブ	bs24963D	1.41×10 ⁻⁹	3,391	2.33
			非 TAA×CD28	NC	1,977	1.57
		IgG4 ^P 対照	bs24963D	2.22×10 ⁻⁹	2,161	2.14
			非 TAA×CD28	ND	1,459	1.49

^a 最大 IL-2 濃度は、試験した抗体濃度範囲内で記録された最も高い平均 IL-2 濃度値である。

^b セミプリマブの存在下または非存在下での bs24963D によって媒介される最大 IL-2 放出の倍率増加は、いずれの抗体によっても媒介されていない最大 IL-2 放出に対して計算した。

略語：NC、データが 4 パラメータロジスティック方程式に適合しなかったため計算せず；ND、IL-2 放出の濃度依存的増加が観察されなかったため決定せず

【表 3 4】

表 3 2 : SW1990 および SW1990/hPD-L1 標的細胞によるセミブリマブの存在下または非存在下でのヒト初代 T 細胞からの増殖の bs24963D を介した強化の要約

標的細胞株	ドナー	固定濃度の Ab (20nM)	様々な濃度で試験した抗体 (7.6pM~500nM)	T 細胞増殖		
				EC ₅₀ (M)	最大増殖 ^a (CPM)	倍率増加 ^b (増殖)
SW1990	ドナー 555109	セミブリマブ	bs24963D	1.68×10 ⁻⁹	557	4.52
			非 TAA×CD28	ND	161	1.41
		IgG4 ^P 対照	bs24963D	2.86×10 ⁻⁹	421	4.36
			非 TAA×CD28	ND	123	1.46
	ドナー 555129	セミブリマブ	bs24963D	4.59×10 ⁻¹⁰	545	2.47
			非 TAA×CD28	ND	279	1.66
		IgG4 ^P 対照	bs24963D	4.83×10 ⁻¹⁰	569	2.17
			非 TAA×CD28	ND	353	1.46
SW1990/hPD-L1	ドナー 555109	セミブリマブ	bs24963D	1.40×10 ⁻⁹	279	4.70
			非 TAA×CD28	ND	151	1.98
		IgG4 ^P 対照	bs24963D	1.54×10 ⁻⁹	140	2.35
			非 TAA×CD28	ND	84.0	1.42
	ドナー 555129	セミブリマブ	bs24963D	2.53×10 ⁻⁹	601	3.20
			非 TAA×CD28	NC	222	1.73
		IgG4 ^P 対照	bs24963D	1.66×10 ⁻⁹	333	2.74
			非 TAA×CD28	ND	146	1.62

^a 最大増殖は、試験した抗体濃度範囲内で記録された最も高い平均 CPM 値である。

^b セミブリマブの存在下または非存在下での bs24963D によって媒介される最大 T 細胞増殖の倍率増加は、bs24963D または非 TAA×CD28 対照の非存在下で媒介される最大増殖に対して計算した。

略語：NC、データが 4 パラメータロジスティック方程式に適合しなかったため計算せず；ND、増殖の濃度依存的増加が観察されなかったため決定せず

【0269】

本発明は、本明細書に記載される特定の実施形態によって範囲が限定されるべきではない。実際、本明細書に記載されたものに加えて本発明の様々な修正は、前述の記載および添付の図から当業者には明らかであろう。そのような変更は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されている。

