

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7155270号
(P7155270)

(45)発行日 令和4年10月18日(2022.10.18)

(24)登録日 令和4年10月7日(2022.10.7)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	Z N A
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
請求項の数 13 (全48頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2020-537816(P2020-537816)	(73)特許権者	520098235
(86)(22)出願日	平成29年9月21日(2017.9.21)		ユーキュア・(ペイジン)・バイオファーマ・カンパニー・リミテッド
(65)公表番号	特表2021-503294(P2021-503294 A)		中華人民共和国・1 0 0 1 7 6 ・ペイジン・ビーディーイー・サウス・ロンファ・ロード・ナンバー・2 ・ビルディング・5 ・アールエム・1 2 0 2
(43)公表日	令和3年2月12日(2021.2.12)	(74)代理人	100108453
(86)国際出願番号	PCT/CN2017/102816		弁理士 村山 靖彦
(87)国際公開番号	WO2019/056281	(74)代理人	100110364
(87)国際公開日	平成31年3月28日(2019.3.28)		弁理士 実広 信哉
審査請求日	令和2年9月18日(2020.9.18)	(74)代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦
		(72)発明者	イ・ヤン
			中華人民共和国・1 0 1 1 1 1 ・ペイジ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗CTLA4抗体及びその用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

重鎖可変領域(VH)と軽鎖可変領域(VL)とを含む、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA4)に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントであって、
 (1)前記VHは、SEQ ID NO: 13もしくは14に示されるアミノ酸配列を含み、且つ、前記VLはSEQ ID NO: 19に示されるアミノ酸配列を含む；又は、
 (2)前記VHは、SEQ ID NO: 21もしくは22に示されるアミノ酸配列を含み、且つ、前記VLは、SEQ ID NO: 25に示されるアミノ酸配列を含む、
 抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項2】

前記VHのアミノ酸配列はSEQ ID NO: 13であり、且つ前記VLのアミノ酸配列はSEQ ID NO: 19であり、又は
 前記VHのアミノ酸配列はSEQ ID NO: 14であり、且つ前記VLのアミノ酸配列はSEQ ID NO: 19である、
 請求項1に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項3】

前記VHのアミノ酸配列はSEQ ID NO: 21であり、且つ前記VLのアミノ酸配列はSEQ ID NO: 25であり、又は
 前記VHのアミノ酸配列はSEQ ID NO: 22であり、且つ前記VLのアミノ酸配列はSEQ ID NO: 25である、

請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

前記抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒト化抗体もしくはその抗原結合フラグメント、又は、一本鎖可変フラグメント (s c F V) である、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

前記抗体がヒト I g G 1 の重鎖定常領域に由来する重鎖定常領域を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸であって、前記ポリペプチドは、
 (1) S E Q I D N O : 1 3 もしくは 1 4 に示される重鎖可変領域 (V H) を含む免疫グロブリン重鎖又はそのフラグメント、及び S E Q I D N O : 1 9 に示される軽鎖可変領域 (V L) を含む免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメント；あるいは
 (2) S E Q I D N O : 2 1 もしくは 2 2 に示される重鎖可変領域 (V H) を含む免疫グロブリン重鎖又はそのフラグメント、及び S E Q I D N O : 2 5 に示される軽鎖可変領域 (V L) を含む免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメント、
 を含む、核酸。

10

【請求項 7】

請求項 6 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の核酸を含む細胞。

20

【請求項 9】

治療剤と共有結合する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む、抗体 - 薬物複合体。

【請求項 10】

前記治療剤は、細胞傷害性薬又は細胞増殖抑制薬である、請求項 9 に記載の抗体 - 薬物複合体。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む、癌を予防または治療するための組成物。

30

【請求項 12】

癌が、乳がん、カルチノイドがん、子宮頸がん、子宮内膜がん、神経膠腫、頭頸部がん、肝臓がん、肺がん、小細胞肺がん、リンパ腫、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、腎がん、結腸直腸がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、膀胱がん、尿道がん、または血液悪性腫瘍である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記癌は、肝臓がん又は小細胞肺がんである、請求項 12 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、抗細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (c y t o t o x i c T - l y m p h o c y t e - a s s o c i a t e d p r o t e i n 4、CTLA4 又は CTLA4 - 4) 抗体及びその用途に関する。

40

【背景技術】

【0002】

現在、がんはヒトの死亡率が最も高い疾患の 1 つである。世界保健機関 (W H O) の統計データによると、2012 年の世界的ながんの発生数と死亡例はそれぞれ 1400 万ヒトと 820 万ヒトに達する。中国では、新たに診断された癌症例は 307 万ヒトであり、死亡者数は 220 万ヒトである。

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】**【0003】**

抗癌抗体の最近の臨床的および商業的成功は、抗体による治療法に大きな注目を引き起こしている。抗体による治療薬に用いられる抗癌抗体を開発する必要がある。

【課題を解決するための手段】**【0004】**

本開示は、抗CTLA4抗体、その抗原結合フラグメント、及びその用途に関する。

【0005】

一つの側面では、本開示は、相補性決定領域(CDRs)1、2及び3(ここで、VH CDR1領域は、選択されたVH CDR1アミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、VH CDR2領域は、選択されたVH CDR2アミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、VH CDR3領域は、選択されたVH CDR3アミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。)を含む重鎖可変領域(VH)と、CDRs 1、2及び3(ここで、VL CDR1領域は、選択されたVL CDR1アミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、VL CDR2領域は、選択されたVL CDR2アミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つVL CDR3領域は、選択されたVL CDR3アミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。)を含む軽鎖可変領域(VL)と、を含む、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA4)に結合した抗体又はその抗原結合フラグメントにおいて、

ここで、選択されたVH CDRs 1、2及び3のアミノ酸配列、並びに選択されたVL CDRs 1、2及び3アミノ酸の配列は、以下のいずれの1つである、抗体又はその抗原結合フラグメントに関する。

(1) 選択されたVH CDR 1、2、3のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 1、2、3に示され、且つ、選択されたVL CDR 1、2、3のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 4、5、6に示されること、

(2) 選択されたVH CDR 1、2、3のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 7、8、9に示され、且つ、選択されたVL CDR 1、2、3のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 10、11、12に示されること、

(3) 選択されたVH CDR 1、2、3のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 45、46、47に示され、且つ、選択されたVL CDR 1、2、3のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 48、49、50に示されること、

(4) 選択されたVH CDR 1、2、3のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 51、52、53に示され、且つ選択されたVL CDR 1、2、3のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 54、55、56に示されること。

【0006】

幾つかの実施態様において、VHは、それぞれSEQ ID NO: 1、2及び3に示されるアミノ酸配列を有するCDR 1、2、3を含み、且つVLは、それぞれSEQ ID NO: 4、5及び6に示されるアミノ酸配列を有するCDR 1、2、3を含む。

【0007】

幾つかの実施態様において、VHは、それぞれSEQ ID NO: 7、8及び9に示されるアミノ酸配列を有するCDR 1、2、3を含み、且つVLは、それぞれSEQ ID NO: 10、11及び12に示されるアミノ酸配列を有するCDR 1、2、3を含む。

【0008】

幾つかの実施態様において、前記抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトCTLA4に特異的に結合している。幾つかの実施態様において、前記抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒト化抗体又はその抗原結合フラグメントである。幾つかの実施態様において、前記抗体又は抗原結合フラグメントは、一本鎖可変フラグメント(scFV)である。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 9 】

一つの側面では、本開示は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸に関し、前記ポリペプチドは、

(1) 重鎖可変領域 (V H) を含む免疫グロブリン重鎖又はそのフラグメントにおいて、前記重鎖可変領域 (V H) は、それぞれ S E Q I D N O : 1、2 及び 3 に示されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域 (C D R) 1、2 及び 3 を含み、且つ前記 V H は S E Q I D N O : 18、19、20 又は 70 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L) とペアリングする際に C T L A 4 に結合する免疫グロブリン重鎖又はそのフラグメント；

(2) V L を含む免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメントにおいて、前記 V L は、それぞれ S E Q I D N O : 4、5 及び 6 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2 及び 3 を含み、且つ前記 V L は、S E Q I D N O : 13、14、15、16、17 又は 69 に示されるアミノ酸配列を含む V H とペアリングする際に C T L A 4 に結合する免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメント；

(3) 重鎖可変領域 (V H) を含む免疫グロブリン重鎖又はそのフラグメントにおいて、前記重鎖可変領域 (V H) は、それぞれ S E Q I D N O : 7、8 及び 9 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2 及び 3 を含み、且つ前記 V H は、S E Q I D N O : 25、26、27、28 又は 72 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L) とペアリングする際に C T L A 4 に結合する免疫グロブリン重鎖又はそのフラグメント；又は

(4) V L を含む免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメントにおいて、前記 V L は、それぞれ S E Q I D N O : 10、11 及び 12 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2 及び 3 を含み、且つ前記 V L は、S E Q I D N O : 21、22、23、24 又は 71 に示されるアミノ酸配列を含む V H とペアリングする際に C T L A 4 に結合する免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメント；

(5) 重鎖可変領域 (V H) を含む免疫グロブリン重鎖又はそのフラグメントにおいて、前記重鎖可変領域 (V H) は、それぞれ S E Q I D N O : 45、46 及び 47 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2 及び 3 を含み、且つ前記 V H は、S E Q I D N O : 74 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L) とペアリングする際に C T L A 4 に結合する免疫グロブリン重鎖又はそのフラグメント；

(6) V L を含む免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメントにおいて、前記 V L は、それぞれ S E Q I D N O : 48、49 及び 50 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2 及び 3 を含み、且つ前記 V L は、S E Q I D N O : 73 に示されるアミノ酸配列を含む V H とペアリングする際に C T L A 4 に結合する免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメント；

(7) 重鎖可変領域 (V H) を含む免疫グロブリン重鎖又はそのフラグメントにおいて、前記重鎖可変領域 (V H) は、それぞれ S E Q I D N O : 51、52 及び 53 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2 及び 3 を含み、且つ前記 V H は、S E Q I D N O : 76 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L) とペアリングする際に C T L A 4 に結合する免疫グロブリン重鎖又はそのフラグメント；

(8) V L を含む免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメントにおいて、前記 V L は、それぞれ S E Q I D N O : 54、55 及び 56 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2 及び 3 を含み、且つ前記 V L は、S E Q I D N O : 75 に示されるアミノ酸配列を含む V H とペアリングする際に C T L A 4 に結合する免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメント；を含む。

【 0 0 1 0 】

幾つかの実施態様において、前記核酸は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、ここで、前記ポリペプチドは、それぞれ S E Q I D N O : 1、2 及び 3 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2 及び 3 を含む V H を含有する免疫グロブリン重鎖又はそのフラグメントを含む。

【 0 0 1 1 】

10

20

30

40

50

幾つかの実施態様において、前記核酸は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、前記ポリペプチドは、それぞれSEQ ID NO: 4、5及び6に示されるアミノ酸配列を含むCDR 1、2及び3を含むVLを含有する免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメントを含む。

【0012】

幾つかの実施態様において、前記核酸は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、前記ポリペプチドは、それぞれSEQ ID NO: 7、8及び9に示されるアミノ酸配列を含むCDR 1、2及び3を含むVHを含有する免疫グロブリン重鎖又はそのフラグメントを含む。

【0013】

幾つかの実施態様において、前記核酸は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、前記ポリペプチドは、それぞれSEQ ID NO: 10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むCDR 1、2及び3を含むVLを含有する免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメントを含む。

【0014】

幾つかの実施態様において、前記VHは、VLとペアリングする際に、ヒトCTLA4に特異的に結合している。幾つかの実施態様において、前記VLは、VHとペアリングする際に、ヒトCTLA4に特異的に結合している。

【0015】

幾つかの実施態様において、前記免疫グロブリン重鎖又はそのフラグメントは、ヒト化免疫グロブリン重鎖又はそのフラグメントであり、且つ前記免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメントは、ヒト化免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメントである。

【0016】

幾つかの実施態様において、前記核酸は、一本鎖可変フラグメント(scFv)をコードする。幾つかの実施態様において、前記核酸は、cDNAである。

【0017】

他の側面では、本開示は、さらに、本明細書に記載するような核酸の1種又は複数種を含むベクターを提供する。幾つかの実施態様において、前記ベクターは、CTLA4と一緒に結合するVL領域及びVH領域をコードする。

【0018】

一つの側面では、本開示は、各ベクターが本明細書に記載の核酸の1種を含むベクターのペアにおいて、前記ベクターは、CTLA4と一緒に結合するVL領域及びVH領域をコードするベクターのペアに関する。

【0019】

一つの側面では、本開示は、本明細書に記載のベクター又はベクターのペアを含む細胞を提供する。幾つかの実施態様において、前記細胞は、CHO細胞である。

【0020】

他の側面では、本開示は、本明細書に記載の核酸の1種又は複数種を含む細胞を提供する。

【0021】

一つの側面では、本開示は、本明細書に記載の核酸の2種を含む細胞を提供する。幾つかの実施態様において、前記2種の核酸は、CTLA4と一緒に結合するVL領域及びVH領域をコードする。

【0022】

一つの側面では、本開示は、さらに、抗体又はその抗原結合フラグメントを産生する方法を提供する。前記方法は、本明細書に記載の細胞に抗体又は抗原結合フラグメントを産生させるために十分な条件下で細胞培養するステップと、細胞によって産生された抗体又は抗原結合フラグメントを収集するステップと、を含む。

【0023】

一つの側面では、本開示は、選択されたVH配列に対して少なくとも90%の同一性を

10

20

30

40

50

有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）、及び選択されたVL配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む、CTLA4に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントにおいて、選択されたVH配列及び選択されたVL配列は、以下のいずれの1つである、CTLA4に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントに関する。

（1）選択されたVH配列は、SEQ ID NO： 13、14、15、16、17又は69であり、且つ選択されたVL配列は、SEQ ID NO： 18、19、20又は70であり；

（2）選択されたVH配列は、SEQ ID NO： 21、22、23、24又は71であり、且つ選択されたVL配列は、SEQ ID NO： 25、26、27、28又は72であり；

（3）選択されたVH配列は、SEQ ID NO： 73であり、且つ選択されたVL配列は、SEQ ID NO： 74であり；

（4）選択されたVH配列は、SEQ ID NO： 75であり、且つ選択されたVL配列はSEQ ID NO： 76である。

【0024】

幾つかの実施態様において、VHは、SEQ ID NO： 13の配列を含み、且つVLは、SEQ ID NO： 19の配列を含む。幾つかの実施態様において、VHは、SEQ ID NO： 14の配列を含み、且つVLは、SEQ ID NO： 19の配列を含む。

【0025】

幾つかの実施態様において、VHは、SEQ ID NO： 21の配列を含み、且つVLは、SEQ ID NO： 25の配列を含む。幾つかの実施態様において、VHは、SEQ ID NO： 22の配列を含み、且つVLは、SEQ ID NO： 25の配列を含む。

【0026】

幾つかの実施態様において、前記抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトCTLA4に特異的に結合している。幾つかの実施態様において、前記抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒト化抗体又はその抗原結合フラグメントである。幾つかの実施態様において、前記抗体又は抗原結合フラグメントは、一本鎖可変フラグメント（scFV）である。

【0027】

一つの側面では、本開示は、治療剤に共有結合または非共有結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含む抗体-薬物複合体も提供する。幾つかの実施態様において、治療剤は、細胞傷害性薬又は細胞増殖抑制薬（例えば、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、エメチン（emetine）、マイトマイシン、エトポシド（etoposide）、テノポシド（tenoposide）、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシン、マイタンシノイド類（例えば、DM-1及びDM-4）、ジオン、ミトキサントロン（mitoxantrone）、ミトラマイシン（mithramycin）、アクチノマイシンD、1-ジヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン（procaine）、テトラカイン（tetracaine）、リドカイン（lidocaine）、プロプラノロール、ピューロマイシン、エピルピシン、シクロホスファミドおよび類似体）。

【0028】

一つの側面では、本開示は、癌を有する対象を治療する方法を提供する。前記方法は、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメント、或いは本明細書に記載の抗体-薬物複合体を含む組成物を対象に治療有効量で投与するステップを含む。

【0029】

幾つかの実施態様において、前記癌は、黒色腫である。幾つかの実施態様において、前記癌は、切除不能な黒色腫または転移性黒色腫である。

10

20

30

40

50

【0030】

幾つかの実施態様において、前記癌は、非小細胞肺癌(non-small cell lung carcinoma、NSCLC)、小細胞肺癌(small cell lung cancer、SCLC)、膀胱がん又は転移性ホルモン不応性前立腺がんである。

【0031】

一つの側面では、本開示は、さらに、腫瘍増殖速度を低下させる方法を提供する。前記方法は、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む組成物を有効量で腫瘍細胞に接触させるステップを含む。

【0032】

他の側面では、本開示は、腫瘍細胞を死滅させる方法において、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント、或いは本明細書に記載の抗体-薬物複合体を含む組成物を有効量で腫瘍細胞に接触させるステップを含む方法に関する。

【0033】

一つの側面では、本開示は、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【0034】

他の側面では、本開示は、本明細書に記載の抗体薬物複合体、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。

【0035】

本明細書で使用されるように、「癌」という用語とは、自律的増殖能力を有する細胞である。そのような細胞の実例には、急激な細胞増殖によって特徴づけられる異常な状態又は状況を含む。その用語は、腫瘍などの癌性増殖、発癌プロセス、転移組織、および悪性に形質転換された細胞、組織、または臓器を、組織病理学的タイプまたは浸潤期間に関係なく含むことを意味する。また、呼吸器系、心臓血管系、腎臓系、生殖器系、血液系、神経系、肝臓系、胃腸系及び内分泌系のような様々な臓器系の悪性腫瘍；ほとんどの結腸がん、腎細胞がん、前立腺がん及び/又は精巣腫瘍、肺の非小細胞がん、及び小腸がんのような悪性腫瘍を含む腺癌も含まれる。「自然発生」のがんは、対象へのがん細胞の移植によって実験的に誘発されないいずれのがんも含まれ、例えば、自然発生がん、発がん物質への患者の曝露によるがん、癌遺伝子の挿入または腫瘍抑制遺伝子のノックアウトによるがん、並びに感染(例えば、ウイルス感染)による癌を含む。「カルシノーマ(carcinoma)」という用語は、当分野で認められており、上皮組織または内分泌組織の悪性腫瘍を指す。この用語は、癌腫と肉腫組織からなる悪性腫瘍を含む癌肉腫も含まれる。「腺癌」とは、腺組織に由来する、または腫瘍細胞が認識可能な腺構造を形成する癌腫を指す。「肉腫」という用語は、当分野で認められており、間葉由来の悪性腫瘍を指す。「造血性新生物障害(hematopoietic neoplastic disorder)」という用語は、造血起源の過形成/腫瘍細胞が関与する疾患が含まれる。造血性腫瘍性障害は、骨髄系、リンパ系、または赤血球系、またはその前駆細胞に引き起こされることができる。

