

(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2019-537619

(P2019-537619A)

(43) 公表日 令和1年12月26日 (2019. 12. 26)

(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 N	2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	4 C 0 8 4
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 A	4 C 0 8 5
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 N	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 G	4 C 2 0 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 124 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-538088 (P2019-538088)	(71) 出願人	519106611
(86) (22) 出願日	平成29年9月26日 (2017. 9. 26)		オンコロジー、インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成31年4月23日 (2019. 4. 23)		アメリカ合衆国 0 2 4 5 1 マサチュー
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/053370		セッツ、ウォルサム、トッテン ポンド
(87) 国際公開番号	W02018/064013		ロード 4 0 0、スウィート 1 2 0
(87) 国際公開日	平成30年4月5日 (2018. 4. 5)	(74) 代理人	110000855
(31) 優先権主張番号	62/480, 994		特許業務法人浅村特許事務所
(32) 優先日	平成29年4月3日 (2017. 4. 3)	(72) 発明者	タン、ミン
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		アメリカ合衆国、カリフォルニア、タスチ
(31) 優先権主張番号	62/406, 727		ン、フランクリン アヴェニュー 1 4 2
(32) 優先日	平成28年10月11日 (2016. 10. 11)	(72) 発明者	シャン、ジョセフ、エス、
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		アメリカ合衆国、カリフォルニア、タスチ
			ン、フランクリン アヴェニュー 1 4 2
			8 2
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 β 2 - 糖タンパク質 1 のレベルに基づいて、バピツキシマブで癌を治療するための方法、およびそのためのアッセイ

(57) 【要約】

P S 標的化抗体で治療可能な癌患者を特定および治療するための、特にバピツキシマブおよびバピツキシマブ併用療法を使用して癌患者を特定および治療するための、驚くべき新たな方法およびキットが開示される。本方法およびキットは、 β 2 - 糖タンパク質 1 (β 2 G P I)、特に機能性 β 2 G P I の定義された範囲の治療前血中濃度が、より良好な治療結果を有する患者を正確に予測する指標として作用するという驚くべき発見に基づく。

【選択図】 図 1 8

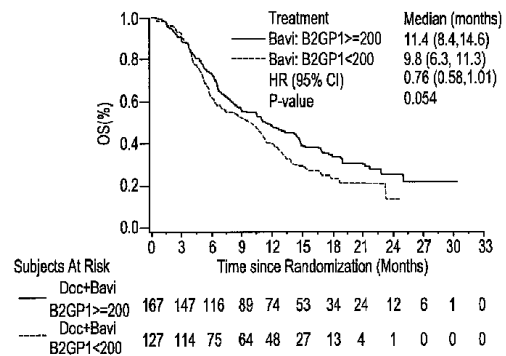


FIG. 18A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者において癌を治療する方法における使用のためのバビツキシマブであって、機能性 2 - 糖タンパク質 1 (2 G P I) が、前記患者の血液試料中に $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以上の濃度で存在し、前記機能性 2 G P I が、ホスファチジルセリン (P S) およびバビツキシマブの両方に結合し、バビツキシマブが、第 1 の抗癌剤であり、前記方法が、少なくとも第 2 の抗癌剤を投与することをさらに含む、方法。

【請求項 2】

前記方法が、

- (a) 前記患者の血液試料中の前記機能性 2 G P I の濃度を特定することと、
- (b) 機能性 2 G P I の血中濃度が $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以上である場合、バビツキシマブおよび少なくとも第 2 の抗癌剤を前記患者に投与することと、を含む、請求項 1 に記載の使用のためのバビツキシマブ。

10

【請求項 3】

前記患者が、卵巣癌、胃癌、肝細胞癌、結腸直腸癌、乳癌、食道癌、悪性神経膠腫、膠芽腫、前立腺癌、黒色腫、頭頸部癌、腎細胞癌、膀胱癌、膵臓癌、または肺癌を有する、請求項 1 または 2 に記載の使用のためのバビツキシマブ。

【請求項 4】

前記患者が、膵臓癌または非小細胞肺癌 (N S C L C) を有する、請求項 1 または 2 に記載の使用のためのバビツキシマブ。

20

【請求項 5】

前記少なくとも第 2 の抗癌剤が、化学療法剤または免疫チェックポイント抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用のためのバビツキシマブ。

【請求項 6】

前記化学療法剤が、ソラフェニブ、パクリタキセル、カルボプラチン、ゲムシタビン、またはドセタキセルである、請求項 5 に記載の使用のためのバビツキシマブ。

【請求項 7】

前記免疫チェックポイント抗体が、C T L A - 4、P D - 1、または P D - L 1 に結合する遮断抗体である、請求項 5 に記載の使用のためのバビツキシマブ。

【請求項 8】

前記免疫チェックポイント抗体が、トレメリムマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、デュルバルマブ、またはアテゾリズマブである、請求項 5 に記載の使用のためのバビツキシマブ。

30

【請求項 9】

前記方法が、第 3 の抗癌剤を投与することをさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の使用のためのバビツキシマブ。

【請求項 10】

機能性 2 G P I の血中濃度が、 $200 \mu\text{g} / \text{ml} \sim 290 \mu\text{g} / \text{ml}$ である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の使用のためのバビツキシマブ。

【請求項 11】

前記機能性 2 G P I が、

- (a) E L I S A プレートにホスファチジルセリン (P S) でコーティングして、P S コーティング E L I S A プレートを調製することと、
- (b) バビツキシマブおよび前記血液試料を、前記血液試料中の 2 G P I を前記バビツキシマブおよび前記 P S コーティング E L I S A プレートの両方に結合させるのに有効な条件下で、前記 P S コーティング E L I S A プレートに添加することと、
- (c) 前記 P S コーティング E L I S A プレートへのバビツキシマブおよび 2 G P I の前記結合を検出し、それによって前記血液試料中の前記機能性 2 G P I を測定することと、を含む、アッセイにおいて測定される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の使用のためのバビツキシマブ。

40

50

【請求項 1 2】

前記血液試料が、血漿試料である、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の使用のためのバビツキシマブ。

【請求項 1 3】

前記血液試料が、血清試料である、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の使用のためのバビツキシマブ。

【請求項 1 4】

第 1 の抗癌剤および少なくとも第 2 の抗癌剤で治療可能な癌患者を診断する方法であって、前記第 1 の抗癌剤が、バビツキシマブであり、前記方法が、前記患者の血液試料中の機能性 2 - 糖タンパク質 1 (2 G P I) の濃度を測定することを含み、前記機能性 2 G P I の血中濃度が 2 0 0 μ g / m l 以上である場合、前記患者がバビツキシマブおよび前記少なくとも第 2 の抗癌剤で治療可能であると決定され、前記機能性 2 G P I が、ホスファチジルセリン (P S) およびバビツキシマブの両方に結合する、方法。

10

【請求項 1 5】

前記患者が、前記第 1 ならびに少なくとも第 2 および第 3 の抗癌剤で治療可能である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

ヒト患者において癌を治療するための方法であって、第 1 および少なくとも第 2 の抗癌剤を前記患者に投与することを含み、前記第 1 の抗癌剤が、バビツキシマブであり、前記患者が、2 0 0 μ g / m l 以上の機能性 2 - 糖タンパク質 1 (2 G P I) の治療前血中濃度を有し、前記機能性 2 G P I が、ホスファチジルセリン (P S) およびバビツキシマブの両方に結合する、方法。

20

【請求項 1 7】

ヒト患者において癌を治療するための方法であって、
(a) 前記患者から得られた治療前血液試料中の機能性 2 - 糖タンパク質 1 (2 G P I) の濃度を測定することであって、前記機能性 2 G P I が、ホスファチジルセリン (P S) およびバビツキシマブの両方に結合する、測定することと、
(b) 2 0 0 μ g / m l 以上の機能性 2 G P I の治療前血中濃度を有する前記患者に、第 1 および少なくとも第 2 の抗癌剤を投与することであって、前記第 1 の抗癌剤が、バビツキシマブである、投与することと、を含む、方法。

30

【請求項 1 8】

ヒト患者において癌を治療するための方法であって、
(a) 前記患者から治療前血液試料を得ることと、
(b) 前記治療前血液試料中の機能性 2 - 糖タンパク質 1 (2 G P I) の濃度を測定することであって、前記機能性 2 G P I が、ホスファチジルセリン (P S) およびバビツキシマブの両方に結合する、測定することと、
(c) 2 0 0 μ g / m l 以上の機能性 2 G P I の治療前血中濃度を有する前記患者に、第 1 および少なくとも第 2 の抗癌剤を投与することであって、前記第 1 の抗癌剤が、バビツキシマブである、投与することと、を含む、方法。

40

【請求項 1 9】

第 1 および少なくとも第 2 の抗癌剤で治療可能なヒト癌患者を特定するための方法であって、前記第 1 の抗癌剤が、バビツキシマブであり、前記患者を治療することが、
(a) 前記患者から得られた治療前血液試料中の機能性 2 - 糖タンパク質 1 (2 G P I) の濃度を測定することであって、前記機能性 2 G P I が、ホスファチジルセリン (P S) およびバビツキシマブの両方に結合する、測定することと、
(b) 前記治療前血液試料中の機能性 2 G P I の濃度が 2 0 0 μ g / m l 以上である場合、前記患者をバビツキシマブおよび前記少なくとも第 2 の抗癌剤で治療可能であると特定することと、
(c) 2 0 0 μ g / m l 以上の機能性 2 G P I の治療前血中濃度を有する前記患者に、バビツキシマブおよび前記少なくとも第 2 の抗癌剤を投与することと、を含む、方法。

50

【請求項 20】

第1および少なくとも第2の抗癌剤で治療可能なヒト癌患者を特定するための方法であって、前記第1の抗癌剤が、パビツキシマブであり、前記患者を治療することが、

(a) 前記患者から治療前血液試料を得ることと、

(b) 前記治療前血液試料中の機能性 2 - 糖タンパク質 1 (2 G P I) の濃度を測定することであって、前記機能性 2 G P I が、ホスファチジルセリン (P S) およびパビツキシマブの両方に結合する、測定することと、

(c) 前記治療前血液試料中の機能性 2 G P I の濃度が $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以上である場合、前記患者をパビツキシマブおよび前記少なくとも第2の抗癌剤で治療可能であると特定することと、

(d) $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以上の機能性 2 G P I の治療前血中濃度を有する前記患者に、パビツキシマブおよび前記少なくとも第2の抗癌剤を投与することと、を含む、方法。

10

【請求項 21】

前記パビツキシマブが、前記患者に $3 \text{mg} / \text{kg}$ の量で投与される、請求項 16 ~ 0 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 22】

少なくとも第2および第3の抗癌剤を前記患者に投与することをさらに含む、請求項 16 ~ 21 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 23】

前記患者が、卵巣癌、胃癌、肝細胞癌、結腸直腸癌、乳癌、食道癌、悪性神経膠腫、膠芽腫、前立腺癌、黒色腫、頭頸部癌、腎細胞癌、膀胱癌、膵臓癌、または肺癌を有する、請求項 14 ~ 22 のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 24】

前記患者が、膵臓癌または非小細胞肺癌 (N S C L C) を有する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記非小細胞肺癌 (N S C L C) が、非扁平上皮非小細胞肺癌である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記少なくとも第2の抗癌剤が、化学療法剤または免疫チェックポイント抗体である、請求項 14 ~ 25 のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 27】

前記化学療法剤が、ソラフェニブ、パクリタキセル、カルボプラチン、ゲムシタビン、またはドセタキセルである、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記免疫チェックポイント抗体が、C T L A - 4、P D - 1、またはP D - L 1 に結合する遮断抗体である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

前記免疫チェックポイント抗体が、トレメリムマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、デュルバルマブ、またはアテゾリズマブである、請求項 28 に記載の方法。

40

【請求項 30】

機能性 2 G P I の血中濃度が $200 \mu\text{g} / \text{ml} \sim 290 \mu\text{g} / \text{ml}$ である場合、前記患者がパビツキシマブおよび少なくとも第2の抗癌剤で治療可能であると決定される、請求項 14 または 15 に記載の方法。

【請求項 31】

前記患者が、 $200 \mu\text{g} / \text{ml} \sim 290 \mu\text{g} / \text{ml}$ の機能性 2 G P I の治療前血中濃度を有する、請求項 16 ~ 29 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 32】

前記血液試料が、血漿試料である、請求項 14、15、または 17 ~ 31 のいずれか1項に記載の方法。

50

【請求項 33】

前記血液試料が、血清試料である、請求項 14、15、または 17～31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

前記機能性 2 GPI が、

- (a) ELISA プレートにホスファチジルセリン (PS) でコーティングして、PS コーティング ELISA プレートを調製することと、
- (b) パビツキシマブおよび前記血液試料を、前記血液試料中の 2 GPI を前記パビツキシマブおよび前記 PS コーティング ELISA プレートの両方に結合させるのに有効な条件下で、前記 PS コーティング ELISA プレートに添加することと、
- (c) 前記 PS コーティング ELISA プレートへのパビツキシマブおよび 2 GPI の前記結合を検出し、それによって前記血液試料中の前記機能性 2 GPI を測定することと、を含む、アッセイにおいて測定される、請求項 14、15、または 17～33 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 35】

機能性 2 - 糖タンパク質 1 (2 GPI) を測定する方法であって、前記機能性 2 GPI が、ホスファチジルセリン (PS) およびパビツキシマブの両方に結合し、前記方法が、

- (a) ELISA プレートにホスファチジルセリン (PS) でコーティングして、PS コーティング ELISA プレートを調製することと、
- (b) パビツキシマブ、および 2 GPI を含有することが疑われる生物学的試料を、前記試料中の 2 GPI を前記パビツキシマブおよび前記 PS コーティング ELISA プレートの両方に結合させるのに有効な条件下で、前記 PS コーティング ELISA プレートに添加することと、
- (c) 前記 PS コーティング ELISA プレートへのパビツキシマブおよび 2 GPI の前記結合を検出し、それによって前記試料中の前記機能性 2 GPI を測定することと、を含む、前記方法。

20

【請求項 36】

前記生物学的試料が、血液試料である、請求項 0 に記載の方法。

【請求項 37】

前記血液試料が、血漿試料である、請求項 34 または 36 に記載の方法。

30

【請求項 38】

前記血液試料が、血清試料である、請求項 34 または 36 に記載の方法。

【請求項 39】

前記パビツキシマブが、検出可能なシグナルを生成する検出可能な物質に結合しており、前記 PS コーティング ELISA プレートへのパビツキシマブおよび 2 GPI の結合が、前記検出可能なシグナルの検出および測定によって検出および測定される、請求項 34～38 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 40】

2 GPI を含有する前記試料の添加前に、前記パビツキシマブが前記 PS コーティング ELISA プレートに添加される、請求項 34～39 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****関連出願の相互参照**

本出願は、2017年5月17日に出願された同時係属中の仮出願第62/507,580号、2017年4月3日に出願された仮出願第62/480,994号、2016年10月11日(2016年10月10日は米国における連邦休日)に出願された仮出願第62/406,727号、および2016年9月27日に出願された仮出願第62/400,589号に対する優先権を主張し、これらの出願の明細書、特許請求の範囲、図面、

50

および順序全体が、権利放棄することなく参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、バイオマーカーの分野に関し、特に、バビツキシマブなどのPS標的化抗体を使用する治療法に対する奏効の成功を予測するための指標としての、治療前レベル 2 - 糖タンパク質 1 (2 GPI)、特に機能性 2 GPI の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

癌およびウイルス感染症を含む全ての疾患と戦う上で、機能的な免疫系は、治療奏効の重要な一部分である。したがって、現在癌を治療するための戦略として認識されている、免疫腫瘍学 (IO) の分野を含む免疫療法に対して、重要な研究がなされてきた。近年、免疫応答を操作する新たな標的および化合物が、研究者および臨床医によって研究されてきた。例えば、プログラム細胞死タンパク質 1 (PD - 1) およびプログラム細胞死リガンド 1 (PD - L 1) を標的化する IO 剤が、既に一部の進行性悪性腫瘍の治療薬として承認を受けている一方で、他の IO 標的と相互作用する化合物は、現在開発中である。

【0004】

それにも関わらず、これらの新たな免疫療法でさえ、特定の患者にしか有効ではない。したがって、旧来の治療法および新たな免疫治療法の両方に対する奏効の可変性、ならびに臨床的利益を最大化するという願望を考慮して、IO療法を含む治療結果を予測することができるバイオマーカーが、依然として必要とされている。一部の研究者が、個別化された予測アプローチを開発するための治療標的の利用に焦点を合わせている一方で、他の研究者は、結合および下流シグナル伝達分子の測定を利用することによる患者選択および識別の代替手段を模索している。

【0005】

近年、膜リン脂質、ホスファチジルセリン (PS) が、宿主の免疫応答を調節する上流免疫チェックポイントとして作用する、特有かつ高度に免疫抑制性の分子として特定されている。これは、PSが癌およびウイルス感染を含む様々な疾患において重要な役割を果たし、PSを遮断するPS標的化抗体の形態で免疫療法の新たな分野を切り拓くことを意味する。

【0006】

主要なPS標的化抗体は、3G4と呼ばれるマウスmAbに由来するマウス - ヒトキメラモノクローナル抗体 (mAb) である、バビツキシマブである (Ranら、2005 ; Huangら、2005 ; 米国特許第7,247,303号)。3G4およびバビツキシマブは、2 - 糖タンパク質 1 (2 GPI) に依存した様式でPSを標的化する、マウス、キメラ、および完全ヒト抗体のファミリーの一部分である。すなわち、バビツキシマブおよび関連PS標的化抗体は、それらが高親和性抗体 - 2 GPI - PS複合体を形成するように、2 GPI の存在下でPSに結合する (Lusterら、2006)。治療法に対する奏効の測定および予測 (Gongら、2013 ; Staffordら、2013) を含む、多数の撮像研究 (Jenneweinら、2008 ; Marconescu & Thorpe、2008 ; Sahaら、2010 ; Stafford & Thorpe、2011 ; Zhaoら、2011 ; Zhangら、2014 ; およびZhouら、2014 ; 米国特許第7,790,860号) によって特に示されているように、操作上、これらの2 GPI 依存性PS標的化抗体は、インビボでPSに特異的である。

【0007】

バビツキシマブは、PSがマーカーである広範囲の疾患、特に癌およびウイルス感染症に対する活性だけでなく、寄生原虫である *Leishmania amazonensis* などの細胞内寄生体 (Wanderleyら、2013)、ならびにそれぞれペストおよび野兔病を引き起こす *Yersinia pestis* および *Francisella tularensis* などの細胞内細菌病原体 (Lonsdaleら、2011) の感染症に対する活性もまた実証している。ウイルス感染症に関して、バビツキシマブなどのPS標的化抗体は、ウイルス複製を阻害し、器官内のウイルス量を減少させ、生存率を増

加させることが示されている (Soaresら、2008; Moodyら、2010; 米国特許第7,906,115号)。バビツキシマブおよび関連PS標的化抗体の抗癌活性は、広範な数の前臨床研究および臨床試験において実証されており、これらにおいて、効果は、腫瘍血管に対してかつPSの免疫抑制シグナル伝達を遮断することによって媒介される (Ranら、2005; 米国特許第7,572,448号; DeRoseら、2011)。

【0008】

バビツキシマブなどのPS標的化抗体の抗腫瘍効果は、例えば、放射線の使用および/または化学療法の同時投与によって、これらの抗体を腫瘍微小環境内でのPSの曝露を増加させる薬剤または条件と併用する場合に、増強される (米国特許第7,422,738号; 米国特許第8,486,391号; 米国特許第7,572,448号)。例えば、PS標的化抗体のバビツキシマブファミリーを、ドセタキセルと併用して乳腺腫瘍を治療する場合 (Huangら、2005)、ゲムシタピンと併用して膵臓腫瘍を治療する場合 (Beckら、2006)、放射線と併用して肺癌 (Heら、2007) および脳癌、神経膠芽腫 (Heら、2009) を治療する場合、ドセタキセルと併用して前立腺癌を治療し、抗腫瘍免疫を再活性化する場合 (Yinら、2013)、およびソラフェニブと併用して肝細胞癌を治療する場合 (Chengら、2016)、抗腫瘍効果の改善が前臨床的に実証されている。CTLA-4またはPD-1に対する抗体の形態のチェックポイント阻害剤と併用して黒色腫 (Freimarkら、2016) および三種陰性乳癌 (Grayら、2016a) を治療した場合について、前臨床的に示されているように、バビツキシマブなどのPS標的化抗体を他のIO剤との併用療法で使用した場合にも、抗腫瘍効果の増強がもたらされる。

【0009】

バビツキシマブはまた、800人を超える患者において臨床研究でも評価されており、そのほとんどが、併用療法で治療されていた。これらの臨床試験には、慢性C型肝炎ウイルス (HCV) およびヒト免疫不全ウイルス (HIV) などのウイルス感染症を有する患者、ならびに肺、乳房、肝臓 (肝細胞癌、HCC)、膵臓、結腸直腸、および腎臓 (腎細胞癌、RCC) を含むいくつかの腫瘍型を有する患者が含まれていた。バビツキシマブを、HER2陰性転移性乳癌を有する患者においてパクリタキセルと併用 (Chalasaaniら、2015)、非小細胞肺癌 (NSCLC) においてパクリタキセル - カルボプラチンと併用 (Digumartiら、2014)、肝細胞癌においてソラフェニブと併用 (Chengら、2016)、および治療歴のある進行性非扁平上皮NSCLCにおいてドセタキセルと併用 (Gerberら、2016) した臨床試験から、有望な抗腫瘍効果が報告されている。

【0010】

全体として、第I相および第II相臨床研究の結果は、バビツキシマブの臨床的に有意な治療効果を実証した。それにも関わらず、バビツキシマブ療法に関連するバイオマーカーは未だ存在していないため、バビツキシマブなどのPS標的化抗体による治療を最適化するための効果的な方法が依然として必要とされている。関連バイオマーカーデータの欠如に対処する試みは、バビツキシマブ抗体およびその生理学的/病理学的標的であるPSの特有の性質によって妨げられてきた。したがって、治療の最適化を可能にするための患者スクリーニング方法の改善が必要とされている。バビツキシマブ治療のための1つ以上の循環バイオマーカーを特定することは特に重要な進歩であり、これは患者を選択し、治療結果を改善するための低侵襲試験を提供するだろう。

【発明の概要】

【0011】

本発明は、バビツキシマブなどのPS標的化抗体および同様の抗体、例えば、1N11での治療を最適化するための新たなバイオマーカー方法、組成物、キット、およびアッセイを提供することによって、先行技術の前述および他の必要性に対処する。本発明は特に、バビツキシマブを使用する治療法に対する奏効を予測するための指標または「バイオマ

ーカー」としての、治療前レベルの 2 - 糖タンパク質 1 (2 G P I)、最も好ましくは機能性 2 G P I の使用に関する。

【 0 0 1 2 】

これらの驚くべき新たな方法、組成物、キット、およびアッセイは、2 G P I 依存性 P S 標的化抗体で治療可能な患者、特にバビツキシマブ含有治療レジメンまたは併用療法による治療のための癌患者の特定および治療、最も好ましくは、バビツキシマブ (第 1 の抗癌剤) および少なくとも第 2 または第 3 の抗癌剤を使用する、癌を有する患者の特定および治療を提供し、これらは全て、機能性 2 G P I の定義された範囲の治療前血中濃度を有する患者を選択することによって行われる。「機能性」 2 G P I は、P S と、2 G P I 依存性 P S 標的化抗体、好ましくはバビツキシマブとの両方に結合する 2 G P I である。

10

【 0 0 1 3 】

最も好ましい実施形態において、本発明は、200 μ g / ml 以上の機能性 2 G P I の治療前レベルに基づく患者の選択、特定、診断、および好ましくは治療に関する。

【 0 0 1 4 】

本発明は、ヒト患者において P S がマーカーである疾患 (特に癌) を治療するための方法であって、P S 標的化抗体、好ましくはバビツキシマブを患者に投与することを含む、方法を提供し、患者は、200 μ g / ml 以上の機能性 2 G P I の治療前血中濃度を有する。好ましくは、本明細書で「第 1 の治療剤」および「第 1 の抗癌剤」と呼ばれる、バビツキシマブなどの P S 標的化抗体は、少なくとも第 2 の治療剤または抗癌剤と共に患者に投与される。

20

【 0 0 1 5 】

本発明はまた、ヒトの患者において P S がマーカーである疾患 (特に癌) を治療するための方法であって、

(a) 患者から得られた治療前血液試料中の機能性 2 G P I の濃度を測定するステップと、

(b) 200 μ g / ml 以上の機能性 2 G P I の治療前血中濃度を有する患者に、P S 標的化抗体、好ましくはバビツキシマブを投与するステップと、を含む、方法も提供する。好ましくは、バビツキシマブなどの P S 標的化抗体は、少なくとも第 2 の治療剤または抗癌剤と共に患者に投与される。

30

【 0 0 1 6 】

本発明は、ヒト患者において P S がマーカーである疾患 (特に癌) を治療するための方法であって、

(a) 患者から治療前血液試料を得るステップと、

(b) 治療前血液試料中の機能性 2 G P I の濃度を測定するステップと、

(c) 200 μ g / ml 以上の機能性 2 G P I の治療前血中濃度を有する患者に、P S 標的化抗体、好ましくはバビツキシマブを投与するステップと、を含む、方法をさらに提供する。好ましくは、バビツキシマブなどの P S 標的化抗体は、少なくとも第 2 の治療剤または抗癌剤と共に患者に投与される。

【 0 0 1 7 】

40

P S 標的化抗体、好ましくはバビツキシマブで治療可能なヒト患者、好ましくはヒト癌患者を特定するための方法であって、

(a) 患者から得られた治療前血液試料中の機能性 2 G P I の濃度を測定するステップと、

(b) 治療前血液試料中の機能性 2 G P I の濃度が 200 μ g / ml 以上である場合、患者を P S 標的化抗体、好ましくはバビツキシマブで治療可能であると特定するステップと、

(c) 200 μ g / ml 以上の機能性 2 G P I の治療前血中濃度を有する患者に、P S 標的化抗体、好ましくはバビツキシマブを投与するステップと、を含む、方法もまた、本発明によって提供される。好ましくは、(b) 患者は、バビツキシマブおよび少なくとも

50

第2の治療剤または抗癌剤で治療可能であると特定され、(c)パビツキシマブおよび少なくとも第2の治療剤または抗癌剤が、患者に投与される。

【0018】

PS標的化抗体、好ましくはパビツキシマブで治療可能なヒト患者、好ましくはヒト癌患者を特定し、その患者を治療するための方法であって、

(a)患者から治療前血液試料を得るステップと、
(b)治療前血液試料中の機能性 2 GPI の濃度を測定するステップと、
(c)治療前血液試料中の機能性 2 GPI の濃度が $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である場合、患者を PS 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブで治療可能であると特定するステップと、

(d) $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の機能性 2 GPI の治療前血中濃度を有する患者に、PS 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブを投与するステップと、を含む、方法が、さらに提供される。好ましくは、(c)患者は、パビツキシマブおよび少なくとも第2の治療剤または抗癌剤で治療可能であると特定され、(d)パビツキシマブおよび少なくとも第2の治療剤または抗癌剤が、患者に投与される。

【0019】

本発明の別の実施形態は、PS標的化抗体、好ましくはパビツキシマブで治療可能な患者、好ましくは癌患者を診断する方法であり、該方法は、患者の血液試料中の機能性 2 GPI の濃度を測定することを含み、機能性 2 GPI の血中濃度が $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である場合、患者は、PS標的化抗体、好ましくはパビツキシマブで治療可能であると決定される。好ましくは、機能性 2 GPI の血中濃度が $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である場合、患者は、パビツキシマブおよび少なくとも第2の治療剤または抗癌剤で治療可能であると診断される。

【0020】

本発明の更なる一実施形態は、患者を治療する方法、好ましくは患者において癌を治療する方法における使用のための PS 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブであり、機能性 2 GPI は、患者の血液試料中に $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で存在する。好ましくは、これは、少なくとも第2の抗癌剤を投与することをさらに含む、そのような癌の治療方法における使用のためのパビツキシマブに関する。

【0021】

本発明のさらに別の実施形態は、PSがマーカーである疾患（好ましくは癌）を治療する方法における使用のための PS 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブであり、この方法は、

(a)患者、好ましくは癌患者の血液試料中の機能性 2 GPI の濃度を特定するステップと、
(b)機能性 2 GPI の血中濃度が $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である場合、PS標的化抗体、好ましくはパビツキシマブを患者に投与するステップと、を含む。好ましくは、癌を治療する方法における使用のためのパビツキシマブおよび少なくとも第2の治療剤または抗癌剤が提供される。

【0022】

$200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の 2 GPI の最も好ましいレベルに加えて、特定の好ましい実施形態において、本発明は、 $200 \sim 290 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲内の治療前の機能性 2 GPI に基づく患者の選択に関する。これらのレベル内の全ての数値および範囲が、 200 または $210 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の機能性 2 GPI の治療前レベルに基づく患者の選択、特定、診断、および好ましくは治療などの前述の方法および使用の各々に含まれ、2 GPI は、低い数として 200 または $210 \mu\text{g}/\text{ml}$ のうちのいずれか一方から、高い数として 270 、 280 、 290 、 300 、 310 、または $320 \mu\text{g}/\text{ml}$ のうちのいずれか1つまでの範囲内（ $200 \sim 270$ 、 $200 \sim 280$ 、 $200 \sim 290$ 、 $200 \sim 300$ 、 $200 \sim 310$ 、 $200 \sim 320$ 、 $210 \sim 270$ 、 $210 \sim 280$ 、 $210 \sim 290$ 、 $210 \sim 300$ 、 $210 \sim 310$ 、および $210 \sim 320 \mu\text{g}/\text{ml}$ などを含む）に

10

20

30

40

50

あり、210～270、210～280、210～290、200～280および200～290が現在好ましい。

【0023】

PS標的化抗体、好ましくはパビツキシマブを患者、好ましくはヒト癌患者に投与する上で、抗体は、約1～10、1～6、3～6、または1～3mg/kgの用量、最も好ましくは約3mg/kgの用量で投与される。

【0024】

前述の方法および使用の各々において、本発明は、PS標的化抗体、好ましくはパビツキシマブを、ソラフェニブ、パクリタキセル、カルボプラチン、ゲムシタビン、またはドセタキセルなどの化学療法剤である第2または第3の抗癌剤と共に使用して、卵巣癌、胃癌、肝臓癌、結腸直腸癌、乳癌、食道癌、脳癌（例えば、神経膠腫、神経膠芽腫）、前立腺癌、皮膚癌（黒色腫）、頭頸部癌、腎臓癌、膀胱癌、膵臓癌、または肺癌などの固形腫瘍、好ましくは非小細胞肺癌（NSCLC）（非扁平上皮NSCLCを含む）の治療に適用することができる。機能性2GPIとPSとの複合体におけるパビツキシマブ結合の機構、および全体的なパビツキシマブの免疫活性化機構は、全てのパビツキシマブ療法に共通している。したがって、本発明は、特に化学療法剤、好ましくは免疫腫瘍（IO）薬剤などとの併用療法において、パビツキシマブなどのPS標的化抗体、または同様の抗体（例えば、1N11）を使用する任意の治療法のための患者の選択に適用される。

10

【0025】

好適なIO剤は、CD28、OX40、および/またはGITRなどの活性化免疫チェックポイント、受容体、または分子に結合するアゴニスト（活性化）抗体を含む、免疫チェックポイント抗体、ならびに好ましくはPD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、および/またはLAG-3などの阻害性免疫チェックポイント、受容体、または分子に結合する拮抗（遮断）抗体である。阻害性免疫チェックポイント、受容体、または分子に結合する拮抗（遮断）抗体はまた、本明細書において「免疫チェックポイント阻害剤」または「ICI」と呼ばれる。免疫チェックポイント抗体（または免疫チェックポイント阻害剤）の好ましい例は、イピリムマブ、トレメリムマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、デュルバルマブ、およびアテゾリズマブなどのCTLA-4、PD-1、またはPD-L1に対する遮断抗体である。

20

【0026】

本発明は特に、PS標的化抗体、好ましくはパビツキシマブ、ならびに第2および第3の治療剤または抗癌剤による患者の選択、診断、および治療を企図する。例えば、化学療法剤および免疫チェックポイント抗体、またはPS標的化抗体、好ましくはパビツキシマブでの治療を含む2つの免疫チェックポイント抗体では、化学療法剤での治療後に免疫チェックポイント抗体での治療が続く。

30

【0027】

この2GPIバイオマーカー技術に関連して、かつ他の研究および臨床用途を有するものとして、本発明はまた、機能性2GPIの検出および定量化に特に適合した新たなアッセイ方法、組成物、およびキットも提供する。したがって、前述の方法および使用の点の両方で、かつ新たなアッセイとして、本発明は、機能性2GPIを測定する方法であって、

40

(a) 任意で、ELISAプレートなどの固体支持体をPSでコーティングして、PSコーティング固体支持体またはPSコーティングELISAプレートを調製するステップ（または事前調製したPSコーティング固体支持体またはELISAプレートを使用してもよい）と、

(b) PS標的化抗体、好ましくはパビツキシマブ、および2GPIを含有することが疑われる生物学的試料をPSコーティング固体支持体に添加し、それによって試料中の2GPIをPS標的化抗体、好ましくはパビツキシマブ、およびPSコーティング固体支持体の両方に結合させるのに有効な条件下で抗体および試料を同時インキュベートするステップと、

50

(c) PS 標的化抗体、好ましくはバビツキシマブ、および 2 GPI の PS コーティング固体支持体への結合を検出し、それによって試料中の機能性 2 GPI を測定するステップと、を含む、方法をさらに提供する。

【0028】

2 GPI を含有することが疑われる生物学的試料は、血漿試料または血清試料などの血液試料であり得る。細胞上清などを含む、2 GPI を含有することが疑われる他の生物学的流体試料が使用されてもよい。

【0029】

本明細書に開示され、当業者にとって既知である、多くの結合形式のアッセイを用いることができる。好ましい実施形態において、PS 標的化抗体、好ましくはバビツキシマブは、それ自体が検出可能なシグナルを生成する検出可能な物質に結合することで、PS コーティング固体支持体に対する抗体および 2 GPI の結合が、検出可能なシグナルを検出および測定することによって検出および測定されるようになる。他の好ましい実施形態において、PS 標的化抗体、好ましくはバビツキシマブは、2 GPI を含有することが疑われる試料（血液試料など）の添加前に、PS コーティング固体支持体に添加される。

【図面の簡単な説明】

【0030】

以下の図面は、本明細書の一部を構成し、本発明の特定の態様をさらに実証するために含まれている。本発明は、本明細書に提示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせ、これらの図面のうちの1つ以上を参照することによってより良好に理解され得る。米国特許または出願ファイルは、少なくとも1つのカラーで作成された図面を含有し得る。カラーの図面（複数可）を有するこの米国特許または特許出願公開のコピーは、請求および必要な手数料の支払いをもって、特許局により提供される。

【0031】

【図1】見た目が均質になるまで精製した、3 G 4 抗体で処理したマウスにおける腫瘍成長の阻害。図1 A、SCIDマウスの乳房脂肪パッド内で成長する、確立された（直径0.6~0.7 cm、体積140 mm³）ヒトMDA-MB-435乳癌；図1 B、SCIDマウスの乳房脂肪パッド内で成長する、確立された（直径0.5~0.7 cm、体積110 mm³）ヒトMDAMB-231乳癌；図1 C、同系のBALB/cマウスにおいて皮下で成長する、小型メタA線維肉腫；および図1 D、SCIDマウスにおいて皮下で成長する、大型（直径0.8~1 cm、体積370 mm³）ヒトL540ホジキン腫瘍。矢印で示した日から開始して、8~10匹のマウスの群に、100 μgの3 G 4 抗体（、白丸）または対照のBBG3抗体（、黒丸）を腹腔内注射した。その後、1週間に3回治療を続けた。

【図2】PS コーティングマイクロタイタープレートに結合する3 G 4 抗体は、血清依存性である。図2 A、3 G 4 抗体を、ウシ血清含有培地（、SCM）または無血清培地（、SFM）中で成長させた細胞から精製した。マイクロタイタープレートをPSでコーティングし、1%の鶏卵白由来の卵白アルブミン（OVA）中で遮断した。3 G 4 の段階希釈を、10%のウシ胎児血清（実線、FBS）または1%の鶏卵白由来の卵白アルブミン（破線、OVA）中で実行した。図2 B、マイクロタイタープレートをPSでコーティングし、1%のOVA中で遮断した。SFM中の3 G 4 の段階希釈を、示されるように、マウス（）、ラット（）、ヒト（）、およびウシ（）の種由来の10%の血清中で実行した。

【図3】3 G 4 抗体は、血漿タンパク質 2 GPI に結合する。マイクロタイタープレートをヒト血漿から精製したヒト 2 GPI（h 2 GPI）でコーティングし、1%のOVA中で遮断した。市販のマウス抗ヒト 2 GPI（、- 2 GPI）、SFM由来の3 G 4 抗体（、3 G 4）、および対照マウスIgG（、対照mIgG）の段階希釈を、1%のOVA中で実行した。

【図4】3 G 4 抗体はドメインIIで 2 GPI と結合する。マイクロタイタープレート

10

20

30

40

50

有しない(-X-、ドメインII-V)、ドメインIおよびIIを有しない(、ドメインIII-V)、ドメインI、II、およびIIIを有しない(、ドメインIV-V)、ならびにドメインI、II、III、およびIVを有しない(、ドメインV)h2 GPI ペプチドでコーティングした。プレートを1%のOVA中で遮断し、SFM由来の3G4抗体の段階希釈を1%のOVA中で実行した。

【図5】ch3G4抗体およびh2 GPIは共に、曝露されたPSを有する細胞に結合する。成体ウシ大動脈内皮(ABAE)細胞を、DMEM+10%の正常マウス血清(MS)中200μMのリゾホスファチジルコリン(LPC)に加えて、(i)ch3G4のみ、(ii)ch3G4+h2 GPI同時、または(iii)精製したh2 GPIのみと共に、30分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、(i)緩衝液のみ、(ii)緩衝液のみ、または(iii)ch3G4と共に、それぞれ30分間インキュベートした。最後に、細胞を洗浄し、固定し、蛍光マーカーで染色して、ch3G4の結合を検出した。ch3G4およびh2 GPIは、2μg/mlの濃度で使用した。ch3G4結合のピクセル面積を、MetaVueソフトウェアを使用して定量化した。値は、条件(i)下でのch3G4の結合に対するものであり、これを1に設定した。

【図6】h2 GPIの脂質結合領域は、曝露されたPSを有する細胞へのch3G4抗体の結合を媒介する。図6A、ABAE細胞を、ch3G4抗体に加えて、(i)非脂質結合形態のh2 GPI(ニック入りh2 GPI)または(ii)インタクトなh2 GPI(「h2 GPI」)と共にインキュベートした。インキュベーションは、DMEM+10%のMS中200μMのLPCの存在下または不在下で30分間実行した。その後、細胞を洗浄し、固定し、蛍光マーカーで染色して、ch3G4の結合を検出した。ch3G4抗体、インタクトなh2 GPI、およびニック入りh2 GPIを、2μg/mlの濃度で使用した。ch3G4結合のピクセル面積を、MetaVueソフトウェアを使用して定量化した。値は、条件(i)LPCなしの下でのch3G4の結合に対するものであり、これを1に設定した。図6B、マイクロタイタープレートのウェルを、インタクトなh2 GPI(三角、h2 GPI)またはニック入りh2 GPI(四角、ニック入り)でコーティングし、1%のOVA中で遮断した。ch3G4抗体(黒)または対照mIgG(白)の段階希釈を、1%のOVA中で実行した。

【図7】h2 GPI媒介3G4抗体が、曝露されたPSを有する細胞に結合するには、二価性が必要とされる。図7A、ABAE細胞を、DMEM+10%のFBS中200μMのLPCの存在下で、20nMの3G4、3G4F(ab')₂、または3G4 Fab'モノマーと共に30分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、固定し、蛍光マーカーで染色して、3G4抗体または抗体断片の結合を検出した(3G4F(ab')₂および3G4 Fab'を図7Aに示す)。抗体結合のピクセル面積を、MetaVueソフトウェアを使用して定量化した。値は、LPCの不在下での3G4の結合に対するものであり、これを1に設定した。図7B、ABAE細胞を、200μMのLPC、40nMの精製したh2 GPI、20nMのch3G4、およびDMEM+10%のMS中ある力価の3G4 Fab'モノマーと共に30分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、固定し、蛍光マーカーで染色して、ch3G4の結合を検出した。ch3G4結合のピクセル面積を、MetaVueソフトウェアを使用して定量化した。値は、競合3G4 Fab'を有しないch3G4の結合に対するものであり、これを100に設定した。

【図8】3G4およびパビツキシマブ抗体ファミリーは、h2 GPIに依存した様式でPSに結合する。3G4、パビツキシマブ、および関連治療PS標的化抗体は(ドメインIで)h2 GPIに結合し、転じて、ドメインVを介してPSに結合する。通常、h2 GPIはモノマーであり、PSには弱くしか結合せず、急速に解離する。3G4またはパビツキシマブなどのPS標的化抗体の存在下で、曝露されたPSを有する表面が存在する場合、h2 GPIの2つの分子がPSに結合し、二価抗体によって架橋され得ることで、安定した複合体が形成される。抗体-h2 GPI複合体は、曝露されたPSを有する細胞から(P S標的化抗体の不在下で)モノマーh2 GPIよりも1,000倍超緩徐に解離する。

10

20

30

40

50

【図 9】低レベルの 2 G P I は、インビボでの 3 G 4 抗体の前臨床抗腫瘍活性を支持する。図 9 A、雑種細胞から産生されたときの 3 G 4 抗体の純度が 9 0 % であると仮定すると、3 G 4 抗体で治療したマウスは、0 . 1 2 の 2 G P I 対抗体のモル比で、2 μ g / m l のウシ 2 G P I を含有する。図 9 B、純度 8 0 % の出発点において、3 G 4 抗体で治療したマウスは、0 . 2 5 の 2 G P I 対抗体のモル比で、4 μ g / m l のウシ 2 G P I を含有する。

【図 1 0】低レベルの 2 G P I は、インビボでの曝露された P S を有する細胞へのパビツキシマブの結合を支持する。A B A E 細胞を、P S 曝露を誘導するための 2 0 0 μ M の L P C、4 0 n M の精製した h 2 G P I、および D M E M + 1 0 % のマウス血清中増加濃度の c h 3 G 4 抗体（パビツキシマブ）と共に 3 0 分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、固定し、蛍光マーカーで染色して、c h 3 G 4 の結合を検出した。c h 3 G 4 結合のピクセル面積を、M e t a V u e ソフトウェアを使用して定量化した。値は、3 2 0 p M の c h 3 G 4 の結合に対するものであり、これを 1 に設定した。

【図 1 1】低レベルの 2 G P I は、インビトロでプレート上の P S に結合する 2 a G 4 抗体を支持する。マイクロタイタープレートを、P S でコーティングした。一定量の 2 a G 4 抗体を含有する溶液を、（卵白アルブミン中）増加量のヒト 2 G P I の存在下で、P S への結合について試験した。T M B を基質として、H R P 共役抗ヒト I g G を二次抗体として使用して、結合した抗体を検出し、吸光度を 4 5 0 n m の波長で読み取った。

【図 1 2】様々なヒト血清中、インビトロで P S に結合するパビツキシマブ。マイクロタイタープレートを、P S でコーティングした。6 つの異なる個々のヒト血清試料を得、名目上番号 3 ()、番号 4 ()、番号 9 ()、番号 1 1 (- x -)、番号 1 3 (- x -)、および番号 1 9 () と呼び、P B S 中で希釈して、0 . 1 % までの様々な % のヒト血清を得た。2 μ g / m l のパビツキシマブ - H R P を、各 % のヒト血清溶液に添加した。ヒト血清中のパビツキシマブ - H R P のそれらの混合物を、P S プレートに添加し、結合させた。プレートを洗浄し、T M B 基質を添加し、吸光度を 4 5 0 n m の波長で読み取った。

【図 1 3】難治性進行性癌を有する患者への投与後の、平均血清パビツキシマブ濃度。パビツキシマブを、0、2 8、3 5、および 4 2 日目に 0 . 1 m g / k g (、白丸) または 0 . 3 m g / k g (、白四角) で静脈内投与し、パビツキシマブを、0、7、1 4、および 2 8 日目に 1 m g / k g (、黒丸) または 3 m g / k g (、黒四角) で投与した。投与後の示された日に、平均血清パビツキシマブ濃度を決定した。定量化の下限は、0 . 1 μ g / m l であった。

【図 1 4】パビツキシマブ投与後の患者における 2 G P I レベル。H C V に感染した患者に、1 m g / k g、3 m g / k g、および 6 m g / k g の量で、（太字の黒矢印 で示した日に）反復用量のパビツキシマブを投与した。各用量（1 m g / k g、上（破）線；3 m g / k g、中央線；6 m g / k g、下線）について、治療後の示した日に血清 2 G P I レベルを決定し、治療前 2 G P I レベルと比較した。

【図 1 5】1 N 1 1 (P G N 6 3 5) 抗体は、血清に依存した様式で P S に結合する。プレートにコーティングした P S、およびホスファチジルコリン (P C) とスフィンゴミエリン (S M) との混合物 (P C / S M) に対する s c F v 形態の 1 N 1 1 の結合を、E L I S A によって試験した。ポリスチレンプレートを、1 0 μ g / m l の P S または同量の P C / S M の混合物（各々ヘキササン中に溶解したもの）でコーティングした。ヘキササンが蒸発した後、P B S 中の 1 0 % のヒト血清（+ 1 0 % の血清）または 1 % の卵白アルブミン（+ 1 % の O V）を添加し、1 時間インキュベートした。2 0 μ g / m l の精製 1 N 1 1 s c F v を、各抗原について 6 つのウェルのうちの第 1 のウェルに、1 0 % のヒト血清（+ 1 0 % の血清）または 1 % の卵白アルブミン（+ 1 % の O V）のいずれかで添加し、3 倍希釈で滴定した。残りの結合した s c F v を、H R P 共役抗 c - m y c タグマウスモノクローナル抗体 (I n v i t r o g e n) によって検出した。

【図 1 6】機能性 2 G P I の標準曲線。既知量の機能性 2 G P I の試料を、実施例 X V I に記載される機能性 2 G P I アッセイで試験し、プロットして、標準曲線を得た。

10

20

30

40

50

標準曲線から、試験試料、特に希釈した血漿または血清試験試料中の機能性 2 G P I の量を決定することができる。

【図 1 7】非小細胞肺癌 (N S C L C) を治療するためのバビツキシマブおよびドセタキセルの第 I I I 相試験に参加した患者における、治療前の機能性 2 G P I レベル ($\mu g / m l$) の分布。図 1 7 A、全 5 9 2 人の評価可能な患者の機能性 2 G P I の分布；図 1 7 B、同じ患者からの 2 G P I のボックスプロット；図 1 7 C、バビツキシマブおよびドセタキセルで治療した患者 (2 9 4 人の評価可能な患者) の機能性 2 G P I の分布；ならびに図 1 7 D、プラセボおよびドセタキセルで治療した患者 (2 9 8 人の評価可能な患者) の機能性 2 G P I の分布。

【図 1 8】2 0 0 $\mu g / m l$ 以上の機能性 2 G P I レベルを有する N S C L C 患者が、バビツキシマブで治療したときに生存期間が延長 (m O S) する傾向があることを示す、第 I I I 相試験のカプランマイヤー生存曲線。図 1 8 A、バビツキシマブで治療した患者において、2 0 0 $\mu g / m l$ 以上の機能性 2 G P I を有する患者 (「バビツキシマブ：B 2 G P 1 2 0 0」、実線で青色の上線) は、2 0 0 $\mu g / m l$ 未満の 2 G P I を有する患者 (「バビツキシマブ：B 2 G P 1 < 2 0 0」、破線で青色の下線) とは対照的に、生存期間が延長する傾向がある。図 1 8 B、2 0 0 $\mu g / m l$ 以上の機能性 2 G P I を有する患者において、バビツキシマブおよびドセタキセルで治療した患者 (「バビツキシマブ」、青色の上線) は、プラセボおよびドセタキセル (「プラセボ」、緑色の下線) で治療した同じ 2 G P I レベル (2 0 0 $\mu g / m l$ 以上) を有する患者とは対照的に、生存期間が延長する傾向がある。

【図 1 9】前臨床研究における 3 G 4 抗体の P S に結合する機能的活性および抗腫瘍活性を支持する 2 G P I レベルと、第 I I I 相試験および他の臨床試験の患者における 2 G P I レベルとの比較。第 I I I 相試験における 5 9 2 人の評価可能な患者の治療前の機能性 2 G P I レベルの分布は、図 1 7 A に明記されるものと同じである。2 0 0 $\mu g / m l$ 以上の機能性 2 G P I レベル (濃い橙色と明るい橙色の棒を合わせて) は、第 I I I 相試験においてバビツキシマブで治療した N S C L C 患者 (図 1 8 A および図 1 8 B) (ならびに実施例 X V I I I および実施例 X X におけるように、バビツキシマブで治療した他の N S C L C および膵臓癌患者についても) が、生存期間が延長する傾向を提供する。2 0 0 $\mu g / m l$ ~ 2 9 0 $\mu g / m l$ (濃い橙色) の範囲内の機能性 2 G P I レベルは、第 I I I 相試験においてバビツキシマブで治療した N S C L C 患者について、統計的に有意なより良好な m O S を提供する (表 1 4 A) 。約 1 0 $\mu g / m l$ 以上 (、長い緑色の矢印) または約 6 0 $\mu g / m l$ 以上 (>、短い緑色の矢印) の機能性 2 G P I レベルは、前臨床研究におけるバビツキシマブの P S に結合する機能的活性および抗腫瘍活性に十分である (実施例 V) 。

【図 2 0】実施例 X V I I I の A に報告される、実施例 X I I I の N S C L C を治療するためのバビツキシマブおよびドセタキセルの第 I I 相試験の患者における治療前の機能性 2 G P I レベル ($\mu g / m l$) の分布。図 2 0 A、全 1 1 9 人の評価可能な患者の機能性 2 G P I の分布；図 2 0 B、3 m g / k g のバビツキシマブおよびドセタキセルで治療した患者 (4 0 人の評価可能な患者) の機能性 2 G P I の分布；ならびに図 2 0 C、プールされた対照群の患者 (プラセボまたは 1 m g / k g のバビツキシマブ) (7 9 人の評価可能な患者) の機能性 2 G P I の分布。

【図 2 1】2 0 0 $\mu g / m l$ 以上の機能性 2 G P I レベルを有する N S C L C 患者が、バビツキシマブで治療したときに生存期間が延長する傾向を示す、実施例 X I I I の第 I I 相試験からのカプランマイヤー生存曲線。図 2 1 A、3 m g / k g のバビツキシマブで治療した患者において、2 0 0 $\mu g / m l$ 以上の機能性 2 G P I を有する患者 (「バビツキシマブ：B 2 G P 1 2 0 0」、青色の上線) は、2 0 0 $\mu g / m l$ 未満の 2 G P I を有する患者 (「バビツキシマブ：B 2 G P 1 < 2 0 0」、黄色の下線) とは対照的に生存期間が延長する傾向がある。図 2 1 B、2 0 0 $\mu g / m l$ 以上の機能性 2 G P I を有する患者において、3 m g / k g のバビツキシマブ (「バビツキシマブ」、青色の上線) で治療した患者は、併用対照群の患者 (「バビツキシマブ」、緑色の下線) とは対照的

10

20

30

40

50

に生存期間が延長する傾向がある。図 2 1 C、併用対照群の患者において、 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以上の機能性 2 GPI を有する患者（「プラセボ：B 2 GPI 200」、青色の線）は、 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 未満の 2 GPI を有する患者（「プラセボ：B 2 GPI < 200」、黄色の線）と類似した生存期間を有する。

【図 2 2】実施例 X V I I I の B に報告される、実施例 X I I の膵臓癌を治療するためのゲムシタビンおよびパビツキシマブの第 I I 相試験の患者における、治療前の機能性 2 GPI レベル（ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ）の分布。31 人全ての評価可能な患者の機能性 2 GPI の分布を示す。

