(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-534550
(P2024-534550A)
(43)公表日　令和6年9月20日(2024.9.20)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/768 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/768		４Ｂ０６５
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｔ	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｕ	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	４Ｈ０４５

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全101頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-518167(P2024-518167)
(86)(22)出願日　令和4年9月21日(2022.9.21)
(85)翻訳文提出日　令和6年3月21日(2024.3.21)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/076268
(87)国際公開番号　WO2023/046777
(87)国際公開日　令和5年3月30日(2023.3.30)
(31)優先権主張番号　21306310.0
(32)優先日　令和3年9月22日(2021.9.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号　22305050.1
(32)優先日　令和4年1月18日(2022.1.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　520031025
バイオインベント インターナショナル
アクティエボラーグ
スウェーデン国，２２３　７０　ルンド，
イデオンガータン　１
(71)出願人　521091985
トランジェヌ ソシエテ アノニム
フランス国，６７４０５　イルキルシュ
グラフェンスタデン セデ，ブールバール
ゴンティエ ダンデルナッハ　４００，パ
ルク ディノバシオン－セエス８０１６６
(74)代理人　100099759
弁理士　青木 篤
(74)代理人　100123582
弁理士　三橋 真二
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗体の新規組み合わせ及びその使用

(57)【要約】
本発明は、一般に、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスと、ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子と、の組み合わせ、並びにがんの治療におけるその使用に関する。

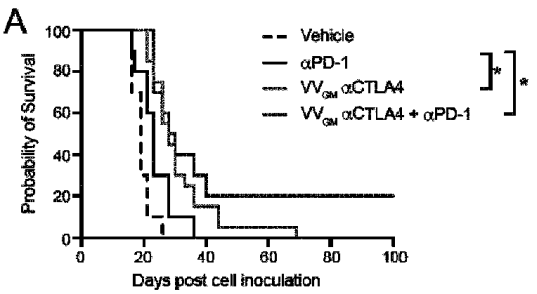


Figure 8

【特許請求の範囲】
【請求項１】
患者におけるがんの治療に使用するための、
－ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスと、
－ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子と、を含む組み合わせであって、
前記がんが、冷たい腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなる、組み合わせ。
【請求項２】
患者におけるがんを治療するための医薬の製造における、
－ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子をコードするヌクレオチド配列を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスと、
－ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子と、の使用であって、
前記がんが、冷たい腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなる、使用。
【請求項３】
患者におけるがんを治療するための方法であって、前記がんが、冷たい腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなり、前記方法が、前記患者に、
－ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスと、
－ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子と、を投与することを含む、方法。
【請求項４】
患者におけるがんを治療するための、ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子と組み合わせて使用するための、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスであって、
前記がんが、冷たい腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなる、腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項５】
前記冷たい腫瘍が、前記第１及び第２の抗体分子によって治療される、請求項１～４のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項６】
ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する前記抗体分子が、Ｆｃγ受容体結合抗体である、請求項１～５のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項７】
ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する前記抗体分子が、Ｔｒｅｇ枯渇抗体である、請求項１～６のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項８】
前記腫瘍溶解性ウイルスが、腫瘍溶解性ポックスウイルスである、請求項１～７のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項９】
前記ポックスウイルスが、Ｃｈｏｒｄｏｐｏｘｖｉｒｉｎａｅ亜科に属し、より好ましくは、ワクシニアウイルス、牛痘ウイルス、カナリア痘ウイルス、エクトロメリアウイルス、及び粘液腫ウイルスからなる群から好ましく選択される、Ｏｒｔｈｏｐｏｘｖｉｒｕｓ属に属する、請求項８に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項１０】

前記腫瘍溶解性ウイルスが、チミジンキナーゼ（ＴＫ）及び／又はリボヌクレオチドレダクターゼ（ＲＲ）活性の両方に欠陥があり、かつ配列番号２０及び配列番号２１、又は配列番号５３及び番号５４をコードするヌクレオチド配列を含む、ワクシニアウイルスである、請求項９に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項１１】

前記ワクシニアウイルスが、ＧＭ－ＣＳＦをコードするヌクレオチド配列を更に含み、ヒトＧＭ－ＣＳＦ（例えば、配列番号５５若しくは配列番号５６を有する）又はマウスＧＭ－ＣＳＦ（例えば、配列番号５７若しくは配列番号５８を有する）が特に好ましい、請求項９又は１０に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項１２】

前記ウイルスが、ウイルスＪ２Ｒ遺伝子座に挿入された前記第１の抗体分子の重鎖をコードするヌクレオチド配列を含み、かつ／又はウイルスＩ４Ｌ遺伝子座に挿入された前記第１の抗体分子の軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項１３】

前記第１の抗体分子が、配列番号３、６、８、１０、１２、及び１４からなる群から選択されるＣＤＲのうちの１～６つを含む抗体分子からなる群から選択される、請求項１～１２のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項１４】

前記第１の抗体分子が、ＣＤＲ、ＶＨ－ＣＤＲ１、ＶＨ－ＣＤＲ２、ＶＨ－ＣＤＲ３、ＶＬ－ＣＤＲ１、及びＶＬ－ＣＤＲ３のうちの１～６個を含む抗体分子からなる群から選択され、

－ＶＨ－ＣＤＲ１が、存在する場合、配列番号１５、２２、２９、及び３５からなる群から選択され、

－ＶＨ－ＣＤＲ２が、存在する場合、配列番号１６、２３、３０、及び３６からなる群から選択され、

－ＶＨ－ＣＤＲ３が、存在する場合、配列番号１７、２４、３１、及び３７からなる群から選択され、

－ＶＬ－ＣＤＲ１が、存在する場合、配列番号１０及び３８からなる群から選択され、

－ＶＬ－ＣＤＲ２が、存在する場合、配列番号１８、２５、３２、及び３９からなる群から選択され、

－ＶＬ－ＣＤＲ３が、存在する場合、配列番号１９、２６、及び４０からなる群から選択される、請求項１～１３のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項１５】

前記第１の抗体分子が、配列番号１５、１６、１７、１０、１８、及び１９を有する６個のＣＤＲ、又は配列番号２２、２３、２４、１０、２５、及び２６を有する前記６個のＣＤＲを含む、請求項１～１４のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項１６】

前記第１の抗体分子が、配列番号２０及び２７からなる群から選択される可変重鎖、並びに／又は配列番号２１及び２８からなる群から選択される可変軽鎖を含む、請求項１～１５のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項１７】

前記第１の抗体分子が、重鎖定常領域配列番号４３及び／又は軽鎖定常領域配列番号４

４を含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項１８】
前記第１の抗体分子が、イピリムマブ及びトレメリムマブからなる群から選択される、請求項１～１２のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項１９】
前記第１の抗体分子が、請求項１３～１８のいずれか一項に定義される抗体分子とＣＴＬＡ－４への結合について競合することができる抗体分子である、請求項１～１８のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２０】
前記第１の抗体分子が、フルサイズ抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ’、及び（Ｆａｂ’）2からなる群から選択される、請求項１～１９のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２１】
前記第１の抗体分子が、ヒトＩｇＧ抗体、ヒト化ＩｇＧ抗体、及びヒト起源のＩｇＧ抗体からなる群から選択される、請求項１～２０のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２２】
前記ウイルスが、請求項１３～２１のいずれか一項に定義される第１の抗体分子をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１～２１のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２３】
前記ヌクレオチド配列が、配列番号４５～５２からなる群から選択される配列を含むか、又はそれからなる、請求項２２に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２４】
前記第２の抗体分子が、ヒト抗体分子、ヒト化抗体分子、及びヒト起源の抗体分子からなる群から選択される、請求項１～２３のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２５】
前記第２の抗体分子が、モノクローナル抗体分子又はモノクローナル起源の抗体分子である、請求項１～２４のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２６】
前記第２の抗体分子が、フルサイズ抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、及びそれらの抗原結合フラグメントからなる群から選択される、請求項１～２５のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２７】
前記第２の抗体分子が、ヒトＩｇＧ抗体、ヒト化ＩｇＧ抗体分子、又はヒト起源のＩｇＧ抗体分子である、請求項１～２６のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２８】
前記第２の抗体分子が、ＰＤ１に特異的に結合し、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、カムレリズマブ、スパルタリズマブ、ドスタルリマブ、チスレリズマブ、ＪＴＸ－４０１４、シンチリマブ（ＩＢＩ３０８）、トリパリマブ（ＪＳ　００１）、ＡＭＰ－２２４、及びＡＭＰ－５１４（ＭＥＤＩ０６８０）からなる群から選択される、請求項１～２７のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は

使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２９】
前記第２の抗体分子が、ＰＤ－Ｌ１に特異的に結合し、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、ＣＳ１００１、ＫＮ０３５（エンバフォリマブ）、及びＣＫ－３０１からなる群から選択される、請求項１～２８のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３０】
前記冷たい腫瘍が、免疫砂漠腫瘍、及び／又は免疫排除腫瘍、及び／又は免疫浸潤が不十分な腫瘍である、請求項１～２９のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３１】
前記冷たい腫瘍が、黒色腫、膵臓がん、前立腺がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、肺がん、膀胱がん、腎臓がん、胃がん、子宮頸がん、メルケル細胞がん、卵巣がん、頭頸部がん、中皮腫、及び乳がんからなる群から選択される、請求項１～３０のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３２】
前記がんが、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体分子による治療に対して耐性であるか、又はＰＤ１に特異的に結合する抗体分子による治療に対して耐性であるか、又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する抗体分子による治療に対して耐性である、請求項１～３１のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３３】
前記がんが、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体分子及びＰＤ１に特異的に結合する抗体分子による治療に対して耐性であるか、又はＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体分子及びＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する抗体分子による治療に対して耐性であるか、又はＰＤ－１に特異的に結合する抗体分子及びＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する抗体分子による治療に対して耐性であるか、又は、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体分子及びＰＤ１に特異的に結合する抗体分子及びＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する抗体分子による治療に対して耐性である、請求項１～３２のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３４】
前記患者が、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体分子、及び／又はＰＤ－１に特異的に結合する抗体分子、及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する抗体分子により以前に治療されており、前記患者が、前記治療に対して耐性であることがわかっているか、又は前記治療後若しくは前記治療中に前記治療に対して耐性になった、請求項１～３３のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項３５】
添付の番号付けされた段落、特許請求の範囲、説明、実施例、及び図面を参照して、実質的に本明細書において特許請求される、使用のための組み合わせ、又は使用、又は方法、又は使用のための腫瘍溶解性ウイルス。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、（ｉ）ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスと、（ｉｉ）ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子と、を含む、組み合わせであって、組み合わせが、患者における冷たい腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなるがんの治療に使用するためのものである、組み合わせに関する。本発明はまた、患者における冷たい腫瘍を含むか又は冷たい腫瘍からなるが

んを治療するための医薬の製造における当該組み合わせの使用、及び当該組み合わせを投与することを含む、患者における冷たい腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなるがんを治療するための方法に関する。

【０００２】

免疫チェックポイント遮断抗体による治療は、転移性黒色腫、非小細胞肺がん、及びミスマッチ修復欠損がんを含む進行性固形がんを有する患者の生存を変化させた（Ｈｏｄｉ ｅｔ ａｌ．，２０１０、Ｌａｒｋｉｎ ｅｔ ａｌ．，２０１５、Ｔｏｐａｌｉａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１２）。

【０００３】

しかしながら、多くの患者が免疫チェックポイント遮断（immune checkpoint blockade、ＩＣＢ）に応答しないか、又は耐性を獲得しないので、大きな満たされていない必要性が残っている（Ｓｈａｒｍａ ｅｔ ａｌ．，２０１７）。効力の欠如の理由は、腫瘍浸潤免疫細胞（tumor infiltrating immune、ＴＩＬ）、中でも注目すべきはＣＤ８＋Ｔ細胞の欠如又は不十分な腫瘍浸潤免疫細胞を含むと考えられている（Ｃｈｅｎ ａｎｄ Ｍｅｌｌｍａｎ，２０１３、Ｇａｊｅｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。固形がん腫瘍微小環境（tumor microenvironment、ＴＭＥ）における走化性及び炎症性シグナルの不足は、同様に、ＣＡＲ－Ｔ細胞療法に対する耐性の根底にあると考えられている（Ｗａｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０２０）。

【０００４】

したがって、炎症性免疫細胞の「免疫砂漠」又は「免疫排除」腫瘍への動員を誘導し、原発性及び転移腫瘍の退縮を伴う、頑強な全身性適応抗腫瘍免疫及びＣＤ８＋Ｔ細胞浸潤に変換する治療薬の特定が非常に望ましい。

【０００５】

腫瘍内（intratumoral、ｉ．ｔ．）腫瘍溶解性ウイルス療法は、Ｔ細胞浸潤を誘導し、抗ＰＤ－１免疫療法を改善する（Ｒｉｂａｓ ｅｔ ａｌ．，２０１７）。抗ＣＴＬＡ－４抗体及び抗ＰＤ－１抗体との併用療法は、単剤ＩＣＢと比較して効力を増強し、これはおそらく、全身性ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞分化並びにＴエフェクタ及び制御性Ｔ細胞の腫瘍局在化調節の相補的機構によるものである（Ａｒｃｅ Ｖａｒｇａｓ ｅｔ ａｌ．，２０１８、Ｗｅｉ ｅｔ ａｌ．，２０１９）。しかしながら、承認されたイピリムマブを含む、全身投与された抗ＣＴＬＡ－４に関する忍容性の問題は、臨床使用を制限している（Ｐｏｓｔｏｗ ｅｔ ａｌ．，２０１５）。

【０００６】

全身性抗ＣＴＬＡ－４抗体療法の効力及び忍容性は、関連しているようである。イピリムマブ用量の増加は、効力及び副作用の両方を増強した（Ｂｅｒｔｒａｎｄ ｅｔ ａｌ．，２０１５）。ＣＴＬＡ－４の中心的な免疫チェックポイント機能と一致して、副作用は重度であり、全身性自己免疫の性質のものであり得る（Ｔｉｖｏｌ ｅｔ ａｌ．，１９９５）。

【０００７】

興味深いことに、ＣＤ８$^{+}$及びＣＤ４$^{+}$エフェクタＴ細胞と比較して、ＣＴＬＡ－４を過剰発現する腫瘍内（「ｉ．ｔ．」）Ｔｒｅｇ細胞の枯渇は、イピリムマブ治療活性に寄与することが最近報告され、Ｔｒｅｇ枯渇増強抗ＣＴＬＡ－４変異型は、腫瘍担持ＦｃγＲヒト化マウスにおいて改善された治療活性を示した（Ａｒｃｅ Ｖａｒｇａｓ ｅｔ ａｌ．，２０１８）。これらの知見は、Ｔｒｅｇ枯渇抗ＣＴＬＡ－４抗体による腫瘍局在化療法が、特に、検証された安全な免疫調節剤、例えば、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１軸の遮断薬又は腫瘍溶解性ウイルスと組み合わせた場合、現在利用可能な抗ＣＴＬＡ－４療法と比較して、副作用が低減された強力な治療活性を提供し得ることを示した（Ｍａｒａｂｅｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，２０１３ａ、Ｍａｒａｂｅｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，２０１３ｂ）。

【０００８】

その背景に対して、本発明者らは、本明細書において、完全長ヒト組換え抗ＣＴＬＡ－４抗体を組み込んだワクシニアウイルス（Vaccinia virus、ＶＶ）ベースの腫瘍溶解性

ベクターを記載し、特徴付ける。本発明者らはまた、最近発見された完全長ヒト組換え抗ＣＴＬＡ－４抗体をコードする腫瘍溶解性ウイルスを記載する。このウイルスにコードされた新規ヒトＩｇＧ１　ＣＴＬＡ－４抗体（「４－Ｅ０３」と命名）は、モノクローナル抗体（「ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ、ｍＡｂ」）及び優れたＴｒｅｇ枯渇活性に関連する標的についての機能優先スクリーニングを使用して識別された。ヒト腫瘍内関連ＣＴＬＡ－４発現を特徴とするヒト化マウスモデルにおいて、４－Ｅ０３　ＩｇＧ１は、臨床的に検証されたイピリムマブと比較して増強したＴｒｅｇ枯渇を実証した。対照的に、４－Ｅ０３は、イピリムマブと比較して、ＣＴＬＡ－４：Ｂ７相互作用の遮断、及びエフェクタＴ細胞増殖のＣＴＬＡ－４媒介性抑制の克服において、同様の効力を示す。本発明では、腫瘍選択的腫瘍溶解性ワクシニアベクターを操作して、この新規のＴｒｅｇ枯渇チェックポイント遮断抗ＣＴＬＡ－４抗体４－Ｅ０３及びＧＭ－ＣＳＦ（ＶＶ$_{GM}$－ａｈＣＴＬＡ４、ＢＴ－００１）をコードする。一致するＴｒｅｇ枯渇マウス代理抗体をコードするウイルスを追加的に生成し、ＩＣＢに対して感受性又は耐性の炎症性又は免疫排除腫瘍微小環境を表す同系免疫適格マウス腫瘍モデルにおける概念実証研究を可能にした。

【０００９】

これは、抗ＣＴＬＡ－４抗体を発現する腫瘍溶解性ウイルスが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１抗体と相乗作用して、「冷たい」腫瘍」（本明細書では「冷たい免疫腫瘍」とも呼ばれる）を拒絶するという予想外の発見をもたらした。冷たい腫瘍は、本明細書に開示される「冷たい腫瘍」マウスモデルにおける動物と同様に、全身性、静脈内、単剤、又は現在利用可能な抗ＣＴＬＡ－４及び／若しくは抗ＰＤ－１と組み合わせたＩＣＢに対して耐性であることが知られているので、これは驚くべきことであった。

【００１０】

実施例及び本明細書において考察されるように、「冷たい」腫瘍は、Ｔ細胞浸潤が不十分である。驚くべきことに、本発明者らは、抗ＣＴＬＡ－４抗体及び抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１抗体を発現する腫瘍溶解性ウイルスによる併用処理が、「冷たい」腫瘍へのＴ細胞の強い流入を誘導し、これが「熱い」腫瘍と同様に高密度にＴ細胞リッチになったことを見出した。

【００１１】

本発明者らの驚くべき知見は、「冷たい」腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなるがんを治療するための更なる有益な治療アプローチを提供する。本明細書に記載されているように、本発明は、一般に、（ｉ）ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスと、（ｉｉ）ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子と、を含む組み合わせであって、組み合わせが、患者における冷たい腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなるがんの治療に使用するためのものである、組み合わせに関する。

【００１２】

第１の態様では、本発明は、患者におけるがんの治療に使用するための、

－ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスと、

－ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子と、を含む組み合わせを提供し、

がんが、冷たい腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなる。

【００１３】

第２の態様では、本発明は、患者におけるがんを治療するための医薬の製造において、

－ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子をコードするヌクレオチド配列を発現することができる腫瘍溶解性ウイルス、及び

－ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子の使用を提供し、

がんが、冷たい腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなる。

【００１４】

第３の態様では、本発明は、患者におけるがんを治療するための方法を提供し、がんが

、冷たい腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなり、方法が、患者に、
－ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスと、
－ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子と、を投与することを含む。

【００１５】
第４の態様では、本発明は、患者におけるがんを治療するための、ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子と組み合わせて使用するための、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスを提供し、がんが、冷たい腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなる。

【００１６】
上記で考察され、添付の実施例において実証されるように、本発明の上記の態様では、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルス、並びにＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体による治療は、患者におけるがんの冷たい腫瘍へのＴ細胞の流入を引き起こす。これは、患者のがんの冷たい腫瘍におけるＴ細胞の数及び／又は密度の増加をもたらし、その結果、腫瘍は、熱い腫瘍と同様に高密度にＴ細胞リッチになる。本発明の一実施形態では、患者のがんの冷たい腫瘍におけるＴ細胞の数及び／又は密度は、約５倍～２５倍以上、例えば、約５倍、又は６倍、又は７倍、又は８倍、又は９倍、又は１０倍、又は１１倍、又は１２倍、又は１３倍、又は１４倍、又は１５倍、又は１６倍、又は１７倍、又は１８倍、又は１９倍、又は２０倍、又は２１倍、又は２２倍、又は２３倍、又は２４倍、又は２５倍以上増加する。

【００１７】
したがって、更なる態様では、本発明は、患者のがんにおける冷たい腫瘍内のＴ細胞の数及び／若しくは密度を増加させ、かつ／又は患者のがんにおける冷たい腫瘍へのＴ細胞の流入を媒介する使用のための、
－ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスと、
－ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子と、
を含む組み合わせを提供する。そうすることによって、本発明は、患者のがんを治療することが理解されるであろう。本発明の一実施形態では、患者のがんの冷たい腫瘍におけるＴ細胞の数及び／又は密度は、約５倍～２５倍以上、例えば、約５倍、又は６倍、又は７倍、又は８倍、又は９倍、又は１０倍、又は１１倍、又は１２倍、又は１３倍、又は１４倍、又は１５倍、又は１６倍、又は１７倍、又は１８倍、又は１９倍、又は２０倍、又は２１倍、又は２２倍、又は２３倍、又は２４倍、又は２５倍以上増加する。

【００１８】
本明細書において考察されるように、本発明の腫瘍溶解性ウイルスは、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる。ＣＤ１５２としても知られる細胞傷害性Ｔリンパ球関連抗原（ＣＴＬＡ－４又はＣＴＬＡ４）は、Ｔ細胞の活性化を遮断するＢ７／ＣＤ２８ファミリーのメンバーである。ＣＴＬＡ－４は活性化Ｔ細胞で発現し、抑制シグナルをＴ細胞に伝達する。これはＴ細胞共刺激タンパク質ＣＤ２８と相同であり、ＣＴＬＡ－４及びＣＤ２８の両方がＣＤ８０（Ｂ７－１とも表示）及びＣＤ８６（Ｂ７－２とも表示）に結合する。ＣＴＬＡ４は調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）にも見られ、その抑制機能に寄与している。ＣＴＬＡ－４タンパク質には、細胞外Ｖドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質尾部が含有されている。

【００１９】
ＣＴＬＡ－４に結合する抗体は、免疫エフェクタＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞に、かつ免疫抑制調節性Ｔ（Ｔ regulatory、Ｔｒｅｇ）細胞の両方に作用する二重機構によってそれらの治療活性を発揮することが提案されている。エフェクタＴ細胞上で、ＣＴＬＡ－４とそのリガンドＢ７．１及びＢ７．２との相互作用を遮断するＣＴＬＡ－４に対する抗

体は、免疫応答を増強することができ、強力な抗腫瘍免疫を刺激することができることが示されている（Ｋｏｒｍａｎ ｅｔ ａｌ ２００６，Ｃｈｅｃｋｐｏｉｎｔ ｂｌｏｃｋａｄｅ ｉｎ ｃａｎｃｅｒ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，Ａｄｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ．９０：２９７－３３９）。

【００２０】

より最近では、Ｆｃエフェクタ機能及びＴｒｅｇ枯渇が、臨床的に関連する抗体であるイピリムマブ及びトレメリムマブを含む、抗ＣＴＬＡ－４抗体の治療活性に寄与し、相関することが示された（Ａｒｃｅ Ｖａｒｇａｓ，Ｆｕｒｎｅｓｓ ｅｔ ａｌ．２０１８）。効力及び毒性（後者は重度であり、自己免疫性質のものであり得る）は、現在利用可能な全身性抗ＣＴＬＡ－４レジメンに関連していると考えられる。したがって、非常に有効であるが安全な抗ＣＴＬＡ－４ベースのＩＣＢを送達するためのアプローチが欠けている。本発明者らは最近、Ｔｒｅｇ枯渇抗ＣＴＬＡ－４抗体（ｉ．ｔ．ベクター化抗ＣＴＬＡ－４）をコードする腫瘍内送達された腫瘍溶解性ウイルスが広範な抗腫瘍活性を有することを実証した。本明細書において、本発明者らは、予想外にも、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ＩＣＢとの関連で、ｉ．ｔ．ベクター化抗ＣＴＬＡ－４が、全身性抗体媒介性ＩＣＢに対して耐性であった、免疫浸潤が不十分な「冷たい」腫瘍に対して効力を有することを実証する。更に、このアプローチに関連する腫瘍限定抗ＣＴＬＡ－４曝露のために、ｉ．ｔ．ベクター化抗ＣＴＬＡ－４は、承認された抗ＣＴＬＡ－４レジメンと比較して安全であり、忍容性が良いと示される。

【００２１】

本明細書において考察されるように、本発明はまた、ＰＤ－１に特異的に結合し、かつ／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子を含む。いくつかの実施形態では、第２の抗体分子は、ＰＤ－１に特異的に結合し、いくつかの実施形態では、第２の抗体分子は、ＰＤ－Ｌ１に特異的に結合し、いくつかの実施形態では、第２の抗体分子は、ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１の両方に特異的に結合する。

【００２２】

ＣＤ２７９としても知られるプログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１又はＰＤ１）は、Ｔ細胞及びＢ細胞の表面上に見られ、Ｔ細胞活性を抑制する。ＰＤ－１は、２つのリガンドＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２に結合する。ＣＤ２７４としても知られるプログラム死リガンド１（programmed death－ligand 1、ＰＤ－Ｌ１）は、その受容体ＰＤ－１に結合して、Ｔ細胞の増殖を低減する抑制シグナルを産生する。

【００２３】

抗体は、免疫学及び分子生物学分野の当業者には公知である。通常は、抗体は、２つの重鎖（Ｈ）と、２つの軽鎖（Ｌ）と、を含む。本明細書では、ときには、この完全な抗体分子をフルサイズ抗体又は完全長抗体と称する。抗体の重鎖は、１つの可変領域（ＶＨ）及び３つの定常領域（ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３）を含み、抗体分子の軽鎖は、１つの可変領域（ＶＬ）及び１つの定常領域（ＣＬ）を含む。可変領域（時にＦｖ領域と総称される）は、抗体の標的、又は抗原に結合する。各可変領域は、相補性決定領域（ＣＤＲ）と称される３つのループを含み、これらのループが標的の結合に関与する。定常領域は、抗体の抗原への結合には直接関与しないが、様々なエフェクタ機能を呈する。それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列に応じて、抗体又は免疫グロブリンを異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭの５つの主要なクラスがあり、ヒトでは、これらのうちのいくつかは、更にサブクラス（アイソタイプ）、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４；ＩｇＡ１及びＩｇＡ２に分割される。抗体の別の部分は、Ｆｃドメイン（あるいはフラグメント結晶性ドメインとしても知られている）であり、抗体の重鎖の各々の２つの定常ドメインを含む。Ｆｃドメインは、抗体とＦｃ受容体との間の相互作用に関与する。

【００２４】

Ｆｃ受容体は、多くの場合、免疫系の細胞の細胞表面上に見られる膜タンパク質である（すなわち、Ｆｃ受容体は、標的細胞膜、そうでなければ形質膜又は細胞質膜としても知

られている膜上に見られる）。Ｆｃ受容体の役割は、Ｆｃドメインを介して抗体に結合し、抗体を細胞内に取り込むことである。免疫系では、これは、抗体媒介性食作用、及び抗体依存性細胞媒介性細胞傷害をもたらし得る。

【００２５】

Ｆｃ受容体のサブグループには、ＩｇＧ抗体に特異的なＦｃγ受容体（Ｆｃ－γ受容体、ＦｃγＲ）がある。Ｆｃγ受容体には、活性型Ｆｃγ受容体（活性化Ｆｃγ受容体とも表される）、及び抑制性Ｆｃγ受容体の２種類がある。活性型受容体及び抑制性受容体は、それぞれ、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ＩＴＡＭ）又は免疫受容抑制性チロシンモチーフ（ＩＴＩＭ）を介して、それらのシグナルを伝達する。ヒトにおいて、ＦｃγＲＩＩｂ（ＣＤ３２ｂ）は、抑制性Ｆｃγ受容体であり、一方ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩａ（ＣＤ３２ａ）、ＦｃγＲＩＩｃ（ＣＤ３２ｃ）、ＦｃγＲＩＩＩａ（ＣＤ１６ａ）及びＦｃγＲＩＶは、活性型Ｆｃγ受容体である。ＦｃγＲＩＩＩｂは、好中球上で発現するＧＰＩ結合受容体であり、ＩＴＡＭモチーフが欠如しているが、脂質ラフトをクロスリンクし、他の受容体と結合するその能力によって活性化ともみなされる。マウスにおいて、活性型受容体は、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩＩ、及びＦｃγＲＩＶである。

【００２６】

抗体がＦｃγ受容体との相互作用を介して免疫細胞活性を調節することは、公知である。具体的には、抗体免疫複合体が免疫細胞の活性化をどのように調節するかは、活性型Ｆｃγ受容体及び抑制性Ｆｃγ受容体の相対的な関与によって決定される。異なる抗体アイソタイプは、異なる親和性で活性型Ｆｃγ受容体及び抑制性Ｆｃγ受容体に結合し、結果として異なるＡ：Ｉ比（活性化：抑制比）をもたらす（Ｎｉｍｍｅｒｊａｈｎ ｅｔ ａｌ；Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００５ Ｄｅｃ ２；３１０（５７５３）：１５１０－２）。

【００２７】

抑制性Ｆｃγ受容体に結合することにより、抗体は、エフェクタ細胞機能を阻害、遮断、及び／又は下方制御することができる。

【００２８】

抗体は、活性化Ｆｃγ受容体に結合することにより、エフェクタ細胞の機能を活性化することができ、それによって抗体依存性細胞傷害（antibody-dependent cellular cytotoxicity、ＡＤＣＣ）、抗体依存性細胞貪食（antibody dependent cellular phagocytosis、ＡＤＣＰ）、サイトカイン放出、及び／又は抗体依存性エンドサイトーシス、並びに好中球の場合、ＮＥＴｏｓｉｓ（すなわち、ＮＥＴ（好中球細胞外トラップ）の活性化及び放出）などの機構を誘発する。活性型Ｆｃγ受容体に結合する抗体も、ＣＤ４０、ＭＨＣＩＩ、ＣＤ３８、ＣＤ８０、及び／又はＣＤ８６などのある特定の活性化マーカーの増加を引き起こし得る。

【００２９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体分子は、Ｆｃγ受容体結合抗体である。「Ｆｃγ受容体結合抗体」とは、抗体分子がそのＦｃ領域を介して少なくとも１つのＦｃγ受容体に結合することができることを意味する。

【００３０】

本明細書で用いる場合、抗体分子という用語は、完全長抗体又はフルサイズ抗体、並びに完全長抗体の機能的フラグメント及びこのような抗体分子の誘導体を包含する。

【００３１】

フルサイズ抗体の機能的フラグメントは、対応するフルサイズ抗体と同じ抗原結合特徴を有し、対応するフルサイズ抗体と同じ可変ドメイン（すなわち、ＶＨ配列及びＶＬ配列）及び／又は同じＣＤＲ配列のいずれかを含む。機能的フラグメントが、対応するフルサイズ抗体と同じ抗原結合特徴を有するということは、標的上のフルサイズ抗体と同じエピトープに結合することを意味する。そのような機能的フラグメントは、フルサイズ抗体のＦｖ部分に対応し得る。代替的に、そのようなフラグメントは、Ｆｃ部分を含有しない、一価の抗原結合フラグメントであるＦａｂ’とも表されるＦａｂ、又はジスルフィド結合又はＦａｂ’、すなわち（Ｆａｂ’）$_2$の一価のバリアントによって一緒に結合された２つ

の抗原結合Ｆａｂ部分を含有する二価の抗原結合フラグメントである（Ｆａｂ’）$_2$であり得る。そのようなフラグメントは、一本鎖可変フラグメント（single chain variable fragment、ｓｃＦｖ）でもあり得る。

【００３２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第１の抗体分子及び／又は第２の抗体分子は、フルサイズ抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、及びそれらの抗原結合フラグメント（例えば、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ’、及び（Ｆａｂ’）$_2$）からなる群から選択される。

【００３３】

機能的フラグメントは、対応するフルサイズ抗体の６個のＣＤＲの全てを常に含有するわけではない。３個以下のＣＤＲ領域（場合によっては、単一のＣＤＲだけ又はその一部）を含有する分子は、そのＣＤＲが由来する抗体の抗原結合活性を保持することができることが理解される。例えば、全ＶＬ鎖（３個のＣＤＲを全て含む）がその基質に対して高い親和性を有することが、Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６９：３２３８９－９３に記載されている。

【００３４】

２個のＣＤＲ領域を含有する分子については、例えば、Ｖａｕｇｈａｎ ＆ Ｓｏｌｌａｚｚｏ ２００１，Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ＆ Ｈｉｇｈ Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ，４：４１７－４３０に記載されている。４１８頁（右欄－３ Ｏｕｒ Ｓｔｒａｔｅｇｙ ｆｏｒ Ｄｅｓｉｇｎ）に、フレームワーク領域内に散在するＨ１及びＨ２ ＣＤＲ超可変領域のみを含むミニボディについて記載されている。ミニボディは、標的に結合することが可能であると記載されている。Ｐｅｓｓｉ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｎａｔｕｒｅ，３６２：３６７－９及びＢｉａｎｃｈｉ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２３６：６４９－５９は、Ｖａｕｇｈａｎ＆Ｓｏｌｌａｚｚｏによって参照され、Ｈ１及びＨ２ミニボディ、並びにその特性についてより詳細に記載している。Ｑｉｕ ｅｔ ａｌ．，２００７，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２５：９２１－９では、２個の結合されたＣＤＲからなる分子が抗原に結合することが可能であることが実証されている。Ｑｕｉｏｃｈｏ １９９３，Ｎａｔｕｒｅ，３６２：２９３－４は、「ミニボディ」技術の概要を提供している。Ｌａｄｎｅｒ ２００７，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２５：８７５－７は、２個のＣＤＲを含有する分子は、抗原結合活性を保持することが可能であると見解を述べている。

【００３５】

単一のＣＤＲ領域を含有する抗体分子については、例えば、Ｌａｕｎｅ ｅｔ ａｌ．，１９９７，ＪＢＣ，２７２：３０９３７－４４に記載されており、ＣＤＲに由来する様々なヘキサペプチドが抗原結合活性を表すことが実証され、完全な単一のＣＤＲの合成ペプチドが強力な結合活性を示すことに留意されたい。Ｍｏｎｎｅｔ ｅｔ ａｌ．，１９９９，ＪＢＣ，２７４：３７８９－９６では、様々な１２量体ペプチド及び関連するフレームワーク領域は、抗原結合活性を有することが実証されており、ＣＤＲ３様ペプチドは、単独で抗原に結合することが可能であると見解を述べている。Ｈｅａｐ ｅｔ ａｌ．，２００５，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．，８６：１７９１－１８００では、「マイクロ抗体」（単一のＣＤＲを含有する分子）は、抗原に結合することが可能であることが報告されており、抗ＨＩＶ抗体からの環状ペプチドは、抗原結合活性及び機能を有することが示されている。Ｎｉｃａｉｓｅ ｅｔ ａｌ．，２００４，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ，１３：１８８２－９１では、単一のＣＤＲは、そのリゾチーム抗原に対する抗原結合活性及び親和性を付与し得ることが示されている。

【００３６】

したがって、５個、４個、３個、又はそれ以下のＣＤＲを有する抗体分子は、それらが由来する完全長抗体の抗原結合特性を保持することが可能である。

【００３７】

抗体分子は、完全長抗体の誘導体又はそのような抗体のフラグメントであってもよい。誘導体が、対応する完全サイズ抗体と同じ抗原結合特徴を有するということは、完全サイズ抗体と同じ標的上のエピトープに結合することを意味する。

【００３８】

したがって、本明細書で使用する場合、「抗体分子」という用語は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、合成抗体、組換えて生成された抗体、多重特異性抗体、二重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、可変フラグメント（Ｆｖ）、二価一本鎖可変フラグメント（ｄｉ－ｓｃＦｖ）及びジスルフィド連結可変フラグメントを含む一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖフラグメント）、Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、抗体重鎖、抗体軽鎖、抗体重鎖のホモ二量体、抗体軽鎖のホモ二量体、抗体重鎖のヘテロ二量体、抗体軽鎖のヘテロ二量体、そのようなホモ及びヘテロ二量体の抗原結合機能的フラグメントを含む、全てのタイプの抗体分子、並びにそれらの機能的フラグメント及びそれらの誘導体を含む。

【００３９】

更に、本明細書で使用される場合、「抗体分子」という用語は、ＩｇＧ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、及びＩｇＥを含む、全てのクラスの抗体分子及び機能的フラグメントを含む。

【００４０】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトＩｇＧ１である。当業者は、マウスＩｇＧ２ａ及びヒトＩｇＧ１が、活性化Ｆｃガンマ受容体と生産的に結合し、例えばＡＤＣＰ及びＡＤＣＣによる、活性化Ｆｃガンマ受容体を担持する免疫細胞（例えば、マクロファージ及びＮＫ細胞）の活性化を通じて、標的細胞の欠失を活性化する能力を共有していることを認識している。このように、マウスＩｇＧ２ａは、マウスでの欠失に好ましいアイソタイプである一方で、ヒトＩｇＧ１は、ヒトにおける欠失に好ましいアイソタイプである。逆に、ＴＮＦＲスーパーファミリーのアゴニスト受容体、例えば、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＴＮＦＲＩＩ、ＣＤ４０の最適な共刺激は、抑制性ＦｃγＲＩＩＢの抗体結合に依存することが知られている。マウスでは、抑制性Ｆｃガンマ受容体（ＦｃγＲＩＩＢ）に優先的に結合し、活性化Ｆｃガンマ受容体に弱くのみ結合するＩｇＧ１アイソタイプは、ｍＡｂを標的とするＴＮＦＲスーパーファミリーの共刺激活性に最適であることが知られている。ヒトでのマウスＩｇＧ１アイソタイプの直接的な同等物については記載されていないが、活性化ヒトＦｃガンマ受容体を上回る抑制性ヒトＦｃガンマ受容体への同様に向上した結合を示すように抗体を操作することができる。そのような操作されたＴＮＦＲスーパーファミリー標的化抗体はまた、ヒトの活性化Ｆｃガンマ受容体及び抑制性Ｆｃガンマ受容体を発現するように操作されたトランスジェニックマウスにおいて、インビボで、改善された共刺激活性を有する（Ｄａｈａｎ ｅｔ ａｌ，２０１６，Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ Ａｇｏｎｉｓｔｉｃ，Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉ－ＣＤ４０ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｒｅｑｕｉｒｅｓ Ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ＦｃγＲ Ｅｎｇａｇｅｍｅｎｔ．Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ．２９（６）：８２０－３１）。

【００４１】

上記で概説したように、抗体分子の異なるタイプ及び形態が本発明に含まれ、免疫学当業者には既知であろう。治療目的で使用される抗体は、多くの場合、抗体分子の特性を改変する追加の構成成分を用いて改変されることが公知である。

【００４２】

したがって、本発明の抗体分子又は本発明に従って使用される抗体分子（例えば、モノクローナル抗体分子、及び／又はポリクローナル抗体分子、及び／又は二重特異性抗体分子）は、検出可能な部分及び／又は細胞傷害性部分を含む、ということが含まれる。

【００４３】

「検出可能部分」とは、以下を含む群からの１つ以上が含まれる：酵素、放射性原子、蛍光部分、化学発光部分、生物発光部分。検出可能な部分により、抗体分子をインビトロ、及び／又はインビボ、及び／又はエクスビボで視覚化することが可能になる。

【００４４】
「細胞傷害性部分」とは、放射性部分、及び／又は酵素（例えば、酵素はカスパーゼである）、及び／又は毒素（例えば、毒素は細菌毒素又は毒液である）が含まれ、細胞毒性部分は、細胞溶解を誘導することが可能である。
【００４５】
更に、抗体分子は、単離された形態、及び／又は精製された形態であってもよく、かつ／又はＰＥＧ化されてもよいことが含まれる。
【００４６】
上で考察したように、抗体のＣＤＲは、抗体標的に結合する。本明細書に記載の各ＣＤＲへのアミノ酸の割り当ては、Ｋａｂａｔ ＥＡ ｅｔ ａｌ．１９９１，「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２，ｐｐ ｘｖ－ｘｖｉｉによる定義に従う。
【００４７】
当業者が認識するように、アミノ酸を各ＣＤＲに割り当てるための他の方法も存在する。例えば、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎシステム（ＩＭＧＴ（Ｒ））（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／及びＬｅｆｒａｎｃ ａｎｄ Ｌｅｆｒａｎｃ「Ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ ＦａｃｔｓＢｏｏｋ」ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｂｙ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，２００１）。
【００４８】
更なる実施形態では、本発明の、又は本発明に従って使用されるＣＴＬＡ－４特異性抗体分子は、配列番号１５、１６、１７、１０、１８、及び１９、又は配列番号２２、２３、２４、１０、２５、及び２６を含む抗体分子などの、本明細書に記載の特定の抗体と競合することが可能である抗体分子である。
【００４９】
「競合することが可能である」とは、競合抗体が、本明細書で定義される抗体分子の特定の標的への結合を少なくとも部分的に抑制又はそうでなければ干渉することが可能であることを意味する。
【００５０】
例えば、そのような競合抗体分子は、本明細書に記載される抗体分子の結合を少なくとも約１０％、例えば、少なくとも約２０％、若しくは少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約１００％抑制することが可能であり得、かつ／又は本明細書に記載される抗体が特定の標的への結合を防止若しくは低減する能力を少なくとも約１０％、例えば、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、若しくは少なくとも約１００％抑制することが可能であり得る。
【００５１】
競合結合は、酵素結合免疫吸着検定法（Enzyme-linked immunosorbent assay、ＥＬＩＳＡ）などの当業者に周知の方法によって決定され得る。
【００５２】
ＥＬＩＳＡアッセイを使用して、エピトープ改変抗体又は遮断抗体を評価することができる。競合抗体を識別するために好適な追加の方法は、参照により本明細書に組み込まれるＡｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｈａｒｌｏｗ＆Ｌａｎｅに開示されている（例えば、５６７～５６９頁、５７４～５７６頁、５８３頁、及び５９０～６１２頁、１９８８，ＣＳＨＬ，ＮＹ，ＩＳＢＮ ０－８７９６９－３１４－２を参照されたい）。
【００５３】

抗体が定義された標的分子又は抗原に特異的に結合すること、かつ、これは、抗体が、標的ではない分子ではなく、その標的に優先的かつ選択的に結合することを意味することはよく知られている。

【００５４】

本発明による第１及び第２の抗体（ＣＴＬＡ－４、ＰＤ１、ＰＤ－Ｌ１）の標的、又は本発明に従って使用される第１及び第２の抗体の標的は、細胞の表面で発現し、すなわち、それらは、細胞表面抗原であり、これらには、抗体に対するエピトープ（そうでなければ、この文脈において、細胞表面エピトープとして既知である）が含まれるであろう。細胞表面抗原及びエピトープは、免疫学又は細胞生物学における当業者によって容易に理解される用語である。

【００５５】

「細胞表面抗原」とは、本明細書に記載の抗体分子が細胞膜の細胞外側に露出している細胞表面抗原又は少なくともそのエピトープを含む。

【００５６】

タンパク質の結合を評価する方法は、生化学及び免疫学における当業者には既知である。当業者であれば、それらの方法を使用して、抗体の標的への結合及び／又は抗体のＦｃドメインのＦｃ受容体への結合、並びにそれらの相互作用における相対的な強度、又は特異性、抑制、又は防止、又は低減を評価することができることを理解するであろう。タンパク質の結合を評価するために使用され得る方法の例は、例えば、イムノアッセイ、ＢＩＡｃｏｒｅ、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ（radioimmunoassay、ＲＩＡ）、及び酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）がある（抗体特異性に関する考察については、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ａｔ ｐａｇｅｓ ３３２－３３６（１９８９）を参照されたい）。

【００５７】

したがって、本明細書において、「ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体分子」及び「抗ＣＴＬＡ－４抗体分子」の両方は、標的ＣＴＬＡ－４に特異的に結合するが、非標的に結合しない、又は標的よりも弱く（親和性が低いなど）非標的に結合する抗体分子を指す。

【００５８】

したがって、本明細書において、「ＰＤ－１に特異的に結合する抗体分子」及び「抗ＰＤ－１抗体分子」の両方は、標的ＰＤ－１に特異的に結合するが、非標的に結合しない、又は標的よりも弱く（親和性が低いなど）非標的に結合する抗体分子を指す。

【００５９】

したがって、本明細書において、「ＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する抗体分子」及び「抗ＰＤ－Ｌ１抗体分子」の両方は、標的ＰＤ－Ｌ１に特異的に結合するが、非標的に結合しない、又は標的よりも弱く（親和性が低いなど）非標的に結合する抗体分子を指す。

【００６０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体分子（又は抗ＣＴＬＡ－４抗体分子）は、ＣＴＬＡ－４の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体分子を指す。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１に特異的に結合する抗体分子（又は抗ＰＤ－１抗体分子）は、ＰＤ－１の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体分子を指す。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する抗体分子（又は抗ＰＤ－Ｌ１抗体分子）は、ＰＤ－Ｌ１の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体分子を指す。

【００６１】

また、抗体が標的ＣＴＬＡ－４又はＰＤ－１若しくはＰＤ－Ｌ１に、非標的よりも、少なくとも２倍強く、又は少なくとも５倍強く、又は少なくとも１０倍強く、又は少なくとも２０倍強く、又は少なくとも５０倍強く、又は少なくとも１００倍強く、又は少なくとも２００倍強く、又は少なくとも５００倍強く、又は少なくとも約１０００倍強く、特異的に結合するという意味が含まれる。

【００６２】
追加的に、抗体が少なくとも約10^{-1}Ｍ、又は少なくとも約10^{-2}Ｍ、又は少なくとも約10^{-3}Ｍ、又は少なくとも約10^{-4}Ｍ、又は少なくとも約10^{-5}Ｍ、又は少なくとも約10^{-6}Ｍ、又は少なくとも約10^{-7}Ｍ、又は少なくとも約10^{-8}Ｍ、又は少なくとも約10^{-9}Ｍ、又は少なくとも約10^{-10}Ｍ、又は少なくとも約10^{-11}Ｍ、又は少なくとも約10^{-12}Ｍ、又は少なくとも約10^{-13}Ｍ、又は少なくとも約10^{-14}Ｍ、又は少なくとも約10^{-15}Ｍの解離定数（K_D）で標的に結合する場合、抗体は、標的ＣＴＬＡ－４又はＰＤ－１若しくはＰＤ－Ｌ１に特異的に結合するという意味が含まれる。
【００６３】
上述したように、本発明の腫瘍溶解性ウイルスは、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体を発現する。
【００６４】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体分子は、Ｆｃγ受容体結合抗体である。
【００６５】
いくつかの実施形態では、第１の抗体分子は、イピリムマブ及びトレメリムマブからなる群から選択される。
【００６６】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体分子（又は抗ＣＴＬＡ－４抗体分子）は、ＣＤ２８と交差反応しない。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体分子（又は抗ＣＴＬＡ－４抗体分子）は、ＣＴＬＡ－４のＣＤ８０及び／又はＣＤ８６への結合を遮断し、それにより、ＣＴＬＡ－４シグナル伝達を阻害する。
【００６７】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体分子（又は抗ＣＴＬＡ－４抗体分子）は、イピリムマブと比較して、ＣＴＬＡ－４陽性細胞に対する改善された枯渇効果を有する。
【００６８】
抗体分子がＣＴＬＡ－４陽性細胞に枯渇効果を有するということは、ヒトなどの対象に投与すると、そのような抗体がＣＴＬＡ－４陽性細胞の表面に発現するＣＴＬＡ－４に特異的に結合し、この結合がそのような細胞の枯渇をもたらすことを意味する。
【００６９】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４陽性細胞は、ＣＤ４陽性（$CD4^+$）細胞、すなわち、ＣＤ４を発現する細胞である。
【００７０】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４陽性細胞は、ＣＤ４陽性及びＦＯＸＰ３陽性の両方であり、すなわち、ＣＤ４及びＦＯＸＰ３の両方を発現する。これらの細胞はＴｒｅｇである。ＣＤ８陽性Ｔ細胞もＣＴＬＡ－４を発現するが、ＴｒｅｇはＣＤ８陽性Ｔ細胞よりも著しく高いレベルのＣＴＬＡ－４を発現する。これにより、Ｔｒｅｇは、発現の少ない$CD8^+$細胞と比較して枯渇しやすくなる。
【００７１】
状況によっては、ＣＴＬＡ－４は腫瘍微小環境の免疫細胞（腫瘍浸潤細胞、ＴＩＬＳ）に優先的に発現する。
【００７２】
したがって、腫瘍微小環境では、Ｔｒｅｇは、ＣＴＬＡ－４の発現が最も高い細胞となり、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体分子（又は抗ＣＴＬＡ－４抗体分子）がＴｒｅｇ枯渇効果を有することとなる。
【００７３】
したがって、いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する抗体分子は、