【0036】

本明細書で使用される「抗体」という用語とは、少なくとも1つ(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つ)の相補性決定領域(CDR)(例えば、免疫グロブリン軽鎖からの3つのCDRのいずれか又は免疫グロブリン重鎖からの3つのCDRのいずれか)を含み、且つエピトープに特異的に結合できる抗原結合分子のいずれかを指す。抗体の非限定的な例は：モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、一本鎖抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、およびヒト化抗体が含まれる。幾つかの実施態様において、抗体は、ヒト抗体のFc区領域を含むことができる。抗体という用語は、誘導体、例えば、抗体フラグメントからなる二重特異性抗体、一本鎖抗体、ダイアボディ(diabody)、線状抗体及び多重特異性抗体も含む。

【0037】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される「抗原結合フラグメント」という用語とは、全長抗体の一部を指し、前記抗体の一部が抗原に特異的に結合できるものである。幾つかの実施態様において、抗原結合フラグメントは、少なくとも1つの可変ドメイン（例えば、重鎖の可変ドメイン又は軽鎖の可変ドメイン）を含む。抗体フラグメントの非限定的な実例は、例えば、F a b、F a b'、F (a b ')₂及びF vフラグメントを含む。

【0038】

本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語とは、ヒトに存在する内因性核酸（例えば、再配列されたヒト免疫グロブリン重鎖または軽鎖遺伝子座）によってコードされる抗体を指す。幾つかの実施態様において、ヒト抗体は、ヒトから収集されるか、ヒト細胞培養（例えば、ヒトハイブリドーマ細胞）で産生される。幾つかの実施態様において、ヒト抗体は非ヒト細胞（例えば、マウスまたはハムスター細胞株）で産生される。幾つかの実施態様において、ヒト抗体は、細菌または酵母細胞で産生される。幾つかの実施態様において、ヒト抗体は、未再構成または再構成されたヒト免疫グロブリン遺伝子座（例えば、重鎖または軽鎖ヒト免疫グロブリン遺伝子座）を含むトランスジェニック非ヒト動物（例えば、ウシ）で産生される。

10

【0039】

本明細書で使用される「キメラ抗体」という用語とは、少なくとも2つの異なる抗体（例えば、ヒトおよびマウス抗体などの2つの異なる哺乳動物種由来の抗体）に存在する配列を含む抗体を指す。キメラ抗体の非限定的な実例は、非ヒト（例えば、マウス）抗体の可変ドメイン配列（例えば、軽鎖及び/又は重鎖可変ドメイン配列の全部又は一部）およびヒト抗体の定常領域を含む抗体である。キメラ抗体の他の実例は、本明細書に記載され、当分野で知られている。

20

【0040】

本明細書で使用される「ヒト化抗体」という用語とは、非ヒト（例えば、マウス）免疫グロブリンに由来する最小配列を含み、ヒト免疫グロブリンに由来する配列を含む非ヒト抗体を指す。幾つかの非限定的な例では、ヒト化抗体は、受容体抗体の超可変（CDR）領域残基が、所望の特異性、親和性、および性能を有する非ヒト抗体（例えば、ドナー抗体）（例えば、マウス、ラット、またはウサギ抗体）の超可変（CDR）領域残基で置き換えられたヒト抗体（受容体抗体）である。幾つかの実施態様において、ヒト免疫グロブリンのF vフレームワーク残基は、対応する非ヒト（例えば、マウス）免疫グロブリン残基で置き換えられている。幾つかの実施態様において、ヒト化抗体は、受容体抗体又はドナー抗体に存在しない残基を含むことができる。抗体の性能をさらに改善するために、これらの修飾を行うことができる。幾つかの実施態様において、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含み、ここで、全部又はほとんど全部の超可変ループ（CDR）は、非ヒト（例えば、マウス）免疫グロブリンの可変ドメインに対応し、且つ全部又はほとんど全部のフレームワーク領域は、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域に対応する。ヒト化抗体とは、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部を含み、典型的にはヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域（Fc）であることを指す。ヒト化抗体は、当該分野で公知の分子生物学的方法を使用して産生される。ヒト化抗体を産生する方法の非限定的な例は、本明細書に記載されている。

30

40

【0041】

本明細書で使用される「一本鎖抗体」という用語とは、抗原に特異的に結合することができる少なくとも2つの免疫グロブリン可変ドメイン（例えば、哺乳類免疫グロブリン重鎖または軽鎖の可変ドメイン）を含む単一のポリペプチドを指す。一本鎖抗体の非限定的な例は、本明細書に記載されている。

【0042】

本明細書で使用される「多量体化抗体」という用語とは、4つ又はそれ以上（例えば、6つ、8つ又は10つ）の免疫グロブリン可変ドメインを含む抗体を指す。幾つかの実施態様において、多量体化抗体は、1つの標的分子（例えば、CTLA4）を哺乳動物細胞（例えば、ヒトT細胞）の表面上での少なくとも1つの第2の標的分子（例えば、PD1

50

)に架橋させることができる。

【0043】

本明細書で使用される「対象」及び「患者」という用語は、本明細書全体で交換可能に使用され、本発明の方法による治療が与えるヒト又は非ヒト動物を説明する。本発明は、獣医学的および非獣医学的用途を考慮している。ヒト患者は、成人または若年の人間（例、18歳未満のヒト）であってもよい。患者には、ヒトに加えて、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、フェレット、ネコ、及び霊長類も含まれる。例えば、非ヒト霊長類（例えば、サル、チンパンジー、ゴリラなど）、げっ歯類（例えば、ラット、マウス、アレチネズミ、ハムスター、フェレット、ウサギ）、ウサギ類、ブタ類（例えば、ブタ、ミニチュアブタ）、ウマ、イヌ、ネコ、ウシ、その他の家畜、農場、動物園の動物を含む。

10

【0044】

本明細書で使用するように、抗体に言及する場合には、「～に特異的に結合する」及び「～を特異的に結合する」という語句は、相互作用が標的分子での特定の構造（即ち、抗原決定基又はエピトープ）の存在に依存するため、他の分子抗体に対して優位にその標的分子（例えば、CTLA4）と相互作用することであり、言い換えれば、該試薬は、一般にすべての分子ではなく、特定の構造を含む分子を認識して結合する。標的分子に特異的に結合する抗体は、標的特異的抗体と呼ばれることができる。例えば、CTLA4分子に特異的に結合する抗体は、CTLA4特異的抗体又は抗CTLA4抗体と呼ばれことができる。

20

【0045】

本明細書で使用される「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は、互換的に使用されることができ、少なくとも2つのアミノ酸の任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。

【0046】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」、「核酸分子」及び「核酸配列」という用語は、本明細書に互換的に使用されることができ、少なくとも2ヌクレオチドの任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、及びその修飾物を含むが、これらに限定されない。

【0047】

特に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書では、本発明で使用される方法および材料を説明するが、当技術分野で知られている他の適切な方法および材料も使用することができる。材料、方法及び実例は、例として説明されるものであり、これらに限定されない。本明細書で言及されるすべての出版物、特許出願、特許、配列、データベースエントリ、および他の参考文献は、参照により本明細書に組み込まれる。矛盾する場合には、本明細書（定義を含む）を基準とする。

30

【0048】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および図面、ならびに特許請求の範囲から明らかになる。

40

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】図1は、抗CTLA4抗体を作製する例示的な態様の第1の部分のフローチャートを示す。

【図2】図2は、抗CTLA4抗体を作製する例示的な態様の第2の部分のフローチャートを示す。

【図3】図3は、抗CTLA4抗体がCTLA4とCD80の間の結合を遮断することを示す一連のフローサイトメトリーグラフである。

【図4】図4は、抗CTLA4抗体がCTLA4とCD86の間の結合を遮断することを示す一連のフローサイトメトリーグラフである。

50

【図5】図5は、サルCTLA4 (rmCTLA4)、マウスCTLA4 (mCTLA4) 及びヒト-マウスキメラCTLA4 (chiCTLA4) に対する抗CTLA4抗体の交差反応性のフローサイトメトリーの結果を示す一連の図である。

【図6】図6は、抗CTLA4抗体13A4及び4G12で処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウスの経時的な体重を示すグラフである。

【図7】図7は、抗CTLA4抗体13A4及び4G12で処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウスの経時的な体重のパーセント変化を示すグラフである。

【図8】図8は、抗CTLA4抗体13A4及び4G12で処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウスの経時的な腫瘍体積を示すグラフである。

10

【図9】図9は、Yervoy及び13A4で処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウスの経時的な体重を示すグラフである。

【図10】図10は、Yervoy及び13A4で処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウスの経時的な体重のパーセント変化を示すグラフである。

【図11】図11は、Yervoy及び13A4で処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウスの経時的な腫瘍体積を示すグラフである。

【図12】図12は、Yervoy、ヒト化抗hCTLA4抗体4G12-H1K1-IgG1及び4G12-H2K1-IgG1で処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウスの経時的な体重を示すグラフである。

【図13】図13は、Yervoy、ヒト化抗hCTLA4抗体4G12-H1K1-IgG1及び4G12-H2K1-IgG1で処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウスの経時的な体重のパーセント変化を示すグラフである。

20

【図14】図14は、Yervoy、ヒト化抗hCTLA4抗体4G12-H1K1-IgG1及び4G12-H2K1-IgG1で処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウス中の経時的な腫瘍体積を示すグラフである。

【図15】図15は、Yervoy、ヒト化抗hCTLA4抗体13A4-H1K2-IgG1、13A4-H2K2-IgG1、13A4-H1K2-IgG4及び13A4-H1K2-IgG1-N297Aで処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウスの経時的な体重を示すグラフである。

【図16】図16は、Yervoy、ヒト化抗hCTLA4抗体13A4-H1K2-IgG1、13A4-H2K2-IgG1、13A4-H1K2-IgG4及び13A4-H1K2-IgG1-N297Aで処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウスの経時的な体重のパーセント変化を示すグラフである。

30

【図17】図17は、Yervoy、ヒト化抗hCTLA4抗体13A4-H1K2-IgG1、13A4-H2K2-IgG1、13A4-H1K2-IgG4及び13A4-H1K2-IgG1-N297Aで処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウスの経時的な腫瘍体積を示すグラフである。

【図18】図18は、抗CTLA4抗体がCTLA4とヒトCD86の間の結合を遮断することを示す一連のフローサイトメトリーグラフである。

【図19】図19は、サル、マウス及びヒト-マウスキメラCTLA4に対する抗CTLA4抗の交差反応性のフローサイトメトリーの結果を示す一連の図である。

40

【図20】図20は、CT4-04-13A4、CT4-20-6D2及びCT4-20-7E12で処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウスの経時的な体重を示すグラフである。

【図21】図21は、CT4-04-13A4、CT4-20-6D2及びCT4-20-7E12で処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウスの経時的な体重のパーセント変化を示すグラフである。

【図22】図22は、CT4-04-13A4、CT4-20-6D2及びCT4-20-7E12で処置されたMC-38腫瘍を移植したB-hCTLA-4ヒト化マウスの経時的な腫瘍体積を示すグラフである。

50

【図 2 3】図 2 3 は、K a b a t 番号により定義される抗 C T L A 4 抗体 1 3 A 4、4 G 1 2、6 D 2、7 E 1 2、及びそのヒト化抗体の C D R 配列を示す。

【図 2 4】図 2 4 は、C h o t h i a 番号により定義される抗 C T L A 4 抗体 1 3 A 4、4 G 1 2、6 D 2、7 E 1 2、及びそのヒト化抗体の C D R 配列を示す。

【図 2 5 - 1】図 2 5 は、ヒト化抗 C T L A 4 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【図 2 5 - 2】図 2 5 は、ヒト化抗 C T L A 4 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【図 2 6】図 2 6 は、ヒト C T L A 4、マウス C T L A 4、サル C T L A 4 及びキメラ C T L A 4 のアミノ酸配列を示す。

10

【図 2 7】図 2 7 は、複数種のマウス抗 h C T L A 4 抗体の重鎖及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0050】

本開示は、細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (C T L A - 4、C T L A 4、C D 1 5 2 としても知られる) に結合する抗体、その抗原結合フラグメントの実例を提供する。

【0051】

C T L A 4 は、活性化 T 細胞によって発現され、T 細胞に抑制シグナルを伝達する免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。これは、免疫チェックポイントであり、C D 8 0 又は C D 8 6 に結合すると「オフ」スイッチとして機能し、免疫応答をダウンレギュレートする。

20

【0052】

本開示は、さらに、ヒト化抗 C T L A 4 抗体の配列及び調製、並びに前記抗体を使用する方法を提供する。

【0053】

C T L A 4 及び癌

免疫系は、i n v i v o の正常な細胞と「外来」とみなされる細胞とを区別することができる。これにより、免疫系は、正常な細胞に影響を与えずに、外来細胞を攻撃できる。このメカニズムには、免疫チェックポイントと呼ばれるタンパク質が関与する場合がある。免疫チェックポイントは、免疫システムの内、シグナルを増幅したり（共刺激分子）、シグナルを抑制する分子である。

30

【0054】

チェックポイント阻害剤は、正常な組織への免疫系の攻撃を防止できるので、自己免疫疾患を防止する。多くの腫瘍細胞は、チェックポイント阻害剤も発現する。これらの腫瘍細胞は、特に腫瘍抗原に特異的な T 細胞において、特定の免疫チェックポイント経路を選択することにより免疫監視を回避する。(C r e e l a n、B e n j a m i n C. 「U p d a t e o n i m m u n e c h e c k p o i n t i n h i b i t o r s i n l u n g c a n c e r .」C a n c e r C o n t r o l 2 1 . 1 (2 0 1 4) : 8 0 - 8 9)。多くの免疫チェックポイントは、リガンドと受容体の相互作用によって引き起こされるため、リガンド及び/又はその受容体に対する抗体によって容易にブロックされる。

40

【0055】

免疫チェックポイント経路は、一連の複雑な細胞相互作用が関与し、正常の条件下でエフェクター T 細胞の過剰な活性化を防止する。該経路の一部は、細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (C T L A 4、C D 1 5 2) と呼ばれる細胞表面受容体である。C T L A 4 は、T 細胞にのみ発現する免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。C T L A 4 は、T 細胞の活性化を阻害する作用を奏するとともに、ヘルパー T 細胞の活性を阻害しながら制御性 T 細胞の免疫抑制活性を高めると報告されている。従って、C T L A - 4 は、「オフ」スイッチとして機能し、免疫応答をダウンレギュレートする。細胞傷害性 T 細胞は活性化すると、その細胞表面に C T L A - 4 を発現し、A P C 上で互に共有するリガンドで

50

ある B7 - 1 (CD 8 0) 又は B7 - 2 (CD 8 6) について共刺激分子 CD 2 8 と競合する。このような「陰 - 陽」のバランスは、細胞傷害活性を抑制しながら、T細胞機能を自己制限的に進める可能である (Creelan, Benjamin C. “ Update on immune checkpoint inhibitors in lung cancer . ” Cancer Control 21 . 1 (2014) : 80 - 89) 。
【 0056 】

多くの癌細胞は、T細胞中 CTLA - 4 の異常な発現を刺激することができ、これらの CTLA - 4 異常 T細胞は、アネルギー表現型を示す。従って、癌細胞は、パトロール中の T細胞を回避するために CTLA - 4 経路を選択する可能性がある。CTLA - 4 を阻害するモノクローナル抗体の取り込みにより、複数の癌 (例えば、黒色腫) で一貫した永続的な抗腫瘍反応を達成できる。これらの抗 CTLA 4 抗体 (例えば、トレメリムマブ (tremelimumab) 及びイピリムマブ (ipilimumab) (Yervoy)) は、CTLA 4 に結合することにより、抑制シグナルを遮断することで、細胞傷害性 Tリンパ球細胞が癌細胞を破壊する。従って、抗 CTLA 4 抗体は、癌の治療に用いられることができる。

【 0057 】

本開示は、幾つかの抗 CTLA 4 抗体、その抗原結合フラグメント、並びにこれらの抗 CTLA 4 抗体及び抗原結合フラグメントによる癌の治療方法を提供する。

【 0058 】

抗体及び抗原結合フラグメント

本開示は、抗 CTLA 4 抗体及其の抗原結合フラグメントを提供する。一般的に、抗体 (免疫グロブリンとも呼ばれる) は、軽鎖及び重鎖の両方のポリペプチド鎖からなる。本開示に係る非限定的な抗体は、2本の重鎖及び2本の軽鎖を含む完璧な4本鎖免疫グロブリンである。抗体の重鎖は、IgM、IgG、IgE、IgA又はIgDを含む任意のアイソタイプ、或いはIgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgE1、IgE2などを含むサブアイソタイプであってもよい。軽鎖可以是軽鎖又は重鎖。抗体は、軽鎖の2つの同一コピー及び重鎖の2つの同一コピーを含んでもよい。それらは、それぞれ1つの可変ドメイン (又は可変領域、V_H) 及び複数の定常ドメイン (又は定常領域) を含む重鎖は、その定常領域内のジスルフィド結合を介して互いに結合し、抗体の「幹」を形成する。それらは、それぞれ1つの可変ドメイン (又は可変領域、V_L) 及び1つの定常ドメイン (又は定常領域) を含む軽鎖は、それぞれジスルフィド結合を介して1本の重鎖に結合する。各軽鎖の可変領域は、それに結合する重鎖の可変領域とペアリングしている。軽鎖と重鎖の両方の可変領域は、いずれもより保存的なフレームワーク領域 (FR) の間に位置する3つの超可変領域を含む。

【 0059 】

これらの超可変領域は、相補性決定領域 (CDR) と称され、抗体の主要な抗原結合表面を含むループを形成する。4つのフレームワーク領域は、主にβ-シート構造を採用し、且つ、CDRはループ接続を形成し、前記ループ接続はβ-シート構造と連結しながらある場合にはβ-シート構造の一部を形成する。各鎖のCDRは、フレームワーク領域によって近接して保持され、且つ、他の鎖に由来するCDRとともに抗原結合領域の形成に寄与する。

【 0060 】

抗体のアミノ酸配列を分析することにより抗体のCDR領域を同定する方法は周知であり、且つCDRの多くの定義は一般的に使用されているものである。Kabatsの定義は、抗体配列の可変性に基づくものであり、Chothiaの定義は、構造ループ領域の位置に基づくものである。これらの方法及び定義は、例えば、Martin, “ Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains, ” Antibody engineering, Springer Berlin Heidelberg, 2001, 422 - 439 ; Abhinandan, et al. “ Analysis and impr

10

20

30

40

50

ovements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains,” *Molecular immunology* 45.14 (2008): 3832-3839; Wu, T. T. and Kabat, E. A. (1970) *J. Exp. Med.* 132: 211-250; Martin et al., *Methods Enzymol.* 203:121-53 (1991); Morea et al., *Biophys Chem.* 68(1-3):9-16 (Oct. 1997); Morea et al., *J Mol Biol.* 275(2):269-94 (Jan. 1998); Chothia et al., *Nature* 342(6252):877-83 (Dec. 1989); Ponomarenko and Bourne, *BMC Structural Biology* 7:64 (2007)に記載されるように、それぞれ本明細書に援引により組み込まれる。

