

(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2020-508637

(P2020-508637A)

(43) 公表日 令和2年3月26日(2020.3.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-519271 (P2019-519271)
 (86) (22) 出願日 平成28年10月10日 (2016.10.10)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年6月7日 (2019.6.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2016/101681
 (87) 国際公開番号 WO2018/068182
 (87) 国際公開日 平成30年4月19日 (2018.4.19)

(71) 出願人 518082884
 クラウン バイオサイエンス、インコーポ
 レイテッド (タイツァン)
 中華人民共和国 2 1 5 4 0 0 チャンス
 , タイツァン, ベイジン ウェスト ロー
 ド 6
 (74) 代理人 100149076
 弁理士 梅田 慎介
 (74) 代理人 100119183
 弁理士 松任谷 優子
 (74) 代理人 100173185
 弁理士 森田 裕
 (74) 代理人 100162503
 弁理士 今野 智介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規抗 C T L A 4 抗体

(57) 【要約】

本開示は、C T L A 4 のそのリガンドとの結合を遮断できる、C T L A 4 に対する抗体および抗原結合断片を提供する。開示される抗体は、癌などの疾患を処置するための物質を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 3、5、7、19、21 および 23 からなる群から選択される重鎖 C D R 配列を含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

配列番号 11、13、15、27、29 および 31 からなる群から選択される軽鎖 C D R 配列を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

a) 配列番号 3、配列番号 5 および / または配列番号 7 を含む重鎖可変領域、ならびに
b) 配列番号 19、配列番号 21 および / または配列番号 23 を含む重鎖可変領域
からなる群から選択される重鎖可変領域を含む、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 4】

a) 配列番号 11、配列番号 13 および / または配列番号 15 を含む軽鎖可変領域、ならびに
b) 配列番号 27、配列番号 29 および / または配列番号 31 を含む軽鎖可変領域、
からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

a) 配列番号 3、配列番号 5 および / もしくは配列番号 7 を含む重鎖可変領域ならびに
配列番号 11、配列番号 13 および / もしくは配列番号 15 を含む軽鎖可変領域、または
b) 配列番号 19、配列番号 21 および / もしくは配列番号 23 を含む重鎖可変領域ならびに配列番号 27、配列番号 29 および / もしくは配列番号 31 を含む軽鎖可変領域、
を含む、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項 6】

配列番号 1、配列番号 17、配列番号 33、配列番号 37 および少なくとも 80% 配列同一性のあるそれらの相同配列からなる群から選択される重鎖可変領域を含む、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7】

配列番号 9、配列番号 25、配列番号 35、配列番号 39 および少なくとも 80% 配列同一性のあるそれらの相同配列からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 8】

a) 配列番号 1 を含む重鎖可変領域および配列番号 9 を含む軽鎖可変領域、
b) 配列番号 17 を含む重鎖可変領域および配列番号 25 を含む軽鎖可変領域、
c) 配列番号 33 を含む重鎖可変領域および配列番号 35 を含む軽鎖可変領域、
d) 配列番号 37 を含む重鎖可変領域および配列番号 39 を含む軽鎖可変領域、
e) a)、b)、c) または d) に対して少なくとも 80% の配列同一性のある重鎖可変領域および軽鎖可変領域
を含む、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

40

【請求項 9】

表面プラズモン共鳴結合アッセイによって測定されるものとして、 10^{-9} M 以下の K D 値でヒト細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (C T L A 4) タンパク質と特異的に結合可能である、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 10】

10^{-8} M 以下または 10^{-9} M 以下の K D 値でサル C T L A 4 と結合する、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 11】

E L I S A アッセイによって測定されるものとして、 $600 \text{ ng} / \text{ml}$ 以下または $300 \text{ ng} / \text{ml}$ 以下の I C 50 でヒト C T L A 4 のそのリガンドとの結合を阻害可能である

50

、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 2】

E L I S A アッセイによって測定されるものとして、3 0 n g / m l 以下または 3 n g / m l 以下の E C 5 0 でヒト C T L A 4 と結合可能である、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 3】

F A C S アッセイによって測定されるものとして、6 0 0 n g / m l 以下または 3 0 n g / m l 以下の I C 5 0 でヒト C T L A 4 のそのリガンドとの結合を阻害可能である、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 4】

F A C S アッセイによって測定されるものとして、6 0 0 0 n g / m l 以下、2 4 0 0 n g / m l 以下、1 2 0 0 n g / m l または 4 0 0 n g / m l 以下の E C 5 0 でヒト C T L A 4 と結合可能である、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 5】

ヒト化モノクローナル抗体である、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 6】

ヒト化モノクローナル抗体が、宿主細胞によって生成される、請求項 1 5 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 7】

先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 8】

先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片と同一のエピトープについて競合する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 9】

ラクダ化単ドメイン抗体、ダイアボディー、s c F v、s c F v 二量体、B s F v、d s F v、(d s F v) 2、d s F v - d s F v'、F v 断片、F a b、F a b'、F (a b') 2、d s ダイアボディー、ナノボディー、ドメイン抗体または二価ドメイン抗体である、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 0】

コンジュゲートをさらに含む、先行する請求項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 1】

請求項 1 から 2 0 に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 4】

請求項 1 から 2 0 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片を発現させる方法であって、請求項 2 3 に記載の宿主細胞を、請求項 2 1 に記載のポリヌクレオチドが発現される条件下で培養することを含む、方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 から 1 9 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片を含むキット。

【請求項 2 6】

個体において C T L A 4 によって媒介される疾患を処置する方法であって、個体に、請求項 1 から 2 0 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片の治療上有効な量を投与することを含む、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

個体が、CTLA4阻害剤に対して応答する可能性が高い障害または状態を有すると同定されている、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

疾患が癌である、請求項26に記載の方法。

【請求項 29】

請求項1から20のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片および1種または複数の医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 30】

免疫応答の上方制御から恩恵を受けるであろう状態を処置するための医薬の製造における、請求項1から20のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片の使用。

10

【請求項 31】

状態が癌である、請求項30に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示内容は、概して、新規抗CTLA4抗体に関する。

【0002】

配列表の参照

本出願は、以下の表に示す配列を含有する。参照により本明細書に組み込まれる、配列表のコンピュータによって読み取り可能なコピーが、本出願とともに提出される。

20

【0003】

【表 A - 1】

配列番号	注釈
1	6F3の重鎖可変領域のペプチド配列
2	6F3の重鎖可変領域のヌクレオチド配列
3	6F3の重鎖CDR1のペプチド配列
4	6F3の重鎖CDR1のヌクレオチド配列
5	6F3の重鎖CDR2のペプチド配列
6	6F3の重鎖CDR2ヌクレオチド配列
7	6F3の重鎖CDR3のペプチド配列
8	6F3の重鎖CDR3のヌクレオチド配列
9	6F3の軽鎖可変領域のペプチド配列
10	6F3の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列
11	6F3の軽鎖CDR1のペプチド配列
12	6F3の軽鎖CDR1のヌクレオチド配列
13	6F3の軽鎖CDR2のペプチド配列
14	6F3の軽鎖CDR2のヌクレオチド配列
15	6F3の軽鎖CDR3のペプチド配列
16	6F3の軽鎖CDR3のヌクレオチド配列
17	10B10の重鎖可変領域のペプチド配列
18	10B10の重鎖可変領域のヌクレオチド配列
19	10B10の重鎖CDR1のペプチド配列
20	10B10の重鎖CDR1のヌクレオチド配列
21	10B10の重鎖CDR2のペプチド配列
22	10B10の重鎖CDR2のヌクレオチド配列
23	10B10の重鎖CDR3のペプチド配列
24	10B10の重鎖CDR3のヌクレオチド配列
25	10B10の軽鎖可変領域のペプチド配列
26	10B10の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列
27	10B10の軽鎖CDR1のペプチド配列
28	10B10の軽鎖CDR1のヌクレオチド配列
29	10B10の軽鎖CDR2のペプチド配列
30	10B10の軽鎖CDR2のヌクレオチド配列

10

20

30

【表 A - 2】

31	10B10の軽鎖CDR3のペプチド配列	
32	10B10の軽鎖CDR3のヌクレオチド配列	
33	ヒト化6F3の重鎖可変領域のペプチド配列	
34	ヒト化6F3の重鎖可変領域のヌクレオチド配列	
35	ヒト化6F3の軽鎖可変領域のペプチド配列	
36	ヒト化6F3の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列	
37	ヒト化10B10の重鎖可変領域のペプチド配列	10
38	ヒト化10B10の重鎖可変領域のヌクレオチド配列	
39	ヒト化10B10の軽鎖可変領域のペプチド配列	
40	ヒト化10B10の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列	
41	ヒト化6F3の重鎖のペプチド配列	
42	ヒト化6F3の重鎖のヌクレオチド配列	
43	ヒト化6F3の軽鎖のペプチド配列	
44	ヒト化6F3の軽鎖のヌクレオチド配列	
45	ヒト化10B10の重鎖のペプチド配列	20
46	ヒト化10B10の重鎖のヌクレオチド配列	
47	ヒト化10B10の軽鎖のペプチド配列	
48	ヒト化10B10の軽鎖のヌクレオチド配列	
49	ヒトCTLA4-Hisのヌクレオチド配列	
50	ヒトCTLA4-Hisのペプチド配列	
51	ヒトCTLA4-mFcのヌクレオチド配列	
52	ヒトCTLA4-mFcのペプチド配列	
53	ヒトCTLA4-hFcのヌクレオチド配列	
54	ヒトCTLA4-hFcのペプチド配列	30

【背景技術】

【0004】

T細胞の活性化には、2つの別個のシグナルが必要である。第1のものは、T細胞受容体(TCR)と抗原提示細胞(APC)の表面のMHCに関連して提示される名目上の抗原との間の抗原特異的相互作用である。第2のシグナルは、いくつかの可能性ある同時刺激分子を介して提供される。T細胞の活性化は、T細胞応答を広げるまたは下方制御する細胞表面タンパク質を含む複数の機序によって厳しく調節されている(Bretscher et al., (1970) Science 69: 1042; Bernard et al., (2002) Transplantation 73: S31-S35)。CD28、構成的に発現されるIg-ファミリータンパク質は、T細胞応答の最良に特性決定された同時刺激シグナルの1つである。APC上のリガンドCD80(B7-1)およびCD86(B7-2)とのCD28結合は、インターロイキン-2(IL-2)および抗アポトーシス因子の産生を誘導することによってT細胞増殖につながる。CTLA4は、共阻害分子として同定された最初の分子であり、体液性および細胞性免疫応答の両方の調節において重要な役割を果たす(Brunet et al., (1987) Nature 328: 267-270)。CTLA4は、CD28スーパーファミリーに属し、CD28に対して31%の全体的なアミノ酸同一性を有する。CTLA4は、細胞外IgVドメインのジスルフィド結合ホモ二量体から構成される(Stamper et al., (2001) Nature 410: 608-611)

10

20

30

40

50

。他の阻害性受容体とは異なり、CTLA4は、古典的な免疫受容体チロシンベースの阻害性モチーフ(ITIM)を欠く。これにもかかわらず、2種のホスファターゼ、SHP-2およびセリン-トレオニンホスファターゼタンパク質ホスファターゼ2A(PP2A)は、CTLA4のYVKMモチーフと会合すると報告されている(Rudd et al., (2009) Immunol Rev. 229: 12-26)。CD28およびCTLA4は、その天然リガンドとしてCD80およびCD86を共有する。しかし、CTLA4:B7相互作用の親和性は、CD28:B7相互作用の親和性よりも10倍高い(Peach et al., (1994) J Exp Med 180: 2049-2058)。これによって、CTLA4が、CD28からB7リガンドを捕捉し、CD28依存性同時刺激をアンタゴナイズすることが可能となり、これは、T細胞活性化に対するCTLA4の阻害効果の一部を説明する。CTLA4はまた、T細胞応答を減弱するTCRシグナルとは独立した別個の遠位シグナルを送達することが提案されている(Calvo et al., (1997) J Exp Med 186: 1645-1653)。APC上のB7分子と相互作用することによって、CTLA4は、トリプトファンのキヌレニンへの変換を触媒するIDOの発現を誘導し、局所トリプトファン枯渇とその後のT細胞増殖および活性化の阻害をもたらす(Mellor et al., (2004) Int Immunol 16: 1391-1401)。脂質ラフトが会合しているCTLA4は、TCR複合体と親密に相互作用し、脂質ラフト完全性およびTCR媒介性シグナルを変更した(Chikuma et al., (2003) J Exp Med 197: 129-135)。さらに、CTLA4は、活性化されたT細胞上のシナプスへのリクルートの結果としてB7ライゲーションとは独立に機能し得る(Chikuma et al., (2005) J Immunol 175: 177-181)。

【0005】

負のレギュレーターとしてのCTLA4の重要性は、CTLA4ノックアウトマウスの表現型によって著しく示される(Tivol et al., (1995) Immunity 3: 541-547)。CTLA4欠損マウスは、抗原の認識およびCD80/CD86とCD28間の対立しないまたは競合しない同時刺激相互作用の後の、T細胞の過剰な増殖に起因する、脾腫、リンパ節腫大および多臓器Tリンパ性浸潤を伴う広範囲の急速致死性Tリンパ増殖性疾患を発症する。さらに、CTLA4遺伝子の多型は、1型糖尿病、甲状腺炎、全身性エリテマトーデスおよび関節リウマチを含むいくつかの自己免疫疾患と関連している(Gough et al., (2005) Immunol Rev 204: 102-115)。

【0006】

CD28は、ほとんどの休止T細胞および活性化されたT細胞で発現されるが、CTLA4は、構成的に発現される制御性T細胞(Treg)の場合を除いて、活性化されたT細胞に制限される。CTLA4は、TregおよびCD8エフェクター細胞(Teff)の両方で機能する。CTLA4は、CD8⁺エフェクター機能の調節において転写因子Eomesを標的とし、IFN γ およびグランザイムB発現および潜在的な細胞溶解性T細胞機能の低減をもたらす。Treg細胞でのCTLA4発現の喪失は、その抑制機能を損ない、病的自己免疫を誘発する。CTLA4のTeffに対する阻害効果およびTregに対する刺激効果は、免疫応答の減弱につながり、したがって、耐性および/またはアレルギーを媒介する(Carreno et al., (2000) J Immunol 165: 1352-1356; Chai et al., (2000) J Immunol 165: 3037-3042)。

【0007】

CTLA4は、その免疫応答における負の役割のために、癌の成長および発生との相関を有するとわかった。CTLA4は、腫瘍において、腫瘍内Teff細胞と比較して高レベルでTreg細胞で発現され、抗CTLA4は、完全な腫瘍保護を誘導するために、Treg細胞と、およびTeff細胞と結合することが必要であることがわかっている(P

eggs et al., (2009) J Exp Med 206: 1717)。さらに、抗CTLA4媒介性腫瘍破壊は、腫瘍内CD4+Teff/Treg細胞比の増大および腫瘍内CD8+Teff/Treg細胞比の増大と規則的に関連していた(Quezada et al., (2006) J Clin Invest 116: 1935; Curran et al., (2010) Proc Natl Acad Sci USA 107: 4275)。

【0008】

動物モデルを用いた初期の研究において、CTLA4の抗体遮断は、自己免疫を増悪させるとわかった(Perrin et al., (1996) J Immunol 157: 1333-6; Hurwitz et al., (1999) J Neuroimmunol 73: 57-62)。したがって、CTLA4阻害性シグナルの遮断は、腫瘍免疫への拡張によって、腫瘍特異的T細胞免疫性を増強し、定着腫瘍の退縮を引き起こすことがわかった。高悪性度結腸癌のマウスモデルでは、例えば、Leachらは、CTLA4遮断の治療効力を実証した。CTLA4に向けられた抗体の投与は、CD80陽性およびCD80陰性結腸癌腫両方の腫瘍成長を有意に拒絶した。さらに、この拒絶は、腫瘍細胞に対する統発的曝露に対して免疫性をもたらした。加えて、本発明者は、抗CTLA4を用いる処置が、マウス線維肉腫Sa1Nの成長を低減することを示した(Leach et al., (1996) Science 271: 1734-1736)。最近の研究によって、両細胞種でのCTLA4の遮断による、Teff細胞機能の直接増強およびTreg細胞活性の同時阻害が、癌免疫療法の際に抗CTLA4抗体の完全治療効果を媒介するために必須であることが示唆された(Peggs et al., (2009) J Exp Med 206: 1717-25)。

【0009】

複数の治療的介入と組み合わせたCTLA4遮断の多用途性は、4T1(乳癌)、EL4(リンパ腫)、CT26(結腸癌)などの種々のマウス腫瘍モデルにおいて報告されている(Jure-Kunkel et al., (2008) J Clin Oncol 26 Suppl 15: 3048)。ワクチン(Saha et al., (2010) Scand J Immunol 71: 70-82)、化学療法(Mokyr et al., (1998) Cancer Res 58: 5301-5304)、放射線(Dewan et al., (2009) Clin Cancer Res 15: 5379-5388)、シトシン-ホスフェートグアニンオリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)アジュバント(Davila et al., (2003) Cancer Res 63: 3281-3288)、抗体(Takeda et al., (2010) J Immunol 184: 5493-5501; Redmond et al., (2013) Cancer Immunol Res 2: 142-53)および凍結融解壊死処置(Waitz et al., (2012) Cancer Res 72: 430-439)と組み合わせた、抗腫瘍活性に対する相乗効果を実証されている。一例では、Jure-Kunkelらは、3種の異なる腫瘍株: SA1N線維肉腫、M109肺癌腫およびEMT-6乳房癌腫を使用して、抗CTLA4抗体およびイクサベピロンの組合せが、これらの腫瘍モデルにおいて、動物の70~100%において長く持続する完全な応答を達成し、各処置単独と比較してかなり優れた有効性をもたらす相乗的抗腫瘍効果を示すことを実証した。完全に腫瘍退縮した動物が、致死用量の腫瘍細胞を用いて再負荷された場合には、イクサベピロンおよびCTLA4抗体を用いて処置された動物は、その後の腫瘍を拒絶し、防御的記憶免疫応答の発生を示した(Jure-Kunkel et al., (2008) J Clin Oncol 26 Suppl 15: 3048)。