Ｔｒｅｇ枯渇抗体である。
【００７４】
上記のように、本明細書に記載の抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、Ｔｒｅｇ枯渇抗体分子であり得、これは、ヒトなどの対象に投与すると、そのような抗体分子は、Ｔｒｅｇの表面に発現するＣＴＬＡ－４に特異的に結合し、この結合がＴｒｅｇの枯渇をもたらすことを意味する。
【００７５】
抗体分子が、本明細書で言及されるＴｒｅｇ枯渇効果を有する抗体分子である（例えば、これは、イピリムマブと比較して改善された枯渇効果であり得る）かどうかを決定するために、インビトロ抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ）アッセイ又はＰＢＭＣ－ＮＯＧ／ＳＣＩＤモデルでのインビボ試験を使用することが可能である。
【００７６】
ＣＤ１６－１５８Ｖ対立遺伝子をＧＦＰとともに発現するように安定的にトランスフェクトされたＮＫ－９２細胞株を使用して実行されるインビトロＡＤＣＣ試験であって、ＡＤＣＣ試験は、以下の連続した７つのステップを含む、インビトロＡＤＣＣ試験。
１）標的細胞としての、ＣＴＬＡ－４陽性細胞、ＣＤ４陽性細胞、又はＴｒｅｇを、健康なドナーの末梢血から単離するステップ。この単離は、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃの市販キットなどのＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞単離キットを使用して行うことができる。
２）次に、標的細胞をＣＤ３／ＣＤ２８で、例えば、ＣＤ３／ＣＤ２８ Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（登録商標）及びｒｈＩＬ－２、例えば、５０ｎｇ／ｍｌのｒｈＩＬ－２を使用して、例えば４８時間刺激するステップ。刺激は３７℃で行うことができる。
３）次に、標的細胞を、試験される抗体分子と、例えば、１０μｇ／ｍｌで、４℃で３０分間プレインキュベートし、次にＮＫ細胞と混合するステップ。
４）次に、標的細胞を、ＨＥＰＥＳバッファー、ピルビン酸ナトリウム、及びＦＢＳ低ＩｇＧを含有するＲＰＭＩ １６４０＋ＧｌｕｔａＭＡＸ培地で、適切な時間、例えば４時間インキュベートするステップ。ＲＰＭＩ １６４０＋ＧｌｕｔａＭＡＸ培地には、１０ｍＭのＨＥＰＥＳバッファー、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム、及び１０％ＦＢＳ低ＩｇＧを含有してもよく、エフェクタ：標的細胞比は、２：１であり得る。
５）溶解をフローサイトメトリーによって決定するステップ。
６）ステップ３で試験された抗体分子の代わりに使用されるイピリムマブを（対照として）用いて、ステップ１～５を繰り返すか、又は並行して実行するステップ。
７）試験した抗体分子の溶解結果を、イピリムマブの溶解結果と比較するステップ。イピリムマブと比較して試験された抗体分子の改善された溶解は、この試験された抗体分子が、使用された標的細胞に応じて、ＣＴＬＡ－４陽性細胞、ＣＤ４陽性細胞又はＴｒｅｇに対してそれぞれ改善された枯渇効果を有することを示している。
【００７７】
いくつかの実施形態では、上記のステップ７）における改善された枯渇効果は、著しく改善された枯渇効果である。
【００７８】
インビボ試験は、ＰＢＭＣマウス及びＮＯＧ／ＳＣＩＤマウスの併用に基づき、これは、本明細書ではＰＢＭＣ－ＮＯＧ／ＳＣＩＤモデルと呼ばれる。ＰＢＭＣマウス及びＮＯＧ／ＳＣＩＤマウス両方とも公知のモデルである。ＰＢＭＣ－ＮＯＧ／ＳＣＩＤモデルにおけるインビボ試験は、次の９つの連続したステップを含む。
１）ヒトＰＢＭＣ（末梢血単核細胞）を単離し、洗浄し、滅菌ＰＢＳに再懸濁するステップ。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、７５×１０^{6}細胞／ｍｌでＰＢＳに再懸濁される。
２）ＮＯＧマウスに、ステップ１）からの細胞懸濁液の適切な量、例えば２００μｌを、ｉ．ｖ．（静脈内）注射するステップ。２００μｌを注射する場合、これは、１５×１０^{6}個の細胞／マウスに相当する。
３）注射後、適切な時期に例えば２週間、ＮＯＧマウスから脾臓を単離し、単一細胞懸

濁液にするステップ。任意選択で、単一細胞懸濁液から少量の試料を採取して、ＣＴＬＡ－４の発現を確認するために、ＦＡＣＳによってヒトＴ細胞上のＣＴＬＡ－４の発現を決定する。

４）ステップ３）の細胞懸濁液を滅菌ＰＢＳに再懸濁するステップ。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、５０×１０^{6}細胞／ｍｌで滅菌ＰＢＳに再懸濁される。任意選択のＣＴＬＡ－４発現決定がステップ３に含まれている場合、残りの細胞懸濁液はステップ４で再懸濁される。

５）ＳＣＩＤマウスに、ステップ４からの懸濁液の適切な量、例えば２００μｌをｉ．ｐ．（腹腔内）注射するステップ。２００μｌを注射する場合、これは、１０×１０^{6}個の細胞／マウスに相当する。

６）ステップ５）の注射後、適切な時間に例えば１時間、ＳＣＩＤマウスを、試験される抗体分子、イピリムマブ又はアイソタイプ対照モノクローナル抗体のいずれかの適切な量、例えば１０ｍｇ／ｋｇで処理するステップ。

７）処理されたＳＣＩＤマウスの腹腔内液を、ステップ６）の処理後、適切な時間例えば２４時間で収集するステップ。

８）ヒトＴ細胞サブセットを、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５及び／又はＣＤ１２７のマーカーを使用してＦＡＣＳによって同定及び定量化するステップ。

９）試験された抗体分子で処理したマウスからのＴ細胞サブセットの同定及び定量化の結果を、イピリムマブで処理したマウスからのＴ細胞サブセットの同定及び定量化の結果、並びにアイソタイプ対照モノクローナル抗体で処理したマウスからのＴ細胞サブセットの同定及び定量化の結果と比較するステップ。イピリムマブで処理されたマウスの腹腔内液中のＣＴＬＡ－４陽性細胞の数と比較して、試験された抗体分子で処理されたマウスの腹腔内液中のＣＴＬＡ－４陽性細胞の数が少ないことは、この抗体分子がイピリムマブと比較してＣＴＬＡ－４陽性細胞に対する改善した枯渇効果を有することを示している。イピリムマブで処理されたマウスからの腹腔内液中のＣＤ４陽性細胞の数と比較して、試験された抗体分子で処理されたマウスの腹腔内液中のＣＤ４陽性細胞の数が少ないことは、この抗体分子が、イピリムマブと比較してＣＤ４陽性細胞に対する改善した枯渇効果を有することを実証している。イピリムマブで処理されたマウスの腹腔内液中のＴｒｅｇの数と比較して、試験された抗体分子で処理されたマウスの腹腔内液中のＴｒｅｇの数が少ないことは、この抗体分子がイピリムマブと比較してＴｒｅｇに対する改善した枯渇効果を有すること示している。

【００７９】

このインビボ試験では、いくつかの実施形態では、ステップ７でのＴｒｅｇ枯渇を調べることが最も興味深い。

【００８０】

Ｔｒｅｇ枯渇はまた、当業者に知られているように、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）アッセイにおいて評価され得る。

【００８１】

いくつかの実施形態では、抗体分子は、Ｙｅｒｖｏｙ（イピリムマブ）と比較して、Ｂ７．１及びＢ７．２リガンドとのＣＴＬＡ－４相互作用に対して同様の遮断効果を有する。これは、ＥＬＩＳＡによって、又は抗ＣＴＬＡ－４抗体がＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓエンテロトキシンＢ（Staphylococcus Enterotoxin B、ＳＥＢ）によるＰＢＭＣの刺激に応答してＴ細胞によりＩＬ－２産生を増強する、より機能的なアッセイにおいて評価することができる。

【００８２】

いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、ヒト抗体分子である。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、ヒト化抗体分子である。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、ヒト由来の抗体分子であり、これは、それが、その後修飾されたヒト抗体分子に由来することを意味する。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、ヒトＩｇＧ１抗体である。

【００８３】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子は、ヒトＩｇＧ抗体、ヒト化ＩｇＧ抗体、及びヒト起源のＩｇＧ抗体からなる群から選択される。
【００８４】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子は、フルサイズ抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、及びそれらの抗原結合フラグメント（例えば、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ’、及び（Ｆａｂ’）$_2$）からなる群から選択される。
【００８５】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、１つ若しくはいくつかの活性化Ｆｃ受容体への結合の改善を示し、かつ／又は１つ若しくはいくつかの活性化Ｆｃ受容体への結合の改善のために操作されたヒトＩｇＧ１抗体の形態の抗体であり、したがって、いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、Ｆｃ操作されたヒトＩｇＧ１抗体である。
【００８６】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、マウス又はヒト化マウスＩｇＧ２ａ抗体である。
【００８７】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、ヒトＣＴＬＡ－４と交差反応性であるマウス抗体である。
【００８８】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４分子は、モノクローナル抗体又はヒト起源の抗体分子である。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、ポリクローナル抗体である。
【００８９】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、以下の表１に示される、３つの選択的ＶＨ－ＣＤＲ１配列のうちの１つ、３つの選択的ＶＨ－ＣＤＲ２配列のうちの１つ、２つの選択的ＶＨ－ＣＤＲ３配列のうちの１つ、２つのＶＬ－ＣＤＲ１配列のうちの１つ、２つのＶＬ－ＣＤＲ２配列のうちの１つ、及び／又は２つの選択的ＶＬ－ＣＤＲ３配列のうちの１つを含む抗体分子である。
【００９０】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、配列番号３、６、８、１０、１２、及び１４からなる群から選択されるＣＤＲのうちの１～６個を含む抗体分子からなる群から選択される。
【００９１】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、配列番号３、６、８、１０、１２、及び１４を有するＣＤＲを含む抗体分子からなる群から選択される。
【００９２】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、ＣＤＲ、ＶＨ－ＣＤＲ１、ＶＨ－ＣＤＲ２、ＶＨ－ＣＤＲ３、ＶＬ－ＣＤＲ１、及びＶＬ－ＣＤＲ３のうちの１～６個を含む抗体分子からなる群から選択され、
ＶＨ－ＣＤＲ１は、存在する場合、配列番号１５、２２、２９、及び３５からなる群から選択され、
ＶＨ－ＣＤＲ２は、存在する場合、配列番号１６、２３、３０、及び３６からなる群から選択され、
ＶＨ－ＣＤＲ３は、存在する場合、配列番号１７、２４、３１、及び３７からなる群から選択され、
ＶＬ－ＣＤＲ１は、存在する場合、配列番号１０及び３８からなる群から選択され、
ＶＬ－ＣＤＲ２は、存在する場合、配列番号１８、２５、３２、及び３９からなる群から選択され、
ＶＬ－ＣＤＲ３は、存在する場合、配列番号１９、２６、及び４０からなる群から選択される。

【００９３】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、以下からなる群から選択される６個のＣＤＲを含む抗体分子からなる群から選択される：
配列番号１５、１６、１７、１０、１８、及び１９、
配列番号２２、２３、２４、１０、２５、及び２６、
配列番号２９、３０、３１、１０、３２、及び２６、並びに
配列番号３５、３６、３７、３８、３９、及び４０。
【００９４】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、配列番号１５、１６、１７、１０、１８、及び１９を有する６つのＣＤＲを含む抗体分子である。
【００９５】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、配列番号２２、２３、２４、１０、２５、及び２６を有する６つのＣＤＲを含む抗体分子である。
【００９６】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、配列番号２０、２７、３３及び４１からなる群から選択されるＶＨを含む抗体分子からなる群から選択される抗体分子である。
【００９７】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、配列番号２１、２８、３４、及び４２からなる群から選択されるＶＬを含む抗体分子からなる群から選択される抗体分子である。
【００９８】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、配列番号２０～２１、２７～２８、３３～３４、及び４１～４２からなる群から選択されるＶＨ及びＶＬを含む抗体分子からなる群から選択される抗体分子である。
【００９９】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、配列番号２０の配列を有するＶＨ、及び配列番号２１の配列を有するＶＬを含む。
【０１００】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、配列番号２７の配列を有するＶＨ、及び配列番号２８の配列を有するＶＬを含む。
【０１０１】
いくつかの実施形態では、第１の抗体分子は、配列番号２０及び２７からなる群から選択される、可変重鎖を含む。いくつかの追加的又は代替的な実施形態では、第１の抗体分子は、配列番号２１及び２８からなる群から選択される可変軽鎖を含む。
【０１０２】
いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、配列番号４３の配列を有する重鎖定常領域（heavy chain constant region、ＣＨ）を含む。いくつかの追加的又は代替的な実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、配列番号４４の配列を有する軽鎖定常領域（light chain constant region、ＣＬ）を含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、配列番号４３及び４４の定常領域を含む。
【０１０３】

【表１】

表１：本明細書に開示される抗体の一般的なＣＤＲ配列

抗体の関連部分	配列	未同定のアミノ酸残基の説明	配列番号
ＶＨ－ＣＤＲ１選択肢１	ＦＸ$_1$Ｘ$_2$ＹＸ$_3$ＭＸ$_4$ＷＸ$_5$Ｒ　Ｑ　ＡＰＧ	Ｘ$_1$＝Ｓ又はＫ、Ｘ$_2$＝Ｄ、Ｓ、又はＡ、Ｘ$_3$＝Ｙ、Ｓ、又はＡ、Ｘ$_4$＝Ｓ又はＮ、及びＸ$_5$＝Ｖ又はＩ	１
ＶＨ－ＣＤＲ１選択肢２	ＦＳＸ$_1$ＹＸ$_2$ＭＸ$_3$ＷＶＲＱ　ＡＰＧ	Ｘ$_1$＝Ｄ又はＳ、Ｘ$_2$＝Ｙ、Ｓ、又はＡ、及びＸ$_3$＝Ｓ又はＮ	２
ＶＨ－ＣＤＲ１選択肢３	ＦＳＸ$_1$ＹＸ$_2$ＭＸ$_3$ＷＶＲＱ　ＡＰＧ	Ｘ$_1$＝Ｄ又はＳ、Ｘ$_2$＝Ｙ又はＳ、及びＸ$_3$＝Ｓ又はＮ	３
ＶＨ－ＣＤＲ２、選択肢１	ＳＸ$_1$ＩＳＸ$_2$Ｘ$_3$Ｘ$_4$Ｘ$_5$Ｘ$_6$Ｘ$_7$Ｘ$_8$Ｘ$_9$ＡＤＳＶＫＧＲ	Ｘ$_1$＝Ｇ又はＡ、Ｘ$_2$＝Ｗ、Ｇ、又はＮ、Ｘ$_3$＝Ｓ又はＴ、Ｘ$_4$＝Ｓ又はＧ、Ｘ$_5$＝Ｒ又はＧ、Ｘ$_6$＝Ｄ、Ｓ、又はＹ、Ｘ$_7$＝Ｋ、Ｔ、又はＩ、Ｘ$_8$＝Ｇ、Ｙ、Ｈ、又はＤ、Ｘ$_9$＝Ｙ又はＦ	４
ＶＨ－ＣＤＲ２、選択肢２	ＳＸ$_1$ＩＳＸ$_2$Ｘ$_3$Ｘ$_4$Ｘ$_5$Ｘ$_6$Ｘ$_7$Ｘ$_8$ＹＡＤＳＶＫＧＲ	Ｘ$_1$＝Ｇ又はＡ、Ｘ$_2$＝Ｗ、Ｇ、又はＮ、Ｘ$_3$＝Ｓ又はＴ、Ｘ$_4$＝Ｓ又はＧ、Ｘ$_5$＝Ｒ又はＧ、Ｘ$_6$＝Ｄ、Ｓ、又はＹ、Ｘ$_7$＝Ｋ、Ｔ、又はＩ、Ｘ$_8$＝Ｇ、Ｙ、Ｈ、又はＤ	５
ＶＨ－ＣＤＲ２、選択肢３	ＳＸ$_1$ＩＳＸ$_2$ＳＸ$_3$Ｘ$_4$Ｘ$_5$Ｘ$_6$Ｘ$_7$ＹＡＤＳＶＫＧＲ	Ｘ$_1$＝Ｇ又はＡ、Ｘ$_2$＝Ｗ又はＧ、Ｘ$_3$＝Ｓ又はＧ、Ｘ$_4$＝Ｒ又はＧ、Ｘ$_5$＝Ｄ又はＳ、Ｘ$_6$＝Ｋ又はＴ、Ｘ$_7$＝Ｇ又はＹ、Ｈ又はＤ	６
ＶＨ－ＣＤＲ３選択肢１	Ｘ$_1$Ｘ$_2$Ｘ$_3$Ｘ$_4$Ｘ$_5$Ｘ$_6$Ｘ$_7$Ｘ$_8$Ｘ$_9$Ｘ$_{10}$　Ｘ$_{11}$Ｘ$_{12}$Ｘ$_{13}$Ｘ$_{14}$Ｘ$_{15}$	Ｘ$_1$＝Ｔ又はＡ、Ｘ$_2$＝Ｔ又はＲ、Ｘ$_3$＝Ｄ、Ｙ、又はＬ、Ｘ$_4$＝Ｌ、Ｒ、Ｓ、又はＧ、Ｘ$_5$＝Ａ、Ｖ、Ｓ、又はＹ、Ｘ$_6$＝Ｒ、Ｅ、Ｇ、又はＳ、Ｘ$_7$＝Ｙ、Ｍ、Ｌ、又はＧ、Ｘ$_8$＝Ｎ、Ｈ、Ｙ、又はなし、Ｘ$_9$＝Ｑ、Ｄ、又はなし、Ｘ$_{10}$＝Ｗ、Ａ、Ｄ、又はなし、Ｘ$_{11}$＝Ｌ、Ｆ、Ｒ、又はなし、Ｘ$_{12}$＝Ａ、Ｄ、Ｇ、又はなし、Ｘ$_{13}$＝Ｄ、Ｉ、Ｍ、又はなし、Ｘ$_{14}$＝Ｄ又はなし、及びＸ$_{15}$＝Ｖ又はなし	７
ＶＨ－ＣＤＲ３選択肢２	Ｘ$_1$Ｘ$_2$ＤＸ$_3$Ｘ$_4$Ｘ$_5$Ｘ$_6$Ｘ$_7$Ｘ$_8$Ｘ$_9$Ｘ$_{10}$　Ｘ$_{11}$Ｘ$_{12}$Ｘ$_{13}$	Ｘ$_1$＝Ｔ又はＡ、Ｘ$_2$＝Ｔ又はＲ、Ｘ$_3$＝Ｌ、Ｘ$_4$＝Ａ又はＶ、Ｘ$_5$＝Ｒ又はＥ、Ｘ$_6$＝Ｙ又はＭ、Ｘ$_7$＝Ｎ又はなし、Ｘ$_8$＝Ｑ又はなし、Ｘ$_9$＝Ｗ又はなし、Ｘ$_{10}$＝Ｌ、又はなし、Ｘ$_{11}$＝Ａ、又はなし、Ｘ$_{12}$＝Ｄ又はなし	８
ＶＬ－ＣＤＲ１選択肢１	ＣＸ$_1$ＧＳＳＳＮＩＧＸ$_2$　Ｘ$_3$ＹＸ$_4$Ｘ$_5$Ｘ$_6$	Ｘ$_1$＝Ｔ又はＳ、Ｘ$_2$＝Ａ又はＳ、Ｘ$_3$＝Ｇ又はＮ、Ｘ$_4$＝Ｄ又はＶ、Ｘ$_5$＝Ｖ又はＹ、Ｘ$_6$＝Ｈ又はなし	９
ＶＬ－ＣＤＲ１選択肢２	ＣＴＧＳＳＳＮＩＧＡＧＹＤＶＨ		１０
ＶＬ－ＣＤＲ２選択肢１	Ｘ$_1$ＮＸ$_2$Ｘ$_3$ＲＰＳ	Ｘ$_1$＝Ｇ、Ｒ、又はＤ、Ｘ$_2$＝Ｄ、Ｎ、又はＳ、Ｘ$_3$＝Ｎ、Ｑ、又はＫ	１１
ＶＬ－ＣＤＲ２選択肢２	Ｘ$_1$ＮＸ$_2$Ｘ$_3$ＲＰＳ	Ｘ$_1$＝Ｇ又はＲ、Ｘ$_2$＝Ｄ又はＮ、及びＸ$_3$＝Ｎ又はＱ	１２
ＶＬ－ＣＤＲ３選択肢１	ＣＸ$_1$Ｘ$_2$Ｘ$_3$ＤＸ$_4$ＳＬＸ$_5$Ｇ　Ｘ$_6$ＶＸ$_7$	Ｘ$_1$＝Ａ又はＱ、Ｘ$_2$＝Ｖ、Ａ、又はＳ、Ｘ$_3$＝Ｗ又はＹ、Ｘ$_4$＝Ｄ又はＳ、Ｘ$_5$＝Ｎ又はＳ、Ｘ$_6$＝Ｖ、Ｗ、又はＰ、及びＸ$_7$＝Ｖ又はなし	１３
ＶＬ－ＣＤＲ３選択肢２	ＣＡＸ$_1$ＷＤＤＳＬＮＧ　Ｘ$_2$Ｖ	Ｘ$_1$＝Ｖ又はＡ、及びＸ$_2$＝Ｖ又はＷ	１４

【０１０４】

【表２－１】

表２：特異的抗ＣＴＬＡ－４抗体分子、ＣＤＲ配列は、完全ＶＨ及びＶＬ配列において太字でマークされている

抗体クローン	領域	配列	配列番号
４－Ｅ０３	ＶＨ－ＣＤＲ１	ＦＳＤＹＹＭＳＷＶＲ　ＱＡＰＧ	１５
	ＶＨ－ＣＤＲ２	ＳＧＩＳＷＳＳＲＤＫ　ＧＹＡＤＳＶＫＧＲ	１６
	ＶＨ－ＣＤＲ３	ＴＴＤＬＡＲＹ	１７
	ＶＬ－ＣＤＲ１	ＣＴＧＳＳＳＮＩＧＡ　ＧＹＤＶＨ	１０
	ＶＬ－ＣＤＲ２	ＧＮＤＮＲＰＳ	１８
	ＶＬ－ＣＤＲ３	ＣＡＶＷＤＤＳＬＮＧ　ＶＶ	１９
	ＶＨ	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT**FS** **DYYMSWVRQA** **PG**KGLEWV**SG** **ISWSSRDKGY** **ADSVKGR**FTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**TTDL** **ARY**WGQGTLV TVSS	２０
	ＶＬ	QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI S**CTGSSSNIG** **AGYDVH**WYQQ LPGTAPKLLI Y**GNDNRPS**GV PDRFSGSKSG TSASLAISGL RSEDEADYY**C** **AVWDDSLNGV** **V**FGGGTKLTV LG	２１
	ヒト免疫＿グロブリンＧ１（ＩｇＧ１）軽鎖（light chain、ＬＣ）	**MGWSCIILFLVATATGVHS**QSVLTQPPSASGTPGQRVT ISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNDNRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAVWDDSLN GVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVC LISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAA SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	５３
	ヒトＩｇＧ１重鎖（heavy chain、ＨＣ）	**MGWSCIILFLVATATGVHS**EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSDYYMSWVRQAPGKGLEWVSGISWSSRD KGYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCT TDLARYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	５４

【０１０５】

【表２－２】

（表２の続き）

抗体クローン	領域	配列	配列番号
５－Ｂ０７	ＶＨ－ＣＤＲ１	ＦＳＳＹＳＭＮＷＶＲＱ　ＡＰＧ	２２
	ＶＨ－ＣＤＲ２	ＳＡＩＳＧＳＧＧＳＴ　ＹＹＡＤＳＶＫＧＲ	２３
	ＶＨ－ＣＤＲ３	ＡＲＤＲＶＥＭＮＱＷ　ＬＡＤ	２４
	ＶＬ－ＣＤＲ１	ＣＴＧＳＳＳＮＩＧＡ　ＧＹＤＶＨ	１０
	ＶＬ－ＣＤＲ２	ＲＮＮＱＲＰＳ	２５
	ＶＬ－ＣＤＲ３	ＣＡＡＷＤＤＳＬＮＧ　ＷＶ	２６
	ＶＨ	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT**FS** **SYSMNWVRQA** **PG**KGLEWV**SA** **ISGSGGSTYY** **ADSVKGR**FTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**ARDR** **VEMNQWLAD**W GQGTLVTVSS	２７
	ＶＬ	QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI S**CTGSSSNIG** **AGYDVH**WYQQ LPGTAPKLLI Y**RNNQRPS**GV PDRFSGSKSG TSASLAISGL RSEDEADYY**C** **AAWDDSLNGW** **V**FGGGTKLTV LG	２８
	マウス免疫グロブリン（ＩｇＧ２ａ）軽鎖（ＬＣ）	MGWSCIILFLVATATGVHSQSVLTQPPSASGTPGQRVTIS CTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGW VFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEELETNKATLVCTIT DFYPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNNKYMAS SYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS	６２
	マウス免疫グロブリン（ＩｇＧ２ａ）重鎖（ＨＣ）	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDR VEMNQWLADWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTT GSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQS DLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPR GPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVT CVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNST LRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKP KGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYV EWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	６３
２－Ｃ０６	ＶＨ－ＣＤＲ１	ＦＳＳＹＡＭＳＷＶＲＱ　ＡＰＧ	２９
	ＶＨ－ＣＤＲ２	ＳＧＩＳＧＳＧＧＹＩ　ＨＹＡＤＳＶＫＧＲ	３０
	ＶＨ－ＣＤＲ３	ＡＴＹＳＳＧＬＨＤＡ　ＦＤＩ	３１
	ＶＬ－ＣＤＲ１	ＣＴＧＳＳＳＮＩＧＡ　ＧＹＤＶＨ	１０
	ＶＬ－ＣＤＲ２	ＤＮＮＫＲＰＳ	３２

【０１０６】

【表２－３】
（表２の続き）

抗体クローン	領域	配列	配列番号
	VL－CDR3	CAAWDDSLNG WV	26
	VH	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT**FS** **SYAMSWVRQA** **PG**KGLEWV**SG** **ISGSGGYIHY** **ADSVKGR**FTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**ATYS** **SGLHDAFDI**W GQGTLVTVSS	33
	VL	QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI S**CTGSSSNIG** **AGYDVH**WYQQ LPGTAPKLLI Y**DNNKRPS**GV PDRFSGSKSG TSASLAISGL RSEDEADYY**C** **AAWDDSLNGW** **V**FGGGTKLTV LG	34
2－F09	VH－CDR1	FKAYSMSWIR QAPG	35
	VH－CDR2	SGISNTGGST DFADSVKGR	36
	VH－CDR3	ARLGYSGYDD RGMDV	37
	VL－CDR1	CSGSSSNIGS NYVY	38
	VL－CDR2	GNSNRPS	39
	VL－CDR3	CQSYDSSLSG PVV	40
	VH	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT**FK** **AYSMSWIRQA** **PG**KGLEWV**SG** **ISNTGGSTDF** **ADSVKGR**FTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAMYYC**ARLG** **YSGYDDRGMD V**WGQGTLVTV SS	41
	VL	QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI S**CSGSSSNIG** **SNYVY**WYQQL PGTAPKLLIY **GNSNRPS**GVP DRFSGSKSGT SASLAISGLR SEDEADYY**CQ** **SYDSSLSGPV** **V**FGGGTKLTV LG	42

【０１０７】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗ＣＴＬＡ－４抗体分子はまた、以下の表３に示される定常領域の一方又は両方を含み得る。
【０１０８】

【表３】

表３：本明細書に開示される抗体の定常領域の配列

領域	配列	配列番号
ＣＨ	ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳ ＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴ ＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧ ＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷ ＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫ ＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥ ＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶ ＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴ ＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ	４３
ＣＬ	ＱＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮＫＡＴＬＶＣＬＩＳＤＦＹＰＧＡＶＴＶＡ ＷＫＡＤＳＳＰＶＫＡＧＶＥＴＴＴＰＳＫＱＳＮＮＫＹＡＡＳＳＹＬＳＬＴＰＥＱＷＫＳ ＨＲＳＹＳＣＱＶＴＨＥＧＳＴＶＥＫＴＶＡＰＴＥＣＳ	４４

【０１０９】

いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体分子は、以下の表４に示されるヌクレオチド配列のうちの１つによってコードされる分子である。

【０１１０】

【表４－１】

表４：抗ＣＴＬＡ－４抗体分子をコードする特定のヌクレオチド配列

クローン	コード化	配列	配列番号
４－Ｅ０３γ１重鎖	４－Ｅ０３ＶＨ	ＧＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＴＴＧＧＡＧＴＣＴＧＧＧＧＧＡＧＧＣＴＴＧＧ ＴＡＣＡＧＣＣＴＧＧＧＧＧＧＧＴＣＣＣＴＧＡＧＡＣＴＣＴＣＣＴＧＴＧＣ ＡＧＣＣＴＣＴＧＧＡＴＴＣＡＣＣＴＴＣＡＧＴＧＡＣＴＡＣＴＡＣＡＴＧ ＡＧＣＴＧＧＧＴＣＣＧＣＣＡＧＧＣＴＣＣＣＧＧＧＡＡＧＧＧＧＣＴＧＧ ＡＧＴＧＧＧＴＣＴＣＡＧＧＣＡＴＴＡＧＴＴＧＧＡＧＴＡＧＴＣＧＴＧＡ ＣＡＡＡＧＧＣＴＡＴＧＣＧＧＡＣＴＣＴＧＴＧＡＡＧＧＧＣＣＧＴＴＴＣ ＡＣＣＡＴＣＴＣＣＡＧＡＧＡＣＡＡＴＴＣＣＡＡＧＡＡＣＡＣＧＣＴＧＴ ＡＴＣＴＧＣＡＡＡＴＧＡＡＣＡＧＣＣＴＧＡＧＡＧＣＣＧＡＧＧＡＣＡＣ ＴＧＣＣＧＴＧＴＡＴＴＡＣＴＧＴＡＣＣＡＣＡＧＡＴＣＴＣＧＣＴＡＧＧ ＴＡＣＴＧＧＧＧＣＣＡＧＧＧＴＡＣＡＣＴＧＧＴＣＡＣＣＧＴＧＡＧＣＴ ＣＡＧＣＣＴＣＣＡＣＣＡＡＧＧＧＣＣＣＡＴＣＧＧＴＣＴＴＣＣＣＣＣＴ ＧＧＣＡＣＣＣＴＣＣＴＣＣＡＡＧＡＧＣＡＣＣＴＣＴＧＧＧＧＧＧＣＡＣＡ ＧＣＧＧＣＣＣＴＧＧＧＣＴＧＣＣＴＧＧＴＣＡＡＧＧＡＣＴＡＣＴＴＣＣ ＣＣＧＡＡＣＣＧＧＴＧＡＣＧＧＴＧＴＣＧＴＧＧＡＡＣＴＣＡＧＧＣＧＣ ＣＣＴＧＡＣＣＡＧＣＧＧＣＧＴＧＣＡＣＡＣＣＴＴＣＣＣＧＧＣＴＧＴＣ ＣＴＡＣＡＧＴＣＣＴＣＡＧＧＡＣＴＣＴＡＣＴＣＣＣＴＣＡＧＣＡＧＣＧ ＴＧＧＴＧＡＣＣＧＴＧＣＣＣＴＣＣＡＧＣＡＧＣＴＴＧＧＧＣＡＣＣＣＡ ＧＡＣＣＴＡＣＡＴＣＴＧＣＡＡＣＧＴＧＡＡＴＣＡＣＡＡＧＣＣＣＡＧＣ ＡＡＣＡＣＣＡＡＧＧＴＧＧＡＣＡＡＧＡＡＡＧＴＴＧＡＧＣＣＣＡＡＡＴ ＣＴＴＧＴＧＡＣＡＡＡＡＣＴＣＡＣＡＣＡＴＧＣＣＣＡＣＣＧＴＧＣＣＣ ＡＧＣＡＣＣＴＧＡＡＣＴＣＣＴＧＧＧＧＧＧＧＡＣＣＧＴＣＡＧＴＣＴＴＣ ＣＴＣＴＴＣＣＣＣＣＣＣＡＡＡＡＣＣＣＡＡＧＧＡＣＡＣＣＣＴＣＡＴＧＡ ＴＣＴＣＣＣＧＧＡＣＣＣＣＴＧＡＧＧＴＣＡＣＡＴＧＣＧＴＧＧＴＧＧＴ ＧＧＡＣＧＴＧＡＧＣＣＡＣＧＡＡＧＡＣＣＣＴＧＡＧＧＴＣＡＡＧＴＴＣ ＡＡＣＴＧＧＴＡＣＧＴＧＧＡＣＧＧＣＧＴＧＧＡＧＧＴＧＣＡＴＡＡＴＧ ＣＣＡＡＧＡＣＡＡＡＧＣＣＧＣＧＧＧＡＧＧＡＧＣＡＧＴＡＣＡＡＣＡＧ ＣＡＣＧＴＡＣＣＧＴＧＴＧＧＴＣＡＧＣＧＴＣＣＴＣＡＣＣＧＴＣＣＴＧ ＣＡＣＣＡＧＧＡＣＴＧＧＣＴＧＡＡＴＧＧＣＡＡＧＧＡＧＴＡＣＡＡＧＴ ＧＣＡＡＧＧＴＣＴＣＣＡＡＣＡＡＡＧＣＣＣＴＣＣＣＡＧＣＣＣＣＣＡＴ ＣＧＡＧＡＡＡＡＣＣＡＴＣＴＣＣＡＡＡＧＣＣＡＡＡＧＧＧＣＡＧＣＣＣ ＣＧＡＧＡＡＣＣＡＣＡＧＧＴＧＴＡＣＡＣＣＣＴＧＣＣＣＣＣＡＴＣＣＣ ＧＧＧＡＴＧＡＧＣＴＧＡＣＣＡＡＧＡＡＣＣＡＧＧＴＣＡＧＣＣＴＧＡＣ ＣＴＧＣＣＴＧＧＴＣＡＡＡＧＧＣＴＴＣＴＡＴＣＣＣＡＧＣＧＡＣＡＴＣ ＧＣＣＧＴＧＧＡＧＴＧＧＧＡＧＡＧＣＡＡＴＧＧＧＣＡＧＣＣＧＧＡＧＡ ＡＣＡＡＣＴＡＣＡＡＧＡＣＣＡＣＧＣＣＴＣＣＣＧＴＧＣＴＧＧＡＣＴＣ ＣＧＡＣＧＧＣＴＣＣＴＴＣＴＴＣＣＴＣＴＡＣＡＧＣＡＡＧＣＴＣＡＣＣ ＧＴＧＧＡＣＡＡＧＡＧＣＡＧＧＴＧＧＣＡＧＣＡＧＧＧＧＡＡＣＧＴＣＴ ＴＣＴＣＡＴＧＣＴＣＣＧＴＧＡＴＧＣＡＴＧＡＧＧＣＴＣＴＧＣＡＣＡＡ ＣＣＡＣＴＡＣＡＣＧＣＡＧＡＡＧＡＧＣＣＴＣＴＣＣＣＴＧＴＣＴＣＣＧ ＧＧＴＡＡＡＴＧＡ	４５
４－Ｅ０３λ軽鎖	４－Ｅ０３ＶＬ	ＣＡＧＴＣＴＧＴＧＣＴＧＡＣＴＣＡＧＣＣＡＣＣＣＴＣＡＧＣＧＴＣＴＧ ＧＧＡＣＣＣＣＣＧＧＧＣＡＧＡＧＧＧＴＣＡＣＣＡＴＣＴＣＣＴＧＣＡＣ ＴＧＧＧＡＧＣＡＧＣＴＣＣＡＡＣＡＴＣＧＧＧＧＣＡＧＧＴＴＡＴＧＡＴ ＧＴＡＣＡＣＴＧＧＴＡＴＣＡＧＣＡＧＣＴＣＣＣＡＧＧＡＡＣＧＧＣＣＣ ＣＣＡＡＡＣＴＣＣＴＣＡＴＣＴＡＴＧＧＴＡＡＴＧＡＴＡＡＣＣＧＧＣＣ ＣＴＣＡＧＧＧＧＴＣＣＣＴＧＡＣＣＧＡＴＴＣＴＣＴＧＧＣＴＣＣＡＡＧ ＴＣＴＧＧＣＡＣＣＴＣＡＧＣＣＴＣＣＣＴＧＧＣＣＡＴＣＡＧＴＧＧＧＣ ＴＣＣＧＧＴＣＣＧＡＧＧＡＴＧＡＧＧＣＴＧＡＴＴＡＴＴＡＣＴＧＴＧＣ ＡＧＴＡＴＧＧＧＡＴＧＡＣＡＧＣＣＴＧＡＡＴＧＧＴＧＴＧＧＴＡＴＴＣ ＧＧＣＧＧＡＧＧＡＡＣＣＡＡＧＣＴＧＡＣＧＧＴＣＣＴＡＧＧＴＣＡＧＣ ＣＣＡＡＧＧＣＴＧＣＣＣＣＣＴＣＧＧＴＣＡＣＴＣＴＧＴＴＣＣＣＧＣＣ ＣＴＣＣＴＣＴＧＡＧＧＡＧＣＴＴＣＡＡＧＣＣＡＡＣＡＡＧＧＣＣＡＣＡ ＣＴＧＧＴＧＴＧＴＣＴＣＡＴＡＡＧＴＧＡＣＴＴＣＴＡＣＣＣＧＧＧＡＧ ＣＣＧＴＧＡＣＡＧＴＧＧＣＣＴＧＧＡＡＧＧＣＡＧＡＴＡＧＣＡＧＣＣＣ ＣＧＴＣＡＡＧＧＣＧＧＧＡＧＴＧＧＡＧＡＣＣＡＣＣＡＣＡＣＣＣＴＣＣ ＡＡＡＣＡＡＡＧＣＡＡＣＡＡＣＡＡＧＴＡＣＧＣＧＧＣＣＡＧＣＡＧＣＴ ＡＴＣＴＧＡＧＣＣＴＧＡＣＧＣＣＴＧＡＧＣＡＧＴＧＧＡＡＧＴＣＣＣＡ ＣＡＧＡＡＧＣＴＡＣＡＧＣＴＧＣＣＡＧＧＴＣＡＣＧＣＡＴＧＡＡＧＧＧ ＡＧＣＡＣＣＧＴＧＧＡＧＡＡＧＡＣＡＧＴＧＧＣＣＣＣＴＡＣＡＧＡＡＴ ＧＴＴＣＡＴＧＡ	４６

【０１１１】

【表４－２】

（表４の続き）

クローン	コード化	配列	配列番号
５－Ｂ０７γ１重鎖	５－Ｂ０７ＶＨ	ＧＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＴＴＧＧＡＧＴＣＴＧＧＧＧＧＡＧＧＣＴＴＧＧ ＴＡＣＡＧＣＣＴＧＧＧＧＧＧＧＴＣＣＣＴＧＡＧＡＣＴＣＴＣＣＴＧＴＧＣ ＡＧＣＣＴＣＴＧＧＡＴＴＣＡＣＣＴＴＣＡＧＴＡＧＣＴＡＴＡＧＣＡＴＧ ＡＡＣＴＧＧＧＴＣＣＧＣＣＡＧＧＣＴＣＣＡＧＧＧＡＡＧＧＧＧＣＴＧＧ ＡＧＴＧＧＧＴＣＴＣＡＧＣＴＡＴＴＡＧＴＧＧＴＡＧＴＧＧＴＧＧＴＡＧ ＣＡＣＡＴＡＣＴＡＣＧＣＡＧＡＣＴＣＣＧＴＧＡＡＧＧＧＣＣＧＧＴＴＣ ＡＣＣＡＴＣＴＣＣＡＧＡＧＡＣＡＡＴＴＣＣＡＡＧＡＡＣＡＣＧＣＴＧＴ ＡＴＣＴＧＣＡＡＡＴＧＡＡＣＡＧＣＣＴＧＡＧＡＧＣＣＧＡＧＧＡＣＡＣ ＴＧＣＣＧＴＧＴＡＴＴＡＣＴＧＴＧＣＧＡＧＡＧＡＴＣＧＧＧＴＡＧＡＧ ＡＴＧＡＡＣＣＡＧＴＧＧＣＴＧＧＣＣＧＡＣＴＧＧＧＧＣＣＡＧＧＧＴＡ ＣＡＣＴＧＧＴＣＡＣＣＧＴＧＡＧＣＴＣＡＧＣＣＴＣＣＡＣＣＡＡＧＧＧ ＣＣＣＡＴＣＧＧＴＣＴＴＣＣＣＣＣＴＧＧＣＡＣＣＣＴＣＣＴＣＣＡＡＧ ＡＧＣＡＣＣＴＣＴＧＧＧＧＧＣＡＣＡＧＣＧＧＣＣＣＴＧＧＧＣＴＧＣＣ ＴＧＧＴＣＡＡＧＧＡＣＴＡＣＴＴＣＣＣＣＧＡＡＣＣＧＧＴＧＡＣＧＧＴ ＧＴＣＧＴＧＧＡＡＣＴＣＡＧＧＣＧＣＣＣＴＧＡＣＣＡＧＣＧＧＣＧＴＧ ＣＡＣＡＣＣＴＴＴＣＣＣＧＧＣＴＧＴＣＣＴＡＣＡＧＴＣＣＴＣＡＧＧＡＣ ＴＣＴＡＣＴＣＣＣＴＣＡＧＣＡＧＣＧＴＧＧＴＧＡＣＣＧＴＧＣＣＣＴＣ ＣＡＧＣＡＧＣＴＴＧＧＧＣＡＣＣＣＡＧＡＣＣＴＡＣＡＴＣＴＧＣＡＡＣ ＧＴＧＡＡＴＣＡＣＡＡＧＣＣＣＡＧＣＡＡＣＡＣＣＡＡＧＧＴＧＧＡＣＡ ＡＧＡＡＡＧＴＴＧＡＧＣＣＣＡＡＡＴＣＴＴＧＴＧＡＣＡＡＡＡＣＴＣＡ ＣＡＣＡＴＧＣＣＣＡＣＣＧＴＧＣＣＣＡＧＣＡＣＣＴＧＡＡＣＴＣＣＴＧ ＧＧＧＧＧＡＣＣＧＴＣＡＧＴＣＴＴＣＣＴＣＴＴＣＣＣＣＣＣＡＡＡＡＣ ＣＣＡＡＧＧＡＣＡＣＣＣＴＣＡＴＧＡＴＣＴＣＣＣＧＧＡＣＣＣＣＴＧＡ ＧＧＴＣＡＣＡＴＧＣＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＡＣＧＴＧＡＧＣＣＡＣＧＡＡ ＧＡＣＣＣＴＧＡＧＧＴＣＡＡＧＴＴＣＡＡＣＴＧＧＴＡＣＧＴＧＧＡＣＧ ＧＣＧＴＧＧＡＧＧＴＧＣＡＴＡＡＴＧＣＣＡＡＧＡＣＡＡＡＧＣＣＧＣＧ ＧＧＡＧＧＡＧＣＡＧＴＡＣＡＡＣＡＧＣＡＣＧＴＡＣＣＧＴＧＴＧＧＴＣ ＡＧＣＧＴＣＣＴＣＡＣＣＧＴＣＣＴＧＣＡＣＣＡＧＧＡＣＴＧＧＣＴＧＡ ＡＴＧＧＣＡＡＧＧＡＧＴＡＣＡＡＧＴＧＣＡＡＧＧＴＣＴＣＣＡＡＣＡＡ ＡＧＣＣＣＴＣＣＣＡＧＣＣＣＣＣＡＴＣＧＡＧＡＡＡＡＣＣＡＴＣＴＣＣ ＡＡＡＧＣＣＡＡＡＧＧＧＣＡＧＣＣＣＣＧＡＧＡＡＣＣＡＣＡＧＧＴＧＴ ＡＣＡＣＣＣＴＧＣＣＣＣＣＡＴＣＣＣＧＧＧＡＴＧＡＧＣＴＧＡＣＣＡＡ ＧＡＡＣＣＡＧＧＴＣＡＧＣＣＴＧＡＣＣＴＧＣＣＴＧＧＴＣＡＡＡＧＧＣ ＴＴＣＴＡＴＣＣＣＡＧＣＧＡＣＡＴＣＧＣＣＧＴＧＧＡＧＴＧＧＧＡＧＡ ＧＣＡＡＴＧＧＧＣＡＧＣＣＧＧＡＧＡＡＣＡＡＣＴＡＣＡＡＧＡＣＣＡＣ ＧＣＣＴＣＣＣＧＴＧＣＴＧＧＡＣＴＣＣＧＡＣＧＧＣＴＣＣＴＴＣＴＴＣ ＣＴＣＴＡＣＡＧＣＡＡＧＣＴＣＡＣＣＧＴＧＧＡＣＡＡＧＡＧＣＡＧＧＴ ＧＧＣＡＧＣＡＧＧＧＧＡＡＣＧＴＣＴＴＣＴＣＡＴＧＣＴＣＣＧＴＧＡＴ ＧＣＡＴＧＡＧＧＣＴＣＴＧＣＡＣＡＡＣＣＡＣＴＡＣＡＣＧＣＡＧＡＡＧ ＡＧＣＣＴＣＴＣＣＣＴＧＴＣＴＣＣＧＧＧＴＡＡＡＴＧＡ	４７
５－Ｂ０７λ軽鎖	５－Ｂ０７ＶＬ	ＣＡＧＴＣＴＧＴＧＣＴＧＡＣＴＣＡＧＣＣＡＣＣＣＴＣＡＧＣＧＴＣＴＧ ＧＧＡＣＣＣＣＣＧＧＧＣＡＧＡＧＧＧＴＣＡＣＣＡＴＣＴＣＣＴＧＣＡＣ ＴＧＧＧＡＧＣＡＧＣＴＣＣＡＡＣＡＴＣＧＧＧＧＣＡＧＧＴＴＡＴＧＡＴ ＧＴＡＣＡＣＴＧＧＴＡＴＣＡＧＣＡＧＣＴＣＣＣＡＧＧＡＡＣＧＧＣＣＣ ＣＣＡＡＡＣＴＣＣＴＣＡＴＣＴＡＴＡＧＧＡＡＴＡＡＴＣＡＧＣＧＧＣＣ ＣＴＣＡＧＧＧＧＴＣＣＣＴＧＡＣＣＧＡＴＴＣＴＣＴＧＧＣＴＣＣＡＡＧ ＴＣＴＧＧＣＡＣＣＴＣＡＧＣＣＴＣＣＣＴＧＧＣＣＡＴＣＡＧＴＧＧＧＣ ＴＣＣＧＧＴＣＣＧＡＧＧＡＴＧＡＧＧＣＴＧＡＴＴＡＴＴＡＣＴＧＴＧＣ ＡＧＣＡＴＧＧＧＡＴＧＡＣＡＧＣＣＴＧＡＡＴＧＧＴＴＧＧＧＴＧＴＴＣ ＧＧＣＧＧＡＧＧＡＡＣＣＡＡＧＣＴＧＡＣＧＧＴＣＣＴＡＧＧＴＣＡＧＣ ＣＣＡＡＧＧＣＴＧＣＣＣＣＣＴＣＧＧＴＣＡＣＴＣＴＧＴＴＣＣＣＧＣＣ ＣＴＣＣＴＣＴＧＡＧＧＡＧＣＴＴＣＡＡＧＣＣＡＡＣＡＡＧＧＣＣＡＣＡ ＣＴＧＧＴＧＴＧＴＣＴＣＡＴＡＡＧＴＧＡＣＴＴＣＴＡＣＣＣＧＧＧＡＧ ＣＣＧＴＧＡＣＡＧＴＧＧＣＣＴＧＧＡＡＧＧＣＡＧＡＴＡＧＣＡＧＣＣＣ ＣＧＴＣＡＡＧＧＣＧＧＧＡＧＴＧＧＡＧＡＣＣＡＣＣＡＣＡＣＣＣＴＣＣ ＡＡＡＣＡＡＡＧＣＡＡＣＡＡＣＡＡＧＴＡＣＧＣＧＧＣＣＡＧＣＡＧＣＴ ＡＴＣＴＧＡＧＣＣＴＧＡＣＧＣＣＴＧＡＧＣＡＧＴＧＧＡＡＧＴＣＣＣＡ ＣＡＧＡＡＧＣＴＡＣＡＧＣＴＧＣＣＡＧＧＴＣＡＣＧＣＡＴＧＡＡＧＧＧ ＡＧＣＡＣＣＧＴＧＧＡＧＡＡＧＡＣＡＧＴＧＧＣＣＣＣＴＡＣＡＧＡＡＴ ＧＴＴＣＡＴＧＡ	４８