10

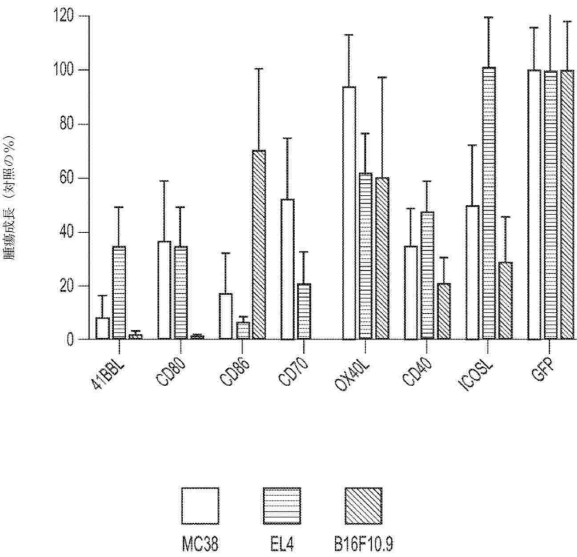
20

30

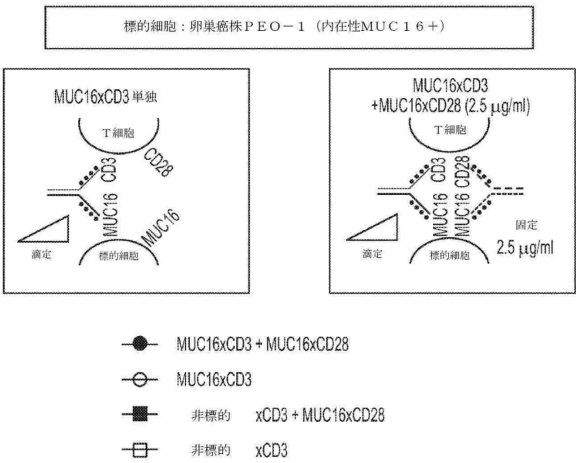
40

50

【図面】
【図 1】

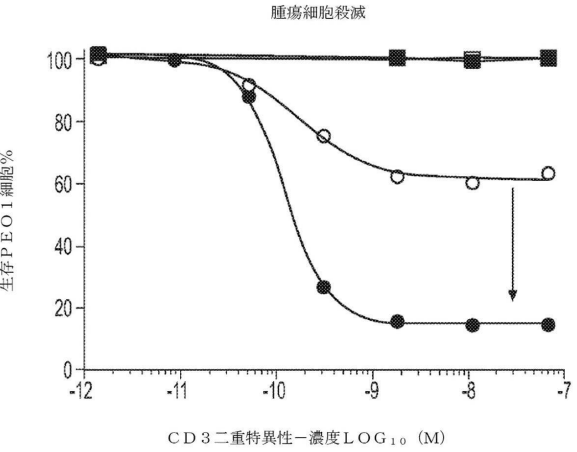


【図 2 A】

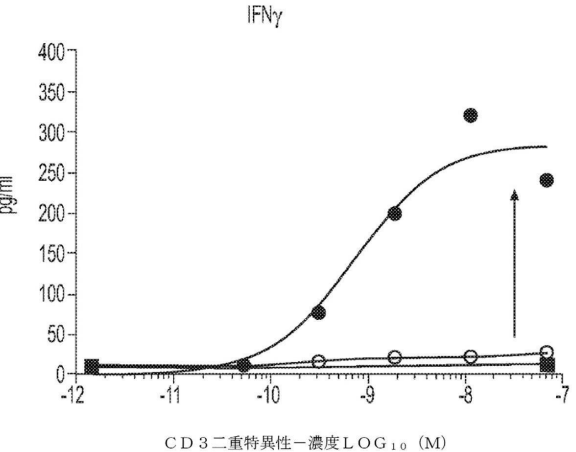


10

【図 2 B】



【図 2 C】



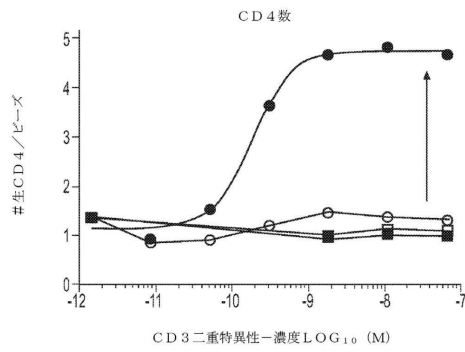
20

30

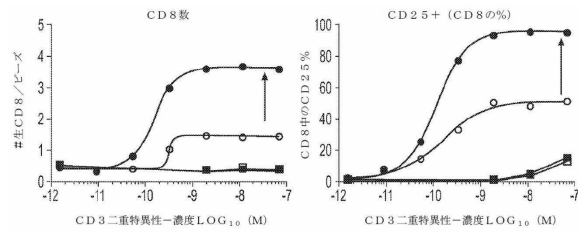
40

50

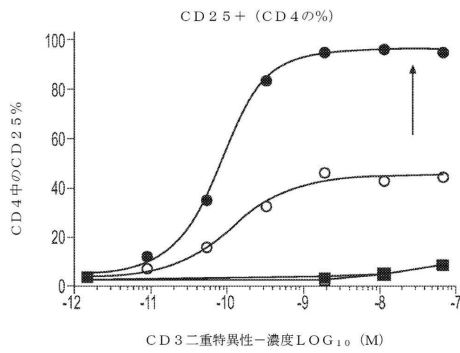
