

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-515809
(P2024-515809A)

(43)公表日 令和6年4月10日(2024.4.10)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	31/675 (2006.01)	A 6 1 K	31/675	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	4 C 0 8 5	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U	4 C 0 8 6
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全68頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-565986(P2023-565986)				(71)出願人 517319271
(86)(22)出願日	令和3年4月28日(2021.4.28)				アセンタウィッツ ファーマシューティ
(85)翻訳文提出日	令和5年12月18日(2023.12.18)				カルズ リミテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2021/029552				中華人民共和国、5 1 8 1 1 8 グァン
(87)国際公開番号	WO2022/231580				ドン、シェンジェン、ピンシャン ディ
(87)国際公開日	令和4年11月3日(2022.11.3)				ストリクト、ケンジ ストリート、ジン
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA				シャ コミュニティ、ジンファイ ロード
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(				ナンバー14、バイオメディカル イノ
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A				ヴェイション インダストリアル パーク
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR				、ビルディング10、フロア10、ルー
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,				ム1003
	MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK				Room 1003, 10th Flo
	,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,G				or, Building 10, Bi
	N,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),				omedical Innovation
	AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,B				Industrial Park, No
	最終頁に続く				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 A K R 1 C 3 活性化化合物及び免疫チェックポイント阻害剤の使用による併用療法

(57)【要約】
化合物1－（3－（3－N，N－ジメチルアミノカルボニル）フェノキシルー4－ニトロフェニル）－1－エチルーN，N’－ビス（エチレン）ホスホルアミダートと、化学療法剤又は生物学的作用剤を含む少なくとも1つの治療剤とを含む医薬組成物、及びその医療用途が提供される。

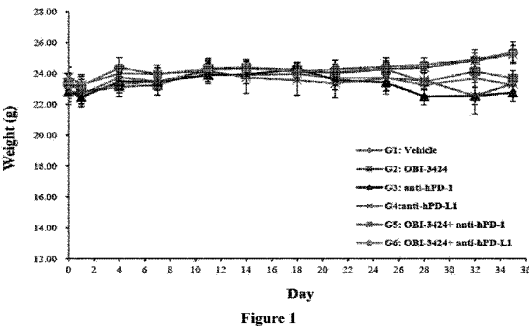


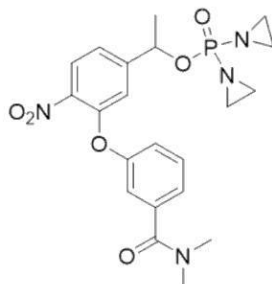
Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) 式 I で表される化合物 1 - (3 - (3 - N, N - ジメチルアミノカルボニル) フェノキシル - 4 - ニトロフェニル) - 1 - エチル - N, N' - ビス (エチレン) ホスホルアミダート

【化 1】



10

式 I

又はその薬学的に許容される塩、同位体バリエーション又は溶媒和物、及び

(2) 化学療法剤又は生物学的作用剤を含む少なくとも 1 つの治療剤

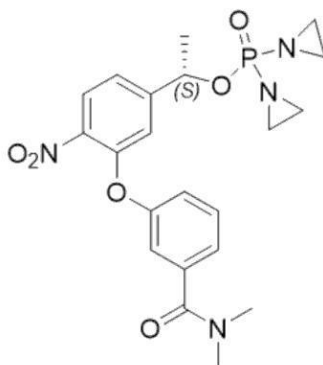
20

を含む医薬組成物。

【請求項 2】

前記化合物は、式 I - 1 で表される (S) - 1 - (3 - (3 - N, N - ジメチルアミノカルボニル) フェノキシル - 4 - ニトロフェニル) - 1 - エチル - N, N' - ビス (エチレン) ホスホルアミダート、又は

【化 2】



30

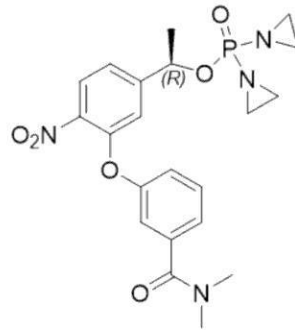
式 I - 1

40

式 I - 2 で表される (R) - 1 - (3 - (3 - N, N - ジメチルアミノカルボニル) フェノキシル - 4 - ニトロフェニル) - 1 - エチル - N, N' - ビス (エチレン) ホスホルアミダートである、

50

【化 3】



式 I-2

請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記化学療法剤は、モノメチルアウリスタチン E (MMAE)、モノメチルアウリスタチン F (MMAF)、メルタンシン (DM1)、アントラサイクリン、ピロロベンゾジアゼピン、 α -アマニチン、チュープリシン、ベンゾジアゼピン、エルロチニブ、ボルテゾミブ、フルベストラント、スニチニブ、レトロゾール、メシル酸イマチニブ、PTK787/ZK222584、オキサリプラチン、ロイコボリン、ラパマイシン、ラパチニブ、ロナファルニブ、ソラフェニブ、ゲフィチニブ、AG1478、AG1571、アルキル化剤、アルキルスルホン酸塩、アジリジン、エチレンジミン、メチラメラミン (methyllamelamine)、アセトゲニン、カンプトテシン、プリオスタチン、カリストアチン、CC-1065、クリプトフィシン、ドラスタチン、デュオカルマイシン、エレウテロビン、パンクラティスタチン、サルコディクチン、スポンジスタチン、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンビチン (novembichin)、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタート、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン、カリケアマイシン、ダイネマイシン、クロドロネート、エスペラマイシン、ネオカルチノスタチン発色団、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラマイシン (authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン (carabycin)、カミノマイシン (caminomycin)、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ- ϵ -ノルロイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ロドルビシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル (5-FU)、デノプテリン、プテロプテリン、トリメトトレキサート、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン (dromostanolone)、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン、フロリン酸、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレプリン酸、エニルラシル、アムサクリン、ベストラブシル (bestrabucil)、ビスアントレン、エダトラキサート (edatraxate)、デフォファミン (defofamine)、デメコルシン、ジアジクオン、エルホルミチン (elfo

10

20

30

40

50

rmithine)、酢酸エリブチニウム、エポチロン、エトグルシド、硝酸ガリウム、ヒドロキシ尿素、レンチナン、ロニダイニン(lonidainine)、メイタンシン、アンサマイトシン、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダンモール(mopidamol)、ニトラエリン(nitraerine)、ペントスタチン、フェナメット、ピラルピシン、ロソキサントロン、ポドフィリン酸、2-エチルヒドラジド、プロカルバジン、ラゾキサン、リゾキシン、シゾフィラン、スピロゲルマニウム、テヌアゾン酸、トリアジクオン(triaziquone)、2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン、トリコテセン、ウレタン、ビンデシン、ダカルバジン、マンノムスチン、ミトブロニトール、ミトラクトール、ピボプロマン、ガシトシン(gacytosine)、アラビノシド、シクロホスファミド、チオテパ、タキソイド、パクリタキセル、ドセタキセル、クロランブシル(chlorambucil)、ゲムシタピン、6-チオグアニン、メルカプトプリン、メトトレキサート、シスプラチン、カルボプラチン、ビンブラスチン、プラチナ、エトポシド、イホスファミド、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ビノレルビン、ノバントロン、テニポシド、エダトレキサート、ダウノマイシン、アミノプテリン、キセローダ、イバンドロン酸、トポイソメラーゼ阻害剤、ジフルオロメチルオルニチン(DMFO)、レチノイド、及びカペシタピンのうちから選択される、請求項1に記載の医薬組成物。

10

【請求項4】

前記生物学的作用剤は、ペプチド、タンパク質、抗体、ホルモン、サイトカイン、又はケモカインから選択される、請求項1に記載の医薬組成物。

20

【請求項5】

前記抗体は、阻害性免疫チェックポイント抗原を阻害／ブロックする抗免疫チェックポイント抗体である、請求項4に記載の医薬組成物。

【請求項6】

前記抗免疫チェックポイント抗体は、抗PD-1／PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体、抗LAG-3抗体、抗TIGIT抗体、抗Ceacam1抗体、抗LAIR-1抗体、抗TIM-3抗体、抗VISTA抗体、抗KIR抗体、抗IDO抗体、抗CD276抗体、抗A2AR抗体、又は抗CD47抗体である、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項7】

抗PD-1／PD-L1抗体は、アベルマブ、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、デュルバルマブ、及びアテゾリズマブのうちの少なくとも1つである、請求項6に記載の医薬組成物。

30

【請求項8】

薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項9】

患者のがんを治療するための医薬の製造における請求項1～8のいずれか一項に記載の医薬組成物の使用。

【請求項10】

前記がんはAKR1C3レダクターゼを過剰発現しているがんである、請求項9に記載の使用。

40

【請求項11】

前記がんは、肝臓がん、肝細胞がん(HCC)、肺がん、黒色腫、前立腺がん、乳がん、白血病、食道がん、腎臓がん、胃がん、結腸がん、脳がん、膀胱がん、子宮頸がん、卵巣がん、頭頸部がん、子宮内膜がん、膵臓がん、肉腫がん、又は直腸がんである、請求項9に記載の使用。

【請求項12】

がんの治療を必要とする患者のがんを治療する方法であって、治療有効量の請求項1～8のいずれか一項に記載の医薬組成物を前記患者に投与する工程を含む方法。

【請求項13】

前記治療有効量は、0.1mg/kg～100mg/kgである、請求項12に記載の方

50

法。

【請求項 1 4】

前記がんは A K R 1 C 3 レダクターゼを過剰発現しているがんである、請求項 1 2 に記載の方法。

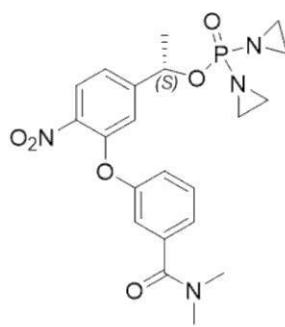
【請求項 1 5】

前記がんは、肝臓がん、肝細胞がん（H C C）、肺がん、黒色腫、前立腺がん、乳がん、白血病、食道がん、腎臓がん、胃がん、結腸がん、脳がん、膀胱がん、子宮頸がん、卵巣がん、頭頸部がん、子宮内膜がん、膵臓がん、肉腫がん、又は直腸がんである、請求項 1 2 に記載の方法。

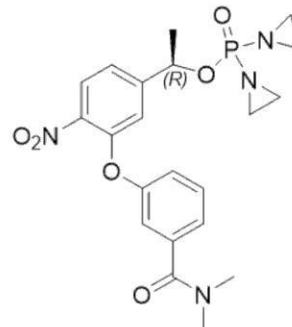
【請求項 1 6】

がん細胞の増殖を阻害する方法であって、それを必要とする患者に、式 I - 1 又は式 I - 2 で表される化合物を免疫チェックポイント阻害剤との組み合わせで含む治療有効量の医薬組成物を投与することを含む、方法。

【化 4】



式 I - 1



式 I - 2

【請求項 1 7】

前記化合物と前記免疫チェックポイント阻害剤の遮断との組み合わせは、T細胞の不活性化を救済し、治療効果を向上させるために総合的又は相乗的に作用する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記免疫チェックポイント阻害剤は、抗 P D - 1 / P D - L 1 抗体である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記がんは A K R 1 C 3 レダクターゼを過剰発現しているがんである、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記がんは、肝臓がん、肝細胞がん（H C C）、肺がん、黒色腫、前立腺がん、乳がん、白血病、食道がん、腎臓がん、胃がん、結腸がん、脳がん、膀胱がん、子宮頸がん、卵巣がん、頭頸部がん、子宮内膜がん、膵臓がん、肉腫がん、又は直腸がんである、請求項 1 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、化学療法剤又は生物学的作用剤を含む少なくとも 1 つの治療剤と組み合わせられた、化合物 1 - (3 - (3 - N, N - ジメチルアミノカルボニル)フェノキシル - 4 - ニトロフェニル) - 1 - エチル - N, N' - ビス(エチレン)ホスホルアミダートを含む組成物、及びその医療用途に関する。

【背景技術】

【0002】

がんは、人間の罹患率と死亡率の主な原因の1つである。がん治療は、正常細胞に損傷を与えたり死滅させたりせずにがん細胞を殺すことが難しいため、困難である。がん治療中の正常細胞の損傷又は死滅は、患者における有害な副作用の原因となり、がん患者に投与される化学療法剤の量が制限される可能性がある。

【0003】

アルドケトレダクターゼファミリー1メンバーC3 (AKR1C3) は、ヒトのAKR1C3 遺伝子によってコードされる酵素である。この遺伝子は、40を超える既知の酵素及びタンパク質からなるアルド／ケトレダクターゼスーパーファミリーのメンバーをコードしている。これらの酵素は、NADH及び／又はNADPHを補因子として利用することにより、アルデヒド及びケトンから対応するアルコールへの変換を触媒する。これは、5型、17β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (17β-HSD) 及びプロスタグランジンFシンターゼとしても知られている。AKR1C3は、アルドケトレダクターゼ (AKR) の15の遺伝子ファミリーのメンバーの1つである。AKR1C3は元々、ヒトの前立腺⁽¹⁾ 及び胎盤⁽²⁾ のcDNAライブラリーからクローニングされた。AKR1C3は、323個のアミノ酸と37kDaの分子量を有する、単量体のサイトゾルのNAD(P)(H)依存性酸化還元酵素である⁽¹⁾。AKR1C3は、AKR1C1、AKR1C2、及びAKR1C4を含む関連するヒトAKR1Cファミリーと高い配列相同性を共有する。AKR1C3は、アンドロゲン、エストロゲン、プロゲステロン、及びプロスタグランジン (PG) の代謝を触媒し、その後、核内受容体活性の調節に関与する^(3、4)。AKR1C3は、ステロイドホルモン依存性細胞及びステロイドホルモン非依存性細胞を含む正常組織で発現され、肝臓、腎臓、及び小腸を除いて、平均発現レベルは低い⁽⁵⁾。多くの研究により、多くの悪性固形腫瘍及び血液腫瘍においてAKR1C3が異常に過剰発現していることが実証されている。データは、肝がん、膀胱がん、腎臓がん、及び胃がんの50%以上が、0～6のスケールで免疫組織化学スコア (IHCスコア) ≥ 4 のAKR1C3の高発現を伴って検出されたことを示している⁽⁶⁾。AKR1C3は非小細胞肺癌 (NSCLC) で高度に発現しているが、小細胞肺癌では発現していない⁽⁷⁾。

【0004】

がんにおけるAKR1C3の上方制御は、去勢抵抗性前立腺がん (CRPC⁽⁸⁾) 及び結腸直腸がん (CRC⁽⁹⁾) の転移と関連していることが報告されており、予後不良や生存率の低さにも関連している^(10、11)。さらに、多くの種類の治療抵抗性は、AKR1C3の過剰発現に起因すると考えられる。ドキソルビシン^(12、13)、エンザルタミド⁽¹⁴⁾、アビラテロン⁽¹⁵⁾、及びメトトレキサート⁽¹⁶⁾ に対する化学療法耐性は、細胞におけるAKR1C3発現の高さに直接関係していることが報告されている。食道がん⁽¹⁷⁾、前立腺がん⁽¹⁸⁾、NSCLCがん細胞⁽¹⁹⁾ における放射線療法抵抗性は、AKR1C3の過剰発現と関連している。電離放射線に対するAKR1C3の主な作用機序は、細胞内のROS (活性酸素種) を減少させ、PGF2αを増加させ、その後MAPキナーゼの活性化とPPARγの阻害をもたらし、結果としてDNA損傷を大幅に減少させることである⁽¹⁸⁾。免疫療法抵抗性も、AKR1C3の高発現に起因すると考えられる。ある研究では、全ゲノムマイクロアレイとマルチプレックス定量的 (q) RT-PCR遺伝子発現解析⁽²⁰⁾ に基づいて、AKR1C3の高発現がPD-L1陽性の進行性腎細胞がん (RCC) 患者におけるPD-1標的療法の失敗と関連していることが示された。AKR1C3が腫瘍特異的に過剰発現しているため、AKR1C3により活性化されるプロドラッグの設計は、がんを特異的に標的とする魅力的なアプローチになる。そのような例の1つは、AKR1C3により活性化されるプロドラッグであるPR104であり、これは元々は低酸素活性化プロドラッグとして設計されたが^(22～24)、*in vitro* 及び *in vivo* で優れた抗腫瘍活性を示した^(6、21)。

【0005】

本願の式Ⅰ-1の抗がんプロドラッグ（本明細書ではOBI-3424と表す）は、化学合成された強力なナイトロジェンマスタードであり、これはNADPHの存在下でAKR1C3によって選択的に切断されて細胞傷害性アジリジン（本明細書ではOBI-2660と表す）になる。OBI-3424によって放出される活性分子OBI-2660は、標準的な化学療法薬であるチオテパ及びマイトマイシンCに類似しており、グアニンのN7（又はO6）位置でDNAのアルキル化及び架橋を引き起こす。プロドラッグOBI-3424は現在、悪性腫瘍の治療のためにアジア諸国ではAscentawits Pharmaceuticals, LTDによって、アジア以外の国々ではOBI Pharma, Inc.によって開発中である（医薬品コードOBI-OBI-3424）。プロドラッグOBI-3424は現在、固形腫瘍や血液悪性腫瘍を含む14種類以上のヒトがんの治療のために、米国（NCT04315324及びNCT03592264）及び中国（CXHL1900137及びCXHL2000263）で複数の第Ⅰ相臨床試験で研究中である。腫瘍ではAKR1C3が高発現しているため、プロドラッグOBI-3424は腫瘍で特異的に活性化されるが、低レベルのAKR1C3を発現する正常細胞では活性化されず、腫瘍特異的標的化を達成するように設計されている。さらに、OBI-3424の腫瘍選択的活性化は、シクロホスファミドやイホスファミドなどの非選択的な従来のアルキル化剤とは区別可能であり、このことは、OBI-3424が広範囲の高選択性抗腫瘍薬となる可能性があることを示している。プロドラッグOBI-3424は、*in vitro*及び*in vivo*でT-ALLの前臨床モデルに対して強力な有効性を示すことが報告された（25、26）。

10

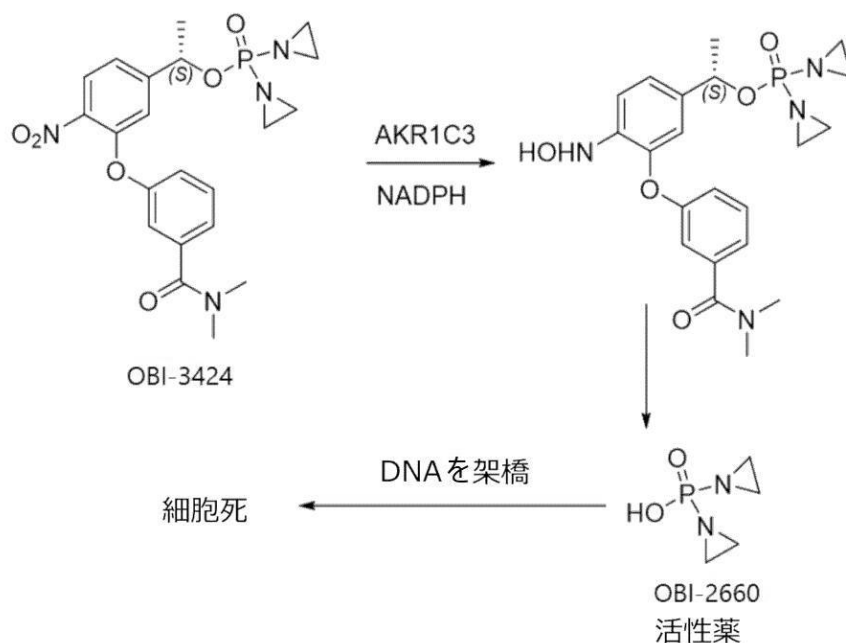
20

【0006】

NADPHの存在下では、OBI-3424の還元がAKR1C3によって媒介され、アジリジンビスアルキル化剤である細胞傷害性部分OBI-2660が放出され、グアニンのN7（又はO6）位でのDNAの架橋、そしてその後の細胞死が引き起こされる。

【0007】

【化1】



30

40

OBI-3424 還元活性化経路のスキーム

【0008】

がん細胞を標的とするように設計されたプロドラッグは、近年、がん治療の魅力的な戦略として浮上している。しかし、患者を選択するための有効なバイオマーカーが欠如して

50

いるため、多くのプロドラッグは第3相臨床試験で失敗した⁽²⁷⁾。AKR1C3発現がRT-PCR又は免疫組織化学を使用して評価できることを考慮すると、AKR1C3発現が高く、プロドラッグに反応する可能性が最も高い患者を選択することにより、臨床的に効率的な方法でOBI-3424を開発できる。AKR1C3は、化学抵抗性^(13、14)、放射線抵抗性⁽¹⁹⁾及び免疫抵抗性⁽²⁰⁾の獲得時に過剰発現されることが証明されている。さらに、卵巣がん、乳がん、及び膵臓がんなどの相同組換え欠損(HRD)を有するがんは、DNA損傷因子に対して感受性があることが知られている⁽²⁸⁾。DNAアルキル化剤として、OBI-3424は、AKR1C3発現を有するHRDがんを治療するための優れた候補薬となる可能性もある。

【0009】

がん患者の治療に適した化合物、すなわち選択的AKR1C3レダクターゼ活性化プロドラッグ、及び新規の選択的かつ広範な抗がん剤の必要性が依然として存在する。本発明は、この必要性を満たすものである。

【0010】

プログラム死-1(PD-1)は、T細胞、B細胞、又は単球上に発現する抑制性受容体である^(29、30)。PD-L1及びPD-L2はPD-1のリガンドであり、PD-1に結合するとT細胞の活性化とサイトカイン分泌を下方制御することが確認されている^(31、32)。PD-1とPD-L1又はPD-L2との結合により、免疫応答の下方制御が引き起こされる。そのため、PD-1/PD-L1経路の遮断は、がんに対する中枢及び末梢の免疫反応を弱めることが提唱されてきた。PD-1及びPD-L1経路を標的とすることは、黒色腫、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎細胞がん(RCC)、膀胱がん、及びホジキンリンパ腫を含む15種類以上のがん種において臨床効果を示している⁽³³⁾。しかし、依然として多くの患者が反応を示さない。一部の患者は初期反応を示したが、時間の経過とともに耐性を獲得した。したがって、併用療法に対する耐性のメカニズムを特定することが緊急に必要とされている。

【発明の概要】

【0011】

本発明は、PCT特許出願番号PCT/US2016/062114(国際公開第2017087428号)に開示されている化合物又は薬学的に許容される塩、又はそれらの溶媒和物に基づいて、上記化合物の医療用途を提供し、上記化合物又はその薬学的に許容される塩、同位体バリエーション又は溶媒和物を含む組成物及びそれらの抗がん医療用途を提供する。

【0012】

一態様では、本発明は、患者のがんを治療するための医薬の製造における式I(本明細書ではOBI-2870と表す)で表される化合物1-(3-(3-N, N-ジメチルアミノカルボニル)フェノキシル-4-ニトロフェニル)-1-エチル-N, N'-ビス(エチレン)ホスホルアミダート、又はその薬学的に許容される塩、同位体バリエーション又は溶媒和物の使用であって、前記がんのAKR1C3レダクターゼレベルは、AKR1C3タンパク質レベル又はRNAレベルで表され、かつ所定の値以上である、前記使用を提供する。AKR1C3レベルは、当業者に周知の日常的な方法に従って測定される。

【0013】

10

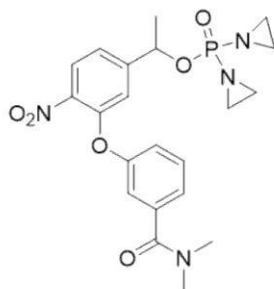
20

30

40

50

【化 2】



式 I

(OBI-2870)

10

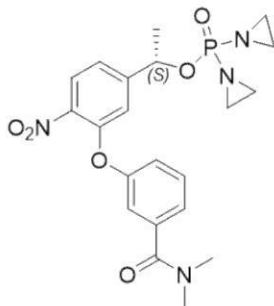
【0014】

本発明の特定の実施形態によれば、前記化合物は、式 I-1（本明細書では OBI-3424 と表す）で表される（S）-1-（3-（3-N，N-ジメチルアミノカルボニル）フェノキシル-4-ニトロフェニル）-1-エチル-N，N'-ビス（エチレン）ホスホルアミダート、又は式 I-2（本明細書では OBI-3423 と表す）で表される（R）-1-（3-（3-N，N-ジメチルアミノカルボニル）フェノキシル-4-ニトロフェニル）-1-エチル-N，N'-ビス（エチレン）ホスホルアミダートである。

20

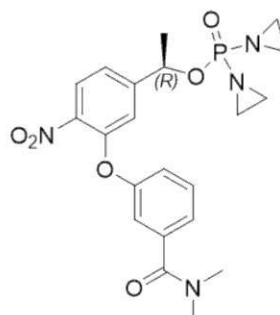
【0015】

【化 3】



式I-1

(OBI-3424)



式I-2

(OBI-3423)

30

【0016】

式 I、式 I-1 又は式 I-2 の化合物の調製は、PCT 特許出願番号 PCT/US 2016/062114（国際公開第 2017087428 号）に開示されており、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。ここで、化合物 OBI-2870 は、R-エナンチオマー 3423 と S-エナンチオマー OBI-3424 の 1：1 比のラセミ混合物である。

40

【0017】

ここで、前記塩は塩基性塩であってもよく、無機塩基（アルカリ金属水酸化物、アルカリ土類金属水酸化物など）を有する化合物又は有機塩基（モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミンなど）を有する化合物の塩が挙げられる。あるいは、前記塩は酸性塩であってもよく、無機酸（塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、過

50

塩素酸、硫酸、リン酸など）を有する化合物又は有機酸（メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、フマル酸、シュウ酸、マレイン酸、クエン酸など）を有する化合物の塩が挙げられる。化合物の許容可能な塩、溶媒和物などを選択し、調製することは、当該技術分野においてよく知られている技術である。

【0018】

本発明の特定の実施形態によれば、式I-1又は式I-2の化合物は80%以上の鏡像体過剰率を有する。好ましくは、化合物は90%以上、より好ましくは95%以上の鏡像体過剰率を有する。

【0019】

本発明の特定の実施形態によれば、式I-1又は式I-2の化合物は実質的に純粋である。

本発明の特定の実施形態によれば、がんは、肝臓がん、肝細胞がん（HCC）、肺がん、黒色腫、前立腺がん、乳がん、白血病、食道がん、腎臓がん、胃がん、結腸がん、脳がん、膀胱がん、子宮頸がん、卵巣がん、頭頸部がん、子宮内膜がん、膵臓がん、肉腫がん、又は直腸がんである。

【0020】

本発明の特定の実施形態によれば、がんは肝臓がんである。

がんの治療に使用される医薬の用量、又はその医薬に含まれる化合物もしくは塩、その同位体バリエーションもしくは溶媒和物、又は他の化学療法剤の用量は、通常、適用される特定の化合物、患者、特定の疾患又は状態及びその重症度、投与の経路及び頻度などに依存し、具体的な状況に応じて主治医が決定する必要がある。本開示の目的のために、典型的な1日用量は、上記の要因に応じて、約0.1 µg/kgから1 µg/kgまで、10 µg/kgまで、100 µg/kgまで、1 mg/kgまで、10 mg/kgまで、100 mg/kgまで、又はそれ以上のいずれかの範囲であり得る。数日以上にわたる反復投与の場合、状態に応じて、症状の所望の抑制が起こるまで、又はがんもしくはその症状を軽減するのに十分な治療レベルが達成されるまで、治療は継続される。例示的な投与計画には、約0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、0.6 mg/kg、0.7 mg/kg、0.8 mg/kg、0.9 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、又はそれ以上の初期用量を投与し、その後毎週維持用量を投与することが含まれる。ただし、医師が達成したい薬物動態学的減衰のパターンに応じて、他の投与計画も有用な場合がある。例えば、週に1~4回の投与が考えられる。特定の実施形態では、投与頻度は、毎週、2週間ごと、4週間ごと、5週間ごと、6週間ごと、7週間ごと、8週間ごと、9週間ごと、又は10週間ごとに1回；又は、毎月、2か月ごと、又は3か月ごと、又はそれ以上に1回である。この治療の進行は、従来の技術やアッセイによって容易に監視できる。

