

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-535204
(P2018-535204A)

(43) 公表日 平成30年11月29日(2018.11.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4C076
A61K 38/02 (2006.01)	A61K 38/02	4C084
A61K 47/68 (2017.01)	A61K 47/68	4C085
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4H045
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-520115 (P2018-520115)
 (86) (22) 出願日 平成28年11月1日 (2016.11.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年4月19日 (2018.4.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/059838
 (87) 国際公開番号 W02017/079117
 (87) 国際公開日 平成29年5月11日 (2017.5.11)
 (31) 優先権主張番号 62/249,836
 (32) 優先日 平成27年11月2日 (2015.11.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/373,654
 (32) 優先日 平成28年8月11日 (2016.8.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507150079
 ファイブ プライム セラピューティクス
 , インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, オ
 イスター ポイント ブールバード 11
 1
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ブレナン, トーマス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, ト
 ャー コーポレイト ドライブ
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD80細胞外ドメインポリペプチドと、がん治療でのそれらの使用

(57) 【要約】

本願は、CD80 (B7-1) 細胞外ドメイン (ECD) ポリペプチド及びCD80-ECD融合分子、ならびにそれらを単独で、かつ他の治療剤 (免疫刺激剤、例えばPD-1/PD-L1インヒビターなど) と組み合わせてがんの治療に使用することに関するものである。いくつかの実施形態では、CD80細胞外ドメイン (ECD) ポリペプチドまたはCD80 ECD融合分子を提供する。いくつかの実施形態では、この融合分子は、CD80 ECDと、免疫グロブリン (ヒトIgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4など) のFcドメイン、アルブミンまたはポリマー (PEGなど) を含む少なくとも1つの融合パートナーを含む。

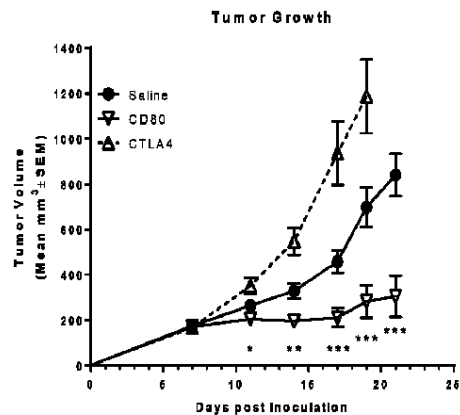


Fig. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトCD80 細胞外ドメイン (ECD) ポリペプチドと、ヒトIgG1 Fcドメインとを含むCD80 ECD融合分子であって、10～60モルのSA / 1モルのCD80 ECD Fcタンパク質を含むとともに、少なくとも1つのマウス同系または異種移植がんモデルにおいて、少なくとも2週間にわたって、腫瘍細胞の成長を少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%阻害できる前記CD80 ECD融合分子。

【請求項 2】

少なくとも15モルのSA / 1モルのタンパク質、例えば少なくとも20モルのSA / 1モルのタンパク質を含む、請求項1に記載のCD80細胞外ドメイン (ECD) 融合分子。

10

【請求項 3】

15～30モルのSA / 1モルのタンパク質を含む、請求項1または2に記載のCD80 ECD Fc融合分子。

【請求項 4】

15～25モルのSA / 1モルのタンパク質を含む、請求項1または2に記載のCD80 ECD Fc融合分子。

【請求項 5】

20～30モルのSA / 1モルのタンパク質を含む、請求項1または2に記載のCD80 ECD Fc融合分子。

20

【請求項 6】

前記Fcドメインが、配列番号14のアミノ酸配列を含む、請求項1～5のいずれか1項に記載のCD80 ECD Fc融合分子。

【請求項 7】

2または3週間の期間にわたって、マウスのCT26腫瘍細胞の成長を少なくとも80%、例えば少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%低下させることができる、請求項1～6のいずれか1項に記載のCD80 ECD Fc融合分子。

【請求項 8】

前記マウスに、前記ECD Fc融合分子が0.3～0.6mg/kg、1用量、2用量または3用量で投与されている、請求項7に記載のCD80 ECD Fc融合分子。

30

【請求項 9】

請求項1～8のいずれか1項に記載のCD80 ECD融合分子を含むとともに、少なくとも1つの製薬学的に許容可能な担体をさらに含む組成物。

【請求項 10】

追加の治療剤をさらに含む、請求項9に記載の組成物。

【請求項 11】

前記追加の治療剤が、少なくとも1つの免疫刺激剤である、請求項10に記載の組成物。

【請求項 12】

前記少なくとも1つの免疫刺激剤が、プログラム細胞死1 (PD-1) / プログラム細胞死リガンド1 (PD-L1) インヒビターを含む、請求項11に記載の組成物。

40

【請求項 13】

前記PD-1 / PD-L1 インヒビターが抗体である、請求項12に記載の組成物。

【請求項 14】

前記PD-1 / PD-L1 インヒビターが抗PD-1抗体である、請求項13に記載の組成物。

【請求項 15】

前記抗PD-1抗体が、ニボルマブ、ピジリズマブ及びペムプロリズマブから選択した抗体の重鎖CDR及び軽鎖CDRを含む、請求項14に記載の組成物。

50

- 【請求項 16】
前記抗 PD - 1 抗体が、ニボルマブ、ピジリズマブ及びペムプロリズマブから選択した抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、請求項 14 に記載の組成物。
- 【請求項 17】
前記抗 PD - 1 抗体が、ニボルマブ、ピジリズマブ及びペムプロリズマブから選択されている、請求項 14 に記載の組成物。
- 【請求項 18】
前記 PD - 1 / PD - L 1 インヒビターが抗 PD - L 1 抗体である、請求項 12 に記載の組成物。
- 【請求項 19】 10
前記抗 PD - L 1 抗体が、BMS - 936559、MPDL3280A、MEDI4736 及び MSB0010718C から選択した抗体の重鎖 CDR 及び軽鎖 CDR を含む、請求項 18 に記載の組成物。
- 【請求項 20】
前記抗 PD - L 1 抗体が、BMS - 936559、MPDL3280A、MEDI4736 及び MSB0010718C から選択した抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、請求項 18 に記載の組成物。
- 【請求項 21】
前記抗 PD - 1 抗体が、BMS - 936559、MPDL3280A、MEDI4736 及び MSB0010718C から選択されている、請求項 18 に記載の組成物。 20
- 【請求項 22】
前記 PD - 1 / PD - L 1 インヒビターが PD - 1 融合分子である、請求項 12 に記載の組成物。
- 【請求項 23】
前記融合分子が AMP - 224 である、請求項 22 に記載の組成物。
- 【請求項 24】
前記 PD - 1 / PD - L 1 インヒビターが、ポリペプチド、例えば AUR - 012 である、請求項 12 に記載の組成物。
- 【請求項 25】
対象のがんの治療方法であって、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の CD80 細胞外ドメイン (ECD) 融合分子または請求項 9 に記載の組成物を有効量、前記対象に投与することを含む前記方法。 30
- 【請求項 26】
前記がんが固形腫瘍である、請求項 25 に記載の方法。
- 【請求項 27】
前記がんが、大腸がん、乳がん、胃がん、非小細胞肺がん、メラノーマ、頭頸部扁平上皮癌、卵巣がん、膵臓がん、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱がん及び子宮体がんから選択されている、請求項 26 に記載の方法。
- 【請求項 28】
前記がんが、手術、化学療法、放射線療法またはこれらを組み合わせたものから選択した療法後、再発性または進行性のものである、請求項 25 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。 40
- 【請求項 29】
前記 CD80 ECD 融合分子が、CD80 ECD Fc 融合分子であり、(a) 前記 CD80 ECD Fc 融合分子が、少なくとも 2 週間の期間にわたって、同じアミノ酸配列であるが、10 モル未満の SA / 1 モルの CD80 ECD Fc タンパク質を含む CD80 ECD Fc タンパク質よりも、マウスの CT26 腫瘍細胞の成長を大きく低下させ、及び / または (b) 前記 CD80 ECD Fc 融合分子が、少なくとも 2 週間の期間にわたって、抗 CTLA4 抗体よりも、マウスの CT26 腫瘍細胞の成長を大きく低下させる、請求項 25 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。 50

【請求項 30】

前記融合分子が、少なくとも15モルのSA / 1モルのタンパク質、例えば、少なくとも20モルのSA / 1モルのタンパク質を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項 31】

前記融合分子が、15～40モル、15～30モル、15～25モルまたは20～30モルのSA / 1モルのタンパク質を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項 32】

CD80 ECD融合タンパク質が、対象のがんを治療する効力の増強方法であって、向上したレベルのSAを含む前記CD80 ECD融合タンパク質を前記対象に投与することによって、前記CD80 ECD融合タンパク質におけるシアル酸(SA)のレベルを向上させることを含む前記方法。

10

【請求項 33】

前記SAレベルを、5モル、10モル、20モル、30モル、40モルまたは50モル / 1モルのCD80 ECDタンパク質向上させる、請求項32に記載の方法。

【請求項 34】

SAレベルの向上していない前記CD80 ECD融合分子を投与したときと比較した場合の、マウス同系または異種移植モデルにおける全生存率の向上、無病生存率の向上または少なくとも1つの腫瘍の成長の低下度の向上として、効力の増強を測定する、請求項32または33に記載の方法。

【請求項 35】

SAレベルの向上していない前記CD80 ECD融合分子を投与したときと比較した場合の、マウス同系もしくは異種移植モデル、例えばCT26マウスモデルにおける腫瘍の成長の低下度の向上、または動物もしくはヒト対象におけるクリアランス速度の低下として、前記効力の増強を測定する、請求項32～34のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 36】

(a) SAレベルの向上していない前記CD80 ECD融合分子を投与したときと比較した場合の、動物もしくはヒト対象における少なくとも1つの腫瘍の成長のさらなる低下、及び / または (b) SAレベルの向上していない前記CD80 ECD融合分子を投与したときと比較した場合の、マウス同系もしくは異種移植モデルにおける腫瘍の成長のさらなる低下として、前記効力の増強を測定し、SAレベルの向上した前記CD80 ECD融合分子を投与すると、前記腫瘍の成長が、SAレベルの向上していない前記CD80 ECD融合分子を投与したときと比べて、少なくとも10%、例えば、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%、少なくとも80%または少なくとも90%さらに低下する、請求項32～35のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 37】

対象のがんの治療方法であって、CD80細胞外ドメイン(ECD)またはCD80 ECD融合分子と、プログラム細胞死1(PD-1) / プログラム細胞死リガンド1(PD-L1)インヒビターとを組み合わせたものを有効量、前記対象に投与することを含む前記方法。

40

【請求項 38】

前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子と、前記PD-1 / PD-L1インヒビターとを組み合わせたものが、マウス同系または異種移植モデルにおいて、前記CD80 ECDもしくはCD80 ECD融合分子、または前記PD-1 / PD-L1インヒビター単独による治療と比べて、腫瘍の成長を相乗的または相加的に低下させる、請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

前記マウスモデルが、マウス大腸癌CT26細胞を含む大腸がんモデルである、請求項38に記載の方法。

【請求項 40】

50

前記がんが固形腫瘍である、請求項 37 または 38 に記載の方法。

【請求項 41】

前記がんが、大腸がん、乳がん、胃がん、非小細胞肺癌、メラノーマ、頭頸部扁平上皮癌、卵巣がん、膵臓がん、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱がん及び子宮体がんから選択されている、請求項 37 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 42】

前記がんが、手術、化学療法、放射線療法またはこれらを組み合わせたものから選択した療法後、再発性または進行性のものである、請求項 37 ~ 41 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 43】

前記組み合わせたものが、I g G F c ドメイン、アルブミン及び P E G から選択した融合パートナーを有する C D 8 0 E C D 融合分子を含む、請求項 37 ~ 42 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 44】

前記融合パートナーが、F c ドメイン、例えば、配列番号 9 ~ 16 のうちの 1 つを含む F c ドメインである、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記 C D 8 0 E C D または C D 8 0 E C D 融合分子が、配列番号 1 の 35 番目から最後までのアミノ酸、配列番号 3、配列番号 4 及び配列番号 5 から選択したアミノ酸配列を含むか、または、配列番号 20 もしくは配列番号 21 の配列を含む、請求項 37 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 46】

前記 P D - 1 / P D - L 1 インヒビターが抗 P D - 1 抗体である、請求項 37 ~ 45 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 47】

前記抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブ、ピジリズマブ及びペムプロリズマブから選択した抗体の重鎖 C D R 及び軽鎖 C D R を含む、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブ、ピジリズマブ及びペムプロリズマブから選択した抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブ、ピジリズマブ及びペムプロリズマブから選択されている、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記 P D - 1 / P D - L 1 インヒビターが抗 P D - L 1 抗体である、請求項 37 ~ 49 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 51】

前記抗 P D - L 1 抗体が、B M S - 9 3 6 5 5 9、M P D L 3 2 8 0 A、M E D I 4 7 3 6 及び M S B 0 0 1 0 7 1 8 C から選択した抗体の重鎖 C D R 及び軽鎖 C D R を含む、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記抗 P D - L 1 抗体が、B M S - 9 3 6 5 5 9、M P D L 3 2 8 0 A、M E D I 4 7 3 6 及び M S B 0 0 1 0 7 1 8 C から選択した抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

前記抗 P D - 1 抗体が、B M S - 9 3 6 5 5 9、M P D L 3 2 8 0 A、M E D I 4 7 3 6 及び M S B 0 0 1 0 7 1 8 C から選択されている、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記 P D - 1 / P D - L 1 インヒビターが P D - 1 融合分子である、請求項 37 ~ 45 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 55】

前記融合分子がAMP-224である、請求項54に記載の方法。

【請求項 56】

前記PD-1/PD-L1インヒビターが、ポリペプチド、例えばAUR-012である、請求項37~45のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 57】

前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子と、前記PD-1/PD-L1インヒビターを同時または順次に投与する、請求項37~56のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 58】

前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子を投与する前に、1用量以上の前記PD-1/PD-L1インヒビターを投与する、請求項57に記載の方法。

【請求項 59】

前記対象が、前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子の投与前に、PD-1/PD-L1インヒビターによる治療クールを完了した者である、請求項58に記載の方法。

【請求項 60】

PD-1/PD-L1インヒビターによる治療の2クール目の最中に、前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子を投与する、請求項58に記載の方法。

【請求項 61】

前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子の投与前に、前記対象に、少なくとも1用量、少なくとも2用量、少なくとも3用量または少なくとも4用量の前記PD-1/PD-L1インヒビターが投与された、請求項58~60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 62】

少なくとも1用量の前記PD-1/PD-L1インヒビターを前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子と同時に投与する、請求項58~61のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 63】

PD-1/PD-L1インヒビターを投与する前に、1用量以上の前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子を投与する、請求項37~62のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 64】

前記PD-1/PD-L1インヒビターの投与前に、前記対象に、少なくとも2用量、少なくとも3用量、少なくとも3用量または少なくとも4用量の前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子が投与された、請求項63に記載の方法。

【請求項 65】

少なくとも1用量の前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子を前記PD-1/PD-L1インヒビターと同時に投与する、請求項63または64に記載の方法。

【請求項 66】

前記対象が、PD-1/PD-L1インヒビターによる治療に耐性のある者である、請求項37~65のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 67】

前記対象が、PD-1/PD-L1インヒビターによる治療を以前受けた者である、請求項66に記載の方法。

【請求項 68】

前記対象に、少なくとも1つの追加の治療剤、例えば、少なくとも1つの化学療法剤、増殖阻害剤、血管新生阻害剤及び/または抗腫瘍組成物を投与する、請求項37~67のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 69】

10

20

30

40

50

前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子が、10～60モルのシアル酸(SA)/1モルのCD80 ECDタンパク質を含むCD80 ECD融合分子である、請求項37～68のいずれか1項に記載の方法。

【請求項70】

前記CD80 ECD融合分子が、少なくとも15モルのSA/1モルのタンパク質、例えば、少なくとも20モルのSA/1モルのタンパク質を含む、請求項69に記載の方法。

【請求項71】

前記CD80 ECD融合分子が、15～30モルのSA/1モルのタンパク質を含む、請求項69に記載の方法。

【請求項72】

前記CD80 ECD融合分子が、15～25モルのSA/1モルのタンパク質を含む、請求項69に記載の方法。

【請求項73】

前記CD80 ECD融合分子が、20～30モルのSA/1モルのタンパク質を含む、請求項72に記載の方法。

【請求項74】

前記CD80 ECD融合分子が、融合パートナーとしてFcドメインを含む、請求項69～73のいずれか1項に記載の方法。

【請求項75】

前記融合パートナーが、野生型IgG1 Fcドメインである、請求項74に記載の方法。

【請求項76】

前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子が、少なくとも1つのマウス同系または異種移植モデルにおいて、2または3週間の期間にわたって、腫瘍細胞の成長を少なくとも50%、60%、70%、80%または90%低下させることができる、請求項37～75のいずれか1項に記載の方法。

【請求項77】

前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子が、2または3週間の期間にわたって、マウスのCT26腫瘍細胞の成長を少なくとも95%、例えば少なくとも98%低下させることができる、請求項76に記載の方法。

【請求項78】

マウスに、前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子が0.3～0.6mg/kg、1用量、2用量または3用量投与された、請求項77に記載の方法。

【請求項79】

前記CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子が、請求項1～8のいずれか1項に記載のCD80 ECD Fc融合分子である、請求項37～78のいずれか1項に記載の方法。

【請求項80】

ヒトCD80 ECDポリペプチドと、L234F、L235E及びP331Sというアミノ酸置換を有するヒトIgG1 Fcドメインとを含むCD80細胞外ドメイン(ECD)融合分子。

【請求項81】

配列番号5、配列番号12及び配列番号21から選択したアミノ酸配列を含む、請求項80に記載のCD80 ECD融合分子。

【請求項82】

前記Fcドメインアミノ酸配列が、前記CD80 ECDアミノ酸配列のC末端アミノ酸に直接結合している、請求項80または81に記載のCD80 ECD融合分子。

【請求項83】

前記Fcドメインアミノ酸配列が、リンカーペプチド、例えばGSリンカーを介して、

10

20

30

40

50

前記CD80 ECDアミノ酸配列のC末端アミノ酸に結合している、請求項80または81に記載のCD80 ECD融合分子。

【請求項84】

請求項80～83のいずれか1項に記載のCD80 ECD融合分子を含むとともに、少なくとも1つの製薬学的に許容可能な担体をさらに含む組成物。

【請求項85】

追加の治療剤、例えば、少なくとも1つの免疫刺激剤をさらに含む、請求項84に記載の組成物。

【請求項86】

前記少なくとも1つの免疫刺激剤が、プログラム細胞死1(PD-1)/プログラム細胞死リガンド1(PD-L1)インヒビター、例えばPD-1融合分子(すなわちAMP224)、例えばポリペプチド(すなわちAUR-012)、あるいは例えば抗体、例えば抗PD-1抗体(すなわち、ニボルマブ、ピジリズマブもしくはペムプロリズマブ)、または抗PD-L1抗体(すなわち、BMS-936559、MPDL3280A、MED14736もしくはMSB0010718C)である、請求項85に記載の組成物。

10

【請求項87】

対象のがんの治療方法であって、請求項80～83のいずれか1項に記載のCD80細胞外ドメイン(ECD)融合分子または請求項84～86のいずれか1項に記載の組成物を有効量、前記対象に投与することを含む前記方法。

【請求項88】

前記がんが固形腫瘍である、請求項87に記載の方法。

20

【請求項89】

前記がんが、大腸がん、乳がん、胃がん、非小細胞肺癌、メラノーマ、頭頸部扁平上皮癌、卵巣がん、膵臓がん、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱がん及び子宮体がんから選択されている、請求項88に記載の方法。

【請求項90】

前記がんが、手術、化学療法、放射線療法またはこれらを組み合わせたものから選択した療法後、再発性または進行性のものである、請求項87～89のいずれか1項に記載の方法。

【請求項91】

前記CD80 ECD融合分子または組成物を少なくとも1つの追加の治療剤、例えば請求項86に記載の治療剤と組み合わせて投与する、請求項87～90のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項92】

前記追加の治療剤が、少なくとも1つの化学療法剤、増殖阻害剤、血管新生阻害剤及び/または抗腫瘍組成物を含む、請求項91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

40

本願は、2016年8月11日に提出された米国特許仮出願第62/373,654号と、2015年11月2日に提出された同第62/249,836号に基づく優先権を主張するものであり、これらの仮出願はいずれも、参照により、その全体が本明細書に援用される。

【0002】

本願は、CD80(B7-1)細胞外ドメイン(ECD)ポリペプチド及びCD80-ECD融合分子、ならびに、がん治療において、それらを単独で、または免疫刺激剤などの治療剤(PD-1/PD-L1インヒビターなど)と組み合わせて使用することに関するものである。

【背景技術】

50

【0003】

CD80 (B7-1としても知られている)は、そのリガンド結合活性を通じて、共刺激または共阻害応答をもたらすことによって、免疫調節に關与する膜結合タンパク質のB7ファミリーの1つである。B7タンパク質ファミリーの他のメンバーとしては、CD86 (B7-2)、誘導性共刺激因子リガンド (ICOS-L)、プログラム死-1リガンド (PD-L1、B7-H1)、プログラム死-2リガンド (PD-L2、B7-H2)、B7-H3及びB7-H4が挙げられる。CD80は、T細胞、B細胞、樹状細胞及び単球の表面で発現する膜貫通タンパク質であり、レセプターのCD28、CTLA4 (CD152)及びPD-L1に結合する。CD80及びCD86、ならびにそれらのレセプターのCTLA4及びCD28は、共刺激-共阻害系として機能して、例えば、T細胞の活性化、増加、分化及び生存を制御する。CD80及びCD86のCD28との相互作用により、例えば、T細胞応答を活性化させる共刺激シグナルが生成される。そして、CD80は、CTLA4のアプレギュレーションを刺激し、このCTLA4は、CD80に結合すると、CD80/CD28相互作用によって以前に誘発されたT細胞応答を抑制するように作用する。このフィードバックループにより、免疫応答を細かく制御可能になる。

10

【0004】

CD80は、CD28に対する親和性が同程度である別のB7ファミリーメンバーPD-L1と相互作用することも示されているが、CD86は、PD-L1とは相互作用しない。PD-L1は、プログラム死-1 (PD-1)タンパク質 (このタンパク質もT細胞の調節に關与する)の2つのリガンドのうちの1つである。具体的には、T細胞が活性化した後、T細胞でのPD-1の発現が誘導されることがあり、PD-1のPD-L1への結合は、T細胞の不活化を促すことによって、T細胞活性をダウンレギュレートする。多くの腫瘍細胞は、その表面にPD-L1を発現して、場合によって、PD-1/PD-L1相互作用と、その腫瘍に対するT細胞応答の阻害をもたらす。この観察により、患者の腫瘍に対する自然免疫応答を刺激するように設計したがん治療剤として、PD-1/PD-L1相互作用のインヒビターの開発に至っている。

20

【0005】

CD80のPD-L1への結合は、PD-1/PD-L1相互作用をブロックして、腫瘍部位においてT細胞応答の阻害を防ぐための代替的な機構として機能し得る。しかしながら、同時に、CD80レベルの向上は、CD28に結合するとともに、CTLA4を誘導するのにも利用可能となり得るので、T細胞応答を誘導または阻害する。いくつかの可溶性のCD80も、内因性CD80活性をブロックすることによって、CTLA4の活性化をブロックするように機能し得る。加えて、異なる可溶性CD80タンパク質形態は、そのタンパク質形態と腫瘍細胞との別の相互作用 (その影響は、検査前には予測できない)を通じて、腫瘍の成長に対して異なる作用を有し得る。実際に、インビボにおいて、どれほど多様な可溶性CD80が腫瘍の成長に影響を及ぼすのかについても、これまでは直接的な調査は行われていない。本発明者は、マウスモデルにおいて、単独で投与したときと、PD-1/PD-L1インヒビターと併せて投与したときの両方において、腫瘍の成長に対して特に強力な作用を持つ一連のCD80細胞外ドメイン (ECD)融合分子を開発した。下記の実施例に示されているデータに基づくと、本発明の実施形態は、がん治療において、優れた治療効果をもたらすことができる。

30

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

いくつかの実施形態では、CD80細胞外ドメイン (ECD)ポリペプチドまたはCD80 ECD融合分子を提供する。いくつかの実施形態では、この融合分子は、CD80 ECDと、免疫グロブリン (ヒトIgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4など)のFcドメイン、アルブミンまたはポリマー (PEGなど)を含む少なくとも1つの融合パートナーとを含む。いくつかの実施形態では、CD80 ECDまたはCD80 E

50

CD融合分子は、ヒトCD80（配列番号5のヒトCD80など）、またはCD80アイソフォーム2もしくはアイソフォーム3由来のヒトCD80 ECD（配列番号3及び4）を含む。いくつかの実施形態では、この融合分子は、Fcドメイン（配列番号9～16から選択した配列を含むFcドメインなど）を含む。いくつかの実施形態では、この融合分子は、ヒトIgG1 Fcドメイン（配列番号14のような野生型配列、あるいは、L234F、L235E及びP331Sというアミノ酸置換を有する変異配列（配列番号12の配列など）を有するドメインなど）を含む。いくつかの実施形態では、CD80 ECD融合分子は、配列番号5、配列番号12、配列番号14、配列番号20及び配列番号21から選択したアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD80 ECD融合分子の融合パートナーは、CD80 ECDアミノ酸配列のC末端アミノ酸または成熟CD80 ECDアミノ酸配列のN末端アミノ酸に直接結合している。いくつかの実施形態では、CD80 ECD融合分子は、リンカーペプチド（GSリンカーなど）を介して、CD80 ECDに結合してよい。

