

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7437307号
(P7437307)

(45)発行日 令和6年2月22日(2024.2.22)

(24)登録日 令和6年2月14日(2024.2.14)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
		A 6 1 P	37/04
請求項の数 11 (全48頁)			
(21)出願番号	特願2020-544565(P2020-544565)	(73)特許権者	520155136
(86)(22)出願日	平成30年11月2日(2018.11.2)		プレシジョン バイオロジックス、イン
(65)公表番号	特表2021-502416(P2021-502416		コーポレイテッド
	A)		アメリカ合衆国 2 0 8 1 4 メリーラン
(43)公表日	令和3年1月28日(2021.1.28)		ド、ベセスダ、デル レイ アベニュー
(86)国際出願番号	PCT/US2018/059039		4 8 1 4
(87)国際公開番号	WO2019/090134	(74)代理人	110000855
(87)国際公開日	令和1年5月9日(2019.5.9)		弁理士法人浅村特許事務所
審査請求日	令和3年10月20日(2021.10.20)	(72)発明者	アーレン、フィリップ、エム .
(31)優先権主張番号	62/581,380		アメリカ合衆国、メリーランド、ロック
(32)優先日	平成29年11月3日(2017.11.3)		ビル、ロックビル パイク 1 1 3 0 0、
(33)優先権主張国・地域又は機関			スウィート 1 1 4 0
	米国(US)	(72)発明者	ツァン、クウォン、ワイ .
(31)優先権主張番号	62/592,778		アメリカ合衆国、メリーランド、ベセス
(32)優先日	平成29年11月30日(2017.11.30)		ダ、ヨーク レイン 5 4 2 0
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトがんの治療のためのモノクローナル抗体NEO - 2 0 1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効量のNEO - 2 0 1抗体を含む、それを必要とする患者において、がん腫細胞を死滅させるための、がん腫を処置するための、がん腫の再発を予防するための、又は腫瘍量を減少させるための、医薬組成物であって、

(a) 前記抗体は、抗体依存性細胞毒性 (A D C C) 及び補体媒介性細胞毒性 (C D C) を媒介し、それにより前記患者のがん腫細胞を死滅させる；

(b) 前記抗体は、(i) 配列番号 2 8 に含まれる重鎖可変領域配列及び配列番号 2 9 に含まれる軽鎖可変領域配列、及び(ii) ヒト I g G 1 定常ドメイン、を含み；

ならびに

(c) 前記患者は、前記医薬組成物の投与前または前記投与時にナチュラルキラー (「 N K 」) が枯渇している、さらに、

(d) 前記がん腫は、NEO - 2 0 1 による、補体媒介性活性化及び補体媒介性溶解に反応性である細胞により特徴づけられる、

医薬組成物。

【請求項 2】

前記患者は、前記投与前または前記投与時に重度のN K 枯渇である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記投与前または前記投与時に、

前記患者が、NK 枯渇しているか、又は前記患者が重度にNK 枯渇しているかを決定すること、

をさらに含む、請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

以下を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の医薬組成物：

(a) 前記患者は、任意により CNKD (例えば、CNKD 1、CNKD 2)、または FNKD (例えば、FNKD 1) を含む NK 細胞欠損症 (NKD) を有する；

(b) 前記患者は、別の治療法の結果として NK が枯渇しているか、または重度に NK が枯渇している；

(c) 前記患者はがん治療を受けている；又は

(d) 前記患者は化学療法または放射線療法を受けていて、任意に、

前記化学療法は、1 つ以上のプロテアソーム阻害剤 (例えば、ボルテゾミブ、MG 132)、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤 (例えば、バルプロ酸、トリコスタチン A、スベロイルアニリド - ヒドロキサム酸 (SAH)、酪酸ナトリウム)、遺伝毒性剤 (例えば、ドキソルピシン、メルファラン、シスプラチン、Ara - C、アフィジコリン、マイトマイシン、メトトレキサート、エトポシド)、GSK 阻害剤 (例えば、LIC1、BIO、SB 21)、BET 阻害剤 (例えば、JQ1)、HSP 90 阻害剤 (例えば、ラディシコラ (radicicola)、17 - AAG)、微小管集合阻害剤 (例えば、ビンクリスチン、サイトカラシン D、ノコダゾール、ドセタキセル)、及び / または免疫調節薬 (例えば、レナリドマイド) を投与することを含む。

【請求項 5】

以下を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の医薬組成物：

前記投与前または前記投与時に、

(a) NK 細胞は、前記個体における末梢血単核細胞 (PBMC) の 5 % 未満を構成する；

(b) NK 細胞は、前記個体における末梢血単核細胞 (PBMC) の 3 % 未満を構成する；

(c) 前記患者の 70 % 未満の PBMC NK 細胞が CD56^{dim}CD16⁺ NK 細胞である；又は

(d) 前記患者の 50 % 未満の PBMC NK 細胞が CD56^{dim}CD16⁺ NK 細胞である。

【請求項 6】

以下を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の医薬組成物：

前記 NEO - 201 抗体は、配列番号 28 の配列を有する重鎖配列、及び配列番号 29 の配列を有する軽鎖配列を含む。

【請求項 7】

前記 NEO - 201 抗体が、以下と組み合わせて投与されるためのものである、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の医薬組成物：

(a) 前記がん腫の細胞の死滅を増強するかまたは刺激するための有効量のサイトカインアゴニスト、ただし、任意に、前記サイトカインアゴニストは、インターロイキン - 2 (IL - 2)、インターロイキン 21 (IL - 21)、ALT - 803、IL - 15 阻害剤、チェックポイント阻害剤、抗 PD1、抗 PDL1、抗 CTLA - 4、抗 - 41BB、抗 OX40、抗 Tim - 3、もしくはそれらの組み合わせ、IL - 15 アゴニストもしくは IL - 15 スーパーアゴニスト、又は IL - 15 受容体 / IgG1 Fc 融合タンパク質に結合した IL - 15 変異体 (IL - 15 N72D) からなる複合体 (ALT - 803 のような複合体)、を含む；又は

(b) 前記がん腫の細胞の死滅を増強するかまたは刺激するための有効量の補体調節タンパク質 (CRP) アンタゴニスト、

前記 CRP アンタゴニストは、任意に、CD46、CD55、または CD59 のうちの 1 つ以上に拮抗し、前記 CRP アンタゴニストは、任意に、抗体またはその抗原結合断片

10

20

30

40

50

を含む。

【請求項 8】

前記 N E O - 2 0 1 抗体の前記有効投与量が、前記サイトカインアゴニストを含まない前記 N E O - 2 0 1 抗体単独での治療と比較して低減される、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記がんは、結腸癌、膵癌、卵巣癌、胃癌、肺癌、乳癌、又は子宮癌である、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 10】

サイトカインアゴニストが I L - 1 5 アゴニスト又は I L - 1 5 スーパーアゴニストである、請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載の医薬組成物。

10

【請求項 11】

I L - 1 5 アゴニスト又は I L - 1 5 スーパーアゴニストが A L T - 8 0 3 を含む、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本明細書は、2017年11月30日に提出された米国仮出願第62/592,778号、及び2017年11月3日に提出された米国仮出願第62/581,380号の利益を主張し、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0002】

配列表情報

この出願は、本開示の一部として、その全体が本明細書に参照により組み込まれる、32563バイトのサイズを有し、2018年11月2日に作成された「4328204402.txt」という名前のファイルに列挙されている生物学的配列を含む。

【背景技術】

【0003】

がんは、世界中で最も頻度の高い死亡原因のうちの1つであり、2025年には早くも毎年推定二千万件の新規症例が予測されている(Ferlayら、2015年)。手術、放射線、化学療法などの従来のがん治療法は、多くの場合重篤な副作用を誘発するが、進行した疾患の大多数の患者を治癒できず、再発となる(Bodeyら、1996年)。より近年の治療法が、主に正常な健康な組織を温存しながらがん性細胞を選択的に標的とするために開発されている。この中でも、免疫療法は、がん医療の分野に革命をもたらしており、がん患者のための重要な治療選択肢となっている。

30

【0004】

がん免疫療法の根本的な原理は、免疫編集として公知であり(Mittalら、2014年)、これは、細胞の形質転換が起こり、がん抑制の固有のメカニズムが奏功しなかった後にのみ開始するがん抑制の外因性のメカニズムである。免疫編集プロセスは、排除、均衡、及び逃避の3つの相で行われる。排除相及び平衡相のそれぞれの間、がん細胞の免疫拒絶反応は、がん細胞の増殖を支配するか、またはそれと均衡して、悪性成長を制御する。しかし、逃避相では、一旦抑制されたがん細胞は、免疫エフェクターメカニズムへの非感受性及び/または腫瘍微小環境における免疫抑制の誘導により、免疫認識を免れる可能性がある。免疫認識を免れたがん細胞は、より自由に増殖し、成長して、臨床的に明らかな疾患となり得る(Dunnら、2004年)。がん免疫療法の目的は、抗腫瘍免疫応答を生成すること、及び/または増幅させることにより、腫瘍の成長を抑制し、腫瘍の再発を遅延させ、生存を延長することにより、がん細胞を排除相及び/または平衡相に保つことである(Carter, 2001; Hodge et al., 2006; Vergati et al., 2010; Gabitzsch et al., 2015)。治療アプローチには、チェックポイント阻害抗体、抗腫瘍ワクチン、及びキメラ抗原受容体(C

40

50

AR) - T細胞により患者を治療することが含まれ、これらはすべてT細胞による適応免疫を利用する。しかし、自然免疫は、抗腫瘍応答を生成し、増強することもでき、腫瘍を標的とするモノクローナル抗体(mAb)を使用して、自然抗腫瘍免疫を刺激することができる(Topalian et al., 2011)。

