

(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2019-503386

(P2019-503386A)

(43) 公表日 平成31年2月7日(2019.2.7)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 61 K 45/06 (2006.01)	A 61 K 45/06	4 C 084
A 61 P 13/12 (2006.01)	A 61 P 13/12	4 C 085
A 61 P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	4 C 086
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	4 H 045
A 61 K 31/4406 (2006.01)	A 61 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号	特願2018-539087 (P2018-539087)	(71) 出願人 507277642 インディアナ ユニバーシティ リサーチ アンド テクノロジー コーポレーション INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION アメリカ合衆国 46202 インディアナ州 インディアナポリス インディアナアベニュー 518
(86) (22) 出願日	平成29年1月27日 (2017.1.27)	100106002 弁理士 正林 真之
(85) 翻訳文提出日	平成30年9月26日 (2018.9.26)	100120891 弁理士 林 一好
(86) 國際出願番号	PCT/US2017/015389	
(87) 國際公開番号	W02017/132536	
(87) 國際公開日	平成29年8月3日 (2017.8.3)	
(31) 優先権主張番号	62/288,121	
(32) 優先日	平成28年1月28日 (2016.1.28)	
(33) 優先権主張國	米国(US)	

(54) 【発明の名称】免疫療法を増強するためのヒストンデアセチラーゼ阻害剤の使用

(57) 【要約】

抗腫瘍活性を増強するためのクラス I ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤およびプログラム細胞死タンパク質 1 (PD - 1) 阻害剤の組み合わせを含む組成物が開示される。さらに、腎細胞がんにおいて制御性 T 細胞を抑制するための免疫療法としてこれらの組成物を投与する方法が開示される。

【選択図】図 1 E

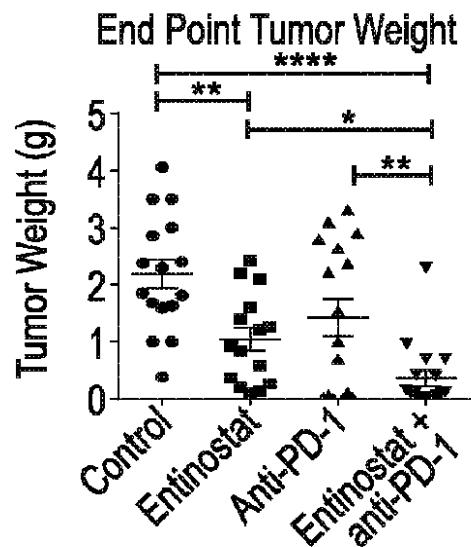


FIG. 1 E

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

クラスⅠヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤およびプログラム細胞死タンパク質1(PD-1)阻害剤を含む組成物。

【請求項 2】

前記クラスⅠ HDAC阻害剤が、エンチノスタッツ(ピリジン-3-イルメチルN-[4-[2-(アミノフェニル)カルバモイル]フェニル]メチル]カルバメート)、ボリノスタッツ(N-ヒドロキシ-N'-フェニルオクタジアミド)およびトリコスタチンA(TSA)((2E,4E,6R)-7-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-N-ヒドロキシ-4,6-ジメチル-7-オキソ-2,4-ヘプタジエンアミド)、ダシノスタッツ((E)-3-[4-((2-(1H-インドール-3-イル)エチル)(2-ヒドロキシエチル)アミノ)メチル]フェニル)-N-ヒドロキシアクリルアミド)、ブチラート、バルプロ酸(VPA)、ベリノスタッツ((2E)-N-ヒドロキシ-3-[3-(フェニルスルファモイル)フェニル]プロパ-2-エナミド)、パノビノスタッツ((2E)-N-ヒドロキシ-3-[4-{[2-(2-メチル-1H-インドール-3-イル)エチル]アミノ}メチル]フェニル]アクリルアミド)、ピロキサミド、SK-7041(4-(ジメチルアミノ)-N-[4-[((E)-3-(ヒドロキシアミノ)-3-オキソプロパ-1-エニル]フェニル]メチル]ベンズアミド)、SK-7068(N-[4-[3-(ヒドロキシアミノ)-3-オキソプロパ-1-エニル]フェニル]メチル)-4-ピロリジン-1-イルベンズアミド)、トラポキシンA(シクロ((S)-ガンマ-オキソ-L-アルファ-アミノオキシランオクタノイル-L-フェニルアラニル-L-フェニルアラニル-D-2-ピペリジンカルボニル))、環状テトラベプチドヒドロキサム酸類似体(CHAP)、デブデシン(4,5:8,9-ジアンヒドロ-1,2,6,7,11-ペンタデオキシ-D-スレオ-D-イド-ウンデカ-1,6-ジエニトール)、モセチノスタッツ(N-(2-アミノフェニル)-4-[4-(ピリジン-3-イルピリミジン-2-イル)アミノ]メチル]ベンズアミド)およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。
10

【請求項 3】

約0.5μM～約2μMの前記クラスⅠ HDAC阻害剤を含む、請求項1に記載の組成物。

30

【請求項 4】

前記クラスⅠ HDAC阻害剤がエンチノスタッツである、請求項1に記載の組成物。

【請求項 5】

約0.5μMのエンチノスタッツを含む、請求項4に記載の組成物。

【請求項 6】

前記PD-1阻害剤が、ニボルマブ、ベンプロリズマブおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項 7】

前記PD-1阻害剤が、ニボルマブである、請求項1に記載の組成物。

【請求項 8】

約1.0μMのニボルマブを含む、請求項5に記載の組成物。

40

【請求項 9】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 10】

必要とする個体において制御性T細胞を抑制する方法であって、クラスⅠヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤およびプログラム細胞死タンパク質1(PD-1)阻害剤を含む組成物を前記個体に投与する工程を含む、方法。

【請求項 11】

前記クラスⅠ HDAC阻害剤が、エンチノスタッツ(ピリジン-3-イルメチルN-[4-[2-(アミノフェニル)カルバモイル]フェニル]メチル]カルバメート)、

50

ボリノスタッフ (N - ヒドロキシ - N' - フェニルオクタンジアミド) およびトリコスタチンA (TSA) ((2E, 4E, 6R) - 7 - [4 - (ジメチルアミノ)フェニル] - N - ヒドロキシ - 4, 6 - ジメチル - 7 - オキソ - 2, 4 - ヘプタジエンアミド)、ダシノスタッフ ((E) - 3 - (4 - ((2 - (1H - インドール - 3 - イル)エチル) (2 - ヒドロキシエチル)アミノ)メチル)フェニル) - N - ヒドロキシアクリルアミド)、ブチラート、バルプロ酸 (VPA)、ベリノスタッフ ((2E) - N - ヒドロキシ - 3 - [3 - (フェニルスルファモイル)フェニル]プロパ - 2 - エナミド)、パノビノスタッフ ((2E) - N - ヒドロキシ - 3 - [4 - ({[2 - (2 - メチル - 1H - インドール - 3 - イル)エチル]アミノ}メチル)フェニル]アクリルアミド)、ピロキサミド、SK - 7041 (4 - (ジメチルアミノ) - N - [[4 - [(E) - 3 - (ヒドロキシアミノ) - 3 - オキソプロパ - 1 - エニル]フェニル]メチル]ベンズアミド)、SK - 7068 (N - [[4 - [3 - (ヒドロキシアミノ) - 3 - オキソプロパ - 1 - エニル]フェニル]メチル] - 4 - ピロリジン - 1 - イルベンズアミド)、トラポキシンA (シクロ((S) - ガンマ - オキソ - L - アルファ - アミノオキシランオクタノイル - L - フェニルアラニル - L - フェニルアラニル - D - 2 - ピペリジンカルボニル))、環状テトラペチドヒドロキサム酸類似体 (CHAP)、デブデシン (4, 5 : 8, 9 - ジアンヒドロ - 1, 2, 6, 7, 11 - ペンタデオキシ - D - スレオ - D - イド - ウンデカ - 1, 6 - ジエニトール)、モセチノスタッフ (N - (2 - アミノフェニル) - 4 - [[(4 - ピリジン - 3 - イルピリミジン - 2 - イル)アミノ]メチル]ベンズアミド)およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。
10

【請求項 12】

前記組成物が約 0.5 μM ~ 約 2 μM の前記クラスI HDAC 阻害剤を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記クラスI HDAC 阻害剤がエンチノスタッフである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

エンチノスタッフが約 5 mg / kg の量で投与される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記PD - 1 阻害剤が、ニボルマブ、ペンプロリズマブおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。
30

【請求項 16】

前記PD - 1 阻害剤がニボルマブである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 17】

ニボルマブが約 10 mg / kg の量で投与される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

前記組成物が薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 19】

前記個体が腎細胞がんを有する、請求項 10 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年1月28日に出願された米国仮出願第62/288,121号に対する優先権を主張し、それは全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表を提出するための支持の声明

878 バイトのサイズ (MICROSOFT WINDOWS (登録商標) EXPLORER で測定した場合) である、ファイル名「IURTC_2016-086-02_ST25.txt」を含む配列表のコンピュータ可読形態が、本明細書に提供され、参照により本明細書に組み込まれる。この配列表は配列番号 1 ~ 3 からなる。
40
50

【0003】

本開示は、概して、クラスIヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤およびプログラム細胞死タンパク質1(PD-1)阻害剤の組み合わせを含む組成物に関する。さらに、制御性T細胞を抑制し、腎細胞がんにおける免疫療法を増強するためのこれらの組成物の使用を開示する。

【背景技術】

【0004】

この10年の間、免疫療法は、固体腫瘍の治療のための最も魅力的で広範に研究される手法の1つになってきている。しかしながら、現在のがん免疫療法の臨床研究は依然として非常に制限された効果を示す。がんに対する免疫寛容が主な障壁であることが示されている。腫瘍成長および間質樹立は、局所微小環境だけでなく、複数のレベルの耐性機構を誘導する免疫系の周辺構成要素：制御性T細胞(Treg)、骨髄由来免疫抑制細胞および腫瘍関連マクロファージなどの免疫抑制細胞；免疫チェックポイント；および循環サイトカインの異常レベルもまた、調節する。これらの免疫抑制因子の間で、Tregは主要なプレーヤーの1つとして識別されている。Tregの数または機能は通常、がん患者において促進される。また、前臨床データにより、腫瘍関連抗原に対する耐性を誘導する際のTregの役割も示唆される。より重要なことに、サイトカインおよびワクチン自体などの免疫療法は、患者においてTregの数または機能の促進を誘導することができる。まとめると、Tregのターゲティングは免疫療法の有効性を改善することができるという強力な証拠が存在する。

10

20

30

40

【0005】

Tregを標的とするほとんどの現在のストラテジーは、細胞表面受容体25に結合するモノクローナル抗体もしくはリガンド指向性毒素(ligand-directed toxin)による、またはメトロノミックシクロフォスファミド治療によるTregの枯渇を目的とする。これらの枯渇アプローチは、活性化Tエフェクター細胞(Teff)を除去するそれらの副作用およびTreg補充の誘導に恐らく起因して臨床的利点を制限する。他の表面マーカーも標的とするストラテジーもまた、特定の問題を有する。通常、可能な臨床応用に対して制限および重要なかい離がある、siRNAおよびmiRNAアプローチなどの、Treg細胞内タンパク質発現、機能またはシグナリングに影響を与える多くの方法が動物において試験されている。

