

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-505386

(P2011-505386A)

(43) 公表日 平成23年2月24日(2011.2.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T 4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	4 C 0 8 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7068 (2006.01)	A 6 1 K 31/7068	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁)

(21) 出願番号	特願2010-536288 (P2010-536288)	(71) 出願人	500021413
(86) (22) 出願日	平成20年12月4日 (2008.12.4)		シーエスエル、リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成22年6月3日 (2010.6.3)		オーストラリア連邦ビクトリア州、パーク
(86) 国際出願番号	PCT/AU2008/001797		ビル、ポプラー、ロード、45
(87) 国際公開番号	W02009/070844	(71) 出願人	510156550
(87) 国際公開日	平成21年6月11日 (2009.6.11)		ユニヴァーシティ ヘルス ネットワーク
(31) 優先権主張番号	60/996,819		カナダ エム5ジー2シー4 オンタリオ
(32) 優先日	平成19年12月6日 (2007.12.6)		トロント エリザベス ストリート 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)		90 アール フレイザー エリオット
			ビルディング ルーム 1 エス-4 17
		(74) 代理人	100092093
			弁理士 辻居 幸一
		(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 白血病性幹細胞の阻害方法

(57) 【要約】

I L - 3 R α (C D 1 2 3) を発現する白血病性幹細胞の阻害方法は、その細胞と、増強された F c エフェクター機能を有する F c 領域または改変 F c 領域を含む抗原結合分子と接触させることを含み、この抗原結合分子は、I L - 3 R α (C D 1 2 3) に選択的に結合する。本発明は、有効量の抗原結合分子を患者に投与することによる患者の血液学的癌病態の治療を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

I L - 3 R α (C D 1 2 3) を発現する白血病性幹細胞を阻害する方法であって、前記細胞と、F c 領域または増強されたF c エフェクター機能を有する改変F c 領域を含む抗原結合分子とを接触させることを含み、前記抗原結合分子がI L - 3 R α (C D 1 2 3) に選択的に結合する、前記方法。

【請求項 2】

F c 領域または増強されたF c エフェクター機能を有する改変F c 領域を含む有効量の抗原結合分子を前記患者に投与することを含む患者における血液学的癌病態を治療する方法であって、前記抗原結合分子がI L - 3 R α (C D 1 2 3) に選択的に結合する、前記方法。

10

【請求項 3】

患者がヒトである請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

抗原結合分子が、モノクローナル抗体またはF c 領域を含む抗体断片である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

抗原結合分子が、増強されたF c エフェクター機能を有する改変F c 領域を含むモノクローナル抗体または抗体断片である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

抗体または抗体断片のF c 領域の改変が、前記F c 領域において、F c 領域と、関連するF c 受容体ならびに補体との相互作用を増強させるために、少なくとも1つのアミノ酸の置換、好ましくは2つまたは3つのアミノ酸の置換を含む、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

改変F c 領域を含む抗体または抗体断片が、脱フコシル化抗体または抗体断片である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前抗体または抗体断片のF c 領域における改変が、前記F c 領域における保存A s n²⁹に結合したオリゴ糖の改変を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

抗原結合分子が、キメラ、ヒト化もしくはヒトのモノクローナル抗体または抗体断片である、請求項 4 または 5 に記載の方法。

30

【請求項 10】

抗原結合分子が、ヒト定常領域に移植されたマウス抗C D 1 2 3モノクローナル抗体の軽可変領域および重可変領域を含むキメラ抗体または抗体断片である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

抗原結合分子が、ヒトのフレームワーク領域上に移植されたマウス抗C D 1 2 3モノクローナル抗体の複数の相補性決定領域(C D R)を含むヒト化抗体または抗体断片である、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記血液学的癌病態が、白血病または悪性リンパ球増殖障害である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 13】

前記白血病が、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ急性白血病、慢性リンパ急性白血病、および脊髄形成異常性症候群からなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

前記悪性リンパ球増殖障害がリンパ腫である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 15】

50

リンパ腫が、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、および小細胞リンパ腫ならびに大細胞濾胞性リンパ腫からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

患者に化学療法剤を投与することをさらに含む請求項 2 に記載の方法。

【請求項 17】

化学療法剤の投与が、抗原結合分子の投与前、投与と同時に、または投与後である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記化学療法剤が、

- (a) マスタードガス誘導体：メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル、メルファラン、およびイホスファミド
 - (b) エチレンイミン類：チオテパおよびヘキサメチルメラミン
 - (c) アルキルスルホネート類：ブスルファン
 - (d) ヒドラジン類およびトリアジン類：アルトレタミン、プロカルバジン、ダカルバジンおよびテモゾロミド
 - (e) ニトロソ尿素類：カルムスチン、ロムスチンおよびストレプトゾシン
 - (f) 金属塩類：カルボプラチン、シスプラチン、およびオキサリプラチン
 - (g) ビンカアルカロイド類：ビンクリスチン、ビンブラスチンおよびビノレルビン
 - (h) タキサン類：パクリタキセルおよびドセタキセル
 - (i) ポドフィロトキシン類：エトポシドおよびテニポシド
 - (j) カンプトテシン類縁体：イリノテカンおよびトポテカン
 - (k) アントラサイクリン類：ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン、ミトキサントロンおよびイダルビシン
 - (l) クロモマイシン類：ダクチノマイシンおよびプリカマイシン
 - (m) その他の抗癌抗生物質：マイトマイシンおよびブレオマイシン
 - (n) 葉酸アンタゴニスト：メトトレキサート
 - (o) ピリミジンアンタゴニスト：5-フルオロウラシル、フォクスリジン、シタラビン、カペシタビン、およびゲムシタビン
 - (p) プリンアンタゴニスト：6-メルカプトプリンおよび6-チオグアニン
 - (q) アデノシンデアミナーゼ阻害剤：クラドリビン、フルダラビン、ネララビンおよびペントスタチン
 - (r) トポイソメラーゼ I 阻害剤：イロノテカンおよびトポテカン
 - (s) トポイソメラーゼ II 阻害剤：アムサクリン、エトポシド、エトポシドリン酸塩およびテニポシド
 - (t) リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤：ヒドロキシ尿素
 - (u) 副腎皮質ステロイド阻害剤：ミトタン
 - (v) 酵素類：アスパラギナーゼおよびペガスバルガーゼ
 - (w) 微小管阻害剤：エストラムスチン
 - (x) レチノイド類：ベキサロテン、イソトレチノインおよびトレチノイン (ATRA)
- からなる群から選択される細胞毒性剤である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記細胞毒性剤がシタラビンである請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

IL-3Ra (CD123) を発現する白血病性幹細胞の阻害、または阻害用医薬品の製造における、Fc 領域または増強された Fc エフェクター機能を有する改変 Fc 領域を含む抗原結合分子の使用であって、前記抗原結合分子が IL-3Ra (CD123) に選択的に結合する使用。

【請求項 21】

患者における血液学的癌病態の治療、またはその治療用医薬品の製造において、Fc 領

10

20

30

40

50

域または増強されたFcエフェクター機能を有する改変Fc領域を含む抗原結合分子の使用であって、前記抗原結合分子がIL-3Ra(CD123)に選択的に結合する使用。

【請求項22】

IL-3Ra(CD123)を発現する白血病性幹細胞を阻害する薬剤であって、Fc領域または増強されたFcエフェクター機能を有する改変Fc領域を含む抗原結合分子を含み、前記抗原結合分子がIL-3Ra(CD123)に選択的に結合する阻害剤。

【請求項23】

患者における血液学的癌病態を治療する薬剤であって、Fc領域または増強されたFcエフェクター機能を有する改変Fc領域を含む抗原結合分子を含み、前記抗原結合分子がIL-3Ra(CD123)に選択的に結合する治療剤。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液学的癌病態に対する有効な療法として、白血病性幹細胞、特に急性骨髄性白血病(AML)および他の血液学的癌病態に関連した白血病性幹細胞を阻害する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

血液学的癌病態は、血液、骨髄、およびリンパ系に影響を及ぼす白血病および悪性リンパ球増殖病態などの癌の種類である。

20

【0003】

白血病は、急性白血病と慢性白血病に分類できる。急性白血病はさらに、急性骨髄性白血病(AML)と急性リンパ性白血病(ALL)に分類できる。慢性白血病としては、慢性骨髄性白血病(CML)および慢性リンパ性白血病(CLL)が挙げられる。他の関連病態としては、骨髄性血液細胞の無効性産生(または異形成)およびAMLへの悪性転換の危険性に結びついた、血液学的病態の多様な集合である脊髄形成異常性症候群(以前「前白血病」として知られていたMDS)が挙げられる。

【0004】

白血病性幹細胞(LSCs)は、正常な幹細胞に関連した特徴、すなわち、自己再生特性および多系列に発展する能力を有する癌細胞である。このような細胞は、異なる集団としてAMLなどの血液学的癌に永続すると提案されている¹。

30

【0005】

急性骨髄性白血病(AML)は、異質な未分化の骨髄芽の増殖増大として臨床的に提示されるクローン障害である。白血病ヒエラルキーは、自己再生の明確な能力を有し、白血病性前駆体へと分化することのできるLSCsの小集団によって維持される¹。これらの前駆体は、診断時および再発時に患者において容易に検出可能な多数の白血病性芽細胞を生じさせ、究極的に死に至らしめる^{2~4}。AML-LSCは、速やかに分裂するクローン原性前駆体とは対照的に、一般に静止細胞として報告されている^{3,5,6}。LSCsのこの性質が、増殖細胞を標的にする従来の化学療法剤の有効性を減じ、高比率のAML患者が完全な寛解に入るがほぼ例外なく再発し、4年を超えて生存するのは成人の<30%である現在の経験の理由を説明する可能性を示すものとなっている⁷。また、最小残留疾病発生率および生存率の低さは、AML患者における診断時の高いLSC頻度に帰するものであった⁸。したがって、新規治療が開発されるAML(ならびに類似の他の上記血液学的癌病態)の長期管理のためには、特にLSCsを除去することが不可避である^{9~14}。

40

【0006】

AML-LSCと正常な造血幹細胞(HSCs)とは、緩徐な分裂、自己複製能力、およびCD34⁺CD38⁻表現型などの表面マーカーという共通な性質を有している。しかしながら、LSCsは、他の細胞表面マーカーの発現変化に加えて、自己複製活性の増強を有することが報告されており、これらは双方とも治療法開発の現在の標的となっている。インターロイキン-3(IL-3)は、2つのサブユニット、αサブユニット(CD1

50

23) とベータ共通 (β_c) 鎖 (CD131) からなる細胞表面受容体との相互作用を介してその作用を媒介する。 α 鎖と β 鎖との相互作用は IL-3 に対する高親和性の受容体を形成し、 β_c 鎖は、引き続くシグナル伝達を媒介する^{15,16}。正常な造血細胞と相対的に、AML 芽細胞上の CD123、CD34⁺ 白血病性前駆体および LSCs の過剰発現は広範に報告されており^{17~23}、いくつかの研究では、LSCs のマーカーとして提案されている^{24,25}。CD131 はまた、AML 細胞上に発現することも報告されているが^{21,25}、AML-LSCs 上の CD131 発現については相反する報告がある^{23,25}。

【0007】

AML 細胞上の CD123 の過剰発現によって、正常な造血細胞よりも色々な増殖上の利点を与えられ、IL-3 に応答して、高比率の AML 芽細胞が増殖するという報告がある^{26~31}。さらに、AML 細胞上の高レベルの CD123 発現は、IL-3 に刺激された STAT-5 活性化のレベル；サイクリング細胞の割合；より原始的な細胞表面表現型；アポトーシスに対する抵抗性に関連していた。臨床的に、AML における CD123 の高発現は、生存時間の短縮、完全寛解率の低下および診断時の多数の芽細胞に関連している^{19,21,32}。

【0008】

HSCs に比較した LSCs 上の CD123 の発現増加により、AML-LSCs の治療標的化に対する機会が提供される。CD123 に対して増加させたモノクローナル抗体 (MAb) 7G3 は、IL-3 媒介増殖および白血病性細胞株と一次細胞双方の活性化を阻害することが以前示されている³³。しかし、標的 CD123 が機能的に AML-LSCs を害することができるかどうか、および標的 CD123 が AML-LSCs の骨髓ニッチにおいて、それらのホーミング、滞留および増殖を阻害することができるかどうかは不明瞭なままである。さらに、AML-LSCs を標的にする 7G3 の能力における IL-3 媒介シグナル伝達の直接的阻害対抗体依存性細胞障害作用 (ADCC) の相対的寄与は解明されていない。

【0009】

米国特許第 6,177,078 号明細書 (Lopez) は、抗 IL-3 受容体アルファ鎖 (IL-3R α) モノクローナル抗体 7G3、ならびに IL-3R α の N 末端ドメイン、特にアミノ酸残基 19~49 に結合する 7G3 の能力を開示している。したがってこの特許は、IL-3 の機能をアンタゴナイズすることによる、患者 (骨髓性白血病、リンパ腫およびアレルギーなど) における IL-3 の過剰産生に起因する病態の治療において、IL-3R α のアミノ酸残基 19~49 に対して結合特異性を有する 7G3 などのモノクローナル抗体またはその抗体断片の使用を開示している。

【0010】

米国特許第 6,733,743 号明細書 (Jordan) は、細胞を、抗体と細胞毒性剤 (化学療法剤、毒素またはアルファ線を放射する放射性同位体から選択) との組成物に接触させ、そのことにより、前記組成物が、細胞死を引き起こす上で有効な量で CD123 に選択的に結合する、CD123 を発現するが CD131 は有意に発現しない血液学的癌前駆体細胞を損傷させる方法を開示している。血液学的癌は、白血病またはリンパ腫などの悪性リンパ球増殖性障害であり得る。

【0011】

本発明に至る研究において、本発明者らは、MAb 7G3 の能力を試験し、AML-LSCs と HSCs との間の CD123 発現および機能における明白な違いを利用した。MAb 7G3 は、IL-3 シグナル伝達経路および一次 AML 細胞の増殖を阻害した。さらに、非肥満性糖尿病／重症複合免疫不全 (NOD／SCID) 異種移植モデルにおける AML 芽細胞のホーミングおよび移植は、MAb 7G3 によって大きく減少し、LSC 機能は阻害された。

【発明の概要】

【0012】

一態様において、本発明は、IL-3R α (CD123) を発現する白血病性幹細胞を

10

20

30

40

50

阻害する方法を提供し、この方法は、I L-3 R α (C D 1 2 3)を発現する白血病性幹細胞と、F c領域、または増強されたF cエフェクター機能を有する改変F c領域を含む抗原結合分子とを接触させることを含み、前記抗原結合分子は選択的にI L-3 R α (C D 1 2 3)に結合する。

【0013】

本発明はまた、患者における血液学的癌病態を治療する方法を提供し、この方法は、F c領域、または増強されたF cエフェクター機能を有する改変F c領域を含む有効量の抗原結合分子を患者に投与することを含み、前記抗原結合分子は選択的にI L-3 R α (C D 1 2 3)に結合する。

【0014】

他の態様において、本発明はまた、I L-3 R α (C D 1 2 3)を発現する白血病性幹細胞の阻害、または阻害用医薬品の製造における、F c領域、または増強されたF cエフェクター機能を有する改変F c領域を含む抗原結合分子の使用を提供し、前記抗原結合分子は選択的にI L-3 R α (C D 1 2 3)に結合する。

【0015】

この態様において、本発明はまた、患者における血液学的癌病態の治療、または治療用医薬品の製造において、F c領域、または増強されたF cエフェクター機能を有する改変F c領域を含む抗原結合分子の使用を提供し、前記抗原結合分子は選択的にI L-3 R α (C D 1 2 3)に結合する。

【0016】

本発明はまた、I L-3 R α (C D 1 2 3)を発現する白血病性幹細胞を阻害する薬剤を提供し、この薬剤はF c領域、または増強されたF cエフェクター機能を有する改変F c領域を含む抗原結合分子を含み、前記抗原結合分子は選択的にI L-3 R α (C D 1 2 3)に結合する。

【0017】

この態様において、本発明はまた、患者における血液学的癌病態を治療する薬剤を提供し、この薬剤はF c領域、または増強されたF cエフェクター機能を有する改変F c領域を含む抗原結合分子を含み、前記抗原結合分子は選択的にI L-3 R α (C D 1 2 3)に結合する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】MA b 7 G 3が、I L-3に刺激されたC D 1 3 1のリン酸化、および一次A M L細胞の増殖を阻害することを示す図である。(a) 2人の個々の患者からの一次A M L細胞を、図に示された濃度の抗体と共に、氷上で30分間インキュベートした。洗浄せずに、細胞をI L-3 (1 n M、37℃で10分間)で刺激した。刺激後、直ちに細胞を溶解させた。細胞溶解物をS D S-P A G E上で操作し、MA b 4 G 1 0により免疫ブロットしてから、ブロットをストリップし、充填対照としてのMA b 1 C 1により再探査した。(b~e) T C A不溶性物質への³H-チミジンにより評価した一次A M L細胞の増殖。(b~d) 3人の個々のA M L患者から新鮮単離した単核細胞を、サイトカインの非存在下(Δ、破線)または存在下で、MA b 7 G 3を48時間滴定しながらインキュベートした：1 n g / m LでのI L-3 (◇、点線)または0.1 n g / m LでのG M-C S F (■、実線)。データの点は、3つの点の平均±標準誤差を示す。(e) 35人のA M L患者からの解凍細胞を、I L-3 (1 n g / m L)の非存在下または存在下で、MA b 7 G 3 (1 μ g / m L)により、増殖の阻害に関して分析した。阻害は、試験した35人の患者のうち32人に示された。これらの患者の9人では、増殖レベルはI L-3の非存在下での増殖レベルよりも下に落ちた(構成的増殖)。増殖は、³H-チミジンの取り込みおよび液体シンチレーションカウンターを用いて定量化した。

【図2】C D 1 2 3中和により、N O D / S C I Dマウスにおける一次A M L細胞のホーミングおよび移植が阻害されることを示す図である。7 G 3 (灰色の棒)またはI g G 2 a (黒色の棒) (10 μ g / m L、2時間)へのエキソビボ暴露後、10人の患者からの

10

20

30

40

50

一次AML細胞の移植（a）、または5個体からの正常な骨髄（NBM）もしくは臍帯血（CB）（b）。抗体処置細胞を致死量以下の放射線照射したNOD/SCIDマウスに移植後、4～8週間目（a）または4～11週間目（b）で淘汰し、大腿骨髄中のヒトCD45⁺細胞の比率をフローサイトメトリーにより推定した。各サンプルに関し、1処置群当たり3匹から10匹のマウスを用いた。AML-8およびAML-8-relは、それぞれ、診断時と再発時における同一患者から採取した白血病性細胞に相当する。NBM-4およびCB-1は、プールしたサンプル起源であった。（c）IgG2a（n=10、実線）または7G3（n=10、点線）エキソビボ処置AML-9細胞を移植したマウスのKaplan-Meier無事象生存曲線。（d）移植24時間後に評価した骨髄および脾臓へのIgG2a（黒色の棒）、7G3（灰色の棒）エキソビボ処置AML-8-relまたはAML-9細胞のホーミング効率。（e）静脈内注入（IV）または大腿内注射（IF）後、IgG2a（白色の棒）または7G3（黒色の棒）エキソビボ処置細胞を移植したマウスにおけるAML-8-rel細胞の移植レベル。IF移植マウスでは、AML細胞が移植された右大腿（RF）における移植レベル、および非移植骨（WBM）における移植レベルが示されている。（d）および（e）では、1処置群当たり、4～5匹のマウスが用いられた。マウスは、移植5週後に殺処置した。値は、平均値±標準誤差を表す。対照IgG2aマウスと処置マウスとの間の有意差が示されている：*、 $P<0.05$ ；**、 $P<0.01$ ；***、 $P\leq 0.0001$ 。（f）エキソビボ7G3処置白血病性細胞を注射したNOD/SCIDマウスの骨髄および脾臓にホーミングしたCD34⁺38⁻AML細胞の絶対数。AML-8に関しては、1群当たりn=2～3のマウスであり、AML-9に関しては、1群当たりn=5のマウスであった。値は、平均値±標準誤差を表す。（g）マウスの骨髄および脾臓双方へのエキソビボ処置後、選別したCD34⁺38⁻AML-9細胞のホーミング効率。1処置群当たり、n=3のマウス。

【図3】NOD/SCIDマウスへの7G3の投与が、AML移植を減少させることを示す図である。（a）移植6時間前に、IgG2a対照または7G3（300μg）の単回投与を受けた放射線照射NOD/SCIDマウスの大腿骨髄中のAML-1細胞の移植レベル。マウスは、移植5週後に淘汰された。（b）IgG2a（黒色の棒）または7G3（灰色の棒）で処置したNOD/SCIDマウスにおけるAML-1、AML-2、およびAML-3の移植。処置は、移植24時間後に開始し、1投与当たり300μg、1日おきに4回投与した。マウスは、移植5週目に淘汰した。（c）骨髄由来細胞上のCD123発現、および（d）マウスに接種され、次いで、移植4日後にIgG2a処置または7G3処置を開始し、合計12回の注射を3回/週投与したAML-1細胞の末梢血および脾臓における移植レベル。マウスは移植5週目に淘汰した。（e）移植28日後にIgG2a処置（点線）または7G3処置（実線）を開始し、殺処置時まで、3回/週を続けた場合の骨髄中のAML-2細胞の移植レベル。1処置群当たり、3匹～10匹の間のマウスを用いた。値は、平均値±標準誤差を表す。（f）移植後28日目に週3回投与を開始した300μg/投与での7G3またはIgG2a対照4回投与後のNOD/SCIDマウス骨髄中のヒトAML-1細胞のパーセンテージ。個々の記号は各々、単一のマウスから得られた値を表す。IgG2a対照処置マウスと7G3処置マウスとの間の有意差が示されている：*、 $P<0.05$ ；**、 $P<0.005$ 。

【図4】パート1は、AML疾患が確立されたマウスへの7G3およびAra-Cの投与が、二次レシピエントマウスのLSCの再増殖をブロックすることを示す図である。（a）略図に示されるように、IgG2aまたは7G3のいずれかと組み合わせたAra-Cによって処置した一次マウスの骨髄および脾臓におけるAML-10細胞の移植レベル。（b）骨髄および脾臓へのホーミング効率。（c）移植レベル。（d）（a）で処置し、二次レシピエントマウスに移植したマウスの骨髄から採取した白血病性細胞の二次移植片中のCD34⁺38⁻細胞の比率。水平の棒は平均値を示す。IgG2aプラスAra-Cで処置した対照群と7G3プラスAra-Cで処置した群との間の有意差が示されている：*、 $P<0.05$ ；**、 $P<0.01$ 。パート2は、（A）7G3処置または対照IgG2a処置の10週間後の骨髄および脾臓におけるAML-10細胞の移植レベルを示す

図である。略図に示されるように、抗体処置は、移植後28日目に、週3回、マウス1匹当たり300 μ gで開始した。(B~D)二次レシピエントマウスのホーミング効率(B)、骨髄および脾臓における移植レベル(C)、および骨髄中のCD34⁺38⁻細胞のパーセンテージ(D)。CおよびDにおけるマウスは、移植後12週目に分析した。各記号は単一のマウスを表し、水平の棒は平均値を示す。対照IgG2a群と7G3群との間で、*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ 。パート3は、(A)7G3処置または対照IgG2a処置の10週間後の骨髄および脾臓におけるAML-9細胞の移植レベルを示す図である。略図に示されるように、抗体処置は、移植後28日目に、週3回、マウス1匹当たり300 μ gで開始した。(B)二次レシピエントマウスの骨髄中の移植のレベルを示す図である。二次マウスは、移植後8週目に分析した。各記号は単一のマウスを表し、水平の棒は平均値を示す。対照IgG2a群と7G3群との間で、**、 $P < 0.01$ 。