【0005】

NEO-201は、Hollinshead同種大腸癌ワクチンプラットフォームに対して生成された新規のヒト化IgG1 mAbである(Hollinshead et al., 1970; Hollinshead et al., 1972)。このワクチンの免疫原性成分は、大腸癌患者79名の外科的切除片からプールされた腫瘍膜画分に由来する腫瘍関連抗原(TAA)であった(Hollinshead et al., 1985)。これらの膜画分は、半精製され、結腸癌患者対健常ボランティアにおける遅延型過敏症(DTH)についてスクリーニングされ、難治性大腸癌患者の臨床試験において評価された(Hollinshead et al., 1985; Hollinshead, US 4810781, 1989; Bristol & Kantor, 米国特許第7829678号, 2010)。これらの治験では、ワクチンに対する細胞媒介応答に加えて持続的なIgG応答が生じた患者での抗腫瘍応答及び全生存期間の有意な延長の両方によって定義される臨床的利益が報告され、それによりワクチンは抗腫瘍抗体を生成できる免疫原性成分を含んでいることが示唆された(Hollinshead, 1991)。この最初の大腸癌ワクチンは、マウスにおいてモノクローナル抗体を生成するために使用されており、以前に記載したエンシツキシマブ(NPC-1C/NEO-102)(Luka et al., 2011; Patel et al., 2013; Beg et al., 2016; Kim et al., 2017)及びNEO-201を生成した。予備調査では、NEO-201がCEACAMファミリーメンバーの腫瘍関連バリエーションに結合し得ることが示唆され(Zeligs et al., 2017)、NEO-201によって認識される抗原(複数可)及び特定のエピトープ(複数可)の特徴をさらに明らかにするための取り組みが進行している。

【0006】

ヒトがん胎児性抗原(CEA)ファミリーは、染色体19q13.2にタンデム配置された29個の遺伝子で構成されている。これらの遺伝子は、ヌクレオチド相同性に基づいて、2つの主要なサブファミリー、CEACAM及び妊娠固有の糖タンパク質サブグループに分類される。CEACAMコードタンパク質としては、CEA(CEACAM5)、CEA関連細胞接着分子(CEACAM1、CEACAM3、CEACAM4、CEACAM6、CEACAM7、及びCEACAM8)が挙げられる。CEACAMファミリーは、Igスーパーファミリーに属している。構造的には、ヒトCEACAMの各々には、108~110個のアミノ酸が含まれ、かつIg可変ドメインと相同である1つのN末端ドメインが含まれ、その後異なる数(0~6)のIgC2型の定常様ドメインが続く。CEACAMタンパク質は、互いに同種親和性及び異種親和性により相互作用し得る。CEACAM1は、その細胞質ドメイン内にPD1様ITIM(免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ)を含むため、このファミリー内の固有のタンパク質である。この阻害効果は、ITIMによるチロシン残基のリン酸化によって引き起こされ、その結果として、Srcホモロジー2ドメインを含むチロシンホスファターゼ-1及び-2が動員される。CEACAM1タンパク質は、単球、顆粒球、活性化T細胞、B細胞、及びNK細胞など様々な免疫細胞に発現する。CEACAM1はいくつかのアイソフォームとして生じ、2つの主要なアイソフォームは、CEACAM1-L及びCEACAM1-Sであり、それぞれ長い(L)または短い(S)細胞質ドメインを有する。CEACAM1-Sの発現は、ヒト白血球では完全に欠如している。CEACAM1-Lは、CD16については陰性であるがCD56については陽性である活性化ヒトNK細胞の亜集団上に発現する。

【0007】

モノクローナル抗体(mAb)は、所与のmAbに特異的である固有の抗原結合領域(断片抗原結合、Fab)、及び同じアイソタイプのすべてのmAbに共通である定常領域

10

20

30

40

50

(結晶化可能断片、Fc)で構成されている。Fc領域は、特定の免疫細胞型の表面に発現するFc受容体(FcR)ファミリーのメンバーと係合することにより、免疫細胞の活性を調節できる。特に、ヒトIgG1 mAbは、マクロファージ及びNK細胞上で発現するFcガンマ受容体IIIIa(FcRIIIa、CD16)と相互作用し得る。この相互作用により、マクロファージが刺激され、mAbオプソニン化されたがん細胞が貪食され、NK細胞が活性化されて、抗体依存性細胞毒性(ADCC)として公知であるメカニズムを介してがん細胞が脱顆粒化され、溶解し得る。ADCCは、多くの前臨床試験においてin vivoでの抗腫瘍効果の主要な媒介物であることが示されており、がん治療に使用されるいくつかのmAbの作用機序において重要な役割を果たしている(Seidel et al., 2013)。ADCCを媒介できる臨床的に承認されたmAbの例としては、乳癌のHER2受容体を標的とするトラスツズマブ(Seidel et al., 2013; Petricevic et al., 2013);リンパ腫の汎B細胞マーカーCD20を標的とするリツキシマブ(Seidel et al., 2013; Dall'Ozzo et al., 2004);大腸癌及び頭頸部癌の上皮増殖因子受容体(EGFR)を標的とするセツキシマブ(Seidel et al., 2013; Levy et al., 2009; Kawaguchi et al., 2007; Lopez-Albaitero et al., 2009);ならびにメルケル細胞癌及び膀胱癌の免疫抑制リガンドPD-L1を標的とするアベルマブ(Boyerinas et al., 2015)が挙げられる。さらに、Fc領域は、C1複合体と相互作用して、補体依存性細胞傷害(CDC)を活性化する可能性がある。ここでは、タンパク質分解カスケードにより、抗体の標的となる細胞の溶解を引き起こす原形質膜の孔が形成される。抗腫瘍CDCがin vitroで実証された場合であっても、それががんにおけるmAb治療の臨床効果に重要であるか否かについては、議論されている(Meyer et al., 2014)。

【0008】

本出願人のこれまでの米国特許第5,688,657号、同第7,314,622号、同第7,491,801号、同第7,763,720号、同第7,829,678号、同第8,470,326号、同第8,524,456号、同第8,535,667号、同第8,802,090号、同第9,034,588号、同第9,068,014号、同第9,371,375号、同第9,592,290号、同第9,718,866号、及びRE 39,760(これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)では、様々な抗がん抗体、がん抗原、及び関連技術が開示されている。

【発明の概要】

【0009】

本明細書の実施例に記載されている研究では、前臨床モデルにおけるin vitro結合特性及びin vivo活性及びNEO-201の局在を評価する。NEO-201は、一連のヒトがん腫細胞株及び腫瘍組織に対して幅広い反応性を呈したが、健康な組織の大部分を結合することは観察されなかった。さらに、NEO-201は、in vitroにおいてヒトがん腫細胞に対してADCC及びCDCの両方の活性を呈し、かつNEO-201は、ADCCのエフェクター細胞源として単独、及びヒト末梢血単核細胞(PBMC)との組み合わせの両方において、in vivoでのヒト脾臓異種移植腫瘍の成長を大幅に減衰させた。最後に、非ヒト霊長類における単回投与毒性研究では、観察された唯一の悪影響が、循環している好中球の一時的な減少であったため、NEO-201の安全性及び忍容性が示された。これらの研究は、様々な固形腫瘍の治療用の新規治療剤としてのNEO-201の潜在的な臨床的有用性の根拠を提供する。さらに、対象の抗体の観察されたCDC活性により、ADCCが有効であることが期待されない免疫不全患者、例えば、疾患が原因で、または放射線、化学療法、及び他の疾患の治療の影響として、免疫不全である患者を治療する機会が開かれる。

【0010】

本出願人らは、以前、Hollinshead同種大腸癌ワクチンプラットフォームに

対して生成されたmAb（エンシツキシマブ（NPC-1C/NEO-102）と呼ばれる）の前臨床抗腫瘍活性（Patel et al., 2013）ならびに臨床安全性及び有効性（Beg et al., 2016; Kim et al., 2017）を報告した。本報告では、NEO-201と呼ばれる同じワクチンプラットフォームに由来する2番目の腫瘍抗原標的化mAbの特性について記載する。NEO-201は、様々な腫瘍タイプ、組織学的サブタイプ、及び変異プロファイルに由来する細胞など、様々なヒトがん腫細胞株をin vitroで陽性染色することが示されている。NEO-201陽性は、肺腺癌対扁平上皮癌に由来する腫瘍細胞株、及びHER2陽性乳癌細胞株対トリプルネガティブ株においてより高い頻度で観察された。ヒト腫瘍試料の染色では、結腸、脾臓、胃、肺、乳房、及び子宮の腫瘍など、多様ながん組織がNEO-201に対して陽性染色されたことが示された。より大きい試料サイズを用いた拡大調査では、NEO-201により、様々ながん腫の組織学的及び/または分子サブタイプを区別できることが明らかになり得る。興味深いことに、培養がん細胞株とは対照的に、より高い割合の腫瘍組織がNEO-201に反応した。この観察から、NEO-201によって認識された標的がin vitroよりもin vivoにおいてより容易に発現することが示され得る。これは、標的発現が、局所的微小環境内からの因子との腫瘍細胞の相互作用に少なくとも部分的に依存していることを示唆している。NEO-201によって認識される抗原（複数可）及びエピトープ（複数可）の特徴をさらに明らかにするため、及び正常組織ではなく腫瘍組織におけるその発現を支配する調節制御メカニズム（複数可）を決定するための実験が現在進行中である。

10

20

【0011】

この調査により、健康な正常組織及び腫瘍組織に隣接している正常組織の圧倒的多数がNEO-201に対して陰性であることが判明したため、染色プロファイルにおいて、NEO-201が著しく腫瘍特異的であることが明らかになった。NEO-201陽性は、正常な舌組織及び子宮頸部組織において観察されたが、染色強度は弱く、マイクロアレイでは、最小の試料サイズ（ $n = 2$ ）のみを表した。これらの観察結果を確認するために、正常組織試料におけるNEO-201染色のさらに拡大した分析が行われる。さらに、NEO-201投与では、マウスにおいて肉眼で観察できる毒性はいずれも誘発されることはなく、非ヒト霊長類に投与した場合の忍容性は良好であった。非ヒト霊長類において好中球の枯渇が観察されたことにより、NEO-201と反応する抗原（複数可）が、これらの免疫細胞上に発現することが示唆され、造血細胞型とのNEO-201の反応性の評価が進行中である。これらの有望な結果からは、1) NEO-201は、患者の生検から良性組織とがん性組織とを区別する際に診断的有用性を有し得ること、及び2) NEO-201は、好中球減少症以外の重大な毒性またはオフターゲット効果を引き起こすことなく、腫瘍を効果的に標的にし得ることが示唆される。現在、NEO-201の安全性及び忍容性をさらに評価する取り組みが進行中であり、NEO-201を使用したがん治療のための臨床試験が計画されている。