10

【0061】

CDRは、抗原エピトープを認識するために重要である。本明細書で使用される「エピトープ」とは、抗原結合部位に特異的に結合することができる、標的分子の最小部分である。エピトープの最小サイズは、約3、4、5、6又は7個のアミノ酸であってもよいが、これらのアミノ酸は必ずしも抗原の一次構造の連続的な線状配列にある必要がない。これは、エピトープが抗原の二次および三次構造に基づく抗原の3次元構造に依存するためである。

【0062】

幾つかの実施態様において、抗体は、無傷の免疫グロブリン分子（例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgD、IgE、IgA）である。IgGサブクラス（IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4）は、高度に保存されたものであり、相違点としては、その定常領域、特にそのヒンジ及び上部CH2ドメインにある。IgGサブクラスの配列及び相違は、当技術分野で知られているものであり、しかも、例えば、Vidarsson, Gestur, Gillian Dekkers, and Theo Rispen. “IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions.” *Frontiers in immunology* 5 (2014); Irani, Vashti, et al. “Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases.” *Molecular immunology* 67.2 (2015): 171-182; Shakib, Farouk, ed. *The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation.* Elsevier, 2016に記載されており、それぞれ本明細書に援引により組み込まれる。

20

30

【0063】

抗体は、また、任意の種（例えば、ヒト、げっ歯類動物、マウス、ラクダ科）に由来する免疫グロブリン分子であってもよい。本明細書に開示される抗体は、ポリクローナル、モノクローナル抗体、単一特異性抗体、多重特異性抗体、及び別のポリペプチドに融合した免疫グロブリン結合ドメインを含むキメラ抗体も含まれるが、これらに限定されない。「抗原結合部位」又は「抗原結合フラグメント」という用語は、インタクトな抗体の特異的結合活性を保持する抗体の一部、即ち、抗体のうち、インタクトな抗体の標的分子でのエピトープに特異的に結合できる任意の部分である。それは、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びこれらのフラグメントの変異体を含む。よって、幾つかの実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、抗体フラグメントからなるscFv、Fv、Fd、dAb、二重特異性抗体、二重特異性scFv、ダイアボディ、線状抗体、一本鎖抗体分子、多重特異性抗体、及び抗体結合ドメインであるまたは抗体結合ド

40

50

メインと相同性を有する結合ドメインを含む任意のポリペプチドであってもよい。抗原結合部位の非限定的な例は、例えば、インタクトな抗体的重鎖及び/又は軽鎖CDR、インタクトな抗体の重鎖及び/又は軽鎖可変領域、インタクトな抗体の全長重鎖又は軽鎖、又はインタクトな抗体の重鎖又は軽鎖に由来する単一のCDRを含む。

【0064】

幾つかの実施態様において、抗原結合フラグメントは、キメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor、CAR)の一部を形成することができる。幾つかの実施態様において、キメラ抗原受容体は、CD3-ゼータ膜貫通及び細胞内ドメインに融合する本明細書に記載の一本鎖可変フラグメント(scFv)の融合体である。幾つかの実施態様において、キメラ抗原受容体は、複数種の共刺激タンパク質受容体(例えば、CD28、41BB、ICOS)に由来する細胞内シグナル伝達ドメインも含む。幾つかの実施態様において、キメラ抗原受容体は、効力を増強するために、複数のシグナル伝達ドメイン、例えば、CD3z-CD28-41BB又はCD3z-CD28-OX40を含む。従って、一つの側面では、本開示は、さらに、発現本明細書に記載のキメラ抗原受容体を発現する細胞(例えば、T細胞)を提供する。

10

【0065】

幾つかの実施態様において、scFvは、1つの重鎖可変ドメイン及び1つの軽鎖可変ドメインを持つ。

【0066】

抗CTLA4抗体と抗原結合フラグメント

本開示は、CTLA4に特異的に結合する抗体及其の抗原結合フラグメントを提供する。本明細書に記載の抗体及び抗原結合フラグメントは、CTLA4に結合でき、抑制CTLA4抑制経路を阻害できることにより、免疫応答を増強させる。本開示は、マウス抗CTLA4抗体CT4-04-13A4(「13A4」)、CT4-03-4G12(「4G12」)、CT4-20-6D2(「6D2」)、CT4-20-7E12(「7E12」)、及びそのヒト化抗体を提供する。

20

【0067】

Kabat番号によって定義される、13A4及び13A4に由来する抗体(例えば、ヒト化抗体)のCDR配列は、重鎖可変ドメインのCDR、SEQ ID NO: 1~3、及び軽鎖可変ドメインのCDR、SEQ ID NO: 4~6を含む。CDRは、Chothiaシステムによっても定義されてもよい。Chothia番号では、重鎖可変ドメインのCDR配列は、SEQ ID NO: 29~31に示され、且つ軽鎖可変ドメインのCDR配列は、SEQ ID NO: 32~34に示される。

30

【0068】

類似しては、Kabat番号によって定義される、4G12及び4G12に由来する抗体のCDR配列は、重鎖可変ドメインのCDR、SEQ ID NO: 7~9、軽鎖可変ドメインのCDR、SEQ ID NO: 10~12を含む。Chothia番号では、重鎖可変ドメインのCDR配列は、SEQ ID NO: 35~37に示され、且つ軽鎖可変ドメインのCDRは、SEQ ID NO: 38~40に示される。

【0069】

Kabatによって定義される、6D2及び6D2に由来する抗体のCDR配列は、重鎖可変ドメインのCDR、SEQ ID NO: 45~47、及び軽鎖可変ドメインのCDR、SEQ ID NO: 48~50を含む。Chothia番号では、重鎖可変ドメインのCDR配列は、SEQ ID NO: 57~59に示され、且つ軽鎖可変ドメインのCDRは、SEQ ID NO: 60~62に示される。

40

【0070】

Kabatによって定義される、7E12及び7E12に由来する抗体のCDR配列は、重鎖可変ドメインのCDR、SEQ ID NO: 51~53、及び軽鎖可変ドメインのCDR、SEQ ID NO: 54~56を含む。Chothia番号では、重鎖可変ドメインのCDR配列は、SEQ ID NO: 63~65に示され、且つ軽鎖可変ド

50

メインのCDRは、SEQ ID NO: 66~68に示される。

【0071】

さらに、ヒト化抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を提供する。マウス抗体をヒト化するには様々な方法があるので(例えば、配列が異なるアミノ酸によって置き換えることができる)、抗体の重鎖及び軽鎖は、1つ以上の態様のヒト化抗体配列を有することができる。ヒト化13A4抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 13~17に示される。ヒト化13A4抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 18~20に示される。これらの重鎖可変領域配列(SEQ ID NO: 13~17)のいずれか1つは、これらの軽鎖可変領域配列(SEQ ID NO: 18~20)のいずれか1つとペアリングすることができる。

10

【0072】

類似しては、ヒト化4G12抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 21~24に示される。ヒト化4G12抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 25~28に示される。これらの重鎖可変領域配列(SEQ ID NO: 21~24)のいずれか1つは、これらの軽鎖可変領域配列(SEQ ID NO: 25~28)のいずれか1つとペアリングすることができる。

【0073】

図25に示すように、ヒト化率とは、国際免疫遺伝情報システム(International Immunogenetics Information System, IMGT)データベース中のヒト抗体配列と比較する重鎖又は軽鎖可変領域配列の同一性の割合を意味する。トップヒット(top hit)とは、重鎖又は軽鎖可変領域配列が他の種よりも特定の種に近いことを意味する。例えば、ヒトへのトップヒットとは、配列が他の種よりもヒトに近いことを意味する。ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)へのトップヒットとは、その配列がヒト配列及びカニクイザル配列と同じ割合の同一性を有し、且つこの割合の同一性が他の種の配列と比較して最高であることを意味する。幾つかの実施態様において、ヒト化率は、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%又は95%を超える。ヒト化率の決定方法及びトップヒットの決定への詳細な説明は、当技術分野で知られており、Jones、Tim D.、et al. "The INNs and outs of antibody nonproprietary names." MAbs. Vol. 8. No. 1. Taylor & Francis, 2016に記載され、本明細書に援引により組み込まれている。

20

30

【0074】

さらに、幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントは、さらに、SEQ ID NO: 1~3、SEQ ID NO: 7~9、SEQ ID NO: 29~31、SEQ ID NO: 35~37、SEQ ID NO: 45~47、SEQ ID NO: 51~53、SEQ ID NO: 57~59及びSEQ ID NO: 63~65から選ばれる1つ、2つ又は3つの重鎖可変領域CDR、及び/又は、SEQ ID NO: 4~6、SEQ ID NO: 10~12、SEQ ID NO: 32~34、SEQ ID NO: 38~40、SEQ ID NO: 48~50、SEQ ID NO: 54~56、SEQ ID NO: 60~62及びSEQ ID NO: 66~68から選ばれる1つ、2つ又は3つの軽鎖可変領域CDRを含む。

40

【0075】

幾つかの実施態様において、抗体は、相補性決定領域(CDR)1、2、3を含む重鎖可変領域(VH)(ここで、CDR1領域は、選択されたVH CDR1アミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%又は95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、CDR2領域は、選択されたVH CDR2アミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%又は95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、且つCDR3領域は、選択されたVH CDR3のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%又は95%の同一性を有するアミノ酸配

50

列を含むか、またはそれからなる)と、CDR 1、2、3を含む軽鎖可変領域(VL) (ここで、CDR 1領域は、選択されたVL CDR 1アミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%又は95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、CDR 2領域は、選択されたVL CDR 2アミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%又は95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、且つCDR 3領域は、選択されたVL CDR 3のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%又は95%の同一性のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる)とを持つ。選択されたVH CDR 1、2、3のアミノ酸配列及び選択されたVL CDR 1、2、3のアミノ酸配列は、図23(Kabat CDR)及び図24(Chothia CDR)に示される。

10

【0076】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸の挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 1; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 2; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 3というCDRの1つ、2つ又は3つを含む重鎖可変ドメインを含むことができる。

【0077】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 7; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 8; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 9というCDRの1つ、2つ又は3つを含む重鎖可変ドメインを含むことができる。

20

【0078】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 29; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 30; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 31というCDRの1つ、2つ又は3つを含む重鎖可変ドメインを含むことができる。

【0079】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 35; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 36; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 37というCDRの1つ、2つ又は3つを含む重鎖可変ドメインを含むことができる。

30

【0080】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 45; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 46; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 47というCDRの1つ、2つ又は3つを含む重鎖可変ドメインを含むことができる。

40

【0081】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 51; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 52; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 53というCDRの1つ、2つ又は3つを含む重鎖可変ドメインを含むことができる。

【0082】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 57; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 58; 0、1又は2

50

個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 59というCDRの1つ、2つ又は3つを含む重鎖可変ドメインを含むことができる。

【0083】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 63; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 64; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 65というCDRの1つ、2つ又は3つを含む重鎖可変ドメインを含むことができる。

【0084】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 4; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 5; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 6というCDRの1つ、2つ又は3つを含む軽鎖可変ドメインを含むことができる。

10

【0085】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 10; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 11; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 12というCDRの1つ、2つ又は3つを含む軽鎖可変ドメインを含むことができる。

20

【0086】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 32; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 33; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 34というCDRの1つ、2つ又は3つを含む軽鎖可変ドメインを含むことができる。

【0087】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 38; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 39; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 40というCDRの1つ、2つ又は3つを含む軽鎖可変ドメインを含むことができる。

30

【0088】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 48; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 49; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 50というCDRの1つ、2つ又は3つを含む軽鎖可変ドメインを含むことができる。

【0089】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 54; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 55; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 56というCDRの1つ、2つ又は3つを含む軽鎖可変ドメインを含むことができる。

40

【0090】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 60; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 61; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 62というCDRの1つ、2つ又は3つを含む軽鎖可変ドメインを含むことができる。

50

【0091】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントは、0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 66; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 67; 0、1又は2個のアミノ酸挿入、欠失又は置換を有するSEQ ID NO: 68というCDRの1つ、2つ又は3つを含む軽鎖可変ドメインを含むことができる。

【0092】

挿入、欠失及び置換は、CDR配列内、又はCDR配列の片方や両方の末端で行うことができる。

【0093】

本開示は、さらに、CTLA4と結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。抗体又はその抗原結合フラグメントは、選択されたVH配列に対して少なくとも80%、85%、90%又は95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる重鎖可変領域(VH)と、選択されたVL配列に対して少なくとも80%、85%、90%又は95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる軽鎖可変領域(VL)とを含む。幾つかの実施態様において、選択されたVH配列は、SEQ ID NO: 13、14、15、16、17又は69であり、且つ選択されたVL配列は、SEQ ID NO: 18、19、20又は70である。幾つかの実施態様において、選択されたVH配列は、SEQ ID NO: 21、22、23、24又は71であり、且つ選択されたVL配列は、SEQ ID NO: 25、26、27、28又は72である。幾つかの実施態様において、選択されたVH配列は、SEQ ID NO: 73であり、且つ選択されたVL配列は、SEQ ID NO: 74である。幾つかの実施態様において、選択されたVH配列は、SEQ ID NO: 75であり、且つ選択されたVL配列は、SEQ ID NO: 76である。

【0094】

2つのアミノ酸配列又は2つの核酸配列のパーセント同一性を決定するために、最適比較目的のために整列される(例えば、最適整列のために第1及び第2のアミノ酸又は核酸配列の1つ又は2つにギャップを導入し、比較目的のために、非相同性配列が無視されることができる)。比較目的のために整列されている参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも80%であり、幾つかの実施態様において、少なくとも90%、95%又は100%である。その後、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置でのアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置及び第2の配列中の対応する位置は、同じアミノ酸残基又はヌクレオチドで占められると、分子がその位置で同一である。2つの配列の間でのパーセント同一性は、2つの配列の最適整列のために導入されるギャップ数及び各ギャップの長さを考慮する場合には、配列が共有する同一位置の数の関数である。本開示の目的のために、配列の比較及び2つの配列の間での同一性パーセントの決定は、Blossum 62スコアリングマトリックスにより達成し、ここで、ギャップペナルティを12とし、ギャップ伸長ペナルティを4とし、フレームシフト・ギャップ・ペナルティを5とする。

【0095】

本開示は、さらに、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸を提供し、前記ポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖又は免疫グロブリン重鎖を含む。免疫グロブリン重鎖又は免疫グロブリン軽鎖は、図23又は図24に示されるCDRを含むか、又は図25又は図27に示される配列を有する。ポリペプチドが対応するポリペプチド(例えば、対応する重鎖可変領域又は対応する軽鎖可変領域)とペアリングする場合には、ペアリングしたポリペプチドは、CTLA4と結合する。

【0096】

抗CTLA4抗体及び抗原結合フラグメントは、抗体又は抗体フラグメントの抗体変異体(包括誘導体及び複合体を含む)、及び多重特異性(例えば、二重特異性)抗体又は抗体フラグメントであってもよい。本明細書で提供される他の抗体は、ポリクローナル、モ

10

20

30

40

50

ノクローナル抗体、多重特異性抗体（多量体化抗体、例えば、二重特異性抗体）、ヒト抗体、キメラ抗体（例えば、ヒト-マウスキメラ体）、一本鎖抗体、細胞内で産生する抗体（即ち、細胞内抗体（*intrabodies*））、及その抗原結合フラグメントであってもよい。抗体又はその抗原結合フラグメントは、任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）、タイプ（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）又はサブクラスであってもよい。幾つかの実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、IgG抗体又はその抗原結合フラグメントである。

【0097】

抗体のフラグメントは、提供される方法に適合し、全長抗体の望ましい親和性及び特異性を保持すればよい。従って、CTLA-4に結合する抗体のフラグメントは、CTLA-4に結合する能力を保持する。Fvフラグメントは、インタクトな抗原認識及び結合部位を含む抗体フラグメントである。該領域は、強固に結合している1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとの二量体からなり、前記結合は、本質的に共有結合であり、例えば、scFvである。この構成では、各可変ドメインの3つのCDRが相互作用し、VH-VL二量体の表面での抗原結合部位を限定する。6つのCDR又はそのサブセットは、一緒に抗原結合特異性を抗体に与える。しかしながら、単一の可変ドメイン（又はFvのうち、抗原に特異的な3つのCDRのみを含む半分）でも、抗原を認識・結合する能力を持つが、通常、結合部位全体よりも低い親和性である。

10

【0098】

単鎖Fv又は（scFv）抗体フラグメントは、抗体のVH及びVLドメイン（又は領域）を含み、ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。通常、Fvポリペプチドは、VHとVLドメインの間にもポリペプチドリンカーを含むため、scFvは抗原結合に望ましい構造を形成できる。

20

【0099】

Fabフラグメントは、軽鎖の可変及び定常領域と、重鎖の可変ドメイン及び第1の定常領域（CH1）とを含む。F(ab')₂抗体フラグメントは、一对のFabフラグメントを含み、それらは、通常に、そのカルボキシ末端付近にヒンジシステインを介して共有結合される。抗体フラグメントの他の化学的カップリングも当技術分野で知られている。

【0100】

ダイアボディは、2つの抗原結合部位を持つ小さな抗体フラグメントであり、そのフラグメントは、同一のポリペプチド鎖でのVLに連結されるVH（VH及びVL）を含む。同一の鎖上の2つのドメインをペアリングするには短すぎるリンカーを使用することにより、これらのドメインは、他の鎖の相補ドメインとペアリングされ、2つの抗原結合部位を発生する。

30

【0101】

線状抗体は、一对のタンデムFdセグメント（VH-CH1-VH-CH1）を含み、相補性軽鎖ポリペプチドと一緒にあって一对の抗原結合領域を形成する。線状抗体は、二重特異性であってもよく又は単特異性であってもよい。

【0102】

本開示に係る抗体及び抗体フラグメントは、Fc領域で修飾して所望のエフェクター機能又は血清半減期を提供することができる。

40

【0103】

抗体の多量体化は、抗体の自然凝集、又は当技術分野で知られている化学的や組換え連結技術により達成されることができ。例えば、ある程度の割合の精製された抗体製剤（例えば、精製されたIgG1分子）は、抗体ホモ二量体及び他の高次抗体多量体を含むタンパク質凝集体を自発的に形成する。

【0104】

また、抗体ホモ二量体は、当技術分野で知られている化学的な連結技術により形成することができる。例えば、ヘテロ二官能性架橋剤を使用して抗体多量体を形成でき、前記架

50

橋剤は、SMCC(4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサカルボン酸N-スクシンイミジル)及びSATA(S-アセチルチオ酢酸スクシンイミジル)を含むが、これらに限定されない。Ghetie et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 7509-7514, 1997)には、抗体ホモ二量体を形成するための例示的な態様が記載されている。ペプシンの消化により抗体ホモ二量体をFab₂ホモ二量体に変換することができる。抗体ホモ二量体の他の形成方法は、Zhao et al. (J. Immunol. 25: 396-404, 2002)に記載の自己好性 (autophilic) T15ペプチドの使用によるものである。