【図5】ナチュラルキラー(NK)リンパ球性細胞が、AML移植の7G3媒介阻害に寄与することを示す図である。(a)移植のレベルおよび(b)IgG2a(白色の棒)または7G3(黒色の棒)(10 μ g/mL、2時間)でエキソビボ処置し、先にCD122⁺NK細胞を枯渇させない(-)またはCD122⁺NK細胞を枯渇させた(+)NOD/SCIDマウスへ移植したAML-8-r e l細胞のホーミング効率。各処置群に4匹のマウスを用いた。値は、平均値±標準誤差を表す。有意差が示されている：*、 $P < 0.05$ および**、 $P < 0.01$ 。

【図6】IL-3依存細胞株およびAML細胞において、IL-3に刺激されたCD131(β_c)のリン酸化、STAT-5およびAktを、MAb 7G3は阻害するが、6H6も9F5も阻害しないことを示す図である。(a)TF-1細胞は、種々の濃度の7G3、9F5または6H6と共に、氷上で30分間インキュベートした。洗浄せずに、細胞をIL-3(1 nM、37℃で10分間)により刺激した。刺激後直ちに細胞を溶解させ、方法に記載されている通りCD131免疫沈降させた。免疫沈降物をSDS-PAGEにより分離し、リン酸化チロシン残基(4G10)、リン酸化STAT-5またはリン酸化Aktに対する抗体により免疫プロットした。プロットをストリップし、充填対照としての β_c (1C1)に対する抗体により再探索した。(b)STAT-5のIL-3に誘導された活性化の7G3阻害は、TF-1細胞株およびM07e細胞株ならびに一次AML-9細胞の細胞内FACS染色によっても確認された。偽処置(点線)、IL-3単独(10 ng/mL、2時間、実線)、IL-3プラス7G3(10 ng/mL、破線)。

【図7】CD34⁺/CD38⁻細胞上のCD123発現の強度が、NOD/SCIDマウスにおける移植を阻害する7G3の能力と逆相関していることを示す図である。Y軸は、各患者またはドナー検体に関するCD34⁺/CD38⁻画分についてのCD123発現のRFI対数を表す。X軸は、各患者個体またはドナーサンプルに関するIgG2a対照を100%とした%に正規化した7G3エキソビボ処置群の移植レベル対数をプロットしている。各点は、1処置群当たり3~10匹のマウスからの平均値を反映する個別の実験を表し、各実験は、種々のAML患者(黒塗り記号)または正常な骨髄サンプル(白抜き記号)を用いて実施された。マウスは全て、移植4~6週間後に分析した。各移植データポイントは、図2aに示された3~10匹のマウスの測定に基づいた。

【図8】AML細胞を標的細胞としてNK細胞におけるCD107a発現を示す図である。正常な健康ドナーからの末梢血単核細胞(PBMCs)を、一次ヒトAML細胞(RMH003)と1:1の比率(A&B)で、IgG1対照(10 μ g/mL)(A&C)またはCSL360(10 μ g/mL)(B&D)のいずれかと共に、37℃で3時間インキュベートした。CD107aの非特異的発現を評価するために、PBMCを、標的細胞なしに(1:0)抗体と共に(C&D)インキュベートした。

【図9】図8で示した実験で得られたデータの棒グラフを示す図であり、示されているように、抗体を添加していないサンプルも含んでいる。

【図10】NOD/SCIDマウスへの接種前に、10 μ g/mLのIgG2a、完全7G3、6H6または9F5の抗体ならびに7G3のF(ab')₂断片(7G3 Fab

10

20

30

40

50

）および6H6のF(ab')₂断片(6H6 Fab)と共にエキソビボ処置したAML-8-relサンプルのホーミング効率を示す図である。骨髓内へのヒト単核細胞のホーミング効率は、16時間後に測定した。各サンプルに関して、1処置群当たり3匹のマウスを用いた。

【図11】10 μg/mLのIgG2a、完全7G3または9F5の抗体ならびに7G3のF(ab')₂断片(7G3 Fab)および9F5のF(ab')₂断片(9F5 Fab)と共にエキソビボ暴露した後、致死量以下で放射線照射したNOD/SCIDマウスへの、2人の患者(AML-9およびAML-10)からの一次AML細胞の移植を示す図である。AML移植は、大腿骨髓中のヒトCD45+細胞の比率として、接種4週後に、フローサイトメトリーによって評価した。各サンプルに関し、1処置群当たり5匹のマウスを用いた。

【図12】キメラCSL360、ヒトCSL360およびそのFc変種のADCC活性の比較を示す図である。種々の抗体ならびに正常なヒトドナーからの新鮮単離PBMCと共に、カルセインAM標識したCTLEN細胞をインキュベートした。CTLEN細胞に対するPBMCの比率は100:1であった。細胞は、5%のCO₂を有する37℃のインキュベーター内で4時間インキュベートした。インキュベート時間後、細胞を遠心分離し、100 μLの上澄み液を新鮮なプレートに移した。この上澄み液における蛍光を、Wallacマイクロプレートリーダー(励起フィルター485 nm、発光フィルター535 nm)を用いて測定した。用いた抗体は、キメラCSL360(白抜きの棒)、ヒト化CSL360(黒塗りの棒)、2つのアミノ酸を変化させたヒト化CSL360(斜線)または3つのアミノ酸を変化させたヒト化CSL360(点状)のいずれかであった。対照として、ヒトIgG1(水平線)および抗体なしのウェル(垂直線)を含めた。

【図13】(a) hCSL360ならびにFcRに結合したその3つの変種のBiacore分析を示す図である。huCSL360ならびにその3つの変種は、CD123に結合させたBIAcore CM5チップ上に個々に捕捉した。0.4 nMから800 nMの範囲の濃度におけるhuFcγRI、huFcγRIIb/cおよびhuFcγRIIIaをそれぞれの表面にフローさせ、それらの応答を用いてKAを判定した。親和性は、相対値を1と定めたhCSL360を上回る増加倍数として報告した。(b) KA値は、4つの抗体各々に関して、huFcγRIIb/cに対するhuFcγRIIIaのA/I比として表した。

【図14】エフェクター細胞として正常なPBMCを用いたカルセイン放出アッセイにおいて調べたラージーCD123陽性細胞のADCC媒介細胞溶解を示す図である。ラージーCD123低および高エクスペッサー上で発現したCD123分子の概数は、それぞれ4,815と24,432であった。(a) E:T=25:1におけるラージーCD123低のADCC媒介細胞溶解(b) E:T=50:1におけるラージーCD123低のADCC媒介細胞溶解(c) E:T=25:1におけるラージーCD123高のADCC媒介細胞溶解(d) E:T=50:1におけるラージーCD123高のADCC媒介細胞溶解。黒三角形はhCSL360Fc3、円形はhCSL360kif、黒円形はCSL360、四角形はhCSL360、星形は抗体無しを表す。

【図15】TF-1細胞を標的細胞としたCSL360とその変種のADCC活性の増強を示す図である。抗体のADCC活性はLDHアッセイを用いて調べた。(a) 黒三角形はhCSL360Fc3、黒四角形はhCSL360Fc2、白円形はhCSL360kif、黒円形はCSL360、星形は抗体無しを表す。(b) 黒三角形は168-26Fc3、黒四角形は168-26Fc2、黒円形は168-26、星形は抗体無しを表す。

【図16】一次ヒト白血病性細胞を標的細胞としたCSL360とその変種のADCC活性の増強を示す図である。(a) RMH003 AML、(b) RMH011 AML、(c) RMH010 AML、(d) RMH008 AML、(e) WMH007 AML、(f) RMH009 B-ALL、(g) RMH007 B-ALL。ADCC活性はLDHアッセイを用いて判定した。

【図17】白血病移植日からの無事象生存率(EFS)に関するKaplan-Meier

10

20

30

40

50

r 曲線として表された、対照 M A b (マウス I g G 2 a)、7 G 3、1 6 8-2 6 および 1 6 8-2 6 F c 3 に対する、A L L を前移植したマウスのインビボ感受性を示す図である。事象は、末梢血中の 2 5 % h C D 4 5 + 負荷として定義する。各群の動物数はそれぞれ、7、6、6、7 であった。白血病性増殖遅延 (L G D) は、中央値 E F S の比較に基づき、対照 M A b 群よりも長く生存した処置群の日数として定義し、7 G 3、1 6 8-2 6 および 1 6 8-2 6 F c 3 に関して、それぞれ、2. 9 (P = 0. 5 4)、6. 4 (P = 0. 1 3)、1 2. 2 (P = 0. 0 4 4) 日であった。

【発明を実施するための形態】

【0019】

一態様において、本発明は、I L-3 R α (C D 1 2 3) を発現する白血病性幹細胞を阻害する方法を提供し、この方法は、I L-3 R α (C D 1 2 3) を発現する白血病性幹細胞と、F c 領域、または増強された F c エフェクター機能を有する改変 F c 領域を含む抗原結合分子とを接触させることを含み、前記抗原結合分子は選択的に I L-3 R α (C D 1 2 3) に結合する。

10

【0020】

一態様において、本発明はまた、患者における血液学的癌病態を治療する方法を提供し、この方法は、F c 領域、または増強された F c エフェクター機能を有する改変 F c 領域を含む有効量の抗原結合分子を患者に投与することを含み、前記抗原結合分子は選択的に I L-3 R α (C D 1 2 3) に結合する。

【0021】

20

前記患者はヒトであることが好ましい。

【0022】

前記抗原結合分子は、F c 領域、または増強された F c エフェクター機能を有する改変 F c 領域を含むモノクローナル抗体または抗体断片であることが好ましい。

【0023】

抗体は、体液性免疫と細胞性免疫との間の連係を提供し、I g G は最も多量に存在する血清免疫グロブリンである。抗体の F a b 領域は抗原を認識するが、F c 部分は、ナチュラルキラー (N K) 細胞、好中球、単核食細胞または樹状細胞などの全ての免疫補助細胞によって異なって発現される F c γ 受容体 (F c γ R s) に結合する。このような結合はこれらの細胞上の F c R と架橋し、その結果それらは活性化する。これらの細胞の活性化は、いくつかの結果をもたらす。例えば、N K 細胞は癌細胞を死滅させ、また細胞増殖および腫瘍関連血管新生を抑制することのできるサイトカイン類やケモカイン類を放出し、主要組織適合抗原 (M H C) 抗原の細胞表面発現の増加を介して腫瘍免疫原性を増大させる。多価抗原/抗体複合体により受容体が架橋すると、エフェクター細胞の脱顆粒およびサイトカインコード遺伝子の転写活性化が引き起こされ、引き続き標的細胞の細胞溶解または食作用が生じる。

30

【0024】

抗体 F c 領域により媒介されるエフェクター機能は次の 2 つのカテゴリーに分けることができる。(1) 抗原に対する抗体の結合後に働くエフェクター機能 (これらの機能には、例えば、補体カスケードまたは F c 受容体 (F c R) 担持細胞の寄与が含まれる) ; (2) 抗原結合とは独立して働くエフェクター機能 (これらの機能は、例えば循環における持続性および経細胞輸送による細胞バリアを超えて移動される能力を与える)。例えば、抗体に対する補体の C 1 要素の結合は、複合体系を活性化する。補体の活性化は、オプソニン化および細胞病原体の細胞溶解において重要である。補体の活性化はまた、炎症性応答を刺激し、自己免疫過感受性に関与し得る。さらに、抗体は F c 領域を介して細胞に結合し、抗体の F c 領域上の F c 受容体結合部位が、細胞上の F c 受容体 (F c R) に結合する。細胞表面上の F c 受容体に対する抗体の結合は、抗体で被覆された粒子の飲み込みと破壊、免疫複合体のクリアランス、抗体で被覆された標的細胞のキラー細胞による細胞溶解 (抗体依存性細胞媒介細胞毒性、または A D C C として知られる)、炎症伝達物質の放出、胎盤輸送および免疫グロブリン産生の制御などの重要で広範な多数の生物学的応答

40

50

を引き起こす。

【0025】

抗原結合分子におけるFc領域または増強されたFcエフェクター機能を有する改変Fc領域の存在が、CD123を発現する白血病性幹細胞の阻害にとって重要であり、したがって、白血病性幹細胞に関連した血液学的癌病態の治療において重要であることを、本発明者らは示した。

【0026】

本発明に従って治療し得る白血病性幹細胞(LSCs)に関連した血液学的癌病態としては、白血病(急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ様白血病、慢性リンパ様白血病および骨髄異形成症候群など)ならびにリンパ腫(多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫、ならびに小細胞および大細胞濾胞性リンパ腫など)を含む悪性リンパ球増殖性病態が挙げられる。

【0027】

本明細書に用いられる用語「抗原結合分子」とは、キメラ、ヒト化またはヒトモノクローナル抗体などのモノクローナル抗体を含む完全免疫グロブリン、または免疫グロブリンの結合相手、例えば宿主細胞タンパク質に対する特異的結合に関して完全免疫グロブリンと競合する免疫グロブリンの抗原結合性および/または可変ドメイン含有性の断片のことである。構造に関わりなく、抗原結合性断片は、完全免疫グロブリンによって認識されるものと同じ抗原に結合する。抗原結合性断片は、合成的に、または完全免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的開裂により作製できるか、または組換えDNA技法により遺伝子操作できる。抗原結合分子およびそれらの断片の作製方法は、当業界によく知られており、例えば、参照として本明細書に援用されている、Antibodies: A Laboratory Manual、Edited by E. Harlow and D. Lane (1988)、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、New Yorkに記載されている。

【0028】

白血病性幹細胞に関して本明細書に用いられる用語「阻害」には、LSCsの機能性または活性(成長または増殖および生存活性など)における何らかの低下、特に生存、増殖および/または白血病の前駆体もしくは他の悪性過増殖血液学的癌細胞へ分化するLSCの能力における低下または制限が含まれる。

【0029】

結合分子、例えば抗体とその結合相手、例えば抗原との相互作用に関して本明細書に用いられる用語「結合選択性」は、相互作用が特定の構造、例えば、結合相手上の抗原決定因子またはエピトープの存在に依存することを意味する。言い換えると、結合相手がたとえ他の分子または生物の混合物中に存在する場合でも、抗体はその結合相手に優先的に結合または認識する。

【0030】

用語「有効量」とは、血液学的癌病態の治療に有効な本明細書に定義された結合分子の量のことである。

【0031】

用語「治療」とは、治療処置のこと、ならびに病態を治癒もしくは停止させるか、または少なくともその進行を遅らせるための予防的または防止的な手段のことである。治療を必要としている者には、すでに血液学的癌病態に罹っている者、ならびにこのような病態を予防しようとする者が含まれる。前記病態から部分的にまたは完全に回復した対象もまた治療が必要である場合もある。予防には、血液学的癌病態に関連した症状の1つまたは複数の発症、発現または進行の抑制または減少が包含される。

【0032】

本発明の方法において、患者への化学療法剤の投与は、抗原結合分子の投与と組み合わせることができ、化学療法剤は、抗原結合分子の投与の前、同時、または後のいずれかに投与される。

10

20

30

40

50

【0033】

化学療法剤は、細胞毒性剤、例えば以下からなる群から選択される細胞毒性剤であることが好ましい：

- (a) マスタードガス誘導体：メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル、メルファラン、およびイホスファミド
- (b) エチレンイミン類：チオテパおよびヘキサメチルメラミン
- (c) アルキルスルホネート類：ブスルファン
- (d) ヒドラジン類およびトリアジン類：アルトレタミン、プロカルバジン、ダカルバジンおよびテモゾロミド
- (e) ニトロソ尿素類：カルムスチン、ロムスチンおよびストレプトゾシン 10
- (f) 金属塩類：カルボプラチン、シスプラチン、およびオキサリプラチン
- (g) ピンカアルカロイド類：ピンクリスチン、ピンブラスチンおよびビノレルビン
- (h) タキサン類：パクリタキセルおよびドセタキセル
- (i) ポドフィロトキシン類：エトポシドおよびテニポシド
- (j) カンプトテシン類縁体：イリノテカンおよびトポテカン
- (k) アントラサイクリン類：ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン、ミトキサントロンおよびイダルビシン
- (l) クロモマイシン類：ダクチノマイシンおよびプリカマイシン
- (m) その他の抗癌抗生物質：マイトマイシンおよびブレオマイシン
- (n) 葉酸アンタゴニスト：メトトレキサート 20
- (o) ピリミジンアンタゴニスト：5-フルオロウラシル、フォクスリジン (Foxuridine)、シタラビン、カペシタビン、およびゲムシタビン
- (p) プリンアンタゴニスト：6-メルカプトプリンおよび6-チオグアニン
- (q) アデノシンデアミナーゼ阻害剤：クラドリビン、フルダラビン、ネララビンおよびペントスタチン
- (r) トポイソメラーゼ I 阻害剤：イロノテカンおよびトポテカン
- (s) トポイソメラーゼ II 阻害剤：アムサクリン、エトポシド、エトポシドリル酸塩およびテニポシド
- (t) リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤：ヒドロキシ尿素
- (u) 副腎皮質ステロイド阻害剤：ミトタン 30
- (v) 酵素類：アスパラギナーゼおよびベガスバルガーゼ
- (w) 微小管阻害剤：エストラムスチン
- (x) レチノイド類：ベキサロテン、イソトレチノインおよびトレチノイン (ATRA)

。

【0034】

化学療法剤の他の例としては、限定はしないが、アシビシン；アクリラルビシン；アコダゾール塩酸塩；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン；アメタントロン酢酸塩；アミノグルテチミド；アナストロゾール；アントラサイクリン；アントラマイシン；アスペルリン；アザシチジン (Vidaza)；アゼテパ；アゾトマイシン；バチマスタット；ベンゾデバ；ビカルタミド；ビスアントレン塩酸塩；ビスナフィドジメシレート；ビスホスホネート類（例えば、パミドロネート (Aredria)、ナトリウムクロンドロネート (Bonafos)、ゾレドロネ酸 (Zometax)、アレンドロネート (Fosamax)、エチドロネート、イバンドルネート、シマドロネート、リセドロメート、およびチルドロメート）；ビゼレシン；ビレキナルナトリウム；プロピリミン；カクチノマイシン；カルステロン；カラセミド；カルベチメル；カルヌスチン；カルビシン塩酸塩；カルゼレシン；セデフィンゴール；シロレマイシン；クリスナトールメシレート；デシタビン (Dacogen)；脱メチル化剤；デキソルマプラチン；デザグアニン；デザグアニンメシレート；ジアジクオン；ドロロキシフェン；ドロロキシフェンクエン酸塩；ドロモスタノロンプロピオン酸塩；デュアゾマイシン；エダトレキサート；エフロルニチン塩酸塩；EphA2 阻害剤；エルサミツルシン；エンロプラ 40 50

チン；エンプロメート；エピプロピジン；エルプロゾール；エソルピシン塩酸塩；エタニ
 ダゾール；エトプリン；ファドロゾール塩酸塩；ファザラビン；フェンレチニド；フロク
 スリジン；フルロシタビン；フォスキドン；フォストリエシンナトリウム；ヒストンデア
 セチラーゼ阻害剤（HDA C-I s）；イルモフォシン；イマチニブメシレート（G l e
 e v e c、G l i v e c）；イプロプラチン；ランレオチド酢酸塩；レナリドミド（R e
 v l i m i d）；レトロゾール；ロイプロリド酢酸塩；リアロゾール塩酸塩；ロメトレキ
 ソールナトリウム；ロムスチン；ロソキサントロン塩酸塩；マソプロコル；メイタンシン
 ；メゲストロール酢酸塩；メレンゲストロール酢酸塩；メノガリル；メトプリン；メトウ
 レデバ；メチンドミド；ミトカルシン；ミトクロミン；ミトジリン；ミトマルシン；ミト
 スペル；ミコフェノール酸；ノコダゾール；ノガラマイシン；オルマブラチン；オキシス
 ラン；ペリオマイシン；ペンタムスチン；ペプロマイシン硫酸塩；ペルホスファミド；ピ
 ボプロマン；ピボスルファン；ピロキサントロン塩酸塩；プロメスタン；ポルフィマーナ
 トリウム；ポルフィロマイシン；プレドニムスチン；プロマイシン；プロマイシン塩酸塩
 ；ピラゾフリン；リボプリン；ログレチミド；サフィンゴール；サフィンゴール塩酸塩；
 セムスチン；シムトラゼン；スパルフォセートナトリウム；スパルソマイシン；スピロゲ
 ルマニウム塩酸塩；スピロムスチン；スピロプラチン；ストレプトニグリン；ストレプト
 ゾシン；スロフェヌル；タリソマイシン；テコガランナトリウム；テガフル；テロキサン
 トロン塩酸塩；テモポルフィン；テロキシロン；テストラクトン；チアミプリン；チアゾ
 フリン；チラパザミン；トレミフェンクエン酸塩；トレストロン酢酸塩；トリシリピンリ
 ン酸塩；トリメトレキサート；トリメトレキサートグルクロン酸塩；トリプトレリン；ツ
 ブロゾール塩酸塩；ウラシルマスタード；ウレデバ；バブレオチド；ベルテポルフィン；
 ビンデシン；ビンデシン硫酸塩；ビネピジン硫酸塩；ビングリシネート硫酸塩；ビンロイ
 ロシン硫酸塩；ビンロシジン硫酸塩；ビンゾリジン硫酸塩；ボロゾール；ゼニプラチン；
 ジノスタチン；ゾルピシン塩酸塩；20-エピー-1, 25ジヒドロキシビタミンD3；5
 -エチニルウラシル；アピラテロン；アクラルピシン；アシルフルベン；アデシペノール
 ；アドゼレシン；アルデスロイキン；A L L-T Kアンタゴニスト類；アルトレタミン；
 アンバムスチン；アミドックス；アミフォスチン；アミノレプリン酸；アムルピシン；ア
 ナグレリド；アナストロゾール；アンドログラホリド；血管新生阻害剤；アンタゴニスト
 D；アンタゴニストG；アンタレリックス；アンチアンドロゲン、前立腺癌；アンチエス
 トロゲン；アンチネオプラストン；アンチセンスオリゴヌクレオチド類；アフィジコリン
 グリシン酸塩；アポトーシス遺伝子モジュレーター類；アポトーシス調節剤；アブリン酸
 ；アラ-C D P-D L-P T B A；アスラクリン；アタメスタン；アトリムスチン；ア
 キシナスタチン1；アキシナスタチン2；アキシナスタチン3；アザセトロン；アザチロ
 シン；バックチンI I I誘導体；バラノール；バチマスタット；B C R/A B Lアンタゴ
 ニスト類；ベンゾクロリン類；ベンゾイルスタウロスポリン；ベータラクタム誘導体；ベ
 ーターアレチン；ベータクラマイシンB；ベツリン酸；b F G F阻害剤；ビカルタミド；
 ビサントレン；ビスジリジニルスベルミン；ビスナフィド；ビストラテンA；ビゼレシン
 ；ブレフレート；プロピリミン；ブドチタン；ブチオニンスルホキシミン；カルシボトリ
 オール；カルホスチンC；カンプトテシン誘導体；カナリボックスI L-2；カルボキサ
 ミド-アミノトリアゾール；カルボキシアミドトリアゾール；C a R e s t M3；C
 A R N700；軟骨由来阻害剤；カルゼレシン；カゼインキナーゼ阻害剤（I C O S）；
 カスタノスベルミン；セクロピンB；セトロレリックス；クロルルنس（c h l o r l n
 s）；クロロキノキサリンスルホンアミド；シカプロスト；シス-ポルフィリン；クロミ
 フェン類縁体；クロトリマゾール；コリスマイシンA；コリスマイシンB；コンプレタス
 タチンA4；コンプレタスタチン類縁体；コナゲニン；克蘭ベシジン816；クリスナ
 トール；クリプトフィシン8；クリプトフィシンA誘導体；クラシンA；シクロペンタン
 トラキノン類；シクロプラタム；シペマイシン；細胞溶解性因子；シトスタチン；ダクリ
 キシマブ；デシタビン；デヒドロジデミンB；デスロレリン；デキサメタゾン；デキシホ
 スファミド；デキスラゾキサナ；デキシベラパミル；ジアジクオン；ジデミンB；ジドッ
 クス；ジエチルノルスベルミン；ジヒドロ-5-アザシチジン；ジヒドロタキソール；ジ

