

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2025-508690  
(P2025-508690A)

(43)公表日 令和7年4月10日(2025.4.10)

|                   |                                                                                                                                                                  |         |       |             |                     |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------|-------------|---------------------|
| (51)国際特許分類        |                                                                                                                                                                  | F I     |       | テーマコード (参考) |                     |
| C 1 2 N           | 5/10 (2006.01)                                                                                                                                                   | C 1 2 N | 5/10  | 4 B 0 6 5   |                     |
| C 1 2 N           | 1/15 (2006.01)                                                                                                                                                   | C 1 2 N | 1/15  | Z N A       | 4 C 0 8 5           |
| C 1 2 N           | 1/19 (2006.01)                                                                                                                                                   | C 1 2 N | 1/19  | 4 H 0 4 5   |                     |
| C 1 2 N           | 1/21 (2006.01)                                                                                                                                                   | C 1 2 N | 1/21  |             |                     |
| C 0 7 K           | 16/40 (2006.01)                                                                                                                                                  | C 0 7 K | 16/40 |             |                     |
|                   |                                                                                                                                                                  | 審査請求    | 未請求   | 予備審査請求      | 未請求 (全104頁) 最終頁に続く  |
| (21)出願番号          | 特願2024-547005(P2024-547005)                                                                                                                                      |         |       | (71)出願人     | 508057896           |
| (86)(22)出願日       | 令和5年2月7日(2023.2.7)                                                                                                                                               |         |       |             | コーネル・ユニバーシティー       |
| (85)翻訳文提出日        | 令和6年10月4日(2024.10.4)                                                                                                                                             |         |       |             | CORNELL UNIVERSITY  |
| (86)国際出願番号        | PCT/US2023/062151                                                                                                                                                |         |       |             | アメリカ合衆国14850ニューヨーク  |
| (87)国際公開番号        | WO2023/150797                                                                                                                                                    |         |       |             | 州イサカ、バイン・トゥリー・ロード3  |
| (87)国際公開日         | 令和5年8月10日(2023.8.10)                                                                                                                                             |         |       |             | 95番、スウィート310        |
| (31)優先権主張番号       | 63/307,502                                                                                                                                                       |         |       | (71)出願人     | 524294068           |
| (32)優先日           | 令和4年2月7日(2022.2.7)                                                                                                                                               |         |       |             | トライーインスティテューショナル セ  |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US)                                                                                                                                                           |         |       |             | ラピューティクス ディスカバリー イン |
| (81)指定国・地域        | AP(BW,CV,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 |         |       |             | スティテュート             |
|                   | 最終頁に続く                                                                                                                                                           |         |       | (74)代理人     | アメリカ合衆国 10021 ニューヨー |
|                   |                                                                                                                                                                  |         |       |             | ク州 ニューヨーク イースト シックス |
|                   |                                                                                                                                                                  |         |       |             | ティーナインス ストリート 413   |
|                   |                                                                                                                                                                  |         |       |             | 100102978           |
|                   |                                                                                                                                                                  |         |       |             | 弁理士 清水 初志           |
|                   |                                                                                                                                                                  |         |       |             | 最終頁に続く              |

(54)【発明の名称】 癌免疫療法のためのART1の標的化

(57)【要約】  
ヒトART1に結合する抗体およびその使用が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

抗ヒトART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1の活性を阻害するポリペプチドをコードする核酸配列に機能的に連結されている異種プロモーターを含む発現カセットを含む単離細胞であって、該抗体、該その抗原結合断片、または該ポリペプチドが、

(i)ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68) を含む第3の相補性決定領域 (CDR) に機能的に連結されているIFSNDEK (SEQ ID NO:67) を含む第2のCDRに機能的に連結されているGFSLSNARM (SEQ ID NO:66) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／もしくは

(ii)QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30) を含む第3のCDRに機能的に連結されているDTS (SEQ ID NO:29) を含む第2のCDRに機能的に連結されているSSVSY (SEQ ID NO:81) を含む第1のCDRを含む可変領域；または

(iii)ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37) を含む第3のCDRに機能的に連結されているISTSGFT (SEQ ID NO:36) を含む第2のCDRに機能的に連結されているGGSISSYY (SEQ ID NO:35) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／もしくは

(iv)QQYGSST (SEQ ID NO:44) を含む第3のCDRに機能的に連結されているGAS (SEQ ID NO:43) を含む第2のCDRに機能的に連結されているQSVSSSY (SEQ ID NO:42) を含む第1のCDRを含む可変領域を有する、前記単離細胞。

## 【請求項 2】

(i)を含むIg重鎖が、  
QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKD  
TSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARIYGGDSWGYFDNWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1) もしくは  
QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEK  
SYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARIYGGDSWGYFDNWGQGLTVTVSS (SEQ ID  
NO:82)

を含む可変領域を含み；またはIg軽鎖(ii)が、  
QIVLTQSPAIMSASLGKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSL  
TISSMEAGDAATYYCQQWSSNPPTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:2) もしくは  
DIQLTQSPSFLSASVGDRVITCRASSSVSYMHYQQKPGTSPKRLIYDTS  
KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:83)

を含む可変領域を含む、請求項1記載の単離細胞。

## 【請求項 3】

(iii)を含むIg重鎖が、  
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRISTSGFTNYPNPSLKSRTMSVD  
SSKNQFSLKLSSLTAADTAVYYCARDGWGRVFDIWLGLTMVTVSS (SEQ ID NO:3)

を含む可変領域を含み；または(iv)を含むIg軽鎖が、  
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT  
LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:4)

を含む可変領域を含む、請求項1記載の単離細胞。

## 【請求項 4】

(ii)を含むIg軽鎖が、

10

20

30

40

50

DIQLTQSPSFLSASVGDRVITICRASSSVSYMHWWYQQKPGTSPKRLIYDTSKLGASGVPSRFSGSGSGTEYTLT  
ISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKL (SEQ ID NO:69);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICSASSSVSYMHWWYQQKPGTSPKRLIYDTSKLGASGVPSRFSGSGSGTDYTL  
TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKL (SEQ ID NO:84); または

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHWWYQQKPGTSPRRLIYDTSKLGATGIPARFSGSGSGTDYTLTI  
SSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGQGTKL (SEQ ID NO:87)

を含む可変領域を含む、請求項1記載の単離細胞。

10

【請求項5】

哺乳動物細胞である、請求項1～4のいずれか一項記載の細胞。

【請求項6】

霊長類細胞である、請求項5記載の細胞。

【請求項7】

ヒト細胞である、請求項5記載の細胞。

【請求項8】

ヒトART1の活性を阻害する抗ヒトART1モノクローナル抗体をコードする核酸配列を  
含むハイブリドマであって、該抗体が、

(i)ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68) を含む第3の相補性決定領域 (CDR) に  
機能的に連結されているIFSNDEK (SEQ ID NO:67) を含む第2のCDRに機能的に連結  
されているGFSLSNARM (SEQ ID NO:66) を含む第1のCDRを含む可変領域；および  
／または

20

(ii)QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30) を含む第3のCDRに機能的に連結されているD  
TS (SEQ ID NO:29) を含む第2のCDRに機能的に連結されているSSVSY (SEQ ID N  
O:81) もしくはSSSVSY (SEQ ID NO:28) を含む第1のCDRを含む可変領域；あるいは

(iii)ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37) を含む第3のCDRに機能的に連結されてい  
るISTSGFT (SEQ ID NO:36) を含む第2のCDRに機能的に連結されているGGSISSYY  
(SEQ ID NO:35) を含む第1のCDRを含む可変領域；および

(iv)QQYGSST (SEQ ID NO:44) を含む第3のCDRに機能的に連結されているGAS  
(SEQ ID NO:43) を含む第2のCDRに機能的に連結されているQSVSSSY (SEQ ID N  
O:42) を含む第1のCDRを含む可変領域

30

を有する、前記ハイブリドマ。

【請求項9】

ヒトおよび／またはマウスART1に結合するIg重鎖または軽鎖の少なくとも可変領域を  
コードするヌクレオチド配列に機能的に連結されているプロモーターを含む単離された核  
酸であって、該鎖が、

(i)ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68) を含む第3の相補性決定領域 (CDR) に  
機能的に連結されているIFSNDEK (SEQ ID NO:67) を含む第2のCDRに機能的に連結  
されているGFSLSNARM (SEQ ID NO:66) を含む第1のCDRを含む可変領域；および  
／もしくは

40

(ii)QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30) を含む第3のCDRに機能的に連結されているD  
TS (SEQ ID NO:29) を含む第2のCDRに機能的に連結されているSSVSY (SEQ ID N  
O:81) を含む第1のCDRを含む可変領域；または

(iii)ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37) を含む第3のCDRに機能的に連結されてい  
るISTSGFT (SEQ ID NO:36) を含む第2のCDRに機能的に連結されているGGSISSYY  
(SEQ ID NO:35) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／もしくは

(iv)QQYGSST (SEQ ID NO:44) を含む第3のCDRに機能的に連結されているGAS  
(SEQ ID NO:43) を含む第2のCDRに機能的に連結されているQSVSSSY (SEQ ID N  
O:42) を含む第1のCDRを含む可変領域

50

を含む、前記単離された核酸。

【請求項 10】

ヒトおよびマウスART1に結合する単離抗体またはその抗原断片であって、該抗体またはその抗原結合断片が、

(i)ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68) を含む第3の相補性決定領域 (CDR) に機能的に連結されているIFSNDEK (SEQ ID NO:67) を含む第2のCDRに機能的に連結されているGFSLSNARM (SEQ ID NO:66) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／または

(ii)QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30) を含む第3のCDRに機能的に連結されているDTS (SEQ ID NO:29) を含む第2のCDRに機能的に連結されているSSVSY (SEQ ID NO:81) を含む第1のCDRを含む可変領域；

(iii)ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37) を含む第3のCDRに機能的に連結されているISTSGFT (SEQ ID NO:36) を含む第2のCDRに機能的に連結されているGGSISSYY (SEQ ID NO:35) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／または

(iv)QQYGSST (SEQ ID NO:44) を含む第3のCDRに機能的に連結されているGAS (SEQ ID NO:43) を含む第2のCDRに機能的に連結されているQSVSSSY (SEQ ID NO:42) を含む第1のCDRを含む可変領域  
を有する、前記単離抗体またはその抗原断片。

【請求項 11】

(i)の前記可変領域が、  
QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSL (SEQ ID NO:24), WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO:25),  
RLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDATYYCAR (SEQ ID NO:26), WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:27),  
QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVS (SEQ ID NO:71), VSWIRQP PGKALEWLAH (SEQ ID NO:72),  
SYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTM TNMDPVDATYYC (SEQ ID NO:73), または WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:74)

の1つまたは複数を含む1つまたは複数のフレームワーク領域をさらに含む、請求項10記載の抗体。

【請求項 12】

(ii)の前記可変領域が、  
QIVLTQSPAIMSASLGKVTMTCSA (SEQ ID NO:31), MHWYQQKSGTSPKRWIY (SEQ ID NO:32),  
KLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISMEAGDAATYYC (SEQ ID NO:33), FGAGTKLELK (SEQ ID NO:34),  
DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRAS (SEQ ID NO:76), YMHWYQQKPGTS PKRLIY (SEQ ID NO:77),  
KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISLQPEDFATY YC (SEQ ID NO:78), FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:79)

の1つまたは複数を含む1つまたは複数のフレームワーク領域をさらに含む、請求項10記載の抗体。

【請求項 13】

(ii)の前記可変領域が、  
DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRA (SEQ ID NO:51), MHWYQQKPGTSPKRLIY (SEQ ID NO:52),  
KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:53), または  
FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:54)

の1つまたは複数を含む1つまたは複数のフレームワーク領域をさらに含む、請求項10記載の抗体。

【請求項 14】

(ii)の前記可変領域が、  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSA (SEQ ID NO:55), MHWYQQKPGTSPKRLIY (SEQ ID NO:56),  
KLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:57), または  
FGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:58)

の1つまたは複数を含む1つまたは複数のフレームワーク領域をさらに含む、請求項10記載の抗体。

【請求項15】

10

(ii)の前記可変領域が、  
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA (SEQ ID NO:59),  
MHWYQQKPGTSPRRLIY (SEQ ID NO:60),  
KLATGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:61), または  
TFQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:62)

の1つまたは複数を含む1つまたは複数のフレームワーク領域をさらに含む、請求項10記載の抗体。

20

【請求項16】

(iii)の前記可変領域が、  
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS (SEQ ID NO:38), WSWIRQPAGKGLEWIGR (SEQ ID NO:39),  
NYNPSLKSRTMSVDSSKNQFSLKLSLTAADTAVYYC (SEQ ID NO:40), または WGLGTMVTVSS (SEQ ID NO:41)

の1つまたは複数を含む1つまたは複数のフレームワーク領域をさらに含む、請求項10記載の抗体。

【請求項17】

30

前記可変領域(iv)が、  
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS (SEQ ID NO:45), LAWYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:46),  
SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:47) または FGPGTKVDIK (SEQ ID NO:63)

の1つまたは複数を含む1つまたは複数のフレームワーク領域をさらに含む、請求項10記載の抗体。

【請求項18】

有効量の抗ヒトART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1に結合するポリペプチドを含む組成物を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物において癌を阻害または処置するための方法。

40

【請求項19】

前記癌が、肺癌、結腸癌、黒色腫、膠芽腫、乳癌、または結腸直腸癌である、請求項18記載の方法。

【請求項20】

前記哺乳動物がヒトである、請求項18または19記載の方法。

【請求項21】

前記量が、腫瘍負荷を減少させること、転移を阻害すること、生存を延ばすこと、またはこれらの任意の組み合わせに有効である、請求項18、19、または20記載の方法。

【請求項22】

前記組成物が静脈内または皮下に投与される、請求項18～21のいずれか一項記載の方

50

法。

【請求項 2 3】

化学療法薬を投与する工程をさらに含む、請求項 18～22 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 4】

免疫チェックポイント阻害剤を投与する工程をさらに含む、請求項 18～22 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 5】

前記抗体、前記その抗原結合断片、または前記ポリペプチドが、

(i)ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68) を含む第3の相補性決定領域 (CDR) に機能的に連結されているIFSNDK (SEQ ID NO:67) を含む第2のCDRに機能的に連結されているGFSLSNARM (SEQ ID NO:66) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／もしくは

(ii)QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30) を含む第3のCDRに機能的に連結されているDTS (SEQ ID NO:29) を含む第2のCDRに機能的に連結されているSSVSY (SEQ ID NO:81) を含む第1のCDRを含む可変領域；または

(iii)ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37) を含む第3のCDRに機能的に連結されているISTSGFT (SEQ ID NO:36) を含む第2のCDRに機能的に連結されているGGSISSYY (SEQ ID NO:35) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／もしくは

(iv)QQYGSST (SEQ ID NO:44) を含む第3のCDRに機能的に連結されているGAS (SEQ ID NO:43) を含む第2のCDRに機能的に連結されているQSVSSSY (SEQ ID NO:42) を含む第1のCDRを含む可変領域を有する、請求項 18～24 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 6】

前記重鎖がIgG重鎖である、請求項 18～25 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 7】

前記軽鎖がIgκ軽鎖である、請求項 18～26 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 8】

前記抗体断片が投与される、請求項 18～26 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 9】

前記断片がFab' またはscFvである、請求項 28 記載の方法。

【請求項 3 0】

有効量の抗ヒトART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1に結合するポリペプチドを含む組成物を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物においてART1媒介性免疫抑制を予防する、阻害する、または処置するための方法。

【請求項 3 1】

前記哺乳動物が癌を有する、請求項 30 記載の方法。

【請求項 3 2】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 30 または 31 記載の方法。

【請求項 3 3】

前記組成物が静脈内に投与される、請求項 30～32 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 4】

化学療法薬を投与する工程をさらに含む、請求項 31～33 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 5】

免疫チェックポイント阻害剤を投与する工程をさらに含む、請求項 30～33 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 6】

前記抗体、前記その抗原結合断片、または前記ポリペプチドが、

(i)ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68) を含む第3の相補性決定領域 (CDR) に機能的に連結されているIFSNDK (SEQ ID NO:67) を含む第2のCDRに機能的に連結されているGFSLSNARM (SEQ ID NO:66) を含む第1のCDRを含む可変領域；および

／または

(ii)QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30) を含む第3のCDRに機能的に連結されているDTS (SEQ ID NO:29) を含む第2のCDRに機能的に連結されているSSVSY (SEQ ID NO:81) もしくはSSSVSY (SEQ ID NO:28) を含む第1のCDRを含む可変領域；あるいは

(iii)ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37) を含む第3のCDRに機能的に連結されているISTSGFT (SEQ ID NO:36) を含む第2のCDRに機能的に連結されているGGSISSYY (SEQ ID NO:35) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／または

(iv)QQYGSST (SEQ ID NO:44) を含む第3のCDRに機能的に連結されているGAS (SEQ ID NO:43) を含む第2のCDRに機能的に連結されているQSVSSSY (SEQ ID NO:42) を含む第1のCDRを含む可変領域

10

を有する、請求項30～35のいずれか一項記載の方法。

【請求項37】

前記重鎖がIgG重鎖である、請求項30～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項38】

前記軽鎖がIgκ軽鎖である、請求項30～37のいずれか一項記載の方法。

【請求項39】

有効量の抗ヒトART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1に結合するポリペプチドを含む組成物を哺乳動物に投与する工程を含む、癌を有する哺乳動物において免疫応答を増強するための方法。

20

【請求項40】

前記哺乳動物がヒトである、請求項39記載の方法。

【請求項41】

前記重鎖がIgG重鎖である、請求項39または40記載の方法。

【請求項42】

前記軽鎖がIgκ軽鎖である、請求項39～41のいずれか一項記載の方法。

【請求項43】

前記抗体、前記その抗原結合断片、または前記ポリペプチドが、

(i)ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68) を含む第3の相補性決定領域 (CDR) に機能的に連結されているIFSNDK (SEQ ID NO:67) を含む第2のCDRに機能的に連結されているGFSLSNARM (SEQ ID NO:66) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／もしくは

30

(ii)QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30) を含む第3のCDRに機能的に連結されているDTS (SEQ ID NO:29) を含む第2のCDRに機能的に連結されているSSVSY (SEQ ID NO:81) を含む第1のCDRを含む可変領域；または

(iii)ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37) を含む第3のCDRに機能的に連結されているISTSGFT (SEQ ID NO:36) を含む第2のCDRに機能的に連結されているGGSISSYY (SEQ ID NO:35) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／もしくは

(iv)QQYGSST (SEQ ID NO:44) を含む第3のCDRに機能的に連結されているGAS (SEQ ID NO:43) を含む第2のCDRに機能的に連結されているQSVSSSY (SEQ ID NO:42) を含む第1のCDRを含む可変領域

40

を有する、請求項39～42のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022年2月7日に出願された米国出願第63/307,502号の出願日の恩典を主張し、その開示は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

参照による配列表の組み入れ

配列表は、2023年2月2日に作成され、99,523バイトのサイズを有するxmlファイル

50

、「2306900.xml」として本明細書とともに提供される。xmlファイルの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0003】

政府の権利に関する記載

本発明は、国防総省により与えられた助成金W81XWH1910422のもとで政府の支援を受けて行われた。政府は本発明に関して一定の権利を有する。

【背景技術】

【0004】

背景

ARTCファミリーのモノADPリボシルトランスフェラーゼであるADPリボシルトランスフェラーゼ1 (ART1) は、局所腫瘍微小環境で細胞表面タンパク質または標的可溶性タンパク質をADPリボシル化するように細胞外で機能する。モノADPリボシル化は、競合阻害剤として作用するアルギニン類似体およびニコチンアミド模倣物によって遮断することができる。そのような類似体としては、他の非標的機構に基づいて肺癌治療で以前に安全に利用された抗生物質のノボジオシンが挙げられる。モノADPリボシル化の第2の公知の阻害剤は、医療イメージング法で有用な長い安全記録を有するノルエピネフリン類似体であるメタヨードベンジルグアニジン (MIBG) である。MIBGは、おそらくモノADPリボシル化の阻害を通じて、肝細胞癌細胞株の転移性の特性に阻害効果を及ぼすことができる。モノADPリボシル化のこれらのよく説明されている阻害剤に加えて、細胞内ポリおよびモノADPリボシル化の小分子阻害剤を開発するために、製薬会社によってさまざま

10

20

【発明の概要】

【0005】

概要

本開示は、腫瘍増殖を抑制し、肺癌細胞を含めた癌細胞などのART1発現細胞に対する免疫細胞の細胞傷害性を助長するために、ART1の選択的阻害剤、例えば、モノADPリボシル化の阻害剤を提供する。特に、本開示は、癌を含めた疾患の処置のために、ART1、すなわち、細胞外モノADPリボシルトランスフェラーゼを標的にする抗体、その断片、および単鎖ART1結合ポリペプチド、例えば、ART1に結合する抗体を提供する。例えば、本明細書において開示されるように、ART1は、別々のドライバー突然変異状態の複数のヒト非小細胞肺癌 (NSCLC) 株で高発現しており、強いART1タンパク質発現が、ヒト肺腺癌の過半数で観察された。遺伝子操作マウスの腺癌モデルにおける実験により、ART1の過剰発現が、おそらく腫瘍微小環境における免疫細胞からの保護により、播種性腫瘍細胞の生存および転移性増殖で重要な役割を果たすことが示唆される。したがって、ART1またはその機能を特異的に阻害する化合物、例えば、抗ヒトART1特異的抗体またはその一部は、例えばNSCLC患者において、ART1を過剰発現する癌における標的治療剤として使用して、播種細胞の免疫介在性破壊を助長することによって癌の転移性伝播を制限することができる。細胞外の酵素標的として、ART1は、抗体およびその断片を含む様々な治療様式による創薬可能性が高い。さらに、ADPリボシル化の阻害剤は、細胞傷害性化学療法または免疫チェックポイント阻害剤との併用療法で 사용할ことができる。ART1阻害剤は、例えば、結腸癌または乳癌を含めて、幅広い種類の癌に有用である。本阻害剤は、癌の進行および／または転移を阻害するのに有用であり得る。

30

40

【0006】

本開示は、ヒトART1および任意でマウスART1に結合する単離抗体を提供する。抗体は、脊椎動物細胞、例えば、抗ART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1の活性を阻害するポリペプチドをコードする、核酸配列でトランスフェクトされたものから

50

、例えば、モノクローナル抗体を発現する、免疫細胞またはハイブリドーマから、生成することができる。一態様では、ヒトおよびマウスART1に結合する単離モノクローナル抗体が提供される。抗ART1抗体もしくはその抗原結合断片または該ポリペプチドをコードする核酸配列は、プロモーター、例えば異種プロモーターに機能的に連結することができる。細胞は、哺乳動物細胞、霊長類細胞、昆虫細胞または植物細胞であってもよい。一態様では、ヒトおよび／またはマウスART1に結合するヒトまたはマウスの重鎖または軽鎖の少なくとも可変領域をコードするヌクレオチド配列に、機能的に連結されているプロモーターを含む、単離された核酸が提供される。

【0007】

一態様では、抗ART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1の活性を阻害するポリペプチドをコードする核酸配列を含む発現カセットが提供され、配列は、  
 QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKD  
 TSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARIYGGDSWGYFDNWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1);  
 QIVLTQSPAIMSASLGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSL  
 TISSMEAGDAATYYCQQWSSNPPTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:2);  
 QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRISTSGFTNYPNPSLKSRTMSVD  
 SSKNQFSLKLSSLTAADTAVYYCARDGWGRVFDIWGLGTMVTVSS (SEQ ID NO:3); もしくは  
 EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT  
 LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:4)

10

20

またはこれらに対して少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする。

【0008】

一態様では、抗ART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1の活性を阻害するポリペプチドをコードする核酸配列を含む発現カセットが提供され、配列は、  
 S NARMGVVS (SEQ ID NO:21)、  
 HIFSNDEKSYSTSLKS (SEQ ID NO:22), IYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:23),  
 QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLS (SEQ ID NO:24); SSSVSY (SEQ ID NO:28), SSVSY (SEQ ID  
 NO:81), DTS (SEQ ID NO:29), もしくは QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30); もしくは GFSLSNARMG (SEQ ID NO:66)  
 IFSNDEK (SEQ ID NO:67), ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68); SSSVSY (SEQ ID NO:28), DTS (SEQ ID  
 NO:29), もしくは QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30)

30

を有する複数のCDRをコードし、

40

50

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSL (SEQ ID NO:24), WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO:25),  
RLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCAR (SEQ ID NO:26)もしくはWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:27),もしくは  
QIVLTQSPAIMSASLGKVTMTCSA (SEQ ID NO:31), MHWYQQKSGTSPKRWIY (SEQ ID NO:32),  
KLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAGDAATYYC (SEQ ID NO:33)もしくはFGAGTKLELK (SEQ ID NO:34),もしくは  
DIQLTQSPSFLSASVGDRVITCRA (SEQ ID NO:51), MHWYQQKPGTSPKRLIY (SEQ ID NO:52),  
KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:53), もしくは  
FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:54) もしくは  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRA (SEQ ID NO:55), MHWYQQKPGTSPKRLIY (SEQ ID NO:56),  
KLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:57) もしくは  
FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:58) ,もしくは  
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA (SEQ ID NO:59), MHWYQQKPGTSPRRLIY (SEQ ID NO:60),  
KLATGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:61) もしくは  
TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:62) ,もしくは  
QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVS (SEQ ID NO:71), VSWIRQP PGKALEWLAH (SEQ ID NO:72),  
SYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYC (SEQ ID NO:73)もしくはWGQGTTLTVSS (SEQ ID  
NO:74),もしくはDIQLTQSPSFLSASVGDRVITCRAS (SEQ ID NO:76), YMHYQQKPGTS PKRLIY (SEQ ID  
NO:77), KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:78),もしくはFGQGTKLEIK (SEQ ID  
NO:79)

10

20

30

40

50

を有する1つまたは複数のフレームワーク領域を任意で含み、  
またはこれらに対して少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%  
、98%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする。

【0009】

一態様では、抗ART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1の活性を阻害す  
るポリペプチドをコードする核酸配列を含む発現カセットが提供され、配列は、  
GGSISSYY (SEQ ID NO:35), ISTSGFT (SEQ ID  
NO:36), ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37) または QSVSSSY (SEQ ID NO:42), GAS (SEQ ID NO:43) または  
QQYGSST (SEQ ID NO:44)

を有する複数のCDRをコードし、  
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO:38), WSWIRQPAGKGLEWIGR (SEQ ID NO:39),  
NYNPSLKSRTMSVDSSKNQFSLKLSSLTAADTAVYYC (SEQ ID NO:40) または WGLGTMVTVSS (SEQ ID  
NO:41), または EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS (SEQ ID NO:45), LAWYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID  
NO:46), SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:47), またはFGPGTKVDIK (SEQ ID  
NO:63)

を有する1つまたは複数のフレームワーク領域を任意で含み、  
これらに対して少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%  
、または99%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする。

【0010】

一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチドは、SEQ ID NO:21  
、SEQ ID NO:22およびSEQ ID NO:23、ならびにSEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29

およびSEQ ID NO:30を含むCDRを含む。

【0011】

一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチドは、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36およびSEQ ID NO:37、ならびにQSVSSSY (SEQ ID NO:42)、GAS (SEQ ID NO:43) およびSEQ ID NO:44を含むCDRを含む。

【0012】

一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチドは、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67およびSEQ ID NO:68、ならびにSEQ ID NO:81、SEQ ID NO:29およびSEQ ID NO:30を含むCDRを含む。

【0013】

一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチド中のフレームワーク領域は、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26および／もしくはWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:27)、または1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つの保存的アミノ酸置換、および任意で1つ、2つ、もしくは3つの非保存的置換を有する配列を含む。

【0014】

一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチド中のフレームワーク領域は、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、および／もしくはSEQ ID NO:34、または1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つの保存的アミノ酸置換、および任意で1つ、2つ、もしくは3つの非保存的置換を有する配列、またはこれらに対して少なくとも80%、82%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを含む。

【0015】

一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチド中のフレームワーク領域は、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、および／もしくはSEQ ID NO:41、または1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つの保存的アミノ酸置換、および任意で1つ、2つ、もしくは3つの非保存的置換を有する配列、またはこれらに対して少なくとも80%、82%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを含む。

【0016】

一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチド中のフレームワーク領域は、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、および／もしくはSEQ ID NO:63、または1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つの保存的アミノ酸置換、および任意で1つ、2つ、もしくは3つの非保存的置換を有する配列、またはこれらに対して少なくとも80%、82%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを含む。

【0017】

一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチドは、例えばSEQ ID NO:90に対して残基70~100、170~182、192~206、または230~245などのヒトまたはマウスART1の部分に結合する。

【0018】

一態様では、CDRは、NARMGVS (SEQ ID NO:21)、HIFSNDEKSYSTSLKS (SEQ ID NO:22)またはIYGGDSWG YFDN (SEQ ID NO:23)

に対して1つ、2つ、または3つのアミノ酸置換を有する。例えば、NARMGVS (SEQ ID NO:21) に対して1つまたは2つの置換を有するCDRは、NAHMGVS (SEQ ID NO:93)、QARMGIS (SEQ ID NO:94)、またはNGRMGVS (SEQ ID NO:95) を有し；HIFSNDEKSYSTSLKS (SEQ ID NO:22) に対して1つ、2つ、または3つの置換を有するCDRは、HIFSNDEKSYSTSIKS (SEQ ID NO:96)、HLFSNDEKSYSTSIKS (SEQ ID NO:97)、またはHIFTNDEKSYSSSLKS (SEQ ID NO:98) を有し；IYGGDSWG YFDN (SEQ ID NO:23) に対して1つまたは少数の置換を有するCDRは、IYGGADSW

10

20

30

40

50

GYFEN (SEQ ID NO:99)、IYGGDSWAYFDN (SEQ ID NO:100)、またはLYGID SWGYFDN (SEQ ID NO:101)を有する。

【0019】

一態様では、CDRは、  
GFSLSNARMG (SEQ ID NO:66)、IFSNDK (SEQ ID NO:67)またはARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68)

に対して1つ、2つ、または3つのアミノ酸置換を有する。例えば、\_GFSLSNARMG (SEQ ID NO:66)に対して1つまたは2つの置換を有するCDRは、GFSISNARMG (SEQ ID NO:102)、GFSASNTRMG (SEQ ID NO:103)、またはGFSISNLRMA (SEQ ID NO:104)を有する。例えば、IFSNDK (SEQ ID NO:67)に対して1つまたは2つの置換を有するCDRは、LFSNDK (SEQ ID NO:105)またはIFSNDK (SEQ ID NO:106)を有する。例えば、ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68)に対して1つ、2つ、または3つの置換を有するCDRは、GRIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:107)、ARIYAADSWGYFDN (SEQ ID NO:108)、またはIRAYGGDSWLYFDN (SEQ ID NO:109)を有する。

【0020】

例えば遺伝子発現ベクター中のART1発現カセット、ART1結合抗体もしくはその抗原結合断片、またはART1に結合するポリペプチドを有する組成物は、インビトロおよびインビボ方法で用いることができる。例えば、該組成物は、例えば、有効量の組成物を哺乳動物に投与することによって、哺乳動物において癌を阻害または処置するために用いることができる。哺乳動物は、肺癌、例えば非小細胞肺癌、結腸癌、黒色腫、膠芽腫、乳癌、または結腸直腸癌を有し得る。一態様では、哺乳動物はヒトである。一態様では、量は、ART1の酵素活性を阻害すること、腫瘍負荷を減少させること、転移を阻害すること、免疫介在性抗腫瘍活性を増強すること、または生存を延ばすことに有効である。一態様では、哺乳動物はART1を過剰発現する腫瘍を有する。組成物は、哺乳動物においてART1媒介性免疫抑制を予防もしくは阻害するために、その必要がある哺乳動物、例えば、ART1を過剰発現する腫瘍を有する哺乳動物、例えば、NSCLC、結腸癌、もしくは黒色腫を有する哺乳動物において免疫応答を増強するために用いることができる。

【0021】

一態様では、ヒトART1および／もしくはマウスART1に結合する、ならびに／またはヒトART1および／またはマウスART1の活性を阻害する抗ART1抗体が提供される。

【0022】

抗ヒトART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1の活性を阻害するポリペプチドをコードする核酸配列に機能的に連結されている異種プロモーターを含む発現カセットを含む単離細胞がさらに提供され、該抗体、該その抗原結合断片、または該ポリペプチドは、(i)

ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68)もしくはIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:23)

を含む第3の相補性決定領域 (CDR) に機能的に連結されている

IFSNDK (SEQ ID NO:67)もしくはHIFSNDKSYSTSLKS (SEQ ID NO:22)

を含む第2のCDRに機能的に連結されているGFSLSNARM (SEQ ID NO:66)もしくはNARMGVS (SEQ ID NO:21)を含む第1のCDRを含む可変領域；および／または(ii) QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30)を含む第3のCDRに機能的に連結されているDTS (SEQ ID NO:29)を含む第2のCDRに機能的に連結されているSSVS (SEQ ID NO:81)もしくはSSSVS (SEQ ID NO:28)を含む第1のCDRを含む可変領域；あるいは(iii) ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37)を含む第3のCDRに機能的に連結されているISTS GFT (SEQ ID NO:36)を含む第2のCDRに機能的に連結されているGGSISSYY (SEQ ID NO:35)を含む第1のCDRを含む可変領域；および／または(iv) QQYGSST (SEQ ID NO:44)を含む第3のCDRに機能的に連結されているGAS (SEQ ID NO:43)を含む

第2のCDRに機能的に連結されているQSVSSSY (SEQ ID NO:42) を含む第1のCDRを含む可変領域を有する。一態様では、細胞は、  
QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKD  
TSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARIYGGDSWGYFDNWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1) もしくは  
QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAH IFSNDEK

SYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARIYGGDSWGYFDNWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:82)

を含む可変領域を含むIg重鎖；または  
QIVLTQSPAIMSASLGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSL  
TISSMEAGDAATYYCQQWSSNPPTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:2) もしくは  
DIQLTQSPSFLSASVGDRVITICRASSSVSYMHWYQQKPGTS PKRLIYDTS  
KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:83)

10

を含む可変領域を含むIg軽鎖(ii)を含むか、または発現する。一態様では、細胞は、  
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRISTSGFTNYPNPSLKSRTMSVD  
SSKNQFSLKLSSSLTAADTAVYYCARDGWGRVFDIWLGLGTMVTVSS (SEQ ID NO:3)

20

を含む可変領域を含む、(iii)を含むIg重鎖；または  
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT  
LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:4)

を含む可変領域を含む、(iv)を含むIg軽鎖を有するか、または発現していた。一態様では、細胞は、  
DIQLTQSPSFLSASVGDRVITICRASSSVSYMHWYQQKPGTSPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEYTLT  
ISSLPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKL (SEQ ID NO:69);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASSSVSYMHWYQQKPGTSPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTL  
TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKL (SEQ ID NO:84); または

30

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRLIYDTSKLATGIPARFSGSGSGTDYTLTI  
SSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGQGTKL (SEQ ID NO:87)

を含む可変領域を含む、(ii)を含むIg軽鎖を有するか、または発現する。一態様では、細胞は哺乳動物細胞である。一態様では、細胞は霊長類細胞である。一態様では、細胞はヒト細胞である。

【0023】

ヒトART1の活性を阻害する抗ヒトART1モノクローナル抗体をコードする核酸配列を含むハイブリドーマも提供され、該抗体は、

40

(i)  
ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68) もしくは IYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:23)

を含む第3の相補性決定領域 (CDR) に機能的に連結されている  
IFSNDEK (SEQ ID NO:67) もしくは HIFSNDEKSYSTSLKS (SEQ ID NO:22)

を含む第2のCDRに機能的に連結されているGFSLSNARM (SEQ ID NO:66) もしくは  
NARMGVSV (SEQ ID NO:21) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／または(ii)  
QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30) を含む第3のCDRに機能的に連結されているDTS (S

50

EQ ID NO:29)を含む第2のCDRに機能的に連結されているSSVSY (SEQ ID NO:81)もしくはSSSVSY (SEQ ID NO:28)を含む第1のCDRを含む可変領域;あるいは(iii)ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37)を含む第3のCDRに機能的に連結されているISTSGFT (SEQ ID NO:36)を含む第2のCDRに機能的に連結されているGGSISSYY (SEQ ID NO:35)を含む第1のCDRを含む可変領域;および(iv)QQYGSST (SEQ ID NO:44)を含む第3のCDRに機能的に連結されているGAS (SEQ ID NO:43)を含む第2のCDRに機能的に連結されているQSVSSSY (SEQ ID NO:42)を含む第1のCDRを含む可変領域を有する。

#### 【0024】

一態様では、ヒトおよび／またはマウスART1に結合するIg重鎖または軽鎖の少なくとも可変領域をコードするヌクレオチド配列に機能的に連結されているプロモーター、例えば、異種プロモーターを含む単離された核酸が提供され、該鎖は、(i)ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68)もしくはIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:23)

10

を含む第3の相補性決定領域 (CDR) に機能的に連結されている  
IFSNDEK (SEQ ID NO:67)もしくは HIFSNDEKSYSTSLKS (SEQ ID NO:22)

を含む第2のCDRに機能的に連結されているGFSLSNARM (SEQ ID NO:66)もしくはNARMGVS (SEQ ID NO:21)を含む第1のCDRを含む可変領域;および／または(ii)QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30)を含む第3のCDRに機能的に連結されているDTS (SEQ ID NO:29)を含む第2のCDRに機能的に連結されているSSVSY (SEQ ID NO:81)もしくはSSSVSY (SEQ ID NO:28)を含む第1のCDRを含む可変領域;あるいは(iii)ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37)を含む第3のCDRに機能的に連結されているISTSGFT (SEQ ID NO:36)を含む第2のCDRに機能的に連結されているGGSISSYY (SEQ ID NO:35)を含む第1のCDRを含む可変領域;および／または(iv)QQYGSST (SEQ ID NO:44)を含む第3のCDRに機能的に連結されているGAS (SEQ ID NO:43)を含む第2のCDRに機能的に連結されているQSVSSSY (SEQ ID NO:42)を含む第1のCDRを含む可変領域を含む。

20

#### 【0025】

ヒトおよびマウスART1に結合する単離抗体またはその抗原断片が提供され、抗体またはその抗原結合断片が(i)ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68)もしくはIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:23)

30

を含む第3の相補性決定領域 (CDR) に機能的に連結されている  
IFSNDEK (SEQ ID NO:67)もしくは HIFSNDEKSYSTSLKS (SEQ ID NO:22)

を含む第2のCDRに機能的に連結されているGFSLSNARM (SEQ ID NO:66)もしくはNARMGVS (SEQ ID NO:21)を含む第1のCDRを含む可変領域;および／または(ii)QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30)を含む第3のCDRに機能的に連結されているDTS (SEQ ID NO:29)を含む第2のCDRに機能的に連結されているSSVSY (SEQ ID NO:81)もしくはSSSVSY (SEQ ID NO:28)を含む第1のCDRを含む可変領域;(iii)ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37)を含む第3のCDRに機能的に連結されているISTSGFT (SEQ ID NO:36)を含む第2のCDRに機能的に連結されているGGSISSYY (SEQ ID NO:35)を含む第1のCDRを含む可変領域;および／または(iv)QQYGSST (SEQ ID NO:44)を含む第3のCDRに機能的に連結されているGAS (SEQ ID NO:43)を含む第2のCDRに機能的に連結されているQSVSSSY (SEQ ID NO:42)を含む第1のCDRを含む可変領域を有する。一態様では、抗体またはその断片中の(i)の可変領域は、

40

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSL (SEQ ID NO:24), WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO:25),  
RLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCAR (SEQ ID NO:26), WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:27),  
QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVS (SEQ ID NO:71), VSWIRQP PGKALEWLAH (SEQ ID NO:72),  
SYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYC (SEQ ID NO:73), または WGQGTTLVTVSS (SEQ ID  
NO:74)

の1つまたは複数を含む1つまたは複数のフレームワーク領域をさらに含む。一態様では、  
抗体またはその断片の(ii)の可変領域は、

QIVLTQSPAIMSASLGEKVTMTCSA (SEQ ID NO:31), MHWYQQKSGTSPKRWIY (SEQ ID NO:32),  
KLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAGDAATYYC (SEQ ID NO:33), FGAGTKLELK (SEQ ID NO:34),  
DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRAS (SEQ ID NO:76), YMHWYQQKPGTS PKRLIY (SEQ ID NO:77),  
KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATY YC (SEQ ID NO:78), FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:79)

10

の1つまたは複数を含む1つまたは複数のフレームワーク領域をさらに含む。一態様では、  
(ii)の可変領域は、

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRA (SEQ ID NO:51), MHWYQQKPGTSPKRLIY (SEQ ID NO:52),  
KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:53), または  
FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:54)

20

の1つまたは複数を含む1つまたは複数のフレームワーク領域をさらに含む。一態様では、  
(ii)の可変領域は、

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSA (SEQ ID NO:55), MHWYQQKPGTSPKRLIY (SEQ ID NO:56),  
KLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:57), または  
FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:58)

30

の1つまたは複数を含む1つまたは複数のフレームワーク領域をさらに含む。一態様では、  
(ii)の可変領域は、

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA (SEQ ID NO:59),  
MHWYQQKPGTSPRRLIY (SEQ ID NO:60),  
KLATGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:61), または  
TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:62)

40

の1つまたは複数を含む1つまたは複数のフレームワーク領域をさらに含む。一態様では、  
(iii)の可変領域は、

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO:38), WSWIRQPAGKGLEWIGR (SEQ ID NO:39),  
NYNPSLKSRTMSVDSSKNQFSLKLSLTAADTAVYYC (SEQ ID NO:40), または WGLGTMVTVSS (SEQ ID  
NO:41)

の1つまたは複数を含む1つまたは複数のフレームワーク領域をさらに含む。一態様では、  
(iv)の可変領域は、

50

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS (SEQ ID NO:45), LAWYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:46),  
SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:47) または FGPGTKVDIK (SEQ ID NO:63)  
の1つまたは複数を含む1つまたは複数のフレームワーク領域をさらに含む。

【0026】

有効量の抗ヒトART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1に結合するポリペプチドを含む組成物を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物において癌を阻害または処置するための方法も提供される。一態様では、癌は、肺癌、結腸癌、黒色腫、膠芽腫、乳癌、または結腸直腸癌である。一態様では、哺乳動物はヒトである。一態様では、量は、腫瘍負荷を減少させること、転移を阻害すること、生存を延ばすこと、またはこれらの任意の組み合わせに有効である。一態様では、組成物は静脈内または皮下に投与される。一態様では、方法は、化学療法薬を投与する工程をさらに含む。一態様では、方法は、免疫チェックポイント阻害剤を投与する工程をさらに含む。一態様では、抗体、その抗原結合断片、またはポリペプチドは、

10

(i)

ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68) もしくは IYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:23)

を含む第3の相補性決定領域 (CDR) に機能的に連結されている  
IFSNDEK (SEQ ID NO:67) もしくは HIFSNDEKSYSTSLKS (SEQ ID NO:22)

20

を含む第2のCDRに機能的に連結されている GFSLSNARM (SEQ ID NO:66) もしくは NARMGVS (SEQ ID NO:21) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／または  
(ii) QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30) を含む第3のCDRに機能的に連結されている DTS (SEQ ID NO:29) を含む第2のCDRに機能的に連結されている SSVSY (SEQ ID NO:81) もしくは SSSVS (SEQ ID NO:28) を含む第1のCDRを含む可変領域；あるいは  
(iii) ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37) を含む第3のCDRに機能的に連結されている ISTSGFT (SEQ ID NO:36) を含む第2のCDRに機能的に連結されている GGSISYY (SEQ ID NO:35) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／または (iv) QQYGSST (SEQ ID NO:44) を含む第3のCDRに機能的に連結されている GAS (SEQ ID NO:43) を含む第2のCDRに機能的に連結されている QSVSSSY (SEQ ID NO:42) を含む第1のCDRを含む可変領域を有する。一態様では、重鎖はIgG重鎖である。一態様では、軽鎖はIgκ軽鎖である。一態様では、抗体断片が投与される。一態様では、断片はFab' または scFv である。

30

【0027】

有効量の抗ヒトART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1に結合するポリペプチドを含む組成物を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物においてART1媒介性免疫抑制を予防する、阻害する、または処置する方法がさらに提供される。一態様では、哺乳動物は癌を有する。一態様では、哺乳動物はヒトである。一態様では、組成物は静脈内に投与される。一態様では、組成物は皮下に投与される。一態様では、方法は、化学療法薬を投与する工程をさらに含む。一態様では、方法は、免疫チェックポイント阻害剤を投与する工程をさらに含む。一態様では、抗体、その抗原結合断片、またはポリペプチドは、

40

(i)

ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68) もしくは IYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:23)

を含む第3の相補性決定領域 (CDR) に機能的に連結されている  
IFSNDEK (SEQ ID NO:67) もしくは HIFSNDEKSYSTSLKS (SEQ ID NO:22)

を含む第2のCDRに機能的に連結されている GFSLSNARM (SEQ ID NO:66) もしくは NARMGVS (SEQ ID NO:21) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／または

50

(ii) QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30) を含む第3のCDRに機能的に連結されているDTS (SEQ ID NO:29) を含む第2のCDRに機能的に連結されているSSVSY (SEQ ID NO:81) もしくはSSSVSY (SEQ ID NO:28) を含む第1のCDRを含む可変領域；あるいは (iii) ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37) を含む第3のCDRに機能的に連結されているISTSGFT (SEQ ID NO:36) を含む第2のCDRに機能的に連結されているGGSISSYY (SEQ ID NO:35) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／または(iv) QQYGSST (SEQ ID NO:44) を含む第3のCDRに機能的に連結されているGAS (SEQ ID NO:43) を含む第2のCDRに機能的に連結されているQSVSSSY (SEQ ID NO:42) を含む第1のCDRを含む可変領域を有する。一態様では、重鎖はIgG重鎖である。一態様では、軽鎖はIgκ軽鎖である。