【図 2 3】ゲムシタビンおよびパビツキシマブで治療した膵臓癌患者が、 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 未満の機能性 2 GPI レベル（「B 2 GPI < 200」、黄色の下線）とは対照的に、機能性 2 GPI が $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以上のレベル（「B 2 GPI 200」、青色の上線）で存在するときに生存期間が延長する傾向を示す、実施例 X I I の第 I I 相試験からのカプランマイヤー生存曲線。

【図 2 4】実施例 X V I I I の C に報告される、NSCLC を治療するためのパビツキシマブおよびパクリタキセル / カルボプラチンの第 I I 相試験の患者における、治療前の機能性 2 GPI レベル（ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ）の分布。図 2 4 A、全 84 人の評価可能な患者の機能性 2 GPI の分布；図 2 4 B、パビツキシマブおよびパクリタキセル / カルボプラチンで治療した患者（44 人の評価可能な患者）の機能性 2 GPI の分布；ならびに図 2 4 C、パクリタキセル / カルボプラチン対照群の患者（40 人の評価可能な患者）の機能性 2 GPI の分布。

【図 2 5】 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以上の機能性 2 GPI レベルを有する NSCLC 患者が、パビツキシマブで治療したときに生存期間が延長する傾向を示す、実施例 X V I I I の C に報告される第 I I 相試験からのカプランマイヤー生存曲線。図 2 5 A、パビツキシマブで治療した患者において、 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以上の機能性 2 GPI（「C / P + パビツキシマブ：B 2 GPI 200」、青色の上線）を有する患者は、 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 未満の 2 GPI を有する患者（「C / P + パビツキシマブ：B 2 GPI < 200」、黄色の下線）とは対照的に生存期間が延長する傾向がある。図 2 5 B、 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以上の機能性 2 GPI を有する患者において、パビツキシマブで治療した患者（「C / P + パビツキシマブ」、青色の上線）は、対照群の患者（「C / P」、緑色の下線）とは対照的に生存期間が延長する傾向がある。図 2 5 C、対照群の患者において、 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以上の機能性 2 GPI を有する患者（「C / P：B 2 GPI 200」、青色の線）は、 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 未満の 2 GPI を有する患者（「C / P：B 2 GPI < 200」、黄色の線）と比較して生存期間が低減する傾向がある。

【図 2 6】パビツキシマブおよびドセタキセル、その後に後続免疫療法（「SACT - IO」）で治療した患者（青色の上線）が、ドセタキセル単独、その後に後続免疫療法で治療した患者（緑色の下線）とは対照的に、統計的に有意なより良好な mOS を有することを示す、カプランマイヤー生存曲線。治療群、mOS、および統計的分析を、これらの生存曲線について表 1 6 に作表する（実施例 X I X）。

【図 2 7】 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以上の機能性 2 GPI レベルを有する NSCLC 患者が、パビツキシマブ、その後に後続免疫療法（「SACT - IO」）で治療したときに統計的に有意なより良好な mOS を有することを示す、カプランマイヤー生存曲線。 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以上の機能性 2 GPI を有する患者において、パビツキシマブで治療した患者（「ドセタキセル + パビツキシマブ」、青色の線）は、SACT - IO を受ける患者（「SACT IO あり」、実線）および SACT - IO を受けない患者（「SACT IO なし」、破線）を含む対照患者（「ドセタキセル + プラセボ」、緑色の線）とは対照的に、生存期間が延長する傾向がある。

【発明を実施するための形態】

【0032】

現代では、患者の疾患リスクおよび / または予測される奏効などの要因に基づいて、個々の患者に合わせて治療を調整することにますます重点が置かれている。この概念は一般

10

20

30

40

50

に、「個別化医療」として説明することができる。特定の治療法の有効性に寄与する異なる構成要素についてのより深い理解は、患者を層別化するための基礎を提供し、それによって連続した患者集団について治療結果を改善することができる。本発明は、パビツキシマブなどのPS標的化抗体を使用する免疫療法を最適化するための新たなバイオマーカーを提供することによる、そのような線に沿った進歩となる。

【0033】

A．治療標的としてのホスファチジルセリン

ホスファチジルセリン(PS)は、上流免疫チェックポイントとして機能し、宿主の免疫応答を調節する、高度に免疫抑制性の分子である。したがって、PSは、癌およびウイルス感染症を含む様々な疾患に関与している。したがって、PS標的化抗体の形態にある免疫療法剤は、癌を含むこれらの疾患に対する新たな治療の選択肢を提供する。

10

【0034】

より詳細には、正常細胞において、PSは、原形質膜の内側リーフレットに分離されるが、様々な病態において、特に癌およびウイルス感染症において、罹患した異常細胞内で原形質膜の外側リーフレットに対して外在化される。癌の文脈において、PSの外在化を引き起こす環境ストレス要因のいくつかは、低酸素/再酸素負荷、酸化ストレス、および特定のサイトカインへの曝露である。PSの外在化はまた、細胞死および免疫食細胞クリアランスの条件下でも生じる(Birgeら、2016)。その後、PSが、免疫細胞上のPS受容体(例えば、TIM3およびTIM4、BAI1、スタビリン(stabilin)2、ならびにRAGE)によって、任意でいくつかの架橋タンパク質のうちの1つ以上を介して認識および結合されることで、PSは、免疫抑制を誘導および維持する。腫瘍微小環境内では、PSは、腫瘍血管内皮細胞、腫瘍細胞、および腫瘍由来のエキソソームの表面上に曝露され、免疫抑制のプロセスが重複しているため、抗腫瘍および炎症反応の発生が予防されている。

20

【0035】

曝露されたPSは、瀕死の細胞の認識およびクリアランスを促進し、免疫抑制性サイトカイン(例えば、TGF-およびIL-10)の放出を引き起こし、炎症誘発性サイトカイン(例えば、TNF-およびIL-12)の産生を阻害する、食作用シグナルである。PSはまた、マクロファージを免疫抑制性M2表現型に偏らせ、樹状細胞(DC)の成熟およびDCが抗原を提示する能力を阻害する一方で、DCを刺激して、T細胞耐性を促進する免疫抑制性メディエーターを分泌させる。要約すると、PSは、免疫抑制された腫瘍微小環境の誘導および維持における中心的要因である。

30

【0036】

B．PS標的化抗体

腫瘍微小環境内でPS曝露が腫瘍進行を促進する傾向のために、PS標的化抗体を使用して、免疫細胞上の特定の受容体へのPSの結合を遮断することによって、効果的な癌療法を提供することができる(Yinら、2013)。下記に例証されるように、いくつかのそのようなPS標的化抗体が、治療薬として開発されている。「PS標的化抗体」の群には、抗体がPSに直接結合するか、またはPSと強固な結合複合体を形成するのに血清タンパク質を必要とするかどうかに関わらず、インビトロでPSに操作可能に結合し、インビボで病態時に曝露されるPS(特に腫瘍細胞上および腫瘍血管上のPS)を特異的に局在化させ、それに結合する、全ての抗体が含まれる。そのような「直接的」および「間接的」PS標的化抗体は、以下により詳細に記載される。

40

【0037】

B1．パビツキシマブ

PS標的化抗体の前臨床潜在性を評価するために生成された初期のモノクローナル抗体は、3G4、IgG₃ mAbと呼ばれる抗体である(実施例I; Ranら、2005; Huangら、2005)。3G4抗体を分泌する雑種細胞株の試料をアメリカ合衆国培養細胞系統保存機関(ATCC)に寄託し、ATCC受入番号PTA4545を与えた。寄託した雑種細胞の入手可能性は、いかなる政府の権限の下でもその特許法に従って付与

50

された権利に違反して本発明を実施するための認可として解釈されるべきではない。

【0038】

バビツキシマブは、マウス可変（抗原結合）領域がヒト抗体定常領域に操作可能に結合している、3G4マウス抗体のヒトキメラバージョンである（実施例III、C）。バビツキシマブファミリーの抗体は、多数の米国特許、例えば、米国特許第7,247,303号および米国特許第7,572,448号に詳細に記載されており、バビツキシマブは、ATCC PTA4545として寄託された抗体のヒトキメラ形態を調製することによって再構築することができる。抗体のかなりの部分がヒト起源のものであるため、バビツキシマブは、患者に投与したときの免疫原性が低い。

【0039】

3G4およびバビツキシマブ抗体は、血清の存在下で、アニオン性リン脂質、特にPSに強く結合するが、ホスファチジルイノシトール（PI）、ホスファチジン酸（PA）、ホスファチジルグリセロール（PG）、およびカルジオリピン（CL）にも強く結合する（Ranら、2005）。これらのアニオン性リン脂質のうち、PSは、生理学および病理学的に最も関連性がある。3G4およびバビツキシマブは、血清の存在に関わらず、中性リン脂質、ホスファチジルコリン（PC）、スフィンゴミエリン（SM）、またはホスファチジリエタノールアミン（PE）に対して検出可能な結合を呈さない。

【0040】

当初、3G4およびバビツキシマブ抗体は、PSに直接結合すると考えられていたが、PS結合は、2-糖タンパク質1（2GPI）として特定される血清タンパク質によって媒介されることが後に決定された（実施例IV；Lusterら、2006）。実際に、精製2GPI、およびELISAに典型的に使用される10%の血清中に単に存在することによって提供される2GPIを含む、2GPIの存在下で実行される酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）において、3G4およびバビツキシマブはPSに強く結合する。

【0041】

アポリポタンパク質Hとしても知られる2GPIは、5つのドメイン、I、II、III、IV、およびV（1、2、3、4、および5）を有し、ドメイン構造は、哺乳動物にわたって保存されている。2GPIは、三次構造としてそれら5つの識別可能なドメイン内に折り畳まれ、閉じた円形構造または開いたJ字形もしくはフック構造を有し得る。2GPIは、酵素プラスミンでの切断などによって、Lys317/Thr318切断部位で、ドメインVが「ニック」されていない限り（これは、PS結合を破壊する）、そのC末端ドメインであるドメインV内の正電荷領域を通して、アニオン性リン脂質、特にPSに結合する（Huntら、1993；Hunt & Krilis、1994）。3G4およびバビツキシマブ抗体は、2GPIのドメインIIに結合する。これは、治療抗体としての3G4およびバビツキシマブの安全性を強化するが、これは、2GPIに結合する特定の他の抗体が病理学に関連付けられているが、それらの抗体は2GPIのドメインIに結合するためである。

【0042】

PSへの3G4およびバビツキシマブ抗体の高親和性結合は、抗体と2GPIとの二価相互作用を必要とする（実施例IV、図8）。そのような抗体が不在である場合、2GPIは、アニオン性リン脂質、特にPSに低い親和性をもってしか結合しない。これは、3G4およびバビツキシマブが、高親和性複合体として2GPIの存在下でPSに結合し、PSへの2GPIの結合を1μMから1nMへと調節することを示す研究において定量化されている。

【0043】

PSへの3G4およびバビツキシマブ抗体の2GPI依存性結合を、図8に描写する。バビツキシマブファミリーの抗体は、2GPIのドメインIIに結合する。述べた通り、バビツキシマブは2GPIのドメインIIに結合するため、それは、2GPIのドメインIに結合する抗体が存在する抗リン脂質抗体症候群に関連するものなどの副作用

10

20

30

40

50

とは無関係である (de Laatら、2005 ; de Laatら、2006 ; Ioannouら、2007)。抗体と 2 GPI との高親和性二価相互作用は、PS が細胞表面上および細胞膜上で外在化される場合を含む、PS への結果として生じる高親和性結合を調和させる。

【0044】

3 G 4 およびバビツキシマブ抗体は、2 GPI に結合するが、それらは、インビボで病態時に曝露される PS を特異的に局在化させ、それに結合するため、「PS 標的化抗体」と呼ばれる。PS は、健康な正常細胞の内側で維持され、病態時にのみ細胞表面上に曝露されるため、インビボでの抗体局在化は、PS に特異的であるだけでなく、PS がマーカーである疾患、特に癌、ならびにウイルス感染症および特定の他の病理学にも特異的である。

10

【0045】

図 8 はまた、PS に結合する 2 GPI 依存性抗体が、インビトロでもインビボと同じであるため、ELISA が治療法の正確なモデルであることも示す。特に、プレートが PS でコーティングされ、ELISA が血清の存在下で実行される ELISA において、3 G 4、バビツキシマブなどの抗体は、PS と安定した結合複合体を形成することができる。したがって、ELISA アッセイは、治療中のインビボの状態を模倣し、ここで、PS は、腫瘍微小環境内の細胞またはウイルス感染細胞などの疾患環境内の細胞上にのみ特異的に曝露される。ELISA と同様に、3 G 4 およびバビツキシマブ抗体が曝露された PS に遭遇するとき、それらは血液中に存在する 2 GPI と安定した結合複合体を形成することができる。PS が ELISA ウェル上にあるか、または罹患した細胞上にあるかに関わらず、抗体 - 2 GPI 複合体は、モノマー 2 GPI、すなわち、PS 標的化抗体を有しない 2 GPI に対するよりも、PS に対して 1,000 倍超高い親和性を有する。

20

【0046】

B 2 . 1 1 . 3 1 などの直接 PS 結合抗体

バビツキシマブなどの間接 PS 結合抗体または PS 標的化抗体に加えて、PS 標的化抗体のファミリー全体は、PS に直接結合する抗体、すなわち、直接 PS 結合抗体または直接 PS 標的化抗体を含む。そのような「直接 PS 結合抗体」(または「直接 PS 標的化抗体」)は、PS に対して機能的に特異的であるだけでなく、(間接結合抗体と同様に)インビトロおよびインビボで PS を標的化し、それに結合もする抗体であるが、インビトロ結合アッセイにおいてすら、PS と強固な結合複合体を形成するのに 2 GPI などの血清タンパク質は必要としない抗体である。

30

【0047】

そのような直接 PS 結合抗体の特定の一例は、9 D 2 と呼ばれるマウスモノクローナル抗体である (Ranら、2002)。9 D 2 抗体は、腫瘍血管を局在化させ、インビボで抗腫瘍効果を発揮することが示されている (Ranら、2002)。直接 PS 結合抗体の別の例は、1 1 . 3 1 と呼ばれる完全ヒト抗体 (PGN 6 3 2) である。1 1 . 3 1 抗体もまた、インビボで (例えば、MDA - MB - 4 3 5 乳癌異種移植片を保有するマウスにおいて) 抗腫瘍効果を発揮することが示されており、印象的な抗ウイルス効果を示す (Moodyら、2010 ; 米国特許第 7,455,833 号)。

40

【0048】

したがって、直接 PS 結合抗体は、PS がマーカーである様々な疾患、特に癌およびウイルス感染症を治療する上で有用である。しかしながら、そのような直接結合 PS 標的化抗体での治療を最適化するためのバイオマーカーは、典型的には、本発明におけるように 2 GPI などの血清タンパク質には依存せず、他の要因に依存するであろう。直接結合抗体の有用なバイオマーカーは、PS 標的化抗体の免疫バイオマーカーを含む。

【0049】

B 3 . 1 N 1 1 などの他の 2 GPI 依存性 PS 標的化抗体

本発明の好ましい実施形態は、PS 標的化抗体ファミリーの他の部分、つまり間接 PS 結合抗体に関する。本明細書で使用される場合、「間接 PS 結合抗体」または「間接 PS

50

標的化抗体」は、P S に対して機能的に特異的であり、インビトロで P S に操作可能に結合し、インビボで P S を標的化し、それに結合する抗体であるが、P S と強固な結合複合体を形成するのに血清タンパク質を必要とする抗体である。本発明は、特に、間接 P S 結合抗体または間接 P S 標的化抗体、すなわち、2 G P I 依存性 P S 結合抗体または 2 G P I 依存性 P S 標的化抗体のサブセットに関する。本明細書で使用される場合、「2 G P I 依存性 P S 結合抗体」または「2 G P I 依存性 P S 標的化抗体」は、P S に対して機能的に特異的であり、インビトロで P S に操作可能に結合し、インビボで P S を標的化する、すなわち、2 G P I を含有する血清または精製された血清の存在下で実行されるアッセイにおいてインビトロで P S に結合する抗体であるが、P S と強固な結合複合体を形成するのに血清タンパク質 2 G P I を必要とする抗体である。上記のように、そのような抗体の例には、マウス抗体 3 G 4 およびキメラ抗体バビツキシマブが含まれる。

10

20

30

40

50

【0050】

2 G P I 依存性 P S 標的化抗体の他の現在好ましい例は、1 N 1 1 (P G N 6 3 5) および 1 G 1 5 と呼ばれる完全ヒト抗体、好ましくは 1 N 1 1 抗体である。撮像および治療を含む、1 N 1 1 抗体、およびそのマウスキメラバージョンを使用するいくつかの研究が記載されている (G o n g ら、2013 ; F r e i m a r k ら、2016 ; G r a y ら、2016 a)。1 N 1 1 抗体の P S 結合特性を、図 15 に示す。1 N 1 1 をファージ提示法によって生成し、血清の存在下でのみ (または 2 G P 1 の存在下でのみ) P S への結合についてのアッセイを使用して選択した。図 15 に示されるように、当業者は、そのような研究を通例的に実行して、更なる P S 標的化抗体および 2 G P I 依存性 P S 標的化抗体を調製し、単離することができる。

【0051】

C . 広範な治療経験

上記に考察される P S 生物学から予測されるように、P S からのシグナルは、免疫細胞が腫瘍を認識し、それと戦う能力を阻害する。バビツキシマブおよび関連抗体は、P S とその受容体との関与を遮断することによって、および代替免疫活性化シグナルを送ることによって、この P S 媒介免疫抑制シグナル伝達を無効化する。したがって、P S 標的化抗体は、腫瘍内での免疫細胞の機能を転換させ、免疫活性化および抗腫瘍免疫応答の複数の徴候をもたらすことが示されている。

【0052】

バビツキシマブなどの P S 標的化抗体は、腫瘍微小環境内の免疫細胞を多局的に再プログラミングして、免疫活性化を支持することによって、P S 媒介免疫抑制のこの遮断を達成する (Y i n ら、2013)。したがって、バビツキシマブおよび関連抗体は、腫瘍微小環境内の免疫耐性を破壊する。抗体媒介 P S 遮断は、骨髄由来免疫抑制細胞 (M D S C)、形質転換増殖因子 - ベータ (T G F)、およびインターロイキン - 10 (I L - 10) のレベルを低減させ、インターフェロンガンマ (I F N)、腫瘍壊死因子 - アルファ (T N F)、およびインターロイキン - 12 (I L - 12) などの炎症誘発性サイトカインのレベルを増加させる。この P S 遮断はまた、M D S C および腫瘍関連マクロファージ (T A M) を優勢な M 2 から優勢な M 1 表現型へと再び偏らせ、樹状細胞 (D C) の成熟を促進し、細胞傷害性 T 細胞を活性化し、強力な適応抗腫瘍 T 細胞免疫を誘導する (Y i n ら、2013)。

【0053】

バビツキシマブおよび関連抗体はまた、自然免疫、すなわち、N K 細胞および M 1 マクロファージも活性化する。重要なことに、これらの抗体はまた、P S を特有に曝露する既存の腫瘍血管の選択的停止も引き起こし (R a n ら、2005 ; 米国特許第 7 , 572 , 448)、この活性は、腫瘍浸潤性 M 1 マクロファージおよび N K 細胞によって媒介される抗体依存性細胞媒介細胞傷害 (A D C C) を含む。このような腫瘍血管の破壊は、腫瘍細胞の破壊をもたらす。免疫療法および血管標的化のこれらの二重機構、特に A D C C 作用は、バビツキシマブが免疫活性化または従来の抗増殖化学療法に耐性のある腫瘍に対して有効であり得ることを意味する。

【0054】

他の免疫療法と同様に、P S 標的化抗体の抗腫瘍効果は、併用療法で使用される場合に増加する。バビツキシマブおよび関連抗体と共に使用するための薬剤の一群は、放射線および/または化学療法剤などの、腫瘍微小環境内でのP S の曝露を増加させる薬剤および/または条件である(米国特許第7,422,738号、米国特許第8,486,391号、米国特許第7,572,448号)。したがって、抗腫瘍効果の増強は、ドセタキセルとの併用での乳腺腫瘍(Huangら、2005)および前立腺癌(Yinら、2013)の治療、ゲムシタピンとの併用での膵臓腫瘍の治療(Beckら、2006)、放射線との併用での肺癌(Heら、2007)および神経膠芽腫(Heら、2009)の治療、変異腫瘍抑制因子p53を再活性化するPRIMA-1との併用での進行性乳腺腫瘍の10治療(Liangら、2011)、アデノウイルスとの併用でのアデノウイルスの腫瘍脈管構造への再標的化(Hoggら、2011)、シスプラチンとの併用での手術後の肺癌再発の治療(Judyら、2012)、ならびにソラフェニブとの併用での肝細胞癌の治療(Chengら、2016)において前臨床的に実証されている。

【0055】

バビツキシマブなどのP S 標的化抗体と共に使用するための別の薬剤の群は、他のIO剤である。P S は上流免疫チェックポイントであるため、バビツキシマブの作用機構は利用可能な治療剤に対して相補的である。したがって、CTLA-4、PD-1、およびPD-L1に対する抗体の形態の他のチェックポイント阻害剤との併用において、バビツキシマブファミリーの抗体について、印象的な併用療法が前臨床的に示されている(Freimarkら、2016; Grayら、2016a)。生存期間の増加を含むそのような20抗腫瘍活性は、PD-1遮断単独との比較での、腫瘍内活性化CD8T細胞の増加、PD-L1発現に関連したM2マクロファージおよびMDS Cの低減、ならびに脾臓内の腫瘍反応性T細胞の増加に関連付けられた。

【0056】

したがって、これらのような前臨床結果は、バビツキシマブファミリーのP S 標的化抗体がP S 媒介免疫抑制を逆転させ、治療的に有効な適応抗腫瘍免疫を開始することを確認する。したがって、下流免疫チェックポイントの遮断と併用したバビツキシマブでの治療は、奏効の結果、期間、およびレベルを有意に改善する、頑強かつ長期にわたる抗腫瘍免疫をもたらす(Freimarkら、2016; Grayら、2016a)。30

【0057】

バビツキシマブなどのP S 標的化抗体の有利な安全性プロファイルを考慮して、これらの抗体はまた、放射線、化学療法剤(「化学放射線療法」)、および/または免疫療法との三種併用、ならびに2つの免疫療法剤との三種併用を含む、三種併用療法において効果的に併用することができる。近年、P S、PD-1、およびLAG-3を標的化する抗体を使用する三種併用について、印象的な結果が示された(Grayら、2016b)。

【0058】

そのような前臨床データに立脚して、バビツキシマブは、主に他の適応症に承認された治療薬と併用して、800人超の患者を対象とした臨床研究において評価されている。様々な抗ウイルス研究および抗腫瘍研究が、治療活性を示している。広範な前臨床試験およびヒトにおける薬物動態プロファイル(実施例VI; Gerberら、2011; Digumartira、2014も参照されたい)に基づいて、静脈内(IV)投与した3mg/kgの用量のバビツキシマブが、肺癌、乳癌、肝臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、および腎臓癌を有する患者を含む腫瘍学のほとんどの臨床研究において決定され、選択された。現在、バビツキシマブについて、HER2陰性転移性乳癌を有する患者におけるパクリタキセル(Chalasanira、2015)、進行性非小細胞肺癌(NSCLC)におけるパクリタキセル-カルボプラチン(Digumartira、2014)、肝細胞癌におけるソラフェニブ(Chengら、2016)、および以前に治療された進行性非扁平上皮NSCLCにおけるドセタキセル(Gerberら、2016)との併用で、有望な臨床的抗腫瘍結果が発表されている。40

10

20

30

40

50

【0059】

要約すると、第Ⅰ相および第Ⅱ相臨床研究からの結果は、バビツキシマブの臨床的に有意な治療効果を実証した。今では、PS標的化抗体を使用して様々な疾患の治療に成功したことを示すかなりの量の研究があるが、現在まで、そのような治療法のための既知のバイオマーカーは存在しない。PS標的化抗体を用いた臨床経験は主に、バビツキシマブなどの2GPI依存性PS標的化抗体に基づいている。治療を最適化するためのバイオマーカーが最も必要とされているのは、それらの抗体である。そのようなバイオマーカー（複数可）を定量化するための高感度かつ迅速な方法と共に、バビツキシマブ治療のための1つ以上の循環バイオマーカーを特定することができれば、これは重要な発展であり、患者選択を促進して、治療結果を改善するための低侵襲試験（複数可）を提供する。

10

【0060】

D. PS標的化抗体のためのバイオマーカー

癌治療薬の分野において、バイオマーカーは、治療に対する奏効に影響を与える特定の患者の特徴を特定する上でますます重要な役割を果たしている。これは、標的化癌治療、ならびにより近年ではPD-1およびPD-L1阻害剤を含むチェックポイント阻害剤について歴史的に見られてきた。

【0061】

バビツキシマブなどのPS標的化抗体での治療に重要なバイオマーカーが、分析されている。本明細書で使用される場合、「バビツキシマブバイオマーカー」は、治療法の少なくとも一部分として、PS標的化抗体、好ましくはバビツキシマブを含む治療法での治療による臨床的利益を改善するために、患者または患者集団を選択する上で、単独で、または2つ以上もしくは複数のバイオマーカーのうちの1つとして使用するためのバイオマーカーである。したがって、2GPIを含むそのようなバビツキシマブバイオマーカーは、治療前に、患者、患者集団、または亜集団が、PS標的化抗体（好ましくはバビツキシマブ）を含む併用療法を含む、PS標的化抗体（好ましくはバビツキシマブ）を含む治療から恩恵を受ける可能性があるかどうかを予測するための方法において使用することができる。

20

【0062】

バビツキシマブ含有治療レジメンによる臨床的利益を改善するために、最も適切な患者集団を特定するための多重マーカー符号もまた考慮されている。これらの分析において特定された第1のバイオマーカーは、2GPIである（節E、節F）。全体として、特定されたバイオマーカーのパターンは、臨床開発および治療を誘導するためのバビツキシマブ「符号」である。

30

【0063】

バビツキシマブバイオマーカーの一部分として、バビツキシマブ免疫バイオマーカーが分析されている。そのようなデータは、免疫系を「ブライミング」する、すなわち、抗腫瘍免疫応答を増幅するためのバビツキシマブの使用を支持する。これに関して、腫瘍がT細胞および他の免疫細胞によってどれほど深く浸潤されているかに応じて、腫瘍を「熱」から「冷」までの尺度に配置することができることが現在既知である。免疫浸潤のレベル（「熱」）は、免疫系が腫瘍を認識し、それに関与しているかどうかを反映する。「熱」である腫瘍を有する患者はより良好な予後を有し、「冷」の腫瘍では、再発の可能性はるかに高くなる。重要なことに、バビツキシマブは、冷の腫瘍に正の影響を与え、それらを（他のチェックポイント阻害剤を含むものを用いて）より治療しやすくすることができることが決定されている。したがって、バビツキシマブ免疫バイオマーカーは、バビツキシマブ療法のために患者を選択することだけでなく、バビツキシマブおよび併用療法のための知的に選択された薬剤での治療のために患者を特定することにおいても、追加の用途を有する。

40

【0064】

D1. 試料

2GPI以外のバイオマーカー（節E）について、本発明を使用して、バイオマーカー

50

ーのうちの1つ以上を含有するか、または含有することが疑われる任意の生物学的試料（糞便を含む、動物、対象、または患者由来の任意の組織試料または生検を含む）を試験することができる。生物学的組織試料由来の清澄化された溶解物が使用されてもよい。しかしながら、本発明は、好ましくは天然の体液と共に使用され、したがって、「液体生検」とも呼ばれる低侵襲または非侵襲技術を使用して得られた生物学的試料に対して実行され得る試験を提供する。これは、典型的には結果を得るのに時間がかかり、それら自体に健康上のリスクを引き起こし得る、生検などのより厳密な技術よりも有利である。

【0065】

1つ以上のバイオマーカーを含有するか、または含有することが疑われる体液（生体液）の例には、血液、尿、腹水（ascites）、脳および脳脊髄液（CSF）、痰、唾液、鼻汁、骨髓吸引液、関節液または滑液、眼房水、羊水、卵胞液、耳垢、母乳（初乳を含む）、気管支肺胞洗浄液、精液、精漿（前立腺液を含む）、カウパー液または射精前液、膣液（female ejaculate）、汗、涙、囊胞液、胸水および腹水（peritoneal fluid）または洗浄液、心膜液、リンパ液、粥状液、胆汁、肝臓灌流液、間質液、月経、膿、皮脂、嘔吐物、膣分泌物、粘膜分泌物、水様便（stool water）、糞便液（faecal fluid）、腓液、副鼻腔からの洗浄液、体腔、気管支肺吸引液、または他の洗浄液が含まれる。生物学的試料にはまた、胎児または母体起源のものであり得る、胚盤胞腔（blastocyst cavity）、臍帯血、または母体循環も含まれ得る。

10

【0066】

試験するのに好ましい体液の例は、血液、尿、および腹水、特に卵巣癌を有するか、またはそれを有することが疑われる動物、対象、または患者由来の腹水である。尿試料が使用される場合、それは好ましくは、例えば、卵巣癌、前立腺癌、腎臓癌、膀胱癌、精巣癌、尿道癌、および陰茎癌などの泌尿器系、泌尿生殖器系、および生殖器系の癌に関連して使用される。2GPIと同様に、他のバイオマーカーのうちの1つ以上の検出および定量化は、好ましくは末梢血試料、好ましくは血漿、および最も好ましくは血清から実行される。

20

【0067】

D2. PS陽性エクソソーム

近年、エクソソームは癌に関連して注目を集めている。エクソソームは、インビボおよびインビトロで全ての細胞によって恒常的に放出される、40～50から100ナノメートル（nm）のサイズの膜由来小胞である。エクソソームは、細胞間の情報交換において重要な役割を果たし、多くの生理学および病理学的プロセスに影響を与える、生物学的に活性な分子シャトルである。癌において、エクソソーム機能は、癌細胞と、転移拡散のためのいわゆる「転移ニッチ」をプライミングする腫瘍間質との間の癌遺伝子の伝達を含む（Anら、2015）。

30

【0068】

エクソソーム形成に関与する複数の細胞内融合事象のために、細胞外に放出されたエクソソームの管腔内容物およびプロテオミクスプロファイルは、起源細胞のものに酷似している。したがって、腫瘍由来エクソソーム（「腫瘍エクソソーム」）は、それらが由来する癌細胞を反映するプロファイルを有する。実際に、起源細胞由来のサイトゾル（特に核酸）および原形質膜構成成分の存在は、循環エクソソームがバイオマーカー分析のための親細胞の特性を反映する容易に入手可能な代用物であることを意味する。

40

【0069】

正常細胞由来のエクソソームとは対照的に、腫瘍エクソソームは、それらの表面上にPSを有することを特徴とする。したがって、PS陽性腫瘍エクソソームを、癌の診断に使用することができる。固相アッセイを使用して、体液試料中のPS陽性腫瘍エクソソームを検出および定量化することによって癌を診断するための、新たな改善された方法、組成物、およびキットが近年報告された。そのような技術は、各々2016年6月9日に出願された米国特許出願第15/177,747号およびPCT特許出願第PCT/US16

50

/ 0 3 6 6 2 9 号に記載されている。

【 0 0 7 0 】

P S は高度に免疫抑制性であるため、P S 陽性腫瘍エキソソームの放出は、腫瘍が免疫抑制環境を促進する別の手段である。したがって、治療前の P S 陽性腫瘍エキソソームのレベルは、任意の癌治療のための治療法に対する奏効の予測マーカーとして使用することが提案されている。明らかに、P S 標的化抗体は、疾患微小環境内で P S に結合する必要がある。したがって、治療前の P S 陽性腫瘍エキソソームのレベルの測定は、バビツキシマブなどの P S 標的化抗体を使用する治療法に対する奏効の予測バイオマーカーとしての使用に特に説得力がある。

【 0 0 7 1 】

したがって、米国第 1 5 / 1 7 7 , 7 4 7 号および P C T 出願第 P C T / U S 1 6 / 0 3 6 6 2 9 号にあるものなどの方法は、本発明のバイオマーカー試験の一部として使用することができる。2 G P I の現在の定量化および/または他のバビツキシマブバイオマーカーとのそれらの併用は、例えば、予測分析全体の感度を増強するために、特定の実施形態において好ましくあり得る。

【 0 0 7 2 】

E . バイオマーカーとしての 2 G P I

それを否定する広範なデータ(例えば、実施例 V)にも関わらず、本発明者らは、治療前のレベルの 2 G P I を、バイオマーカーとして、またはバイオマーカーのパネルの一部として使用して、バビツキシマブおよび関連抗体を使用する治療法の治療結果を予測することができるかどうかを調査することを決定した。

【 0 0 7 3 】

2 G P I は、遊離のものトリポタンパク質に関連するものとの両方が見出される、豊富な血漿(血清)糖タンパク質である。マウス、ラット、イヌ、ウシ、チンパンジー、およびヒトを含む、様々な哺乳動物種由来の 2 G P I の D N A およびアミノ酸配列が既知である(Steinkasserer ら、1991)。例示的な参考までに、ヒト 2 G P I アミノ酸配列は、受入番号 1 C 1 Z A として提供されている。2 G P I はグリコシル化されており、50 k D a のタンパク質として通例的に報告されている(実施例 I V 、A 4、B 3 ; McNeil ら、1990 の図 3 ; Balasubramanian ら、1998 の図 1 ; Luster ら、2006 の図 1 D もまた参照されたい)。2 G P I は数十年間研究されているものの、2 G P I の正確な生理学的役割は未知のままである(Prakasam & Thiagarajan、2012)。実際に、2 G P I を欠損したノックアウトマウスの見かけ上健康な生活は、その役割が重要ではないことを示している(Sheng ら、2011)。

【 0 0 7 4 】

驚くべきことに、治療前の 2 G P I 、特に機能性 2 G P I の血中濃度が、バビツキシマブなどの P S 標的化抗体を使用する治療法に対する奏効を予測するためのバイオマーカーとして有効であることが決定された。実際に、P S と、バビツキシマブなどの P S 標的化抗体との両方に結合する 2 G P I を意味する「機能性」2 G P I のレベルは、バビツキシマブに対する応答のためのバイオマーカーとして単独で有用である。

【 0 0 7 5 】

バビツキシマブなどの P S 標的化抗体に対する応答のバイオマーカーとして治療前の 2 G P I レベルを単独で使用する本発明の実施形態において、それらの 2 G P I レベルは共に数値的に定義され、本明細書に定義される「機能性」2 G P I を検出できるアッセイにおいて測定される。しかしながら、バビツキシマブなどの P S 標的化抗体に対する応答の 2 つ以上または複数のバイオマーカーのうちの 1 つとして治療前の 2 G P I レベルを使用する本発明の実施形態において、2 G P I レベルはそれほど厳密に数値的に定義される必要はなく、機能性 2 G P I のアッセイにおいて単独で測定される必要はない。

【 0 0 7 6 】

したがって、バビツキシマブ含有療法のための二重または多重マーカー符号の一部としての $\beta 2\text{GPI}$ レベルは、「 $\beta 2\text{GPI}$ 高」対「 $\beta 2\text{GPI}$ 低」であり得、VeriStrat（登録商標）良好（VS 良好）および VS 不良、ならびに「熱」または「冷」腫瘍などの説明と同様である。バビツキシマブなどの PS 標的化抗体での治療には、「 $\beta 2\text{GPI}$ 高」を有する患者が選択されるべきである。この文脈において、「 $\beta 2\text{GPI}$ 高」である $\beta 2\text{GPI}$ のレベルは、約 180、190、200、210、220、230、240、250、または 260 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、好ましくは約 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の $\beta 2\text{GPI}$ （全 $\beta 2\text{GPI}$ 、または好ましくは機能性 $\beta 2\text{GPI}$ のいずれか）の治療前レベルである。したがって、「 $\beta 2\text{GPI}$ 高」は、約 180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、または 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に等しい $\beta 2\text{GPI}$ 、（全 $\beta 2\text{GPI}$ 、または好ましくは機能性 $\beta 2\text{GPI}$ のいずれか）の治療前レベルを含む。

10

【0077】

本発明はまた、機能性 $\beta 2\text{GPI}$ を検出することができるアッセイにおいて測定される、特定の数値的に定義された量および範囲の機能性 $\beta 2\text{GPI}$ に関するバイオマーカーも提供する。最も好ましい実施形態において、本発明は、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の機能性 $\beta 2\text{GPI}$ の治療前レベルに基づく患者の選択および治療に関する（実施例 XVI、図 18A および図 18B、実施例 XVII、実施例 XX）。これは、約 200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、または 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に等しい治療前レベルの機能性 $\beta 2\text{GPI}$ を含み得る。

20

【0078】

実施例 XVI、実施例 XVII、および実施例 XX のデータによって例証されるように、 $\beta 2\text{GPI}$ データが利用可能である全ての臨床試験において、バビツキシマブは、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の機能性 $\beta 2\text{GPI}$ を有する患者で全生存期間を改善した。結果を表 A に要約し、表中、治療欄は、引用された薬剤を併用した、列挙された適応症のバビツキシマブ治療を指す。加えて、バビツキシマブおよび後続 IO で治療した NSCLC 患者（実施例 XX）では、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の機能性 $\beta 2\text{GPI}$ がプラセボよりもバビツキシマブの生存期間にとって有利であることが示された（バビツキシマブでは mOS に到達しなかったのに対して、プラセボでは 12.3 ヶ月； $p = 0.002$ 、図 27）が、200 以上の $\beta 2\text{GPI}$ 群および 200 未満の $\beta 2\text{GPI}$ 群におけるバビツキシマブ治療患者間の比較は、mOS がいずれの群についてもまだ到達されていないため、未だ行うことができない。

30

【表 1】

表 A

治療前の 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の $\beta 2\text{GPI}$ がバビツキシマブの全生存期間を改善する

治療	全生存期間の中央値（月）			
	N	$\beta 2\text{GPI} \geq 200$	$\beta 2\text{GPI} < 200$	P 値
NSCLC ドセタキセル	294	11.4	9.8	0.054
NSCLC ドセタキセル	40	16.8	9.4	0.564
NSCLC パクリタキセル／カルボプラチン	44	17.0	14.2	0.147
膵臓癌 ゲムシタビン	31	7.4	5.3	0.038

40

【0079】

200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の広く適用可能なレベルの $\beta 2\text{GPI}$ と同様に、本発明の特定の現在好ましい実施形態は、特に NSCLC を治療するための、200 ~ 290 $\mu\text{g}/\text{ml}$

50

の範囲内の機能性 2 GPI の治療前レベルに基づく患者の選択および治療に関する（実施例 X V I I、表 1 4 A および表 1 4 B を比較されたい）。これはまた、200 ~ 270、200 ~ 280、200 ~ 290、200 ~ 300、200 ~ 310、200 ~ 320、210 ~ 270、210 ~ 280、210 ~ 290、210 ~ 300、210 ~ 310、および 210 ~ 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ などの範囲内の機能性 2 GPI の治療前レベルも含み、210 ~ 270、210 ~ 280、210 ~ 290、200 ~ 280、および 200 ~ 290 が現在好ましい。

【0080】

更なる実施形態において、本発明は、低い数として約 190、200、210、または 220 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のうちのいずれか 1 つから、高い数として約 260、270、280、290、300、310、または 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のうちのいずれか 1 つまでの範囲内の機能性 2 GPI の治療前レベルに基づく患者の選択および治療に関する。これらの範囲には以下、

約 190 ~ 260、190 ~ 270、190 ~ 280、190 ~ 290、190 ~ 300、190 ~ 310、および 190 ~ 320；

約 200 ~ 260、200 ~ 270、200 ~ 280、200 ~ 290、200 ~ 300、200 ~ 310、および 200 ~ 320；

約 210 ~ 260、210 ~ 270、210 ~ 280、210 ~ 290、210 ~ 300、210 ~ 310、および 210 ~ 320；

約 220 ~ 260、220 ~ 270、220 ~ 280、220 ~ 290、220 ~ 320、220 ~ 310、および 220 ~ 320 の全てが含まれ、その中でも約 210 ~ 270、210 ~ 280、210 ~ 290、200 ~ 280、および 200 ~ 290 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲が好ましい。

【0081】

200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の機能性 2 GPI の治療前レベルに基づく、患者の最も好ましくかつ一般的に適用可能な選択および治療に加えて、任意の特定の治療または併用治療のために上記の数または範囲のうちのいずれか 1 つ以上のどれが選択されようと、治療前レベルの 2 GPI、好ましくは機能性 2 GPI のバイオマーカーとしての、またはバイオマーカーのパネルの一部としての使用は、PS がマーカーである広範囲の疾患（特に癌およびウイルス感染症であるが、細胞内寄生体の感染症でもある）を有する患者の選択、ならびに単独で、または好ましくは任意の併用療法でのいずれかで、PS 標的化抗体を使用するそれらの治療に適用される。

【0082】

F . 2 GPI のアッセイ

2 GPI の治療前レベルは、パピツキシマブおよび関連抗体のバイオマーカーであるため、2 GPI のアッセイに関して以下の指針が提供される。本発明はまた、機能性 2 GPI を定量化するための特定の好ましいアッセイも提供する（節 G）。

【0083】

F 1 . 2 GPI 試料

血清タンパク質として、2 GPI は、下記のように末梢血（血漿、血清）試料中での検出に理想的である。しかしながら、PS が関与する様々な病態生理学的条件下で、2 GPI はインビボで内皮細胞に局在化することが研究により示唆されている（Agostinissら、2011）。したがって、全範囲の生物学的試料（節 D 1）が潜在的には 2 GPI 検出に使用され得る。

【0084】

それにも関わらず、末梢血、血漿、および血清試料が、全 2 GPI であるか機能性 2 GPI であるかに関わらず、2 GPI の検出および定量化に特に好ましい（節 G）。全血が使用されてもよい（赤血球、白血球、血小板、タンパク質、および血漿）。好ましくは、赤血球および白血球の沈殿後に残る液体である血漿が使用される。血漿は、フィブリノーゲンおよび他の凝固因子を含有するため、放置すると凝固する傾向がある。凝固し

10

20

30

40

50

にくい血漿が入手可能であり、これが好ましく、また無血小板血漿が使用されてもよい。最も好ましくは、血清が、 α_2 GPI の検出および定量に使用される。血清は凝固因子を有せず、主にフィブリノーゲンを有しない血漿であるため、血清は放置しても凝固しない。動物およびヒトの血清が診断目的で通例的に使用されており、調製技術は広く知られている。 α_2 GPI 試験用の血清試料を調製するための例示的な方法を本明細書に示す（実施例 XV、A）。

【0085】

本発明の利点は、試験を、生物学的試料、好ましくは血液、血漿、または血清に対して直接実行することができることである。感度のために、 α_2 GPI は、いかなる事前の富化または濃縮もせずに（しかし、これは排除されない）容易に検出することができる。試験試料、好ましくは血清試料は、新鮮なものでも、事前に凍結され、その後解凍されたものでもよい。実施例 XV、実施例 XVI、実施例 XVII、および実施例 XVIII は、

α_2 GPI が -70 °C での長期保存に対して安定であることを示す。低音貯蔵管もしくはバイアルおよび/または全体的なタンパク質分解を制限するためのプロテアーゼ阻害剤の使用などの、凍結、保存、および/または解凍の業界標準の技術を使用するのが好ましい。

【0086】

F2. α_2 GPI アッセイの範囲

それが「機能性」 α_2 GPI であるかどうかに関係なく、 α_2 GPI を測定するためのアッセイ（すなわち、「全」 α_2 GPI のためのアッセイ）の幅は、治療前 α_2 GPI レベルがパピツキシマブの2つ以上のバイオマーカーのうちの唯一のものとして使用される本発明の実施形態との使用に適用可能である。 α_2 GPI のレベルがパピツキシマブのバイオマーカーとして単独で使用される場合、節 G に記載されるように、「機能性」 α_2 GPI アッセイが使用されるべきである。

【0087】

全 α_2 GPI レベルは、当該技術分野において既知である多くのインビトロ結合アッセイおよびキットのうちの任意の1つ以上を使用して検出および好ましくは定量化することができる。好適な結合アッセイとしては、例えば、免疫プロット、ウエスタンブロット、ドットプロット、RIA、免疫組織化学、蛍光活性化細胞選別（FACS）、免疫沈降、親和性クロマトグラフィーなどが挙げられる。典型的には固相結合アッセイが好ましいが、 α_2 GPI を検出するための様々な他の方法が文献に記載されており、それらのいずれを使用してもよい。例えば、 α_2 GPI レベルは、放射状免疫拡散によって正確に決定することができる。実際に、放射状免疫拡散は、1960年代後半からより現代まで α_2 GPI の定量化に使用されてきた（例えば、Balasubramanianら、1998）。ウエスタンブロット、免疫電気泳動、およびオクタロニー二重免疫拡散（Takeuchiら、2000）と同様に、等電点電気泳動（IEF）およびそれに続く免疫プロットもまた、 α_2 GPI の定量化に使用することができる（Kambohら、1988）。

【0088】

F3. 固相 α_2 GPI 結合アッセイ

α_2 GPI の多数の高感度固相結合アッセイが当該技術分野において既知であり、全 α_2 GPI は、好ましくはそのようなアッセイのうちの1つ以上を使用して検出および定量される。そのようなアッセイの好ましい一例は、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）としてのものである。修飾捕捉 ELISA（例えば、Mehdiら、1999）および競合 ELISA（例えば、Balasubramanianら、1998）を含む、全 α_2 GPI に特異的な様々な ELISA が文献に報告されている。診断用ラベルに添付されているものを含む、市販の抗 α_2 GPI 抗体と同様に、全 α_2 GPI をアッセイするための多数の市販のキットが利用可能である。任意のそのようなキットまたは抗体を使用して、全 α_2 GPI を検出および定量することができる。例えば、US Biological の抗 α_2 GPI 抗体が、本明細書において比較アッセイで使用される（実施例 XVI、A10、B2）。

10

20

30

40

50

【0089】

一般論として、全 2 G P I のための E L I S A は、1 つ以上の抗 2 G P I 抗体を使用する。抗体技術は非常に進歩しているが、市販のキットおよび市販の抗 2 G P I 抗体はしばしばポリクローナル抗 2 G P I 抗体を使用し、それらはそのような実施形態における使用に完全に好適である。全 2 G P I のための例示的なアッセイにおいて、抗 2 G P I 抗体は 96 ウェルプラスチックプレートなどの固体表面に吸着され、2 G P I (この場合「抗原」) を含有することが疑われる生物学的試料と共にインキュベートされる。結合した 2 G P I (抗原) は、検出可能な物質、すなわち、検出および定量化可能である色または蛍光などの検出可能なシグナルを生成する物質で直接的または間接的に標識された二次結合剤を使用して検出される。好ましくは、二次結合剤は、検出可能な物質で標識されている抗 2 G P I 抗体である。

10

【0090】

全 2 G P I のためのそのような E L I S A は、実施例 X V I、A 10、B 2 に例証され、固体支持体および検出可能な物質などの多くの一般的な構成要素およびステップもまた、本発明の機能性 2 G P I アッセイに関して以下により完全に記載される(節 G)。したがって、特定の試薬またはステップが機能性 2 G P I アッセイでの使用にのみ適用されることが明らかでない限り、全 2 G P I を検出するためのアッセイでのそれらの適用が本明細書において企図される。

【0091】

G. 機能性 2 G P I のための好ましい E L I S A

20

より良い結果を予測するためのバイオマーカーの臨床試験結果を分析するための様々な市販のアッセイおよび研究ツールが利用可能であるが、いずれもバビツキシマブなどの P S 標的化抗体に特有に適用可能であることは知られていなかった。低レベルおよび/または変動するレベルの血清 2 G P I がバビツキシマブの治療結果に有意な影響を及ぼさない(実施例 V、図 19)ことを示す、広範な前臨床モデル化および有意な先行臨床経験にも関わらず、第 I I I 相試験の患者における 2 G P I 濃度の分析(実施例 X I V)が模索された。

【0092】

しかしながら、全 2 G P I とは対照的に、P S に結合し得る 2 G P I を特異的に検出するための信頼できる定量的な 2 G P I アッセイは、入手することができなかった。そのようなアッセイは、特に 2 G P I の一部分(「全」2 G P I)がニック入り 2 G P I として存在し、それが P S に結合できず、したがって疾患部位で抗体結合を媒介できないことが周知であるため、バイオマーカーに適用される最も正確な測定に必要である。さらに、P S にだけでなく、バビツキシマブなどの P S 標的化抗体にも結合し得る 2 G P I を特異的に検出するためのいかなるアッセイも著しく欠如していた。これは、例えば、他の有意義な変化(特に、ドメイン I I における、またはそれに影響を与える突然変異および/またはニックもしくは切断)を有する 2 G P I が検出されていた可能性を除外するための最高の忠実度のバイオマーカー測定にとって特に重要であるが、これは、いかなるそのような 2 G P I 変化も、治療活性に必要とされる抗体: 2 G P I : P S 複合体の形成を減少または無効化するためである。

30

40

【0093】

したがって、第 I I I 相試験(実施例 X I V)の患者を含む、バビツキシマブなどの P S 標的化抗体で治療した(または治療される予定の)患者において 2 G P I 濃度の最適な分析を実行するには、まず新たなアッセイを発明する必要があった。本出願は、血漿および血清などのヒト血液試料中の機能性(活性) 2 G P I の量を検出および定量化する目的に特有に適合した、そのような有利なアッセイを開示し、このアッセイは、P S と、バビツキシマブなどの P S 標的化抗体との両方に結合し得る 2 G P I のレベルを決定することができる。

【0094】

機能性 2 G P I のためのそのようなアッセイを使用することによって、本発明は、バ

50

ビツキシマブおよび関連 P S 標的化抗体での治療に対する奏効の単一のバイオマーカーとして使用するための定義されたレベルの治療前 2 G P I を提供する。特に、200 μ g / ml 以上の機能性 2 G P I (実施例 X V I I、図 18 A および図 18 B、実施例 X V I I I、実施例 X X) は、200 ~ 290 μ g / ml の範囲内の機能性 2 G P I によって例証されるように、バビツキシマブでの治療に対する奏効を広く予測する (実施例 X V I I、表 14 A および表 14 B を比較されたい)。本発明によって提供される機能性 2 G P I のための好ましい E L I S A は、実施例 X V I の詳細な教示によって例証され、また以下により完全に記載される。

【0095】

G 1 . アッセイ方法

一般論として、機能性 2 G P I のための E L I S A などの固相アッセイは、P S と、バビツキシマブなどの P S 標的化抗体との両方を使用し、それらのうちの少なくとも一方は、固体支持体に操作可能に関連付けられている、かつ / またはそれらのうちの少なくとも一方は、検出可能な物質で直接的もしくは間接的に標識されている。全ての結合形式が使用され得る。例えば、P S 標的化抗体を固体支持体に吸着させ、P S を検出可能な物質で標識してもよい。検出可能な物質で標識される P S などの多くの脂質が当該技術分野において既知であり、それらのいずれが使用されてもよい。しかしながら、簡略化のために、現在好ましい実施形態は、P S が 96 ウェルプラスチックプレートなどの固体表面に吸着されているものである。これは、バビツキシマブまたは 1 N 1 1 などの P S 標的化抗体が、好ましくは抗体に結合した直接標識である検出可能な物質で標識され得ることを意味する。

【0096】

これらのアッセイにおいて、E L I S A プレート (またはそのウェル) などの P S コーティング固体支持体は、バビツキシマブまたは 1 N 1 1 などの P S 標的化抗体、および 2 G P I を含有することが疑われる生物学的試料と共にインキュベートされる。概念的には、P S 標的化抗体、好ましくはバビツキシマブ、および 2 G P I 試料が、P S コーティング固体支持体またはプレート上で「同時インキュベート」されることが重要である。科学的には、2 G P I が (インタクトな) ドメイン V を介して P S に結合し、その後プレートに結合した 2 G P I のドメイン I I に結合するバビツキシマブが続くか、またはバビツキシマブが溶液中で 2 G P I のドメイン I I に結合し、その後プレート上の P S に結合する (インタクトなドメイン V を有する) 複合体化したバビツキシマブ / 2 G P I が続くかのいずれかであり得る。両方の結合事象はインキュベーション時間中に生じるため、同時インキュベーションは全てのそのような結合機構を包含する。

