

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-512377
(P2025-512377A)

(43)公表日 令和7年4月17日(2025.4.17)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	4 C 0 8 4
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 C 0 8 5
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04		4 C 0 8 7
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全124頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-560297(P2024-560297)	(71)出願人	597160510		
(86)(22)出願日	令和5年4月11日(2023.4.11)		リジェネロン・ファーマシューティカル		
(85)翻訳文提出日	令和6年11月6日(2024.11.6)		ズ・インコーポレイテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2023/065627		REGENERON PHARMACE		
(87)国際公開番号	WO2023/201226		UTICALS, INC.		
(87)国際公開日	令和5年10月19日(2023.10.19)		アメリカ合衆国10591-6707ニ		
(31)優先権主張番号	63/329,762		ューヨーク州タリータウン、オールド・		
(32)優先日	令和4年4月11日(2022.4.11)		ソー・ミル・リバー・ロード777番		
(33)優先権主張国・地域又は機関		(74)代理人	100105957		
	米国(US)		弁理士 恩田 誠		
(31)優先権主張番号	63/347,330	(74)代理人	100068755		
(32)優先日	令和4年5月31日(2022.5.31)		弁理士 恩田 博宣		
(33)優先権主張国・地域又は機関		(74)代理人	100142907		
	米国(US)		弁理士 本田 淳		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ	(74)代理人	100152489		
	最終頁に続く				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ユニバーサルな腫瘍細胞殺傷のための組成物及び方法

(57)【要約】

本明細書において、第1の標的抗原に特異的な第1の抗原結合領域及びCD28タンパク質に特異的な第2の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を対象に投与することにより、腫瘍細胞の殺傷をもたらす方法が提供される。幾つかの実施形態では、腫瘍細胞は、標的抗原を発現しない。幾つかの実施形態では、腫瘍細胞は、標的抗原を発現すると予測されない。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における腫瘍内の腫瘍細胞の殺傷をもたらす方法であって、標的抗原に特異的な第 1 の抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な第 2 の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を前記対象に投与することを含み、前記腫瘍細胞が、前記標的抗原を発現しないか、または発現すると予測されない、前記方法。

【請求項 2】

対象における腫瘍内の腫瘍細胞の殺傷を誘発する方法であって、前記方法が、標的抗原に特異的な第 1 の抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な第 2 の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を前記対象に投与することを含み、前記腫瘍細胞の少なくともサブセットが前記標的抗原を発現しない、前記方法。

10

【請求項 3】

対象における腫瘍内の腫瘍細胞に対する T 細胞活性化を誘発する方法であって、前記方法が、標的抗原に特異的な第 1 の抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な第 2 の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を前記対象に投与することを含み、前記腫瘍細胞の少なくともサブセットが前記標的抗原を発現しない、前記方法。

【請求項 4】

腫瘍を有する対象におけるがんを処置する方法であって、前記方法が、標的抗原に特異的な第 1 の抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な第 2 の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を前記対象に投与することを含み、前記腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットが前記標的抗原を発現しない、前記方法。

20

【請求項 5】

前記方法が、前記腫瘍内の前記腫瘍細胞の少なくとも前記サブセットが前記標的抗原を発現しないと判定することを更に含み、任意により、腫瘍細胞は、前記標的抗原の発現が検出レベル未満、またはシグナル対ノイズ比未満である場合、前記標的抗原を発現しない、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

対象のがんを処置する方法であって、

i) 前記対象が、標的抗原を発現しない腫瘍細胞を含む腫瘍を含むと判定することと、
i i) 前記標的抗原に特異的な第 1 の抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な第 2 の抗原結合領域を含む多重特異性の抗原結合分子を前記対象に投与することと、を含む、前記方法。

30

【請求項 7】

がん治療の対象を選択する方法であって、

i) 前記対象が、標的抗原を発現しない腫瘍細胞を含む腫瘍を含むと判定することと、
i i) 前記標的抗原に特異的な第 1 の抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な第 2 の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を前記対象に投与することと、を含み、任意により、前記腫瘍細胞は、前記標的抗原の発現が検出レベル未満、またはシグナル対ノイズ比未満である場合、前記標的抗原を発現せず、これにより、がん治療の対象が選択される、前記方法。

40

【請求項 8】

前記標的抗原が、

i) 腫瘍関連抗原 (T A A)、
i i) 前記腫瘍の腫瘍微小環境に関連する抗原であって、任意により、前記腫瘍微小環境に関連する前記抗原が、腫瘍間質に関連する抗原、前記腫瘍の細胞外マトリックスに関連する抗原、前記腫瘍微小環境内の血管に関連する抗原、もしくは癌関連線維芽細胞に関連する抗原である、前記抗原、または
i i i) 免疫抗原

である、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

50

前記標的抗原が、CD38、EGFR、CD22、MUC16、PSMA、CA9、FOLR1、HER2、及びSLAMF7から選択されるTTAである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記標的抗原がCD22である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記標的抗原が、PSA、CEA、CA-125、CA-19、COL10、FAP、B7H3、LRRC15、及びフィブロネクチンアイソフォームEDBから選択される腫瘍間質に関連する抗原である、請求項8に記載の方法。

【請求項12】

前記標的抗原が、ネクチン、バーシカン(VACN)、フィブロネクチン、及び癌胎児性抗原関連細胞接着分子(CEACAM)タンパク質から選択される前記腫瘍の前記細胞外マトリックスに関連する抗原である、請求項8に記載の方法。

【請求項13】

前記標的抗原が、 α -平滑筋アクチン(α -SMA)、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、S100A4、血小板由来成長因子受容体(PDGFR α/β)、ビメンチン、PDPN、CD70、CD10、GPR77、CD10、CD74、CD146、CAV1、Saa3-、及びCD49eから選択されるがん関連線維芽細胞に関連する抗原である、請求項8に記載の方法。

【請求項14】

前記標的抗原が、DLK1、EphA2、HBB、NG2、NRP1、NRP2、PDGFR β 、PSMA、RGS5、TEM1、VEGFR1、及びVEGFR2から選択される前記腫瘍微小環境内の前記血管に関連する抗原である、請求項8に記載の方法。

【請求項15】

前記免疫抗原が、免疫細胞の表面に発現される抗原であり、前記免疫細胞が、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、単球、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、T細胞、及びB細胞から選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項16】

前記免疫細胞が、前記腫瘍または前記腫瘍の前記腫瘍微小環境に浸潤している、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記標的抗原が、表4に列挙される免疫抗原のいずれか1つから選択される免疫抗原である、請求項8に記載の方法。

【請求項18】

前記腫瘍が免疫細胞を含む、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

前記免疫細胞が、B細胞及び／またはCD20を発現する細胞である、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記標的抗原を発現しない前記腫瘍細胞が、CD20も発現しない、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記標的抗原がTTAであり、前記腫瘍が、前記TTAを発現する腫瘍細胞を更に含む不均一性腫瘍である、請求項8に記載の方法。

【請求項22】

前記腫瘍の前記腫瘍微小環境が、前記標的抗原を発現する細胞を含む、先行請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも20%が前記標的抗原を発現しない、先行請求項のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 24】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも30%が前記標的抗原を発現しない、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも40パーセントが前記標的抗原を発現しない、請求項23に記載の方法。

【請求項 26】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも50パーセントが前記標的抗原を発現しない、請求項23に記載の方法。

【請求項 27】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも60パーセントが前記標的抗原を発現しない、請求項23に記載の方法。

【請求項 28】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも70パーセントが前記標的抗原を発現しない、請求項23に記載の方法。

【請求項 29】

前記腫瘍内の細胞のうちの少なくとも80%が前記標的抗原を発現しない、請求項23に記載の方法。

【請求項 30】

前記腫瘍内の細胞のうちの少なくとも90パーセントが前記標的抗原を発現しない、請求項23に記載の方法。

【請求項 31】

前記腫瘍内の細胞のうちの100%が前記標的抗原を発現しない、請求項23に記載の方法。

【請求項 32】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも10%～100%が前記標的抗原を発現しない、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 33】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも30%～100%が前記標的抗原を発現しない、請求項32に記載の方法。

【請求項 34】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも50パーセント～100%が前記標的抗原を発現しない、請求項32に記載の方法。

【請求項 35】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも70パーセント～100%が前記標的抗原を発現しない、請求項32に記載の方法。

【請求項 36】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも90パーセント～100%が前記標的抗原を発現しない、請求項32に記載の方法。

【請求項 37】

前記多重特異性の抗原結合分子が、二重特異性抗体または二重特異性抗体断片、例えば、二重特異性Tエンゲージング抗体（BiTE）、二重親和性再標的化分子（DART）、またはタンデムダイアボディ（TandAb）である、請求項1～36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 38】

前記多重特異性の抗原結合分子が、表3に列挙される二重特異性抗体から選択される二重特異性抗体である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 39】

前記多重特異性の抗原結合分子が、第2の標的抗原に特異的な第1の抗原結合領域及びCD3タンパク質に特異的な第2の抗原結合領域を有する第2の多重特異性の抗原結合分

10

20

30

40

50

子と共に前記対象に投与される、請求項 1 ～ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記第 2 の多重特異性の抗原結合分子が、二重特異性抗体または二重特異性抗体断片、例えば、二重特異性 T エンゲージング抗体 (B i T E)、二重親和性再標的化分子 (D A R T)、またはタンデムダイアボディ (T a n d A b) である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記第 2 の標的抗原が、表 2 に列挙される T A A のいずれかから選択される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記第 2 の標的抗原が C D 2 0 タンパク質である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記第 2 の多重特異性の抗原結合分子が、表 5 の多重特異性の抗原結合分子のいずれかから選択される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記多重特異性の抗原結合分子が、前記第 2 の多重特異性の抗原結合分子と共に投与される場合に共刺激効果を示す、請求項 3 9 ～ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記共刺激効果が、T 細胞の活性化、I L - 2 放出の誘発、P B M C における C D 2 5 + 上方調節の誘発、及び T 細胞媒介性細胞傷害の増強のうちの 1 つ以上である、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記腫瘍細胞が、B 細胞癌の腫瘍細胞である、請求項 1 ～ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記 B 細胞癌が、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (D L B C L)、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病 (C L L)、小リンパ球性リンパ腫 (S L L)、マントル細胞リンパ腫 (M C L)、辺縁帯リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫 (ワルデンシュトレームマクログロブリン血症)、毛様細胞性白血病、中枢神経系原発 (C N S) リンパ腫、または原発性眼内リンパ腫 (眼のリンパ腫) である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記腫瘍が固形腫瘍である、請求項 1 ～ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記腫瘍が、腺癌、副腎腫瘍、肛門腫瘍、胆管腫瘍、膀胱腫瘍、骨腫瘍、血液由来の腫瘍、脳 / C N S 腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、子宮内膜腫瘍、食道腫瘍、ユーイング腫瘍、眼腫瘍、胆嚢腫瘍、胃腸腫瘍、腎臓腫瘍、喉頭腫瘍もしくは下咽頭腫瘍、肝腫瘍、肺腫瘍、中皮腫、多発性骨髄腫、筋腫瘍、鼻咽頭腫瘍、神経芽細胞腫、口腔腫瘍、骨肉腫、卵巣腫瘍、脾臓腫瘍、陰茎腫瘍、下垂体腫瘍、原発性腫瘍、前立腺腫瘍、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺腫瘍、軟部組織肉腫、黒色腫、転移性腫瘍、基底細胞癌、メルケル細胞腫、精巣腫瘍、胸腺腫瘍、甲状腺腫瘍、子宮腫瘍、陰嚢腫瘍、外陰腫瘍、またはウィルムス腫瘍である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記多重特異性の抗原結合分子が、全身、静脈内、皮下、または筋肉内投与される、請求項 1 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記多重特異性の抗原結合分子が、薬学的に許容される製剤で前記対象に投与される、前述の請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記方法が、追加の抗がん剤を投与することを更に含む、前述の請求項のいずれか 1 項

10

20

30

40

50

に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記追加の抗がん剤が、化学療法薬、免疫チェックポイント阻害剤、腫瘍ワクチン、または細胞療法であり、任意により、前記細胞療法が、C A R-T細胞、ナチュラルキラー細胞、またはマクロファージを含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記追加の抗がん剤が、免疫チェックポイント阻害剤である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗 P D-1 抗体、抗 P D L 1 抗体、抗 C T L A 4 抗体、または抗 L A G 3 抗体である、請求項 5 4 に記載の方法。 10

【請求項 5 6】

前記対象が治療抵抗性のがんに罹患している、請求項 1 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 7】

腫瘍を有する対象におけるがんを処置する方法であって、
第 1 の標的抗原に特異的な抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な抗原結合領域を有する第 1 の多重特異性の抗原結合分子と、
第 2 の標的抗原に特異的な抗原結合領域及び C D 3 タンパク質に特異的な抗原結合領域を有する第 2 の多重特異性の抗原結合分子と、を前記対象に投与することを含み、 20
前記第 1 の標的抗原が、前記第 2 の標的抗原と同じ抗原ではない、前記方法。

【請求項 5 8】

対象における腫瘍内の腫瘍細胞の殺傷を誘発する方法であって、
第 1 の標的抗原に特異的な抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な抗原結合領域を有する第 1 の多重特異性の抗原結合分子と、
第 2 の標的抗原に特異的な抗原結合領域及び C D 3 タンパク質に特異的な抗原結合領域を有する第 2 の多重特異性の抗原結合分子と、を前記対象に投与することを含み、
前記第 1 の標的抗原が、前記第 2 の標的抗原と同じ抗原ではない、前記方法。

【請求項 5 9】

対象における腫瘍内の腫瘍細胞に対する T 細胞活性化を誘発する方法であって、 30
第 1 の標的抗原に特異的な抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な抗原結合領域を有する第 1 の多重特異性の抗原結合分子と、
第 2 の標的抗原に特異的な抗原結合領域及び C D 3 タンパク質に特異的な抗原結合領域を有する第 2 の多重特異性の抗原結合分子と、を前記対象に投与することを含み、
前記第 1 の標的抗原が、前記第 2 の標的抗原と同じ抗原ではない、前記方法。

【請求項 6 0】

前記腫瘍が前記第 1 の標的抗原を発現しない腫瘍細胞の少なくともサブセットを含むと判定することを更に含む、請求項 5 7 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞の少なくともサブセットが前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 5 7 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 6 2】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも 1 0 % が前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも 2 0 パーセントが前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも 3 0 パーセントが前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。 50

【請求項 6 5】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも 4 0 パーセントが前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも 5 0 パーセントが前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも 6 0 パーセントが前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも 7 0 パーセントが前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも 8 0 パーセントが前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも 9 0 パーセントが前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの 1 0 0 % が前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも 1 0 % ～ 1 0 0 % が前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも 3 0 パーセント～ 1 0 0 % が前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも 5 0 パーセント～ 1 0 0 % が前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも 7 0 パーセント～ 1 0 0 % が前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞のうちの少なくとも 9 0 パーセント～ 1 0 0 % が前記第 1 の標的抗原を発現しない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記第 1 の標的抗原が、
i) 腫瘍関連抗原 (TAA)、
i i) 前記腫瘍の腫瘍微小環境に関連する抗原であって、任意により、前記腫瘍微小環境に関連する前記抗原が、腫瘍間質に関連する抗原、前記腫瘍の細胞外マトリックスに関連する抗原、前記腫瘍微小環境内の血管に関連する抗原、もしくは癌関連線維芽細胞に関連する抗原である、前記抗原、または
i i i) 免疫抗原である、請求項 5 7 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記第 1 の標的抗原が、CD 3 8、EGFR、CD 2 2、MUC 1 6、PSMA、CA 9、FOLR 1、HER 2、及び SLAMF 7 から選択される TTA である、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記第 1 の標的抗原が CD 2 2 である、請求項 7 8 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 80】

前記第1の標的抗原が、PSA、CEA、CA-125、CA-19、COL10、FAP、B7H3、LRRC15、及びフィブロネクチンアイソフォームEDBから選択される前記腫瘍間質に関連する抗原である、請求項77に記載の方法。

【請求項 81】

前記第1の標的抗原が、ネクチン、バーシカン(VACN)、フィブロネクチン、及び癌胎児性抗原関連細胞接着分子(CEACAM)タンパク質から選択される前記腫瘍の前記細胞外マトリックスに関連する抗原である、請求項77に記載の方法。

【請求項 82】

前記第1の標的抗原が、 α -平滑筋アクチン(α -SMA)、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、S100A4、血小板由来成長因子受容体(PDGFR α/β)、ビメンチン、PDPN、CD70、CD10、GPR77、CD10、CD74、CD146、CAV1、Saa3-、及びCD49eから選択されるがん関連線維芽細胞に関連する抗原である、請求項77に記載の方法。

10

【請求項 83】

前記第1の標的抗原が、DLK1、EphA2、HBB、NG2、NRP1、NRP2、PDGFR β 、PSMA、RGS5、TEM1、VEGFR1、及びVEGFR2から選択される前記腫瘍微小環境内の前記血管に関連する抗原である、請求項77に記載の方法。

【請求項 84】

前記第1の標的抗原が、免疫細胞の表面に発現される免疫抗原であり、前記免疫細胞が、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、単球、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、T細胞、及びB細胞から選択される、請求項77に記載の方法。

20

【請求項 85】

前記免疫細胞が、前記腫瘍または前記腫瘍の腫瘍微小環境に浸潤している、請求項84に記載の方法。

【請求項 86】

前記第1の標的抗原が、表4に列挙される免疫抗原のいずれかから選択される免疫抗原である、請求項84に記載の方法。

【請求項 87】

前記第1の標的抗原が、表2に列挙される抗原のいずれかから選択され得る、請求項57～76のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 88】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞の少なくともサブセットが前記第2の標的抗原を発現しない、請求項57～87のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 89】

前記腫瘍が、前記第1の標的抗原を発現する細胞及び前記第2の標的抗原を発現する細胞を含む不均一性腫瘍である、請求項57～88のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 90】

前記腫瘍内の前記腫瘍細胞が、前記第1の標的抗原及び前記第2の標的抗原の両方を発現しない、請求項89に記載の方法。

40

【請求項 91】

前記第1の多重特異性の抗原結合分子が、二重特異性抗体または二重特異性抗体断片、例えば、二重特異性Tエンゲージング抗体(BiTE)、二重親和性再標的化分子(DART)、またはタンデムダイアボディ(TandAb)である、請求項57～90のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 92】

前記第1の多重特異性の抗原結合分子が、表3に列挙される二重特異性抗体から選択される、請求項57～90のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 93】

50

前記第2の標的抗原が、表2に列挙される抗原のいずれかから選択される、請求項57～92のいずれか1項に記載の方法。

【請求項94】

前記第2の標的抗原がCD20である、請求項93に記載の方法。

【請求項95】

前記第2の標的抗原が免疫腫瘍抗原である、請求項57～92のいずれか1項に記載の方法。

【請求項96】

前記免疫腫瘍抗原が、CD22、CD20、CD72、CD19、CD21、CD24、またはCD79である、請求項95に記載の方法。

【請求項97】

前記第2の多重特異性の抗原結合分子が、二重特異性抗体または二重特異性抗体断片、例えば、二重特異性Tエンゲージング抗体（BiTE）、二重親和性再標的化分子（DART）、またはタンデムダイアボディ（TandAb）である、請求項57～96のいずれか1項に記載の方法。

【請求項98】

前記第2の多重特異性の抗原結合分子が、表5に列挙される二重特異性抗体から選択される、請求項57～97のいずれか1項に記載の方法。

【請求項99】

前記第1の多重特異性の抗原結合分子が、前記第2の多重特異性の抗原結合分子と共に投与される場合に共刺激効果を示す、請求項57～98のいずれか1項に記載の方法。

【請求項100】

前記共刺激効果が、T細胞の活性化、IL-2放出の誘発、PBMCにおけるCD25＋上方調節の誘発、及びT細胞媒介性細胞傷害の増強のうちの1つ以上である、請求項99に記載の方法。

【請求項101】

前記腫瘍がB細胞癌に由来する、請求項57～100のいずれか1項に記載の方法。

【請求項102】

前記B細胞癌が、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、マンツル細胞リンパ腫（MCL）、辺縁帯リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫（ワルデンシュトレームマクログロブリン血症）、毛様細胞性白血病、中枢神経系原発（CNS）リンパ腫、または原発性眼内リンパ腫（眼のリンパ腫）である、請求項101に記載の方法。

【請求項103】

前記腫瘍が固形腫瘍である、請求項57～100のいずれか1項に記載の方法。

【請求項104】

前記腫瘍が、腺癌、副腎腫瘍、肛門腫瘍、胆管腫瘍、膀胱腫瘍、骨腫瘍、血液由来の腫瘍、脳／CNS腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、子宮内膜腫瘍、食道腫瘍、ユーイング腫瘍、眼腫瘍、胆嚢腫瘍、胃腸腫瘍、腎臓腫瘍、喉頭腫瘍もしくは下咽頭腫瘍、肝腫瘍、肺腫瘍、中皮腫、多発性骨髄腫、筋腫瘍、鼻咽頭腫瘍、神経芽細胞腫、口腔腫瘍、骨肉腫、卵巣腫瘍、脾臓腫瘍、陰茎腫瘍、下垂体腫瘍、原発性腫瘍、前立腺腫瘍、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺腫瘍、軟部組織肉腫、黒色腫、転移性腫瘍、基底細胞癌、メルケル細胞腫、精巣腫瘍、胸腺腫瘍、甲状腺腫瘍、子宮腫瘍、陰嚢腫瘍、外陰腫瘍、またはウィルムス腫瘍である、請求項103に記載の方法。

【請求項105】

前記第1の多重特異性の抗原結合分子が、全身、静脈内、皮下、または筋肉内投与される、請求項57～104のいずれか1項に記載の方法。

【請求項106】

前記第2の多重特異性の抗原結合分子が、全身、静脈内、皮下、または筋肉内投与され

10

20

30

40

50

る、請求項 57～105 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 107】

前記第 1 の多重特異性の抗原結合分子及び前記第 2 の多重特異性の抗原結合分子が、薬学的に許容される製剤で前記対象に投与される、請求項 57～106 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 108】

前記方法が、追加の抗がん剤を投与することを更に含む、請求項 57～107 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 109】

前記追加の抗がん剤が、化学療法薬、免疫チェックポイント阻害剤、または細胞療法であり、任意により、前記細胞療法が、CAR-T 細胞、ナチュラルキラー細胞、またはマクロファージを含む、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

前記追加の抗がん剤が、免疫チェックポイント阻害剤である、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 111】

前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗 PD-1 抗体、抗 PDL1 抗体、抗 CTLA4 抗体、または抗LAG3 抗体である、請求項 110 に記載の方法。

【請求項 112】

前記対象が治療抵抗性のがんに罹患している、請求項 1～111 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022 年 4 月 11 日に提出された米国仮出願第 63/329,762 号、及び 2022 年 5 月 31 日に提出された米国仮出願第 63/347,330 号の利益を主張し、各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

がんは、北米における主な死亡原因の 1 つである。数十年の研究にもかかわらず、多数のがんで、従来の化学療法及び他の治療薬が相変わらず無効であるか、またはそれに対する抵抗性が生じている。近年、免疫療法における進歩により、幾つかの有望な治療法をもたらされたが、これらの治療法でさえ、特定の患者及びがん種においてのみ有効であることが証明される傾向にある。従って、がんの新規治療法の必要性が存在する。

【発明の概要】

【0003】

本明細書において提供される方法及び組成物は、腫瘍関連抗原、腫瘍微小環境内の細胞を標的とする抗原、または免疫抗原（例えば、腫瘍内または腫瘍微小環境内の免疫細胞の表面に発現される抗原）を標的とする CD28 二重特異性抗体が、かかる抗原の発現を欠くがん細胞または腫瘍細胞の殺傷を誘発することができるという予想外の発見に部分的に基づく。

【0004】

ある種の態様では、標的抗原に特異的な第 1 の抗原結合領域及び CD28 タンパク質に特異的な第 2 の抗原結合領域を有する多重特異性（例えば、二重特異性）の抗原結合分子を対象に投与することにより、当該対象における腫瘍内の腫瘍細胞の殺傷をもたらすための方法及び組成物が本明細書において提供され、ここで、当該腫瘍細胞は、標的抗原を発現しないか、または発現すると予測されない。幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットは、標的抗原を発現しない。

【0005】

10

20

30

40

50

幾つかの態様では、対象における腫瘍内の腫瘍細胞の殺傷を誘発するため、及び／または腫瘍細胞に対するT細胞活性化を誘発するための方法及び組成物が本明細書において提供され、当該方法は、標的抗原に特異的な第1の抗原結合領域及びCD28タンパク質に特異的な第2の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を対象に投与することを含む。幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットは、標的抗原を発現しない。

【0006】

幾つかの態様では、腫瘍を有する対象のがんを処置するための方法及び組成物も本明細書において提供され、当該方法は、標的抗原に特異的な第1の抗原結合領域及びCD28タンパク質に特異的な第2の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を当該対象に投与することを含む。幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットは、標的抗原を発現しない。

10

【0007】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍関連抗原（TAA）である。幾つかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍微小環境（例えば、対象における腫瘍の微小環境）に関連する抗原である。例えば、幾つかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍微小環境内の免疫細胞上、腫瘍細胞間質上、または細胞外マトリックス上の抗原である。細胞外マトリックス抗原の例としては、ネクチン（例えば、ネクチン-3またはネクチン-4）、バーシカン（VACN）、フィブロネクチン、及び癌胎児性抗原関連細胞接着分子（CEACAM）タンパク質抗原が挙げられる。

20

【0008】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される方法は、腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットが標的抗原を発現しないと判定することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、腫瘍細胞は、標的抗原の発現が検出レベル未満、またはシグナル対ノイズ比未満である場合、標的抗原を発現しない。

【0009】

幾つかの態様では、対象のがんを処置する方法であって、i) 当該対象が、標的抗原を発現しない腫瘍細胞を含む腫瘍を含むと判定すること、ならびにii) 当該標的抗原に特異的な第1の抗原結合領域及びCD28タンパク質に特異的な第2の抗原結合領域を含む多重特異性の抗原結合分子を当該対象に投与することを含む、当該方法が本明細書において提供される。

30

【0010】

幾つかの態様では、がん治療の対象を選択する方法であって、i) 当該対象が、標的抗原を発現しない腫瘍細胞を含む腫瘍を含むと判定すること、ならびにii) 当該標的抗原に特異的な第1の抗原結合領域及びCD28タンパク質に特異的な第2の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を当該対象に投与することを含み、任意により、当該腫瘍細胞は、標的抗原の発現が検出レベル未満、またはシグナル対ノイズ比未満である場合、標的抗原を発現せず、これにより、がん治療の対象が選択される、当該方法が本明細書において提供される。

【0011】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍関連抗原（TAA）である。幾つかの実施形態では、腫瘍は、TAAを発現する腫瘍細胞を更に含む不均一性腫瘍であり得る。幾つかの実施形態では、腫瘍の腫瘍微小環境は、TAAを発現する細胞を含む。幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞のうちの少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、または少なくとも80%は、TAAを発現しない。幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞のうちの少なくとも10%～100%、20%～100%、30%～100%、40%～100%、50%～100%、60%～100%、70%～100%、80%～100%、または90%～100%は、TAAを発現しない。

40

【0012】

50

幾つかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍の腫瘍微小環境に関連する抗原、例えば、腫瘍間質に関連する抗原、腫瘍の細胞外マトリックスに関連する抗原、腫瘍微小環境内の血管に関連する抗原、または癌関連線維芽細胞に関連する抗原である。

【0013】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、PSA、CEA、CA-125、CA-19、COL10、FAP、B7H3、LRRC15、及びフィブロネクチンアイソフォームEDBから選択される腫瘍間質に関連する抗原である。

【0014】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、ネクチン（例えば、ネクチン-3またはネクチン-4）、パーシカン（VACN）、フィブロネクチン、及び癌胎児性抗原関連細胞接着分子（CEACAM）タンパク質から選択される腫瘍の細胞外マトリックスに関連する抗原である。

10

【0015】

幾つかの実施形態では、腫瘍の腫瘍微小環境は、標的抗原を発現する細胞を含む。

【0016】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、癌関連線維芽細胞の表面に発現される抗原（例えば、 α -平滑筋アクチン（ α -SMA）、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）、S100A4、血小板由来成長因子受容体（PDGFR α/β ）、ビメンチン、PDPN、CD70、CD10、GPR77、CD10、CD74、CD146、CAV1、Saa3-、またはCD49e）である。

20

【0017】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍微小環境内の血管表面に発現される抗原、例えば、DLK1、EphA2、HBB、NG2、NRP1、NRP2、PDGFR β 、PSMA、RGS5、TEM1、VEGFR1、またはVEGFR2である。

【0018】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、免疫抗原である。幾つかの実施形態では、免疫抗原は、免疫細胞の表面に発現される抗原である。免疫細胞は、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、単球、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、T細胞、またはB細胞であり得る。幾つかの実施形態では、免疫細胞は、腫瘍または腫瘍の腫瘍微小環境に浸潤している。免疫抗原は、表4に列挙される免疫抗原のいずれかから選択され得る。

30

【0019】

幾つかの実施形態では、腫瘍内の少なくとも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%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の腫瘍細胞が標的抗原を発現しない。幾つかの実施形態では、腫瘍内の少なくとも10%~100%、20%~100%、30%~100%、40%~100%、50%~100%、60%~100%、70%~100%、80%~100%、または90%~100%の腫瘍細胞が標的抗原を発現しない。

40

【0020】

幾つかの実施形態では、腫瘍は、免疫細胞（例えば、B細胞及び／またはCD20を発現する細胞）を含む。幾つかの実施形態では、標的抗原を発現しない腫瘍細胞は、CD20も発現しない。標的抗原は、CD38、EGFR、CD22、MUC16、PSMA、

50

C A 9、F O L R 1、H E R 2、及び S L A M F 7 から選択され得る。標的抗原は C D 2 2 であり得る。

【0021】

幾つかの実施形態では、多重特異性の抗原結合分子は、二重特異性抗体（例えば、表 3 に列挙される二重特異性抗体のいずれか）または二重特異性抗体断片、例えば、二重特異性 T エンゲージング抗体（B i T E）、二重親和性再標的化分子（D A R T）、及びタンデムダイアボディ（T a n d A b）であり得る。幾つかの実施形態では、多重特異性の抗原結合分子は、第 2 の標的抗原（例えば、第 2 の腫瘍関連抗原（T A A 2））に特異的な第 1 の抗原結合領域及び C D 3 タンパク質に特異的な第 2 の抗原結合領域を有する第 2 の多重特異性の抗原結合分子と共に投与される。幾つかの実施形態では、第 2 の多重特異性の抗原結合分子は、二重特異性抗体または二重特異性抗体断片、例えば、二重特異性 T エンゲージング抗体（B i T E）、二重親和性再標的化分子（D A R T）、及びタンデムダイアボディ（T a n d A b）である。

10

【0022】

第 2 の標的抗原は、表 2 に列挙される抗原のいずれかから選択され得る。第 2 の標的抗原は、C D 2 0 タンパク質であり得る。幾つかの実施形態では、第 2 の多重特異性の抗原結合分子は、表 5 の多重特異性の抗原結合分子のいずれかから選択される。多重特異性の抗原結合分子は、第 2 の多重特異性の抗原結合分子と共に投与される場合に共刺激効果を示し得る。幾つかの実施形態では、共刺激効果は、以下のうちの 1 つ以上である：T 細胞の活性化、I L - 2 放出の誘発、P B M C における C D 2 5 + 上方調節の誘発、及び T 細胞媒介性細胞傷害の増強。幾つかの実施形態では、腫瘍細胞は、B 細胞癌の腫瘍細胞である。B 細胞癌としては、限定されるものではないが、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（D L B C L）、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病（C L L）、小リンパ球性リンパ腫（S L L）、マントル細胞リンパ腫（M C L）、辺縁帯リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫（ワルデンシュトレームマクログロブリン血症）、毛様細胞性白血病、中枢神経系原発（C N S）リンパ腫、または原発性眼内リンパ腫（眼のリンパ腫）が挙げられる。

20

【0023】

幾つかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。腫瘍は、腺癌、副腎腫瘍、肛門腫瘍、胆管腫瘍、膀胱腫瘍、骨腫瘍、血液由来の腫瘍、脳／C N S 腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、子宮内膜腫瘍、食道腫瘍、ユーイング腫瘍、眼腫瘍、胆嚢腫瘍、胃腸腫瘍、腎臓腫瘍、喉頭腫瘍もしくは下咽頭腫瘍、肝腫瘍、肺腫瘍、中皮腫、多発性骨髄腫、筋腫瘍、鼻咽頭腫瘍、神経芽細胞腫、口腔腫瘍、骨肉腫、卵巣腫瘍、脾臓腫瘍、陰茎腫瘍、下垂体腫瘍、原発性腫瘍、前立腺腫瘍、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺腫瘍、軟部組織肉腫、黒色腫、転移性腫瘍、基底細胞癌、メルケル細胞腫、精巣腫瘍、胸腺腫瘍、甲状腺腫瘍、子宮腫瘍、膣腫瘍、外陰腫瘍、またはウィルムス腫瘍であり得る。

30

【0024】

多重特異性の抗原結合分子は、全身、静脈内、皮下、または筋肉内投与され得る。多重特異性の抗原結合分子は、薬学的に許容される製剤で対象に投与され得る。幾つかの実施形態では、本方法は、追加の抗がん剤を投与することを更に含む。追加の抗がん剤は、化学療法薬、免疫チェックポイント阻害剤、C A R - T 細胞、または腫瘍ワクチンであり得る。免疫チェックポイント阻害剤は、抗 P D - 1 抗体、抗 P D L 1 抗体、抗 C T L A 4 抗体、または抗 L A G 3 抗体であり得る。

40

【0025】

幾つかの実施形態では、対象は、治療抵抗性のがんに罹患している。

【0026】

幾つかの態様では、腫瘍を有する対象のがんを処置し、対象における腫瘍内の腫瘍細胞の殺傷を誘発もしくはもたらし、及び／または対象における腫瘍内の腫瘍細胞に対する T 細胞活性化を誘発する方法であって、当該方法が、第 1 の標的抗原に特異的な抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な抗原結合領域を有する第 1 の多重特異性の抗原結合

50

分子、ならびに第2の標的抗原に特異的な抗原結合領域及びCD3タンパク質に特異的な抗原結合領域を有する第2の多重特異性の抗原結合分子を当該対象に投与することを含み、当該第1の標的抗原が当該第2の標的抗原と同じ抗原ではない、当該方法が本明細書において提供される。幾つかの実施形態では、第1及び／または第2の標的抗原は、腫瘍関連抗原（TAA）である。

【0027】

幾つかの実施形態では、本方法は、腫瘍が第1の標的抗原を発現しない腫瘍細胞のサブセットを含むと判定することを更に含む。

【0028】

幾つかの態様では、腫瘍を有する対象のがんを処置し、対象における腫瘍内の腫瘍細胞の殺傷を誘発もしくはもたらし、及び／または対象における腫瘍内の腫瘍細胞に対するT細胞活性化を誘発する方法であって、当該方法が、当該腫瘍が第1の標的抗原を発現しない腫瘍細胞を含むかどうかを判定すること、当該第1の標的抗原に特異的な抗原結合領域及びCD28タンパク質に特異的な抗原結合領域を有する第1の多重特異性の抗原結合分子、ならびに第2の標的抗原に特異的な抗原結合領域及びCD3タンパク質に特異的な抗原結合領域を有する第2の多重特異性の抗原結合分子を当該対象に投与することを含み、当該第1の標的抗原が当該第2の標的抗原と同じ抗原ではない、当該方法が本明細書において提供される。幾つかの実施形態では、第1及び／または第2の標的抗原は、腫瘍関連抗原（TAA）である。

【0029】

幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットは、第1の標的抗原を発現しない。幾つかの実施形態では、腫瘍内の少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、または少なくとも80%の腫瘍細胞が第1の標的抗原を発現しない。幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットは、第2の標的抗原を発現しない。幾つかの実施形態では、腫瘍は、第1の標的抗原を発現する細胞及び第2の標的抗原を発現する細胞を含む不均一性腫瘍である。幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞は、第1の標的抗原及び第2の標的抗原の両方を発現しない。

【0030】

幾つかの実施形態では、第1の標的抗原は、腫瘍の腫瘍微小環境に関連する抗原、例えば、腫瘍間質に関連する抗原、腫瘍の細胞外マトリックスに関連する抗原、腫瘍微小環境内の血管に関連する抗原、または癌関連線維芽細胞に関連する抗原である。

【0031】

幾つかの実施形態では、第1の標的抗原は、PSA、CEA、CA-125、CA-19、COL10、FAP、B7H3、LRRC15、及びフィブロネクチンアイソフォームEDBから選択される腫瘍間質に関連する抗原である。

【0032】

幾つかの実施形態では、第1の標的抗原は、ネクチン（例えば、ネクチン-3またはネクチン-4）、バーシカン（VACN）、フィブロネクチン、及び癌胎児性抗原関連細胞接着分子（CEACAM）タンパク質から選択される腫瘍の細胞外マトリックスに関連する抗原である。

【0033】

幾つかの実施形態では、腫瘍の腫瘍微小環境は、標的抗原を発現する細胞を含む。

【0034】

幾つかの実施形態では、第1の標的抗原は、癌関連線維芽細胞の表面に発現される抗原（例えば、 α -平滑筋アクチン（ α -SMA）、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）、S100A4、血小板由来成長因子受容体（PDGFR α/β ）、ビメンチン、PDPN、CD70、CD10、GPR77、CD10、CD74、CD146、CAV1、Saa3-、またはCD49e）である。

【0035】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態では、第1の標的抗原は、腫瘍微小環境内の血管表面に発現される抗原、例えば、DLK1、EphA2、HBB、NG2、NRP1、NRP2、PDGFRβ、PSMA、RGS5、TEM1、VEGFR1、及びVEGFR2である。

【0036】

幾つかの実施形態では、第1の標的抗原は、免疫抗原である。幾つかの実施形態では、免疫抗原は、免疫細胞の表面に発現される抗原である。免疫細胞は、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、単球、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、T細胞、またはB細胞であり得る。幾つかの実施形態では、免疫細胞は、腫瘍または腫瘍の腫瘍微小環境に浸潤している。免疫抗原は、表4に列挙される免疫抗原のいずれかから選択され得る。

【0037】

幾つかの実施形態では、腫瘍内の少なくとも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%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の腫瘍細胞が第1または第2の標的抗原を発現しない。幾つかの実施形態では、腫瘍内の少なくとも10%~100%、20%~100%、30%~100%、40%~100%、50%~100%、60%~100%、70%~100%、80%~100%、または90%~100%の腫瘍細胞が第1及び／または第2の標的抗原を発現しない。

【0038】

第1の標的抗原は、表2に列挙される抗原のいずれかから選択され得る。第1の標的抗原はCD22であり得る。第1の標的抗原は、非免疫抗原であり得る。非免疫抗原は、CD38、EGFR、MUC16、PSMA、CA9、FOLR1、HER2、またはSLAMF7であり得る。幾つかの実施形態では、第1の多重特異性の抗原結合分子は、二重特異性抗体または二重特異性抗体断片、例えば、二重特異性Tエンゲージング抗体（BiTE）、二重親和性再標的化分子（DART）、及びタンデムダイアボディ（TandAb）である。幾つかの実施形態では、第1の多重特異性の抗原結合分子は、表3に列挙される二重特異性抗体から選択される。幾つかの実施形態では、第2の標的抗原は、表2に列挙される抗原のいずれかから選択される。第2の標的抗原は、CD20であり得る。第2の標的抗原は、免疫抗原であり得る。幾つかの実施形態では、免疫抗原は、CD22、CD20、CD72、CD19、CD21、CD24、またはCD79である。第2の多重特異性の抗原結合分子は、二重特異性抗体または二重特異性抗体断片であり得る。幾つかの実施形態では、第2の多重特異性の抗原結合分子は、表5に列挙される二重特異性抗体から選択される。幾つかの実施形態では、第2の多重特異性の抗原結合分子は、二重特異性抗体または二重特異性抗体断片、例えば、二重特異性Tエンゲージング抗体（BiTE）、二重親和性再標的化分子（DART）、及びタンデムダイアボディ（TandAb）である。

【0039】

幾つかの実施形態では、第1の多重特異性の抗原結合分子は、第2の多重特異性の抗原結合分子と共に投与される場合に共刺激効果を示す。共刺激効果は、以下のうちの1つ以上であり得る：T細胞の活性化、IL-2放出の誘発、PBMICにおけるCD25+上方調節の誘発、及びT細胞媒介性細胞傷害の増強。

【0040】

腫瘍は、B細胞癌、例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、マンタル細胞リンパ腫（MCL）、辺縁帯リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫（ワルデンシュトレームマクログロブリン血症）、毛様細胞性白血病、中枢神経系原発（CNS）リンパ腫、または原発性眼内リンパ腫（眼のリンパ腫）に由来し得る。

【0041】

幾つかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。腫瘍は、腺癌、副腎腫瘍、肛門腫瘍、胆管腫瘍、膀胱腫瘍、骨腫瘍、血液由来の腫瘍、脳／CNS腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、子宮内膜腫瘍、食道腫瘍、ユーイング腫瘍、眼腫瘍、胆嚢腫瘍、胃腸腫瘍、腎臓腫瘍、喉頭腫瘍もしくは下咽頭腫瘍、肝腫瘍、肺腫瘍、中皮腫、多発性骨髄腫、筋腫瘍、鼻咽頭腫瘍、神経芽細胞腫、口腔腫瘍、骨肉腫、卵巣腫瘍、脾臓腫瘍、陰茎腫瘍、下垂体腫瘍、原発性腫瘍、前立腺腫瘍、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺腫瘍、軟部組織肉腫、黒色腫、転移性腫瘍、基底細胞癌、メルケル細胞腫、精巣腫瘍、胸腺腫瘍、甲状腺腫瘍、子宮腫瘍、膣腫瘍、外陰腫瘍、またはウィルムス腫瘍であり得る。

10

【0042】

幾つかの実施形態では、第1の多重特異性の抗原結合分子は、全身、静脈内、皮下、または筋肉内投与される。第2の多重特異性の抗原結合分子は、全身、静脈内、皮下、または筋肉内投与され得る。第1の多重特異性の抗原結合分子及び／または第2の多重特異性の抗原結合分子は、薬学的に許容される製剤で対象に投与され得る。

【0043】

幾つかの実施形態では、本方法は、追加の抗がん剤を投与することを更に含む。幾つかの実施形態では、追加の抗がん剤は、化学療法薬、免疫チェックポイント阻害剤、CAR-T細胞、または腫瘍ワクチンである。幾つかの実施形態では、追加の抗がん剤は、免疫チェックポイント阻害剤である。免疫チェックポイント阻害剤は、抗PD-1抗体、抗PDL1抗体、抗CTLA4抗体、または抗LAG3抗体である。

20

【0044】

幾つかの実施形態では、対象は、治療抵抗性のがんに罹患していてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1A】CD28が、オドロネクスタマブ投与前及び投与後の両方のr/r NHL患者由来の腫瘍内CD8T細胞上に発現されることを示す。オドロネクスタマブ第I相試験のDLBCL患者ベースライン試料の多重IHC染色（CD3、CD8、CD28、及びDAPI）の代表画像を示す。

30

【図1B】CD28が、オドロネクスタマブ投与前及び投与後の両方のr/r NHL患者由来の腫瘍内CD8T細胞上に発現されることを示す。ベースラインDLBCL及びFL試料のCD4+CD28+細胞及びCD8+CD28+細胞の密度を示す。n=64。

【図1C】CD28が、オドロネクスタマブ投与前及び投与後の両方のr/r NHL患者由来の腫瘍内CD8T細胞上に発現されることを示す。ベースライン（左上）及びオドロネクスタマブ投与開始の5週間後（右上）のDLBCL患者試料の代表画像を示す。ベースライン時及び処置の5週間時点での対応するDLBCL及びFL試料のCD8+CD28+細胞及びCD8+CD28+細胞の密度。

40

【図2A】REGN5837二重特異性抗体が、インビトロでオドロネクスタマブにより媒介されるT細胞活性化、細胞傷害性、及びエフェクター機能を増強することを示す。WSU-DLCL2細胞を、リンパ球を濃縮したヒトPBMCと漸増する用量のオドロネクスタマブ及び一定濃度のREGN5837（ 7.72×10^{-9} ~ 1.00×10^{-7} Mの範囲）との組み合わせと共にインキュベートした。腫瘍細胞殺傷がパーセント死細胞により評価されたことを示す。

【図2B】REGN5837二重特異性抗体が、インビトロでオドロネクスタマブにより媒介されるT細胞活性化、細胞傷害性、及びエフェクター機能を増強することを示す。WSU-DLCL2細胞を、リンパ球を濃縮したヒトPBMCと漸増する用量のオドロネク

50

スタマブ及び一定濃度の REGN5837 ($7.72 \times 10^{-9} \sim 1.00 \times 10^{-7} \text{ M}$ の範囲)との組み合わせと共にインキュベートした。CD4T細胞の活性化が、CD25 上方調節により示されたことを示す。

【図2C】REGN5837二重特異性抗体が、インビトロでオドロネクスタマブにより媒介されるT細胞活性化、細胞傷害性、及びエフェクター機能を増強することを示す。WSU-DLCL2細胞を、リンパ球を濃縮したヒトPBMCと漸増する用量のオドロネクスタマブ及び一定濃度のREGN5837 ($7.72 \times 10^{-9} \sim 1.00 \times 10^{-7} \text{ M}$ の範囲)との組み合わせと共にインキュベートした。増殖がCD4T細胞のパーセント分裂により評価されたことを示す。

【図2D】REGN5837二重特異性抗体が、インビトロでオドロネクスタマブにより媒介されるT細胞活性化、細胞傷害性、及びエフェクター機能を増強することを示す。WSU-DLCL2細胞を、リンパ球を濃縮したヒトPBMCと漸増する用量のオドロネクスタマブ及び一定濃度のREGN5837 ($7.72 \times 10^{-9} \sim 1.00 \times 10^{-7} \text{ M}$ の範囲)との組み合わせと共にインキュベートした。CD8T細胞の活性化が、CD25 上方調節により示されたことを示す。

【図2E】REGN5837二重特異性抗体が、インビトロでオドロネクスタマブにより媒介されるT細胞活性化、細胞傷害性、及びエフェクター機能を増強することを示す。WSU-DLCL2細胞を、リンパ球を濃縮したヒトPBMCと漸増する用量のオドロネクスタマブ及び一定濃度のREGN5837 ($7.72 \times 10^{-9} \sim 1.00 \times 10^{-7} \text{ M}$ の範囲)との組み合わせと共にインキュベートした。増殖がCD8T細胞のパーセント分裂により評価されたことを示す。

【図2F】REGN5837二重特異性抗体が、インビトロでオドロネクスタマブにより媒介されるT細胞活性化、細胞傷害性、及びエフェクター機能を増強することを示す。WSU-DLCL2細胞を、リンパ球を濃縮したヒトPBMCと漸増する用量のオドロネクスタマブ及び一定濃度のREGN5837 ($7.72 \times 10^{-9} \sim 1.00 \times 10^{-7} \text{ M}$ の範囲)との組み合わせと共にインキュベートした。上清が、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 、及びIL-17Aのサイトカイン放出について評価されたことを示す。矢印は、最高濃度のREGN5837 ($1.00 \times 10^{-7} \text{ M}$)とREGN5837なしとの間でのEC50の倍率変化または最大サイトカイン濃度の倍率変化を示す。

【図2G】REGN5837二重特異性抗体が、インビトロでオドロネクスタマブにより媒介されるT細胞活性化、細胞傷害性、及びエフェクター機能を増強することを示す。精製したヒトT細胞と異なる比率の混合されたCD22+及びCD22-WSU-DLCL2腫瘍細胞との組み合わせを、一定濃度のREGN5837 ($4.63 \times 10^{-10} \sim 1.67 \times 10^{-8} \text{ M}$ の範囲)及び5 pMのオドロネクスタマブと共にインキュベートすることにより、CD22陰性細胞のT細胞による殺傷のREGN5837 (R5837)による増強が測定されたことを示す。CD22+標的の殺傷を赤色で示し、CD22-標的の殺傷を青色で示す。

【図2H】REGN5837二重特異性抗体が、インビトロでオドロネクスタマブにより媒介されるT細胞活性化、細胞傷害性、及びエフェクター機能を増強することを示す。WSU-DLCL2 CD22+及びCD22-混合培養物中のT細胞の活性化が、CD25の上方調節により測定されたことを示す。

【図3A】REGN5837が、WSU-DLCL2腫瘍モデルにおける予防処置の状況でオドロネクスタマブの抗腫瘍効力を増強し、腫瘍内CD8T細胞を増殖させることを示す。NSG動物に移植されたWSU-DLCL2腫瘍の処置スキームを示す。

【図3B】REGN5837が、WSU-DLCL2腫瘍モデルにおける予防処置の状況でオドロネクスタマブの抗腫瘍効力を増強し、腫瘍内CD8T細胞を増殖させることを示す。個々の腫瘍容積がプロットされていることを示す。比率は腫瘍のないマウス数を示す。

【図3C】REGN5837が、WSU-DLCL2腫瘍モデルにおける予防処置の状況

でオドロネクスタマブの抗腫瘍効力を増強し、腫瘍内CD8T細胞を増殖させることを示す。腫瘍成長の平均値（左）及び生存率（右）を示す。腫瘍成長平均値の統計的有意性は、二元配置ANOVA及びテューキーの多重比較を用いて算出した。生存率の統計的有意性は、カプラン・マイヤー法をログランク検定と共に使用して算出した。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 。

【図3D】REGN5837が、WSU-DLCL2腫瘍モデルにおける予防処置の状況でオドロネクスタマブの抗腫瘍効力を増強し、腫瘍内CD8T細胞を増殖させることを示す。腫瘍内T細胞応答の免疫表現型を検査するために、WSU-DLCL2担腫瘍動物を移植の26日後に殺した。腫瘍由来の全ての生細胞のUMAPプロットを、FlowSOMにより同定された色分けした免疫細胞サブセットと重ね合わせた（図3D左）。密度UMAPプロット（図3D右）は、併用療法に応答した特定の集団の偏りを明らかにした。

10

【図3E】REGN5837が、WSU-DLCL2腫瘍モデルにおける予防処置の状況でオドロネクスタマブの抗腫瘍効力を増強し、腫瘍内CD8T細胞を増殖させることを示す。WSU-DLCL2細胞の密度（左）及び腫瘍内CD8+T細胞の密度（右）を示す。

【図3F】REGN5837が、WSU-DLCL2腫瘍モデルにおける予防処置の状況でオドロネクスタマブの抗腫瘍効力を増強し、腫瘍内CD8T細胞を増殖させることを示す。処置に応答した腫瘍内CD8T細胞の活性化されたメモリーサブセットの比率を示す円グラフ（左）を示す。エフェクターメモリー及びセントラルメモリー腫瘍内CD8+T細胞（右）の密度。統計量は、一元配置ANOVAをテューキー検定と共に用いて算出した。 $***P<0.001$ 、 $****P<0.0001$ 。

20

【図4A】REGN5837により媒介される共刺激が、治療処置の状況におけるB細胞悪性腫瘍に対するオドロネクスタマブの抗腫瘍効力を増強することを示す。NSG動物に移植されたWSU-DLCL2腫瘍の治療処置の処置スキームを示す。

【図4B】REGN5837により媒介される共刺激が、治療処置の状況におけるB細胞悪性腫瘍に対するオドロネクスタマブの抗腫瘍効力を増強することを示す。個々の腫瘍容積がプロットされていることを示す。比率は腫瘍のないマウス数を示す。

【図4C】REGN5837により媒介される共刺激が、治療処置の状況におけるB細胞悪性腫瘍に対するオドロネクスタマブの抗腫瘍効力を増強することを示す。腫瘍成長の平均値（左）及び生存率（右）を示す。腫瘍成長平均値の統計的有意性は、二元配置ANOVA及びテューキーの多重比較を用いて算出した。生存率の統計的有意性は、カプラン・マイヤー法をログランク検定と共に使用して算出した。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 。

30

【図4D】REGN5837により媒介される共刺激が、治療処置の状況におけるB細胞悪性腫瘍に対するオドロネクスタマブの抗腫瘍効力を増強することを示す。PBMCが生着したNSG動物に移植されたNALM6-luc腫瘍の治療処置の処置スキームを示す。

【図4E】REGN5837により媒介される共刺激が、治療処置の状況におけるB細胞悪性腫瘍に対するオドロネクスタマブの抗腫瘍効力を増強することを示す。個々のマウスの腫瘍量を示すBLIを示す。

40

【図4F】REGN5837により媒介される共刺激が、治療処置の状況におけるB細胞悪性腫瘍に対するオドロネクスタマブの抗腫瘍効力を増強することを示す。NALM6-luc腫瘍成長の平均値を示す。有意性は、二元配置ANOVA及びテューキーの多重比較を用いて算出した。 $*P<0.05$ 、 $***P<0.001$ 。

【図5A】REGN5837のオドロネクスタマブとの組み合わせが、WSU-DLCL2腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物における末梢及び腫瘍内T細胞応答を増強することを示す。ヒト免疫系再構築動物に移植されたWSU-DLCL2腫瘍の処置スキームを示す。

【図5B】REGN5837のオドロネクスタマブとの組み合わせが、WSU-DLCL

50

2 腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物における末梢及び腫瘍内 T 細胞応答を増強することを示す。個々の腫瘍容積がプロットされていることを示す。

【図 5 C】REGN5837 のオドロネクスタマブとの組み合わせが、WSU-DLCL2 腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物における末梢及び腫瘍内 T 細胞応答を増強することを示す。腫瘍成長の平均値（左）及び生存率（右）を示す。腫瘍成長平均値の統計的有意性は、二元配置 ANOVA 及びテューキーの多重比較を用いて算出した。生存率の統計的有意性は、カプラン・マイヤー法をログランク検定と共に使用して算出した。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 。