10

【0028】

有効量の抗ヒトART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1に結合するポリペプチドを含む組成物を哺乳動物に投与する工程を含む、癌を有する哺乳動物において免疫応答を増強するための方法が提供される。一態様では、哺乳動物はヒトである。一態様では、重鎖はIgG重鎖である。一態様では、軽鎖はIgκ軽鎖である。一態様では、抗体、その抗原結合断片、またはポリペプチドは、

(i)

ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68) もしくはIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:23)

を含む第3の相補性決定領域 (CDR) に機能的に連結されている  
IFSNDEK (SEQ ID NO:67) もしくはHIFSNDEKSYSTSLKS (SEQ ID NO:22)

20

を含む第2のCDRに機能的に連結されているGFSLSNARM (SEQ ID NO:66) もしくはNARMGVS (SEQ ID NO:21) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／または (ii) QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30) を含む第3のCDRに機能的に連結されているDTS (SEQ ID NO:29) を含む第2のCDRに機能的に連結されているSSVSY (SEQ ID NO:81) もしくはSSSVSY (SEQ ID NO:28) を含む第1のCDRを含む可変領域；あるいは (iii) ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37) を含む第3のCDRに機能的に連結されているISTSGFT (SEQ ID NO:36) を含む第2のCDRに機能的に連結されているGGSISSYY (SEQ ID NO:35) を含む第1のCDRを含む可変領域；および／または(iv) QQYGSST (SEQ ID NO:44) を含む第3のCDRに機能的に連結されているGAS (SEQ ID NO:43) を含む第2のCDRに機能的に連結されているQSVSSSY (SEQ ID NO:42) を含む第1のCDRを含む可変領域を有する。

30

【0029】

一態様では、ヒトART1に結合する場合に、ヒトART1、例えば、SEQ ID NO:90の以下の残基:S75、S77、T79、R80、R89、H92、またはY99の少なくとも1つに結合する単離抗体またはその断片が提供される。一態様では、単離抗体またはその断片は、ヒトART1、例えば、SEQ ID NO:90のS75、S77、T79、R80、R89、H92、またはY99の2つ、3つ、4つ、5つ、または6つに結合する。一態様では、単離抗体またはその断片は、ヒトART1、例えば、SEQ ID NO:90のS75、S77、T79、R80、R89、H92、およびY99に結合する。

40

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】 様々なMAbを用いた、huART1の生化学的な酵素アッセイ。

【図2】 様々なMAbを用いた、huART1の細胞ベースの酵素アッセイ。

【図3】 様々なMAbを用いた、huART1/moART1の生化学的な酵素アッセイ。

【図4】 12F09および14G01のhuART1結合の特性評価。

【図5】 12F09および14G01のmoART1結合の特性評価。

【図6】 精製された14G01および22C12の特性評価。

【図7】 KP-1-/ +Dox結合22C12。

50

【図 8】 KP-1-/+Dox結合14G01。

【図 9】 KP-1 OE-/+Dox結合22C12。

【図 10】 KP-1 OE-/+Dox結合14G01。

【図 11】 機能的ART1抗体の特定。(A)NAD<sup>+</sup>を測定する蛍光性読み出しを使用して、精製されたヒトART1の阻害について抗ヒトART1陽性ウェルを試験した。(B)細胞表面ADPリボシル化アッセイによって、HEK293細胞で一過的に発現させたヒトART1の阻害について抗ヒトART1ウェルを試験した。(C)クローン22C12および14G01を精製されたマウスART1の阻害について試験した。抗ART1ハイブリドーマ上清は、HEK293細胞において一過的に発現させたヒトART1の阻害についても試験した。ART2について以前に記載されている (Krebs et. al.) この方法は、次いでフローサイトメトリーを使用して抗エテノ抗体で検出されるNAD<sup>+</sup>類似体 (エテノ-NAD<sup>+</sup>) を介して、細胞表面ADPリボシル化を確認する。2つのハイブリドーマ上清 (融合ウェル22C12および14G01) は、生化学的アッセイおよび細胞ベースのアッセイでヒトART1の阻害について陽性であった。次いで、22C12および14G01由来の上清を、ELISAによるmoART1への結合および精製されたマウスART1の阻害について試験した。

10

【図 12】 表面プラスモン共鳴法による、ヒトおよびマウスART1に対する22C12および14G01の親和性測定。ハイブリドーマクローン22C12および14G01から精製された抗体を抗マウスFc表面で捕獲し、指定の濃度の分析物を表面上にインジェクトした。(A)ヒトART1への22C12の結合。(B)マウスART1への22C12の結合。(C)ヒトART1への14G01の結合。(D)マウスART1への14G01の結合。対照表面およびブランクインジェクションを使用してセンサーグラムを二重参照減算した。1:1結合モデルを使用するキネティックフィットによって、親和定数を決定した。

20

【図 13】 22C12および14G01による細胞表面ADPリボシル化の用量依存的阻害。ヒトART1を一過的にトランスフェクトしたHEK293細胞を指定の濃度の22C12または14G01とともにインキュベートし、続いて、エテノ-NAD<sup>+</sup>で処理し、抗エテノ抗体で染色し、フローサイトメトリーを行った。阻害%は、ヒトART1をトランスフェクトし、エテノ-NAD<sup>+</sup>処置を行わずに抗エテノ抗体で染色したHEK293細胞に対して正規化した。

【図 14】 ART1はヒト肺癌のサブセットで過剰発現している。(A~B)ヒト肺癌細胞株A549およびH1650ならびに良性の気管支上皮細胞株BEAS2BのART1免疫蛍光染色。(A)非透過処理細胞におけるART1の表面発現 (左カラム) および透過処理細胞におけるART1の全細胞発現 (右カラム) の代表的な写真。(B)A549、H1650、およびBEAS2B細胞における、ART1の表面染色の平均蛍光強度 (MFI)。各ドットは、1細胞のART1 MFIを表す。(C)BEAS2B、A549、およびH1650細胞 (n=1) におけるART1の表面MFIとART1の全MFIの比 (図19Aのグラフ)。(D)ステージI~IIIの肺腺癌の患者 (n=40) からのマッチする肺腫瘍組織および正常な肺組織のART1のqPCR分析を示すバイオリンプロット、ウィルコクソンの対応した符号付き順位検定 (中央値を赤色の点線で示し、四分位値を赤色の実線で示す)。(E~F)493個のステージI腺癌を含むヒト組織マイクロアレイ (TMA) におけるART1発現のIHC分析。ART1発現の局在を、(1)膜性 (細胞質内染色ありもしくはなし) または(2)腫瘍細胞の細胞質のみとしてスコア化した。腫瘍を、免疫細胞の浸潤についてスコア化した (表4に列挙する)。(E)代表的なIHC画像およびART1の膜性発現または細胞質のみのART1発現について陽性に染色された腫瘍のパーセンテージを示すパイチャート。(F)膜性ART1染色または細胞質内ART1染色のみを有する腫瘍において低または中/高のCD8を有する腫瘍のパーセンテージ。カイ二乗検定。遺伝子発現データは、統計的検定より前に平方根変換した。\*p < 0.05。(G)TCGA Pan Cancer Atlasコホート (n=503) の肺腺癌患者における、ART1遺伝子発現、ならびにCD8 T細胞の細胞傷害性に関連がある遺伝子; IFNガンマ (IFNG)、グランザイムA (GZMA)、グランザイムB (GZMB)、パーフォリン1 (PRF1) 41BB (TNFRSF9) ならびに免疫調節遺伝子; CTLA-4 (CTLA4)、PD-1 (PDCD1)、Tim-3 (HAVCR2)、Lag-3 (LAG3)、およびTigit (TIGIT) のmRNA発現分析。すべての試料に対する、mRNA発現のzスコアを示すクラスター化されたOncoPrintヒートマップ。

30

40

50

【図15】マウス肺腫瘍モデルにおいて、ART1発現は腫瘍増殖を促進する。(A)野生型および免疫不全ヌードマウスにおける、KP1-ART1<sup>OE</sup>腫瘍の増殖を評価する異所性皮下(s.c.)側腹部腫瘍モデル。(B~D)CD8 T細胞の肺腫瘍負荷および肺浸潤を評価する同所性肺腫瘍モデル。異所性モデルと同所性モデルの両方で、KP1細胞をART過剰発現レンチウイルスベクターで安定して形質導入し(KP1-ART1<sup>OE</sup>)、続いて、ART1を標的にするshRNA(shART1)で形質導入した。指示される場合、マウスをドキシサイクリン水で適宜処置して、shART1を誘導した。(A)免疫適格性の野生型C57BL/6マウス(左パネル、n=5マウス/群)および免疫不全の胸腺欠損ヌードマウス(右パネル、n=5マウス/群)における、皮下KP1-ART1<sup>OE</sup>側腹部腫瘍の増殖曲線。群間の腫瘍増殖の統計的有意差は、反復測定ANOVAによって決定した。(B)同所性肺腫瘍モデルに関する実験の模式図。(C)KP1-ART1<sup>OE</sup>の注射後14日目に殺したマウスからのH&Eで染色した肺切片の代表的な画像(左パネル)および肺小結節の計数(右パネル)(n=4~5マウス/群)ウェルチのt検定。H&E染色中の肺小結節を黒色の矢印で示す。腫瘍小結節カウントは、Image Jソフトウェアを使用して決定した。(D)腫瘍注射後16および25日目の、全肺浸潤白血球(CD45+細胞)中のCD8 T細胞のパーセンテージ。ウェルチのt検定。箱ひげ図は、中央値および10~90パーセンタイルを示す。パーセンテージおよびカウントデータは、統計的検定より前に平方根変換した\*\*p<0.01。

【図16】ART1遮断は、肺腫瘍負荷を低減し、P2X7R+CD8 T細胞の浸潤を促進する。(A~H)KP1-ART1<sup>OE</sup>腫瘍を尾静脈注射によって同所接種したマウスにおいて肺腫瘍負荷および肺免疫細胞分析を研究するインビボ実験。6日目に開始して18日目まで3日ごとに、ART1遮断抗体(22C12 Ab)またはアイソタイプマッチ対照抗体(アイソ対照(iso ctrl) Ab)による腹腔内(i.p.)処置をマウスに与えた(n=7~8マウス/群)。実験を一度繰り返し、同様の結果になった。(A)実験の模式図。(B)マウスの肺の切片の代表的なH&E染色画像。腫瘍接種後19日目の(C)平均肺腫瘍小結節カウントおよび(D)平均肺小結節面積。ウェルチのt検定。(E~H)22C12 Abまたはアイソ対照Abによる処置後19日目のマウスの消化した肺のフローサイトメトリーによる免疫表現型検査。(E)P2X7Rおよび/または増殖マーカーKi67を発現するCD8 T細胞のパーセンテージを示す代表的なドットプロットおよびボックスプロット。(F)P2X7Rおよび/または免疫調節受容体PD-1を発現するCD8 T細胞のパーセンテージを示す代表的なドットプロットおよびボックスプロット。(G~H)腫瘍細胞の注射後25日目のKP1-ART1<sup>OE</sup>肺腫瘍モデルにおける肺の重量に対して正規化された、CD8 T細胞サブセットの絶対カウント(n=6~7)。(G)腫瘍担持肺組織1グラムあたりのP2X7R+CD8 T細胞、PD-1+CD8 T細胞、およびKi67高CD8 T細胞のカウント。(H)腫瘍担持肺組織1グラムあたりのP2X7R+CD8 TCM、P2X7R+CD8 TEM、およびP2X7R+CD8 TRMのカウント。箱ひげ図は、中央値および10~90パーセンタイルを示す。ウェルチのt検定。パーセンテージおよびカウントデータは、統計的検定より前に平方根変換した。(I~L)ART1遮断の抗腫瘍効果に対するCD8 T細胞およびCD4 T細胞の枯渇の効果を研究するインビボ実験。0日目に、KP1-ART1<sup>OE</sup>腫瘍を尾静脈注射によってマウスに同所接種した。指示される場合、-1日目に500ug、続いて、3~18日目に3日ごと250ugのART1遮断抗体(22C12 Ab)またはアイソタイプマッチ対照抗体(アイソ対照Ab)(25mg/kg)、CD8枯渇化抗体(クローン:53-6.7)またはCD4枯渇化抗体(クローン:GK1.5)による腹腔内処置をマウスに与えた(n=7~8マウス/群)。(I)実験の模式図、腫瘍接種後19日目の(J)マウスの肺の切片の代表的なH&E染色画像、(K)平均肺腫瘍小結節カウント、および(L)平均肺小結節面積。腫瘍小結節のカウントおよび面積は、Image Jソフトウェアを使用して決定した。a.u.=任意単位。箱ひげ図は、中央値および10~90パーセンタイルを示す。一元配置ANOVA。パーセンテージおよびカウントデータは、統計的検定より前に平方根変換した\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001。

【図17】ART1媒介性ADPリボシル化および肺腫瘍浸潤T細胞サブセットのNICD。(A~C)ADPリボシル化およびNICDアッセイ。C57BL/6マウスの野生型KP1腫瘍担持肺から単離したT細胞を、エタノール-NAD(eNAD)単独(-rART1)とともに、またはeNADお

よび組換えマウスART1 (rART1)、CD38遮断抗体 (NIMR-5) (CD38遮断) もしくはART1遮断抗体 (ART1遮断 (22C12)) とともに2時間インキュベートした。ART1遮断だけを測定するために、ART2遮断ナノボディ (s+16a) を使用して、すべての培養条件でART2活性を遮断した。共培養後、eNAD染色によってADPリボシル化について、およびDAPI染色によって細胞死について、T細胞をフローサイトメトリーによって分析した (n=7)。(A)CD8 T細胞、CD4 Tconv (CD4+CD25-)、およびCD4 Treg (CD4+CD25+) の特定を示すゲーティングの例。(B)全eNAD染色によるADPリボシル化および(C)eNADとDAPIの共染色に基づくNICDについて、各T細胞サブセットのP2X7R+画分およびP2X7R-画分を別々に分析した。反復測定一元配置ANOVAを使用して、処置間の統計的有意差を決定した。各接続された線は、1匹のマウスの対応のある分析を表す。パーセンテージデータは、統計的検定より前に平方根変換した \*p < 0.05、\*\*p < 0.01、\*\*\*p < 0.001、\*\*\*\*p < 0.0001。

10

【図18】ヒト肺腫瘍におけるART1の過剰発現は、P2X7R+CD8 T細胞の低浸潤と関係がある。(A~E)肺腺癌患者 (n=12) からの肺腫瘍組織およびマッチする正常な肺組織の免疫蛍光染色の分析。(A)肺腫瘍およびマッチする正常組織におけるART1免疫蛍光染色の代表的な画像。(B)肺腫瘍およびマッチする正常組織のDAPI MFIに対して正規化されたART1染色の平均蛍光強度 (MFI) を示す棒グラフ。対応のあるt検定。(C)肺腫瘍およびマッチする正常組織におけるCD8 (赤色)、P2X7R (緑色)、およびDAPIによる核染色 (青色) の免疫蛍光染色の代表的な画像。マージした画像中の黄色は、CD8染色とP2X7R染色の共局在 (白矢印で強調した) を示す。(D)肺腫瘍およびマッチする正常組織のCD8 T細胞中のP2X7R+CD8 T細胞のパーセンテージを示す棒グラフ。対応のあるt検定。(E)マッチする組織由来の肺腫瘍におけるP2X7R+CD8 T細胞のパーセント変化とマッチする正常組織由来の肺腫瘍におけるART1 MFIのパーセント変化とを相関させる線形回帰分析。R<sup>2</sup>はピアソン相関係数を表す。(F~H)肺腺癌患者 (n=5) からの肺腫瘍組織および隣接するマッチする正常な肺組織に浸潤するCD8 T細胞のフローサイトメトリー分析。(F)正常な肺組織および肺腫瘍組織に浸潤するCD8 T細胞におけるP2X7RおよびCD38発現の代表的なドットプロット。(G)P2X7Rを発現するCD8 T細胞のパーセンテージ。対応のあるt検定。(H)CD38の高い表面発現を有するP2X7R+CD8 T細胞のパーセンテージ。棒グラフは平均値を示す。対応のあるt検定。パーセンテージおよびMFIデータは、統計的検定より前に対数変換した \*p < 0.05、\*\*\*p < 0.001、\*\*\*\*p < 0.0001。

20

30

【図19】ヒト肺癌細胞株および腫瘍試料におけるART1およびGPLD1の発現、肺腺癌患者 (TCGA) における細胞傷害性および免疫調節遺伝子の発現。(A)透過処理したヒト肺癌細胞A549、H1650、および良性の気管支上皮細胞株BEAS2Bにおける全ART1発現の免疫蛍光表面染色。各ドットは、1細胞のART1 MFIを表す。(B)ステージI~IIIの肺腺癌の患者 (n=40) からのマッチする肺腫瘍組織および正常な肺組織のGPLD1 qPCR分析を示すバイオリンプロット、ウィルコクソンの対応した符号付き順位検定 (中央値を赤色の点線で示し、四分位値を赤色の実線で示す)。(C)493個のステージI腺癌を含むヒト組織マイクロアレイ (TMA) におけるART1発現のIHC分析。弱い、中程度、または強いART1染色を有していた腫瘍のパーセンテージを示す代表的なIHC画像およびパイチャート。(D)TCGA PanCancer Atlasコホート (n=503) の肺腺癌患者における、ART1遺伝子発現、ならびにCD8 T細胞の細胞傷害性と関係がある遺伝子; IFN $\gamma$  (IFNG)、グランザイムA (GZMA)、41BB (TNFRSF9) ならびに免疫調節遺伝子; CTLA-4 (CTLA4)、PD-1 (PDCD1)、およびTigit (TIGIT) のmRNA発現分析。ボックスプロットは、高ART1腫瘍発現 (ART1<sup>高</sup>、zスコア > 1、n=115) または低ART1腫瘍発現 (ART1<sup>低</sup>、zスコア < 1 n=395) を有する肺腺癌患者の間で統計的有意差を示した遺伝子の発現を示す。箱ひげ図は、中央値および25~75パーセンタイルを示す。\*p < 0.01。

40

【図20】KP1細胞におけるART1の過剰発現およびノックダウン。(A)1細胞およびshART1のドキシサイクリン誘導ありおよびなしのKP1ART1OE細胞ならびにルイス肺癌

50

(LLC1)細胞における、ART1表面免疫蛍光染色の代表的な画像およびART1平均蛍光強度(MFI)の定量化。散布図は、SEMをともなつて平均を示す。各ドットは、1細胞のART1 MFIを表す。(B)NAD<sup>+</sup>(20 μM)の存在または非存在下でshART1のドキシサイクリン誘導ありおよびなしのKP1-ART1OE細胞のADPリボシル化を測定する、MAR/PAR免疫蛍光染色。(C)shART1のドキシサイクリン誘導ありまたはなしでインビトロでのKP1-ART1OE細胞の増殖を試験する、増殖アッセイ。(D)shART1のドキシサイクリン誘導ありまたはなしのマウスから腫瘍接種後31日目に採取したKP1-ART1OE腫瘍のART1免疫蛍光染色。グラフは、ヘキストMFIに対して正規化されたART1染色の平均蛍光強度(MFI)を示す。箱ひげ図は、中央値および10~90パーセンタイルを示す。ART1 MFI値は平方根変換した。ウェルチのt検定。\*p < 0.05、\*\*\*p < 0.0001。

10

【図21】B16-F10細胞におけるART1のCRISPR/Cas9媒介性ノックアウト。(A~B)B16-F10マウス黒色腫細胞のCRISPR/Cas9クローンにおけるART1ノックアウトの確認。B16-F10スクランブルクローンB16対照(Scr-6)は非特異的CRISPR gRNAで形質導入されており、対照として働く。B16-F10 ART1ノックアウト(ART1KO)クローンB16ART1KO(42-1)およびB16ART1KO(63-1)は、ART1遺伝子のエクソン1の2つの異なる領域を標的にするgRNAで形質導入された。(A)B16 CRISPRクローンB16対照(Scr-6)、B16ART1KO(42-1)、およびB16ART1KO(63-1)に対するART1のフローサイトメトリー細胞表面染色。オレンジ色のヒストグラムは、ART1一次抗体(ウサギIgG)およびCy5コンジュゲート化二次抗ウサギ抗体で染色された細胞を表す。青色のヒストグラムは、二次抗体単独で染色された細胞を表す。(B)B16対照クローンB16対照(Scr-6)ならびにB16 ART1ノックアウトクローンB16ART1KO(42-1)およびB16ART1KO(63-1)のインビトロのART1の免疫蛍光染色。(C)野生型C57BL/6マウス(n=5~6マウス/群)における、B16対照クローンB16対照(Scr-6)ならびにB16 ART1ノックアウトクローンB16ART1KO(42-1)およびB16ART1KO(63-1)の側腹部腫瘍増殖。マウスの右脇腹に1×10<sup>5</sup>細胞のそれぞれのCRISPRクローンを注射した(n=6マウス/群)。腫瘍接種の日から21日目までの反復測定ANOVA、P値は、B16対照(Scr-6)と比較して、腫瘍増殖の統計的有意差を示す。(D)インビトロでのB16 CRISPRクローンB16対照(Scr-6)、B16ART1KO(42-1)、およびB16ART1KO(63-1)の増殖を試験する増殖アッセイ。赤色の星印および青色の星印は、それぞれB16対照(Scr-6)とB16ART1KO(63-1)またはB16ART1KO(42-1)の間の、指定された時点での細胞数の統計的有意差を表す。スチューデントのt検定\*p < 0.05、\*p < 0.01、\*\*\*p < 0.001。

20

30

【図22】ART1遮断抗体22C12の生成および機能試験。(A)ART1遮断抗体22C12の生成のためのワークフローの概略図。(B)クローン22C12によるART1活性の阻害を示す、NAD-GloアッセイによるART1結合抗体クローンのスクリーニング。(C)ART1をトランスフェクトしたHEK293細胞に対する、マウス軽鎖(22C12(mLC))およびヒト軽鎖(22C12(HuLC))を有する22C12抗体クローンの最大半量結合(EC50)値を決定するNAD-Gloアッセイ。(D)KP1-ART1OE細胞への22C12抗体(mLC)の結合を示すフローサイトメトリーヒストグラム。(E)ART1をトランスフェクトしたHEK293細胞に対する、22C12抗体クローンのADPリボシル化の最大半量阻害(IC50)を決定するエテノ-NAD(eNAD)ADPリボシル化アッセイ。Hu IgG1をアイソタイプ対照として使用した。2E2抗体を無関係の抗体として使用した。(F)20 μg/mlの22c12 ART1抗体ありまたはなしで処理した、指定の濃度のNAD<sup>+</sup>とともに2時間インキュベートしたKP1-ART1OE細胞における、ADPリボシル化タンパク質のウェスタンブロット分析(MAR/PAR抗体を使用する)。(G~H)毒性研究。腫瘍ナীবマウスを3週間にわたって3日ごとに25 mg/kgの22C12抗体の腹腔内注射で処置し、ベースラインで、および研究の終了まで毎週、体重減少および血中グルコースレベルについてモニターした。22c12抗体で処置したマウスは、アイソタイプ対照抗体で処置したマウスと比較して、外観、活動、歩行、および敏捷性が正常なままであった。(G)0日目のベースライン体重からの倍率変化として示されるマウスの体重。(H)0日目のベースライン測定値からの倍率変化として示

40

50

されるマウスの血漿グルコースレベル。

【図23】KP1-ART10EおよびLLC1腫瘍モデルにおいて、ART1のインビボ阻害は腫瘍負荷を低減し、P2X7R+CD8 T細胞の腫瘍浸潤を促進する。(A)抗ART1 Ab (22C12 Ab) またはIgG2Aアイソタイプ対照Ab (アイソ対照Ab) による腫瘍内 (i.t.) 処置後のKP1-ART10E側腹部腫瘍の腫瘍進行を研究するインビボ実験 (n=7~8マウス/群) のための実験の模式図。腫瘍接種後25日目に腫瘍を採取して、秤量およびフローサイトメトリー分析を行った。実験を一度繰り返し、同様の結果になった。(B)22C12 Abまたはアイソ対照Abのi.t.注射で処置した皮下KP1-ART10E側腹部腫瘍の増殖。反復測定ANOVA混合効果モデル。(C)腫瘍接種後25日目の、22C12抗体またはアイソ対照抗体で処置した切除腫瘍の腫瘍重量。ウェルチのt検定。(D~F)LLC1同所性肺腫瘍モデル。0日目に、 $1.5 \times 10^5$ 個のLLC1細胞を静脈内注射によってマウスに接種した。6日目に開始して21日目まで3日ごとに22C12 Abまたはアイソ対照Ab (25mg/kg、n=9マウス/群) による腹腔内処置を行った。22日目に、マウスを殺し、肺を固定し、H&Eで染色して、肺腫瘍負荷を決定した。腫瘍担持肺におけるP2X7R+CD8 T細胞の浸潤をフローサイトメトリー分析によって評価した。腫瘍接種後22日目の(D)平均肺腫瘍小結節カウントおよび(E)平均肺小結節面積。腫瘍小結節のカウントおよび面積は、Image Jソフトウェアを使用して決定した。a.u.=任意単位。ウェルチのt検定。(F)腫瘍接種後22日目のLLC1担持マウス肺に浸潤する全CD8 T細胞中のP2X7R+CD8 T細胞の頻度に関するフローサイトメトリー分析。(G)腫瘍注射/shART1誘導後18日目のマウスにおいて全CD8 T細胞中のP2X7R+CD8 T細胞の頻度を評価する、KP1-ART10E担持マウス肺のフローサイトメトリー分析 (n=6マウス/群)。ウェルチのt検定。箱ひげ図は、中央値および10~90パーセンタイルを示す。パーセンテージデータは、統計的検定より前に平方根変換した。\*p<0.05、\*\*p<0.01。

【図24】B16-ARTKO側腹部腫瘍モデルにおけるCD8/CD4 T細胞の枯渇研究。(A~B)ART1産生能がある (ART1-proficient) およびART1欠乏性のB16-F10側腹部腫瘍の進行に対するCD8 T細胞およびCD4 T細胞の枯渇の効果を研究するインビボ実験。0日目に、 $1 \times 10^5$ 個のB16対照 (クローンScr-6) またはB16ART1KO (クローン63-1) 腫瘍細胞の側腹部注射によって、野生型C57BL/6マウスに異所的に接種した (n=7~8マウス/群)。CD8枯渇化抗体 (CD8 depl、クローン:53-6.7) またはCD4枯渇化抗体 (CD4 depl、クローン:GK1.5) またはアイソタイプ対照抗体 (アイソ対照) でマウスを処置した。-2日目に500ug、続いて、2日目からエンドポイントまで5日ごとに250ug。(A)対照B16Scr腫瘍 (上部パネル) およびART1ノックアウトB16ART1KO腫瘍 (下部パネル) の側腹部腫瘍の増殖曲線。グラフ中のアステリスクは、エンドポイントで腫瘍がないマウスの数を示す。(B)マウスの生存パーセントを示す Kaplan-Meier プロット。ログランク (マンテル-コックス) 検定。\*p<0.05、\*\*\*p<0.001。

【図25】KP1肺腫瘍担持マウス由来のCD8 T細胞におけるP2X7R発現および免疫調節遺伝子のRNAseq分析、CD8およびCD4 T細胞ならびにB16-F10およびKP1-ART10E腫瘍細胞のART1のqPCR分析。(A~B)ナイーブマウスおよびKP1腫瘍細胞を静脈内に接種したマウスの脾臓および肺から単離したCD8 T細胞のRNAシーケンシング。腫瘍注射後7日目および17日目に、CD8 T細胞の単離のために腫瘍を採取した。(A)ヒートマップは、P2RX7およびCD8 T細胞の細胞傷害性を調節する遺伝子 (GZMA、GZMB、IFNG、PRF1) および免疫調節分子 (CTLA4、HAVCR2、LAG3、PDCD1、TIGIT) の遺伝子発現を示す。(B)散布図はP2RX7の遺伝子発現を示す。クラスカル・ウォリスの検定を使用して、脾臓由来および肺由来CD8 T細胞の指定された時点でのP2RX7発現レベル間の統計的差異を別々に決定した。散布図はSEMをとまって平均を示す。(C)KP1腫瘍注射後21日目のナイーブマウスまたは腫瘍担持マウス肺に浸潤するCD8 T細胞におけるP2X7R発現を示す代表的なフローサイトメトリーヒストグラム。\*p<0.05、\*\*p<0.01。

【図26】組換えART1 (rART1) のADPリボシル化試験、ART1およびART2遮断抗体によるADPリボシル化の阻害、T細胞および腫瘍細胞におけるP2RX7スプライス変異体

の発現、NAD<sup>+</sup>およびART1遮断の存在下での腫瘍細胞の増殖。(A)アルギニンに富んだ基質であるヒストン (Hist) をADPリボシル化するための遊離NAD<sup>+</sup>の利用を測定するNAD-Gloアッセイ。指示される場合、ボイルすることによってART1を不活性化した。各ドットは技術的反復を表す。(B)CD4およびCD8 T細胞のADPリボシル化に対するART1およびART2遮断の遮断効果を測定するエテノ-NAD (eNAD) アッセイ。野生型C57BL/6マウスのKP1腫瘍担持肺から単離したT細胞を、ART1遮断抗体 (22C12) またはART2遮断ナノボディ (s+16a) の存在または非存在下でエタノ-NAD (eNAD) とともに2時間インキュベートし、その後、eNAD染色によって、フローサイトメトリーでADPリボシル化についてこれを分析した (n=4)。箱ひげ図は、中央値および10~90パーセンタイルを示す。多重比較のためにチューキーの検定を用いる一元配置ANOVA。\*p < 0.05、\*\*p < 0.01。(C~D)腫瘍接種後15日目のKP1腫瘍担持肺から単離したCD4 Tconv細胞およびCD8 T細胞ならびに腫瘍細胞KP1、LLC1およびB16における(C)p2rx7-kおよび(D)p2rx7-aアイソフォームの発現レベルを示す、qPCRによる遺伝子発現分析。(E~G)NAD<sup>+</sup> (20uM) および／またはART1遮断抗体 (22c12、20ug/ml) の存在下で(E)KP1ART1OE肺細胞、(F)LLC1細胞、および(G)B16 CRISPRクローンB16対照 (Scr-6)、B16ART1KO (42-1)、B16ART1KO (63-1) のインビトロでの増殖を試験する増殖アッセイ。

10

【図27】(A)野生型KP1肺癌細胞をタブシガルジンに24時間曝露し、qPCRによってART1のmRNA発現について評価した。(B)野生型KP1マウス肺癌細胞およびA549ヒト肺癌細胞を、小動物放射線研究プラットフォーム (Small Animal Radiation Research Platform) (SARRP) を使用して、8Gyまたは20Gyの単回線量またはモック処理 (0Gy) の放射線療法に曝露した。線量率271cGy/分でX線を照射した。照射後48時間目に、免疫蛍光染色によってART1の細胞表面発現を評価した。散布図はSEMをともなつて平均を示す。各ドットは、1細胞のART1 MFIを表す。

20

【図28】CD8 (TIL) MicroBeads、mouse (Miltenyi、カタログ#130-116-478) キットを使用して、磁気ビーズソーティングによって、CD8 T細胞を野生型KP1腫瘍担持肺から単離した。マウス組換えART1 (rART1) (10μg/ml) で予めコーティングされた48ウェルプレートに4℃で24時間細胞を加えた。100μMエテノ-NADおよび5μg/ml抗ART2.2抗体 (s+16a、Biolegend、カタログ#149801) を含む血清フリーRPMI1640培地 (Gibco) 中に1×10<sup>6</sup>個のCD8 T細胞を再懸濁し、これをウェルに加えた。細胞を37℃で2時間インキュベートした。穏やかにピペッティングすることによってCD8 T細胞をプレートから取り出し、これを3.7%ホルムアルデヒドで5分間固定した。微量遠心機で細胞を30秒間スピンドウンした。上清を捨て、1mLの脱イオンH<sub>2</sub>Oに細胞ペレットを再懸濁した。次いで、試料を30秒間スピンドウンし、200μLの脱イオンH<sub>2</sub>Oにペレットを再懸濁した。各ゼラチンコーティングスライド (Gelatin-Coated Microscope Slides #1178T40、Thomas Scientific) に5μLの細胞懸濁液を加えた。スライドあたり3スポットを作製し、ピペットチップの側面で各スポットを塗りつけた。次いで、スライドをホットプレート上に置き、液体を蒸発させた。各スポットを疎水性バリアで区分し、風乾した。細胞をCD8 (マウス (32-M4) #sc-1177)、MAR/PAR (ポリ／モノADPリボース (E6F6A) ウサギmAb #83732)、P2RX7 (精製されたラットP2X7R抗体、#148702、Biolegend) に対する一次抗体を加えることによって免疫染色し、4℃で0/Nインキュベートした。残りの染色手順は、接着細胞を免疫染色するために使用されるアプローチと同一であった。次いで、prolong goldマウント培地 (#P36934、Thermofisher) を使用して、試料をマウントした。スライドを暗所、-20℃で一晩低温硬化させた。蛍光顕微鏡観察は、冷却電荷結合素子カメラ (Princeton Instruments、Trenton、NJ) を備えたDMIRB倒立顕微鏡 (Leica Microsystems、Deerfield、IL) を使用して行った。20×1.25開口数対物レンズで画像を収集した。画像処理および定量化のためにMetaMorphソフトウェア (UniversalImaging、West Chester、PA) を使用した。

30

40

【図29】肺腺癌患者由来からの肺腫瘍およびマッチする正常組織におけるART1免疫蛍

50

光染色の代表的な画像。DAPI核染色でスライドを対比染色した。

【図30】KP1-ART10E腫瘍細胞を尾静脈注射によって同所接種したマウスの肺由来の肺腫瘍浸潤樹状細胞(DC)の特性評価。6日に開始して18日目まで3日ごとに、ART1遮断抗体(22C12)またはアイソタイプマッチ対照抗体(アイソ対照)による腹腔内(i.p.)処置をマウスに与えた。19日目に、マウスを安楽死させ、フローサイトメトリー分析のために肺を秤量し、消化した。取得より前にカウンティングビーズを加えて、腫瘍担持肺組織1グラムあたりの絶対細胞カウントの定量化を可能にした(n=7マウス/群)。(A)全生細胞中のDC(CD11c+MHCII+)の頻度。全DC中の(B)通常のI型DC(cDC1)(CD103+Sirpa-DC)および(C)通常のII型DC(cDC2)(CD103-Sirpa+DC)の頻度。(D)DC、(E)cDC1および(F)cDC2中のP2X7R+細胞の頻度。肺組織の重量に対して正規化された、肺腫瘍浸潤(G)P2X7R+DC、(H)P2X7R+cDC1および(I)P2X7R+cDC2の絶対カウント。ウェルチのt検定。箱ひげ図は、中央値および10~90パーセンタイルを示す。パーセンテージデータは、統計的検定より前に平方根変換した。\*p<0.05、\*\*p<0.01。

10

【図31】B16-F10細胞におけるART1のCRISPR/Cas9媒介性ノックアウトおよびArt1の22C12媒介性遮断は、マウスの腫瘍増殖の阻害を引き起こす。B16-F10マウス黒色腫瘍細胞のCRISPR/Cas9クローンにおけるART1ノックアウトの確認。B16-F10スクランブルクローンB16対照(Scr-6)は非特異的CRISPR gRNAで形質導入されており、対照として働く。B16-F10 ART1ノックアウト(ART1KO)クローンおよびB16<sup>ART1KO</sup>(63-1)は、ART1遺伝子のエクソン1の領域を標的にするgRNAで形質導入された。(A)B16 CRISPRクローンB16対照(Scr-6)およびB16<sup>ART1KO</sup>(63-1)に対するART1のフローサイトメトリー細胞表面染色。オレンジ色のヒストグラムは、ART1一次抗体(ウサギIgG)およびCy5コンジュゲート化二次抗ウサギ抗体で染色された細胞を表す。青色のヒストグラムは、二次抗体単独で染色された細胞を表す。(B)B16対照クローンB16対照(Scr-6)およびB16<sup>ART1KO</sup>(63-1)のインビトロのART1の免疫蛍光染色。(C)20 ug/mlの抗ART1抗体22C12ありまたはなしで処理した、20 μM NAD<sup>+</sup>とともに2時間インキュベートしたB16対照(Scr-6)およびB16<sup>ART1KO</sup>(63-1)細胞における、22C12による処理でMAR/PAR化の低下を示すADPリボシル化タンパク質のウエスタンブロット分析(MAR/PAR抗体を使用する)。(D)22C12の抗腫瘍効果を示す、22C12 Abまたはアイソ対照Abのi.t.注射で処置した皮下B16対照(Scr-6)側腹部腫瘍およびアイソ対照Abで処置したB16<sup>ART1KO</sup>(63-1)側腹部腫瘍の増殖(\*\*\*p<0.001)。

20

30

【図32】LLC1におけるART1の22C12媒介性遮断は、マウスの側腹部腫瘍増殖の阻害を引き起こす。(A)LLC1細胞におけるインビトロのART1の免疫蛍光表面染色。(B)インビトロでのLLC1細胞への22C12 Abの結合を示すフローサイトメトリーヒストグラム。オレンジ色のヒストグラムは、22C12+抗体を有する細胞を表す。青色のヒストグラムは二次抗体を表すが、赤色のヒストグラムはアイソタイプ抗体で標識された細胞を表す。(C)20 μg/mlの抗ART1抗体22C12ありまたはなしで処理した、20 μM NAD<sup>+</sup>とともに2時間インキュベートしたインビトロのLLC1細胞における、ADPリボシル化タンパク質のウエスタンブロット分析(MAR/PAR抗体を使用する)。NAD<sup>+</sup>の添加はMAR/PAR化を増加させ、これは、22C12によって部分的に遮断された。(D)22C12 Abまたはアイソ対照Abのi.t.注射で処置した皮下LLC1側腹部腫瘍の増殖によって、22C12の抗腫瘍効果が示された(\*\*\*\*P≤0.0001)。

40

【図33】ART1およびART1パラログへのTDI-Y-009(22C12 hLC1 IgG4)の結合。結合した抗体は、HRPコンジュゲート化二次抗体試薬によって媒介される比色反応によって検出した。

【図34】ART1過剰発現KP1細胞への22C12 hLC1 IgG4(TDI-Y-009)抗体の結合。結合EC50は4.4 nMであると決定された。

【図35】単回IVボラス投与後のC57BL/6マウスにおけるTDI-Y-009の血漿濃度。捕獲された抗体は、HRPコンジュゲート化二次抗体試薬によって媒介される比色反応によって測定した。

50

【図36】図36A - 36C。TDI-Y-009は、同所性肺腫瘍モデルにおいて腫瘍増殖を抑制する。(A)実験の模式図。(B)肺の平均重量。腫瘍接種後19日目の(C)小結節カウントおよび(D)平均肺小結節面積。腫瘍小結節のカウントおよび面積は、Image Jソフトウェアを使用して決定した。a.u.=任意単位。ウェルチのt検定。

【図37】TDI-Y-009で処置したマウスにおいて、安全性への有害な作用(adverse safety effects)は観察されなかった。(A)0日目のベースライン体重から毎週示す、マウスの体重。(B)0日目のベースライン測定値から処置後3週目までの、マウスの血漿グルコースレベル。

【図38】huART1とTDI-Y-009 (SEQ ID NO: 110) の相互作用。

【図39】放射線および化学療法後のART1発現。放射線療法(8Gy×3、上部の列)およびシスプラチン(下部の列)による処置後に、全ART1発現および表面ART1発現は、RT-PCRによって、および単一細胞免疫蛍光によって測定した場合に、KP1細胞(左パネル)およびA549細胞(右パネル)で増加した。

【図40】放射線後のMAR化(MARylation)の発現。KP1細胞において、細胞表面ART1の増加に加えて、放射線療法(8Gy×3)は、MAR特異的抗体を使用して単一細胞免疫蛍光によって測定した場合に、細胞表面モノADPリボシル化(MAR化)を増加させた。MAR化の増加は、細胞培養への22C12の添加によって遮断された。

【発明を実施するための形態】

【0031】

詳細な説明

免疫チェックポイント阻害剤(ICI)は、単独で、または化学療法と組み合わせて、標準化可能な分子変化がない進行性非小細胞肺癌(NSCLC)の患者において、標準的ケアになってきている(Mok et al., 2019)。しかし、腫瘍のPD-L1発現が高い患者の多くを含めて、肺癌患者の大多数は、ICIに応答しないか、またはICIからの長期の利益を経験しないかのいずれかである(Gandhi et al., 2018; Gandini et al., 2016)。したがって、ICIへの応答を予測する他の確固たるバイオマーカーを特定すること、および免疫療法に対する肺癌の一次および獲得耐性の機構を理解することが緊急に必要である。

【0032】

細胞表面モノADPリボシルトランスフェラーゼ(ARTまたはADP)は、ADP-リボース部分をNAD<sup>+</sup>からアミノ酸残基に移して、標的タンパク質を翻訳後修飾する。ヒトでは、ADP-リボシルトランスフェラーゼ-1(ART1)は、肺を含めた健康な組織で、低レベルで発現している。ART1は、細胞外触媒ドメインを有するGPIアンカー酵素である。したがって、ART1は、局所微小環境において細胞外タンパク質をモノADPリボシル化し、それらの機能を変化させることができる(Stevens et al., 2009; Okazaki et al., 1994; Balducci et al., 1999)。肺癌におけるART1の発現は研究されていないが、以前の研究によって、結腸直腸癌および膠芽腫においてART1タンパク質発現の増加が示唆されており、高発現は予後不良と関係があった(Tang et al., 2013)。結腸直腸癌のマウスモデルでは、ART1発現は、上皮間葉転換の増加および血管新生の増加をとまなう、より侵襲性の表現型を促進することが示された(Yang et al., 2016; Song et al., 2016)。しかし、腫瘍のART1発現が、免疫微小環境との腫瘍のクロストークを調節することができるかどうかは決定されていない。

【0033】

ADPリボシルトランスフェラーゼの標的の中にはP2X7受容体(P2X7R、遺伝子id:P2rx7)がある。P2X7Rは、2型プリン受容体ファミリーのATP作動性陽イオンチャネルであり、細胞外ATPに親和性が低く、炎症促進経路を活性化する(Burnstock & Knight, 2004)。これは、T細胞を含めた複数の免疫細胞サブセットで発現しており、その発現は、炎症反応および抗腫瘍免疫に必須である(Adinolfi et al., 2015; Haag et al., 2007)。NSCLCでは、P2X7Rの高発現は、全生存および無増悪生存の改善と関係があった(Boldrini et al., 2015)。組織損傷、腫瘍発生、または炎症などの病的状

10

20

30

40

50

態では、サイトゾルの $\text{NAD}^+$ が局所細胞外環境中に放出され、ここで、細胞外ADPリボシルトランスフェラーゼが基質としてこれを使用して、P2X7RへのADP-リボースの移行を触媒することができる (Haag et al., 2007)。この共有結合的修飾は、P2X7Rの恒常的活性化をもたらし、大きな孔の形成、制御されないカルシウム流入、ホスファチジルセリンの外在化、最終的に、NAD誘導性細胞死 (NICD) として説明されるプロセスにつながる (Scheuplein et al., 2009)。典型的には、細胞外 $\text{NAD}^+$ の濃度は一般に低く、活性化された免疫細胞ならびに癌細胞で発現しているADPリボシルシクラーゼCD38によって嚴重に調節される (Sandoval-Montes & Santos-Argumedo, 2005; Chen et al., 2018)。しかし、CD38の存在下でさえ、細胞外 $\text{NAD}^+$ の濃度は、ストレスを受けたかまたは死にかけている細胞からの急速な放出に続いて高まる可能性がある (Haag et al., 2007)。前臨床研究では、T細胞のART媒介性NICDは、炎症組織中のナイーブおよびバイスタンダーT細胞を除去するための恒常性維持機構として提唱されている (Adriouch et al., 2007)。ごく最近、NICDは、肺腫瘍における存在が予後良好と関係があった組織常在性メモリーT細胞 (TRM) の恒常性維持を調節することが示された (Stark et al., 2018; Nizard et al., 2017)。

10

20

30

40

50

#### 【0034】

免疫介在性拒絶反応からの逃避により、非小細胞肺癌 (NSCLC) の腫瘍進行が可能になり、患者の一部では、抗腫瘍免疫機能を回復させる治療的免疫チェックポイント阻害 (ICI) によって、免疫介在性拒絶反応に対向することができる。しかし、NSCLC患者の大多数はICIに応答せず、腫瘍免疫逃避のさらなる機構の存在が示唆される。細胞外 $\text{NAD}^+$ の濃度が高い炎症組織では、モノADPリボシルトランスフェラーゼ (ART) によって媒介されるP2X7受容体 (P2X7R) 発現T細胞のNAD誘導性細胞死 (NICD) は、免疫の恒常性維持を調節する。

#### 【0035】

損傷を受けたかまたは炎症を起こした肺の上皮細胞は、炎症細胞による細胞クリアランスから保護するための細胞生存の機構として、ART1を過剰発現する可能性がある。進化的に保存されたパラレルな保護的役割が、肺癌細胞におけるART1発現によって提供されると仮定された。ART1と免疫チェックポイント経路の間に類似性を導き出すことができる。両方の場合で、炎症部位での二次的損傷から組織を保護するために存在する進化的機構が、免疫応答を回避するために癌によって利用される。免疫逃避に打ち勝ち、転移性の肺癌を効果的に処置するための戦略としてのチェックポイント阻害の成功を考慮して、ART1阻害について同様の戦略が想定された。