10

【0007】

いくつかの実施形態では、CD80 ECD融合分子のシアル酸含有量は、10～60モルのシアル酸（SA）/1モルのタンパク質（15～60モルのSA/1モルのタンパク質など）である。いくつかの実施形態では、この含有量は、10～40モルのSA/1モルのタンパク質（15～40モルのSA/1モルのタンパク質、例えば、20～40モルのSA/1モルのタンパク質、20～30モルのSA/1モルのタンパク質、15～25モルのSA/1モルのタンパク質、15～30モルのSA/1モルのタンパク質または30～40モルのSA/1モルのタンパク質など）である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、少なくとも15モルのSA（少なくとも20モル、少なくとも25モル、少なくとも30モル、少なくとも35モルまたは少なくとも40モルのSAなど）/1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、15モル、20モル、25モル、30モル、35モルまたは40モルのSA/1モルのタンパク質である。いくつかのこのような実施形態では、CD80 ECD融合分子は、例えば、野生型Fcドメイン（ヒトIgG1、IgG2もしくはIgG4 Fcドメインなど）、またはL234F、L235E及びP331Sという置換を有するIgG1 Fcドメインを有するCD80 ECD Fc融合体である。いくつかの実施形態では、CD80 ECD融合分子は、配列番号5、配列番号12、配列番号14、配列番号20及び配列番号21から選択したアミノ酸配列を含む。上記のいくつかの実施形態では、融合分子の、マウス同系または異種移植モデル（CT26マウスモデルなど）における腫瘍成長阻害率は、同一のアミノ酸配列であるが、SA含有量の少ない融合分子よりも高い。融合分子が、少なくとも10モルのSA/1モルのタンパク質（少なくとも15モルのSA/1モルのタンパク質、例えば、少なくとも20モルのSA/1モルのタンパク質など）を含む上記のいくつかの実施形態では、融合分子の、マウス同系または異種移植モデル（CT26マウスモデルなど）における腫瘍成長阻害率は、それぞれ、同一のアミノ酸配列であるが、10モル未満のSA/1モルのタンパク質、15モル未満のSA/1モルのタンパク質または20モル未満のSA/1モルのタンパク質である融合分子よりも高い。

20

30

【0008】

本発明のいくつかの実施形態は、少なくとも1つのマウス同系または異種移植がんモデル（CT26モデルなど）において、少なくとも10日の期間にわたって（少なくとも2週間、例えば、10日～2週間、2～3週間または少なくとも3週間の期間にわたってなど）、腫瘍細胞成長を少なくとも50%（少なくとも60%、例えば、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%など）阻害できるCD80 ECD融合分子を含む。

40

【0009】

いくつかの実施形態では、マウスに、CD80 ECD Fc融合分子を0.3～3mg/kg（0.3～0.6mg/kgなど）、1～3回投与する。いくつかのこのような実施形態では、CD80 ECD融合分子のシアル酸含有量は、10～60モルのシアル

50

酸 (S A) / 1 モルのタンパク質 (15 ~ 60 モルの S A / 1 モルのタンパク質など) でもある。いくつかの実施形態では、この含有量は、10 ~ 40 モルの S A / 1 モルのタンパク質 (15 ~ 40 モルの S A / 1 モルのタンパク質、例えば、20 ~ 40 モルの S A / 1 モルのタンパク質、20 ~ 30 モルの S A / 1 モルのタンパク質、15 ~ 25 モルの S A / 1 モルのタンパク質、15 ~ 30 モルの S A / 1 モルのタンパク質または 30 ~ 40 モルの S A / 1 モルのタンパク質など) である。いくつかの実施形態では、S A 含有量は、少なくとも 15 モル (少なくとも 20 モル、少なくとも 25 モル、少なくとも 30 モル、少なくとも 35 モルまたは少なくとも 40 モルなど) の S A / 1 モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、S A 含有量は、15 モル、20 モル、25 モル、30 モル、35 モルまたは 40 モルの S A / 1 モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、C D 80 E C D 融合分子は融合パートナーとして、F c (ヒト I g G 1、I g G 2 または I g G 4 F c ドメインなど) を有する。いくつかの実施形態では、C D 80 E C D 融合分子は、配列番号 5、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 20 及び配列番号 21 から選択したアミノ酸配列を含む。融合分子が、少なくとも 10 モルの S A / 1 モルのタンパク質 (少なくとも 15 モルの S A / 1 モルのタンパク質、例えば、少なくとも 20 モルの S A / 1 モルのタンパク質など) を含む上記のいくつかの実施形態では、この分子の、マウス同系または異種移植モデル (C T 26 マウスモデルなど) における腫瘍成長阻害率は、それぞれ、同一のアミノ酸配列であるが、10 モル未満の S A / 1 モルのタンパク質、15 モル未満の S A / 1 モルのタンパク質または 20 モル未満の S A / 1 モルのタンパク質である融合分子よりも大きい。融合分子が、少なくとも 10 モルの S A / 1 モルのタンパク質 (少なくとも 15 モルの S A / 1 モルのタンパク質、例えば、少なくとも 20 モルの S A / 1 モルのタンパク質など) を含む上記のいくつかの実施形態では、この分子の、マウス同系または異種移植モデル (C T 26 マウスモデルなど) における腫瘍成長阻害率は、少なくとも 10 日後、少なくとも 2 週間後または少なくとも 3 週間後 (10 日 ~ 2 週間後、または 2 ~ 3 週間後など)、抗 C T L A 4 抗体 (抗 C T L A 4 抗体クローン 9 D 9 など) よりも大きい。

【 0010 】

上記の実施形態のいくつかでは、C D 80 E C D F c 融合分子は、同系または異種移植腫瘍モデル (C T 26 モデルなど) のマウスにおいて、完全な腫瘍退縮を誘導することもできる。

【 0011 】

また、本明細書で提供するのは、上記の実施形態のいずれかの C D 80 E C D または C D 80 E C D 融合分子を含むとともに、少なくとも 1 つの製薬学的に許容可能な担体をさらに含む組成物である。いくつかのこのような組成物は、少なくとも 1 つの追加の治療剤をさらに含む。

【 0012 】

いくつかの実施形態では、追加の治療剤は、少なくとも 1 つの免疫刺激剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫刺激剤は、プログラム細胞死 1 (P D - 1) / プログラム細胞死リガンド 1 (P D - L 1) インヒビターを含む。P D - 1 / P D - L 1 インヒビターは、抗体 (抗 P D - 1 抗体もしくは抗 P D - L 1 抗体など)、ペプチド、融合分子、または小分子であってよい。

【 0013 】

いくつかの実施形態では、P D - 1 / P D - L 1 インヒビターは、抗 P D - 1 抗体 (ニボルマブ、ピジリズマブ及びペムプロリズマブから選択した抗体の重鎖 C D R 及び軽鎖 C D R を含むか、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むか、または完全アミノ酸配列を含む抗体など) である。いくつかの実施形態では、P D - 1 / P D - L 1 インヒビターは、抗 P D - L 1 抗体 (B M S - 936559、M P D L 3280A、M E D I 4736 及び M S B 0010718C から選択した抗体の重鎖 C D R 及び軽鎖 C D R、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域または完全アミノ酸配列を含む抗体など) である。

【 0014 】

いくつかの実施形態では、PD - 1 / PD - L 1 インヒビターは、PD - 1 融合分子 (AMP - 224) またはポリペプチド (AUR - 012 など) である。

【0015】

また、本発明に含まれるのは、対象のがんの治療方法であって、上記の実施形態の CD 80 ECD、CD 80 ECD 融合タンパク質または組成物を有効量、対象に投与することを含む方法である。いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、がんは、大腸がん、乳がん、胃がん、非小細胞肺癌、メラノーマ、頭頸部扁平上皮癌、卵巣がん、膵臓がん、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱がん及び子宮体がんから選択する。いくつかの実施形態では、がんは、手術、化学療法、放射線療法またはこれらを組み合わせたものから選択した療法の後、再発性または進行性のものである。

10

【0016】

本発明の方法のいくつかでは、CD 80 ECD、CD 80 ECD 融合分子または組成物は、少なくとも1つの追加の治療剤と組み合わせて投与する。いくつかのこのような実施形態では、追加の治療剤は、同じ組成物の一部として、CD 80 ECD または CD 80 ECD 融合分子とともに包装してよく、例えば、1つの組成物において併せて混合したり、別々の容器、バイアルまたはその他のパッケージに入れたりしてよい。いくつかの実施形態では、追加の治療剤は、少なくとも1つの免疫刺激剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫刺激剤は、プログラム細胞死 1 (PD - 1) / プログラム細胞死リガンド 1 (PD - L 1) インヒビターを含む。PD - 1 / PD - L 1 インヒビターは、抗体 (抗 PD - 1 抗体もしくは抗 PD - L 1 抗体など)、ペプチド、融合分子、または小分子であってよい。

20

【0017】

いくつかの実施形態では、PD - 1 / PD - L 1 インヒビターは、抗 PD - 1 抗体 (ニボルマブ、ピジリズマブ及びペムプロリズマブから選択した抗体の重鎖 CDR 及び軽鎖 CDR を含むか、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むか、または完全アミノ酸配列を含む抗体など) である。いくつかの実施形態では、PD - 1 / PD - L 1 インヒビターは、抗 PD - L 1 抗体 (BMS - 936559、MPDL3280A、MEDI4736 及び MSB0010718C から選択した抗体の重鎖 CDR 及び軽鎖 CDR、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域または完全アミノ酸配列を含む抗体など) である。

30

【0018】

いくつかの実施形態では、PD - 1 / PD - L 1 インヒビターは、PD - 1 融合分子 (AMP - 224 など) またはポリペプチド (AUR - 012 など) である。

【0019】

本発明の方法のいくつかの実施形態では、CD 80 ECD または CD 80 ECD 融合分子と、追加の治療剤 (免疫刺激剤、例えば、PD - 1 / PD - L 1 インヒビターなど) は、同時または順次に投与してよい。いくつかのケースでは、CD 80 ECD または CD 80 ECD 融合分子を投与する前に、1用量以上の PD - 1 / PD - L 1 インヒビターを投与する。いくつかのケースでは、対象は、CD 80 ECD または CD 80 ECD 融合分子の投与前に、免疫刺激剤、例えば PD - 1 / PD - L 1 インヒビターによる治療クールを完了した者である。いくつかのケースでは、CD 80 ECD または CD 80 ECD 融合分子は、免疫刺激剤、例えば PD - 1 / PD - L 1 インヒビターによる治療の 2クール目の最中に投与する。いくつかのケースでは、対象は、CD 80 ECD または CD 80 ECD 融合分子の投与前に、少なくとも1用量、少なくとも2用量、少なくとも3用量または少なくとも4用量の免疫刺激剤 (PD - 1 / PD - L 1 インヒビターなど) を投与された者である。いくつかのケースでは、少なくとも1用量の免疫刺激剤、例えば PD - 1 / PD - L 1 インヒビターを CD 80 ECD または CD 80 ECD 融合分子と同時に投与する。

40

【0020】

いくつかの実施形態では、追加の治療剤 (免疫刺激剤、例えば、PD - 1 / PD - L 1 インヒビターなど) を投与する前に、1用量以上の CD 80 ECD または CD 80 E

50

CD融合分子を投与する。いくつかのこのようなケースでは、対象は、免疫刺激剤（例えばPD-1/PD-L1インヒビターなど）の投与前に、少なくとも1用量、少なくとも2用量、少なくとも3用量または少なくとも4用量のCD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子を投与された者である。いくつかのケースでは、少なくとも1用量のCD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子を免疫刺激剤、例えばPD-1/PD-L1インヒビターと同時に投与する。

【0021】

本発明の方法のいずれでも、対象は、PD-1/PD-L1インヒビターによる治療に耐性のある者であってよい。いくつかのこのようなケースでは、対象は、PD-1/PD-L1インヒビターによる治療を以前受けた者であるが、別のこのようなケースでは、対象は、PD-1/PD-L1インヒビターによる治療をこれまで受けたことがないが、他の手段（特定の表現型形質など）を通じて、耐性があると特定されている者である。

10

【0022】

上記の方法のいずれでも、対象に、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子に加えて、少なくとも1つの化学療法剤、増殖阻害剤、血管新生阻害剤及び/または抗腫瘍組成物を含む追加の治療剤を投与してよい。

【0023】

いくつかの実施形態では、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子と、免疫刺激剤（PD-1/PD-L1インヒビターなど）を組み合わせたものであって、対象に投与するものは、CD80 ECDもしくは融合分子または免疫刺激剤（PD-1/PD-L1インヒビターなど）のいずれかの単独による治療と比べて、少なくとも1つのマウス同系または異種移植がんモデルにおいて、腫瘍の成長を相乗的に低下または阻害することが示されている。いくつかの実施形態では、このマウスモデルは、マウス大腸癌CT26細胞を有する大腸がんモデルである。別の実施形態では、モデルは、MC38モデルまたはB16モデルであってよい。

20

【0024】

上記方法の実施形態のいずれでも、対象に投与するCD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、少なくとも1つのマウス同系または異種移植がんモデルにおいて、1週間、10日、2週間または3週間の期間にわたって、腫瘍の成長を、例えば少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも98%阻害できるか、または患者において、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月もしくは1年の期間にわたって、腫瘍の成長を少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも98%阻害できる。上記方法の実施形態のいずれでも、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子を投与すると、例えば1カ月、2カ月、3カ月、6カ月または1年の期間にわたって、動物またはヒト対象の少なくとも1つの腫瘍の体積を少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%縮小できる。いくつかのこのような実施形態では、腫瘍は固形腫瘍である。

30

40

【0025】

上記併用療法の実施形態のいずれでも、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子を追加の治療剤（免疫刺激剤、例えばPD-1/PD-L1インヒビターなど）と組み合わせて、対象に投与すると、少なくとも1つのマウス同系または異種移植がんモデルにおいて、1週間、10日、2週間または3週間の期間にわたって、腫瘍の成長を、例えば少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも98%阻害できるか、または患者において、1

50

カ月、2カ月、3カ月、6カ月もしくは1年の期間にわたって、腫瘍の成長を少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも98%阻害できる。上記併用療法の実施形態のいずれでも、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子を追加の治療剤(免疫刺激剤、例えばPD-1/PD-L1インヒビターなど)と組み合わせると、例えば1カ月、2カ月、3カ月、6カ月または1年の期間にわたって、動物またはヒト対象の少なくとも1つの腫瘍の体積を少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%縮小できる。いくつかのこのような実施形態では、腫瘍は固形腫瘍である。

10

【0026】

上記の併用療法の実施形態のいくつかでは、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、10~60モルのシアラル酸(SA)/1モルのCD80 ECDタンパク質(15~60モルのSA/1モルのタンパク質など)を含むCD80 ECD融合分子である。いくつかの実施形態では、この含有量は、10~40モルのSA/1モルのタンパク質(15~40モルのSA/1モルのタンパク質、例えば、20~40モルのSA/1モルのタンパク質、20~30モルのSA/1モルのタンパク質、15~25モルのSA/1モルのタンパク質、15~30モルのSA/1モルのタンパク質または30~40モルのSA/1モルのタンパク質など)である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、少なくとも15モル(少なくとも20モル、少なくとも25モル、少なくとも30モル、少なくとも35モルまたは少なくとも40モルなど)のSA/1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、15モル、20モル、25モル、30モル、35モルまたは40モルのSA/1モルのタンパク質である。いくつかのこのような実施形態では、CD80 ECD融合分子は、融合パートナーとして、Fcドメイン(野生型Fcドメイン、例えば、野生型ヒトIgG1、IgG2またはIgG4 Fcドメインなど)を含む。いくつかの実施形態では、CD80 ECD融合分子は、配列番号5、配列番号12、配列番号14、配列番号20及び配列番号21から選択したアミノ酸配列を含む。いくつかのこのような実施形態では、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、少なくとも10日の期間にわたって(少なくとも2週間、例えば、少なくとも3週間、例えば、10日~2週間または2~3週間の期間にわたってなど)、マウスのCT26腫瘍細胞の成長を少なくとも90%(少なくとも95%または少なくとも98%など)低下できる。いくつかの実施形態では、マウスに、CD80 ECD Fc融合分子を0.3~3mg/kg(0.3~0.6mg/kgなど)、1~3回投与した後に、これらの結果が得られる。

20

30

【0027】

また、本発明に含まれるのは、ヒトCD80 ECDポリペプチドと、ヒトIgG1 Fcドメイン(野生型ヒトIgG1 Fcなど)とを含むCD80 ECD融合分子であって、10~60モルのSA/1モルのCD80 ECD Fcタンパク質(15~60モルのSA/1モルのタンパク質など)を含むCD80 ECD Fcである。いくつかの実施形態では、この含有量は、10~40モルのSA/1モルのタンパク質(15~40モルのSA/1モルのタンパク質、例えば、20~40モルのSA/1モルのタンパク質、20~30モルのSA/1モルのタンパク質、15~25モルのSA/1モルのタンパク質、15~30モルのSA/1モルのタンパク質または30~40モルのSA/1モルのタンパク質など)である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、少なくとも15モル(少なくとも20モル、少なくとも25モル、少なくとも30モル、少なくとも35モルまたは少なくとも40モルなど)のSA/1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、15モル、20モル、25モル、30モル、35モルまたは40モルのSA/1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、融合分子は、配列番号

40

50

20のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、この分子は、少なくとも10日の期間にわたって（少なくとも2週間、例えば、少なくとも3週間、例えば、10日～2週間または2～3週間の期間にわたってなど）、マウスのCT26腫瘍細胞の成長を少なくとも90%（少なくとも95%または少なくとも98%など）低下させることができる。いくつかの実施形態では、マウスに、CD80 ECD Fc融合分子を0.3～3mg/kg（0.3～0.6mg/kgなど）、1～3回投与した後に、これらの結果が得られる。

【0028】

また、含まれるのは、CD80 ECD IgG1 Fcを含むとともに、少なくとも1つの製薬学的に許容可能な担体をさらに含む組成物である。このような組成物は、追加の治療剤も含んでよい。いくつかの実施形態では、追加の治療剤は、少なくとも1つの免疫刺激剤（プログラム細胞死1（PD-1）/プログラム細胞死リガンド1（PD-L1）インヒビターなど）である。いくつかのケースでは、PD-1/PD-L1インヒビターは、抗体（抗PD-1抗体、例えば、ニボルマブ、ピジリズマブ及びペムブロリズマブなど）である。例えば、この抗体は、ニボルマブ、ピジリズマブ及びペムブロリズマブから選択した抗体の重鎖CDR及び軽鎖CDRまたは重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有してよい。別の実施形態では、PD-1/PD-L1インヒビターは、抗PD-L1抗体である。抗PD-L1抗体は、例えば、BMS-936559、MPDL3280A、MED14736及びMSB0010718Cから選択した抗体の重鎖CDR及び軽鎖CDRを有してよく、または、BMS-936559、MPDL3280A、MED14736もしくはMSB0010718Cの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、BMS-936559、MPDL3280A、MED14736及びMSB0010718Cから選択する。あるいは、PD-1/PD-L1インヒビターは、PD-1融合分子（AMP-224など）またはポリペプチド（AUR-012など）であってよい。

【0029】

本開示は、対象のがんの治療方法であって、上記のようなCD80 ECD IgG1 Fc融合分子を有効量、対象に投与することを含む方法も含む。いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍（大腸がん、乳がん、胃がん、非小細胞肺癌、メラノーマ、頭頸部扁平上皮癌、卵巣がん、膵臓がん、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱がん及び子宮体がんから選択したがんなど）である。いくつかの実施形態では、がんは、手術、化学療法、放射線療法またはこれらを組み合わせたものから選択した療法後、再発性または進行性のものである。

【0030】

これらの方法の実施形態のいくつかでは、CD80 ECD Fcは、10～60モルのSA/1モルのCD80 ECD Fcタンパク質（15～60モルのSA/1モルのタンパク質など）を含む。いくつかの実施形態では、この含有量は、10～40モルのSA/1モルのタンパク質（15～40モルのSA/1モルのタンパク質、例えば、20～40モルのSA/1モルのタンパク質、20～30モルのSA/1モルのタンパク質、15～25モルのSA/1モルのタンパク質、15～30モルのSA/1モルのタンパク質または30～40モルのSA/1モルのタンパク質など）である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、少なくとも15モル（少なくとも20モル、少なくとも25モル、少なくとも30モル、少なくとも35モルまたは少なくとも40モルなど）のSA/1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、15モル、20モル、25モル、30モル、35モルまたは40モルのSA/1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG1、IgG2またはIgG4 Fcドメインである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、融合分子は、配列番号20または21のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、この分子は、マウスに腫瘍細胞を接種後、2または3週間の期間にわたって、マウスのCT26腫瘍細胞の成長を少なくとも90%低下させるこ

10

20

30

40

50

とができる。いくつかの実施形態では、この分子は、マウスに腫瘍細胞を接種後、2または3週間の期間にわたって、マウスにおいて、CT26腫瘍細胞の成長を少なくとも95%（少なくとも98%など）低下させることができる。例えば、マウスに、ECD Fc融合分子を0.3~3.0mg/kg（0.3~0.6mg/kgなど）、1~3用量投与すると、このような結果を得ることができる。この方法の実施形態のいくつかでは、CD80 ECD Fcは、10~40モルのSA/1モルのCD80 ECD Fcタンパク質を含み、このCD80 ECD Fcは、10モル未満のSA/1モルのCD80 ECD Fcタンパク質を含む同じアミノ酸配列のCD80 ECD Fcタンパク質よりも、2または3週間の期間にわたって、マウスのCT26腫瘍細胞の成長を大きく低下させる。本明細書における開示は、CD80 ECD融合タンパク質が対象のがんを治療する効力の増強方法であって、そのCD80 ECD融合タンパク質におけるシアル酸（SA）のレベルを向上させるか、またはSAレベルの向上したCD80 ECD融合タンパク質を用意すること、レベルの向上したSAを含むCD80 ECD融合タンパク質を対象に投与することを含む方法も含む。いくつかのこのような実施形態では、SAレベルは、5モル、10モル、20モル、30モル、40モルまたは50モル/1モルのCD80 ECDタンパク質だけ向上させる。これらの方法の実施形態のいくつかでは、CD80 ECD Fcは、10~60モルのSA/1モルのCD80 ECD Fcタンパク質（15~60モルのSA/1モルのタンパク質など）を含む。いくつかの実施形態では、この含有量は、10~40モルのSA/1モルのタンパク質（15~40モルのSA/1モルのタンパク質、例えば、20~40モルのSA/1モルのタンパク質、20~30モルのSA/1モルのタンパク質、15~25モルのSA/1モルのタンパク質、15~30モルのSA/1モルのタンパク質または30~40モルのSA/1モルのタンパク質など）である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、15モル、20モル、25モル、30モル、35モルまたは40モルのSA/1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG1、IgG2またはIgG4 Fcドメインである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、融合分子は、配列番号20または21のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、この分子は、2または3週間の期間にわたって、マウスのCT26腫瘍細胞の成長を少なくとも90%低下させることができる。いくつかの実施形態では、この分子は、少なくとも10日の期間にわたって（少なくとも2週間、例えば、少なくとも3週間、10日~2週間または2~3週間の期間にわたってなど）、マウスのCT26腫瘍細胞の成長を少なくとも95%（少なくとも98%など）低下させることができる。いくつかの実施形態では、マウスに、CD80 ECD Fc融合分子を0.3~3mg/kg（0.3~0.6mg/kgなど）、1~3用量投与した後、これらの結果が得られる。

【0031】

これらの方法の実施形態のいくつかでは、効力の増強は、動物またはヒト対象における全生存率の向上、無病生存率の向上または少なくとも1つの腫瘍の成長の低下度の向上として測定する。換言すると、SA含有量の多いCD80 ECD融合分子を投与すると、SA含有量の少ないCD80 ECD融合分子と比べて、これらのパラメーターの1つ以上が改善する。別の実施形態では、効力の増強は、マウス同系または異種移植モデル（CT26マウスモデルなど）における腫瘍の成長の低下度の向上として、または動物またはヒト対象におけるクリアランス速度の低下として測定する。いくつかの実施形態では、効力は、対象における少なくとも1つの腫瘍の成長の低下度の向上、または少なくとも1つのマウス同系または異種移植モデルにおける腫瘍の成長の低下度の向上として測定し、SAレベルの向上したCD80 ECD融合分子を投与すると、腫瘍の成長はさらに、SAレベルの向上していないCD80 ECD融合分子を投与した場合と比べて、少なくとも10%（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%、少なくとも80%または少なくとも90%など）低下する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 2 】

上記の大まかな説明と、下記の詳細な説明はいずれも、例示と説明のためのものに過ぎず、請求項を制限するものではないことを理解されたい。本明細書で使用されている項の見出しは、構成上のためのものに過ぎず、説明されている主題を限定するものとして解釈すべきではない。本明細書で引用されているすべての参考文献は、特許出願及び刊行物を含め、参照により、あらゆる目的のために、その全体が本明細書に援用される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 3 】

【 図 1 】 図 1 a ~ 1 b は、マウス大腸癌細胞株 C T 2 6 細胞を移植したマウスに、C D 8 0 E C D F c 融合分子を投与することの作用を、C T L A 4 E C D F c 融合分子と、コントロールの生理的食塩水と比較したものを示している。図 1 a は、マウスに C T 2 6 細胞を接種してから 2 1 日までの腫瘍体積を示している。図に示されているように、C T L A 4 E C D F c では、腫瘍の成長が拡大したが、C D 8 0 E C D F c は、コントロールの生理的食塩水と比べて、統計的に有意な形で腫瘍の成長を阻害した。P 値は、調査の各日における腫瘍体積計算値の独立両側 t 検定解析を用いて計算した ($* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$)。図 1 b は、3つの群に関して、接種から 1 9 日目における個々の腫瘍体積を示している。