【０１１２】

【表４－３】

（表４の続き）

クローン	コード化	配列	配列番号
２－Ｃ０６ γ１重鎖	２－Ｃ０６ ＶＨ	ＧＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＴＴＧＧＡＧＴＣＴＧＧＧＧＧＡＧＧＣＴＴＧＧ ＴＡＣＡＧＣＣＴＧＧＧＧＧＧＧＴＣＣＣＴＧＡＧＡＣＴＣＴＣＣＴＧＴＧＣ ＡＧＣＣＴＣＴＧＧＡＴＴＣＡＣＣＴＴＴＡＧＣＡＧＣＴＡＴＧＣＣＡＴＧ ＡＧＣＴＧＧＧＴＣＣＧＣＣＡＧＧＣＴＣＣＡＧＧＧＡＡＧＧＧＧＣＴＧＧ ＡＧＴＧＧＧＴＣＴＣＡＧＧＴＡＴＴＡＧＴＧＧＣＡＧＣＧＧＴＧＧＧＴＡ ＣＡＴＡＣＡＣＴＡＴＧＣＡＧＡＣＴＣＣＧＴＧＡＡＧＧＧＣＣＧＧＴＴＣ ＡＣＣＡＴＣＴＣＣＡＧＡＧＡＣＡＡＴＴＣＣＡＡＧＡＡＣＡＣＧＣＴＧＴ ＡＴＣＴＧＣＡＡＡＴＧＡＡＣＡＧＣＣＴＧＡＧＡＧＣＣＧＡＧＧＡＣＡＣ ＴＧＣＣＧＴＧＴＡＴＴＡＣＴＧＴＧＣＧＡＣＣＴＡＴＡＧＣＡＧＴＧＧＣ ＣＴＧＣＡＴＧＡＴＧＣＴＴＴＴＧＡＴＡＴＣＴＧＧＧＧＣＣＡＧＧＧＴＡ ＣＡＣＴＧＧＴＣＡＣＣＧＴＧＡＧＣＴＣＡＧＣＣＴＣＣＡＣＣＡＡＧＧＧ ＣＣＣＡＴＣＧＧＴＣＴＴＣＣＣＣＣＴＧＧＣＡＣＣＣＴＣＣＴＣＣＡＡＧ ＡＧＣＡＣＣＴＣＴＧＧＧＧＧＣＡＣＡＧＣＧＧＣＣＣＴＧＧＧＣＴＧＣＣ ＴＧＧＴＣＡＡＧＧＡＣＴＡＣＴＴＣＣＣＣＧＡＡＣＣＧＧＴＧＡＣＧＧＴ ＧＴＣＧＴＧＧＡＡＣＴＣＡＧＧＣＧＣＣＣＴＧＡＣＣＡＧＣＧＧＣＧＴＧ ＣＡＣＡＣＣＴＴＴＣＣＣＧＧＣＴＧＴＣＣＴＡＣＡＧＴＣＣＴＣＡＧＧＡＣ ＴＣＴＡＣＴＣＣＣＴＣＡＧＣＡＧＣＧＴＧＧＴＧＡＣＣＧＴＧＣＣＣＴＣ ＣＡＧＣＡＧＣＴＴＧＧＧＣＡＣＣＣＡＧＡＣＣＴＡＣＡＴＣＴＧＣＡＡＣ ＧＴＧＡＡＴＣＡＣＡＡＧＣＣＣＡＧＣＡＡＣＡＣＣＡＡＧＧＴＧＧＡＣＡ ＡＧＡＡＡＧＴＴＧＡＧＣＣＣＡＡＡＴＣＴＴＧＴＧＡＣＡＡＡＡＣＴＣＡ ＣＡＣＡＴＧＣＣＣＡＣＣＧＴＧＣＣＣＡＧＣＡＣＣＴＧＡＡＣＴＣＣＴＧ ＧＧＧＧＧＡＣＣＧＴＣＡＧＴＣＴＴＣＣＴＣＴＴＣＣＣＣＣＣＡＡＡＡＣ ＣＣＡＡＧＧＡＣＡＣＣＣＴＣＡＴＧＡＴＣＴＣＣＣＧＧＡＣＣＣＣＴＧＡ ＧＧＴＣＡＣＡＴＧＣＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＡＣＧＴＧＡＧＣＣＡＣＧＡＡ ＧＡＣＣＣＴＧＡＧＧＴＣＡＡＧＴＴＣＡＡＣＴＧＧＴＡＣＧＴＧＧＡＣＧ ＧＣＧＴＧＧＡＧＧＴＧＣＡＴＡＡＴＧＣＣＡＡＧＡＣＡＡＡＧＣＣＧＣＧ ＧＧＡＧＧＡＧＣＡＧＴＡＣＡＡＣＡＧＣＡＣＧＴＡＣＣＧＴＧＴＧＧＴＣ ＡＧＣＧＴＣＣＴＣＡＣＣＧＴＣＣＴＧＣＡＣＣＡＧＧＡＣＴＧＧＣＴＧＡ ＡＴＧＧＣＡＡＧＧＡＧＴＡＣＡＡＧＴＧＣＡＡＧＧＴＣＴＣＣＡＡＣＡＡ ＡＧＣＣＣＴＣＣＣＡＧＣＣＣＣＣＡＴＣＧＡＧＡＡＡＡＣＣＡＴＣＴＣＣ ＡＡＡＧＣＣＡＡＡＧＧＧＣＡＧＣＣＣＣＧＡＧＡＡＣＣＡＣＡＧＧＴＧＴ ＡＣＡＣＣＣＴＧＣＣＣＣＣＡＴＣＣＣＧＧＧＡＴＧＡＧＣＴＧＡＣＣＡＡ ＧＡＡＣＣＡＧＧＴＣＡＧＣＣＴＧＡＣＣＴＧＣＣＴＧＧＴＣＡＡＡＧＧＣ ＴＴＣＴＡＴＣＣＣＡＧＣＧＡＣＡＴＣＧＣＣＧＴＧＧＡＧＴＧＧＧＡＧＡ ＧＣＡＡＴＧＧＧＣＡＧＣＣＧＧＡＧＡＡＣＡＡＣＴＡＣＡＡＧＡＣＣＡＣ ＧＣＣＴＣＣＣＧＴＧＣＴＧＧＡＣＴＣＣＧＡＣＧＧＣＴＣＣＴＴＣＴＴＣ ＣＴＣＴＡＣＡＧＣＡＡＧＣＴＣＡＣＣＧＴＧＧＡＣＡＡＧＡＧＣＡＧＧＴ ＧＧＣＡＧＣＡＧＧＧＧＡＡＣＧＴＣＴＴＣＴＣＡＴＧＣＴＣＣＧＴＧＡＴ ＧＣＡＴＧＡＧＧＣＴＣＴＧＣＡＣＡＡＣＣＡＣＴＡＣＡＣＧＣＡＧＡＡＧ ＡＧＣＣＴＣＴＣＣＣＴＧＴＣＴＣＣＧＧＧＴＡＡＡＴＧＡ	４９
２－Ｃ０６ λ軽鎖	２－Ｃ０６ ＶＬ	ＣＡＧＴＣＴＧＴＧＣＴＧＡＣＴＣＡＧＣＣＡＣＣＣＴＣＡＧＣＧＴＣＴＧ ＧＧＡＣＣＣＣＣＧＧＧＣＡＧＡＧＧＧＴＣＡＣＣＡＴＣＴＣＣＴＧＣＡＣ ＴＧＧＧＡＧＣＡＧＣＴＣＣＡＡＣＡＴＣＧＧＧＧＣＡＧＧＴＴＡＴＧＡＴ ＧＴＡＣＡＣＴＧＧＴＡＴＣＡＧＣＡＧＣＴＣＣＣＡＧＧＡＡＣＧＧＣＣＣ ＣＣＡＡＡＣＴＣＣＴＣＡＴＣＴＡＴＧＡＣＡＡＴＡＡＴＡＡＧＣＧＡＣＣ ＣＴＣＡＧＧＧＧＴＣＣＣＴＧＡＣＣＧＡＴＴＣＴＣＴＧＧＣＴＣＣＡＡＧ ＴＣＴＧＧＣＡＣＣＴＣＡＧＣＣＴＣＣＣＴＧＧＣＣＡＴＣＡＧＴＧＧＧＣ ＴＣＣＧＧＴＣＣＧＡＧＧＡＴＧＡＧＧＣＴＧＡＴＴＡＴＴＡＣＴＧＴＧＣ ＡＧＣＡＴＧＧＧＡＴＧＡＣＡＧＣＣＴＧＡＡＴＧＧＴＴＧＧＧＴＧＴＴＣ ＧＧＣＧＧＡＧＧＡＡＣＣＡＡＧＣＴＧＡＣＧＧＴＣＣＴＡＧＧＴＣＡＧＣ ＣＣＡＡＧＧＣＴＧＣＣＣＣＣＴＣＧＧＴＣＡＣＴＣＴＧＴＴＣＣＣＧＣＣ ＣＴＣＣＴＣＴＧＡＧＧＡＧＣＴＴＣＡＡＧＣＣＡＡＣＡＡＧＧＣＣＡＣＡ ＣＴＧＧＴＧＴＧＴＣＴＣＡＴＡＡＧＴＧＡＣＴＴＣＴＡＣＣＣＧＧＧＡＧ ＣＣＧＴＧＡＣＡＧＴＧＧＣＣＴＧＧＡＡＧＧＣＡＧＡＴＡＧＣＡＧＣＣＣ ＣＧＴＣＡＡＧＧＣＧＧＧＡＧＴＧＧＡＧＡＣＣＡＣＣＡＣＡＣＣＣＴＣＣ ＡＡＡＣＡＡＡＧＣＡＡＣＡＡＣＡＡＧＴＡＣＧＣＧＧＣＣＡＧＣＡＧＣＴ ＡＴＣＴＧＡＧＣＣＴＧＡＣＧＣＣＴＧＡＧＣＡＧＴＧＧＡＡＧＴＣＣＣＡ ＣＡＧＡＡＧＣＴＡＣＡＧＣＴＧＣＣＡＧＧＴＣＡＣＧＣＡＴＧＡＡＧＧＧ ＡＧＣＡＣＣＧＴＧＧＡＧＡＡＧＡＣＡＧＴＧＧＣＣＣＣＴＡＣＡＧＡＡＴ ＧＴＴＣＡＴＧＡ	５０

【０１１３】

【表４－４】

（表４の続き）

クローン	コード化	配列	配列番号
２－Ｆ０９γ１重鎖	２－Ｆ０９ＶＨ	ＧＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＴＴＧＧＡＧＴＣＴＧＧＧＧＧＡＧＧＣＴＴＧＧ ＴＡＣＡＧＣＣＴＧＧＧＧＧＧＧＴＣＣＣＴＧＡＧＡＣＴＣＴＣＣＴＧＴＧＣ ＡＧＣＣＴＣＴＧＧＡＴＴＣＡＣＣＴＴＣＡＡＡＧＣＣＴＡＴＡＧＣＡＴＧ ＡＧＣＴＧＧＡＴＣＣＧＣＣＡＧＧＣＴＣＣＡＧＧＧＡＡＧＧＧＧＣＴＧＧ ＡＧＴＧＧＧＴＣＴＣＡＧＧＴＡＴＣＡＧＴＡＡＣＡＣＧＧＧＡＧＧＴＡＧ ＣＡＣＡＧＡＣＴＴＣＧＣＡＧＡＣＴＣＣＧＴＧＡＡＧＧＧＣＣＧＧＴＴＣ ＡＣＣＡＴＣＴＣＣＡＧＡＧＡＣＡＡＴＴＣＣＡＡＧＡＡＣＡＣＧＣＴＧＴ ＡＴＣＴＧＣＡＡＡＴＧＡＡＣＡＧＣＣＴＧＡＧＡＧＣＣＧＡＧＧＡＣＡＣ ＴＧＣＣＡＴＧＴＡＴＴＡＣＴＧＴＧＣＧＡＧＡＴＴＧＧＧＡＴＡＴＡＧＴ ＧＧＣＴＡＣＧＡＣＧＡＣＣＧＴＧＧＴＡＴＧＧＡＣＧＴＣＴＧＧＧＧＣＣ ＡＡＧＧＴＡＣＡＣＴＧＧＴＣＡＣＣＧＴＧＡＧＣＴＣＡＧＣＣＴＣＣＡＣ ＣＡＡＧＧＧＣＣＣＡＴＣＧＧＴＣＴＴＣＣＣＣＣＴＧＧＣＡＣＣＣＴＣＣ ＴＣＣＡＡＧＡＧＣＡＣＣＴＣＴＧＧＧＧＧＧＣＡＣＡＧＣＧＧＣＣＣＴＧＧ ＧＣＴＧＣＣＴＧＧＴＣＡＡＧＧＡＣＴＡＣＴＴＣＣＣＣＧＡＡＣＣＧＧＴ ＧＡＣＧＧＴＧＴＣＧＴＧＧＡＡＣＴＣＡＧＧＣＧＣＣＣＴＧＡＣＣＡＧＣ ＧＧＣＧＴＧＣＡＣＡＣＣＴＴＣＣＣＧＧＣＴＧＴＣＣＴＡＣＡＧＴＣＣＴ ＣＡＧＧＡＣＴＣＴＡＣＴＣＣＣＴＣＡＧＣＡＧＣＧＴＧＧＴＧＡＣＣＧＴ ＧＣＣＣＴＣＣＡＧＣＡＧＣＴＴＧＧＧＣＡＣＣＣＡＧＡＣＣＴＡＣＡＴＣ ＴＧＣＡＡＣＧＴＧＡＡＴＣＡＣＡＡＧＣＣＣＡＧＣＡＡＣＡＣＣＡＡＧＧ ＴＧＧＡＣＡＡＧＡＡＡＧＴＴＧＡＧＣＣＣＡＡＡＴＣＴＴＧＴＧＡＣＡＡ ＡＡＣＴＣＡＣＡＣＡＴＧＣＣＣＡＣＣＧＴＧＣＣＣＡＧＣＡＣＣＴＧＡＡ ＣＴＣＣＴＧＧＧＧＧＧＧＡＣＣＧＴＣＡＧＴＣＴＴＣＣＴＣＴＴＣＣＣＣＣ ＣＡＡＡＡＣＣＣＡＡＧＧＡＣＡＣＣＣＴＣＡＴＧＡＴＣＴＣＣＣＧＧＡＣ ＣＣＣＴＧＡＧＧＴＣＡＣＡＴＧＣＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＡＣＧＴＧＡＧＣ ＣＡＣＧＡＡＧＡＣＣＣＴＧＡＧＧＴＣＡＡＧＴＴＣＡＡＣＴＧＧＴＡＣＧ ＴＧＧＡＣＧＧＣＧＴＧＧＡＧＧＴＧＣＡＴＡＡＴＧＣＣＡＡＧＡＣＡＡＡ ＧＣＣＧＣＧＧＧＡＧＧＡＧＣＡＧＴＡＣＡＡＣＡＧＣＡＣＧＴＡＣＣＧＴ ＧＴＧＧＴＣＡＧＣＧＴＣＣＴＣＡＣＣＧＴＣＣＴＧＣＡＣＣＡＧＧＡＣＴ ＧＧＣＴＧＡＡＴＧＧＣＡＡＧＧＡＧＴＡＣＡＡＧＴＧＣＡＡＧＧＴＣＴＣ ＣＡＡＣＡＡＡＧＣＣＣＴＣＣＣＡＧＣＣＣＣＣＡＴＣＧＡＧＡＡＡＡＣＣ ＡＴＣＴＣＣＡＡＡＧＣＣＡＡＡＧＧＧＣＡＧＣＣＣＣＧＡＧＡＡＣＣＡＣ ＡＧＧＴＧＴＡＣＡＣＣＣＴＧＣＣＣＣＣＡＴＣＣＣＧＧＧＡＴＧＡＧＣＴ ＧＡＣＣＡＡＧＡＡＣＣＡＧＧＴＣＡＧＣＣＴＧＡＣＣＴＧＣＣＴＧＧＴＣ ＡＡＡＧＧＣＴＴＣＴＡＴＣＣＣＡＧＣＧＡＣＡＴＣＧＣＣＧＴＧＧＡＧＴ ＧＧＧＡＧＡＧＣＡＡＴＧＧＧＣＡＧＣＣＧＧＡＧＡＡＣＡＡＣＴＡＣＡＡ ＧＡＣＣＡＣＧＣＣＴＣＣＣＧＴＧＣＴＧＧＡＣＴＣＣＧＡＣＧＧＣＴＣＣ ＴＴＣＴＴＣＣＴＣＴＡＣＡＧＣＡＡＧＣＴＣＡＣＣＧＴＧＧＡＣＡＡＧＡ ＧＣＡＧＧＴＧＧＣＡＧＣＡＧＧＧＧＡＡＣＧＴＣＴＴＣＴＣＡＴＧＣＴＣ ＣＧＴＧＡＴＧＣＡＴＧＡＧＧＣＴＣＴＧＣＡＣＡＡＣＣＡＣＴＡＣＡＣＧ ＣＡＧＡＡＧＡＧＣＣＴＣＴＣＣＣＴＧＴＣＴＣＣＧＧＧＴＡＡＡＴＧＡ	５１
２－Ｆ０９λ軽鎖	２－Ｆ０９ＶＬ	ＣＡＧＴＣＴＧＴＧＣＴＧＡＣＴＣＡＧＣＣＡＣＣＣＴＣＡＧＣＧＴＣＴＧ ＧＧＡＣＣＣＣＣＧＧＧＣＡＧＡＧＧＧＴＣＡＣＣＡＴＣＴＣＴＴＧＴＴＣ ＴＧＧＡＡＧＣＡＧＣＴＣＣＡＡＣＡＴＣＧＧＡＡＧＴＡＡＴＴＡＴＧＴＧ ＴＡＣＴＧＧＴＡＴＣＡＧＣＡＧＣＴＣＣＣＡＧＧＡＡＣＧＧＣＣＣＣＣＡ ＡＡＣＴＣＣＴＣＡＴＣＴＡＴＧＧＴＡＡＣＡＧＣＡＡＴＣＧＧＣＣＣＴＣ ＡＧＧＧＧＴＣＣＣＴＧＡＣＣＧＡＴＴＣＴＣＴＧＧＣＴＣＣＡＡＧＴＣＴ ＧＧＣＡＣＣＴＣＡＧＣＣＴＣＣＣＴＧＧＣＣＡＴＣＡＧＴＧＧＧＣＴＣＣ ＧＧＴＣＣＧＡＧＧＡＴＧＡＧＧＣＴＧＡＴＴＡＴＴＡＣＴＧＣＣＡＧＴＣ ＣＴＡＴＧＡＣＡＧＣＡＧＣＣＴＧＡＧＴＧＧＴＣＣＴＧＴＧＧＴＡＴＴＣ ＧＧＣＧＧＡＧＧＡＡＣＣＡＡＧＣＴＧＡＣＧＧＴＣＣＴＡＧＧＴＣＡＧＣ ＣＣＡＡＧＧＣＴＧＣＣＣＣＣＴＣＧＧＴＣＡＣＴＣＴＧＴＴＣＣＣＧＣＣ ＣＴＣＣＴＣＴＧＡＧＧＡＧＣＴＴＣＡＡＧＣＣＡＡＣＡＡＧＧＣＣＡＣＡ ＣＴＧＧＴＧＴＧＴＣＴＣＡＴＡＡＧＴＧＡＣＴＴＣＴＡＣＣＣＧＧＧＡＧ ＣＣＧＴＧＡＣＡＧＴＧＧＣＣＴＧＧＡＡＧＧＣＡＧＡＴＡＧＣＡＧＣＣＣ ＣＧＴＣＡＡＧＧＣＧＧＧＡＧＴＧＧＡＧＡＣＣＡＣＣＡＣＡＣＣＣＴＣＣ ＡＡＡＣＡＡＡＧＣＡＡＣＡＡＣＡＡＧＴＡＣＧＣＧＧＣＣＡＧＣＡＧＣＴ ＡＴＣＴＧＡＧＣＣＴＧＡＣＧＣＣＴＧＡＧＣＡＧＴＧＧＡＡＧＴＣＣＣＡ ＣＡＧＡＡＧＣＴＡＣＡＧＣＴＧＣＣＡＧＧＴＣＡＣＧＣＡＴＧＡＡＧＧＧ ＡＧＣＡＣＣＧＴＧＧＡＧＡＡＧＡＣＡＧＴＧＧＣＣＣＣＴＡＣＡＧＡＡＴ ＧＴＴＣＡＴＧＡ	５２

【０１１４】

いくつかの実施形態では、抗体分子が、ヒトＣＴＬＡ－４（ｈＣＴＬＡ－４）及びカニクイザルＣＴＬＡ－４（ｃｍＣＴＬＡ－４又はｃｙｎｏ　ＣＴＬＡ－４）の両方に結合することが有利である。カニクイザル（crab-eating macaque）又はＭａｃａｃａ　ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓとも呼ばれるカニクイザル（cynomolgus monkey）の細胞に発現するＣＴＬＡ－４との交差反応性は、特に忍容性に焦点を当てた代理抗体を使用せずにサルにおける抗体分子の試験を可能にするため、有利である可能性がある。

【０１１５】

いくつかの実施形態では、抗体分子がヒトＣＴＬＡ－４（ｈＣＴＬＡ－４）及びマウス

ＣＴＬＡ－４（ｍＣＴＬＡ－４）の両方に結合することが有利である。これは、代理抗体を使用する必要なしに、効果及び薬力学に特に焦点を合わせて、マウスにおける抗体分子の試験を可能にするため、これは有利である可能性がある。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、抗体分子は、３つ全てのｈＣＴＬＡ－４、ｃｍＣＴＬＡ－４及びｍＣＴＬＡ－４に結合する。

【０１１７】

いくつかの実施形態では、マウスの関連するインビボモデルにおいて抗体分子の機能的活性を試験するために、代理抗体を使用する必要がある。ヒトにおける抗体分子の効果とマウスにおける代理抗体のインビボ結果との間の比較可能性を確実にするために、ヒト抗体分子と同じインビトロ特性を有する機能的に同等の代理抗体を選択することが不可欠である。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子は、ヒトＣＤ２８に結合しない。

【０１１９】

本明細書で考察されるように、第２の抗体は、ＰＤ－１に特異的に結合し得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１に特異的に結合する抗体分子は、以下の抗ＰＤ－１抗体の非限定的な例のうちの１つ以上から選択される：

●ペムブロリズマブ（現在使用が承認されている）、
●ニボルマブ（現在使用が承認されている）、
●セミプリマブ（現在使用が承認されている）、
●カムレリズマブ（現在使用が承認されている）、
●スパルタリズマブ（spartalizumab）（現在臨床開発中）、
●ドスタルリマブ（dostarlimab）（現在臨床開発中）、
●チスレリズマブ（tislelizumab）（現在臨床開発中）、
●ＪＴＸ－４０１４（現在臨床開発中）、
●シンチリマブ（sintilimab）（ＩＢＩ３０８）（現在臨床開発中）、
●トリパリマブ（toripalimab）（ＪＳ　００１）（現在臨床開発中）、
●ＡＭＰ－２２４（現在臨床開発中）、
●ＡＭＰ－５１４（ＭＥＤＩ０６８０）（現在臨床開発中）。

【０１２０】

好ましい実施形態では、ＰＤ－１に特異的に結合する抗体は、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、又はカムレリズマブである。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１に特異的に結合する抗体は、これらの抗体のうちの２つ以上の組み合わせである。好ましい実施形態では、ＰＤ－１に特異的に結合する抗体は、ペムブロリズマブである。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体分子は、ヒト抗体分子である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体分子は、ヒト化抗体分子である。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体分子は、ヒト由来の抗体分子であり、これは、それが、その後修飾されたヒト抗体分子に由来することを意味する。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体分子は、ヒトＩｇＧ１抗体である。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、１つ若しくはいくつかの活性化Ｆｃ受容体への結合の改善を示し、かつ／又は１つ若しくはいくつかの活性化Ｆｃ受容体への結合の改善のために操作されたヒトＩｇＧ１抗体の形態の抗体であり、したがって、いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、Ｆｃ操作されたヒトＩｇＧ１抗体である。

【０１２５】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、マウス又はヒト化マウスＩｇＧ２ａ抗体である。

【０１２６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１に特異的に結合する第２の抗体分子は、ヒト抗体分子、ヒト化抗体分子、及びヒト起源の抗体分子からなる群から選択される。

【０１２７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１に特異的に結合する第２の抗体分子は、フルサイズ抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、及びそれらの抗原結合フラグメント（例えば、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ’、及び（Ｆａｂ’）$_2$）からなる群から選択される。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１に特異的に結合する第２の抗体分子は、ヒトＩｇＧ抗体、ヒト化ＩｇＧ抗体、及びヒト起源のＩｇＧ抗体からなる群から選択される。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、ヒトＰＤ－１と交差反応性であるマウス抗体である。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１分子は、モノクローナル抗体又はヒト起源の抗体分子である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、ポリクローナル抗体である。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、第２の抗体分子は、ＰＤ－Ｌ１に特異的に結合し得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する抗体分子は、以下の抗ＰＤ－Ｌ１抗体の非限定的な例のうちの１つ以上から選択される：

●アテゾリズマブ（現在使用が承認されている）、

●デュルバルマブ（現在使用が承認されている）、

●アベルマブ（現在使用が承認されている）、

●ＣＳ１００１（現在臨床開発中）、

●ＫＮ０３５（エンバフォリマブ（envafolimab））（米国、中国、及び日本において現在臨床評価中の皮下製剤を伴うＰＤ－Ｌ１抗体）、

●ＣＫ－３０１（現在、Ｃｈｅｃｋｐｏｉｎｔ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓによって臨床開発中）

【０１３２】

好ましい実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する抗体は、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、又はアベルマブである。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する抗体は、これらの抗体のうちの２つ以上の組み合わせである。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体分子は、ヒト抗体分子である。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体分子は、ヒト化抗体分子である。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体分子は、ヒト由来の抗体分子であり、これは、それが、その後修飾されたヒト抗体分子に由来することを意味する。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体分子は、ヒトＩｇＧ１抗体である。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、１つ若しくはいくつかの活性化Ｆｃ受容体への結合の改善を示し、かつ／又は１つ若しくはいくつかの活性化Ｆｃ受容体への結合の改善のために操作されたヒトＩｇＧ１抗体の形態の抗体であり、したがって、いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、Ｆｃ操作されたヒトＩｇＧ１抗体である。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、マウス又はヒト化マウスＩｇＧ２ａ抗

体である。
【０１３９】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子は、ヒト抗体分子、ヒト化抗体分子、及びヒト起源の抗体分子からなる群から選択される。
【０１４０】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子は、フルサイズ抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、及びそれらの抗原結合フラグメント（例えば、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ’、及び（Ｆａｂ’）$_2$）からなる群から選択される。
【０１４１】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子は、ヒトＩｇＧ抗体、ヒト化ＩｇＧ抗体、及びヒト起源のＩｇＧ抗体からなる群から選択される。
【０１４２】
いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ヒトＰＤ－Ｌ１と交差反応性であるマウス抗体である。
【０１４３】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１分子は、モノクローナル抗体又はヒト起源の抗体分子である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ポリクローナル抗体である。
【０１４４】
本明細書に記載されるように、本発明は、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスを含む。
【０１４５】
本明細書で使用される場合、「腫瘍溶解性」という用語は、分裂細胞（例えば、がん細胞などの増殖細胞）において選択的に複製する、ウイルスの能力を指し、非分裂（例えば、正常又は健康）細胞において複製を全く示さないか、又は最小限の複製を示しながら、インビトロ又はインビボでのいずれかで、当該分裂細胞の成長を遅らせ、かつ／又はそれを溶解する目的を伴う。
【０１４６】
「複製（Replication）」（又は「複製する（replicate）」及び「複製すること（replicating）」などの任意の形態の複製）は、核酸のレベルで、又は好ましくは感染性ウイルス粒子のレベルで起こり得るウイルスの重複（duplication）を意味する。このような腫瘍溶解性ウイルスは、現時点で同定されているウイルスの任意のメンバーから入手することができる。それは、自然に腫瘍溶解性であるか、又はＤＮＡ複製、核酸代謝、宿主向性、表面付着、病原性、溶解、及び拡散に関与するものなどの分裂細胞における腫瘍選択性及び／若しくは優先的複製を増加させるように、１つ以上のウイルス遺伝子を改変することによって操作され得る天然ウイルスであり得る（例えば、Ｗｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０，Ｖｉｒｕｓｅｓ　２：７８－１０６を参照されたい）。また、１つ以上のウイルス遺伝子をイベント又は組織特異的調節エレメント（例えば、プロモーター）の制御下に置くことを想定することもできる。
【０１４７】
例示的な腫瘍溶解性ウイルスとしては、限定されないが、レオウイルス、セネカバレーウイルス（Seneca Valley virus、ＳＶＶ）、水疱性口内炎ウイルス（vesicular stomatitis virus、ＶＳＶ）、ニューカッスル病ウイルス（Newcastle disease virus、ＮＤＶ）、単純ヘルペスウイルス（herpes simplex virus、ＨＳＶ）、モルビリウイルス、アデノウイルスポックスウイルス、レトロウイルス、麻疹ウイルス、フォーミーウイルス、アルファウイルス、レンチウイルス、インフルエンザウイルス、シンビスウイルス、粘液腫ウイルス、ラブドウイルス、ピコルナウイルス、コクサッキーウイルス、パルボウイルスなどが挙げられる。腫瘍溶解性ウイルスは、医薬及びウイルス学の当業者に既知である。
【０１４８】

いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、ヘルペスウイルスから得られる。Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅは、全て共通の構造を共有するＤＮＡウイルスの大きな科であり、脂質二重層膜に包まれた正二十面体キャプシド内にキャプシド形成されている、１００～２００個の遺伝子をコードする比較的大きな二本鎖の線形ＤＮＡゲノムで構成されている。腫瘍溶解性ヘルペスウイルスは様々な種類のＨＳＶに由来する可能性があるが、ＨＳＶ１及びＨＳＶ２が特に好ましい。ヘルペスウイルスは、腫瘍内でウイルス複製を制限するか、又は非分裂細胞内での細胞傷害性を低減するように、遺伝子改変することができる。例えば、チミジンキナーゼ（Ｍａｒｔｕｚａ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５２：８５４－６）、リボヌクレオチドレダクターゼ（ribonucleotide reductase、ＲＲ）（Ｍｉｎｅｔａ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５４：３３６３－６６）、又はウラシル－Ｎ－グリコシラーゼ（Ｐｙｌｅｓ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６８：４９６３－７２）など、核酸代謝に関与する任意のウイルス遺伝子を不活性化することができる。別の態様は、ＩＣＰ３４．５遺伝子などの病原性因子をコードする遺伝子の機能に欠損があるウイルス変異体を含む（Ｃｈａｍｂｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９２：１４１１－５）。腫瘍溶解性ヘルペスウイルスの代表例としては、ＮＶ１０２０（例えば、Ｇｅｅｖａｒｇｈｅｓｅ ｅｔ ａｌ．，２０１０，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２１（９）：１１１９－２８）及びＴ－ＶＥＣ（Ｈａｒｒｉｎｇｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，２０１５，Ｅｘｐｅｒｔ Ｒｅｖ．Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒ．１５（１２）：１３８９－１４０３）が挙げられる。

【０１４９】

いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、アデノウイルスから得られる。腫瘍溶解性アデノウイルスを操作するための方法が当技術分野で利用可能である。有利な戦略には、ウイルスプロモーターを腫瘍選択的プロモーターに置き換えるか、又はＥ１アデノウイルス遺伝子産物を改変して、腫瘍細胞において変更されるｐ５３又は網膜芽細胞腫（retinoblastoma、Ｒｂ）タンパク質とのそれらの結合機能を不活性化することが含まれる。自然な状況では、アデノウイルスＥ１Ｂ５５ｋＤａ遺伝子は、別のアデノウイルス産物と協力してｐ５３を不活性化し（ｐ５３はがん細胞で頻繁に調節不全になる）、アポトーシスを防止する。腫瘍溶解性アデノウイルスの代表的な例には、ＯＮＹＸ－０１５（例えば、Ｋｈｕｒｉ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｎａｔ．Ｍｅｄ ６（８）：８７９－８５）及びＯｎｃｏｒｉｎｅとも呼ばれるＨ１０１（Ｘｉａ ｅｔ ａｌ．，２００４，Ａｉ Ｚｈｅｎｇ ２３（１２）：１６６６－７０）が含まれる。

【０１５０】

いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍溶解性ポックスウイルスである。本明細書で使用される場合、「ポックスウイルス」という用語は、Ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅ科に属するウイルスを指し、Ｃｈｏｒｄｏｐｏｘｖｉｒｉｄａｅ亜科、より好ましくはＯｒｔｈｏｐｏｘｖｉｒｕｓ属に属するポックスウイルスが特に好ましい。ワクシニアウイルス、牛痘ウイルス、カナリア痘ウイルス、エクトロメリアウイルス、粘液腫ウイルスは、本発明に関連して特に適切である。そのようなポックスウイルスのゲノム配列は、当技術分野及び専門のデータベースで入手可能である（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ、それぞれ受入番号ＮＣ＿００６９９８、ＮＣ＿００３６６３、又はＡＦ４８２７５８．２、ＮＣ＿００５３０９、ＮＣ＿００４１０５、ＮＣ＿００１１３２）。

【０１５１】

特定の好ましい実施形態では、そのような腫瘍溶解性ポックスウイルスは、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスである。ワクシニアウイルスは、ウイルスが宿主細胞機構から独立して複製することを可能にする多数のウイルス酵素及び因子をコードする２００ｋｂの二本鎖ＤＮＡゲノムを特徴とするポックスウイルス科のメンバーである。ワクシニアウイルス粒子の大部分は、細胞内にあり（細胞内成熟ビリオンの場合はＩＭＶ）、単一の脂質エンベロープを有し、溶解するまで感染細胞のサイトゾルに留まる。他の感染形態は、感染した細胞を溶解せずに発芽する二重エンベロープ粒子（細胞外エンベロープビリオンのＥＥ

Ｖ）である。ワクシニアウイルス株に由来する可能性があるが、エルストリー（Elstree）、ワイス（Wyeth）、コペンハーゲン（Copenhagen）、リスター（Lister）、ウエスタンリザーブ（Western Reserve）株が特に好ましい。本明細書で使用される遺伝子命名法は、特に明記しない限り、コペンハーゲンワクシニア株の命名法である。ただし、コペンハーゲンと他のワクシニア株との間の対応は、一般に文献で入手できる。

【０１５２】

好ましくは、そのような腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、１つ以上のウイルス遺伝子を変更することによって改変される。当該改変は、好ましくは、合成の欠如、又は未改変遺伝子によって通常の条件下で産生されるタンパク質の活性を保証することができない欠陥ウイルスタンパク質の合成をもたらす。例示的な改変は、ＤＮＡ代謝、宿主毒性、ＩＦＮ経路（例えば、Ｇｕｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１，Ｅｘｐｅｒｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎ　Ｔｈｅｒ．１１（５）：５９５－６０８）などに関与するウイルス遺伝子を変更することを目的とする文献に開示されている。ウイルス遺伝子座を変更するための改変は、ウイルス遺伝子又はその調節エレメント内の１つ以上のヌクレオチド（隣接しているかどうかにかかわらず）の欠失、変異及び／又は置換を包含する。改変は、従来の組換え技術を使用して当業者に知られているいくつかの方法によって行うことができる。

【０１５３】

より好ましくは、そのような腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、チミジンキナーゼをコードする遺伝子（遺伝子座Ｊ２Ｒ）を変更することによって改変される。チミジンキナーゼ（thymidine kinase、ＴＫ）酵素は、デオキシリボヌクレオチドの合成に関与している。ＴＫは、正常細胞でのウイルス複製に必要であり、それはこれらの細胞が一般にヌクレオチド濃度が低いためであり、一方、高いヌクレオチド濃度を含有する分裂細胞では不要である。

【０１５４】

代替的に、又は組み合わせて、そのような腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、リボヌクレオチドレダクターゼ（ribonucleotide reductase、ＲＲ）をコードする少なくとも１つの遺伝子又は両方の遺伝子を変更することによって改変される。自然な状況では、この酵素はリボヌクレオチドのデオキシリボヌクレオチドへの還元を触媒し、これは、ＤＮＡ生合成の重要なステップを表している。ウイルス酵素は、サブユニット構造が哺乳類の酵素と類似しており、Ｉ４Ｌ及びＦ４Ｌ遺伝子座によってそれぞれコードされるＲ１及びＲ２として設計された２つの異種サブユニットで構成されている。本発明の関連では、Ｉ４Ｌ遺伝子（Ｒ１大サブユニットをコードする）又はＦ４Ｌ遺伝子（Ｒ２小サブユニットをコードする）のいずれか又は両方が不活性化され得る（例えば、国際公開第２００９／０６５５４６号及びＦｏｌｏｐｐｅ　ｅｔ　ａｌ．，２００８，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．，１５：１３６１－７１に記載される）。Ｊ２Ｒ、Ｉ４Ｌ及びＦ４Ｌ遺伝子の配列、並びに様々なポックスウイルスのゲノムにおけるそれらの位置は、公開データベースで入手できる。

【０１５５】

したがって、いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、チミジンキナーゼ（ＴＫ）及び／又はリボヌクレオチドレダクターゼ（ＲＲ）活性に欠陥がある。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、チミジンキナーゼ（ＴＫ）及び／又はリボヌクレオチドレダクターゼ（ＲＲ）活性に欠陥があるワクシニアウイルスである。

【０１５６】

いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、本明細書において定義される第１の抗体分子をコードするヌクレオチド配列を含む。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、上記の表２に示される配列と少なくとも８０％の同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、上記の表２に示される配列と少なくとも８５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では

、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、上記の表２に示される配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、上記の表２に示される配列と少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、配列番号２０及び番号２１をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、配列番号２７及び番号２８をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、配列番号３３及び番号３４をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、配列番号４１及び番号４２をコードするヌクレオチド配列を含む。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、上記の表４に示される配列と少なくとも８０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、上記の表４に示される配列と少なくとも８５％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、上記の表４に示される配列と少なくとも９０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、上記の表４に示される配列と少なくとも９５％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号４５～５２からなる群から選択される配列を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、配列番号４５及び４６を含む。いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、配列番号４７及び４８を含む。いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、配列番号４９及び５０を含む。いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、配列番号５１及び５２を含む。

【０１６１】

一部の腫瘍溶解性ウイルスは、完全長ヒト抗体配列の統合に対応するのに十分な大きさのＤＮＡ挿入を受け入れる能力を有する。弱毒化ワクシニアウイルス及び単純ヘルペスウイルスは、治療用腫瘍溶解性ウイルスの例であり、ウイルスのゲノムは、完全長ＩｇＧ抗体配列の統合を可能にするのに十分な大きさである（Ｃｈａｎ ａｎｄ ＭｃＦａｄｄｅｎ ２０１４，Ｂｏｍｍａｒｅｄｄｙ，Ｓｈｅｔｔｉｇａｒ ｅｔ ａｌ．２０１８）。完全長ＩｇＧ抗体は、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスにうまく統合されており、ウイルス感受性宿主細胞、例えば、がん細胞の感染時に完全長ＩｇＧ抗体の発現及び細胞外放出（産生）をもたらす（Ｋｌｅｉｎｐｅｔｅｒ，ｅｔ ａｌ．２０１６）。アデノウイルスはまた、細胞感染時に機能的に産生及び分泌される完全長ＩｇＧ抗体をコードするように操作することもできる（Ｍａｒｉｎｏ，ｅｔ ａｌ．２０１７）。

【０１６２】

好ましい実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、ポックスウイルス（例えば、ワクシニアウイルス）であって、ＴＫ活性（Ｊ２Ｒ遺伝子座の変更から生じる）又はＴＫ活性及びＲＲ活性の両方（Ｊ２Ｒ遺伝子座並びにＲＲをコードするＩ４Ｌ及び／又はＦ４Ｌ遺伝子座のうちの少なくとも１つの両方の変更から生じる）に欠陥があり、かつ（ａ）配列番号２０及び番号２１をコードするヌクレオチド配列、又は（ｂ）配列番号２７及び番号２８をコードするヌクレオチド配列、又は（ｃ）配列番号３３及び番号３４をコードするヌクレオチド配列、又は（ｄ）配列番号４１及び番号４２をコードするヌクレオチド配列を含む、ポックスウイルスである。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、ＴＫ及びＲＲ活性は、関連する遺伝子座（すなわち、Ｊ２Ｒ、Ｉ４Ｌ、及び／又はＦ４Ｌ遺伝子座）内に第１の抗体分子をコードするヌクレオチド配列を導入することによって破壊され得る。いくつかの好ましい実施形態では、ウイルスは

、ウイルスＪ２Ｒ遺伝子座に挿入された第１の抗体分子の重鎖をコードするヌクレオチド配列を含み、かつ／又はウイルスＩ４Ｌ遺伝子座に挿入された第１の抗体分子の軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む。

【０１６４】

適切な場合、本明細書に記載の腫瘍溶解性ウイルスに挿入されたヌクレオチド配列が、発現、輸送及び生物学的活性を促進するための追加の調節エレメントを含むことが有利であり得る。例えば、シグナルペプチドは、プロデューサ細胞（例えば、感染細胞）の外側への分泌を促進するために含まれ得る。シグナルペプチドは通常、Ｍｅｔイニシエーターの直後にコードされたポリペプチドのＮ末端に挿入される。シグナルペプチドの選択は広く、当業者が利用できる。例えば、別の免疫グロブリン（例えば、重鎖ＩｇＧ）に由来するシグナルペプチドを本発明の状況下で使用して、本明細書に記載の抗ＣＴＬＡ４抗体をプロデューサ細胞の外に分泌させることができる。説明のために、ＩｇＧ由来ペプチドシグナルを備えた本明細書に記載の４－Ｅ０３抗体の軽鎖及び重鎖を含む配列番号５３及び配列番号５４を参照することができる。

【０１６５】

特に好ましい腫瘍溶解性ウイルスは、ワクシニアウイルス（例えば、コペンハーゲン株）であって、ＴＫ及びＲＲ活性（Ｊ２Ｒ遺伝子座及びＩ４Ｌ遺伝子座の両方の変化に起因する）の両方に欠陥があり、かつ配列番号２０及び配列番号２１又は配列番号５３及び配列番号５４をコードするヌクレオチド配列を含む、ワクシニアウイルスである。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、免疫調節性ポリペプチド（すなわち、直接的又は間接的のいずれかで免疫応答を刺激することに関与するポリペプチド）をコードするヌクレオチド配列などの治療的な関心の追加のヌクレオチド配列を更に含むことができる。適切な免疫調節性ポリペプチドの代表的な例には、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（granulocyte macrophage colony stimulating factor、ＧＭ－ＣＳＦ）、特にヒト、非ヒト霊長類又はマウスＧＭ－ＣＳＦが特異的に好ましいサイトカイン及びケモカインが含まれるが、これらに限定されない。

【０１６７】

したがって、いくつかの実施形態は、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルス（例えば、ワクシニアウイルス）は、ＧＭ－ＣＳＦ、好ましくはヒトＧＭ－ＣＳＦ（例えば、配列番号５５若しくは配列番号５６を有する）又はマウスＧＭ－ＣＳＦ（例えば、配列番号５７若しくは配列番号５８を有する）をコードするヌクレオチド配列を更に含む。

【０１６８】

追加のヌクレオチド配列は、当技術分野でアクセス可能な配列データ及び本明細書で提供される情報を使用して、標準的な分子生物学技術（例えば、ＰＣＲ増幅、ｃＤＮＡクローニング、化学合成）によって容易に得ることができる。特に好ましい腫瘍溶解性ウイルスは、ワクシニアウイルス（例えば、コペンハーゲン株）であって、ＴＫ及びＲＲ活性（Ｊ２Ｒ遺伝子座及びＩ４Ｌ遺伝子座の両方の変化に起因する）の両方に欠陥があり、かつ配列番号２０及び配列番号２１又は配列番号５３及び配列番号５４をコードするヌクレオチド配列、並びにＧＭ－ＣＳＦをコードするヌクレオチド配列を含み、ヒトＧＭ－ＣＳＦ（例えば、配列番号５５又は配列番号５６を有する）又はマウスＧＭ－ＣＳＦ（例えば、配列番号５７又は配列番号５８を有する）が特に好ましい、ワクシニアウイルスである。

【０１６９】

以下の表は、本明細書中で言及されるＧＭ－ＣＳＦの配列を提供する。

【０１７０】

【表５】

	配列	配列番号
シグナルペプチドを含まないヒトGM－CSF	APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAE MNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGSL TKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQTITFESF KENLKDFLLVIPFDCWEPVQE	５５
シグナルペプチドを含むヒトGM－CSF	MWLQSLLLLGTVACSISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLS RDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGSLTKLKGP LTMMASHYKQHCPPTPETSCATQTITFESFKENLKDFLLVIPFDCWE PVQE	５６
シグナルペプチドを含まないマウスGM－CSF	APTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNE EVEVVSNEFSFKKLTCVQTRLKIFEQGLRGNFTKL KGALNMTASYYQTYCPPTPETDCETQVTTYADFID SLKTFLTDIPFECKKPVQK	５７
シグナルペプチドを含むマウスGM－CSF	MWLQNLLFLGIVVYSLSAPTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMP VTLNEEVEVVSNEFSFKKLTCVQTRLKIFEQGLRGNFTKLKGALNMT ASYYQTYCPPTPETDCETQVTTYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPVQK	５８