【0010】

イピリムマブ、CTLA4/B7相互作用を遮断可能であるヒト抗CTLA4抗体(Keler et al., (2003) J Immunol 171: 6251-9)は、複数の悪性腫瘍についての種々の臨床治験において試験されている(Hoos

10

20

30

40

50

et al., (2010) Semin Oncol 37: 533-46; Ascierto et al., (2011) J Transl Med 9: 196)。腫瘍退縮および疾患安定化が頻繁に観察され、種々の臓器系に影響を及ぼすことが可能な炎症性浸潤物を伴う有害事象を伴った。2011年には、イピリムマブは、すでに処置されていた進行黒色腫を有する患者の第III相治療における全生存の改善に基づいて、米国および欧州連合において切除不能なまたは転移性の黒色腫の処置のために承認された(Hodi et al., (2010) N Engl J Med 363: 711-23)。

【0011】

しかし、イピリムマブ処置は、処置されている人のうち10~20%におけるT細胞活性化および増殖のために、重症の、命にかかわる可能性のある免疫学的有害作用と関連していた。イピリムマブ処置の費用は、驚くほど高い。したがって、CTLA4に対する新規抗体を開発することが継続的に必要である。

10

【発明の概要】

【0012】

一態様では、本開示は、CTLA4と結合する新規抗体またはその抗原結合断片、それをコードするポリヌクレオチドおよびそれを使用する方法を提供する。

【0013】

一実施形態では、抗体またはその断片は、ヒトCTLA4と結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片は、ヒトおよびカニクイザルCTLA4と結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片は、T細胞上のCTLA4の、そのリガンドCD80およびCD86との相互作用を遮断する。

20

【0014】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号3、5、7、19、21、および23からなる群から選択される重鎖CDR配列を含む。

【0015】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号11、13、15、27、29および31からなる群から選択される軽鎖CDR配列を含む。

【0016】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、
a) 配列番号3、配列番号5および/または配列番号7を含む重鎖可変領域、ならびに
b) 配列番号19、配列番号21および/または配列番号23を含む重鎖可変領域
からなる群から選択される重鎖可変領域を含む。

30

【0017】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、
a) 配列番号11、配列番号13および/または配列番号15を含む軽鎖可変領域、ならびに
b) 配列番号27、配列番号29および/または配列番号31を含む軽鎖可変領域
からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む。

40

【0018】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、
a) 配列番号3、配列番号5および/または配列番号7を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号11、配列番号13および/または配列番号15を含む軽鎖可変領域、または
b) 配列番号19、配列番号21および/または配列番号23を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号27、配列番号29および/または配列番号31を含む軽鎖可変領域
を含む。

【0019】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号1、配列番号17、配列番号33、配列番号37および少なくとも80% (例えば、少なくとも85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%

50

)の配列同一性のあるそれらの相同配列からなる群から選択される重鎖可変領域を含む。

【0020】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号9、配列番号25、配列番号35、配列番号39および少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）の配列同一性のあるそれらの相同配列からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む。

【0021】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、

- a) 配列番号1を含む重鎖可変領域および配列番号9を含む軽鎖可変領域、
- b) 配列番号17を含む重鎖可変領域および配列番号25を含む軽鎖可変領域、
- c) 配列番号33を含む重鎖可変領域および配列番号35を含む軽鎖可変領域、
- d) 配列番号37を含む重鎖可変領域および配列番号39を含む軽鎖可変領域、
- e) a)、b)、c)またはd)に対して少なくとも80%の配列同一性のある重鎖可変領域および軽鎖可変領域

を含む。

【0022】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、表面プラズモン共鳴結合アッセイによって測定されるものとして、 10^{-9} M以下（例えば、 9×10^{-10} M、 8×10^{-10} M、 7×10^{-10} M、 6×10^{-10} M、 5×10^{-10} M、 4×10^{-10} M、 3×10^{-10} M、 2×10^{-10} Mまたは 10^{-10} M）のKD値で、ヒト細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA4）タンパク質と特異的に結合可能である。

【0023】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、 10^{-8} M以下（例えば、 9×10^{-9} M、 8×10^{-9} M、 7×10^{-9} M、 6×10^{-9} M、 5×10^{-9} M、 4×10^{-9} M、 3×10^{-9} M、 2×10^{-9} Mまたは 10^{-9} M）または 10^{-9} M以下（例えば、 9×10^{-10} M、 8×10^{-10} M、 7×10^{-10} M、 6×10^{-10} M、 5×10^{-10} M、 4×10^{-10} M、 3×10^{-10} M、 2×10^{-10} Mまたは 10^{-10} M）のKD値でサルCTLA4と結合する。

【0024】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、ELISAアッセイによって測定されるものとして、600 ng/ml以下（例えば、500 ng/ml、400 ng/ml、300 ng/ml、200 ng/ml、100 ng/ml）のIC50で、ヒトCTLA4のそのリガンドとの結合を阻害可能である。

【0025】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、ELISAアッセイによって測定されるものとして、30 ng/ml以下（例えば、25 ng/ml、20 ng/ml、15 ng/ml、10 ng/ml、9 ng/ml、8 ng/ml、7 ng/ml、6 ng/ml、5 ng/ml、4 ng/ml、3 ng/ml、2 ng/ml、1 ng/ml）のEC50で、ヒトCTLA4と結合可能である。

【0026】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、FACSアッセイによって測定されるものとして、600 ng/ml以下（例えば、500 ng/ml、400 ng/ml、300 ng/ml、200 ng/ml、100 ng/ml）または30 ng/ml以下（例えば、25 ng/ml、20 ng/ml、15 ng/ml、10 ng/ml、9 ng/ml、8 ng/ml、7 ng/ml、6 ng/ml、5 ng/ml、4 ng/ml、3 ng/ml、2 ng/ml、1 ng/ml）のIC50で、ヒトCTLA4のそのリガンドとの結合を阻害可能である。

【0027】

10

20

30

40

50

先行する請求項のいずれかの抗体またはその抗原結合断片は、FACSアッセイによって測定されるものとして、6000 ng/ml以下、2400 ng/ml以下、1200 ng/mlまたは400 ng/ml以下のEC50でヒトCTLA4と結合可能である。

【0028】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、ヒト化モノクローナル抗体である。

【0029】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、宿主細胞によって生成される。

【0030】

別の態様では、本開示は、同一エピトープについて、本明細書において開示される抗体またはその抗原結合断片と競合する抗体またはその抗原結合断片を提供する。

10

【0031】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、ラクダ化された単ドメイン抗体、ダイアポディー、scFv、scFv二量体、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、dsFv-dsFv'、Fv断片、Fab、Fab'、F(ab')₂、ジスルフィド安定化ダイアポディー(dsダイアポディー)、ナノポディー、ドメイン抗体または二価ドメイン抗体である。

【0032】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、コンジュゲートをさらに含む。

【0033】

本開示は、本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片をコードする単離されたポリヌクレオチドをさらに提供する。本開示は、前記の単離されたポリヌクレオチドを含むベクターをさらに提供する。本開示は、前記ベクターを含む宿主細胞をさらに提供する。特定の実施形態では、本明細書において提供されるポリヌクレオチドは、ベクター中でSV40プロモーターなどのプロモーターと作動可能に結合される。特定の実施形態では、本明細書において提供されるベクターを含む宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣細胞または293F細胞である。

20

【0034】

別の態様では、本開示は、本明細書において開示される抗体またはその抗原結合断片を発現する方法を提供する。特定の実施形態では、方法は、宿主細胞を、抗体またはその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドが発現される条件下で培養することを含む。

30

【0035】

別の態様では、本開示は、本明細書において開示されるような抗体またはその抗原結合断片を含むキットを提供する。

【0036】

別の態様では、本開示は、個体においてCTLA4によって媒介される疾患を処置する方法を提供する。特定の実施形態では、方法は、個体に本明細書において開示される抗体またはその抗原結合断片の治療上有効な量を投与することを含む。特定の実施形態では、個体は、CTLA4阻害剤に対して応答する可能性が高い障害または状態を有すると同定されている。特定の実施形態では、疾患は癌である。

40

【0037】

別の態様では、本開示は、本明細書において開示されるような抗体またはその抗原結合断片および1種以上の医薬上許容される担体を含む医薬組成物を提供する。これらの実施形態のうち特定のものでは、医薬担体は、例えば、希釈剤、抗酸化剤、アジュバント、賦形剤または非毒性補助物質であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】図1は、ELISAによって測定されたものとしての、マウス抗体6F3および10B10の結合EC50を示す図である。図の上のパネルは、マウス抗体の濃度の一定範囲にわたる吸光度を示し、図の下のパネルは、各試験抗体の算出されたEC50を示す

50

。

【図2】図2は、FACSによって測定されたものとしての、マウス抗体6F3および10B10の結合EC50を示す図である。図の上のパネルは、マウス抗体の濃度の一定範囲にわたる平均蛍光強度(MFI)を示し、図の下のパネルは、各試験抗体の算出されたEC50を示す。

【図3】図3は、ELISAによって測定されたものとしての、マウス抗CTLA4抗体6F3および10B10による、CTLA4リガンドCD80のCTLA4との結合の遮断を示す。図の上のパネルは、抗体の濃度の一定範囲にわたる吸光度を示す。抗CTLA4抗体の遮断IC50が、図3の下のパネルに示されている。

【図4】図4は、FACSによって測定されたものとしての、マウス抗CTLA4抗体6F3および10B10による、CTLA4リガンドCD80のCTLA4との結合の遮断を示す。図の上のパネルは、抗体濃度の一定範囲にわたるMFIを示す。抗CTLA4抗体の遮断IC50が、図4の下のパネルに示されている。

【図5】図5は、ELISAによって測定されたものとしての、ヒト化抗体6F3および10B10の結合EC50を示す図である。図の上のパネルは、ヒト化抗体の濃度の一定範囲にわたる吸光度を示し、図の下のパネルは、各試験抗体の算出されたEC50を示す。

。

【図6】図6は、FACSによって測定されたものとしての、ヒト化抗体6F3および10B10の結合EC50を示す図である。図の上のパネルは、ヒト化抗体の濃度の一定範囲にわたる平均蛍光強度(MFI)を示し、図の下のパネルは、各試験抗体の算出されたEC50を示す。

【図7】図7は、ELISAによって測定されたものとしての、ヒト化抗CTLA4抗体6F3および10B10による、CTLA4リガンドCD80のCTLA4との結合の遮断を示す。図の上のパネルは、抗体濃度の一定範囲にわたる吸光度を示す。抗CTLA4抗体の遮断IC50が、図7の下のパネルに示されている。

【図8】図8は、FACSによって測定されたものとしてのヒト化抗CTLA4抗体6F3および10B10による、CTLA4リガンドCD80のCTLA4との結合の遮断を示す。図の上のパネルは、抗体濃度の一定範囲にわたるMFIを示す。抗CTLA4抗体の遮断IC50が、図8の下のパネルに示されている。

【図9】図9は、種々の濃度のマウス抗CTLA4抗体に応じた、PBMCによるIL-2 (pg/mL) 産生を示す図である。試験されたマウス抗CTLA4抗体は、左から右に、10B10、6F3、mIgG1アイソタイプ対照であった。x軸上に示されるように、各抗体は、30 μg/mL、10 μg/mL、1 μg/mLで試験した。

【図10】図10は、種々の濃度のマウス抗CTLA4抗体に応じた、PBMCによるIFN- (pg/mL) 産生を示す図である。試験されたマウス抗CTLA4抗体は、左から右に、10B10、6F3、mIgG1アイソタイプ対照であった。x軸上に示されるように、各抗体は、30 μg/mL、10 μg/mL、1 μg/mLで試験した。

【図11】図11は、種々の濃度のヒト化抗CTLA4抗体に応じた、PBMCによるIL-2 (pg/mL) 産生を示す図である。試験されたヒト化抗CTLA4抗体は、左から右に、10B10、6F3、hIgG1アイソタイプ対照であった。x軸上に示されるように、各抗体は、30 μg/mL、10 μg/mL、1 μg/mLで試験した。

【図12】図12は、種々の濃度のヒト化抗CTLA4抗体に応じた、PBMCによるIFN- (pg/mL) 産生を示す図である。試験されたヒト化抗CTLA4抗体は、左から右に、10B10、6F3、mIgG1アイソタイプ対照であった。x軸上に示されるように、各抗体は、30 μg/mL、10 μg/mL、1 μg/mLで試験した。

【図13】図13は、HuGEMMモデルにおける腫瘍成長に対するヒト化CTLA4抗体の阻害効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0039】

本開示の以下の説明は、単に、本開示の種々の実施形態を例示するよう意図される。そ

10

20

30

40

50

のようなものとして、論じられる特定の改変は、本開示の範囲に対する制限と解釈されてはならない。本開示の範囲から逸脱することなく、種々の等価物、変法および改変が行われ得ることは当業者には明らかであろう、また、このような同等な実施形態は、本明細書に含まれるべきであるということは理解される。刊行物、特許および特許出願を含む本明細書において引用されたすべての参考文献は、参照によりその全文で本明細書に組み込まれる。

【0040】

定義

用語「抗体」は、本明細書において、特異的抗原と結合する任意の免疫グロブリン、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体または二重特異性（二価）抗体を含む。天然の無傷の抗体は、2つの重鎖および2つの軽鎖を含む。各重鎖は、可変領域ならびに第1、第2および第3の定常領域からなり、各軽鎖は、可変領域および定常領域からなる。哺乳動物重鎖は、 γ 、 μ 、 δ および ϵ として分類され、哺乳動物軽鎖は、 κ または λ として分類される。抗体は、「Y」型を有し、Yのステムは、ジスルフィド結合を介して一緒に結合している2つの重鎖の第2および第3の定常領域からなる。Yの各アームは、単一軽鎖の可変および定常領域と結合している単一重鎖の可変領域および第1の定常領域を含む。軽鎖および重鎖の可変領域は、抗原結合に関与している。両鎖中の可変領域は、一般に、相補性決定領域（CDR）（LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含む軽（L）鎖CDR、HCDR1、HCDR2、HCDR3を含む重（H）鎖CDR）と呼ばれる3つの高度可変ループを含有する。本明細書において開示される抗体および抗原結合断片のCDR境界は、Kabata、ChothiaまたはAl-Lazikaniの慣習（Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J Mol Biol 第273巻（4号）：927頁（1997）；Chothia, C.ら、J Mol Biol 第186巻（3号）：651～63頁（1985年）；Chothia, C.およびLesk, A. M., J Mol Biol 第196巻：901頁（1987年）；Chothia, C.ら、Nature 第342巻（6252号）：877～83頁（1989年）；Kabata E. A.ら、National Institutes of Health, Bethesda, Md.（1991年））によって定義または同定され得る。3つのCDRは、CDRよりもより高度に保存され、超可変ループを支持するスキャフォールドを形成するフレームワーク領域（FR）として知られる、両端に位置するストレッチの間に挿入されている。重鎖および軽鎖の定常領域は、抗原結合に関与しないが、種々のエフェクター機能を示す。抗体は、その重鎖の定常領域のアミノ酸配列に基づいてクラスに割り当てられる。抗体の5種の主要なクラスまたはアイソタイプとして、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがあり、これらは、 γ 、 δ 、 ϵ および μ 重鎖それぞれの存在を特徴とする。主要な抗体クラスのうちいくつかは、IgG1（1重鎖）、IgG2（2重鎖）、IgG3（3重鎖）、IgG4（4重鎖）、IgA1（1重鎖）またはIgA2（2重鎖）などのサブクラスに分割される。

【0041】

用語「抗原結合断片」とは、本明細書において、1つまたは複数のCDRを含む、抗体の一部から形成される抗体断片、または抗原と結合するが無傷の天然抗体構造を含まない任意のその他の抗体断片を指す。抗原結合断片の例として、制限するものではないが、ダイアボディー、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、ジスルフィド安定化Fv断片（dsFv）、（dsFv）₂、二重特異性dsFv（dsFv-dsFv'）、ジスルフィド安定化ダイアボディー（dsダイアボディー）、一本鎖抗体分子（scFv）、scFv二量体（二価ダイアボディー）、多重特異性抗体、ラクダ化単一ドメイン抗体、ナノボディー、ドメイン抗体および二価ドメイン抗体が挙げられる。抗原結合断片は、親抗体が結合する同一抗原と結合可能である。特定の実施形態では、抗原結合断片は、1種または複数の異なるヒト抗体に由来するフレームワーク領域にグラフトされた特定のヒト抗体に由来する1つまたは複数のCDRを含み得る。