10

【 図 2 】 図 2 a ~ 2 b は、マウス大腸癌細胞株 C T 2 6 細胞を移植したマウスに、C D 8 0 E C D F c 融合分子もしくは抗 P D - 1 抗体、またはこれらの 2 つを組み合わせたものを投与することの作用を、コントロールの生理的食塩水と比較したものを示している。図 2 a は、接種から 1 4 日までの腫瘍体積を示している。C D 8 0 E C D F c と抗 P D - 1 を組み合わせたものを投与されたマウスでは、C D 8 0 E C D F c ($p < 0.01$ 、9 日目の後に開始) または抗 P D - 1 (1 4 日目の $p < 0.01$) のいずれによる単剤療法と比べて、腫瘍の成長の統計的に有意な低下が見られた。統計的な有意性は、併用群を C D 8 0 E C D F c 群と比較した両側独立 t 検定によって割り出した。図 2 b は、1 4 日目における個々の腫瘍体積を示している。

20

【 図 3 】 図 3 a ~ b は、C D 8 0 E C D F c 融合分子が、マウスにおける C T 2 6 腫瘍の成長に及ぼす作用に、F c 融合ポリペプチド配列が及ぼす作用を示している。具体的には、マウスに、コントロールの生理的食塩水、またはヒト I g G 1 野生型 F c ドメイン融合パートナー (C D 8 0 - I g G 1 W T) を有する C D 8 0 E C D F c もしくは変異 (L 2 3 4 F / L 2 3 5 E / P 3 3 1 S) ヒト I g G 1 F c ドメイン融合パートナーを有する C D 8 0 E C D F c (C D 8 0 - I g G 1 M T) を投与した。図 3 a は、接種から 2 1 日までの腫瘍体積の変化を示している。F c ドメインの変異により、抗腫瘍活性が増強され、この増強は、統計的に有意な形で、接種から 1 4 日目に開始された ($p < 0.01$)。統計的な有意性は、両側独立 t 検定によって割り出した。図 3 b は、接種から 2 1 日目における個々の腫瘍体積を示している。

30

【 図 4 A 】 図 4 a ~ b は、コントロールの生理的食塩水または野生型及び変異 F c 融合パートナーのいずれかを有する C D 8 0 E C D F c 融合分子への暴露後、C D 3 + 及び C D 4 + T 細胞が存在するかに関して、マウス腫瘍細胞を染色したものを示している。図 4 a は、生理的食塩水、C D 8 0 - I g G 1 W T または C D 8 0 - I g G 1 M T の注射から 7 日目に採取した C T 2 6 腫瘍における C D 3 + 細胞 (上方の画像) と、対応する D A P I 染色 (核、下方の画像) を示す代表的な画像を示している。C D 8 0 - I g G 1 W T と C D 8 0 - I g G 1 M T のいずれも、ビヒクルと比べて、腫瘍内の C D 3 + 細胞の数を増加させたが、その増加の程度は、C D 8 0 - I g G 1 M T の後の方が大きかった。画像は、1 0 倍の対物レンズを用いて取得した。図 4 b は、生理的食塩水、C D 8 0 - I g G 1 W T または C D 8 0 - I g G 1 M T の注射から 7 日目に採取した C T 2 6 腫瘍における C D 3 + 細胞 (上の列) と C D 4 + 細胞 (下の列) を示す代表的な画像を示している。これらの画像は、同じ視野だが、異なるチャンネルで撮影した。C D 8 0 - I g G 1 W T と C D 8 0 - I g G 1 M T のいずれも、ビヒクルと比べて、浸潤 C D 4 + 細胞の数を増加させた。C D 3 + 細胞の C D 4 + 細胞に対する比率は、C D 8 0 - I g

40

50

G1 MTによる方が、CD80-EG1 WTと比べて向上した。画像は、10倍の対物レンズを用いて取得した。

【図4B】図4a~bは、コントロールの生理的食塩水または野生型及び変異Fc融合パートナーのいずれかを有するCD80-EG1 Fc融合分子への暴露後、CD3+及びCD4+ T細胞が存在するかに関して、マウス腫瘍細胞を染色したものを示している。図4aは、生理的食塩水、CD80-EG1 WTまたはCD80-EG1 MTの注射から7日目に採取したCT26腫瘍におけるCD3+細胞(上方の画像)と、対応するDAPI染色(核、下方の画像)を示す代表的な画像を示している。CD80-EG1 WTとCD80-EG1 MTのいずれも、ビヒクルと比べて、腫瘍内のCD3+細胞の数を増加させたが、その増加の程度は、CD80-EG1 MTの後の方が大きかった。画像は、10倍の対物レンズを用いて取得した。図4bは、生理的食塩水、CD80-EG1 WTまたはCD80-EG1 MTの注射から7日目に採取したCT26腫瘍におけるCD3+細胞(上の列)とCD4+細胞(下の列)を示す代表的な画像を示している。これらの画像は、同じ視野だが、異なるチャンネルで撮影した。CD80-EG1 WTとCD80-EG1 MTのいずれも、ビヒクルと比べて、浸潤CD4+細胞の数を増加させた。CD3+細胞のCD4+細胞に対する比率は、CD80-EG1 MTによる方が、CD80-EG1 WTと比べて向上した。画像は、10倍の対物レンズを用いて取得した。

10

【図5-1】図5a~dは、0.01 µg/ウェル、0.1 µg/ウェルまたは1 µg/ウェルのCD80-EG1 Fcドメイン融合分子(CD80-Fc)でコーティングしたプロテインAビーズに暴露した、96ウェル組織培養プレートにおけるT細胞からのサイトカイン(IFN-及びTNF-)の放出を示している。図5a及び5cは、可溶性サイトカインの産生によって測定したところ、ビーズ固定化CD80-Fc単独では、T細胞の有意な活性化が起きなかったことを示している。図5b及び5dは、少量のOKT3-scFv(非常に少ないので、それ自体では、T細胞の刺激を引き起こさない)をCD80-Fcとともに固定化したところ、サイトカインの放出が観察されたことを示している。

20

【図5-2】図5a~dは、0.01 µg/ウェル、0.1 µg/ウェルまたは1 µg/ウェルのCD80-EG1 Fcドメイン融合分子(CD80-Fc)でコーティングしたプロテインAビーズに暴露した、96ウェル組織培養プレートにおけるT細胞からのサイトカイン(IFN-及びTNF-)の放出を示している。図5a及び5cは、可溶性サイトカインの産生によって測定したところ、ビーズ固定化CD80-Fc単独では、T細胞の有意な活性化が起きなかったことを示している。図5b及び5dは、少量のOKT3-scFv(非常に少ないので、それ自体では、T細胞の刺激を引き起こさない)をCD80-Fcとともに固定化したところ、サイトカインの放出が観察されたことを示している。

30

【図6】コントロールの生理的食塩水、または3つの異なるシアル酸(SA)含有量を有する3つの異なるロットのCD80-EG1 Fc融合分子(用量0.3 mg/kgもしくは0.6 mg/kg)による治療後のマウスCT26腫瘍の成長を示している。ロットAは、5モルのSA/1モルのタンパク質を有し、ロットDは、15モルのSA/1モルのタンパク質を有し、ロットEは、20モルのSA/1モルのタンパク質を有する。ロットEのCD80-EG1 Fc 0.3 mg/kgまたは0.6 mg/kgによる治療を行ったところ、コントロールと比べて、腫瘍の成長が93%及び98%阻害された($P < 0.001$)。ロットDのCD80-EG1 Fc 0.3 mg/kgまたは0.6 mg/kgによる治療を行ったところ、コントロールと比べて、腫瘍の成長が93%及び95%阻害された($P < 0.001$)。比較によって、ロットAのCD80-EG1 Fc 0.3 mg/kgによる治療を行ったところ、コントロールと比べて、腫瘍の成長が阻害されず、0.6 mg/kgで投与した場合のみに、腫瘍の成長の70%の阻害が誘導された($P < 0.001$)。

40

【図7】10 mg/kgのマウスIG2b、0.3 mg/kgのマウスCD80-EG1 Fc

50

D - F c (S A 2 0 モル / モル)、 1 0 m g / k g の抗 C T L A 4 抗体クローン 9 D 9 及び 1 . 5 m g / k g の抗 C T L A 4 抗体クローン 9 D 9 で処置した C T 2 6 腫瘍の成長を示している。矢印は、マウスに投与した時点を示している。アスタリスクのシンボル (*) は、 0 . 3 m g / k g のマウス C D 8 0 E C D - F c (S A 2 0 モル / モル) と他の治療剤との統計的に有意な差を示している。

【図 8】 1 0 m g / k g のマウス I g G 2 b、 3 m g / k g のマウス C D 8 0 E C D - F c (S A 2 0 モル / モル)、 1 0 m g / k g の抗 C T L A 4 抗体クローン 9 D 9 及び 1 . 5 m g / k g の抗 C T L A 4 抗体クローン 9 D 9 で処置した M C 3 8 腫瘍の成長を示している。矢印は、マウスに投与した時点を示している。アスタリスクのシンボル (*) は、 3 m g / k g のマウス C D 8 0 E C D - F c (S A 2 0 モル / モル) と他の治療剤との統計的に有意な差を示している。

10

【図 9】 1 0 m g / k g のマウス I g G 2 b、 3 m g / k g のマウス C D 8 0 E C D - F c (S A 2 0 モル / モル)、 1 0 m g / k g の抗 C T L A 4 抗体クローン 9 D 9 及び 1 . 5 m g / k g の抗 C T L A 4 抗体クローン 9 D 9 で処置した B 1 6 腫瘍の成長を示している。矢印は、マウスに投与した時点を示している。アスタリスクシンボル (*) は、 3 m g / k g のマウス C D 8 0 E C D - F c (S A 2 0 モル / モル) と他の治療剤との統計的に有意な差を示している。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 4 】

定義

20

別段の定めのない限り、本発明との関連で用いる科学用語及び技術用語は、当業者によって広く理解されている意味を有するものとする。さらに、文脈によって別段に定められる場合を除き、単数形の用語には、複数形が含まれるものとし、複数形の用語には、単数形が含まれるものとする。

【 0 0 3 5 】

本願では、「または」の使用は、別段の記載のない限り、「及び/または」を意味する。多数従属クレームにおいては、「または」の使用は、前の 2 つ以上の独立または従属クレームに択一的に引用するものである。また、特に別段の記載のない限り、「要素」または「成分」などの用語には、1 つのユニットを含む要素及び成分と、2 つ以上のサブユニットを含む要素及び成分の両方が含まれる。

30

【 0 0 3 6 】

組み換え DNA、オリゴヌクレオチドの合成、組織の培養及び形質転換（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）、酵素反応との関連で用いられる例示的な技法、ならびに精製技法は、例えば、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)) などに説明されている。

【 0 0 3 7 】

本開示に従って使用する場合、下記の用語は、別段に示されていない限り、下記の意味を有すると理解するものとする。

40

【 0 0 3 8 】

「核酸分子」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、同義的に使用してよく、ヌクレオチドのポリマーを指す。このようなヌクレオチドポリマーは、天然及び/または非天然のヌクレオチドを含んでよく、DNA、RNA 及び PNA が挙げられるが、これらに限らない。「核酸配列」とは、核酸分子またはポリヌクレオチドを含む直鎖状のヌクレオチド配列を指す。

【 0 0 3 9 】

「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指す目的で同義的に使用し、最小長に限らない。このようなアミノ酸残基ポリマーは、天然または非天然のアミノ酸残基を含んでよく、ペプチド、オリゴペプチド、アミノ酸残基の二量

50

体、三量体及び多量体が挙げられるが、これらに限らない。完全長タンパク質と、その断片のいずれもが、この定義に含まれる。この用語には、ポリペプチドが発現後修飾されたもの、例えば、糖鎖付加、シアリル化、アセチル化、リン酸化されたものなども含まれる。さらに、本発明の目的においては、「ポリペプチド」とは、天然型配列の欠失、付加及び置換（概して保存的な性質のものである）などの修飾を含むタンパク質を指し、ただし、そのタンパク質が所望の活性を保持することを条件とする。これらの修飾は、部位特異的突然変異誘発法によるような意図的なものであっても、そのタンパク質を産生する宿主の変異またはPCR増幅によるエラーによるような偶発的なものであってもよい。

【0040】

「CD80細胞外ドメイン」または「CD80 ECD」とは、CD80の細胞外ドメインポリペプチドを指し、その天然のバリエーションと操作バリエーションを含む。CD80 ECDの非限定的な例としては、配列番号 - - が挙げられる。「CD80 ECD融合分子」とは、CD80 ECDと融合パートナー（Fcドメイン、アルブミンまたはPEGなど）とを含む分子を指す。この融合パートナーは、例えば、CD80 ECDのN末端もしくはC末端に共有結合していても、内側の位置にあってもよい。CD80 ECD融合分子の非限定的な例としては、配列番号 - - が挙げられる。

10

【0041】

「プログラム細胞死タンパク質1」及び「PD-1」という用語は、CD28ファミリーに属する免疫抑制レセプターを指す。PD-1は主に、インビボにおいて、すでに活性化しているT細胞上に発現し、PD-L1及びPD-L2という2つのリガンドに結合する。「PD-1」という用語には、本明細書で使用する場合、ヒトPD-1（hPD-1）、hPD-1のバリエーション、アイソフォーム及び種相同体、ならびにhPD-1と少なくとも1つの共通のエピトープを有する類縁体が含まれる。完全hPD-1配列は、GenBank受託番号U64863に見ることができる。いくつかの実施形態では、PD-1は、配列番号 - - （シグナル配列を有する前駆体）または配列番号 - - （シグナル配列を有さない成熟体）のアミノ酸配列を有するヒトPD-1である。

20

【0042】

「プログラム細胞死1リガンド1」及び「PD-L1」という用語は、PD-1に結合すると、T細胞の活性化とサイトカインの分泌をダウンレギュレートする、PD-1の2つの細胞表面糖タンパク質リガンドのうちの1つを指す（もう一方はPD-L2である）。「PD-L1」という用語には、本明細書で使用する場合、ヒトPD-L1（hPD-L1）、hPD-L1のバリエーション、アイソフォーム及び種相同体、ならびにhPD-L1と少なくとも1つの共通のエピトープを有する類縁体が含まれる。完全hPD-L1配列は、GenBank（登録商標）受託番号Q9NZQ7で見ることができる。いくつかの実施形態では、PD-L1は、配列番号 - - （シグナル配列を有する前駆体）または配列番号 - - （シグナル配列を有さない成熟体）のアミノ酸配列を有するヒトPD-L1である。

30

【0043】

「免疫刺激剤」という用語は、本明細書で使用する場合、共刺激分子を含む免疫刺激分子のアゴニストとして機能するか、または共抑制分子を含む免疫抑制分子のアンタゴニストとして機能するかのいずれかによって、免疫系を刺激する分子を指す。免疫刺激剤は、生体物質（抗体もしくは抗体断片など）、その他のタンパク質またはワクチンであっても、小分子薬であってもよい。「免疫刺激分子」には、免疫応答を増強するか、刺激するか、誘導するかまたは別段の形で「オンする」ように機能するレセプターまたはリガンドが含まれる。本明細書で定義されているような免疫刺激分子には、共刺激分子が含まれる。「免疫抑制分子」には、免疫応答を低下させるか、阻害するか、抑制するかまたは別段の形で「オフする」ように機能するレセプターまたはリガンドが含まれる。本明細書で定義されているような免疫抑制分子には、共抑制分子が含まれる。このような免疫刺激分子と免疫抑制分子は、例えば、免疫細胞（T細胞など）で見られるか、または自然免疫に関与する細胞（NK細胞など）で見られるレセプターまたはリガンドであってもよい。

40

50

【0044】

「PD-1/PD-L1インヒビター」という用語は、PD-1/PD-L1のシグナル伝達経路を破壊する部分を指す。いくつかの実施形態では、このインヒビターは、PD-1及び/またはPD-L1に結合することによって、PD-1/PD-L1のシグナル伝達経路を阻害する。いくつかの実施形態では、このインヒビターは、PD-L2にも結合する。いくつかの実施形態では、PD-1/PD-L1インヒビターは、PD-1のPD-L1及び/またはPD-L2への結合をブロックする。非限定的な例示的PD-1/PD-L1インヒビターとしては、PD-1に結合する抗体、PD-L1に結合する抗体、融合タンパク質（AMP-224など）、及びペプチド（AUR-012など）が挙げられる。

10

【0045】

「PD-1を阻害する抗体」という用語は、PD-1に結合するか、またはPD-L1に結合することによって、PD-1及び/またはPD-L1のシグナル伝達を阻害する抗体を指す。いくつかの実施形態では、PD-1を阻害する抗体は、PD-1に結合して、PD-L1及び/またはPD-L2のPD-1への結合をブロックする。いくつかの実施形態では、PD-1を阻害する抗体は、PD-L1に結合して、PD-1のPD-L1への結合をブロックする。PD-1を阻害する抗体のうち、PD-L1に結合する抗体は、抗PD-L1抗体と称してよい。PD-1を阻害する抗体のうち、PD-1に結合する抗体は、抗PD-1抗体と称してよい。

20

【0046】

CD80 ECD及びCD80 ECD融合分子に関しては、リガンド「の結合をブロックする」という用語と、その文法的な変形表現は、CD80とCD80リガンド（CD28、CTLA4またはPD-L1など）との相互作用を阻害できることを指す。このような阻害は、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子が結合においてCD80リガンドと競合することによることを含むいずれかの機構を通じて生じ得る。

30

【0047】

抗PD-1抗体及びPD-1融合分子またはペプチドに関しては、リガンド（PD-L1など）「の結合をブロックする」という用語と、その文法的な変形表現は、PD-1とPD-1リガンド（PD-L1など）との相互作用を阻害できることを指す目的で使用される。このような阻害は、例えば、PD-1上の結合部位の重複、及び/もしくはリガンドの親和性などを変化させる抗体によって誘導される、PD-1のコンフォメーション変化による、リガンド結合への直接干渉、または、PD-1融合分子もしくはペプチドのケースでは、結合におけるPD-1リガンドとの競合によることを含むいずれかの機構を通じて生じ得る。

40

【0048】

「親和性」または「結合親和性」とは、分子（例えばポリペプチド）の単結合部位とその結合パートナー（例えばリガンド）との非共有相互作用の合計の強さを指す。いくつかの実施形態では、「結合親和性」とは、結合対（例えば、ポリペプチドとリガンド）のメンバー間の1:1の相互作用を反映する固有結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は概して、解離定数（ K_d ）によって表すことができる。

50

【0049】

「抗体」という用語は、本明細書で使用する場合、重鎖の少なくとも相補性決定領域（CDR）1、CDR2及びCDR3、ならびに軽鎖の少なくともCDR1、CDR2及びCDR3を含む分子であって、抗原に結合できる分子を指す。「抗体」という用語としては、抗原に結合できる断片（Fv、一本鎖Fv（scFv）、Fab、Fab'及び（Fab'）₂など）が挙げられるが、これらに限らない。また、「抗体」という用語としては、キメラ抗体、ヒト化抗体及び様々な種（マウス、ヒト、カニクイザルなど）の抗体などが挙げられるが、これらに限らない。

【0050】

いくつかの実施形態では、抗体は、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む。いくつかの実

60

施形態では、抗体は、重鎖可変領域と、重鎖定常領域の少なくとも一部とを含む少なくとも1本の重鎖と、軽鎖可変領域と、軽鎖定常領域の少なくとも一部とを含む少なくとも1本の軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、2本の重鎖（その各重鎖は、重鎖可変領域と、重鎖定常領域の少なくとも一部を含む）と、2本の軽鎖（その各軽鎖は、軽鎖可変領域と、軽鎖定常領域の少なくとも一部を含む）を含む。本明細書で使用する場合、一本鎖Fv（scFv）または例えば、6個のすべてのCDR（3個の重鎖CDRと、3個の軽鎖CDR）を含む1本のポリペプチド鎖を含むいずれかの他の抗体は、重鎖と軽鎖を有するものとみなす。いくつかのこのような実施形態では、重鎖は、3個の重鎖CDRを含む抗体領域であり、軽鎖は、3個の軽鎖CDRを含む抗体領域である。

【0051】

「重鎖可変領域」という用語は、重鎖HVR1と、フレームワーク（FR）2と、HVR2と、FR3と、HVR3とを含む領域を指す。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、FR1の少なくとも一部及び/またはFR4の少なくとも一部も含む。

【0052】

「重鎖定常領域」という用語は、C_H1、C_H2及びC_H3という少なくとも3個の重鎖定常ドメインを含む領域を指す。非限定的な例示的重鎖定常領域としては、 γ 及び μ が挙げられる。非限定的な例示的重鎖定常領域としては、 δ 及び μ も挙げられる。各重鎖定常領域は、抗体アイソタイプに対応する。例えば、 γ 定常領域を含む抗体は、IgG抗体であり、 δ 定常領域を含む抗体は、IgD抗体であり、 ϵ 定常領域を含む抗体は、IgA抗体である。さらに、 μ 定常領域を含む抗体は、IgM抗体であり、 δ 定常領域を含む抗体は、IgE抗体である。特定のアイソタイプはさらに、サブクラスに細分化できる。例えば、IgG抗体としては、IgG1（ γ_1 定常領域を含む）、IgG2（ γ_2 定常領域を含む）、IgG3（ γ_3 定常領域を含む）及びIgG4（ γ_4 定常領域を含む）という抗体が挙げられるが、これらに限らない。IgA抗体としては、IgA1（ α_1 定常領域を含む）及びIgA2（ α_2 定常領域を含む）という抗体が挙げられるが、これらに限らず、IgM抗体としては、IgM1及びIgM2が挙げられるが、これらに限らない。

【0053】

「重鎖」という用語は、リーダー配列を有するか、またはリーダー配列を有さない状態で、少なくとも重鎖可変領域を含むポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、重鎖は、重鎖定常領域の少なくとも一部を含む。「完全長重鎖」という用語は、リーダー配列を有するか、またはリーダー配列を有さない状態で、重鎖可変領域と重鎖定常領域とを含むポリペプチドを指す。

【0054】

「軽鎖可変領域」という用語は、軽鎖HVR1と、フレームワーク（FR）2と、HVR2と、FR3と、HVR3とを含む領域を指す。いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、FR1及び/またはFR4も含む。

【0055】

「軽鎖定常領域」という用語は、軽鎖定常ドメインC_Lを含む領域を指す。非限定的な例示的重鎖定常領域としては、 κ 及び λ が挙げられる。

【0056】

「軽鎖」という用語は、リーダー配列を有するか、またはリーダー配列を有さない状態で、少なくとも軽鎖可変領域を含むポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、軽鎖は、軽鎖定常領域の少なくとも一部を含む。「完全長軽鎖」という用語は、リーダー配列を有するか、またはリーダー配列を有さない状態で、軽鎖可変領域と軽鎖定常領域とを含むポリペプチドを指す。

【0057】

「超可変領域」または「HVR」という用語は、配列において超可変性であり及び/または構造的に定義されるループ（「超可変ループ」）を形成する抗体可変ドメインの各領域を指す。概して、ネイティブな4本鎖抗体は、6個のHVR（V_Hに3個（H1、H2

10

20

30

40

50

、H3)と、V_Lに3個(L1、L2、L3)を含む。HVRは概して、超可変ループ及び/または「相補性決定領域」(「CDR」)に由来するアミノ酸残基を含み、CDRは、配列可変性が最も高く、及び/または抗原の認識に関与する。例示的な超可変ループは、26~32番目(L1)、50~52番目(L2)、91~96番目(L3)、26~32番目(H1)、53~55番目(H2)及び96~101番目(H3)のアミノ酸残基に見られる(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))。例示的なCDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3)は、L1の24~34番目、L2の50~56番目、L3の89~97番目、H1の31~35B番目、H2の50~65番目、H3の95~102番目のアミノ酸残基に見られる(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。超可変領域(HVR)及び相補性決定領域(CDR)という用語はいずれも、抗原結合領域を形成する可変領域部分を指す。

【0058】

「キメラ抗体」とは、本明細書で使用する場合、第1の種(マウス、ラット、カニクイザルなど)に由来する少なくとも1つの可変領域と、第2の種(ヒト、カニクイザルなど)に由来する少なくとも1つの定常領域とを含む抗体を指す。いくつかの実施形態では、キメラ抗体は、少なくとも1つのマウス可変領域と、少なくとも1つのヒト定常領域を含む。いくつかの実施形態では、キメラ抗体は、少なくとも1つのカニクイザル可変領域と、少なくとも1つのヒト定常領域を含む。いくつかの実施形態では、キメラ抗体は、少なくとも1つのラット可変領域と、少なくとも1つのマウス定常領域を含む。いくつかの実施形態では、キメラ抗体のすべての可変領域は、第1の種に由来しており、キメラ抗体のすべての定常領域は、第2の種に由来している。

【0059】

「ヒト化抗体」とは、本明細書で使用する場合、ヒト以外の可変領域のフレームワーク領域における少なくとも1つのアミノ酸が、ヒト可変領域の対応するアミノ酸に置き換えられている抗体を指す。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも1つのヒト定常領域またはその断片を含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、Fab、scFv、(Fab')₂などである。

【0060】

「ヒト抗体」は、本明細書で使用する場合、ヒトで産生される抗体と、ヒト以外の動物で産生される抗体のうち、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含む抗体(Xenomouse(登録商標)など)と、インビトロ法(ファージディスプレイなど)を用いて選択した抗体であって、その抗体レパートリーが、ヒト免疫グロブリン配列に基づいている抗体を指す。