30

【0012】

自然免疫エフェクター機構は、宿主の抗腫瘍免疫を促進し、増強する上で主要な役割を果たすことが示されている。ヒトIgG1 mAbのFc部分は、オプソニン化された標的に対する自然免疫を活性化し、ADCC及び/またはCDCを媒介する可能性があることは周知である（Strome et al., 2007; Hayes J, et al., 2017）。特に、ADCCを媒介する能力は、がんの治療が承認された様々なヒトIgG1 mAbの治療効果の重要な要素と見なされている（Boyerinas et al., 2015; Seidel et al., 2013; Petricevic et al., 2013; Dall'Ozzo et al., 2004; Levy et al., 2009; Kawaguchi et al., 2007; Lopez-Albaitero et al., 2009）。重要なことに、FCGR3A遺伝子（FcRIIIaをコードする）内のV158F多型は、ヒトIgG1 mAbの親和性の違いに関連しており（Koene et al., 1997; Wu et al., 1997）、高親和性

40

50

V/V遺伝子型のドナー由来の免疫細胞は、*in vitro*でより高いトラスツズマブ媒介ADCC活性を呈する(Musolino et al., 2008)。V/V遺伝子型は、トラスツズマブで治療された乳癌患者において客観的奏効率及び無増悪生存期間と有意に相関することも示され(Musolino et al., 2008)、これにより、mAbベースの治療におけるADCCの役割に関する間接的な臨床的エビデンスがもたらされる。腫瘍細胞をNEO-201で処理することにより、NK細胞の細胞傷害活性が2~5倍増強され、ADCC活性が、低濃度の抗体(0.1 µg/mL)でも維持されたため、*in vitro*ではNEO-201は、ADCCを媒介できる。これらのデータは、V/V遺伝子型を有する患者がNEO-201治療から追加の利益を得る可能性を提起している。追加の見通しは、サイトカイン刺激によるNK細胞機能の増強により、ADCC活性及びおそらくNEO-201の潜在的な臨床的利点が向上する可能性があることである。IL-2は、NK細胞の強力な活性化因子であることが周知であり(Hank et al., 1990)、IL-21により、トラスツズマブ及びセツキシマブによって媒介されるADCC活性が増強されることが示された(Watanabe et al., 2010)。ALT-803と称される、IL-15シグナル伝達の新規融合タンパク質スーパーアゴニストを用いた近年の前臨床研究では、NK細胞(及びCD8+T細胞)の増殖、活性化、及び溶解能力が大幅に向上し、これにより、がんの様々な動物モデルにおいて有意な抗腫瘍活性がもたらされることが実証されている(Han et al., 2011; Gomes-Giacchia et al., 2014; Mathios et al., 2016; Rhode et al., 2016; Kim et al., 2016; Felices et al., 2017)。興味深いことに、ALT-803は、B細胞リンパ腫細胞株及び原発性濾胞性リンパ腫細胞に対する*in vitro*でのNK細胞脱顆粒、IFN- γ の産生、及びリツキシマブ媒介ADCCを実質的に増強し、*in vivo*での2つのB細胞リンパ腫モデルにおけるALT-803及びリツキシマブによる併用治療により、腫瘍細胞量が大幅に減少し、生存率が向上することが見出された(Rosario et al., 2016)。

【0013】

MAbが係合し得る別の自然免疫エフェクター機構は、CDCを促す補体系の活性化であり、NEO-201は、CDCを媒介して腫瘍細胞を死滅させる能力を有することが判明した。MAbの治療有効性に対してCDCが寄与しているかについては、議論の余地があるが、少なくとも一部の特定の例では、がん治療に有益であることが示唆されている(Meyer et al., 2014)。さらに、いくつかの異なる補体調節タンパク質(CRP)は、補体活性化を阻害するように機能し、CD46、CD55、及びCD59などの特定の膜結合CRPが、CDCへの耐性を付与する可能性が高い様々ながんにおいて異常に発現することが報告されている(Seya et al., 1994; Niehans et al., 1996; Donin et al., 2003)。今後の調査では、CRPをブロックする戦略が耐性腫瘍細胞のNEO-201媒介CDCを増強できるか否かを確認する予定である。

【0014】

*In vivo*でのNEO-201の評価では、活性化されたヒト免疫エフェクター細胞と組み合わせて投与した場合に、顕著な抗腫瘍効果が明らかになった。この組み合わせにより、2つの組み合わせ群の一部のマウス(5/20、25%)において完全な退行さえもたらされた。さらに、NEO-201は、異種移植腫瘍組織に優先的に局在するが、様々な健康な組織には局在しないことが判明した。これらのデータから、腫瘍に対するNEO-201の作用機序が、自然免疫細胞による腫瘍細胞のADCC依存性溶解であることが確認される。しかし、抗腫瘍活性は、ヒト免疫細胞を免疫不全マウスに追加することなく、NEO-201のみでも観察されたことに留意する必要がある。ADCCアッセイにおいて、*in vitro*では、NEO-201によるCFPAC-1腫瘍細胞の処理により、実質的な毒性が誘発されることはなかったため、この現象は、*in vivo*で発生する条件に固有のものであり得る。免疫エフェクター細胞の不在下でのNEO-20

1 活性に関する1つの仮説は、CDCの誘発であり得る。NEO-201のCDC活性は、実施例3に記載されているさらなる実験で直接実証した。

【0015】

要約すると、この調査により、NEO-201が、ADCC及びCDCの両方などの自然免疫エフェクター機構と係合して、腫瘍細胞を死滅させることができる、非常に腫瘍特異的な抗体であることが実証されている。さらに、NEO-201では、脾臓のin vivo異種移植モデルでの安全性及び抗腫瘍有効性、ならびに非ヒト霊長類での忍容性が実証された。これらの知見が、様々な種類のがんを有する患者の診断剤及び治療剤としてのNEO-201の臨床開発の根拠となる。強力なADCC活性がない場合であっても、CDCから抗腫瘍効果が生じ得るため、これらの結果から、免疫不全(NK細胞レベルが低い)患者におけるNEO-201の使用も裏付けられる。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1A~1Dは、ヒトがん腫細胞株へのNEO-201結合のフローサイトメトリの結果を示す図である。様々なレベルのNEO-201抗原発現を有する代表的なヒトがん腫細胞株、(図1A)脾臓CFPAC-1(高)、(図1B)NSCLC H441(中)、(図1C)乳房HCC1937(低)、及び(図1D)結腸SW1116(陰性)である。結果は、各細胞株のNEO-201陽性率%及び平均蛍光強度(MFI)として表す。赤、NEO-201染色細胞；黒、非染色細胞。NEO-201陽性は、陽性率% 10%と定義された。

20

【図2】図2A~2Cは、NEO-201によるヒト腫瘍試料のIHC染色を示す図である。図2Aは、結腸、脾臓、胃、及び肺の試料からの隣接する正常組織及び悪性組織からの代表的なNEO-201染色を示す図である。いずれの画像も100Xで得た。図2Bは、様々ながん性組織からのヒト腫瘍マイクロアレイ試料からのNEO-201陽性染色の定量化した図である。図2Cは、腫瘍組織に隣接する正常組織のヒト腫瘍マイクロアレイ試料からのNEO-201陽性染色を定量化した図である。n = 試料の数。

【図3】図3A~3Cは、NEO-201が、ヒト腫瘍細胞株に対してADCC及びCDCを媒介することを示す図である。図3Aは、標的細胞としてCFPAC-1細胞またはASPC-1細胞を使用したADCC活性を示す図である。細胞を10 µg/mLのNEO-201またはヒトIgG1(陰性対照)で処理した。2名の健康なドナー由来の精製されたNK細胞を、指定されたE:T比でエフェクター細胞として使用した。* T検定により、統計上有意である(p < 0.05)。図3Bは、用量を増加したNEO-201で処理されたCFPAC-1細胞を使用したADCCアッセイを示す図である。健康なドナーから単離されたNK細胞をE:T比12.5:1のエフェクター細胞として使用した。グラフは、10 µg/mLヒトIgG1で処理された対照細胞に対するNEO-201処理された腫瘍細胞の特異的溶解率%の倍率変化を示している。* T検定により、統計上有意である(p < 0.05)。図3Cは、指定された期間、指定された用量のNEO-201で処理されたASPC-1細胞を使用したCDCアッセイを示す図である。* T検定により、統計上有意である(p < 0.05)。

30

【図4】図4A~4Dは、CFPAC-1腫瘍異種移植片におけるNEO-201の抗腫瘍効果を示す図である。図4Aは、様々な時点での各処理群のCFPAC-1異種移植片の腫瘍容積測定結果を示す図である。マウス(n = 10動物/群)に、腫瘍細胞移植後13日目、17日目、及び20日目に生理食塩水、ヒトIgG1(250 µg)、またはNEO-201(100 µg及び250 µg)を腹腔内投与した。マウスに、免疫エフェクター細胞源として、14日目、18日目、及び21日目に、約1.0 × 10⁷個のIL-2活性化ヒトPBMCも腹腔内投与した。図4Bは、36日目に依然として触知可能な腫瘍を担持しているマウスを定量化した図である。図4Cは、NEO-201処理対生理食塩水处理腫瘍担持マウスの代表的な画像を示す図である。図4Dは、研究中の様々な時点での腫瘍担持マウスの体重測定結果を示す図である。

40

【図5】図5A~5Bは、CFPAC-1異種移植片担持マウスにおけるNEO-201

50

生体内分布を示す図である。放射能標識されたNEO-201を静脈内投与したCFPAC-1腫瘍を担持している雌(図5A)及び雄(図5B)マウスの指定された組織からの正規化放射能の測定結果を示す図である。n = 4動物/時点。1日目、2日目、4日目、及び7日目は、放射性標識抗体の注入から剖検までの時間量を表す。

【図6】図6A～図6Cは、CNEO-201で処理したカニクイザルの体重及び好中球数を示す図である。図6Aは、指示された用量レベルでNEO-201の単回用量を受けた7日後及び14日後に、サルについて測定された、ベースライン(-1日目)に対する体重の変化率(%)を示す図である。n = 4匹の動物/群(雌2匹、雄2匹)。図6Bは、指定された用量レベルでのNEO-201の単回用量で処理されたサルの血液からのベースライン(-7日目)に対する好中球レベルの変化率を示す図である。n = 4匹の動物/群(雌2匹、雄2匹)。図6Cは、好中球レベル对各用量及び時点での0mg/kg対照のp値を示す図である。*T検定により、統計上有意である($p < 0.05$)。