【図 5 D】REGN5837 のオドロネクスタマブとの組み合わせが、WSU-DLCL2 腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物における末梢及び腫瘍内 T 細胞応答を増強することを示す。処置に応答した末梢 CD8 T 細胞カウント数（左）及び末梢 B 細胞カウント数（右）の経時変化を示す。

10

【図 5 E】REGN5837 のオドロネクスタマブとの組み合わせが、WSU-DLCL2 腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物における末梢及び腫瘍内 T 細胞応答を増強することを示す。処置に応答して誘発された血清サイトカインの経時変化を示す。

【図 5 F-1】REGN5837 のオドロネクスタマブとの組み合わせが、WSU-DLCL2 腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物における末梢及び腫瘍内 T 細胞応答を増強することを示す。腫瘍内 T 細胞応答の免疫表現型を検査するために、WSU-DLCL2 担腫瘍ヒト免疫系動物を移植の 30 日後に殺した。血液、脾臓、及び腫瘍由来の全ての生細胞の UMAP プロットを、FlowSOM により同定された色分けした免疫細胞サブセットと重ね合わせた（図 5 F 左）。密度 UMAP プロット（図 5 F 右）は、併用療法に応答した特定の集団の偏りを明らかにした。

20

【図 5 F-2】（続き）同上。

【図 5 F-3】（続き）同上。

【図 5 G】REGN5837 のオドロネクスタマブとの組み合わせが、WSU-DLCL2 腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物における末梢及び腫瘍内 T 細胞応答を増強することを示す。腫瘍内 CD4 T 細胞（右上）、CD8 T 細胞（左上）、及び WSU-DLCL2 細胞（下部）の密度を示す。

【図 5 H】REGN5837 のオドロネクスタマブとの組み合わせが、WSU-DLCL2 腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物における末梢及び腫瘍内 T 細胞応答を増強することを示す。全ての腫瘍内 T 細胞の UMAP プロットが、FlowSOM により同定された色分けしたメタクラスターと重ね合わされたことを示す（左）。密度 UMAP プロット（右）は、特定のメタクラスターの偏りを明らかにした。

30

【図 5 I】REGN5837 のオドロネクスタマブとの組み合わせが、WSU-DLCL2 腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物における末梢及び腫瘍内 T 細胞応答を増強することを示す。T 細胞メタクラスターを同定するために FlowSOM により使用された T 細胞活性化マーカー、メモリーマーカー、機能不全マーカーのヒートマップを示す。

【図 5 J】REGN5837 のオドロネクスタマブとの組み合わせが、WSU-DLCL2 腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物における末梢及び腫瘍内 T 細胞応答を増強することを示す。併用療法に応答して濃縮されるか、または減少する選択された T 細胞クラスターの頻度を示す。統計量は、一元配置 ANOVA をテューキー検定と共に用いて算出した。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $****P < 0.0001$ 。

40

【図 6 A】REGN5837 がオドロネクスタマブと組み合わせられる場合の、カニクイザルの末梢血における CD8 T 細胞の相乗作用的活性化を示す。カニクイザルは、漸増する用量のオドロネクスタマブと組み合わせられた 1 または 10 mg/kg（括弧内に示される）のいずれかの REGN5837 の単回投与を受けた。血液を投与後の示される時間（hour）に採取した。図 6 A は、投与の 5 時間後（左）及び実験期間の間（右）での B 細胞カウント数を示す。

【図 6 B】REGN5837 がオドロネクスタマブと組み合わせられる場合の、カニクイザルの末梢血における CD8 T 細胞の相乗作用的活性化を示す。カニクイザルは、漸増する

50

用量のオドロネクスタマブと組み合わせられた1または10mg/kg（括弧内に示される）のいずれかのREGN5837の単回投与を受けた。血液を投与後の示される時間（hour）に採取した。図6Bは、投与の5時間後（左）及び実験期間の間（右）での末梢CD8+T細胞数を示す。

【図6C】REGN5837がオドロネクスタマブと組み合わせられる場合の、カニクイザルの末梢血におけるCD8T細胞の相乗作用的活性化を示す。カニクイザルは、漸増する用量のオドロネクスタマブと組み合わせられた1または10mg/kg（括弧内に示される）のいずれかのREGN5837の単回投与を受けた。血液を投与後の示される時間（hour）に採取した。図6Cは、投与の5時間後（左）での末梢CD8+T細胞上のICOS上方調節及び投与の4日後の増殖（右）を示す。

10

【図6D】REGN5837がオドロネクスタマブと組み合わせられる場合の、カニクイザルの末梢血におけるCD8T細胞の相乗作用的活性化を示す。カニクイザルは、漸増する用量のオドロネクスタマブと組み合わせられた1または10mg/kg（括弧内に示される）のいずれかのREGN5837の単回投与を受けた。血液を投与後の示される時間（hour）に採取した。図6Dは、投与の5時間後に誘発された血清サイトカインを示す。統計量は、一元配置ANOVAをテューキー検定と共に用いて算出した。黒色の星はプラセボと比較した有意性を示す。n=3匹の動物/群。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、****P<0.0001。

【図7A】CD22発現の発現が、DLBCL患者切除試料において変動的であることを示す。図7Aは、未治療DLBCL患者切除試料のCD20及びCD22についての発色免疫組織化学染色を示す。CD22高発現（左）、中程度発現（中央）、及び低発現（右）の代表画像。

20

【図7B】CD22発現の発現が、DLBCL患者切除試料において変動的であることを示す。図7Bは、PAX5、CD20、及びCD22の多重IHC染色によりCD22の高発現%（上部）及び低発現%（下部）を示すDLBCL患者試料の代表画像を示す。

【図7C】CD22発現の発現が、DLBCL患者切除試料において変動的であることを示す。図7Cは、未治療DLBCL患者試料由来のB細胞マーカー陽性細胞の百分率を示す。

【図8】発色IHCによりDLBCL患者試料においてCD28、CTLA4、CD80、及びCD86が検出可能であることを示す。Aは、未治療DLBCL患者切除試料（Tristar）でのCD28、CTLA4、CD80、及びCD86についての発色染色の代表画像を示す。Bは、25人のDLBCL患者試料由来のCD28'、CTLA4'、CD86'、及びCD80'細胞の密度を示す。

30

【図9A】REGN5837二重特異性抗体が、オドロネクスタマブにより媒介されるT細胞傷害性及び増殖を強化することを示す。REGN5837、非標的化対照抗体、またはCD28スーパーアゴニスト（REGN2329）が湿式コーティング法を使用してアッセイプレートに係留されたことを示す。抗体がコーティングされたアッセイプレートでヒトPBMCをインキュベートし、サイトカイン放出を50～54時間後に測定した。示すデータは、4人の個別のドナーによるものである。非結合性の対照群と比較して有意な放出反応が観察されるサイトカインを示す（テューキーの事後検定）。

40

【図9B】REGN5837二重特異性抗体が、オドロネクスタマブにより媒介されるT細胞傷害性及び増殖を強化することを示す。抗体結合能として報告されるWSU-DLCL2細胞株の細胞1個当たりのCD22（左）及びCD20（右）エピトープの数を示す。

【図9C】REGN5837二重特異性抗体が、オドロネクスタマブにより媒介されるT細胞傷害性及び増殖を強化することを示す。NALM-6細胞またはRaji CD80/CD86 DKO細胞と共に培養された場合の、オドロネクスタマブの存在下または非存在下でのREGN5837により媒介されるヒトCD4及びCD8T細胞増殖の概要を示す。NC：算出せず。

【図9D】REGN5837二重特異性抗体が、オドロネクスタマブにより媒介されるT

50

細胞傷害性及び増殖を強化することを示す。フローサイトメトリーによるWSU-DLCL2 CD22 KO株（赤色）及びWSU-DLCL2 CD22 WT株（緑色）でのCD22発現（左）及びCD20発現（右）を示す。

【図10A】WSU-DLBCL（DLBCL）腫瘍モデルにおいてオドロネクスタマブ単独療法による処置が腫瘍成長を抑制するが、完全な腫瘍拒絶をもたらさないことを示す。NSG動物に移植されたWSU-DLCL2腫瘍の処置スキームを示す。

【図10B】WSU-DLBCL（DLBCL）腫瘍モデルにおいてオドロネクスタマブ単独療法による処置が腫瘍成長を抑制するが、完全な腫瘍拒絶をもたらさないことを示す。図10Bは、漸増する用量のオドロネクスタマブに応答した個々の腫瘍成長曲線を示す。

【図10C】WSU-DLBCL（DLBCL）腫瘍モデルにおいてオドロネクスタマブ単独療法による処置が腫瘍成長を抑制するが、完全な腫瘍拒絶をもたらさないことを示す。図10Cは腫瘍成長の平均値を示す。

【図10D】WSU-DLBCL（DLBCL）腫瘍モデルにおいてオドロネクスタマブ単独療法による処置が腫瘍成長を抑制するが、完全な腫瘍拒絶をもたらさないことを示す。生存率を示す。アイソタイプによる処置と漸増するR1979との間の生存率の統計的有意性は、カプラン・マイヤー法をログランク検定と共に使用して算出した。 $***P < 0.001$ 、 $****P < 0.0001$ 。

【図11A】REGN5837とオドロネクスタマブとの組み合わせが、インビボで腫瘍内T細胞増殖及び活性化ならびにWSU-DLBCL2腫瘍細胞の殺傷を促進することを示す。図11Aは、移植の26日後でのNSGマウスにおけるWSU-DLCL2腫瘍の免疫表現型検査のための処置スキームを示す。

【図11B】REGN5837とオドロネクスタマブとの組み合わせが、インビボで腫瘍内T細胞増殖及び活性化ならびにWSU-DLBCL2腫瘍細胞の殺傷を促進することを示す。図11Bは、各処置群についてプロットされた移植の26日後での腫瘍量を示す。

【図11C】REGN5837とオドロネクスタマブとの組み合わせが、インビボで腫瘍内T細胞増殖及び活性化ならびにWSU-DLBCL2腫瘍細胞の殺傷を促進することを示す。図11Cは、CD4及びCD8T細胞の増殖ならびにWSU-DLCL2細胞からの片寄りを示す、総生存細胞からの示される細胞集団の百分率を示す。

【図11D】REGN5837とオドロネクスタマブとの組み合わせが、インビボで腫瘍内T細胞増殖及び活性化ならびにWSU-DLBCL2腫瘍細胞の殺傷を促進することを示す。図11Dは、プロットされた腫瘍内CD4T細胞の密度を示す。

【図11E】REGN5837とオドロネクスタマブとの組み合わせが、インビボで腫瘍内T細胞増殖及び活性化ならびにWSU-DLBCL2腫瘍細胞の殺傷を促進することを示す。図11Eは、腫瘍内CD4T細胞についてプロットされたメモリーサブセットの百分率を示す。統計量は、一元配置ANOVAをテューキー検定と共に用いて算出した。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 、 $****P < 0.0001$ 。

【図12A】REGN5837がIL-2産生を増加させること、及びオドロネクスタマブによる同種異系反応により媒介されるシグナル1の存在下でのT細胞増殖の増強を示す。ヒトB細胞白血病細胞株の存在下でIL-2放出及びT細胞増殖を媒介するREGN5837の能力を、濃縮されたヒト初代T細胞及び同種異系NALM-6細胞を使用して測定した。図12Aは、アッセイが、シグナル1をもたらすオドロネクスタマブ（500 pM）の存在下、またはオドロネクスタマブの非存在下で実行されたことを示し、ここで、シグナル1は、同種異系反応及び漸増する用量のREGN5837または非結合性の二重特異性CD28対照抗体によってのみもたらされた。プレートを72時間インキュベートし、この時点で培養液上清をIL-2分析のために採取した。増殖を評価するために、三重水素を添加し、細胞を更に16時間インキュベートした。

【図12B】REGN5837がIL-2産生を増加させること、及びオドロネクスタマブによる同種異系反応により媒介されるシグナル1の存在下でのT細胞増殖の増強を示す。ヒトB細胞白血病細胞株の存在下でIL-2放出及びT細胞増殖を媒介するREGN5

10

20

30

40

50

837の能力を、濃縮されたヒト初代T細胞及び同種異系NALM-6細胞を使用して測定した。図12Bは、オドロネクスタマブの存在下及び非存在下におけるIL-2放出及びT細胞増殖のREGN5837により媒介される濃度依存的増加の概要を示す。

【図13A】オドロネクスタマブとREGN5837との組み合わせが、DLBCL腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物において末梢及び腫瘍内T細胞を増殖させることを示す。末梢CD4T細胞カウント数の経時変化を示す。

【図13B】オドロネクスタマブとREGN5837との組み合わせが、DLBCL腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物において末梢及び腫瘍内T細胞を増殖させることを示す。処置に応答して誘導された血清IL-10の経時変化を示す。

【図13C】オドロネクスタマブとREGN5837との組み合わせが、DLBCL腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物において末梢及び腫瘍内T細胞を増殖させることを示す。免疫表現型検査のために 殺する前のWSU-DLCL2腫瘍成長の平均値を示す。併用療法とアイソタイプとの間（黒色の星）、または併用療法とREGN5837単独療法との間（赤色の星）の統計的有意性は、二元配置ANOVA及びテューキーの多重比較を用いて算出した。

【図13D】オドロネクスタマブとREGN5837との組み合わせが、DLBCL腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物において末梢及び腫瘍内T細胞を増殖させることを示す。全ての腫瘍内生存細胞のWSU-DLCL2細胞（左）及びT細胞（右）の百分率を示す。

【図13E】オドロネクスタマブとREGN5837との組み合わせが、DLBCL腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物において末梢及び腫瘍内T細胞を増殖させることを示す。腫瘍内CD8T細胞のメモリー及び活性化サブセットの百分率を示す。

【図13F】オドロネクスタマブとREGN5837との組み合わせが、DLBCL腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物において末梢及び腫瘍内T細胞を増殖させることを示す。腫瘍内CD4T細胞のメモリー及び活性化サブセットの百分率を示す。

【図13G】オドロネクスタマブとREGN5837との組み合わせが、DLBCL腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物において末梢及び腫瘍内T細胞を増殖させることを示す。メモリーCD8T細胞の腫瘍内密度を示す。

【図13H】オドロネクスタマブとREGN5837との組み合わせが、DLBCL腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物において末梢及び腫瘍内T細胞を増殖させることを示す。メモリーCD4T細胞の腫瘍内密度を示す。統計量は、一元配置ANOVAをテューキー検定と共に用いて算出した。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 、 $****P<0.0001$ 。

【図14A】オドロネクスタマブが、DLBCL腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物において脾臓及び血液B細胞を効率的に枯渇させる一方で、エフェクターメモリーT細胞誘導を促進することを示す。図14Aは、WSU-DLCL2腫瘍の移植の30日後における脾臓のB細胞（左）及びT細胞（右）の百分率を示す。

【図14B】オドロネクスタマブが、DLBCL腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物において脾臓及び血液B細胞を効率的に枯渇させる一方で、エフェクターメモリーT細胞誘導を促進することを示す。図14Bは、WSU-DLCL2腫瘍の移植の30日後における血液のB細胞（左）及びT細胞（右）の百分率を示す。

【図14C】オドロネクスタマブが、DLBCL腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物において脾臓及び血液B細胞を効率的に枯渇させる一方で、エフェクターメモリーT細胞誘導を促進することを示す。図14Cは、脾臓におけるB及びT細胞サブセットの列挙を示す。

【図14D】オドロネクスタマブが、DLBCL腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物において脾臓及び血液B細胞を効率的に枯渇させる一方で、エフェクターメモリーT細胞誘導を促進することを示す。図14Dは、血液中の全ての生細胞の密度UMAPプロット（右）を示す。

【図14E】オドロネクスタマブが、DLBCL腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物にお

10

20

30

40

50

いて脾臓及び血液B細胞を効率的に枯渇させる一方で、エフェクターメモリーT細胞誘導を促進することを示す。図14Eは、血液中のB及びT細胞サブセットの列挙を示す。

【図15A】REGN5837がオドロネクスタマブと組み合わせられる場合の、カニクイザルの末梢血におけるCD4T細胞の相乗作用的活性化を示す。図15Aは、投与の4日後（左）及び実験期間の間での末梢CD4T細胞カウント数を示す。

【図15B】REGN5837がオドロネクスタマブと組み合わせられる場合の、カニクイザルの末梢血におけるCD4T細胞の相乗作用的活性化を示す。図15Bは、投与の5時間後（左）での末梢CD4+T細胞上のICOS上方調節及び投与の4日後の増殖（右）を示す。統計量は、一元配置ANOVAをチューキー検定と共に用いて算出した。黒色の星はプラセボと比較した有意性を示す。n=3匹の動物／群。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、****P<0.0001。

10

【図16】DLBCL患者試料におけるCD22発現がCD20発現より変動的であることを示す。

【図17】CD22WT及びCD22KO腫瘍細胞の混合培養物において、CD22xCD28とCD20xCD3との組み合わせが、バイスタンダーCD22KO標的細胞のT細胞による殺傷の増強をもたらすことができることを示す。

【図18】幾つかのがんにおけるEGFR標的抗原の例示的な発現プロファイルを示す。

【図19】幾つかのがんにおけるPMSA標的抗原の例示的な発現プロファイルを示す。

【図20】幾つかのがんにおけるCA9標的抗原の例示的な発現プロファイルを示す。

【図21】幾つかのがんにおけるHER2標的抗原の例示的な発現プロファイルを示す。

20

【図22】幾つかのがんにおけるSLAMF7標的抗原の例示的な発現プロファイルを示す。

【図23】幾つかのがんにおけるMUC16標的抗原の例示的な発現プロファイルを示す。

【図24】幾つかのがんにおけるFOLR1標的抗原の例示的な発現プロファイルを示す。

【図25】幾つかのがんにおけるCD38標的抗原の例示的な発現プロファイルを示す。

【図26】幾つかのがんにおけるCD22標的抗原の例示的な発現プロファイルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0046】

30

本明細書において示すように、T細胞のCD22⁺を発現する標的細胞及び抗CD28／抗CD22二重特異性抗体との培養は、二重特異性CD3抗体により媒介される腫瘍細胞溶解を増強した。本明細書の開示は、抗CD28／抗CD22二重特異性抗体との併用療法が、CD22⁺及びCD22⁻標的集団の両方の二重特異性CD3抗体により媒介される腫瘍細胞溶解を増強したという発見に部分的に基づく。同様の方法は、CD22⁺及びCD22⁻標的集団の両方においてCD4及びCD8 T細胞活性化も増強した。従って、出願人は、腫瘍関連抗原を標的とする抗CD28二重特異性抗体が、当該腫瘍関連抗原を欠く腫瘍細胞の殺傷を増強することができることを示す。

【0047】

本明細書において、標的抗原に特異的な第1の抗原結合領域及びCD28タンパク質に特異的な第2の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を対象に投与することにより、当該対象における腫瘍内の腫瘍細胞の殺傷をもたらすための方法及び組成物が提供され、ここで、当該腫瘍細胞は、標的抗原を発現しないか、または発現すると予測されない。幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットは、標的抗原を発現しない。

40

【0048】

幾つかの態様では、対象における腫瘍内の腫瘍細胞の殺傷を誘発するため、及び／または腫瘍細胞に対するT細胞活性化を誘発するための方法及び組成物が本明細書において提供され、当該方法は、標的抗原に特異的な第1の抗原結合領域及びCD28タンパク質に特異的な第2の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を対象に投与することを

50

含む。幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットは、標的抗原を発現しない。

【0049】

本明細書において、腫瘍を有する対象のがんを処置するための方法及び組成物も提供され、当該方法は、標的抗原に特異的な第1の抗原結合領域及びCD28タンパク質に特異的な第2の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を当該対象に投与することを含む。幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットは、標的抗原を発現しない。

【0050】

本明細書において使用される、「標的抗原を発現しない」腫瘍内の腫瘍細胞に言及する場合、この語句は、腫瘍細胞の少なくともサブセットが標的抗原を発現しないことの実験に基づく発見または確認、及び腫瘍細胞が標的抗原を発現しないと予測することを含む方法（すなわち、更なる実験による確認の有無にかかわらず）を包含する。

【0051】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍関連抗原（TAA）である。幾つかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍微小環境（例えば、対象における腫瘍の微小環境）に関連する抗原である。例えば、幾つかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍微小環境内の免疫細胞上、腫瘍細胞間質上、または細胞外マトリックス上の抗原である。細胞外マトリックス抗原の例としては、ネクチン（例えば、ネクチン-3またはネクチン-4）、バーシカン（VACN）、フィブロネクチン、及び癌胎児性抗原関連細胞接着分子（CEACAM）が挙げられる。

【0052】

定義

冠詞「a」及び「an」は、冠詞の文法的対象のうちの1つまたは2つ以上（すなわち、少なくとも1つ）を指すために本明細書において使用される。一例として、「元素（an element）」は、1個の元素または2個以上の元素を意味する。

【0053】

本明細書で使用する場合、用語「投与すること」または「投与」は、対象に医薬品または組成物を提供することを意味し、限定されるものではないが、医療専門家による投与及び自己投与を包含する。このような医薬品は、例えば、本明細書において提供される二重特異性抗体または二重特異性抗体断片を含有し得る。

【0054】

本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、インタクトな抗体及びその抗原結合断片の両方を指し得る。インタクトな抗体は、ジスルフィド結合により相互に連結された少なくとも2本の重（H）鎖及び2本の軽（L）鎖を含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではV_Hと略す）及び重鎖定常領域を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではV_Lと略す）及び軽鎖定常領域を含む。V_H領域及びV_L領域は、「相補性決定領域」（CDR）と称される超可変領域に更に細分され得、「フレームワーク領域」（FR）と称されるより保存的な領域が間に置かれている。各V_H及びV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序で配置された3つのCDRと4つのFRから構成される。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。用語「抗体」は、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体、三重特異性抗体）、一本鎖抗体、及び抗原結合性抗体断片を包含する。

【0055】

本明細書で使用する場合、抗体の「抗原結合断片」及び「抗原結合部分」という用語は、抗原に結合する能力を保持している、抗体の1つ以上の断片を指す。抗原結合断片の非限定的な例としては、以下が挙げられる：（i）Fab断片；（ii）F（ab'）₂断片；（iii）Fd断片；（iv）Fv断片；（v）一本鎖Fv（scFv）分子；（v

10

20

30

40

50

i) dAb断片；及び(vii)抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位(例えば、単離された相補性決定領域(CDR)、例えば、CDR3ペプチド)またはFR3-CDR3-FR4拘束ペプチド。他の遺伝子操作された分子、例えば、ドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ(例えば、一価ナノボディ、二価ナノボディなど)、小型モジュール免疫医薬品(SMIP)、及びサメ可変IgNARDメインも、本明細書で使用する場合、「抗原結合断片」という表現の範囲内に包含される。

【0056】

更に、用語「抗体」は(特に明記しない限りまたはそれ以外のことが文脈から明らかでない限り)、限定されるものではないが、細胞内抗体、ドメイン抗体、抗体ミメティック、Zybody(登録商標)、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fd'断片、Fd断片、単離されたCDRまたはそのセット、一本鎖抗体、一本鎖Fv(scFv)、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、ポリペプチド-Fc融合物、単ドメイン抗体(例えば、サメ単ドメイン抗体、例えば、IgNARまたはその断片)、ラクダ科抗体、ラクダ化抗体、マスクされた抗体(例えば、Probody(登録商標))、アフィボディ、抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、抗抗Id抗体が含まれる)、Small Modular Immunopharmaceuticals(「SMIP(商標)」)、単鎖またはタンデムダイアボディ(TandAb(登録商標))、VHH、Anticalin(登録商標)、Nanobody(登録商標)、ミニボディ、BiTE(登録商標)、アンキリンリピートタンパク質またはDARPIN(登録商標)、Avimer(登録商標)、DART、TCR様抗体、Adnectin(登録商標)、Affilin(登録商標)、Trans-body(登録商標)、Affibody(登録商標)、TrimerX(登録商標)、MocroProtein、Fynomer(登録商標)、Centyrin(登録商標)、及びKALBITOR(登録商標)、CAR、遺伝子操作されたTCR、及び上記のいずれかの抗原結合断片が含まれる、抗体の構造及び/または機能的特徴を利用する当分野において公知の任意の構築物またはフォーマットを包含し得る。

【0057】

本発明に使用される抗体は、二重特異性抗体であり得る。二重特異性抗体は、単一の抗体ポリペプチド内に2つの異なる抗原に対する結合部位を有する。抗原結合は、同時または逐次的であり得る。トリオーマ及びハイブリッドハイブリドーマは、二重特異性抗体を分泌し得る細胞系の2つの例である。ハイブリッドハイブリドーマまたはトリオーマにより産生される二重特異性抗体の例は、米国特許第4,474,893号に開示されている。二重特異性抗体は、化学的手段(Staerz et al. (1985) Nature 314:628、及びPerez et al. (1985) Nature 316:354)及びハイブリドーマ技術(Staerz and Bevan (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:1453、及びStaerz and Bevan (1986) Immunol. Today 7:241)により構築されてきた。二重特異性抗体は、米国特許第5,959,084号にも記載されている。二重特異性抗体の断片は、米国特許第5,798,229号に記載されている。

【0058】

二重特異性薬剤は、異なる抗体を作るハイブリドーマまたは他の細胞を融合させ、続いて、両方の抗体を産生し、同時にアSEMBLするクローンを同定することにより、ヘテロハイブリドーマを作製することによっても生成され得る。二重特異性薬剤は、全長免疫グロブリン鎖またはその一部、例えば、Fab及びFv配列の化学的コンジュゲーションまたは遺伝子接合によっても作製され得る。

【0059】

抗体は「ヒト化」されてもよく、これは、ヒト細胞により作られる抗体とより酷似するように改変された可変及び定常領域を有する、非ヒト細胞により作られる抗体を包含する

ことを意図する。例えば、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に見出されるアミノ酸を組み込むように、非ヒト抗体アミノ酸配列を改変することによる。本開示のヒト化抗体は、例えば、CDRにおいて、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的変異誘発により、またはインビボでの体細胞突然変異により導入された変異）を含み得る。本明細書で使用する場合、用語「ヒト化抗体」は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系列に由来するCDR配列が、ヒトフレームワーク配列に移植された抗体も包含する。

【0060】

本明細書で使用する場合、「癌関連線維芽細胞」(CAF)は、腫瘍組織内及び腫瘍組織周囲に見出される線維芽細胞を包含し、これらは、正常な組織常在線維芽細胞から活性化されるか、または腫瘍微小環境の刺激により非線維芽細胞系列、例えば、上皮細胞及び脂肪細胞から分化転換される。例示的ながん関連線維芽細胞抗原としては、 α -平滑筋アクチン(α -SMA)、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、S100A4、血小板由来成長因子受容体(PDGFR α/β)、ビメンチン、PDPN、CD70、CD10、GPR77、CD10、CD74、CD146、CAV1、Saa3-、及びCD49eが挙げられる。抗原及びバイオマーカーに関する更なる詳細は、Han, C., Liu, T. & Yin, R. Biomarkers for cancer-associated fibroblasts. Biomark Res 8, 64 (2020)に見出され得る。

【0061】

「がん」は、周囲組織及び潜在的に、宿主内の異常細胞増殖の最初の部位より遠位の組織の侵襲をもたらす、宿主自身の細胞の制御されない異常な増殖を広義に指す。主要な種類としては、上皮組織（例えば、皮膚、扁平上皮細胞）のがんであるがん腫；結合組織（例えば、骨、軟骨、脂肪、筋肉、血管など）のがんである肉腫；造血組織（例えば、骨髄組織）のがんである白血病；免疫細胞のがんであるリンパ腫及び骨髄腫；ならびに脳及び脊髄組織由来のがんが挙げられる中枢神経系癌が挙げられる。「がん（複数可）」及び「新生物（複数可）」は、本明細書において互換的に使用される。本明細書で使用する場合、「がん」は、新規または再発性にかかわらず、白血病、がん腫、及び肉腫が含まれる、全ての種類のがんまたは新生物または悪性腫瘍を指す。がんの具体例は、がん腫、肉腫、骨髄腫、白血病、リンパ腫、及び混合型腫瘍である。がんの非限定的な例は、脳、黒色腫、膀胱、乳房、子宮頸部、結腸、頭頸部、腎臓、肺、非小細胞肺、中皮腫、卵巣、前立腺、肉腫、胃、子宮及び髓芽腫の新規または再発性がんである。幾つかの実施形態では、がんは、固形腫瘍を含む。幾つかの実施形態では、がんは、転移を含む。

【0062】

用語「キメラ抗原受容体」(CAR)は、特異的な抗標的細胞免疫活性を示すキメラタンパク質を作製するために、標的細胞に存在する成分に対する結合ドメイン、例えば、所望の抗原（例えば、腫瘍抗原）に対する抗体ベースの特異性を、T細胞受容体活性化細胞内ドメインと共に組み合わせた分子を指す。一般に、CARは、T細胞抗原受容体複合体と鎖の細胞内シグナル伝達ドメインに融合された細胞外一本鎖抗原結合ドメイン(scFv)からなり、T細胞で発現される場合に、モノクローナル抗体の特異性に基づいて抗原認識を再方向付けする能力を有する。

【0063】

本明細書で使用する場合、語句「共投与」または「共投与される」は、事前に投与された治療薬が身体内でまだ有効である間に第2の薬剤が投与されるような、2種以上の異なる治療薬の任意の投与形態を指す（例えば、2種の薬剤は、対象内で同時に有効であり、このことは、2種の薬剤の相乗効果を含み得る）。例えば、異なる治療薬は、同じ製剤として投与され得るか、または別個の製剤として同時にもしくは逐次的に投与され得る。ある特定の実施形態では、異なる治療薬は、互いに約1時間、約12時間、約24時間、約36時間、約48時間、約72時間、または1週間以内に投与され得る。従って、かかる処置を受ける対象は、異なる治療薬の併用効果から恩恵を受け得る。

【0064】

「共刺激ドメイン」または「共刺激分子」は、共刺激リガンドに特異的に結合し、これにより、細胞による共刺激応答、例えば、限定されるものではないが、増殖を媒介する、T細胞上の同族結合パートナーを指す。共刺激ドメインは、ヒトの共刺激ドメインであり得る。例示的な共刺激分子としては、CD28、4-1BB、CD27、CD8、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、及びB7-H3が挙げられる。

【0065】

「共刺激リガンド」は、T細胞上の同族共刺激分子に特異的に結合し、これにより、限定されるものではないが、増殖活性化、分化などが含まれる、T細胞応答を媒介するシグナルをもたらす抗原提示細胞上の分子を指す。共刺激リガンドとしては、限定されるものではないが、CD7、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激因子リガンド（ICOS-L）、細胞間接着分子（ICAM）、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M1CB、HVEM、リンホトキシンβ受容体、3/TR6、ILT3、ILT4、Tollリガンド受容体に結合するアゴニストまたは抗体、及びB7-H3に特異的に結合するリガンドが挙げられ得る。

【0066】

「共刺激シグナル」は、一次シグナルとの組み合わせで、T細胞増殖及び／または重要な分子の上方調節もしくは下方調節を引き起こすシグナルを指す。

【0067】

用語「エピトープ」は、パラトープとして公知の抗体分子の可変領域内の特異的な抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を指す。単一の抗原は、2つ以上のエピトープを有し得る。従って、異なる抗体は、抗原上の異なる領域に結合し得、異なる生物学的効果を有し得る。エピトープは、立体構造エピトープまたは直鎖状エピトープであり得る。立体構造エピトープは、直鎖状ポリペプチド鎖の異なるセグメントからの空間的に並置されたアミノ酸により形成される。直鎖状エピトープは、ポリペプチド鎖の隣接するアミノ酸残基により形成されるものである。ある特定の状況では、エピトープは、抗原上のサッカライド、ホスホリル基、またはスルホニル基の部分を含み得る。

【0068】

本明細書で使用する場合、「免疫細胞」は、骨髄の幹細胞から発生した任意の白血球を包含する。例としては、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、単球、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、T細胞、またはB細胞が挙げられる。免疫細胞は、腫瘍または腫瘍微小環境に存在し得る。

【0069】

本明細書で使用する場合、語句「薬学的に許容される」は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症を伴わずにヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに好適であり、妥当な利益／リスク比に見合う薬剤、化合物、物質、組成物、及び／または剤形を指す。

【0070】

本明細書で使用する場合、語句「薬学的に許容される担体」は、薬剤を身体のある器官または一部から身体別の器官または一部に移動させるか、または輸送することに関与する、薬学的に許容される物質、組成物、またはビヒクル、例えば、液体もしくは固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、または溶媒カプセル化物質を意味する。各担体は、製剤の他の成分と相溶性があり、かつ患者に有害でないという意味で「許容可能」でなければならない。薬学的に許容される担体として機能し得る材料の幾つかの例としては、以下が挙げられる：（1）糖、例えば、ラクトース、グルコース、及びスクロース、（2）デンプン、例えば、トウモロコシデンプン及びジャガイモデンプン、（3）セルロース及びその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、及び酢酸セルロース

10

20

30

40

50

ース、(4)トラガント末、(5)麦芽、(6)ゼラチン、(7)タルク、(8)賦形剤、例えば、ココアバター及び坐剤ワックス、(9)油、例えば、落花生油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油、及び大豆油、(10)グリコール、例えば、プロピレングリコール、(11)ポリオール、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、及びポリエチレングリコール、(12)エステル、例えば、オレイン酸エチル及びラウリン酸エチル、(13)寒天、(14)緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウム、(15)アルギン酸、(16)発熱物質を含まない水、(17)等張食塩水、(18)リンガー液、(19)エチルアルコール、(20)pH緩衝水溶液、(21)ポリエステル、ポリカーボネート、及び／またはポリ無水物、ならびに(22)医薬製剤に用いられる他の非毒性の適合可能な物質。

10

【0071】

本明細書で使用する場合、状態を「予防する」治療薬は、障害または状態の発症前に統計的試料に投与される場合に、無処置の対照試料と比較して、処置された試料における障害もしくは状態の発生を低減するか、または無処置の対照試料と比較して、障害もしくは状態の1つ以上の症状の発症を遅延させるか、もしくはその重症度を低減する化合物を指す。

【0072】

核酸またはその断片に言及する場合、用語「実質的同一性」または「実質的に同一な」は、適切なヌクレオチド挿入または欠失を用いて別の核酸（またはその相補鎖）と最適にアラインメントされる場合に、後述するように、任意のよく知られた配列同一性のアルゴリズム、例えば、FASTA、BLAST、またはGapにより測定されるように、ヌクレオチド塩基の少なくとも約95%、より好ましくは、少なくとも約96%、97%、98%、または99%のヌクレオチド配列同一性が存在することを示す。参照核酸分子に対する実質的な同一性を有する核酸分子は、特定の例では、当該参照核酸分子によりコードされるポリペプチドと同一のまたは実質的に類似するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得る。

20

【0073】

ポリペプチドに適用される場合、用語「実質的類似性」または「実質的に類似する」は、2つのペプチド配列が、例えば、GAPまたはBESTFITプログラムによりデフォルトのギャップの重みを使用して最適にアラインメントされる場合に、少なくとも95%の配列同一性、更に好ましくは少なくとも98%または99%の配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換により異なる。

30

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の化学的性質（例えば、電荷または疎水性）を有する側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基により置換されている置換である。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能特性を実質的に変化させない。2つ以上のアミノ酸配列が保存的置換により互いに異なる場合、配列同一性パーセントまたは類似度は、置換の保存的性質に対して補正するために上方調整され得る。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331を参照のこと。類似の化学的特性を有する側鎖を有するアミノ酸群の例としては、(1)脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン；(2)脂肪族ヒドロキシル側鎖：セリン及びトレオニン；(3)アミド含有側鎖：アスパラギン及びグルタミン；(4)芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン；(5)塩基性側鎖：リジン、アルギニン、及びヒスチジン；(6)酸性側鎖：アスパラギン酸及びグルタミン酸；ならびに(7)含硫黄側鎖：システイン及びメチオニンが挙げられる。好ましい保存的アミノ酸置換群は、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸-アスパラギン酸、及びアスパラギン-グルタミンである。あるいは、保存的置換は、参照により本明細書に組み込まれる、Gonnet et al. (1992) *Science* 256:1443-1445に開示されているPAM250対数尤度マトリックスにおいて正の値

40

50

を有する任意の変化である。「中程度に保存的な」置換は、P A M 2 5 0 対数尤度マトリックスにおいて負でない値を有する任意の変化である。

【0074】

ポリペプチドに言及する場合、本明細書において使用される用語「特異的に結合する」または「特異的結合」は、タンパク質及び他の生物学的製剤の不均一集団におけるタンパク質またはポリペプチドまたは受容体の存在を確定する結合反応を指す。従って、所定の条件（例えば、抗体の場合には免疫アッセイ条件）下で、特定のリガンドまたは抗体が、試料に存在する他のタンパク質に有意な量で結合しないか、または当該リガンドもしくは抗体が生物内で接触し得る他のタンパク質に有意な量で結合しない場合、当該特定のリガンドまたは抗体は、その特定の「標的」に「特異的に結合する」（例えば、抗体は抗原に特異的に結合する）。一般に、第2の分子に「特異的に結合する」第1の分子は、その第2の分子に対する約 10^5 M^{-1} （例えば、 10^6 M^{-1} 、 10^7 M^{-1} 、 10^8 M^{-1} 、 10^9 M^{-1} 、 10^{10} M^{-1} 、 10^{11} M^{-1} 、及び 10^{12} M^{-1} 、またはそれ以上）を超える親和定数（ K_a ）を有する。例えば、P I G 特異的 C A R が M H C（例えば、クラス I M H C またはクラス II M H C）上に提示されたペプチドに結合する能力の場合、通常、C A R は、少なくとも約 10^{-4} M 以下の K D の親和性でそのペプチド／M H C に特異的に結合し、非特異的かつ無関係なペプチド／M H C 複合体（例えば、B S A ペプチドまたはカゼインペプチドを含むもの）への結合の親和性と比べて少なくとも10分の1、少なくとも100分の1、または少なくとも1000分の1の親和性（K D により表される）で所定の抗原／結合パートナーに結合する。

10

20

【0075】

本明細書で使用する場合、用語「対象」は、処置または治療のために選択されるヒトまたは非ヒト動物を意味する。本明細書において提供されるある特定の実施形態では、対象は、ヒト対象である。本明細書において提供される幾つかの実施形態では、対象は、本明細書において提供される方法を必要とする対象、例えば、がんを有する対象である。

【0076】

「腫瘍微小環境」は、腫瘍が存在する細胞環境を指し、例えば、間質、腫瘍を取り囲む間質液、周囲血管、免疫細胞、他の細胞、線維芽細胞、シグナル伝達分子、及び細胞外マトリックスを含む。

【0077】

本明細書で使用する場合、用語「処置」は、臨床病態の経過中に、処置されている個体の自然経過を変化させるように設計された臨床的介入を指す。処置の望ましい効果としては、進行速度の減少、病的状態の改善または緩和、及び特定の疾患、障害、または状態の寛解または予後の改善が挙げられる。例えば、特定の疾患、障害、または状態に関連する1つ以上の症状が軽減または除去される場合に個体は成功裡に「処置される」。

30

【0078】

本明細書で使用する場合、語句「治療上有効量」及び「有効量」は、任意の医学的処置に適用可能な妥当な利益／リスク比で、対象の細胞の少なくとも亜集団において所望の治療効果をもたらすのに効果的な薬剤の量を意味する。

【0079】

治療用抗体 全般

ある特定の態様では、本明細書において提供される方法及び組成物は、治療用抗体（例えば、本明細書において開示される二重特異性抗体、例えば、任意により、第2の二重特異性抗 C D 3 抗体及び／または免疫チェックポイント阻害剤と共に投与される、第1の標的抗原に特異的な抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な抗原結合領域を有する二重特異性抗体）の使用に関する。

40

【0080】

上述したように、本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、完全な抗体分子及び完全な抗体分子の抗原結合断片の両方を包含する。抗原結合断片の非限定的な例としては、以

50

下が挙げられる：(i) Fab断片；(ii) F(ab')₂断片；(iii) Fd断片；(iv) Fv断片；(v) 一本鎖Fv(scFv)分子；(vi) dAb断片；及び(vii) 抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位（例えば、単離された相補性決定領域(CDR)、例えば、CDR3ペプチド）またはFR3-CDR3-FR4拘束ペプチド。他の遺伝子操作された分子、例えば、ドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ（例えば、一価ナノボディ、二価ナノボディなど）、小型モジュール免疫医薬品(SMIP)、及びサメ可変IgNARDドメインも、本明細書で使用する場合、「抗原結合断片」という表現の範囲内に包含される。

【0081】

抗体の抗原結合断片は、通常、少なくとも1つの可変ドメインを含む。可変ドメインは、任意のサイズまたはアミノ酸組成のものであり得、通常、1つ以上のフレームワーク配列に隣接しているか、またはそれとインフレームである少なくとも1つのCDRを含む。VLドメインと会合したVHドメインを有する抗原結合断片において、当該VH及びVLドメインは、互いに対して任意の好適な配置で位置し得る。例えば、可変領域は二量体であり得、VH-VH、VH-VL、またはVL-VL二量体を含有し得る。あるいは、抗体の抗原結合断片は、単量体VHまたはVLドメインを含有し得る。

【0082】

ある特定の実施形態では、抗体の抗原結合断片は、少なくとも1つの定常ドメインに共有結合的に連結された少なくとも1つの可変ドメインを含有し得る。本明細書において開示される抗体の抗原結合断片内に見出され得る可変ドメイン及び定常ドメインの非限定的な例示的構成としては、以下が挙げられる：(i) VH-CH1；(ii) VH-CH2；(iii) VH-CH3；(iv) VH-CH1-CH2；(v) VH-CH1-CH2-CH3；(vi) VH-CH2-CH3；(vii) VH-CL；(viii) VL-CH1；(ix) VL-CH2；(x) VL-CH3；(xi) VL-CH1-CH2；(xii) VL-CH1-CH2-CH3；(xiii) VL-CH2-CH3；及び(xiv) VL-CL。上記に列挙された例示的な構成のいずれかが含まれる、可変ドメイン及び定常ドメインの任意の構成において、可変ドメイン及び定常ドメインは、互いに直接連結されていてもよく、または完全もしくは部分的なヒンジもしくはリンカー領域により連結されていてもよい。ヒンジ領域は、単一のポリペプチド分子における隣接する可変及び／または定常ドメインの間に可動性または半可動性の連結をもたらす少なくとも2個（例えば、5、10、15、20、40、60個、またはそれ以上）のアミノ酸からなり得る。更に、本明細書において開示される抗体の抗原結合断片は、互いに及び／または1つ以上の単量体VHもしくはVLドメインと（例えば、ジスルフィド結合（複数可）により）非共有結合的に会合した、上記に列挙された可変ドメイン及び定常ドメインの構成のいずれかのホモ二量体またはヘテロ二量体（または他の多量体）を含み得る。

【0083】

完全抗体分子と同様に、抗原結合断片は、単一特異性または多重特異性（例えば、二重特異性）であり得る。抗体の多重特異性抗原結合断片は、通常、少なくとも2つの異なる可変ドメインを含み、ここで、各可変ドメインは、別個の抗原に、または同じ抗原上の異なるエピトープに特異的に結合することができる。本明細書において開示される例示的な二重特異性抗体フォーマットが含まれる、任意の多重特異性抗体フォーマットが、当該技術分野において利用可能な通常の技術を使用して、本明細書において開示される抗体の抗原結合断片における使用のために適合され得る。

【0084】

本明細書において提供されるある特定の実施形態では、多重特異性抗体の少なくとも1つの可変ドメインは、T細胞共刺激ドメイン、例えば、CD28に特異的に結合することができる。本明細書において提供されるある特定の実施形態では、本明細書において開示される多重特異性抗体の少なくとも1つの可変ドメインは、CD3に特異的に結合することができる。

【0085】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される抗体は、補体依存性細胞傷害（CDC）または抗体依存性細胞媒介細胞傷害（ADCC）により機能し得る。「補体依存性細胞傷害」（CDC）は、補体の存在下での本明細書において開示される抗体による抗原発現細胞の溶解を指す。「抗体依存性細胞媒介細胞傷害」（ADCC）は、Fc受容体（FcR）を発現する非特異的な細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、及びマクロファージ）が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、これにより、標的細胞の溶解をもたらす細胞媒介反応を指す。CDC及びADCCは、当該技術分野において周知であり、利用可能なアッセイを使用して測定され得る（例えば、米国特許第5,500,362号及び同第5,821,337号、ならびにClynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656を参照のこと）。抗体の定常領域は、補体を固定し、細胞依存性細胞傷害を媒介する抗体の能力に重要である。従って、抗体アイソタイプは、抗体が細胞傷害を媒介するために望ましいかどうかに基づいて選択され得る。

10

【0086】

本明細書において提供されるある特定の実施形態では、本明細書において提供される多重特異性（例えば、二重特異性または三重特異性）抗体は、ヒト抗体である。本明細書で使用する場合、用語「ヒト抗体」は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域を有する抗体を包含することを意図する。本明細書において開示されるヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダムまたは部位特異的変異誘発により、またはインビボでの体細胞変異により導入される変異）を例えば、CDR、特にCDR3に含み得る。しかしながら、本明細書で使用する場合、用語「ヒト抗体」は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系列に由来するCDR配列が、ヒトフレームワーク配列に移植された抗体を包含することを意図しない。

20

【0087】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される抗体は、組換えヒト抗体であり得る。本明細書で使用する場合、用語「組換えヒト抗体」は、組換え手段により製造、発現、作製、または単離される全てのヒト抗体、例えば、宿主細胞に形質移入された組換え発現ベクターを使用して発現された抗体（以下で更に記載される）、組換えヒト抗体ライブラリーの組み合わせから単離された抗体（以下で更に記載される）、ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックな動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295を参照のこと）、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列への挿入を含む任意の他の手段により調製、発現、作製、もしくは単離された抗体を包含することを意図する。かかる組換えヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域を有する。しかしながら、ある特定の実施形態では、かかる組換えヒト抗体は、インビトロでの変異誘発（または、ヒトIg配列に関してトランスジェニックな動物が使用される場合、インビボでの体細胞変異誘発）に供されており、これにより、組換え抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列VH及びVL配列に由来し、かつそれに関連するが、インビボでのヒト抗体生殖細胞系列レポーター内に天然に存在しなくてもよい配列である。

30

40

【0088】

ヒト抗体は、ヒンジ不均一性に関連する2つの形態で存在し得る。1つの形態では、免疫グロブリン分子は、二量体が鎖間重鎖ジスルフィド結合により互いに保持されている約150～160kDaの安定な4本鎖の構築物を含む。第2の形態では、二量体は鎖間ジスルフィド結合により連結されておらず、共有結合的に連結された軽鎖及び重鎖から構成される約75～80kDaの分子（半抗体）が形成される。これらの形態は、アフィニティ精製後でさえ分離することが非常に困難であった。

【0089】

50

様々なインタクトなIgGアイソタイプにおける第2の形態の出現頻度は、限定されるものではないが、抗体のヒンジ領域アイソタイプに関連する構造的差異に起因する。ヒトIgG4ヒンジのヒンジ領域における単一アミノ酸置換は、ヒトIgG1ヒンジを使用して通常観察されるレベルまで、第2の形態の出現を有意に低減し得る（Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105）。本開示は、ヒンジ、CH2、またはCH3領域に1つ以上の変異を有する抗体を包含し、当該変異は、例えば、製造において、所望の抗体形態の収率を改善するために望ましくてもよい。

【0090】

配列バリエーション

本明細書において開示される単一特異性または多重特異性（例えば、二重特異性または三重特異性）抗体は、抗体が由来する対応する生殖細胞系列配列と比較して、重鎖及び軽鎖可変ドメインのフレームワーク及び／またはCDR領域に1つ以上のアミノ酸置換、挿入、及び／または欠失を含み得る。かかる変異は、本明細書において開示されるアミノ酸配列を、例えば、公的抗体配列データベースから入手可能な生殖細胞系列配列と比較することにより容易に確認され得る。本開示は、1つ以上のフレームワーク及び／またはCDR領域内の1つ以上のアミノ酸が、抗体が由来した生殖細胞系列配列の対応する残基（複数可）に変異されているか、または別のヒト生殖細胞系列配列の対応する残基（複数可）に変異されているか、または対応する生殖細胞系列残基（複数可）の保存的アミノ酸置換に変異されている（かかる配列変化は、本明細書において集合的に「生殖細胞系列変異」と称される）、本明細書において開示されるアミノ酸配列のいずれかに由来する抗体及びその抗原結合断片を含む。当業者は、本明細書において開示される重鎖及び軽鎖可変領域配列から出発して、1つ以上の個々の生殖細胞系列変異またはその組み合わせを含む多数の抗体及び抗原結合断片を容易に作製することができる。ある特定の実施形態では、VH及び／またはVLドメイン内の全てのフレームワーク及び／またはCDR残基が、抗体が由来した元の生殖細胞系列配列において見出される残基に逆変異される。他の実施形態では、特定の残基のみ、例えば、FR1の最初の8アミノ酸内もしくはFR4の最後の8アミノ酸内に見出される変異した残基のみ、またはCDR1、CDR2、もしくはCDR3内に見出される変異した残基のみが元の生殖細胞系列配列に逆変異される。他の実施形態では、フレームワーク及び／またはCDR残基（複数可）のうちの1つ以上が、異なる生殖細胞系列配列（すなわち、抗体が元々由来した生殖細胞系列配列と異なる生殖細胞系列配列）の対応する残基（複数可）に変異される。更に、本明細書において開示される抗体は、フレームワーク及び／またはCDR領域内に2つ以上の生殖細胞系列変異の任意の組み合わせを含有し得、例えば、フレームワーク及び／またはCDR領域において、特定の個々の残基は、特定の生殖細胞系列配列の対応する残基に変異されている一方で、元の生殖細胞系列配列と異なる特定の他の残基は、維持されているか、または異なる生殖細胞系列配列の対応する残基に変異されている。得られたら、1つ以上の生殖細胞系列変異を含有する抗体及び抗原結合断片は、1つ以上の所望の特性、例えば、改善された結合特異性、増強された結合（例えば、細胞結合抗体価の測定またはFACS結合により評価される）または結合親和性（例えば、KD）、（場合によっては）改善または増強された生物学的アンタゴニストまたはアゴニスト特性、低減された免疫原性などについて容易に試験され得る。この一般的な方法で得られた抗体及び抗原結合断片は、本開示の範囲内に包含される。

【0091】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される多重特異性（例えば、二重特異性または三重特異性）抗体は、1つ以上の保存的置換を有する、本明細書において開示されるHCVR、LCVR、及び／またはCDRアミノ酸配列のいずれかのバリエーションを含む。例えば、ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗CD40アンタゴニスト抗体または多重特異性（例えば、二重特異性または三重特異性）CD3抗体は、本明細書において開示されるHCVR、LCVR、及び／またはCDRアミノ酸配列のいずれ

10

20

30

40

50

かと比較して、例えば、10個以下、8個以下、6個以下、4個以下などの保存的アミノ酸置換を有するHCV R、LCV R、及び／またはCD Rアミノ酸配列を有する。

【0092】

Fcバリエーション

本明細書において提供されるある特定の実施形態によれば、例えば、中性pHと比較して酸性のpHにおいて、FcRn受容体への抗体の結合を増強または減弱する1つ以上の変異を含むFcドメインを含む抗体及び多重特異性抗原結合分子が提供される。例えば、本開示は、FcドメインのCH2またはCH3領域に変異を含む抗体を含み、ここで、変異（複数可）は、酸性環境における（例えば、pHが約5.5～約6.0の範囲のエンドソームにおける）FcRnに対するFcドメインの親和性を増加させる。かかる変異は、動物に投与される場合に抗体の血清半減期の増加をもたらし得る。かかるFc変異の非限定的な例としては、例えば、250位（例えば、EまたはQ）；250及び428位（例えば、LまたはF）；252位（例えば、L／Y／F／WまたはT）、254位（例えば、SまたはT）、及び256位（例えば、S／R／Q／E／DまたはT）での改変；または428及び／または433位（例えば、H／L／R／S／P／QまたはK）及び／または434位（例えば、H／FまたはY）での改変；または250及び／または428位での改変；または307もしくは308位（例えば、308F、V308F）及び434位での改変が挙げられる。一実施形態では、改変は、428L（例えば、M428L）及び434S（例えば、N434S）改変；428L、259I（例えば、V259I）、及び308F（例えば、V308F）改変；433K（例えば、H433K）及び434（例えば、434Y）改変；252、254、及び256（例えば、252Y、254T、及び256E）改変；250Q及び428L改変（例えば、T250Q及びM428L）；ならびに307及び／または308改変（例えば、308Fまたは308P）を含む。

10

20

30

【0093】

例えば、本開示は、250Q及び248L（例えば、T250Q及びM248L）；252Y、254T、及び256E（例えば、M252Y、S254T、及びT256E）；428L及び434S（例えば、M428L及びN434S）；ならびに433K及び434F（例えば、H433K及びN434F）からなる群から選択される1つ以上の変異対または変異群を含むFcドメインを含む、多重特異性抗原結合分子（例えば、抗CD28／抗TAA二重特異性抗体または抗CD3／抗TAA二重特異性抗体）を含む。前述のFcドメイン変異、及び本明細書において開示される抗体可変ドメイン内の他の変異の全ての可能な組み合わせが本明細書において意図される。

【0094】

生物学的同等性

本明細書において開示される例示的な分子のアミノ酸配列とは異なるが、同じ抗原または複数の抗原に結合する能力を保持しているアミノ酸配列を有する抗原結合分子が本明細書において提供される。かかるバリエーション分子は、親配列と比較した場合に、1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含み得るが、記載される二重特異性抗原結合分子の生物活性と本質的に同等の生物活性を示す。

