

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6650537号  
(P6650537)

(45) 発行日 令和2年2月19日 (2020.2.19)

(24) 登録日 令和2年1月22日 (2020.1.22)

(51) Int. Cl.	F I	
<b>C 1 2 N 15/13 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/13	
<b>C O 7 K 16/28 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/28	Z N A
<b>C O 7 K 19/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 19/00	
<b>C O 7 K 16/46 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/46	
<b>C 1 2 N 15/62 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/62	Z
請求項の数 15 (全 62 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-559329 (P2018-559329)	(73) 特許権者	503231882
(86) (22) 出願日	平成29年4月13日 (2017.4.13)		エージェンシー フォー サイエンス, テ
(65) 公表番号	特表2019-519208 (P2019-519208A)		クノロジー アンド リサーチ
(43) 公表日	令和1年7月11日 (2019.7.11)		シンガポール国, 1 3 8 6 3 2 シンガポ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/058956		ール, フージョノポリス ウェイ 1, コ
(87) 国際公開番号	W02017/194265	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開日	平成29年11月16日 (2017.11.16)		弁理士 小野 新次郎
審査請求日	令和1年7月9日 (2019.7.9)	(74) 代理人	100118902
(31) 優先権主張番号	10201603721T		弁理士 山本 修
(32) 優先日	平成28年5月10日 (2016.5.10)	(74) 代理人	100106208
(33) 優先権主張国・地域又は機関	シンガポール (SG)		弁理士 宮前 徹
早期審査対象出願		(74) 代理人	100120112
			弁理士 中西 基晴
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗 C T L A - 4 抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C T L A - 4 に結合可能である抗体または抗原結合性断片であって、

( i ) L C - C D R 1 : R A T Q G I S S W L A ( 配列番号 5 )、L C - C D R 2 : A A S S L Q S ( 配列番号 6 ) 及び L C - C D R 3 : Q Q A N T L P L F T ( 配列番号 7 )

をを取り込む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域；並びに、

( i i ) H C - C D R 1 : S N T A A W N ( 配列番号 8 )、H C - C D R 2 : R T Y Y R S K W Y S D Y G L S V K S ( 配列番号 9 ) 及び H C - C D R 3 : E G S G G T L I Y ( 配列番号 10 ) を取り込む少なくとも 1 つの重鎖可変領域

を有する、前記抗体または抗原結合性断片。

【請求項 2】

軽鎖可変領域配列および重鎖可変領域配列を含む、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合性断片であって、ここにおいて：

軽鎖可変領域配列が、配列番号 1 または 2 の軽鎖配列に少なくとも 90 % の配列同一性を有し、そして；

重鎖可変領域配列が、配列番号 3 または 4 の重鎖配列に少なくとも 90 % の配列同一性を有する、

前記抗体または抗原結合性断片。

【請求項 3】

C D 28 に結合しない、請求項 1 または請求項 2 に記載の抗体または抗原結合性断片。

10

20

## 【請求項 4】

C T L A - 4 および C D 8 0、任意にヒト C T L A - 4 およびヒト C D 8 0、の間の相互作用を阻害する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

## 【請求項 5】

C T L A - 4 および C D 8 6、任意にヒト C T L A - 4 およびヒト C D 8 6、の間の相互作用を阻害する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

## 【請求項 6】

抗体が、T 細胞消耗または T 細胞アネルギーを示す T 細胞において、T 細胞機能を回復するのに有効である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

## 【請求項 7】

C T L A - 4 に結合可能であり、( i ) 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性断片、および ( i i ) C T L A - 4 以外のターゲットタンパク質に結合可能な抗原結合性断片またはポリペプチドを含む、二重特異性抗体または二重特異性抗原結合性断片である、任意に単離された、抗体または抗原結合性断片であって、

任意に、C T L A - 4 以外のターゲットタンパク質に結合可能である抗原結合性断片またはポリペプチドが、P D - 1、P D - L 1、C D 2 7、C D 2 8、I C O S、C D 4 0、C D 1 2 2、O X 4 3、4 - 1 B B、G I T R、B 7 - H 3、B 7 - H 4、B T L A、L A G - 3、A 2 A R、V I S T A、T I M - 3、K I R、H E R - 2、H E R - 3、E G F R、E p C A M、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 8、C D 2 0、C D 2 4、C D 9 0、C D 1 5、C D 5 2、C A - 1 2 5、C D 3 4、C A - 1 5 - 3、C A - 1 9 - 9、C E A、C D 9 9、C D 1 1 7、C D 3 1、C D 4 4、C D 1 2 3、C D 1 3 3、A B C B 5 および C D 4 5、の 1 つに結合可能である、  
前記抗体または抗原結合性断片。

## 【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性断片を含む、キメラ抗原受容体 ( C A R )。

## 【請求項 9】

請求項 8 記載の C A R を含む細胞。

## 【請求項 10】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片、あるいは、請求項 8 に記載の C A R をコードする単離された核酸。

## 【請求項 11】

療法または医学的治療法において使用するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片、請求項 8 に記載の C A R、あるいは請求項 9 に記載の細胞、を含む組成物。

## 【請求項 12】

T 細胞機能不全障害、癌または感染症疾患の治療において使用するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片、請求項 8 に記載の C A R、あるいは請求項 9 に記載の細胞、を含む組成物。

## 【請求項 13】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片、請求項 8 に記載の C A R、あるいは請求項 9 に記載の細胞を、機能不全 T 細胞に投与する工程を含む、T 細胞機能を増進させる、*i n v i t r o* の方法。

## 【請求項 14】

C T L A - 4 を含有するかまたは含有すると推測される試料を、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片、請求項 8 に記載の C A R、あるいは請求項 9 に記載の細胞と接触させ、そして抗体若しくは抗原結合性断片、C A R または細胞と、C T L A - 4 のと複合体の形成を検出する、工程を含む方法。

## 【請求項 15】

T 細胞を、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片、請求項 8

10

20

30

40

50

に記載の C A R、あるいは請求項 9 に記載の細胞と、i n v i t r o または e x v i v o で接触させる、T 細胞集団を拡大するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 ( C T L A - 4 ) に結合する抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

T 細胞消耗は、多くの慢性感染および癌の間に生じる T 細胞機能不全状態である。該状態は、劣った T 細胞エフェクター機能、阻害性受容体発現の持続、および機能するエフェクターまたは記憶 T 細胞のものとは異なる転写状態によって定義される。消耗は、感染および腫瘍の最適な制御を妨げる ( E J o h n W h e r r y , , N a t u r e I m m u n o l o g y 1 2 , 4 9 2 - 4 9 9 ( 2 0 1 1 ) ) 。

10

【0003】

T 細胞消耗は、段階的および進行性の T 細胞機能喪失によって特徴付けられる。消耗は、慢性リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス ( L C M V ) 感染中によく定義され、そして一般的に、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスおよびヒト免疫不全ウイルス感染を含む多くの慢性感染後に、ならびに腫瘍転移中に起こる、抗原持続状態下で発展する。表現型および機能的欠陥の漸次的変化が現れる可能性があり、消耗は均一に機能しなくなった状態ではなく、そしてこれらの細胞は原型エフェクター、記憶およびまたアネルギー性 T 細胞とは異なる。消耗 T 細胞は、最も一般的には、高度慢性感染中に出現し、そして抗原刺激のレベルおよび期間は該プロセスの決定的な決定要因である ( Y i r a , I m m u n o l o g y A p r 2 0 1 0 ; 1 2 9 ( 4 ) : 4 7 4 - 4 8 1 ) 。

20

【0004】

循環ヒト腫瘍特異的 C D 8 + T 細胞は、細胞傷害性である可能性があり、そして i n v i v o でサイトカインを産生する可能性があることから、自己および腫瘍特異的ヒト C D 8 + T 細胞が、ペプチド、不完全フロイントアジュバント ( I F A )、および C p G のワクチン接種などの強力な免疫療法後、または養子移入後に、機能的反応能に到達する可能性もあることが示される。末梢血と対照的に、腫瘍部位に浸潤する T 細胞は、しばしば機能的に不全であり、異常な低サイトカイン産生および阻害性受容体 P D - 1、C T L A - 4、T I M - 3 および L A G - 3 の上方制御を示す。黒色腫組織から単離された T 細胞は、短期 i n v i t r o 培養後に I F N - 産生を回復しうるため、機能的不全は可逆性である。しかし、依然として、この機能障害が、さらなる分子経路、おそらくは動物モデルにおいて定義されるような T 細胞消耗またはアネルギーと似た経路を伴うかどうかを決定する必要がある ( B a i t s c h r a , J C l i n I n v e s t . 2 0 1 1 ; 1 2 1 ( 6 ) : 2 3 5 0 - 2 3 6 0 ) 。

30

【0005】

細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 ( C T L A - 4 ) はまた、C D 1 5 2 とも称され、ヒトにおいて C T L A 4 遺伝子によってコードされる I 型膜貫通タンパク質である。本明細書記載の C T L A - 4 の分子特性および生物学的機能は、M c C o y および L e G r o s s I m m u n o l o g y a n d C e l l B i o l o g y ( 1 9 9 9 ) 7 7 : 1 - 1 0、ならびに G r o s s o および K u n k e l , C a n c e r I m m u n i t y ( 2 0 1 3 ) 1 3 : 5 に概説される。

40

【0006】

正の共刺激受容体 C D 2 8 の、抗原提示細胞 ( A P C ) 上のそのリガンド、C D 8 0 および C D 8 6 への結合は、T 細胞の活性化を導き、T 細胞増殖およびインターロイキン - 2 ( I L - 2 ) の産生を生じる。C T L A - 4 は、活性化 C D 4 + および C D 8 + T 細胞の細胞表面上で発現され、そして T 細胞機能の重要な負の制御因子である。C T L A - 4 は、C D 2 8 に類似の構造を有し、そしてまた、A P C 上の C D 8 0 および C D 8 6 の

50

両方に結合するが、より高いアビディティおよびアフィニティを持つ (Collinsら, *Immunity* (2002) 17: 201-210)。

【0007】

CTLA-4は、GrossoおよびKunkel, *Cancer Immunity* (2013) 13: 5の表1に要約される、内因性および外因性両方の機構を通じて、免疫活性化を負に制御することが示されてきている。簡潔には、(i) APC上のCD80およびCD86を通じた逆シグナル伝達は、T細胞反応の抑制を生じ、そして/または未処理 (naive) T細胞のTregへの変換を促進し、(ii) CTLA-3を通じたシグナル伝達は、TGF-などの制御性サイトカインの産生を刺激し、APCによる抗原提示の阻害およびT細胞機能の阻害を生じ、(iii) CD80/CD86へのCTLA-4の結合は、CD28による結合に関するこれらのリガンドの利用可能性を減少させ、APCによるT細胞活性化減少を生じ、(iv) CD80/CD86へのCTLA-4の結合は、そのトランスエンドサイトーシスを引き起こし、APCがT細胞を活性化する能力を減少させ、(v) CTLA-4は、T細胞シナプスにPP2AおよびPTPN11などの阻害性タンパク質を補充して、CD28およびTCRを通じたシグナル伝達を阻害し、(vi) CTLA-4は、CD80/86を占め、そしてそれによってCD28による結合を防止する高アフィニティ競合剤として作用し、(vii) CTLA-4の可溶性スプライス変異体は、T細胞活性化を阻害可能であってもよく、そして(viii) CTLA-4は、APCによるT細胞の活性化に重要なT細胞停止シグナルを阻害する。

【0008】

CTLA-4による負の制御の阻害は、適応免疫反応およびT細胞活性化の刺激を促進することが示されてきている。CTLA-4ブロック抗体は、癌のマウスモデルにおいて有効であることが示されてきており、そして抗CTLA-4抗体、例えばイピリムマブ (WO2001014424 A1に記載されるYervoy、MDX-010、10D1) およびトレメリムマブ (チシリムマブ; CP-675, 206) が、癌における抗腫瘍免疫を促進する戦略として調べられている。CTLA-4の遮断はまた、慢性ウイルス感染などのT細胞消耗と関連する障害に関する有望な療法戦略でもある。

【0009】

イピリムマブは、ネズミCTLA-4に結合不能であることが示されてきており (WO2001/1014424 A1、表5、81ページ)、そしてトレメリムマブは、同様に、ネズミCTLA-4に結合しないことが示されてきている (Hansonら *Proc Amer Assoc Cancer Res* (2004) 64: 877)。Hansonらはまた、トレメリムマブがヒトCD28への結合を示すことも開示する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】WO2001014424 A1

【特許文献2】WO 2001/1014424 A1

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】E John Wherry, *Nature Immunology* 12, 492-499 (2011)

【非特許文献2】Yiら, *Immunology Apr* 2010; 129(4): 474-481

【非特許文献3】Baitschら, *J Clin Invest.* 2011; 121(6): 2350-2360

【非特許文献4】McCoyおよびLe Gros *Immunology and Cell Biology* (1999) 77: 1-10

【非特許文献5】GrossoおよびKunkel, *Cancer Immunity*

10

20

30

40

50

(2013)13:5

【非特許文献6】Collinsら, Immunity (2002)17:201-210

【非特許文献7】Hansonら Proc Amer Assoc Cancer Res (2004)64:877

# 【発明の概要】

## 【0012】

本発明は、CTLA-4に結合する抗体または抗原結合性断片に関する。重鎖および軽鎖ポリペプチドもまた開示する。抗体、抗原結合性断片およびポリペプチドは、単離および/または精製型で提供されてもよく、そして研究、療法および診断において使用するために適した組成物に配合されてもよい。

10

## 【0013】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合性断片またはポリペプチドは、T細胞、例えば、CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup> T細胞において、T細胞機能を回復するために有効であってもよい。いくつかの態様において、抗体または抗原結合性断片またはポリペプチドは、T細胞消耗またはT細胞アネルギーを示しているT細胞において、T細胞機能を回復するために有効であってもよい。

## 【0014】

本発明の1つの側面において、CTLA-4に結合し、そしてCD28に実質的に結合をまったく示さない、抗体または抗原結合性断片を提供する。

20

本発明の別の側面において、CTLA-4に結合し、そしてCD28およびCD80の間の相互作用、ならびに/あるいはCD28およびCD86の間の相互作用を防止または阻害しない、抗体または抗原結合性断片を提供する。

## 【0015】

本発明の1つの側面において、抗体または抗原結合性断片を提供し、抗体のアミノ酸配列は、アミノ酸配列i)~iii)、またはアミノ酸配列iv)~vi)、または好ましくはアミノ酸配列i)~vi)：

## 【0016】

### 【化1】

- i) LC-CDR1: RATQGISSWLA (配列番号5);
- ii) LC-CDR2: AASSLQS (配列番号6);
- iii) LC-CDR3: QQANTLPLFT (配列番号7);
- iv) HC-CDR1: SNTAAWN (配列番号8);
- v) HC-CDR2: RTYYRSKWYSDYGLSVKS (配列番号9);
- vi) HC-CDR3: EGSGGTLIY (配列番号10);

30

## 【0017】

あるいは配列(i)~(vi)の1またはそれより多くにおいて、1または2または3アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているその変異体を含んでもよい。

40

いくつかの態様において、LC-CDR1は、RATQGISSWLA(配列番号5)である。いくつかの態様において、LC-CDR2は、AASSLQS(配列番号6)である。いくつかの態様において、LC-CDR3は、QQANTLPLFT(配列番号7)である。いくつかの態様において、HC-CDR1は、SNTAAWN(配列番号8)である。いくつかの態様において、HC-CDR2は、RTYYRSKWYSDYGLSVKS(配列番号9)である。いくつかの態様において、HC-CDR3は、EGSGGTLIY(配列番号10)である。

## 【0018】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合性断片は、以下のCDR：

## 【0019】

50

## 【化2】

LC-CDR1: RATQGISSWLA (配列番号5)

LC-CDR2: AASSLQS (配列番号6)

LC-CDR3: QQANTLPLFT (配列番号7).

## 【0020】

を取り込む少なくとも1つの軽鎖可変領域を含んでもよい。

いくつかの態様において、抗体または抗原結合性断片は、以下のCDR：

## 【0021】

## 【化3】

HC-CDR1: SNTAAWN (配列番号8)

HC-CDR2: RTYYRSKWYSDYGLSVKS (配列番号9)

HC-CDR3: EGSGGTLIY (配列番号10).

## 【0022】

を取り込む少なくとも1つの重鎖可変領域を含んでもよい。

抗体は、図1に示すCDRを取り込む少なくとも1つの軽鎖可変領域を含んでもよい。

抗体は、図2に示すCDRを取り込む少なくとも1つの重鎖可変領域を含んでもよい。

## 【0023】

抗体は、配列番号1、5、6、7；または2、5、6、7の1つのアミノ酸配列、あるいは図1に示すアミノ酸配列の1つ、あるいは配列番号1、5、6、7；または2、5、6、7の1つ、または図1に示すV<sub>L</sub>鎖アミノ酸配列のアミノ酸配列に、少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の1つの配列同一性を有するアミノ酸配列を含む少なくとも1つの軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)を含んでもよい。

## 【0024】

抗体は、配列番号3、8、9、10；または4、8、9、10の1つのアミノ酸配列、あるいは図2に示すアミノ酸配列の1つ、あるいは配列番号3、8、9、10；または4、8、9、10の1つ、または図2に示すV<sub>H</sub>鎖アミノ酸配列のアミノ酸配列に、少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の1つの配列同一性を有するアミノ酸配列を含む少なくとも1つの重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)を含んでもよい。

## 【0025】

抗体は、配列番号1、5、6、7；または2、5、6、7の1つのアミノ酸配列、または図1に示すアミノ酸配列の1つ（あるいは配列番号1、5、6、7；または2、5、6、7の1つ、または図1に示すV<sub>L</sub>鎖アミノ酸配列のアミノ酸配列の1つに、少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の1つの配列同一性を有するアミノ酸配列）を含む少なくとも1つの軽鎖可変領域、および配列番号3、8、9、10；または4、8、9、10の1つのアミノ酸配列、または図2に示すアミノ酸配列の1つ（あるいは配列番号3、8、9、10；または4、8、9、10の1つ、または図2に示すV<sub>H</sub>鎖アミノ酸配列のアミノ酸配列の1つに、少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の1つの配列同一性を有するアミノ酸配列）を含む少なくとも1つの重鎖可変領域を含んでもよい。

## 【0026】

抗体は、任意に、CTLA-4、任意にヒトまたはネズミCTLA-4、に結合してもよい。いくつかの態様において、抗体は、ヒトおよびネズミCTLA-4の両方に結合可

10

20

30

40

50

能である。抗体は、任意に、上述のようなアミノ酸配列構成要素を有してもよい。抗体は I g G であってもよい。1つの態様において、C T L A - 4 に結合した、本明細書に記載するような抗体または抗原結合性断片を含む、任意に単離された、i n v i t r o 複合体を提供する。

【 0 0 2 7 】

抗体は、任意に、ヒト C T L A - 4 およびヒト C D 8 0 または 8 6、あるいはネズミ C T L A - 4 およびネズミ C D 8 0 または 8 6、の間の相互作用または機能的関連を阻害するかまたは防止してもよい。C T L A - 4 および C D 8 0 または 8 6 の間の相互作用または機能的関連のこうした阻害または防止は、C T L A - 4 の C D 8 0 または C D 8 6 が仲介する活性化、C D 8 0 / C T L A - 4 シグナル伝達または C D 8 6 / C T L A - 4 シグナル伝達を阻害するかまたは防止してもよい。

10

【 0 0 2 8 】

本発明の 1 つの側面において、単離軽鎖可変領域ポリペプチドを提供し、該軽鎖可変領域ポリペプチドは、以下の C D R :

【 0 0 2 9 】

【 化 4 】

LC-CDR1: RATQGISSWLA (配列番号 5)

LC-CDR2: AASSLQS (配列番号 6)

LC-CDR3: QQANTLPLFT (配列番号 7).

20

【 0 0 3 0 】

を含む。

本発明の 1 つの側面において、軽鎖配列：配列番号 1 または 2 ( 図 1 ) に少なくとも 8 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離軽鎖可変領域ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、単離軽鎖可変領域ポリペプチドは、C T L A - 4 に結合可能である。

【 0 0 3 1 】

本発明の 1 つの側面において、単離重鎖可変領域ポリペプチドを提供し、該重鎖可変領域ポリペプチドは、以下の C D R :

30

【 0 0 3 2 】

【 化 5 】

HC-CDR1: SNTAAWN (配列番号 8)

HC-CDR2: RTYYRSKWYSDYGLSVKS (配列番号 9)

HC-CDR3: EGSGGTLIY (配列番号 10).

【 0 0 3 3 】

を含む。

本発明の 1 つの側面において、配列番号 3 または 4 ( 図 2 ) の重鎖配列に少なくとも 8 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離重鎖可変領域ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、単離重鎖可変領域ポリペプチドは、C T L A - 4 に結合可能である。

40

【 0 0 3 4 】

本発明の 1 つの側面において、重鎖および軽鎖可変領域配列を含む抗体または抗原結合性断片であって：

軽鎖が、L C - C D R 1 : R A T Q G I S S W L A ( 配列番号 5 )、L C - C D R 2 : A A S S L Q S ( 配列番号 6 )、L C - C D R 3 : Q Q A N T L P L F T ( 配列番号 : 7 ) に、少なくとも 8 5 % の全体の配列同一性を有する、L C - C D R 1、L C - C D R 2、L C - C D R 3 を含み、そして；

50

重鎖が、HC - CDR1 : SNTAAWN (配列番号8)、HC - CDR2 : RTYYRSKWYS DYGLSVKS (配列番号9)、HC - CDR3 : EGS GGTLIY (配列番号10)に、少なくとも85%の全体の配列同一性を有する、HC - CDR1、HC - CDR2、HC - CDR3を含む、前記抗体または抗原結合性断片を提供する。

【0035】

いくつかの態様において、配列同一性の度合いは、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の1つであってもよい。

【0036】

本発明の別の側面において、任意に単離され、重鎖および軽鎖可変領域配列を含む抗体または抗原結合性断片であって：

軽鎖配列が、軽鎖配列：配列番号1または2 (図1)に少なくとも85%の配列同一性を有し、そして；

重鎖配列が、配列番号3または4 (図2)の重鎖配列に少なくとも85%の配列同一性を有する

前記抗体または抗原結合性断片を提供する。

【0037】

いくつかの態様において、配列同一性の度合いは、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の1つであってもよい。

【0038】

いくつかの態様において、抗体、抗原結合性断片またはポリペプチドは、配置LCFR1 : LC - CDR1 : LCFR2 : LC - CDR2 : LCFR3 : LC - CDR3 : LCFR4にしたがって、CDR間に可変領域軽鎖フレームワーク配列をさらに含む。フレームワーク配列は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列由来であってもよい。

【0039】

本発明の1つの側面において、任意に、本明細書記載の重鎖可変領域ポリペプチドと組み合わされた単離軽鎖可変領域ポリペプチドを提供し、該軽鎖可変領域ポリペプチドは、以下のCDR：

【0040】

【化6】

LC-CDR1: RATQGISSWLA (配列番号5)

LC-CDR2: AASSLQS (配列番号6)

LC-CDR3: QQANTLPLFT (配列番号7).

【0041】

を含む。

いくつかの態様において、抗体、抗原結合性断片またはポリペプチドは、配置HCFR1 : HC - CDR1 : HCFR2 : HC - CDR2 : HCFR3 : HC - CDR3 : HCFR4にしたがって、CDR間に可変領域重鎖フレームワーク配列をさらに含む。フレームワーク配列は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列由来であってもよい。

【0042】

本発明の1つの側面において、任意に、本明細書記載の軽鎖可変領域ポリペプチドと組み合わされた単離重鎖可変領域ポリペプチドを提供し、該重鎖可変領域ポリペプチドは、以下のCDR：

【0043】

10

20

30

40



## 【化 7】

HC-CDR1: SNTAAWN (配列番号8)  
 HC-CDR2: RTYYRSKWYSDYGLSVKS (配列番号9)  
 HC-CDR3: EGSGGTLIY (配列番号10).