【0061】

「リーダー配列」という用語は、ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基の配列であって、哺乳動物細胞からポリペプチドの分泌を促す配列を指す。リーダー配列は、ポリペプチドが哺乳動物細胞から輸送されて、成熟タンパク質が形成されると、切断することができる。リーダー配列は、天然のものであっても、合成したものであってもよく、その配列が結合するタンパク質に対して異種のものであっても、同種のものであってもよい。非限定的な例示的リーダー配列としては、異種のタンパク質に由来するリーダー配列も挙げられる。いくつかの実施形態では、抗体は、リーダー配列を欠損している。いくつかの実施形態では、抗体は、少なくとも1つのリーダー配列を含み、その配列は、ネイティブな抗体リーダー配列と異種のリーダー配列から選択してよい。

【0062】

「単離されている」という用語は、本明細書で使用する場合、天然においては、その分子とともに典型的には存在する成分の少なくとも一部から分離した分子を指す。例えば、

ポリペプチドは、そのポリペプチドを産生した細胞の成分の少なくとも一部から分離されているときには、「単離されている」と称する。ポリペプチドが、発現後、細胞によって分泌される場合、そのポリペプチドを産生した細胞から、そのポリペプチドを含む上清を物理的に分離することは、ポリペプチドを「単離すること」とみなす。同様に、ポリヌクレオチドは、それよりも大きいポリヌクレオチド（例えば、DNAポリヌクレオチドのケースでは、ゲノムDNAまたはミトコンドリアDNAなど）であって、天然においては、そのポリヌクレオチドが典型的に含まれる大きいポリヌクレオチドの一部ではないとき、または、そのポリヌクレオチドを産生した細胞の成分の少なくとも一部から分離されているとき（例えば、RNAポリヌクレオチドのケース）には、「単離されている」と称する。したがって、宿主細胞内のベクターに含まれているDNAポリヌクレオチドは、「単離されている」と称してよい。ただし、そのポリヌクレオチドが、天然において、そのベクター内に存在しないことを条件とする。

【0063】

「低下する」という用語は、腫瘍体積などのパラメーターに適用するときには、そのパラメーターのレベルが観察可能かつ測定可能な形で低下することを意味する。いくつかの実施形態では、その低下の度合いは、少なくとも10%（少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%または少なくとも50%など）であってよい。いくつかの実施形態では、その低下の度合いは、別の治療またはコントロールと比べて統計的に有意であってよい。

【0064】

「対象」及び「患者」という用語は、本明細書では、ヒトを指す目的で同義的に使用する。いくつかの実施形態では、他の哺乳動物（齧歯動物、類人猿、ネコ科動物、イヌ科動物、ウマ科動物、ウシ亜科動物、ブタ、ヒツジ、ヤギ、哺乳類の実験動物、哺乳類の家畜、哺乳類の競技用動物及び哺乳類のペットが挙げられるが、これらに限らない）の治療方法も提供する。

【0065】

「耐性」または「非応答性」という用語は、治療剤による治療に関して使用するときには、対象において、標準的な用量の治療剤に対するその対象の過去の応答と比べて、または同様の障害を有する同様の対象において予測される、標準的な用量の治療剤に対する応答と比べて、標準的な用量の治療剤に対する応答の低下または応答の欠如が見られることを意味する。したがって、いくつかの実施形態では、対象は、治療剤に耐性のある者であるが、過去にその治療剤を投与されたことのない者であっても、過去の1回以上の治療において、その治療剤に応答した後、その治療剤に対する耐性を発現した者であってもよい。

【0066】

「試料」という用語は、本明細書で使用する場合、対象から採取するか、またはその対象に由来する組成物であって、例えば、物理的、生化学的、化学的及び/または生理的特徴に基づき、特徴付け、定量及び/または同定が行われる細胞的及び/またはその他の分子の実体を含む組成物を指す。例示的な試料は、組織試料である。

【0067】

「組織試料」という用語は、対象の組織から得られる類似の細胞の一群を指す。組織試料の供給源は、未処理であるか、凍結したか及び/または保存した器官、組織試料、生検体または吸引体に由来するような固形組織、血液またはいずれかの血液成分、体液（脳脊髄液、羊水、腹水、滑液または間質液など）、対象の胎児時または発生時のいずれかの時点の細胞であってよい。いくつかの実施形態では、組織試料は、滑膜生検組織試料及び/または滑液試料である。いくつかの実施形態では、組織試料は、滑液試料である。組織試料は、初代細胞、培養細胞または細胞株であってもよい。任意に応じて、組織試料は、疾患組織/器官から採取する。組織試料は、天然ではその組織と混合されていない化合物（保存剤、抗凝固剤、緩衝剤、固定剤、栄養素、抗生物質など）を含んでよい。「コントロール試料」または「コントロール組織」とは、本明細書で使用する場合、治療を行って

10

20

30

40

50

る対象の疾患に罹患していないことが知られているか、または罹患していないと考えられる供給源から得られる試料、細胞または組織を指す。

【0068】

本発明での目的では、組織試料の「切片」は、組織試料の一部または一片（固形組織試料から切り出した組織または細胞の薄片など）を意味する。

【0069】

「がん」という用語は、本明細書では、異常に高いレベルの増殖と成長を示す細胞群を指す目的で使用される。がんは、良性（良性腫瘍ともいう）、前癌性または悪性であってもよい。がん細胞は、固形がん細胞（すなわち「固形腫瘍」）であっても、白血病のがん細胞であってもよい。「がんの成長」という用語は、本明細書では、がんのサイズまたは程度
10

【0070】

がんの例としては、癌、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病が挙げられるが、これらに限らない。このようながんの、より具体的な非限定的な例としては、扁平上皮がん、小細胞肺がん、下垂体がん、食道がん、星状細胞腫、軟組織肉腫、非小細胞肺がん（扁平上皮非小細胞肺がんを含む）、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜がん、肝細胞がん、消化器がん、膵臓がん、神経膠肉腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、ヘパトーマ、乳がん、結腸がん、大腸がん、子宮体癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓がん、腎細胞癌、肝臓がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、肝臓癌、脳腫瘍、子宮体がん、精巣がん、
20

【0071】

「治療」とは、本明細書で使用する場合、治療的処置と予防措置の両方を指し、その目的は、標的の病的状態または障害を予防または遅延（抑制）することである。特定の実施形態では、「治療」という用語は、哺乳動物（ヒトを含む）の疾患に対する治療剤のいずれかの投与または塗布を網羅し、疾患もしくは疾患の進行を阻害もしくは遅延すること、例えば退縮を引き起こすことによって、疾患を部分的もしくは完全に緩和すること、喪失した機能、欠失した機能もしくは異常な機能を回復または修復すること、非効率的なプロセスを刺激すること、または疾患を安定させて、重症度を低下させることを含む。「治療」
30

【0072】

「効力」という用語は、本明細書で使用する場合、1年、5年または10年などの期間にわたる1つ以上のパラメーター（生存率または無病生存率など）と、対象における1つ以上の腫瘍の成長の低下のようなパラメーターから判断してよい。薬物動態パラメーター（バイオアベイラビリティなど）と基本的なパラメーター（クリアランス速度など）も、効力に影響を及ぼすことがある。したがって、「効力の増強」（すなわち、効力の改善）
40

【0073】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、対象における疾患または障害を治療するのに有効な薬物量を指す。特定の実施形態では、有効量とは、必要な投与量と期間で、所望の治療結果または予防結果をもたらすのに有効な量を指す。CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子の治療有効量は、疾患の状態、個体の年齢、性別、体重、薬物が個体において所望の応答を惹起する能力などの要因によって変化し得る。治療有効量には、薬物のいずれかの毒性作用または有害な作用よりも、治療上有益な作用が上回る量が
50

含まれる。いくつかの実施形態では、「有効量」という表現は、がんの治療に有効な薬物量を指す。

【0074】

1つ以上のさらなる治療剤（免疫刺激剤など）「と組み合わせて」投与することには、同時投与といずれかの順番による連続（順次）投与が含まれる。

【0075】

「製薬学的に許容可能な担体」とは、治療剤とともに使用する無毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、カプセル化材、調合補助剤または当該技術分野における従来の担体であって、対象に投与するための「医薬組成物」を共に構成する物質を指す。製薬学的に許容可能な担体は、使用する用量及び濃度において、被投与者に対して無毒性のものであり、その製剤の他の成分と適合するものである。製薬学的に許容可能な担体は、用いる製剤に適するものである。例えば、治療剤を経口投与する場合には、担体は、ゲルカプセルであってよい。治療剤を皮下投与する場合には、担体は理想的には、皮膚を刺激しないものであり、注射部位の反応を引き起こさないものである。

10

【0076】

例示的なCD80細胞外ドメインと細胞外ドメイン融合分子

本発明では、CD80 ECDとCD80 ECD融合分子を提供する。CD80 ECDは例えば、ヒトCD80アイソフォーム1、アイソフォーム2及びアイソフォーム3のECDを含んでよい（配列番号1～3を参照されたい。いくつかの実施形態では、CD80 ECDは、配列番号5のアミノ酸配列を含んでよい。

20

【0077】

CD80 ECD融合分子は、ポリマー、ポリペプチド、親油性部分及びサクシニル基のような融合パートナーを含んでよい。例示的なポリペプチド融合パートナーとしては、血清アルブミン及びIgGFcドメインが挙げられるが、これらに限らない。さらなる例示的なポリマー融合パートナーとしては、ポリエチレングリコール（分岐鎖及び/または直鎖を有するポリエチレングリコールを含む）が挙げられるが、これらに限らない。特定の例示的なFcドメインのアミノ酸配列は、本明細書の配列番号9～16に示されている。

【0078】

特定の実施形態では、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、シグナルペプチドを欠損している。特定の実施形態では、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、少なくとも1つのシグナルペプチドを含み、このシグナルペプチドは、ネイティブなCD80シグナルペプチド（配列番号7もしくは配列番号1の1～34番目のアミノ酸）及び/または異種のシグナルペプチドから選択してよい。

30

【0079】

CD80 ECD融合分子のケースでは、融合パートナーは、そのポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかに連結してよい。特定の実施形態では、ポリペプチドと融合パートナーは、共有結合している。融合パートナーもポリペプチド（「融合パートナーポリペプチド」）である場合には、ポリペプチドと融合パートナーポリペプチドは、連続するアミノ酸配列の一部であってよい。このようなケースでは、ポリペプチドと融合パートナーポリペプチドは、ポリペプチドと融合パートナーポリペプチドの両方をコードするコード配列から、1つのポリペプチドとして翻訳できる。いくつかのこのようなケースでは、これらの2つのポリペプチドは、配列内で直接連結して、一方のポリペプチドのN末端のすぐ後に、介在するアミノ酸なしに、もう一方のC末端が続くようになっている。別のケースでは、これらの2つのポリペプチドの間に、リンカーペプチド配列（GSリンカー配列など）が挿入されている。特定の実施形態では、CD80 ECDと融合パートナーは、他の手段（例えば、ペプチド結合以外の化学結合など）を通じて、共有結合している。特定の実施形態では、ポリペプチドと融合パートナーは、非共有結合している。このような特定の実施形態では、これらは、例えば、結合対を用いて連結していてもよい。例示的な結合対としては、ビオチンとアビジンまたはストレプトアビジン

40

50

、抗体とその抗原などが挙げられるが、これらに限らない。

【0080】

いくつかの実施形態では、CD80 ECD融合分子は、配列番号20または21の配列を含む。

【0081】

CD80 ECD融合分子は、その生成方法に応じて、特定の糖鎖付加修飾を異なるレベルで有してよい。例えば、CD80 ECD融合分子は、CD80 ECDタンパク質の濃度に対して、異なる濃度のシアル酸残基を有してよい。いくつかの実施形態では、シアル酸含有量が多いほど、体内でのクリアランス時間が長くなることがあるので、全体的バイオアベイラビリティが向上し得る。いくつかの実施形態では、CD80 ECD融合分子のシアル酸含有量は、10～60モルのシアル酸(SA)/1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、CD80 ECD融合分子のシアル酸含有量は、15～60モルのシアル酸(SA)/1モルのタンパク質である。例えば、いくつかの実施形態では、SA含有量は、10～40モルのSA/1モルのタンパク質(15～30モルのSA/1モルのタンパク質、例えば15～25モルのSA/1モルのタンパク質、例えば20～40モルのSA/1モルのタンパク質、例えば20～30モルのSA/1モルのタンパク質、例えば30～40モルのSA/1モルのタンパク質、例えば、10モル、15モル、20モル、25モル、30モル、35モルまたは40モルのSA/1モルのタンパク質など)である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、少なくとも15モルのSA/1モルのタンパク質(少なくとも20モルのSA/1モルのタンパク質、少なくとも25モルのSA/1モルのタンパク質、少なくとも30モルのSA/1モルのタンパク質、少なくとも35モルのSA/1モルのタンパク質または少なくとも40モルのSA/1モルのタンパク質など)である。いくつかのこのような実施形態では、融合パートナーは、Fcドメイン(ヒトIgG1、IgG2またはIgG4 Fcドメインなど)である。

10

20

30

40

50

【0082】

いくつかの実施形態では、CD80 ECD融合分子のSA含有量は、現行のCD80 ECD融合分子と比べて、増加しているか、または相対的に高いレベルに保持されている。いくつかの実施形態では、SA含有量の増加(5モル、10モル、15モル、20モル、30モル、40モルまたは50モルのSA/1モルのCD80 ECDタンパク質分の増加など)により、少なくとも1つのマウス同系または異種移植腫瘍モデルにおける効力の増強をもたらすことができる。例えば、いくつかの実施形態では、SA含有量の増加(5モル、10モル、15モル、20モル、30モル、40モルまたは50モルのSA/1モルのCD80 ECDタンパク質分の増加など)が見られると、マウス腫瘍モデルにおける腫瘍の成長を、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または98%さらに低下させることができる。

【0083】

例えば、いくつかの実施形態では、CD80 ECD Fc融合分子(10～60モルのSA/1モルのタンパク質を含むヒトIgG1 Fcドメインを含む融合分子など)は、少なくとも1つのマウス同系または異種移植がんモデルにおいて、腫瘍細胞の接種後、少なくとも10日、少なくとも2週間または少なくとも3週間(10日～2週間または2～3週間など)の期間にわたって、腫瘍細胞の成長を少なくとも80%(少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%など)阻害できる。いくつかのこのような実施形態では、この分子は、少なくとも15モルのSA/1モルのタンパク質(少なくとも20モルのSA/1モルのタンパク質など)または15～30モル、15～25モルもしくは20～30モルの範囲のSA/1モルのタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、マウスモデルは、CT26、MC38またはB16マウス腫瘍モデルである。いくつかの実施形態では、腫瘍が最小体積に達したら、マウスに、上記の分子を0.3～3.0mg/kg(0.3～0.6mg/kgなど)で、例えば1週間の期間にわたって、1～3用量投与する。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD80 ECD融合分子は、配列番号2

0 または 2 1 の配列を含む。

【0084】

いくつかの実施形態では、CD80 ECD Fc 融合分子は、同一のアミノ酸配列であるが、タンパク質 1 モル当たりの SA レベルが低い CD80 ECD Fc 融合タンパク質よりも、接種後、少なくとも 10 日、少なくとも 2 週間または少なくとも 3 週間（10 日～2 週間または 2～3 週間など）の期間にわたって、マウスの CT26 腫瘍細胞の成長を大きく低下させる。いくつかの実施形態では、CD80 ECD Fc 融合分子は、抗 CTLA4 抗体（抗 CTLA4 抗体クローン 9D9 など）よりも、マウスにおいて、接種後、少なくとも 10 日または少なくとも 2 週間（10 日～2 週間または 2～3 週間など）の期間にわたって、CT26 腫瘍の成長を大きく低下させる。いくつかのこのような実施形態では、CD80 ECD Fc 分子は、1～3 回、0.3 mg/kg、0.6 mg/kg または 3.0 mg/kg で投与し、抗 CTLA4 抗体は、同じ回数、1.5 または 10 mg/kg で投与する。いくつかのこのような実施形態では、モデルは、CT26、MC38 または B16 マウス腫瘍モデルである。

10

【0085】

本発明の実施例 6 では、例えば、15 または 20 モルの SA / 1 モルのタンパク質を有する CD80 ECD 融合分子で、マウス同系腫瘍モデルを治療したところ、0.3 mg/kg を 1 用量投与後、腫瘍の成長が少なくとも 93% 阻害されたが、5 モルの SA / 1 モルのタンパク質しか有さない分子で、同じ治療を行ったところ、腫瘍の成長を有意には阻害しなかったことを示すデータを提供する。同様に、15 または 20 モルの SA / 1 モルのタンパク質を有する CD80 ECD 融合分子を 0.6 mg/kg 投与したところ、腫瘍の成長が 95%～98% 阻害されたが、5 モルの SA / 1 モルのタンパク質を有する分子で、同じ治療を行ったところ、腫瘍の成長は 70% しか阻害されなかった。（図 6 を参照されたい。）阻害の程度は、腫瘍の接種後、約 3 週間評価した。

20

【0086】

さらに、本発明の実施例 7 では、3 つの異なる同系マウス腫瘍モデル（CT26、MC38 及び B16 モデル）において、20 モルの SA / 1 モルのタンパク質を有する CD80 ECD Fc 融合分子（マウスサロゲート）を 0.3 mg/kg（CT26）または 3.0 mg/kg（MC38 及び B16）投与した場合を、1.5 mg/kg 及び 10 mg/kg の用量での抗 CTLA4 抗体（クローン 9D9）と比べたデータを示している。各タンパク質は、図 7～9（矢印は投与日を示している）に示されているように、腫瘍細胞の接種から数日後、7 日の期間にわたって、3 回投与した。各ケースにおいて、CD80 ECD Fc では、2～3 週間の調査を通じて、抗 CTLA4 抗体よりも腫瘍の成長の阻害が優れていた（図 7～9）。例えば、CT26 モデルでは、腫瘍細胞の接種から 21 日目に、CD80 ECD Fc 融合分子では、腫瘍の成長が 90% 低下したのに対して、2 つの用量レベルの抗 CTLA4 では、75% または 53% であったことが示された。MC38 モデルでは、接種から 19 日目に、CD80 ECD Fc 分子では、腫瘍の成長阻害が約 80% 低下したのに対して、用量の多い方の抗 CTLA4 では、腫瘍の成長が 21% のみであったとともに、用量の少ない方の抗 CTLA4 では、腫瘍の成長が阻害されなかったことが示された。B16 モデルでは、CD80 ECD Fc 融合分子では、接種から 13 日目に、腫瘍の成長が 41% 阻害していたのに対して、抗 CTLA4 抗体は、いずれの用量レベルでも、腫瘍の成長を阻害しなかったことが示された。（図 7～9 を参照されたい。）

30

40

【0087】

これらの調査に基づき、CD80 ECD 融合分子は、少なくとも 2 週間の期間にわたって、腫瘍の成長を特定の割合で阻害できると見られ、例えば、マウスに腫瘍細胞を接種し、融合分子を投与してから約 2 週間、治療したマウスにおいて、示されている割合程度の腫瘍平均成長阻害率が観察される。CD80 ECD 融合分子は、2～3 週間の期間にわたって、腫瘍の成長を特定の割合で阻害できると見られ、例えば、マウスに腫瘍細胞を接種し、融合分子を投与してから 2～3 週間、治療したマウスにおいて、示されている割

50

合程度の腫瘍平均成長阻害率が観察される。

【0088】

実施例6及び7では、CD80 ECD融合分子で治療した多くのCT26モデルマウスにおいて、これらの2～3週間の期間で、腫瘍が完全に退縮したことも示されている。さらに、SA含有量の多いCD80 ECD融合分子の方が、比較用治療剤よりも、腫瘍が完全に退縮したマウスの割合が大きかったとともに、CD80 ECD融合分子の方が、抗CTLA4抗体よりも、腫瘍が完全に退縮したマウスの割合が大きかった。したがって、いくつかの実施形態では、同系または異種移植モデル（CT26、MC38またはB16など）のマウスにおいて、CD80 ECD融合分子（0.3mg/kg～0.6mg/kgのCD80 ECD融合分子または0.3mg/kg～3.0mg/kgのCD80 ECD融合分子など）で治療すると、腫瘍を完全に退縮し得る。

10

【0089】

例示的なFcドメイン融合パートナー

いくつかの実施形態では、CD80 ECD融合分子は、融合パートナーとしてFcドメインを有する。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4に由来する。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、野生型配列（野生型ヒトIgG1またはIgG2（例えばIgG2a）配列など）を有する。別の実施形態では、Fcドメインは、天然のバリエーションまたは操作したバリエーションのいずれかである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのFcと1つ以上のFcレセプターとの相互作用を変化させたものを選択する。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのFcと1つ以上の補体因子との相互作用を変化させたものを選択する。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのFcと1つ以上のFcレセプターとの相互作用を変化させたとともに、そのFcと1つ以上の補体因子との相互作用を変化させたものを選択する。

20

【0090】

いくつかの実施形態では、Fcドメインは、WO2014/144960に記載されているような少なくとも1つの点変異を含む。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、E233、L234、L235、P238、D265、N297、A327、P329またはP331という位置のうちの一つ以上に置換を有するヒトFcドメインである（これらの位置の番号付けは、KababtにおけるようなEUIンデックスによるものである）。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、L234、L235及び/またはP331に変異を有するヒトFcドメインである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、L234F、L235E及びP331Sという置換を有するヒトFcドメインである。（例えば、配列番号12を参照されたい。）いくつかの実施形態では、Fcドメインは、N297の位置にアミノ酸置換を有する。（例えば、配列番号13を参照されたい。）いくつかの実施形態では、Fcドメインは、C237Sという変異を含む。（例えば、配列番号9を参照されたい。）

30

【0091】

いくつかの実施形態では、Fc融合パートナーの変異によって、CD80 ECD Fc融合分子では、Fcドメイン変異以外は同じアミノ酸配列を有するCD80 ECD融合分子と比べて、1つ以上のFcレセプターとの相互作用が変化している。いくつかの実施形態では、FcのFcレセプター（FcRN、RI、RIIA、RIIB及びRIIIの1つ以上など）に対する親和性が、野生型Fcドメインと比べて低下している。いくつかの実施形態では、FcのFcRN、RI、RIIA、RIIB及びRIIIのすべてに対する親和性が、野生型Fcドメインと比べて低下している。

40

【0092】

いくつかの実施形態では、Fc融合パートナーの変異によって、CD80 ECD Fc融合分子では、1つ以上の補体因子（C1、C2、C3、C4など）と、それらの切断産物（C4a、C4b、C2a、C2b、C3a及びC3bなど）との相互作用が変化している。いくつかの実施形態では、Fc融合パートナーの変異によって、CD80 ECD

50

D Fc融合分子では、1つ以上の補体因子との相互作用が、Fcドメイン変異以外は同じアミノ酸配列を有するCD80 ECD融合分子の相互作用と比べて変化している。

【0093】

いくつかの実施形態では、CD80 ECDと融合パートナー（Fc融合パートナーなど）は、直接連結していて、FcのN末端またはC末端アミノ酸が、CD80 ECD配列のN末端またはC末端アミノ酸の直前または直後に位置するようになっている。（例えば、配列番号20及び21を参照されたい。）別の実施形態では、CD80 ECDと融合パートナーは、リンカー分子（リンカーペプチド配列、例えばGSリンカー配列など）によって連結されている。

【0094】

治療用組成物と治療方法
がんの治療方法

いくつかの実施形態では、がんの治療方法であって、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子を有効量投与することを含む方法を提供する。

【0095】

いくつかの実施形態では、がんは、良性（良性腫瘍ともいう）、前癌性または悪性であってよい。いくつかの実施形態では、がんは、固形がん細胞（すなわち「固形腫瘍」）を含んでもよく、あるいは、白血病のがん細胞を含んでもよい。いくつかの実施形態では、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、ヒトもしくは動物対象、または治療するがんのマウス同系もしくは異種移植モデルにおいて、がんの成長を低下させるのに有効である。いくつかの実施形態では、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、治療するがんのマウス同系または異種移植モデルなどにおいて、腫瘍体積を縮小させるのに有効である。

【0096】

治療してよい特定のがんの例としては、癌、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病が挙げられるが、これらに限らない。このようながんの、より具体的な非限定的な例としては、扁平上皮がん、小細胞肺癌、下垂体がん、食道がん、星状細胞腫、軟組織肉腫、非小細胞肺癌（扁平上皮非小細胞肺癌を含む）、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜がん、肝細胞がん、消化器がん、膵臓がん、神経膠肉腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、ヘパトーマ、乳がん、結腸がん、大腸がん、子宮体癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓がん、腎細胞癌、肝臓がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、肝臓癌、脳腫瘍、子宮体がん、精巣がん、胆管癌、胆嚢癌、胃がん、メラノーマ及び様々なタイプの頭頸部がん（頭頸部扁平上皮癌を含む）が挙げられるが、これらに限らない。

【0097】

上記方法の実施形態のいずれでも、対象に投与するCD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、マウス同系異種移植がんモデルにおいて、1週間、10日、2週間または3週間の期間にわたって、腫瘍の成長を、例えば少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%阻害できる。いくつかの実施形態では、CD80 ECD融合分子は、CT26マウス異種移植腫瘍モデルにおいて、接種から2週間または3週間で、腫瘍の成長を少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%阻害できる。いくつかのこのようなケースでは、融合分子は、1~3回、0.3~3mg/kg（0.3~0.6mg/kgなど）で投与してよい。上記方法の実施形態のいずれでも、対象に投与するCD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子の投与は、ヒトまたは動物対象において、例えば、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月または1年の期間にわたって、少なくとも1つの腫瘍の体積を少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%、少な