【0105】

幾つかの実施態様において、多重特異性抗体は、二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の割合を最大化するために、一对の抗体分子間の界面を設計することにより作成することができる。例えば、界面は、抗体定常領域のCH3ドメインの少なくとも一部を含むことができる。該方法では、第1抗体分子の界面に由来する1つ又は複数の小さなアミノ酸側鎖が、より大きな側鎖(例えば、チロシン又はトリプトファン)に置き換えられる。大きな側鎖と同一又は類似するサイズの代償的な「空洞」は、第2抗体分子の界面で大きなアミノ酸側鎖を、小さな側鎖(例えば、アラニン又はスレオニン)に置換することにより発生する。これは、他の望ましくない最終生成物(例えば、ホモ二量体)よりもヘテロ二量体の収率を高めるメカニズムを提供する。例えば、WO96/27011には該方法が記載され、その全体が援引により組み込まれている。

【0106】

二重特異性抗体は、架橋抗体又は「ヘテロコンジュゲート」抗体が含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の1つは、アビジンにカップリングし、また、もう1つはビオチンにカップリングすることができる。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の便利な架橋法により作製されることができる。適切な架橋剤及び架橋法は、当分野で周知されているものであり、米国特許No. 4,676,980に開示されており、その全体が援引により本明細書に組み込まれている。

【0107】

抗体フラグメントから二重特異性抗体を産生させる技術も当技術分野で知られている。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を使用し調製することができる。Brennan et al. (Science 229: 81, 1985)は、インタクトな抗体をタンパク質分解により開裂してF(ab')₂フラグメントを発生させる方法を記載している。これらのフラグメントは、ジチオール複合化剤亜ヒ酸ナトリウムの存在下に還元して隣接するジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。次いで、発生したFab'フラグメントをチオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に転換する。次いで、メルカプトエチルアミンによる還元によってFab'TNB誘導体の1つをFab'-チオールに再転換し、等モル量の他のFab'TNB誘導体と混合して二重特異性抗体を形成させる。

【0108】

本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントのいずれかは、安定化分子(例えば、対象のin vivo又は溶液中の抗体又はその抗原結合フラグメントの半減期を増加させる分子)に結合されることができる。安定化分子の非限定的な例は、ポリマー(例えば、ポリエチレングリコール)又はタンパク質(例えば、ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン)が含まれる。安定化分子の複合化は、抗体又は抗原結合フラグメント在in vitro(例えば、組織培養物中又は医薬組成物として保管される場合)又はin vivo(例えば、ヒト中)での半減期を延長したり、生物学的活性を高めることができる。

【0109】

抗体特性

本明細書に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントは、CTLA4とCD80の結合及び/又はCTLA4とCD86の結合を遮断することができる。CTLA4とCD80

10

20

30

40

50

の結合及び/又はCTLA4とCD86の結合を遮断することにより、抗CTLA4抗体はCTLA4抑制経路を破壊し、免疫応答をアップレギュレートする。

【0110】

幾つかの実施態様において、抗体（又はその抗原結合フラグメント）は、 1×10^{-6} M未満、 1×10^{-7} M未満、 1×10^{-8} M未満、 1×10^{-9} M未満、又は 1×10^{-10} M未満という解離定数（Kd）でCTLA4（例えば、ヒトCTLA4、サルCTLA4、マウスCTLA4及び/又はキメラCTLA4）と特異的に結合する。幾つかの実施態様において、Kdは、20 nM、15 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM又は1 nM未満である。

10

【0111】

幾つかの実施態様において、Kdは、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M又は 1×10^{-12} Mを超える。

【0112】

抗原に対する抗体の親和性を測定する一般的な手法は、例えば、ELISA、RIA、及び表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance、SPR）を含む。幾つかの実施態様において、抗体は、ヒトCTLA4（SEQ ID NO: 41）、サルCTLA4（例えば、アカゲザルCTLA4、SEQ ID NO: 43）、キメラCTLA4（SEQ ID NO: 44）及び/又はマウスCTLA4（SEQ ID NO: 42）に結合する。幾つかの実施態様において、抗体は、ヒトCTLA4（SEQ ID NO: 41）、サルCTLA4（例えば、アカゲザルCTLA4、SEQ ID NO: 43）、キメラCTLA4（SEQ ID NO: 44）及び/又はマウスCTLA4（SEQ ID NO: 42）に結合しない。

20

【0113】

幾つかの実施態様において、抗体の腫瘍成長阻害率（TGI%）は、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、又は200%を超える。幾つかの実施態様において、抗体の腫瘍成長阻害率は、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、又は200%未満である。TGI%は、例えば、治療開始後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又は30日又は治療開始後1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12か月で特定されることができる。本明細書で使用されるように、腫瘍成長阻害率（TGI%）は、次の式を使用して計算する。

30

【数1】

$$TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$$

40

T_i は、 i 日目の治療群の平均腫瘍体積である。 T_0 は、0日目の治療群の平均腫瘍体積である。 V_i は、 i 日目の対照群の平均腫瘍体積である。 V_0 は、0日目の対照群の平均腫瘍体積である。

【0114】

抗CTLA4抗体の作製方法

ヒトCTLA4の単離フラグメントは、ポリクローナル及びモノクローナル抗体の作製のための標準的技術を使用して抗体を生成する免疫原として用いられる。ポリクローナルは、抗原ペプチド又はタンパク質の複数回の注射（例えば、皮下又は腹腔内注射）により動物内で発生されることができる。幾つかの実施態様において、抗原ペプチド又はタンパク質は、少なくとも1つのアジュバントとともに注射される。幾つかの実施態様において

50

、抗原ペプチド又はタンパク質は、予防接種を受ける種において免疫原性である試薬と複合化されることができる。動物には抗原ペプチド又はタンパク質を1回超え（例えば、2回、3回又は4回）注射することができる。

【0115】

全長ポリペプチド又はタンパク質を使用することができるか、又はその抗原ペプチド断片を免疫原として使用することができる。タンパク質の抗原ペプチドは、ペプチドに対して産生された抗体がタンパク質と特異性免疫複合体を形成するようにCTLA4のアミノ酸配列の少なくとも8個（例えば、少なくとも10、15、20又は30個）のアミノ酸残基を含み、且つタンパク質のエピトープを含む。上記のように、ヒトCTLA4の全長配列は当技術分野で知られている（SEQ ID NO: 41）。

10

【0116】

免疫原は、通常、適当な対象（例えば、ヒト、又は少なくとも1つのヒト免疫グロブリン遺伝子座を発現するトランスジェニック動物）を予防接種することにより抗体を調製する。適当な免疫原性製剤は、例えば、組換え発現又は化学合成されたポリペプチド（例えば、ヒトCTLA4のフラグメント）を含むことができる。該製剤は、さらに、アジュバント、例えば、フロインド完全又は不完全アジュバント、又は類似する免疫増強薬を含む。

【0117】

ポリクローナル抗体は、上記のように、CTLA4ポリペプチド又はその抗原ペプチド（例えば、CTLA4の一部）を免疫原として適当な対象を予防接種することにより調製される。予防接種された対象の抗体力価は、例えば、固定化CTLA4ポリペプチド又はペプチドを使用する酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）などの標準的な手法により経時的に監視することができる。必要に応じて、抗体分子を哺乳動物（例えば、血液）から単離し、周知の技術、例えば、プロテインA/Gクロマトグラフィーによりさらに精製してIgG画分を得る。予防接種後の適切な時間、例えば、特異性抗体力価が最も高い場合、抗体産生細胞を対象から取得し、例えば、Kohler et al. (Nature 256: 495 - 497, 1975) 初回に記載されたハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor et al., Immunol. Today 4: 72, 1983）、EBV-ハイブリドーマ技術（Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96, 1985）又はトリオーマ技術などの標準的な技術によりモノクローナル抗体を調製する。ハイブリドーマを産生する技術は、よく知られている（一般に、Current Protocols in Immunology, 1994, Coligan et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NYを参照）。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準的なELISAアッセイを使用し、目的のポリペプチドまたはエピトープに結合する抗体についてハイブリドーマ培養物上清液をスクリーニングすることにより検出される。

20

30

【0118】

本明細書に記載のヒト抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体、又はその抗原結合フラグメントをコードするDNAに適切なヌクレオチド変化を導入することにより、又はペプチド合成により、本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントの変異体を調製する。このような変異体は、例えば、抗体又は抗原結合部位を構成する抗原結合部位のアミノ酸配列中の残基の欠失、挿入又は置換を含む。このような変異体の集団では、一部の抗体又は抗原結合フラグメントは、標的タンパク質（例えば、CTLA4）に対する親和性が増加する。欠失、挿入及び/又はそれらの任意の組み合わせにより標的に対する結合親和性が増加した抗体又はその抗原結合フラグメントを取得することができる。抗体又は抗原結合フラグメントに導入されたアミノ酸の変化は、抗体又は抗原結合フラグメントを変化させ、或いは、それらに新たな翻訳後修飾を導入し、例えば、グリコシル化部位の数量を変更（例えば、増加又は減少）し、グリコシル化部位のタイプを変更し（例えば、細胞中に存在する酵素によって異なる糖が結合するようにアミノ酸配列を変更し）、又は新たなグリコシ

40

50

ル化部位を導入する。

【0119】

本明細書に開示される抗体は、哺乳動物を含む動物のあらゆる種に由来し得る。天然抗体の非限定的な例は、ヒト、霊長類（例えば、サル及び猿）、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ラクダ科（例えば、ラクダ及びラマ）、ニワトリ、ヤギ及びげっ歯類動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター及びウサギ）に由来する抗体を含み、ヒト抗体を産生するように遺伝子操作されたトランスジェニックげっ歯類動物を含む。

【0120】

ヒト及びヒト化抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する（又はそれと同じアミノ酸配列を有するものに由来する）可変領域及び定常領域を有する抗体を含む。ヒト抗体は、例えば、CDR内の、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基（例えば、*in vitro*でのランダムや部位特異的突然変異誘発、*in vivo*での体細胞突然変異により導入された突然変異）を含む。

10

【0121】

ヒト化抗体は、通常、非ヒトCDRが移植されたヒトフレームワーク（FR）を持つ。従って、ヒト化抗体は、ヒト以外の由来源から導入された1つ以上のアミノ酸残基をもつ。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「インポート（import）」残基と呼ばれることが多く、典型的には「インポート」可変ドメインから取られる。ヒト化は、本質的には、例えば、げっ歯類動物CDR又はCDR配列でヒト抗体の対応配列を置換することにより行うことができる。これらの方法は、例えば、Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)に記載されており、それぞれ援引により本明細書に組み込まれる。従って、「ヒト化」抗体は、インタクトなヒトVドメインよりも少ないものが非ヒト生物種由来の対応配列によって実質的に置換されているキメラ抗体である。実際には、ヒト化抗体は、通常、一部のCDR残基及び一部のFR残基がヒト抗体中の類似する部位に由来する残基によって置換されるマウス抗体である。

20

【0122】

ヒト化抗体を作製するためのヒトVH及びVLドメインの選択は、免疫原性の低減に非常に重要である。いわゆる「ベストフィット」という方法によれば、既知のヒトドメイン配列のライブラリ全体に対してマウス抗体のVドメインの配列をスクリーニングする。そして、マウスの配列に最も近いヒト配列は、ヒト化抗体のヒトFRとして組み込まれる（Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)）。

30

【0123】

さらには、抗体をヒト化するとともに、抗原に対する高特異性、親和性及び他の有利な生物学的特性を保持することは重要である。この目標を達成するために、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列および様々な概念的ヒト化産物の分析プロセスによりヒト化抗体を調製することができる。三次元免疫グロブリンモデルは一般に入手可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元立体配座構造を図示し表示するコンピュータープログラムが利用可能である。これらの表示の検査により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある役割を分析し、即ち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このように、レシピエント配列及びインポート配列からFR残基を選択して組み合わせることにより、所望の抗体特性、例えば、標的抗原に対する親和性の増加を取得することができる。

40

【0124】

通常、ヒト、ヒト化又はキメラ抗CTLA4抗体のアミノ酸配列変異体は、元の抗体の

50

軽鎖又は重鎖に存在する配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0125】

元の配列に対する同一性又は相同性は、通常、配列を整列させて必要に応じてギャップを導入し、配列同一性の最大パーセントを達成しながら配列同一性の一部として任意の保存的置換を考慮しない場合には、候補配列中で存在する、ヒト、ヒト化又はキメラ抗CTLA4抗体又はフラグメントに存在する配列と同じアミノ酸残基の百分率である。抗体配列のN端、C端又は内部の伸長、欠失又は挿入は、いずれも配列の同一性又は相同性に影響を与えると解釈されない。

【0126】

抗CTLA4抗体又は抗原結合フラグメントには、追加の修飾を加えることができる。例えば、システイン残基をFc領域に導入することにより、該領域で鎖間ジスルフィド結合を形成することができる。これにより産生するホモ二量体抗体は、任意に延長される、*in vitro*及び/又は*in vivo*での半減期を有する。また、ヘテロ二官能性架橋剤を使用することにより、延長される*in vitro*及び/又は*in vivo*での半減期を持つホモ二量体抗体を調製することができ、例えば、Wolff et al. (Cancer Res. 53:2560-2565, 1993)に記載されている。また、2つのFc領域を持つ抗体を改造することができる(例えば、Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230, 1989を参照)。

【0127】

幾つかの実施態様において、抗CTLA4抗体又はその抗原結合フラグメントに共有結合修飾を行うことができる。これらの共有結合修飾は、化学的や酵素的合成、又は酵素的や化学的切断により行うことができる。抗体又は抗体フラグメントの他のタイプの共有結合修飾は、抗体又はフラグメントの標的とするアミノ酸残基を、選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応可能な有機誘導体化剤と反応させることにより分子に導入される。

【0128】

組換えベクター

本開示は、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド(例えば、本明細書に開示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド)を含む組換えベクター(例えば、発現ベクター)、それに組換えベクターが導入される宿主細胞(即ち、宿主細胞はポリヌクレオチド及び/又はポリヌクレオチド含有ベクターを含む)、及び組換え技術による組換え抗体ポリペプチド又はそのフラグメントの生産を提供する。

【0129】

本明細書で使用される「ベクター」は、ベクターが宿主細胞に導入される場合に、1種又は複数種の目的のポリヌクレオチドを宿主細胞に送達できる任意の構築物である。「発現ベクター」は、1種又は複数種の目的のポリヌクレオチドを送達しながら、発現ベクターが導入された宿主細胞に1種又は複数種の目的ポリヌクレオチドをコードされるポリペプチドとして発現することができる。従って、発現ベクターにおいて、ベクター又は宿主細胞ゲノム中の調節エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサー及び/又はポリA尾部と作動可能に連結することにより、目的のポリヌクレオチドをベクター中に発現し、前記調節エレメントは、目的のポリヌクレオチドが発現ベクターが導入された宿主細胞内で翻訳されるように、目的のポリヌクレオチドの統合部位又はその付近又は脇側にある。

【0130】

ベクターは、当該分野で公知の方法、例えば、エレクトロポレーション、化学的トランスフェクション(例えば、DEAE-デキストラン)、形質転換、トランスフェクション、感染及び/又は形質導入(例えば、組換えウイルスによる)によって宿主細胞に導入される。従って、ベクターの非限定的な例は、ウイルスベクター(組換えウイルスを生成するために使用できる)、裸のDNA又はRNA、プラスミド、黏粒、ファージベクター及びカチオン性凝集剤に結び付けるDNA又はRNA発現ベクターを含む。

10

20

30

40

50

【0131】

幾つかの実施態様において、本明細書に開示されるポリヌクレオチド（例えば、本明細書に開示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド）は、使用ウイルス発現系（例えば、ワクシニアまたは他のポックスウイルス、レトロウイルス、またはアデノウイルス）を使用して導入され、ここで、非病原性（欠陥）複製コンピテントウイルス、又は複製欠陥ウイルスの使用に関する。後者の場合には、ウイルスの増殖は、一般にウイルスパッケージング細胞を補完する場合にのみ発生する。適当な系は、例えば、Fisher-Hoch et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321; Flexner et al., 1989, Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86-103; Flexner et al., 1990, Vaccine, 8:17-21; U.S. Pat. No. 4,603,112, 4,769,330, 及び、5,017,487; WO 89/01973; U.S. Pat. No. 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner-Biotechniques, 6:616-627, 1988; Rosenfeld et al., 1991, Science, 252:431-434; Kolls et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:215-219; Kass-Eisler et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11498-11502; Guzman et al., 1993, Circulation, 88:2838-2848; 及び Guzman et al., 1993, Cir. Res., 73:1202-1207に開示されている。そのような発現系にDNAを組み込むための技術は、当業者に周知である。DNAは、「裸」であってもよく、例えば、Ulmer et al., 1993, Science, 259:1745-1749及びCohen, 1993, Science, 259:1691-1692に記載されるようになる。DNAを、細胞内に効率的に輸送される生分解性ビーズ上にコーティングして裸のDNAの取り込みを向上させることができる。

10

20

【0132】

発現のために、本明細書に開示される抗体又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むDNAインサートは、適当なプロモーター（例えば、異種プロモーター）、例えば、ファージラムダPLプロモーター、大腸菌（*E. coli*）lac, trp及びtacプロモーター、SV40初期及び後期プロモーター及びレトロウイルスLTRのプロモーターなどに有効的に連結する。他の適切なプロモーターは、当業者に知られている。発現構築物は、さらに、転写開始、終結のための部位、及び転写領域で翻訳のためのリボソーム結合部位を含むことができる。構築物により発現される成熟転写物のコーディング領域は、開始位置にある翻訳開始点、及び翻訳されるポリペプチド末端に適当に位置する終止コドン（UAA、UGA又はUAG）を含むことができる。

30

【0133】

上記のように、発現ベクターは、少なくとも1つの選択マーカを含むことができる。このようなマーカは、真核細胞培養用のジヒドロ葉酸還元酵素またはネオマイシン耐性、および大腸菌および他の細菌での培養用のテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性遺伝子を含む。適切な宿主の代表例は、例えば、大腸菌、ストレプトミセス（*Streptomyces*）及びサルモネラ菌（*Salmonella typhimurium*）の細胞などの細菌細胞；酵母細胞などの真菌細胞；ショウジョウバエ（*Drosophila*）S2及びスポドプテラ（*Spodoptera*）Sf9細胞などの昆虫細胞；CHO、COS、Bowes黒色腫及びHK 293細胞などの動物細胞；植物細胞を含むが、これらに限定されない。本明細書に記載の宿主細胞に適切な培地および条件は、当技術分野で知られている。

40

【0134】

細菌で用いられる非限定的なベクターは、Qiagenから入手可能なpQE70、p

50

QE60及びpQE-9; Stratageneから入手可能なpBSベクター、Phagescriptベクター、Bluescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A; Pharmaciaから入手可能なptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5を含む。非限定的な真核ベクターは、Stratageneから入手可能なpWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1及びpSG; Pharmaciaから入手可能なpSVK3、pBPV、pMSG及びpSVLを含む。他の適当なベクターは、当業者にとって容易に明らかになる。

【0135】

適当に使用される非限定的な細菌プロモーターは、大腸菌lacI及びlacZプロモーター、T3及びT7プロモーター、gptプロモーター、PR及びPLプロモーター及びtrpプロモーターを含む。適当な真核プロモーターは、CMV最初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、SV40初期及び後期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(Rous sarcoma virus、RSV)のようなレトロウイルスLTRのプロモーター、及びマウスメタロチオネイン-Iプロモーターのようなメタロチオネインプロモーターを含む。