## 【0044】

を含む。

いくつかの態様において、抗体または抗原結合性断片は、ヒト定常領域をさらに含んでもよい。例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3およびI g G 4の1つより選択されるものである。

10

## 【0045】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合性断片は、ネズミ定常領域をさらに含んでもよい。例えば、I g G 1、I g G 2 A、I g G 2 BおよびI g G 3の1つより選択されるものである。

## 【0046】

本発明の別の側面において、C T L A - 4に結合可能であり、二重特異性抗体または二重特異性抗原結合性断片である、任意に単離された、抗体または抗原結合性断片を提供する。二重特異性抗体または抗原結合性断片は、( i ) 本明細書に記載するようなC T L A - 4に結合可能な抗原結合性断片またはポリペプチド、および( i i ) C T L A - 4以外

20

## 【0047】

いくつかの態様において、C T L A - 4以外のターゲットタンパク質は、細胞表面受容体、例えばT細胞の細胞表面上に発現される受容体であってもよい。いくつかの態様において、細胞表面受容体は、免疫チェックポイント受容体、例えば共刺激受容体または阻害性受容体であってもよい。いくつかの態様において、共刺激受容体は、C D 2 7、C D 2 8、I C O S、C D 4 0、C D 1 2 2、O X 4 3、4 - 1 B BおよびG I T Rより選択されてもよい。いくつかの態様において、阻害性受容体は、B 7 - H 3、B 7 - H 4、B T L A、L A G - 3、A 2 A R、V I S T A、T I M - 3、P D - 1、およびK I Rより選択されてもよい。

30

## 【0048】

いくつかの態様において、C T L A - 4以外のターゲットタンパク質は、その発現が癌と関連する癌マーカーであってもよい。いくつかの態様において、癌マーカーは、細胞表面で発現されてもよい。いくつかの態様において、癌マーカーは、H E R - 2、H E R - 3、E G F R、E p C A M、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 8、C D 2 0、C D 2 4、C D 9 0、C D 1 5、C D 5 2、C A - 1 2 5、C D 3 4、C A - 1 5 - 3、C A - 1 9 - 9、C E A、C D 9 9、C D 1 1 7、C D 3 1、C D 4 4、C D 1 2 3、C D 1 3 3、A B C B 5およびC D 4 5より選択されてもよい。

## 【0049】

本発明の別の側面において、本明細書に記載するような抗原結合性断片を含むキメラ抗原受容体( C A R )を提供する。

40

別の側面において、本発明は、本明細書に記載するようなC A Rを含む細胞を提供する。

## 【0050】

本発明の別の側面において、C T L A - 4に結合した、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A Rまたは細胞を含む、i n v i t r o複合体を提供する。i n v i t r o複合体は、任意に単離されていてもよい。

## 【0051】

本発明の別の側面において、組成物、例えば薬学的組成物または薬剤を提供する。組成物は、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A Rまたは細胞

50

胞、および少なくとも１つの薬学的に許容されうるキャリアー、賦形剤、アジュバントまたは希釈剤を含んでもよい。

【 0 0 5 2 】

本発明の別の側面において、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、またはCARをコードする、単離核酸を提供する。核酸は、配列番号 11、12、13または14（図3）の1つの配列、あるいは遺伝暗号の結果として縮重しているコード配列を有してもよく、あるいは少なくとも70%の同一性、任意に、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の1つの同一性を有するヌクレオチド配列を有してもよい。

10

【 0 0 5 3 】

本発明の1つの側面において、本明細書記載の核酸を含むベクターを提供する。本発明の別の側面において、ベクターを含む宿主細胞を提供する。例えば、宿主細胞は、真核、または哺乳動物、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）、またはヒトであってもよいし、あるいは原核細胞、例えば大腸菌（E. coli）であってもよい。本発明の1つの側面において、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、ポリペプチドまたはCARを作製するための方法であって、抗体、または抗原結合性断片、ポリペプチドまたはCARをコードするベクターを発現するために適切な条件下で、本明細書に記載するような宿主細胞を培養し、そして抗体、抗原結合性断片、ポリペプチドまたはCARを回収する工程を含む、前記方法を提供する。

20

【 0 0 5 4 】

本発明の別の側面において、療法または医学的治療法において使用するための、抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、細胞または組成物を提供する。本発明の別の側面において、T細胞機能不全障害の治療において使用するための、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、細胞または組成物を提供する。本発明の別の側面において、T細胞機能不全障害の治療において使用するための薬剤または薬学的組成物の製造における、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、細胞または組成物の使用を提供する。

【 0 0 5 5 】

本発明の別の側面において、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、細胞または組成物を、機能不全T細胞に投与する工程を含む、T細胞機能を増進させる方法を提供する。該方法は、in vitroまたはin vivoで実行してもよい。

30

【 0 0 5 6 】

本発明の別の側面において、T細胞機能不全障害を患う患者に、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片またはポリペプチドを投与する工程を含む、T細胞機能不全障害を治療する方法を提供する。

【 0 0 5 7 】

本発明の別の側面において、癌の治療において使用するための、抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、細胞または組成物を提供する。本発明の別の側面において、癌の治療において使用するための薬剤または薬学的組成物の製造における、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、細胞または組成物の使用を提供する。

40

【 0 0 5 8 】

本発明の別の側面において、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、細胞または組成物を腫瘍細胞に投与する工程を含む、腫瘍細胞を殺す方法を提供する。該方法は、in vitroまたはin vivoで実行してもよい。腫瘍細胞の殺傷は、例えば抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）、補体依存性細胞傷害性（CDC）の結果として、あるいは抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、細胞または組成物にコンジュゲート化された薬剤の作用を通じてであってもよい。

50

## 【0059】

本発明の別の側面において、癌を患う患者に、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、細胞または組成物を投与する工程を含む、癌を治療する方法を提供する。

## 【0060】

癌は、CTLA-4を発現するかまたは過剰発現する癌であってもよいし、あるいはCTLA-4を発現するかまたは過剰発現する細胞を含んでもよい。

本発明の別の側面において、被験体において、免疫反応を調節する方法であって、被験体における免疫反応が調節されるように、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、細胞または組成物を、被験体に投与する工程を含む、前記方法を提供する。

10

## 【0061】

本発明の別の側面において、腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、細胞または組成物を投与する工程を含む、前記方法を提供する。該方法は、*in vitro*または*in vivo*であってもよい。いくつかの態様において、被験体において、腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、細胞または組成物の療法的有効量を、被験体に投与する工程を含む、前記方法を提供する。

## 【0062】

20

本発明の別の側面において、CTLA-4を含有するかまたは含有すると推測される試料を、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、CARまたは細胞と接触させ、そして抗体、抗原結合性断片、CARまたは細胞およびCTLA-4の複合体の形成を検出する工程を含む、方法を提供する。

## 【0063】

本発明の別の側面において、被験体における疾患または状態を診断する方法であって、*in vitro*で、被験体由来の試料を、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、CARまたは細胞と接触させ、そして抗体、抗原結合性断片、CARまたは細胞およびCTLA-4の複合体の形成を検出する工程を含む、前記方法を提供する。

## 【0064】

30

本発明のさらなる側面において、*in vitro*でのCTLA-4の検出のための、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、CARまたは細胞の使用を提供する。本発明の別の側面において、*in vitro*診断剤としての、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、CARまたは細胞の使用を提供する。

## 【0065】

本発明の方法において、抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CARまたは細胞は、本明細書に記載するような組成物として提供されてもよい。

別の側面において、本発明は、被験体において、癌を治療するかまたは防止する方法であって：

(a) 被験体から少なくとも1つの細胞を単離し；

40

(b) 少なくとも1つの細胞が、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、核酸またはベクターを発現するかまたは含むように修飾し、そして；

(c) 被験体に、修飾した少なくとも1つの細胞を投与する工程を含む、前記方法を提供する。

## 【0066】

別の側面において、本発明は、被験体において、癌を治療するかまたは防止する方法であって：

(a) 被験体から少なくとも1つの細胞を単離し；

(b) 少なくとも1つの細胞に、本明細書記載の核酸またはベクターを導入し、それに

50

よって、少なくとも1つの細胞を修飾し、そして；

(c)被験体に、修飾した少なくとも1つの細胞を投与する工程を含む、前記方法を提供する。

【0067】

別の側面において、本発明は、あらかじめ決定した量の本明細書記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、組成物、核酸、ベクターまたは細胞を含む部分のキットを提供する。

【0068】

いくつかの態様において、抗体は、本明細書に記載するようなクローン2C8または2C8—g1であってもよい。

【図面の簡単な説明】

【0069】

本発明の原理を例示する態様および実験は、ここで、付随する図に言及しながら論じられる。

【図1】抗CTLA-4抗体クローン2C8および2C8—g1の軽鎖可変ドメイン配列。CDRを下線で示し、そして別個に示す。

【図2】抗CTLA-4抗体クローン2C8および2C8—g1の重鎖可変ドメイン配列。CDRを下線で示し、そして別個に示す。

【図3A】抗CTLA-4抗体クローン2C8および2C8—g1の重鎖および軽鎖可変ドメイン配列のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸配列。

【図3B】抗CTLA-4抗体クローン2C8および2C8—g1の重鎖および軽鎖可変ドメイン配列のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸配列。

【図4A】バイオパニング後の抗ヒトCTLA-4ヒットの選択を示す棒グラフ。FabをヒトCTLA-4と混合し、そしてCD80への結合をELISAによって分析した。矢印は、CD80へのCTLA-4結合の効率的な遮断剤であることが同定された、クローン2C8を示す。

【図4B】バイオパニング後の抗ヒトCTLA-4ヒットの選択を示す棒グラフ。FabをヒトCTLA-4と混合し、そしてCD80への結合をELISAによって分析した。矢印は、CD80へのCTLA-4結合の効率的な遮断剤であることが同定された、クローン2C8を示す。

【図5】ヒトCTLA-4への2C8 Fabの結合のELISA分析の結果を示すグラフ。

【図6】2C8 Fabによる、CD80へのCTLA-4結合の遮断のELISA分析の結果を示すグラフ。

【図7】マウスCTLA-4への2C8 IgGの結合のELISA分析の結果を示すグラフ。

【図8】ヒトCD28への2C8の結合のELISA分析の結果を示すグラフ。

【図9】ヒトCTLA-4への2C8の結合の結合アフィニティのELISA分析の結果を示すグラフ。示すのは、どちらも2つ組で行った、2回の独立の実験に関する平均吸光度±SDである。

【図10】ヒトCTLA-4への2C8の結合のアビディティのELISA分析結果を示すグラフ。

【図11】CD80を通じた活性化のCTLA-4誘導性阻害後の、2C8によるT細胞活性の回復を示すグラフ。示すのは、上清中のIL-2濃度に対応する吸光度測定の実験における、2つ組に関する平均±SDである。

【図12】CD86を通じた活性化のCTLA-4誘導性阻害後の、2C8によるT細胞活性の回復を示すグラフ。示すのは、上清中のIL-2濃度に対応する吸光度測定の実験における、2つ組に関する平均±SDである。

【図13】結腸癌のMC38腫瘍増殖マウスモデルにおけるin vivoの2C8の抗腫瘍活性の分析結果を示すグラフ。(A)および(B)は、2回の独立の実験の結果を示

10

20

30

40

50

す。

【図14】カニクイザル(cynomolgus)/アカゲザル(rhesus)CTLA-4への2C8の結合を示すグラフ。

【図15】マウスCTLA-4に関する結合アフィニティを示すグラフ。示すのは、2C8、2C8 g1およびLALA突然変異を伴う2C8のIgG1型、2C8のIgG4型、イピリムマブ(ヒト抗huCTLA-4)およびIgG1アイソタイプ対照の2つ組に関する平均吸光度 $\pm$ SDである。

【図16】マウスCTLA-4に関する結合アビディティを示すグラフ。示すのは、2C8、2C8 g1およびLALA突然変異を伴う2C8のIgG1型、2C8のIgG4型、イピリムマブ(マウスCTLA-4と交差反応しないことが知られている抗huCTLA-4)およびIgG1アイソタイプ対照の2つ組に関する平均吸光度 $\pm$ SDである。

【図17】ヒトCTLA-4でトランスフェクションされているHEK-293.6E細胞への2C8の結合を示すグラフ。示すのは、2つ組に関する平均蛍光強度 $\pm$ SDである。

【図18】マウスCTLA-4でトランスフェクションされているHEK-293.6E細胞への2C8の結合を示すグラフ。示すのは、2つ組に関する平均蛍光強度 $\pm$ SDである。

【図19A】活性化のCTLA-4誘導性障害後の、2C8または派生抗体による、T細胞活性の回復を示すグラフ。示すのは、陽性対照としてのイピリムマブおよびIgG1アイソタイプ対照を用いた、4回の独立の実験(A~D)における2つ組に関する分泌IL-2の平均 $\pm$ SDである。

【図19B】活性化のCTLA-4誘導性障害後の、2C8または派生抗体による、T細胞活性の回復を示すグラフ。示すのは、陽性対照としてのイピリムマブおよびIgG1アイソタイプ対照を用いた、4回の独立の実験(A~D)における2つ組に関する分泌IL-2の平均 $\pm$ SDである。

【図19C】活性化のCTLA-4誘導性障害後の、2C8または派生抗体による、T細胞活性の回復を示すグラフ。示すのは、陽性対照としてのイピリムマブおよびIgG1アイソタイプ対照を用いた、4回の独立の実験(A~D)における2つ組に関する分泌IL-2の平均 $\pm$ SDである。

【図19D】活性化のCTLA-4誘導性障害後の、2C8または派生抗体による、T細胞活性の回復を示すグラフ。示すのは、陽性対照としてのイピリムマブおよびIgG1アイソタイプ対照を用いた、4回の独立の実験(A~D)における2つ組に関する分泌IL-2の平均 $\pm$ SDである。

【発明を実施するための形態】

【0070】

抗体

本発明記載の抗体は、好ましくは、CTLA-4(抗原)、好ましくはヒトまたはネズミCTLA-4に、任意に2~20nMの範囲の $K_D$ で結合する。

【0071】

本発明記載の抗体は、単離型で提供されてもよい。

本発明記載の抗体は、以下の特性の少なくとも1つを示しうる：

a)(例えばSPRによって決定した際)1 $\mu$ Mまたはそれ未満、好ましくは、100nM、75nM、50nM、40nM、30nM、20nM、15nM、12.5nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、500pMの1つの $K_D$ で、ヒトまたはマウスCTLA-4に結合する；

b)(例えばELISAによって決定した際)EC50=1 $\mu$ Mまたはそれ未満、好ましくは、100nM、75nM、50nM、40nM、30nM、20nM、15nM、12.5nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、500pMの1つの結合アフ

10

20

30

40

50

ィニティで、ヒトまたはマウス C T L A - 4 に結合する；

c ) ( 例えば E L I S A によって決定した際 ) E C 5 0 = 5 0 0 p M またはそれ未満、好ましくは、 4 0 0 p M、 3 0 0 p M、 2 0 0 p M、 1 5 0 p M、 1 0 0 p M、 9 0 p M、 8 0 p M、 7 5 p M、 7 0 p M、 6 5 p M、 6 0 p M、 5 5 p M、 5 0 p M の 1 つの結合アビディティで、ヒトまたはマウス C T L A - 4 に結合する；

d ) C D 2 8 ( 例えばヒト C D 2 8 またはマウス C D 2 8 ) に実質的に結合を示さない。

#### 【 0 0 7 2 】

e ) ヒトおよびマウス C T L A - 4 に結合し、そしてヒト C D 2 8 に実質的に結合を示さない；

f ) C T L A - 4 および C D 8 0、任意にヒト C T L A - 4 およびヒト C D 8 0、の間の相互作用を阻害するかまたは防止する；

g ) C T L A - 4 および C D 8 6、任意にヒト C T L A - 4 およびヒト C D 8 6、の間の相互作用を阻害するかまたは防止する；

h ) C T L A - 4 および C D 8 0 の間の相互作用ならびに C T L A - 4 および C D 8 6 の間の相互作用、任意にヒト C T L A - 4、ヒト C D 8 0 およびヒト C D 8 6 の間の相互作用を阻害するかまたは防止する；

i ) C D 2 8 および C D 8 0、任意にヒト C D 2 8 およびヒト C D 8 0、の間の相互作用を阻害せずまたは防止しない；

j ) C D 2 8 および C D 8 6、任意にヒト C D 2 8 およびヒト C D 8 6、の間の相互作用を阻害せずまたは防止しない；

k ) C D 2 8 および C D 8 0 の間の相互作用、ならびに C D 2 8 および C D 8 6 の間の相互作用、任意にヒト C D 2 8、ヒト C D 8 0 およびヒト C D 8 6 の間の相互作用を阻害せずまたは防止しない；

l ) *in vitro* で T 細胞の活性化を増加させる；

m ) T 細胞再活性化アッセイにおいて、T 細胞による I L - 2 産生を増加させる；

n ) 感染に反応して、T 細胞増殖、I L - 2 産生および I F N 産生の 1 またはそれより多くを増加させる；

) 任意に *in vivo* で腫瘍増殖を阻害する。

#### 【 0 0 7 3 】

いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、免疫細胞、例えば T 細胞集団の拡大のための方法において有用でありうる。本発明記載の抗体は、望ましい特性を持つ免疫細胞集団の拡大のために有用である。

#### 【 0 0 7 4 】

いくつかの態様において、本発明の抗体は、免疫制御 / 免疫抑制表現型を持つ免疫細胞 ( 例えば T r e g ) よりも、エフェクター表現型を持つ免疫細胞 ( 例えば C T L ) 集団を拡大するための方法において、拡大するために有用である。

#### 【 0 0 7 5 】

「抗体」によって、本発明者らは、その断片または誘導体、あるいは合成抗体または合成抗体断片も含める。

モノクローナル抗体技術に関連した今日の技術を考慮すると、抗体は、大部分の抗原に対して調製可能である。抗原結合部分は、抗体の部分 ( 例えば F a b 断片 ) または合成抗体断片 ( 例えば一本鎖 F v 断片 [ S c F v ] ) であってもよい。選択した抗原に対する適切なモノクローナル抗体を、既知の技術、例えば、 “ M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s : A m a n u a l o f t e c h n i q u e s ” , H Z o l a ( C R C P r e s s , 1 9 8 8 ) に、そして “ M o n o c l o n a l H y b r i d o m a A n t i b o d i e s : T e c h n i q u e s a n d A p p l i c a t i o n s ” , J G R H u r r e l l ( C R C P r e s s , 1 9 8 2 ) に開示されるものによって調製してもよい。キメラ抗体は、N e u b e r g e r ら ( 1 9 8 8 , 8 t

10

20

30

40

50

h International Biotechnology Symposium  
Part 2, 792-799) によって論じられる。

【0076】

モノクローナル抗体 (mAb) は、本発明の方法において有用であり、そして抗原上の単一のエピトープを特異的にターゲティングする抗体の均質な集団である。

ポリクローナル抗体は、本発明の方法において有用である。単一特異的ポリクローナル抗体が好ましい。当該技術分野に周知の方法を用いて、適切なポリクローナル抗体を調製してもよい。

【0077】

いくつかの態様において、抗体 / 断片は、完全ヒト抗体 / 断片である。完全ヒト抗体 / 断片は、ヒト核酸配列 (単数または複数) によってコードされる。完全ヒト抗体 / 断片は、非ヒトアミノ酸配列を欠く。

10

【0078】

いくつかの態様において、抗体 / 断片は、キメラ抗体 / 断片であってもよい。キメラ抗体 / 断片は、異なる抗体 / 断片由来のアミノ酸配列を含んでもよい。例えば、キメラ抗体 / 断片は、1つの抗体 / 抗原結合性断片由来のCDRまたは可変ドメイン配列 (単数または複数)、および別の抗体 / 抗原結合性断片由来の定常領域配列 (単数または複数) を含んでもよい。いくつかの態様において、キメラ抗体 / 断片は、1つの抗体 / 抗原結合性断片由来のCDR、ならびに別の抗体 / 抗原結合性断片の定常領域配列 (単数または複数) およびフレームワーク領域配列 (単数または複数) を含んでもよい。

20

【0079】

いくつかの態様において、キメラ抗体 / 断片は、本明細書記載の抗CTLA-4クローン2C8または2C8\_\_g1のCDRまたは可変ドメイン配列 (単数または複数)、および別の抗体 / 抗原結合性断片の定常領域配列 (単数または複数) を含んでもよい。いくつかの態様において、キメラ抗体 / 断片は、本明細書記載の抗CTLA-4クローン2C8または2C8\_\_g1のCDR、ならびに別の抗体 / 抗原結合性断片の定常領域配列 (単数または複数) およびフレームワーク領域配列 (単数または複数) を含んでもよい。

【0080】

いくつかの態様において、キメラ抗体 / 断片は、1つの種由来の抗体由来のCDRまたは可変ドメイン配列 (単数または複数) および別の種由来の抗体由来の定常領域配列 (単数または複数) を含んでもよい。いくつかの態様において、キメラ抗体 / 断片は、1つの種由来の抗体由来のCDR、ならびに別の種由来の抗体由来の定常領域配列 (単数または複数) およびフレームワーク領域配列 (単数または複数) を含んでもよい。

30

【0081】

いくつかの態様において、本発明にしたがったキメラ抗体 / 断片は、本明細書記載の抗CTLA-4クローン2C8または2C8\_\_g1由来のCDRまたは可変ドメイン配列 (単数または複数)、および非ヒト種由来の抗体由来の定常領域配列 (単数または複数) を含んでもよい。いくつかの態様において、本発明記載のキメラ抗体 / 断片は、本明細書記載の抗CTLA-4クローン2C8または2C8\_\_g1由来のCDR、ならびに非ヒト種由来の抗体由来の定常領域配列 (単数または複数) およびフレームワーク領域配列 (単数または複数) を含んでもよい。いくつかの態様において、非ヒト種は、例えば非ヒト哺乳動物 (例えばウサギ、モルモット、ラット、マウスまたは他の齧歯類 (齧歯類目 (order Rodentia) の任意の動物を含む)、ネコ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ (雌牛、例えば乳牛、またはウシ目 (order Bos) の任意の動物を含む)、ウマ (ウマ目 (order Equidae) の任意の動物を含む)、ロバ、および非ヒト霊長類) であってもよい。

40

【0082】

いくつかの態様において、本発明記載の抗体 / 断片は、関心対象の種において天然に産生される抗体に対する類似性を増加させるため、修飾 (例えば1またはそれより多いアミノ酸置換) を含んでもよい。

50

## 【0083】

FabおよびFab<sub>2</sub>断片などの、抗体の抗原結合性断片もまた用いて／提供してもよく、遺伝子操作した抗体および抗体断片もまた用いて／提供してもよい。抗体の可変重鎖(V<sub>H</sub>)および可変軽鎖(V<sub>L</sub>)ドメインは、抗原認識に関与し、この事実は、初期のプロテアーゼ消化実験によって最初に認識された。さらなる確認は、齧歯類抗体の「ヒト化」によって見出された。齧歯類起源の可変ドメインを、ヒト起源の定常ドメインに融合させて、生じる抗体が、齧歯類親抗体の抗原特異性を保持するようにしてもよい(Morrisonら(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855)。

## 【0084】

抗原特異性は可変ドメインによって与えられ、そして定常ドメインからは独立であることは、すべて1またはそれより多くの可変ドメインを含有する抗体断片の細菌発現を伴う実験から知られる。これらの分子には、Fab様分子(Betterら(1988) Science 240, 1041); Fv分子(Skerreraら(1988) Science 240, 1038); V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>パートナードメインが柔軟なオリゴペプチドを通じて連結される、一本鎖Fv(ScFv)分子(Birdら(1988) Science 242, 423; Hustonら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879);ならびに単離Vドメインを含む単一ドメイン抗体(dAb)(Wardら(1989) Nature 341, 544)が含まれる。特異的結合部位を保持する抗体断片合成に関与する技術の一般的な概説は、Winter & Milstein(1991) Nature 349, 293-299中に見出されるはずである。

## 【0085】

「ScFv分子」によって、本発明者らは、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>パートナードメインが、例えば柔軟なオリゴペプチドによって共有結合されている分子を意味する。

Fab、Fv、ScFvおよびdAb抗体断片は、すべて大腸菌において発現可能であり、そして大腸菌から分泌可能であり、したがって、多量の前記断片の容易な産生が可能になる。

## 【0086】

全抗体、およびF(ab')<sub>2</sub>断片は「二価」である。「二価」によって、本発明者らは、前記抗体およびF(ab')<sub>2</sub>断片が2つの抗原結合部位を有することを意味する。対照的に、Fab、Fv、ScFvおよびdAb断片は一価であり、1つの抗原結合部位しか持たない。また、当該技術分野に周知であるようなファージディスプレイ技術を用いて、CTLA-4に結合する合成抗体を作製してもよい。

## 【0087】

やはり提供するのには、本発明記載の抗原結合性断片またはポリペプチドを含む、多重特異性抗体および多重特異性抗原結合性断片である。

本明細書において、「多重特異性」は、1より多いエピトープに対する特異性を有することを意味する。いくつかの態様において、多重特異性抗体または多重特異性抗原結合性断片は、例えば2(二重特異性)、3(三重特異性)、4、5、6、7、8、9または10の異なるエピトープに対して特異的であってもよい。

## 【0088】

いくつかの態様において、本発明記載の多重特異性抗体／断片は、1より多いターゲット分子に対する特異性を有してもよい。いくつかの態様において、多重特異性抗体／断片は、例えば2(二重特異性)、3(三重特異性)、4、5、6、7、8、9または10の異なるターゲット分子に対して特異的であってもよい。

## 【0089】

いくつかの態様において、多重特異性抗体および多重特異性抗原結合性断片は、CTLA-4に結合可能な抗原結合性断片、および別のターゲットタンパク質に結合可能な抗原結合性断片を含む。いくつかの態様において、多重特異性抗体／断片は、CTLA-4に



結合可能な抗原結合性断片、および別のターゲットタンパク質、すなわち C T L A - 4 以外のタンパク質に結合可能な例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、または 9 の抗原結合性断片（単数または複数）を含む。

【0090】

本出願はまた、C T L A - 4 に結合可能であり、そして二重特異性抗体または二重特異性抗原結合性断片である、抗体または抗原結合性断片も提供する。いくつかの態様において、二重特異性抗体または二重特異性抗原結合性断片は単離されていてもよい。

【0091】

いくつかの態様において、二重特異性抗体および二重特異性抗原結合性断片は、本発明記載の抗原結合性断片またはポリペプチドを含む。いくつかの態様において、二重特異性抗体および二重特異性抗原結合性断片は、C T L A - 4 に結合可能な抗原結合性断片であって、C T L A - 4 に結合可能な抗原結合性断片が本発明記載の抗原結合性断片またはポリペプチドを含むかまたはこれらからなる、前記断片を含む。

【0092】

いくつかの態様において、二重特異性抗体および二重特異性抗原結合性断片は、C T L A - 4 に結合可能な抗原結合性断片、および別のターゲットタンパク質に結合可能な抗原結合性断片を含む。

【0093】

別のターゲットタンパク質に結合可能な抗原結合性断片は、C T L A - 4 以外の別のタンパク質に結合可能であってもよい。

いくつかの態様において、ターゲットタンパク質は、細胞表面受容体であってもよい。いくつかの態様において、ターゲットタンパク質は、免疫細胞、例えば T 細胞の細胞表面上に発現される細胞表面受容体であってもよい。いくつかの態様において、細胞表面受容体は、免疫チェックポイント受容体であってもよい。いくつかの態様において、免疫チェックポイント受容体は、共刺激受容体であってもよい。いくつかの態様において、共刺激受容体は、C D 2 7、C D 2 8、I C O S、C D 4 0、C D 1 2 2、O X 4 3、4 - 1 B B および G I T R より選択されてもよい。いくつかの態様において、免疫チェックポイント受容体は阻害性受容体であってもよい。いくつかの態様において、阻害性受容体は、B 7 - H 3、B 7 - H 4、B T L A、L A G - 3、A 2 A R、V I S T A、T I M - 3、P D - 1、および K I R より選択されてもよい。