【図7】図7A～7Cは、NEO-201を使用したhANK ADCCアッセイ(4時間)を示す図である。標的細胞 = 3000細胞/ウェル。図6A～6Bは、エフェクター：標的(E:T)比に対応させた4時間でのNEO-201(上線、四角記号)またはIgG1陰性対照(下線、丸記号)で処理したH520肺癌(図6A)またはOV90卵巣癌(図6B)細胞の特異的溶解率を示す図である。E:T比は、6.25:1、12.5:1、または25:1であった。mAb濃度は10µg/mLであった。示されている値は3回の繰り返しの平均+/-SDである。アスタリスク(*)は、IgG陰性対照に対する統計的有意性を示す($p < 0.01$ 、両側t検定)。図6Cは、4時間、E:T比25:1での肺(H520、HCC827)、乳房(ZR-75-1)、及び卵巢(OV90)のがん細胞をNEO-201(右、薄い灰色の棒線)または陰性対照IgG(左、黒の棒線)で処理した細胞の特異的溶解率を示す図である。mAb濃度は10µg/mLであった。示されている値は3回の繰り返しの平均+/-SDである。アスタリスク(*)は、IgG陰性対照に対する統計的有意性を示す($p < 0.01$ 、両側t検定)。

【図8】ALT-803による処理により、NEO-201によって媒介されるADCC活性が増強されることを示す図である。2名の正常なドナーから単離されたNK細胞をALT-803(25ng/mL)または培地対照で48時間処理し、CeliGo Imagingサイトメーターを使用して4時間の非放射性ADCCアッセイにおいてエフェクター細胞として使用した。CF-PAC1(ヒト膀胱癌細胞株)細胞をカルセインAMで染色し、3,000細胞/ウェルで標的として使用した。結果は、特異的溶解率%(SE)で表す。

【図9】ALT-803による処理により、ヒトNK細胞でのTIM-3及びNKG2Dの発現が増強されたことを示す図である。正常なドナー由来の精製されたヒトNK細胞を、ALT-803(25ng/mL)を含むか、または含まずに48時間培養した。結果は、陽性細胞率%(MFI)で表す。

【図10】ALT-803による処理により、ヒトNK細胞でのTIM-3及びNKG2Dの発現が増強されたことを示す図である。別の正常なドナー由来の精製されたヒトNK細胞を、ALT-803(25ng/mL)を含むか、または含まずに48時間培養した。結果は、陽性細胞率%(MFI)で表す。

【図11】ALT-803による処理により、低濃度NEO-201によって媒介されるADCC活性が増強されたことを示す図である。正常なドナーから単離されたNK細胞(ND#6)をALT-803(25ng/mL)または培地対照で48時間処理し、CeliGo Imagingサイトメーターを使用して4時間の非放射性ADCCアッセイにおいてエフェクター細胞として使用した。NEO-201は、3つの異なる濃度(10µg/mL、1µg/mL、0.1µg/mL)で使用した。CF-PAC1(ヒト膀胱癌細胞株)細胞をカルセインAMで染色し、3,000細胞/ウェルで標的として使用した。E:T = 25:1。結果は特異的溶解(SE)%で表す。*統計的に有意である($p < 0.01$)。

【図12】ALT-803による処理により、正常のドナー(ND#8)のADCC活性

10

20

30

40

50

を増強し、NEO-201によって媒介されるADCC活性が最小となることを示す図である。この活性は、抗CD16及び抗TIM-3抗体によってブロックされ得る。ADCC活性が最小の正常なドナーから単離されたNK細胞をALT-803(25 ng/ml)または培地対照で48時間処理し、CeliGo Imagingサイトメーターを使用して4時間の非放射性ADCCアッセイにおいてエフェクター細胞として使用した。抗CD16及び抗TIM-3は、30 µg/ml及び15 µg/mlの濃度で使用した。NEO-201及びエフェクター細胞を添加する前に、NK細胞を抗CD16または抗TIM-3で2時間前処理した。CF-PAC1(ヒト膀胱癌細胞株)細胞をカルセインAMで染色し、3,000細胞/ウェルで標的として使用した。NEO-201は、10 µg/mlの濃度で使用した。E:T=25:1。結果は、特異的溶解率%(SE)で表す。* ALT-803処理のない場合と比較して統計的に有意である($p < 0.01$)。# 抗CD16及び抗TIM-3処理のない場合と比較して統計的に有意である($p < 0.01$)。

10

【図13】NEO-201を使用したNK-92死滅アッセイ(16時間)を示す図である。標的腫瘍細胞(ASPC-1、BxPC-3、CFPAC-1、またはLS174T)を3000細胞/ウェルで播種した。その後、腫瘍細胞を10 µg/mlのヒトIgG1アイソタイプ対照抗体またはNEO-201で処理し、ナチュラルキラー(NK)細胞株NK-92をエフェクター対標的(E:T)比1.5625:1、3.125:1、6.25:1、及び12.5:1で添加した。37℃で16時間のインキュベーション後、CeliGo Imaging Cytometer及びGraphPad Prism7ソフトウェアを使用して、細胞生存率を定量化した。生きた標的細胞(カルセインAM+/PI-)を各ウェルで数え、特異的溶解を計算した。結果をグラフで示し、各腫瘍細胞型について以下に表に示す。* 統計的に有意である($p < 0.05$)。

20

【発明を実施するための形態】

【0017】

一態様では、本開示は、有効量のNEO-201抗体を、それを必要とする患者に投与することを含む、がん腫細胞を死滅させる方法を提供する。

【0018】

一態様では、本開示は、有効量のNEO-201抗体を、それを必要とする患者に投与することを含む、がん腫を治療する方法を提供する。

【0019】

一態様では、本開示は、有効量のNEO-201抗体を、それを必要とする患者に投与することを含む、がん腫の再発を予防する方法を提供する。

30

【0020】

一態様では、本開示は、有効量のNEO-201抗体を、それを必要とする患者に投与することを含む、がん腫を有する患者の腫瘍量を減少させる方法を提供する。

【0021】

この抗体は、補体媒介性細胞毒性(CDC)を媒介し、それにより患者のがん腫細胞を死滅させることができる。

【0022】

患者は、投与前または投与時にナチュラルキラー(「NK」)が枯渇している場合がある。患者は、投与前または投与時に重度のNK枯渇であり得る。患者は、CNKD(例えば、CNKD1、CNKD2)、またはFNKD(例えば、FNKD1)などのNK細胞欠損症(NKD)を有し得る。患者は、別の治療法、例えば、化学療法または放射線療法などのがん療法の結果として、NK枯渇または重度のNK枯渇であり得る。患者は、1つ以上のプロテアソーム阻害剤(例えば、ボルテゾミブ、MG132)、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤(例えば、パルプロ酸、トリコスタチンA、スベロイルアニリド-ヒドロキサム酸(SAH)、酪酸ナトリウム)、遺伝毒性剤(例えば、ドキソルビシン、メルファラン、シスプラチン、Ara-C、アフィジコリン、マイトマイシン、メトトレキサート、エトポシド)、GSK阻害剤(例えば、LIC1、BIO、SB21)、BET阻害剤(例えば、JQ1)、HSP90阻害剤(例えば、ラディシコラ(radicicola

40

50

))、17-AAG)、微小管集合阻害剤(例えば、ビクリスチン、サイトカラシンD、ノコダゾール、ドセタキセル)、及び/または免疫調節薬(例えば、レナリドマイド)で治療されてもよい。

【0023】

この方法は、投与前または投与時に、患者がNK枯渇しているかを決定することを含み得る。

【0024】

この方法は、投与前または投与時に、患者が重度のNK枯渇であるかを決定することを含み得る。

【0025】

この方法では、投与前または投与時に、NK細胞は、個体における末梢血単核細胞(PBMC)の5%未満を構成し得る。

【0026】

この方法では、投与前または投与時に、NK細胞は、個体における末梢血単核細胞(PBMC)の3%未満を構成し得る。

【0027】

この方法では、投与前または投与時に、患者の70%未満のPBMC NK細胞がCD56dimCD16+NK細胞であり得る。

【0028】

この方法では、投与前または投与時に、患者の50%未満のPBMC NK細胞がCD56dimCD16+NK細胞であり得る。

【0029】

NEO-201抗体は、配列番号28及び配列番号29に含まれるCDR配列の少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つすべてを含み得る。

【0030】

NEO-201抗体は、配列番号38に対して少なくとも90%の同一性を有する可変重鎖配列を含み得る。

【0031】

NEO-201抗体は、配列番号39に対して少なくとも90%の同一性を有する可変軽鎖配列を含み得る。

【0032】

NEO-201抗体は、配列番号38に対して少なくとも90%の同一性を有する可変重鎖配列、及び配列番号39に対して少なくとも90%の同一性を有する可変軽鎖配列を含み得る。

【0033】

NEO-201抗体は、配列番号28のアミノ酸20~470に対して少なくとも90%の同一性を有する重鎖配列、及び配列番号29のアミノ酸20~233に対して少なくとも90%の同一性を有する軽鎖配列を含み得る。

【0034】

NEO-201抗体は、配列番号28及び配列番号29に含まれる6つすべてのCDR配列を含み得る。

【0035】

NEO-201抗体は、ヒトIgG1定常ドメインを含み得る。

【0036】

NEO-201抗体は、ヒト化され得る。

【0037】

NEO-201抗体は、別の部分にコンジュゲートされてもよい。

【0038】

NEO-201抗体は、別の細胞毒性部分、標識、放射性部分、または親和性タグにコンジュゲートされてもよい。

10

20

30

40

50

【0039】

この方法は、がん腫の細胞の死滅を増強するか、または刺激するために有効量のサイトカインアゴニストを患者に投与することをさらに含み得る。サイトカインアゴニストは、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン21 (IL-21)、ALT-803、IL-15阻害剤、チェックポイント阻害剤、抗PD1、抗PDL1、抗CTLA-4、抗-41BB、抗OX40、抗Tim-3、またはそれらの組み合わせであり得る。

【0040】

この方法は、がん腫の細胞の死滅を増強するかまたは刺激するために有効量の補体調節タンパク質 (CRP) アンタゴニストを患者に投与することをさらに含み得る。CRPアンタゴニストは、CD46、CD55、またはCD59のうちの1つ以上に拮抗し得る。CRPアンタゴニストは、抗体またはその抗原結合断片を含み得る。