【0021】

上記医薬は、錠剤、坐剤、分散錠、腸溶錠、チュアブル錠、口腔内崩壊錠、カプセル剤、糖衣剤、顆粒剤、乾燥粉末、経口液剤、注射用の細い針、注射用凍結乾燥粉末、又は輸液などの、臨床投与のための任意の剤形であり得る。

【0022】

本発明の特定の実施形態によれば、前記方法は、AKR1C3抗体を使用して患者のがん細胞のAKR1C3レダクターゼの含有量を測定する工程をさらに含み、AKR1C3レダクターゼの含有量が所定の値以上であることが測定されると、前記化合物が患者に投与される。

【0023】

別の態様では、本発明は、細胞を有効量の式Iで表される化合物1-(3-(3-N, N-ジメチルアミノカルボニル)フェノキシル-4-ニトロフェニル)-1-エチル-N, N'-ビス(エチレン)ホスホルアミダート、又はその薬学的に許容される塩、同位体

10

20

30

40

50

バリエーション又は溶媒和物と接触させる工程を含む、細胞の増殖を阻害する方法を提供し、細胞の A K R 1 C 3 レダクターゼレベルは、A K R 1 C 3 タンパク質レベル又は R N A レベルで表され、所定の値以上である。

【0024】

本発明の特定の実施形態によれば、この方法は、A K R 1 C 3 抗体を使用して細胞の A K R 1 C 3 レダクターゼの含有量を測定する工程をさらに含み、A K R 1 C 3 レダクターゼの含有量が所定の値以上であることが測定されると、前記化合物を細胞と接触させる。

【0025】

別の態様では、本発明は、細胞の増殖を阻害するための医薬の製造における、式 I で表される化合物 1 - (3 - (3 - N, N - ジメチルアミノカルボニル) フェノキシル - 4 - ニトロフェニル) - 1 - エチル - N, N' - ビス (エチレン) ホスホルアミダート、又はその薬学的に許容される塩、同位体バリエーション又は溶媒和物の使用を提供し、前記細胞の A K R 1 C 3 レダクターゼレベルは、A K R 1 C 3 タンパク質レベル又は R N A レベルで表され、所定の値以上である。

【0026】

本発明の特定の実施形態によれば、前記細胞はがん細胞である。

別の態様では、本発明は、以下を含む組成物を提供する：

(1) 式 I で表される化合物 1 - (3 - (3 - N, N - ジメチルアミノカルボニル) フェノキシル - 4 - ニトロフェニル) - 1 - エチル - N, N' - ビス (エチレン) ホスホルアミダート、又は薬学的に許容される塩、同位体バリエーション又はその溶媒和物；及び

(2) 化学療法剤又は生物学的作用剤を含む少なくとも 1 つの治療剤。

【0027】

本発明の特定の実施形態によれば、前記化合物は、式 I - 1 で表される (S) - 1 - (3 - (3 - N, N - ジメチルアミノカルボニル) フェノキシル - 4 - ニトロフェニル) - 1 - エチル - N, N' - ビス (エチレン) ホスホルアミダート、又は式 I - 2 で表される (R) - 1 - (3 - (3 - N, N - ジメチルアミノカルボニル) フェノキシル - 4 - ニトロフェニル) - 1 - エチル - N, N' - ビス (エチレン) ホスホルアミダートである。

【0028】

本発明の特定の実施形態によれば、抗 P D - 1 / P D - L 1 抗体は、バベンチオ (登録商標) (アベルマブ)、オブジーボ (登録商標) (ニボルマブ)、キートルーダ (登録商標) (ペムブロリズマブ)、イミフィンジ (登録商標) (デュルバルマブ) 及び / 又は テセントリク (登録商標) (アテゾリズマブ) である。

【0029】

本発明の特定の実施形態によれば、前記がんが肝臓がんである場合、抗 P D - 1 抗体はキートルーダ (登録商標) (ペムブロリズマブ) であり、抗 P D - 1 抗体はバベンチオ (登録商標) (アベルマブ) である。

【0030】

本発明の特定の実施形態によれば、組成物は薬学的に許容される賦形剤をさらに含む。好ましくは、賦形剤は、不活性希釈剤、分散剤及び / 又は造粒剤、界面活性剤及び / 又は乳化剤、崩壊剤、結合剤、保存剤、緩衝剤、潤滑剤及び油から選択される。

【0031】

別の態様では、本発明は、有効量の本発明による組成物を患者に投与する工程を含む、それを必要とする患者のがんを治療する方法を提供する。

本発明の特定の実施形態によれば、前記方法は、A K R 1 C 3 抗体を使用して患者のがん細胞の A K R 1 C 3 レダクターゼの含有量を測定する工程をさらに含み、前記 A K R 1 C 3 レダクターゼの含有量が所定の値以上であることが測定されると、前記組成物は患者に投与される。

【0032】

したがって、本発明の実施形態は、式 I (O B I - 2 8 7 0)、式 I - 1 (O B I - 3 4 2 4) 又は式 I - 2 (O B I - 3 4 2 3) の化合物と、阻害性免疫チェックポイント抗

10

20

30

40

50

原の少なくとも1つの阻害剤とを含む組み合わせに関する。ある特定の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、阻害性免疫チェックポイント抗原を阻害／ブロックする免疫チェックポイント抗体である。

【0033】

一実施形態では、阻害性免疫チェックポイント抗原は、PD-1／PD-L1抗原、CTLA-4（細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4）、LAG-3（リンパ球活性化遺伝子3）、TIGIT（T細胞免疫グロブリン及び免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフドメイン）、Ceacam1（がん胎児性抗原関連細胞接着分子1）、LAIR-1（白血球関連免疫グロブリン様受容体-1）、TIM-3（T細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン-3）、VISTA（T細胞活性化のVドメインIgサブレッサー）、KIR（キラー細胞免疫グロブリン様受容体）、IDO（インドールアミン-ピロール2,3-ジオキシゲナーゼ）、B7-H3（CD276）、A2AR（アデノシンA2A受容体）又はCD47からなる群から選択される。

10

【0034】

一実施形態では、抗免疫チェックポイント抗体は、抗PD-1／PD-L1抗体、抗CTLA-4（細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4）抗体、抗LAG-3（リンパ球活性化遺伝子3）抗体、抗TIGIT（T細胞免疫グロブリン及び免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフドメイン）抗体、抗Ceacam1（がん胎児性抗原関連細胞接着分子1）抗体、抗LAIR-1（白血球関連免疫グロブリン様受容体-1）抗体、抗TIM-3（T細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン-3）抗体、抗VISTA（T細胞活性化のVドメインIgサブレッサー）抗体、抗KIR（キラー細胞免疫グロブリン様受容体）抗体、抗IDO（インドールアミン-ピロール2,3-ジオキシゲナーゼ）抗体、抗B7-H3（抗CD276）抗体、抗A2AR（アデノシンA2A受容体）抗体、又は抗CD47抗体である。

20

【0035】

一実施形態では、抗PD-1／PD-L1抗体は、バベンチオ（登録商標）（アベルマブ）、オブジーボ（登録商標）（ニボルマブ）、キートルーダ（登録商標）（ペムブロリズマブ）、イミフィンジ（登録商標）（デュルバルマブ）及び／又はテセントリク（登録商標）（アテゾリズマブ）である。

【図面の簡単な説明】

30

【0036】

【図1】実施例1の各群の平均体重。ビヒクル群、単独治療群、及び併用治療群の体重を、35日目まで週に2回記録した。体重減少は、ヒト肝細胞がんHepG2腫瘍担持ヒト化マウスのすべての治療群で見られなかった。データは平均±SEM（各群N=5）として示された。統計分析をスチューデントのt検定によって行った。

【図2】実施例1の各群の平均腫瘍重量。腫瘍細胞接種後36日目にマウスを殺し、ビヒクル、単独治療群及び併用治療群のマウスの腫瘍重量を記録した。OBI-3424（G2）及びOBI-3424+抗hPD-1／抗hPD-L1（G5／G6）併用治療群における腫瘍重量は、ビヒクル（G1）群と比較して有意に抑制された（ $p < 0.001$ ）。さらに、OBI-3424+抗hPD-1／抗hPD-L1（G5／G6）併用治療群における腫瘍重量は、抗hPD-1／抗hPD-L1（G3／G4）治療群と比較して有意に抑制された（ $p < 0.05$ ）。データは平均±SEMとして示された（各群N=5）。統計分析をスチューデントのt検定によって行った。P値<0.05を有意であるとみした。星印1つは $0.05 < P < 0.001$ 、星印2つは $P < 0.001$ を表す。

40

【図3】実施例1の各群の平均腫瘍体積。ビヒクル群、単独治療群及び併用治療群のマウスの腫瘍体積を、35日目まで週に2回記録した。OBI-3424（G2）及びOBI-3424+抗hPD-1／抗hPD-L1（G5／G6）併用治療群における腫瘍体積は、ビヒクル（G1）群と比較して有意に抑制された。データは平均±SEMとして示された（各群N=5）。統計分析をスチューデントのt検定によって行った。

【図4】実施例2の各群の平均体重。ビヒクル群、OBI-3424低用量及び高用量治

50

療群、及び OBI-3424+PD-1 抗体併用治療群の体重を、30 日目まで週に 2 回記録した。ヒト肝細胞がん HepG2 腫瘍担持ヒト化マウスにおいて、ビヒクル群、OBI-3424 単独群又は OBI-3424+PD-1 抗体の併用治療群では体重減少は見られなかった。データは平均±SEMとして示された（各群 N=5）。統計分析をスチューデントの t 検定によって行った。

【図 5】実施例 2 の各群の平均腫瘍重量。試験品の投与後 30 日目にマウスを殺し、OBI-3424 低用量（G2）、高用量治療（G3）、及び OBI-3424+PD-1 抗体の併用治療（G5～G7）におけるマウスの腫瘍重量は、ビヒクル（G1）群と比較して有意に抑制された（ $p < 0.05$ ）。さらに、高用量 OBI-3424+PD-1 抗体の併用治療（G6）における腫瘍重量は、高用量 OBI-3424 単独治療（G3）と比較して有意に減少した（ $p < 0.05$ ）。データは平均±SEMとして示された。統計分析をスチューデントの t 検定によって行った。P 値 < 0.05 を有意であるとみした。星印 1 つは $0.05 < P < 0.001$ 、星印 2 つは $P < 0.001$ を表す。

【図 6】実施例 2 の各群の平均腫瘍体積。ビヒクル群、OBI-3424 低用量及び高用量治療群、及び OBI-3424+PD-1 抗体併用治療群のマウスの腫瘍体積を、30 日目まで週に 2 回記録した。OBI-3424 高用量治療群（G3）及び OBI-3424+抗 hPD-1（G5～G7）併用治療群における腫瘍体積は、ビヒクル（G1）群と比較して有意に抑制された。データは平均±SEMとして示された（各群 N=5）。統計分析をスチューデントの t 検定によって行った。

【発明を実施するための形態】

【0037】

発明の詳細な説明

以下、本発明を具体的な実施例に基づいて説明する。当業者であれば、これらの例は本発明を説明するためにのみ使用されており、決してその範囲を限定するものではないことを理解できよう。

【0038】

定義

以下の定義は、読み手を助けるために提供されている。別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語、表記法、及びその他の科学的又は医学的用語又は専門用語は、化学及び医学分野の当業者によって一般に理解される意味を有することを意図している。場合によっては、一般的に理解されている意味を持つ用語は、明確にするため、及び／又はすぐに参照できるようにするために、本明細書で定義されている。本明細書にそのような定義を含めることは、当技術分野で一般に理解されている用語の定義との実質的な違いを表すものとして解釈されるべきではない。

【0039】

すべての数値指定、例えば、pH、温度、時間、濃度、及び重量（それぞれの範囲を含む）は、通常、必要に応じて 0.1、1.0、又は 10.0 の増分で（+）又は（-）に変更できる近似値である。すべての数値指定は、「約」という用語が前に付くものとして理解され得る。本明細書に記載の試薬は例示的なものであり、その等価物が当技術分野で知られている場合がある。

【0040】

「1つ」、「その」、及び「前記」という用語には、文脈上明らかにそうでないことが示されない限り、複数の指示対象が含まれる。したがって、例えば、1つの化合物への言及は、1つ以上の化合物、又は少なくとも1つの化合物を指す。したがって、用語「1つ」、「1つ以上」、及び「少なくとも1つ」は、本明細書では互換的に使用される。

【0041】

「約」又は「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値の許容誤差を意味し、その値のがどのように測定又は決定されるかに部分的に依存する。特定の実施形態では、「約」又は「およそ」という用語は、1、2、3、又は 4 標準偏差以内を意味する。特定の実施形態において、「約」又は「およそ」という用語は、指定された値又は範

図の50%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、又は0.05%以内を意味する。

【0042】

本明細書で使用される場合、「含む」又は「含有する」という用語は、組成物及び方法が列挙された要素を含むが、他の要素を排除しないことを意味することを意図する。組成物及び方法を定義するために使用される「本質的に～からなる」は、その組成物又は方法にとって本質的に重要な要素の他の要素を除外することを意味するものとする。「～からなる」とは、特許請求された組成物及び実質的な方法ステップについて、他の成分の微量元素を超えるものを除外することを意味するものとする。これらの移行句のそれぞれによって定義される実施形態は、本発明の範囲内にある。したがって、方法及び組成物は、追加のステップ及び構成要素を含むことができること（～を含む／含有する）、あるいは、重要ではないステップ及び組成物を含むことができること（～から本質的になる）、あるいは、記載された方法ステップ又は組成物のみを意図すること（～からなる）が意図される。

10

【0043】

患者に薬物を「投与する」又は患者への薬物「の投与」という用語（及びこの語句の文法上の等価物）は、直接投与（これは、医療専門家による患者への投与又は自己投与であり得る）、及び／又は間接的な投与（これは、薬物を処方する行為であり得る）を指す。例えば、患者に薬物を自己投与するよう指示する医師、及び／又は患者に薬物の処方箋を提供する医師は、患者に薬物を投与している。

20

【0044】

「抗体」という用語はさらに、抗体、消化断片、それらの特定の部分及びバリエーションを含むことを意図しており、これには、抗体模倣物が含まれ、又は抗がん抗体もしくはその特定の断片もしくは部分の構造及び／もしくは機能を模倣する抗体の部分が含まれ、これには、それぞれが本発明の抗がん抗体に由来する少なくとも1つのCDRを含む単鎖抗体及びその断片が含まれる。

【0045】

「生物学的作用剤」という用語には、ペプチド、タンパク質、抗体、ホルモン、サイトカイン、ケモカイン、及びそれらの任意の組み合わせが含まれる。

「がん」という用語は、浸潤によって局所的に、及び転移によって全身的に拡大し得る、無制限に増殖する可能性のある、白血病、リンパ腫、がん腫、及び固形腫瘍を含む他の悪性腫瘍を指す。がんの例には、限定するものではないが、副腎がん、骨がん、脳がん、乳がん、気管支がん、結腸がん及び／又は直腸がん、胆嚢がん、頭頸部がん、腎臓がん、喉頭がん、肝臓がん、肺がん、神経組織のがん、膵臓がん、前立腺がん、副甲状腺がん、皮膚がん、胃がん、及び甲状腺がんが挙げられる。がんの他の特定の例としては、急性及び慢性のリンパ球性及び顆粒球性腫瘍、腺がん、腺腫、基底細胞がん、子宮頸部異形成及び上皮内癌、ユーイング肉腫、表皮癌、巨細胞腫瘍、多形神経膠芽腫、有毛細胞腫瘍、腸神経節神経腫、過形成性角膜神経腫瘍、島細胞がん、カポジ肉腫、平滑筋腫、白血病、リンパ腫、悪性カルチノイド、悪性黒色腫、悪性高カルシウム血症、マルファノイドハビトゥス腫瘍、髄様がん、転移性皮膚がん、粘膜神経腫、骨髄腫、菌状息肉腫、神経芽腫、骨肉腫、骨原性及びその他の肉腫、卵巣腫瘍、褐色細胞腫、真性赤血球増加症、原発性脳腫瘍、小細胞肺腫瘍、潰瘍性及び乳頭型の両方の扁平上皮がん、過形成、精上皮腫、軟部肉腫、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、腎細胞腫瘍、局所的皮膚病変、細網細胞肉腫、及びウィルムス腫瘍が挙げられる。

30

40

【0046】

本明細書で使用される「化学療法剤」という用語は、がんの治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、モノメチルアウリスタチンE（MMAE）、モノメチルアウリスタチンF（MMAF）、メルタンシン（DM1）、アントラサイクリン、ピロロベンゾジアゼピン、 α -アマニチン、チューブリシン、ベンゾジアゼピン、エルロチニブ、ボルテゾミブ、フルベストラント、スニチニブ、レトロゾール、メシル酸イマチニブ、PTK7

50

87 / Z K 2 2 2 5 8 4、オキサリプラチン、ロイコボリン、ラパマイシン、ラパチニブ、ロナファルニブ (S A R A S A R (商標)、S C H 6 6 3 3 6)、ソラフェニブ、ゲフィチニブ、A G 1 4 7 8、A G 1 5 7 1、アルキル化剤、アルキルスルホン酸塩、アジリジン、エチレンイミン、メチラメラミン (m e t h y l a m e l a m i n e)、アセトゲニン、カンプトテシン、プリオスタチン、カリストアチン、C C - 1 0 6 5、クリプトフィシン、ドラスタチン、デュオカルマイシン、エレウテロビン、パンクラティスタチン、サルコディクチン、スポンジスタチン、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンビチン (n o v e m b i c h i n)、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン、カリケアマイシン、ダイネマイシン、クロドロネート、エスペラマイシン、ネオカルチノスタチン発色団、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラマイシン (a u t h r a m y c i n)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン (c a r a b i c i n)、カミノマイシン (c a m i n o m y c i n)、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-2-ノルロイシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (p o t f i r o m y c i n)、ピューロマイシン、ケラマイシン (q u e l a m y c i n)、ロドルビシン (r o d o r u b i c i n)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル (5 - F U)、デノプテリン、プテロプテリン、トリメトトレキサート、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン (d r o m o s t a n o l o n e)、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン、フロリン酸、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレブリン酸、エニルラシル、アムサクリン、ベストラブシル (b e s t r a b u c i l)、ビスアントレン、エダトラキサート (e d a t r a x a t e)、デフォファミン (d e f o f a m i n e)、デメコルシン、ジアジクオン、エルホルミチン (e l f o r m i t h i n e)、酢酸エリブチニウム、エボチロン、エトグルシド、硝酸ガリウム、ヒドロキシ尿素、レンチナン、ロニダイニン (l o n i d a i n i n e)、メイタンシン、アンサマイトシン、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダンモール (m o p i d a n m o l)、ニトラエリン (n i t r a e r i n e)、ペントスタチン、フェナメット、ピラルビシン、ロソキサントロン、ポドフィリン酸、2-エチルヒドラジド、プロカルバジン、ラゾキサン、リゾキシン、シゾフィラン、スピロゲルマニウム、テヌアゾン酸、トリアジクオン (t r i a z i q u o n e)、2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン、トリコテセン、ウレタン、ビンデシン、ダカルバジン、マンノムスチン、ミトブロニトール、ミトラクトール、ピボプロマン、ガシトシン (g a c y t o s i n e)、アラビノシド、シクロホスファミド、チオテパ、タキソイド、パクリタキセル、ドセタキセル、クロランブシル (c h l o r a n b u c i l)、ゲムシタビン、6-チオグアニン、メルカプトプリン、メトトレキサート、シスプラチン、カルボプラチン、ビンブラスチン、プラチナ、エトポシド、イホスファミド、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ビノレルビン、ノバントロン、テニポシド、エダトレキサート、ダウノマイシン、アミノプテリン、キセローダ、イバンドロン酸、トポイソメラーゼ阻害剤、ジフルオロメチルオルニチン (D M F O)、レチノイド、及びカペシタビンが挙げられる。

【0047】

「併用」という用語は、併用療法を指し、O B I - 3 4 2 3 / O B I - 3 4 2 4 化合物の量及び／又は他の生物学的作用剤又は化学薬剤の量を、治療サイクル中の同じ日又は異

10

20

30

40

50

なる日に順番に又は同時に一緒に（同時投与及び／又は共製剤として）投与した場合、治療上効果があり、かつ治療上相加以上の相乗効果が得られるような量である。

【0048】

「接触させる」又は「接触」という用語は、そのような接触の結果として生理学的及び／又は化学的效果が生じるように、治療薬と細胞又は組織とを一緒にすることを指すことを意味する。接触は、*in vitro*、*ex vivo*、又は*in vivo*で行うことができる。一実施形態では、治療薬を細胞培養物（*in vitro*）中の細胞と接触させて、細胞に対する治療薬の効果を測定する。別の実施形態では、治療薬と細胞又は組織との接触には、接触させる細胞又は組織を有する対象への治療薬の投与が含まれる。

【0049】

「光学活性」という用語は、約10%以上、約20%以上、約30%以上、約40%以上、約50%以上、約60%以上、約70%以上、約80%以上、約90%以上、約91%以上、約92%以上、約93%以上、約94%以上、約95%以上、約96%以上、約97%以上、約98%以上、約99%以上、約99.5%以上、約99.8%以上、又は約99.9%以上の鏡像体過剰率を有する分子の集合を指す。特定の実施形態では、光学活性化合物の鏡像体過剰率は、約90%以上、約95%以上、約98%以上、又は約99%以上である。化合物の鏡像体過剰率は、当業者によって使用される任意の標準的な方法によって決定することができ、これには、限定するものではないが、光学活性固定相を使用したカイロプティカル（*chiroptical*）クロマトグラフィー（ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、及び薄層クロマトグラフィー）、同位体希釈、電気泳動、熱量測定、偏光測定、キラル誘導体化によるNMR分光法、及びキラル溶媒和剤又はキラルシフト試薬を用いたNMR法が挙げられる。

【0050】

光学活性化合物を説明する際、接頭辞R及びSは、そのキラル中心の周りの分子の絶対配置を示すために使用される。

「実質的に純粋」という用語は、当業者によって使用される標準的な分析方法によって、例えば限定するものではないが、薄層クロマトグラフィー（TLC）、ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、ガスクロマトグラフィー（GC）、核磁気共鳴（NMR）、及び質量分析（MS）によって決定されたときに、容易に検出可能な不純物が存在しないように見えるほど十分に均質であるか、又は、さらに精製してもその物質の物理的、化学的、生物学的及び／又は薬理学的特性（酵素活性や生物学的活性など）が検出可能なほど変化しない程度に十分に純粋であることを意味する。特定の実施形態において、「実質的に純粋」とは、標準的な分析方法によって測定されたときに、分子の少なくとも約50重量%、少なくとも約70重量%、少なくとも約80重量%、少なくとも約90重量%、少なくとも約95重量%、少なくとも約98重量%、少なくとも約99重量%、又は少なくとも約99.5重量%が化合物の単一の立体異性体である分子の集合を指す。

【0051】

「患者」及び「対象」は、がんの治療が必要な哺乳動物を指すために同じ意味で使用される。通常、患者はヒトである。通常、患者はがんと診断されたヒトである。特定の実施形態では、「患者」又は「対象」は、薬剤及び治療法のスクリーニング、特徴解析、及び評価に使用される非ヒト哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、マウス、又はラットを指す場合がある。

【0052】

「プロドラッグ」という用語は、投与後、生物学的に活性な、又は少なくとも1つの特性に関してより活性な化合物（又は薬物）に代謝又はその他の方法で変換される化合物を指す。プロドラッグは、薬物と比較して、その活性が低下又は不活性になるような方法で化学的に修飾されるが、その化学修飾は、プロドラッグが投与された後に代謝又は他の生物学的プロセスによって対応する薬物が生成されるようなものである。プロドラッグは、活性薬物と比較して、変化した代謝安定性又は輸送特性、より少ない副作用又はより低い

10

20

30

40

50

毒性、又は改善された風味を有し得る（例えば、参考文献 N o g r a d y , 1 9 8 5 , M e d i c i n a l C h e m i s t r y A B i o c h e m i c a l A p p r o a c h , O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s , N e w Y o r k , 3 8 8 ~ 3 9 2 頁を参照、参照により本明細書に組み込まれる）。プロドラッグは、対応する薬物以外の反応物を使用して合成され得る。

【0053】

「固形腫瘍」という用語は、骨、脳、肝臓、肺、リンパ節、脾臓、前立腺、皮膚及び軟組織（肉腫）における転移性腫瘍を含むがこれらに限定されない固形腫瘍を指す。

薬物の「治療有効量」という用語は、がん患者に投与した場合に、意図した治療効果、例えば、その患者においてがんの1つ以上の症状の軽減、改善、緩和又は排除を有するであろう薬物の量を指す。治療効果は必ずしも1回の投与で生じるとは限らず、一連の投与後にのみ生じる場合もある。したがって、治療有効量は、1回以上の投与で投与され得る。

10

【0054】

状態又は患者「の治療」という用語は、臨床結果を含む有益な又は望ましい結果を得るために措置を講じることを指す。本発明の目的において、有益な又は望ましい臨床結果には、限定するものではないが、がんの1つ以上の症状の緩和又は改善；病気の程度の軽減；病気の進行の遅延又は鈍化；病気の状態の緩和、軽減、又は安定化；又はその他の有益な結果が含まれる。がんの治療により、場合によっては、部分応答又は安定した疾患が得られる場合がある。

20

【0055】

「腫瘍細胞」という用語は、任意の適切な種、例えば、ネズミ科、イヌ科、ネコ科、ウマ科又はヒトなどの哺乳動物の腫瘍細胞を指す。

「同位体バリエーション」という用語は、そのような化合物を構成する1つ以上の原子に不自然な割合の同位体を含む化合物を指す。特定の実施形態では、化合物の「同位体バリエーション」は、水素 (^1H)、重水素 (^2H)、三重水素 (^3H)、炭素11 (^{11}C)、炭素12 (^{12}C)、炭素13 (^{13}C)、炭素14 (^{14}C)、窒素13 (^{13}N)、窒素14 (^{14}N)、窒素15 (^{15}N)、酸素14 (^{14}O)、酸素15 (^{15}O)、酸素16 (^{16}O)、酸素17 (^{17}O)、酸素18 (^{18}O)、フッ素17 (^{17}F)、フッ素18 (^{18}F)、リン31 (^{31}P)、リン32 (^{32}P)、リン33 (^{33}P)、硫黄32 (^{32}S)、硫黄33 (^{33}S)、硫黄34 (^{34}S)、硫黄35 (^{35}S)、硫黄36 (^{36}S)、塩素35 (^{35}Cl)、塩素36 (^{36}Cl)、塩素37 (^{37}Cl)、臭素79 (^{79}Br)、臭素81 (^{81}Br)、ヨウ素123 (^{123}I)、ヨウ素125 (^{125}I)、ヨウ素127 (^{127}I)、ヨウ素129 (^{129}I)、及びヨウ素131 (^{131}I) を含むがこれらに限定されない1つ以上の同位体を不自然な割合で含む。特定の実施形態では、化合物の「同位体バリエーション」は安定した形態、すなわち非放射性である。特定の実施形態では、化合物の「同位体バリエーション」は、水素 (^1H)、重水素 (^2H)、炭素12 (^{12}C)、炭素13 (^{13}C)、窒素14 (^{14}N)、窒素15 (^{15}N)、酸素16 (^{16}O)、酸素17 (^{17}O)、酸素18 (^{18}O)、フッ素17 (^{17}F)、リン31 (^{31}P)、硫黄32 (^{32}S)、硫黄33 (^{33}S)、硫黄34 (^{34}S)、硫黄36 (^{36}S)、塩素35 (^{35}Cl)、塩素37 (^{37}Cl)、臭素79 (^{79}Br)、臭素81 (^{81}Br)、及びヨウ素127 (^{127}I) を含むがこれらに限定されない1つ以上の同位体を不自然な割合で含む。特定の実施形態では、化合物の「同位体バリエーション」は不安定な形態、すなわち放射性である。特定の実施形態では、化合物の「同位体バリエーション」は、三重水素 (^3H)、炭素11 (^{11}C)、炭素14 (^{14}C)、窒素13 (^{13}N)、酸素14 (^{14}O)、酸素15 (^{15}O)、フッ素18 (^{18}F)、リン32 (^{32}P)、リン33 (^{33}P)、硫黄35 (^{35}S)、塩素36 (^{36}Cl)、ヨウ素123 (^{123}I)、ヨウ素125 (^{125}I)、ヨウ素129 (^{129}I)、及びヨウ素131 (^{131}I) を含むがこれらに限定されない1つ以上の同位体を不自然な割合で含む。本明細書で提供される化合物において、当業者の判断により可能な場合、任意の水