【図 2 D】



【図 2 E】

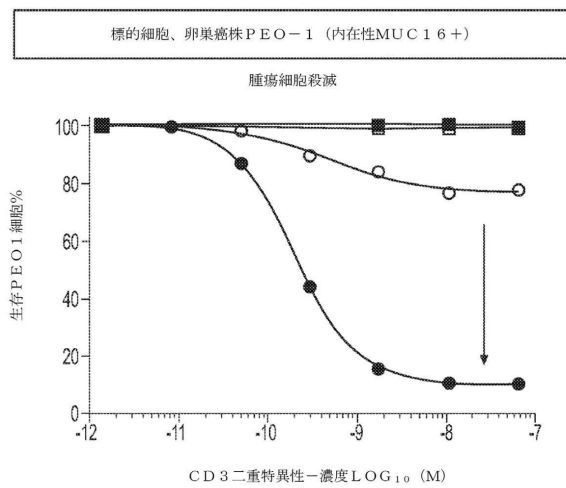


10

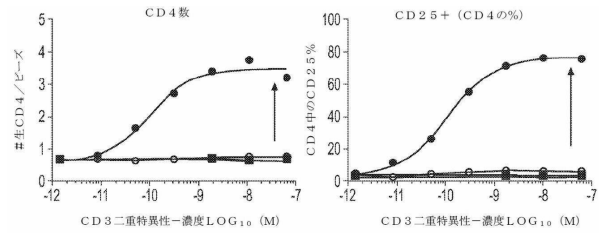


20

【図 2 F】



【図 2 G】

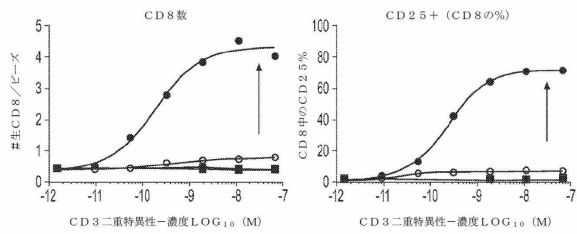


30

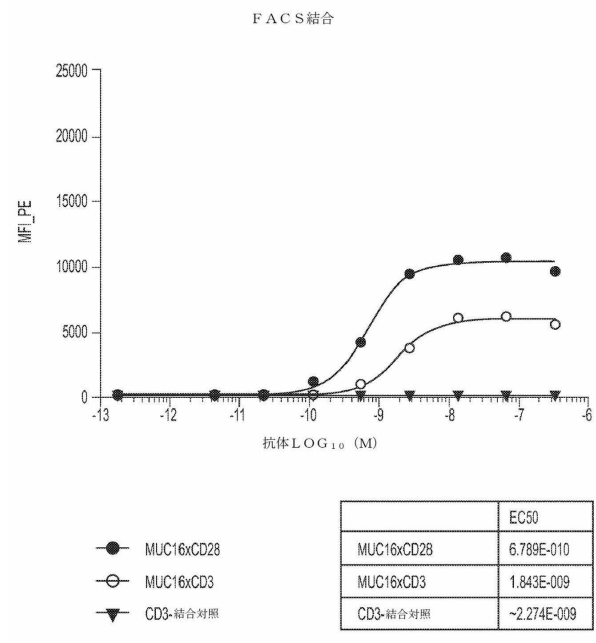
40

50

【図 2 H】

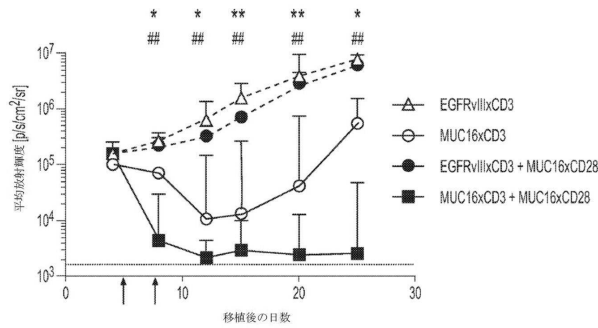


【図 2 I】

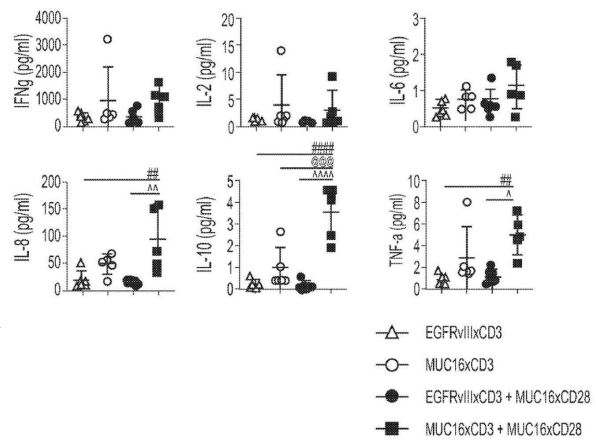


10

【図 3 A】