10

【0136】

醸造用酵母(Saccharomyces cerevisiae)では、構成的または誘導性プロモーター(例えば、因子、アルコールオキシダーゼ及びPGH)含む多くのベクターを使用できる。レビューについては、Ausubel et al. (1989) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、N.Y.、及びGrant et al.、Methods Enzymol.、153: 516-544 (1997)を参照する。

20

【0137】

宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、カチオン性脂質媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染又は他の方法により実現できる。多くの標準的な実験室マニュアルには、例えば、Davis et al.、BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1986)という方法が記載される。

30

【0138】

エンハンサー配列をベクターに挿入することにより、高等真核生物による本開示に係る抗体をコードするDNAの転写を増加することができる。エンハンサーは、DNAのシスエレメントであり、通常、約10~300bpであり、特定の宿主細胞タイプのプロモーターの転写活性を高める働きを奏する。エンハンサーの実例としては、塩基対100~270で複製出発点の後側に位置するSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製出発点の後側に位置するポリオーマウイルスエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。

【0139】

翻訳されたタンパク質を小胞体の内腔、周辺腔または細胞外環境に分泌するために、適切な分泌シグナルを発現ポリペプチドに組み込むことができる。シグナルはポリペプチドに内因性であっても、異種シグナルであってもよい。

40

【0140】

ポリペプチド(例えば、抗体)は、修飾された態様、例えば、融合タンパク質(例えば、GST-融合タンパク質)又はヒスチンタグを備える態様、で発現でき、分泌シグナルだけでなく、他の異種機能領域も含む場合がある。例えば、ポリペプチドのN末端に別のアミノ酸(特に荷電アミノ酸)の領域を追加し、宿主細胞において、精製中又はその後の取り扱い及び保管期間の安定性及び持続性を改善することができる。また、精製しやすいために、ペプチド部分をポリペプチドに加えることができる。そのような領域は、ポリペプチドの最終調製の前に除去されることができる。ポリペプチドへのペプチド部分の付

50

加により分泌または排泄を引き起こすることで、安定性を改善し、精製しやすくすることは、当技術分野でよく知られた通常の技術である。

【0141】

治療方法

本開示に係る抗体又はその抗原結合フラグメントは、多くの治療目的に用いられる。一方、本開示は、対象の癌を治療するための方法、対象中腫瘍体積の経時的増大の速率を低減させる方法、転移のリスクを低下させる方法、又は対象中に別の転移が発生するリスクを低下させる方法を提供する。幾つかの実施態様において、癌の進行を停止、退縮、遅延、または阻害する可能性がある。幾つかの実施態様において、治療は、対象中の癌の1種又は複数種の症状の数、重症度及び/又は持続期間の減少をもたらす。

10

【0142】

一つの側面では、本開示は、本明細書に開示される抗体又はその抗原結合フラグメントを治療有効量でそれを必要とする対象（例えば、癌を有する、または癌を有すると同定または診断された対象）に投与することを含む方法を特徴とする。癌としては、例えば、乳がん（例えば、トリプルネガティブ乳がん）、カルチノイドがん、子宮頸がん、子宮内膜がん、神経膠腫、頭頸部がん、肝臓がん、肺がん、小細胞肺がん、リンパ腫、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、腎がん、結腸直腸がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、膀胱がん、尿道がん、または血液悪性腫瘍が挙げられる。幾つかの実施態様において、癌は、切除不能な黒色腫または転移性黒色腫、非小細胞肺がん（NSCLC）、小細胞肺がん（SCLC）、膀胱がん又は転移性ホルモン不応性前立腺がんである。

20

【0143】

幾つかの実施態様において、本明細書に開示される組成物および方法は、癌のリスクがある患者の治療に使用することができる。癌患者は、当技術分野で知られているさまざまな方法で特定できる。

【0144】

本明細書で使用される「有効量」とは、有益または望ましい結果（疾患、例えば癌の進行を停止、退縮、遅延、または阻害することを含む）をもたらすのに十分な量又は用量を意味する。有効量は、例えば、抗体、抗原結合断片、抗体をコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含むベクター、および/またはそれらの組成物が投与される個体の年齢および体重、重症度、投与経路に応じて異なり、したがって、各々患者の状況に応じて投与する。

30

【0145】

有効量は、1回又はそれ以上の投与で投与できる。例としては、抗体又は抗原結合フラグメントの有効量は、患者の癌の進行を改善、停止、安定化、逆転、阻害、退縮および/または遅延させるのに十分な量、或いは *in vitro* での細胞（例えば、生検細胞、本明細書に記載の癌細胞のいずれか、又は細胞株（例えば、癌細胞株））の増殖を改善、停止、安定化、逆転、阻害、退縮および/または遅延させるのに十分な量である。当技術分野で理解されているように、抗体又は抗原結合フラグメントの有効量は、変化してもよく、これは、特に、患者の病歴及び他の因素、例えば、使用される抗体のタイプ（及び/又は用量）によるものである。

40

【0146】

本明細書に開示される抗体、抗体をコードするポリヌクレオチド及び/又は組成物の有効量及びスケジュールは、経験的に決定することができ、そのような決定を行うことは当業者の範囲内である。当業者は、投与する必要がある用量が、例えば、本明細書に開示される抗体、抗体をコードするポリヌクレオチド及び/又は組成物を投与する哺乳動物、投与経路、用いられる本明細書に開示されている抗体、抗体をコードするポリヌクレオチド、抗原結合フラグメント及び/又は組成物の具体的なタイプ、及び哺乳動物が投与される他の薬物に応じて変化する。抗体又は抗原結合フラグメントの適当な用量の指針は、抗体及び抗原結合フラグメントの治療用途に関する文献、例えば、*Handbook of Monoclonal Antibodies*、*Ferrone et al., eds*

50

、 N o g e s P u b l i c a t i o n s 、 P a r k R i d g e 、 N . J . 、 1 9 8 5 、 c h . 2 2 a n d p p . 3 0 3 - 3 5 7 ; S m i t h e t a l . 、 A n t i b o d i e s i n H u m a n D i a g n o s i s a n d T h e r a p y 、 H a b e r e t a l . 、 e d s . 、 R a v e n P r e s s 、 N e w Y o r k 、 1 9 7 7 、 p p . 3 6 5 - 3 8 9 に見つけられる。

【 0 1 4 7 】

抗体の有効量の典型的な1日投与量は、0.01mg/kg～100mg/kgである。幾つかの実施態様において、用量は、100mg/kg、10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg又は0.1mg/kg未満であること
10
ことができる。幾つかの実施態様において、用量は、10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg、0.1mg/kg、0.05mg/kg又は0.01mg/kgを超えること
10
ことができる。幾つかの実施態様において、用量は、約10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.9mg/kg、0.8mg/kg、0.7mg/kg、0.6mg/kg、0.5mg/kg、0.4mg/kg、0.3mg/kg、0.2mg/kg又は0.1mg/kgである。

【 0 1 4 8 】

本明細書に記載の任意の方法において、少なくとも1種の抗体、その抗原結合フラグメント又は医薬組成物（例えば、本明細書に記載の任意の抗体、抗原結合フラグメント又は医薬組成物）、及び選択してもよい少なくとも1種の追加の治療剤は、対象に少なくとも週1回（例えば、週1回、週2回、週3回、週4回、1日1回、1日2回又は1日3回）投与される。幾つかの実施態様において、同じ組成物（例えば、液体組成物）では少なくとも2種の異なる抗体及び/又は抗原結合フラグメントが投与される。幾つかの実施態様において、同じ組成物（例えば、液体組成物）では、少なくとも1種の抗体又は抗原結合フラグメント及び少なくとも1種の追加の治療剤が投与される。幾つかの実施態様において、少なくとも1種の抗体又は抗原結合フラグメント及び少なくとも1つの追加の治療剤は、2種の異なる組成物（例えば、少なくとも1種の抗体又は抗原結合フラグメントを含む液体組成物、及び少なくとも1つの追加の治療剤を含む経口固体組成物）で投与される
20
30
。幾つかの実施態様において、前記少なくとも1種の追加の治療剤は、丸剤、錠剤又はカプセルとして投与される。幾つかの実施態様において、前記少なくとも1つの追加の治療剤は、徐放性経口製剤として投与される。

【 0 1 4 9 】

幾つかの実施態様において、少なくとも1種の抗体、抗原結合抗体フラグメント又は医薬組成物（例えば、本明細書に記載の任意の抗体、抗原結合抗体フラグメント又は医薬組成物）を投与する前又は後に、1種又は複数種の追加の治療剤を対象に投与する。幾つかの実施態様において、1種又は複数種の追加の治療剤及び少なくとも1種の抗体、抗原結合抗体フラグメント又は医薬組成物（例えば、本明細書に記載の任意の抗体、抗原結合抗体フラグメント又は医薬組成物）を対象に投与することができ、対象において1種又は複数種の追加の治療剤及び少なくとも1種の抗体又は抗原結合フラグメント（例えば、本明細書に記載の任意の抗体又は抗原結合フラグメント）の生物活性期間が重なり合うこと
40
になる。

【 0 1 5 0 】

幾つかの実施態様において、少なくとも1つの抗体、抗原結合抗体フラグメント又は医薬組成物（例えば、本明細書に記載の任意の抗体、抗原結合抗体フラグメント又は医薬組成物）を対象に長期間（例えば、在少なくとも1週間、2週間、3週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、1年、2年、3年、4年又は5年の期間内）投与する。熟練した医療専門家は、本明細書に記載される、治療の有効性を診断または追跡するための任意の方法（例えば、
50

癌の少なくとも1つの症状の観察)により治療期間の長さを決定することができる。本明細書に記載されるように、熟練した医療専門家は、治療の有効性の評価(例えば、本明細書に記載及び当技術分野で知られている任意の方法)に基づいて、対象に投与する抗体又は抗原結合抗体フラグメント(及び/又は1種又は複数種の追加の治療剤)の種類及び数量(例えば、増加又は減少)を変更してもよく、さらに、対象に投与する少なくとも1種の抗体又は抗原結合抗体フラグメント(及び/又は1種又は複数種の追加の治療剤)の用量又は頻度を調整(例えば、向上又は低減)してもよい。

【0151】

医薬組成物及び投与経路

本明細書には、さらに、少なくとも1種(例えば、1種、2種、3種又は4種)の本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントを含む医薬組成物を提供する。本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントのいずれかの2種又はそれ以上(例えば、2種、3種又は4種)は、任意に組み合わせて医薬組成物に存在することができる。医薬組成物は、当技術分野で知られている任意の方法で製剤化することができる。

10

【0152】

医薬組成物は、意図された投与経路(例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、皮下又は腹腔内)に適合するように調製される。組成物は、滅菌希釈剤(例えば、滅菌水又は生理食塩水)、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒;ベンジルアルコール又はメチルパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン、チメロサルなどの抗菌剤又は抗真菌剤;アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの酸化防止剤;エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤;酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩などの緩衝液;及び糖(例えば、デキストロース)、多価アルコール(例えば、マンニトールまたはソルビトール)又は塩(例えば、塩化ナトリウム)などの等張化剤;又はそれらの任意の組み合わせを含むことができる。リポソーム懸濁液は、薬学的に許容される担体としても使用できる(例えば、米国特許第4,522,811号を参照)。組成物の製剤を調製し、アンプル、使い捨て注射器、または複数回投与バイアルに封入することができる。必要とする場合には(例えば、注射用製剤など)、例えば、コーティング(例えば、レシチン)又は界面活性剤を使用することにより適切な流動性を維持することができる。吸収を遅延させる試薬(例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン)を含むことにより抗体又はその抗原結合フラグメントの吸収を延長させることができる。また、制御放出は、生分解性の生体適合性ポリマー(例えば、エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸;Alza Corporation及びNova Pharmaceutical, Inc.)を含むインプラント及びマイクロカプセル化デリバリーシステムによって実現できる。

20

30

【0153】

本明細書に記載の抗体又は抗原結合フラグメントのいずれか1種又は複数種を含む組成物は、投与単位形態(即ち、投与を容易にし、投与量を均一にするための、予定量の活性化化合物を含む物理的分散ユニット)で非経口(例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、皮下又は腹腔内)投与する。

40

【0154】

組成物の毒性および治療効果は、細胞培養または実験動物(例えば、サル)において標準的な薬学的操作によって決定できる。例えば、LD50(集団の50%に致死的な用量)及びED50(集団の50%で治療的に有効な用量)を特定できる。治療指数は、LD50:ED50の比率である。高い治療指数を示す薬剤が好ましい。薬剤が望ましくない副作用を示すと、潜在的なリスクを最小限に抑える(即ち、望ましくない副作用を減らす)ように注意する必要がある。毒性及び治療効果は、他の標準的な薬学的操作によって決定できる。

【0155】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、適当な用量で任意の所与の薬

50

剤を調製して対象（例えば、ヒト）に投与するのに使用できる。1種又は複数種の（例えば、1種、2種、3種又は4種）抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、本明細書に記載の任意の抗体又は抗体フラグメント）の治療有効量は、対象（例えば、癌を有すると判定されたヒト対象）、又は疾患を発症するリスクがあると判定された対象（例えば、以前に癌を発症したが現在に治癒された対象）において対象の疾患を治療し（例えば、癌細胞を殺す）、対象（例えば、ヒト）の疾患の1種又は複数種の症状の重症度、頻度及び/又は持続期間を低減させる量である。本明細書に記載の任意の抗体又は抗原結合フラグメントの有効性及び用量は、医療専門家または獣医専門家が当該分野で公知の方法を使用し、対象（例えば、ヒト）における疾患の1種又は複数種の症状を観察することにより決定することができる。特定の要因は、対象を効果的に治療するために必要な用量及びタイミングに影響を与える可能性がある（例えば、疾患または障害の重症度、以前の治療、対象の一般的な健康および/または年齢、および他の疾患の存在）。

10

【0156】

例示的な用量は、対象の体重1キログラム当たり本明細書に記載の任意の抗体又は抗原結合フラグメントのミリグラムまたはマイクログラム（例えば、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $500\text{mg}/\text{kg}$ ；約 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $500\text{mg}/\text{kg}$ ；約 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $50\text{mg}/\text{kg}$ ；約 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $5\text{mg}/\text{kg}$ ；約 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ ；又は約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ ）を含む。これらの用量は広い範囲をカバーするが、当業者は、抗体およびその抗原結合フラグメントを含む治療剤の効力が異なり、有効量は当該技術分野で既知の方法により決定できることを理解すべきである。通常、最初は比較的低用量を投与し、担当の医療専門家または獣医専門家（治療的応用の場合）または研究者（まだ開発段階で作業している場合）は、適切な応答が得られるまで徐々に用量を増やすことができる。さらに、特定の対象の具体的な用量レベルは、使用する特定の化合物の活性、対象の年齢、体重、一般的な健康、性別、食事、投与時間、投与経路、排泄率、および抗体または抗体フラグメントの*in vivo*での半減期などのさまざまな要因に依存することが理解される。

20

【0157】

医薬組成物は、投与のための説明書と共に容器、パック、またはディスペンサーに含めることができる。

【実施例】

30

【0158】

以下、以下の実施例で本発明をさらに説明するが、これらの実施例は特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

【0159】

実施例1. マウス抗hCTLA4抗体の産生

ヒトCTLA4（hCTLA4；SEQ ID NO：41）に対するマウス抗体を産生するために、6～8週齢の雌性BALB/cマウスをヒトCTLA4で予防接種した。抗hCTLA4抗体は、以下に記載の方法により収集された（図1及び図2）。

【0160】

マウスの予防接種

40

6～8週齢の雌性BALB/cマウスを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で $20\mu\text{g}$ /マウスのhisタグ付きヒトCTLA4タンパク質で予防接種した。hisタグ付きヒトCTLA4タンパク質をアジュバントで乳化し、マウスの背中中の4つの位置に注射した。1回目の皮下（s.c.）注射では、希釈された抗原を同体積の完全フロイントアジュバント（CFA）で乳化した。次の皮下注射では、タンパク質を同体積の不完全フロイントアジュバント（IFA）で乳化した。3回目の注射又は追加予防接種の3日後に、血液（血清）を収集し、ELISAを使用して抗体価を分析した。

【0161】

別の実験では、ヒトCTLA4をコードする発現プラスミドをマウスに注入することにより6～8週齢の雌性BALB/cマウスを予防接種した。抗原をコードするプラスミド

50

を、 $1000 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ の濃度で各マウスあたり $60 \mu\text{g}$ にて遺伝子銃を使用することにより、マウスの前脛骨筋に注射した（筋肉内注射；i.m.注射）。各注射の間に少なくとも14日間、少なくとも4回の注射が行われた。最後の予防接種から7日後に血液（血清）を採取し、ELISAにより抗体価について血清を検査した。

【0162】

前の予防接種の少なくとも14日後に、さらに、予防接種を強化する手順も実行された（プラスミドの注射又はタンパク質の注射）。表面にCTLA4抗原を発現するCHO細胞を尾静脈からマウスに静脈内注射した。そして、注射の4日後に脾臓を採取した。

【0163】

SP2/0細胞と脾臓細胞の融合

脾臓組織を粉砕した。まず、CD3 マイクロビーズ及び抗マウスIgMマイクロビーズにより脾臓細胞を選択し、次に、SP2/0細胞と融合させた。その後、細胞をヒポキサンチン - アミノプテリン - チミジン（HAT）培地を含む96ウェルプレートに播種した。

【0164】

ハイブリドーマの1次スクリーニング

標準的プロトコルに従って、蛍光活性化セルソーティング（Fluorescence - Activated Cell Sorting、FACS）を使用し、96ウェルプレート内のハイブリドーマ上清に1次スクリーニングを行った。スクリーニングの前に、チャイニーズハムスター卵巣（Chinese hamster ovary、CHO）細胞を96ウェルプレートに加えた（ウェルあたり 2×10^4 細胞）。上清 $50 \mu\text{l}$ を使用した。実験で使用された抗体は、

【0165】

（1）フルオレセイン（FITC）複合化AffiniPure F(ab)₂フラグメントヤギ抗マウスIgG、Fcフラグメント特異的；及び

【0166】

（2）Alexa Fluor（登録商標）647複合化AffiniPure F(ab)₂フラグメントヤギ抗ヒトIgG、Fcフラグメント特異的である。

サブクローン

ClonePix2を使用してサブクローン化を施した。単純的には、1次スクリーニング中に特定された陽性ウェルを半固体培地に移し、IgG陽性クローンを同定してテストした。FITC抗マウスIgG Fc抗体を使用した。

【0167】

腹水抗体

1×10^6 個の陽性ハイブリドーマ細胞をB-NDG（登録商標）マウス（Beijing Biocytogen、北京、中国）に腹腔内注射した。マウスの腹腔内でハイブリドーマ細胞を増殖させることによりモノクローナル抗体を産生した。ハイブリドーマ細胞は、マウスの腹部に増殖し腹水を産生した。腹水は、高濃度の抗体を含み、それを採取して用意した。