【0094】

いくつかの態様において、ターゲットタンパク質は癌マーカーであってもよい。すなわち、ターゲットタンパク質は、その発現（例えば上方制御された発現）が癌と関連するタンパク質であってもよい。いくつかの態様において、癌マーカーは、細胞表面で発現されてもよい。いくつかの態様において、癌マーカーは受容体であってもよい。いくつかの態様において、癌マーカーは、H E R - 2、H E R - 3、E G F R、E p C A M、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 8、C D 2 0、C D 2 4、C D 9 0、C D 1 5、C D 5 2、C A - 1 2 5、C D 3 4、C A - 1 5 - 3、C A - 1 9 - 9、C E A、C D 9 9、C D 1 1 7、C D 3 1、C D 4 4、C D 1 2 3、C D 1 3 3、A B C B 5 および C D 4 5 より選択されてもよい。

【0095】

いくつかの態様において、C D 2 7 の抗原結合性断片は、例えば抗 C D 2 7 抗体クローン 0 3 2 3 ( M i l l o p o r e ) またはバルリルマブ ( C e l l d e x T h e r a p e u t i c s ) の C D R、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他の C D 2 7 結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、C D 2 8 の抗原結合性断片は、例えば抗 C D 2 8 抗体クローン C D 2 8 . 6 ( e B i o s c i e n c e )、クローン C D 2 8 . 2、クローン J J 3 1 9 ( N o v u s B i o l o g i c a l s )、クローン 2 0 4 . 1 2、クローン B - 2 3、クローン 1 0 F 3 ( T h e r m o S c i e n t i f i c P i e r c e A n t i b o d i e s )、クローン 3 7 4 0 7 ( R & D S y s t e m s )、クローン 2 0 4 - 1 2 ( A b n o v a C o r p o r a t i o n )、クローン 1 5 E 8 ( E M D

10

20

30

40

50

Millopore)、クローン204-12、クローンYTH913.12 (AbD Serotec)、クローンB-T3 (Acris Antibodies)、クローン9H6E2 (Sino Biological)、クローンC28/77 (MyBioSource.com)、クローンKOLT-2 (ALPCO)、クローン152-2E10 (Santa Cruz Biotechnology)、またはクローンXPH-56 (Creative Diagnostics)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD28結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、ICOSの抗原結合性断片は、例えば抗ICOS抗体クローンISA-3 (eBioscience)、クローンSP98 (Novus Biologicals)、クローン1G1、クローン3G4 (Abnova Corporation)、クローン669222 (R&D Systems)、クローンTQ09 (Creative Diagnostics)、またはクローンC398.4A (BioLegend)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のICOS結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD40の抗原結合性断片は、例えば抗CD40抗体クローン82111 (R&D Systems)、またはASKP1240 (Okimuraら, AM J Transplant (2014) 14(6):1290-1299)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD40結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD122の抗原結合性断片は、抗CD122抗体クローンmik-2 (PharMingen)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD122結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、OX43の抗原結合性断片は、例えばUS 20130280275、US 8283450またはWO2013038191に開示される抗OX43抗体、例えばクローン12H3またはクローン20E5のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のOX43結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、4-1BBの抗原結合性断片は、例えば抗4-1BB抗体PF-05082566 (Fisherら, Cancer Immunol Immunother (2012) 61:1721-1733)、またはウレルマブ (BMS-665513; Bristol-Myers Squibb; LiおよびLiu, Clin Pharmacol (2013); 5:47-53)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他の4-1BB結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、GITRの抗原結合性断片は、例えば抗GITR抗体TRX-518 (Tolerx<sup>R</sup>; Schaerら, (2010) 11(12):1378-1386)、またはクローンAIT 518D (LifeSpan Biosciences)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のGITR結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、B7-H3の抗原結合性断片は、例えばUS 20130078234、WO2014160627またはWO2011109400に開示される抗B7-H3抗体クローンのCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のB7-H3結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、B7-H4の抗原結合性断片は、例えばWO2013067492、WO2009073533またはEP2934575に開示される抗B7-H4抗体クローン、例えばクローン2H9のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のB7-H4結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、BTLAの抗原結合性断片は、例えば抗BTLA抗体クローン1B7、クローン2G8、クローン4C5 (Abnova Corporation)、クローン4B8 (antibodies-online)、クローンMIH26 (Thermo Scientific Pierce Antibodies)、クローンUMAB61 (OriGene Technologies)、クローン330104 (R&D Systems)、クローン1B4 (LifeSpan Biosciences)、クローン440205、クローン5E7 (Creative Diagnostics)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のBTLA結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、LAG-3の抗原結合性断片は、例えば抗LAG-3抗体クローン17B4 (Enzo Life Sciences)、クローン333210 (R&D Systems)、クローン14L676 (United

10

20

30

40

50

States Biological)、BMS-986016、またはWO2015042246 A1に記載される抗LAG-3抗体のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のLAG-3結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、A2ARの抗原結合性断片は、例えば抗A2AR抗体クローン7F6(Millipore; Koshibaら Molecular Pharmacology(1999); 55: 614-624)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のA2AR結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、VISTAの抗原結合性断片は、例えばWO2015097536またはUS20140105912に開示される抗VISTA抗体、例えばクローン13F3のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のVISTA結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、TIM-3の抗原結合性断片は、例えば抗TIM-3抗体クローンF38-2E2(BioLegend)、クローン2E2(Merck Millipore; Pires da Silvaら, Cancer Immunol Res(2014) 2(5): 410-422)、クローン6B6E2、クローン024(Sino Biological) クローン344801(R&D Systems)、クローンE-18、クローンH-191(Santa Cruz Biotechnology)、またはクローン13A224(United States Biological)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のTIM-3結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、PD-1の抗原結合性断片は、例えば抗PD-1抗体クローンJ116、クローンMIH4(eBioscience)、クローン7A11B1(Rockland Immunochemicals Inc.)、クローン192106(R&D Systems)、クローンJ110、クローンJ105(MBL International)、クローン12A7D7、クローン7A11B1(Abbottec)、クローン#9X21(MyBioSource.com)、クローン4H4D1(Proteintech Group)、クローンD3W4U、クローンD3O4S(Cell Signaling Technology)、クローンRMP1-30、クローンRMP1-14(Merck Millipore)、クローンEH12.2H7(BioLegend)、クローン10B1227(United States Biological)、クローンUMAB198、クローンUMAB197(Origene Technologies)、ニボルマブ(BMS-936558)、ラムプロリズマブ、あるいはWO 2010/077634またはWO 2006/121168に記載される他の抗PD-1抗体のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のPD-1結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、KIRの抗原結合性断片は、例えば抗KIR抗体クローン1-7F9(Romagneら, Blood(2009) 114(13): 2667-2677)、リリルマブ(BMS-986015; Solaら, J Immunother Cancer(2013); 1:P40)あるいはUS 2015/0344576またはWO 2014/066532に記載される抗KIR抗体のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のKIR結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、HER-2の抗原結合性断片は、例えば抗HER-2抗体トラスツズマブ(ハーセプチン)、あるいはWO 2003/006509またはWO 2008/019290に記載される抗HER-2抗体のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のHER-2結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、HER-3の抗原結合性断片は、例えば抗HER-3抗体クローンMM-121(Lyuら, Int. J Clin Exp Pathol(2015) 8(6): 6143-6156)、MEHD7945A(Schaeferら, Cancer Cell(2011) 20(4): 472-486)、AMG 888(U3-1287; Aurisicchioら, Oncotarget(2012) 3(8): 744-758)あるいはWO2008/100624またはWO 2013048883に記載される抗HER-3抗体のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のHER-3結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、EGFRの抗原結合性断片は、例えば抗EGFR抗体パニツムマブ(ABX-

10

20

30

40

50

E G F ; ベクチビックス)、セツキシマブ(エルピタックス)、ニモツズマブ、マタズマブ(EMD 7200)または抗体クローン048-006(Sogawara, Nucleic Acid Med Comm(2012) 33(7): 719-725)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のE G F R結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、E p C A Mの抗原結合性断片は、例えば抗E p C A M抗体エドレコロマブ、IN G - 1、3622W4、またはアデカツムマブ(Munzら, Cancer Cell Int(2010) 10:44)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のE p C A M結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD30の抗原結合性断片は、例えば抗CD30抗体ブレンツキシマブ(cAC10)、クローンSGN-30(Wahlら, Cancer Res 2002 62(13): 3736-3742)、クローン5F11(Borchmannら, Blood(2003) 102(1): 3737-3742)、あるいはWO 1993024135またはWO 2003059282に記載される抗CD30抗体のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD30結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD33の抗原結合性断片は、例えば抗CD33抗体リンツズマブ(SGN-33)、ゲムツズマブ(ミロターゲット)、またはクローンhP67.7(Sieversら, Blood(1999) 93(11): 3678-3684)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD33結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD38の抗原結合性断片は、例えば抗CD38抗体ダラツムマブ(ダルザレックス)、SAR650984(Martinら, J Clin Oncol(2014) 32:5s, (補遺;要約 8532)またはMOR202(MorphoSys AG)、あるいはWO 2006099875またはUS 20100285004に記載される抗CD38抗体のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD38結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD20の抗原結合性断片は、例えば抗CD20抗体リツキシマブ、オクレリズマブ、オフアツムマブ、オビヌツズマブまたはBM-ca(Kobayashiら, Cancer Med(2013) 2(2): 130-143)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD20結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD24の抗原結合性断片は、例えば抗CD24抗体クローンeBioSN3(eBioscience)、クローンML5(BD Biosciences)、またはWO 2008059491に記載される抗CD24抗体のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD24結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD90の抗原結合性断片は、例えば抗CD90抗体クローン5E10(BD Biosciences)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD90結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD15の抗原結合性断片は、例えば抗CD15抗体クローンC3D-1、Carb-3(DAKO A/S)、MMA(Roche)またはBY87(Abcam)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD15結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD52の抗原結合性断片は、例えば抗CD52抗体アレムツズマブ、クローンHI186、またはクローンYTH34.5(AbD Serotec)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD52結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CA-125の抗原結合性断片は、例えば抗CA-125抗体オレゴボマブのCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCA-125結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD34の抗原結合性断片は、例えば抗CD34抗体クローン561(BioLegend)、クローン581(Beckton Dickinson)、またはクローン5F3(Sigma Aldrich)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD34結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CA-15-3の抗原結合性断片は、例えば抗CA-15-3抗体クローン2F16(USBiological)、クローンTA998(ThermoFisher Scientific)、クローン1D1(Sigma Aldrich)、またはMab AR20.5(Qi, Hybrid Hybridomics(2001) 20(5-6): 313-32

10

20

30

40

50

4) のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCA-15-3結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CA-19-9の抗原結合性断片は、例えば抗CA-19-9抗体クローン116-NS-19-9(DAKO A/S)、クローンSPM110、またはクローン121SLE(ThermoFisher Scientific)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCA-19-9結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CEAの抗原結合性断片は、例えば抗CEA抗体ラベツズマブ、C2-45(協和発酵キリン株式会社)あるいはImakiireら, Int J Cancer(2004) 108: 564-570またはWO 2011034660に開示される抗CEA抗体のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCEA結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD99の抗原結合性断片は、例えば抗CD99抗体クローンC7A(Moricoliら, J Immunol Methods(2014) 408: 35-45)またはクローン12E7(DAKO A/S)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD99結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD117の抗原結合性断片は、例えば抗CD117抗体クローンCK6(Lebronら, Cancer Biol Ther(2014) 15(9): 1208-1218)、またはクローン104D2(Sigma Aldrich)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD117結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD31の抗原結合性断片は、例えば抗CD31抗体クローンJC70A(DAKO A/S)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD31結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD44の抗原結合性断片は、例えば抗CD44抗体PF-03475952(Runnellsら, Adv Ther(2010); 27(3): 168-180)、RG7356(Vugt'sら, MAbs(2014) 6(2): 567-575)、クローンIM7、またはクローンA3D8(Sigma Aldrich)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD44結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD123の抗原結合性断片は、例えば抗CD123抗体CSL362(Nievergalら, Blood(2014) 123(8): 1218-1228)、CSL360(Heら, Leuk Lymphoma(2015) 56(5): 1406-1415) 73G(Jinら, Cell Stem Cell(2009) 5(1): 31-42) クローン6H6(ABD Serotec)またはWO 2014130635に記載される抗CD123抗体のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD123結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD133の抗原結合性断片は、例えば抗CD133抗体クローン6B3、クローン9G4、クローンAC141(Wangら, Hybridoma(Larchmt)(2010) 29(3): 241-249)、クローン6B6(Chenら, Hybridoma(Larchmt)(2010) 29(4): 305-310、クローンAC113(Miltényi Biotech)、またはWO 2011149493に記載される抗CD133抗体のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD133結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、ABCB5の抗原結合性断片は、例えば抗ABCB5抗体クローン5H3C6(Thermo Fisher Scientific)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のABCB5結合性断片を含んでもよい。いくつかの態様において、CD45の抗原結合性断片は、例えば抗CD45抗体YAML568(Glattingら, J Nucl Med(2006) 47(8): 1335-1341)またはクローンBRA-55(Sigma Aldrich)のCDR、軽鎖および重鎖可変ドメインまたは他のCD45結合性断片を含んでもよい。

#### 【0096】

本発明記載の二重特異性抗体の抗原結合性断片または二重特異性抗原結合性断片は、抗原に結合可能なポリペプチドの任意の断片であってもよい。いくつかの態様において、抗原結合性断片は、抗体または抗原結合性断片の抗原結合性領域と一緒に定義する少なくとも

10

20

30

40

50

も3つの軽鎖CDR(すなわちLC-CDR1、LC-CDR2およびLC-CDR3)および3つの重鎖CDR(すなわちHC-CDR1、HC-CDR2およびHC-CDR3)を含む。いくつかの態様において、抗原結合性断片は、抗体または抗原結合性断片の軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含んでもよい。いくつかの態様において、抗原結合性断片は、抗体または抗原結合性断片の軽鎖ポリペプチドおよび重鎖ポリペプチドを含んでもよい。

#### 【0097】

本発明記載の二重特異性抗体および二重特異性抗原結合性断片は、任意の適切な形式、例えば本明細書にその全体が援用されるKontermann MAb s 2012, 4(2): 182-197に記載される形式で提供されてもよい。例えば、二重特異性抗体または二重特異性抗原結合性断片は、二重特異性抗体コンジュゲート(例えばIgG2、F(ab')<sub>2</sub>またはCovX-Body)、二重特異性IgGまたはIgG様分子(例えばIgG、scFv<sub>4</sub>-Ig、IgG-scFv、scFv-IgG、DVD-Ig、IgG-sVD、sVD-IgG、2イン1-IgG、mAb<sup>2</sup>、またはTandemab共通LC)、非対称二重特異性IgGまたはIgG様分子(例えばkih IgG、kih IgG共通LC、CrossMab、kih IgG-scFab、mAb-Fv、電荷対(charge pair)またはSEED-body)、小分子二重特異性抗体分子(例えばディアボディ(Db)、dsDb、DART、scDb、tandAbs、タンデムscFv(taFv)、タンデムdAb/VHH、三重ボディ、三重ヘッド、Fab-scFv、またはF(ab')<sub>2</sub>-scFv<sub>2</sub>)、二重特異性FcおよびC<sub>H</sub>3融合タンパク質(例えばtaFv-Fc、Di-ディアボディ、scDb-C<sub>H</sub>3、scFv-Fc-scFv、HCAb-VHH、scFv-kih-Fc、またはscFv-kih-C<sub>H</sub>3)、または二重特異性融合タンパク質(例えばscFv<sub>2</sub>-アルブミン、scDb-アルブミン、taFv-毒素、DNL-Fab<sub>3</sub>、DNL-Fab<sub>4</sub>-IgG、DNL-Fab<sub>4</sub>-IgG-サイトカイン<sub>2</sub>)であってもよい。特に、Kontermann MAb s 2012, 4(2): 182-19の図2を参照されたい。

#### 【0098】

当業者は、本発明記載の二重特異性抗体および二重特異性抗原結合性断片を設計し、そして調製することが可能である。

二重特異性抗体を産生するための方法には、例えば還元可能ジスルフィドまたは還元不能チオエーテル結合を用いた、例えば本明細書にその全体が援用されるSegalおよびBast, 2001. 二重特異性抗体の産生。Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16に記載されるような、抗体または抗体断片の化学的架橋が含まれる。例えば、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオネート(SPDP)を用いて、例えばFab断片をヒンジ領域SH基を通じて化学的に架橋して、ジスルフィド連結二重特異性F(ab)<sub>2</sub>ヘテロ二量体を生成してもよい。

#### 【0099】

二重特異性抗体を産生するための他の方法には、例えばD. M.およびBast, B. J. 2001. 二重特異性抗体の産生。Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16に記載されるように、抗体産生ハイブリドーマを、例えばポリエチレングリコールで融合させて、二重特異性抗体を分泌可能なクアドローマ細胞を産生することが含まれる。

#### 【0100】

本発明記載の二重特異性抗体および二重特異性抗原結合性断片はまた、組換え的に、例えばどちらも本明細書にその全内容が援用される、Antibody Engineering: Methods and Protocols, 第2版(Humana Press, 2012), 第40章: 二重特異性抗体の産生: ディアボディおよびタンデムscFv(HornigおよびFarber-Schwarz)、またはFrench, 二重特異性抗体作製法, Methods Mol. Med. 2000;

40 : 333 - 339に記載されるような、抗原結合性分子のためのポリペプチドをコードする核酸構築物からの発現によって産生してもよい。例えば、2つの抗原結合性断片のための軽鎖および重鎖可変ドメイン（すなわちCTLA-4に結合可能な抗原結合性断片のための軽鎖および重鎖可変ドメイン、ならびに別のターゲットタンパク質に結合可能な抗原結合性断片のための軽鎖および重鎖可変ドメイン）をコードし、そして抗原結合性断片間に適切なリンカーまたは二量化ドメインをコードする配列を含むDNA構築物を、分子クローニング技術によって調製してもよい。その後、組換え二重特異性抗体を、適切な宿主細胞（例えば哺乳動物宿主細胞）において構築物を発現させる（例えば*in vitro*で）ことによって産生してもよく、そして次いで、任意に、発現した組換え二重特異性抗体を精製してもよい。

10

#### 【0101】

非修飾親抗体に比較して、抗原に対する抗体のアフィニティが改善されている修飾抗体を生成する、アフィニティ成熟プロセスによって抗体を産生してもよい。当該技術分野に知られる方法、例えばMarksら, Rio/Technology 10:779-783(1992); Barbasら Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813(1994); Schierら Gene 169:147-155(1995); Yeltonら J. Immunol. 155:1994-2004(1995); Jacksonら, J. Immunol. 154(7):3310-3319(1995); およびHawkinsら, J. Mol. Biol. 226:889-896(1992)によって、アフィニティ成熟抗体を産生してもよい。

20

#### 【0102】

本発明記載の抗体は、好ましくはCTLA-4に対する特異的結合を示す。ターゲット分子に特異的に結合する抗体は、好ましくは、他のターゲットに結合するよりもより高いアフィニティで、および/またはより長い期間、ターゲットに結合する。いくつかの態様において、本発明の抗体は、PD-1、TIM-3、ICOS、BTLA、CD28またはLAG-3の1またはそれより多くに対してよりも、CTLA-4に対して、より高いアフィニティで結合可能である。

#### 【0103】

本発明の態様において、抗体、断片またはポリペプチドは、CD28、例えばヒトCD28に実質的に結合を示さない。先行技術の抗体（例えば抗体クローンL3D10）は、高濃度でCD28への結合を示すため（例えば図5を参照されたい）、これはCTLA-4への結合が可能な抗体に関する予期せぬ特徴である。好適には、こうした抗体は、CD28/CD80またはCD28/CD86シグナル伝達を阻害/防止することなく、CTLA-4/CD80またはCTLA-4/CD86シグナル伝達を阻害/防止可能である。

30

#### 【0104】

「実質的に結合しない」は、本明細書において、陰性対照抗体（例えばCD28に関連しないターゲットに対して向けられる抗体、またはCD28に結合しないことが知られる抗体）による結合レベルよりも有意に高くはない結合を指す。いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、所定のアッセイにおいてまたは所定の濃度で、陰性対照抗体（例えばCD28に関連しないターゲットに対して向けられる抗体、またはCD28に結合しないことが知られる抗体）によって示されるCD28への結合の500%、400%、300%、250%、200%、150%、または100%である、CD28（例えばヒトCD28）への結合を示してもよい。

40

#### 【0105】

所定の分子への本発明記載の抗体の結合は、ELISA、SPR、Bio-Layerインターフェロメトリー、フローサイトメトリーを含む当業者に周知の技術によって、またはラジオイムノアッセイ（RIA）によって、測定可能である。こうした分析を通じて、所定のターゲットへの結合を測定し、そして定量化してもよい。いくつかの態様におい

50

て、結合は、所定のアッセイにおいて検出される反応であってもよい。

【0106】

1つの態様において、関連しないターゲットへの抗体の結合の度合いは、例えばELISA、SPR、Bio-Layerインターフェロメトリーによって、またはRIAによって測定されるような、ターゲットに対する抗体の結合の約10%未満である。あるいは、結合特異性は、本発明の抗CTLA-4抗体が、別のターゲット分子に対する抗体の $K_D$ よりも少なくとも0.1桁分（すなわち $0.1 \times 10^n$ 、式中、 $n$ は桁を示す整数である）高い $K_D$ で、CTLA-4に結合する結合アフィニティの観点から、反映されうる。これは、任意に、少なくとも0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、または2.0の1つであってもよい。

10

【0107】

本発明記載の抗体は、好ましくは、10 nM、5 nM、3 nM、2 nM、1.5 nM、1.4 nM、1.3 nM、1.25 nM、1.24 nM、1.23 nM、1.22 nM、1.21 nM、1.2 nM、1.15 nM、1.1 nM、1.05 nM、1 nM、900 pM、800 pM、700 pM、600 pM、500 pMの1つの解離定数（ $K_D$ ）を有する。 $K_D$ は約0.1～約3 nMの範囲であってもよい。抗体のそのターゲットに対する結合アフィニティは、しばしば、解離定数（ $K_D$ ）の観点で記載される。結合アフィニティは、当該技術分野に知られる方法によって、例えば、ELISA、表面プラズモン共鳴（SPR；例えばHeartlyら、Methods Mol Biol (2012) 907: 411-442を参照されたい）、Bio-Layerインターフェロメトリー（例えばLadら、(2015) J Biomol Screen 20(4): 498-507を参照されたい）、または抗体のFab型および抗原分子で行う放射標識抗原結合アッセイ（RIA）によって、測定してもよい。

20

【0108】

本発明記載の抗体は、参照抗CTLA-4抗体による結合のアフィニティよりも高いアフィニティまたはこれと類似のアフィニティで、CTLA-4（例えばヒトCTLA-4またはマウスCTLA-4）に対する結合を示す。所定のターゲットに対する、本発明記載の抗体および参照抗体の結合の相対アフィニティは、例えば本明細書に記載するようなELISAによって決定可能である。

30

【0109】

本発明記載の抗体は、抗体クローンL3D10（例えばMayら、Blood (2005) 105: 1114-1120に記載される）による結合のアフィニティよりも高いアフィニティまたはこれと類似のアフィニティで、ヒトCTLA-4に対する結合を示してもよい。いくつかの態様において、抗体は、マウスCTLA-4に対する結合が可能な参照抗体よりも高いアフィニティまたはこれと類似のアフィニティで、マウスCTLA-4に対する結合を示してもよい。

【0110】

本明細書において、参照抗体に比較して、所定のターゲット分子に関して、「より高いアフィニティ」を示す抗体は、ターゲット分子に対する参照抗体の結合強度に比較した際に、より強い強度で、そのターゲット分子に結合する。所定のターゲット分子に関する抗体のアフィニティを、定量的に決定してもよい。いくつかの態様において、ターゲットタンパク質に対する参照抗体よりも高いアフィニティを示す抗体は、参照抗体によるそのターゲットの結合に関する値未満の $K_D$ 値またはEC50値でターゲット分子に結合してもよい。

40

【0111】

いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、所定のアッセイにおいて、CTLA-4に関する参照抗体のアフィニティの1.01倍またはそれより高い、1.05倍またはそれより高い、1.1倍またはそれより高い、1.15倍またはそれより高い、1.2倍またはそれより高い、1.25倍またはそれより高い、1.3倍またはそれより高い、1

50



． 3 5 倍またはそれより高い、 1 ． 4 倍またはそれより高い、 1 ． 4 5 倍またはそれより高い、 1 ． 5 倍またはそれより高い、 C T L A - 4 に関するアフィニティを有してもよい。いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、所定のアッセイにおいて、C T L A - 4 に関する参照抗体の対応する  $K_D$  値または E C 5 0 値の 0 ． 9 9 倍またはそれ未満、 0 ． 9 5 倍またはそれ未満、 0 ． 9 倍またはそれ未満、 0 ． 8 5 倍またはそれ未満、 0 ． 8 倍またはそれ未満、 0 ． 7 5 倍またはそれ未満、 0 ． 7 倍またはそれ未満、 0 ． 6 5 倍またはそれ未満、 0 ． 6 倍またはそれ未満、 0 ． 5 5 倍またはそれ未満、 0 ． 5 倍またはそれ未満の  $K_D$  値または E C 5 0 値で C T L A - 4 に結合する。

【 0 1 1 2 】

本発明記載の抗体は、好ましくは、 E C 5 0 = 5 0 0 p M またはそれ未満、より好ましくは、 4 0 0 p M、 3 0 0 p M、 2 0 0 p M、 1 5 0 p M、 1 0 0 p M、 9 0 p M、 8 0 p M、 7 5 p M、 7 0 p M、 6 5 p M、 6 0 p M、 5 5 p M、 5 0 p M の 1 つの結合アビディティで、ヒトまたはマウス C T L A - 4 に結合する。本明細書において、結合アビディティは、抗体：ターゲット複合体を形成する、抗体のターゲット分子への結合の強度を指す。高アビディティで結合する抗体は、ターゲット分子により強く結合し、そしてしたがって、安定な抗体：ターゲット複合体を形成する。ターゲット分子への抗体の結合アビディティを、例えば、本明細書に記載するような E L I S A によって分析し、そして定量化してもよい。

【 0 1 1 3 】

いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、C T L A - 4 および C D 8 0 の間の相互作用を阻害 / 防止してもよい。いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、C T L A - 4 および C D 8 6 の間の相互作用を阻害 / 防止してもよい。いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、C T L A - 4 および C D 8 0 の間の相互作用を阻害 / 防止してもよく、そして C T L A - 4 および C D 8 6 の間の相互作用を阻害 / 防止してもよい。