10

20

30

40

50

オキサマイシン；ジフェニルスピロムスチン；ドコサノール；ドラセトロン；ドキシフル
 リジン；ドロロキシフェン；ドロナビノール；デュオカルマイシン S A；エブセリン；エ
 コムスチン；エデルフォシン；エドレコロマブ；エフロルニチン；エレメン；エミテフル
 ；エプリステリド；エストラムスチン類縁体；エストロゲンアゴニスト類；エストロゲン
 アンタゴニスト類；エタニダゾール；エキセメスタン；ファドロゾール；ファザラビン；
 フェンレチニド；フィルグラスチム；フィナステリド；フラボピリドール；フレゼラスチ
 ン；フルアステロン；フルオロダウノルニシン塩酸塩；フォルフェニメックス；フォルメ
 スタン；フォストリエシン；フォテムスチン；ガドリニウムテキサフィリン；ガリウム硝
 酸塩；ガロシタビン；ガニレリックス；ゼラチナーゼ阻害剤；グルタチオン阻害剤；H M
 G C o A レダクターゼ阻害剤（例えば、アトルバスタチン、セリバスタチン、フルバス
 タチン、レスコール、ルピトール、ロバスタチン、ロスバスタチン、およびシンバスタチ
 ン）；ヘプスルファム；ヘレグリン；ヘキサメチレンビスセトアミド；ヒペリシン；イバ
 ンドロン酸；イドキシフェン；イドラマントン；イルモフォシン；イロマスタット；イミ
 ダゾアクリドン類；イミキモド；インスリン様成長因子-1 受容体阻害剤；インターフェ
 ロンアゴニスト類；インターフェロン類；インターロイキン類；イオベングアン；ヨード
 ドキソルピシン；イボメアノール、4-イロプラクト；イルソグラジン；イソベンガゾー
 ル；イソホモハリコンドリノ B；イタセトロン；ジャスプラキノリド；カハラリド F；ラ
 メラリン-N トリアセテート；ランレオチド；レイナマイシン；レノグラスチム；レンチ
 ナン硫酸塩；レプトールスタチン；レトロゾール；ロイプロリドおよび、エストロゲン、
 ならびにプロゲステロン；ロイプロレリン；レバミゾール；L F A-3 T I P (B i o g
 e n、C a m b r i d g e、M A；国際公開第 9 3 / 0 6 8 6 号パンフレットおよび米国
 特許第 6, 1 6 2, 4 3 2 号明細書)；リアロゾール；線状ポリアミン類縁体；親油性二
 糖ペプチド；親油性白金化合物；リソクリナミド 7；ロバプラチン；ロンブリシン；ロメ
 トレキソール；ロニダミン；ロソキサントロン；ロバスタチン；ロキソリビン；ルルトテ
 カン；ルテチウムテキサフィリン；リソフィリン；溶解性ペプチド類；メイタンシン；マ
 ノノスタチン A；マリマスタット；マソプロコル；マトリリシン阻害剤；マトリックス金
 属ロプロテイナーゼ阻害剤；メノガリル；メルバロン；メテレリン；メトクロプラミド；
 M I F 阻害剤；ミフェプリストン；ミルテフォシン；ミリモスチム；ミスマッチド二本鎖
 R N A；ミトグアゾン；ミトラクトール；ミトナフィド；ミトトキシ線維芽細胞成長因
 子-サポリン；モファロテン；モルグラモスチム；モノホスホリルリピド A + ミオバクテ
 リウム細胞壁 s k；モビダモル；多剤耐性遺伝子阻害剤；多重腫瘍サプレッサー 1 ベース
 療法；マスタード抗癌剤；ミカペルオキシド B；ミコバクテリア細胞壁抽出物；ミリアポ
 ロン；N-アセチルジナリン；N 置換ベンズアミド類；ナファレリン；ナグレスチップ；
 ナロキソン+ペンタゾシン；ナパビン；ナフテルピン；ナルトグラスチム；ネダプラチン
 ；ネモルピシン；ネリドロロン酸；ニルタミド；ニサマイシン；酸化窒素モジュレーター類
 ；窒素酸化物抗酸化剤；ニトルリン；O 6-ベンジルグアニン；オクトレオチド；オキセ
 ノン；オリゴヌクレオチド類；オナプリストン；オラシン；経口サイトカインインデュ
 サー；オルマプラチン；オサテロン；オキサウノマイシン；パクリタキセル；パクリタキ
 セル類縁体；パクリタキセル誘導体；パラウアミン；パルミトイルリゾキシシン；パミドロ
 ン酸；パナキシトリオール；パノミフェン；バラバクチン；パゼリブチン；ペルデシン；
 ペントサンポリ硫酸ナトリウム；ペントロゾール；ペルフルブロン；ペルホスファミド；
 ペリリルアルコール；フェナジノマイシン；フェニルアセテート；ホスファターゼ阻害剤
 ；ピシバニル；ピロカイン塩酸塩；ピラルピシン；ピリトレキシム；プラセチン A；プラ
 セチン B；白金複合体；白金化合物；白金-トリアミン複合体；ポルフィマーナトリウム
 ；ポルフィロマイシン；プレドニゾン；プロピルビス-アクリドン；プロスタグランジン
 J 2；プロテアソーム阻害剤；タンパク質 A ベース免疫モジュレーター；タンパク質キナ
 ーゼ C 阻害剤；マイクロアルガル；タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤；プリンヌク
 レオシドホスホリラーゼ阻害剤；プルプリン類；ピラゾロアクリジン；ピドキシル化ヘモ
 グロビンポリオキシエチレン結合体；r a f アンタゴニスト類；ラルチトレキセド；ラモ
 セトロン；r a s ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤；r a s 阻害剤；r

a s - G A P 阻害剤；脱メチル化レテリプチン；レニウム Re 1 8 6 エチドロネート；リゾキシシン；R I I レチナミド；ログレチミド；ロヒツカイン；ロムルチド；ロキニメックス；ルビギノン B 1；ルボキシル；サフィンゴール；サイントピン；S a r C N U；サルコフィトール A；サルグラモスチム；S d i 1 模倣物；セムスチン；セネセンス誘導阻害剤 1；センスオリゴヌクレオチド類；シグナル伝達阻害剤；シグナル伝達調節剤；ガンマセクレターゼ阻害剤、シゾフィラン；ソブゾキサシン；ナトリウムボロカプテート；ナトリウムフェニルアセテート；ソルベロール；ソネルミン；スパルホス酸；スピカマイシン D；スピロムスチン；スプレノペンチン；スポンギスタチン 1；スクワラミン；幹細胞阻害剤；幹細胞分裂阻害剤；スチピアミド；ストロメリシン阻害剤；スルフィノシン；超活性血管作用性小腸ペプチドアンタゴニスト；スラジスタ；スラミン；スウェインソニン；合成グリコサミノグリカン類；タリムスチン；ロイコボリン；タモキシフェンメチオダイド；タウロムスチン；タゾロテン；テコガランナトリウム；テガフル；テルラピリリウム；テロメラゼ阻害剤；テモボルフィン；テトラクロロデカオキシド；テトラゾミン；タリブ

ラスチン；チオコラリン；トロンボポイエチン；トロンボポイエチン模倣物；チマルファシン；チモポイエチン受容体アゴニスト；チモトリナン；スズエチルエチオプルプリン；チラパザミン；チタノセンビクロリド；トブセンチン；トレミフェン；トチポテント幹細胞因子；翻訳阻害剤；トリアセチルウリジン；トリシリピン；トリメトレキサート；トリプトレリン；トロピセトロン；ツロステリド；チロシンキナーゼ阻害剤；チルホスチン類；U B C 阻害剤；ウベニメックス；ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト類；バプレオチド；バリオリン B；ベクターシステム、エリスロサイト遺伝子療法；サリドマイド；ベラレゾール；ベラミン；ベルジン類；ベルテボルフィン；ピンキサルチン；ボロゾール；ザノテロン；ゼニプラチン；ジラスコルブ；およびジノスタチンスチマラマーが挙げられる。

【0035】

本発明により、F c 領域または増強された F c エフェクター機能を有する改変 F c 領域を含む抗原結合分子は、非経口投与経路によって患者に投与されることが好ましい。非経口投与には、注射、注入などによる投与を含めた、消化管を通さない（すなわち、非経腸）任意の投与経路が含まれる。注射による投与としては、例えば、静脈（静脈内）、動脈（動脈内）、筋肉（筋内）および皮膚下（皮下）が挙げられる。抗原結合分子は、所望の薬理学的効果を得るのに十分な投与量で、デポー剤で、または徐放製剤で経皮投与または筋肉投与することもできる。

【0036】

本発明の一実施形態において、抗原結合分子は、改変 F c 領域、より具体的には、F c 受容体に対する結合親和性の増強、抗体依存性細胞の細胞毒性（A D C C）および補体依存性細胞毒性（C D C）などのエフェクター機能の増強を提供するために改変された F c 領域を含む。I g G クラスの抗体では、これらのエフェクター機能は、種々の免疫細胞上に発現する F c γ 受容体（F c γ R s）と称される受容体のファミリーと F c 領域との係合によって制御される。F c / F c γ R 複合体の形成により、これらの細胞が抗原結合部位に動員され、一般にはシグナル伝達および引き続く免疫応答がもたらされる。エフェクター機能を増強させるため、特に、「親」F c 領域に比較して A D C C 活性および／または C D C 活性を変化させるために、抗体の F c 領域に対する F c γ R s の結合親和性を最適化する方法は、当業者によく知られている。単に例として挙げれば、F c 領域に対する結合親和性を最適化する手法は、N i w a e t a l .³⁴、L a z a r e t a l .³⁵、S h i e l d s e t a l .³⁶、および D e s j a r l a i s e t a l .³⁷に記載されている。これらの方法は、関連する F c 受容体との相互作用を増強させて、抗体依存性細胞媒介細胞毒性（A D C C）および抗体依存性細胞媒介食作用（A D C P）を促進させる可能性を高めるための抗体の F c 領域の改変を含み得る³⁴。F c 領域における保存 A s n²⁹⁷において I g G 1 抗体に共有結合したオリゴ糖の改変による A D C C 活性の増強も記載されている^{35, 36}。他の方法としては、F c エフェクター機能を増強させた抗体を固有に産生する細胞株の使用が挙げられる（例えば、ウィルスワクチンの作製に関す

るアヒル胚由来幹細胞、国際公開第2008/129058号パンフレット；鳥類EBX（登録商標）細胞における組換えタンパク質産生、国際公開第2008/142124号パンフレット）。CDC活性を増強させる方法としては、IgG3サブクラスの部分が、IgG1サブクラスの対応する領域内へ導入されるイソ型キメラ現象を挙げることができる（例えば、組換え抗体組成物、米国特許出願公開第2007148165号明細書）。

【0037】

他の態様において、本発明は、IL-3R α （CD123）を発現する白血病性幹細胞の阻害、または阻害用医薬品の製造における、Fc領域、または増強されたFcエフェクター機能を有する改変Fc領域を含む抗原結合分子の使用を提供し、前記抗原結合分子は選択的にIL-3R α （CD123）に結合する。

10

【0038】

この態様において、本発明はまた、患者における血液学的癌病態の治療、または治療用医薬品の製造において、Fc領域、または増強されたFcエフェクター機能を有する改変Fc領域を含む抗原結合分子の使用を提供し、前記抗原結合分子は選択的にIL-3R α （CD123）に結合する。

【0039】

さらに他の態様において、本発明は、IL-3R α （CD123）を発現する白血病性幹細胞を阻害する薬剤を提供し、この薬剤は、Fc領域、または増強されたFcエフェクター機能を有する改変Fc領域を含む抗原結合分子を含み、前記抗原結合分子は選択的にIL-3R α （CD123）に結合する。

20

【0040】

この態様において、本発明はまた、患者における血液学的癌病態を治療する薬剤を提供し、この薬剤は、Fc領域、または増強されたFcエフェクター機能を有する改変Fc領域を含む抗原結合分子を含み、前記抗原結合分子は選択的にIL-3R α （CD123）に結合する。

【0041】

本発明のこの態様の薬剤は、1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤および／または希釈剤と共に抗原結合分子を含む製薬組成物であり得る。

【0042】

非経口投与に好適な組成物は、好ましくはレシピエントの血液に等張な活性成分の滅菌水性製剤を含むのが便利である。この水性製剤は、好適な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を用いる公知の方法により製剤化できる。この滅菌注射用製剤はまた、非毒性の非経口的に許容できる希釈剤または溶媒中の滅菌注射用の溶液または懸濁液であり得、例えば、ポリエチレングリコールおよび乳酸中の溶液としてあり得る。使用し得る許容できる媒体および溶媒の中でも、水、リンガー液、好適な炭水化物（例えば、スクロース、マルトース、トレハロース、グルコース）および等張な塩化ナトリウムがある。また、滅菌の不揮発性油は、溶媒として、または懸濁媒体として使用するのが便利である。この目的で、合成のモノグリセリドまたはジグリセリドなどの任意の無刺激油が使用できる。また、オレイン酸などの脂肪酸が注射用製剤に使用される。

30

【0043】

このような治療用組成物の製剤は、当業者によく知られている。好適な薬学的に許容される担体および／または希釈剤としては、いずれかのおよび全ての従来の溶媒、分散剤、媒体、増量剤、固体担体、水性溶液、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などが挙げられる。このような薬学的活性物質のための媒体ならびに試剤の使用は、当業界によく知られており、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Company, Pennsylvania, USAに記載されている。従来の任意の媒体または試剤が、活性成分に不適合性でない限り、本発明の製薬組成物におけるそれらの使用が考慮される。補助的な活性成分もまたこれらの組成物中に組み込むことができる。

40

50

【0044】

本明細書ならびに以下の特許請求の範囲を通して、文脈により別様に必要とされない限り、「含む」という用語および、または「含んでいる」などの変形は、記述された整数もしくはステップまたは整数もしくはステップの群を含むが、他の任意の整数もしくはステップまたは整数もしくはステップの群を除外するものでないことは理解されるであろう。

【0045】

任意の先行刊行物（またはそれに由来する情報）または公知の任意の事項に対する本明細書における記述は、先行刊行物（またはそれに由来する情報）または公知の事項が、本明細書が関連する努力分野における共通の一般的知識の一部を形成するとの認知または承認または何らかの形態の示唆と考えられてはおらず、また考えるべきではない。

10

【0046】

本発明はさらに、以下の非限定的である実施例によって説明される。

【実施例1】

【0047】

実施例1

本実施例では、MAb 7G3の能力を証明し、AML-LSCsとHSCsとの間のCD123発現および機能における明白な違いを利用する。MAb 7G3はIL-3シグナル伝達経路および一時AML細胞の増殖を阻害する。さらに、NOD/SCID異種移植モデルにおけるAML芽細胞のホーミングおよび移植が、MAb 7G3によって著しく減少し、LSC機能が阻害される。

20

【0048】

方法

AML患者サンプル、正常造血細胞、および細胞株

アフエレーシス産物、骨髄または末梢血サンプルは、AMLに罹っている新たに診断した患者および再発患者から得た。患者サンプルは、施設内ガイドラインによるインフォームドコンセント後に採取し、試験は、Royal Adelaide Hospital Human Ethics Committee、Melbourne Health Human Research Ethics Committee、Research Ethics Board of the University Health Network、およびthe South Eastern Sydney & Illawarra Area Health Service Human Research Ethics Committeeにより承認された。診断は、細胞形態学、細胞遺伝学、白血球抗原発現を用いて行い、仏国—米国—英国（FAB）分類に従って評価した。単核細胞は、Lymphoprep分離またはFicoll密度勾配分離によって濃縮し、液体窒素中で凍結した。ヒト臍帯血およびBM細胞は、それぞれ、予定日正常分娩または股関節置換手術を受けていて同意を得た患者から得たか、またはCambrex（米国）から市販品を得、先に記載したとおりに処理した³⁸。

30

【0049】

増殖アッセイ

IL-3またはGM-CSFに対するAML細胞増殖応答を、先に記載したとおりに、 [³H]-チミジンアッセイによって測定した³⁹。簡単に述べると、96ウェルプレートで1ウェル当たり 2×10^4 単核細胞を、200 μ lのIMDM+10%の熱不活化ウシ胎仔血清（HI-FCS）（Hyclone、Utah）中、0.001 nM~10 nMの7G3、またはイソ型マッチド対照BM4（IgG2a）の存在下、IL-3（1 nM）またはGM-CSF（0.1 nM）により、37℃、5% CO₂で48時間刺激し、培養の最後の6時間は、³H-チミジン（MP Biomedicals、NSW、Australia）の0.5 μ Ciを加えた。Packard Filtermate細胞ハーベスター（Perkin Elmer、Victoria、Australia）を用いて、細胞をグラスファイバー紙上に沈積させ、Top Count（Perkin Elmer）を用いてカウントした。サイトカイン類および抗体は全て、市販品を入手（R&

40

50

D Systems、Minneapolis、MN) したか、または CSL Limited (Melbourne、Australia) により供給された。

【0050】

サイトカインシグナル伝達

シグナル伝達タンパク質のリン酸化を、免疫沈降および免疫プロットにより検出した。TF-1細胞およびAML MNC細胞を洗浄し、成長因子非存在下で、0.5%のHIFCS (Hyclone、Utah) または0.5%のヒトアルブミン (CSL、Melbourne、Australia) と共に、IMDM媒体中で、18時間静止状態にした。1億個の細胞をIgG2a (100nM)、9F5、6H6 (非ブロック抗CD123抗体)、または7G3 (0.0001~100nM) と共に、氷上30分間インキュベートし、次いで、50ng/mLのIL-3により、37℃で15分間刺激した。細胞を、NP-40細胞溶解緩衝液⁴⁰中で溶解させ、1C1およびセファロースビーズに結合させた8E4抗体を用いて、ヒトβ_c (CD131) を免疫沈降させた。免疫沈降物を、先に記載したとおり、SDS-PAGEおよび免疫プロットに供した⁴¹。免疫プロットを探索するために用いた抗体は：4G10、抗ホスホチロシンMAbs (Upstate Biotech、Lake Placid、NY)、抗ホスホAkt Ser473 (Cell Signaling、Beverly、MA)；ならびに抗リン酸化シグナルトランスデューサーおよび転写5 (STAT-5) Mabのアクチベーター (Zymed、San Francisco、CA) であった。抗体は全て、製造元の指示に従って使用した。シグナルは、増強化学ルミネセンス (ECL; Amersham Pharmacia または Pierce) からのWest Dura) を用いて発色させた。

【0051】

STAT-5活性化はまた、白血病細胞株のM07eおよびTF1、ならびに一次AML細胞について細胞内FACSによって検出した。細胞は、MEDMプラス10%FCSおよび10ng/mLのhuIL-3 (CSL、Melbourne、Australia) 中、60分間インキュベートし、BD Cytotfix (商標) 緩衝液 (Becton-Dickinson) により固定し、引き続きメタノール透過処理した。次いで細胞を、抗ホスホSTAT-5 (Becton-Dickinson) により染色し、FACSCalibur (Becton-Dickinson) を用いて分析した。

【0052】

エキソビボ抗体処理

解凍AMLまたは正常造血細胞を、15~20%のBIT (Stemcell Technologies、Vancouver、BC Canada) を添加したX-VIVO 10 (Cambrex Bioscience) 中、対照のIgG2aまたは7G3と共に、37℃で2時間インキュベートしてから、再取り込みアッセイのため (以下を参照) 致死量以下で放射線照射したNOD/SCIDマウス内へ静脈内移植した。移植を、4~10週目に2つの異なる時点で測定した。

【0053】

AMLのインビボ抗体処理

インビボ試験のため、対照のIgG2aまたは7G3 (1回の注射当たり、300~500μg) を各図の説明文に記載されたスケジュールで週3回、マウスに腹腔内注射した。シタラビン (Ara-C) による7G3の相乗効果の可能性を調べるために、移植35日後、500μgの抗体を1日1回、3日間連続して注射し、引き続き、40mg/kg/日でAra-Cを5日間連続腹腔内注射した。さらに4週間、週3回、1回の注射当たり500μgでの抗体処置を再開し、その後、最後の抗体注射の3日後に移植を測定した。

【0054】

NOD/SCIDマウスへのヒト細胞の異種移植

University Health Network/Princess Margaret Hospital Animal Care CommitteeまたはUn

10

20

30

40

50

iversity of New South Walesのthe Animal Care and Ethics Committeeにより承認された施設内指針の下で、動物試験を実施した。NOD／SCIDマウスへのヒト細胞の移植は、先に記載したとおりに行った³⁸。簡単に述べると、全てのマウスが、マウス1匹当たり、500～1000万のヒト細胞を静脈内（i. v.）移植または大腿内移植前に、致死量以下の放射線照射（250～350 cGy）を受けた。抗CD122抗体は、ハイブリドーマ細胞株TM-β1（兵庫健康科学大学のT. Tanaka教授により恵与）⁴²から精製し、先に記載したとおりナチュラルキラー細胞枯渇のための放射線照射の直後に、200 μgをマウスに腹腔内注射した⁴³。同様に、マウス1匹当たり、800万の正常骨髄細胞、または100万の選別CD34⁺正常骨髄細胞または 3×10^5 の系列枯渇CD34⁺正常臍帯血細胞を静脈内移植した。ヒトAMLの移植レベル、ならびにマウス骨髄中の正常造血細胞、末梢血、肝臓および脾臓を、フローサイトメトリーによるhCD45⁺細胞のパーセンテージに基づいて評価した。LSC活性に及ぼす7G3の効果を測定するために、IgG2a処置群または7G3処置群において、先に移植したマウスの骨髄から単離したヒト細胞と同数の（900万細胞／マウス）の静脈内移植により二次移植も行った。

【0055】

ホーミングアッセイ

一次患者サンプルからのまたは移植マウスから採取した同数のヒト細胞を、致死量以下に放射線照射したNOD／SCIDマウスへ静脈内注射した。注射の16～24時間後、ヒト細胞に関し、 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ の採集結果を用いて、レシピエントマウスの骨髄、脾臓、および末梢血からの単核細胞を、フローサイトメトリーによって分析した。マウス組織内へのヒト細胞のホーミング効率を、特定臓器内に見られる注射細胞の％を測定することによって判定し、式：組織内で評価されたhCD45⁺細胞の％×特定組織内の細胞総数／注射したヒト細胞の総数×100^{44～46}によって算出した。