30

40

50

素は例えば ^2H であり得、又は任意の炭素は例として ^{13}C であり得、又は任意の窒素は例として ^{15}N であり得、かつ任意の酸素は ^{18}O であり得ることが理解されよう。特定の実施形態では、化合物の「同位体バリエーション」は、不自然な割合の重水素を含む。

【0056】

「溶媒和物」という用語は、溶質（例えば、本明細書で提供される化合物）の1つ以上の分子と、化学量論的量又は非化学量論的量で存在する溶媒の1つ以上の分子とによって形成される複合体又は凝集体を指す。適切な溶媒としては、限定するものではないが、水、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、イソプロパノール、及び酢酸が挙げられる。特定の実施形態では、溶媒は薬学的に許容される。一実施形態では、複合体又は凝集体は結晶形態である。別の実施形態では、複合体又は凝集体は非結晶形態である。溶媒が水である場合、溶媒和物は水和物である。水和物の例としては、限定するものではないが、半水和物、一水和物、二水和物、三水和物、四水和物、及び五水和物が挙げられる。

10

【0057】

「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、液体又は固体の充填剤、希釈剤、溶媒、又はカプセル化材料などの薬学的に許容される材料、組成物、又はビヒクルを指す。一実施形態では、各成分は、医薬製剤の他の成分と適合するという意味で、及び過剰な毒性、刺激、アレルギー反応を伴わずにヒト及び動物の組織又は器官と接触して使用するのに適しているという意味で「薬学的に許容される」ものである。

【0058】

「免疫チェックポイント阻害剤」という用語は、抑制性免疫チェックポイントシステムを阻害／ブロックする分子であり、進行性腫瘍に対する効果的な治療法として登場した。その中には、細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4（CTLA4）及びプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）をブロックする治療用抗体があり、これらはいくつかの腫瘍に使用されている⁽³⁴⁾。PD-1（プログラム細胞死タンパク質、CD279）、（受容体のB7／CD28ファミリーのメンバー）は、T細胞、B細胞、NK細胞、及び骨髄由来サプレッサー細胞などの活性化白血球の細胞表面に発現する単量体分子である。その発現は、遺伝的メカニズムとエピジェネティックなメカニズムの間の相互作用によって細かく制御される。PD-1の既知のリガンドはPD-L1及びPD-L2である⁽³⁵⁾。

20

【0059】

PD-L1（プログラム細胞死タンパク質リガンド1、B7H1、CD274）は、低レベルで発現し、細胞活性化により、T細胞、B細胞、骨髄細胞、及び樹状細胞を含む造血細胞、ならびに非造血細胞（例えば、肺、心臓、内皮、膵島細胞、ケラチノサイトなど）、特にがん細胞で上方制御される。PD-L2（プログラム細胞死タンパク質リガンド2、B7-DC、CD273）は、マクロファージ、樹状細胞（DC）、活性化CD4⁺及びCD8⁺リンパ球、及び一部の固形腫瘍（卵巣がん、小細胞肺癌、食道がん）で発現する。PD-L1及びPD-L2の発現は、正常細胞及びがん関連線維芽細胞でも検出されている。PD-L1とPD-L2は両方とも、追加の受容体と相互作用する。PD-L1はCD28リガンドCD80と相互作用し、PD-L2はマクロファージ及び他の細胞型で発現される反発誘導分子（RGM）bと相互作用する。PD-1の細胞質尾部は、免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（ITIM）及び免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ（ITSM）を含む。Tリンパ球では、PD-1とそのリガンドの相互作用により、PD-1の細胞内尾部にある2つのチロシンがリン酸化される。SH2ドメイン含有タンパク質チロシンホスファターゼ（SHP-1及び／又はSHP-2）がPD-1のITSM細胞質領域に動員されると、T細胞受容体の下流シグナルが阻害され、それによってT細胞の増殖とサイトカインの産生が阻害される。PD-1はT細胞に他の効果も及ぼす。例えば、Akt及びRas経路を阻害することにより、PD-1の誘発はユビキチンリガーゼ成分SKP2の転写を抑制する。これにより、SKP2によって仲介される、サイクリン依存性キナーゼの阻害剤であるp27（kip1）の分解が損なわれることで、細胞周期の進行をブロックする。さらに、PD-1は複数のメカニズムによってアポトーシスを促進することができる。T細胞活性化を直接阻害するだけでなく、PD-

30

40

50

L1によるPD-1の誘発は、エフェクターT細胞を積極的に抑制する末梢寛容の重要なメディエーターである制御性T細胞(Treg)の発生を誘導することができる。PD-1誘発によるTreg誘導は、ホスホ-Aktなどの重要なシグナル伝達分子の調節によって媒介され、そのレベルはPD-1によって誘導されるPTEN活性によって低く保たれる。いくつかの種類のがん細胞はPD-L1を発現する。さらに、腫瘍微小環境内の非腫瘍細胞(内皮細胞、白血球、線維芽細胞)もPD-L1を発現することができる。これは、それらが腫瘍浸潤性PD-1+Tリンパ球(TIL)に耐性があること、及び／又はTregの発生を誘導できることを示唆している。実際、一部の種類のがん(黒色腫、腎がん、非小細胞肺癌など)に罹患した患者を抗PD-1/PD-L1モノクローナル抗体(mAb)で治療すると腫瘍増殖を低減できることを示す証拠が増えてきている。

10

【0060】

免疫チェックポイント阻害剤は、ヒトにおいてある程度の抗腫瘍活性をもたらすことが知られており、この部分的な抗腫瘍活性は、治療を受けた被験者の一部でのみ観察される。チェックポイント阻害剤には、タンパク質、アミノ酸残基を含むポリペプチド、及びモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体が含まれる場合もあれば除外される場合もある。本明細書に記載の組成物は、2つ以上のチェックポイント阻害剤を含むか、又はそれと一緒に投与することができる。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、CD28/CTLA-4を含むT細胞制御因子のファミリーのいずれかに見出されるリガンド又はタンパク質に結合する。チェックポイント阻害剤の標的には、免疫系エフェクター細胞又は調節細胞(例えば、T細胞)上に発現する受容体又は共受容体(例えば、CTLA-4、CD8)；抗原提示細胞の表面に発現するタンパク質(すなわち、活性化T細胞の表面に発現し、PD-1、PD-2、PD-L1、及びPD-L2を含むことも除外することもできる)；代謝酵素、又は腫瘍及び腫瘍浸潤細胞の両方によって発現される代謝酵素(例えば、インドールアミン-ピロール2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)、例えばIDO1及びIDO2などのアイソフォームを含む)；免疫グロブリンスーパーファミリーに属するタンパク質(例えば、LAG3としても知られるリンパ球活性化遺伝子3)；B7スーパーファミリーに属するタンパク質(例えば、B7-H3/CD276又はそのホモログ)が含まれる場合もあれば除外される場合もある。B7タンパク質は、活性化抗原提示細胞とT細胞の両方に見られる。いくつかの実施形態では、2つ以上のチェックポイント阻害剤を組み合わせ、又は一緒にペアにすることができる。例えば、抗原提示細胞に存在するB7ファミリーチェックポイント阻害剤は、T細胞の表面に発現するCD28又はCTLA-4の阻害剤とペアにすることで、これら2種類の細胞間の活性を低下させる共阻害シグナルを生成できる。共受容体とは、外部リガンドに結合した後、細胞内プロセスを制御できる2つの異なる受容体と同じ細胞上に存在することを指す。共受容体は刺激性又は抑制性であり得る。共受容体は、アクセサリ受容体又は共シグナル受容体と呼ばれることもある。本明細書で使用する場合、「共阻害」という用語は、複数の分子が細胞表面上のそれぞれの受容体に結合し、それによって細胞内プロセスの発生を遅らせたり、妨げたりする結果を指す。

20

30

【0061】

特定の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤には、抗PD-1、抗PD-L1、又は抗CTLA-4抗体又は阻害剤など、PD-1又はCTLA-4経路を阻害する阻害性受容体のアンタゴニストが含まれ得る。PD-1又はPD-L1阻害剤の例としては、限定するものではないが、ヒトPD-1をブロックするヒト化抗体、例えば、ラムプロリズマブ(抗PD-1Ab、商品名キートルーダ(登録商標))又はピディリズマブ(抗PD-1Ab)、バベンチオ(登録商標)(抗PD-L1Ab、アベルマブ)、イミフィンジ(登録商標)(抗PD-L1Ab、デュルバルマブ)、テセントリク(登録商標)(抗PD-L1Ab、アテゾリズマブ)、及び完全ヒト抗体、例えば、ニボルマブ(抗PD-1Ab、商品名オブジーボ(登録商標))が挙げられる。他のPD-1阻害剤には、B7-DC-Ig又はAMP-244としても知られるPD-L2Fc融合タンパク質、及び現在治療での使用のために研究中及び／又は開発中の他のPD-1阻害剤を含むがこれら

40

50

に限定されない、可溶性PD-1リガンドの提示が含まれ得る。さらに、免疫チェックポイント阻害剤には、限定するものではないが、PD-L1をブロックするヒト化抗体又は完全ヒト抗体、例えば、デュルバルマブ及びM1H1、ならびに現在研究中の他のPD-L1阻害剤が含まれ得る。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4、PD-L1、又はPD-1抗体である。いくつかの実施形態では、PD-1又はCTLA-4阻害剤には、限定するものではないが、ヒトPD-1をブロックするヒト化抗体、例えば、ラムプロリズマブ（抗PD-1Ab、商品名キートルーダ（登録商標））又はピディリズマブ（抗PD-1Ab）、ニボルマブ（抗PD-1Ab、商品名オプジーボ（登録商標））、チシリムマブ（抗CTLA-4Ab）、イピリムマブ（抗CTLA-4Ab）、MPDL3280A、BMS-936559、AMP-224、IMP321（ImmuFact）、MGA271、インドキシモド、及びINCB024360が含まれる。

10

【0062】

実施例

実施例1. HepG2腫瘍担持ヒト化マウスモデルにおけるOBI-3424+抗PD-1（ペムプロリズマブ）又は抗PD-L1抗体（アベルマブ）の有効性評価

研究の目的は、HepG2腫瘍担持ヒト化マウスモデルにおいて、抗hPD-1抗体又は抗hPD-L1抗体の存在下での試験品OBI-3424の単独療法又は併用治療の有効性を評価することである。

【0063】

材料

1. OBI-3424-DP

ロット番号：FLC-INJ-1711-01

試験品の数：2バイアル／1バイアル当たり1mL

成分：DNAアルキル化剤

濃度：10mg/mL

外観：透明な液体

保管条件：-20℃

2. 抗ヒトPD-1、ペムプロリズマブ、Merck&Co., Inc.

ロット番号：7302614A13

試験品の数：1バイアル／1バイアル当たり1.2mL

成分：抗体

濃度：25mg/mL

外観：透明な液体

保管条件：2～8℃

3. 抗ヒトPD-L1、アベルマブ、Merck&Co., Inc.

ロット番号：AU024788

試験品の数：1チューブ／1チューブ当たり1.5mL

成分：抗体

濃度：20mg/mL

外観：透明な液体

保管条件：2～8℃

4. 滅菌生理食塩水（Taiwan Biotech Co., LTD）

ロット番号：1PD2A054

試験品の数：20mLチューブ6本

濃度：0.9%塩化ナトリウム

外観：透明な液体

溶解度：情報なし

保管条件：室温

5. マトリゲル（コーニングカタログ番号：354248、ロット番号：822800

20

30

40

50

1)

6. ヒトP BMC (ロット: P BMC 102219D、Zenbio、米国)

7. コラゲナーゼ (Sigma Aldrich、C5138)、DNase I (Sigma Aldrich、D5025)、ヒアルロニダーゼ (Sigma Aldrich、H6254)

8. RBC赤血球溶解バッファー (Biolegend、420302)

9. 細胞染色バッファー (Biolegend、420201)

10. Human TruStain FcX (商標) (Fc受容体ブロッキング溶液) (Biolegend、422302)

11. 抗体:

抗ヒトCD45抗体 (Beckman、IM0782U)、抗ヒトCD8抗体 (Beckman、IM0452U及びBiolegend、300911)、抗ヒトCD4抗体 (Beckman、B16491)、抗ヒトCD56抗体 (Beckman、IM2474U)、抗ヒトCD16抗体 (Beckman、IM1238U)、抗ヒトCD25抗体 (Beckman、IM0479U)。

【0064】

マウス

1. 種: ハツカネズミ

系統: 進行性免疫不全マウス。

【0065】

(NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg)

供給元: Trineo Biotechnology Co., LTD.

性別: メス

研究開始時の年齢: 6~8週齢

研究開始時の体重範囲: 17~28g

2. 番号付けと識別: 各マウスには耳標によって番号を付けた。収容ケージは、研究番号、ケージ番号、動物番号、性別、用量レベルなどを含む情報を記したケージカードによって識別した。

【0066】

動物のグループ分け: マウスを6つの群に分けた: G1 (ビヒクル)、G2 (OBI-3424)、G3 (抗hPD-1)、G4 (抗hPD-L1)、G5 (OBI-3424+抗hPD-1)、G6 (OBI-3424+抗hPD-L1)。各群には5匹のマウスが含まれる。ヒト肝細胞がん細胞株HepG2を進行性免疫不全マウスの皮下に接種した。合計30匹のマウスがこの研究に含まれた。

【0067】

3. 動物選択の理由: TFDAが発行した薬剤提案の非臨床安全性研究における抗がん剤の非臨床研究のガイドラインによれば、動物異種移植片腫瘍モデルは新薬又は新抗がん剤の有効性を評価するために使用できる。一般的に使用されるマウス系統であるBALB/c、C57BL/6に対して、BALB/cヌード、Nu/Nu、及びNOD/SCIDマウスは、通常、目的の薬剤の抗腫瘍効果を評価するために選択される。これらの系統は、よく知られた遺伝的及び品種的背景に基づいて世界規模で管理されており、人体における適切な反応の機能的な重要性について有益な洞察を提供することができる。

【0068】

4. 順応期間: 無作為化の前に、マウスを少なくとも3日間順応させた。臨床観察と体重測定を順応期間中に行った。この期間中、動物には病気の兆候や行動の変化は見られなかった。

【0069】

5. 動物の飼育条件: マウスを、温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 20\%$ 、及び12/12時間の明暗サイクルの制御された環境で、滅菌寝床 (10054、Andersons、米国) を備えた個別換気ケージ (IVC) で飼育した。餌 (Lab Diet 5010

10

20

30

40

50

、PMI、米国）及び水（滅菌RO水）は、研究期間全体を通じて自由摂取させた。
【0070】

6．無作為化：研究前にすべての動物の体重を測定し、健康状態を観察した。異常な臨床徴候のない動物を実験用を選択した。健康な動物を、群の間で体重に有意な差が出ないように、無作為に異なる群に分けた。動物の体重のばらつきは平均体重の±20%を超えないようにした。この手順は実験動物の実践基準に従って行われた。

【0071】

7．IACUC承認番号：IACUC-2020-SH-016

装置

細胞培養インキュベーター（Shell Lab／3552）

安全キャビネット（BAKER／SG604）

電子天秤（PRECISA／XS 225A-SCS）

ピペット（Thermo／フィンピペットF1）

正負圧検証済み個別ケージハウジングシステム（Allentown／NEXGEN）

分析天秤（PRECISA／XS3250C-SCS）

動物安楽死装置（Forward Biotech Supply）

フローサイトメーター（Beckman Coulter／Navios EX）

バーニヤ（ミットヨ／CD-6"ASX）

方法

実験計画

1．サンプリング：実験計画、実験群、注射の用量と体積、投与経路、及び動物の数を表1に示す。

【0072】

【表1】

表 1. 投与計画とサンプリング

群	試験品の経路及び投与	注射用量 (mg/kg)	注射体積 (mg/kg)	動物数
G1: ビヒクル	IV 及び IP	N/A	5+10	5
G2: OBI-3424	IV	1	5	5
G3: 抗 hPD-1	IP	10 (D15 から 20*)	5	5
G4: 抗 hPD-L1	IP	10 (D15 から 20*)	10	5
G5: OBI-3424+ 抗 hPD-1	IV 及び IP	10 (D15 から 20*)	5+10	5
G6: OBI-3424+ 抗 hPD-L1	IV 及び IP	1+10 (D15 から 20*)	5+10	5
静脈注射 (IV): 注射体積は 5 mL/kg である				
腹腔内注射 (IP): 注射体積は 10 mL/kg である				

* 15 日目から腹腔内投与量を 20 mg/kg に変更した。

【0073】

2．異種移植マウスモデルの確立

2．1．動物の毛の除去：ヒト肝細胞がん細胞株 Hep G 2 を注射する前に、右脇腹の毛のみをクリッピングによって除去した。

【0074】

2.2. 腫瘍細胞の皮下接種： 1×10^7 個の Hep G2 細胞を 0.25×10^7 個の hP BMC（細胞数比 4：1）と予め混合してから、マトリゲル（体積比 1：1）（コーニングカタログ番号：354248、ロット番号：8228001）を混合した。皮下注射体積は $200 \mu\text{L}$ / マウスであった。

【0075】

3. 試験品の経路及び投与：

3.1. 腫瘍細胞の接種後 8 日目に、試験品の抗 hPD-1 抗体又は参照品をマウスに腹腔内注射した。注射は、インスリン注射器を用いて、 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量（15 日目から注射用量を $20 \text{ mg} / \text{kg}$ に変更した）、 $10 \text{ mL} / \text{kg}$ の注射体積で行った。試験品の抗 hPD-1 抗体を、G3 及び G5 に、8、11、15、18、22、25、29、及び 32 日目に続けて投与した。参照品を G1 に投与した。手順はサンプル投与基準に従った。

10

【0076】

3.2. 腫瘍細胞の接種後 8 日目に、試験品の抗 hPD-L1 抗体又は参照品をマウスに腹腔内注射した。注射は、インスリン注射器を用いて、 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量（15 日目から注射用量を $20 \text{ mg} / \text{kg}$ に変更した）、 $10 \text{ mL} / \text{kg}$ の注射体積で行った。試験品の抗 hPD-L1 を、G4 及び G6 に、8、11、15、18、22、25、29、及び 32 日目に続けて投与した。参照品を G1 に投与した。手順はサンプル投与基準に従った。

20

【0077】

3.3. 腫瘍細胞の接種後 14 日目に、試験品の OBI-3424、参照品をマウスに静脈内注射した。注射は、インスリン注射器を用いて、 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量、 $5 \text{ mL} / \text{kg}$ の注射体積で行った。試験品の OBI-3424 を、G2、G5、及び G6 に、14、21、28、及び 35 日目に続けて投与した。参照品を G1 に投与した。手順はサンプル投与基準に従った。

【0078】

3.4. 試験品又は参照品の調製：

投与前に、試験品を参照品で希釈した。試験品 OBI-3424 の溶液濃度は $0.2 \text{ mg} / \text{mL}$ であり、試験品抗 hPD-1 及び試験品抗 hPD-L1 は $1 \text{ mg} / \text{mL}$ であった（15 日目からは $2 \text{ mg} / \text{mL}$ ）。

30

【0079】

4. 体重測定：

測定は接種翌日から行った。動物の体重を週に 2 回測定し、記録した。

5. 腫瘍直径の測定：

測定は接種翌日から行った。腫瘍体積を週に 2 回（月曜、木曜）測定し、記録した。腫瘍体積を、記録に従って楕円体方程式により計算した（（長径×短径×短径）×（ $\pi / 6$ ））。

【0080】

6. 腫瘍増殖阻害率の計算：

腫瘍体積を使用して、次の式に従って腫瘍増殖阻害（TGI）率を計算した： $\text{TGI} (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (C_i - C_0)] \times 100$ 、ここで、 T_i 及び C_i は、実験終了時（35 日目）の治療群及びビヒクル群の平均腫瘍体積を表す。一方、 T_0 及び C_0 は、実験開始時（1 日目）の治療群及びビヒクル群の平均腫瘍体積を表す。

40

【0081】

7. 採血：

顎下血液サンプルをエンドポイントで収集した。殺時には、心臓穿刺を使用して血液サンプルを採取することができた。採取した血液サンプルを $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $1500 \times g$ で 15 分間遠心分離して、血清とペレットとを分離した。上部の血清を収集し、 -70°C 以下の温度で保存した。手順は動物血液サンプリングの基準に従った。

【0082】

50

8. 研究のエンドポイントの決定：

研究は36日目に終了した。

9. 腫瘍切除：

研究期間の終わりにマウスをCO₂により安楽死させ、腫瘍周囲の結合組織を切除した。次いで、腫瘍サンプルを取り出して重量を測定した。半分の組織を10%ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。残りの半分は腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の単離に調製された。

【0083】

10. 腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の単離：

マウス腫瘍の半分をメスを使用して小さい断片に切り分け、コラゲナーゼ、DNase I、及びヒアルロニダーゼのカクテル（コラゲナーゼ#C5138、DNase I#D5025、ヒアルロニダーゼ#H6254、Sigma Aldrich）で少なくとも2時間消化させた。次いで、腫瘍消化物をシリンジプランジャーを使用して70µmメッシュセルストレーナー（Falcon#352350）に通し、PBSで洗浄した。細胞をRBC赤血球溶解バッファー（Biolegend#420302）で処理し、フローサイトメトリー用の単一細胞懸濁液を調製した。

【0084】

11. TIL集団のフローサイトメトリー分析：

細胞を染色バッファー（Biolegend#420201）で洗浄し、Fc受容体ブロック溶液（Biolegend#422302）を含む染色バッファーに再懸濁させ、4℃で15分間インキュベートした。細胞を蛍光結合表面抗体で染色し、4℃で30分間インキュベートした後、フローサイトメトリー分析のために染色バッファーに再懸濁させた。フローサイトメトリーは、Navios EXフローサイトメーター（Beckman Coulter）を使用して行われた。データを、Kaluzza Analysisソフトウェア（Beckman Coulter）を使用して分析した。

【0085】

12. 統計分析：

結果を、平均値及び平均値の標準誤差（平均±SEM）として表示した。各治療群について収集されたすべてのデータと並行する陰性対照データとの比較は、スチューデントのt検定（Microsoft Excel（登録商標）、2007）を使用して計算された。P≤0.05を有意とみなす。

【0086】

結果

群の体重をまとめたものを表2に示す。研究開始時に各群間で平均体重には統計的に有意な差は見られなかった。研究の終了時点で、G5（OBI-3424+抗hPD-1）及びG6（OBI-3424+抗hPD-L1）の体重は、他の群と比較してわずかに増加していた（図1及び表2）。腫瘍応答を様々な試験品から検査し、平均腫瘍応答を1、4、7、11、14、18、21、25、28、32、及び35日目に記録した（図3及び表3）。

【0087】

10

20

30

40

50

【表 2－1】

表 2. 体重のまとめ

群	動物 No.	体重 (g)											
		0 日目	1 日目	4 日目	7 日目	11 日目	14 日目	18 日目	21 日目	25 日目	28 日目	32 日目	35 日目
G1: ビヒクル	MI039	24.99	24.93	25.83	25.32	25.81	24.73	24.63	24.55	24.60	23.64	24.15	23.62
	MI047	20.78	20.80	21.81	22.05	22.97	23.69	23.28	23.07	22.91	22.23	23.04	22.58
	MI049	23.24	22.25	23.62	22.65	24.47	24.98	24.70	23.99	23.91	23.77	24.10	23.87
	MI057	22.07	22.32	23.10	23.14	22.35	21.86	23.11	23.13	23.22	23.31	23.02	22.01
	MI059	23.33	22.89	24.40	24.24	24.12	24.30	24.12	23.80	24.02	23.35	24.16	24.20
	平均	22.88	22.64	23.75	23.48	23.94	23.91	23.97	23.71	23.73	23.26	23.69	23.26
	SEM	0.70	0.67	0.67	0.58	0.60	0.56	0.33	0.28	0.30	0.27	0.27	0.41
G2: OBI-3424	MI035	24.96	22.46	22.37	22.47	23.94	24.07	24.35	24.16	24.25	23.76	24.05	24.05
	MI036	24.90	25.09	24.64	24.34	25.49	25.93	25.50	25.46	26.12	24.92	24.28	23.62
	MI040	22.27	22.27	23.03	23.05	23.21	23.33	22.61	22.60	22.64	20.15	22.28	21.87
	MI051	22.28	22.08	22.64	23.08	25.15	25.28	24.90	24.19	24.16	24.19	25.24	24.53
	MI053	22.68	22.05	23.02	23.25	23.92	23.25	23.80	23.77	24.18	24.28	24.80	24.42
	平均	23.42	22.79	23.14	23.24	24.34	24.37	24.23	24.04	24.27	23.46	24.13	23.70
	SEM	0.62	0.58	0.39	0.31	0.42	0.53	0.49	0.46	0.55	0.85	0.51	0.48
G3: 抗 hPD-1	MI031	24.48	23.77	24.37	24.33	25.23	25.73	25.52	25.31	25.35	24.05	23.93	24.51
	MI041	22.83	22.64	23.22	23.26	23.13	23.05	24.00	23.64	23.30	21.35	21.55	21.67
	MI055	22.77	22.39	23.69	23.03	22.86	22.58	23.68	23.07	23.44	22.97	23.13	23.02
	MI058	22.35	22.37	23.44	23.66	24.79	24.78	24.66	24.39	24.30	23.07	23.22	23.30
	MI060	21.75	21.18	22.64	23.10	23.48	23.54	23.64	21.55	20.71	21.15	20.92	21.34
	平均	22.84	22.47	23.47	23.48	23.90	23.94	24.30	23.59	23.42	22.52	22.55	22.77
	SEM	0.45	0.41	0.28	0.24	0.47	0.58	0.36	0.63	0.77	0.55	0.56	0.58

【 0 0 8 8 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

G4: 抗 hPD-L1	MI037	23.68	23.15	23.83	23.75	24.89	25.06	24.70	24.14	24.47	23.71	23.83	23.41
	MI046	25.61	25.88	26.01	26.73	26.45	26.71	26.09	26.11	25.74	25.42	25.58	24.98
	MI048	23.03	22.46	23.49	23.02	23.97	23.84	24.20	24.05	24.60	22.64	22.43	22.69
	MI052	21.27	21.36	21.62	21.92	22.76	22.29	22.27	21.02	22.60	21.81	18.37	*
	MI062	20.75	20.78	21.66	22.00	22.78	20.81	20.56	21.51	21.07	24.27	22.52	22.32
	平均	22.87	22.73	23.32	23.48	24.17	23.74	23.56	23.37	23.70	23.57	22.55	23.35
	SEM	0.87	0.89	0.81	0.88	0.70	1.03	0.97	0.94	0.83	0.63	1.19	0.59
G5: OBI-3424+ 抗 hPD-1	MI034	24.95	24.33	25.05	24.40	25.22	25.31	24.96	24.83	24.70	24.33	25.61	25.91
	MI042	25.59	25.08	25.58	25.24	24.20	24.12	24.42	24.53	25.02	25.15	25.57	26.42
	MI050	22.28	22.34	23.28	23.74	25.05	25.31	24.89	25.38	25.09	25.13	25.75	26.23
	MI054	23.20	23.02	23.81	23.75	22.96	23.02	22.93	22.61	23.68	23.46	23.66	23.62
	MI056	22.96	21.62	22.27	22.67	23.69	24.00	23.47	23.02	23.08	23.81	23.66	24.08
	平均	23.80	23.28	24.00	23.96	24.22	24.35	24.13	24.07	24.31	24.38	24.85	25.25
	SEM	0.63	0.63	0.60	0.42	0.42	0.44	0.40	0.54	0.40	0.34	0.49	0.58
G6: OBI-3424+ 抗 hPD-L1	MI033	24.49	24.60	25.89	25.25	25.37	24.64	24.78	24.95	25.59	25.71	25.99	26.47
	MI038	22.81	22.96	24.01	24.22	24.80	24.30	24.40	24.38	24.70	24.18	24.12	24.45
	MI043	21.17	21.04	22.06	21.83	21.70	22.36	22.13	22.13	22.31	23.00	22.71	23.24
	MI044	24.26	23.76	25.16	24.35	25.05	25.46	24.03	24.15	24.37	24.80	25.51	25.78
	MI045	23.88	23.67	24.74	24.22	24.62	25.02	25.30	25.75	25.26	25.12	26.14	26.98
	平均	23.32	23.21	24.37	23.97	24.31	24.36	24.13	24.27	24.45	24.56	24.89	25.38
	SEM	0.61	0.60	0.65	0.57	0.66	0.54	0.54	0.60	0.57	0.46	0.65	0.68