【0097】

P S コーティング支持体上で P S 標的化抗体、好ましくはバビツキシマブ、および 2 G P I 試料を「同時インキュベートすること」は、「有効な結合条件」下、すなわち、「2 G P I が、試料中の P S 標的化抗体および P S コーティング支持体の両方に結合するのを可能にするのに有効な条件下および時間」で一緒にインキュベートすることを意味する。「結合」は、「特異的結合」、すなわち、通常の洗浄によっては除去されない結合を可能にするのに有効な条件下かつ時間を意味する。したがって、バビツキシマブを使用する場合、有効な結合条件は、P S の 2 G P I のインタクトな (ニックのない) ドメイン V への結合およびバビツキシマブの 2 G P I のドメイン I I への結合を可能にする。バビツキシマブ以外の P S 標的化抗体を使用する場合、有効な結合条件は、P S の 2 G P I のインタクトな (ニックのない) ドメイン V への結合、および P S 標的化抗体の 2 G P I へのドメイン V 以外のドメインでの結合 (好ましくはドメイン I および I I を接合するヒンジ領域への、ならびに最も好ましくは 2 G P I のドメイン I I への結合) を可能にする。

【0098】

P S 標的化抗体、好ましくはバビツキシマブ、および 2 G P I 試料が P S コーティング固体支持体またはプレート上で同時インキュベートされる限り、本発明のアッセイはい

10

20

30

40

50

くつかの異なる形式を含む。例えば、P S 標的化抗体、および 2 G P I を含有することが疑われる試料は、実質的に同時に P S コーティング支持体に添加されてもよい。好ましくは、P S 標的化抗体、および 2 G P I を含有することが疑われる試料は、連続的に、すなわち、時間間隔を置いて P S コーティング支持体に添加される。

【0099】

連続アッセイ結合ステップを実施する上で、E L I S A ウェルなどの P S コーティング固体支持体は、まず 2 G P I を含有することが疑われる生物学的試料と共にインキュベートされ、その後、P S 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブと共に同時インキュベートされてもよい。上記のアッセイは、事前調製された P S コーティング支持体を利用することができ、その場合、アッセイは、以下（または以下のステップ）、

10

(a) 2 G P I のインタクトなドメイン V を介して生物学的試料中の 2 G P I を P S コーティング支持体に結合させるのに有効な条件下で、2 G P I を含有することが疑われる生物学的試料を P S コーティング支持体に添加し、それによって P S および 2 G P I コーティング支持体を調製するステップと、

(b) ドメイン V 以外の 2 G P I ドメインへの抗体結合によって P S 標的化抗体を P S および 2 G P I コーティング支持体に結合させるのに、好ましくは 2 G P I ドメイン I I への抗体結合によってパビツキシマブを P S および 2 G P I コーティング支持体に結合させるのに有効な条件下で、P S 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブを P S および 2 G P I コーティング支持体に添加するステップと、

(c) P S 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブの P S および 2 G P I コーティング支持体への結合を検出し、それによって生物学的試料中の機能性 2 G P I を測定するステップと、を含む。

20

【0100】

しかしながら、連続アッセイ結合ステップを実行する上で、P S 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブ、および最も好ましくは検出可能に標識されたパビツキシマブは、最初に P S コーティング固体支持体に適用され、その後 2 G P I を含有することが疑われる生物学的試料と共に同時インキュベートされる。そのようなアッセイまたは一連のステップは、技術的な理由で、例えば、ピベッティング中の相互汚染を回避するために好ましい。そのような好ましいアッセイは、以下（または以下のステップ）、

(a) 固体支持体を P S でコーティングして、P S コーティング支持体を調製するステップと、

30

(b) P S 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブ、および最も好ましくは検出可能に標識されたパビツキシマブを、P S コーティング支持体に添加して、抗体で覆われた P S コーティング支持体を調製するステップと、

(c) 生物学的試料中の 2 G P I を抗体で覆われた P S コーティング支持体に結合させるのに有効な条件下で、すなわち、2 G P I のインタクトなドメイン V を介した 2 G P I の P S コーティング支持体への結合によって、およびドメイン V 以外の 2 G P I ドメインを介した 2 G P I の P S 標的化抗体への結合によって、好ましくは 2 G P I ドメイン I I を介した 2 G P I のパビツキシマブへの結合によって、本質的に洗浄することなく、2 G P I を含有することが疑われる生物学的試料を抗体で覆われた P S コーティング支持体に添加するステップと、

40

(d) P S 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブ（最も好ましくは検出可能に標識されたパビツキシマブ）、および 2 G P I の P S コーティング支持体への結合を検出し、それによって生物学的試料中の機能性 2 G P I を測定するステップと、を含む。

【0101】

このアッセイはまた、事前調製された P S コーティング支持体を利用してもよく、その場合、アッセイは以下（または以下のステップ）、

(a) P S 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブ、および最も好ましくは検出可能に標識されたパビツキシマブを P S コーティング支持体に添加して、抗体で覆われた P S コーティング支持体を調製するステップと、

50

(b) 生物学的試料中の 2 G P I を抗体で覆われた P S コーティング支持体に結合させるのに有効な条件下で、すなわち、2 G P I のインタクトなドメイン V を介した 2 G P I の P S コーティング支持体への結合によって、およびドメイン V 以外の 2 G P I ドメインを介した 2 G P I の P S 標的化抗体への結合によって、好ましくは 2 G P I ドメイン I I を介した 2 G P I のパビツキシマブへの結合によって、本質的に洗浄することなく、2 G P I を含有することが疑われる生物学的試料を抗体で覆われた P S コーティング支持体に添加するステップと、

(c) P S 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブ (最も好ましくは検出可能に標識されたパビツキシマブ)、および 2 G P I の P S コーティング支持体への結合を検出し、それによって生物学的試料中の機能性 2 G P I を測定するステップと、を含む。

10

【0102】

P S 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブ、および最も好ましくは検出可能に標識されたパビツキシマブが、最初に P S コーティング固体支持体に適用され、その後 2 G P I を含有することが疑われる生物学的試料と共に同時インキュベートされる連続結合ステップを有する好ましいアッセイは、簡潔には、以下 (または以下のステップ)、

(a) 固体支持体を P S でコーティングして、P S コーティング支持体を調製するステップと、

(b) 試料中の 2 G P I を P S 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブと、P S コーティング支持体との両方に結合させるのに有効な条件下で、P S 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブ、および最も好ましくは検出可能に標識されたパビツキシマブ、ならびに 2 G P I を含有することが疑われる生物学的試料を、P S コーティング支持体に添加するステップであって、好ましくは、P S 標的化抗体が 2 G P I を含有する試料の添加前に P S コーティング支持体に添加され、それらが一緒に同時インキュベートされる、ステップと、

20

(c) P S 標的化抗体および 2 G P I の P S コーティング支持体への結合を検出し、それによって試料中の機能性 2 G P I を測定するステップと、を含む。

【0103】

繰り返すが、アッセイは事前調製された P S コーティング支持体を利用してもよく、その場合、アッセイは、以下 (または以下のステップ)、

(a) 試料中の 2 G P I を P S 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブと、P S コーティング支持体との両方に結合させるのに有効な条件下で、P S 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブ、および最も好ましくは検出可能に標識されたパビツキシマブ、ならびに 2 G P I を含有することが疑われる生物学的試料を、P S コーティング支持体に添加するステップであって、好ましくは、P S 標的化抗体が 2 G P I を含有する試料の添加前に P S コーティング支持体に添加され、それらが一緒に同時インキュベートされる、ステップと、

30

(b) P S 標的化抗体および 2 G P I の P S コーティング支持体への結合を検出し、それによって試料中の機能性 2 G P I を測定するステップと、を含む。

【0104】

結合した P S 標的化抗体および 2 G P I (抗原) は、少なくとも P S 標的化抗体の形態、好ましくはパビツキシマブまたは 1 N 1 1 の形態の少なくとも 1 つの二次結合剤を使用して検出され、これは、検出可能な物質で直接的または間接的に標識される。非標識 P S 標的化抗体は、P S 標的化抗体に結合し、かつ検出可能な物質で直接標識されている三次結合剤、好ましくは別の抗体との関連で使用され得る。そのような三次結合抗体は当該技術分野において周知であり、例えば、P S 標的化抗体の F c 部分に特異的に結合する。

40

【0105】

簡略化のために、現在好ましい実施形態は、P S 標的化抗体、好ましくはパビツキシマブが、それ自体検出可能な物質に直接結合しているものである。検出可能な物質は、色または蛍光などの検出および測定または定量化され得る検出可能なシグナルを生成する物質である。例示的な検出可能な物質は、酵素の西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) であ

50

り、HRPは、基質3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を切断して、450nmで検出および測定される色付きシグナルを生成する。典型的には、シグナルから測定される結合材料の量は、標準曲線などの「基準シグナル」のレベルと比較される。必要に応じて、標準曲線は、全てのアッセイにおいて複製されてもよい。

【0106】

これらのアッセイの全ての形式において、最終的に検出される唯一の2GPIは、PSおよびPS標的化抗体の両方に結合することができる2GPI、すなわち、通例的な洗浄によって全体的には除去されない2GPIである。したがって、これらのアッセイは、臨床治療に最も関連する形態の治療前2GPI、すなわち、投与された抗体、好ましくはパビツキシマブ、および好ましくは腫瘍の微小環境内の疾患部位に曝露されたPSと結合複合体を形成するように「機能する」2GPIの検出に特有に適している。したがって、これらのアッセイの使用は、パビツキシマブ療法での改善された治療結果のための患者の選択において有利である。

10

【0107】

本発明によって提供される機能性2GPIアッセイはまた、単純で再現性があり、高感度で費用効果が高く、かつ低侵襲技術によって得られる生物学的試料、特に血液(血清および血漿)試料と共に使用するのに理想的である。アッセイの迅速な性質は、バイオマーカー試験を素早く実行し、治療決定を適時に行い、実施することができるという重要な利点を提供する。しかしながら、本発明によって提供される機能性2GPIを定量化するための新たなアッセイは、単にパビツキシマブなどのPS標的化抗体を使用する治療法でバイオマーカーとして使用するための2GPIの測定における使用のみに限定されない。2GPIは、基礎的および指向的前臨床研究および臨床研究において重要な分子であるため、これらのアッセイは、任意の1つ以上のそのような実施形態において(例えば、ノックアウトマウス、またはヒトにおける抗リン脂質抗体症候群(APS)に関連する実施形態など)機能性2GPIを測定するために使用することができる。

20

【0108】

G2. 固体支持体

本発明の固相結合アッセイは、典型的には、結合構築物を(コーティングまたは結合のための少なくとも1つの表面を有する)固体支持体または基質と操作可能に会合させることを必要とする。本明細書で使用される場合、「結合構築物」は、バイオマーカーの検出に有用な構成成分に結合する構築物を含む。2GPIバイオマーカーに関連して、結合構築物は、抗2GPI抗体、PS、およびパビツキシマブなどのPS標的化抗体を含む。

30

【0109】

そのような固体支持体または基質としては、例えば、プレート、ビーズ、および繊維が挙げられる。本発明の好ましい実施形態において、固体支持体または基質は、標準的な96ウェルプレートなどのマルチウェルプレートである。固体支持体または基質は、Sepharose、ラテックス、ガラス、ポリスチレン、ポリビニル、ニトロセルロース、シリコン、シリカ、ポリジメチルシロキサン(PDMS)などの任意の好適な材料から製造することができる。結合構築物は、支持体または基質の少なくとも1つの表面を結合構築物と効率的に接触させることによって、固体支持体または基質と操作可能に会合されている。好ましくは、結合構築物は、固体支持体または基質の少なくとも1つの表面に固定化される。結合構築物はまた、コーティングされたスライドガラス上に印刷され、バイオマーカーアレイまたはマイクロアレイにおいて使用されてもよい。非接触印刷および接触印刷の両方を使用して、そのようなマイクロアレイを調製することができ、接触印刷が好ましい。

40

【0110】

G3. 検出可能な物質

好適な検出可能な物質としては、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)、 α -ガラクトシダーゼ、およびウレアーゼなどの酵素が

50

挙げられる。西洋ワサビペルオキシダーゼ検出系は、例えば、発色基質テトラメチルベンジジン (TMB) と共に使用することができ、これは、過酸化水素の存在下、450 nm で検出可能な可溶性生成物をもたらす。他の好都合な酵素結合系としては、例えば、アルカリホスファターゼ検出系が挙げられ、これを発色基質 p - ニトロフェニルリン酸と共に使用して、405 nm で容易に検出可能な可溶性生成物を得ることができる。同様に、
- ガラクトシダーゼ検出系を発色基質 O - ニトロフェニル - D - ガラクトピラノシド (ONPG) と共に使用して、410 nm で検出可能な可溶性生成物を得ることができ、またはウレアーゼ検出系をウレア - プロモクレゾールパープルなどの基質と共に使用することができる。

【0111】

検出可能な物質の更なる例としては、化学発光標識および蛍光検出用の標識が挙げられる。有用な蛍光色素としては、DAPI (4', 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール)、フルオレセイン、Hoechst 33258、R - フィコシアニン、B - フィコエリトリン、R - フィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、およびリサミンが挙げられる。フルオレセインもしくはローダミン標識抗体もしくはアネキシン、および / またはフルオレセインもしくはローダミン標識二次抗体が使用されてもよい。同位体もまた検出方法において有用であり得、その部分およびアッセイは当該技術分野において周知である。

【0112】

検出可能な物質は検出可能なシグナルを生成し、その後、これは検出および好ましくは定量化される。検出可能なシグナルは、例えば、発色基質から色を検出するための分光光度計、放射線を検出するための放射線計数器 (^{125}I 検出用ガンマ計数器など)、または特定の波長の光の存在下で蛍光を検出するための蛍光光度計を使用して分析することができる。酵素結合アッセイを使用する場合、検出可能なシグナルの定量分析は、分光光度計を使用して実行することができる。

【0113】

G4 . キット

本発明はまた、診断的、予後的、および予測的治療キットを含む一連のバイオマーカーに基づくキットを提供する。バイオマーカーキットは、典型的には、本明細書に教示されるバイオマーカーの検出に有用な結合構築物のうちの1つ以上を含むだろう。2 GPI バイオマーカーに関連するキットは一般に、抗 2 GPI 抗体、PS、および PS 標的化抗体 (パピツキシマブなど) などの少なくとも第1の 2 GPI 結合構築物を含むだろう。

【0114】

他のキットは、バイオマーカー検出のための結合構築物と、選択された患者の治療に使用するための少なくとも第1の治療剤、例えば、パピツキシマブもしくは1N11などのPS標的化抗体、またはその免疫複合体との両方を含む。そのようなキットは、PS標的化抗体との併用治療に使用するための少なくとも第2または第3の異なる治療剤をさらに含む得る。例えば、1つ以上の化学療法剤、放射線療法剤、抗血管新生剤、免疫療法剤、および / または抗ウイルス剤である。

【0115】

一般に、キットは、少なくとも第1の好適な容器 (または容器手段) 内に述べられる構成成分を含有するだろう。容器は一般に、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、瓶、シリンジ、または他の容器もしくは容器手段を含み、その中に所望の薬剤を入れ、好ましくは好適にアリコートする。キットはまた、典型的には、個々のバイアル瓶などを送達のために厳重に閉じ込めて収容するための手段、例えば、所望のバイアル瓶および他の装置を入れて保持する射出または吹込成形プラスチック容器を含む。

【0116】

キットの構成成分は、水性媒体または凍結乾燥形態のいずれかに含有され得る。試薬または構成成分が乾燥粉末として提供されるとき、粉末は、好適な溶媒の添加によって再構

10

20

30

40

50

成され得る。溶媒はまた、キット内の別の容器内に提供されてもよい。任意の治療構成成分は、好ましくは薬学的に許容される製剤中にあるか、またはそのまま再構成する準備ができています。キットはまた、動物または患者に治療剤を投与するための手段、例えば、1つ以上の針もしくはシリンジ、または点眼器、ピペット、または動物に製剤を注入するか、もしくは身体の患部に適用することができる他の同様の装置を含有し得る。

【0117】

キットは、好ましくは所望の各構成成分または薬剤、特にバイオマーカー検出および診断用構成成分のための異なる容器を有するだろう。しかしながら、併用療法での使用のために、キットは、モル当量の組み合わせで、または他の構成成分を超える1つの構成成分と共に、事前混合された2つ以上の治療薬を含有する1つの容器を含み得る。キットは、完全に共役した形態の事前標識された抗体、またはキットの使用者によって共役される別々の標識部分を、好ましくは結合についての説明書と共に含み得る。免疫検出のために、PSなどの1つ以上の構成成分が、既にマイクロタイタープレートのウェルなどの固体支持体に結合されていてよい。

10

【0118】

キットはまた、好ましくは、例えば、併用療法における使用を含む、定量化、前臨床的、臨床的、および/または獣医学的実施形態における使用のための書面上または電子的な説明書も含むだろう。バイオマーカーに基づくため、キットは、好ましくは、検出アッセイのための標準曲線を準備するために使用され得るように、標識の有無に関わらず、好適にアリコートされた生物学的組成物などの制御剤をさらに含むだろう。

20

【0119】

G5. チップおよびナノアッセイ形式

全 2 G P I および/または機能性 2 G P I を含む固相および E L I S A 型バイオマーカーアッセイは、必要に応じて自動化またはロボットで実行することができ、複数の試料からのシグナルを同時に検出することができる。本発明の文脈ではないが、一般にバイオマーカーを検出および定量化するために、そのような様々なアッセイ形式が使用されてきた。例えば、「チップ」と呼ばれるナノプラズモンセンサーおよびマイクロ流体デバイスが記載され、癌患者の循環バイオマーカーのオンチップ単離、定量化、および特徴付けに使用されている。したがって、本発明の特異性を依然として維持しながら、本アッセイは、そのようなマイクロ流体、チップ、ナノ技術、および他の合理化かつ自動化されたアッセイを使用して達成することができる。

30

【0120】

予測方法およびバイオマーカー誘導治療法に加えて、本発明はまた、コンピュータに基づくハードウェアおよび試験も提供する。本発明のそのようなコンピュータに基づく実施形態は、全 2 G P I および/または機能性 2 G P I のものを含む1つ以上の実験室バイオマーカー試験を読み取るように構成されたインターフェース、ならびにそのようなバイオマーカー試験からのデータを分析し、好ましくは分析されたデータを確立されたデータセット(試験データセットおよび対照データセットを含む)と比較するコンピュータを含む。本発明のコンピュータで実装される実施形態は、好ましくは、メモリストレージ、出力機能、および出力に基づいて治療法を誘導するように構成された命令を含む。

40

【0121】

H. 疾患の治療

本発明は、動物およびヒトを選択し、バビツキシマブなどのPS標的化抗体での治療を最適化するためのバイオマーカー方法、組成物、およびキットを提供するため、動物、対象、および患者(ヒト患者を含む)に関する以下の指針が、バイオマーカー検出および選択された集団の治療に適用される。

【0122】

H1. 動物、対象、および患者

本発明は、ヒト対象および患者に最も直接的に適用可能であるため、ヒトの選択および治療が最も好ましい実施形態である。それにも関わらず、種を超えたバイオマーカーの共

50

通性および保存は、本発明がヒト以外の動物にも適用可能であることを意味する。動物の中では、哺乳動物が好ましく、最も好ましくは、家庭用ペット、競走馬、および人間が消費するための食物を直接的（例えば、肉）または間接的（例えば、牛乳）に生産する動物などの価値ある貴重な動物であるが、実験動物もまた含まれる。したがって、本発明は、臨床的、獣医学的、および研究的用途を含む。したがって、ヒトに加えて、本発明は、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、イノシシ、ヒツジ、ヤギ、バッファロー、バイソン、ラマ、シカ、ヘラジカ、および他の大型動物、ならびに子牛および子羊を含むそれらの幼若動物に適用され、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、霊長類（サルなど）、および他の実験動物に適用される。

【0123】

10

H2．抗体用量

パビツキシマブなどのPS標的化抗体の「治療有効」量または用量は、そのような治療を必要とする動物、好ましくはヒト患者に投与したとき（併用療法の一部として投与したときを含む）に有益な治療効果を発揮する量または用量である。例えば、治療的に有効な抗癌投与量は、癌を有する動物、好ましくはヒト患者に投与したとき（併用療法の一部として投与したときを含む）に有益な抗癌効果を発揮する量または用量である。治療的に有効な抗ウイルス用量は、ウイルス感染症または疾患を有する動物、好ましくはヒト患者に投与したとき（併用ウイルス療法の一部として投与したときを含む）に有益な抗ウイルス効果を発揮する量または用量である。

【0124】

20

「有益な抗癌効果」は、腫瘍脈管構造血栓症および／または破壊、腫瘍壊死、腫瘍退縮、および腫瘍寛解（治癒までを含む）を含む、任意の一貫して検出可能な抗腫瘍および抗癌効果を含む。有益な抗癌効果の臨床的尺度としては、例えば、完全奏効（CR）、部分奏効（PR）、およびCR+PRを含む全奏効率（ORR）の改善；腫瘍進行までの時間（TTP）；奏効期間（DORまたはDR）；ならびに該当する場合、個々の患者、患者集団、および亜集団における無増悪生存期間（PFS）、無病生存期間（DFS）、および全生存期間（OS）（全生存期間の中央値（mOS）を含む）の改善または拡大が挙げられる。

【0125】

「有益な抗ウイルス効果」は、ウイルス感染、複製、成熟、繁殖、および放出、ならびに／または更なる細胞（宿主細胞）もしくは組織の進行中の感染またはそれらへの拡散の阻害を含む、任意の一貫して検出可能な抗ウイルス効果を含む。有益な抗ウイルス効果の臨床的尺度としては、例えば、早期のウイルス学的応答、ウイルス量の低減およびウイルスのクリアランス、ならびにウイルス感染症によって引き起こされる症状の改善が挙げられる。

【0126】

有益な治療効果、特に抗癌効果は、特に中期または長期的には治療的ではない可能性があるが、それは治療の有用性を無効化するものではないことが理解される。これに関して、しかしまた一般に、「有益な」治療効果、抗癌効果、および抗ウイルス効果はまた、比較的小さいおよび／または適度の治療効果も含むが、いずれか1つ以上の安全性の尺度における改善を伴う。「有益な」治療効果についての別の考慮事項は、パビツキシマブなどのPS標的化抗体が、疾患または腫瘍をさらに治療処置しやすくし得るために、その後の治療が全体的に改善された効果をもたらし得るという事実である。

【0127】

パビツキシマブまたは1N11などのPS標的化抗体の治療有効用量は、動物モデルからのデータを含む広範囲のデータを試用して現在容易に決定可能であるが、特に、本明細書に詳述され、文献に公開されるものなどの臨床研究に基づく。一般に、静脈内（IV）投与され、mg/kgで引用されるパビツキシマブなどのPS標的化抗体の有効用量範囲は、約0.1から約13~15、好ましくは約0.1から約6~10、好ましくは、約0.3~約6、より好ましくは、約0.5~約6、より好ましくは、約1~約6、より好ま

50

しくは、約 0.5 ~ 約 3、または約 3 ~ 約 6、より好ましくは、約 1 ~ 約 3 である。静脈内投与され、mg/kg で引用されるパビツキシマブなどの PS 標的化抗体の例示的な有効用量は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、および約 15、好ましくは約 0.1、0.3、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、および約 6、より好ましくは約 2 または 3、ならびに最も好ましくは約 3 mg/kg である。

【0128】

臨床治療のために、特に全ての腫瘍学的適応症のために静脈内 (IV) 投与される 3 mg/kg のパビツキシマブの現在好ましい用量は、広範な安全性データと共に、広範な前臨床および臨床データ、ならびに特にヒトにおける薬物動態プロファイル (実施例 VI) に基づいて推奨される。それにも関わらず、0.3 mg/kg での臨床的抗ウイルス活性を含む、一連の用量が有効であることが示されている (実施例 VI)。加えて、パビツキシマブは、ラットおよびサルに 10 mg/kg 超、最大 100 mg/kg までの用量で安全に投与されている。サルにおける 100 mg/kg 用量レベルでは、パビツキシマブは、体循環中の 2 GPI を一過的に減少させたため、そのような超高用量は推奨されない。

10

【0129】

したがって、幅広いデータから、3 mg/kg の投与量が、好ましくはあるが本発明を限定しないことは明らかである。したがって、本明細書に提示されるパラメータおよび詳細な指針を考慮して、活性または最適用量範囲および用量における更なる変形が本発明に包含されることが理解される。したがって、特定の薬剤との併用ではより低い用量がより適切であり得ること、および特に通常致命的な疾患を治療する場合には高用量が依然として許容され得ることが理解される。

20

【0130】

パビツキシマブなどの PS 標的化抗体を投与する上で、(無菌性、発熱性、純度、および一般的安全性の FDA 標準に従って) 薬学的に許容される組成物が動物または患者に全身投与される。静脈内注射が一般に好ましく、数時間にわたる連続注入が最も好ましい。

【0131】

用量自体を変えることに加えて、投与レジメンもまた、当業者に周知のように、治療戦略を最適化するように適合させることができる。治療されている対象の病態に応じて、投薬量および治療レジメンにおけるいくつかの変動が必要となり得る。担当医師 (複数可) は、本開示を考慮して、個々の対象にとって適切な治療を決定することができるだろう。そのような最適化および調整は、当該技術分野において慣例的に実行されており、決して過度の量の実験を反映していない。

30

【0132】

H3. 2 GPI での補足治療

単独で、または多重バイオマーカー選択の一部としてのいずれかで、治療前 2 GPI レベルを PS 標的化抗体 (パビツキシマブなど) に対する応答のバイオマーカーとして使用する上で、全 2 GPI または機能性 2 GPI が測定されるかどうかに関わらず、本方法は治療のために患者のサブセットのみを選択する。

40

【0133】

したがって、本出願の別の実施形態は、パビツキシマブなどの PS 標的化抗体と共に 2 GPI をそれらの患者に同時投与することによって、任意の非選択患者を治療適格性に回復させることである。このようにして、集団全体が PS 標的化抗体で治療可能になる。例えば、200 µg/ml 以上の治療前レベルの機能性 2 GPI に基づいて、治療のための患者を選択する上で、2 GPI レベルを少なくとも約 200 µg/ml に回復させるのに十分な機能性 2 GPI との併用でパビツキシマブを同時投与することによって、150 µg/ml の治療前レベルの機能性 2 GPI を有する患者を治療可能な群に戻すことができる。試料は、バイオマーカー分析に使用されるいずれの治療前レベルの 2 GPI にも適用される。

50

【 0 1 3 4 】

I . P S がマーカーである疾患の治療

バビツキシマブなどの P S 標的化抗体は、P S を特異的に標的化するため、治療の第 1 の（および最も重要な）適応症は癌（節 K ）、特に固形腫瘍およびそれらの転移であるが、液性腫瘍（白血病など）およびホジキンリンパ腫もまた適応症である。

【 0 1 3 5 】

正常で健康な細胞では、P S は細胞膜の内側に維持されており、結合に利用することはできない。疾患細胞のみが細胞膜の外側に曝露された P S を有し、これらは特に腫瘍微小環境内にある細胞であるが、瀕死の細胞、異常細胞、不適切に活性化された細胞、感染した細胞、および病原性生物自体でもある。癌において、腫瘍微小環境内での P S 曝露は「免疫抑制」であり、これは身体が癌と適切に戦うことができないことを意味する。P S を遮断することによって、バビツキシマブは P S 媒介免疫抑制を無効化し、身体が腫瘍を攻撃するのを助ける。

10

【 0 1 3 6 】

腫瘍微小環境内にある細胞、特に腫瘍内（およびウイルスに感染した細胞およびウイルス内）の血管を覆う細胞において、P S は比較的安定したマーカーであり、これはそれが治療の理想的な標的であることを意味する。多くの細胞死が存在する疾患において、P S はまた細胞の外側にも曝露され、これは、バビツキシマブが、増加した細胞死または不適切な細胞死が生じる様々な疾患（そのような病態は、例えば、癌および心臓発作を含む）の診断において、ならびに特に「撮像」（すなわち、インビボ診断）のためにも使用され得ることを意味する（撮像については下記を参照されたい）。

20

【 0 1 3 7 】

宿主細胞に P S を外在化させる主な病原体は、ウイルスである（節 J ）。実際に、エンペローブウイルスの侵入および感染の増強剤としての P S および P S 受容体の役割は現在十分に立証されており、広範囲のウイルスに適用される。さらに、P S とウイルスとの関係は、エンペローブウイルスに限定されず、非エンペローブウイルスにも及ぶ。特に、ウイルスに感染した細胞から放出される「P S 脂質小胞」が、エンテロウイルスの効率的な一括感染を可能にすることが既知である（Chen ら、2015）。

【 0 1 3 8 】

癌およびウイルス感染症に加えて、広範囲の疾患および病原性感染症は、P S を健康な細胞内のその内部位置から弾き出して、細胞の外側に曝露させ、これは、バビツキシマブなどの P S 標的化抗体がそれらの細胞および病原体に局所化し、有益な効果を発揮し得ることを意味する。まとめると、これらは「P S がマーカーである疾患および障害」である。

30

【 0 1 3 9 】

癌、ウイルス性および病原性感染症以外で、P S がマーカーである顕著な疾患および障害としては、（凝固しやすい）血栓形成促進性血管を有する疾患および障害、ならびに異常な血管新生に關与するものを含む、異常な脈管構造（血管）に關与する疾患を含む。血管新生は、既存の血管から新たな血管が形成されるプロセスであり、新たな血管の発達は、P S を必要とする内皮細胞芽の形成から始まる（Wei hua ら、2005）。異常な血管新生は、多くの疾患、特に癌に關与している。それらの異常な脈管構造を考慮して、バビツキシマブなどの P S 標的化抗体は、良性前立腺肥大症（BPH）などの（悪性とは対照的に）良性腫瘍、聴神経腫瘍、神経線維腫、トラコーマ、肉芽腫（化膿性肉芽腫およびサルコイドーシス（サルコイド）を含む）、髄膜腫、アングイオーマ、血管腫、ならびに全身型血管腫である血管腫症を治療することができる。

40

【 0 1 4 0 】

バビツキシマブなどの P S 標的化抗体で治療することができる異常な脈管構造に直接關連する病態としては、血管形成術後の再狭窄、静脈閉塞、動脈閉塞、および閉塞性頸動脈または閉塞性疾患を含む血管再狭窄（血管の狭小化）；ベーチェット病（眼疾患でもある）、結節性多発動脈炎（結節性汎動脈炎または PAN ）、およびウェゲナー肉芽腫症（W

50

G) またはサルコイドーシス (多発性血管炎を伴う肉芽腫症、GPA) を含む血管炎 (炎症によって血管が破壊される障害) ; 動静脈奇形 (AVM) および動静脈瘻 ; 鼻出血 (鼻血) ; 血管癒着 ; ならびに過粘稠度症候群が挙げられる。

【0141】

バビツキシマブなどのPS標的化抗体は、異常な脈管構造とのそれらの関連のために、関節リウマチおよび変形性関節症などの関節疾患、滑膜炎、血友病性関節、およびパジェット病 ; 乾癬、皮膚炎、強皮症 (全身性硬化症またはCREST症候群)、弾性線維性仮性黄色腫 (PXE、Gronblad-Strandberg症候群として知られる)、酒さ、スティーブンス-ジョンソン症候群またはスティーブンス-ジョンソン病 (PXE、酒さ、およびスティーブンス-ジョンソン症候群はまた眼疾患でもある) 類天疱瘡、肥厚性瘢痕、およびケロイドなどの皮膚疾患 ; オスラー-ウェーバー (またはオスラー-ランデュ-ウェーバー) 症候群またはオスラー-ウェーバー (またはオスラー-ランデュ-ウェーバー) 病 (遺伝性出血性末梢血管拡張症、HHTとしても知られる) を含む臨床的に重要な疾患を治療することができる。

10

【0142】

バビツキシマブなどのPS標的化抗体で治療される異常な脈管構造に關与する疾患の特に重要な例は、眼の血管新生疾患である。これらの疾患は、網膜、脈絡膜、および/または角膜などの眼の構造への新たな血管の浸潤を特徴とする。それらは失明の最も一般的な原因であり、約20の眼疾患に關与している。最も一般的な眼の血管新生疾患は、(増殖性) 糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性症 (AMD) を含む黄斑変性症、未熟児網膜症 (ROPまたはテリー症候群、以前は後水晶体線維増殖症RLFとして知られていた)、血管新生緑内障、角膜移植血管新生、および角膜移植後拒絶反応である。脈絡膜血管新生 (CNV) は、進行性AMDを有する患者における重度の視力喪失の症例の90%を占め、直接および間接PS標的化抗体の両方を含むPS標的化抗体で効果的に治療されている (Lira、2015)。

20

【0143】

バビツキシマブなどのPS標的化抗体で治療することができる網膜/脈絡膜血管新生に關連する他の疾患には、梅毒性眼感染症、マイコバクテリア性眼感染、および/または網膜炎もしくは脈絡膜炎を引き起こす他の眼感染症 ; 硝子体炎および周辺部ぶどう膜炎を含むぶどう膜炎 (虹彩毛様体炎) ; エールス病、推定眼ヒストプラズマ症候群 (POHS)、ベスト病 (卵黄様黄斑変性症)、シュタルガルト病、眼の外傷、およびレーザー後合併症が含まれる。

30

【0144】

バビツキシマブなどのPS標的化抗体で治療することができる角膜血管新生に特に關連する更なる疾患としては、アトピー性角膜炎、上輪部角結膜炎、乾燥翼状片角膜炎、および辺縁性表皮剥離どの、角膜炎 (角膜のみが炎症する) および結膜炎 (結膜のみが炎症する) を含むあらゆる形態の角結膜炎 ; フィレクテヌローシス (phylectenulosis) ; モーレン潰瘍 ; 化学熱傷、細菌性潰瘍、真菌性潰瘍、ヘルペス感染症、ならびに眼の外傷およびコンタクトレンズの過剰装着が挙げられる。

40

【0145】

バビツキシマブなどのPS標的化抗体で治療することができる他の眼疾患としては、強膜炎、ルベオーシス (虹彩の血管新生)、隅角血管新生 (NVA)、および糖尿病に關連するかどうかに関わらず、線維血管または線維組織の異常増殖によって引き起こされる疾患 (全ての形態の増殖性硝子体網膜症 (PVR) を含む) が挙げられる。

【0146】

内皮細胞芽の形成にはPSが必要であるため、新たな血管の発達にもまたPSが必要である (Weihuaら、2005)。このプロセスはまた、特定の正常な生理学的象、特に創傷治癒および再生にも關与し、排卵および受精後の胞胚の着床において重要である。したがって、バビツキシマブを使用するこのプロセスの予防は、無月経を誘発する (生殖年齢の女性における月経期間の不在)、排卵を遮断する、かつ/または胞胚による着床

50

を防止する、すなわち避妊薬として使用することができる。創傷治癒において、過剰な修復または線維増殖は、外科手順の有害な副作用である可能性があり、癒着は、手術の頻繁な合併症であり、これは小腸閉塞などの問題をもたらし得る。これらもまた、バビツキシマブなどのPS標的化抗体によって治療することができる。

【0147】

慢性炎症もまた、異常かつ病理学的な脈管構造に関与する。特に、潰瘍性大腸炎およびクローン病などの慢性炎症性疾患の状態は、炎症組織への新たな血管の内部成長と共に組織学的変化を示す。したがって、それらの疾患もまた、バビツキシマブなどのPS標的化抗体によって治療することができる。

【0148】

宿主細胞がPSを曝露する、ならびに/またはPS陽性細胞外微小胞およびエキソソームが立証されている、いくつかの他の疾患および障害が既知である。例えば、鎌状赤血球症（鎌状赤血球貧血とも呼ばれる）および鎌状赤血球クリーゼでは、赤血球の30～40%が時期尚早に老化し、PS陽性（「鎌状赤血球」）であるのに対して、健康な人々ではこれは約1%に過ぎない。PS陽性鎌状赤血球は循環したままであり、内皮に付着し、それらの曝露されたPSは凝血塊増殖の原因となる凝固カスケードの開始のためのプラットフォームとして作用する（Kennedyら、2015）。

【0149】

PSはまたアテローム動脈硬化症においても発現され、PS陽性細胞外微小胞はアテローム硬化性プラークから放出される（Mallatら、1999）。PS陽性である血管内腔内に形成されたプラークもまた、血管新生刺激活性を有することが示されている。ヒト冠状動脈アテローム性硬化症の進行における、および閉塞性冠状動脈疾患における再開通プロセスにおける、VEGFなどの血管新生マーカーの病態生理学的有意性についての特別な証拠が存在する。したがって、バビツキシマブなどのPS標的化抗体は、アテローム性動脈硬化症および閉塞性冠状動脈疾患のための効果的な治療を提供する。

【0150】

1型および2型糖尿病患者はいずれも、アネキシンV陽性であることによって示されるように、PS陽性の細胞外微小胞を有する（Sabatierら、2002）。アルツハイマー病において、脳のエキソソームは、PSと、この疾患の病原体であるアミロイド-ペプチド（A β ）とを含有する（Yuyamaら、2012）。PSおよびPS陽性細胞外微小胞もまた敗血症（敗血症性ショック）に関与しており、それらは敗血症誘導微小血管機能不全および免疫抑制のマーカーおよびメディエーターである（Souzaら、2015）。

【0151】

身体自身のリン脂質に対して抗体が産生される自己免疫性障害である、抗リン脂質抗体症候群（APS）および全身性エリテマトーデス（SLEまたはループス）は、流産および血小板減少症（低血小板数）などの凝固障害に関連付けられている。したがって、これらの患者における抗リン脂質抗体は、血栓症を引き起こす病原性抗体である。しかしながら、バビツキシマブなどのPS標的化抗体は、いかなるそのような副作用も呈することなくPSを標的化する。したがって、バビツキシマブはまた、抗リン脂質抗体症候群、関連疾患、およびその合併症も治療することができる。特に、バビツキシマブは、APS患者において病原性抗体と拮抗または競合する可能性があり、したがって病原性抗体を体内のそれらのリン脂質-タンパク質標的から退ける。

【0152】

病原性感染症に関して、例えば、リーシュマニア症を引き起こす寄生原虫である*Leishmania amazonensis*（Zandbergenら、2006；Wanderleyら、2009；Wanderleyら、2013）、マラリアを引き起こす*Plasmodium falciparum*（Eda&Sherman、2002；Pattanapanyasatら、2010）、およびトリパノソーマ症を引き起こす寄生原虫である*Trypanosoma cruzi*（DaMattaら、2007）など

10

20

30

40

50

の細胞内寄生体は全て、PS曝露をもたらす。同様に、トキソプラズマ症を引き起こす *Toxoplasma gondii* (Seabraら、2004)と同様に、住血吸虫症を引き起こす寄生扁形動物である *Schistosoma* もまたPSを曝露する (van der Kleijら、2002)。

【0153】

PS曝露はまた、それぞれペストおよび野兔病を引き起こす *Yersinia pestis* および *Francisella tularensis* などの細胞内細菌性病原体による感染後の細胞外表面上でも示されている (Lonsdaleら、2011)。リステリア症を引き起こす *Listeria monocytogenes* もまた、感染した宿主細胞からの細胞外表面のPSを有する膜由来小胞の放出を促進する (Czuczmanら、2014)。同様に、髄膜炎を引き起こす病原体である *Neisseria meningitidis* に感染した内皮細胞は、細胞表面へのPS転位を呈する (Schubert-Unkmeirら、2007)。マクロファージにおいて細胞内複製し、結核 (TB) を引き起こす *Mycobacterium tuberculosis* への感染は、結核病変の好中球におけるPS外在化と関連付けられている (Francisら、2014)。同様に、レジオネラ症を引き起こす通性的な細胞内寄生体である *Legionella pneumophila* は、ヒト単球においてPS外在化を誘導する (Hagelleら、1998)。

【0154】

したがって、上記に詳述した通性的な細胞内寄生体に共通するPS外在化は、それぞれブルセラ症、ならびに腸チフス、パラチフス、および食中毒などの疾病などを引き起こす、*Bruceella* および *Salmonella* などの他のそのような病原体について生じる可能性がある。これはまた、性感染性クラミジア感染症を引き起こす *Chlamydia* 菌種などの偏性的な細胞内寄生体による感染症についても立証されており、PS外在化は病態形成にとって重要であり、感染した上皮細胞、内皮細胞、顆粒球細胞、および単球細胞上で示されている (Goth & Stephens、2001)。トラコーマを引き起こす *Chlamydia trachomatis* もまた治療することができる (上記も参照されたい)。

【0155】

実際に、宿主細胞上のPS外在化は、現在、様々な細菌および病原体への感染に応答する一般に認識されている現象である (Wandlerら、2010)。これは、胃上皮細胞に侵入し (Petersen & Kroghelt、2003)、胃潰瘍を引き起こす *Helicobacter pylori* をさらに含む。H. pylori が胃上皮細胞と直接接触を持つと、それは宿主の原形質膜の外小葉へのPS外面化を誘導する (Murata-Kamiyara、2010)。PSはまた、梅毒を引き起こす *Treponema pallidum* にも存在する。南アメリカで見られる細菌性感染症であるバルトネラ症は、バビツキシマブで治療することができるが、これは、特にバルトネラ症が血管内皮細胞の増殖を特徴とする慢性期をもたらす、癌治療において明らかに示されるバビツキシマブの作用機構のうちの1つが血管内皮細胞を破壊することであるためである。

【0156】

インビボ診断に関して、バビツキシマブなどのPS標的化抗体を使用して、前述の疾患、障害、および感染症のいずれかを撮像すること、最も好ましくは血管新生化腫瘍を撮像することができる (Jenneweinerら、2008; Marconescu & Thorpe、2008; Sahaら、2010; Stafford & Thorpe、2011; Gongら、2013; Staffordら、2013; 米国特許第7,790,860号)。バビツキシマブはまた、深部静脈血栓症、肺塞栓症、心筋梗塞、心房細動、人工心臓血管材料の問題、脳卒中 (脳血管障害 (CVA) または脳血管発作 (CVI) などの、特に心臓内また心臓付近の血管血栓症の撮像にも使用することができる。バビツキシマブなどのPS標的化抗体はまた、例えば、膿瘍、再狭窄、関節炎などの病態にある、ならびに動脈血栓症、冠動脈血栓、静脈血栓症、および脳血栓症などの止血障害にある、活性化

10

20

30

40

50

血小板の撮像にも使用することができる。

【0157】

したがって、パビツキシマブなどのPS標的化抗体は、PSが立証されたマーカーである上記全ての疾患および障害を治療および/または診断するのに好適である。

【0158】

J. ウイルス感染症の治療

宿主細胞にPSを外在化させる主な病原体は、ウイルスである。PSの存在は、ウイルスおよびウイルスに感染した細胞の表面上で実証されており、かつ/またはArenaviridae、Bunyaviridae、Flaviviridae、Filoviridae、Herpesviridae、Orthomyxoviridae、Paramyxoviridae、Poxviridae、Retroviridae、およびRhabdoviridaeを含む広範囲のウイルスファミリーによる感染症にとって重要であることが示されている(各々2015年2月27日に出願された米国特許出願第14/634,607号ならびにPCT特許出願第PCT/US15/18183号の表2Aおよび表2Bもまた参照されたい)。加えて、ウイルスおよびウイルスに感染した細胞上でのそのようなPS曝露は単に偶発的なものではなく、ウイルス感染症において重要な役割を有することを実証するデータが提示されている(米国特許出願第14/634,607号の表2Cおよび表2D、米国特許第7,906,115号、WO2015/131153A1もまた参照されたい)。これは、インビトロおよびインビボの両方で、多様なウイルスファミリーによる感染症を阻害するためのPS標的化抗体の使用によって示されている。

10

20

【0159】

PSとウイルス感染症との間の関係もまた、現在文献に詳しく立証されている(例えば、米国特許第7,906,115号; Soaresら、2008; Mercer and Helenius、2008; Moodyら、2010; Morizonoら、2011; Meertensら、2012; Best、2013; Bhattacharyyaら、2013; Jemielityら、2013; Moller-Tank & Maury、2014; Birgeら、2016)。これは、エンベロープウイルスの侵入および感染の増強剤としてのPSおよびPS受容体の役割を含む(例えば、Moller-Tank & Maury、2014の表1を参照されたい)。PSと、ウイルス感染症と、エキソソームなどの細胞外微小胞との関係もまた近年ますます明らかになってきており(Meckes & Raab-Traub、2011; Simsら、2014)、また広範囲のウイルスに適用されている(例えば、Walkerら、2009; Meckesら、2010; Izquierdo-Userosら、2010; Meckes & Raab-Traub、2011)。

30

【0160】

さらに、PSとウイルスとの関係は、エンベロープウイルスに限定されず、非エンベロープウイルスにも及ぶ(Claysonら、1989; Chenら、2015)。特に、「PS脂質小胞」(本質的にはエキソソーム)を示し、PS小胞がエンテロウイルスの効率的な一括感染を可能にすることを示すデータを添付する、Chenら、2015によるCell論文の表紙の図を参照されたい。特定の機構によって拘束されるものではないが、以下の理論的根拠は、PSがエンベロープウイルスおよび非エンベロープウイルスの両方による感染症に関与していることを説明する。

40

【0161】

全てのウイルスは、宿主細胞からの成熟ビリオンの時間を計った排出を調整して、新たな宿主細胞の感染の成功を確実にする。エンベロープウイルスは、宿主細胞原形質膜を利用して、子孫ビリオンの次の宿主細胞への効率的な侵入を媒介するウイルスタンパク質を埋め込む。PSは、ウイルス放出前にウイルスに感染した細胞の外側に見られ、エンベロープウイルスは、宿主細胞からの排出時にPSをウイルスエンベロープに組み込む。

【0162】

50

エンベロープをそれらの成熟ビリオンに組み込まないウイルスは、他の機構によって宿主細胞を離れる。非エンベロープウイルスが細胞から新たなビリオンを放出するために使用するいくつかの戦略には、細胞溶解が含まれ、これは感染した細胞（T細胞またはマクロファージ）に対する宿主免疫応答によって直接的に、または宿主細胞タンパク質合成または細胞構造に対する直接的なウイルスの活性のために引き起こされ得る。細胞構造を変化させて細胞溶解を誘導するウイルスの一例は、アデノウイルスである。アデノウイルスは、感染中後半に、フィラメントネットワークおよびタンパク質合成を破壊することによって細胞の構造的統合性を変化させるいくつかのタンパク質を発現する。いくつかの非エンベロープウイルスは、いかなる細胞変性効果もなく、非破壊的機構を介してそれらの子孫ウイルスを放出することができる。ポリオウイルスは急速に（約8時間）細胞溶解を誘導するが、それはまた、新たな宿主細胞を感染させることができるPS脂質小胞内の細胞からも放出される。PS小胞内のポリオウイルス粒子は、HeLa細胞および初代マクロファージを感染させる上でPS小胞から除去されるウイルス粒子よりも効率的であり、アネキシンVによる小胞の遮断は、用量に依存した様式で感染した細胞からの小胞を阻害し、これは、PS脂質がポリオウイルス感染症の補助因子であることを示唆している。ポリオウイルスに加えて、コクサッキーウイルスB3およびライノウイルス粒子もまたPS脂質小胞内に放出され（Chenら、2015）、これは、細胞を溶解することなく成熟粒子を選択的に放出するためにエンテロウイルスによって利用される共通の機構を示している。

10

20

【0163】

SV40に関して、SV40もまた上記の種類のPS-脂質小胞内の細胞から放出される可能性がある。例えば、細胞変性効果の誘導前にSV40粒子の細胞からの放出が見られ得ることが報告されている（Claysonら、1989）。また、SV40ビリオンは、感染の48時間後に平滑な細胞質小胞内で観察され、SV40粒子の放出は、脂質膜にわたるカチオン輸送を遮断することによって細胞内タンパク質輸送を遮断するナトリウムイオン透過孔である、モネンシンによって阻害された。

【0164】

また、多くのウイルスは、効率的に複製するための環境を作り出すために宿主細胞の活性化を誘導する必要がある。ウイルス活性化剤または非ウイルス活性化剤のいずれかによる細胞活性化は、PS転位を活性化する細胞内カルシウム（ Ca^{2+} ）の上昇をもたらす。したがって、パピツキシマブなどのPS標的化抗体の潜在的な作用機構としては、細胞活性化に必要とされるタンパク質またはウイルス放出を媒介するそれらの能力との干渉、PS媒介免疫抑制の逆転、および免疫クリアランス機構による感染した細胞またはウイルスのクリアランスが挙げられる。

30

【0165】

インビボウイルスモデルは、PS標的化抗体で治療したウイルスに感染した動物の生存期間の増加を実証する。パピツキシマブなどのPS標的化抗体がそのような抗ウイルス特性を発揮することが示されている潜在的な機構には、1)ウイルス粒子への結合、2)感染した細胞への結合、3)ウイルス複製の阻害、および4)PSに結合する免疫抑制細胞受容体を遮断することによる免疫応答の増強が含まれる。HIV-1モデルにおけるデータは、ウイルスに感染したマクロファージによって産生されたビリオンが、マクロファージのHIV-1感染の補助因子としての役割を果たす、上昇したレベルのPSを有することを実証する。PS標的化抗体でHIV-1上のPSを遮断することは、細胞間相互作用を予防し、ウイルス標的細胞融合を遮断し得る。結果はまた、パピツキシマブがピチンデウイルス粒子に結合し、ピチンデウイルスに感染したモルモットの治療が抗ピチンデ抗体および細胞応答の両方の発生を増強することも示している。

40

【0166】

全体として、パピツキシマブなどのPS標的化抗体を使用するエンベロープウイルスおよび非エンベロープウイルスを含む全てのウイルス感染症の治療は、そのような治療に関して本開示を補足する米国特許第7,611,704号および米国特許第7,906,1

50

15号に教示されている。特に、これら特許の表H、表J、および表Gは、パビツキシマブなどのPS標的化抗体との併用療法において使用することができる一般的な抗ウイルス薬(表G)と共に、動物およびヒトにおけるウイルス感染症および関連疾患の治療(表H、表J)を例証している。

【0167】

K. 癌の治療

本出願の広範な節は、パビツキシマブなどのPS標的化抗体を使用して腫瘍および癌を治療することに関する。聴神経腫、聴神経腫瘍、神経線維腫、トラコーマ、化膿性肉芽腫およびBPHなどの良性腫瘍の治療が含まれる。悪性腫瘍の治療が好ましい。本明細書で使用される場合、「腫瘍(複数可)および癌(複数可)」は、別段明確に述べられない限り、悪性腫瘍を示すことが意図される。

10

【0168】

白血病およびリンパ腫などの血液由来腫瘍、ならびに骨髓の様々な急性または慢性新生物疾患の治療が包含される。好ましくは、治療される腫瘍は、血管新生が活性である腫瘍および血栓形成促進性血管を有する腫瘍を含む、固形腫瘍または血管新生化腫瘍である。「固形」および「血管新生化」腫瘍は、血管構成成分を有する、すなわち、腫瘍細胞への酸素および栄養素の提供に腫瘍血管を必要とする腫瘍である。

【0169】

原発性または転移性であるかに関わらず、乳癌、卵巣癌、胸部癌、肺癌、肝臓癌(肝細胞癌、HCC)、結腸癌、結腸直腸癌、直腸癌、前立腺癌、膵臓癌、脳癌(神経膠腫および神経膠芽腫)、子宮頸癌、子宮癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、耳下腺癌、食道癌、喉頭癌、甲状腺癌、胃腸癌、胃癌、腎臓癌(腎細胞癌、RCC)、胆道癌、膀胱癌、精巣癌、ならびに黒色腫、メルケル細胞癌、および血液悪性腫瘍だけでなく、細胞腫(扁平上皮癌および非扁平上皮癌、小細胞癌および非小細胞癌)、腺癌、および神経芽腫も含む他の癌によって例証される、全ての癌が含まれる。特定の実施形態において、本発明は特に、非小細胞肺癌(NSCLC)、あるいは乳癌、膵臓癌、肝臓癌、腎臓癌、直腸癌、もしくは卵巣癌、または黒色腫に適用される。特に、本発明は、非扁平上皮NSCLCなどのNSCLCに適用される。