#### 【0036】

ART1は肺癌で過剰発現しており、細胞保護的であり、転移性増殖を助長する。本明細書で記載されるように、モノADPリボシル化の阻害剤は、癌の治療的阻害に利用するために特定された。例えば、バイオバンクに保管されたヒト材料を使用して、ヒトNSCLC腫瘍におけるART1発現の証拠が、全腫瘍RT-PCR、免疫蛍光、および免疫組織化学を使用して、見出された。マッチする隣接する正常な肺 ( $n=40$ ) と比較した場合、RT-PCRによると、ART1の腫瘍発現の中央値が2倍を超えて増加し ( $p=0.01$ )、腫瘍発生または腫瘍進行における役割が示唆される。RT-PCRによると、不均一な発現が存在し、ART1腫瘍発現は患者の異なる亜集団でより明らかであり得ることが暗示される。続いて、主に (74%) ステージIのNSCLCの184症例を含む組織マイクロアレイを染色して、ART1について陽性染色のNSCLC腫瘍の有症率を決定した。ART1染色は、腺癌の83% ( $n=145$ ) および扁平上皮細胞癌の45% ( $n=39$ ,  $p<0.001$ ) で中程度であるかまたは強かった。ART1発現は、すべてのステージIV腫瘍で見出された。

#### 【0037】

ART1発現が肺癌の異なる表現型特徴に寄与するかどうかを決定するために、shRNA技術 (sh175KP1) を使用して、 $\text{KRAS}^{\text{G12D}/+}/\text{p53}^{-/-}$ 細胞株、KP1 (遺伝子操作マウスモデルから開発された) においてART1をノックダウンした。免疫適格性マウスの尾静脈注射モデルでは、ART1ノックダウン細胞株において、その親株と比較して転移の非常

に著しい減少が認められた。インビトロモデルを用いて、免疫適格性マウスから新しく調達した好中球が肺癌細胞においてアポトーシスを誘導する能力を評価した。際だったことに、20:1の好中球：腫瘍細胞比で、ART1発現を欠くノックダウン細胞株sh175KP1は、共培養アッセイにおいて、好中球誘導性アポトーシスにより感受性である（87%対56% アネキシンV陽性、 $p=0.05$ ）。これは、好中球由来タンパク質に対する、肺胞上皮細胞へのART1発現の保護効果と矛盾がない。2つの十分に確立されている阻害剤を用いた、親KP1細胞株におけるモノADPリボシル化の化学的阻害は、好中球誘導性アポトーシスを助長し、ART1の酵素活性が表現型に対して重要であることが暗示される。このことに基づいて、ART1発現は肺癌細胞に対して細胞保護的であり、血液もしくは転移ニッチ中の腫瘍抑制免疫細胞または可溶性タンパク質に対するその阻害作用を通じて、循環細胞の転移性増殖を助長することが仮定された。モノADPリボシル化は、腫瘍微小環境中の他の免疫細胞、特にT細胞にも影響を及ぼす可能性が高い。ART1は細胞外の酵素標的であるので、これは創薬可能性が高く、したがって、治療介入を受けやすい。

10

【0038】

#### 定義

「ベクター」は、ポリヌクレオチドを含むかまたはポリヌクレオチドと結合し、インビトロまたはインビボのいずれかで細胞へのポリヌクレオチドの送達を媒介するために使用することができる、巨大分子または巨大分子の結合体を指す。例示的ベクターとしては、例えば、プラスミド、ウイルスベクター、リポソーム、および他の遺伝子送達媒体が挙げられる。「標的ポリヌクレオチド」または「導入遺伝子」と称されることもある送達されるポリヌクレオチドは、遺伝子療法における関心対象のコード配列（例えば、治療的に関心のあるタンパク質をコードする遺伝子）、ワクチン開発における関心対象のコード配列（例えば、哺乳動物において免疫応答を引き起こすのに適したタンパク質、ポリペプチド、もしくはペプチドを発現するポリヌクレオチド）、および／または選択可能もしくは検出可能なマーカーを含むことができる。

20

【0039】

本明細書で使用される「形質導入」、「トランスフェクション」、「形質転換」、または「形質導入する」は、細胞中でポリヌクレオチド、例えば、導入遺伝子の発現をもたらす、宿主細胞中へ外来性ポリヌクレオチドの導入のためのプロセスを指す用語であり、宿主細胞に外来性ポリヌクレオチドを導入するための組換えウイルスの使用を含む。細胞中のポリヌクレオチドの形質導入、トランスフェクション、または形質転換は、限定されないが、例えば、ELISA、フローサイトメトリー、およびウエスタンブロットによるタンパク質発現（定常状態レベルを含む）、異種化（heterologousization）アッセイ、例えば、ノーザンブロット、サザンブロット、およびゲルシフト移動度アッセイによるDNAおよびRNAの測定を含めて、当業者に周知の方法によって確認することができる。外来性ポリヌクレオチドの導入のために使用される方法としては、例えば、ウイルス感染またはトランスフェクション、リポフェクション、形質転換、およびエレクトロポレーション、ならびに他の非ウイルス遺伝子送達技法などの周知の技法が挙げられる。導入されたポリヌクレオチドは、宿主細胞中で安定して、または一過的に維持され得る。

30

【0040】

「遺伝子送達」は、遺伝子移入のための細胞中への外来性ポリヌクレオチドの導入を指し、標的化、結合、取り込み、輸送、局在、レプリコンの組み込みおよび発現を包含することができる。

40

【0041】

「遺伝子移入」は、標的化、結合、取り込み、輸送、局在、およびレプリコンの組み込みを包含することができるが、遺伝子のその後の発現とは異なり、遺伝子のその後の発現を含意しない、細胞中への外来性ポリヌクレオチドの導入を指す。

【0042】

「遺伝子発現」または「発現」は、遺伝子転写、翻訳、および翻訳後修飾のプロセスを指す。

50

## 【0043】

用語「ポリヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドまたはそれらの類似体を含む、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えば、メチル化またはキャップ付加ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体を含むことができ、非ヌクレオチド成分が割り込んでいてもよい。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーのアセンブリーの前または後に加えることができる。本明細書で使用する場合、ポリヌクレオチドという用語は、二本鎖分子および一本鎖分子を互換的に指す。別段の指定がない限り、または必要とされない限り、ポリヌクレオチドである、本明細書に記載される本開示の任意の態様は、二本鎖形態と二本鎖形態を構成することが公知であるか予想される2つの相補的な一本鎖形態のそれぞれとの両方を包含する。

10

## 【0044】

「核酸配列」は、一本鎖でも二本鎖でもよく、非天然または変化させられたヌクレオチドを含むことができる、DNAまたはRNAのポリマー、すなわち、ポリヌクレオチドを包含することが意図される。本明細書で使用される用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、リボヌクレオチド（RNA）またはデオキシリボヌクレオチド（DNA）のいずれかである任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。これらの用語は分子の一次構造を指し、したがって、二本鎖および一本鎖DNAならびに二本鎖および一本鎖RNAを含む。本用語は、均等物として、ヌクレオチド類似体でできているRNAまたはDNAのいずれかの類似体、ならびに修飾ポリヌクレオチド、例えば、限定されないが、メチル化および／またはキャップ付加ポリヌクレオチドを含む。

20

## 【0045】

「単離された」ポリヌクレオチド、例えば、プラスミド、ウイルス、ポリペプチド、または他の物質は、物質または類似の物質が天然に存在するか、または最初に調製される場合にも存在する可能性がある他の成分の少なくともいくつかを欠いている物質の調製物を指す。したがって、例えば、単離された物質は、供給源混合物からそれを富化するための精製技法を使用することによって、調製することができる。単離された核酸、ペプチド、またはポリペプチドは、それが天然に見られるものと異なる形態または状況で存在する。例えば、所与のDNA配列（例えば、遺伝子）は、隣接遺伝子に近接して、宿主細胞の染色体上に見出され；RNA配列、例えば、特定のタンパク質をコードする特定のmRNA配列は、数多くのタンパク質をコードする多数の他のmRNAとの混合物として、細胞中に見出される。単離された核酸分子は、一本鎖または二本鎖形態で存在し得る。単離された核酸分子がタンパク質を発現するために利用される場合、該分子は、最小限、センスまたはコード鎖を含むと考えられる（すなわち、該分子は一本鎖であり得る）が、センス鎖とアンチセンス鎖の両方を含むことができる（すなわち、該分子は二本鎖であり得る）。富化は、溶液の体積当たりの重量などの絶対基準で測定することができ、または供給源混合物中に存在する第2の潜在的干渉物質に関して測定することができる。本開示の態様の漸増的富化が想定される。したがって、例えば、2倍富化、10倍富化、100倍富化、または1000倍富化である。

30

## 【0046】

「転写調節配列」（TRS）は、それが機能的に連結されている遺伝子またはコード配列の転写を制御するゲノム領域を指す。本開示で有用な転写調節配列は、一般に、少なくとも1つの転写プロモーターを含み、転写の1つまたは複数のエンハンサーおよび／またはターミネーターを含むこともできる。

40

## 【0047】

「機能的に連結される」は、そのように記載される成分が、それらが協調して機能することを可能にする関係にある、2つ以上の成分の配置を指す。例示として、転写調節配列またはプロモーターは、TRSまたはプロモーターがコード配列の転写を促進する場合、コード配列に機能的に連結されている。機能的に連結されるTRSは、一般に、コード配列とシスで結合されるが、必ずしもコード配列に直接隣接するとは限らない。

50

## 【0048】

「異種」は、それが比較される実体と遺伝子型が異なる実体に由来することを意味する。例えば、遺伝子操作技法によって異なる細胞型に導入されるポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである（および、発現する場合、異種ポリペプチドをコードすることができる）。同様に、そのネイティブコード配列から取り出され、異なるコード配列に機能的に連結される、プロモーターなどの転写調節エレメントは、異種転写調節エレメントである。

## 【0049】

「ターミネーター」は、リードスルー転写を減らすかまたは防止する傾向があるポリヌクレオチド配列を指す（すなわち、ターミネーターの一方の側で始まる転写が、ターミネーターのもう一方の側まで続くことを減らすかまたは防止する）。転写が乱される程度は、典型的には、ターミネーター配列の塩基配列および／または長さの関数である。特に、多数の分子生物学的システムで周知あるように、一般に「転写終結配列」と称される特定のDNA配列は、おそらく、RNAポリメラーゼ分子を停止させる、および／または転写されているDNAから離脱させることによって、RNAポリメラーゼによるリードスルー転写を乱す傾向がある、特異的な配列である。そのような配列特異的ターミネーターの典型例としては、ポリアデニル化（「ポリA」）配列、例えば、SV40ポリAが挙げられる。そのような配列特異的ターミネーターに加えて、またはその代わりに、プロモーターとコード領域の間の比較的長いDNA配列の挿入も、一般に介在配列の長さに比例して、コード領域の転写を乱す傾向がある。この効果は、おそらく、転写されるDNAからRNAポリメラーゼ分子が離脱するいくらかの傾向が常にあるために生じ、コード領域に到達する前に通過する配列の長さを延ばすことにより、一般に、コード領域の転写が完了する前に、またはおそらく開始する前にさえ、離脱が起こるであろう可能性が高まると考えられる。したがって、ターミネーターは、一方向のみから（「一方向性」ターミネーター）または両方向から（「二方向性」ターミネーター）の転写を防止することができ、配列特異的終結配列または配列非特異的ターミネーターまたは両方から構成され得る。様々なそのようなターミネーター配列が当技術分野において公知であり；本開示の文脈内のそのような配列の例示的使用が、以下に提供される。

## 【0050】

「宿主細胞」、「細胞株」、「細胞培養物」、「パッケージング細胞株」、および他のそのような用語は、例えば、組換えウイルスまたは組換え融合ポリペプチドを生成するために本開示で有用な、高等真核細胞、例えば、ヒト細胞を含めた哺乳動物細胞を意味する。これらの細胞は、形質導入された元の細胞の後代を含む。単一細胞の後代は、（形態またはゲノム相補体が）元の親細胞と必ずしも完全に同一でない可能性があることが理解されよう。

## 【0051】

ポリヌクレオチドに適用される「組換え」は、ポリヌクレオチドが、クローニング、制限酵素処理（restriction）、および／またはライゲーション工程、ならびに天然に見られるポリヌクレオチドと異なるコンストラクトをもたらす他の手順の様々な組み合わせの産物であることを意味する。組換えウイルスは、組換えポリヌクレオチドを含むウイルス粒子である。本用語は、それぞれ、元のポリヌクレオチドコンストラクトの複製物および元のウイルスコンストラクトの後代を含む。

## 【0052】

「制御エレメント」または「制御配列」は、ポリヌクレオチドの複製、重複、転写、スプライシング、翻訳、または分解を含めて、ポリヌクレオチドの機能的調節に寄与する、分子の相互作用に関与するヌクレオチド配列である。調節は、プロセスの頻度、速度、または特異性に影響を及ぼすことができ、本質的に増強的または阻害的であり得る。当技術分野において公知である制御エレメントとしては、例えば、プロモーターおよびエンハンサーなどの転写調節配列が挙げられる。プロモーターは、ある特定の状態で、RNAポリメラーゼに結合し、プロモーターの下流（3'方向）に通常位置するコード領域の転写

を開始することができる、DNA領域である。プロモーターとしては、AAVプロモーター、例えば、P5、P19、P40、およびAAV ITRプロモーター、ならびに異種プロモーターが挙げられる。

【0053】

「発現ベクター」は、関心対象の遺伝子産物をコードする領域を含むベクターであり、意図された標的細胞において遺伝子産物の発現をもたらすために使用される。発現ベクターは、標的においてタンパク質の発現を助長するためにコード領域に機能的に連結されている制御エレメントも含む。制御エレメントと発現のためにそれが機能的に連結される1つの遺伝子または複数の遺伝子の組み合わせは、「発現カセット」と称されることもあり、多数の発現カセットが当技術分野において公知であり、入手可能であり、または当技術分野において入手可能な成分から容易に構築することができる。

10

【0054】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は本明細書において互換的に使用されて、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。本用語は、修飾；例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、アセチル化、ホスホニル化、脂質化、または標識成分とコンジュゲーションを受けたアミノ酸ポリマーも包含する。

【0055】

細胞または生物中のタンパク質、遺伝子、核酸、またはポリヌクレオチドに関して使用される場合、用語「外来性」は、人工的または天然の手段によって細胞または生物に導入された、タンパク質、遺伝子、核酸、またはポリヌクレオチドを指す。外来性核酸は異なる生物もしくは細胞からのものでもよく、または生物もしくは細胞内天然に存在する核酸の1つもしくは複数のさらなるコピーであってもよい。非限定例として、外来性核酸は、天然の細胞のものと異なる染色体上の位置にあるか、またはそうでなければ、ある遺伝子のプロモーターを異なる遺伝子の遺伝子産物のためのオープンリーディングフレームに連結する発現カセットなど、天然に見られるものと異なる核酸配列に隣接している。

20

【0056】

「形質転換された」または「トランスジェニック」は、少なくとも1つの組換えDNA配列の存在によって変化させられたかまたは強化させられた任意の宿主細胞または細胞株を含むように、本明細書で使用される。本開示の宿主細胞は、単離された直鎖DNA配列としての、プラスミド発現ベクター中のDNA配列を用いたトランスフェクションによって、または組換えウイルスベクターを用いた感染によって、典型的には生成される。

30

【0057】

用語「配列相同性」は、2つの核酸配列間の塩基マッチの割合、または2つのアミノ酸配列間のアミノ酸マッチの割合を意味する。配列相同性があるパーセンテージ、例えば50%として表される場合、そのパーセンテージは、いくつかの他の配列と比較される選択された配列の長さに対するマッチの割合を意味する。(2つの配列のいずれかにおける)ギャップは、マッチングを最大にするために許容され；15塩基以下のギャップ長が通常使用され、6塩基以下が好ましく、2塩基以下がより好ましい。プローブまたは処置としてオリゴヌクレオチドを使用する場合、標的核酸とオリゴヌクレオチド配列の間の配列相同性は、一般に、20個の可能なオリゴヌクレオチド塩基対マッチのうちの17個以上の標的塩基マッチ(85%)；10個の可能な塩基対マッチのうちの9個以上のマッチ(90%)、または20個の可能な塩基対マッチのうちの19個以上のマッチ(95%)である。

40

【0058】

2つのアミノ酸配列は、それらの配列の間に部分的または完全な同一性がある場合、相同である。例えば、85%の相同性は、最大マッチングのために2つの配列が整列させられる場合に、85%のアミノ酸が同一であることを意味する。(マッチさせられる2つの配列のいずれかにおける)ギャップは、マッチングを最大にする際に許容され；5以下のギャップ長が好ましく、2以下がより好ましい。あるいは、2つのタンパク質配列(または、少なくとも30アミノ酸の長さの、それらに由来するポリペプチド配列)は、この用語が本明細書で使用される場合、これらが、突然変異データ行列および6以上のギャップペナ

50

ルティーでALIGNプログラムを使用して、（標準偏差単位で）5を超えるアライメントスコアを有する場合、相同である。2つの配列またはそれらの一部は、それらのアミノ酸が、ALIGNプログラムを使用して最適に整列させられた場合に50%以上同一である場合、より相同である。

#### 【0059】

用語「に対応する」は、ポリヌクレオチド配列が、参照ポリヌクレオチド配列のすべてもしくは一部に構造的に関連していること、またはポリペプチド配列が、参照ポリペプチド配列のすべてもしくは一部に構造的に関連していることを意味するように本明細書で使用され、例えば、これらは少なくとも80%、85%、90%、95%またはそれ以上、例えば、99%または100%の配列同一性を有する。対照的に、用語「に相補的」は、相補的配列が参照ポリヌクレオチド配列のすべてまたは一部と相同であることを意味するように本明細書で使用する。例示のために、ヌクレオチド配列「TATAC」は、参照配列「TATAC」に対応し、参照配列「GTATA」に相補的である。

10

#### 【0060】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列が、比較のウィンドウにわたって同一である（すなわち、ヌクレオチド単位で）ことを意味する。用語「配列同一性のパーセンテージ」は、2つのポリヌクレオチド配列が、比較のウィンドウにわたって（すなわち、ヌクレオチド単位で）同一であることを意味する。用語「配列同一性のパーセンテージ」は、比較のウィンドウにわたって2つの最適に整列させられた配列を比較し、同一の核酸塩基（例えば、A、T、C、G、U、またはI）が両方の配列に存在する位置の数を決定して、マッチした位置の数を得て、マッチした位置の数を比較のウィンドウ中の位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）で割り、その結果に100を掛けて、配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。本明細書で使用する用語「実質的な同一性」は、ポリヌクレオチド配列の特徴を意味し、ポリヌクレオチドは、少なくとも20個のヌクレオチド位置の比較ウィンドウにわたって、しばしば少なくとも20~50個のヌクレオチドのウィンドウにわたって、参照配列と比較して、少なくとも85パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも90~95パーセントの配列同一性、より一般的には、少なくとも99パーセントの配列同一性を有する配列を含み、配列同一性のパーセンテージは、比較のウィンドウにわたって参照配列の合計20パーセント以下になる欠失または付加を含み得るポリヌクレオチド配列と参照配列を比較することによって、計算される。

20

30

#### 【0061】

「保存的」アミノ酸置換は、例えば、極性酸性アミノ酸としてのアスパラギン酸-グルタミン酸；極性塩基性アミノ酸としてのリジン/アルギニン/ヒスチジン；非極性または疎水性アミノ酸としてのロイシン/イソロイシン/メチオニン/バリン/アラニン/グリシン/プロリン；極性または無電荷親水性アミノ酸としてのセリン/スレオニンである。保存的アミノ酸置換は、側鎖に基づくグループ化も含む。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり；脂肪族-ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群はセリンおよびスレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群はアスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸の群はフェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸の群はリジン、アルギニン、およびヒスチジンであり；含硫側鎖を有するアミノ酸の群はシステインおよびメチオニンである。例えば、ロイシンのイソロイシンもしくはバリンによる置換、アスパラギン酸のグルタミン酸による置換、スレオニンのセリンによる置換、またはあるアミノ酸の構造的に関連したアミノ酸による同様の置換は、得られたポリペプチドの特性に対して大きな影響がないであろうと予想することは合理的である。アミノ酸の変更が機能的ポリペプチドをもたらすかどうかは、ポリペプチドの特定の活性をアッセイすることによって容易に決定することができる。天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて群に分けられる：(1)疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；(2)中性親水性：cys、ser、thr；(3)酸性：asp、glu；(4)塩基性：asn、gln、his、lys、arg；(5)鎖配向に影響する残基：gly、pro；および(6)芳香

40

50

族；trp、tyr、phe。

【0062】

本開示は、非保存的置換を有するポリペプチドも想定する。非保存的置換は、上記のクラスの中の1つのメンバーを別のものと交換することを必要とする。

【0063】

「ART1」は、ADPリボシルトランスフェラーゼ1、例えば、その開示が参照により本明細書に組み入れられるアクセション番号NP\_004305.2、XP\_011518416.1、NP\_033840.2、もしくはXP\_011239959.1の配列を有する哺乳動物のART1、またはそれらに少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、97%、98%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質、それらの選択的スプライシングアイソフォーム、それらの断片ペプチド、またはそれらの翻訳後修飾されたタンパク質もしくはペプチドを意味する。例えば、本開示の範囲内の抗体は、ヒトART1、例えば、  
MQMPAMMSLL LVSVGLMEAL QAQSHPIRR DLFSQEIQLD MALASFDDQY AGCAAAMTAA  
LPDLNHTEFQ ANQVYADSWT LASSQWQERQ ARWPEWSLSP TRPSPPLGF RDEHGVALLA  
YTANSPLHKE FNAAVREAGR SRAHYLHHFS FKTLHFLTE ALQLLGSGQR PPRCHQVFRG  
VHGLRFRPAG PRATVRLGGF ASASLKHVAA QQFGEDTFFG IWTCLGAPIK GYSFFPGEEE  
VLIPPFETFQ VINASRLAQG PARIYLRALG KHSTYNCEYI KDKKCKSGPC HLDNSAMGQS  
PLSAVWSLLL LLWFLVVR AF PDGPGLL (SEQ ID NO:16)

10

20

に結合することができ、および／またはマウスART1、例えば、  
MKIPAMMSLL LVSVGLRDGV QVQSYSISQL DIFSQETPLD

MAPASFDDQY AGCLADMTAA LPDLNHSEFQ ANKVYADGWA QANNQWQERR AWGSVWGSPL  
PSPPGFRDEH GVALLAYTAN SPLHKEFNAA VREAGRSRAH YLHHFSFKTL HFLLEALQL LRSRHSRGCC  
QVYRGVHGLR FRPAGPGATV RLGGFASASL KNVAAQQFGE DTFFGIWTCL GAPIRGYSFF PEEEEVLIPP  
FETFQVINTS RPTQGPARIY LRALGKRSTY NCEYIKEKKC RSGPCWLGS APGSISASCS  
LLLLLLFLVL SALPENPGLQ QLTRC (SEQ ID NO:88)

30

に結合することができる。

【0064】

本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、全長免疫グロブリン分子、または例えば、ペプシンなどの酵素による抗体の切断、もしくは例えば哺乳動物細胞における抗体軽鎖と抗体重鎖の共発現によって生成されるFabもしくはF(ab')<sub>2</sub>断片またはScFvなどの免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片を指す。抗体はまた、IgG、IgD、IgA、IgE、またはIgM抗体であってもよい。全長免疫グロブリン「軽鎖」（約25kDまたは214アミノ酸）は、アミノ末端（約110アミノ酸）の可変領域遺伝子およびカルボキシ末端のカッパまたはラムダ定常領域遺伝子にコードされる。全長免疫グロブリン「重鎖」（約50kDまたは446アミノ酸）は、同様に、可変領域遺伝子（約116アミノ酸）および他の前述の定常領域遺伝子のうちの1つ、例えば、ガンマ（約330アミノ酸をコードする）にコードされる。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンに分類され、次にこれらが、それぞれ、免疫グロブリンクラス、IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEを定義する。例示的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、四量体を含む。各四量体は、ポリペプチド鎖の2つの同一の対からなり、各対は、1つの「軽」鎖（約25kD）および1つの「重」鎖（約50～70kD）を有する。各鎖のN末端は、主として抗原認識に関与する、約100～110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を定義する。可変軽鎖（V<sub>L</sub>）および可変重鎖（V<sub>H</sub>）という用語は、それぞれ、これらの軽鎖および重鎖を指す。四量体の各対では、軽鎖および重鎖の可変領域は、抗原への結合に共に関与し、定常領域は、抗体のエフェクター機能に関与する。天然に存在する抗体に加えて、免疫グロブリンは、例えば、Fv、ScFv、Fab、およびF(ab')<sub>2</sub>、ならびに二官能性ハイブリッド抗体（例え

40

50

ば、Lanzavecchia et al. (1987)) を含めた様々な他の形態で、ならびに単鎖で（例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Huston et al. (1988)およびBird et al. (1988)) 存在し得る（一般に、参照により本明細書に組み入れられる、Hood et al., "Immunology", Benjamin, N.Y., 2<sup>nd</sup> ed. (1984)およびHunkapiller and Hood (1986)を参照されたい）。したがって、用語「抗体」は、当技術分野において公知であるように抗原結合抗体断片を含み、抗原結合抗体断片としては、Fab、Fab<sub>2</sub>、単鎖抗体（例えば、scFv）、キメラ抗体などが挙げられ、これらは、抗体全体の修飾によって生成されるか、組換えDNA技術を使用してデノボ合成されたもののいずれかである。

#### 【0065】

免疫グロブリンの軽鎖または重鎖可変領域は、CDRとも呼ばれる3つの超可変領域が割り込んでいる「フレームワーク」領域からなる。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、正確に定義されている ("Sequences of Proteins of Immunological Interest," E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983)を参照されたい；これは、参照により本明細書に組み入れられる)。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。本明細書で使用する場合、「ヒトフレームワーク領域」は、天然に存在するヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域に実質的に同一（約85%またはそれ以上、通常90~95%またはそれ以上）であるフレームワーク領域である。構成成分の軽鎖および重鎖の組み合わせされたフレームワーク領域である、抗体のフレームワーク領域は、CDRを配置および整列させるように働く。CDRは、抗原のエピトープへの結合に主として関与する。

#### 【0066】

キメラ抗体は、軽鎖および重鎖遺伝子が、典型的には、異なる種に属する免疫グロブリンの可変領域遺伝子および定常領域遺伝子から遺伝子操作によって構築された抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体由来の遺伝子の可変セグメントをヒト定常セグメント、例えば、ガンマ1およびガンマ3に結合させることができる。キメラ抗体の一例は、マウス抗体由来の可変ドメインまたは抗原結合ドメインおよびヒト抗体由来の定常ドメインまたはエフェクタードメインからなるものであるが、他の哺乳動物種を使用してもよい。

#### 【0067】

本明細書で使用する場合、用語「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域および非ヒト（通常、マウスまたはラット）免疫グロブリン由来の1つまたは複数のCDRを有する免疫グロブリンを指す。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは「アクセプター」と呼ばれる。定常領域は存在する必要はないが、存在する場合は、これは、一般に、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一であり、すなわち、少なくとも約85~90%、または約95%以上同一である。したがって、ヒト化免疫グロブリンのすべての部分は、おそらくCDRを除いて、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。ドナー抗体は、得られるヒト化抗体がCDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合することが期待されるので、「ヒト化」のプロセスによって「ヒト化されている」と言える。

#### 【0068】

したがって、非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含む、キメラの免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらの断片（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>もしくは抗体の他の抗原結合サブ配列）である。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（CDR）由来の残基が、マウス、ラット、またはウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）の望ましい特異性、親和性および能力を有するCDR由来の残基に置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含む。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基に置き換えられている。ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも移入されるCDRま

10

20

30

40

50

たはフレームワーク配列にも見出されない残基も含むことができる。一般に、ヒト化抗体は、CDR領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを有する。ヒト化抗体は、最適には、免疫グロブリン定常領域 (Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの、の少なくとも一部も含むと考えられる (Jones et al. (1986); Riechmann et al. (1988); および Presta (1992))。

#### 【0069】

ヒト化抗体は、抗原結合にも他の免疫グロブリン機能にも実質的に影響がない付加的な保存的アミノ酸置換を有することができることが理解されよう。保存的置換は、gly、ala; val、ile、leu; asp、glu; asn、gln; ser、thr; lys、arg; および phe、tyr などの組み合わせを意図する。

#### 【0070】

ヒト化抗体を含めて、ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子操作によって構築されている。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当技術分野において周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は「移入」残基と称されることが多く、これは、典型的には、「移入」可変ドメインから得られる。ヒト化は、げっ歯類のCDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することによって、Winterおよび共同研究者 (Jones et al., Nature, 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534 (1988)) の方法に従って本質的に実施することができる。したがって、そのような「ヒト化」抗体は、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている実質的にインタクトではないヒト可変ドメインを有する、キメラ抗体である。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかのCDR残基およびおそらくいくつかのフレームワーク残基が、げっ歯類抗体の類似部位由来の残基によって置換されているヒト抗体である。

#### 【0071】

ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリー (Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)) を含めて、当技術分野において公知である様々な技法を使用して生成することもできる。ColeらおよびBoernerらの技法もヒトモノクローナル抗体の調製のために利用可能である (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) および Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991))。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば、内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的にまたは完全に不活性化されたマウスに導入することによって、作製することができる。チャレンジの際に、ヒト抗体の産生が観察され、これは、遺伝子再編成、アセンブリー、および抗体レパートリーを含めたすべての点で、ヒトで見られるものと酷似している。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号; 第5,545,806号; 第5,569,825号; 第5,625,126号; 第5,633,425号; 第5,661,016号、および以下の科学刊行物: Marks et al., Bio/Technology 10:779 (1992); Lonberg et al., Nature, 368:856 (1994); Morrison, Nature, 368:812 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14:845 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14:826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65 (1995) に記載されている。以前に述べられた大抵のヒト化免疫グロブリンは、特定のヒト免疫グロブリン鎖のフレームワークと同一のフレームワークおよび非ヒトドナー免疫グロブリン鎖由来の3つのCDRを有する。

#### 【0072】

フレームワークは、ヒト化されるドナー免疫グロブリンに著しく相同である特定のヒト免疫グロブリン由来のものでもよく、または多くのヒト抗体に由来するコンセンサスフレームワークでもよい。例えば、マウス重 (または軽) 鎖可変領域の配列とデータバンク (

10

20

30

40

50

例えば、National Biomedical Research Foundationのタンパク質同定リソース)中のヒト重(または軽)可変領域との比較によって、異なるヒト領域に対する相同性の程度が、典型的には約40%から約60~70%まで大きく変動することが示される。他の免疫グロブリンの重(それぞれ軽)鎖可変領域に最も相同なヒト重(それぞれ軽)鎖可変領域のうちの1つを選択することによって、ある免疫グロブリンからヒト化免疫グロブリンへの移行の際に、変化するアミノ酸がより少なくなると考えられる。ヒト化免疫グロブリン鎖を有するヒト化抗体の正確な全体的形状は、ドナー抗体の形状により酷似している可能性があり、これもCDRを変形させる機会を低減する。

#### 【0073】

典型的には、少なくとも約10~20個の異なるヒト重鎖の代表的な収集物における3~5個の最も相同な重鎖可変領域配列のうちの1つが、重鎖フレームワークを提供するためのアクセプターとして選択され、軽鎖についても同様である。1~3個の最も相同な可変領域のうちの1つを使用することができる。選択されたアクセプター免疫グロブリン鎖は、ドナー免疫グロブリンに対して少なくとも約65%の相同性をフレームワーク領域中に有し得る。

#### 【0074】

多くの場合で、確実にヒト化軽鎖および重鎖がお互いに好ましく接触するように、アクセプター配列として同じヒト抗体由来の軽鎖および重鎖を使用することが望ましいと考えられ得る。アクセプター免疫グロブリンがどのように選択されるかにかかわらず、アクセプターではなくドナー中のその位置にあるアミノ酸と同じになるように、ヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の少数のアミノ酸を選択することによって、より高い親和性を達成することができる。

#### 【0075】

ヒト化抗体は、一般に、ヒト療法での使用に関して、マウス抗体または場合によってはキメラ抗体と比べて利点があり：なぜならば、エフェクター部分がヒトであり、これは、ヒト免疫系の他の部分とより良く相互作用する(例えば、補体依存性細胞傷害(CDC)または抗体依存性細胞傷害(ADCC)によって、標的細胞をより効率的に破壊する)ことができ；ヒト免疫系は、ヒト化抗体のフレームワークまたは定常領域を外來性として認識しないはずであり、したがって、そのような抗体に対する抗体応答は、完全に外來性のマウス抗体または部分的に外來性のキメラ抗体に対するよりも低いはずである。

#### 【0076】

免疫グロブリン配列を有するDNAセグメントは、典型的には、天然に関連しているかまたは異種であるプロモーター領域を含めて、ヒト化免疫グロブリンコード配列に機能的に連結されている発現制御DNA配列をさらに含む。一般に、発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすることができるベクター中の真核性プロモーターシステムであると考えられるが、原核宿主のための制御配列を使用することもできる。一旦ベクターが適切な宿主に組み込まれたら、宿主は、ヌクレオチド配列の高レベル発現に適した条件下で維持され、所望により、ヒト化軽鎖、重鎖、軽/重鎖二量体、もしくはインタクトな抗体、結合断片、または他の免疫グロブリン形態の収集および精製が続く可能性がある(参照により本明細書に組み入れられる、S. Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, New York, (1979)を参照されたい)。

#### 【0077】

天然配列に対して「実質的に相同な」他の改変免疫グロブリンは、当業者に周知の様々な組換えDNA技法を利用して、容易に設計することができ、製造することができる。例えば、フレームワーク領域は、いくつかのアミノ酸置換、末端および中間の付加および欠失などによって、一次構造レベルで変化する可能性がある。さらに、本開示のヒト化免疫グロブリンの基礎として、様々な異なるヒトフレームワーク領域を単独でまたは組み合わせて使用することができる。一般に、遺伝子の改変は、部位特異的変異誘発などの様々な周知の技法によって容易に達成することができる(Gillman and Smith, Gene, 8:81 (1979)およびRoberts et al., Nature, 328:731 (1987)を参照されたい。これら

10

20

30

40

50

の両方とも参照により本明細書に組み入れられる)。実質的に相同な免疫グロブリン配列は、参照免疫グロブリンタンパク質と少なくとも約85%の相同性、通常、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の相同性を示すものである。

#### 【0078】

あるいは、一次抗体構造の一部しか含まないポリペプチド断片を生成することができ、この断片は、1つまたは複数の免疫グロブリン活性（例えば、抗原結合）を有する。これらのポリペプチド断片は、当技術分野において周知である方法によるインタクトな抗体のタンパク質分解性切断によって、または部位特異的変異誘発を使用して、当業者に公知のベクター中の望ましい位置に終止コドンを挿入することによって、生成することができる。

10

#### 【0079】

##### 例示的な抗ART1分子

本開示は、ART1に対する抗体、その抗原結合断片、またはポリペプチドを提供する。一態様では、抗体、その断片、またはポリペプチドはヒトART1とマウスART1の両方に結合するので、おそらくこれらのタンパク質の保存配列に結合するが（以下のアライメントを参照されたい）、ヒトART1には結合するがマウスART1には結合しない抗体は、おそらく非保存配列に結合する（以下のアライメントを参照されたい）。

MQMPAMMSLLLVSVGLMEALQAQSHPIRRDLFSQEIQLDMALASFDDQYAGCAAAMTAA

M++PAMMSLLLVSVGL + +Q QS+ I++ D+FSQE LDMA ASFDDQYAGC A MTAA

MKIPAMMSLLLVSVGLRDGVQVQSYSISQLDIFSQETPLDMPASFDDQYAGCLADMTAA

20

LPDLNHTEFQANQVYADSWTLASSQWQERQARWPEWSLSPTRPSPPLGFRDEHGVALLA

LPDLNH+EFQAN+VYAD W A++QWQER+A W P PSPP GFRDEHGVALLA

LPDLNHSEFQANKVYADGWAQANNQWQERRAWGWSVWGSPL--PSPP--GFRDEHGVALLA

YTANSPLHKEFNAAVREAGRSRAHYLHHFSFKTLHFLLTEALQLLGSGQRPPRCHQVFRG

YTANSPLHKEFNAAVREAGRSRAHYLHHFSFKTLHFLLTEALQLL S R C QV+RG

YTANSPLHKEFNAAVREAGRSRAHYLHHFSFKTLHFLLTEALQLLRS-HRSRGCQQVYRG

30

VHGLRFRPAGPRATVRLGGFASASLKHVAAQQFGEDTFFGIWTCLGAPIKGYSFFPGEEE

VHGLRFRPAGP ATVRLGGFASASLK+VAAQQFGEDTFFGIWTCLGAPI+GYSFFP EEE

VHGLRFRPAGPGATVRLGGFASASLKNVAAQQFGEDTFFGIWTCLGAPIRGYSFFPEEEEE

VLIPPFETFQVINASRLAQQPARIYLRALGKHSTYNCEYIKDKKCKSGPCHLDNSAMG (SEQ ID NO:90)

VLIPPFETFQVIN SR QGPARIYLRALGK STYNCEYIK+KKC+SGPC L +SA G (SEQ ID NO:91)

VLIPPFETFQVINTSRPTQGPARIYLRALGKRSTYNCEYIKEKKCRSGPCWLGSSAPG (SEQ ID NO:92)

40

#### 【0080】

したがって、一態様では、ヒトART1とマウスART1の両方に結合する、ART1に対する抗体、その抗原結合断片、またはポリペプチドは、位置170~185（ヒト番号付け）、195~210もしくは230~250のもの、またはこれらの組み合わせを含む残基に結合することができる。一態様では、ART1に結合する抗体は、ART1の位置110~160、185~225もしくは245~275のもの、またはこれらの組み合わせを含む残基に結合するものを含む。一態様では、ART1に結合する抗体は、位置20~50、80~100、170~85、225~245もしくは275~C末端のもの、またはこれらの組み合わせを含む残基に結合するものを含む。一態様では、抗体、その抗原結合断片、またはポリペプチドは、以下

50

の残基：ヒトART1（例えばSEQ ID NO:90）のS75、S77、T79、R80、R89、H92、またはY99のうちの少なくとも1つに結合する。一態様では、単離抗体またはその断片は、ヒトART1、例えば、SEQ ID NO:90のS75、S77、T79、R80、R89、H92、またはY99の2つ、3つ、4つ、5つ、または6つに結合する。一態様では、単離抗体またはその断片は、ヒトART1、例えば、SEQ ID NO:90のS75、S77、T79、R80、R89、H92、およびY99に結合する。

#### 【0081】

抗体は4つのポリペプチド：重（H）鎖ポリペプチドの2つの同一コピーおよび軽（L）鎖ポリペプチドの2つのコピーからなることを、当業者は認識するであろう。重鎖のそれぞれは、1つのN末端可変（V<sub>H</sub>）領域および3つのC末端定常（CH1、CH2、およびCH3）領域を含み、各軽鎖は、1つのN末端可変（V<sub>L</sub>）領域および1つのC末端定常（C<sub>L</sub>）領域を含む。軽鎖および重鎖の各対の可変領域は、抗体の抗原結合部位を形成する。ART1に対する抗体をコードする核酸配列は、1つまたは複数の核酸配列を含むことができ、これらのそれぞれは、抗ART1抗体の重鎖および／または軽鎖ポリペプチドの1つまたは複数にコードする。この点で、ART1に対する抗体をコードする核酸配列は、抗ART1抗体の重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドをコードする単一の核酸配列を含むことができる。あるいは、ART1に対する抗体をコードする核酸配列は、抗ART1抗体の重鎖ポリペプチドをコードする第1の核酸配列、および抗ART1抗体の軽鎖ポリペプチドをコードする第2の核酸配列を含むことができる。さらに別の態様では、ART1に対する抗体の断片をコードする核酸配列は、抗ART1抗体の重鎖可変領域ポリペプチドをコードする核酸配列、抗ART1抗体の軽鎖可変領域ポリペプチドをコードする核酸配列、または抗ART1抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域ポリペプチドをコードする核酸配列を含むことができる。

#### 【0082】

別の態様では、ART1に対する抗体をコードする核酸配列は、抗ART1抗体の抗原結合断片（「抗体断片」とも称される）をコードする。用語「抗原結合断片」は、抗原（例えば、ART1）に特異的に結合する能力を保持する、抗体の1つまたは複数の断片を指す（一般に、Holliger and Hudson 2005を参照されたい）。抗原結合断片の例としては、限定されないが、(i) V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub>、およびCH1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架橋によって連結した2つのFab断片を含む二価の断片であるF(ab')<sub>2</sub>断片；ならびに(iii) 抗体の単一アームのV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>ドメインからなるFv断片が挙げられる。一態様では、ART1に対する抗体をコードする核酸配列は、抗ART1抗体のFab断片をコードする核酸配列を含むことができる。一態様では、ART1に対する抗体またはその断片をコードする核酸配列は、ART1に結合する重鎖可変領域をコードする核酸配列を含むことができる。一態様ではART1に対する抗体またはその断片をコードする核酸配列は、ART1に結合する軽鎖可変領域をコードする核酸配列を含むことができる。一態様では、ART1に対する抗体をコードする核酸配列は、ART1に結合する、例えば重鎖可変領域の1つ、2つ、または3つのCDRをコードする核酸配列を含むことができる。一態様では、ART1に対する抗体をコードする核酸配列は、ART1に結合する、例えば軽鎖可変領域の1つ、2つ、または3つのCDRをコードする核酸配列を含むことができる。抗体断片は、scFv抗体またはナノボディ（重鎖中に単一可変ドメインを有するVHH抗体）、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>であってもよい。

#### 【0083】

一態様では、核酸配列は、ART1結合モノクローナル抗体22C12またはその断片をコードすることができる。一態様では、核酸配列は、ART1結合モノクローナル抗体14G01またはその断片をコードすることができる。

#### 【0084】

一態様では、ヒトおよびマウスART1を認識する（結合する）、ART1に対する抗体をコードする核酸配列。一態様では、ART1に対する抗体をコードする核酸配列は、ヒトART1は認識するがマウスART1は認識しない。

10

20

30

40

50

## 【0085】

抗体またはその抗原結合断片は、インビトロ供給源（例えば、ハイブリドーマまたは組換えで抗体を産生する細胞株）およびインビボ供給源（例えば、げっ歯類）を介することを含めた任意の手段によって、得ることができる。

## 【0086】

抗体を生成するための方法は当技術分野において公知であり、例えば、Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 5:511 (1976); Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988); および C.A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001) に記載されている。ある特定の態様では、ヒト抗体またはキメラ抗体は、1つまたは複数の内在性免疫グロブリン遺伝子が1つまたは複数のヒト免疫グロブリン遺伝子に置き換えられているトランスジェニック動物（例えば、マウス）を使用して生成することができる。内在性抗体遺伝子がヒト抗体遺伝子に効果的に置き換えられているトランスジェニックマウスの例としては、限定されないが、AlivaMab（登録商標）マウス、VelocImmuneマウス、Trianni（登録商標）マウス、Kymab（商標）マウス、HUMAB-MOUSE（商標）、Kirin TC MOUSE（商標）、およびKM-MOUSE（商標）が挙げられる（例えば、Lonberg, Nat. Biotechnol., 23(9):1117 (2005) および Lonberg, Handb. Exp. Pharmacol., 181:69 (2008) を参照されたい）。

## 【0087】

ART1 に対する抗体、その抗原結合断片、または ART1 に結合するポリペプチドをコードする核酸配列は、当技術分野において公知である方法を使用して生成することができる。ポリペプチドおよびタンパク質は、例えば、標準的な組換え DNA 方法を使用して、組換えで産生することができる（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; および Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994 を参照されたい）。さらに、ART1 に対する抗体またはその抗原結合断片は、そのような抗体または抗原結合断片をコードする合成的に生成された核酸配列が導入された、細菌、昆虫、または哺乳動物、例えば、ラット、ヒトなどのような供給源から単離および／または精製することができる。単離および精製の方法は、当技術分野において周知である。あるいは、本明細書に記載される核酸配列は商業的に合成することができる。この点で、核酸配列は、合成であっても、組換えであっても、単離されていても、および／または精製されていてもよい。

## 【0088】

ART1 に対する抗体をコードする核酸配列は、利用可能な抗体産生ハイブリドーマ細胞から RNA を抽出することによって特定することができる。逆転写によって cDNA を生成し、定常ドメイン中の保存された領域に特異的なプライマーと組み合わせて cDNA 末端の迅速増幅（RACE）ストラテジーを使用して、軽鎖および重鎖の PCR 増幅を行う。

## 【0089】

ART1 に対する抗体をコードする核酸配列は、当技術分野において公知である手段によって、完全にまたは部分的にヒト化することもできる。例えば、抗体キメラは、抗体のマウス Fc 領域をコードする DNA をヒトのものをコードする cDNA と置換することによって作り出すことができる。

## 【0090】

分子の Fab 部分は、配列を適切な個々のアミノ酸と交換することにより、ヒトのものとは異なる Fab 配列の非 CDR 部分の DNA を選択的に変化させることによって、ヒト化することもできる。

## 【0091】

あるいは、ヒト化は、ヒト抗体「スキャフォールド」中への適切な CDR コーディングセグメントの挿入によって、達成することができる。

## 【0092】

当技術分野において公知であるように、RNA不安定性エレメントの除去および／またはコドン最適化を通じて、哺乳動物細胞における高発現レベルのために、得られる抗体DNA配列を改変することができる。

## 【0093】

一態様では、ART1に対する抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸配列を、2A配列（シス作用性ヒドロラーゼエレメント）自己切断可能配列を使用して、単一プロモーターの制御下で1:1の比で発現させることができる。2A配列はタンパク質翻訳中に自己切断し、上流タンパク質のC末端にアミノ酸の短い尾部を残す。残存アミノ酸の除去を確実にするために、2A配列と上流遺伝子の間にフューリン切断認識部位を加えることができる。DNAシーケンシングによって、およびウエスタン分析およびELISAアッセイを使用する抗体特異的結合によって、正しいインサートを発現するプラスミドを特定することができる。