【0006】

さらに、腎細胞がん(RCC)を有する患者の治療における最近の進歩により、ニボルマブ、PD-1阻害剤などの、免疫チェックポイント阻害剤の使用についての扉が開かれた。PD-1/PD-L1軸は、細胞傷害性T細胞の抗腫瘍活性を減少させるように作用することによって腫瘍の免疫回避能力において中心的役割を果たす。RCCにおいて異常に発現されると報告されている、この免疫チェックポイントの遮断は、最近、cancer RCC患者の30~40%において客観的反応を生じる見込みがあると示されている。第II相臨床試験結果により、進行性腎細胞がんを有する患者における抗PD-1治療からの明白な利点を示すことによってニボルマブが承認された。標準治療と比較して、エベロリムス、ニボルマブ患者は、治療関連有害作用が制限された全生存の78%の増加を示した。しかしながら、これらの優れた臨床的進歩にも関わらず、RCCおよび多くの他の固体腫瘍についての免疫療法は患者のサブセットに有益なだけである。免疫学的監視からの腫瘍回避は、RCCを有する患者からの腫瘍を効果的に治療する際に大きな障害のままである。

【0007】

上記に基づいて、当該技術分野において、上記の制限を克服できるようにTregの抑制をターゲティングできる代替の免疫療法を開発する必要性が存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

50

本開示は、概して、制御性T細胞（T_{reg}）を抑制し、腎細胞がんにおいて免疫療法を増強するためのクラスIヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤およびプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）阻害剤を含む組成物に関する。特に、一実施形態において、クラスI HDAC阻害剤、エンチノスタットはPD-1阻害の抗腫瘍効果を増強することが見出される。

【0009】

一態様において、本開示は、クラスIヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤およびプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）阻害剤を含む組成物を対象とする。

【0010】

別の態様において、本開示は、必要とする個体における制御性T細胞を抑制する方法を対象とする。その方法は、クラスIヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤およびプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）阻害剤を含む組成物を個体に投与する工程を含む。

【0011】

本開示は、以下の詳細な説明を考慮して、より良く理解され、上記以外の特徴、態様および利点が明白になるであろう。そのような詳細な説明は以下の図面に対する参照となる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1A】図1A～1Fは、同系腎細胞がんマウスモデルにおけるエンチノスタットにより改善された免疫療法を示す。（図1A）実験タイムライン、メスのB_a1b/cマウスに、-8日目に 1×10^4 RENCA-Luc細胞を同所性注射した。注入後1週間で、毎週、生物発光イメージングを開始し、実施例2の期間継続した。処置を実施例2の1日目に開始した。

【図1B】上部：ベースライン生物発光イメージング。下部：エンドポイント生物発光イメージング。まとめると、これらの画像はin vivoでの腫瘍成長の阻害を示す。

【図1C】実施例2の期間にわたる、対照、エンチノスタット、抗PD-1、およびエンチノスタット+抗PD-1コホートにおける各マウスの平均放射輝度 [p/s/cm²/sr]。

【図1D】各群についてのエンドポイント腫瘍の画像。実験1および2は結果を実証するために連続的に実施した。

【図1E】エンチノスタット+抗PD-1免疫療法による腫瘍サイズの有意な減少を示すエンドポイント腫瘍重量 (g)。

【図1F】左：10mg/kgの抗PD-1を用いた生存研究により、対照および抗PD-1免疫療法単独と比較したエンチノスタット+抗PD-1で処置したマウスの生存曲線の有意な変化が示される。右：20mg/kgの抗PD-1を用いた生存研究により、対照およびエンチノスタットコホートと比較したエンチノスタット+抗PD-1におけるさらなる有意な変化が示され、さらに増加した投薬量の抗PD-1免疫療法により、マウスの生存率が伸びた。結果は平均±SEMとして示し (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001)、ウェルチ補正による独立t検定を使用して腫瘍重量統計値を算出し；ログランク（Mantel-Cox）検定を使用して生存統計値を算出した。

【図2A】図2Aおよび2Bは、エンチノスタットが同系ccRCCマウスマodel、RENCAにおけるT細胞および腫瘍関連マクロファージ反応を調節したことを示す。血液および腫瘍試料を実施例2の終わりにマウスから単離し、フローサイトメトリー分析のために処理した。（図2A）左：血液のFACS分析はCD4およびFoxP3レベルに対するビヒクルおよび組み合わせ処置の効果を示す。右：血液に存在する制御性T細胞および平均蛍光強度(MFI)として示されるタンパク質発現の定量化により、制御性T細胞についての機能的転写因子である対照と比較して、組み合わせコホートにおいてFoxP3の減少に伴い制御性T細胞の存在の有意な増加が示される。

10

20

30

40

50

【図2B】左：対照またはエンチノスタッフ処置後のRENCAマウス由来の腫瘍細胞懸濁液のFACS分析。右：TMEに存在する制御性T細胞および平均蛍光強度(MFI)として示されるタンパク質発現の定量化により、制御性T細胞についての機能的転写因子であるFoxP3の有意な減少を伴う対照と比較して、組み合わせコホートにおいて制御性T細胞の存在のわずかな増加が示される。

【図2C】TMEへのCD8⁺T細胞浸潤の定量的FACS分析を示す。結果は、CD8⁺浸潤およびCD8⁺：制御性T細胞比の有意な増加を示す。

【図2D】TMEへの腫瘍関連マクロファージ浸潤の定量的FACS分析結果を示し、マクロファージ浸潤の有意な減少が示され、HDACiが先天性免疫系に影響を及ぼし得ることを示す。n=3~5の腫瘍/血液試料/コホート/パネル。結果は平均±SEMとして示し(*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001)、ウェルチ補正による独立t検定を使用して統計値を計算した。
10

【図3A】図3A~3Fは、エンチノスタッフがRENCA腫瘍から採取されたMDCSの免疫抑制能を阻害したことを見た。(図3A)右：エンチノスタッフ、抗PD-1免疫療法、または組み合わせによる処置後のRENCA腫瘍由来の腫瘍細胞懸濁液のFACS分析。左：CD45⁺CD11b⁺細胞の全集団におけるLy6C⁺およびLy6G⁺細胞のパーセンテージとして表されるTMEへの単球および顆粒球MDCS浸潤物の定量的分析により、対照と比較して組み合わせコホートにおいてM-MDCSおよびG-MDCSの両方の存在下で有意な増加が示された(n=3~5の腫瘍)。

【図3B】血液中のG-MDCSおよびM-MDCSの存在の定量的FACS分析により、G-MDCSの対照と比較して組み合わせにおいて有意な減少が示され、対照と比較して組み合わせにおいてM-MDCSの有意な増加が示される(n=3~5の血液試料)。対照と比較して、組合せにおいてM-MDCSの有意な増加を示す(n=3~5血液サンプル)。
20

【図3C】TMEから分離したM-MDCS細胞を、16~18時間、CFSE標識化CD8⁺T細胞と共に培養し、その時点でそれらを収集し、CD8およびグランザイムB抗体で染色し、T細胞増殖についてFACS分析に供した。結果は、in vivoでエンチノスタッフで処置した場合、M-MDCS抑制能の顕著な障害を示す(n=3~5の腫瘍)。

【図3D】TMEから分離したG-MDCS細胞を、16~18時間、CFSE標識化CD8⁺T細胞と共に培養し、その時点でそれらを収集し、CD8およびグランザイムB抗体で染色し、T細胞増殖についてFACS分析に供した。細胞を以前に記載されるように収集し、共培養し、結果は、in vivoでエンチノスタッフで処置した場合、G-MDCS抑制能の顕著な阻害が明らかとなる(n=3~5の腫瘍)。
30

【図3E】対照、エンチノスタッフ、または組み合わせで処置したコホート由来のMDCSと共に培養したT細胞由来の細胞傷害性CD8⁺活性タンパク質のグランザイムBのFACS分析。

【図3F】FACS分析の定量的表現は、エンチノスタッフおよび組み合わせで処置したマウス由来のMDCSが、対照よりグランザイムBによるCD8⁺T細胞活性化の阻害能が低いことを示す。結果は平均±SEMとして示し(*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001)、ウェルチ補正による独立t検定を使用して統計値を計算した。
40

【図4A】図4A~4Eは、エンチノスタッフがMDCS様細胞株J774Mの阻害能を減少させたことを示す。(図4A)J774M細胞株の特徴的FACS分析により、CD45⁺CD11b⁺Gr1⁺細胞の中で、細胞の約90%がLy6G⁺G-MDCS様であり、10%がLy6C⁺M-MDCS様細胞であり、代表的なものはTMEにおいて典型的に見られるものであることが明らかとなった。J774M細胞をエンチノスタッフにより24時間in vitroで処置し、続いて68~72時間、事前活性化したCD8⁺T細胞と共に培養した。

【図4B】68~72時間の共培養時のT細胞の代表的な画像(スケールバー：400μ
50

m)。

【図4C】1:1の比でJ77M細胞とインキュベートしたゲートしたCD8⁺T細胞のCFSE蛍光ヒストグラム。J774M細胞をエンチノstatttの濃度を増加させて処置した。右から左:対照(未処置)、0.01uM、0.05uM、0.25uM、0.37uM、0.5uM。

【図4D】図4Bの定量的表現;棒は、増殖しているCD8T⁺細胞の平均パーセンテージを示す(n=3の技術的複製)。この実験は独立して3回繰り返した。

【図4E】定量的RT-PCR分析により、J774M細胞をエンチノstatttで処置した場合、重要なMDS機能調節因子アルギナーゼ-1の有意な減少が示される。

【図4F】エンチノstattt処置の48時間後のJ774M細胞増殖または生存率の分析。

【図4G】J774M細胞をエンチノstatttで処置した場合のiNOSの倍率変化を示す定量分析。結果は平均±SEMとして示し(*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001)、ウェルチ補正による独立t検定を使用して統計値を計算した。

【図5A】図5A~5Eは、エンチノstatttによる処置が、RENCA腫瘍において見出される高度な免疫抑制環境を有意に変化させたことを示す。実施例2の終わりにマウスから採取した腫瘍および血液試料を処理し、Proteome Profiler Mouse XL Cytokine array kit(Ary028)を使用して検査した。(図5A)対照およびエンチノstattt処置コホートにおける腫瘍溶解物からのマウスサイトカイン/ケモカインアレイ結果(n=2の腫瘍/コホートおよび1つの腫瘍当たり3データ点)。腫瘍内微小環境分析により、腫瘍抑制環境の有意な変化が生じた。

【図5B】エンチノstatttの存在下で有意に下方制御したMDS関連またはpro-腫瘍サイトカイン/ケモカインの定量。

【図5C】エンチノstattt処置の存在下で有意に上方制御した抗腫瘍ケモカイン/サイトカインの定量。

【図5D】左:対照およびエンチノstattt処置マウスの血清試料からのAry028アレイ結果(n=2の腫瘍/コホートおよび1つの腫瘍当たり3データ点)。エンチノstattt処置単独は、図5Dの右パネルに示されるように循環中のMDS関連およびpro-腫瘍サイトカインおよびケモカインの多くを阻害した。