20

【0170】

公開された文献に加えて、パビツキシマブなどのPS標的化抗体を使用する全ての癌の治療がいくつかの米国特許に教示されている。例えば、米国特許第6,406,693号、同第7,422,738号、同第8,486,391号、同第7,247,303号、および同第7,572,448号であり、これらは全てそのような治療に関して本開示を補足する。治療的に有効な抗癌量に関する上記の考察もまた参照されたい(節H2)。パビツキシマブなどのPS標的化抗体の作用機序は、全ての固形腫瘍において実質的にまたは完全に同じであるため、本発明は、腫瘍細胞自体の特定の表現型または遺伝子型に関わらず、全ての固形腫瘍の治療に広く適用可能であることが理解される。

30

【0171】

L. 併用療法

本出願の多くの節、公開された文献、およびいくつかの米国特許もまた、併用療法においてパビツキシマブなどのPS標的化抗体を使用して癌を治療することに関する(例えば、米国特許第7,422,738号、米国特許第8,486,391号、米国特許第7,572,448号)。

40

【0172】

したがって、バイオマーカーおよび治療方法は、動物または患者が呈する特定の疾患または障害、特に癌およびウイルス感染症ならびにウイルス疾患の治療において一般に用いられる任意の他の方法と併用することができる。所与の治療アプローチ自体が患者の病態に有害であることが既知ではなく、PS標的化抗体療法に有意に反作用しない限り、それと本発明との併用が企図される。非悪性疾患のための併用療法もまた企図される。

【0173】

50

癌治療に関して、本発明は、外科手術、化学療法、放射線療法、サイトカイン療法、抗血管新生などのような古典的なアプローチ、および免疫腫瘍（ＩＯ）剤などのより新しいアプローチと併用して使用することができる。したがって、本発明は、パビツキシマブなどのＰＳ標的化抗体が手術もしくは放射線治療と同時に、その前に、もしくはその後に使用されるか、または従来の化学療法剤もしくは放射線療法剤、サイトカイン、抗血管新生剤、アポトーシス誘導剤、標的化療法、ＩＯ剤などと共に、その前に、もしくはその後に患者に投与される、バイオマーカーおよび併用療法を提供する。

【０１７４】

手術に関して、任意の外科介入が本発明との併用で実施され得る。放射線療法に関連して、線照射、Ｘ線、ＵＶ照射、マイクロ波、およびさらには電子放出などの、腫瘍細胞内で局所的にＤＮＡ損傷を誘導するための任意の機構が企図される。腫瘍細胞への放射性同位体の指向的送達もまた企図され、これは標的化抗体または他の標的化手段との関連で使用され得る。

10

【０１７５】

癌治療における物質の併用の一般的な使用法は、周知である。１つ以上の薬剤を、パビツキシマブなどのＰＳ標的化抗体と併用して使用する場合、併用した結果が、各治療を別々に実行したときに観察される効果の相加である必要はない。少なくとも相加効果が一般には望ましいが、単一療法のうちの１つを超える任意の治療効果または利益の増加（例えば、副作用の低減）は価値があるだろう。また、併用治療が相乗効果を呈する特別な必要はないが、これは可能かつ有利である。

20

【０１７６】

本明細書で使用される場合、本発明で使用される「一次治療剤」または「第１の抗癌剤」は、パビツキシマブなどのＰＳ標的化抗体である。本明細書で使用される場合、「二次もしくは三次治療剤」または「少なくとも第２もしくは第３の抗癌剤」は、第２または第３の異なる治療剤、抗癌剤、または抗ウイルス剤、すなわち、一次治療剤「以外の」治療剤、抗癌剤、または抗ウイルス剤である。本発明の併用療法において、任意の二次または三次治療剤を使用することができる。また、二次または三次治療剤、「第２もしくは第３の抗癌剤」、または「第２もしくは第３の抗ウイルス剤」は、本開示の指針および当業者の知識に従って、相加効果、相加効果を超える効果、および潜在的には相乗効果を達成する目的で選択され得る。

30

【０１７７】

併用療法、抗腫瘍療法、または抗ウイルス療法を実施するためには、動物または患者に、パビツキシマブなどのＰＳ標的化抗体を、動物または患者内でそれらの併用治療作用、抗癌作用、または抗ウイルス作用をもたらすのに有効な様式で、別のもの、すなわち、第２または第３の異なる治療剤、抗癌剤、または抗ウイルス剤と併用して投与するだけでよい。したがって、薬剤は、疾患部位（例えば、腫瘍、腫瘍環境、もしくは腫瘍微小環境）内でのそれらの組み合わせでの存在をもたらすのに、かつ／または動物もしくは患者内でそれらの併用治療作用を発揮するのに、好ましくは動物もしくは患者の免疫系に対するそれらの併用治療作用を発揮するのに有効な量および有効な期間で提供される。この目的を達成するために、一次治療剤および第２または第３の異なる治療剤は、単一の組成物で、または異なる投与経路を使用して２つもしくは３つの異なる組成物として、実質的に同時に投与され得る。

40

【０１７８】

あるいは、パビツキシマブなどのＰＳ標的化抗体は、例えば、数分から数週間または数ヶ月の範囲の間隔だけ、第２または第３の異なる治療剤、抗癌剤、または抗ウイルス剤に先行しても、後続してもよい。一次治療剤および第２または第３の異なる治療剤が動物または患者に別々に適用される特定の実施形態において、各薬剤が依然として有利な併用効果を発揮することができるように、各送達時の間に不動作期間が存在しないことを確実にする。パビツキシマブによる今日までの臨床経験を含む標準的な実施から、１週間または２週間は、パビツキシマブの投与と第２または第３の異なる治療剤の投与との間の不動作

50

期間ではない。実際に、約 1 週間の間隔が好ましくあり得る。

【0179】

さらに、1 つの好ましい併用腫瘍療法は、動物または患者に、実質的に同時にまたは好ましくは数週間の間隔で、第 2 の異なる抗癌剤と併用してパビツキシマブなどの P S 標的化抗体を投与し、その後、後続する時間に第 3 の異なる抗癌剤を投与し、後続する有効な時間（数ヶ月など）にわたって第 3 の異なる抗癌剤の定期的投与を続けることに関する。

【0180】

別々に時間を計った併用療法のための二次または三次治療剤が、本明細書で考察され、当該技術分野において既知であるものを含む特定の基準に基づいて選択され得る。しかしながら、前後の投与のために 1 つ以上の第 2 または第 3 の異なる治療剤を選択することが好ましくても、これは必要に応じて、実質的な同時投与におけるそれらの使用を排除しない。

10

【0181】

癌に関して、一次治療剤の「前に」投与するために選択され、増加した効果および潜在的には相乗効果を達成するように設計される第 2 または第 3 の異なる抗癌剤は、腫瘍微小環境内で P S の発現を誘導する薬剤を含む。例えば、局在化したカルシウム産生を刺激する、P S を原形質膜の外表面に移動させる膜輸送体を活性化させる、腫瘍内皮を損傷させる、アポトーシス前変化を引き起こす、かつ / または腫瘍内皮または腫瘍細胞内のアポトーシスを誘導する薬剤は一般に、P S 発現の増加をもたらすだろう。そのような薬剤の例は、ドセタキセルおよびパクリタキセルである。その後、P S は、パビツキシマブなどの P S 標的化抗体を使用して標的化され得、それにより全体的な治療効果を増幅し、また宿主エフェクター（補体、A D C C、抗体媒介食作用、C D C）を介した攻撃を増加させる。

20

【0182】

腫瘍血管内には存在するが、正常な静止血管内には存在しないような、血管新生、リモデリング、または活性化内皮細胞に対する選択性を有する薬物もまた、腫瘍微小環境内の P S の曝露を選択的に引き起こすために使用することができる。そのような薬剤の例は、コンプレタスタチンおよびドセタキセルである。これもまた、抗体結合の増加および宿主エフェクター機構の開始の増強をもたらすだろう。

【0183】

一次治療剤に「後続して」投与するために選択され、増加した効果および潜在的には相乗効果を達成するように設計される、第 2 または第 3 の異なる抗癌剤は、一次治療剤の効果から利益を得る薬剤を含む。パビツキシマブなどの P S 標的化抗体は、腫瘍壊死を引き起こす。したがって、後続投与に有効な第 2 または第 3 の異なる抗癌剤には、転移を阻害する抗血管新生剤、壊死腫瘍細胞を標的化する薬剤（インビボで悪性細胞から利用可能になる細胞内抗原に特異的な抗体など）（米国特許第 5, 019, 368 号、同第 5, 882, 626 号）、末梢で生存し得るあらゆる腫瘍細胞を攻撃する化学療法剤および抗腫瘍細胞免疫複合体が含まれる。下記のように、パビツキシマブなどの P S 標的化抗体に後続して投与するための現在最も好ましい第 2 または第 3 の異なる抗癌剤は、免疫チェックポイント阻害剤である。

30

40

【0184】

状態によっては、治療期間を大幅に延長することが望ましい場合があり、数日間（2、3、4、5、6、もしくは 7）、数週間（1、2、3、4、5、6、7、もしくは 8）、または数ヶ月間（1、2、3、4、5、6、7、もしくは 8）がそれぞれの投与間に経過する。これは、ある治療が腫瘍を実質的に破壊することを意図し、別の治療が微小転移もしくは腫瘍の再成長の予防および / または腫瘍に対する宿主応答の刺激もしくは補助（抗血管新生剤もしくは免疫チェックポイント阻害剤）を意図する状況において有利である。しかしながら、効果的な創傷治癒を可能にするために、抗血管新生剤は手術後の慎重な時期に投与されるべきである。その後、抗血管新生剤は、患者の生涯にわたって投与される。

50

【 0 1 8 5 】

一次治療剤または第2もしくは第3の異なる治療剤のいずれかの複数回投与を利用することもまた、想定される。一次治療剤および第2もしくは第3の異なる治療剤は、1日置きもしくは1週間置きに互換的に投与されてもよく、または一連の1つの薬剤治療が与えられ、その後一連の他の治療（複数可）が与えられてもよい。いずれにしても、併用療法を使用して治療効果を達成するためには、投与時間に関わらず、治療効果を発揮するのに有効な併用量で2つ以上の薬剤を送達することが必要である。

【 0 1 8 6 】

L 1 . 化学療法

実質的に同時に投与されようと、連続的に投与されようと、バビツキシマブなどのPS標的化抗体は、1つ以上の化学療法剤または化学療法薬と併用して投与することができる。化学療法薬は、増殖中の腫瘍細胞を死滅させ、治療全体によって生じる壊死領域を増強することができる。したがって、薬物は、本発明の一次治療剤の作用を増強することができる。

10

【 0 1 8 7 】

ほとんどの癌化学療法薬は、分裂中の酸素化細胞に対して選択的である。それらは併用療法において利点を有するが、これは化学療法薬が一次治療剤とは異なる標的に作用し、より完全な抗腫瘍効果をもたらすためである。例えば、化学療法薬は、腫瘍末梢において急速に分裂する酸素化腫瘍細胞に対して選択的に活性である。腫瘍末梢における高酸素化血管新生血管に選択的である抗血管新生薬もまた、併用に有効だろう。

20

【 0 1 8 8 】

腫瘍血管内で血栓の形成を誘導することによって、本発明の一次治療剤はまた、腫瘍内に薬物を保持または捕捉することにより化学療法薬の作用を増強することができる。したがって、化学療法剤は腫瘍内に保持される一方で、残りの薬物は身体から除去される。したがって、腫瘍細胞はより長期間にわたってより高濃度の薬物に曝露される。腫瘍内への薬物のこの閉じ込めは薬物の用量の低減を可能にし、治療をより安全かつより効果的にする。

【 0 1 8 9 】

本発明において併用するための更なる薬物は、一次治療剤の作用によって薬物に対して「感作」された細胞に作用するものであるため、その抗腫瘍効果を達成するのに必要とされる第2の薬物の用量は低減される。例えば、これは、第2の薬物の作用の腫瘍構成成分が腫瘍血管に発揮され、本発明の抗体または薬剤が細胞を薬物に対して感作する場合に生じ得る。これは、本発明の一次治療剤が、直接的にまたはサイトカイン放出の刺激を通して、腫瘍細胞を第2の薬物に対して感作する場合にも同様である。

30

【 0 1 9 0 】

併用療法に好適な他の第2または第3の抗癌剤は、例えば、免疫系の免疫抑制構成成分の活性を選択的に阻害することによって、宿主エフェクター細胞の活性を増強するものである。そのような薬剤は、それらの機構の一部分としてエフェクター細胞による攻撃を刺激する本発明の一次治療剤を、より積極的に機能させることができる。そのような薬剤の例は、ドセタキセルおよび免疫チェックポイント阻害剤である。

40

【 0 1 9 1 】

一次治療剤の正確な作用機構（複数可）についての理解は、本発明の治療の実施に必要なではないが、そのような機構に関するデータおよび道理にかなった推論を使用して、本発明において併用するための特定の第2または第3の抗癌剤を選択することができる。転じて、選択された併用療法の有効性は、元のデータおよび提案された作用機構を支持し、また併用療法を実施するための第2または第3の抗癌剤の好ましいカテゴリーをもたらす。

【 0 1 9 2 】

アポトーシスを誘導する薬物が、併用療法に使用されてもよい。例えば、ドセタキセルは、微小管への結合および細胞有糸分裂の破壊によってアポトーシスを誘導し、したがってPS曝露を誘導する（Hotchkissら、2002）。腫瘍血管を覆う内皮細胞お

50

よび腫瘍細胞の、無症状濃度のドセタキセルによる治療は、細胞表面でのPS発現を誘導することが既知である。

【0193】

バビツキシマブなどのPS標的化抗体の抗腫瘍効果には、ADCC、CDCなどの免疫エフェクター機能のFcドメイン媒介増大、サイトカイン産生の刺激、およびそのような機構の組み合わせが含まれる。これはまたドセタキセルにも関連するが、それは、他の研究が、乳癌患者のドセタキセルでの治療が血清IFN、IL-2、IL-6、およびGM-CSFサイトカインレベルの増加をもたらし、ナチュラルキラー(NK)細胞およびリンホカイン活性化キラー細胞(LAK)細胞の活性を増強することによってこれらの患者における抗腫瘍免疫応答を増大することを示しているためである。

10

【0194】

したがって、ドセタキセルは、投与された抗体のPS発現および結合の両方を誘導し、また抗腫瘍効果を媒介する免疫エフェクターの活性も増強する。前述の考慮事項に基づいて、抗体とドセタキセルとの併用は、下記のように、免疫チェックポイント阻害剤とも併用されるか、または免疫チェックポイント阻害剤による治療が続く場合に特に好ましい実施形態である。

【0195】

したがって、ドセタキセルおよびアポトーシスを誘導する他の化学療法剤は、本発明の併用療法に使用するための特定の好ましい薬剤である。ドセタキセルなどのアポトーシスを誘導する化学療法薬との併用は、腫瘍脈管構造内皮細胞および腫瘍細胞区画を相乗的に攻撃し、治療効力の有意な増強だけでなく、毒性の低下ももたらす。これらの併用は、乳癌治療、特にドセタキセルを使用するメトロノーム化学療法とPS標的化抗体との併用での使用が企図される。

20

【0196】

併用療法のための例示的な化学療法剤は、米国特許第7,572,448号および米国特許第9,421,256号に記載されており(例えば、米国特許第7,572,448号の表Dおよび米国特許第9,421,256号の表Cに列挙されるもの)、例えば、ペメトレキセド、テモゾロミド、タモキシフェン、エルロチニブ、スニチニブ、ソラフェニブ、パクリタキセル、カルボプラチン、ゲムシタビン、およびドセタキセルなどである。例えば、トラスツズマブ、リツキシマブ、およびベバシズマブなどの他の治療抗体もまた使用することができる。当該技術分野において既知であるそれらの化学療法剤、抗体、および他の薬物の各々は例示的であり、限定的ではない。治療される病態に応じて、投薬量の変動が生じ得る。治療する医師は、個々の対象にとって適切な用量を決定することができるだろう。特定の好ましい実施形態において、ドセタキセルは、 60 mg/m^2 の出発用量で投与されるドセタキセル、または 75 mg/m^2 の量で患者に投与されるドセタキセルとして使用される。

30

【0197】

M. 免疫療法(IO)の併用

効果的な免疫療法に対する課題は、自然または適応免疫活性化を阻害する複数の経路を克服することである。PD-1免疫チェックポイントは、主要な免疫抑制経路として特定されており、化学療法よりも毒性が少ない癌免疫療法のための有望な標的として浮上している。それは、活性化した腫瘍特異的T細胞を消耗させ、それらの殺腫瘍活性を弱めるように機能する。PD-1は、ナイーブT細胞、B細胞、マクロファージ、DC、および単球には不在であるが、それらの活性化対応物には高度に発現される。特に、腫瘍および関連骨髄細胞は、PD-1経路を利用して、PD-L1発現の上方制御を通して自然および適応免疫耐性を生成する。機構的研究は、これらの免疫チェックポイントの遮断が、新規または既存の抗腫瘍免疫応答が存在するときに最も有効であることを示している。残念なことに、腫瘍微小環境を支配するPSおよび他の免疫抑制因子の曝露のために、既存の腫瘍特異的免疫活性は癌患者において限定的である。

40

【0198】

50

複数の癌型において、PD-1シグナル伝達を遮断する薬剤による持続的な抗腫瘍免疫応答が観察されているが、あるサブセットの患者のみが応答しており、結果的に満たされない重要な医学的必要性が残っている。特に、腫瘍微小環境内で低レベルのPD-1およびPD-L1（免疫抑制およびT細胞活性化の欠如のバイオマーカー）を発現する患者は、チェックポイント遮断療法に対する応答性が低いようである。免疫活性化の観察は、パビツキシマブなどのPS標的化抗体が、抗PD-1/PD-L1および他のチェックポイント療法から利益を得ることができる患者の割合を増加させ得ることを示している。

【0199】

本明細書に提示されるのは、パビツキシマブおよび免疫療法で治療したヒト患者が、有意な生存優位性を有することを初めて示す臨床データである。特に、実施例XIXの結果は、パビツキシマブ（およびドセタキセル）、その後に後続免疫療法（「SACT-IO」）で治療した患者が、プラセボ（ドセタキセル単独）、その後に免疫療法で治療した患者と比較して、統計的に有意でより良好な全生存期間を有することを実証する。後続IOを受けるパビツキシマブ患者のmOSはまだ到達されていないため、生存期間の延長は統計的に有意であり（ $p = 0.006$ ）、さらにより印象的であった（実施例XIX、図26、表16）。したがって、パビツキシマブは実際に、ヒト患者において免疫療法剤の活性を増強する。

【0200】

したがって、実施例XIXのデータによって例証されるように、本発明の重要な実施形態は、免疫療法剤または免疫腫瘍（IO）剤との併用での、パビツキシマブなどのPS標的化抗体による癌患者の治療である。併用療法のための例示的な免疫療法剤は、2016年10月11日出願された仮出願第62/406,727号の表C、ならびに2017年4月3日出願された仮出願第62/480,994号、および2017年5月17日出願された仮出願第62/507,580号の各々の表Dに列挙されており、このうちNK細胞療法およびCAR-T療法との併用が現在好ましい。

【0201】

IO剤の特定の好ましい例は、2017年4月3日出願された仮出願第62/480,994号および2017年5月17日出願された仮出願第62/507,580号の各々の表Eに記載されているものなどの、臨床治療またはヒト臨床試験、好ましくは後期臨床試験において承認されているものである。2017年4月3日出願された仮出願第62/480,994号および2017年5月17日出願された仮出願第62/507,580号の各々の表Eの詳細によって例証されるように、使用のための用量および治療のための適応症は当業者に周知である。例えば、黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、腎細胞癌（RCC）、古典的ホジキン（Hodgkin）リンパ腫、頭頸部の扁平上皮癌（頭頸部癌）、膀胱癌、小細胞肺癌、脳癌（悪性神経膠腫、未分化星状細胞腫（AA）、および多形神経膠芽腫（GBM）など）、肝細胞癌（HCC）、食道癌、胃癌、中皮腫、および骨髄腫の治療には2週間毎に240mgまたは3mg/kgのニボルマブ；黒色腫、NSCLC、古典的ホジキンリンパ腫、頭頸部癌、胃癌、乳癌、膀胱癌、全固形腫瘍、結腸直腸癌、RCC、多発性骨髄腫、食道癌、およびHCCの治療には3週間毎に200mgまたは2mg/kgのペムブロリズマブ；膀胱癌、NSCLC、RCC、結腸直腸癌、前立腺癌、黒色腫、乳癌、卵巣癌、および小細胞肺癌の治療には3週間毎に1200mgのアテゾリズマブ；転移性メルケル細胞癌、NSCLC、卵巣癌、胃癌、膀胱癌、RCC、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、非ホジキンリンパ腫、および頭頸部癌の治療には2週間毎に10mgのアベルマブ；ならびにNSCLC、頭頸部癌、膀胱癌、および小細胞肺癌の治療には2週間毎に10mg/kgのデュルバルマブ（MED14736）である。

【0202】

他の好適なIO剤は、切除不能または転移性黒色腫の治療には3週間毎に3mg/kgまたは10mg/kgのイピリムマブ；黒色腫の治療には3ヶ月毎に15mg/kgのトレメリムマブ；NSCLCの治療にはREGN2810；黒色腫の治療にはPDR001

；NSCLCの治療にはラコツモマブ；進行性固形腫瘍の治療にはMED I 0 5 6 2 およびGS K 3 1 7 4 9 9 8；黒色腫の治療にはウレルマブ；DLBCLの治療にはウトミルマブ；ならびに固形腫瘍の治療にはBMS - 9 8 6 0 1 6、LAG 5 2 5、JNJ - 6 1 6 1 0 5 8 8、TSR - 0 2 2、MBG 4 5 3、MED I 1 8 7 3、およびINCAGN 0 1 8 7 6の各々である。

【0203】

実施例XIXのデータによって直接支持されるように、バビツキシマブなどのPS標的化抗体との併用療法に特に好ましいIO剤は、本明細書において「免疫チェックポイント抗体」とも呼ばれる「チェックポイント阻害剤」である。好適な「免疫チェックポイント抗体」としては、CD 2 8、OX 4 0、および/またはGITRなどの活性化免疫チェックポイント、受容体、または分子に結合するアゴニスト（活性化）抗体、ならびにPD - 1、PD - L 1、CTLA - 4、TIM - 3、および/またはLAG - 3などの阻害免疫チェックポイント、受容体、または分子に結合する拮抗（遮断）抗体が挙げられる。そのような遮断抗体は慣例的に「免疫チェックポイント阻害剤」と呼ばれ、これもまた本明細書で使用される。いくつかのそのような抗体はまた、臨床治療または後期臨床試験に承認されているものとして、2017年4月3日に出願された仮出願第62/480,994号および2017年5月17日に出願された仮出願第62/507,580号の各々の表Eにも記載されている。

10

【0204】

免疫チェックポイント抗体（免疫チェックポイント阻害剤）の現在最も好ましい例は、「CTLA - 4、PD - 1、またはPD - L 1に結合する遮断抗体」である。CTLA - 4、PD - 1、またはPD - L 1に結合するいくつかのそのような遮断抗体、ならびにそれらの選択、調製、および使用のための機能アッセイを含む方法は、表Bに記載されるように、当業者に周知である。これらには、イピリムマブおよびトレメリムマブなどのCTLA - 4に対する遮断抗体；ニボルマブ（Brahmerら、2015）、REGN 2 8 1 0、およびペンブロリズマブ（Garonら、2015）などのPD - 1に対する遮断抗体；デュルバルマブ（MED I 4 7 3 6）およびアテゾリズマブ（Fehrenbacherら、2016）などのPD - L 1に対する遮断抗体；ならびに「IOダブレット」として知られる、そのような抗体のうちのいずれか1つ以上の組み合わせが含まれる。これらのうち、トレメリムマブ、ニボルマブ、デュルバルマブ、およびアテゾリズマブが現在好ましい。トレメリムマブ、ニボルマブ、デュルバルマブ、およびアテゾリズマブの主な米国特許はそれぞれ、米国特許第6,682,736号、米国特許第8,008,449号、米国特許第8,779,108号、および米国特許第8,217,149号である。

20

30

【0205】

表Bに加えて、抗CTLA - 4抗体の他の好適な例は、米国特許第6,207,156号に記載されているものであり、この特許は特に、寄託された雑種細胞に由来する定義された抗体から選択されるCDR（CDR 3、CDR 2、またはCDR 1）を含む、抗CTLA - 4抗体に関する。

【0206】

表Bに加えて、抗PD - L 1抗体の他の好適な例は、米国特許第8,168,179号に記載されているもの（この特許は特に、化学療法の併用を含む、ヒト抗PD - L 1抗体によるPD - L 1過剰発現癌の治療に関する）、米国特許第9,402,899号（この特許は特に、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体を含む、PD - L 1に対する抗体による腫瘍の治療に関する）に記載されているもの、米国特許第9,439,962号に記載されているもの（この特許は特に、抗PD - L 1抗体および化学療法による癌の治療に関する）である。これらの抗PD - L 1抗体組成物および方法は、Ono Pharmaceuticalsおよび共同研究者らによって開発中のものを含む。

40

【0207】

PD - L 1に対する更なる好適な抗体は、米国特許第7,943,743号、同第9,

50

580, 505号、および同第9, 580, 507号のもの、それらのキット（米国特許第9, 580, 507号）、ならびにそれらの抗体をコードする核酸（米国特許第8, 383, 796号）である。そのような抗体はPD-L1に結合し、結合について基準抗体と競合するか、VHおよびVL遺伝子によって定義されるか、あるいは定義された配列の重鎖および軽鎖CDR3（米国特許第7, 943, 743号）もしくは重鎖CDR3（米国特許第8, 383, 796号）またはそれらの保存的修飾によって定義されるか、あるいは基準抗体に対して90%または95%の配列同一性を有する。これらの抗PD-L1抗体はまた、定義された定量的（結合親和性を含む）特性および定性的特性を有するもの、免疫複合体、ならびに二重特異性抗体を含む。免疫応答を増強する上で、そのような抗体、ならびに定義された定量的（結合親和性を含む）特性および定性的特性を有するもの（単鎖形式の抗体および単離されたCDRの抗体にある抗体を含む）を使用する方法がさらに含まれる（米国特許第9, 102, 725号）。米国特許第9, 102, 725号にあるように、免疫応答の増強を使用して、癌または感染症（ウイルス、細菌、真菌、または寄生体による病原性感染症など）を治療することができる。これらの抗PD-L1抗体組成物および方法は、BMS936559の製品を含む。

10

【0208】

PD-L1に対する更なる好適な抗体は、米国特許出願第2016/0009805号にあるものであり、この特許は、定義されたCDR配列の抗体および競合抗体を含む、PD-L1上の特定のエピトープに対する抗体；核酸、ペクター、宿主細胞、免疫複合体；検出、診断、予後、およびバイオマーカー方法；ならびに治療方法に関する。

20

【表 2 - 1】

表 B				
CTLA-4、PD-1、および PD-L1 に対する遮断抗体ならびに機能アッセイ				
標的	代表的な総称	代表的な商品名	米国特許	教示
CTLA-4	イピリムマブ	Yervoy (登録商標)	6, 984, 720	配列によって定義される CTLA-4 に対する抗体；定量的および定性的特性
			7, 605, 238	阻害アッセイおよび競合結合アッセイを含む結合親和性によって定義される CTLA-4 に対する抗体；配列
			8, 318, 916	CDR3 配列によって定義される CTLA-4 に対する抗体の核酸
			8, 784, 815	CDR3 配列および親和性、または基準抗体との競合および親和性によって定義される CTLA-4 抗体によって免疫応答を増加させ、癌を治療する
	トレメリムマブ		8, 017, 114	
			6, 682, 736	VH 遺伝子およびその中の aa 置換によって定義される CTLA-4 に対する抗体（好ましくはヒトおよび霊長類）；結合親和性、定量的特性、抗体競合
			7, 109, 003	定量的結合特性または VL 遺伝子によって定義される CTLA-4 に対する抗体の発現；親和性、抗体競合
			7, 132, 281	宿主細胞、抗体競合（例えば、寄託された抗体）および VL 遺伝子、定量的結合特性、90%、95%の配列同一性によって定義される CTLA-4 に対する抗体の発現および精製
			7,411,057	CDR 配列および寄託された抗体によって定義される、核酸、宿主細胞、および CTLA-4 に対する抗体の発現

10

20

30

40

【表 2 - 2】

表 B				
CTLA-4、PD-1、および PD-L1 に対する遮断抗体ならびに機能アッセイ				
標的	代表的な総称	代表的な商品名	米国特許	教示
PD-1			7,807,797 7,824,679 8,143,379 8,491,895 8,883,984	重鎖もしくは軽鎖配列（鎖シャッフリング）または CDR によって定義される CTLA-4 に対する抗体、単鎖特異性抗体および二重特異性抗体、ならびに癌の治療
	ニボルマブ	Opdivo（登録商標）	8,008,449 8,779,105 9,387,247	結合について基準抗体と競合する PD-1 に対する抗体；免疫複合体；二重特異性抗体；定量的および定性的特性
			9,492,539 9,492,540	結合について基準抗体と競合する PD-1 に対する抗体、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% のフレームワーク配列同一性、および癌の治療
			8,728,474	キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体を含む、PD-1 に対する抗体での腫瘍の治療
			9,067,999	併用を含む PD-1 に対する抗体での肺癌の治療
			9,073,994	併用を含む PD-1 に対する抗体での黒色腫の治療
			7,595,048	化学療法の併用を含む、ヒト抗 PD-1 抗体での PD-L1 または PD-L2 過剰発現癌の治療
	ペンブロリズマブ	Keytruda（登録商標）	8,354,509	PD-1 に対する競合結合抗体；定量的および定性的特性
			8,900,587	CDR または特定の配列によって定義される PD-1 に対する抗体
			8,952,136	CDR または特定の配列によって定義される PD-1 に対する抗体

10

20

30

40

【表 2 - 3】

表 B CTLA-4、PD-1、および PD-L1 に対する遮断抗体ならびに機能アッセイ				
標的	代表的な総称	代表的な商品名	米国特許	教示
PD-L1	デュルバルマブ	[MEDI4736]	8,779,108	既知のエピトープへの結合について寄託された抗体と競合するか、または重鎖および軽鎖可変ドメインに対して 90% の同一性を有する、PD-L1 (B7-H1) に対する抗体；突然変異分析のための競合アッセイ
	アテゾリズマブ	Tecentriq (登録商標)	9,493,565 8,217,149	CDR または配列によって定義される PD-L1 (B7-H1) に対する抗体 無エフェクターFc 突然変異および非グリコシル化を含む配列変異体を有する CDR によって定義される、PD-L1 に結合する重鎖可変領域および抗体；化学療法、抗ウイルス剤、およびワクチンの併用
Combos			9,084,776 [8,728,474] [9,067,999] [9,073,994]	PD-1 および CTLA-4 に対する抗体での腫瘍の治療
			9,358,289	治療量以下の用量および PD-L1 陰性腫瘍を含む、PD-1 および CTLA-4 に対する抗体での腫瘍の治療
			9,393,301 [9,402,899]	PD-L1 および CTLA-4 に対する抗体での腫瘍の治療

10

20

30

40

*

*

*

【0209】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例に開示されている技術は、本発明の実施において十分に機能することが発明者によって発見された技術を表しており、したがってその実施のための好ましい様式を構成すると見な

50

され得ることが、当業者によって理解されるべきである。しかしながら、当業者は、本開示を考慮して、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、開示される特定の実施形態において多くの変更を行い、依然として同様または類似の結果を得ることができることを理解するべきである。

【0210】

実施例 I

3G4 抗体の生成

本実施例は、3G4 と呼ばれるマウス P S 標的化抗体の免疫化プロトコル、生成、および初期特徴付けを記載する。

【0211】

アニオン性リン脂質、主に P S をより強い免疫原として免疫系に提示するために、それらを細胞の文脈において、特に P S 陽性細胞として製剤化した。他の膜構成成分によって囲まれた、膜に曝露された P S は、抗体を産生させるためのより良好な立体構造を有する。その意図は、P S を発現する自己細胞で免疫適格動物を免疫化することであり、ここで動物は全ての自己表面抗原に対する抗体を産生するのではなく、外的要素として膜に曝露された P S を認識する。

【0212】

マウス内皮腫細胞 b E n d . 3 (不死化マウス (B A L B / c 株) 内皮細胞) を、10 % の C O ₂ のインキュベーター内、9 m l / 500 m l の H E P E S 緩衝液を有する 10 % の D M E M 中で培養した。所望の数の細胞が得られるまで、b E n d . 3 細胞を T 1 7 5 T C フラスコ内で増殖させた。典型的には、約 70 ~ 80 % の培養密度の各フラスコは、約 3×10^6 個の細胞を有し、各マウスは、 $1 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ 個の細胞、最大で 1×10^7 個の細胞を受ける。

【0213】

b E n d . 3 細胞を 37 ° で 1 または 2 時間、50 μ M ~ 200 μ M の過酸化水素で処理して、免疫化前にアニオン性リン脂質、特に P S を曝露させた。H₂O₂ のストックは、[9 . 8 M]、30 体積 % であった。これを 1 : 1000 に希釈し、その後、0 . 4 m l を 40 m l の培地を有する T 1 7 5 T C フラスコに添加して、H₂O₂ の最終濃度を 100 μ M とした。細胞を 37 ° で 1 時間維持した。採取するために、培地中の全ての B S A または血清タンパク質を除去する目的で、細胞を温かいリン酸緩衝食塩水 (P B S) + 10 m M の E D T A で 3 回洗浄した。細胞を穏やかなトリプシン処理で除去し、洗浄し、1000 r p m で 5 分間遠心分離した。上清を吸引し、細胞を添加剤なしで適切な体積になるように D M E M 中に再懸濁し (各マウスは 200 μ l 中約 1×10^7 個の細胞を受けた)、氷上に維持した。

【0214】

このようにして処理した細胞を、1 m l のシリンジおよび 23 ゲージの針を使用して、B A L B / c マウスの腹腔内に注射した (200 μ l の細胞懸濁液)。まず、マウスを 3 ~ 4 週間の間隔で 3 ~ 7 回免疫化した。2 回目の追加免疫から始めて、各追加免疫の 10 日後にマウスを出血させることによって、免疫血清を収集した。P S 抗体の血清力価を E L I S A によって試験した。

【0215】

自己 P S 陽性細胞によるこれらの免疫化は、自己抗体の非制限的な産生はもたらさず、P S と反応性の抗体の産生、主に他のアニオン性リン脂質との併用で P S と反応性の抗体の産生に限定されていた。P S などのアニオン性リン脂質と反応性の抗体の力価が非常に高いマウスを得た。マウスは、いかなる毒性の徴候も示さなかった。

【0216】

更なる免疫化において、様々なマウスを過酸化水素処理した b E n d . 3 細胞で 3 回免疫化し、血清を初回免疫の 54 日後に試験した。血清中の P S と反応性の I g G 抗体を、抗マウス I g G、F c 特異的二次抗体で検出した (血清中の I g M 抗体を、抗マウス I g G m u 特異的二次抗体で検出した)。この免疫化プロトコルを使用して、P S と反応性

10

20

30

40

50

の I g G および I g M 抗体を有するいくつかの有効な抗血清を得、そのうち I g G 抗体を有する抗血清が一般により有効であった。

【 0 2 1 7 】

典型的には、P S に対する所望の抗血清の I g G 力価が 2 0 0 , 0 0 0 超に達しているが、P C 力価が 5 0 , 0 0 0 未満であったときに融合を実行して、モノクローナル抗体を生成した。免疫化した動物の脾細胞を骨髓腫パートナー P 3 X 6 3 A G 8 . 6 5 3 細胞 (A T C C 、 R o c k v i l l e , M D) と融合させることによって、雑種細胞を得た。

【 0 2 1 8 】

腫瘍治療に有用なモノクローナル抗体を調製するためのこの技術の重要な一態様は、アニオン性リン脂質に結合するが、中性リン脂質には結合しない抗体を選択するためのスクリーニングに關与する選択戦略であった。別の重要な態様は、血清の不在下でも血清の存在下と同様に強く P S コーティングプレートに結合する抗体を選択することであった。これは、P S と 2 G P I との複合体などの、P S と血清タンパク質との複合体を認識する抗体を排除する目的で実行した。

【 0 2 1 9 】

P S と反応性のモノクローナル抗体を単離するための戦略は、抗マウス I g G 、 F c ガンマ特異的二次抗体を使用して、P S コーティングプレート上の雑種細胞上清をスクリーニングすることに関与した。まず、4 つのリン脂質 (P S 、ホスファチジルセリン ; P E 、ホスファチジルエタノールアミン ; C L 、カルジオリピン ; および P C 、ホスファチジルコリン) 、ならびに b E n d 3 細胞に対してスクリーニングを実行した。中性リン脂質である P C と反応性のクローンを廃棄し、b E n d 3 細胞と非反応性のクローンも同様に廃棄した。P S に対して高い結合を有するクローンを選択した。第 1 に、P S のみの反応性または P S に対する強い選択性を有するウェルをサブクローニングし、第 2 に、他のアニオン性リン脂質への結合と組み合わせて P S 反応性を呈するウェルをサブクローニングした。

【 0 2 2 0 】

選択された各雑種細胞のアイソタイプを決定した。I g G クラスの抗体は、典型的により高い親和性、インビボでのより低いクリアランス速度、ならびに精製、修飾、および取り扱いの単純さを含む、I g M よりも多数の利点を有するため、それらの生成が特に所望された。均質な I g G アイソタイプを有するウェルに焦点を合わせるために、I g M または異なる I g の混合物を含有するウェルを廃棄するか、または再クローニングした。高度に陽性のクローンのサブクローニングを、3 ~ 4 回反復した。

【 0 2 2 1 】

最初に「F 3 - G 4」と呼ばれ、3 G 4 として再度命名された、有利なマウス I g G 抗体 (I g G ₃) を選択した。3 G 4 抗体を、血清の存在下および不在下で E L I S A において P S への結合について試験し、最初に「血清非依存性」、すなわち、血清の不在下で P S に結合する抗体として特徴付けた。

【 0 2 2 2 】

P S または他のリン脂質への結合を試験するために使用した以下の「標準 E L I S A」を使用して、3 G 4 抗体を研究した。リン脂質抗原 (P S 抗原、2 . 5 m l の瓶中 P - 6 6 4 1 が 2 5 m g 1 0 m g / m l (溶媒は 9 5 : 5 のクロロホルム : M e O H)) 原液をアリコートし、- 3 0 °C で気密容器内に保存する。好ましい 9 6 ウェルプレートは、D y n a t e c h U b o t t o m I m m u n o n 1 (D y n a t e c h L a b s より、カタログ番号 0 1 1 - 0 1 0 - 3 5 5 0) である。

【 0 2 2 3 】

使用した標準遮断緩衝液は、P B S 中に溶解した 1 0 % のウシ血清であった。一次抗体は、試験試料であった。二次抗体は、ヤギ抗マウス I g G - H R P であった。発色溶液は、1 0 m l の 0 . 2 M の N a ₂ P O ₄、1 0 m l の 0 . 1 M のクエン酸、1 個の 1 0 m g の O P D 錠剤、および 1 0 μ L の過酸化水素であった。停止溶液は、0 . 1 8 M の H ₂ S O ₄ であった。

10

20

30

40

50

【0224】

プロトコルは、以下のようにP Sで96ウェルプレートをコーティングすることを伴った：P S原液を、n - ヘキサン中に10 μ g / mlになるまで希釈し、よく混合した。50 μ lを各ウェルに添加し、1時間蒸発させた。200 μ lの10%の血清を（遮断緩衝液として）各ウェルに添加し、覆いをし、室温で2時間または4 で一晩維持した。プレートをP B Sで3回洗浄した。一次抗体（遮断緩衝液中に希釈）を添加し、37 で2時間インキュベートした。プレートをP B Sで3回洗浄した。1ウェル当たり100 μ lの二次抗体（典型的にはヤギ抗マウスI g G - H R P）を添加し、37 で1時間インキュベートした。プレートをP B Sで3回洗浄した。ウェルの各々に100 μ lの発色溶液を添加することによってE L I S Aを発色させ、10分間発色させ、その後、各プレートに100 μ lの停止溶液を添加し、光学濃度を490 nmで読み取った。

10

【0225】

3 G 4抗体が、従来の抗体と比較して改善されたP Sに対する相対的親和性を有すること、ならびに3 G 4抗体が、P S、C L、P I（ホスファチジルイノシトール）、P A（ホスファチジン酸）、およびP G（ホスファチジルグリセロール）に結合することを決定した。腫瘍内で差次的に発現されるP Sを標的化するためのモデルと一致して、3 G 4抗体は、中性リン脂質、P C、およびS Mとは反応しなかった。

【0226】

標準的なタンパク質A手順を使用して、3 G 4抗体を、培養した雑種の上清から見た目が均質になるまで精製した。簡潔には、生理学的p Hの3 G 4抗体を含有する試料を、タンパク質Aカラムに適用し、I g Gが固定化タンパク質Aに結合するように緩徐に通過させた。カラムを洗浄緩衝液で洗浄して、非結合血清構成成分を除去した。3 G 4抗体を、酸性溶出緩衝液（約p H 2 . 8）を使用してカラムから溶出させ、その後、溶出した抗体を含有する画分を中和または透析して、生理学的p Hに戻した。血清の不在下で実行されたE L I S AにおいてP Sへの結合について、この高度に精製された3 G 4抗体を試験する上で、依然として、3 G 4はP Sに直接、すなわち、血清または血清タンパク質なしで結合すると考えられた。

20

【0227】

実施例 I I

3 G 4抗体の前臨床抗腫瘍効果

30

この実施例において、同系および異種腫瘍モデルにおける3 G 4抗体の抗腫瘍効果のいくつかを示す初期前臨床経験を例証するためのデータを提供する。

【0228】

動物腫瘍研究のためのプロトコル

3 G 4の効果を、まず同系および異種腫瘍モデルにおいて検査した。動物腫瘍治療研究のための一般的なプロトコルは、以下の通りである。

【0229】

動物は、Charles Rivers Laboratoriesから得た。マウスは、生後4 ~ 5週間の雌のC . B - 17 S C I DまたはFox Chase S C I Dマウスであった。マウスは、無菌取り扱いによって、オートクレーブケージ内に収容し、無菌の食物および水を与えた。全ての手順は、層流フード内で実行した。マウスを1週間順応させ、その後、耳にタグ付けし、尾静脈から血液試料（約75 ~ 100 μ l）を採取して、E L I S Aによって漏出を確認した。漏出E L I S A試験に不合格であったマウスは、試験手順には使用しなかった。耳のタグ付けおよび血液試料除去の2 ~ 3日後に、腫瘍細胞をマウスの乳房脂肪パッド（M F P）に同所注射するか、または右側腹部に皮下注射した。

40

【0230】

同所モデルでは、0 . 1 mlのD M E M中、 1×10^7 個の細胞を、典型的には麻酔したマウスのM F Pに注射した。0 . 075 mlのマウスカクテルを腹腔内注射して、マウスを麻酔した。マウスカクテルは、5 mlのケタミン（100 mg / ml）、2 . 5 ml

50

のキシラジン (2 0 m g / m l)、1 m l のアセプロマジン (1 0 m g / m l)、1 1 m l の無菌水である。投薬量は、3 0 分間にわたり腹腔内経路を介して、体重 2 0 ~ 3 0 グラム当たり 0 . 1 m l であった。

【 0 2 3 1 】

マウスに麻酔をかけた後 (趾 / 足をつまんでも応答がないことによって測定される)、マウスをその左側を下にして置き、頭のすぐ後ろおよび右前腕の周り / 背中の領域を 7 0 % のエタノールで拭いた。右前腕 (側方胸部) のすぐ後ろに 2 ~ 3 m m の切開を入れたところ、皮弁を上げたときに白っぽい脂肪パッドが現れた。1 m l のシリンジおよび 2 7 ゲージの針を使用して、0 . 1 m l の細胞を脂肪パッドに注射したところ、脂肪パッド内に小疱が生じた。切開部を、9 m m の無菌創傷クリップを使用して閉じた。マウスをそのケージに戻し、それが麻酔から目覚め、動けるようになるまで観察した。手術後の健康状態を決定し、何らかの苦痛の徴候が観察された場合には、動物に飲料水中のアセトアミノフェン (0 . 2 4 m g / m l) + コデイン (0 . 0 2 4 m g / m l) を与えた。1 週間後に創傷クリップを除去した。この方法は、細胞が皮下領域ではなく選択された部位に正確に配置されるように使用した。腫瘍は 1 4 ~ 1 5 日間で約 2 0 0 μ l の体積 (長さ \times 幅 \times 重量) であり、生着率は本質的に 1 0 0 % であった。

10

【 0 2 3 2 】

皮下モデルでは、マウスに典型的には 0 . 2 m l 中 1×10^7 個の細胞を注射した。マウスには麻酔をかけなかったが、マウスの皮膚をしっかりと握って拘束し、右側腹部を曝露させた。2 3 ゲージの針を有する 1 m l のシリンジを使用して、マウスの皮膚のすぐ下に 2 0 0 μ l 中 1×10^7 個の細胞を注射したところ、小疱が見られた。注射部位からの少量の漏出を観察することは珍しくはなかった。この漏出を低減するために、皮下注射から針を引き抜くときにねじり運動を使用した。腫瘍体積を、長さ \times 幅 \times 高さによって測定した。

20

【 0 2 3 3 】

灌流プロトコルでは、マウスに 0 . 2 m l の生理食塩水中 1 0 0 0 U のヘパリンを静脈内注射した。その後、マウスに 0 . 1 m l のマウスカクテルを腹腔内注射することによって、マウスを鎮静させた。マウスが十分に鎮静した後 (趾 / 足をつまんでも反射がないことによって測定される)、胸腔を開いて、心臓および肺を曝露させる。管および灌流ポンプに取り付けた 3 0 ゲージの針を、左心室に挿入した。血液が滴り落ちるように、右心室を切り取った。生理食塩水を、毎分 1 m l の速度で 1 2 分間ポンピングした。灌流の終了時に、針および管を取り除いた。免疫組織化学または病理学のいずれかの更なる研究のために、組織を取り除いた。

30

【 0 2 3 4 】

ノンパラメトリック検定 (マン - ホイットニーの順位和検定) を使用して、腫瘍成長速度の差を統計的有意性について試験した。

【 0 2 3 5 】

B . 腫瘍治療結果

同系モデルでは、M e t h A マウスの線維肉腫腫瘍細胞を B A L B / c マウスと共に使用した。異種モデルでは、ヒト M D A - M B - 2 3 1 乳房腫瘍細胞または M D A - M B - 4 3 5 細胞を S C I D マウスの乳房脂肪パッドに播種した。別の異種モデルでは、細胞を注入し、治療前に腫瘍を 5 0 0 m m ³ 超のサイズまで成長させることによって、大型ヒトホジキンリンパ腫 L 5 4 0 異種移植片を確立した。対照抗体 (B B G 3 と呼ばれる、B a b e s i a b o v i s 抗原に対するマウス I g G ₃ 抗体、A T C C から 2 3 . 8 . 3 4 . 2 4 として得られる雑種細胞から分泌 ; H B - 1 0 1 1 3) とは対照的に、腫瘍保有マウス (1 群当たり 8 ~ 1 0 匹の動物) には見た目が均質になるまで精製した 1 0 0 μ g の 3 G 4 抗体を腹腔内注射した。治療を 1 週間に 3 回反復した。腫瘍測定のために、動物を 1 週間に 2 回または 3 回監視した。

40

【 0 2 3 6 】

同系腫瘍および異種腫瘍の両方の成長は、3 G 4 抗体での治療によって効果的に阻害さ

50

れた ($P < 0.05$)。研究終了時に、対照マウスとは対照的に、3G4 治療マウスにおける腫瘍成長の平均低減は、MDA-MB-435では65% (図1A)、MDA-MB-231では75% (図1B)、Meth Aでは90% (図1C)、およびL540では50% (図1D)であった。アイソタイプが一致した対照抗体であるBBG3で治療した対照マウスでは、腫瘍成長の遅延は生じなかった。同系Meth A腫瘍細胞の治療は特に成功した。壊死に耐性があることが既知である大型L540腫瘍を保有するマウスにおいてさえ、3G4抗体治療は対照と比較して腫瘍成長を阻害した。3G4抗体で治療したマウスでは、毒性は観察されなかった。

【0237】

したがって、要約すると、3G4抗体は、毒性の証拠なしに、腫瘍血管損傷、局在性血栓症、腫瘍壊死、および腫瘍成長の遅延を引き起こした。

【0238】

実施例 I I I

キメラ3G4抗体バビツキシマブの生成

本実施例は、合わせて6つの相補性決定領域(CDR)を含む3G4抗体の重鎖および軽鎖可変領域の全配列を提供し、現在バビツキシマブと呼ばれているマウス-ヒトキメラ抗体(ch3G4)を含む3G4抗体のキメラバージョンの生成を記載する。

【0239】

A. 3G4抗体の配列

3G4抗体可変領域の元の配列を、3G4抗体を産生する雑種細胞からRACEによって得、その配列を検証した。3G4抗体の重鎖可変領域(VH)の核酸配列およびアミノ酸配列は、米国特許第7,572,448号の図18Aに示される。重鎖可変領域の配列は、Kabattによって予測可能な位置にVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を包含する(Kabattら、1991)。核酸配列内のBstEII部位を好都合な部位として使用して、例えば、ヒト定常領域への移植に使用するための機能性マウス可変領域を調製することができる。

【0240】

実際に、3G4-2BVH配列は、Lonza pEEベクターを使用してBstEII部位のヒト1定常領域に移植されている。結果として生じる生成物はマウスリーダー配列を含有し、そのVHは米国特許第7,572,448号の図18Aに示される様式でヒトCH1配列に接合される。

【0241】

3G4抗体の軽鎖可変領域(VL)の核酸配列およびアミノ酸配列は、米国特許第7,572,448号の図18Bに示される。軽鎖可変領域配列は、Kabattによって予測可能な位置にVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を包含する(Kabattら、1991)。核酸配列内のBbsI部位を好都合な部位として使用して、例えば、ヒト定常領域への移植に使用するための機能性マウス可変領域を調製することができる。

【0242】

実際に、3G4-2BVL配列は、Lonza pEEベクターを使用してBbsI部位のヒト1定常領域に移植されている。結果として生じる生成物はマウスリーダー配列を含有し、そのVLは米国特許第7,572,448号の図18Bに示される様式でヒトCL1配列内に接合される。

【0243】

B. マウスキメラ抗体2aG4の生成

直下に記載のように、マウス3G4抗体のヒトキメラ(ch3G4)は、ヒトIgG₁アイソタイプ(hIgG₁)である。ch3G4のマウスIgGホモログは、IgG_{2a}アイソタイプ(mIgG_{2a})に対応する。この構築物を作製し、試験したところ、元のマウスIgG₃抗体と本質的に同じように挙動することが示された。

【0244】

10

20

30

40

50

簡潔には、3 G 4 軽鎖コード配列を、3 G 4 雑種細胞の細胞株から単離した全 R N A から R T - P C R によって増幅した。R T - P C R プライマーは、L o n z a 発現ベクターである p E E 1 2 . 4 ベクターへのクローニングのために、増幅断片が増幅産物の両端に X m a I および E c o R I 制限酵素部位を含有するように設計した。3 G 4 重鎖可変領域を、3 G 4 雑種細胞の細胞株から単離した全 R N A から R T - P C R によって増幅した。プライマーは、L o n z a 発現ベクターである p E E 6 . 4 ベクターへのクローニングのために、増幅断片が増幅産物の両端に H i n d I I I および X m a I 制限酵素部位を含有するように設計した。

【0245】

マウス I g G 2 a 定常領域を、プラスミドベクターから P C R によって増幅した。P C R プライマーは、p E E 6 . 4 + 3 G 4 V H ベクターへのクローニングのために、増幅産物の両端に B s t I I および E c o R I 制限酵素部位を有するように設計した。B s t E I I 部位は、上流の 3 G 4 の V H 可変領域配列とインフレームになるように設計した。重鎖および軽鎖構築物を、両方のベクターを S a l I および N o t I で切断することによって単一の二重遺伝子ベクター (1 2 . 4 3 G 4 I g G 2 a) に組み合わせた。重鎖および軽鎖コード領域を、配列決定によって検証した。