*: MI052 は 34 日目に死んでいた。

【 0 0 8 9 】

【表 3－1】

表 3. 腫瘍体積及び重量のまとめ

群	動物 No.	腫瘍体積 (mm ³)											腫瘍 重量 (mg)	TGI (%)
		D1	D4	D7	D11	D14	D18	D21	D25	D28	D32	D35	D35	
G1: ビヒクル	MI039	273.66	265.50	334.42	388.44	462.39	600.99	954.55	1033.73	1246.21	1698.35	1833.05	1064.10	N/A
	MI047	300.06	222.20	246.06	268.86	333.72	538.18	716.42	1405.89	1582.38	1771.38	2073.85	1704.60	
	MI049	322.78	280.12	289.67	292.95	321.52	372.96	523.55	557.61	670.58	796.22	940.35	638.90	
	MI057	482.26	362.35	332.03	382.50	404.25	465.56	639.62	955.72	991.31	1159.28	1357.04	995.80	
	MI059	576.81	357.00	292.38	349.42	380.15	405.82	464.71	544.77	906.23	1171.66	1488.24	933.90	
	平均	391.11	297.43	298.91	336.43	380.41	476.70	659.77	899.54	1079.34	1319.38	1538.51	1067.46	
	SEM	58.97	27.15	16.25	23.93	25.43	41.91	85.77	161.30	155.84	182.90	195.78	175.01	
G2: OBI-3424	MI035	336.94	248.60	247.70	272.45	316.87	443.46	495.51	530.21	534.09	458.78	326.08	187.80	83.13
	MI036	416.45	319.17	329.31	403.25	450.69	595.27	703.20	1087.59	929.53	802.95	875.83	442.00	
	MI040	374.19	317.11	337.59	346.18	410.20	558.01	847.55	1133.30	1088.12	1097.24	1092.67	575.30	
	MI051	431.65	274.75	282.91	337.46	361.93	491.94	487.42	479.83	505.34	313.47	325.92	74.00	
	MI053	426.18	316.40	293.88	361.50	385.75	588.12	603.56	635.01	537.45	543.00	332.59	93.10	
	平均	397.08	295.20	298.28	344.17	385.09	535.36	627.45	773.19	718.91	643.09	590.62	274.44	
	SEM	18.11	14.31	16.31	21.19	22.50	29.34	67.74	140.13	121.11	138.64	164.32	99.79	
G3: 抗 hPD-I	MI031	317.46	236.70	257.47	308.80	397.01	693.99	881.79	1085.08	1583.17	1923.48	2446.76	2447.20	-9.69
	MI041	272.82	209.94	296.62	308.98	339.27	629.12	1133.34	1200.68	1453.15	1801.67	2416.49	2501.20	
	MI055	354.07	270.30	282.75	291.53	334.80	515.62	545.25	648.40	782.93	970.79	1023.97	447.30	
	MI058	458.23	341.42	343.00	412.75	473.75	891.77	904.48	901.39	1044.52	1211.89	1248.89	655.20	
	MI060	371.40	288.50	328.21	375.46	423.96	944.97	935.49	904.19	991.40	923.05	930.75	281.50	
	平均	354.80	269.37	301.61	339.50	393.76	735.09	880.07	947.95	1171.03	1366.17	1613.37	1266.48	
	SEM	30.89	22.54	15.41	23.27	26.24	80.53	94.85	93.94	149.72	209.37	338.07	496.67	
G4: 抗 hPD-L1	MI037	311.93	275.12	258.52	261.37	274.59	334.71	560.79	596.92	636.51	844.25	1122.20	960.10	35.60
	MI046	470.43	344.51	365.09	379.77	444.66	599.46	759.83	849.43	918.32	1330.79	1513.23	1437.50	
	MI048	376.06	275.94	275.91	328.38	353.38	481.58	589.05	897.19	949.94	1161.94	1337.47	1190.20	

【 0 0 9 0 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

	MI052	413.00	384.63	326.38	445.55	490.86	624.77	1049.86	1294.64	1343.20	1884.53	*	*963.00	
	MI062	477.14	300.15	296.62	299.06	293.86	415.39	417.12	426.57	486.86	557.69	621.65	455.10	
	平均	409.71	316.07	304.50	342.83	371.47	491.18	675.33	812.95	866.97	1155.84	1148.64	*1010.73	
	SEM	30.77	21.27	18.90	32.15	42.04	54.72	108.32	147.72	147.29	225.44	193.00	209.29	
G5: OBI-3424+ 抗 hPD-1	MI034	255.56	235.32	259.12	316.52	319.27	406.87	333.76	271.54	259.90	317.15	388.43	124.30	109.71
	MI042	365.53	303.74	314.43	364.96	412.55	508.29	322.13	314.43	298.78	320.28	245.14	53.70	
	MI050	450.24	376.72	371.44	372.22	438.22	579.37	570.71	493.70	503.36	367.28	242.18	102.40	
	MI054	445.96	267.88	273.95	314.86	334.05	384.14	295.90	243.93	211.39	196.54	198.00	53.10	
	MI056	376.86	279.26	300.66	327.56	347.38	423.68	432.55	417.39	229.54	257.99	263.40	65.70	
	平均	378.83	292.58	303.92	339.23	370.30	460.47	391.01	348.20	300.59	291.85	267.43	79.84	
	SEM	35.34	23.74	19.47	12.24	23.28	36.38	50.54	46.82	52.81	29.47	32.10	14.29	
G6: OBI-3424+ 抗 hPD-L1	MI033	383.35	290.41	302.58	412.69	451.18	568.41	452.77	375.48	426.92	519.39	396.47	147.70	97.11
	MI038	286.46	235.58	260.09	326.89	435.04	570.91	615.63	595.06	735.67	793.12	773.46	429.20	
	MI043	516.08	320.84	267.89	306.21	340.88	695.17	687.48	641.22	565.46	512.11	366.43	132.80	
	MI044	418.50	332.14	388.79	389.37	484.13	672.17	688.96	406.06	259.81	281.58	341.67	86.90	
	MI045	493.81	349.65	306.13	389.67	478.67	548.76	623.49	413.49	504.75	501.25	385.72	145.60	
	平均	419.64	305.72	305.09	364.96	437.98	611.08	613.66	486.26	498.52	521.49	452.75	188.44	
	SEM	41.15	20.01	22.83	20.48	25.88	30.10	43.07	54.70	78.38	81.19	80.72	61.18	

*MI052 は 34 日目に死んでおり、腫瘍重量を記録した。MI052 は平均腫瘍重量統計計算には含めなかった。

【0091】

まず、G1（ビヒクル）、G2（OBI-3424）、G3（抗hPD-1）、及びG4（抗hPD-L1）から、腫瘍応答に対するすべての試験品の効果を調べた。OBI-3424の存在下では、35日目に平均腫瘍体積の有意な減少が観察された（G1 ビヒクル：1538.51±195.78mm³、G2 OBI-3424：590.62±164.32mm³、p=0.003<0.05）。抗hPD-1及び抗hPD-L1の治療では、35日目には統計的に有意な差は観察されなかった（G1 ビヒクル：1538.51±195.78mm³、G3 抗hPD-1：1613.37±338.07mm³、G4 抗hPD-L1：1148.64±193.00mm³）。

【0092】

さらに、G5（抗hPD-1+OBI-3424）及びG6（抗hPD-L1+OBI-3424）の併用治療では、結果は、35日目に平均腫瘍体積の有意な減少を示した（G1 ビヒクル：1538.51±195.78mm³、G5 抗hPD-1+OBI-3424：267.43±32.10mm³、p=0.0001<0.001、G6 抗hPD-L1+OBI-3424：452.75±80.72mm³、p=0.0005<0.001）。一方、35日目の平均腫瘍体積は、G3とG5の間で有意に減少した（G3 抗hPD-1：1613.37±338.07mm³、G5 抗hPD-1+OBI-3424：267.43±32.10mm³、p=0.0001<0.001）。

I-3424: 267.43 ± 32.10 mm³、 $p = 0.002 < 0.05$)。さらに、G4とG6の間の35日目の腫瘍体積も、35日目の平均腫瘍体積の有意な減少を示した (G4 抗hPD-L1: 1148.64 ± 193.00 mm³、G6 抗hPD-L1 + OBI-3424: 452.75 ± 80.72 mm³、 $p = 0.004 < 0.05$) (図3及び表3)。同様の傾向が腫瘍重量でも観察された (図2及び表3)。さらに、G4 (抗hPD-L1) のマウス1匹が34日目に死んでいるのが発見され、腫瘍重量を同日に記録した。

【0093】

腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を新鮮な腫瘍組織から単離し、フローサイトメーターにより群間の表面マーカーCD45、CD4、CD8、CD56、CD16、CD25、PD-1、及びPD-L1の発現レベルを測定した。個々のマウスの数値データを表4～7に示す。これは、ビヒクルと比較した場合、OBI-3424治療後 (G2) の腫瘍においてCD8⁺細胞傷害性T細胞 (CTL) 細胞数が有意に増加していることを示したが、この増加は抗PD-1 (G3) 又は抗PD-L1 (G4) 治療後の腫瘍では観察されなかった。しかし、OBI-3424 + 抗PD-1 (G5) 及びOBI-3424 + 抗PD-L1 (G6) 治療後の腫瘍では、CTL数が両群で有意に増加していることが判明した。これは、CTL数の増加が抗PD-1又は抗PD-L1治療ではなく、OBI-3424によって引き起こされたことを示唆した。さらに、CD4⁺Tヘルパー細胞数はG5及びG6の腫瘍で有意に増加した。NK細胞数は、ビヒクルと各治療群の間で有意差はなかった。

【0094】

10

20

30

40

50

【表 4－1】

表 4. TIL 中の CTL 細胞の割合のまとめ

群	動物 No.	細胞密度	合計細胞数	生存率	CTL 細胞 (CD45 ⁺ CD8 ⁺)			CD25 ⁺ CTL 細胞 (CD45 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺)			PD-1 ⁺ CTL 細胞 (CD45 ⁺ CD8 ⁺ PD-1 ⁺)		
		× (10 ⁵ /mL)	× 10 ⁶	%	合計%	CD45 ⁺ ゲートイン ゲ%	細胞数 (x10 ⁵)	合計%	CTL ゲートイン ゲ%	細胞数 (x10 ⁵)	合計%	CTL ゲートイン ゲ%	細胞数 (x10 ⁵)
G1: ビヒクル	MI039	5.87	10.50	55.90	9.21	53.75	9.67	0.40	4.35	0.42	13.93	95.18	14.63
	MI047	8.63	13.10	65.88	10.71	41.07	14.03	0.35	3.27	0.46	10.06	90.88	13.18
	MI049	5.16	12.30	41.95	6.62	51.92	8.14	0.85	12.84	1.05	5.85	80.80	7.20
	MI057	5.53	9.62	57.48	7.90	37.24	7.60	0.07	0.89	0.07	20.46	95.45	19.68
	MI059	12.30	19.00	64.74	14.06	37.94	26.71	0.19	1.35	0.36	13.78	90.03	26.18
G2: OBI-3424	MI035	2.85	4.36	65.37	20.93	49.08	9.13	0.27	1.27	0.12	21.41	92.13	9.33
	MI036	2.81	7.37	38.13	12.12	66.81	8.93	0.30	2.48	0.22	12.30	91.25	9.07
	MI040	5.72	8.18	69.93	21.14	72.14	17.29	0.77	3.64	0.63	20.63	99.25	16.88
	MI051	1.91	2.44	78.28	45.53	74.09	11.11	0.52	1.13	0.13	41.26	91.79	10.07
	MI053	3.22	4.06	79.31	36.08	57.70	14.65	0.28	0.78	0.11	28.90	85.06	11.73
G3: 抗 hPD-1	MI031	20.80	30.40	68.42	9.30	36.10	28.27	0.26	2.80	0.79	10.83	89.36	32.92
	MI041	23.00	35.10	65.53	6.22	34.75	21.83	0.10	1.53	0.35	9.53	84.37	33.45
	MI055	6.17	9.53	64.74	21.30	75.47	20.30	0.65	3.05	0.62	15.71	66.70	14.97
	MI058	7.72	12.90	59.84	11.17	53.85	14.41	0.84	7.48	1.08	10.88	66.59	14.04
	MI060	4.45	6.79	65.54	24.91	55.75	16.91	0.41	1.65	0.28	14.41	57.38	9.78
G4: 抗 hPD-L1	MI037	8.66	12.20	70.98	14.00	57.51	17.08	0.27	1.93	0.33	17.16	97.44	20.94
	MI046	15.00	22.00	68.18	18.51	57.17	40.72	0.30	1.59	0.66	16.84	88.98	37.05
	MI048	11.60	17.70	65.54	11.85	56.56	20.97	0.21	1.77	0.37	12.16	94.63	21.52
	MI062	3.28	7.22	45.43	16.01	70.33	11.56	0.63	3.90	0.45	16.68	98.61	12.04
G5: OBI-3424+ 抗 hPD-1	MI034	2.00	2.90	68.97	30.12	56.19	8.73	0.64	2.13	0.19	15.92	52.86	4.62
	MI042	0.24	0.49	48.28	25.43	46.84	1.25	0.20	0.77	0.01	11.13	35.95	0.55
	MI050	1.71	2.91	58.76	20.78	59.78	6.05	0.44	2.09	0.13	11.90	52.33	3.46
	MI054	0.89	1.21	73.88	31.55	63.27	3.82	0.58	1.84	0.07	16.88	48.79	2.04

【 0 0 9 5 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

	MI056	2.06	3.13	65.81	30.09	55.23	9.42	0.37	1.23	0.12	12.41	39.23	3.88
G6: OBI-3424+ 抗 hPD-L1	MI033	2.16	3.20	67.50	27.93	65.90	8.94	0.30	1.07	0.10	25.02	87.30	8.01
	MI038	4.46	5.69	78.38	31.74	49.21	18.06	0.39	1.23	0.22	30.71	97.65	17.47
	MI043	3.20	4.50	71.11	40.03	69.67	18.01	0.28	0.69	0.13	25.12	66.20	11.30
	MI044	1.06	1.81	58.56	22.68	53.32	4.11	0.33	1.43	0.06	20.46	89.05	3.70
	MI045	3.28	4.20	78.10	32.10	61.60	13.48	0.27	0.83	0.11	29.07	93.11	12.21

CD45⁺ゲーティング%= ゲート CD45⁺細胞
細胞数 (x10⁴)=合計細胞数×合計% ×10
CTL ゲーティング%= ゲート CD45⁺CD8⁺細胞

【 0 0 9 6 】
【表 5 - 1】

表 5. TIL 中の TH 細胞の割合のまとめ

群	動物 No.	細胞密 度	合計細 胞数	生存率	TH 細胞 (CD45 ⁺ CD4 ⁺)			CD25 ⁺ TH 細胞 (CD45 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺)			PD-1 ⁺ TH 細胞 (CD45 ⁺ CD4 ⁺ PD-1 ⁺)		
		× (10 ⁵ /mL)	× 10 ⁶		合計%	ゲー ティ ング%	細胞数 (x10 ³)	合計%	ゲー ティ ング%	細胞数 (x10 ³)	合計%	ゲー ティ ング%	細胞数 (x10 ³)
G1: ビビク ル	MI039	5.87	10.50	55.90	6.86	40.03	7.20	0.59	8.61	0.62	7.13	99.30	7.49
	MI047	8.63	13.10	65.88	15.84	60.74	20.75	0.77	4.86	1.01	14.43	98.23	18.90
	MI049	5.16	12.30	41.95	5.60	43.88	6.89	0.58	10.28	0.71	5.47	98.20	6.73
	MI057	5.53	9.62	57.48	11.34	53.43	10.91	0.39	3.40	0.38	15.83	99.94	15.23
	MI059	12.30	19.00	64.74	17.72	47.82	33.67	0.77	4.35	1.46	18.40	99.00	34.96
G2: OBI-3424	MI035	2.85	4.36	65.37	18.53	43.45	8.08	1.06	5.70	0.46	19.45	99.46	8.48
	MI036	2.81	7.37	38.13	9.14	50.36	6.74	0.68	7.39	0.50	9.29	98.15	6.85
	MI040	5.72	8.18	69.93	14.30	48.78	11.70	0.82	5.74	0.67	13.77	99.75	11.26
	MI051	1.91	2.44	78.28	14.34	23.33	3.50	0.52	3.63	0.13	15.00	97.06	3.66
	MI053	3.22	4.06	79.31	16.81	26.88	6.82	0.53	3.15	0.22	16.75	97.78	6.80
G3: 抗 hPD-1	MI031	20.80	30.40	68.42	19.18	74.49	58.31	0.71	3.70	2.16	20.78	96.11	63.17
	MI041	23.00	35.10	65.53	11.07	61.90	38.86	0.67	6.05	2.35	11.99	90.08	42.08
	MI055	6.17	9.53	64.74	9.76	34.59	9.30	0.82	8.35	0.78	9.21	83.23	8.78
	MI058	7.72	12.90	59.84	11.17	53.85	14.41	1.28	11.42	1.65	11.61	82.55	14.98
	MI060	4.45	6.79	65.54	18.23	40.81	12.38	0.45	2.44	0.31	15.49	85.27	10.52

10

20

30

40

50

【 0 0 9 7 】
【 表 5 - 2 】

G4: 抗 hPD-L1	MI037	8.66	12.20	70.98	9.82	40.34	11.98	1.19	12.12	1.45	10.85	99.40	13.24
	MI046	15.00	22.00	68.18	12.42	38.36	27.32	1.34	10.75	2.95	11.67	99.02	25.67
	MI048	11.60	17.70	65.54	6.81	32.51	12.05	1.01	14.76	1.79	6.66	99.40	11.79
	MI062	3.28	7.22	45.43	15.92	69.93	11.49	1.14	7.16	0.82	15.38	99.19	11.10
G5: OBI-3424+ 抗 hPD-1	MI034	2.00	2.90	68.97	31.40	58.59	9.11	1.49	4.73	0.43	29.96	89.25	8.69
	MI042	0.24	0.49	48.28	29.46	54.25	1.45	0.60	2.02	0.03	28.73	86.08	1.42
	MI050	1.71	2.91	58.76	14.65	42.15	4.26	0.94	6.42	0.27	13.65	87.05	3.97
	MI054	0.89	1.21	73.88	22.65	45.42	2.74	1.62	7.13	0.20	20.44	83.31	2.47
	MI056	2.06	3.13	65.81	24.15	44.32	7.56	0.85	3.50	0.27	22.53	87.16	7.05
G6: OBI-3424+ 抗 hPD-L1	MI033	2.16	3.20	67.50	14.36	33.88	4.60	0.56	3.90	0.18	15.43	98.75	4.94
	MI038	4.46	5.69	78.38	43.37	67.24	24.68	3.95	9.11	2.25	41.44	99.72	23.58
	MI043	3.20	4.50	71.11	19.38	33.73	8.72	0.53	2.71	0.24	20.71	99.00	9.32
	MI044	1.06	1.81	58.56	19.02	44.72	3.44	0.94	4.94	0.17	21.16	99.18	3.83
	MI045	3.28	4.20	78.10	20.28	38.91	8.52	0.59	2.91	0.25	21.10	99.67	8.86

CD45⁺ゲーティング%= ゲート CD45⁺細胞
細胞数 (x10⁴)=合計細胞数×合計% ×10
TH ゲーティング%= ゲート CD45⁺CD4⁺細胞

【 0 0 9 8 】
【 表 6 - 1 】

表 6. TIL 中の NK 細胞の割合のまとめ

群	動物 No.	細胞密 度	合計細 胞数	生存率	NK 細胞 (CD45 ⁺ CD56 ⁺)			CD16 ⁺ NK 細胞 (CD45 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺)			PD-1 ⁺ NK 細胞 (CD45 ⁺ CD56 ⁺ PD-1 ⁺)		
		× (10 ⁵ /mL)	× 10 ⁶	%	合計%	CD45 ⁺ ゲーティ ング%	細胞数 (x10 ⁵)	合計%	NK ゲーティ ング%	細胞数 (x10 ⁵)	合計%	NK ゲーティ ング%	細胞数 (x10 ⁵)
G1: ビヒク ル	MI039	5.87	10.50	55.90	1.26	9.08	1.32	0.16	12.30	0.17	1.89	99.74	1.98
	MI047	8.63	13.10	65.88	2.62	9.86	3.43	1.01	38.43	1.32	1.68	94.10	2.20
	MI049	5.16	12.30	41.95	2.78	23.40	3.42	0.69	24.82	0.85	1.04	66.77	1.28
	MI057	5.53	9.62	57.48	0.74	3.67	0.71	0.26	34.46	0.25	1.91	100.00	1.84
	MI059	12.30	19.00	64.74	0.72	1.96	1.37	0.18	24.48	0.34	3.36	94.12	6.38
G2: OBI-3424	MI035	2.85	4.36	65.37	2.47	6.06	1.08	0.39	15.62	0.17	3.26	88.81	1.42
	MI036	2.81	7.37	38.13	1.62	9.96	1.19	0.21	12.65	0.15	1.51	88.82	1.11

10

20

30

40

50

【 0 0 9 9 】
【 表 6 - 2 】

	MI040	5.72	8.18	69.93	1.15	4.16	0.94	0.24	20.43	0.20	1.63	97.60	1.33
	MI051	1.91	2.44	78.28	2.73	5.20	0.67	0.21	7.71	0.05	2.76	90.05	0.67
	MI053	3.22	4.06	79.31	1.39	2.33	0.56	0.17	11.87	0.07	2.38	83.33	0.97
G3: 抗 hPD-1	MI031	20.80	30.40	68.42	2.91	12.27	8.85	0.41	13.94	1.25	2.67	99.81	8.12
	MI041	23.00	35.10	65.53	1.08	6.34	3.79	0.32	29.77	1.12	1.13	100.00	3.97
	MI055	6.17	9.53	64.74	3.01	12.96	2.87	0.44	14.48	0.42	2.36	87.08	2.25
	MI058	7.72	12.90	59.84	1.93	9.57	2.49	0.32	16.58	0.41	1.46	98.31	1.88
	MI060	4.45	6.79	65.54	4.76	12.69	3.23	0.79	16.61	0.54	1.78	64.90	1.21
G4: 抗 hPD-L1	MI037	8.66	12.20	70.98	1.67	9.51	2.04	0.44	26.13	0.54	2.28	99.56	2.78
	MI046	15.00	22.00	68.18	2.61	10.84	5.74	0.80	30.65	1.76	2.28	97.23	5.02
	MI048	11.60	17.70	65.54	1.42	12.49	2.51	0.62	43.46	1.10	2.10	88.77	3.72
	MI062	3.28	7.22	45.43	1.80	8.78	1.30	0.48	26.39	0.35	1.78	91.52	1.29
G5: OBI-3424+ 抗 hPD-1	MI034	2.00	2.90	68.97	3.12	6.58	0.90	0.40	12.82	0.12	2.46	65.29	0.71
	MI042	0.24	0.49	48.28	5.87	10.28	0.29	0.80	13.54	0.04	2.83	63.38	0.14
	MI050	1.71	2.91	58.76	3.98	12.46	1.16	0.82	20.50	0.24	2.11	68.62	0.61
	MI054	0.89	1.21	73.88	4.04	8.60	0.49	0.59	14.60	0.07	1.99	70.82	0.24
	MI056	2.06	3.13	65.81	3.66	7.72	1.15	0.43	11.76	0.13	1.99	62.09	0.62
G6: OBI-3424+ 抗 hPD-L1	MI033	2.16	3.20	67.50	1.71	4.79	0.55	0.39	22.81	0.12	2.57	85.50	0.82
	MI038	4.46	5.69	78.38	3.94	7.12	2.24	0.77	19.42	0.44	4.00	90.69	2.28
	MI043	3.20	4.50	71.11	3.32	11.18	1.49	0.40	11.90	0.18	4.01	67.25	1.80
	MI044	1.06	1.81	58.56	3.01	8.98	0.54	0.46	15.28	0.08	2.79	85.43	0.50
	MI045	3.28	4.20	78.10	3.09	6.87	1.30	0.71	23.01	0.30	4.69	90.36	1.97

CD45⁺ゲーティング%= ゲート CD45⁺細胞
細胞数 (x10⁴)=合計細胞数×合計% ×10
NK ゲーティング%= ゲート CD45⁺CD56⁺細胞

【 0 1 0 0 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表 7. TIL 中の PD-L1 細胞の割合のまとめ

群	動物 No.	細胞密度	合計細胞数	生存率	CD45 ⁺ 細胞			合計細胞			合計 PD-L1 ⁺ 細胞 (PD-L1 ⁺)		
		× (10 ⁵ /mL)	× 10 ⁶		合計%	ゲーテ ィング %	細胞数 (x10 ⁶)	合計%	ゲーテ ィング %	細胞数 (x10 ⁶)	合計%	ゲーテ ィング % 細胞 %	細胞数 (x10 ⁵)
G1: ビヒクル	MI039	5.87	10.50	55.90	17.13	30.98	1.80	53.73	53.73	5.64	3.80	7.06	3.99
	MI047	8.63	13.10	65.88	26.08	37.00	3.42	82.52	82.52	10.81	7.38	8.94	9.67
	MI049	5.16	12.30	41.95	12.75	18.11	1.57	81.77	81.77	10.06	24.44	29.89	30.06
	MI057	5.53	9.62	57.48	21.22	39.14	2.04	46.07	46.07	4.43	0.70	1.51	0.67
	MI059	12.30	19.00	64.74	37.05	53.59	7.04	78.60	78.60	14.93	3.86	4.90	7.33
G2: OBI-3424	MI035	2.85	4.36	65.37	42.64	58.88	1.86	87.63	87.63	3.82	4.97	5.67	2.17
	MI036	2.81	7.37	38.13	18.14	28.16	1.34	79.89	79.89	5.89	19.30	24.15	14.22
	MI040	5.72	8.18	69.93	29.31	40.69	2.40	84.57	84.57	6.92	5.09	6.02	4.16
	MI051	1.91	2.44	78.28	61.46	79.75	1.50	94.06	94.06	2.30	1.08	1.15	0.26
	MI053	3.22	4.06	79.31	62.53	79.11	2.54	94.44	94.44	3.83	0.62	0.65	0.25
G3: 抗 hPD-1	MI031	20.80	30.40	68.42	25.75	41.15	7.83	53.84	53.84	16.37	3.47	6.45	10.55
	MI041	23.00	35.10	65.53	17.89	30.42	6.28	51.71	51.71	18.15	3.89	7.52	13.65
	MI055	6.17	9.53	64.74	28.22	47.95	2.69	67.88	67.88	6.47	2.50	3.68	2.38
	MI058	7.72	12.90	59.84	20.74	36.87	2.68	77.26	77.26	9.97	6.05	7.83	7.80
	MI060	4.45	6.79	65.54	44.68	63.31	3.03	89.23	89.23	6.06	6.21	6.95	4.22
G4: 抗 hPD-L1	MI037	8.66	12.20	70.98	24.35	34.93	2.97	77.18	77.18	9.42	1.11	1.43	1.35
	MI046	15.00	22.00	68.18	32.38	47.08	7.12	75.98	75.98	16.72	1.81	2.38	3.98
	MI048	11.60	17.70	65.54	20.95	31.41	3.71	74.62	74.62	13.21	8.80	11.79	15.58
	MI062	3.28	7.22	45.43	22.77	28.59	1.64	88.63	88.63	6.40	16.86	19.02	12.17
G5: OBI-3424+ 抗 hPD-1	MI034	2.00	2.90	68.97	53.60	70.26	1.55	88.56	88.56	2.57	0.85	0.96	0.25
	MI042	0.24	0.49	48.28	54.30	81.64	0.27	53.73	53.73	0.26	1.46	2.72	0.07
	MI050	1.71	2.91	58.76	34.76	53.31	1.01	50.19	50.19	1.46	2.12	4.21	0.62
	MI054	0.89	1.21	73.88	49.86	70.32	0.60	49.84	49.84	0.60	1.86	3.73	0.23

【 0 1 0 1 】

10

20

30

40

50

【表 7－2】

	MI056	2.06	3.13	65.81	54.48	78.32	1.71	90.68	90.68	2.84	2.12	2.34	0.66
G6: OBI-3424+ 抗 hPD-L1	MI033	2.16	3.20	67.50	42.38	60.88	1.36	72.79	72.79	2.33	1.67	2.29	0.53
	MI038	4.46	5.69	78.38	64.51	81.40	3.67	80.45	80.45	4.58	0.74	0.92	0.42
	MI043	3.20	4.50	71.11	57.46	79.35	2.59	88.15	88.15	3.97	1.48	1.67	0.67
	MI044	1.06	1.81	58.56	42.53	64.37	0.77	89.54	89.54	1.62	2.50	2.79	0.45
	MI045	3.28	4.20	78.10	52.11	72.03	2.19	93.65	93.65	3.93	1.00	1.06	0.42

10

【0102】

結果は、抗 h P D－1 又は抗 h P D－L 1 の投与が腫瘍増殖に効果を及ぼさないことを示した。対照的に、O B I－3 4 2 4 の投与、O B I－3 4 2 4 と抗 h P D－1 の併用治療、又は O B I－3 4 2 4 と抗 h P D－L 1 の併用治療は、H e p G 2 ヒト化マウスモデルにおける腫瘍増殖に対する効率的な抗腫瘍効果を実証した。

【0103】

実施例 2．H e p G 2 腫瘍担持ヒト化マウスモデルにおける O B I－3 4 2 4＋抗 P D－1（ペムブロリズマブ）の有効性評価

20

研究の目的は、H e p G 2 ヒト化マウスモデルにおける抗 P D－1 抗体（ペムブロリズマブ）の存在下での腫瘍増殖に対する、異なる用量の試験品 O B I－3 4 2 4 の有効性と、併用治療（O B I－3 4 2 4／抗 P D－1）の抗腫瘍効果に対する C D 8⁺T 細胞枯渇の影響を評価することである。

【0104】

材料

1．O B I－3 4 2 4－D P

ロット番号：F L C－I N J－1 7 1 1－0 1

試験品の数：2 バイアル／1 バイアル当たり 1 m L

30

成分：D N A アルキル化剤

濃度：1 0 m g／m L

外観：透明な液体

保管条件：－2 0℃

2．抗ヒト P D－1、ペムブロリズマブ、M e r c k & C o. , I n c. .