【図5E】左:対照コホートと組み合わせコホートを比較したアレイ結果(n=2の腫瘍/コホートおよび腫瘍あたり3データ点)。組み合わせ処置は、図5Eの右パネルに示されるように、複数の抗腫瘍関連ケモカインおよびサイトカインを有意に上方制御した。結果は平均±SEMとして示し(*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001)、多重t検定を使用して統計値を計算し、Q=1%で、Benjamini、KriegerおよびYekutieliの2段階線形上昇手順(Two-stage linear step-up procedure)を使用して発見を決定した。

【図6】cCRCCに対する先天性および適応免疫応答者のエンチノstattt変化の概略図を示す。エンチノstatttがどのように制御性T細胞活性を阻害するかのモデルが含まれる。さらに、エンチノstatttがアルギナーゼ1を下方制御することによりMDS機能を阻害し、それにより細胞傷害性T細胞活性に必要とされるL-アルギニンのプールを遊離する、仮定された機構が示される。

【発明を実施するための形態】

【0013】

他に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術的および科学的用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等の任意の方法および材料を、本開示の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法および材料は、以下に記載される。

10

20

30

40

50

【0014】

概して、本開示は、クラスI HDAC阻害剤およびPD-1阻害剤の組み合せを含む組成物を対象とする。HDACは、細胞周期の進行、増殖、およびアポトーシスに関与する遺伝子の転写調節を媒介することによって、発がん性形質転換に関与することが示されている。HDAC阻害剤は、現在、がん治療のために開発されており、異なる腫瘍において抗腫瘍活性を実証している。HDACは、標的および細胞内部位が異なる4つの異なるクラスに特徴付けられている。最近、クラスI HDAC阻害剤がSTAT3のアセチル化を誘導し、その結果、TregにおけるFOXP3転写を低下させることが見出された。この重要な転写因子の阻害により、Tregの機能が低下し、抗腫瘍免疫応答が解放される。

10

【0015】

本開示の組成物において使用するための1つの適切な選択的クラスI HDAC阻害剤は、合成ベンズアミド、エンチノスタット(ピリジン-3-イルメチルN-[4-[(2-アミノフェニル)カルバモイル]フェニル]メチル)カルバメート)を含む。エンチノスタット、合成ベナミドは、いくつかの腫瘍モデルにおいて、*in vitro*および*in vivo*の両方で抗腫瘍活性を有する。特に、エンチノスタットは、腫瘍内微小環境と宿主免疫監視との間の動的相互作用を破壊することが示されている。腫瘍組織は、古典的に、腫瘍促進性炎症を可能にする、無数の免疫抑制因子および走化性因子の両方を放出することによって、免疫監視を回避する。クラスI HDAC阻害剤によるHDAC処置は、腫瘍の免疫原性を増加させ、1つの免疫抑制機構に対抗することが示されている。他の適切なクラスI HDAC阻害剤としては、例えば、ボリノスタット(N-ヒドロキシ-N'-フェニルオクタンジアミド)およびトリコスタチンA(TSA)((2E,4E,6R)-7-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-N-ヒドロキシ-4,6-ジメチル-7-オキソ-2,4-ヘプタジエンアミド)、ダシノスタット(Dacinosstat)(LAQ824としても知られている)((E)-3-(4-((2-(1H-インドール-3-イル)エチル)(2-ヒドロキシエチル)アミノ)メチル)フェニル)-N-ヒドロキシアクリルアミド)、ブチラート、バルプロ酸(VPA)、ベリノスタット(Belinostat)(PXD101としても知られている)((2E)-N-ヒドロキシ-3-[3-(フェニルスルファモイル)フェニル]プロパ-2-エナミド)、パノビノスタット(LBH589としても知られている)((2E)-N-ヒドロキシ-3-[4-({[2-(2-メチル-1H-インドール-3-イル)エチル]アミノ}メチル)フェニル]アクリルアミド)、ピロキサミド、SK-7041(4-(ジメチルアミノ)-N-[4-[(E)-3-(ヒドロキシアミノ)-3-オキソプロパ-1-エニル]フェニル]メチル)ベンズアミド)、SK-7068(N-[4-[3-(ヒドロキシアミノ)-3-オキソプロパ-1-エニル]フェニル]メチル)ベンズアミド)、SK-7041(4-(ジメチルアミノ)-N-[4-[(E)-3-(ヒドロキシアミノ)-3-オキソプロパ-1-エニル]フェニル]メチル)-4-ピロリジン-1-イルベンズアミド)、トラポキシンA(シクロ((S)-ガンマ-オキソ-L-アルファ-アミノオキシランオクタノイル-L-フェニルアラニル-L-フェニルアラニル-D-2-ビペリジンカルボニル))、環状テトラペプチドヒドロキサム酸類似体(CHAP)、デブデシン(4,5:8,9-ジアンヒドロ-1,2,6,7,11-ペンタデオキシ-D-スレオ-D-イド-ウンデカ-1,6-ジエニトール)、モセチノスタット(MGCD-01013としても知られている)(N-(2-アミノフェニル)-4-[4-(ピリジン-3-イルピリミジン-2-イル)アミノ]メチル)ベンズアミド)などおよびそれらの組み合わせが挙げられる。

20

30

40

【0016】

クラスI HDAC阻害剤の適切な投薬量は、例えば、個体の年齢および体重、治療を必要とする少なくとも1つの正確な状態、状態の重症度、組成物の性質、投与経路およびそれらの組み合わせを含む、多くの因子に依存する。最終的に、適切な投薬量は、例えば、医師、獣医師、科学者、ならびに他の医学および研究の専門家などの当業者によって容易に決定することができる。例えば、当業者は、所望の治療成果または結果に達するまで増加され得る低い投薬量で開始してもよい。あるいは、当業者は、所望の治療成果または

50

結果を達成するのに必要とされる最小投薬量に達するまで減らすことができる高い投薬量で開始してもよい。クラスI HDAC阻害剤の例示的な適切な投薬量は、約0.5 μMを含む、約0.5 μM～約2 μMを含んでもよい。さらなる実施形態において、個体は、約5 mg / kgのクラスI HDAC阻害剤の投薬量で、PD-1阻害剤と組み合わせて、クラスI HDAC阻害剤を投与され得る。

【0017】

組成物は、概して、クラスI HDAC阻害剤と組み合わせてPD-1阻害剤を含む。PD-1は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞表面受容体であり、T細胞およびproto-B細胞上で発現する。PD-1は2つのリガンド、PD-L1およびPD-L2に結合する。免疫チェックポイントとして機能するPD-1は、T細胞の活性化を防ぐことによって免疫系を下方制御する際に重要な役割を果たし、それにより次に自己免疫を低減させ、自己寛容を促進する。PD-1の阻害効果は、リンパ節の抗原特異的T細胞においてアポトーシス（プログラム細胞死）を促進すると同時に、Tregにおけるアポトーシスを低下させるという二重機構によって達成される。本開示の組成物における使用に適したPD-1阻害剤には、ニボルマブ、ペンプロリズマブなど、およびアテゾリズマブなどのPD-L1阻害剤、ならびにそれらの組み合わせが挙げられる。

【0018】

PD-1阻害剤の適切な投薬量は、例えば、個体の年齢および体重、治療を必要とする少なくとも1つの正確な状態、状態の重症度、組成物の性質、投与経路およびそれらの組み合わせを含む、多くの因子に依存する。最終的に、適切な投薬量は、例えば、医師、獣医師、科学者、ならびに他の医学および研究の専門家などの当業者によって容易に決定することができる。例えば、当業者は、所望の治療成果または結果に達するまで増加され得る低い投薬量で開始してもよい。あるいは、当業者は、所望の治療成果または結果を達成するのに必要とされる最小投薬量に達するまで減らすことができる高い投薬量で開始してもよい。PD-1阻害剤の1つの例示的な適切な投薬量は約1.0 μMを含んでもよい。さらなる実施形態において、個体は、約10 mg / kgのPD-1阻害剤の投薬量で、クラスI HDAC阻害剤と組み合わせてPD-1阻害剤を投与されてもよい。

【0019】

クラスI HDAC阻害剤およびPD-1阻害剤の組み合わせは、1つ以上の薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物として投与されてもよい。本明細書に使用される場合、「薬学的に許容される」という語句は、十分な医学的判断の範囲内で、過度な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を伴わずに、合理的なベネフィット/リスク比に相応して、ヒトおよび動物の組織との接触における使用に適した、リガンド、材料、製剤、および/または投薬形態を指す。本明細書に使用される場合、「薬学的に許容される担体」という語句は、活性化合物を身体の1つの器官または部分から、身体の別の器官または部分へ運搬または輸送することに関与する、液体または固体充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒またはカプセル化材料などの、薬学的に許容される材料、製剤またはビヒクルを指す。各担体は、組成物の他の成分（例えば、クラスI HDAC阻害剤、PD-1阻害剤）と適合性があり、個体に有害ではないという意味で「許容可能」でなければならない。再構成および投与され得る凍結乾燥組成物もまた、本開示の範囲内である。

【0020】

薬学的に許容される担体は、例えば、賦形剤、ビヒクル、希釈剤、およびそれらの組み合わせであってもよい。例えば、組成物が経口投与される場合、それらは、錠剤、カプセル、顆粒、粉末、もしくはシロップとして処方されてもよく；または非経口投与については、それらは、注射（筋肉内、皮下、髄内、髄腔内、脳室内、静脈内、硝子体内、網膜下、結膜下）、滴下注入製剤、または座剤として処方されてもよい。これらの組成物は、従来の手段によって調製することができ、所望であれば、活性化合物（すなわち、クラスI HDAC阻害剤、PD-1阻害剤）を、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味剤、可溶化剤、懸濁助剤、乳化剤、コーティング剤、またはそれらの組合せなどの任意の従来の

10

20

30

40

50

添加剤と混合することができる。

【0021】

本開示の医薬組成物は、本明細書中に記載される疾患、障害、および状態を緩和、媒介、予防、および治療するために、さらなる公知の治療剤、薬物、合成化合物のプロドラッグへの修飾剤などをさらに含んでもよいことが理解されるべきである。

【0022】

別の様において、本開示は、概して、Treregを抑制し、抗腫瘍効果を増強するための組成物の投与に関する。したがって、本開示の方法に使用されるクラスⅠ HDAC阻害剤およびPD-1阻害剤の組み合わせを含む組成物は、必要とする個体のサブセットに投与されてもよい。本明細書に使用される場合、「必要とする個体」とは、がん、特に腎細胞がん、乳がん、前立腺がん、黒色腫などのリスクがあるか、またはそれらを有する個体を指す。さらに、「必要とする個体」はまた、本明細書において、がんを有するリスクがあるか、または医療専門家によってがんを有すると診断された個体を指すために使用される。したがって、いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法は一般集団のサブセットを対象とし、したがってこれらの実施形態では、一般集団の全てがこの方法から恩恵を受けるとは限らない。上記に基づいて、本開示の方法の実施形態のいくつかは、同定された個体の特定のサブセットまたはサブクラス（すなわち、本明細書に記載される1つ以上の特定条件に対処する際に支援を「必要とする」個体のサブセットまたはサブクラス）を対象とするため、全ての個体が、本明細書に記載される個体のサブセットまたはサブクラスの範囲内に入るわけではない。特に、必要とする個体はヒトである。必要とする個体は、例えば、非ヒト霊長類、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ブタ、ならびに当業者に公知の他の種類の研究動物および/またはペットなどの動物であってもよい。