【0168】

抗体精製

腹水中の抗体は、GE AKTAタンパク質液体クロマトグラフィー（GE Healthcare、Chicago、Illinois、United States）により精製された。CT4-04-13A4（「13A4」）、CT4-03-4G12（「4G12」）、CT4-20-6D2（「6D2」）及びCT4-20-7E12（「7E12」）は、上記の方法により産生したマウス抗体に存在した。これらの抗体の重鎖・軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、図27に示した。

【0169】

実施例2．マウス抗体のヒト化

ヒト化の出発点は、マウス抗体（例えば、13A4及び4G12）である。これらのマ

10

20

30

40

50

ウス抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を特定した。異なる置換の配列を含む(図25を参照)、13A4の5つのヒト化重鎖可変領域変異体(SEQ ID NO: 13~17)及び3つのヒト化軽鎖可変領域変異体(SEQ ID NO: 18~20)を構築した。ヒト化13A4の重鎖及び軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 1~6(Kabat番号)又はSEQ ID NO: 29~34(Chothia番号)に示した。

【0170】

異なる置換の配列を含む(図25を参照)、4G12の4つのヒト化重鎖可変領域変異体(SEQ ID NO: 21~24)及び4つのヒト化軽鎖可変領域変異体(SEQ ID NO: 25~28)を構築した。ヒト化4G12の重鎖及び軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 7~12(Kabat番号)又はSEQ ID NO: 35~40(Chothia番号)に示した。

10

【0171】

これらのヒト化抗体は、標準的プロトコルで発生し、BioLuminate 1.0 (Schrodinger、中国上海)を使用した。

【0172】

実施例3. マウス抗hCTLA4抗体の*in vitro*試験: CD80及びCD86のCTLA4結合の遮断

抗CTLA4抗体がCTLA4とCD80の結合及びCTLA4とCD86の結合を遮断できるかどうかを判定するために、ブロックングアッセイを実施した。

20

【0173】

抗CTLA4抗体は、マウス腹水から採取され、クロマトグラフィーで精製された。ヒトCTLA4で一時的にトランスフェクトされたCHO細胞25µlをプレートの各ウェルに加えた。精製抗体は、最終濃度が50、5、0.5、0.05、0.005 µg/mlになるまで滴下された。滴下された抗体を、各ウェルに4でウェルあたり25 µl添加し、30分間インキュベートした。

【0174】

ビオチン-hCD80又はビオチン-hCD86を0.4 µg/mlに滴下した。リガンド溶液50 µlを各ウェルに加え、ビオチン-hCD80又はビオチン-hCD86の最終濃度を0.2 µg/mlにした。ビオチン-hCD80又はビオチン-hCD86を含む細胞を4で15分間インキュベートした。

30

【0175】

リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄した後、4で50 µlの抗マウスIgG Fc抗体フルオレセインイソチオシアネート(IgG Fc-FITC)及びストレプトアビジン-フィコエリトリン(ストレプトアビジン-PE)を1:100の希釈倍率で各ウェルに添加し、15分間インキュベートし、その後、PBSで洗浄した。FITC及びPEのシグナルは、フローサイトメトリーにより特定された。

【0176】

図3に示すように、マウス抗hCTLA4抗体(CT4-04-13A4及びCT4-03-4G12)の濃度が向上すると、PEのシグナルが低下し、CT4-04-13A4及びCT4-03-4G12抗体はヒトCTLA4とビオチン-hCD80の結合を阻害することが分かった。

40

【0177】

類似して、図4では、抗hCTLA4抗体(CT4-04-13A4及びCT4-03-4G12)の濃度が向上すると、PEのシグナルが低下し、CT4-04-13A4及びCT4-03-4G12抗体がヒトCTLA4とビオチン-hCD86の結合を阻害することが分かった。

【0178】

実施例4. サル、マウス及びヒト-マウスキメラCTLA4に対するキメラ抗hCTLA4抗体の交差反応性

50

CHO細胞にアカゲザルCTLA4 (rmCTLA4、SEQ ID NO: 43)、マウスCTLA4 (mCTLA4、SEQ ID NO: 42)及びキメラ(マウス及びヒト)CTLA4 (chiCTLA4、SEQ ID NO: 44)をトランスフェクトした。

【0179】

CHO細胞25µlを各ウェルに添加した。精製キメラ抗hCTLA抗体(1µg/ml)(CT4-03-4G12-mHvKv-IgG1及びCT4-04-13A4-mHvKv-IgG1)を各ウェルに25µl加え、4で30分間インキュベートした。CT4-03-4G12-mHvKv-IgG1及びCT4-04-13A4-mHvKv-IgG1は、キメラ抗hCTLA抗体である。CT4-03-4G12-mHvKv-IgG1は、マウス抗体4G12に由来する重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメイン、及びヒトIgG1抗体定常領域(CL、CH1、CH2、CH3)を有した。類似して、CT4-04-13A4-mHvKv-IgG1は、マウス抗体13A4に由来する重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメイン、及びヒトIgG1抗体定常領域(CL、CH1、CH2、CH3)を有した。

10

【0180】

PBS(1200rpm, 5分間)で2回洗浄した後、抗ヒトIgG Fc抗体フルオレセインイソチオシアネート(IgG Fc-FITC)50µlを以1:100の希釈倍率で各ウェルに加え、4で30分間インキュベートし、その後、PBSで洗浄した。FITCのシグナルは、フローサイトメトリーにより特定された。

20

【0181】

図5に示すように、CT4-04-13A4-mHvKv-IgG1は、マウスCTLA4と交差反応せず、rmCTLA4及びキメラCTLA4と強い交差反応性を有した。類似して、CT4-03-4G12-mHvKv-IgG1は、マウスCTLA4と交差反応せず、rmCTLA4及びキメラCTLA4と強い交差反応性を有した。図5では、NCは、陰性対照を示し、PCは、陽性対照を示した。

【0182】

実施例5. マウス抗hCTLA4抗体のin vivo検出

in vivoで抗hCTLA4抗体をテストし、人体中でこれらの抗体の作用を予測するために、CTLA-4ヒト化マウスモデルを作成した。CTLA4ヒト化マウスモデルは、マウスCTLA4タンパク質の細胞外領域の一部がヒトCTLA4細胞外領域で置換されたキメラCTLA4タンパク質(SEQ ID NO: 44)を発現するように設計された。SEQ ID NO: 44の41~143番目のアミノ酸残基は、ヒトCTLA4に由来する。ヒト化マウスモデル(B-hCTLA-4ヒト化マウス)は、ヒトとマウスCTLA4を発現する通常のマウスの臨床結果の差を大幅に減らすことにより、臨床設定で新しい治療法をテストするための新しいツールを提供できる。

30

【0183】

結腸癌モデルにおいて、抗hCTLA4抗体をアッセイしてin vivoでの腫瘍成長に対する作用を示した。MC-38癌腫瘍細胞(結腸腺癌細胞)をB-hCTLA-4ヒト化マウスに皮下注射した。マウスの腫瘍が $150 \pm 50 \text{ mm}^3$ の体積に達する場合には、腫瘍の体積に基づいてマウスを異なる群にランダムに分けた。次いで、マウスにPBS及び抗hCTLA4抗体を静脈内注射した。抗体は3日ごとに合計15日間投与された(合計6回の注射)。注射量は、 $10 \mu\text{l} / \text{g}$ でマウスの体重に基づいて計算された。腫瘍の長軸及び短軸の長さは、毎週2回測定され、腫瘍の体積を $0.5 \times (\text{長軸}) \times (\text{短軸})^2$ として計算された。マウスの体重は、さらに、注射前、マウスを異なる群に分ける際に(1回目の抗体注射の前)、抗体注射期間中に週2回、安楽死前に測定された。

40

【0184】

腫瘍成長阻害率(TGI%)は、次の式： $TGI(\%) = [1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)] \times 100$ を使用して計算された。Tiは、i日目の治療群の平均腫瘍体積である。T0は、0日目の治療群の平均腫瘍体積である。Viは、i日目の対照群の平

50

均腫瘍体積である。V0は、0日目の対照群の平均腫瘍体積である。

【0185】

統計分析のためにT検定を実施した。TGI%が60%を超えると、腫瘍の成長が著しく抑制された。p < 0.05は、有意差を示す閾値である。

【0186】

マウス抗hCTLA4抗体13A4及び4G12のin vivo結果

マウスの体重は、治療期間全体にわたって監視されモニタリングされた。異なる群のマウスの体重は、すべて増加した(図6及び図7)。対照群と抗hCTLA4治療群の間に体重の有意差は観察されなかった。結果としては、抗hCTLA4抗体は忍容性が高く、マウスに対して毒性がないことを示した。

10

【0187】

しかしながら、腫瘍サイズは、抗体13A4及び4G12で処置された群で有意差を示した(図8を参照)。図8に示すように、13A4及び4G12は、用量依存的に腫瘍成長を抑制した。興味深いことには、用量が1 mg/kgの4G12と比較して、用量が0.3 mg/kgの4G12は、より良い結果を示し、比較的低い用量(例えば、0.5 mg/kg未満、又は0.1 mg/kg~0.5 mg/kg)の4G12は、最高の結果を達成できる。

【0188】

次の表に示すように、各治療群の22日目のTGI%も計算された。

【0189】

20

【表1】

群	抗体	TGI%
G2	13A4 (3mg/kg)	103.00%
G3	13A4 (1mg/kg)	82.90%
G4	13A4 (0.3mg/kg)	69.00%
G5	4G12 (3mg/kg)	45.20%
G6	4G12 (1mg/kg)	10.10%
G7	4G12 (0.3mg/kg)	73.60%

30

【0190】

13A4及びYervoyのin vivo結果

CTLA4抗体の效力を比較するために、Yervoyを13A4と同一の実験で使用した。異なる群のマウスは、投与中に、体重がすべて増加した(図9及び図10を参照)。毒性効果は観察されなかった。

【0191】

13A4及びYervoy治療は、いずれも腫瘍サイズの有意な減少をもたらした(図11を参照)。特に、Yervoyと比較しては、13A4治療は、少なくともYervoyと比較可能な結果をもたらした。両方の治療群の28日目のTGI%を以下に示した。

40

【0192】

【表2】

群	抗体	TGI%
G3	Yervoy	104.60%
G5	13A4	104.70%

50

【0193】

実施例6. ヒト化抗hCTLA4抗体のin vivo結果

ヒト化抗体は、実施例2に記載の方法により産生した。ヒト化抗体の治療効果を確認するために、6つのヒト化抗hCTLA4抗体(4G12-H1K1-IgG1; 4G12-H2K1-IgG1; 13A4-H1K2-IgG1; 13A4-H2K2-IgG1; 13A4-H1K2-IgG4; 13A4-H1K2-IgG1-N297A)をB-hCTLA-4ヒト化マウスでテストし、in vivoでの腫瘍成長に対する効果を示した(図12~17)。さらに、グリカン不均一性を低減させるために、ヒト化抗体13A4-H1K2-IgG1的Fc領域をさらに改良し、297位のアスパラギンをアラニンで置換した(図17を参照)。抗体の軽鎖及び重鎖可変領域を下表に示した。

【0194】

【表3】

ヒト化抗体	重鎖可変領域	軽鎖可変領域	タイプ
4G12-H1K1-IgG1	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 25	IgG1
4G12-H2K1-IgG1	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 25	IgG1
13A4-H1K2-IgG1	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 19	IgG1
13A4-H2K2-IgG1	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 19	IgG1
13A4-H1K2-IgG4	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 19	IgG4
13A4-H1K2-IgG1-N297A	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 19	Fc領域に N297A突然変 異を持つIgG1

【0195】

実施例5に記載と同様の手順が使用された。MC-38腫瘍細胞(結腸腺癌細胞)をB-hCTLA-4ヒト化マウスに皮下注射した。マウスの腫瘍が $150 \pm 50 \text{ mm}^3$ の体積に達する場合には、マウスは、腫瘍の体積に基づいて異なる群に分けられた。次いで、PBS及び抗hCTLA4抗体をマウスに静脈内注射した。抗体は、週2回(毎週の1、4日目)に3週間(合計6回の注射)投与された。用量は、マウスの体重に基づいて 10 mg/kg にて計算された。腫瘍の長軸と短軸の長さを毎週2回測定し、腫瘍の体積を $0.5 \times (\text{長軸}) \times (\text{短軸})^2$ と計算した。マウスの体重も、注射前、及びマウスを異なる群に分ける時(1日目の抗体注射前)に測定された。体重は、抗体注射期間中に週2回、および安楽死の直前の時点で測定された。

【0196】

腫瘍成長阻害率(TGI%)は、次の式： $TGI(\%) = [1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)] \times 100$ により計算された。Tiは、i日目の治療群の平均腫瘍体積である。T0は、0日目の治療群の平均腫瘍体積である。Viは、i日目の対照群の平均腫瘍体積である。V0は、0日目の対照群の平均腫瘍体積である。

【0197】

統計分析のためにt検定を実施した。TGI%が60%を超えると、腫瘍成長が著しく抑制された。 $p < 0.05$ は有意差を示すと見なされた。

【0198】

4G12-H1K1-IgG1及び4G12-H2K1-IgG1のin vivo結果
マウスを以下の4群に分けた。1)G1では、ヒトIgGを対照として使用し; 2)G4では、Yervoyを比較目的でマウスに投与し; 3)G10では、4G12-H1K

1 - I g G 1をマウスに投与し ; 及び 4) G 1 1では、4 G 1 2 - H 2 K 1 - I g G 1をマウスに投与した。

【 0 1 9 9 】

4つの群のマウスの体重は、投与期間全体にわたってモニタリングした(図12及び図13を参照)。各群中のマウスは、ほとんど健康であり、結果としては、抗CTLA4抗体は忍容性が高く、マウスに対して毒性がないことを示した。

【 0 2 0 0 】

しかしながら、Yervoy、4G12-H1K1-IgG1及び4G12-H2K1-IgG1で処置された群では、腫瘍サイズが有意に小さくなった(図14を参照)。図14に示すように、4G12-H1K1-IgG1(P = 0.002)及び4G12-H2K1-IgG1(P = 0.002)は、対照群よりも腫瘍の成長を抑制し、Yervoy(P = 0.007)よりもより良い結果を有した。各治療群の21日目のTGI%を以下に示した。

10

【 0 2 0 1 】

【表4】

群	抗体	TGI%
G4	Yervoy	82.20%
G10	4G12-H1K1-IgG1	90.50%
G11	4G12-H2K1-IgG1	90.50%

20

【 0 2 0 2 】

13A4-H1K2-IgG1、13A4-H2K2-IgG1、13A4-H1K2-IgG4及び13A4-H1K2-IgG1-N297Aのin vivo結果

マウスを6群に分けた。1)G1では、ヒトIgGを対照群として使用され; 2)G4では、Yervoyを比較目的でマウスに投与し; 3)G6では、13A4-H1K2-IgG1をマウスに投与し; 4)G7では、13A4-H2K2-IgG1をマウスに投与し; 5)G8では、13A4-H1K2-IgG4をマウスに投与し; 及び6)G9では、13A4-H1K2-IgG1-N297Aをマウスに投与した。

30

【 0 2 0 3 】

6つの群のマウスの体重は、投与期間全体にわたってモニタリングした(図15及び図16を参照)。結果としては、各群マウスは、いずれも健康であり、抗CTLA4抗体マウスに対して毒性がないことを示した。

【 0 2 0 4 】

しかしながら、各群の腫瘍体積は異なる。図17に示すように、対照群と比較して、すべての抗CTLA4抗体は、腫瘍成長を抑制することができる。特に、Yervoyよりも、13A4-H1K2-IgG1及び13A4-H2K2-IgG1は、より良い結果を有する。

40

【 0 2 0 5 】

各治療群の21日目のTGI%を以下に示した。

【 0 2 0 6 】

50

【表 5】

群	抗体	TGI%
G4	Yervoy	82.20%
G6	13A4-H1K2-IgG1	99.00%
G7	13A4-H2K2-IgG1	96.60%
G8	13A4-H1K2-IgG4	56.10%
G9	13A4-H1K2-IgG1-N297A	47.30%

10

【0207】

実施例 7 . マウス抗 hCTLA4 抗体の *in vitro* 検出 : CT4 - 20 - 6D2 (「6D2」) 及び CT4 - 20 - 7E12 (「7E12」)

抗 CTLA4 抗体は、マウス腹水から採取され、クロマトグラフィーで精製された。ヒト CTLA4 で一時的にトランスフェクトされた CHO 細胞 25 μ l をプレートの各ウェルに加えた。精製抗体は、最終濃度が 50、5、0.5、0.05、0.005 μ g / ml になるまで滴下された。滴下された抗体を各ウェルに 4 で各ウェルあたり 25 μ l 添加し、30 分間インキュベートした。ビオチン - hCD86 を 0.4 μ g / ml に滴下した。リガンド溶液 50 μ l を各ウェルに加え、ビオチン - hCD86 の最終濃度を 0.2 μ g / ml にした。ビオチン - hCD86 を含む細胞を 4 で 15 分間インキュベートした。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した後、4 で 50 μ l の抗マウス IgG Fc 抗体フルオレセインイソチオシアネート (IgG Fc - FITC) 及びストレプトアビジン - フィコエリトリン (ストレプトアビジン - PE) を 1 : 100 の希釈倍率で各ウェル中に添加し、15 分間インキュベートし、次いで、PBS で洗浄した。FITC 及び PE のシグナルは、フローサイトメトリーにより確認した。

20

【0208】

図 18 に示すように、抗 hCTLA4 抗体 (CT4 - 20 - 6D2 及び CT4 - 20 - 7E12) の濃度が向上すると、PE のシグナルが低下し、CT4 - 20 - 6D2 及び CT4 - 20 - 7E12 抗体はヒト CTLA4 とビオチン - hCD86 の結合を阻害することが分かった。

30

【0209】

実施例 8 . サル、マウス及びヒト - マウスキメラ CTLA4 に対する抗 hCTLA4 抗体の交差反応性

アカゲザル CTLA4 (rmCTLA4、SEQ ID NO : 43)、マウス CTLA4 (mCTLA4、SEQ ID NO : 42) 及びキメラ (マウス及びヒト) CTLA4 (chiCTLA4、SEQ ID NO : 44) を CHO 細胞にトランスフェクトした。

【0210】

CHO 細胞 25 μ l を各ウェルに添加した。精製マウス抗 hCTLA4 抗体 (1 μ g / ml) (CT4 - 20 - 6D2 及び CT4 - 20 - 7E12) を各ウェルに 25 μ l 添加し、4 で 30 分間インキュベートした。

40

【0211】

PBS (1200 rpm, 5 分間) で 2 回洗浄した後に、抗ヒト IgG Fc 抗体フルオレセインイソチオシアネート (IgG Fc - FITC) 50 μ l を 1 : 100 の希釈倍率で各ウェルに添加し、4 で 30 分間インキュベートし、次いで、PBS で洗浄した。FITC のシグナルは、フローサイトメトリーにより特定された。