【 0 1 1 4 】

C T L A - 4 および C D 8 0 または C D 8 6 の間の相互作用の阻害 / 防止を、C T L A - 4 および C D 8 0 または C D 8 6 の間の相互作用と関連する反応の分析によって推測してもよい。本発明記載の抗体の C T L A - 4 および C D 8 0 または C D 8 6 の間の相互作用の相対阻害 / 防止を、例えば本明細書に記載するように、*in vitro* で決定してもよい。

【 0 1 1 5 】

いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、C T L A - 4 に結合可能な参照抗体、例えば抗体クローン L 3 D 1 0 による、C T L A - 4 および C D 8 0 または C D 8 6 の間の相互作用の阻害 / 防止より高いかまたはそれと同等の度合いまで、C T L A - 4 および C D 8 0 または C D 8 6 の間の相互作用を阻害 / 防止してもよい。いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、所定のアッセイにおいて、C T L A - 4 に結合可能な参照抗体による、C T L A - 4 および C D 8 0 または C D 8 6 の間の相互作用の阻害 / 防止よりも、 1 ． 0 1 倍またはそれより高い、 1 ． 0 5 倍またはそれより高い、 1 ． 1 倍またはそれより高い、 1 ． 1 5 倍またはそれより高い、 1 ． 2 倍またはそれより高い、 1 ． 2 5 倍またはそれより高い、 1 ． 3 倍またはそれより高い、 1 ． 3 5 倍またはそれより高い、 1 ． 4 倍またはそれより高い、 1 ． 4 5 倍またはそれより高い、 1 ． 5 倍またはそれより高い度合いまで、C T L A - 4 および C D 8 0 または C D 8 6 の間の相互作用を阻害 / 防止してもよい。

【 0 1 1 6 】

いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、C D 2 8 および C D 8 0 の間の相互作用を阻害 / 防止しなくてもよい。いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、C D 2 8 および C D 8 6 の間の相互作用を阻害 / 防止しなくてもよい。いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、C D 2 8 および C D 8 0 の間の相互作用を阻害 / 防止しなくてもよく、そして C D 2 8 および C D 8 6 の間の相互作用を阻害 / 防止しなくてもよい。

【 0 1 1 7 】

C D 2 8 および C D 8 0 または C D 8 6 の間の相互作用の阻害 / 防止を、例えば *i n v i t r o* アッセイにおいて、C D 2 8 および C D 8 0 または C D 8 6 の間の相互作用と関連した反応を測定することによって、分析してもよい。

【 0 1 1 8 】

いくつかの態様において、本発明記載の抗体の存在下で、C D 2 8 および C D 8 0 または C D 8 6 の間の相互作用に関連する反応は、抗体の非存在下での反応、あるいは陰性対照抗体（すなわち関連しないターゲットに対して向けられる抗体、あるいは C D 2 8、C D 8 0 または C D 8 6 に結合しないことが知られる抗体）の存在下での反応の 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、または 9 9 % であってもよい。

【 0 1 1 9 】

いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、C T L A - 4 に結合可能な参照抗体、例えば抗体クローン L 3 D 1 0 による、C T L A - 4 および C D 8 0 または C D 8 6 の間の相互作用の阻害 / 防止より高いかまたはそれと等しい度合いまで、C T L A - 4 および C D 8 0 または C D 8 6 の間の相互作用を阻害 / 防止してもよい。いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、所定のアッセイにおいて、C T L A - 4 に結合可能な参照抗体による、C T L A - 4 および C D 8 0 または C D 8 6 の間の相互作用の阻害 / 防止の 1 . 0 1 倍またはそれより高い、1 . 0 5 倍またはそれより高い、1 . 1 倍またはそれより高い、1 . 1 5 倍またはそれより高い、1 . 2 倍またはそれより高い、1 . 2 5 倍またはそれより高い、1 . 3 倍またはそれより高い、1 . 3 5 倍またはそれより高い、1 . 4 倍またはそれより高い、1 . 4 5 倍またはそれより高い、1 . 5 倍またはそれより高い度合いまで、C T L A - 4 および C D 8 0 または C D 8 6 の間の相互作用を阻害 / 防止してもよい。

【 0 1 2 0 】

本発明記載の抗体は、好ましくは、*i n v i t r o* で、T 細胞の活性化を増加させる。T 細胞活性化増加を、所定のアッセイにおける、T 細胞増殖、T 細胞による I L - 2 発現 / 産生、または I F N 発現 / 産生の増加の 1 またはそれより多くの検出によって推測してもよい。T 細胞増殖は、当業者に周知の方法によって、例えばトリチウム化チミジンの取り込みを測定することによって、または C F S E 色素希釈によって、例えば *A n t h o n y* ら、2 0 1 2 *C e l l s* 1 : 1 2 7 - 1 4 0 に記載されるように、評価してもよい。I L - 2 および / または I F N 発現 / 産生は、例えば当業者に周知の核酸 / 抗体に基づく方法、例えば q R T - P C R、ウェスタンブロット、免疫組織化学、免疫細胞化学、フローサイトメトリー、E L I S A、E L I S P O T によって、またはレポーターに基づく方法によって、分析してもよい。

【 0 1 2 1 】

いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、所定のアッセイにおいて、C T L A - 4 に結合可能な参照抗体（例えば L 3 D 1 0 ）と類似の度合いまで、またはより高い度合いまで、T 細胞増殖、I L - 2 産生および I F N 産生の 1 またはそれより多くを増加させてもよい。いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、所定のアッセイにおいて、C T L A - 4 に結合可能な参照抗体に反応した T 細胞増殖、I L - 2 産生および I F N 産生の増加の 1 . 0 1 倍またはそれより高い、1 . 0 5 倍またはそれより高い、1 . 1 倍またはそれより高い、1 . 1 5 倍またはそれより高い、1 . 2 倍またはそれより高い、1 . 2 5 倍またはそれより高い、1 . 3 倍またはそれより高い、1 . 3 5 倍またはそれより高い、1 . 4 倍またはそれより高い、1 . 4 5 倍またはそれより高い、1 . 5 倍またはそれより高い度合いまで、T 細胞増殖、I L - 2 産生および I F N 産生の 1 またはそれより多くを増加させてもよい。

【 0 1 2 2 】

いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、腫瘍増殖または癌進行を阻害可能であってもよい。いくつかの態様において、本発明記載の抗体は、抗癌活性を示してもよい。いくつかの態様において、腫瘍増殖または癌進行の阻害は、*i n v i v o* であってもよい。「阻害」は、腫瘍増殖の減少または制御、あるいは癌細胞数の減少または制御であっ

10

20

30

40

50

てもよい。腫瘍増殖または癌進行の阻害を、例えば本明細書に記載するような癌の動物モデルにおいて、*in vivo*で評価してもよい。

【0123】

本発明記載の抗体は、該抗体が結合する抗原の生物学的活性を阻害するかまたは減少させる「アンタゴニスト」抗体であってもよい。CTLA-4およびCD80および/またはCD86の間の相互作用のブロッキングは、CTLA-4によって仲介される免疫阻害性シグナル伝達経路を阻害することによって、T細胞機能の回復を補助する。

【0124】

本発明はまた、本発明記載の抗原結合性断片を含むキメラ抗原受容体(CAR)も提供する。

10

キメラ抗原受容体(CAR)は、抗原結合およびT細胞活性化機能の両方を提供する組換え受容体である。CAR構造および操作は、例えば、本明細書にその全体が援用される、Dottirら, Immunol Rev (2014) 257(1)に概説される。

【0125】

CARは、細胞膜アンカー領域およびシグナル伝達領域に連結された抗原結合性領域を含む。任意のヒンジ領域は、抗原結合性領域および細胞膜アンカー領域間に分離を提供してもよく、そして柔軟性リンカーとして作用してもよい。

【0126】

CARの抗原結合性領域は、CARがターゲティングする抗原に特異的な抗体、またはターゲットに結合可能である他の剤の抗原結合性領域に基いてもよい。例えば、CARの抗原結合性ドメインは、ターゲットタンパク質に特異的に結合する抗体の、相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列または全長軽鎖および重鎖可変領域アミノ酸配列を含んでもよい。CARの抗原結合性ドメインは、他のタンパク質：タンパク質相互作用、例えばリガンド：受容体結合に基づいて抗原をターゲティングしてもよく；例えば、IL-13に基づく抗原結合性ドメインを用いて、IL-13R<sub>2</sub>をターゲティングするCARが開発されてきている(例えば、Kahlonら 2004 Cancer Res 64(24): 9160-9166を参照されたい)。

20

【0127】

本発明のCARは、CTLA-4結合性領域を含む。いくつかの態様において、本発明のCARは、本発明記載の抗体/抗原結合性断片を含むかまたはこれらからなる抗原結合性領域を含む。

30

【0128】

本発明のCARのCTLA-4結合性領域は、任意の適切な形式、例えばscFv、Fab等で提供されてもよい。いくつかの態様において、本発明のCARのCTLA-4結合性領域は、CTLA-4結合性scFvを含むかまたはこれからなる。

【0129】

細胞膜アンカー領域を、CARの抗原結合性領域およびシグナル伝達領域の間で提供する。細胞膜アンカー領域は、抗原結合性領域が細胞外空間にあり、そしてシグナル伝達領域が細胞内部にあるように、CARを発現している細胞の細胞膜へのCARのアンカーリングを提供する。いくつかの態様において、本発明のCARは、CD3-、CD4、CD8またはCD28の1つの膜貫通領域アミノ酸配列を含むか、該配列からなるか、または該配列に由来するアミノ酸配列を含むかまたは該配列からなる細胞膜アンカー領域を含む。

40

【0130】

本明細書において、参照アミノ酸配列「に由来する」領域は、参照配列に、少なくとも60%、例えば少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の1つの配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0131】

CARのシグナル伝達領域は、T細胞の活性化を可能にする。CARシグナル伝達領域

50

は、リン酸化およびCAR発現T細胞の活性化のための免疫受容体チロシンに基づく活性化モチーフ(ITAM)を提供する、CD3- の細胞内ドメインのアミノ酸配列を含んでもよい。他のITAM含有タンパク質の配列を含むシグナル伝達領域もまた、CARにおいて使用されてきており、例えば、Fc RIのITAM含有領域を含むドメイン(Haynesら, 2001 J Immunol 166(1):182-187)がある。CD3- の細胞内ドメイン由来のシグナル伝達領域を含むCARは、しばしば、第一世代CARと称される。

#### 【0132】

CARのシグナル伝達領域はまた、ターゲットタンパク質への結合に際して、CAR発現T細胞の活性化を促進するため、共刺激分子のシグナル伝達領域由来の共刺激配列も含んでもよい。適切な共刺激分子には、CD28、OX40、4-1BB、ICOSおよびCD27が含まれる。さらなる共刺激配列を含むシグナル伝達領域を有するCARは、しばしば、第二世代CARと称される。

10

#### 【0133】

いくつかの場合、CARは、異なる細胞内シグナル伝達経路の共刺激を提供するよう操作される。例えば、CD28共刺激に関連するシグナル伝達は、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3K)経路を優先的に活性化し、一方、4-1BB仲介性シグナル伝達は、TNF受容体関連因子(TRAF)アダプタータンパク質を通じる。したがって、CARのシグナル伝達領域は、ときに、1より多い共刺激分子のシグナル伝達領域に由来する共刺激配列を含有する。多数の共刺激配列を含むシグナル伝達領域を含むCARは、しばしば、第三世代CARと称される。

20

#### 【0134】

いくつかの態様において、本発明のCARは、CD28、OX40、4-1BB、ICOSおよびCD27の1またはそれより多くの細胞内ドメインのアミノ酸配列を含むか、該配列からなるかまたは該配列に由来する、1またはそれより多い共刺激配列を含む。

#### 【0135】

任意のヒンジ領域は、抗原結合性ドメインおよび膜貫通ドメイン間の分離を提供してもよく、そして柔軟性リンカーとして作用してもよい。ヒンジ領域は、結合部分が異なる方向を向くことを可能にする、柔軟性ドメインであってもよい。ヒンジ領域は、免疫グロブリンのIgG1またはCH2CH3領域に由来してもよい。いくつかの態様において、本発明のCARは、免疫グロブリンのIgG1またはCH2CH3領域のヒンジ領域のアミノ酸配列を含むか、該配列からなるか、または該配列に由来するアミノ酸配列を含むかまたは該配列からなるヒンジ領域を含む。

30

#### 【0136】

CARは、T細胞強度、特異性および安全性をさらに増進させるため、共刺激性リガンド、キメラ共刺激性受容体またはサイトカインと組み合わせられてもよい(本明細書に特に援用される、Sadelainら, キメラ抗原受容体(CAR)設計の基本原則。Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0548)。

#### 【0137】

本発明記載のCARを含む細胞もまた提供する。本発明記載のCARを用いて、T細胞を生成してもよい。T細胞へのCARの操作は、形質導入および拡大のためのin vitroでの培養中に実行してもよく、例えば養子T細胞療法のためのT細胞の拡大中に起こる。

40

#### 【0138】

いくつかの側面において、抗体は、クローン2C8または2C8\_\_g1、あるいは2C8または2C8\_\_g1の変異体である。2C8および2C8\_\_g1は、以下のCDR配列を含む：

#### 【0139】

## 【化 8】

LC-CDR1: RATQGISSWLA (配列番号 5)  
 LC-CDR2: AASSLQS (配列番号 6)  
 LC-CDR3: QQANTLPLFT (配列番号 7).

## 重鎖:

HC-CDR1: SNTAAWN (配列番号 8)  
 HC-CDR2: RTYYRSKWYSDYGLSVKS (配列番号 9)  
 HC-CDR3: EGSGGTLIY (配列番号 10).

10

## 【0140】

C D R 配列は K a b a t 定義によって決定される。

本発明記載の抗体は、2 C 8 または 2 C 8 \_ g 1 の C D R、あるいは配列番号 1 および 3 ; または 2 および 4 の 1 つを含んでもよい。本発明記載の抗体において、6 つの C D R 配列のうち 1 または 2 または 3 または 4 が異なってもよい。変異体は、6 つの C D R 配列のうち 1 つまたは 2 つに、1 つまたは 2 つのアミノ酸置換を有してもよい。

## 【0141】

抗 C T L A - 4 クローンの V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> 鎖のアミノ酸配列を図 1 および 2 に示す。コードヌクレオチド配列を図 3 に示す。

20

軽鎖および重鎖 C D R はまた、いくつかの異なるフレームワーク領域と組み合わせて特に有用でありうる。したがって、L C - C D R 1 ~ 3 または H C - C D R 1 ~ 3 を有する軽鎖および / または重鎖は、代替フレームワーク領域を所持してもよい。適切なフレームワーク領域は、当該技術分野に周知であり、そして例えば、本明細書に援用される M . L e f r a n c & G . L e : f r a n c ( 2 0 0 1 ) " T h e I m m u n o g l o b u l i n F a c t s B o o k " , A c a d e m i c P r e s s に記載される。

## 【0142】

本明細書において、抗体は、配列番号 1 および 3 ; または 2 および 4 の V<sub>H</sub> および / または V<sub>L</sub> アミノ酸配列の 1 またはそれより多く、あるいは図 1 および 2 に示すアミノ酸配列の 1 つに高い割合の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V<sub>H</sub> および / または V<sub>L</sub> 鎖を有してもよい。

30

## 【0143】

例えば、本発明記載の抗体には、C T L A - 4 に結合し、そして配列番号 1 ~ 4 の 1 つの V<sub>H</sub> または V<sub>L</sub> 鎖アミノ酸配列に、あるいは図 1 および 2 に示すアミノ酸配列の 1 つに、少なくとも 7 0 %、より好ましくは少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の 1 つの配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、V<sub>H</sub> または V<sub>L</sub> 鎖を有する抗体が含まれる。

## 【0144】

40

本発明記載の抗体は、検出可能に標識されるか、または少なくとも検出可能であってもよい。例えば、抗体を、放射性原子または着色分子または蛍光分子または任意の他の方法で容易に検出可能な分子で標識してもよい。適切な検出可能分子には、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、酵素基質、および放射標識が含まれる。結合部分を検出可能標識で直接標識してもよいし、または間接的に標識してもよい。例えば、結合部分は、それ自体標識されている別の抗体によって検出可能な、非標識抗体であってもよい。あるいは、第二の抗体が該抗体に結合したビオチンを有してもよく、そしてビオチンに対する標識スト렙トアビジンの結合を用いて、第一の抗体を間接的に標識する。

## 【0145】

核酸 / ペクター

50

本発明は、本発明記載の抗体、抗原結合性断片またはC A Rをコードする核酸を提供する。いくつかの態様において、核酸は、例えば他の核酸または天然存在生物学的材料から精製されるかまたは単離されている。

#### 【0146】

本発明はまた、本発明記載の抗体、抗原結合性断片またはC A Rをコードする核酸を含むベクターも提供する。

本発明記載の核酸および/またはベクターは、細胞、例えば初代ヒト免疫細胞内に導入するために提供されてもよい。適切なベクターには、プラスミド、バイナリーベクター、DNAベクター、mRNAベクター、ウイルスベクター（例えばガンマレトロウイルスベクター（例えばネズミ白血病ウイルス（MLV）由来ベクター）、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターおよびヘルペスウイルスベクター）、トランスポゾンに基づくベクター、および人工染色体（例えば酵母人工染色体）、例えばどちらも本明細書にその全体が援用される、M a u s ら , A n n u R e v I m m u n o l ( 2 0 1 4 ) 3 2 : 1 8 9 - 2 2 5 またはM o r g a n およびB o y e r i n a s , B i o m e d i c i n e s 2 0 1 6 4 , 9 に記載されるようなものが含まれる。いくつかの態様において、ウイルスベクターは、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、または単純ヘルペスウイルスベクターであってもよい。いくつかの態様において、レンチウイルスベクターはp E L N S であってもよいし、またはp E L N S に由来してもよい。いくつかの態様において、ベクターは、C R I S P R / C a s 9 をコードするベクターであってもよい。

#### 【0147】

##### 抗体/断片/C A Rを含む/発現する細胞

本発明はまた、本発明記載の抗体、抗原結合性断片またはC A Rを含むかまたは発現する細胞も提供する。本発明記載の核酸またはベクターを含むかまたは発現する細胞もまた提供する。

#### 【0148】

細胞は、真核細胞、例えば哺乳動物細胞であってもよい。哺乳動物は、ヒト、または非ヒト哺乳動物（例えばウサギ、モルモット、ラット、マウスまたは他の齧歯類（齧歯類目の任意の動物を含む）、ネコ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ（雌牛、例えば乳牛、またはウシ目の任意の動物を含む）、ウマ（ウマ目の任意の動物を含む）、ロバ、および非ヒト霊長類）であってもよい。

#### 【0149】

いくつかの態様において、細胞は、ヒト被験体由来であってもよいし、またはヒト被験体から得られていてもよい。

細胞は免疫細胞であってもよい。細胞は、造血起源の細胞、例えば好中球、好酸球、好塩基球、樹状細胞、リンパ球、または単球であってもよい。リンパ球は、例えば、T細胞、B細胞、NK細胞、NK T細胞または自然リンパ球（I L C）、あるいはその前駆体であってもよい。細胞は、例えばC D 3 ポリペプチド（例えばC D 3 C D 3 C D 3 またはC D 3 ）、T C R ポリペプチド（T C R またはT C R ）、C D 2 7、C D 2 8、C D 4 またはC D 8 を発現してもよい。いくつかの態様において、細胞はT細胞である。いくつかの態様において、T細胞はC D 3 + T細胞である。いくつかの態様において、T細胞はC D 3 +、C D 8 + T細胞である。いくつかの態様において、T細胞は細胞傷害性T細胞（例えば細胞傷害性Tリンパ球（C T L））である。

#### 【0150】

細胞が本発明記載のC A Rを含むT細胞である場合、細胞は、C A R - T細胞と称されてもよい。

いくつかの態様において、細胞は抗原特異的T細胞である。本明細書のいくつかの態様において、「抗原特異的」T細胞は、T細胞が特異的である抗原または前記抗原を発現する細胞に反応してT細胞の特定の機能特性を示す細胞である。いくつかの態様において、特性は、エフェクターT細胞、例えば細胞傷害性T細胞と関連する機能特性である。いく

つかの態様において、抗原特異的T細胞は、以下の特性の1またはそれより多くを示してもよい：例えばT細胞が特異的である抗原を含む／発現する細胞に対する、細胞傷害性；例えばT細胞が特異的である抗原またはT細胞が特異的である抗原を含む／発現する細胞に反応した、増殖、IFN 発現、CD107a発現、IL-2発現、TNF 発現、パーフォリン発現、グランザイム発現、グラニュリシン発現、および／またはFASリガンド(FASL)発現。いくつかの態様において、T細胞が特異的である抗原は、ウイルス、例えばエプスタインバーウイルス(EBV)、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、単純ヘルペスウイルス(HSV)またはヒトパピローマウイルス(HPV)のペプチドまたはポリペプチドであってもよい。

10

#### 【0151】

本発明はまた、本発明記載の核酸またはベクターを含む細胞を産生するための方法であって、本発明記載の核酸またはベクターを細胞内に導入する工程を含む、前記方法も提供する。本発明はまた、本発明記載の抗体、抗原結合性断片またはCARを発現する細胞を産生するための方法であって、本発明記載の核酸またはベクターを細胞に導入する工程を含む、前記方法も提供する。いくつかの態様において、方法は、細胞による核酸またはベクターの発現に適した条件下で、細胞を培養する工程をさらに含む。いくつかの態様において、方法を*in vitro*で行う。

#### 【0152】

20

いくつかの態様において、本発明記載の単離核酸またはベクターの細胞内への導入は、形質導入、例えばレトロウイルス形質導入を含む。したがって、いくつかの態様において、単離核酸またはベクターは、ウイルスベクターに含まれるか、またはベクターはウイルスベクターである。いくつかの態様において、方法は、本発明記載の核酸またはベクターを、エレクトロポレーションによって、例えば本明細書にその全体が援用される、Kohra, Molecular Therapy - Nucleic Acids (2013) 2, e114に記載されるように、導入する工程を含む。

#### 【0153】

本発明はまた、本発明記載の細胞を産生するための方法によって得られるかまたは得られうる細胞も提供する。

30

#### 検出法

本明細書記載の抗体、抗原結合性断片、CARまたは細胞を、CTLA-4に対する抗体、抗原結合性断片、CARまたは細胞の結合を伴う方法で用いてもよい。こうした方法は、抗体、抗原結合性断片、CARまたは細胞およびCTLA-4の結合した複合体の検出を伴ってもよい。こうしたものとして、1つの態様において、CTLA-4を含有するかまたは含有すると推測される試料を、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、CARまたは細胞と接触させ、そして抗体、抗原結合性断片、CARまたは細胞およびCTLA-4の複合体の形成を検出する工程を含む方法を提供する。

#### 【0154】

サンドイッチアッセイ、例えばELISAなどのイムノアッセイを含む適切な方法形式は、当該技術分野に周知である。該方法は、抗体、抗原結合性断片、CARもしくは細胞、またはCTLA-4、あるいは両方を、検出可能標識、例えば蛍光、発光または放射標識で標識することを伴ってもよい。CTLA-4発現は、例えば生検によって得られた組織試料の、免疫組織化学(IHC)によって測定してもよい。

40

#### 【0155】

この種の方法は、CTLA-4またはCD80またはCD86の検出およびまたは定量化を必要とする疾患または状態の診断法の基礎を提供しうる。こうした方法を、*in vitro*で、患者試料に対して、または患者試料のプロセッシング後に行ってもよい。試料をひとたび収集したら、診断の*in vitro*法が実行されるために、患者が居合わせる必要はなく、そしてしたがって、方法は、ヒトまたは動物の身体に対して行わないもの

50

であってもよい。

【0156】

こうした方法は、患者試料に存在するCTLA-4の量を決定することを伴ってもよい。該方法は、診断に到達するプロセスの一部として、標準または参照値に対して、決定した量を比較する工程をさらに含んでもよい。他の診断試験を、本明細書に記載するものと組み合わせて用いて、診断または予後診断の正確さを増進するか、あるいは本明細書に記載する試験を用いることによって得られる結果を確認してもよい。

【0157】

癌細胞は、CTLA-4の発現を上方制御して、腫瘍微小環境に浸潤するいかなるT細胞上の阻害性CTLA-4受容体の活性化も可能にし、そしてそれによってその活性を抑制することによって、免疫抑制環境を生成するために、CTLA-4経路を利用しうる。CTLA-4発現の上方制御は、多くの異なる癌タイプにおいて立証されてきており、そして高いCTLA-4発現はまた、劣った臨床転帰に関連付けられてきている。

【0158】

患者試料に存在するCTLA-4またはCD80またはCD86のレベルは、患者が抗CTLA-4抗体での治療に反応しうることを示しうる。試料中の高レベルのCTLA-4またはCD80またはCD86の存在を用いて、抗CTLA-4抗体での治療のために患者を選択してもよい。したがって、本発明の抗体を用いて、抗CTLA-4療法を用いた治療のための患者を選択してもよい。

【0159】

CTLA-4の試料における検出を、患者におけるT細胞機能不全障害または癌性状態の診断、癌性状態に対する素因の診断の目的のために、あるいは癌性状態の予後を提供する（予言する）ために、用いてもよい。診断または予後は、存在する（以前診断された）良性または悪性であってもよい癌性状態に関連してよく、推測される癌性状態に関連してもよく、あるいは患者における癌性状態（以前未診断であってもよい）に関してスクリーニングすることに関連してもよい。

【0160】

1つの態様において、T細胞消耗の度合いおよび疾患状態の重症度を示すために、CD8+ T細胞上のCTLA-4発現レベルを検出してもよい。

1つの態様において、疾患状態、例えば感染、組織炎症または癌の存在または重症度を示すために、例えば抗原提示細胞または腫瘍細胞上の、CD80またはCD86発現のレベルを検出してもよい。

【0161】

任意の組織または体液から試料を採取してもよい。試料は：ある量の血液；フィブリン塊および血球を除去した後得られる、血液の液体部分を含んでもよい、個体の血液由来のある量の血清；組織試料または生検；あるいは前記個体から単離された細胞を含んでもよいし、またはこれらに由来してもよい。