【図 3 B】



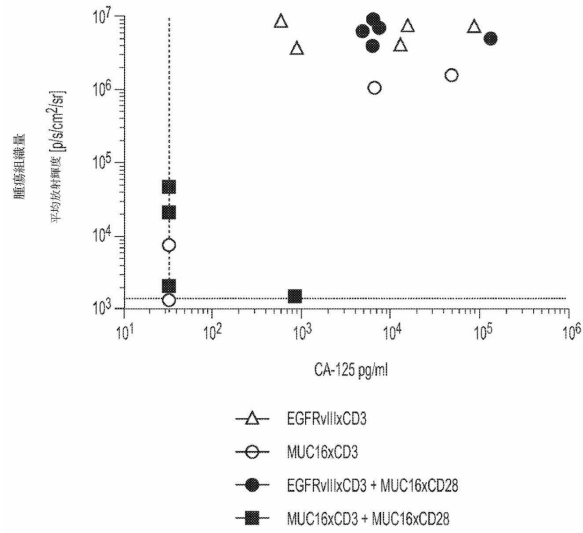
20

30

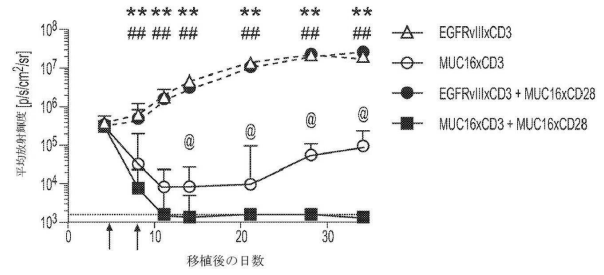
40

50

【図 3 C】

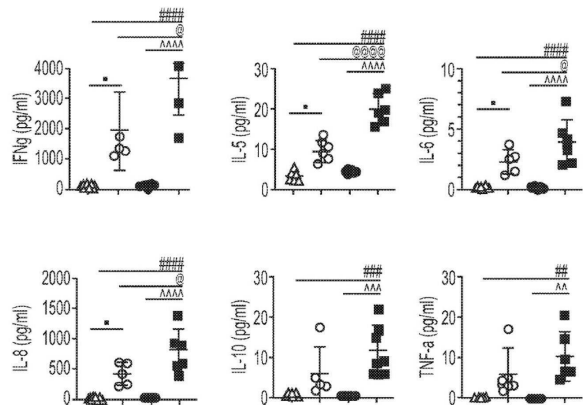


【図 4 A】

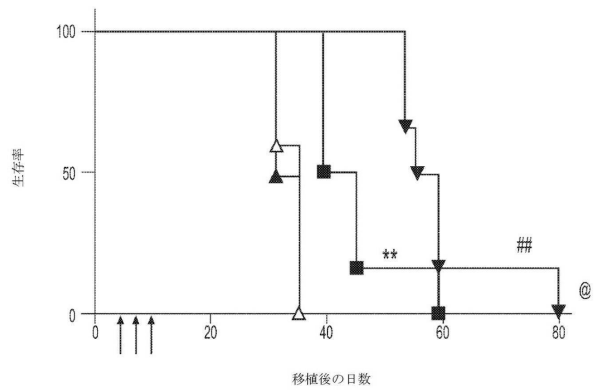


10

【図 4 B】



【図 5】



20

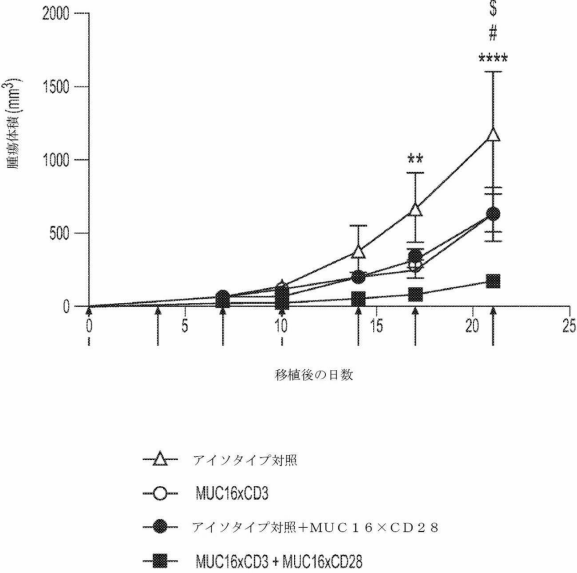
- △ EGFRvIIIxCD3
- MUC16xCD3
- EGFRvIIIxCD3 + MUC16xCD28
- ▼ MUC16xCD3 + MUC16xCD28