10

20

30

【0023】

当業者であれば、組成物を単回投薬または複数回投薬として長期間にわたって投与できることを理解すべきである。例えば、組成物は、3日間、5日間、7日間またはそれ以上の期間にわたって、毎日、隔日、3日毎、週1回などで投与することができる。さらに、組成物は、1日に1回または1日に2回、1日に3回もしくはそれ以上の回数を含む、1日に1回より多く投与されてもよい。

【0024】

本開示のこれらおよび他の実施形態の様々な機能および利点は、以下に示す実施例からより十分に理解されるであろう。これらの実施例は、本開示の利益を例示することを意図しているが、本開示の全範囲を例示するものではない。

30

【実施例】

【0025】

実施例1

この実施例において、抗PD-1抗体処置と組み合わせたエンチノstatt処置の免疫調節能を分析した。

【0026】

材料および方法：

細胞株：American Type Culture Collection (National Cancer Institute)から購入した、RENCA-Lucネズミ腎細胞がん細胞株を、Pili実験室においてルシフェラーゼレポーターで安定にトランスフェクトした。細胞を、10%ウシ胎児血清(Corning)および1%Pen/Strep(Life Technologies)を含むRPMI 1640(Corning)を使用して培養した。細胞を37および5%CO₂に維持したインキュベーター内でインキュベートした。75~80%コンフルエント細胞を、0.25%トリプシン(Corning)を使用してBalb/cマウスの腎臓への同所性注射のために収集し、1:1の比のMatrikel(登録商標)(Corning)およびDPBS(Gibco)中に懸濁した。

40

【0027】

50

J 7 7 4 M 細胞株 - Georgia Cancer Center による寄付 / 培養方法

J 7 7 4 M 細胞株を、10%ウシ胎児血清 (Corning) および 1% Pen / Strep (Life Technologies) を含む DMEM (Corning) 培地で培養した。細胞を 37 ℃ および 5% CO₂ 中でインキュベートした。70 ~ 80% コンフルエントな細胞を、セルスクレーパーを使用して収穫し、ATCC ガイドラインに従って親細胞株について示唆されているように継代した。

【0028】

腫瘍懸濁液および脾細胞調製物：生きた腫瘍切片を腫瘍から単離し、小片に切断し、マウス腫瘍解離キット (Miltenyi Biotec - 130-096-730) からの酵素カクテル溶液で消化した。腫瘍を酵素カクテルと共に 37 ℃ で 30 分間攪拌しながらインキュベートした。酵素反応を、PBS を使用して停止させ、細胞を 300 g、4 ℃ で 7 分間回転させ、PBS 中に再懸濁し、70 μm セルストレーナーを通してすりつぶした。これらの腫瘍由来の細胞をフローサイトメトリー分析に使用するか、またはさらに処理して機能分析のために使用した。

【0029】

T 細胞単離および活性化：全脾臓をナイーブマウスから採取し、すりつぶし、70 μm ストレーナーに通した。次いで、細胞を洗浄し、RBC 溶解緩衝液 (Affymetrix 00-4333-57) で溶解し、10% FBS、Pen (100 単位 / ml) - Strep (100 mg / ml)、1 mM ピルビン酸ナトリウム、100 mM 非必須アミノ酸、2 mM L-グルタミン、55 μM BME を含む RPMI 培地中で、抗 CD3 (e Bioscience 16-0031-85) および抗 CD28 (e Bioscience 5012503) と共に約 24 時間培養した。次いで、CD8⁺ T 細胞を、Miltenyi Biotec (130-104-075) からの CD8a⁺ T 細胞単離キットを使用して単離し、製造業者のプロトコルに従って CFSE (NC9759757) で染色し、下記のように MDSC と共に培養した。

【0030】

MDSC 単離：MDSC を、Miltenyi Biotec's Myeloid Derived Suppressor Cell Isolation Kit (130-094-538) を使用して各群の RENCA 腫瘍から単離し、連続希釈濃度で単離した CD8⁺ T 細胞と共に培養した。

【0031】

T 細胞抑制アッセイ：T 細胞 (1 × 10⁵; CD8a⁺ T 細胞単離キットで単離した; Miltenyi Biotec) を、RENCA 腫瘍から単離した異なる数の G-MDSC または M-MDSC のいずれかを有するプレートで 16 ~ 18 時間培養した。記載した方法で単離した T 細胞を、エンチノスタット処置した J 7 7 4 M 細胞と 68 ~ 72 時間共培養した。次いで、細胞を回収し、染色し、FACS 分析により分析した。

【0032】

in vivo 腫瘍増殖 (RENCA) : International Animal Care and Use Committee (IACUC)、Roswell Park Cancer Institute、Indiana University School of Medicine、および NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animal guidelines に厳密に従って、全ての手順は実施され、承認された。

【0033】

5 ~ 6 週齢のメスの Balb/c マウス (Charles Rivers) を、12 / 12 時間の明 / 暗スケジュールで温度制御された部屋に維持し、食物を自由に与えた。70 ~ 80% コンフルエントな RENCA-Luc 細胞を、0.25% トリプシン (Corning) を使用して回収し、1 : 1 比のマトリゲル (Corning) と HBSS (Gibco) 中に懸濁し、1 × 10⁴ 細胞を含有する 10 μl を腎被膜下に注入した。注射

10

20

30

40

50

後1週間の予備生物発光イメージング後、マウスを4つの群：対照、エンチノstattt、抗P D - 1、または組み合わせに無作為化した。マウス腫瘍を、生物発光IVISイメージング装置を使用して連続的にイメージングした。

【0034】

エンチノstatttおよび抗P D - 1処置：処置群のマウスを、エンチノstattt 5 mg / kg 5日/週で経口、BioXCell製の10 mg / kg または20 mg / kg (2回目の生存研究)でのI.P.、または組み合わせ処置レジメンで処置した。

【0035】

細胞染色およびフローサイトメトリー：脾細胞、腫瘍細胞懸濁液、および末梢血細胞を洗浄し、4にて15分間、Fc Block (抗マウスCD16/32mAb; BD Biosciences)でブロックし、表面マーカー：BioLegend、eBio scienceまたはBD Biosciencesから購入したCD45 (クローン30-F11)、CD11b (クローンM1/70)、Gr1 (クローンRB6-8C5)、Ly6C (クローンAL-21)、Ly6G (クローン1A8)、F480 (クローンBM8)、CD8a (クローン53-6.7)、CD4 (クローンRM4-5)抗体に対する蛍光コンジュゲート抗体で染色した。次いで、細胞を固定/透過緩衝液 (eBioscience)中で固定し、FoxP3 (NRRF-30)およびグランザイムB (クローンGB11)を含む、細胞内タンパク質に対する抗体で染色した。抗体は、BD Biosciences、Biolegend、およびR&D Systemsから購入し、染色に使用した。染色細胞およびアイソタイプ対照染色細胞をLSR4またはFortessaフローサイトメーター (BD Biosciences)でアッセイした。データ解析は、FlowJo (FlowJo LLC)および/またはModFit LT 4.1ソフトウェアを使用して実施した。

10

20

20

30

40

【0036】

プロテオームプロファイル：腫瘍組織を、プロテアーゼ阻害剤を含有するPBS中でホモジナイズした。ホモジナイゼーション後、Triton X-100を加えて最終濃度1%とし、-80にて凍結し、解凍し、10,000gとして5分間遠心分離し、定量し、製造業者のプロトコルに従ってアッセイした。各コホートのマウスから血液試料を採取し、室温にて2時間凝固させ、2000gにて15分間遠心分離した。血清試料を分析時間まで-80にて凍結し、その分析時間のときにそれらを製造業者のプロトコルに従って実行した。全ての試料を処理し、R&D SystemsマウスXLサイトカインアレイキット (Ary028)で実行した。

【0037】

定量的リアルタイムPCR：標準的なTrizolプロトコルを使用して±エンチノstatttで処置したJ774M細胞からmRNAを抽出した。RNA濃度および純度は、Synergy Hi Multi-Modeリーダーを用いてA260/280比の測定により決定した。iScriptキット (Bio-Rad)を使用してcDNAを調製し、Applied Biosystems 7900 HT高速リアルタイムPCRシステムを使用してqPCRを実施した。Sequence Detection Systemソフトウェアv2.3を使用して、サイクル闘 (Ct) 値を同定し、遺伝子発現曲線を生成した。データをGapdh式に対して正規化し、倍数変化を計算した。標的遺伝子に使用したプライマーは以下の通りであった：Gapdh_フォワード5'-AAC TTT GGC ATT GTGGAAAGG-3'、Gapdh_リバース5'-ACACATTGGGGTAGGAACA-3' (配列番号1)、アルギナーゼ1_フォワード5'-GTGAGAACCCACGGTCTGT-3' (配列番号2)、およびアルギナーゼ1_リバース5'-CTGGTTGTCAGGGGAGTGT-3' (配列番号3)。

【0038】

結果：

エンチノstatttはネズミ腎細胞がんモデルにおいてPD-1阻害の抗腫瘍効果を増強した。以前の研究は、エンチノstattt処置が、制御性T細胞を含む腫瘍内微小環境への

50

直接的な影響を介して免疫療法処置を増強する可能性を有することを示している。さらに、エンチノスタッフは、RENCAモデルにおいて、STAT3アセチル化によって制御性T細胞機能を調節することによって、IL-2免疫療法を増強することが以前に示された。先天性免疫系に対するエンチノスタッフの免疫調節能を調べるために、RENCAモデルにおいてエンチノスタッフを、マウスチェックポイント阻害剤、抗PD-1抗体と組み合わせて使用した。抗PD-1免疫チェックポイント阻害剤の使用は、腫瘍および先天性免疫細胞の両方に提示されるPD-L1発現により全体として腫瘍内微小環境(TME)に影響を与える。RENCAモデルは、抗腫瘍T細胞活性の抑制における重要な因子である、高度に免疫抑制性のMDSCを誘引することが示されている。Balb/cマウスにルシフェリン標識化RENCA細胞を同所的に接種した。

10

【0039】

腫瘍を有するマウスを、生物発光読み取りに基づいて無作為化し、4つの群に分けた：対照、エンチノスタッフ(5mg/kg)、抗PD-1(10mg/kg)、またはエンチノスタッフと抗PD-1の組み合わせ。エンチノスタッフ単独での処置は、腫瘍成長の顕著な阻害をもたらしたが(52.6%成長阻害；エンチノスタッフ対対照： $p = 0.015$)、抗PD-1単独は、腫瘍成長を中程度に減少させたのみであった(35.05%成長阻害；抗PD-1対対照： $p = 0.0768$)（図1A～1E）。さらに、エンチノスタッフおよび抗PD-1処置の組み合わせは、対照および単一処置群の各々と比較して腫瘍成長阻害を増強した(83.3%減少；組み合わせ対ビヒクル： $p < 0.0001$ ；組み合わせ対エンチノスタッフ： $p = 0.0115$ ；組み合わせ対抗PD-1： $p = 0.0076$ ）（図1A～1E）。