【0042】

抗体に関して「Fab」とは、ジスルフィド結合によって単一重鎖の可変領域および第1の定常領域と結合している単一軽鎖（可変および定常領域の両方）からなる抗体の部分を指す。

【0043】

「Fab'」とは、ヒンジ領域の部分を含むFab断片を指す。

【0044】

「F(ab')₂」とは、Fab'の二量体を指す。

【0045】

抗体に関して「Fc」とは、ジスルフィド結合を介して第2の重鎖の第2および第3の定常領域と結合している、第1の重鎖の第2および第3の定常領域からなる抗体の部分を指す。抗体のFc部分は、ADCCおよびCDCなどの種々のエフェクター機能に關与するが、抗原結合における機能に關与しない。

10

【0046】

抗体に関して「Fv」とは、完全抗原結合部位を有するための抗体の最小断片を指す。Fv断片は、単一重鎖の可変領域と結合している単一軽鎖の可変領域からなる。

【0047】

「一本鎖Fv抗体」または「scFv」とは、互いに直接またはペプチドリンカー配列を介して接続している軽鎖可変領域および重鎖可変領域からなる遺伝子操作された抗体を指す（Houston JSら Proc Natl Acad Sci USA、第85巻：5879頁（1988年））。「一本鎖Fv-Fc抗体」または「scFv-Fc」とは、抗体のFc領域と接続しているscFvからなる遺伝子操作された抗体を指す。

20

【0048】

「ラクダ化単一ドメイン抗体」、「重鎖抗体」または「HCAb」とは、2つのV_Hドメインを含有し、軽鎖を含有しない抗体を指す（Riechmann L.およびMuyldermans S.、J Immunol Methods 第231巻（1-2号）：25～38頁（1999年）；Muyldermans S.、J Biotechnol 第74巻（4号）：277～302頁（2001年）；WO94/04678；WO94/25591；米国特許第6,005,079号）。重鎖抗体は、元々、ラクダ科〔Camelidae〕（ラクダ、ヒトコブラクダおよびラマ）に由来していた。ラクダ化抗体は、軽鎖を欠くが、信頼のおける抗原結合レパートリーを有する（Hamers-Casterman C.ら、Nature 第363巻（6428号）：446～8頁（1993年）；Nguyen VK.ら Immunogenetics 第54巻（1号）：39～47頁（2002年）；Nguyen VK.ら Immunology 第109巻（1号）：93～101頁（2003年））。重鎖抗体の可変ドメイン（V_HHドメイン）は、適応免疫応答によって生じた最小の既知抗原結合単位に相当する（Koch-Nolte F.ら、FASEB J 第21巻（13号）：3490～8頁（2007年））。

30

【0049】

「ナノボディー」とは、重鎖抗体に由来するV_HHドメインおよび2つの定常ドメイン、CH2およびCH3からなる抗体断片を指す。

40

【0050】

「ダイアボディー」は、2つの抗原結合部位を有する小さい抗体断片を含み、この断片は、同一ポリペプチド鎖中でV_Lドメインと接続しているV_Hドメイン（V_H-V_LまたはV_L-V_H）を含む（例えば、Holliger P.ら、Proc Natl Acad Sci USA、第90巻（14号）：6444～8頁（1993年）；EP404097；WO93/11161を参照のこと）。同一鎖上の2つのドメイン間で対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインが、別の鎖の相補的ドメインと対を形成するようにされ、それによって、2つの抗原結合部位を作製する。抗原結合部位は、異なる抗原（またはエピトープ）の同一のものを標的とし得る。

50

【0051】

「ドメイン抗体」とは、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含有する抗体断片を指す。特定の例では、2つまたはそれ以上の V_H ドメインは、ペプチドリinkerと共有結合によって結合されて、二価または多価ドメイン抗体を作製する。二価ドメイン抗体の2つの V_H ドメインは、同一または異なる抗原を標的とし得る。

【0052】

特定の実施形態では、「 $(dsFv)_2$ 」は、3つのペプチド鎖：ペプチドリinkerによって連結され、2つの V_L 部分とジスルフィド橋によって結合されている2つの V_H 部分を含む。

【0053】

特定の実施形態では、「二重特異性 ds ダイアボディー」は、 V_{H1} および V_{L1} の間のジスルフィド橋を介して $V_{L1} - V_{H2}$ （同様にペプチドリinkerによって連結された）と結合している $V_{H1} - V_{L2}$ （ペプチドリinkerによって連結された）を含む。

【0054】

特定の実施形態では、「二重特異性 $dsFv$ 」または「 $dsFv - dsFv'$ 」は、3つのペプチド鎖：重鎖がペプチドリinker（例えば、長い可動性リンカー）によって連結され、ジスルフィド橋を介してそれぞれ、 V_{L1} および V_{L2} 部分と結合しており、各ジスルフィド対形成された重鎖および軽鎖が異なる抗原特異性を有する、 $V_{H1} - V_{H2}$ 部分を含む。

【0055】

特定の実施形態では、「 $scFv$ 二量体」は、別の $V_H - V_L$ 部分と二量体化された $V_H - V_L$ （ペプチドリinkerによって連結された）を含み、その結果、一方の部分の V_H のものが、もう一方の部分の V_L と協調し、同一抗原（またはエピトープ）または異なる抗原（またはエピトープ）を標的化し得る2つの結合部位を形成する、二価ダイアボディーまたは二価 $scFv$ （ $BsFv$ ）である。その他の実施形態では、「 $scFv$ 二量体」は、 $V_{L1} - V_{H2}$ （同様にペプチドリinkerによって連結された）と会合している $V_{H1} - V_{L2}$ （ペプチドリinkerによって連結された）を含み、その結果、 V_{H1} および V_{L1} が協調し、 V_{H2} および V_{L2} が協調し、各協調対が異なる抗原特異性を有する二重特異性ダイアボディーである。

【0056】

抗体または抗原結合断片に関して用語「ヒト化」とは、本明細書において、抗体または抗原結合断片が、非ヒト動物に由来するCDR、ヒトに由来するFR領域、適用可能な場合には、ヒトに由来する定常領域を含むことを意味する。ヒト化抗体または抗原結合断片は、特定の実施形態では、ヒトにおいて低減された免疫原性を有するので、ヒト治療薬として有用である。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモットまたはハムスターである。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体または抗原結合断片は、非ヒトであるCDR配列を除く実質的にすべてのヒト配列から構成される。いくつかの実施形態では、ヒトに由来するFR領域は、それが由来するヒト抗体と同一のアミノ酸配列を含み得る、またはいくつかのアミノ酸変更、例えば、例えば、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1つ以下のアミノ酸の変更を含み得る。いくつかの実施形態では、このようなアミノ酸の変更は、重鎖FR領域中にのみ、軽鎖FR領域中にのみまたは両方の鎖中に存在し得る。いくつかの好ましい実施形態では、ヒト化抗体は、ヒトFR1 - 3およびヒトJHおよびJを含む。

【0057】

用語「キメラ」とは、本明細書において、ある種に由来する重鎖および/または軽鎖の一部ならびに別の種に由来する重鎖および/または軽鎖の残りを有する抗体または抗原結合断片を意味する。例示的例では、キメラ抗体は、ヒトに由来する定常領域およびマウスなどに由来する非ヒト種に由来する可変領域を含み得る。

【0058】

「CTLA4」は、本明細書において、細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4、膜貫通タン

10

20

30

40

50

パク質を指し、活性化された T r e g 細胞の表面で主に発現される。C T L A 4 は、C D 8 0 (B 7 - 1) および C D 8 6 (B 7 - 2) (両方とも抗原提示細胞 (A P C) 上に発現される) とより高い親和性で結合する C D 2 8 の相同体である。細胞性免疫の同時刺激経路、すなわち、C D 2 8 は、T 細胞の表面の C D 8 0 (B 7 - 1) および C D 8 6 (B 7 - 2) と結合し、T 細胞活性化、分化、組織遊走および末梢性トレランス誘導において役割を果たすが (S a l o m o n e t a l . , 2 0 0 1 , A n n R e v I m m u n o l 1 9 : 2 2 5 を参照のこと)、C T L A 4 の C D 8 0 / 8 6 との競合的結合は、C D 8 0 / 8 6 - C D 2 8 相互作用の遮断および T 細胞活性化の終結をもたらす。ヒト C T L A 4 の代表的なアミノ酸配列は、G e n B a n k 受託番号 : A A L 0 7 4 7 3 . 1 の下で公開されており、ヒト C T L A 4 をコードする代表的な m R N A 核酸配列は、G e n B a n k 受託番号 : A F 4 1 4 1 2 0 . 1 の下で示されている。

10

【 0 0 5 9 】

用語「特異的結合」または「特異的に結合する」とは、本明細書において、例えば、抗体および抗原の間などの 2 つの分子間の非ランダム結合反応を指す。特定の実施形態では、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片は、ヒトおよび / または C T L A 4 と、 10^{-6} M (例えば、 5×10^{-7} M、 2×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 2×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 2×10^{-9} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M) の結合親和性 (K_D) で特異的に結合する。 K_D とは、本明細書において、結合速度に対する解離速度の割合 (k_{off} / k_{on}) を指し、表面プラズモン共鳴法を使用して、例えば、B i a c o r e などの機器を使用して決定され得る。

20

【 0 0 6 0 】

「結合を遮断する」または「同一エピトープについて競合する」能力とは、本明細書において、抗体または抗原結合断片の、2 つの分子 (例えば、ヒト C T L A 4 および抗 C T L A 4 抗体) の間の結合相互作用を、任意の検出可能な程度に阻害する能力を指す。特定の実施形態では、2 つの分子間の結合を遮断する抗体または抗原結合断片は、2 つの分子間の結合相互作用を少なくとも 5 0 % 阻害する。特定の実施形態では、この阻害は、6 0 % 超、7 0 % 超、8 0 % 超または 9 0 % 超であり得る。

【 0 0 6 1 】

用語「エピトープ」は、本明細書において、抗体が結合する、抗原上の原子またはアミノ酸の特定の群を指す。2 種の抗体は、抗原について競合結合を示す場合には、抗原内の同一エピトープと結合し得る。例えば、本明細書において開示されるような抗体または抗原結合断片が、6 F 3 および 1 0 B 1 0 などの例示的抗体のヒト C T L A 4 との結合を遮断する場合には、抗体または抗原結合断片は、それらの例示的抗体と同一のエピトープと結合すると考えられ得る。

30

【 0 0 6 2 】

「6 F 3」または「6 F 3 マウス」とは、本明細書において、配列番号 3 の重鎖 C D R 1、配列番号 5 の C D R 2 および配列番号 7 の C D R 3 ならびに配列番号 1 1 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 3 の C D R 2 および配列番号 1 5 の C D R 3 を有するマウスモノクローナル抗体を指す。

40

【 0 0 6 3 】

「6 F 3 ヒト化」とは、本明細書において、6 F 3 のヒト化モノクローナル抗体を指し、配列番号 3 3 の重鎖可変領域および配列番号 3 5 の軽鎖可変領域を有する。

【 0 0 6 4 】

「1 0 B 1 0」または「1 0 B 1 0 マウス」とは、本明細書において、配列番号 1 9 の重鎖 C D R 1、配列番号 2 1 の C D R 2 および配列番号 2 3 の C D R 3 ならびに配列番号 2 7 の軽鎖 C D R 1、配列番号 2 9 の C D R 2 および配列番号 3 1 の C D R 3 を有するマウスモノクローナル抗体を指す。

【 0 0 6 5 】

「1 0 B 1 0 ヒト化」とは、本明細書において、1 0 B 1 0 のヒト化モノクローナルを

50

指し、配列番号 37 の重鎖可変領域および配列番号 39 の軽鎖可変領域を有する。

【0066】

「保存的置換」とは、アミノ酸配列に関して、アミノ酸残基を、同様の生理化学的特性を有する側鎖を有する異なるアミノ酸残基と置換することを指す。例えば、保存的置換は、疎水性側鎖を有するアミノ酸残基（例えば、Met、Ala、Val、LeuおよびIle）の間で、中性親水性側鎖を有する残基（例えば、Cys、Ser、Thr、AsnおよびGln）の間で、酸性側鎖を有する残基（例えば、Asp、Glu）の間で、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、His、LysおよびArg）の間で、または芳香族側鎖を有する残基（例えば、Trp、TyrおよびPhe）の間で行われ得る。当技術分野で公知であるように、保存的置換は、通常、タンパク質のコンホメーション構造において重大な変化を引き起こさず、従って、タンパク質の生物活性を保持し得る。

10

【0067】

アミノ酸配列（または核酸配列）に関して「配列同一性パーセント（％）」は、最大数の同一アミノ酸（または核酸）を達成するように、配列をアラインし、必要に応じて、ギャップを導入した後の、参照配列中のアミノ酸（または核酸）残基と同一である、候補配列中のアミノ酸（または核酸）残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸残基の保存的置換は、同一残基と考えられる場合も考えられない場合もある。アミノ酸（または核酸）配列同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、例えば、BLASTN、BLASTp (U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI) のウェブサイト入手可能、Altschul S.F.ら、J. Mol. Biol.、第215巻：403～410頁(1990年)；Stephen F.ら、Nucleic Acids Res.、第25巻：3389～3402頁(1997年)も参照のこと)、ClustalW2 (European Bioinformatics Institute のウェブサイト入手可能、Higgins D.G.ら、Methods in Enzymology、第266巻：383～402頁(1996年)；Larkin M.A.ら、Bioinformatics (Oxford, England)、第23巻(21号)：2947～8頁(2007年)も参照のこと)およびALIGNまたはMegalign (DNASTAR) ソフトウェアなどの公的に入手可能なツールを使用して達成され得る。当業者は、ツールによって提供されるデフォルトパラメータを使用してもよく、またはアラインメントにとって必要に応じて、例えば、適したアルゴリズムを選択することなどによって、パラメータをカスタマイズしてもよい。

20

30

【0068】

「エフェクター機能」とは、本明細書において、抗体のFc領域の、C1複合体およびFc受容体などのそのエフェクターとの結合に起因する生物学的活性を指す。例示的エフェクター機能は、抗体およびC1複合体上のC1qの相互作用によって誘導される補体依存性細胞毒性(CDC)、抗体のFc領域の、エフェクター細胞上のFc受容体との結合によって誘導される抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)、および食作用を含む。

【0069】

状態を「処置すること」または「処置」とは、本明細書において、状態を予防することまたは軽減すること、状態の発症または発生の速度を減速すること、状態の発生のリスクを低減すること、状態と関連する症状の発生を予防することまたは遅延すること、状態と関連する症状を低減することまたは終了させること、状態の完全なまたは部分的な退縮をもたらすこと、状態を治癒させることまたはそれらのいくつかの組合せを含む。

40

【0070】

「単離された」物質は、天然状態から人の手によって変更されている。「単離された」組成物または物質が天然に生じる場合には、元の環境から変化されている、または取り出されている、または両方である。例えば、生存する動物中に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、「単離されて」いないが、同一ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、実質的に純粋な状態で存在するようにその天然状態の共存する材料から十分

50

に分離されている場合には「単離されている」。特定の実施形態では、抗体および抗原結合断片は、電気泳動法（SDS-PAGE、等電点電気泳動、キャピラリー電気泳動など）またはクロマトグラフィー法（イオン交換クロマトグラフィーまたは逆相HPLCなど）によって決定されるような、少なくとも90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%の純度を有する。

【0071】

用語「ベクター」とは、本明細書において、タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、そのタンパク質の発現を引き起こすように作動可能に挿入され得る媒体を指す。ベクターは、宿主細胞内に運ぶ遺伝要素の発現を引き起こすように、宿主細胞を形質転換、形質導入またはトランスフェクトするために使用され得る。ベクターの例として、プラスミド、ファージミド、コスミド、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）またはP1由来人工染色体（PAC）などの人工染色体、ファージまたはM13ファージなどのバクテリオファージおよび動物ウイルスが挙げられる。ベクターとして使用される動物ウイルスのカテゴリーとして、レトロウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、パキユロウイルス、パピローマウイルスおよびパポバウイルス（例えば、SV40）が挙げられる。ベクターは、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択可能要素およびリポーター遺伝子を含む、発現を制御するための種々の要素を含有し得る。さらに、ベクターは、複製起点を含有し得る。ベクターはまた、限定されるものではないが、ウイルス粒子、リボソームまたはタンパク質コーティングを含む、細胞へのその侵入を補助するための材料を含み得る。

10

20

【0072】

語句「宿主細胞」とは、本明細書において、外因性ポリヌクレオチドおよび/またはベクターが導入されている細胞を指す。

【0073】

用語「治療上有効な量」または「有効投与量」とは、本明細書において、CTLA4抗体に關与している疾患または状態を処置するのに有用な薬物の投与量または濃度を指す。

【0074】

用語「医薬上許容される」は、指定された担体、ビヒクル、希釈剤、賦形剤（単数または複数）および/または塩が、一般に、製剤を含むその他の成分と化学的におよび/または物理的に適合しており、そのレシピエントと生理学的に適合していることを示す。