ロット番号：7 0 0 6 8 4 6 9 0 0

試験品の数：1 バイアル／1 バイアル当たり 1 0 0 m g

成分：抗体

濃度：2 5 m g／m L

外観：透明な液体

40

保管条件：2～8℃

3．等張塩化ナトリウム溶液（T a i w a n B i o t e c h C o. , L T D）

ロット番号：1 O P 2 A 0 9 2

濃度：0. 9 % 塩化ナトリウム

外観：透明な液体

溶解度：情報なし

保管条件：室温

4．マトリゲル（C o r n i n g、カタログ番号：3 5 4 2 4 8、ロット番号：0 2 6 1 0 0 2）

5．ヒト P B M C（ロット：P B M C 1 0 2 2 1 9 D、Z e n b i o、米国）

50

6. コラゲナーゼ (Sigma Aldrich、C5138)、DNase I (Sigma Aldrich、D5025)、ヒアルロニダーゼ (Sigma Aldrich、H6254)

7. RBC 赤血球溶解バッファー (Biolegend、420302)

8. 細胞染色バッファー (Biolegend、420201)

9. Human TruStain FcX (商標) (Fc 受容体ブロッキング溶液) (Biolegend、422302)

10. 抗体:

抗ヒトCD45抗体 (Biolegend、368508)、抗ヒトCD8抗体 (Biolegend、344710)、抗ヒトCD4抗体 (Biolegend、317429)、抗ヒトCD56抗体 (Biolegend、318332)、抗ヒトCD11c抗体 (Biolegend、301614)、抗ヒトCD25抗体 (Biolegend、302610)、抗ヒトCD69抗体 (Biolegend、310914)、抗ヒトCD86抗体 (Biolegend、305406)、抗ヒトCD91抗体 (Invitrogen、46-0919-42)、抗ヒトFoxp3抗体 (Biolegend、320108)、抗ヒトIFN- γ 抗体 (Biolegend、506507)、抗ヒトグランザイムB抗体 (Biolegend、372204)、抗ヒトカルレティキュリン抗体 (Abcam、ab209577)、抗ヒトPD-1抗体 (Biolegend、329907)、抗ヒトPD-L1抗体 (Biolegend、329738) 及びV α Krome405 (Biolegend、302610)

マウス

1. 種: ハツカネズミ

系統: 進行性免疫不全マウス。

【0105】

(NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg)

供給元: Trineo Biotechnology Co., LTD.

性別: メス

研究開始時の年齢: 6~8週齢

研究開始時の体重範囲: 17~30g

2. 番号付けと識別: 各マウスには耳標によって番号を付けた。収容ケージは、研究番号、ケージ番号、動物番号、性別、用量レベルなどを含む情報を記したケージカードによって識別した。

【0106】

動物のグループ分け: マウスを9つの群に分けた: G1 (ビヒクル)、G2 (OBI-3424 0.3mg/kg)、G3 (OBI-3424 1mg/kg)、G4 (抗hPD-1)、G5 (OBI-3424 0.3mg/kg + 抗hPD-1)、G6 (OBI-3424 1mg/kg + 抗hPD-1)、及びG7 (OBI-3424 1mg/kg + 抗hPD-1、CD8⁺PBMCを除外)。各群には6匹のマウスが含まれる。ヒト肝細胞がん細胞株HepG2を進行性免疫不全マウスの皮下に接種した。合計42匹のマウスがこの研究に含まれた。

【0107】

3. 動物選択の理由: TFDAが発行した薬剤提案の非臨床安全性研究における抗がん剤の非臨床研究のガイドラインによれば、動物異種移植片腫瘍モデルは新薬又は新抗がん剤の有効性を評価するために使用できる。一般的に使用されるマウス系統にはBALB/c、C57BL/6が含まれるが、BALB/cヌード、Nu/Nu、及びNOD/SCIDマウスは、通常、目的の薬剤の抗腫瘍効果を評価するために選択される。これらの系統は、よく知られた遺伝的及び品種的背景に基づいて世界規模で管理されており、人体における適切な反応の機能的な重要性について有益な洞察を提供することができる。

【0108】

4. 順応期間: 無作為化の前に、マウスを少なくとも3日間順応させた。臨床観察と体

10

20

30

40

50

重測定を順応期間中に実施した。この期間中、動物には病気の兆候や行動の変化は見られなかった。

【0109】

5. 動物の飼育条件：マウスを、温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 20\%$ 、及び 12 / 12 時間の明暗サイクルの制御された環境で、滅菌寝床（10054、Andersons、米国）を備えた個別換気ケージ（IVC）で飼育した。餌（Lab Diet 5010、PMI、米国）及び水（滅菌RO水）は、研究期間全体を通じて自由摂取させた。

【0110】

6. 無作為化：研究前にすべての動物の体重を測定し、健康状態を観察した。異常な臨床徴候のない動物が実験用に選択した。健康な動物を、群の間で体重に有意な差が出ないように、無作為に異なる群に分けた。動物の体重のばらつきは平均体重の $\pm 20\%$ を超えないようにした。この手順は実験動物の実践基準に従って行われた。

【0111】

7. IACUC 承認番号：IACUC-2020-SH-024

装置

細胞培養インキュベーター（Shell Lab / 3552）

安全キャビネット（BAKER / SG604）

電子天秤（PRECISA / XS 225A-SCS）

ピペット（Thermo / フィンピペット F1）

正負圧検証済み個別ケージハウジングシステム（Allentown / NEXGEN）

分析天秤（PRECISA / XS3250C-SCS）

動物安楽死装置（Forward Biotech Supply）

フローサイトメーター（Beckman Coulter / Navios EX）

バーニヤ（ミットヨ / CD-6" ASX）

方法

実験計画

サンプリング：実験計画、実験群、注射の用量と体積、投与経路、及び動物の数を表 8 に示す。

【0112】

【表 8】

表 8. 投与計画とサンプリング

群	試験品の経路及び 投与	注射用量 (mg/kg)	注射体積 (mg/kg)	動物数
G1: ビヒクル	IV	N/A	5	6
G2: OBI-3424	IV	0.3	5	6
G3: OBI-3424	IV	1	5	6
G4: 抗 hPD-1	IP	20	10	6
G5: OBI-3424+PD-1	IV 及び IP	0.3+20	5+10	6
G6: OBI-3424+PD-1	IV 及び IP	1+20	5+10	6
G7: OBI-3424+PD-1 (CD8 ⁺ PBMC を除外)	IV 及び IP	1+20	5+10	6
静脈注射 (IV): 注射体積は 5 mL/kg である 腹腔内注射 (IP): 注射体積は 10 mL/kg である				

【0113】

2. 異種移植マウスモデルの確立

2.1. 動物の毛の除去：ヒト肝細胞がん細胞株 H e p G 2 を注射する前に、右脇腹の毛のみをクリッピングによって除去した。

【0114】

2.2. 腫瘍細胞の皮下接種： 1×10^7 個の H e p G 2 細胞を 0.25×10^7 個の h P B M C （細胞数比 4 : 1）と予め混合してから、マトリゲル（体積比 1 : 1）（C o r n i n g、354248、ロット番号：0261002）を混合した。皮下注射量は $200 \mu\text{L}$ / マウスであった。

【0115】

腫瘍細胞注射の日を潜伏期間の初日（L 0）として示した。

3. 試験品の経路及び投与：

3.1. 試験品 O B I - 3 4 2 4 又は参照品を 0 日目にマウスに静脈内注射した。注射は、インスリン注射器を用いて、 $0.3 \text{ mg} / \text{kg}$ 又は $1 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量で行い、注射体積は $5 \text{ mL} / \text{kg}$ であった。試験品 O B I - 3 4 2 4 を、G 2、G 3、G 5、G 6 及び G 7 に、7、14、21、及び 28 日目に続けて投与した。参照品を G 1 に投与した。手順はサンプル投与標準に従った。試験品投与の開始日を最初の実験日（D 0）として示した。

【0116】

3.2. 試験品の抗 h P D - 1 抗体を、2 日目にマウスに腹腔内注射した。注射は、インスリン注射器を用いて、 $20 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量、 $10 \text{ mL} / \text{kg}$ の注射体積で行った。試験品の抗 h P D - 1 抗体を、G 4、G 5、G 6、及び G 7 に、5、9、12、16、19、23、及び 26 日目に続けて投与した。手順はサンプル投与基準に従った。

【0117】

3.3. 試験品又は参照品の調製：

投与前に、試験品を参照品で希釈した。試験品 O B I - 3 4 2 4 の溶液濃度は $0.06 \text{ mg} / \text{mL}$ 及び $0.2 \text{ mg} / \text{mL}$ であり、試験品抗 h P D - 1 は $2 \text{ mg} / \text{mL}$ であった。

【0118】

4. 体重測定：

測定は接種翌日から行った。動物の体重を週に 2 回測定し、記録した。

5. 腫瘍直径の測定：

測定は接種翌日から行った。腫瘍体積を週に 2 回（月曜、木曜）測定し、記録した。腫瘍体積を、記録に従って楕円体方程式により計算した（（長径 $\times$ 短径 $\times$ 短径） $\times$ （ $\pi / 6$ ））。

【0119】

6. 腫瘍増殖阻害率の計算：

腫瘍体積を使用して、次の式に従って腫瘍増殖阻害（T G I）率を計算した： $\text{T G I} (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (C_i - C_0)] \times 100$ 、ここで、 T_i 及び C_i は、実験終了時（30 日目）の治療群及びビヒクル群の平均腫瘍体積を表す。一方、 T_0 及び C_0 は、実験開始時（0 日目）の治療群及びビヒクル群の平均腫瘍体積を表す。

【0120】

7. 採血：

顎下血液サンプルをエンドポイントで収集した。殺時には、心臓穿刺を使用して血液サンプルを採取することができた。採取した血液サンプルを $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $1500 \times g$ で 15 分間遠心分離して、血清とペレットとを分離した。上部の血清を収集し、 -70°C 以下の温度で保存した。手順は動物血液サンプリングの基準に従った。

【0121】

8. 研究のエンドポイントの決定：

研究は 30 日目に終了した。

9. 腫瘍切除：

10

20

30

40

50

研究期間の終わりにマウスをCO₂により安楽死させ、腫瘍周囲の結合組織を切除した。次いで、腫瘍サンプルの重量を測定し、腫瘍重量が400mgを超える場合は3等分に切断した。腫瘍組織を腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の単離用に調製した。残る切片のうち1つを10%ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。もう1つを-70℃未満の温度で保管した。

【0122】

10. 腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の単離：

腫瘍サンプルをメスを使用して小さい断片に切り分け、コラゲナーゼ、DNase I、及びヒアルロニダーゼのカクテル（コラゲナーゼ#C5138、DNase I#D5025、ヒアルロニダーゼ#H6254、Sigma Aldrich）で少なくとも2時間消化させた。次いで、腫瘍消化物をシリンジプランジャーを使用して70μmメッシュセルストレーナー（Falcon#352350）に通し、PBSで洗浄した。細胞をRBC赤血球溶解バッファー（Biolegend#420302）で処理し、フローサイトメトリー用の単一細胞懸濁液を調製した。

10

【0123】

11. TIL集団のフローサイトメトリー分析：

細胞を染色バッファー（Biolegend#420201）で洗浄し、Fc受容体ブロッッキング溶液（Biolegend#422302）を含む染色バッファーに再懸濁させ、4℃で15分間インキュベートした。細胞を蛍光結合表面抗体で染色し、4℃で30分間インキュベートした後、フローサイトメトリー分析のために染色バッファーに再懸濁させた。フローサイトメトリーは、Navios EXフローサイトメーター（Beckman Coulter）を使用して行われた。データを、Kaluzza Analysisソフトウェア（Beckman Coulter）を使用して分析した。

20

【0124】

12. 統計分析：

結果を、平均値及び平均値の標準誤差（平均±SEM）として表示した。各治療群について収集されたすべてのデータと並行する陰性対照データとの比較は、スチューデントのt検定（Microsoft Excel（登録商標）、2007）を使用して計算された。P≤0.05を有意とみなす。

【0125】

結果

群の体重をまとめたものを表9に示す。研究開始時又は殺時に群G1～G7間で平均体重に統計的に有意な差は見られなかった（図4及び表9）。

30

【0126】

40

50

【表 9－1】

表 9.体重のまとめ

群	動物 No.	体重 (g)												
		L0	L1	L3	L7	D2	D6	D9	D13	D16	D20	D23	D27	D30
G1: ビビクル	MI031	22.05	21.73	22.89	22.36	23.62	25.05	24.09	24.58	24.59	24.56	24.44	24.68	22.93
	MI033	20.51	19.87	20.11	19.94	19.10	20.14	20.06	22.19	21.81	22.02	21.24	21.69	20.11
	MI054	23.71	23.62	23.44	22.98	23.28	24.10	23.93	24.23	24.65	23.87	23.06	22.54	21.47
	MI058	24.10	24.35	24.34	24.45	24.28	24.34	24.03	24.98	25.02	25.30	25.31	25.50	24.29
	MI070	20.37	19.72	20.50	20.71	20.18	23.10	20.59	23.14	23.13	23.53	21.78	20.73	20.37
	MI079	19.28	20.19	21.02	21.52	21.78	22.78	22.54	23.33	24.20	24.51	23.71	24.04	22.57
	平均	21.67	21.58	22.05	21.99	22.04	23.25	22.54	23.74	23.90	23.97	23.26	23.20	21.96
	SEM	0.79	0.82	0.71	0.66	0.84	0.71	0.74	0.42	0.49	0.46	0.64	0.75	0.66
G2: OBI-3424 (0.3 mg/kg)	MI036	20.66	20.85	21.84	21.82	21.10	21.72	20.84	21.95	21.66	22.00	21.53	21.32	20.17
	MI042	21.24	21.28	21.89	23.06	22.12	23.84	23.67	23.82	23.93	24.14	23.32	23.24	22.36
	MI048	23.04	22.53	23.06	23.01	22.75	23.46	22.94	23.20	23.72	23.44	23.35	23.18	21.65
	MI061	22.63	23.02	23.57	23.62	23.28	24.10	24.14	23.96	24.02	24.21	23.91	23.92	22.81
	MI090	25.00	25.12	24.12	23.73	23.23	23.68	23.38	23.82	24.56	23.98	23.98	23.80	22.44
	MI093	23.36	23.18	23.45	23.44	23.55	24.82	24.58	24.87	24.17	23.75	23.72	23.94	22.94
	平均	22.66	22.66	22.99	23.11	22.67	23.60	23.26	23.60	23.68	23.59	23.30	23.23	22.06
	SEM	0.64	0.62	0.38	0.28	0.38	0.42	0.54	0.40	0.42	0.34	0.37	0.41	0.42
G3: OBI-3424 (1 mg/kg)	MI038	21.11	20.59	20.70	22.50	21.69	21.91	22.01	22.55	22.68	22.87	23.02	22.66	22.31
	MI039	21.33	21.16	22.24	22.44	22.40	23.15	23.65	24.14	23.51	23.39	24.10	24.41	23.72
	MI056	23.07	22.18	22.28	22.31	22.55	23.56	22.70	23.60	23.20	24.21	23.75	23.42	23.08
	MI060	24.07	23.34	24.21	24.22	23.34	24.29	24.85	25.97	25.06	25.53	25.37	24.68	23.90
	MI077	19.46	20.56	20.80	21.42	20.20	21.84	21.52	22.22	22.25	21.98	22.89	22.84	22.02
	MI089	22.68	23.40	24.01	25.55	24.22	24.90	23.72	24.68	23.35	24.69	25.12	24.66	23.87
	平均	21.95	21.87	22.37	23.07	22.40	23.28	23.08	23.86	23.34	23.78	24.04	23.78	23.15
	SEM	0.67	0.53	0.62	0.62	0.56	0.51	0.50	0.57	0.39	0.53	0.42	0.38	0.34

【 0 1 2 7 】

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

G4: PD-I (20 mg/kg)	MI030	21.15	22.22	22.28	22.27	22.72	23.42	23.27	23.91	24.02	23.53	24.14	23.57	22.68
	MI035	21.19	20.61	21.38	21.44	21.11	21.38	21.52	21.90	21.33	22.00	21.15	19.29	18.42
	MI045	21.82	21.84	22.87	23.16	22.69	23.51	23.58	23.56	24.01	24.34	23.47	23.24	22.49
	MI047	21.03	20.64	21.14	22.30	21.97	22.44	21.24	21.85	21.00	20.52	19.43	19.43	18.28
	MI053	22.27	22.00	22.64	22.76	22.88	23.38	23.19	23.60	23.33	24.43	24.46	24.74	24.00
	MI087	23.11	22.72	23.21	24.04	23.93	24.02	23.71	24.09	23.04	22.69	21.87	19.83	19.38
	平均	21.76	21.67	22.25	22.66	22.55	23.03	22.75	23.15	22.79	22.92	22.42	21.68	20.88
	SEM	0.33	0.35	0.34	0.36	0.39	0.39	0.44	0.41	0.54	0.61	0.80	0.99	1.01
G5: OBI-3424+ PD-I (0.3 mg/kg +20 mg/kg)	MI029	20.81	21.05	21.58	21.21	21.99	22.57	22.26	22.94	23.38	23.34	22.84	22.12	21.45
	MI032	20.96	21.45	22.27	22.62	23.34	23.63	23.65	23.46	24.27	24.53	24.34	24.51	23.89
	MI049	23.40	22.90	23.13	23.49	23.00	24.07	24.30	24.48	24.34	24.57	24.17	25.20	25.43
	MI062	22.36	21.91	22.25	23.49	23.07	23.28	23.39	23.33	23.16	23.38	23.24	23.21	22.79
	MI064	21.01	20.89	21.73	21.74	21.87	22.91	23.70	23.88	24.66	23.54	24.37	23.81	22.50
	MI076	18.35	18.83	19.93	20.92	20.68	21.15	20.75	21.24	21.70	21.41	21.08	21.23	20.31
	平均	21.15	21.17	21.82	22.25	22.33	22.94	23.01	23.22	23.59	23.46	23.34	23.35	22.73
	SEM	0.70	0.55	0.44	0.46	0.41	0.42	0.53	0.45	0.45	0.47	0.52	0.61	0.73
G6: OBI-3424+ PD-I (1 mg/kg +20 mg/kg)	MI034	20.15	19.74	20.75	21.61	21.05	21.96	21.26	21.82	23.03	22.78	21.12	21.90	21.32
	MI041	21.74	21.58	23.24	23.66	23.68	24.37	24.27	24.74	24.45	25.08	24.09	25.08	24.33
	MI046	20.48	19.99	21.39	22.05	21.59	22.18	21.14	22.18	22.59	22.68	22.49	23.38	22.13
	MI059	21.61	21.78	22.69	22.56	22.69	22.46	22.64	23.04	23.84	23.62	23.58	23.76	23.73
	MI088	22.82	22.81	21.54	22.64	22.44	23.25	23.03	23.26	22.89	23.39	23.74	24.35	23.76
	MI095	23.26	22.67	22.61	23.43	23.01	24.34	23.94	22.66	22.80	22.97	23.04	23.23	22.41
	平均	21.68	21.43	22.04	22.66	22.41	23.09	22.71	22.95	23.27	23.42	23.01	23.62	22.95
	SEM	0.50	0.53	0.39	0.32	0.39	0.44	0.54	0.42	0.29	0.36	0.44	0.44	0.48
G7: OBI-3424+ PD-I (1 mg/kg +20 mg/kg)	MI066	23.91	23.62	24.10	24.30	24.26	25.08	24.84	25.43	24.90	25.28	25.31	25.50	24.54
	MI067	21.49	21.56	22.25	22.47	22.97	23.44	23.23	24.16	24.11	24.43	24.52	25.14	23.89
	MI068	20.43	19.82	20.13	20.79	20.59	21.24	21.40	21.21	21.20	22.13	22.40	22.23	22.02
	MI069	21.89	21.28	22.28	23.53	22.75	23.31	22.84	23.04	22.84	23.65	23.51	23.80	23.61
	MI078	19.10	18.53	19.45	19.76	19.41	20.48	20.25	20.27	20.13	20.12	19.83	20.15	19.32

【 0 1 2 8 】
【表 9 - 3】

(CD8+PBMC を除外)	MI091	25.33	25.36	24.88	24.91	23.78	23.98	23.71	24.11	24.00	24.24	23.75	25.17	23.88
	平均	22.03	21.70	22.18	22.63	22.29	22.92	22.71	23.04	22.86	23.31	23.22	23.67	22.88
	SEM	0.93	1.01	0.87	0.83	0.77	0.71	0.67	0.80	0.76	0.77	0.79	0.86	0.79

10

20

30

40

50

【0129】

腫瘍応答を様々な試験品から検査し、平均腫瘍応答を腫瘍細胞注射後のL I、3、及び7、及び試験品投与後のD 0、2、6、9、13、16、20、23、27、及び30に記録した（図6及び表10）。

【0130】

まず、G 1（ビヒクル）、G 2（O B I-3 4 2 4 0.3 mg / k g）、G 3（O B I-3 4 2 4 1 mg / k g）、及びG 4（抗h P D-1、20 mg / k g）から、腫瘍応答に対する試験品の効果を調べた。O B I-3 4 2 4（0.3 mg / k g及び1 mg / k g）の存在下では、D 30で平均腫瘍体積の用量依存的減少が観察された（G 1ビヒクル：882.92±158.14 mm³、G 2 O B I-3 4 2 4 0.3 mg / k g：716.44±31.12 mm³、G 3 O B I-3 4 2 4 1 mg / k g：216.90±22.20 mm³、p=0.00096<0.001）。D 30で抗h P D-1の治療において統計的に有意な差は見られなかった（G 1ビヒクル：882.92±158.14 mm³、G 4抗h P D-1：983.84±266.44 mm³）。

【0131】

G 5（O B I-3 4 2 4 0.3 mg / k g+抗h P D-1 20 mg / k g）、G 6（O B I-3 4 2 4 1 mg / k g+抗h P D-1 20 mg / k g）、及びG 7（O B I-3 4 2 4 1 mg / k g+抗h P D-1 20 mg / k g、C D 8⁺ P B M Cを除外）の併用治療では、結果は、これらすべての群の平均腫瘍体積が、D 30でビヒクル群と比較して有意に減少していることを示した（G 1ビヒクル：882.92±158.14 mm³）、G 5 O B I-3 4 2 4 0.3 mg / k g+抗h P D-1：429.41±106.14 mm³、p=0.0193<0.05、G 6 O B I-3 4 2 4 1 mg / k g+抗h P D-1：197.74±19.62 mm³、p=0.00078<0.001、G 7 O B I-3 4 2 4 1 mg / k g+抗h P D-1、C D 8⁺ P B M Cを除外：374.44±36.97 mm³、=0.0053<0.05）。

【0132】

単独治療と比較して、併用治療はG 2とG 5の間、及びG 3とG 6の間のD 30での平均腫瘍体積の阻害効果を改善する傾向があったが、これらの減少は有意ではなかった（G 2 O B I-3 4 2 4 0.3 mg / k g：716.44±31.12 mm³、G 5 O B I-3 4 2 4 0.3 mg / k g+抗h P D-1：429.41±106.14 mm³；G 3 O B I-3 4 2 4 1 mg / k g：216.90±22.20 mm³、G 6 O B I-3 4 2 4 1 mg / k g+抗h P D-1：197.74±19.62 mm³）。さらに、腫瘍増殖阻害（T G I）の割合を計算して、治療効果を定量化した。低用量及び高用量のO B I-3 4 2 4による単独治療は、それぞれ27.82%及び113.27%のT G Iをもたらした。低用量及び高用量のO B I-3 4 2 4による抗h P D-1併用治療は、それぞれ77.22%及び117.66%のT G Iをもたらした（図6及び表10）。

【0133】

それにもかかわらず、G 6（O B I-3 4 2 4 1 mg / k g+抗h P D-1）とG 7（O B I-3 4 2 4 1 mg / k g+抗h P D-1、C D 8⁺ P B M Cを除外）を比較すると、C D 8⁺細胞の枯渇は、D 30での平均腫瘍体積の有意な増加を引き起こし（G 6 O B I-3 4 2 4 1 mg / k g+抗h P D-1：197.74±19.62 mm³、G 7 O B I-3 4 2 4 1 mg / k g+抗h P D-1、C D 8⁺ P B M Cを除外：374.44±36.97 mm³、p=0.00088<0.001）、同用量の併用治療にもかかわらず、T G Iの割合は117.66%から87.35%まで減少した（図6及び表10）。同様の傾向が腫瘍重量でも観察された（図5及び表10）。