【0095】

本開示は、本明細書に記載される例示的な抗原結合分子のいずれかと生物学的に同等な抗原結合分子を含む。2つの抗原結合タンパク質または抗体は、例えば、それらが、同様の実験条件下で同じモル用量で単回投与または反復投与のいずれかで投与される場合にそれらの吸収の速度及び程度が有意差を示さない製剤学的同等製剤または製剤学的代替製剤である場合に、生物学的に同等とみなされる。幾つかの抗原結合タンパク質は、それらが吸収の程度において同等であるが、吸収速度においては同等でなく、それでも、吸収速度におけるかかる差異は意図的であり、かつラベルに反映されており、例えば、慢性使用での効果的な身体薬物濃度の達成に重要ではなく、研究されている特定の製剤に関して医学的に重要でないため、生物学に同等であるとみなされ得る場合、同等製剤または製剤学的代替製剤とみなされる。

40

50

【0096】

一実施形態では、2つの抗原結合タンパク質は、それらの安全性、純度、及び効力において臨床的に意義のある差異がない場合、生物学的に同等である。

【0097】

一実施形態では、2つの抗原結合タンパク質は、切り替えなしに継続された治療と比較して、有害作用のリスクの増加、例えば、免疫原性の臨床的に問題となる変化、または有効性の減少が予想されることなく、患者が参照製剤と生物学的製剤との間で1回以上切り替えられ得る場合、生物学的に同等である。

【0098】

一実施形態では、2つの抗原結合タンパク質は、それらの両方が使用条件または複数の使用条件において共通の機序または作用機序により、かかる機序が公知である範囲で作用する場合、生物学的に同等である。

【0099】

生物学的同等性は、インビボ及びインビトロでの方法により実証され得る。生物学的同等性の測定法としては、例えば、(a) 血液、血漿、血清、または他の生体液中の抗体またはその代謝産物の濃度が時間の関数として測定される、ヒトまたは他の哺乳動物でのインビボ試験；(b) インビボでのヒト生物学的利用能データと相関しており、かつそれを合理的に予測するインビトロ試験；(c) 抗体（またはその標的）の適切な急性薬理作用が時間の関数として測定される、ヒトまたは他の哺乳動物でのインビボ試験；及び(d) 抗原結合タンパク質の安全性、有効性、もしくは生物学的利用能または生物学的同等性を証明する十分に管理された臨床試験が挙げられる。

【0100】

本明細書に記載される例示的な二重特異性抗原結合分子の生物学的に同等なバリエーションは、例えば、残基もしくは配列の様々な置換を行うことにより、または生物活性に必要とされない末端もしくは内部の残基もしくは配列を除去することにより構築され得る。例えば、生物活性に必須ではないシステイン残基は、復元の際に不必要なまたは適切でない分子内ジスルフィド架橋の形成を防止するために、除去され得るか、または他のアミノ酸と置き換えられ得る。他の文脈では、生物学的に同等な抗原結合タンパク質としては、分子のグリコシル化特徴を改変するアミノ酸変化、例えば、グリコシル化を排除または除去する変異を含む、本明細書に記載される例示的な二重特異性抗原結合分子のバリエーションが挙げられ得る。

【0101】

抗体結合

本明細書で使用する場合、用語「結合」は、抗体、免疫グロブリン、抗体結合断片またはFc含有タンパク質の、例えば、いずれかの所定の抗原、例えば、細胞表面タンパク質またはその断片への結合の文脈において、通常、最低2つの実体または分子構造の間の相互作用または会合、例えば、抗体抗原相互作用を指す。

【0102】

例えば、結合親和性は、例えば、BIAcore 3000機器での表面プラズモン共鳴（SPR）技術により、リガンドとしての抗原、及び分析物（またはアンチリガンド）としての抗体、Ig、抗体結合断片、またはFc含有タンパク質を使用して測定される場合、典型的には、約 10^{-7} M以下、例えば、約 10^{-8} M以下、例えば、約 10^{-9} M以下のKD値に相当する。細胞ベースの結合戦略、例えば、蛍光活性化セルソーティング（FACS）による結合アッセイも慣例的に使用され、FACSデータは、放射性リガンド競合結合及びSPRなどの他の方法と良く相関する（Benedict, CA, J Immunol Methods. 1997, 201(2): 223-31、Geuijen, CA, et al. J Immunol Methods. 2005, 302(1-2): 68-77）。

【0103】

従って、本明細書において提供される抗体または抗原結合性タンパク質は、非特異的抗

10

20

30

40

50

原（例えば、BSA、カゼイン）に対する結合親和性の少なくとも10分の1であるKD値に相当する親和性を有する所定の抗原または細胞表面分子（受容体）に結合する。本開示によれば、非特異的抗原の10分の1以下であるKD値に相当する抗体の親和性は、検出不可能な結合とみなされ得るが、このような抗体は、本明細書において開示される二重特異性抗体の作製のために第2の抗原結合アームと組み合わせられ得る。

【0104】

用語「KD」（M）は、特定の抗体抗原相互作用の解離平衡定数、または抗原に結合する抗体もしくは抗体結合断片の解離平衡定数を指す。KDと結合親和性との間には逆相関があり、従って、KD値が小さいほど、親和性がより高く、すなわちより強い。従って、用語「より高い親和性」または「より強い親和性」は、相互作用を形成するより高い能力、従って、より小さいKD値を指し、逆に、用語「より低い親和性」または「より弱い親和性」は、相互作用を形成するより低い能力、従って、より大きいKD値を指す。幾つかの場合では、特定の分子（例えば、抗体）の別の相互作用パートナー分子（例えば、抗原Y）に対する結合親和性と比較した、その分子（例えば、抗体）の相互作用パートナー分子（例えば、抗原X）に対するより高い結合親和性（またはKD）は、より大きいKD値（より低い、またはより弱い親和性）をより小さいKD（より高い、またはより強い親和性）で除算することにより決定される結合比として表現され得、例えば、場合によっては、5倍または10倍高い結合親和性と表現される。

【0105】

用語「kd」（sec⁻¹または1/s）は、特定の抗体抗原相互作用の解離速度定数、または抗体もしくは抗体結合断片の解離速度定数を指す。上記値は、koff値とも称される。

【0106】

用語「ka」（M⁻¹×sec⁻¹または1/M）は、特定の抗体抗原相互作用の会合速度定数、または抗体もしくは抗体結合断片の会合速度定数を指す。

【0107】

用語「KA」（M⁻¹または1/M）は、特定の抗体抗原相互作用の会合平衡定数、または抗体もしくは抗体結合断片の会合平衡定数を指す。会合平衡定数は、kaをkdで除算することにより得られる。

【0108】

用語「EC50」または「EC50」は、特定の曝露時間後にベースラインと最大値との中間の反応を誘発する抗体の濃度を包含する、最大半減有効濃度を指す。EC50は、本質的に、その最大効果の50%が観察される抗体の濃度を表す。ある特定の実施形態では、EC50値は、例えば、FACSによる結合アッセイによって測定される場合に、CD28または腫瘍関連抗原（例えば、表2に開示される抗原）を発現する細胞に対する最大半減結合を示す本明細書において開示される抗体の濃度に等しい。従って、増加したEC50値または最大半減有効濃度値では、低減された結合またはより弱い結合が観察される。

【0109】

一実施形態では、多重特異性CD28抗体の結合の減少は、標的細胞の最大半量への結合を可能にするEC50抗体濃度の増加と定義され得る。

【0110】

別の実施形態では、EC50値は、T細胞の細胞傷害活性による標的細胞の最大半減枯渇を誘発する本明細書において開示される多重特異性CD28抗体の濃度を表す。従って、減少したEC50または最大半減有効濃度値では、増強された細胞傷害活性（例えば、T細胞媒介腫瘍細胞殺傷）が観察される。

【0111】

抗原結合ドメインの調製及び二重特異性分子の構築

特定の抗原に特異的な抗原結合ドメインは、当該技術分野において公知の任意の抗体作製技術により調製され得る。得られたら、2つの異なる抗原（例えば、CD28及びヒト

10

20

30

40

50

腫瘍抗原)に特異的な2つの異なる抗原結合ドメインは、定型的な方法を使用して本明細書において開示される二重特異性の抗原結合分子を作製するために互いに対して適切に配置され得る。ある特定の実施形態では、本明細書において開示される多重特異性の抗原結合分子の個々の成分(例えば、重鎖及び軽鎖)のうちの1つ以上は、キメラ、ヒト化、または完全ヒト抗体に由来し得る。かかる抗体を作製するための方法は、当該技術分野において周知である。例えば、本明細書において開示される二重特異性抗原結合分子の重鎖及び／または軽鎖のうちの1つ以上は、VELOCIMMUNE(商標)技術を使用して調製され得る。VELOCIMMUNE(商標)技術(または任意の他のヒト抗体作製技術)を使用して、ヒト可変領域及びマウス定常領域を有する、特定の抗原(例えば、CD28またはヒト腫瘍関連抗原)に対する高親和性キメラ抗体が最初に単離される。抗体は、親和性、選択性、エピトープなどが含まれる、所望の特徴について特徴付け及び選択される。本明細書において開示される二重特異性抗原結合分子に組み込むことができる完全ヒト重鎖及び／または軽鎖を作製するために、マウス定常領域が所望のヒト定常領域と置き換えられる。

10

20

30

40

50

【0112】

ヒト二重特異性抗原結合分子を作製するために、遺伝子操作された動物が使用され得る。例えば、内在性マウス免疫グロブリン軽鎖可変配列を再構成及び発現することができない遺伝子改変マウスが使用されてもよく、当該マウスは、内在性マウスκ遺伝子座におけるマウスκ定常遺伝子に作動可能に連結されたヒト免疫グロブリン配列によりコードされる1つまたは2つのみのヒト軽鎖可変ドメインを発現する。かかる遺伝子改変マウスは、2つの異なるヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントのうちの1つに由来する可変ドメインを含む同一の軽鎖と会合する2本の異なる重鎖を含む完全ヒト二重特異性抗原結合分子を作製するために使用され得る(US2011/0195454を参照のこと)。完全ヒトは、抗体またはその抗原結合断片もしくは免疫グロブリンドメインの各ポリペプチドの全長にわたって、ヒト配列に由来するDNAによりコードされるアミノ酸配列を含む、当該抗体またはその抗原結合断片もしくは免疫グロブリンドメインを指す。幾つかの例では、完全ヒト配列は、ヒトに内在するタンパク質に由来する。他の例では、完全ヒトタンパク質または完全ヒトタンパク質配列は、各構成要素の配列がヒト配列に由来するキメラ配列を含む。いずれの理論にも拘束されるものではないが、キメラタンパク質またはキメラ配列は、一般に、例えば、任意の野生型ヒト免疫グロブリン領域またはドメインと比較して、構成要素配列の接合部における免疫原性エピトープの生成を最小限にするように設計される。

【0113】

多重特異性CD28抗原結合分子

ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法及び組成物は、CD28抗原結合分子(すなわち、CD28に結合する少なくとも1つの抗原結合領域を含む抗原結合分子)に関する。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される多重特異性CD28抗原結合分子は、標的抗原(例えば、がん細胞上に発現される抗原、例えば、腫瘍関連抗原(TAA))に結合する抗原結合ドメインを更に含む。

【0114】

ある特定の実施形態では、標的抗原(例えば、がん細胞上に発現される抗原、例えば、腫瘍関連抗原(TAA))に結合する抗原結合ドメインを更に含む、本明細書において提供される多重特異性CD3抗原結合分子である第2の抗原結合分子が本明細書において提供される。

【0115】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍関連抗原(TAA)である。幾つかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍微小環境(例えば、対象における腫瘍の微小環境)に関連する抗原である。例えば、幾つかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍微小環境内の免疫細胞上、腫瘍細胞間質上、または細胞外マトリックス上の抗原である。細胞外マトリックス抗原の例としては、ネクチン(例えば、ネクチン-3またはネクチン-4)、バーシカン(V

A C N)、フィブロネクチン、及び癌胎児性抗原関連細胞接着分子 (C E A C A M) が挙げられる。

【0116】

本明細書で使用する場合、「多重特異性抗原結合分子」という表現は、少なくとも第1の抗原結合領域及び第2の抗原結合領域を含むタンパク質、ポリペプチド、または分子複合体を指す。幾つかの実施形態では、多重特異性抗原結合分子内の各抗原結合ドメインは、単独でまたは1つ以上の追加のCDR及び／またはFRとの組み合わせで、特定の抗原に特異的に結合する少なくとも1つのCDRを含み得る。ある特定の実施形態では、第1の抗原結合ドメインは、第1の抗原（例えば、CD28）に特異的に結合し、第2の抗原結合ドメインは、異なる第2の抗原（例えば、腫瘍関連抗原）に特異的に結合する。

10

【0117】

幾つかの実施形態では、多重特異性CD28抗原結合分子は、多重特異性CD28抗体、例えば、二重特異性CD28抗体である。本明細書において提供されるCD28多重特異性抗体は、例えば、二重特異性または三重特異性であり得る。多重特異性抗体は、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であり得るか、または2種以上の標的ポリペプチドに特異的な抗原結合ドメインを含有し得る。例えば、Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147: 60-69、Kuffer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22: 238-244を参照のこと。本明細書において提供される二重特異性CD28抗体は、別の機能分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質に連結され得るか、またはそれと共発現され得る。例えば、第2または追加の結合特異性を有する二重特異性または多重特異性抗体を作製するために、抗体またはその断片は、（例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合性の会合、または別の方法により）1つ以上の他の分子実体、例えば、別の抗体または抗体断片に機能的に連結され得る。

20

【0118】

本明細書で使用する場合、用語「CD28」は、T細胞活性化及び生存に必要とされる共刺激シグナルをもたらす、T細胞上に発現されるタンパク質の1つである分化抗原群28を指す。T細胞受容体 (TCR) に加えてCD28によるT細胞刺激は、様々なインターロキンの産生の強力なシグナルを発生させ得る。ヒトCD28は、下記のようなアミノ酸配列を含む。

30

表1：CD28のヒトタンパク質配列

>NP_001230006.1; GeneID=940; アイソフォーム2前駆体
MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLS
WKHLCPSPLPFGPSKPFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFI
FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA
AYRS

>NP_001230007.1; GeneID=940; アイソフォーム3前駆体
MLRLLLALNLFPSIQVTGKHLCPSPLPFGPSKPFWVLVV
VGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRR
PGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

40

>NP_006130.1; GeneID=940; アイソフォーム1前駆体
MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLS
CKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQQQLQVY
SKTGFNC DGKLGNESVT FYLQNLVYNQTDIYFCKIEVMYP
PPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFWVLVV
VGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRR
PGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

>XP_011510496.1; GeneID=940; アイソフォームX1
MPCGLSALIMCPKGMVAVVAVDDGDSQALAGNKILVKQ
SPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEV

50

CVVYGNYSQQQLQVYSKTGFNC D G K L G N E S V T F Y L Q N L Y V N
Q T D I Y F C K I E V M Y P P P Y L D N E K S N G T I I H V K G K H L C P S P L
F P G P S K P F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V R S K R S R
L L H S D Y M N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y R S

>XP__011510497.1;GeneID=940;アイソフォームX2

M P C G L S A L I M C P K G M V A V V V A V D D G D S Q A L A G N K I L V K Q
S P M L V A Y D N A V N L S Y N E K S N G T I I H V K G K H L C P S P L F P G P
S K P F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V R S K R S R L L H S
D Y M N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y R S

>XP__011510499.1;GeneID=940;アイソフォームX3

M L R L L L A L N L F P S I Q V T G N K I L V K Q S P M L V A Y D N A V N L S
Y N E K S N G T I I H V K G K H L C P S P L F P G P S K P F W V L V V V G G V L
A C Y S L L V T V A F I I F W V R S K R S R L L H S D Y M N M T P R R P G P T R
K H Y Q P Y A P P R D F A A Y R S

【0119】

本明細書におけるタンパク質、ポリペプチド、及びタンパク質断片への全ての言及は、非ヒト種由来であると明示的に記載されない限り、それぞれのタンパク質、ポリペプチド、またはタンパク質断片のヒトバージョンを指すことを意図する。従って、「CD28」という表現は、非ヒト種由来、例えば、「マウスCD28」、「サルCD28」などであると明記されない限り、ヒトCD28を意味する。

【0120】

本明細書で使用する場合、「細胞表面に発現されたCD28」という表現は、CD28タンパク質の少なくとも一部が細胞膜の細胞外側に曝露され、抗体の抗原結合部分との接触が可能となるように、インビトロまたはインビボで細胞の表面上に発現している1つ以上のCD28タンパク質（複数可）を意味する。細胞表面に発現されたCD28は、細胞膜の機能的T細胞受容体の状況に含まれるCD28タンパク質を含む。細胞表面に発現されたCD28は、CD28タンパク質を通常発現する細胞の表面に発現されたCD28タンパク質を含み得るか、またはそれからなり得る。あるいは、細胞表面に発現されたCD28は、通常は表面上にヒトCD28を発現しないが、表面上にCD28を発現するように人工的に遺伝子操作された細胞の表面に発現されたCD3タンパク質を含み得るか、またはそれからなり得る。

【0121】

幾つかの実施形態では、本開示は、免疫グロブリンの一方のアームがCD28に結合し、免疫グロブリンの他方のアームが標的抗原（例えば、腫瘍抗原または「TAA」）に特異的である二重特異性抗体を含む。幾つかの実施形態では、本開示は、免疫グロブリンの第1のアームがCD28を結合し、免疫グロブリンの第2のアームが腫瘍抗原に特異的であり、免疫グロブリンの第3のアームが追加のT細胞抗原（例えば、CD3）または追加の腫瘍抗原に結合する三重特異性抗体を含む。

【0122】

幾つかの実施形態では、多重特異性CD28抗体は、US2020/0239576に開示される抗体のいずれかを含み得る。幾つかの実施形態では、CD28結合アームは、US2020/0239576に開示されるHCVR/LCVRまたはCDRアミノ酸配列のいずれかを含み得る。ある特定の実施形態では、CD28結合アームは、ヒトCD28に結合し、ヒトT細胞活性化を誘発する。ある特定の実施形態では、CD28結合アームは、ヒトCD28に弱く結合し、ヒトT細胞活性化を誘発する。他の実施形態では、CD28結合アームは、ヒトCD28に弱く結合し、二重特異性または多重特異性抗体の文脈において、腫瘍関連抗原を発現する細胞の殺傷を誘発する。

【0123】

ある特定の実施形態では、本開示に使用される多重特異性抗体または抗原結合断片は、ICOS、HVEM、CD27、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、

10

20

30

40

50

S L A M、C D 2、2 B 4、C D 2 2 6、T I M 1、または T I M 2 に結合して、T 細胞活性化を誘発する抗原結合アームを含む。

【0124】

ある特定の実施形態では、多重特異性 C D 2 8 抗原結合分子は、腫瘍関連抗原に特異的な抗原結合ドメインを含む。

【0125】

ある特定の実施形態では、腫瘍関連抗原は、免疫腫瘍抗原である。ある特定の実施形態では、腫瘍関連抗原は、非免疫腫瘍抗原である。

【0126】

腫瘍関連抗原は、以下の表 2 から選択される抗原のいずれかであり得る。

10

【表 1 - 1】

表 2 : 例示的な腫瘍関連抗原

AIM-2	ALDH1A1	α -アクチニン 4	α フェトプロテイン(「AFP」)	ARTC1
B-RAF	BAGE-1	BCLX (L)	BCMA	BCR-ABL 融合タンパク質 b3a2
β -カテニン	BING-4	CA-125	CALCA	癌胎児性抗原(「CEA」)
CD9	CASP-5	CASP-8	CD22	CD20
CD72	CD19	CD21	CD24	CD38
CD79	CD274	CD45	Cdc27	CDK12
CDK4	CDKN2A	CEA	CLPP	COA-1
CPSF	CSNK1A1	CTAG1	CTAG2	サイクリン D1
サイクリン A1	dek-can 融合タンパク質	DKK1	EFTUD2	伸長因子 2
EGFR	ENAH (hMena)	Ep-CAM	EPCAM	EphA3
上皮性腫瘍抗原(「ETA」)	ETV6-AML1 融合タンパク質	EZH2	FOLR1	FGF5
FLT3-ITD	FN1	G250/MN/CAIX	GAGE-1	GAGE-2
GAGE-8	GAGE-3	GAGE-4	GAGE-5	GAGE-6
GAGE-7	GAS7	グリピカン-3	GnTV	gp100/Pmel17
GPNMB	HAUS3	ヘプシン	HER-2/neu	HERV-K-MEL
HLA-A11	HLA-A2	HLA-DOB	hsp70-2	IDO1
IGF2B3	IL13R α 2	腸カルボキシルエステラーゼ	K-ras	カリクレイン 4
KIF20A	KK-LC-1	KKLC1	KM-HN-1	CCDC110 としても公知の KMHN1

20

30

40

【表 1 - 2】

LAGE-1	LDLR-フコシルト ランスフェラーゼ AS 融合タンパク 質	レングシン	M-CSF	MAGE-A1
MAGE-A10	MAGE-A12	MAGE-A2	MAGE-A3	MAGE-A4
MAGE-A6	MAGE-A9	MAGE-C1	MAGE-C2	リンゴ酸酵素
マンマグロビン -A	MART2	MATN	MC1R	MCSP
mdm-2	ME1	Melan-A/MART-1	Meloe	ミッドカイン
MMP-2	MMP-7	MUC1	MUC5AC	MUC16
ムチン	MUM-1	MUM-2	MUM-3	ミオシン
ミオシンクラス I	N-raw	NA88-A	neo-PAP	NFYC
NY-BR-1	NY-ESO-1/LAGE- 2	OA1	OGT	OS-9
P ポリペプチド	p53	PAP	PAX5	PBF
pml-RAR α 融合 タンパク質	多型性上皮ムチン (「PEM」)	PPP1R3B	PRAME	PRDX5
PSA	PSMA	PTPRK	RAB38/NY-MEL -1	RAGE-1
RBAF600	RGS5	RhoC	RNF43	RU2AS
SAGE	セセルニン 1	SIRT2	SNRPD1	SOX10
Sp17	SPA17	SLAMF7	SSX-2	SSX-4
STEAP1	STEAP2	サバイビン	SYT-SSX1 また は SYT-SSX2 融 合タンパク質	TAG-1
TAG-2	テロメラーゼ	TGF- β RII	TPBG	TRAG-3
トリオースリン 酸イソメラーゼ	TRP-1/gp75	TRP-2	TRP2-INT2	チロシナーゼ
チロシナーゼ (「TYR」)	VEGF	WT1 及び XAGE-1b/GAGED 2a		

【0127】

ある特定の実施形態では、腫瘍関連抗原は、AIM-2、ALDH1A1、 α -アクチニン4、 α フェトプロテイン(「AFP」)、ARTC1、B-RAF、BAGE-1、BCLX(L)、BCMA、BCR-ABL 融合タンパク質 b3a2、 β -カテニン、BING-4、CA-125、CALCA、癌胎児性抗原(「CEA」)、CASP-5、CASP-8、CD20、CD274、CD45、Cdc27、CDK12、CDK4、CDKN2A、CEA、CLPP、COA-1、CPSF、CSNK1A1、CTAG1、CTAG2、サイクリンD1、サイクリンA1、dek-can 融合タンパク質、DKK1、EFTUD2、伸長因子2、ENAH(hMena)、Epcam、Epcam

、EphA3、上皮性腫瘍抗原（「ETA」）、ETV6-AML1融合タンパク質、EZH2、FGF5、FLT3-ITD、FN1、G250/MN/CAIX、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-8、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAS7、グリピカン-3、GnTV、gp100/Pmel17、GPNMB、HAUS3、ヘプシン、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13R α 2、腸カルボキシルエステラーゼ、K-ras、カリクレイン4、KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、CCDC110としても公知のKMHN1、LAGE-1、LDLR-フコシルトランスフェラーゼAS融合タンパク質、レングシン、M-CSF、MAGE-A1、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-C1、MAGE-C2、リンゴ酸酵素、マンマグロビン-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、Melan-A/MART-1、Melo、ミッドカイン、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、MUC16、ムチン、MUM-1、MUM-2、MUM-3、ミオシン、ミオシンクラスI、N-ran、NA88-A、neo-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、Pポリペプチド、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RAR α 融合タンパク質、多型性上皮ムチン（「PEM」）、PPP1R3B、PRAME、PRDX5、PSA、PSMA、PTPRK、RAB38/NY-MEL-1、RAGE-1、RBAF600、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、SAGE、セセルニン1、SIRT2、SNRPD1、SOX10、Sp17、SPA17、SSX-2、SSX-4、STEAP1、STEAP2、サバイビン、SYT-SSX1またはSYT-SSX2融合タンパク質、TAG-1、TAG-2、テロメラーゼ、TGF- β RII、TPBG、TRAG-3、トリオースリン酸イソメラーゼ、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、チロシナーゼ、チロシナーゼ（「TYR」）、VEGF、WT1、及びXAGE-1b/GAGED2aから選択される。

10

20

30

40

50

【0128】

幾つかの実施形態では、腫瘍関連抗原としては、ADAM17、BCMA、CA-IX、CD19、CD20、CD21、CD22、CD24、CD30、CD33、CD38、CD52、CD56、CD70、CD72、CD74、CD79b、CD123、CD138、CDH3、CEA、EphA2、EpCAM、ERBB2、ENPP3、EGFR、EGFR-vIII、FLT3、FOLRL、GD-2、グリピカン-3、gpA33、GPNMB、GPRC5D、HER2、HER3、LMP1、LMP2A、MUC16、メソテリン、PSMA、PSCA、RON、ROR1、ROR2、STEAP1、STEAP2、SSTR2、SSTR5、5T4、及びTrop-2が挙げられ得る。幾つかの実施形態では、腫瘍抗原は、CD19、CD123、STEAP2、CD20、SSTR2、CD38、STEAP1、5T4、ENPP3、PSMA、MUC16、GPRC5D、またはBCMAであり得る。

【0129】

幾つかの実施形態では、腫瘍関連抗原は、CD38、EGFR、MUC16、PSMA、CA9、FOLR1、HER2、及びSLAMF7から選択される非免疫関連抗原であり得る。

【0130】

幾つかの実施形態では、腫瘍関連抗原は、CD22、CD20、CD72、CD19、CD21、CD24、及びCD79から選択される免疫関連抗原であり得る。

【0131】

CD22（Siglec2）は、B細胞の細胞膜上に発現される受容体である。CD22は、B細胞/B細胞相互作用を媒介する。これは、リンパ系組織におけるB細胞の局在化にも関与し得る。CD22は、シアル化糖タンパク質に結合し、そのうちの1つはCD

45である。CD22は、 $\alpha-2,6$ 結合シアル酸にも優先的に結合する。これは、Srcファミリーチロシンキナーゼとの相互作用により正の調節における役割も果たし、シグナル伝達分子の脱リン酸化によりシグナル伝達を遮断する細胞質ホスファターゼをそれらのSH2ドメインを介して動員することにより抑制性受容体としても作用し得る。

【0132】

CD20は、成熟B細胞の細胞膜上に発現される非グリコシル化リンタンパク質である。CD20は、それがB細胞非ホジキンリンパ腫（NHL）の95%超及び他のB細胞悪性腫瘍により発現され、前駆B細胞、樹状細胞、及び形質細胞には存在しないため、B細胞腫瘍関連抗原と考えられている。ヒトCD20タンパク質は、米国特許出願第US2020/0129617号（その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）の配列番号5に示されるアミノ酸配列を有する。

10

【0133】

MUC16は、ムチン16を指す。MUC16は、卵巣癌に高度に発現する単一膜貫通ドメインの高グリコシル化膜内在性タンパク質である。ヒトMUC16のアミノ酸配列は、米国特許出願第US2018/0118848A1号（その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）の配列番号1899に記載されている。

【0134】

BCMAは、B細胞成熟抗原を指す。BCMA（TNFRSF17及びCD269としても公知）は、悪性形質細胞上に発現される細胞表面タンパク質であり、B細胞成熟及び免疫グロブリン産生形質細胞への分化の調節において中心的役割を果たす。ヒトBCMAのアミノ酸配列は、米国特許出願第US2020/0024356号（その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）の配列番号115に示されている。これは、GenBankアクセッション番号：NP_001183.2においても見出され得る。

20

【0135】

PSMAは、葉酸ヒドロラーゼ1（FOLH1）としても公知の前立腺特異的膜抗原を指す。PSMAは、前立腺上皮細胞で高度に発現する非脱落型膜内在性糖タンパク質であり、前立腺癌の細胞表面マーカーである。ヒトPSMAのアミノ酸配列は、米国特許出願第US2020/0129617号（その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）の配列番号7に記載されている。

【0136】

幾つかの実施形態では、CD28多重特異性抗体は、二重特異性CD28 x CD19抗体、二重特異性CD28 x CD22抗体、二重特異性CD28 x CD20抗体、二重特異性CD28 x CD72抗体、二重特異性CD28 x CD20抗体、二重特異性CD28 x CD19抗体、二重特異性CD28 x CD21抗体、二重特異性CD28 x CD24抗体、または二重特異性CD28 x CD79抗体であり得る。

30

【0137】

幾つかの実施形態では、多重特異性CD28抗体は、二重特異性CD28 x CD38抗体、二重特異性CD28 x EGFR抗体、二重特異性CD28 x MUC16抗体、二重特異性CD28 x PSMA抗体、二重特異性CD28 x CA9抗体、二重特異性CD28 x CD20抗体、二重特異性CD28 x FOLR1抗体、二重特異性CD28 x HER2抗体、及び二重特異性CD28 x SLAMF7抗体であり得る。

40

【0138】

ある特定の実施形態では、多重特異性抗原結合分子は、多重特異性抗体またはその抗原結合断片である。多重特異性抗体の各抗原結合ドメインは、重鎖可変ドメイン（HCVR）及び軽鎖可変ドメイン（LCVR）を含む。第1及び第2の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗原結合分子（例えば、二重特異性抗体）の文脈において、第1の抗原結合ドメインのCDRは、接頭辞「A1」を用いて示され得、第2の抗原結合ドメインのCDRは、接頭辞「A2」を用いて示され得。従って、第1の抗原結合ドメインのCDRは、本明細書においてA1-HCDR1、A1-HCDR2、及びA1-HCDR3と称され得、第2の抗原結合ドメインのCDRは、本明細書においてA2-HCDR1、A2-HC

50

D R 2、及び A 2－H C D R 3 と称され得る。第 1、第 2、及び第 3 の抗原結合ドメインを含む三重特異性抗原結合分子（例えば、三重特異性抗体）の文脈において、第 1 の抗原結合ドメインの C D R は、接頭辞「A 1」を用いて示され得、第 2 の抗原結合ドメインの C D R は、接頭辞「A 2」を用いて示され得、第 3 の抗原結合ドメインの C D R は、接頭辞「A 3」を用いて示され得る。従って、第 1 の抗原結合ドメインの C D R は、本明細書において A 1－H C D R 1、A 1－H C D R 2、及び A 1－H C D R 3 と称され得、第 2 の抗原結合ドメインの C D R は、本明細書において A 2－H C D R 1、A 2－H C D R 2、及び A 2－H C D R 3 と称され得、第 3 の抗原結合ドメインの C D R は、本明細書において A 3－H C D R 1、A 3－H C D R 2、及び A 3－H C D R 3 と称され得る。

【0139】

上記のまたは本明細書における二重特異性抗原結合分子は、二重特異性抗体であり得る。幾つかの例では、二重特異性抗体は、ヒト I g G 重鎖定常領域を含む。幾つかの例では、ヒト I g G 重鎖定常領域は、アイソタイプ I g G 1 である。幾つかの例では、ヒト I g G 重鎖定常領域は、アイソタイプ I g G 4 である。種々の実施形態では、二重特異性抗体は、同じアイソタイプの野生型ヒンジと比較して F c γ 受容体結合を低減するキメラヒンジを含む。

【0140】

幾つかの実施形態では、多重特異性 C D 2 8 抗体は、表 3 における多重特異性抗体のいずれかである。

【表 2】

表 3：多重特異性 C D 2 8 抗体

名称	標的
REGN7075	EGFR/CD28
REGN5678	PSMA/CD28
SAR442257	CD38/CD28xCD3
REGN5668	MUC16/CD28
REGN7945	CD38/CD28
REGN5837	CD22/CD28

【0141】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍の腫瘍微小環境に関連する抗原である。本明細書で使用する場合、腫瘍微小環境に関連する抗原としては、間質、腫瘍を取り囲む間質液、腫瘍を取り囲む血管、及び細胞外マトリックス内の細胞上の任意の抗原が挙げられる。腫瘍微小環境内の免疫細胞、他の細胞、線維芽細胞、またはシグナル伝達分子に関連する抗原も挙げられる。

【0142】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、P S A、C E A、C A－1 2 5、C A－1 9、C O L 1 0、F A P、B 7 H 3、L R R C 1 5、及びフィブロネクチンアイソフォーム E D B から選択される腫瘍間質に関連する抗原である。

【0143】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、ネクチン（例えば、ネクチン－3 またはネクチン－4）、パーシカン（V A C N）、フィブロネクチン、及び癌胎児性抗原関連細胞接着分子（C E A C A M）タンパク質から選択される腫瘍の細胞外マトリックスに関連する抗原である。

【0144】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、癌関連線維芽細胞の表面に発現される抗原（例え

ば、 α -平滑筋アクチン (α -SMA)、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)、S100A4、血小板由来成長因子受容体 (PDGFR α/β)、ビメンチン、PDPN、CD70、CD10、GPR77、CD10、CD74、CD146、CAV1、Saa3-、またはCD49e) である。

【0145】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍微小環境内の血管表面に発現される抗原、例えば、DLK1、EphA2、HBB、NG2、NRP1、NRP2、PDGFR β 、PSMA、RGS5、TEM1、VEGFR1、及びVEGFR2である。

【0146】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、免疫抗原である。幾つかの実施形態では、免疫抗原は、免疫細胞の表面に発現される抗原である。免疫細胞は、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、単球、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、T細胞、またはB細胞であり得る。幾つかの実施形態では、免疫細胞は、腫瘍または腫瘍の腫瘍微小環境に浸潤している。免疫抗原は、表4に列挙される免疫抗原のいずれかから選択され得る。

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 4：例示的な免疫抗原

免疫細胞種	標的抗原
マクロファージ	CD11b/インテグリン αM CD14 CD68 FcγRIII/CD16、 FcγRI/CD64 CCR5
B 細胞	IgM CD19 CD80 ⁺ CD86 ⁺ CD44 ⁺ CD69 ⁺ PD-L1 ⁺ CD27 ⁺ CD5 ⁺
T 細胞	CD27 CD28 CD127 PD-1 CD122 CD132 KLRG-1 CD58 CD99 CD62L CD103 CCR4 CCR5 CCR6 CCR9 CCR10 CXCR3 CXCR4 CLA グランザイム A グランザイム B パーフォリン CD161 IL-18Ra c-Kit CD130
樹状細胞	BDCA-1 CD8 CD8α CD11b CD11c CD103 CD205

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

好中球	CD11b CD16 CD32 CD44 CD55 CD15 CD33 CD45 CD66b+ CD18 CD62L
マスト細胞	CD33 CD45 CD117 CD203c CD32 FceROα+ IL-3Rα CD63 CD203
好酸球	CD11b+ CD62L+ CDR3 CD11b CD14 CD15 CD16 CD45 CD66b EMR1 HLA-DR CD125 CD49d Siglec-8

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

好塩基球	CCR3 CD11c CD22 CD45 CD69 CD117 CRTH-2 ENPP-3 FcεRIα HLA-DR IL-3Rα CD49b CD13 CD107a CD164
単球	CD14 CD11b CCR2 CD16 CD141 CD11c HLA-DR CCR7 CCR5 CD62L CX3CR1 CD68

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

ナチュラルキラー細胞	KLRK1
	NCR1
	NCR2
	NCR3
	KLRB1
	CD122
	KLRD1
	ITGB2
	KIR 受容体
	PRF1
	IFNG
	CD56
	CD16
	CCR7
	CSF2
	CXCR3
	IL2RB
	KLRC1
	SELL

10

20

【0147】

第1の抗原結合ドメイン及び第2の抗原結合ドメインは、本明細書において開示される二重特異性抗原結合分子を形成させるために、直接または間接的に互いに連結され得る。代替的に、第1の抗原結合ドメイン及び第2の抗原結合ドメインは、各々が別個の多量体化ドメインに連結され得る。ある多量体化ドメインの別の多量体化ドメインとの会合は、2つの抗原結合ドメイン間の会合を促進し、これにより、二重特異性抗原結合分子を形成させる。本明細書で使用する場合、「多量体化ドメイン」は、同じか、または類似する構造または構成の別の多量体化ドメインと会合する能力を有する任意の高分子、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、またはアミノ酸である。例えば、多量体化ドメインは、免疫グロブリンCH3ドメインを含むポリペプチドであり得る。多量体化成分の非限定的な例は、免疫グロブリンのFc部分（CH2-CH3ドメインを含む）、例えば、アイソタイプIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4、ならびに各アイソタイプ群内の任意のアロタイプから選択されるIgGのFcドメインである。

30

【0148】

本明細書において開示される二重特異性抗原結合分子は、通常、それぞれが個々に別個の抗体重鎖の一部である2つの多量体化ドメイン、例えば、2つのFcドメインを含む。第1及び第2の多量体化ドメインは、例えば、同じIgGアイソタイプのもの、IgG1/IgG1、IgG2/IgG2、IgG4/IgG4などであり得る。あるいは、第1及び第2の多量体化ドメインは、異なるIgGアイソタイプのもの、例えば、IgG1/IgG2、IgG1/IgG4、IgG2/IgG4などであり得る。

40

【0149】

ある特定の実施形態では、多量体化ドメインは、少なくとも1つのシステイン残基を含有するFc断片または1〜約200アミノ酸の長さのアミノ酸配列である。他の実施形態では、多量体化ドメインは、システイン残基、または短鎖システイン含有ペプチドである

50

。他の多量体化ドメインとしては、ロイシンジッパー、ヘリックスループモチーフ、またはコイルドコイルモチーフを含むか、またはそれからなるペプチドまたはポリペプチドが挙げられる。

【0150】

本明細書において開示される二重特異性抗原結合分子を作製するために、任意の二重特異性抗体フォーマットまたは技術が使用され得る。例えば、二重特異性抗原結合分子を作製するために、第1の抗原結合特異性を有する抗体またはその断片が、（例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合性会合、または別の方法により）1つ以上の他の分子実体、例えば、第2の抗原結合特異性を有する別の抗体または抗体断片に機能的に連結され得る。本明細書において提供される方法に使用され得る特定の例示的な二重特異性フォーマットとしては、限定されるものではないが、例えば、s c F vベースのフォーマットまたはダイアボディ二重特異性フォーマット、I g G - s c F v 融合物、二重可変ドメイン（D V D）- I g、クアドローマ、ノブ・イン・ホール、共通軽鎖（例えば、ノブ・イン・ホールを有する共通軽鎖など）、C r o s s M a b、C r o s s F a b、S E E Dボディ、ロイシンジッパー、デュオボディ、I g G 1 / I g G 2、二重作用性 F a b（D A F）- I g G、及び M a b 2 二重特異性フォーマットが挙げられる（上述のフォーマットの概説については、例えば、K l e i n e t a l . 2 0 1 2 , m A b s 4 : 6 , 1 - 1 1 及びその中で引用される参考文献を参照のこと）。

【0151】

本明細書において提供される二重特異性抗原結合分子の文脈において、多量体化ドメイン、例えば、F cドメインは、野生型の天然に存在するバージョンのF cドメインと比較して1つ以上のアミノ酸変化（例えば、挿入、欠失、または置換）を含み得る。例えば、本開示は、F cとF c R nとの間の改変された（例えば、増強または減弱された）結合相互作用を示す改変F cドメインをもたらす1つ以上の改変をF cドメインに含む二重特異性抗原結合分子を含む。一実施形態では、二重特異性抗原結合分子は、C H 2またはC H 3領域に改変を含み、ここで、当該改変は、酸性環境において（例えば、p Hが約5.5～約6.0の範囲であるエンドソームにおいて）F c R nに対するF cドメインの親和性を増加させる。かかるF c改変の非限定的な例としては、例えば、250位（例えば、EまたはQ）；250及び428位（例えば、LまたはF）；252位（例えば、L / Y / F / WまたはT）、254位（例えば、SまたはT）、及び256位（例えば、S / R / Q / E / DまたはT）での改変；または428及び／または433位（例えば、L / R / S / P / QまたはK）及び／または434位（例えば、H / FまたはY）での改変；または250及び／または428位での改変；または307もしくは308位（例えば、308 F、V 308 F）及び434位での改変が挙げられる。一実施形態では、改変は、428 L（例えば、M 428 L）及び434 S（例えば、N 434 S）改変；428 L、259 I（例えば、V 259 I）、及び308 F（例えば、V 308 F）改変；433 K（例えば、H 433 K）及び434（例えば、434 Y）改変；252、254、及び256（例えば、252 Y、254 T、及び256 E）改変；250 Q及び428 L改変（例えば、T 250 Q及びM 428 L）；ならびに307及び／または308改変（例えば、308 Fまたは308 P）を含む。

【0152】

ある特定の実施形態では、第1のC H 3ドメイン及び第2のI g C H 3ドメインを含む二重特異性抗原結合分子であって、当該第1及び第2のI g C H 3ドメインが互いに少なくとも1アミノ酸異なり、少なくとも1アミノ酸の差異が、アミノ酸の差異を欠く二重特異性抗体と比較して、当該二重特異性抗体のプロテインAへの結合を低減する、当該二重特異性抗体が本明細書において提供される。一実施形態では、第1のI g C H 3ドメインは、プロテインAに結合し、第2のI g C H 3ドメインは、プロテインA結合を低減するか、または消失させる変異、例えば、H 95 R改変（I M G Tエクソン番号付けによる；E U番号付けではH 435 R）を含有する。第2のC H 3は、Y 96 F改変（I M G Tによる；E UではY 436 F）を更に含み得る。例えば、米国特許第8,586,

10

20

30

40

50

713号を参照のこと。第2のCH3内に見出され得る更なる改変としては、以下が挙げられる：IgG1抗体の場合のD16E、L18M、N44S、K52N、V57M、及びV82I（IMGTによる；EUではD356E、L358M、N384S、K392N、V397M、及びV422I）；IgG2抗体の場合のN44S、K52N、及びV82I（IMGT；EUではN384S、K392N、及びV422I）；ならびにIgG4抗体の場合のQ15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q、及びV82I（IMGTによる；EUではQ355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q、及びV422I）。

【0153】

ある特定の実施形態では、Fcドメインは、2つ以上の免疫グロブリンアイソタイプに由来するFc配列を組み合わせたキメラであり得る。例えば、キメラFcドメインは、ヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4のCH2領域に由来するCH2配列の一部または全体、及びヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4に由来するCH3配列の一部または全体を含み得る。キメラFcドメインは、キメラヒンジ領域も含有し得る。例えば、キメラヒンジは、ヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4ヒンジ領域に由来する「下部ヒンジ」配列と組み合わせられた、ヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4ヒンジ領域に由来する「上部ヒンジ」配列を含み得る。本明細書に記載される抗原結合分子のいずれかに含まれ得るキメラFcドメインの具体例は、N末端からC末端までに、[IgG4 CH1] - [IgG4 上部ヒンジ] - [IgG2 下部ヒンジ] - [IgG4 CH2] - [IgG4 CH3] を含む。本明細書に記載される抗原結合分子のいずれかに含まれ得るキメラFcドメインの別の例は、N末端からC末端までに、[IgG1 CH1] - [IgG1 上部ヒンジ] - [IgG2 下部ヒンジ] - [IgG4 CH2] - [IgG1 CH3] を含む。本明細書において開示される抗原結合分子のいずれかに含まれ得るキメラFcドメインのこれらの例及び他の例は、2014年8月28日に公開された米国特許出願公開第2014/0243504号に記載されており、これはその全体が本明細書に組み込まれる。これらの全体的構造配置を有するキメラFcドメイン及びそのバリエーションは、変化したFc受容体結合を示し得、これにより、Fcエフェクター機能に影響を及ぼす。

【0154】

本明細書において開示される多重特異性（例えば、二重特異性または三重特異性）CD28抗体は、抗体が由来した対応する生殖細胞系列配列と比較して、軽鎖及び軽鎖可変ドメインのフレームワーク及び／またはCDR領域に1つ以上のアミノ酸置換、挿入、及び／または欠失を含み得る。かかる変異は、本明細書において開示されるアミノ酸配列を、例えば、公的抗体配列データベースから入手可能な生殖細胞系列配列と比較することにより容易に確認され得る。本開示は、1つ以上のフレームワーク及び／またはCDR領域内の1つ以上のアミノ酸が、抗体が由来した生殖細胞系列配列の対応する残基（複数可）に変異されているか、または別のヒト生殖細胞系列配列の対応する残基（複数可）に変異されているか、または対応する生殖細胞系列残基（複数可）の保存的アミノ酸置換に変異されている（かかる配列変化は、本明細書において集合的に「生殖細胞系列変異」と称される）、本明細書において開示されるアミノ酸配列のいずれかに由来する抗体及びその抗原結合断片を含む。当業者は、本明細書において開示される重鎖及び軽鎖可変領域配列から出発して、1つ以上の個々の生殖細胞系列変異またはその組み合わせを含む多数の抗体及び抗原結合断片を容易に作製することができる。ある特定の実施形態では、VH及び／またはVLドメイン内の全てのフレームワーク及び／またはCDR残基が、抗体が由来した元の生殖細胞系列配列において見出される残基に逆変異される。他の実施形態では、特定の残基のみ、例えば、FR1の最初の8アミノ酸内もしくはFR4の最後の8アミノ酸内に見出される変異した残基のみ、またはCDR1、CDR2、もしくはCDR3内に見出される変異した残基のみが元の生殖細胞系列配列に逆変異される。他の実施形態では、フレームワーク及び／またはCDR残基（複数可）のうちの1つ以上が、異なる生殖細胞系列配列（すなわち、抗体が元々由来した生殖細胞系列配列と異なる生殖細胞系列配列）の

対応する残基（複数可）に変異される。更に、本明細書において開示される抗体は、フレームワーク及び／またはCDR領域内に2つ以上の生殖細胞系列変異の任意の組み合わせを含有し得、例えば、フレームワーク及び／またはCDR領域において、特定の個々の残基は、特定の生殖細胞系列配列の対応する残基に変異されている一方で、元の生殖細胞系列配列と異なる特定の他の残基は、維持されているか、または異なる生殖細胞系列配列の対応する残基に変異されている。得られたら、1つ以上の生殖細胞系列変異を含有する抗体及び抗原結合断片は、1つ以上の所望の特性、例えば、改善された結合特異性、増強された結合（例えば、細胞結合抗体価の測定またはFACS結合により評価される）または結合親和性（例えば、KD）、（場合によっては）改善または増強された生物学的アンタゴニストまたはアゴニスト特性、低減された免疫原性などについて容易に試験され得る。この一般的な方法で得られた抗体及び抗原結合断片は、本開示の範囲内に包含される。

10

【0155】

幾つかの実施形態では、腫瘍内の少なくとも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%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の腫瘍細胞が標的抗原を発現しない。幾つかの実施形態では、腫瘍内の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%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%未満の腫瘍細胞が標的抗原を発現しない。幾つかの実施形態では、腫瘍内のある百分率の範囲の腫瘍細胞が標的抗原を発現せず、ここで、百分率の上限及び下限は、本明細書において開示されている。

20

30

【0156】

腫瘍抗原の発現またはレベルの測定は、フローサイトメトリーによる抗原表面発現の直接検出が含まれる、当該技術分野において公知の任意の方法により達成され得る。従って、本明細書で使用する場合、語句「標的抗原を発現しない腫瘍内の細胞」は、抗原タンパク質の表面発現を指し得る。例えば、腫瘍抗原は、腫瘍免疫ペプチドーム、すなわち、MHC分子により細胞表面上に提示される全ての内在性ペプチドの直接的な調査により同定され得る。この手法では、腫瘍細胞からの抽出後、ペプチドがMHC分子との複合体から溶離され、次いで、タンデム型質量分析（LC-MS/MS）と組み合わせた液体クロマトグラフィーに供される。MSスペクトルは、患者の腫瘍からのシーケンシングデータを参照タンパク質配列と組み合わせることにより作製されるカスタマイズされたデータベースと比較され得る。幾つかの実施形態では、一連のpMHC同位体置換体及び内部標準トリガー標的化質量分析を利用して、内在性pMHC濃度を決定するための組み込まれた多点校正曲線を生成する、SureQuant-IsomHCと称されているプラットフォームでの腫瘍抗原の定量化。更なる詳細については、Stopfer LE, Gajja

40

50

dhar AS, Patel B, Gallien S, Frederick DT, Boland GM, Sullivan RJ, White FM. Absolute quantification of tumor antigens using embedded MHC-I isotopologue calibrants. Proc Natl Acad Sci USA. 2021 Sep 14;118(37) (その全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照のこと。加えて、抗原コピー数を推定するために、T細胞受容体(TCR)模倣抗体が使用され得る。あるいは、標的抗原(例えば、本明細書において開示される任意の標的抗原)の発現の測定は、腫瘍細胞における核酸発現(例えば、RNA、例えば、mRNA発現)の測定により達成され得る。核酸発現は、核酸増幅及び関連する技術により達成され得る。

10

【0157】

多重特異性CD3抗体

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される多重特異性CD28抗体は、CD3抗体(例えば、多重特異性CD3抗体)と共に投与され得る。

【0158】

幾つかの実施形態では、多重特異性CD3抗体は、表5に列挙される多重特異性CD3抗体のいずれかである。

【表4】

表5：多重特異性CD3抗体

20

名称	標的
オドロネクスタマブ (REGN1979)	CD20xCD3
REGN2281	CD20xCD3
REGN5458	BCMAxCD3
REGN1979	CD20xCD3
AMV-564	CD33 x CD3
GBR1342	CD38xCD3
XmAb18968	CD3 x CD38
SAR443216	CD3xCD28xHER2
A-319	CD19xCD3
AMG330/エルビクスタマブ	CD33/CD3
エメルフェタマブ	CD33/CD3
エルツマキソマブ	CD3-HER2neu
REGN5459	BCMA x CD3
REGN4336	PSMA x CD3
REGN4018	MUC16 x CD3

30

40

【0159】

幾つかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載される抗体、WO2014/047231もしくはWO2017/053856において開示される抗CD3抗体、WO2014/047231において開示される二重特異性抗CD20x抗CD3抗体、WO2017/023761において開示される二重特異性抗PSMAx抗CD3抗体、WO2018/067331もしくはWO2018/058003において開示される二重特異性抗MUC16x抗CD3抗体、WO2018/058001において開示される二重特異

50

性抗STEAP2 x 抗CD3抗体、またはWO2020/018820（これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる）において開示される二重特異性抗BCMA x 抗CD3抗体のHCVR、LCVR、及び／またはCDRアミノ酸配列を有する抗体を含む。

【0160】

本明細書において開示される組成物及び方法に使用され得る追加の例示的な多重特異性CD3抗体としては、限定されるものではないが、例えば、米国特許第10,787,521B2号、米国特許出願公開第2018/0222987A1号、及びUS2019/0241657A1、ならびに国際特許出願公開第WO2016/036937A1号、同第WO2017/210443A1号、同第WO2019/050521A1号、同第WO2019/210147A1号、同第WO2019/232528A1号、及び同第WO2020/092404A1号において開示される二重特異性CD3 x CD123抗体；国際特許出願公開第WO2018/058001A1号において開示される二重特異性CD3 x STEAP2抗体；WO2014/047231A1、WO2015/143079A1、WO2016/081490A1、WO2017/112775A1、WO2017/210485A1、WO2018/114748A1、WO2018/093821A8、WO2018/223004A1、WO2018/188612A1、WO2019/155008A1、WO2019/228406A1、WO2020/088608A1、WO2020/156405A1、ならびに米国特許出願公開第US2020/0199231A1号及び同第US2020/0172627A1号において開示される二重特異性CD3 x CD20抗体；国際特許出願公開第WO2018/005706A1号において開示される二重特異性CD3 x SSTR2抗体；国際特許出願第WO2015/149077A1号及び同第WO2020/018556A1号、ならびに米国特許出願公開第US2018/0305465A1号及び同第US2020/0102403A1号において開示される二重特異性CD3 x CD38抗体；Olivier Nolan-Stevaux (2020) Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2020の要約において開示される二重特異性CD3 x STEAP1抗体；国際特許出願公開第WO2013/041687A1号、米国特許出願公開第US2017/0342160A1号、同第US20200277397A1号において開示される二重特異性CD3 x 5T4抗体；国際特許出願公開第WO2020/180726A1号に記載されるような二重特異性CD3 x ENPP3抗体；国際特許出願公開第WO2018/067331A9号及び同第WO2019/246356A1号において開示される二重特異性CD3 x MUC16抗体；国際特許出願公開第WO2013/072406A1号、同第WO2014/140248A1号、同第WO2016/166629A1号、同第WO2017/031104A1号、同第WO2017/134134A1号、同第WO2017/095267A1号、同第WO2019/220369A3号、同第WO2019/075359A1号、同第WO2019/226761A1号、同第WO2020/025596A1号、同第WO2020/191346A1号、同第WO2020018820A1号、米国特許出願公開第US2013/0273055A1号、同第US2019/0263920A1号において開示される二重特異性CD3 x BCMA抗体；国際特許出願公開第WO2012/055961A1号、同第WO2016/048938A1号、同第WO2017/087603A1号、同第WO2017/096368A1号、同第WO2018/188612A1号、同第WO2019/237081A1号、同第WO2020/048525A1号、同第WO2020/135335A1号、米国特許出願公開第US2016/0326249A1号、同第US2020/0283523A1号、同第US2019/0284279A1号、米国特許第US9,315,567B2号、同第US7,575,923B2号、同第US7,635,472B2号において開示される二重特異性CD3 x CD19抗体；国際特許出願公開第WO2018/017786A3号、同第WO2019/220369A3号において開示される二重特異性CD3 x GPRC5D抗体；米国特許出願公開第U