10

【0246】

1 2 . 4 3 G 4 I g G 2 a ベクターを、電気穿孔によって N S 0 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション後、N S 0 細胞を希釈し、グルタミンを欠如する培地中で 9 6 ウェルプレートにプレーティングした。(陽性選択のためのグルタミンシンターゼ遺伝子を含有する) 構築物でトランスフェクトした細胞のみが、グルタミンの不在下で成長することができる。実施例 I の標準的な E L I S A を使用して、トランスフェクタントを特定し、抗体分泌についてスクリーニングし、最高量の抗体を分泌するそれらのトランスフェクタントを大型培養物中で成長させて、精製抗体を生成した。

20

【0247】

結果として生じる 2 a G 4 抗体を見た目が均質になるまで精製し、3 G 4 抗体と本質的に同じ親和性および結合プロファイルを有することが示された。

【0248】

C . ヒトキメラ抗体 c h 3 G 4 (バビツキシマブ) の生成

マウス可変領域およびヒト定常領域を含有するキメラ構築物を生成し (c h 3 G 4) 、元のマウス抗体と本質的に同じ特徴を有することが示された。

30

【0249】

マウス 3 G 4 抗体を、ヒト - マウスキメラ抗体に変換した。マウス V_H をクローニングし、L o n z a 2 B V H ベクターの B s t E I I 部位のヒト₁ 定常領域上に移植した。マウス V_K をクローニングし、L o n z a 2 B V L ベクターの B b s I 部位のヒト K 定常領域上に移植した。配列を検証した。全構築物を C H O (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞内で発現させ、抗体を精製した。これは、現在バビツキシマブと呼ばれる抗体である。

【0250】

実施例 I の標準的な E L I S A を使用して、結果として生じる c h 3 G 4 は、少なくともマウス 3 G 4 と同程度にリン脂質コーティング E L I S A プレートに結合した。キメラ 3 G 4 の、リン脂質 P S 、 P A 、 C L 、 P I 、および P G へのインビトロ結合プロファイルは、3 G 4 と同じであることが示された。無関係な特異性の対照抗体では結合は観察されなかったため、結合は抗原特異的であった。インビボでは、c h 3 G 4 は腫瘍血管内皮に局在化すること、ならびに広範囲の研究において抗腫瘍効果および抗ウイルス効果を発揮することもまた示された。

40

【0251】

しかしながら、キメラ 3 G 4 構築物を無血清条件下で C H O 細胞内に発現させ、精製抗体を血清の不在下で E L I S A において P S への結合について試験した場合、P S への結合は失われた。

50

【0252】

実施例 I V

3 G 4 抗体およびバビツキシマブは、2 G P I に依存した様式で P S を標的化するこの実施例は、元の雑種細胞由来の 3 G 4 抗体と、C H O 細胞内で発現されたキメラ抗体との P S 結合プロファイルにおける見かけ上の矛盾を解決するためのデータを提供する。そうすることで、本実施例は、3 G 4 抗体と P S との間の相互作用が血漿タンパク質 2 - 糖タンパク質 I (2 G P I) に依存することを実証する。

【0253】

A . 材料および方法

1 . 材料

ダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M) およびトリプシン / E D T A は、M e d i a t e c h , I n c . (H e r n d o n , V A) から得た。ウシ胎児血清 (F B S) 、正常ヒト血清、正常ラット血清、および正常マウス血清は、B i o m e d a (F o s t e r C i t y , C A) から得た。新鮮なヒト血漿は、C a r t e r B l o o d C a r e (D a l l a s , T X) から得た。無血清雑種細胞培地、S y n t h e c h o l N S 0 補助剤、L - - ホスファチジルセリン (P S) 、ウシ血清アルブミン (B S A) 、および鶏卵白由来の卵白アルブミン (O V A) は、S i g m a C h e m i c a l C o . (S t . L o u i s , M O) から得た。D E A E セルロース、ヘパリン - S e p h a r o s e 、および H y b o n d - P 膜は、A m e r s h a m B i o s c i e n c e s (B u c k i n g h a m s h i r e , U K) から得た。1 - パルミトイル - 2 - ヒドロキシ - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン [リゾホスファチジルコリン (L P C)] は、A v a n t i P o l a r L i p i d s (A l a b a s t e r , A L) から得た。96 ウェルの I m m u l o n - 1 B および I m m u l o n - 2 H B マイクロタイタープレートは、T h e r m o L a b S y s t e m s (F r a n k l i n , M A) から得た。トリス - H C l 勾配 S D S - P A G E ゲルおよび O p t i - 4 C N 基質キットは、B i o r a d (H e r c u l e s , C A) から得た。8 ウェルガラスチャンバースライドは、B D B i o s c i e n c e s (B e d f o r d , M A) から得た。

【0254】

2 . 抗体

アニオン性リン脂質 P S に結合するように生成された 3 G 4 マウスモノクローナル抗体は、実施例 I に記載されている抗体である。3 G 4 を最初に雑種細胞上清中で産生させた (実施例 I 、実施例 I I) 。3 G 4 をマウス I g G 2 a アイソタイプにも変換し (実施例 I I I 、B) 、N S 0 マウス骨髓腫細胞株内でも産生させた。N S 0 細胞を、10 % の F B S を補充した D M E M 中または S y n t h e c h o l N S 0 補助剤を有する無血清雑種細胞培地中で培養した。3 G 4 のヒトキメラバージョン (c h 3 G 4 、バビツキシマブ) を生成し (実施例 I I I 、C) 、無血清条件下で C H O 細胞から抗体を産生させた。

【0255】

マウス抗ヒト 2 G P I (抗 2 G P I または - 2 G P I) m A b は、U S B i o l o g i c a l (S w a m p s c o t t , M A) から得た。C 4 4 を分泌する雑種細胞、コルヒチン特異的マウス I g G 2 a m A b は、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (R o c k v i l l e , M D) から得、3 G 4 および抗 2 G P I の対照として使用した。リツキシマブ (ヒト I g G 1 キメラ m A b) を、c h 3 G 4 の対照として使用した。全ての二次抗体は、J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h L a b s (W e s t G r o v e , P A) から得た。

【0256】

3 . 抗体断片の調製

3 G 4 F (a b ') ₂ は、プロテアーゼペプシンと共にインキュベートすることによって生成した。3 G 4 F a b および対照 F a b 7 H 1 1 (抗アデノウイルス) は、プロテアーゼパパインと共にインキュベートすることによって生成した。全ての抗体切断生成物を F P L C によって精製し、S D S - P A G E によって検証した。

【0257】

4. ヒト血漿からの 2 GPI の精製

本実施例において使用するためのヒト 2 GPI (h 2 GPI) は、本質的に以前に記載されているように (Polzら、1980; Wurmら、1984) ヒト血漿から精製した。簡潔には、過塩素酸 (70%) を、1.57 体積% の最終濃度になるまでプールした血漿に添加した。沈殿物を廃棄し、上清を飽和 Na_2CO_3 で pH 7.5 に調整し、その後に 50 mM のトリス (pH 8.0) に対する広範な透析を続けた。この材料を、50 mM のトリス (pH 8.0) で平衡化した DEAE セルロースカラムに適用して、混入物を除去した。その後、DEAE カラム通過画分を、50 mM のトリス (pH 8.0) で平衡化したヘパリン-Sepharose 親和性カラムに適用し、結合したタンパク質を、1.0 M の NaCl を使用して溶出させた。最後に、2 GPI 調製物を PBS に対して透析し、タンパク質 A/G によってさらに精製して、混入 IgG を除去した。最終調製物は、非還元 SDS/PAGE および Coomassie (登録商標) 染色によって示されるように、50 kDa で均質なバンドを含有した。

10

【0258】

5. 2 GPI および 2 GPI ドメインの構築および発現

純粋な組み換え完全長および欠失型の 2 GPI を生成するために、酵母シャトル発現ベクター pPIC6 A (Invitrogen) および宿主株 Mut⁺ X-33 (Invitrogen) を使用した。発現ベクターは、アルコール (メタノール) オキシダーゼ遺伝子 (AOX1) の 5' プロモーター配列および 3' 転写終結配列を含有する。このベクターはまた、AOX1 プロモーターの下流に酵母 接合因子シグナル配列も有し、これに外的 cDNA を融合させて、組み換え異種タンパク質を培地に分泌させることができる。P. pastoris における発現は、哺乳動物細胞内のものに類似したグリコシル化およびジスルフィド結合形成を提供する。

20

【0259】

発現構築物を生成するために、Lusterら、2006 および米国特許第 8,956,616 号に記載されるように、ヒト 2 GPI cDNA を使用して以下の 5 つの発現構築物、その同族シグナルペプチドを有しない 2 GPI cDNA の全コード領域 (ドメイン I-V); ドメイン I 欠失 (ドメイン II-V); ドメイン I および II 欠失 (ドメイン III-V); ドメイン I、II、および III 欠失 (ドメイン IV-V); なら

30

びにドメイン V のみ (ドメイン I、II、III、および IV 欠失) を作製した。共通の 3' プライマーを、全ての断片の PCR に使用した。

【0260】

PCR 増幅断片を、接合因子シグナル配列のすぐ下流の pPIC A の EcoR1 制限部位と XbaI 制限部位との間にインフレームで挿入した。各断片の末端に停止コドンを導入して、組み換えタンパク質が c-myc エピトープまたは C 末端の His タグに融合するのを予防した。プラスミド構築物を、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプラスチシジンの存在下、E. coli 中で増殖させ、制限分析およびヌクレオチド配列決定によって検証した。上記の 5 つの構築物によって発現された組み換えタンパク質は、グリコシル化前にそれぞれ約 36、29、24、16、および 9 kDa のタンパク質をコードしていた。

40

【0261】

発現クローンの形質転換およびスクリーニングのために、組み換えプラスミド構築物を制限酵素 SacI で直線化し、精製し、10 μg を使用して、スフェロブラスト法 (Invitrogen) によって宿主株 X-33 を形質転換した。400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプラスチシジンを含有する YPD (酵母抽出物ペプトンデキストロス培地) プレート上で、これらの構築物の各々の形質転換体を 4 日間選択した。これらの構築物の各々のいくつかのクローンを、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプラスチシジンを有する YPD プレート上に再度画線付けして、真の組み込み体を決定した。その後、各構築物の 10 のクローンを、最小デキストロス (MD) プレートおよび最小メタノール (MM) プレート上に画線付けした。その後、MD プレートおよび MM プレート上の両方で同様に良好に成長する各構築物の 5 つ

50

のクローンを、24、48、72、96、および120時間、液体MD培地およびMM培地中で成長させた。各時点での各クローンの上清およびペレットを、抗ヒト 2 GPI ポリクローナル抗体を使用してウエスタンブロットによって分析した。上清中で最高のタンパク質発現を示したクローンを、大規模な調製にさらに使用した。

【0262】

組み換えタンパク質の大規模な精製のために、Invitrogenによって推奨されている培養条件を使用して組み換えタンパク質を生成した。各クローンの出発培養物を、30 で激しく振盪しながら5 mlの緩衝最小グリセロール複合体培地(BMGY)中で一晚培養した。細胞を収集し、25 mlのBMGYを播種するのに使用し、2日間成長させた。その後、25 mlの培養物に由来する細胞を使用して、1 Lの緩衝最小メタノール複合体(BMMY)培地(1.0%のメタノール)に播種した。30 で激しく振盪しながら4日間培養を続け、100%のメタノールを24時間毎に添加して(1.0%の最終濃度)、タンパク質発現を維持した。培地を遠心分離(4000 x g、15分間)によって清澄化し、上清を50 mMのトリス緩衝液中、4 で2日間透析してから、50 mMのトリス緩衝液で平衡化したDEAE-Sephacelカラムに適用した。通過画分溶液を収集し、ヘパリン-Sepharoseカラムに適用した。2 GPIを、1 MのNaClでヘパリン-Sepharoseカラムから溶出させ、50 mMのトリス緩衝液に対して透析し、Amicon濃縮器を使用して濃縮し、ウエスタンブロットによって分析した。各タンパク質のN末端を配列決定して、因子リーダー配列の切断を確認した。タンパク質収量は、10 mg/L(完全長 2 GPI)から25 mg/L(2 GPIドメインV)まで変動した。

10

20

【0263】

6. 「ニック入り」h 2 GPIの調製

本実施例において上記のように、ヒト血漿から精製したインタクトなh 2 GPIからニック入りh 2 GPIを調製した。h 2 GPIをプラスミンコーティングビーズと共に37 で17時間インキュベートした。ビーズを遠心分離によって除去し、切断されたタンパク質を含有する上清を回収した。精製された生成物のウエスタンブロットは、ニック入り 2 GPI調製物がプラスミンを含まず、プラスミン自己タンパク質分解産物を含有しない(抗プラスミン抗体または抗アンジオスタチン抗体との反応性がない)ことを示した。N末端配列分析により、2 GPIのN末端に対応する2つのN末端、およびLys 317/Thr 318切断部位で生成された1つの新たな配列が明らかになった。

30

【0264】

7. PS ELISA

実施例Iの標準的なELISAを、以下の変更を加えて適合させた。PSコーティングImmulon 1Bマイクロタイタープレートを、1重量体積%のOVA中で一晚遮断した。翌日、血清含有上清または無血清上清から精製した3G4の段階2倍希釈液を、13.33 nMの初期濃度から調製した。希釈は、1%のOVAまたはウシ、ヒト、ラット、またはマウス由来の10%の非加熱不活性化血清中で実行した。プレートを37 で1時間インキュベートし、3G4の結合を検出した。全てのELISA研究を、少なくとも3回実行した。

40

【0265】

8. 抗h 2 GPI ELISA

以下の変更を加えて、上記のようにアッセイを実行した。h 2 GPI、ニック入りh 2 GPI、または組み換えh 2 GPIペプチドを、10 µg/mlの濃度で96ウェルのImmulon 2HBマイクロタイタープレート上に一晚コーティングした。その後、1%のOVA中、室温でプレートを1時間遮断した。3G4、ch3G4、または抗 2 GPIを、1%のOVA中で13.33 nMの初期濃度まで希釈し、段階2倍希釈液を調製した。プレートを37 で1時間インキュベートし、抗体結合を検出した。全てのELISA研究を、少なくとも3回実行した。

50

【0266】

9. ウェスタンブロット

タンパク質試料を、非還元 SDS 試料緩衝液中で 95℃ まで 5 分間加熱した。その後、試料をトリス - HCl の 4 ~ 15 % の勾配 SDS - PAGE ゲル上に充填し、Mini Protean II 装置 (Bio-rad) を使用して分離した。分離したタンパク質を PVDF 膜に移し、3 重量体積 % の BSA 中で一晚遮断した。膜を、3 % の BSA 中 1 µg / ml に希釈した抗 2 GPI、3 G4、または対照マウス IgG で探索し、徹底的に洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG と共にインキュベートした。膜を、Opti - 4 CN 基質キットを使用して発色させた。

【0267】

10. 内皮細胞上の PS 曝露の誘導および検出

成体ウシ大動脈内皮 (ABAE) 細胞を、10 % の FBS および 2 mM の L - グルタミンを補充した DMEM 中で維持した。ABAE 細胞を、0.25 % のトリプシン / 0.02 % の EDTA への短時間の曝露によって亜集密培養物から除去し、8 ウェルチャンバースライドに 1 ウェル当たり 2×10^4 個の細胞で播種した。一晚培養した後、細胞を PBS で穏やかに洗浄し、200 µM のリゾホスファチジルコリン (LPC) で処理して、PS 曝露を誘導した。LPC 処理は、10 % の FBS 中または 10 % の正常マウス血清 (MS) 中のいずれかで、37℃ で 30 分間、3 G4、ch 3 G4、または対照 IgG の存在下で実行した。LPC 処理を 10 % の MS で実行した場合、3 G4 / ch 3 G4 は MS 中では PS に結合することができないため、h 2 GPI を補助因子として添加した (本実施例の以下の結果を参照されたい)。

【0268】

免疫蛍光染色によって、PS 曝露を決定した。細胞を PBS 中で徹底的に洗浄し、4 重量体積 % のパラホルムアルデヒド中に固定し、ビオチン共役抗マウス二次抗体と共にインキュベートした。次に、細胞を FITC 共役ストレプトアビジン (Jackson Immunoresearch) と共にインキュベートして、抗体結合を検出した。その後、細胞を PBS 中 0.1 % の Triton - X100 で透過処理し、テキサスレッド共役ファロイジン (Molecular Probes、Eugene, OR) および 4', 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール (DAPI、Molecular Probes) で対比染色した。Nikon 顕微鏡に取り付けた Cool snap デジタルカメラ (Photometrics、Tucson, AZ) を使用して画像をキャプチャし、MetaVue ソフトウェア (Universal Imaging Corporation、Downingtown, PA) で処理した。

【0269】

11. ABAE 細胞への抗体結合の定量化

画像中の点灯ピクセル数を定量化することができる MetaVue 画像分析ソフトウェアを使用して、抗体結合の面積を決定した。FITC 蛍光の画像を使用して、抗体結合を定量化した。対応する DAPI 蛍光画像を使用して、視野内に存在する細胞数について FITC 画像を正規化した。小さい FITC / DAPI 比は小さい抗体結合面積を示す一方で、大きい FITC / DAPI 比は大きい結合面積を示す。FITC / DAPI 比を使用して、選択された条件下での抗体結合の基礎量に対する抗体結合面積の増加または減少を決定した。各分析には、200 倍の倍率の 5 枚の画像を使用した。データを、標準偏差との平均相対 FITC / DAPI 比として分析する。

【0270】

B. 結果

全体として、以下のデータは、3 G4 (およびバビツキシマブ) 抗体と PS との間の相互作用が、血漿タンパク質 2 GPI に依存することを実証している。3 G4 は、一般に 2 GPI ドメイン I を認識する、抗リン脂質抗体症候群 (APS) を有する患者から単離された病原性抗体とは関連しないドメイン II で 2 GPI に結合することが示されている。このデータは、PS 陽性細胞への結合を含む PS 結合の増強に二価 3 G4 / 2 GPI 複合体が必要とされ、これは 3 G4 Fab' 断片がこの活性を有しないためであるこ

とを示している。

【0271】

1. 3G4は、PSコーティングマイクロタイタープレートへの結合に血清因子を必要とする

血清含有培地 (SCM) または無血清培地 (SFM) から精製した3G4抗体は、10%のFBS中で段階希釈を実行すると、PSコーティングマイクロタイタープレートに結合する (図2A、実線)。対照的に、(ウシ血清タンパク質を欠如する) 1%のOVA中で段階希釈を実行すると、SFMから精製した3G4は、もはやPSには結合しない (図2A、破線、)。この発見は、ウシ血清中に存在する因子が3G4とPSの間の相互作用を媒介することを示している。

10

【0272】

興味深いことに、1%のOVA中で段階希釈を実行すると、SCMから精製した3G4は依然としてPSに結合する (図2A、破線、)。明らかに、血清含有培地由来の血清タンパク質は3G4とPSとの間の相互作用を媒介している。これは、SCM中で成長させた3G4を精製したとしても、精製抗体中に存在し得る低レベルの血清タンパク質が依然としてPS結合を支持するのに十分であることを示している。

【0273】

これらの発見を考慮して、SFMから精製した3G4を使用して下記の研究を実行した。

【0274】

2. 異なる種由来の血清中のPSへの3G4の結合

他の哺乳動物種由来の血清が3G4抗体とPSとの間の相互作用を媒介し得るかどうかを決定するために、10%のマウス、ラット、ヒト、または他の血清中で3G4の段階希釈を実行した。3G4抗体は、ウシ血清の存在下でとほぼ同様に、ラットおよびヒト血清の存在下でPSに結合した (図2B)。しかしながら、3G4は、マウス血清の存在下ではPSに結合しなかった (図2B)。関連研究において、3G4は、ハムスター、フェレット、モルモット、ウサギ、およびサル血清の存在下でPSに結合した。したがって、3G4によって認識される血清タンパク質エピトープは、マウスを除いて試験した全ての哺乳動物種の間で保存されている。

20

【0275】

3. 3G4は、血清糖タンパク質 2GPIに結合する

1990年代初期には、多くのいわゆる抗リン脂質 (aPL) 抗体がリン脂質を直接認識せず、代わりに血清タンパク質に結合し、それが転じてリン脂質に対する親和性を有することが示された (Gallila, 1990; McNeil, 1990)。したがって、アニオン性リン脂質と相互作用することが既知であるヒト血清タンパク質のパネルを、3G4抗体との反応性についてスクリーニングした。

30

【0276】

例えば、ヒト 2GPI (h 2GPI) をマイクロタイタープレート上にコーティングし、マウス抗ヒト 2GPI抗体 (抗 2GPI)、3G4抗体、または無関係の特異性を有する対照マウス IgG2a (対照mIgG) と共にインキュベートした。予想通り、抗 2GPIはh 2GPIに結合したが、対照mIgGは結合しなかった (図3)。3G4抗体もまた、h 2GPIコーティングプレートに強く結合した (図3)。

40

【0277】

2GPIが3G4抗体によって認識される唯一の血清タンパク質であるかどうかを決定するために、精製h 2GPIおよび10%のヒト血清をSDS-PAGEゲル上に流し、免疫プロット用の膜支持体に移した。3G4は、ヒト血清中で50kDaの精製h 2GPIおよび類似サイズの単一のバンドを検出した。重要なことに、3G4免疫プロットは、抗 2GPI抗体を使用して生成したプロットと実質的に同一であった。対照mIgG抗体は、いかなるタンパク質も検出しなかった。

【0278】

50

アニオン性リン脂質と相互作用することが既知である他のヒト血清タンパク質を試験して、E L I S Aにおいて3 G 4抗体との反応性の欠如を確認した。等量の特定のタンパク質をマイクロタイタープレート上にコーティングし、1%のO V A中で遮断し、3 G 4抗体の段階希釈物と共にインキュベートした。プレートを徹底的に洗浄し、抗体結合をペルオキシダーゼ標識二次検出抗体で検出した。全ての研究は、予想通りに機能した陽性および陰性対照抗体を含んだ。免疫プロットおよびE L I S A研究の結果は、陽性が2 G P I、陰性がアネキシンV、第X I I因子、キニノーゲン（低または高分子量）、酸化L D L、タンパク質C、タンパク質S、プロトロンビン、および組織プラスミノーゲン活性化因子（t P A）である。まとめると、これらのデータは、3 G 4抗体が血清タンパク質2 G P Iに結合することを示している。

10

【0279】

4. 3 G 4は、ドメインI Iで2 G P Iに結合する

2 G P Iは5つのドメインを有し、そのうち第5のドメインはP Sなどのアニオン性リン脂質への結合に関与している。2 G P Iのどのドメインが3 G 4抗体によって認識されるかを決定するために、異なるドメイン構造を有する組み換えヒト2 G P I構築物を生成し、組み換え完全長h 2 G P Iと共に試験した。これらのドメイン構築物は、N末端からの連続短縮化によって作製されたため、転じて、以下のようにN末端ドメインの各々を欠如している。組み換え完全長h 2 G P IはドメインI - Vを含有し、ドメインIが欠失しているh 2 G P IはドメインI I - Vを含有し、ドメインIおよびI Iが欠失しているh 2 G P IはドメインI I I - Vを含有し、ドメインI、I I、およびI I Iが欠失しているh 2 G P IはドメインI V - Vを含有し、ドメインI、I I、I I I、およびI Vが欠失しているh 2 G P IはドメインVのみを含有する。

20

【0280】

等量の完全長h 2 G P Iおよび上記のh 2 G P Iドメイン構築物の各々を、マイクロタイタープレート上にコーティングし、3 G 4抗体の段階希釈物と共にインキュベートした。この研究は、2 G P IのドメインI Iを含有するh 2 G P I構築物（ドメインI - VおよびドメインI I - V）のみが3 G 4によって検出されることを示した（図4）。ドメインIが欠失すると、3 G 4はドメインI I - Vに同様に良好に結合した（図4）。したがって、3 G 4抗体はドメインI Iで2 G P Iに結合する。

【0281】

A P S患者から単離した病原性抗体について既知である情報を考慮すると、3 G 4抗体がドメインI Iで2 G P Iに結合するという発見は重要である。A P S患者から単離した病原性抗2 G P I抗体は一般に、2 G P IのドメインIを認識する（de L a a tら、2005）。ドメインI Iを認識するA P S患者由来の抗2 G P I抗体は、しばしば病原性ではない。このことは、様々な動物モデルにおいて、および広範な臨床経験において実行される毒性学的研究（本明細書に記載されているものなど）後の3 G 4に関連する毒性の欠如を説明する可能性が高い。

30

【0282】

5. 曝露されたP Sを有する細胞への3 G 4および2 G P Iの共結合

より生理学的な条件下で上記の発見を検証するために、生細胞結合アッセイを開発した。このアッセイは、膜破壊剤リゾホスファチジルコリン（L P C）で処理して、P S破壊を誘発した後の細胞膜表面への抗体結合を検出および測定する。

40

【0283】

このアッセイでは、A B A E細胞を、200 μ MのL P Cの存在下または不在下で、D M E M + 10%のF B S中の3 G 4抗体または対照m I g Gと共に30分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、固定し、蛍光マーカーで染色して、細胞表面への抗体の結合を視覚化した。3 G 4またm I g G結合のピクセル面積は、M e t a V u eソフトウェアを使用して定量化した。全ての値は、L P C処理されていない細胞への3 G 4の結合に対するものであり、これを1に設定した。

【0284】

50

3 G 4 抗体を通常の条件下で A B A E 細胞培地に添加した場合、細胞への結合は観察されなかった。しかしながら、A B A E 細胞を L P C の存在下で 3 G 4 と共にインキュベートした場合、3 G 4 抗体結合の多数のピンポイントが容易に検出可能である。L P C は、一時的な膜の歪みを誘導することが既知であり (K o g u r e ら、2 0 0 3)、これは膜の非対称性の喪失および P S の曝露を引き起こす可能性が高い。

【 0 2 8 5 】

定量化は、3 G 4 抗体結合の面積が L P C 処理時に 5 0 0 倍超増加する一方で、対照 m I g G の結合は検出不能なままであることを示した。類似した結果が以前に得られており、その時には 3 G 4 および P S 結合分子 アネキシン V が、H₂O₂ での P S 曝露の誘導後に内皮細胞に結合することが示された (R a n ら、2 0 0 5 ; 米国特許第 8 , 4 8 6 , 3 9 1 号)。L P C 処理した A B A E 細胞は、膜不透過性色素であるヨウ化プロピジウムまたは D A P I によって染色されず、これは、3 G 4 が原形質膜の内小葉ではなく細胞膜上の P S と結合することを示した。

10

【 0 2 8 6 】

3 G 4 抗体が曝露された P S を有する細胞に結合するのに、 α 2 G P I が必要であることを確認するために、1 0 % の F B S ではなく 1 0 % のマウス血清を含有する培地中で生細胞結合アッセイを実行して、ウシ α 2 G P I からの干渉を予防した。上記に実証されるように、3 G 4 抗体は、マウス血清の存在下では P S に結合しない。さらに、3 G 4 抗体は、免疫プロットによって 1 0 % のマウス血清中のいかなるタンパク質も検出せず、これは、3 G 4 がマウス α 2 G P I を認識しないことを示した。

20

【 0 2 8 7 】

この研究のために、ヒトキメラ 3 G 4 抗体 (c h 3 G 4) を使用して、マウス血清中に存在するマウス I g G の検出によって引き起こされるバックグラウンドを予防した。A B A E 細胞を、1 0 % のマウス血清および L P C の存在下で c h 3 G 4 と共にインキュベートした場合、抗体結合は検出されなかった (図 5)。対照的に、結合反応への精製 h α 2 G P I の添加は c h 3 G 4 の広範な結合を支持し (図 5)、これは、c h 3 G 4 抗体結合が h α 2 G P I に依存することを実証した。全ての状況において、c h 3 G 4 結合は L P C 処理に依存し、無関係な特異性の対照ヒト I g G を使用した場合、結合は検出されなかった。

【 0 2 8 8 】

興味深いことに、A B A E 細胞を 1 0 % のマウス血清および L P C の存在下で h α 2 G P I と共にインキュベートし、徹底的に洗浄し、その後 c h 3 G 4 抗体と共にインキュベートして、h α 2 G P I の結合を検出した場合、非常に少ない c h 3 G 4 結合が検出された (図 5)。この発見は、h α 2 G P I が c h 3 G 4 抗体の不在下では曝露された P S を有する細胞に結合しないことを示し、これは、 α 2 G P I が生理学的条件下で P S 膜表面に対して低い親和性を有するという報告と一貫している (W i l l e m s ら、1 9 9 6 ; B e v e r s ら、2 0 0 4 ; B e v e r s ら、2 0 0 5)。まとめると、これらのデータは、曝露された P S を有する A B A E 細胞に結合するには、c h 3 G 4 抗体および h α 2 G P I が同時に存在しなければならないことを示し、これは、c h 3 G 4 抗体が P S に対する α 2 G P I の親和性を増強することを示唆する。

30

40

【 0 2 8 9 】

6 . α 2 G P I の脂質結合領域が、3 G 4 の共結合に必要とされる

α 2 G P I の脂質結合領域が、曝露された P S を有する細胞への α 2 G P I ならびに 3 G 4 抗体および c h 3 G 4 抗体の共結合に必要であることを確認するために、「ニック入り」h α 2 G P I を使用して生細胞結合アッセイを実行した。ニック入り h α 2 G P I は、ドメイン V の脂質結合領域内のプラスミン媒介切断のために、P S に結合することができない (H u n t ら、1 9 9 3 ; H u n t & K r i l i s , 1 9 9 4)。

【 0 2 9 0 】

L P C の不在下で A B A E 細胞を c h 3 G 4 抗体および h α 2 G P I またはニック入り h α 2 G P I と共にインキュベートした場合、c h 3 G 4 結合は検出されない (図 6 A)

50

。LPCの存在下では、h 2 GPIは曝露されたPSを有するABAE細胞へのch 3 G 4の結合を媒介することができるが、ニック入りh 2 GPIは結合を媒介することができない(図6A)。等量のタンパク質がマイクロタイタープレート上にコーティングされている場合には、ch 3 G 4はニック入りh 2 GPIおよびh 2 GPIに結合するため、生細胞アッセイにおける結合の欠如は、ch 3 G 4抗体がニック入りh 2 GPIに結合できないことによるものではない(図6B)。これらの発見は、ch 3 G 4/h 2 GPI複合体が、h 2 GPIドメインVの脂質結合領域を通してABAE細胞上に曝露されたPSを検出することを実証する。

【0291】

7. 抗体二価性が、h 2 GPIの共結合に必要とされる

10

上記に提示されたデータは、3 G 4抗体が、アニオン性リン脂質に対するh 2 GPIの結合活性を増強することによってPSを検出することを示唆する。曝露されたPSを有する細胞への3 G 4/h 2 GPIの結合に、二価性が必要とされるかどうかを決定するために、3 G 4 F(a b')₂および3 G 4 F a b'モノマーを生成し、インタクトな3 G 4抗体による生細胞結合アッセイに使用した。予想通り、インタクトな3 G 4抗体は、LPC処理したABAE細胞に結合したが、未処理の細胞には結合しなかった。等濃度の3 G 4 F(a b')₂もまた、LPC処理したABAE細胞に結合した(図7A)が、3 G 4 F a b'の結合は無視できるものであった(図7A)。3 G 4と比較して、3 G 4 F(a b')₂の結合の明らかな減少が検出されたが、これは、3 G 4 F(a b')₂上に欠損しているFcエピトープに対するポリクローナル二次抗体の結合の喪失によるものである可能性が高い。マイクロタイタープレート上にコーティングされたh 2 GPIに結合するのに必要とされる濃度よりも1,000倍高い2 μMの濃度ですら、3 G 4 F a b'の結合はABAE細胞上では検出できなかった。

20

【0292】

さらに、3 G 4 F a b'は濃度に依存した様式でLPC処理したABAE細胞へのch 3 G 4/h 2 GPIの結合を阻害したが(図7B)、無関係な特異性の対照F a b'は阻害しなかった。3 G 4 F a b'がch 3 G 4結合を阻害する能力は、3 G 4 F a b'がh 2 GPIに結合することができること、およびモノマー3 G 4 F a b'/h 2 GPI複合体が曝露されたPSを有する細胞に結合することができないことを確認する。これらのデータは、二価の3 G 4/h 2 GPI複合体が、細胞表面上に曝露されたPSに結合するのに必要とされることを示す。

30

【0293】

要約すると、図4に示されるように、3 G 4抗体はドメインIIでh 2 GPIに結合し、図6Aおよび図6Bに示されるように、h 2 GPIドメインVの脂質結合領域が、細胞上に曝露されたPSへの3 G 4(およびch 3 G 4)ならびにh 2 GPIの共結合に必要とされる。加えて、図7Aおよび図7Bに実証されるように、抗体二価性が、曝露されたPSへの3 G 4(およびch 3 G 4)ならびにh 2 GPIのそのような共結合に必要とされる。したがって、活性化内皮細胞、腫瘍血管内皮細胞および腫瘍細胞、ならびにウイルス感染細胞で生じるものなどの、膜の外面上に曝露されたPSへの抗体およびh 2 GPIの共結合のモデルを提示する(図8)。

40

【0294】

実施例V

バビツキシマブとh 2 GPIとの間の相互作用の前臨床モデリング

本実施例は、バビツキシマブファミリーの抗体h 2 GPIとPS間との相互作用に関する前臨床データを提供する。全体として、データは、ヒト集団における典型的な量を著しく下回る比較的低レベルのh 2 GPIが、PSへのバビツキシマブの有効な結合に十分であることを示している。

【0295】

A. 低h 2 GPIはマウスにおける抗腫瘍効果を支持する

マウス3 G 4抗体の初期の開発では、標準的なタンパク質A手順を使用して、培養雑種

50

細胞の上清から抗体を見た目が均質になるまで精製した（実施例 I）。マウスにおける初期の研究において、この精製抗体は、いくつかのモデルにおいて抗腫瘍効果を発揮することが示された（実施例 I I）。

【0296】

3 G 4 抗体が P S 結合に 2 G P I を必要とすること（実施例 I V）、およびマウスを除いて全ての種の 2 G P I が P S 結合を支持すること（図 2 B）を決定した後、実施例 I I の抗腫瘍効果が 3 G 4 抗体の効力の過小評価であると推論した。すなわち、図 1 A、図 1 B、図 1 C、および図 1 D における 3 G 4 抗体の抗腫瘍効果は、タンパク質 A カラムを通して 3 G 4 抗体と共精製された可能性がある低レベルのウシ 2 G P I によってのみ支持される。基本的に、送達されるタンパク質の大部分は純粋な 3 G 4 抗体であったが、低レベルのウシ 2 G P I がマウスに同時投与されたはずである（雑種細胞の培養に使用された 10 % のウシ胎児血清（F B S）に由来）。したがって、これらの初期データは、3 G 4 抗体がインビボで腫瘍成長を阻害するには、高レベルの 2 G P I が必要ではないことを示唆している。

10

【0297】

I g G に対する親和性に基づいて抗体を精製するタンパク質 A カラムを使用して、3 G 4 抗体を見た目が均質になるまで精製した。培養培地由来の 2 G P I が、精製中に 3 G 4 抗体から分離した更なる理由が存在する。第一に、3 G 4 抗体に対する 2 G P I の親和性は低い（かつタンパク質 A と 3 G 4 との間の親和性よりも小さい）ため、2 G P I は充填および洗浄の間に 3 G 4 から分離した可能性がある。第二に、（タンパク質 A から 3 G 4 抗体を分離するための）低 pH 溶出ステップは、3 G 4 に複合体化した 2 G P I を除去した可能性がある。また、主要抗体ピークにおける溶出したタンパク質の収集時に、より小さい 2 G P I タンパク質が収集されなかった可能性がある。それにも関わらず、図 9 A および図 9 B に示されるように、マウスに送達された見かけ上純粋な 3 G 4 抗体のうちの 10 ~ 20 % が、実際には 3 G 4 - 2 G P I 複合体の形態にあったという仮説的な立場を取ったとしても、そのようなレベルのウシ 2 G P I は、絶対的にも抗体との比較でも、依然として非常に低い。

20

【0298】

より詳細には、3 G 4 抗体を 10 % の F B S 中の雑種細胞から産生した。1 リットル体積は、典型的には 10 m g / L の 3 G 4 抗体を産生するだろう。F B S が 200 μ g / m l のウシ 2 G P I（ヒト血清中のヒト 2 G P I のレベルと同様）を含有すると仮定すると、10 % の F B S は 20 μ g / m l のウシ 2 G P I を含む。収集時に、1 リットルの雑種細胞上清は、10 m g の 3 G 4 抗体および最大 20 m g のウシ 2 G P I（20 μ g / m l \times 1000 = 20 m g）を含有するだろう。タンパク質 A での精製時、得られた材料は 10 m g のタンパク質を含有するだろう。3 G 4 純度を 80 ~ 90 % と仮定すると、残りの 10 ~ 20 % は 3 G 4 : 2 G P I「複合体」であり、ここで 1 つの抗体は 2 つの 2 G P I に結合している（3 G 4 - 2 \times 2 G P I）。

30

【0299】

マウスにそのようなタンパク質を 100 μ g 投与した。90 % の純度では、投与された 100 μ g のタンパク質のうち 90 μ g が純粋な 3 G 4 であり、10 μ g の 3 G 4 - 2 \times 2 G P I 複合体を有する。抗体の分子量（MW）を 145 k D とし、2 G P I の MW を 50 k D とすると（実施例 I V、A 4、B 3；M c N e i l ら、1990；L u s t e r ら、2006）、複合体中の各抗体について 2 つの 2 G P I では、重量比は約 3 : 2 である（正確には 59.2 % の抗体および 40.8 % の抗体）。したがって、10 μ g の複合体のうち、約 6 μ g が 3 G 4 であり、4 μ g が 2 G P I である（正確には 5.92 μ g の 3 G 4、4.08 μ g が 2 G P I である）。

40

【0300】

マウスの血液の体積は、2 m l である。純粋な 3 G 4 抗体は、マウス 1 匹当たり 90 μ g、または 45 μ g / m l で存在する。約 3 : 2 の比で、マウス 1 匹当たり 10 μ g の複合体は、約 6 μ g の 3 G 4 および約 4 μ g の 2 G P I（3 μ g / m l の 3 G 4 および 2

50

$\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\beta 2\text{GPI}$) を含有する。抗体結合が可能な $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\beta 2\text{GPI}$ では、これはヒト血清中の平均 $\beta 2\text{GPI}$ レベルの約 1 % であり、依然として抗腫瘍活性を支持した (図 1 A、図 1 B、図 1 C、および図 1 D)。

【 0 3 0 1 】

マウスにおける $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\beta 2\text{GPI}$ は、 $0.04\mu\text{M}$ に相当する。 $\beta 3\text{G4}$ に関しては、投与された $\beta 3\text{G4} - 2\times\beta 2\text{GPI}$ 複合体由来の $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\beta 3\text{G4}$ を $45\mu\text{g}/\text{ml}$ の純粋な $\beta 3\text{G4}$ に添加し、 $48\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\beta 3\text{G4}$ 抗体が存在する。これは、 $0.33\mu\text{M}$ の抗体に相当する。90 % の純度の出発点で、 $0.04\mu\text{M}$ の $\beta 2\text{GPI}$ および $0.33\mu\text{M}$ の $\beta 3\text{G4}$ 抗体では、これは 0.12 の $\beta 2\text{GPI}$ 対抗体のモル比である (図 9 A)。80 % の純度の出発点でさえ、同じ計算は、 $\beta 2\text{GPI}$ のインビボ濃度が $4\mu\text{g}/\text{ml}$ ($0.08\mu\text{M}$) であることを示し、インビボ抗体濃度は $46\mu\text{g}/\text{ml}$ ($0.32\mu\text{M}$) である。これは、依然としてわずか 0.25 の $\beta 2\text{GPI}$ 対抗体のモル比である (図 9 B)。抗体調製物の高感度ウエスタンブロット (その後ゲル上の $\beta 2\text{GPI}$ バンドを特定することができる) を含む後続研究は、 $\beta 3\text{G4}$ 抗体が常に少なくとも 80 ~ 90 % の純度であることを確認した。したがって、0.12 ~ 0.25 の $\beta 2\text{GPI}$ 対抗体のモル比のこれらの計算は、 $\beta 3\text{G4}$ 抗体を使用する初期のマウスデータが高レベルの $\beta 2\text{GPI}$ が抗腫瘍活性には必要ないことを示すという当初の説明に定量的視点を加える。

【 0 3 0 2 】

B . 低 $\beta 2\text{GPI}$ は細胞結合を支持する

細胞上の PS への $\beta 3\text{G4} - \beta 2\text{GPI}$ 複合体の結合に必要とされる $\beta 2\text{GPI}$ レベルを分析するための第 1 の研究において、ABA E 細胞を LPC で処理して、PS 曝露を誘導し (実施例 I V)、その後 40nM の精製ヒト $\beta 2\text{GPI}$ および様々な濃度の ch $\beta 3\text{G4}$ 抗体 (パビツキシマブ) と共にインキュベートした。相対 ch $\beta 3\text{G4}$ 結合は、 320pM から 80nM の ch $\beta 3\text{G4}$ の見かけ上のピークまで濃度に依存した様式で増加し、これは 2 : 1 の抗体対 $\beta 2\text{GPI}$ 比である (図 10)。表 1 に示されるように (抗体の MW、 145kD ; ヒト $\beta 2\text{GPI}$ の MW、 50kD)、この研究における見かけ上のピーク結合は、0.5 の $\beta 2\text{GPI}$ 対抗体のモル比に対応する。

【 表 3 】

表 1

細胞結合におけるパビツキシマブおよび $\beta 2\text{GPI}$

ch3G4(nM)	ch3G4(μM)	ch3G4($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$\beta 2\text{GPI}(\mu\text{g}/\text{ml})$	$\beta 2\text{GPI}(\mu\text{M})$	$\beta 2\text{GPI}(\text{nM})$	$\beta 2\text{GPI}$ 対 Ab のモル比
0.32	3.2×10^{-4}	0.0464	2	0.04	40	125
1.25	1.25×10^{-3}	0.1812	2	0.04	40	32
5	5×10^{-3}	0.725	2	0.04	40	8
20	0.02	2.9	2	0.04	40	2
80	0.08	11.6	2	0.04	40	0.5
320	0.32	46.4	2	0.04	40	0.125
1280	1.28	185.6	2	0.04	40	0.03125
5120	5.12	742.4	2	0.04	40	0.0078125

【 0 3 0 3 】

ch $\beta 3\text{G4}$ の濃度と曝露された PS を有する細胞への結合との間の釣鐘形の関係 (図 10) は、膜表面上の二価の ch $\beta 3\text{G4} 2\times\beta 2\text{GPI}$ 複合体の形成をさらに支持し、一価の ch $\beta 3\text{G4} - \beta 2\text{GPI}$ 複合体が非常に高い抗体濃度で形成されることを示唆する。そのような濃度では、一価 (非結合) 複合体と二価 (結合) 複合体との間の競合が、細胞に結合した ch $\beta 3\text{G4} 2\times\beta 2\text{GPI}$ 複合体の量の減少を引き起こした (「フック効果」 と

しても知られる)と考えられる。

【0304】

この研究における最大の相対結合は、80 nMの抗体濃度で生じ、これはわずか0.5の2GPI対抗体比である(図10、表1)。これは、図8に示される二価相互作用の予測よりも低い比であるが、雑種細胞から精製された3G4抗体によるマウスの治療について上記に報告された比と一般に一致する。しかしながら、この研究において、細胞上のPSの正確な密度は既知ではない。より重要なことに、試験したch3G4濃度において、飽和結合(プラトー)は観察されず、20~80 nMおよび80~320 nMのch3G4濃度での更なる試験が有益であるだろう。それでもなお、そのような中間試験がなくとも、0.125、0.5、および2の間の2GPI対抗体のモル比で、最適な抗体結合が生じると結論付けることができる。これらのインビトロ数は、2GPI対抗体のモル比が抗体純度に応じて0.12~0.25であった、雑種細胞精製3G4抗体を使用するインビボ治療について上記に報告したものと良好に一致する。したがって、この第1のインビトロ研究はまた、低レベルの2GPIが、曝露されたPSを有する細胞へのパビツキシマブの結合を効果的に支持することも示す。

10

【0305】

低 2GPIはPS結合を支持する

以後の研究において、PSへの2aG4抗体の結合(実施例III)を、様々な濃度のヒト2GPIの存在下でELISAにおいて試験した。

【0306】

一定量の2aG4抗体および増加量のヒト2GPIを含有する溶液を調製した。簡潔には、62.5 ng/ml(0.4 nM)の2aG4を、卵白アルブミンの0.0032、0.016、0.08、0.4、2、10、または50 nMのヒト2GPIに添加した。異なる2aG4-2GPI混合物をPSマイクロタイタープレートに添加し、分子を37で1~2時間結合させた。未結合分子は、PBSで洗浄することによって除去した。二次抗体は、結合緩衝液中のHRP結合抗ヒトIgGであった。プレートを37で1時間放置してから、PBSで5回洗浄することによって未結合抗体を除去した。TMB基質を100 µlの体積で各ウェルに添加し、室温で15分間放置して、比色反応を生じさせた。100 µlの2MのH₂SO₄を添加することによって、反応を停止させた。停止溶液を添加してから30分以内に、吸光度(光学密度、OD)を450 nmの波長でプレート分光計によって読み取り、SoftMax Proソフトウェアを使用して分析した(2GPIを有しない対照の平均ODを、試験試料の平均ODから減算することを含む)。

20

30

【0307】

この研究は、PSへの2aG4抗体の結合が、約1の2GPI対抗体のモル比でプラトーになり始め、ここでは両方の分子が約0.4 nMで存在することを示した(図11)。より正確には、表2に示されるように(抗体のMW、145 kD; ヒト2GPIのMW、50 kD)、0.93の2GPI対抗体のモル比は、PSでコーティングされたプレートへの抗体結合を支持するのに有効である。

【表 4】

表 2

P S 結合における抗体および β 2 G P I

2aG4(ng/ml)	2aG4 nM	β 2GPI nM	β 2 G P I 対 A b のモル比
0	0	50	--
62.5	0.43	0	--
62.5	0.43	0.0032	7.42×10^{-3}
62.5	0.43	0.016	0.037
62.5	0.43	0.08	0.186
62.5	0.43	0.4	0.93
62.5	0.43	2	4.65
62.5	0.43	10	23.26
62.5	0.43	50	116.28

10

【 0 3 0 8 】

上記の第 1 のインビトロ研究の観察を延長し、この研究は、P S への抗体結合が、低い 2 G P I 対抗体のモル比で既に飽和に到達し、その後プラトーに到達することを示した (5 0 n M の 2 G P I で P S 結合のわずかな喪失が観察され (図 1 1) 、これは E L I S A アッセイ形式において一般的に検出される典型的な飽和効果に関連する可能性が高い)。本研究では、2 G P I 対抗体の有効モル比は、約 1 (0 . 9 3) であった。2 G P I 対抗体の比を 5 超に増加させても、結合の改善はもたらされなかった (図 1 1 、表 2) 。

20

【 0 3 0 9 】

卵白アルブミン中、様々な濃度のヒト 2 G P I の存在下で、E L I S A においてバビツキシマブの P S への結合を試験する一連の関連研究を実行した。バビツキシマブ滴定および 2 G P I 滴定の両方を実行した。これらの研究もまた、0 . 5 μ g / m l までの濃度を含む低レベルの 2 G P I が、P S でコーティングされたプレートに結合する上での様々な抗体濃度を支持するのに有効であることを示した。

30

【 0 3 1 0 】

D . 希釈ヒト血清中での抗体結合および活性

別の一連の研究を実行して、様々な希釈度のヒト血清中での P S に対するバビツキシマブの結合および機能を試験した。これらには、E L I S A における P S への結合、P S 陽性細胞を使用する F A C S 分析、および N F A T 代替 A D C C バイオアッセイの形式の機能アッセイが含まれた。

【 0 3 1 1 】

1 . E L I S A

E L I S A を実行して、様々なパーセンテージの 6 つの異なる個々のヒト血清試料中での P S へのバビツキシマブの結合を試験した。異なるヒト血清 (B i o R e c l a m a t i o n I V T 、 N o r t h A m e r i c a より) を P B S 中に希釈して、0 . 1 % までの様々な範囲の % のヒト血清を調製した。2 μ g / m l のバビツキシマブ - H R P (実施例 X V I 、 A 3) を、各 % のヒト血清溶液に添加した。異なるバビツキシマブ - H R P 混合物を P S マイクロタイタープレートに添加し、3 7 で 1 ~ 2 時間結合させた。プレートを P B S で洗浄した。T M B 基質を 1 0 0 μ l の体積で各ウェルに添加し、室温で 1 5 分間放置して、比色反応を生じさせた。1 0 0 μ l の 2 M の H ₂ S O ₄ を添加することによって、反応を停止させた。停止溶液を添加してから 3 0 分以内に、吸光度を 4 5 0 n m の波長でプレート分光計によって読み取り、S o f t M a x P r o ソフトウェアを使用して分析した。

40

50

【0312】

2. FACS

PS陽性細胞(エトボシド処理したHT1080細胞)へのバビツキシマブの結合を、ウシ 2GPIの供給源として異なるパーセンテージのFBSを使用して試験し、フローサイトメトリーとしても知られる蛍光標識細胞分取(FACS)によって測定した。

【0313】

PBS溶液中の異なるパーセンテージのFBSを作製し、 $10\mu\text{g/ml}$ のバビツキシマブを各溶液に添加した。細胞表面へのPS曝露を誘導するために、HT1080細胞を $50\mu\text{M}$ のエトボシドで18時間処理した。その後、細胞を異なるバビツキシマブのパーセンテージのFBS溶液と共にインキュベートし、続いてバビツキシマブに対する二次抗体と共にインキュベートして、フローサイトメトリーを介して細胞に結合した抗体を可視化した。陰性対照には、PSを表面上に曝露させないエトボシドで処理していない細胞、およびFBSを欠如するPBS溶液が含まれた。

10

【0314】

3. NFAT

活性化T細胞の核因子(NFAT)は、免疫応答において重要であることが示されている転写因子のファミリーに適用される一般名である。NFATシグナル伝達経路およびNFAT応答エレメント(NFAT-RE)が、培養細胞内のNFATシグナル伝達経路を監視するためのアッセイおよび市販のキットの開発に使用されてきた。

【0315】

バビツキシマブ抗体ファミリーと共に使用するためのNFATバイオアッセイが、開発されている(Larsonら、2013)。細胞表面上にFcRIIa-V158受容体を発現するように操作されたジャーカット細胞(Promega)もまた、複数のNFAT-REを含有する最小のTATAプロモーターの制御下でルシフェラーゼ遺伝子を含有する遺伝要素でトランスフェクトされていた。これらは、PS陽性標的細胞と共培養されるNFATエフェクター細胞である。バビツキシマブなどのPS標的化抗体は、標的細胞の表面上のPSに結合する。その後、PS標的化抗体のFc領域は、NFATエフェクター細胞上のFcRIIa-V158受容体に結合し、NFAT経路を通じたシグナル伝達を引き起こされる。NFATはNFAT-REに結合し、定量化できるルシフェラーゼ発現を活性化する。したがって、このNFATアッセイは、バビツキシマブおよび他のPS標的化抗体の代替ADCCバイオアッセイである。

20

30

【0316】

4. 結果

上記のELISAアッセイの例示的な結果を図12に提示し、これもまた、低レベルの2GPIを有する希釈ヒト血清が抗体結合を効果的に支持することを示す。精製2GPIを使用する上記PS ELISA(図11)と同様に、50%および100%のヒト血清でPS結合のいくらかの喪失が存在し、これは、特に未希釈の血清を使用する場合に、ELISAアッセイ形式において一般的に検出される典型的な飽和効果に関連する。そのような効果はFACSアッセイでは観察されず、曝露されたPSを有する細胞へのバビツキシマブの結合は、50%、75%、および100%のウシ胎児血清中で本質的に同じであることが示された。

40

【0317】

図12から、ELISAにおけるPSへのバビツキシマブの結合は、約1%のヒト血清でプラトーになり始めたことが理解され得る。正常なヒト血清は、平均して $200\mu\text{g/ml}$ の2GPIを含有する(Steinkassererら、1991; Mehdiら、1999; Miyakisら、2004)ため、1%のヒト血清は、約 $2\mu\text{g/ml}$ または $0.04\mu\text{M}$ の2GPIを含有する。図12は、PSへのバビツキシマブの結合が、この濃度の2GPIで既に飽和状態にあることを示す。表3に示されるように(抗体のMW、 145kD ; 2GPIのMW、 50kD)、ELISAにおける1%のヒト血清は、2.86の2GPI対抗体のモル比に対応する。これは一般に、細胞表面上でP