【０１７１】

更に、そのような腫瘍溶解性ウイルスに挿入されるヌクレオチド配列は、１つ以上のコドンを改変することによって、特定の宿主細胞又は対象において高レベルの発現を提供するために最適化することができる。コドン使用頻度の最適化に加えて、集中領域に存在するまれな非最適コドンのクラスター化を防止するため、及び／又は発現レベルに悪影響を与えると予想される「負の」配列要素を抑制又は改変するために、様々な改変も想定され得る。そのような負の配列エレメントは、非常に高い（８０％超）若しくは非常に低い（３０％未満）ＧＣ含量、ＡＴリッチ若しくはＧＣリッチな配列ストレッチ、不安定な順方向若しくは逆方向反復配列、Ｒ　Ａ二次構造、及び／又は内部ＴＡＴＡボックス、カイ部位、リボソーム進入部位、及び／又はスプライシングドナー／アクセプター部位などの内部潜在性調節エレメントを有する領域を含むが、これらに限定されない。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、宿主細胞又は対象におけるそれらの適切な発現のための適切な調節エレメントの制御下に置かれる。本明細書で使用される場合、「調節エレメント」という用語は、その複製、重複、転写、スプライシング、翻訳、安定性、及び／又は発現細胞内外の輸送を含む、所与の宿主細胞又は対象におけるコード化ヌクレオチド配列の発現を可能にし、寄与し、又は調節する任意のエレメントを指す。調節エレメントの選択は、ヌクレオチド配列自体、それが挿入されるウイルス、宿主細胞又は対象、所望の発現レベルなどのような因子に依存し得ることが当業者によって理解されるであろう。プロモーターは、特別に重要である。本発明の状況において、それは、多くの種類の宿主細胞で制御するか、又はある特定の宿主細胞に特異的であるか、又は特定の事象若しくは外因性因子（例えば、温度、栄養添加物、ホルモンなどによる）に応答してか、若しくはウイルスサイクルの段階（例えば、後期又は初期）に従って調節されるヌクレオチド配列の構成的指示発現であり得る。ウイルス媒介性発現に適応したプロモーターは当技術分野で知られている。

【０１７３】

腫瘍溶解性ポックスウイルスによる発現の代表的な例としては、ワクシニアｐ７．５Ｋ、ｐＨ５．Ｒ、ｐ１１Ｋ７．５、ＴＫ、ｐ２８、ｐ１１、ｐＢ２Ｒ、ｐＡ３５Ｒ、Ｋ１Ｌ、及びｐＳＥ／Ｌプロモーター（Ｅｒｂｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００８，Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．１５（１）：１８－２８、Ｏｒｕｂｕ　ｅｔ　ａｌ．２０１２，ＰｌｏＳ　Ｏｎｅ　７：ｅ４０１６７）、初期／後期キメラプロモーター、及び合成プロモー

ター（Ｃｈａｋｒａｂａｒｔｉ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２３：１０９４－７、Ｈａｍｍｏｎｄ ｅｔ ａｌ，１９９７，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ６６：１３５－８、及びＫｕｍａｒ ａｎｄ Ｂｏｙｌｅ，１９９０，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １７９：１５１－８）が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、本明細書に記載の抗体の軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列は、それぞれ、同じ転写強度を有するプロモーターの制御下に置かれ、好ましくは、同じプロモーター（例えば、配列番号５９に記載されているようなｐ７．５Ｋ又は配列番号６０に記載されているようなｐＨ５．Ｒ）の制御下に置かれて、両方の鎖に対して同様のレベルの発現を取得し、したがって、ヘテロ四量体タンパク質としての抗体の最適な組み立てを取得する（すなわち、過度の会合していない鎖を回避する）。追加のヌクレオチド配列（例えば、ＧＭ－ＣＳＦをコードする）は、異なるプロモーター（例えば、配列番号６１に記載されているようなｐＳＥ／Ｌ）の下に置くことができる。

【０１７４】

以下の表は、上記のプロモーターの配列を提供する。

【０１７５】

【表６】

	配列	配列番号
プロモーターｐ７．５Ｋ	ＣＣＡＣＣＣＡＣＴＴＴＴＴＡＴＡＧＴＡＡＧＴＴＴＴＴＣＡＣＣＣ ＡＴＡＡＡＴＡＡＴＡＡＡＴＡＣＡＡＴＡＡＴＴＡＡＴＴＴＣＴＣＧ ＴＡＡＡＡＧＴＡＧＡＡＡＡＴＡＴＡＴＴＣＴＡＡＴＴＴＡＴＴＧＣ ＡＣＧＧＴＡＡＧＧＡＡＧＴＡＧＡＡＴＣＡＴＡＡＡＧＡＡＣＡＧＴ	５９
プロモーターｐＨ５．Ｒ	ＴＴＴＡＴＴＣＴＡＴＡＣＴＴＡＡＡＡＡＡＴＧＡＡＡＡＴＡＡＡＴ ＡＣＡＡＡＧＧＴＴＣＴＴＧＡＧＧＧＴＴＧＴＧＴＴＡＡＡＴＴＧＡ ＡＡＧＣＧＡＧＡＡＡＴＡＡＴＣＡＴＡＡＡＴＴＡＴＴＴＣＡＴＴＡ ＴＣＧＣＧＡＴＡＴＣＣＧＴＴＡＡＧＴＴＴＧ	６０
プロモーターｐＳＥ／Ｌ	ＡＡＡＡＡＴＴＧＡＡＡＴＴＴＴＡＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＧＧＡ ＡＴＡＴＡＡＡＴＡ	６１

【０１７６】

そのような腫瘍溶解性ウイルスのゲノムへのヌクレオチド配列（おそらく適切な調節エレメントを備えている）の挿入は、適切な制限酵素を使用するか、又は好ましくは相同組換えによる、従来の手段によって行われる。ヌクレオチド配列は、ウイルスゲノムの任意の位置に独立して挿入することができる。様々な挿入部位が、例えば、そのような腫瘍溶解性ウイルスのゲノムの非必須ウイルス遺伝子、遺伝子間領域、又は非コード部分を考慮することができる。Ｊ２Ｒ遺伝子座及び／又はＩ４Ｌ遺伝子座は、ポックスウイルスである腫瘍溶解性ウイルス（例えば、腫瘍溶解性ワクシニアウイルス）に特に適している。ヌクレオチド配列のウイルスゲノムへの挿入後、挿入部位のウイルス遺伝子座は、少なくとも部分的に欠失し得る。一実施形態では、この欠失又は部分的欠失は、完全に又は部分的に欠失した遺伝子座によってコードされるウイルス遺伝子産物の抑制された発現をもたらし、当該ウイルス機能の欠損ウイルスをもたらし得る。特に好ましい腫瘍溶解性ウイルスは、Ｊ２Ｒ遺伝子座に挿入された重鎖をコードするカセット及びＩ４Ｌ遺伝子座に挿入された軽鎖をコードするカセットを含む、ＴＫ及び／又はＲＲ欠損ワクシニアウイルスである。追加のＧＭ－ＣＳＦをコードするヌクレオチド配列をコードするカセットは、ウイルスゲノムの別の位置、又はＪ２Ｒ若しくはＩ４Ｌ遺伝子座に挿入することができ、Ｉ４Ｌ遺伝子座での挿入が好ましい。

【０１７７】

本発明はまた、本明細書に記載のそのような腫瘍溶解性ウイルス、特に腫瘍溶解性ポックスウイルスを適切な宿主細胞（プロデューサ細胞）において産生するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、そのような方法は、ウイルスゲノムと、挿入部位の上流及び下流にそれぞれ存在するウイルス配列の５’及び３’に隣接して挿入されるヌクレオチド配列（おそらく調節エレメントを有する）を含むトランスファープラスミドとの間の相同組換えの１つ以上のステップを含む。当該トランスファープラスミドは、日常的な技術によって（例えば、トランスフェクションによって）産生され、宿主細胞に導入され得る。ウイルスゲノムは、感染によって宿主細胞に導入され得る。各隣接ウイルス配列のサイズは、ヌクレオチド配列の各側で少なくとも１００ｂｐから最大で１５００ｂｐまで変化し得る（好ましくは２００～５５０ｂｐ、より好ましくは２５０～５００ｂｐ）。そのような腫瘍溶解性ウイルスの産生を可能にする相同組換えは、好ましくは、培養細胞株（例えば、ＨｅＬａ、Ｖｅｒｏ）又は発育卵から得られたニワトリ胚性線維芽細胞（chicken embryonic fibroblast、ＣＥＦ）細胞において行われる。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列及びおそらく追加のヌクレオチド配列（例えば、ＧＭ－ＣＳＦ）をコードする抗ＣＴＬＡ４を組み込んだ腫瘍溶解性ウイルスの識別は、選択及び／又は検出可能な遺伝子の使用によって容易にできる。

【０１７９】

好ましい実施形態では、トランスファープラスミドは、選択培地（例えば、ミコフェノール酸、キサンチン、及びヒポキサンチンの存在下）での成長を可能にするＧＰＴ遺伝子（グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする）、又はＧＦＰ、ｅ－ＧＦＰ、若しくはｍＣｈｅｒｒｙなどの検出可能な遺伝子産物をコードする検出可能な遺伝子が特に好ましい、選択マーカーを更に含む。更に、当該選択又は検出可能な遺伝子において二本鎖切断を提供することができるエンドヌクレアーゼの使用も考慮され得る。当該エンドヌクレアーゼは、タンパク質の形態にあり得るか、又は発現ベクターによって発現され得る。

【０１８０】

一旦生成されると、そのような腫瘍溶解性ウイルスは、感染性粒子の産生及び回収を可能にするために、適切な条件下でトランスフェクト又は感染した宿主細胞を培養することを含む従来の技術を使用して、適切な宿主細胞内で増幅することができる。

【０１８１】

本発明はまた、本明細書に記載の腫瘍溶解性ウイルスを産生するための方法に関する。好ましくは当該方法は、ａ）プロデューサ細胞株を調製するステップと、ｂ）調製したプロデューサ細胞株に腫瘍溶解性ウイルスをトランスフェクト又は感染させるステップと、ｃ）トランスフェクト又は感染したプロデューサ細胞株を適切な条件下で培養して、ウイルスの産生を可能にするステップと、ｄ）当該プロデューサ細胞株の培養物から産生されたウイルスを回収するステップと、任意選択で、ｅ）当該回収されたウイルスを精製するステップと、を含む。

【０１８２】

いくつかの実施形態では、プロデューサ細胞は、哺乳類（例えば、ヒト又は非ヒト）細胞、例えば、ＨｅＬａ細胞（例えば、ＡＴＣＣ－ＣＲＭ－ＣＣＬ－２（商標）又はＡＴＣＣ－ＣＣＬ－２．２（商標））、ＨＥＲ９６、ＰＥＲ－Ｃ６（Ｆａｌｌａｕｘ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．９：１９０９－１７）、ハムスター細胞株、例えば、ＢＨＫ－２１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－１０）など、及び鳥類細胞、例えば、国際公開第２００５／０４２７２８号、同第２００６／１０８８４６号、同第２００８／１２９０５８号、同第２０１０／１３０７５６号、同第２０１２／００１０７５に記載されているものなど、並びに受精卵から得られたニワトリ胚から調製された初代ニワトリ胚線維芽細胞（ＣＥＦ）からなる群から選択される。プロデューサ細胞は、必要に応じて、血清及び／又は好適な成長因子を補充しても、しなくてもよい（例えば、動物又はヒト由来の産物を含まないことが好ましい化学的に定義された培地）、適切な培地で培養する

ことが好ましい。適切な培地は、プロデューサ細胞に応じて当業者によって容易に選択され得る。そのような培地は市販されている。プロデューサ細胞は、感染前に、＋３０℃～＋３８℃（より好ましくは約＋３７℃）の温度で１～８日間培養することが好ましい。必要に応じて、細胞の総数を増やすために、１～８日の継代を数回行うことができる。

【０１８３】

ステップｂ）では、プロデューサ細胞の生産的な感染を可能にするために、適切な感染多重度（multiplicity of infection、ＭＯＩ）を使用して、プロデューサ細胞を適切な条件下で腫瘍溶解性ウイルスに感染させる。説明のために、適切なＭＯＩは10^{-3}～２０の範囲であり、特に好ましいＭＯＩは、０．０１～５、より好ましくは０．０３～１を含む。感染ステップは、プロデューサ細胞の培養に使用される培地と同じであっても異なっていてもよい培地で実施される。

【０１８４】

次に、ステップｃ）では、感染したプロデューサ細胞を、子孫ウイルス粒子が産生されるまで、当業者に周知の適切な条件下で培養する。感染したプロデューサ細胞の培養はまた、好ましくは、プロデューサ細胞の培養及び／又は感染ステップに使用される培地／培地（複数）と同じ又は異なっていてもよい培地で、＋３２℃～＋３７℃の温度で１～５日間行われる。

【０１８５】

ステップｄ）では、ステップｃ）で生成されたウイルス粒子を、培養上清及び／又はプロデューサ細胞から収集する。プロデューサ細胞からの回収には、プロデューサ細胞膜の破壊を可能にしてウイルスの遊離を可能にするステップが必要な場合がある。プロデューサ細胞膜の破壊は、凍結／解凍、低張溶解、超音波処理、マイクロフルイダイゼーション、高剪断（高速とも呼ばれる）均質化又は高圧均質化を含むがこれらに限定されない、当業者に周知の様々な技術によって誘発することができる。

【０１８６】

回収された腫瘍溶解性ウイルスは、用量で分配され、本明細書に記載されるように使用される前に、少なくとも部分的に精製され得る。清澄化、酵素処理（例えば、エンドヌクレアーゼ、プロテアーゼなど）、クロマトグラフィー、及び濾過ステップを含む、膨大な数の精製ステップ及び方法が当技術分野で利用可能である。適切な方法は、当該技術分野において記載されている（例えば、国際公開第２００７／１４７５２８号、国際公開第２００８／１３８５３３号、同第２００９／１００５２１号、同第２０１０／１３０７５３号、同第２０１３／０２２７６４号）。

【０１８７】

一実施形態では、本発明はまた、本明細書に記載の第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスに感染した細胞を提供する。

【０１８８】

ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスと、ＰＤ－１及び／又はＰＤ－１に特異的に結合する第２の抗体分子との組み合わせは、患者におけるがんの治療に使用するためのものであり、がんは、冷たい腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなる。

【０１８９】

対象は、哺乳類又は非哺乳類である場合を含む。好ましくは、ウマ、又はウシ、又はヒツジ、又はブタ、又はラクダ、又はイヌ、又はナコなどの哺乳類対象はヒトであるか、あるいは非哺乳類である。最も好ましくは、哺乳類対象はヒトである。

【０１９０】

患者は、彼らががんを有することを示唆する徴候又は症状を呈し得る。「呈する」とは、対象が、がん症状及び／若しくはがん診断マーカーを表すこと、並びに／又はがん症状及び／若しくはがん診断マーカーを測定、及び／又は評価、及び／又は定量化できることを含む。

【０１９１】

医薬当業者にとって、がん症状及びがん診断マーカーがどのようなものであるか、並びにがん症状の重症度に低減若しくは増加があるかどうか、又はがん診断マーカーに低減若しくは増加があるかどうかを測定及び／又は評価及び／又は定量化する方法、並びにそれらのがん症状及び／又はがん診断マーカーをどのように使用して、がんに関する予後診断を形成することができるかは、容易に明らかであろう。

【０１９２】

がん治療は、多くの場合、一連の治療として投与され、すなわち、治療剤は、ある期間にわたって投与される。一連の治療の時間的な長さは、他の理由の中でもとりわけ、投与される治療剤のタイプ、治療されるがんのタイプ、治療されるがんの重篤度、並びに対照の年齢及び健康状態を含む多数の要因に依存する。

【０１９３】

「治療中」とは、対象が現在一連の治療を受けていること、及び／又は治療剤を受けていること、及び／又は一連の治療剤を受けていることを含む。

【０１９４】

上述したように、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスと、ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子との組み合わせは、具体的には、患者におけるがんの治療に使用するためのものであり、がんは、冷たい腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなる。

【０１９５】

したがって、いくつかの実施形態では、冷たい腫瘍は、第１及び第２の抗体分子によって治療される。

【０１９６】

当業者は、冷たい腫瘍が「治療」されたかどうかを決定することは、任意の他のタイプの腫瘍に使用される同じ種類の決定を含むことを理解するであろう。例えば、当業者は、ＣＴスキャンを使用して測定することができる腫瘍縮小（注射された腫瘍及び注射されていない腫瘍の両方における）、及び／又は無増悪生存、及び／又は全生存などの徴候を探すであろう。他の場合では、これは、対象によって報告される症状の重症度の低減などの、より主観的な効果であり得る。治療抗体の投与に応答した対象における治療効果の測定は、当該分野で周知である。

【０１９７】

「冷たい腫瘍」とは、炎症性免疫細胞、最も顕著にはＴ細胞、特にＣＤ８＋$^{+}$Ｔ細胞による浸潤が不十分な腫瘍を指す。腫瘍免疫浸潤、特にＣＤ８＋Ｔ細胞浸潤は、異なる組織学的特徴及び解剖学的位置を有するがんにおけるより長い無病生存（disease-free survival、ＤＦＳ）及び／又は全生存（overall survival、ＯＳ）と相関することが広く実証されているので、冷たい腫瘍は、臨床的に高度に関連している。これは、黒色腫、ほとんどの扁平上皮がん（squamous cell carcinomas、ＳＣＣ）、肺大細胞がん、及びいくつかのタイプの腺がんを含む原発及び転移（Ｂｒｕｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０）の両方の状況において実証されており（Ｇａｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００６、Ｆｒｉｄｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２、Ｆｒｉｄｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７、Ｈｕ　ｅｔ　ａｌ．，２０１８）、ＩＣＢに対する反応性と相関し、それを予測する（Ｇａｌｏｎ　ａｎｄ　Ｂｒｕｎｉ，２０１９）と実証されている。

【０１９８】

例えば、最近、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞密度は、ヒト固形がん患者における黒色腫（Ｔｕｍｅｈ　ｅｔ　ａｌ．２０１４）、腎細胞がん（ＭｃＤｅｒｍｏｔｔ，Ｈｕｓｅｎｉ　ｅｔ　ａｌ．２０１８）及びＮＳＣＬＣ（Ｔｈｏｍｍｅｎ，Ｋｏｅｌｚｅｒ　ｅｔ　ａｌ．２０１８）において、抗ＣＴＬＡ－４及びＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１に対する抗体によるＩＣＢへの応答／進行と相関することが示された。同様に、前臨床マウス腫瘍モデルは、免疫浸潤に関して量的及び質的に異なり、Ｂ１６／Ｃ５７ＢＬ６モデルは、ＣＤ８$^{+}$Ｔを含む免疫細胞浸潤に関して特に乏しいことが十分に理解されている（Ｍｏｓｅｌｙ　ｅｔ　ａｌ．２０１７）。更に、ヒト「冷たい腫瘍」と同様に、Ｂ１６／Ｃ５７ＢＬ６モデルは、抗ＣＴＬ

Ａ－４及び／又は抗ＰＤ－１／Ｌ１による全身性ＩＣＢに対して特に耐性であり、全身性ＩＣＢに対する「冷たい腫瘍」耐性を克服するのを助ける療法を特定するのを助けるのに有用である。

【０１９９】

ＰＤ－Ｌ１の腫瘍細胞、免疫細胞、又は複合細胞レベルを定量化する臨床的に関連するアッセイが考案されており、抗ＰＤ－１／Ｌ１　ＩＣＢ試薬、例えば、ペムブロリズマブによって治療する患者を識別するのを助けるために臨床において使用される（ＫＥＹＴＲＵＤＡ（登録商標）Ｓｅｃｔｉｏｎ　２．１の処方情報を参照されたく、これは、療法に対する患者を選択する方法を記載する。ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ａｃｃｅｓｓｄａｔａ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ｄｒｕｇｓａｔｆｄａ＿ｄｏｃｓ／ｌａｂｅｌ／２０２１／１２５５１４ｓ０９６ｌｂｌ．ｐｄｆで利用可能）。

【０２００】

マルチカラー免疫蛍光に基づく最近のデータは、黒色腫において、浸潤縁ＣＤ８＋Ｔ細胞密度を最良の完全予測パラメータとして、及び腫瘍ＣＤ８＋Ｔ細胞密度を、ＰＤ－１遮断療法に対する応答／進行の２番目に良好な予測因子として特定した（Ｔｕｍｅｈ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４）。更に、主成分分析は、ＣＤ８浸潤、ＰＤ－１、及びＰＤ－Ｌ１が治療転帰と著しく相関することを実証した。これらのデータは、ＣＤ８＋Ｔ細胞密度が、冷たい腫瘍を有する患者を識別するための有用な方法であり得ることを裏付ける。最近、がん患者の腫瘍におけるＣＤ３＋　ＣＤ８＋Ｔ細胞浸潤をインサイチュで定量化する「イムノスコア（Immunoscore）」と名付けられた免疫ベースのアッセイが開発された（Ｂｒｕｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０、Ｇａｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００６、Ｌａｎｚｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０）。

【０２０１】

イムノスコアは、免疫組織化学及びデジタル病理ベーススコアリングシステムであり、腫瘍及びその浸潤縁におけるＣＤ３＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞の密度を評価する。簡潔に述べると、ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍ブロックの２つの隣接するスライドを、自動染色装置において抗ＣＤ３抗体及び抗ＣＤ８抗体で染色する。次いで、スライドをスキャンし、デジタル画像を使用して、デジタル病理ソフトウェアを用いて目的の細胞の密度を定量化する。密度は、最終的に、低イムノスコア（Ｉ０）から高イムノスコア（Ｉ４）の範囲のイムノスコアに変換される。

【０２０２】

イムノスコアを「熱い及び冷たい腫瘍」の概念に連携させるアプローチが、Ｇａｌｏｎ及びＢｒｕｎｉによって提案されている（Ｇａｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９、Ａｎｇｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０）。このアプローチを使用して、腫瘍を、Ｔ細胞浸潤に基づいて４つのカテゴリーに分類した：熱い免疫腫瘍、変化し免疫抑制された免疫腫瘍、変化し排除された免疫腫瘍、及び冷たい腫瘍。

【０２０３】

これらの４つのタイプの腫瘍の特徴は、Ｇａｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９のＢｏｘ１に詳述されており、これは、以下の特徴に従って腫瘍タイプを記載している。

１．　熱い免疫腫瘍（本明細書において熱い腫瘍とも称される）

－高度のＴ細胞及び細胞傷害性Ｔ細胞浸潤（高イムノスコア）

－チェックポイント活性化（プログラム細胞死タンパク質１（programmed cell death protein 1、ＰＤ－１）、細胞傷害性Ｔリンパ球関連抗原４（cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4、ＣＴＬＡ－４）、Ｔ細胞免疫グロブリンムチン受容体３（T cell immunoglobulin mucin receptor 3、ＴＩＭ－３）、及びリンパ球活性化遺伝子３（lymphocyte activation gene 3、ＬＡＧ－３））、又はそうでなければ損なわれたＴ細胞機能（例えば、細胞外カリウム駆動Ｔ細胞抑制）

２．　変化し免疫抑制された免疫腫瘍

－存在しないわけではないが、不十分なＴ細胞及び細胞傷害性Ｔ細胞浸潤（中間イムノスコア）

－可溶性の抑制性メディエータ（トランスフォーミング成長因子－β（transforming growth factor－β、ＴＧＦβ）、インターロイキン１０（interleukin 10、ＩＬ－１０）、及び血管内皮成長因子（vascular endothelial growth factor、ＶＥＧＦ））の存在
－免疫抑制細胞（骨髄由来サプレッサー細胞及び調節性Ｔ細胞）の存在
－Ｔ細胞チェックポイント（ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＭ－３、及びＬＡＧ－３）の存在
３．　変化し排除された免疫腫瘍
－腫瘍床内にＴ細胞浸潤がない腫瘍境界（浸潤縁）でのＴ細胞の蓄積（中間イムノスコア）
－発がん経路の活性化
－腫瘍微小環境のエピジェネティック制御及び再プログラミング
－異常な腫瘍血管系及び／又は間質
－低酸素
４．　冷たい免疫腫瘍（本明細書では冷たい腫瘍とも呼ばれる）
－腫瘍内及び腫瘍端にＴ細胞が存在しない（低イムノスコア）
－失敗したＴ細胞プライミング（低い腫瘍突然変異負荷、不十分な抗原提示、及びＴ細胞死滅に対する固有の非感受性）。

【０２０４】

したがって、いくつかの実施形態では、患者は、上記で定義されるような、変化し免疫抑制された免疫腫瘍、変化し排除された免疫腫瘍、又は冷たい免疫腫瘍の定義に適合する腫瘍を有する場合、冷たい腫瘍を有するとみなされる。

【０２０５】

上記のタイプの腫瘍の各々は、Ｔ細胞チェックポイント阻害に対して異なるレベルの応答を有し、冷たい免疫腫瘍は、最も低いレベルの応答（応答なし）を有し、その後に、それぞれ、変化し排除された免疫腫瘍、及び変化し免疫抑制された免疫腫瘍（最適以下のレベルの応答を有する）が続くことが理解されるであろう。

【０２０６】

「冷たい腫瘍」、すなわち、免疫細胞（例えば、ＣＤ３＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞）による浸潤が不十分な腫瘍の本明細書で使用される定義は、古典的な冷たい免疫腫瘍、変化し排除された腫瘍、及び変化し免疫抑制された腫瘍の両方を包含するが、これは、これらのカテゴリーの全てが、Ｔ細胞浸潤が不十分な（変化した免疫）、又は存在しない（排除され、冷たい免疫）ことによって定義されるためである。これは、イムノスコアＩ、ＩＩ、又はＩＩＩを有するが、ＩＶを有しない（後者はＴ細胞炎症性腫瘍である）がん患者と同等である。そのため、本発明は、イムノスコアＩ、ＩＩ、及びＩＩＩを有するが、ＩＶを有しない患者に適用可能である。

【０２０７】

したがって、いくつかの実施形態では、腫瘍がＩ、又はＩＩ、又はＩＩＩのイムノスコアを有する場合、患者は、冷たい腫瘍を有するとみなされる。

【０２０８】

当業者は、イムノスコア又はＴ細胞密度以外の他のアッセイ及び技術が、特に耐性のある「冷たいタイプ」のがんを識別するのに役立ち得ることを理解するであろう。

【０２０９】

いくつかの実施形態では、冷たい腫瘍は、アネルギー化（又はアネルギー性）リンパ球を有する。これは、リンパ球が抗原に応答できないことを意味する。アネルギー性リンパ球を決定する方法は、当技術分野で周知である。

【０２１０】

いくつかの他の実施形態では、冷たい腫瘍は、低レベルのＣＤ３陽性細胞を有する。例えば、冷たい腫瘍は、１０％未満のＣＤ３陽性細胞（腫瘍中の全細胞の百分率として）、すなわち、５％未満、４％未満、３％未満、２％未満、１％未満、０．５％未満、０．１

％未満のＣＤ３陽性細胞を有し得るか、又はＣＤ３陽性細胞を有しない。ＣＤ３陽性細胞の百分率を測定する方法は、当技術分野において公知である。

【０２１１】

上述のように、本明細書に記載される冷たい腫瘍は、典型的には免疫系によってあまり標的化されない腫瘍である。いくつかの代替又は追加の実施形態では、そのような冷たい腫瘍は、以下のタイプに分類することもできる。

－免疫砂漠腫瘍、すなわち、腫瘍浸潤Ｔ細胞の欠如に起因する、腫瘍における免疫応答の完全な欠如が存在する。

－免疫排除腫瘍、すなわち、応答性Ｔ細胞は、産生されるが、腫瘍に浸透して、それに対する応答を開始することができず、Ｔ細胞は、腫瘍末梢に存在し得る。

－免疫浸潤が不十分な腫瘍、すなわち、腫瘍微小環境への免疫細胞（Ｔ細胞）の浸透レベルが低下している。

【０２１２】

本明細書で使用される「冷たい腫瘍」には、免疫砂漠腫瘍、免疫排除腫瘍、及び免疫浸潤が不十分な腫瘍のうちの全ても含まれる。これらの定義は、上記の冷たい腫瘍（変化し免疫抑制された腫瘍、変化し排除された腫瘍、又は冷たい免疫腫瘍として）の定義の代わりに、又はそれに加えて使用され得る。いくつかの実施形態では、変化し免疫抑制された免疫腫瘍は、免疫浸潤が不十分な腫瘍に対応する。いくつかの実施形態では、変化し排除された免疫腫瘍は、免疫排除腫瘍に対応する。いくつかの実施形態では、冷たい免疫腫瘍は、免疫砂漠腫瘍に対応する。

【０２１３】

「冷たい腫瘍を含むか、又は冷たい腫瘍からなる」とは、冷たい腫瘍及び冷たくない腫瘍から構成され得るがんを指す。例えば、これは、元のがん（冷たい腫瘍であり得る）が転移し、冷たい腫瘍ではない二次腫瘍を形成した場合に起こり得る。本明細書における患者は、複数の腫瘍を有してもよく、そのうちの１つのみが、本発明が有益であるための冷たい腫瘍の要件を満たす必要がある。他の実施形態では、患者は、冷たい腫瘍とみなされる単一の腫瘍を有し得る。

【０２１４】

これらの「冷たい腫瘍」サブタイプに分類され得るがんとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：黒色腫、膵臓がん、前立腺がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、肺がん、膀胱がん、腎臓がん、胃がん、子宮頸がん、メルケル細胞がん、卵巣がん、頭頸部がん、中皮腫、又は乳がん。

【０２１５】

上述のがんのいずれもが周知されており、症状及びがん診断マーカーは、それらのがんを治療するのに使用される治療剤であるため、十分に説明されている。したがって、上記の種類のがんを治療するために用いられる症状、がん診断マーカー及び治療剤は、医薬当業者には既知であろう。

【０２１６】

大多数のがんの診断、予後診断、進行の臨床的定義は、ステージ分類として既知である、ある特定の分類による。それらのステージ分類システムは、いくつかの異なるがん診断マーカー及びがん症状を照合して、がんの診断、及び／又は予後診断、及び／又は進行の概要を提供するように機能する。ステージ分類システムを使用して、がんの診断、及び／又は予後診断、及び／又は進行を評価する方法、並びにそのためにどのがん診断マーカー及びがん症状を使用するべきかということは、腫瘍学当業者には既知であろう。

【０２１７】

「がんのステージ分類」とは、ステージ０、ステージＩ、ステージＩＩ、ステージＩＩＩ、及びステージＩＶを含む、Ｒａｉステージ分類、並びに／又はステージＡ、ステージＢ、及びステージＣを含むＢｉｎｅｔステージ分類、並びに／又はステージＩ、ステージＩＩ、ステージＩＩＩ、及びステージＩＶを含む、Ａｎｎ　Ａｒｂｏｕｒステージ分類が含まれる。

【０２１８】
がんは、細胞の形態に異常を引き起こし得ることが既知である。これらの異常は、多くの場合、ある特定のがんで再生可能な方法で生じ、これは、形態におけるこれらの変化の検査（そうでなければ、組織学的検査としても既知である）は、がんの診断又は予後診断に使用することができることを意味する。細胞の形態を検査するために試料を視覚化し、視覚化用に試料を準備するための技法は、例えば、当技術分野で公知であり、例えば、光学顕微鏡法又は共焦点顕微鏡法である。
【０２１９】
「組織学的検査」とは、小さな成熟リンパ球の存在、及び／又は細胞質の境界が狭い小さな成熟リンパ球の存在、識別可能な核小体が欠如する密な核を有する小さな成熟リンパ球の存在、及び／又は細胞質の境界が狭く、識別可能な核小体が欠如する密な核を有する小さな成熟リンパ球の存在、及び／又は異型細胞、及び／若しくは切断細胞、及び／若しくは前リンパ球の存在が挙げられる。
【０２２０】
がんは、細胞のＤＮＡの変異の結果であり、これによって細胞死を回避する細胞、又は制御不能な増殖に至り得ることは公知である。したがって、これらの変異を検査すること（細胞遺伝学的検査としても既知である）は、がんの診断及び／又は予後診断を評価するための有用なツールであり得る。この例は、慢性リンパ球性白血病の特徴である染色体上の位置１３ｑ１４．１の欠失である。細胞における変異を試験するための技術は、当該分野で周知であり、例えば、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（fluorescence in situ hybridization、ＦＩＳＨ）がある。
【０２２１】
「細胞遺伝学的検査」とは、細胞内のＤＮＡ、具体的には染色体の検査を含む。細胞遺伝学的検査を使用して、難治性がん及び／又は再発したがんの存在に関連し得る、ＤＮＡの変化を識別することができる。そのようなものとしては、染色体１３の長腕における欠失、及び／又は染色体位置１３ｑ１４．１の欠失、及び／又は染色体１２のトリソミー、及び／又は染色体１２の長腕における欠失、及び／又は染色体１１の長腕における欠失、及び／又は１１ｑの欠失、及び／又は染色体６の長腕における欠失、及び／又は６ｑの欠失、及び／又は染色体１７の短腕における欠失、及び／又は１７ｐの欠失、及び／又はｔ（１１：１４）転座、及び／又は（ｑ１３：ｑ３２転座、及び／又は抗原遺伝子受容体再配列、及び／又はＢＣＬ２再配列、及び／又はＢＣＬ６再配列、及び／又はｔ（１４：１８）転座、及び／又はｔ（１１：１４）転座、及び／又は（ｑ１３：ｑ３２転座、及び／又は（３：ｖ）転座、及び／又は（８：１４）転座、及び／又は（８：ｖ）転座、及び／又はｔ（１１：１４）及び（ｑ１３：ｑ３２）転座が挙げられる。
【０２２２】
がんを有する対象は、ある特定の身体的症状を呈することが知られており、これは多くの場合、がんが身体に負担をかけている結果である。これらの症状は、多くの場合、同じがんで再発するため、疾患の診断、及び／又は予後診断、及び／又は進行に特徴であり得る。医薬当業者であれば、どの身体症状がどのがんに関連しているか、並びにそれらの身体系の評価が疾患の診断、及び／又は予後診断、及び／又は進行とどのように相関し得るかを理解するであろう。「身体的症状」としては、肝腫大及び／又は脾腫が挙げられる。
【０２２３】
「冷たい」腫瘍を有する患者は、従来の免疫チェックポイント遮断療法（例えば、抗ＣＴＬＡ－４抗体又は抗ＰＤ－１抗体の投与）に応答する可能性が低い。したがって、いくつかの実施形態では、冷たい腫瘍を有する患者は、免疫チェックポイント遮断療法に対して耐性である。
【０２２４】
これらの観察を考慮すると、ＩＣＢに対する耐性は、重大な満たされていない医学的必要性を構成し、耐性を克服するのに役立ち得る薬物は、大きな治療的見込みを有する。したがって、本発明の利点は、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体を発現すること

ができる腫瘍溶解性ウイルスが、ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的な抗体と組み合わせて、当該耐性を克服することができる相乗効果をもたらし、以前は免疫チェックポイント阻害剤を使用して治療することができなかった冷たい腫瘍を標的化することである。

【０２２５】

本発明はまた、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスと、ＰＤ－１及び／又はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する第２の抗体分子との組み合わせを、薬学的に許容される担体及び／又は希釈剤及び／又はアジュバントと組み合わせて含む薬学的組成物を包含する。そのような薬学的に受容可能な担体、希釈剤、及びアジュバントは、当該分野で公知である。

【０２２６】

本明細書に記載の抗体分子、ヌクレオチド配列、プラスミド、ウイルス、細胞及び／又は薬学的組成物は、抗酸化剤、及び／若しくはバッファー、及び／若しくは静菌剤、及び／若しくは、意図するレシピエントの血液と製剤を等張にする溶質を含有し得る水性及び／若しくは非水性滅菌注射溶液；並びに／又は懸濁剤及び／若しくは増粘剤を含み得る水性及び／若しくは非水性滅菌懸濁液を含み、非経口投与に好適であり得る。本明細書に記載の抗体分子、ヌクレオチド配列、プラスミド、細胞、及び／又は薬学的組成物は、単回用量又は複数回用量の容器、例えば、密封されたアンプル及びバイアル内に存在してもよく、使用直前の滅菌液体担体、例えば、注射用水の添加のみを必要とするフリーズドライ（すなわち、凍結乾燥）状態で保存されてもよい。

【０２２７】

即時注射液及び懸濁液は、前述の種類の滅菌粉末、及び／又は顆粒、及び／又は錠剤から調製され得る。

【０２２８】

ヒト患者への非経口投与では、抗ＰＤ－１及び／若しくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体分子の１日投与量レベルは通常、患者の体重で１ｋｇ当たり１ｍｇ～２０ｍｇ／ｋｇであるか、又は場合によっては、最大１００ｍｇ／ｋｇが単回又は分割用量で投与されるであろう。いくつかの好ましい実施形態では、用量は、１０ｍｇ／ｋｇである。特別な状況下、例えば、長期投与と組み合わせて、より低い用量を使用してもよい。いずれにしても、医師は、任意の個々の患者に最も好適であろう実際の投与量を決定し、それは、特定の患者の年齢、体重、及び反応によって変動するであろう。上述の投与量は平均的な場合の例示である。当然ながら、より高いか又はより低い投与量範囲が妥当である個々の症例があり得、それらは、本発明の範囲内である。

【０２２９】

典型的には、抗体分子を含む本明細書に記載の薬学的組成物（又は医薬）は、約２ｍｇ／ｍｌ～１５０ｍｇ／ｍｌ又は約２ｍｇ／ｍｌ～２００ｍｇ／ｍｌの濃度で抗ＰＤ－１及び／又は抗ＰＤ－Ｌ１抗体分子を含有するであろう。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、１０ｍｇ／ｍｌ又は２５ｍｇ／ｍｌの濃度で抗ＰＤ－１及び／又は抗ＰＤ－Ｌ１抗体分子を含有するであろう。

【０２３０】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体がペムブロリズマブである場合、抗体は、約２５ｍｇ／ｍｌの用量で使用される。いくつかの他の実施形態では、ペムブロリズマブは、３週間毎に２００ｍｇ（ｉｖ）の用量で、又は６週間毎に４００ｍｇ（ｉｖ）の用量で使用される。

【０２３１】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体がニボルマブである場合、抗体は、約１０ｍｇ／ｍｌの用量で使用される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、２週間毎に２４０ｍｇ（ｉｖ）の用量で、又は４週間毎に４８０ｍｇ（ｉｖ）の用量で使用される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、抗ＣＴＬＡ－４抗体イピリムマブと組み合わせて使用されてもよく、この場合、ニボルマブは、３週間毎に１ｍｇ／ｋｇの用量で最大４回、又は２若しくは３週間毎に３ｍｇ／ｋｇの用量で使用される。

【０２３２】
いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体がアテゾリズマブである場合、抗体は、約６０ｍｇ／ｍｌの用量で使用される。いくつかの他の実施形態では、アテゾリズマブは、２週間毎に８４０ｍｇ（ｉｖ）の用量で、又は３週間毎に１２００ｍｇ（ｉｖ）の用量で、又は４週間毎に１６８０ｍｇ（ｉｖ）の用量で使用される。
【０２３３】
当業者は、本明細書に記載される抗ＰＤ－１又は抗ＰＤ－Ｌ１抗体のいずれも、それらの処方情報に記載される任意の用量又は投薬レジメンで使用され得ることを理解するであろう。
【０２３４】
典型的には、薬学的組成物（又は医薬）は、ウイルス及び定量的技術に依存して約10^3～10^{12}ｖｐ（ウイルス粒子）、ｉｕ（感染単位）又はｐｆｕ（プラーク形成単位）の濃度で、本明細書に記載の腫瘍溶解性ウイルスを含有する。試料中に存在するｐｆｕの量は、許容細胞（例えば、ＣＥＦ又はＶｅｒｏ細胞）の感染後のプラーク数を数えて、プラーク形成単位（plaque forming unit、ｐｆｕ）の力価を取得することによって決定することができ、ｖｐの量は、２６０ｎｍ吸光度を測定することによって決定することができ、ｉｕの量は、例えば、抗ウイルス抗体を使用する、定量的免疫蛍光法によって決定することができる。一般的なガイダンスとして、腫瘍溶解性ポックスウイルスを含む薬学的組成物に好適である個々の用量は、約10^3～約10^{10}ｐｆｕ、有利には約10^3ｐｆｕ～約10^9ｐｆｕ、好ましくは約10^4ｐｆｕ～約10^7ｐｆｕ、より好ましくは約10^6ｐｆｕ～約10^7ｐｆｕの範囲である。
【０２３５】
いくつかの実施形態では、対象がマウスである場合、腫瘍溶解性ウイルスの最適用量は、約10^6～10^7ｐｆｕである。いくつかの実施形態では、対象がヒトである場合、腫瘍溶解性ウイルスの最適用量は、約10^6～10^9ｐｆｕである。
【０２３６】
一般に、ヒトでは、本明細書に記載の抗体分子、ヌクレオチド配列、プラスミド、ウイルス、細胞、及び／又は薬学的組成物の経口又は非経口投与が好ましい経路であり、最も便利である。獣医学的使用のために、本明細書に記載の抗体分子、ヌクレオチド配列、プラスミド、ウイルス、細胞、及び／又は薬学的組成物は、通常の獣医学的診療に従って適宜許容される薬剤処方として投与され、獣医師は、ある特定の動物にとって最も適切であろう投与計画及び投与経路を決定するであろう。したがって、本発明は、（上述及び以下で更に説明する）様々な状態を治療するのに有効な、本発明の抗体分子、ヌクレオチド配列、プラスミド、ウイルス及び／又は細胞の量を含む薬学的製剤を提供する。
【０２３７】
好ましくは、本明細書に記載の抗体分子、ヌクレオチド配列、プラスミド、ウイルス、細胞、及び／又は薬学的組成物は、静脈内、腫瘍内、筋肉内、皮下から選択される経路による送達に適合される。投与は、単回注射又は複数回の反復注射の形態で行うことができる（例えば、同じ又は異なる用量で、同じ又は異なる経路で、同じ又は異なる投与部位で）。例示の目的のために、約10^4、5×10^4、10^5、5×10^5、10^6、5×10^6、10^7、5×10^7、10^8、5×10^8、10^9、5×10^9、又は10^{10}ｐｆｕの腫瘍溶解性ポックスウイルス（例えば、本明細書に記載のＴＫ及びＲＲ欠損ワクシニアウイルス）を含む個々の用量が、腫瘍内投与に特に適している。
【０２３８】
本発明はまた、本発明のポリペプチド結合部分の薬学的に許容される酸又は塩基付加塩を含む、本明細書に記載の抗体分子、ヌクレオチド配列、プラスミド、ウイルス、細胞及び／又は薬学的組成物を含む。本発明で有用な前述の塩基化合物の薬学的に許容可能な酸付加塩を調製するために使用される酸は、とりわけ、非毒性の酸付加塩、すなわち、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、酢酸塩、乳酸塩、クエン酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、重酒石酸塩、コハク酸塩

、マレイン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、糖酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩、及びパモエート、［すなわち、１，１’－メチレン－ビス－（２－ヒドロキシ－３ナフトエート）］塩などの薬学的に許容可能なアニオンを含有する塩を形成するものである。また、薬学的に許容される塩基付加塩を使用して、本発明による薬剤の薬学的に許容される塩の形態を産生してもよい。本質的に酸性である本薬剤の薬学的に許容される塩基塩を調製するための試薬として使用され得る化学塩基は、そのような化合物と非毒性塩基塩を形成するものである。そのような非毒性塩基塩には、これらに限定されないが、とりわけ、アルカリ金属カチオン（例えば、カリウム及びナトリウム）及びアルカリ土類金属カチオン（例えば、カルシウム及びマグネシウム）、アンモニウム又は水溶性アミン付加塩、例えば、Ｎ－メチルグルカミン－（メグルミン）、及び低級アルカノールアンモニウム、並びに他の薬学的に許容される有機アミンの塩基塩などのそのような薬学的に許容されるカチオンに由来するものが含まれる。本明細書に記載の抗体分子、ヌクレオチド配列、プラスミド、ウイルス及び／又は細胞は、保存のために凍結乾燥され、使用前に適切な担体中で元にもどすことができる。任意の好適な凍結乾燥法（例えば、噴霧乾燥、ケーキ乾燥）、及び／又は再構成技法を用いてもよい。凍結乾燥及び再構成によって、抗体活性損失の程度の変動に至る場合があり（例えば、従来の免疫グロブリンでは、ＩｇＭ抗体は、ＩｇＧ抗体よりも活性損失が大きい傾向がある）、使用レベルを上方調節して補う必要があり得ることを当業者は理解するであろう。一実施形態では、凍結乾燥（フリーズドライ）ポリペプチド結合部分は、再水和されるとき、（凍結乾燥前の）その活性の約２０％以下、又は約２５％以下、又は約３０％以下、又は約３５％以下、又は約４０％以下、又は約４５％以下、又は約５０％以下を損失する。

【０２３９】

いくつかの実施形態では、ウイルス組成物は、生理学的又はわずかに塩基性のｐＨ（例えば、約ｐＨ７～約ｐＨ９であり、７～８．５の間、より具体的には８に近いｐＨが特に好ましい）で好適に緩衝される。適切な浸透圧を確保するために、ウイルス組成物に一価の塩を含めることも有益である可能性がある。当該一価塩は、特に、ＮａＣｌ及びＫＣｌから選択することができ、好ましくは、当該一価塩は、好ましくは１０～５００ｍＭ（例えば、５０ｍＭ）の濃度のＮａＣｌである。適切なウイルス組成物は、サッカロース５０ｇ／Ｌ、ＮａＣｌ　５０ｍＭ、トリス－ＨＣｌ　１０ｍＭ及びグルタミン酸ナトリウム１０ｍＭ、ｐＨ８を含む。組成物はまた、低い保存温度で腫瘍溶解性ウイルスを保護するための凍結防止剤を含むように製剤化され得る。適切な凍結防止剤には、好ましくは０．５～２０％（ｗ／ｖとも称される、ｇによる重量／Ｌによる体積）の濃度でのスクロース（又はサッカロース）、トレハロース、マルトース、ラクトース、マンニトール、ソルビトール、及びグリセロール並びにデキストラン若しくはポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）などの高分子量ポリマーが含まれるが、これらに限定されない。

【０２４０】

第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスを含む組成物、及び本明細書に記載される第２の抗体分子を含む組成物は、単一の組成物として同時に（すなわち、同時に）投与され得ることが理解されるであろう。

【０２４１】

代替的に、これらの組成物は、同様の時間又は異なる時点（例えば、１日又は１週間間隔）のいずれかで、別々に投与され得る。例えば、腫瘍溶解性ウイルスは、第２の抗体分子の前に投与され得る。他の例では、第２の抗体分子が、腫瘍溶解性ウイルスの前に投与され得る。そのような連続投与は、腫瘍溶解性ウイルス及び第２の抗体分子の時間的分離によって達成され得る。代替的に、又は第１の選択肢と組み合わせて、連続投与は、抗ＣＴＬＡ－４抗体を発現することができる腫瘍溶解性ウイルスを腫瘍内投与などの方法で投与し、その結果、それは、第２の抗体分子の前にがんに到達し、その後、第２の抗体分子を全身投与等の方法で投与し、その結果、それは、腫瘍溶解性ウイルスの後にがんに到達することによる、腫瘍溶解性ウイルス及び第２の抗体分子の空間的分離によっても達成さ

れ得る。

【０２４２】

本発明の腫瘍溶解性ウイルス及び第２の抗体分子は、上記のように、各成分の確立された治療レジメンに従って投与することができる。これは、各成分の投与が同時であってもよい、又は互いに対して異なる時間であってもよいことを意味する。

【０２４３】

いくつかの実施形態では、第１の抗体分子を発現することができる腫瘍溶解性ウイルス及び本明細書に記載の第２の抗体分子の投与は、繰り返されてもよい。例えば、投与は、２回、３回、４回、５回、又は治療効果があるのに必要な回数繰り返されてもよい。

【０２４４】

ここで、本発明のある特定の態様を具体化する好ましい非限定的な実施例が、以下の図及び実施例を参照して説明される。

【図面の簡単な説明】

【０２４５】

【図１－１】新規のＴｒｅｇ枯渇αＣＴＬＡ－４　ｍＡｂの生化学的及び機能的特徴付け。（Ａ）抗体媒介性生存、及び（Ｂ）ＣＴ２６腫瘍担持ＢＡＬＢ／ｃマウスにおけるＴＩＬ調節。確立された腫瘍を有する動物は、示されたＴｒｅｇ関連特異性を有する抗体又は対照ｍＩｇＧ２ａ抗体の４回の注射（１０ｍｇ／ｋｇ）を受けた（ｎ＝５～１５）。