30

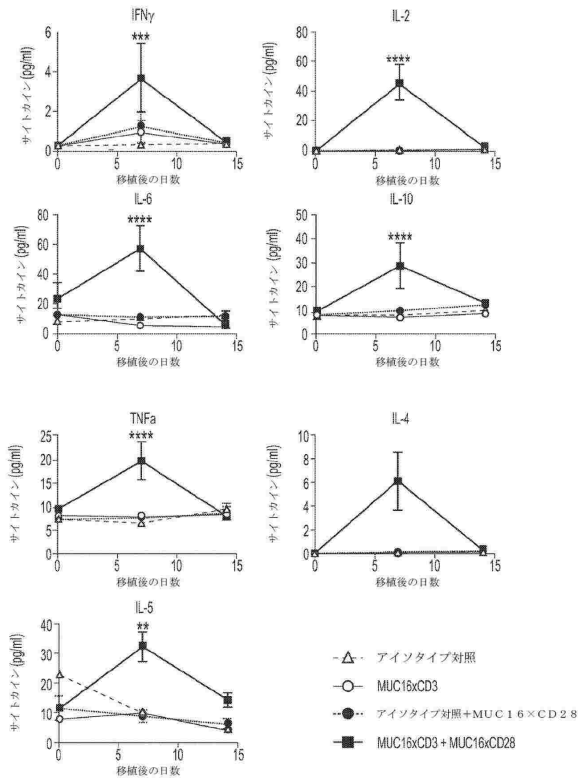
40

50

【図 6 A】



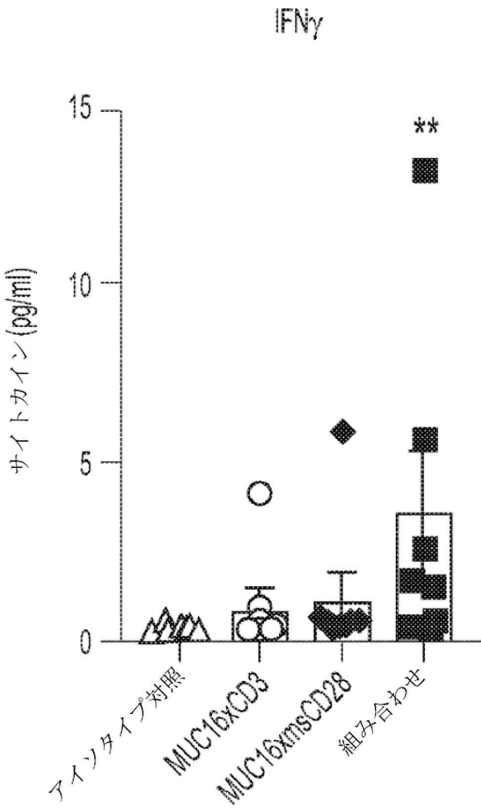
【図 6 B】



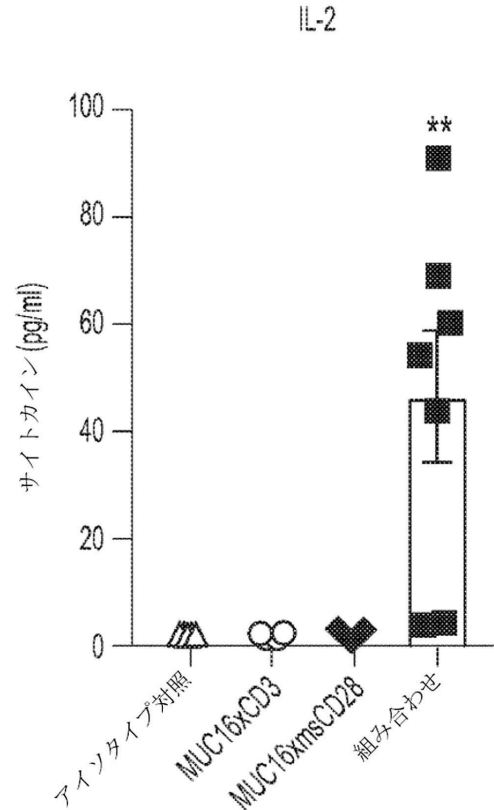
10

20

【図 6 C】



【図 6 D】

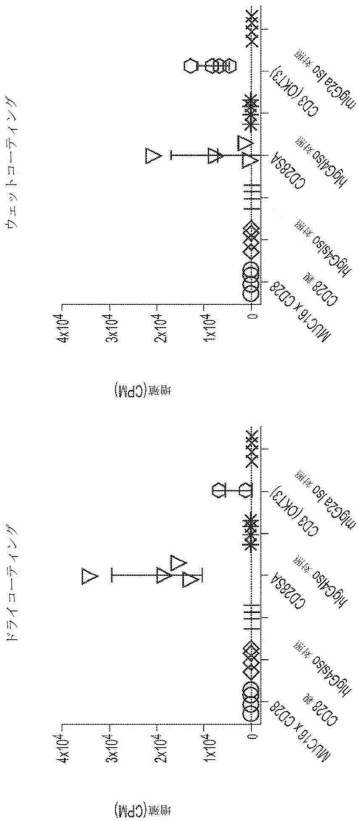