10

## 【0094】

例示的な遺伝子移入ベクター

本開示は、ART1に対する抗体、その抗原結合断片、またはポリペプチドをコードする核酸配列を含む遺伝子移入ベクターも提供する。一態様では、遺伝子移入ベクターはウイルスである。本開示は、哺乳動物のART1に対して遺伝子移入ベクターまたはコードされる遺伝子産物を使用する方法をさらに提供し、方法は、上記の遺伝子移入ベクターまたはコードされる遺伝子産物を哺乳動物に投与する工程を含む。遺伝子移入ベクター、抗体またはその抗原結合断片、および方法の様々な局面を以下に論じる。各パラメーターを別々に論じるが、遺伝子移入ベクター、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチド、および方法は、以下に記載されるパラメーターの組み合わせを含むことができる。したがって、遺伝子移入ベクター、抗体またはその抗原結合断片、ポリペプチド、および方法に従って、パラメーターの任意の組み合わせを使用することができる。

20

## 【0095】

「遺伝子移入ベクター」は、コードされるタンパク質の合成が起こる適切な宿主細胞中に異種核酸配列を輸送および送達する能力を有する任意の分子または組成物である。典型的には、遺伝子移入ベクターは、異種核酸配列を組み込むように、当技術分野において公知である組換えDNA技法を使用して操作された、核酸分子である。望ましくは、遺伝子移入ベクターはDNAから構成される。適切なDNAベースの遺伝子移入ベクターの例としては、プラスミドおよびウイルスベクターが挙げられる。しかし、核酸に基づかない遺伝子移入ベクター、例えばリポソームも当技術分野において公知であり、使用される。遺伝子移入ベクターは、単一タイプの核酸（例えば、プラスミド）または非核酸分子（例えば、脂質またはポリマー）に基づき得る。遺伝子移入ベクターは、宿主細胞のゲノム中に組み込まれ得るか、またはエピソームの形態で宿主細胞中に存在し得る。

30

## 【0096】

一態様では、遺伝子移入ベクターはウイルスベクターである。適切なウイルスベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス（HSV）ベースのベクター、パルボウイルスベースのベクター、例えば、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベースのベクター、AAV-アデノウイルスキメラベクター、およびアデノウイルスベースのベクターが挙げられる。これらのウイルスベクターは、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)、およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994)に記載されている標準的な組換えDNA技法を使用して、調製することができる。

40

## 【0097】

哺乳動物細胞を含めた細胞に、または哺乳動物に、抗体をコードする配列を送達するために、任意のウイルスベクターを用いることができ、ウイルスベクターとしては、限定さ

50

れないが、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、またはレンチウイルスベクターが挙げられる。

【0098】

ART1に対する抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸配列に加えて、ウイルスベクターは、宿主細胞中で核酸配列の発現をもたらす発現制御配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、転写ターミネーター、配列内リボソーム進入部位 (IRES) などを含むことができる。例示的な発現制御配列は当技術分野において公知であり、例えば、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Vol. 185, Academic Press, San Diego, CA. (1990) に記載されている。

【0099】

様々な異なる供給源由来の、構成的、誘導性および抑制性プロモーターを含めた多数のプロモーターが当技術分野において周知である。プロモーターの代表的な供給源としては、例えば、ウイルス、哺乳動物、昆虫、植物、酵母、および細菌が挙げられ、これらの供給源由来の適切なプロモーターは、容易に入手可能であるか、または例えばATCCなどの寄託機関および他の商業的もしくは個人的供給源から公的に入手可能な配列に基づいて合成的に作製することができる。プロモーターは、一方向性 (すなわち、一方向で転写を開始する) または二方向性 (すなわち、3' 方向もしくは5' 方向のいずれかで転写を開始する) であり得る。プロモーターの非限定例としては、例えば、T7細菌発現システム、pBAD (araA) 細菌発現システム、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、SV40 プロモーター、およびRSVプロモーターが挙げられる。誘導性プロモーターとしては、例えば、Tetシステム (米国特許第5,464,758号および第5,814,618号)、エクジソン誘導システム (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93:3346 (1996)、T-REXT Mシステム (Invitrogen, Carlsbad, CA)、LACSWITCH (商標) システム (Stratagene, San Diego, CA)、およびCre-ERTタモキシフェン誘導性リコンビナーゼシステム (Indra et al., Nuc. Acid. Res., 27:4324 (1999); Nuc. Acid. Res., 28:e99 (2000); 米国特許第7,112,715号; およびramer & Fussenegger, Methods Mol. Biol., 308:123 (2005)) が挙げられる。

【0100】

本明細書で使用される用語「エンハンサー」は、例えば、それが機能的に連結されている核酸配列の転写を増大させるDNA配列を指す。エンハンサーは、核酸配列のコード領域から何キロベースも離れて位置することができ、調節因子の結合、DNAメチル化のパターン、またはDNA構造の変化を媒介することができる。様々な異なる供給源由来の多数のエンハンサーが当技術分野において周知であり、クローニングされたポリヌクレオチド (例えば、ATCCなどの寄託機関および他の商業的または個人的供給源由来) として、または該ポリヌクレオチド内で入手可能である。プロモーター (例えば、一般に使用されるCMVプロモーター) を含むいくつかのポリヌクレオチドは、エンハンサー配列も含む。エンハンサーは、コード配列の上流、内部、または下流に位置し得る。一態様では、ART1に対する抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸配列は、CMVエンハンサー／ニワトリベーターアクチンプロモーター (「CAGプロモーター」とも称される) に機能的に連結されている (例えば、Niwa et al., Gene, 108:193 (1991); Daly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96:2296 (1999); およびSondhi et al., Mol. Ther., 15:481 (2007) を参照されたい)。

【0101】

典型的には、AAVベクターは、よく特徴づけられたプラスミドを使用して生成される。例えば、ヒト胎児由来腎臓293T細胞を、導入遺伝子特異的プラスミドのうちの1つならびにアデノウイルスヘルパーおよびAAV repおよびcap遺伝子 (必要に応じて、AAVrh.10、8、または9に特異的) を含む別のプラスミドでトランスフェクトする。72時間後、細胞を採取し、5回の凍結／融解サイクルによって、細胞からベクターを放出させる。その後の遠心分離およびベンゾナーゼ処理によって、細胞残屑およびカプシド化されていないDNAを除去する。イオジキサノール勾配およびイオン交換カラムを使用して、各A

10

20

30

40

50

AVベクターをさらに精製することができる。次に、サイズ排除遠心分離スピнкаラムによって、精製されたベクターを必要とされる濃度まで濃縮する。最後に、緩衝液を交換して、（例えば）1×リン酸緩衝生理食塩水中に製剤化された最終的なベクター生成物を作り出す。TaqMan（登録商標）リアルタイムPCRによってウイルスのタイターを測定することができ、SDS-PAGEによってウイルスの純度を評価することができる。

【0102】

#### 例示的な薬学的組成物および送達

本開示は、上記の抗体、抗体断片、例えば単鎖ポリペプチドもしくは遺伝子移入ベクターおよび薬学的に許容される（例えば、生理学的に許容される）担体、または薬学的に許容される（例えば、生理学的に許容される）担体を任意でともなう抗体もしくはその抗原結合断片を含む、これらから本質的になる、またはこれらからなる組成物を提供する。組成物が、抗体、抗体断片、例えば単鎖ポリペプチドまたは遺伝子移入ベクターおよび薬学的に許容される担体から本質的になる場合、組成物に実質的に影響を及ぼさないさらなる成分（例えば、アジュバント、緩衝液、安定剤、抗炎症剤、可溶化剤、防腐剤など）を含めることができる。組成物が遺伝子移入ベクターおよび薬学的に許容される担体、または薬学的に許容される担体を任意でともなう抗体、その抗原結合断片もしくはポリペプチドからなる場合、組成物は、いかなるさらなる成分も含まない。任意の適切な担体を本開示の文脈内で使用することができ、そのような担体は当技術分野において周知である。担体の選択は、組成物が投与され得る特定の部位、および組成物を投与するために使用される特定の方法によって、部分的に決定され则认为られる。組成物は、本明細書に記載される遺伝子移入ベクターまたは抗体もしくはその抗原結合断片もしくはポリペプチドを除いて、任意で無菌であってもよい。組成物は、保存のために凍結または凍結乾燥することができ、使用前に、適切な無菌担体中で再構成することができる。組成物は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001)に記載されている従来の技法に従って生成することができる。

【0103】

組成物に適した製剤としては、抗酸化剤、緩衝液、および静菌薬を含むことができる、水性および非水性溶液剤、等張溶液剤、ならびに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、および防腐剤を含むことができる水性および非水性の無菌懸濁剤が挙げられる。製剤は、単位用量または複数用量密封容器、例えば、アンプルおよびバイアルに入れて提供することができ、使用直前に無菌液体担体、例えば水を添加することしか必要としないフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存することができる。即時の溶液剤および懸濁剤は、前述の種類の無菌の粉末剤、顆粒剤、および錠剤から調製することができる。一態様では、担体は、緩衝生理食塩液である。一態様では、遺伝子移入ベクター、抗体またはその抗原結合断片は、投与より前に遺伝子移入ベクターまたは抗体もしくはその抗原結合断片を損傷から保護するために製剤化された組成物で投与される。例えば、組成物は、遺伝子移入ベクターを調製する、保存する、または投与するために使用されるデバイス、例えば、ガラス器具、シリンジ、または針における遺伝子移入ベクターの喪失を低減するために製剤化することができる。組成物は、遺伝子移入ベクターまたは抗体もしくはその抗原結合断片の光感受性および／または温度感受性を低下させるために製剤化することができる。この目的のために、組成物は、薬学的に許容される液体担体、例えば上記のものなど、ならびにポリソルベート80、L-アルギニン、ポリビニルピロリドン、トレハロースおよびこれらの組み合わせからなる群より選択される安定化剤を含むことができる。そのような組成物の使用は、遺伝子移入ベクターの保存寿命を延ばし、投与を助長し、方法の効率を高めると考えられる。遺伝子移入ベクター含有組成物のための製剤は、例えば、Wright et al., Curr. Opin. Drug Discov. Devel., 6(2): 174-178 (2003)およびWright et al., Molecular Therapy, 12: 171-178 (2005)) にさらに記載されている。

【0104】

組成物は、形質導入効率を増強するために製剤化することもできる。さらに、遺伝子移

入ベクターまたは抗体もしくはその抗原結合断片は、他の治療的または生物学的に活性な剤とともに組成物中に存在することができることを当業者は認識するであろう。例えば、炎症を制御する因子、例えば、イブプロフェンまたはステロイドは、遺伝子移入ベクターまたは抗体もしくはその抗原結合断片のインビボ投与に関連する腫脹および炎症を低減するために、組成物の一部となり得る。抗ART1免疫応答を増強または修正するために、免疫系刺激物質またはアジュバント、例えば、インターロイキン、リポ多糖、および二本鎖RNAを投与することができる。抗生物質、すなわち、殺菌剤および殺真菌剤は、現存する感染を処置するおよび／または将来の感染、例えば、遺伝子移入手順と関係がある感染の危険性を低減するために存在することができる。

#### 【0105】

注射用デポー形態は、ポリラクチド-ポリグリコリドなどの生分解性ポリマー中に対象化合物のマイクロカプセル化マトリックスを形成することによって作製される。薬物対ポリマーの比および用いられる特定のポリマーの性質に応じて、薬物放出の速度を制御することができる。他の生分解性ポリマーの例としては、ポリ(オルソエステル)およびポリ(無水物)が挙げられる。デポー注射用製剤は、体組織に適合するリポソームまたはマイクロエマルジョン中に薬物を封入することによって調製することもできる。

#### 【0106】

ある特定の態様では、本開示の製剤は、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、アクリル酸エステルおよびメタクリル酸エステルのポリマー、ポリビニルポリマー、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタン、およびこれらのコポリマー、セルロース、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスチレン、乳酸およびグリコール酸のポリマー、ポリ酸無水物、ポリ(オルソ)エステル、ポリ(ブチック酸)、ポリ(吉草酸)、ポリ(ラクチド-コ-カプロラクトン)、多糖、タンパク質、ポリヒアルロン酸、ポリシアノアクリレート、ならびにこれらのブレンド物、混合物またはコポリマーからなる群より選択される生体適合性ポリマーを含む。

#### 【0107】

組成物は、スポンジ、生体適合性網目構造物、機械的リザーバー、または機械的埋植体などの、制御放出または持続性放出を可能にするデバイス中またはデバイス上で投与することができる。埋植体（例えば、米国特許第5,443,505号を参照されたい）、デバイス（例えば、米国特許第4,863,457号を参照されたい）、例えば、埋植可能なデバイス、例えば、機械的リザーバーもしくは埋植体、またはポリマー組成物から構成されるデバイスは、遺伝子移入ベクター、抗体またはその抗原結合断片の投与に特に有用である。組成物は、例えば、ゲルフォーム、ヒアルロン酸、ゼラチン、コンドロイチン硫酸、ポリリン酸エステル、例えば、ビス-2-ヒドロキシエチル-テレフタレート（BHET）および／またはポリ乳酸-グリコール酸を含む持続性放出製剤（例えば、米国特許第5,378,475号を参照されたい）の形態で投与することもできる。

#### 【0108】

遺伝子移入ベクター、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチドを含む組成物の送達は、当技術分野において公知であるデバイスを使用した、脳内（限定されないが、実質内、脳室内、もしくは大槽内を含める）、髄腔内（限定されないが、腰部もしくは大槽を含める）、または静脈内、経口を含めた全身的、あるいはこれらの任意の組み合わせであってもよい。送達は、埋植されるデバイスの外科的埋植を介してもよい。

#### 【0109】

哺乳動物に投与される組成物中の遺伝子移入ベクターの用量は、哺乳動物のサイズ（質量）、任意の副作用の程度、特定の投与経路などを含めたいくつかの因子に依存すると考えられる。一態様では、方法は、本明細書に記載される遺伝子移入ベクター、抗体またはその抗原結合断片を含む「治療有効量」の組成物を投与することを含む。「治療有効量」は、必要な投薬量および期間での、望ましい治療結果を達成するために有効な量を指す。治療有効量は、個体の病状の程度、年齢、性別、および体重、ならびに遺伝子移入ベクター、抗体またはその抗原結合断片が個体において望ましい応答を引き起こす能力などの因

10

20

30

40

50

子に従って変動し得る。特定の治療効果を達成するために必要とされる、組成物中の遺伝子移入ベクターの用量は、典型的には、細胞あたりのベクターゲノムコピー（gc/細胞）またはベクターゲノムコピー／体重キログラム（gc/kg）の単位で投与される。当業者は、これらおよび当技術分野において周知である他の因子に基づいて、特定の疾患または障害を有する患者を処置するのに適した遺伝子移入ベクター用量範囲を容易に決定することができる。治療有効量は、 $1 \times 10^{10}$ ゲノムコピー～ $1 \times 10^{13}$ ゲノムコピーの間であり得る。治療有効量は、 $1 \times 10^{12}$ ゲノムコピー～ $1 \times 10^{15}$ ゲノムコピー（合計）の間であり得る。治療有効量は、 $1 \times 10^{12}$ ゲノムコピー/kg～ $1 \times 10^{15}$ ゲノムコピー/kgの間であり得る。

#### 【0110】

特定の治療効果を達成するために必要とされる組成物中の抗体またはその抗原結合断片の用量は、典型的には、kgあたりの抗体または抗原結合断片（mg/kg）の単位または総用量（mg）で投与される。当業者は、これらおよび当技術分野において周知である他の因子に基づいて、特定の疾患または障害を有する患者を処置するのに適した用量範囲を容易に決定することができる。抗体またはその抗原結合断片の治療有効量は、25～200mg、例えば、50～100mg、25～50mg、50～75mg、100～150mg、150～200mg、200mg～300mg、300mg～400mg、400mg～500mg、または500mg～600mgの間であり得る。抗体またはその抗原結合断片の治療有効量は、1mg/kg～20mg/kg、例えば、2～5mg/kg、5～7mg/kg、または10～15mg/kgの間であり得る。

#### 【0111】

一態様では、組成物は哺乳動物に1回投与される。組成物の単回投与は、最小限の副作用で、哺乳動物において抗ART1抗体の持続的発現をもたらすであろうと考えられる。しかし、特定の場合には、組成物への細胞の十分な曝露を確実にするために、治療期間中に組成物を複数回投与することが適切であり得る。例えば、治療期間中に2回以上（例えば、2、3、4、5、6、6、8、9、または10回またはそれ以上）哺乳動物に組成物を投与することができる。

#### 【0112】

本開示は、上記のように、ART1に対する抗体をコードする核酸配列を含む治療有効量の遺伝子移入ベクターまたは治療有効量の抗体もしくはその抗原結合断片を含む薬学的に許容される組成物を提供する。

#### 【0113】

##### 例示的な疾患および状態

抗体またはそれに対する抗原結合断片で予防、阻害、または処置することができる疾患の例としては、限定はされないが、新生物癌（例えば、扁平上皮癌、腺癌、肝細胞癌、および腎細胞癌）、特に膀胱、腸、乳房、頸部、結腸、食道、頭部、腎臓、肝臓、肺、首、卵巣、脾臓、前立腺および胃のもの；白血病；良性および悪性リンパ腫、特にバーキットリンパ腫および非ホジキンリンパ腫；良性および悪性黒色腫；骨髓増殖性疾患；肉腫、特に、ユーイング肉腫、血管肉腫、カポジ肉腫、脂肪肉腫、筋肉腫、末梢性神経上皮腫、および滑膜肉腫；中枢神経系の腫瘍（例えば、神経膠腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、上衣腫、神経膠芽腫、神経芽腫、神経節腫、神経節膠腫、髓芽腫、松果体細胞腫瘍、髄膜腫、髄膜肉腫、神経線維腫、および神経鞘腫）；生殖細胞系腫瘍（例えば、腸癌、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、肺癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、星状細胞腫、食道癌、脾臓癌、胃癌、肝臓癌、結腸癌、および黒色腫）；異常増殖の混合型、特に癌肉腫およびホジキン病；ならびに混合起源の腫瘍、例えば、ウィルムス腫瘍および奇形癌が挙げられる（Beers and Berkow (eds.), The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17.sup.th ed.(Whitehouse Station, N.J.: Merck Research Laboratories, 1999) 973-74, 976, 986, 988, 991。一態様では、疾患は、脾臓癌、肺癌、肝臓癌、皮膚癌、結腸癌、乳癌、前立腺癌、白血病、バーキット様リンパ腫、急性リンパ性白血病、または黒色腫である。

#### 【0114】

開示される組成物は、ART1の過剰発現をともなう医学的状態または障害を有する対象を処置するのに、または例えば癌におけるART1活性の変化を処置するのに有用である。

【0115】

対象

対象は、ヒトおよび非ヒト動物を含めた任意の動物であり得る。非ヒト動物としては、すべての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、雌ウシ、ウマ、ニワトリ、両生類、および爬虫類が挙げられるが、対象として、哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、雌ウシ、およびウマが想定される。対象はまた、家畜、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、家禽、およびウマ、またはペット、例えば、イヌおよびネコであってもよい。

10

【0116】

例示的な対象としては、本明細書に記載される医学的疾患および状態に罹患しているか、または該疾患および状態の危険性があるヒト対象が挙げられる。対象は、一般に、当業者、例えば医師によって、本開示の状態と診断される。

【0117】

本明細書に記載される本開示の方法は、任意の種、性別、年齢、民族集団、または遺伝子型の対象に用いることができる。したがって、対象という用語は、男性および女性を含み、高齢者、高齢者から成人までの移行年齢の対象の成人、成人から未成年者までの移行年齢の対象、および若者、子供および乳児を含む未成年者を含む。

【0118】

ヒト民族集団の例としては、コーカサス人、アジア人、ラテンアメリカ人、アフリカ人、アフリカアメリカ人、ネイティブアメリカン、セム人、および太平洋諸島の住民が挙げられる。本開示の方法は、いくつかの民族集団、例えば、コーカサス人、特に北欧人集団、およびアジア人集団により適している可能性がある。

20

【0119】

対象という用語は、上記のように、本開示を必要としている限り、任意の遺伝子型または表現型の対象も含む。さらに、対象は、任意の毛髪色、眼色、皮膚色、またはこれらの任意の組み合わせに関する遺伝子型または表現型を有し得る。対象という用語は、任意の身長、体重、または任意の器官もしくは体部位のサイズまたは形状の対象を含む。

【0120】

例示的な配列

30

40

50

QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKD  
TSKSQVVLTMTNMDPVDATYYCARIYGGDSWGYFDNWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:1)

QIVLTQSPAIMSASLGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSL  
TISSMEAGDAATYYCQQWSSNPPTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:2)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRISTSGFTNYPNPSLKSRTMSVD  
SSKNQFSLKLSSSLTAADTAVYYCARDGWGRVFDIWGLGTMVTVSS (SEQ ID NO:3) 10

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT  
LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:4)

CCTGCGCTTTTCGGCCAGCG (SEQ ID NO:5)

CCAACAAAGTATACGCGGA (SEQ ID NO:6)

CGCGATAGCGCGAATATATT (SEQ ID NO:7)

TTG ATG ACC AGT ATG CTG GCT (SEQ ID NO:8) 20

TTG TTG GCC TGA AAG TCT GAG (SEQ ID NO:9)

CAG CGT CCT TTG ATG ACC AG (SEQ ID NO:10)

CCA CTG ATT GTT GGC CTG AG (SEQ ID NO:11)

AAT GTG TCC GTC GTG GAT CT (SEQ ID NO:12)

GGT CCT CAG TGT AGC CCA AG (SEQ ID NO:13)

AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC (SEQ ID NO:14)

CTT GTA GTT GCC GTC GTC CTT GCC (SEQ ID NO:15)

MQMPAMMSLL LVSVGLMEAL QAQSHPIRR DLFSQEIQLD MALASFDDQY AGCAAAMTAA

LPDLNHTEFQ ANQVYADSWT LASSQWQERQ ARWPEWSLSP TRPSPPLGF RDEHGVALLA 30

YTANSPLHKE FNAAVREAGR SRAHYLHHFS FKTLHLLTE ALQLLGSGQR PPRCHQVFRG

VHGLRFRPAG PRATVRLGGF ASASLKHVAA QQFGEDTFFG IWTCLGAPIK GYSFFPGEEE

VLIPPFETFQ VINASRLAQG PARIYLRALG KHSTYNCEYI KDKKCKSGPC HLDNSAMGQS

40

50

PLSAVWSLLL LLWFLVVRAF PDGPGLL (SEQ ID NO:16)

TTTGATGTATTCACAGTTGTAT (SEQ ID NO:17)

TGCTGTTGACAGTGAGCGATAGACATCTTTCTCAAGAAATAGTGAAGCCACAGATGTATTTCTTGAGAAA  
AGATGTCTAGTGCCTACTGCCTCGGA (SEQ ID NO:18).

CCAACAAAGTATACGCGGA (SEQ ID NO:19)

CGCGATAGCGCGAATATATT (SEQ ID NO:20)

NARMGVS (SEQ ID NO:21)

HIFSNDEKSYSTSLKS (SEQ ID NO:22)

IYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:23)

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLS (SEQ ID NO:24)

WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO:25)

RLTISKDTSKSQVLTMTNMDPVDATYYCAR (SEQ ID NO:26)

WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:27)

SSSVSY (SEQ ID NO:28)

DTS (SEQ ID NO:29)

QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30)

QIVLTQSPAIMSASLGEKVTMTCSA (SEQ ID NO:31)

MHWYQQKSGTSPKRWIY (SEQ ID NO:32)

KLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISMEAGDAATYYC (SEQ ID NO:33)

FGAGTKLELK (SEQ ID NO:34)

GGSISSYY (SEQ ID NO:35)

ISTSGFT (SEQ ID NO:36)

ARDGWGRVFDI (SEQ ID NO:37)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO:38)

WSWIRQPAGKGLEWIGR (SEQ ID NO:39)

NYNPSLKSRTMSVDSSKNQFSLKLSSLTAADTAVYYC (SEQ ID NO:40)

WGLGTMVTVSS (SEQ ID NO:41)

QSVSSSY (SEQ ID NO:42)

GAS (SEQ ID NO:43)

QQYGSST (SEQ ID NO:44).

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS (SEQ ID NO:45)

LAWYQQKPGQAPRLIY (SEQ ID NO:46)

10

20

30

40

50

SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:47)

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGTSPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEYTLT  
ISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ  
ID NO:48)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTL  
TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
(SEQ ID NO:49)

10

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRLIYDTSKLATGIPARFSGSGSGTDYTLTI  
SSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ  
ID NO:50)

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRA (SEQ ID NO:51)

MHWYQQKPGTSPKRLIY (SEQ ID NO:52)

KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:53)

20

FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:54).

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSA (SEQ ID NO:55)

MHWYQQKPGTSPKRLIY (SEQ ID NO:56)

KLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:57)

30

FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:58)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA (SEQ ID NO:59)

MHWYQQKPGTSPRRLIY (SEQ ID NO:60)

KLATGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:61)

TFQGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:62)

40

FGPGTKVDIK (SEQ ID NO:63)

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSNARMGVSIRQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKD  
TSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARIYGGDSWGYFDNWGGQTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA  
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDK  
RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT  
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNNKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQYEGNVFSC SVM  
HEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:64)

10

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGTSPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEYTLT  
ISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ  
ID NO:65)

GFSLSNARMG (SEQ ID NO:66)

IFSNDK (SEQ ID NO:67)

ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68)

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGTSPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEYTLT  
ISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKL (SEQ ID NO:69)

20

SLSPTRSPPPPLGFRDEHGVALLAY (SEQ ID NO:70)

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVS (SEQ ID NO:71)

VSWIRQP PGKALEWLAH (SEQ ID NO:72)

SYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYC (SEQ ID NO:73)

WGQGTLTVTVSS (SEQ ID NO:74)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
SSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT  
SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
SNGQPENNNKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQYEGNVFSC SVM HEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ  
ID NO:75)

30

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRAS (SEQ ID NO:76)

YMHYQQKPGTS PKRLIY (SEQ ID NO:77)

KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATY YC (SEQ ID NO:78)

FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:79)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSS  
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:80)

40

SSVSY (SEQ ID NO:81)

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKD  
TSKSQVVLTMNMDPVDATYYCARIYGGDSWGYFDNWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:82)

DIQLTQSPSFLSASVGDRVITICRASSSVSYMHWYQQKPGTS PKRLIYDTS  
KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGKLEIK (SEQ ID NO:83).

10

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICSASSSVSYMHWYQQKPGTSPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTL  
TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGKTL (SEQ ID NO:84)

AGA AGA GGT CTC GTC GTG TGA SEQ ID NO:85)

GAT GCC TGC TAT GAT GTC TCT G (SEQ ID NO:86)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRLIYDTSKLATGIPARFSGSGSGTDYTLTI  
SSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGQGKTL (SEQ ID NO:87).

20

MKIPAMMSLL LVSVGLRDGV QVQSYSISQL DIFSQETPLD MAPASFDDQY AGCLADMTAA LPDLNHSEFQ  
ANKVYADGWA QANNQWQERR AWGSVWGSPL PSPPGFRDEH GVALLAYTAN SPLHKEFNAA  
VREAGRSRAH YLHHFSFKTL HLLTEALQL LRSHRSRGCG QVYRGVHGLR FRPAGPGATV  
RLGGFASASL KNVAAQQFGE DTFFGIWTCL GAPIRGYSFF PEEEEVLIPP  
FETFQVINTS RPTQGPARIY LRALGKRSTY NCEYIKEKKC RSGPCWLGSS APGSISASCS  
LLLLLLFLVL SALPENPGLQ QLTRC (SEQ ID NO:88).

MQMPAMMSLLLVSVGLMEALQAQSHPIRRDLFSQEIQLDMALASFDDQYAGCAAAMTAA  
LPDLNHTEFQANQVYADSWTLASSQWQERQARWPEWSLSPTRPSPPLGFRDEHGVALLA  
YTANSPLHKEFNAAVREAGRSRAHYLHHFSFKTLHLLTEALQLLGSGQRPPRCHQVFRG  
VHGLRFRPAGPRATVRLGGFASASLKHVAAQQFGEDTFFGIWTCLGAPIKGYSFFPGEEE  
VLIPPFETFQVINASRLAQGPARIYLRALGKHSTYNCEYIKDKKCKSGPCHLDNSAMG (SEQ ID NO:90)

30

M++PAMMSLLLVSVGL + +Q QS+ I++ D+FSQE LDMA ASFDDQYAGC A MTAA  
LPDLNH+EFQAN+VYAD W A++QWQER+A W P PSPP GFRDEHGVALLA  
YTANSPLHKEFNAAVREAGRSRAHYLHHFSFKTLHLLTEALQLL S R C QV+RG  
VHGLRFRPAGP ATVRLGGFASASLK+VAAQQFGEDTFFGIWTCLGAPI+GYSFFP EEE  
VLIPPFETFQVIN SR QGPARIYLRALGK STYNCEYIK+KKC+SGPC L +SA G (SEQ ID NO:91)

40

MKIPAMMSLLLLVSVGLRDGVQVQSYSSISQLDIFSQETPLDMPASFDDQYAGCLADMTAA  
LPDLNHSEFQANKVYADGWAQANNQWQERRAWGSVWGSPLP--PSPP--GFRDEHGVALLA  
YTANSPLHKEFNAAVREAGRSRAHYLHHFSFKTLHFLLTEALQLLRS-HRSRGCQQVYRG  
VHGLRFRPAGPGATVRLGGFASASLKNVAAQQFGEDTFFGIWTCLGAPIRGYSFFPEEEEE  
VLIPPFETFQVINTSRPTQGPARIYLRALGKRSTYNCEYIKEKKCRSGPCWLGSSAPG (SEQ ID NO:92)

NAHMGVS (SEQ ID NO:93)

QARMGIS (SEQ ID NO:94)

NGRMGVS (SEQ ID NO:95)

HIFSNDEKSYSTSIKS (SEQ ID NO:96)

HLFSNDEKSYSTSIKS (SEQ ID NO:97)

HIFTNDEKSYSSSLKS (SEQ ID NO:98)

IYGGADSWGYFEN (SEQ ID NO:99)

IYGGDSWAYFDN (SEQ ID NO:100)

LYGIDSWGYFDN (SEQ ID NO:101)

GFSISNARMG (SEQ ID NO:102)

GFSASNTRMG (SEQ ID NO:103)

GFSISNLRMA (SEQ ID NO:104).

LFSNDEK (SEQ ID NO:105)

IFSNEDEK (SEQ ID NO:106).

GRIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:107)

ARIYAADSWGYFDN (SEQ ID NO:108)

IRAYGGDSWLYFDN (SEQ ID NO:109)

### 【 0 1 2 1 】

#### 例示的な態様

本開示は、抗ヒトART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1の活性を阻害するポリペプチドをコードする核酸配列に機能的に連結されている異種プロモーターを含む発現カセットを含む単離細胞を提供し、該抗体、該その抗原結合断片、または該ポリペプチドは、第3の相補性決定領域（CDR）に機能的に連結されている第2のCDRに機能的に連結されている第1のCDRを含む可変重鎖領域；および／または第3のCDRに機能的に連結されている第2のCDRに機能的に連結されている第1のCDRを含む可変軽鎖領域を有する。CDR中の配列は、SEQ ID No.21～23、28～30、35～36、42～44、66～68、もしくは81のいずれか、または1、2、3、4、もしくは5個の置換を有する配列を含むことができる。一態様では、置換の大多数またはすべては保存的置換である。一態様では、重鎖または軽鎖は、限定されないが、SEQ ID No.24～27、31～34、38～41、45～47、51～63、71～74、もしくは76～79のうちの1つ、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10個の置換を有する配列を含む1つまたは複数のフレームワーク領域を含むことができる。一態様では、置換の大多数またはすべて保存的置換である。一態様では、重鎖または軽鎖は、限定されないが、SEQ ID No.24～27、31～34、38～41、45～47、51～63、71～74、もしくは76～79のうちの1つ、またはそれらに対して少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む1つまたは複数のフレームワーク領域を含むことができる。一態様では、細胞は哺乳動物細胞、例えば、霊長類細胞またはげっ歯類細胞、例えば、CHO細胞である。一態様では、細胞はヒト細胞である。

10

20

30

40

50

## 【0122】

ヒトART1の活性を阻害する抗ヒトART1モノクローナル抗体をコードする核酸配列を含むハイブリドーマも提供され、該抗体は、第3のCDRに機能的に連結されている第2のCDRに機能的に連結されている第1のCDRを含む可変重鎖領域；および／または第3のCDRに機能的に連結されている第2のCDRに機能的に連結されている第1のCDRを含む可変軽鎖領域を有する。CDR中の配列は、SEQ ID No.21～23、28～30、35～37、42～44、66～68、もしくは81のいずれか、または1、2、3、4、もしくは5個の置換を有する配列を含むことができる。一態様では、置換の大多数またはすべては保存的置換である。一態様では、重鎖または軽鎖は、限定されないが、SEQ ID No.24～27、31～34、38～41、45～47、51～63、71～74、もしくは76～79のうちの1つ、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10個の置換を有する配列を含む1つまたは複数のフレームワーク領域を含むことができる。一態様では、重鎖または軽鎖は、限定されないが、SEQ ID No.24～27、31～34、38～41、45～47、51～63、71～74、もしくは76～79のうちの1つ、またはそれらに対して少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む1つまたは複数のフレームワーク領域を含むことができる。

10

## 【0123】

ヒトおよび／またはマウスART1に結合するIg重鎖または軽鎖の少なくとも可変領域をコードするヌクレオチド配列に機能的に連結されているプロモーターを含む単離された核酸がさらに提供され、該鎖は、第3のCDRに機能的に連結されている第2のCDRに機能的に連結されている第1のCDRを含む可変重鎖領域；および／または第3のCDRに機能的に連結されている第2のCDRに機能的に連結されている第1のCDRを含む可変軽鎖領域を含む。CDR中の配列は、SEQ ID No.21～23、28～30、35～36、42～44、66～68、もしくは81、または1、2、3、4、もしくは5個の置換を有する配列のいずれかを含むことができる。一態様では、置換の大多数またはすべては保存的置換である。一態様では、重鎖または軽鎖は、限定されないが、SEQ ID No.24～27、31～34、38～41、45～47、51～63、71～74、もしくは76～79のうちの1つ、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10個の置換を有する配列を含む1つまたは複数のフレームワーク領域を含むことができる。一態様では、重鎖または軽鎖は、限定されないが、SEQ ID No.24～27、31～34、38～41、45～47、51～63、71～74、もしくは76～79のうちの1つ、またはそれらに対して少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む1つまたは複数のフレームワーク領域を含むことができる。

20

30

## 【0124】

抗体またはその抗原結合断片が、第3のCDRに機能的に連結されている第2のCDRに機能的に連結されている第1のCDRを含む可変重鎖領域；および／または第3のCDRに機能的に連結されている第2のCDRに機能的に連結されている第1のCDRを含む可変軽鎖領域を有する、ヒトおよびマウスART1に結合する単離抗体またはその抗原断片も提供される。CDR中の配列は、SEQ ID No.21～23、28～30、35～36、42～44、66～68、もしくは81、または1、2、3、4、もしくは5個の置換を有する配列のいずれかを含むことができる。一態様では、置換の大多数またはすべては保存的置換である。一態様では、重鎖または軽鎖は、限定されないが、SEQ ID No.24～27、31～34、38～41、45～47、51～63、71～74、もしくは76～79のうちの1つ、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10個の置換を有する配列を含む1つまたは複数のフレームワーク領域を含むことができる。一態様では、重鎖または軽鎖は、限定されないが、SEQ ID No.24～27、31～34、38～41、45～47、51～63、71～74、もしくは76～79のうちの1つ、またはそれらに対して少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む1つまたは複数のフレームワーク領域を含むことができる。

40

## 【0125】

50

ART1の阻害剤、例えば、抗ヒトART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1に結合するポリペプチドは、インビボで用いることができる。一態様では、有効量の抗ヒトART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1に結合するポリペプチドを含む組成物が哺乳動物に投与される、哺乳動物において癌を阻害または処置するための方法が提供される。一態様では、癌は、肺癌、結腸癌、黒色腫、膠芽腫、乳癌、または結腸直腸癌である。一態様では、哺乳動物はヒトである。一態様では、量は、腫瘍負荷を減少させること、転移を阻害すること、生存を延ばすこと、またはこれらの任意の組み合わせに有効である。一態様では、組成物は全身的に投与される。一態様では、哺乳動物は化学療法薬も投与される。一態様では、哺乳動物は免疫チェックポイント阻害剤が投与される。一態様では、抗体の重鎖またはその断片はIgG重鎖である。一態様では、抗体の軽鎖またはその断片はIgκ軽鎖である。一態様では、断片は、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、または単一ドメインである。一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチドは、第3のCDRに機能的に連結されている第2のCDRに機能的に連結されている第1のCDRを含む可変重鎖領域；および／または第3のCDRに機能的に連結されている第2のCDRに機能的に連結されている第1のCDRを含む可変軽鎖領域を有する。CDR中の配列は、SEQ ID No.21～23、28～30、35～36、42～44、66～68、もしくは81、または1、2、3、4、もしくは5個の置換を有する配列のいずれかを含むことができる。一態様では、置換の大多数またはすべては保存的置換である。一態様では、重鎖または軽鎖は、限定されないが、SEQ ID No.24～27、31～34、38～41、45～47、51～63、71～74、もしくは76～79のうちの1つ、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10個の置換を有する配列を含む1つまたは複数のフレームワーク領域を含むことができる。一態様では、重鎖または軽鎖は、限定されないが、SEQ ID No.24～27、31～34、38～41、45～47、51～63、71～74、もしくは76～79のうちの1つ、またはそれらに対して少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む1つまたは複数のフレームワーク領域を含むことができる。

10

20

#### 【0126】

一態様では、哺乳動物においてART1媒介性免疫抑制を予防する、阻害する、または処置する方法が提供される。該方法は、有効量の抗ヒトART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1に結合するポリペプチドを含む組成物を哺乳動物に投与する工程を含む。一態様では、組成物は全身的に投与される。一態様では、哺乳動物は、化学療法薬および／または放射線療法も投与される。一態様では、哺乳動物は免疫チェックポイント阻害剤が投与される。一態様では、抗体の重鎖またはその断片はIgG重鎖である。一態様では、抗体の軽鎖またはその断片はIgκ軽鎖である。一態様では、断片はFab'またはscFvである。一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチドは、第3のCDRに機能的に連結されている第2のCDRに機能的に連結されている第1のCDRを含む可変重鎖領域；および／または第3のCDRに機能的に連結されている第2のCDRに機能的に連結されている第1のCDRを含む可変軽鎖領域を有する。CDR中の配列は、SEQ ID No.21～23、28～30、35～36、42～44、66～68、もしくは81、または1、2、3、4、もしくは5個の置換を有する配列のいずれかを含むことができる。一態様では、置換の大多数またはすべては保存的置換である。一態様では、重鎖または軽鎖は、限定されないが、SEQ ID No.24～27、31～34、38～41、45～47、51～63、71～74、もしくは76～79のうちの1つ、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の置換を有する配列を含む1つまたは複数のフレームワーク領域を含むことができる。一態様では、重鎖または軽鎖は、限定されないが、SEQ ID No.24～27、31～34、38～41、45～47、51～63、71～74、もしくは76～79のうちの1つ、またはそれらに対して少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む1つまたは複数のフレームワーク領域を含むことができる。

30

40

#### 【0127】

有効量の抗ヒトART1抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトART1に結合するポリペプチドを含む組成物を哺乳動物に投与する工程を含む、癌を有する哺乳動物において免

50

疫応答を増強するための方法も提供される。一態様では、組成物は全身的に投与される。一態様では、哺乳動物は、化学療法薬および／または放射線療法も投与される。一態様では、哺乳動物は免疫チェックポイント阻害剤が投与される。一態様では、抗体の重鎖またはその断片はIgG重鎖である。一態様では、抗体の軽鎖またはその断片はIgκ軽鎖である。一態様では、断片はFab'またはscFvである。一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチドは、第3のCDRに機能的に連結されている第2のCDRに機能的に連結されている第1のCDRを含む可変重鎖領域；および／または第3のCDRに機能的に連結されている第2のCDRに機能的に連結されている第1のCDRを含む可変軽鎖領域を有する。CDR中の配列は、SEQ ID No.21~23、28~30、35~36、42~44、66~68、もしくは81、または1、2、3、4、もしくは5個の置換を有する配列のいずれかを含むことができる。一態様では、置換の大多数またはすべては保存的置換である。一態様では、重鎖または軽鎖は、限定されないが、SEQ ID No.24~27、31~34、38~41、45~47、51~63、71~74、もしくは76~79のうちの1つ、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の置換を有する配列を含む1つまたは複数のフレームワーク領域を含むことができる。一態様では、重鎖または軽鎖は、限定されないが、SEQ ID No.24~27、31~34、38~41、45~47、51~63、71~74、もしくは76~79のうちの1つ、またはそれらに対して少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む1つまたは複数のフレームワーク領域を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0128】

本発明を以下の非限定的実施例によって説明する。

【実施例】

【0129】

#### 実施例1

ART1が異なる表現型特徴に寄与するかどうかを決定するために、shRNAを使用して、マウスKRAS<sup>G12D</sup>/+/p53<sup>-/-</sup>細胞株(KP1)においてART1発現をノックダウンした。免疫適格性マウスにおける、尾静脈注射誘導性肺腫瘍モデルと皮下注射側腹部腫瘍モデルの両方で、ART1のノックダウンおよび酵素阻害の際に腫瘍負荷の有意な減少が認められた。KP1尾静脈モデルでは、ART1ノックダウンは、マウスの腫瘍進行の制御および長期生存(およそ50%)に関連しており(p<0.001)、PD-1抗体を使用した免疫チェックポイント遮断(ICB)で見られるものより優れている。腫瘍増殖に対するART1ノックダウンのこの効果はヌードマウスおよびCD8枯渇マウスで有意に抑止され、ART1は免疫介在性機構を通じて作用する可能性があることが示唆される。ART1は、CD8+T細胞、特に組織常在性メモリーT細胞(Trm)でP2RX7を特異的にMARする可能性がある。P2RX7は、T細胞、マクロファージ、および樹状細胞のアポトーシス細胞死を媒介する、細胞溶解性ATP受容体である。細胞ストレスまたは細胞死および細胞外NAD<sup>+</sup>の放出の際に、T細胞の表面でのP2RX7のMARは、NAD誘導性細胞死(NICD)と呼ばれる現象である、長期の受容体活性化、Ca<sup>2+</sup>流入、およびT細胞アポトーシスをもたらす。したがって、T細胞でのP2RX7のART1誘導性MARにより、ART1に富む癌細胞が、T細胞アポトーシスを誘導することによりそれらに対するT細胞免疫応答を鈍らせることが可能になり得ることが仮定された。実際に、細胞死および炎症の間に放出されるNAD<sup>+</sup>は、細胞外ADPリボシル化を通じて細胞傷害性CD8<sup>+</sup>T細胞の恒常性維持を調節することが以前に示された。マウスモデルにおける肺浸潤CD8<sup>+</sup>T細胞集団のRNAseqによって、本発明者らは、マウスの尾静脈注射後に、腫瘍負荷とともに、P2RX7の相対的発現が、CD8+T細胞中で増加すること(p<0.001)、およびP2RX7+CD8<sup>+</sup>T細胞が優先的にADPリボシル化されることを示した。インビボでは、dox誘導性shRNAを使用して、癌細胞中のART1発現が高いほど活性化された肺浸潤CD8+T細胞の割合が低くなることが示された。ART1過剰発現ヒト腫瘍において同様の発見が観察され、ART1がより低い隣接する肺よりもCD103+/P2RX7+CD8+Trm細胞の割合が低いことが見出された。マウスモデルでは、癌細胞におけるART1発現の抑止が腫瘍浸潤P2RX7+/CD8+およびCD103+/CD8+(

Trm) T細胞の有意な富化につながる事が観察された。さらに、ART1のノックダウンの際に、KP1埋植腫瘍マウスにおいて、活性化されたCD103+/P2RX7+樹状細胞(DC)の有意な富化があることが観察された。

#### 【0130】

ART1発現癌細胞と腫瘍免疫微小環境の間の複雑な関係性を研究した。細胞外の酵素標的として、ART1は創薬可能性が高いはずである。小分子アルギニン類似体、例えば、抗生物質のノボジオシン、MIBG(安全なノルエピネフリン類似体イメージング剤)、および非特異的PARP阻害剤(例えばEB-47)によって、MARを遮断することができる。これらの薬物は、酵素活性部位でNAD<sup>+</sup>と競合し、マウスモデルまたは非標的患者集団において抗癌作用を有することが示されている。ART1過剰発現腫瘍は、ICBと同様に、治療用モノクローナル抗体で標的化することができる。ART1発現癌細胞でART1に結合し、ADPリボシル化を阻害するヒト化治療用モノクローナル抗体(22C12)が開発された(実施例2および3を参照されたい)。予備的なデータによって、22C12で腫瘍内処置した場合に、対照抗体と比較して、マウスKP1側腹部腫瘍の激しい低減(約59%)が示された。この低減は、腫瘍内のP2X7R+CD8<sup>+</sup>T細胞およびP2RX7+CD103+DCの有意な富化と関係があった。

10

#### 【0131】

ART1の治療的標的化のための機構および適切な状況を研究した。ART1発現が細胞ストレスによってアップレギュレートされ、その酵素活性がNAD<sup>+</sup>の放出によって高まる可能性があり、これらの両方は、一般に使用される細胞傷害性療法後に生じる。したがって、処置後の腫瘍のART1発現の増加は、化学療法、放射線療法、または免疫チェックポイント遮断(ICB)と組み合わせたART1の治療的阻害の基礎をなす可能性がある。

20

#### 【0132】

##### 実施例2

癌の処置のための、ART1、すなわち細胞外モノADPリボシルトランスフェラーゼを標的にする治療抗体の開発

ART1またはその機能の特異的に阻害する抗体は、例えば、ART-1を過剰発現するNSCLC患者において、ART1を発現する、例えば過剰発現する癌における標的治療剤として使用して、播種細胞の免疫介在性破壊を助長することによって癌の転移性伝播を制限することができる。細胞外の酵素標的として、ART1は創薬可能性が高い。ART1抗体は、細胞傷害性化学療法または免疫チェックポイント阻害剤との併用療法として、使用することができる。