30

【0075】

抗CTLA4抗体

抗CTLA3抗体6F3、10B10、6F3ヒト化および10B10ヒト化のCDR配列および重鎖または軽鎖可変領域が、以下の表1～4に示されている。

【0076】

【表1】

表1. アミノ酸配列番号

抗体	アミノ酸配列番号							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
6F3	1	3	5	7	9	11	13	15
10B10	17	19	21	23	25	27	29	31
6F3 Hu	33	3	5	7	35	11	13	15
10B10 Hu	37	19	21	23	39	27	29	31

40

【0077】

【表 2】

表2. 重鎖CDR配列

名称	HCDR	配列番号	配列
6F3	1	3	DYEMH
	2	5	VIDPETGGITYNQKFKG
	3	7	RGARATVYNYVMDY
10B10	1	19	SGYSWN
	2	21	YIRFDGNNNYPFLKN
	3	23	NYGTWGAMDF

10

【 0 0 7 8 】

【表 3】

表3. 軽鎖CDR配列

名称	LCDR	配列番号	配列
6F3	1	11	RASENIHNYLA
	2	13	NAKTLGD
	3	15	QHFWSTPWT
10B10	1	27	KTSQDINKYMA
	2	29	YTSILQP
	3	31	QQYDNLNT

20

30

【 0 0 7 9 】

【表 4 - 1】

表4.重鎖および軽鎖可変領域ならびに全長配列

名称	領域 ¹	配列番号	配列
6F3 マウス	重鎖 可変	25	QVKLQESGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWM KQTPVHGLEWIGVIDPETGGITYNQKFKGKATLTADKSS STAYMEFLSLTSEDSAVYYCTRRGARATVYNYVMDYW GQGTSVTVSS
6F3 マウス	軽鎖 可変	27	DIVMTQTTASLSASVGETVTITCRASENIHNYLAWYQQ KQGRSPQLLVYNAKTLGDGVPSRFSGSGSGTQYSLKINS LQPEDFGSYYCQHFWSTPWTFGGGKLEIK
10B10 マウス	重鎖 可変	29	DVQLQESGPGLVTPSQSLTCSVTGYSITSGYSWNWIR QFPGNKLEWMGYIRFDGNNNYPFLKNRISITRDTSENQ FFLKLNSVTTEDTATYYCARNYGTWGAMDFWGQGTSV TVSS
10B10 マウス	軽鎖 可変	31	DIVLTQSPSSLSASLGKVTITCKTSQDINKYMAWYQHK PGKGPRLLIYYTSILQPGIPSRFSGSGSGTDYSFSINNLEP EDIATYYCQQYDNLNTFGGGTMLEIKR
6F3 ヒト化	重鎖 可変	33	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEMHWV RQAPGQGLEWIGVIDPETGGITYNQKFKGRATLTADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRRGARATVYNYVMDY WGQGLVTVSS
6F3 ヒト化	軽鎖 可変	35	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIHNYLAWYQQK PGKAPKLLVYNAKTLGDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFATYYCQHFWSTPWTFGGGKVEIK
10B10 ヒト化	重鎖 可変	37	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVSGYSITSGYSWNWIR QPPGKGLEWMGYIRFDGNNNYPFLKNRITISRDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARNYGTWGAMDFWGQGT LTVSS
10B10 ヒト化	軽鎖 可変	39	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKTSQDINKYMAWYQQ KPGKAPKLLIYYTSILQPGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQ PEDIATYYCQQYDNLNTFGGGKVEIK
6F3 ヒト化	全長 重鎖	41	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEMHWV RQAPGQGLEWIGVIDPETGGITYNQKFKGRATLTADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRRGARATVYNYVMDY WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
6F3 ヒト化	全長 軽鎖	43	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIHNYLAWYQQK PGKAPKLLVYNAKTLGDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFATYYCQHFWSTPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

【表 4 - 2】

10B10 ヒト化	全長 重鎖	45	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVSGYSITSGYSWNWIR QPPGKGLEWMGYIRFDGNNNNYNPFLKNRITISRDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARNYGTWGAMDFWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10B10 ヒト化	全長 軽鎖	47	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKTSQDINKYMAWYQQ KPGKAPKLLIYYTSLIQPGVPSRFSGSGSGTDYFTISLQ PEDIATYYCQQYDNLNTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

【0080】

20

特定の実施形態では、本明細書において提供される1つまたは複数のCDR配列は、得られる抗体が1つまたは複数の特性において親抗体を上回って改善されるように（例えば、抗原結合の改善、グリコシル化パターンの改善、CDR残基でのグリコシル化のリスクの低減、CDR残基での脱アミノ化の低減、薬物動態半減期の増大、pH感受性およびコンジュゲーションに対する適合性）、そうでなければ、親抗体と比較可能である（すなわち、上記の修飾または変更を除いて、CDR配列の同一のセットを有する抗体）、または親抗体の抗原結合特性を少なくとも実質的に保持するように、修飾または変更され得る。

【0081】

30

当業者ならば、本明細書において提供されるCDR配列は、ヒトCTLA4との結合親和性の改善などの生物活性の改善を提供するように、アミノ酸の1つまたは複数の置換を含有するように修飾され得るということを理解するであろう。例えば、抗体変異体（FabまたはscFv変異体など）のライブラリーが作製され、ファージディスプレイ技術を用いて発現され、次いで、ヒトCTLA4との結合親和性についてスクリーニングされ得る。別の例については、抗体の、ヒトCTLA4との結合をコンピュータ上でシミュレートし、結合面を形成する抗体上のアミノ酸残基を同定するためにコンピュータソフトウェアが使用され得る。このような残基は、結合親和性の低下を防ぐために置換において避けられるか、またはより強力な結合を提供するために置換のために標的とされるかのいずれかであり得る。特定の実施形態では、CDR配列中の置換（単数または複数）のうち少なくとも1つ（またはすべて）は、保存的置換である。

【0082】

40

特定の実施形態では、抗体およびその抗原結合断片は、表1および2に列挙されるもの（単数または複数）に対して、少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）の配列同一性を有する、1つまたは複数のCDR配列を含み、その一方で、対応するCDR配列が、表1および2に列挙されるもの（単数または複数）に対して100%の配列同一性にある場合を除いて、ヒトCTLA4に対して、実質的に同一の配列を有するその親抗体と同様またはさらにより高いレベルの結合親和性を保持する。

【0083】

特定の実施形態では、抗CTLA4抗体およびその抗原結合断片は、ヒト化されている。ヒト化抗体は、ヒト化抗体を用いる場合にしばしば観察されるような、ヒトにおける免

50

疫原性および/または結合親和性の低減の問題を有さない。これらのヒト化抗体は、ヒト CTLA4 に対する結合親和性を、好ましくは、例示的抗体：6F3 および 10B10 のものと同様のレベルで保持する。

【0084】

また、同一エピトープについて、本明細書において提供される抗 CTLA4 抗体およびその抗原結合断片と競合する、抗体および抗原結合断片も本明細書において考慮される。特定の実施形態では、抗体は、6F3、10B10、6F3 ヒト化または 10B10 ヒト化のヒトまたはサル CTLA4 との結合を、例えば、 10^{-6} M 未満、 10^{-7} M 未満、 $10^{-7} \cdot 5$ M 未満、 10^{-8} M 未満、 $10^{-8} \cdot 5$ M 未満、 10^{-9} M 未満または 10^{-10} M 未満の IC_{50} 値（すなわち、50% 阻害濃度）で遮断する。 IC_{50} 値は、ELISA アッセイ、放射性リガンド競合結合アッセイおよび FACS 解析などの競合アッセイに基づいて決定される。

10

【0085】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される抗 CTLA4 抗体およびその抗原結合断片は、プラズモン共鳴結合アッセイまたは ELISA によって測定されるものとして、 10^{-6} M（例えば、 5×10^{-7} M、 2×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 2×10^{-8} M、 10^{-8} M、 $5 \cdot 10^{-9}$ M、 2×10^{-9} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M）の結合親和性（ K_D ）でヒト CTLA4 と特異的に結合可能である。結合親和性は、抗原および抗原結合分子間の結合が平衡に達する場合に、結合速度に対する解離速度の割合（ k_{off} / k_{on} ）として算出される K_D 値によって表され得る。抗原結合親和性（例えば、 K_D ）は、例えば、Biacore などの機器を使用するプラズモン共鳴結合アッセイを含む当技術分野で公知の適した方法を使用して適宜決定され得る（例えば、Murphy, M.ら、Current protocols in protein science、第19章、19.14 単元、2006 年を参照のこと）。

20

【0086】

特定の実施形態では、本明細書において提供される抗体およびその断片は、ヒト CTLA4 と、 0.05 nM ~ 1 nM（例えば、 0.1 nM ~ 0.9 nM、 0.1 nM ~ 0.8 nM、 0.1 nM ~ 0.7 nM、 0.1 nM ~ 0.6 nM、 0.1 nM ~ 0.5 nM、 0.1 nM ~ 0.4 nM、 0.1 nM ~ 0.3 nM または 0.1 nM ~ 0.2 nM）の EC_{50} （すなわち、50% 結合濃度）で結合する。抗体のヒト CTLA4 との結合は、当技術分野で公知の方法、例えば、ELISA などのサンドイッチアッセイ、ウエスタンブロット、その他の結合アッセイによって測定され得る。例示的例では、試験抗体（すなわち、第1の抗体）は、固定化されたヒト CTLA4 と結合することが可能にされ、結合していない抗体を洗浄除去した後に、結合している第1の抗体と結合でき、その検出を可能にする標識された二次抗体が導入される。検出は、固定化された CTLA4 が使用される場合にはマイクロプレートリーダーを用いて実施され得る。

30

【0087】

特定の実施形態では、本明細書において提供される抗体およびその断片は、ヒト CTLA4 のヒト B7.1 または B7.2 との結合を、競合アッセイにおいて測定されるような、 3 nM ~ 10 nM（例えば、 3.5 nM ~ 9.5 nM、 3.5 nM ~ 8.5 nM または 5 nM ~ 8.5 nM）の IC_{50} で阻害する。

40

【0088】

いくつかの実施形態では、抗 CTLA4 抗体およびその抗原結合断片は、免疫グロブリン定常領域をさらに含む。いくつかの実施形態では、免疫グロブリン定常領域は、重鎖および/または軽鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、CH1、CH1-CH2 または CH1-CH3 領域を含む。いくつかの実施形態では、定常領域は、所望の特性を付与するように1つまたは複数の修飾をさらに含み得る。例えば、定常領域は、1種もしくは複数のエフェクター機能を低減もしくは枯渇させるように、FcRn 受容体結合を改善するように、または1つまたは複数のシステイン残基を導入するように修飾され得る。いくつかの実施形態では、抗 CTLA4 抗体およびその抗原結合断片は、エフェクター機能が低減し

50

ている、または枯渇している I g G 4 アイソタイプの定常領域を有する。種々のアッセイ、例えば、F c 受容体結合アッセイ、C 1 q 結合アッセイおよび細胞溶解アッセイが、A D C C または C D C 活性を評価すると知られており、当業者によって容易に選択され得る。

【0089】

特定の実施形態では、抗体およびその抗原結合断片は、抗体-薬物コンジュゲート、二重特異性または多価抗体の基礎として使用され得る。

【0090】

本明細書において提供される抗 C T L A 4 抗体またはその抗原結合断片は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、組換え抗体、二重特異性抗体、標識された抗体、二価抗体または抗イディオタイプ抗体であり得る。組換え抗体は、動物においてではなく組換え法を使用して *in vitro* で調製される抗体である。二重特異性または二価抗体は、2種の異なるモノクローナル抗体の断片を有し、2種の異なる抗原を結合し得る人工抗体である。「二価」である抗体またはその抗原結合断片は、2つの抗原結合部位を含む。2つの抗原結合部位は、同一抗原と結合する場合も、またはそれらは、異なる抗原と各々結合する場合もあり、その場合には、抗体または抗原結合断片は、「二重特異性」と特性決定される。

【0091】

いくつかの実施形態では、抗 C T L A 4 抗体およびその抗原結合断片は、ラクダ化単ドメイン抗体、ダイアボディー、s c F v、s c F v 二量体、B s F v、d s F v、(d s F v) 2、d s F v - d s F v'、F v 断片、F a b、F a b'、F (a b') 2、d s ダイアボディー、ナノボディー、ドメイン抗体または二価ドメイン抗体である。

【0092】

いくつかの実施形態では、抗 C T L A 4 抗体およびその抗原結合断片は、コンジュゲートをさらに含む。種々のコンジュゲートは、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片と連結され得るということは考慮される(例えば、「Conjugate Vaccines」、Contributions to Microbiology and Immunology、J. M. Cruse および R. E. Lewis、Jr. (編)、Carger Press、New York、(1989年)を参照のこと)。これらのコンジュゲートは、その他の方法の中でも、共有結合、親和性結合、インターカレーション、配位結合、複合体形成、会合、ブレンドまたは付加によって抗体または抗原結合断片と連結され得る。特定の実施形態では、本明細書において開示される抗体および抗原結合断片は、エピトープ結合部分の外側に、1つまたは複数のコンジュゲートとの結合に利用され得る特異的部位を含有するように遺伝子操作され得る。例えば、このような部位は、コンジュゲートとの共有結合を促進するために、例えば、システインまたはヒスチジン残基などの1つまたは複数の反応性アミノ酸残基を含み得る。特定の実施形態では、抗体は、コンジュゲートと間接的に、または別のコンジュゲートを介して連結され得る。例えば、抗体または抗原結合断片は、ビオチンとコンジュゲートされ、次いで、アビジンとコンジュゲートされている第2のコンジュゲートと間接的にコンジュゲートされ得る。コンジュゲートは、検出可能な標識、薬物動態修飾部分、精製部分または細胞傷害性部分であり得る。検出可能な標識の例として、蛍光標識(例えば、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、フィコエリトリンまたはテキサスレッド)、酵素基質標識(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖類オキシダーゼまたは - D - ガラクトシダーゼ)、放射性同位元素(例えば、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{111}At 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi および ^{32}P 、その他のランタニド、発光標識)、発色団部分、ジゴキシゲニン、ビオチン/アビジン、DNA 分子または検出用金を挙げることができる。特定の実施形態では、コンジュゲートは、抗体の半減期を増大するのに役立つ P E G などの薬物動態修飾部分であり得る。その他の適した

10

20

30

40

50

ポリマーとして、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンなど、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマーなどが挙げられる。特定の実施形態では、コンジュゲートは、磁性ビーズなどの精製部分であり得る。「細胞傷害性部分」は、細胞にとって有害である、または細胞に損傷を与え得る、または死滅させ得る任意の薬剤であり得る。細胞傷害性部分の例として、制限するものではないが、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラセンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ビューロマイシンおよびその類似体、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンCおよびシスジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルピシン（以前は、ダウノマイシン）およびドキシソルピシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前は、アクチノマイシン）、プレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（AMC））および抗有糸分裂剤（例えば、ピンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられる。

10

20

【0093】

ポリヌクレオチドおよび組換え法

本開示は、抗CTLA4抗体およびその抗原結合断片をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。特定の実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、表1に提供されるCDR配列をコードする、表1および2に示されるような1種または複数のヌクレオチド配列を含む。

【0094】

いくつかの実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、重鎖可変領域をコードし、配列番号2、配列番号18、配列番号34、配列番号38および少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）の配列同一性を有するそれらの相同配列からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、軽鎖可変領域をコードし、配列番号10、配列番号26、配列番号36、配列番号40および少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）の配列同一性を有するそれらの相同配列からなる群から選択される配列を含む。特定の実施形態では、同一性パーセンテージは、遺伝暗号縮重に起因し、コードされるタンパク質配列は、変更されないままである。

30

【0095】

抗CTLA4抗体およびその抗原結合断片（例えば、表1中の配列を含む）をコードする単離されたポリヌクレオチドは、当技術分野で公知の組換え技術を使用してさらなるクローニング（DNAの増幅）のために、または発現のためにベクター中に挿入され得る。別の実施形態では、抗体は、当技術分野で公知の相同組換えによって生成され得る。モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離され、配列決定される。多数のベクターが入手可能である。ベクター成分は、一般に、限定されるものではないが、以下のうち1種または複数を含む：シグナル配列、複製起点、1種または複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター（例えば、SV40、CMV、EF-1）および転写終結配列。

40

【0096】

50

いくつかの実施形態では、ベクター系として、哺乳動物、細菌、酵母系などが挙げられ、限定されるものではないが、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pCMV、pEGFP、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS420、pLexA、pACT2.2など、ならびにその他の実験室および市販のベクターなどのプラスミドを含む。適したベクターとして、プラスミドまたはウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）を挙げるができる。

【0097】

抗体または抗原結合断片をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターは、クローニングまたは遺伝子発現のために宿主細胞に導入され得る。クローニングに適した、本明細書におけるベクター中でDNAを発現する宿主細胞は、上記の原核生物、酵母または高等真核生物細胞である。この目的に適した原核生物として、グラム陰性またはグラム陽性生物などの真正細菌、例えば、エシェリキア属〔*Escherichia*〕、例えば、大腸菌〔*E. coli*〕、エンテロバクター属〔*Enterobacter*〕、エルウィニア属〔*Erwinia*〕、クレブシエラ属〔*Klebsiella*〕、プロテウス属〔*Proteus*〕、サルモネラ属〔*Salmonella*〕、例えば、サルモネラ・チフィリウム〔*Salmonella typhimurium*〕、セラチア属〔*Serratia*〕、例えば、セラチア・マルセセンス〔*Serratia marcescans*〕および赤痢菌属〔*Shigella*〕ならびに*B. subtilis*および*B. licheniformis*などのバチルス属〔*Bacilli*〕、*P. aeruginosa*などのシュードモナス属〔*Pseudomonas*〕およびストレプトマイセス属〔*Streptomyces*〕などの腸内細菌科〔*Enterobacteriaceae*〕が挙げられる。