10

20

30

40

50

S 2 0 1 7 / 0 3 2 0 9 4 7 A 1 号において開示される二重特異性 C D 3 x P S M A 抗体；米国特許出願公開第 U S 2 0 2 0 / 0 1 4 0 5 5 2 A 1 号において開示される三重特異性 C D 3 x C D 2 8 x C D 3 8 抗体；または国際特許出願公開第 W O 2 0 1 6 / 0 8 6 1 8 9 A 2 号、同第 W O 2 0 2 0 / 0 8 8 6 0 8 A 1 号、同第 W O 2 0 1 9 1 9 1 1 2 0 A 1 号、及び同第 W O 2 0 1 6 / 1 0 5 4 5 0 A 3 号（これらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）において開示される他の多重特異性 C D 3 抗体が挙げられる。

【 0 1 6 1 】

幾つかの実施形態では、C D 3 及び腫瘍抗原に特異的に結合する上述の多重特異性（例えば、二重特異性または三重特異性）抗原結合分子は、インビトロ結合親和性アッセイにより測定される場合に、約 4 0 n M を超える K D を示すなどの弱い結合親和性で C D 3 に結合する抗 C D 3 抗原結合分子を含み得る。上述の二重特異性抗原結合分子は、C D 3 に結合し、F A C S による抗体価測定アッセイにより測定される場合に、約 1 0 0 n M を超える E C 5 0 を示す抗 C D 3 抗原結合分子を含み得る。上述の二重特異性抗原結合分子は、インビトロ結合親和性アッセイまたは F A C S による抗体価測定アッセイによって測定される場合に、測定可能または観察可能な C D 3 への結合を示さないが、ヒト P B M C 細胞を活性化し、及び／または腫瘍抗原を発現する細胞株に対する細胞傷害活性を誘発する能力を保持している抗 C D 3 抗原結合分子を含み得る。

10

【 0 1 6 2 】

治療方法

本明細書において、標的抗原に特異的な第 1 の抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な第 2 の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を対象に投与することにより、当該対象における腫瘍内の腫瘍細胞の殺傷をもたらすための方法及び組成物が提供され、ここで、当該腫瘍細胞は、標的抗原を発現しないか、または発現すると予測されない。幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットは、標的抗原を発現しない。

20

【 0 1 6 3 】

幾つかの態様では、対象における腫瘍内の腫瘍細胞の殺傷を誘発するため、及び／または腫瘍細胞に対する T 細胞活性化を誘発するための方法及び組成物が本明細書において提供され、当該方法は、標的抗原に特異的な第 1 の抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な第 2 の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を対象に投与することを含む。幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットは、標的抗原を発現しない。

30

【 0 1 6 4 】

本明細書において、腫瘍を有する対象のがんを処置するための方法及び組成物も提供され、当該方法は、標的抗原に特異的な第 1 の抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な第 2 の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を当該対象に投与することを含む。幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットは、標的抗原を発現しない。

【 0 1 6 5 】

幾つかの態様では、がん治療の対象を選択する方法であって、i) 当該対象が、標的抗原を発現しない腫瘍細胞を含む腫瘍を含むと判定すること、ならびに ii) 当該標的抗原に特異的な第 1 の抗原結合領域及び C D 2 8 タンパク質に特異的な第 2 の抗原結合領域を有する多重特異性の抗原結合分子を当該対象に投与することを含み、任意により、当該腫瘍細胞は、標的抗原の発現が検出レベル未満、またはシグナル対ノイズ比未満である場合、標的抗原を発現せず、これにより、がん治療の対象が選択される、当該方法が本明細書において提供される。

40

【 0 1 6 6 】

幾つかの実施形態では、多重特異性の抗原結合分子は、二重特異性 T 細胞エンゲージャーである。幾つかの実施形態では、多重特異性の抗原結合分子は、二重特異性抗体断片、

50

例えば、二重特異性Ｔエンゲージング抗体（ＢｉＴＥ）、二重親和性再標的化分子（ＤＡＲＴ）、またはタンデムダイアボディ（ＴａｎｄＡｂ）である。二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）は、２つの抗体結合部位を含有する小さな融合タンパク質である。ＤＡＲＴは、安定化を改善するＣ末端ジスルフィド架橋が追加されたダイアボディ骨格を使用する二重特異性エンゲージャーである。タンデムダイアボディ（ＴａｎｄＡｂ）は、一種の二重特異性抗体断片である。ｔａｎｄＡｂは、Ｆｖドメインからなる四価（２＋２の抗原結合価）の二重特異性分子である。ＴａｎｄＡｂは、通常、２つの親抗体由来の４つの可変ドメインを有する単量体サブユニット（一本鎖ダイアボディ、ｓｃＤｂ）として発現される。

【０１６７】

本明細書において提供される方法は、腫瘍または腫瘍微小環境内の腫瘍細胞の少なくともサブセット（例えば、少なくとも０．１％、０．２％、０．３％、０．４％、０．５％、０．６％、０．７％、０．８％、０．９％、１％、１．１％、１．２％、１．３％、１．４％、１．５％、１．６％、１．７％、１．８％、１．９％、２％、２．１％、２．２％、２．３％、２．４％、２．５％、２．６％、２．７％、２．８％、２．９％、３％、３．１％、３．２％、３．３％、３．４％、３．５％、３．６％、３．７％、３．８％、３．９％、４％、４．１％、４．２％、４．３％、４．４％、４．５％、４．６％、４．７％、４．８％、４．９％、５％、５．１％、５．２％、５．３％、５．４％、５．５％、５．６％、５．７％、５．８％、５．９％、６％、６．１％、６．２％、６．３％、６．４％、６．５％、６．６％、６．７％、６．８％、６．９％、７％、７．１％、７．２％、７．３％、７．４％、７．５％、７．６％、７．７％、７．８％、７．９％、８％、８．１％、８．２％、８．３％、８．４％、８．５％、８．６％、８．７％、８．８％、８．９％、９％、９．１％、９．２％、９．３％、９．４％、９．５％、９．６％、９．７％、９．８％、９．９％、１０％、１０．１％、１０．２％、１０．３％、１０．４％、１０．５％、１０．６％、１０．７％、１０．８％、１０．９％、１１％、１１．１％、１１．２％、１１．３％、１１．４％、１１．５％、１１．６％、１１．７％、１１．８％、１１．９％、１２％、１２．１％、１２．２％、１２．３％、１２．４％、１２．５％、１２．６％、１２．７％、１２．８％、１２．９％、１３％、１３．１％、１３．２％、１３．３％、１３．４％、１３．５％、１３．６％、１３．７％、１３．８％、１３．９％、１４％、１４．１％、１４．２％、１４．３％、１４．４％、１４．５％、１４．６％、１４．７％、１４．８％、１４．９％、１５％、１５．１％、１５．２％、１５．３％、１５．４％、１５．５％、１５．６％、１５．７％、１５．８％、１５．９％、１６％、１６．１％、１６．２％、１６．３％、１６．４％、１６．５％、１６．６％、１６．７％、１６．８％、１６．９％、１７％、１７．１％、１７．２％、１７．３％、１７．４％、１７．５％、１７．６％、１７．７％、１７．８％、１７．９％、１８％、１８．１％、１８．２％、１８．３％、１８．４％、１８．５％、１８．６％、１８．７％、１８．８％、１８．９％、１９％、１９．１％、１９．２％、１９．３％、１９．４％、１９．５％、１９．６％、１９．７％、１９．８％、１９．９％、２０％、２０．１％、２０．２％、２０．３％、２０．４％、２０．５％、２０．６％、２０．７％、２０．８％、２０．９％、２１％、２１．１％、２１．２％、２１．３％、２１．４％、２１．５％、２１．６％、２１．７％、２１．８％、２１．９％、２２％、２２．１％、２２．２％、２２．３％、２２．４％、２２．５％、２２．６％、２２．７％、２２．８％、２２．９％、２３％、２３．１％、２３．２％、２３．３％、２３．４％、２３．５％、２３．６％、２３．７％、２３．８％、２３．９％、２４％、２４．１％、２４．２％、２４．３％、２４．４％、２４．５％、２４．６％、２４．７％、２４．８％、２４．９％、２５％、２５．１％、２５．２％、２５．３％、２５．４％、２５．５％、２５．６％、２５．７％、２５．８％、２５．９％、２６％、２６．１％、２６．２％、２６．３％、２６．４％、２６．５％、２６．６％、２６．７％、２６．８％、２６．９％、２７％、２７．１％、２７．２％、２７．３％、２７．４％、２７．５％、２７．６％、２７．７％、２７．８％、２７．９％、２８％、２８．１％、２８．２％、２８．３％、２

10

20

30

40

50

8 . 4 %、2 8 . 5 %、2 8 . 6 %、2 8 . 7 %、2 8 . 8 %、2 8 . 9 %、2 9 %、2
9 . 1 %、2 9 . 2 %、2 9 . 3 %、2 9 . 4 %、2 9 . 5 %、2 9 . 6 %、2 9 . 7 %
、2 9 . 8 %、2 9 . 9 %、3 0 %、3 0 . 1 %、3 0 . 2 %、3 0 . 3 %、3 0 . 4 %
、3 0 . 5 %、3 0 . 6 %、3 0 . 7 %、3 0 . 8 %、3 0 . 9 %、3 1 %、3 1 . 1 %
、3 1 . 2 %、3 1 . 3 %、3 1 . 4 %、3 1 . 5 %、3 1 . 6 %、3 1 . 7 %、3 1 .
8 %、3 1 . 9 %、3 2 %、3 2 . 1 %、3 2 . 2 %、3 2 . 3 %、3 2 . 4 %、3 2 .
5 %、3 2 . 6 %、3 2 . 7 %、3 2 . 8 %、3 2 . 9 %、3 3 %、3 3 . 1 %、3 3 .
2 %、3 3 . 3 %、3 3 . 4 %、3 3 . 5 %、3 3 . 6 %、3 3 . 7 %、3 3 . 8 %、3
3 . 9 %、3 4 %、3 4 . 1 %、3 4 . 2 %、3 4 . 3 %、3 4 . 4 %、3 4 . 5 %、3
4 . 6 %、3 4 . 7 %、3 4 . 8 %、3 4 . 9 %、3 5 %、3 5 . 1 %、3 5 . 2 %、3
5 . 3 %、3 5 . 4 %、3 5 . 5 %、3 5 . 6 %、3 5 . 7 %、3 5 . 8 %、3 5 . 9 %
、3 6 %、3 6 . 1 %、3 6 . 2 %、3 6 . 3 %、3 6 . 4 %、3 6 . 5 %、3 6 . 6 %
、3 6 . 7 %、3 6 . 8 %、3 6 . 9 %、3 7 %、3 7 . 1 %、3 7 . 2 %、3 7 . 3 %
、3 7 . 4 %、3 7 . 5 %、3 7 . 6 %、3 7 . 7 %、3 7 . 8 %、3 7 . 9 %、3 8 %
、3 8 . 1 %、3 8 . 2 %、3 8 . 3 %、3 8 . 4 %、3 8 . 5 %、3 8 . 6 %、3 8 .
7 %、3 8 . 8 %、3 8 . 9 %、3 9 %、3 9 . 1 %、3 9 . 2 %、3 9 . 3 %、3 9 .
4 %、3 9 . 5 %、3 9 . 6 %、3 9 . 7 %、3 9 . 8 %、3 9 . 9 %、4 0 %、4 0 .
1 %、4 0 . 2 %、4 0 . 3 %、4 0 . 4 %、4 0 . 5 %、4 0 . 6 %、4 0 . 7 %、4
0 . 8 %、4 0 . 9 %、4 1 %、4 1 . 1 %、4 1 . 2 %、4 1 . 3 %、4 1 . 4 %、4
1 . 5 %、4 1 . 6 %、4 1 . 7 %、4 1 . 8 %、4 1 . 9 %、4 2 %、4 2 . 1 %、4
2 . 2 %、4 2 . 3 %、4 2 . 4 %、4 2 . 5 %、4 2 . 6 %、4 2 . 7 %、4 2 . 8 %
、4 2 . 9 %、4 3 %、4 3 . 1 %、4 3 . 2 %、4 3 . 3 %、4 3 . 4 %、4 3 . 5 %
、4 3 . 6 %、4 3 . 7 %、4 3 . 8 %、4 3 . 9 %、4 4 %、4 4 . 1 %、4 4 . 2 %
、4 4 . 3 %、4 4 . 4 %、4 4 . 5 %、4 4 . 6 %、4 4 . 7 %、4 4 . 8 %、4 4 .
9 %、4 5 %、4 5 . 1 %、4 5 . 2 %、4 5 . 3 %、4 5 . 4 %、4 5 . 5 %、4 5 .
6 %、4 5 . 7 %、4 5 . 8 %、4 5 . 9 %、4 6 %、4 6 . 1 %、4 6 . 2 %、4 6 .
3 %、4 6 . 4 %、4 6 . 5 %、4 6 . 6 %、4 6 . 7 %、4 6 . 8 %、4 6 . 9 %、4
7 %、4 7 . 1 %、4 7 . 2 %、4 7 . 3 %、4 7 . 4 %、4 7 . 5 %、4 7 . 6 %、4
7 . 7 %、4 7 . 8 %、4 7 . 9 %、4 8 %、4 8 . 1 %、4 8 . 2 %、4 8 . 3 %、4
8 . 4 %、4 8 . 5 %、4 8 . 6 %、4 8 . 7 %、4 8 . 8 %、4 8 . 9 %、4 9 %、4
9 . 1 %、4 9 . 2 %、4 9 . 3 %、4 9 . 4 %、4 9 . 5 %、4 9 . 6 %、4 9 . 7 %
、4 9 . 8 %、4 9 . 9 %、5 0 %、5 0 . 1 %、5 0 . 2 %、5 0 . 3 %、5 0 . 4 %
、5 0 . 5 %、5 0 . 6 %、5 0 . 7 %、5 0 . 8 %、5 0 . 9 %、5 1 %、5 1 . 1 %
、5 1 . 2 %、5 1 . 3 %、5 1 . 4 %、5 1 . 5 %、5 1 . 6 %、5 1 . 7 %、5 1 .
8 %、5 1 . 9 %、5 2 %、5 2 . 1 %、5 2 . 2 %、5 2 . 3 %、5 2 . 4 %、5 2 .
5 %、5 2 . 6 %、5 2 . 7 %、5 2 . 8 %、5 2 . 9 %、5 3 %、5 3 . 1 %、5 3 .
2 %、5 3 . 3 %、5 3 . 4 %、5 3 . 5 %、5 3 . 6 %、5 3 . 7 %、5 3 . 8 %、5
3 . 9 %、5 4 %、5 4 . 1 %、5 4 . 2 %、5 4 . 3 %、5 4 . 4 %、5 4 . 5 %、5
4 . 6 %、5 4 . 7 %、5 4 . 8 %、5 4 . 9 %、5 5 %、5 5 . 1 %、5 5 . 2 %、5
5 . 3 %、5 5 . 4 %、5 5 . 5 %、5 5 . 6 %、5 5 . 7 %、5 5 . 8 %、5 5 . 9 %
、5 6 %、5 6 . 1 %、5 6 . 2 %、5 6 . 3 %、5 6 . 4 %、5 6 . 5 %、5 6 . 6 %
、5 6 . 7 %、5 6 . 8 %、5 6 . 9 %、5 7 %、5 7 . 1 %、5 7 . 2 %、5 7 . 3 %
、5 7 . 4 %、5 7 . 5 %、5 7 . 6 %、5 7 . 7 %、5 7 . 8 %、5 7 . 9 %、5 8 %
、5 8 . 1 %、5 8 . 2 %、5 8 . 3 %、5 8 . 4 %、5 8 . 5 %、5 8 . 6 %、5 8 .
7 %、5 8 . 8 %、5 8 . 9 %、5 9 %、5 9 . 1 %、5 9 . 2 %、5 9 . 3 %、5 9 .
4 %、5 9 . 5 %、5 9 . 6 %、5 9 . 7 %、5 9 . 8 %、5 9 . 9 %、6 0 %、6 0 .
1 %、6 0 . 2 %、6 0 . 3 %、6 0 . 4 %、6 0 . 5 %、6 0 . 6 %、6 0 . 7 %、6
0 . 8 %、6 0 . 9 %、6 1 %、6 1 . 1 %、6 1 . 2 %、6 1 . 3 %、6 1 . 4 %、6
1 . 5 %、6 1 . 6 %、6 1 . 7 %、6 1 . 8 %、6 1 . 9 %、6 2 %、6 2 . 1 %、6
2 . 2 %、6 2 . 3 %、6 2 . 4 %、6 2 . 5 %、6 2 . 6 %、6 2 . 7 %、6 2 . 8 %

10

20

30

40

50

、 6 2 . 9 %、 6 3 %、 6 3 . 1 %、 6 3 . 2 %、 6 3 . 3 %、 6 3 . 4 %、 6 3 . 5 %
、 6 3 . 6 %、 6 3 . 7 %、 6 3 . 8 %、 6 3 . 9 %、 6 4 %、 6 4 . 1 %、 6 4 . 2 %
、 6 4 . 3 %、 6 4 . 4 %、 6 4 . 5 %、 6 4 . 6 %、 6 4 . 7 %、 6 4 . 8 %、 6 4 .
9 %、 6 5 %、 6 5 . 1 %、 6 5 . 2 %、 6 5 . 3 %、 6 5 . 4 %、 6 5 . 5 %、 6 5 .
6 %、 6 5 . 7 %、 6 5 . 8 %、 6 5 . 9 %、 6 6 %、 6 6 . 1 %、 6 6 . 2 %、 6 6 .
3 %、 6 6 . 4 %、 6 6 . 5 %、 6 6 . 6 %、 6 6 . 7 %、 6 6 . 8 %、 6 6 . 9 %、 6
7 %、 6 7 . 1 %、 6 7 . 2 %、 6 7 . 3 %、 6 7 . 4 %、 6 7 . 5 %、 6 7 . 6 %、 6
7 . 7 %、 6 7 . 8 %、 6 7 . 9 %、 6 8 %、 6 8 . 1 %、 6 8 . 2 %、 6 8 . 3 %、 6
8 . 4 %、 6 8 . 5 %、 6 8 . 6 %、 6 8 . 7 %、 6 8 . 8 %、 6 8 . 9 %、 6 9 %、 6
9 . 1 %、 6 9 . 2 %、 6 9 . 3 %、 6 9 . 4 %、 6 9 . 5 %、 6 9 . 6 %、 6 9 . 7 % 10
、 6 9 . 8 %、 6 9 . 9 %、 7 0 %、 7 0 . 1 %、 7 0 . 2 %、 7 0 . 3 %、 7 0 . 4 %
、 7 0 . 5 %、 7 0 . 6 %、 7 0 . 7 %、 7 0 . 8 %、 7 0 . 9 %、 7 1 %、 7 1 . 1 %
、 7 1 . 2 %、 7 1 . 3 %、 7 1 . 4 %、 7 1 . 5 %、 7 1 . 6 %、 7 1 . 7 %、 7 1 .
8 %、 7 1 . 9 %、 7 2 %、 7 2 . 1 %、 7 2 . 2 %、 7 2 . 3 %、 7 2 . 4 %、 7 2 .
5 %、 7 2 . 6 %、 7 2 . 7 %、 7 2 . 8 %、 7 2 . 9 %、 7 3 %、 7 3 . 1 %、 7 3 .
2 %、 7 3 . 3 %、 7 3 . 4 %、 7 3 . 5 %、 7 3 . 6 %、 7 3 . 7 %、 7 3 . 8 %、 7
3 . 9 %、 7 4 %、 7 4 . 1 %、 7 4 . 2 %、 7 4 . 3 %、 7 4 . 4 %、 7 4 . 5 %、 7
4 . 6 %、 7 4 . 7 %、 7 4 . 8 %、 7 4 . 9 %、 7 5 %、 7 5 . 1 %、 7 5 . 2 %、 7
5 . 3 %、 7 5 . 4 %、 7 5 . 5 %、 7 5 . 6 %、 7 5 . 7 %、 7 5 . 8 %、 7 5 . 9 %
、 7 6 %、 7 6 . 1 %、 7 6 . 2 %、 7 6 . 3 %、 7 6 . 4 %、 7 6 . 5 %、 7 6 . 6 % 20
、 7 6 . 7 %、 7 6 . 8 %、 7 6 . 9 %、 7 7 %、 7 7 . 1 %、 7 7 . 2 %、 7 7 . 3 %
、 7 7 . 4 %、 7 7 . 5 %、 7 7 . 6 %、 7 7 . 7 %、 7 7 . 8 %、 7 7 . 9 %、 7 8 %
、 7 8 . 1 %、 7 8 . 2 %、 7 8 . 3 %、 7 8 . 4 %、 7 8 . 5 %、 7 8 . 6 %、 7 8 .
7 %、 7 8 . 8 %、 7 8 . 9 %、 7 9 %、 7 9 . 1 %、 7 9 . 2 %、 7 9 . 3 %、 7 9 .
4 %、 7 9 . 5 %、 7 9 . 6 %、 7 9 . 7 %、 7 9 . 8 %、 7 9 . 9 %、 8 0 %、 8 0 .
1 %、 8 0 . 2 %、 8 0 . 3 %、 8 0 . 4 %、 8 0 . 5 %、 8 0 . 6 %、 8 0 . 7 %、 8
0 . 8 %、 8 0 . 9 %、 8 1 %、 8 1 . 1 %、 8 1 . 2 %、 8 1 . 3 %、 8 1 . 4 %、 8
1 . 5 %、 8 1 . 6 %、 8 1 . 7 %、 8 1 . 8 %、 8 1 . 9 %、 8 2 %、 8 2 . 1 %、 8
2 . 2 %、 8 2 . 3 %、 8 2 . 4 %、 8 2 . 5 %、 8 2 . 6 %、 8 2 . 7 %、 8 2 . 8 %
、 8 2 . 9 %、 8 3 %、 8 3 . 1 %、 8 3 . 2 %、 8 3 . 3 %、 8 3 . 4 %、 8 3 . 5 % 30
、 8 3 . 6 %、 8 3 . 7 %、 8 3 . 8 %、 8 3 . 9 %、 8 4 %、 8 4 . 1 %、 8 4 . 2 %
、 8 4 . 3 %、 8 4 . 4 %、 8 4 . 5 %、 8 4 . 6 %、 8 4 . 7 %、 8 4 . 8 %、 8 4 .
9 %、 8 5 %、 8 5 . 1 %、 8 5 . 2 %、 8 5 . 3 %、 8 5 . 4 %、 8 5 . 5 %、 8 5 .
6 %、 8 5 . 7 %、 8 5 . 8 %、 8 5 . 9 %、 8 6 %、 8 6 . 1 %、 8 6 . 2 %、 8 6 .
3 %、 8 6 . 4 %、 8 6 . 5 %、 8 6 . 6 %、 8 6 . 7 %、 8 6 . 8 %、 8 6 . 9 %、 8
7 %、 8 7 . 1 %、 8 7 . 2 %、 8 7 . 3 %、 8 7 . 4 %、 8 7 . 5 %、 8 7 . 6 %、 8
7 . 7 %、 8 7 . 8 %、 8 7 . 9 %、 8 8 %、 8 8 . 1 %、 8 8 . 2 %、 8 8 . 3 %、 8
8 . 4 %、 8 8 . 5 %、 8 8 . 6 %、 8 8 . 7 %、 8 8 . 8 %、 8 8 . 9 %、 8 9 %、 8
9
、 8 9 . 1 %、 8 9 . 2 %、 8 9 . 3 %、 8 9 . 4 %、 8 9 . 5 %、 8 9 . 6 %、 8 9 . 7 %、 40
8 9 . 8 %、 8 9 . 9 %、 9 0 %、 9 0 . 1 %、 9 0 . 2 %、 9 0 . 3 %、 9 0 . 4 %、
9 0 . 5 %、 9 0 . 6 %、 9 0 . 7 %、 9 0 . 8 %、 9 0 . 9 %、 9 1 %、 9 1 . 1 %、
9 1 . 2 %、 9 1 . 3 %、 9 1 . 4 %、 9 1 . 5 %、 9 1 . 6 %、 9 1 . 7 %、 9 1 . 8
%、 9 1 . 9 %、 9 2 %、 9 2 . 1 %、 9 2 . 2 %、 9 2 . 3 %、 9 2 . 4 %、 9 2 . 5
%、 9 2 . 6 %、 9 2 . 7 %、 9 2 . 8 %、 9 2 . 9 %、 9 3 %、 9 3 . 1 %、 9 3 . 2
%、 9 3 . 3 %、 9 3 . 4 %、 9 3 . 5 %、 9 3 . 6 %、 9 3 . 7 %、 9 3 . 8 %、 9 3
、 9 3 . 9 %、 9 4 %、 9 4 . 1 %、 9 4 . 2 %、 9 4 . 3 %、 9 4 . 4 %、 9 4 . 5 %、 9 4
、 9 4 . 6 %、 9 4 . 7 %、 9 4 . 8 %、 9 4 . 9 %、 9 5 %、 9 5 . 1 %、 9 5 . 2 %、 9 5
、 9 5 . 3 %、 9 5 . 4 %、 9 5 . 5 %、 9 5 . 6 %、 9 5 . 7 %、 9 5 . 8 %、 9 5 . 9 %、
9 6 %、 9 6 . 1 %、 9 6 . 2 %、 9 6 . 3 %、 9 6 . 4 %、 9 6 . 5 %、 9 6 . 6 %、 50

96.7%、96.8%、96.9%、97%、97.1%、97.2%、97.3%、97.4%、97.5%、97.6%、97.7%、97.8%、97.9%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、100%) が標的抗原 (例えば、標的抗原、第1の標的抗原、または第2の標的抗原) を発現しないと判定することを更に含み得る。

【0168】

本明細書において提供される方法は、腫瘍または腫瘍微小環境内の腫瘍細胞の少なくともサブセット (例えば、少なくとも0.1%~1%、1%~5%、1%~10%、5%~10%、10%~15%、10%~20%、15%~20%、15%~25%、20%~25%、25%~30%、20%~30%、25%~35%、30%~35%、30%~40%、35%~40%、40%~45%、40%~50%、45%~50%、50%~55%、50%~60%、55%~60%、60%~65%、60%~70%、65%~70%、65%~75%、70%~75%、70%~80%、75%~85%、75%~80%、80%~90%、85%~90%、85%~95%、90%~95%、90%~100%、または95%~100%) が標的抗原 (例えば、標的抗原、第1の標的抗原、または第2の標的抗原) を発現しないと判定することを更に含み得る。

【0169】

本発明の方法は、腫瘍微小環境内の一部の細胞が標的抗原を発現するか、または標的抗原を発現すると予測される場合に、腫瘍が標的抗原を発現しない (例えば、100%の腫瘍が、標的抗原を発現しないか、または標的抗原を発現すると予測されない) 対象に対して利用され得ることが当業者によって理解されるであろう。

【0170】

幾つかの態様では、腫瘍を有する対象のがんを処置し、対象における腫瘍内の腫瘍細胞の殺傷を誘発もしくはもたらし、及び／または対象における腫瘍内の腫瘍細胞に対するT細胞活性化を誘発する方法であって、当該方法が、第1の標的抗原に特異的な抗原結合領域及びCD28タンパク質に特異的な抗原結合領域を有する第1の多重特異性の抗原結合分子、ならびに第2の標的抗原に特異的な抗原結合領域及びCD3タンパク質に特異的な抗原結合領域を有する第2の多重特異性の抗原結合分子を当該対象に投与することを含み、当該第1の標的抗原が当該第2の標的抗原と同じ抗原ではない、当該方法が本明細書において提供される。例えば、第1の標的抗原及び第2の標的抗原の両方が表2に列挙される抗原から選択され得、第1の標的抗原及び第2の標的抗原は、同じ抗原であってはならない。

【0171】

幾つかの実施形態では、第1または第2の多重特異性の抗原結合分子は、二重特異性T細胞エンゲージャーである。幾つかの実施形態では、第1または第2の多重特異性の抗原結合分子は、二重特異性抗体断片、例えば、二重特異性Tエンゲージング抗体 (BiTE)、二重親和性再標的化分子 (DART)、またはタンデムダイアボディ (TandAb) である。

【0172】

従って、ある特定の実施形態では、本明細書において開示される薬剤は、単独で使用され得るか、または別の種類の治療薬と共投与され得る。例えば、異なる治療薬は、同じ製剤として投与され得るか、または別個の製剤として同時にもしくは逐次的に投与され得る。ある特定の実施形態では、異なる治療薬は、互いに約1時間、約12時間、約24時間、約36時間、約48時間、約72時間、または1週間以内に投与され得る。従って、かかる処置を受ける対象は、異なる治療薬の併用効果から恩恵を受け得る。

【0173】

ある特定の実施形態では、約週4回、週2回、週1回、2週間毎に1回、3週間毎に1回、4週間毎に1回、5週間毎に1回、6週間毎に1回、8週間毎に1回、12週間毎に

10

20

30

40

50

1回の投与頻度で、または治療反応が達成される限り、より低い頻度で多重特異性の抗原結合分子を対象に投与することを含む方法が本明細書において提供される。

【0174】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される少なくとも1種の薬剤を薬学的に許容される担体と共に含有する組成物、例えば、医薬組成物が本明細書において提供される。一実施形態では、組成物は、本明細書に記載される複数（例えば、2種以上、3種以上、4種以上、または5種以上）の薬剤の組み合わせを含む。

【0175】

幾つかの実施形態では、医薬組成物は、局所または全身投与される。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、対象に存在する腫瘍または腫瘍微小環境に局所投与され得る。幾つかの実施形態では、薬剤または医薬組成物は、第2のがん治療剤と共に投与される。

【0176】

本明細書に記載される薬剤は、免疫療法が含まれる、任意の他のがん治療と共に投与され得る。追加のがん治療としては、免疫チェックポイント阻害が挙げられる。幾つかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイントタンパク質を阻害する。免疫チェックポイント阻害は、がん細胞が免疫応答を防止または下方調節するために形成し得るチェックポイントを阻害することを広く指す。免疫チェックポイントタンパク質の例は、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRPα (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HLA2、ブチロフィリン、A2aR、及びそれらの組み合わせである。免疫チェックポイント阻害剤は、センプリマブ (REGN2810)、ニボルマブ (BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538)、ペムブロリズマブ (MK-3475、SCH900475)、アテゾリズマブ (MPDL3280A、RG7446、RO5541267)、デュルバルマブ (MED14736、MED1-4736)、アベルマブ (MSB0010718C)、イピリムマブ (BMS-734016、IBI310、MDX-010)、SHR1210、シンチリマブ (IBI308)、スパルタリズマブ (PDR001)、チスレリズマブ (BGB-A317)、ピディリズマブ、BCD-100、トリパリマブ (JS001)、BAY1905254、ASP8374、PF-06801591、AMP-224、AB122、AK105、AMG404、BCD-100、BI754091、F520、HLX10、HX008、JTX-4014、LZM009、MED10680、MGA012、Sym021、TSR-042、PSB205、MGD019、MGD013、AK104、XmAb20717、RO7121661、CX-188、INCB086550、FS118、BCD-135、BGB-A333、CBT-502、CK-301、CS1001、FAZ053、HLX20、KN035、MDX-1105、MSB2311、SHR-1316、TG-1501、ZKAB001、INBRX-105、MCLA-145、KN046、M7824、LY3415244、INCB086550、CA-170、CX-072、ADU-1604、AGEN1181、AGEN1884、MK-1308、REGN4659、XmAb22841、ATOR-1015、PSB205、MGD019、AK104、XmAb20717、BMS-986249、トレメリムマブ、BMS-986258、BGB-A425、INCAGN02390、Sym023、JNJ61610588、BI754111、LAG525、MK-4280、REGN3767、Sym022、TSR-033、レマトリマブ、JTX-2011、MGD009、BMS-986207、OMP-313M32、MK-7684、またはTSR-022であり得る。

【0177】

追加のがん免疫療法としては、養子免疫療法、例えば、自家もしくは同種異系T細胞療法または自家もしくは同種異系CAR T細胞療法が挙げられる。養子免疫療法は、腫瘍

10

20

30

40

50

またはがん細胞に対する患者の免疫応答を高めるように設計された治療方法である。この方法は、個体からの免疫細胞の取り出し、エキスピボでのエフェクター細胞の形成、臨床的に適切な数への細胞の増殖、及び細胞の患者への再注入を含む。本明細書において、本明細書に開示される薬剤及びクラスⅠ MHC上に提示されるペプチド（例えば、がんペプチドまたは対象に特異的なペプチド）に特異的に結合するT細胞受容体を発現する同種異系または自家CTLの同時投与を含む方法が提供される。幾つかの実施形態では、CTLは、細胞バンクに由来するか、またはCTLが投与される対象に由来する。幾つかの実施形態では、MHCは、クラスⅠMHCである。幾つかの実施形態では、クラスⅠIMHCは、HLA-DMA、HLA-DOA、HLA-DPA、HLA-DQA、またはHLA-DRAであるα鎖ポリペプチドを有する。幾つかの実施形態では、クラスⅠIMHCは、HLA-DMB、HLA-DOB、HLA-DPB、HLA-DQB、またはHLA-DRBであるβ鎖ポリペプチドを有する。幾つかの実施形態では、CTLは、それらが対象に投与される前に細胞ライブラリーまたは細胞バンクに保存される。

10

【0178】

追加のがん治療は、細胞療法であり得る。本明細書で使用する場合、細胞療法としては、例えば、腫瘍浸潤リンパ球、改変されたTCRリンパ球、または改変されたCARリンパ球が挙げられる。本明細書において開示される方法は、T細胞療法及び任意の他の養子療法、例えば、ナチュラルキラー細胞またはマクロファージ療法による治療も含む。細胞療法は、従来のTIL療法におけるような未改変細胞、または遺伝子改変細胞を含有し得る。本明細書に含まれる方法は、細胞療法の細胞の腫瘍標的への標的化を達成するための当該技術分野において公知の任意の方法を含む。一例として、細胞療法は、キメラ抗原受容体(CAR)を含む細胞を含み得る。一本鎖抗体が使用され得、CARは共刺激ドメインも含有し得る。CAR細胞の標的は標的細胞の膜に存在し得るが、TCR改変は細胞内標的を利用し得る。

20

【0179】

一実施形態では、細胞療法は、T細胞、CD8+細胞、CD4+細胞、NK細胞、δ/γ T細胞、制御性T細胞、及び末梢血単核細胞からなる群から選択される種類の細胞を含む。別の実施形態では、TIL、T細胞、CD8+細胞、CD4+細胞、NK細胞、δ/γ T細胞、制御性T細胞、または末梢血単核細胞が、本明細書において開示されるような細胞療法を構成する。ある具体的な実施形態では、細胞療法は、T細胞を含む。本明細書で使用する場合、「腫瘍浸潤リンパ球」またはTILは、血流から離れ、腫瘍に遊走した白血球を指す。リンパ球は、B細胞、T細胞、及びナチュラルキラー細胞を含む3つの群に分類され得る。別の特定の実施形態では、細胞療法は、標的特異的キメラ抗原受容体または特に、選択されたT細胞受容体を用いて改変されているT細胞を含む。本明細書で使用する場合、「T細胞」としては、限定されるものではないが、CD4+ヘルパー細胞、CD8+細胞傷害性T細胞、及びγδ T細胞が含まれる、CD3+細胞が挙げられる。

30

【0180】

幾つかの実施形態では、T細胞は、対象のがんまたは腫瘍に特異的なペプチドを提示する抗原提示細胞(APC)と接触させられる。幾つかの実施形態では、APCは、B細胞、抗原提示T細胞、樹状細胞、または人工抗原提示細胞（例えば、aK562細胞）である。本方法において使用される樹状細胞は、患者試料からPBMCを採取し、それらをプラスチックに付着させることにより調製され得る。一般に、単球集団は固着し、他の全ての細胞は洗い落とされ得る。次いで、付着集団は、単球由来の樹状細胞を作製するために、IL-4及びGM-CSFを用いて分化される。これらの細胞は、（樹状細胞表面の重要な共刺激分子を上方調節する）IL-1β、IL-6、PGE-1、及びTNF-αの添加により成熟し得、次いで、本明細書において提供される1種以上のペプチドを形質導入される。幾つかの実施形態では、APCは、aK562細胞などの人工抗原提示細胞である。幾つかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、CD80、CD83、41BB-L、及び/またはCD86を発現するように遺伝子操作される。aK562細胞が含まれる例示的な人工抗原提示細胞は、米国特許公開第2003/0147869号に記載されて

40

50

おり、これは参照により本明細書に組み込まれる。抗原提示細胞を作製する例示的な方法は、WO 2013088114（その全体が本明細書に組み込まれる）に見出され得る。

【0181】

別の例示的な養子免疫療法プロトコールは、自家腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の投与を含む。TIL細胞は殺傷力が高い。TIL細胞は、固形腫瘍内のインビボで分化したエフェクター細胞である（がんの養子免疫療法のためのTIL細胞を作製するための方法を記載している米国特許第5,126,132号を参照のこと）。TIL細胞は、例えば、患者から腫瘍試料を取り出し、当該腫瘍試料に浸潤していたリンパ球を単離し、これらのTIL細胞をIL-2の存在下でエクスピボで増殖させ、細胞をIL-2と共に患者に再注入することにより作製され得る。

10

【0182】

追加のがん治療は、CAR-T細胞療法であり得る。キメラ抗原受容体（CAR）は、腫瘍関連表面抗原に対する抗体ベースの特異性を、T細胞受容体活性化細胞内ドメインと組み合わせた特異的な抗腫瘍細胞免疫活性を有する分子である（Eshhar, 1997, Cancer Immunol Immunother 45(3-4):131-136, Eshhar et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90(2):720-724, Bocker and Karjalainen, 1998, Adv Immunol 68:257-269）。これらのCARは、T細胞活性化及び共刺激シグナルを提供する細胞内ドメインに融合された一本鎖Fv（scFv）抗原特異的細胞外領域により、T細胞がMHC非依存的な一次活性化を達成するのを可能にする。第2世代及び第3世代CARは、CD28及び／またはCD137（4-1BB）細胞内活性化モチーフにより適切な共刺激シグナルも提供し、これは、種々の固形腫瘍及び白血病モデルにおいてサイトカイン分泌及び抗腫瘍活性を増強する（Ponthus, et al., 2004, J Clin Invest 114(12):1774-1781, Milone, et al., 2009, Mol Ther 17(8):1453-1464, Sadelain, et al., 2009, Curr Opin Immunol 21(2):215-223）。キメラ抗原受容体（CAR）T細胞療法は、患者の自家T細胞を遺伝子改変して、腫瘍抗原に特異的なCARを発現させ、続いて、エクスピボで細胞を増殖させ、患者に再注入して戻すことを含む。CARは、特異的なモノクローナル抗体由来の選択された一本鎖断片可変部分及び1つ以上のT細胞受容体細胞内シグナル伝達ドメインの融合タンパク質である。このT細胞の遺伝子改変は、ウイルスベースの遺伝子導入方法または非ウイルス法、例えば、DNAベースのトランスポゾン、CRISPR/Cas9技術、もしくはエレクトロポレーションによるインビトロで転写されたmRNAの直接導入のいずれかにより行われ得る。

20

30

【0183】

追加のがん治療は、ナチュラルキラー細胞療法であり得る。ナチュラルキラー（NK）細胞は、腫瘍細胞を標的として認識することができ、従って、がんの免疫療法に有用であり得る（Vivier et al., 2011, Science 331:44-49, Ruggeri et al., 2002, Science 295:2097-2100, Cooley et al., 2010, Blood 116:2411-2419, Miller et al., 2005, Blood 105:3051-3057, Rubnitz et al., 2010, J Clin Oncol. 28:955-959）。様々な種類のがんを有する患者を処置するために、NK細胞の注入が使用されてきた（Vivier et al., 2011, Science 331:44-49, Caligiuri, 2008, Blood 112(3):461-469, Ruggeri et al., 2002, Science 295:2097-2100, Miller et al., 2005, Blood 105:3051-3057）。増殖させていないNK細胞の抗腫瘍能力より高い抗腫瘍能力を示す多量のヒトNK細胞を得ることを可能にする方法が利用可能である（米国特許第7,435,596号、Imai et al., 2005, Blood 106:376-83, Fujisaki

40

50

et al., 2009, Cancer Res. 69:4010-4017、Choe et al., 2010, Clin Cancer Res. 16:3901-3909を参照のこと）。初代末梢血単核細胞（PBMC）から増殖させたNK細胞が本明細書に含まれる。キメラ抗原受容体または他の改変を含むNK細胞も本明細書に含まれる。

【0184】

追加のがん療法は、マクロファージ細胞療法であり得る。幾つかの実施形態では、細胞療法は、エクスピボで増殖させた細胞傷害性マクロファージを含む。マクロファージ細胞は、腫瘍細胞を標的として認識することができ、従って、がんの免疫療法に有用であり得る（Andreessen R, Hennemann B, Krause SW. Adoptive immunotherapy of cancer using monocyte-derived macrophages: rationale, current status, and perspectives. J Leukoc Biol. 1998 Oct; 64 (4): 419-26）。マクロファージは、強力な免疫エフェクター細胞であり、その機能的可塑性は、異なる状況において抗腫瘍機能及び腫瘍促進性機能をもたらし、この可塑性が、腫瘍関連マクロファージを枯渇または再分化させるための顕著な努力に結びついている。あるいは、幾つかの実施形態では、マクロファージは、例えば、エクスピボでの遺伝子改変後に、養子移入される（Anderson NR, Minutolo NG, Gill S, Klichinsky M. Macrophage-Based Approaches for Cancer Immunotherapy. Cancer Res. 2021 Mar 1; 81 (5): 1201-1208）。

10

20

【0185】

また本明細書において、対象からT細胞を含む試料を採取し、当該試料から細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を単離し、エクスピボでCTLを増殖させ、増殖させたCTLを少なくとも1種の薬剤（例えば、本明細書において開示される任意の薬剤）と共に対象に投与することにより、当該対象のがんを処置する方法も提供される。細胞傷害性T細胞は、腫瘍浸潤リンパ球であり得る。CTLを増殖させることは、CTLをがん特異的または腫瘍特異的抗原を発現する抗原提示細胞（APC）と接触させて、抗原特異的CTLを作製することを含み得る。幾つかの実施形態では、T細胞または単離されたCTLを含む試料は、対象への投与前に刺激される。本方法は、対象に投与前に、CTLを抗CD3モノクローナル抗体（OKT3）と接触させることを更に含み得る。他の実施形態では、本方法は、対象への投与前に、CTLをヒトインターロイキン（IL）-2と接触させることを更に含む。

30

【0186】

追加のがん治療としては、免疫細胞の任意の公知の刺激剤も挙げられ、かかる薬剤としては、例えば、かかる免疫細胞の増殖、増大、または活性化を誘発するものが挙げられる。例示的な刺激方法は、刺激性サイトカイン、例えば、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、及びIL-21の投与を含む。

【0187】

幾つかの実施形態では、対象は、薬剤の投与前に化学療法剤を投与されている。対象は、化学療法剤に対する抵抗性を示し得る。対象は、本明細書において開示される追加のがん治療の投与に続いてまたはそれと同時に化学療法薬を投与され得る。化学療法薬としては、アルキル化剤、例えば、チオテパ及びシクロホスファミド（Cytosan（商標））；アルキルスルホン酸塩、例えば、ブスルファン、インプロスルファン、及びピボスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ、及びウレドパ；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、及びトリメチロールメラミンが含まれる、エミレルミン（emylerumine）及びメミラメラミン（memyllamelamine）；アセトゲニン（特にプラタシン及びプラタシノン）；カンプトテシン（合成類似体のトポテカンが含まれる）；ブリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（その合成類似体であるアドゼレシ

40

50

ン、カルゼレシン、及びビセレシンが含まれる)；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体、KW-2189、及びCBI-TMIが含まれる）；エロイテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノブエンピキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；抗生物質、例えば、エンジン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシン γ 1及びカリケアマイシン ϕ 1）；ジネマイシンAが含まれるジネマイシン；ビスホスホネート、例えば、クロドロネート；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモフォア及び関連するクロモプロテイン系エンジン抗生物質クロモフォア、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン（carabycin）、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ- ϵ -ノルロイシン、ドキシソルビシン（Adramycin（商標））（モルホリノドキシソルビシン、シアノモルホリノドキシソルビシン、2-ピロリノドキシソルビシン、及びデオキシドキシソルビシンが含まれる）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えば、マイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromicin）、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；代謝拮抗薬、例えば、メトトレキサート及び5-フルオロウラシル（5-FU）；葉酸類似体、例えば、デモプテリン（demopterin）、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート；プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充薬、例えば、フォリン酸；アセグラトン；アルドホスファミド配糖体；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ヘストラブシル；ビスアントレン；エダトラキサート（edatraxate）；デフォファミン（defofamine）；デメコルシン；ジアジクオン；エルホルミチン（elformthine）；エリプチニウムアセテート；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；メイタンシノイド、例えば、マイタンシン及びアンサマイトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン、PSK（商標）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特に、T-2毒素、ベラクリンA（verracurin A）、ロリジンA、及びアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン（gacytosine）；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセル（Taxol（登録商標）、Bristol Meyers Squibb Oncology, Princeton, N. J.）及びドセタキセル（Taxotere（商標）、Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France）；クロラムブシル、ゲムシタビン（Gemzar（商標））；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金類似体、例えば、シスプラチン及びカルボプラチン；ビンブラスチン；白金；エト

10

20

30

40

50

ボシド (VP-16) ; イホスファミド ; ミトキサントロン ; ビンクリスチン ; ビノレリン (Navelbine (商標)) ; ノバントロン ; テニボシド ; エダトレキサート ; ダウノマイシン ; アミノプテリン ; ゼローダ ; イバンドロネート ; CPT-11 ; トポイソメラーゼ阻害剤 RFS2000 ; ジフルオロメチルオルニチン (DMFO) ; レチノイド、例えば、レチノイン酸 ; カペシタビン ; ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤、例えば、タモキシフェン (Nolvadex (商標)) が含まれる) 、ラロキシフェン、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、及びトレミフェン (Fareston (商標)) が含まれる、抗エストロゲン剤及び選択的エストロゲン受容体調節薬 (SERM) ; 副腎内のエストロゲン産生を調節するアロマターゼ酵素の阻害剤、例えば、4 (5) -イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール (Megace (商標)) 、エキセメスタン、ホルメスタイン、ファドロゾール、ボロゾール (Rivisor (商標)) 、レトロゾール (Femara (商標)) 、及びアナストロゾール (Arimidex (商標)) ; 抗アンドロゲン剤、例えば、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリン ; ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体も「化学療法薬」の定義に含まれる。

10

【0188】

以下で詳細に記載されるように、本明細書において開示される医薬組成物及び／または薬剤は、固体または液体形態での投与用に特別に製剤化され得、これには、以下に適したものが含まれる：(1) 経口投与、例えば、水薬 (水溶液または非水溶液または懸濁液) 、錠剤、例えば、口腔吸収、舌下吸収、及び全身性吸収を標的とするもの、巨丸剤、粉末、顆粒、舌に適用するためのペースト ; または (2) 非経口投与、例えば、皮下、筋肉内、静脈内、クモ膜下腔内、脳内、もしくは硬膜外注射による非経口投与、例えば、無菌の溶液もしくは懸濁液、もしくは持続放出製剤。医薬製剤または組成物を調製する方法は、本明細書に記載される薬剤を担体及び任意に1種以上の補助的成分と混合するステップを含む。一般に、製剤は、本明細書に記載される薬剤を、液体担体もしくは微粉化された固体担体またはその両方と均一かつ均質に混合し、次いで、必要に応じて、生成物を成形することにより調製される。

20

【0189】

本明細書において提供される医薬組成物は、適切な担体、賦形剤、及び改善された輸送、送達、耐久性などをもたらす他の薬剤と共に製剤化され得る。多数の適切な製剤が、全ての薬剤師に公知の以下の処方集において見出され得る：Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA。これらの製剤としては、例えば、散剤、ペースト、軟膏、ゼリー、ワックス、油剤、脂質、脂質 (カチオン性またはアニオン性) 含有小胞 (例えば、LIPOFECTIN (商標)、Life Technologies, Carlsbad, CA)、DNAコンジュゲート、無水吸収ペースト、水中油型及び油中水型エマルション、カーボワックスエマルション (emulsions carbowax) (様々な分子量のポリエチレングリコール)、半固形ゲル、及びカーボワックスを含有する半固形混合物が挙げられる。Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311も参照のこと。

30

40

【0190】

患者に投与される抗原結合分子の用量は、患者の年齢及びサイズ、標的疾患、状態、投与経路などに応じて異なり得る。

【0191】

様々な送達系が公知であり、本明細書において提供される医薬組成物を投与するために使用され得、例えば、リポソームへの封入、マイクロパーティクル、マイクロカプセル、

50

変異型ウイルスを発現することができる組換え細胞、受容体媒介エンドサイトーシスである（例えば、Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432を参照のこと）。導入方法としては、限定されるものではないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、及び経口経路が挙げられる。組成物は、任意の便利な経路、例えば、注入またはボーラス注射により、上皮または粘膜皮膚内層（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸管粘膜など）を通した吸収により投与され得、他の生物活性物質と共に投与され得る。投与は、全身投与または局所投与であり得る。

【0192】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される医薬組成物は、標準的な針及び注射器を用いて皮下または静脈内に送達され得る。更に、皮下送達に関して、ペン型送達デバイスは、本明細書において開示される医薬組成物の送達に容易に使用される。このようなペン型送達デバイスは、再使用可能であり得るか、またはディスポーザブルであり得る。再使用可能なペン型送達デバイスは、通常、医薬組成物を含有する交換式カートリッジを利用する。カートリッジ内の全ての医薬組成物が投与され、カートリッジが空になると、空のカートリッジは容易に廃棄され得、医薬組成物を含有する新しいカートリッジと交換され得る。次いで、ペン型送達デバイスは再使用され得る。ディスポーザブルペン型送達デバイスでは、交換式カートリッジが存在しない。むしろ、ディスポーザブルペン型送達デバイスは、デバイス内のリザーバーに収容される医薬組成物が予め充填された状態で製造されている。医薬組成物が出されてリザーバーが空にされると、デバイス全体が廃棄される。

【0193】

多数の再使用可能なペン型自動注入送達デバイスが本明細書において開示される医薬組成物の皮下送達に使用される。例としては、限定されるものではないが、ほんの数例を挙げると、AUTOPEN（商標）（Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK）、DISETRONIC（商標）ペン（Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland）、HUMALOG MIX 75/25（商標）ペン、HUMALOG（商標）ペン、HUMALIN 70/30（商標）ペン（Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN）、NOVOPEN（商標）I、II、及びIII（Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark）、NOVOPEN JUNIOR（商標）（Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark）、BD（商標）ペン（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ）、OPTIPEN（商標）、OPTIPEN PRO（商標）、OPTIPEN STARLET（商標）、及びOPTICLICK（商標）（sanofi-aventis, Frankfurt, Germany）が挙げられる。本明細書において開示される医薬組成物の皮下送達に使用されるディスポーザブルペン型送達デバイスの例としては、限定されるものではないが、ほんの数例を挙げると、SOLOSTAR（商標）ペン（sanofi-aventis）、FLEXPEN（商標）（Novo Nordisk）、及びKWIKPEN（商標）（Eli Lilly）、SURECLICK（商標）自動注入器（Amgen, Thousand Oaks, CA）、PENLET（商標）（Hasselmeier, Stuttgart, Germany）、EPIPEN（Dey, L.P.）、及びHUMIRA（商標）ペン（Abbott Labs, Abbott Park, IL）が挙げられる。

【0194】

特定の状況では、医薬組成物は、制御放出システムで送達され得る。一実施形態では、ポンプが使用され得る（Langer（前出）；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201を参照のこと）。別の実施形態では、ポリマー材料が使用され得る。Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Press., Boca Raton, Floridaを参照のこと。

更に別の実施形態では、制御放出システムは、組成物の標的の近傍に配置され得、これにより、全身用量の一部しか必要としない（例えば、Goodson, 1984, Medical Applications of Controlled Release (前出), vol. 2, pp. 115-138を参照のこと）。他の制御放出システムは、Langer, 1990, Science 249:1527-1533による概説に記載されている。

【0195】

注射用製剤としては、静脈内、皮下、皮内、及び筋肉内注射、点滴注入などのための剤形が挙げられ得る。これらの注射用製剤は、公知の方法により調製され得る。例えば、注射用製剤は、例えば、上記の抗体またはその塩を、注射用に従来使用される無菌の水性媒体または油性媒体中に溶解、懸濁、または乳化させることにより調製され得る。注射用の水性媒体としては、例えば、生理食塩水、グルコース及び他の補助剤含有する等張液などがあり、これらは、適切な可溶化剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤〔例えば、ポリソルベート80、HCO-50（硬化ヒマシ油のポリオキシエチレン（50mol）付加物）〕などと組み合わせて使用され得る。油性媒体としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、これらは、可溶化剤、例えば、ベンジル安息香酸、ベンジルアルコールなどと組み合わせて使用され得る。従って、注射剤は、好ましくは適切なアンプル中に充填される。

【0196】

有利には、上記の経口または非経口使用のための医薬組成物は、活性成分の投与を適合させるのに適している単位用量で剤形に調製される。単位用量のかかる剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル、注射剤（アンプル）、坐剤などが挙げられる。