【0134】

10

20

30

40

50

【表 1 0 - 1】

表 10. 腫瘍体積及び重量のまとめ

群	動物 No.	腫瘍体積 (mm ³)														腫瘍 重量 (mg)	TGI (%)
		L1	L3	L7	D0	D2	D6	D9	D13	D16	D20	D23	D27	D30	D30		
G1: ビヒクル	MI031	537.1	527.4	303.8	314.2	317.2	328.7	417.9	528.2	724.3	804.6	830.3	868.4	1015.	615.80	N/A	
	MI033	398.9	395.5	278.0	285.4	286.1	287.5	320.9	335.6	424.2	529.0	543.8	563.1	673.3	486.20		
	MI054	352.0	347.2	276.2	277.9	279.7	281.1	390.3	520.1	569.8	641.1	817.8	841.5	867.3	805.90		
	MI058	485.4	463.9	368.9	373.9	375.1	378.1	403.4	418.1	421.6	422.0	422.4	422.4	423.7	91.20		
	MI070	251.6	251.4	215.7	217.0	222.1	292.5	317.2	407.6	632.0	789.9	916.4	1085.	1562.	942.50		
	MI079	354.0	297.0	302.9	311.8	312.9	316.9	338.8	353.9	442.6	500.7	535.2	659.7	755.3	544.80		
	平均	396.5	380.4	290.9	296.7	298.9	314.1	364.8	427.3	535.7	614.6	677.7	740.1	882.9	581.07		
	SEM	41.81	42.23	20.35	21.07	20.63	14.80	18.10	33.20	51.68	64.53	82.33	97.39	158.1	120.09		
G2: OBI-3424 (0.3 mg/kg)	MI036	501.6	474.1	278.0	280.0	283.9	289.0	375.6	569.5	714.1	808.4	889.2	926.9	1012.	445.50	27.82	
	MI042	529.3	501.4	273.7	279.4	281.1	293.9	367.0	452.6	528.0	658.4	661.3	527.6	468.2	223.90		
	MI048	346.7	337.6	216.4	226.0	230.6	241.0	395.2	528.9	714.4	854.0	890.1	909.1	882.8	327.90		
	MI061	442.3	401.2	336.7	353.6	354.0	356.0	367.9	388.3	405.8	419.5	297.5	205.1	181.5	63.40		
	MI090	597.1	491.4	313.3	317.7	321.0	330.5	388.9	590.7	749.1	751.9	842.6	848.5	850.4	449.00		
	MI093	493.5	461.1	301.9	303.0	334.4	336.3	437.7	524.2	591.5	721.3	884.2	886.5	903.5	317.00		
	平均	485.1	444.5	286.7	293.3	300.8	307.8	388.7	509.0	617.1	702.3	744.1	717.3	716.4	304.45		
	SEM	34.55	25.76	16.95	17.53	18.24	16.99	10.83	30.95	54.63	62.98	96.27	119.0	131.1	59.47		
G3: OBI-3424 (1 mg/kg)	MI038	448.8	395.2	273.6	290.8	295.5	297.0	337.5	341.3	359.9	345.0	260.7	246.4	185.2	62.40	113.27	
	MI039	449.7	447.9	315.2	318.0	322.4	328.4	468.5	492.3	556.8	552.1	544.3	426.0	295.5	101.90		
	MI056	394.4	373.2	278.1	286.8	292.9	304.4	334.0	362.5	465.2	465.2	419.2	295.9	215.0	105.20		

【 0 1 3 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 0 - 2】

	MI060	244.8	244.1	219.0	233.0	238.8	240.6	301.7	342.7	343.3	343.7	343.7	327.7	197.1	90.30	
	MI077	508.7	446.7	300.7	306.6	310.3	312.8	337.3	352.9	354.8	355.2	355.2	252.6	145.5	69.80	
	MI089	410.4	379.8	332.7	332.7	334.6	338.1	416.4	422.6	429.4	425.6	360.3	341.1	262.8	76.80	
	平均	409.5	381.2	286.5	294.7	299.1	303.6	365.9	385.7	418.2	414.4	380.6	315.0	216.9	84.40	
	SEM	36.68	30.45	16.27	14.16	13.69	14.02	25.72	24.60	33.95	34.15	38.76	27.16	22.20	7.14	
G4: PD-1 (20 mg/kg)	MI030	585.9	550.0	299.8	300.3	303.5	305.3	433.1	485.3	516.7	522.8	525.5	446.8	342.6	166.60	-15.29
	MI035	508.2	411.4	273.3	277.4	280.5	284.0	469.1	934.7	982.0	1192.	1346.	1629.	1673.	1230.8	
	MI045	554.1	364.6	280.8	283.7	285.9	288.1	339.5	382.0	382.6	391.8	416.4	600.5	674.1	453.90	
	MI047	400.6	393.3	332.0	345.0	346.9	348.5	552.4	762.2	772.3	1032.	1076.	1076.	1093.	676.50	
	MI053	326.5	323.9	242.4	324.7	328.3	331.6	382.0	366.3	356.9	333.6	317.7	310.1	310.1	108.20	
	MI087	506.8	431.1	316.9	316.7	318.5	321.9	389.3	671.7	690.8	1015.	1089.	1730.	1808.	1541.7	
	平均	480.4	412.4	290.9	308.0	310.6	313.2	427.6	600.4	616.9	748.1	795.2	965.6	983.8	696.28	
	SEM	40.04	31.49	13.18	10.51	10.43	10.33	30.89	92.87	99.24	152.6	174.4	249.6	266.4	237.06	
G5: OBI-3424+ PD-1 (0.3 mg/kg +20 mg/kg)	MI029	575.5	511.0	269.1	276.3	279.9	283.4	365.0	432.8	490.6	523.4	561.4	565.7	567.2	284.00	77.22
	MI032	410.1	393.6	317.4	323.5	325.6	326.8	367.2	397.3	424.8	432.7	432.7	348.6	203.6	77.30	
	MI049	527.7	452.6	331.3	338.1	345.1	348.9	424.6	433.2	437.4	441.7	442.5	314.1	237.6	87.30	
	MI062	392.7	318.9	242.9	248.4	252.5	254.4	283.4	386.4	390.9	426.4	430.7	399.8	305.0	149.00	
	MI064	364.1	346.6	286.4	295.5	298.7	301.9	373.1	469.4	475.2	555.2	573.0	427.5	372.4	173.40	
	MI076	464.4	397.7	298.1	293.1	296.3	297.4	399.6	500.9	539.8	640.5	690.6	799.1	890.3	609.80	
	平均	455.8	403.4	290.9	295.8	299.7	302.1	368.8	436.7	459.8	503.3	521.8	475.8	429.4	230.13	
	SEM	33.69	28.57	13.15	13.15	13.37	13.48	19.49	17.60	21.65	34.93	42.90	73.72	106.1	81.77	
G6: OBI-3424+ PD-1 (1 mg/kg +20 mg/kg)	MI034	403.6	365.0	245.5	271.9	277.1	280.2	322.4	410.6	417.8	395.8	357.2	317.5	267.7	76.20	117.66
	MI041	431.2	427.1	293.8	298.0	301.8	303.3	346.5	368.4	373.1	359.4	306.5	197.8	185.5	59.30	
	MI046	484.8	472.0	326.2	328.4	330.0	241.5	254.9	260.8	377.3	389.9	403.1	331.0	238.4	73.60	
	MI059	315.5	314.3	268.4	274.3	276.5	279.3	319.6	335.2	335.8	330.2	303.5	193.0	162.1	69.20	
	MI088	440.6	413.0	288.4	297.3	302.9	305.1	344.2	362.6	371.1	370.8	297.0	278.3	138.0	45.20	
	MI095	586.6	568.9	331.0	337.3	342.7	345.8	365.3	465.9	471.9	333.2	314.2	241.2	194.5	66.20	
	平均	443.7	426.7	292.2	301.2	305.2	292.5	325.5	367.3	391.2	363.2	330.3	259.8	197.7	64.95	
	SEM	36.66	36.01	13.45	11.03	11.03	14.19	15.70	28.28	19.33	11.32	17.00	24.07	19.62	4.63	

【 0 1 3 6】

10

20

30

40

50

【表 1 0 - 3】

G7; OBI-3424+ PD-1 (1 mg/kg +20 mg/kg) (CD8 ⁺ PBMC を 除外)	MI066	373.0	371.9	295.3	298.1	304.0	307.0	422.4	466.3	472.2	473.1	475.1	475.6	356.3	85.30	87.35
	MI067	350.1	347.3	247.0	262.5	268.3	274.2	369.0	377.4	386.5	387.4	387.4	333.1	268.0	93.60	
	MI068	338.4	336.6	323.7	354.0	356.0	358.0	412.1	428.2	437.2	445.7	468.4	471.5	390.8	124.20	
	MI069	364.3	356.6	249.3	256.3	262.9	264.5	301.9	359.9	360.6	382.0	386.1	379.4	325.8	50.60	
	MI078	387.0	382.9	293.1	304.8	309.2	311.4	363.6	457.0	458.0	524.0	534.9	535.4	537.7	255.60	
	MI091	343.3	342.5	324.5	325.6	328.8	330.7	380.8	447.2	451.4	488.5	497.6	501.2	367.8	133.40	
	平均	359.4	356.3	288.8	300.2	304.8	307.6	374.9	422.7	427.6	450.1	458.3	449.4	374.4	118.78	
	SEM	7.66	7.33	13.99	15.18	14.50	14.22	17.49	17.99	18.03	23.12	24.52	31.45	36.97	24.53	

【 0 1 3 7】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を新鮮な腫瘍組織から単離し、各群の表面マーカーCD45、CD4、CD8、CD56、CD11c、CD69、CD25、CD86、CD91、グランザイムB、IFN-γ、Foxp3、カルレティキュリン、PD-1、及びPD-L1の発現レベルをフローサイトメーターによって測定した。個々のマウスの数値データを表11～16に示す。細胞傷害性リンパ球（CTL）細胞（CD45⁺CD8⁺T細胞）及びヘルパーT（TH）細胞（CD45⁺CD4⁺T細胞）の集団は、高用量OBI-3424の単独治療又は抗hPD-1との併用治療で、ビヒクル群と比較して有意に増加した（CTL細胞：G1 ビヒクル：15.53±5.66%、G3 OBI-3424 1mg/kg：33.50±3.38%、p=0.0107<0.05、G6 OBI-3424 1mg/kg+抗hPD-1：38.46±2.63%、p=0.00215<0.05；TH細胞：G1 ビヒクル：14.59±2.00%、G3 OBI-3424 1mg/kg：25.05±2.08%、p=0.0023<0.05、G6 OBI-3424 1mg/kg+抗hPD-1：30.62±2.07%、p=0.00012<0.001）（表13～14）。

【 0 1 3 8】

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 1】

表 11. TIL 中のカルレティキュリン細胞の割合のまとめ

群	動物 No.	細胞密度	合計細胞数	生存率	合計 CD45 ⁺ 細胞 (CD45 ⁺)			CD45 ⁺ 生細胞 (CD45 ⁺ ViaKrome405 ^{weak})			カルレティキュリン細胞 (CD45 ⁺ カルレティキュリン ⁺)		
		×	×		合計%	CD45 ⁺	細胞数 (x10 ⁵)	合計%	CTL	細胞数 (x10 ⁵)	合計%	CTL	細胞数 (x10 ⁵)
		(10 ⁶ /mL)	10 ⁶			ケ-テイン グ%			ケ-テイン グ%			ケ-テイン グ%	
G1: ビヒグル	MI031	2.33	23.30	52.58	34.52	51.85	80.43	15.84	45.89	36.91	0.67	4.24	1.56
	MI033	2.60	25.95	62.24	34.54	45.88	89.63	13.47	39.00	34.95	0.87	6.44	2.26
	MI054	2.56	25.60	64.65	30.47	41.12	78.00	15.06	49.43	38.55	0.91	6.06	2.33
	MI058	0.73	7.30	67.53	18.76	21.62	13.69	8.71	46.41	6.36	0.45	5.19	0.33
	MI070	2.43	24.30	74.90	40.29	48.60	97.90	19.59	48.62	47.60	1.11	5.68	2.70
	MI079	4.42	44.20	72.29	28.66	36.41	126.68	16.05	56.01	70.94	1.50	9.32	6.63
	平均	2.51	25.11	65.70	31.21	40.91	81.06	14.79	47.56	39.22	0.92	6.16	2.63
	SEM	0.48	4.78	3.25	2.98	4.46	15.26	1.47	2.26	8.53	0.15	0.71	0.87
G2: OBI-3424 (0.3 mg/kg)	MI036	1.95	19.45	64.78	36.29	50.59	70.58	20.24	55.78	39.37	2.85	14.09	5.54
	MI042	2.05	20.45	62.35	22.44	29.66	45.89	12.36	55.07	25.28	0.62	5.02	1.27
	MI048	5.40	54.00	80.46	24.15	28.87	130.41	15.52	64.29	83.81	1.90	12.21	10.26
	MI061	0.21	2.14	72.34	10.20	12.41	2.18	6.30	61.79	1.35	0.28	4.51	0.06
	MI090	2.47	24.65	80.93	26.47	31.01	65.25	12.13	45.83	29.90	0.45	3.69	1.11
	MI093	0.73	7.25	71.03	14.28	21.40	10.35	8.10	56.69	5.87	0.26	3.21	0.19
	平均	2.14	21.32	71.98	22.31	28.99	54.11	12.44	56.58	30.93	1.06	7.12	3.07

【表 1 1 – 2】

	SEM	0.74	7.41	3.15	3.77	5.18	19.06	2.06	2.61	12.12	0.44	1.94	1.66
G3: OBI-3424 (1 mg/kg)	MI038	0.29	2.90	68.97	8.45	9.67	2.45	5.94	70.28	1.72	0.17	2.90	0.05
	MI039	1.26	12.62	80.03	12.06	13.99	15.22	7.66	63.52	9.67	0.20	2.61	0.25
	MI056	0.71	7.06	65.44	16.62	19.95	11.73	11.16	67.13	7.88	1.25	11.18	0.88
	MI060	0.99	9.88	73.48	11.79	13.15	11.65	9.18	77.84	9.07	0.25	2.75	0.25
	MI077	0.74	7.44	64.52	11.27	12.84	8.38	7.02	62.30	5.22	0.26	3.65	0.19
	MI089	0.81	8.10	84.69	11.04	12.22	8.94	8.30	75.12	6.72	0.15	1.83	0.12
	平均	0.80	8.00	72.86	11.87	13.64	9.73	8.21	69.37	6.71	0.38	4.15	0.29
	SEM	0.13	1.32	3.32	1.09	1.40	1.76	0.74	2.55	1.19	0.17	1.43	0.12
G4: PD-1 (20 mg/kg)	MI030	3.86	38.55	66.41	30.12	39.67	116.11	18.34	60.90	70.70	0.55	2.99	2.12
	MI035	10.32	103.20	64.44	16.86	35.97	174.00	7.84	46.50	80.91	0.29	3.72	2.99
	MI045	2.67	26.65	63.41	44.65	67.00	118.99	27.23	60.98	72.57	0.42	1.53	1.12
	MI047	24.70	247.00	73.48	17.29	27.78	427.06	11.87	68.63	293.19	0.34	2.83	8.40
	MI053	2.84	28.35	72.84	17.20	20.43	48.76	8.94	51.99	25.34	0.17	1.88	0.48
	MI087	7.96	79.60	44.22	13.96	28.78	111.12	4.37	31.30	34.79	0.30	6.78	2.39
	平均	8.73	87.23	64.13	23.35	36.61	166.01	13.10	53.38	96.25	0.35	3.29	2.92
	SEM	3.43	34.33	4.34	4.85	6.67	54.67	3.41	5.43	40.43	0.05	0.77	1.16
G5: OBI-3424+ PD-1 (0.3 mg/kg +20 mg/kg)	MI029	6.00	60.00	65.75	18.72	22.49	112.32	12.14	64.85	72.84	0.56	4.58	3.36
	MI032	0.69	6.86	61.81	11.22	12.86	7.70	8.70	77.57	5.97	0.27	3.13	0.19
	MI049	0.94	9.44	59.96	10.46	11.76	9.87	7.77	74.33	7.33	0.58	7.51	0.55
	MI062	2.40	24.00	47.08	42.80	50.53	102.72	8.18	19.12	19.63	0.24	2.93	0.58
	MI064	2.52	25.20	62.22	24.16	28.02	60.88	10.99	45.49	27.69	0.80	7.31	2.02
	MI076	3.17	31.65	47.71	35.75	52.15	113.15	18.92	52.91	59.88	0.99	5.22	3.13
	平均	2.62	26.19	57.42	23.85	29.64	67.77	11.12	55.71	32.23	0.57	5.11	1.64
	SEM	0.78	7.82	3.26	5.37	7.30	20.23	1.71	8.87	11.41	0.12	0.81	0.57
G6: OBI-3424+ PD-1 (1 mg/kg +20	MI034	0.70	7.00	58.57	11.25	13.01	7.88	7.08	62.92	4.96	0.36	5.14	0.25
	MI041	0.75	7.54	48.01	12.45	14.26	9.39	9.13	73.31	6.88	0.23	2.50	0.17
	MI046	0.95	9.50	54.32	10.29	12.12	9.78	6.32	61.43	6.00	0.26	4.05	0.25
	MI059	0.54	5.36	48.88	10.13	11.15	5.43	7.00	69.15	3.75	0.25	3.54	0.13

【 0 1 4 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 3】

mg/kg)	MI088	0.28	2.84	44.23	8.02	8.81	2.28	5.55	69.11	1.58	0.43	7.71	0.12
	MI095	0.74	7.38	59.08	18.72	20.88	13.82	15.58	83.21	11.50	0.17	1.08	0.13
	平均	0.66	6.60	52.18	11.81	13.37	8.09	8.44	69.86	5.78	0.28	4.00	0.18
	SEM	0.09	0.93	2.48	1.51	1.68	1.61	1.51	3.22	1.37	0.04	0.93	0.02
G7: OBI-3424+ PD-1 (1 mg/kg +20 mg/kg) (CD8 ⁺ PBMC を除外)	MI066	1.40	14.02	51.93	24.34	27.12	34.12	19.92	81.85	27.93	1.13	5.68	1.58
	MI067	1.22	12.16	59.05	8.22	9.18	10.00	6.57	79.95	7.99	0.06	0.85	0.07
	MI068	2.64	26.40	60.15	6.81	7.56	17.98	5.17	75.97	13.65	0.20	3.94	0.53
	MI069	0.47	4.72	38.31	6.71	7.57	3.17	4.82	71.75	2.28	0.15	3.16	0.07
	MI078	2.54	25.40	71.65	16.11	18.71	40.92	11.09	68.84	28.17	0.87	7.86	2.21
	MI091	1.20	11.96	75.92	17.00	19.44	20.33	14.21	83.62	17.00	0.26	1.83	0.31
	平均	1.58	15.78	59.50	13.20	14.93	21.09	10.30	77.00	16.17	0.45	3.89	0.80
	SEM	0.35	3.46	5.55	2.91	3.29	5.82	2.44	2.39	4.28	0.18	1.05	0.36

CD45⁺ゲーティング%= ゲート CD45⁺細胞
生ゲーティング%= ゲート CD45⁺ViaKrome405^{weak}細胞
細胞数 (x10⁵)=合計細胞数×合計%×10

【0 1 4 1】
【表 1 2 - 1】

表 12. TIL 中の PD-L1⁺細胞の割合のまとめ

群	動物 No.	細胞密 度	合計細 胞数	生存率	合計細胞			合計 PD-L1 ⁺ 細胞 (PD-L1 ⁺)			PD-L1 ⁺ 細胞 (CD45 ⁺ PD-L1 ⁺)		
		× (10 ⁶ /mL)	× 10 ⁶		合計%	ゲーティング%	細胞数 (x10 ⁵)	合計%	合計細胞 ゲーティング%	細胞数 (x10 ⁵)	合計%	CD45 ⁺ ゲーティング%	細胞数 (x10 ⁵)
G1: ビビクル	MI031	2.33	23.30	52.58	48.90	48.90	113.94	3.28	6.70	7.64	1.97	7.65	4.59
	MI033	2.60	25.95	62.24	67.54	67.54	175.27	3.61	5.35	9.37	1.88	6.67	4.88
	MI054	2.56	25.60	64.65	62.60	62.60	160.26	4.06	6.49	10.39	1.96	8.58	5.02
	MI058	0.73	7.30	67.53	88.24	88.24	64.42	2.07	2.35	1.51	0.56	3.81	0.41
	MI070	2.43	24.30	74.90	78.33	78.33	190.34	3.32	4.24	8.07	1.75	5.20	4.25
	MI079	4.42	44.20	72.29	74.74	74.74	330.35	1.67	2.23	7.38	0.58	2.34	2.56
	平均	2.51	25.11	65.70	70.06	70.06	172.43	3.00	4.56	7.39	1.45	5.71	3.62
	SEM	0.48	4.78	3.25	5.57	5.57	36.74	0.38	0.80	1.27	0.28	0.97	0.74
G2:	MI036	1.95	19.45	64.78	62.65	62.65	121.85	7.42	11.84	14.43	4.84	15.51	9.41

【0 1 4 2】

【表 1 2 - 2】

OBI-3424 (0.3 mg/kg)	MI042	2.05	20.45	62.35	74.17	74.17	151.68	2.94	3.97	6.01	1.01	5.86	2.07
	MI048	5.40	54.00	80.46	82.83	82.83	447.28	4.56	5.50	24.62	1.98	9.64	10.69
	MI061	0.21	2.14	72.34	93.16	93.16	19.94	1.34	1.44	0.29	0.35	4.13	0.07
	MI090	2.47	24.65	80.93	83.93	83.93	206.89	4.33	5.16	10.67	2.69	12.53	6.63
	MI093	0.73	7.25	71.03	68.08	68.08	49.36	2.15	3.16	1.56	0.84	7.23	0.61
	平均	2.14	21.32	71.98	77.47	77.47	166.17	3.79	5.18	9.60	1.95	9.15	4.91
	SEM	0.74	7.41	3.15	4.60	4.60	62.69	0.88	1.46	3.72	0.67	1.75	1.89
G3: OBI-3424 (1 mg/kg)	MI038	0.29	2.90	68.97	94.96	94.96	27.54	1.58	1.66	0.46	0.27	4.18	0.08
	MI039	1.26	12.62	80.03	94.48	94.48	119.23	1.19	1.26	1.50	0.24	2.31	0.30
	MI056	0.71	7.06	65.44	86.71	86.71	61.22	2.88	3.32	2.03	0.58	3.76	0.41
	MI060	0.99	9.88	73.48	95.07	95.07	93.93	1.71	1.80	1.69	0.52	4.37	0.51
	MI077	0.74	7.44	64.52	93.62	93.62	69.65	2.24	2.39	1.67	0.66	7.16	0.49
	MI089	0.81	8.10	84.69	94.29	94.29	76.37	2.86	3.03	2.32	0.58	4.63	0.47
	平均	0.80	8.00	72.86	93.19	93.19	74.66	2.08	2.24	1.61	0.48	4.40	0.38
G4: PD-1 (20 mg/kg)	SEM	0.13	1.32	3.32	1.31	1.31	12.63	0.29	0.33	0.26	0.07	0.65	0.07
	MI030	3.86	38.55	66.41	79.18	79.18	305.24	2.73	3.45	10.52	1.07	3.76	4.12
	MI035	10.32	103.20	64.44	37.54	37.54	387.41	2.44	6.49	25.18	1.20	8.16	12.38
	MI045	2.67	26.65	63.41	62.56	62.56	166.72	2.54	4.07	6.77	1.47	3.98	3.92
	MI047	24.70	247.00	73.48	60.73	60.73	1500.03	3.53	5.82	87.19	1.46	10.27	36.06
	MI053	2.84	28.35	72.84	89.83	89.83	254.67	2.21	2.46	6.27	1.10	7.27	3.12
	MI087	7.96	79.60	44.22	17.89	17.89	142.40	1.74	9.73	13.85	0.89	13.27	7.08
G5: OBI-3424+ PD-1 (0.3 mg/kg +20 mg/kg)	平均	8.73	87.23	64.13	57.96	57.96	459.41	2.53	5.34	24.96	1.20	7.79	11.12
	SEM	3.43	34.33	4.34	10.83	10.83	211.34	0.24	1.07	12.76	0.09	1.50	5.18
	MI029	6.00	60.00	65.75	85.20	85.20	511.20	2.36	2.77	14.16	0.92	5.55	5.52
	MI032	0.69	6.86	61.81	93.50	93.50	64.14	2.09	2.24	1.43	0.70	6.28	0.48
	MI049	0.94	9.44	59.96	93.21	93.21	87.99	2.02	2.17	1.91	0.63	6.68	0.59
	MI062	2.40	24.00	47.08	58.90	58.90	141.36	4.94	8.38	11.86	1.20	10.78	2.88
	MI064	2.52	25.20	62.22	81.27	81.27	204.80	2.74	3.37	6.90	0.86	5.35	2.17
	MI076	3.17	31.65	47.71	61.30	61.30	194.01	3.62	5.90	11.46	1.93	6.89	6.11

【 0 1 4 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 3】

	平均	2.62	26.19	57.42	78.90	78.90	200.58	2.96	4.14	7.95	1.04	6.92	2.96
	SEM	0.78	7.82	3.26	6.25	6.25	66.17	0.46	1.02	2.21	0.20	0.81	0.98
G6: OBI-3424+ PD-1 (1 mg/kg +20 mg/kg)	MI034	0.70	7.00	58.57	91.38	91.38	63.97	2.62	2.87	1.83	0.71	7.78	0.50
	MI041	0.75	7.54	48.01	93.44	93.44	70.45	1.96	2.09	1.48	0.33	2.81	0.25
	MI046	0.95	9.50	54.32	94.93	94.93	90.18	1.88	1.98	1.79	0.50	7.52	0.48
	MI059	0.54	5.36	48.88	94.81	94.81	50.82	2.83	2.99	1.52	0.81	7.96	0.43
	MI088	0.28	2.84	44.23	95.18	95.18	27.03	2.02	2.12	0.57	0.56	10.01	0.16
	MI095	0.74	7.38	59.08	95.84	95.84	70.73	1.35	1.41	1.00	0.42	2.43	0.31
	平均	0.66	6.60	52.18	94.26	94.26	62.20	2.11	2.24	1.36	0.56	6.42	0.35
	SEM	0.09	0.93	2.48	0.66	0.66	8.74	0.22	0.24	0.20	0.07	1.26	0.06
G7: OBI-3424+ PD-1 (1 mg/kg +20 mg/kg) (CD8 ⁺ PBMC を除外)	MI066	1.40	14.02	51.93	93.45	93.45	131.02	3.06	3.27	4.29	0.81	3.39	1.14
	MI067	1.22	12.16	59.05	95.47	95.47	116.09	1.10	1.15	1.34	0.13	1.56	0.16
	MI068	2.64	26.40	60.15	95.72	95.72	252.70	1.79	1.87	4.73	0.40	5.38	1.06
	MI069	0.47	4.72	38.31	95.30	95.30	44.98	1.41	1.48	0.67	0.28	4.39	0.13
	MI078	2.54	25.40	71.65	91.26	91.26	231.80	2.42	2.65	6.15	0.77	5.35	1.96
	MI091	1.20	11.96	75.92	93.52	93.52	111.85	1.17	1.25	1.40	0.10	0.61	0.12
	平均	1.58	15.78	59.50	94.12	94.12	148.07	1.83	1.95	3.09	0.42	3.45	0.76
	SEM	0.35	3.46	5.55	0.70	0.70	32.25	0.32	0.35	0.92	0.13	0.81	0.31

CD45⁺ ゲーティング%= ゲート CD45⁺ 細胞
細胞数 (x10⁵)= 合計細胞数×合計%×10

【 0 1 4 4】

【表 1 3 - 1】

表 13. TIL 中の CTL 細胞の割合のまとめ

群	動物 No.	CTL 細胞 (CD45 ⁺ CD8 ⁺)			PD-1 ⁺ CTL 細胞 (CD45 ⁺ CD8 ⁺ PD-1 ⁺)			CD69 ⁺ CTL 細胞 (CD45 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺)			CD25 ⁺ CTL 細胞 (CD45 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺)			γ/δ TCR ⁺ B ⁺ CTL 細胞 (CD45 ⁺ CD8 ⁺ GrB ⁺)			IFN-γ ⁺ CTL 細胞 (CD45 ⁺ CD8 ⁺ IFN-γ ⁺)		
		合計	CD45 ⁺ ゲート %	細胞 数 (x10 ⁵)	合計	CTL ゲート %	細胞数 (x10 ⁵)	合計	CTL ゲート %	細胞数 (x10 ⁵)	合計	CTL ゲート %	細胞数 (x10 ⁵)	合計	CTL ゲート %	細胞数 (x10 ⁵)	合計	CTL ゲート %	細胞数 (x10 ⁵)
		%	インク %	%	%	インク %	%	%	インク %	%	%	インク %	%	%	インク %	%	%	インク %	%
G1: ビ クル	MI031	5.09	33.26	11.86	4.99	97.96	11.63	3.94	60.23	9.18	1.33	20.28	3.10	6.11	91.66	14.24	0.13	1.98	0.30
	MI033	12.58	43.90	32.65	11.28	89.64	29.27	7.98	59.50	20.71	0.73	5.43	1.89	12.87	99.84	33.40	0.28	2.17	0.73
	MI054	11.35	39.92	29.06	10.31	90.87	26.39	8.02	64.46	20.53	0.66	5.31	1.69	13.11	98.26	33.56	0.30	2.28	0.77