30

#### 【0133】

一態様では、抗体は、マウスART1とヒトART1の両方に対して反応性である。ART1、基質タンパク質、および標識されたNAD<sup>+</sup>を利用して、抗体をモノADPリボシル化の阻害剤について酵素的にスクリーニングする。インビトロでの好中球およびリンパ球細胞傷害性アッセイを利用して、潜在的な治療用抗体を試験する。インビトロでは、ART1の治療的遮断は、ART1発現肺癌細胞に対する免疫細胞の細胞傷害性を助長する。特に、マウスおよびヒトの乳癌モデルならびに臨床検体ならびにヒト結腸直腸癌検体において、ART1発現(および同様の表現型)が観察された。したがって、抗ART1抗体は幅広い抗癌適応範囲を有する。

40

#### 【0134】

ART1に対する機能的ヒト化抗体を生成するために、HEK293哺乳動物細胞で産生され、精製された組換えヒトおよびマウスART1を使用して、ヒト免疫グロブリンレパートリーでトランスジェニックマウスを免疫化した。免疫化および試験採血分析後に、脾臓を採取し、骨髓腫融合パートナーと融合して、ハイブリドーマを生成した。

#### 【0135】

最初に、精製されたヒトART1でコーティングされたELISAプレート上で、ハイブリドーマ上清をスクリーニングした。陽性ウェルのハイブリドーマ細胞を後に回復させるために凍結した。次いで、蛍光性のNAD<sup>+</sup>の読み出しによって、抗ヒトART1陽性のハイブリ

50

ドーマ上清を、精製されたヒトART1の阻害について試験した。このアッセイは、ART1によるヒストンタンパク質のADPリボシル化で消費されるNAD<sup>+</sup>を測定する。

#### 【0136】

抗ART1ハイブリドーマ上清を、HEK293細胞において一過的に発現させたヒトART1の阻害についても試験した。ART2について以前に記載されている（Krebs et al.）この方法は、次いでフローサイトメトリーを使用して抗エテノ抗体で検出されるNAD<sup>+</sup>類似体（エテノ-NAD<sup>+</sup>）を介して、細胞表面ADPリボシル化を確認する。2つのハイブリドーマ上清（融合ウェル22C12および14G01）は、生化学的アッセイおよび細胞ベースのアッセイでヒトART1の阻害について陽性であった。次いで、22C12および14G01由来の上清は、ELISAによるmoART1への結合および精製されたマウスART1の阻害について

10

#### 【0137】

ハイブリドーマのサブクローニングならびにクローン22C12および14G01の拡大後、表面プラスモン共鳴法（SPR）による効力のランク付けおよび親和性の決定のために、ハイブリドーマ上清から抗体を精製した。クローン22C12および14G01から精製された抗体をSPR抗Fcチップで捕獲し、精製されたヒトおよびマウスART1を指定の濃度で分析物として使用した（図12）。

20

#### 【0138】

細胞ベースの機能アッセイにおいて効力を決定するために、クローン22C12および14G01から精製された抗体を指定の濃度のhuART1を一過的にトランスフェクトしたHEK293細胞とインキュベートしてから、エテノ-NAD<sup>+</sup>で処理した。次いで、フローサイトメトリーによって細胞表面ADPリボシル化を確認し、これを使用して、IC<sub>50</sub>値を計算した（図13）。mAb 22C12および14G01由来の結合親和性およびインビトロ効力のデータを表1にまとめる。

#### 【0139】

（表1）リード候補mAbに関する結合親和性およびインビトロ効力のデータ

| クローン  | KD ヒトART1 (SPR) | KD マウス ART1 (SPR) | IC <sub>50</sub> 細胞表面ADPリボシル化 |
|-------|-----------------|-------------------|-------------------------------|
| 22C12 | 161 pM          | 439 pM            | 14 nM                         |
| 14G01 | 4 nM            | 6 nM              | 28nM                          |

30

pM：ピコモル濃度

nM：ナノモル濃度

#### 【0140】

例示的なART1抗体配列：

22C12 VH（ヒト）

40

50

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLANIFSNDEKSYSTSLKSRLTISK  
DTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARIYGGDSWGYFDNWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1)

#### 22C12 VK (マウス)

QIVLTQSPAISASLGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSL  
TISSMEAGDAATYYCQQWSSNPFTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:2)

#### 14G01 VH (ヒト)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRISTSGFTNYNPSLKSRTMSVD  
SSKNQFSLKLSSSLTAADTAVYYCARDGWGRVFDIWGLGTMVTVSS (SEQ ID NO:3)

#### 14G01 VK (ヒト)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT  
LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:4)

赤色：IMGTの命名法に従ってCDRを標識した。

【0141】

#### 実施例3

##### ART1は抗腫瘍T細胞の生死のバランスを傾ける

P2X7受容体のモノADPリボシル化後のNAD誘導性細胞死によるT細胞の排除は、組織免疫の恒常性を維持するための調節機構を構成する。本開示は、非小細胞肺癌において、モノADPリボシルトランスフェラーゼ1、すなわちART1を過剰発現する腫瘍細胞は、この機構を勝手に利用して、局所微小環境においてP2X7受容体陽性CD8 T細胞を排除することによって、免疫介在性制御を免れることを示す。新規なモノクローナル抗体を用いたART1の治療的標的化は、肺癌のマウスモデルにおいて腫瘍制御を改善した。

【0142】

特に、ART1は肺腺癌の大多数で強く発現していること、およびその膜での発現が、ART1陰性腫瘍と比較して低いCD8 T細胞浸潤と関係があることが見出された。NSCLCのマウスモデルでは、ART1の遺伝子的小および薬理的標的化が、免疫不全マウスではなく免疫適格性マウスで腫瘍増殖を阻害し、かつ免疫適格性マウスの腫瘍においてP2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞の浸潤を増加させることが示された。インビトロ実験によって、P2X7R<sup>-/-</sup>マウスではなく野生型マウスから単離したCD8 T細胞がART1媒介性ADPリボシル化およびNICDを優先的に受けやすいことが確認された。P2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞による、NAD<sup>+</sup>を分解するADPリボシルシクラーゼCD38の発現は、ART1媒介性ADPリボシル化およびNICDを低減した。ART1媒介性NICDは、NSCLCおよび他の癌における免疫耐性の機構である。

【0143】

#### 序論

免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) は、単独で、または化学療法と組み合わせて、標的化可能な分子変化がない進行性非小細胞肺癌 (NSCLC) の患者において、標準的ケアになってきている (Mok et al., 2019; Reck et al., 2016)。しかし、腫瘍のPD-L1発現が高い患者の多くを含めて、肺癌患者の大多数は、ICIに応答しないか、またはICIからの長期の利益を経験しないかのいずれかである (Gandhi et al., 2018; Gandini et al., 2016)。したがって、ICIへの応答を予測する他の確固たるバイオマーカーを特定すること、および免疫療法に対する肺癌の一次および獲得耐性の機構を理解することが緊急に必要である。

【0144】

ヒトでは、ADP-リボシルトランスフェラーゼ-1 (ART1) は、肺を含めた健康な組織で、低レベルで発現している。ART1は、細胞外触媒ドメインを有するGPIアンカー酵素である。したがって、ART1は、局所微小環境において細胞外タンパク質をモノADPリボシル化し、それらの機能を変化させることができる (Stevens et al., 2009; Okazaki et al., 1994; Balducci et al., 1999)。肺癌におけるART1の発現は研究されていないが、以前の研究によって、結腸直腸癌および膠芽腫においてART1タンパク質発現の増加が示唆されており、高発現は予後不良と関係があった (Yang et al., 2013)。結腸直腸癌のマウスモデルでは、ART1発現は、上皮間葉転換の増加、細胞増殖性シグナリング、および血管新生の増加をとまなう、より侵攻性の表現型を促進することが示された (Yang et al., 2013; Song et al., 2016)。しかし、腫瘍のART1発現が、免疫微小環境との腫瘍のクロストークを調節することができるかどうかは決定されていない。

10

#### 【0145】

ADPリボシルトランスフェラーゼのよく説明されている標的の中には、P2X7受容体 (P2X7R、遺伝子id:P2RX7) がある。P2X7Rは、2型プリン受容体ファミリーのATP作動性陽イオンチャネルであり、細胞外ATPに親和性が低く、炎症促進経路を活性化 (Burnstark & Knight, 2004)。これは、T細胞を含めた複数の免疫細胞サブセットで発現しており、その発現は、炎症反応および抗腫瘍免疫に必須である (Adinolfi et al., 2015; Haag et al., 2007)。P2X7Rは癌細胞で過剰発現している可能性もあり、ここで腫瘍進行を促進する可能性がある。しかし、NSCLCでは、P2X7Rの高発現は、全生存および無増悪生存の改善と関係があった (Boldrini et al., 2015)。組織損傷、腫瘍発生、または炎症などの病的状態では、サイトゾルのNAD<sup>+</sup>が局所細胞外環境中に放出され、ここで、細胞外ADPリボシルトランスフェラーゼが基質としてこれを使用して、P2X7RへのADP-リボースの移行を触媒することができる (Haag et al., 2007)。この共有結合的修飾は、P2X7Rの恒常的活性化をもたらし、大きな孔の形成、制御されないカルシウム流入、およびホスファチジルセリンの外在化を誘発し、これが、NAD誘導性細胞死 (NICD) として公知であるプロセスにつながる (Scheuplein et al., 2009)。典型的には、細胞外NAD<sup>+</sup>の濃度は低く、活性化された免疫細胞ならびに癌細胞で発現しているADPリボシルシクラーゼCD38によって嚴重に調節される (Sandoval-Montes & Santos-Argumedo, 2005; Chen et al., 2018)。しかし、CD38の存在下でさえ、細胞外NAD<sup>+</sup>の濃度は、ストレスを受けたかまたは死にかけている細胞からの急速な放出に続いて高まる可能性がある (Haag et al., 2007)。前臨床研究では、T細胞のART媒介性NICDは、炎症組織中のナイーブおよびバイスタンダーT細胞を除去するための恒常性維持機構として提唱されている (Adriouch et al., 2007)。ごく最近、NICDは、幅広い免疫調節機能を有するCD4調節性T細胞 (CD4 Treg) および肺腫瘍における存在が予後良好と関係があった組織常在性メモリーT細胞 (TRM) の恒常性維持を調節することが示された (Stark et al., 2018; Nizard et al., 2017)。これらの前臨床研究は、NICDを介した免疫モジュレーションにおけるADP-リボシルトランスフェラーゼ-2 (ART2) の役割を識別する。ART2は、マウスリンパ球で発現しており、ここで、ART2は、P2X7R媒介NICDをシスで自己ADPリボシル化することができる。しかし、ヒトでは、ART2遺伝子は未成熟終止コドンを含み、これにより偽遺伝子になるが、ART1、ART3、ART4、およびART5のような他のARTは、転写的に活性である。

20

30

40

#### 【0146】

本明細書において開示されるように、ART1はヒト肺癌細胞の表面で発現しており、その発現はP2X7R<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞の肺腫瘍浸潤の低減と関係がある。肺癌および黒色腫の前臨床モデルでは、腫瘍細胞のART1発現は、CD8<sup>+</sup> T細胞媒介性腫瘍制御からの逃避を促進する。治療用モノクローナル抗体によるART1遮断は、免疫適格性マウスにおいてART1発現腫瘍の増殖および播種を低減し、活性化されたP2X7R<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞の腫瘍浸潤を促進した。全体的に見て、本データは、ART1腫瘍発現は免疫耐性の独自の機構であること、およびART1はT細胞媒介性腫瘍拒絶反応を増強するための実行可能な標的であることを示唆する。

50

## 【0147】

## 結果

ART1はヒトNSCLCで発現しており、CD8 T細胞浸潤の低減と関係がある

ヒトNSCLC株A549およびH1650ならびに良性の気管支上皮細胞株（BEAS2B）において、免疫蛍光によりART1発現を評価した。腫瘍細胞株は、細胞表面（図14A～B）および全細胞ART1（図14A、図19A）の不均一な発現があった。両方の腫瘍細胞株は、BEAS2B細胞よりも細胞表面／全細胞発現の比が高かった（それぞれ59.5%および55.4%対29.2%、図14C）。ステージI～IIIの肺腺癌の40人の患者からの腫瘍およびマッチする正常な肺組織におけるRT-qPCRによるART1遺伝子発現の分析によって、癌試料における有意に高い平均発現が示され、これは、発現が著しく高い一部分の腫瘍によって引き起こされた（図14D）。注目すべきことに、マッチする腫瘍は、GPIアンカーの切断を調節する唯一のよく特徴づけられた哺乳動物ホスホリパーゼであるグリコシルホスファタジリノシトール特異的ホスホリパーゼD1（GPLD1）の発現も有意に低かった（図19B）。細胞結合性GPLD1は、細胞表面からGPIアンカータンパク質を放出することができ、発現は、肺癌細胞においてストレスでダウンレギュレートされることが示されており、腫瘍細胞は良性細胞よりも細胞表面上にART1を保持する可能性が高いことが示唆される。

10

## 【0148】

ART1タンパク質発現を決定するために、免疫組織化学によって、493個のステージI肺腺癌からなる組織マイクロアレイ（TMA）をART1発現について分析した。癌細胞におけるART1の染色は、それぞれ、腫瘍の55%、42%および3%で、強、中程度、および弱であった（図19Cおよび表2）。

20

## 【0149】

大部分は、癌細胞におけるIHCによるART1発現は細胞質内に散在しているが、細胞周辺および膜（膜性）近くに集中した染色が腫瘍の10%で特定された（図14Eおよび表3）。コホートの3.7%のみを構成した珍しい腫瘍である、粘液状組織サブタイプを有する腫瘍は他の組織サブタイプと比較して、膜性ART1を発現する可能性が特に高かった（44%対8.4%）。CD3、CD8、CD4、およびFoxP3 T細胞、CD20（B細胞）、CD56（ナチュラルキラー（NK）細胞）、ならびにCD68またはCD163（マクロファージ）の浸潤についても腫瘍をスコア化した（表4）。全体的なART1染色強度と免疫細胞浸潤の間に相関はなかった（表2）。しかし、膜性ART1染色のある腫瘍は、細胞質内に散在するART1のみを有する腫瘍と比較して、CD8 T細胞浸潤が低い可能性が有意に高かった（72%対44%、図19F、表3）。

30

## 【0150】

次に、cBioportalプラットフォームを使用して、肺腺癌コホート（TCGA、PanCancer Atlas）由来のトランスクリプトームデータを分析して、ART1腫瘍発現がCD8 T細胞の細胞傷害性と関係がある遺伝子；IFN $\gamma$ （IFNG）、グランザイムA（GZMA）、グランザイムB（GZMB）、パーフォリン1（PRF1）41BB（TNFRSF9）、ならびに免疫調節と関係がある遺伝子；CTLA-4（CTLA4）、PD-1（PDCD1）、Tim-3（HAVCR2）、Lag-3（LAG3）、およびTigit（TIGIT）の差次的発現と関係があるかどうかを評価した。クラスターリングとともにcBioportals OncoPrintを使用してヒートマップを作成し、これは、高いART1 mRNA発現はCD8 T細胞の細胞傷害性遺伝子および免疫調節遺伝子の低い発現と関係があることを示した（図14G）。個々の遺伝子の分析によって、ART1<sup>高</sup>腫瘍を有する患者は、ART1<sup>低</sup>腫瘍を有する患者と比較して、IFNG、GZMA、TNFRSF9、CTLA4、PDCD1、およびTIGITのmRNA発現が有意に低減していることが示された（図19D）。

40

## 【0151】

ART1腫瘍発現はマウスの肺腫瘍モデルにおいて免疫耐性を発揮する

ART1発現がT細胞媒介性拒絶反応から腫瘍を保護するという仮説を試験するために、ART1過剰発現NSCLCのマウスモデルを開発した。誘導性KRAS<sup>G12D/+</sup>/p53<sup>-/-</sup>マウス

50

(KP1-ART1<sup>OE</sup>)に元々由来するKP1細胞中にART1プラスミドを導入した。親の野生型KP1株は、ベースラインでART1の細胞表面発現のレベルが低いが、操作されたKP1-ART1<sup>OE</sup>株は、IFによって、細胞あたりでART1の表面発現のおよそ9倍の増加を示した(図20A)。ART1発現をモジュレートするために、KP1-ART1<sup>OE</sup>細胞を、ART1を標的にするドキシサイクリン誘導性低分子ヘアピン型RNA(shRNA)(shART1)で形質導入した。ドキシサイクリン誘導性ART1ノックダウンは、癌細胞自体のART1の細胞表面発現(図20A)と腫瘍細胞表面標的のADPリボシル化の両方を著しく低減した(図20B)。KP1-ART1<sup>OE</sup>細胞の増殖は、ART1ノックダウンによる影響を受けないままであった(図20C)。

#### 【0152】

インビボで腫瘍増殖に対するART1発現の効果を試験するために、免疫適格性野生型マウスおよびT細胞欠乏性ヌードC57BL/6マウスにKP1-ART1<sup>OE</sup>細胞を皮下接種した。各群のマウスの半分にドキシサイクリンを与えて、インビボでART1ノックダウンを誘導し、腫瘍検体の免疫蛍光染色によってこれを確認した(図20D)。免疫適格性マウスでは、KP1-ART1<sup>OE</sup>側腹部腫瘍は急速に増殖したが、ドキシサイクリン誘導性ART1ノックダウンは、側腹部腫瘍増殖を有意に遅らせた(図15A、左パネル)。T細胞欠乏性ヌードマウスでは、KP1-ART1<sup>OE</sup>側腹部腫瘍は野生型マウスと同様の増殖速度を有していた。しかし、腫瘍増殖に対するART1ノックダウンの効果は免疫適格性マウスでのみ抑止され、ART1の腫瘍促進効果はT細胞依存的であり得ることが示唆される(図15A、右パネル)。次に、同所性肺腫瘍モデルにおけるART1の過剰発現の役割を研究した。

#### 【0153】

KP1-ART1<sup>OE</sup>肺腫瘍を生成するために、KP1-ART1<sup>OE</sup>細胞を尾静脈に注射し、マウスのコホートにドキシサイクリンを与えて、インビボでART1ノックダウンを誘導した(図15B)。ART1ノックダウンは、ヘマトキシリン-エオジン(H&E)染色された肺切片の小結節頻度カウントによって評価した場合、14日目に肺腫瘍負荷の有意な低下をもたらした(図15C)。16日目および25日目に、フローサイトメトリーによって肺のCD8 T細胞浸潤を決定した。腫瘍注射後25日目では、ART1ノックダウンが誘導されたマウスは、ART1発現腫瘍を担持するマウスよりも、全肺腫瘍浸潤白血球(CD45+細胞)中のCD8 T細胞の頻度が有意に高かった(図15D)。肺腫瘍浸潤CD8 T細胞のパーセンテージは、対照マウスにおいて、16日目と比較して25日目に減少し、これは、腫瘍進行と関係がある免疫制御の喪失と矛盾がない。第2の免疫適格性マウス腫瘍モデルにおいて腫瘍進行におけるART1の役割を試験するために、ヒト黒色腫が、Human Protein AtlasにおいてART1を強く発現することが示されることから、黒色腫株を選択した。B16-F10マウス黒色腫細胞は内因性のART1細胞表面発現が高く、CRISPR/Cas9および2つの異なるガイドRNAを使用して、ART1陰性誘導体を作り出した(図21A~B)。同系免疫適格性マウスにおけるART1発現B16-F10細胞の皮下注射は、急速に増殖する側腹部腫瘍の形成をもたらすが、ART1欠乏性B16-F10細胞は、著しく害された腫瘍増殖を示すか、または触知可能な腫瘍を形成することができないことが観察された(図21C)。インビボでのART1欠乏性B16-F10細胞の増殖が害されたことは、インビトロで、ART1欠乏性細胞がART1発現B16-F10細胞よりも速く増殖ので、癌細胞自体の適応性の低下が理由ではなかった(図21D)。

#### 【0154】

ART1遮断は肺腫瘍負荷を低減し、P2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞の浸潤を促進する

ART1を標的化する22C12モノクローナル抗体を使用して、表面ART1を標的にする治療剤を研究した。治療抗体候補は、最初に、ヒトART1を利用したヒト免疫グロブリンレパートリーでのAlivaMab(登録商標)マウスのトランスジェニックマウスの免疫化を通じて開発した。ヒトART1とマウスART1の両方に結合し、モノADPリボシル化を阻害する候補抗体をさらに開発した(図22A~B)。一次スクリーニングアッセイにおいてART1の酵素活性を強力に阻害するリード候補、22C12をさらに開発した。マウス軽鎖(22C12(mLC))およびヒト軽鎖(22C12(HuLC))を有する22C12抗体クローン

10

20

30

40

50

を生成し、これをインビトロおよびインビボで活性について試験した。ART1をトランスフェクトしたHEK293細胞 (HEK-ART1<sup>OE</sup>) への22C12抗体の結合をNAD-Gloアッセイによって決定し、0.8~1.5 nMの範囲内の最大半量結合 (EC<sub>50</sub>) 値が示された (図22C)。フローサイトメトリー染色によって、KP1-ART1<sup>OE</sup>細胞への22C12の結合を評価した (図22D)。22C12抗体によるADPリボシル化の最大半量阻害 (IC<sub>50</sub>) は、HEK-ART1<sup>OE</sup>細胞の細胞表面ADPリボシル化によって決定した場合、4.5 nM抗体濃度に達した (図22E)。22C12 Abが癌細胞誘導性モノADPリボシル化を遮断する能力が、NAD<sup>+</sup>と共培養したKP1-ART1<sup>OE</sup>細胞で確認された (図22F)。腫瘍ナীবマウスにおいて22C12抗体の全身投与の潜在的な毒性を、3週間にわたって3日ごとの25 mg/kgのi.p.注射によって評価し、ベースラインで、および研究の終了まで毎週、体重減少および血中グルコースレベルについてモニターした。マウスは、研究全体を通して、外観、活動、歩行、および敏捷性が正常なままであった (図22G~H)。22C12のインビボでの抗腫瘍活性を試験するために、皮下に埋植したKP1-ART1<sup>OE</sup>側腹部腫瘍に、22C12抗体またはアイソタイプサブクラスがマッチする対照抗体 (5 mg/kg) の腫瘍内注射を行い、これは、腫瘍が触知可能になったとき (11日目) に開始した。注射は、23日目まで3日ごとに繰り返した。25日目に、マウスを殺し、腫瘍を秤量した (図23A~C)。ART1遮断は、アイソタイプ対照抗体で処置した腫瘍と比較して、腫瘍増殖を有意に遅らせ (図23B)、25日目の平均腫瘍重量は、アイソタイプ対照抗体と比較して、22C12で処置したマウスにおいて有意に低かった (図23C)。次に、同所性KP1-ART1<sup>OE</sup>肺腫瘍モデルにおいてART1遮断の抗腫瘍効果および免疫モジュレーション特性を評価するために研究を設計した。腫瘍注射後6日目に開始して18日目まで、22C12抗体 (25 mg/kg) または等価用量のアイソタイプ対照抗体でマウスに腹腔内処置した (図16A)。19日目に、マウスの肺を固定し、H&Eで染色して、肺腫瘍負荷を評価し、アイソタイプ処置マウスと比較して、22C12抗体で処置したマウスにおいてより少なく有意に小さな腫瘍小結節が示された (図16B~D)。第2の肺腫瘍モデルにおける観察を確認するために、ルイス肺癌 (LLC1) 細胞における内在性の表面ART1発現を評価した (図20A)。LLC1同所性肺腫瘍モデル (図16Aと同様の処置ストラテジー) において、ART1遮断で処置したマウスは、対照マウスと比較して肺腫瘍負荷が低減した (図23D~E)。

#### 【0155】

次に、消化したKP1-ART1<sup>OE</sup>腫瘍担持肺に対してフローサイトメトリー分析を行って、ART1遮断がCD8 T細胞コンパートメントにおけるP2X7R発現にどのように影響を及ぼすかについて評価した。Ki67発現が評価され、増殖の状態が示され、免疫調節受容体PD-1の発現が評価され、活性化および腫瘍関与が示された。NICDに対するP2X7R+T<sub>RM</sub>の感受性を示す最近の研究を考慮して、ART1遮断が、セントラルメモリー (T<sub>CM</sub>、CD62L+CD44+CD69-)、エフェクターメモリー (T<sub>EM</sub>、CD62L-CD44+CD69-)、およびT<sub>RM</sub> (CD62L-CD44+CD69+) CD8 T細胞を含むP2X7R+メモリーCD8 T細胞サブセットの浸潤を増加させるかどうかを評価した。

#### 【0156】

P2X7R+CD8 T細胞の大多数はKi67を共発現しており、これらが増殖状態にあることが示され、ART1遮断は、P2X7R+Ki67+のパーセンテージは増加させるが、P2X7R-Ki67-CD8 T細胞サブセットのパーセンテージは増加させないことが観察された (図16E)。PD-1はP2X7R+CD8 T細胞のサブセットで共発現しており、ART1遮断後に、P2X7R-とP2X7R+の両方のCD8 T細胞サブセットでPD-1発現のパーセンテージの増加が観察された (図16F)。さらに、肺組織の重量に対して正規化された、P2X7RおよびKi67を発現するCD8 T細胞の絶対数が、対照マウスと比較して、ART1遮断で処置したマウスで増加することが見出された (図16G)。ART1遮断はP2X7R+T<sub>RM</sub>の浸潤を増加させたが、P2X7R+T<sub>EM</sub>およびT<sub>CM</sub>集団は有意に増加しなかった (図16H)。LLC1肺腫瘍モデルにおいてART1遮断後に (図23F)、およびKP1-ART1<sup>OE</sup>同所性肺腫瘍モデルにおいてART1ノックダウン後に (図23G)、P2X7R+CD8 T細胞の富化が観察された。

#### 【0157】

これらの発見によって、腫瘍のART1発現は、腫瘍内のCD8 T細胞をモジュレートすることが示された。したがって、次に、ART1発現によって発揮される腫瘍抵抗性がCD8 T細胞媒介性免疫の抑制に依存しているかどうかを研究した。この目的のために、KP1A RT1<sup>OE</sup>同所性肺腫瘍モデルを用い、モノクローナル抗体の投与によってCD8およびCD4 T細胞をマウス中で枯渇させた。腫瘍注射後6日目に開始して、22C12のi.p.注射によってART1を遮断した(図16I)。腫瘍接種後19日目に肺を採取して、H&E染色によって腫瘍負荷を評価した。肺小結節の定量化において、対照マウスと比較して、ART1遮断で処置したマウスにおいて腫瘍小結節の数の減少が観察されたが、ART1遮断およびCD8またはCD4 T細胞枯渇化抗体で処置したマウスの間に有意差はなかった(図16J~K)。しかし、腫瘍小結節の平均面積の分析によって、CD8の枯渇は、ART1遮断単独で観察された腫瘍小結節サイズの低減を抑止するが、CD4 T細胞の枯渇は、ART1遮断によって誘導される抗腫瘍効果を有意に変えないことが示された(図16J、L)。CD8 T細胞へのART1媒介性抗腫瘍効果の依存性が、異なる腫瘍モデルにわたって適用可能であったかどうか確認するために、B16-F10 ART1ノックアウトモデルにおいて、CD8/CD4枯渇研究を行った(図24)。同系免疫適格性マウスにおけるART1発現B16-F10細胞(B16対照)の皮下注射は、急速に増殖する側腹部腫瘍の形成をもたらすことが観察された。B16対照腫瘍を担持するマウスにおいて、CD8およびCD4枯渇は、アイソタイプ対照抗体を受けたマウスと同様の腫瘍進行をもたらした(図24A、上部パネル、24B)。ART1欠乏性B16-F10(B16<sup>ART1KO</sup>)細胞を接種したマウスは、著しく害された腫瘍増殖を示すか、または触知可能な腫瘍を形成することができなかった(70日目で3/7マウスが腫瘍なし)。B16<sup>ART1KO</sup>腫瘍を担持するマウスでは、CD8 T細胞の枯渇は、アイソタイプ対照抗体で処置したB16<sup>ART1KO</sup>腫瘍を担持するマウスと比較して、より高い腫瘍負荷および生存の有意な低減をもたらした。CD4 T細胞の枯渇を受けたマウスは、CD8枯渇マウスと比較して腫瘍増殖が遅くはあるが腫瘍を発生し、アイソタイプ対照で処置した動物と比較して生存に有意差はなかった(図24A、下部パネル、24B)。

10

20

30

40

50

【0158】

CD8 T細胞におけるP2X7R発現により、CD8 T細胞はART1媒介性NICDを受けやすくなる

細胞外NAD<sup>+</sup>の増加を特徴とする急性炎症組織では、P2X7Rを発現するCD8 T細胞はNICDによって排除される。しかし、肺癌における抗腫瘍免疫に対するCD8 T細胞のP2X7R発現の重要性は、十分に説明されていない。肺腫瘍の進行の間にわたってマウスのCD8 T細胞中でP2RX7発現が変化するかどうかを評価した。この目的のために、低レベルのART1を発現する野生型KP1細胞を同所接種したマウスの肺および脾臓から単離したCD8 T細胞に対してRNAシーケンシング分析を行った。腫瘍接種後7および17日目に単離されたCD8 T細胞ならびにナイーブな非腫瘍担持マウス肺由来のCD8 T細胞において、P2RX7ならびにCD8 T細胞の細胞傷害性および免疫調節と関係がある遺伝子の遺伝子発現を評価した。P2RX7発現、ならびにIFNG、PRF1、PDCD1、CTLA4、HAVCR2、LAG3、およびTIGITは、ナイーブマウスの肺から単離したCD8 T細胞と比較して、KP1の注射後7日目にKP1腫瘍負荷を有するマウスの肺から単離したCD8 T細胞において中程度に増加し、17日目に著しく増加した(図25A~B)。脾臓由来CD8 T細胞では同様の発現変化が観察されなかったため、P2RX7発現の観察された変化は肺常在性CD8 T細胞に限定されているように思われた(図26)。野生型KP1腫瘍担持マウス由来のCD8 T細胞の集団におけるP2X7Rの表面発現の増加が、フローサイトメトリーによって確認された(図25C)。

【0159】

ART1の遺伝子的または薬理的阻害後にP2X7R+CD8 T細胞が肺腫瘍組織中で富化されたという発見に照らして、P2X7RがART1媒介性ADPリボシル化および肺腫瘍浸潤T細胞のNICDの標的であるかどうかを評価した。この目的のために、インビトロ共培養アッセイを確立し、野生型KP1腫瘍担持マウス肺から単離したT細胞を組換えマウスART1(rART1)ありまたはなしでインキュベートした。qPCRによってT細胞がART1を発

現しないことが確認され、NAD-GloアッセイによってrART1の酵素活性が確認された。フローサイトメトリーによって検出可能なエテノタグが付いたNAD<sup>+</sup> (eNAD) を共培養に加えて、ADPリボシル化された細胞を特定し、一方で、DAPI (4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール) 染色を使用して、細胞死を測定した。ART2遮断ナノボディ (s+16a) を使用して、マウスリンパ球で発現し、T細胞の自己ADPリボシル化をシスで媒介することができるART2を遮断した。22C12モノクローナル抗体を使用して、表面ART1を遮断した。ART2およびART1遮断抗体がADPリボシル化を阻害する能力を、T細胞をeNADのみの存在下で培養する実験で確認した。ART2の遮断は、 $70.1 \pm 8.8\%$  から  $12.9 \pm 2.6\%$  へのCD8 T細胞および  $54.6 \pm 9.6\%$  から  $9.3 \pm 7.2\%$  へのCD4 T細胞のADPリボシル化の低減をもたらした。ART1遮断は、CD8 T細胞のADPリボシル化にもCD4 T細胞のADPリボシル化にも影響を及ぼさなかった。CD38遮断抗体 (NIMR-5) を使用して、CD38の発現が、隣接した微小環境からの遊離NAD<sup>+</sup>を異化することによって、細胞保護的を果たすことができるかどうかを評価した。

10

#### 【0160】

P2X7Rを介したNICDに対するCD4+調節性T細胞 (CD4 Treg) の感受性を示す以前の研究(22)を考慮して、CD4 Treg、CD4 Tconv細胞、およびCD8 T細胞において、ならびにT細胞サブセットのP2X7R+画分およびP2X7R-画分において別々に、ADPリボシル化とNICDを別々に分析した (図17)。平均P2X7R発現は、CD8 T細胞について  $9.3 \pm 2.4\%$ 、CD4 Tconvについて  $21.6 \pm 3.9\%$ 、およびCD4 Tregについて  $80.8 \pm 2.6\%$  であった。

20

#### 【0161】

陽性eNAD染色によって表される全ADPリボシル化 (図17B) を評価した。rART1との共培養は、P2X7R-またはP2X7R+CD4 Tconv細胞サブセットのいずれのADPリボシル化も有意に増加させなかったが、P2X7R-およびP2X7R+CD4 Tregの両方とも、rART1の存在下で、有意により多くADPリボシル化された。CD38遮断は、rART1の存在下で、P2X7R-およびP2X7R+CD4 TconvとCD4 Tregの両方のADPリボシル化を有意に増加させた。P2X7R-CD8 T細胞ではなくP2X7R+CD8 T細胞がART1媒介性ADPリボシル化を受けやすく、これは、CD8遮断抗体の存在下で増加した。共培養へのART1遮断抗体 (22c12) の添加は、CD8 T細胞ならびにCD4 TconvおよびCD4 TregのART1媒介性ADPリボシル化をベースラインレベルまで低減した (図17B)。NICDを測定し、これは、eNADおよびDAPIの両方について陽性に染色された細胞の頻度によって決定した (図17C)。P2X7R-CD8 T細胞ではなくP2X7R+CD8 T細胞がART1媒介性NICDを受けやすく、これは、CD38遮断によって悪化した。ART1遮断は、P2X7R+CD8 T細胞のNICDをベースラインレベルまで低減した。CD4 Tconv細胞について低いNICDレベルを検出したが、CD4 TregのNICDは、主にP2X7R+サブセットにおいて、rART1の存在下で有意に上昇し、ART1遮断の際にベースラインレベルまで低減した。P2X7R+CD8 T細胞に対するその効果と対照的に、CD38遮断は、P2X7R+CD4 TregのART1媒介性NICDを低減した (図17C)。

30

#### 【0162】

まとめて、本データは、CD8 T細胞およびCD4 Tregは、P2X7Rを介して、ART1媒介性ADPリボシル化およびNICDを受けやすいことを示す。rART1およびCD38遮断薬との共培養後のP2X7R-CD4 Tregの、ならびに比較的程度は低いP2X7R-およびP2X7R+CD4 Tconv細胞の有意なADPリボシル化は、これらの細胞にさらなる標的が存在し、これは、CD38発現の非存在下で、ART1によってADPリボシル化を受けやすいことを示す。しかし、P2X7R+CD8 T細胞で観察された、ART1媒介性NICDに対するCD38の細胞保護的な役割は、P2X7R+ Tregでは逆転した。

40

#### 【0163】

ART1媒介性NICDに対するCD8 T細胞とCD4 Tconv細胞の感受性の違いは、P2RX7スプライス変異体P2RX7-aおよびP2RX7-kの相対的発現の違いによって説明することができることが仮定され、P2RX7-kは、P2RX7-a変異体と比較して、モノADPリボシ

50

ル化された場合に、NICDを誘発する傾向がより高いことが示されている。この目的のために、KP1腫瘍担持マウス肺から単離したCD8 T細胞およびCD4 Tconv細胞のRNAをP2RX7-aおよびP2RX7-kの発現についてqPCRによって分析した。以前の研究によって示唆されるように、免疫細胞に加えて、腫瘍細胞もP2X7Rを発現することが公知であり、これによって、腫瘍細胞がART1媒介性NICDを受けやすくなる可能性がある。したがって、KP1、B16、およびLLC1マウス腫瘍細胞から単離したRNAをP2RX7スプライス変異体の発現について分析した。KP1腫瘍担持肺から単離したCD8 T細胞、CD4 Tconv細胞は匹敵するレベルのP2RX7-kを発現するが、すべての腫瘍細胞は低レベルのP2RX7-kを発現することが観察された（図26C）。P2RX7-aの発現はCD8 T細胞とCD4 Tconv細胞の両方で低かったが、KP1およびLLC1細胞で発現が検出され、B16細胞では高発現しており、これは、自己ADPリボシル化後にART1発現腫瘍細胞をNICDから保護する可能性がある（図26D）。これらの発見と一致して、増殖アッセイによって、NAD+および／またはART1遮断の存在下で増殖したART1発現腫瘍細胞は、細胞増殖に有意差がないことが示される（図26E～G）。

10

【0164】

ART1発現ヒト肺腫瘍はP2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞の浸潤が低減している

ART1の発現が確認されているヒト肺腫瘍においてP2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞の浸潤がモジュレートされるかどうかを決定した。12個のマッチする肺腺癌および隣接する正常な肺組織検体を、免疫蛍光によってART1発現について染色した。正常肺組織と癌性肺組織の両方で、膜性ART1染色の不均一な発現が観察された。免疫蛍光染色によって、P2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞の浸潤について患者の試料を評価し、これにより、全CD8 T細胞中のP2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞のパーセンテージが、正常な肺組織と比較して肺腫瘍組織で有意に低いことが明らかになった（図18C～D）。正常な肺と腫瘍組織の間のCD8 T細胞におけるP2X7R陽性のパーセント変化および正常な肺と腫瘍組織の間のART1 MFIのパーセント変化の線形回帰分析により、P2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞とART1 MFIの間の明らかな逆相関が明らかになった（ピアソン相関、 $R^2=0.85$ 、 $p<0.0001$ ）（図18E）。さらに、5人の肺腺癌患者からの分離組織に対してフローサイトメトリー分析を行って、CD8 T細胞ならびにそのP2X7RおよびCD38の発現を評価した。全CD8 T細胞中のP2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞のパーセンテージは、隣接する肺組織と比較して腫瘍中で低かった（ $7.1\pm5.6\%$ 対 $19.5\pm14.8\%$ 、 $p<0.05$ ）（図18F～G）。腫瘍浸潤P2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞は高レベルのCD38を発現しており、これは、正常な肺組織と比較して有意に高かった（図18FおよびH）。これらのデータは、ヒト肺癌におけるART1の発現は、マウスモデルと同様に、P2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞による腫瘍浸潤の低下と関係があり、CD38の共発現が、腫瘍微小環境におけるART1媒介性NICDを回避するために必要であり得ることを示す。

20

30

【0165】

考察

腫瘍の免疫構成は、予後および免疫療法に対する応答と関係があり、CD8 T細胞浸潤は、一般に、ICIによって再活性化され得る進行中の抗腫瘍免疫応答の指標として働く。患者の転帰を改善するためには、腫瘍においてCD8 T細胞浸潤およびその機能を調節する因子の理解を進歩させることは重要である。正常組織では、ART媒介性ADPリボシル化およびNICDは、組織損傷または感染後にT細胞の恒常性維持を調節する。しかし、この機構が腫瘍内のCD8 T細胞浸潤の調節に関与しているかどうか、およびARTの発現がヒトの癌において調節不全であるかどうかは、以前に研究されていない。本研究では、ヒト肺癌細胞におけるART1の過剰発現が、生存不良および腫瘍内CD8 T細胞の低減、特に、P2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞サブセットの低減と関係があることが示された。さらに、マウスの腫瘍におけるART1の発現は、免疫適格性マウスでは腫瘍増殖を促進したが、T細胞欠乏性マウスまたはCD8 T細胞の枯渇後では促進せず、かつ腫瘍浸潤P2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞の低減と関係がある。インビトロでは、P2X7R<sup>-</sup>CD8 T細胞ではなくP2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞が、ART1媒介性ADPリボシル化およびNICDを受けやすく、これはCD38の遮断の際に悪化し、潜在的な細胞保護的な役割が示唆された。全体的に見て、これらのデータは

40

50

、腫瘍微小環境におけるCD8 T細胞浸潤の新規な調節因子として、肺癌、およびおそらく他の癌におけるART1発現を特定する。ART1は、免疫介在性腫瘍制御を改善するための実行可能な標的である。細胞外の膜アンカー酵素として、ART1は創薬可能性が高いはずである。本明細書では、ART1誘導性ADPリボシル化に結合し、ART1誘導性ADPリボシル化を阻害するモノクローナル抗体による処置は、前臨床モデルにおいて治療的利益を有し、ART1<sup>+</sup>肺癌の増殖の低減および活性化された増殖性のP2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞の腫瘍浸潤の増加をもたらすことが示された。

【0166】

腫瘍発生におけるモノADPリボシル化の役割についての知識が拡大しているにもかかわらず、ART1は、癌の進行で役割を果たすことがごく最近になって説明された。マウス結腸腺癌のモデルにおいて、Xuらは、ART1の過剰発現は腫瘍増殖を助長するが、ノックダウンは様々な免疫適格性モデルにおいて腫瘍増殖を阻害することを示した。この効果は、インテグリンおよびRhoエフェクターファミリーのメンバーのシス-ADPリボシル化に起因し、その後、細胞遊走の下流のメディエーターに影響を及ぼした。マウス肺癌モデルにおけるART1のノックダウンまたは遮断の抗腫瘍効果は、CD8 T細胞に依存する。インビトロでは、ART1のノックダウンはKP1-ART1<sup>OE</sup>細胞の増殖に影響がなく、実際は、B16マウス黒色腫細胞の腫瘍細胞の増殖を増強し、しかし、免疫適格性マウスではインビボでの腫瘍増殖が害された。したがって、ART1は、モデル依存的であり得る癌細胞固有の効果を有するが、ART1発現の免疫抑制効果は、本インビボモデルにおいて優勢であるように思われる。

【0167】

これらの効果は、CD8 T細胞でのP2X7RのモノADPリボシル化を通じて主に媒介される。P2X7Rの腫瘍発現は、NSCLC患者における生存の改善と関連があるが、CD8 T細胞でのP2X7R発現が生存優位性と関係があるかどうかは不明なままである。前臨床研究によって、腫瘍進行および抗腫瘍免疫におけるP2X7Rの役割の複雑な状況が描かれた。Di Virgilioおよび共同研究者は、B16-F10黒色腫モデルのP2X7R欠乏性マウスにおいて、低CD8 T細胞浸潤と関係がある腫瘍進行の増大を示した。それとは対照的に、野生型腫瘍担持マウスへのP2X7Rアンタゴニストの投与は、腫瘍増殖の低減および免疫活性化の増大をもたらした。これらの一見矛盾した結果は、P2X7Rが、死にかけている癌細胞が放出するATPによる、樹状細胞中のインフラマソームの活性化に必要とされ、これが、抗腫瘍CD8 T細胞のプライミングに必要とされたという事実によって、説明することができる。したがって、P2X7R欠乏性マウスでは、抗腫瘍免疫応答を開始することができない。それとは対照的に、CD8 T細胞のプライミングが既に生じた後のP2X7Rの薬理的阻害は、B16黒色腫細胞が高発現しているART1によって誘導される、P2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞のNICDを予防することができる。本明細書において、確立された腫瘍においてART1を遮断することが、P2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞の浸潤を促進することが示された。

【0168】

機構的研究によって、P2X7R+CD8 T細胞および比較的程度は低いCD4 Tregは、P2X7Rを介してART1媒介性NICDを受けやすいことが示された。ART1媒介性NICDに対してP2X7R+ CD4 Tconv細胞が感受性を欠如していることは興味深い。NICDを誘発する傾向が少ないP2X7R-aスプライス変異体の選択的発現がこの不一致を説明するであろうことが仮定されたが、本発明者らは、腫瘍担持肺から単離したCD4 TconvとCD8 T細胞のどちらにおいても高レベルのこの変異体を検出することができず、P2X7R+CD8 T細胞をART1媒介性NICDに対して独自に感受性にする他の細胞固有の機構が働いている可能性があることが示される。しかし、腫瘍細胞が高レベルのP2X7R-Aを発現するという発見は、腫瘍細胞が、自己ADPリボシル化およびNICDを誘発することなしに、ART1およびP2X7Rを同時に発現することができる機構を示す可能性がある。

【0169】

最近の研究により、再循環メモリーCD8 T細胞におけるP2X7R発現は、ミトコンドリア機能および代謝適応性の細胞外ATP駆動性維持に必須であること、TGFβセンシング

を介したCD8 T<sub>RM</sub>sの生成がP2X7Rに依存していること、およびT<sub>RM</sub>の恒常性維持がP2X7Rを介したNICDによって調節されることが示された。これらの発見と一致して、ART1は、腫瘍担持肺におけるP2X7R+CD8 T<sub>RM</sub>sの浸潤の増加を遮断することが見出された。肺腫瘍浸潤CD8 T細胞はP2X7Rの発現が上昇しており、かつ細胞傷害性マーカーと免疫調節マーカーを共発現するという観察とともに、肺腫瘍に浸潤するP2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞は、抗腫瘍活性を有する、メモリーT細胞の重要な組織常在性サブセットに相当し、これらがART1腫瘍発現によって標的にされる可能性が高い。

#### 【0170】

CD38のT細胞発現も、細胞がNICDを受けるかどうかを決定する上で重要な成分である可能性が高い。CD38は、マウスおよびヒトT細胞で活性化および分化の際にアップレギュレートされ、NAD<sup>+</sup>が豊富な炎症組織においてADPリボシル化およびNICDを回避するための細胞保護機構に相当する可能性がある。本結果は、P2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞および比較的程度は低いP2X7R+CD4 Tregは、ART1媒介性ADPリボシル化およびNICDを受けやすいこと、ならびにCD38遮断は、ART1の存在下で、P2X7R+CD8 T細胞のADPリボシル化およびNICDを増強することを示す。さらに、CD38<sup>+</sup>P2X7R<sup>+</sup>CD8 T細胞のサブセットがART1<sup>+</sup>ヒト肺腫瘍中で富化されることが見出され、CD38発現は、そうでなければ、P2X7Rを介したART1媒介性NICDによって排除されていたであろう抗腫瘍CD8 T細胞のサブセットの生存を可能にし得ることが示唆される。重要なことに、インビトロ実験によって、CD4 TregのART1媒介性NICDがCD38遮断後に抑止されたことが示される。したがって、臨床状況では、CD38遮断によるART1陽性腺癌患者の処置は、CD8 T細胞のNICDを悪化させる一方で、CD4 Tregを保護するという二重の効果を有し、したがって、免疫療法応答および腫瘍拒絶反応と関係があるCD8 T細胞対CD4 Tregの比を歪める可能性がある。