10

【0041】

サイトカインアゴニストは、IL-15アゴニストまたはIL-15スーパーアゴニストを含み得る。

【0042】

サイトカインアゴニストは、ALT-803などのIL-15受容体 / IgG1 Fc融合タンパク質に結合したIL-15変異体 (IL-15N72D) からなる複合体を含み得る。

【0043】

NEO-201抗体の有効投与量は、サイトカインアゴニストを含まないNEO-201抗体単独での治療と比較して低減され得る。

20

【0044】

がん腫は、結腸癌であり得る。がん腫は、膵癌であり得る。がん腫は、卵巣癌であり得る。がん腫は、胃癌であり得る。がん腫は、肺癌であり得る。がん腫は、乳癌であり得る。がん腫は、子宮癌であり得る。

【0045】

別の実施形態では、本開示は、有効量のNEO-201抗体を、それを必要とする患者に投与することを含む、がん腫細胞を死滅させる方法を提供し、本方法では、患者は、投与前または投与時にナチュラルキラー (「NK」) が枯渇している。NK枯渇は、患者由来の試料、例えば血液試料中において、5%未満または3%未満のNK細胞である末梢血単核細胞 (PBMC) を有する患者であり得る。代替的にまたは追加的に、この方法では、投与前または投与時に、患者の70%未満 (任意により50%未満) のPBMC NK細胞がCD56dimCD16+ NK細胞であり得る。

30

【0046】

別の実施形態では、本開示は、有効量のNEO-201抗体を、それを必要とする患者に投与することを含む、がん腫を治療する方法を提供し、本方法では、患者は、投与前または投与時にナチュラルキラー (「NK」) が枯渇している。

【0047】

別の実施形態では、本開示は、有効量のNEO-201抗体を、それを必要とする患者に投与することを含む、がん腫の再発を予防する方法を提供し、本方法では、患者は、投与前または投与時にナチュラルキラー (「NK」) が枯渇している。

40

【0048】

別の実施形態では、本開示は、有効量のNEO-201抗体を、それを必要とする患者に投与することを含む、がん腫を有する患者の腫瘍量を減少させる方法を提供し、本方法では、患者は、投与前または投与時にナチュラルキラー (「NK」) が枯渇している。

【0049】

前述の方法では、抗体はCDCを媒介し、それにより、例えば、患者がNK枯渇しているために有効なADCCが存在しないにもかかわらず、それによって患者においてがん腫細胞を死滅させることができる。患者は、投与時に重度のNK枯渇であり得る。任意により、方法は、例えば、投与時または投与前の期間内、例えば、1週間または2週間前など

50

、患者がNK枯渇であるか、または重度のNK枯渇であることをさらに含む。NK枯渇または重度のNK枯渇状態は、NK細胞を枯渇させる別の治療法の事前使用または同時使用など、患者の病歴から推測されてもよい。例えば、患者は、放射線療法または化学療法などのがん療法を受けているか、または同時に受けている。がん療法は、1つ以上のプロテアソーム阻害剤（例えば、ボルテゾミブ、MG132）、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤（例えば、バルプロ酸、トリコスタチンA、スベロイルアニリド-ヒドロキサム酸（SAH）、酪酸ナトリウム）、遺伝毒性剤（例えば、ドキソルビシン、メルファラン、シスプラチン、Ara-C、アフィジコリン、マイトマイシン、メトトレキサート、エトポシド）、GSK阻害剤（例えば、LIC1、BIO、SB21）、BET阻害剤（例えば、JQ1）、HSP90阻害剤（例えば、ラディシコラ（radicicola））、17-AAG）、微小管集合阻害剤（例えば、ビンクリスチン、サイトカラシンD、ノコダゾール、ドセタキセル）、及び/または免疫調節薬（例えば、レナリドマイド）を投与することを含み得る。

10

【0050】

患者は、CNKD（例えば、CNKD1、CNKD2）、またはFNKD（例えば、FNKD1）などのNK細胞欠損症（NKD）を有し得る。

【0051】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、NEO-201抗体は、配列番号28及び配列番号29に含まれるCDR配列の少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つすべてを含み得る。

20

【0052】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、NEO-201抗体は、配列番号38に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有する可変重鎖配列を含み得る。上記パーセント配列同一性を有する可変重鎖は、配列番号38に含まれる3つすべてのCDR配列を含み得る。

【0053】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、NEO-201抗体は、配列番号39に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有する可変軽鎖配列を含み得る。可変軽鎖は、配列番号39に含まれる3つすべてのCDR配列を含み得る。

30

【0054】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、NEO-201抗体は、配列番号38に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有する可変重鎖配列、及び配列番号39に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有する可変軽鎖配列を含み得る。可変軽鎖は、配列番号39に含まれる3つすべてのCDR配列を含み得、パーセント配列同一性を有する可変重鎖は、配列番号38に含まれる3つすべてのCDR配列を含み得る。

40

【0055】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、NEO-201抗体は、配列番号28のアミノ酸20~470に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有する重鎖配列、及び配列番号29のアミノ酸20~233に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有する軽鎖配列を含み得る。軽鎖は、配列番号29に含まれる3つすべてのCDR配列を含み得、パーセント配列同一性を有する可変重鎖は、配列番号28に含まれる3つすべてのCDR配列を含み得る。

50

【 0 0 5 6 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、NEO-201抗体は、配列番号28に含まれる重鎖可変領域配列及び配列番号29に含まれる軽鎖可変領域配列を含み得る。

【 0 0 5 7 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、NEO-201抗体は、配列番号28のアミノ酸20～470を含む重鎖配列及び配列番号29のアミノ酸20～233を含む軽鎖配列を含み得る。

【 0 0 5 8 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、NEO-201抗体は、ヒトIgG1定常ドメインを含む。

10

【 0 0 5 9 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、NEO-201抗体は、ヒト化され得る。

【 0 0 6 0 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、NEO-201抗体は、別の細胞毒性部分、標識、放射性部分、または親和性タグなどの別の部分にコンジュゲートさせ得る。

【 0 0 6 1 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、この方法は、がん腫の細胞の死滅を増強するか、または刺激するために有効量のサイトカインアゴニストを患者に投与することをさらに含み得る。サイトカインアゴニストは、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン21(IL-21)、ALT-803、IL-15阻害剤、チェックポイント阻害剤、抗PD1、抗PDL1、抗CTLA-4、抗-41BB、抗OX40、抗Tim-3、またはそれらの組み合わせであり得る。

20

【 0 0 6 2 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、この方法は、がん腫の細胞の死滅を増強するかまたは刺激するために有効量の補体調節タンパク質(CRP)アンタゴニストを患者に投与することをさらに含み得る。CRPアンタゴニストは、CD46、CD55、またはCD59のうちの1つ以上に拮抗し得る。CRPアンタゴニストは、抗体またはその抗原結合断片を含み得る。サイトカインアゴニストは、IL-15アゴニストまたはIL-15スーパーアゴニストを含み得る。サイトカインアゴニストは、IL-15受容体/IgG1Fc融合タンパク質に結合したIL-15変異体(IL-15N72D)からなる複合体を含み得る。サイトカインアゴニストは、ALT-803を含み得る。

30

【 0 0 6 3 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、NEO-201抗体の有効投与量は、サイトカインアゴニストを含まないNEO-201抗体単独での治療と比較して低減される。

40

【 0 0 6 4 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、がんはNEO-201抗原を発現し得る。NEO-201抗原の発現は、がんの試料中においてNEO-201抗原を検出することにより決定され得る。検出は、組織学的染色、フローサイトメトリー、RT-PCR、ドットプロット、ウエスタンプロット、ノーザンプロット及び周知の技術を含む技術により行われ得る。再発がんまたは転移性がんの場合、NEO-201抗原の発現は、原発がん中のNEO-201の発現またはNEO-201抗体治療法に対する原発がんの反応から予測してもよい。

【 0 0 6 5 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態

50

では、がんは、結腸癌であり得る。

【 0 0 6 6 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、がんは、膵癌であり得る。

【 0 0 6 7 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、がんは、卵巣癌であり得る。

【 0 0 6 8 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、がんは、胃癌であり得る。

【 0 0 6 9 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、がんは、肺癌であり得る。

【 0 0 7 0 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、がんは、乳癌であり得る。

【 0 0 7 1 】

前述のまたは以下の実施形態のいずれかと共に使用され得る本発明の好ましい実施形態では、がんは、子宮癌であり得る。

【 0 0 7 2 】

定義

【 0 0 7 3 】

別途定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解され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同様または同等の方法及び材料は、本発明または本発明の試験で使用され得るが、好適な方法及び材料が本明細書に記載される。材料、方法、及び実施例は単なる例示であり、限定することを意図するものではない。

【 0 0 7 4 】

本明細書の説明において、及び下記特許請求の範囲にわたって用いられる場合、文脈が別途明確に指示しない限り、「a」、「an」、及び「the」の意味は、複数の指示対象を含む。

【 0 0 7 5 】

本明細書で使用される「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸及び合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣体を広く指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝暗号によってコードされたもの、ならびに例えばヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸、及びO-ホスホセリンなど、後に修飾されるアミノ酸である。アミノ酸類似体とは、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造を有する化合物、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、及びR基に結合している炭素、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。このような類似体は、修飾されたR基を有するか（例えばノルロイシン）または修飾されたペプチド主鎖を有するが、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を保持している。アミノ酸模倣体とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然アミノ酸と同様の形で機能する化学化合物を指す。

【 0 0 7 6 】

本明細書で使用される用語「NK枯渇」または「ナチュラルキラー枯渇」は、正常範囲と比較して低いナチュラルキラー（NK）細胞レベルを有する患者を指す。NK細胞は、細胞傷害性自然免疫リンパ球である。典型的には、NK細胞は、健康な個体の末梢血単核細胞（PBMC）の5～20%を構成する。PBMCの5%未満を構成するNK細胞を有する患者は、NK枯渇と呼ばれる。さらに、NK細胞がPBMCの3%未満を構成する場合、患者は、重度のNK細胞の枯渇と称される。さらに、正常な個体では、最大90%の