【0056】

細胞染色およびフローサイトメトリー

処置マウスの骨髄、脾臓、肝臓および末梢血からの細胞を、先に記載したとおり²、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）結合抗マウス抗体ならびにフィコエリスリン-シアニン5（PC5、Becton-Coulter）抗体またはアロフィコシアニン（APC、BiolegendおよびBecton-Dickinson）結合抗ヒト抗体により染色した。CD123発現を、フィコエリスリン（PE）結合抗ヒトCD123抗体（クローン9F5）により測定した。7G3処置マウスから回収したヒト細胞上の7G3結合を、9F5-PE、または7G3-PEにより、二通りのサンプルを染色することにより測定した。これら2種のクローンは、完全に別個のエピトープに結合し、非処置一次細胞における蛍光と同様のレベルを生じるからである（データは示していない）。7G3結合のレベルは、式： $[(9F5-PE \text{ 検出 } CD123 \text{ の } RFI) - (7G3-PE \text{ 検出 } CD123 \text{ の } RFI)] \div (9F5-PE \text{ 検出 } CD123 \text{ の } RFI) \times 100$ により算出した。免疫表現型および幹細胞集団は、一連の抗ヒト抗体：抗CD15-FITC、PEに結合した抗CD14、抗CD19-PE、抗CD33-PE、抗CD34-FITCまたはCD34-PC5、および抗CD38-PEまたはPE-シアニン7（別様に記述しない限り、抗体は全て、Becton-Dickinsonから）を用いて同定した。陰性細胞の99.9％を排除するために、イソ型対照抗体を用い、細胞は、FACScanまたはFACS Caliburフローサイトメーター（Becton-Dickinson）を用いて分析した。

【0057】

統計解析

データは、平均値±標準誤差として表している。群間差の有意性は、スチューデントt検定を用いて決定した。

【0058】

結果

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体 7G3 は、IL-3 依存性細胞株および一次 AML 細胞における IL-3 媒介シグナル伝達をブロックする。

IL-3 R 受容体 α サブユニット (IL-3 R α 、CD123) に対して増加させたモノクローナル抗体 7G3 は、CD123 に対する IL-3 結合を阻害すると共に、白血病性細胞株 (TF-1) の増殖、ヒト好塩基球からのヒスタミン放出、および内皮細胞活性化などのインビトロ IL-3 媒介効果を阻害することが先に示されている³³。これらの所見に矛盾せず、MAb 7G3 は、TF-1 細胞および一次ヒト AML 細胞における細胞内シグナル伝達を阻害することが判明した。IL-3 (1 nM) による成長因子誘導 TF-1 細胞の刺激により、受容体 β サブユニット (CD131) のチロシンリン酸化、ならびに STAT-5 および細胞増殖と生存に役割を果たす Akt 下流シグナル伝達分子の活性化がもたらされる (図 6a)。CD131 チロシンリン酸化、ならびに STAT-5 および Akt の活性化は、1 nM の濃度の 7G3 と共に細胞をインキュベートすることによって阻害され、10 nM の濃度でさらに減少し、100 nM の濃度では完全にブロックされ、7G3 に関して報告された 900 pM の Kd に矛盾しない³³。IL-3 結合をブロックしない CD123 に対する 2 つの中和不良の抗体、9F5 および 6H6 は、IL-3 媒介シグナル伝達の阻害に無効であった (図 6a)。IL-3 依存性白血病細胞株 TF-1 および MO7e における 7G3 による STAT-5 の IL-3 刺激リン酸化の阻害もまた、フローサイトメトリーアッセイによって実証された (図 6b)。一次 AML 細胞において、細胞生存⁴⁰の促進に関与するシグナルである CD131 のチロシン 577 の IL-3 依存性リン酸化を、MAb 7G3 が濃度依存的様式で選択的に阻害したことは重要である (図 6a)。同様に、7G3 はまた、フローサイトメトリーで測定すると、一次 AML 細胞における IL-3 刺激 STAT-5 リン酸化も減少させた (図 6b)。MAb 7G3 による IL-3 シグナル伝達のこの選択的阻害は、IL-3 結合をブロックするその能力と矛盾せず、以前は CD131 (β 鎖) を発現しないと報告されていた²⁵ 白血病性幹細胞が、もっぱら CD123 (α 鎖) を介してシグナル伝達し得るかどうかという重要な疑問が生じる。

【0059】

AML 白血病性幹細胞上で、CD123 (IL-3 R 受容体 α 鎖) は CD131 (受容体 β 鎖) と共発現する。

AML 患者からの CD34⁺/CD38⁻細胞上の CD123 の過剰発現は広範に報告されており¹⁷⁻²¹、いくつかの研究では、白血病性 CD34⁺/CD38⁻幹細胞 (LSC) のマーカーとして提案されている^{24、25}。現在の研究では、多くの AML サンプル上の CD123 発現が、2 つの異なる研究室で独立して測定されている。CD34⁺/CD38⁻細胞上の CD123 発現 (RFI 67.7 $\pm$ 24.2、n = 9) は、正常の造血 CD34⁺/CD38⁻細胞上の CD123 発現 (RFI 17.1 $\pm$ 8.6、n = 4、P = 0.21) よりも有意に高く (データは下表 1 にまとめてある)、他の報告^{17-21、24、25}と矛盾しなかった。この過剰発現は、フローサイトメトリーで測定すると、GM-CSF 受容体 α 鎖 (CD116) が AML サンプル中の等しい集団において発現しなかった点で、選択的であるようだ。その代わり、GM-CSF 受容体 α 鎖は、CD34⁻芽細胞上に多く発現した (データは示していない)。さらに、フローサイトメトリーおよび PCR 分析は、CD123 を発現する CD34⁺細胞は CD131 も発現し (データは示していない)、シグナル変換が CD123 単独を介して生じるのではなく、古典的なヘテロダイマー IL-3 受容体を介して生じることを示唆しており、これも CD131 リン酸化データによって裏付けられている (図 1a)。さらに、正常の CD34⁺/CD38⁻前駆体細胞と悪性のそれとの間の CD123 発現レベルの差は、7G3 が LSC を選択的に標的化するが、正常の造血幹細胞は標的にしない根拠を提供している。

【0060】

7G3 は、インビトロで一次 AML 細胞の自然な増殖および IL-3 に誘導された増殖を阻害する。

38 人の一次 AML 患者サンプルを用いて、IL-3 に誘導された増殖を阻害する 7G

3の能力を調べた。3つの一次サンプルの代表的なプロットを図1b～1dに示す。7G3は、32/35サンプルにおけるIL-3に誘導された増殖を阻害した(図1e)が、GM-CSFに刺激された増殖は阻害しなかった(図1b～1d)。外来的に添加した成長因子の非存在下で、7G3はまた、いくつかのAMLサンプルからの細胞の増殖を阻害した。試験したサンプルのうち9つで、7G3およびIL-3の存在により、外来性レベルのおよそ60%(50～75%の範囲)に増殖が減少し(図1e)、オートクリン経路が示唆された。ブロック不良の6H6抗体は、IL-3誘導増殖を阻害しなかった(データは示していない)。7G3抗体のKd(約900pM)³³は、増殖を阻害するのに必要な濃度によく合致した(図1b～1d)。全体として、7G3は、大多数の一次AMLサンプルにおけるIL-3媒介増殖ならびに自然な増殖(IL-3の添加なし)の阻害に有効であり、いくつかのAML細胞が構成的にIL-3を産生するか、または7G3がこれらの細胞に負のシグナルを引き起こすことが示唆された。

10

【0061】

NOD/SCIDマウスにおいて、7G3による前処置はAMLを阻害するが、正常な造血細胞の移植は阻害しない。

免疫欠損マウスにおいて正常細胞および悪性細胞の再増殖能力に及ぼす7G3の効果を評価するために、一次AML細胞および正常骨髄(NBM)細胞または臍帯血(CB)細胞を、7G3または無関連のIgG2a(10μg/mL、2時間)と共に、エキソビボインキュベートし、致死量以下の放射線照射したNOD/SCIDマウスに移植した。対照は接種4～8週後に骨髄移植の証拠を示したが、エキソビボ7G3インキュベーションは、AMLサンプルの9/10の移植を著しく減少させた(対照に比較して、平均89.7±1.9%の減少、P=0.013、図2aおよび表1)。移植におけるこの減少は、接種8週後と12週後との間で評価した際、サンプルの6/7で持続していた。対照的に、接種4～11週後、7G3は、3/5の正常サンプルの移植に有意な阻害効果を持たず、また、2つのNBMに対する小さな効果が統計的有意性に達していたが、この阻害は、AML細胞と比較するとはるかに低かった(図2bおよび表1)。エキソビボ7G3処置は、IgG2a対照に比較して、平均23.5±8.9%(P=0.078)、正常の造血細胞移植を減少させた。NBMの3つに関する多系列移植は、CD33、CD19、およびCD3の発現をモニターすることにより測定したが、IgG2a処置群と7G3処置群との間に有意差は見られなかった(データは示していない)。

20

30

【0062】

エキソビボ7G3処置は、診断時と再発時双方で採取したAML-8の移植を同程度に阻害しており、診断サンプルと再発サンプルの双方が、7G3処置に対して同等の感受性を有し得ることを示した。AML-5は移植がエキソビボ7G3処置によって減少しなかった唯一のAMLサンプルであり、これは、評価した全てのAMLサンプルのうちで、このサンプルが高比率のLSC(CD34⁺/CD38⁻)および最低のCD123発現を示すことに起因すると考え得る(表1)。全体として、これらの結果は、AML LSCに比較して、7G3処置に対する正常の造血幹細胞の感受性の減少を実証している。

【0063】

エキソビボ7G3処置によって生じるAML移植の減少はまた、生存率の改善にも関連していた。IgG2a処置または7G3処置のAML-9細胞を移植したマウスは、それぞれ、11.5週間と24週間の生存率中央値を示した(P=0.0188、各群に関してn=10、図2c)。20週間を超えて生存したマウスがいなかった対照群とは対照的に、7G3群の40%は実験の終了を超えて生存した(25週間)。

40

【0064】

AMLまたは正常な造血細胞の移植に及ぼすエキソビボ7G3処置の阻害効果は、有意な相関性を持って、CD34⁺/CD38⁻集団におけるCD123発現の強度と逆の関連性があった(図7; R=-0.68、P=0.0051)。2つのパターンは明らかであり、7G3によって移植が強く阻害されたAMLサンプルでは、CD123の発現が一般に高かった。逆に、7G3によって移植がそれほど顕著に影響されなかった正常の造血サ

50

ンプルと単一のAMLサンプル（AML-5）では、一般にCD123を発現は低レベルであった。

【0065】

7G3は、NOD/SCIDマウスにおけるAMLホーミング能力を阻害する。

静脈内接種されたAML細胞が、骨髄および脾臓へホーミングする能力に関する7G3の効果判定のために、エキソビボ処置されたAML-8-rel細胞およびAML-9細胞を移植し、24時間後にマウスを安楽死させて調べた。イソタイプ処置の対照と比較して、7G3は、骨髄に対するホーミングが46~93%の間で有意に減少したが（ $P < 0.05$ ）、一方、脾臓へのホーミングは、対照の35%から90%減じたが、この差は統計的に有意ではなかった（ $P > 0.05$ ）（図2d）。接種24時間後の時点で骨髄および脾臓内に残留した白血病性細胞は、主としてCD34⁺の始原細胞であり、また7G3は、骨髄において細胞数が減少し、残留細胞の細胞表面表現型を変化させなかった（データは示していない）。

【0066】

骨髄へのAMLホーミングに及ぼす7G3の効果をさらに特性化するために、AML-8-rel細胞を7G3抗体またはイソタイプ対照抗体に曝露し、引き続き尾静脈（IV）を経るか、または直接右大腿（RF）に移植し、その5週後にマウスを安楽死させた。図2eは、大腿内接種が、静脈内接種と比較して移植に及ぼす7G3の阻害効果を減衰させたが、大腿注射および非大腿注射双方において移植の有意な減少における7G3の有効性は存続した。AML-LSCの7G3阻害をより直接的に示すために、AML-LSC（NOD/SCIDマウスにおいてヒト疾患を再利用する能力により規定された）が、このフラクションにかなり濃いのでCD34⁺CD38⁻細胞に及ぼす7G3の処置効果を本発明者らは調べた^{2,3}。BMへのAML-8-relおよびAML-9のホーミングからのCD34⁺CD38⁻細胞数は、エキソビボ7G3の処置により対照のそれぞれ $8.4 \pm 0.018\%$ と $12.0 \pm 4.3\%$ とに減少した（ $P = 0.16$ と 0.013 、図2f）。同様に、脾臓に対するAML-9ホーミングからのCD34⁺CD38⁻細胞数が、対照の $3.8 \pm 1.5\%$ に減少した（ $P = 0.019$ ）。この所見をさらに確認するために、AML-9から選別されたCD34⁺CD38⁻細胞によりホーミング実験を繰り返し、次いでIgG2aまたは7G3のいずれかによりエキソビボ処置してからNOD/SCIDマウスに注射した。7G3の処置群におけるヒト細胞のホーミング効率は、BMにおいてIgG2a対照の $7.8 \pm 1.7\%$ に、脾臓においては $11.2 \pm 0.84\%$ に減少した（ $P = 0.09$ ）（図2g）。したがって、CD123は、AMLのNOD/SCID白血病開始細胞（SL-IC）の支持微小環境へのホーミング、ならびにNOD/SCIDマウスにおける疾患の確立および伝播に重要な役割を果たしていると思われる。

【0067】

7G3の早期投与は、NOD/SCIDマウスにおけるAML移植を減少させる

NOD/SCIDマウスの7G3処置が、AML細胞の移植に影響を与えるかどうかを判定するために、7G3またはイソタイプの対照抗体（ $300 \mu\text{g}$ ）を腹腔内注射により単回投与し、次いで6時間後にAML-1細胞を、静脈内に移植した。7G3処置により、骨髄における移植が、移植後5週目に対照の $1.3 \pm 0.9\%$ へとほぼ完全に剥離した（ $P = 0.0006$ 、 $n = 5$ 、図3a）。

【0068】

移植24時間後または4日後に処置を開始することにより、NOD/SCIDマウスにおけるAMLの進行の制御における7G3の有効性もまた調べ、SL-ICを、処置開始前の骨髄微小環境にホーミングさせると推定した^{44~46}。移植24時間後に処置を開始すると、移植はAMLサンプルの2/3に減少した。1日ごとに投与された4回投与のこの処置療法により、AML-2およびAML-3の移植は、それぞれ対照の $41.1 \pm 27.1\%$ （ $P = 0.096$ ）と $39.6 \pm 10.0\%$ （ $P = 0.026$ ）に減少したが、一方、AML-1の移植では影響されなかった（図3b）。

【0069】

双方の移植後処置療法における7G3の比較的低い効果にもかかわらず、マウスの骨髄から採取されたAML細胞上の7G3の被覆は、はっきりと明白であった（データは示していない）。さらに、7G3処置により、試験されたいずれの処置療法もAML-1細胞上のCD123発現を減少させた。例示として移植4日目後に開始する7G3の処置により、9F5抗体を用いて評価されたように、BMから採取されたAML-1のCD123発現は対照の $51.3 \pm 4.0\%$ に減少した（図3c、 $P < 0.0001$ ）。同じ実験において、7G3はまた、マウスの末梢血および脾臓に対するAML-1の伝播をそれぞれ対照の $27.8 \pm 7.5\%$ （ $P = 0.0029$ ）と $23.5 \pm 5.3\%$ （ $P = 0.0009$ ）とに減少させた（図3d）。

【0070】

7G3は、NOD/SCIDマウスにおける確立されたAML疾患の負荷を減少させることができる。

本試験の主要目的は、AML幹細胞上の標的CD123の効果を試験することであるが、白血病性幹細胞の移植に及ぼす効果を超えた確立された白血病疾患に対する任意の単一薬剤の治療活性を示す7G3の能力を、確立された疾患モデルにおいて移植28日後に連続7G3処置または対照IgG2a処置を開始し、殺処置時まで処置を継続することによって評価した。患者のサンプルの間でこのモデルにおける7G3処置への応答にばらつきがあったが、これは臨床的に見られるAMLの異種性を反映している可能性が高い。5つのサンプルのうち2つに、AMLのBM負荷における有意な減少が見られた（図3eおよび3fに示す）。AML-2は、移植後9週目と14週目に、BM移植において有意な減少を伴って7G3に応答したが（図3e）、一方、8日間にわたって7G3の4回のみの投与によるマウスの処置では、AML-1の移植がIgG2a対照の $18.9 \pm 4.1\%$ （ $P = 0.001$ 、図3f）に有意に減少した。さらに、多数のAMLサンプルにおいて、移植後4日目または28日目における7G3処置の開始によりBMにおける白血病負荷に有意な減少はなかったが、末梢造血器官（脾臓、末梢血、および肝臓）における白血病負荷が、7G3処置群においてより低下した（図3d、データは示していない）。まとめるとこれらのデータは、7G3が、生物学的にインビボ活性であり、単一薬剤として使用される場合、NOD/SCIDモデルにおけるAMLの増殖を抑制できることを示唆している。

【0071】

7G3は、SL-ICの自己複製能力を標的にする。

連続的移植実験は、全ての癌幹細胞（CSC）特異的療法に関して重要な問題を扱っており、CSCが実際にインビボで標的にされているという証拠を提供する。AMLの場合、AML-LSCを一次NOD/SCIDマウスを再増殖させると、それらは自己複製しなければならないことが知られており³；自己複製は、全ての幹細胞において重要な性質であり、二次移植により最良に評価される。

【0072】

より迅速に増殖するAML芽細胞を標的にする従来の療法に対するアジュバントとして、自己複製能力を有するLSCを標的にするために、7G3もまた使用できるかどうかを調べる目的で、7G3またはIgG2aを、シタラビン（Ara-C）と組み合わせ、SL-ICおよび白血病負荷に及ぼすそれらの効果を判定した。AML-10細胞の移植後35日目に、マウスを3日間毎日7G3またはIgG2a対照（ $500 \mu\text{g}/\text{日}$ ）で処置し、次いで連続5日間Ara-C（ $40 \text{ mg}/\text{kg}/\text{日}$ ）で処置した。Ara-Cで処置後、さらに4週間7G3を投与した。7G3およびAra-Cで処置されたマウスの骨髄および脾臓内の白血病移植は、IgG2aおよびAra-Cで処置されたマウスと比較して減少しなかった（図4のパートIa）。しかしながら、細胞を、処置マウスの骨髄から採取し、同数のヒト細胞を二次レシピエントマウスに移植した場合、7G3/Ara-C処置ドナーマウスから採取された細胞の骨髄および脾臓へのホーミングは、それぞれIgG2a/Ara-C処置対照の $33.6 \pm 5.0\%$ （ $P = 0.014$ ）と $10.9 \pm 4.6\%$ （ $P = 0.15$ ）まで阻害された（図4のパートIb）。さらに、二次レシピエント

10

20

30

40

50

マウスの骨髄および脾臓の再増殖もまた、7 G 3 / A r a - C により、それぞれ I g G 2 a / A r a - C 処置対照の $21.0 \pm 15.2\%$ ($P = 0.024$) と $35.8 \pm 31.8\%$ ($P = 0.31$) とに減少した (図4のパート I c)。ドナーマウスの骨髄に出現する $CD34^+ / CD38^-$ L S C の比率は、I g G 2 a / A r a - C 処置に比して、7 G 3 / A r a - C により減少しなかったが (データは示していない)、図4のパート I d は、I g G 2 a / A r a - C で処置されたドナーと比較して、7 G 3 / A r a - C ドナーからの二次レシピエントマウスの骨髄および脾臓における細胞集団の有意な減少を示している。これらのデータは、7 G 3 のインビボ投与が N O D / S C I D マウスの A M L - L S C を特異的に標的にし、二次レシピエントマウスにおけるホーミングおよび移植の減少をもたらすことを示している。

10

【0073】

7 G 3 が単一薬剤として作用できるかどうかを確認するために、A r a - C の非存在下で7 G 3 のインビボ処置後に連続移植を実施した。図4のパート I I A に示すように、10週間の7 G 3 処置は、一次移植マウスの B M または脾臓における A M L - 10 の移植を明白には減少させなかったが、7 G 3 処置マウスから採取した A M L 細胞は、I g G 2 a 処置対照と比較して二次レシピエントマウスの B M ($28.2 \pm 2.9\%$, $P = 0.0083$) および脾臓 ($18.3 \pm 4.8\%$, $P = 0.0021$) へのホーミング能力は有意に減少した (図4のパート I I B)。再増殖能力もまた、有意に減少した：未処置の対照細胞を移植した9匹の二次レシピエントマウスのうちの8匹は、移植されたが、一方、7 G 3 処置マウスからの細胞を接種した8匹のマウスのうちの3匹だけが、移植の証拠を示した (図4のパート I I C)。7 G 3 処置マウスにおける平均移植レベルは、I g G 2 a 処置対照と比較して有意に減少した (B M、 $34.6 \pm 18.6\%$, $P = 0.039$; 脾臓、 $33.7 \pm 20.4\%$, $P = 0.19$) (図4のパート I I C)。この患者サンプルは、7 G 3 処置一次マウスにおいて減少しなかった高レベルの $CD34^+ / CD38^-$ 始原細胞を有した。しかしながら、I g G 2 a で処置されたドナーと比較して、7 G 3 処置ドナーから移植された二次レシピエントマウスの B M における始原細胞集団が有意に減少した (対照の $56.6 \pm 15.0\%$, $P = 0.031$) (図4のパート I I D)。A M L - 9 細胞を用いる独立した実験において同様の結果が得られ、7 G 3 は、平均レベルの移植を対照の $19.3\% \pm 9.8\%$ に減少させたことを示した (図4のパート I I I)。

20

【0074】

図4に示された3つの独立した実験の全てのデータを組み合わせてまとめると、I g G 2 a または I g G 2 a プラス A r a - C で処置した対照マウスから採取された細胞により、27匹の二次マウスのうちの1匹 (3.7%) だけが移植されなかった。対照的に、7 G 3 または7 G 3 プラス A r a - C で処置したマウスから採取された細胞により、23匹の二次マウスのうちの11匹 (48%) が移植できなかった。これらの結果は、7 G 3 のインビボ投与は、N O D / S C I D マウスの A M L - L S C を特異的に標的にし、その結果、二次レシピエントにおけるホーミングおよび移植を減少させることを実証している。

30

【0075】

$CD122^+$ N K 細胞は、N O D / S C I D マウスにおける A M L 再増殖の7 G 3 媒介阻害に寄与する

40

F c 依存、抗体依存性の細胞障害活性 (A D C C) を促進する免疫系におけるエフェクター細胞の中には、N K 細胞、マクロファージ、好中球および樹状細胞がある。A M L の移植を阻害する7 G 3 の能力へのそれらの寄与は、エキソビボの7 G 3 処置 A M L 細胞の白血病性細胞移植前に、 $CD122$ としても知られている I L - 2 R β - 鎖 (I L - 2 R β) に対するモノクローナル抗体を放射線照射された N O D / S C I D マウスに注射することによって評価された。I L - 2 R β は、N K 細胞、T 細胞、およびマクロファージに広く発現し、m A b による I L - 2 R β のブロックによって、N O D / S C I D 異種移植系におけるヒト造血細胞の移植を改善することができる。

【0076】

移植後4週目に、I g G 2 a 対照によりエキソビボ処置された A M L - 8 - r e l 細胞

50

を移植したNK細胞欠失マウスにおける白血病移植は、非欠失マウスの $113.3 \pm 2.8\%$ ($P = 0.023$)に増加し(図5a)、CD122⁺NK細胞が、NOD/SCIDマウスにおけるAML移植を中等度に減少させることが示唆された。CD122⁺細胞の欠失はまた、部分的ではあるが有意に、AML細胞の移植を減少させる7G3の能力を減じたことから、CD122陽性細胞は、7G3の阻害効果を一部媒介することが示唆された(図5a)。NOD/SCID再増殖に及ぼす効果と対照的に、7G3は依然として、抗CD122処置マウスにおいて、IgG対照の85%を超えて白血病細胞のホーミングを強力に阻害した(図5b)。これらの結果により、NOD/SCIDマウスにおけるAML細胞の移植およびホーミングを阻害する7G3の能力は、少なくとも2つの協同的経路：NKおよび／または他のCD122依存性細胞により生じたADCC；およびIL-3/CD123シグナル経路をブロックする7G3の特異的阻害効果によって媒介されることを示している。