【0197】

本明細書に記載される薬剤は、複数用量、例えば、初期用量、二次用量、及び三次用量で投与され得る。用語「初期用量」、「二次用量」、及び「三次用量」は、本明細書において開示される抗原結合分子の投与の時間的順序を指す。従って、「初期用量」は処置レジメンの初めに投与される用量（「ベースライン用量」とも称される）であり、「二次用量」は初期用量の後に投与される用量であり、「三次用量」は二次用量の後に投与される用量である。初期、二次、及び三次用量は、全てが同量の本明細書に記載される治療薬を含有していてもよいが、通常、投与頻度の観点から互いに異なり得る。しかしながら、ある特定の実施形態では、初期、二次、及び／または三次用量に含有される抗原結合分子の量は、処置の過程で互いに変化する（例えば、必要に応じて上方または下方に調整される）。ある特定の実施形態では、2つ以上（例えば、2つ、3つ、4つ、または5つ）の用量が、処置レジメンの初めに「負荷用量」として投与され、続いて、後続用量（例えば、維持用量）がより低い頻度で投与される。

【0198】

本明細書において開示される一例示的实施形態では、二次用量及び／または三次用量の各々は、直前の投与の1～26週間後（例えば、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5週間、またはそれ以上後）に投与される。本明細書で使用する場合、語句「直前の投与」は、一連の複数回投与において、間に投与が介在することなく、その順番における他ならぬ次の用量の投与前に患者に投与される抗原結合分子の用量を意味する。

【0199】

本明細書において開示されるこの態様による方法は、本明細書に記載される治療薬の任意の数の二次用量及び／または三次用量を患者に投与することを含み得る。例えば、ある

特定の実施形態では、単回のみの二次用量が患者に投与される。他の実施形態では、2回以上（例えば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、またはそれ以上）の二次用量が患者に投与される。同様に、ある特定の実施形態では、単回のみの三次用量が患者に投与される。他の実施形態では、2回以上（例えば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、またはそれ以上）の三次用量が患者に投与される。

【0200】

複数回の二次用量を含む実施形態では、各二次用量は、他の二次用量と同じ頻度で投与され得る。例えば、各二次用量は、直前の投与の1～2週間後に患者に投与され得る。同様に、複数回の三次用量を含む実施形態では、各三次用量は他の三次用量と同じ頻度で投与され得る。例えば、各三次用量は、直前の投与の2～4週間後に患者に投与され得る。あるいは、二次用量及び／または三次用量が患者に投与される頻度は、処置レジメンの過程で変化し得る。また投与頻度は、臨床検査後に個々の患者の必要性に応じて、医師による処置の経過中に調整され得る。

【0201】

適応症

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、任意のがん性腫瘍または前がん性腫瘍が含まれる、任意のがんを処置するために使用され得る。本明細書において提供される方法及び組成物により処置され得るがんとしては、限定されるものではないが、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳房、結腸、食道、胃腸、歯肉、頭部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌、または子宮のがんが挙げられる。加えて、がんは、特に以下の組織型のものであり得るが、これらに限定されない：悪性新生物；がん腫；未分化癌；巨細胞癌及び紡錘細胞癌；小細胞癌；乳頭状癌；扁平上皮細胞癌；リンパ上皮癌；基底細胞癌；毛母癌；移行上皮癌；乳頭状移行上皮癌；腺癌；悪性ガストリノーマ；胆管癌；肝細胞癌；肝細胞癌と胆管癌の複合体；索状腺癌；腺様嚢胞癌；腺腫性ポリープの腺癌；家族性大腸ポリポーシス腺癌；固形癌；悪性カルチノイド腫瘍；気管支肺腺癌；乳頭状腺癌；色素嫌性癌；好酸性癌；好酸性腺癌；好塩基性癌；透明細胞腺癌；顆粒細胞癌；濾胞腺癌；乳頭状濾胞腺癌；非被包性硬化性癌；副腎皮質癌；類内膜癌；皮膚付属器癌；アポクリン腺癌；皮脂腺癌；耳道腺癌；粘表皮癌；嚢胞腺癌；乳頭状嚢胞腺癌；乳頭漿液性嚢胞腺癌；粘液性嚢胞腺癌；粘液腺癌；印環細胞癌；浸潤性乳管癌；髓様癌；小葉癌；炎症性癌；乳房パジェット病；腺房細胞癌；腺扁平上皮癌；扁平上皮化生腺癌；悪性胸腺腫；悪性卵巣間質腫；悪性テコーマ；悪性顆粒膜細胞腫瘍；及び悪性神経芽細胞腫；セルトリ細胞癌；悪性ライディッヒ細胞腫；悪性脂質細胞腫；悪性傍神経節腫；悪性乳房外傍神経節腫；褐色細胞腫；血管球血管肉腫；悪性黒色腫；無色素性黒色腫；表在拡大型黒色腫；巨大色素性母斑の悪性黒色腫；類上皮細胞黒色腫；悪性青色母斑；肉腫；線維肉腫；悪性線維性組織球腫；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；胞巣状横紋筋肉腫；間質肉腫；悪性混合腫瘍；ミューラー管混合腫瘍；腎芽腫；肝芽腫；癌肉腫；悪性間葉腫；悪性ブレンナー腫瘍；悪性葉状腫瘍；滑膜肉腫；悪性中皮腫；未分化胚細胞腫；胚性癌腫；悪性奇形腫；悪性卵巣甲状腺腫；絨毛癌；悪性中腎腫；血管肉腫；悪性血管内皮腫；カボジ肉腫；悪性血管外皮腫；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍骨性骨肉腫；軟骨肉腫；悪性軟骨芽細胞腫；間葉性軟骨肉腫；骨巨細胞腫；ユーイング肉腫；悪性歯原性腫瘍；エナメル上皮歯牙肉腫；悪性エナメル上皮腫；エナメル芽細胞性線維肉腫；悪性松果体腫；脊索腫；悪性神経膠腫；上衣腫；星状細胞腫；原形質星状細胞腫；線維性星状細胞腫；星状芽細胞腫；神経膠芽腫；乏突起神経膠腫；乏突起神経膠芽細胞腫；原始神経外胚葉性腫瘍；小脳肉腫；神経節芽細胞腫；神経芽細胞腫；網膜芽細胞腫；嗅覚神経原性腫瘍；悪性髄膜腫；神経線維肉腫；悪性神経鞘腫；悪性顆粒細胞腫；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキンリンパ腫；側肉芽腫；小リンパ球性悪性リンパ腫；びまん性大細胞型悪性リンパ腫；濾胞性悪性リンパ腫；菌状息肉症；他の特定の非ホジキンリンパ腫；悪性組織球症；多発性骨髄腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ性白血病；形質細胞性白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞性白血病；骨髄性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；肥満細胞性白血病；巨核芽球性白血

10

20

30

40

50

病；骨髓性肉腫；及び毛様細胞性白血病。

【0202】

本発明の組成物または方法は、CD20を発現するがんまたは腫瘍を処置するのに有用である。本発明の組成物または方法は、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、小リンパ球性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、縦隔原発B細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、またはバーキットリンパ腫が含まれる、B細胞悪性腫瘍を処置するのに有用である。幾つかの実施形態では、がんは、濾胞性リンパ腫である。幾つかの実施形態では、がんは、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である。

10

【0203】

幾つかの実施形態では、がんは、固形腫瘍を含む。幾つかの実施形態では、腫瘍は、腺癌、副腎腫瘍、肛門腫瘍、胆管腫瘍、膀胱腫瘍、骨腫瘍、血液由来の腫瘍、脳／CNS腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、子宮内膜腫瘍、食道腫瘍、ユーイング腫瘍、眼腫瘍、胆嚢腫瘍、胃腸腫瘍、腎臓腫瘍、喉頭腫瘍もしくは下咽頭腫瘍、肝腫瘍、肺腫瘍、中皮腫、多発性骨髄腫、筋腫瘍、鼻咽頭腫瘍、神経芽細胞腫、口腔腫瘍、骨肉腫、卵巣腫瘍、膵臓腫瘍、陰茎腫瘍、下垂体腫瘍、原発性腫瘍、前立腺腫瘍、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺腫瘍、軟部組織肉腫、黒色腫、転移性腫瘍、基底細胞癌、メルケル細胞腫瘍、精巣腫瘍、胸腺腫瘍、甲状腺腫瘍、子宮腫瘍、陰嚢腫瘍、外陰腫瘍、またはウィルムス腫瘍である。

20

【0204】

ある特定の実施形態では、処置される腫瘍は、特定の標的抗原を発現すると予想されない腫瘍である。本明細書において開示される例示的な標的抗原（例えば、例示的なTAA）の発現プロファイルは、当技術分野において公知であり、及び／または本明細書において提供される方法を使用して決定され得る。

【0205】

発現プロファイルは、公知であり、例えば、以下のデータベースにおいて見出され得る：TANTIGEN 2.0（ワールドワイドウェブ上のprojects.methilab.org/tadb/index.phpで見つかる；更なる詳細は、Zhang, G., Chitkushev, L., Olsen, L. R. et al. TANTIGEN 2.0: a knowledge base of tumor T cell antigens and epitopes. BMC Bioinformatics 22, 40 (2021) において見出され得る）、Cancer Epitope Database and Analysis Resource (CEDAR) (CEDAR)（更なる詳細は、Kosaloglu-Yalcin, Z. et al., The Cancer Epitope Database and Analysis Resource: A Blueprint for the Establishment of a New Bioinformatics Resource for Use by the Cancer Immunology Community, Frontiers in Immunology, 12 (2021) において見出され得る）、Human Protein Atlas（ワールドワイドウェブ上の[v17.proteinatlas.org/](https://www.proteinatlas.org/)で見つかる）、dbPepNeo（ワールドワイドウェブ上のbiostatistics.online/dbPepNeo/search.phpで見つかる）、及びcBioPortal（ワールドワイドウェブ上の[cbioportal.org](https://www.cbioportal.org/)で見つかる）。

30

40

【0206】

ある特定の例示的な標的抗原の例示的な発現プロファイルは、図18～26に示される。

【0207】

幾つかの実施形態では、腫瘍は、既知の発現プロファイル（例えば、本明細書において

50

開示される発現プロファイル)に基づいて、標的抗原を発現すると予測されない。幾つかの実施形態では、ある腫瘍型は、分析された腫瘍のうちの1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、10.5%、11%、11.5%、12%、12.5%、13%、13.5%、14%、14.5%、15%、15.5%、16%、16.5%、17%、17.5%、18%、18.5%、19%、19.5%、20%、20.5%、21%、21.5%、22%、22.5%、23%、23.5%、24%、24.5%、25%、25.5%、26%、26.5%、27%、27.5%、28%、28.5%、29%、29.5%、30%、30.5%、31%、31.5%、32%、32.5%、33%、33.5%、34%、34.5%、35%、35.5%、36%、36.5%、37%、37.5%、38%、38.5%、39%、39.5%、40%、40.5%、41%、41.5%、42%、42.5%、43%、43.5%、44%、44.5%、45%、45.5%、46%、46.5%、47%、47.5%、48%、48.5%、49%、49.5%、または50%未満が標的抗原を発現する場合、標的抗原を発現しないと予測される。

10

【0208】

原発性腫瘍は、腫瘍内だけでなく患者間で異なる抗原発現パターンを示す。同じ組織学的腫瘍型を有する患者間での抗原発現の変動性は、大きいものであり得る。従って、本明細書において開示される例示的な発現プロファイルは、本明細書において開示される方法を使用して処置され得る腫瘍型に関して有益であるが、本明細書において開示される方法を使用して処置され得るがんまたは腫瘍型に限定されない。幾つかの実施形態では、処置される腫瘍は、検査されており、腫瘍の抗原発現プロファイルが、腫瘍型が標的抗原を通常発現することを示すにもかかわらず、標的抗原を発現しないか、または標的抗原を発現しない腫瘍細胞のサブセットを含有する腫瘍であり得る。幾つかの実施形態では、標的抗原は、特定の腫瘍型において豊富であるが、患者における当該特定の腫瘍型の腫瘍細胞のサブセットにおいて標的抗原が発現されない。幾つかの実施形態では、標的抗原は、通常、種々の腫瘍型において発現されるが、患者の腫瘍細胞のサブセットにおいて標的抗原が発現されない。

20

【0209】

スクリーニング、診断、及び予後診断アッセイ

30

対象のがんにおけるがんまたは腫瘍細胞上の腫瘍関連抗原のレベルを同定するか、またはその量を定量化するためのスクリーニング、診断、及び／または予後診断アッセイも提供される。

【0210】

幾つかの実施形態では、腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットは、標的抗原を発現しない。本明細書において提供される方法は、腫瘍または腫瘍微小環境内の腫瘍細胞の少なくともサブセット（例えば、少なくとも0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4%、4.1%、4.2%、4.3%、4.4%、4.5%、4.6%、4.7%、4.8%、4.9%、5%、5.1%、5.2%、5.3%、5.4%、5.5%、5.6%、5.7%、5.8%、5.9%、6%、6.1%、6.2%、6.3%、6.4%、6.5%、6.6%、6.7%、6.8%、6.9%、7%、7.1%、7.2%、7.3%、7.4%、7.5%、7.6%、7.7%、7.8%、7.9%、8%、8.1%、8.2%、8.3%、8.4%、8.5%、8.6%、8.7%、8.8%、8.9%、9%、9.1%、9.2%、9.3%、9.4%、9.5%、9.6%、9.7%、9.8%、9.9%、10%、10.1%、10.2%、10.3%、10.4%、10.5%、10.6%、10.7%、10.8%、10.9%、11%、11.1%、11.2%、11.3%、11.4%、11.5%、11.6%、11.7%、11.8%、11.9%、12%、12.1%、12.2%、12.3%、12.4%、12.5%、12.6%、12.7%、12.8%、12.9%、13%、13.1%、13.2%、13.3%、13.4%、13.5%、13.6%、13.7%、13.8%、13.9%、14%、14.1%、14.2%、14.3%、14.4%、14.5%、14.6%、14.7%、14.8%、14.9%、15%、15.1%、15.2%、15.3%、15.4%、15.5%、15.6%、15.7%、15.8%、15.9%、16%、16.1%、16.2%、16.3%、16.4%、16.5%、16.6%、16.7%、16.8%、16.9%、17%、17.1%、17.2%、17.3%、17.4%、17.5%、17.6%、17.7%、17.8%、17.9%、18%、18.1%、18.2%、18.3%、18.4%、18.5%、18.6%、18.7%、18.8%、18.9%、19%、19.1%、19.2%、19.3%、19.4%、19.5%、19.6%、19.7%、19.8%、19.9%、20%、20.1%、20.2%、20.3%、20.4%、20.5%、20.6%、20.7%、20.8%、20.9%、21%、21.1%、21.2%、21.3%、21.4%、21.5%、21.6%、21.7%、21.8%、21.9%、22%、22.1%、22.2%、22.3%、22.4%、22.5%、22.6%、22.7%、22.8%、22.9%、23%、23.1%、23.2%、23.3%、23.4%、23.5%、23.6%、23.7%、23.8%、23.9%、24%、24.1%、24.2%、24.3%、24.4%、24.5%、24.6%、24.7%、24.8%、24.9%、25%、25.1%、25.2%、25.3%、25.4%、25.5%、25.6%、25.7%、25.8%、25.9%、26%、26.1%、26.2%、26.3%、26.4%、26.5%、26.6%、26.7%、26.8%、26.9%、27%、27.1%、27.2%、27.3%、27.4%、27.5%、27.6%、27.7%、27.8%、27.9%、28%、28.1%、28.2%、28.3%、28.4%、28.5%、28.6%、28.7%、28.8%、28.9%、29%、29.1%、29.2%、29.3%、29.4%、29.5%、29.6%、29.7%、29.8%、29.9%、30%、30.1%、30.2%、30.3%、30.4%、30.5%、30.6%、30.7%、30.8%、30.9%、31%、31.1%、31.2%、31.3%、31.4%、31.5%、31.6%、31.7%、31.8%、31.9%、32%、32.1%、32.2%、32.3%、32.4%、32.5%、32.6%、32.7%、32.8%、32.9%、33%、33.1%、33.2%、33.3%、33.4%、33.5%、33.6%、33.7%、33.8%、33.9%、34%、34.1%、34.2%、34.3%、34.4%、34.5%、34.6%、34.7%、34.8%、34.9%、35%、35.1%、35.2%、35.3%、35.4%、35.5%、35.6%、35.7%、35.8%、35.9%、36%、36.1%、36.2%、36.3%、36.4%、36.5%、36.6%、36.7%、36.8%、36.9%、37%、37.1%、37.2%、37.3%、37.4%、37.5%、37.6%、37.7%、37.8%、37.9%、38%、38.1%、38.2%、38.3%、38.4%、38.5%、38.6%、38.7%、38.8%、38.9%、39%、39.1%、39.2%、39.3%、39.4%、39.5%、39.6%、39.7%、39.8%、39.9%、40%、40.1%、40.2%、40.3%、40.4%、40.5%、40.6%、40.7%、40.8%、40.9%、41%、41.1%、41.2%、41.3%、41.4%、41.5%、41.6%、41.7%、41.8%、41.9%、42%、42.1%、42.2%、42.3%、42.4%、42.5%、42.6%、42.7%、42.8%、42.9%、43%、43.1%、43.2%、43.3%、43.4%、43.5%、43.6%、43.7%、43.8%、43.9%、44%、44.1%、44.2%、44.3%、44.4%、44.5%、44.6%、44.7%、44.8%、44.9%、45%、45.1%、45.2%、45.3%、45.4%、45.5%、45.6%、45.7%、45.8%、45.9%、46%、46.1%、46.2%、46.3%、46.4%、46.5%、46.6%、46.7%、46.8%、46.9%、47%、47.1%、47.2%、47.3%、47.4%、47.5%、47.6%、47.7%、47.8%、47.9%、48%、48.1%、48.2%、48.3%、48.4%、48.5%、48.6%、48.7%、48.8%、48.9%、49%、49.1%、49.2%、49.3%、49.4%、49.5%、49.6%、49.7%、49.8%、49.9%、50%、50.1%、50.2%、50.3%、50.4%、50.5%、50.6%、50.7%、50.8%、50.9%、51%、51.1%、51.2%、51.3%、51.4%、51.5%、51.6%、51.7%、51.8%、51.9%、52%、52.1%、52.2%、52.3%、52.4%、52.5%、52.6%、52.7%、52.8%、52.9%、53%、53.1%、53.2%、53.3%、53.4%、53.5%、53.6%、53.7%、53.8%、53.9%、54%、54.1%、54.2%、54.3%、54.4%、54.5%、54.6%、54.7%、54.8%、54.9%、55%、55.1%、55.2%、55.3%、55.4%、55.5%、55.6%、55.7%、55.8%、55.9%、56%、56.1%、56.2%、56.3%、56.4%、56.5%、56.6%、56.7%、56.8%、56.9%、57%、57.1%、57.2%、57.3%、57.4%、57.5%、57.6%、57.7%、57.8%、57.9%、58%、58.1%、58.2%、58.3%、58.4%、58.5%、58.6%、58.7%、58.8%、58.9%、59%、59.1%、59.2%、59.3%、59.4%、59.5%、59.6%、59.7%、59.8%、59.9%、60%、60.1%、60.2%、60.3%、60.4%、60.5%、60.6%、60.7%、60.8%、60.9%、61%、61.1%、61.2%、61.3%、61.4%、61.5%、61.6%、61.7%、61.8%、61.9%、62%、62.1%、62.2%、62.3%、62.4%、62.5%、62.6%、62.7%、62.8%、62.9%、63%、63.1%、63.2%、63.3%、63.4%、63.5%、63.6%、63.7%、63.8%、63.9%、64%、64.1%、64.2%、64.3%、64.4%、64.5%、64.6%、64.7%、64.8%、64.9%、65%、65.1%、65.2%、65.3%、65.4%、65.5%、65.6%、65.7%、65.8%、65.9%、66%、66.1%、66.2%、66.3%、66.4%、66.5%、66.6%、66.7%、66.8%、66.9%、67%、67.1%、67.2%、67.3%、67.4%、67.5%、67.6%、67.7%、67.8%、67.9%、68%、68.1%、68.2%、68.3%、68.4%、68.5%、68.6%、68.7%、68.8%、68.9%、69%、69.1%、69.2%、69.3%、69.4%、69.5%、69.6%、69.7%、69.8%、69.9%、70%、70.1%、70.2%、70.3%、70.4%、70.5%、70.6%、70.7%、70.8%、70.9%、71%、71.1%、71.2%、71.3%、71.4%、71.5%、71.6%、71.7%、71.8%、71.9%、72%、72.1%、72.2%、72.3%、72.4%、72.5%、72.6%、72.7%、72.8%、72.9%、73%、73.1%、73.2%、73.3%、73.4%、73.5%、73.6%、73.7%、73.8%、73.9%、74%、74.1%、74.2%、74.3%、74.4%、74.5%、74.6%、74.7%、74.8%、74.9%、75%、75.1%、75.2%、75.3%、75.4%、75.5%、75.6%、75.7%、75.8%、75.9%、76%、76.1%、76.2%、76.3%、76.4%、76.5%、76.6%、76.7%、76.8%、76.9%、77%、77.1%、77.2%、77.3%、77.4%、77.5%、77.6%、77.7%、77.8%、77.9%、78%、78.1%、78.2%、78.3%、78.4%、78.5%、78.6%、78.7%、78.8%、78.9%、79%、79.1%、79.2%、79.3%、79.4%、79.5%、79.6%、79.7%、79.8%、79.9%、80%、80.1%、80.2%、80.3%、80.4%、80.5%、80.6%、80.7%、80.8%、80.9%、81%、81.1%、81.2%、81.3%、81.4%、81.5%、81.6%、81.7%、81.8%、81.9%、82%、82.1%、82.2%、82.3%、82.4%、82.5%、82.6%、82.7%、82.8%、82.9%、83%、83.1%、83.2%、83.3%、83.4%、83.5%、83.6%、83.7%、83.8%、83.9%、84%、84.1%、84.2%、84.3%、84.4%、84.5%、84.6%、84.7%、84.8%、84.9%、85%、85.1%、85.2%、85.3%、85.4%、85.5%、85.6%、85.7%、85.8%、85.9%、86%、86.1%、86.2%、86.3%、86.4%、86.5%、86.6%、86.7%、86.8%、86.9%、87%、87.1%、87.2%、87.3%、87.4%、87.5%、87.6%、87.7%、87.8%、87.9%、88%、88.1%、88.2%、88.3%、88.4%、88.5%、88.6%、88.7%、88.8%、88.9%、89%、89.1%、89.2%、89.3%、89.4%、89.5%、89.6%、89.7%、89.8%、89.9%、90%、90.1%、90.2%、90.3%、90.4%、90.5%、90.6%、90.7%、90.8%、90.9%、91%、91.1%、91.2%、91.3%、91.4%、91.5%、91.6%、91.7%、91.8%、91.9%、92%、92.1%、92.2%、92.3%、92.4%、92.5%、92.6%、92.7%、92.8%、92.9%、93%、93.1%、93.2%、93.3%、93.4%、93.5%、93.6%、93.7%、93.8%、93.9%、94%、94.1%、94.2%、94.3%、94.4%、94.5%、94.6%、94.7%、94.8%、94.9%、95%、95.1%、95.2%、95.3%、95.4%、95.5%、95.6%、95.7%、95.8%、95.9%、96%、96.1%、96.2%、96.3%、96.4%、96.5%、96.6%、96.7%、96.8%、96.9%、97%、97.1%、97.2%、97.3%、97.4%、97.5%、97.6%、97.7%、97.8%、97.9%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、100%未満が標的抗原を発現する場合、標的抗原を発現しないと予測される。

40

50

. 1 %、1 1 . 2 %、1 1 . 3 %、1 1 . 4 %、1 1 . 5 %、1 1 . 6 %、1 1 . 7 %、
1 1 . 8 %、1 1 . 9 %、1 2 %、1 2 . 1 %、1 2 . 2 %、1 2 . 3 %、1 2 . 4 %、
1 2 . 5 %、1 2 . 6 %、1 2 . 7 %、1 2 . 8 %、1 2 . 9 %、1 3 %、1 3 . 1 %、
1 3 . 2 %、1 3 . 3 %、1 3 . 4 %、1 3 . 5 %、1 3 . 6 %、1 3 . 7 %、1 3 . 8
%、1 3 . 9 %、1 4 %、1 4 . 1 %、1 4 . 2 %、1 4 . 3 %、1 4 . 4 %、1 4 . 5
%、1 4 . 6 %、1 4 . 7 %、1 4 . 8 %、1 4 . 9 %、1 5 %、1 5 . 1 %、1 5 . 2
%、1 5 . 3 %、1 5 . 4 %、1 5 . 5 %、1 5 . 6 %、1 5 . 7 %、1 5 . 8 %、1 5
. 9 %、1 6 %、1 6 . 1 %、1 6 . 2 %、1 6 . 3 %、1 6 . 4 %、1 6 . 5 %、1 6
. 6 %、1 6 . 7 %、1 6 . 8 %、1 6 . 9 %、1 7 %、1 7 . 1 %、1 7 . 2 %、1 7
. 3 %、1 7 . 4 %、1 7 . 5 %、1 7 . 6 %、1 7 . 7 %、1 7 . 8 %、1 7 . 9 %、 10
1 8 %、1 8 . 1 %、1 8 . 2 %、1 8 . 3 %、1 8 . 4 %、1 8 . 5 %、1 8 . 6 %、
1 8 . 7 %、1 8 . 8 %、1 8 . 9 %、1 9 %、1 9 . 1 %、1 9 . 2 %、1 9 . 3 %、
1 9 . 4 %、1 9 . 5 %、1 9 . 6 %、1 9 . 7 %、1 9 . 8 %、1 9 . 9 %、2 0 %、
2 0 . 1 %、2 0 . 2 %、2 0 . 3 %、2 0 . 4 %、2 0 . 5 %、2 0 . 6 %、2 0 . 7
%、2 0 . 8 %、2 0 . 9 %、2 1 %、2 1 . 1 %、2 1 . 2 %、2 1 . 3 %、2 1 . 4
%、2 1 . 5 %、2 1 . 6 %、2 1 . 7 %、2 1 . 8 %、2 1 . 9 %、2 2 %、2 2 . 1
%、2 2 . 2 %、2 2 . 3 %、2 2 . 4 %、2 2 . 5 %、2 2 . 6 %、2 2 . 7 %、2 2
. 8 %、2 2 . 9 %、2 3 %、2 3 . 1 %、2 3 . 2 %、2 3 . 3 %、2 3 . 4 %、2 3
. 5 %、2 3 . 6 %、2 3 . 7 %、2 3 . 8 %、2 3 . 9 %、2 4 %、2 4 . 1 %、2 4
. 2 %、2 4 . 3 %、2 4 . 4 %、2 4 . 5 %、2 4 . 6 %、2 4 . 7 %、2 4 . 8 %、 20
2 4 . 9 %、2 5 %、2 5 . 1 %、2 5 . 2 %、2 5 . 3 %、2 5 . 4 %、2 5 . 5 %、
2 5 . 6 %、2 5 . 7 %、2 5 . 8 %、2 5 . 9 %、2 6 %、2 6 . 1 %、2 6 . 2 %、
2 6 . 3 %、2 6 . 4 %、2 6 . 5 %、2 6 . 6 %、2 6 . 7 %、2 6 . 8 %、2 6 . 9
%、2 7 %、2 7 . 1 %、2 7 . 2 %、2 7 . 3 %、2 7 . 4 %、2 7 . 5 %、2 7 . 6
%、2 7 . 7 %、2 7 . 8 %、2 7 . 9 %、2 8 %、2 8 . 1 %、2 8 . 2 %、2 8 . 3
%、2 8 . 4 %、2 8 . 5 %、2 8 . 6 %、2 8 . 7 %、2 8 . 8 %、2 8 . 9 %、2 9
%、2 9 . 1 %、2 9 . 2 %、2 9 . 3 %、2 9 . 4 %、2 9 . 5 %、2 9 . 6 %、2 9
. 7 %、2 9 . 8 %、2 9 . 9 %、3 0 %、3 0 . 1 %、3 0 . 2 %、3 0 . 3 %、3 0
. 4 %、3 0 . 5 %、3 0 . 6 %、3 0 . 7 %、3 0 . 8 %、3 0 . 9 %、3 1 %、3 1
. 1 %、3 1 . 2 %、3 1 . 3 %、3 1 . 4 %、3 1 . 5 %、3 1 . 6 %、3 1 . 7 %、 30
3 1 . 8 %、3 1 . 9 %、3 2 %、3 2 . 1 %、3 2 . 2 %、3 2 . 3 %、3 2 . 4 %、
3 2 . 5 %、3 2 . 6 %、3 2 . 7 %、3 2 . 8 %、3 2 . 9 %、3 3 %、3 3 . 1 %、
3 3 . 2 %、3 3 . 3 %、3 3 . 4 %、3 3 . 5 %、3 3 . 6 %、3 3 . 7 %、3 3 . 8
%、3 3 . 9 %、3 4 %、3 4 . 1 %、3 4 . 2 %、3 4 . 3 %、3 4 . 4 %、3 4 . 5
%、3 4 . 6 %、3 4 . 7 %、3 4 . 8 %、3 4 . 9 %、3 5 %、3 5 . 1 %、3 5 . 2
%、3 5 . 3 %、3 5 . 4 %、3 5 . 5 %、3 5 . 6 %、3 5 . 7 %、3 5 . 8 %、3 5
. 9 %、3 6 %、3 6 . 1 %、3 6 . 2 %、3 6 . 3 %、3 6 . 4 %、3 6 . 5 %、3 6
. 6 %、3 6 . 7 %、3 6 . 8 %、3 6 . 9 %、3 7 %、3 7 . 1 %、3 7 . 2 %、3 7
. 3 %、3 7 . 4 %、3 7 . 5 %、3 7 . 6 %、3 7 . 7 %、3 7 . 8 %、3 7 . 9 %、
3 8 %、3 8 . 1 %、3 8 . 2 %、3 8 . 3 %、3 8 . 4 %、3 8 . 5 %、3 8 . 6 %、 40
3 8 . 7 %、3 8 . 8 %、3 8 . 9 %、3 9 %、3 9 . 1 %、3 9 . 2 %、3 9 . 3 %、
3 9 . 4 %、3 9 . 5 %、3 9 . 6 %、3 9 . 7 %、3 9 . 8 %、3 9 . 9 %、4 0 %、
4 0 . 1 %、4 0 . 2 %、4 0 . 3 %、4 0 . 4 %、4 0 . 5 %、4 0 . 6 %、4 0 . 7
%、4 0 . 8 %、4 0 . 9 %、4 1 %、4 1 . 1 %、4 1 . 2 %、4 1 . 3 %、4 1 . 4
%、4 1 . 5 %、4 1 . 6 %、4 1 . 7 %、4 1 . 8 %、4 1 . 9 %、4 2 %、4 2 . 1
%、4 2 . 2 %、4 2 . 3 %、4 2 . 4 %、4 2 . 5 %、4 2 . 6 %、4 2 . 7 %、4 2
. 8 %、4 2 . 9 %、4 3 %、4 3 . 1 %、4 3 . 2 %、4 3 . 3 %、4 3 . 4 %、4 3
. 5 %、4 3 . 6 %、4 3 . 7 %、4 3 . 8 %、4 3 . 9 %、4 4 %、4 4 . 1 %、4 4
. 2 %、4 4 . 3 %、4 4 . 4 %、4 4 . 5 %、4 4 . 6 %、4 4 . 7 %、4 4 . 8 %、
4 4 . 9 %、4 5 %、4 5 . 1 %、4 5 . 2 %、4 5 . 3 %、4 5 . 4 %、4 5 . 5 %、 50

45.6%、45.7%、45.8%、45.9%、46%、46.1%、46.2%、
46.3%、46.4%、46.5%、46.6%、46.7%、46.8%、46.9
%、47%、47.1%、47.2%、47.3%、47.4%、47.5%、47.6
%、47.7%、47.8%、47.9%、48%、48.1%、48.2%、48.3
%、48.4%、48.5%、48.6%、48.7%、48.8%、48.9%、49
%、49.1%、49.2%、49.3%、49.4%、49.5%、49.6%、49
.7%、49.8%、49.9%、50%、50.1%、50.2%、50.3%、50
.4%、50.5%、50.6%、50.7%、50.8%、50.9%、51%、51
.1%、51.2%、51.3%、51.4%、51.5%、51.6%、51.7%、
51.8%、51.9%、52%、52.1%、52.2%、52.3%、52.4%、
52.5%、52.6%、52.7%、52.8%、52.9%、53%、53.1%、
53.2%、53.3%、53.4%、53.5%、53.6%、53.7%、53.8
%、53.9%、54%、54.1%、54.2%、54.3%、54.4%、54.5
%、54.6%、54.7%、54.8%、54.9%、55%、55.1%、55.2
%、55.3%、55.4%、55.5%、55.6%、55.7%、55.8%、55
.9%、56%、56.1%、56.2%、56.3%、56.4%、56.5%、56
.6%、56.7%、56.8%、56.9%、57%、57.1%、57.2%、57
.3%、57.4%、57.5%、57.6%、57.7%、57.8%、57.9%、
58%、58.1%、58.2%、58.3%、58.4%、58.5%、58.6%、
58.7%、58.8%、58.9%、59%、59.1%、59.2%、59.3%、
59.4%、59.5%、59.6%、59.7%、59.8%、59.9%、60%、
60.1%、60.2%、60.3%、60.4%、60.5%、60.6%、60.7
%、60.8%、60.9%、61%、61.1%、61.2%、61.3%、61.4
%、61.5%、61.6%、61.7%、61.8%、61.9%、62%、62.1
%、62.2%、62.3%、62.4%、62.5%、62.6%、62.7%、62
.8%、62.9%、63%、63.1%、63.2%、63.3%、63.4%、63
.5%、63.6%、63.7%、63.8%、63.9%、64%、64.1%、64
.2%、64.3%、64.4%、64.5%、64.6%、64.7%、64.8%、
64.9%、65%、65.1%、65.2%、65.3%、65.4%、65.5%、
65.6%、65.7%、65.8%、65.9%、66%、66.1%、66.2%、
66.3%、66.4%、66.5%、66.6%、66.7%、66.8%、66.9
%、67%、67.1%、67.2%、67.3%、67.4%、67.5%、67.6
%、67.7%、67.8%、67.9%、68%、68.1%、68.2%、68.3
%、68.4%、68.5%、68.6%、68.7%、68.8%、68.9%、69
%、69.1%、69.2%、69.3%、69.4%、69.5%、69.6%、69
.7%、69.8%、69.9%、70%、70.1%、70.2%、70.3%、70
.4%、70.5%、70.6%、70.7%、70.8%、70.9%、71%、71
.1%、71.2%、71.3%、71.4%、71.5%、71.6%、71.7%、
71.8%、71.9%、72%、72.1%、72.2%、72.3%、72.4%、
72.5%、72.6%、72.7%、72.8%、72.9%、73%、73.1%、
73.2%、73.3%、73.4%、73.5%、73.6%、73.7%、73.8
%、73.9%、74%、74.1%、74.2%、74.3%、74.4%、74.5
%、74.6%、74.7%、74.8%、74.9%、75%、75.1%、75.2
%、75.3%、75.4%、75.5%、75.6%、75.7%、75.8%、75
.9%、76%、76.1%、76.2%、76.3%、76.4%、76.5%、76
.6%、76.7%、76.8%、76.9%、77%、77.1%、77.2%、77
.3%、77.4%、77.5%、77.6%、77.7%、77.8%、77.9%、
78%、78.1%、78.2%、78.3%、78.4%、78.5%、78.6%、
78.7%、78.8%、78.9%、79%、79.1%、79.2%、79.3%、
79.4%、79.5%、79.6%、79.7%、79.8%、79.9%、80%、

10
20
30
40
50

80.1%、80.2%、80.3%、80.4%、80.5%、80.6%、80.7%、80.8%、80.9%、81%、81.1%、81.2%、81.3%、81.4%、81.5%、81.6%、81.7%、81.8%、81.9%、82%、82.1%、82.2%、82.3%、82.4%、82.5%、82.6%、82.7%、82.8%、82.9%、83%、83.1%、83.2%、83.3%、83.4%、83.5%、83.6%、83.7%、83.8%、83.9%、84%、84.1%、84.2%、84.3%、84.4%、84.5%、84.6%、84.7%、84.8%、84.9%、85%、85.1%、85.2%、85.3%、85.4%、85.5%、85.6%、85.7%、85.8%、85.9%、86%、86.1%、86.2%、86.3%、86.4%、86.5%、86.6%、86.7%、86.8%、86.9%、87%、87.1%、87.2%、87.3%、87.4%、87.5%、87.6%、87.7%、87.8%、87.9%、88%、88.1%、88.2%、88.3%、88.4%、88.5%、88.6%、88.7%、88.8%、88.9%、89%、89.1%、89.2%、89.3%、89.4%、89.5%、89.6%、89.7%、89.8%、89.9%、90%、90.1%、90.2%、90.3%、90.4%、90.5%、90.6%、90.7%、90.8%、90.9%、91%、91.1%、91.2%、91.3%、91.4%、91.5%、91.6%、91.7%、91.8%、91.9%、92%、92.1%、92.2%、92.3%、92.4%、92.5%、92.6%、92.7%、92.8%、92.9%、93%、93.1%、93.2%、93.3%、93.4%、93.5%、93.6%、93.7%、93.8%、93.9%、94%、94.1%、94.2%、94.3%、94.4%、94.5%、94.6%、94.7%、94.8%、94.9%、95%、95.1%、95.2%、95.3%、95.4%、95.5%、95.6%、95.7%、95.8%、95.9%、96%、96.1%、96.2%、96.3%、96.4%、96.5%、96.6%、96.7%、96.8%、96.9%、97%、97.1%、97.2%、97.3%、97.4%、97.5%、97.6%、97.7%、97.8%、97.9%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、100%)

10

20

30

が標的抗原を発現しないかどうかを判定または数値化すること、及び判定されたサブセット／百分率が標的抗原を発現しない場合、本明細書において開示される薬剤または複数の薬剤を対象に投与することを更に含み得る。本発明の方法は、腫瘍微小環境内の一部の細胞が標的抗原を発現するか、または標的抗原を発現すると予測される場合に、腫瘍が標的抗原を発現しない（例えば、約100%の腫瘍が、標的抗原を発現しないか、または標的抗原を発現すると予測されない）対象に対して利用され得ることが当業者によって理解されるであろう。

【0211】

本明細書において提供される方法は、腫瘍内の腫瘍細胞の少なくともサブセットが標的抗原を発現しないと判定することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、腫瘍細胞は、標的抗原の発現が検出レベル未満、またはシグナル対ノイズ比未満である場合、標的抗原を発現しない。

40

【0212】

本明細書において、対象のがんにおける腫瘍関連抗原の量またはレベルを測定または算出することにより対象をスクリーニングする方法が提供される。腫瘍関連抗原は、当該技術分野において公知の任意の方法により測定され得る。例えば、生体試料は、患者から採取され得る。試料は、当該技術分野において公知の任意の手段により採取され得る。試料は、がん、腫瘍、または腫瘍微小環境から直接採取されてもよい。用語「生体試料」は、対象から単離された組織、細胞、及び生体液、ならびに対象内に存在する組織、細胞、及び体液を包含することを意図する。

50

【0213】

幾つかの実施形態では、標的抗原を発現する腫瘍細胞の百分率の決定は、対象から採取された生体試料（例えば、腫瘍または腫瘍微小環境の生検材料）の標的抗原のレベルまたは発現を測定することにより決定され得る。幾つかの実施形態では、上記百分率は、次いで、対象における腫瘍及び／または腫瘍微小環境の標的抗原を発現する細胞の予測される全体での百分率を定量化するために外挿され得る。

【0214】

本開示により包含される検出法は、生体試料中の腫瘍関連抗原のmRNA、タンパク質、もしくはゲノムDNA、またはそれらの生物学的に活性な断片をインビトロ及びインビボで検出するために使用され得る。例えば、mRNAを検出するためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーション及びin situハイブリダイゼーションが挙げられる。タンパク質を検出するためのインビトロ技術としては、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、ウェスタンブロット、免疫沈降、及び免疫蛍光法が挙げられる。ゲノムDNAを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。更に、タンパク質を検出するためのインビボ技術としては、検出されるべき目的のタンパク質に対する標識抗体を対象に導入することが挙げられる。例えば、抗体は、放射性マーカーで標識され得、対象におけるその存在及び位置は、標準的なイメージング技術により検出され得る。

【0215】

本明細書に記載されるアッセイは、（例えば、生検後または生体試料の単離後の）細胞からの単離後に腫瘍関連抗原のレベルを測定することを含み得る。これらは、腫瘍関連抗原の遺伝子発現の公知の構成要素を使用して無細胞フォーマットで実施され得る。アッセイの特定の構成要素を固定化することが望ましくてもよく、かかる実施形態は、生体分子固定化のよく知られた適用を使用すること、例えば、マイクロタイタープレート、ビーズ、試験管、微量遠心チューブを、誘導体化可能な部分、例えば、融合タンパク質ドメイン、ビオチン化、抗体などと組み合わせて使用することによる恩恵を受け得る。

【0216】

対象が本明細書において開示される状態に罹患しているかどうか、このような状態を発症するリスクを有するかどうか、または本明細書において開示される薬剤の投与による恩恵を受け得るかどうかを決定するために、生体試料が当該対象から採取され得、当該生体試料は、当該生体試料中の腫瘍関連抗原タンパク質または当該腫瘍関連抗原をコードするポリヌクレオチド（例えば、mRNAまたはゲノムDNA）を検出することができる化合物または薬剤と接触させられ得る。mRNAまたはゲノムDNAを検出するための薬剤は、mRNAまたはゲノムDNAにハイブリダイズすることができる標識された核酸プローブを含み得る。核酸プローブは、例えば、腫瘍関連抗原をコードする核酸またはその一部に相補的な配列、例えば、少なくとも15、20、25、30、25、40、45、50、100、250、または500ヌクレオチドの長さであり、ストリンジェント条件下で目的のmRNAまたはゲノムDNAに特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドであり得る。本開示により包含される診断アッセイに使用される他の好適なプローブは、本明細書に記載されている。

【0217】

別の実施形態では、本方法は、対照の対象から対照生体試料を採取すること、生体試料中の目的のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在が検出されるように、対照試料をタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAを検出することができる化合物または薬剤と接触させること、及び対照試料中のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在を、対照試料中のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在と比較することを更に含む。

【0218】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるアッセイは、腫瘍関連抗原の遺伝子発現の公知の構成要素を使用して無細胞フォーマットで実施され得る。アッセイの特定の構成

10

20

30

40

50

要素を固定化することが望ましくてもよく、かかる実施形態は、生体分子固定化のよく知られた適用を使用すること、例えば、マイクロタイタープレート、ビーズ、試験管、微量遠心チューブを、誘導体化可能な部分、例えば、融合タンパク質ドメイン、ビオチン化、抗体などと組み合わせて使用することによる恩恵を受け得る。

【0219】

対象における腫瘍関連抗原の核酸の1つ以上の領域の分析は、対象が本明細書において開示される方法による恩恵を受けるかどうか、またはおそらく恩恵を受けそうかどうかを予測するのに有用であり得る。例えば、がんが不均一性がんと分類されるような、がんの一部における腫瘍関連抗原の検出は、対象が本明細書において開示される方法による恩恵を受けることを示す。同様に、対象における腫瘍関連抗原のゲノムコピー数の分析は、対象が本明細書において開示される方法による恩恵を受けるかどうかを予測するのに有用であり得る。幾つかの実施形態では、本開示により包含される方法は、対象由来の細胞試料における、腫瘍関連抗原をコードする遺伝子の1つ以上の多型領域の存在または不存在を検出することを含むことを特徴とし得る。

10

【0220】

他の検出法では、生体試料中の検出される核酸の少なくとも一部を最初に増幅することが必要とされる。増幅は、当該技術分野において公知の方法に従って、例えば、PCR及び／またはLCR (Wu and Wallace, (1989) Genomics 4:560を参照のこと) により実行され得る。一実施形態では、細胞のゲノムDNAが、2つのPCRプライマーに曝露され、必要とされる量の増幅DNAを生成するのに十分なサイクル数で増幅される。

20

【0221】

代替的な増幅方法としては、自律配列複製 (Guatelli, J. C. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅システム (Kwoh, D. Y. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q β -レプリカーゼ (Lizardi, P. M. et al., 1988, Bio/Technology 6:1197)、及び自律配列複製 (Guatelli et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:1874)、及び核酸配列ベース増幅 (NABSA)、または任意の他の核酸増幅方法が挙げられ、これに続いて、増幅された分子が当業者に周知の技術を使用して検出される。これらの検出スキームは、核酸分子が非常に少ない数で存在する場合に、かかる分子の検出に特に有用である。

30

【0222】

一実施形態では、当該技術分野において公知の種々のシーケンシング反応のいずれかが、試料配列の配列を対応する参照 (対照) 配列と比較することにより、生体試料中の核酸を直接配列決定するために使用され得る。例示的なシーケンシング反応としては、Maxam及びGilbert (Proc. Natl Acad Sci USA (1977) 74:560) またはSanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci 74:5463) により開発された技術に基づくものが挙げられる。主題のアッセイ (Biotechniques (1995) 19:448) を実行する場合に、質量分析による配列決定 (例えば、H. KosterによるDNA Sequencing by Mass Spectrometryという表題の米国特許第5,547,835号及び国際特許出願公開第WO94/16101号、H. Kosterによる「DNA Sequencing by Mass Spectrometry Via Exonuclease Degradation」という表題の米国特許第5,547,835号及び国際特許出願公開第WO94/21822号、ならびにH. KosterによるDNA Diagnostics Based on Mass Spectrometryという表題の米国特許第5,605,798号及び国際特許出願第PCT/US96/03651号、Cohen et al. (1996) Adv Chromatogr 36:127-162、ならびにGriffin et

40

50

al. (1993) Appl Biochem Biotechnol 38:147-159)を参照のこと)が含まれる、種々の自動化シーケンシング法のいずれかが利用され得ることも意図される。特定の実施形態では、核酸塩基のうちの1、2、または3つのみの出現頻度が、シーケンシング反応において決定される必要があることは当業者には明白である。例えば、1つのヌクレオチドのみが検出されるA追跡(A-track)などが実行され得る。

【0223】

腫瘍関連抗原に対して指向された抗体も疾患の診断及び予後診断において使用され得る。加えて、かかる診断方法は、かかるポリペプチドの発現レベルの異常、またはかかるポリペプチドの構造及び／または組織位置、細胞位置、もしくは細胞内位置における異常を検出するために使用され得る。構造の差異としては、例えば、変異型ポリペプチドの正常なポリペプチドと比較したサイズ、電気陰性度、または抗原性の差異が挙げられ得る。組織または細胞種由来の分析されるタンパク質は、限定されるものではないが、ウェスタンブロット分析が含まれる、当業者に周知の技術を使用して容易に検出または単離され得る。ウェスタンブロット分析を実行するための方法の詳細な説明については、Sambrook et al, 1989 (前出)の第18章を参照のこと。本明細書において用いられるタンパク質検出方法及び単離方法は、例えば、Harlow and Lane (Harlow, E. and Lane, D., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)に記載されるものなどであり得、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

【0224】

これは、例えば、蛍光標識抗体(下記を参照のこと)を光学顕微鏡による検出、フローサイトメトリーによる検出、または蛍光検出と組み合わせて用いた免疫蛍光法により達成され得る。更に、本開示による有用な抗体(またはその断片)が、免疫蛍光法または免疫電子顕微鏡法におけるように、腫瘍関連抗原の生体内原位置での検出のために組織学的検査に利用され得る。生体内原位置での検出は、対象から組織検体を取り出すこと、及び本明細書において開示される標識抗体をそれに適用することにより達成され得る。抗体(または断片)は、生体試料上に標識抗体(または断片)を重層することにより適用され得る。このような手順を使用することにより、腫瘍関連抗原の存在だけでなく、被検組織におけるその分布も測定することが可能である。当業者は、多種多様な組織学的方法のいずれか(例えば、染色手順)が、かかる生体内原位置での検出を達成するために改変され得ることを容易に理解するであろう。

30

【0225】

多くの場合、固相支持体または担体が、抗原または抗体に結合することができる支持体として使用される。周知の支持体または担体としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然及び修飾セルロース、ポリアクリルアミド、斑瀾岩、及び磁鉄鉱が挙げられる。担体の性質は、本開示により達成される目的のために、ある程度可溶性であり得るか、または不溶性であり得る。支持体材料は、結合された分子が抗原または抗体に結合することができる限り、実質的に任意の可能な構造配置を有し得る。従って、支持体の形状は、ビーズのような球状、または試験管の内表面もしくはロッドの外表面のような円柱状であり得る。あるいは、表面は、例えば、シート、試験ストリップなどの平面であり得る。支持体としては、限定されるものではないが、ポリスチレンビーズが挙げられる。当業者は、抗体もしくは抗原を結合させるのに適した多数の他の担体を知っているか、または定型的な実験を使用してそれを確認することができるであろう。

40

【0226】

抗体を標識するための1つの手段は、酵素に連結させ、酵素免疫測定法(EIA)に使用することによるものである(Voller, "The Enzyme Linked

50

Immunosorbent Assay (ELISA)”, Diagnostic Horizons 2:1-7, 1978, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD. Voller, et al., J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978)、Butler, Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981)、Maggio, (ed.) Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL, 1980、Ishikawa, et al., (eds.) Enzyme Immunoassay, Kagaku Shoin, Tokyo, 1981)。抗体に結合される酵素は、例えば、分光測光法、蛍光測定法、または視覚的手段により検出され得る化学部分を生じるような様式で、適切な基質、例えば、発色基質と反応する。抗体を検出可能に標識するために使用され得る酵素としては、限定されるものではないが、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、 Δ 5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコール脱水素酵素、 α -グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、及びアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。検出は、酵素の発色基質を用いる比色法により達成され得る。検出は、同様に調製された標準物質と比較した、基質の酵素反応の程度の目視比較によっても達成され得る。

10

20

30

40

50

【0227】

検出は、種々の他の免疫測定法のいずれかを使用することによっても達成され得る。例えば、抗体または抗体断片を放射活性標識することによって、フィンガープリント遺伝子の野生型または変異型ペプチドを放射免疫測定法 (RIA) を使用することにより検出することが可能である (例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照のこと)。放射性同位体は、ガンマカウンター、シンチレーションカウンターの使用などの手段により、またはオートラジオグラフィーにより検出され得る。

【0228】

蛍光化合物で抗体を標識することも可能である。蛍光標識抗体が適切な波長の光に曝露される場合、次いで、その存在が蛍光により検出され得る。最も一般的に使用される蛍光標識化合物には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド、及びフルオレスカミンがある。抗体は、 ^{152}Eu またはランタニド系列の他のものなどの蛍光放出金属を使用することによっても検出可能に標識され得る。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) などの金属キレート基を使用して抗体に結合され得る。

【0229】

抗体は、それを化学発光化合物に結合させることによっても検出可能に標識され得る。次いで、化学発光タグ付けされた抗体の存在は、化学反応の経過中に生じる発光の存在を検出することにより測定される。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマティックアクリジニウムエステル (theromatic acridinium ester)、イミダゾール、アクリジニウム塩、及びシュウ酸エステルである。

【0230】

同様に、生物発光化合物が、本開示により包含される抗体を標識するために使用され得る。生物発光は、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を増加させる生物学的系において見出される一種の化学発光である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することにより測定される。標識化のための重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフ

エラーゼ、及びエクオリンである。

【0231】

本明細書に記載される方法は、例えば、本明細書に記載される少なくとも1種のプローブまたはプライマー核酸を含む、包装済みの診断キット、例えば、上記のものを利用することにより、実行され得、当該診断キットは、例えば、対象が関心対象の特定のアレルバリエーションに関連する疾患を有するかどうか、またはそれを発症するリスクがあるかどうか決定するために、便利に使用され得る。上記の診断方法及び予後診断方法のいずれかにより分析される核酸試料は、対象の任意の細胞種または組織から採取され得る。例えば、対象の体液（例えば血液）は、公知の技術（例えば、静脈穿刺）により採取され得る。あるいは、核酸の検査は、乾燥試料（例えば、毛髪または皮膚）で実行され得る。胎児核酸試料は、Bianchiに属する国際特許出願第WO91/07660号に記載されるように、母体血液から採取され得る。あるいは、出生前検査を実行するために、羊膜細胞または絨毛膜絨毛が採取され得る。

10

【0232】

診断法は、生検または切除術により採取された対象組織の（固定及び／または凍結された）組織切片に対して生体内原位置で直接実行されてもよく、その結果、核酸の精製は必要とされない。核酸試薬は、かかる生体内原位置での方法のためのプローブ及び／またはプライマーとして使用され得る（例えば、Nuovo, G. J., 1992, PCR in situ hybridization: protocols and applications, Raven Press, NYを参照のこと）。

20

【0233】

1つの核酸配列の検出に主に焦点を置く方法に加えて、プロファイルがかかる検出スキームで評価されてもよい。フィンガープリントプロファイルは、例えば、ディファレンシャルディスプレイ法、ノーザン分析、及び／またはRT-PCRを利用することにより、生成され得る。

【0234】

また本明細書において、組織または腫瘍の標的抗原発現プロファイルにより対象における腫瘍細胞が標的抗原を発現するかどうかを予測する方法も提供される。例えば、対象が、がんと診断され得、組織または腫瘍の公知の発現プロファイルが、通常、標的抗原を発現しない場合、対象における腫瘍内の腫瘍細胞は、標的抗原を発現すると予測されない。更に、対象が、がんと診断され得、組織または腫瘍の公知の発現プロファイルが、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%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%未満、または75%未満が標的抗原を発現しないことを示す場合、対象における腫瘍内の腫瘍細胞は、標的抗原を発現すると予測されない。

30

40

【0235】

本開示は更に、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規薬剤に関する。従って、腫瘍関連抗原を発現しない腫瘍細胞の殺傷を誘発／軽減するか、または当該腫瘍細胞に対してT細胞を活性化させる、当該腫瘍関連抗原に特異的な抗体を同定するためのスクリーニング、診断、及び／または予後診断アッセイも提供される。