【 0 1 4 5】

【表 1 3 - 2】

	MI058	42.94	75.72	31.35	26.06	60.69	19.02	29.48	78.49	21.52	0.98	2.60	0.72	34.50	88.28	25.19	0.24	0.62	0.18
	MI070	6.94	21.57	16.86	6.12	88.19	14.87	2.35	41.51	5.71	0.30	5.30	0.73	6.01	94.83	14.60	0.14	2.27	0.34
	MI079	14.27	40.45	63.07	11.14	78.05	49.24	7.84	53.18	34.65	0.51	3.45	2.25	16.20	99.14	71.60	0.06	0.37	0.27
	平均	15.53	42.47	30.81	11.65	84.23	25.07	9.94	59.56	18.72	0.75	7.06	1.73	14.80	95.34	32.10	0.19	1.62	0.43
	SEM	5.66	7.39	7.31	3.08	5.38	5.55	4.03	5.00	4.20	0.15	2.69	0.37	4.28	1.89	8.64	0.04	0.36	0.10
G2: OBI-3424 (0.3 mg/kg)	MI036	8.21	43.92	15.97	7.87	95.86	15.31	5.21	62.46	10.13	0.98	11.79	1.91	5.97	66.16	11.61	0.18	2.04	0.35
	MI042	26.79	72.25	54.79	18.38	68.60	37.59	23.86	73.01	48.79	1.90	5.81	3.89	33.78	97.44	69.08	0.23	0.66	0.47
	MI048	31.80	73.64	171.72	23.04	72.47	124.42	22.84	61.79	123.34	1.43	3.87	7.72	36.33	95.50	196.18	0.20	0.54	1.08
	MI061	45.54	66.97	9.75	22.62	49.67	4.84	35.19	85.14	7.53	1.62	3.93	0.35	30.78	85.88	6.59	0.13	0.36	0.03
	MI090	26.88	60.34	66.26	25.86	96.18	63.74	17.92	68.69	44.17	1.27	4.86	3.13	28.03	99.84	69.09	0.31	1.10	0.76
	MI093	17.47	46.12	12.67	12.75	73.00	9.24	16.34	67.19	11.85	0.80	3.31	0.58	22.98	99.74	16.66	0.15	0.64	0.11
	平均	26.12	60.54	55.19	18.42	75.96	42.52	20.23	69.71	40.97	1.33	5.60	2.93	26.31	90.76	61.54	0.20	0.89	0.47
	SEM	5.18	5.27	25.24	2.82	7.24	18.66	4.04	3.52	18.05	0.17	1.29	1.11	4.49	5.35	29.31	0.03	0.25	0.16
G3: OBI-3424 (1 mg/kg)	MI038	43.72	66.02	12.68	25.64	58.64	7.44	35.67	80.80	10.34	1.49	3.38	0.43	40.55	90.46	11.76	0.39	0.87	0.11
	MI039	31.93	53.39	40.30	20.11	62.98	25.38	25.23	70.50	31.84	1.02	2.85	1.29	31.10	99.18	39.25	0.20	0.63	0.25
	MI056	30.92	62.97	21.83	25.04	80.96	17.68	25.96	83.69	18.33	1.26	4.07	0.89	28.95	89.16	20.44	0.28	0.85	0.20
	MI060	22.88	38.03	22.61	19.75	86.30	19.51	12.76	59.32	12.61	1.57	7.29	1.55	21.85	96.01	21.59	0.14	0.63	0.1
	MI077	43.04	65.33	32.02	31.41	72.97	23.37	32.38	76.33	24.09	2.57	6.05	1.91	42.67	95.94	31.75	0.09	0.20	0.07
	MI089	28.52	49.11	23.10	26.74	93.75	21.66	18.14	60.89	14.69	2.34	7.84	1.90	17.29	58.25	14.00	0.18	0.61	0.15
	平均	33.50	55.81	25.42	24.78	75.93	19.17	25.02	71.92	18.65	1.71	5.25	1.33	30.40	88.17	23.13	0.21	0.63	0.15
	SEM	3.38	4.52	3.89	1.79	5.56	2.60	3.49	4.16	3.29	0.23	0.80	0.24	3.78	5.72	4.31	0.04	0.09	0.03
G4: PD-1 (20 mg/kg)	MI030	20.34	62.25	78.41	6.46	31.77	24.90	14.94	75.13	57.59	2.23	11.21	8.60	17.56	98.76	67.69	0.07	0.38	0.27
	MI035	8.15	58.12	84.11	5.62	68.92	58.00	9.40	52.94	97.01	1.12	6.33	11.56	16.76	96.54	172.96	0.10	0.55	1.03
	MI045	7.63	43.67	20.33	6.86	89.83	18.28	5.25	68.03	13.99	1.00	13.01	2.67	7.08	87.71	18.87	0.08	0.99	0.21
	MI047	10.44	35.54	257.87	8.64	82.69	213.41	5.14	24.85	126.96	2.05	9.91	50.64	17.18	93.27	424.35	0.16	0.85	3.95
	MI053	37.52	64.31	106.37	8.16	21.75	23.13	31.34	74.74	88.85	1.66	3.96	4.71	42.68	98.96	121.00	0.11	0.25	0.31
	MI087	3.74	50.11	29.77	2.90	77.62	23.08	6.08	54.03	48.40	0.93	8.28	7.40	7.23	64.06	57.55	0.18	1.60	1.43
	平均	14.64	52.33	96.14	6.44	62.10	60.13	12.03	58.29	72.13	1.50	8.78	14.26	18.08	89.88	143.74	0.12	0.77	1.20
	SEM	5.11	4.61	35.06	0.84	11.59	31.22	4.15	7.78	16.39	0.23	1.35	7.38	5.31	5.44	60.25	0.02	0.20	0.59

【 0 1 4 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 3】

G5: OBI-3424+ PD-1 (0.3 mg/kg +20 mg/kg)	MI029	16.57	34.68	99.42	10.62	64.12	63.72	8.26	50.84	49.56	0.88	5.42	5.28	13.91	96.69	83.46	0.05	0.36	0.30
	MI032	39.77	63.46	27.28	15.81	39.76	10.85	29.46	73.79	20.21	1.32	3.32	0.91	32.47	99.23	22.27	0.06	0.18	0.04
	MI049	41.68	62.07	39.35	12.52	30.05	11.82	29.44	75.60	27.79	3.58	9.20	3.38	33.30	89.55	31.44	0.08	0.23	0.08
	MI062	18.13	50.51	43.51	7.14	39.41	17.14	11.02	69.86	26.45	1.98	12.55	4.75	16.71	99.78	40.10	0.10	0.60	0.24
	MI064	16.60	36.40	41.83	7.24	43.61	18.24	9.53	55.76	24.02	1.48	8.68	3.73	15.12	99.92	38.10	0.05	0.32	0.13
	MI076	10.51	51.48	33.26	7.30	69.47	23.10	7.28	60.72	23.04	0.98	8.20	3.10	9.90	90.63	31.33	0.08	0.73	0.25
	平均	23.88	49.77	47.44	10.11	47.74	24.14	15.83	64.43	28.51	1.70	7.90	3.52	20.24	95.97	41.12	0.07	0.40	0.17
	SEM	5.44	5.00	10.68	1.46	6.33	8.12	4.34	4.15	4.35	0.41	1.31	0.62	4.11	1.92	8.85	0.01	0.09	0.04
G6: OBI-3424+ PD-1 (1 mg/kg +20 mg/kg)	MI034	38.17	61.22	26.72	13.21	34.60	9.25	24.82	71.33	17.37	1.94	5.56	1.36	33.88	96.68	23.72	0.13	0.38	0.09
	MI041	36.57	60.58	27.57	13.06	35.70	9.85	28.01	76.61	21.12	2.87	7.85	2.16	27.28	91.46	20.57	0.15	0.51	0.11
	MI046	47.52	71.66	45.14	5.80	12.20	5.51	38.01	79.06	36.11	2.05	4.26	1.95	48.90	99.20	46.46	0.11	0.23	0.10
	MI059	44.53	65.11	23.87	21.69	48.72	11.63	31.83	72.07	17.06	2.77	6.28	1.48	35.22	82.90	18.88	0.11	0.25	0.06
	MI088	32.19	44.50	9.14	14.83	46.07	4.21	21.54	74.67	6.12	2.88	10.00	0.82	15.89	52.69	4.51	0.09	0.29	0.03
	MI095	31.76	53.09	23.44	16.37	51.54	12.08	14.80	46.63	10.92	1.98	6.25	1.46	29.71	94.29	21.93	0.08	0.27	0.06
	平均	38.46	59.36	25.98	14.16	38.14	8.75	26.50	70.06	18.12	2.42	6.70	1.54	31.81	86.20	22.68	0.11	0.32	0.08
	SEM	2.63	3.87	4.71	2.11	5.90	1.32	3.30	4.83	4.20	0.19	0.81	0.19	4.42	7.08	5.53	0.01	0.04	0.01
G7: OBI-3424+ PD-1 (1 mg/kg +20 mg/kg) (CD8 ⁺ PBMC を除外)	MI066	7.49	16.15	10.50	6.13	81.85	8.59	2.88	42.02	4.04	0.89	13.00	1.25	4.77	75.68	6.69	0.10	1.59	0.14
	MI067	11.27	17.67	13.70	6.64	58.94	8.07	7.44	64.95	9.05	0.84	7.30	1.02	10.92	98.66	13.28	0.17	1.52	0.21
	MI068	3.79	5.74	10.01	3.22	85.02	8.50	1.32	44.96	3.48	0.38	12.94	1.00	1.68	71.87	4.44	0.12	5.32	0.32
	MI069	13.88	20.93	6.55	11.49	82.82	5.42	4.65	36.73	2.19	0.74	5.88	0.35	2.17	17.23	1.02	0.12	0.92	0.06
	MI078	3.20	5.84	8.13	2.49	77.88	6.32	0.87	34.72	2.21	0.45	17.92	1.14	1.59	91.47	4.04	0.15	8.76	0.38
	MI091	7.51	14.95	8.98	4.62	61.50	5.53	3.56	51.33	4.26	0.50	7.16	0.60	5.97	98.87	7.14	0.06	0.99	0.07
	平均	7.86	13.55	9.65	5.77	74.67	7.07	3.45	45.79	4.21	0.63	10.70	0.89	4.52	75.63	6.10	0.12	3.18	0.20
	SEM	1.70	2.59	0.99	1.32	4.68	0.61	0.98	4.54	1.03	0.09	1.91	0.14	1.48	12.58	1.69	0.02	1.30	0.05

CD45⁺ゲーティング%= ゲート CD45⁺細胞
CTLゲーティング%= ゲート CD45⁺CD8⁺ cells
細胞数 (x10⁵)=合計細胞数×合計%×10

【 0 1 4 7 】

【表 1 4 - 1】

表 14. TIL 中の TH 細胞の割合のまとめ

群	動物 No.	TH 細胞 (CD45 ⁺ CD4 ⁺)			PD-1 ⁺ TH 細胞 (CD45 ⁺ CD4 ⁺ PD-1 ⁺)			CD69 ⁺ TH 細胞 (CD45 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺)			CD25 ⁺ TH 細胞 (CD45 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺)			Foxp3 ⁺ Treg 細胞 (CD45 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺)		
		合計	TH ⁺ TH ⁺	細胞数	合計	TH ⁺ TH ⁺	細胞数	合計	TH ⁺ TH ⁺	細胞数	合計	TH ⁺ TH ⁺	細胞数	合計	TH ⁺ TH ⁺	細胞数
		%	%	(x10 ⁵)	%	%	(x10 ⁵)	%	%	(x10 ⁵)	%	%	(x10 ⁵)	%	%	(x10 ⁵)
G1: ビヒク ル	MI031	9.47	61.88	22.07	9.32	98.44	21.72	8.27	59.31	19.27	3.46	24.81	8.06	0.05	1.50	0.12
	MI033	11.45	39.95	29.71	11.40	99.51	29.58	6.84	46.34	17.75	1.41	9.53	3.66	0.10	7.10	0.26
	MI054	15.68	55.17	40.14	15.58	99.34	39.88	9.07	48.48	23.22	1.88	10.07	4.81	0.13	6.79	0.3
	MI058	13.00	22.91	9.49	12.26	94.31	8.95	7.88	64.02	5.75	1.42	11.50	1.04	0.08	5.37	0.06
	MI070	23.53	73.10	57.18	23.16	98.45	56.28	11.02	54.44	26.78	1.32	6.54	3.21	0.07	5.14	0.17
	MI079	14.43	40.91	63.78	14.23	98.61	62.90	5.57	35.29	24.62	1.22	7.71	5.39	0.04	3.62	0.18
	平均	14.59	48.99	37.06	14.33	98.11	36.55	8.11	51.31	19.56	1.79	11.69	4.36	0.08	4.92	0.19
	SEM	2.00	7.33	8.50	1.98	0.78	8.42	0.76	4.18	3.08	0.35	2.72	0.96	0.01	0.85	0.04
G2: OBI-3424 (0.3 mg/kg)	MI036	11.03	59.01	21.45	10.86	98.48	21.12	7.64	63.07	14.86	2.23	18.38	4.34	0.11	5.03	0.21
	MI042	9.70	26.17	19.84	7.88	81.16	16.11	6.79	71.55	13.89	1.66	17.49	3.39	0.13	7.95	0.27
	MI048	7.52	17.42	40.61	7.14	94.89	38.56	5.20	57.32	28.08	1.65	18.21	8.91	0.08	5.08	0.43
	MI061	22.11	32.52	4.73	20.09	90.86	4.30	15.65	75.09	3.35	2.12	10.15	0.45	0.13	6.05	0.03
	MI090	13.12	29.44	32.34	13.06	99.60	32.19	6.87	49.45	16.93	4.23	30.45	10.43	0.16	3.69	0.39
	MI093	13.82	36.50	10.02	13.65	98.76	9.90	8.60	44.32	6.24	2.84	14.61	2.06	0.11	3.81	0.08
	平均	12.88	33.51	21.50	12.11	93.96	20.36	8.46	60.13	13.89	2.46	18.22	4.93	0.12	5.27	0.24
	SEM	2.07	5.74	5.47	1.92	2.88	5.35	1.51	4.95	3.56	0.40	2.76	1.60	0.01	0.65	0.07
G3: OBI-3424 (1 mg/kg)	MI038	25.00	37.76	7.25	24.22	96.86	7.02	16.35	61.50	4.74	1.46	5.51	0.42	0.07	4.64	0.02
	MI039	24.72	41.33	31.20	23.33	94.38	29.44	15.22	60.62	19.21	2.88	11.47	3.63	0.06	2.22	0.08
	MI056	17.44	35.50	12.31	16.66	95.57	11.76	13.01	67.91	9.19	2.69	14.05	1.90	0.10	3.57	0.07
	MI060	24.40	40.55	24.11	24.05	98.57	23.76	11.04	45.46	10.91	5.06	20.81	5.00	0.12	2.45	0.12
	MI077	25.26	38.34	18.79	24.52	97.07	18.24	16.92	68.87	12.59	4.55	18.53	3.39	0.06	1.41	0.04
	MI089	33.47	57.62	27.11	33.34	99.62	27.01	20.76	63.43	16.82	3.26	9.97	2.64	0.13	3.92	0.11
	平均	25.05	41.85	20.13	24.35	97.01	19.54	15.55	61.30	12.24	3.32	13.39	2.83	0.09	3.04	0.07

【 0 1 4 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

	SEM	2.08	3.27	3.72	2.17	0.78	3.61	1.37	3.45	2.14	0.50	2.13	0.64	0.01	0.46	0.01
G4: PD-1 (20 mg/kg)	MI030	12.78	39.13	49.27	9.19	71.87	35.43	8.75	63.85	33.73	3.08	22.44	11.87	0.10	3.38	0.39
	MI035	6.23	44.45	64.29	5.61	90.05	57.90	5.80	44.44	59.86	1.30	9.95	13.42	0.07	5.23	0.72
	MI045	11.05	63.24	29.45	9.68	87.55	25.80	6.80	60.36	18.12	2.74	24.33	7.30	0.04	1.31	0.11
	MI047	19.16	65.22	473.25	18.33	95.66	452.75	5.43	20.34	134.12	4.77	17.86	117.82	0.16	3.27	3.95
	MI053	17.34	29.71	49.16	14.42	83.20	40.88	10.05	56.98	28.49	2.21	12.52	6.27	0.08	3.80	0.23
	MI087	4.73	63.41	37.65	4.03	85.19	32.08	9.41	60.75	74.90	1.81	11.70	14.41	0.23	12.58	1.83
	平均	11.88	50.86	117.18	10.21	85.59	107.47	7.71	51.12	58.20	2.65	16.47	28.51	0.11	4.93	1.20
	SEM	2.36	6.17	71.38	2.19	3.26	69.20	0.80	6.75	17.45	0.50	2.45	17.91	0.03	1.61	0.61
G5: OBI-3424+ PD-1 (0.3 mg/kg +20 mg/kg)	MI029	26.12	54.68	156.72	23.73	90.86	142.38	9.50	37.70	57.00	1.93	7.67	11.58	0.06	3.31	0.36
	MI032	24.04	38.35	16.49	19.71	81.99	13.52	15.02	65.21	10.30	2.29	9.94	1.57	0.08	3.32	0.05
	MI049	24.72	36.82	23.34	19.89	80.46	18.78	15.43	67.23	14.57	4.06	17.69	3.83	0.11	2.76	0.10
	MI062	16.62	46.31	39.89	11.64	70.04	27.94	7.18	59.46	17.23	3.31	27.44	7.94	0.08	2.29	0.19
	MI064	21.51	47.16	54.21	19.37	90.05	48.81	8.30	39.40	20.92	2.68	12.74	6.75	0.04	1.34	0.10
	MI076	12.90	63.18	40.83	9.65	74.81	30.54	12.65	73.71	40.04	3.52	20.51	11.14	0.10	2.84	0.32
	平均	20.99	47.75	55.24	17.33	81.37	46.99	11.35	57.12	26.68	2.97	16.00	7.14	0.08	2.64	0.19
	SEM	2.12	4.07	21.03	2.23	3.36	19.71	1.44	6.16	7.38	0.33	3.00	1.62	0.01	0.30	0.05
G6: OBI-3424+ PD-1 (1 mg/kg +20 mg/kg)	MI034	32.23	51.69	22.56	24.70	76.63	17.29	17.76	60.04	12.43	3.09	10.44	2.16	0.07	2.20	0.05
	MI041	25.80	42.74	19.45	20.10	77.89	15.16	15.91	61.65	12.00	3.39	13.13	2.56	0.12	3.54	0.09
	MI046	23.78	35.87	22.59	14.56	61.24	13.83	15.23	67.57	14.47	2.81	12.46	2.67	0.08	2.99	0.08
	MI059	31.85	46.58	17.07	26.28	82.51	14.09	20.82	68.88	11.16	4.28	14.15	2.29	0.09	2.06	0.05
	MI088	37.77	52.21	10.73	28.20	74.67	8.01	23.50	69.63	6.67	6.21	18.40	1.76	0.15	2.38	0.04
	MI095	32.31	54.02	23.84	26.32	81.47	19.42	11.71	37.95	8.64	3.13	10.14	2.31	0.10	3.32	0.07
	平均	30.62	47.19	19.37	23.36	75.74	14.63	17.49	60.95	10.90	3.82	13.12	2.29	0.10	2.75	0.06
	SEM	2.07	2.83	2.00	2.09	3.14	1.58	1.72	4.87	1.14	0.52	1.23	0.13	0.01	0.25	0.01
G7: OBI-3424+ PD-1 (1 mg/kg)	MI066	32.30	69.63	45.28	27.95	86.55	39.19	16.28	49.59	22.82	4.90	14.94	6.87	0.08	1.63	0.11
	MI067	50.70	79.45	61.65	39.02	76.97	47.45	32.52	61.40	39.54	3.32	6.26	4.04	0.12	3.62	0.1
	MI068	56.19	85.06	148.34	45.95	81.78	121.31	19.64	40.53	51.85	3.83	7.91	10.11	0.14	3.55	0.37
	MI069	57.47	86.67	27.13	45.08	78.43	21.28	23.64	43.70	11.16	2.62	4.84	1.24	0.11	4.13	0.05

【 0 1 4 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 3】

+20	MI078	38.81	70.85	98.58	25.46	65.62	64.67	10.75	26.95	27.31	4.36	10.94	11.07	0.11	2.47	0.28
mg/kg)	MI091	34.79	69.23	41.61	25.26	72.62	30.21	21.56	52.60	25.79	2.99	7.29	3.58	0.07	2.41	0.08
(CD8 ⁺ PBMC	平均	45.04	76.82	70.43	34.79	77.00	54.02	20.73	45.80	29.74	3.67	8.70	6.15	0.11	2.97	0.17
を除外)	SEM	4.54	3.25	18.51	3.97	2.97	14.77	2.99	4.80	5.77	0.35	1.50	1.59	0.01	0.39	0.05

CD45⁺ ゲーティング%= ゲート CD45⁺ 細胞
TH ゲーティング%= ゲート CD45⁺CD4⁺細胞
細胞数 (x10⁵)=合計細胞数×合計%×10

10

【 0 1 5 0 】

20

30

40

50

【表 1 5 - 1】

表 15. TIL 中の NK 細胞の割合のまとめ

群	動物 No.	細胞密 度	合計細 胞数	生存率	NK 細胞 (CD45 ⁺ CD56 ⁺)			PD-1 ⁺ NK (CD45 ⁺ CD56 ⁺ PD-1 ⁺)		
		× (10 ⁶ /mL)	× 10 ⁶	%	合計%	CD45 ⁺ ゲートイン ゲ-%	細胞数 (x10 ⁵)	合計%	NK ゲートイン ゲ-%	細胞数 (x10 ⁵)
G1: ビヒクル	MI031	2.33	23.30	52.58	0.57	3.74	1.33	0.50	88.11	1.17
	MI033	2.60	25.95	62.24	3.32	11.57	8.62	1.64	49.46	4.26
	MI054	2.56	25.60	64.65	1.92	6.74	4.92	1.04	54.49	2.66
	MI058	0.73	7.30	67.53	4.38	7.72	3.20	1.57	35.80	1.15
	MI070	2.43	24.30	74.90	1.33	4.13	3.23	0.77	57.83	1.87
	MI079	4.42	44.20	72.29	2.66	7.53	11.76	1.08	40.51	4.77
	平均	2.51	25.11	65.70	2.36	6.91	5.51	1.10	54.37	2.65
	SEM	0.48	4.78	3.25	0.56	1.16	1.60	0.18	7.55	0.64
G2: OBI-3424 (0.3 mg/kg)	MI036	1.95	19.45	64.78	1.18	6.33	2.30	0.85	71.96	1.65
	MI042	2.05	20.45	62.35	3.26	8.78	6.67	1.08	33.17	2.21
	MI048	5.40	54.00	80.46	3.83	8.87	20.68	2.01	52.46	10.85
	MI061	0.21	2.14	72.34	6.83	10.05	1.46	1.44	21.08	0.31
	MI090	2.47	24.65	80.93	1.00	2.25	2.47	0.88	87.65	2.17
	MI093	0.73	7.25	71.03	2.54	6.70	1.84	1.14	44.79	0.83
	平均	2.14	21.32	71.98	3.11	7.16	5.90	1.23	51.85	3.00
	SEM	0.74	7.41	3.15	0.87	1.14	3.06	0.18	10.05	1.60
G3: OBI-3424 (1 mg/kg)	MI038	0.29	2.90	68.97	2.64	3.99	0.77	0.91	34.34	0.26
	MI039	1.26	12.62	80.03	3.38	5.65	4.27	1.30	38.34	1.64
	MI056	0.71	7.06	65.44	2.95	6.00	2.08	1.44	48.85	1.02
	MI060	0.99	9.88	73.48	2.44	4.05	2.41	1.79	73.40	1.77
	MI077	0.74	7.44	64.52	2.63	3.99	1.96	1.40	53.12	1.04
	MI089	0.81	8.10	84.69	2.46	4.24	1.99	2.18	88.62	1.77
	平均	0.80	8.00	72.86	2.75	4.65	2.25	1.50	56.11	1.25
	SEM	0.11	1.11	1.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11

【 0 1 5 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 2】

	SEM	0.13	1.32	3.32	0.14	0.35	0.46	0.16	7.94	0.24
G4: PD-1 (20 mg/kg)	MI030	3.86	38.55	66.41	5.98	18.31	23.05	0.53	8.83	2.04
	MI035	10.32	103.20	64.44	0.66	4.68	6.81	0.40	60.98	4.13
	MI045	2.67	26.65	63.41	0.82	4.67	2.19	0.26	32.35	0.69
	MI047	24.70	247.00	73.48	1.41	4.81	34.83	0.97	68.84	23.96
	MI053	2.84	28.35	72.84	3.60	6.18	10.21	0.70	19.53	1.98
	MI087	7.96	79.60	44.22	0.57	7.62	4.54	0.20	34.51	1.59
	平均	8.73	87.23	64.13	2.17	7.71	13.60	0.51	37.51	5.73
	SEM	3.43	34.33	4.34	0.89	2.17	5.20	0.12	9.51	3.67
G5: OBI-3424+ PD-1 (0.3 mg/kg +20 mg/kg)	MI029	6.00	60.00	65.75	1.63	3.42	9.78	0.97	59.56	5.82
	MI032	0.69	6.86	61.81	3.28	5.23	2.25	0.71	21.59	0.49
	MI049	0.94	9.44	59.96	6.65	9.90	6.28	0.73	10.95	0.69
	MI062	2.40	24.00	47.08	6.30	17.57	15.12	0.75	11.93	1.80
	MI064	2.52	25.20	62.22	2.82	6.19	7.11	0.81	28.75	2.04
	MI076	3.17	31.65	47.71	1.05	5.15	3.32	0.39	36.88	1.23
	平均	2.62	26.19	57.42	3.62	7.91	7.31	0.73	28.28	2.01
	SEM	0.78	7.82	3.26	0.96	2.12	1.91	0.08	7.45	0.80
G6: OBI-3424+ PD-1 (1 mg/kg +20 mg/kg)	MI034	0.70	7.00	58.57	5.74	9.20	4.02	0.63	10.95	0.44
	MI041	0.75	7.54	48.01	2.06	3.41	1.55	0.48	23.54	0.36
	MI046	0.95	9.50	54.32	4.30	6.49	4.09	0.30	7.06	0.29
	MI059	0.54	5.36	48.88	3.70	5.40	1.98	1.11	30.09	0.59
	MI088	0.28	2.84	44.23	3.52	4.86	1.00	0.86	24.57	0.24
	MI095	0.74	7.38	59.08	2.35	3.93	1.73	0.43	18.37	0.32
	平均	0.66	6.60	52.18	3.61	5.55	2.40	0.64	19.10	0.37
	SEM	0.09	0.93	2.48	0.55	0.85	0.54	0.12	3.57	0.05
G7: OBI-3424+ PD-1 (1 mg/kg +20 mg/kg)	MI066	1.40	14.02	51.93	3.44	7.42	4.82	0.60	17.56	0.84
	MI067	1.22	12.16	59.05	5.44	8.53	6.62	0.75	13.74	0.91
	MI068	2.64	26.40	60.15	3.62	5.47	9.56	0.96	26.66	2.53
	MI069	0.47	4.72	38.31	10.72	16.16	5.06	2.25	20.98	1.06