【0212】

図 19 に示すように、CT4 - 20 - 6D2 及び CT4 - 20 - 7E12 は、マウス C

50

T L A 4 と交差反応せず、キメラ C T L A 4 に弱い交差反応性を有し、r m C T L A 4 に比較的強い交差反応性を有した。

【 0 2 1 3 】

実施例 9 . マウス抗 h C T L A 4 抗体の i n v i v o 検出

結腸癌モデルにおいて、抗 h C T L A 4 抗体をアッセイして i n v i v o での腫瘍成長に対する作用を示した。M C - 3 8 腫瘍細胞（結腸腺癌細胞）を B - h C T L A - 4 ヒト化マウスに皮下注射した。マウスの腫瘍が 1 5 0 ± 5 0 m m ³ の体積に達する場合には、腫瘍の体積に基づいてマウスをランダムに異なる群に分けた。次いで、P B S 及び抗 h C T L A 4 抗体をマウスに静脈内注射した。抗体は週 2 回投与された（合計 6 回の注射）。対照群では、マウスに生理食塩水を投与した。注射量は、マウスの体重に基づいて 1 0 μ l / g にて計算された。腫瘍の長軸及び短軸の長さは毎週 2 回測定され、腫瘍の体積を 0 . 5 ×（長軸）×（短軸）² として計算した。マウスの体重も、注射前、マウスを異なる群に分ける時（1 回目の抗体注射前）、抗体注射期間中に週 2 回、安楽死前に測定された。

10

【 0 2 1 4 】

統計分析のために T 検定を実施した。T G I % が 6 0 % を超えると、腫瘍成長が有意に抑制されることを示した。p < 0 . 0 5 は有意差を示すと見なされた。

【 0 2 1 5 】

マウスの体重は、投与期間全体にわたってモニタリングした。異なる群のマウスの体重は、いずれも増加した（図 2 0 及び図 2 1 を参照）。対照群と抗 h C T L A 4 治療群の間に体重の有意差は観察されなかった。結果としては、抗 h C T L A 4 抗体は、マウスに毒性がないことを示した。

20

【 0 2 1 6 】

しかしながら、腫瘍サイズは、抗体 1 3 A 4、6 D 2 及び 7 E 1 2 で処置された群で有意差を示した（図 2 2 を参照）。図 2 2 に示すように、1 3 A 4、6 D 2 及び 7 E 1 2 は、いずれもマウスの腫瘍成長を阻害した。

【 0 2 1 7 】

各治療群の 2 1 日目の T G I % は、以下に示した。

【 0 2 1 8 】

【表 6】

30

群	抗体	TGI%
G2	13A4	109.70%
G3	6D2	69.80%
G4	7E12	65.60%

【 0 2 1 9 】

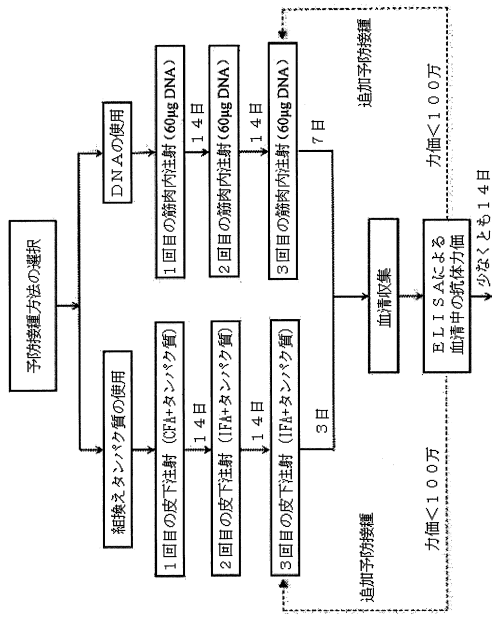
その他の実施態様

本発明に係る具体的な実施形態と組み合わせて本発明を説明したが、上記の説明は、特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定するのではなく例示することを意図していることを理解すべきである。他の側面、利点及び修正案も添付の特許請求の範囲内にある。

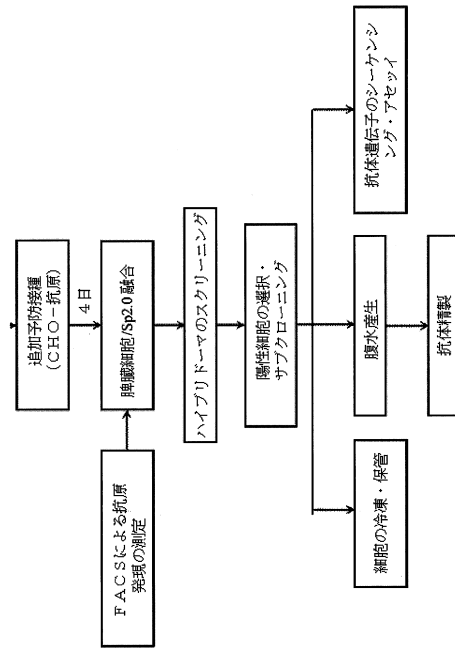
40

50

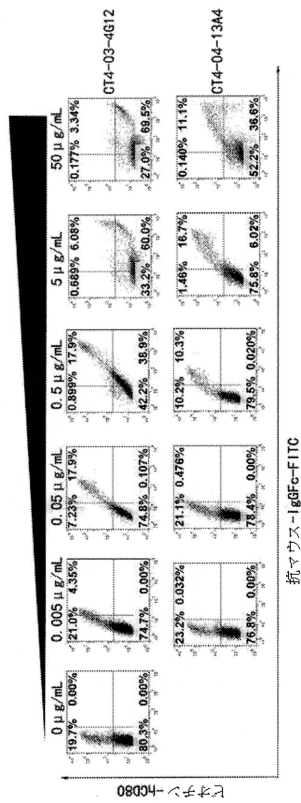
【 図 面 】
【 図 1 】



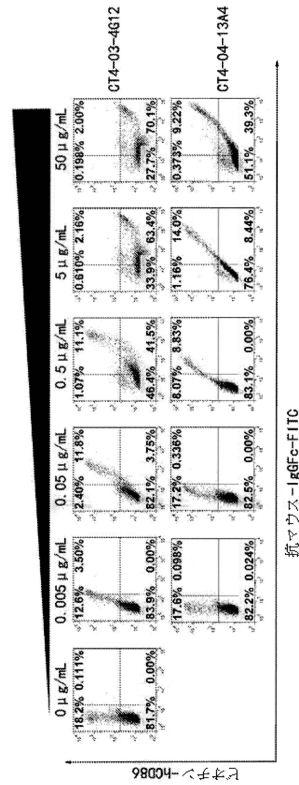
【 図 2 】



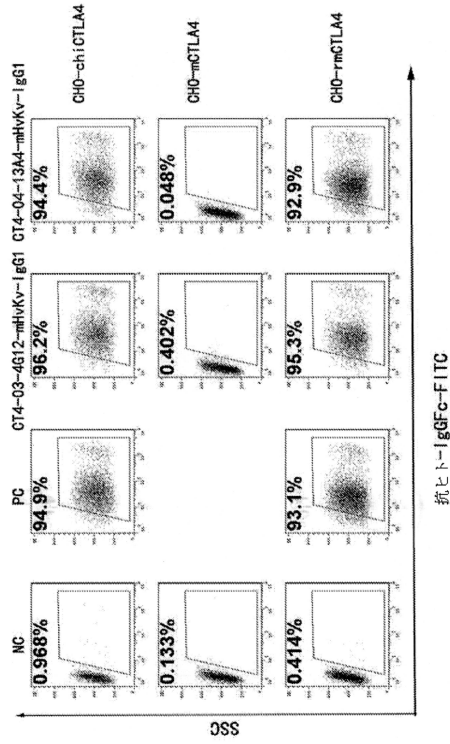
【 図 3 】



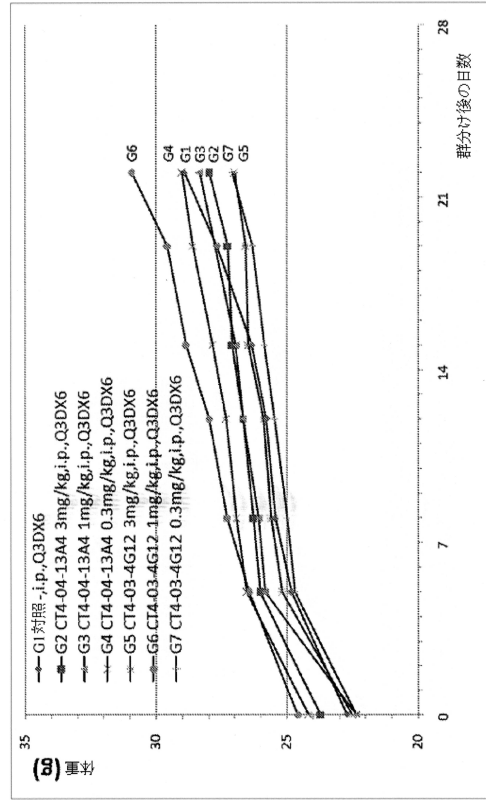
【 図 4 】



【 図 5 】



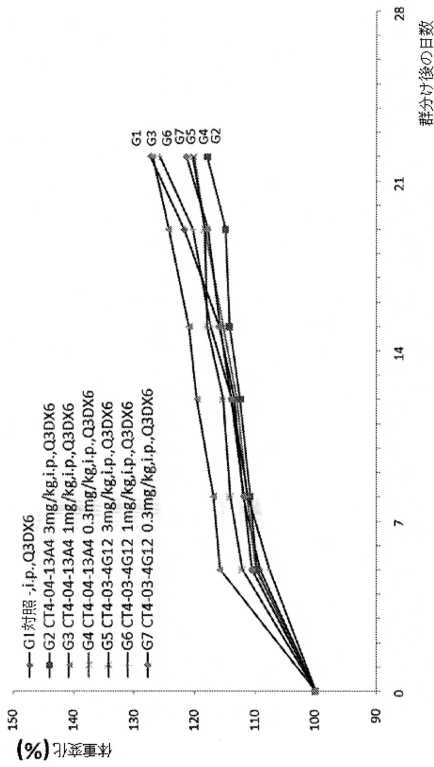
【 図 6 】



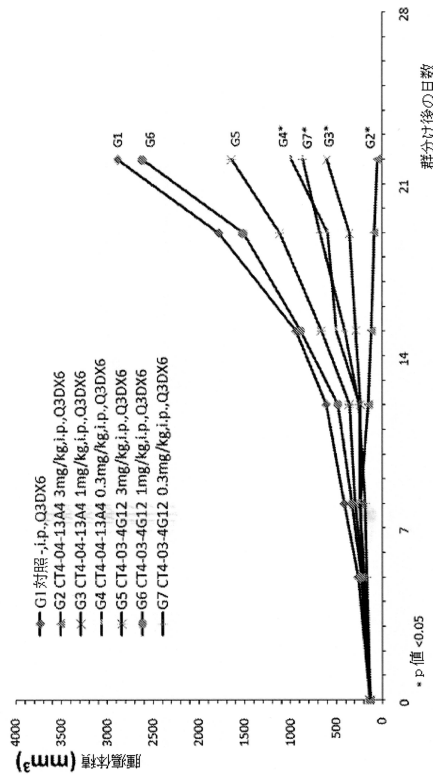
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】

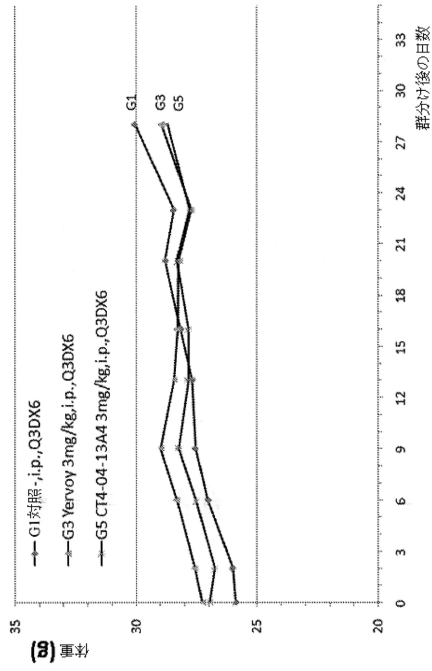


30

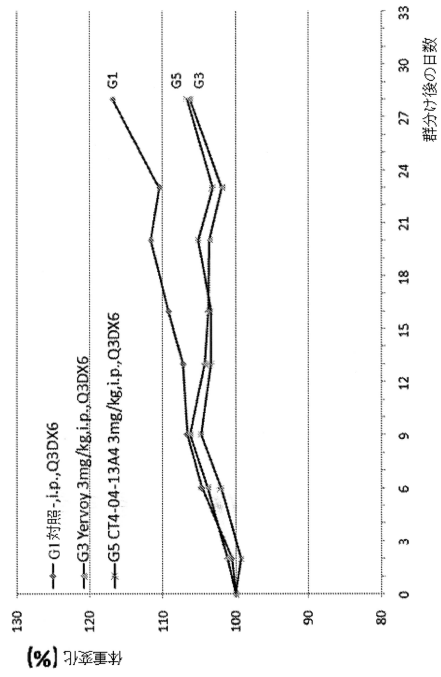
40

50

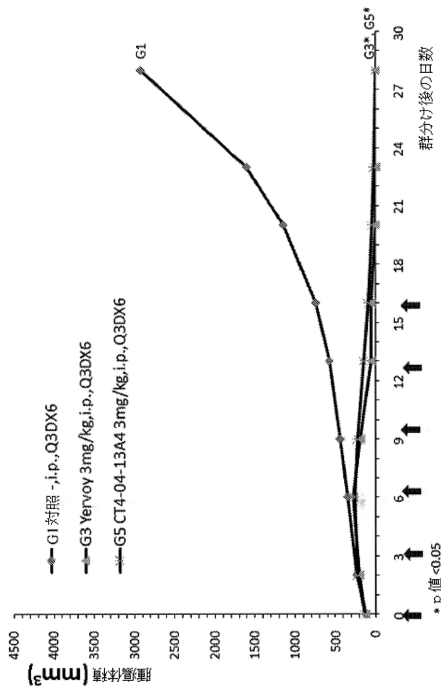
【 図 9 】



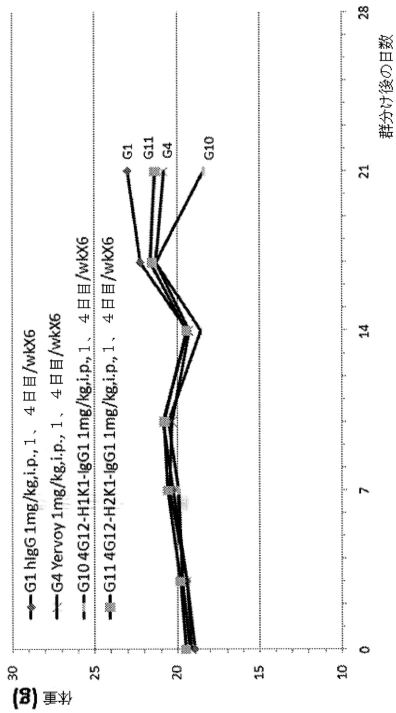
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



10

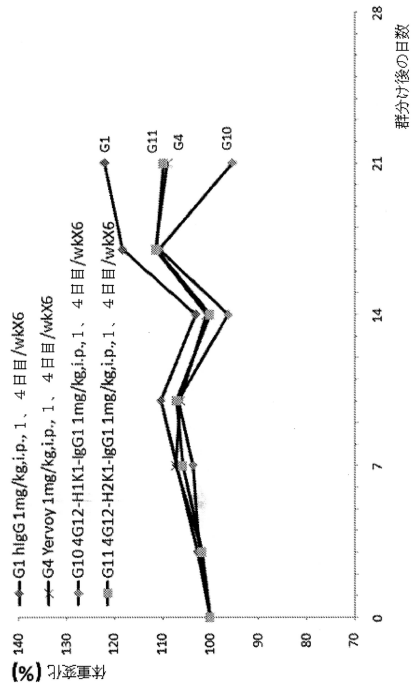
20

30

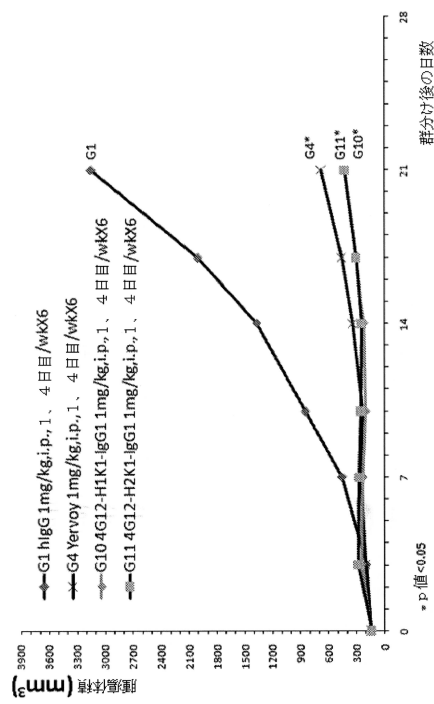
40

50

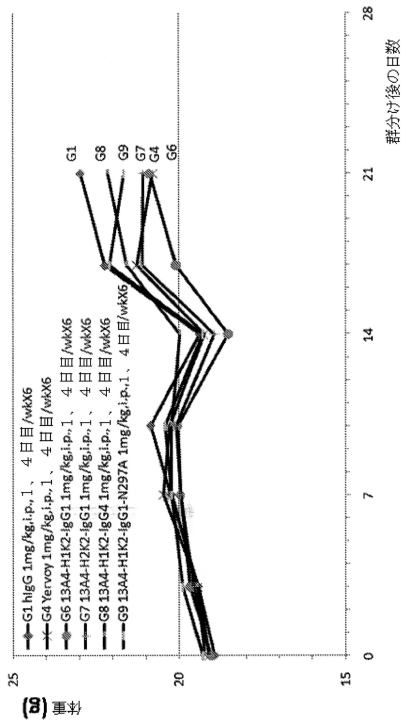
【 図 1 3 】



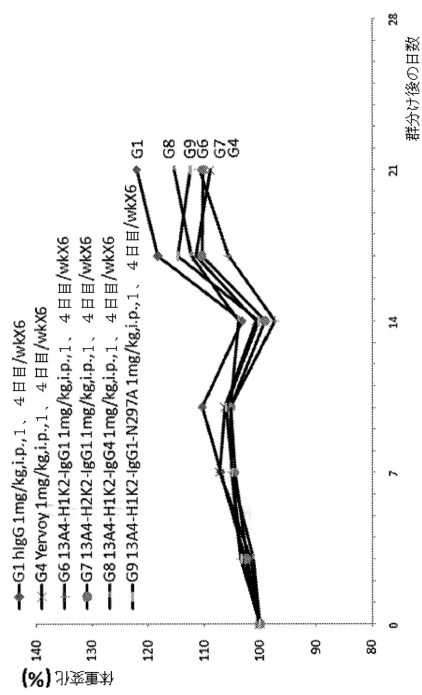
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