10

20

30

40

50

くとも95%または少なくとも98%縮小できる。いくつかのケースでは、CD80 ECD Fc融合分子は、マウス腫瘍モデル（CT26モデルなど）において、例えば、試験したマウスの有意な部分（マウスの少なくとも40%または少なくとも50%など）において、腫瘍を完全に退縮させることができると見られる。

【0098】

これらの方法のいずれでも、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、10~60モルのSA/1モルのCD80 ECD Fcタンパク質（15~60モルのSA/1モルのタンパク質など）を含むCD80 ECD Fcであってよい。いくつかの実施形態では、この含有量は、10~40モルのSA/1モルのタンパク質（15~40モルのSA/1モルのタンパク質、例えば、20~40モルのSA/1モルのタンパク質、20~30モルのSA/1モルのタンパク質、15~25モルのSA/1モルのタンパク質、15~30モルのSA/1モルのタンパク質または30~40モルのSA/1モルのタンパク質など）である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、少なくとも15モル（少なくとも20モル、少なくとも25モル、少なくとも30モル、少なくとも35モルまたは少なくとも40モルなど）のSA/1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、15モル、20モル、25モル、30モル、35モルまたは40モルのSA/1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG1、IgG2またはIgG4 Fcドメインである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、融合分子は、配列番号20または21のアミノ酸配列を含む。

10

20

【0099】

PD-1/PD-L1インヒビターを含む免疫刺激剤との併用治療

いくつかの実施形態では、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子を投与して、有効量の少なくとも1つの免疫刺激剤と組み合わせて、上記のがんの1つを治療する。免疫刺激剤としては、例えば、小分子薬物または生体物質を挙げてよい。生体的な免疫刺激剤の例としては、抗体、抗体断片、例えば、レセプターとリガンドの結合をブロックするレセプターまたはリガンドポリペプチドの断片、ワクチン及びサイトカインが挙げられるが、これらに限らない。

【0100】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、免疫刺激分子（共刺激分子を含む）のアゴニストを含み、いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、免疫抑制分子（共抑制分子を含む）のアンタゴニストを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、免疫細胞（T細胞など）で見られる免疫刺激分子（共刺激分子を含む）のアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、免疫細胞（T細胞など）で見られる免疫抑制分子（共抑制分子を含む）のアンタゴニストを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、自然免疫に關与する細胞（NK細胞など）で見られる免疫刺激分子（共刺激分子を含む）のアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、自然免疫に關与する細胞（NK細胞など）で見られる免疫抑制分子（共抑制分子を含む）のアンタゴニストを含む。いくつかの実施形態では、この併用により、治療する対象における抗原特異的なT細胞応答を増強し、及び/または対象における自然免疫応答を増強する。いくつかの実施形態では、併用により、CD80 ECDもしくはCD80 ECD融合分子または免疫刺激剤を単独で投与した場合と比べて、動物がんモデル（同系または異種移植モデルなど）において、抗腫瘍応答が改善する。いくつかの実施形態では、併用により、CD80 ECDもしくはCD80 ECD融合分子または免疫刺激剤を単独で投与した場合と比べて、動物がんモデル（同系または異種移植モデルなど）において、相乗的な応答が生じる。

30

40

【0101】

上記併用療法の実施形態のいずれでも、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子を免疫刺激剤（PD-1/PD-L1インヒビターなど）と組み合わせたものであ

50

て、対象に投与するものは、マウス同系または異種移植がんモデルにおいて、1週間、10日、2週間または3週間の期間にわたって、腫瘍の成長を、例えば少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%阻害できる。上記併用療法の実施形態のいずれでも、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子を免疫刺激剤（PD-1 / PD-L1インヒビターなど）と組み合わせたものであって、対象に投与するものは、対象または動物モデルにおいて、例えば、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月または1年の期間にわたって、少なくとも1つの腫瘍の体積を少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%縮小できる。

10

【0102】

併用療法のいずれでも、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、10~60モルのSA / 1モルのCD80 ECD Fcタンパク質（15~60モルのSA / 1モルのタンパク質など）を含むCD80 ECD Fcであってよい。いくつかの実施形態では、この含有量は、10~40モルのSA / 1モルのタンパク質（15~40モルのSA / 1モルのタンパク質、例えば、20~40モルのSA / 1モルのタンパク質、20~30モルのSA / 1モルのタンパク質、15~25モルのSA / 1モルのタンパク質、15~30モルのSA / 1モルのタンパク質または30~40モルのSA / 1モルのタンパク質など）である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、少なくとも15モル（少なくとも20モル、少なくとも25モル、少なくとも30モル、少なくとも35モルまたは少なくとも40モルなど）のSA / 1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、15モル、20モル、25モル、30モル、35モルまたは40モルのSA / 1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG1、IgG2またはIgG4 Fcドメインである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、融合分子は、配列番号20または21のアミノ酸配列を含む。

20

【0103】

特定の実施形態では、免疫刺激剤は、免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）のメンバーである刺激または抑制分子を標的とする。例えば、免疫刺激剤は、ポリペプチドのB7ファミリーの別のメンバーを標的とする（またはその別のメンバーに特異的に結合する）薬剤であってよい。免疫刺激剤は、膜結合リガンドのTNFファミリーのメンバー、またはTNFファミリーのメンバーに特異的に結合する共刺激もしくは共抑制レセプターを標的とする薬剤であってよい。免疫刺激剤の標的としてよい例示的なTNF及びTNFRファミリーメンバーとしては、CD40及びCD40L、OX-40、OX-40L、GITR、GITRL、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137（4-1BB）、TRAIL / Apo2-L、TRAILR1 / DR4、TRAILR2 / DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR / Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LT α R、LIGHT、DcR3、HVEM、VEG1 / TL1A、TRAMP / DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、リンホトキシン α / TNF、TNFR2、TNF β 、LT α R、リンホトキシン β 1 2、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY及びNGFRが挙げられる。

30

40

【0104】

いくつかの実施形態では、免疫刺激剤は、(i) T細胞の活性化を阻害するタンパク質（例えば、免疫チェックポイントインヒビター）（CTLA4、LAG-3、TIM3、ガレクチン9、CEACAM-1、BTLA、CD69、ガレクチン-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、B7-H3、B7-H4、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1、TIM-4及びILT4など）のアンタゴニストを含んでよく、ならびに / または(ii) T細胞の活性化を刺激するタンパク質（

50

B7-2、CD28、4-1BB(CD137)、4-1BBL、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、GITR、GITRL、CD70、CD27、CD40、CD40L、DR3及びCD28Hなど)のアゴニストを含んでよい。

【0105】

いくつかの実施形態では、免疫刺激剤は、T細胞の活性化を阻害するサイトカイン(例えば、IL-6、IL-10、TGF- β 、VEGF及びその他の免疫抑制サイトカイン)を阻害するか、またはそのアンタゴニストである薬剤を含んでよく、いくつかの実施形態では、免疫刺激剤は、T細胞の活性化を刺激するサイトカイン(IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21及びIFN γ など)のアゴニスト(例えば、サイトカイン自体)である薬剤を含んでよい。いくつかの実施形態では、免疫刺激剤は、ケモカイン(CXCR2(例えばMK-7123)、CXCR4(例えばAMD3100)、CCR2またはCCR4(モガムリズマブ)など)のアンタゴニストを含んでよい。

10

【0106】

いくつかの実施形態では、免疫刺激剤としては、NK細胞上の抑制レセプターのアンタゴニストまたはNK細胞上の活性化レセプターのアゴニストを挙げてよい。例えば、CD80/CD86またはCD80/CD86融合分子は、KIRのアンタゴニストと組み合わせることができる。

【0107】

免疫刺激剤としては、TGF- β シグナル伝達を阻害する薬剤、腫瘍抗原提示を増強する薬剤、例えば、樹状細胞ワクチン、GM-CSF分泌細胞ワクチン、CpGオリゴヌクレオチド及びイミキモド、または腫瘍細胞の免疫原性を増強する治療剤(例えばアントラサイクリン)も挙げてよい。

20

【0108】

免疫刺激剤としては、メソセリン標的ワクチンまたは弱毒化リステリアがんワクチン(CRS-207など)のような特定のワクチンも挙げてよい。

【0109】

免疫刺激剤は、Treg細胞を枯渇またはブロックする薬剤(CD25に特異的に結合する薬剤など)も含んでよい。

【0110】

免疫刺激剤は、インドールアミンジオキシゲナーゼ(IDO)、ジオキシゲナーゼ、アルギナーゼまたは一酸化窒素シンターゼなどの代謝酵素を阻害する薬剤も含んでよい。

30

【0111】

免疫刺激剤は、アデノシンの形成を阻害するか、またはアデノシンA_{2A}レセプターを阻害する薬剤も含んでよい。

【0112】

免疫刺激剤は、T細胞のアネルギーまたは疲弊を逆転/予防する薬剤と、腫瘍部位において自然免疫の活性化及び/または炎症を誘発する薬剤も含んでよい。

【0113】

いくつかの実施形態では、免疫刺激剤は、CD40アゴニスト(CD40アゴニスト抗体など)を含んでよい。CD80/CD86またはCD80/CD86融合分子は、免疫経路の複数の要素を標的とするコンビナトリアルなアプローチ(腫瘍抗原提示を増強する少なくとも1つの薬剤(例えば、樹状細胞ワクチン、GM-CSF分泌細胞ワクチン、CpGオリゴヌクレオチド、イミキモド)、例えば、CTLA4経路を阻害するか、及び/またはTregもしくはその他の免疫抑制細胞を枯渇もしくはブロックすることによって、負の免疫調節を阻害する少なくとも1つの薬剤、例えば、CD-137、OX-40及び/もしくはGITR経路を刺激し、ならびに/またはT細胞のエフェクター機能を刺激するアゴニストによって、正の免疫調節を刺激する療法、抗腫瘍T細胞の出現頻度を全身的に向上させる少なくとも1つの薬剤、例えば、CD25のアンタゴニスト(例えばダクリズマブ)を用いるか、またはエキソピボ抗CD25ピーズ枯渇法によって、Treg(腫瘍におけるTregなど)を枯渇または阻害する療法、腫瘍におけるサブレッサー骨髄系細

40

50

胞の機能に影響を及ぼす少なくとも1つの薬剤、腫瘍細胞の免疫原性を増強する治療剤（例えばアントラサイクリン）、遺伝子改変細胞、例えば、キメラ抗原レセプターによって改変した細胞（CAR-T療法）を含む養子T細胞またはNK細胞移入、代謝酵素（インドールアミンジオキシゲナーゼ（IDO）、ジオキシゲナーゼ、アルギナーゼまたは一酸化窒素シンターゼなど）を阻害する少なくとも1つの薬剤、T細胞のアネルギーまたは疲弊を逆転/予防する少なくとも1つの薬剤、腫瘍部位において自然免疫の活性化及び/または炎症を誘発する療法、免疫刺激サイトカインの投与、または免疫抑制サイトカインのブロックのうちの1つ以上など）とも組み合わせよう。

【0114】

例えば、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、正の共刺激レセプターをライゲーションする1つ以上のアゴニスト剤と、抑制レセプターを通じてシグナル伝達を減弱させる1つ以上のアンタゴニスト（ブロッキング剤）（腫瘍微小環境内の別個の免疫抑制経路を抑えるアンタゴニストなど）と、（例えば、CD25を阻害することによって）抗腫瘍免疫細胞（T細胞など）の出現頻度を全身的に向上させ、Tregを枯渇または阻害する1つ以上の薬剤と、代謝酵素（IDOなど）を阻害する1つ以上の薬剤と、T細胞のアネルギーまたは疲弊を逆転/予防する1つ以上の薬剤と、腫瘍部位において自然免疫の活性化及び/または炎症を誘発する1つ以上の薬剤とともに用いることができる。

10

【0115】

一実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、CTLA4アンタゴニスト（アンタゴニストCTLA4抗体など）を含む。好適なCTLA4抗体としては、例えば、YERVOY（イピリムマブ）またはトレメリムマブが挙げられる。

20

【0116】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、LAG-3アンタゴニスト（アンタゴニストLAG-3抗体など）を含む。好適なLAG-3抗体としては、例えば、BMS-986016（WO10/19570、WO14/08218）、またはIMP-731もしくはIMP-321（WO08/132601、WO09/44273）が挙げられる。

【0117】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、CD137（4-1BB）アゴニスト（アゴニストCD137抗体など）を含む。好適なCD137抗体としては、例えば、ウレルマブまたはPF-05082566（WO12/32433）が挙げられる。

30

【0118】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、GITRアゴニスト（アゴニストGITR抗体など）を含む。好適なGITR抗体としては、例えば、TRX-518（WO06/105021、WO09/009116）、MK-4166（WO11/028683）またはWO2015/031667に開示されているGITR抗体が挙げられる。

【0119】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、OX40アゴニスト（アゴニストOX40抗体など）を含む。好適なOX40抗体としては、例えば、MEDI-6383、MEDI-6469またはMOXR0916（RG7888、WO06/029879）が挙げられる。

40

【0120】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、CD27アゴニスト（アゴニストCD27抗体など）を含む。好適なCD27抗体としては、例えば、バルリルマブ（CDX-1127）が挙げられる。

【0121】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、B7H3を標的とするMGA271（WO11/109400）を含む。

50

【0122】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、KIRアンタゴニスト（リリルマブなど）を含む。

【0123】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、IDOアンタゴニストを含む。IDOアンタゴニストとしては、例えば、INCB-024360（WO2006/122150、WO07/75598、WO08/36653、WO08/36642）、インドキシモド、NLG-919（WO09/73620、WO09/1156652、WO11/56652、WO12/142237）またはF001287が挙げられる。

10

【0124】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、Toll様レセプターアゴニスト、例えば、TLR2/4アゴニスト（例えば、カルメット・ゲラン桿菌）、TLR7アゴニスト（例えば、Hiltonolまたはイミキモド）、TLR7/8アゴニスト（例えばResiquimod）またはTLR9アゴニスト（例えばCpG7909）を含む。

【0125】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫刺激剤は、TGF-インヒビター、例えば、GC1008、LY2157299、TEW7197またはIMC-TR1を含む。

20

【0126】

いくつかの実施形態では、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子を投与して、有効量のPD-1/PD-L1インヒビターと組み合わせて、上記のがんの1つを治療する。

【0127】

例示的なPD-1/PD-L1インヒビター

PD-1/PD-L1インヒビターとしては、抗体、融合タンパク質及びペプチドが挙げられる。PD-1/PD-L1インヒビターである非限定的な例示的融合タンパク質は、AMP-224（Amplimmune、GlaxoSmithKline）である。PD-1/PD-L1インヒビターである非限定的な例示的ペプチドは、AUR-012

30

【0128】

いくつかの実施形態では、併用すると、動物がんモデル（異種移植モデルなど）において、CD80 ECDもしくはCD80 ECD融合分子、またはPD-1/PD-L1インヒビターのいずれかを単独で投与した場合と比べて、抗腫瘍応答が改善する。いくつかの実施形態では、併用すると、動物がんモデル（異種移植モデルなど）において、CD80 ECDもしくはCD80 ECD融合分子、またはPD-1/PD-L1インヒビターのいずれかを単独で投与した場合と比べて、相乗的な応答が生じる。

40

【0129】

PD-1は、活性化T細胞及びB細胞によって発現される重要な免疫チェックポイントレセプターであり、免疫抑制を媒介する。PD-1は、レセプターのCD28ファミリーのメンバーであり、このファミリーメンバーとしては、CD28、CTLA4、ICOS、PD-1及びBTLAが挙げられる。PD-1に対する2つの細胞表面糖タンパク質リガンド（プログラム死リガンド-1（PD-L1）とプログラム死リガンド-2（PD-L2））が同定されている。これらのリガンドは、抗原提示細胞と多くのヒトがんが発現し、PD-1に結合すると、T細胞の活性化とサイトカインの分泌をダウンレギュレートすることが示されている。PD-1/PD-L1の相互作用の阻害によって、前臨床モデルにおいて、強力な抗腫瘍活性が媒介される。

50

【0130】

PD-1に高い親和性で特異的に結合するヒトモノクローナル抗体(HuMAb)は、米国特許第8,008,449号に開示されている。その他の抗PD-1 mAbは、例えば、米国特許第6,808,710号、同第7,488,802号、同第8,168,757号及び同第8,354,509号、ならびに国際公開第2012/145493号に記載されている。米国特許第8,008,449号に開示されている抗PD-1 HuMAbはそれぞれ、(a) 1×10^{-7} M以下の K_D (Biocoreのバイオセンサーシステムを用いて表面プラズモン共鳴によって判定)で、ヒトPD-1に結合し、(b) ヒトCD28、CTLA-4またはICOSには実質的には結合せず、(c) 混合リンパ球反応(MLR)アッセイにおいて、T細胞の増殖を増大させ、(d) MLRアッセイにおいて、インターフェロンの産生を増大させ、(e) MLRアッセイにおいて、IL-2の分泌を増大させ、(f) ヒトPD-1とカニクイザルPD-1に結合し、(g) PD-L1及び/もしくはPD-L2のPD-1への結合を阻害し、(h) 抗原特異的なメモリー応答を刺激し、(i) 抗体応答を刺激し、ならびに/または(j) インビボにおいて、腫瘍細胞の成長を阻害する。本発明で有用な抗PD-1抗体としては、ヒトPD-1に特異的に結合する抗体が挙げられ、これらの抗体は、上記の特徴(a)~(j)のうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つまたは少なくとも5つを示す。

10

【0131】

一実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブである。ニボルマブ(「Opdivo(登録商標)」)としても知られており、以前は、5C4、BMS-936558、MDX-1106またはONO-4538と称されていた)は、PD-1リガンド(PD-L1及びPD-L2)との相互作用を選択的に防ぐことによって、抗腫瘍T細胞の機能のダウンレギュレーションをブロックする完全ヒトIgG4(S228P)PD-1免疫チェックポイントインヒビター抗体である(米国特許第8,008,449号、Wang et al., 2014 Cancer Immunol Res. 2(9): 846-56)。

20

【0132】

別の実施形態では、抗PD-1抗体は、ペムプロリズマブである。ペムプロリズマブ(「Keytruda(登録商標)」、ランプロリズマブ及びMK-3475としても知られている)は、ヒト細胞表面レセプターPD-1(プログラム死-1またはプログラム細胞死-1)に対するヒト化モノクローナルIgG4抗体である。ペムプロリズマブは、例えば、米国特許第8,900,587号で説明されており、「www.dot.cancer.gov/drugdictionary?cdrd=695789」というアドレスのサイト(最終アクセス: 2014年12月14日)も参照されたい。ペムプロリズマブは、再発性または難治性メラノーマの治療用として、FDAに承認されている。

30

【0133】

別の実施形態では、抗PD-1抗体は、PD-1レセプターに対するモノクローナル抗体であるMED10608(以前はAMP-514)である。MED10608は、例えば、米国特許第8,609,089B2号またはwww.dot.cancer.gov/drugdictionary?cdrd=756047(最終アクセス: 2014年12月14日)で説明されている。

40

【0134】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ヒト化モノクローナル抗体であるピジリズマブ(CT-011)である。ピジリズマブは、米国特許第8,686,119B2号またはWO2013/014668A1で説明されている。

【0135】

開示されている方法において有用な抗PD-1抗体としては、ヒトPD-1に特異的に結合するとともに、ヒトPD-1への結合に対して、ニボルマブと交差競合する単離抗体も挙げられる(例えば、米国特許第8,008,449号、WO2013/173223

50

を参照されたい)。抗体が、抗原への結合に対して交差競合する能力によって、これらの抗体が、抗原の同じエピトープ領域に結合し、他の交差結合抗体のその特定のエピトープ領域への結合を立体的に妨害することが示される。これらの交差競合抗体は、PD-1の同じエピトープ領域に結合することから、ニボルマブの機能的特性と非常に似た機能的特性を有すると予測される。交差競合抗体は、ニボルマブと交差競合する能力に基づき、標準的なPD-1結合アッセイ(Biacore解析、ELISAアッセイまたはフローサイトメトリーなど)において、容易に同定できる(例えば、WO2013/173223を参照されたい)。

【0136】

特定の実施形態では、ヒトPD-1への結合に対してニボルマブと交差競合するか、または、ヒトPD-1のエピトープ領域うち、ニボルマブと同じエピトープ領域に結合する抗体は、モノクローナル抗体である。これらの交差競合抗体は、ヒト対象への投与用に、キメラ抗体であることも、またはヒト化抗体もしくはヒト抗体であることもできる。

10

【0137】

開示されている発明の方法において有用な抗PD-1抗体としては、上記の抗体の抗原-結合部分も挙げられる。例としては、(i) V_L 、 V_H 、 C_L 及び C_{H1} ドメインからなる一価の断片であるFab断片、(ii) ヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結された2個のFab断片を含む二価の断片であるF(ab')₂断片、(iii) V_H 及び C_{H1} ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一アームの V_L 及び V_H ドメインからなるFv断片が挙げられる。

20

【0138】

CD80 ECDまたはCD80 ECD融合タンパク質を免疫刺激剤またはPD-1/PD-L1インヒビターと組み合わせて投与すること

いくつかの実施形態では、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子と、免疫刺激剤またはPD-1/PD-L1インヒビターを同時に投与する。いくつかの実施形態では、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子と、免疫刺激剤またはPD-1/PD-L1インヒビターを順次に投与する。いくつかの実施形態では、免疫刺激剤またはPD-1/PD-L1インヒビターの投与前に、少なくとも1用量、少なくとも2用量、少なくとも3用量、少なくとも5用量または少なくとも10用量のCD80 ECDまたはCD80融合分子を投与する。いくつかの実施形態では、CD80 ECDまたはCD80融合分子の投与前に、少なくとも1用量、少なくとも2用量、少なくとも3用量、少なくとも5用量または少なくとも10用量の免疫刺激剤またはPD-1/PD-L1インヒビターを投与する。いくつかの実施形態では、免疫刺激剤またはPD-1/PD-L1インヒビターの最後の用量は、CD80 ECDまたはCD80融合分子の最初の用量の少なくとも1日、2日、3日、5日、10日、1週間、2週間、3週間、5週間、12週間または24週間前に投与する。いくつかの他の実施形態では、CD80 ECDまたはCD80融合分子の最後の用量は、免疫刺激剤またはPD-1/PD-L1インヒビターの最初の用量の少なくとも1日、2日、3日、5日、10日、1週間、2週間、3週間、5週間、12週間または24週間前に投与する。いくつかの実施形態では、対象は、免疫刺激剤またはPD-1/PD-L1インヒビターによる治療を受けたことがあるか、または受けている者であり、CD80 ECDまたはCD80融合分子を治療レジメンに加える。

30

40

【0139】

いくつかの実施形態では、対象は、免疫刺激剤またはPD-1/PD-L1インヒビターに対する応答が不十分な者である(すなわち、1つ以上の免疫刺激剤またはPD-1/PD-L1インヒビターに対する耐性を示す者である)。PD-1/PD-L1インヒビターに対する応答が不十分な対象は、例えば、以前は、PD-1/PD-L1インヒビターに反応したことがあってよく、PD-1/PD-L1インヒビターに対する応答性が低下した者であっても、または、その対象は、PD-1/PD-L1インヒビターに反応したことがなくてもよい。免疫刺激剤またはPD-1/PD-L1インヒビターに対する不

50

十分な応答とは、標準的な用量のPD-1/PD-L1インヒビターの投与後に改善すると予測された状態の特徴が改善しないか、及び/または標準的な用量を上回る用量を投与した場合のみに改善が見られることを意味する。いくつかの実施形態では、免疫刺激剤またはPD-1/PD-L1インヒビターに対する応答が不十分な者は、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも6週間または少なくとも12週間、標準的な用量の投与を受けた後に、その薬物に対する応答が不十分であったことがあるか、または不十分である。免疫刺激剤またはPD-1/PD-L1インヒビターの「標準的な」用量は、医療専門家が判断でき、対象の年齢、体重、病歴、疾患の重症度、投与頻度などに左右されることがある。いくつかの実施形態では、免疫刺激剤またはPD-1/PD-L1インヒビターに対する応答が不十分な者は、抗PD-1抗体及び/または抗PD-L1抗体に対する応答が不十分であったことがあるか、または不十分である。いくつかの実施形態では、PD-1/PD-L1インヒビターに対する応答が不十分な者は、AMP-224に対する応答が不十分であったことがあるか、または不十分である。いくつかの実施形態では、PD-1/PD-L1インヒビターに対する応答が不十分な者は、ニボルマブ、ピジリズマブ及びペムブロリズマブから選択したPD-1/PD-L1インヒビターに対する応答が不十分であったことがあるか、または不十分である。

10

【0140】

上記の実施形態のいずれでも、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子をPD-1/PD-L1インヒビターと組み合わせたものであって、対象に投与するものは、マウス同系または異種移植がんモデルにおいて、1週間、10日または2週間の期間にわたって、腫瘍の成長を、例えば少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%阻害できる。上記併用療法の実施形態のいずれでも、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子をPD-1/PD-L1インヒビターと組み合わせたものであって、対象に投与するものは、対象または動物モデル対象において、少なくとも1つの腫瘍の体積を少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%、例えば、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月または1年の期間にわたって縮小できる。

20

30

【0141】

これらの併用療法のいずれでも、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、10~60モルのSA/1モルのCD80 ECD Fcタンパク質(15~60モルのSA/1モルのタンパク質など)を含むCD80 ECD Fcであってよい。いくつかの実施形態では、この含有量は、10~40モルのSA/1モルのタンパク質(15~40モルのSA/1モルのタンパク質、例えば、20~40モルのSA/1モルのタンパク質、20~30モルのSA/1モルのタンパク質、15~25モルのSA/1モルのタンパク質、15~30モルのSA/1モルのタンパク質または30~40モルのSA/1モルのタンパク質など)である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、少なくとも15モル(少なくとも20モル、少なくとも25モル、少なくとも30モル、少なくとも35モルまたは少なくとも40モルなど)のSA/1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、15モル、20モル、25モル、30モル、35モルまたは40モルのSA/1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG1、IgG2またはIgG4 Fcドメインである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上記の融合分子は、配列番号20または21のアミノ酸配列を含む。