10

20

30

40

50

P B M C NK細胞がC D 5 6^{d i m} C D 1 6⁺ NK細胞であり、これらは最も細胞毒性のあるサブセットと考えられている。70%未満のP B M C NK細胞がC D 5 6^{d i m} C D 1 6⁺ NK細胞である場合、その患者はNK枯渇と称される。さらに、P B M C NK細胞の50%未満がC D 5 6^{d i m} C D 1 6⁺ NK細胞である場合、その患者は重度のNK枯渇と称される。所定の患者は、これらの個々の基準の一方または両方を満たすことに基づいて、NK枯渇または重度のNK枯渇と称される場合がある。一般的に言えば、NK枯渇または重度のNK枯渇としての患者の状態は、患者から採取された試料、例えば、血液試料、例えば、1週間または2週間前以内に得られ、検査された試料を検査することによって決定される。NK枯渇または重度のNK枯渇としての患者の状態は、NK細胞のこうした枯渇に関連する疾患の診断及び/または一連の治療からも推測され得る。

10

【0077】

NK枯渇には、NK細胞欠損症(NKD)を有する対象も含まれる。例示的なNKD状態としては、NK細胞の欠如及び末梢血リンパ球間のそれらの機能の特徴とする古典的なNKD(CNKD)、末梢血リンパ球内にNK細胞が存在し、NK細胞活性に欠陥を有することを特徴とする機能的NKD(FNKD)が挙げられる。CNKD及びFNKDの両方において、NK細胞の異常は主要な免疫学的欠損であり、これにより、ADCC応答が不十分になる。CNKD及びFNKDは、原因遺伝子(複数可)の同一性または他の患者の特徴などの患者の特徴に基づいてさらに細かく分類できる。CNKDとしては、常染色体優性であり、GATA2遺伝子での欠陥に関連するCNKDサブタイプ1(CNKD1)と、常染色体劣性であり、MCM4遺伝子での欠陥に関連するCNKDサブタイプ2(CNKD2)が挙げられる。FNKDとしては、常染色体劣性であり、FCCR3A遺伝子での欠陥に関連するFNKD1が挙げられる。

20

【0078】

「抗体」は、本明細書で用いられる場合、エピトープに適合し、それを認識する特定形状を有する任意のポリペプチド鎖含有分子構造を広く指し、1つ以上の非共有結合相互作用により、分子構造とエピトープとの間の複合体が安定化する。原型的な抗体分子は、免疫グロブリンであり、全ての源、例えば、ヒト、齧歯類、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ニワトリからのあらゆる種類の免疫グロブリン、IgG、IgM、IgA、IgE、IgDが「抗体」であると考えられる。抗体としては、これらに限定されないが、キメラ抗体、ヒト抗体及び他の非ヒト哺乳動物抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体(scFv)、ラクダボディ、ナノボディ、IgNAR(サメに由来する一本鎖抗体)、小モジュラー免疫医薬品(SMIP)、及び抗体断片(例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂)が挙げられる。多数の抗体コード配列が記載されている。また他のものは、当技術分野で周知の方法によって出現させ得る。Streltsov, et al. (2005) Protein Sci. 14(11): 2901-9; Greenberg, et al. (1995) Nature 374(6518): 168-173; Nuttall, et al. (2001) Mol Immunol. 38(4): 313-26; Hamers-Casterman, et al. (1993) Nature 363(6428): 446-8; Gill, et al. (2006) Curr Opin Biotechnol. 17(6): 653-8を参照されたい。

30

40

【0079】

「NEO-201抗体」は、配列番号28及び29の重鎖及び軽鎖、または任意によりその中に含まれる定常領域と共に可変領域、ならびにそれらの断片及び変異体を含む抗体を指す。そのような変異体としては、配列番号28及び配列番号29に含まれるCDR配列の1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは好ましくは6つすべてを含む配列、すなわち配列番号32の重鎖CDR1、配列番号33の重鎖CDR2、配列番号34の重鎖CDR3、配列番号35の軽鎖CDR1、配列番号36の軽鎖CDR2、及び配列番号37の軽鎖CDR3が挙げられる。この抗体は、ヒト化され得る。この抗体は、抗体の発現及び/またはプロセッシング及び分泌中に除去され得る1つ以上のリーダー配列を含有して発現され得る。この抗体は、これらに限定されないが、NEO-201抗体配列及び異なる抗体の

50

結合断片を含む二特異性抗体または多特異性抗体など、一価、二価、またはより多価の形態で提示されてもよい。典型的には、この抗体は、がん腫細胞に特異的に結合し、配列番号 38 の可変重鎖及び配列番号 39 の可変軽鎖を含むか、または配列番号 28 の重鎖及び配列番号 29 の軽鎖を含む抗体とがん腫細胞への結合について競合する。配列番号 28 及び / または配列番号 29 に含まれるそれらの C D R 配列のうちの 1 つ以上は、配列番号 1 または 4 の軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 2 または 5 の軽鎖 C D R 2 ; 配列番号 3 または 6 の軽鎖 C D R 3 ; 配列番号 7 の重鎖 C D R 1 ; 配列番号 8、10、30、または 31 の重鎖 C D R 2 ; 配列番号 9 もしくは 11 または配列番号 30 ~ 31 の重鎖 C D R 3 ; などのバリエーション配列と置換されてもよい。軽鎖は、配列番号 14、16、17、18、19、20、21、または 29 の軽鎖配列に含まれる C D R を含み得る。重鎖は、配列番号 15、22、23、24、25、26、27、または 29 の重鎖配列に含まれる C D R を含み得る。抗体は、配列番号 38 に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する可変重鎖配列、及び / または配列番号 39 に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する可変軽鎖配列を含み得、任意により、重鎖及び / または軽鎖配列は、配列番号 28 及び配列番号 29 に含まれる C D R 配列の 1、2、3、4、5、または好ましくは 6 つすべて、すなわち、配列番号 32 の重鎖 C D R 1、配列番号 33 の重鎖 C D R 2、配列番号 34 の重鎖 C D R 3、配列番号 35 の軽鎖 C D R 1、配列番号 36 の軽鎖 C D R 2、及び配列番号 37 の軽鎖 C D R 3 を含む。抗体は、細胞毒性部分、放射性部分、標識、または精製タグなどの別の部分にコンジュゲートされてもよい。

10

20

【0080】

本明細書で使用される「抗原」は、動物がその抗原のエピトープに結合できる抗体を産生するようにさらに誘導できる抗体によって結合され得る分子または分子の一部を広く指す。抗原は、1 つのエピトープを有していても、1 つ以上のエピトープを有していてもよい。本明細書で言及される特定の反応は、抗原が、非常に選択的な様式で、対応する抗体と反応し、他の抗原によって誘起され得る他の多数の抗体とは反応しないことを示す。抗原は、腫瘍特異的であり得る（例えば、脾臓及び結腸癌の腫瘍性細胞によって発現される）。

【0081】

本明細書で使用される「がん」は、悪性の成長または腫瘍を引き起こす、制御されていない異常な細胞分裂を特徴とする任意の新生物疾患（侵襲性または転移性）を広く指す。

30

【0082】

本明細書で使用される「キメラ抗体」は、抗原結合部位（可変領域）が、異なるまたは変更されたクラス、エフェクター機能及び / もしくは種の定常領域、またはキメラ抗体に新しい特性を付与する完全に異なる分子、例えば、酵素、毒素、ホルモン、成長因子、薬物に連結されるように、定常領域もしくはその一部分が変更されるか、置換されるか、もしくは交換されるか；または、可変領域もしくはその一部が、異なるまたは変更された抗原特異性を有する可変領域により変更され、置換され、または交換される抗体分子を広く指す。

40

【0083】

本明細書で使用される「保存的に改変されたバリエーション」は、アミノ酸配列及び核酸配列の両方に適用され、特定の核酸配列に関しては、保存的に改変されたバリエーションを広く指し、同一もしくは本質的に同一のアミノ酸配列をコードするそれらの核酸を指すか、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を指す。遺伝暗号の縮重のため、機能的に同一である多数の核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。そのような核酸多様性は「サイレント変動」であり、保存的に改変された変動の一種である。ポリペプチドをコードする本明細書中のいずれの核酸配列にも、核酸のあらゆる可能なサイレント変動について記載されている。当業者であれば、核酸中の各コドン（通常、メチオニンの唯一のコドンである A U G、及び通常、トリプトファンの唯一のコドンである T

50

G Gを除く)が機能的に同一の分子を生成するように改変され得ることを認識している。

【0084】

本明細書で使用する「相補性決定領域」、「超可変領域」、または「CDR」は、抗体の軽鎖または重鎖の可変領域に見られる1つ以上の超可変領域または相補性決定領域(CDR)を広く指す。Kabat, et al. (1987)「Sequences of Proteins of Immunological Interest」National Institutes of Health, Bethesda, MD.を参照されたい。これらの発現としては、Kabatらによって定義された((1983)「Sequences of Proteins of Immunological Interest」U.S. Dept. of Health and Human Services)超可変領域、または抗体の三次元構造における超可変ループが挙げられる。Chothia and Lesk (1987) J Mol. Biol. 196: 901-917。各鎖内のCDRは、フレームワーク領域によって密接に近接して保持され、他の鎖のCDRと共に、抗原結合部位の形成に寄与する。CDR内には、選択性決定領域(SDR)として記載されている選択されたアミノ酸があり、抗体と抗原との相互作用においてCDRが使用する重要な接触残基を表している。Kashmiri (2005) Methods 36: 25-34。

10

【0085】

本明細書で使用する「対照量」は、広くマーカーを指し、マーカーの試験量と比較される任意の量または量の範囲であり得る。例えば、マーカーの対照量は、特定の疾患または状態を有する患者またはそのような疾患または状態を有さないヒトにおけるマーカーの量であり得る。対照量は、絶対量(例えば、マイクログラム/ml)または相対量(例えば、シグナルの相対強度)のいずれかであり得る。

20

【0086】

本明細書で使用する「差次的に存在する」は、疾患または状態を有する患者から採取した試料に存在するマーカーの量または質における、疾患または状態のうちの1つを有さない患者から採取した同等の試料と比較した差異を広く指す。例えばハイブリダイゼーション/またはNATベースのアッセイによって測定された場合、例えば、一方の試料中の核酸断片の量が、他方の試料中の核酸断片の量と著しく異なる場合、核酸断片は任意により2つの試料間で異なるように存在してもよい。一方の試料中のポリペプチドの量が他方の試料中のポリペプチドの量と大幅に異なる場合、ポリペプチドは2つの試料間で異なるように存在する。マーカーが一方の試料中で検出可能であり、他方の試料では検出可能でない場合、こうしたマーカーは異なるように存在すると見なされ得ることに留意すべきである。任意により、比較的少量の上方調節がマーカーとして役立ち得る。