【0162】

本発明記載の方法は、好ましくは*in vitro*で行われる。用語「*in vitro*」は、培養中の細胞を用いた実験を含むよう意図され、一方、用語「*in vivo*」は、損なわれていない（*intact*）多細胞生物を用いた実験を含むよう意図される。

【0163】

療法適用

本発明記載の抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞およびポリペプチド、ならびにこうした剤を含む組成物を、医学的治療の方法において使用するために提供してもよい。治療を、治療を必要とする疾患または状態を有する被験体に提供してもよい。疾患または状態は、癌に関連するT細胞機能不全障害、または癌、または感染と関連するT細胞機能障害、または感染を含む、T細胞機能不全障害の1つであってもよい。

【0164】

T細胞機能不全障害は、正常T細胞機能が損なわれて、例えば外因性病原体、例えば微

10

20

30

40

50



生物、細菌およびウイルスによる感染によって生じる、あるいはある型の癌におけるもの（例えば腫瘍関連抗原の型）などのある疾患状態にある宿主によって生成される、病原性抗原に対する被験体の免疫反応の下方制御を引き起こす疾患または状態であってもよい。

【0165】

T細胞機能不全障害は、T細胞消耗またはT細胞アネルギーを含んでもよい。T細胞消耗は、CD8<sup>+</sup> T細胞が、増殖できないか、または抗原刺激に反応してT細胞エフェクター機能、例えば細胞傷害性およびサイトカイン（例えばIFN $\gamma$ ）分泌を発揮できない状態を含む。消耗T細胞はまた、CTLA-4の持続発現によって特徴付けられることも可能であり、この場合、CTLA-4:CD80またはCTLA-4:CD86の相互作用のブロックはT細胞消耗を逆転させ、そして抗原特異的T細胞反応を回復させることも可能である。

10

【0166】

T細胞機能不全障害は、感染として、または感染に対する有効な免疫反応を開始することが出来ない状態として現れうる。感染は、慢性、持続性、不顕性または緩慢であってもよく、そして細菌、ウイルス、真菌または寄生虫感染の結果であってもよい。こうしたものとして、細菌、ウイルスまたは真菌感染を有する患者に、治療を提供してもよい。細菌感染の例には、ヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*）での感染が含まれる。ウイルス感染の例には、HIV、B型肝炎またはC型肝炎での感染が含まれる。

【0167】

20

T細胞機能不全障害は、癌、例えば腫瘍免疫エスケープと関連してもよい。多くのヒト腫瘍は、T細胞によって認識され、そして免疫反応を誘導可能な腫瘍関連抗原を発現する。CTLA-4を通じたT細胞活性化の負の制御の阻害は、いくつかの研究において、癌の有望な治療であることが示されてきており、これらは例えば、GrossoおよびKunkel, Cancer Immunity (2013) 13:5に概説されている。

【0168】

T細胞機能不全障害、例えばT細胞消耗の徴候がない場合もまた、癌を治療可能であるが、本発明記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CARまたは細胞の使用は、被験体がCTLA-4シグナル伝達を抑制し、そして限定された障害、回避または腫瘍免疫エスケープの誘導を伴って、有効な免疫反応を開始することを可能にする。こうした治療において、抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CARまたは細胞は、腫瘍免疫エスケープの発展の防止を伴う、癌の治療を提供しうる。

30

【0169】

CTLA-4を過剰発現する癌もまた、治療可能である。例えば、CTLA-4を過剰発現するこうした腫瘍細胞を、抗体依存性細胞仲介性細胞傷害性(ADCC)、補体依存性細胞傷害性(CDC)による、または抗CTLA-4抗体-薬剤コンジュゲートを用いる、抗CTLA-4抗体での治療によって、直接殺してもよい。

【0170】

治療は、T細胞機能不全障害の防止、例えば感染の防止、あるいは癌の発展または進行の防止を目的としてもよい。こうしたものとして、抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞およびポリペプチドを用いて、薬学的組成物または薬剤を配合して、そして被験体を疾患状態の発展に対して予防的に治療してもよい。これは、疾患状態の症状の開始前に行ってもよく、そして/または感染または癌発展のリスクがより高いと見なされる被験体に対して行ってもよい。

40

【0171】

治療は、ワクチン、例えばT細胞ワクチンとの併用療法を含んでもよく、これは、同時、別個または連続療法を伴ってもよいし、あるいは単一組成物中のワクチンおよび抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドの組み合わせ投与であってもよい。この背景において、抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドを、ワクチンに対するアジュバントとして提供してもよい。消耗T細胞の限定された増殖能は、T細胞

50

免疫療法の失敗の主な理由とされてきており、そしてT細胞消耗をブロックするかまたは逆転させることが可能な剤の組み合わせは、T細胞免疫療法の有効性を改善するための潜在的な戦略である(Barbera, Nature Vol 439, No. 9 p 682 - 687 Feb 2006)。

【0172】

抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドの投与は、好ましくは、「療法的有効量」であり、これは、個体に利益を示すために十分な量である。投与する実際の量、ならびに投与速度および時間経過は、治療する疾患の性質および重症度に応じるであろう。治療の処方、例えば投薬量の決定等は、開業医および他の医師の責任の範囲内であり、そして典型的には、治療しようとする障害、個々の患者の状態、送達部位、投与方法、および医師に知られる他の要因が考慮されるであろう。上述の技術およびプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第20版, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins 刊行に見出されうる。

10

【0173】

#### 薬学的に有用な組成物および薬剤の配合

本発明記載の抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞およびポリペプチドは、臨床的使用のための薬学的組成物として配合してもよく、そして薬学的に許容されうるキャリアー、希釈剤、賦形剤またはアジュバントを含んでもよい。

【0174】

20

本発明にしたがって、薬学的に有用な組成物の産生のためにも方法を提供し、こうした産生法は：本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドを単離し；そして/または本明細書に記載するような単離抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドを、薬学的に許容されうるキャリアー、アジュバント、賦形剤または希釈剤と混合する工程より選択される1またはそれより多い工程を含んでもよい。

【0175】

例えば、本発明のさらなる側面は、T細胞機能不全障害の治療において使用するための薬剤または薬学的組成物を配合するかまたは産生する方法であって、本明細書に記載するような抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドを、薬学的に許容されうるキャリアー、アジュバント、賦形剤または希釈剤と混合することによって、薬学的組成物または薬剤を配合する工程を含む、前記方法に関する。

30

【0176】

#### 感染

感染は、いかなる感染または感染性疾患、例えば細菌、ウイルス、真菌、または寄生虫感染であってもよい。いくつかの態様において、慢性/持続性感染、例えばこうした感染がT細胞機能不全またはT細胞消耗に関連する場合の感染を治療することが特に望ましい可能性もある。

【0177】

T細胞消耗が、多くの慢性感染(ウイルス、細菌および寄生虫感染を含む)中に、ならびに癌において(Wherry Nature Immunology Vol. 12, No. 6, p 492 - 499, 2011年6月)生じるT細胞機能不全状態であることがよく確立されている。

40

【0178】

感染または感染性疾患は、CTLA-4が上方制御されるものであってもよい。

治療可能な細菌感染の例には、バチルス属(Bacillus)種、百日咳菌(Bordetella pertussis)、クロストリジウム属(Clostridium)種、コリネバクテリウム属(Corynebacterium)種、コレラ菌(Vibrio cholerae)、スタフィロコッカス属(Staphylococcus)種、ストレプトコッカス属(Streptococcus)種、エシェリキア属(Esc

50

herichia)、クレブシエラ属(Klebsiella)、プロテウス属(Proteus)、エルシニア属(Yersinia)、エルウィナ属(Erwinia)、サルモネラ属(Salmonella)、リステリア属(Listeria)種、ヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)、ミコバクテリア(例えば結核菌(Mycobacterium tuberculosis))および緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)が含まれる。例えば、細菌感染は、敗血症または結核であってもよい。

【0179】

Kirmanら, Infect Immun(1996)67(8):3786-3792は、マイコバクテリア感染によって誘導される免疫反応を、CTLA-4遮断が増進する能力を記載し、そしてRoweら, Immunology(2008)128:e471-e478は、CTLA-4の遮断による、リステリア菌(Listeria monocytogenes)による感染に対するT細胞反応の増大を記載する。

【0180】

治療可能なウイルス感染の例には、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、単純ヘルペスウイルスおよびヒトパピローマウイルスが含まれる。

【0181】

HIV感染中、CTLA-4発現は、ウイルス負荷と正に相関することが示されてきており、そしてCTLA-4遮断は、HIV特異的CD4+ T細胞増殖、ならびにIFN-およびIL-2の産生を回復させることが示されてきている(Kaufmannら Nat Immunol(2007)8:1246-1252)。CTLA-4の遮断はまた、TGF-およびIL-10のHIV特異的CD8+ T細胞による産生を減少させるが、HIV特異的CD8+ T細胞によるIFN-産生を増加させる(Elrefaeiら PLoS One(2009)4(12):e8194)。

【0182】

慢性ウイルス感染、例えばLCMV、HCV、HBV、およびHIVによって引き起こされるものは、一般的に、阻害性受容体の発現など、免疫クリアランスを逃れる機構を伴う。Schurichら(2011)53(5):1494-1503は、慢性HBV感染を伴う患者において、CD8+ T細胞上のCTLA-4発現の上方制御を記載し、そしてこれがウイルス負荷と相関することを記載する。

【0183】

治療可能な真菌感染の例には、アルテルナリア属(Alternaria)種、アスペルギルス属(Aspergillus)種、カンジダ属(Candida)種およびヒストプラズマ属(Histoplasma)種による感染が含まれる。真菌感染は真菌敗血症またはヒストプラズマ症であってもよい。真菌感染を仲介する際のT細胞消耗の重要性は、例えばChangら Critical Care(2013)17:R85、およびLazar-Molnarら PNAS(2008)105(7):2658-2663によって確立されてきている。

【0184】

治療可能な寄生虫感染の例には、プラスモジウム属種(例えば熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)、ネズミマラリア原虫(Plasmodium yoeli)、卵形マラリア原虫(Plasmodium ovale)、三日熱マラリア原虫(Plasmodium vivax)、またはプラスモジウム・シャバウディ・シャバウディ(Plasmodium chabaudi chabaudi))による感染が含まれる。寄生虫感染は、例えばマラリア、リーシュマニア症およびトキソプラズマ症などの疾患であってもよい。

【0185】

癌

10

20

30

40

50

癌は、任意の望ましくない細胞増殖（または望ましくない細胞増殖によって現れる任意の疾患）、新生物または腫瘍、あるいは望ましくない細胞増殖、新生物または腫瘍に対するリスクまたは素因の増加であってもよい。癌は、良性または悪性であってもよく、そして原発性または続発性（転移性）であってもよい。新生物または腫瘍は、細胞の任意の異常な成長または増殖であってもよく、そして任意の組織に位置していてもよい。組織の例には、副腎、副腎髄質、肛門、虫垂、膀胱、血液、骨、骨髓、脳、乳房、盲腸、中枢神経系（脳を含むまたは除く）、小脳、子宮頸部、結腸、十二指腸、子宮内膜、上皮細胞（例えば腎上皮）、胆嚢、食道、グリア細胞、心臓、回腸、空腸、腎臓、涙腺、喉頭、肝臓、肺、リンパ、リンパ節、リンパ芽球、上顎骨、縦隔、腸間膜、子宮筋、上咽頭、網（omentum）、口腔、卵巣、膵臓、耳下腺、末梢神経系、腹膜、胸膜、前立腺、唾液腺、S状結腸、皮膚、小腸、柔組織、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、舌、扁桃腺、気管、子宮、外陰部、白血球が含まれる。

10

#### 【0186】

いくつかの態様において、治療されうる癌は、結腸、直腸、上咽頭、子宮頸、中咽頭、胃、肝臓、頭頸部、口腔、食道、唇、口、舌、扁桃腺、鼻、喉、唾液腺、洞、咽頭、喉頭、前立腺、肺、膀胱、皮膚、腎臓、卵巣または中皮からなる群より選択される組織の癌であってもよい。

#### 【0187】

治療されうる腫瘍は、神経系または非神経系腫瘍であってもよい。神経系腫瘍は、中枢または末梢神経系のいずれから生じてもよく、例えば神経膠腫、髄芽腫、髄膜腫、神経線維腫、上衣腫、シュワン腫、神経線維肉腫、星状細胞腫および乏突起神経膠腫であってもよい。非神経系癌／腫瘍は、任意の他の非神経組織で生じてもよく、例には、黒色腫、中皮腫、リンパ腫、骨髄腫、白血病、非ホジキンリンパ腫（NHL）、ホジキンリンパ腫、慢性骨髄性白血病（CML）、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄異形成症候群（MDS）、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、肝細胞腫、類表皮癌、前立腺癌、乳癌、肺癌、結腸癌、卵巣癌、膵臓癌、胸腺癌、NSCLC、血液学的癌および肉腫が含まれる。

20

#### 【0188】

特定の態様において、治療されうる癌は、前立腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌または黒色腫（例えば進行性黒色腫）であってもよい。

30

いくつかの態様において、治療されうる癌は、結腸癌、結腸癌腫、結腸直腸癌、上咽頭癌、子宮頸癌、中咽頭癌、胃癌、肝細胞癌、頭頸部癌、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、口腔癌、喉頭癌、前立腺癌、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、尿路上皮癌、黒色腫、進行性黒色腫、腎細胞癌、卵巣癌または中皮腫であってもよい。

#### 【0189】

##### 養子T細胞移入療法

本発明の態様において、治療法または予防法は、免疫細胞の養子細胞移入を含んでもよい。養子T細胞移入療法は、一般的に、典型的には血液試料を抜き取ることによって、白血球を被験体から除去し、そこから白血球を分離し、*in vitro*または*ex vivo*で拡大し、そして同じ被験体または異なる被験体のいずれかに戻すプロセスを指す。治療は、典型的には、被験体において必要とされるT細胞集団の活性型の量／濃度を増加させることを目的とする。こうした治療は、T細胞消耗を経験している被験体において有益でありうる。

40

#### 【0190】

T細胞消耗機構をブロックするかまたは逆転させることが可能な抗体は、T細胞活性を増進させ、そしてT細胞拡大を促進する手段を提供する。

免疫チェックポイント受容体（例えばCTLA-4）に対して向けられる抗体もまた、例えば特定の関心対象のT細胞集団の拡大のための、T細胞拡大法において有用でありうる。例えば、抗体は、（例えば望ましくない特性を有するT細胞サブセットよりも）望ましい特性を有するT細胞サブセットを優先的に拡大するための、T細胞拡大法において有

50

用でありうる。

【0191】

したがって、本発明のさらなる側面において、T細胞を、*in vitro*または*ex vivo*で、本発明記載の抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドと接触させる、T細胞集団を拡大するための方法を提供する。

【0192】

該方法は、任意に、以下の工程：被験体から血液試料を採取する工程；血液試料からT細胞を単離する工程；*in vitro*または*ex vivo*細胞培養中でT細胞を培養し（ここで該細胞を抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドと接触させてもよい）、T細胞の拡大集団を収集する工程；T細胞をアジュバント、希釈剤、または

10

【0193】

したがって、本発明のいくつかの側面において、T細胞機能不全障害を有する被験体の治療法であって、治療が必要な被験体から血液試料を得て、T細胞集団が拡大されるように、本発明記載の抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドの存在下で、血液試料から得たT細胞を培養し、拡大されたT細胞を収集し、そして拡大されたT細胞を、治療が必要な被験体に投与する工程を含む、前記治療法を提供する。

【0194】

治療が必要な被験体からT細胞を得てもよく、そして単離し、そして/または精製してもよい。これらはCD4<sup>+</sup>および/またはCD8<sup>+</sup> T細胞集団であってもよい。T細胞は、T細胞消耗を経験している集団に相当してもよく、そして任意にCTLA-4の上方制御された発現を有してもよい。

20

【0195】

培養中、T細胞が望ましい細胞数に拡大することを可能にする条件下で、そしてそれに適した期間、T細胞を、抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドと接触させてもよい。適切な期間の後、T細胞を採取し、任意に濃縮してもよく、そして適切なキャリアー、アジュバントまたは希釈剤と混合し、そして被験体の体内に戻してもよい。被験体は、こうした療法の1またはそれより多い周期を経てもよい。

【0196】

T細胞拡大法は、当該技術分野に周知であり、例えばKalamaszら, J Immunother 2004 Sep-Oct; 27(5):405-18; Montesら, Clin Exp Immunol 2005 Nov; 142(2):292-302; WoelflおよびGreenburg Nature Protocols 9 p950-966 27 March 2014; TrickettおよびKwan Journal of Immunological Methods Vol. 275, Issues 1-2, 1 April 2003, p251-255; Butlerら PLoS ONE 7(1) 12 Jan 2012に記載されるものがある。

30

【0197】

例えば、T細胞拡大の方法は、T細胞を刺激する工程を含んでもよい。刺激は、例えば抗CD3/抗CD28での処理による、非特異的刺激を含んでもよい。T細胞の刺激は、例えば抗原（例えばMHCと複合体を形成した、例えば抗原提示細胞によって発現される）での処理による、特異的刺激を含んでもよい。T細胞拡大の方法は、T細胞増殖/拡大を促進するための1またはそれより多い因子の存在下での培養を含んでもよい。例えば、T細胞拡大の方法は、IL-2の存在下での培養を含んでもよい。

40

【0198】

本発明において、養子細胞移入(ACI)は、被験体内に細胞または細胞集団を導入し、そして/または被験体における細胞または細胞集団の頻度を増加させることを目的として行ってもよい。

50

## 【0199】

T細胞の養子移入は、例えば、本明細書にその全体が援用される、K a l o s および J u n e 2013, I m m u n i t y 39(1): 49-60において記載される。NK細胞の養子移入は、例えば、本明細書にその全体が援用される、D a v i s ら 2015, C a n c e r J. 21(6): 486-491に記載される。

## 【0200】

細胞は、好中球、好酸球、好塩基球、樹状細胞、リンパ球、または単球であってもよい。リンパ球は、例えばT細胞、B細胞、NK細胞、NK T細胞または自然リンパ球(ILC)、あるいはその前駆体であってもよい。いくつかの態様において、細胞はT細胞である。いくつかの態様において、T細胞はCD3+ T細胞である。いくつかの態様において、T細胞はCD3+、CD8+ T細胞である。いくつかの態様において、T細胞は細胞傷害性T細胞(例えば細胞傷害性Tリンパ球(CTL))である。いくつかの態様において、T細胞はウイルス特異的T細胞である。いくつかの態様において、T細胞は、EBV、HPV、HBV、HCVまたはHIVに特異的である。

10

## 【0201】

本発明は、被験体において、疾患または状態を治療するかまたは提示する方法であって、被験体から得た少なくとも1つの細胞が、本発明記載の抗体、抗原結合性断片、CAR、核酸またはベクターを発現するかまたは含むように修飾し、任意に、修飾した少なくとも1つの細胞を拡大し、そして修飾した少なくとも1つの細胞を被験体に投与する工程を含む、前記方法を提供する。

20

## 【0202】

いくつかの態様において、方法は：

(a) 被験体から少なくとも1つの細胞を単離し；

(b) 少なくとも1つの細胞が、本発明記載の抗体、抗原結合性断片、CAR、核酸またはベクターを発現するかまたは含むように修飾し、

(c) 任意に、修飾した少なくとも1つの細胞を拡大し、そして；

(d) 修飾した少なくとも1つの細胞を被験体に投与する

工程を含む。

## 【0203】

いくつかの態様において、細胞を単離した被験体は、修飾細胞を投与する被験体である(すなわち養子移入は自己細胞のものである)。いくつかの態様において、細胞を単離した被験体は、修飾した細胞を投与する被験体とは異なる被験体である(すなわち養子移入は同種細胞のものである)。

30

## 【0204】

本発明記載の修飾した少なくとも1つの細胞は、当業者に周知の方法にしたがって修飾してもよい。修飾は、トランスファーされる核酸の永続的または一過性発現のための核酸トランスファーを含んでもよい。

## 【0205】

いくつかの態様において、細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)、あるいはCARをコードする核酸またはベクターを含むかまたは発現するようにさらに修飾されてもよい。

40

任意の適切な遺伝子操作プラットフォームを用いて、本発明記載の細胞を修飾してもよい。細胞を修飾するための適切な方法には、例えば、本明細書で上記に援用される、M a u s ら, A n n u R e v I m m u n o l (2014) 32: 189-225に記載されるような遺伝子操作プラットフォーム、例えばガンマレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、DNAトランスフェクション、トランスポゾンに基づく遺伝子送達およびRNAトランスフェクションの使用が含まれる。

## 【0206】

いくつかの態様において、方法は、以下の工程の1またはそれより多くを含んでもよい：被験体から血液試料を採取する；血液試料から少なくとも1つの細胞を単離および/または拡大する；in vitroまたはex vivo細胞培養において、少なくとも1

50

つの細胞を培養する；少なくとも1つの細胞内に、本発明記載の抗体、抗原結合性断片、CAR、核酸、またはベクターを導入し、それによって少なくとも1つの細胞を修飾する；修飾した少なくとも1つの細胞を拡大する；修飾した少なくとも1つの細胞を収集する；修飾細胞を、アジュバント、希釈剤、またはキャリアーと混合する；修飾細胞を被験体に投与する。

【0207】

いくつかの態様において、方法は、細胞を処理して、抗体、抗原結合性断片、CAR、核酸、またはベクターの発現を誘導／増進させる工程をさらに含んでもよい。例えば、核酸／ベクターは、特定の剤での処理に反応した、核酸／ベクターからの、抗体、抗原結合性断片またはCARの発現の誘導性上方制御のための制御要素を含んでもよい。いくつかの態様において、処理は、本発明記載の修飾細胞を投与されている被験体への、剤の投与によって、*in vivo*であってもよい。いくつかの態様において、処理は、*ex vivo*または*in vitro*の培養中の細胞への剤の投与によって、*ex vivo*または*in vitro*であってもよい。

10

【0208】

当業者は、本発明記載の細胞の養子移入のための適切な試薬および方法を決定することが可能であり、例えば本明細書にその全体が援用される、Daira, 2016 J Nat Cancer Inst 108(7): djv439を参照されたい。

【0209】

関連する側面において、本発明は、修飾細胞を調製する方法、細胞内に、本発明記載の抗体、抗原結合性断片、CAR、核酸またはベクターを導入し、それによって少なくとも1つの細胞を修飾する工程を含む方法を提供する。方法は、好ましくは、*in vitro*または*ex vivo*で行われる。

20

【0210】

1つの側面において、本発明は、被験体において、疾患または状態を治療するかまたは防止する方法であって：

(a) 被験体から少なくとも1つの細胞を単離し；

(b) 少なくとも1つの細胞内に、本発明記載の核酸またはベクターを導入し、それによって少なくとも1つの細胞を修飾し；そして

(c) 被験体に、修飾した少なくとも1つの細胞を投与する工程を含む、前記方法を提供する。

30

【0211】

いくつかの態様において、細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸またはベクターを導入するようにさらに修飾されてもよい。

いくつかの態様において、方法は、例えば癌の治療または防止のため、療法的または予防的介入をさらに含む。いくつかの態様において、療法的または予防的介入は、化学療法、免疫療法、放射療法、手術、ワクチン接種および／またはホルモン療法より選択される。

【0212】

同時または連続投与

治療しようとする状態に応じて、組成物を単独で、あるいは他の治療と組み合わせて、同時にまたは連続してのいずれかで投与してもよい。

40

【0213】

本明細書において、本発明の抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチド、および抗感染剤または化学療法剤(療法剤)を同時にまたは連続して投与してもよい。

いくつかの態様において、本発明の抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドでの治療には、化学療法が付随してもよい。

【0214】

同時投与は、抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドおよび療法剤の一緒の投与、例えば両方の剤を含有する薬学的組成物(組み合わせ調製物)、あるいは互

50

いの直後の、そして任意に同じ投与経路を通じた、例えば同じ動脈、静脈または他の血管への投与を指す。

#### 【0215】

連続投与は、抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドあるいは療法剤の1つの投与に続く、所定の時間間隔後の他の剤の別個の投与を指す。2つの剤が同じ経路で投与される必要はないが、いくつかの態様ではこれに当てはまる。時間間隔は、任意の時間間隔であってもよい。

#### 【0216】

PD-1/PD-L1経路およびCTLA-4遮断の組み合わせた阻害が、抗腫瘍有効性を提供することが示されてきている。Wolchokら, NEJM(2013); 369:122-123を参照されたい。したがって、1つの側面において、本発明は、PD-1/PD-L1経路の阻害剤との組み合わせ療法において使用するための、本発明記載の抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドを提供する。

#### 【0217】

いくつかの態様において、本発明は、PD-1、PD-L1またはPD-1/PD-L1経路の阻害剤を用いた組み合わせ療法を提供する。いくつかの態様において、阻害剤は、PD-1およびPD-L1の間の相互作用によって仲介されるシグナル伝達を阻害または防止することが可能な剤である。いくつかの態様において、阻害剤は、PD-1および/またはPD-L1の遺伝子またはタンパク質発現を下方制御することが可能な剤である。いくつかの態様において、阻害剤は、PD-1およびPD-L1の間の結合を阻害または防止することが可能な剤である。いくつかの態様において、剤は抗体である。いくつかの態様において、剤はPD-1への結合が可能な抗体である。いくつかの態様において、剤は、PD-L1への結合が可能な抗体である。抗体は、アンタゴニスト抗体、またはブロック抗体であってもよい。PD-1、PD-L1またはPD-1/PD-L1経路の阻害剤は、当業者に周知であり、そしてこれには、例えば、ニボルマブ、ピジリズマブ、BMS936559、MPDL328A、ペムブロリズマブ、およびアベルマブが含まれる。本発明にしたがった使用が意図されるPD-1/PD-L1阻害剤には、本明細書にその全体が援用される、SunshineおよびTaube「PD-1/PD-L1阻害剤」, Curr. Opin. Pharmacol. 2015, 23:32-38に記載されるものが含まれる。