30

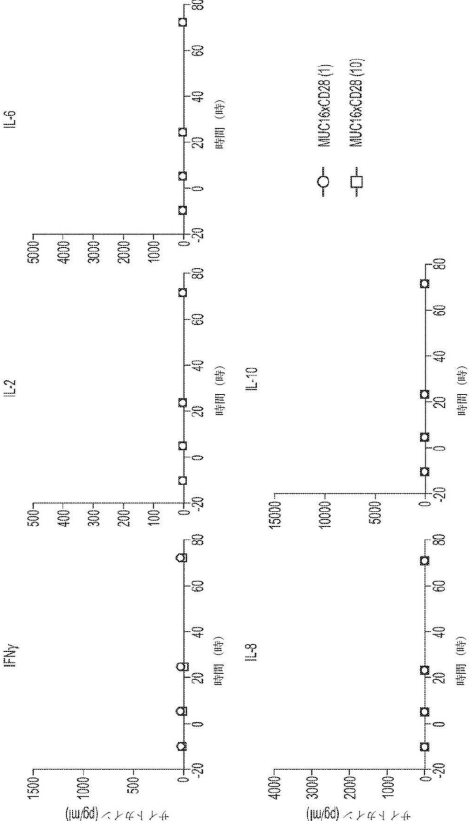
40

50

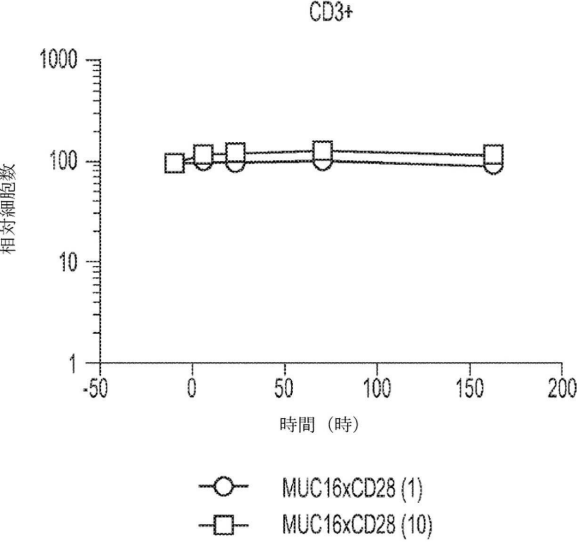
【図 7】



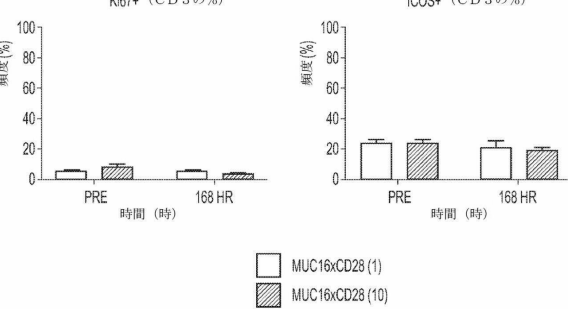
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 8 C】