#### 【0171】

これらの発見は、抗腫瘍免疫を増強するためにCD38を標的にする臨床研究の設計に影響がある。T細胞に加えて、CD38は他の免疫細胞およびいくつかの癌細胞が発現し、前臨床研究において、NAD<sup>+</sup>を幅広い免疫抑制機能を有するADPR、すなわちアデノシンの前駆体に変換することによってPD-1/PD-L1遮断に対する獲得耐性に寄与することが示されている。抗CD38抗体ダラツムマブは、臨床試験（NCT03023423）のNSCLC患者において、アテゾリズマブ（抗PD-L1抗体）と組み合わせて最近試験された。この研究は、併用処置アームにおける死亡率の増加により、早期に終了した。この転帰についての理由は不明であるが、抗腫瘍T細胞のNICDの増加が寄与した可能性があるかどうかを考慮することは興味深い。ART1発現は、細胞ストレス後に増加するので、腫瘍におけるその発現は非常に動的であり、TME中の炎症の程度に応じて、および処置に応答して、増減する可能性があることが示された。したがって、ART1の免疫モジュレーション効果は、細胞傷害性作用物質、例えば、化学療法剤および放射線による処置の後にさらにいっそう重要な役割を果たす可能性がある。そのような処置は、細胞死後の細胞外NAD<sup>+</sup>のレベルの増加にも寄与すると考えられ、ART1誘導性モノADPリボシル化のための局所微小環境をプライミングする可能性がある。したがって、細胞傷害性作用物質と免疫療法の組み合わせへの応答に対する実行可能なバリアとしてのART1の役割へのより多くの研究が必要とされる。

#### 【0172】

したがって、NSCLCでは、ART1発現腫瘍細胞はNICDを介して腫瘍浸潤CD8 T細胞を排除する。本発見によって、ART1腫瘍発現は、免疫療法を受ける肺癌患者において予後的小および予想的価値があり得ることが示唆される。ART1の薬理的標的化は、NSCLC患者においてCD8 T細胞媒介性免疫応答を強める可能性がある。

#### 【0173】

#### 材料および方法

統計分析：ヒト患者データ：NSCLC TMAについて、連続変数は、中央値（四分位範囲 [IQR]）として報告され、カテゴリー変数は、カウント（パーセント）として報告さ

10

20

30

40

50

れる。カイ二乗またはフィッシャーの正確確率検定を使用して、独立の群間でカテゴリ変数を比較した。マンホイットニーのU検定を使用して、2つの独立の群間で連続変数を比較した。ウィルコクソン符号順位検定を使用して、対になった試料からの遺伝子発現データの統計的有意差を評価した。対応のあるt検定を使用して、対になった試料における免疫蛍光表面染色によって決定したART1発現の統計的有意差を決定した。ART1発現データは平方根変換し、一方で、組織浸潤免疫細胞のパーセンテージは、検定の根底にある前提が満たされていることを確実にするために、対応のあるt検定による統計的検定より前に対数変換した。ヒト肺腫瘍細胞株におけるART1 MFIの統計的有意差は、多重比較のためにチューキーの検定を用いる一元配置ANOVAによって決定した。

#### 【0174】

マウス実験のデータ：カウント、パーセンテージおよび発現データからなるデータは、指示される場合、ウェルチのt検定による統計的検定より前に、対数変換または平方根変換した。KP1-ART1<sup>OE</sup>腫瘍における誘導性ART1ノックダウンまたはB16-F10腫瘍におけるART1ノックアウトの効果を比較する腫瘍増殖データは、Geisser-Greenhouse補正を用いた反復測定ANOVAによって分析した。混合モデル分析を使用して、ART1遮断抗体またはアイソタイプ対照抗体で処置したマウス間の腫瘍増殖の統計的有意差を決定した。shART1誘導ありまたはなしのKP1細胞およびKP1ART1<sup>OE</sup>におけるART1 MFIの統計的有意差は、多重比較のためにチューキーの検定を用いる一元配置ANOVAによって決定した。すべての統計的検定は両側であり、 $p < 0.05$ で統計学的に有意であるとみなされた。データ分析は、SPSSソフトウェアバージョン25 (IBM Corp.) またはGraphPad Prismバージョン8 (GraphPad) を使用して行った。

#### 【0175】

患者試料の収集および分析：免疫蛍光およびフローサイトメトリー染色ならびにRNA抽出およびqPCR分析のためのヒト肺腺癌試料は、IRBによって承認されたプロトコール (IRB#1008011221) に従って、New York Presbyterian Hospital/Weill Cornell Medical Collegeから得た。ART1に対するIHC染色は、493個のステージI肺腺癌からなるTMAで行った (Suzuki et al., 2013) (一次抗ヒトART1Ab: Santa Cruz、カタログ#sc-20255)。ART1染色の強度および位置について、盲検方式でTMAをスコア化した。ART染色の強度は、(1)陰性、(2)弱、(3)中程度、または(4)強としてスコア化した。染色の位置は、(1)細胞質内、(2)膜性、または(3)細胞質内と膜性の両方としてスコア化した。さらに、腫瘍および間質における免疫細胞サブセット；汎T細胞、CD4 T細胞、CD8 T細胞、Treg、B細胞、およびマクロファージの(1)低、(2)中、または(3)高の浸潤について、マーカー；CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD20、CD56、CD68、およびCD163を使用して、TMAをスコア化した。腫瘍および間質におけるNK細胞の浸潤は、CD56マーカーを使用して、非存在または存在として判定した。スコアリング細胞数のカットオフを表4に記載する。

#### 【0176】

動物：すべての動物研究は、New York Presbyterian Hospital/Weill Cornell Medical Collegeの動物実験委員会によって承認されたプロトコール (IACUC # 2010-0050、2015-0028) に従って行った。野生型C57BL/6マウス (系統：C57BL/6 NTac) および胸腺欠損ヌードマウス (系統：B6.Cg/NTac-Foxn1nu NE10) は、Taconic Biosciencesから購入した。すべてのマウスは、Weill Cornell Medicine動物施設において病原体フリー条件下で維持した。

#### 【0177】

動物腫瘍モデル：インビボでのART1ノックダウンについては、ショ糖 (50 g/Lショ糖中に0.1 mg/mLドキシサイクリン) を含む飲料水でドキシサイクリンをマウスに48~72時間送達してから、KP1-ART1<sup>OE</sup>細胞を注射した。対照動物には、ショ糖のみを含む水を与えた。4日ごとに水を交換した。同所性肺腫瘍モデル： $0.5 \times 10^5$  個のKP1-ART1<sup>OE</sup>細胞を100  $\mu$ lのPBSに再懸濁し、免疫適格性C57BL/6マウス (4~6週齢) の尾静脈に注射した。指定されたエンドポイントにおける肺腫瘍負荷評価については、マウスを

10

20

30

40

50

殺し、腫瘍担持肺の一部をホルマリン固定し、パラフィン包埋し、その後のH&E染色および肺小結節の盲検計数のために切片化した。腫瘍担持肺の残りの部分を秤量し、分離して単一細胞の懸濁液にし、CD8 T細胞の特性評価のためにフローサイトメトリーによって分析するために染色した。異所性側腹部腫瘍モデル：KP1-ART1<sup>OE</sup>、B16対照(Scr-6)、またはB16<sup>ART1KO</sup>細胞を、C57BL/6マウス(50  $\mu$ l PBS中に $1 \times 10^5$ 個の細胞)または免疫不全ヌードマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍が触知可能になった後、デジタルキャリパーで腫瘍径を測定し、式(長さ $\times$ 幅<sup>2</sup>) / 2)によって腫瘍体積を決定した。B16-F10 CRISPR垂系統を使用した側腹部腫瘍モデルでは、一部のマウスは、転移性播種の証拠をとまって、最大腫瘍体積に達する前に死亡することが観察された。指示される場合、腫瘍を切除し、秤量し、免疫蛍光および／またはフローサイトメトリー分析のために処理した。

10

#### 【0178】

CD4およびCD8 T細胞の抗体枯渇CD8およびCD4 T細胞の枯渇については、a-CD8 (クローン：53-6.7、Bioxcell #BP0004-1) およびa-CD4 (クローン：GK1.5、Bioxcell #BP0003-1) 抗体を以下のレジメンに従ってマウスごとにip注射した：1日目および3日目(500ug)、次いで、実験のエンドポイントまで72時間ごと(250ug) (38)。CD8およびCD4枯渇に対する陰性対照として、他の群のマウスに、それぞれInVivoPlusラットIgG2aアイソタイプ対照、抗トリニトロフェノール(クローン2A3、Bioxcell #BP0089) およびInVivoPlusラットIgG2bアイソタイプ対照、抗キーホールリンペットヘモシアニン(クローンLTF-2、Bioxcell #BP0090) をip注射によって与えた。

20

#### 【0179】

腫瘍担持マウスの22C12処置：側腹部腫瘍については、腫瘍内注射は、KP1-ART1<sup>OE</sup>腫瘍が触知可能になった11日目に開始し、腫瘍接種後23日目まで72時間ごとに行った。群「22C12 Ab」に対して5mg/kgのART1抗体クローン22C12を、または群「アイソ対照Ab」に対してマウスIgG1アイソタイプ対照(BioXcell、カタログ#BP0297) をマウスに注射した。72時間ごとに腫瘍サイズを測定し、腫瘍接種後25日目にマウスを

殺し、このときに、腫瘍を秤量し、フローサイトメトリー染色のために処理した。同所性肺腫瘍モデルについては、0日目に、 $0.5 \times 10^5$ 個のKP1-ART1<sup>OE</sup>細胞をマウスにi.v注射した。群「22C12 Ab」に対して25mg/kgのART1抗体クローン22C12を、または25mg/kgのヒト化軽鎖22C12 Ab 22C12 Ab (HuLC1) を、または群「アイソ対照Ab」に対してマウスIgG1アイソタイプ対照(BioXcell、カタログ#BP0297) をマウスに腹腔内(i.p.)注射した。i.p.注射は、示されるように、6日目から開始し、18日目まで72時間ごとに続けた。

30

#### 【0180】

細胞株：ヒト細胞株H1650、A549、BEAS2B、およびHEK293をATCCから得て、37℃の加湿された5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにおいて、10%ウシ胎仔血清(FBS) および1%ペニシリンストレプトマイシンが補充されたRPMI培地中で培養した。マウスNSCLC細胞株KP1は、KRAS<sup>G12D/+</sup>/p53<sup>-/-</sup> (KP1) マウスの肺腫瘍から以前に生成した。マウスLLC1肺癌細胞およびB16-F10黒色腫細胞をATCCから得て、37℃の加湿された5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにおいて、10%FBSおよび1%ペニシリンストレプトマイシンが補充されたDMEM培地中で培養した。

40

#### 【0181】

KP1-ART1<sup>OE</sup>および誘導性ヘアピン型安定細胞株の生成：(i) KP1-ART1<sup>OE</sup>細胞の生成：pLVX-IRES-tdTomatoベクターは、哺乳動物細胞中に形質導入された場合に関心対象のタンパク質とPCMV IE由来のtdTomatoを構成的に共発現するように設計されている。形質導入の前に、Lenti-XTM HTパッケージングシステム(カタログ#632160 および632161, Takara) を使用して、本ベクターをHEK293T細胞中でウイルス粒子にパッケージングした。tdTomatoの存在によって、形質導入体を蛍光顕微鏡によって可視化し、フローサイトメトリーによって選別することが可能になる。このコンストラク

50

ト (pLVX-IRES-td-tomato\_ART1) を使用することによって、ART1遺伝子を過剰発現させた。7ugのレンチウイルスショートヘアピン型コンストラクト (LT3GENIR) およびレンチウイルスパッケージングシステム (Clontech lenti-x single shot) の一過的トランスフェクションによって、293T細胞 ( $6 \times 10^6$ 細胞/100mmプレート) から組換えレンチウイルス (LV) を生成した。48時間および72時間後にLV粒子を採取し、これを0.45  $\mu$ mフィルターを通して濾過し、lenti-x concentrator (clontech) を加えることによって濃縮した。次いで、LVを4°Cで30分間インキュベートし、4°Cで45分間、1,500gで遠心分離した。LV粒子を使用して、4  $\mu$ g/mLのポリブレン (Sigma-Aldrich) の存在下で、サブコンフルエントな細胞培養物に6時間感染させた。tdTomato陽性細胞の選別によって、ART1を発現するウイルス感染細胞の選択を行った。(ii)shART1細胞の生成：shRNA-LT3GENIRコンストラクトを使用して、KP1-ART1<sup>OE</sup>細胞においてART1遺伝子をノックダウンした。カスタム設計したレンチウイルスコンストラクトは、Art1遺伝子を標的にするショートヘアピンを発現し、選択のためのGFP発現を有していた。LVは、前のセクションに記載されているように生成した。培地中で1mg/mLのG418 (ネオマイシン類似体、Sigma-Aldrich) を使用することによって、shRNAを発現するウイルス感染細胞の選択を行った。サイレンシングを誘導するために、細胞は、GFPおよびshRNA発現を誘導する1ug/mlのドキシサイクリンで処理された細胞であった。ART1 shRNAコンストラクト#1、Art1\_87 LT3GENIR。アンチセンスガイド配列

TTTGATGTATTCACAGTTGTAT. (SEQ ID NO:17)

#### 97merコンストラクト

TGCTGTTGACAGTGAGCGATAGACATCTTTTCTCAAGAAATAGTGAAGCCACAGATGTATTTCTTGAGAAA  
AGATGTCTAGTGCCTACTGCCTCGGA (SEQ ID NO:18)

。  
【0182】

B16-F10細胞におけるART1のCRISPR媒介性遺伝子ノックアウト：U6gRNA:CMV-CAS9-2A-tGFPバックボーンのSigma-Aldrichにカスタムメイドの即時使用可能なDNAプラスミドを使用して、B16-F10細胞においてART1のCRISPR/Cas9媒介性ノックアウトを行った。ART1遺伝子のエクソン3中の領域を標的にするgRNAを含む2つのプラスミドを使用して、B16-F10クローンB16<sup>ART1KO</sup> (63-1)

(配列 5'-3': CCTGCGCTTTCGGCCAGCG; SEQ ID NO: 5)

およびB16<sup>ART1KO</sup> (42-1)

(配列 5'-3': CCAACAAAGTATACGCGGA; SEQ ID NO:19)

を作り出した。陰性対照プラスミドを使用して、B16-F10クローンB16対照 (Scr-6)

(配列 5'-3': CGCGATAGCGCAATATATT; SEQ ID NO:20)

を作り出した。手短に言えば、B16-F10細胞を12ウェルプレート中に播種し、48時間時間インキュベートして、80%コンフルエンスにした。各CRISPRプラスミド (0.5  $\mu$ g DNA) を100  $\mu$ lのOpti-MEM培地 (Gibco) 中で3  $\square$ lのTransIT-CRISPR (Sigma-Aldrich) と混合し、室温で30分間インキュベートした。混合物をB16-F10細胞に加え、加湿された5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにおいて、37°Cで24時間インキュベートした。フローサイトメトリー活性化セルソーティング (FACS) を使用して、トランスフェクトされたGFP陽性単一細胞を平底96ウェルプレート中に選別した。クローンを拡大し、フローサイトメトリーおよび免疫蛍光染色によって、ART1の表面発現について試験した (図21)。

【0183】

増殖アッセイ： $1.4 \times 10^4$ 個の細胞を6ウェルプレート中にプレーティングした。細胞をトリプシン処理し、Cellometer細胞カウティングチャンバー（Nexcelom Bioscience）を使用し4日間毎日カウントした。細胞をNAD（ $20 \mu\text{M}$ 、Sigma Aldrich、カタログ#N8285）+/-22C12（ $20 \mu\text{g/ml}$ ）で処理した実験については、エンドポイントまで24時間ごとに、言及された試薬をFBS培地に補給した。

【0184】

細胞免疫蛍光：接着細胞をポリ-D-リジンコーティングカバーガラスにプレーティングし、すべての実験の前に、血清フリー培地で12時間処置した。細胞をPBS-CM（ $1\text{mM MgCl}_2$ 、 $0.1\text{mM CaCl}_2$ ）で洗浄し、3.7%ホルムアルデヒドで5分間固定した（透過化を防止するため）、ブロッキング溶液（ $1 \times \text{PBS}$ 中に5%BSA）とともに $37^\circ\text{C}$ のエアーインキュベーター中で1時間インキュベートした。次いで、1%BSA（ $1 \times \text{PBS}$ 中、「細胞IF抗体緩衝液」と称される）中に溶解した一次抗体ART1（精製されたART1抗体、Pocano、ウサギ#2）（1:200）またはポリ／モノADPriボース（CST、クローン：E6F6AウサギmAbカタログ#83732）（1:200）で、 $37^\circ\text{C}$ のエアーインキュベーター中で1時間細胞を処理した。細胞をPBS-CMで洗浄し、次いで、「細胞IF抗体緩衝液」中に溶解した抗ウサギ蛍光二次抗体1:500（Thermofisher、#A10523）とともに30分間インキュベートした。細胞をPBS-CMで洗浄し、次いで、PBS-CM中で1:1000ヘキスト（ヘキスト3342、Thermofisher）で5分間染色した。PBS-CMで洗浄後、3.7%ホルムアルデヒドで5分間試料を固定した。次いで、試料をPBS中で洗浄し、PBS中で、暗所、 $4^\circ\text{C}$ で保存した。細胞蛍光顕微鏡観察は、冷却電荷結合素子カメラ（Princeton Instruments、Trenton、NJ）を備えたDMIRB倒立顕微鏡（Leica Microsystems、Deerfield、IL）を使用して行った。 $40 \times 1.25$ 開口数対物レンズで画像を収集した。MFIの画像処理および定量化ならびにバックグラウンド除去のためにMetaMorphソフトウェア（Universal Imaging、West Chester、PA）を使用した。

【0185】

NAD<sup>+</sup>による細胞処理：すべての実験の前に、細胞を血清フリー培地でO/N処理した。次いで、dox（Art1 KD）なしもしくはあり、またはArt1遮断抗体（22C12）ありで、用量依存的段階希釈（0~50 $\mu\text{M}$ の範囲）を使用して、NAD<sup>+</sup>（Sigma Aldrich、カタログ#N8285）で細胞を処理した。

【0186】

マウス組織試料の分離：マウスを安楽死させ、右心室を通した10mlの冷却PBSの注射により、腫瘍担持肺を灌流した。肺および皮下腫瘍を切除し、メスを使用して小片に切り刻んだ。肺および腫瘍断片をGentleMACS Cチューブ（Miltenyi、カタログ#130-096-334）に移し、その後、肺分離混合物（Miltenyi、カタログ#130-095-927）およびマウス腫瘍分離混合物（Miltenyi、カタログ#130-096-730）をそれぞれ、製造者の指示書に従って調製した後、チューブに加えた。肺および腫瘍断片を、それぞれプログラム37C\_m\_LDK\_1および37C\_m\_TDK\_1を使用し、gentleMACS Octo Dissociator with heaters（Miltenyi、カタログ#130-095-937）を使用して、酵素的および機械的に消化した。組織ホモジネートを10%FBSが補充されたRPMI1640（Corning、カタログ#15-040-CV）に再懸濁し、 $70 \mu\text{M}$ ストレーナー（Corning、カタログ#431751）を通過させて、単一細胞の懸濁液を得た。細胞をペレットにし、冷却PBS中で1回洗浄した。細胞をペレットにし、RBC Lysis Buffer（eBioscience、カタログ#00-4300-54）の使用液中に再懸濁し、室温で2分間インキュベートした。細胞をPBS中で2回洗浄してから、T細胞の単離またはフローサイトメトリー染色に進めた。

【0187】

フローサイトメトリー用ヒト組織試料の分離：新鮮なNSCLC患者腫瘍および隣接する正常組織を、DMEM+10%FBS+1%p/s中の氷上のOR/Pathから得た。組織を冷却DMEM+10%FBS+1%p/sで2回洗浄し、それぞれ腫瘍および正常物について、以下の酵素カクテル（コラゲナーゼI 50U/mL、コラゲナーゼII 20U/mL、コラゲナーゼIV 50U/mL、Dnase I 50 Kunitz U/mL、エラスターゼ0.075U/mL）が補充されたDMEM中

で切り刻んだ。組織を37℃で30分間消化し、濾過し、4℃で遠心分離して、ペレットを収集して、氷冷のDMEM+10% FBS+1% p/sを含むRBC溶解を使用して不活性化されたAck溶解バッファに、これを再懸濁した。フローソーティング染色のために、ペレットをFACS緩衝液中に再懸濁した。

#### 【0188】

ADPリボシル化およびNICDアッセイ：肺単一細胞懸濁液をペレットにし、MACS緩衝液（0.5% BSA保存液（Miltenyi、カタログ#130-091-376）が補充されたAutoMACS Rinsing溶液（Miltenyi、カタログ#130-091-222））中に再懸濁した。製造者の指示書に従ってPan T Cell Isolation Kit II、マウス（Miltenyi、カタログ#130-095-130）を使用して、磁気ビーズソーティングによって、T細胞の単離を行った。共培養の48時間より前に、マウスART1（10 µg/ml）で予めコーティングされた48ウェルプレートに細胞を4℃で24時間加えた。1×10<sup>6</sup>個のT細胞を100 µM eNAD（Sigma Aldrich、カタログ#N2630）、5 µg/mlの抗ART2.2抗体（s+16a、Biolegend、カタログ#149801）を含む血清フリーRPMI1640培地（Corning、カタログ#15-040-CV）中に再懸濁し、30 µg/mlの抗CD38中和抗体（クローン：NIMR-5、Novus Biologicals、カタログ#NBP2-59506）をウェルに加えたか、加えず、20 µg/ml ART1遮断22C12抗体をウェルに加えたか、加えなかった。細胞を37℃で2時間インキュベートした。穏やかにピペティングすることによってT細胞をプレートから取り出し、染色プレートに移した。T細胞をPEコンジュゲート化抗エテノ-NAD抗体で4℃で30分間染色し（クローン：IG4、Santa Cruz、カタログ#sc-52666）、続いて、FACS緩衝液（2 mM EDTAおよび0.2% BSAが補充されたPBS）中で洗浄し、表面抗体CD3 AF594（Biolegend、カタログ#100240）、CD8a BV605（Biolegend、カタログ#100743）、CD4 APC-Cy7（Biolegend、カタログ#100413）、CD25 AF488（Biolegend、カタログ#102018）、およびP2X7R PE-Cy7（Biolegend、カタログ#148707）で、4℃で20分間染色した。FACSsymphonyアナライザー（BD Biosciences）での取得より10分前に、DAPI（Biolegend、カタログ#422801）を細胞に加えた。FlowJoソフトウェア（FlowJo LLC、Becton Dickinson）を使用して、フローサイトメトリーデータ分析した。

#### 【0189】

ヒトおよびマウス試料のフローサイトメトリー染色：肺腺癌の患者の酵素的に消化した腫瘍組織およびマッチする正常な肺組織に由来する単一細胞懸濁液を、固定可能な生存率色素（eFluor 780）を用いて、PBS中で、4℃で20分間染色した。細胞をFcRブロッキング溶液（Miltenyi、カタログ#130-092-575）中に5分間再懸濁し、続いて、FACS緩衝液中のP2X7R一次抗体（Novus Biologicals、クローン：7G1D6カタログ#NBP2-61748）を4℃で20分間加えた。細胞をFACS緩衝液中で洗浄し、Alexa Fluor（登録商標）488コンジュゲート化ヤギ抗マウスIgG二次抗体（Biolegend、カタログ#405319）中に4℃で20分間再懸濁した。細胞をFACS緩衝液中で洗浄し、フルオロフォアコンジュゲート化表面マーカー抗体のマスターミックス；CD3-Viogreen（Miltenyi、カタログ#130-113-704）、CD8-PerCP-Vio700（Miltenyi、カタログ#103-113-723）、CD38-PE（eBioscience、カタログ#12-0389-42）とともに4℃で20分間インキュベートした。

#### 【0190】

腫瘍担持マウス肺または皮下側腹部腫瘍由来の単一細胞懸濁液を、固定可能な生存率色素（eFluor 780）を用いて、PBS中で、4℃で20分間染色した。最初の研究については、細胞をFACS緩衝液中で洗浄し、フルオロフォアコンジュゲート化表面マーカー抗体のマスターミックス：CD45-BD Horizon V500（BD Biosciences、カタログ#561487）、CD3-eFluor 450（eBioscience、カタログ#48-0031-82）、CD8b-PE-Vio770（Miltenyi、カタログ#130-106-316）、P2X7R-FITC（Miltenyi、カタログ#130-114-221）中に再懸濁した。CD8 T細胞の増殖および活性化を特性評価するためのさらなる研究については、以下のコンジュゲート化抗体のマスターミックス：CD

45-VioBlue (Miltenyi、カタログ#130-110-802)、CD3-FITC (Miltenyi、カタログ#130-119-798)、CD8b-PerCPVio700 (Miltenyi、カタログ#130-111-715)、P2X7R-APC (Miltenyi、カタログ#130-114-330)、CD279 (PD1) -PE (Miltenyi、カタログ#130-111-953)。Ki67 PE-Vio770 (Miltenyi、カタログ#130-120-419) による染色のために細胞を透過処理した。メモリーT細胞集団CD8 T細胞を特性評価するために、分散した細胞を以下のコンジュゲート化抗体のマスターミックス：CD69 PE (Miltenyi、カタログ#130-115-575)、CD3-FITC (Miltenyi、カタログ#130-119-798)、CD8b-PerCPVio700 (Miltenyi、カタログ#130-111-715)、P2X7R-APC (Miltenyi、カタログ#130-114-330)、CD62L-VioBlue (Miltenyi、カタログ#130-112-841)、およびCD44 PE-Vio770 (Miltenyi、カタログ#130-110-085) の中で表面染色した。メモリーCD8 T細胞サブセットを以下、T<sub>CM</sub>：CD62L+CD44+CD69-、T<sub>EM</sub>：CD62L-CD44+CD69-、T<sub>RM</sub>：CD62L-CD44+CD69+のように分類した。表面染色後、ヒトおよびマウス細胞をFACS緩衝液中で洗浄し、IC固定緩衝液 (Invitrogen) を使用して、4℃で30分間固定した。免疫集団の絶対カウントを得るために、30ulのカウンティングビーズ (CountBright (商標) Absolute Counting Beads、0.52×10<sup>5</sup>ビーズ/50ul、Invitrogen #C36950) を加えてから、試料ごとにデータを取得した。絶対カントは、式； $(\text{細胞事象カウント} \times \text{カウンティングビーズ体積}) / (\text{カウンティングビーズ事象カウント} \times \text{細胞体積}) \times \text{カウンティングビーズ濃度}$ を使用して、計算した。染色された試料をMACSQuantアナライザーで取得し、FlowJoソフトウェア (FlowJo LLC、Becton Dickinson) を使用して、フローサイトメトリーデータを分析した。

10

20

#### 【0191】

凍結組織免疫蛍光：マウスおよびバイオマークされた患者の試料をホルムアルデヒド中で固定し、試料が沈むまで30%ショ糖 (PBS中) で維持した。試料をOCTブロック中に包埋し、クリオスタット (Leica) を使用して切片化した。切片を帯電したスライド上に置き、バリアペンで区分し、アセトン中で脱水した。次いで、ブロッキング溶液 (1×PBS中に0.25% Triton -x100+5% FBS) 中で切片を1時間ブロッキングした。一次抗体：抗体緩衝液 (1×PBS中に溶解した5% FBS) 中に溶解した、精製されたART1抗体 (精製されたART1抗体、Pocono、ウサギ#2、1:100)、CD8ポリクローナル抗体 (#PA5-88265、1:100)、P2X7R (P2RX7抗体、カタログ#113544、Biolegend、1:100) ) とともに試料を暗所、4℃で一晩インキュベーションした。精製されたART1抗体 (精製されたART1抗体、Pocono、ウサギ#2、1:100) は、ヒト患者試料のArt1染色のために使用した。ヒト試料のCD8/P2X7R染色のために、以下の抗体：CD8抗体 (YTS105.18) (カタログ#NB200-578 Novus Biologicals、1:100)、およびP2X7/P2RX7抗体 (7G1D6) (NBP2-61748 Novus Biologicals、1:100) を使用した。マッチする腫瘍および正常な肺の複数の切片を染色した。試料をブロッキング溶液中で複数回洗浄し、抗体緩衝液中に溶解したそれぞれの二次抗体 (1:200、各二次抗体) 中で、暗所で1時間インキュベートした。試料をブロッキング溶液中で複数回洗浄し、ヘキスト (ヘキスト3342、Thermofisher、1×PBS中に1:1000) とともに5分間インキュベートした。prolong goldマウント培地 (#P36934、Thermofisher) を使用して、切片をマウントした。切片を暗所、20℃で一晩硬化させた。各一次抗体の特異性を決定するために、二次抗体のみで染色された切片を使用した。蛍光顕微鏡観察は、Zeiss LSM 880レーザー走査型共焦点顕微鏡を使用して行った。各試料の複数の切片から複数の視野を取得した。画像処理、バックグラウンド除去、定量化MFI計算、および細胞のカウントのために、ImageJ (NIH) を使用した。

30

40

#### 【0192】

ウエスタンブロット分析：すべての実験の前に、細胞を血清フリー培地でO/N処理した。次いで、dox (Art1 KD) なしもしくはあり、またはArt1遮断抗体 (22C12) ありで、用量依存的段階希釈 (0~50uMの範囲) を使用して、NAD<sup>+</sup> (Sigma Aldrich、カタログ#N8285) で細胞を処理した。細胞をPBSで洗浄し、1×溶解バッファー (カ

50

タログ#9803、CST)とHalt Protease & Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (カタログ#78442、ThermoFisher)の混合液中で溶解した。細胞を削り取るにより採取し、遠心分離して上清を収集した。免疫ブロット分析のために、細胞タンパク質を10% SDS/PAGEで分離し、ニトロセルロース膜にトランスファーし、ウサギMAR/PAR抗体 (CST #83732、1:1000)でプローブした。MyECLイメージャー (ThermoFisher)を使用して、ブロットを取得した。Pageruler plus着色済みタンパク質ラダー (10~250kDa、#26619、ThermoFisher)を使用して、タンパク質バンドの重量を決定した。

#### 【0193】

定量的RT-PCR分析: RNA抽出 (QIAGEN RNeasy (登録商標) ミニキット) で細胞の全RNAを抽出した。腫瘍細胞株を用いる最初の研究については、RNA to cDNA Eco Dry (商標) プレミックス (ランダムヘキサマー) (カタログ#639546、Takara) を使用して、各ウェルについて500ngの抽出RNAをcDNAに逆転写した。SYBR green マスターミックス (iQ (商標) SYBR (登録商標) Green Supermix、#1708884) を使用して、定量的PCRを行った。ヒトおよびマウス遺伝子に対するプライマー配列を表5に列挙する。C1000サーマルサイクラー (Bio-Rad) を使用してリアルタイムqPCRを行い、Bio-Rad CFX Managerソフトウェアを使用して、相対的定量化を行った。肺由来T細胞、KP1肺由来CD8、KP1肺由来CD4、および腫瘍株 (KP1、LLC1、およびB16) の間でP2X7R、P2X7R-a、およびP2X7R-kのレベルを比較するための研究については、TaqMan-工程qPCR方法を利用した。プライマーは、ThermoFisherのバイオインフォマティクスサポートの助けを借りて設計した。50ng RNAを各ウェルに入れ、「関心対象の遺伝子」に対するFAMコンジュゲート化マウスプライマー [P2X7R (ThermoFisherアッセイID: Mm01199500\_m1、標的化エクソン2~3) またはP2X7R-A (ThermoFisherアッセイID: APXGWX4、標的化エクソン1、カスタムメイド) またはP2X7R-K (ThermoFisherアッセイID: APAAF6U、標的化エクソン1、カスタムメイド)、およびVICコンジュゲート化GAPDHプライマー (ThermoFisherアッセイID: Mm05724508\_g1、標的化エクソン4) を反応混合物 (iTaq Universal Probes One-Step Kit、Biorad #1725141) に加えた。相対的mRNA発現レベルは、 $2^{-\Delta\Delta ct}$  方法を使用して計算し、適切なハウスキーピング遺伝子 (GAPDH) に対して正規化した。

#### 【0194】

RNAシーケンシングおよび遺伝子発現分析: CD8 T細胞をKP1肺腫瘍を担持する未処置マウスから単離し、以前に述べられたように (Markowitz et al., 2018) RNAシーケンシングを行った。様々な処置群および細胞型にわたって選択された遺伝子の遺伝子発現を表示するために、各処置/細胞型に対するFPKMをR (バージョン3.6.2) にインポートした。関数pheatmapを使用して、ヒートマップとして遺伝子発現を表示し、遺伝子発現値は、中央に揃え、各値に対してzスコアを決定することによって、行に沿ってスケール変更した。クラスタリングは、階層クラスタリングを使用して行った。

#### 【0195】

TCGAデータ分析: cBioPortalを使用して、TCGA PanCancer Atlas (www.cbioportal.org) のトランスクリプトームデータを可視化および分析した。503個の肺腺癌試料の遺伝子発現およびOSデータを分析した。試料は、 $\pm 1.0$  のzスコア閾値を使用して、mRNA発現データ (Illumina HiSeq\_RNASeqV2からバッチ正規化) に、ART1<sup>高</sup>およびART1<sup>低</sup>腫瘍に層別化した。

#### 【0196】

NAD-gloアッセイ: NAD/NADH-Glo (商標) アッセイ (#G9071、Promega) キットを使用した。ヒストン (1.5mg/mL)、NAD (200nM) (両方ともキット由来) および組換えART1 (40nM) または変性ART1 (40nM) 酵素 (酵素は、Tri-Institutional Therapeutic Discovery Institute (TDI) の本発明者らの共同研究者によって、クローニング、発現、および精製された) を96ウェル白色不透明底プレートに加え

10

20

30

40

50

た。すべての成分を50  $\mu$ L/ウェルの最終的反応量で1×PBSに加え、振盪機で、37℃で1時間インキュベートし、5分間室温に平衡化した。NAD/NADH-Glo検出試薬は、1mLの再構成されたルシフェリン検出試薬、5  $\mu$ Lの還元酵素、5  $\mu$ Lの還元酵素基質、5  $\mu$ LのNADサイクリング酵素、および5  $\mu$ LのNADサイクリング基質を軽く5回転倒させて混合することによって、調製した。50  $\mu$ L/ウェル上清および50  $\mu$ L/ウェル検出試薬を新しい96ウェル白色ルミノメータープレートに移し、次いで、振盪機で、暗所、室温で30分間インキュベートした。ルミノメーターで試料の発光を読み取った。

【0197】

22C12抗体の開発および特性評価：抗体生成：モノクローナルART1結合および遮断抗体を、ヒト免疫グロブリンレパートリーを含むAlivaMab（登録商標）マウス（Ablexis, LLC）トランスジェニックマウスプラットフォームを利用して調製した。ART1に対する機能的ヒト抗体を生成するために、HEK293哺乳動物細胞で産生された、精製された組換えヒトおよびマウスART1を使用して、AlivaMab（登録商標）マウスを免疫化し、続いて、ハイブリドーマを生成した。TDIによって開発された厳密なスクリーニングファンネルを利用して、望ましい特性を有する抗体を発現する融合脾細胞からのハイブリドーマ上清を特定した。最初に、精製されたヒトART1でコーティングされたプレートを使用するELISAによって、ハイブリドーマ上清をスクリーニングした。次いで、蛍光性のNAD<sup>+</sup>の読み出し（Abcam、カタログab176723）によって、抗ヒトART1陽性のハイブリドーマ上清を、精製されたヒトART1の阻害について試験した。抗ART1ハイブリドーマ上清は、e-NADベースのADPリボシル化アッセイ（Krebs et al., 2003）を使用し、HEK293細胞において一過的に発現させたヒトART1の阻害についても試験した。ハイブリドーマ上清クローン22C12は、生化学的アッセイおよび細胞ベースのアッセイにおいて、ヒトART1の阻害に対して陽性であった。次いで、ELISAおよび精製されたマウスART1の酵素的阻害によって、マウスART1への結合について22C12の上清を試験した。

【0198】

ヒトおよびマウスART1に対する22C12の結合親和性試験：ハイブリドーマのサブクローニングおよびクローン22C12の拡大に続いて、生物発光（BLI）による効力のランク付けおよび親和性の決定のために、ハイブリドーマ上清から抗体を精製した。精製されたマウスおよびヒト軽鎖22C12抗体ならびに精製されたヒトまたはマウスART1の濃度の範囲を使用して、KDを決定した。

【0199】

22C12による表面ADPリボシル化の用量依存的阻害の試験：細胞ベースの機能アッセイにおいて効力を決定するために、e-NADによる処理より前に、精製された22C12抗体をヒトART1を一過的にトランスフェクトしたHEK293細胞とともに様々な濃度でインキュベートした。次いで、フローサイトメトリーによって細胞表面ADPリボシル化を確認し、これを使用して、IC<sub>50</sub>値を計算した。

【0200】

#### 概要

非小細胞肺癌（NSCLC）患者の大多数は、免疫チェックポイント阻害剤から永続性のある臨床応答を達成せず、さらなる抵抗性機構の存在が示唆される。モノADPリボシルトランスフェラーゼ（ART）によって媒介されるP2X7受容体（P2X7R）発現T細胞のNAD誘導性細胞死（NICD）は、炎症組織において免疫の恒常性維持を調節する。ヒト肺腺癌において、膜性ART1腫瘍細胞発現とCD8<sup>+</sup>T細胞浸潤の低減、特に、P2X7R<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞サブセットの低減の間に関連が見出された。マウスNSCLCモデルでは、遺伝子的小および薬理的な抗体媒介性ART1-阻害は、CD8<sup>+</sup>T細胞依存的に腫瘍増殖を遅らせ、活性化されたP2X7R<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の腫瘍浸潤を促進する。インビトロでは、P2X7R<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞はART1媒介性ADPリボシル化およびNICDを受けやすく、これは、NAD<sup>+</sup>分解ADPリボシルシクラーゼCD38の遮断の際に悪化した。ART1媒介性NICDはNSCLCにおいて免疫耐性を提供し、ART1の抗体媒介性標的化は腫瘍制御を改善することができる。

## 【 0 2 0 1 】

（表 2）NSCLC組織マイクロアレイ（TMA）におけるART1染色強度。腺癌組織マイクロアレイの臨床パラメーターおよび免疫細胞スコアリング。表は、ART1染色が強い腫瘍対ART1染色が弱いまたは中程度の腫瘍を比較する。連続変数は中央値（四分位範囲）として報告され、カテゴリ変数は数（パーセント）として報告される。カイニ乗検定またはフィッシャーの正確確率検定（\*\*）をカテゴリ変数の対比較に使用した。マンホイットニーのU検定を連続変数の対比較に使用した。

|                         | ART1 染色強度        |                  | P 値     |
|-------------------------|------------------|------------------|---------|
|                         | 強い (n=257)       | 弱い/中程度 (n=206)   |         |
|                         |                  |                  |         |
| 年齢 (中央値、歳)              | i9.7 (63.7-75.6) | i8.6 (60.1-75.6) | 0.157   |
| 性別 (女性)                 | 167 (65%)        | 123 (60%)        | 0.244   |
| 喫煙 (現在／以前)              | 205 (81%)        | 185 (90%)        | 0.004   |
| パック／年 (中央値)             | 35 (5.5-54.5)    | 42.75 (20-68)    | 0.002   |
|                         |                  |                  |         |
| 病理学的ステージ                |                  |                  |         |
| IA                      | 185 (72%)        | 128 (62%)        | 0.024   |
| IB                      | 72 (28%)         | 78 (38%)         |         |
|                         |                  |                  |         |
| 病理学的特色                  |                  |                  |         |
| 壊死                      | 37 (14.4%)       | 46 (22.3%)       | 0.027   |
| リンパ浸潤                   | 62 (24%)         | 62 (30%)         | 0.149   |
| 血管浸潤                    | 68 (26.5%)       | 62 (30%)         | 0.387   |
| 臓側胸膜浸潤                  | 42 (16.3%)       | 48 (23.3%)       | 0.06    |
|                         |                  |                  |         |
| 主な組織サブタイプ               |                  |                  |         |
| AIS/MIS                 | 6 (2.3%)         | 3 (1.5%)         | 0.737** |
| 鱗状                      | 19 (7.4%)        | 6 (2.9%)         | 0.034   |
| 腺房状                     | 126 (49%)        | 79 (38.3%)       | 0.022   |
| 乳頭状                     | 67 (26%)         | 59 (28.6%)       | 0.537   |
| 微小乳頭状                   | 6 (2.3%)         | 6 (3.9%)         | 0.333   |
| 固形状                     | 23 (8.9%)        | 36 (17.5%)       | 0.006   |
| 粘液状                     | 9 (3.5%)         | 9 (4.4%)         | 0.632   |
| コロイド状                   | 1 (0.4%)         | 6 (2.9%)         | 0.048** |
|                         |                  |                  |         |
| 突然変異状態                  |                  |                  |         |
| 突然変異EGFRまたはKRAS (n=456) | 255              | 201              | 0.026   |
| 野生型 (EGFR- および KRAS -)  | 137 (53.7%)      | 121 (60.2%)      |         |
| EGFR +                  | 55 (21.6%)       | 24 (11.9%)       |         |
| KRAS +                  | 63 (24.7%)       | 56 (27.9%)       |         |
|                         |                  |                  |         |
| 免疫細胞マーカー                |                  |                  |         |
| CD3 (>150 対 ≤150)       | 22 (8.5%)        | 18 (8.8%)        | 0.921   |
| CD4 (>70 対 ≤70)         | 30 (11.7%)       | 36 (17.6%)       | 0.072   |
| CD8 (>150 対 ≤150)       | 28 (11%)         | 26 (12.7%)       | 0.55    |
| CD20 (>70 対 ≤70)        | 23 (9%)          | 18 (8.8%)        | 0.908   |
| FoxP3 (>50 対 ≤50)       | 22 (8.6%)        | 14 (7%)          | 0.5     |
| CD68 (>150 対 ≤150)      | 54 (21%)         | 53 (26%)         | 0.179   |
| CD163 (>150 対 ≤150)     | 21 (8.2%)        | 27 (13.2%)       | 0.083   |
| CD56 (存在対非存在)           | 8 (3%)           | 6 (3%)           | 0.937   |

## 【 0 2 0 2 】

（表 3）NSCLC組織マイクロアレイ（TMA）におけるART1染色の局在。腺癌組織マイクロアレイの臨床パラメーターおよび免疫細胞スコアリング。表は、ART1染色が細胞表面または細胞表面および細胞質に位置する腫瘍対ART1染色が細胞質のみに位置する腫瘍を比較する。連続変数は中央値（四分位範囲）として報告され、カテゴリ変数は数（パーセント）として報告される。カイニ乗検定またはフィッシャーの正確確率検定（\*）

をカテゴリー変数の対比較に使用した。マンホイットニーのU検定を連続変数の対比較に使用した。

|                        | ART1 染色の局在           |                   | P 値    |
|------------------------|----------------------|-------------------|--------|
|                        | 細胞表面／<br>細胞質内 (n=48) | 細胞質内のみ<br>(n=445) |        |
| 年齢 (中央値、年齢)            | 67 (58-77)           | 69 (62-76)        |        |
| 性別 (女性)                | 24 (56%)             | 266 (63%)         | 0.33   |
| 喫煙 (現在／以前)             | 38 (88%)             | 352 (85%)         | 0.51   |
| パック／年 (中央値)            | 45 (17-68)           | 38 (10-60)        | 0.5    |
| 公知の位置で切除               | (n=43)               | (n=420)           |        |
|                        |                      |                   |        |
| <b>病理学的ステージ</b>        |                      |                   |        |
| IA                     | 28 (65%)             | 285 (68%)         | 0.71   |
| IB                     | 15 (35%)             | 135 (32%)         |        |
|                        |                      |                   |        |
| <b>病理学的特色</b>          |                      |                   |        |
| 壊死                     | 10 (23%)             | 73 (17%)          | 0.34   |
| リンパ浸潤                  | 10 (23%)             | 114 (27%)         | 0.58   |
| 血管浸潤                   | 11 (26%)             | 119 (28%)         | 0.7    |
| 臓側胸膜浸潤                 | 5 (12%)              | 85 (20%)          | 0.17   |
|                        |                      |                   |        |
| <b>主な組織サブタイプ</b>       |                      |                   |        |
| AIS/MIS                | 1 (2%)               | 8 (2%)            | 0.59*  |
| 鱗状                     | 2 (5%)               | 23 (5.5%)         | 1*     |
| 腺房状                    | 19 (44%)             | 186 (44.5%)       | 1*     |
| 乳頭状                    | 3 (7%)               | 123 (29.5%)       | 0.001* |
| 微小乳頭状                  | 0                    | 14 (3%)           | 0.63   |
| 固形状                    | 8 (19%)              | 51 (12%)          | 0.23   |
| 粘液状                    | 8 (19%)              | 10 (2%)           | <0.001 |
| コロイド状                  | 2 (5%)               | 5 (1%)            | 0.13*  |
|                        |                      |                   |        |
| <b>突然変異状態</b>          |                      |                   |        |
| 野生型 (EGFR- および KRAS -) | 27 (67.5%)           | 231 (55.5%)       | 0.091  |
| EGFR +                 | 2 (5%)               | 77 (18.5%)        |        |
| KRAS +                 | 11 (27.5%)           | 108 (26%)         |        |
|                        |                      |                   |        |
| <b>免疫細胞マーカー</b>        |                      |                   |        |
| CD3 (>150 対 ≤150)      | 4 (%)                | 36 (9%)           | 0.88   |
| CD4 (>70 対 ≤70)        | 5 (11.5%)            | 61 (14.5%)        | 0.59   |
| CD8 (>50 対 ≤50)        | 12 (28%)             | 190 (56%)         | 0.026  |
| CD20 (>70 対 ≤70)       | 5 (11.5%)            | 36 (9%)           | 0.52   |
| FoxP3 (>50 対 ≤50)      | 3 (7%)               | 33 (8%)           | 1*     |
| CD68 (>150 対 ≤150)     | 8 (19%)              | 99 (24%)          | 0.44   |
| CD163 (>150 対 ≤150)    | 4 (9.5%)             | 44 (10%)          | 1*     |
| CD56 (存在対非存在)          | 1 (2%)               | 13 (3%)           | 0.77   |