【0077】

【表 1】

表 1. ヒト正常細胞および白血病細胞に対する 7G3 処置のエキソビボ効力は、CD34+/CD38- 細胞に対する CD123 発現と関連する

移植細胞	AML サブタイプ ^a	CD34+ CD38- (%)	CD34+/CD38- CD123 発現 (RFI)	CD34+ CD123+ 発現 (RFI)	CD123 発現 (RFI)	7G3 処置細胞の移植 ^b (対照%としての移植)
AML						
1	M0	2.9	52.1	85.3	76.3	3.6
2	M1	2.2	26.1	20.8	34.6	5.3
3	M5b	0.048	C _{9.9}	C _{27.4}	29.4	19.5
4	M5 ^a	3.5	36.5	47.0	18.8	6.6
5	M2	6.2	13.8	12.2	11.2	97.1
6	M2	0.18	C _{51.7}	C _{52.4}	21.8	NE
7	M5b	0.010	C ₂₀	C ₈₆	54.3	NE
8	M4eo	4.9	24.2	18.6	16.7	1.5
正常細胞						
NBM-1	NA	0.42	12.0	17.1	3.0	139.9
NBM-2	NA	2.3	6.7	8.8	3.0	34.8
NBM-3 (CD34+)	NA	0.40	7.0	6.5	6.5	50.4

CD34、CD38 および CD123 抗原を、蛍光色素結合抗体で染色した。CD34 および CD38 発現に基づいた元の AML 患者または NBM ドナーの特定の亜集団および全体サンプルにおける CD123 発現は、インタイプ対照に対する染色サンプルの蛍光強度の幾何平均の比率から判定された相対的蛍光指数(RFI)として測定した。NBM-3 は、選別された正常骨髓サンプルの CD34+であった。高い CD123 発現は、7G3 処置細胞の移植減少と関連する。

a FAB 基準

b 7G3 処置細胞の移植は、図1に基づいた IgG2a インキュベート群における平均移植レベルのパーセンテージとして 7G3 エキソビボインキュベート j 群の平均移植として表される。

c サンプルが、極めて低い CD34 発現、または CD34+細胞数を有した。

NE =対照における移植なし NA =該当なし

10

20

30

40

【0078】

考察

AML 芽細胞および LSC 上の CD123 の一貫した過剰発現は、特に再発または最少

50

残存疾患に関して、AML単独または確立された療法と併用した治療のための将来有望な治療標的を提供する。CD123に基づいた幾つかの療法が考案されており、種々のアッセイにおいて抗AML効果を示している^{23、47~49}。本研究において、7G3は、インビトロでIL-3媒介シグナル経路、それに続く種々のAMLサンプルの誘導増殖を特異的かつ一貫して阻害することが示された。さらに、7G3処置により、AML-LSC移植は著しく減少し、マウスの生存率が改善された。予め確立された疾患を有するマウスは、BMおよび周辺部のAML負荷の減少および処置の際の二次的移植の減損を示し、処置マウスにおいてAML-LSCが直接標的にされていることを確証した。これらの結果により、治療的抗CD123モノクローナル抗体によるAML-LSCの標的化、および臨床的適用の可能性に向けたインビボ前臨床研究知見の解釈に対して明瞭な確証を提供している。

10

【実施例2】

【0079】

実施例2

CSL360は、マウスモノクローナル抗体7G3の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を、ヒトIgG1定常領域上に移植することによって得られたキメラ抗体である。7G3と同様に、CSL360は、CD123（ヒトIL-3R α ）に高親和性で結合し、受容体への結合に関してIL-3と競合し、その生物活性をブロックする³³。したがってヒトキメラ抗体CSL360の大部分は、AML-LSC細胞を標的とし、排除するためにも使用できる可能性がある。CSL360はまた、ヒト設定のエフェクター活性を開始できると思われるそのヒトIgG1Fc領域があるため、ヒトの治療剤としての潜在的有用性の利点を有する。さらに、ヒトにおけるCSL360は、恐らくマウス7G3対応物に比してクリアランスの減少を示し、より免疫原性が少ないと考えられる。CD123発現白血病の治療におけるCSL360の作用機序は、1) IL-3とその受容体との結合をブロックすることによるIL-3シグナル伝達の阻害、2) 抗体が標的細胞に結合した後の補体の動員および補体依存性細胞障害活性（CDC）を引き起こすこと、または3) 抗体が標的細胞に結合した後、エフェクター細胞の動員および抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）を引き起こすこと、を含み得る。

20

【0080】

抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）を試験するために開発された方法が、以下に記載されており、このアッセイにおいて（1）標的細胞集団または（2）エフェクター細胞集団を分析する方法に分類することができる。標的細胞の分析に關与する方法では、ADCCによってもたらされた標的細胞溶解または標的細胞の早期アポトーシスを測定する。エフェクター集団を調べる方法では、NK細胞-誘導細胞溶解に関するマーカーとしてNK細胞などのエフェクター細胞上の膜顆粒の誘導を測定する。

30

【0081】

方法

⁵¹クロム放出アッセイを用いるADCCの測定

Jenkinsら⁵⁰により記載されたCD123を発現させるために操作されたマウスリンパ細胞株CTL-ENまたは新たに解凍された白血病患者細胞（ 5×10^6 ）を、250 μ Ciの⁵¹Crムークロム酸ナトリウムと共に37℃で1時間インキュベートした。RPMI-10% FCS媒体により細胞を3回洗浄して遊離の⁵¹Crムークロム酸ナトリウムを除去した。クロム標識された標的細胞を、丸底96ウェルプレート中に10,000個の細胞/ウェルで分配した。CSL360またはイソタイプ対照抗体、（MonoRh ϕ 、組換え抗アカゲザルDヒト免疫グロブリンG1）を、10 μ g/mLで加えた。

40

【0082】

単離された新鮮PBMCを、三通りの異なる比率でエフェクター細胞として添加し、5% CO₂インキュベーター中37℃で4時間インキュベートした。サンプルの全量は200 μ L/ウェルであった。インキュベーション時間後、プレートを600 $\times$ gで5分間遠心分離し、100 μ Lの上澄液を取り出し、放出⁵¹CrをWallace γ カウンター中で測定

50

した。

【0083】

特異的細胞溶解は、式、細胞溶解% = $100 \times [(\text{抗体がある場合の平均cpm} - \text{平均自然発生放出cpm}) / (\text{平均最大cpm} - \text{平均自然発生放出cpm})]$ を用いることにより決定した。自然発生放出は、抗体もエフェクター細胞もない標的細胞を有したサンプルから得られた。最大放出は、1% (v/v) Triton X-100で処理された標的細胞から決定した。

【0084】

カルセインAM標識の標的細胞アッセイを用いるADCCの測定

CSL360により誘導されたADCCを、Neriら⁵²によって記載された方法により測定した。この方法は、⁵¹クロムの代わりにカルセインAMによる標的細胞の標識を含んだ。標的細胞を、5% CO₂インキュベーター中、37℃で30分間10 μMカルセインAM (Invitrogen、カタログ番号C3099) と共にインキュベートした。標識細胞を洗浄して遊離のカルセインAMを除去し、次いで丸底プレートに1ウェル当たり5000個の細胞で分配した。エフェクター細胞を異なる比率で添加した。関連する抗体を、10 μg/mLの最終濃度に加え、抗体の無い細胞を陰性対照として供した。プレートを、5% CO₂インキュベーター中、37℃で4時間インキュベートした。インキュベーション時間後、プレートを600 × gで5分間遠心分離した。100 μLの上澄液を取り出し、蛍光を、Envisionマイクロプレートリーダー (励起フィルター485 nm、発光フィルター535 nm) で測定した。特異的細胞溶解は、式、細胞溶解% = $100 \times [(\text{抗体を有する平均蛍光} - \text{平均自然発生蛍光}) / (\text{最大平均蛍光} - \text{自然発生平均蛍光})]$ を用いることにより算出した。最大蛍光は、3% Extracellularによる細胞溶解により決定し、自然発生細胞溶解は、抗体またはエフェクター細胞の無い標的細胞により得られた蛍光であった。

【0085】

細胞溶解の代理マーカーとしての膜顆粒タンパク質CD107aのエフェクター細胞発現としてのADCCの測定

NK細胞による膜結合溶解性顆粒タンパク質であるCD107aの発現レベルが、標的細胞の細胞障害性と関連することを、Fischerら⁵¹は示した。この方法を用いてCSL360のADCC活性を評価した。この方法は、標的細胞を有する白血球層から新鮮に単離されたヒトPBMCのインキュベーションを含んだ。使用された標的細胞は、CD123発現細胞株または一次ヒトAML細胞であった。抗体の存在または非存在下、1:1の比率で標的細胞をヒトPBMCに加えた。CD107aの非特異的または自然発生発現を、添加された抗体または標的細胞の無いヒトPBMCで評価した。PE-Cy5結合CD107aモノクローナル抗体 (BD Pharmingen、カタログ番号555802) を全てのサンプルに加え、5% CO₂インキュベーター中、37℃で3時間インキュベートした。インキュベーション開始1時間後、ブレフェルジンA (BFA) を加えた。インキュベーション終了時に、細胞を洗浄し、抗CD56-PE (BD Pharmingen、カタログ番号347747) および抗CD16-FTTC (BD Pharmingen、カタログ番号555406) モノクローナル抗体で染色した。次に細胞を、FACS Caliburを用いてフローサイトメトリーにより分析し、膜結合溶解性顆粒タンパク質を発現したFcγRIIA受容体を発現するNK細胞を表すCD56dimCD16+CD107a細胞に関して分析した (Flow Jo Software Tree Star, Inc.)。

【0086】

結果

CSL360は、⁵¹クロム放出アッセイにより評価した際、AMLサンプルおよびCD123発現細胞株においてADCCを誘導する。

CTL細胞による⁵¹クロムの総取り込みは、界面活性剤の細胞溶解によるクロムの最大放出で判定した際、AML細胞によるわずかに約400~200 cpmと比較して20

00～1500cpmの間であった。陰性対照抗体MonoRhοによる1.9%の細胞溶解と比較して、エフェクター対標的細胞の100:1比率でAML(SL)細胞の15%の細胞溶解が見られた。陰性対照抗体MonoRhοによる5%の細胞溶解と比較して、エフェクター対標的細胞の100:1比率でCTL EN細胞の51%の細胞溶解が見られた(表2)。これらの結果により、たとえばAML細胞がCD123のより高レベルの表面発現があっても、CTL EN細胞は、AML細胞よりもCSL360媒介ADCC細胞溶解を受けやすいことが示唆された。

【0087】

CSL360は、エフェクターNK細胞上のCD107a発現により評価した際、AMLサンプルおよびCD123発現細胞株においてADCCを誘導する。

図8は、CSL360またはイソタイプ対照抗体の存在下、AML患者サンプル、RMH003と共にインキュベートした正常なドナーからのPBMCを混合することにより誘導されたNK細胞上の膜溶解性顆粒、CD107aの誘導を示すフローサイトメーター分析を示している。この混合集団内のNK細胞は、CD56(NKマーカー)およびCD16(FcγRIIA)を発現したリンパ球集団から導かれた。イソタイプ対照抗体と共にインキュベートした同じドナーおよび患者サンプルからのNKと比較して(図8Aの約3%のCD107a陽性細胞)、CSL360で被覆されたAML細胞に曝露されたNKは、有意に上昇したCD107aを示した(図8Bの約39%のCD107a陽性細胞)をデータが示している。CSL360を、標的AML患者細胞の非存在下でエフェクター細胞に添加するとCD107aが検出されなかったことから、ドナーNK細胞上のCD107aの誘導は標的細胞依存性である(図8D)。図9は、棒グラフとしてプロットされた同一の実験からのデータを示している。

【0088】

ヒトCD123(CTL EN、EL4)を発現するために操作された多数の細胞株または内因性CD123を発現するヒト白血病細胞株(TF-1)および3つまでの異なるドナーに由来するエフェクター細胞とインキュベートされた標的細胞としての白血病患者の一次サンプルから上記と同様の方法で作出されたデータが表3に含まれる。データは、CSL360の存在下または添加抗体無しで種々のサンプルとインキュベートされた、CD107aを発現したNK細胞のパーセンテージとして表されている。CSL360の存在下、ヒトCD123を発現する2つのマウス細胞株は、NK細胞においてCD107a発現を誘導した。4/8一次白血病サンプルは、NK細胞上のCD107aのCSL360媒介発現を示した。RMH007は、CSL360の非存在下であってもNK細胞におけるCD107aの発現を誘導した。RBH013は、1つのドナーからPBMCにより同様の結果を与えたが、異なるドナーではCD107a発現は、CSL360に特異的であり、この場合CSL360により誘導されたNK媒介ADCCに対するドナー特異的感受性を示した。

【0089】

8つの一次白血病サンプルのうち6つを、エフェクター細胞源として種々のドナーを用いて、ADCC効果に関して調べた。ADCCに感受性であったサンプルは、通常ドナーに関わりなくエフェクター細胞においてCD107aを誘導したことは重要な所見であった。同様に、ADCCに耐性であったサンプルもまた、一般にドナー細胞に関わりなく陰性のままであった。

【0090】

CSL360は、カルセインAM放出アッセイにより評価した際、AMLサンプルにおいてADCCを誘導する。

溶解された細胞により媒体に放出されたカルセインは、ADCC媒介細胞溶解の指標である。患者RMH003およびRMH008は、このアッセイにおいてADCCに対する感受性を示したが、一方、RMH009、RMH010およびRMH013は、細胞溶解に耐性であったと思われる(表4)。これら5人の患者全てを、このアッセイに用いられたものと同じエフェクター細胞を用いるNK細胞CD107a発現アッセイにおいて、C

S L 3 6 0 媒介 A D C C に対する感受性について試験し、比較結果を表 5 に示してある。
6 人の患者サンプルのうちの 3 つにおける A D C C の状態は、2 つの異なるアッセイと一致した。

【 0 0 9 1 】

【表 2】

表 2. ⁵¹クロム放出アッセイにおける ADCC 媒介細胞溶解

サンプル	E:T における CSL360 による溶解 %		E:T における MonoRho による溶解 %	
	100:1	10:1	100:1	10:1
CTLEN	51	10	5	1
SL (AML)	15	2.4	1.9	4.5

10

【 0 0 9 2 】

【表 3】

表 3. ADCC 活性の測定値として CD107a の表面発現

サンプル	CD107a を発現する NK 細胞の%			
	E:T における CSL360		E:T における抗体なし	
	1:1	1:0	1:1	1:0
CTLEN-001	6.7	0.7	0.6	0.6
CTLEN-008	24	1.0	2.6	0.6
CTLEN-010	5.7	2.2	2.7	-
CTLEN-011-PBMC-1	8.1	0.8	2.7	0.6
CTLEN-011-PBMC-2	10.5	1.3	0.25	0.28
EL4hi/lo-001	2.8	0.8	0.6	0.6
EL4hi-002	2.9	0.7	0.5	0.5
EL4hi-003	15.0	1.1	6.7	0.6
EL4hi-004	16	0.46	0.04	-
EL4hi-005	21	1.5	7.0	0.6
EL4hi-010	34	1.2	2	2
EL4hi-011-PBMC-1	15.5	0.18	5.7	0.45
EL4hi-011-PBMC-2	23.5	0.6	0.12	0.18
TF-1 (IL-3)	1.45	0.7	1.4	0.5
TF-1 (GM-CSF)	0.7	0.7	0.6	0.5
RMH003 ^a (AML)	30	nd	3.5	nd
RMH003 ^b (AML)	33	1.4	0.8	0.6
RMH003 ^c (AML)	38.0	1.2	3.7	0.4
RMH007 (B-ALL)	16.4	8.9	16.7	4.0
RMH008 ^a (AML)	9	nd	4	nd
RMH008 ^b (AML)	16	1.8	1.6	0.6
RMH008 ^c (AML)	8.7	1	0.9	0.4
RMH009 ^a (B-ALL)	3.0	nd	1.8	nd
RMH009 ^b (B-ALL)	1.7	1.0	0.9	0.55
RMH009 ^c (B-ALL)	7.4	8.6	4.2	3.6
RMH010 ^a (AML)	14	nd	6	nd
RMH010 ^b (AML)	25.5	7.8	5.2	3.6
RMH011 (AML)	6.6	6.6	3.4	2.2
RBH009 ^a (AML)	8.5	nd	4.5	nd
RBH009 ^b (AML)	8.0	6.7	3.8	2.8
RBH013 ^a (AML)	10.0	nd	10.0	nd
RBH013 ^b (AML)	22.0	5.9	3.3	2.7

^{a, b, c} は、サンプルを、エフェクター細胞源として ADCC に関して種々のドナーにより試験したことを示す。

【表 4】

表 4. カルセイン放出アッセイにおけるADCCの評価

サンプル	溶解%			
	E:T における CSL360		E:T における 抗体なし	
	100:1	10:1	100:1	10:1
RMH003 (AML)	82.6	39.2	19.9	7.1
RMH008 (AML)	100	59.5	58.2	0
RMH009 (B-ALL)	0	0	0	0
RMH009* (B-ALL)	0	0	0	0
RMH010 (AML)	0	4	4	8
RBH013 (AML)	0	0	0	0

*エフェクター細胞として別の PBMC 源を用いたサンプル RMH009
による反復アッセイ

【 0 0 9 4 】

【表 5】

表 5. フローサイトメトリーベースアッセイ対細胞溶解アッセイの比較

サンプル	CD 107a の状態	カルセイン放出	⁵¹ クロム放出
CTLEN	陽性	nd	陽性
EL4hi	陽性	nd	nd
RMH003 ^a (AML)	陽性	陽性	nd
RMH008 ^a (AML)	陽性	陽性	nd
RMH007 (B-ALL)	陰性	nd	nd
RMH009 ^a (B-ALL)	陰性	陰性	nd
RMH010 ^a (AML)	陽性	陰性	nd
RBH013 ^a (AML)	陽性	陰性	nd
SL (AML)	Nd	nd	陽性

^a これらのサンプルを、両アッセイに関して同じエフェクター細胞による CD107a および
カルセイン放出アッセイを用いて ADCC に関して試験した。

* 実施せず

【 0 0 9 5 】

考察

A D C C 活性を測定するために知られた幾つかのアッセイ全ての使用を通して、感受性
に変動はあるにしても、C S L 3 6 0 が、異所性ヒト C D 1 2 3 を発現する培養物中に維
持されたマウス細胞株における A D C C 応答を誘導できることが示されていた。重要なこ
とに、C S L 3 6 0 はまた、正常なドナーからの機能性エフェクター細胞の存在下、一次
ヒト A M L 患者サンプルに対する A D C C 応答を誘導することができた。このデータによ
り、白血病細胞が L S C を含む白血病患者において C D 1 2 3 の十分なレベルを発現する
こと、特に患者、例えば、寛解期患者または最少の残存疾患を有する患者などが、血行中
に幾つかの機能性エフェクターを保持した場合、治療的に投与された C S L 3 6 0 は、白
血病細胞の A D C C 特異的排除を誘導し得ることが示唆されている。

【実施例 3】

10

20

30

40

50

【0096】

実施例 3

LSCを含むAML細胞上のCD123の遍在的な発現およびAMLの病因において重要な役割を果たすIL-3が関係している証拠により、IL3R α 機能をブロックする能力が、7G3などのIL-3R α を標的にする抗体の治療的活性にとって重大な意味を持つ出であろうことが示唆された。本実施例において、やや意外なことに、AML患者サンプルによりNOD/SCIDマウスの移植または再増殖を阻害する7G3の能力は、7G3のFcドメインによって誘導されたエフェクター機能の応答に少なくとも部分的に依存することが示されている。また、IL-3R α 機能を有意に阻害することのない他のIL-3R α 抗体もまた、移植をブロックし、それ故、AMLのNOD/SCIDマウスモデルにおいて治療活性を示す。

10

【0097】

方法

F(ab)'₂断片の調製

6H6、9F5および7G3に関するF(ab)'₂断片は、抗体と共に37℃、2時間インキュベートされた固定化ペプシン-アガロース(22.5Uのペプシンアガロース/mg抗体)を用いるペプシン開裂により誘導された。3Mトリスを用いてpHを6.5に調整することにより消化をクエンチした。固定化ビーズを、遠心分離により得られたF(ab)'₂から分離した。

【0098】

7G3のF(ab)'₂を、直列型クロマトグラフィー法：チオール基吸着クロマトグラフィー(15カラム容量超で40mMのHEPES中20~0%の硫酸アンモニウム勾配)およびアニオン交換クロマトグラフィーを用いて残存する免疫グロブリンおよび他の不純物から精製した。9F5 F(ab)'₂および6H6 F(ab)'₂を、イオン交換クロマトグラフィー、次いでアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。エンドトキシン濃度は、LAL発色アッセイにより定量した。エンドトキシン濃度が>10EU/mLであった場合、Detoxigelを用いてエンドトキシン濃度を減少させた。予想したとおり7G3 F(ab)'₂は、IL-3依存TF-1増殖アッセイにより評価した際、CD123中和活性を保持した(データは示していない)。

20

【0099】

AML患者サンプル

末梢血細胞は、3人の新たに診断された患者からインフォームドコンセントを得た後に採取した。AML患者を診断し、仏国-米国-英国(FAB)診断基準に従って分類した。AML-8-relは最初の診断において当初、M4として分類され、AML-9はM5aとして分類され、AML-10は分類されなかった。AML芽細胞は、フィコール密度勾配遠心分離により単離し、液体窒素中、一定分量で凍結させた。

30

【0100】

インビトロ抗体処置

IL-3受容体 α 鎖(CD123)、7G3、9F5、6H6およびそれらのF(ab)'₂断片に対するモノクローナル抗体を用いてAML患者から採取した細胞を処置した。対照としてIgG2aを並行して用いた。解凍AML細胞を、XVIVO10プラス15%BIT中に接種し、10 μ g/mLの濃度で抗体と共に独立してインキュベートした。37℃で2時間のインキュベーション後、採取した白血病細胞を、再増殖アッセイのために致死量以下の放射線照射したNOD/SCIDマウスに静脈内注入した。

40

【0101】

NOD/SCIDマウスへのヒト細胞の異種移植

異種移植は基本的には、実施例1に概説したように実施した。NOD/SCIDマウスを繁殖させ、the University Health Network/Princess Margaret Hospital Animal Care Committeeで飼育した。the University Health Network/

50

Princess Margaret Hospitalの動物保護委員会によって承認された、施設ガイドラインの下で動物試験を実施した。NOD／SCIDマウスへの白血病細胞の移植は、以前に記載されたとおりに実施した³。手短に述べると、同一実験での全てのマウスを、300 cGyの線量で同時に照射してから、同数のヒト細胞を注射した。静脈内移植に関しては、各群5匹のマウスを用いて、マウス1匹当たり500万～1000万の白血病細胞を注射した。ヒトAMLの移植レベルは、マウス骨髄のフローサイトメトリーによりCD45+細胞のパーセンテージに基づいて評価した。

【0102】

細胞染色およびフローサイトメトリー

処置マウスの骨髄からの細胞を、APC (Beckman-Coulter) に結合したヒトCD45 (抗CD45)、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) に結合した抗CD34、および抗CD38-PC5 (Becton-Dickinson) に特異的なマウス抗体で染色した。偽陽性細胞を回避するためにイソタイプ対照を用いた。抗CD123-PE (クローン9F5および7G3、Becton-Dickinson) を用いて、AML細胞上のIL-3受容体 α 鎖の発現を試験した。染色した細胞は、Caliber (Becton-Dickinson) を用いて分析した。