20

【0040】

臨床的に、抗PD-1免疫療法は、RCCを有する患者の最大41%において疾患の長期安定化を示している。以前の研究に続いて、エンチノスタッフおよび抗PD-1抗体の組み合わせの生存増強効果を分析した。以前に記載した処置濃度を使用して、マウスの生存率の有意な増加が観察された。組み合わせ処置は生存率の有意な増加をもたらした（組み合わせ対抗PD-1： $p = 0.0012$ ；組み合わせ対対照： $p = 0.0009$ ）（図1F）。次に、抗PD-1抗体処置の用量を増加させると、RENCA腫瘍モデルの応答がさらに増強するかどうかを調べた。その結果は、抗PD-1群の生存期間が延長し、対照群およびエンチノスタッフ群と比較して組み合わせ処置したコホートで効果が増強された（組み合わせ対対照： $p = 0.0471$ ；組み合わせ対エンチノスタッフ： $p = 0.0372$ ）（図1F）ことを示した。これらの研究の結果は、エンチノスタッフと抗PD-1抗体免疫療法の組み合わせがネズミcancerモデルRENCAにおいて生存を促進する可能性があることを示唆している。

30

【0041】

増強した抗PD-1免疫療法は、抗腫瘍免疫応答の増加および免疫抑制細胞集団の存在の減少と関連している。PD/L-1軸は、活性化T細胞アポトーシスの促進を介して免疫監視の腫瘍回避を支援する際に中心的な役割を果たす。さらに、HDAC阻害(HDACi)処置は、Treg細胞活性を低下させ、CD8 T細胞浸潤を増強することによって、腫瘍内微小環境を変化させることが示されている。組み合わせ処置に起因している腫瘍成長の阻害が増強した免疫応答と関連しているかどうかを理解するために、循環および腫瘍浸潤免疫集団を調べた。エンドポイント血液および腫瘍試料を、この実施例の各アームにおけるマウスから採取し、免疫蛍光染色およびFACS分析に供した。血液中に存在する、増加したTreg、CD4⁺FoxP3⁺が観察され、TMEにおいて有意差は観察されなかった。しかしながら、以前に示したように、HDAC阻害処置は、MFI(平均蛍光強度)によって表されるように、循環CD4⁺FoxP3⁺細胞サブタイプにおいてFoxP3のタンパク質レベルの有意な減少をもたらした。組み合わせ群は、FoxP3タンパク質レベルの低下も示したが、対照または血液試料における抗PD-1群単独と比較して有意に低下しなかった（図2A）。TMEでは、CD4⁺FoxP3⁺細胞のMFIの有意な減少が観察され、抗PD-1およびエンチノスタッフ組み合わせ処置に応答

40

50

して T_{reg} 機能の阻害が示唆された（図 2B）。

【0042】

CD8⁺ T 細胞は P D / L - 1 軸の重要な構成要素であり、腫瘍監視に不可欠である。P D / L - 1 チェックポイント軸が遮断されると、多くの場合、T 細胞機能および腫瘍浸潤が増加する。エンチノstattと抗 P D - 1 免疫療法の併用効果は、腫瘍浸潤 CD8⁺ T 細胞の有意な増加をもたらすことが見出された（対照対組み合わせ： p = 0.0352）（図 2C、左側）。同様に、CD8⁺ T 細胞：制御性 T 細胞比の統計的に有意な増加が観察され、少しの腫瘍抑制環境の生成が示唆された（対照対組み合わせ： p = 0.0218）（図 2C、右側）。

【0043】

腫瘍関連マクロファージ（TAM）は免疫抑制性 TME を支持する。未熟骨髓細胞が腫瘍に移動すると、これらの細胞は、多くの場合、腫瘍細胞からのケモカインおよびサイトカインの放出に応答して TAM になるようにプライミングされる。これらの細胞は、CD45⁺ CD11b⁺ マーカーと組み合わせて pan - マクロファージマーカー F4 / 80 によってマークされる。したがって、エンチノstatt および抗 P D - 1 免疫療法に応答する TAM の存在を調べ、TAM 存在の有意な減少が対照およびエンチノstatt 単独と比較して組み合わせ群において観察された（組み合わせ対対照： p = 0.0272；組み合わせ対エンチノstatt： p = 0.009）（図 2D）。まとめると、これらの結果は、抗 P D - 1 免疫療法との HDAC 阻害の組み合わせが、腫瘍内微小環境の抑制特性を有意に変化させ、RENCA モデルにおける免疫応答の増加を可能にすることを示唆する。

【0044】

骨髓由来サプレッサー細胞機能は、エンチノstatt と抗 P D - 1 免疫療法の組み合わせによって損なわれる。骨髓由来サプレッサー細胞（MDSC）は、抗腫瘍 T 細胞免疫応答を阻害することによって免疫抑制性 TME の一因となる未熟骨髓細胞に由来する。MDSC は、明確に定義された 2 つの免疫抑制性亜集団、顆粒球 Ly6G⁺ Ly6C⁺ (G-MDSC) および単球 Ly6C⁺ Ly6G⁻ (M-MDSC) MDSC に存在する。腫瘍は、CCL2、CCL5、CCL7、および CXCL12 などの、化学誘引物質の放出を介して、MDSC、単球、および未熟骨髓細胞を誘引する。MDSC は、表面 P D - L 1 の上方制御、免疫抑制性サイトカイン (IL-10、TGF-β) および T_{reg} 誘引サイトカイン (CCL4、CCL5) の産生、アルギナーゼ 1 (Arg1) および iNOS の上昇、ならびに細胞傷害性 T 細胞に対する抵抗性を含む、複数の機構を介して、腫瘍の免疫回避を保護し、増強することが示されている。

【0045】

エンチノstatt 単独処置では、腫瘍浸潤 G-MDSC および M-MDSC 集団においてわずかな増加が観察されたが（エンチノstatt 対対照： G-MDSC p = 0.2025、M-MDSC p = 0.1903）、抗 P D - 1 単独薬剤での処置は、G-MDSC 集団の減少がもたらされた（抗 P D - 1 対対照： G-MDSC p = 0.00402）（図 3A）。エンチノstatt 群で最初に観察された MDSC 集団のわずかな増加は組み合わせ群で增幅され、両集団にわたる存在の増加傾向（組み合わせ対対照： G-MDSC p = 0.0199、M-MDSC p = 0.0222；組み合わせ対エンチノstatt： G-MDSC p = 0.0102、M-MDSC p = 0.5613；組み合わせ対抗 P D - 1： G-MDSC p = 0.0001、M-MDSC p = 0.0198）が観察された（図 3A）。さらに、エンチノstatt または組み合わせ処置後、循環 G-MDSC のわずかな減少および循環 M-MDSC のわずかな増加を伴う循環 MDSC の変化（エンチノstatt 対対照： G-MDSC p = 0.0421、M-MDSC p = 0.0188；エンチノstatt 対組み合わせ： G-MDSC p = 0.0608、M-MDSC p = 0.0500；抗 P D - 1 対組み合わせ： G-MDSC p = 0.0424、M-MDSC p = 0.0229；組み合わせ対対照： G-MDSC p = 0.0080、M-MDSC p = 0.0049）が観察された（図 3B）。このように、エンチノstatt は、末梢免疫状態および腫瘍内微小環境の両方の変化を伴う RENCA モデルにおいて

10

20

30

40

50

抗P D - 1免疫療法処置の効果を増強し得ることが示された。この効果の機構をさらに調べるために、免疫系のM D S Cコンパートメントにおいて見られる興味深い変化をさらに分析した。

【0046】

M D S C 浸潤物における処置特異的増加が、M D S C 抑制能の機能の変化と関連するかどうかを決定するために、腫瘍関連M D S C が腫瘍ナイーブマウス由来の事前活性化C D 8⁺ T 細胞を抑制する能力をe x v i v oで試験した。R E N C A 腫瘍を移植したマウスの生存率および腫瘍阻害の向上を示すi n v i v oデータと一致して、エンチノスタットまたは組み合わせ処置後、M D S C (G - M D S C またはM - M D S C) は、C D 8⁺ T 細胞増殖を阻害するそれらの能力の有意な減少を示すことが観察された。M D S C 対T細胞比、1 : 1、0 . 5 : 1、および0 . 2 5 : 1の各々において、前刺激した(抗C D 3 / C D 2 8 刺激)細胞をT M E から単離したM D S C と1 6 ~ 1 8 時間共培養した場合、C D 8⁺ T 細胞増殖のM D S C 阻害が統計的に有意に減少した(G - M D S C およびM - M D S C 条件の各々についてp 値 0 . 0 1)(図3 C および3 D)。i n v i v o T M E からのこれらの細胞の免疫抑制状態の潜在的变化を回避するために、より短い共培養物時点をここで選択した。処置マウスの腫瘍から単離したこれらの細胞はC D 8⁺ T 細胞の増殖を阻害することができず、それらは対照刺激C D 8⁺ T 細胞単独と同様に増殖した(約9 0 %の増殖)。これらの共培養実験からのC D 8⁺ T 細胞のさらなる検査により、対照群と比較して約4 0 %のグランザイムB 産生の増加が明らかになり、未処置腫瘍保有マウスからのM D S C を、前刺激したC D 8⁺ T 細胞と共に培養した(各々の条件およびM D S C : T 細胞比についてp 値 0 . 0 1)(図3 E および3 F)。まとめると、これらのデータは、エンチノスタット処置単独および抗P D - 1免疫療法との組み合わせに応答して腫瘍浸潤M D S C の機能の十分な変化を示している。エンチノスタットはF o x P 3 機能を阻害することにより腫瘍内微小環境を変化させることができることが示されており、これらのデータは、c c R C C の同系マウスモデルにおいてM D S C の機能的阻害を介してT M E のさらなる修飾を示す。

【0047】

M D S C 様細胞株、J 7 7 4 M のエンチノスタット処置により、アルギナーゼ1が潜在的機構の標的であることが明らかになった。G e o r g i a C a n c e r C e n t e r 、A u g u s t a U n i v e r s i t y におけるK e b i n L i u 研究所から好意的に供給されたJ 7 7 4 M 細胞株は、最近、安定なM D S C 様細胞株として特徴付けられている。これらの知見を本実施例の目的のために検証するために、これらの細胞をL y 6 C およびL y 6 G について染色して、細胞のM D S C 様状態をさらに解明した。図4 Aにおいて、これらの細胞の亜集団比がR E N C A T M E において見出されるものと非常によく似ていることが示される。C D 4 5⁺ C D 1 1 b⁺ G r 1⁺ 集団のうち、約9 0 %の細胞がG - M D S C (L y 6 G⁺)であり、約1 0 %の細胞がM - M D S C (L y 6 C⁺)陽性細胞である。細胞表現型のこの検証の後、i n v i t r oでのエンチノスタットの処置によって機能的に変化するこれらのM D S C 様細胞の能力を研究した。細胞を0 . 0 1 ~ 5 u M の範囲の濃度のエンチノスタットで4 8 時間まで処置したが、J 7 7 4 M 細胞の増殖または生存率に有意な変化はなかった(図4 F)。エンチノスタットで処置したJ 7 7 4 M 細胞を、予め活性化したC D 8⁺ T 細胞と6 8 ~ 7 2 時間共培養すると、C D 8⁺ T 細胞単独のものに近いC D 8⁺ T 細胞増殖の有意な増加が明らかとなり、この実施例は3つの独立した複製を表す(図4 B ~ 4 C)。これらのi n v i t r o実験からのJ 7 7 4 M 細胞のさらなる調査により、対照 - 未処置細胞と比較して、エンチノスタットで処置したM D S C 様細胞におけるアルギナーゼ-1(A r g 1)発現の有意な阻害が明らかとなった(対照対0 . 5 u M エンチノスタット:p = 0 . 0 0 3 ; 対照対1 u M エンチノスタット:p = 0 . 0 0 4 1 ; 対照対2 u M エンチノスタット:p = 0 . 0 0 4 3)(図4 D)。M D S C は特徴としてアルギナーゼ1およびi N O S のレベルが高い。i N O S の評価は決定的な結果をもたらさなかったが(図4 G)、A r g 1 の高い活性は、循環L - アルギニンプールの尿素およびL - オルニチンへのa r g 1 変換を介して細胞傷害