【図１－２】新規のＴｒｅｇ枯渇αＣＴＬＡ－４　ｍＡｂの生化学的及び機能的特徴付け。（Ｃ）ＣＴＬＡ－４特異的ｍＡｂは、インビトロ活性化ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞のＡＤＣＣを誘導する。溶解した標的Ｔ細胞をＦＡＣＳによって識別した。図は、スチューデントｔ検定による平均±ＳＤ（ｎ＝４～８）＊＊ｐ＜０．０１を示す。（Ｄ）抗ＣＴＬＡ－４（ＩｇＧ１）ｍＡｂは、ｈｕＰＢＭＣマウスにおけるインビボでのＴｒｅｇ枯渇を媒介する。クローン４－Ｅ０３は、イピリムマブと比較して、ヒトＴｒｅｇ細胞（上パネル）の枯渇の増強を示すが、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞（下パネル）の枯渇の増強を示さない。各ドットは、１匹のマウスを表す。グラフは、２つの実験からの平均データを示す。一元配置分散分析による、＊ｐ＜０．０５。

【図１－３】新規のＴｒｅｇ枯渇αＣＴＬＡ－４　ｍＡｂの生化学的及び機能的特徴付け。（Ｅ）ＥＬＩＳＡによるヒト、マウス、及びカニクイザルＣＴＬＡ－４及びＣＤ２８への４－Ｅ０３　ｈＩｇＧ１及びイピリムマブ結合。（Ｆ）インビトロ活性化ＣＴＬＡ－４発現ヒトＴ細胞への４－Ｅ０３　ＩｇＧ１結合は、ｒｈＣＴＬＡ－４－Ｆｃタンパク質（黒線）で予め遮断され、（Ｇ）４－Ｅ０３及び２－Ｃ０６は、ＥＬＩＳＡによってＣＴＬＡ－４へのＣＤ８０及びＣＤ８６結合を遮断する。（Ｈ）インビトロでの機能的リガンド遮断。グラフは、αＣＴＬＡ－４によるインビトロ活性化ヒトＰＢＭＣの処理後の上清中のＩＬ－２を示す。代表的なドナーを示す（ｎ＝６）。

【図１－４】新規のＴｒｅｇ枯渇αＣＴＬＡ－４　ｍＡｂの生化学的及び機能的特徴付け。（Ｉ）フローサイトメトリーによる、ｍＣＴＬＡ－４トランスフェクト細胞へのマウスαＣＴＬＡ－４の用量依存的結合。（Ｊ）抗ＣＴＬＡ－４ｍＡｂは、ＥＬＩＳＡにより組換えＣＴＬＡ－４への（ＣＤ８０及びＣＤ８６）結合するＢ７リガンドを遮断する。（Ｋ）Ｔｒｅｇ枯渇活性及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞／Ｔｒｅｇ比（ｎ＝４～８）、及び（Ｌ）ＣＴ２６腫瘍を担持するＢＡＬＢ／ｃマウスにおけるαマウスＣＴＬＡ－４抗体によって誘導された生存。

【図２－１】Ｔｒｅｇ枯渇αＣＴＬＡ－４及びＧＭ－ＣＳＦを発現する腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの産生及び特徴付け。（Ａ）αＣＴＬＡ４抗体及びＧＭ－ＣＳＦの重鎖（Ｊ２Ｒ遺伝子座での）及び軽鎖（Ｉ４Ｌ遺伝子座での）をコードするために使用されるワクシニアウイルスベクターの概略図。

【図２－２】Ｔｒｅｇ枯渇αＣＴＬＡ－４及びＧＭ－ＣＳＦを発現する腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの産生及び特徴付け。（Ｂ）ＬｏＶｏ細胞における複製動態、及び（Ｃ）ＶＶ$_{GM}$－αｈＣＴＬＡ４（ＢＴ－００１）のＭＩＡ　ＰａＣａ－２細胞に対する腫瘍溶解活性。ＴＧ６００２（組換えＪ２Ｒ及びＩ４Ｌ欠失ワクシニアウイルス）を対照として添

加した。（Ｄ）ＭＩＡ　ＰａＣａ－２　ＢＴ－００１感染細胞培養物から精製された４－Ｅ０３のクマシーブルー染色後の電気泳動プロファイル。レーン２及び５：組換え４－Ｅ０３、レーン１及び４：ＭＩＡ　ＰａＣａ－２　ＢＴ－００１感染細胞の培養培地から精製された４－Ｅ０３。レーン１及び２：非還元条件、レーン３及び４：還元条件。

【図２－３】Ｔｒｅｇ枯渇αＣＴＬＡ－４及びＧＭ－ＣＳＦを発現する腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの産生及び特徴付け。（Ｅ）VV_{GM}－αｈＣＴＬＡ４（ＢＴ－００１）による感染４８時間後の示されたヒト腫瘍細胞の４－Ｅ０３及びヒトＧＭ－ＣＳＦの発現レベル。

【図２－４】Ｔｒｅｇ枯渇αＣＴＬＡ－４及びＧＭ－ＣＳＦを発現する腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの産生及び特徴付け。（Ｆ）ＴＦ－１増殖アッセイによって決定された、Ｅ）において産生されたＧＭ－ＣＳＦの生物学的活性。組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（欧州薬局方参照標準から入手したモルグラモスチム（Ｍｏｌｇｒａｍｏｓｔｉｍ））を陽性対照として含めた。（Ｇ及びＨ）ＢＴ－００１感染ＭＩＡ　ＰａＣａ－２細胞によって産生された４－Ｅ０３の機能評価。

【図２－５】Ｔｒｅｇ枯渇αＣＴＬＡ－４及びＧＭ－ＣＳＦを発現する腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの産生及び特徴付け。（Ｇ）インビトロ：図１Ｅのように固定化された組換えｈＣＴＬＡタンパク質に結合することによる、及び（Ｈ）インビボ：（Ｔｒｅｇ枯渇）図１Ｄと同様。

【図３－１】腫瘍内VV_{GM}－αＣＴＬＡ４は、腫瘍限定ＣＴＬＡ－４受容体飽和及びＴｒｅｇ枯渇に関連するインビボ抗腫瘍活性を有する。（Ａ）ＣＴ２６腫瘍担持マウスをVV_{GM}－αＣＴＬＡ４（7.5×10^{6}、7.5×10^{5}、又は7.5×10^{4}ｐｆｕ）、ＶＶ－αＣＴＬＡ４（7.5×10^{6}ｐｆｕ）、又は空の対照ＶＶ（7.5×10^{6}ｐｆｕ）で処理した（ｎ＝２０匹のマウス／群）。

【図３－２】腫瘍内VV_{GM}－αＣＴＬＡ４は、腫瘍限定ＣＴＬＡ－４受容体飽和及びＴｒｅｇ枯渇に関連するインビボ抗腫瘍活性を有する。（Ｂ）10^{7}ｐｆｕでのVV_{GM}－αＣＴＬＡ４の３回のｉ．ｔ．注射（０日目、２日目、及び４日目）の後、又はαＣＴＬＡ－４　ｍＡｂ　５－Ｂ０７の単回ｉ．ｐ．３ｍｇ／ｋｇの注射の後のＣＴ２６腫瘍担持マウスの腫瘍及び血清中のαＣＴＬＡ－４の薬物動態（ｎ＝３匹のマウス／時点）。灰色の領域は、ＣＴＬＡ－４受容体飽和のEC_{10}～EC_{90}の範囲を示す（図１Ｊ参照）。

【図３－３】腫瘍内VV_{GM}－αＣＴＬＡ４は、腫瘍限定ＣＴＬＡ－４受容体飽和及びＴｒｅｇ枯渇に関連するインビボ抗腫瘍活性を有する。（Ｃ）VV_{GM}－αＣＴＬＡ４注射後１０日目の腫瘍及び脾臓における$FoxP3^{+}$細胞の数をＦＡＣＳによって分析した。グラフは、３つの独立した実験からプールされたデータを示す（ｎ＝１３匹のマウス／群）。

【図４－１ａ】腫瘍内VV_{GM}－αＣＴＬＡ４は、炎症性及び冷たい腫瘍微小環境にわたって、同系腫瘍モデルにおいて広範な抗腫瘍活性を有する。（Ａ）ＣＴ２６、Ａ２０、若しくはＥＭＴ６腫瘍を担持するＢＡＬＢ／ｃマウス、又はＭＣ３８若しくはＢ１６腫瘍を担持するＣ５７ＢＬ／６マウスは、VV_{GM}－αＣＴＬＡ４、又はαｍＣＴＬＡ－４　ｍＡｂを欠く対照ウイルス（ＶＶ空又はVV_{GM}）の３回のｉ．ｔ．注射を受けた。処理は、腫瘍が約５０～１００mm^{3}の体積を有したとき、又は腫瘍細胞注射の４日後（Ｂ１６のみ）に開始した。グラフは、個々のマウスの腫瘍成長及び対応する生存を示す（ｎ＝１０）。

【図４－１ｂ】腫瘍内VV_{GM}－αＣＴＬＡ４は、炎症性及び冷たい腫瘍微小環境にわたって、同系腫瘍モデルにおいて広範な抗腫瘍活性を有する。（Ａ）ＣＴ２６、Ａ２０、若しくはＥＭＴ６腫瘍を担持するＢＡＬＢ／ｃマウス、又はＭＣ３８若しくはＢ１６腫瘍を担持するＣ５７ＢＬ／６マウスは、VV_{GM}－αＣＴＬＡ４、又はαｍＣＴＬＡ－４　ｍＡｂを欠く対照ウイルス（ＶＶ空又はVV_{GM}）の３回のｉ．ｔ．注射を受けた。処理は、腫瘍が約５０～１００mm^{3}の体積を有したとき、又は腫瘍細胞注射の４日後（Ｂ１６のみ）に開始した。グラフは、個々のマウスの腫瘍成長及び対応する生存を示す（ｎ＝１０）。

【図４－２ａ】腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、炎症性及び冷たい腫瘍微小環境にわたって、同系腫瘍モデルにおいて広範な抗腫瘍活性を有する。（Ｂ）ＣＴ２６腫瘍細胞をＢＡＬＢ／ｃマウスの右及び左側腹部に移植した。ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４による右側腹部腫瘍へのｉ．ｔ．注射（垂直点線、Ａと同じ）は、腫瘍が約１００ｍｍ^{3}の体積に達したときに開始した（ｎ＝９～１０）。

【図４－２ｂ】腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、炎症性及び冷たい腫瘍微小環境にわたって、同系腫瘍モデルにおいて広範な抗腫瘍活性を有する。（Ｂ）ＣＴ２６腫瘍細胞をＢＡＬＢ／ｃマウスの右及び左側腹部に移植した。ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４による右側腹部腫瘍へのｉ．ｔ．注射（垂直点線、Ａと同じ）は、腫瘍が約１００ｍｍ^{3}の体積に達したときに開始した（ｎ＝９～１０）。

【図５－１】腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、頑強な全身性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞依存性抗腫瘍免疫を誘発する。（Ａ）ＢＡＬＢ／ｃマウスを、ＣＴ２６腫瘍細胞によるｓ．ｃ．チャレンジの前及び後に、ＣＤ８（短破線）又はＣＤ４（長破線）枯渇抗体で処理した。腫瘍が約２０～５０ｍｍ^{3}の体積に達したとき、図４Ａのように処理を開始した。１群当たり１０匹のマウスを用いた１つの代表的な実験（２つのうち）を示す。

【図５－２】腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、頑強な全身性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞依存性抗腫瘍免疫を誘発する。（Ｂ～Ｄ）ＣＴ２６腫瘍担持マウスを、ＶＶでｉ．ｔ．処理したか、又はαＣＴＬＡ－４　ｍＡｂでｉ．ｐ．処理した（３ｍｇ／ｋｇでのクローン５－Ｂ０７）。腫瘍細胞懸濁液及び脾細胞を、ＶＶ又はＣＴ２６（ＡＨ－１）特異的ペプチドによりエクスビボで再刺激し、ＩＦＮ－γ$^+$及びＴＮＦ－α$^+$ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、又はＭＨＣクラスＩ標識多量体陽性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞の百分率をＦＡＣＳによって定量化した。（Ｂ）は、ＡＨ－１ペプチド陽性（上パネル）又はサイトカイン陽性（下パネル）脾細胞のフローサイトメトリードットプロットを示す。

【図５－３】腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、頑強な全身性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞依存性抗腫瘍免疫を誘発する。（Ｂ～Ｄ）ＣＴ２６腫瘍担持マウスを、ＶＶでｉ．ｔ．処理したか、又はαＣＴＬＡ－４　ｍＡｂでｉ．ｐ．処理した（３ｍｇ／ｋｇでのクローン５－Ｂ０７）。腫瘍細胞懸濁液及び脾細胞を、ＶＶ又はＣＴ２６（ＡＨ－１）特異的ペプチドによりエクスビボで再刺激し、ＩＦＮ－γ$^+$及びＴＮＦ－α$^+$ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、又はＭＨＣクラスＩ標識多量体陽性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞の百分率をＦＡＣＳによって定量化した。示された臓器における（Ｃ）抗原特異的及び（Ｄ）ＩＦＮ－γ$^+$／ＴＮＦ－α$^+$ＣＤ８$^+$Ｔ細胞の定量化。各ドットは、１匹のマウスを表す。（ｎ＝３～６つの実験）一元配置分散分析による、＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．０００５、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１。

【図５－４】腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、頑強な全身性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞依存性抗腫瘍免疫を誘発する。（Ｂ～Ｄ）ＣＴ２６腫瘍担持マウスを、ＶＶでｉ．ｔ．処理したか、又はαＣＴＬＡ－４　ｍＡｂでｉ．ｐ．処理した（３ｍｇ／ｋｇでのクローン５－Ｂ０７）。腫瘍細胞懸濁液及び脾細胞を、ＶＶ又はＣＴ２６（ＡＨ－１）特異的ペプチドによりエクスビボで再刺激し、ＩＦＮ－γ$^+$及びＴＮＦ－α$^+$ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、又はＭＨＣクラスＩ標識多量体陽性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞の百分率をＦＡＣＳによって定量化した。示された臓器における（Ｃ）抗原特異的及び（Ｄ）ＩＦＮ－γ$^+$／ＴＮＦ－α$^+$ＣＤ８$^+$Ｔ細胞の定量化。各ドットは、１匹のマウスを表す。（ｎ＝３～６つの実験）一元配置分散分析による、＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．０００５、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１。

【図６－１】腫瘍内で誘導されたＣＤ８$^+$Ｔ細胞抗腫瘍免疫は、ＦｃγＲ依存性及びｃＤＣ１依存性である。（Ａ）ＣＴ２６腫瘍担持ＷＴマウス及びＦｃｅｒ１ｇ$^{-/-}$ＢＡＬＢ／ｃマウスは、図４Ａのように、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４又はＰＢＳのｉ．ｔ．注射を受けた。グラフは、腫瘍体積（左及び中央パネル）及びマウス生存（右パネル）を示す。垂直線は、処理の終了を示す。（ｎ＝１０匹のマウス／群）

【図６－２】腫瘍内で誘導されたＣＤ８$^+$Ｔ細胞抗腫瘍免疫は、ＦｃγＲ依存性及びｃＤＣ１依存性である。（Ｂ）ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４対ＶＶ空で処理されたＣＴ２６腫瘍に

おける、上方制御又は下方制御のいずれかをされた３５２個の差次的に発現された遺伝子のセットにおいて濃縮されたＧＯターム。最も低い調整されたｐ値を有する２０個の濃縮されたタームが示されている。

【図６－３】腫瘍内で誘導されたＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞抗腫瘍免疫は、ＦｃγＲ依存性及びｃＤＣ１依存性である。（Ｃ）図６ｂからの５つの最も濃縮されたＧＯタームに関連する差次的に発現された遺伝子のネットワーク図。上方制御された遺伝子のみが、これらの５つの濃縮されたＧＯタームと関連することが見出された。

【図６－４】腫瘍内で誘導されたＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞抗腫瘍免疫は、ＦｃγＲ依存性及びｃＤＣ１依存性である。（Ｄ）ＭＣ３８腫瘍担持ＷＴマウス及びＢａｔｆ３$^{-/-}$ＢＡＬＢ／ｃマウスは、図４Ａ及び図６Ａのように、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４又はＰＢＳのｉ．ｔ．注射を受けた。グラフは、腫瘍体積（左及び中央パネル）及びマウス生存（右パネル）を示す。垂直線は、処理の終了を示す。（ｎ＝８～１０匹のマウス／群）。

【図７－１】腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、末梢エフェクタＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を拡大させ、Ｔｒｅｇ及び疲弊ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を低減させる。ＣＴ２６「双子」腫瘍担持ＢＡＬＢ／ｃマウスを、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４又はＰＢＳでｉ．ｔ．処理した（右側腹部腫瘍のみ）。脾臓の注射された腫瘍及び対側腫瘍を処理後１０日目に収集し、Ｔ細胞集団を識別するために設計された高次元パネルで染色した。（Ａ）ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、注射された、及び注射されていない腫瘍（上パネル）において、活性化ＣＤ４$^{+}$Ｔｒｅｇ細胞（ＦｏｘＰ３$^{+}$Ｋｌｒｇ１$^{+}$、「Ｔ１」）を低減させ、疲弊ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞（ＰＤ１$^{+}$ＴＩＭ３$^{+}$、「Ｔ２」）を低減させ、かつ活性化エフェクタＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞（Ｋｌｒｇ１$^{+}$、「Ｔ３」）を拡大させ、並びに脾臓（Ｓ１、下パネル）において、活性化ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を拡大させた。

【図７－２】腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、末梢エフェクタＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を拡大させ、Ｔｒｅｇ及び疲弊ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を低減させる。ＣＴ２６「双子」腫瘍担持ＢＡＬＢ／ｃマウスを、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４又はＰＢＳでｉ．ｔ．処理した（右側腹部腫瘍のみ）。脾臓の注射された腫瘍及び対側腫瘍を処理後１０日目に収集し、Ｔ細胞集団を識別するために設計された高次元パネルで染色した。（Ｂ）Ａに示されるデータの定量化を示す。５匹のマウス／群を用いた１つの代表的な実験（３つのうち）。

【図７－３】腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、末梢エフェクタＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を拡大させ、Ｔｒｅｇ及び疲弊ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を低減させる。ＣＴ２６「双子」腫瘍担持ＢＡＬＢ／ｃマウスを、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４又はＰＢＳでｉ．ｔ．処理した（右側腹部腫瘍のみ）。脾臓の注射された腫瘍及び対側腫瘍を処理後１０日目に収集し、Ｔ細胞集団を識別するために設計された高次元パネルで染色した。（Ｃ）フローサイトメトリープロットは、選択されたｉ．ｔ．Ｔ細胞クラスターの特徴的なマーカーを示す。

【図８－１】腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、「冷たい」ＩＣＢ耐性腫瘍を拒絶するためにαＰＤ－１と相乗作用する。（Ａ及びＢ）１つの大きい腫瘍（５×１０^{5}個の細胞、処理された腫瘍）及び１つの小さい腫瘍（１×１０^{5}個の細胞、対側部）の２つのＢ１６腫瘍を保有するＣ５７ＢＬ／６マウスは、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４の３回のｉ．ｔ．注射（垂直点線）及びｉ．ｐ．αＰＤ－１（２９Ｆ．１Ａ１２、１０ｍｇ／ｋｇ、週２回、３週間、灰色領域）を受けた。（Ａ）生存（ｎ＝１０～２０）、ログランク検定による＊ｐ＜０．０５。

【図８－２】腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、「冷たい」ＩＣＢ耐性腫瘍を拒絶するためにαＰＤ－１と相乗作用する。（Ａ及びＢ）１つの大きい腫瘍（５×１０^{5}個の細胞、処理された腫瘍）及び１つの小さい腫瘍（１×１０^{5}個の細胞、対側部）の２つのＢ１６腫瘍を保有するＣ５７ＢＬ／６マウスは、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４の３回のｉ．ｔ．注射（垂直点線）及びｉ．ｐ．αＰＤ－１（２９Ｆ．１Ａ１２、１０ｍｇ／ｋｇ、週２回、３週間、灰色領域）を受けた。（Ｂ）腫瘍内注射された腫瘍及び対側腫瘍の腫瘍成長曲線。

【図８－３】腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、「冷たい」ＩＣＢ耐性腫瘍を拒絶するためにαＰＤ－１と相乗作用する。（Ｃ）Ａ２０腫瘍担持ＢＡＬＢ／ｃマウスを、腫瘍が約１３５ｍｍ^{3}の体積に達したとき、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４　ｉ．ｔ．（１×１０^{5}ｐｆ

ｕの最適以下の用量で）、αＰＤ－１　ｉ．ｐ．（ＲＭＰ１－１４、１０ｍｇ／ｋｇの総量）、又は両方の組み合わせで３回処理した。グラフは、動物の生存を示す（ｎ＝１０）。

【図９－１】ＣＴＬＡ４特異的ｍＡｂの特徴付け。（Ａ）新たに切除した卵巣腫瘍、腹水、及び血液の試料を健康なＰＢＭＣと比較した。ＣＴＬＡ－４発現を、フローサイトメトリーによってＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$ＣＤ１２７$^{-}$Ｔｒｅｇ細胞、ＣＤ４$^{+}$非Ｔｒｅｇ細胞、及びＣＤ８$^{+}$エフェクタＴ細胞について評価し、ＰＢＭＣ移動の２週間後にＮＯＧ脾臓から単離したヒトＴ細胞上での発現と比較した。データは、個々の患者／ドナーを表し、健康なＰＢＭＣではｎ＝１１、腹水ではｎ＝２０、腫瘍ではｎ＝９、及び患者の血液ではｎ＝５である。（Ｂ）ヒトＰＢＭＣをＮＯＧマウスに静脈内注射した。移植の２～３週間後、脾臓を切除し、細胞懸濁液をＳＣＩＤレシピエントにｉ．ｐ．注射し、続いて１０ｍｇ／ｋｇの４－Ｅ０３　ｈＩｇＧ１、４－Ｅ０３　ｈＩｇＧ１　Ｎ２９７Ｑ、又はアイソタイプ対照で処理した。ｉ．ｐ．洗浄によって細胞を収集し、処理の２４時間後に定量化した。細胞枯渇％をアイソタイプ対照に対して正規化した。各ドットは、１匹のマウスを表す。

【図９－２】ＣＴＬＡ４特異的ｍＡｂの特徴付け。（Ｃ）４－Ｅ０３及びイピリムマブの可溶性ヒトＣＴＬＡ－４への結合動態を、Ｂｉａｃｏｒｅ分析によって評価した。固定化抗ヒトＦｃによってｍＡｂをチップ上に捕捉し、異なる濃度のＣＴＬＡ－４タンパク質を各サイクルで注射した。４－Ｅ０３及びイピリムマブのK_D値は、それぞれ０．６ｎＭ及び２．７ｎＭであった。

【図９－３】ＣＴＬＡ４特異的ｍＡｂの特徴付け。（Ｄ）フローサイトメトリーによる、ＣＴＬＡ－４を内因的に発現するヒトＴ細胞への抗ＣＴＬＡ－４　ｍＡｂの用量依存的結合。

【図９－４】ＣＴＬＡ４特異的ｍＡｂの特徴付け。（Ｅ）滴定用量のマウス代理抗体５－Ｂ０７　ｍＩｇＧ２ａ（１０μｇ／ｍｌから、３倍希釈ステップで）の結合を、ＥＬＩＳＡによって、マウスＣＴＬＡ－４及びＣＤ２８に対して試験した。（Ｆ）１×１０^{6}個のＣＴ２６細胞をＢＡＬＢ／ｃマウスに皮下注射した（ｎ＝７）。腫瘍が約１００ｍｍ^{3}のサイズに達したとき、０、４、及び７日目に、マウスは、２００μｇ（１０ｍｇ／ｋｇ）の５－Ｂ０７　ｍＩｇＧ２ａ、５－Ｂ０７　ｍＩｇＧ１　Ｎ２９７Ａ、又はアイソタイプ対照抗体を受けた。８日目に、腫瘍を取り出し、ＴＩＬをＦＡＣＳによって分析した。示されるデータは、１群当たりｎ＝７匹のマウスを用いた１つの代表的な実験の平均値（＋ＳＤ）である。

【図１０－１】腫瘍及び血液中のウイルス及び導入遺伝子の薬物動態。（Ａ及びＢ）図３Ｂに記載の腫瘍試料を使用して、ＬｏＶｏ異種移植腫瘍における（Ａ）マウスＧＭ－ＣＳＦの腫瘍内濃度、及び（Ｂ）ウイルス負荷Ｃ～Ｅ）薬物動態を測定した。ＬｏＶｏ細胞をＳｗｉｓｓヌードマウスの右側腹部に移植した。腫瘍体積が約１２０ｍｍ^{3}に達したとき（Ｄ０と定義される）、マウスを、１０^{5}ｐｆｕのＶＶ$_{GM}$－ｈＣＴＬＡ４（ＢＴ－００１）若しくはＶＶ　ｉ．ｔ．、又は３ｍｇ／ｋｇの４－Ｅ０３モノクローナル抗体ｉ．ｐ．のいずれかの単回注射によって処理した。３匹のマウスの血液及び腫瘍を、示された各時点で収集した。（Ｃ）４－Ｅ０３、（Ｄ）ＧＭ－ＣＳＦ、及び（Ｅ）ウイルスの濃度を、それぞれＥＬＩＳＡ及びＶｅｒｏ細胞での滴定によって決定した。線は、各時点の値の中央値を結んでいる。

【図１０－２】腫瘍及び血液中のウイルス及び導入遺伝子の薬物動態。（Ａ及びＢ）図３Ｂに記載の腫瘍試料を使用して、ＬｏＶｏ異種移植腫瘍における（Ａ）マウスＧＭ－ＣＳＦの腫瘍内濃度、及び（Ｂ）ウイルス負荷Ｃ～Ｅ）薬物動態を測定した。ＬｏＶｏ細胞をＳｗｉｓｓヌードマウスの右側腹部に移植した。腫瘍体積が約１２０ｍｍ^{3}に達したとき（Ｄ０と定義される）、マウスを、１０^{5}ｐｆｕのＶＶ$_{GM}$－ｈＣＴＬＡ４（ＢＴ－００１）若しくはＶＶ　ｉ．ｔ．、又は３ｍｇ／ｋｇの４－Ｅ０３モノクローナル抗体ｉ．ｐ．のいずれかの単回注射によって処理した。３匹のマウスの血液及び腫瘍を、示された各時点で収集した。（Ｃ）４－Ｅ０３、（Ｄ）ＧＭ－ＣＳＦ、及び（Ｅ）ウイルスの濃度を

、それぞれＥＬＩＳＡ及びＶｅｒｏ細胞での滴定によって決定した。線は、各時点の値の中央値を結んでいる。
【図１０－３】腫瘍及び血液中のウイルス及び導入遺伝子の薬物動態。（Ａ及びＢ）図３Ｂに記載の腫瘍試料を使用して、ＬｏＶｏ異種移植腫瘍における（Ａ）マウスＧＭ－ＣＳＦの腫瘍内濃度、及び（Ｂ）ウイルス負荷Ｃ～Ｅ）薬物動態を測定した。ＬｏＶｏ細胞をＳｗｉｓｓヌードマウスの右側腹部に移植した。腫瘍体積が約１２０ｍｍ^{3}に達したとき（Ｄ０と定義される）、マウスを、１０^{5}ｐｆｕのＶＶ$_{GM}$－ｈＣＴＬＡ４（ＢＴ－００１）若しくはＶＶ　ｉ．ｔ．、又は３ｍｇ／ｋｇの４－Ｅ０３モノクローナル抗体ｉ．ｐ．のいずれかの単回注射によって処理した。３匹のマウスの血液及び腫瘍を、示された各時点で収集した。（Ｃ）４－Ｅ０３、（Ｄ）ＧＭ－ＣＳＦ、及び（Ｅ）ウイルスの濃度を、それぞれＥＬＩＳＡ及びＶｅｒｏ細胞での滴定によって決定した。線は、各時点の値の中央値を結んでいる。
【図１１－１】ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４による処理は、処理された腫瘍及び未処理の腫瘍において持続性の抗腫瘍応答を誘導する。（Ａ）ＣＴ２６腫瘍細胞をＢＡＬＢ／ｃマウスの右及び左側腹部に移植した。右側腹部腫瘍へのＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４によるｉ．ｔ．注射（×３、２日間隔）は、腫瘍が約１００ｍｍ^{3}の体積に達したときに開始した。処理した腫瘍及び対側腫瘍におけるウイルス濃度を、処理の１日後に評価した。（ｎ＝群当たり３匹のマウス、マウス１－３（Ｍ１～３）、Ｎ．Ｄ．＝検出されず）Ｂ～Ｃ）ＣＴ２６腫瘍担持マウスを、Ａ）のように、示された用量のＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４で処理した。代替的に、１０^{7}又は１０^{5}ｐｆｕのＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４をｉ．ｖ．投与した。個々の腫瘍成長曲線（Ｂ）及び生存曲線（Ｃ）を示す。（Ｄ）再チャレンジされた腫瘍成長の抑制。ＣＴ２６細胞をＢＡＬＢ／ｃマウスにｓ．ｃ．移植した。ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４又は空対照ＶＶによるｉ．ｔ．処理をＡ）のようにスケジュールした。図４Ｂの図の説明文に示されるように、最後のＶＶ注射の１００日後に、生存マウスをＣＴ２６又はＲｅｎｃａ細胞によりｓ．ｃ．で再チャレンジした。
【図１１－２】ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４による処理は、処理された腫瘍及び未処理の腫瘍において持続性の抗腫瘍応答を誘導する。（Ａ）ＣＴ２６腫瘍細胞をＢＡＬＢ／ｃマウスの右及び左側腹部に移植した。右側腹部腫瘍へのＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４によるｉ．ｔ．注射（×３、２日間隔）は、腫瘍が約１００ｍｍ^{3}の体積に達したときに開始した。処理した腫瘍及び対側腫瘍におけるウイルス濃度を、処理の１日後に評価した。（ｎ＝群当たり３匹のマウス、マウス１－３（Ｍ１～３）、Ｎ．Ｄ．＝検出されず）Ｂ～Ｃ）ＣＴ２６腫瘍担持マウスを、Ａ）のように、示された用量のＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４で処理した。代替的に、１０^{7}又は１０^{5}ｐｆｕのＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４をｉ．ｖ．投与した。個々の腫瘍成長曲線（Ｂ）及び生存曲線（Ｃ）を示す。（Ｄ）再チャレンジされた腫瘍成長の抑制。ＣＴ２６細胞をＢＡＬＢ／ｃマウスにｓ．ｃ．移植した。ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４又は空対照ＶＶによるｉ．ｔ．処理をＡ）のようにスケジュールした。図４Ｂの図の説明文に示されるように、最後のＶＶ注射の１００日後に、生存マウスをＣＴ２６又はＲｅｎｃａ細胞によりｓ．ｃ．で再チャレンジした。
【図１１－３】ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４による処理は、処理された腫瘍及び未処理の腫瘍において持続性の抗腫瘍応答を誘導する。（Ａ）ＣＴ２６腫瘍細胞をＢＡＬＢ／ｃマウスの右及び左側腹部に移植した。右側腹部腫瘍へのＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４によるｉ．ｔ．注射（×３、２日間隔）は、腫瘍が約１００ｍｍ^{3}の体積に達したときに開始した。処理した腫瘍及び対側腫瘍におけるウイルス濃度を、処理の１日後に評価した。（ｎ＝群当たり３匹のマウス、マウス１－３（Ｍ１～３）、Ｎ．Ｄ．＝検出されず）Ｂ～Ｃ）ＣＴ２６腫瘍担持マウスを、Ａ）のように、示された用量のＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４で処理した。代替的に、１０^{7}又は１０^{5}ｐｆｕのＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４をｉ．ｖ．投与した。個々の腫瘍成長曲線（Ｂ）及び生存曲線（Ｃ）を示す。（Ｄ）再チャレンジされた腫瘍成長の抑制。ＣＴ２６細胞をＢＡＬＢ／ｃマウスにｓ．ｃ．移植した。ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４又は空対照ＶＶによるｉ．ｔ．処理をＡ）のようにスケジュールした。図４Ｂの図の説明文に示されるように、最後のＶＶ注射の１００日後に、生存マウスをＣＴ２６又

はＲｅｎｃａ細胞によりｓ．ｃ．で再チャレンジした。
【図１２】腫瘍内で誘導されたＣＤ８Ｔ細胞免疫は、ＦｃγＲ依存性である。ＷＴ及びＦｃｅｒ１ｇ－／－ＢＡＬＢ／ｃマウスを、１×１０^{6}個のＣＴ２６細胞によりｓ．ｃ．でチャレンジした。腫瘍が約１００ｍｍ^{3}に達したとき、マウスは、０、２、及び５日目に、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４又はＰＢＳ対照の３回のｉ．ｔ．注射を受けた（１０^{7}ｐｆｕの最終用量）。８日目に、腫瘍及び脾臓を単離し、ＦｏｘＰ３$^{+}$ＣＤ４$^{+}$細胞をＦＡＣＳによって分析した。
【図１３－１】ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４による処理は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞に依存する。（Ａ）１０匹のＢＡＬＢ／ｃマウスの群を、マウスを１×１０^{6}個のＣＴ２６細胞によりｓ．ｃ．でチャレンジする３日前に、１ｍｇのＣＤ８枯渇抗体又はＣＤ４枯渇抗体（又は対応するアイソタイプ対照抗体）で処理したか、又はしなかった。更に４日後（処理開始に対して－３日目）に、２００μｇの枯渇抗体をｉ．ｐ．投与した。次いで、マウスを、０、２、及び４日目に、１×１０^{7}ｐｆｕのＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４でｉ．ｔ．処理した。人道的エンドポイントまでの生存百分率を示す。データは、２つの独立した実験を表す。
【図１３－２】ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４による処理は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞に依存する。（Ｂ）ＣＴ２６腫瘍担持マウスを、ＶＶでｉ．ｔ．処理するか、又は抗ＣＴＬＡ－４ｍＡｂ（３ｍｇ／ｋｇでのクローン５－Ｂ０７）でｉ．ｐ．処理した。腫瘍細胞懸濁液をＶＶ又はＣＴ２６（ＡＨ－１）特異的ペプチドによりエクスビボで再刺激し、４時間培養し、ＩＦＮ－γ^{+}及びＴＮＦ－α^{+}ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の数をフローサイトメトリーによって定量化した。各ドットは、１匹のマウスを表す。代表的な実験（ｎ＝３～６）、一元配置ＡＮＯＶＡによる、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００５、＊＊＊＊ｐ＜０．００１。
【図１３－３】ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４による処理は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞に依存する。（Ｃ）及び（Ｄ）教師なしクラスタリングによって識別された（Ｃ）１２個の腫瘍内、（Ｄ）１０個の脾臓ＣＤ３＋サブ集団の中央値マーカー発現を示すヒートマップ。
【図１３－４】ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４による処理は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞に依存する。（Ｃ）及び（Ｄ）教師なしクラスタリングによって識別された（Ｃ）１２個の腫瘍内、（Ｄ）１０個の脾臓ＣＤ３＋サブ集団の中央値マーカー発現を示すヒートマップ。
【図１４－１】Ｂ１６腫瘍は、抗ＣＴＬＡ－４、加えて抗ＰＤ－１による全身処理に対して不応性である。Ｂ１６腫瘍担持Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、４、７、１１日目に、１０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ－１、又は抗ＰＤ－１と抗ＣＴＬＡ－４との組み合わせ（１０ｍｇ／ｋｇ）でｉ．ｐ．処理した。（Ａ）データは、示されるように細胞接種後の日における腫瘍体積ｍｍ^{3}として表され、各ラインは、個々のマウスを表す。（Ｂ）下のパネルは、示された処理後のＢ１６を担持するマウスの人道的エンドポイントまでの生存百分率を示す。
【図１４－２】Ｂ１６腫瘍は、抗ＣＴＬＡ－４、加えて抗ＰＤ－１による全身処理に対して不応性である。Ｂ１６腫瘍担持Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、４、７、１１日目に、１０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ－１、又は抗ＰＤ－１と抗ＣＴＬＡ－４との組み合わせ（１０ｍｇ／ｋｇ）でｉ．ｐ．処理した。（Ｃ）Ｂ１６腫瘍担持Ｃ５７ＢＬ／６マウスは、図８に記載されるように、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４の３回のｉ．ｔ．注射及び／又はｉ．ｐ．抗ＰＤ－１を受けた。最後の処理の６日後、腫瘍を収集し、腫瘍浸潤Ｔ細胞の数をフローサイトメトリーによって分析した。各ドットは、１匹のマウスを表す。（ｎ＝３つの実験）。一元配置分散分析による、＊ｐ＜０．０５。高度にＴ細胞炎症性ＣＴ２６腫瘍微小環境におけるＴ細胞浸潤のレベルを参照のために示す（細胞接種後約２０日目のＣＴ２６腫瘍において決定された）。
【実施例】
【０２４６】
材料及び方法
細胞株
ヒト胚性腎細胞株２９３Ｔ、マウス黒色腫Ｂ１６－Ｆ１０、マウス結腸がんＣＴ２６、

マウスＢ細胞リンパ腫Ａ２０、マウス乳腺ＥＭＴ６、及びマウスルイス肺がん細胞株（ＬＬ／２）をＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から購入し、Ｃｒｏｗｎ ＢｉｏからのヒトｃＴＬＡ－４（２９３Ｔ－ＣＴＬＡ４）で安定にトランスフェクトした。細胞を、１０％ＦＣＳ、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、及び１ｍＭのピルビン酸ナトリウムを補充したＲＰＭＩ＋グルタマックス（ＣＴ２６）又はＤＭＥＭ＋グルタマックス（ＭＣ３８、Ｂ１６－Ｆ１０）中で培養した。ＥＭＴ６細胞を、１５％ＦＣＳ、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、及び１ｍＭのピルビン酸ナトリウムを補充したＷａｙｍｏｕｔｈ培地中で維持した。ｈＦｃγＲＩＩＩＡ－１５８Ｖを発現するＮＫ－９２細胞株を、ＧＦＰ（ＡＴＣＣから購入）とともに、補充α－ＭＥＭ培地中で培養した（Ｂｉｎｙａｍｉｎ ｅｔ ａｌ．，２００８）。初代細胞をＲ１０培地（２ｍＭのグルタミン、１ｍＭのピルビン酸、１００ＩＵ／ｍｌのペニシリン、及びストレプトマイシン、並びに１０％ＦＢＳ、Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるｇＩＢＣＯ）を含有するＲＰＭＩ １６４０）中で培養した。ヒト結腸直腸腺がん細胞株ＬｏＶｏ（ＡＴＣＣ）、膵臓腫瘍細胞株ＭＩＡ ＰａＣａ－２（ＡＴＣＣ）、及びヒト胃がん細胞株Ｈｓ－７４６Ｔ（ＡＴＣＣ）を、１０％ＦＢＳを補充し、４０ｍｇ／Ｌのゲンタマイシンを含有するＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ）中で成長させた。ヒト卵巣腫瘍細胞株ＳＫ－ＯＶ－３（ＡＴＣＣ）及びヒト結腸直腸がん細胞株ＨＣＴ １１６（ＡＴＣＣ）を、１０％ＦＢＳを補充し、４０ｍｇ／Ｌのゲンタマイシンを含有するＭｃ Ｃｏｙ’ｓ ５Ａ培地（ＡＴＣＣ）中で成長させた。ヒト赤芽球細胞株ＴＦ－１（ＡＴＣＣ）を、１０％ＦＢＳを補充し、４０ｍｇ／Ｌのゲンタミシン＋２ｎｇ／ｍＬのＧＭ－ＣＳＦを含有するＲＰＭＩ １６４０（Ｓｉｇｍａ）中で成長させた。

【０２４７】

マウス

マウスは、地方の無菌施設で維持した。全ての実験について、若い成体マウスを性別及び年齢適合させ、実験群に無作為に割り当てた。全ての手順は、許可番号１７１９６／２０１８又は２９３４／２０２０の下、ＢｉｏＩｎｖｅｎｔにおいて、又は導入遺伝子ＡＰＡＦＩＳ Ｎｒ２１６２２プロジェクト２０１９０７２４１４３４３４６５において実験動物に関する地方倫理委員会（Malmo/Lunds djurforsoksetiska namnd）によって承認され、地方倫理ガイドラインに従って実施された。Ｃ５７ＢＬ／６及びＢＡＬＢ／ｃマウスは、Ｔａｃｏｎｉｃ、Ｊａｎｖｉｅｒ、又はＣｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒから入手した。使用した遺伝子変更株は、Ｔａｃｏｎｉｃから購入したＣ．１２９Ｐ２（Ｂ６）－Ｆｃｅｒ１ｇｔｍ１Ｒａｖ（ＢＡＬＢ／ｃバックグラウンド及びＢＡＬＢ／ｃＡｎＮＴａｃ ＷＴ対照に対するＦｃｅｒ１ｇ－ＫＯ）、及びＪａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから購入したＢ６．１２９Ｓ（Ｃ）－Ｂａｔｆ３ｔｍ１Ｋｍｍ／Ｊ（Ｈｉｌｄｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００８）Ｃ５７ＢＬ／６Ｊバックグラウンド及びＣ５７ＢＬ／６Ｊ ＷＴ対照に対するＢａｔｆ３－ＫＯ）であった。

【０２４８】

ヒト（臨床）試料及び倫理

倫理承認は、Ｓｋａｎｅ大学病院の倫理委員会によって得られた。インフォームドコンセントは、ヘルシンキ宣言に従って提供した。患者試料は、スウェーデン、ＬｕｎｄのＳｋａｎｅｓ大学病院の産婦人科及び腫瘍科を通じて入手した。単離した単一細胞懸濁液として腹水を評価した。

【０２４９】

ヒト組織の処理

手術を受ける患者から得た卵巣腫瘍試料を小片に切断し、３７℃で２０分間、ＤＮａｓｅ Ｉ（Ｓｉｇｍａ）及びリベラーゼ（商標）（Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）を含むＲ１０で培養した。残りの組織は、機械的に解離し、細胞懸濁液と一緒に７０μｍのセルストレーナーを通した。一致する末梢血試料を得、８００×ｇで２０分間、Ｌｅｕｃｏｓｅｐチューブ（Ｇｒｅｉｎｅｒ）で遠心分離することによって、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ ＰＬＵＳ（Ｃｙｔｉｖａ）を使用し末梢血単核細胞を分離した。ヒトバフィー

コートは、Ｈａｌｍｓｔａｄ（Ｓｗｅｄｅｎ）の病院の血液センターから入手し、標準的なプロトコルに従って処理した。

【０２５０】

抗体依存性細胞傷害

ＧＦＰとともにＣＤ１６－１５８Ｖ対立遺伝子を発現するように安定にトランスフェクトされたＮＫ－９２細胞株を使用して、ＡＤＣＣアッセイを実施した。ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して、健康なドナーの末梢血からＣＤ４$^{+}$標的Ｔ細胞を単離した。細胞を、ＣＴＬＡ－４を上方制御するためのＣＤ３／ＣＤ２８ダイナビーズ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）及び５０ｎｇ／ｍｌの組換えｈＩＬ－２（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて３７℃で７２時間刺激した。標的細胞を０．１～１０μｇ／ｍｌのｍＡｂと、４℃で３０分間プレインキュベートし、その後ＮＫ細胞と混合した。細胞を２：１のエフェクタ：標的細胞比で４時間インキュベートした。溶解は、フローサイトメトリーによって決定した。簡潔に述べると、インキュベーションの最後に、細胞懸濁液を、Ｆｉｘａｂｌｅ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ｄｙｅ　ｅＦｌｕｏｒ７８０（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）とともに、ＶｉｏＧｒｅｅｎコンジュゲートされた抗ＣＤ４（Ｍ－Ｔ４６６、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）により、４℃の暗所で３０分間染色し、次いで細胞をＦＡＣＳによって分析した。

【０２５１】

インビトロでの機能的遮断

ＳＥＢ　ＰＢＭＣアッセイでは、健康なドナーからの全ＰＢＭＣを９６ウェルプレート（1×10^{5}個の細胞／ウェル）に播種し、２０～０．６２５μｇ／ｍｌの範囲の抗－ＣＴＬＡ－４　ＩｇＧの存在下で、１μｇ／ｍｌのＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓエンテロトキシンＢ（ＳＥＢ、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）で刺激した。３日後、上清を採取し、ＩＬ－２をＭＳＤ（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＵＳＡ）により製造業者の指示に従って定量化した。

【０２５２】

インビトロ結合アッセイ

ＣＴＬＡ－４発現トランスフェクト細胞を、４℃で示された濃度の抗ＣＴＬＡ－４　ｍＡｂと２０分間インキュベートした後、洗浄し、ＡＰＣ標識ヤギ抗ヒト二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）で染色した。空ベクターでトランスフェクトした細胞への結合は観察されなかった（示さず）。

【０２５３】

初代細胞へのＩｇＧ結合を、単離されたインビトロ活性化ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞上で分析した。簡潔に述べると、ヒト末梢ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を、ＭＡＣＳ　ＣＤ４Ｔ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用する陰性選択によって全ＰＢＭＣから精製した。ＣＤ４＋Ｔ細胞を、Ｒ１０培地中のＣＤ３／ＣＤ２８　ｄｙｎａｂｅａｄｓ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、加えて５０ｎｇ／ｍｌ組換えｈＩＬ－２（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）で３日間、インビトロで活性化させて、ＣＴＬＡ－４発現を上方制御した。インビトロ活性化ヒトＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を、抗ＣＤ４とともに、示された濃度の抗ＣＴＬＡ－４　ｍＡｂとインキュベートした。結合した抗ＣＴＬＡ－４　ｍＡｂを、ＡＰＣ標識ヤギ抗ヒトＩｇＧで検出した。競合結合アッセイでは、２μｇ／ｍｌのＡｌｅｘａ　６４７標識抗ＣＴＬＡ－４ｍＡｂを組換えヒト又はカニクイザルＣＴＬＡ－４－Ｆｃタンパク質（５０μｇ／ｍｌ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）と混合した後、ＣＴＬＡ－４発現細胞とインキュベーションした。結合したＩｇＧ結合は、ＦＡＣＳによって検出された。

【０２５４】

ＶＶ産生及び精製

組換えウイルスは、Ｊ２Ｒ及びＩ４Ｌ遺伝子座でＧＦＰ又はｍＣｈｅｒｒｙをコードする出発親コペンハーゲンワクシニアウイルス及び２つのトランスファープラスミドを使用して、ニワトリ胚線維芽細胞（chicken embryo fibroblast、ＣＥＦ）における２回の連続相同組換えによって産生した。トランスファープラスミドは、ｐ７．５プロモータ

ー下の、Ｊ２Ｒ組換えアームに隣接したｍＡｂの重鎖、又はｐ７．５プロモーター下のｍＡｂ、それに加えて、若しくはそうではなく、ｐＳＥ／Ｌプロモーターの、Ｉ４Ｌ組換えアームに隣接したマウス若しくはヒトＧＭ－ＣＳＦの軽鎖のいずれかをコードした（図２Ａ参照）。組換えウイルスを、非蛍光プラークの増幅／単離のいくつかのサイクルによって単離した。次いで、組換えウイルスをＣＥＦ上で産生し、細胞溶解後に５μｍ濾過によって精製し、続いて０．２μｍ接線流濾過を使用して精製／濃縮した。最後に、ウイルスを、透析濾過によって、サッカロース５０ｇ／Ｌ、ＮａＣｌ　５０ｍＭ、トリス１０ｍＭ、グルタミン酸ナトリウム１０ｍＭ、ｐＨ８で製剤化し、等分し、使用するまで－８０℃で保存した。