【0098】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母などの真核細胞微生物は、抗CTLA4抗体をコードするベクターの適したクローニングまたは発現宿主である。サッカロミセス・セレビシエ〔*Saccharomyces cerevisiae*〕または一般的なパン酵母は、下等真核細胞宿主微生物の中で最もよく使用されている。しかし、シゾサッカロミセス・ポンベ〔*Schizosaccharomyces pombe*〕；例えば、*K. lactis*、*K. fragilis*（ATCC 12,424）、*K. bulgaricus*（ATCC 16,045）、*K. wickerhamii*（ATCC 24,178）、*K. waltii*（ATCC 56,500）、*K. drosophilorum*（ATCC 36,906）、*K. thermotolerans*および*K. marxianus*などのクリベロミセス属〔*Kluyveromyces*〕宿主；ヤロウイア属〔*yarrowia*〕（EP 402,226）；ピキア・パストリス〔*Pichia pastoris*〕（EP 183,070）；カンジダ属〔*Candida*〕；トリコデルマ・リーゼイ〔*Trichoderma reesia*〕（EP 244,234）；アカパンカビ〔*Neurospora crassa*〕；シュワニオミセス・オクシデンタリス〔*Schwanniomyces occidentalis*〕などのシュワニオミセス属〔*Schwanniomyces*〕；および例えば、アカパンカビ属〔*Neurospora*〕、アオカビ属〔*Penicillium*〕、トリポクラジウム属〔*Tolyposcladium*〕ならびに*A. nidulans*およびクロコウジカビ〔*A. niger*〕などのアスペルギルス属〔*Aspergillus*〕宿主などの糸状菌などの、いくつかのその他の属、種および株が一般に入手可能であり、本明細書において有用である。

【0099】

本明細書において提供されるグリコシル化抗体または抗原断片の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物に由来する。脊椎動物細胞における例として、植物および昆虫細胞が挙げられる。多数のパキウウイルス株および変異体ならびにヨトウガ〔*Spodoptera frugiperda*〕（イモムシ）、ネッタイシマカ〔*Aedes aegypti*〕（蚊）、ヒトスジシマカ〔*Aedes albopictus*〕（蚊）、キイロショウジョウバエ〔*Drosophila melanogaster*〕（ショウジョウバエ〔*fruitfly*〕）およびカイコ〔*Bombyx mori*〕などの宿主に由来する対応する許容昆虫宿主細胞が同定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス株、例

10

20

30

40

50

えば、オートグラファ・カリフォルニカ〔*Autographa californica*〕NPVのL-1変異体およびカイコ〔*Bombyx mori*〕NPVのBm-5株が公的に入手可能であり、このようなウイルスは、本明細書において、本発明に従って、特に、ヨトウガ〔*Spodoptera frugiperda*〕細胞のトランスフェクションのためにウイルスとして使用され得る。ワタ、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマトおよびタバコの植物細胞培養物も宿主として使用され得る。

【0100】

しかし、関心は、脊椎動物細胞において最大であり、培養（組織培養）での脊椎動物細胞の増殖は、日常的な手順となった。有用な哺乳動物宿主細胞株の例として、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7、ATCC CRL1651）；ヒト胚性腎臓株（293または懸濁培養における成長のためにサブクローニングされた293細胞、Grahamら、*J. Gen. Virol.* 第36巻：59頁（1977））；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK、ATCC CCL10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／-DHFR（CHO、Urlaubら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 第77巻：4216頁（1980年））；マウスセルトリ細胞（TM4、Mather、*Biol. Reprod.* 第23巻：243～251頁（1980年））；サル腎臓細胞（CV1 ATCC CCL70）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76、ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA、ATCC CCL2）；イヌ腎臓細胞（MDCK、ATCC CCL34）；バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A、ATCC CRL1442）；ヒト肺細胞（W138、ATCC CCL75）；ヒト肝臓細胞（Hep G2、HB 8065）；マウス乳房腫瘍（MMT 060562、ATCC CCL51）；TRI細胞（Matherら、*Annals N. Y. Acad. Sci.* 第383巻：44～68頁（1982年））；MRC5細胞；FS4細胞；およびヒト肝細胞腫株（Hep G2）がある。いくつかの好ましい実施形態では、宿主細胞は、293F細胞である。

【0101】

宿主細胞は、抗CTLA4抗体生成のために上記の発現またはクローニングベクターを用いて形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択するか、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために必要に応じて修飾された従来の栄養培地で培養される。

【0102】

本明細書において提供される抗体または抗原結合断片を生成するために使用される宿主細胞は、種々の培地で培養され得る。HamのF10（Sigma）、最小必須培地（MEM）、（Sigma）、RPMI-1640（Sigma）および「ダルベッコ改変イーグル培地」（DMEM）、Sigmaなどの市販の培地は、宿主細胞を培養するのに適している。さらに、Hamら、*Meth. Enz.* 第58巻：44頁（1979年）、Barnesら、*Anal. Biochem.* 第102巻：255頁（1980年）、米国特許第4,767,704号；同4,657,866号；同4,927,762号；同4,560,655号；または同5,122,469号；WO90/03430；WO87/00195；または再発行米国特許第30,985号に記載される培地のいずれも、宿主細胞のための培養培地として使用され得る。これらの培地のいずれも、必要に応じて、ホルモンおよび／またはその他の増殖因子（インスリン、トランスフェリンまたは上皮成長因子など）、塩（塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウムおよびリン酸など）、バッファー（HEPESなど）、ヌクレオチド（アデノシンおよびチミジンなど）、抗生物質（GENTAMYCIN（商標）薬など）、微量元素（マイクロモラー範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物として定義される）およびグルコースまたは同等のエネルギー供給源を用いて補給され得る。任意のその他の必要な栄養補助剤もまた、当業者に公知であろう適当な濃度で含まれ得る。温度、pHなどといった培養状態は、発現のために選択された宿主細胞とともにこれまでに使用されたものであり、当業者には明らかとなる。

10

20

30

40

50

【0103】

組換え技術を使用する場合には、抗体は、細胞膜周辺腔において細胞内で生成され得る、または培地中に直接分泌され得る。抗体が細胞内で生成される場合には、第1のステップとして、微粒子状細片、宿主細胞または溶解した断片のいずれかが例えば、遠心分離または限外濾過によって除去される。Carterら、Bio/Technology第10巻：163～167頁（1992年）には、大腸菌（E. coli）の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順が記載されている。手短には、細胞ペーストが、酢酸ナトリウム（pH 3.5）、EDTAおよびフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSEF）の存在下で約30分かけて解凍される。細胞細片は、遠心分離によって除去され得る。抗体が培地中に分泌される場合には、このような発現系から得られた上清は、一般に、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを使用してまず濃縮される。タンパク質分解を阻害するために、PMSEFなどのプロテアーゼ阻害剤が前記のステップのいずれにも含まれ得る、外来性の混入物質の成長を防ぐために、抗生物質が含まれ得る。

10

【0104】

細胞から調製される抗体は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿、塩析およびアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製され得、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。親和性リガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種およびアイソタイプに応じて変わる。プロテインAは、ヒト 1、 2または 4重鎖をベースとする抗体を精製するために使用され得る（Lindmarkら、J. Immunol. Meth. 第62巻：1～13頁（1983年））。プロテインGは、すべてのマウスアイソタイプに対して、およびヒト 3に対して推奨される（Gussら、EMBO J. 第5巻：1567～1575（1986年））。親和性リガンドが付着されるマトリックスは、最も多くはアガロースであるが、その他のマトリックスが利用可能である。コントロールポアガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは、アガロースを用いて達成され得るものよりも迅速な流速およびより短い処理時間を可能にする。抗体がCH3ドメインを含む場合には、精製にはBakerbond A BX.TM.樹脂（J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.）が有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE（商標）でのクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂（ポリアスパラギン酸カラムなど）でのクロマトグラフィー、等電点電気泳動、SDS-PAGEおよび硫酸アンモニウム沈殿などのタンパク質精製のためのその他の技術も、回収されるべき抗体に応じて利用可能である。

20

30

【0105】

任意の予備的精製ステップ（単数または複数）後に、対象の抗体および混入物質を含む混合物は、約2.5～4.5の間のpHの溶出バッファーを使用する、好ましくは、低塩濃度（例えば、約0～0.25Mの塩）で実施される低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーに付され得る。

40

【0106】

キット

本開示は、生体サンプルにおいてCTLA4と結合するために使用される抗CTLA4抗体を含むキットを提供する。生体サンプルは、血漿を含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、検出可能な標識とコンジュゲートしている抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片を含む。特定のその他の実施形態では、キットは、未標識抗CTLA4抗体または抗原結合断片を含み、未標識抗CTLA4抗体と結合可能である二次標識抗体をさらに含む。キットは、使用の説明、およびキット中の成分の各々を分離するパッケージをさらに含む得る。

【0107】

50

いくつかの実施形態では、キットは、C T L A 4によって媒介される疾患または状態を処置、予防または遅延するのに有用である。特定の実施形態では、抗C T L A 4抗体またはその抗原結合断片は、E L I S Aなどのサンドイッチアッセイにおいて、またはイムノグラフィー〔immunographic〕アッセイにおいて有用な基質またはデバイスと関連している。有用な基質またはデバイスは例えば、マイクロタイタープレートおよび試験ストリップであり得る。

【0108】

医薬組成物および治療方法

本開示は、抗C T L A 4抗体またはその抗原結合断片および1種または複数の医薬上許容される担体を含む医薬組成物をさらに提供する。

10

【0109】

本明細書において開示される医薬組成物において使用するための医薬上許容される担体として、例えば、医薬上許容される液体、ゲルまたは固体担体、水性ビヒクル、非水性ビヒクル、抗菌剤、等張化剤、バッファー、抗酸化剤、麻酔剤、懸濁剤/分配剤〔dispensing agents〕、封鎖剤またはキレート化剤、希釈剤、アジュバント、賦形剤または非毒性補助物質、当技術分野で公知のその他の成分またはそれらの種々の組合せを挙げることができる。

【0110】

適した成分として、例えば、抗酸化剤、増量剤、結合剤、崩壊剤、バッファー、保存料、滑沢剤、香味料、増粘剤、着色剤、乳化剤または糖およびシクロデキストリンなどの安定化剤を挙げることができる。適した抗酸化剤として、例えば、メチオニン、アスコルビン酸、E D T A、チオ硫酸ナトリウム、白金、カタラーゼ、クエン酸、システイン、チオグリセロール、チオグリコール酸、チオソルビトール、ブチル化ヒドロキシアニソール〔butylated hydroxanisol〕、ブチル化ヒドロキシトルエンおよび/または没食子酸プロピルを挙げることができる。本明細書において開示されるように、本明細書において提供されるような抗体または抗原結合断片およびコンジュゲートを含む組成物中に、メチオニンなどの1種または複数の抗酸化剤を含めることによって、抗体または抗原結合断片の酸化が減少される。酸化の低減は、結合親和性の喪失を防ぐまたは低減し、それによって、抗体安定性を改善し、有効期間を最大化する。したがって、特定の実施形態では、本明細書において開示されるような1種または複数の抗体または抗原結合断片およびメチオニンなどの1種または複数の抗酸化剤を含む組成物が提供される。抗体または抗原結合断片を、メチオニンなどの1種または複数の抗酸化剤と混合することによって、酸化を防ぐための、有効期間を延長するための、および/または本明細書において提供されるような抗体もしくは抗原結合断片の有効性を改善するための方法がさらに提供される。

20

30

【0111】

さらに例示するために、医薬上許容される担体として、例えば、塩化ナトリウム注射、リンゲル注射、等張性デキストロス注射、滅菌水注射またはデキストロスおよび乳酸リンゲル注射などの水性ビヒクル、植物起源の硬化油、綿実油、トウモロコシオイル、ゴマ油またはピーナッツオイルなどの非水性ビヒクル、静菌性または静真菌性濃度の抗菌剤、塩化ナトリウムまたはデキストロスなどの等張性剤、リン酸またはクエン酸バッファーなどのバッファー、重硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤、塩酸プロカインなどの局所麻酔、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースまたはポリビニルピロリドンなどの懸濁剤および分散剤、ポリソルベート80 (T W E E N - 80)などの乳化剤、E D T A (エチレンジアミン四酢酸)またはE G T A (エチレングリコール四酢酸)などの封鎖剤またはキレート化剤、エチルアルコール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸または乳酸を挙げることができる。担体として利用される抗菌剤は、複数回用量容器中の医薬組成物に添加され得、これとして、フェノールまたはクレゾール、水銀剤、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルおよびプロピルp - ヒドロキシ安息香酸エステル、チメロサル、塩化ベンズアルコニウムおよび塩化ベンゼトニウムが挙げられる。適した賦形剤として、例

40

50

えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロールまたはエタノールを挙げることができる。適した非毒性補助物質として、例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、安定化剤、溶解促進剤、または酢酸ナトリウム、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミンもしくはシクロデキストリンなどの薬剤を挙げることができる。

【0112】

医薬組成物は、液体溶液、懸濁液、エマルジョン、丸剤、カプセル剤、錠剤、持続放出製剤または散剤であり得る。経口製剤はとして、医薬等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどといった標準担体を挙げることができる。

【0113】

実施形態では、医薬組成物は、注射用組成物に製剤化される。注射用医薬組成物は、例えば、液体溶液、懸濁液、エマルジョンまたは液体溶液、懸濁液またはエマルジョンを作製するのに適した固体形態などの任意の従来の形態で調製され得る。注射のための調製物として、注射用に準備された滅菌および/または非発熱性溶液、皮下錠剤を含む、使用直前に溶媒と組み合わせられるべく準備された凍結乾燥散剤などの滅菌乾燥可溶性製剤、注射用に準備された滅菌懸濁液、使用直前にビヒクルと組み合わせられるべく準備された滅菌乾燥不溶性製剤、ならびに滅菌および/または非発熱性エマルジョンを挙げることができる。

【0114】

特定の実施形態では、単位用量非経口調製物は、アンプル、バイアルまたはニードルを備えたシリンジ中にパッケージングされる。非経口投与用のすべての調製物は、当技術分野で公知であり、実施されるように滅菌および非発熱性でなくてはならない。

【0115】

特定の実施形態では、滅菌、凍結乾燥散剤は、適した溶媒中に本明細書において開示されるような抗体または抗原結合断片を溶解することによって調製される。溶媒は、散剤または散剤から調製された再構成された溶液の安定性またはその他の薬理学的成分を改善する賦形剤を含有し得る。使用され得る賦形剤として、それだけには限らないが、水、デキストロース、ソルビトール〔sorbitol〕、フルクトース、コーンシロップ、キシリトール、グリセリン、グルコース、スクロースまたはその他の適した薬剤が挙げられる。溶媒は、クエン酸、リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウムなどのバッファーまたは、一実施形態ではおよそ中性のpHの、当業者に公知のその他のこのようなバッファーを含有し得る。当業者に公知の溶液のその後の滅菌濾過と、それに続く標準状態下での凍結乾燥によって、望ましい製剤が提供される。一実施形態では、得られた溶液は、凍結乾燥のためにバイアル中に配分される。各バイアルは、抗CTL A 4抗体またはその抗原結合断片またはその組成物の単一投与量または複数回投与量を含有し得る。バイアルに用量または用量のセットに必要なものを上回る少量（例えば、約10%）を過剰充填することは、正確なサンプル引き出しおよび正確な投薬を促進するために許容される。凍結乾燥散剤は、約4~室温などの適当な状態下で保存され得る。

【0116】

注射水を用いる凍結乾燥散剤の再構成は、非経口投与において使用するための製剤を提供する。一実施形態では、再構成のために滅菌および/または非発熱性水またはその他の液体の適した担体が、凍結乾燥散剤に付加される。正確な量は、与えられている選択された療法に応じて変わり、経験的に決定され得る。

【0117】

本明細書において提供されるような抗体または抗原結合断片の治療上有効な量を、それを必要とする対象に投与し、それによって、CTL A 4と関係する関連する状態または障害を処置または予防することを含む治療方法もまた提供される。別の態様では、本明細書において提供されるような抗体または抗原結合断片の治療上有効な量を、それを必要とする対象に投与することを含む、免疫応答の上方制御から恩恵を受ける対象における状態を処置するための方法が提供される。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 8 】

本明細書において提供されるような抗体または抗原結合断片の治療上有効な量は、例えば、体重、年齢および過去の病歴、現在の薬物適用、対象の健康の状態および交差反応の可能性、アレルギー、感受性および有害な副作用、ならびに投与経路および腫瘍発達の程度などの当技術分野で公知の種々の因子に応じて変わる。投与量は、これらおよびその他の状況または必要条件によって示されるように、当業者（例えば、医師または獣医師）によって比例的に低減または増大され得る。