【0236】

一実施形態では、本開示は、腫瘍関連抗原の基質であるか、またはそれと相互作用する候補化合物または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。

【0237】

一実施形態では、アッセイは、がん細胞などの細胞が被検薬剤と接触させられ、試験化

50

合物の腫瘍細胞を殺傷する能力またはT細胞を活性化する能力が測定される細胞ベースのアッセイである。記載される機能を果たす被検薬剤の能力の測定は、本明細書に記載されるバイオマーカーのモニタリング、例えば、生検、バイオマーカー発現、物理アッセイなどにより達成され得る。

【0238】

抗体のその標的基質への結合を調節する被検薬剤の能力も測定され得る。被検薬剤の結合する能力の測定は、基質の抗体への結合が複合体内の標識された基質を検出することにより測定できるように、例えば、基質を放射性同位体または酵素標識と結合させることにより、達成され得る。標的基質は、複合体における基質への結合を調節する被検薬剤の能力をモニタリングするために、放射性同位体または酵素標識に結合されてもよい。標的タンパク質に結合する被検薬剤の能力の測定は、結合が複合体内の標識された薬剤を検出することにより測定できるように、例えば、薬剤を放射性同位体または酵素標識と結合させることにより、達成され得る。例えば、かかる薬剤は、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H を用いて直接的または間接的に標識され得、放射線放射の直接的計数またはシンチレーション計数により放射性同位体を検出され得る。薬剤は、例えば、ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼを用いて更に酵素標識され得、適切な基質の生成物への変換を同定することにより酵素標識が検出され得る。

10

【0239】

ある特定の実施形態では、薬剤の結合する能力は、反応体のいずれかを標識して、またはいずれも標識することなく測定される。例えば、マイクロフィジオメーターは、なんらの成分も標識することなく相互作用を検出するために使用され得る (McConnell, H. M. et al. (1992) Science 257:1906-1912)。本明細書で使用する場合、「マイクロフィジオメーター」(例えば、Cytosensor)は、光アドレス電位差センサー(LAPS)を使用して細胞がその環境を酸性化する速度を測定する分析機器である。

20

【0240】

一態様では、本明細書に記載されるような細胞ベースのシステムが、本明細書において開示されるがんを処置する薬剤を同定するために使用され得る。例えば、かかる細胞システムは、十分な濃度で、かつ曝露された細胞における疾患症状のこのような改善を誘発するのに十分な時間、薬剤に曝露され得る。曝露後、細胞は、疾患表現型のうちの1つ以上が、より正常な表現型またはより野生型の表現型に類似するように変化したかどうかを決定するために試験され得る。

30

【0241】

加えて、動物または動物ベースの疾患システム、例えば、本明細書に記載されるものがかかる薬剤を同定するために使用され得る。かかる動物モデルは、例えば、本明細書において開示されるがんを処置または予防するために、本明細書における腫瘍関連抗原または他の標的に結合するのに効果的であり得る薬物、医薬品、治療法、及び処置を同定するための試験用基材として使用され得る。

【実施例】

【0242】

実施例1：CD22に標的化されたCD28二重特異性抗体は、治療抵抗性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫モデルにおけるオドロネクスタマブの抗腫瘍効力を増強する

40

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)を有する多数の患者が、最先端の化学免疫療法による完全奏効を達成することができるが、再発性/治療抵抗性(r/r)疾患を有する患者は、通常、転帰が不良である。T細胞受容体/CD3複合体の活性化により「シグナル1」をもたらすCD20xCD3二重特異性抗体であるオドロネクスタマブは、第I相試験において高度に治療抵抗性のDLBCL患者に対して早期に有望な活性を示したが、全ての患者が完全奏効を達成するわけではなく、また多数が再発する。このことは、大きなアンメットメディカルニーズを意味する。この実施例では、T細胞上のCD28受容体に結合させることによる共刺激「シグナル2」の追加がオドロネクスタマブの活

50

性を増強することができるかどうか調査される。本明細書において開示されるデータは、CD22を発現する腫瘍細胞をCD28を発現するT細胞と架橋する二重特異性抗体であるREGN5837が、T細胞活性化及び細胞溶解機能を強化することによりオドロネクスタマブの活性を増強することを初めて実証する。ヒト免疫系を再現した動物を使用したDLBCL腫瘍の前臨床試験において、REGN5837は、オドロネクスタマブの抗腫瘍活性を促進し、再プログラム化可能な可塑的T細胞の腫瘍内増殖を誘発する一方で機能不全状態からそれさせる。REGN5837単独療法は、霊長類試験において活性を示し、毒性を示さず、オドロネクスタマブと組み合わせて投与される場合にT細胞活性化を増強する。加えて、非ホジキンリンパ腫（NHL）臨床試料の分析は、オドロネクスタマブ投与後のCD28⁺CD8⁺T細胞の増加を明らかにし、このことは、CD22×CD28抗体により標的とされ得る集団の存在を実証する。まとめると、これらのデータは、REGN5837が、前臨床NHLモデルにおいてオドロネクスタマブの抗腫瘍活性を増強し、これらの2つの二重特異性抗体の組み合わせが、r/r DLBCLの処置のための化学療法を使わない新規の手法を提供し得ることを実証する。

10

【0243】

癌免疫療法の分野における治療戦略は、抗腫瘍活性を増強するために、T細胞を腫瘍に再方向付けするための二重特異性抗体を使用することである。このことが、急性リンパ芽球性白血病の処置のためのCD19×CD3 T細胞エンゲージャーであるBlincyto、及び悪性腹水の処置のためのEpCAM×CD3二重特異性抗体であるRemovabの承認をもたらした。T細胞を再方向付けするこれらの治療薬は、一方の抗原結合断片（Fab）アームにより腫瘍抗原に、及び他方のFabアームによりT細胞活性化受容体に会合するように設計されている。オドロネクスタマブは、前臨床腫瘍モデルにおいてCD20を発現する細胞のT細胞により媒介される殺傷を効率的に誘発するCD20×CD3二重特異性抗体である。第1相試験の臨床データは、高度に治療抵抗性かつ再発性のB-NHLを有する患者において、管理可能な安全性と共に有望な活性を示す。しかしながら、多くの前治療が行われた患者は例外なく再発するため、高悪性度リンパ腫を有する患者に対する有効性を改善する余地がまだ存在する。最適なT細胞活性化のために、T細胞は、「シグナル1」をもたらすT細胞受容体複合体（TCR）の関与、及び「シグナル2」をもたらす共刺激受容体の更なる関与を必要とする。オドロネクスタマブは、CD3の架橋によってシグナル1を提供することによりT細胞を活性化するが、T細胞のエフェクター機能及び活性化の更なる増強が、共刺激シグナルの追加によりもたらされ得る。この研究では、CD22×CD28二重特異性抗体の追加が、オドロネクスタマブの抗腫瘍活性を増強することができるかどうか調査される。

20

30

【0244】

REGN5837またはCD22×CD28は、CD22を発現する細胞をCD28を発現するT細胞と架橋することによりCD22を発現する腫瘍（すなわちNHL）に対するT細胞応答を増強するように設計された、ヒンジ安定化ヒトIgG4ベースの抗体である。CD22は、シアル酸に結合する膜貫通タンパク質であり、正常B細胞及びDLBCL腫瘍などの悪性B細胞上に見出される。ヒトCD22の正確な役割は完全には明らかになっていないが、CD22は、B細胞抗原受容体のシグナル伝達、B細胞遊走、ならびに末梢B細胞の恒常性及び生存の維持を調節することが示唆されている。腫瘍細胞上のCD22をT細胞上のCD28と架橋させることにより、CD20×CD3より誘導されるT細胞活性化の増強に重要なCD28共刺激シグナルが伝達され得る。この研究では、REGN5837と組み合わせることにより、DLBCL腫瘍細胞に対するオドロネクスタマブの抗腫瘍活性の強力な増幅がインビトロ及びインビボの両方で達成され得ることが実証される。腫瘍内T細胞応答の特徴付けは、オドロネクスタマブと組み合わせたCD28の関与が、DLBCLの前臨床モデルにおいて治療的抗腫瘍効果をもたらすだけでなく、腫瘍内T細胞を増殖させ、再プログラム化可能なT細胞を誘導することを明らかにする。従って、これらのデータは、r/r DLBCL患者におけるREGN5837とオドロネクスタマブとの組み合わせの有望な臨床研究の支持を提供する。

40

50

【0245】

結果

CD28発現は、 r/r NHL患者においてベースライン時及びオドロネクスタマブ投与後に腫瘍内CD8⁺T細胞で検出される。

CD22は、B細胞白血病及びリンパ腫の処置のための十分に検証された腫瘍標的であり、DLBCL患者試料内で広範に発現するが、可変的に発現する（図7A～図7C）。加えて、未治療DLBCL患者切除試料から、CD22×CD28二重特異性抗体により標的とされ得るCD28⁺細胞の顕著な集団が観察された（図8A及び図8B）。オドロネクスタマブの用量設定第I相試験（ClinicalTrials.gov識別番号：NCT02290951）からのベースライン試料の分析は、このCD28発現が、腫瘍内CD8⁺T細胞で優先的に見られ、CD4⁺T細胞ではより程度が低いことを実証した（図1A及びB）。加えて、数は限られるが、オドロネクスタマブ投与前及び後の幾つかの対応する患者試料が、CD28⁺CD8⁺T細胞の存在について評価された。エフェクターメモリー分化を増強し、抗腫瘍活性を更に増強するためにREGN5837により標的とされ得る腫瘍内T細胞集団の持続と一致して、濾胞性リンパ腫及びDLBCL患者試料におけるCD8⁺CD28⁺T細胞の密度の特異的な増加が、オドロネクスタマブ治療開始の5週間後に観察された（図1C）。CD86及びより低い程度でCD80（CD28の2つのリガンド）もDLBCL患者切除試料において発現していたが、CD80及びCD86に対するより高い親和性を有し、CD28共刺激活性を抑止し得る共抑制分子CTLA4の発現が同時に観察された（図8A及び図8B）。従って、CD22×CD28二重特異性抗体の利用は、CD28の特異的な関与及びオドロネクスタマブ活性の強力な増強を可能にし得る。

【0246】

REGN5837は、インビトロでオドロネクスタマブにより媒介されるT細胞活性化及びエフェクター機能を増強する

オドロネクスタマブの細胞溶解活性及びT細胞活性化活性を増強するREGN5837の能力を評価するために、リンパ球を濃縮したヒト末梢血単核細胞（PBMC）を、単一薬剤としての漸増する用量のオドロネクスタマブ（4.8 fM～10 nM）、または一定濃度のREGN5837（77 pM～10 uMの範囲）の存在下でのオドロネクスタマブと共に、WSU-DLCL2標的細胞または高レベルのCD20及びCD22（図9B）を発現するDLBCL細胞と共培養した。二重特異性CD28は、TeGeneroのようなCD28スーパーアゴニストと異なり、シグナル1またはTCR/CD3複合体の関与の非存在下で共刺激活性をもたらすことができないため、REGN5837活性をオドロネクスタマブの存在下で分析した（図9A）。REGN5837による共刺激の適用は、濃度依存的様式（表6）で、WSU-DLCL2細胞のオドロネクスタマブにより媒介される細胞傷害性を増強し（図2A）、CD4⁺T細胞（図2B）及びCD8⁺T細胞（図2D）上の活性化マーカーCD25を上方調節し、CD4⁺T細胞（図2C）及びCD8⁺T細胞（図2E）の増殖を誘発した。

10

20

30

40

50

【表 5】

表 6：REGN5837 二重特異性抗体は、オドロネクスタマブにより媒介される T 細胞活性化及び細胞傷害性を増強する

[R5837]		1.00E-07	1.67E-08	2.78E-09	4.63E-10	7.72E-11	R5837なし
%細胞傷害性	EC50	8.53E-14	1.85E-13	3.98E-13	3.46E-13	8.37E-13	2.89E-12
	最大値	81.49	79.75	80.55	87.49	82.07	83.19
	倍率 (EC50)	33.9	15.7	7.3	8.3	3.5	1.0
CD4 T細胞活性化 (%CD25)	EC50	1.16E-13	8.70E-14	7.11E-14	1.46E-13	2.08E-13	9.17E-13
	最大値	94.14	95.64	94.22	91.92	91.68	92.35
	倍率 (EC50)	7.9	10.5	12.9	6.3	4.4	1.0
CD8 T細胞活性化 (%CD25)	EC50	6.32E-13	5.88E-13	2.68E-13	9.01E-13	1.64E-12	3.38E-12
	最大値	89	90.87	89.66	86.2	88.38	87.12
	倍率 (EC50)	5.3	5.7	12.6	3.8	2.1	1.0
CD4 T細胞増殖 (%分裂)	EC50	8.42E-13	9.31E-13	4.25E-13	1.25E-12	2.36E-12	1.63E-11
	最大値	54.72	54.09	54.79	52.06	44.73	38.67
	倍率 (EC50)	19.3	17.5	38.3	13.1	6.9	1.0
CD8 T細胞増殖 (%分裂)	EC50	1.55E-12	8.31E-13	7.09E-13	3.43E-12	8.36E-12	1.97E-11
	最大値	59.12	58.92	60.21	56.4	53.15	51.09
	倍率 (EC50)	12.7	23.7	27.8	5.7	2.4	1.0

【0247】

共培養物の上清の分析は、REGN5837 が、用量依存的様式（表 7）でオドロネクスタマブにより媒介されるサイトカイン放出も増加させた（図 2 F）ことを明らかにした。オドロネクスタマブ活性を増強する REGN5837 の能力は、B 細胞急性リンパ芽球性白血病（NALM6）細胞株及びバーキットリンパ腫（Raji CD80／Cd86 dko）細胞株を標的として用いて追加的に実証された（図 9 C）。

【表 6】

表 7：REGN5837 二重特異性抗体は、オドロネクスタマブ投与によるサイトカイン産生を増強する

	[R5837]	1.00E-07	1.67E-08	2.78E-09	4.63E-10	7.72E-11	R5837 なし
IL-2	EC50	1.66E-11	1.53E-11	1.28E-11	1.89E-11	3.77E-10	9.997E-10
	最大値(pg/ml)	2637	2793	2705	1560	935	775
	倍率 (最大値)	3.4	3.6	3.5	2.0	1.2	1.0
IL-4	EC50	2.81E-11	1.96E-11	5.18E-12	5.36E-11	3.89E-08	1.25E-10
	最大値(pg/ml)	79.32	75.35	63.24	70.29	116.3	36.17
	倍率 (最大値)	2.2	2.1	1.7	1.9	3.2	1.0
IL-6	EC50	5.13E-11	7.89E-12	2.68E-11	1.45E-12	1.61E-11	7.42E-11
	最大値(pg/ml)	366.2	303.8	367.1	246	210.3	189.8
	倍率 (最大値)	1.9	1.6	1.9	1.3	1.1	1.0
IL-10	EC50	3.54E-11	1.04E-10	2.43E-10	5.29E-11	3.34E-11	9.95E-11
	最大値(pg/ml)	527.7	682.5	835	633.3	449.9	511.8
	倍率 (最大値)	1.0	1.3	1.6	1.2	0.9	1.0
TNFa	EC50	5.03E-12	8.69E-13	3.45E-12	2.08E-03	1.62E-10	2.43E-10
	最大値(pg/ml)	235.5	129.2	170.3	NC	35.35	29.6
	倍率 (最大値)	8.0	4.4	5.8	NC	1.2	1.0
IFNg	EC50	1.17E-10	5.34E-11	2.00E-10	6.72E-11	6.57E-11	1.82E-10
	最大値(pg/ml)	525.3	536.8	693.1	348.4	166.5	205.5
	倍率 (最大値)	2.6	2.6	3.4	1.7	0.8	1.0
IL-17a	EC50	3.22E-10	1.11E-10	7.60E-11	4.63E-10	1.86E-10	2.50E-10
	最大値(pg/ml)	26.59	25.23	20.56	33.31	21.92	20.52
	倍率 (最大値)	1.3	1.2	1.0	1.6	1.1	1.0

10

20

【0248】

CD22 発現はDLBCL 患者試料内で変動的であり、腫瘍はCD22⁺及びCD22⁻腫瘍細胞の混合物を含有するため（図1A～C）、CD22⁺及びCD22⁻標的を殺傷するT細胞の能力を増強するREGN5837の能力も評価した。精製したT細胞を、CRISPRにより編集されたCD22欠損WSU-DLCL2細胞及びCD22野生型WSU-DLCL2細胞と共にインキュベートし、一定濃度のオドロネクスタマブ（5 pM）及び $4.63 \times 10^{-10} \sim 1.67 \times 10^{-8}$ Mの範囲のREGN5837で刺激した。T細胞とCD22⁺を発現する標的細胞及びREGN5837との培養は、オドロネクスタマブにより媒介される腫瘍細胞溶解を増強したが、T細胞とCD22を発現しない標的細胞との培養は、予想通り、細胞傷害性の増強をもたらさなかった（図2G）。しかしながら、T細胞と20～80%のCD22⁺標的からなる混合集団との培養は、REGN5837の用量依存的様式で、CD22⁺及びCD22⁻標的集団の両方の増強された殺傷（図2G）、ならびにCD4及びCD8 T細胞活性化の増強（図2H）をもたらした。CD22⁻標的細胞は、評価された最高濃度のREGN5837においてCD22⁺標的細胞と同じ規模で溶解されなかったが（4：1の比率で混合された場合に、REGN5837投与なしでの60%の生存と比較して、CD22⁺細胞のうちの11%生存対CD22⁻細胞のうちの21%生存）、CD22⁺標的の存在は、評価された最も低いCD22⁺/CD22⁻細胞の比率であってもCD22⁻細胞の殺傷を増強することができた。従って、これらのデータは、オドロネクスタマブのインビトロでの細胞傷害活性のREGN5837による増強が、DLBCL腫瘍細胞のCD22発現の変動性によって妨げられないことを実証する。

30

40

【0249】

REGN5837により媒介される共刺激は、異種DLBCL腫瘍モデルにおいてオドロネクスタマブの抗腫瘍効力を増強する

オドロネクスタマブの抗腫瘍活性をインビボで増強するREGN5837の能力を、単

50

独でのオドロネクスタマブが腫瘍排除をもたらすのに十分ではなかった異種D L B C L腫瘍であるW S U - D L C L 2腫瘍モデルで評価し、これにより、二重特異性C D 3抗体治療に対して完全奏効がない患者をモデル化した。漸増する用量のオドロネクスタマブにより、W S U - D L C L 2腫瘍モデルが最初はC D 2 0 x C D 3により媒介されるインビボでの殺傷による効果を示したが（図1 0 B及び図1 0 C）、この処置が持続的な腫瘍拒絶をもたらすことができず、高用量のオドロネクスタマブ（1 0 m g / k g）による処置にもかかわらず、全ての動物が最終的に腫瘍負荷に屈したことが明らかとなった（図1 0 B及び1 0 D）。従って、R E G N 5 8 3 7の追加が抗腫瘍活性を更に促進することができるかどうかを評価した（図3 A）。予想通りに、R E G N 5 8 3 7単独による予防処置は、腫瘍成長に対してなんらの効果も有さなかった（図3 B、C）。オドロネクスタマブ単独療法は、アイソタイプ対照で処置された動物と比較して、最初は腫瘍成長を抑制し（図3 B、C左）、生存優位性をもたらしたが（図3 C右）、全ての動物が最終的に腫瘍成長に屈した。しかしながら、R E G N 5 8 3 7のオドロネクスタマブとの組み合わせは抗腫瘍免疫を増強し、結果として、8 6 %（6 / 7）の動物がそれらの腫瘍を拒絶し（図3 B）、単独療法で処置された群と比較して動物の全生存期間を有意に延長した（図3 C右）。

10

【0 2 5 0】

C D 2 2 x C D 2 8により媒介される共刺激は、B細胞悪性腫瘍の前臨床モデルに対するC D 2 0 x C D 3抗腫瘍効力を増強する

併用療法がどのように抗腫瘍免疫を増強するかを調査するために、異なる処置における移植の2 6日後の腫瘍内T細胞応答の調節を評価した（図1 1 A）。この時点で、オドロネクスタマブによる処置は腫瘍体積を有意に減少させ、併用療法は腫瘍成長を更に抑制した（図1 1 B）。腫瘍内免疫サブセット（図3 D）の高度な次元削減解析は、二重特異性C D 3または併用療法に応答した特定の集団の濃縮及び枯渇を明らかにした。オドロネクスタマブによる処置の投与は、腫瘍内C D 4⁺及びC D 8⁺T細胞を優先的に増殖させる一方で、W S U - D L C L 2腫瘍細胞の百分率（%）を減少させた（図1 1 C）。オドロネクスタマブ処置へのR E G N 5 8 3 7の追加は、二重特異性C D 3による単独療法と比較して、T細胞の頻度を更に増加させ、同時に腫瘍細胞の頻度が減少した（図1 1 C）。腫瘍及びT細胞サブセットの密度を計数し、これにより、オドロネクスタマブ単独療法が、C D 4⁺T細胞（図1 1 D）及びC D 8⁺T細胞（図3 E）の腫瘍内密度を有意に増加させたことが明らかになった。併用療法は、オドロネクスタマブ単独と比較してC D 8⁺T細胞の密度を更に増加させ、同時にW S U - D L C L 2細胞／m g腫瘍の数を減少させた（図3 E）。メモリーサブセットの誘導の調査は、オドロネクスタマブによる処置が、アイソタイプ対照と比較して、エフェクター及びセントラルメモリーC D 8 T細胞（図3 F左）ならびにエフェクター及びセントラルメモリーC D 4 T細胞（図1 1 E）の増殖を有意に駆動したことを明らかにした。興味深いことに、R E G N 5 8 3 7の追加は、オドロネクスタマブまたはC D 2 2 x C D 2 8単独療法で処置された群と比較して、セントラル及びエフェクターメモリーC D 8⁺T細胞の密度を有意に増加させ（図3 F右）、これは、C D 8⁺T細胞集団の密度の増加により引き起こされた（図3 E右）。併用療法は、メモリー細胞対ナイーブ細胞の比率を更に変化させなかった。

20

30

40

W S U - D L C L 2腫瘍の予防処置におけるR E G N 5 8 3 7とオドロネクスタマブとの組み合わせによる強力な相乗効果が観察されたため、遅らせた処置または治療処置の文脈における組み合わせの有効性を調査することを決定した。腫瘍成長がもはや抑制されなかったように、治験薬投与の1週間の遅延は、オドロネクスタマブ単独療法の活性を抑止した（図4 B、C）。しかしながら、併用処置は、強力な抗腫瘍活性を依然としてもたらし、腫瘍成長を有意に抑制し（図4 C）、拒絶率は全体で4 0 %であった。これらは、オドロネクスタマブ単独（7 5日目で0 %生存）と比較した有意な延命効果（腫瘍移植の1 2 5日後で5 0 %生存）に関連付けられた。加えて、オドロネクスタマブ活性の増強におけるR E G N 5 8 3 7の有効性を、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B - A L L）の全身性腫瘍モデルで評価した。免疫不全動物にヒトP B M Cを事前に移植し、生物発光イメー

50

ジング (BLI) を使用したインビボでの追跡を可能にするためにルシフェラーゼを発現するように遺伝子操作されたNALM-6 B-ALL細胞を12日後に静脈内に移植した。移植の8日後までの処置の遅延は、オドロネクスタマブ処置群において腫瘍量が減少に向かう有意でない傾向をもたらした (図4E及び図4F)。しかしながら、REGN5837とオドロネクスタマブとの組み合わせは、腫瘍成長の有意な抑制を誘発した (図4F)。

【0251】

REGN5837とオドロネクスタマブとの組み合わせは、DLBCL腫瘍を有するヒト免疫系再構築動物において末梢及び腫瘍内CD8⁺T細胞応答を増強する

より生理学的関連性の高い状況におけるREGN5837のインビボでの有効性を評価するために、WSU-DLCL2腫瘍を、SIRPA^h/hTPO^h/mRag2^{-/-}IL2rg^{-/-}マウス、または胎児肝臓CD34⁺細胞を移植したヒト免疫系 (HIS) 動物に皮下移植した。胎児肝臓ドナー、ヒトT細胞生着頻度、及び性別に基づいて、動物を示される処置群に無作為化した。0.4mpkのオドロネクスタマブによる単独療法は、腫瘍成長を抑制しなかったが、REGN5837との併用療法は、腫瘍成長を有意に抑制 (図5C左) し、単独での二重特異性CD3抗体 (移植の64日後で0%生存) またはアイソタイプ対照 (移植の61日後で0%生存) と比較して生存率を改善した (移植の64日後で80%生存) (図5C右)。REGN5837単独療法は、腫瘍拒絶 (図5B及び図5C) も誘発した。これは、「シグナル1」を提供するドナーT細胞とWSU-DLCL2腫瘍細胞との間の同種異系性 (allogenicity) がこの抗腫瘍反応の基礎をなしていたためであった。インビトロにおいて、REGN5837は、同種異系シグナル1により媒介されるT細胞活性化及びエフェクター機能を増強した (図12A及び図12B)。従って、インビボでのこの抗腫瘍活性の増強は、同種異系応答の共刺激に起因し得る。

【0252】

併用療法後の末梢T細胞活性化及びサイトカイン放出増強の能力を調査するために、血清サイトカインを評価した。リンパ球サブセット及び血清サイトカインの誘導の評価のために、投与前及び後に担腫瘍ヒト免疫系マウスを採血した。投与後にT細胞活性化が認められなかったため、予想通りに、REGN5837単独療法による処置は、末梢血における単剤活性を示さなかった。しかしながら、オドロネクスタマブ単独療法による処置は、効率的に循環B細胞 (図5D右) を減少させ、最初のT細胞の辺縁趨向後に血液中のCD8⁺T細胞 (図5D左) を増加させた。これは、前臨床試験及び臨床試験において他の二重特異性CD3抗体に対する応答でも観察された。REGN5837のオドロネクスタマブとの組み合わせは、オドロネクスタマブ単独療法と比較して血液中でのCD8⁺T細胞 (図5D左) 及びCD4⁺T細胞 (図13A) の増殖を更に促進した。投与後の血清サイトカインの検査は、同種異系腫瘍またはCD20xCD3投与のいずれかによるシグナル1がなかったため、予想通りに、REGN5837がなんらの血清サイトカインも誘発しなかったことを明らかにした。しかしながら、以前の研究と一致して、オドロネクスタマブ投与により、初回投与後に血清サイトカインの誘導が観察された (図5E及び図13B)。併用処置は、オドロネクスタマブ単独療法と比較して、有意な初回投与後のサイトカイン放出 (TNF α 、IL-2、IL-10) を誘発した一方で、IL-6が増加する傾向が存在した。全体として、増強されるが、一過性である血清サイトカインの誘導及び末梢血中のT細胞の増殖は、CD28共刺激により誘発されたT細胞活性化の増強の証拠である。

【0253】

オドロネクスタマブとREGN5837との組み合わせは、腫瘍内T細胞蓄積を増強し、T細胞を再プログラム化可能な状態に偏らせ、機能不全表現型からそれさせることにより抗腫瘍活性を増強する。

REGN5837がどのようにオドロネクスタマブの抗腫瘍活性を増強したかを決定するために、移植の30日後に腫瘍内、脾臓、及び血中T細胞応答の免疫プロファイリング

10

20

30

40

50

を行った。この時点において、オドロネクスタマブ及びREGN5837の組み合わせは、アイソタイプ及びREGN5837単独療法により処置された動物と比較して腫瘍成長を有意に抑制し、オドロネクスタマブ単独療法と比較して腫瘍成長を減少させる傾向がある（図13C）。異なる細胞集団（メタクラスター）を同定するための教師なしクラスタリングアルゴリズムであるFlowSOMを使用して腫瘍、脾臓、及び血液由来の全ての生細胞を解析し、これらのメタクラスターをUMAP（次元削減のための一様多様体の近似及び投影）プロットにマッピングした（図5F左）。脾臓（図5F右）、腫瘍（図5F右）、及び血液（図14D）のUMAPプロットは、異なる処置に対する応答としての異なる免疫サブセットの相対的比率の顕著な差を明らかにした。脾臓（図14A及び図14C）及び血液（図14B及び図14E）において、オドロネクスタマブ単独療法は、アイソタイプ及びREGN5837単独療法による処置と比較してB細胞の有意な枯渇をもたらすのに十分であった。重要なことに、併用処置は、脾臓B細胞をオドロネクスタマブ単独療法と同程度まで減少させ、アイソタイプで処置された動物と比較して脾臓T細胞集団（図14A及びC）及び血中T細胞集団（図14B及びE）を増殖させる傾向があった。加えて、オドロネクスタマブ及びREGN5837の併用投与は、オドロネクスタマブ単独療法と比較して、腫瘍内の腫瘍細胞の頻度の顕著な低減（図13D左）と同時に腫瘍内T細胞の増殖（図13D右）をもたらした。

10

20

30

40

50

【0254】

腫瘍細胞の絶対カウント数の計数は、オドロネクスタマブまたは併用処置に応答した、アイソタイプで処置された動物と比較して有意な腫瘍成長の抑制を明らかにした（図5G下部）。この時点では、併用処置またはオドロネクスタマブ処置の間で腫瘍容積（図13C）またはWSU-DLC2細胞の絶対カウント数における有意差はなかったが（図5G下部）、オドロネクスタマブまたはREGN5837単独療法と比較した場合に、併用療法に応答してCD4⁺及びCD8⁺T細胞が有意に増殖した（図5G上部）。メモリーサブセットの誘導の調査は、オドロネクスタマブまたは併用療法による処置が、エフェクターメモリー（EM）CD8⁺T細胞（図13E）及びCD4⁺T細胞（図13F）の有意な増殖を引き起こし、90%超がEM表現型を獲得したことを明らかにした。オドロネクスタマブと比較して、併用処置に応答してEM形成が若干増加する傾向があったが（CD8⁺T細胞：96%対91%；CD4⁺T細胞：93%対90%）、しかしながら、腫瘍内総T細胞の全体的な増加に起因してエフェクター及びセントラルメモリーCD8⁺T細胞（図13G）及びCD4⁺T細胞（図13H）の密度が有意に増加した。

【0255】

異なる処置がどのように腫瘍内T細胞表現型を調節したのかをより良く理解するために、腫瘍内CD4⁺及びCD8⁺T細胞集団をFlowSOMにより解析し、11個のメタクラスターを同定した（図5H左）。UMAPプロットは、併用療法が、腫瘍内CD8⁺T細胞におけるメタクラスター1の顕著な濃縮及びメタクラスター3の抑制をもたらし、腫瘍内CD4⁺T細胞においてはメタクラスター11に偏らせ、メタクラスター10からそれさせたことを明らかにした（図5H及び図5J）。メタクラスター1は、再プログラム化可能な表現型（CD38^{lo}CD101^{lo}）、または以前に文献に記載されていた可逆的な機能不全状態を有するCD8⁺T細胞の集団である一方で、メタクラスター3は、高増殖性であるが、エフェクターサイトカイン産生の欠如及び腫瘍の進行に関連付けられているCD8⁺T細胞の機能不全集団（PD1^{hi}CD28⁺Ki67⁺）である（図5I）。メタクラスター11は、幹細胞性及びエフェクター機能の維持ならびに代謝疲弊の防止に起因して、メタクラスター10のCD38^{hi}CD4⁺T細胞と比べてより良好な腫瘍制御を示すことが報告されているPD-1⁺CD38^{lo}CD4⁺T細胞の集団である（図5I）。従って、これらのデータは、オドロネクスタマブと組み合わせたCD22×CD28二重特異性抗体による共刺激が、腫瘍内T細胞を増殖させるだけでなく、機能不全T細胞の誘導も予防し、これにより、抗腫瘍免疫の増強を引き起こしたことを実証した。

【0256】

REGN5837単独療法は、カニクイザル試験においてT細胞を活性化しないが、二重特異性CD28抗体は、オドロネクスタマブにより媒介されるT細胞活性化を増強する。

単独でのREGN5837またはオドロネクスタマブとの組み合わせの忍容性を評価するために、カニクイザルでの試験を実行した。群当たり3匹のサルが、単独でのREGN5837(10mpk)、単独でのオドロネクスタマブ(0.001、0.01、0.1、または1mpk)、またはREGN5837(1または10mpk)に続くオドロネクスタマブ(0.001、0.01、または0.1mpk)の単回の緩徐な静脈内ボラス投与を受けた。試験の生存フェーズにおける忍容性及び薬理学的活性の評価には、体重、臨床所見、獣医学的身体検査(心拍数、体温、及び呼吸数の評価を含んでいた)、神経筋／筋骨格所見、臨床病理検査(血液学的検査、血液生化学検査[C反応性タンパク質が含まれる]、血液凝固、及び尿分析)が含まれた。加えて、サイトカインプロファイリング及びフローサイトメトリーによる免疫表現型分析のために、投与後の5時間時点、1日目、4日目、及び8日目の試験終了時に血液試料を採取した。剖検時に、肉眼及び顕微鏡による詳しい評価を実施した。単独療法としてのまたは組み合わせでのREGN5837またはオドロネクスタマブの単回または反復静脈内投与は、いずれの瀕死状態または早死にも関連していなかった。加えて、サイトカイン放出症候群(CRS)の徴候(例えば、嘔吐または糞便の変化)がないことを含め、臨床所見において被験物質に関連する有害な所見は認められなかった。

【0257】

他のCD28ベースの二重特異性共刺激抗体で以前に記載されたように、単独薬剤としてのREGN5837による処置は、二重特異性CD28抗体がシグナル1の非存在下でT細胞活性化を誘発しないことを実証するインビトロデータと一致して(図9A)、末梢CD4⁺またはCD8⁺T細胞の増殖または活性化を誘発しなかった(図6B、C、及び図15A～B)。加えて、REGN5837単独療法は、末梢におけるB細胞数に対する効果を有さなかった(図6A)。しかしながら、二重特異性CD3抗体について以前に公開されたデータと一致して、オドロネクスタマブは、ICOSの上方調節及び増殖の誘導により示されるように、最初のリンパ球辺縁趨向に続いて、CD4⁺T細胞(図15A、B)及びCD8⁺T細胞(図6B及び図6C)の増殖及び活性化の傾向を誘発した。評価された全ての濃度のオドロネクスタマブにおいて、T細胞活性化と同時に末梢B細胞の持続的な枯渇が生じた(図6A)。オドロネクスタマブへのREGN5837の追加は、単独でのオドロネクスタマブと同様に効率的に末梢B細胞を枯渇させた。重要なことに、1mpkのREGN5837との組み合わせは、オドロネクスタマブ単独療法及びプラセボ対照と比較して、末梢CD8⁺T細胞(図6B及び6C)及びCD4⁺T細胞を有意に増殖させ、活性化した(図15A及び15B)。10mpkのREGN5837との併用療法も、オドロネクスタマブにより媒介されるT細胞活性化が増強される傾向を誘発したが、この濃度の共刺激抗体の追加は、1mpkで投与されたREGN5837と同程度までT細胞活性を有意に増強しなかった。これは、高濃度の二重特異性CD28抗体の一方のアームの結合に起因し得、この結合は、T細胞活性化のパラメーターを調査する場合にベル型の曲線をもたらす。

【0258】

オドロネクスタマブ単独療法は、血清サイトカインの用量依存的増加をもたらした(図6D)。このことは、別の腫瘍標的化二重特異性CD3抗体による以前の観察結果と相関する。オドロネクスタマブ(0.1mpk)とREGN5837(1mpk)との組み合わせは、併用処置により観察されるT細胞活性化の増強を反映して、プラセボと比較してIL-2産生を有意に増加させ、血清IL-6が増加する傾向を伴った(図6C及び図15B)。興味深いことに、0.1または0.01mpkのオドロネクスタマブとREGN5837(1mpk)との組み合わせは、1mpkで投与された単独でのオドロネクスタマブほどIL-6を強く誘発しなかったが、併用処置は、1mpkのオドロネクスタマブ単独療法と同程度までCD4⁺及びCD8⁺T細胞を増殖させ、活性化した(図6B及び

図15A)。全体として、これらの結果は、オドロネクスタマブへのREGN5837の追加が、血清サイトカインの増加及び末梢T細胞の増殖を誘発することによりカニクイザル動物におけるT細胞活性化を増強したことを実証する。

【0259】

結論

本実施例において、REGN5837が、DLBCL及び他のNHL細胞株のインビトロでの細胞傷害を促進することにより、ならびに二重特異性CD3抗体による処置により排除することができないDLBCL腫瘍に対する抗腫瘍活性を強力に増強することにより、オドロネクスタマブにより媒介される活性を増強することができることが実証された。単独薬剤としてのオドロネクスタマブは、WSU-DLCL2腫瘍成長を抑制したが、REGN5837との併用処置のみが前臨床インビボモデルにおいて治療効果をもたらし、全生存期間を増加させた。加えて、REGN5837及びオドロネクスタマブの組み合わせは、CD20を発現する細胞に対する細胞傷害性を維持しただけでなく、オドロネクスタマブ単独療法と比較して、腫瘍内T細胞の有意な増殖ももたらし、エフェクターメモリー細胞の誘導を増強した。HISマウス由来の腫瘍内免疫区画の更なる特徴付けは、オドロネクスタマブへのCD28共刺激の追加が、CD8⁺T細胞集団を再プログラム化可能な表現型(CD38^{lo}CD101^{lo})または正常な条件下で逆転され得る可塑的な機能不全状態に偏らせ、これにより、再度活性化されたT細胞が高レベルの炎症誘発性サイトカインを産生し、抗腫瘍免疫を媒介することを可能にすることを明らかにした。この増殖に付随して、CD28⁺Ki67⁺CD8⁺機能不全T細胞の誘導が同時に減少した。これは、エフェクター機能が欠如していると以前に記載されており、黒色腫及び後期NSCLCにおいて増殖し、PD-1阻害療法に対する抵抗性に関連付けられている過剰活性化された集団である。REGN5837の追加は、エフェクター機能の維持、T細胞持続性の促進、及びグルタミノリシスの増強により駆動される代謝再プログラム化に起因して、CD38^{hi}T細胞と比較して優れた腫瘍制御を示すことが報告されているPD-1⁺CD38^{lo}CD4⁺T細胞の集団も増殖させた。従って、このデータは、REGN5837が、腫瘍内T細胞を増殖させるだけでなく、機能不全T細胞の誘導も防止し、これにより、抗腫瘍免疫の増強を可能にすることを示唆する。

【0260】

カニクイザルにおける毒性試験及びHISマウス由来の末梢血の分析は、REGN5837が、末梢B細胞上でのCD22の発現にもかかわらず、シグナル1の欠如により単独療法としてほとんど活性を有さず、毒性を示さないことを実証した。REGN5837がTCRクラスター形成を媒介するオドロネクスタマブと組み合わせて投与された場合のみ、末梢T細胞の活性化及び増殖が観察された。重要なことに、カニクイザル試験では、低用量オドロネクスタマブへのREGN5837の追加は、10～100倍高い用量の二重特異性CD3抗体と同程度のレベルの末梢T細胞増殖をもたらすことができたが、この増殖は、カニクイザル試験における二重特異性CD3抗体の高用量単独療法による処置と比較して血清サイトカインのより低い誘導を伴った。従って、組み合わせまたは高用量二重特異性CD3抗体のいずれかによる処置は、動物におけるサイトカイン放出症候群(CRS)のなんらの徴候もなく十分な忍容性を示した。

【0261】

オドロネクスタマブは、r/r B細胞NHLの治療の第1相及び第2相臨床試験で現在評価されている。この臨床試験における患者集団は、多くの前治療を受けており、少なくとも2種類以上の前治療が無効であった。オドロネクスタマブ臨床試験初期の結果では、有望な活性が認められ、少なくとも5mgのオドロネクスタマブを週1回投与された治療抵抗性濾胞性リンパ腫患者のORRは92.9%であり、完全奏効率(CR)は75.0%である。80mg以上で投与され、かつCAR T前治療を受けていない、多くの前治療が行われたr/r DLBCL患者は、60%のORR及びCR率を有し、CAR T治療に治療抵抗性を示す患者は、33.3%のORR及び23.8%のCR率を有する。全体として、安全性プロファイルは、管理可能であり、CD20×CD3二重特異性薬

のクラスと一致しているようである。有望であるが、これらのデータは、特にCAR T治療後の状況におけるr/r DLBCL患者の治療に関して依然として改善の余地があることを明らかにする。まとめると、このデータは、新規のCD22 x CD28二重特異性抗体であるREGN5837が、オドロネクスタマブの抗腫瘍活性を増強することができ、高悪性度リンパ腫を有する治療が難しい患者におけるREGN5837とオドロネクスタマブとの組み合わせの研究の支持を提供することを示す。

【0262】

実施例2：実施例1の材料及び方法

試験デザイン

この試験は、腫瘍標的化二重特異性CD28抗体がオドロネクスタマブにより媒介されるT細胞活性化を増殖して、抗腫瘍活性を増強することができることを実証した。対照治療及び実験的治療を年齢及び性別が一致するマウスに投与した。標本サイズは、適切な統計的検出力を確保するように経験的に選択し、試験において使用される技術の分野における標準と一致していた。治療開始前に腫瘍容積に基づいて全ての動物を異なる処置群に無作為化し、試験担当医師は、全ての処置群に対して盲検であった。実験反復の回数を図の凡例に示す。

10

【0263】

細胞株

WSU-DLCL2での試験のために、DLBCL細胞株を、DSMZ (ACC 575) から入手し、ペニシリン、ストレプトマイシン、グルタミン、及び1mMのHEPES (Gibco) を補足した10%のFBS (Seradigm) を含有するRPMI-1640で維持した。CRISPRにより編集されたCD22欠損株は、TrueCut (商標) Cas9 Protein v2 (Invitrogen) 及びヒトCD22を標的とするHigh Scoring TrueGuide (商標) Synthetic sgRNA (Invitrogen、ガイドRNA: CCGGTGACACCTCAATGACAG) を用いて、Neon (商標) Transfection System 100µL Kit (Invitrogen) を使用したCas9リボ核タンパク質 (RNP) のエレクトロポレーションにより作製した。CD22欠損細胞を、エレクトロポレーションの96時間後にバルクソートした。

20

【0264】

NALM6-luc腫瘍での実験について、腫瘍細胞成長をインビボで画像化するために、NALM6細胞株 (DSMZ: ACC 128) を、EF1α-ルシフェラーゼ-2A-GFP-Puroレンチウイルス (GenTarget) で改変した。細胞株は、PSG (ペニシリン、ストレプトマイシン、及びグルタミン) 及びピューロマイシン選択 (1µg/ml) を補足した10%のFBSを含有するRPMIで維持した。

30

【0265】

動物試験

全ての手順をNIHのGuide for the Care and Use of Laboratory Animalsに従って実行した。実験計画は、Regeneration Pharmaceuticalsの動物実験委員会 (IACUC) により承認され、全ての動物は、病原体が存在しない条件下で維持された。

40

【0266】

NSG実験のために、WSU-DLCL2細胞 (3×10^6 個細胞) を採取し、 5×10^5 個のPBMC (ReachBio) と混合し、PBS及びGFRマトリゲル (Corning) の1:1混合物中に再懸濁した。雌性NSGマウス (Jackson Laboratory) の右側腹部に細胞混合物を皮下注射した。ヒト免疫系再構築実験では、WSU-DLCL2細胞 (3×10^6 個細胞) を、胎児肝臓CD34⁺細胞を移植したSIRPα^{h/h} TP0^{h/m} Rag2^{-/-} IL2rg^{-/-} マウスに皮下移植した。各処置群が胎児肝臓ドナー、ヒト免疫細胞生着頻度、及び性別の同様の分布を有するように動物を分けた。アイソタイプ対照 (EGFRV3 x CD3またはMUC16 x CD2

50

8) または被験物質 (REGN5837、オドロネクスタマブ) のいずれかの盲検化された処置を受けるようにマウスを無作為化し、被験物質は、予防処置では移植後の1日目、8日目、及び15日目、ならびに治療処置では8日目、15日目、及び22日目に単独療法または組み合わせとして特定の濃度で腹腔内注射により投与した。腫瘍成長は、デジタルノギス (VWR) によるX及びY直径の測定 (長さ及び幅の垂直な測定) を使用して経時的にモニタリングした。腫瘍容積を算出した ($X \times Y \times (X/2)$ (式中、Xはより短い直径である))。腫瘍が指定の腫瘍エンドポイントに到達したら、マウスを安楽死させた (腫瘍直径 > 20 mm または腫瘍潰瘍化)。この指定のエンドポイントは、IACUC基準に従ったものである。

【0267】

NALM6-luc 腫瘍実験では、雌性免疫不全NSGマウス (Jackson Laboratories) に 4×10^6 個のヒトPBMC (ReachBio) を移植し、成功裡に生着した動物に、 5×10^6 個細胞のNALM6-luc細胞をPBMC移植の12日後に静脈内注射した。アイソタイプ対照 (EGFRV3xCD3またはMUC16xCD28) または被験物質 (REGN5837、オドロネクスタマブ) のいずれかの盲検化された処置を受けるようにマウスを無作為化し、被験物質は、移植後の8日目、15日目、及び22日目に単独療法または組み合わせとして特定の濃度で腹腔内注射により投与した。NALM6-lucが移植されたマウスを、ルシフェリン基質 (Perkin Elmer) を腹腔内注射した後にIVIS Spectrum (Perkin Elmer) を使用して週2回撮像した。Living Imageソフトウェアを使用して生物発光 (全光量) を定量化した。IACUC基準に従って、マウスがGVHDの徴候 (重量減少 $\geq 20\%$) を示し始めたら、実験を終了した。

【0268】

マウスの血清サイトカインの測定

示される時点で、血液を下顎下静脈からMicrotainer血清チューブ (BD 365967) に採取した。サイトカイン濃度は、V-plex Human ProInflammatory-10 Plexキットを製造者の使用説明書 (Meso Scale Diagnostics) に従って使用して分析した。

【0269】

フローサイトメトリー

免疫表現型検査実験のために、腫瘍、脾臓、血液を示される日に採取した。単細胞懸濁液を調製し、Live/Dead Fixable Blue Dead Cell Staining Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して生/死細胞識別を実行した。組織の細胞数を定量化するために、一定数のCountBright絶対計数ビーズ (Thermo Fisher Scientific) を捕捉する前に各試料に添加した。試料を、Symphony (BD Biosciences) で捕捉し、FlowJo (TreeStar) またはOMIQを使用して解析した。

【0270】

選択したマーカーに基づいてT細胞クラスターを自動で同定するために、Symphony (BD Biosciences) で捕捉した試料に対してOMIQのFlowSOMを実行した。試料毎に等しい数のイベントに対して解析を実行した。イベントの範囲は、最も少ない細胞を含有する試料により決定した。腫瘍内CD8⁺T細胞の選択したパラメーター (活性化/機能不全及びメモリーマーカー) についてのOmiq.aiでのFlowSOMクラスタリングをデフォルト設定で実行した。FlowSOMにより同定されたクラスターを可視化するために、高度な次元削減法であるUMAPをOmiq.ai内で全ての試料に対して実行した。各処置群の試料を連結し、FlowSOMクラスターをUMAPプロットに重ね合わせた。

【0271】

湿式プレートコーティングアッセイ

PBS中に10 µg/mlまで希釈した抗体を、ポリプロピレンプレート上に一晚湿式コーティングした。希釈した抗体(100 µl)を三重反復で96ウェルポリプロピレンアッセイプレートに添加した。プレートを4℃で一晩保存して、抗体を吸着させ、増殖アッセイで使用する前にプレートをPBSで2回洗浄した。PBMCは、4人の健常な別個のドナーから採取された白血球濃縮末梢血(New York Blood Center)から単離した。各ドナー由来のPBMCを、10%のヒトAB血清(GemCell)及びペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミン(それぞれ100単位/ml、100 µg/ml、292 µg/ml、Gibco)を含有するRPMI培地(Irvine Scientific)中に再懸濁し、次いで、100,000個細胞/ウェル、200 µl/ウェルの最終容量で96ウェルアッセイプレートに添加した。次いで、アッセイプレートを37℃+5%CO₂で54時間インキュベートした。54時間時点で、アッセイプレートを遠心分離し、100 µlの上清をサイトカイン分析のために取り出した。IFNγ、IL1β、IL2、IL4、IL6、IL8、IL10、IL13、及びTNFαのサイトカイン濃度を、V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Human Kitを製造者の使用説明書に従って使用して測定した。4人のドナーから得られた濃度(pg/mL)の平均値及び範囲をプロットした。個々のデータ点は、三重反復のウェルで実行されたアッセイにより得られた各個別のドナーでの平均濃度を表す。

10

【0272】

増殖を評価するために、100 µlの1mCi/mlのトリチウムチミジン(Perkin Elmer)を各ウェルに添加し、37℃+5%CO₂で更に18時間インキュベートした。各96ウェルアッセイプレートを、Filtermate Harvester(Perkin Elmer)を使用して収集し、TopCountシンチレーションカウンター(Perkin Elmer)で分析した。放射能の量は、ウェル当たりの毎分放射能数(CPM)として測定し、増殖細胞の数と比例していた。CPM値を示す。4つのデータ点は、三重反復のウェルで実行されたアッセイにより得られた各個別のドナーでの平均放射能数を表す。

20

【0273】

インビトロT細胞活性化アッセイ

50mLのSepMate(商標)チューブを使用した密度勾配遠心分離により健常ドナーの白血球パックから単離し、予め凍結させたヒトCD3⁺T細胞を、50 U/mlのBenzonaseヌクレアーゼを含有する刺激培地(10% FBS、HEPES、Na Pyr、NEAA、及び0.01mMのBMEを補足したX-VIVO 15細胞培養培地)でのアッセイの日に解凍し、1×10⁵個細胞/ウェルの濃度で96ウェル丸底プレートにプレーティングした。NALM6細胞を、10 µg/mLのマイトマイシンCを用いて10×10⁶個細胞/mLの濃度の一次刺激培地中で処理した。37℃、5%CO₂での1時間のインキュベーション後、マイトマイシンCで処理された細胞を、2%のFBSを含有するD-PBSで3回洗浄し、CD3⁺T細胞を含有するウェルにウェル当たり5×10⁴個細胞の最終濃度で添加した。全てのウェルに、無関係なhIgG1 mAb(100 nM/ウェル)を添加して、Fc受容体を遮断した。一定濃度のオドロネクスタマブまたは500 pMの非結合性アイソタイプ対照を、漸増する用量のREGN5837または3.1 pM~200 nMの非結合性アイソタイプ対照と共にウェルに添加した。プレートを37℃及び5%CO₂で72時間インキュベートし、この時点での50 µlの培養液上清を採取した。5 µlのこの採取した上清をヒトIL-2(AL221F) AlphaLISAアッセイ(Perkin Elmer)で製造者のプロトコールに従って試験した。測定値は、Envisionマルチラベルプレートリーダー(Perkin Elmer)で取得した。既知の濃度の検量線を生成して、アッセイウェル中の生成されたIL-2の濃度を推定した。T細胞増殖を評価するために、1.25 µM [³H]の最終濃度のチミジン(Perkin Elmer)を培地に補足し、細胞を37℃、5%CO₂で16時間インキュベートした。プレートをMicrobeta Filtermate-96 Cell Harvester(Perkin Elmer)を使用して収集し

30

40

50

、30 μ LのMicroScint-20 (Perkin Elmer) を添加し、 $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みをTopCount NXTマイクロプレートシンチレーションカウンタ (Perkin Elmer) を使用して測定した。全ての系列希釈物を三重反復で試験した。抗体のEC50値は、GraphPad Prismソフトウェアを使用して10点用量反応曲線に対する4パラメーターロジスティック方程式により決定した。

【0274】

インビトロ細胞傷害性アッセイ

ヒトPBMCを解凍し、完全培地 (10% FBS、ペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミンを補足したRPMI細胞培養培地) に 1×10^6 個細胞/mLでプレーティングし、接着細胞、例えば、マクロファージ、樹状細胞、及び一部の単球を枯渇させることによりリンパ球を濃縮するために37°Cで一晩インキュベートした。翌日、PBMCを採取し、1 μ MのViolet Cell Tracker 追跡用蛍光色素で標識した。WSU-DLCL2細胞を1 μ MのVybrant CFDA-SE蛍光色素で標識した。標識後、5,000個の標識した標的細胞を、標識したPBMCと共に1:5の比率で丸底96ウェルプレートにプレーティングした。R5837の系列希釈物をR1979の系列希釈物と組み合わせ、標識した標的細胞及びエフェクター細胞に添加し、プレートを37°Cで72時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を洗浄し、PBS中の生/死細胞染色剤で染色し、続いて、生存標的細胞、T細胞活性化、及び増殖の分析のために、CD2、CD4、CD8、及びCD25に対するフルオロフォア標識抗体のカクテルで染色した。BD Celestaフローサイトメーターでの試料分析の直前に計数ビーズ (ウェル当たり20 μ L) を添加した。

【0275】

標的細胞殺傷は、収集されたビーズ/ウェルの数に正規化することによってCFDA-SEで標識された生存標的細胞/ウェルの数を算出することにより評価した。パーセント生存率は、対照条件 (PBMCのみの存在下での標的細胞) での生存標的細胞の数に正規化された。T細胞活性化は、CD4+及びCD8+T細胞上の%CD25を記録することにより評価した。T細胞増殖は、Violet Cell Tracker色素のMFIが減少した細胞の百分率を記録することにより評価した。

【0276】

このアッセイによる上清をサイトカインレベルの分析のために採取した。IL-17a、IFN γ 、TNF α 、IL-10、IL-6、IL-4、及びIL-2の濃度を、サイトメトリービーズアレイ (CBA) キットを製造者の使用説明書に従って使用して分析した。要約すると、上清の1/15希釈物を標準試料と共に、サイトカイン特異的ビーズアレイを含有する96ウェルアッセイプレートで室温にて3時間インキュベートした。インキュベーション後、試料を2回洗浄し、BD FACS Canto IIでのフローサイトメトリーにより分析した。サイトカインレベルは、キット標準物質のMFIから補間し、pg/mLとして記録した。