【０２５５】

この公開に使用された全てのウイルスは、ＴＫ－ＲＲコペンハーゲン株由来であった。

ＶＶ：非アーム化ワクシニアウイルス又はＴＧ６００２（ＦＣＵ１キメラ酵素をコードするワクシニアウイルス、ベンチマーク組換えＶＶ）

ＶＶ$_{GM}$：マウスＧＭ－ＣＳＦをコードするワクシニアウイルス

ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４：マウスＧＭ－ＣＳＦ及び５－Ｂ０７（抗マウスＣＴＬＡ－４、マウスＩｇＧ２ａ）をコードするワクシニアウイルス

ＶＶ－αＣＴＬＡ４：５－Ｂ０７をコードするワクシニアウイルス

ＶＶ$_{GM}$－αｈＣＴＬＡ４（ＢＴ－００１）：ヒトＧＭ－ＣＳＦ及び４－Ｅ０３（抗ヒトＣＴＬＡ－４、ヒトＩｇＧ１）をコードするワクシニアウイルス。

【０２５６】

インビトロでのウイルス複製、腫瘍溶解活性、及び導入遺伝子発現

ＢＴ－００１の複製は、10^{-3}の感染多重度（multiplicity of infection、ＭＯＩ）（すなわち、１０００個の細胞に対して１つのウイルス）で、ＬｏＶｏ細胞をＢＴ－００１に感染させてから２４、４８、及び７２時間後の総ウイルス力価を測定することによって評価した。ウイルス力価を、Ｖｅｒｏ細胞でのプラークアッセイによって決定した。

【０２５７】

ＭＩＡ　ＰａＣａ－２細胞とＢＴ－００１とを図の説明文に示されるＭＯＩで５日間インキュベートした後、細胞計数器（Ｖｉ－Ｃｅｌｌ）を使用して細胞の生存を定量化することによって、ＢＴ－００１の腫瘍溶解活性を評価した。ＢＴ－００１の複製及び腫瘍溶解活性の両方を、現在臨床評価中のコペンハーゲンＴＫ－ＲＲ－ワクシニアウイルスＴＧ６００２のそれらを用いてベンチマークした（Ｆｏｌｏｐｐｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９）。

【０２５８】

導入遺伝子発現を、いくつかのヒト腫瘍細胞株ＬｏＶｏ、ＨＣＴ　１１６（結腸がん）、ＭＩＡ　ＰａＣａ－２（膵臓がん）、ＳＫ－ＯＶ３（卵巣がん）、及びＨｓ１７６Ｔ（胃がん）の、ＭＯＩ０．０５でのＢＴ－００１による感染後に評価した。培養上清を感染４８時間後に収集し、遠心分離し、０．２μｍで濾過した後、ＥＬＩＳＡによって４－Ｅ０３及びｈＧＭ－ＣＳＦ濃度を測定した。

【０２５９】

抗体精製

約４．７×10^{7}個のＭＩＡ　ＰａＣａ－２細胞／フラスコを含有する１５個のＦ１７５フラスコを、ウシ血清を含まないＤＭＥＭ中のＢＴ－００１によりＭＯＩ０．０１で感染させた。感染の７２時間後、細胞上清を採取し、プールし、遠心分離し、０．２μｍで濾過した後、ＥＤＴＡ（最終２ｍＭ）及びＴｒｉｓ　ｐＨ７．５（最終２０ｍＭ）を添加した。プール上清を、予めＰＢＳで平衡化した１ｍＬのｐｒｏｔＡ　Ｈｉｔｒａｐカラム（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ｒｅｆ　１７－５０７９－０１）に４℃で装填した。結合した抗体を１００ｍＭのグリシンＨＣｌ　ｐＨ２．８によって溶出し、ＰＢＳに対して透析した。精製された４－Ｅ０３を、還元又は非還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ＮｕＰａｇｅ　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル　４～１２％　Ｔｈｅｒｍｏ　ＮＰ０３２３）に装填し、

ゲルをＩｎｓｔａｎｔＢｌｕｅ（Ｅｘｐｅｄｅｏｎ、ＩＳＢ１Ｌ）クマシーブルーで染色した。この精製された抗体（すなわち、４－Ｅ０３　ＭＩＡ　ＰａＣａ－２）を、ＣＴＬＡ－４結合及びインビボＴｒｅｇ枯渇活性について更に評価した。

【０２６０】

酵素結合免疫吸着アッセイ

ＧＭＣＳＦ．ヒト及びマウスＧＭ－ＣＳＦ濃度を、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ（登録商標）ＥＬＩＳＡ　ＧＭ－ＣＳＦイムノアッセイ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して決定した。

【０２６１】

ヒトＧＭ－ＣＳＦ機能性を、ＴＦ－１増殖アッセイを使用して評価した。既知濃度のｈＧＭ－ＣＳＦ（標準又はＢＴ－００１感染細胞由来）の存在下でのＴＦ－１細胞の細胞増殖を、生存細胞のデヒドロゲナーゼによるＭＴＳのホルマザンへの酵素的変換（４９０ｎｍでの吸光度により測定）を用いる比色分析によって測定した。４９０ｎｍでの吸収をＧＭ－ＣＳＦの濃度に対してプロットし、曲線を組換えＧＭ－ＣＳＦ（すなわち、モルグラモスチム）で得られたものと比較した。

【０２６２】

ＣＴＬＡ４／ＣＤ２８タンパク質への結合。抗体結合ＥＬＩＳＡのために、精製されたヒトＣＴＬＡ４－Ｆｃ、ヒトＣＤ２８－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、及びマウスＣＴＬＡ４－Ｆｃ（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）をアッセイプレートに１ｐｍｏｌ／ウェルでコーティングし、同時に、マウスＣＤ２８－Ｈｉｓ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を５ｐｍｏｌ／ウェルでコーティングした。異なる抗体を１０μｇ／ｍｌで添加し、室温で１時間結合させた。結合したｎ－Ｃｏｄｅｒ（登録商標）ｍＩｇＧ２Ａ又はｈＩｇＧ１抗体を、抗マウス／抗ヒトＨ＋Ｌ－ＨＲＰ（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ）又は抗マウス／ヒトラムダ軽鎖抗体ＨＲＰ（Ｂｅｔｈｙｌ）のいずれかを使用して検出した。発色基質（ＴＭＢ　Ｔ０４４０）又は発光基質（Ｐｉｅｒｃｅ　３７０７０）を使用し、Ｔｅｃａｎ　Ｕｌｔｒａを用いてプレート読み取りを行った。

【０２６３】

ＣＤ８０／ＣＤ８６相互作用の遮断。リガンド遮断ＥＬＩＳＡのために、精製されたヒトＣＴＬＡ４－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を、２ｐｍｏｌ／ウェル（ＣＤ８０について）又は１ｐｍｏｌ／ウェル（ＣＤ８６について）でアッセイプレートにコーティングした。抗体を０．４ｐＭ～６７ｎＭの範囲の濃度で添加し、１時間結合させた。Ｈｉｓタグ付きリガンドを、ＥＬＩＳＡによるパイロット実験において最適化された通り（データ示さず）、それぞれ２００ｎＭ及び１００ｎＭで添加した（ｒｈＣＤ８０及びｒｈＣＤ８６、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）。プレートを更に１５分間インキュベートした。洗浄後、結合したリガンドをＨＲＰ標識抗Ｈｉｓ抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）で検出した。Ｓｕｐｅｒ　Ｓｉｇｎａｌ　ＥＬＩＳＡ　Ｐｉｃｏ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を基質として使用し、Ｔｅｃａｎ　Ｕｌｔｒａ　Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ　ｒｅａｄｅｒを使用してプレートを分析した。代替的に、マウスＣＴＬＡ４－Ｆｃ（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）を１ｐｍｏｌ／ウェルでアッセイプレートにコーティングした。抗体を、１０μｇ／ｍｌ（６７ｎＭ）の開始濃度で、２倍希釈段階により添加し、１時間結合させた。Ｈｉｓタグ付きリガンド、ＣＤ８０及びＣＤ８６（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）を５０ｎＭで添加し、プレートを更に３０分間インキュベートした。検出及び読み取りを上記のように実施した。

【０２６４】

マウス実験

インビボ腫瘍実験。培養した腫瘍細胞を、左側腹部のみ又は両方の側腹部に皮下注射した（ＣＴ２６　１×10^6個の細胞、ＭＣ３８　５×10^5個の細胞、Ａ２０　５×10^6個の細胞、ＥＭＴ６　１×10^6個の細胞、Ｂ１６－Ｆ１０　０．５～５×10^5個の細胞）。特に明記しない限り、マウスを10^7ｐｆｕのＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４又は対照ＶＶにより、１日おきに３回、ｉ．ｔ．処理した。腫瘍成長実験のために、処理された腫瘍

及び遠位腫瘍の腫瘍サイズを、キャリパーを用いて週２回測定し、腫瘍体積（mm^3）を、式：（幅^2×長さ×０．５２）に従って計算した。腫瘍全体の負担（処理した腫瘍と対側腫瘍を合わせたもの）が２０００mm^3の体積に達したときに（実験エンドポイント）、動物を安楽死させた。機能的実験のために、組織を収集し、図の説明文に示した時点で処理した。マウス腫瘍を、ＤＮａｓｅ　Ｉ（Ｓｉｇｍａ）及びＬｉｂｅｒａｓｅ（商標）（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）を含むＲ１０中において３７℃で１５分間消化させた。次いで、細胞を７０μｍのセルストレーナーに通し、アッセイに直接使用した。ＤＣ表現型決定のために、生存白血球を、密度勾配遠心分離（Ｃｅｄａｒｌｉｎｅカタログ番号ＣＬ５０３５）後に濃縮した。

【０２６５】

初代ヒト異種移植片モデル。ＰＢＭＣ－ＮＯＧ／ＳＣＩＤマウスは、ＮＯＧマウス（ＮＯＤ．Ｃｇ－ＰｒｋｄｃｓｃｉｄＩｌ２ｒｇｔｍ１Ｓｕｇ／ＪｉｃＴａｃ（Ｔａｃｏｎｉｃ））を、２００μｌのＰＢＳ中の、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ　ＰＬＵＳを用いて単離した１～２×１０^{7}個のＰＢＭＣで静脈内注射した。注射の約２週間後、ＳＣＩＤマウス（Ｃ．Ｂ－Ｉｇｈ－１ｂ／ＩｃｒＴａｃ－Ｐｒｋｄｃｓｃｉｄ（Ｔａｃｏｎｉｃ））に、再構成ＮＯＧマウスからの１０×１０^{6}個の脾細胞を腹腔内注射した。１時間後、マウスを１０ｍｇ／ｋｇのｍＡｂで処理した。マウスのｉｎｔｒａｐｅｒｉｔｏｎｅａｌ　ｆｌｕｉｄを２４時間後に収集した。ヒトＴ細胞サブセットは、以下のマーカー：ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ１２７（全てＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ製）を使用するＦＡＣＳによって識別及び定量化した。

【０２６６】

腫瘍及び血液中の導入遺伝子及びウイルスの薬物動態。前述のＣＴ２６腫瘍モデルでは、VV_{GM}－αＣＴＬＡ４又はＶＶ－αＣＴＬＡ４を上記と同じ条件で投与した（すなわち、０、２、及び４日目での１０^{7}ｐｆｕのｉ．ｔ．注射３回）。３匹のマウス／時点の腫瘍及び血液を、１、４（３回目の注射前）、８、及び１０日目に収集した。ウイルスの濃度を、Ｖｅｒｏ細胞でのウイルス力価測定によって、全血中、及びＰＢＳ中でホモジナイズした腫瘍において測定した。５－Ｂ０７及びｍＧＭ－ＣＳＦの両方の濃度を、血清及び腫瘍ホモジネートにおいてＥＬＩＳＡによって測定した。異種移植ヒト腫瘍モデルにおいて、ＬｏＶｏ細胞をＳｗｉｓｓヌードマウスの左側腹部に皮下注射した。腫瘍体積が約１２０mm^3に達した約２週間後、マウスを無作為化し、２群に分けた（１５匹のマウス／群）。第１群には、１０^{5}ｐｆｕのVV_{GM}－αｈＣＴＬＡ４（ＢＴ－００１）を１回ｉ．ｔ．注射し、第２の群には、３ｍｇ／ｋｇの４－Ｅ０３を腹腔内注射した。３匹のマウス／時点の腫瘍及び血液／血清を、ウイルス注射後１、３、６、１０、及び２０日目に収集した。４－Ｅ０３及びｈＧＭ－ＣＳＦの両方のウイルス力価及び濃度を、前段落に記載したように測定した。

【０２６７】

抗原特異的Ｔ細胞応答

抗原特異的Ｔ細胞応答を、脾臓、処理した腫瘍、及び対側腫瘍において分析した。簡潔に述べると、１×１０^{6}個の単離された細胞を、２μｇ／ｍｌの腫瘍（ＡＨ－１、ＳＰＳＹＶＹＨＱＦ）特異的ペプチド又はウイルス（Ｓ９Ｌ８、ＳＰＧＡＡＧＹＤＬ）特異的ペプチド（ＢｉｏＮｏｒｄｉｋａ）で再刺激した（Ｈｕａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６、Ｒｕｓｓｅｌｌ　ａｎｄ　Ｔｓｃｈａｒｋｅ，２０１４）。腫瘍細胞を、ブレフェルジンＡ（Ｓｉｇｍａ）の存在下で４時間パルスした。単離した脾細胞を４８時間再刺激し、最後の４時間はブレフェルジンＡの存在下で再刺激した。次いで、サイトカイン産生ＣＤ８$^+$Ｔ細胞を、ＣＤ４５、ＴＣＲ－β、ＣＤ８、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－γ、及びＣＤ２５について、ＦＡＣＳ染色によって識別した。並行して、腫瘍及びウイルス特異的ＣＤ８$^+$Ｔ細胞を、ＭＨＣクラスＩ多量体（ペンタマーＨ－２Ｌｄ－ＳＰＧＡＡＧＹＤＬ－Ｒ－ＰＥ（Ｓ９Ｌ８）ＰｒｏＩｍｍｕｎｅ、ペンタマーＨ－２Ｌｄ－ＴＰＨＰＡＲＩＧＬ－Ｒ－ＰＥ（対照）ＰｒｏＩｍｍｕｎｅ、デキストラマーＨ－２Ｌｄ－ＳＰＳＹＶＹＨＱＦ－ＡＰＣ（ＡＨ－１）Ｉｍｍｕｄｅｘ、デキストラマーＨ－２Ｌｄ－ＴＰＨＰＡＲＩＧＬ－ＡＰ

Ｃ（対照）Ｉｍｍｕｄｅｘ）を用いて識別した。
【０２６８】
フローサイトメトリー
死細胞を、Ｆｉｘａｂｌｅ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｄｙｅ ｅＦｌｕｏｒ（商標）７８０、Ｆｉｘａｂｌｅ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｓｔａｉｎ ４４０ ＵＶ、又はヨウ化プロピジウムを使用して日常的に識別し、ダブレットとともに分析から除外した。細胞内染色は、ＦｏｘＰ３ Ｓｔａｉｎｉｎｇ Ｂｕｆｆｅｒ Ｓｅｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して行った。ＢＤ ＦＡＣＳ Ｖｅｒｓｅ又はＦｏｒｔｅｓｓａ ＩＩのいずれかで試料取得を行い、ＦｌｏｗＪｏ １０．７．２を用いてデータを分析した。腫瘍及び脾臓ＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞のＵＭＡＰを生成するために、ＦｌｏｗＡＩツール（ｖ．２．２）を使用してデータをクリーニングし、次いで、試料を処理群及び臓器によりバーコード化し、連結した。ＦｌｏｗＪｏプラグインＵＭＡＰ（ｖ３．１）を、デフォルト設定（距離関数：ユークリッド、最近傍：１５、及び最小距離：０．５）を使用して、全ての補正パラメータ、並びに前方散乱（forward scatter、ＦＳＣ）及び側方散乱（side scatter、ＳＳＣ）測定値を含めて、得られたフローサイトメトリー標準（flow cytometry standard、ＦＣＳ）ファイルに対して実行した。クラスター識別のために、ＦｌｏｗＪｏプラグインｘシフト（ｖ１．３）を、デフォルト設定（最近傍Ｋ＝８２）を使用し、以下のパラメータ：ＣＤ４、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ２５、ＩＣＯＳ、ＦｏｘＰ３、Ｋｌｒｇ１、ＣＤ４４、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、Ｔ－ｂｅｔ、ＧｚｍＢ、Ｋｉ－６７を含めて、得られたＵＭＡＰに対して実行した。ＦｌｏｗＪｏから得られたスケーリングされたチャネル値を使用して、前述のパラメータについての１つのクラスター当たりの平均発現を計算した。平均発現ヒートマップを、１つのクラスター当たりのパラメータ平均を用いて生成し、０～１の間でスケーリングした。
【０２６９】
抗体
フローサイトメトリー用モノクローナル抗体：抗ヒトＣＤ４－ＶｉｏＧｒｅｅｎ（Ｍ－Ｔ４６６）Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ カタログ番号１３０－１１３－２５９、抗ヒトＣＤ２５－ＢＶ４２１（クローンＭ－Ａ２５１）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５６２４４２、抗ヒトＣＤ１２７－ＦＩＴＣ（クローンＨＩＬ－７Ｒ－Ｍ２１）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５６１６９７、抗ヒトＣＤ８－ＡＰＣ（クローンＲＰＡ－Ｔ８）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５５５３６９、抗ヒトＣＴＬＡ－４－ＰＥ（クローンＢＮＩ３）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５５５８５３、マウスＩｇＧ２ａ、ｋアイソタイプ対照－ＰＥ ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５５５５７４、抗マウスＣＤ４５．２－ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５（クローン１０４）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５５２９５０、抗マウスＣＤ４５．２－ＢＵＶ７３７（クローン１０４）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号６１２７７９、抗マウスＣＤ２５－ＢＶ４２１（クローン７Ｄ４）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５６４５７１、抗マウスＣＤ８－ＢＶ７８６（クローン５３－６．７）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５６３３２、抗マウスＣＤ４－ＢＶ５１０（クローンＲＭ４－５）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５６３１０６、抗マウスＴＣＲｂ－Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８（クローンＨ５７－５９７）ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ カタログ番号１０９２１５、抗マウスＰＤ－１－ＢＢ７００（クローンＲＭＰ１－３０）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号７４８２４２、抗マウスＣＴＬＡ－４－ＰＥＣＦ５９４（クローンＵＣ１０－４Ｆ１０－１１）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５６４３３２、抗マウスＣＴＬＡ－４－ＡＰＣ（クローンＵＣ１０－４Ｂ９）ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ カタログ番号１０６３１０、抗マウスＫｌｒｇ１－ＡＰＣ（クローン２Ｆ１）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５６１６２０、抗マウスＣＤ６２Ｌ－ＢＵＶ３９５（クローンＭＥＬ－１４）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号７４０２１８、抗マウスＴＩＭ３－ＰＥ（クローン５Ｄ１２）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５６６３４６、抗マウスＩＣＯ

Ｓ－ＢＶ６０５（クローン７Ｅ．１７Ｇ９）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号７４５２５４、抗マウスＣＤ４４－ＡＰＣ－Ｃｙ７（クローンＩＭ７）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５６０５６８、抗マウスＫｉ６７－Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ７００（クローンＢ５６）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５６１２７７、抗ヒトグランザイムＢ－Ｒ７１８（クローンＧＢ１１）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５６６９６４、抗マウスＴｂｅｔ－ＢＶ７１１（クローンＯ４－４６）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５６３３２０、抗マウスＦｏｘＰ３－ＰｅＣｙ７（クローンＦＪＫ－１６ｓ）Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ カタログ番号１７－５７７３－８２、抗マウスＩＦＮｇ－ＰｅＣｙ７（クローンＸＭＧ１．２）ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ カタログ番号５０５８２６、抗マウスＴＮＦａ－Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ７００（クローンＭＰ６－ＸＴ２２）ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号５５８０００、ペンタマーＨ－２Ｌｄ－ＳＰＧＡＡＧＹＤＬ－Ｒ－ＰＥ（Ｓ９Ｌ８）ＰｒｏＩｍｍｕｎｅ、ペンタマーＨ－２Ｌｄ－ＴＰＨＰＡＲＩＧＬ－Ｒ－ＰＥ（対照）ＰｒｏＩｍｍｕｎｅ、デキストラマーＨ－２Ｌｄ－ＳＰＳＹＶＹＨＱＦ－ＡＰＣ（ＡＨ－１）Ｉｍｍｕｄｅｘ、デキストラマーＨ－２Ｌｄ－ＴＰＨＰＡＲＩＧＬ－ＡＰＣ（対照）Ｉｍｍｕｄｅｘ。

【０２７０】

二次抗体：ヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）ペルオキシダーゼＪａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ カタログ番号１１５－０３５－００３、ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）ペルオキシダーゼＪａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ カタログ番号１０９－０３５－００３、ヤギ抗ヒトＩｇＧ、Ｆｃフラグメント特異的ＡＰＣ Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ カタログ番号１０９－１３６－０９８、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＡＰＣ Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ カタログ番号１０９－１３６－０８８、ヤギ抗ヒトカッパ軽鎖ＨＲＰ Ｂｅｔｈｙｌ カタログ番号Ａ８０－１１５Ｐ、ヤギ抗マウスラムダ軽鎖ＨＲＰ Ｂｅｔｈｙｌ カタログ番号Ａ９０－１２１Ｐ、ヤギ抗マウスＩｇＧ－ＡＰＣ Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ カタログ番号１１５－１３６－１４６、抗Ｈｉｓ ＭＡｂ、（クローンＡＤ１．１．１０）Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ カタログ番号ＭＡＢ０５０、抗Ｈｉｓ－ＨＲＰ（クローンＡＤ１．１．１０）Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ カタログ番号ＭＡＢ０５０Ｈ。

【０２７１】

インビボ実験に使用した市販の抗体：抗マウスＣＤ８（クローン５３．６．７２）ＢｉｏＸＣｅｌｌ カタログ番号ＢＰ０００４－１、抗マウスＣＤ４（クローンＧＫ１．５）ＢｉｏＸＣｅｌｌ カタログ番号ＢＥ０００３－１、抗マウスＰＤ１（クローン２９Ｆ．１Ａ１２）ＢｉｏＸＣｅｌｌ カタログ番号ＢＥ０２７３、抗トリニトロフェノールｒＩｇＧ２ａアイソタイプ対照（クローン２Ａ３）ＢｉｏＸＣｅｌｌ カタログ番号ＢＥ００８９、抗マウスＣＴＬＡ－４（クローン９Ｈ１０）ＢｉｏＸＣｅｌｌ カタログ番号ＢＥ０１３１、抗マウスＰＤ１（クローンＲＭＰ１－１４）ＢｉｏＸＣｅｌｌ カタログ番号ＢＥ０１４６。

【０２７２】

ｎ－ＣｏＤｅＲファージディスプレイライブラリから単離された、社内で産生された抗マウス及び抗ヒト抗体。抗マウスＣＴＬＡ－４（クローン５－Ｂ０７）及び抗ヒトＣＴＬＡ－４（クローン４－Ｅ０３）が本明細書に記載されている。

【０２７３】

ＲＮＡ配列

実験手順。ＣＴ２６腫瘍細胞を、１群当たり１０匹のＢＡＬＢ／ｃマウスに移植した。移植の約１週間後、腫瘍体積が２０～５０ｍｍ^{3}に到達したとき（０日目として定義される）、マウスを、処理されなかったか、又はＤ０及びＤ２において、５０μＬ中の10^7ｐｆｕ ｉ．ｔ．によって、非アーム化ワクシニアウイルス（ＶＶ空）若しくはVV_{GM}－αＣＴＬＡ４のいずれかを用いて２回処理した。４日目に腫瘍を採取し、ＱｉａｇｅｎｋｉｔＲＮｅａｓｙプラスミニキットを用いてＲＮＡを抽出した。その後の品質評価の日

まで、試料を－８０℃で保存した。Ａｇｉｌｅｎｔ ＲＮＡ ６０００ Ｎａｎｏ Ｋｉｔ、Ａｇｉｌｅｎｔ ２１００ Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ Ｓｙｓｔｅｍ、２１００ Ｅｘｐｅｒｔ Ｓｏｆｔｗａｒｅを使用して、精製されたＲＮＡの品質を評価して、ＲＮＡフラグメントの少なくとも２５％がその後の３’ｍＲＮＡ配列決定に必要とされる２００ｎｔより長い（ＤＶ２００＞２５％）ことを確実にした。鎖特異的ライブラリを調製し、両末端をＩｎｔｅｇｒａＧｅｎ（Ｆｒａｎｃｅ）によって配列決定し（ペアエンド配列決定）、１００ｎｔ長のリードの対を得た。

【０２７４】

データ分析。対のリードを、カスタムバイオインフォマティクスパイプラインによって処理した。簡潔に述べると、固有分子識別子（unique molecular identifier、ＵＭＩ）配列をリード１から抽出し、捕捉されたＲＮＡフラグメントの３’末端の配列をリード２から抽出した。品質ベースのトリミング及び品質管理の後、リード２を、ＳＴＡＲ（Ｄｏｂｉｎ ｅｔ ａｌ．，２０１３）を用いて、Ｍｕｓ ｍｕｓｃｕｌｕｓ完全ゲノム（ｍｍ１０アセンブリ）、加えて人工染色体外としてのＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４ゲノムを含有するカスタムゲノムに対してマッピングした。次いで、一組のツールであるＵＭＩツール（Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，２０１７）からのプログラムｄｅｄｕｐを方法「ユニーク」とともに使用して、リードを重複排除した。最後に、重複排除されたリードを、ＨＴＳｅｑカウントを使用して定量化した（Ａｎｄｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，２０１５）。次いで、１つの試料当たりのリードカウントデータを、ＤＥＳｅｑ２（Ｌｏｖｅ ｅｔ ａｌ．，２０１４）を使用して正規化し、遺伝子は、２つの条件間の倍数変化が２を超え、調整されたｐ値が０．１未満である場合、差次的に発現されたとみなされた（多重検定のためのＢｅｎｊａｍｉｎｉ－Ｈｏｃｈｂｅｒｇ補正）。遺伝子オントロジー（Gene Ontology、ＧＯ）濃縮分析を、Ｒ ｐａｃｋａｇｅ ｃｌｕｓｔｅｒＰｒｏｆｉｌｅｒからの機能ｅｎｒｉｃｈＧＯ（Ｙｕ ｅｔ ａｌ．，２０１２）を用いて、上方制御又は下方制御された、上記で定義されたように差次的に発現された遺伝子のセットを使用して行った。

【０２７５】

腫瘍Ｔｒｅｇ関連受容体に特異的なＴｒｅｇ枯渇抗体の単離

腫瘍Ｔｒｅｇ細胞関連受容体に特異的な抗体を、本質的に以前に記載された腫瘍担持マウスからのＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞枯渇ナイーブ細胞及びＣＤ１１ｂ$^{+}$細胞に対する、腫瘍関連Ｔｒｅｇ細胞（ＣＴ２６、４Ｔ１、Ｂ１６、及びＬｅｗｉｓ肺腫瘍担持マウスから単離された）の差次的バイオパニングに、インビトロＣＤＲシャッフルｎ－Ｃｏｄｅｒ（登録商標）ライブラリを供することによって単離した（Ｖｅｉｔｏｎｍａｋｉ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。

【０２７６】

ＣＴＬＡ－４ ｍＡｂ産生

ヒト／マウスＣＴＬＡ－４に対する抗体フラグメントを、ｎ－Ｃｏｄｅｒ（登録商標）ｓｃＦｖファージディスプレイライブラリから単離した。特異的ＣＴＬＡ－４抗体の濃縮は、ストレプトアビジンダイナビーズ又はポリスチレンボール上に装填されたビオチン化ｈ／ｍＣＴＬＡ－４－Ｈｉｓタンパク質（Ｓｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）を使用した３回の連続パニングによって達成した。第３の選択ラウンドはまた、ｈ／ｍＣＴＬＡ－４の細胞外及び膜貫通領域又は無関係な非標的タンパク質をコードするｃＤＮＡ（Ｓｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）で一過的にトランスフェクトされた懸濁適合ＨＥＫ２９３－ＥＢＮＡ細胞を含んだ。ビオチン化非標的タンパク質を用いた各選択の前に予備選択を行った。結合ファージは、トリプシン消化によって各選択ラウンド後に溶出し、標準的な手順を使用してプレート上で増幅した。選択３からのファージミドをｓｃＦｖ産生フォーマットに変換し、可溶性（組換えタンパク質）及び細胞結合抗原（一過性トランスフェクト細胞）への特異的結合を評価する、後続のスクリーニングアッセイにおいて使用した。市販の抗体を、フローサイトメトリー、蛍光マイクロアレイ技術（fluorescence microarray technology、ＦＭＡＴ）、及びＥＬＩＳＡによって、組換え及び表面結合ヒト（Ｙ

ｅｒｖｏｙ、Ｂｒｉｓｔｏｌ　Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ；抗ヒトＡＰＣ、Ｊａｃｋｓｏｎ）、及び抗マウスＣＴＬＡ－４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）ＣＴＬＡ－４の評価のために使用した。対応するアイソタイプ対照を、全ての実験において陰性対照として含めた。ｓｃＦｖの一次スクリーニングのために、ｈ／ｍＣＴＬＡ－４トランスフェクト細胞をＦＭＡＴプレートに播種した。Ｅ．ｃｏｌｉ発現ｓｃＦｖを添加し、続いて脱グリコシル化マウス抗Ｈｉｓ抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）及び抗マウスＡＰＣ（Ｊａｃｋｓｏｎ）を添加した。染色された細胞を、８２００検出システム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて検出した。一次スクリーニングからの陽性クローンを再発現させ、トランスフェクト細胞及び組換えタンパク質への結合についてＥＬＩＳＡで再試験した。ＥＬＩＳＡのために、Ｅ．ｃｏｌｉ発現ｓｃＦｖを、ｈ／ｍＣＴＬＡ－４又は非標的タンパク質でコーティングしたプレートに添加した。結合したｓｃＦｖを、抗ＦＬＡＧ－ＡＰ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）、続いて基質添加（ＣＤＰ－ｓｔａｒ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、及び発光読み取り（Ｔｅｃａｎ　Ｕｌｔｒａ）を使用して検出した。

【０２７７】

合計で４２個及び３１個のユニーククローンを、それぞれｈＩｇＧ１及びｍＩｇＧ２ａバリアントに変換した。ＶＨ及びＶＬをＰＣＲ増幅し、それぞれ抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域を含有する発現ベクターに挿入し、懸濁適合ＨＥＫ　２９３ＥＢＮＡ細胞（ＡＴＣＣ）にトランスフェクトした。トランスフェクションの６日後に培養培地を採取し、標準的な手順に従って、ＡＫＴＡ　Ｐｕｒｉｆｉｅｒシステムに接続された、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を充填したカラムを使用して抗体を精製した。抗体を低ｐＨ緩衝液で溶出し、次いで、最終滅菌濾過の前に、Ｓｐｅｃｔｒａ／ＰｏｒＤｉａｌｙｓｉｓ　Ｍｅｍｂｒａｎｅ　４（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ）を使用して適切な製剤緩衝液に透析した。

【０２７８】

抗体純度は、ＣＥ－ＳＤＳ（ＬａｂＣｈｉｐ　ＸＩＩ、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ、Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ、ＵＳＡ）及びＳＥ－ＨＰＬＣ（Ｕｌｔｉｍａｔｅ　３０００、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によって評価した。Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｐｈａｒｍａｃｏｐｏｅｉａ　２．６．１４、現行版、細菌内毒素、「方法Ｄ．発色速度論的方法」に適合させたＣｈｒｏｍｏｇｅｎｉｃ　ＬＡＬ－Ｅｎｄｏｃｈｒｏｍｅ－Ｋキット（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）を用いて決定したところ、全ての調製物は、エンドトキシンが低かった（＜０．１ＥＵ／ｍｇタンパク質）。

【０２７９】

次いで、精製されたＩｇＧを、トランスフェクトされたＨＥＫ細胞、及び初代細胞、並びに組換えタンパク質への結合について、ＥＬＩＳＡ及びＢｉａｃｏｒｅの両方において評価した。

【０２８０】

表面プラズモン共鳴

組換えタンパク質への結合も、Ｂｉａｃｏｒｅ　３０００を使用して、表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance、ＳＰＲ）技術で試験した。抗ヒトＦｃ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を捕捉抗体として、３３０ｎＭの濃度でＣＭ５センサーチップ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）上に固定化した。４－Ｅ０３及びイピリムマブの最適濃度を、組換えタンパク質とともに、予備試験で評価して、良好な曲線フィッティングを得て、物質移動を制限した。抗体（この特定の実験では５ｎＭ）を１０μｌ／分で１分間添加し、続いて滴定濃度（４－Ｅ０３については１．６～５０ｎＭ及びイピリムマブについては１．６～２００ｎＭ）のヒトＣＴＬＡ－４タンパク質（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）を３０μｌ／分で３分間添加した。各サイクルの間に、１０ｍＭのグリシン、ｐＨ１．５で表面を再生した。

【０２８１】

細胞トランスフェクション

ヒト及びマウス（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）ＣＴＬＡ－４をコードするｃＤＮ

Ａを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、懸濁適合２９３ＦＴ細胞（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）２９３発現培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）において、３７℃、５％ＣＯ２、１２０ｒｐｍで４８時間培養した。フローサイトメトリーを用いて、標的発現を分析した。

【０２８２】

データ利用可能性

この論文で報告されたＲＮＡｓｅｑデータに割り当てられた受託番号は、ＧＥＯ：ＧＳＥ１７６０５２である。

【０２８３】

定量化及び統計分析

全ての統計分析は、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ ９．０（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｉｎｃ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）を使用して行った。スチューデントｔ検定又は一元配置ＡＮＯＶＡを用いて、ｐ値を計算した。人道的エンドポイントまでの生存を、ログランク検定による有意性についての分析を用いるカプラン－マイヤー法を使用してプロットした。ｐ＜０．０５のとき、有意性を認めた。

【０２８４】

結果

Ｔｒｅｇ枯渇抗ＣＴＬＡ－４抗体の識別及び特徴付け

免疫チェックポイント遮断及び抗ＣＴＬＡ－４抗体療法は、臨床的に検証されたアプローチであるが、抗ＣＴＬＡ－４抗体効力の根底にある機構は、完全に特徴付けられていない。外来抗原発現細胞及び腫瘍細胞の効果的なＴ細胞媒介性認識及び除去を可能にしながら、自己抗原に対する寛容を維持する際のＣＴＬＡ－４の中心的役割は、十分に確立されている（Ｌｅａｃｈ ｅｔ ａｌ．，１９９６、Ｔｉｖｏｌ ｅｔ ａｌ．，１９９５、Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，１９９５）。データの蓄積は、抗ＣＴＬＡ－４抗体が、Ｔ細胞が腫瘍抗原を認識し、腫瘍を拒絶する閾値を低下させるように作用することの他に、ＦｃγＲ発現エフェクタ細胞との抗体相互作用後の腫瘍内Ｔｒｅｇ細胞の枯渇を介して治療活性を発揮し得ることを示唆している（Ｐｅｇｇｓ ｅｔ ａｌ．，２００９、Ｓｉｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２０１３）（Ｉｎｇｒａｍ ｅｔ ａｌ．，２０１８）。これと一致して、最近のデータは、イピリムマブを含む抗ＣＴＬＡ－４抗体の効力におけるＦｃγＲ及びＴｒｅｇ枯渇の役割を示した（Ａｒｃｅ Ｖａｒｇａｓ ｅｔ ａｌ．，２０１８）。

【０２８５】

標的に依存しないＦ．Ｉ．Ｒ．Ｓ．Ｔ（商標）発見プラットフォーム（Ｖｅｉｔｏｎｍａｋｉ ｅｔ ａｌ．，２０１３）を使用して、本発明者らは、Ｔ細胞炎症性ＣＴ２６マウス腫瘍モデルにおいて、Ｔｒｅｇ細胞を枯渇させ、生存を改善することができる一連の抗体及びそれらの関連する標的を識別した（データは示さず、図１Ａ及び図Ｂ）。これらの中でもＣＴＬＡ－４及び抗ＣＴＬＡ－４抗体が識別され、抗ＣＴＬＡ－４ ｍＩｇＧ２ａ ｍＡｂは、腫瘍内Ｔｒｅｇ細胞を枯渇させ、同系ＣＴ２６腫瘍を担持する動物の処理時に生存を与えた（図１Ａ）。ヒトＣＴＬＡ－４特異的ＩｇＧ１抗体の集中的スクリーニングにより、ＣＴＬＡ－４発現ヒトＴ細胞の同様のインビトロ枯渇活性を有するいくつかのクローンが識別された（図１Ｃ）。１つのクローン（４－Ｅ０３）は、複数のドナーにわたってスクリーニングされた場合、他のクローンと比較して、その一貫してより強いＣＴＬＡ－４$^{+}$Ｔ細胞枯渇効力に基づいて際立っていた（図１Ｃ）。このクローンの明らかにより強い枯渇活性のインビボ関連性を調査するために、本発明者らは、ヒトＰＢＭＣがＮＯＤ ＳＣＩＤ ＩＬ－２Ｒガンマ－／－（ＮＯＤ ＳＣＩＤ ＩＬ－２Ｒ ｇａｍｍａ、ＮＳＧ）マウスに移植されるモデルに目を向けた。移植片対宿主型の相互作用のために、ヒトＴｒｅｇ及びＣＤ８＋Ｔ細胞は、強く活性化され、ヒト腫瘍において観察されるものと比較して、同様の共刺激性及び共抑制性発現を示す（Ｂｕｃｈａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１８）（図９Ａ）。ＮＯＧ－ｈＰＢＭＣ ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$ＣＤ１２７^{低}Ｔｒｅ

ｇ及びＣＤ８＋Ｔ細胞の分析は、実際に、９人の卵巣がん患者から得られたＴ細胞で観察されたものと同様のＣＴＬＡ－４発現レベルを明らかにした（図９Ａ）。更に、ＮＯＧ－ｈＰＢＭＣマウスに１０ｍｇ／ｋｇのイピリムマブ又は追加の抗ＣＴＬＡ－４抗体クローン（２－Ｃ０６及び２－Ｆ０９）を投与すると、ヒトＣＤ４＋ＣＤ２５＋ＣＤ１２７低Ｔｒｅｇ細胞の同様のインビボ枯渇活性が実証された（図１Ｄ）。しかしながら、４－Ｅ０３は、ヒトＴｒｅｇ細胞の著しくより大きな枯渇を誘発した。重要なことに、Ｔｒｅｇ細胞と比較して、腫瘍内及びＮＯＧ－ｈＰＢＭＣ　ＣＤ８ＮＯＧ－ｈＰＢＭＣ　ＣＤ８＋Ｔ細胞上のＣＴＬＡ－４のより低い発現と一致して（図９Ａ）、４－Ｅ０３は、ヒト活性化ＣＤ８＋Ｔ細胞の枯渇を示さなかった（図１Ｄ）。４－Ｅ０３抗体調製物の生化学的特徴付け、特にＨＰＬＣ－ＳＥＣ分析は、９５％超の単量体ＩｇＧを示し（データは示さず）、４－Ｅ０３増強Ｔｒｅｇ枯渇が抗体の凝集から生じたことを除外した。本発明者ら及び他の観察と一致して、抗ＣＴＬＡ－４　ｍＡｂ　Ｔｒｅｇ枯渇は、抗体Ｆｃ：ＦｃγＲ相互作用に依存することが示された。４－Ｅ０３のＦｃγＲ結合障害バリアント（ＩｇＧ１Ｎ２９７Ｑ）は、ＷＴ　ＦｃγＲ堪能ＩｇＧ１と比較して、Ｔｒｅｇ枯渇の重度の障害を示した（図９Ｂ）。

【０２８６】

これらの知見は、４－Ｅ０３がＣＴＬＡ－４上の機能的に異なるエピトープに結合することを示した。したがって、本発明者らは、イピリムマブ及び他の抗ＣＴＬＡ－４抗体と比較した４－Ｅ０３の結合及びリガンド遮断活性を特徴付けた。全ての抗体は、ヒトＣＴＬＡ－４の細胞外ドメインに対して高い特異性を示し、ＥＬＩＳＡによって、その密接に関連するヒトホモログＣＤ２８への観察可能な結合はなかった（図１Ｅ）。４－Ｅ０３及びイピリムマブは、同様の有効性及び効力でｈＣＴＬＡ－４と結合したが（図１Ｅ及び図９Ｃ）、４－Ｅ０３のみが、マウスＣＴＬＡ－４と弱いが明らかな交差反応性を示した（図１Ｅ）。これらの知見は、２つの抗体が異なるエピトープに結合することと一致する。

【０２８７】

インビトロ活性化ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞上で内因的に発現したＣＴＬＡ－４への結合（図９Ｄ及び図１Ｆ）、Ｂ７：ＣＴＬＡ－４相互作用の遮断（図１Ｇ）、又はＢ７：ＣＴＬＡ－４媒介性Ｔ細胞抑制の抑制（図１Ｈ）を評価する、４－Ｅ０３及びイピリムマブの更なる比較分析は、他の点ではほぼ同一の効力及び有効性を明らかにした。結論として、結果は、４－Ｅ０３が、機能的に異なるＣＴＬＡ－４エピトープに結合することを示し、これは、より強いＴｒｅｇ枯渇に関連するが、Ｂ７：ＣＴＬＡ－４の同等の遮断は、イピリムマブによって標的とされるエピトープに対するＴエフェクタ細胞抑制を誘導した。

【０２８８】

４－Ｅ０３は、マウスＣＴＬＡ－４と弱くしか交差反応しなかったので（図１Ｅ）、本発明者らは、次に、免疫能力のあるマウス腫瘍モデルにおけるインビボ概念実証研究のための適切な代理を識別するためのスクリーニングに焦点を当てた。ヒト設定における４－Ｅ０３と比較して、マウスＣＴＬＡ－４トランスフェクトＣＨＯ細胞（図１Ｉ）及びマウスＣＴＬＡ－４タンパク質（図９Ｅ）への高度に特異的な結合、Ｂ７：ＣＴＬＡ－４相互作用の遮断（図１Ｊ）、並びに腫瘍内マウスＴｒｅｇの同様の強い枯渇（図１Ｋ）を示した１つのクローン（５－Ｂ０７）が識別された。更に、抗ｍＣＴＬＡ－４（５－Ｂ０７）は、抗腫瘍活性を付与し、ＣＴ２６腫瘍担持ＢＡＬＢ／ｃマウスの生存を改善した（図１Ｌ）。ヒト細胞上の抗ｈＣＴＬＡ－４（４－Ｅ０３）で観察されたように、マウスＴｒｅｇの抗ｍＣＴＬＡ－４（５－Ｂ０７）枯渇は、Ｆｃ：ＦｃγＲ相互作用に依存することが見出された。５－Ｂ０７のＦｃ：ＦｃγＲ結合堪能であるが、Ｆｃ：ＦｃγＲ結合障害ではないバリアントは、腫瘍内Ｔｒｅｇを枯渇させた（図９Ｆ）。

【０２８９】

同様の顕著なＴｒｅｇ枯渇活性は、ＣＴＬＡ－４に対するそれらの同様の高い特異性及びＣＴＬＡ－４：Ｂ７ファミリー相互作用の遮断活性と並んで、好適なＭｏＡ適合代理としての抗ｈＣＴＬＡ－４（４－Ｅ０３）及び抗ｍＣＴＬＡ－４（５－Ｂ０７）の治療可能性を示した。

【０２９０】
腫瘍選択的ＣＴＬＡ－４遮断及びＴｒｅｇ枯渇のための、抗体をコードする腫瘍溶解性ウイルスの操作
抗ＣＴＬＡ－４抗体療法の頻繁な副作用は、Ｔ細胞ホメオスタシス及び自己に対する寛容を維持するための中央チェックポイントとして作用するＣＴＬＡ－４の十分に確立された役割と一致する（Ｔｉｖｏｌ ｅｔ ａｌ．，１９９５、Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，１９９５）。しかし、Ｑｕｅｚａｄａらによる最近の研究は、腫瘍内Ｔｒｅｇ枯渇がイピリムマブ臨床活性に著しく寄与し得ること（Ａｒｃｅ Ｖａｒｇａｓ ｅｔ ａｌ．，２０１８）、及び腫瘍内送達されたＴｒｅｇ枯渇抗体がマウス腫瘍モデルにおいて実質的な抗がん活性をもたらし得ること（Ｆｒａｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，２０１３、Ｍａｒａｂｅｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，２０１３ｂ）を示した。それぞれ中央及び末梢区画において作用する抗ＣＴＬＡ－４のこの二重活性は、抗ＣＴＬＡ－４療法を腫瘍に局在化することが、抗ＣＴＬＡ－４効力を毒性から切り離すための魅力的な戦略であり得ることを示唆する。

【０２９１】
本発明者らは、Ｔｒｅｇ枯渇抗ＣＴＬＡ－４を発現するように操作された腫瘍内送達された腫瘍溶解性ウイルス（oncolytic virus、ＯＶ）が、有効であるが安全な腫瘍局在化抗ＣＴＬＡ－４療法を達成するための特に魅力的な手段を表すと仮定した。ＯＶは、腫瘍細胞の感染時に、局所抗体の産生及びＣＴＬＡ－４受容体の遮断、並びにＴＭＥにおけるＴｒｅｇ枯渇を可能にすることの他に、直接的及び間接的な抗がん活性の両方を発揮すると考えられており、がん免疫療法に対して承認されている（Ｂｏｍｍａｒｅｄｄｙ ｅｔ ａｌ．，２０１８）。

【０２９２】
したがって、本発明者らは、世界的な天然痘ワクチン接種プログラムにおいて観察された臨床的に証明された安全性及び強力な免疫調節効果、並びに免疫砂漠及び免疫排除がんのマウス実験モデルにおける細胞溶解性及び炎症性細胞浸潤誘導特性（Ｆｅｎｄ ｅｔ ａｌ．，２０１７Ｋｌｅｉｎｐｅｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１６、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，２０１７、Ｍａｒｃｈａｎｄ ｅｔ ａｌ．，２０１８）を有する、弱毒化コペンハーゲン株（Ｆｏｌｏｐｐｅ ｅｔ ａｌ．，２０１９）に由来するワクシニアウイルスベクターを、完全長抗ｈＣＴＬＡ－４又は抗ｍＣＴＬＡ－４ ＩｇＧ抗体配列を用いて操作した。ＧＭ－ＣＳＦ（ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４）を追加的にコードするバリアントベクター（図２Ａ）、骨髄造血及び先天性免疫細胞走化性の成長因子誘導因子及びエンハンサーも産生し、治療効力について評価した。

【０２９３】
遺伝子再構築後、組換え抗ＣＴＬＡ－４をコードするウイルスは、腫瘍細胞株に感染し、複製し（図２Ｂ）、溶解する（図２Ｃ）ことが確認された。操作された腫瘍溶解性ウイルスに感染した腫瘍細胞株は、組換え産生されたタンパク質と比較して、ＣＴＬＡ－４受容体への等効力結合（図２Ｇ）及びＧＭ－ＣＳＦ依存性ＴＦ－１細胞増殖の支持（図２Ｆ）を有する、完全長ＩｇＧ抗体及びＧＭ－ＣＳＦ導入遺伝子（図２Ｄ及び図２Ｅ）を産生することが更に示された。ＢＴ－００１感染ＭＩＡ－ＰａＣａ－２腫瘍細胞によって産生された４－Ｅ０３もまた、ヒトＴｒｅｇ細胞をインビボで枯渇させることが示された（図２Ｈ）。

【０２９４】
腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、腫瘍選択的ＣＴＬＡ－４受容体飽和及びＴｒｅｇ枯渇に関連する抗腫瘍活性を有する
ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４抗腫瘍活性は、Ｔ細胞によって高度に浸潤され、全身性抗ＣＴＬＡ－４抗体治療に対して感受性であることが知られているＣＴ２６ ＢＡＬＢ／ｃモデルにおいて最初に評価された（Ｇｒｏｓｓｏ ａｎｄ Ｊｕｒｅ－Ｋｕｎｋｅｌ，２０１３）。７．５×１０^{4}、７．５×１０^{5}、又は７．５×１０^{6}ｐｆｕのＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４によるＣＴ２６腫瘍担持動物への３回の腫瘍内注射は、用量依存的抗腫瘍効果を実