50

S と安定した複合体を形成するために、バビツキシマブの各分子が、 $\beta 2 \text{ GPI}$ の 2 つの分子に結合する必要があるという理論的根拠と一致する (図 8)。

【表 5】

表 3

P S 結合のためのヒト血清中の $\beta 2 \text{ GPI}$ の量

バビツキシマブ ($\mu \text{ g} / \text{m l}$)	バビツキシマブ ($\mu \text{ M}$)	ヒト血清%	$\beta 2 \text{ GPI}$ ($\mu \text{ g} / \text{m l}$)	$\beta 2 \text{ GPI}$ ($\mu \text{ M}$)	$\beta 2 \text{ GPI}$ 対 A b のモル比
2	0.014	10	20	0.4	28.57
2	0.014	5	10	0.2	14.28
2	0.014	1	2	0.04	2.86
2	0.014	0.5	1	0.02	1.43
2	0.014	0.1	0.2	0.004	0.28
2	0.014	0	0	0	--

10

【0318】

図 12 に示されるように、0.5% のヒト血清でさえ、P S へのバビツキシマブの結合は特に血清試料 13 番についてプラトーに接近しており、これは 1.43 の $\beta 2 \text{ GPI}$ 対抗体のモル比に対応する (表 3)。N F A T 代替 A D C C バイオアッセイの結果はまた、この一般的な範囲内の $\beta 2 \text{ GPI}$ 対抗体のモル比が、バビツキシマブ機能を支持するのに効果的であることも示した。例えば、この研究は、バビツキシマブ活性の最適比を特定するには設計されていないが、1.9 の (ウシ) $\beta 2 \text{ GPI}$ 対抗体のモル比は、N F A T アッセイにおいてバビツキシマブ活性を効果的に支持することが示された。

20

【0319】

要約すると、本実施例は、0.12 ~ 2.86 ほど低い $\beta 2 \text{ GPI}$ 対抗体のモル比が、P S および P S 陽性細胞への抗体結合を支持し、機能アッセイにおける活性を促進し、マウスの腫瘍の効果的な治療を可能にすることを示す。上記の全てのデータを考慮し、予防的アプローチを採ると、バビツキシマブの結合および機能を最大化するためには、 $\beta 2 \text{ GPI}$ 対抗体のモル比は約 2.86 であるべきだが (表 3)、それは約 3 より高い必要はないことが推定された。

30

【0320】

実施例 V I

臨床研究におけるバビツキシマブの薬物動態

この実施例は、P S がマーカーである疾患、特に癌およびウイルス感染症を有するヒト対象に投与したときのバビツキシマブの薬物動態に関する。臨床経験は、上記のように、前臨床モデリングと一致することが示されている。

40

【0321】

A. 初期第 I 相研究

第 I 相多施設非盲検用量漸増研究を実行して、難治性進行性固形腫瘍を有する 26 人の患者に静脈内投与 (バビツキシマブ単独療法) した場合のバビツキシマブの安全性、耐容性、および薬物動態 (P K) を評価した。2 つの投薬スケジュールで、4 つの連続的な用量漸増コホート (毎週 0.1、0.3、1、または 3 mg / kg のバビツキシマブ) に患者を登録した。0.1 mg / kg および 0.3 mg / kg のコホートでは、患者は 0、28、35、および 42 日目にバビツキシマブを受け、1 mg / kg および 3 mg / kg のコホートでは、0、7、14、および 21 日目に患者にバビツキシマブを投与した。

【0322】

前臨床モデル (実施例 V) および他の患者集団における経験に基づいて、1 週間に 3 m

50

g / k g の上限用量を選択した。実施例 I I の研究に続く広範な動物モデル研究において、1 週間に 3 回の 0 . 5 m g / k g の抗体用量で最大有効性が達成され、治療の過程を通じて、4 8 時間の半減期および 2 μ g / m l の模擬平均血液濃度で 5 . 5 μ g / m l の C_{max} がもたらされた。そのような用量を超えると、P S 陽性細胞へのバビツキシマブの結合がインビトロで飽和する濃度の観察に基づいて、バビツキシマブによる P S 結合は飽和することが推定された（実施例 V）。

【0323】

研究前、0、1、2、4、7、10、14 日目、および 21 ~ 70 日目までの 7 日毎に、0 . 1 および 0 . 3 m g / k g の用量コホートの患者から試料を収集した。研究前、0、1、2、4、7、14、21、22、23、25 日目、および 28 ~ 56 日目までの 7 日毎に、1 および 3 m g / k g の用量コホートの患者から、試料を収集した。バビツキシマブ血中レベルを、有効な E L I S A によって決定した。

【0324】

表 4 は、最大濃度（ C_{max} ）、クリアランス（CL）、半減期（ $t_{1/2}$ ）、およびゼロから無限までの血漿濃度 - 時間曲線下面積（ AUC_{inf} ）を含む、この第 I 相試験における単回投与（0 日目）および複数回投与（21 日目）後のバビツキシマブの平均（変動係数、CV）PK パラメータの要約を提示する。

【表 6】

表 4

第 I 相試験におけるバビツキシマブの薬物動態学的パラメータ

用量 (mg/kg)	0 日目				
	N=	平均 (CV%)			
		$C_{max}(\mu\text{g/ml})$	CL(ml/時/kg)	$t_{1/2}(\text{時})$	$AUC_{inf}(\text{d}\mu\text{g/ml})$
0 . 1	8	2.11(27.3)	1.10(48.7)	43.9(48.5)	113(50.1)
0 . 3	6	5.13(42.4)	1.39(34.3)	39.8(34.1)	241(39.8)
1 . 0	6	16.6(30.9)	1.14(36.7)	40.3(20.2)	966(30.0)
3 . 0	6	56.4(25.8)	1.34(72.2)	37.2(34.5)	3,017(50.3)
用量 (mg/kg)	21 日目 (1 および 3 m g / k g について)				
	N=	平均 (CV%)			
		$C_{max}(\mu\text{g/ml})$	CL(ml/kg/日)	$t_{1/2}(\text{時})$	$AUC_{inf}(\text{d}\mu\text{g/ml})$
1 . 0	6	18.7(31.8)	1.12(52.1)	46.8(38.4)	1,053(38.0)
3 . 0	4	59.6(27.6)	1.51(61.4)	46.0(44.4)	2,672(63.4)

【0325】

表 4 に示されるように、単回投与後、バビツキシマブの平均半減期は 37 . 2 ~ 43 . 9 時間の範囲であることが決定された。0 日目に、最大血清濃度（ T_{max} ）に到達したときの投与後の時間の中央値で、平均最大血清濃度（ C_{max} ）は、2 . 11 ~ 56 . 4 μ g / m l（用量依存）の範囲であった（値は 2 . 04 ~ 3 . 73 時間の範囲）。3 m g / k g で投与したバビツキシマブでは、最大血清濃度は 56 . 4 μ g / m l であった。研究全体では、バビツキシマブ半減期は 37 ~ 47 時間の範囲であった。この研究では、最大許容用量には到達しなかった。

【0326】

バビツキシマブは、直線的な単回用量（0 日目）および複数回用量（21 または 42 日目）の PK 特徴を呈した（図 13）。バビツキシマブは、複数回用量投与後に明らかな蓄

積または時間依存的な P K の差は呈さなかった。要約すると、この研究は、バビツキシマブが 1 週間に最大 3 m g / k g までの範囲の用量で良好に許容され、薬物動態が毎週の投薬レジメンを支持することを示した。特に、1 m g / k g の用量では、バビツキシマブ濃度は 6 日間、前臨床モデルに基づいて予測される治療閾値である 2 μ g / m l を超えたままであり、3 m g / k g の用量では、バビツキシマブ濃度は 7 日間、この 2 μ g / m l を超えたままであることが決定された (図 13)。したがって、1 週間に 3 m g / k g の用量を腫瘍学における将来の使用のために選択した。

【0327】

B. 更なる薬物動態学的研究

上記の第 I 相試験に加えて、ここでは、単回投与、1 週間 1 回または 1 週間に 2 回の注入 (60 ~ 90 分間) として投与されるバビツキシマブの P K を、癌またはウイルス感染症を有する患者におけるいくつかの他の臨床研究にわたって、120 人超の患者で評価した。バビツキシマブは、0.1 ~ 6 m g / k g の範囲の用量で直線的な単回用量および複数回用量の P K 特徴を呈することが確認され、バビツキシマブの明らかな蓄積または時間依存的な P K の差の証拠はなかった。中央値 T_{max} は、注入終了後の最初の 2 ~ 3 時間以内に生じることが示された。血清バビツキシマブ濃度は、見かけ上、単一指数関数的または双指数関数的な一次様式で低下する。観察された場合、より急速な分布相は本質的に 6 時間以内に完了し、最終排出半減期は約 1 ~ 2 日 (21.9 ~ 46.8 時間) である。

【0328】

1. ウイルス感染症における P K

バビツキシマブの P K 特徴は、H I V の有無に関わらず、H C V に慢性的に感染した患者において試験されたように、癌および慢性ウイルス感染症を有する患者において一般に類似している。

【0329】

第 I 相非盲検単一施設用量漸増研究は、H C V に慢性的に感染した患者におけるバビツキシマブの単回静脈内注入を評価した (実施例 V I I、A)。表 5 に示されるように、観察されたバビツキシマブ濃度は、P K モデリングデータの予測値と非常に一貫していることが見出された。

【表 7】

表 5

バビツキシマブ濃度の予測値および測定値

パラメータ	値				
用量 (m g / k g)	0.1	0.3	1	3	6
C_{max} 予測値 (μ g/ml)	2.2	6.5	21.8	65.4	130.8
C_{max} 観察値 (μ g/ml)	2.5	5.7	24.3	75.8	135.0

【0330】

慢性 H C V 患者における対応する第 I b 相多施設非盲検非無作為化漸増反復用量研究において、P K データの分析は、全ての用量レベルにおいて、0 日目に直線的な単回用量 P K 特徴を、および 10 日目に直線的な複数回用量特徴を示し、2 週間の投薬後、バビツキシマブの蓄積または時間依存的な P K の差の証拠はなかった。

【0331】

慢性 H C V および H I V に同時感染した患者における第 I b 相研究 (実施例 V I I、C) において、バビツキシマブは、0.3 ~ 6 m g / k g の範囲の用量での 1 週間に 1 回の投与後、0 日目に直線的な単回用量 P K 特徴を、および 49 日目に直線的な複数回用量 P K 特徴を呈した。バビツキシマブは、8 週間にわたる 1 週間に 1 回の複数回投与後、時間依存的な P K の差または蓄積は呈さなかった。

【0332】

2. 併用療法における P K

重要なことに、バビツキシマブおよび他の薬物（特に化学療法剤）を併用して投与した場合、いずれの薬物にも臨床的に関連する薬物動態学的相互作用は見られなかった。これには、バビツキシマブおよびドセタキセルを併用して投与した場合も含まれる。

【0333】

これに関して、第Ⅰb相多施設非盲検非無作為化研究はまず、難治性進行性固形腫瘍を有する患者において、ゲムシタビン、パクリタキセル＋カルボプラチン、またはドセタキセルと併用した場合の3mg/kgのバビツキシマブの1週間に1回の静脈内投与の安全性、耐容性、およびPKを評価した。単回用量（0日目）または複数回用量のバビツキシマブ投与（21日目）後に、3つの治療群間のいかなる測定可能なパラメータにも有意差は存在しないことが決定された。C_{max} およびAUCの評価は、8週間にわたって1週間に1回の複数回用量投与後に、バビツキシマブの蓄積がないことを示した。

10

【0334】

治療歴を有する局所進行性または転移性の非扁平上皮NSCLC患者においてバビツキシマブ＋ドセタキセルを評価する、第Ⅰ相無作為化二重盲検プラセボ対照研究（実施例XIII）において、全研究集団のサブセット（1群当たり6人の患者）はまた、バビツキシマブとドセタキセルとの間の薬物間相互作用を調査するためのPK下位研究にも参加した。周期1および2の指定された時点で、これらの患者に対して追加の採血を実行した。ドセタキセルありのバビツキシマブについて、臨床的に関連する薬物動態学的な薬物間相互作用は観察されなかった。加えて、ドセタキセルは、バビツキシマブの投与の有無に関わらず、類似した薬物動態学的特徴を呈した。したがって、これらの患者において、ドセタキセルありのバビツキシマブについて、臨床的に関連する薬物動態学的な薬物間相互作用は観察されなかった。

20

【0335】

実施例VII

バビツキシマブを使用する、患者におけるウイルス感染症の治療

この例では、リバビリンとの併用でのバビツキシマブを含む、バビツキシマブを使用する、患者におけるウイルス感染症の治療における臨床経験のいくつかを例証するためのデータが提示されている。選択された臨床用量では、バビツキシマブの投与が、ヒト対象の2GPIレベルを認識できるほどには低減させないことを示すためのデータもまた提示されている。

30

【0336】

A．HCV患者における第Ⅰ相研究

C型肝炎ウイルス（HCV）に慢性的に感染した患者における、第Ⅰ相非盲検用量漸増研究および第Ⅰb相非盲検漸増反復用量研究で、まずバビツキシマブを評価した。これらの研究は、バビツキシマブの安全性、耐容性、PKプロファイル、ウイルス動態、最大許容用量（MTD）、および最大有効量（MED）に関するものであった。0.1、0.3、1、3、および6mg/kgの用量を第Ⅰ相（30人の患者、6人の患者の連続コホート）において投与し、0.3、1、3、および6mg/kgの用量を第Ⅰb相（24人の患者、6人の患者の4つのコホート）において投与した。

40

【0337】

HCV患者における第Ⅰ相および第Ⅰb相の研究では、全ての用量レベルのバビツキシマブが良好に許容された。第Ⅰ相では、抗ウイルス活性を示唆するウイルス量の一過的な低減が、全ての用量レベルで観察された。第Ⅰb相では、0.3、1、および6mg/kgの用量のバビツキシマブによる治療後にウイルス量がわずかに減少し、これらの減少はしばしば一過的なものであったが、各コホートの少なくとも1人の患者において、ウイルス量の持続的な減少があった。特に、3mg/kgのバビツキシマブの用量では、HCVの一貫した減少が研究治療および経過観察を通して実証された。

【0338】

B．バビツキシマブは2GPIを枯渇させない

上記の第Ⅰb相研究はまた、患者における2GPIのレベルを測定して、バビツキシ

50

マブの投与がこれらのヒト対象における 2 G P I レベルを変化させたかどうかを決定した。結果を図 1 4 に描写する。1 m g / k g のバビツキシマブを受けている患者において、2 G P I レベルは実質的に変化がなかった。3 m g / k g のバビツキシマブを受けている患者において、2 G P I の血清レベルの一過的な低減 (2 0 ~ 2 5 %) が観察された。しかしながら、そのような低減は、用量前レベルから統計的に有意には変化していなかった (図 1 4)。実際に、3 m g / k g のバビツキシマブ用量では、2 G P I レベルは正常範囲内に留まり、2 4 時間以内に治療前レベルに戻った。対照的に、6 m g / k g のバビツキシマブを受けている患者において、2 G P I は有意に低減した ($p < 0.02$) (図 1 4)。6 m g / k g の用量では、2 G P I レベルは治療前レベルと比較して、ほぼ正常範囲の下限まで 4 0 % 低下した。それに関わらず、6 m g / k g のバビツキシマブで治療したヒト対象においてさえ、2 G P I は 3 日以内にベースラインレベルに回復した。

10

【 0 3 3 9 】

したがって、これらのデータは、ヒトにおける使用のための 3 m g / k g 用量のバビツキシマブの選択を確認した。この用量は、バビツキシマブおよび 2 G P I が、血漿 2 G P I レベルを枯渇させることなく、バビツキシマブ - 2 G P I 複合体が形成され、疾患部位の細胞上に曝露された P S に結合するのを可能にするのに有効な濃度で共に存在する、最大用量であることが決定された。しかしながら、このデータはまた、バビツキシマブ治療中のいかなる 2 G P I の低減も一過的なものに過ぎないこと、および 2 G P I レベルが 3 日以内に回復することも示している。

20

【 0 3 4 0 】

C . H C V - H I V 患者における第 I 相研究

別個の第 I b 相多施設非盲検無作為化用量漸増反復用量研究を実行して、慢性 H C V (H C V 遺伝子型 1 の大部分) およびヒト免疫不全ウイルス (H I V) に同時感染した患者においてバビツキシマブを評価した。主な目的は、安全性、耐容性、P K プロファイル、ウイルス動態、M T D、および / または M E D を決定することであった。この研究は、約 1 6 週間にわたって 1 6 回の訪問予定を伴った。バビツキシマブを、以下の用量、0 . 3 m g / k g (6 人の患者)、1 m g / k g (6 人の患者)、3 m g / k g (9 人の患者)、および 6 m g / k g (6 人の患者) で患者の連続コホートに投与した。患者は、8 週間にわたって毎週静脈内にバビツキシマブを受けた。コホート内の全ての患者が、重篤有害事象 (S A E) として分類される血栓の事象なく最初の 4 週間の投薬を完了した後に、用量漸増を進めた。

30

【 0 3 4 1 】

ベースライン H C V ウイルス量の中央値は $6.76 \log_{10}$ であり、H I V のベースライン中央値は $3.99 \log_{10}$ であった。研究中の特定の時点で、H C V および H I V の血漿ウイルス量を測定した。全ての用量レベルにおいてバビツキシマブで治療した場合、各治療群の何人かの患者は、一過的な抗ウイルス活性を呈した (ベースラインから $0.5 \log_{10}$ 以上の H C V および / または H I V ウイルス量の最大低減)。

【 0 3 4 2 】

D . H C V 患者における第 I I 相研究

第 I I 相多施設無作為化活性対照研究を実行して、慢性 H C V (遺伝子型 1) 感染症の初期治療のための、リバビリンとの併用でのバビツキシマブを評価した。主要評価項目は、研究 1 2 週目に早期ウイルス学的応答 (E V R) を示した患者の割合であり、E V R は、H C V R N A レベルの $2 - \log_{10}$ 国際単位 (I U) 以上の低減と定義された。安全性は、副次的評価項目に含まれた。

40

【 0 3 4 3 】

患者は、最長 2 8 日間のスクリーニング / 洗い流し期間、その後 (1 : 1 : 1 の比の) ランダム化を受けて、全て 1 日 2 回の経口リバビリン 1 0 0 0 m g (体重 7 5 k g 未満) または 1 2 0 0 m g (体重 7 5 k g 以上) と共に、1 週間に 0 . 3 または 3 m g / k g のバビツキシマブ注入または 1 2 週間のペグ化インターフェロンアルファ - 2 a (ペグ化イ

50

ンターフェロン、PEG-IFN-2aとも称される)の皮下注射を受けた。12週間後にEVRを示した患者は、最大48週間経過までペグ化インターフェロン+リバビリンでの研究外治療を受けた。

【0344】

平均年齢39.1歳の合計66人の患者(男性38人、女性28人)をこの研究に登録した。22人の患者は各々、0.3mg/kgのバビツキシマブ、3mg/kgのバビツキシマブ、およびペグ化インターフェロンを受けた。受けた0.3および3mg/kgのバビツキシマブ用量の中央値は各々12回の用量であり、平均治療期間はそれぞれ78および75日間であった。

【0345】

この研究では、バビツキシマブ+リバビリンで治療した一部の患者で、12週間にわたって徐々にウイルス低減が見られた。興味深いことに、より高い用量の3mg/kgのバビツキシマブとは対照的に、より低い用量のバビツキシマブ(0.3mg/kg)で治療した患者において、2倍の人数の患者でEVRが見られた。(18%対9%)。いずれの用量でも、ペグ化インターフェロンを受けた患者ではEVR率はバビツキシマブを受けた患者よりも高かったが、バビツキシマブはより好ましい安全性プロファイルを示し、いずれのバビツキシマブ含有群と比較しても、ペグ化インターフェロン群のほぼ2倍の患者がAEを報告した。

【0346】

実施例VII

バビツキシマブおよびパクリタキセルによる乳癌患者の治療

臨床癌治療に目を向けると、本実施例は、タキサン、パクリタキセルと併用してバビツキシマブを使用する、HER2陰性転移性乳癌を有する患者の治療からのデータを提供する。

【0347】

単一施設研究者主導研究では、14人のHER2陰性転移性乳癌を有する患者が、4週間周期で1、8、および15日目に投与されるパクリタキセル(80mg/m²)との併用で1週間に1回3mg/kgのバビツキシマブを受けた。骨痛、疲労、頭痛、および好中球減少が、最も一般的な有害事象(AE)であった。対処可能な注入関連反応が、バビツキシマブに関連する最も一般的なAEであった。バビツキシマブは、血栓形成性の増加の証拠は示さなかった。治療は85%の全奏効率(ORR)をもたらし、2人の患者が完全奏効を示し、無増悪生存期間(PFS)中央値は7.3ヶ月(95%のCI:2.8、10.8)であった。

【0348】

要約すると、この研究は、パクリタキセルと併用したバビツキシマブが、転移性乳癌を有する患者の治療に良好に許容され、臨床奏効率(RR)およびPFSに関して有望な結果が観察されることを示した。

【0349】

実施例IX

バビツキシマブおよびパクリタキセル-カルボプラチンによる乳癌患者の治療

この例は、ホルモンまたはHER2の状態に制限されない、局所進行性または転移性乳癌を有する患者における、バビツキシマブ+パクリタキセルおよびカルボプラチンの安全性および有効性を評価する、第II相非盲検単一群研究の結果を報告する。

【0350】

この第II相研究は、Simonの2段階設計を利用した。15人の患者を段階Aに登録し、試験を段階Bにおいてさらに31人の患者に拡大し、合計46人の患者とした。主な目的は、完全奏効(CR)+部分奏効(PR)、つまりCR+PRとして定義される全奏効率(ORR)を決定することであった。副次的目的には、腫瘍進行までの時間、奏効期間(DORまたはDR)、全生存期間(OS)、および安全性が含まれた。

【0351】

最大6周期まで、28日間周期の1、8、および、15日目にカルボプラチン（AUC = 2の用量）およびパクリタキセル100mg/m²と併用して、疾患進行まで1週間に1回パビツキシマブ（3mg/kg）を与えた。46人の患者のうち16人（34.8%）が、治療未経験者であった。

【0352】

最も一般的なグレード4の治療下で発現した有害事象（TEAE）は、好中球減少（12人の患者、26.1%）であり、これはこの研究で使用する化学療法で治療した患者において予想される発生率である。最も一般的なグレード3のTEAEは、白血球減少（11人の患者、23.9%）、好中球減少（9人の患者、19.6%）、および貧血（5人の患者、10.9%）であった。これらもまた、この研究で使用する化学療法で治療した患者において予想される発生率である。

10

【0353】

固形腫瘍効果判定基準（RECIST）に従う客観的奏効は、46人中34人の患者（73.9%）において生じ、46人中5人の患者（10.9%）はCRが有し、29人の患者（63.0%）がPRを有した。平均奏効期間（DOR）は3.7ヶ月（95%の信頼区間 [CI] : 3.1、5.8）であり、PFS中央値は6.9ヶ月（95%のCI : 5.6、7.7）であった。研究終了時に、OS中央値は23.2ヶ月であることが決定された（95%のCI : 「決定せず」まで553日）。これらの結果は、特に併用療法において、現在進行中のパビツキシマブの開発にとって非常に有望である。

【0354】

20

実施例 X

パビツキシマブおよびドセタキセルによる乳癌患者の治療

本実施例は、今度は局所進行性または転移性乳癌を有する患者におけるドセタキセルとの併用での、パビツキシマブの安全性および有効性を評価する、別の第II相非盲検単一群研究の結果を報告する。

【0355】

この試験はまた、Simonの2段階設計を利用する第II相多施設試験でもあった。15人の患者を段階Aに登録し、試験を段階Bにおいてさらに31人の患者に拡大し、合計46人の患者とした。主な目的は、ORR（CR + PR）を決定することであった。副次的目的には、腫瘍進行までの時間、DOR、OS、および安全性が含まれた。

30

【0356】

最大6周期まで、4週間の計画周期の1、8、および、15日目に与えられるドセタキセル（35mg/m²）と併用して、進行まで1週間に1回パビツキシマブ（3mg/kg）を与えた。全ての患者は、1つの事前化学療法レジメンを受けた。報告された最も一般的なTEAEのうち、疲労、頭痛、腰痛、および高血圧のみがグレード3以上であった。

【0357】

この研究では、46人の患者のうち28人（60.9%）に客観的奏効が生じることが決定され、46人の患者のうち5人（10.9%）がCRを有し、46人の患者のうち23人（50.0%）がPRを有した。DOR中央値は6.1ヶ月（95%のCI : 5.7、7.5）であり、PFS中央値は7.4ヶ月（95%のCI : 6.1、9.1）であった。最終分析時点で、OS中央値は約20.7ヶ月であった（95%のCI : 「決定せず」まで16.1ヶ月）。これらのデータは、ドセタキセルとの併用療法を含む、パビツキシマブの更なる開発に対する強力な支持を提供する。

40

【0358】

実施例 XI

パビツキシマブおよびソラフェニブによる肝癌患者の治療

この実施例では、ソラフェニブと併用してパビツキシマブを使用する、進行肝細胞癌（HCC）を有する患者の治療からのデータを提示する。

【0359】

50

進行肝細胞癌（HCC）におけるパビツキシマブおよびソラフェニブの第ⅠⅠ相単一施設研究を実行した。患者は、放射線学的進行まで、1週間に1回3mg/kgのパビツキシマブを静脈内（IV）に、および400mgのソラフェニブを経口で1日に2回（PO BID）受けた。副次的評価項目には、全生存期間（OS）、疾患特異的生存期間、4ヶ月無増悪生存期間、安全性、および奏効率が含まれた。この研究には、38人の患者を集めた。

【0360】

本研究の6人の患者からの関連橋渡しデータでは、複数の前臨床癌モデルにおいて関連PS標的化抗体について示されたものと類似して、評価した患者の半数が、1周期のパビツキシマブ治療後に抗腫瘍免疫細胞の増加を有することが決定された。加えて、免疫応答の増加はより長期間にわたって研究治療を続けた患者に関連付けられ、これは臨床的に有意義な抗腫瘍免疫応答を示唆した。評価した6人の患者のうち3人は腫瘍微小環境内への活性化抗腫瘍T細胞（CD8）の浸潤の増加を有し、これは疾患進行までの期間の延長と関連していた。加えて、これらの応答する患者は、治療開始前により低レベルのPD-1陽性細胞（T細胞活性化および疾患成績の確立されたマーカーである）を最初に示し、続いてパビツキシマブ治療後に測定可能な上昇を示した。

10

【0361】

臨床的には、グレード4または5の有害事象は記録されなかった。最も一般的な全グレードの事象は、下痢（32%）、疲労（26%）、および食欲不振（24%）であった。OS中央値（mOS）は6.2ヶ月であった。2人の患者が部分奏効を達成し、4ヶ月PFSは61%であった。

20

【0362】

これらの結果は、他のチェックポイント免疫療法で見られた自己免疫有害事象の徴候なく、進行HCCを有する患者においてパビツキシマブおよびソラフェニブが良好に許容されることを実証した。進行までの時間、疾患制御率、および4ヶ月無増悪生存期間の臨床成績は、高い大血管浸潤率を含む彼らの好ましくない疾患生物学のために、非常に不良な予後を有する多数の前治療歴を有するこの患者コホートにおいて特に有望である。

【0363】

実施例XII

パビツキシマブおよびゲムシタピンによる膵臓癌患者の治療

30

本実施例では、パビツキシマブと併用してゲムシタピンを使用する、治療歴のないⅠⅤ期膵臓癌を有する患者の治療のデータを提示する。

【0364】

この研究（PPHM1002）は、治療歴のないⅠⅤ期膵臓癌を有する患者において、パビツキシマブと併用して、または併用せずに投与した時のゲムシタピンを評価するための第ⅠⅠ相無作為化非盲検研究である。主な目的は、治療群間での患者のOSを比較することであった。副次的目的には、PFS、ORR、DR、および安全性を比較することが含まれた。

【0365】

登録された患者を1:1の比で無作為化して、ゲムシタピン単独、または1週間に1回の3mg/kgのパビツキシマブとの併用でのゲムシタピンの研究治療を受けさせた。ゲムシタピン（1000mg/m²）を、疾患進行または許容できない毒性があるまで、各28日周期（4週間）の1、8、および15日目に与えた。合計70人の患者をこの研究に登録した。一般に、患者集団は非常に広範な疾患負荷量を有しており、これが両治療群において奏効を低減させている可能性がある。

40

【0366】

パビツキシマブ+ゲムシタピン治療群の最も一般的なTEAEは、悪心（44.1%）、貧血（35.3%）、ならびに疲労、便秘、および食欲不振（各々患者の32.4%に発生）であった。ゲムシタピンのみに無作為化した3人（9.1%）の患者は、グレード5（致命的）の事象（突然死[1人]、肝膿瘍[1人]、および心停止[1人]）を有し

50

た。ゲムシタピン+パビツキシマブ群では、グレード5（致命的）の事象は発生しなかった。

【0367】

ほとんどの有効性評価項目は治療群間で同等であったが、パビツキシマブおよびゲムシタピン群では、1年時点で数値的に高い奏効率および生存確率が存在した。研究終了時、全生存期間中央値（95%のCI）は、ゲムシタピン単独治療群で5.2（4.0～6.3）ヶ月、パビツキシマブ+ゲムシタピン治療群で5.6（4.7～7.0）ヶ月であった。パビツキシマブの追加に対するこれらの結果は、非常に広範な疾患負荷量を有するこの患者集団において特に有望である。

【0368】

実施例XIVの第III相試験、および機能性2GPIレベルが治療結果と関連することを示す実施例XVIIの機能性2GPI分析後、本第III相試験からの保存試料もまた、機能性2GPIについて試験した。実施例XVIIに報告されるように、これらの分析の結果は、機能性2GPIのレベルがパビツキシマブ治療の成功のためのバイオマーカーであるという発見を強化する。

【0369】

実施例XII

NSCLC患者におけるパビツキシマブおよびドセタキセルの第III相試験

第I相および単一群第III相試験を基にして、本実施例は、治療歴を有するIIIB/IV期非扁平上皮非小細胞肺癌（NSCLC）を有する患者においてパビツキシマブ+ドセタキセルを試験する、第III相試験に関する。

【0370】

この研究（PPHM0902）は、治療歴を有する局所進行性または転移性の非扁平上皮NSCLCを有する患者においてパビツキシマブ+ドセタキセルを評価する、第III相無作為化二重盲検プラセボ対照試験である。この研究の主な目的は、治療群間のORR（CR+PR）を比較することであった。副次的目的には、PFS、DR、OS、安全性、およびPKを比較することが含まれた。

【0371】

患者を1:1:1の比で無作為化して、ドセタキセル+プラセボ、ドセタキセル+1mg/kgのパビツキシマブ、またはドセタキセル+3mg/kgのパビツキシマブを受けさせた。ドセタキセル75mg/m²を、最大6周期まで各21日周期の1日目に与え、プラセボまたは割り当てられた用量のパビツキシマブを1週間に1回投与した。進行または毒性があるまで、患者は、1週間に1回割り当てられた盲検治療（プラセボ、1mg/kgのパビツキシマブ、または3mg/kgのパビツキシマブ）を受け続けた。

【0372】

全研究集団のサブセット（1群当たり6人の患者）が、パビツキシマブとドセタキセルとの間の薬物間相互作用を調査するためのPK下位研究に参加した。周期1および2の特定の時点で、これらの患者に対して追加の採血を実行した。

【0373】

平均年齢60.0歳の合計121人の患者（男性76人および女性45人）をこの研究に登録した。独立データモニタリング委員会（IDMC）では、ORRの主要評価項目に到達したため、研究治療の非盲検化が推奨されることが決定され、この会議後に研究治療を非盲検化した。加えて、安全性の懸念または問題は、IDMCによって特定されなかった。

【0374】

研究の非盲検化後、プラセボ群および1mg/kg群に關与する、包装および標識業者による標識の誤りが発見された。調査要約を食品医薬品局（FDA）に提出し、プラセボまたは1mg/kgのパビツキシマブを投薬した患者のデータをプールして、探索分析および3mg/kgのパビツキシマブ群に対する比較のための複合対照群を形成した。

【0375】

全体として、毒性グレードによる治療群間のA Eの発生率に有意差は観察されなかった。治療群間でS A Eに顕著な差は観察されなかった。複合対照群の3人の患者(3.8%)およびドセタキセルありの3mg/kgのパビツキシマブ群の2人の患者(5.0%)は、グレード5(致命的)の事象を有した。致命的事象を有する複合対照患者には、1人の敗血症を有する患者、1人の脳血管発作を有する患者、および1人の肺炎および偽敗血症の両方を経験する患者が含まれた。3mg/kgのパビツキシマブ+ドセタキセル群では、1人の患者がパビツキシマブとは無関係の致命的な敗血症を有し、1人の患者が同様にパビツキシマブとは無関係の老衰事象を有した。

【0376】

有効性評価項目の要約を表6に提示し、この中で分析は治療意図(ITT)集団および中央判定データに基づいている。全ての評価項目(ORR、PFS、およびOS)は、複合対照群(プラセボまたは1mg/kgのパビツキシマブ)と比較して、3mg/kgのパビツキシマブが優位に向かう傾向を実証した。複合群と比較して、3mg/kgのパビツキシマブのORRは約50%高かった。PFS中央値は、複合群と3mg/kgのパビツキシマブ群との間で類似していたが、3mg/kgのパビツキシマブを受けた患者のOS中央値は約60%長かった。特に、複合群の患者のmOSがわずか7.3ヶ月であるのに対して、3mg/kgのパビツキシマブ+ドセタキセルで治療した患者は11.7ヶ月のmOSを有した(HR=0.66)。

【表8】

表6

第I相試験に基づく有効性分析の要約

有効性尺度	プラセボ+1mg/kgのパビツキシマブ	3mg/kgのパビツキシマブ
N=	80	41
全奏効率(CR+PR)		
N(%)	9(11.3)	7(17.1)
95%のCI	(4.3、18.2)	(5.6、28.6)
無増悪生存期間		
日数での中央値(月)	11.9(3.9)	12.7(4.2)
95%のCI(日数)	(7.9、12.6)	(8.2、19.7)
全生存期間		
死亡数(%)	60(75.0)	22(53.7)
日数での中央値(月)	22.1(7.3)	35.5(11.7)
95%のCI(日数)	(16.9、36.7)	(15.7、52.5)

【0377】

実施例XIVの第III相試験、および機能性2GPIレベルが治療結果と関連することを示した実施例XVIIにおける機能性2GPIの分析に続いて、本第III相試験からの保存試料もまた、機能性2GPIについて試験した。実施例XVIIIIに記載されているこれらの分析の結果は、機能性2GPIのレベルがパビツキシマブ治療の成功のためのバイオマーカーであることをさらに確認する。

【0378】

実施例XIV

NSCLC患者におけるパビツキシマブおよびドセタキセルの第III相試験

前の実施例において報告されるように、第I相および第II相研究の全体的な結果は、パビツキシマブの臨床的に有意義な治療効果を実証した。そのような結果、特に上記の二重盲検第III相試験に基づいて、第III相試験を行い、本実施例は第III相試験および得られたデータを記載する。

【 0 3 7 9 】

第ⅠⅠⅠ相試験（PPHM1202）は、治療歴を有するⅠⅠⅠb／ⅠⅤ期非扁平上皮非小細胞肺癌（NSCLC）患者における、バビツキシマブ＋ドセタキセルの無作為化二重盲検プラセボ対照多施設試験であった。この世界的な二重盲検第ⅠⅠⅠ相試験は、2012年に開始された。選択基準は、プラチナ－ダブレット化学療法を進行した（既知のEGFRまたはALK突然変異の場合、適切な標的化療法を進行したはずである）ⅠⅠⅠb／ⅠⅤ期の非扁平上皮NSCLCを有する患者のものである（ECOG PS0－1および以前の免疫療法を許容）。この試験には、597人のそのような患者を1：1の比で集めて、進行または毒性があるまで、最大6周期の21日周期のドセタキセル（75mg/m²）を毎週3mg/kgのバビツキシマブ（バビツキシマブ＋ドセタキセル）またはプラセボ（ドセタキセル単独）と併用して受けさせた。主要評価項目は、全生存期間（OS）であり、副次的評価項目は、客観的奏効率（独立中央判定、ICR）、無増悪生存期間（ICR）、安全性、PK、生活の質（LCSS）、および免疫相関を含む探索バイオマーカーである。選択された患者のベースライン特徴を表7に示し、表中の「プラセボ」欄はドセタキセル単独で治療した患者を指し、「バビツキシマブ」欄はバビツキシマブ＋ドセタキセルで治療した患者を指す。

【表 9】

表 7

第ⅠⅠⅠ相試験における患者のベースライン特徴

	プラセボ n = 300	バビツキシマブ n = 297
年齢の中央値、歳（範囲）	62(30~82)	63(37~85)
> 75 (%)	5	8
男性／女性%	61/39	60/40
病期%		
ⅠⅠⅠb期	5	5
ⅠⅤ期	95	95
現喫煙者／元喫煙者%	75	79
遺伝子突然変異%		
EGFR	8	12
ALK	2	2
他	14	9
なし	52	52
不明または試験せず	26	28
活動指標%		
0	29	32
1	70	66
以前の治療%		
維持療法および／または標的化療法	57	57
免疫療法	4	2
ベースラインβ2GP1≥200 μg/ml %	49	56

【 0 3 8 0 】

A．安全性

標的とするOS事象の70%に到達したため、OS中央値(mOS)を評価した(下記を参照されたい)。研究全体を通して、安全性プロファイルは群間で一般に類似していることが決定された。治療および安全性の要約が近年発表されている(Palmeroら、2017)。その中で報告されているように、バビツキシマブおよびドセタキセルの併用の安全性プロファイルは、プラセボ+ドセタキセルの併用に類似している。グレード3以上の有害事象は、バビツキシマブ+ドセタキセル群の患者のうち68%に、およびドセタキセル単独群の患者の60%に発生した。15%超の患者において報告される治療関連AEが近年報告された(Palmeroら、2017)。加えて、治療関連グレード3/4の発熱性好中球減少症は、ドセタキセル単独(5%)よりもバビツキシマブ+ドセタキセル(8%)でわずかに高かった。表7のベースライン特徴におけるドセタキセル単独(プラセボ、n=300)で治療した患者数は、ITT集団に基づいていること、すなわち、全ての無作為化患者を含む一方で、Palmeroら、2017において発表されるドセタキセル単独(プラセボ、n=299)で治療した患者数は、安全性集団に基づいていること、すなわち、治療を受けた全ての無作為化患者を含むことに留意されたい。

10

【0381】

B. 有効性

標的とするOS事象の70%に到達したため、バビツキシマブ+ドセタキセル群の297人の患者におけるmOSは10.7ヶ月(95%の信頼区間[CI]、8.6~11.5)であり、ドセタキセル単独群の300人の患者におけるmOSは10.8ヶ月(95%のCI、9.2~12.6)であった(死亡ハザード比(HR)、1.10(0.89、1.37))。無増悪生存期間(PFS)もまた、標的とするOS事象の70%に到達した時点で2群において類似しており、PFS中央値はバビツキシマブ+ドセタキセル群で4.1ヶ月、ドセタキセル単独群で3.9ヶ月であった。その後の免疫療法は、本研究の患者のうち約15%が受け、バビツキシマブ+ドセタキセル群とドセタキセル単独群との間で均等に分布していた(実施例XIXを参照されたい)。

20

【0382】

最後の患者を無作為化してから12ヶ月間の経過観察が経過し、かつ標的とするOS事象の約85%に到達し、OS中央値は、バビツキシマブ+ドセタキセル群の297人の患者で10.5ヶ月(95%の信頼区間[CI]、8.4~11.9)、およびドセタキセル単独群の300人の患者で10.9ヶ月(95%のCI、9.2~12.1)であった(HR、1.06; P=0.533)。この段階でのPFSは、バビツキシマブ+ドセタキセル群で4.2ヶ月(95%のCI、3.9~4.6)、およびドセタキセル単独群で4.1ヶ月(95%のCI、3.2~4.8)であった(HR、1.02; P=0.876)。この段階でのORRは、バビツキシマブ+ドセタキセル群で15%であったのに対し、ドセタキセル単独群では11%であった(オッズ比0.7、P=0.15)。

30

【0383】

この段階での有効性分析(ITT)を表8に列挙し、ここで、P値は両側層別コクラン-マンテル-ヘンツェル厳密法に基づく。層別因子には、病期(III B対IV)、地理上の地域(北米、欧州、その他の地域)、以前の維持療法および/または標的化療法(あり対なし)が含まれる。

40

【表 10】

表 8
第 I I I 相試験、有効性分析

有効性尺度	プラセボ n = 3 0 0	バビツキシマブ n = 2 9 7
全生存期間 (OS)		
死亡した患者数 (%)	212(70.7%)	206(69.4%)
月での中央値 (95%のCI)	10.9(9.2~12.1)	10.5(8.4~11.9)
HR (95%のCI) ; p 値	1.06(0.88~1.29);p=0.533	
客観的奏効率 (ORR) - CR+PR		
患者の% (95%のCI)	11(7~15)	14(11~19)
オッズ比 (95%のCI) ; p 値	0.7(0.4~1.2);p=0.18	
奏効期間 (DOR)		
月での中央値 (範囲)	4.6(0.03+~17.6)	4.2(0.03+~21.0)
無増悪生存期間 (PFS)		
事象を有する患者数 (%)	200(66.7%)	190(64.0%)
月での中央値 (95%のCI)	3.9(2.8~4.4)	4.1(3.3~4.6)
HR (95%のCI) ; p 値	1.00(0.82~1.22);p=0.990	

10

20

【0384】

OS 中央値のこれらの結果は、実施例 X I I I に上記の第 I I 相データおよび研究の検出力に使用した仮定 mOS とは予想外に異なり、これらのうち後者は、バビツキシマブ + ドセタキセルでは 9 . 1 ヶ月の mOS であり、ドセタキセル単独では 7 . 0 ヶ月の mOS であった (9 . 1 対 7 . 0 ヶ月の mOS を仮定して、80% の検出力および片側 2 . 5 % の有意水準を提供する 473 の OS 事象 ; HR 0 . 77)。

【0385】

後ろ向き VeriStrat (登録商標) プロテオミクス試験は、バビツキシマブ + ドセタキセル群の 80% およびドセタキセル単独群の 84% において V S 良好サインを実証した (実施例 X V)。治療歴を有する非扁平上皮 NSCLC を有する患者におけるこの第 I I I 相試験は、バビツキシマブ + ドセタキセル群における優れた OS という主な目的は満たさなかったが、この結果は、特にドセタキセル単独群において、全体的に予想よりも高い割合の V S 良好サインによって影響された可能性がある。

30

【0386】

実施例 X V

バビツキシマブの第 I I I 相試験の初期バイオマーカー分析

上記の第 I I I 相試験に関連して、バビツキシマブ含有治療レジメンから最大の利益を得る患者について、1 つ以上のバイオマーカー、またはバイオマーカーのパターン (バビツキシマブの「符号」) を特定する目的で、バイオマーカー分析を実行した。本実施例は、後の研究に適用される試料収集技術に関し、最初のプロテオミクス符号分析を記載する。

40

【0387】

A . 試料収集

第 I I I 相試験を設計し、患者の血液試料の収集のためにインフォームドコンセントを得た。患者の血液検体は、適切な静脈切開技術を使用して得た。止血帯を静脈穿刺部位の 7 ~ 10 cm 上に置いたが、予備的な静脈選択のための止血帯の適用は 1 分を超えないようにした。患者に自らの拳を握らずに閉じさせ、中心から周辺への円運動を使用して、70% のイソプロピルアルコールパッドで静脈穿刺部位を洗浄し、風乾させた。

50

【0388】

21ゲージの針を使用して、患者の血液を5.0mlの金蓋血清分離管（SST）に収集した。血液が流れ始めた後できるだけ早く止血帯を取り外し、管を完全に充填させた。収集後直ちに管を5回反転させ、少なくとも30分間凝固させた。血清を分離するために、収集後30～60分以内に管を1,000～1,300gで15分間遠心分離した。ピペットを使用して、約1.25mlの血清を3.6mlのクリオバイアル管2本に移し、それらの試料を凍結した。

【0389】

凍結したバイアルを検体袋に入れ、しっかりと密封した。ドライアイス輸送箱の底部にドライアイスを層状に重ね、この箱に検体袋を入れた。箱が一杯になるまでドライアイスを添加し、蓋を所定の位置に固定し、試料を-70℃で保存するために中央実験室に輸送した。

10

【0390】

中央実験室は、試料を解凍することによって部分アリコートのためのバイアルを準備した。ピペットを使用して、血清の少なくとも250μlを2mlの自然蓋クリオバイアル管4本に移し、-70℃で再凍結した。同じ輸送指示を反復し、部分アリコートした試料を、試験用バイオマーカーのためにドライアイス上で凍結した状態で試験室に輸送した。

【0391】

B. VeriStrat（登録商標）分析

癌の多次元特徴を理解することは、患者選択および治療計画にとって重要である。VeriStrat（登録商標）試験は、進行NSCLCを有する患者のための、血液に基づく市販の予測的および予後的プロテオミクス試験である。予後的であることに加えて、VeriStratは、単剤治療の選択肢から選択する場合の差次的な治療利益を予測する。VeriStratは、第III相試験の患者試料に対して後ろ向きに実行した。

20

【0392】

より侵襲性の疾患と相関するVeriStrat（VS）不良（VS-P）、またはより好ましい予後と相関するVS良好（VS-G）として患者を分類する質量分析を使用して、第III相試験の患者の治療前血清試料をタンパク質発現について試験した。カプランマイヤー統計法を使用して、OSをVeriStratサブグループによって分析した。

30

【0393】

VeriStrat分類は、597人の無作為化患者のうち569人の患者について入手可能であった。バビツキシマブ+ドセタキセル群では、80%がVS良好、20%がVS不良であった。ドセタキセル単独群では、84%がVS良好、16%がVS不良であった。したがって、第III相試験では、VeriStratの良好/不良サインは治療群間でほぼ均衡が取れていた。

【0394】

全生存期間中央値（mOS）は、全VS良好では11.5ヶ月（95%の信頼区間[CI]、10.6～12.9）であり、全VS不良では5.7ヶ月（95%のCI、4.2～7.2）であった（ $p < 0.0001$ ）。HR OS（VS良好対VS不良）0.49（95%のCI 0.37～0.64）； $p < 0.001$ 。これらのVeriStrat結果は、PROSE試験（Gregorcら、2014）ならびにPFSおよびOSの全体的な予後と一致している。

40

【0395】

VS良好患者のうち、バビツキシマブ+ドセタキセル群のmOSは11.2ヶ月（95%のCI、10.2～12.8）であり、ドセタキセル単独群では11.8ヶ月（95%のCI、10.4～13.5）である（ $p = 0.38$ ）。VS不良患者のうち、バビツキシマブ+ドセタキセル群のmOSは5.8ヶ月（95%のCI、5.0～11.3）であり、ドセタキセル単独群では4.7ヶ月（95%のCI、3.4～7.2）である（ $p = 0.27$ ）。この群の患者に対する治療選択肢が限定されていることを考慮すると、バビ

50

ツキシマブがV S 不良患者においてO S を改善する能力は重要である。

【0396】

結論として、第I I I 相試験のV e r i S t r a t 結果は、P F S およびO S について全体的な予後であるが、パビツキシマブ治療応答の予測はできない。ドセタキセル群での予想外のO S 結果は、V e r i S t r a t 良好患者の比較的高い全体的割合によって影響を受けた可能性がある。特に、この第I I I 相試験におけるV e r i S t r a t 良好患者のパーセンテージ(80%超)は以前に報告されたもの(約67%)よりも高く、これは患者が全体的に良好な予後を有したことを示し、したがって、ドセタキセル群の予想よりも良好な性能を部分的に説明する。

【0397】

前述のV e r i S t r a t 分析とは別に、特にパビツキシマブについて別個のプロテオミクスアプローチもまた探求した。広範な質量分析および相関分析を実行して、パビツキシマブの追加から利益を得る患者のサブグループを特定することができる可能性のある試験を調査したが、そのような遺伝子セットの富化分析は、臨床的利益に関連するいかなるマーカーの特定ももたらさなかったため、更なる研究および可能性のある新たなアプローチに対する必要性を強調した。

【0398】

実施例X V I

機能性 2 G P I のアッセイ

本実施例は、流体試料中の機能性(活性) 2 G P I の検出のために明確に設計された 2 G P I アッセイの開発に関する。この試験方法は、機能性 2 G P I (P S およびパビツキシマブの両方に結合することができる 2 G P I を意味する)を検出および定量化するように特有に適合している。したがって、本実施例は、パビツキシマブ治療に関連して更なる有意義なバイオマーカー分析に必要とされる、以前は利用できなかった手段を提供する。

【0399】

A. 材料および方法

1. 材料および装置

以下の特定の材料および装置をアッセイにおいて使用して、本実施例の節B 1 およびB 2 に提示される結果を生成した。材料: 96 ウェルの培地結合平底プレート(G r e i n e r B i o O n e、カタログ番号655001)、96 ウェルの非結合丸底プレート(C o s t a r、カタログ番号3605)、ヘキサシグマ(S i g m a、カタログ番号32293)、P S 抗原(S i g m a、カタログ番号P6641)、卵白アルブミン(S i g m a、カタログ番号A5503)、発色基質、テトラメチルベンジジン(T M B)(K P L、カタログ番号50-76-00)、2 M のH₂SO₄(F i s h e r、カタログ番号S A 818-4)、プレートカバー(F i s h e r 015-027-11)、接着プレート密封機(V W R 232701)、試薬リザーバー(V i s t a L a b カタログ番号3054-1000)。1.5 ml の微量遠心管、50 ml の円錐管、および15 ml の円錐管もまた利用した。

【0400】

装置: ボルテックス(S c i e n t i f i c I n d u s t r i e s)、タイマー(V W R 62344-64)、10~1000 μl のピペッター(R a i n i n)、100~300 μl の多チャンネルピペッター(R a i n i n)、450 および650 nm のプレートリーダー(E N 1835)。秤、撹拌棒、および37 °C のインキュベーターもまた利用した。このアッセイにはS o f t M a x (登録商標) P r o ソフトウェアを使用した。

【0401】

2. 緩衝液および技術

洗浄緩衝液は1×リン酸緩衝食塩水(P B S)であり、遮断緩衝液は1×P B S 中2%の卵白アルブミンである。

【0402】

アッセイ全体を通して、大量（例えば、 $500\mu\text{l}$ 以上）で作業するときは、減法ピペッティングを利用した。全量の希釈剤を最初にピペッティングした。追加の試薬を添加する前に、等量の希釈剤を除去した。潜在的に危険な蒸気は全て、ドラフト内で取り扱った。

【0403】

3. バビツキシマブ - HRP

バビツキシマブ抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）に共役させて、アッセイに使用するためのバビツキシマブ - HRP検出剤を調製した。EZ-Link（登録商標）Plus 活性化ペルオキシダーゼ（Thermo Scientific、カタログ番号31487）を使用し、その後pH7.2で活性化ペルオキシダーゼを抗体に共役させるための手順（製造者により提供）を続けて、共役を実行した。簡潔には、 1mg のバビツキシマブをPBS（pH7.2）中で $1\text{mg}/\text{ml}$ まで希釈した。これを 1mg の凍結乾燥EZ-Link Plus 活性化ペルオキシダーゼに添加して、再構成した。再構成直後に、 $10\mu\text{l}$ の5Mのシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液を反応物に添加し、室温で1時間インキュベートした。インキュベーションの完了後、 $20\mu\text{l}$ の反応停止緩衝液を添加し、室温で15分間インキュベートした。共役バビツキシマブ - HRP（ $1\text{mg}/\text{ml}$ ）を4℃で最大4週間保存した。