【 0 1 5 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 3】

(CD8 ⁺ PBMCを除 外)	MI078	2.54	25.40	71.65	4.04	7.38	10.26	0.60	14.74	1.52
	MI091	1.20	11.96	75.92	8.08	16.08	9.66	0.76	9.41	0.91
	平均	1.58	15.78	59.50	5.89	10.17	7.66	0.99	17.18	1.30
	SEM	0.35	3.46	5.55	1.20	1.92	1.00	0.26	2.47	0.27

CD45⁺ゲーティング%= ゲート CD45⁺細胞
NKゲーティング%= ゲート CD45⁺CD56⁺細胞
細胞数 (x10⁵)=合計細胞数×合計%×10

10

【 0 1 5 3】

【表 1 6 - 1】

表 16. TIL 中の樹状細胞の割合のまとめ

群	動物 No.	細胞密 度	合計細 胞数	生存率	DC 細胞 (CD45 ⁺ CD11c ⁺)			CD86 ⁺ DC 細胞 (CD45 ⁺ CD11c ⁺ CD86 ⁺)			CD91 ⁺ DC 細胞 (CD45 ⁺ CD11c ⁺ CD91 ⁺)		
		×	×	%	合計%	CD45 ⁺ ゲーティング%	細胞数 (x10 ⁵)	合計%	CTL ゲーティング%	細胞数 (x10 ⁵)	合計%	CTL ゲーティング%	細胞数 (x10 ⁵)
		(10 ⁶ /mL)	10 ⁶	%	合計%	ゲーティング%	(x10 ⁵)	合計%	ゲーティング%	(x10 ⁵)	合計%	ゲーティング%	(x10 ⁵)
G1: ビビグル	MI031	2.33	23.30	52.58	5.45	26.37	12.70	2.98	54.77	6.94	0.07	1.32	0.16
	MI033	2.60	25.95	62.24	13.15	41.24	34.12	6.38	48.51	16.56	0.10	0.79	0.26
	MI054	2.56	25.60	64.65	10.61	34.69	27.16	3.87	36.50	9.91	0.14	1.28	0.36
	MI058	0.73	7.30	67.53	11.86	20.97	8.66	5.36	45.23	3.91	0.08	0.67	0.06
	MI070	2.43	24.30	74.90	4.68	15.74	11.37	2.54	54.19	6.17	0.08	1.62	0.19
	MI079	4.42	44.20	72.29	10.37	30.75	45.84	5.20	50.10	22.98	0.04	0.39	0.18
	平均	2.51	25.11	65.70	9.35	28.29	23.31	4.39	48.22	11.08	0.09	1.01	0.20
	SEM	0.48	4.78	3.25	1.42	3.78	6.08	0.61	2.76	2.98	0.01	0.19	0.04
G2: OBI-3424 (0.3 mg/kg)	MI036	1.95	19.45	64.78	5.46	32.90	10.62	3.27	59.93	6.36	0.09	1.61	0.18
	MI042	2.05	20.45	62.35	11.42	30.81	23.35	7.01	61.40	14.34	0.08	0.70	0.16
	MI048	5.40	54.00	80.46	19.59	44.83	105.79	5.11	26.07	27.59	0.10	0.51	0.54
	MI061	0.21	2.14	72.34	12.80	19.60	2.74	5.82	45.47	1.25	0.08	0.63	0.02
	MI090	2.47	24.65	80.93	10.32	24.30	25.44	6.34	61.42	15.63	0.09	0.85	0.22
	MI093	0.73	7.25	71.03	12.66	36.70	9.18	6.50	51.39	4.71	0.06	0.44	0.04
	平均	2.14	21.32	71.98	12.04	31.52	29.52	5.68	50.95	11.65	0.08	0.79	0.19
	SEM	0.74	7.41	3.15	1.87	3.65	15.66	0.55	5.62	3.92	0.01	0.17	0.08
G3:	MI038	0.29	2.90	68.97	15.16	23.54	4.40	7.68	50.65	2.23	0.14	0.90	0.04

20

30

40

【 0 1 5 4】

50

【表 1 6 – 2】

OBI-3424 (1 mg/kg)	MI039	1.26	12.62	80.03	18.68	31.09	23.57	8.39	44.92	10.59	0.08	0.41	0.10
	MI056	0.71	7.06	65.44	19.60	41.01	13.84	7.73	39.45	5.46	0.09	0.45	0.06
	MI060	0.99	9.88	73.48	12.37	19.89	12.22	6.81	55.03	6.73	0.08	0.68	0.08
	MI077	0.74	7.44	64.52	22.41	35.18	16.67	9.38	41.86	6.98	0.06	0.29	0.04
	MI089	0.81	8.10	84.69	17.47	28.58	14.15	8.78	50.27	7.11	0.07	0.41	0.06
	平均	0.80	8.00	72.86	17.62	29.88	14.14	8.13	47.03	6.52	0.09	0.52	0.06
	SEM	0.13	1.32	3.32	1.33	2.90	2.54	0.34	2.24	1.11	0.01	0.08	0.01
G4: PD-1 (20 mg/kg)	MI030	3.86	38.55	66.41	9.61	32.74	37.05	3.50	36.43	13.49	0.04	0.37	0.15
	MI035	10.32	103.20	64.44	3.99	34.88	41.18	1.25	31.29	12.90	0.04	1.00	0.41
	MI045	2.67	26.65	63.41	4.92	38.28	13.11	1.99	40.37	5.30	0.02	0.49	0.05
	MI047	24.70	247.00	73.48	5.24	25.68	129.43	2.40	45.76	59.28	0.13	2.52	3.21
	MI053	2.84	28.35	72.84	9.27	16.68	26.28	3.84	41.48	10.89	0.04	0.39	0.11
	MI087	7.96	79.60	44.22	0.78	13.45	6.21	0.44	56.41	3.50	0.04	5.64	0.32
	平均	8.73	87.23	64.13	5.64	26.95	42.21	2.24	41.96	17.56	0.05	1.74	0.71
	SEM	3.43	34.33	4.34	1.37	4.14	18.29	0.53	3.51	8.51	0.02	0.85	0.50
G5: OBI-3424+ PD-1 (0.3 mg/kg +20 mg/kg)	MI029	6.00	60.00	65.75	10.77	23.07	64.62	6.36	59.06	38.16	0.04	0.33	0.24
	MI032	0.69	6.86	61.81	10.83	16.62	7.43	6.15	56.79	4.22	0.04	0.41	0.03
	MI049	0.94	9.44	59.96	11.79	18.07	11.13	5.30	44.96	5.00	0.03	0.24	0.03
	MI062	2.40	24.00	47.08	9.62	30.34	23.09	4.71	48.94	11.30	0.11	1.16	0.26
	MI064	2.52	25.20	62.22	15.61	32.00	39.34	7.50	48.07	18.90	0.08	0.54	0.20
	MI076	3.17	31.65	47.71	5.96	34.00	18.86	3.20	53.62	10.13	0.08	1.34	0.25
	平均	2.62	26.19	57.42	10.76	25.68	27.41	5.54	51.91	14.62	0.06	0.67	0.17
	SEM	0.78	7.82	3.26	1.28	3.04	8.72	0.61	2.23	5.18	0.01	0.19	0.05
G6: OBI-3424+ PD-1 (1 mg/kg +20 mg/kg)	MI034	0.70	7.00	58.57	10.74	18.16	7.52	5.54	51.56	3.88	0.10	0.97	0.07
	MI041	0.75	7.54	48.01	8.66	15.07	6.53	4.54	52.35	3.42	0.11	1.29	0.08
	MI046	0.95	9.50	54.32	16.79	26.86	15.95	7.56	45.00	7.18	0.08	0.45	0.08
	MI059	0.54	5.36	48.88	13.35	19.71	7.16	5.70	42.69	3.06	0.07	0.54	0.04
	MI088	0.28	2.84	44.23	15.24	21.31	4.33	8.17	53.62	2.32	0.04	0.29	0.01
	MI095	0.74	7.38	59.08	9.55	16.02	7.05	5.83	61.08	4.30	0.03	0.34	0.02

【 0 1 5 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 6 - 3】

	平均	0.66	6.60	52.18	12.39	19.52	8.09	6.22	51.05	4.03	0.07	0.65	0.05
	SEM	0.09	0.93	2.48	1.33	1.74	1.64	0.56	2.68	0.69	0.01	0.16	0.01
G7: OBI-3424+ PD-1 (1 mg/kg +20 mg/kg) (CD8 ⁺ PBMC を除外)	MI066	1.40	14.02	51.93	12.46	26.87	17.47	7.73	62.04	10.84	0.09	0.74	0.13
	MI067	1.22	12.16	59.05	15.61	24.15	18.98	10.54	67.54	12.82	0.08	0.49	0.10
	MI068	2.64	26.40	60.15	10.93	16.58	28.86	8.14	74.42	21.49	0.10	0.91	0.26
	MI069	0.47	4.72	38.31	13.43	19.06	6.34	10.18	75.82	4.80	0.09	0.66	0.04
	MI078	2.54	25.40	71.65	10.68	19.89	27.13	6.91	64.72	17.55	0.10	0.97	0.25
	MI091	1.20	11.96	75.92	18.70	36.18	22.37	13.58	72.58	16.24	0.08	0.43	0.10
	平均	1.58	15.78	59.50	13.64	23.79	20.19	9.51	69.52	13.96	0.09	0.70	0.15
	SEM	0.35	3.46	5.55	1.25	2.90	3.31	1.00	2.28	2.38	0.00	0.09	0.04

CD45⁺ゲーティング%=ゲート CD45⁺細胞
DCゲーティング%=ゲート CD45⁺CD11c⁺細胞
細胞数 (x10⁵)=合計細胞数×合計%×10

【 0 1 5 6 】

結果は、OBI-3424の投与が腫瘍増殖を有意に大きく抑制し、抗腫瘍活性に関して用量依存的な傾向を示すことを示した。さらに、抗hPD-1治療と組み合わせた高用量OBI-3424は、HepG2ヒト化マウスモデルにおける腫瘍増殖に対して最も効果的な抗腫瘍効果を示した。しかし、CD8⁺細胞の枯渇は、併用治療の抗腫瘍効果を著しく損なう結果となった。

【 0 1 5 7 】

本発明の実施形態に関する上記の説明は、本発明を限定するものではない。当業者は、本発明に従って様々な修正及び変更を行うことができ、また、本発明の範囲内のあらゆる修正及び変更は、本発明に添付された特許請求の範囲に包含されるものとする。

【 0 1 5 8 】

本明細書で引用したすべての参考文献は、法律で認められる最大限の範囲で参照により本明細書に組み込まれる。これらの参考文献の議論は、単に著者らの主張を要約することを目的としている。いずれの参考文献（又はいずれの参考文献の一部）も、関連する先行技術であることを自認するものではない。出願人は、引用された参考文献の正確性及び適切性について異議を唱える権利を留保する。

【 0 1 5 9 】

参考文献

【 0 1 6 0 】

【表 1 7 - 1】

1.	Lin HK, Jez JM, Schlegel BP, Peehl DM, Pachter JA, Penning TM. Expression and characterization of recombinant type 2 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) from human prostate: demonstration of bifunctional 3 alpha/17 beta-HSD activity and cellular distribution. <i>Mol Endocrinol</i> 1997;11:1971-84	
2.	Dufort I, Rheault P, Huang XF, Soucy P, Luu-The V. Characteristics of a highly labile human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. <i>Endocrinology</i> 1999;140:568-74	10
3.	Penning TM, Drury JE. Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. <i>Arch Biochem Biophys</i> 2007;464:241-50	
4.	Rizner TL, Penning TM. Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. <i>Steroids</i> 2014;79:49-63	20
5.	Chang TS, Lin HK, Rogers KA, Brame LS, Yeh MM, Yang Q, et al. Expression of aldo-keto reductase family 1 member C3 (AKR1C3) in neuroendocrine tumors & adenocarcinomas of pancreas, gastrointestinal tract, and lung. <i>Int J Clin Exp Pathol</i> 2013;6:2419-29	
6.	Guisse CP, Abbattista MR, Singleton RS, Holford SD, Connolly J, Dachs GU, et al. The bioreductive prodrug PR-104A is activated under aerobic conditions by human aldo-keto reductase 1C3. <i>Cancer Res</i> 2010;70:1573-84	
7.	Miller VL, Lin HK, Murugan P, Fan M, Penning TM, Brame LS, et al. Aldo-keto reductase family 1 member C3 (AKR1C3) is expressed in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma but not small cell carcinoma. <i>Int J Clin Exp Pathol</i> 2012;5:278-89	30
8.	Zhao J, Zhang M, Liu J, Liu Z, Shen P, Nie L, et al. AKR1C3 expression in primary lesion rebiopsy at the time of metastatic castration-resistant prostate cancer is strongly associated with poor efficacy of abiraterone as a first-line therapy. <i>Prostate</i> 2019;79:1553-62	40

【 0 1 6 1】

【表 1 7 - 2】

9. Nakarai C, Osawa K, Akiyama M, Matsubara N, Ikeuchi H, Yamano T, et al. Expression of AKR1C3 and CNN3 as markers for detection of lymph node metastases in colorectal cancer. *Clin Exp Med* 2015;15:333-41
10. Hsu NY, Ho HC, Chow KC, Lin TY, Shih CS, Wang LS, et al. Overexpression of dihydrodiol dehydrogenase as a prognostic marker of non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001;61:2727-31
11. Powell K, Semaan L, Conley-LaComb MK, Asangani I, Wu YM, Ginsburg KB, et al. ERG/AKR1C3/AR Constitutes a Feed-Forward Loop for AR Signaling in Prostate Cancer Cells. *Clin Cancer Res* 2015;21:2569-79 10
12. Heibei AD, Guo B, Sprowl JA, Maclean DA, Parissenti AM. Role of aldo-keto reductases and other doxorubicin pharmacokinetic genes in doxorubicin resistance, DNA binding, and subcellular localization. *BMC Cancer* 2012;12:381
13. Zhong T, Xu F, Xu J, Liu L, Chen Y. Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) is associated with the doxorubicin resistance in human breast cancer via PTEN loss. *Biomed Pharmacother* 2015;69:317-25 20
14. Liu C, Lou W, Zhu Y, Yang JC, Nadiminty N, Gaikwad NW, et al. Intracrine Androgens and AKR1C3 Activation Confer Resistance to Enzalutamide in Prostate Cancer. *Cancer Res* 2015;75:1413-22
15. Liu C, Armstrong CM, Lou W, Lombard A, Evans CP, Gao AC. Inhibition of AKR1C3 Activation Overcomes Resistance to Abiraterone in Advanced Prostate Cancer. *Mol Cancer Ther* 2017;16:35-44 30
16. Zhao J, Xiang Y, Xiao C, Guo P, Wang D, Liu Y, et al. AKR1C3 overexpression mediates methotrexate resistance in choriocarcinoma cells. *Int J Med Sci* 2014;11:1089-97
17. Xiong W, Zhao J, Yu H, Li X, Sun S, Li Y, et al. Elevated expression of AKR1C3 increases resistance of cancer cells to ionizing radiation via modulation of oxidative stress. *PLoS One* 2014;9:e111911
18. Sun SQ, Gu X, Gao XS, Li Y, Yu H, Xiong W, et al. Overexpression of AKR1C3 significantly enhances human prostate cancer cells resistance to radiation. 40

【0 1 6 2】

【表 17-3】

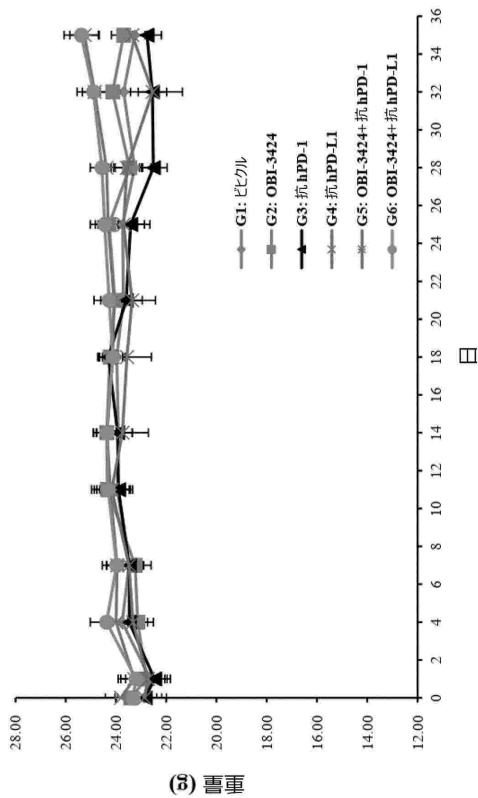
- Oncotarget 2016;7:48050-8
19. Xie L, Yu J, Guo W, Wei L, Liu Y, Wang X, et al. Aldo-keto reductase 1C3 may be a new radioresistance marker in non-small-cell lung cancer. *Cancer Gene Ther* 2013;20:260-6
 20. Ascierto ML, McMiller TL, Berger AE, Danilova L, Anders RA, Netto GJ, et al. The Intratumoral Balance between Metabolic and Immunologic Gene Expression Is Associated with Anti-PD-1 Response in Patients with Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res* 2016;4:726-33 10
 21. Moradi Manesh D, El-Hoss J, Evans K, Richmond J, Toscan CE, Bracken LS, et al. AKR1C3 is a biomarker of sensitivity to PR-104 in preclinical models of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015;126:1193-202
 22. Guise CP, Abbattista MR, Tipparaju SR, Lambie NK, Su J, Li D, et al. Diflavin oxidoreductases activate the bio-reductive prodrug PR-104A under hypoxia. *Mol Pharmacol* 2012;81:31-40 20
 23. Guise CP, Wang AT, Theil A, Bridewell DJ, Wilson WR, Patterson AV. Identification of human reductases that activate the dinitrobenzamide mustard prodrug PR-104A: a role for NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase under hypoxia. *Biochem Pharmacol* 2007;74:810-20
 24. Patterson AV, Ferry DM, Edmunds SJ, Gu Y, Singleton RS, Patel K, et al. Mechanism of action and preclinical antitumor activity of the novel hypoxia-activated DNA cross-linking agent PR-104. *Clin Cancer Res* 2007;13:3922-32
 25. Evans K, Duan J, Pritchard T, Jones CD, McDermott L, Gu Z, et al. OBI-3424, a Novel AKR1C3-Activated Prodrug, Exhibits Potent Efficacy against Preclinical Models of T-ALL. *Clin Cancer Res* 2019;25:4493-503 30
 26. Wang Y, Liu Y, Zhou C, Wang C, Zhang N, Cao D, et al. An AKR1C3-specific prodrug with potent anti-tumor activities against T-ALL. *Leuk Lymphoma* 2020;1-9
 27. Spiegelberg L, Houben R, Niemans R, de Ruyscher D, Yaromina A, Theys J, et al. Hypoxia-activated prodrugs and (lack of) clinical progress: The need for hypoxia-based biomarker patient selection in phase III clinical trials. *Clin Transl* 40

【0163】

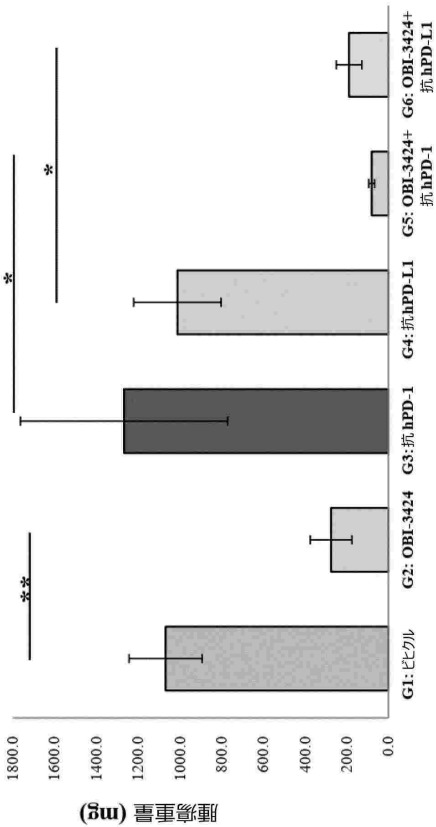
【表 17-4】

- Radiat Oncol 2019;15:62-9
28. Heeke AL, Pishvaian MJ, Lynce F, Xiu J, Brody JR, Chen WJ, et al. Prevalence of Homologous Recombination-Related Gene Mutations Across Multiple Cancer Types. *JCO Precis Oncol* 2018;2018
 29. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992; 11:3887-95 10
 30. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 1996; 8:765-72
 31. Freeman G J, Long A J, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz L J, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne M C, Horton H F, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman M R, Carreno B M, Collins M, Wood C R, Honjo T, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000; 192: 1027-34 20
 32. Latchman Y, Wood C R, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long A J, Brown J A, Nunes R, Greenfield E A, Bourque K, Boussiotis V A, Carter L L, Carreno B M, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe A H, Freeman G J, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001; 2:261-8. 30
 33. Padmanee Sharma and James P Allison. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015; 348:56-61.
 34. Suzanne L Topalian, Janis M Taube, Robert A Anders, Drew M Pardoll, et al. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2016; 16:275-87.
 35. Sofia Farkona, Eleftherios P Diamandis, Ivan M Blasutig, et al. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med* 2016; 14:73. 40

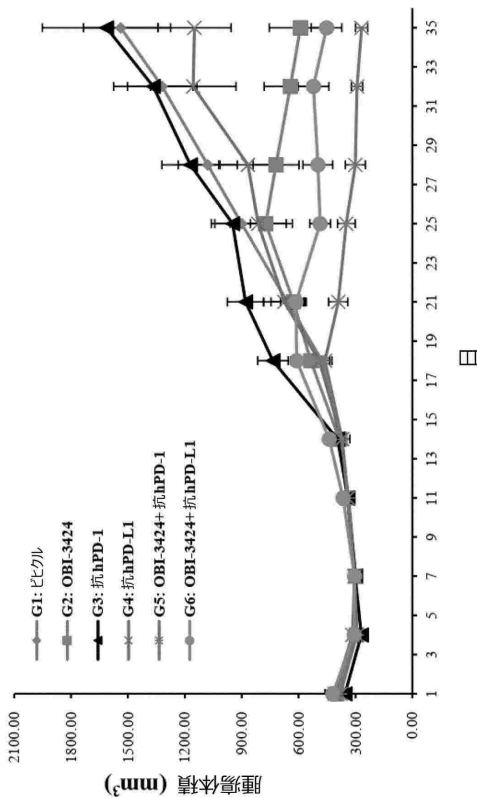
【図面】
【図 1】



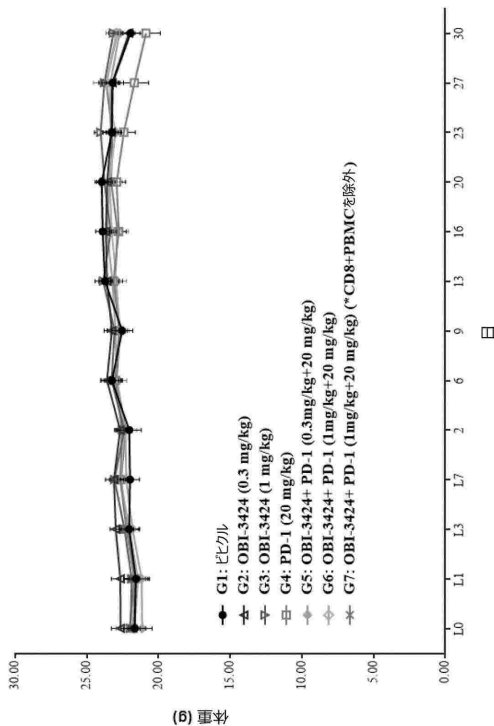
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

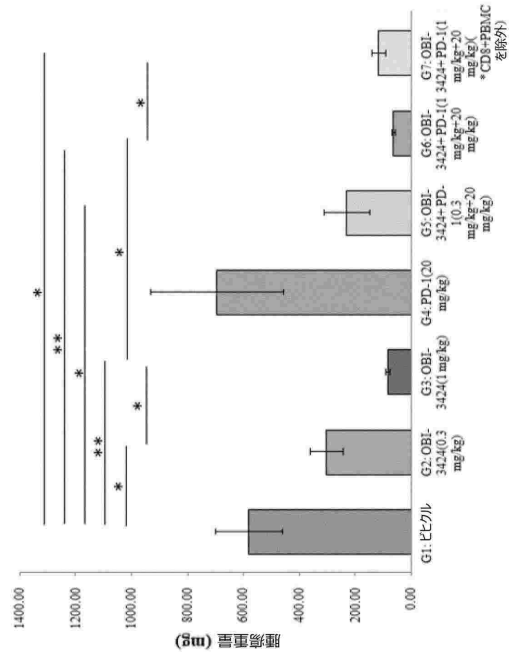
20

30

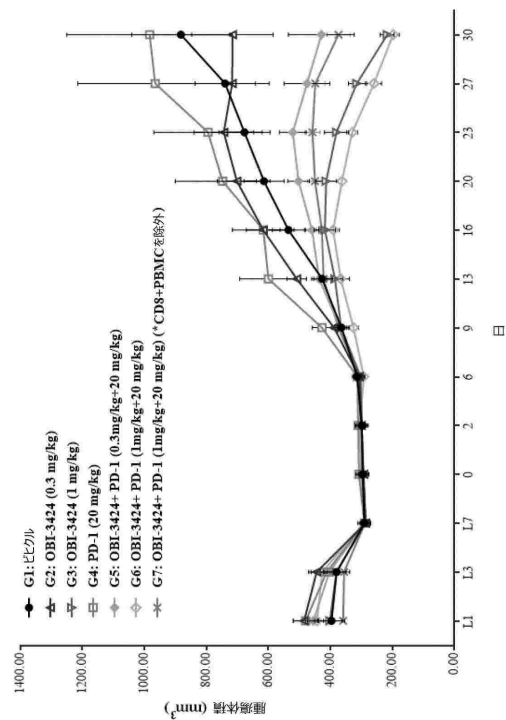
40

50

【図 5】



【図 6】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

PCT/US2021/029552 12.07.2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/029552

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 31/396; C07D 203/22; C07F 9/02 (2021.01)

CPC - A61K 31/396; C07D 203/22; C07F 9/02 (2021.05)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

see Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

see Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/062919 A1 (OBI PHARMA INC et al) 04 April 2019 (04.04.2019) entire document	1-3, 8-15
Y		4-7, 16-20
Y	US 2019/0192531 A1 (ELI LILLY AND COMPANY) 27 June 2019 (27.06.2019) entire document	4-7, 16-20
A	US 10,409,869 B2 (OBI PHARMA INC) 10 September 2019 (10.09.2019) entire document	1-20
A	PUBCHEM, SID 384736141, Available Date: 20 July 2019 [retrieved on 01 June 2021]. Retrieved from the Internet: <URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/384736141 > entire document	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 June 2021

Date of mailing of the international search report

'JUL 12 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Harry Kim

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I
A 6 1 P 35/02

テーマコード (参考)

G,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY, MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU, RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW . 1 4 J i n h u i R o a d , J i n s h a C o m m u n i t y , K e n g z i S t r e e t , P i n g s h a n D i s t r i c t , S h e n z h e n , G u a n g d o n g 5 1 8 1 1 8 , C h i n a

(74)代理人 100105957
弁理士 恩田 誠

(74)代理人 100068755
弁理士 恩田 博宣

(74)代理人 100142907
弁理士 本田 淳

(74)代理人 100152489
弁理士 中村 美樹

(72)発明者 ライ、ミン-タイン
台湾 1 1 5 タイペイ シティ ナンガン ディストリクト ユアンチュー ストリート ナンバー 3 1 9 エフ.

(72)発明者 リー、ワン-フェン
台湾 1 1 5 タイペイ シティ ナンガン ディストリクト ユアンチュー ストリート ナンバー 3 1 9 エフ.

(72)発明者 ワン、チューン-チョン
台湾 1 1 5 タイペイ シティ ナンガン ディストリクト ユアンチュー ストリート ナンバー 3 1 9 エフ.

(72)発明者 チェン、ルー-ツー
台湾 1 1 5 タイペイ シティ ナンガン ディストリクト ユアンチュー ストリート ナンバー 3 1 9 エフ.

F ターム (参考)

4C084 AA19 NA05 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
4C085 AA13 AA14 BB11 EE03
4C086 AA01 AA02 DA38 GA16 MA02 MA04 NA05 ZB26 ZB27