【0277】

抗体のEC50値は、GraphPad Prismソフトウェアを使用して9点用量反応曲線に対する4パラメーターロジスティック方程式により決定した。パーセント細胞傷害性、T細胞活性化、増殖、及びサイトカイン放出の最大応答は、Prismカーブフィッティングにより生成されたプラトー値として得た。EC50の倍率変化を、EC50 R5837なし/EC50 [M] R5837として算出し、サイトカイン放出最大値の倍率変化を、最大値 [M] R5837/最大値 R5837なしとして算出した。

【0278】

発色IHC

発色IHCアッセイを、Ventana Discovery ULTRAプラットフォームでホルマリン固定パラフィン包埋DLBCL患者試料 (Tristar) に対して実行した。Tris-EDTA (pH9) 緩衝液を使用して抗原賦活化を実行し、スライ

ドガラスを以下に列挙される一次抗体と共にインキュベートした。OptiView DAB検出システムを使用し、一部のマーカーについては、シグナルを可視化するために追加の増幅ステップが必要とされた。スライドガラスをNovolink Hematoxylin (Leica Microsystems, Inc) で対比染色し、Cytoseal 60 (Thermo Scientific/Richard Allen Scientific) を用いてカバーガラス (Corningのカバーガラス、#1) をかけた。封入剤が完全に乾燥したら、スライドガラスをLeica Aperio AT2スキャナーで40xにてスキャンした。Indica HALO ソフトウェアを使用して画像を解析した。

【表7】

10

表8

標的	クローン		供給業者	カタログ 番号	検出法
CD20	SP32	ウサギモノクローナル	ABCAM	ab64088	OptiView DAB
CD22	SP104	ウサギモノクローナル	Roche	06391117001	OptiView DAB
CD28	EPR22076	ウサギモノクローナル	ABCAM	ab243228	OptiView DAB(増幅有り)
CTLA4	CAL49	ウサギモノクローナル	ABCAM	ab2377712	OptiView DAB(増幅有り)
CD80	37711	ウサギモノクローナル	R&D Systems	MAB140-500	OptiView DAB(増幅有り)
CD86	E2G8P	ウサギモノクローナル	Cell Signaling	91882	OptiView DAB(増幅有り)

20

30

【0279】

多重IHC

完全自動化された多重免疫組織化学アッセイを、Ventana Discovery ULTRAプラットフォーム (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) で実行した。5ラウンドの逐次的な一次抗体及び西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体の適用を実行した。結合した一次及び二次抗体を完全に除去するための各ステップ間の加熱変性を実行して、下流での交差反応性を排除した。これにより、同じ種で産生された一次抗体を使用することが可能となった。使用された蛍光色素は、スペクトル分離を確実にし、最適な染色をもたらすように慎重に選択した。一次抗体及びチラミドフルオロフォアの組み合わせ及び適用の順序は、エピトープ及びフルオロフォアの両方が確実に熱変性ステップの反復に耐えることができるように最適化した。各抗体の最適濃度を決定し、それらを以下の順序で適用し、示されるフルオロフォアを用いて検出した。

40

50

【表 8】

表 9

標的	クローン		供給業者	カタログ番号	Roche のフルオ ロフォア	カタログ番 号
CD20	SP32	ウサギモ ノクロー ナル	ABCAM	ab64088	DISCOVERY Rhodamine 6G	7988168001
CD22	SP104	ウサギモ ノクロー ナル	ABCAM	ab240404	DISCOVERY DCC	7988192001
CD19	SP291	ウサギモ ノクロー ナル	ABCAM	ab237772	DISCOVERY Red 610	7988176001
CD79b	SP240	ウサギモ ノクロー ナル	ABCAM	ab245745	DISCOVERY Cy5	7551215001
PAX5	SP34	ウサギモ ノクロー ナル	Roche	05552729001	DISCOVERY FAM	7988150001

10

20

標的	クローン		供給業者	カタログ 番号	Roche のフルオ ロフォア	カタログ番 号
CD28	EPR22076	ウサギモ ノクロー ナル	ABCAM	ab243228	DISCOVERY Rhodamine 6G	7988168001
CD3	SP162	ウサギモ ノクロー ナル	ABCAM	ab135372	DISCOVERY DCC	7988192001
CD8	SP239	ウサギモ ノクロー ナル	ABCAM	ab178089	DISCOVERY Red 610	7988176001
Ki67	EPR3610	ウサギモ ノクロー ナル	ABCAM	ab92742	DISCOVERY FAM	7988150001

30

40

【0280】

染色後、組織を対比染色し、Invitrogen ProLong Gold Antifade Mountant with NucBlueを用いてカバーガラスをかけた。スライドガラス全体の画像化を、これらの特定のフルオロフォアを可視化するためのColibri光源及び適切なフィルターを備えたZeiss AxioScanで実行した。定量的画像解析は、HALO Indica Labs Hyperplexモジュール（Indica Labs、Albuquerque、NM）を使用して実行した。各免疫サブセットの陽性細胞の数及び腫瘍面積全体での密度を測定した。

【0281】

50

カニクイザル毒性試験

カニクイザル試験は、国際実験動物ケア評価認証協会により公認されており、動物福祉保証番号が実験動物福祉局により発行されており、米国農務省及びIACUCに登録されている施設で実施した。雄性のカニクイザル (*Macaca fascicularis*) (群当たり3匹の動物) を使用して、Altasciences Preclinical Seattle (以前はSNBL USA) で試験を実施した。対象は、静脈内ボラス投与 (REGN5837) または静脈内注入 (約30分のオドロネクスタマブ注入) による各被験物質の単回投与を受けた。併用療法を逐次投与し、オドロネクスタマブの注入をREGN5837の投与の5~10分後に開始した。処置に関連する効果の評価には、体重測定、臨床所見、獣医学的身体検査 (心拍数、体温、及び呼吸数の評価を含んでいた)、神経筋/筋骨格所見、臨床病理検査 (血液学的検査) が含まれた。サイトカイン分析、免疫表現型分析、組織病理検査、及び毒物動態評価のために血液及び/または組織試料を採取した。末梢血のフローサイトメトリーのために、血液をカリウムEDTAチューブに採取し、溶血させ、CD3、CD4、CD8、CD14、CD16、CD20、CD28、及びKi67 (BD Biosciences)、ならびにCD278 (BioLegend) について染色し、FACSCanto IIフローサイトメーターで分析した。サイトカイン分析のために、血液を抗凝固剤を含有する血清分離チューブに採取した。血清を4℃、1000g~2000gで10~15分間の遠心分離により分離し、MSD U-Plexプラットフォームを使用して分析した (IL-1 β 、IL-2、IL-6、MCP-1、及びTNF- α 、及びIFN- γ)。

10

20

【0282】

統計解析

標本サイズは、適切な統計的検出力を確保するように経験的に選択し、試験において使用される技術における標準と一致していた。統計的有意性を一元配置及び二元配置分散分析 (ANOVA) を用いて決定し、群間の生存時間を比較するためにカプラン・マイヤー法をログランク検定と共に用いた。グラフ生成及び統計解析を、GraphPad Prism (バージョン8) を使用して実行した。

【0283】

実施例3: REGN5837は、CD20 $\times$ CD3二重特異性抗体REGN1979により活性化されたヒトT細胞により媒介される、CD22を表面発現するか、または表面発現しないB細胞リンパ腫細胞に対する細胞傷害性を増強する。

30

新たに解凍したPBMCからEasySep Human T-Cell Isolation Kitを使用してT細胞を単離し、直ちに使用した。WSU-DLCL2/CD22^{WT}細胞を1 μ MのVybrant CFDA-SE蛍光色素で標識した。WSU-DLCL2/CD22^{KO}細胞を1 μ MのCellTrace Far Red蛍光色素で標識した。標識したWSU-DLCL2/CD22^{WT}及びWSU-DLCL2/CD22^{KO}標的細胞を異なる比率 (0:100、20:80、40:60、60:40、80:20、100:0) で96ウェル丸底プレートにプレーティングし、非標識のT細胞を5:1のエフェクター対標的最終比率で添加した。標的細胞及びエフェクター細胞を、単独での5pMのCD20 $\times$ CD3 (REGN1979) と共に、またはそれと異なる濃度のREGN5837 (16.7nM、2.77nM、463pM) との組み合わせと共にインキュベートし、プレートは37℃で72時間インキュベートした。

40

【0284】

インキュベーション後、細胞を洗浄し、PBS中の生/死細胞染色剤で染色し、続いて、T細胞活性化の分析のために、CD2、CD4、CD8、及びCD25に対するフルオロフォア標識抗体のカクテルで染色した。BD Celestaフローサイトメーターでの試料分析の直前に計数ビーズ (ウェル当たり20 μ L) を添加した。

【0285】

WSU-DLCL2/CD22^{WT}の殺傷は、収集されたビーズ/ウェルの数に正規化することによってCFDA-SEで標識された生存標的細胞/ウェルの数を算出すること

50

により評価した。WSU-DLCL2/CD22^{KO}細胞殺傷は、収集されたビーズ／ウェルの数に正規化することによってFar-Redで標識された生存標的細胞／ウェルの数を算出することにより評価した。パーセント生存率は、対照条件（エフェクター細胞のみの存在下での標的細胞）での生存標的細胞の数に正規化された。T細胞活性化は、CD4+及びCD8+T細胞上のCD25のMFIを記録することにより評価した。

【0286】

結果の要約

CD20xCD3二重特異性抗体REGN1979により活性化されたヒトT細胞により媒介される、CD22を表面発現するか、または表面発現しないB細胞リンパ腫細胞に対する細胞傷害性を増強するREGN5837の能力を、フローサイトメトリーを使用して評価した。更に、T細胞上のCD25の上方調節により測定されるT細胞活性化を評価した。

10

・5pMのREGN1979は、ヒトT細胞を活性化し、ヒトT細胞がWSU-DLCL2/CD22^{WT}及びWSU-DLCL2/CD22^{KO}を同程度まで殺傷するように誘導した（表8）。5pMのREGN1979のみの存在下でのT細胞活性化は、CD22^{KO}:CD22^{WT}細胞の比率に関係なく同程度であった（表11）。

・REGN5837は、REGN1979により媒介されるWSU-DLCL2/CD22^{WT}細胞の殺傷を用量依存的様式で増強した。WSU-DLCL2/CD22^{WT}細胞の殺傷は、培養物中のWSU-DLCL2/CD22^{KO}の存在に関係なく同程度であった（表10）。

20

・REGN5837は、20%以上のWSU-DLCL2/CD22^{WT}細胞を含有していた培養物において、REGN1979により媒介されるWSU-DLCL2/CD22^{KO}細胞の殺傷を増強した。REGN5837は、培養物中になんらのWSU-DLCL2/CD22^{WT}細胞も存在しない場合、REGN1979により媒介されるWSU-DLCL2/CD22^{KO}細胞の殺傷を増強しなかった（表10）。

・WSU-DLCL2/CD22^{WT}細胞を含有する培養物では、REGN5837は、REGN1979により媒介されるT細胞活性化を用量依存的様式で増強し、より高い比率のWSU-DLCL2/CD22^{WT}細胞が存在した場合に、より強いT細胞活性化が観察された。REGN5837は、培養物中になんらのWSU-DLCL2/CD22^{WT}細胞も存在しない場合、REGN1979により媒介されるT細胞活性化を増強しなかった（表11）。

30

【0287】

要約すると、REGN5837による共刺激は、CD22を発現する細胞が培養物中に存在する限り、REGN1979により媒介されるCD22発現を欠く標的細胞の殺傷を増強した。

40

50

【表 9】

表 10: WSU-DLCL2/CD22^{KO}及びWSU-DLCL2/CD22^{WT}の%生存率
CD22^{KO}:CD22^{WT}比率

		100:0	80:20	60:40	40:60	20:80	0:100
% CD22 ^{KO} 生存率	5pM の R1979 のみ	58.6	60.15	61.75	60.55	59.45	NA
	+16.7nM の R5837	45.4	26.95	19.1	19.85	20.85	NA
	+2.8nM の R5837	56	28.8	28.25	24.1	25.25	NA
	+0.46nM の R5837	60.1	37.2	33.9	31.85	29.9	NA
% CD22 ^{WT} 生存率	5pM の R1979 のみ	NA	54.75	55.15	49.9	48.8	58.75
	+16.7nM の R5837	NA	7.95	8.6	9.45	11.15	12.6
	+2.8nM の R5837	NA	13.1	12.45	12.8	16.45	22.4
	+0.46nM の R5837	NA	20.6	19.1	20.15	19.3	28.5

10

20

30

40

50

【表 1 0】

表 1 1 : T細胞活性化 (C D 2 5 上方調節)

		CD22 ^{KO} :CD22 ^{WT} 比率					
		100:0	80:20	60:40	40:60	20:80	0:100
CD4+T 細胞活 性化 (CD25 の MFI)	5pM の R1979 のみ	4375	4306	4483	4463	3902	4633
	+16.7nM の R5837	3154	9853	12029	13583	15280	17661
	+2.8nM の R5837	4055	8275	10895	13229	14398	14845
	+0.46nM の R5837	4280	7518	8522	11751	11202	13365
	刺激なし	678	654	695	657	634	595
CD8+T 細胞活 性化 (CD25 の MFI)	5pM の R1979 のみ	2502	2486	2644	2617	2791	2837
	+16.7nM の R5837	2159	4971	6668	7880	8661	9875
	+2.8nM の R5837	2510	4894	6618	7916	8413	9031
	+0.46nM の R5837	3001	4254	4796	6136	6310	7919
	刺激なし	392	375	401	424	371	342

【0 2 8 8】

参照による組み込み

本明細書に記載される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各個別の刊行物、特許、または特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個別個々に示されているかのように、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。矛盾する場合、本明細書における任意の定義を含め、本出願が優先する。

【0 2 8 9】

ワールドワイドウェブ上で The Institute for Genomic Research (TIGR) により維持されているもの及び／またはワールドワイドウェブ上で National Center for Biotechnology Information (NCBI) により維持されているものなどの公開データベースにおけるエントリーと相関するアクセッション番号を参照する任意のポリヌクレオチド及びポリペプチド配列もそれらの全体が参照により組み込まれる。

【0 2 9 0】

等価物

当業者は、本明細書に記載される本発明の具体的な実施形態の多くの均等物を理解するか、または定型的に過ぎない実験を使用して確認することができるであろう。かかる等価物は、以下の特許請求の範囲に包含されることを意図する。

10

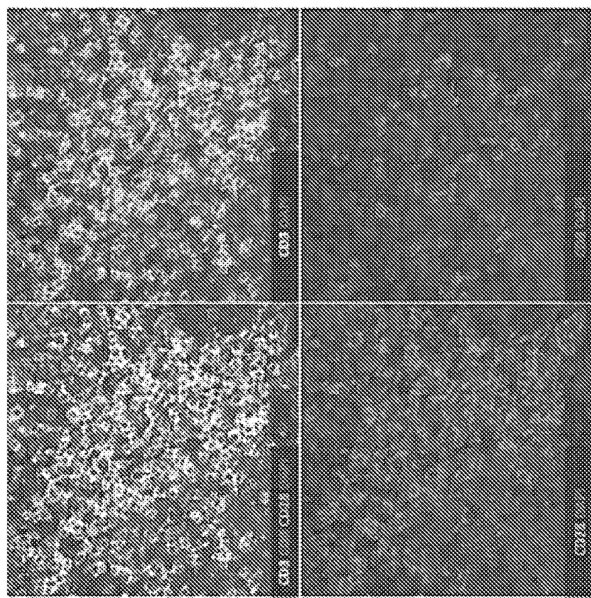
20

30

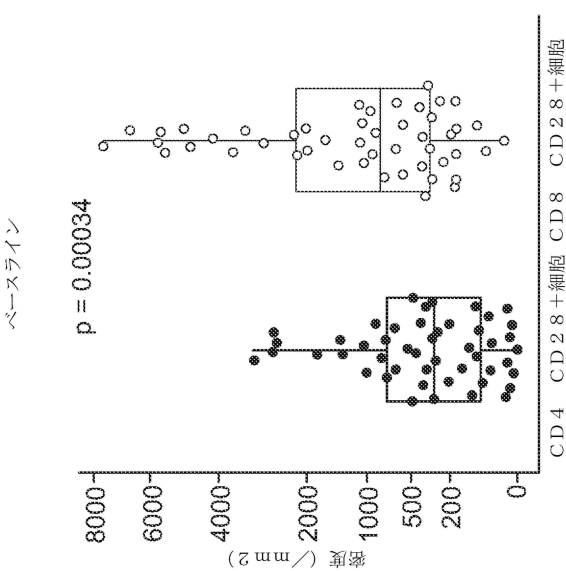
40

50

【図面】
【図 1 A】



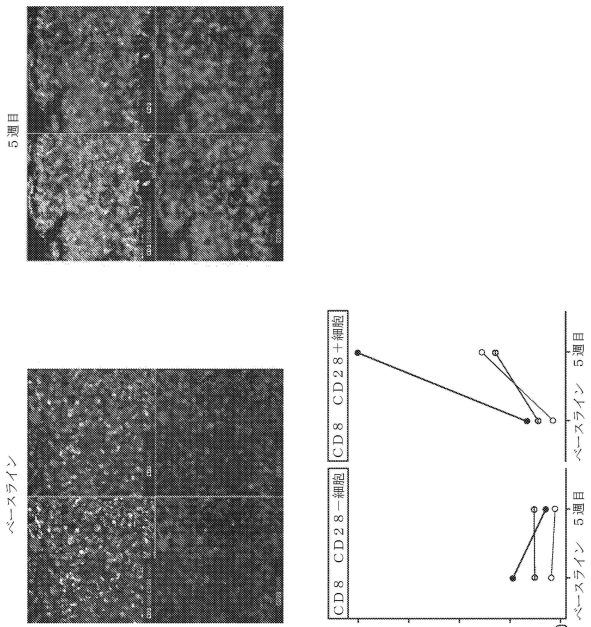
【図 1 B】



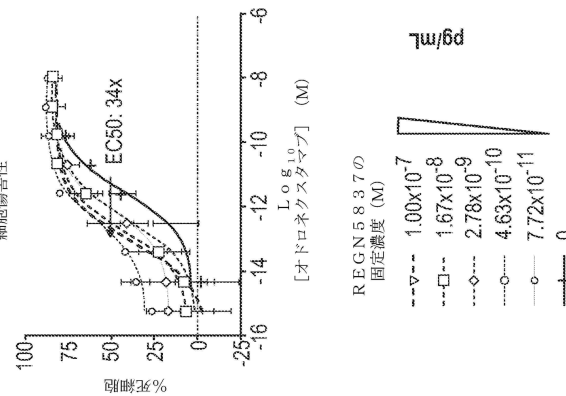
10

20

【図 1 C】



【図 2 A】

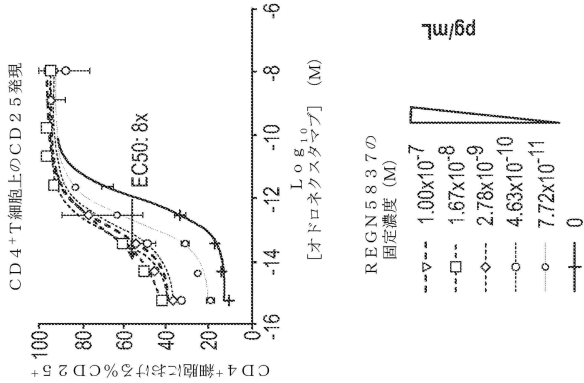


30

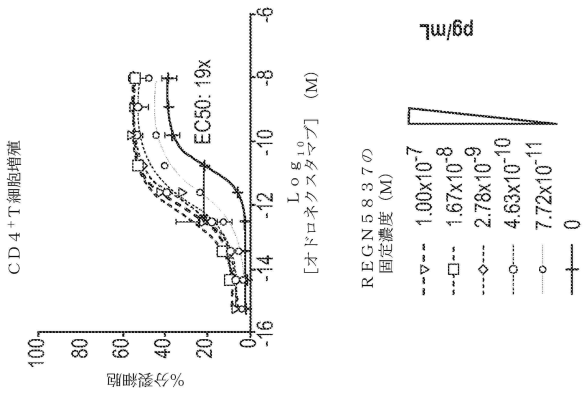
40

50

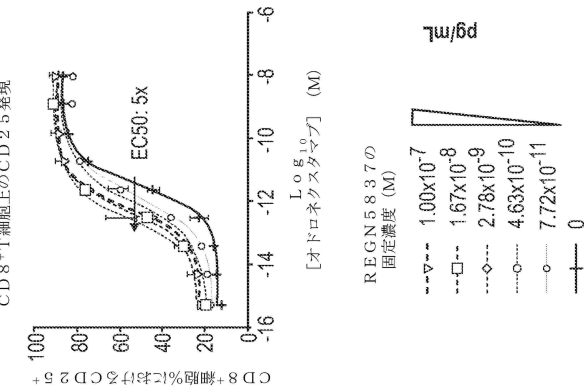
【図 2 B】



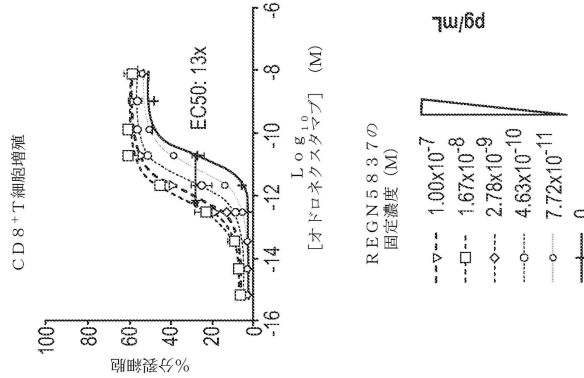
【図 2 C】



【図 2 D】



【図 2 E】



10

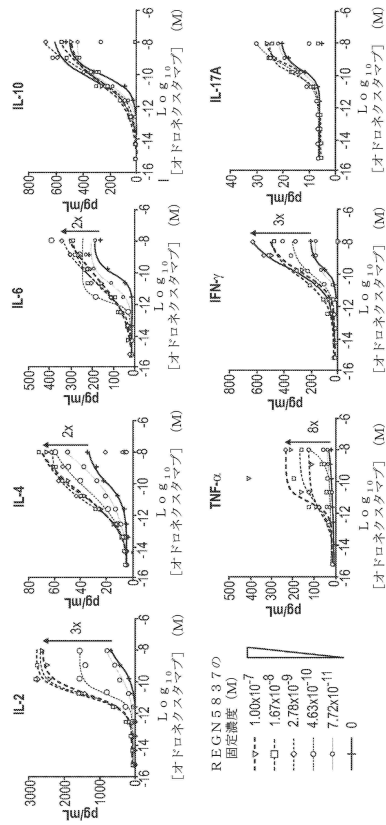
20

30

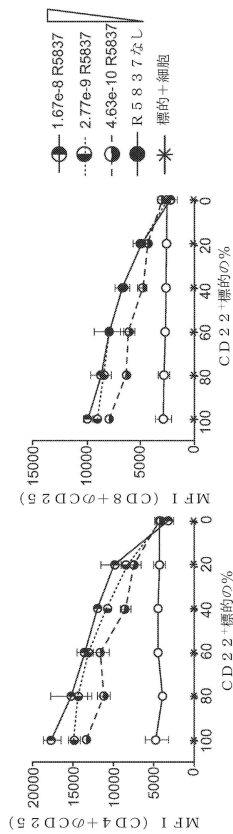
40

50

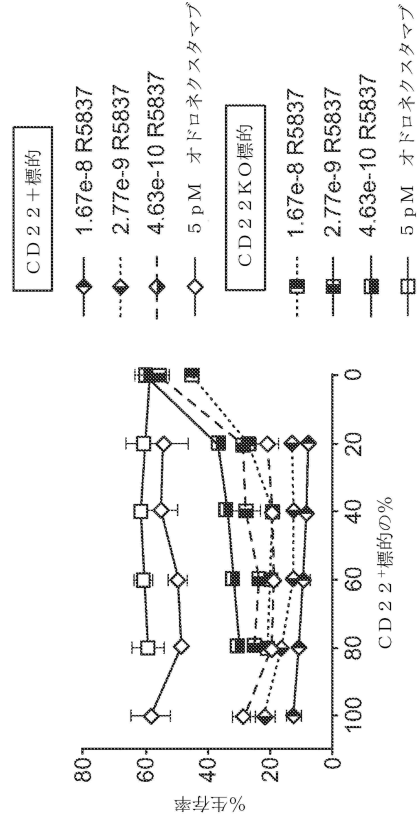
【図 2 F】



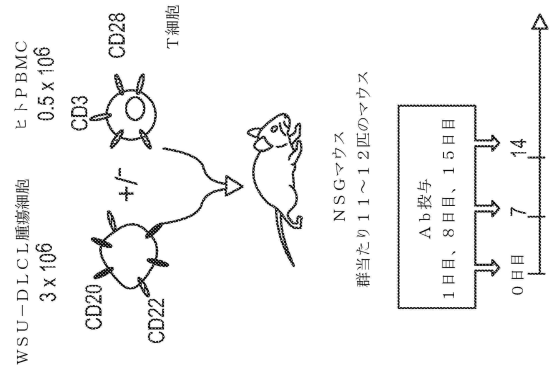
【図 2 H】



【図 2 G】



【図 3 A】



10

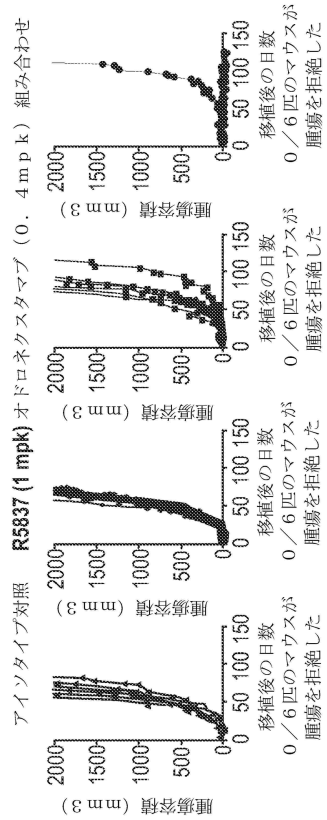
20

30

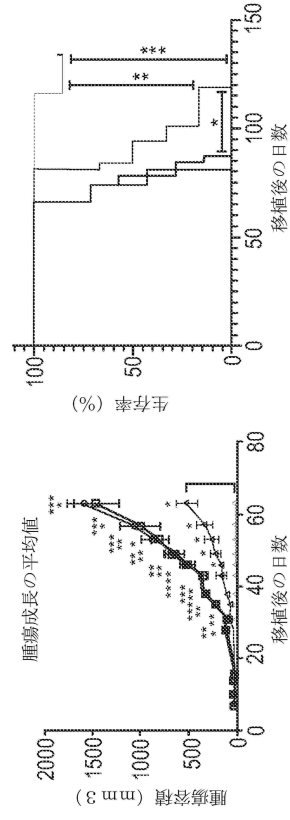
40

50

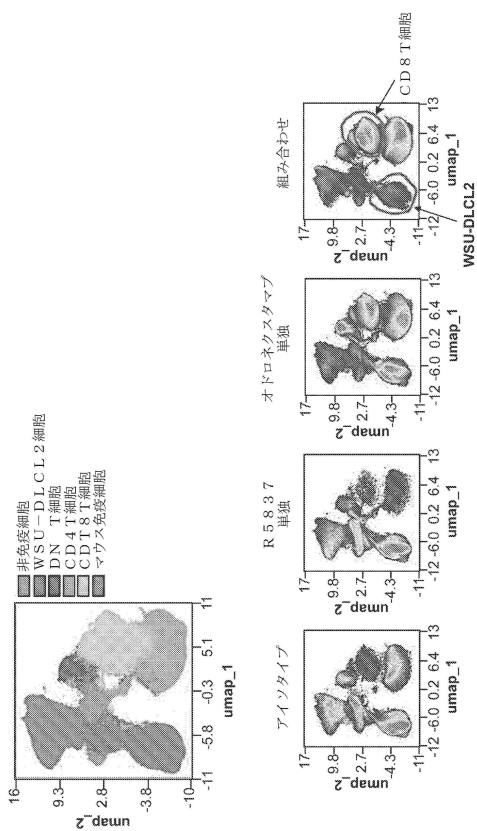
【図 3 B】



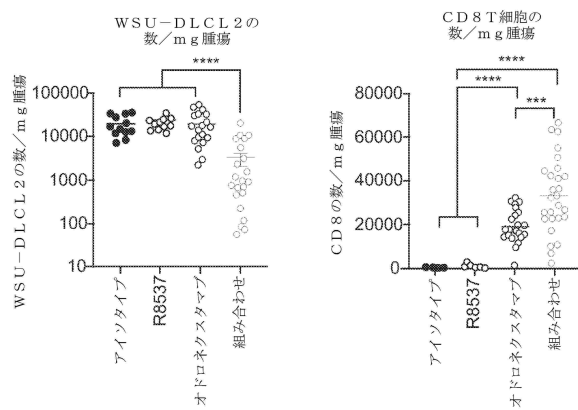
【図 3 C】



【図 3 D】



【図 3 E】



10

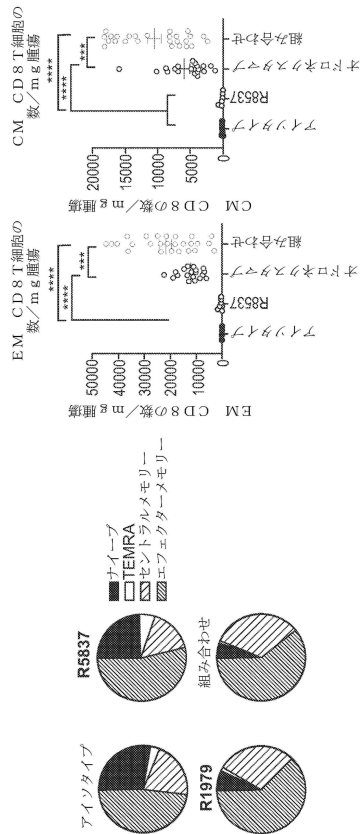
20

30

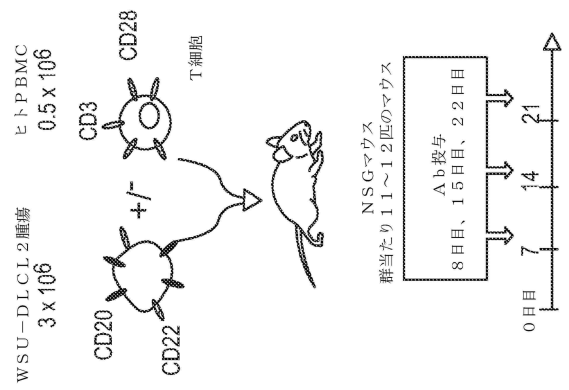
40

50

【図 3 F】



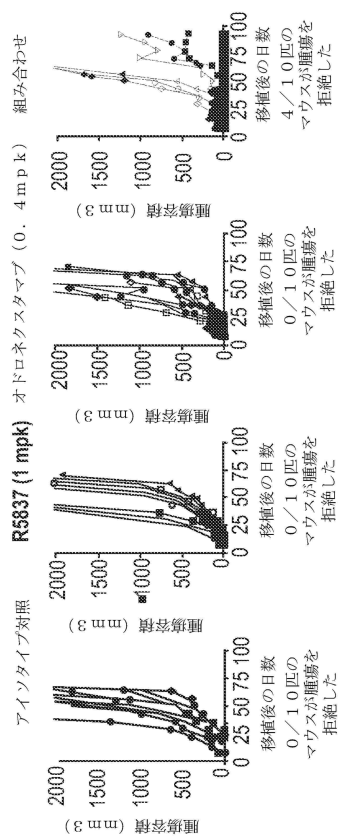
【図 4 A】



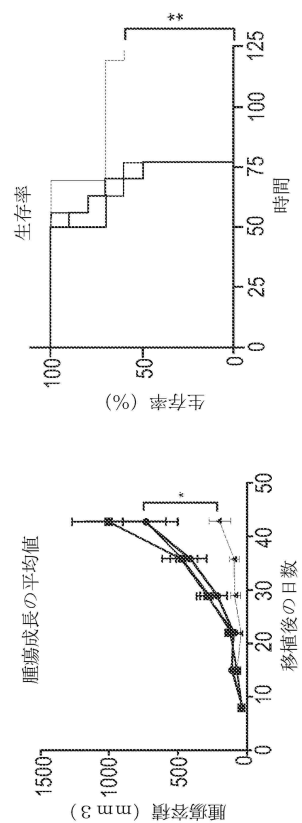
10

20

【図 4 B】



【図 4 C】

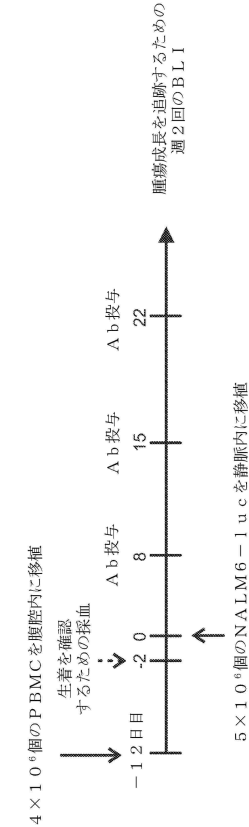


30

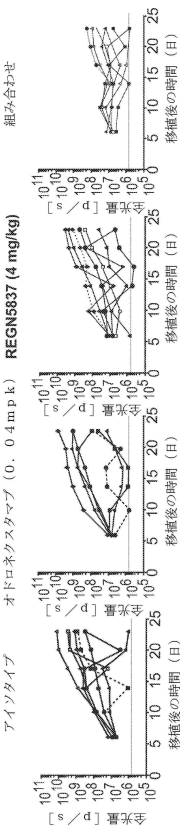
40

50

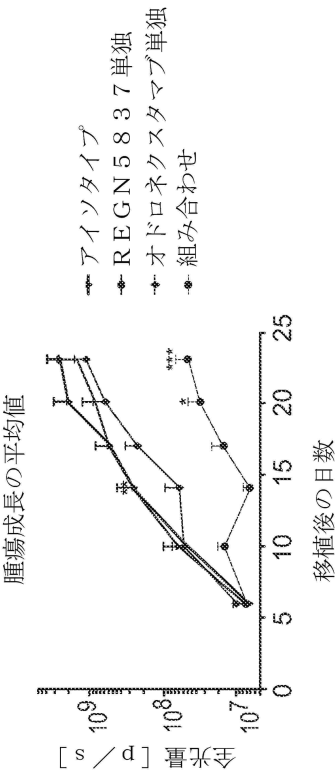
【図 4 D】



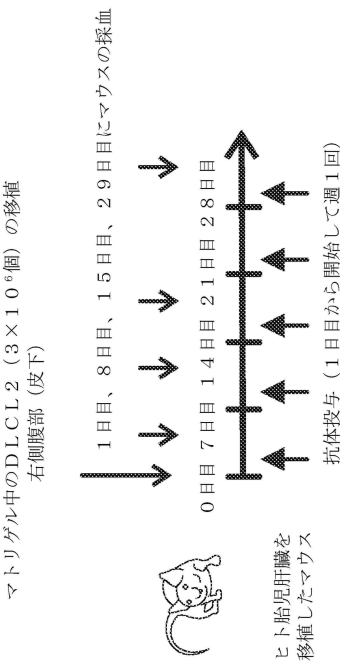
【図 4 E】



【図 4 F】



【図 5 A】



10

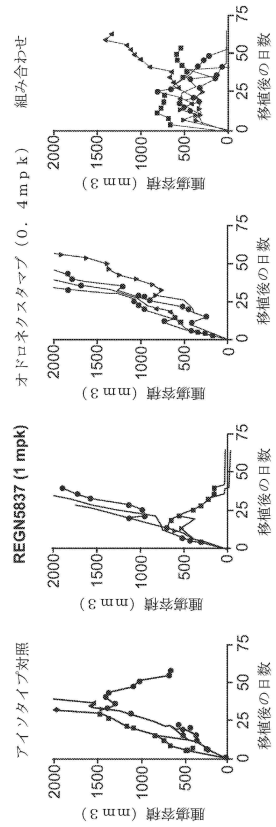
20

30

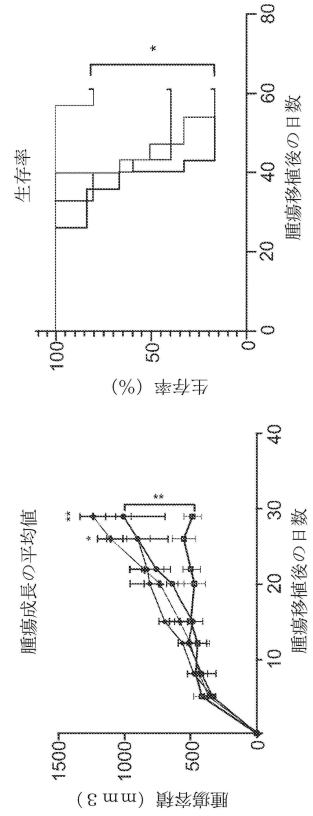
40

50

【図 5 B】



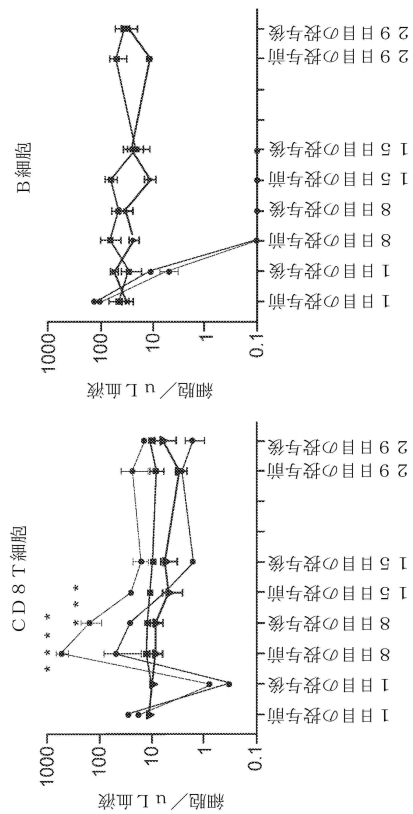
【図 5 C】



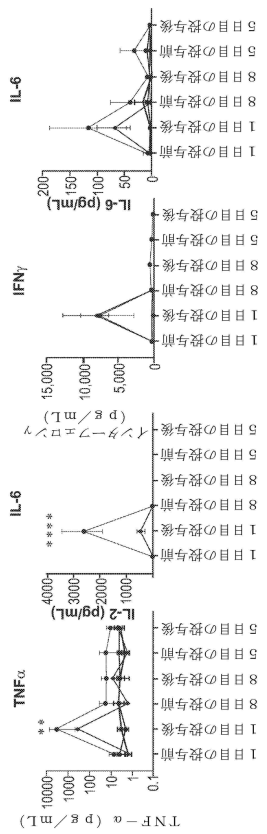
10

20

【図 5 D】



【図 5 E】

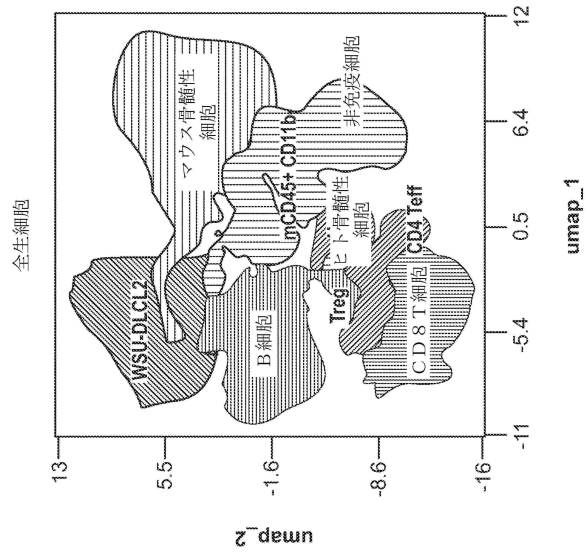


30

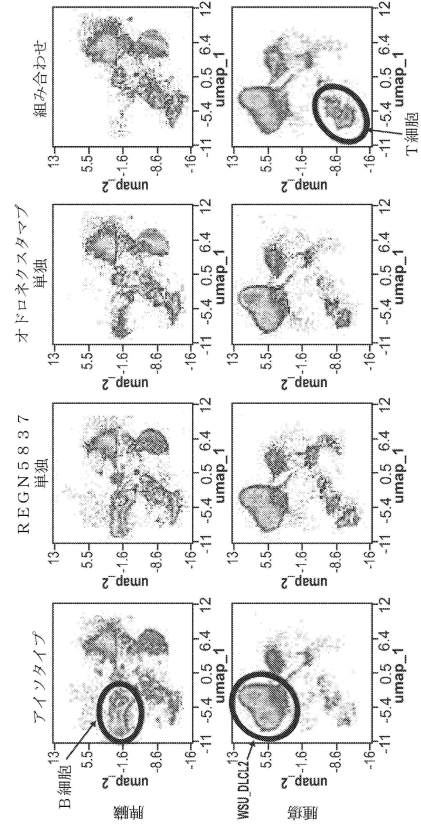
40

50

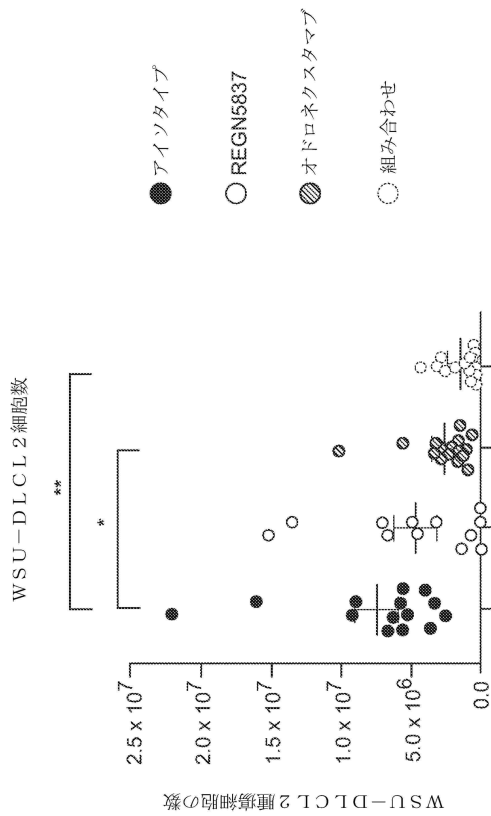
【図 5 F - 1】



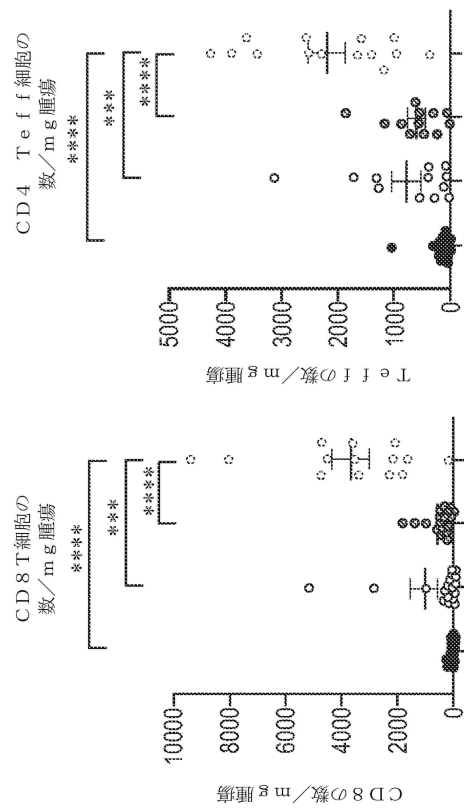
【図 5 F - 2】



【図 5 F - 3】



【図 5 G】



10

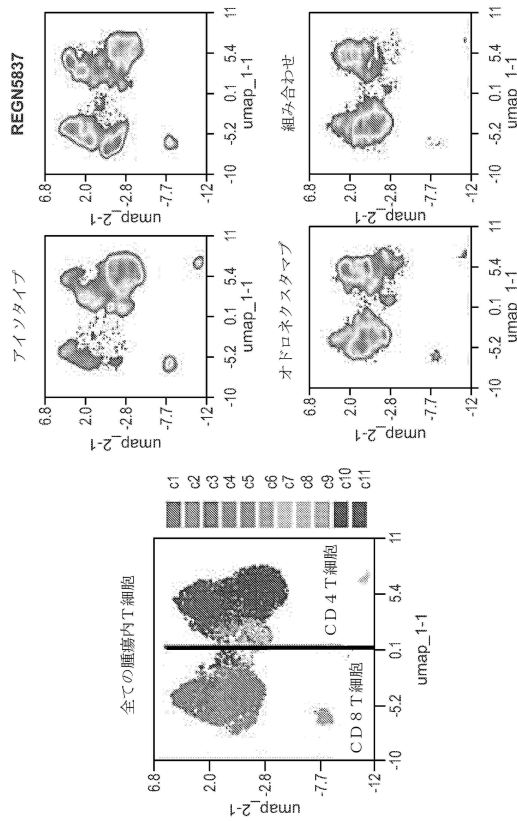
20

30

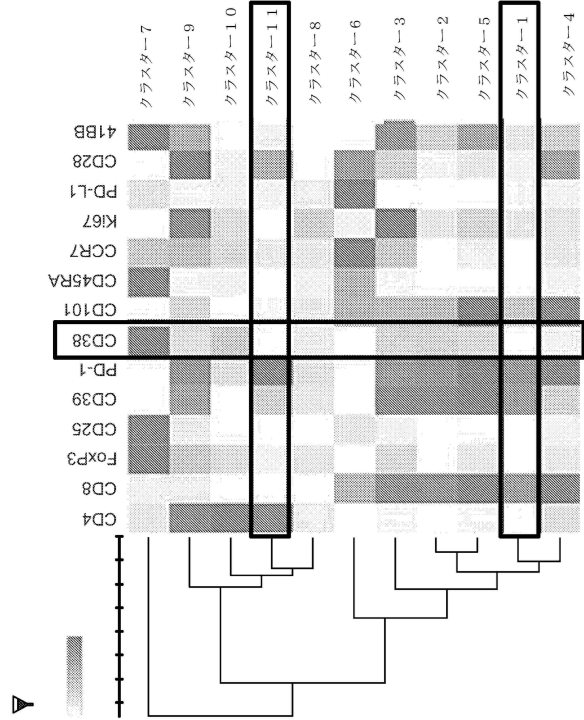
40

50

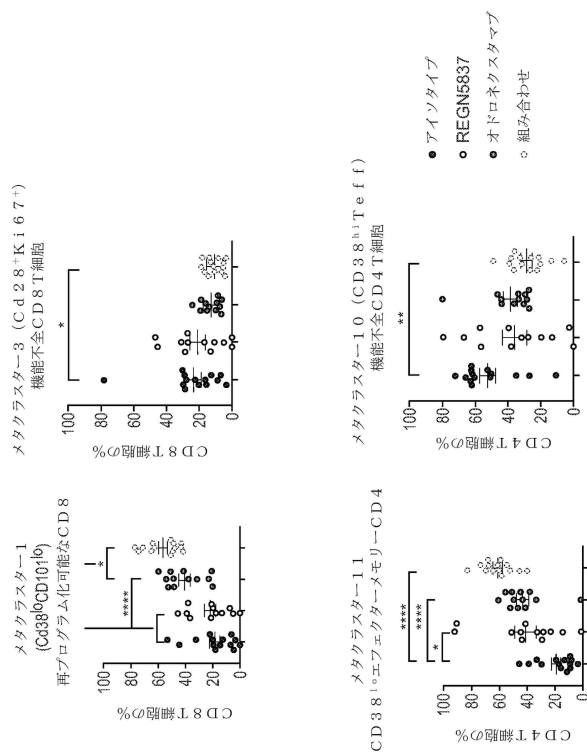
【図 5 H】



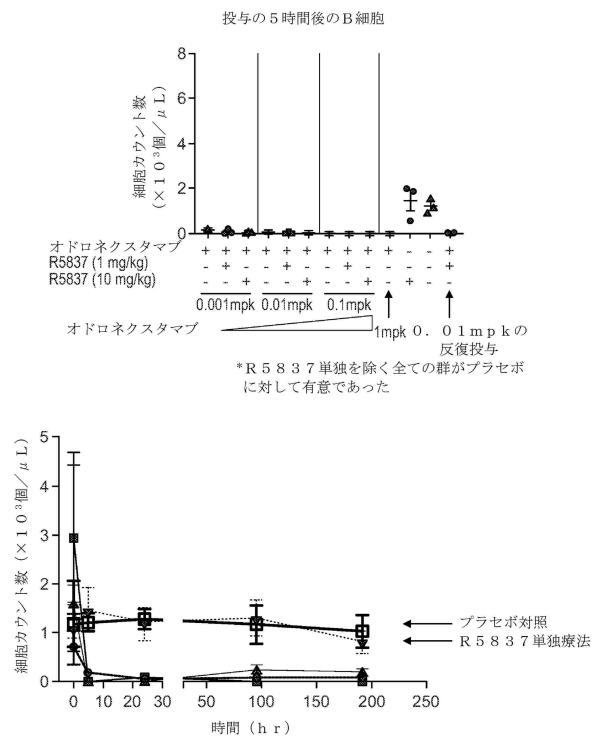
【図 5 I】



【図 5 J】



【図 6 A】



10

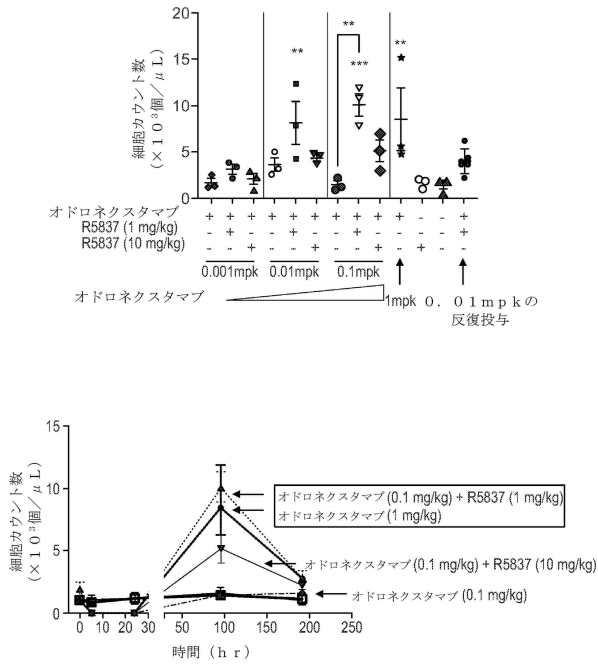
20

30

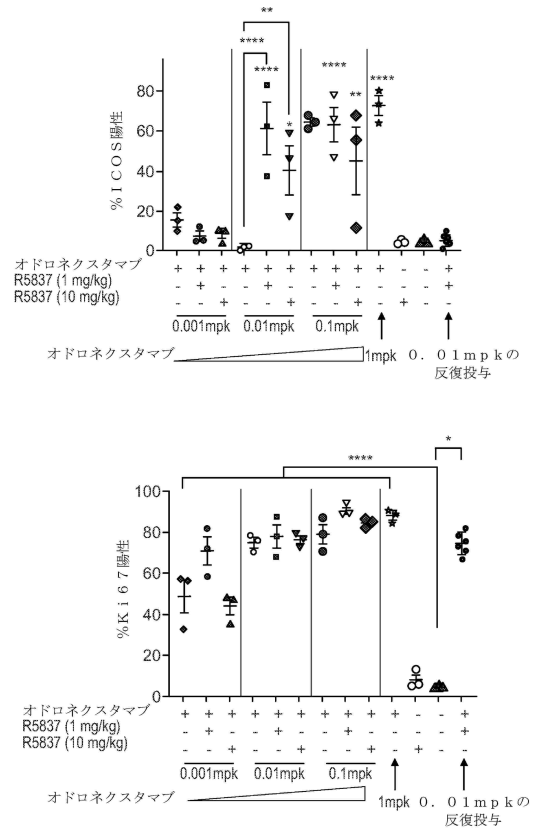
40

50

【図 6 B】



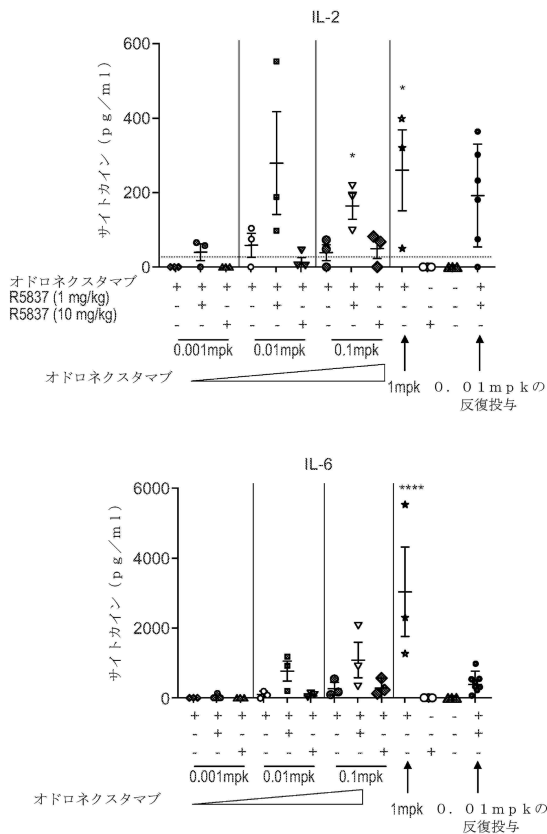
【図 6 C】



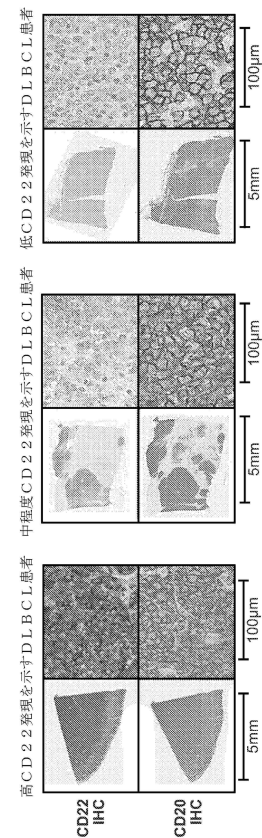
10

20

【図 6 D】



【図 7 A】

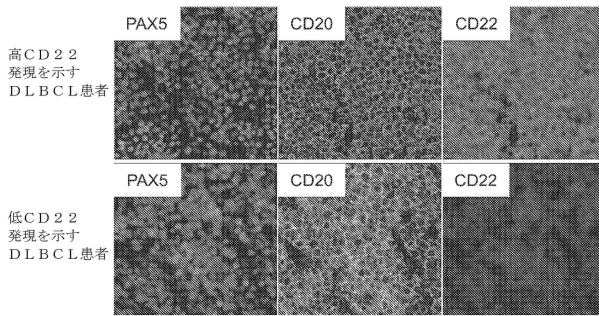


30

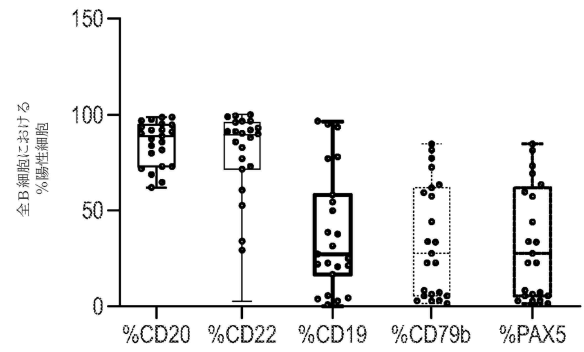
40

50

【図 7 B】

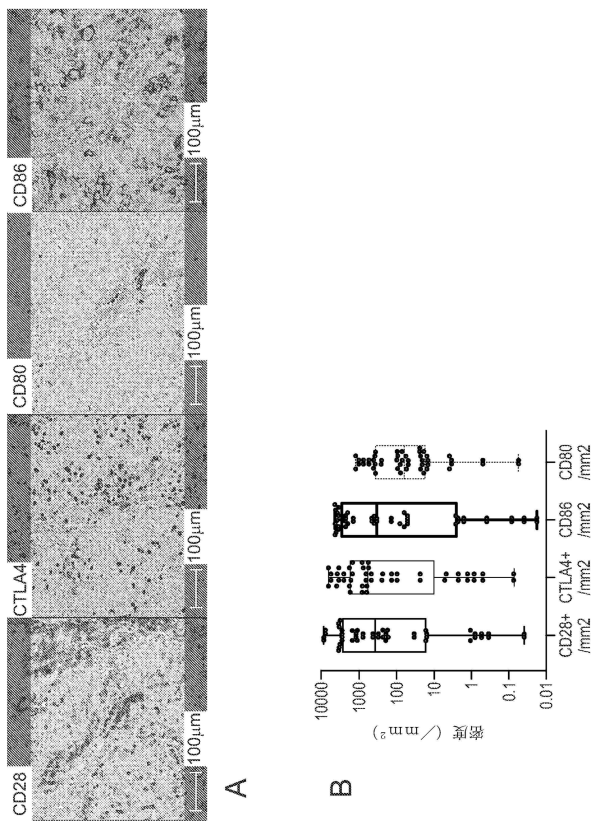


【図 7 C】

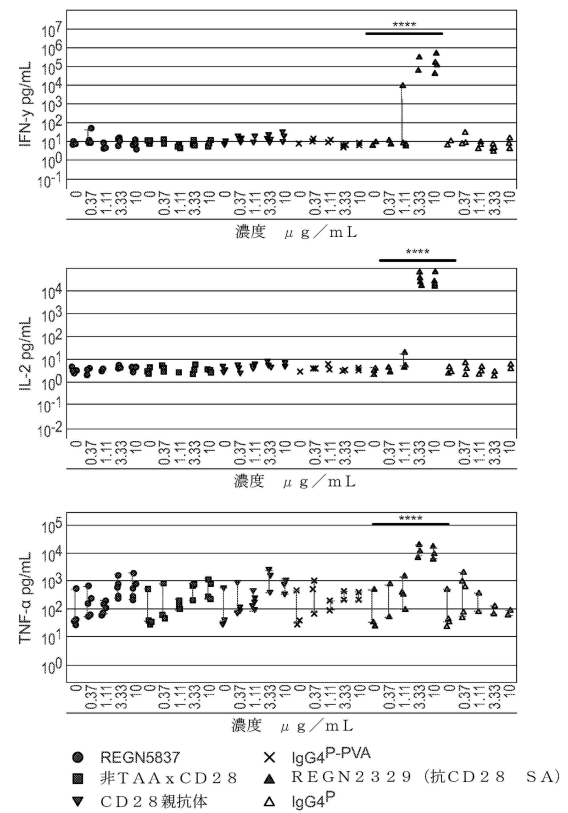


10

【図 8】



【図 9 A】



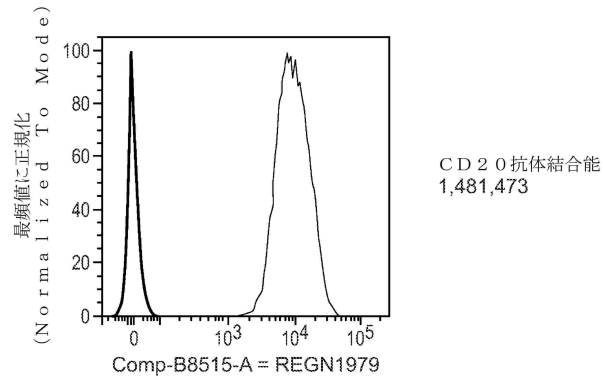
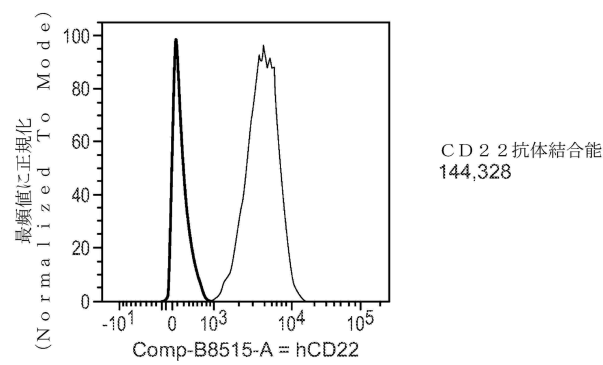
20