40

【0142】

投与経路と担体

様々な実施形態では、ポリペプチドと融合分子は、インピボで、様々な経路(経口経路、動脈内経路、非経口経路、鼻腔内経路、静脈内経路、筋肉内経路、心臓内経路、脳室内

50

経路、気管内経路、口腔内経路、直腸経路、腹腔内経路、皮内経路、局所経路、経皮及び髄腔内経路、または別段に、埋入もしくは吸入による経路が挙げられるが、これらに限らない)によって投与してよい。対象組成物は、固体、半固体、液体または気体形状の調製物(錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏剤、液剤、座剤、注腸剤、注射剤、吸入剤及びエアゾール剤が挙げられるが、これらに限らない)に調合してよい。文献に説明されているように、ポリペプチドをコードする核酸分子を金微粒子にコーティングして、粒子ボンバードメント器具または「遺伝子銃」によって皮内送達してよい(例えば、Tang et al., Nature 356:152-154(1992)を参照されたい)。適切な調合と投与経路は、意図する用途に従って選択してよい。

【0143】

様々な実施形態では、ポリペプチドを含む組成物は、広範な製薬学的に許容可能な担体とともに、製剤中で提供する(例えば、Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drug Facts Plus, 20th ed. (2003)、Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004)、Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)を参照されたい)。様々な製薬学的に許容可能な担体(ビヒクル、アジュバント及び希釈剤が挙げられる)が入手可能である。さらに、様々な製薬学的に許容可能な補助物質(pH調整剤、pH緩衝剤、浸透圧調整剤、安定剤、湿潤剤など)も入手可能である。非限定的な例示的担体としては、生理的食塩水、緩衝生理的食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール及びこれらを組み合わせたものが挙げられる。

【0144】

様々な実施形態では、ポリペプチドと融合分子を含む組成物は、それらを水性または非水性溶媒(植物油またはその他の油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸のエステルまたはプロピレングリコールなど)に、所望に応じて、従来の添加剤(溶解補助剤、等張化剤、懸濁化剤、乳化剤、安定剤及び保存剤など)とともに、溶解、懸濁または乳化することによって、皮下投与を含む注射用に調合してよい。様々な実施形態では、この組成物は、例えば、加圧した許容可能な噴射剤(ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素など)を用いて、吸入用に調合してよい。この組成物は、様々な実施形態では、生分解性または非生分解性ポリマーによるなどして、徐放マイクロカプセル剤に調合してもよい。非限定的な例示的生分解性調合物としては、ポリ乳酸-グリコール酸ポリマーが挙げられる。非限定的な例示的非生分解性調合物としては、ポリグリセリン脂肪酸エステルが挙げられる。このような調合物を作成する特定の方法は、例えば、EP 1 125 584 A 1で説明されている。

【0145】

1つ以上の容器であって、それぞれ、1用量以上のポリペプチドまたはポリペプチドを組み合わせたものを含む医薬パック及びキットも提供する。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の薬剤とともに、または1つ以上の追加の薬剤なしに、ポリペプチドまたはポリペプチドを組み合わせたものを含む組成物を所定量含む単位投与量を提供する。いくつかの実施形態では、このような単位投与量は、予め充填する使い捨ての注射用シリンジ内に供給する。様々な実施形態では、この単位投与量に含まれる組成物は、生理的食塩水、スクロースなど、緩衝剤(ホスフェート)などを含んでよく、及び/または安定かつ有効なpH範囲内に調合してよい。あるいは、いくつかの実施形態では、この組成物は、適切な液体、例えば滅菌水を加えると再構成できる凍結乾燥粉末として供給してよい。いくつかの実施形態では、この組成物は、タンパク質の凝集を阻害する1つ以上の物質(スクロース及びアルギニンが挙げられるが、これらに限らない)を含む。いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、ヘパリン及び/またはプロテオグリカンを含む。

10

20

30

40

50

【0146】

医薬組成物は、具体的な適応症の治療または予防に有効な量で投与する。治療有効量は典型的には、治療する対象の体重、その対象の身体的状態もしくは健康状態、治療する状態の広範性、または治療する対象の年齢に左右される。いくつかの実施形態では、PD-1 / PD-L1 インヒビター（抗体または融合タンパク質など）は、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子とともに、1～4 mg / kgの用量で投与する。いくつかの実施形態では、PD-1 / PD-L1 インヒビターは、1 mg / kg、2 mg / kg、3 mg / kgまたは4 mg / kgの用量で投与する。

【0147】

投与頻度の判断は、主治医などの当業者が、治療する状態、治療する対象の年齢、治療する状態の重症度、治療する対象の全般的な健康状態などの検討に基づき行ってよい。いくつかの実施形態では、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子の有効用量を対象に1回以上投与する。様々な実施形態では、有効用量を対象に、1カ月に1回、1カ月に1回未満（例えば、2カ月ごとまたは3カ月ごと）投与する。別の実施形態では、1カ月に1回超（例えば、3週間ごと、2週間ごとまたは毎週など）、有効用量を投与する。いくつかの実施形態では、1週間、2週間、3週間、4週間または5週間に1回、有効用量を投与する。いくつかの実施形態では、1週間に2回または3回、有効用量を投与する。少なくとも1回、有効用量を対象に投与する。いくつかの実施形態では、複数回（少なくとも1カ月、少なくとも6カ月または少なくとも1年の期間を含む）、有効用量を投与してよい。

10

20

【0148】

追加の併用療法

CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、単独で投与しても、PD-1 / PD-L1 インヒビター及び/または他の治療様式とともに投与してもよい。CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、他の治療様式、例えば、手術、化学療法、放射線療法または別の生体物質の投与の前、実質的に同時または後に与えてもよい。いくつかの実施形態では、がんは、手術、化学療法及び放射線療法、またはこれらを組み合わせた療法から選択した療法の後に再発または進行したものである。

【0149】

がんの治療のために、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、1つ以上の追加の抗がん剤（化学療法剤、増殖阻害剤、血管新生阻害剤及び/または抗腫瘍組成物など）と併せて投与してよい。本発明の抗体と併用できる化学療法剤、増殖阻害剤、血管新生阻害剤、抗がん剤及び抗腫瘍組成物の非限定的な例は、下記の定義に示されている。

30

【0150】

上記併用療法の実施形態のいずれでも、対象に行う療法は、マウス同系または異種移植がんモデルにおいて、1週間、10日または2週間の期間にわたって、腫瘍の成長を、例えば少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%阻害できる。上記併用療法の実施形態のいずれでも、対象に行う療法は、対象または動物モデル対象において、少なくとも1つの腫瘍の体積を少なくとも10%、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%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%、例えば1カ月、2カ月、3カ月、6カ月または1年の期間にわたって縮小できる。

40

【0151】

これらのさらなる併用療法のいずれでも、CD80 ECDまたはCD80 ECD融合分子は、10～60モルのSA / 1モルのCD80 ECD Fcタンパク質（15～60モルのSA / 1モルのタンパク質など）を含むCD80 ECD Fcであってよい。いくつかの実施形態では、この含有量は、10～40モルのSA / 1モルのタンパク質（15～40モルのSA / 1モルのタンパク質、例えば、20～40モルのSA / 1モル

50

のタンパク質、20～30モルのSA/1モルのタンパク質、15～25モルのSA/1モルのタンパク質、15～30モルのSA/1モルのタンパク質または30～40モルのSA/1モルのタンパク質など)である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、少なくとも15モル(少なくとも20モル、少なくとも25モル、少なくとも30モル、少なくとも35モルまたは少なくとも40モルなど)のSA/1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、SA含有量は、15モル、20モル、25モル、30モル、35モルまたは40モルのSA/1モルのタンパク質である。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG1、IgG2またはIgG4 Fcドメインである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、融合分子は、配列番号20または21のアミノ酸配列を含む。

10

【0152】

「化学療法剤」は、がんの治療に有用な化学化合物である。化学療法剤の例としては、アルキル化剤(チオテパ及びCytosine(登録商標)というシクロホスファミドなど)、アルキルスルホネート(ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンなど)、アジリジン(ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ及びウレドーパなど)、エチレンイミン及びメチルメラミン(アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド及びトリメチロールメラミンを含む)、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(合成類似体トポテカン)、プリオスタチン、カリスタチン、CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成類似体を含む)、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(合成類似体のKW-2189及びCB1-TM1を含む)、エレウテロピン、パンクラチスタチン、サルコジクチン、スポンジスタチン、ナイトロジェンマスタード(クロラムブシル、クロロナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドハイドロクロライド、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなど)、ニトロソウレア(カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン及びラニムスチンなど)、抗生物質(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1I及びカリケアマイシンI1(例えば、Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)を参照されたい)など)、ダイネミシン(ダイネミシンAを含む)、ビスホスホネート(クロドロネートなど)、エスペラミシン、ネオカルジノスタチン発色団及び関連する色素タンパク質エンジン抗生物質発色団)、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、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、Adriamycin(登録商標)というドキソルピシン(モルホリノ-ドキソルピシン、シアノモルホリノ-ドキソルピシン、2-ピロリノ-ドキソルピシン及びデオキシドキソルピシンを含む)、エビルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン(マイトマイシンCなど)、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、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、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、ゾルピシン、代謝拮抗剤(メトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)など)、葉酸類似体(デノブテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキセートなど)、プリン類縁体(フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなど)、ピリミジン類縁体(アンシタピン、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、エノシタピン、フロクスウリジンなど)、アンドロゲン(カルステロン、ドロモスタノロンプロピオネート、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなど)、抗副腎剤(アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなど)、葉酸補充剤(フロリン酸など)、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレプリン酸

20

30

40

50

、エニルウラシル、アムサクリン、ベストラブシル、ピサントレン、エダトレキサート、デフォファミン、デメコルチン、ジアジクオン、エルフォルニチン、エリブチニウムアセテート、エポチロン、エトグルシド、ガリウムニトレート、ヒドロキシウレア、レンチナン、ロニダミン、メイトンシノイド（メイトンシン及びアンサマイトシンなど）、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モビダンモール、ニトラエリン、ペントスタチン、フェナメット、ピラルピシン、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（登録商標）という多糖複合体（オレゴン州ユージーンのJHS Natural Products）、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トキシン、ベラキュリンA、ロリジンA及びアングエイジン）、ウレタン、ピンデシン、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、ピボプロマン、ガシトシン、アラビノシド（「Ara - C」）、シクロホスファミド、チオテパ、タキソイド、例えばTaxol（登録商標）というパクリタキセル（ニュージャージー州プリンストンのBristol - Myers Squibb Oncology）、Abraxane（登録商標）というパクリタキセルのクレモフォア無添加アルブミン改変ナノ粒子製剤（イリノイ州シャンバーグのAmerican Pharmaceutical Partner）及びTaxotere（登録商標）というドキシセタキセル（フランスのアントニーのRhone - Poulenc Rorer）、クロランブシル、Gemzar（登録商標）というゲムシタピン、6 - チオグアニン、メルカプトプリン、メトトレキサート、白金類縁体（シスプラチン、オキサリプラチン及びカルボプラチンなど）、ピンブラスチン、白金、エトポシド（VP - 16）、イホスファミド、ミトキサントロン、ピンクリスチン、Navelbine（登録商標）というビノレルピン、ノバントロン、テニポシド、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、イリノテカン（Camptosar, CPT - 11）（イリノテカンと、5 - FU及びロイコボリンとの治療レジメンを含む）、トポイソメラーゼインヒビターRFS 2000、ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）、レチノイド（レチノイン酸など）、カペシタピン、コンプレタスタチン、ロイコボリン（LV）、オキサリプラチン（オキサリプラチン治療レジメン（FOLFOX）を含む）、細胞の増殖を低下させる、PKC - 、Raf、H - Ras、EGFR及びVEGF - Aのインヒビター（例えば、エルロチニブ（Tarceva（登録商標）））、ならびに上記のいずれかの製薬学的に許容可能な塩、酸または誘導体が挙げられるが、これらに限らない。

【0153】

さらなる非限定的な例示的薬学療法剤としては、ホルモンのがんに対する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（抗エストロゲン及び選択的エストロゲンレセプターモジュレーター（SERM）（例えば、タモキシフェン（Nolvadex（登録商標））というタモキシフェンを含む）、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、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Fareston（登録商標）というトレミフェンを含む）など）、副腎でのエストロゲンの産生を調節する酵素のアロマターゼを阻害するアロマターゼインヒビター（例えば、4（5） - イミダゾール、アミノグルテチミド、Megase（登録商標）というメゲストロールアセテート、Aromasin（登録商標）というエキセメスタン、フォルメスタン、ファドロゾール、Rivisor（登録商標）というボロゾール、Femara（登録商標）というレトロゾール及びArimidex（登録商標）というアナastroゾールなど）、抗アンドロゲン（フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド及びゴセレリンなど）、トロキサシタピン（1, 3 - ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、接着細胞の増殖に関するシグナル伝達経路における遺伝子（例えば、PKC - 、Raf及びH - Rasなど）の発現を阻害するもの、リボザイム（VEGF発現インヒビター（例えば、Angiozyme（登録商標））というリボザイムなど）及びHER2発現インヒビターなど）、ワクチン（遺伝子療法ワクチン、例えば、Allovectin（登録商標）というワクチン

ン、Leuvectin（登録商標）というワクチン及びVaxid（登録商標）というワクチンなど）、Proleukin（登録商標）というrIL-2、Lurtotecan（登録商標）というトポイソメラーゼ1インヒビター、Abarelix（登録商標）というrmRH、ならびに上記のいずれかの製薬学的に許容可能な塩、酸または誘導体が挙げられる。

【0154】

「血管新生阻害剤」または「血管新生インヒビター」とは、血管新生、脈管形成または望ましくない血管透過性を直接または間接的に阻害する小分子量物質、ポリヌクレオチド（例えば、抑制RNA（RNAiもしくはsiRNA）を含む）、ポリペプチド、単離タンパク質、組み換えタンパク質、抗体、またはそのコンジュゲート体もしくは融合タンパク質を指す。血管新生阻害剤には、血管新生因子またはそのレセプターと結合し、その血管新生活性をブロックする薬剤が含まれることを理解されたい。例えば、血管新生阻害剤は、血管新生物質に対する抗体またはその他のアンタゴニスト、例えば、VEGF-Aに対する抗体（例えばベバシズマブ（Avastin（登録商標）））またはVEGF-Aレセプターに対する抗体（例えばKDRレセプターもしくはFlt-1レセプター）、抗PDGFRインヒビター（Gleevec（登録商標）（イマチニブメシレート））、VEGFレセプターのシグナル伝達をブロックする小分子（例えば、PTK787/ZK2284、SU6668、Sutent（登録商標）/SU11248（スニチニブマレート）、AMG706または例えば国際公開第2004/113304号に記載されているもの）である。抗血管新生剤には、ネイティブな血管新生インヒビター、例えば、アンジオスタチン、エンドスタチンなども含まれる。例えば、Klagsbrun and D'Amore（1991）Annu. Rev. Physiol. 53: 217-39、Streit and Detmar（2003）Oncogene 22: 3172-3179（例えば、悪性メラノーマにおける抗血管新生療法を列挙している表3）、Ferrara & Allitalo（1999）Nature Medicine 5（12）: 1359-1364、Tonini et al.（2003）Oncogene 22: 6549-6556（例えば、既知の抗血管新生因子を列挙している表2）及びSato（2003）Int. J. Clin. Oncol. 8: 200-206（例えば、臨床試験で用いた抗血管新生剤を列挙している表1）を参照されたい。

【0155】

「増殖阻害剤」とは、本明細書で使用する場合、インビトロまたはインビボのいずれかで、細胞（VEGFを発現する細胞など）の成長を阻害する化合物または組成物を指す。したがって、増殖阻害剤は、S期における細胞（VEGFを発現する細胞など）の割合を有意に低下させる薬剤であってよい。増殖阻害剤の例としては、（S期以外の周期に）細胞周期の進行をブロックする薬剤（G1停止及びM期停止を誘導する薬剤など）が挙げられるが、これらに限らない。古典的なM期ロッカーとしては、ビンカ（ビンクリスチン及びピンブラスチン）、タキサン、ならびにトポイソメラーゼIIインヒビター（ドキシルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド及びブレオマイシンなど）が挙げられる。G1を停止するこれらの薬剤は、S期停止にまで影響を及ぼし、例えば、DNAアルキル化剤（タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル及びara-Cなど）である。さらに、Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995)、例えば13ページで情報を得ることができる。タキサン（パクリタキセル及びドセタキセル）はいずれも、イチイに由来する抗がん薬である。ヨーロッパイイチイに由来するドセタキセル（Taxotere（登録商標）、Rhône-Poulenc Rorer）は、パクリタキセル（Taxol（登録商標）、Bristol-Myers Squibb）の半合成類似体である。パクリタキセルとドセ

10

20

30

40

50

タキセルは、脱重合を防いで、細胞における有糸分裂の阻害を導くことによって、チューブリン二量体からの微小管の重合を促し、微小管を安定化する。

【0156】

「抗腫瘍組成物」という用語は、がんの治療に有用な組成物であって、少なくとも1つの活性治療剤を含む組成物を指す。治療剤の例としては、例えば、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞障害剤、放射線療法で用いる薬剤、血管新生阻害剤、PD-1/PD-L1インヒビターの他のがん免疫治療剤、アポトーシス剤、抗チューブリン剤、及びがんを治療するためのその他の薬剤（抗HER-2抗体、抗CD20抗体、上皮細胞成長因子レセプター（EGFR）アンタゴニスト（例えば、チロシンキナーゼインヒビター）、HER1/EGFRインヒビター（例えば、エルロチニブ（Tarceva（登録商標））、血小板由来成長因子インヒビター（例えば、Gleevec（登録商標）（イマチニブメシレート））、COX-2インヒビター（例えば、セレコキシブ）、インターフェロン、CTLA-4インヒビター（例えば、抗CTLA抗体イピリムマブ（YERVOY（登録商標）））、PD-L2インヒビター（例えば、抗PD-L2抗体）、TIM3インヒビター（例えば、抗TIM3抗体）、サイトカイン、ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR、BlyS、APRIL、BCMA、PD-L2、CTLA-4、TIM3またはVEGFレセプター（複数可）という標的の1つ以上に結合するアンタゴニスト（例えば、中和抗体）、TRAIL/Apo2、ならびにその他の生物活性有機化学剤など）が挙げられるが、これらに限らない。これらを組み合わせたものも、本発明に含まれる。

10

【実施例】

20

【0157】

下記で論じられている実施例は、本発明を純粹に例示するものとして意図されており、本発明を限定するものと決してみなすべきではない。下記の実験が、実施したすべてまたは唯一の実験であることを表すようには実施例は意図されていない。使用した数値（例えば、量、温度など）は、正確になるように努めたが、ある程度の実験誤差及び偏差を考慮する必要がある。別段に示されていない限り、部は、重量部であり、分子量は、重量平均分子量であり、温度は、摂氏温度であり、圧力は、大気圧または大気圧近傍である。

【0158】

実施例1：CD80 ECD Fc融合分子は、マウス大腸癌細胞株CT26を移植したマウスにおいて、腫瘍の成長を低下させる

30

雌の7週齢BALB/cマウスをCharles River Laboratories（カリフォルニア州ホリスター）から購入し、2週間馴化してから、調査を開始した。マウス大腸癌細胞株CT26をマウスの右側腹部に、 1.0×10^6 細胞/ $200 \mu\text{l}$ /マウスで皮下移植した。接種前に、10%熱不活化ウシ胎仔血清（FBS）と2mMのL-グルタミンを添加したRPMI1640培地で、細胞を3継代未満で培養した。細胞を37℃で、5%CO₂を含む加湿雰囲気において成長させた。80~85%コンフルエントに達したら、細胞を回収し、無血清RPMI1640とMatrigel（登録商標）の1:1混合物に、1ミリリットル当たり 5×10^6 細胞で再懸濁した。

【0159】

細胞の移植後、マウスを週に2回、腫瘍の成長についてモニタリングした。腫瘍の測定では、ノギスを用いて、各腫瘍の長さ（mm）と幅（mm）を測定し、腫瘍体積（ mm^3 ）=（幅（mm）×長さ（mm））²/2という式に従って、体積を計算した。7日目に、すべての腫瘍を測定し、マウスを無作為に治療群に割り当てた。治療群に登録されたすべてのマウスの平均腫瘍体積は、 175mm^3 であった。RIPPS（サービスマーク）によって、マウスに、生理的食塩水またはプラスミドDNAを投与した。RIPPS（サービスマーク）によって投与したプラスミドDNAは、マウスCD80またはCTLA4の細胞外ドメイン（ECD）と、ヒトIgG2aのFcドメインの配列を含んでいた。腫瘍体積が、マウスの体重の10%を超えるか、または約 2000mm^3 になるまで、腫瘍の測定を少なくとも週に2回続けた。

40

【0160】

50

マウスにCT26細胞を移植した日に対して平均腫瘍体積をグラフ化することによって、腫瘍サイズの変化が示されている。(図1a。)マウスCD80 ECDを用いたRIPPSでは、コントロールの生理的食塩水に比べて、腫瘍の成長が有意に低下し($p < 0.05$)、その低下は、11日目に開始された(図1a~b)。P値は、調査の各日における腫瘍体積計算値の独立両側t検定解析を用いて計算した(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$)。腫瘍の成長のCD80 ECDによる阻害は、コントロールの生理的食塩水と比べて、78.8%であることが確認され、この値は、 $100 \times (1 - (\text{CD80における腫瘍体積の平均変化} / \text{生理的食塩水における腫瘍体積の平均変化}))$ として計算した。図1aに示されているように、マウスCTLA4-ECD Fcを用いたRIPPSでは、実際に、コントロールの生理的食塩水と比べて、腫瘍の成長が拡大した。この結果の説明の1つは、CTLA4-ECD Fcコンストラクトが、CD80に対するリガンドトラップとして作用し、CD80が、CD28に結合するのを防ぎ、腫瘍細胞に対するT細胞の活性を刺激した可能性があることである。

10

20

30

40

50

【0161】

実施例2：抗PD-1抗体と組み合わせたCD80 ECD Fc融合分子は、マウス大腸癌細胞株CT26を移植したマウスにおいて、腫瘍の成長を低下させる

雌の7週齢BALB/cマウスをCharles River Laboratories(カリフォルニア州ホリスター)から購入し、12日間馴化してから、調査を開始した。マウス大腸癌細胞株CT26をマウスの右側腹部に、 1.0×10^6 細胞/ $200 \mu\text{l}$ /マウスで皮下移植した。接種の前に、10%熱不活化ウシ胎仔血清(FBS)と2mMのL-グルタミンを添加したRPMI1640培地で、細胞を3継代未満で培養した。細胞を37℃で、5%CO₂を含む加湿雰囲気中で成長させた。80~85%コンフルエントに達したら、細胞を回収し、無血清RPMI1640とMatrigel(登録商標)の1:1混合物に、1ミリリットル当たり 5×10^6 細胞で再懸濁した。

【0162】

細胞の移植後、マウスを週に2回、腫瘍の成長についてモニタリングした。腫瘍の測定では、ノギスを用いて、各腫瘍の長さ(幅)を測定し、腫瘍体積(mm^3) = (幅(mm) × 長さ(mm))² / 2という式に従って、体積を計算した。7日目に、すべての腫瘍を測定し、マウスを無作為に治療群に割り当てた。治療群に登録されたすべてのマウスの平均腫瘍体積は、約 150mm^3 であった。RIPPS(サービスマーク)によって、マウスに、マウスCD80 ECDと、ヒトIgG2a由来のFcまたはFcのみ(ネガティブコントロール)をコードするプラスミドDNAを投与した。抗PD1(クローンRMP1-14)またはラットIgG2a(クローン2A3、ネガティブコントロール)においては、タンパク質を投与した。投与群は、1)Fc RIPPS(サービスマーク)及びラットIgG2a、2)CD80 RIPPS(サービスマーク)及びラットIgG2a、3)Fc RIPPS(サービスマーク)及び抗PD1、または4)CD80 RIPPS(サービスマーク)及び抗PD1であった。腫瘍体積が、マウスの体重の10%を超えるか、または約 2000mm^3 になるまで、腫瘍の測定を少なくとも週に2回続けた。

【0163】

調査の最後に、すべての群の平均腫瘍重量をグラフ化することによって、腫瘍サイズの変化が示されている。(図2a。)マウスCD80 ECDを用いたRIPPS(サービスマーク)、または抗PD1の投与では、コントロールと比べて、腫瘍の成長が低下した。(図2a~b。)CD80 RIPPS(サービスマーク)と抗PD1を組み合わせたところ、CD80($p < 0.01$ 、9日目の後に開始)または抗PD-1($p < 0.01$ 、14日目)のいずれか単独と比べて、腫瘍の成長が有意に低下した($p < 0.05$)(治療開始から9日目に開始)。P値は、各測定日における腫瘍体積計算値の独立両側t検定解析を用いて計算した。

【0164】

コントロールと比べて、CD80 ECDによる腫瘍の成長の阻害(TGI)は28.7%、抗PD1によるTGIは、41.5%であることが確認された。CD80 ECD

と抗PD1を組み合わせた場合のTGIは、83%であることが確認された。(図2bを参照されたい。)TGIは、 $100 \times (1 - (\text{治療群の平均体積差} / \text{生理的食塩水の平均体積差}))$ という式を用いて計算した。