30

【0087】

「診断的」は、本明細書で用いられる場合、病態の存在または性質を特定することを広く指す。診断的方法是、それらの感受性及び特異性において異なる。診断的アッセイの「感受性」は、検査で陽性を示す、罹患した個体のパーセンテージである(「真の陽性」のパーセント)。アッセイによって検出されない罹患した個体は、「偽陰性」である。罹患していない、かつアッセイにおいて検査で陰性を示す対象は、「真陰性」と呼ばれる。診断的アッセイの「特異性」は、1 - 偽陽性率であり、「偽陽性」率は、検査で陽性を示す疾患のない者の割合として定義される。特定の診断的方法是、状態の確定診断を提供しないことがあるが、この方法により、診断を補助する陽性表示がもたらされる場合は、この方法で十分である。

40

【0088】

「診断する」は、本明細書で用いられる場合、疾患または症状を分類することと、疾患の重症度を決定することと、疾患の進行を監視することと、疾患の転帰及び/または回復の見通しを予測することと、を広く指す。「検出する」という用語も、前述のいずれかを任意に包含し得る。本発明による疾患の診断は、いくつかの実施形態において、対象から得られた生物試料中の本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドのレベルを決定する

50

ことによって影響されることがあり、決定されるレベルは、疾患に対する素因、または疾患の存在もしくは非存在と相関し得る。「対象から得られた生物試料」は、対象から物理的に除去されていない試料も任意により含み得ることに留意すべきである。

【0089】

本明細書で使用する、「有効量」は、疾患を治療するために患者に投与される場合、疾患のこうした治療をもたらすのに十分な化合物、抗体、抗原、または細胞の量を広く指す。有効量は、予防に有効な量、及び/または防止に有効な量であり得る。有効量は、兆候/症状の発生を低減するために有効な量、防止するために有効な量、兆候/症状の発生の重症度を低減するため、兆候/症状の発生を排除するため、兆候/症状の発生の発達を遅延させるため、兆候/症状の発生の発達を防止するため、及び/または兆候/症状の発生の予防をもたらすために有効な量であり得る。「有効量」は、疾患及びその重症度、ならびに治療される患者の年齢、体重、病歴、感受性、及び既存状態に応じて異なり得る。「有効量」という用語は、本発明の目的で「治療上有効な量」と同義である。

10

【0090】

本明細書で使用する「発現ベクター」は、原核生物、酵母、真菌、植物、昆虫または哺乳動物の細胞などあらゆる細胞において、構成的または誘導的に *in vitro* または *in vivo* で本発明の核酸配列を発現する目的のあらゆる組換え発現系を広く指す。この用語には、線形または環式発現系を含む。この用語には、エピソームのままであるか、宿主細胞ゲノムに組み込まれる発現系を含む。発現系は、自己複製する、または自己複製しない、すなわち、細胞における一過性発現のみを駆動する能力を有し得る。この用語としては、組換え核酸の転写に必要な最小限のエLEMENTのみを含む組換え発現カセットが挙げられる。

20

【0091】

本明細書で使用する「フレームワーク領域」または「FR」は、抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域内のフレームワーク領域の1つ以上を広く指す。Kabata, et al. (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, MDを参照されたい。これらの発現には、抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域内のCDR間に挿入されたアミノ酸配列領域を含む。

【0092】

本明細書で使用する「異種」とは、核酸の一部分を広く指す場合、その核酸が、自然界では互いに同じ関係で見られることのない2つ以上の部分配列を含むことを示す。例えば、核酸は、典型的には組換え生産され、新しい機能的核酸、例えばある供給源からのプロモーター及び別の供給源からのコード領域を作製するように配置された無関係な遺伝子由来の2つ以上の配列を有する。同様に、異種タンパク質は、そのタンパク質が、自然界では互いに同じ関係で見られない2つ以上の部分配列を含むことを示す(例えば、融合タンパク質)。

30

【0093】

本明細書で使用する「高親和性」は、標的抗原に対して少なくとも 10^{-8} M、より好ましくは少なくとも 10^{-9} M、さらにより好ましくは少なくとも 10^{-10} MのKDを有する抗体を広く指す。しかし、「高親和性」結合は、他の抗体アイソタイプについて異なる場合がある。例えば、IgMアイソタイプの「高親和性」結合とは、少なくとも 10^{-7} M、より好ましくは少なくとも 10^{-8} MのKDを有する抗体を指す。

40

【0094】

本明細書で使用する「相同性」は、核酸配列と参照核酸配列との間、またはポリペプチド配列と参照ポリペプチド配列との間の類似性の程度を広く指す。相同性は、一部または全体であり得る。完全な相同性は、核酸またはアミノ酸配列が同一であることを示す。部分的に相同な核酸またはアミノ酸配列は、参照核酸またはアミノ酸配列と同一ではないものである。相同性の程度は、配列比較により決定できる。用語「配列同一性」は、「相同性」と同義的に使用され得る。

50

【0095】

本明細書で使用される「宿主細胞」は、発現ベクターを含み、発現ベクターの複製または発現を支持する細胞を広く指す。宿主細胞は、E. coliなどの原核細胞、または酵母、昆虫（例えば、SF9）、両生類などの真核細胞、またはCHO、HeLa、HEK-293などの哺乳動物細胞、例えば、培養細胞、外植片、及びin vivoでの細胞であってよい。

【0096】

本明細書で使用される「ハイブリダイゼーション」は、鎖が互いに逆平行に配置されたときの相補的ヌクレオチド間に水素結合が形成されることによる相補的（部分的相補など）ポリヌクレオチド鎖の物理的相互作用を広く指す。

10

【0097】

本明細書で使用される「K-assoc」または「Ka」は、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度を広く指すが、本明細書で使用される用語「Kdiss」または「Kd」は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を指す。本明細書で使用される用語「KD」は、Kd対Kaの比（すなわち、Kd/Ka）から得られ、モル濃度（M）として表される解離定数を指すことが意図されている。抗体のKD値は、当技術分野で十分に確立されている方法を使用して決定できる。

【0098】

「イムノアッセイ」は、本明細書で用いられる場合、抗体を使用して特異的に抗原に結合させるアッセイを広く指す。イムノアッセイは、抗原を単離、標的化、及び/または定量する特定の抗体の特異的結合特性を使用することを特徴とし得る。

20

【0099】

「単離された」は、本明細書で用いられる場合、それが天然に存在するその元の環境から除去され、したがってその天然環境からヒトの手によって改変された物質を広く指す。単離された物質は、例えば、ベクター系に含まれる外因性核酸、宿主細胞内に含有される外因性核酸、またはその元の環境から除去され、したがってヒトの手によって改変された任意の物質（例えば、「単離された抗体」）であり得る。

【0100】

「標識」または「検出可能な部分」は、本明細書で用いられる場合、顕微鏡的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的、または他の物理的手段によって検出可能な組成物を広く指す。

30

【0101】

本明細書で使用される「低ストリンジェンシー」、「中ストリンジェンシー」、「高ストリンジェンシー」、または「非常に高いストリンジェンシーの条件」は、核酸ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件を広く指す。ハイブリダイゼーション反応を行うためのガイドランスは、Ausubel, et al. (2002) Short Protocols in Molecular Biology (第5版) John Wiley & Sons, NYに記載されている。例示的な特定のハイブリダイゼーション条件には、これらに限定されないが、以下が挙げられる：（1）約45℃、6X塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）での低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の後、少なくとも50℃、0.2XSSC、0.1%SDSで2回洗浄（低ストリンジェンシー条件の場合、洗浄温度を55℃まで上げることができる）する；（2）約45℃、6XSSCで中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件の後、60℃、0.2XSSC、0.1%SDSで1回以上洗浄する；（3）約45℃、6XSSCでの高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の後、65℃、0.2XSSC、0.1%SDSで1回以上洗浄する；及び（4）65℃、0.5Mリン酸ナトリウム、7%SDSでの非常に高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件の後、65℃、0.2XSSC、1%SDSで1回以上洗浄する。

40

【0102】

「哺乳動物」は、本明細書で用いられる場合、皮膚の体毛被覆、及び雌において、子を

50

育てるための乳汁産生乳腺を特徴とする、ヒトなどの哺乳動物クラスの任意かつ全ての温血脊椎動物を広く指す。哺乳動物の例としては、これらに限定されないが、アルパカ、アルマジロ、カビバラ、ネコ、ラクダ、チンパンジー、チンチラ、ウシ、イヌ、ヤギ、ゴリラ、ハムスター、ウマ、ヒト、キツネザル、ラマ、マウス、非ヒト霊長類、ブタ、ラット、ヒツジ、トガリネズミ、リス、及びバクが挙げられる。哺乳動物としては、これらに限定されないが、ウシ科、イヌ科、ウマ科、ネコ科、ネズミ科、ヒツジ科、ブタ科、霊長類、及び齧歯類が挙げられる。哺乳動物には、National Museum of Natural History, Smithsonian Institution (Washington DC) によって維持される世界の哺乳類に列挙される任意かつ全てのものも含まれる。

10

【0103】

本明細書で使用される「核酸」または「核酸配列」は、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドオリゴヌクレオチドを広く指す。この用語は、天然ヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸、すなわちオリゴヌクレオチドを包含する。この用語はまた、合成骨格を有する核酸様構造体を包含する。特に明記しない限り、特定の核酸配列は、保存的に改変されたそのバリエーション（例えば、縮重コドン置換）及び相補的配列、ならびに明示的に示される配列も暗黙的に包含する。用語核酸は、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、及びポリヌクレオチドと同義的に使用される。

【0104】

20

本明細書で使用される「作動可能に連結された」は、2つのDNA断片によってコードされるアミノ酸配列がフレーム内に留まるように2つのDNA断片が結合されているときを広く指す。

【0105】

本明細書で使用される「パレート」は、抗原を認識する抗体の部分（例えば、抗体の抗原結合部位）を広く指す。パレートは、抗体のFv領域の小さい領域（例えば、15～22のアミノ酸）であり、抗体の重鎖及び軽鎖の一部分を含む場合がある。Goldsbey, et al. *Antigens (Chapter 3) Immunology* (5th Ed.) New York: W. H. Freeman and Company 57-75 ページを参照されたい。