【0103】

統計解析

データは、平均値±標準誤差として供される。処置群間差の有意性は、スチューデントt検定を用いたp値により決定した。結果は、 $P < 0.05$ で統計的に有意であると考えられた。

【0104】

結果

抗IL-3R α 抗体Fcドメインは、AMLホーミング能力の阻害に有意に寄与する。

実施例1におけるデータ、図5aおよび5bにより、NKおよび／または他のCD122依存細胞により生じたADCCは、NOD／SCIDマウスの骨髄内へのAML細胞のホーミングおよび再増殖を阻害する7G3の能力に寄与し、さらにIL-3／CD123シグナル伝達経路をブロックする7G3の効果を示している。これを直接調べるために、エキソピボ処置のAMLサンプルのホーミングに対する抗IL-3R α 抗体6H6および9F5を、他に不十分に中和する効果を調べた。6H6および9F5が双方とも、CD123と特異的に結合するが、7G3とは異なり、それらはIL-3R α 機能をブロックしない³³。これはまた、7G3とは異なり、6H6および9F5が双方とも、試験された最高用量でもCD131 (β c) チロシンのリン酸化、STAT-5のリン酸化およびAktのリン酸化を含むIL-3誘導シグナル伝達を阻害できなかったことを図6aに明白に示している。6H6および9F5はそれでも、この実験においてBMへのAML細胞のホーミングを少なくとも7G3と同様に強力に阻害したことを図10は示している。

【0105】

ホーミングの阻害に関する7G3の効果に対するFcドメインの寄与は、7G3および6H6双方のF(ab)'₂断片を試験することによって評価された。抗体F(ab)'₂断片は、Fcエフェクター免疫グロブリンドメインを欠いており、ADCCまたはCDC応答を誘発できない。図10はまた、この実験において7G3および6H6双方のF(ab)'₂断片が、AML細胞ホーミングを阻害しなかったことを示しており、双方の抗体のFcドメインが、骨髄へのAML細胞のホーミング阻害にとって重要であることを示している。

【0106】

抗IL-3R α 抗体のFcドメインは、AML細胞の骨髄移植および再増殖能力の阻害に有意に寄与する。

次にIL-3R α の中和およびレシビエントマウスの骨髄内へのAML細胞の移植阻害のためのエフェクター活性の寄与を評価するために、この実験を拡張した。2人のAML患者のサンプルを、10 μ g/mLの濃度で種々の無処置抗体および抗体断片を37℃で2時間エキソピボ処置をした。インキュベーション後、細胞を遠心分離して未結合の抗体

10

20

30

40

50

を除去し、致死量以下の放射線照射したNOD／SCIDマウスに移植した。ヒトAMLの移植レベルを、移植4週後のマウスの骨髄におけるhuCD45陽性細胞のパーセンテージを評価することによって分析した。図11aおよび11bに示されるように、予想したとおり7G3は、AML患者サンプル双方のNOD／SCIDマウスへの移植を有意に阻害した。ホーミングに対する効果と一致して、9F5もまた、患者サンプル双方のAML細胞移植を強力に阻害した。興味深いことに、図11aは、患者サンプルAML-9に関して、7G3および9F5双方のF(ab)'₂断片は、有意に減少した阻害能力を示したが、移植を対照抗体で見られたレベルに完全に戻すことができなかったことを示している。対照的にサンプルAML-10に関して、双方のF(ab)'₂断片の阻害効果は無かった。

【0107】

10

考察

これらの結果をまとめると、7G3がIL-3R α 機能を中和する能力に加えて、7G3のFcドメインもまた、AML細胞のホーミングと移植能力の阻害にとって重要であることが示されている。Fcドメインが無いと、CD123に対する抗体は、NOD／SCIDマウスにおけるAML-LSCのホーミング、滞留、および再増殖を阻害する能力を喪失する。

【実施例4】

【0108】

実施例4

抗体のエフェクター機能活性を増加させるための多くの方法が記載されている。これらの方法は、関連するFc受容体との相互作用を増強し、抗体依存細胞媒介細胞障害性(ADCC)および抗体依存細胞媒介食作用(ADCP)を促進させる可能性を増加させるために、抗体のFc領域のアミノ酸改変を含み得る^{34,35}。Fc領域における保存Asn²⁹⁷におけるIgG1抗体に共有結合したオリゴ糖の改変に続いてADCC活性における増強もまた記載されている³⁴。Lee13細胞におけるヒトIgG1抗体発現のさらなる研究において³⁶、他の点では正常なオリゴ糖にフコースを添加させる能力を欠いている変異体のチャイニーズハムスター卵巣細胞株は、ヒトFc γ RIIIAに50倍まで改善された結合性を有しADCC活性の改善されたフコース欠失抗体を生じた。

20

【0109】

脱フコシル化抗体を生成させる代替りのアプローチもまた、一定のグリコシダーゼ阻害剤の存在下、抗体発現細胞の培養を介して記載されている⁵³。この研究において、目的の抗体を発現するCHO細胞を強力な α -マンノシダーゼI阻害剤であるキフネンシン(kifunensine)の存在下で培養し、フコースを含有していないオリゴマンノースタイプのグリカン類を有するIgG類の分泌が生じた。これらの抗体は、FcRに関する親和性の増加およびADCC活性の増強を示した。

30

【0110】

本実施例では、Fc操作または脱フコシル化を介して増強されたADCC活性を有するCSL360変種の作出および試験を記載している。

【0111】

方法

40

CSL360の一過性の発現およびFc最適化CSL360に関する哺乳動物の発現ベクター構築

マウス抗CD123抗体7G3の軽鎖および重鎖双方の可変領域に関する遺伝子を、総7G3からクローン化した。1B8ハイブリドーマRNAは、製造元の取扱説明書に従ってNucleoSpin RNA IIキット(BD Bioscience)を用いて単離した。第一鎖cDNAは、SMART RACE Amplificationキット(Clontech)を用いて合成し、可変領域は、プルーフリーディングDNAポリメラーゼ、Plantinum(登録商標)Pfx DNAポリメラーゼ(Invitrogen)を用いてRACE-PCRにより増幅させた。可変重鎖領域に対して用いられたプライマーは、UPM(Universal Primer Mix、DB Bios

50

c i e n c e) およびMH2a (5' AATAACCCCTTGACCAAGGCATCCTA3')であった。同様に、可変軽鎖領域は、UPMおよびMK (5' CTGAGGCA CCTCCAGATGTTAACT3')を用いて増幅された。標準的な分子生物学的技法を用いて、重鎖可変領域は；a) ヒトIgG1定常領域を含むように改変されたpcDNA3.1 (+) 発現ベクター (Invitrogen) に基づいた哺乳動物発現ベクターpcDNA3.1 (+) -hIgG1、またはb) pcDNA3.1 (+) -hIgG1_{S239D/A330L/I332E}、またはc) pcDNA3.1 (+) -hIgG1_{S239D/I332E}にクローン化された。b) およびc) に使用されたベクターは、有意に改善されたADCC活性を有する抗体を生じることが報告されているアミノ酸変異を組み入れるタンパク質をコードする³⁵。これらのアミノ酸変異は、QuickChange変異誘発技法 (Stratagene) を用いて導入された。軽鎖可変性領域は、ヒトカッパ定常領域を含むように改変されたpcDNA3.1 (+) 発現ベクターに基づいた発現ベクターpcDNA3.1 (+) -hκにクローン化された。

【0112】

細胞培養

FreeStyle (商標) 293-F細胞は、Invitrogenから入手した。ペニシリン/ストレプトマイシン/ファンギゾーン剤 (Invitrogen) を添加したFreeStyle (商標) 発現用培地 (Invitrogen) 中で細胞を培養した。トランスフェクション前に、細胞を8% CO₂の雰囲気中で37℃に維持した。

【0113】

一過性トランスフェクション

FreeStyle (商標) 293-F細胞を用いる発現プラスミドの一過性トランスフェクションは、製造元の取扱説明書に従って293フェクチンのトランスフェクション剤 (Invitrogen) を用いて実施した。軽鎖および重鎖発現ベクターを合わせて、FreeStyle (商標) 293-F細胞に共トランスフェクトした。細胞 (1000 ml) を、 1×10^6 個の生存細胞/mLの最終濃度でトランスフェクトし、2/10 Wave Bioreactorシステム2/10または20/50 (Wave Biotech/GE Healthcare) 上で8% CO₂の雰囲気下、37℃で5日間Cellbag 2L (Wave Biotech/GE Healthcare) 中でインキュベートした。トランスフェクション4時間後にPluronic (登録商標) F-68 (Invitrogen) を、0.1% v/vの最終濃度で加えた。トランスフェクション24時間後に、細胞培養物を、0.5% v/vの最終濃度にTryptone N1 (Organotechnie, France) を添加した。次いで細胞培養上澄液を、精製前にMillistak+PODフィルター (Millipore) を通する過により採取した。

【0114】

キフネンシン処理

脱フコシル化抗体の産生のために、指示されたキフネンシン (Tronto Research Chemicals) を記載されたとおりに⁵³、0.5 μg/mLの最終濃度で一過性にトランスフェクトされたFreeStyle (商標) 293-F細胞の培養培地 (トランスフェクション24時間後) に加えた。

【0115】

タンパク質発現の分析

5日後、20 μlの培養物上澄液を、4~20%のトリス-グリシンSDSポリアクリルアミドゲル上での電気泳動に供し、クーマシーブルー試剤で染色することにより可視化した。

【0116】

抗体精製

実施例2に記載されたキメラCSL360に加えて、本実施例においてはCSL360のヒト化変種 (hCSL360) の使用もまた記載している。これは、7G3からのマウ

スCDR領域を、好適なヒト可変性フレームワーク領域に移植した標準的なCDR移植技法により産生した⁵⁴。得られたヒト化抗体は、完全にヒトフレームワーク配列を含有する。ヒト化過程の結果、CD123に対するMAb親和性は、中等度に減少したが(CSL360およびhCSL360に関して、それぞれ1.06nM対12.8nMのKD値を示す)、結合特異性は変化せず、IL-3依存TF-1細胞増殖により測定すると、hCSL360は、強力なCd123中和活性を保持した(CSL360およびhCSL360に関して、それぞれ5nM対19nMのIC₅₀値を示す)。標準的なリボソームベースの変異誘発⁵⁵を用いる親和性の最適化を使用して、親マウスのMAb7G3およびキメラCSL360に少なくとも等しいレベルにhCSL360の結合親和性を回復させた。同等のCD123結合親和性および親MAbに対するCD123の中和活性(CD123への結合に関して0.6nMのKDおよび6nMのIL-3中和IC₅₀を示す)を示した、親和性を最適化したMAbクローンを産生した(168-26)。3つのアミノ酸置換S239D/A330L/I332E(168-26Fc3)または2つのアミノ酸置換S239D/I332E(168-26Fc2)を有するIgG1Fcドメインを含有するこのクローンのFc操作誘導体はまた、hCSL360に関して上記のとおり産生した。

【0117】

非改変キメラCSL360、ヒト化変種(hCSL360)およびADCC最適化およびヒト化CSL360_{S239D/I332E}(hCSL360Fc2)とCSL360_{S239D/A330L/I332E}(hCSL360Fc3)およびキフネンシン処理細胞から誘導された材料を、30mLのPoly-Prep空カラム(Bio-Rad、CA)内にパックされたMab Select樹脂(5mL、GE Healthcare、UK)を有するタンパク質Aアフィニティークロマトグラフィーを用いて4℃で精製した。最初にこの樹脂を、10カラム容量のパイロジェン無しのGIBCO蒸留水(Invitrogen、CA)で洗浄して貯蔵エタノールを除去し、次いで5カラム容量のパイロジェン無しのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(GIBCO PBS、Invitrogen、CA)で平衡にした。次いでろ過した調整細胞培養培地(1L)を樹脂上に重力を与えて装填した。次に樹脂を、5カラム容量のパイロジェン無しのPBSで洗浄して非特異的タンパク質を除去した。結合抗体を、2カラム容量の0.1MのグリシンpH2.8(Sigma、MO)で溶出させ、低pHを中和するために0.2カラム容量の2Mトリス-HCl pH8.0(Sigma、MO)を含有するフラクションに入れた。溶出された抗体は、5LのPBSに対して12mLのSlide-A-Lyzerカセット分子量カットオフ3.5kD(Pierce、IL)中、4℃で18時間透析した。抗体の濃度は、Ultraspec 3000(GE Healthcare、UK)分光計を用い、280nmにおける吸光度を測定することにより決定した。抗体の純度は、還元性サンプル緩衝液(Invitrogen、CA)中2μgのタンパク質をNovex10~20%のトリスグリシンSDS操作作用緩衝液を用いてXcell SureLock Mini-Cell(Invitrogen、CA)内で90分間印加したSDS-PAGEにより分析してから、製造元の取扱説明書に従ってクーマシー染色を用いて可視化した。

【0118】

結果

野生型CSL360およびFc操作CSL360変種のADCC試験

種々の変異抗体のエフェクター活性を試験するために、CD123発現CTL細胞株を、標的細胞株を用い、エフェクター細胞源として正常なPBMCの存在下、実施例2に概説されたカルセインAM放出アッセイを用いてADCC活性を評価した。図12は、CTL細胞株のADCC特異的細胞溶解を誘導する能力に関して、キメラCSL360とヒト化変異(hCSL360)抗体ならびにFc改変変種hCSL360Fc2とhCSL360Fc3の比較を示している。キメラCSL360ならびにFcドメインの改変なしのヒト化変種の双方が、CTL細胞株(5~10%の標的細胞溶解)に対してADCCを誘導する能力は検出可能性を有したが、中等度であり、実施例2に概説さ

れた知見と一致していることをデータは示している。改変Fcドメインを有する変種hCSL360Fc2とhCSL360Fc3の双方は、Fc非改変抗体と同じ濃度で試験した場合に見られる50～60%の標的細胞溶解でCTL EN標的細胞のADCC特異的溶解を誘発する能力が有意に増強されたことを示した。

【0119】

Fc受容体に対する結合に関するCSL360、Fc操作CSL360変種および脱フコシル化CSL360の試験

既述されたように、抗体Fcエフェクター機能は、生来の免疫系の種々のエフェクター細胞上に発現したFcガンマ受容体(FcγR)への結合を介して媒介される³⁷。

【0120】

FcγRへの結合増強に関する抗体の最適化により、エフェクター細胞のより大きな活性化および抗体被覆腫瘍細胞のより多くの死滅を生じる。

hCSL360、Fc操作変種のhCSL360Fc2とhCSL360Fc3、キプネシン処理により産生した脱フコシル化hCSL360(hCSL360kif)に対する種々のヒトFcγRの相対的親和性を、BIAcore A100バイオセンサーで測定した。種々の抗体は個々に、CD123と結合したCM5 BIAcoreチップ上で捕捉された。0.3nMから800nMの範囲の濃度で可溶性FcγR類(huFcγRI、huFcγRIIb/cおよびhuFcγRIIIa(R & D Systemsから入手))は、それぞれの表面上でフローさせ、親和性の測定は、動態学的モデルおよび/または定常状態モデルにデータを適合させることによって判定した。

【0121】

図13Aは、huFcγRI、huFcγRIIb/cおよびhuFcγRIIIaに結合に関してhCSL360に比してhCSL360Fc2、hCSL360Fc3およびhCSL360kifの親和性(KA)を比較している。その結果は、hCSL360Fc2およびhCSL360Fc3に関して概して同様であり、huFcγRIおよびhuFcγRIIb/cへの結合に関してhCSL360に比してKAがおおよそ15～35倍の増加を有する。結合について最も著しい増加は、親和性が約100倍増加したhuFcγRIIIaに見られた。hCSL360kifの親和性の絶対的増加倍数は、Fc操作変種よりも少なかったが、huFcγRI(0.75倍)およびhuFcγRIIb/c(2.6倍)と比較して、huFcγRIIIaでは同様のパターンが見られ、やはり最大の改善倍数(約5倍)を示した。

【0122】

最近の研究では、絶対的な親和性よりも、IgG親和性における高い活性/阻害(A/I)(FcγRIII:huFcγRIIb)比が、最大抗体媒介エフェクター活性にとって重要であることが示されている⁵⁶。FcγRIII:huFcγRIIに関するhCSL360変種の親和性の比率として表されるデータを図13bに示してある。全ての変種が、hCSL360kif、hCSL360Fc2およびhCSL360Fc3に関して、hCSL360に比してそれぞれ約2倍、約4倍、および約3倍の増加でA/I比の増加を示した。

【0123】

予想されたとおり、種々のhCSL360Fc増強変種は、FcγR変種に対して親和性増加を示し、活性対阻害FcγR変種に関してはより大きな効果を有することがこれらのデータにより確認される。

【0124】

考察

Fc操作および脱フコシル化CSL360変種は、FcγRに対して有意に増加した親和性およびA/I結合比ならびにインビトロでの改善されたADCCエフェクター活性を実証することが本実施例で示された。この結果、AMLのマウスモデルにおける抗CD123抗体の治療効果に対するエフェクター機能活性にとって重要な役割を示す実施例1および3に提供されたデータと共にまとめると、エフェクター機能増強変種の抗CD123

抗体療法は、ヒト患者におけるAMLおよび他のCD123陽性白血病の治療に関して恐らく改善された治療活性を示し得ることが強く示唆される。

【実施例5】

【0125】

実施例5

本実施例において、CD123を発現させるために操作された細胞株ならびに固有のCD123を発現するヒト白血病細胞株に対するADCC活性増強に関して、種々のFc増強抗体を試験した。Fc増強MAb類もまた、AMLおよびALL患者からの一次白血病サンプル群に対してエキソピボADCCアッセイを用いて試験した。

【0126】

方法

乳酸デヒドロゲナーゼ放出アッセイを用いるADCCの測定

ADCCは、記載されたとおり³⁵、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)放出アッセイを用いて測定した。LDHは、細胞溶解の際に放出される安定なサイトゾル酵素である。LDHが特定の基質を赤色産物に変換させる比色アッセイを用いて、培養培地に放出されたLDHを測定する。細胞溶解は、放出されたLDHとして測定され、形成された着色度に直接比例する。CD123を発現する標的細胞を、ADCCに対するエフェクター細胞として用いられたNK細胞の存在下、抗CD123抗体の量を変えてインキュベートした。NK細胞は、Miltenyi BiotecのNK単離キット(カタログ番号130-092-657)を用いて正常なバフィーパックから精製した。5%CO₂の存在下、37℃で4時間細胞をインキュベートした。抗体またはNK細胞の無い標的細胞を、自然発生LDH放出(バックグラウンド)対照として用い、細胞溶解用緩衝液で溶解された標的細胞を、最大細胞溶解対照として用いた。培養培地に放出されたLDHは、製造元の取扱説明書に従ってPromega's Cytotox 96(登録商標)の非放射性細胞障害性アッセイキットを用いて測定した。

【0127】

他の方法は全て、先の実施例に記載されたとおりである。

【0128】

結果

図14は、CD123を発現させるために操作されたヒトリンパ芽球腫ラージ細胞に対するADCC活性に及ぼす種々のCSL360誘導抗体の効果を調べている。低レベルのCD123(約4,800の受容体/細胞)を発現する安定なクローン(ラージCD123低)(図14aおよび14b)または高レベルのCD123(約24,400の受容体/細胞)を発現する独立したクローン(ラージCD123高)(図14cおよび14d)を、これらの実験に用いた。25:1および50:1のエフェクター対標的細胞比を用いた。一貫して、hCSL360Fc3およびhCSL360kifは、親のhCSL360抗体と比較してラージCD123低およびラージCD123高双方に対して有意に改善されたADCC活性を示した。50:1のE:T比でhCSL360Fc3およびhCSL360kifは双方とも、低濃度(約1ng/mL)抗体でラージCD123高の標的細胞のほぼ完全な溶解を達成した。ラージCD123低細胞では等しい効果のために、量がおよそ1桁多い抗体を必要とした。興味深いことに、hCSL360と比較して、キメラCSL360誘導ADCCは、(Fc増強変種よりも低レベルにもかかわらず)わずかにより著しかった。このことは、先に考察されたようにヒト化処置から得られたキメラMAbと比較して、CD123結合に関するヒト化変種に対する親和性が約10倍減少するためと考えられる。

【0129】

図15aは、標的細胞としてのCD123を自然に発現するTF-1ヒト白血病細胞を用いた今回の上記実験の反復したものを示している。hCSL360Fc3変種は、やはりhCSL260Fc3およびhCSL360kifにより効力はより小さいが有意に改善されたADCCを示し、Fc非最適化hCSL360と比較して活性増加も示した。

【0130】

図15bは、TF-1細胞において、ヒト化され親和性最適化された抗CD123抗体変種168-26およびそのFc増強誘導体169-26Fc3および169-26Fc2の活性を比較している。この図面におけるデータは、Fc操作が、ヒト化のみの変種(hCSL360)で見られたものと同様に、ヒト化され親和性最適化された168-26変種のADCC活性を改善したことを示している。

【0131】

次に、種々のFc増強hCSL360変種に関する活性を、5人のAML患者(図16a~e)および2人のALL患者(図16f~g)から一次白血病細胞サンプル群に対して比較した。これら一次患者サンプルにおける結果は、ADCC活性に関する効力のランク順序がhCSL360Fc3 $\geq$ 168-26Fc3>hCSL360Fc2 $\geq$ hCSL360kif>>CSL360 $\geq$ 168-26 $\geq$ hCSL360である細胞株を用いて得られたものと同様であった。重要なこととして、Fc最適化変種は、試験した一次患者サンプルの全てにおいて一貫してADCCを誘導した。5つのAMLサンプルの全ておよび双方のALLサンプルが、Fc最適化変種により有意により高いレベルのADCCを示したが、一方、Fc最適化のない変種では、AMLサンプルのうちの3つだけが、弱い応答を示した。全てのサンプルはいずれも、Fc非最適化変種MAb類に対しては有意なADCC応答を示さなかった。

【0132】

これらのデータは、CSL360処理が、4/6AMLサンプルおよび0/2ALLサンプルにおいて、種々のADCC方法論により評価した際に、低いADCC活性を誘導した実施例2に説明された結果と一致している。

【0133】

考察

実施例5におけるデータにより、CD123MAbのFc最適化は、エキソビボアッセイで試験された一次白血病サンプルの全てに対して有意なエフェクター機能応答がもたらされ、Fc非最適化抗CD123MAbと比較して有意な改善を表すことを示している。

【0134】

CD123を発現するALL腫瘍によるこれらの知見は、AMLに加えてCD123を発現する他の悪性疾患もまた、Fcエフェクター機能を増強させた抗CD123MAb療法に対して恐らく感受性であるという考えと一致する^{57~61}。

【実施例6】

【0135】

実施例6

実施例4および5に記載された結果により、Fcエフェクター機能を増強させたCSL360変種が、CD123を発現させるために操作された細胞株、CD123を固有に発現するヒト白血病細胞株の群、および重要なこととして、AML患者またはALL患者から採取された一次白血病サンプルを用いたエキソビボアッセイにおいてもインビトロでのADCC活性増加を提示することを示している。このエキソビボ設定における試験によりヒト疾患設定において効力の可能性に何らかの予測が可能になるので、AML患者およびALL患者双方の一次サンプルに対するエキソビボADCCのデータは、特に重要である。

【0136】

本実施例では、NOD/SCIDマウスのヒトALL異種移植モデルにおける治療的効力に関してCSL360のFc操作変種(168-26Fc3)を試験するために実験を拡張している。これは、ALL臨床疾患を正確に反映し、患者成績と有意に相関することが示されている前臨床モデルである⁶²。このモデルの臨床関連性は、十分に認識されており、現在、the National Cancer Institute主導：the Pediatric Preclinical Testing Programの不可欠な部分である⁶³。