#### 【0218】

##### 抗感染剤

感染治療において、本発明の抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドを、上述のように、抗感染剤と組み合わせて投与してもよい。抗感染剤は、感染の原因となる微生物またはウイルスに対する作用を有することが知られる剤であってもよい。

#### 【0219】

適切な抗感染剤には、抗生物質（例えばペニシリン、セファロsporin、リファマイシン、リピアルマイシン、キノロン、スルホンアミド、マクロライド、リンコサミド、テトラサイクリン、環状リポペプチド、グリシルサイクリン、オキサゾリジノン、およびリピアルマイシン）、抗ウイルス剤（例えば逆転写酵素阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、転写因子阻害剤、アンチセンスおよびsiRNA剤およびプロテアーゼ阻害剤）、抗真菌剤（例えばポリエン、イミジアゾール、トリアゾール、チアゾール、アリルアミン、およびエキノキャンディン）、および抗寄生虫剤（例えば抗線虫剤、抗条虫剤、抗吸虫剤、抗アメーバ剤および抗原生動物剤）が含まれる。

#### 【0220】

##### 化学療法

化学療法は、薬剤または電離放射線（例えばX線または $\gamma$ 線を用いた放射療法）での癌の治療を指す。好ましい態様において、化学療法は、薬剤での治療を指す。薬剤は、化学実体、例えば小分子薬剤、抗生物質、DNA挿入剤、タンパク質阻害剤（例えばキナーゼ阻害剤）、あるいは生物学的剤、例えば抗体、抗体断片、核酸またはペプチドアプタマー

10

20

30

40

50



、核酸（例えばDNA、RNA）、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質であってもよい。薬剤を、薬学的組成物または薬剤として配合してもよい。配合物は、1またはそれより多い薬剤（例えば1またはそれより多い活性剤）を、1またはそれより多い薬学的に許容されうる希釈剤、賦形剤またはキャリアーと一緒に含んでもよい。

【0221】

治療は、1より多い薬剤の投与を伴ってもよい。治療しようとする状態に応じて、薬剤は、単独で、あるいは他の治療と組み合わせて、同時にまたは連続してのいずれかで投与されてもよい。例えば、化学療法は、2つの薬剤の投与を伴う併用療法であってもよく、これらの1つまたはそれより多くが、癌を治療するよう意図されてもよい。

【0222】

化学療法は、1またはそれより多い投与経路、例えば非経口、静脈内注射、経口、皮下、皮内または腫瘍内経路によって投与されてもよい。

化学療法は治療計画（treatment regime）にしたがって投与されてもよい。治療計画は、医者または医師によって準備されてもよく、そして治療を必要とする患者に合わせてあつらえてもよい、化学療法投与のあらかじめ決定されたタイムテーブル、プラン、スキームまたはスケジュールであってもよい。

【0223】

治療計画は：患者に投与する化学療法のタイプ；各薬剤または放射線の用量；投与間の時間間隔；各治療の長さ；あるとすれば任意の治療休止日の数および性質等の1またはそれより多くを指してもよい。併用療法に関して、各薬剤をどのように投与するかを示す単一の治療計画を提供してもよい。

【0224】

化学療法薬剤および生物製剤は以下から選択してもよい：アルキル化剤、例えばシスプラチン、カルボプラチン、メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル、イホスファミド；プリンまたはピリミジン代謝拮抗剤、例えばアザチオプリンまたはメルカプトプリン；アルカロイドおよびテルペノイド、例えばビンカアルカロイド（例えばビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンデシン）、ポドフィロトキシン、エトポシド、テニポシド、タキサン、例えばパクリタキセル（タキソール<sup>TM</sup>）、ドセタキセル；トポイソメラーゼ阻害剤、例えばI型トポイソメラーゼ阻害剤、カンプトテシン、イリノテカンおよびトポテカン、またはII型トポイソメラーゼ阻害剤、アムサクリン、エトポシド、リン酸エトポシド、テニポシド；抗腫瘍抗生物質（例えばアントラサイクリン抗生物質）、例えばダクチノマイシン、ドキソルビシン（アドリアマイシン<sup>TM</sup>）、エピルビシン、ブレオマイシン、ラバマイシン；抗体に基づく剤、例えば抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIM-3抗体、抗CTLA-4、抗4-1BB、抗GITR、抗CD27、抗BLTA、抗OX43、抗VEGF、抗TNF、抗IL-2、抗Gp120/IIIIa、抗CD-52、抗CD20、抗RSV、抗HER2/neu（erbb2）、抗TNF受容体、抗EGFR抗体、モノクローナル抗体または抗体断片、例には：セツキシマブ、パニツマブ、インフリキシマブ、バシリキシマブ、ベバシズマブ（アバスチン（登録商標））、アブシキシマブ、ダクリズマブ、ゲムツズマブ、アレムツズマブ、リツキシマブ（マブテラ（登録商標））、パリビズマブ、トラスツズマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、ニモツズマブが含まれる；EGFR阻害剤、例えばエルロチニブ、セツキシマブおよびゲフィチニブ；抗血管新生剤、例えばベバシズマブ（アバスチン（登録商標））；抗癌ワクチン、例えばシブルーセル-T（プロベンジ（登録商標））。

【0225】

1つの態様において、化学療法剤は、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIM-3抗体、抗LAG-3、抗4-1BB、抗GITR、抗CD27、抗BLTA、抗OX43、抗VEGF、抗TNF、抗IL2、抗Gp120/IIIIa、抗CD-52、抗CD20、抗RSV、抗HER2/neu（erbb2）、抗TNF受容体、抗EGFRまたは他の抗体である。いくつかの態様において、化学療法剤は、免疫チェックポイント阻害剤または共刺激分子である。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 2 6 】

さらなる化学療法薬剤は: 1 3 - シス - レチノイン酸、2 - クロロデオキシアデノシン、5 - アザシチジン 5 - フルオロウラシル、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、アブラキサン、アキュタン (登録商標)、アクチノマイシン - D、アドリアマイシン (登録商標)、アドルシル (登録商標)、アフニトール (登録商標)、アグリリン (登録商標)、A l a - コート (登録商標)、アルデスロイキン、アレムツズマブ、A L I M T A、アリトレチノイン、アルカバン - A Q (登録商標)、アルケラン (登録商標)、オールトランスレチノイン酸、アルファインターフェロン、アルトレタミン、アメトプテリン、アミフォスチン、アミノグルテチミド、アナグレリド、アナンドロン (登録商標)、アナストロゾール、アラビノシルシトシン、アラネスブ (登録商標)、アレジア (登録商標)、アリミデックス (登録商標)、アロマシン (登録商標)、アラノン (登録商標)、亜ヒ酸、アスバラギナーゼ、A T R A アバスチン (登録商標)、アザシチジン、B C G、B C N U、ベンダムスチン、ベバシズマス、ベキサロテン、B E X X A R (登録商標)、ピカルタミド、B i C N U、ブレノキサン (登録商標)、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、ブスルフェックス (登録商標)、カルシウムロイコボリン、カンパス (登録商標)、カンプトサル (登録商標)、カンプトテシン - 1 1、カペシタビン、カラック<sup>T M</sup>、カルボプラチン、カルムスチン、カソデックス (登録商標)、C C - 5 0 1 3、C C I - 7 7 9、C C N U、C D D P、C e e N U、セルビジン (登録商標)、セツキシマブ、クロラムブシル、シスプラチン、シトロボルム因子、クラドリビン、コルチゾン、コスメゲン (登録商標)、C P T - 1 1、シクロホスファミド、シタドレン (登録商標)、シタラビン シトサル - U (登録商標)、シトキサン (登録商標)、ダコゲン、ダクチノマイシン、ダルベポエチンアルファ、ダサチニブ、ダウノマイシン、ダウノルピシン、ダウノルピシン塩酸、ダウノルピシン・リポソーマル、ダウノキソーム (登録商標)、デカドロン、デシタビン、デルタ - コルテフ (登録商標)、デルタゾン (登録商標)、デニロイキン、ディフチトックス、デポシト<sup>T M</sup>、デキサメタゾン、酢酸デキサメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、デキサゾン、デクスラゾキサン、D H A D、D I C、ジオデックス、ドセタキセル、ドキシル (登録商標)、ドキシソルピシン、ドキシソルピシン・リポソーマル、ドロキシア<sup>T M</sup>、D T I C、D T I C - D o m e (登録商標)、デュラロン (登録商標)、エリガード<sup>T M</sup>、エレンス<sup>T M</sup>、エロキサチン<sup>T M</sup>、エルスパー (登録商標)、エンシット (登録商標)、エピルピシン、エポエチンアルファ、エルビタックス、エルロチニブ、エルウィニア L - アスバラギナーゼ、エストラムスチン、エチヨルエトポフォス (登録商標)、エトボシド、リン酸エトボシド、ユーレキシシン (登録商標)、エベロリムス、エビスタ (登録商標)、エキセメスタン、ファスロデックス (登録商標)、フェマラ (登録商標)、フィルグラスチム、フロクスウリジン、フルダラ (登録商標)、フルダラビン、フルオロプレックス (登録商標)、フルオロウラシル、フロキシメステロン、フルタミド、フォリン酸、F U D R (登録商標)、フルベストラント、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゲムツツマブ・オゾガマイシン、グリーベック<sup>T M</sup>、グリアデル (登録商標) ウェハー、ゴセレリン、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、ハーセプチン (登録商標)、ヘキサドロール、ヘキサレン (登録商標)、ヘキサメチルメラミン、H M M、ヒカムチン (登録商標)、ヒドレア (登録商標)、酢酸ヒドロコルト (登録商標)、ヒドロコルチゾン、リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム、リン酸ヒドロコルトン、ヒドロキシ尿素、イブリツモマブ、イブリツモマブ・チウキセタン、イダマイシン (登録商標)、イダルピシン、イフェックス (登録商標)、I F N - アルファ、イホスファミド、I L - 1 1、I L - 2、メシル酸イマチニブ、イミダゾールカルボキサミド、インターフェロンアルファ、インターフェロンアルファ - 2 b (P E G コンジュゲート)、インターロイキン - 2、インターロイキン - 1 1、イントロン A (登録商標) (インターフェロンアルファ - 2 b)、イレッサ (登録商標)、イリノテカン、イソトレチノイン、イキサベピロン、イキセンブラ<sup>T M</sup>、キドロラーゼ、ラナコート (登録商標)、ラパチニブ、L - アスバラギナーゼ、L C R、レナリドミド、レトロゾール、ロイコボリン、ロイケラン、ロイカイン<sup>T M</sup>、リユープロ

10

20

30

40

50

リド、リユーロクリスチン、リュースタチン<sup>T M</sup>、リポソーマルA r a - C、液体ブレド（登録商標）、ロムスチン、L - P A M、L - サルコリシン、リュブロン（登録商標）、リュブロンデボ（登録商標）、マツラン（登録商標）、マキシデックス、メクロレタミン、メクロレタミン塩酸、メドラロン（登録商標）、メドロール（登録商標）、メゲース（登録商標）、メゲストロール、酢酸メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メスネックス<sup>T M</sup>、メトトレキセート、メトトレキセートナトリウム、メチルブレドニゾロン、メチコルテン（登録商標）、マイトマイシン、マイトマイシン - C、ミトキサントロン、M - プレドニゾール（登録商標）、M T C、M T X、ムスターゲン（登録商標）、ムスチン、ムタマイシン（登録商標）、ミレラン（登録商標）、ミロセル<sup>T M</sup>、ミロターゲット（登録商標）、ナベルピン（登録商標）、ネララビン、ネオサル（登録商標）、ニューラスタ<sup>T M</sup>、ニューメガ（登録商標）、ニューポゲン（登録商標）、ネキサバル（登録商標）、ニランドロン（登録商標）、ニルタミド、ナイトロジェンマスタード、ノバルデックス（登録商標）、ノバントロン（登録商標）、オクトレオチド、酢酸オクトレオチド、オンコスパ（登録商標）、オンコピン（登録商標）、オンタック（登録商標）、オンキサル<sup>T M</sup>、オプレベルキン、オラブレッド（登録商標）、オラゾン（登録商標）、オキサリプラチン、パクリタキセル、パクリタキセルタンパク質結合型、パミドロネート、パニツムマブ、パンレチン（登録商標）、パラプラチン（登録商標）、ペディアブレド（登録商標）、P E Gインターフェロン、ペガスパルガーゼ、ペグフィルグラストイム、P E G - イントロン<sup>T M</sup>、P E G - L - アスパラギナーゼ、P E M E T R E X E D、ペントスタチン、フェニルアラニンマスタード、プラチノール（登録商標）、プラチノール - A Q（登録商標）、プレドニゾロン、プレドニゾン、プレロン（登録商標）、プロカルバジン、P R O C R I T（登録商標）、プロロイキン（登録商標）、カルムスチンインプラントプリネトール（登録商標）を含むプロリフプロスパン20、ラロキシフェン、レブリミド（登録商標）、リユーマトレックス（登録商標）、リツキサン（登録商標）、リツキシマブ、ロフェロン - A（登録商標）（インターフェロンアルファ - 2 a）、リユーベックス（登録商標）、ルビドマイシン塩酸、サンドスタチン（登録商標）、サンドスタチンL A R（登録商標）、サルグラモスチン、ソリュ - コルテフ（登録商標）、ソリュ - メドロール（登録商標）、ソラフェニブ、S P R Y C E L<sup>T M</sup>、S T I - 5 7 1、ストレプトゾシン、S U 1 1 2 4 8、スニチニブ、スーテント（登録商標）、タモキシフェン、タルセバ（登録商標）、タルグレチン（登録商標）、タキソール（登録商標）、タキソテール（登録商標）、テモダール（登録商標）、テモゾロミド、テムシロリムス、テニボシド、T E S P A、サリドマイド、タロミド（登録商標）、テラシス（登録商標）、チオグアニン、チオグアニンタブロイド（登録商標）、チオホスホアミド、チオプレックス（登録商標）、チオテパ、T I C E（登録商標）、トボサル（登録商標）、トボテカン、トレミフェン、トリセル（登録商標）、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレアンダ（登録商標）、トレチノイン、トレキサール<sup>T M</sup>、トリセノックス（登録商標）、T S P A、T Y K E R B（登録商標）、V C R、ベシチビックス<sup>T M</sup>、ベルバン（登録商標）、ベルケード（登録商標）、ベベシド（登録商標）、ベサノイド（登録商標）、ピアデュル<sup>T M</sup>、ピダザ（登録商標）、ピンブラスチン、硫酸ピンブラスチン、ピンカサルP f s（登録商標）、ピンクリスチン、ピノレルピン、酒石酸ピノレルピン、V L B、V M - 2 6、ポリノスタット、V P - 1 6、ヴモン（登録商標）、キセロダ（登録商標）、ザノサル（登録商標）、ゼパリン<sup>T M</sup>、ジネカード（登録商標）、ゾラデックス（登録商標）、ゾレドロン酸、ゾリンザ、ゾメタ（登録商標）より選択されてもよい。

#### 【0227】

##### 投与経路

本発明の側面にしたがつた抗体、抗原結合性断片、C A R、細胞、ポリペプチドおよび他の療法剤、薬剤および薬学的組成物を、限定されるわけではないが、非経口、静脈内、動脈内、筋内、皮下、皮内、腫瘍内および経口を含む、いくつかの経路による投与のために配合してもよい。抗体、抗原結合性断片、C A R、細胞、ポリペプチドおよび他の療法剤を、液体または固体型で配合してもよい。ヒトまたは動物の体の選択した領域への注射

10

20

30

40

50

による投与のため、液体配合物を配合してもよい。

【 0 2 2 8 】

2 回の独立の実験の結果を図 1 3 A および 1 3 B に示す。2 C 8 は腫瘍増殖を調節する際に有効であることが示された。非限定的に、本発明は以下の態様を含む。

[ 態様 1 ]

C T L A - 4 に結合可能であり、任意に単離されており、アミノ酸配列 i ) ~ v i ) :

【 化 1 】

- i) LC-CDR1: RATQGISSWLA (配列番号 5);
- ii) LC-CDR2: AASSLQS (配列番号 6);
- iii) LC-CDR3: QQANTLPLFT (配列番号 7);
- iv) HC-CDR1: SNTAAWN (配列番号 8);
- v) HC-CDR2: RTYYRSKWYSDYGLSVKS (配列番号 9);
- vi) HC-CDR3: EGSGGTLIY (配列番号 10);

10

を有する抗体または抗原結合性断片、あるいは配列 ( i ) ~ ( v i ) の 1 またはそれより多くにおいて、1 または 2 または 3 アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているその変異体である、前記抗体または抗原結合性断片。

[ 態様 2 ]

LC - CDR 1 が、R A T Q G I S S W L A ( 配列番号 5 ) である、態様 1 の抗体または抗原結合性断片。

20

[ 態様 3 ]

LC - CDR 2 が、A A S S L Q S ( 配列番号 6 ) である、態様 1 または態様 2 の抗体または抗原結合性断片。

[ 態様 4 ]

LC - CDR 3 が、Q Q A N T L P L F T ( 配列番号 7 ) である、態様 1 ~ 3 のいずれか一項の抗体または抗原結合性断片。

[ 態様 5 ]

HC - CDR 1 が、S N T A A W N ( 配列番号 8 ) である、態様 1 ~ 4 のいずれか一項の抗体または抗原結合性断片。

30

[ 態様 6 ]

HC - CDR 2 が、R T Y Y R S K W Y S D Y G L S V K S ( 配列番号 9 ) である、態様 1 ~ 5 のいずれか一項の抗体または抗原結合性断片。

[ 態様 7 ]

HC - CDR 3 が、E G S G G T L I Y ( 配列番号 1 0 ) である、態様 1 ~ 6 のいずれか一項の抗体または抗原結合性断片。

[ 態様 8 ]

以下の C D R :

【 化 2 】

- LC-CDR1: RATQGISSWLA (配列番号 5)
- LC-CDR2: AASSLQS (配列番号 6)
- LC-CDR3: QQANTLPLFT (配列番号 7).

40

を取り込む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域を有する、態様 1 ~ 7 のいずれか一項の抗体または抗原結合性断片。

[ 態様 9 ]

以下の C D R :

## 【化 3】

HC-CDR1: SNTAAWN (配列番号 8)  
 HC-CDR2: RTYYRSKWYSDYGLSVKS (配列番号 9)  
 HC-CDR3: EGSGGTLIY (配列番号 10).

を取り込む少なくとも 1 つの重鎖可変領域を有する、態様 1 ~ 8 のいずれか一項の抗体または抗原結合性断片。

## [ 態様 10 ]

C D 2 8 に結合しない、態様 1 ~ 9 のいずれか一項記載の抗体または抗原結合性断片。 10

## [ 態様 11 ]

C T L A - 4 に結合し、そして C D 2 8 に実質的に結合を示さない、抗体または抗原結合性断片。

## [ 態様 12 ]

ヒトまたはネズミ C T L A - 4 に特異的に結合する、態様 1 ~ 11 のいずれか一項記載の抗体または抗原結合性断片。

## [ 態様 13 ]

C T L A - 4 および C D 8 0、任意にヒト C T L A - 4 およびヒト C D 8 0、の間の相互作用を阻害する、態様 1 ~ 12 のいずれか一項記載の抗体または抗原結合性断片。

## [ 態様 14 ]

C T L A - 4 および C D 8 6、任意にヒト C T L A - 4 およびヒト C D 8 6、の間の相互作用を阻害する、態様 1 ~ 13 のいずれか一項記載の抗体または抗原結合性断片。 20

## [ 態様 15 ]

抗体が、T 細胞消耗または T 細胞アネルギーを示す T 細胞において、T 細胞機能を回復するのに有効である、態様 1 ~ 14 のいずれか一項の抗体または抗原結合性断片。

## [ 態様 16 ]

以下の C D R :

## 【化 4】

LC-CDR1: RATQGISSWLA (配列番号 5)  
 LC-CDR2: AASSLQS (配列番号 6)  
 LC-CDR3: QQANTLPLFT (配列番号 7).

30

を含む、単離軽鎖可変領域ポリペプチド。

## [ 態様 17 ]

軽鎖配列：配列番号 1、または 2 (図 1) に少なくとも 85 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離軽鎖可変領域ポリペプチド。

## [ 態様 18 ]

以下の C D R :

## 【化 5】

HC-CDR1: SNTAAWN (配列番号 8)  
 HC-CDR2: RTYYRSKWYSDYGLSVKS (配列番号 9)  
 HC-CDR3: EGSGGTLIY (配列番号 10).

40

を含む、単離重鎖可変領域ポリペプチド。

## [ 態様 19 ]

配列番号 3 または 4 (図 2) の重鎖配列に少なくとも 85 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離重鎖可変領域ポリペプチド。

## [ 態様 20 ]

50

態様 18 または態様 19 記載の重鎖可変領域ポリペプチドと組み合わせられた、態様 15 または態様 16 記載の単離軽鎖可変領域ポリペプチド。

[ 態様 21 ]

CTLA - 4 に結合可能であり、重鎖および軽鎖可変領域配列を含む抗体または抗原結合性断片であって：

軽鎖が、LC - CDR1 : RATQGIISSWLA (配列番号 5)、LC - CDR2 : AASSLQS (配列番号 6)、LC - CDR3 : QQANTLPLFT (配列番号 7) に、少なくとも 85 % の全体の配列同一性を有する、LC - CDR1、LC - CDR2、LC - CDR3 を含み、そして

重鎖が、HC - CDR1 : SNTAAWN (配列番号 8)、HC - CDR2 : RTYYRSKWYS DYGLSVKS (配列番号 9)、HC - CDR3 : EGS GGTLIIY (配列番号 10) に、少なくとも 85 % の全体の配列同一性を有する、HC - CDR1、HC - CDR2、HC - CDR3 を含む、  
前記抗体または抗原結合性断片。

10

[ 態様 22 ]

CTLA - 4 に結合可能であり、任意に単離され、重鎖および軽鎖可変領域配列を含む抗体または抗原結合性断片であって：

軽鎖配列が、軽鎖配列：配列番号 1 または 2 (図 1) に少なくとも 85 % の配列同一性を有し、そして；

重鎖配列が、配列番号 3 または 4 (図 2) の重鎖配列に少なくとも 85 % の配列同一性を有する  
前記抗体または抗原結合性断片。

20

[ 態様 23 ]

CTLA - 4 に結合可能であり、(i) 態様 1 ~ 22 のいずれか一項記載の抗原結合性断片またはポリペプチド、および (ii) CTLA - 4 以外のターゲットタンパク質に結合可能な抗原結合性断片またはポリペプチドを含む、二重特異性抗体または二重特異性抗原結合性断片である、任意に単離された、抗体または抗原結合性断片。

[ 態様 24 ]

CTLA - 4 以外のターゲットタンパク質に結合可能である抗原結合性断片またはポリペプチドが、PD - 1、PD - L1、CD27、CD28、ICOS、CD40、CD122、OX43、4 - 1BB、GITR、B7 - H3、B7 - H4、BTLA、LAG - 3、A2AR、VISTA、TIM - 3、KIR、HER - 2、HER - 3、EGFR、EpCAM、CD30、CD33、CD38、CD20、CD24、CD90、CD15、CD52、CA - 125、CD34、CA - 15 - 3、CA - 19 - 9、CEA、CD99、CD117、CD31、CD44、CD123、CD133、ABCB5 および CD45 の 1 つに結合可能である、態様 23 の抗体または抗原結合性断片。

30

[ 態様 25 ]

態様 1 ~ 24 のいずれか一項記載の抗原結合性断片を含む、キメラ抗原受容体 (CAR)。

[ 態様 26 ]

態様 25 記載の CAR を含む細胞。

40

[ 態様 27 ]

CTLA - 4 に結合した、態様 1 ~ 26 のいずれか一項記載の抗体、または抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR または細胞を含む、任意に単離された、in vitro 複合体。

[ 態様 28 ]

態様 1 ~ 25 のいずれか一項の抗体、または抗原結合性断片、ポリペプチドまたは CAR および少なくとも 1 つの薬学的に許容されうるキャリアーを含む、組成物。

[ 態様 29 ]

態様 1 ~ 25 のいずれか一項の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチドまたは CAR をコ

50

ードする、単離核酸。

[ 態様 3 0 ]

態様 2 9 の核酸を含むベクター。

[ 態様 3 1 ]

態様 3 0 のベクターを含む宿主細胞。

[ 態様 3 2 ]

態様 1 ~ 2 5 のいずれか一項の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチドまたは C A R を作製するための方法であって、抗体、抗原結合性断片、ポリペプチドまたは C A R をコードするベクターを発現するために適切な条件下で、態様 3 1 の宿主細胞を培養し、そして抗体、または抗原結合性断片またはポリペプチドまたは C A R を回収する工程を含む、前記方法。

10

[ 態様 3 3 ]

療法または医学的治療法において使用するための、態様 1 ~ 2 6 または 2 8 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、細胞または組成物。

[ 態様 3 4 ]

T 細胞機能不全障害の治療において使用するための、態様 1 ~ 2 6 または 2 8 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、細胞または組成物。

[ 態様 3 5 ]

癌の治療において使用するための、態様 1 ~ 2 6 または 2 8 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、細胞または組成物。

20

[ 態様 3 6 ]

感染性疾患の治療において使用するための、態様 1 ~ 2 6 または 2 8 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、細胞または組成物。

[ 態様 3 7 ]

T 細胞機能不全障害の治療において使用するための薬剤製造における、態様 1 ~ 2 6 または 2 8 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、細胞または組成物の使用。

[ 態様 3 8 ]

癌の治療において使用するための薬剤製造における、態様 1 ~ 2 6 または 2 8 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、細胞または組成物の使用。

30

[ 態様 3 9 ]

感染性疾患の治療において使用するための薬剤製造における、態様 1 ~ 2 6 または 2 8 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、細胞または組成物の使用。

[ 態様 4 0 ]

態様 1 ~ 2 6 または 2 8 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、細胞または組成物を、機能不全 T 細胞に投与する工程を含む、T 細胞機能を増進させる、*in vitro* または *in vivo* の方法。

[ 態様 4 1 ]

T 細胞機能不全障害を患う患者に、態様 1 ~ 2 6 または 2 8 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、細胞または組成物を投与する工程を含む、T 細胞機能不全障害を治療する方法。