10

20

30

40

50

性T細胞集団における細胞周期停止の誘導を可能にし、これにより、細胞傷害性T細胞の生存に必要な細胞外L-アルギニンの存在を減少させる。これらのデータは、エンチノスタッフが、アルギナーゼ1を潜在的な特異的標的として、M D S Cの腫瘍促進、T細胞阻害活性を直接損なうことを示す。

【0048】

エンチノスタッフ処置は免疫療法に対する反応の増強のために腫瘍内微小環境(T M E)を刺激する。腫瘍内微小環境は、免疫細胞を動員してその機能を変化させることにより、宿主免疫系を利用する。腫瘍または腫瘍浸潤細胞によって放出されるケモカインおよびサイトカインは腫瘍内微小環境への免疫細胞輸送を促進する。M D S C浸潤の増強をもたらすものの中には、C C L 2 (J E / M C P - 1)、C C L 5、C C L 1 2 (M C P - 5)、C X C L 1 2 (S D F - 1)およびV C A M - 1がある。これらの細胞がT M Eに動員されると、それらは、M - C S F、G - C S F、G M - C S F、C 5 a、I L 1 - 、I L - 1 0、およびI L - 6を含む腫瘍由来因子に応答して増殖し、活性化する。次いで、M D S Cは、アルギナーゼ-1およびi N O Sの上方制御、ならびに関連サイトカイン(すなわち、T r e g促進I L - 1 0、C C L 4、C C L 5)の産生を介して、成長、増殖、血管新生、および免疫監視の回避において、腫瘍を支援し得る。T M Eは、腫瘍細胞および関連する免疫浸潤物の両方によって放出され、解釈されるサイトカインの連続したストームを伴う複雑なシステムである。この複雑なバランスならびにH D A C阻害および免疫療法によってどのように変化するかを理解することは、重要な関心事である。

【0049】

T M E免疫状態に対するエンチノスタッフの役割を調べるために、対照およびエンチノスタッフ処置コホートの腫瘍試料をプロテオームプロファイラー分析(A r y 0 2 8)に供し、対照およびエンチノスタッフ処置コホートの異なるプロファイルを含む1 1 1個のケモカインおよびサイトカインの読み取りを提供した。このプール内で、T M EにおけるM D S C関連輸送/蓄積(C C L 2 : p 0 . 0 0 0 1、V C A M - 1 / C D 1 0 6 : p 0 . 0 0 0 1 / アンジオポエチン-2 : p 0 . 0 0 1)、拡大/活性化サイトカイン(G - C S F : p 0 . 0 0 1、G M - C S F : p 0 . 0 1、I L - 1 : p 0 . 0 0 1、およびI L - 1 0 : p 0 . 0 0 0 1)の有意な減少が観察された。抗腫瘍ケモカインおよびサイトカインの有意な上方制御も認められ、これらは抗腫瘍免疫記憶(C X C L 1 0 / I P - 1 0 : p 0 . 0 1)、T細胞誘引(E - セレクチン : p 0 . 0 0 0 1)、p r o - M D S C阻害(I L - 1 r a : p 0 . 0 1)および先天性抗腫瘍応答(I L - 4 : p 0 . 0 0 1およびI L - 1 2 p 4 0 : p 0 . 0 1)の一因となる(図5A)。これらの結果は、エンチノスタッフ処置が抗腫瘍状態に対してT M Eの免疫状態を変化させるのに十分であり、抗P D - 1処置などの免疫療法介入によりよく応答するようにT M Eを刺激し得ることを示唆する。外来診療に変更可能な免疫療法処置に応答するための宿主免疫系をプライミングするエンチノスタッフ処置に関するこれらのデータについて、対照およびエンチノスタッフ処置マウス由来の血清試料を同じA r y 0 2 8プロテオームプロファイラーに供した。複数の循環p r o -腫瘍関連ケモカインおよびサイトカインの有意な減少が、対照とエンチノスタッフ処置コホートとの間で観察された。これらの中には、M D S C拡大調節因子、アディポネクチン(p 0 . 0 1); p r o -腫瘍化学誘引物質、アンジオポエチン-2(p 0 . 0 0 1); 炎症促進キチナーゼ3様1(p 0 . 0 0 1)、C C L 1 2 (p 0 . 0 1)、補体成分C 5 (p 0 . 0 0 1)、c - 反応性タンパク質(p < 0 . 0 0 1)、I L - 6 (p < 0 . 0 0 0 1)、ペントラキシン2/3(p 0 . 0 1)およびペリオスチン(p 0 . 0 0 1); 制御性T細胞ケモカイン、C C L 1 7 (p 0 . 0 0 1)、M D S C化学誘引物質M - C S F (p 0 . 0 0 1)およびG M - C S F (p 0 . 0 1); E M T / 浸潤マトリクス-メタロプロテイナーゼ、M M P - 2 (p 0 . 0 0 1)およびM M P - 9 (p 0 . 0 0 0 1); C C L 2 (p 0 . 0 1) - オステオプロテグリンを含むM D S C誘引物質(p 0 . 0 0 1); および白血球誘引物質V C A M (p 0 . 0 0 1)があった。

【0050】

10

20

30

40

50

抗腫瘍サイトカイン／ケモカインの上方制御がエンチノstattt処置群において観察されたが、複数のサイトカイン／ケモカインの有意な上方制御が組み合わせコホートにおいて見られ、抗PD-1免疫療法およびエンチノstatttが一緒に作用して、改善された免疫療法反応のために宿主免疫系が増強することが示唆された。以下の抗腫瘍関連サイトカイン／ケモカインの増加も観察された：T細胞誘引物質および抗内皮マーカー（CXCL9（p 0.001）、CXCL10（p 0.0001））、腫瘍増殖抑制性サイトカイン（IL-4（p 0.0001）およびIL-13（p 0.0001））、T細胞化学誘引物質（E-セレクチン（p 0.0001））、および抗腫瘍マーカー（IL-12p40（p 0.0001））。まとめると、これらの結果は、エンチノstattt処置が抗PD-1免疫療法処置の増強を可能にするように宿主環境およびTMEを変化させることを示唆する。

10

【0051】

上記の結果は、エンチノstatttによる処置が骨髄由来サプレッサー細胞の機能を調節し、それによってTMEを調節することを示す。この調節により、免疫応答の増幅がもたらされ、免疫療法処置に対する抗腫瘍応答が増強される。さらに、明細胞腎細胞がんのマウスモデルにおいてエンチノstatttと抗PD-1免疫療法を組み合わせた場合、相乗的な抗腫瘍効果が観察された。腫瘍増殖の遅延に加えて、エンチノstatttおよび抗PD-1免疫療法がcCRCCモデルにおいて相乗的に作用して生存期間を延長することが示された。

20

【0052】

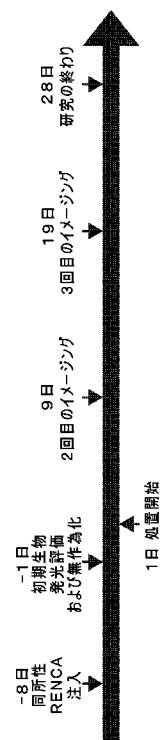
以前の結果と一致して、エンチノstattt処置は、制御性T細胞の存在および機能状態に対して直接的な効果を示した。組み合わせ処置は、抗PD-1処置でわずかに上昇した腫瘍関連FoxP3⁺細胞を減少させ、細胞中のFoxP3タンパク質の存在を有意に減少させ、相乗的な抗腫瘍活性を示唆した。エンチノstattt処置に起因する制御性T阻害は、TMEへのCD8⁺浸潤の増加、およびその後のCD8⁺対TReg比の増加を伴った。これらの知見は、免疫療法処置と組み合わせたエンチノstatttが、腫瘍に対して直接的な細胞傷害性というよりむしろ、有意な免疫調節活性を有するという考えを支持する。

【0053】

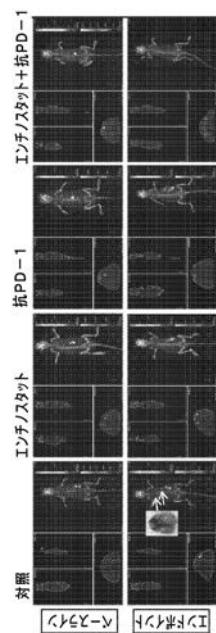
乳がん患者における第II相臨床の最近の分析により、腫瘍内微小環境において単球および顆粒球MDSの両方の減少が示された。実験条件において、MDS集団の単球および顆粒球サブセットの両方の有意な増加が見られた。これらのデータをまとめると、特異的腫瘍内微小環境が腫瘍種類を超えて見られる異なる観察において役割を果たしている可能性が示唆される。