証し、これは、10^6～10^7ｐｆｕでピークに達し、１０匹中６～７匹の動物が治癒した（図３Ａ）。抗ＣＴＬＡ－４抗体及び／又はＧＭ－ＣＳＦ導入遺伝子を欠く対照ウイルスによる処理により、抗ＣＴＬＡ－４抗体に対する偏性依存（０／１０匹のマウスが生存）、及び治療効力についてＧＭ－ＣＳＦのわずかな抗ＣＴＬＡ－４増強効果（７／１０対５／１０匹のマウスが生存）が実証された。したがって、確立された用量依存的な、抗ＣＴＬＡ－４抗体依存的な、かつＧＭ－ＣＳＦ増強性の効果に基づいて、本発明者らは、１ｘ10^7ｐｆｕの腫瘍内送達される用量を使用して、二重導入遺伝子をコードするＯＶ（VV_{GM}－αＣＴＬＡ４）に対する治療及び機構的評価及び特徴付けを調査した。

【０２９５】

本発明者らは、次に、導入遺伝子をコードするワクシニアＯＶの腫瘍内投与後に、抗ＣＴＬＡ－４（図３Ｂ）、ＧＭ－ＣＳＦ（図１０Ａ）、及びウイルス粒子（図１０Ｂ）の腫瘍濃度及び全身濃度を評価した。$10^7$$VV_{GM}$－αＣＴＬＡ４感染性粒子の、同系マウス腫瘍担持免疫適格マウスへの腫瘍内注射は、血液ではなく、腫瘍のＣＴＬＡ－４発現細胞の持続的飽和に関連する腫瘍内抗体曝露をもたらした（図３Ｂ～図１Ｉ）。同様に、VV_{GM}－αｈＣＴＬＡ４の、ヒト腫瘍異種移植片担持免疫欠損マウスへのｉ．ｔ．投与は、血液と比較して、腫瘍において数桁高い抗体濃度を生じた（図１０Ｃ～図１０Ｅ）。全身区画ではなく腫瘍内で受容体飽和濃度を達成した（図３Ｂ）腫瘍内投与と一致して、VV_{GM}－αＣＴＬＡ４は、ＣＴ２６腫瘍担持ＢＡＬＢ／ｃマウスの脾臓において、腫瘍内Ｔｒｅｇ細胞のほぼ完全な枯渇をもたらしたが、Ｔｒｅｇ数に影響を及ぼさなかった（図３Ｃ）。

【０２９６】

まとめると、結果は、抗ＣＴＬＡ－４をコードするワクシニアウイルスの腫瘍内投与が、インビボでの腫瘍限定ＣＴＬＡ－４受容体飽和及びＴｒｅｇ枯渇を成功裡に達成することを実証し、その腫瘍選択的な抗ＣＴＬＡ－４の治療的性質を支持し、多様ながん実験モデルにおけるインビボ効力及び忍容性の試験を促した。

【０２９７】

VV_{GM}－αＣＴＬＡ４は、広範な抗腫瘍活性を有する

本発明者らは、高度にＴ細胞炎症性（ＣＴ２６）腫瘍微小環境から免疫排除（Ｂ１６）腫瘍微小環境を表す、異なる遺伝的マウスバックグラウンド（ＣＴ２６　ＢＡＬＢ／ｃ結腸、ＥＭＴ６　ＢＡＬＢ／ｃ乳房、ＭＣ３８　Ｃ５７ＢＬ／６結腸、及びＢ１６　Ｃ５７ＢＬ／６黒色腫、図４Ａ）上の異なる起源の血液がん（Ａ２０）及び固形がんに及ぶ免疫適格マウスがんモデルの範囲におけるｉ．ｔ．VV_{GM}－αＣＴＬＡ４の抗腫瘍活性の評価に進んだ。モデルは、抗ＣＴＬＡ－４又は抗ＰＤ－１を有するＩＣＢに対して感受性又は耐性のものを含んだ。

【０２９８】

驚くべきことに、多様な免疫炎症型の腫瘍微小環境を特徴とする確立された同系腫瘍を保有するＣ５７ＢＬ／６又はＢＡＬＢ／ｃマウスへのVV_{GM}－αＣＴＬＡ４のｉ．ｔ．投与は、動物の大部分（Ａ２０＝１０／１０、ＥＭＴ６＝８／１０、ＭＣ３８＝８／１０、及びＣＴ２６＝１０／１０匹の生存マウス）を治癒させた（図４Ａ）。同様に印象的なことに、免疫砂漠型のＴＭＥ並びに抗ＰＤ－１及び抗ＣＴＬＡ－４の両方に対する耐性を特徴とするＢ１６　Ｃ５７ＢＬ／６モデルにおいて、ｉ．ｔ．VV_{GM}－αＣＴＬＡ４は、腫瘍成長を著しく遅延させ、３／１０匹の動物を治癒させた。これらの結果は、多様な炎症性及び免疫排除型のＴＭＥを有する患者を含む多様ながん型におけるVV_{GM}－αＣＴＬＡ４の広範な治療可能性を示した。

【０２９９】

VV_{GM}－αＣＴＬＡ４による腫瘍内処理は、長期持続性全身性抗腫瘍免疫を誘導する

前臨床及び臨床研究により、腫瘍局在化がん免疫療法の治療可能性が実証されている。単独（Ａｎｄｔｂａｃｋａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５）で、又はＩＣＢと組み合わせた（Ｃｈｅｓｎｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１８、Ｒｉｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７）腫瘍内腫瘍溶解性ウイルス療法は、黒色腫がん患者において持続的な応答を誘導する。機構的

に、ｉ．ｔ．オンコウイルス療法は、注入された腫瘍への炎症性細胞浸潤を誘導又は増強し、腫瘍抗原提示の増加、流入領域リンパ節への遊走、及びプライミング後の遠隔（非注射）腫瘍病変へのＣＤ８＋Ｔ細胞輸送をもたらして、全身性抗腫瘍「アブスコパル」効果を発揮することが提案されている（Ｎｇｗａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１８）。がん患者は、転移した腫瘍、検出不可能な腫瘍、又は注射不可能な腫瘍を特徴とする広範な疾患を示し得るので、診療所において、全身性適応抗腫瘍記憶応答のそのような誘導は、重要となるであろう。

【０３００】

本発明者らは、多方面からのアプローチを使用して、ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４がアブスコパル効果及び全身性抗腫瘍免疫を誘導するかどうかを評価した。第１に、腫瘍細胞を各動物の左右の側腹部に皮下移植するが、一方の腫瘍のみにＯＶを注射し、他方を未治療のままにする「双子腫瘍モデル」を使用して、アブスコパル効果を評価し、注射していない腫瘍における腫瘍成長の減少として示すことができる。

【０３０１】

ＣＴ２６腫瘍担持マウスにおける最大限に効果的なＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４用量の腫瘍内注射は、注射された腫瘍の完全な拒絶（９／９）及び注射されていない腫瘍のほぼ完全な拒絶（７／９）をもたらし、強いアブスコパル効果を示した図４Ｂ）。ｉ．ｔ．ＯＶ投与の真のアブスコパル性質は、２倍確認された。第一に、注射された腫瘍から注射されていない腫瘍へのウイルス粒子拡散の潜在的な治療効果を除外するために、非注射腫瘍を分析し、ウイルス粒子について陰性であることを確認した（図１１Ａ）。

【０３０２】

第二に、双子腫瘍モデルを使用して、本発明者らは、局所（ｉ．ｔ．）又は全身（ｉ．ｖ．）投与されたＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４の最大限に効果的な用量（10^{7}ｐｆｕ）及び準最適用量（10^{5}ｐｆｕ）の抗腫瘍活性を比較した。真のアブスコパル効果と一致して、ｉ．ｔ．投与は、両方の試験用量でｉ．ｖ．投与と比較して生存の増強を付与した（図１１Ｃ）。実際に、10^{5}ｐｆｕのｉ．ｔ．投与は、非注射腫瘍の拒絶において、１００倍多いｉ．ｖ．注射用量と比較して少なくとも同程度に効果的であった（図１１Ｂ及び図１１Ｃ）。最後に、適応抗原特異的免疫応答に特徴的な免疫学的記憶を誘導するｉ．ｔ．ＯＶ投与と一致して、治癒した動物は、同じ腫瘍（ＣＴ２６）での再チャレンジに対して防御されたが、無関係な腫瘍（Ｒｅｎｃａ）では防御されなかった（図１１Ｄ）。

【０３０３】

ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、頑強な全身性ＣＤ８＋Ｔ細胞依存性抗腫瘍免疫を引き起こす

本発明者らは、ＣＤ４＋Ｔ細胞枯渇又はＣＤ８＋Ｔ細胞枯渇ＣＴ２６腫瘍担持マウスと比較して、免疫が損なわれていないＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４治療活性を評価することによって全身性抗腫瘍免疫応答の性質を調査した（図５Ａ及び図１３Ａ）。驚くべきことに、ＣＤ８＋Ｔ細胞枯渇はＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４を完全に排除した。ＣＤ４＜８１７２＞＋＜／８１７２＞Ｔ細胞枯渇により、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４効果は低減したが、除去されなかった。これらのデータは、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４抗腫瘍活性が、ＣＤ８＋Ｔ細胞に決定的に依存することを実証した。実証されたアブスコパル効果及び再チャレンジに対する腫瘍特異的防御の他に、結果は、腫瘍内送達されたＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４が、頑強な全身性ＣＤ８＋Ｔ細胞抗腫瘍免疫を誘導したことを強く示唆した。

【０３０４】

したがって、本発明者らは次に、ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４が、腫瘍及び末梢において腫瘍特異的及びウイルス特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を誘導又は拡大指せるかどうかを評価した。ＣＴ２６腫瘍担持ＢＡＬＢ／ｃマウスを、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４で腫瘍内処理するか、又は臨床的に利用可能な抗ＣＴＬＡ－４レジメンを模倣するために、抗ｍＣＴＬＡ－４　ｍＡｂ　５－Ｂ０７（３ｍｇ／ｋｇ）で全身（ｉ．ｐ．）処理した。腫瘍及び中心区画（脾臓）におけるＣＴ２６腫瘍特異的及びワクシニア特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を、２つのアプローチによって定量化した：ＣＴ２６腫瘍抗原（ＡＨ－１）特異的及びワクシニ

アウイルス特異的多量体を使用した、採取された脾臓における腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の直接定量、並びに脾細胞のエクスビボ刺激後のＩＦＮ－γ＋ＴＮＦ－α＋ＣＤ８＋Ｔ細胞（図５Ｂ）、又はそれぞれＣＴ２６由来腫瘍ペプチドＡＨ－１及びワクシニア由来ペプチドＳ９Ｌ８によるＴＩＬの評価。ＧＭ－ＣＳＦのみをコードするＰＢＳ又はＶＶによる処理を対照として含めた。予想通り、頑強な全身性ＣＤ８＋Ｔ細胞依存性抗腫瘍免疫を誘導する腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４と一致して、ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、脾細胞のエクスビボ刺激又はデキストラマー染色によって評価したところ、注射された腫瘍及び末梢（非注射腫瘍及び脾臓）区画の両方において腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を誘導した（図５Ｂ～図５Ｄ及び図１３Ｂ）。印象的には、ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、全身性抗ＣＴＬＡ－４と比較して、腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞をより効果的に拡大させた。ＰＢＳ又はウイルス欠損αＣＴＬＡ－４による対照処理は、いずれの読み出しによっても腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を誘導しなかった。興味深いことに、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４によるｉ．ｔ．処理はまた、少数ではあるがワクシニア特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を誘導した。

【０３０５】

まとめると、これらのデータは、腫瘍内ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、頑強な全身性ＣＤ８＋Ｔ細胞依存性抗腫瘍免疫を誘導した。

【０３０６】

腫瘍内で誘導されたＣＤ８＋Ｔ細胞抗腫瘍免疫は、ＦｃγＲ依存性であり、Ｔｒｅｇ枯渇と相関する

広範な抗腫瘍活性、腫瘍及び末梢における腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の強い拡大、並びにＴｒｅｇ細胞の腫瘍限定枯渇は、ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４による非常に有効かつ安全な処理を支持した。

【０３０７】

抗腫瘍免疫の根底にある抗体媒介性Ｔｒｅｇ枯渇の役割を更に評価及び確認するために、本発明者らは、ＣＴ２６腫瘍担持ＷＴ及び共通ガンマ鎖欠損（Ｆｃｅｒ１ｇ$^{-/-}$）ＢＡＬＢ／ｃマウスにおけるｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４の抗腫瘍効果を比較した。Ｆｃｅｒ１ｇ$^{-/-}$マウスは、機能的活性型Ｆｃガンマ受容体及び抗ＣＴＬＡ－４抗体インビボＴｒｅｇ枯渇を欠き、関連する抗がん活性は、活性化ＦｃγＲ依存性であることが以前に示されている（Ａｒｃｅ Ｖａｒｇａｓ ｅｔ ａｌ．，２０１８、Ｓｉｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。決定的にｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４抗腫瘍免疫の根底にある抗ＣＴＬＡ－４誘導性Ｔｒｅｇ枯渇と一致して、ＷＴ（１０／１０）は、それらのがんから完全に保護され、治癒したが、ＦｃγＲ欠損動物（３／１０）はそうではなかった（図６Ａ）。ＦｃγＲ欠損動物において観察された、限定されているが著しい抗腫瘍活性は、ウイルスベクター（図４Ａ）及びＣＴＬＡ－４：Ｂ７遮断は、それ自体、Ｔｒｅｇ枯渇の非存在下では（図９Ｆ及び図１２Ａ）、腫瘍成長を遅延させたが、限られた生存優位性のみに寄与したという、本発明者ら及び他の観察と一致した。

【０３０８】

抗体被覆標的細胞の免疫エフェクタ媒介性ＡＤＣＣ及びＡＤＣＰをもたらすことの他に、ＦｃγＲは、腫瘍抗原交差提示を促進することが示されており（ＤｉＬｉｌｌｏ ａｎｄ Ｒａｖｅｔｃｈ，２０１５）、通常排除されるＭＨＣＩＩ限定細胞外腫瘍抗原を包含するように、ＣＤ８＋Ｔ細胞抗腫瘍応答を拡大及び増強する。本発明者らの、ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４抗腫瘍免疫は、ＦｃγＲ依存性であり、腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のより頑強な拡大を誘導し、追加的にウイルス特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を誘導したという知見は、それが腫瘍抗原交差提示も促進し得ることを示した。この概念は、ウイルス骨格（ＶＶ）注射された及び未処理のＣＴ２６腫瘍担持マウスと比較した、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４注射されたマウスから採取した腫瘍の差次的遺伝子発現分析によって補強された（図６Ｂ及び図６Ｃ）。Ｂａｔｆのそれ自体を上方制御することの他に、差次的遺伝子分析は、抗原交差提示ｃＤＣ１樹状細胞に関連するＩ型ＩＦＮ応答及びＣＤ８αマーカーの上方制御を実証した。追加のシグネチャーは、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４抗腫瘍免疫の誘発及び

作動の根底にある、上記で特徴付けられたＣＤ８＋Ｔ細胞依存性の（かつ潜在的にＮＫ細胞媒介性グランザイム依存性の）腫瘍細胞溶解を支持した。

【０３０９】

ＶＶGM－αＣＴＬＡ４誘導性抗腫瘍免疫における抗原交差提示の役割を評価するために、本発明者らは、転写因子Ｂａｔｆ３を欠くマウス（Ｂａｔｆ３－／－マウス）を使用した。Ｂａｔｆ３－／－マウスは、ＣＤ８α＋樹状細胞を欠き、結果として、欠陥のある抗原交差提示、並びに感染中のウイルスに対する、及びがんのマウス実験モデルにおける腫瘍抗原に対するＣＤ８＋Ｔ細胞応答の重度の障害を示す（Ｈｉｌｄｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）。更に、ｃＤＣ１及び抗原交差提示は、αＣＴＬＡ－４を含む、免疫チェックポイント遮断薬の治療活性を媒介することが知られている（Ｇｕｂｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４）。したがって、本発明者らは、ＭＣ３８腫瘍を移植されたＢａｔｆ３＋／＋及びＢａｔｆ３－／－Ｃ５７ＢＬ／６マウスにおけるｉ．ｔ．ＶＶGM－αＣＴＬＡ４の抗腫瘍活性を比較した。驚くべきことに、Ｂａｔｆ３欠損は、９／９匹のＷＴマウス生存と比較して、０／８匹のＢａｔｆ３－／－によって実証されるように、ｉ．ｔ．ＶＶGM－αＣＴＬＡ４抗腫瘍免疫を無効にした（図６Ｄ）。

【０３１０】

まとめると、これらの結果は、ＶＶGM－αＣＴＬＡ４が、ＦｃγＲ依存性及びｃＤＣ１依存性抗腫瘍活性の両方を有し、主要な機構として腫瘍内で誘導されたＴｒｅｇ枯渇及び腫瘍抗原交差提示、並びに支持機構として腫瘍内ＣＴＬＡ－４：Ｂ７遮断及び腫瘍溶解を識別し、基礎的なｉ．ｔ．ＶＶGM－αＣＴＬＡ４は、ＣＤ８＋Ｔ細胞抗腫瘍免疫を誘導した。

【０３１１】

腫瘍内抗ＣＴＬＡ－４－ＶＶは、末梢エフェクタＣＤ８＋Ｔ細胞を拡大させ、Ｔｒｅｇ及び疲弊ＣＤ８＋Ｔ細胞を低減させる

本発明者らは、どのようにｉ．ｔ．ＶＶGM－αＣＴＬＡ４が、注射された腫瘍及び隣接する腫瘍、並びに末梢におけるＴＩＬ応答を調節するかを定性的に特徴付けることを進めた。マルチカラーフローサイトメトリー、並びに機能的に異なる抗腫瘍及び腫瘍促進性ＴＩＬサブセットを識別するように設計された高次元抗体パネルを使用して、処理群にわたる１２個のＴ細胞クラスターを識別した（図７及び図１３Ｃ）。際立って、ｉ．ｔ．ＶＶGM－αＣＴＬＡ４は、モック処理された動物と比較して、注射された腫瘍において、疲弊した（ＰＤ－１＋　ＴＩＭ－３＋）ＣＤ８＋Ｔ細胞を排除し、疲弊していないＫｌｒｇ１＋エフェクタＣＤ８＋Ｔ細胞を強く拡大させた（図７）。同時に、上記の知見と一致して、ｉ．ｔ．ＶＶGM－αＣＴＬＡ４は、は、高レベルのＣＴＬＡ－４を発現し、特に抑制性であることが知られているＫｌｒｇ１＋ＴｒｅｇをＣＴＬＡ－４＋腫瘍内Ｔｒｅｇを効果的に枯渇させた（Ｎａｋａｇａｗａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）（図７）。

【０３１２】

抗体をコードするウイルスを注射されなかった隣接遠位腫瘍の評価は、同様であるが、ｉ．ｔ．ＶＶGM－αＣＴＬＡ４によるＴＩＬのあまり顕著でない調節を明らかにした。更に、αＣＴＬＡ４をコードする腫瘍溶解性ウイルスの腫瘍内投与は、末梢において腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を拡大させた（図５Ｂ～図５Ｄ）という本発明者らの観察と一致して、ｉ．ｔ．ＶＶGM－αＣＴＬＡ４は、脾臓において活性化グランザイムＢ＋（Ｋｌｒｇ１＋）ＣＤ８＋Ｔ細胞サブセットを誘導した（図７Ａ）。最後に、腫瘍限定Ｔｒｅｇ枯渇を達成する、抗体をコードするウイルスと一致して、腫瘍床において枯渇したＴｒｅｇ集団は、ｉ．ｔ．ＶＶGM－αＣＴＬＡ４によって脾臓において大きく変化しなかった（図７Ａ）。

【０３１３】

腫瘍内抗ＣＴＬＡ－４－ＶＶを抗ＰＤ－１と組み合わせて、「冷たい」遠位腫瘍を拒絶する

本発明者の観察は、ＶＶGM－αＣＴＬＡ４が、主に抗ＣＴＬＡ－４　ｍＡｂ依存性腫瘍抗原交差提示及びＴｒｅｇ枯渇を含む機構によって、注射された腫瘍において局所的に

作用して、全身性適応抗腫瘍免疫及び頑強な末梢腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞拡大を「発火」させた。これらの知見は、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４が、ＣＤ８＋Ｔ細胞の腫瘍への動員を助ける治療剤と相乗作用する可能性があることを示した。抗ＰＤ－１は、主にＴ細胞疲弊の逆転によって（Ｈｕｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７、Ｗｅｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１８）、場合によっては幹様記憶ＣＤ８＋Ｔ細胞を腫瘍に動員することによって（Ｇａｌｌｅｔｔｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０、Ｓｉｍｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０）作用すると考えられている。抗ＰＤ－１が、異なる起源の複数の固形がんにおいて生存を改善できることが実証されているにもかかわらず、抗ＰＤ－１は、免疫浸潤が不十分な「冷たい腫瘍」を有する患者における転帰を改善せず（Ｇａｌｏｎ　ａｎｄ　Ｂｒｕｎｉ，２０１９）、これは、おそらく、今日のがん療法における最大の満たされていない医学的必要性を表す。

【０３１４】

したがって、それらの明らかに異なり、潜在的に相補的な作用機序に基づいて、本発明者らは、次に、モデル系としてＢ１６　Ｃ５７ＢＬ／６を使用して、ＩＣＢ耐性、免疫浸潤が不十分ながん、及び低免疫原性の「冷たい」がんに焦点を当てて、抗ＰＤ－１及びＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４の相乗作用を調べた。以前のデータは、Ｂ１６腫瘍が、抗ＰＤ－１（１０ｍｇ／ｋｇ）、抗ＣＴＬＡ－４（１０ｍｇ／ｋｇ）、又はそれらの組み合わせの臨床的に関連する全身投与を含み、ＩＣＢ療法に対して不応性であることを実証した（図１４）。

【０３１５】

触知可能な大きな腫瘍に抗体をコードするウイルスが注射されるが、小さい又は検出不可能な転移病変には注射できない臨床状況を模倣するために、本発明者らは、動物が１つの「大きな」腫瘍及び１つの「小さな」腫瘍を有し、大きな腫瘍のみにＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４をｉ．ｔ．注射した、双子腫瘍Ｂ１６／Ｃ５７ＢＬ６モデルを確立した。抗ＰＤ－１に対する耐性は、１０ｍｇ／ｋｇの最大限に効果的な用量による全身処理後の腫瘍成長抑制又は生存利益の欠如によって確認された（図８Ａ）。

【０３１６】

以前に観察されたように、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４による単剤処理は、原発性注射腫瘍の腫瘍成長を著しく低減させた（図４及び図８Ｂ）。しかしながら、ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、注射されていない腫瘍の成長のわずかな遅延を誘導しただけであり（図８Ｂ）、これは、動物の生存にはつながらなかった（図８Ａ）。驚くべきことに、その後、単剤又は抗ＰＤ－１と抗ＣＴＬＡ－４との併用処理とは対照的に、ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４及び全身性抗ＰＤ－１による併用処理は、注射された及び注射されていない腫瘍成長を著しく抑制し、担持する動物の約２０％が、この「冷たい」がんのＩＣＢ処理耐性モデルにおいて治癒した（図８Ａ）。

【０３１７】

更に、冷たい、ＩＣＢ耐性腫瘍を、炎症性、ＩＣＢ応答性の表現型に変換することができるＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４と一致して、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４による併用処理（しかし、抗ＰＤ－１単独ではない）は、Ｂ１６腫瘍へのＴ細胞の強い流入を誘導し、これは、炎症性ＣＴ２６腫瘍と比較して同様に密にＴ細胞リッチになった（図１４Ｃ）。

【０３１８】

これらは、組み合わせたｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４及び全身性抗ＰＤ－１の相乗効果が、同系Ａ２０腫瘍を移植したＢＡＬＢ／ｃマウスにおいて確認されたことを示した。このモデルは、抗ＰＤ－１に対して半応答性であることが示され、動物の約２０％が、完全処理ｉ．ｐ．投薬（１０ｍｇ／ｋｇ）によって治癒した（図８Ｃ）。ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４による最適な治療投薬は、完全に保護的であり（１０／１０匹の動物が治癒した、図４）、最適用量の１／１００での最適以下の処理は、著しくない腫瘍成長抑制を示し、生存優位性はなかった。治療用ｉ．ｐ．抗ＰＤ－１及び治療量以下のｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４を組み合わせたところ、動物の大部分（７／１０）が治癒した（図８Ｃ）。

【０３１９】
考察
本発明者らは、オンコウイルス的にコードされたＴｒｅｇ枯渇（Treg-depleting）αＣＴＬＡ－４が、承認された全身性αＣＴＬＡ－４レジメンと比較して、より強力かつ広範な抗腫瘍活性を有するが、その曝露の腫瘍限定性質を通して、安全であり、忍容性が良好であることが示されている。Ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、全身性組換えαＣＴＬＡ－４と比較して、腫瘍特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞のより強い拡大を誘導し、全身性αＣＴＬＡ－４及びαＰＤ－１による臨床的に関連する投与に耐性のある、免疫浸潤が不十分な「冷たい」同系マウス腫瘍モデルにおいて抗腫瘍活性を有した。注目すべきことに、本発明者らの観察は、注射された腫瘍における「免疫点火」効果に厳密に由来するオンコウイルスαＣＴＬＡ－４によって誘導された強力な全身性抗腫瘍免疫、ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４は、遠位の注射されていない腫瘍へのウイルス拡散又は抗体曝露と関連しなかったが、むしろ腫瘍限定ＣＴＬＡ－４受容体飽和及びＴｒｅｇ枯渇を達成したことを示唆した。
【０３２０】
これらの観察は、ｉ．ｔ．ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４の予想される臨床的効力及び忍容性の両方に重要な意味を有する。効力の観点から、本発明者らは、オンコウイルス的にコードされたαＣＴＬＡ－４が、利用可能な（イピリムマブ）、及びＴｒｅｇ枯渇最適化された（Ａｒｃｅ Ｖａｒｇａｓ，Ｆｕｒｎｅｓｓ ｅｔ ａｌ．２０１８）又は「マスクされた」（Ｇｕｔｉｅｒｒｅｚ，Ｌｏｎｇ ｅｔ ａｌ．２０２０）全身性αＣＴＬＡ－４抗体レジメンと比較して、並びに非Ｔｒｅｇ枯渇最適化αＣＴＬＡ－４をコードする以前に記載された腫瘍溶解性ウイルスアプローチ（Ａｒｏｌｄｉ，Ｓａｃｃｏ ｅｔ ａｌ．２０２０）と比較して、より大きな治療利益を提供し得ることを実証した。機構レベルでは、ＶＶ$_{GM}$－αＣＴＬＡ４誘導性ＦｃγＲ依存性Ｔｒｅｇ枯渇及びｃＤＣ１$^{+}$抗原交差提示は、観察された頑強なＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞増殖及び冷たい腫瘍を拒絶するためのαＰＤ－１による相乗作用の療法の根底にある。内因性抗腫瘍免疫応答の誘導を媒介すること（Ｈｉｌｄｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．２００８）及び全身性チェックポイント遮断療法の効力（Ｇｕｂｉｎ，Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．２０１４、Ｓａｌｍｏｎ，Ｉｄｏｙａｇａ ｅｔ ａｌ．２０１６、Ｇａｒｒｉｓ、Ａｒｌａｕｃｋａｓ ｅｔ ａｌ．２０１８）の他に、ｃＤＣ１は、腫瘍内ＣＤ８$^{+}$ＴＩＬの増殖応答を促進し、ＴＣＦ１$^{+}$幹様前駆体のプールを拡大し、αＰＤ－１療法中のＴＩＭ３$^{+}$端末エフェクタの産生を誘導する（Ｍａｏ，ｅｔ ａｌ．２０２１）。
【０３２１】
同様に、共刺激性受容体又は共抑制性受容体、例えば、ＩＬ－２Ｒ及びＣＴＬＡ－４に対するｍＡｂを用いて達成されたＴｒｅｇ枯渇は、ＣＤ８$^{+}$エフェクタ機能を促進し、αＰＤ－１と相乗作用し得る（Ｗｅｉ，ｅｔ ａｌ．２０１９、Ｓｏｌｏｍｏｎ，ｅｔ ａｌ．２０２０）。Ｔｒｅｇを低減させ、抗腫瘍ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を拡大させる「二重活性」免疫調節抗体の開発に関して、蓄積されたデータは、標的生物学、エフェクタＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞増強特性及びＴｒｅｇ枯渇特性の微調整の両方、並びに送達レジメンの重要性を実証する。例えば、最近、Ｔｒｅｇを枯渇させるが、重要な（ＩＬ－２媒介性）成長生存シグナル伝達のＣＤ８$^{+}$エフェクタＴ細胞を飢餓させない、ＩＬ－２Ｒに対するＦｃγＲ適格非リガンド遮断抗体は、リガンド遮断抗体αＩＬ－２Ｒ抗体と比較して、がん療法において優れた治療可能性を有することが実証された（Ｓｏｌｏｍｏｎ，ｅｔ ａｌ．２０２０）。
【０３２２】
同様に、しかし異なって、本発明者らは、４－１ＢＢに対する抗体が、抗体アイソタイプスイッチング（ＦｃγＲ結合を変化させる）によってＴｒｅｇを枯渇させるか又はエフェクタＴ細胞拡大を促進するように作製され得るが、両方の機構を利用することは、連続投与又はヒンジ操作を必要とすることを最近報告した（Ｂｕｃｈａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１８）。腫瘍溶解性ウイルス感染に関連して本明細書に記載されるように、注射された

腫瘍に対するＴｒｅｇ枯渇増強機能遮断抗ＣＴＬＡ－４の空間的制限は、単独で又は相乗作用するチェックポイント遮断療法、例えば、抗ＰＤ－１／Ｌ１と組み合わせて使用される場合、免疫調節抗ＣＴＬＡ－４抗体の最大治療活性を利用するための特に有望なアプローチであるように思われる。

【０３２３】

いくつかの観察は、腫瘍局在化療法のための抗ＣＴＬＡ－４におけるＴｒｅｇ枯渇の最適化を裏付ける。第一に、独立した研究により、抗ＣＴＬＡ－４の治療効力がＴｒｅｇ枯渇に依存し、Ｔｒｅｇ枯渇と相関することが確立されている（Ａｒｃｅ Ｖａｒｇａｓ ｅｔ ａｌ．，２０１８、Ｓｉｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。Ｔｒｅｇ枯渇抗ＣＴＬＡ－４クローンの治療活性に関する本明細書で提示されたデータは、ＦｃγＲ欠損（非枯渇）対応物と比較して、ＦｃγＲ能を有する（Ｔｒｅｇ枯渇）抗体Ｆｃフォーマット及び宿主において強い治癒効果を示し、この概念を裏付ける。第二に、イピリムマブで治療された黒色腫患者の臨床転帰は、ＦｃγＲ結合及びＴｒｅｇ枯渇と相関することが最近報告されたが、本発明者らのＴ細胞ヒト化マウスモデルからのデータは、イピリムマブが、腫瘍内に関連するレベルのＣＴＬＡ－４を発現するヒトＴｒｅｇ細胞に対して、本明細書におけるベクター化された抗ＣＴＬＡ－４抗体４－Ｅ０３と比較して、限定された枯渇活性を有することを示唆する。更に、イピリムマブの臨床的に許容される用量（適応及びレジメンに応じて１ｍｇ／ｋｇ～３ｍｇ／ｋｇ）は、亜飽和ＣＴＬＡ－４受容体占有率及び最大以下の効果（Ｒｉｂａｓ ｅｔ ａｌ．，２００５）（Ｂｅｒｔｒａｎｄ ｅｔ ａｌ．，２０１５）とのみ関連するが、本発明者らのデータは、腫瘍溶解性ベクター化及びｉ．ｔ．投与が、Ｔｒｅｇ枯渇増強抗ＣＴＬＡ－４を用いても、明らかに安全な様式で治療上最適な曝露（持続的なＣＴＬＡ－４受容体飽和）を生じさせることができることを実証する。最後に、Ｔｒｅｇ枯渇増強及びチェックポイント遮断「二重活性」αＣＴＬＡ－４抗体の本発明者らのベクター化を支持して、抗体媒介性ＣＴＬＡ－４遮断は、最近、腫瘍特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答の改善におけるＦｃγＲ依存性枯渇と相乗作用することが示された。ＣＴＬＡ－４の抗体遮断は、腫瘍内Ｔｒｅｇを機能的に不安定化させ、糖分解の変化及びＢ７リガンドに対する競合を含むプロセスを介して、Ｂ７：ＣＤ２８共刺激及び抗腫瘍性ＣＤ８$^{+}$Ｔエフェクタ機能を促進した（Ｚａｐｐａｓｏｄｉ，ｅｔ ａｌ．２０２１）。

【０３２４】

完全な治療投薬が腫瘍限定抗ＣＴＬＡ－４曝露を達成したという事実は、持続的な全身性Ｔｒｅｇ枯渇に関連する重度の毒性、例えば、ＦｏｘＰ３－ＤＴＲマウスモデルにおいて観察されたもの（Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，２００７）が現れそうにないことを示す。同様に、抗ＣＴＬＡ－４チェックポイント遮断効果は、腫瘍抗原特異性を有するＴＩＬに限定されるので、全身性抗ＣＴＬＡ－４に関連する不都合な自己反応性は、最小限であるはずである。対照的であるが、ＣＴＬＡ－４の十分に実証された中心的免疫チェックポイントの性質と一致して（Ｃｈａｍｂｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，１９９６、Ｌｅａｃｈ ｅｔ ａｌ．，１９９６）、全身投与に関連する抗ＣＴＬＡ－４副作用、すなわち、体全体の抗体曝露は、重度の自己免疫の性質のものであり得、致命的な結果を有し得る（Ｔｉｖｏｌ ｅｔ ａｌ．，１９９５、Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，１９９５）。

【０３２５】

したがって、総合すると、抗ＣＴＬＡ－４の効力及び忍容性は、これまで、抗ＣＴＬＡ－４ベースのレジメンの完全な治療用量の使用を妨げることに関連し、用量依存的であると考えられてきたが、これらの知見は、ベクター化されたＴｒｅｇ枯渇αＣＴＬＡ－４の空間的制限が、これらの現在の制限を克服することができ、効力を忍容性から切り離すことを強く示唆している。

【０３２６】

参考文献

１．Ｈｏｄｉ ＦＳ，Ｏ’Ｄａｙ ＳＪ，ＭｃＤｅｒｍｏｔｔ ＤＦ，Ｗｅｂｅｒ ＲＷ，Ｓｏｓｍａｎ ＪＡ，Ｈａａｎｅｎ ＪＢ，ｅｔ ａｌ．Ｉｍｐｒｏｖｅｄ ｓｕｒ

vival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med. 2010;363(8):711-23.
2. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. N Engl J Med. 2015;373(1):23-34.
3. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med. 2012;366(26):2443-54.
4. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, and Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. Cell. 2017;168(4):707-23.
5. Chen DS, and Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity. 2013;39(1):1-10.
6. Gajewski TF, Schreiber H, and Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. Nat Immunol. 2013;14(10):1014-22.
7. Wagner J, Wickman E, DeRenzo C, and Gottschalk S. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors: Bright Future or Dark Reality? Mol Ther. 2020;28(11):2320-39.
8. Ribas A, Dummer R, Puzanov I, VanderWalde A, Andtbacka RHI, Michielin O, et al. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. Cell. 2017;170(6):1109-19 e10.
9. Wei SC, Sharma R, Anang NAS, Levine JH, Zhao Y, Mancuso JJ, et al. Negative Co-stimulation Constrains T Cell Differentiation by Imposing Boundaries on Possible Cell States. Immunity. 2019;50(4):1084-98. e10.
10. Arce Vargas F, Furness AJS, Litchfield K, Joshi K, Rosenthal R, Ghorani E, et al. Fc Effector Function Contributes to the Activity of Human Anti-CTLA-4 Antibodies. Cancer Cell. 2018;33(4):649-63 e4.
11. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. N Engl J Med. 2015;372(21):2006-17.
12. Bertrand A, Kostine M, Barnetche T, Tr

uchetet ME, and Schaeverbeke T. Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: systematic review and meta-analysis. BMC Med. 2015;13:211.
13. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, and Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. Immunity. 1995;3(5):541-7.
14. Marabelle A, Kohrt H, and Levy R. Intratumoral anti-CTLA-4 therapy: enhancing efficacy while avoiding toxicity. Clin Cancer Res. 2013;19(19):5261-3.
15. Marabelle A, Kohrt H, Sagiv-Barfi I, Ajami B, Axtell RC, Zhou G, et al. Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors. J Clin Invest. 2013;123(6):2447-63.
16. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. Science. 1995;270(5238):985-8.
17. Leach DR, Krummel MF, and Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. Science. 1996;271(5256):1734-6.
18. Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, and Allison JP. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. J Exp Med. 2009;206(8):1717-25.
19. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. J Exp Med. 2013;210(9):1695-710.
20. Ingram JR, Blomberg OS, Rashidian M, Ali L, Garforth S, Fedorov E, et al. Anti-CTLA-4 therapy requires an Fc domain for efficacy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(15):3912-7.
21. Veitonmaki N, Hansson M, Zhan F, Sundberg A, Lofstedt T, Ljungars A, et al. A human ICAM-1 antibody isolated by a function-first approach has potent macrophage-de

pendent antimyeloma activity in vivo. Cancer Cell. 2013;23(4):502-15.
22. Buchan SL, Dou L, Remer M, Booth SG, Dunn SN, Lai C, et al. Antibodies to Costimulatory Receptor 4-1BB Enhance Anti-tumor Immunity via T Regulatory Cell Depletion and Promotion of CD8 T Cell Effector Function. Immunity. 2018.
23. Fransen MF, van der Sluis TC, Ossendorp F, Arens R, and Melief CJ. Controlled local delivery of CTLA-4 blocking antibody induces CD8+ T-cell-dependent tumor eradication and decreases risk of toxic side effects. Clin Cancer Res. 2013;19(19):5381-9.
24. Bommareddy PK, Shettigar M, and Kaufman HL. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. Nat Rev Immunol. 2018;18(8):498-513.
25. Foloppe J, Kempf J, Futin N, Kintz J, Cordier P, Pichon C, et al. The Enhanced Tumor Specificity of TG6002, an Armed Oncolytic Vaccinia Virus Deleted in Two Genes Involved in Nucleotide Metabolism. Mol Ther Oncolytics. 2019;14:1-14.
26. Kleinpeter P, Fend L, Thioudellet C, Geist M, Sfrontato N, Koerper V, et al. Vectorization in an oncolytic vaccinia virus of an antibody, a Fab and a scFv against programmed cell death -1 (PD-1) allows their intratumoral delivery and an improved tumor-growth inhibition. Oncoimmunology. 2016;5(10):e1220467.
27. Fend L, Yamazaki T, Remy C, Fahrner C, Gantzer M, Nourtier V, et al. Immune Checkpoint Blockade, Immunogenic Chemotherapy or IFN-alpha Blockade Boost the Local and Abscopal Effects of Oncolytic Virotherapy. Cancer Res. 2017;77(15):4146-57.
28. Liu Z, Ravindranathan R, Kalinski P, Guo ZS, and Bartlett DL. Rational combination of oncolytic vaccinia virus and PD-L1 blockade works synergistically to enhance therapeutic efficacy. Nat Commun. 2017;8:14754.
29. Marchand J-B, Semmrich M, Fend L, Tornberg U-C, Silvestre N, Frendeus B, et al. Society of Immunotherapy 33rd Annual meeting. National Harbour, MD: Journal of Cancer Therapy; 2018.

30. Grosso JF, and Jure-Kunkel MN. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. Cancer Immun. 2013; 13: 5.
31. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. J Clin Oncol. 2015; 33 (25): 2780-8.
32. Chesney J, Puzanov I, Collichio F, Singh P, Milhem MM, Glaspy J, et al. Randomized, Open-Label Phase II Study Evaluating the Efficacy and Safety of Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab Versus Ipilimumab Alone in Patients With Advanced, Unresectable Melanoma. J Clin Oncol. 2018; 36 (17): 1658-67.
33. Ngwa W, Irabor OC, Schoenfeld JD, Hesser J, Demaria S, and Formenti SC. Using immunotherapy to boost the abscopal effect. Nat Rev Cancer. 2018; 18 (5): 313-22.
34. DiLillo DJ, and Ravetch JV. Differential Fc-Receptor Engagement Drives an Anti-tumor Vaccinal Effect. Cell. 2015; 161 (5): 1035-45.
35. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, et al. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. Science. 2008; 322 (5904): 1097-100.
36. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Noguchi T, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. Nature. 2014; 515 (7528): 577-81.
37. Nakagawa H, Sido JM, Reyes EE, Kiers V, Cantor H, and Kim HJ. Instability of Helios-deficient Tregs is associated with conversion to a T-effector phenotype and enhanced antitumor immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016; 113 (22): 6248-53.
38. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. Science. 2017; 355 (6332): 1428-33.
39. Wei SC, Duffy CR, and Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. Cancer Discov. 2018; 8 (9)

:1069-86.
40. Simon S, Voillet V, Vignard V, Wu Z, Dabrowski C, Jouand N, et al. PD-1 and TIGIT coexpression identifies a circulating CD8 T cell subset predictive of response to anti-PD-1 therapy. J Immunother Cancer. 2020;8(2).
41. Galletti G, De Simone G, Mazza EMC, Puccio S, Mezzanotte C, Bi TM, et al. Two subsets of stem-like CD8(+) memory T cell progenitors with distinct fate commitments in humans. Nat Immunol. 2020;21(12):1552-62.
42. Galon J, and Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. Nat Rev Drug Discov. 2019;18(3):197-218.
43. Gutierrez M, Long GV, Friedman CF, Richards DA, Corr B, Bastos BR, et al. Anti-CTLA-4 probody BMS-986249 alone or in combination with nivolumab in patients with advanced cancers: Initial phase I results. Journal of Clinical Oncology. 2020;38(15_suppl):3058-.
44. Aroldi F, Sacco J, Harrington K, Olsson-Brown A, Nanclares P, Menezes L, et al. 421 Initial results of a phase 1 trial of RP2, a first in class, enhanced potency, anti-CTLA-4 antibody expressing, oncolytic HSV as single agent and combined with nivolumab in patients with solid tumors. Journal for ImmunoTherapy of Cancer. 2020;8(Suppl 3):A256-A7.
45. Garris CS, Arlauckas SP, Kohler RH, Trefny MP, Garren S, Piot C, et al. Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN-gamma and IL-12. Immunity. 2018;49(6):1148-61 e7.
46. Salmon H, Idoyaga J, Rahman A, Leboeuf M, Remark R, Jordan S, et al. Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. Immunity. 2016;44(4):924-38.
47. Mao T, Song E, and Iwasaki A. PD-1 blockade-driven anti-tumor CD8+ T cell immunity requires XCR1+ dendritic cells. bioRXIV. 2021.
48. Solomon I, Amann M, Goubier A, Vargas

FA, Zervas D, Qing C, et al. CD25-Treg-depleting antibodies preserving IL-2 signaling on effector T cells enhance effector activation and antitumor immunity. Nat Cancer. 2020;1(12):1153-66.
49. Wei SC, Anang NAS, Sharma R, Andrews MC, Reuben A, Levine JH, et al. Combination anti-CTLA-4 plus anti-PD-1 checkpoint blockade utilizes cellular mechanisms partially distinct from monotherapies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(45):22699-709.
50. Ribas A, Camacho LH, Lopez-Berestein G, Pavlov D, Bulanhagui CA, Millham R, et al. Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. J Clin Oncol. 2005;23(35):8968-77.
51. Zappasodi R, Serganova I, Cohen IJ, Maeda M, Shindo M, Senbabaoglu Y, et al. CTLA-4 blockade drives loss of Treg stability in glycolysis-low tumours. Nature. 2021;591(7851):652-8.
52. Kim JM, Rasmussen JP, and Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. Nat Immunol. 2007;8(2):191-7.
53. Chambers CA, Krummel MF, Boitel B, Hurwitz A, Sullivan TJ, Fournier S, et al. The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses. Immunol Rev. 1996;153:27-46.
54. Binyamin L, Alpaugh RK, Hughes TL, Lutz CT, Campbell KS, and Weiner LM. Blocking NK cell inhibitory self-recognition promotes antibody-dependent cellular cytotoxicity in a model of anti-lymphoma therapy. J Immunol. 2008;180(9):6392-401.
55. Chen T, Hoffmann K, Ostman S, Sandberg AS, and Olsson O. Identification of gliadin-binding peptides by phage display. BMC Biotechnol. 2011;11:16.
56. Huang AY, Gulden PH, Woods AS, Thomas MC, Tong CD, Wang W, et al. The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(18):9730-5.
57. Russell TA, and Tscharke DC. Striking

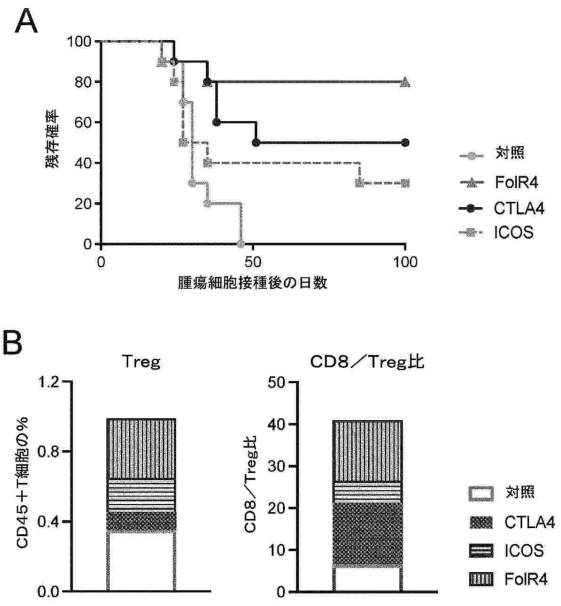
ly poor CD8+ T-cell immunogenicity of vaccinia virus strain MVA in BALB/c mice. Immunol Cell Biol. 2014;92(5):466-9.
58. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR:ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics. 2013;29(1):15-21.
59. Smith T, Heger A, and Sudbery I. UMI-tools:modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. Genome Res. 2017;27(3):491-9.
60. Anders S, Pyl PT, and Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics. 2015;31(2):166-9.
61. Love MI, Huber W, and Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 2014;15(12):550.
62. Yu G, Wang LG, Han Y, and He QY. clusterProfiler:an R package for comparing biological themes among gene clusters. OMICS. 2012;16(5):284-7.
63. Chan, W. M. and G. McFadden (2014). "Oncolytic Poxviruses." Annu Rev Virol 1(1):119-141.
64. Marino, N. et al. (2017). "Development of a versatile oncolytic virus platform for local intra-tumoural expression of therapeutic transgenes." PLoS One 12(5):e0177810.
65. McDermott, D. F. et al. (2018). "Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma." Nat Med 24(6):749-757.
66. Mosely, S. I. et al. (2017). "Rational Selection of Syngeneic Preclinical Tumor Models for Immunotherapeutic Drug Discovery." Cancer Immunol Res 5(1):29-41.
67. Tumeh, P. C. et al. (2014). "PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance." Nature 515(7528):568-571.
68. Bruni, D. et al. (2020). "The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy." Nature Rev Cancer 20:662-680.