10

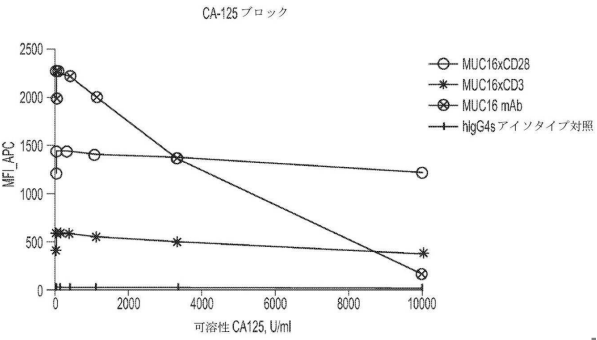
20

30

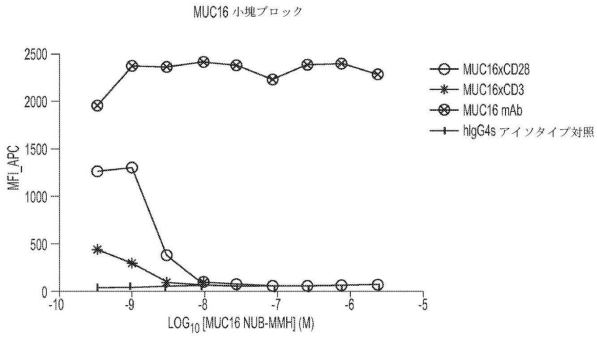
40

50

【図 9 A】

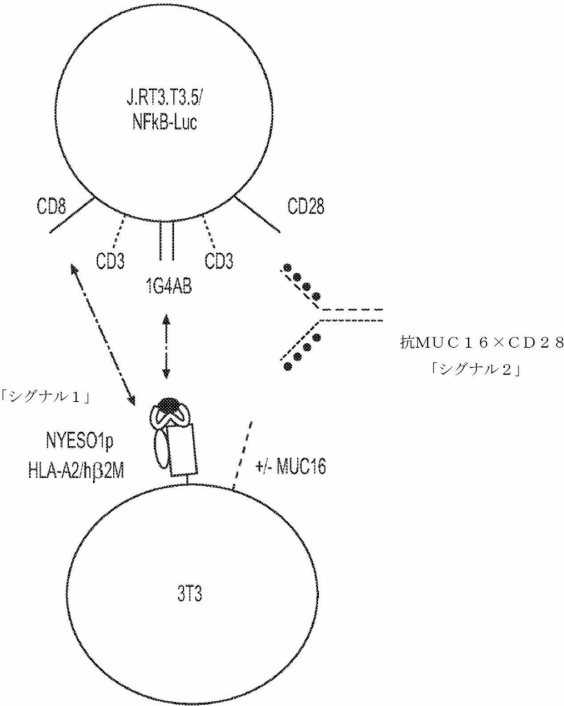


【図 9 B】

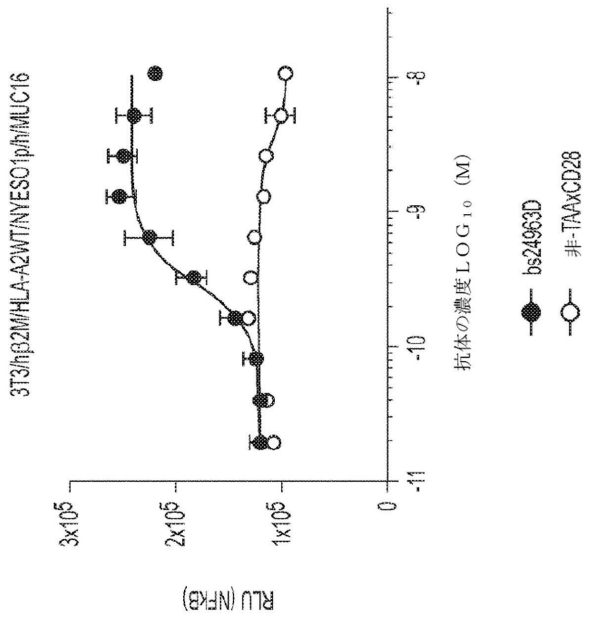


10

【図 10】



【図 11 A】



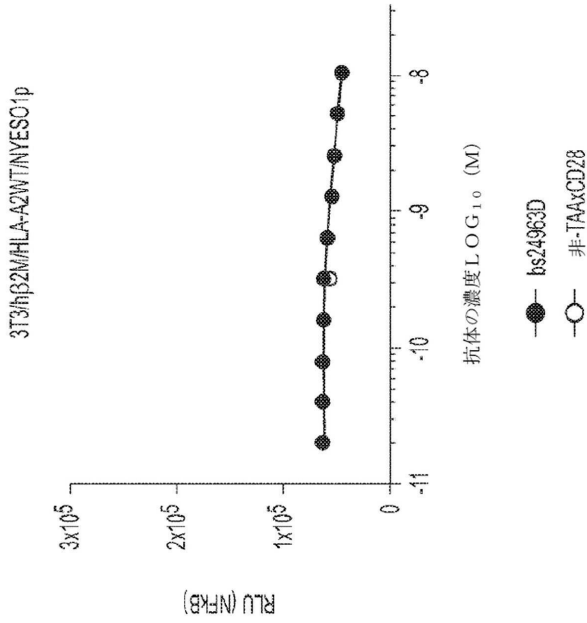
20

30

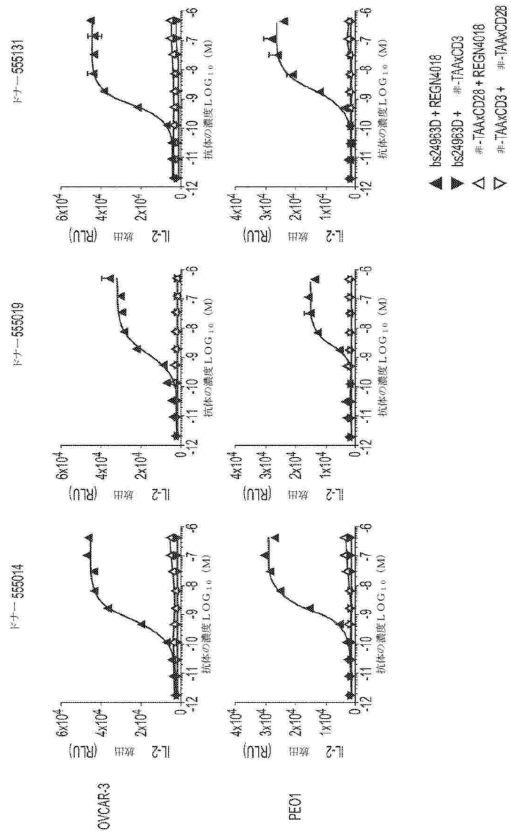
40

50

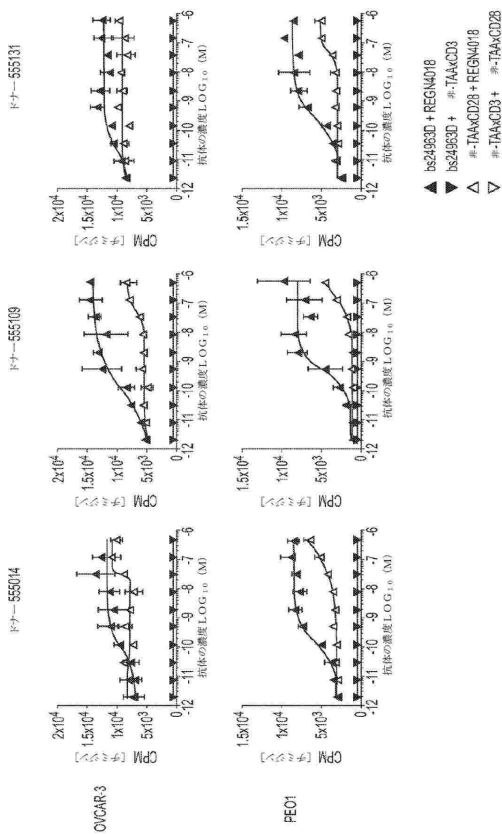
【図 1 1 B】



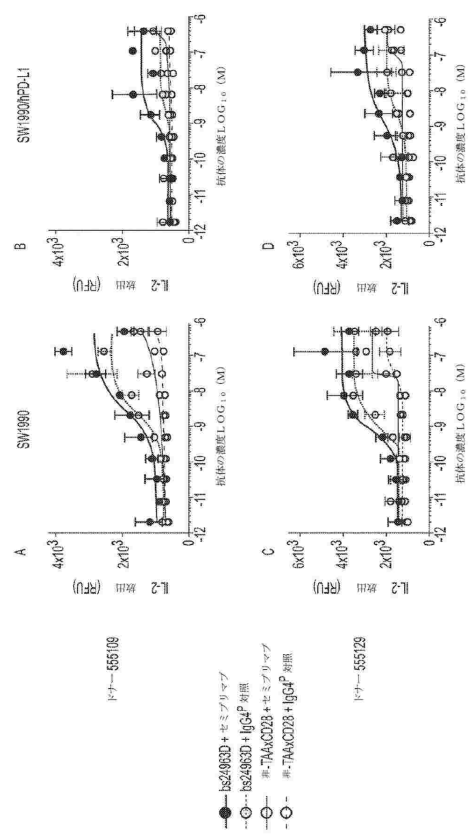
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

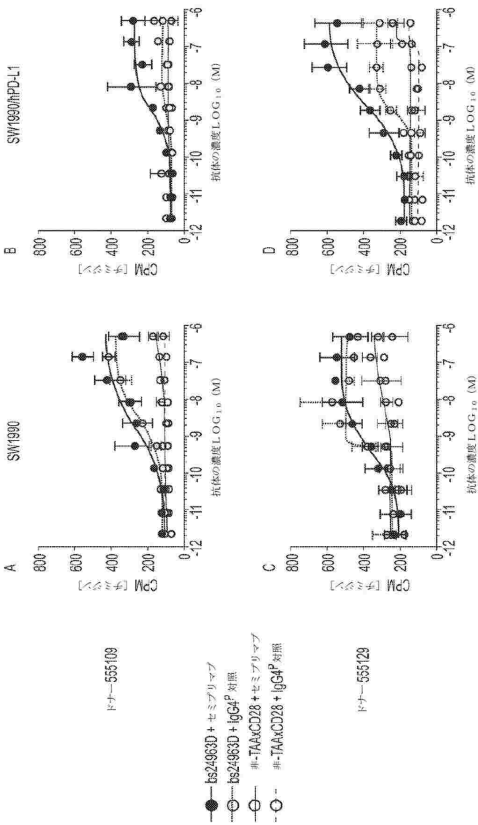
20

30

40

50

【図 15】



【配列表】

0007588586000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
			C 1 2 P	21/08	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

バーロード 7 7 7 . リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ディミトリス・スココス

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン・オールドソーミルリバーロード 7 7 7
・リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ジャネール・ウェイト

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン・オールドソーミルリバーロード 7 7 7
・リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 エリカ・ウルマン

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン・オールドソーミルリバーロード 7 7 7
・リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 アイナー・ハーマン

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン・オールドソーミルリバーロード 7 7 7
・リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 エリック・スミス

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン・オールドソーミルリバーロード 7 7 7
・リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ラウリック・ハーバー

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン・オールドソーミルリバーロード 7 7 7
・リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ジョージ・ディー・ヤンコプロス

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン・オールドソーミルリバーロード 7 7 7
・リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 アリソン・クロフォード

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン・オールドソーミルリバーロード 7 7 7
・リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 特表 2 0 1 6 - 5 3 0 8 8 9 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 8 / 0 6 7 3 3 1 (W O , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 0 7 K 1 6 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 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 / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)