10

20

30

40

50

【 0 2 0 3 】

(表 4) NSCLC組織マイクロアレイの免疫細胞スコアリング

| 細胞マーカー                | 浸潤スコア   | 細胞数カットオフ |
|-----------------------|---------|----------|
| 腫瘍と間質の両方におけるCD3カウント   | 1 (低)   | <50      |
|                       | 2 (中)   | 51-150   |
|                       | 3 (高)   | >150     |
| 腫瘍と間質の両方におけるCD4カウント   | 1 (低)   | <20      |
|                       | 2 (中)   | 21-70    |
|                       | 3 (高)   | >70      |
| 腫瘍と間質の両方におけるCD8カウント   | 1 (低)   | <50      |
|                       | 2 (中)   | 51-150   |
|                       | 3 (高)   | >150     |
| 腫瘍と間質の両方におけるCD20カウント  | 1 (低)   | <20      |
|                       | 2 (中)   | 21-70    |
|                       | 3 (高)   | >70      |
| 腫瘍と間質の両方におけるFoxP3カウント | 1 (低)   | <20      |
|                       | 2 (中)   | 21-50    |
|                       | 3 (高)   | >50      |
| 腫瘍と間質の両方におけるCD68カウント  | 1 (低)   | <50      |
|                       | 2 (中)   | 51-100   |
|                       | 3 (高)   | >100     |
| 腫瘍と間質の両方におけるCD163カウント | 1 (低)   | <50      |
|                       | 2 (中)   | 51-100   |
|                       | 3 (高)   | >100     |
| 腫瘍と間質の両方におけるCD56カウント  | 0 (非存在) | 非存在      |
|                       | 1 (存在)  | 存在       |

10

20

【 0 2 0 4 】  
（表 5 ） qPCR 分析 に 使用 さ れ る プ ラ イ マ ー

30

40

50

| qPCR用マウスプライマー      |                                                |
|--------------------|------------------------------------------------|
| プライマー名             | プライマー配列 (5'→3')                                |
| mART1 プライマー 2 REV  | TTG ATG ACC AGT ATG CTG GCT (SEQ ID NO:8)      |
| mART1 プライマー 2 FWD  | TTG TTG GCC TGA AAG TCT GAG (SEQ ID NO:9)      |
| mART1 プライマー B4 REV | CAG CGT CCT TTG ATG ACC AG (SEQ ID NO:10)      |
| mART1 プライマー B4 FWD | CCA CTG ATT GTT GGC CTG AG (SEQ ID NO:11)      |
| mGAPDH REV         | AAT GTG TCC GTC GTG GAT CT (SEQ ID NO:12)      |
| mGAPDH FWD         | GGT CCT CAG TGT AGC CCA AG (SEQ ID NO:13)      |
| GFP FWD            | AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC (SEQ ID NO:14) |
| GFP REV            | CTT GTA GTT GCC GTC GTC CTT GCC (SEQ ID NO:15) |
|                    |                                                |
|                    |                                                |
| qPCR用ヒトプライマー       |                                                |
| プライマー名             | プライマー配列 (5'→3')                                |
| ヒト ART1 REV        | AGA AGA GGT CTC GTC GTG TGA SEQ ID NO:85)      |
| ヒト ART1 FWD        | GAT GCC TGC TAT GAT GTC TCT G (SEQ ID NO:86)   |
| ヒト GAPDH REV       |                                                |
| ヒト GAPDH FWD       |                                                |

【 0 2 0 5 】

実施例 4

結果

ART1 (Art1 KO) は、ガイドRNAを使用して、B16-F10 黒色腫細胞中でCRISPR/Cas9を使用してノックアウトした (図31A~B)。「63-1KO」B16細胞においてArt1をKOすると、細胞培地に細胞外NAD<sup>+</sup>を加えた場合に、シス-adpリボシル化の阻害があった。同様に、シス-ADPリボシル化は、細胞外NAD<sup>+</sup>と22C12抗体で共処理した場合に、B16-F10「Scr対照6」細胞においても大きく阻害された (図31C)。同系免疫適格性マウスへのART1発現「Scr対照6」B16-F10細胞の皮下注射は、急速に増殖する側腹部腫瘍の形成をもたらしたが、22C12で腫瘍内処置したART1欠乏性B16-F10「63-1KO」腫瘍および「Scr対照6」B16-F10腫瘍は、腫瘍増殖の有意な遅延を示した (図31D)。

【 0 2 0 6 】

表面ART1発現がマウス肺癌株LLC1で観察された (図32A)。LLC1細胞は、これらの細胞の表面上のART1レベルと矛盾なく、22C12にインビトロで結合した (図32B)。LLC1細胞を細胞外NAD<sup>+</sup>と22C12で共処理することによる表面Art1の酵素活性のインビトロ遮断は、シス-ADPリボシル化シグナルを部分的に遮断した (図32C)。

【 0 2 0 7 】

腫瘍が触知可能になった7日目を開始して、皮下に埋植したLLC1側腹部腫瘍中への22

C12抗体 (5mg/kg) または等価用量のアイソタイプ対照抗体の腫瘍内注射を行った。注射は、25日目まで3日ごとに繰り返した。ART1遮断は、アイソタイプ対照抗体で処置した腫瘍と比較して腫瘍増殖を有意に低減することが観察された (図32D)。

【0208】

#### 方法

##### 細胞株

B16およびLLC1細胞株をATCCから得て、37℃の加湿された5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにおいて、10%ウシ胎仔血清 (FBS) および1%ペニシリンストレプトマイシンが補充されたRPMI培地中で培養した。B16-F10細胞におけるART1のCRISPR媒介性遺伝子ノックアウト: U6gRNA:CMV-CAS9-2A-tGFPバックボーンのSigma-Aldrichにカスタムメイドの即時使用可能なDNAプラスミドを使用して、B16-F10細胞におけるART1のCRISPR/Cas9媒介性ノックアウトを行った。ART1遺伝子のエクソン3中の領域を標的にするgRNAを含む2つのプラスミドを使用して、B16-F10クローンB16<sup>ART1KO</sup> (63-1)

(配列5'-3': CCTGCGCTTTTCGGCCAGCG; SEQ ID NO:5)

およびB16<sup>ART1KO</sup> (42-1)

(配列5'-3': CCAACAAAGTATACGCGGA; SEQ ID NO:6)

を作り出した。陰性対照プラスミドを使用して、B16-F10クローンB16<sup>対照</sup> (Scr-6) (配列5'-3': CGCGATAGCGCGAATATATT; SEQ ID NO:7) を作り出した。手短に言えば、B16-F10細胞を12ウェルプレート中に播種し、48時間時間インキュベートして、80%コンフルエンスにした。各CRISPRプラスミド (0.5 μg DNA) を100 μlのOpti-MEM培地 (Gibco) 中で3 μlのTransIT-CRISPR (Sigma-Aldrich) と混合し、室温で30分間インキュベートした。混合物をB16-F10細胞に加え、加湿された5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにおいて、37℃で24時間インキュベートした。フローサイトメトリー活性化セルソーティング (FACS) を使用して、トランスフェクトされたGFP陽性単一細胞を平底96ウェルプレート中に選別した。クローンを拡大し、フローサイトメトリーおよび免疫蛍光染色によって、ART1の表面発現について試験した (図31A~B)。

【0209】

##### 細胞免疫蛍光

接着細胞をポリ-D-リジンコーティングカバーガラスにプレーティングし、すべての実験の前に、血清フリー培地で12時間処置した。細胞をPBS-CM (1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>) で洗浄し、3.7%ホルムアルデヒドで5分間固定した (透過化を防止するため)、ブロッキング溶液 (1×PBS中に5%BSA) とともに37℃のエアーインキュベーター中で1時間インキュベートした。次いで、1%BSA (1×PBS中、「細胞IF抗体緩衝液」と称される) 中に溶解した一次抗体ART1 (精製されたART1抗体、Pocono、ウサギ#2) (1:200) で、37℃のエアーインキュベーター中で1時間細胞を処理した。細胞をPBS-CMで洗浄し、次いで、「細胞IF抗体緩衝液」中に溶解した抗ウサギ蛍光二次抗体1:500 (Thermofisher、#A10523) とともに30分間インキュベートした。細胞をPBS-CMで洗浄し、次いで、PBS-CM中で1:1000ヘキスト (ヘキスト3342、Thermofisher) で5分間染色した。PBS-CMで洗浄後、3.7%ホルムアルデヒドで5分間試料を固定した。次いで、試料をPBS中で洗浄し、PBS中で、暗所、4℃で保存した。

【0210】

細胞蛍光顕微鏡観察は、冷却電荷結合素子カメラ (Princeton Instruments、Trenton、NJ) を備えたDMIRB倒立顕微鏡 (Leica Microsystems、Deerfield、IL) を使用して行った。40×1.25開口数対物レンズで画像を収集した。MFIの画像処理および定量化ならびにバックグラウンド除去のためにMetaMorphソフトウェア (Universal Imaging、West Chester、PA) を使用した。

【0211】

10

20

30

40

50

### NAD<sup>+</sup>による細胞処理およびウエスタンブロット

すべての実験の前に、細胞を血清フリー培地でO/N処理した。次いで、Art1遮断抗体（20ug/ml）（22C12）なしまたはありで、用量依存的段階希釈（0および20uM）を使用して、NAD<sup>+</sup>（Sigma Aldrich、カタログ#N8285）で細胞を処理した。細胞をPBSで洗浄し、1×溶解バッファー（カタログ#9803、CST）とHalt Protease & Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail（カタログ#78442、Thermofisher）の混合液中で溶解した。細胞を削り取るにより採取し、遠心分離して上清を収集した。免疫ブロット分析のために、細胞タンパク質を10%SDS/PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に転写し、ウサギMAR/PAR抗体（CST #83732、1:1000）でプローブした。MyECLイメージャー（Thermofisher）を使用して、ブロットを取得した。Pageruler plus着色済みタンパク質ラダー（10~250kDa、#26619、Thermofisher）を使用して、タンパク質バンドの重量を決定した。

10

#### 【0212】

LLC1細胞への22c12 Abの結合を検出するためのフローサイトメトリー：分散したLLC1細胞をAF780生存率色素中で10分間インキュベートした（PBS中に1:200）。次いで、ペレットを洗浄し、FACS緩衝液中に再懸濁した。細胞を22C12（終濃度20ug/ml、4度）とともに30分間インキュベートし、続いて、抗ウサギ568（1:200、4度）とともに30分間インキュベートした。試料をFACS緩衝液中で3回洗浄し、濾過し、フローサイトメーターによって分析した。

20

#### 【0213】

### 動物

すべての動物研究は、New York Presbyterian Hospital/Weill Cornell Medical Collegeの動物実験委員会によって承認されたプロトコル（IACUC #2010-0050、2015-0028）に従って行った。野生型C57BL/6マウス（系統：C57BL/6NTac）は、Taconic Biosciencesから購入した。すべてのマウスは、Weill Cornell Medicine動物施設において病原体フリー条件下で維持した。

#### 【0214】

### 異所性側腹部腫瘍モデル

B16-F10細胞およびLLC1をC57BL/6マウスの側腹部に皮下注射した（B16について0.05mL PBS中に1×10<sup>5</sup>個の細胞、およびLLC1について0.05mL中に5×10<sup>5</sup>個の細胞）。腫瘍が触知可能になった後、デジタルキャリパーで腫瘍径を測定し、式（長さ×幅<sup>2</sup>）／2によって腫瘍体積を決定した。腫瘍担持マウスの22C12処置：側腹部腫瘍については、腫瘍内注射は、腫瘍が触知可能になった12日目（B16について）および7日目（LLC1について）に開始し、それ以降72時間ごとに腫瘍内処置した。群「22C12 Ab」に対して5mg/kgのART1抗体クローン22C12を、または群「アイソ対照Ab」に対してマウスIgG2aアイソタイプ対照（BioXcell、カタログ#BE0085）をマウスに注射した。

30

#### 【0215】

### 実施例5

マウス22C12抗体軽鎖可変領域のヒト化を行い、それに続いて、ヒト化候補分子のパネルの抗原結合および機能的特性を評価した。

40

#### 【0216】

親マウス抗体22C12軽鎖可変領域をヒト化するために、インシリコ配列分析およびホモロジーモデリングによって生成される3D構造利用したアプローチを用いて、適切である可能性があるヒト軽鎖フレームワークを特定した。親抗体の特異性および親和性を保持しながらヒト化抗体中のヒト配列の量を最大にするように設計されている候補配列から、ヒト化抗体のパネルを生成した。パネルからの候補ヒト化抗体の選択は、ART1標的抗原への結合およびART1の酵素活性の機能阻害の評価に基づいて決定した。

#### 【0217】

以下は、抗体22C12の軽鎖の例示的なヒト化フレームワーク領域である。

50

22C12 LC1

DIQLTQSPSFLSASVGDRVITICRASSSVSYMHWWYQQKPGTSPKRLIYDTSKLGASGVPSRFSGSGSGTEYTLT  
 ISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ  
 ID NO:48)

22C12 LC2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICSASSSVSYMHWWYQQKPGTSPKRLIYDTSKLGASGVPSRFSGSGSGTDYTL  
 TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
 (SEQ ID NO:49)

22C12 LC3

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHWWYQQKPGTSPRRLIYDTSKLATGIPARFSGSGSGTDYTLTI  
 SSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ  
 ID NO:50)

10

20

**【 0 2 1 8 】****実施例 6****例示的な抗ヒトART1抗体の特性****【 0 2 1 9 】****(表 6) 分子薬理学的特性**

| パラメーター                                  | 観察                                                           |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 標的への結合                                  |                                                              |
| ヒトART1に対する結合親和性                         | $K_D = 1.36 \text{ nM}$                                      |
| カニクイザルART1に対する交差反応性                     | $K_D = 1.46 \text{ nM}$                                      |
| マウスART1に対する交差反応性                        | $K_D = 2.70 \text{ nM}$                                      |
| 細胞結合 (HEK293 OE ART1)                   | $EC_{50} = 4.5 \text{ nM}$                                   |
| 分子選択性                                   |                                                              |
| ART1パラログに対する選択性 (ART3, ART4, ART5)      | 1.3 $\mu\text{M}$ まで結合なし                                     |
| インビトロ機能活性                               |                                                              |
| ART1の酵素活性の阻害<br>(細胞ベース: HEK293 OE ART1) | $EC_{50} = 4.5 \text{ nM}$                                   |
| 薬物動態                                    |                                                              |
| マウスにおけるクリアランスおよび血清半減期 (10 mg/kg, i.v.)  | $T_{1/2} \text{ (h)} = 94.3$ ; $Cl \text{ (mL/日/kg)} = 19.5$ |

30

40

**【 0 2 2 0 】****(表 7) インビボ効力**

| パラメーター         | 観察                                               |
|----------------|--------------------------------------------------|
| マウスモデル         |                                                  |
| マウス免疫適格性肺腫瘍モデル | T細胞およびDC浸潤の増加をともなう、肺の重量、腫瘍小結節の数および腫瘍小結節サイズの有意な低減 |

**【 0 2 2 1 】**

50

(表 8) 生物学的治療剤の性状

| パラメーター             | 観察                                         |
|--------------------|--------------------------------------------|
| 安定なプール細胞株の産生能      | チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 由来<br>2.4g/Lのタイター      |
| 細胞培養産物の品質          | プロテインA (Pro-A) 溶出液中で>95%モノマー               |
| 熱変性                | T <sub>m</sub> 1-3 (°C) = 67.4 /74.4 /86.0 |
| 電荷プロファイル           | 等電点 (pI) 範囲8.0~8.5                         |
| 溶解度/外観 (150 mg/mL) | 粘性<20センチポアズ (cP)                           |

## 【 0 2 2 2 】

TDI-Y-009 mAbの全長タンパク質配列を表9に示す。IMGTの相補性決定領域 (CDR) の定義を表10に示す。

## 【 0 2 2 3 】

(表 9) 候補抗体TDI-Y-009のタンパク質配列

鎖名 全長タンパク質配列

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TDI-Y-009 重鎖 | <b>QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQP</b><br><b>PGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTM</b><br><b>TNMDPVDATATYYCARIYGGDSWGYFDNWGQGLVTVSSAS</b><br>TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL<br>TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPS<br>NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS<br>RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF<br>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA<br>KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQYEGNVFSC SVM<br>HEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:64) |
| TDI-Y-009 軽鎖 | <b>DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGT</b><br><b>SPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATY</b><br><b>YCQQWSSNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT</b><br>ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ<br>ID NO:65)                                                                                                                                                                                                                                                                |

注：可変ドメインを太字フォントで示し；CDRに下線を引き；定常ドメインを通常フォントで示す。

## 【 0 2 2 4 】

(表 10) TDI-Y-009のCDR配列

| Ab      | LC CDR1                    | LC CDR2 | LC CDR3                        | HC CDR1                         | HC CDR2                      | HC CDR3                          |
|---------|----------------------------|---------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| hu22C12 | SSVSY<br>(SEQ ID<br>NO:81) | DTS     | QQWSSNPPT<br>(SEQ ID<br>NO:30) | GFSLSNARMG<br>(SEQ ID<br>NO:66) | IFSNDEK<br>(SEQ ID<br>NO:67) | ARIYGGDSWGYFDN<br>(SEQ ID NO:68) |

## 【 0 2 2 5 】

## 特性評価

標的候補プロファイル (TCP) を確立するために、結合、薬物動態、安全性、および効力について、抗体TDI-Y-009を特性評価した。インビボ効力および安全性試験については、長期間にわたって免疫適格性マウスで研究を実施したので、抗薬物抗体 (ADA) を引き起こす危険性を低下させるために、抗体をマウスIgG1 Fcでフォーマットした。

## 【 0 2 2 6 】

## ART1への結合：ヒト、カニクイザル、マウス

ヒトART1に対するカニクイザルおよびマウスART1の配列同一性は、それぞれ95%および76%である。研究は、C1センサーチップを使用してBiacore 4000で実施した。手

10

20

30

40

50

短に言えば、標準的なNHS/EDC (0.1/0.4 M) 活性化、それに続く、10 mM NaAc pH 5.0中に50  $\mu$ g/mLの抗体および1 Mエタノールアミンブロッキング工程を使用して、ヤギ抗ヒト抗体をC1センサーチップにアミンカップリングした。すべての研究は、PBS (NaCl 137 mM、KCl 2.7 mM、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM、およびKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM、pH 7.4で) 中で行った。データは25°Cで収集した。各結合サイクルについて、mAbを50 nM、10 nM、3.3 nM、および1.1 nMに希釈し、60秒間捕獲した。解離相を10分間モニターし、続いて、再生工程を行った。各結合サイクルの間、抗体の新しいアリコートを捕獲した。処理されたセンサーグラムデータは、単純な1:1相互作用モデルを使用して、全体的に適合させた。ヒトおよびカニクイザルART1に対するmAbの同様の高親和性結合が、匹敵するオンおよびオフ速度で観察された。マウスART1の結合は、ヒトARTと比較して約2倍低かった (表11)。

10

【0227】

(表11) ART1に対するTDI-Y-009の結合キネティクス

| 抗原         | $k_{on}$ (1/Ms)   | $k_{off}$ (1/s)      | $K_D$   |
|------------|-------------------|----------------------|---------|
| ヒトART1     | $1.2 \times 10^5$ | $1.6 \times 10^{-4}$ | 1.36 nM |
| カニクイザルART1 | $1.8 \times 10^5$ | $2.6 \times 10^{-4}$ | 1.46 nM |
| マウスART1    | $1.2 \times 10^5$ | $3.3 \times 10^{-4}$ | 2.70 nM |

【0228】

20

ヒトART1パラログに対する選択性

TDI-Y-009の選択性を評価するために、ART1パラログ (ART3、ART4、ART5) に対する結合をELISAで行った。手短に言えば、高結合ELISAプレート上にART1またはパラログを1×PBS中に2.5  $\mu$ g/mLでプレーティングし、振盪しながら4°Cでo/nインキュベートした。ブロッキング後、TDI-Y-009 mAbの1:5段階希釈物をプレートに加え、RTで90分間インキュベートした。洗浄後、次いで、1:12,000希釈のヤギ抗ヒト二次HRP標識mAbを加えて、RTで1時間インキュベートしてから洗浄し、TMB基質を加え、発色させ、酸で反応を停止させた後、450 nmで吸光度を読み取った。図33に示されるように、1.3  $\mu$ M (200  $\mu$ g/mL) まで、ART1パラログのいずれに対しても結合が観察されなかった。

30

【0229】

細胞上のART1への結合

手短に言えば、KP1-ART1<sup>OE</sup>またはKP1-ART1ノックダウン細胞を100,000細胞/ウェルでプレート上に播種した。100  $\mu$ g/mLで開始した試験抗体を1:5で段階希釈し、次いで、細胞に加え、氷上で30分間インキュベートし、続いて洗浄した。次いで、細胞を抗ヒトIgG Fcで染色し、氷上で30分間インキュベートし、続いて洗浄した。1000×希釈したSYTOX green死染色を含む流動緩衝液中に細胞を再懸濁し、Cytotoflexフローサイトメーターでプレートを読み取った。TDI-Y-009によるKP1-ART1<sup>OE</sup>細胞への用量反応性結合が観察された (図34) が、KP1-ART1ノックダウン細胞では観察されなかった (データ非表示)。

40

【0230】

エピトープマッピング

質量分析 (XL-MS) と併せて化学架橋結合を使用して、エピトープマッピング実験を行った。この結果によって、TDI-Y-009はhuART1の以下の残基: S75、S77、T79、R80、R89、H92、およびY99と架橋結合することが示された。TDI-Y-009に対して対応するパラトープアミノ酸には、軽鎖のS51 (CDR2)、T96 (CDR3) ; 重鎖CDR2残基S55、K59、T63、ならびに重鎖CDR3残基S105およびY108が含まれていた。huART1のモデリングに基づく、エピトープはhuART1のN末端ヘリックスドメイン位置し、酵素のC末端 $\beta$ シートドメインに位置するART1活性部位ともNAD結合ポケットとも重複していない。エピトープ残基Y99 (酵素のヘリックス3中) の結合は、NAD結合ポ

50

ケットに抗体を方向づけられる可能性があり、おそらくNAD結合を立体的に妨害する。あるいは、ART1活性の阻害はY-009の結合の際に誘導され、基質結合を制限する、コンホメーション変化による可能性がある。S75、S77、T79、およびR80はマウスART1で保存されていないが、これらの残基は、可動性である可能性があり、したがって、近くに結合した抗体と化学的架橋結合を形成することができる、ヒトART1における挿入部分を形成する。この方法によって示唆される他のエピトープ残基（R89、H92、およびY99）はマウス、カニクイザル、およびヒトART1にわたって保存されており、ART1配列内の高度に保存された直鎖領域内にある。

#### 【0231】

##### マウスの薬物動態

TDI-Y-009の単回用量PKを評価するための研究をC57BL/6マウスで行った。mAbの血漿PKは、未検証ELISAアッセイを使用して、1、3、または10mg/kg（n=5/群）の単回IVボラス後に決定した。手短に言えば、ヤギ抗ヒトIgGをプレート上にコーティングし、次いで、血清希釈物をインキュベートし、続いて、二次ビオチン標識ヤギ抗ヒトIgG-Fcを加え、ストレプトアビジン-HRPを使用して検出した。WinNonlinソフトウェアを使用して分析を行った。図35に示されるように、TDI-Y-009は、飽和性標的媒介性クリアランスと矛盾がない用量依存的クリアランスをとまなう非線形PKを有する。10mg/kg用量は、 $T_{1/2}(h)=94.3$ を有しており、これは、線形PKを示す、マウスで十分に挙動する抗体に典型的である。これは、この用量での完全な標的飽和を示唆するが、これを確認するために3～10mg/kgの間のさらなる用量が必要とされると考えられる。

#### 【0232】

##### インビボ効力研究

TDI-Y-009 mAb（mIgG1 Fcでフォーマットされた）のインビボ効力を確認するために、腫瘍細胞の尾静脈注射によって肺腫瘍が播種される同所性KP1-ART1<sup>OE</sup>肺腫瘍モデルを実施した。以前のインビボ研究で使用したものよりも低い用量で効果を探るために、抗体を10mg/kgで試験した。腫瘍細胞の注射後6日目に開始して18日目まで、マウスにTDI-Y-009または等価用量のアイソタイプ対照抗体をIP投与した。TDI-Y-009抗体で処置したマウスは、対照マウスと比較して肺腫瘍負荷が有意に低減し、腫瘍小結節の数が減少し、腫瘍小結節面積が低減していた（図36）。この研究のために再フォーマットしたTDI-Y-009におけるマウスIgG1 Fcの使用により、抗腫瘍活性を引き起こす際にADCCが果たす役割が除外された。

#### 【0233】

##### インビボでの安全性研究

手短に言えば、3週間にわたって3日ごとに、親22C12（「mLC22C12」）、TDI-Y-009（「hLC22C12」）またはアイソタイプ対照抗体25mg/kgを腫瘍ナীবC57BL/6マウスにIP投与した。マウスを体重減少について綿密にモニターし、血中グルコースレベルをT=0で、次いで、研究の終了まで毎週測定した。試験抗体で処置したマウスは、アイソタイプ対照抗体で処置したマウスと比較して、外観、活動、歩行、および敏捷性が正常であった（図37）。

#### 【0234】

##### エピトープマッピング

化学的架橋結合、High-Mass MALDI質量分析、およびnLC-Orbitrap質量分析を使用して、huART1と22C12-hLCの間の分子界面を特性評価した。手短に言えば、各タンパク質複合体を重水素化架橋剤とともにインキュベートし、多酵素切断に供した。架橋結合したペプチドの富化後、高分解能質量分析によって試料を分析した。本分析によって、相互作用はhuART1のアミノ酸、75、77、79、80、89、92、99を含むことが示される。これらの結果を図38に図示する。

#### 【0235】

図39は、huART1/mAbの相互作用を示す。huArt1のPDB構造はSwissmodelソフトウェアを使用して作成し、エピトープ部位を青で色付けした。huART1配列の75～99

10

20

30

40

50

(SLSPTRPSPPLGFRDEHGVALLAY;SEQ ID NO:70)

に対応するアミノ酸が提供される。

【0236】

一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチド中のフレームワーク領域は、

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVS (SEQ ID NO:71), VSWIRQP PGKALEWLAH

(SEQ ID NO:72), SYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTM TNMDPVDATYYC (SEQ ID NO:73), または

WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:74)

10

、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの保存的アミノ酸置換、および任意で1つ、2つまたは3つの非保存的置換を有する配列を含む。

【0237】

一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチド中のフレームワーク領域は、

DIQLTQSPSFLSASVGDRVITICRAS (SEQ ID NO:76), YMHYQKPGTS PKRLIY

(SEQ ID NO:77), KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISLQPEDFATY YC (SEQ ID NO:78), FGQGTKLEIK

(SEQ ID NO:79)

20

または1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つの保存的アミノ酸置換、および任意で1つ、2つ、もしくは3つの非保存的置換を有する配列を含む。

【0238】

一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチドは、  
AS

TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS  
SLGKTITCTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV  
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISK  
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE

30

SNGQPENNKITPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQYEGNVFSC SVM HEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ  
ID NO:75), RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
TYSLSL TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:80)

または1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つの保存的アミノ酸置換、および任意で1つ、2つ、もしくは3つの非保存的置換を有する配列、またはこれらに対して少なくとも80%、82%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを含む。

【0239】

一態様では、抗体もしくはその抗原結合断片またはポリペプチドは、

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAH IFSNDEK

SYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDATYYCARIYGGDSWGYFDNWGQGTLLTVSS (SEQ ID

NO:82), DIQLTQSPSFLSASVGDRVITICRASSSVSYMHYQKPGTS PKRLIYDTS

KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISLQPEDFATYYCQWSSNPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:83)

40

または1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つの保存的アミノ酸置換、および任意で1つ、2つもしくは3つの非保存的置換を有する配列、またはこれらに対して少なくとも80%、82%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%

50

、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを含む。

【 0 2 4 0 】

**参考文献**

Adinolfi et al., Cancer Res., 75:635 (2015).

Adriouch et al., J. Immunol., 179:186 (2007).

Balducci et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 21:337 (1999).

Boldrini et al., Oncol. Lett., 9:449 (2015).

Borges da Silva et al., Nature, 559:264 (2018).

Borges da Silva et al., Immunity, 53:158 (2020).

Burnstock et al., Int. Rev. Cytol., 240:31 (2004).

Cerami et al., Cancer Discov., 2:401 (2012).

Chen et al., Cancer Discov., 8:1156 (2018).

10

20

30

40

50

- Chen et al., *J. Thor. Onc.*, **11**:S44 (2016).
- Choi et al., *Cell Rep.*, **10**:1187 (2015).
- Corda & Girolamo, *EMBO J.*, **22**:1953 (2003).
- De Marchi et al., *Oncogene*, **38**:3636 (2019).
- Di Virgilio et al., *Immunity*, **47**:15 (2017).
- Di Virgilio et al., *Nat. Rev. Cancer*, **18**:601 (2018).
- Du et al., *Infect. Immun.*, **69**:3214 (2001).
- Durrans et al., *PLoS One*, **10**:e0129123 (2015).
- Fabrizio et al., *Cell Mol. Life Sci.*, **72**:1209 (2015).
- Gandhi et al., *N. Engl. J. Med.*, **378**:2078 (2018).
- Gandini et al., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **100**:88 (2016).
- Gao et al., *Sci. Signal*, **6**:p11 (2013).
- Ghiringhelli et al., *Nat. Med.*, **15**:1170 (2009).
- Haag et al., *J. Mol. Biol.*, **243**:537 (1994).
- Haag et al., *Purinergic Signal*, **3**:71 (2007).
- Haag et., *Dev. Immunol.*, **9**:197 (2002).
- Horenstein t al., *Oncoimmunology* **2**:e26246 (2013).
- Hubert et al., *J. Exp. Med.*, **207**:2561 (2010).
- Krebs et al., *Anal. Biochem.*, **314**:108 (2003).
- Laing et al., *Amino Acids*, **41**:257 (2011).
- Lujambio, A., and Lowe, S.W. (2012). The microcosmos of cancer. *Nature* **482**, 347–355.
- Markowitz et al., *JCI Insight*, **3**:\_\_ (2018).
- Mok et al., *Lancet*, **393**:1819 (2019).
- Nizard et al., *Nat. Commun.*, **8**:15221 (2017).
- Okazaki et al., *Biochemistry*, **33**:12828 (1994).
- Paone et al., *J. Biol. Chem.*, **281**:17054 (2006).
- Paone et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**:8231 (2002).
- Postow et al., *N. Engl. J. Med.*, **366**:925 (2012).
- Reck et al., *N. Engl. J. Med.*, **375**:1823 (2016).
- Sandoval-Montes & Santos-Argumedo, *J. Leukoc. Biol.*, **77**:513 (2005).
- Scheuplein et al., *J. Immunol.*, **182**:2898 (2009).
- Schwarz et al., *PLoS One*, **7**:e41269 (2012).

10

20

30

40

50

Seman et al., *Immunity*, 19:571 (2003).

Sharma & Allison, *Science*, 348:56 (2015).

Simon & Labarriere, *Oncoimmunology*, 7:e136482 (2017).

Song et al., *Int. J. Oncol.*, 49:646 (2016).

Stark et al., *Sci. Immunol.*, 3:\_\_\_\_ (2018).

Stevens et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106:19796 (2009).

Suzuki et al., *J. Clin. Oncol.*, 31:490 (2013).

Tang et al., *Int. J. Mol. Med.*, 32:130 (2013).

Taube et al., *Mod. Pathol.*, 31:214 (2018).

Wang et al., *J. Immunol.*, 153:4048 (1994).

Xu et al., *Mol. Med. Rep.*, 15:1222 (2017).

Yang et al., *Int. J. Mol. Med.*, 37:734 (2016).

Zamarin et al., *Sci. Transl. Med.*, 6:226ra232 (2014).

10

20

【 0 2 4 1 】

すべての刊行物、特許および特許出願は参照により本明細書に組み入れられる。前述の明細書において、ある特定の好ましい態様に関して本発明を説明し、多くの詳細を例示の目的で記載してきたが、本発明はさらなる態様を受け入れる余地があること、および本明細書に記載される詳細の一部は、本発明の基本原理から逸脱することなく、かなり変更することができることは、当業者には明らかであると考えられる。

【 図 面 】

【 図 1 】

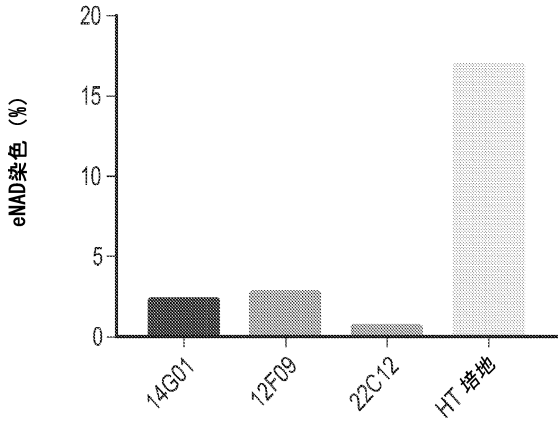
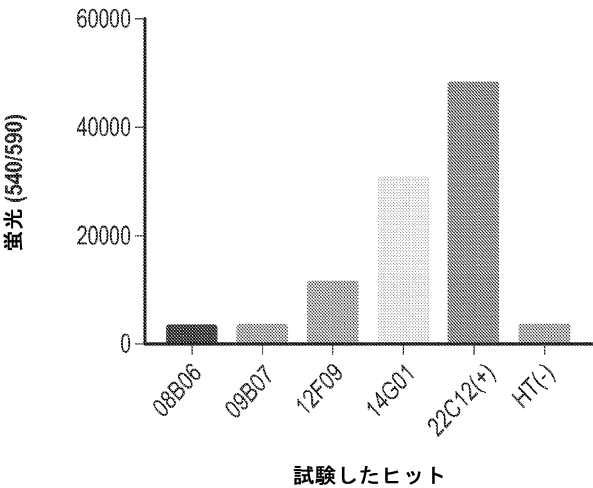
生化学的な酵素アッセイ (huART1)

Art1スクリーン3ヒット\_機能アッセイ

【 図 2 】

細胞ベースの酵素アッセイ (huART1)

細胞上eNAD酵素アッセイ



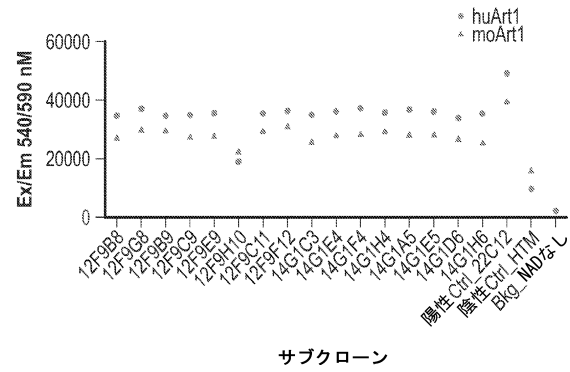
30

40

【図 3】

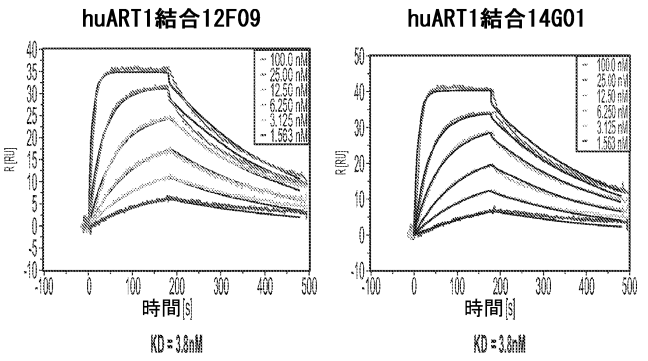
生化学的な酵素アッセイ (huART/moART1)

huART1およびmoART1を用いた第3スクリーンサブクローンの機能アッセイ



【図 4】

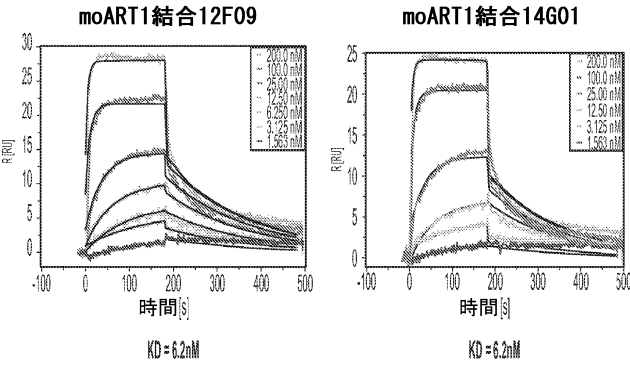
12F09 & 14G01の特性評価



10

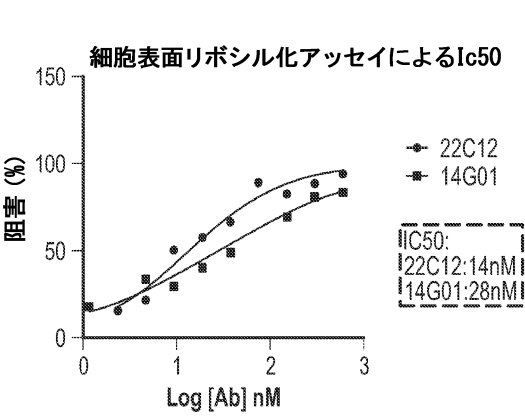
【図 5】

12F09 & 14G01の特性評価



【図 6】

精製された14G01の特性評価



20

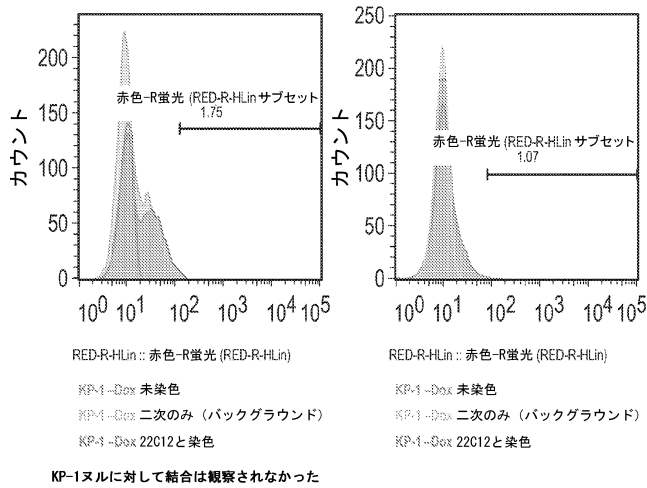
30

40

50

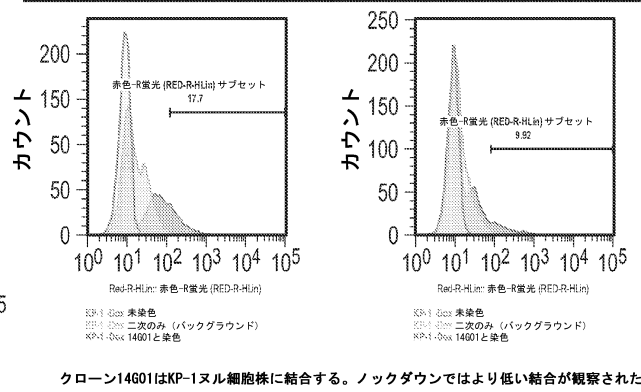
【図 7】

KP-1-/+Dox結合 クローン22C12



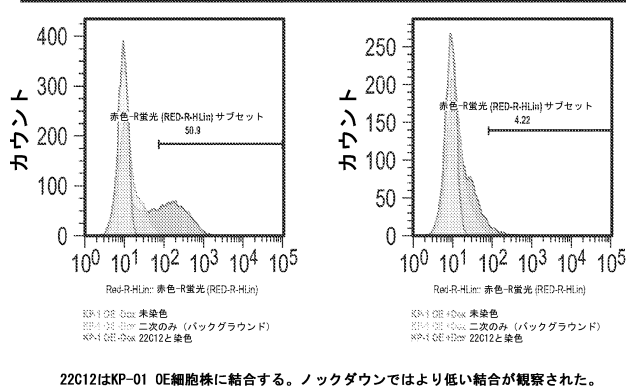
【図 8】

精製された14G01の特性評価



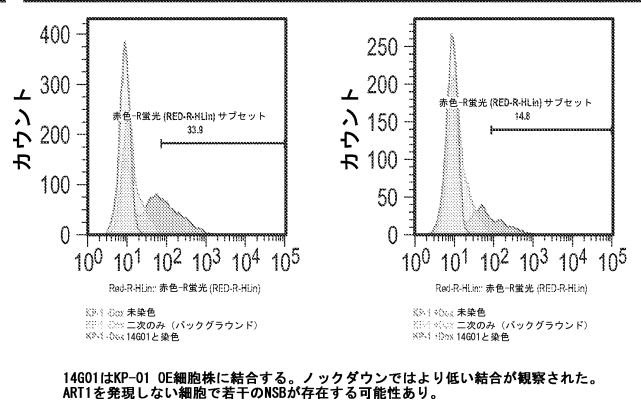
【図 9】

KP-1 OE-/+Dox結合 クローン22C12



【図 10】

KP-1 OE-/+Dox結合 クローン14G01



10

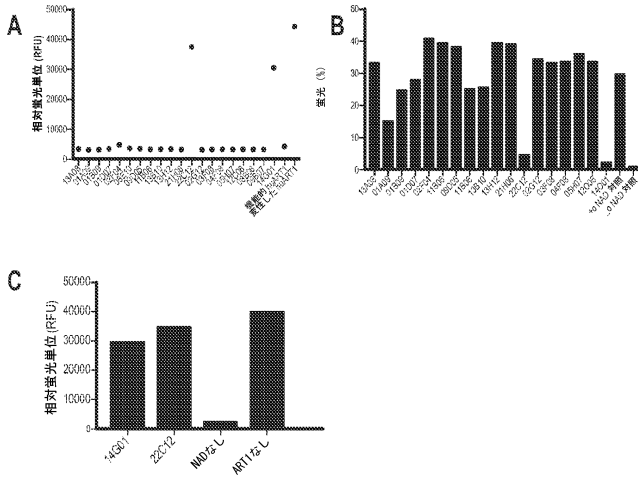
20

30

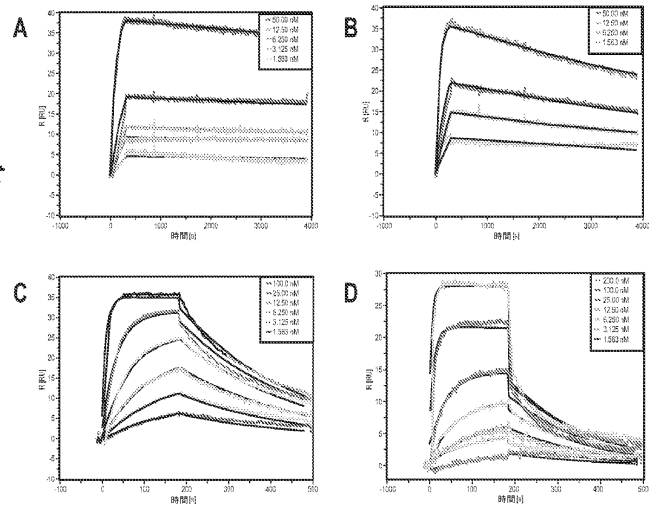
40

50

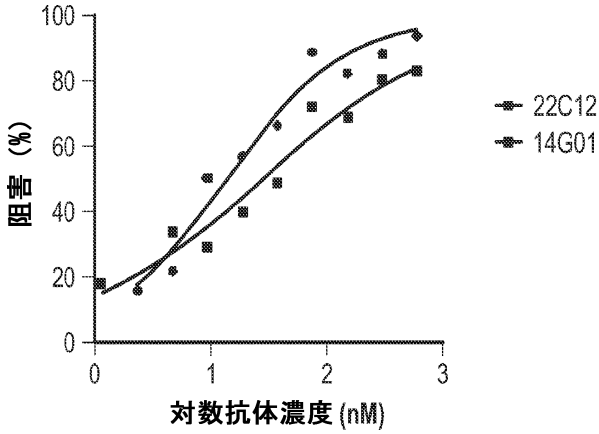
【図 1 1】



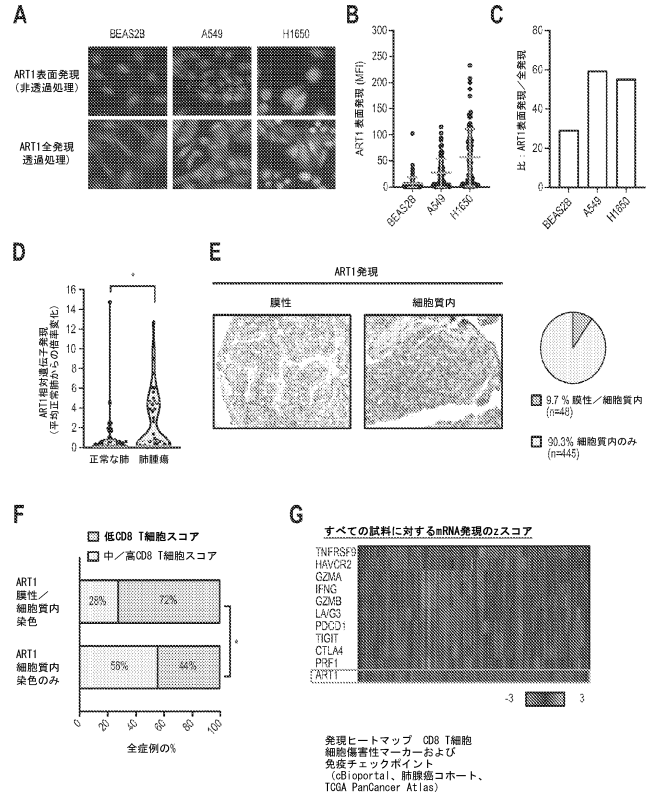
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