30

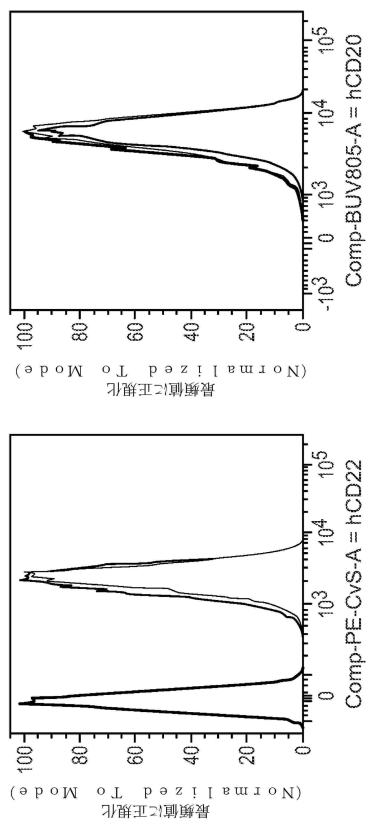
40

50

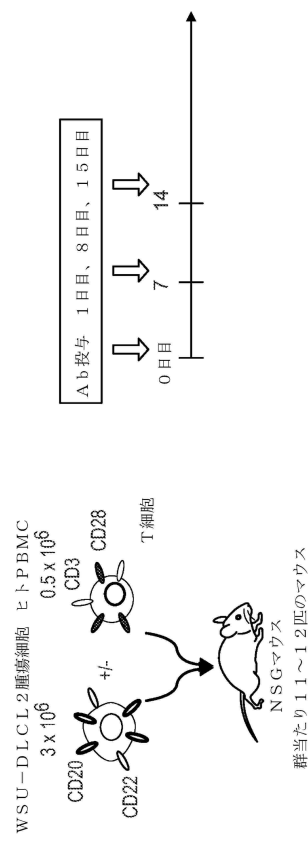
【図 9 B】



【図 9 D】



【図 1 0 A】



PBMC	細胞株	オドロンネクスチン または対照の 固定剤	細胞生存率		CD4 ⁺ T細胞	CD8 ⁺ T細胞
			EC50 (M)	Max %	EC50 (M)	Max %
ヒト	NALM-6	15pMのオドロンネクスチン	3.3x10 ⁻¹⁰	30	1.02x10 ⁻⁹	40
	Raji	15pMのIgG4P-PVA	2.94x10 ⁻¹⁰	53	ND	3.0
	CD80/CD86	15pMのオドロンネクスチン	9.1x10 ⁻¹²	18	3.40x10 ⁻¹¹	81
	DKO	15pMのIgG4P-PVA	NC	55	5.46x10 ⁻¹¹	5.3

10

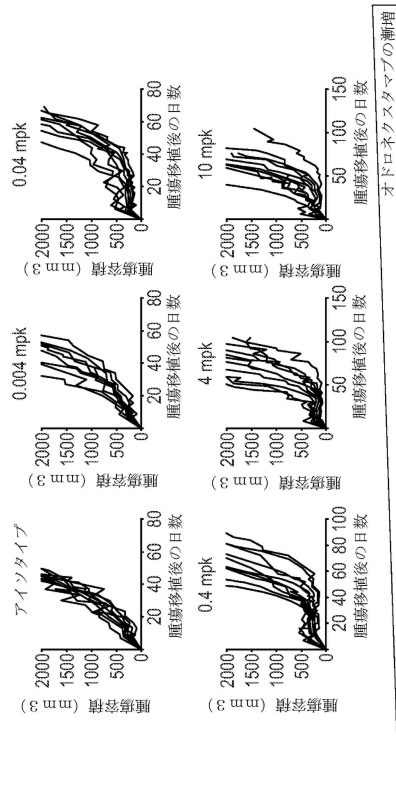
20

30

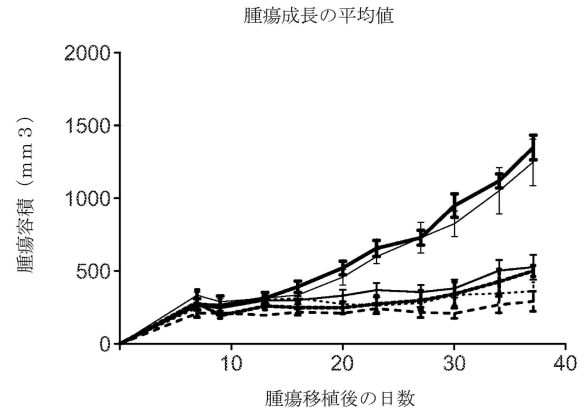
40

50

【図 10 B】



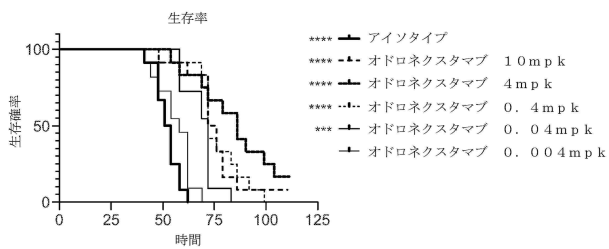
【図 10 C】



10

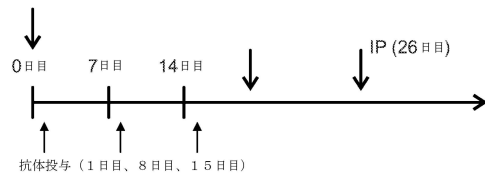
20

【図 10 D】



【図 11 A】

50%マトリゲル中のWSU-DLCL2 (3×10^6 個) + PBMC (0.5×10^6 個) を移植
右側腹部 (皮下)

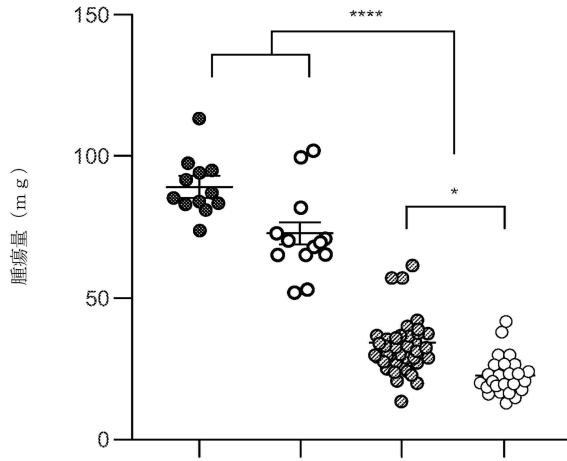


30

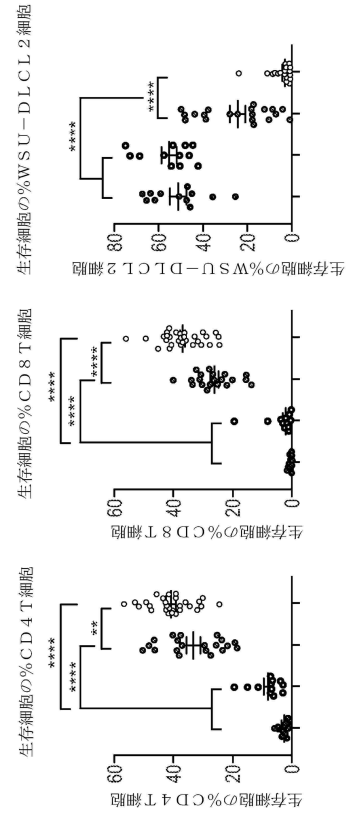
40

50

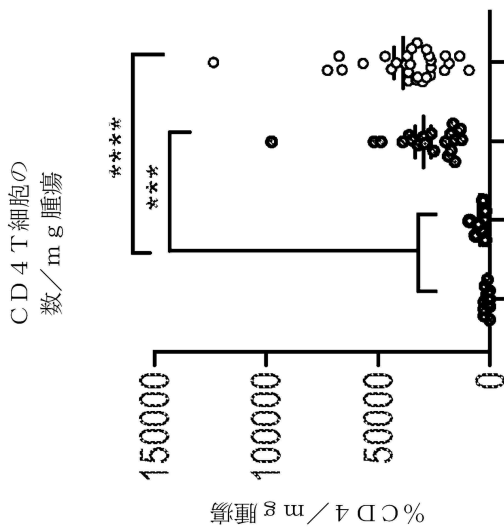
【図 1 1 B】



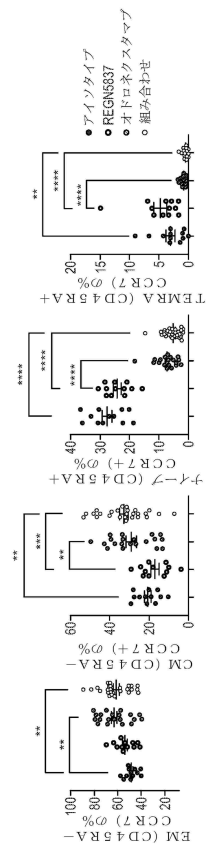
【図 1 1 C】



【図 1 1 D】



【図 1 1 E】



10

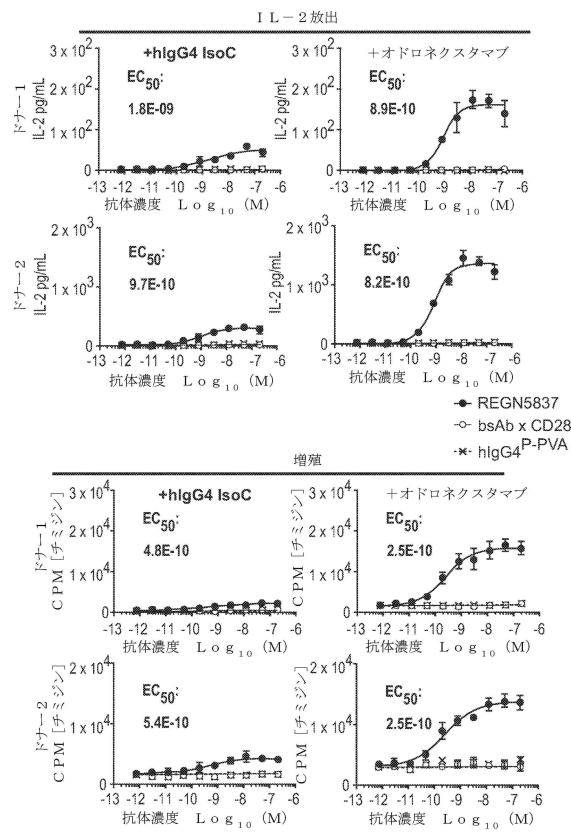
20

30

40

50

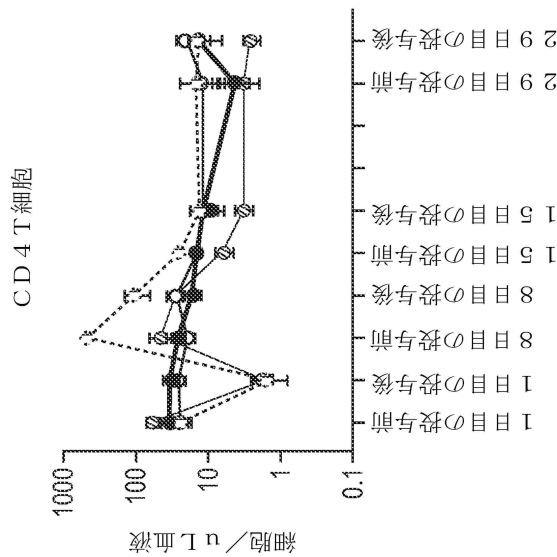
【図 1 2 A】



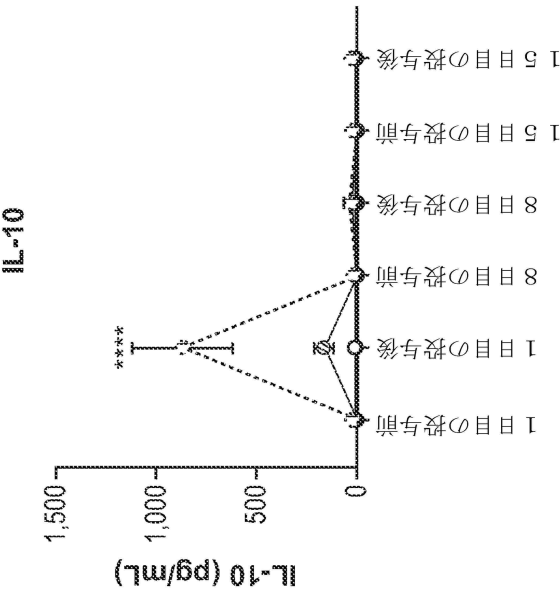
【図 1 2 B】

T細胞増殖	ヒト一次T細胞からのIL2放出		固定濃度の抗体*	ドナー	標的細胞株
	REGN5837 EC50 (M) ^b	増強倍率 (IL2) ^c			
	REGN5837 EC50 (M) ^b	増強倍率 (増殖) ^c			
	2.5x10 ⁻¹⁰	85.2	オドロネクスタマブ	ドナー 1	NALM-6
	4.8x10 ⁻¹⁰	12.1	IgG4 ^P -PVA	ドナー 1	
	2.5x10 ⁻¹⁰	48.7	オドロネクスタマブ	ドナー 2	
	5.4x10 ⁻¹⁰	6.9	IgG4 ^P -PVA	ドナー 2	

【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



10

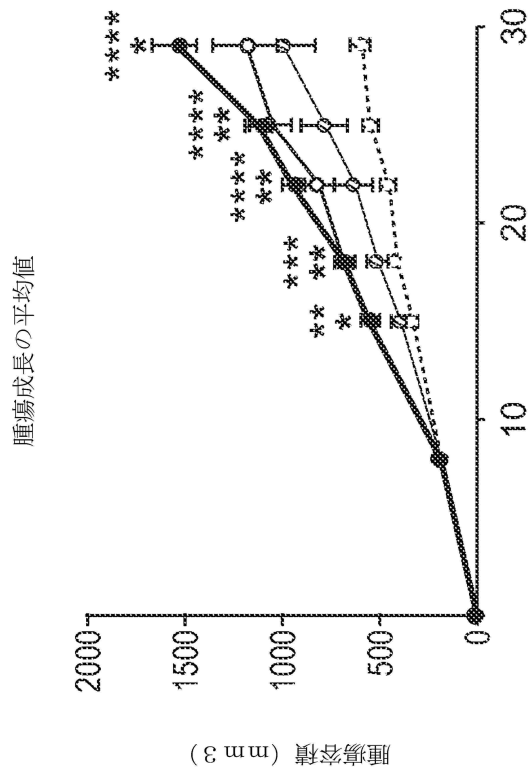
20

30

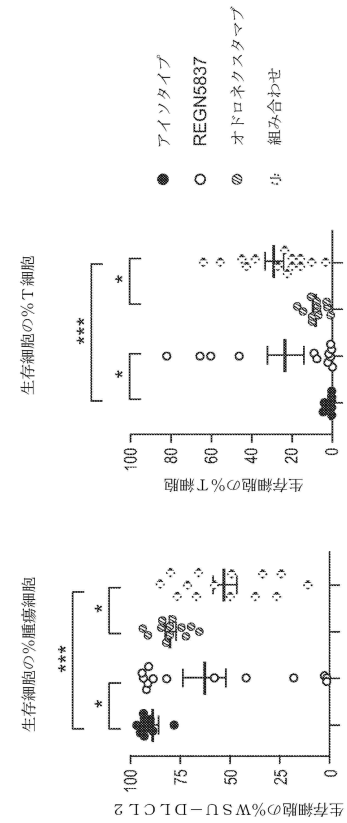
40

50

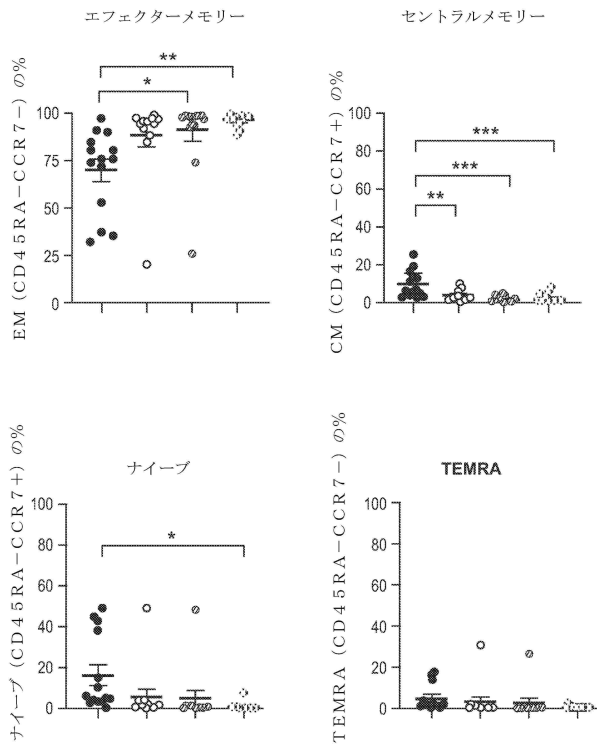
【図 1 3 C】



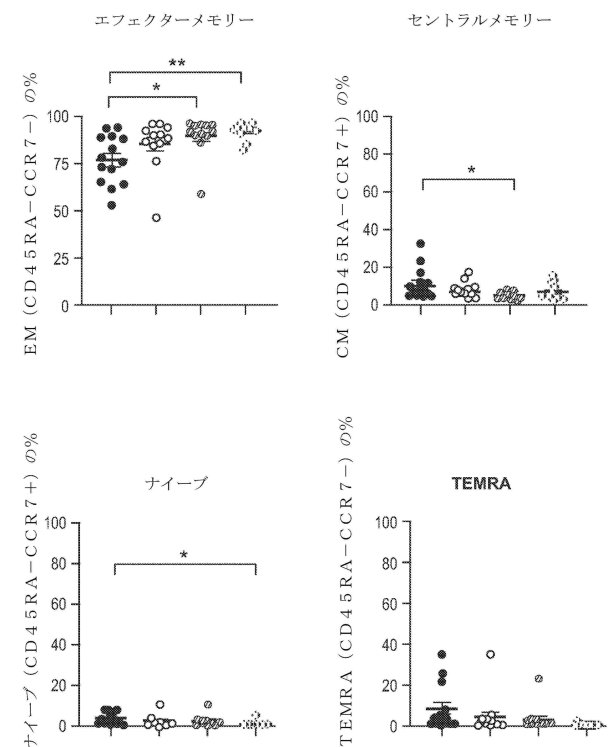
【図 1 3 D】



【図 1 3 E】



【図 1 3 F】



10

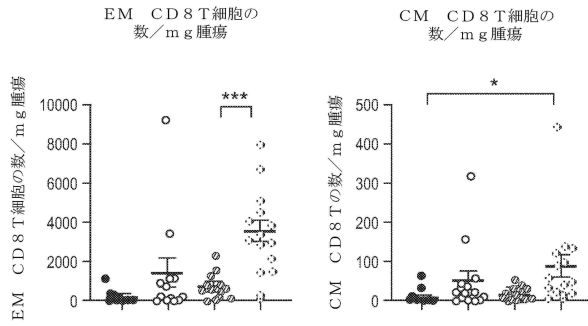
20

30

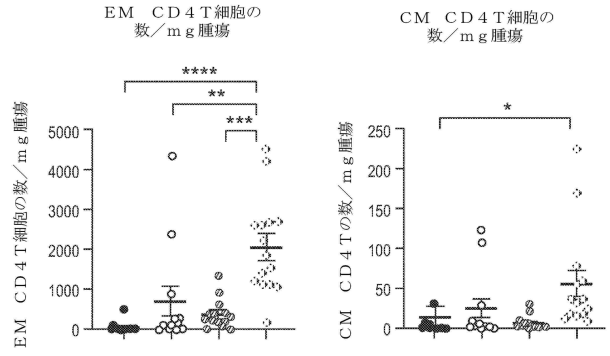
40

50

【図 1 3 G】

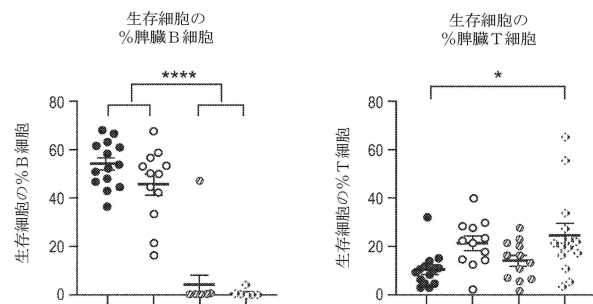


【図 1 3 H】

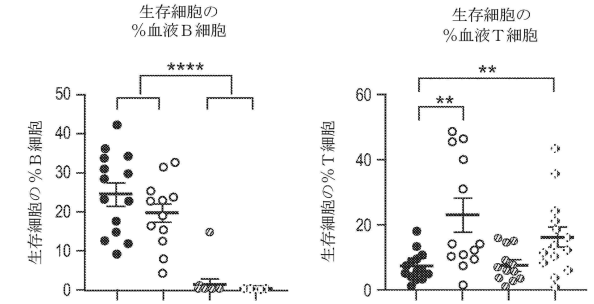


10

【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



20

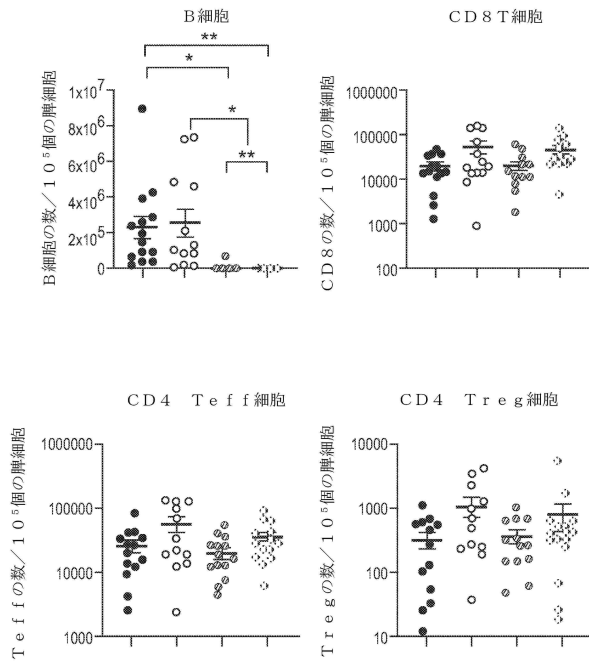
30

40

50

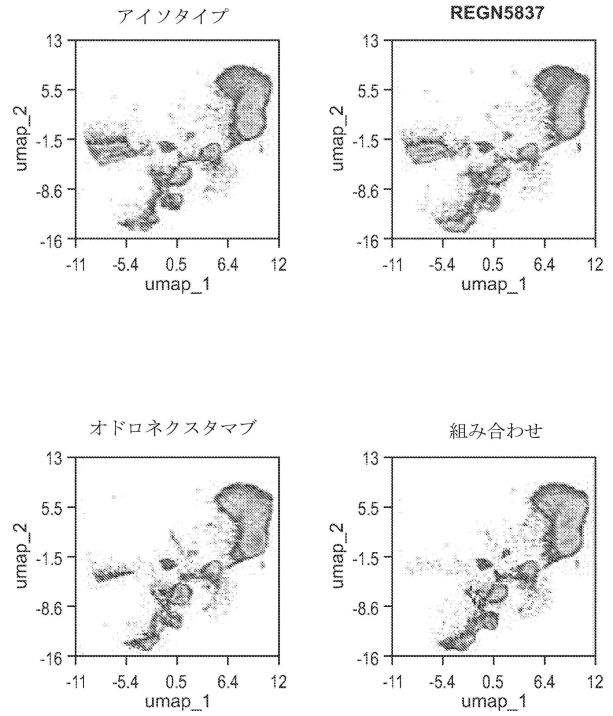
【図 1 4 C】

脾臓リンパ球サブセット



【図 1 4 D】

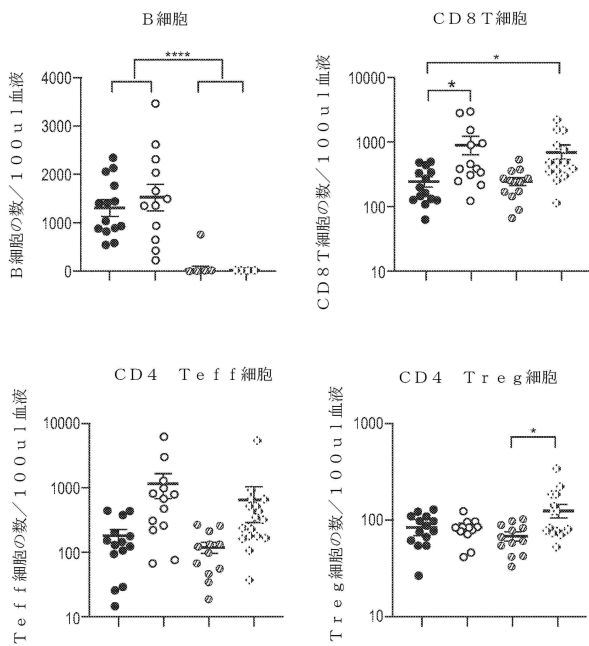
全ての生存血液細胞



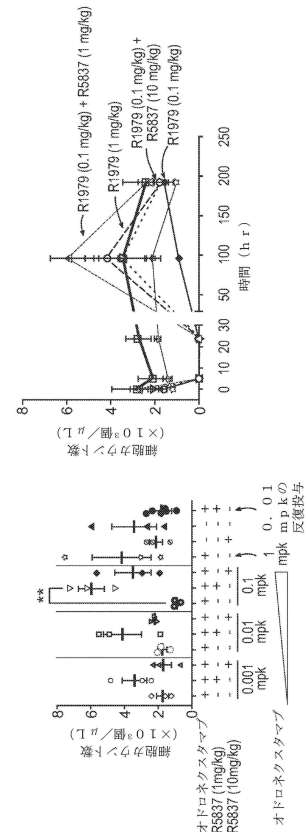
10

20

【図 1 4 E】

血液
リンパ球サブセット

【図 1 5 A】

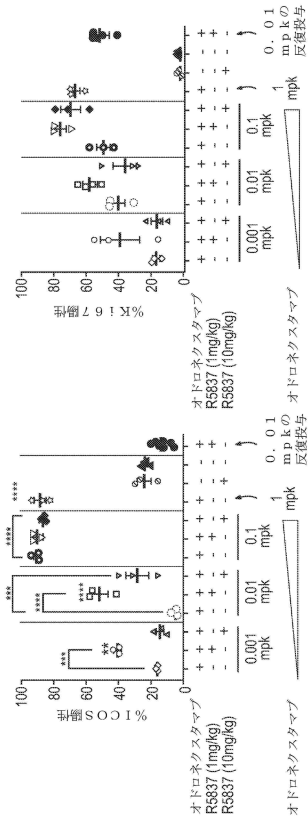


30

40

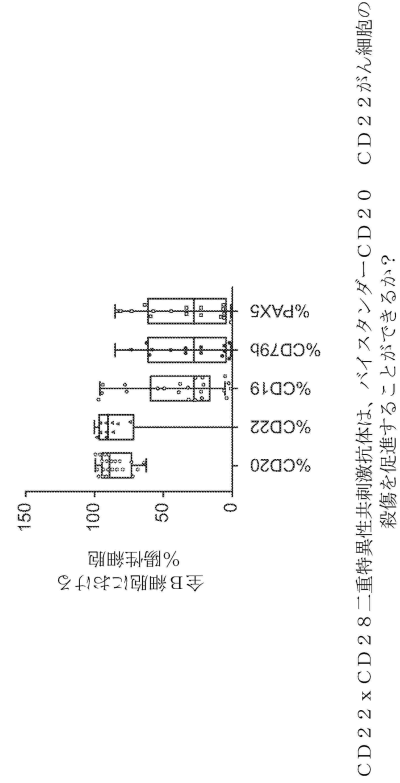
50

【図 15 B】



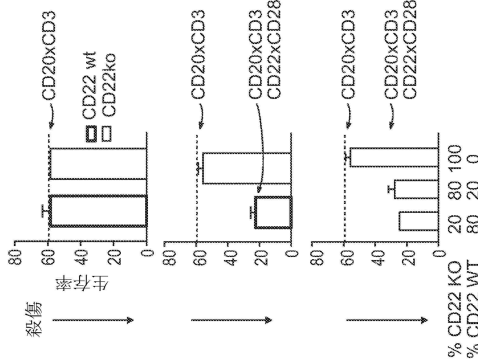
【図 16】

DLBCL患者試料におけるCD22発現は、CD20発現より変動的である



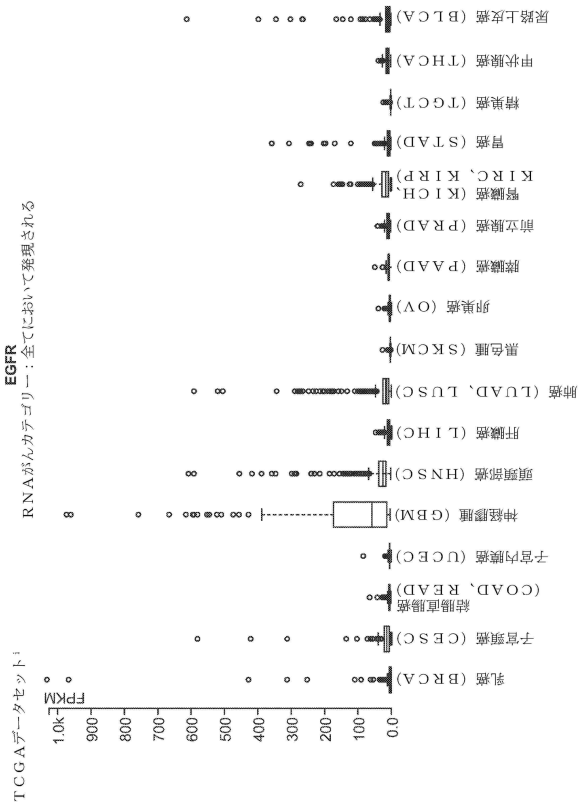
【図 17】

CD22 KO及びCD22 WT腫瘍細胞の混合培養物において、CD22 x CD28とCD20 x CD3との組み合わせは、パイスタンダーCD22 KO標的細胞のT細胞による殺傷の増強をもたらすことができる



【図 18】

EGFR
RNAがんゲノム：全てにおいて発現される



10

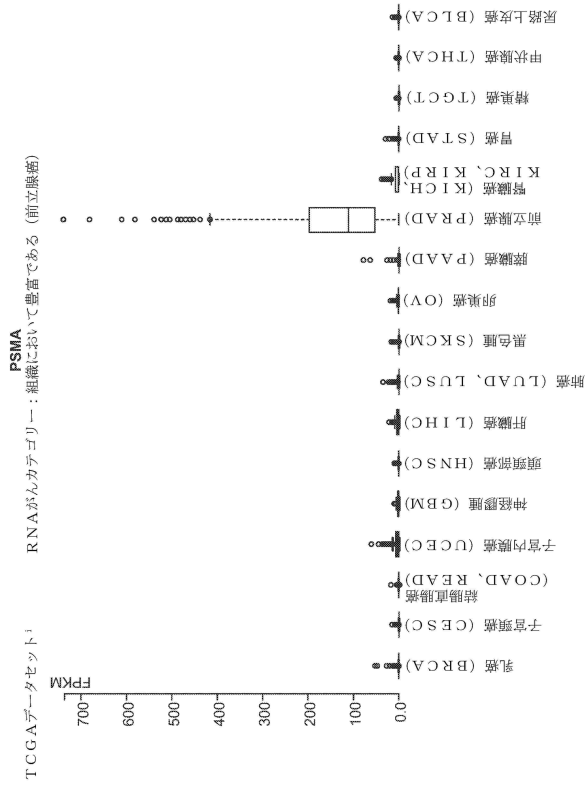
20

30

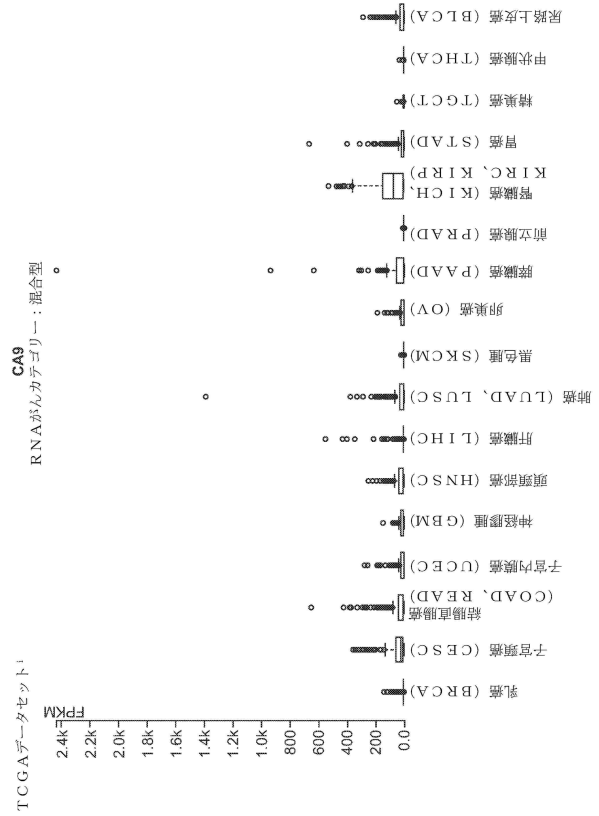
40

50

【図 19】



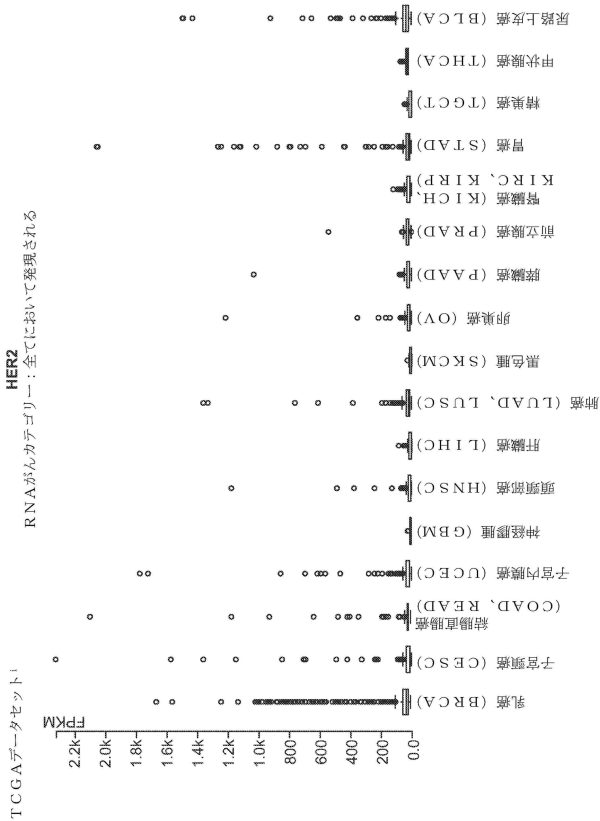
【図 20】



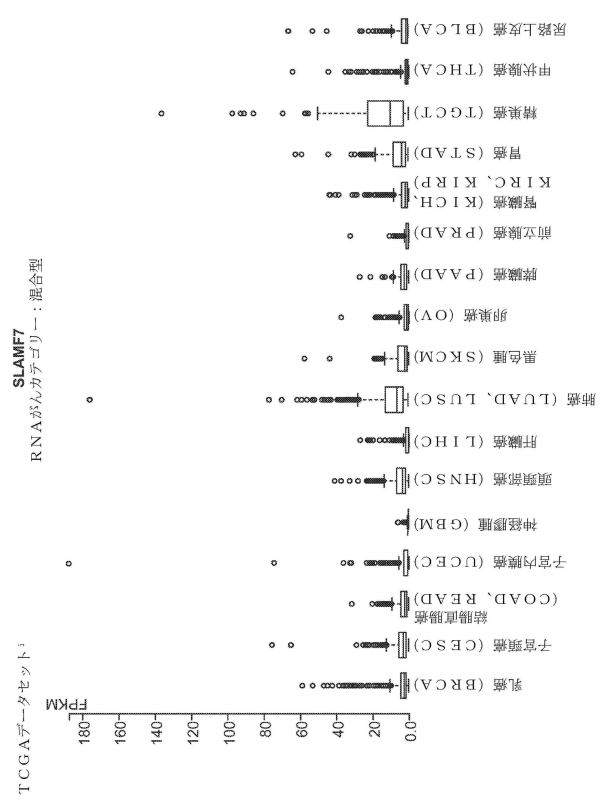
10

20

【図 21】



【図 22】

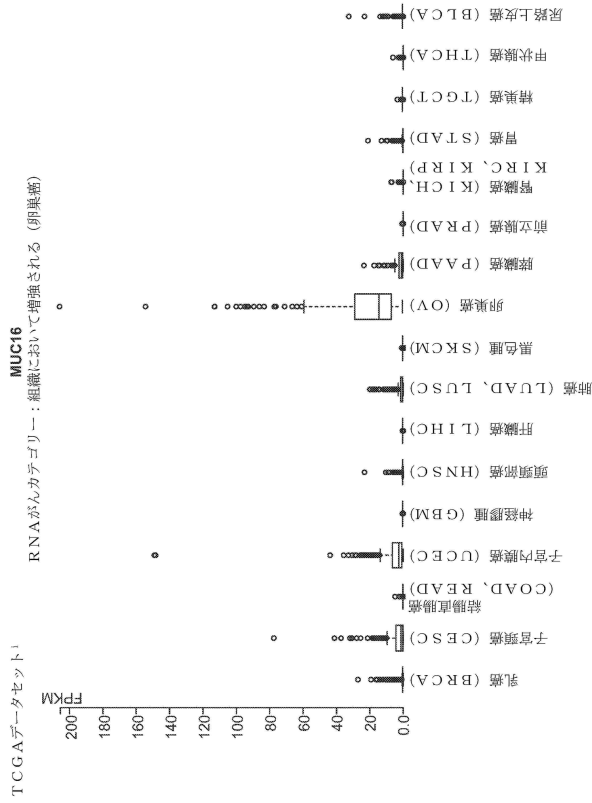


30

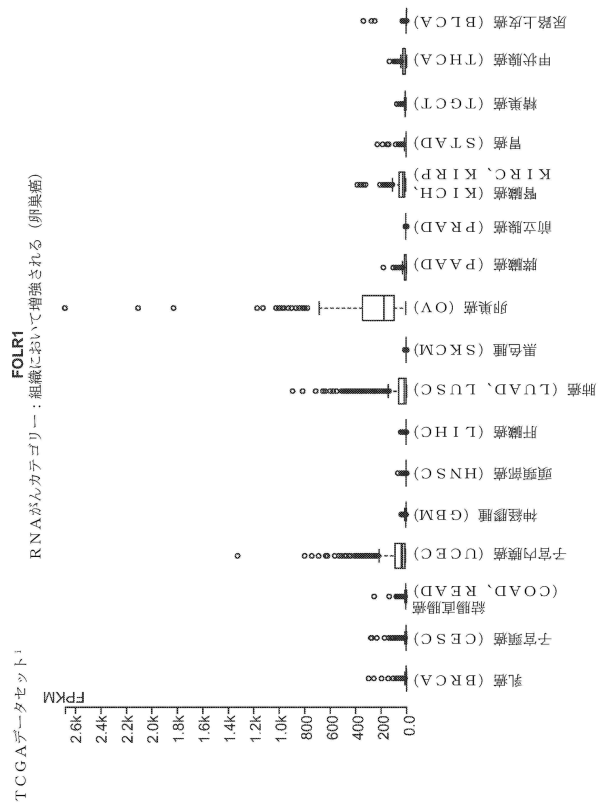
40

50

【図 2 3】



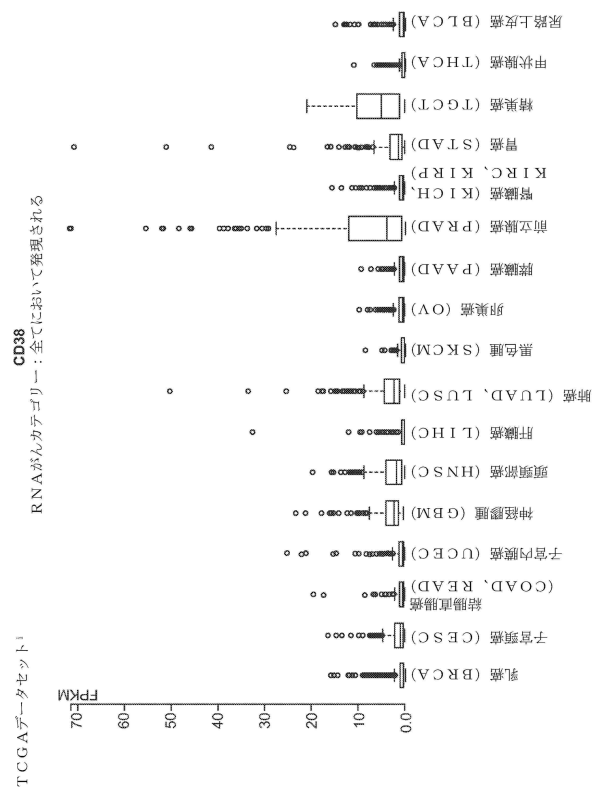
【図 2 4】



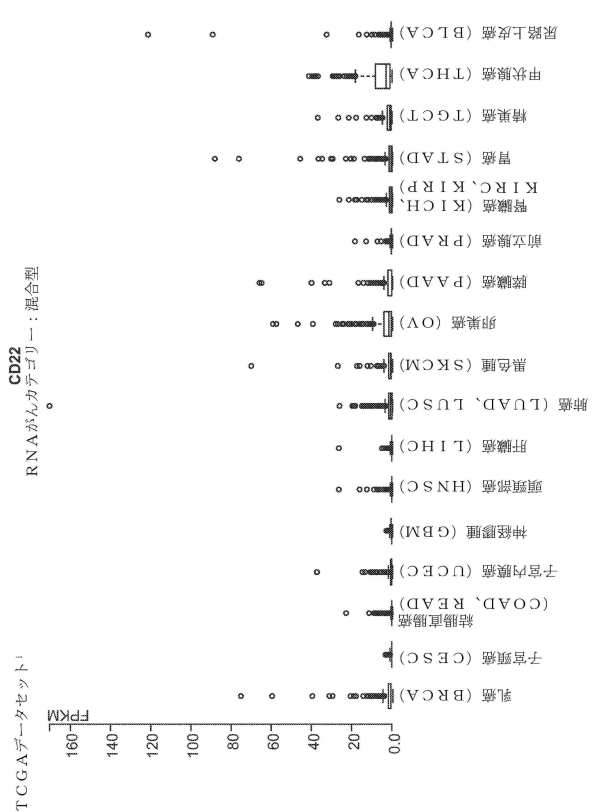
10

20

【図 2 5】



【図 2 6】



30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/065627

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61P35/00 C07K16/28 A61K39/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61P A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/132066 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 25 June 2020 (2020-06-25) paragraphs 0011, 0008, 0035, 0037, 00176, 00255; claims 1, 8, 9, 32, 35; example 11; table 5 ----- -/--	1-112
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 July 2023		Date of mailing of the international search report 28/07/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mattugini, Nicola

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/065627

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/065627

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Dimitris Skokos ET AL: "A class of costimulatory CD28-bispecific antibodies that enhance the antitumor activity of CD3-bispecific antibodies", Sci. Transl. Med, 8 January 2020 (2020-01-08), page Article No.: eaaw7888, XP055671428, DOI: 10.1126/scitranslmed.aaw7888 Retrieved from the Internet: URL:https://stm.sciencemag.org/content/12/525/eaaw7888.full.pdf [retrieved on 2020-02-25] pages 2-4; abstract -----	57-59, 77, 78, 87, 91-107
A	WAITE JANELLE C. ET AL: "Tumor-targeted CD28 bispecific antibodies enhance the antitumor efficacy of PD-1 immunotherapy", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 12, no. 549, 24 June 2020 (2020-06-24), page 2325, XP093057250, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.aba2325 the whole document -----	1-112
A	GAOWEI FAN ET AL: "Bispecific antibodies and their applications", JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY, vol. 8, no. 130, 1 December 2015 (2015-12-01), pages 1-14, XP055298353, DOI: 10.1186/s13045-015-0227-0 the whole document -----	1-112
A	SHAH NIRALI N. ET AL: "Characterization of CD22 expression in acute lymphoblastic leukemia : CD22 Expression in ALL", PEDIATRIC BLOOD AND CANCER, [Online] vol. 62, no. 6, 1 March 2015 (2015-03-01), pages 964-969, XP93065131, US ISSN: 1545-5009, DOI: 10.1002/pbc.25410 Retrieved from the Internet: URL:https://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1002%2Fpbc.25410> page 1 ----- -/--	1-112

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/065627

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WEI JOYCE ET AL: "CD22-targeted CD28 bispecific antibody enhances antitumor efficacy of odronextamab in refractory diffuse large B cell lymphoma models", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 14, no. 670, 9 November 2022 (2022-11-09), XP93064408, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.abn1082 the whole document -----	1-112

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/065627

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020132066 A1	25-06-2020	AU 2019405747 A1	17-06-2021
		BR 112021010238 A2	24-08-2021
		CA 3124168 A1	25-06-2020
		CL 2021001630 A1	17-12-2021
		CN 113164598 A	23-07-2021
		CO 2021009004 A2	30-07-2021
		EA 202191580 A1	01-11-2021
		EP 3897715 A1	27-10-2021
		IL 283945 A	29-07-2021
		JP 2022510964 A	28-01-2022
		KR 20210104836 A	25-08-2021
		MA 54540 A	27-10-2021
		US 2020239576 A1	30-07-2020
		US 2023174652 A1	08-06-2023
		WO 2020132066 A1	25-06-2020

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/12 (2015.01)
 C 0 7 K 16/46 (2006.01)
 C 0 7 K 16/30 (2006.01)
 C 0 7 K 16/28 (2006.01)

A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 39/00 H
 A 6 1 K 35/12
 C 0 7 K 16/46 Z N A
 C 0 7 K 16/30
 C 0 7 K 16/28

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

弁理士 中村 美樹

(72)発明者

スミス、エリック

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

(72)発明者

スココス、ディミトリス

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

(72)発明者

オルソン、カラ

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

(72)発明者

ヘイバー、ローリック

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

(72)発明者

ウェイ、ジョイス

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

(72)発明者

リン、チャーヤン

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

F ターム (参考)

4C084 AA19 AA22 NA05 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC751
 4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 BB36 BB44 CC22 CC23 EE01 EE03
 GG02 GG03 GG04
 4C087 AA01 AA02 BB63 CA04 MA02 NA05 ZB09 ZB26 ZB27 ZC75
 4H045 AA11 AA30 BA09 BA41 DA76 EA20