【0165】

実施例3：CD80 ECD Fc融合分子と、野生型及び変異ヒトIgG1 Fc融合ポリペプチド配列との活性の比較

雌の7週齢BALB/cマウスをCharles River Laboratories(カリフォルニア州ホリスター)から購入し、2週間馴化してから、調査を開始した。マウス大腸癌細胞株CT26をマウスの右側腹部に、 1.0×10^6 細胞/200 μ l/マウスで皮下移植した。接種の前に、10%熱不活化ウシ胎仔血清(FBS)と2mMのL-グルタミンを添加したRPMI1640培地で、細胞を3継代未満で培養した。細胞を37℃で、5%CO₂を含む加湿雰囲気中で成長させた。80~85%コンフルエントに達したら、細胞を回収し、無血清RPMI1640とMatrigel(登録商標)の1:1混合物に、1ミリリットル当たり 5×10^6 細胞で再懸濁した。

【0166】

細胞の移植後、マウスを週に2回、腫瘍の成長についてモニタリングした。腫瘍の測定では、ノギスを用いて、各腫瘍の長さ(長さ)と幅(幅)を測定し、腫瘍体積(mm³)=(幅(mm)×長さ(mm))²/2という式に従って、体積を計算した。5日目に、すべての腫瘍を測定し、マウスを無作為に治療群に割り当てた。治療群に登録されたすべてのマウスの平均腫瘍体積は、175mm³であった。RIPPS(サービスマーク)によって、マウスに、生理的食塩水またはプラスミドDNAを投与した。RIPPS(サービスマーク)によって投与したプラスミドDNAは、ヒトIgG1のFcドメインとともに、マウスCD80の細胞外ドメイン(ECD)の配列を含んでいた。RIPPS(サービスマーク)によって2クローンを投与し、その一方は、野生型ヒトIgG1 Fcを含み(CD80-IgG1 WT)、もう一方は、FcとFcレセプターとの相互作用を変更するために、3つの変異アミノ酸(L234F/L235E/P331S)を有する野生型ヒトIgG1 Fcを含んでいた(CD80-IgG1 MT)。腫瘍体積が、マウスの体重の10%を超えるか、または約2000mm³になるまで、腫瘍の測定を少なくとも週に2回続けた。

【0167】

マウスにCT26細胞を移植した日に対して平均腫瘍体積をグラフ化することによって、腫瘍サイズの変化が示されている。(図3a-b。)CD80-IgG1 WTを用いたRIPPS(サービスマーク)では、コントロールの生理的食塩水に比べて、腫瘍の成長が有意に低下した(p<0.05)(14日目に開始された)。CD80-IgG1 MTでは、CD80-IgG1 WTと比べて、腫瘍の成長が有意に低下した(p<0.01)(14日目に開始された)。P値は、調査の各日における腫瘍体積計算値の独立両側t検定解析を用いて計算した(*p<0.05、**p<0.01)。CD80-IgG1 WTによる腫瘍の成長の阻害(TGI)は、コントロールの生理的食塩水と比べて、69.4%であることが確認され、CD80-IgG1 MTのTGIと比べたところ、98%として算出された。(図3bを参照されたい。)TGIは、 $100 \times (1 - (\text{治療群の平均体積差} / \text{生理的食塩水の平均体積差}))$ という式を用いて割り出した。

【0168】

実施例4：野生型及び変異ヒトIgG1 Fc融合ポリペプチド配列を有するCD80 ECD Fc融合分子が、CT26腫瘍における浸潤T細胞に及ぼす作用

別のインビボ調査を行って、CD80-IgG1 WTとCD80-IgG1 MTが、治療早期に、CT26腫瘍における浸潤T細胞に及ぼす作用を解析した。

【0169】

雌の7週齢BALB/cマウスをCharles River Laboratories(カリフォルニア州ホリスター)から購入し、2週間馴化してから、調査を開始した。マウス大腸癌細胞株CT26をマウスの右側腹部に、 1.0×10^6 細胞/200 μ l

ノマウスで皮下移植した。接種の前に、10%熱不活化ウシ胎仔血清(FBS)と2mMのL-グルタミンを添加したRPMI 1640培地で、細胞を3継代未満で培養した。細胞を37℃で、5%CO₂を含む加湿雰囲気中で成長させた。80~85%コフルエントに達したら、細胞を回収し、無血清RPMI 1640とMatrigel(登録商標)の1:1混合物に、5×10⁶細胞/mLで再懸濁した。

【0170】

細胞の移植後、マウスを週に2回、腫瘍の成長についてモニタリングした。腫瘍の測定では、ノギスを用いて、各腫瘍の長さ×幅を測定し、腫瘍体積(mm³)=(幅(mm)×長さ(mm))²/2という式に従って、体積を計算した。5日目に、すべての腫瘍を測定し、マウスを無作為に治療群に割り当てた(n=1群当たり5匹のマウス)。治療群に登録されたすべてのマウスの平均腫瘍体積は、72mm³であった。マウスに、生理的食塩水、野生型ヒトIgG1 Fcを有する、CD80のマウス細胞外ドメイン(ECD)(CD80-IgG1 WT)またはFc レセプターとの相互作用を変化させるために、変異ヒトIgG1 Fcを有する、CD80のマウスECD(CD80-IgG1 MT、変異L234F/L235E/P331S)を投与した。腫瘍は、5日目と11日目に測定した。

10

【0171】

12日目に、マウスをCO₂で安楽死させ、リン酸緩衝生理的食塩水(PBS)(pH7.4)でかん流した。簡潔に述べると、マウスを迅速に開胸し、20ゲージのニードルを備えたシリンジを用いて、左室における切り目を介して、40mLのPBSを大動脈に注入した。右房における開口部から、血液とPBSを出した。腫瘍を取り除き、10%中性緩衝ホルマリンに4℃で浸漬した。2時間後、組織を3回、PBSでリンスしてから、PBS中の30%スクロースに一晩移した。翌日、腫瘍をOCT化合物において凍結し、-80℃で保存した。

20

【0172】

クリオスタット切片を厚さ20μmで切断した。切片をSuperfrost(登録商標)Plus slideで1~2時間乾燥した。0.3%Triton(登録商標)X-100を含むPBSで試験片を透過処理し、PBS0.3%Triton(登録商標)X-100中の5%正常ヤギ血清(ブロッキング溶液)で1時間、室温でインキュベートして、非特異的な抗体結合をブロックした。T細胞を検出するために、切片をラット抗CD4(GK1.5/eBiosciences)とウサギ抗CD3抗体(SP7/Thermo Scientific)(いずれも、ブロッキング溶液で1:500に希釈したもの)とともに一晩インキュベートした。コントロール試験片は、一次抗体の代わりに、5%正常血清で同じ期間、インキュベートした。0.3%Triton(登録商標)X-100を含むPBSでリンス後、試験片を4時間、室温で、Alexa(登録商標)594標識化ヤギ抗ラット及びAlexa(登録商標)488標識化ヤギ抗ウサギ二次抗体(PBSで1:400に希釈したもの)(Jackson ImmunoResearch)とともに、インキュベートした。0.3%Triton(登録商標)X-100を含むPBSで、試験片をリンスし、1%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定し、PBSで再度リンスし、DAPIを含むVectashieldという非退色標本保存液(Vector Laboratories)で封入した。

30

40

【0173】

Axiocam(登録商標)HRCというカメラを備えたZeiss Axiophot(登録商標)2 plusという蛍光顕微鏡で、試験片を調べた。腫瘍内のCD3⁺細胞とCD4⁺細胞の量と分布を示す、各実験群の代表的な画像を集めたが、これは、図4a及び4bに示されている。

【0174】

CD80-IgG1 WTまたはCD80-IgG1 MTによる処置によって、腫瘍内のCD3⁺細胞とCD4⁺細胞の数が、生理的食塩水と比べて増加した(図4a及び4b)。CD4⁺細胞の量は、CD80-IgG1 WTで処置した腫瘍と、CD80-I

50

g G 1 M Tで処置した腫瘍との間で同程度であったが、C D 8 0 - I g G 1 M Tによる処置の方が、C D 8 0 - I g G 1 W Tと比べて、腫瘍浸潤C D 3 + T細胞が増加した(図4b)。C D 3 + 細胞のC D 4 + 細胞に対する比率は、C D 8 0 - I g G 1 M Tにおける方が、C D 8 0 - I g G 1 W Tと比べて増加した。

【0175】

実施例5：C D 8 0 E C D F c融合分子のサイトカイン放出作用

方法

タンパク質の処理

R P M I 1 6 4 0と、1 0 0 I Uのペニシリン/1 0 0 u g / m lのストレプトマイシンと、2 m MのL - グルタミンと、1 0 0 n Mの非必須アミノ酸と、5 5 u Mの2 - メルカプトエタノールと、1 0 % u l t r a l o w - I g Gウシ胎仔血清とを含むT細胞増殖培地中のプロテインA磁気ビーズ(L i f e T e c h n o l o g i e s)で、ヒトC D 8 0 E C D I g G 1 F c融合分子(C D 8 0 - F c)を結合させた。1 ウェル当たりの体積が1 0 0 u lの9 6 ウェル平底組織培養プレートにおいて、1 m l当たり3 0 0 万個のビーズ濃度で、結合反応を行った。C D 8 0 - F cは、1 0 u g / m l、1 u g / m l、0 . 1 u g / m lという一連の濃度にわたってビーズに結合させた。3 n g / m lのO K T 3 - s c F vを加えることによって、追加の結合反応セットも行った。タンパク質を1時間、室温で、ロッキングプラットフォームで結合させてから、各ウェルに、2 0 u g / m l(終濃度1 0 u g / m l)のI g G 1 F r e e - F c(F P T)を1 0 0 u l加えて、ビーズ上のいずれかの空いているプロテインA結合部位をブロックするために、さらに1時間結合させた。続いて、未結合のタンパク質を除去するために、9 6 ウェルプレート磁気スタンドを用いて、完全にロードしたビーズとブロックしたビーズを3回、P B Sで洗浄した。続いて、乾燥した洗浄ビーズの入った各ウェルに、ヒトP a n T細胞1 0 0 u lを 1×10^6 細胞/m lの濃度で加えた。各条件をトリプリケートで試験した。

10

20

【0176】

細胞

F i c o l l(登録商標)(B i o c h r o m)の密度勾配遠心分離を用いて、単離の約1 8時間前に健常なドナーから採取した血液であって、アフエーシスで濃縮した血液(パフィーコート)からヒトP B M Cを単離した。続いて、ヒトP a n T細胞単離キット(M i l t e n y i)を用いて、P a n T細胞をP B M Cから単離した。T 2 2 5組織培養フラスコにおいて、8 n g / m lのI L - 2と1ビーズ/細胞のH u m a n T - c e l l A c t i v a t o r D y n a b e a d s(登録商標)(L i f e T e c h)を添加した増殖培地(上記)に、T細胞を1 0 0万細胞/m lの密度で播種した。播種後、細胞に新鮮なI L - 2を供給し、2日おきに新鮮な増殖培地を加えることによって、3 0万細胞/m lの濃度を継続して保った。3 7 °Cの水ジャケット付きインキュベーターであって、5 % C O ₂に保ったインキュベーターに細胞を保持した。増加の6日後、磁気チューブスタンドを用いて、アクチベータービーズを除去し、細胞を1 0 0万細胞/m lの濃度で、I L - 2を含めずに、新鮮な増殖培地に再懸濁した。2 4時間後、細胞に対して、プロテインAビーズ固定化タンパク質によるアッセイを行った。

30

40

【0177】

サイトカインの測定

メーカーの指示に従って、細胞をプロテインAビーズ固定化タンパク質で処理した2 4時間後、H T R F - E L I S Aキット(C i s b i o)を用いて、上清において、可溶性インターフェロン(I F N -)と腫瘍壊死因子(T N F -)のレベルを測定した。

【0178】

結果

可溶性サイトカインの産生によって測定したところ、ビーズ固定化C D 8 0 - F c単独では、ヒトT細胞の有意な活性化は生じなかった(図5a及びc)。しかしながら、少量

50

の O K T 3 - s c F v を C D 8 0 - F c とともに固定化したところ、C D 8 0 依存性の I F N - 及び T N F - の活発な放出が観察された (図 5 b 及び d) 。このアッセイでの O K T 3 - s c F v の使用量は、それ自体で T 細胞を刺激するには低すぎたため、共刺激タンパク質としての C D 8 0 の存在が必要であった。したがって、これらの結果から、このアッセイで用いた C D 8 0 - F c は実際に生物活性を有していたことが確認される。

【 0 1 7 9 】

このアッセイにおける I F N - と T N F - の放出によって、C D 8 0 - F c が生物活性を有していたことが示されたが、I F N - 及び T N F - のようなサイトカインの過剰放出は有害なことがある。したがって、C D 8 0 E C D F c による治療の潜在的な安全性に取り組むために、T 細胞「超アゴニスト」であるとともに、過剰かつ有害なレベルのサイトカイン (I F N - 及び T N F - など) をヒト対象において放出することが示されたモノクローナル抗 C D 2 8 抗体である T G N 1 4 1 2 によってこれまで公開された結果と、上記の結果を比較した。

10

【 0 1 8 0 】

サイトカインのヒト T 細胞からの放出の誘導に関しては、固定化 T G N 1 4 1 2 単独の方が、ヒト C D 8 0 単独よりも有意に強力であると見られる。Findlay et al., J. Immunological Methods 352: 1-12 (2010) では、1 μ g / ウェルの T G N 1 4 1 2 によって、T N F が活発に放出された (約 2000 pg / ml) ことが報告され、Vessillier et al., J. Immunological Methods 424: 43-52 (2015) では、同じ量の T G N 1 4 1 2 によって、活発な I F N - (約 10000 pg / ml) が得られたことが報告された。本発明のアッセイでは、同じ量の固定化 C D 8 0 - F c では、いずれのサイトカインも、有意には放出されなかった。これらの結果から、C D 8 0 - F c は、サイトカインの放出作用の強さが、T G N 1 4 1 2 と比べて少なくとも 1000 分の 1 であるので、ヒトにおいてサイトカインストームを誘導するリスクが T G N 1 4 1 2 よりも有意に低いことが示唆されている。

20

【 0 1 8 1 】

実施例 6 : C D 8 0 E C D F c 融合分子が、シアル酸 (S A) 含有量の異なる F c ドメインとともに、インビボで C T 2 6 腫瘍に及ぼす作用

インビボ調査を C T 2 6 腫瘍において行って、シアル酸 (S A) 含有量の異なる野生型ヒト I g G 1 F c に融合した C D 8 0 E C D の 3 つの異なるロットの作用を解析した。具体的には、ロット E の C D 8 0 E C D F c は、20 モルの S A / 1 モルのタンパク質を含み、ロット D は、15 モルの S A / 1 モルのタンパク質を含み、ロット A は、5 モルの S A / 1 モルのタンパク質を含む。

30

【 0 1 8 2 】

雌の 7 週齢 B A L B / c マウスを Charles River Laboratories (カリフォルニア州ホリスター) から購入し、1 週間馴化してから、調査を開始した。マウス大腸癌細胞株 C T 2 6 をマウスの右側腹部に、 1.0×10^6 細胞 / 200μ l / マウスで皮下移植した。接種の前に、10% 熱不活化ウシ胎仔血清 (F B S) と 2 mM の L - グルタミンを添加した R P M I 1 6 4 0 培地で、細胞を 3 継代未満で培養した。細胞を 37 °C で、5% C O ₂ を含む加湿雰囲気中で成長させた。80 ~ 85% コンフルエントに達したら、細胞を回収し、無血清 R P M I 1 6 4 0 と Matrigel (登録商標) の 1 : 1 混合物に、1 ミリリットル当たり 5×10^6 細胞で再懸濁した。

40

【 0 1 8 3 】

細胞の移植後、マウスの腫瘍の成長について、週に 2 回モニタリングした。腫瘍の測定では、ノギスを用いて各腫瘍の長さ幅を測定し、腫瘍体積 (mm^3) = (幅 (mm) × 長さ (mm)) ² / 2 という式に従って、体積を計算した。7 日目に、すべての腫瘍を測定し、マウスを無作為に 7 つの治療群に割り当てた (n = 1 実験群当たり 10 匹のマウス) 。登録されたすべてのマウスの平均腫瘍体積は、94 mm^3 であった。第 1 の群の尾静脈に、200 μ l の P B S (コントロール) を静脈内 (i . v .) 注射した。第 2 の群に

50

は、20モルのSA / 1モルのタンパク質のCD80 ECD Fc (ロットE) を0.3 mg / kg で i . v . 注射した。第3の群には、20モルのSA / 1モルのタンパク質のCD80 ECD Fc (ロットE) を0.6 mg / kg で i . v . 注射した。第4の群には、15モルのSA / 1モルのタンパク質のCD80 ECD Fc (ロットD) を0.3 mg / kg で i . v . 注射した。第5の群には、15モルのSA / 1モルのタンパク質のCD80 ECD Fc (ロットD) を0.6 mg / kg で i . v . 注射した。第6の群には、5モルのSA / 1モルのタンパク質のCD80 ECD Fc (ロットA) を0.3 mg / kg で i . v . 注射した。第7の群には、5モルのSA / 1モルのタンパク質のCD80 ECD Fc (ロットA) を0.6 mg / kg で i . v . 注射した。10日目、14日目、16日目、18日目、22日目、24日目に、腫瘍を測定した。

10

【0184】

20モルのSA / 1モルのタンパク質のCD80 ECD Fc (ロットE) 0.3 mg / kg で処置したところ、腫瘍の成長が、コントロールと比べて、93% 阻害され、0.6 mg / kg で処置したところ、98% 阻害された ($P < 0.001$)。15モルのSA / 1モルのタンパク質のCD80 ECD Fc (ロットD) 0.3 mg / kg で処置したところ、腫瘍の成長が、コントロールと比べて、93% 阻害され、0.6 mg / kg で処置したところ、95% 阻害された ($P < 0.001$)。比較により、ロットAのCD80 ECD Fc 0.3 mg / kg (5モルのSA / 1モルのタンパク質を含む) は、コントロールと比べて、腫瘍の成長を阻害せず、0.6 mg / kg で投与した時のみ、70% の阻害を誘導した ($P < 0.001$) (図6)。

20

【0185】

37日目に、腫瘍のないマウスの発生率を解析した。20モル / モルのSAのCD80 ECD - Fc (ロットE) 0.3 mg / kg または0.6 mg / kg での処置によって、8匹 / 10匹 (80%) または10匹 / 10匹 (100%) のマウスで、腫瘍が完全に退縮した。15モル / モルのSAのCD80 ECD - Fc (ロットD) 0.3 mg / kg または0.6 mg / kg での処置によって、9匹 / 10匹 (90%) のマウスで、腫瘍が完全に退縮した。比較によって、ロットAのCD80 ECD - Fc 0.6 mg / kg による処置は、下記の表に示されているように、1匹 / 10匹 (10%) のマウスで、腫瘍退縮を誘導したに過ぎなかった。

【表1-1】

30

治療群	37日目に腫瘍のないマウス
生理的食塩水	0% (0匹 / 10匹のマウス)
0.3 mg / kg で1用量投与したCD8	80% (8匹 / 10匹のマウス)

【表 1 - 2】

0 ECD-Fc (SA20モル/モル) (ロットE)	
0.6mg/kgで1用量投与したCD8 0 ECD-Fc (SA20モル/モル) (ロットE)	100% (10匹/10匹のマウス)
0.3mg/kgで1用量投与したCD8 0 ECD-Fc (SA15モル/モル) (ロットD)	90% (9匹/10匹のマウス)
0.6mg/kgで1用量投与したCD8 0 ECD-Fc (SA15モル/モル) (ロットD)	90% (9匹/10匹のマウス)
0.3mg/kgで1用量投与したCD8 0 ECD-Fc (SA5モル/モル) (ロ ットA)	0% (0匹/10匹のマウス)
0.6mg/kgで1用量投与したCD8 0 ECD-Fc (SA5モル/モル) (ロ ットA)	10% (1匹/10匹のマウス)

10

20

【0186】

実施例7：マウスCD80 ECD - マウスFc融合分子が、3つの異なる同系腫瘍モデルにおいて、腫瘍の成長に及ぼす作用

野生型マウスIgG2aのFcドメインに連結した、マウスCD80の細胞外ドメイン(ECD)(マウスCD80 ECD - Fc)を含むマウスサロゲートを用いて、インビボ調査を行った。CT26結腸癌モデル、MC38結腸癌モデル及びB16メラノーマモデルという3つの異なる同系腫瘍モデルにおいて、マウスCD80 ECD - Fcの作用を抗CTLA4抗体クローン9D9(IgG2b)の作用と比較した。

30

【0187】

CT26腫瘍モデル

雌の7週齢BALB/cマウスをCharles River Laboratories(カリフォルニア州ホリスター)から購入し、1週間馴化してから、調査を開始した。マウス大腸癌細胞株CT26をマウスの右側腹部に、 1.0×10^6 細胞/200 μ l/マウスで皮下移植した。接種の前に、10%熱不活化ウシ胎仔血清(FBS)と2mMのL-グルタミンを添加したRPMI1640培地で、細胞を3継代未満で培養した。細胞を37 $^{\circ}$ Cで、5%CO₂を含む加湿雰囲気中で成長させた。80~85%コンフルエントに達したら、細胞を回収し、無血清RPMI1640とマトリゲルの1:1混合物に再懸濁した。

40

【0188】

細胞の移植後、マウスを週に2回、腫瘍の成長についてモニタリングした。腫瘍の測定では、ノギスを用いて各腫瘍の長さ(長さ)と幅(幅)を測定し、腫瘍体積(mm³)=(幅(mm)×長さ(mm))²/2という式に従って、体積を計算した。7日目に、すべての腫瘍を測定し、マウスを無作為に7つの治療群に割り当てた(n=1実験群当たり15匹のマウス)。登録されたすべてのマウスの平均腫瘍体積は、96mm³であった。マウスには、4日目、7日目及び11日目に3回投与した。第1の群には、マウスIgG2b(mIgG2b)を10mg/kgでi.p.注射した(コントロール)。第2の群には、マウスCD80 ECD - Fc(20モル/モルのSA)を0.3mg/kgでi.v.注射した。第3の群には、抗CTLA4抗体クローン9D9(IgG2b)を1.5mg/kgで

50

i . p . 注射した。第 4 の群には、抗 C T L A 4 抗体クローン 9 D 9 (I g G 2 b) を 1 0 m g / k g で i . p . 注射した。1 0 日目、1 3 日目、1 7 日目、1 9 日目、2 1 日目、2 4 日目に、腫瘍を測定した。

【 0 1 8 9 】

2 0 モル / モルの S A のマウス C D 8 0 E C D - F c 0 . 3 m g / k g で処置したところ、2 1 日目 (すべてのコントロールはまだ調査中であつた) に、腫瘍の成長が、コントロールと比べて、9 0 % 阻害された ($P < 0 . 0 0 1$) 。抗 C T L A 4 抗体 1 0 m g / k g で処置したところ、腫瘍の成長が、コントロールと比べて、7 5 % 阻害された ($P < 0 . 0 0 1$) 。比較によって、抗 C T L A 4 抗体 1 . 5 m g / k g での処置は、腫瘍の成長の 5 3 % の阻害を誘導したに過ぎなかつた ($P < 0 . 0 0 1$) (図 7) 。2 0 モル / モルの S A のマウス C D 8 0 E C D - F c 0 . 3 m g / k g での処置が腫瘍の成長に及ぼす影響は、2 1 日目において、1 . 5 m g / k g ($P < 0 . 0 0 1$) または 1 0 m g / k g ($P = 0 . 0 0 9$) で投与した抗 C T L A 4 抗体よりも有意に大きかつた。

10

【 0 1 9 0 】

3 7 日目に、腫瘍のないマウスの発生率を解析した。2 0 モル / モルの S A のマウス C D 8 0 E C D - F c 0 . 3 m g / k g で処置したところ、7 匹 / 1 5 匹 (4 7 %) のマウスで、腫瘍が完全に退縮した。抗 C T L A 4 抗体 1 0 m g / k g で処置したところ、3 匹 / 1 5 匹 (2 0 %) のマウスで、腫瘍が完全に退縮した。抗 C T L A 4 抗体 1 . 5 m g / k g で処置したマウスには、腫瘍が完全に退縮したマウスはいなかつた。

20

【 0 1 9 1 】

M C 3 8 腫瘍モデル

雌の 7 週齢 C 5 7 B 1 / 6 マウスを Charles River Laboratories (カリフォルニア州ホリスター) から購入し、1 週間馴化してから、調査を開始した。マウス大腸癌細胞株 M C 3 8 をマウスの右側腹部に、 $0 . 5 \times 1 0 ^ 6$ 細胞 / 1 0 0 μ l / マウスで皮下移植した。接種の前に、1 0 % 熱不活化ウシ胎仔血清 (F B S) と 2 m M の L - グルタミンを添加した R P M I 1 6 4 0 培地で、細胞を 3 継代未満で培養した。細胞を 3 7 ° C で、5 % C O ₂ を含む加湿雰囲気中で成長させた。8 0 ~ 8 5 % コンフルエントに達したら、細胞を回収し、無血清 R P M I 1 6 4 0 とマトリゲルの 1 : 1 混合物に再懸濁した。