【 0 1 1 9 】

特定の実施形態では、本明細書において提供されるような抗体または抗原結合断片は、約 0.01 mg/kg ~ 約 100 mg/kg（例えば、約 0.01 mg/kg、約 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 2 mg/kg、約 3 mg/kg、約 5 mg/kg、約 10 mg/kg、約 15 mg/kg、約 20 mg/kg、約 25 mg/kg、約 30 mg/kg、約 35 mg/kg、約 40 mg/kg、約 45 mg/kg、約 50 mg/kg、約 55 mg/kg、約 60 mg/kg、約 65 mg/kg、約 70 mg/kg、約 75 mg/kg、約 80 mg/kg、約 85 mg/kg、約 90 mg/kg、約 95 mg/kg または約 100 mg/kg）の治療上有効な投与量で投与され得る。これらの実施形態のうち特定のものでは、抗体または抗原結合断片は、約 50 mg/kg 以下の投与量で投与され、これらの実施形態のうち特定のものでは、投与量は、10 mg/kg 以下、5 mg/kg 以下、3 mg/kg 以下、1 mg/kg 以下、0.5 mg/kg 以下または 0.1 mg/kg 以下である。特定の実施形態では、投薬量は、治療過程にわたって変化し得る。例えば、特定の実施形態では、初期投薬量は、その後の投薬量よりも高い場合がある。特定の実施形態では、投薬量は、対象の反応に応じて治療過程にわたって変わり得る。

10

20

【 0 1 2 0 】

投与計画は、最適な望ましい応答（例えば、治療的応答）を提供するように調整され得る。例えば、単回用量が投与され得、または数回の分割用量が経時的に投与され得る。

【 0 1 2 1 】

本明細書において開示される抗体および抗原結合断片は、例えば、非経口（例えば、皮下、腹腔内、静脈内注入を含む静脈内、筋肉内または皮内注射）または非経口ではない（例えば、経口、鼻腔内、眼球内、舌下、直腸内または局所）経路などの当技術分野で公知の任意の経路によって投与され得る。

30

【 0 1 2 2 】

CTL A 4 と関連する状態および障害は、免疫関係疾患または障害であり得る。特定の実施形態では、CTL A 4 関連状態および障害として、腫瘍および癌、例えば、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、胃癌腫、膀胱癌、食道癌、中皮腫、黒色腫、頭頸部癌、甲状腺癌、肉腫、前立腺癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、胸腺癌腫、白血病、リンパ腫、骨髄腫、菌状息肉腫〔mycoses fungoids〕、メルケル細胞癌、および古典的なホジキンリンパ腫（CHL）、原発性縦隔大細胞型 B 細胞リンパ腫、T 細胞 / 組織球豊富型 B 細胞リンパ腫、EBV 陽性および陰性 PTLD ならびに EBV 関連びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）、形質芽球性リンパ腫、節外性 NK / T 細胞リンパ腫、上咽頭癌腫および HHV 8 関連原発性滲出リンパ腫、ホジキンリンパ腫、原発性 CNS リンパ腫などの中枢神経系（CNS）の新生物、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫が挙げられる。特定の実施形態では、腫瘍および癌は、転移性、特に、PD-L1 を発現する転移性腫瘍である。特定の実施形態では、PD-L1 関連状態および障害として、全身性エリテマトーデス（SLE）、乾癬、全身性強皮症、自己免疫糖尿病などといった自己免疫疾患が挙げられる。特定の実施形態では、PD-L1 関連状態および障害として、慢性ウイルス感染、例えば、B 型肝炎、C 型肝炎、ヘルペスウイルス、エプスタイン・バーウイルス、HIV、サイトメガロウイルス、1 型単純ヘルペスウイルス、2 型単純ヘルペスウイルス、ヒトパピローマウイルス、アデノウイルス、カポジウエスト〔Kaposi West〕肉腫関連ヘルペスウイルス伝染病、シンリングウイルス〔thin ring virus〕（トルクテノウイルス）、JC ウイルスまたは BK ウイルスのウイルス感染などの感染性疾患が

40

50

挙げられる。

【0123】

使用方法

本開示は、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片を使用する方法をさらに提供する。

【0124】

いくつかの実施形態では、本開示は、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の治療上有効な量を投与することを含む、個体においてCTLA4によって媒介される状態を処置する方法を提供する。特定の実施形態では、個体はCTLA4アンタゴニストに対して応答する可能性が高い障害または状態を有すると同定されている。特定の実施形態では、障害または状態は、腫瘍または癌を含む。

10

【0125】

特定のこれらの実施形態では、1種または複数の上記のさらなる治療薬と組み合わせて投与される本明細書において開示される抗体または抗原結合断片は、1種または複数のさらなる治療薬と同時に投与されてもよく、特定のこれらの実施形態では、抗体または抗原結合断片およびさらなる治療薬（複数可）は、同一医薬組成物の一部として投与されてもよい。しかし、別の治療薬と「組み合わせて」投与される抗体または抗原結合断片は、薬剤と同時に、または薬剤と同一組成物中で投与されなくてもよい。別の薬剤に先立って、またはその後投与される抗体または抗原結合断片は、抗体または抗原結合断片および第2の薬剤が、異なる経路によって投与される場合でさえ、その語句が本明細書において使用される場合、その薬剤と「組み合わせて」投与されると考えられる。可能であれば、本明細書において開示される抗体または抗原結合断片と組み合わせて投与されるさらなる治療薬は、さらなる治療薬の英文添付文書に列挙されるスケジュールに従って、またはPhysicians' Desk Reference 2003年(Physicians' Desk Reference、第57版；Medical Economics Company；ISBN：1563634457；第57版(2002年11月))もしくは当技術分野で周知のプロトコールに従って投与される。

20

【0126】

以下の実施例は、特許請求された本発明をより良好に例示するために提供され、本発明の範囲を制限すると解釈されてはならない。以下に記載されるすべての特定の組成物、材料および方法は、全体で、または一部で本発明の範囲内に入る。これらの特定の組成物、材料および方法は、本発明を制限するものではなく、単に、本発明の範囲内に入る特定の実施形態を例示するものである。当業者は、発明の能力を行使することなく、本発明の範囲から逸脱することなく、同等の組成物、材料および方法を開発し得る。本発明の範囲内にとどまりながら本明細書に記載される手順において多数の変法を行うことができるということは理解されよう。このような変法が本発明の範囲内に含まれることは本発明者らの意図である。

30

【実施例】

【0127】

[実施例1]

マウス免疫処置およびヒトCTLA4に対するマウス抗体の生成

ヒトCTLA4に対する抗体を作製するために、ヒスチジンタグが融合されたCTLA4の細胞外ドメインのオープンリーディングフレームをコードするcDNA(hCTLA4-His、配列番号49)、マウスFc(hCTLA4-mFc、配列番号51)およびヒトFcタグ(hCTLA4-hFc、配列番号53)をPCRによって得、それぞれ、発現ベクターpcDNA3.1(Invitrogenカタログ番号：V-790)中にサブクローニングした。freestyle 293細胞における一時的な発現後、hCTLA4-HisTagをNTAカラム(GE healthcare)を用いて精製し、hCTLA4-mFcおよびhCTLA4-hFcをプロテインGカラム(GE healthcare)を用いて精製した。

40

50

【0128】

ハイブリドーマ細胞株を作製するために必要なマウスを免疫処置するために、100 µgのヒトCTLA4-mFc融合タンパク質および100 µlの完全フロイントアジュバントを混合し、混合物を皮下注射によって5匹の6～7週齢のBALB/cマウス各々に投与した。2週間後、抗原（これまでに注射した量の半量）を、上記と同一の方法を使用して不完全フロイントアジュバントと混合し、混合物を皮下注射によって各マウスに投与した。1週間後、最終追加免疫を実施した。3日後、各マウスの尾から血液を採取して血清を得た。次いで、血清をPBSを用いて1/1000で希釈し、ELISAを実施して、ヒトCTLA4-mFcを認識する抗体の力価が増大したか否かを解析した。その後、十分な量の抗体が得られたマウスを選択し、選択したマウスで細胞融合プロセスを実施した。

10

【0129】

細胞融合実験の3日前に、50 µgのヒトCTLA4-mFc融合タンパク質を、腹膜内注射によって各マウスに投与した。各免疫処置マウスに麻酔を施し、次いで、身体の左側に位置するその脾臓を抽出し、メッシュを用いてすりつぶして細胞を単離し、これを培養培地（RPMI 1640）と混合して、脾臓細胞懸濁液を調製した。懸濁液を遠心分離して、細胞層を集めた。得られた 1×10^8 個の脾臓細胞を 1.5×10^7 個の骨髓腫細胞（Sp2/0）と混合し、混合物を遠心分離して細胞を沈殿させた。沈殿物をゆっくりと分散させ、PEG Hybri-Max（Sigma Inc.、カタログ番号7181）を用いて処置した。混合した細胞を96ウェルプレートにウェルあたり0.1 mlで分配し、37 °Cの5% CO₂ インキュベーターでインキュベートした。1日目に、各ウェルへ、血清ならびにHATおよび2×メトトレキサートを含む追加の0.1 mlの培地を添加することによって、細胞に供給した。3日目および7日目に、各ウェルから得た0.1 mlの培地を、0.1 mlの新鮮なHT培地と交換した。スクリーニングは、通常9～14日目の間に行った。

20

【0130】

[実施例2]

ELISAおよびFACS解析に基づく、ヒトCTLA4に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞の選択

ヒトCTLA4-hFcを使用してELISA結合解析を実施した。96ウェルプレート（Costar、カタログ番号9018）を、100 µlのコーティングバッファー（PBS、HyClone、カタログ番号：SH30256.01B）中の2 µg/ml CTLA4-hFc（CrownBio）を用いて、4 °Cで一晩コーティングした。ウェルを吸引し、200 µlの、1%（w/v）のウシ血清アルブミン（BSA、Roche、カタログ番号：738328）を有するブロッキングバッファーを添加し、37 °Cで1時間インキュベートすることによって、非特異的結合部位をブロッキングした。洗浄バッファー（0.05%（v/v）TWEEN-20（商標）（Sigma、カタログ番号：P1379）を有するPBS）を用いてプレートを3回洗浄した後、100 µl/ウェルの、ブロッキングバッファー中のハイブリドーマ上清の適した希釈物を添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、100 µl/ウェルの、ブロッキングバッファー中のヤギ抗マウスIgG（H+L）（Thermo、カタログ番号：31432）とともに60分間インキュベートした。プレートを洗浄した後、100 µl/ウェルの基質溶液TMB（eBioscience、カタログ番号：00-4201-56）を添加し、プレートを室温で2分間インキュベートした。100 µl/ウェルの停止溶液（2N H₂SO₄）を添加して、反応を停止した。比色シグナルを発現させ、Auto Plate SpectraMax Plus（供給業者：Molecular Devices、モデル：MNR0643、ソフトウェア：SoftMax Pro v5.4）を使用して450 nmで読み取った。この方法によって、ヒトCTLA4タンパク質と高度に特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を反復的に選択した。

30

40

【0131】

50

ビオチン化ヒトCD80-mFcを、ヒトCTLA4-mFcとの結合から遮断することによって、ELISAベースのリガンド遮断解析を実施した。CTLA4-mFc抗原(CrownBio)を、PBS(Hyclone、カタログ番号:SH30256.01B)バッファーに懸濁し(2 μ g/ml、100 μ l/ウェル)、96ウェルプレート(Costar、カタログ番号:9018)を4で一晚コーティングした。プレートを、洗浄バッファーPBS+0.05% Tween 20(Sigma、カタログ番号:P1379)を使用して3回洗浄した。各ウェルに200 μ lのブロッキングバッファー(PBS+1% BSA(Roche、カタログ番号:738328))を添加し、37で1時間インキュベートし、3回洗浄した。ウェルに、種々の濃度(PBS中のハイブリドーマ上清の適した希釈)の抗CTLA4抗体を添加し(100 μ l/ウェル)、37で1時間インキュベートした。リガンドを添加し(0.1 μ g/ml CD80-mFc-ビオチン、100 μ l/ウェル)、37で2時間インキュベートし、3回洗浄した。二次抗体(Avidin HRP、eBioscienceカタログ番号:E07418-1632、1:500、100 μ l/ウェル)を添加し、37で0.5時間インキュベートし、3回洗浄した。TMB(Sigma、カタログ番号:T0440、100 μ l/ウェル)を添加し、室温で3分間インキュベートした。反応を停止するために、2N H₂SO₄(100 μ l/ウェル)を添加した。比色シグナルを発現させ、Auto Plate SpectraMax Plus(供給業者:Molecular Devices、モデル:MNR0643、ソフトウェア:SoftMax Pro v5.4)を使用して450nmで読み取った。

10

20

【0132】

hCTLA4-293T細胞株を使用して抗体の細胞結合解析を実施した。96ウェル培養プレートの各ウェルに2 \times 10⁵個の293T-CTLA4細胞を入れることによって、各反応にそれらを使用した。細胞を、示された抗体(1/5の希釈を用いて20 μ g/ml)とともに4で1時間インキュベートした。細胞をFACSバッファーを用いて3回洗浄した。100 μ l/ウェルの細胞に、二次抗体(PEヤギ抗マウス:1:200、PEマウス抗ヒト:1:10)を添加し、4で40分間インキュベートした。細胞をFACSバッファーを用いて3回洗浄し、FACSアレイによって解析した。

【0133】

FACSベースのリガンド遮断解析を実施して、hCTLA4-293T細胞とのビオチン化ヒトCD80結合の遮断における抗CTLA4ハイブリドーマ抗体を調べた。CTLA4発現性293T細胞をFACSバッファー(3%ウシ胎児血清を有するPBS)に懸濁した。細胞懸濁液に種々の濃度の試験ハイブリドーマ抗体を添加し、96ウェルプレート中で4で60分間インキュベートした。ウェルにビオチン標識CD80タンパク質を添加し、4で60分間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、マウス抗ビオチンPE抗体(Biolgend、カタログ番号409004)を添加した。FACSアレイを使用してフローサイトメトリー解析を実施した。

30

【0134】

研究の結果が図1~4に示されている。抗CTLA4モノクローナル抗体は、固相(図1)および細胞表面(図2)上でCTLA4を結合できる。抗体はまた、96ウェルプレート(図3)またはヒトCTLA4を用いてトランスフェクトされた293T細胞(図4)上でCD80のCTLA4との結合を遮断できる。これらのデータは、抗CTLA4抗体が、CTLA4を結合し、リガンドCD80とのその結合を遮断できることを実証した。

40

【0135】

[実施例3]

抗hCTLA4抗体の、モノクローナル抗体クローンを得るためのサブクローニングおよび精製

サブクローニングは、制限希釈の手順に基づいており、モノクローナル抗体を産生する個々のハイブリドーマクローンを得るように設計されている。各ハイブリドーマを複数ラ

50

ウンド（４ラウンド）の制限希釈に付した。サブクロニングの各ラウンドについて、ELISAおよびFACSベースの遮断解析によってクローンを試験した。

【0136】

合計20種の抗hCTLA4ハイブリドーマ抗体について抗体精製を実施した。ハイブリドーマ細胞を、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、2%L-グルタミンおよび1%の調整したNaHCO₃溶液を含有するダルベッコ改変イーグル培地（GIBCO; Invitrogen Corporation、カリフォルニア州、カールスバッド）中で培養した。次いで、選択されたハイブリドーマ細胞を血清不含培養培地に適応させ、プロテインGカラム（GE Healthcare）を使用して上清から抗体を精製した。PBSを用いて洗浄した後、結合された抗体を、0.1MグリシンpH3.0を使用して溶出し、続いて、2.0M Trisを使用してpH中和した。バッファー交換および抗体濃縮のためにUltra-15遠心濃縮機（Amicon）を使用した。

10

【0137】

[実施例4]

ELISAおよびFACS解析に基づく、結合およびリガンド遮断活性における、精製されたマウス抗hCTLA4抗体の特性決定

ELISAおよびFACS解析に基づいて、精製されたハイブリドーマ抗体をさらに特性決定した。適用された方法は、これらの場合には、EC50およびIC50を測定するために精製された抗体を使用した点を除いて、実施例2において上記のものと同様であった。表5～8は、抗体6F3および10B10の結果を示す。

20

【0138】

【表5】

表5. マウス抗CTLA4抗体のELISAベースの結合EC50

ng/ml	6F3	10B10
EC50	24.97	12.68

【0139】

【表6】

30

表6. マウス抗CTLA4抗体のELISAベースの遮断IC50

ng/ml	6F3	10B10
IC50	526.3	594.0

【0140】

【表7】

表7. マウス抗CTLA4抗体のFACSベースの結合EC50

ng/ml	6F3	10B10
EC50	1179	305.5

40

【0141】

【表8】

表8. マウス抗CTLA4抗体のFACSベースの遮断IC50

ng/ml	6F3	10B10
IC50	525.7	511.3

【0142】

50

[実施例 5]

マウス抗CTLA4抗体のBiacore解析

抗体の結合特徴をさらに特性決定するために、Biacore (Biacore 3000、GE) を使用してハイブリドーマ抗体をプロファイリングして、結合動態学を解明し、平衡結合定数を算出した。このアッセイは、マウス抗体捕獲キット (BR-1008-38、GE) を使用して捕獲法によって実施した。抗マウスFc mAbを、pH 5.0 固定化バッファーで25 µg/mlに希釈した後、5 µl/分の流速で表9に示されるパラメータを用いて固定化を実施した。1) 10 µl/分の流速で通常0.5~1分間リガンドを注入すること、2) 通常3分間、選択した解析物を注入することと、それに続いて、30 µl/分の流速で通常5~10分間、ランニングバッファー (1xPBS-P20) 中で解離させること、ならびに3) 10 µl/分の流速で通常1~2分間、再生溶液10 mMグリシンpH 1.7を注入することによって、動態的実行を行った。