40

[ 態様 4 2 ]

癌を患う患者に、態様 1 ~ 2 6 または 2 8 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、細胞または組成物を投与する工程を含む、癌を治療する方法。

[ 態様 4 3 ]

感染性疾患を患う患者に、態様 1 ~ 2 6 または 2 8 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、細胞または組成物を投与する工程を含む、感染性疾患を治療する方法。

[ 態様 4 4 ]

50

C T L A - 4 を含有するかまたは含有すると推測される試料を、態様 1 ~ 2 6 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、C A R または細胞と接触させ、そして抗体、抗原結合性断片、C A R または細胞および C T L A - 4 の複合体の形成を検出する工程を含む方法。

[ 態様 4 5 ]

被験体における疾患または状態を診断する方法であって、*in vitro* で、被験体由来の試料を、態様 1 ~ 2 6 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、C A R または細胞と接触させ、そして抗体、抗原結合性断片、C A R または細胞および C T L A - 4 の複合体の形成を検出する工程を含む、前記方法。

[ 態様 4 6 ]

C T L A - 4 または C D 8 6 または C D 8 0 にターゲティングされる剤での治療のため、被験体を選択するかまたは層別化する方法であって、*in vitro* で、被験体由来の試料を、態様 1 ~ 2 6 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、C A R または細胞と接触させ、そして抗体、抗原結合性断片、C A R または細胞および C T L A - 4 の複合体の形成を検出する工程を含む、前記方法。

[ 態様 4 7 ]

*in vitro* で C T L A - 4 を検出するための、態様 1 ~ 2 6 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、C A R または細胞の使用。

[ 態様 4 8 ]

*in vitro* 診断剤としての、態様 1 ~ 2 6 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、C A R または細胞の使用。

[ 態様 4 9 ]

T 細胞を、態様 1 ~ 2 6 または 2 8 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、細胞または組成物と、*in vitro* または *ex vivo* で接触させる、T 細胞集団を拡大するための方法。

[ 態様 5 0 ]

T 細胞機能不全障害を有する被験体の治療法であって、T 細胞集団を拡大させるように、態様 1 ~ 2 6 または 2 8 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、細胞または組成物の存在下で、被験体由来の血液試料から得た T 細胞を培養し、拡大された T 細胞を収集し、そして治療の必要がある被験体に、拡大された T 細胞を投与する工程を含む、前記方法。

[ 態様 5 1 ]

被験体において、癌を治療するかまたは防止する方法であって：

( a ) 被験体から少なくとも 1 つの細胞を単離し；

( b ) 少なくとも 1 つの細胞が、態様 1 ~ 2 6、2 9 または 3 0 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、核酸またはベクターを発現するかまたは含むように修飾し、そして；

( c ) 被験体に、修飾した少なくとも 1 つの細胞を投与する工程を含む、前記方法。

[ 態様 5 2 ]

被験体において、癌を治療するかまたは防止する方法であって：

( a ) 被験体から少なくとも 1 つの細胞を単離し；

( b ) 少なくとも 1 つの細胞内に、態様 2 9 記載の核酸または態様 3 0 記載のベクターを導入し、それによって、少なくとも 1 つの細胞を修飾し、そして；

( c ) 被験体に、修飾した少なくとも 1 つの細胞を投与する工程を含む、前記方法。

[ 態様 5 3 ]

あらかじめ決定した量の態様 1 ~ 2 6、または 2 8 ~ 3 1 のいずれか一項記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、組成物、核酸、ベクターまたは細胞を含む部分のキット。

10

20

30

40

50



## 【0229】

多数回用量は、あらかじめ決定した時間間隔によって分かれていてもよく、これは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、または31日、あるいは1、2、3、4、5または6ヶ月の1つであるように選択されてもよい。例えば、用量を、7、14、21または28日ごとに1回投与してもよい（プラスまたはマイナス3、2、または1日）。

## 【0230】

キット

本発明のいくつかの側面において、部分のキットを提供する。いくつかの態様において、キットは、あらかじめ決定された量の抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドを有する少なくとも1つの容器を有してもよい。キットは、薬剤または薬学的組成物の形で、抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドを提供してもよく、そして明記する疾患または状態を治療するため、患者に投与するための使用説明書とともに提供されてもよい。抗体、抗原結合性断片、CAR、細胞またはポリペプチドを、腫瘍へのまたは血液への注射または注入に適切であるように配合してもよい。

10

## 【0231】

いくつかの態様において、キットはさらに、あらかじめ決定した量の別の療法剤（例えば抗感染剤または化学療法剤）を有する少なくとも1つの容器を含んでもよい。こうした態様において、キットはまた、2つの薬剤または薬学的組成物が特定の疾患または状態に対する組み合わせ治療を提供するように、これらを同時にまたは別個に投与可能であるように、第二の薬剤または薬学的組成物も含んでもよい。療法剤はまた、腫瘍または血液への注射または注入に適切であるように配合されてもよい。

20

## 【0232】

被験体

治療しようとする被験体は、任意の動物またはヒトであってもよい。被験体は好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。被験体は、非ヒト哺乳動物であってもよいが、より好ましくはヒトである。被験体は男性または女性であってもよい。被験体は患者であってもよい。被験体は治療が必要な疾患または状態を有すると診断されていてもよいし、あるいはこうした疾患または状態を有すると推測されていてもよい。

30

## 【0233】

タンパク質発現

細胞において本発明記載のポリペプチドを産生するために適した分子生物学技術は、当該技術分野に周知であり、例えば、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ニューヨーク: Cold Spring Harbor Press, 1989に示されるものがある。

## 【0234】

ポリペプチドはヌクレオチド配列から発現されてもよい。ヌクレオチド配列は、細胞中に存在するベクターに含有されてもよいし、または細胞のゲノム内に取り込まれていてもよい。

40

## 【0235】

「ベクター」は、本明細書において、細胞内に外因性遺伝物質をトランスファーするためのビヒクルとして用いられるオリゴヌクレオチド分子（DNAまたはRNA）である。ベクターは、細胞において、遺伝物質を発現させるための発現ベクターであってもよい。こうしたベクターには、発現しようとする遺伝子配列をコードするヌクレオチド配列に機能可能であるように連結されたプロモーター配列が含まれてもよい。ベクターにはまた、終結コドンおよび発現エンハンサーも含まれてもよい。当該技術分野に知られる任意の適切なベクター、プロモーター、エンハンサーおよび終結コドンを用いて、本発明記載のベクターからポリペプチドを発現させてもよい。適切なベクターには、プラスミド、バイナリーベクター、ウイルスベクターおよび人工染色体（例えば酵母人工染色体）が含まれる

50

。

## 【0236】

本明細書において、用語「機能可能であるように連結される」には、選択されたヌクレオチド配列および制御ヌクレオチド配列（例えばプロモーターおよび／またはエンハンサー）が、制御配列の影響または調節下で、ヌクレオチド配列の発現を達成するような方式で、共有連結される（それによって発現カセットを形成する）状況が含まれる。したがって、制御配列がヌクレオチド配列の転写を達成可能であるならば、制御配列は、選択されたヌクレオチド配列に、機能可能であるように連結されている。適切な場合、生じた転写物は、次いで、望ましいタンパク質またはポリペプチドに翻訳されてもよい。

## 【0237】

本発明記載のペプチドを産生するため、ポリペプチドの発現に適した任意の細胞を使用しうる。細胞は、原核細胞または真核細胞であってもよい。適切な原核細胞には大腸菌が含まれる。真核細胞の例には、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞が含まれる。いくつかの場合、ある原核細胞は、真核細胞と同じ翻訳後修飾を可能にしないため、細胞は原核細胞ではない。さらに、真核細胞では非常に高い発現レベルが可能であり、そして適切なタグを用いると、真核細胞からタンパク質を精製することがより容易でありうる。培地へのタンパク質の分泌を増進させる特定のプラスミドもまた、利用してもよい。

## 【0238】

関心対象のポリペプチドを産生する方法は、ポリペプチドを発現するように修飾された細胞の培養または発酵を伴ってもよい。培養または発酵は、栄養素、空気／酸素および／または増殖因子の適切な供給を提供され、バイオリアクター中で実行されてもよい。細胞から、培地／発酵ブロス分配し、タンパク質内容を抽出し、そして個々のタンパク質を分離して、分泌されたポリペプチドを単離することによって、分泌されたタンパク質を収集してもよい。培養、発酵および分離技術は、当業者に周知である。

## 【0239】

バイオリアクターには、その中で細胞を培養可能である1またはそれより多い容器が含まれる。バイオリアクター中の培養は、連続して生じてよく、リアクター内への反応物の連続流動、およびリアクターからの培養細胞の連続流動が伴う。あるいは、培養はバッチで生じてよい。バイオリアクターは、培養中の細胞のために最適な条件が提供されるように、pH、酸素、容器内へのおよび容器外への流速、ならびに容器内の攪拌などの環境条件を監視し、そして調節する。

## 【0240】

関心対象のポリペプチドを発現する細胞の培養後、好ましくはそのポリペプチドを単離する。当該技術分野に知られる、細胞培養からポリペプチド／タンパク質を分離するための任意の適切な方法を使用してもよい。培養から関心対象のポリペプチド／タンパク質を単離するため、まず、関心対象のポリペプチド／タンパク質を含有する培地から、培養された細胞を分離する必要がある可能性もある。関心対象のポリペプチド／タンパク質が細胞から分泌される場合、分泌されたポリペプチド／タンパク質を含有する培地から、遠心分離によって細胞を分離してもよい。関心対象のポリペプチド／タンパク質が細胞内に集積する場合、遠心分離前に、例えば超音波、迅速凍結融解または浸透圧溶解を用いて、細胞を破壊する必要があるであろう。遠心分離は、培養細胞を含有するペレット、または培養細胞の細胞破片、ならびに培地および関心対象のポリペプチド／タンパク質を含有する上清を生じるであろう。

## 【0241】

次いで、他のタンパク質および非タンパク質構成要素も含有しうる上清または培地から、関心対象のポリペプチド／タンパク質を単離することが望ましい可能性もある。上清または培地からポリペプチド／タンパク質構成要素を分離するための一般的なアプローチは、沈殿による。異なる溶解度のポリペプチド／タンパク質は、硫酸アンモニウムなどの沈殿剤の異なる濃度で沈殿する。例えば、低濃度の沈殿剤では、水溶性タンパク質が抽出さ

10

20

30

40

50

れる。したがって、増加する濃度の沈殿剤を添加することによって、異なる溶解度のタンパク質が区別可能である。続いて、透析を用いて、分離されたタンパク質から硫酸アンモニウムを除去してもよい。

#### 【0242】

異なるポリペプチド/タンパク質を区別するための他の方法が当該技術分野に知られ、例えばイオン交換クロマトグラフィおよびサイズクロマトグラフィがある。これらを沈殿の代替法として用いてもよいし、または沈殿に続いて行ってもよい。

#### 【0243】

関心対象のポリペプチド/タンパク質が、ひとたび培養から単離されたら、タンパク質を濃縮する必要がある可能性もある。関心対象のタンパク質を濃縮するためのいくつかの方法が当該技術分野に知られ、例えば限外濾過または凍結乾燥がある。

#### 【0244】

##### 配列同一性

アミノ酸またはヌクレオチド配列同一性パーセントを決定する目的のための整列を、当業者に知られる多様な方式で達成してもよく、例えば公的に入手可能なコンピュータソフトウェア、例えばClustalW 1.82、T-coffeeまたはMegalign (DNASTAR) ソフトウェアを用いてもよい。こうしたソフトウェアを用いる場合、好ましくは、デフォルトパラメータ、例えばギャップペナルティおよび伸長ペナルティに関するものを用いる。ClustalW 1.82のデフォルトパラメータは：タンパク質ギャップ・オープンペナルティ = 10.0、タンパク質ギャップ伸長ペナルティ = 0.2、タンパク質マトリックス = Gonnet、タンパク質/DNA END GAP = -1、タンパク質/DNA GAP DIST = 4である。

#### 【0245】

本発明には、記載する側面および好ましい特徴の組み合わせが含まれるが、こうした組み合わせが明らかに許容されえないかまたは明らかに回避される場合を除く。

本明細書に用いるセクション見出しは、構成上の目的のみのためであり、そして記載する主題を限定するとは意図されないものとする。

#### 【0246】

本発明の側面および態様はここで、例として、付随する図を参照しながら例示されるであろう。さらなる側面および態様は、当業者には明らかであろう。本文書に言及するすべての文書が本明細書に援用される。

#### 【0247】

本明細書全体にわたって、続く請求項を含めて、背景が別であることを必要としない限り、単語「含む」、ならびに変形、例えば「含む」および「含んでいる」は、言及する整数または工程、あるいは整数または工程群の包含を意味するが、いかなる他の整数または工程、あるいは整数または工程群も排除しないことが理解されるであろう。

#### 【0248】

本明細書および付随する請求項において、単数形「a」、「an」、および「the」には、背景が明らかに別であると示さない限り、複数の指示対象が含まれることに留意しなければならない。範囲は、本明細書において、「約」1つの特定の値から、そして/または「約」別の特定の値までとして表されてもよい。こうした範囲を示した場合、別の態様には、1つの特定の値から、そして/または他の特定の値までが含まれる。同様に、値を近似値で表した場合、先行する「約」を使用することによって、特定の値が別の態様を形成することが理解されるであろう。

#### 【0249】

以下の番号付けした段落は、本発明の特定の側面および態様を記載する：

1. 癌を治療する方法であって、癌を患っている患者に、抗体または抗原結合性断片を投与する工程を含み、抗体または抗原結合性断片は、CTLA-4に結合し、そして：以下のCDRを取り込む少なくとも1つの軽鎖可変領域：

#### 【0250】

## 【化 9】

LC-CDR1: RATQGISSWLA (配列番号:5)  
 LC-CDR2: AASSLQS (配列番号:6)  
 LC-CDR3: QQANTLPLFT (配列番号:7);

## 【0251】

および、以下の C D R を取り込む少なくとも 1 つの重鎖可変領域：

## 【0252】

## 【化 10】

10

HC-CDR1: SNTAAWN (配列番号:8)  
 HC-CDR2: RTYYRSKWYSDYGLSVKS (配列番号:9)  
 HC-CDR3: EGSGGTLIY (配列番号:10).

## 【0253】

を含む、前記方法。

2. 抗体または抗原結合性断片が、配列番号 3 または 4 のアミノ酸配列に少なくとも 85% の配列同一性を有する重鎖可変領域配列、および配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列に少なくとも 85% の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列を含む、段落 1 の方法。

20

## 【0254】

3. 抗体または抗原結合性断片が、配列番号 3 または 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、段落 1 の方法。

## 【0255】

4. 癌が、結腸、直腸、上咽頭、子宮頸、中咽頭、胃、肝臓、頭頸部、口腔、食道、唇、口、舌、扁桃腺、鼻、喉、唾液腺、洞、咽頭、喉頭、前立腺、肺、膀胱、皮膚、腎臓、卵巣または中皮からなる群より選択される組織の癌であるか、あるいは癌が、結腸癌、結腸癌腫、結腸直腸癌、上咽頭癌、子宮頸癌、中咽頭癌、胃癌、肝細胞癌、頭頸部癌、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)、口腔癌、喉頭癌、前立腺癌、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、尿路上皮癌、黒色腫、進行性黒色腫、腎細胞癌、卵巣癌および中皮腫からなる群より選択される、段落 1 の方法。

30

## 【0256】

5. 抗体または抗原結合性断片の投与が静脈内である、段落 1 の方法。

6. 抗体が、IgG1、IgG2、IgG3 および IgG4 より選択されるヒト定常領域を含む、段落 1 の方法。

## 【0257】

7. 抗原結合性断片が、Fab断片またはscFv断片である、段落 1 の方法。

8. 抗原結合性断片が、キメラ抗原受容体 (CAR) に含まれる、段落 1 の方法。

9. 癌を治療する方法であって、癌を患う患者に抗体または抗原結合性断片を投与する工程を含み、抗体または抗原結合性断片がCTLA-4に結合し、そして：

40

配列番号 3 または 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、前記方法。

## 【0258】

10. 癌が、結腸、直腸、上咽頭、子宮頸、中咽頭、胃、肝臓、頭頸部、口腔、食道、唇、口、舌、扁桃腺、鼻、喉、唾液腺、洞、咽頭、喉頭、前立腺、肺、膀胱、皮膚、腎臓、卵巣または中皮からなる群より選択される組織の癌であるか、あるいは癌が、結腸癌、結腸癌腫、結腸直腸癌、上咽頭癌、子宮頸癌、中咽頭癌、胃癌、肝細胞癌、頭頸部癌、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)、口腔癌、喉頭癌、前立腺癌、肺癌、小細胞肺癌、非小

50

細胞肺癌、膀胱癌、尿路上皮癌、黒色腫、進行性黒色腫、腎細胞癌、卵巣癌および中皮腫からなる群より選択される、段落 9 の方法。

【 0 2 5 9 】

1 1 . 抗体または抗原結合性断片の投与が静脈内である、段落 9 の方法。

1 2 . 抗体が、I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 より選択されるヒト定常領域を含む、段落 9 の方法。

【 0 2 6 0 】

1 3 . 抗原結合性断片が F a b 断片または s c F v 断片である、段落 9 の方法。

1 4 . 抗原結合性断片が、キメラ抗原受容体 ( C A R ) に含まれる、段落 9 の方法。

1 5 . 被験体において癌を治療する方法であって：

癌を有する被験体由来の血液試料から得た T 細胞を、C T L A - 4 に結合する抗体または抗原結合性断片の存在下で培養して、T 細胞集団を拡大させ；そして

拡大された T 細胞集団を被験体に投与する工程を含み；

C T L A - 4 に結合する抗体または抗原結合性断片が：

以下の C D R を取り込む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域；

【 0 2 6 1 】

【 化 1 1 】

LC-CDR1: RATQGISSWLA (配列番号 5)

LC-CDR2: AASSLQS (配列番号 6)

LC-CDR3: QQANTLPLFT (配列番号 7);

【 0 2 6 2 】

および以下の C D R を取り込む少なくとも 1 つの重鎖可変領域

【 0 2 6 3 】

【 化 1 2 】

HC-CDR1: SNTAAWN (配列番号 8)

HC-CDR2: RTYYRSKWYSDYGLSVKS (配列番号 9)

HC-CDR3: EGSGGTLIY (配列番号 10).

【 0 2 6 4 】

を含む、前記方法。

1 6 . 抗体または抗原結合性断片が、配列番号 3 または 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、段落 1 5 の方法。

【 0 2 6 5 】

1 7 . 癌が、結腸、直腸、上咽頭、子宮頸、中咽頭、胃、肝臓、頭頸部、口腔、食道、唇、口、舌、扁桃腺、鼻、喉、唾液腺、洞、咽頭、喉頭、前立腺、肺、膀胱、皮膚、腎臓、卵巣または中皮からなる群より選択される組織の癌であるか、あるいは癌が、結腸癌、結腸癌腫、結腸直腸癌、上咽頭癌、子宮頸癌、中咽頭癌、胃癌、肝細胞癌、頭頸部癌、頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C C )、口腔癌、喉頭癌、前立腺癌、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、尿路上皮癌、黒色腫、進行性黒色腫、腎細胞癌、卵巣癌および中皮腫からなる群より選択される、段落 1 5 の方法。

【 0 2 6 6 】

1 8 . 抗体が、I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 より選択されるヒト定常領域を含む、段落 1 5 の方法。

1 9 . 抗原結合性断片が F a b 断片または s c F v 断片である、段落 1 5 の方法。

【 0 2 6 7 】

2 0 . 抗原結合性断片が、キメラ抗原受容体 ( C A R ) に含まれる、段落 1 5 の方法

10

20

30

40

50

。

## 【実施例】

## 【0268】

本発明者らは、以下の実施例において、ヒトおよびマウスCTLA-4に結合し、ヒトCD28に結合せず、CTLA-4およびCD80の相互作用を遮断可能であり、CTLA-4/CD80およびCTLA-4/CD86シグナル伝達を阻害し、そして*in vivo*で抗癌活性を示すことが示される、抗CTLA-4抗体の単離および特徴付けを記載する。

## 【0269】

実施例1：抗ヒトCTLA-4抗体クローン2C8の単離

10

*in vitro*選択を通じて、ヒト抗体ファージディスプレイライブラリーから抗CTLA-4抗体を単離した。ブロッキングELISAにおいて、CTLA-4のそのリガンドに対する結合を遮断する能力に関して、抗体をスクリーニングした。試験した384クローンのうち、クローン2C8は、CTLA-4結合の劇的な阻害を示す唯一のクローンであった(図4)。

## 【0270】

実施例2：ヒトCTLA-4に対する2C8の結合の分析

ヒトCTLA-4に対する2C8の結合を、ELISAによって分析した。ヒトCTLA-4をELISAプレート上にコーティングし、そして2C8 Fabまたは陰性対照Fabを多様な濃度で添加した。結果を図5に示す。2C8は、用量依存方式で、ヒトCTLA-4に強く結合する能力を示した。

20

## 【0271】

実施例3：ヒトCTLA-4およびCD80の間の相互作用のブロッキングの分析

2C8が、CTLA-4のそのリガンド、CD80への結合を阻害する能力を、ELISAによって分析した。簡潔には、CD80をELISAプレート上にコーティングした。2C8、陰性対照FabまたはL3D10(商業的マウス抗ヒトCTLA-4 IgG1)をヒトCTLA-4とプレインキュベーションし、そして次いで、ELISAプレート上に添加した。CD80に対するCTLA-4の結合をELISAによって決定した。

## 【0272】

結果を図3に示す。2C8は、CTLA-4およびCD80の間の相互作用をブロッキングすることが示された。

30

実施例4：2C8の2C8<sub>g1</sub>への操作

抗体クローン2C8を、ヒトIgG1として発現させた。2C8可変ドメインのフレームワーク領域を操作して、生殖系列様免疫グロブリンに復帰させ、そして操作したクローンを2C8<sub>g1</sub>と名付けた。

## 【0273】

実施例5：種交差反応性の分析

2C8がマウスCTLA-4を認識する能力をELISAによって分析した。2C8 IgG、2C8<sub>g1</sub> IgGおよび商業的ラット抗マウスCTLA-4 IgGをELISAプレート内にコーティングした。マウスCTLA-4をビオチン化し、そして次いで、多様な濃度でELISAプレートに添加した。streptavidin-HRPを用いて、マウスCTLA-4の抗体への結合を顕色した。

40

## 【0274】

結果を図7に示す。2C8は、マウスCTLA-4を認識可能であり、そして商業的陽性対照よりもはるかに高い効率を有することが示された。生殖系列復帰操作は抗体2C8<sub>g1</sub>としての抗体の結合能に影響を及ぼさず、該抗体は、2C8と同一の結合プロファイルを示した(図7)。

## 【0275】

実施例6：交差種反応性の分析：カニクイザルおよびアカゲザルCTLA-4に対する結合

50

カニクイザル / アカゲザル C T L A - 4 を用いて類似の E L I S A を行った。イピリムマブを陽性対照として用いた。2 C 8 は、カニクイザル / アカゲザル C T L A - 4 を強く認識した ( 図 1 4 ) 。

【 0 2 7 6 】

実施例 7 : C D 2 8 との交差反応性の分析

C T L A - 4 は C D 2 8 とリガンドを共有する。C D 2 8 が C D 8 0 および C D 8 6 への結合に際して、T 細胞に刺激シグナルを伝達する一方、C T L A - 4 は阻害シグナルを送る。2 C 8 の C D 2 8 への結合を E L I S A によって調べた。ヒト F c にコンジュゲート化されたヒト C D 2 8 を E L I S A プレート上にコーティングし、そして多様な濃度の抗 C T L A - 4 または陰性対照抗体を添加した。

10

【 0 2 7 7 】

結果を図 8 に示す。商業的ラット抗マウス C T L A - 4 I g G とは異なり、2 C 8 は、C D 2 8 への結合を、高濃度の抗体であってさえ、まったく示さなかった ( 図 5 ) 。特に、2 C 8 は、L 3 D 1 0 よりも C D 2 8 への低い結合を示した。

【 0 2 7 8 】

実施例 8 : C T L A - 4 に対する 2 C 8 の結合のアフィニティの分析

C T L A - 4 に対する抗体 2 C 8 の結合アフィニティを E L I S A によって測定した。抗体をプレート上にコーティングし、そしてヒト C T L A - 4 を異なる濃度で添加した。用量反応曲線をプロットし ( 図 9 を参照されたい ) 、そして有効濃度 5 0 % ( E C 5 0 ) を計算した。このアッセイにおいて、2 C 8 は、5 . 0 n M の平均 E C 5 0 を示した ( 2

20

【 0 2 7 9 】

マウス C T L A - 4 に関する結合アフィニティを同様に測定し、そしてマウス C T L A - 4 に関する E C 5 0 を外挿した ; 2 C 8 I g G 1 は、9 . 6 n M の E C 5 0 を示した ( 2 C 8 \_\_ g l I g G 1 に関しては 2 3 . 5 n M 、 L A L A 突然変異を伴う 2 C 8 I g G 1 に関しては 5 . 1 n M 、そして 2 C 8 I g G 4 に関しては 7 . 0 n M ) ( 図 1 5 ) 。「 L A L A 」突然変異は、F c 領域の 2 3 4 および 2 3 4 位のロイシン残基のアラニンへの突然変異を指す ( すなわち L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A ) ; この突然変異は、F c および F c - R の間の相互作用を弱め、そしてしたがって A D C C 活性を防止することが知られる ( 例えば H e z a r e h ら , J V i r o l ( 2 0 0 1 ) 7 5 ( 2 4 ) : 1 2 1 6 1 - 1 2 1 6 8 を参照されたい ) 。

30

【 0 2 8 0 】

ヒト C T L A - 4 への 2 C 8 の結合のアフィニティを表面プラズモン共鳴 ( S P R ) 分析によってもまた測定した。抗体をバイオセンサーチップ上に固定し、ヒト C T L A - 4 を異なる濃度で流し、そして反応を測定した。このアッセイにおいて、2 C 8 は、9 . 6 n M の結合アフィニティ ( K <sub>D</sub> ) を示した。