10

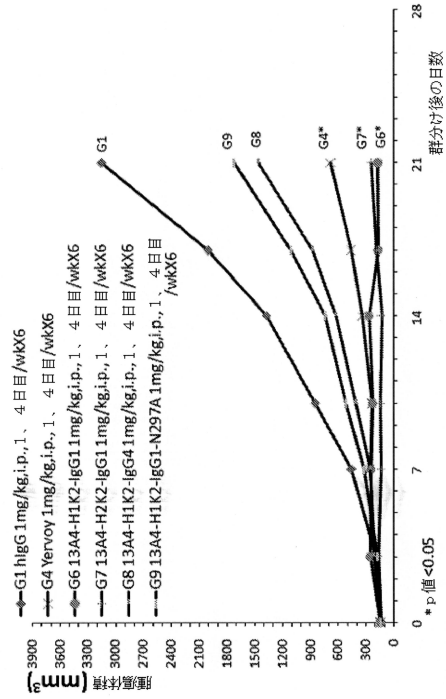
20

30

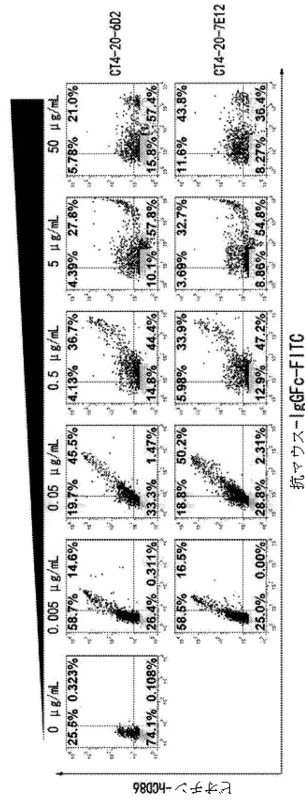
40

50

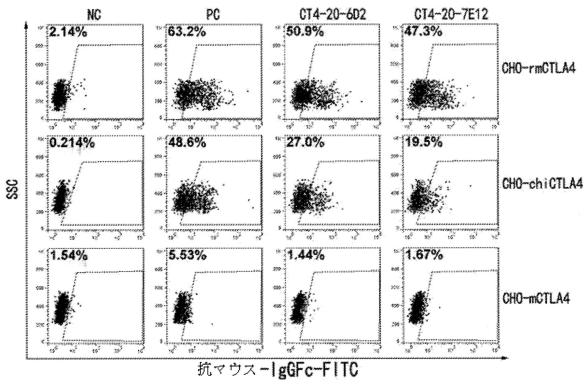
【図 17】



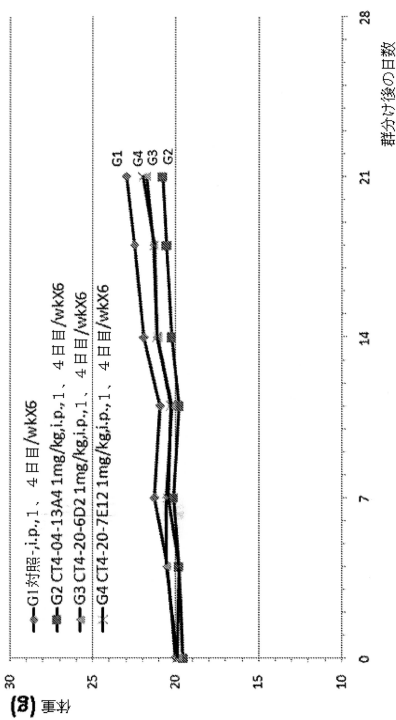
【図 18】



【図 19】



【図 20】



10

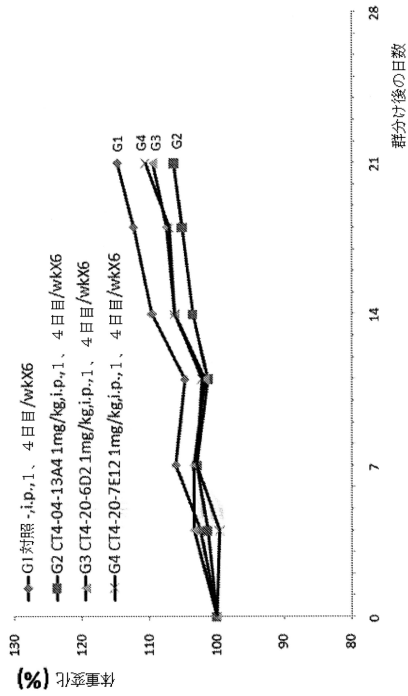
20

30

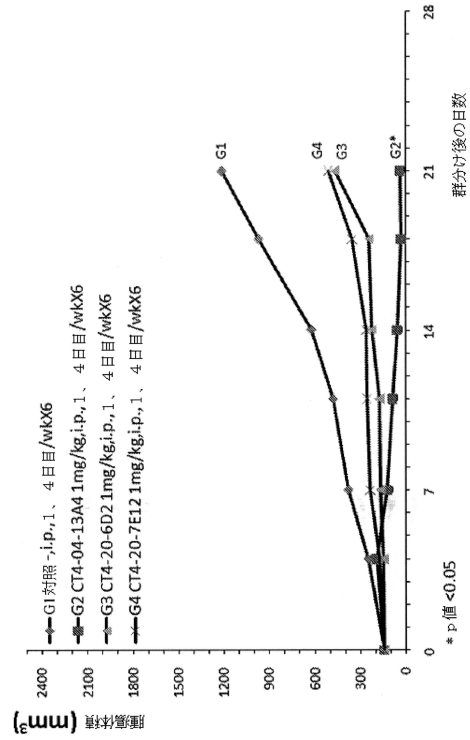
40

50

【 2 1 】



【 2 2 】



10

20

【 2 3 】

Kabat CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID:	VH CDR2	SEQ ID:	VH CDR3	SEQ ID:	VL CDR1	SEQ ID:	VL CDR2	SEQ ID:	VL CDR3	SEQ ID:
13A4	DYEM H	1	VIDPETGGTAYN QKFKG	2	GTTVWGLDY 3	EDYGSVYVH WFAF	RASGNHNVLA 4	KEKLTLD 5	NARTLAE 11	QHFVST PWT 6		
4G12	SYTMS	7	TISRGGGYSYPP SVKG	8	EDYGSVYVH WFAF	RAGENYSYLA 9	RASGNHNVLA 10	NAKTLAD 49	QHFVST PWT 50			
6D2	DYEM H	45	TIDPETGGTAYN QKFKG	46	RGKYGVNDY VMDY	RASGNHNVLA 47	GTSENYGGGLN 54	GATNLAD 55	QNVLSTP YT 56			
7E12	DYV MN	51	QIRNKPVNYETH YSDSVKG	52	TFAY 53							

【 2 4 】

Chothia CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID:	VH CDR2	SEQ ID:	VH CDR3	SEQ ID:	VL CDR1	SEQ ID:	VL CDR2	SEQ ID:	VL CDR3	SEQ ID:
13A4	GYFT DYEM H	29	DPETGG	30	GTTVWGLDY 31	EDYGSVYVH WFAF	RASGNHNVLA 32	KEKLTLD 33	NARTLAE 39	QHFVST PWT 34		
4G12	GTFYS SYTMS	35	SIRGGY	36	EDYGSVYVH WFAF	RAGENYSYLA 37	RASGNHNVLA 38	NAKTLAD 61	QHFVST PWT 62			
6D2	GYFT DYEM H	57	DPETGG	58	RGKYGVNDY VMDY	RASGNHNVLA 59	GTSENYGGGLN 66	GATNLAD 67	QNVLSTP YT 68			
7E12	GTFYS DYV MN	63	RNKPVNYE	64	TFAY 65							

30

40

50

【 2 5 - 1 】

Ab	説明	アミノ酸配列	SEQ ID NO:
ヒトヒ13A4	ヒトヒ1(ヒトの百分率88.5%; ヒト及びマニウライナ(ヒトのトランプヒット (Mianca fluctuans)))	QVQLVQSGAEVKRPGASVYKCKVSGYTFDDYEMHWVROAQRKGLVWVGVDPETGGVSS	13
ヒトヒ13A4	ヒトヒ2(ヒトの百分率88.4%; ヒト及びマニウライナ(ヒトのトランプヒット (Mianca fluctuans)))	QVQLVQSGAEVKRPGASVYKCKVSGYTFDDYEMHWVROAQRKGLVWVGVDPETGGVSS	14
ヒトヒ13A4	ヒトヒ3(ヒトの百分率84.2%)	QVQLVQSGAEVKRPGASVYKCKVSGYTFDDYEMHWVROAQRKGLVWVGVDPETGGVSS	15
ヒトヒ13A4	ヒトヒ4(ヒトの百分率82.3%)	QVQLVQSGAEVKRPGASVYKCKVSGYTFDDYEMHWVROAQRKGLVWVGVDPETGGVSS	16
ヒトヒ13A4	ヒトヒ5(ヒトの百分率81.2%)	QVQLVQSGAEVKRPGASVYKCKVSGYTFDDYEMHWVROAQRKGLVWVGVDPETGGVSS	17
ヒトヒ13A4	ヒトヒ6(ヒトの百分率88.3%; ヒトへのトランプヒット)	DIQMTQSPFSLASVGRVITTCRAAGENIYSLAWYQKQKPKAPKLLVYKEKLLDGVPS	18
ヒトヒ13A4	ヒトヒ7(ヒトの百分率88.3%; ヒトへのトランプヒット)	DIQMTQSPFSLASVGRVITTCRAAGENIYSLAWYQKQKPKAPKLLVYKEKLLDGVPS	19
ヒトヒ13A4	ヒトヒ8(ヒトの百分率83.2%)	DIQMTQSPFSLASVGRVITTCRAAGENIYSLAWYQKQKPKAPKLLVYKEKLLDGVPS	20
ヒトヒ13A4	ヒトヒ9(ヒトの百分率82.1%)	DIQMTQSPFSLASVGRVITTCRAAGENIYSLAWYQKQKPKAPKLLVYKEKLLDGVPS	21
ヒトヒ13A4	ヒトヒ10(ヒトの百分率80.8%; ヒトへのトランプヒット)	DIQMTQSPFSLASVGRVITTCRAAGENIYSLAWYQKQKPKAPKLLVYKEKLLDGVPS	22

【 2 5 - 2 】

4G12	(ヒトの百分率89.8%; ヒトへのトランプヒット)	YFDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRLEADTAMYYCAREDYGSSVYVHFAYWGQGITLVTNSA	23
ヒトヒ4G12	4G12hmVH3:(ヒトの百分率87.8%)	EVLVDSGGGLVQPGGSLRISCAASGFTSSYTMSSVROTPKRLKLEWVATISRGGGYTSVTNSA	24
ヒトヒ4G12	4G12hmVH4:(ヒトの百分率85.7%)	EVLVDSGGGLVQPGGSLRISCAASGFTSSYTMSSVROTPKRLKLEWVATISRGGGYTSVTNSA	25
ヒトヒ4G12	4G12hmVH1:(ヒトの百分率85.3%; ヒトへのトランプヒット)	DIQMTQSPFSLASVGRVITTCRAAGENIYSLAWYQKQKPKAPKLLVYKEKLLDGVPS	26
ヒトヒ4G12	4G12hmVH2:(ヒトの百分率82.1%; ヒトへのトランプヒット)	DIQMTQSPFSLASVGRVITTCRAAGENIYSLAWYQKQKPKAPKLLVYKEKLLDGVPS	27
ヒトヒ4G12	4G12hmVH3:(ヒトの百分率80%; ヒトへのトランプヒット)	DIQMTQSPFSLASVGRVITTCRAAGENIYSLAWYQKQKPKAPKLLVYKEKLLDGVPS	28

10

20

【 2 6 】

タンパク質	アミノ酸配列	SEQ ID NO:
ヒトCTLA4 (hCTLA4)	MALGIFQRHKAQLNLAATRWRTQLLLELLELHIVFCKAMHVAQPAAYVLAASSRGIASVCEASAPGKATEVRYVLRQADSOVTEVCAATYVMGMNELTFLDSDICTGSSGQVNLTIQGLRAMDITGLVICKVELMYPYPPYVLGIGNGTQIYVIDPEPCDSDFLWLLAAAVSSGLFFYSFLTAVSLSKMLKRRSPLTTGVYVKMPPTEPECEKQFOYFIPIN	41
マウスCTLA4 (mCTLA4)	MAGLGRRYKAQLQLPSPRTWPFVALLTLLFIFVFEAIOVTPQSVLASSHGVAAPFPCEYSPSHNTEVRYVLRQADSOVTEVCAATYVMGMNELTFLDSDICTGSSGQVNLTIQGLRAMDITGLVICKVELMYPYPPYVLGIGNGTQIYVIDPEPCDSDFLWLLAAVSSGLFFYSFLTAVSLSKMLKRRSPLTTGVYVKMPPTEPECEKQFOYFIPIN	42
サルCTLA4 (mCTLA4)	MALGIFQRHKAQLNLAATRWRTQLLLELLELHIVFCKAMHVAQPAAYVLAASSRGIASVCEASAPGKATEVRYVLRQADSOVTEVCAATYVMGMNELTFLDSDICTGSSGQVNLTIQGLRAMDITGLVICKVELMYPYPPYVLGIGNGTQIYVIDPEPCDSDFLWLLAAVSSGLFFYSFLTAVSLSKMLKRRSPLTTGVYVKMPPTEPECEKQFOYFIPIN	43
キヌマウCTLA4 (hCTLA4) (ヒトCTLA4)	MALGIFQRHKAQLNLAATRWRTQLLLELLELHIVFCKAMHVAQPAAYVLAASSRGIASVCEASAPGKATEVRYVLRQADSOVTEVCAATYVMGMNELTFLDSDICTGSSGQVNLTIQGLRAMDITGLVICKVELMYPYPPYVLGIGNGTQIYVIDPEPCDSDFLWLLAAVSSGLFFYSFLTAVSLSKMLKRRSPLTTGVYVKMPPTEPECEKQFOYFIPIN	44

【 2 7 】

CT4-04-13A4 (13A4) 重鎖可変領域 (SEQ ID NO: 69)
 QVQLVQSGAEVKRPGASVYKCKVSGYTFDDYEMHWVROAQRKGLVWVGVDPETGGTAYNQKFKGKATLADRSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRGTTVVGLDYWGQGITLTVSS

CT4-04-13A4 (13A4) 軽鎖可変領域 (SEQ ID NO: 70)
 DIQMTQSPFSLASVGRVITTCRAAGENIYSLAWYQKQKPKAPKLLVYKEKLLDGVPSRFSGSGGTQFSLKINSLQPEDFGSYCQHFVSTPWTFGGGTLNLEIK

CT4-04-4G12 (4G12) 重鎖可変領域 (SEQ ID NO: 71)
 DYLKLVESGGGLVQPGGSLKLSCTASGFTSSYTMSSVROTPKRLKLEWVATISRGGGYTSYFDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRLEADTAMYYCAREDYGSSVYVHFAYWGQGITLVTNSA

CT4-04-4G12 (4G12) 軽鎖可変領域 (SEQ ID NO: 72)
 DIQMTQSPFSLASVGRVITTCRAAGENIYSLAWYQKQKPKAPKLLVYKEKLLDGVPSRFSGSGGTQFSLKINSLQPEDFGSYCQHHYVSPRTGGGTLKLEIK

CT4-20-6D2 (6D2) 重鎖可変領域 (SEQ ID NO: 73)
 MEWSVYFELLSVIAGVQVQLQSGAEVRFSGSGLRISCAASGFTSSYTMSSVROTPKRLKLEWVATISRGGGTQKFKGKATLADRSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRGRKRYGNYDYMDYWGQGITLTVSS

CT4-20-6D2 (6D2) 軽鎖可変領域 (SEQ ID NO: 74)
 MSVLIQVLAALLLWLTGARCDIOMTQSPFSLASVGRVITTCRAAGENIYSLAWYQKQKPKAPKLLVYKEKLLDGVPSRFSGSGGTQFSLKINSLQPEDFGSYCQHFVSTPWTFGGGTLNLEIK

CT4-20-7E12 (7E12) 重鎖可変領域 (SEQ ID NO: 75)
 MYLGLSGVFNELLCYQCEVLELDETCGELVQGRPMKLSVCSGFTESDYVSNVYQSPKGLVWVQIRNKPYYIETHYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRLEADTAMYYCAREDYGSSVYVHFAYWGQGITLTVSS

CT4-20-7E12 (7E12) 軽鎖可変領域 (SEQ ID NO: 76)
 MGYPVTOILLWLVYVRCDIOMTQSPFSLASVGRVITTCRAAGENIYSLAWYQKQKPKAPKLLVYKEKLLDGVPSRFSGSGGTQFSLKINSLQPEDFGSYCQHHYVSPRTGGGTLKLEIK

30

40

50

【配列表】

0007155270000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/04
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 D
		A 6 1 K	39/395 N
		A 6 1 K	39/395 T
		A 6 1 K	39/395 E

ン・ビーディーエー・ケチャン・6・アヴェニュー・ナンバー・88・ビルディング・3・ルーム
・306

(72)発明者

ヤンアン・グオ

中華人民共和国・101111・ベイジン・ビーディーエー・ケチャン・6・アヴェニュー・ナン
バー・88・ビルディング・3・ルーム・1201-1210

(72)発明者

シャオドン・チェン

中華人民共和国・101111・ベイジン・ビーディーエー・ケチャン・6・アヴェニュー・ナン
バー・88・ビルディング・3・ルーム・1201-1210

(72)発明者

ユンユン・チェン

中華人民共和国・101111・ベイジン・ビーディーエー・ケチャン・6・アヴェニュー・ナン
バー・88・ビルディング・3・ルーム・1201-1210

(72)発明者

ジンシュ・シェ

中華人民共和国・101111・ベイジン・ビーディーエー・ケチャン・6・アヴェニュー・ナン
バー・88・ビルディング・3・ルーム・306

(72)発明者

チュンヤン・ドン

中華人民共和国・101111・ベイジン・ビーディーエー・ケチャン・6・アヴェニュー・ナン
バー・88・ビルディング・3・ルーム・306

(72)発明者

ファン・ヤン

中華人民共和国・101111・ベイジン・ビーディーエー・ケチャン・6・アヴェニュー・ナン
バー・88・ビルディング・3・ルーム・306

(72)発明者

チェンユアン・ル

中華人民共和国・101111・ベイジン・ビーディーエー・ケチャン・6・アヴェニュー・ナン
バー・88・ビルディング・3・ルーム・306

(72)発明者

ユエレイ・シェン

中華人民共和国・101111・ベイジン・ビーディーエー・ケチャン・6・アヴェニュー・ナン
バー・88・ビルディング・3・ルーム・1201-1210

(72)発明者

ジェン・ニ

中華人民共和国・101111・ベイジン・ビーディーエー・ケチャン・6・アヴェニュー・ナン
バー・88・ビルディング・3・ルーム・1201-1210

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献

特表2014-512809(JP,A)

特表2017-523807(JP,A)

米国特許出願公開第2017/0226211(US,A1)

特開2009-111655(JP,A)

The EMBO Journal, 1995年, Vol.14, No.12, p.2784-2794

Research in Immunology, 1994年, Vol.145, No.1, p.33-36

Immunology Today, 1993年, Vol.14, No.6, p.243-246

Journal of Molecular Biology, 1992年, Vol.224, No.2, p.487-499

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 1 3

C07K 16/28

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(ST
N)