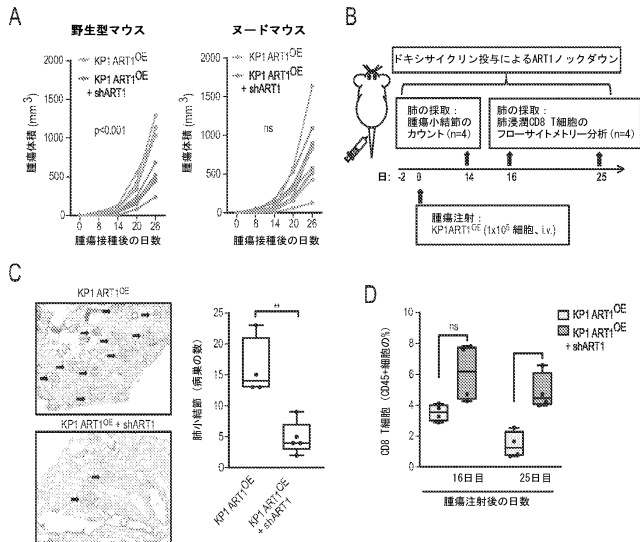
20

30

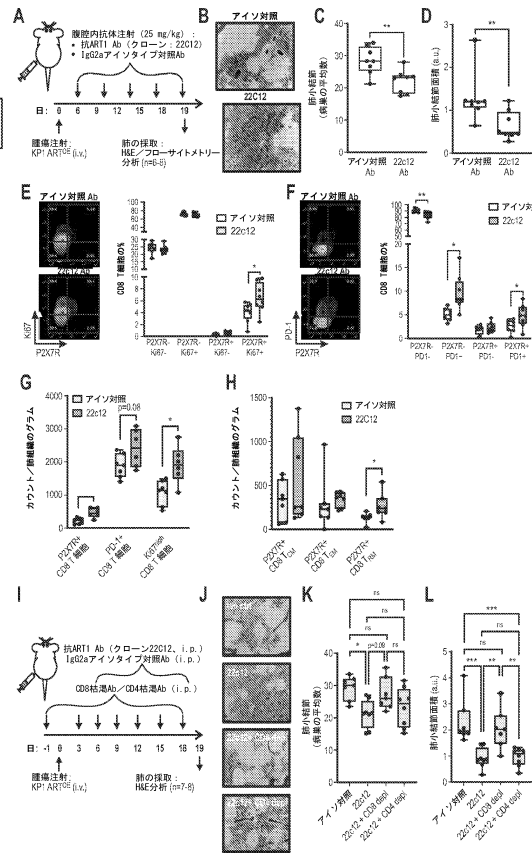
40

50

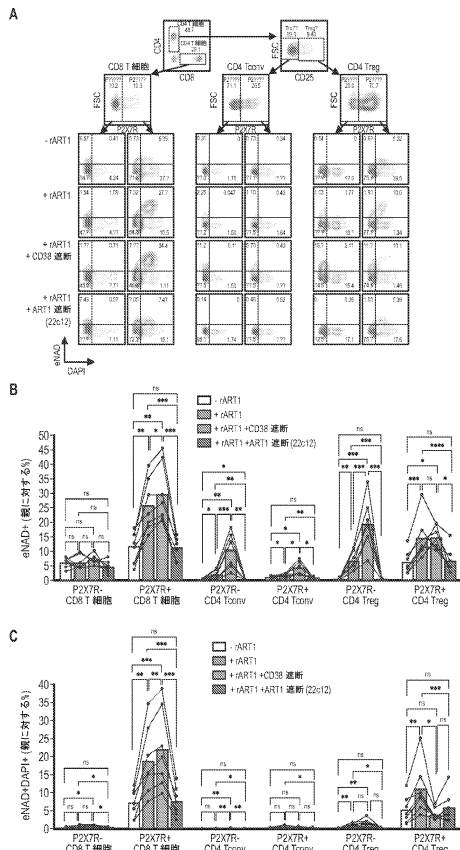
【図 15】



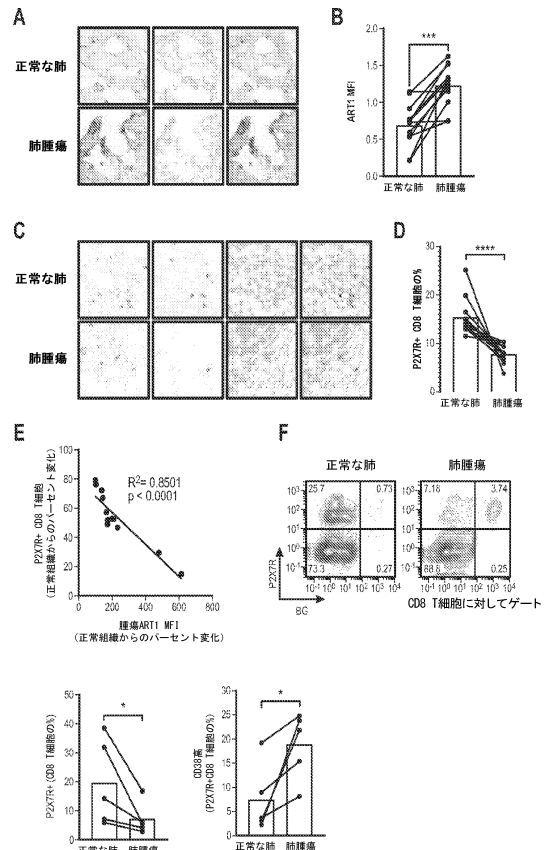
【図 16】



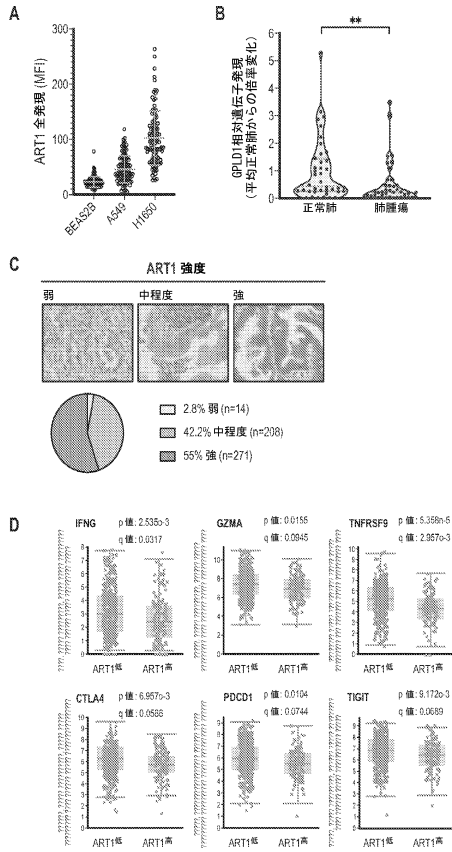
【図 17】



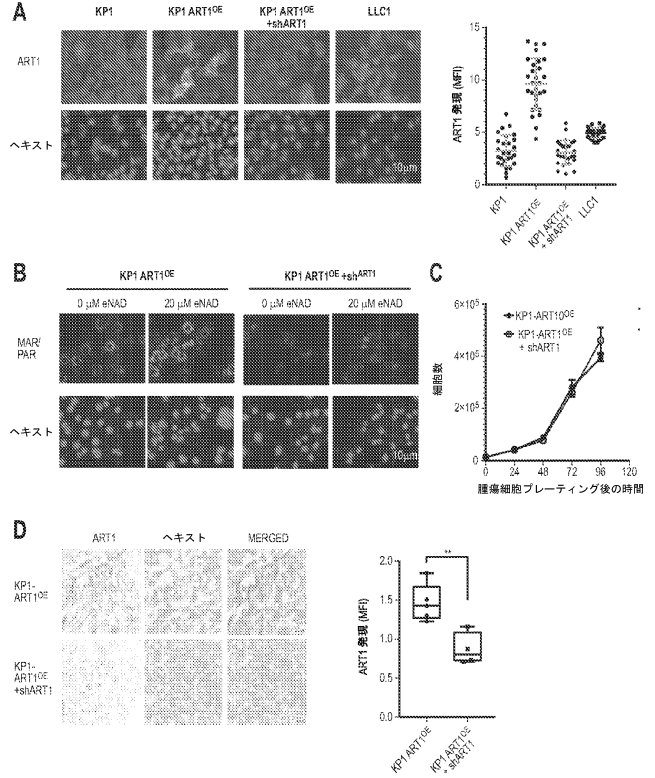
【図 18】



【図 19】



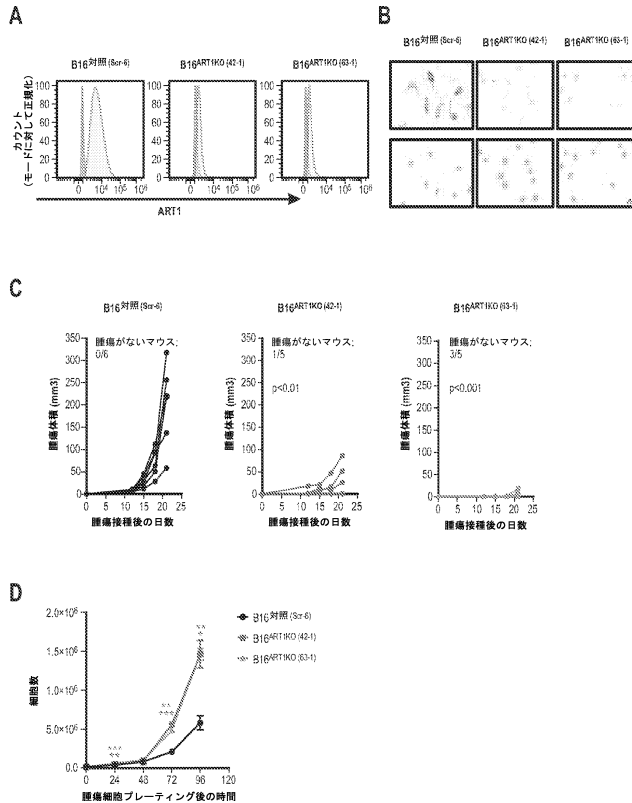
【図 20】



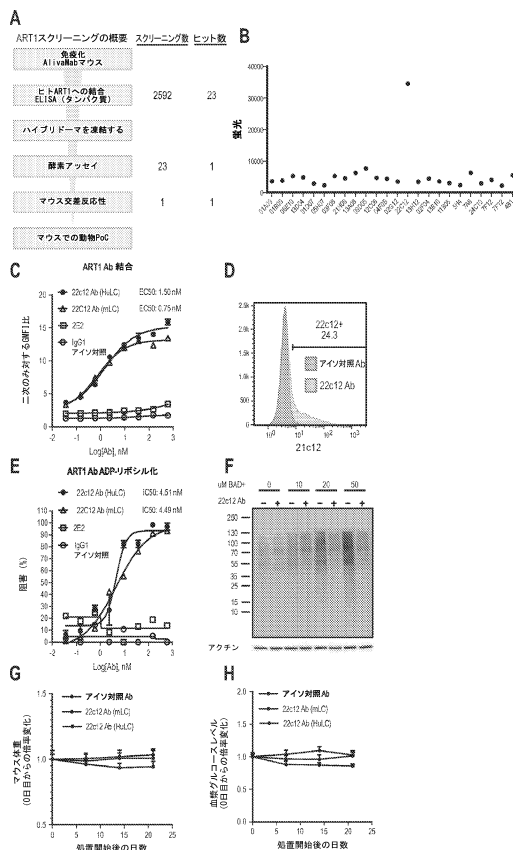
10

20

【図 21】



【図 22】

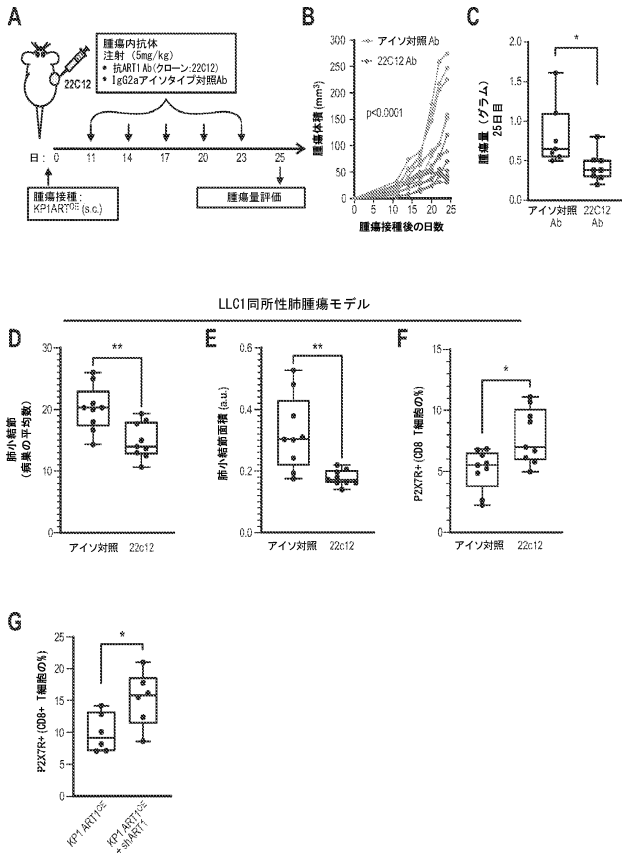


30

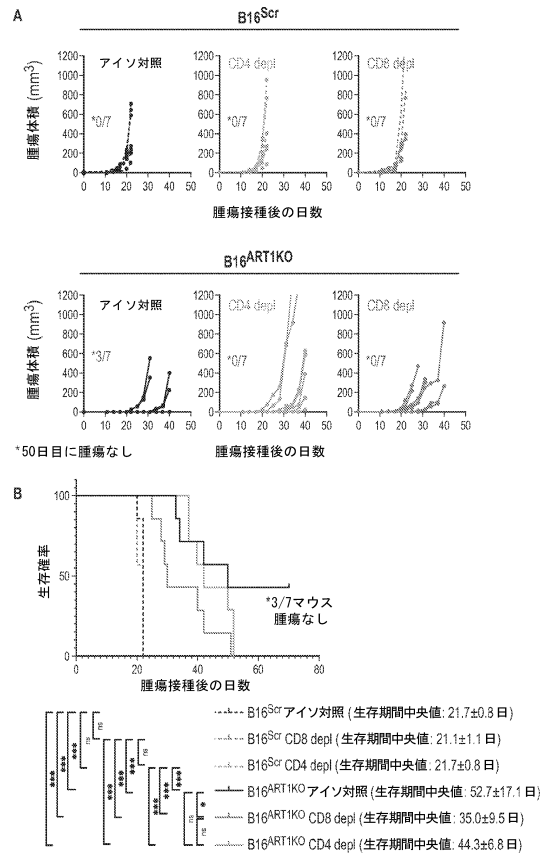
40

50

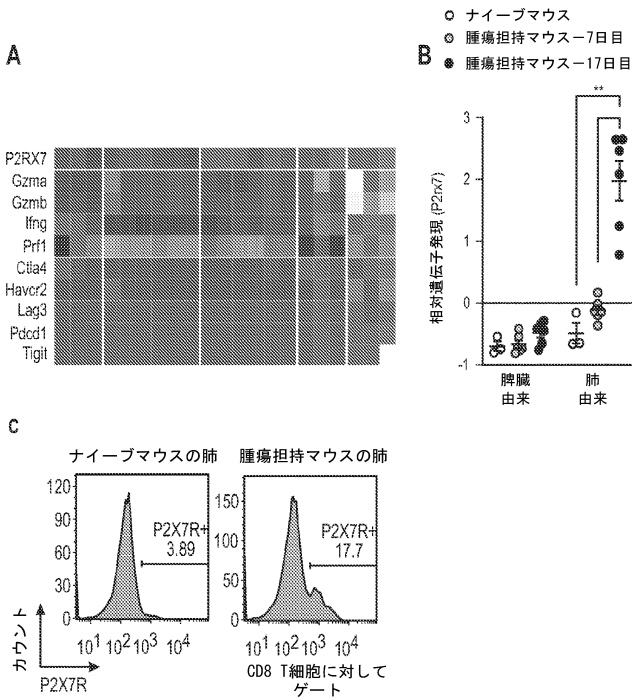
【図 2 3】



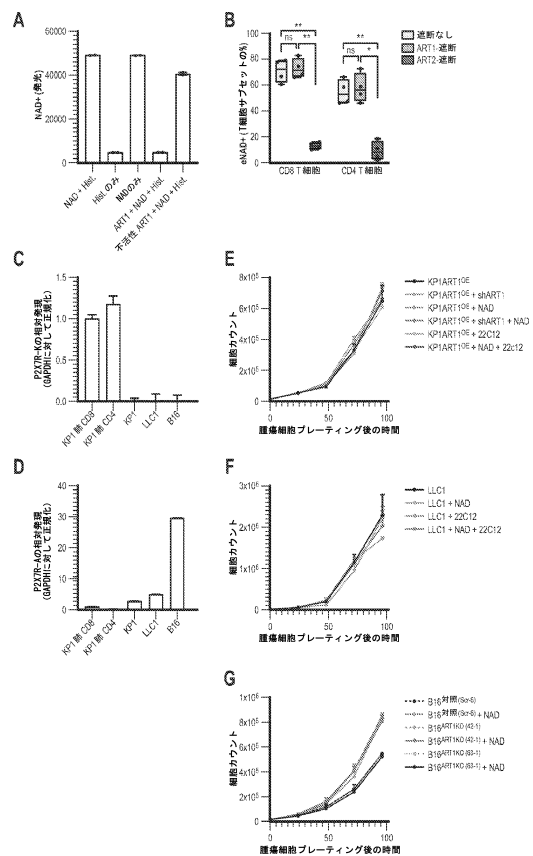
【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】



10

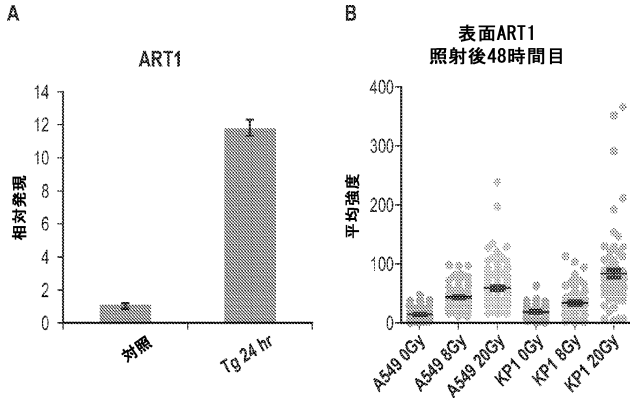
20

30

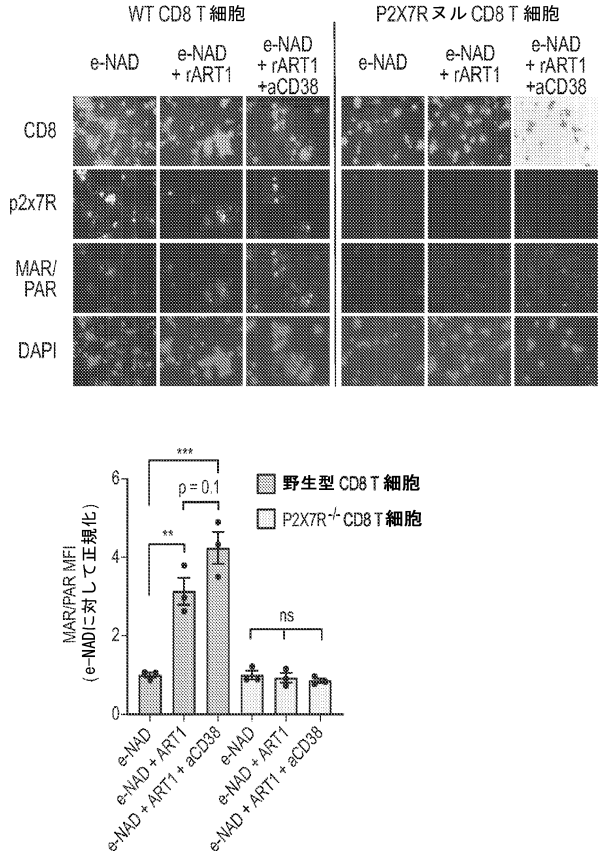
40

50

【図 27】



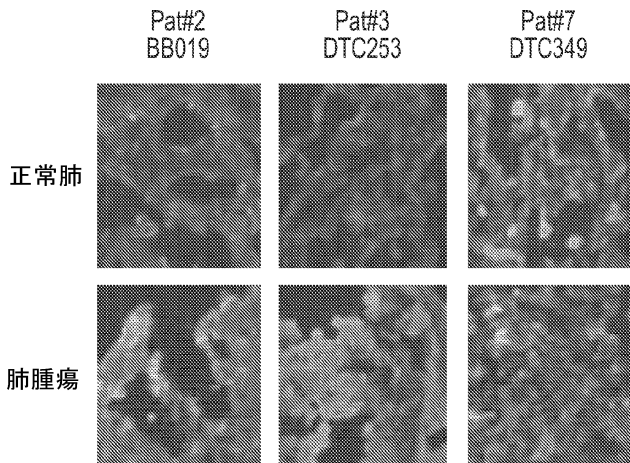
【図 28】



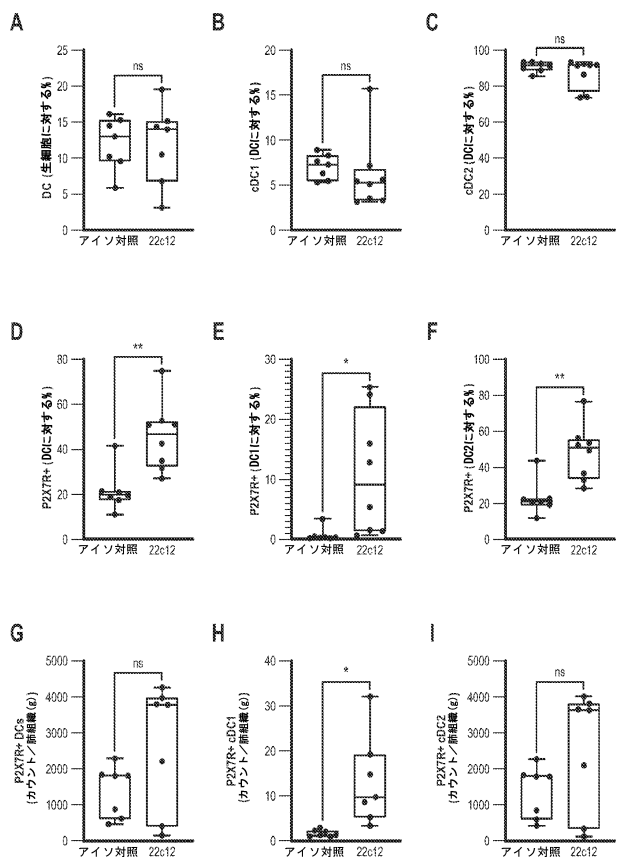
10

20

【図 29】



【図 30】

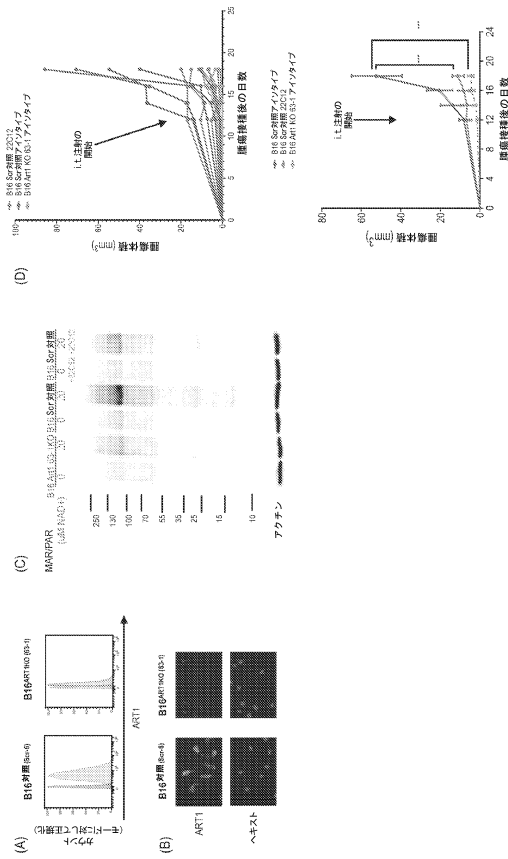


30

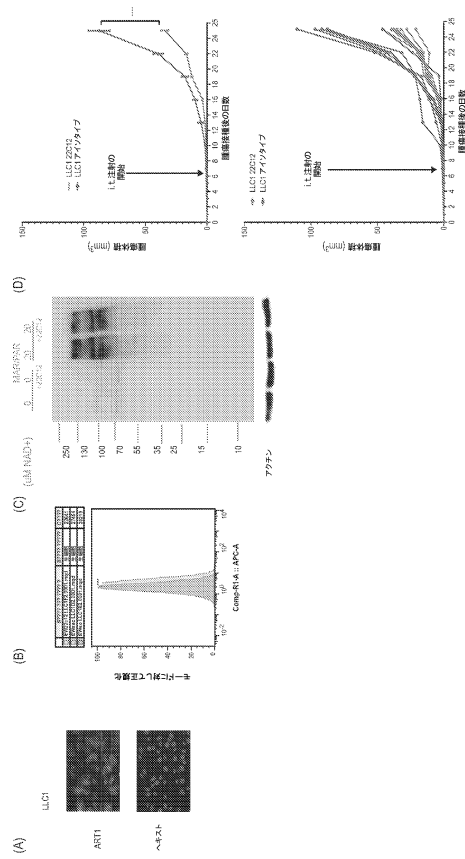
40

50

【図 3 1】



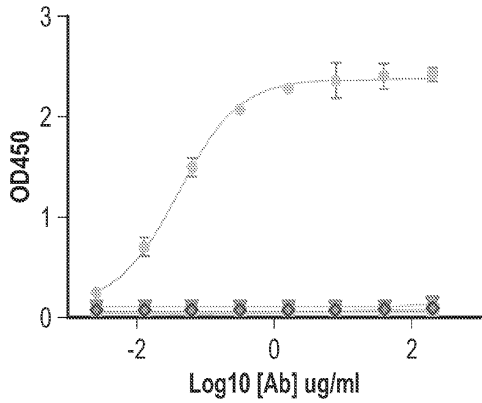
【図 3 2】



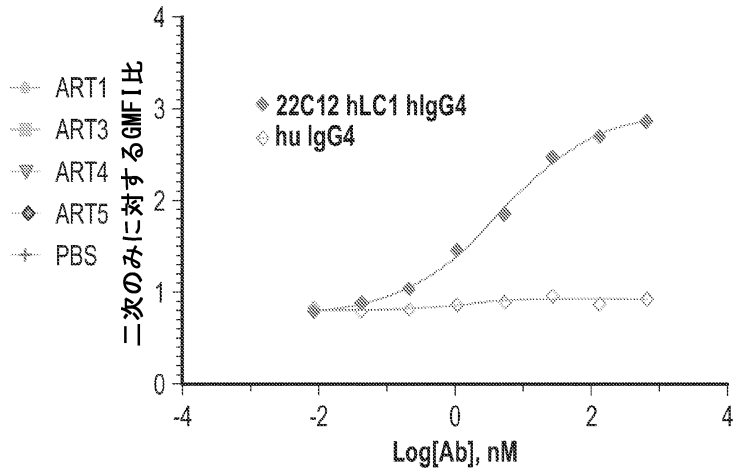
10

20

【図 3 3】



【図 3 4】

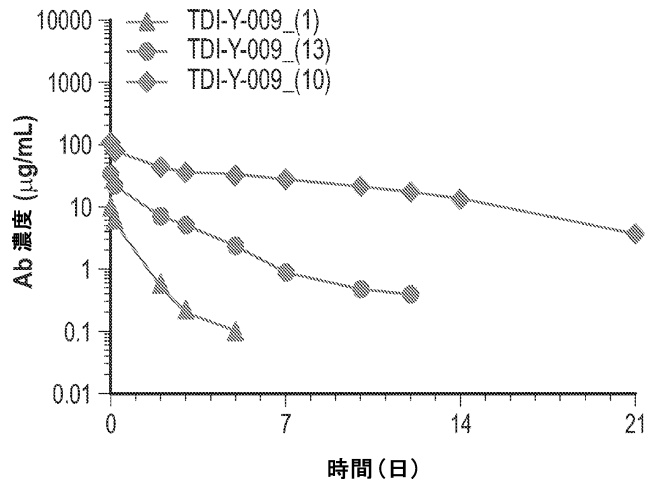


30

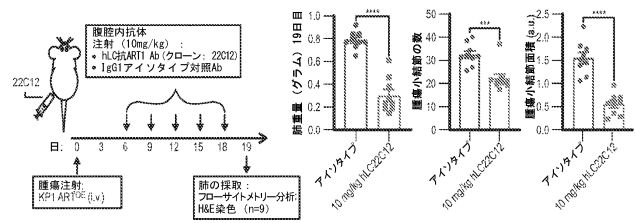
40

50

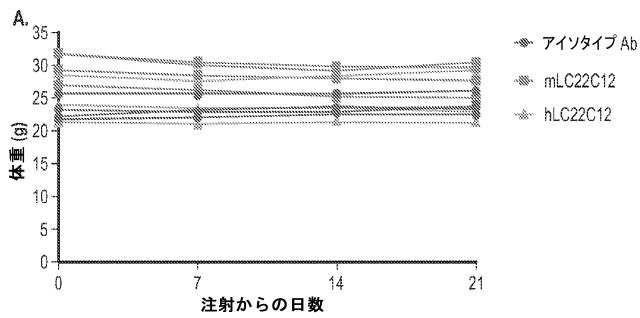
【図 3 5】



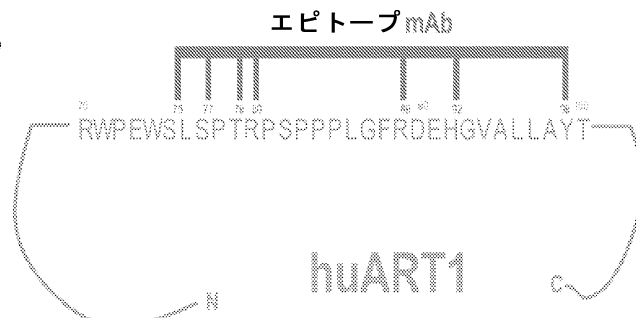
【図 3 6】



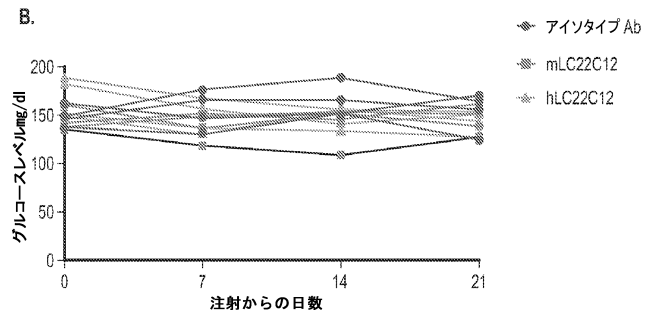
【図 3 7】



【図 3 8】



B.



10

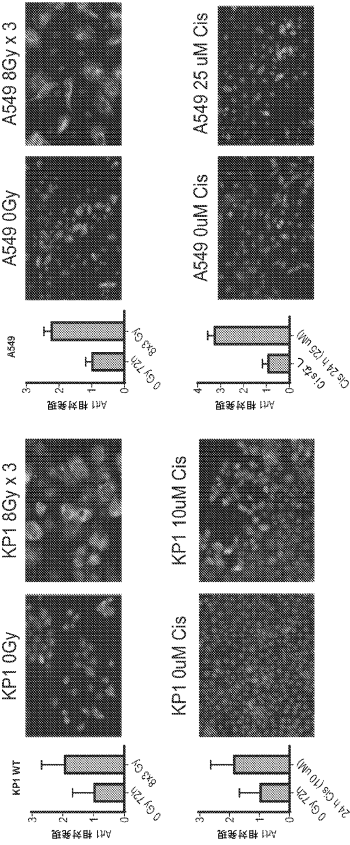
20

30

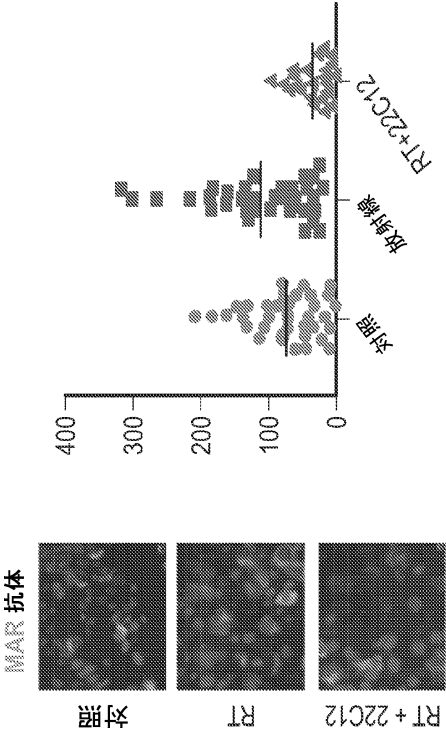
40

50

【図 3 9】



【図 4 0】



【配列表】

2025508690000001.xml

## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                            | International application No.<br>PCT/US2023/062151                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - INV. - C07K 16/40 (2023.01)<br>ADD. - A61K 39/395; A61P 35/00; C12N 15/113 (2023.01)<br>CPC - INV. - C07K 16/40 (2023.05)<br>ADD. - A61K 39/39558; A61P 35/00; C12N 15/113 (2023.05)<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                            |                                                                               |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>See Search History document<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>See Search History document<br>Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)<br>See Search History document                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                            |                                                                               |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                            |                                                                               |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages         | Relevant to claim No.                                                         |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | US 2016/0053283 A1 (MAXCYTE INC.) 25 February 2016 (25.02.2016) entire document            | 1, 2, 5, 8-10, 18-20, 30-32, 39-41                                            |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | WO 2021/204781 A1 (UNIVERSITÄT ZÜRICH et al.) 14 October 2021 (14.10.2021) entire document | 1, 2, 5, 8-10, 18-20, 30-32, 39-41                                            |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | WO 2009/040134 A1 (U3 PHARMA AG et al.) 02 April 2009 (02.04.2009) entire document         | 1, 2, 5, 8-10, 18-20, 30-32, 39-41                                            |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | WO 2014/078373 A1 (IOGENETICS LLC) 22 May 2014 (22.05.2014) entire document                | 1, 2, 5, 8-10, 18-20, 30-32, 39-41                                            |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                            |                                                                               |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"D" document cited by the applicant in the international application<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                            |                                                                               |
| Date of the actual completion of the international search<br>19 June 2023                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                            | Date of mailing of the international search report<br><b>JUL 25 2023</b>      |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                            | Authorized officer<br>Taina Matos<br>Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/062151

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/082151

**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.: 21-29, 33-38, 42, 43  
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 extra sheet(s).

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 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, 2, 5, 8-10, 18-20, 30-32, 39-41

**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/US2023/062151

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-20, 30-32, and 39-41 are drawn to anti-human ART1 antibodies, and isolated cells, hybridomas, nucleic acids, and methods comprising the same.

The first invention of Group I+ is restricted to an anti-human ART1 antibody comprising a heavy chain variable region (VH), and a light chain variable region (VL), where the VH is selected to be SEQ ID NO:1, and further comprises HCDR1 (SEQ ID NO:66), HCDR2 (SEQ ID NO:67), HCDR3 (SEQ ID NO:68), and the VL is selected to be SEQ ID NO:2, which further comprises LCDR1 (SEQ ID NO:81), LCDR2 (SEQ ID NO:29), LCDR3 (SEQ ID NO:30), and isolated cells, hybridomas, nucleic acids, and methods comprising the same. It is believed that claims 1, 2, 5, 8-10, 18-20, 30-32, and 39-41 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on SEQ ID NOs:1 and 2.

Applicant is invited to elect additional VH, VL, and the respective, corresponding, SEQ ID NOs to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be an anti-human ART1 antibody comprising a heavy chain variable region (VH), and a light chain variable region (VL), where the VH is selected to be SEQ ID NO:82, and further comprises HCDR1 (SEQ ID NO:35), HCDR2 (SEQ ID NO:36), HCDR3 (SEQ ID NO:37), and the VL is selected to be SEQ ID NO:83, which further comprises LCDR1 (SEQ ID NO:42), LCDR2 (SEQ ID NO:43), LCDR3 (SEQ ID NO:44), and isolated cells, hybridomas, nucleic acids, and methods comprising the same. Additional VH, VL, and the respective, corresponding, SEQ ID NOs will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for binding human ART1, requiring the selection of alternative antibody VH and VL where "An isolated cell comprising an expression cassette comprising a heterologous promoter operably linked to nucleic acid sequences encoding an anti-human ART1 antibody, or an antigen binding fragment thereof, or a polypeptide, that inhibits human ART1 activity, wherein the antibody, the antigen binding fragment thereof, or the polypeptide has: i) a variable region comprising a first complementarity determining region (CDR) comprising GFSLSNARM (SEQ ID NO:66) operably linked to a second CDR comprising IFSNDEK (SEQ ID NO:67) operably linked to a third CDR comprising ARIYGGDSWGYFDN (SEQ ID NO:68); and/or ii) a variable region comprising a first CDR comprising SSVSY (SEQ ID NO:81) operably linked to a second CDR comprising DTS (SEQ ID NO:29) operably linked to a third CDR comprising QQWSSNPPT (SEQ ID NO:30); or iii) a variable region comprising a first CDR comprising GGSISYY (SEQ ID NO:35) operably linked to a second CDR comprising ISTSGFT (SEQ ID NO:36) operably linked to a third CDR comprising ARDWGRVFDI (SEQ ID NO:37); and/or iv) a variable region comprising a first CDR comprising QSVSSSY (SEQ ID NO:42) operably linked to a second CDR comprising GAS (SEQ ID NO:43) operably linked to a third CDR comprising QQYGSST (SEQ ID NO:44)."

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of an isolated cell comprising an expression cassette comprising a heterologous promoter operably linked to nucleic acid sequences encoding an anti-human ART1 antibody, or an antigen binding fragment thereof, or a polypeptide, that inhibits human ART1 activity, wherein the antibody, the antigen binding fragment thereof, or the polypeptide has: a VH, HCDR1, HCDR2, HCDR3, a VL, LCDR1, LCDR2, LCDR3; a hybridoma comprising nucleic acid sequences encoding an anti-human ART1 monoclonal antibody that inhibits human ART1 activity; an isolated nucleic acid comprising a promoter operably linked to a nucleotide sequence which encodes at least the variable region of a heavy or light Ig chain that binds human and/or mouse ART1; an isolated antibody or antigen fragment thereof that binds human and mouse ART1; a method to inhibit or treat cancer in a mammal, comprising: administering to a mammal a composition comprising an effective amount of an anti-human ART1 antibody or an antigen binding fragment thereof, or a polypeptide that binds human ART1; a method to enhance an immune response in a mammal having cancer, comprising: administering to a mammal a composition comprising an effective amount of an anti-human ART1 antibody or an antigen binding fragment thereof, or a polypeptide that binds human ART1. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, WO 2021/204781 A1 to Universität Zürich et al. discloses encoding an anti-human ART1 antibody, or an antigen binding fragment thereof, or a polypeptide, that inhibits human ART1 activity (anti-ARTC1 polypeptide ligand is a single domain antibody, Para. [0079]; a polynucleotide containing at least one open reading frame (ORF) that is capable of encoding a particular polypeptide, Para. [0030]), wherein the antibody, the antigen binding fragment thereof, or the polypeptide has: a VH, HCDR1, HCDR2, HCDR3, a VL, LCDR1, LCDR2, LCDR3 (ARTC1 polypeptide ligand is an immunoglobulin consisting of two heavy chains and two light chains, Para. [0079]; LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 and HCDR3 sequences, Para. [0057]); that binds human and/or mouse ART1 (human ARTC1, Para. [0090]); an isolated antibody or antigen fragment thereof that binds human and mouse ART1 (anti-ARTC1 polypeptide ligand is a single domain antibody, consisting of an isolated variable domain from a heavy or light chain, Para. [0079]); a method to inhibit or treat cancer in a mammal, comprising: administering to a mammal a composition comprising an effective amount of an anti-human ART1 antibody or an antigen binding fragment thereof, or a polypeptide that binds human ART1 (the invention encompasses methods of treatment of a patient having been diagnosed with cancer. This method entails administering to the patient an effective amount of a non agonist ARTC1 ligand or a nucleic acid molecule as identified herein, or its pharmaceutically acceptable salt, as specified in detail herein, Para. [0084]); a method to enhance an immune response in a mammal having cancer, comprising: administering to a mammal a composition comprising an effective amount of an anti-human ART1 antibody or an antigen binding fragment thereof, or a polypeptide that binds human ART1 (the invention encompasses methods of treatment of a patient having been diagnosed with cancer. This method entails administering to the patient an effective amount of a non agonist ARTC1 ligand or a nucleic acid molecule as identified herein, or its pharmaceutically acceptable salt, as specified in detail herein, Para. [0084]; treatment experiments in CB17-Scid mice revealed an influence on immune cell infiltration (Fig. 6E). CD11b is present on all myeloid cells including the myeloid derived suppressor cells (MDSC) which are frequently populating immunologically cold tumors. CD11b+ cells could be detected throughout the ARTC1-expressing control tumors while CD11b+ cells were confined to the tumor borders in antibody-treated tumors, Para. [0127]).

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2023/062151

Further, US 2016/0053283 A1 to Maxcyte Inc. teaches an isolated cell (isolated and selected cell, Para. [0028]) comprising an expression cassette comprising a heterologous promoter operably linked to nucleic acid sequences (the coding sequence itself, may be combined with other nucleic acid sequences, such as promoters, Para. [0108]; expressing a heterologous nucleic acid sequence, Para. [0085]); a hybridoma (hybridoma, Para. [0143]); an isolated nucleic acid comprising a promoter operably linked to a nucleotide sequence which encodes at least the variable region of a heavy or light Ig chain (there are isolated nucleic acid segments and recombinant vectors incorporating nucleic acid sequences that encode a polypeptide (e.g., an antibody or fragment thereof), Para. [0107]; [a]n antibody is an immunoglobulin which possesses the ability to combine with an antigen. It comprises at least two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds, Para. [0131]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

## テーマコード (参考)

|                |                         |                |               |          |
|----------------|-------------------------|----------------|---------------|----------|
| <b>C 0 7 K</b> | <b>19/00 (2006.01)</b>  | <b>C 0 7 K</b> | <b>19/00</b>  |          |
| <b>C 1 2 N</b> | <b>5/16 (2006.01)</b>   | <b>C 1 2 N</b> | <b>5/16</b>   |          |
| <b>C 1 2 N</b> | <b>15/13 (2006.01)</b>  | <b>C 1 2 N</b> | <b>15/13</b>  |          |
| <b>C 1 2 N</b> | <b>15/62 (2006.01)</b>  | <b>C 1 2 N</b> | <b>15/62</b>  | <b>Z</b> |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>39/395 (2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>39/395</b> | <b>N</b> |
| <b>A 6 1 P</b> | <b>37/02 (2006.01)</b>  | <b>A 6 1 P</b> | <b>37/02</b>  |          |
| <b>A 6 1 P</b> | <b>35/00 (2006.01)</b>  | <b>A 6 1 P</b> | <b>35/00</b>  |          |
| <b>A 6 1 P</b> | <b>35/04 (2006.01)</b>  | <b>A 6 1 P</b> | <b>35/04</b>  |          |

,MC,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1. T R I T O N

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 スタイルズ ブレンドン エム.

アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク州 ニューヨーク ヨーク アベニュー 1 3 2 0 アパートメント 3 3 ジー

(72)発明者 マグロウ ティモシー

アメリカ合衆国 1 0 0 1 3 ニューヨーク州 ニューヨーク レオナルド ストリート 6 6 アパートメント 1 1 ディー

- 
- (72)発明者    ロレンツ イヴォ シー.  
                 アメリカ合衆国 1 1 2 0 1    ニューヨーク州 ブルックリン    マートル アベニュー 1 5 0    アパー  
                 トメント 3 0 0 3
- (72)発明者    ホワイト トーマス イー.  
                 アメリカ合衆国 1 0 0 2 1    ニューヨーク州 ニューヨーク    イースト シックスティースタイン  
                 ストリート 4 1 3
- (72)発明者    カーン アブドゥル ジー.  
                 アメリカ合衆国 1 1 7 0 4    ニューヨーク州 ウェスト バビロン    カールトン ロード 7 9 7    ア  
                 パートメント 2 2 0 6
- F ターム (参考)    4B065    AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y  
                                         AB01 AC14 BA02 CA44 CA46  
                                         4C085    AA14 BB01 DD62 EE01 GG02 GG04  
                                         4H045    AA10 AA30 BA09 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74