10

【0143】

【表9】

表9. Biacoreパラメータ

事象	注入	条件
活性化	EDC/NHS (1:1 Mix)	7分
固定化	希釈した抗ヒトFc mAb	約7000RU固定化レベルに到達するために4分
脱活性化	エタノールアミン-HCl	7分

20

【0144】

研究の結果が表10に示されている。6F3および10B10の両方とも、CTLA4との高い結合親和性を有する。

【表10】

30

表10. 抗CTLA4ハイブリドーマ抗体のCTLA4との結合動態学

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Kd (M)	Chi2
10B10	6.93E+05	1.52E-04	2.19E-10	0.39
6F3	5.98E+05	2.44E-04	4.09E-10	0.24

【0145】

[実施例 6]

種間および同様の分子間の交差反応性

抗体の種交差反応性を評価するために、マウスおよびカニクニザル [cynomolgus macaque] CTLA4をRT-PCRによってクローニングし、freestyle 293細胞において発現させ、精製した。タンパク質ベースのELISAを使用してカニクイザルCTLA4との結合について抗体を試験した。研究の結果は、抗体は、ヒトおよびカニクイザルCTLA4と同等の親和性で結合し、CD80のカニクイザルCTLA4との結合を、ヒトCTLA4と比較して同様の有効性で遮断することを示した。選択された抗体のうち、使用したアッセイのいずれにおいても、マウスCTLA4と検出可能な親和性で結合したものはなかった。ヒトICOSおよびCD28と交差反応したものはなかった。

40

【0146】

[実施例 7]

PBMCによるサイトカイン産生に対する抗CTLA4ハイブリドーマ抗体の効果

50

CTLA4ハイブリドーマ抗体の活性を、リンパ球エフェクター細胞におけるCTLA4シグナル伝達経路の遮断に対するその効果によって評価した。Histopaque (Sigma、カタログ番号：1077-1)を使用することによって新たに単離されたヒトPBMCを調製し、 2×10^6 個細胞/mlの濃度の10% FBSを補給したRPMI 1640中、5 ng/mlブドウ球菌 [staphylococcus] エンテロトキシンB (SEB) (Sigma)を用いて刺激した。次いで、CTLA4抗体の存在下または不在下で、96ウェルプレートで各ウェルに100 μ lのPBMCを添加した(ウェルあたり 2×10^5 個細胞)。抗体の一連の濃縮物(30 μ g/ml、10 μ g/ml、1 μ g/ml)を試験した。37で72または96時間インキュベートした後、96ウェルプレートを遠心分離し、上清を集め、ELISAキット(R&D Systems、カタログ番号：DY285)を使用してIL-2およびIFN- γ 生成を測定した。陰性対照としてアイソタイプ対照抗体を使用した。研究の結果が、図9(IL-2分泌)および図10(IFN- γ 分泌)に提供され、抗CTLA4モノクローナル抗体6F3および10B10が、PBMCによるIFN- γ およびIL-2分泌を促進できることを実証する。対照的に、アイソタイプ対照抗体を含有する培養物は、IFN- γ またはIL-2分泌の増大を全く示さなかった。

10

【0147】

[実施例8]

抗CTLA4抗体cDNA配列クローニングおよびヒト化

免疫グロブリンcDNAのクローニング

20

RNeasy Miniキット(Qiagen、カタログ番号：74104)によって、hCTLA4抗体を産生するハイブリドーマ細胞株から単離された全RNAを鋳型として使用し、スーパースクリプト(登録商標)II逆転写酵素(Life Technology、カタログ番号：18064-14)を製造業者の使用説明書に従って用いて第1鎖cDNAを合成した。次いで、縮重マウスIgGプライマーを使用して、50 μ l容量反応混合物中でcDNA産物をPCRに付した(Kettleborough et al, (1993) Eur J Immunology 23: 206-211; Strebe et al, (2010) Antibody Engineering 1: 3-14)。変性のための94、1.5分、アニーリングのための50、1分および合成のための72、1分の30サイクルを用い、S1000(商標)Thermal Cycler(Bio-Rad、カタログ番号：184-2000)において反応を実施した。30回目のサイクルの最後に、反応混合物を伸長のためにさらに72で7分間インキュベートした。

30

【0148】

PCR混合物を、0.5 μ g/mlの臭化エチジウムを含有する1%アガロース/TriS-ホウ酸ゲルでの電気泳動に付した。予測される大きさ(重鎖および軽鎖についておよそ400 bp)を有するDNA断片を、ゲルから切り出し、精製した。3 μ lの精製されたPCR産物を、pMD-18Tベクター(Takara、カタログ番号：D101A)中にクローニングし、One Shot(登録商標)TOP10 Chemically Competent大腸菌[E.coli](Invitrogen、カタログ番号：C4040-03)中に形質転換した。ユニバーサルM13フォワードおよびリバープライマーを使用するコロニーPCRによってクローンをスクリーニングし、M13フォワードおよびM13リバープライマーを使用する両方向でのDNAシーケンシングのために各反応物から10個の陽性クローンを選択した。

40

【0149】

抗体6F3(配列番号1および9)、10B10(配列番号17および25)の可変領域配列を、対応するハイブリドーマクローンから増幅した。これらの抗体は、CD80とのCTLA4結合の遮断ならびにT細胞活性化およびサイトカイン放出の増強などの所望の機能を示した。

【0150】

50

抗体ヒト化設計

C D R グラフティングアプローチ（その全文が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 5, 225, 539 号）を使用して、6 F 3 および 10 B 10 抗体をヒト化した。マウス抗体 6 F 3 および 10 B 10 の軽鎖および重鎖可変鎖配列を、N C B I データベースを検索することによって構造バイオインフォマティクス研究共同体〔Research Collaboratory for Structural Bioinformatics〕（R C S B）タンパク質データバンクにおいて入手可能なものに対して比較した。6 F 3 および 10 B 10 のモデルを、最高配列相同性を有する V H および V L 構造に基づいてそれぞれ作製した。

【0151】

マウス 6 F 3 および 10 B 10 抗体の V H および V L 中の相補性決定領域（C D R）とグラフトされることとなる鑄型ヒト抗体を、I M G T / D o m a i n G a p A l i g n 3 D 構造データベース、<http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi> を検索することによって、マウス 6 F 3 および 10 B 10 抗体と高い相同性を有するアミノ酸配列を有するヒト抗体生殖系列から選択した。6 F 3 については、選択された鑄型ヒト V H は、I G H V 1 - 46 * 01 および I G H J 4 * 01 の組合せであり、選択された鑄型ヒト V L は、I G K V 1 - N L 1 * 01 および I G K J 4 * 01 の組合せであった。10 B 10 については、選択された鑄型ヒト V H は、I G H V 4 - 30 - 4 * 07 および I G H J 1 * 01 の組合せであり、選択された鑄型ヒト V L は、I G K V 1 - 33 * 01 および I G K J 4 * 01 の組合せであった。

【0152】

上記の鑄型ヒト抗体の C D R アミノ酸配列を、それぞれ、マウス 6 F 3 および 10 B 10 抗体の C D R のものによって置換した。さらに、上記の鑄型ヒト抗体 V H および V L のフレームワークが、マウス 6 F 3 および 10 B 10 抗体の V H および V L に由来する必要なアミノ酸配列とグラフトされて、機能的ヒト化抗体が得られた。6 F 3 および 10 B 10 の V H および V L については、上記の鑄型ヒト抗体のフレームワークアミノ酸のいくつかの部位を、マウス 6 F 3 および 10 B 10 抗体中の対応するアミノ酸配列に復帰変異させた。6 F 3 抗体軽鎖可変領域のヒト化のために、位置 48 のアミノ酸を L e u (L) から V a l (V) に変異させ、6 F 3 抗体重鎖可変領域ヒト化のために、位置 48 のアミノ酸を M e t (M) から I l e (I) に変異させ、位置 67 のアミノ酸を V a l (V) から A l a (A) に変異させ、位置 69 のアミノ酸を M e t (M) から L e u (L) に変異させ、位置 71 のアミノ酸を A r g (R) から A l a (A) に変異させ、位置 73 のアミノ酸を T h r (T) から L y s (K) に変異させ、位置 78 のアミノ酸を V a l (V) から A l a (A) に変異させ、位置 93 のアミノ酸を A l a (A) から T h r (T) に変異させた。ヒト化 10 B 10 抗体の軽鎖可変領域については、位置 4 のアミノ酸を M e t (M) から L e u (L) に変異させ、位置 71 のアミノ酸を P h e (F) から T y r (Y) に変異させ、ヒト化 10 B 10 抗体の重鎖可変領域については、位置 27 のアミノ酸を G l y (G) から T y r (Y) に変異させ、位置 30 のアミノ酸を、S e r (S) から T h r (T) に変異させ、位置 48 のアミノ酸を I l e (I) から M e t (M) に変異させ、位置 67 のアミノ酸を V a l (V) から I l e (I) に変異させ、位置 71 のアミノ酸を V a l (V) から A r g (R) に変異させた。

【0153】

ヒト化 6 F 3 抗体の重鎖および軽鎖可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 33 および 35 と名付けた。重鎖および軽鎖可変領域をコードする D N A 配列を、それぞれ配列番号 34 および 36 と名付けた。ヒト化 10 B 10 抗体の軽鎖可変および重鎖可変のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 37 および 39 と名付けた。アミノ酸配列をコードする D N A の塩基配列は、それぞれ配列番号 38 および 40 と名付けた。

【0154】

ヒト化 6 F 3 または 10 B 10 抗体の I g G 1 アイソタイプを生成した（h 6 F 3 - I g G 1 および h 10 B 10 - I g G 1）。h 6 F 3 - I g G 1 の全長重鎖および軽鎖アミ

ノ酸配列（配列番号41および43）、h10B10-IgG1の全長重鎖および軽鎖アミノ酸配列（配列番号45および47）が上記の表4中に提供されている。

【0155】

ヒト化6F3および10B10抗体の構築および発現

ヒト化6F3および10B10抗体軽鎖および重鎖をコードするDNAを合成し、発現ベクターpcDNA3.1(Invitrogen、カタログ番号：V-790)中にクローニングした。Freestyle 293細胞(10⁶個/mLで200mL)を100μgの各ヒト化重鎖および軽鎖発現プラスミドを用いてトランスフェクトし、6日間培養した。次いで、上清中のヒト化抗体を、プロテインGカラム(GE Healthcare)を用いて精製した。

10

【0156】

[実施例9]

結合の活性および特異性ならびにリガンド遮断活性におけるヒト化抗CTLA4抗体の特性決定

ヒト化6F3-hIgG1および10B10-hIgG1抗体の作製および精製後に、ELISAベースの結合およびCTLA4/CD80遮断解析ならびにFACSベースの結合およびCTLA4/CD80遮断解析を使用して、抗体の結合および特異性を調べた。使用した方法は、上記の実施例4において記載したものと同様であった。

【0157】

図5(上のパネル)は、それぞれヒト化6F3および10B10抗体のCTLA4結合曲線を示した。図5の下のパネルは、ELISA結合データから算出された、試験した各抗体のEC50を示し、ヒト化6F3および10B10抗体が、CTLA4と結合できることを実証する。対照的に、hIgG1アイソタイプ対照抗体は、CTLA4結合を全く示さなかった。

20

【0158】

同様に、FACSベースの結合アッセイでは、ヒト化6F3および10B10抗体の両方とも(図6、上のパネル)、CTLA4との強力な結合を実証した。ヒト化6F3および10B10抗体のFACS結合データから算出されたEC50は、それぞれ図6の下のパネルに示されている。

【0159】

図7(上のパネル)は、それぞれヒト化6F3およびヒト化10B10抗体のELISAベースのリガンド遮断アッセイの結果を示す。各ヒト化抗体のIC50の定量化が、図7の下のパネルに示されている。

30

【0160】

図8は、FACSベースのリガンド遮断アッセイによって測定されるようにヒト化6F3およびヒト化10B10抗体の両方が、CD80とのCTLA4結合を遮断したことを示す。図8の下のパネルは、各ヒト化抗体のIC50を提供する。

【0161】

【表11】

表11. ヒト化抗CTLA4抗体のELISAベースの結合EC50

40

ng/ml	6F3	10B10
EC50	2.012	2.932

【0162】

【表 1 2】

表12. ヒト化抗CTLA4抗体のELISAベースの遮断IC50

ng/ml	6F3	10B10
IC50	295.1	284.9

【0 1 6 3】

【表 1 3】

表13. ヒト化抗CTLA4抗体のFACSベースの結合EC50

ng/ml	6F3	10B10
EC50	2335	5279

【0 1 6 4】

【表 1 4】

表14. ヒト化抗CTLA4抗体のFACSベースの遮断IC50

ng/ml	6F3	10B10
IC50	435.1	25.27

【0 1 6 5】

[実施例 1 0]

ヒト化6F3および10B10抗体のBiacore動態解析

CTLA4およびヒト化CTLA4抗体間の結合動態学を、実施例5において記載されたとおりBiacore3000によって測定した。関係式 $KD = kd / ka$ によって決定された速度定数から解離定数、KDを算出した。表15に示されるように、ヒト化抗CTLA4抗体6F3および10B10は、そのマウス対応物に対して同様の親和性でヒトCTLA4と結合した。

【0 1 6 6】

【表 1 5】

表15. CTLA4とのヒト化抗CTLA4抗体の結合動態学

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Kd (M)	Chi2
6F3	2.95E+05	1.30E-04	4.41E-10	0.27
10B10	4.14E+05	1.13E-04	2.73E-10	0.79

【0 1 6 7】

[実施例 1 1]

PBMCによるサイトカイン産生に対するヒト化抗CTLA4抗体の効果

ヒト化CTLA4抗体の活性を、実施例6に記載されるように、リンパ球エフェクター細胞におけるCTLA4シグナル伝達経路の遮断に対するその効果によって評価した。研究の結果は、図11(IL-2分泌)および図12(IFN-分泌)に提供されており、抗CTLA4モノクローナル抗体6F3および10B10が、IFN-およびIL-2分泌を促進できることを実証する。対照的に、アイソタイプ対照抗体を含有する培養物は、IFN-またはIL-2分泌の増大を示さなかった。

【0 1 6 8】

[実施例 1 2]

腫瘍成長阻害に対するヒト化CTLA4抗体の効果

ヒト化10B10抗体のin vivo抗腫瘍活性を、CTLA4 HuGEMM、C57BL/6マウスにおいてヒト化エクソン2およびエクソン3を含有するキメラヒトノ

10

20

30

40

50

マウスCTLA4遺伝子を有する遺伝子操作されたマウスモデル(GEMM)の一種を使用して評価した。各マウスに、腫瘍発生のためにMC38マウス結腸腺癌細胞(1×10⁶個)を用いて右の後側腹部に皮下播種した。平均腫瘍サイズが約75mm³に達した時点で、マウスをその腫瘍サイズに基づいて無作為にグループ化し、同日に抗体処置を開始した。アイソタイプ対照および試験抗体を、PBSを用いて1mg/mLに新たに製剤化し、マウスに10mg/kgで腹腔内注射(i.p.)によって週に2回(BIW)3週間投薬した。腫瘍サイズおよび体重をBIWで測定し、腫瘍成長阻害(TGI)を(1-(処置グループにおけるTV21日目-TV0日目/対照グループにおけるTV21日目-TV0日目)×100%)として算出した。

【0169】

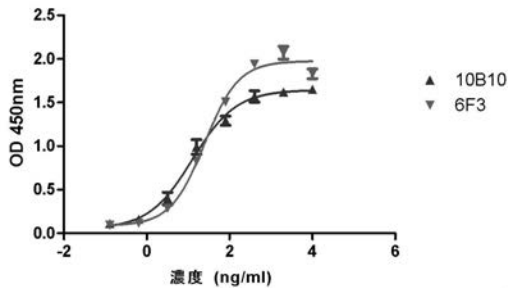
図13に示されるように、グループ2中のヒト化抗CTLA4抗体10B10は、有意な抗腫瘍活性をもたらし(p<0.001)、21日目にそのTGIは84.85%であった。

【0170】

本開示は、特定の実施形態(その一部は好ましい実施形態である)に関して特に示され、記載されているが、本明細書において開示されるような本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく、形態および詳細の種々の変法が行われ得るということは当業者によって理解されなくてはならない。