【 0 2 8 1 】

実施例 9 : C T L A - 4 に対する 2 C 8 の結合のアビディティの分析

ヒト C T L A - 4 に対する 2 C 8 の結合のアビディティを E L I S A によって分析した。簡潔には、ヒト C T L A - 4 を E L I S A プレート上にコーティングし、そして抗ヒト C T L A - 4 抗体を多様な濃度で E L I S A プレートに添加した。反応曲線をプロットし ( 図 1 0 を参照されたい ) 、そして E C 5 0 を計算した。独立のアッセイにおける 2 C 8 に関する平均 E C 5 0 は 6 3 . 6 p M であった。

40

【 0 2 8 2 】

マウス C T L A - 4 に関するアビディティを E L I S A によって同様に測定した ( 図 1 6 ) 。マウスタンパク質を用いると、E C 5 0 は 2 C 8 I g G 1 に関して 4 . 9 n M である ( 2 C 8 \_\_ g l I g G 1 に関しては 7 7 . 1 n M ; L A L A 突然変異を伴う 2 C 8 I g G 1 に関しては 8 . 0 n M ; 2 C 8 I g G 4 に関しては 2 0 . 9 n M ) 。

【 0 2 8 3 】

実施例 1 0 : 細胞表面上に発現される C T L A - 4 に対する結合の分析

50

H E K - 2 9 3 . 6 E 細胞をヒトまたはマウス C T L A - 4 でトランスフェクションした。次いで、過剰発現細胞を 2 C 8 またはアイソタイプ対照の存在下でインキュベーションし、そして細胞に対する抗体の結合をフローサイトメトリーによって測定した。

【 0 2 8 4 】

2 C 8 は、これらのアッセイにおいて、細胞表面で発現されたヒト C T L A - 4 ( 図 1 7 ) またはマウス C T L A - 4 ( 図 1 8 ) に効率的に結合可能であった。

実施例 1 1 : 抗 C T L A - 4 抗体 2 C 8 の i n v i t r o 活性の分析

T 細胞再活性化アッセイを行って、抗体の活性を分析した。該アッセイにおいて、J u r k a t T 細胞を植物性血球凝集素および C D 8 0 または C D 8 6 のいずれかで刺激する。こうした処理の後、細胞は I L - 2 を分泌する。C T L A - 4 の添加は、I L - 2 の刺激および分泌を阻害する。抗 C T L A - 4 および対照抗体の存在下での細胞活性化、すなわち I L - 2 分泌のレベルを E L I S A によって測定した ( 図 1 1 ) 。再活性化アッセイにおいて、イピリムマブ ( Y e r v o y ( 登録商標 ) ) として市販されているヒト抗 h u C T L A - 4 ) または L 3 D 1 0 ( 商業的マウス抗 h u C T L A - 4 I g G 1 ) のいずれかを陽性対照として用いた。

10

【 0 2 8 5 】

2 C 8 は、C D 8 0 ( 図 1 1 ) または C D 8 6 ( 図 1 2 ) を通じた刺激および C T L A - 4 での阻害後、J u r k a t T 細胞による I L - 2 分泌を用量依存方式で回復させることが可能であった。

【 0 2 8 6 】

20

アッセイを数回反復し、そしてこれは、2 C 8 および派生抗体の、C T L A - 4 仲介性阻害を抑制する能力を一貫して示した ( 図 1 9 ) 。これらのアッセイにおいて、2 C 8 は、0 . 5 ~ 1 . 4 n M の間の E C 5 0 を示すイピリムマブと非常によく似て、0 . 6 ~ 2 . 0 n M の範囲の E C 5 0 を示した。L A L A 突然変異は抗体強度に影響を及ぼさず、突然変異を含む 2 C 8 は 0 . 7 ~ 1 . 2 n M の間の E C 5 0 を示した。抗体の生殖系列型は、1 つの実験においてより高い E C 5 0 ( 5 . 6 n M ) および別の実験において同等の E C 5 0 ( 1 . 1 n M ) を示し、これは有意でない可能性もある。

【 0 2 8 7 】

実施例 1 2 : 抗 C T L A - 4 抗体 2 C 8 の i n v i v o 活性の分析

2 C 8 の活性をまた、結腸癌 M C 3 8 細胞を用いて、i n v i v o で、腫瘍増殖のマウスモデルでも試験した。第 0 日、マウスに  $2 \times 10^6$  M C 3 8 細胞を皮下接種した。第 8 日に始まり、マウスに 5 用量 ( 動物あたり 2 0 0  $\mu$  g ) の 2 C 8 I g G 1 または I g G 1 アイソタイプ対照抗体を腹腔内注射した。実験全体で腫瘍サイズを測定した。

30

【 0 2 8 8 】

2 回の独立の実験の結果を図 1 3 A および 1 3 B に示す。2 C 8 は腫瘍増殖を調節する際に有効であることが示された。



## 【図 1】

2C8 クローン

DIQLTQSPSSVSASVGDRTITCRATQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS  
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQANTLPLFTFGPGTKVDIK (配列  
番号 1)

LC-CDR1: RATQGISSWLA (配列番号5)  
LC-CDR2: AASSLQS (配列番号6)  
LC-CDR3: QQANTLPLFT (配列番号7)

2C8\_g1 クローン

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRATQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS  
GVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQANTLPLFTFGPGTKVDIK (配列  
番号 2)

LC-CDR1: RATQGISSWLA (配列番号:5)  
LC-CDR2: AASSLQS (配列番号6)  
LC-CDR3: QQANTLPLFT (配列番号:7)

図 1

## 【図 2】

2C8 クローン

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDTVSSNTAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYY  
RSKWYSDYGLSVKSRMTINADTSKNQVSLHLNSVTPEDTAVYYCAREGSGGTLY  
WGQGLTVTVSS (配列番号3)

HC-CDR1: SNTAAWN (配列番号8)  
HC-CDR2: RTYYRSKWYSDYGLSVKS (配列番号9)  
HC-CDR3: EGS GGTLIY (配列番号10)

2C8\_g1 クローン

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNTAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYY  
RSKWYSDYGLSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREGSGGTLYW  
GQGLTVTVSS (配列番号4)

HC-CDR1: SNTAAWN (配列番号8)  
HC-CDR2: RTYYRSKWYSDYGLSVKS (配列番号9)  
HC-CDR3: EGS GGTLIY (配列番号10)

図 2

## 【図 3 A】

軽鎖可変ドメイン2C8 クローン

>2C8\_aa\_L  
DIQLTQSPSSVSASVGDRTITCRATQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS  
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQANTLPLFTFGPGTKVDIK [配列  
番号 1]

>2C8\_ntd\_L  
GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGA  
GTCACCATCACTTGTCCGGCGACTCAGGGTATAAGCAGCTGGTTAGCCTGGTA  
TCAGCAGAAACCAAGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT  
GCAAAATGGGGTCCCATCCAGGTTCAAGCGGCAGTGGCTCTGGGACAGAGTTC  
ACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTACTATTGTCAAC  
AGGCTAATACTCTCCCCTATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGATATCA  
AA [ 配列番号 11]

2C8\_g1 クローン

>2C8\_g1\_aa\_L  
DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRATQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS  
GVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQANTLPLFTFGPGTKVDIK [配列  
番号 2]

>2C8\_g1\_ntd\_L  
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGA  
GTCACCATCACTTGTCCGGCGACTCAGGGTATAAGCAGCTGGTTAGCCTGGTA  
TCAGCAGAAACCAAGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT  
GCAAAATGGGGTCCCATCCAGGTTCAAGCGGCAGTGGCTCTGGGACAGATTTC  
CTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGAACCTTACTATTGTCAACA  
GGCTAATACTCTCCCCTATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGATATCAA  
A [ 配列番号 12]

図 3

## 【図 3 B】

重鎖可変ドメイン2C8 クローン

>2C8\_aa\_H  
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDTVSSNTAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYY  
RSKWYSDYGLSVKSRMTINADTSKNQVSLHLNSVTPEDTAVYYCAREGSGGTLY  
WGQGLTVTVSS [ 配列番号 3]

>2C8\_ntd\_H  
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCC  
TCTCACTCACCTGCGCCATCTCCGGGGGACACTGTCTCTAGCAACACTGCTGCTT  
GGAATTGGATCAGGCAGTCCCCCTCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGAC  
ATACTACAGGTCCAAGTGGTATAGTACTATGGACTATCTGTGAAAAGTCGGAT  
GACCATCAATGCAGACACATCCAAGAACCAGGTCTCCCTACACCTGAACCTGT  
AACTCCCAGAGACACGGCTGTATATTACTGTGCAAGAGAGGGCAGTGGCGGAA  
CTTTGATCTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCTCTCAAGC [ 配列番号  
13]

2C8\_g1 クローン

>2C8\_g1\_aa\_H  
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNTAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYY  
RSKWYSDYGLSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREGSGGTLYW  
GQGLTVTVSS [ 配列番号 4]

>2C8\_g1\_ntd\_H  
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCC  
TCTCACTCACCTGCGCCATCTCCGGGGGACAGTGTCTCTAGCAACACTGCTGCTT  
GGAATTGGATCAGGCAGTCCCCCTCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGAC  
ATACTACAGGTCCAAGTGGTATAGTACTATGGACTATCTGTGAAAAGTCGGAT  
ACCATCAATCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTACAGCTGAACCTGTGA  
ACTCCCAGAGACACGGCTGTATATTACTGTGCAAGAGAGGGCAGTGGCGGAAC  
TTTGATCTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCTCTCAAGC [ 配列番号 14]

図 3 (続き)

【図 4 A】

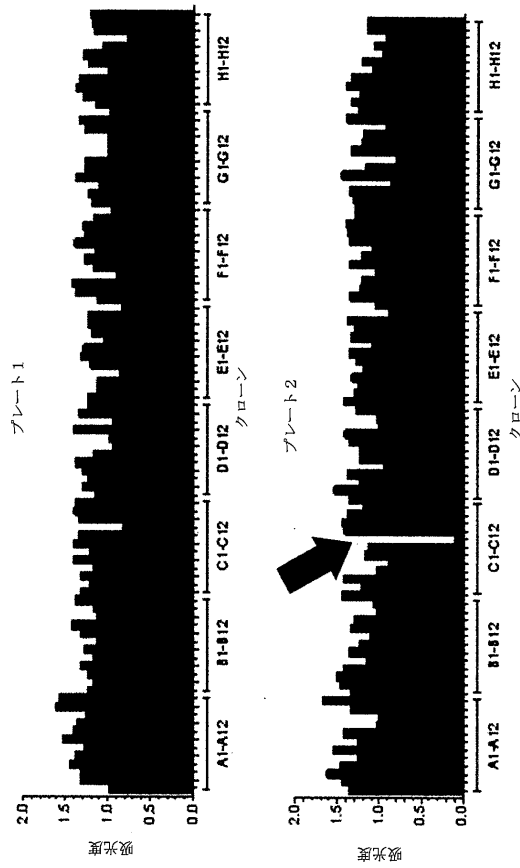


図 4

【図 4 B】

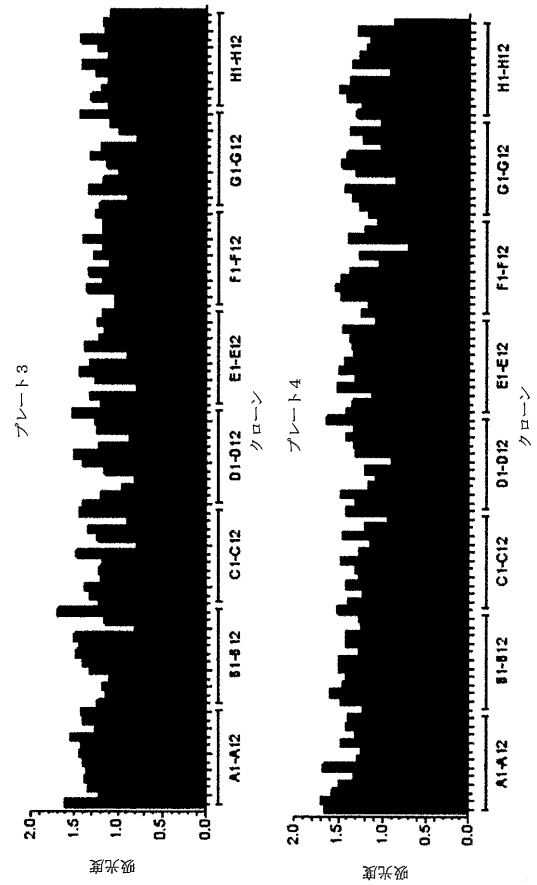


図 4 (続き)

【図 5】

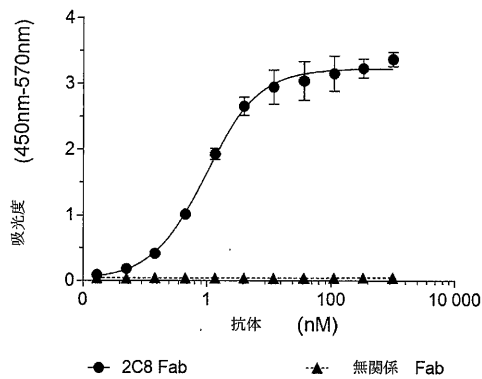


図 5

【図 7】

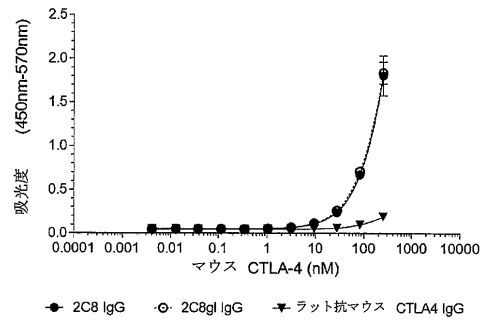


図 7

【図 6】

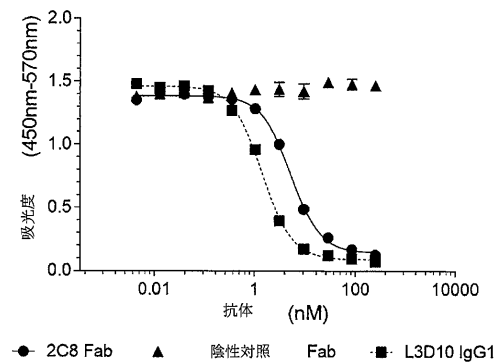


図 6

【図 8】

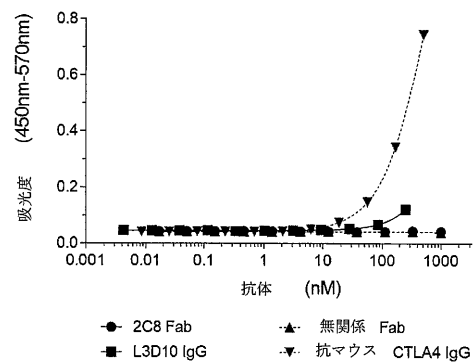
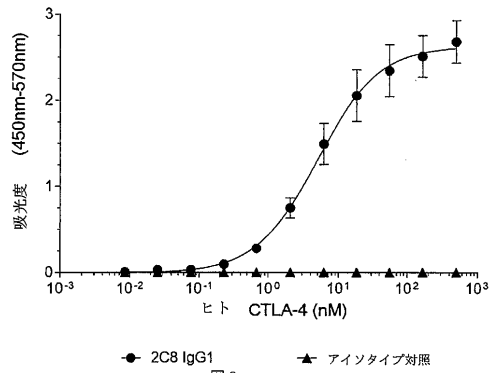
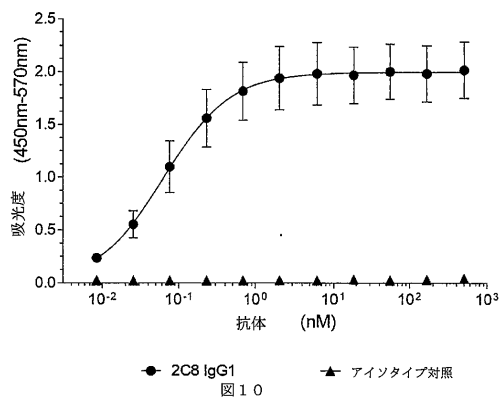


図 8

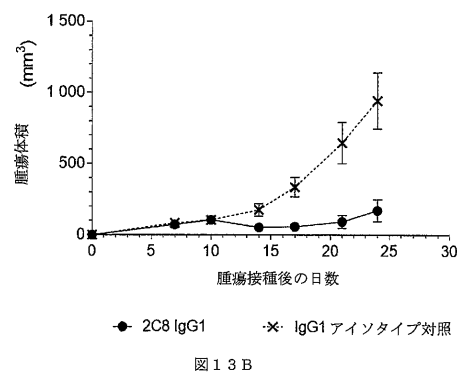
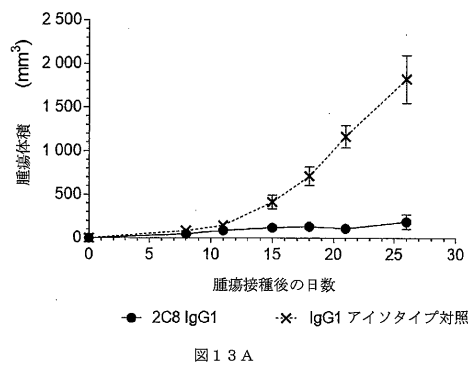
【図 9】



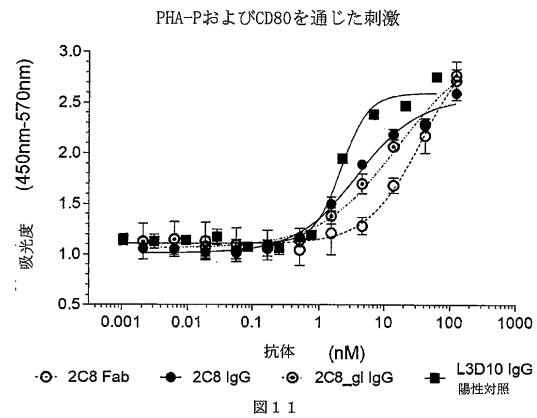
【図 10】



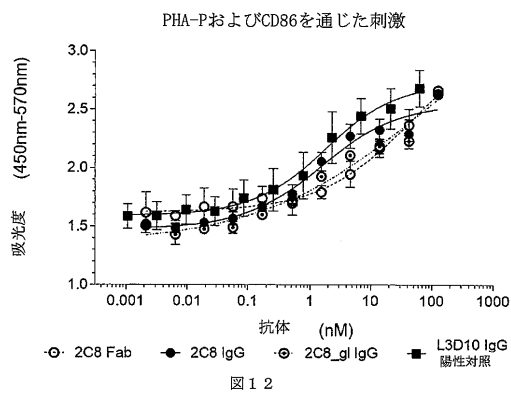
【図 13】



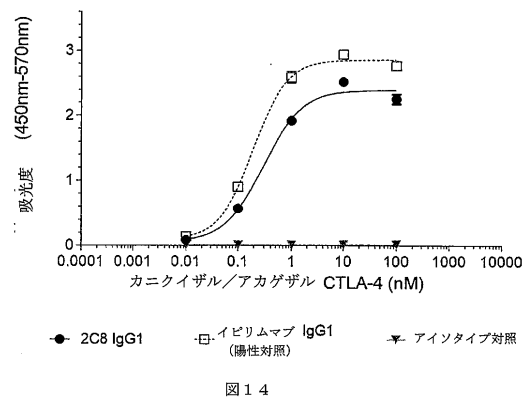
【図 11】



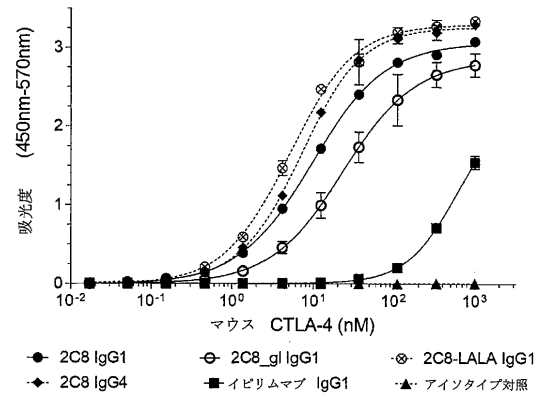
【図 12】



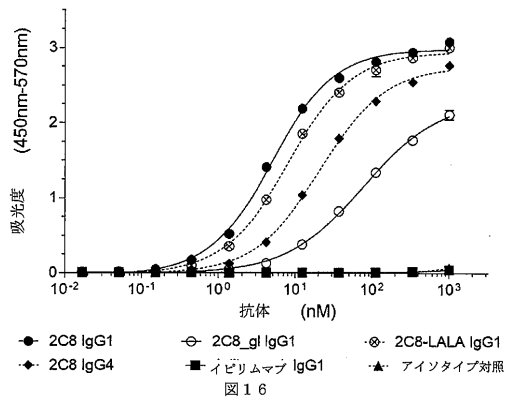
【図 14】



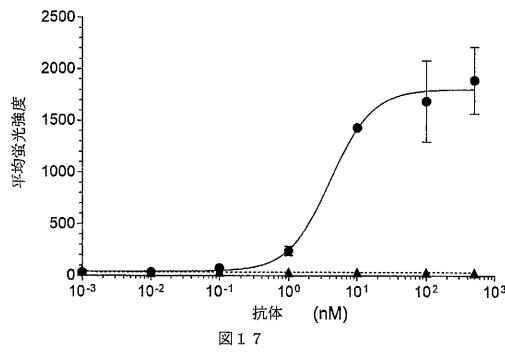
【図 15】



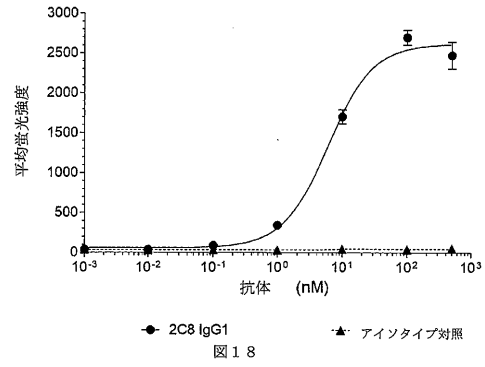
【図 16】



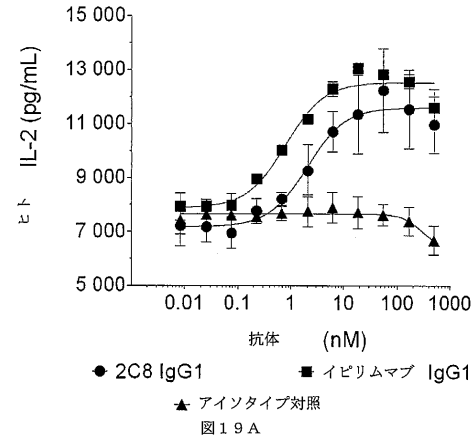
【図 17】



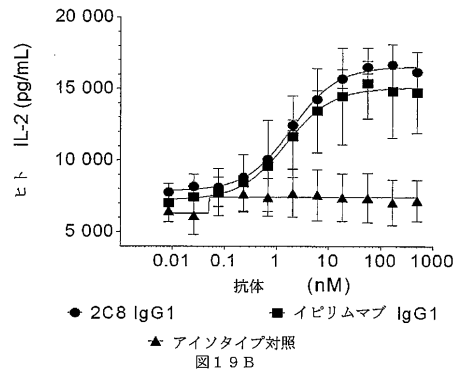
【図 18】



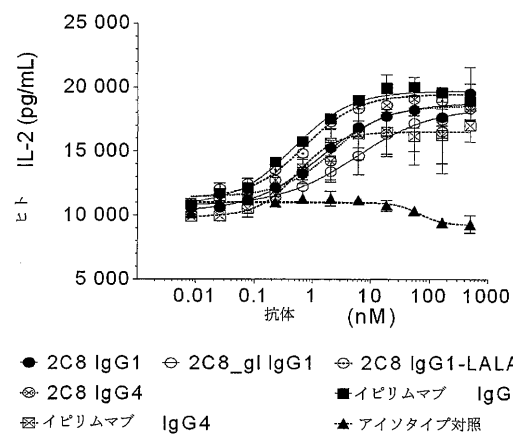
【図 19 A】



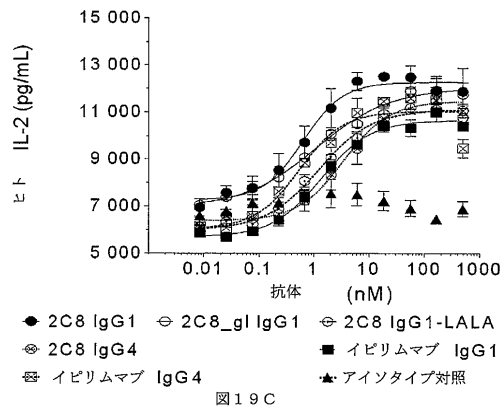
【図 19 B】



【図 19 D】



【図 19 C】



【配列表】

0006650537000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D

(74)代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72)発明者 ワン, チェン - イ

シンガポール国 1 3 8 6 4 8 , パイオメディカル・グローブ 8 エイ, 0 3 - 0 0 , ケア・オブ・エージェンシー フォー サイエンス, テクノロジー アンド リサーチ

(72)発明者 ゴー, イヴ

シンガポール国 1 3 8 6 4 8 , パイオメディカル・グローブ 8 エイ, 0 3 - 0 0 , ケア・オブ・エージェンシー フォー サイエンス, テクノロジー アンド リサーチ

(72)発明者 ヨー, ショク・ピン

シンガポール国 1 3 8 6 4 8 , パイオメディカル・グローブ 8 エイ, 0 3 - 0 0 , ケア・オブ・エージェンシー フォー サイエンス, テクノロジー アンド リサーチ

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 Immunology, 2000, 101(2), pp.169-177

Biochem. Biophys. Res. Commun., 2013, 440(2), pp.222-228

Cancer Immun., 2013, 13:5

Human CTLA-4 Antibody, [online], R And D SYSTEMS, 2 0 1 5 年 1 0 月 1 3 日, [ 2 0 1 9 年 8 月 2 日検索 ], U R L , <http://images-na.ssl-images-amazon.com/images/I/717kr48fool.pdf>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 9 / 0 0

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

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