30

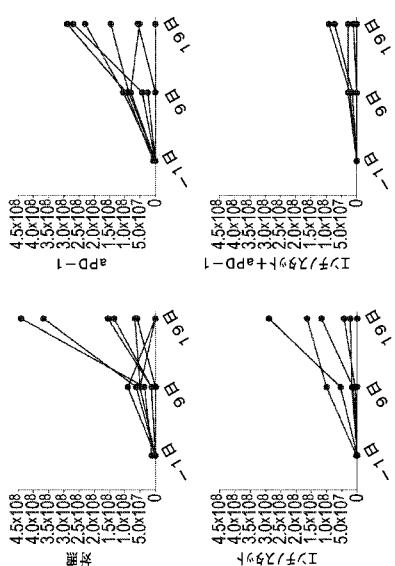
【図 1 A】



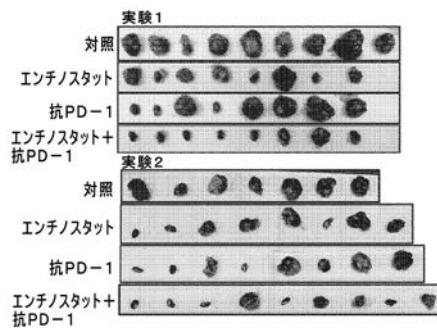
【図 1 B】



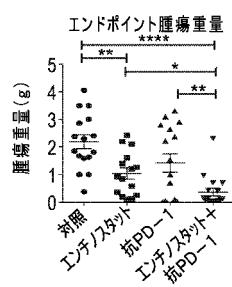
【図 1 C】



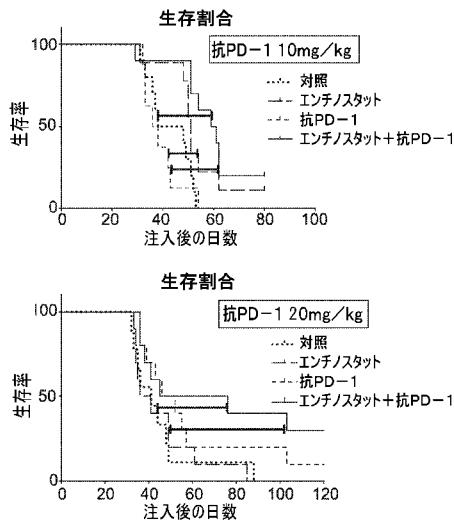
【図 1 D】



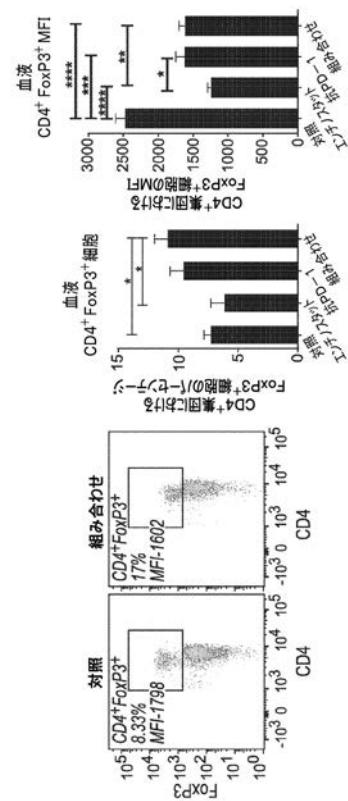
【図 1 E】



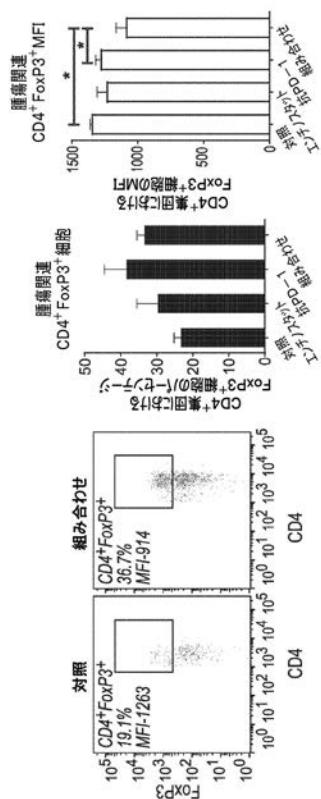
【図 1 F】



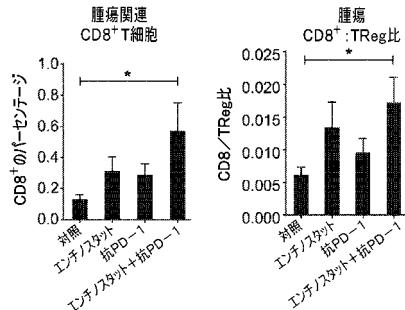
【図 2 A】



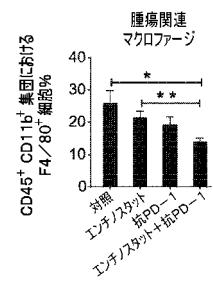
【図 2 B】



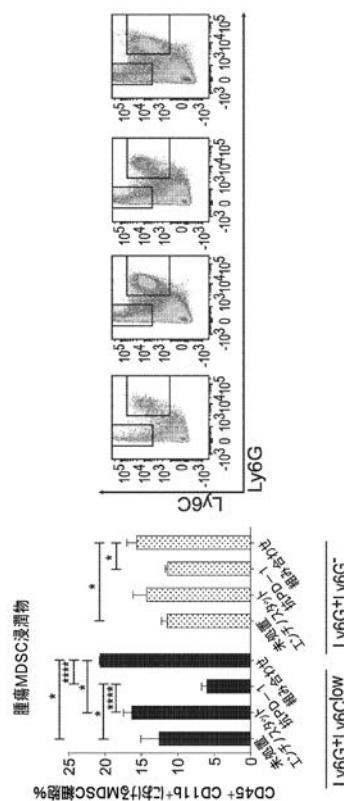
【図 2 C】



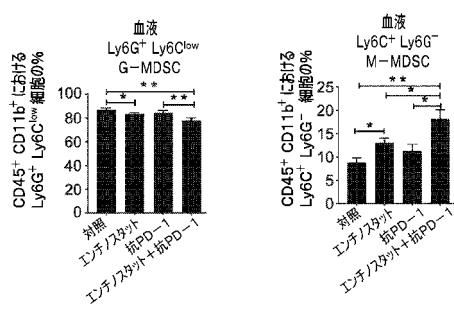
【図 2 D】



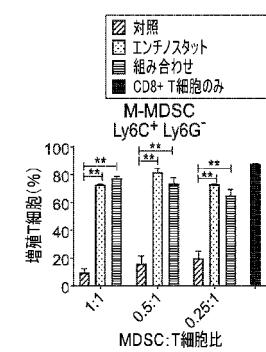
【図 3 A】



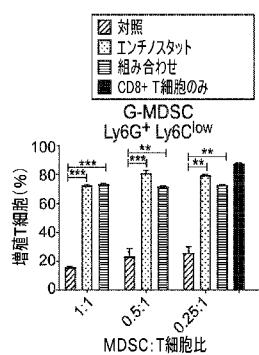
【図 3 B】



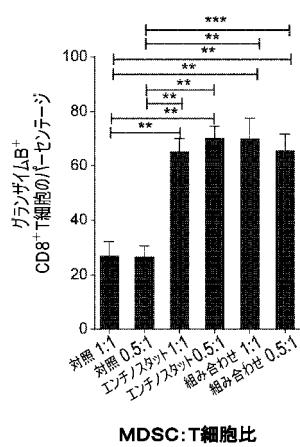
【図 3 C】



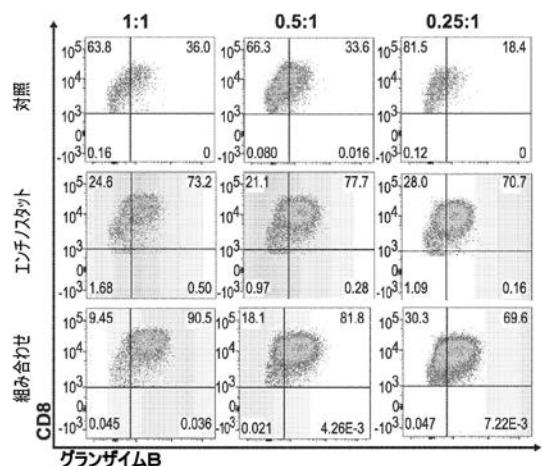
【図 3 D】



【図 3 F】



【図 3 E】



【図 4 A】

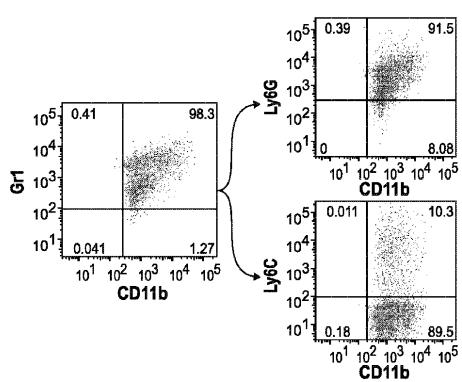
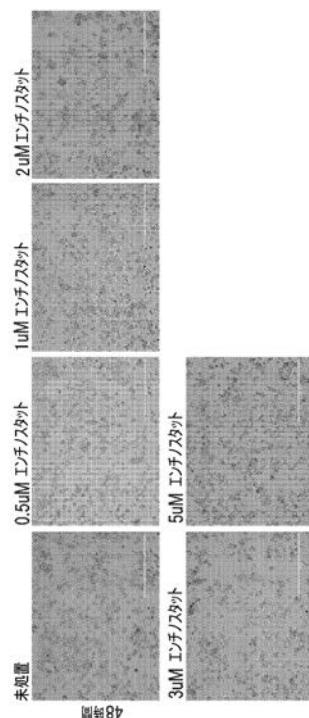
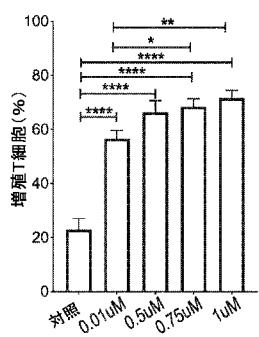