10

20

30

40

50

【0137】

方法

以前に記載されたように⁶²、小児ALL患者に由来するヒトALL白血病細胞（ALL-2）を、メスの非肥満糖尿病（NOD）／scid-マウスに静脈内接種することにより伝播させた。この異種移植は、通常のCD10⁺B細胞前駆体ALLと診断された65ヶ月齢の女性の3回目の再発に由来した。この患者は疾患のため死亡し、この異種移植は従来の化学療法に耐性である⁶²。マウスを各々6～7匹の処置群と対照群とに無作為化して、処置開始時に全ての群にほぼ等しい中央値の白血病負荷を与えた。全てのマウスを隔壁条件下で維持し、the Committee and the Animal Care and Ethics Committee of the University of New South Walesにより承認されたプロトコルと条件を用いて実験を実施した。ヒトCD45陽性（hCD45+）細胞のパーセンテージは、以前に記載されたとおりに決定した⁶²。

10

【0138】

GraphPad Prism 4.0aを用いて実施された正確なログランク検定を用いて、治療群と対照群との間の無事象の生存率分布を比較した。P値は、両側であり、試験の探索的性質を与えられた多重比較に関して調整しなかった。

【0139】

処置は、移植後34日目に開始し、マウスは、リン酸緩衝生理食塩水に溶解した抗体の100μL当り300μgの処置を受けた。腹腔内注射により1週当たり3回（2～3日ごとに）投与の抗体を投与した。白血病負荷は、毎週マウスの尾静脈出血によりモニターした。事象が及ぶまで処置を継続し、末梢血において25%のhCD45+負荷として規定した。

20

【0140】

結果

図17は、無関連のMAb対照（マウスIgG2a）、マウスMAb7G3、ヒト化して親和性最適化した変種168-26および後者のFc操作変種168-26Fc3を含む種々の抗体に関してALL移植マウスに及ぼす効果を調べている。この図面は、各々の処置群に関する無事象の生存（EFS）のKaplan-Meier曲線を示しており、各垂直線は事象を表している。対照MAbで処置されたマウスは、7G3、168-26および168-26Fc3に対してそれぞれ56.3日、59.9日および65.7日と比較して、53.5日の中央値EFSを示した。この結果では、7G3および168-26は、それぞれ2.9日および6.4日、白血病増殖の進行を遅らせたが、この効果は、対照MAbと比較して統計的に有意ではなかった（ $P > 0.05$ ）ことを示している。168-26Fc3は、対照処置マウスと比較して統計的に有意な12.2日の白血病増殖遅延（ $P = 0.044$ ）を有し、ALLの増殖に対して最も著しい効果を示した。重要なこととして、Fc操作変種168-26Fc3対168-26（Fc改変無しの同じMAb）のEFS効果の増加は統計的に有意であり（ $P = 0.037$ ）、5.9日の白血病増殖遅延であった。このことにより、Fcエフェクター機能を増強させた抗CD123抗体が、インビボ治療効力の改善を示すことを示している。

30

40

【0141】

結論

これらのデータは、予め確立された白血病を有するマウスにおいて増強させたFcエフェクター機能を有する抗CD123MAb類が、Fc非改変MAb類と比較して治療の効力を改善したことを示している先の実施例に供されたものをかなり拡張している。重要なこととして、ヒト疾患の過程を予測することが示されているALLの前臨床的に実証されたモデル⁶²の使用により、このようなFc最適化抗CD123MAb類もまた、白血病患者における臨床的効力の改善をも示し得ることが強く裏付けられている。

【0142】

参考文献

50

1. Wang, J. C. & Dick, J. E. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* (2005).
2. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3, 730-737 (1997).
3. Hope, K. J., Jin, L. & Dick, J. E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol*. 5, 738-743 (2004). 10
4. Lapidot, T., et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648 (1994).
5. Guan, Y. & Hogge, D. E. Proliferative status of primitive hematopoietic progenitors from patients with acute myelogenous leukemia (AML). *Leukemia* 14, 2135-2141 (2000). 20
6. Guzman, M. L., et al. Nuclear factor- κ B is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 98, 2301-2307 (2001).
7. Lowenberg, B., Griffin, J. D. & Tallman, M. S. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 82-101 (2003). 30
8. van Rhenen, A., et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res* 11, 6520-6527 (2005).
9. Morgan, M. A. & Reuter, C. W. Molecularly targeted therapies in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Ann Hematol* 85, 139-163 (2006).
10. Tallman, M. S. New agents for the treatment of acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 19, 311-320 (2006). 40
11. Aribi, A., Ravandi, F. & Giles, F. Novel agents in acute myeloid leukemia. *Cancer J*. 12, 77-91 (2006).
12. Abutalib, S. A. & Tallman, M. S. Monoclonal antibodies for the treatment of acute myeloid leukemia. *Curr Pharm Biotechnol*. 7, 343-369 (2006). 50

13. Stone, R. M. Novel therapeutic agents in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 35, 163-166 (2007).
14. Krug, U., et al. New molecular therapy targets in acute myeloid leukemia. *Recent Results Cancer Res.* 176, 243-262 (2007).
15. Miyajima, A., Mui, A. L., Ogorochi, T. & Sakamaki, K. Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5. *Blood* 82, 1960-1974 (1993). 10
16. Bagley, C. J., Woodcock, J. M., Stomski, F. C. & Lopez, A. F. The structural and functional basis of cytokine receptor activation: lessons from the common beta subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors. *Blood* 89, 1471-1482 (1997). 20
17. Munoz, L., et al. Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica* 86, 1261-1269 (2001).
18. Sperr, W. R., et al. Human leukaemic stem cells: a novel target of therapy. *Eur J Clin Invest.* 34 Suppl 2, 31-40 (2004).
19. Graf, M., et al. Expression and prognostic value of hemopoietic cytokine receptors in acute myeloid leukemia (AML): implications for future therapeutic strategies. *Eur J Haematol.* 72, 89-106 (2004). 30
20. Florian, S., et al. Detection of molecular targets on the surface of CD34+/CD38-- stem cells in various myeloid malignancies. *Leuk Lymphoma* 47, 207-222 (2006).
21. Testa, U., et al. Elevated expression of IL-3Ralpha in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis. *Blood* 100, 2980-2988 (2002). 40
22. Riccioni, R., et al. Immunophenotypic features of acute myeloid leukemias overexpressing the interleukin 3 receptor alpha chain. *Leuk Lymphoma* 45, 1511-1517 (2004). 50

23. Yalcintepe, L., Frankel, A. E. & Hogge, D. E. Expression of interleukin-3 receptor subunits on defined subpopulations of acute myeloid leukemia blasts predicts the cytotoxicity of diphtheria toxin in interleukin-3 fusion protein against malignant progenitors that engraft in immunodeficient mice. *Blood* 108, 3530-3537 (2006).
24. Hauswirth, A. W., et al. Expression of the target receptor CD33 in CD34+/CD38-/CD123+ AML stem cells. *Eur J Clin Invest* 37, 73-82 (2007). 10
25. Jordan, C. T., et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 14, 1777-1784 (2000).
26. Budel, L. M., Touw, I. P., Delwel, R., Clark, S. C. & Lowenberg, B. Interleukin-3 and granulocyte-monocyte colony-stimulating factor receptors on human acute myelocytic leukemia cells and relationship to the proliferative response. *Blood* 74, 565-571 (1989). 20
27. Salem, M., et al. Maturation of human acute myeloid leukaemia in vitro: the response to five recombinant haematopoietic factors in a serum-free system. *Br J Haematol.* 71, 363-370 (1989). 30
28. Delwel, R., et al. Growth regulation of human acute myeloid leukemia: effects of five recombinant hematopoietic factors in a serum-free culture system. *Blood* 72, 1944-1949 (1988).
29. Miyauchi, J., et al. The effects of three recombinant growth factors, IL-3, GM-CSF, and G-CSF, on the blast cells of acute myeloblastic leukemia maintained in short-term suspension culture. *Blood* 70, 657-663 (1987). 40
30. Pebusque, M. J., et al. Recombinant human IL-3 and G-CSF act synergistically in stimulating the growth of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 3, 200-205 (1989).
31. Vellenga, E., Ostapovicz, D., O'Rourke, B. & Griffin, J. D. Effects of recombinant IL-3, GM-CSF, and G-CSF on proliferation of leukemic clonogenic cells in sh 50

- ort-term and long-term cultures. Leukemia 1, 584-589 (1987).
32. Testa, U., et al. Interleukin-3 receptor in acute leukemia. Leukemia 18, 219-226 (2004).
33. Sun, Q., et al. Monoclonal antibody 7G3 recognizes the N-terminal domain of the human interleukin-3 (IL-3) receptor alpha-chain and functions as a specific IL-3 receptor antagonist. Blood 87, 83-92 (1996). 10
34. Niwa, R., et al. IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn²⁹⁷-linked oligosaccharides. J. Immunol. Methods, 306, 151-160 (2005).
35. Lazar, G. A., et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 4005-4010 (2006). 20
36. Shields, R. L., et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RII and antibody dependent cellular toxicity. J. Biol. Chem., 277:26733-26740 (2002).
37. Desjarlais et al Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. Drug Discov Today. 2007 Nov; 12(21-22):898-910). 30
38. Mazurier, F., Doedens, M., Gan, O. I. & Dick, J. E. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. Nat Med. 9, 959-963 (2003).
39. Lopez, A. F., et al. Recombinant human interleukin-3 stimulation of hematopoiesis in humans: loss of responsiveness with differentiation in the neutrophilic myeloid series. Blood 72, 1797-1804 (1988). 40
40. Guthridge, M. A., et al. The phosphoserine-585-dependent pathway of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors mediates hematopoietic cell survival through activation of NF-kappaB and induction of bcl-2. Blood 103, 820-827 (2004).
41. Guthridge, M. A., et al. Site-specific 50

- serine phosphorylation of the IL-3 receptor is required for hemopoietic cell survival. *Mol Cell* 6, 99-108 (2000).
42. Tanaka, T., et al. Selective long-term elimination of natural killer cells in vivo by an anti-interleukin 2 receptor beta chain monoclonal antibody in mice. *J Exp Med*. 178, 1103-1107 (1993).
43. McKenzie, J. L., Gan, O. I., Doedens, M. & Dick, J. E. Human short-term repopulating stem cells are efficiently detected following intrafemoral transplantation into NOD/SCID recipients depleted of CD122+ cells. *Blood* 106, 1259-1261 (2005). 10
44. Dick, J. E. & Lapidot, T. Biology of normal and acute myeloid leukemia stem cells. *Int J Hematol*. 82, 389-396 (2005).
45. Kollet, O., et al. Rapid and efficient homing of human CD34 (+) CD38 (-/low) CXCR4 (+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m (null) mice. *Blood* 97, 3283-3291 (2001). 20
46. Lapidot, T., Dar, A. & Kollet, O. How do stem cells find their way home? *Blood* 106, 1901-1910 (2005).
47. Hogge, D. E., Feuring-Buske, M., Gerhard, B. & Frankel, A. E. The efficacy of diphtheria-growth factor fusion proteins is enhanced by co-administration of cytosine arabinoside in an immunodeficient mouse model of human acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 28, 1221-1226 (2004). 30
48. Feuring-Buske, M., Frankel, A. E., Alexander, R. L., Gerhard, B. & Hogge, D. E. A diphtheria toxin-interleukin 3 fusion protein is cytotoxic to primitive acute myeloid leukemia progenitors but spares normal progenitors. *Cancer Res*. 62, 1730-1736 (2002). 40
49. Du, X., Ho, M. & Pastan, I. New immunotoxins targeting CD123, a stem cell antigen on acute myeloid leukemia cells. *J Immunother* (1997) 30, 607-613 (2007).
50. Jenkins et al., A Cell Type-specific Constitutive Point Mutant of the Common-Subunit of the Human Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF), Interleukin (IL)-3, and IL-5 Receptors Requires the GM-CSF Receptor -Subunit fo 50

r Activation. J Biol Chem, 1999 274:13, 8669-8677)

51. Fischer, Lars, Olaf Penack, Chiara Gentilini, Axel Nogai, Arne Muessig, Eckhard Thiel and Lutz Uharek. The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells. Exp Hematol. 34: 753-759 (2006)

10

52. Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L and Facchini A. Calcein-Acetoxymethyl cytotoxicity assay: standardisation of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. Clinical and Diagnostic Lab Immunol. 8:1131-1135 (2001)

53. Zhou et al, Development of a simple and rapid method for producing non-fucosylated oligomannose containing antibodies with increased effector function. Biotechnol Bioeng. 2008 99(3):652-65)

20

54. Tan, P., et al, "Superhumanized" Antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity-determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28. 2002 J Immunol. 169, 1119-1125)

55. Kopsidas, G., et al, RNA mutagenesis yields highly diverse mRNA libraries for in vitro protein evolution. 2007 BMC Biotechnol. 7, 18)

30

56. Nimmerjahn and Ravetch, Divergent immunoglobulin subclass activity through selective Fc receptor binding. Science 2005 310(5753):1510-2).

57. Feuillard et al, Clinical and biological features of CD4(+)CD56(+) malignancies Blood 2002 99(5):1556-63

58. Munoz et al, Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies Haematologica 2001 86(12):1261-9

40

59. Lhermitte et al, Most immature T-ALLs express Ra-IL3 (CD123): possible target for DT-IL3 therapy. Leukemia 2006 20(10):1908-10

60. Aldinucci et al, The role of interleukin-3 in classical Hodgkin's disease. Leuk Lymphoma 2005 46(3):303-11

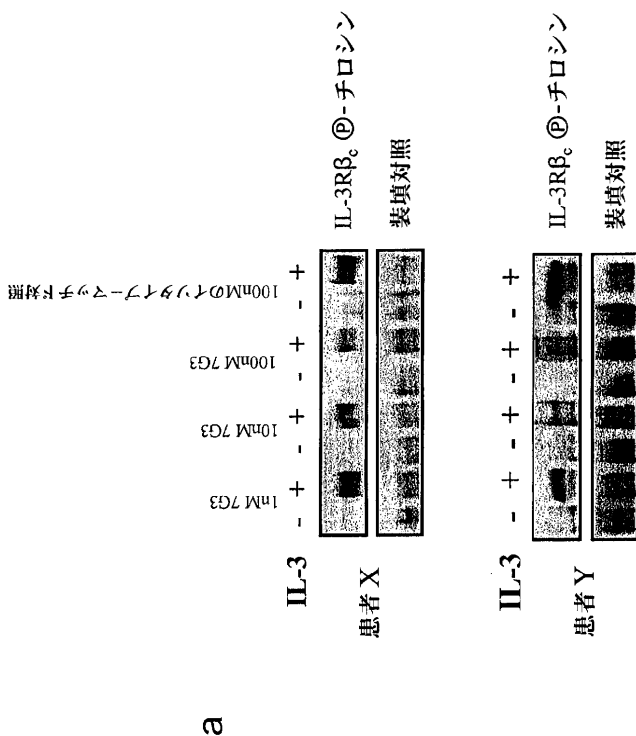
50

61. Jiang et al, Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci USA. 1999 26; 96 (22) : 12804-9)
62. Liem et al, Characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia xenograft models for the preclinical evaluation of new therapies Blood 2004; 103 (10) : 3905-14)
63. Houghton et al, Testing of New Agents in Childhood Cancer Preclinical Models. Clinical Cancer Research. 2002; 8 : 3646-3657)

10

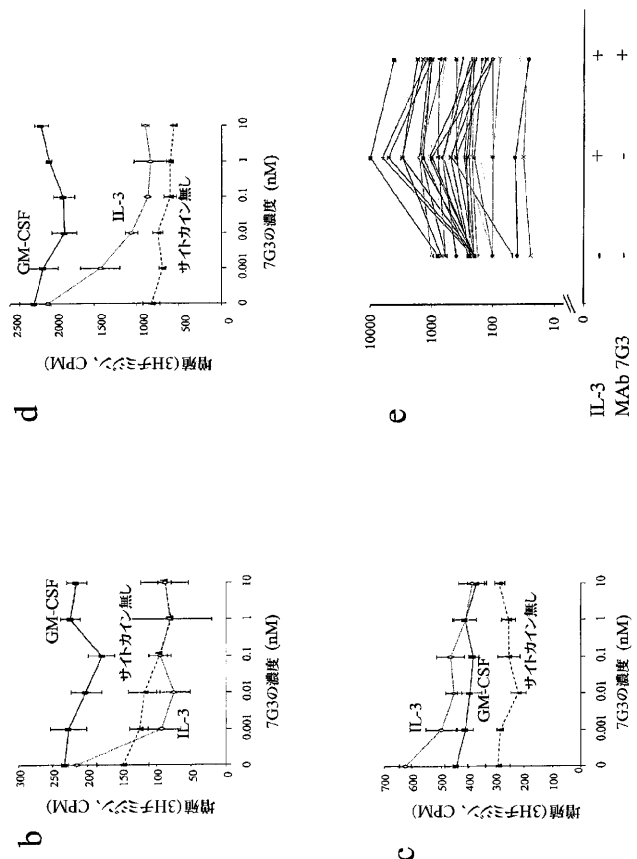
【図 1 a】

Figure 1a



【図 1 b - e】

Figure 1b-e



【図 2】

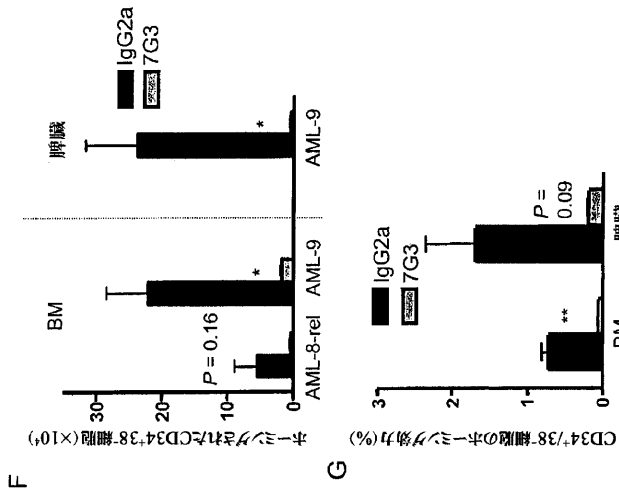


Figure 2

【図 2 a】

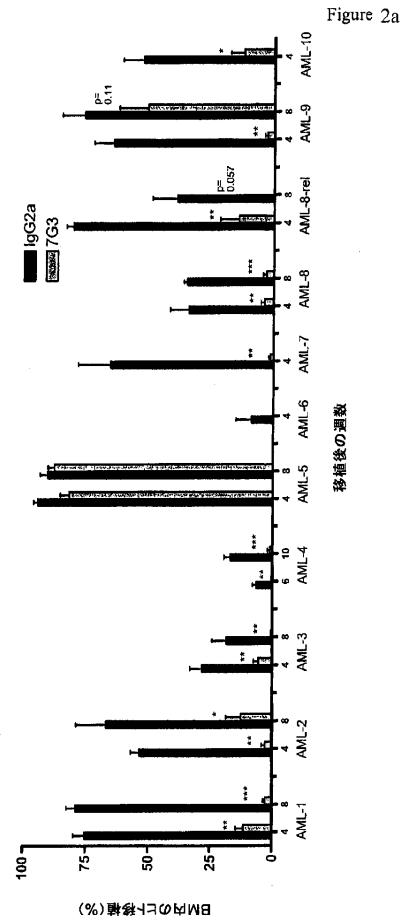
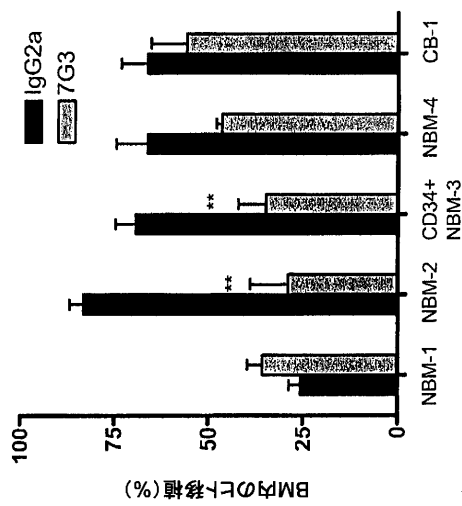