10

【0404】

4. コーティング

ELISAプレートを以下のようにPS抗原でコーティングした。 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のPS抗原を調製し、送風機がオフの状態のドラフト内で 6ml のヘキサン中に希釈した。12チャンネルピペットを使用して、 $50\mu\text{l}$ のPS溶液を各ウェルに添加した。ドラフトの送風機を再びオンにし、ヘキサンを30～45分間、典型的には30分間蒸発させた。

20

【0405】

5. 遮断

PSコーティングELISAプレートを以下のように遮断した。1プレート当たり 100ml の遮断緩衝液（ $1\times\text{PBS}$ 中2%の卵白アルブミン）を調製した。12チャンネルピペットを使用して、 $200\mu\text{l}$ の遮断緩衝液を各ウェルに添加した。遮断されたELISAプレートを、37℃で120分間（ ± 10 分間、これによるアッセイ性能の変化はなかった）インキュベートした。

30

【0406】

6. 試料調製

アッセイ用の標準物、陽性対照、および試料調製を下記のように実行した。

【0407】

陽性対照のための2GPI標準物は、0.2Mのグリシン、0.15MのNaClの緩衝液（pH7.4）中、Haematologic Technologies, Inc.（HTI、カタログ番号B2G1-0001-C、 $1.0\text{mg}/\text{ml}$ ）から得た。

2GPIのバイアルを解凍し、標準物および陽性対照調製を以下のように実行した。

$10\mu\text{g}/\text{ml}$ の2GPIサブストックAを 1ml 、遮断緩衝液中で調製し、サブストックAから $100\mu\text{l}$ を減法ピペッティングすることによって、 $1,000\text{ng}/\text{ml}$ の2GPIサブストックBを 1ml 、遮断緩衝液中で調製し、サブストックBから $250\mu\text{l}$ を減法ピペッティングすることによって、 $250\text{ng}/\text{ml}$ の2GPI標準物を 1ml 、遮断緩衝液中で調製し、

40

減法ピペッティングを使用して、表9に従って $1000\text{ng}/\text{ml}$ のサブストックから $200\text{ng}/\text{ml}$ 、 $75\text{ng}/\text{ml}$ 、 $30\text{ng}/\text{ml}$ 、および $5\text{ng}/\text{ml}$ の対照試料を調製した。

【表 1 1】

表 9

機能性 β 2 G P I アッセイ用の陽性対照調製

陽性対照濃度 ng/ml	サブストック Bの体積(μ l)	遮断緩衝液の希釈体積 (μ l)	総体積 (μ l)
200	200	800	1000
75	75	925	1000
30	30	970	1000
5	5	995	1000

10

【0408】

未知試料を試験のために以下のように調製した。1 : 4000および1 : 8000の最終希釈度で未知試料を遮断緩衝液中で調製し、1 : 100の希釈度の未知試料を最初に調製し、1 : 40の希釈度を1 : 100の希釈度から調製して1 : 4000の希釈度を達成し、1 : 80の希釈度を1 : 100の希釈度から調製して1 : 8000の希釈度を達成した。

【0409】

非結合プレートの調製を以下のように実行した。75 μ lの遮断緩衝液を行B ~ Hの列1 ~ 3に添加し、250 ng / mlの標準物150 μ lを列1 ~ 3、行Aに添加し、多チャンネルピペットを使用して、列1 ~ 3の75 μ lを列Aから列Gまで段階希釈し、75 μ lの陽性対照および試料を指定のウェルに添加し、75 μ lの遮断緩衝液を全ての空のウェルに添加した。プレート設定を表10に示す。

20

【表 1 2】

表 1 0

機能性 β 2 G P I アッセイ用のプレート設定

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	250ng/mlの標準物			(+)対照 200ng/ml			試料3希釈1			試料7希釈1		
B	125ng/mlの標準物			(+)対照 75ng/ml			試料3希釈2			試料7希釈2		
C	62.5ng/mlの標準物			(+)対照 30ng/ml			試料4希釈1			試料8希釈1		
D	31.3ng/mlの標準物			(+)対照 5ng/ml			試料4希釈2			試料8希釈2		
E	15.6ng/mlの標準物			試料1希釈1			試料5希釈1			試料9希釈1		
F	7.8ng/mlの標準物			試料1希釈2			試料5希釈2			試料9希釈2		
G	3.9ng/mlの標準物			試料2希釈1			試料6希釈1			試料10希釈1		
H	0ng/mlの標準物			試料2希釈2			試料6希釈2			試料10希釈2		

30

40

【0410】

7. 検出

遮断終了前に、300 ng / mlのパピツキシマブ - HRPを6 ml、遮断緩衝液中で調製した。250 μ lを各ウェルにピペティングすることによって、アッセイプレートを1 x PBSで洗浄し、これをさらに2回反復した。プレート洗浄機を使用してもよく、その場合、プレートを1 x PBSで1回洗浄する。プレートができるだけ乾燥していることを確実にした。

【0411】

300 ng / mlのパピツキシマブ - HRPを50 μ l、アッセイプレートの全ウェル

50

に添加した。非結合プレートの対応する各ウェルから、 $50\mu\text{l}$ を添加した。アッセイプレートおよび非結合プレートをこのように使用することは、非結合プレートから 2 GPI を含有する試料を添加する前に、検出可能に標識されたバビツキシマブを最初に P S コーティングアッセイプレートに添加することを意味する。この順序は、ピベッティング中の交差汚染を回避する。バビツキシマブ - H R P および 2 GPI を含有する試料をプレート上で共にインキュベートし、インキュベーションを 37 で 90 分間実行した。

【0412】

8. 発色

T M B ペルオキシダーゼ基質および T M B ペルオキシダーゼ溶液 B を、使用の少なくとも 1 時間前に冷蔵庫から取り出した。 $250\mu\text{l}$ を各ウェルにピベッティングすることによって、アッセイプレートを $1\times\text{PBS}$ で洗浄し、これをさらに 2 回反復した。プレート洗浄機を使用してもよく、その場合、プレートを $1\times\text{PBS}$ で 1 回洗浄する。プレートができるだけ乾燥していることを確実にした。

【0413】

6ml の T M B ペルオキシダーゼ基質を 6ml の T M B 溶液 B と混合することによって、 12ml の T M B 混合物を調製した。 $100\mu\text{l}$ の T M B 溶液をアッセイプレートの各ウェルに添加し、5 ~ 6 分間発色させた。アッセイプレートの各ウェルに 2M の H_2SO_4 を $100\mu\text{l}$ 添加することによって、発色を停止させた。アッセイプレートを読み取り、反応停止後 30 分以内に 450nm で光学密度 (O D) を決定した。アッセイデータの印刷物を提供する S o f t M a x P r o プレートデータおよび分析テンプレートと併用して、マイクロプレートリーダーを使用した。

【0414】

9. ニック入り 2 GPI の調製

ヒト血漿および組み換えヒト 2 GPI から精製した 2 GPI の試料を両方ともブラスミンで処理 (酵素加水分解) して、ニック入り 2 GPI の大部分を含有する試料を調製した。ニック入り 2 GPI は、初期研究では均質になるまで精製しなかったが、ニック入り 2 GPI は、ニックのない、すなわち「インタクトな」2 GPI を超えて存在することが決定された。

【0415】

10. 全 2 GPI のためのアッセイ

使用した抗体に関する製造者の仕様に基づいて、全 2 GPI を検出するアッセイを設計した。これは、U S B i o l o g i c a l から市販されている抗体を使用するアッセイであり、このアッセイでは、プレートを 2 GPI に対する捕捉抗体でコーティングし、検出抗体として抗 2 GPI - H R P 共役体を使用して、全ての結合 2 GPI を検出する。抗体カタログ番号は、捕捉抗体、U S B i o l o g i c a l 番号 A 2 2 9 9 - 8 1 A、親和性精製抗 2 GPI および検出抗体、U S B i o l o g i c a l 番号 A 2 2 9 9 - 8 1 B、ペルオキシダーゼ共役抗 2 GPI である。

【0416】

捕捉抗体の 1 : 100 の希釈物を、炭酸塩緩衝液 (50mM の重炭酸ナトリウム) 中に $\text{pH}9.6$ で調製した。 $100\mu\text{l}$ を E L I S A プレートの各ウェルに添加し、室温でインキュベートした。T w e e n - 20 を含有する $1\times\text{PBS}$ 緩衝液でプレートを洗浄し、その後 1 % の B S A を含有する 1 ウェル当たり $200\mu\text{l}$ のアッセイ希釈剤で遮断し、37 でインキュベートした。精製 2 GPI を使用して、アッセイ希釈剤中 $500\text{ng}/\text{ml}$ から始まる 2 倍希釈標準曲線を準備した。試料をアッセイ希釈剤中で希釈して、標準曲線の直線領域内の濃度を達成した。遮断インキュベーション後、プレートを洗浄し、続いて 1 ウェル当たり $100\mu\text{l}$ の標準曲線および試料を 2 連または 3 連で添加した。標準曲線および試料の添加後、プレートを 37 でインキュベートした。検出抗体を、アッセイ希釈剤で 1 : 400 に希釈した。試料および標準曲線のインキュベート後、プレートを洗浄し、続いて 1 ウェル当たり $100\mu\text{l}$ の検出抗体を添加した。プレートを 37 でインキュベートした。二次抗体のインキュベーション後、プレートを洗浄し、その後 T M B

で発色させた。450nmでプレートを読取り、試料濃度を標準曲線から決定した。

【0417】

B. 結果

1. 機能性 2 GPI とニック入り 2 GPI との区別

ヒト血漿から精製した 2 GPI (「ヒト」) または組み換え発現後の 2 GPI (「組み換え」) をプラスミンで処理して、PS に結合しない、プラスミン切断された (ニック入り) 2 GPI の大部分を含有する 2 GPI 試験試料を調製した。本アッセイ (表 11B) において、かつ市販の捕捉抗体および検出抗体を使用して全 2 GPI を検出するように設計したアッセイ (表 11A) を使用して、これらの試料を、無プラスミン (インタクトな) 2 GPI、および各々の 50 : 50 混合物と共に試験した。結果を以下に示す。

10

【表 13】

表 11A

全 2 GPI アッセイにおけるニック入り 2 GPI および機能性 2 GPI の試験

試料		濃度(ng/ml)
ヒト	プラスミン処理した 2 GPI	104.12
	50 : 50 の混合物	119.77
	無プラスミン 2 GPI	140.90
組み換え	プラスミン処理した 2 GPI	141.35
	50 : 50 の混合物	134.51
	無プラスミン 2 GPI	140.90

20

【表 14】

表 11B

機能性 2 GPI アッセイにおけるニック入り 2 GPI および機能性 2 GPI の試験

試料		濃度(ng/ml)
ヒト	プラスミン処理した 2 GPI	32.95
	50 : 50 の混合物	80.86
	無プラスミン 2 GPI	136.42
組み換え	プラスミン処理した 2 GPI	33.26
	50 : 50 の混合物	88.29
	無プラスミン 2 GPI	136.42

30

【0418】

市販の抗体を使用するいわゆる「全 2 GPI アッセイ」 (表 11A) および本発明の「機能性 2 GPI アッセイ」 (表 11B) は両方とも、類似した濃度の 2 GPI (141 ng/ml および 136 ng/ml) が読み取られることがまず理解され得る。全 2 GPI アッセイを使用しても、プラスミン処理した組み換え 2 GPI を検出する上で本質的な違いはなく、ヒト血漿からのプラスミン処理した 2 GPI の量が増加するにつれて、中程度の検出の低減のみが存在した (141 から 104 ng/ml)。対照的に、機能性 2 GPI アッセイを使用すると、組み換えまたは血漿由来のプラスミン処理した 2 GPI の量の増加は、有意な結合の低減をもたらす (136 から 33 ng/ml)。

40

【0419】

したがって、アッセイの設計と一貫して、これらの結果は、本アッセイが、ニック入り 2 GPI とは対照的に、機能性 2 GPI (すなわち、PS およびバビツキシマブの両

50

方に結合する 2 G P I) を効果的に検出することができることを示す。これにより、本発明の機能性 2 G P I アッセイは、P S に結合する 2 G P I と一緒に (P S に結合しない) ニック入り 2 G P I も検出する市販のアッセイキット (および市販の抗 2 G P I 抗体を使用するアッセイ) から区別される。

【 0 4 2 0 】

2 . 機能性 2 G P I の定量化

アッセイは、流体試料中の機能性 2 G P I (P S およびバビツキシマブの両方に結合する 2 G P I である) の量を決定に成功することができる。このアッセイは現在、再現性がある 2 G P I 標準曲線を準備するために慣例的に実行されている。これに関して、4 パラメータロジスティック適合が使用され、これは非線形回帰分析に使用される統計的等式である。4 パラメータ適合式は、

10

【 数 1 】

$$y = \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)} + D$$

であり、式中、

A は、X 軸の低い値に対する漸近線 (すなわち、曲線の平坦部分) に対応する Y 値であり、

20

B は、曲線の中心にある漸近線から、曲線がいかに素早く推移するかを説明する係数であり、一般に勾配係数と呼ばれ、

C は、A と D との中間点に対応する X 値であり、一般に E C 5 0 と呼ばれ、

D は、X 軸の高い値に対する漸近線に対応する Y 値である。

【 0 4 2 1 】

機能性 2 G P I の標準曲線の代表例を、図 1 6 に示す。そのような標準曲線から、血漿または血清試料などのヒト血液試料中の機能性 2 G P I の濃度を決定することができる。主に正確さのためではあるが、また試料調製の経済性のためにも、標準曲線は n g / m l (ナノグラム / m l) で準備される。正常なヒト集団における 2 G P I の平均レベルは約 2 0 0 μ g / m l (マイクログラム / m l) であるため (M e h d i ら、1 9 9 9 ; M i y a k i s ら、2 0 0 4)、標準曲線は試験試料がアッセイでの分析前に希釈されるという期待の下で準備される。希釈した血漿または血清試験試料をアッセイにかけ、その後、希釈係数を調整することによって患者の 2 G P I 濃度を計算することができる。

30

【 0 4 2 2 】

このアッセイは現在、上記の第 I I I 相試験の患者における機能性 2 G P I のレベルを決定するために使用されており、その結果を、以下の実施例 X V I I 、ならびに実施例 X V I I I および実施例 X X に提示する。

【 0 4 2 3 】

3 . 代替的な同等のアッセイ構成要素およびステップ

本実施例の節 A 1 ~ A 8 に記載される特定の材料、装置、およびアッセイステップに加えて、機能性 2 G P I を検出および定量化するためのアッセイの概念から逸脱することなく、構成要素および方法ステップにおける変形がなされ、実行され得る。以下の結果は、関連薬剤が節 A 1 ~ A 8 に記載される薬剤に取って代わり得ること、および本質的に同じ結果が達成されることを示す。

40

【 0 4 2 4 】

特定の好ましい E L I S A プレートは、脂質吸着に最適化されたものであり、これは上記の節 A 1 の E L I S A プレートに取って代わるように使用することができる。脂質吸着に最適化された E L I S A プレートが既知であり、それはより良好な脂質 (P S) 結合を提供する表面化学を有する。1 つのそのような E L I S A プレートは、新たなアッセイ形式で使用されている T h e r m o F i s h e r P o l y S o r p (登録商標) プレート

50

である。

【0425】

上記の節 A 4 のヘキサンに基づく P S コーティング方法には、好ましくは、(ヘキサンの使用を回避することによって) ユーザに特定の安全性利益を提供することができるイソプロパノールに基づく P S コーティング方法が取って代わってもよい。新たなアッセイ形式において、コーティング緩衝液としてイソプロパノールを使用する際には、イソプロパノール中に希釈した $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の P S 抗原を使用して E L I S A プレートに P S 抗原でコーティングし、インキュベーション時間は 90 分間である。

【0426】

有効な 2 G P I 校正曲線を生成するために、2 G P I を得る任意の既知の方法を用いることができる。例えば、H T I (上記の節 A 6) などの商業販売会社から購入されるものである。明確で再現性のある校正制御のために、代替的な 2 G P I 調製物もまた開発され得る。1つのそのような好ましい方法は、C H O 細胞内で 2 G P I を発現させ、発現された 2 G P I を精製することである。

【0427】

C H O 細胞由来の 2 G P I の好ましい精製は、混入物を除去し、清澄化された採取物が $0.2 \mu\text{m}$ のフィルタを通過することを可能にする、採取物の清澄化、クロマチン抽出ステップ; 清澄化された採取物を緩衝液交換し、体積を増加させずに、その伝導率を低下させるための、タンジェント流濾過 (T F F) システムの使用; 更なる混入物を除去するための、アニオン流スルーモードにおける C a p t o A d h e r e ステップ; 凝集物および他の混入物を除去し、溶出液を濃縮し、任意の緩衝液交換を促進するための、N u v i a (商標) S を使用する強力チオンステップ; ならびに任意で、精製 2 G P I を緩衝液交換し、濃縮するための、T F F システムの使用を含む。2 G P I はこのように発現および精製され、新たなアッセイ形式において使用されている。

【0428】

上記の節 A 3 に加えて、特定の好ましいバビツキシマブ - H R P 検出剤は、2つの一般に使用されている非専売の架橋剤である S M C C (スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサノ - 1 - カルボキシレート) または S A T A (N - スクシンイミジル 5 - アセチルチオアセテート) のいずれかを使用して架橋された共役体である。他の好ましいバビツキシマブ - H R P 検出剤は、H R P の数がバビツキシマブ抗体の数を超える共役体、特に 2 : 1 または 3 : 1 の H R P : バビツキシマブ比をもたらす、本質的に遊離 (非共役) 抗体を有しないものである。そのようなコンジュゲートは、S - 300 サイズ分類カラムによって精製されて、未反応の反応構成成分が除去される。これらの成分および特性の各々を有するバビツキシマブ - H R P 検出剤は、C o l u m b i a B i o s c i e n c e s , 4985 W i n c h e s t e r B l v d . , F r e d e r i c k , M a r y l a n d , 21703 から得られ、新たなアッセイ形式において $600 \text{ ng}/\text{ml}$ で使用されている。

【0429】

特に技術的な理由から、上記の代替的な構成要素およびアッセイステップのうちの1つ以上が好ましいが、全てのそのような代替物の併用でさえも、本実施例 (すなわち、節 A 1 ~ A 8) において最初に記載したアッセイと本質的に同じ結果をもたらす機能性 2 G P I が提供される。そのような比較結果を以下の表 12 に示し、この表は、S a n D i e g o B l o o d B a n k から得た4つの無作為ヒト試料 (ドナー) を使用して、2つの異なるアッセイ形式で測定される機能性 2 G P I レベルを提示する。

【表 1 5】

表 1 2
機能性 β 2 G P I アッセイの同等の性能

ドナー	β 2 G P I 濃度 (μ g / m l)			
	アッセイ形式、実施例 XVI、A1~A8		アッセイ形式、実施例 X V I、B 9	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差
1	2 1 4	2 1	2 1 4	2 0
2	2 7 6	2 0	2 8 1	3 3
3	2 2 4	2 2	2 2 6	2 2
4	2 2 3	2 1	2 1 9	2 3

10

【 0 4 3 0 】

実施例 X V I I

バビツキシマブ第 I I I 相試験における 2 G P I バイオマーカー分析

上記の機能性 2 G P I アッセイを利用して、本実施例は、実施例 X I V の第 I I I 相試験の患者における治療前の機能性 2 G P I のレベルを報告する。機能性 2 G P I のレベルを治療結果と関連させることによって、本実施例はまた、バビツキシマブおよびドセタキセルならびに他の併用療法で治療した N S C L C 患者におけるものなどの、バビツキシマブ治療の成功のためのバイオマーカーとしての機能性 2 G P I にも関する。

20

【 0 4 3 1 】

A . 患者における機能性 2 G P I レベル

上記の第 I I I 相試験には 5 9 7 人の患者を集めた。第 I I I 相試験における患者の血液試料の収集は、実施例 X V、A に記載されている。本分析の時点で、機能性 2 G P I が評価可能な 5 9 2 の患者試料が存在した。これらの 5 9 2 人の患者の血液試料の部分アリコートと、直前の実施例に記載されるアッセイを使用して機能性 2 G P I について試験した。

【 0 4 3 2 】

μ g / m l での治療前の機能性 2 G P I のレベルおよび統計の要約を表 1 3 に示し、表中、「バビツキシマブ」列はバビツキシマブ + ドセタキセルで治療した患者を指し、「プラセボ」列はドセタキセル単独で治療した患者を指す。

30

【表 1 6】

表 1 3
第 I I I 相患者における機能性 β 2 G P I レベル

	数	平均値 (標準偏差)	最小	Q 1	中央値	Q 3	最大
バビツキシマブ	294	202(57.3)	22	162	207	240	365
プラセボ	298	195(59.7)	0.5	159	199	238	402
全	592	198(58.6)	0.5	161	203	239	402

40

【 0 4 3 3 】

治療前の機能性 2 G P I のレベルは 0 . 5 ~ 4 0 2 μ g / m l の範囲であり、全ての患者の機能性 2 G P I の分布を図 1 7 A および図 1 7 B に示す。バビツキシマブ + ドセタキセルで治療した患者において、機能性 2 G P I は、図 1 7 C に示されるように、2 2 ~ 3 6 5 μ g / m l の範囲であった。ドセタキセル単独で治療した患者における機能性 2 G P I の分布を図 1 7 D に示し、これはこの研究の全範囲を網羅する (0 . 5 ~ 4 0 2 μ g / m l) 。

50

【0434】

各治療群（202および195 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）について、ならびに研究全体（198 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）について、治療前の機能性 2 GPI のレベルは文献に報告されている200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の平均と一貫している（20 mg/dl はMehdiら、1999によって、および200 mg/l はMiyakisら、2004によって）。

【0435】

200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の治療前の機能性 2 GPI レベルを有する患者のパーセンテージは、バビツキシマブ+ドセタキセルで治療した患者では56%、およびドセタキセル単独で治療した患者では49%であることが決定された。

【0436】

B．単一カットオフの 2 GPI バイオマーカー分析

バビツキシマブ+ドセタキセル療法を受けている患者における応答の予測因子としての機能性 2 GPI を評価するために実行したサブグループ分析は、生存期間の延長に対する強い傾向を実証した。

【0437】

まず単一カットオフ法を使用して、患者の 2 GPI データを評価した。このように最適なカットオフを探索する上で、ステップ1は、バビツキシマブ+ドセタキセル群の患者について、高 2 GPI 群対低 2 GPI 群のOS分離または有意なOS分離を探索することであり、ステップ2は、それらの高 2 GPI 患者について、バビツキシマブ+ドセタキセル群対ドセタキセル単独群（プラセボ）のOS分離または有意なOS分離を探索することである。

【0438】

評価可能な578人の患者に単一カットオフ法を適用することによる、可能性のあるバイオマーカーとしての機能性 2 GPI の初期分析は、驚くべきことに、高 2 GPI を有する患者において、バビツキシマブ+ドセタキセル群の167人の患者ではmOSが11.9ヶ月（95%のCI、9.0~14.7）であり、ドセタキセル単独群の141人の患者では9.4ヶ月（95%のCI、7.7~11.7）（死亡HR、0.77； $P=0.1$ ）であることを示した。これらの初期分析において、「高 2 GPI」は、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上（200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の機能性 2 GPI の治療前レベルと定義される。これらの分析は単一カットオフに基づいているため、「高 2 GPI」を有しない患者は、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満（<200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の機能性 2 GPI を有する。

【0439】

その後、単一カットオフ分析を評価可能な592人の患者に拡大した。統計的に有意ではないが、これらの分析もまた、患者が200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の機能性 2 GPI の治療前レベルを有するときに、バビツキシマブ+ドセタキセル群において生存期間が延長する驚くべき傾向を実証した。これらの結果は、図18Aおよび図18Bにおいて、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の機能性 2 GPI について、カプランマイヤー生存曲線によって表される。評価可能な592人の患者のうち、図18Aは、バビツキシマブで治療した患者について、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の機能性 2 GPI を有する者（167人の患者）が11.4ヶ月のmOSを有したのに対し、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の「低 2 GPI」を有する127人の患者ではmOSが9.8ヶ月に過ぎなかったことを示す（死亡HR、0.76； $P=0.054$ 、CI（0.58、1.01））。図18Bに示されるように、無作為化患者のうちの約52%となる200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の機能性 2 GPI の治療前レベルを有する患者において、バビツキシマブ+ドセタキセル群の167人の患者におけるmOSは11.4ヶ月（95%のCI、8.4~16.6）であり、ドセタキセル単独群の146人の患者におけるmOSは10.2ヶ月（95%のCI、8.5~11.9）であった（死亡HR、0.82； $P=0.134$ 、CI（0.63、1.06））。

【0440】

C．2カットオフの 2 GPI バイオマーカー分析

上記の単一カットオフ分析後に、2カットオフ法を使用して、592人の評価可能な患

10

20

30

40

50

者におけるデータをさらに分析した (K l e i n & M o e s c h b e r g e r、2003)。2カットオフ法において、ステップ1は、バビツキシマブ (+ドセタキセル) で治療した患者の「範囲内」対「範囲外」のOSの有意な分離を検索することであり、ステップ2は、「範囲内」の患者のバビツキシマブ群対プラセボ群の有意なOS分離を探索することである。

【0441】

592人の評価可能な患者における2カットオフ法を使用するこれらのサブグループ分析は、各々が200 μ g/ml以上の機能性 2GPIで始まるバビツキシマブの生存利益を示す、いくつかの統計的に有意な範囲の機能性 2GPIを生成し、したがって、200 μ g/ml以上の機能性 2GPIの治療前レベルがバビツキシマブでの治療に有益であるという初期の驚くべき発見を確認した。特に、2カットオフ法は、210~270、210~280、210~290、200~280、および200~290 μ g/mlの範囲の各々にある機能性 2GPIの治療前レベルが、ドセタキセル単独で治療した患者に対して、バビツキシマブ+ドセタキセルで治療した患者の全生存期間における利益の統計的に有意な予測因子であることを示した。210~270、210~280、210~290、200~280、および200~290 μ g/mlの機能性 2GPI範囲についてのこれらの結果を、表14Aおよび表14Bに示す。

【表17】

表14A

治療前 β 2GPIの範囲はバビツキシマブの全生存期間を改善する

β 2GPI(μ g/ml)		範囲内患者 (数)			範囲内		
低	高	バビツキシマブ	プラセボ	合計	ハザード率	C I	P 値
210	280	124	102	226	0.689891086	0.51、0.94	0.0184092
210	290	131	108	239	0.702335779	0.52、0.95	0.0206955
210	270	111	93	204	0.704885964	0.51、0.98	0.0356625
200	280	149	129	278	0.750114990	0.57、1.00	0.0455542
200	290	156	135	291	0.758545153	0.58、1.00	0.0486627

【表18】

表14B

治療前 β 2GPIの範囲はバビツキシマブの全生存期間を改善する

β 2GPI(μ g/ml)		範囲外患者 (数)			範囲外		
低	高	バビツキシマブ	プラセボ	合計	ハザード率	C I	P 値
210	280	170	196	366	1.326781940	1.03、1.70	0.0260507
210	290	163	190	353	1.350309796	1.05、1.74	0.0205255
210	270	183	205	388	1.267025810	1.00、1.61	0.0537042
200	280	145	169	314	1.366480252	1.05、1.79	0.0217840
200	290	138	163	301	1.396948670	1.06、1.84	0.0164154

【 0 4 4 2 】

表 1 4 A の結果をまとめると、2 1 0 ~ 2 7 0、2 1 0 ~ 2 8 0、2 1 0 ~ 2 9 0、2 0 0 ~ 2 8 0、および 2 0 0 ~ 2 9 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の機能性 2 G P I の範囲の各々は、1 未満のハザード比および生存期間の改善を表す統計的に有意な P 値を有する。表 1 4 B は、当然、それらの述べられる範囲外の機能性 2 G P I を有する患者が、1 超のハザード比および生存期間の悪化（または死亡率の増加）を表す統計的に有意な P 値を有するという点において反対を示す。例えば、無作為化患者の約 4 9 % となる治療前の 2 G P I レベルが 2 0 0 ~ 2 9 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の患者は、パビツキシマブ（+ ドセタキセル）で治療した場合に 1 1 . 4 ヶ月の m O S を有したのに対して、同じ範囲の 2 G P I レベルを有する対照群の患者では、1 0 . 1 ヶ月であった。1 0 . 1 ヶ月に対する 1 1 . 4 ヶ月のこの増加は、m O S の統計的に有意な改善を反映している（H R 0 . 7 6、P = 0 . 0 4 9）。

10

【 0 4 4 3 】

2 0 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の機能性 2 G P I の治療前レベルが、パビツキシマブ治療時に生存期間が延長する傾向を示すという示唆は文献には存在せず、2 1 0 ~ 2 7 0、2 1 0 ~ 2 8 0、2 1 0 ~ 2 9 0、2 0 0 ~ 2 8 0、および 2 0 0 ~ 2 9 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の機能性 2 G P I の治療前レベルが、パビツキシマブで治療した患者の全生存期間における利益を予測するという示唆も存在しない。実際に、パビツキシマブの有意な以前の臨床経験には、そのような結果を示唆するものは何もない。さらに、そのような発見は、広範な前臨床モデリングからのデータと非常に矛盾しており、これは、様々なレベルの血清 2 G P I がパビツキシマブの治療結果に有意な影響を及ぼさないことを示した。特に、臨床前の経験は、むしろ約 1 0 ~ 2 0 から 5 0 ~ 6 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度などの非常に低いレベルの血清 2 G P I が、パビツキシマブの結合および活性を支持するのに十分であることを示した（実施例 V）。

20

【 0 4 4 4 】

特に、異なるアッセイを使用して、実施例 V は、0 . 1 2 ~ 0 . 2 5（図 1 A、図 1 B、図 1 C、および図 1 D と共に、図 9 A および図 9 B）、0 . 1 2 5、0 . 5 ~ 2（図 1 0）、0 . 9 3（図 1 1）、ならびに 1 . 4 3 ~ 2 . 8 6（図 1 2）の 2 G P I 対抗体のモル比が、P S へのパビツキシマブの結合を支持する上で有効であることを示す。パビツキシマブが約 2 . 8 6 の 2 G P I 対抗体のモル比で有効であることを示す前臨床データ（表 3）を含む、いくつかの異なる結合および機能試験システムを考慮すると、2 G P I 対抗体のモル比は 3 を超える必要はない。本第 I I I 相試験において 3 m g / k g の用量のパビツキシマブを使用すると、そのような比は 6 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の 2 G P I レベルで達成される（図 1 9）。参考のために、第 I I I 相試験の 2 G P I の量、抗体の量、および相当する 2 G P I - 抗体比を表 1 5 に示し、表中、N = 定義された各増分内の機能性 2 G P I レベルを有する患者数（5 9 2 人の評価可能な患者から）である。

30

【表 19】

表 15

第 I I I 相患者の β 2 G P I および抗体レベルならびに比

バビツ キシマ ブ (mg/kg)	Cmax(μ g/ml)	バビツキ シマブ (μ M)	β 2GPI(μ g/ml)	N=	β 2GPI(μ M)	モル比 β 2 G P I 対抗体のモル 比
3	56.4	0.389	10	3	0.2	0.514
3	56.4	0.389	20		0.4	1.028
3	56.4	0.389	30	1	0.6	1.542
3	56.4	0.389	40		0.8	2.057
3	56.4	0.389	50	0	1.0	2.571
3	56.4	0.389	60		1.2	3.085
3	56.4	0.389	80	9	1.6	4.113
3	56.4	0.389	100	26	2.0	5.141
3	56.4	0.389	120	28	2.4	6.170
3	56.4	0.389	140	43	2.8	7.198
3	56.4	0.389	160	36	3.2	8.226
3	56.4	0.389	180	43	3.6	9.254
3	56.4	0.389	200	90	4.0	10.283
3	56.4	0.389	220	101	4.4	11.311
3	56.4	0.389	240	70	4.8	12.339
3	56.4	0.389	260	62	5.2	13.368
3	56.4	0.389	280	44	5.6	14.396
3	56.4	0.389	300	23	6.0	15.424
3	56.4	0.389	320	7	6.4	16.452
3	56.4	0.389	340	2	6.8	17.481
3	56.4	0.389	360	1	7.2	18.509
3	56.4	0.389	380	1	7.6	19.537
3	56.4	0.389	402	2	8.0	20.566

【 0 4 4 5 】

表 15 および図 17 A をモデリングに使用したデータ（表 1、表 2、および表 3）と比較すると、第 I I I 相試験の大多数の患者は、バビツキシマブがその最大血中濃度である（56.4 μ g/ml の Cmax；実施例 V I；Gerber ら、2011）場合ですら、バビツキシマブ結合を飽和させるのに十分過ぎるほどである（2.86 以上）、すなわち、60 μ g/ml または 1.2 μ M（表 15、図 19）から始まる、 β 2 G P I 対抗体モル比に一致する機能性 β 2 G P I のレベルを有していたことが理解され得る。実際に、592 人の評価可能な患者のうち 4 人（0.68%）が、60 μ g/ml 未満の機能性 β 2 G P I の治療前レベルを有していた。さらに、機能性 β 2 G P I のレベルが増加する（これは試験における大多数の患者に当てはまる）場合、 β 2 G P I 対バビツキシマブのモル比は 2 または 3 よりはるかに高く、200 μ g/ml で 10 を超える。以前の臨床モデリングまたは臨床経験では、そのような β 2 G P I レベルまたは比がバビツキシマブ療法に有益であることを指摘するものは何もなくあった。むしろ、図 19 に示されるように、臨床データは、約 10 μ g/ml 以下から始まる低レベルの血清 β 2 G P I（5 μ g/ml）

ml の 2 G P I は 0 . 2 5 7 の 2 G P I : 抗体モル比を有する)、および約 6 0 μ g / ml でも簡単に、パビツキシマブの結合および活性を支持するのに十分であることを示した(実施例 V)。

【0446】

予想外ではあったが、パビツキシマブの成績についての可能性のあるバイオマーカーとしての、機能性 2 G P I の治療前レベルについてのこれらの詳細な分析は、非常に有望である。したがって、患者における機能性 2 G P I の治療前濃度を測定することは、パビツキシマブ療法に対する応答を予測するための、すなわち、パビツキシマブでの治療から利益を得る可能性がより高いか、または最も可能性が高い患者を選択するための戦略を提供する。これは、特に NSCLC において、ドセタキセルと共にパビツキシマブを使用した場合に最初に観察された。しかしながら、機能性 2 G P I および PS を有する複合体中でのパビツキシマブ結合の機構、および全体的なパビツキシマブの免疫活性化機構は、全てのパビツキシマブ療法に共通しているため、したがって、2 0 0 μ g / ml 以上の機能性 2 G P I の治療前レベルに基づく患者の選択は、これが治療結果を改善するという根拠の十分な期待の下でパビツキシマブを使用する全ての将来の試験および治療法に含めることができる。実際に、これを支持する更なる証拠が実施例 X V I I I および実施例 X X に提供されている。

10

【0447】

実施例 X V I I I

更なるパビツキシマブ臨床試験における 2 G P I バイオマーカー分析

20

実施例 X V I I I におけるパビツキシマブ治療の成功のバイオマーカーとしての機能性 2 G P I の特定に続いて、本実施例は、機能性 2 G P I アッセイの使用を、より初期のパビツキシマブ臨床試験の試料に拡大する。以下の結果は、同じレベルの機能性 2 G P I がパビツキシマブの成功した治療結果とも相関することを示し、したがって、機能性 2 G P I がパビツキシマブのバイオマーカーとして確認される。

【0448】

A . 実施例 X I I I I の第 I I 相試験

実施例 X I I I I の NSCLC 第 I I 相試験 (P P H M 0 9 0 2) の試料を、実施例 X V I の機能性 2 G P I アッセイを使用して試験した。機能性 2 G P I の治療前レベルが評価可能な 1 1 9 人の患者の試料があり、そのうち 4 0 人の患者がパビツキシマブ 3 m g / k g 群にあり、7 9 人の患者が複合対照群 (プラセボまたは 1 m g / k g のパビツキシマブ) にいた。

30

【0449】

機能性 2 G P I の治療前レベルは、全患者について 0 . 5 ~ 2 6 6 μ g / ml の範囲であった (図 2 0 A) 。パビツキシマブ 3 m g / k g + ドセタキセルで治療した患者では、機能性 2 G P I は 0 . 5 ~ 2 6 6 μ g / ml の範囲であった (図 2 0 B) 。複合対照群の患者における機能性 2 G P I の分布は 0 . 5 ~ 2 5 7 . 4 μ g / ml であった (図 2 0 C) 。各治療群 (パビツキシマブ 3 m g / k g では 1 6 9 . 4 μ g / ml 、および複合対照群では 1 7 1 . 8 μ g / ml) について、ならびに研究全体 (1 7 1 . 0 μ g / ml) について、機能性 2 G P I の治療前レベルは文献に報告されている平均と一貫している。

40

【0450】

2 0 0 μ g / ml 以上 (2 0 0 μ g / ml) の機能性 2 G P I の治療前レベルとして定義される、「高 2 G P I 」のカットオフを使用して、パビツキシマブ 3 m g / k g 群では、2 0 0 μ g / ml 以上の 2 G P I が全生存期間の増加と共に増加する傾向がある (図 2 1 A および図 2 1 B) が、他方の群ではそのような傾向はない (図 2 1 C) と決定した。例えば、3 m g / k g のパビツキシマブで治療した患者について、2 0 0 μ g / ml 以上の機能性 2 G P I を有する者は 1 6 . 8 ヶ月の m O S を有したのに対して、2 0 0 μ g / ml 未満の「低 2 G P I 」ではわずか 9 . 4 ヶ月であった (図 2 1 A) 。また、2 0 0 μ g / ml 以上の機能性 2 G P I を有する患者において、3 m g / k g の

50

バビツキシマブで治療した患者の16.8ヶ月のmOSは、複合対照群の患者のわずか8.7ヶ月のmOSを超えていた(図21B)。図21Aおよび図21Bの各々における曲線の明確な分離を、図21Cの上重ね曲線と対比されたい(複合対照群の200 μ g/ml以上の2GPIを200 μ g/ml未満の2GPIと比較)。

【0451】

B. 実施例XIIの第II相試験

実施例XIIの第II相膀胱癌試験の試料(PPHM1002)を、実施例XVIの機能性2GPIアッセイを使用して試験した。機能性2GPIの治療前レベルが評価可能な31の患者試料があった。機能性2GPIの治療前レベルは、全患者について82.5~343.2 μ g/mlの範囲であった(図22)。これら31人の患者について、治療前の機能性2GPIの平均レベル(219.2 μ g/ml)は文献に報告されている平均と一貫していた。

10

【0452】

試料サイズが小さく、かつ疾患が非常に侵襲性であるが、200 μ g/ml以上(200 μ g/ml)の機能性2GPIの「高2GPI」のカットオフを使用して、バビツキシマブについて、200 μ g/ml以上の2GPIが全生存期間の増加と共に増加する傾向があることを決定した。200 μ g/ml以上の機能性2GPIを有するバビツキシマブで治療した患者は、7.4ヶ月のmOSを有したのに対して、200 μ g/ml未満の「低2GPI」では5.3ヶ月であった(図23)。

20

【0453】

C. NSCLCにおけるバビツキシマブおよびパクリタキセル/カルボプラチンの第II相試験

バビツキシマブ併用または非併用のパクリタキセル/カルボプラチンの無作為化非盲検第II相試験(PPHM1001)を、治療歴のない局所進行または転移性非扁平上皮NSCLCを有する患者において実行した。この試験の試料を、実施例XVIの機能性2GPIアッセイを使用して試験した。機能性2GPIの治療前レベルが評価可能な84の患者試料があり、そのうち44人の患者がバビツキシマブ群に、40人の患者がパクリタキセル/カルボプラチン群にいた。

【0454】

機能性2GPIの治療前レベルは、全患者について0.5~326 μ g/mlの範囲であった(図24A)。バビツキシマブで治療した患者内では、機能性2GPIは0.5~326 μ g/mlの範囲であった(図24B)。パクリタキセル/カルボプラチン群の患者における機能性2GPIは、88.8~292.7 μ g/mlの範囲であった(図24C)。各治療群(バビツキシマブでは187.9 μ g/ml、パクリタキセル/カルボプラチン群では186.4 μ g/ml)について、および研究全体(187.2 μ g/ml)について、機能性2GPIの治療前レベルは、ここでもまた文献に報告されている平均と一貫している。

30

【0455】

200 μ g/ml以上(200 μ g/ml)の機能性2GPIの治療前レベルであるものと同じ「高2GPI」のカットオフを使用して、200 μ g/ml以上の2GPIは、ここでもまたバビツキシマブ群においては全生存期間の増加と共に増加する傾向があるが、対照(パクリタキセル/カルボプラチン)群ではそのような傾向はないと決定した。例えば、バビツキシマブで治療した患者では、200 μ g/ml以上の機能性2GPIを有する患者は17.0ヶ月のmOSを有したのに対して、200 μ g/ml未満の「低2GPI」では14.2ヶ月であった(図25A)。また、200 μ g/ml以上の機能性2GPIを有する患者では、バビツキシマブで治療した患者の17.0ヶ月のmOSは、対照群の患者のわずか13.2ヶ月のmOSを超えた(図25B)。図25Aおよび図25B、特に図25Aにおける曲線の分離を、対照群の患者について2GPIが200 μ g/ml未満の場合により長期間生存する傾向が存在する図25Cと対比されたい。

40

50

【 0 4 5 6 】

結論として、4つの別個の臨床試験からの実施例X V I Iおよび実施例X V I I Iのデータは、機能性 2 G P Iレベルが治療結果と相関し、したがって機能性 2 G P Iレベルをバビツキシマブ治療の成功のバイオマーカーとして確認することを一貫して示している。

【 0 4 5 7 】

実施例X I X

後続免疫療法との併用におけるバビツキシマブの生存期間

実施例X I Vの第I I I相試験の初期の分析は、ドセタキセル単独群と比較して、バビツキシマブ+ドセタキセル群において優れたOSを示さなかったが、バビツキシマブ治療に対する治療的利益の他の可能性のある指標を特定する目的で、進行中の研究を実行した。本実施例は、バビツキシマブおよびドセタキセル、その後に後続免疫療法(S A C T - I O)で治療した患者は、ドセタキセル単独、その後に免疫療法で治療した患者とは対照的に、統計的に有意なより良好なm O Sを有することを示す。

10

【 0 4 5 8 】

バビツキシマブおよびドセタキセル、またはドセタキセル単独のいずれかによる治療の後、患者の約15%(597人中93人)が、免疫チェックポイント阻害剤(I C I)を使用する後続免疫腫(I O)療法(S A C T - I O)の形態で後続抗癌療法(S A C T)を受けた。これらの93人の患者は、治療群間で等しく均衡が取れており、46人の患者がバビツキシマブおよびドセタキセルによる前治療を受け、47人の患者がドセタキセル単独による前治療を受けた。

20

【 0 4 5 9 】

驚くべきことに、後続I Oで治療した場合、プラセボとは対照的に、バビツキシマブでの前治療を受ける患者では、m O Sの劇的な増加が存在することが決定された(図26)。特に、後続I Oを受ける患者について、バビツキシマブおよびドセタキセル群では依然としてm O Sには到達していない(95%のC I、15.2~該当せず)一方で、ドセタキセル単独群では12.6ヶ月(95%のC I、10.4~17.8) ; H R = 0.46およびp = 0.006であった(図26、表16)。後続I Oを受けなかった患者では、m O Sは、バビツキシマブおよびドセタキセル群で9.2ヶ月、ならびにドセタキセル単独群で10.2ヶ月 ; H R = 1.16およびp = 0.172であった。

30

【表20】

表16

後続免疫療法との併用でのバビツキシマブの生存利益

治療群	パラメータ	バビツキシマブ+ドセタキセルn=46	プラセボ+ドセタキセルn=47
後続I O	月数中央値(95%のCI)	該当せず~未到達(15.2~該当せず)	12.6(10.4~17.8)
	HR(95%のCI)	0.46(0.24~0.79)	
	P値	0.006	
後続I Oなし	月数中央値(95%のCI)	9.2(7.2~11.0)	10.2(8.9~11.9)
	HR(95%のCI)	1.16(0.94~1.42)	
	P値	0.172	

40

【 0 4 6 0 】

後続I O群において、「第1の後続I O」の特定の免疫療法剤もまた特定した。バビツ

50

キシマブ（およびドセタキセル）ならびに後続ＩＯで治療した４６人の患者において、免疫療法剤を表１７に示し、それらは全て、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、またはＰＤ－Ｌ１に結合する遮断抗体の形態のチェックポイント阻害剤抗体（免疫チェックポイント阻害剤）である。特に、使用した遮断抗体は、ＣＴＬＡ－４に結合する遮断抗体であるトレメリムマブ、ＰＤ－１に結合する遮断抗体であるニボルマブ、およびＰＤ－Ｌ１に結合する遮断抗体であるデュルバルマブ（ＭＥＤＩ４７３６）であった。要約すると、４６人中４２人のバビツキシマブ患者は後続してニボルマブを受け、２人はデュルバルマブ単独療法を受け、２人はトレメリムマブ＋デュルバルマブを受けた（表１７）。

【表２１】

表１７

バビツキシマブおよび後続免疫療法剤

バビツキシマブ（＋ドセタキセル）	後続ＩＯ	患者数
	デュルバルマブ(MEDI4736)	４
	ニボルマブ(Opdivo(登録商標))	４１
	トレメリムマブ	２
	ニボルマブ＋ＩＬ－１０	１

【０４６１】

４人の患者が２回以上のＩＯ剤を受けたこと、すなわち、彼らの「第１の後続ＩＯ」療法自体が「ＩＯ併用」、すなわち、第１および第２のチェックポイント阻害剤抗体であったことに留意されたい。したがって、「ＩＴＴ」（治療意図）分析では、バビツキシマブで治療した４６人の患者が第１の後続ＩＯを受けたが、表１７では４８の後続ＩＯ剤が存在する。これは、２人の患者が「ＩＯダブルット」を受けたためである。全体として、４人の患者が２回以上の後続ＩＯを受け、これらの各々がＭＥＤＩ４７３６（デュルバルマブ）およびトレメリムマブのダブルットを受けた。これら４人の対象のうち、２人はバビツキシマブ群であり、２人はプラセボ群であった。

【０４６２】

後続ＩＯを受ける９３人の患者において、ドセタキセル単独（プラセボ）の治療歴のある患者もまた、トレメリムマブ、ニボルマブ、またはデュルバルマブ（ＭＥＤＩ４７３６）を受けた。加えて、プラセボ群の２人の患者がペンブロリズマブ（以前のＭＫ－３４７５）を受け、プラセボ群の１人の患者がＲＥＧＮ２８１０を受け、これらはどちらもＰＤ－１に結合する遮断抗体である。全体として、プラセボ群の４７人の患者における第１の後続ＩＯは、トレメリムマブ（３人）、ニボルマブ（４０人）、デュルバルマブ（３人）、ペンブロリズマブ（２人）、およびＲＥＧＮ２８１０（１人）であり、これは４７人の患者において合計４９の薬剤であり、２人の患者がデュルバルマブ（ＭＥＤＩ４７３６）－トレメリムマブのＩＯダブルットを受けた。すなわち、対照群の４７人中４０人の患者が後続してニボルマブを受け、１人がデュルバルマブ単独療法を受け、１人がトレメリムマブ単独療法を受け、２人がトレメリムマブ＋デュルバルマブを受け、２人がペンブロリズマブを受け、１人がＲＥＧＮ２８１０を受けた。

【０４６３】

図２６は、無作為化からの時間に関して、後続ＩＯ前のバビツキシマブによる初期治療の生存利益を示す。後続ＩＯ前の初期バビツキシマブ治療の生存利益は、第１の後続ＩＯ治療からの時間として測定したときにさらに顕著である。この文脈において、後続ＩＯを受ける患者について、バビツキシマブおよびドセタキセル群（９５％のＣＩ、１０．２～該当せず）ではｍＯＳには依然として到達していない一方で、ドセタキセル単独群ではわずか６．２ヶ月（９５％のＣＩ、３．９～８．７）；ＨＲ＝０．４２およびｐ＝０．００２であった。

【０４６４】

10

20

30

40

50

結論として、本実施例のデータは初めて、バビツキシマブがヒト患者において免疫療法剤の活性を増強することを示している。したがって、これらの結果は、免疫療法剤、特に免疫チェックポイント阻害剤との併用でのバビツキシマブによる癌患者の進行中および将来の治療を強く支持する。

【0465】

実施例XX

バビツキシマブおよび後続免疫療法の 2GPI バイオマーカ分析

実施例XIXに示されるように、バビツキシマブ(+ドセタキセル)および後続IOで治療した患者は、ドセタキセル単独および後続IOで治療した患者よりも著しく良好なmOSを有する。本実施例は、バビツキシマブバイオマーカとしての機能性 2GPIの使用をさらに確認し、これは、同じレベルの機能性 2GPIが免疫療法との併用でのバビツキシマブによる治療の成功とも相関することを示す。

10

【0466】

実施例XVIのアッセイを使用すると、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の機能性 2GPIレベルは、第III相試験を含むバビツキシマブ治療の成功と相関することが示される(実施例XVII)。 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上($200\mu\text{g}/\text{ml}$)の機能性 2GPIの治療前レベルであるものと同じ「高 2GPI」のカットオフに基づいて、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の 2GPIは、バビツキシマブおよび後続IOで治療した患者では全生存期間の増加と相関するが、後続IOを受けた対照患者では相関しないことを再度決定した。

20

【0467】

特に、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の機能性 2GPIを有する患者について、バビツキシマブおよび後続IOで治療した患者ではmOSには未だ到達していない一方で、ドセタキセルおよび後続IOで治療した患者ではmOSは12.3ヶ月(10.2~17.6)であった(図27、 $p=0.002$)。実施例XVIIのデータによって予測されるように、後続IOなしの患者では、対照(9.2ヶ月)と比較して、バビツキシマブで治療した患者(10.5ヶ月)において $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の 2GPIは依然として全生存期間の増加と共に増加する傾向があったが、曲線の分離は、後続IO患者について観察されたほどは顕著ではない(図27)。バビツキシマブ治療とは対照的に、後続IOありの患者および後続IOなしの患者の両方について、対照群の患者では、2GPIが $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満であるときに生存期間がより長くなる傾向がある。2GPIが $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満である群のデータの詳細な分析は、2GPIが $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満である群においてバビツキシマブ($n=12$)およびプラセボ($n=19$)ならびに後続IOで治療した患者が比較的少数であることによって妨害される。

30

【0468】

したがって、これらの臨床データは、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の機能性 2GPIが、免疫療法との併用での、特にトレメリムマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、デュルバルマブ、およびアテゾリズマブなどの免疫チェックポイント阻害剤との併用での、バビツキシマブによる治療の成功のバイオマーカであることを示す。

* * *

【0469】

本明細書に開示および主張される組成物および方法の全ては、本開示を考慮して、過度の実験をすることなく作製および実行することができる。本発明の組成物および方法を、好ましい実施形態に関して説明してきたが、本発明の概念、趣旨、および範囲から逸脱することなく、本組成物および方法、ならびに本明細書に記載の方法のステップまたはステップの順序に変更を適用することができることは、当業者に明らかだろう。より具体的には、同じまたは類似の結果を達成しながら、化学的にも生理学的にも関連する特定の薬剤が本明細書に記載の薬剤に取って代わってもよいことは明らかだろう。当業者に明らかであるそのような類似の代替および変更は全て、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の趣旨、範囲、および概念の範囲内にあると見なされる。

40

【0470】

50

参考文献

- The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details supplementary to those set forth herein, are referenced.
- Agostinis et al., "In vivo distribution of 2 GPI under pathophysiologic conditions", *Blood*, 118(15):4231-4238, 2011.
- An et al., "Exosomes serve as tumour markers for personalized diagnostics owing to their important role in cancer metastasis", *J. Extracell. Vesicles*, 4:27522, 2015; <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v4.27522>.
- Balasubramanian et al., "Estimation of plasma beta-2-glycoprotein levels by competitive ELISA", *Thromb. Res.*, 92:91-97, 1998.
- Beck et al., "Combination of a monoclonal anti-phosphatidylserine antibody with gemcitabine strongly inhibits the growth and metastasis of orthotopic pancreatic tumors in mice", *Int. J. Cancer*, 118:2639-2643, 2006.
- Best, "Viruses play dead to TAME interferon responses", *Cell Host & Microbe*, 14(2):117-8, 2013.
- Bervers, Zwaal, Willems, "The effect of phospholipids on the formation of immune complexes between autoantibodies and 2-glycoprotein I or prothrombin", *Clin. Immunol.*, 112:150-160, 2004.
- Bervers et al., "Quantitative determination of the binding of 2-glycoprotein I and prothrombin to phosphatidylserine-exposing blood platelets", *Biochem. J.*, 386:271-279, 2005.
- Bhattacharyya et al., "Enveloped viruses disable innate immune responses in dendritic cells by direct activation of TAM receptors", *Cell Host & Microbe*, 14(2):136-147, 2013.
- Birge et al., "Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer", *Cell Death Differ.*, 23(6):962-78, 2016.
- Brahmer et al., "Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer", *N. Engl. J. Med.*, 373(2):123-135, 2015.
- Chalasani et al., "A Phase I Clinical Trial of Baviximab and Paclitaxel in Pati

- ents with HER2 Negative Metastatic Breast Cancer", *Cancer Medicine*, 4 (7): 1051 - 1059, 2015.
- Chen et al., "Phosphatidylserine Vesicles Enable Efficient En Bloc Transmission of Enteroviruses", *Cell*, 160: 619 - 630, 2015.
- Cheng et al., "Antibody-Mediated Blockade of Phosphatidylserine Enhances the Antitumor Effect of Sorafenib in Hepatocellular Carcinomas Xenografts", *Ann. Surg. Oncol.*, 5107 - 5, DOI 10.1245/s10434-016-5107-5, 2016. 10
- Clayson et al., "Release of Simian Virus 40 Virions from Epithelial Cells is Polarized and Occurs without Cell Lysis", *J. Virology*, 63 (5): 2278 - 2288, 1989.
- Czuczman et al., "Listeria monocytogenes exploits efferocytosis to promote cell-to-cell spread", *Nature*, 509: 230 - 234, 2014.
- DaMatta et al., "Trypanosoma cruzi exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism", *FEMS Microbiol. Lett.*, 266: 29 - 33, 2007. 20
- de Laat, Derksen, Urbanus, de Groot, "IgG antibodies that recognize epitope Gly 40 - Arg 43 in domain I of α_2 -glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis", *Blood*, 105 (4): 1540 - 5, 2005.
- de Laat, Derksen, van Lummel, Pennings, de Groot, "Pathogenic anti- α_2 -glycoprotein I antibodies recognize domain I of α_2 -glycoprotein I only after a conformational change", *Blood*, 107 (5): 1916 - 24, 2006. 30
- DeRose et al., "Development of bavituximab, a vascular targeting agent with immune-modulating properties, for lung cancer treatment", *Immunotherapy*, 3 (8): 933 - 944, 2011.
- Digumarti et al., "Bavituximab Plus Paclitaxel and Carboplatin for the Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer", *Lung Cancer*, 86: 231 - 236, 2014. 40
- Eda & Sherman, "Cytoadherence of Malaria-Infected Red Blood Cells Involves Exposure of Phosphatidylserine", *Cell Physiol. Biochem.*, 12: 373 - 384, 2002.
- Fehrenbacher et al., "Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLA 50

- R) : a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial", *The Lancet*, 387 (10030) : 1837 - 1846, 2016.
- Francis et al., "Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 is a leukocidin causing Ca²⁺ influx, necrosis and neutrophil extracellular trap formation", *Cell Death and Disease*, 5 : e1474; doi:10.1038/cddis.2014.394, 2014.
- Freimark et al., "Antibody-Mediated Phosphatidylserine Blockade Enhances the Antitumor Responses to CTLA-4 and PD-1 Antibodies in Melanoma", *Cancer Immunol. Res.*, 4 (6) : 531 - 40, 2016. 10
- Galli et al., "Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor", *Lancet*, 335 (8705) : 1544 - 1547, 1990.
- Garon et al., "Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer", *N. Engl. J. Med.*, 372 (21) : 2018 - 2028, 2015. 20
- Gerber et al., "Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of Baviximab, a Chimeric Phosphatidylserine-Targeting Monoclonal Antibody, in Patients with Advanced Solid Tumors", *Clin. Cancer Res.*, 17 (21) : 1 - 9, 2011.
- Gerber et al., "Docetaxel Combined with Baviximab in Previously Treated, Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer", *Clinical Lung Cancer*, 17 (3) : 169 - 176, 2016. 30
- Gong et al., "Measuring Response to Therapy by Near-Infrared Imaging of Tumors Using a Phosphatidylserine-Targeting Antibody Fragment", *Molecular Imaging*, 12 (4) : 244 - 256, 2013.
- Goth & Stephens, "Rapid, Transient Phosphatidylserine Externalization Induced in Host Cells by Infection with Chlamydia spp", *Infect. Immun.*, 69 (2) : 1109 - 1119, 2001. 40
- Gray et al., "Phosphatidylserine-targeting antibodies augment the anti-tumorigenic activity of anti-PD-1 therapy by enhancing immune activation and downregulating pro-oncogenic factors induced by T-cell checkpoint inhibition in murine triple-negative breast cancers", *Breast Cancer Research*, 18 (1) : 50, DOI 10.1186/s13058-016-0708-2, 2016a. 50

Gray et al., "LAG3 is an immunotherapeutic target in murine triple negative breast cancers whose activity is significantly enhanced in combination with phosphatidylserine targeting antibodies", Poster B019, CRI-CIMT-EATI-AACR International Cancer Immunotherapy Conference, New York, NY, September 25-28, 2016b.