30

【 0 1 9 2 】

細胞の移植後、マウスを週に 2 回、腫瘍の成長についてモニタリングした。腫瘍の測定では、ノギスを用いて、各腫瘍の長さ と 幅 を測定し、腫瘍体積 (mm^3) = (幅 (mm) \times 長さ (mm)) ² / 2 という式に従って、体積を計算した。7 日目に、すべての腫瘍を測定し、マウスを無作為に 7 つの治療群に割り当てた ($n = 1$ 実験群当たり 1 5 匹のマウス) 。登録されたすべてのマウスの平均腫瘍体積は、7 8 mm^3 であつた。マウスには、7 日目、1 0 日目及び 1 4 日目に、3 回投与した。第 1 の群には、マウス I g G 2 b (m I g G 2 b) を 1 0 m g / k g で i . p . 注射した (コントロール) 。第 2 の群には、2 0 モル / モルの S A のマウス C D 8 0 E C D - F c を 3 m g / k g で i . v . 注射した。第 3 の群には、抗 C T L A 4 抗体クローン 9 D 9 (I g G 2 b) を 1 . 5 m g / k g で i . p . 注射した。第 4 の群には、抗 C T L A 4 抗体クローン 9 D 9 (I g G 2 b) を 1 0 m g / k g で i . p . 注射した。1 1 日目、1 4 日目、1 7 日目及び 1 9 日目に、腫瘍を測定した。

40

【 0 1 9 3 】

2 0 モル / モルの S A のマウス C D 8 0 E C D - F c 3 m g / k g で処置したところ、1 9 日目 (すべてのコントロールはまだ調査中であつた) に、腫瘍の成長が、コントロールと比べて、7 9 % 阻害された ($P < 0 . 0 0 1$) 。さらに、2 0 モル / モルの S A のマウス C D 8 0 E C D - F c の方が、抗 C T L A 4 抗体と比べて、腫瘍の成長への影響が大きかつた ($P < 0 . 0 0 1$) 。抗 C T L A 4 抗体 1 0 m g / k g で処置したところ、コントロールと比べて、腫瘍の成長が 2 1 % 阻害された ($P = 0 . 0 5$) が、1 . 5 m g / k g では、腫瘍サイズへの有意な作用は見られなかつた (図 8) 。2 1 日目には、2 0

50

モル/モルのSAのマウスCD80 ECD - Fc 3 mg / kgによる処置が腫瘍の成長に及ぼす影響は、抗CTLA4抗体 1.5 mg / kg (P < 0.001) または 10 mg / kg (P = 0.009) よりも有意に大きかった。

【0194】

これらの実験では、3 mg / kgの用量のCD80 ECD - Fcを用いたが、0.3 mg / kgの用量のCD80 ECD - Fcも、MC38腫瘍モデルにおいて、腫瘍細胞の成長を低下させた(データは示されていない)。

【0195】

B16腫瘍モデル

雌の7週齢C57Bl/6マウスをCharles River Laboratories (カリフォルニア州ホリスター) から購入し、1週間馴化してから、調査を開始した。マウスメラノーマ細胞株B16-F10をマウスの右側腹部に、 0.5×10^6 細胞 / $100 \mu\text{l}$ / マウスで皮下移植した。接種の前に、10%熱不活化ウシ胎仔血清(FBS)と2 mMのL-グルタミンを添加したDMEM培地で、細胞を3継代未満で培養した。細胞を37℃で、5%CO₂を含む加湿雰囲気中で成長させた。80~85%コンフルエントに達したら、細胞を回収し、無血清DMEMとマトリゲルの1:1混合物に再懸濁した。

10

【0196】

細胞の移植後、マウスを週に2回、腫瘍の成長についてモニタリングした。腫瘍の測定では、ノギスを用いて、各腫瘍の長さ(幅)を測定し、腫瘍体積(mm^3) = (幅(mm) × 長さ(mm))² / 2という式に従って、体積を計算した。7日目に、すべての腫瘍を測定し、マウスを無作為に7つの治療群に割り当てた(n = 1実験群当たり15匹のマウス)。登録されたすべてのマウスの平均腫瘍体積は、70 mm^3 であった。マウスには、3日目、6日目及び10日目に、3回投与した。第1の群には、マウスIgG2b (mIgG2b) を10 mg / kgでi.p.注射した(コントロール)。第2の群には、20モル/モルのSAのマウスCD80 ECD - Fcを3 mg / kgでi.v.注射した。第3の群には、抗CTLA4抗体クローン9D9 (IgG2b) を1.5 mg / kgでi.p.注射した。第4の群には、抗CTLA4抗体クローン9D9 (IgG2b) を10 mg / kgでi.p.注射した。10日目、13日目、15日目、16日目、17日目に、腫瘍を測定した。

20

30

【0197】

20モル/モルのSAのマウスCD80 ECD - Fc 3 mg / kgで処置したところ、13日目(すべてのコントロールはまだ調査中であった)に、腫瘍の成長が、コントロールと比べて、41%阻害された(P < 0.001)。抗CTLA4抗体10 mg / kgまたは1.5 mg / kgで処置したところ、コントロールと比べて、腫瘍の成長への有意な作用は見られなかった(図9)。

【0198】

配列の表

下記の表に、本明細書で参照した特定の配列のリストを示す。

【表 2 - 1】

配列番号	明細	配列
1	ヒトCD80前駆体（シグナル配列を含む）アミノ酸配列	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFNMTTNHFSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNNTTKQEHFPDNLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV
2	マウスCD80前駆体（シグナル配列を含む）アミノ酸配列	MACNCQLMQDTPLLKFCPRLLILFVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKVLSVIAGKLVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTYSVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLDFNTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKNTLVLFAGFGAVITVVVIVVVIKCFCKHRSCFRRNEASRETNNSLTFGPEEALAEQTVFL
3	ヒトCD80アイソフォーム2（シグナル配列を含まない）	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFNMTTNHFSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNNTSFAPRCRERRRNERLRRESVRPV
4	ヒトCD80アイソフォーム3（シグナル配列を含まない）	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKGFAPRCRERRRNERLRRESVRPV
5	ヒトCD80ECD配列（シグナル配列を含まない）	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFNMTTNHFSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNNTTKQEHFPDN
6	マウスCD80ECD配列（シグナル配列を含まない）	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKVLSVIAGKLVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTYSVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLDFNTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKN
7	ヒトCD80シ	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSG

10

20

30

40

【表 2 - 2】

	グナル配列	
8	マウス C D 8 0 シグナル配列	MACNCQLMQDTPLLKFPCLILLFVLLIRLSQVSSD
9	F c C 2 3 7 S	EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	F c	ERKCCVECPC CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRWVSVLTV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGDSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
11	F c	ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGDSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK
12	ヒト I g G 1 F c L 2 3 4 F、L 2 3 5 E、 P 3 3 1 S 変異 体	EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	ヒト I g G 1 F c N 2 9 7 変異体	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	F c ヒト I g G 1	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

【表 2 - 3】

15	Fc ヒト Ig G3	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDT PPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPPMLDSGGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVMSHEALTHNRFTQKLSL SPGK	
16	Fc ヒト Ig G4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCFVMSHEALTHNHHTQKLSLSPGK	10
17	マウス CD80 ECD マウス Fc IgG2a (下線は Fc 部 分)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKV VLSVIAGKLVWPEYKNRTLYDNTTYSLLGLVLSDRGTY SCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSA DTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPES ELYTISSQLDFNTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPE DPPDSKNEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIK <u>DVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQ</u> <u>TQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKD</u> <u>LPAPIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTC</u> <u>MVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFM</u> <u>YSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTP</u> <u>GK</u>	20
18	マウス CD80 ECD ヒト Fc IgG1 WT (下線は Fc 部分)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKV VLSVIAGKLVWPEYKNRTLYDNTTYSLLGLVLSDRGTY SCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSA DTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPES ELYTISSQLDFNTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPE DPPDSKNEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK <u>DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC</u> <u>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY</u> <u>SKLTVDKSRWQQGNVSCFVMSHEALTHNHHTQKLSLSP</u> <u>GK</u>	30
19	マウス CD80 ECD Fc IgG1 MT (234、23 5、331) (下 線は Fc 部分、 変異は太字で示 されている)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKV VLSVIAGKLVWPEYKNRTLYDNTTYSLLGLVLSDRGTY SCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSA DTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPES ELYTISSQLDFNTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPE DPPDSKNEPKSSDKTHTCPPCPAPEF EG GGPSVFLFPPKPK <u>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN</u> <u>KALPSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT</u> <u>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF</u> <u>LYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVMSHEALTHNHHTQKLSL</u> <u>PGK</u>	40

【表 2 - 4】

20	ヒトCD80 ECD ヒトFc IgG1 WT (下線はFc 部分)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIWQKEKMMVL TMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYE CVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPSTNI RRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELY AVSSKLDNFMTTNSFMCLIKYGHRLVNQTFNWNTTKQE HFPDNEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT <u>LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</u> <u>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV</u> <u>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS</u> <u>KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> K	10
21	ヒトCD80 ECD ヒトFc IgG1 L234F、L 235E、P3 31S MT (下線はFc部 分、変異は太字)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIWQKEKMMVL TMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYE CVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPSTNI RRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELY AVSSKLDNFMTTNSFMCLIKYGHRLVNQTFNWNTTKQE HFPDNEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD <u>LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK</u> <u>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA</u> <u>LPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL</u> <u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY</u> <u>SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GK</u>	20
22	ヒトPD-1前 駆体 (シグナル 配列を含む) UniProt KB/Swiss- Prot: Q15116. 3、01-OC T-2014	MQIPQAPWPV VVAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL	30
23	ヒトPD-1 (成熟体、シグ ナル配列を含ま ない)	PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL	40

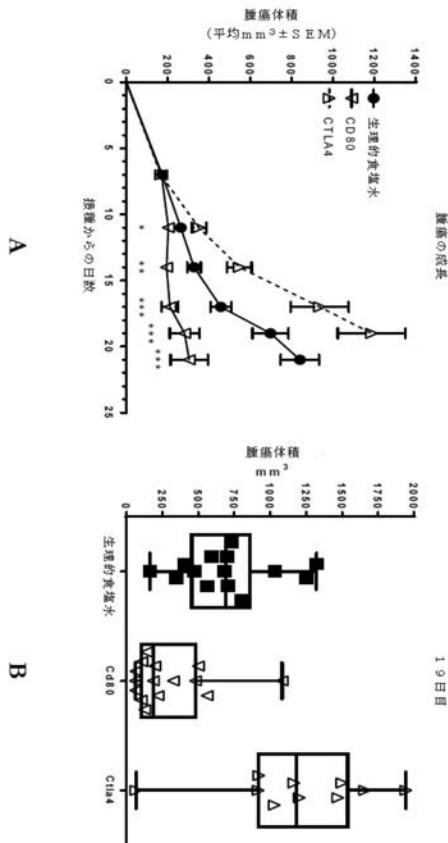
【表 2 - 5】

24	ヒトPD-L1前駆体 (シグナル配列を含む) UniProt KB/Swiss-Prot: Q9NZQ7.1、01-OC T-2014	MRIFAVFIFM TYWHLNAFT VTPKDLVYV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVDPVTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPELP LAHPPNERH LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET
25	ヒトPD-L1 (成熟体、シグナル配列を含まない)	FT VTPKDLVYV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVDPVTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPELP LAHPPNERH LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET

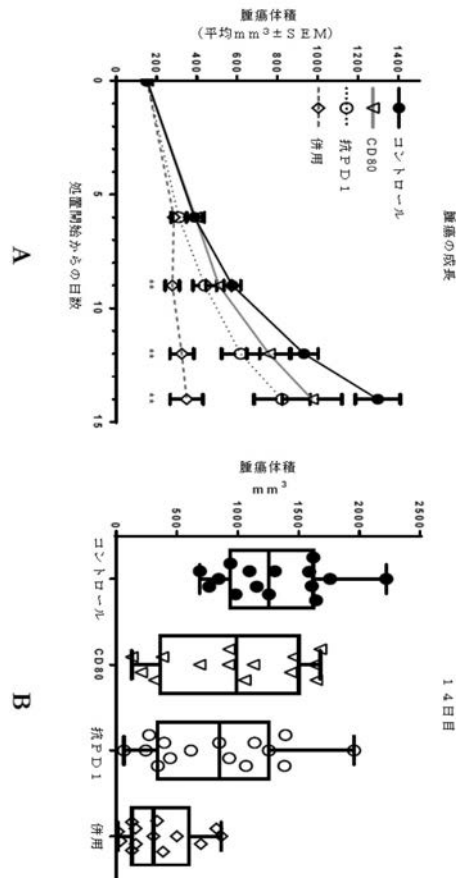
10

20

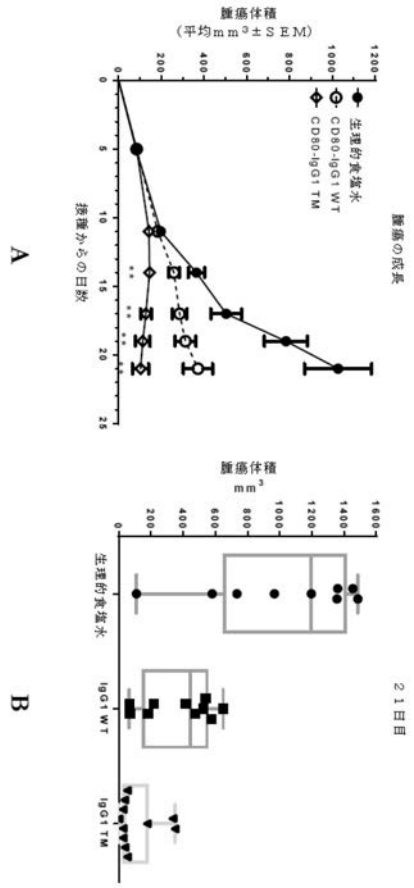
【図 1】



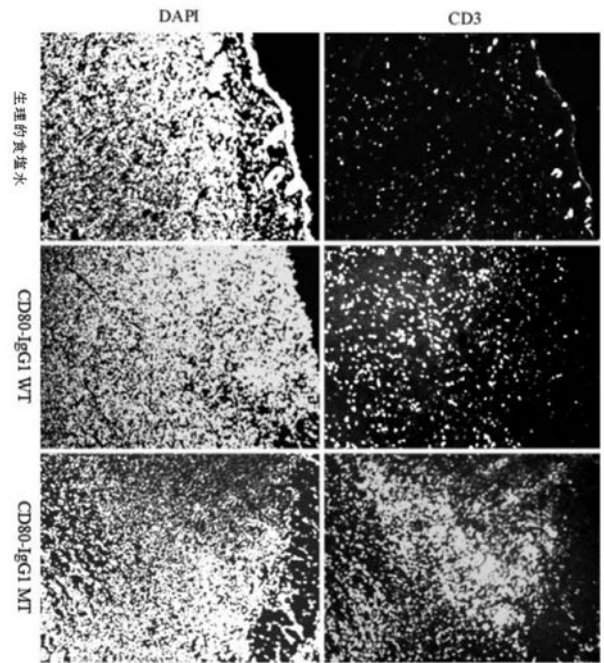
【図 2】



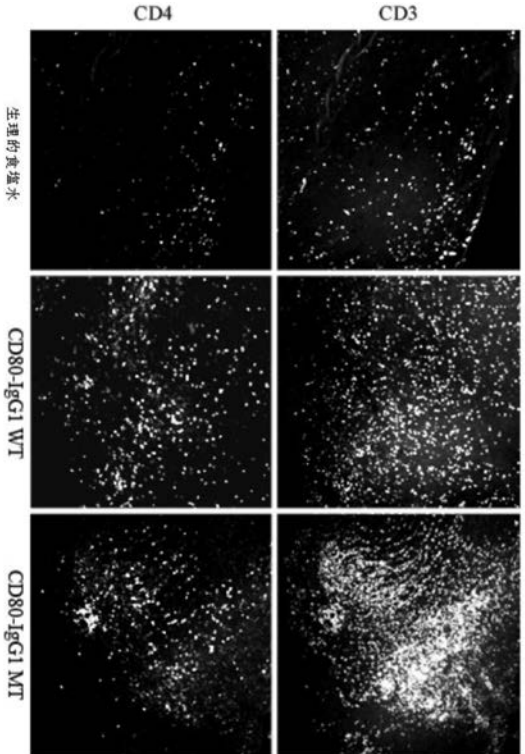
【図3】



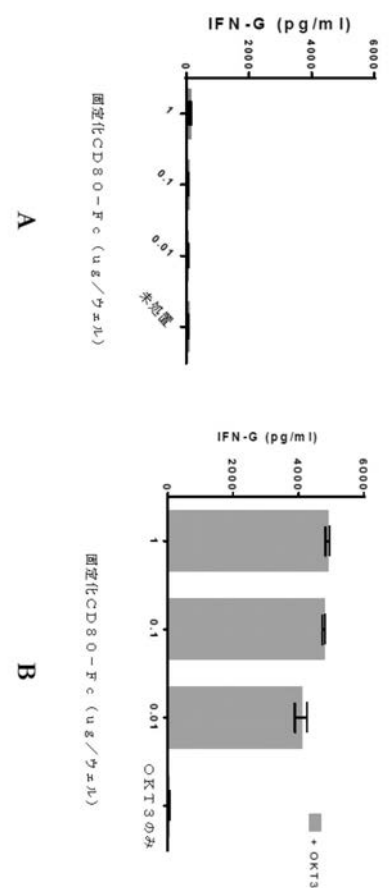
【図4A】



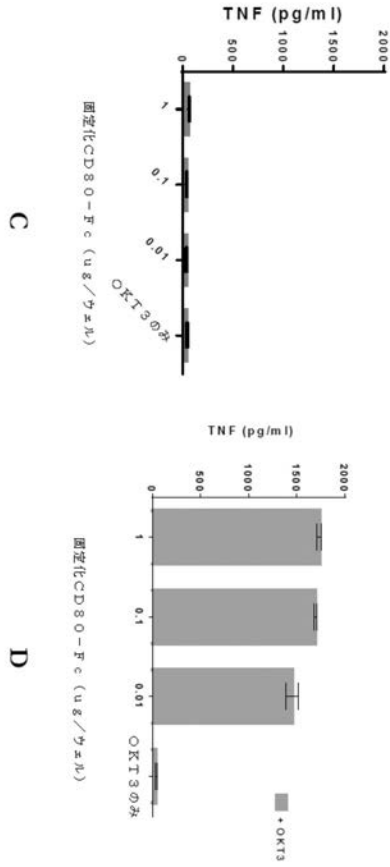
【図4B】



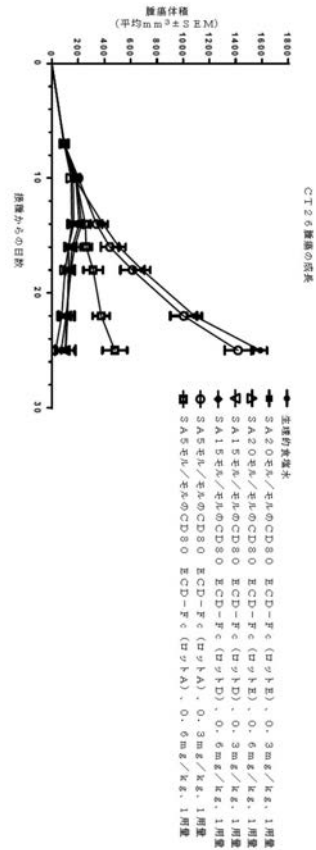
【図5 - 1】



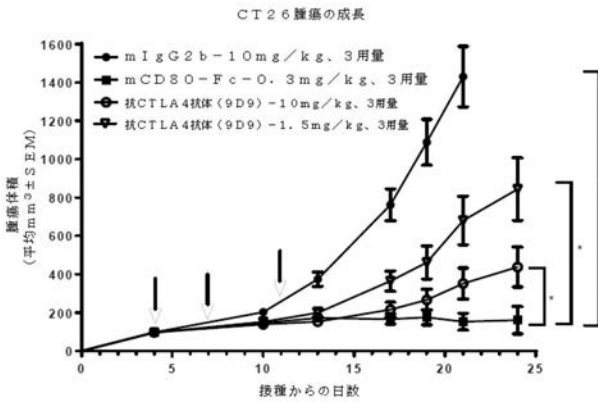
【 図 5 - 2 】



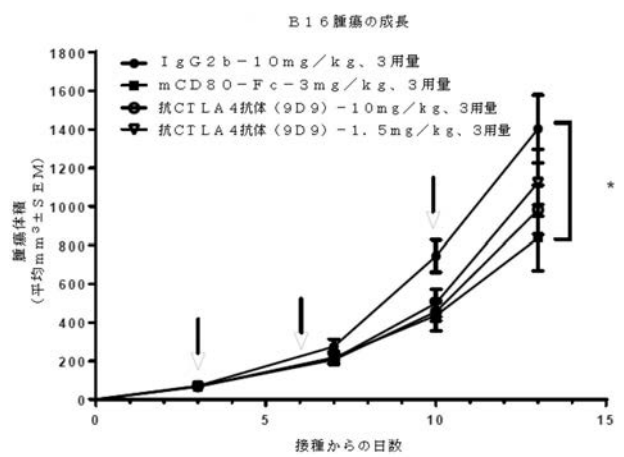
【 図 6 】



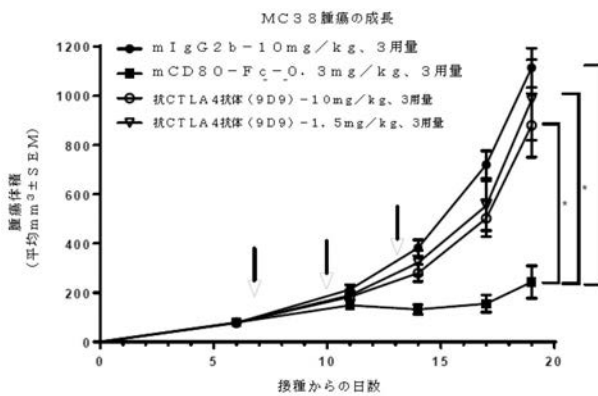
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 8 】



【配列表】

2018535204000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/059838**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-11, 25-36(completely); 12-24, 69-73, 79(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/059838

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705 A61K38/17 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) C07K A61K		
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	S. T. HAILE ET AL: "Soluble CD80 Restores T Cell Activation and Overcomes Tumor Cell Programmed Death Ligand 1-Mediated Immune Suppression", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 191, no. 5, 5 August 2013 (2013-08-05), pages 2829-2836, XP055334763, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1202777 abstract page 5 - page 6 page 9 ----- -/--	1-31, 69-73,79
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 13 January 2017		Date of mailing of the international search report 29/03/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Brero, Alessandro

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/059838

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>S. T. HAILE ET AL: "A Soluble Form of CD80 Enhances Antitumor Immunity by Neutralizing Programmed Death Ligand-1 and Simultaneously Providing Costimulation", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 2, no. 7, 2 April 2014 (2014-04-02), pages 610-615, XP055334764, US ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0204 abstract page 613 - page 614</p> <p>-----</p>	1-9, 25-31
X	<p>OSTRAND-ROSENBERG SUZANNE ET AL: "Novel strategies for inhibiting PD-1 pathway-mediated immune suppression while simultaneously delivering activating signals to tumor-reactive T cells", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN/HEIDELBERG, vol. 64, no. 10, 20 March 2015 (2015-03-20), pages 1287-1293, XP035533178, ISSN: 0340-7004, DOI: 10.1007/S00262-015-1677-5 [retrieved on 2015-03-20] abstract figure 2 page 1290</p> <p>-----</p>	1-9, 25-31
A	<p>DANIEL M. CZAJKOWSKY ET AL: "Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives", EMBO MOLECULAR MEDICINE, vol. 4, no. 10, 26 July 2012 (2012-07-26), pages 1015-1028, XP055160259, ISSN: 1757-4676, DOI: 10.1002/emmm.201201379 page 1016 page 1023</p> <p>-----</p>	1-36, 69-73,79
A	<p>RICARDO J. SOLÁ ET AL: "Glycosylation of Therapeutic Proteins", BIODRUGS, vol. 24, no. 1, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 9-21, XP055016446, ISSN: 1173-8804, DOI: 10.2165/11530550-000000000-00000 page 6</p> <p>-----</p>	1-36, 69-73,79

1

International Application No. PCT/ US2016/ 059838

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-11, 25-36(completely); 12-24, 69-73, 79(partially)

A CD80 extracellular domain (ECD) fusion molecule comprising a human CD80 ECD polypeptide and a human IgG1 Fc domain wherein the CD80 ECD fusion molecule comprises 10-60 mol sialic acid (SA) to mol of CD80 ECD Fc protein, wherein the molecule is capable of at least 80% tumor cell growth inhibition in at least one mouse syngeneic or xenograft cancer model over at least two weeks; and subject-matter relating thereto.

2. claims: 37-68, 74-78(completely); 12-24, 69-73, 79, 86-92(partially)

A method of treating cancer in a subject comprising administering to the subject an effective amount of a combination of a CD80 extracellular domain (ECD) or CD80 ECD fusion molecule and a programmed cell death 1 (PD-1) / programmed cell death ligand 1 (PD-L1) inhibitor; and subject-matter relating thereto.

3. claims: 80-85(completely); 86-92(partially)

A CD80 extracellular domain (ECD) fusion molecule comprising a human CD80 ECD polypeptide and a human IgG1 Fc domain with L234F, L235E, and P331S amino acid substitutions; and subject-matter relating thereto.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	Z N A
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
	C 1 2 N	15/62	

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

(72) 発明者 ベロヴィン, デイビッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, トゥー コーポ
レイト ドライブ

(72) 発明者 ブッシャ, デイビッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, トゥー コーポ
レイト ドライブ

(72) 発明者 センニーノ, バーバラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, トゥー コーポ
レイト ドライブ

F ターム(参考) 4C076 CC41 EE41 EE59 FF68
4C084 AA02 AA07 AA19 BA01 BA21 BA22 BA41 BA44 CA53 DA39
NA05 ZB26 ZC01 ZC75
4C085 AA14 AA15 BB11 CC23 EE01 EE03
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA86 EA22 EA28 FA74