Figure 2a

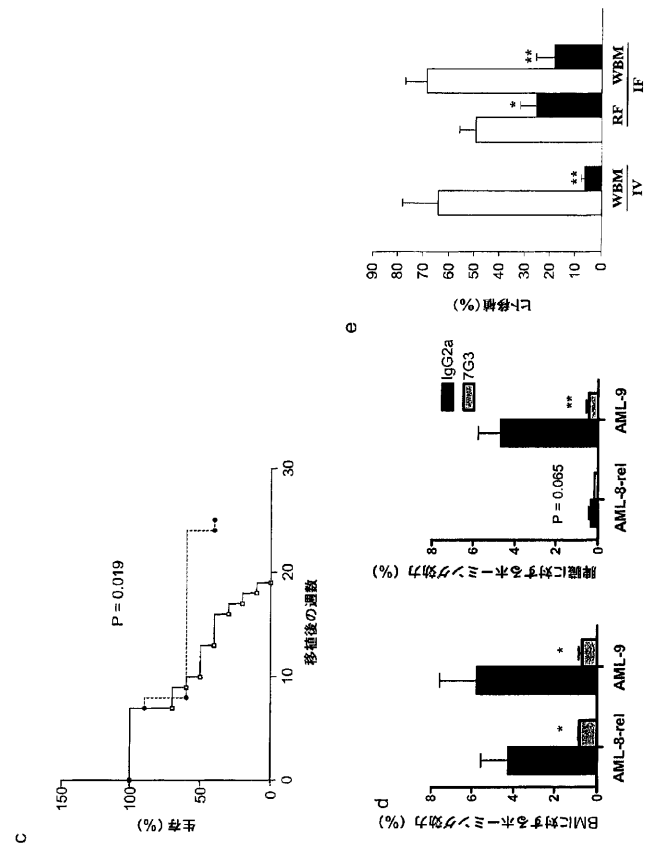
【図 2 b】

Figure 2b



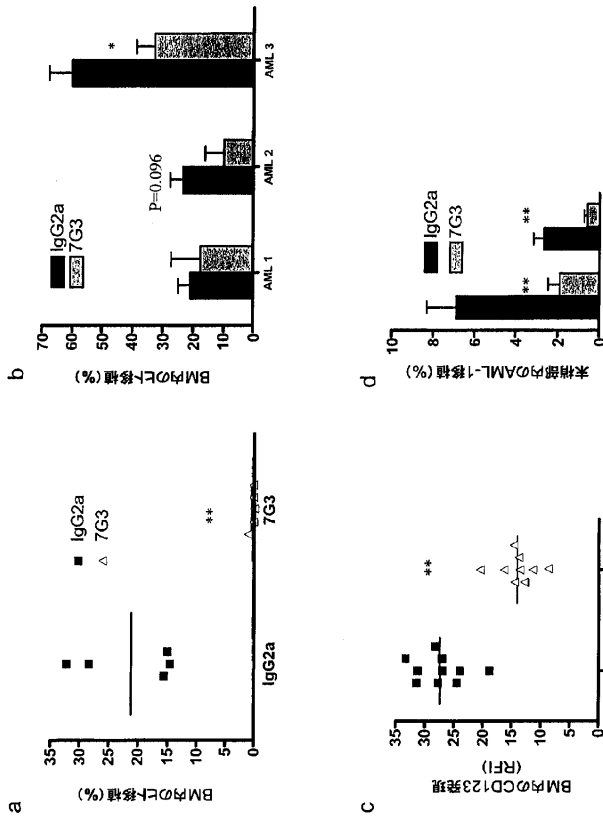
【図 2 c - e】

Figure 2c-e



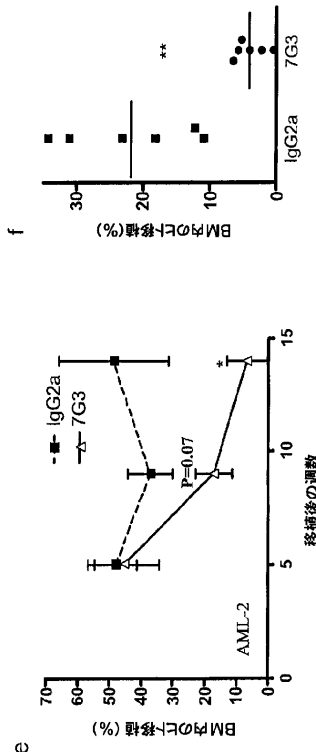
【図 3 a - d】

Figure 3



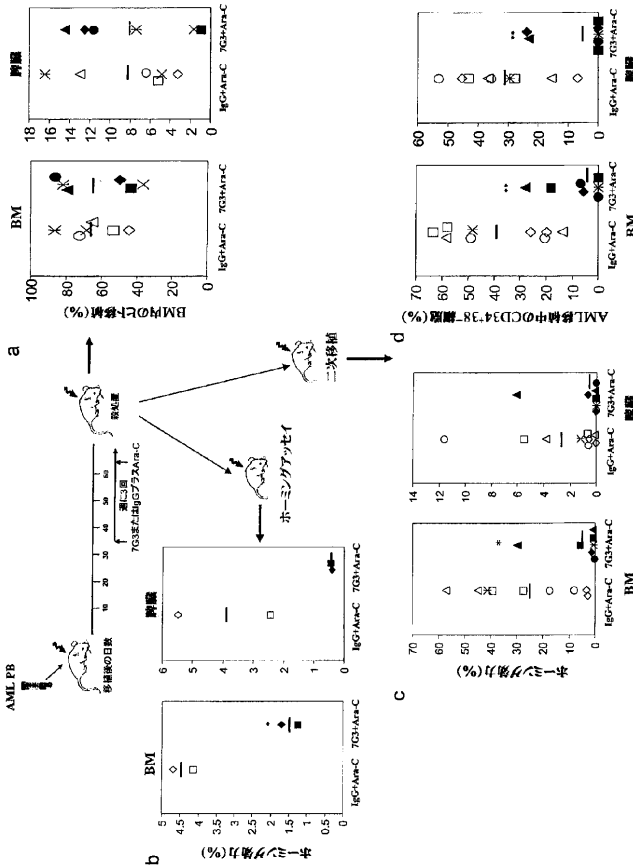
【図 3 e - f】

Figure 3

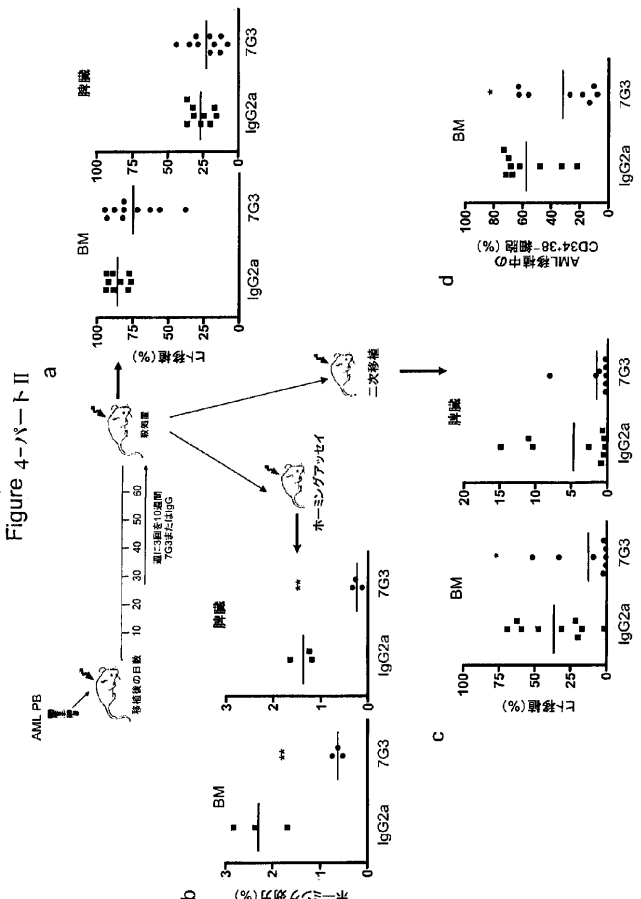


【図 4 - 1】

Figure 4-パート I

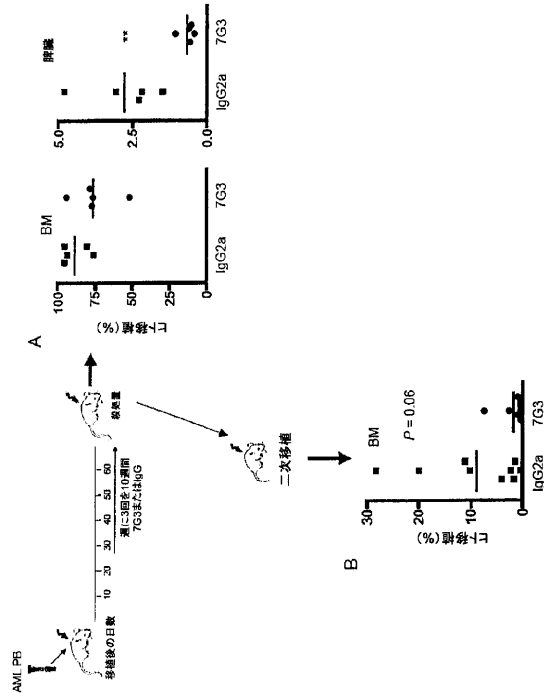


【図 4 - 2】



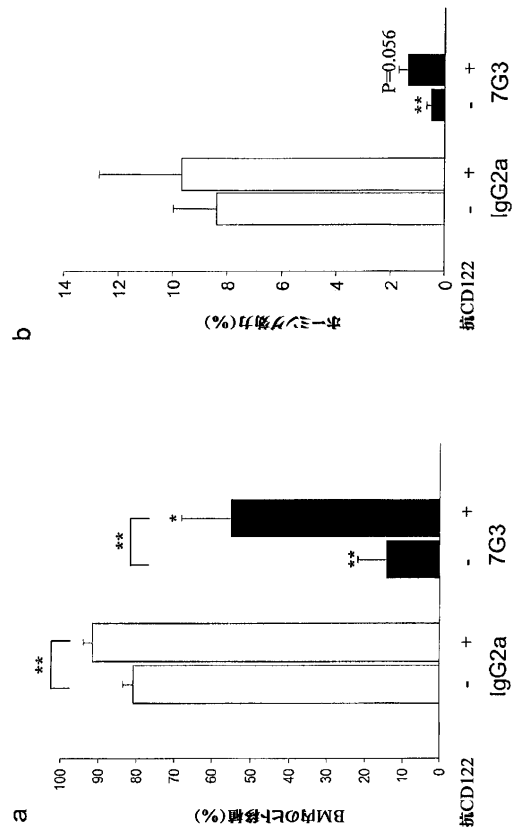
【図 4 - 3】

Figure 4-パートIII



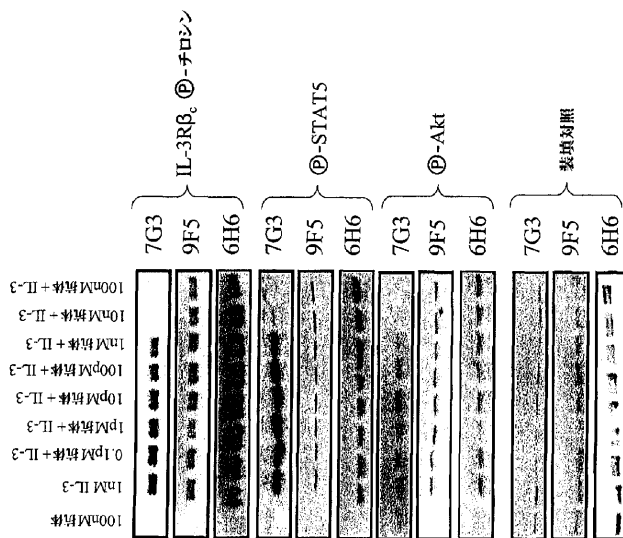
【図 5】

Figure 5



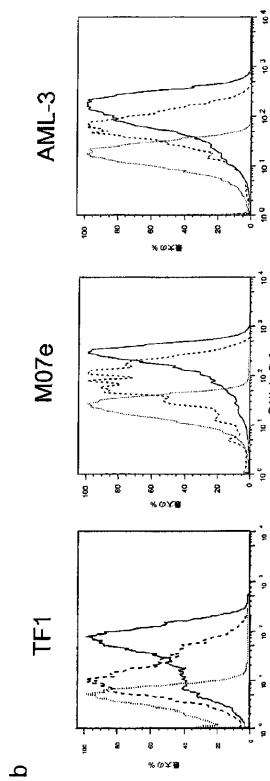
【図 6 a】

Figure 6a



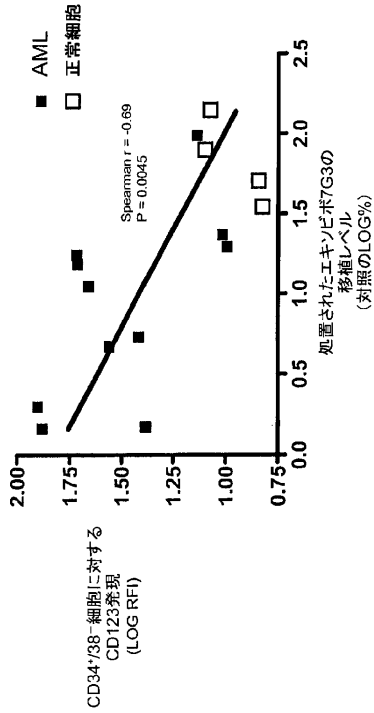
【図 6 b】

Figure 6b



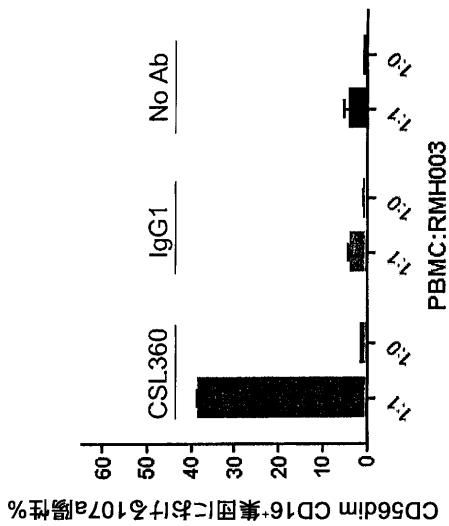
【図7】

Figure 7



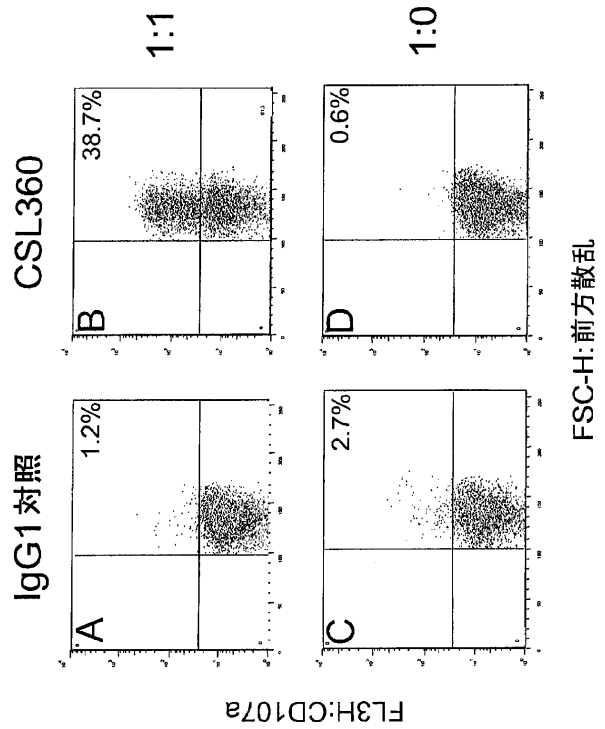
【図6】

Figure 9



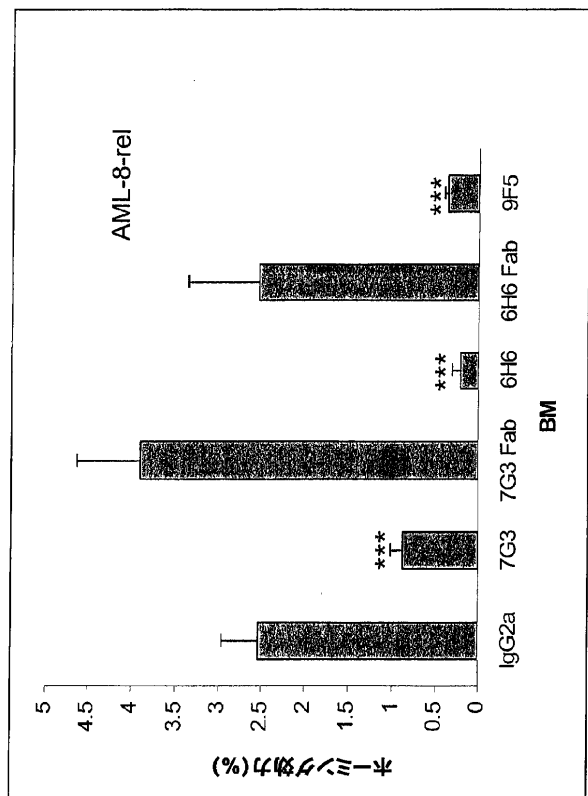
【図8】

Figure 8



【図10】

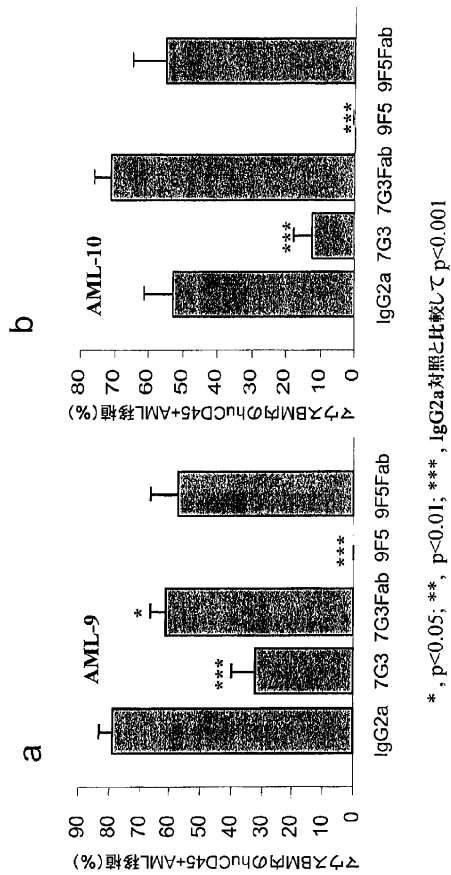
Figure 10



*** IgG2a対照と比較して $p < 0.001$

【図 1 1 a - b】

Figure 11a & b



【図 1 3 a】

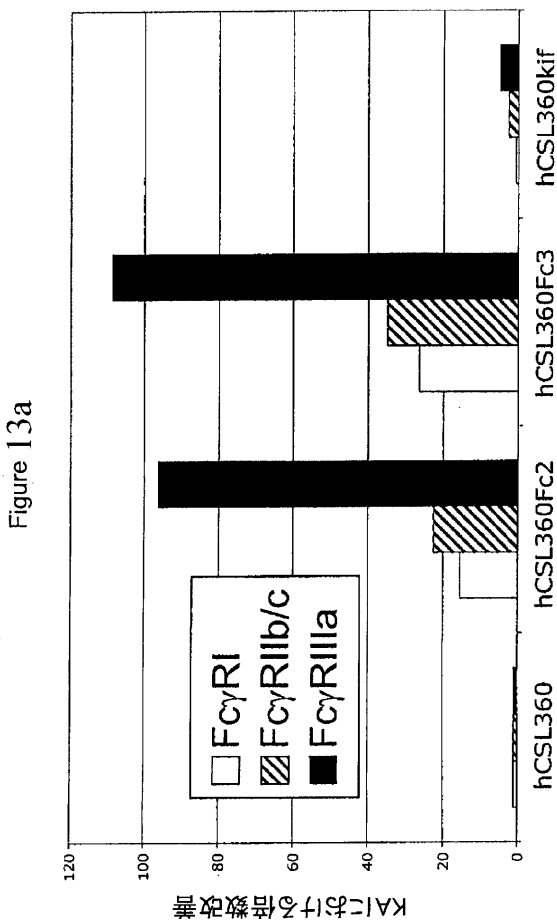
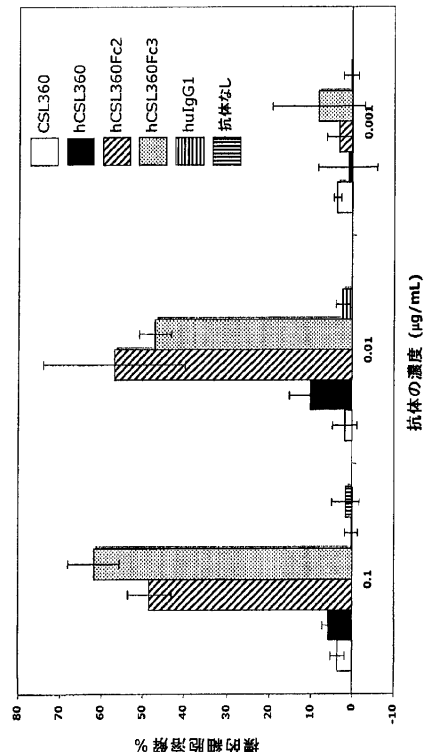


Figure 13a

【図 1 2】

Figure 12



【図 1 3 b】

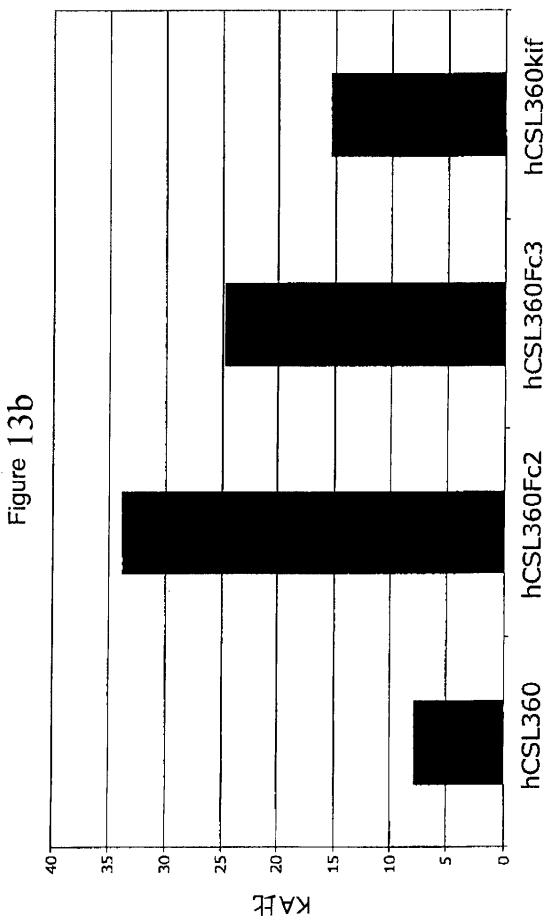


Figure 13b

【図 15】

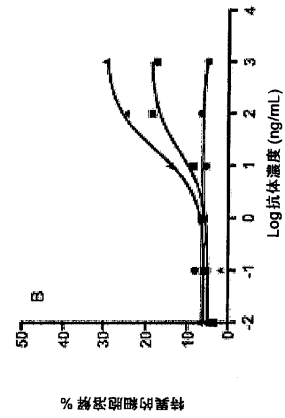
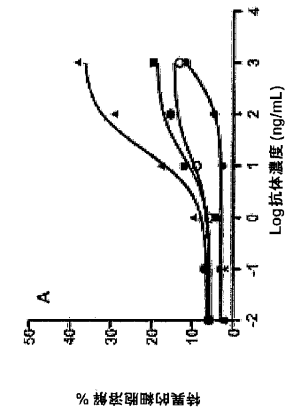


Figure 15



【图 17】



Figure 17

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2008/001797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl.		
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)		
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)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPID, Medline, EPODOC and keywords (CD123, IL-3Ralpha, antibodies, leukaemia, lymphoma, myelodysplastic and related terms)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US6177078 B1 (LOPEZ) 23 January 2001 Abstract; lines 64, column 10 to line 8, column 11; Figure 7A; Figure 7B; lines 50-60, column 8; lines 28-31, column 1	1-4, 9, 12-15, 20-23
X	US 6733743 B2 (JORDAN) 11 May 2004 Abstract; lines 42-47, column 3; line 20, column 1 to line 48, column 2; lines 15-16, column 3; lines 35-45, column 13; line 48, column 5 to line 9, column 6; line 50, column 13 to line 7, column 14	1-4, 12-23
X	US 2007/0071675 A1 (WU et al) 29 March 2007 Paragraph 0011, page 2; paragraph 0021, page 3; paragraph 0036, page 6, paragraph 0193, page 33; paragraph 0194, page 34; paragraph 0042, page 8; paragraph 0053, page 9; paragraph 0062, page 11; paragraphs 0100-0102, pages 15-16; paragraph 0066, page 11; paragraph 0073, page 12, paragraphs 0108-0110, page 17; paragraph 0136, page 21; paragraph 0037, page 7	1-23
☒ 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 January 2009		Date of mailing of the international search report 23 FEB 2009
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer Margaret Chang AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : +61 2 6283 2631

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/AU2008/001797
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2008/127735 A1 (STEMLINE THERAPEUTICS, INC.) 23 October 2008 Paragraph 0024, page 9; paragraph 007, page 3; paragraph 0027, page 10; paragraph 00302, page 107; paragraph 00367, page 129; paragraph 0042, page 15; paragraphs 00187-00188, pages 64-66, paragraphs 00356-00357, pages 121-123	1-4, 9, 12-19, 20-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2008/001797

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
US	6177078	AU	11340/97	WO	9724373
US	6733743	AU	50030/01	CA	2402081
		NZ	521255	US	2003039611
		WO	0166139	EP	1263463
				US	2004197337
US	2007071675	WO	2008024188		
WO	2008127735	NONE			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.					
END OF ANNEX					

フロントページの続き

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

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100111501

弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 ディック ジョン エドガー

カナダ エム4イー2ゼット8 オンタリオ トロント マクリーン アベニュー 57

(72)発明者 ジン リキング

カナダ エム6ピー4ビー2 オンタリオ トロント ダンダス ストリート ウェスト 2360 アpartment # 1609

(72)発明者 ヴァイロ ジーノ ルイジ

オーストラリア 3070 ヴィクトリア ノースコート タナー グローブ 23

(72)発明者 ギアリング デイヴィット ポール

オーストラリア 3124 ヴィクトリア キャンバーウェル ブロードウェイ 83

(72)発明者 バスフィールド サマンサ ジェーン

オーストラリア 3056 ヴィクトリア ブランズウィック ブランズウィック ロード 4/185

Fターム(参考) 4C084 AA19 MA02 NA05 ZB272

4C085 AA14 AA16 BB31 BB42 CC23 EE01

4C086 AA01 EA17 MA02 MA04 NA05 ZB27