Gregorc et al., "Predictive value of a proteomic signature in patients with non-small-cell lung cancer treated with second-line erlotinib or chemotherapy (PROSE): a biomarker-stratified, randomised phase 3 trial", *Lancet Oncology*, 15(7): 713-721, 2014.

Hagele et al., "Legionella pneumophila kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death", *FEMS Microbiol. Lett.*, 169(1): 51-58, 1998.

He et al., "Radiation-enhanced vascular targeting of human lung cancers in mice with a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids", *Clin. Cancer Res.*, 13(17): 5211-5218, 2007.

He et al., "Antiphosphatidylserine antibody combined with irradiation damages tumor blood vessels and induces tumor immunity in a rat model of glioblastoma", *Clin. Cancer Res.*, 15(22): 6871-80, 2009.

Hogg et al., "Retargeting Adenoviral Vectors to Improve Gene Transfer into Tumors", *Cancer Gene Therapy*, 18: 275-287, 2011.

Hotchkiss et al., "Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center", *Mol. Cancer Ther.*, 1(13): 1191-200, 2002.

Huang, Bennett, Thorpe, "A monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on tumor blood vessels enhances the antitumor effect of docetaxel on human breast tumors in mice", *Cancer Res.*, 65(10): 4408-4416, 2005.

Hunt, Simpson, Krilis, "Identification of a region of α_2 -glycoprotein I critical for lipid-binding and anticardiolipin antibody cofactor activity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2141-2145, 1993.

10

20

30

40

50

- Hunt and Krilis, "The fifth domain of α_2 -glycoprotein I contains a phospholipid-binding site (Cys 281 - Cys 288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies", *J. Immunol.*, 152: 653 - 659, 1994.
- Ioannou et al., "Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human α_2 -glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43", *Arthritis Rheum.*, 56(1): 280 - 90, 2007. 10
- Izquierdo-Useros et al., "HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse?", *PLoS Pathog*, 6(3): e1000740, 2010.
- Jennewein et al., "Vascular Imaging of Solid Tumors in Rats with a Radioactive Arsenic-Labeled Antibody that Binds Exposed Phosphatidylserine", *Clin. Cancer Res.*, 14(5): 1377 - 1385, 2008. 20
- Jemielity et al., "TIM-Family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-Associated Phosphatidylserine", *PLoS Pathogens*, 9(3): e1003232; 2013.
- Judy et al., "Vascular Endothelial-Targeted Therapy Combined with Cytotoxic Chemotherapy Induces Inflammatory Intratumoral Infiltrates and Inhibits Tumor Relapse after Surgery", *Neoplasia*, 14: 352 - 359, 2012. 30
- Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest" 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, pp 647 - 669 in particular.
- Kamboh et al., "Genetic Studies of Human Apolipoproteins. IV. Structural Heterogeneity of Apolipoprotein H (α_2 -Glycoprotein I)", *Am. J. Hum. Genet.*, 42: 452 - 457, 1988. 40
- Kennedy et al., "Attenuating a sickle cell crisis with annexin V", *Medical Hypotheses*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2015.01.037>, 2015.
- Klein & Moeschberger, "Survival Analysis. Techniques for censored and truncated data", 2nd Edition, New York, 2003 (ISBN - 10: 038795399X; ISBN - 13: 978 - 0387953991).
- Kogure et al., "Temporary membrane distortion of vascular smooth muscle cells is 50

responsible for their apoptosis induced by platelet-activating factor-like oxidized phospholipids and their degradation product, lysophosphatidylcholine", Chemistry and Physics of Lipids, 126:29-38, 2003. Larson et al., "Customization, Scale-Up and Qualification of an Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC) Bioassay", IBC's 23rd International Intensive Symposium Development, Validation and Maintenance of Biological Assays Conference, Seattle, Washington, May 14-16, 2013; Poster Board #7.

Li et al., "Phosphatidylserine (PS) is Exposed in Choroidal Neovascular Endothelium: PS-Targeting Antibodies Inhibit Choroidal Angiogenesis In vivo and Ex Vivo", Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 56:7137-7145, 2015.

Liang et al., "Targeting Mutant P53 Protein and the Tumor Vasculature: An Effective Combination Therapy for Advanced Breast Tumors", Breast Cancer Res. Treat., 125:407-420, 2011.

Lonsdale et al., "Phosphatidylserine as a Therapeutic Target for the treatment of Francisella tularensis and Yersinia pestis infections", Chemical & Biological Defense Science & Technology Conference, 2011 Las Vegas, NV Abstract W15-048.

Luster et al., "Plasma Protein α_2 -glycoprotein 1 Mediates Interaction between the Anti-tumor Monoclonal Antibody 3G4 and Anionic Phospholipids on Endothelial Cells", J. Biol. Chem., 281(40):29863-29871, 2006.

Mallat et al., "Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in Human Atherosclerotic Plaques", Circulation, 99:348-353, 1999.

Marconescu & Thorpe, "Coincident Exposure of Phosphatidylethanolamine and Anionic Phospholipids on the Surface of Irradiated Cells", Biochimica et Biophysica Acta, 1778(10):2217-2224, 2008.

McNeil, Simpson, Chesterman, Krilis, "Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: α_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H)", Proc. N

10

20

30

40

50

- atl. Acad. Sci. USA, 87(11):4120-4124, 1990.
- Meckes et al., "Human tumor virus utilize s exosomes for intercellular communicati on", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107(47):20370 - 20375, 2010.
- Meckes and Raab-Traub, "Microvesicles and Viral Infection", J. Virology, 85(24):12844 - 12854, 2011.
- Mehdi et al., "Genetic variation in the a polipoprotein H(2-glycoprotein I) gene affects plasma apolipoprotein H concentr ations", Hum. Genet., 105:6371, 1999. 10
- Meertens et al., "The TIM and TAM familie s of phosphatidylserine receptors mediat e dengue virus entry", Cell Host & Microb e, 12(4):544-557, 2012.
- Mercer and Helenius, "Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells", Science, 320:531-535 , 2008. 20
- Miyakis et al., " 2-glycoprotein I - func tion in health and disease", Thromb. Res., 114:335-346, 2004.
- Moller-Tank & Maury, "Phosphatidylserine receptors: Enhancers of enveloped virus e ntry and infection", Virology, 468-470(2014) 565-580, 2014.
- Moody et al., "Anti-phospholipid human mo noclonal antibodies inhibit CCR5-tropic HIV-1 and induce -chemokines", J. Exp. Med ., 207(4):763-776, 2010. 30
- Morizono et al., "The soluble serum prote in Gas6 bridges virion envelope phosphat idylserine C254 to the TAM receptor tyro sine kinase Axl to mediate viral entry", Cell Host Microbe, 9:286-298. 2011.
- Murata-Kamiya et al., "Helicobacter pylor i Exploits Host Membrane Phosphatidylser ine for Delivery, Localization, and Pathop hysiological Action of the CagA Oncoprot ein", Cell Host Microbe, 7:399-411, 2010. 40
- Palmero et al., "Final Clinical Results f rom SUNRISE: A Phase III, Randomized, Doubl e-Blind, Placebo-Controlled Multicenter T rial of Bavituximab Plus Docetaxel in Pa tients with Previously Treated Stage III b/IV Nonsquamous Non-Small Cell Lung Can cer", Annals Oncol., 28(Suppl. 5):487, Abstr act 1364P, 2017.
- Pattanapanyasat et al., "Febrile temperat 50

- ure but not proinflammatory cytokines promotes phosphatidylserine expression on Plasmodium falciparum malaria-infected red blood cells during parasite maturation", Cytometry, Part A, 77A: 515 - 523, 2010.
- Petersen & Krogfelt, "Helicobacter pylori: an invading microorganism? A review", FEMS Immunol. Med. Microbiol., 36: 117 - 126, 2003.
- Polz, Wurm, Kostner, "Investigations on 2-glycoprotein-I in the rat - isolation from serum and demonstration in lipoprotein density fractions", Int. J. Biochem., 11: 265 - 270, 1980. 10
- Prakasam and Thiagarajan, "2-Glycoprotein I - A Protein in Search of Function", In Antiphospholipid Syndrome, Ed. Alena Bulikova, ISBN: 978-953-51-0526-8, Intech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/antiphospholipid-syndrome/beta2-glycoprotein-i-in-search-of-function>, 2012. 20
- Ran et al., "Antitumor effects of a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels in mice", Clin. Cancer Res., 11: 1551 - 1562, 2005.
- Sabatier et al., "Type 1 And Type 2 Diabetic Patients Display Different Patterns of Cellular Microparticles", Diabetes, 51: 2840 - 2845, 2002. 30
- Saha et al., "An Orthotopic Lung Tumor Model for Image-Guided Microirradiation in Rats", Radiat. Res., 174: 62 - 71, 2010.
- Schubert-Unkmeir et al., "Gene Expression Pattern in Human Brain Endothelial Cells in Response to Neisseria meningitidis", Infect. Immun., 75(2): 899 - 914, 2007.
- Seabra et al., "Toxoplasma gondii exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion", Biochem. Biophys. Res. Comm., 324(2): 744 - 752, 2004. 40
- Sheng et al., "Impaired Thrombin Generation in 2-Glycoprotein I Null Mice", J. Biol. Chem., 276(17): 13817 - 13821, 2011.
- Sims et al., "Neural stem cell-derived exosomes mediate viral entry", Int. J. Nanomedicine, 9: 4893 - 4897, 2014.
- Soares et al., "Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy 50

for viral diseases", *Nature Medicine*, 14 (12): 1357 - 1362, 2008.

Souza et al., "Microparticles: markers and mediators of sepsis-induced microvascular dysfunction, immunosuppression, and AKI", *Kidney Int.*, doi: 10.1038/ki.2015.26, 2015.

Stafford & Thorpe, "Increased Exposure of Phosphatidylethanolamine on the Surface of Tumor Vascular Endothelium", *Neoplasia*, 13: 299 - 308, 2011.

Stafford et al., "Highly Specific PET Imaging of Prostate Tumors in Mice with an Iodine-124-Labeled Antibody Fragment that Targets Phosphatidylserine", *PLOS ONE*, 8 (12): e84864, 2013.

Steinkasserer et al., "Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human 2-glycoprotein I", *Biochem. J.*, 277: 387 - 391, 1991.

Takeuchi et al., "Coagulation and fibrinolytic activities in 2 siblings with 2-glycoprotein I deficiency", *Blood*, 96: 1594 - 1595, 2000.

米国特許出願第US 2016/0009805号。

米国特許第5,019,368号

米国特許第5,882,626号

米国特許第7,247,303号

米国特許第7,422,738号

米国特許第7,455,833号

米国特許第7,572,448号

米国特許第7,611,704号

米国特許第7,790,860号

米国特許第7,906,115号

米国特許第8,486,391号

米国特許第8,956,616号

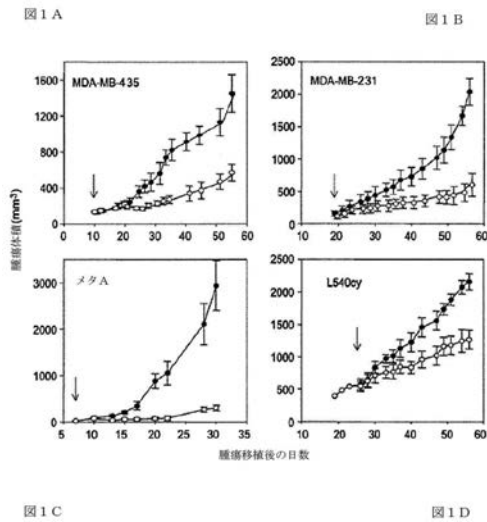
van der Kleij et al., "A Novel Host-Parasite Lipid Cross-talk: schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization", *J. Biol. Chem.*, 277(50): 48122 - 48129, 2002.

Walker et al., "Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing antigenic exosomes" ' *J. Immunol.*, 182(3): 1548 - 1559, 2009.

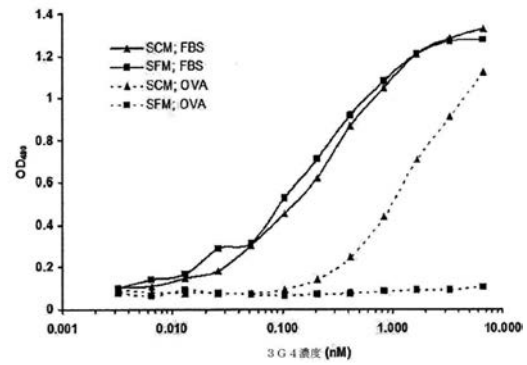
Wanderley et al., "Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of leishmaniasis", *PLOS One*, 4(5): e5733, 2009.

- Wanderley et al., "Phosphatidylserine exposure on the surface of *Leishmania amazonensis* amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function", *Parasite Immunology*, 35:109-119, 2013.
- Wandler et al., "A Greasy Foothold for *Helicobacter pylori*", *Cell Host Microbe*, 7:338-339, 2010.
- Weihua et al., "Apoptotic Cells Initiate Endothelial Cell Sprouting via Electrostatic Signaling", *Cancer Res.*, 65(24):11529-11535, 2005. 10
- Willems, Janssen, Pelsers et al., "Role of divalency in the high-affinity binding of anticardiolipin antibody-2-glycoprotein I complexes to lipid membranes", *Biochemistry*, 35:13833-13842, 1996.
- Wurm, "2-glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles", *Int. J. Biochem.*, 16:511-15, 1984. 20
- Yin et al., "Phosphatidylserine-targeting antibody induces M1 macrophage polarization and promotes myeloid-derived suppressor cell differentiation", *Cancer Immunol. Res.*, 1(4):256-268, 2013.
- Yuyama et al., "Sphingolipid-modulated Exosome Secretion Promotes Clearance of Amyloid- β by Microglia", *J. Biol. Chem.*, 287(14):10977-10989, 2012.
- Zandbergen et al., "Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 103(37):13837-13842, 2006. 30
- Zhang et al., "Phosphatidylserine-Targeted Bimodal Liposomal Nanoparticles for in vivo Imaging of Breast Cancer in Mice", *J. Control. Release*, 183:114-123, 2014.
- Zhao et al., "Near-Infrared Optical Imaging of Exposed Phosphatidylserine in a Mouse Glioma Model", *Translational Oncology*, 4:355-364, 2011. 40
- Zhou et al., "Phosphatidylserine-Targeted Molecular Imaging of Tumor Vasculature by Magnetic Resonance Imaging", *J. Biomed. Nanotechnol.*, 10:1-10, 2014.

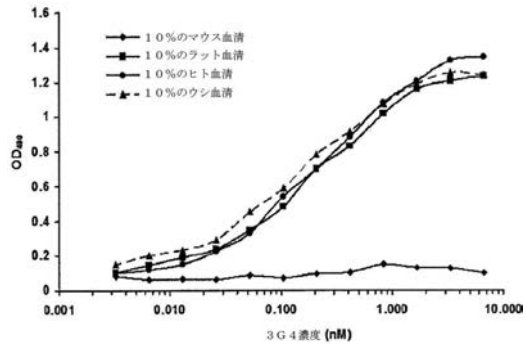
【 図 1 】



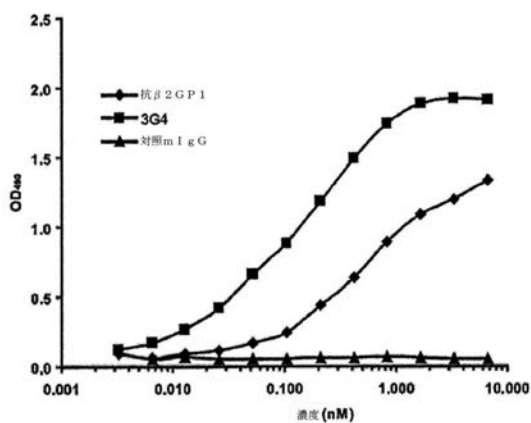
【 図 2 A 】



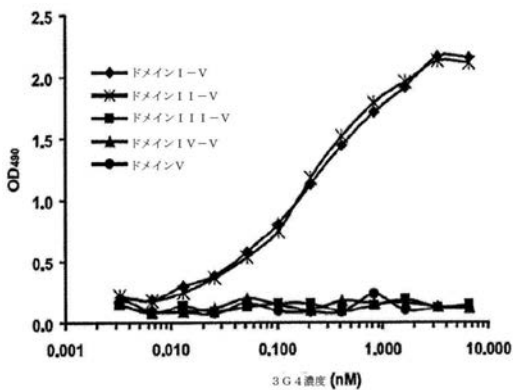
【 図 2 B 】



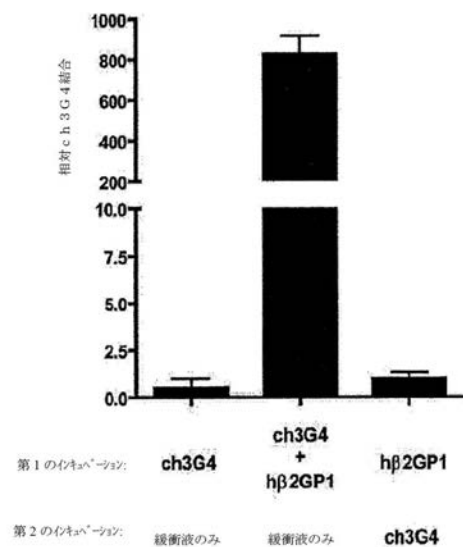
【 図 3 】



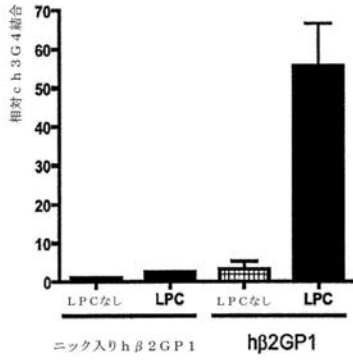
【 図 4 】



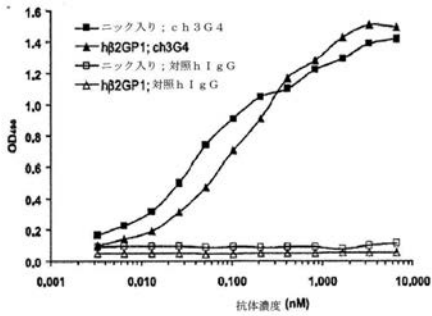
【 図 5 】



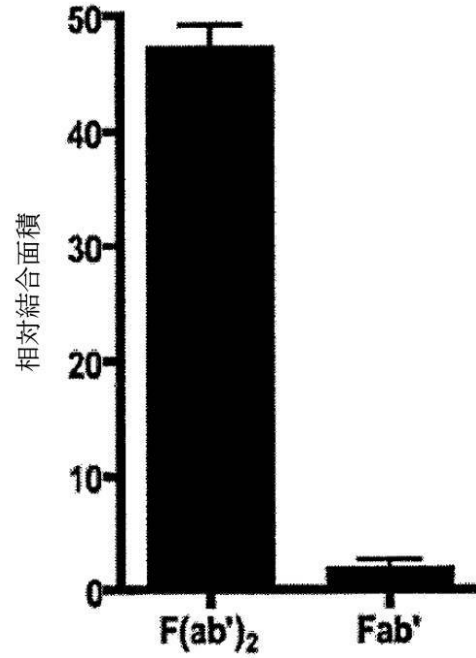
【図 6 A】



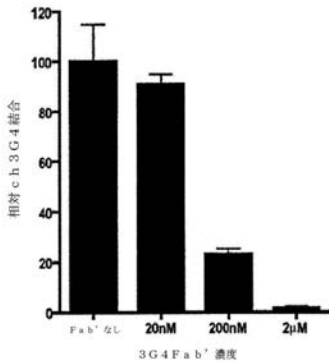
【図 6 B】



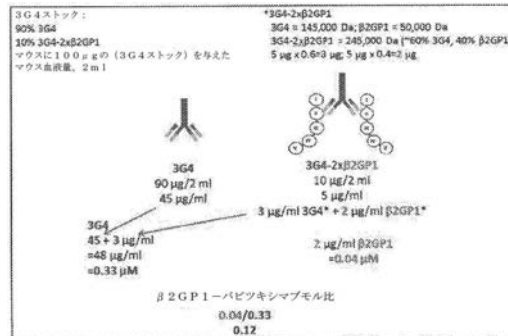
【図 7 A】



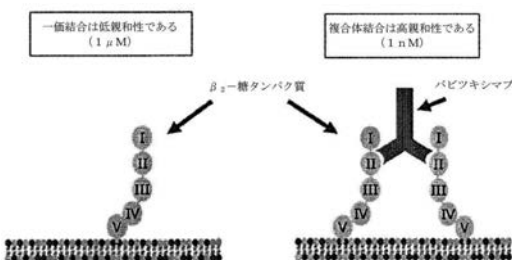
【図 7 B】



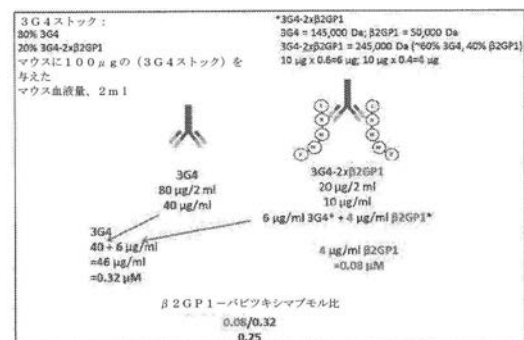
【図 9 A】



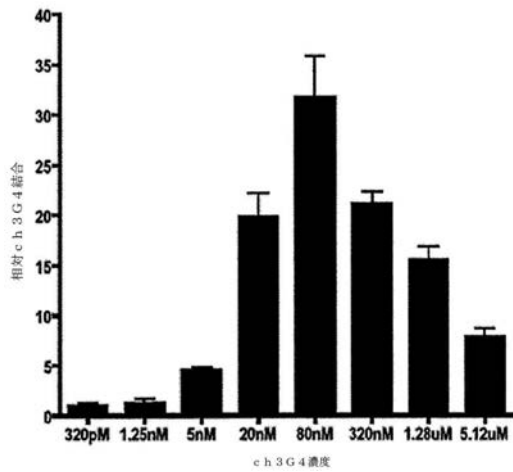
【図 8】



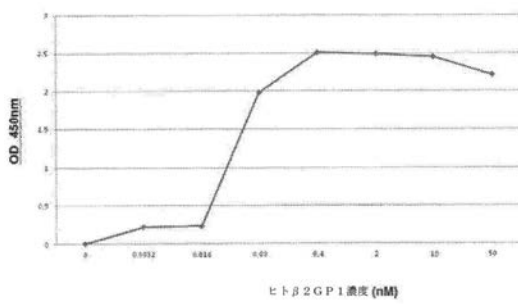
【図 9 B】



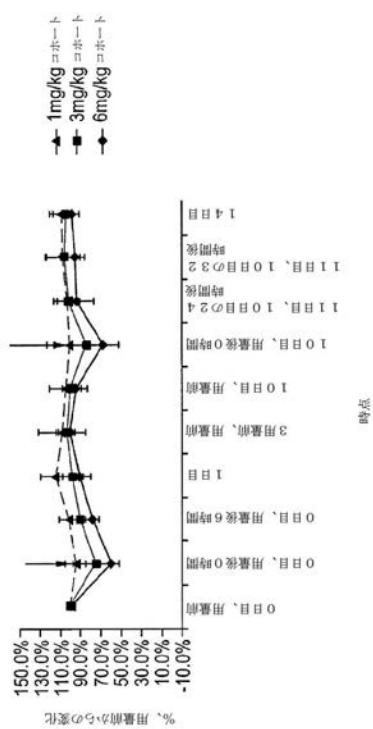
【図 10】



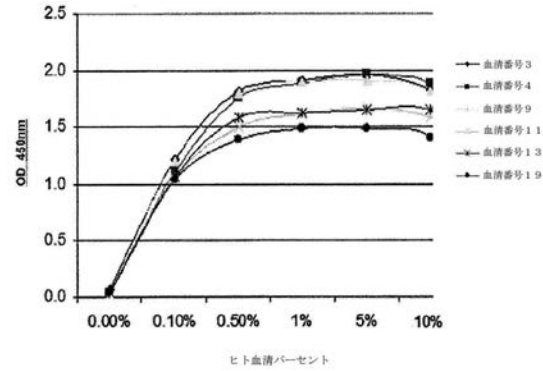
【図 11】



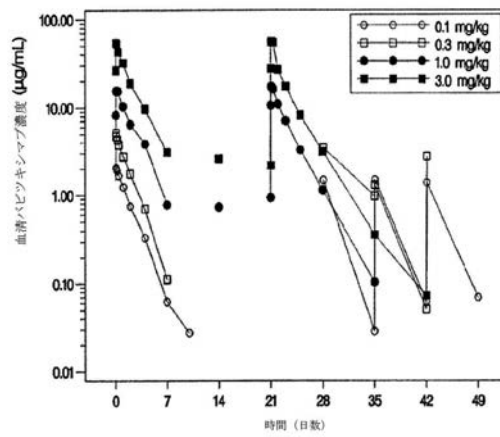
【図 14】



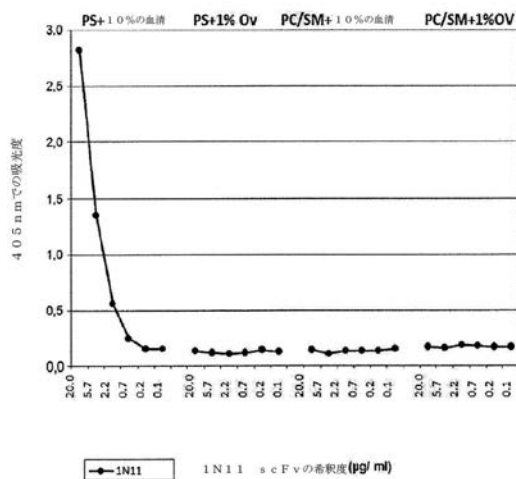
【図 12】



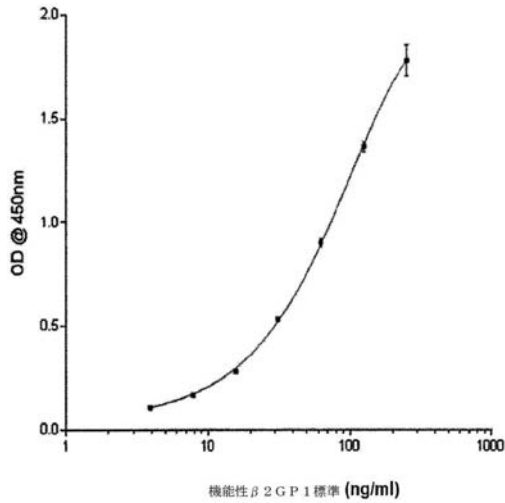
【図 13】



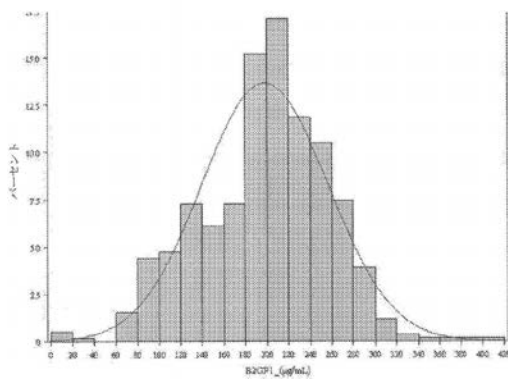
【図 15】



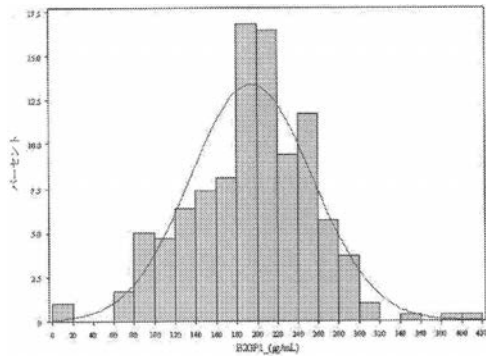
【図 16】



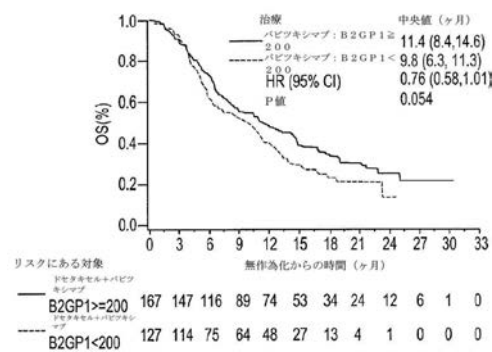
【図 17 A】



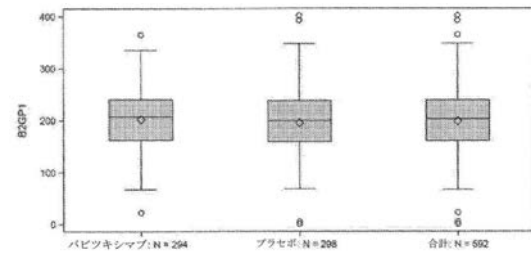
【図 17 D】



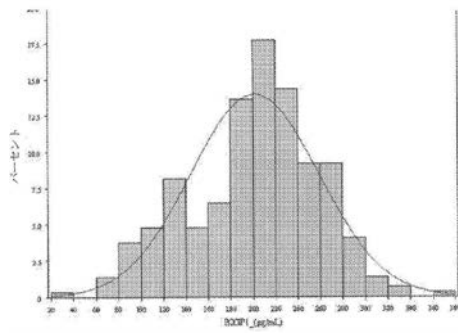
【図 18 A】



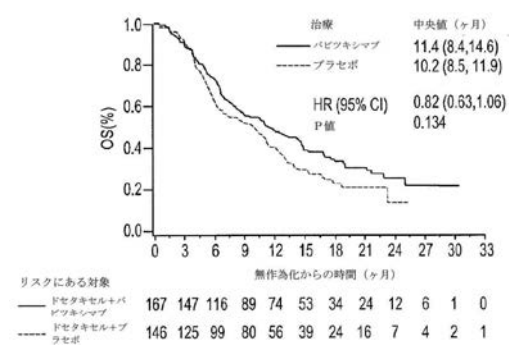
【図 17 B】



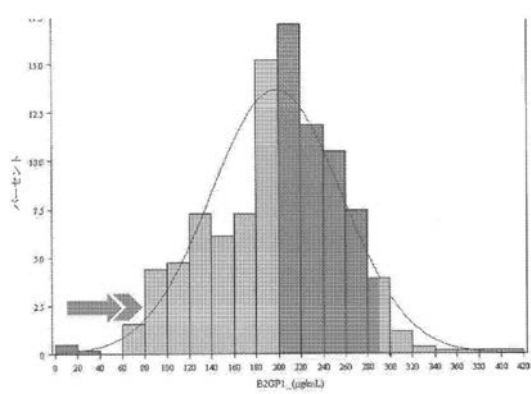
【図 17 C】



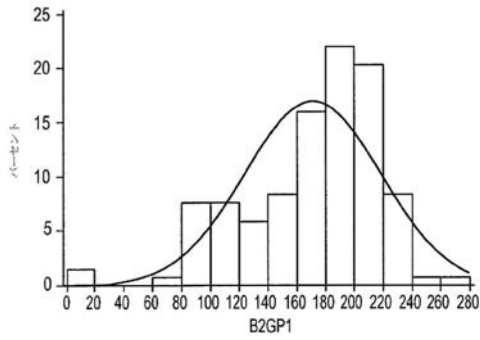
【図 18 B】



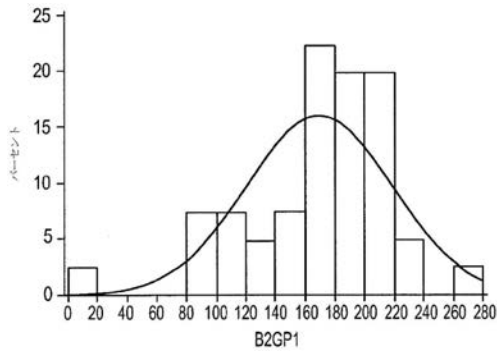
【図 19】



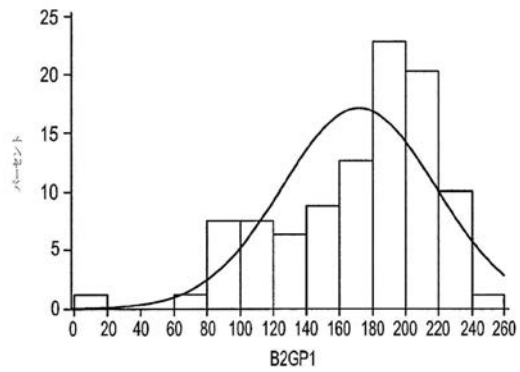
【図 20 A】



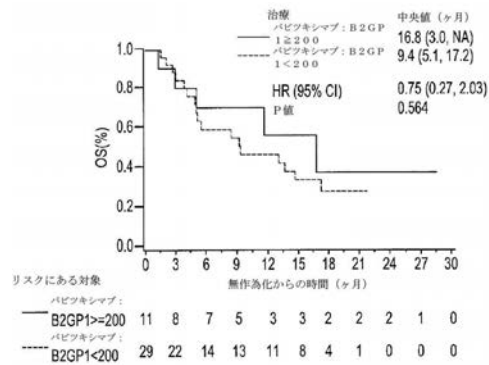
【図 20 B】



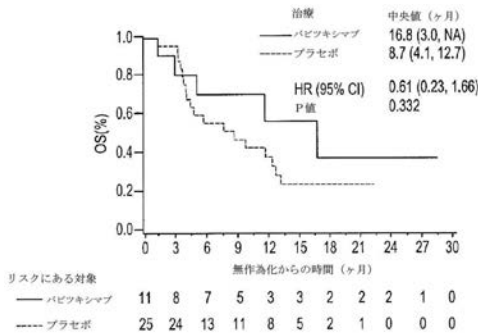
【図 20 C】



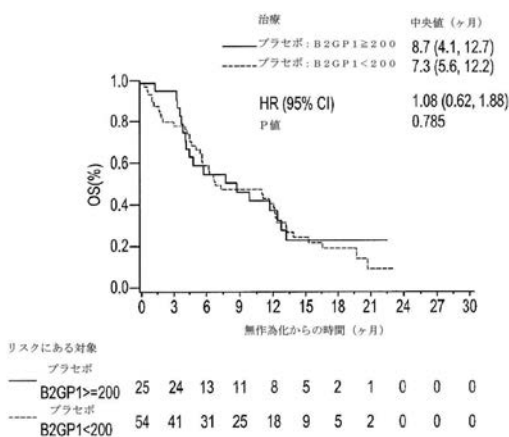
【図 21 A】



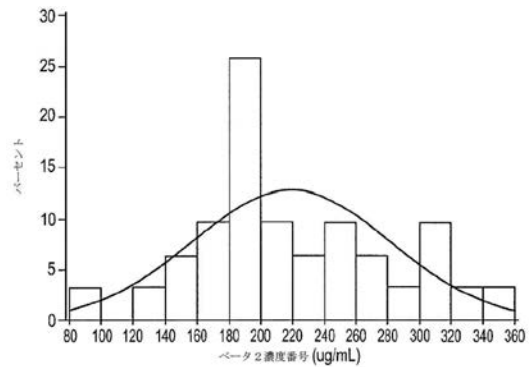
【図 21 B】



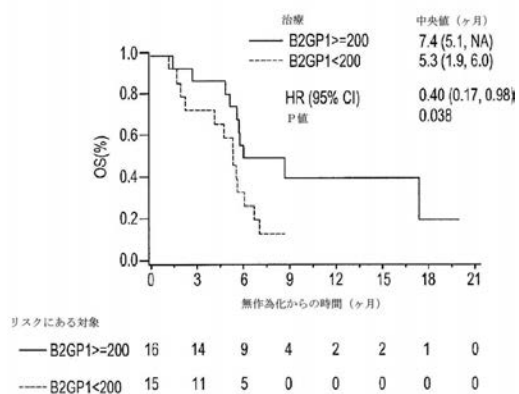
【図 21 C】



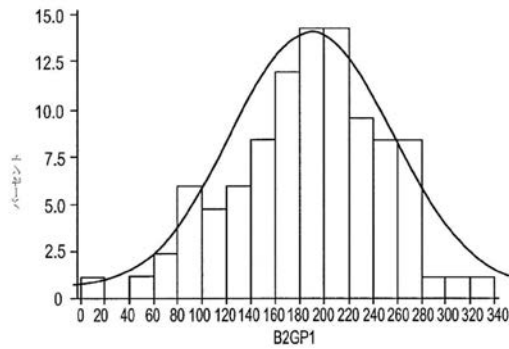
【図 22】



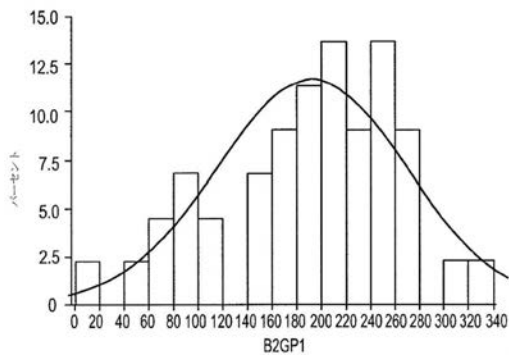
【図 23】



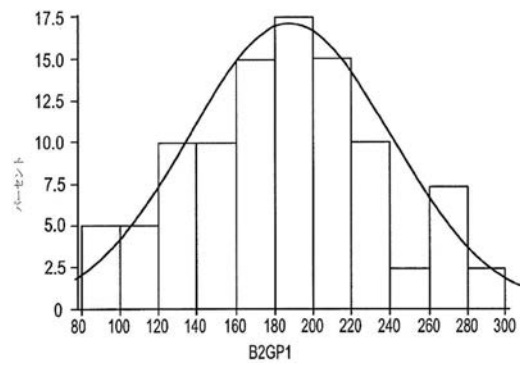
【図 2 4 A】



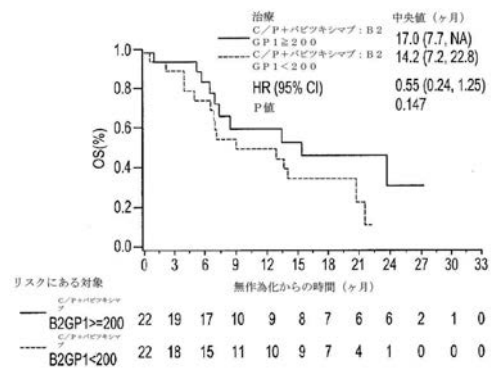
【図 2 4 B】



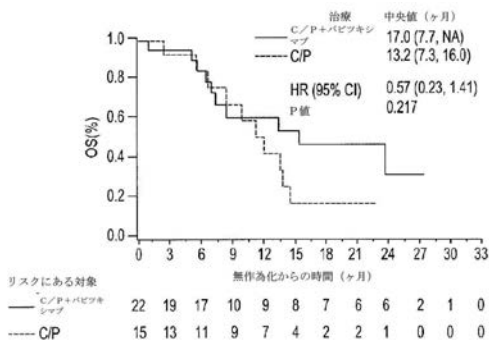
【図 2 4 C】



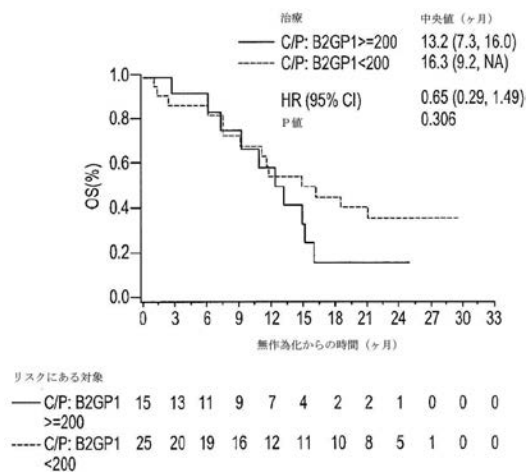
【図 2 5 A】



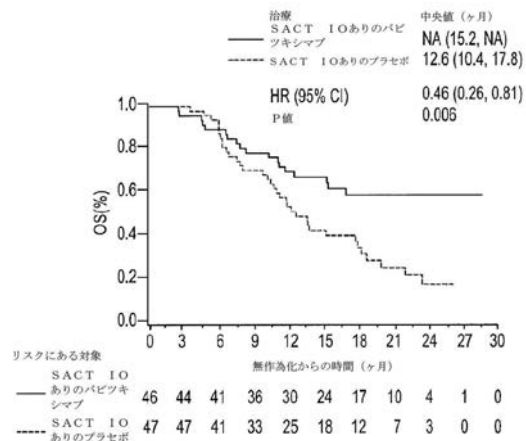
【図 2 5 B】



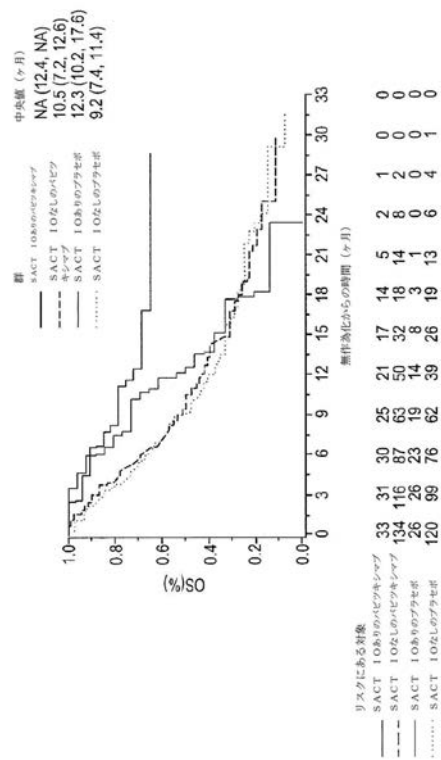
【図 2 5 C】



【図 2 6】



【図 27】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/053370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/574 C07K16/28 G01N33/92
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N C07K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MICHAEL J. GRAY ET AL: "Phosphatidylserine-targeting antibodies augment the anti-tumorigenic activity of anti-PD-1 therapy by enhancing immune activation and downregulating pro-oncogenic factors induced by T-cell checkpoint inhibition in murine triple-negative breast cancers", BREAST CANCER RESEARCH, vol. 18, no. 1, 11 May 2016 (2016-05-11), pages 50-50, XP055430724, GB ISSN: 1465-5411, DOI: 10.1186/s13058-016-0708-2 abstract ; pg 3, col 2, para 1 ; Fig 2-3 ----- -/--	1-3,5,7, 8,10-13

☒ 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

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 December 2017

Date of mailing of the international search report

15/12/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vadot-Van Geldre, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/053370

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	B. D. FREIMARK ET AL: "Antibody-Mediated Phosphatidylserine Blockade Enhances the Antitumor Responses to CTLA-4 and PD-1 Antibodies in Melanoma", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 4, no. 6, 1 June 2016 (2016-06-01), pages 531-540, XP055430729, US ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0250	1-3,5,7, 8,10-13
Y	abstract ; pg 532, col 1, para 4 ; Fig 1-3, 6	14-34
X	----- XIANMING HUANG ET AL: "A Monoclonal Antibody that Binds Anionic Phospholipids on Tumor Blood Vessels Enhances the Antitumor Effect of Docetaxel on Human Breast Tumors in Mice", CANCER RESEARCH, vol. 65, no. 10, 15 May 2005 (2005-05-15), pages 4408-4416, XP055430834, US ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0031	1-3,5,6, 10-13
Y	abstract ; pg 4409, col 1, para 3 ; Fig 2-6	14-34
X	----- S. RAN: "Antitumor Effects of a Monoclonal Antibody that Binds Anionic Phospholipids on the Surface of Tumor Blood Vessels in Mice", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 11, no. 4, 15 February 2005 (2005-02-15), pages 1551-1562, XP055309977, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1645	1,2,9-13
Y	abstract ; pg 1554, col 2, para bridging pg 1555 ; Fig 1, 3-4	14-34
X	----- FEDERICO CAPPUZZO ET AL: "Profile of bavituximab and its potential in the treatment of non-small-cell lung cancer", LUNG CANCER: TARGETS AND THERAPY, vol. 5, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 43-50, XP055430735, ISSN: 1179-2728, DOI: 10.2147/LCTT.S37981	1-6,9-13
Y	abstract ; Table 1 ; pg 46, col 2, para 1 - pg 48, col 1, 1 3 ; pg 44, col 2, para 2-3; tables I-II	14-34
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/053370

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AU 2012 201 537 A1 (UNIV TEXAS) 5 April 2012 (2012-04-05)	35,36, 38-40
Y	example 27	14-34
Y	----- TROY A. LUSTER ET AL: "Plasma Protein [beta]-2-Glycoprotein 1 Mediates Interaction between the Anti-tumor Monoclonal Antibody 3G4 and Anionic Phospholipids on Endothelial Cells", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 281, no. 40, 6 October 2006 (2006-10-06), pages 29863-29871, XP055430720, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M605252200 abstract 29865, col 2, para 2-3; figures 1-7	14-34
A	----- P. G. DE GROOT ET AL: "[beta]2-Glycoprotein I: evolution, structure and function : [beta]2-Glycoprotein I", JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 9, no. 7, 1 July 2011 (2011-07-01), pages 1275-1284, XP055390168, GB ISSN: 1538-7933, DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04327.x pg 1277, col 2, para 1 -----	1-40

Information on patient family members

PCT/US2017/053370

Patent document
cited in search report

Publication date

Patent family member(s)

Publication date

AU 2012201537	A1	05-04-2012	NONE
---------------	----	------------	------

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 K 31/44 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 K 31/7068 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 31/282 (2006.01)	A 6 1 K 31/44	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 K 31/7068	
C 0 7 K 16/44 (2006.01)	A 6 1 K 31/282	
	C 0 7 K 16/28	
	C 0 7 K 16/44	

(31)優先権主張番号 62/507,580

(32)優先日 平成29年5月17日(2017.5.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/400,589

(32)優先日 平成28年9月27日(2016.9.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

2. T W E E N

(72)発明者 キング、スティーブン、ダブリュー.

アメリカ合衆国、カリフォルニア、タスチン、フランクリン アヴェニュー 1 4 2 8 2

(72)発明者 チャン、コニー

アメリカ合衆国、カリフォルニア、タスチン、フランクリン アヴェニュー 1 4 2 8 2

(72)発明者 ブラウン、マイケル、エイ.

アメリカ合衆国、カリフォルニア、タスチン、フランクリン アヴェニュー 1 4 2 8 2

Fターム(参考) 2G045 AA26 CA26 DA37 DA44 FB03

4C084 AA03 AA19 AA22 AA23 BA44 NA05 ZB261 ZB262

4C085 AA13 AA14 BB11 BB50 DD62

4C086 AA01 AA02 BA02 BC17 EA17 MA02 MA04 NA05 ZA59 ZA66

ZB26

4C206 AA01 AA02 JB16 MA02 MA04 NA05 ZA59 ZA66 ZB26

4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA20 FA74