FIG. 4A

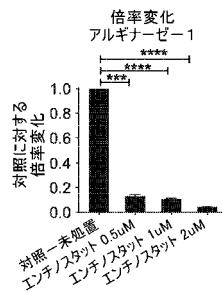
【図 4 B】



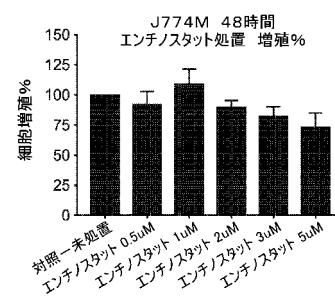
【図 4 C】



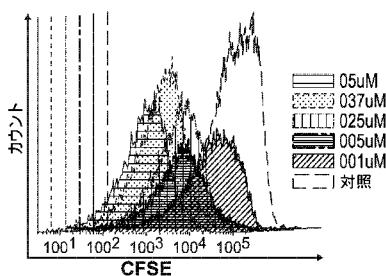
【図 4 E】



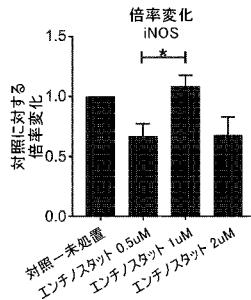
【図 4 F】



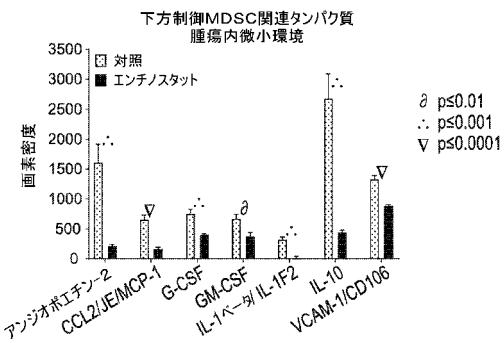
【図 4 D】



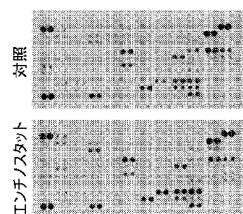
【図 4 G】



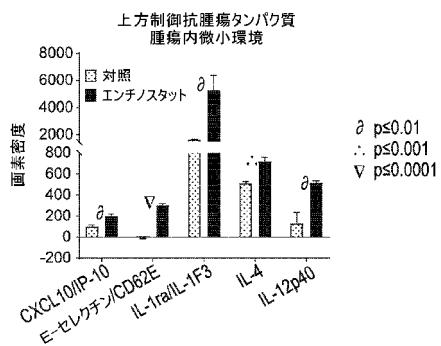
【図 5 B】



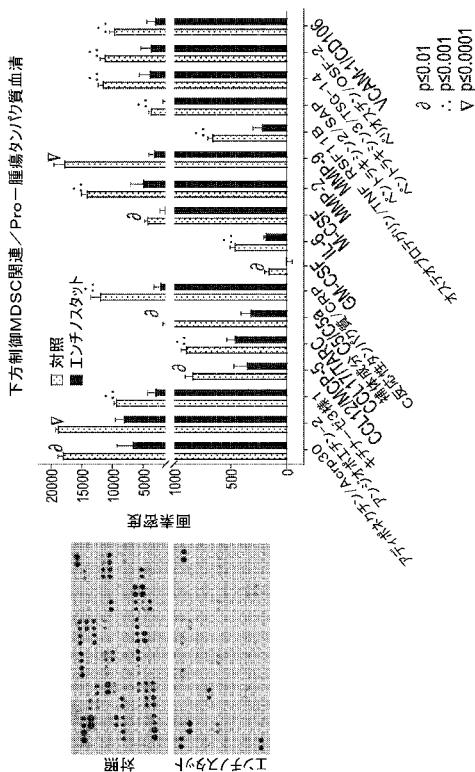
【図 5 A】



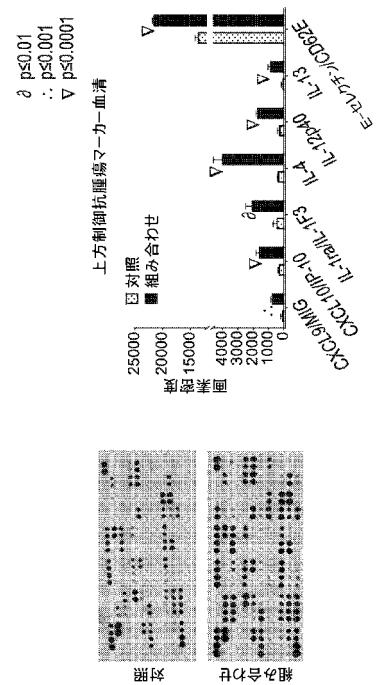
【図 5 C】



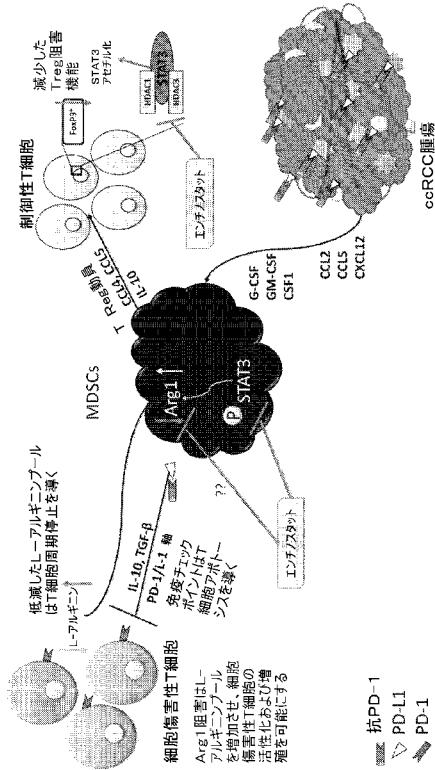
【図 5 D】



【図 5 E】



【図6】



【配列表】

2019503386000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成30年9月27日(2018.9.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

必要とする個体において制御性T細胞を抑制する方法であつて、クラスIヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤を含む組成物およびプログラム細胞死タンパク質1(PD-1)阻害剤を含む組成物を前記個体に投与する工程を含む、方法。

【請求項2】

前記クラスI HDAC阻害剤が、エンチノスタッフ(ピリジン-3-イルメチルN-[[(4-[(2-アミノフェニル)カルバモイル]フェニル]メチル]カルバメート)、ボリノスタッフ(N-ヒドロキシ-N'-フェニルオクタノニアミド)およびトリコスタチンA(TSA)((2E,4E,6R)-7-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-N-ヒドロキシ-4,6-ジメチル-7-オキソ-2,4-ヘプタジエンアミド)、ダシノスタッフ((E)-3-[4-((2-(1H-インドール-3-イル)エチル)(2-ヒドロキシエチル)アミノ)メチル]フェニル)-N-ヒドロキシアクリルアミド)、ブチラート、バルプロ酸(VPA)、ベリノスタッフ((2E)-N-ヒドロキシ-3-[3-(フェニルスルファモイル)フェニル]プロパン-2-エナミド)、パノビノスタッフ((2E)-N-ヒドロキシ-3-[4-({[2-(2-メチル-1H-インド-

ル - 3 - イル)エチル]アミノ}メチル)フェニル]アクリルアミド)、ピロキサミド、SK - 7041(4-(ジメチルアミノ)-N-[[(4-[(E)-3-(ヒドロキシアミノ)-3-オキソプロパ-1-エニル]フェニル]メチル]ベンズアミド)、SK - 7068(N-[[4-[(3-(ヒドロキシアミノ)-3-オキソプロパ-1-エニル]フェニル]メチル]-4-ピロリジン-1-イルベンズアミド)、トラポキシンA(シクロ((S)-ガンマ-オキソ-L-アルファ-アミノオキシランオクタノイル-L-フェニルアラニル-L-フェニルアラニル-D-2-ピペリジンカルボニル))、環状テトラベプチドヒドロキサム酸類似体(CHAP)、デブデシン(4,5:8,9-ジアンヒドロ-1,2,6,7,11-ペンタデオキシ-D-スレオ-D-イド-ウンデカ-1,6-ジエニトール)、モセチノスタット(N-(2-アミノフェニル)-4-[(4-ピリジン-3-イルピリミジン-2-イル)アミノ]メチル]ベンズアミド)およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記クラスI HDAC阻害剤組成物が、約0.5μM～約2μMの前記クラスI HDAC阻害剤を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記クラスI HDAC阻害剤がエンチノスタットである、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記クラスI HDAC阻害剤組成物が約0.5μMのエンチノスタットを含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記PD-1阻害剤が、ニボルマブ、ペンブロリズマブおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記PD-1阻害剤がニボルマブである、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記PD-1阻害剤組成物が約1.0μMのニボルマブを含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記PD-1阻害剤組成物が注入により投与される、請求項6に記載の方法。

【請求項10】

前記クラスI HDAC阻害剤組成物および前記PD-1阻害剤組成物のうちの少なくとも1つが、薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記個体が腎細胞がんを有する、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

前記エンチノスタットが5mgの用量で投与される、請求項4に記載の方法。

【請求項13】

前記エンチノスタットが1週間に1回投与される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記クラスI HDAC阻害剤組成物および前記PD-1阻害剤組成物が、異なる時間間隔で投与される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

腎細胞がんを治療する方法であって、エンチノスタットを含むクラスI HDAC阻害剤組成物およびプログラム細胞死タンパク質1(PD-1)阻害剤を含むプログラム細胞死タンパク質1(PD-1)阻害剤組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項16】

前記エンチノスタットが5mgの用量で投与される、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記エンチノスタットが1週間に1回投与される、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

前記クラス I H D A C 阻害剤組成物および前記 P D - 1 阻害剤組成物が異なる時間間隔で投与される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 P D - 1 阻害剤が、ニボルマブ、ペンプロリズマブおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 P D - 1 阻害剤組成物が注入により投与される、請求項 19 に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/015389

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 A61K45/06 A61K31/4406 A61P35/00 A61P37/02
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)
A61K A61P

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/157162 A1 (H LEE MOFFITT CANCER CT & RES [US]) 15 October 2015 (2015-10-15)	1,2,4,6, 7,9-11, 13,15, 16,18,19 1-19
Y	page 2, line 12 - page 3, line 10 page 8, line 13 - page 9, line 22 page 27; example 4 claims 1-12 ----- -/-	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

23 March 2017

05/04/2017

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

Young, Astrid

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/015389

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/015389

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ROBERT J. MOTZER ET AL: "Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 33, no. 13, 1 May 2015 (2015-05-01), pages 1430-1437, XP055357875, US ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2014.59.0703 page 1430, left-hand column - page 1431, left-hand column page 1435, right-hand column, paragraph 2 - page 1436, right-hand column</p> <p>-----</p>	1-19
Y	<p>APRIL K. SALAMA ET AL: "Clinical applications of PD-1-based therapy: a focus on pembrolizumab (MK-3475) in the management of melanoma and other tumor types", ONCOTARGETS AND THERAPY, 1 April 2015 (2015-04-01), page 929, XP055202068, DOI: 10.2147/OTT.S53164 page 929, paragraph 2 page 930, left-hand column, paragraph 3 - paragraph 4 Conclusion; page 935, right-hand column</p> <p>-----</p>	1-19
Y	<p>LI SHEN ET AL: "Class I Histone Deacetylase Inhibitor Entinostat Suppresses Regulatory T Cells and Enhances Immunotherapies in Renal and Prostate Cancer Models", PLOS ONE, vol. 7, no. 1, 27 January 2012 (2012-01-27), pages 1-14, XP055121805, DOI: 10.1371/journal.pone.0030815 page 2, left-hand column, paragraph 1 - paragraph 3 abstract</p> <p>-----</p>	1-19
X,P	<p>WO 2016/154068 A1 (SYNDAX PHARMACEUTICALS INC [US]) 29 September 2016 (2016-09-29) page 3, paragraphs 8,14 page 17, paragraph 65 examples 1,2 claims 1-38</p> <p>-----</p>	1-6, 9-15,18
E	<p>WO 2017/035453 A1 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]) 2 March 2017 (2017-03-02) page 7, line 28 - page 8, line 3 claims 1-22</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/015389

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2017/041043 A1 (SYNDAX PHARMACEUTICALS INC [US]) 9 March 2017 (2017-03-09) page 7, paragraph 21 - paragraph 22 page 8, paragraph 27 claims 1-33 -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/015389

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2015157162 A1	15-10-2015	US 2017049755 A1		23-02-2017
		WO 2015157162 A1		15-10-2015
WO 2016154068 A1	29-09-2016	NONE		
WO 2017035453 A1	02-03-2017	NONE		
WO 2017041043 A1	09-03-2017	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 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 31/4406
C 0 7 K 16/28	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 E
		A 6 1 K 39/395 T
		C 0 7 K 16/28 Z N A

(81) 指定国 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,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,C1,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,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,TZ

(72) 発明者 ピリ 口ベルト

アメリカ合衆国 インディアナ州 46202 インディアナポリス インディアナ アヴェニュー
518 インディアナ ユニバーシティー リサーチ アンド テクノロジー コーポレーション内

F ターム(参考) 4C084 AA19 AA20 MA23 MA31 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA60
MA66 NA05 ZA811 ZA812 ZB261 ZB262 ZC201 ZC202 ZC411 ZC412
ZC751 ZC752
4C085 AA13 AA14 BB01 BB11 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04 GG08
GG10
4C086 AA01 AA02 BC17 MA02 MA04 MA23 MA31 MA35 MA37 MA41
MA43 MA52 MA60 MA66 NA05 ZA81 ZB26 ZC20 ZC41 ZC75
4H045 AA11 AA30 DA76 EA20 FA74