69. Galon, J. et al. (2006). "Type, density and location of immune cells within human colorectal tumours predict clinical outcome." Science. 313: 1960-1964.
70. Fridman, W. H. et al. (2012). "The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome." Nature Rev Cancer 12: 298-306.
71. Fridman, W. H. et al. (2017). "The immune contexture in cancer prognosis and treatment." Nature Rev Clin. Oncol. 14: 717-334.
72. Hu, Z. et al. (2018). "Tumor-infiltrating CD45RO+ memory cells correlate with favorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma. J. Thorac. Dis. 10: 2089-2099.
73. Lanzi A. et al. (2020). "The consensus immunoscore: toward a new classification of colorectal cancer" OncoImmunology, 9: 1-3.
74. Angell, H. K. et al. (2020). "The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond." Clinical Cancer Research 26: 332-339.

【図面】

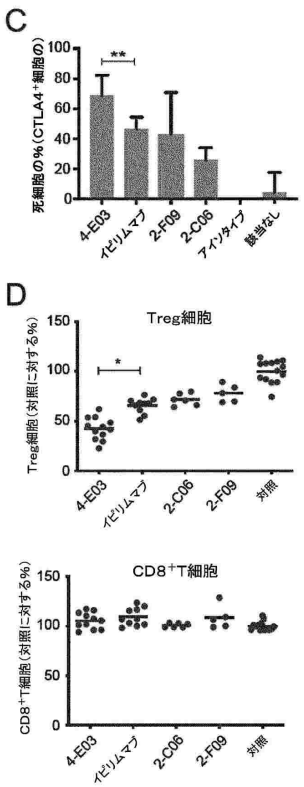
【図１－１】

図1-1



【図１－２】

図1-2



（続き）

【図１－３】

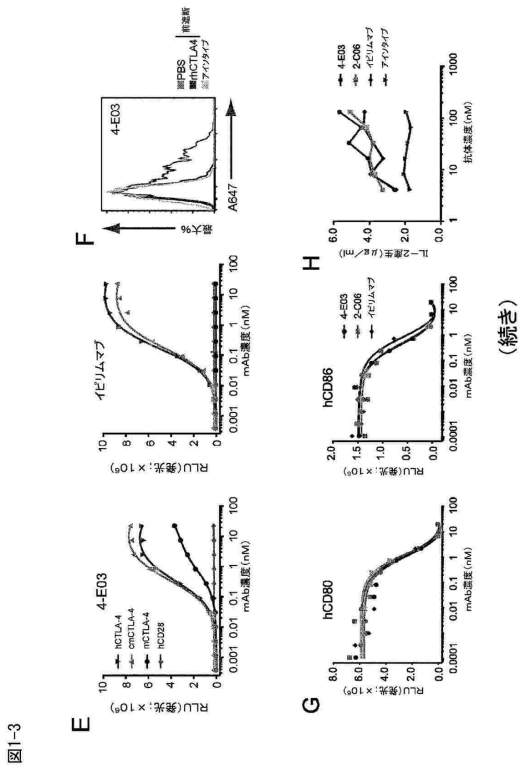


図1-3

【図１－４】

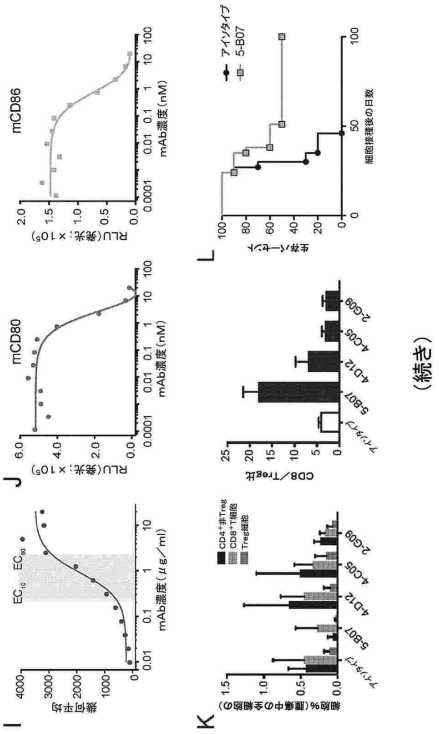
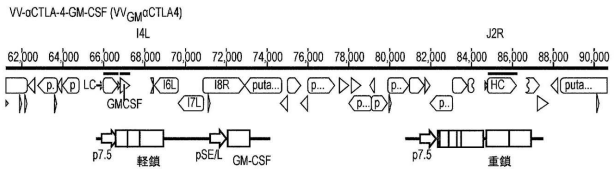


図1-4

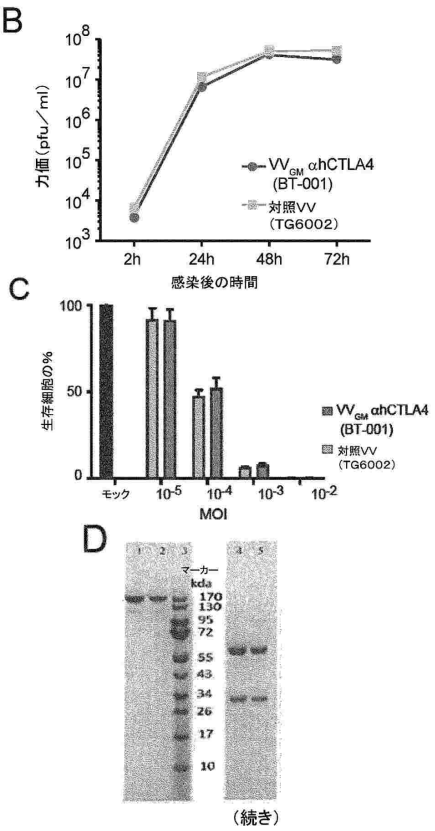
【図２－１】

図2-1



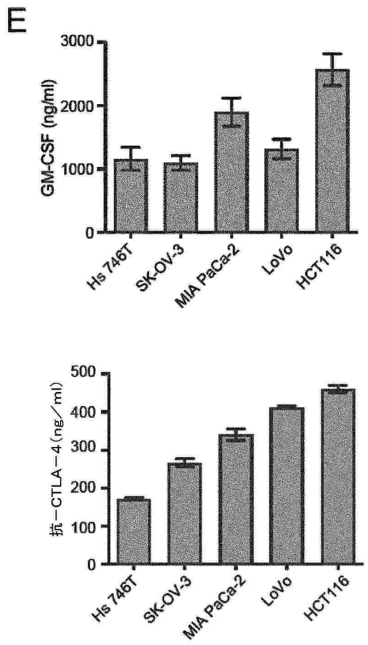
【図２－２】

図2-2



【図２－３】

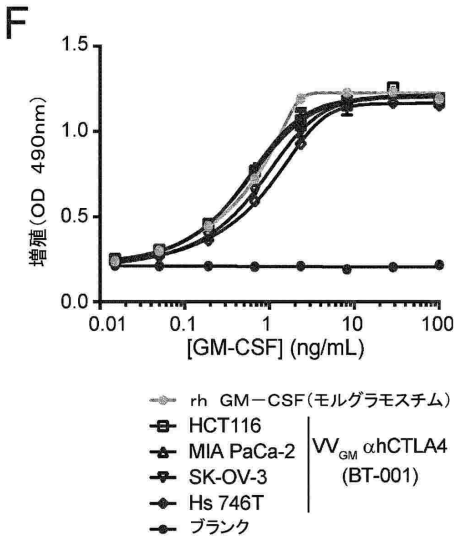
図2-3



（続き）

【図２－４】

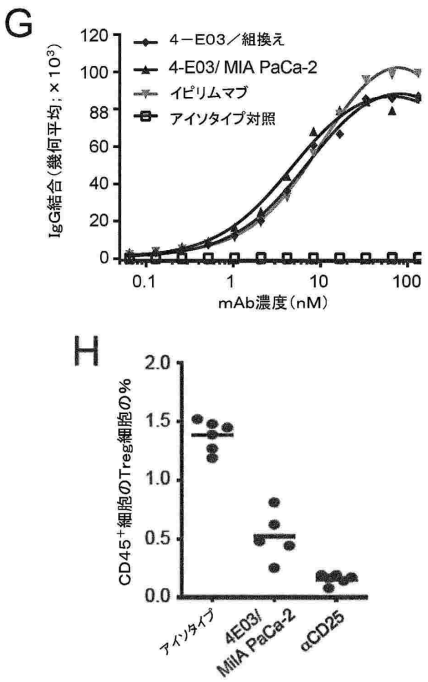
図2-4



（続き）

【図２－５】

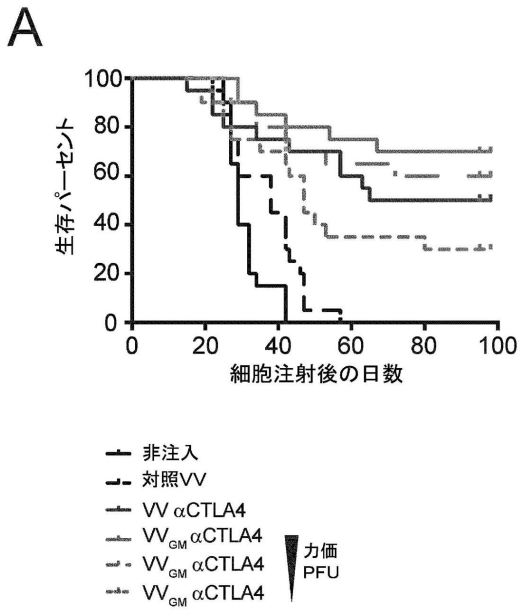
図2-5



（続き）

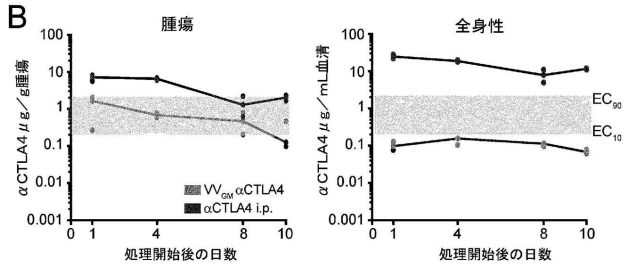
【図３－１】

図3-1



【図３－２】

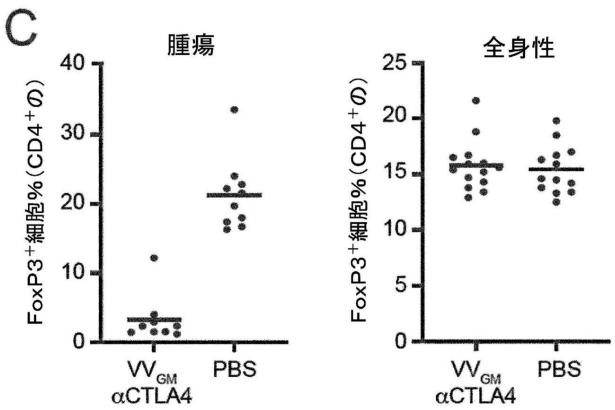
図3-2



（続き）

【図３－３】

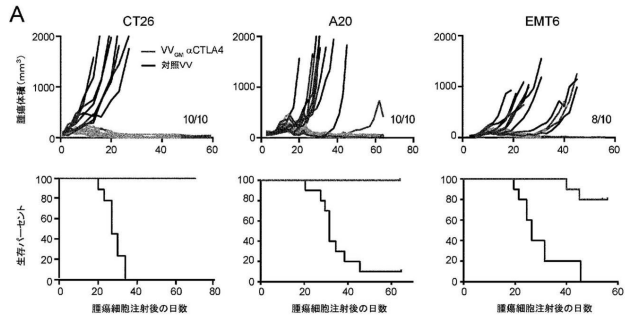
図3-3



（続き）

【図４－１ａ】

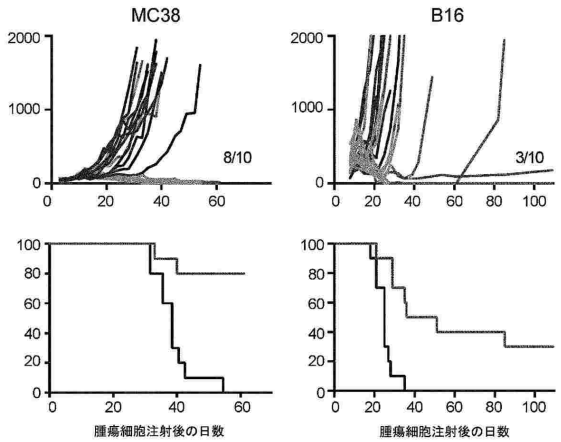
図4-1a



【図４－１ｂ】

図4-1b

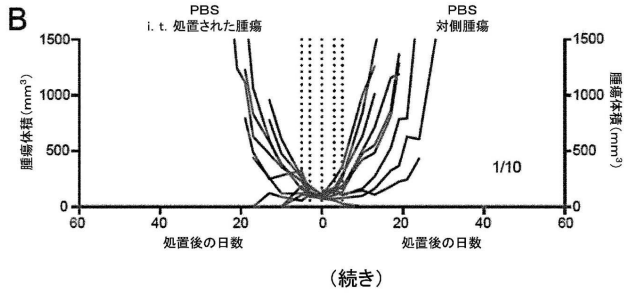
A（続き）



（続き）

【図４－２ａ】

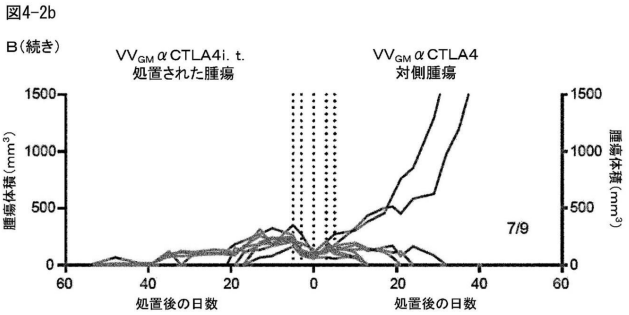
図4-2a



（続き）

【図４－２ｂ】

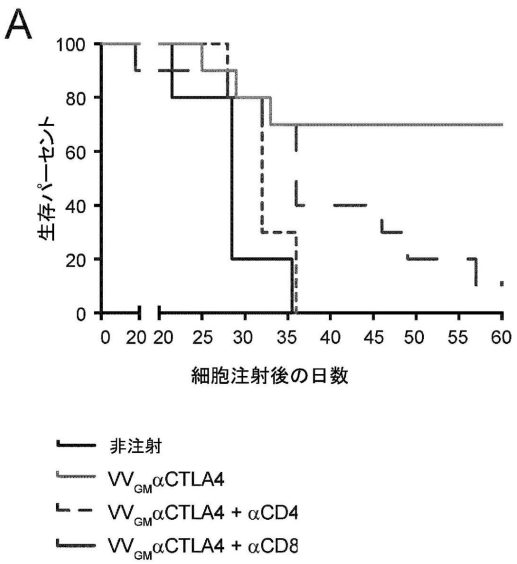
図4-2b



（続き）

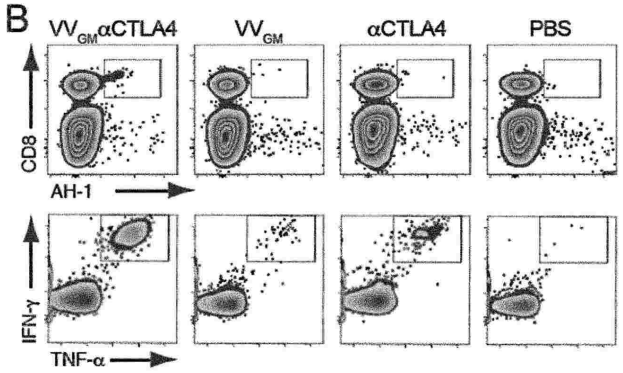
【図５－１】

図5-1



【図５－２】

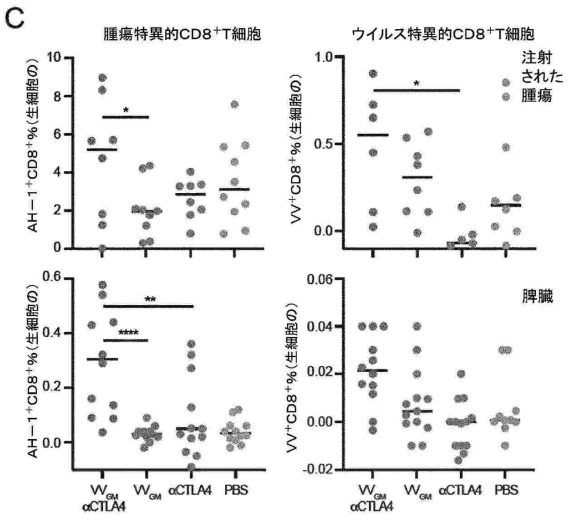
図5-2



（続き）

【図５－３】

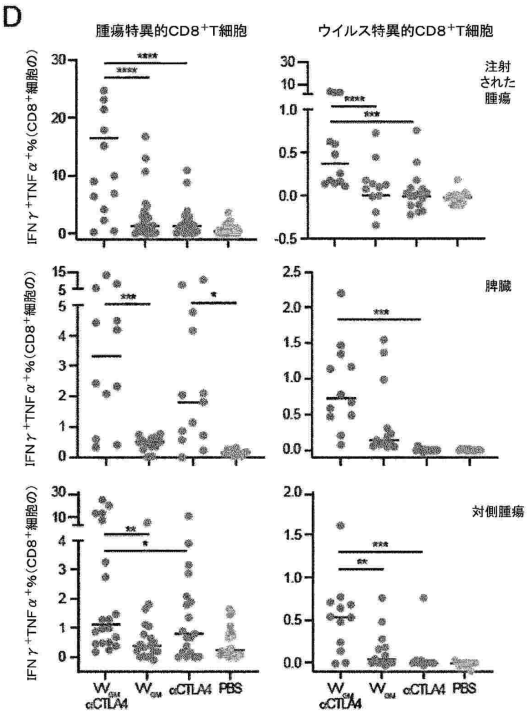
図5-3



（続き）

【図５－４】

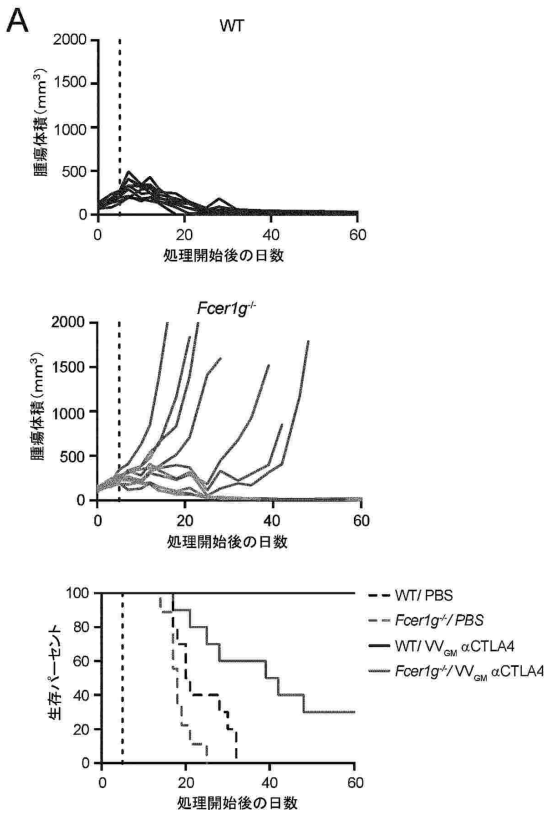
図5-4



（続き）

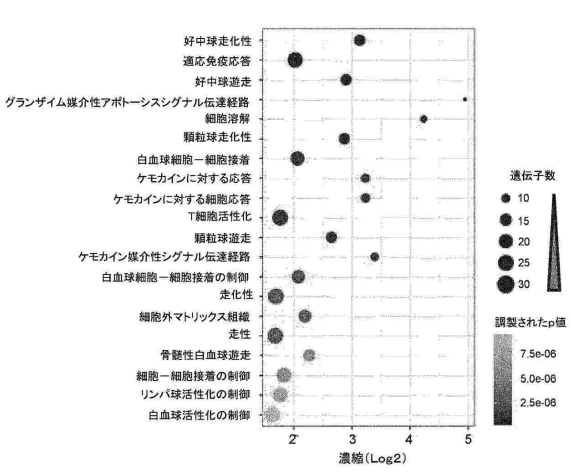
【図６－１】

図6-1



【図６－２】

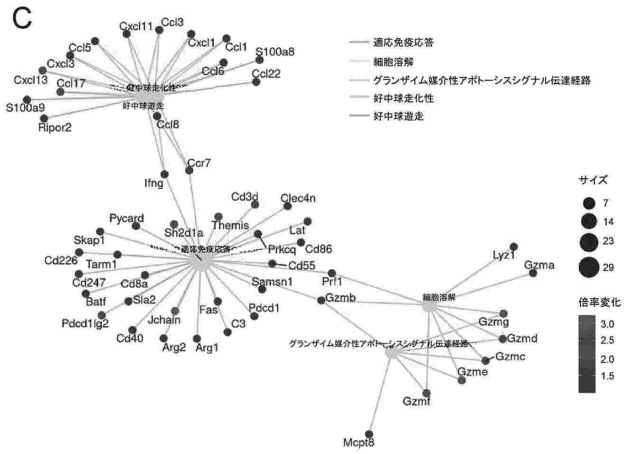
図6-2



（続き）

【図６－３】

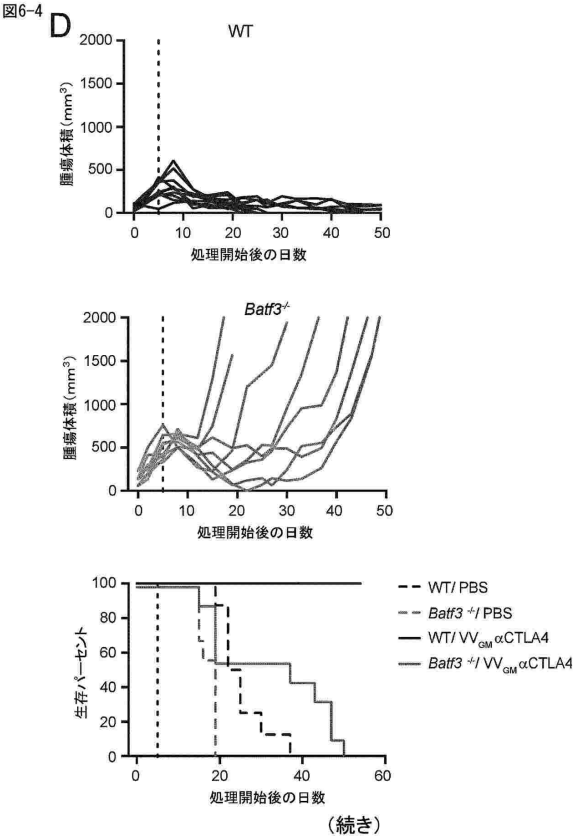
図6-3



（続き）

【図６－４】

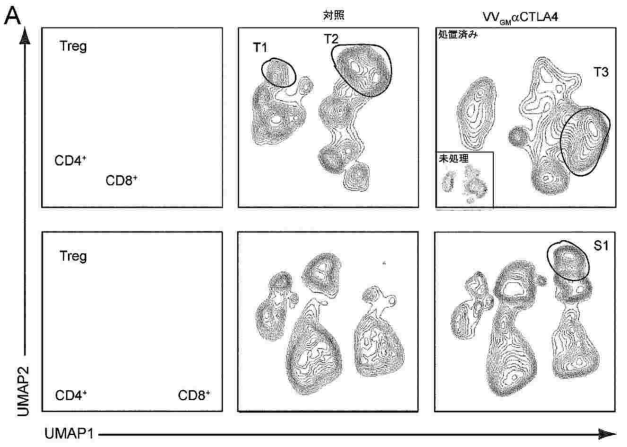
図6-4



（続き）

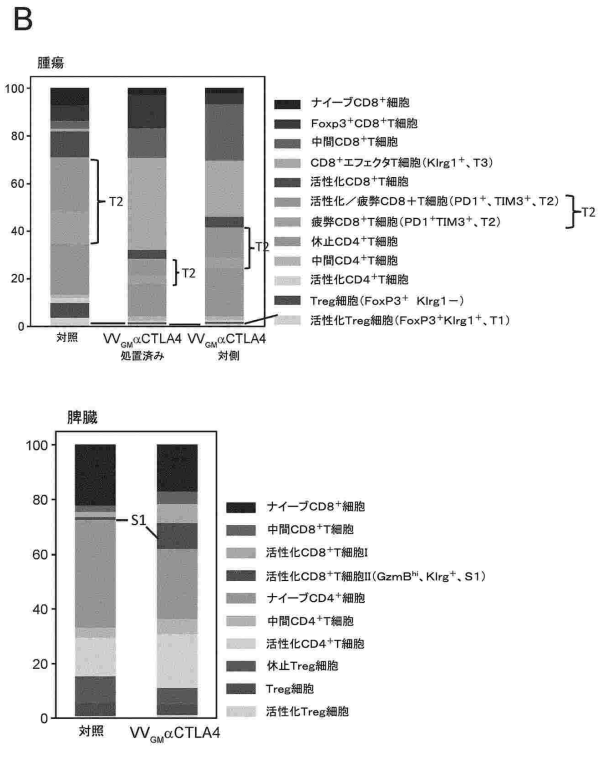
【図７－１】

図7-1



【図７－２】

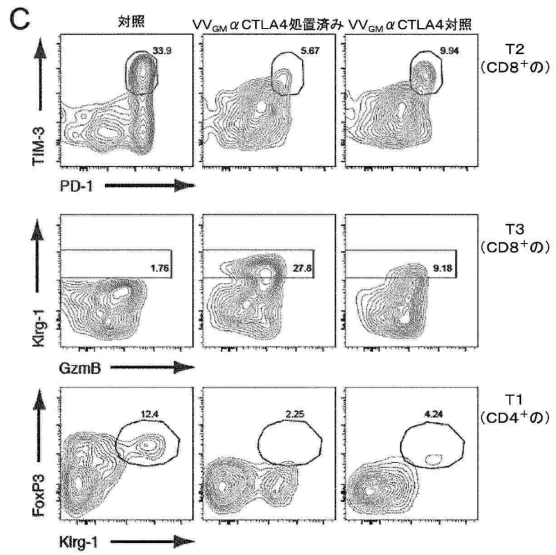
図7-2



（続き）

【図７－３】

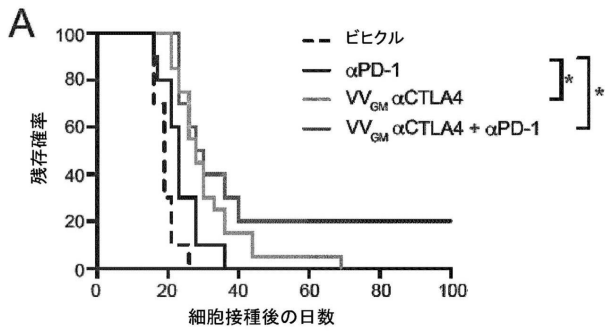
図7-3



（続き）

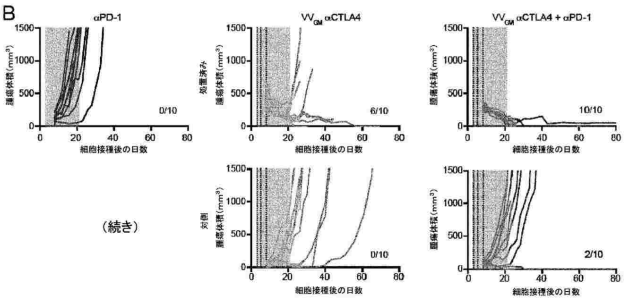
【図８－１】

図8-1



【図８－２】

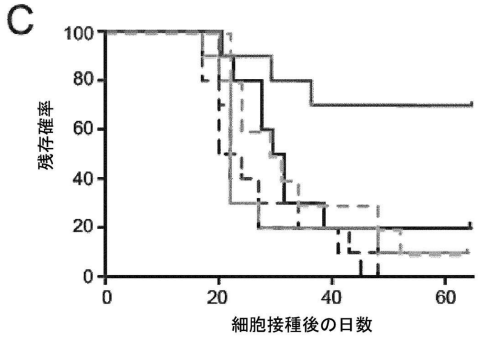
図8-2



（続き）

【図８－３】

図8-3

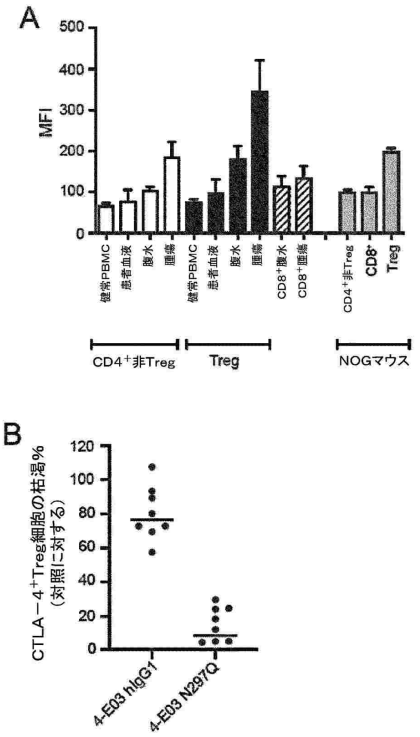


VVGMαCTLA4 + αPD-1
VVGMαCTLA4＋アイソタイプ
対照VV＋αPD－1
αPD-1
ビヒクル
対照VV

（続き）

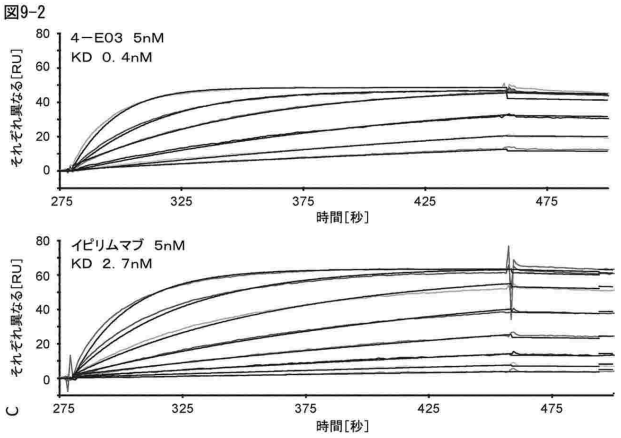
【図９－１】

図9-1



【図９－２】

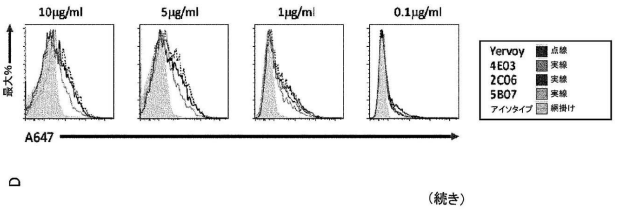
図9-2



（続き）

【図９－３】

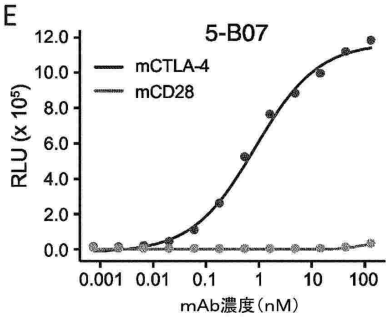
図9-3

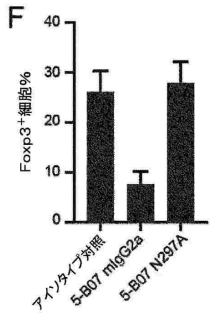


（続き）

【図９－４】

図9-4

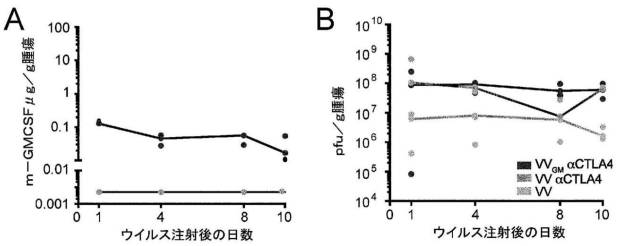




（続き）

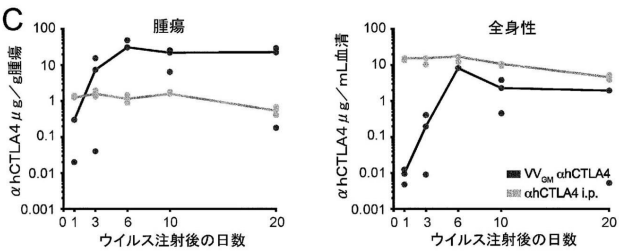
【図１０－１】

図10-1



【図１０－２】

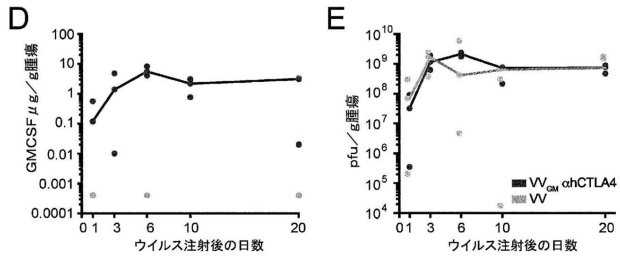
図10-2



（続き）

【図１０－３】

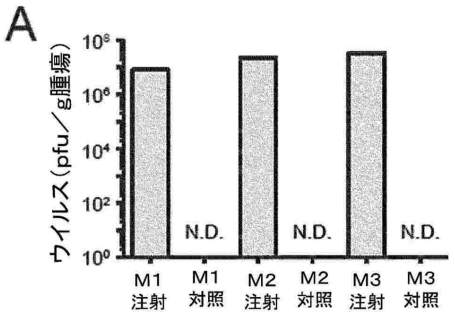
図10-3



（続き）

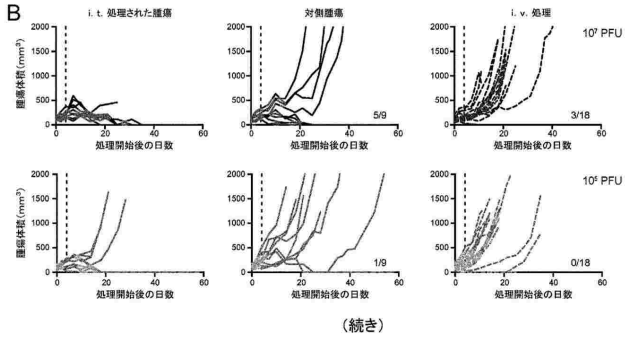
【図１１－１】

図11-1



【図１１－２】

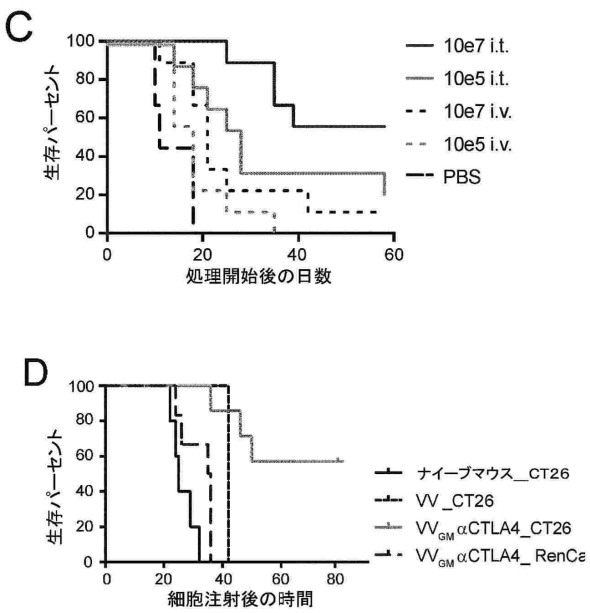
図11-2



（続き）

【図１１－３】

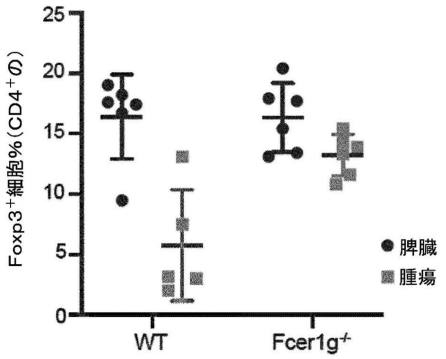
図11-3



（続き）

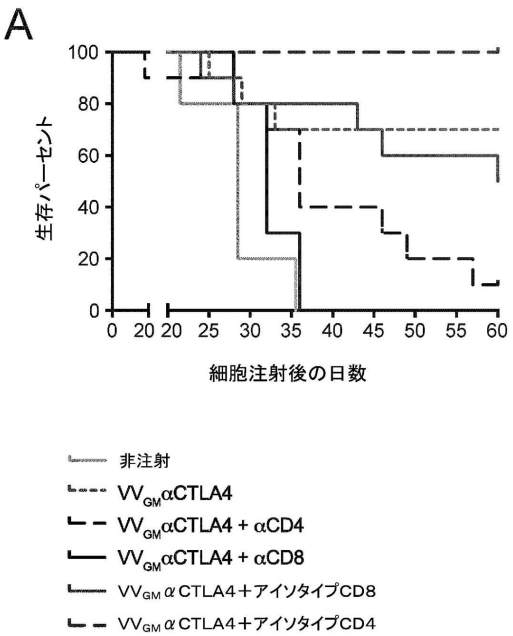
【図１２】

図12



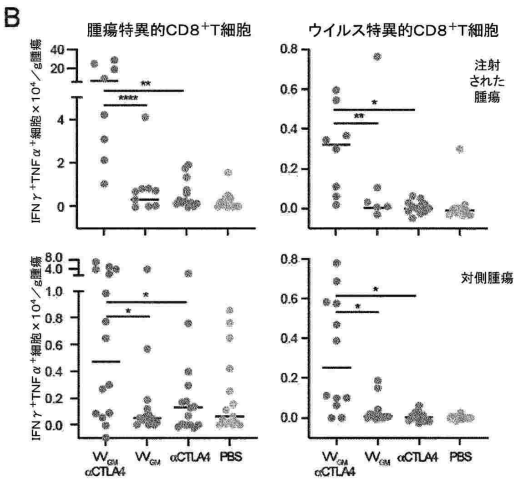
【図１３－１】

図13-1



【図１３－２】

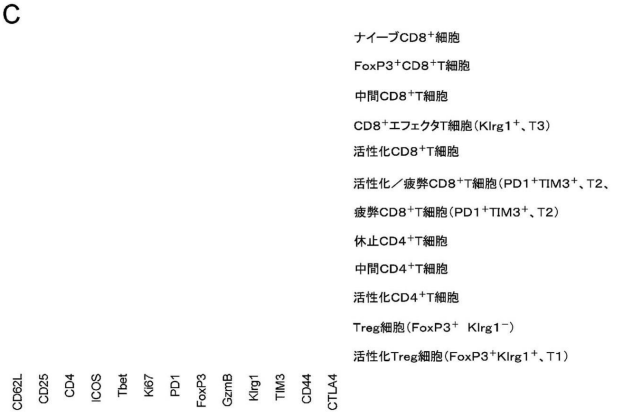
図13-2



（続き）

【図１３－３】

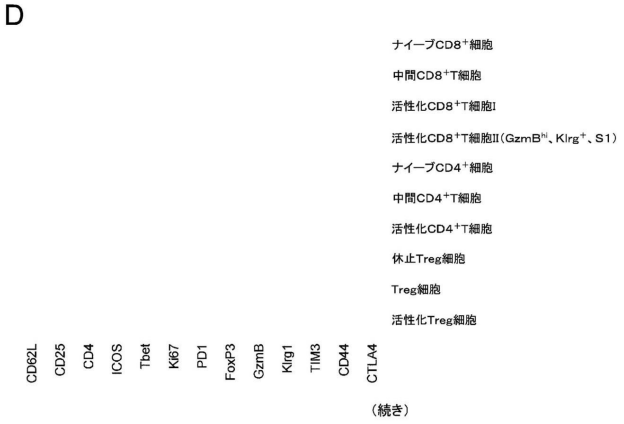
図13-3



（続き）

【図１３－４】

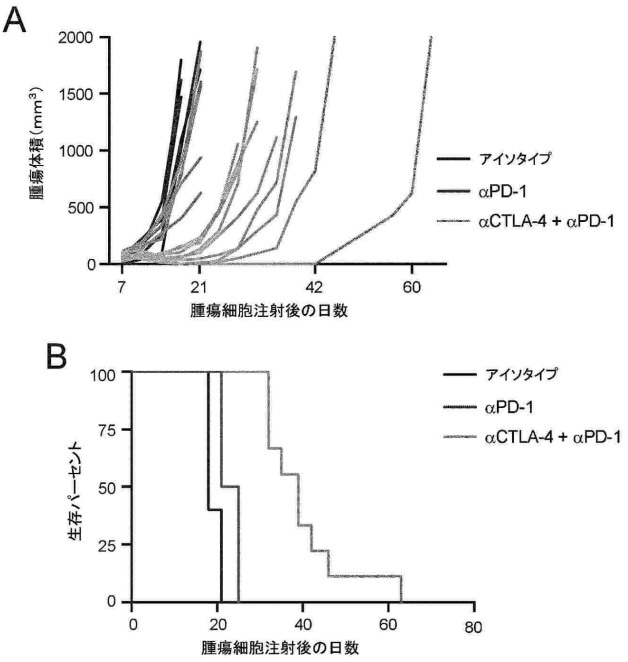
図13-4



（続き）

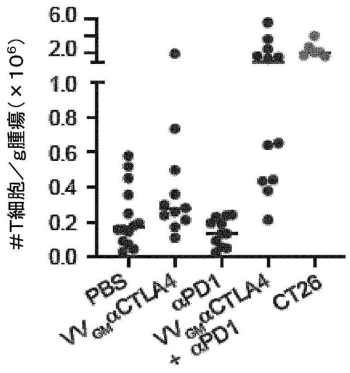
【図１４－１】

図14-1



【図１４－２】

図14-2 C



（続き）

【配列表】

<u>２０２４５３４５５０００００００１．ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/076268

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61P35/00 C07K16/28
ADD. A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P A61K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/178101 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER [US]) 19 September 2019 (2019-09-19) example 10	1-34
Y	WO 2018/195552 A1 (SILLAJEN INC) 25 October 2018 (2018-10-25) paragraphs [0231], [0237] - [0238]	1-34

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
1 December 2022	08/12/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Galli, Ivo

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/076268

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG WEIYI ET AL: "LB-306: Oncolytic vaccinia virus expressing immune checkpoint blockade antibody as cancer immunotherapeutics", CANCER RESEARCH; ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH (AACR), AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US; CHICAGO, IL, USA, vol. 78, no. 13, Suppl. S, 30 June 2018 (2018-06-30), pages LB-306, XP009517611, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2018-LB-306 the whole document -----	1-34
A	ROTTE ANAND: "Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer", JOURNAL OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER RESEARCH , vol. 38, no. 1, 255, 1 December 2019 (2019-12-01), XP055821773, DOI: 10.1186/s13046-019-1259-z Retrieved from the Internet: URL:https://jeccr.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13046-019-1259-z.pdf the whole document -----	1-34
A	WO 2020/049001 A1 (BIOINVENT INT AB [SE]; TRANSGENE SA [FR]) 12 March 2020 (2020-03-12) the whole document -----	1-34
A	A. MARABELLE ET AL: "Intratumoral Anti-CTLA-4 Therapy: Enhancing Efficacy While Avoiding Toxicity", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 19, no. 19, 1 October 2013 (2013-10-01), pages 5261-5263, XP055376748, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1923 cited in the application the whole document -----	1-34
A	CN 111 763 660 A (UNIV NANJING) 13 October 2020 (2020-10-13) the whole document -----	1-34
2 A	WO 2018/170133 A1 (AMGEN INC) 20 September 2018 (2018-09-20) paragraph [0162] -----	1-34
2	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/076268

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/205412 A1 (AMGEN INC) 8 October 2020 (2020-10-08) paragraph [0057] -----	1-34
T	SUBUDHI SUMIT K ET AL: "Combined CTLA-4 and PD-L1 blockade in patients with chemotherapy-naïve metastatic castration-resistant prostate cancer is associated with increased myeloid and neutrophil immune subsets in the bone microenvironment", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER , vol. 9, no. 10 1 October 2021 (2021-10-01), page e002919, XP055896995, DOI: 10.1136/jitc-2021-002919 Retrieved from the Internet: URL:https://jitc.bmj.com/content/jitc/9/10/e002919.full.pdf the whole document -----	1-34

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/076268

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed.

   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/076268

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 35
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2022/076268

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 35

Claim 35 is an omnibus claim, which so lacks clarity of scope that it is impossible to search.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/076268

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019178101 A1	19-09-2019	AU 2019234642 A1	24-09-2020
		CA 3093696 A1	19-09-2019
		CN 112088009 A	15-12-2020
		EP 3765047 A1	20-01-2021
		JP 2021517814 A	29-07-2021
		KR 20200131863 A	24-11-2020
		SG 11202008589T A	29-10-2020
		US 2021023151 A1	28-01-2021
		WO 2019178101 A1	19-09-2019
WO 2018195552 A1	25-10-2018	AU 2018254626 A1	14-11-2019
		BR 112019022009 A2	12-05-2020
		CA 3060516 A1	25-10-2018
		CN 110678192 A	10-01-2020
		EP 3612201 A1	26-02-2020
		JP 2020517737 A	18-06-2020
		KR 20190137911 A	11-12-2019
		US 2020085891 A1	19-03-2020
		WO 2018195552 A1	25-10-2018
WO 2020049001 A1	12-03-2020	AU 2019333862 A1	11-03-2021
		BR 112021003916 A2	25-05-2021
		CA 3111153 A1	12-03-2020
		CN 112912398 A	04-06-2021
		EP 3617230 A1	04-03-2020
		EP 3847193 A1	14-07-2021
		IL 281198 A	29-04-2021
		JP 2022512544 A	07-02-2022
		KR 20210055722 A	17-05-2021
		US 2022041723 A1	10-02-2022
		WO 2020049001 A1	12-03-2020
CN 111763660 A	13-10-2020	NONE	
WO 2018170133 A1	20-09-2018	AU 2018235944 A1	26-09-2019
		CA 3056392 A1	20-09-2018
		CN 110461346 A	15-11-2019
		EP 3595690 A1	22-01-2020
		JP 2020510050 A	02-04-2020
		MA 51630 A	22-01-2020
		US 2020009204 A1	09-01-2020
		WO 2018170133 A1	20-09-2018
WO 2020205412 A1	08-10-2020	AU 2020256075 A1	23-09-2021
		CA 3130658 A1	08-10-2020
		EP 3946627 A1	09-02-2022
		JP 2022526942 A	27-05-2022
		TW 202102543 A	16-01-2021
		US 2022211784 A1	07-07-2022
		WO 2020205412 A1	08-10-2020

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C07K 16/28 (2006.01)		A61K	48/00	
C12N 7/01 (2006.01)		C07K	16/28	ZNA
C07K 16/46 (2006.01)		C12N	7/01	
A61K 38/19 (2006.01)		C07K	16/46	
		A61K	38/19	

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
(74)代理人 100138210
弁理士 池田 達則
(72)発明者 ビョルン フレンデウス
スウェーデン国，エスエー－２２４ ６８ ルンド，テノールグランデン １
(72)発明者 マティルダ レーン
スウェーデン国，エスエー－２１２ １３ マルメー，ドーベルンスガタン ３アー
(72)発明者 モニカ セムリッチ
スウェーデン国，エスエー－２１５ ６７ マルメー，グロンダルスグレンド １
(72)発明者 リンダ モルテンソン
スウェーデン国，エスエー－２３７ ９１ ビャアレッド，フィエリエ リレビーベーグ ８
(72)発明者 ジャン－バティスト マルシャン
フランス国，６７２１０ オベルネ，リュ デ オー パテュラージュ １ア

Ｆターム（参考） 4B065 AA90Y AA95X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C084 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 BA44 CA53 DA19 NA14 ZB261
4C085 AA14 AA16 BB01 BB36 BB41 BB43 BB44 CC23 DD61 EE03
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA09 CA12 MA02 NA14 ZB26 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74 GA26