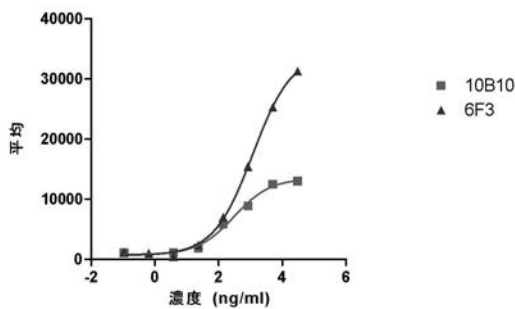
【図1】

CTLA4と結合するCTLA4抗体のElisaによるEC50



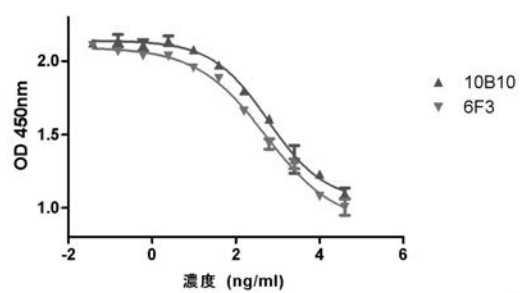
【図2】

CTLA4と結合するCTLA4抗体のFACSによるEC50



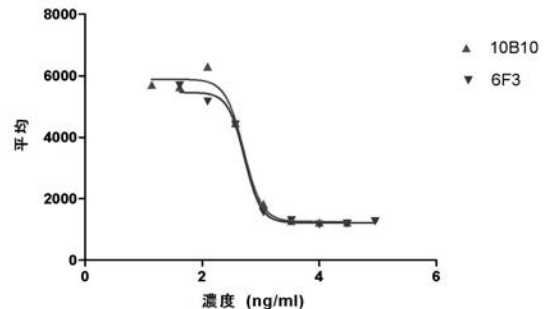
【図3】

CTLA4とCD80間の相互作用を遮断する CTLA4抗体のElisaによるIC50



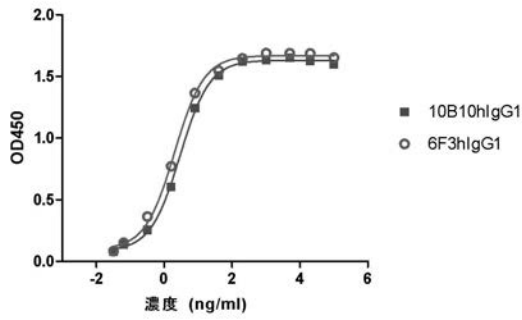
【図4】

CTLA4とCD80間の相互作用を遮断する CTLA4抗体のFACSによるIC50



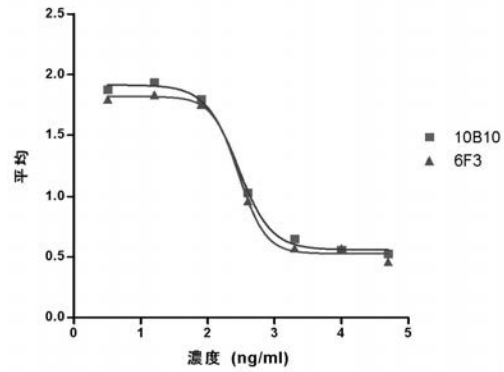
【 図 5 】

CTLA4と結合するCTLA4抗体のElisaによるEC50



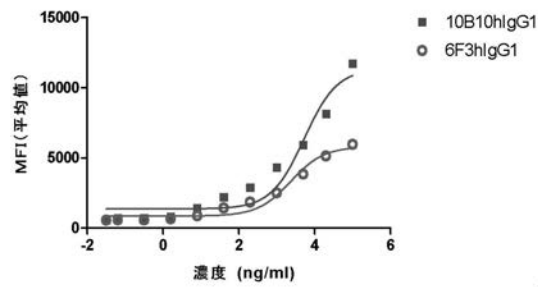
【 図 7 】

CTLA4とCD80間の相互作用を遮断する CTLA4抗体のElisaによるIC50



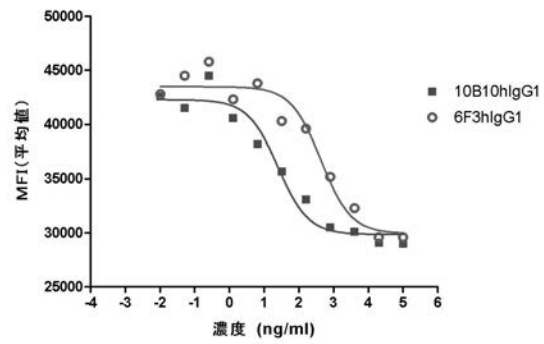
【 図 6 】

CTLA4との結合するCTLA4抗体のFACSによるEC50



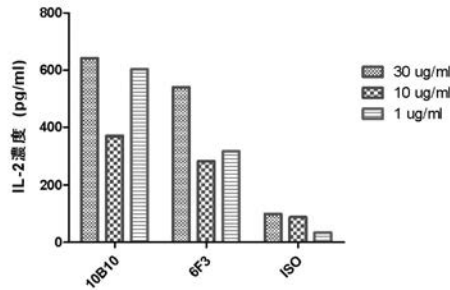
【 図 8 】

CTLA4とCD80間の相互作用を遮断する CTLA4抗体のFACSによるIC50



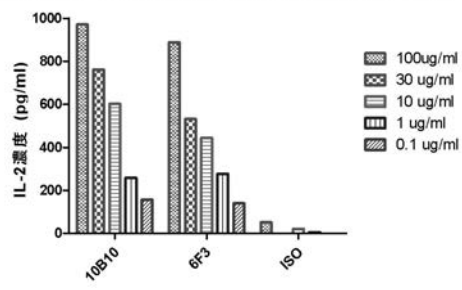
【 図 9 】

PBMCによるIL-2分泌に対するCTLA4モノクローナル抗体の効果



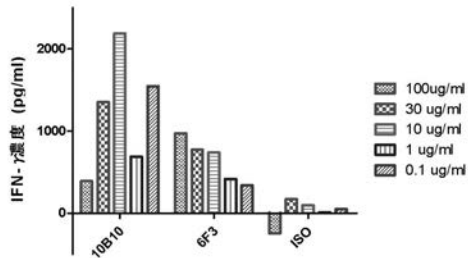
【 図 1 1 】

PBMCによるIL-2分泌に対するヒト化CTLA4抗体の効果



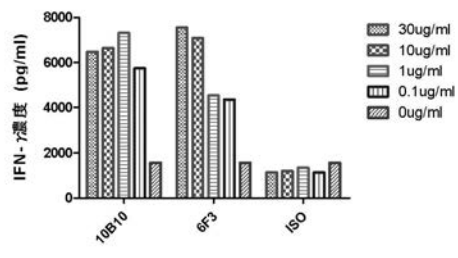
【 図 1 0 】

PBMCによるINF-γ分泌に対するCTLA4モノクローナル抗体の効果

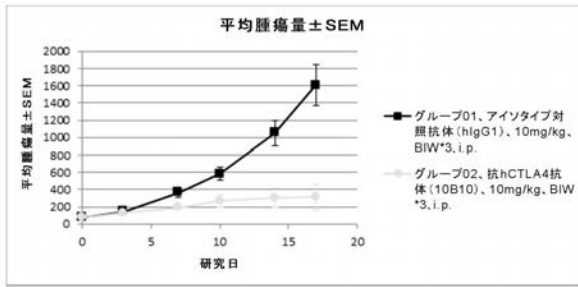


【 図 1 2 】

PBMCによるINF-γ分泌に対するヒト化CTLA4抗体の効果



【 図 1 3 】



【 配列表 】

2020508637000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和1年9月30日 (2019.9.30)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

配列番号 3、5、7、19、21 および 23 からなる群から選択される重鎖 C D R 配列を含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【 請求項 2 】

配列番号 11、13、15、27、29 および 31 からなる群から選択される軽鎖 C D R 配列を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【 請求項 3 】

a) 配列番号 3、配列番号 5 および / または配列番号 7 を含む重鎖可変領域、ならびに
 b) 配列番号 19、配列番号 21 および / または配列番号 23 を含む重鎖可変領域からなる群から選択される重鎖可変領域を含む、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【 請求項 4 】

a) 配列番号 11、配列番号 13 および / または配列番号 15 を含む軽鎖可変領域、ならびに

b) 配列番号 27、配列番号 29 および / または配列番号 31 を含む軽鎖可変領域、

からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む、請求項 1 ~ 3のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

a) 配列番号 3、配列番号 5 および / もしくは配列番号 7 を含む重鎖可変領域ならびに配列番号 1 1、配列番号 1 3 および / もしくは配列番号 1 5 を含む軽鎖可変領域、または

b) 配列番号 1 9、配列番号 2 1 および / もしくは配列番号 2 3 を含む重鎖可変領域ならびに配列番号 2 7、配列番号 2 9 および / もしくは配列番号 3 1 を含む軽鎖可変領域、を含む、請求項 1 ~ 4のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

配列番号 1、配列番号 1 7、配列番号 3 3、配列番号 3 7 および少なくとも 8 0 % 配列同一性のあるそれらの相同配列からなる群から選択される重鎖可変領域を含む、請求項 1 ~ 5のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7】

配列番号 9、配列番号 2 5、配列番号 3 5、配列番号 3 9 および少なくとも 8 0 % 配列同一性のあるそれらの相同配列からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む、請求項 1 ~ 6のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

a) 配列番号 1 を含む重鎖可変領域および配列番号 9 を含む軽鎖可変領域、

b) 配列番号 1 7 を含む重鎖可変領域および配列番号 2 5 を含む軽鎖可変領域、

c) 配列番号 3 3 を含む重鎖可変領域および配列番号 3 5 を含む軽鎖可変領域、

d) 配列番号 3 7 を含む重鎖可変領域および配列番号 3 9 を含む軽鎖可変領域、

e) a)、b)、c) または d) に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性のある重鎖可変領域および軽鎖可変領域

を含む、請求項 1 ~ 7のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

表面プラズモン共鳴結合アッセイによって測定されるものとして、 10^{-9} M 以下の K D 値でヒト細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (C T L A 4) タンパク質と特異的に結合可能である、請求項 1 ~ 8のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 10】

10^{-8} M 以下または 10^{-9} M 以下の K D 値でサル C T L A 4 と結合する、請求項 1 ~ 9のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 11】

E L I S A アッセイによって測定されるものとして、 600 ng / ml 以下または 300 ng / ml 以下の I C 5 0 でヒト C T L A 4 のそのリガンドとの結合を阻害可能である、請求項 1 ~ 10のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 12】

E L I S A アッセイによって測定されるものとして、 30 ng / ml 以下または 3 ng / ml 以下の E C 5 0 でヒト C T L A 4 と結合可能である、請求項 1 ~ 11のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 13】

F A C S アッセイによって測定されるものとして、 600 ng / ml 以下または 30 ng / ml 以下の I C 5 0 でヒト C T L A 4 のそのリガンドとの結合を阻害可能である、請求項 1 ~ 12のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 14】

F A C S アッセイによって測定されるものとして、 6000 ng / ml 以下、 2400 ng / ml 以下、 1200 ng / ml または 400 ng / ml 以下の E C 5 0 でヒト C T L A 4 と結合可能である、請求項 1 ~ 13のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 15】

ヒト化モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 14のいずれかに記載の抗体またはその

抗原結合断片。

【請求項 16】

ヒト化モノクローナル抗体が、宿主細胞によって生成される、請求項 15 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片と同一のエピトープについて競合する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 18】

ラクダ化単ドメイン抗体、ダイアポディー、s c F v、s c F v 二量体、B s F v、d s F v、(d s F v) 2、d s F v - d s F v '、F v 断片、F a b、F a b '、F (a b ') 2、d s ダイアポディー、ナノポディー、ドメイン抗体または二価ドメイン抗体である、請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 19】

コンジュゲートをさらに含む、請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 22】

請求項 21 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片を発現させる方法であって、請求項 22 に記載の宿主細胞を、請求項 20 に記載のポリヌクレオチドが発現される条件下で培養することを含む、方法。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片を含むキット。

【請求項 25】

治療上有効な量の請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片および 1 種または複数の医薬上許容される担体を含む、個体において C T L A 4 によって媒介される疾患または免疫応答の上方制御から恩恵を受けるであろう状態を処置するための、医薬組成物。

【請求項 26】

C T L A 4 阻害剤に対して応答する可能性が高い障害または状態を有すると同定されている個体に投与される、請求項 25 に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

疾患または状態が癌である、請求項 25 または 26 に記載の医薬組成物。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2016/101681
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/395(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 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) A61K; C07K; A61P 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) CNMED,CPRSABS,CNABS,CPEA,DWPI,SIPOABS,AUABS,CNKI,NCBI,GoogleScholar:CTLA4,cancer,CDR,antibody,SEQ ID Nos:1-39, cytotoxic T lymphocyte associated protein4 etc.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013142796 A2 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 26 September 2013 (2013-09-26) see the abstract, claims 1-20	1-31
A	Kuraoka, M.et al. "KU257259.1" <i>GenBank</i> , 10 March 2016 (2016-03-10), see the nucleotide sequence	6-31
A	Mylvaganam et al. "X60684.1" <i>GenBank</i> , 26 July 2016 (2016-07-26), see the nucleotide sequence	6-31
A	CN 105296433 A (ZHONGSHAN AKESO BIOPHARMA CO LTD) 03 February 2016 (2016-02-03) see the whole document	1-31
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 29 June 2017		Date of mailing of the international search report 20 July 2017
Name and mailing address of the ISA/CN STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer LI,Lan
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No. (86-10)62411619

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/101681

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - on paper
 - in electronic form
 - b. (time)
 - in the international application as filed
 - together with the international application in electronic form
 - subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/101681

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.: **26-28**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] PCT Rule 39.1(iv) - Method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.
 - [2] The search of claims 26-28 are restricted to the subject matter "use of the antibody or antigen-binding fragment thereof of any of claims 1-20 in the manufacture of a medicament for therapeutic application".
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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/101681

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2013142796	A2	25 September 2013	US	2015079100	A1	19 March 2015
				WO	2013142796	A3	19 December 2013
CN	105296433	A	03 February 2016	AU	2015295936	A1	09 March 2017
				WO	2016015675	A1	04 February 2016
				CN	106687479	A	17 May 2017
				EP	3176181	A1	07 June 2017
				KR	20170036092	A	31 March 2017
				CA	2956000	A1	04 February 2016
				SG	11201700819Q	A	30 March 2017
				AP	201709762	D0	28 February 2017

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/543	5 9 5
	C 0 7 K 16/28	

(81)指定国・地域 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, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, 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

(74)代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(72)発明者 サン, ジヨン

中華人民共和国 2 1 5 4 0 0 チャンス, タイツァン, ベイジン ウエスト ロード 6

(72)発明者 ジョウ, マン

中華人民共和国 2 1 5 4 0 0 チャンス, タイツァン, ベイジン ウエスト ロード 6

(72)発明者 マ, ウェンツウイ

中華人民共和国 2 1 5 4 0 0 チャンス, タイツァン, ベイジン ウエスト ロード 6

(72)発明者 マ, ホンリ

中華人民共和国 2 1 5 4 0 0 チャンス, タイツァン, ベイジン ウエスト ロード 6

(72)発明者 チェン, ウエイ

中華人民共和国 2 1 5 4 0 0 チャンス, タイツァン, ベイジン ウエスト ロード 6

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA05

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AB01 BA02 CA25 CA44

4C085 AA13 AA14 BB01 BB41 BB43 BB50 CC01 CC02 DD62 EE01

GG01 GG08

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 DA76 EA28 EA50 FA74

专利名称(译)	新的抗ctla4抗体		
公开(公告)号	JP2020508637A	公开(公告)日	2020-03-26
申请号	JP2019519271	申请日	2016-10-10
[标]发明人	チェンウェイ		
发明人	サン, ジョン ジョウ, マン マ, ウエンツウイ マ, ホンリ チェン, ウエイ		
IPC分类号	C12N15/13 C12N11/15 C12N5/10 C07K16/46 C12N15/63 C12P21/08 C12N1/19 C12N1/21 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/02 G01N33/53 G01N33/543 C07K16/28		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/00 A61P37/04 C07K16/2818 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/76 C07K2317/92 A61K39/395 C07K16/28		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C12N1/15 C12N5/10 C07K16/46 C12N15/63.Z C12P21/08 C12N1/19 C12N1/21 A61K39/395.N A61K39/395.D A61K39/395.T A61K39/395.E A61P35/00 A61P37/02 G01N33/53.D G01N33/543.595 C07K16/28		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB50 4C085/CC01 4C085/CC02 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	松任谷裕子 森田 裕 Nobuto 滤纸冲		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开提供了针对CTLA4的抗体和抗原结合片段，其可以阻断CTLA4与其配体的结合。本公开的抗体提供了用于治疗疾病例如癌症的试剂。

(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2020-508637 (P2020-508637A)
		(43) 公表日 令和2年3月26日(2020.3.26)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/13	ZNA 4B064
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4B065
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4C085
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4H045
C12N 15/63 (2006.01)	C12N 15/63	Z
	審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2019-519271(P2019-519271)	(71) 出願人 518082884	
(82) 出願日 平成28年10月10日(2016.10.10)	クラウン バイオサイエンス、インコーポ	
(83) 優先文書出日 令和1年6月7日(2019.6.7)	レイテッド(タイツァン)	
(84) 国際出願番号 PCT/CN2016/101681	中華人民共和國 215400 チャンス	
(87) 国際公開番号 W02018/068182	、タイツァン、ベイジン ウェスト ロー	
(87) 国際公開日 平成30年4月19日(2018.4.19)	ド 6	
	(74) 代理人 100149076	
	弁理士 梅田 慎介	
	(74) 代理人 100119183	
	弁理士 松任谷 優子	
	(74) 代理人 100173185	
	弁理士 森田 裕	
	(74) 代理人 100162503	
	弁理士 今野 智介	
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】新規抗CTLA4抗体		