30

【0106】

「患者」は、本明細書で用いられる場合、疾患状態を軽減するか、または疾患状態の発生もしくは再発を防止するかのいずれかのために治療を必要とする任意の動物を広く指す。また「患者」は、本明細書で用いられる場合、危険因子、病歴、感受性、症状、兆候を有し、疾患が以前に診断されたか、疾患の危険性があるか、または疾患の患者集団の一員である、任意の動物を広く指す。患者は、ヒト等の臨床患者、または随伴動物、家畜動物、畜産動物、エキゾチック動物、または動物園動物であり得る。用語「対象」は、用語「患者」と同義的に用いられ得る。

【0107】

「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は同義的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを広く指す。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の類似体または模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然アミノ酸ポリマーに適用される。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工化学模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然アミノ酸ポリマー及び非天然アミノ酸ポリマーに適用される。ポリペプチドは、例えば、糖タンパク質を形成するための炭水化物残基の付加によって改変され得る。「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」という用語として、糖タンパク質、ならびに非糖タンパク質が挙げられる。

40

【0108】

本明細書で使用される「プロモーター」は、核酸の転写を指示する核酸配列のアレイを広く指す。本明細書で使用されるとき、プロモーターとしては、例えば、ポリメラーゼI

50

I型プロモーターの場合、TATAエレメントなど、転写の開始部位の近くにおける、必要な核酸配列が挙げられる。また、プロモーターとしては、任意により、転写の開始部位から数千塩基対と同程度の距離に配置され得る、遠位エンハンサーまたはリプレッサーエレメントが挙げられる。「構成的」プロモーターは、ほとんどの環境及び発生条件下において活性であるプロモーターである。「誘導性」プロモーターは、環境または発生の調節下において活性であるプロモーターである。

【0109】

本明細書で使用される「予防的有効量」は、疾患の予防または疾患の再発の防止のために患者に投与された場合、疾患または再発のそのような予防をもたらすのに十分である化合物の量を広く指す。予防的有効量は、兆候及び/または症状の発生を防止するのに有効な量であり得る。「予防的有効量」は、疾患及びその重症度、ならびに治療される患者の年齢、体重、病歴、状態への素因、既存状態に応じて異なり得る。

10

【0110】

本明細書で使用される「予防」は、兆候及び/または症状が患者に存在しない、寛解にある、または以前に患者に存在していた治療過程を広く指す。予防は、患者の疾患の治療後に生じる疾患を予防することを含む。さらに、予防は、疾患を潜在的に発症する可能性のある患者、特に疾患に罹患しやすい患者（例えば、患者集団（patient population）のメンバー、危険因子を有する患者、または疾患を発症するリスクのある患者）を治療することを含む。

【0111】

20

本明細書で使用される「組換え」は、生成物、例えば細胞、または核酸、タンパク質、またはベクターに関して広く言及し、細胞、核酸、タンパク質、またはベクターが、異種核酸もしくはタンパク質の導入、または天然の核酸もしくはタンパク質の改変によって改変されたか、または細胞がそのように改変された細胞に由来することを指す。したがって、例えば、組換え細胞は、細胞の天然（非組換え）形態内に見出されない遺伝子を発現するか、さもなければ発現が少ないか、または全く発現しない異常発現する天然遺伝子を発現する。

【0112】

本明細書で使用される場合、抗体に「特異的に（もしくは選択的に）結合する」または「特異的に（もしくは選択的に）免疫反応する」または「特異的に相互作用または結合する」とは、タンパク質またはペプチド（または他のエピトープ）を広く指し、いくつかの実施形態では、タンパク質及び他の生物製剤の不均一な集団におけるタンパク質の存在の決定因子である結合反応を指す。例えば、指定されたイムノアッセイ条件下で、特定の抗体は、バックグラウンド（非特異的シグナル）よりも少なくとも2倍大きい特定のタンパク質に結合し、有意な量では、試料中に存在する他のタンパク質に実質的に結合しない。典型的に、特異的または選択的反応は、少なくとも2倍のバックグラウンドシグナルまたはノイズであり、より典型的には約10～100倍超のバックグラウンドである。

30

【0113】

本明細書で使用される「特異的にハイブリダイズ可能」及び「相補的」とは、核酸が伝統的なWatson-Crickまたは他の非伝統的なタイプのいずれかによって別の核酸配列と水素結合（複数可）を形成できることを広く指す。その相補的配列を有する核酸分子の結合自由エネルギーは、核酸の関連機能、例えばRNAi活性を進行させるのに十分である。核酸分子の結合自由エネルギーの決定は、当技術分野において周知である。例えば、Turner, et al. (1987) CSH Symp. Quant. Biol. LII: 123-33; Frier, et al. (1986) PNAS 83: 9373-77; Turner, et al. (1987) J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-85を参照されたい。相補性パーセントは、第2の核酸配列と水素結合（例えば、Watson-Crick塩基対合）を形成できる、核酸分子内の隣接する残基のパーセントを示す（例えば、10のうち少なくとも約5、6、7、8、9、10は約50%、60%、70%、80%、90%、及び100%相補的であり、包括的である）。

40

50

「完全に相補的」または100%相補性とは、第2の核酸配列中の同数の隣接する残基と水素結合する核酸配列の隣接する残基のすべてを広く指す。「実質的に相補性である」とは、非相補的であるように選択されたオーバーハングなどのポリヌクレオチド鎖の領域を除いて、少なくとも約90%の相補性を呈するポリヌクレオチド鎖を指す。特異的結合では、特異的結合が所望される条件下、すなわち*in vivo*アッセイもしくは治療処置の場合生理学的条件下で、または*in vitro*アッセイの場合、アッセイが実施される条件下で、オリゴマー化合物の非標的配列への非特異的結合を回避するのに十分な程度の相補性を必要とする。非標的配列は、典型的には、少なくとも5つのヌクレオチドのみ異なり得る。

【0114】

本明細書で使用される疾患の「兆候」は、患者の検査で発見可能な、疾患、疾患の主観的な兆候である症状とは対照的である、疾患の客観的な兆候を示す任意の異常を広く指す。

【0115】

本明細書で使用される「固体支持体」、「支持体」、及び「基質」は、これに限定されないが、平滑支持体（例えば、金属、ガラス、プラスチック、シリコン、及びセラミックの表面）、ならびにテクスチャ及び多孔質物質などの別の物質を接着することができる固体または半固体構造を提供する任意の物質を広く指す。

【0116】

本明細書で使用される「対象」は、本発明に従って治療されるのに好適である任意のヒトを広く指し、これらに限定されないが、鳥類及び哺乳動物の対象が挙げられ、好ましくは哺乳動物である。本発明の哺乳動物には、これらに限定されないが、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ブタ、げっ歯類（例えば、ラット及びマウス）、ウサギ、霊長類、ヒトが挙げられる。本発明による治療を必要とするあらゆる哺乳動物対象が好適である。両方の性別及び任意の発達段階（すなわち、新生児、幼児、若年者、青年期、成人）のヒト対象は、本発明により治療され得る。本発明はまた、動物対象、特にマウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、及びウマなどの哺乳動物対象に対して、獣医学的目的、ならびに薬物スクリーニング及び薬物開発目的で実施できる。「対象」は、「患者」と同義的に使用される。

【0117】

本明細書で使用される疾患の「症状」は、患者が経験し、疾患を示す、任意の病的現象、または正常な構造、機能、もしくは感覚からの逸脱を広く指す。

【0118】

「治療法」、「治療的」、「治療する」、または「治療」は、本明細書で用いられる場合、疾患を治療すること、疾患もしくはその臨床症状の発達を停止もしくは低減すること、及び/または疾患を緩和し、疾患もしくはその臨床症状の退行を引き起こすことを広く指す。治療法は、疾患、疾患の兆候、及び/または症状の予防、治療、修復、低減、軽減、及び/または緩和をもたらすことを包含する。治療法は、進行中の疾患兆候及び/または症状（例えば、腫瘍の成長、転移）を有する患者における兆候及び/または症状の軽減を包含する。治療法は、「予防」も包含する。「低減された」という用語は、治療法のために、兆候及び/または症状の臨床的に有意な低減を広く指す。治療法としては、再燃または再発の兆候及び/または症状（例えば、腫瘍の成長、転移）の治療が挙げられる。治療法は、これらに限定されないが、兆候及び/または症状の出現をいつでも除外すること、ならびに既存の兆候及び/または症状を低減すること、ならびに既存の兆候及び/または症状を排除することを包含する。治療法は、慢性疾患（「維持」）及び急性疾患を治療することを含む。例えば、治療としては、兆候及び/または症状（例えば、腫瘍の成長、転移）の再燃または再発を治療することまたは防止することが挙げられる。

【0119】

本明細書で使用される「可変領域」または「VR」は、抗体の抗原への結合に直接関与する抗体の軽鎖及び重鎖の各ペア内のドメインを広く指す。各重鎖は、一方の端に可変ドメイン（ V_H ）を有し、続いて、いくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一方の端

10

20

30

40

50

に可変ドメイン（V_L）を有し、その他方の端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列している。

【0120】

本明細書で使用される「ベクター」は、宿主細胞内で自律的に複製でき、1つまたは少数の制限エンドヌクレアーゼ認識部位を特徴とするプラスミド、コスミド、ファージミド、ファージDNA、または他のDNA分子を広く指す。こうした認識部位では、そのようなDNA配列が、ベクターの本質的な生物学的機能を失うことなく決定可能な方法で切断され得、その部位には、その複製及びクローニングをもたらすためにDNAが挿入され得る。ベクターはさらに、ベクターで形質転換された細胞の同定に使用するのに好適であるマーカーを含んでもよい。

10

【0121】

技術及び手順は一般に、当該技術分野において周知である従来の方法に従って、かつ本明細書全体を通して引用され、考察されている、一般的かつより具体的な様々な参考文献に記載されているように実行される。例えば、Sambrook, et al. (2001) Molec. Cloning: Lab. Manual [3rd Ed] Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい。組み換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織培養及び形質転換（例えば、電気穿孔、リポフェクション）には、標準技術が使用され得る。酵素反応及び精製技術は、製造業者の仕様書に従って、または当該技術分野において一般的に達成されるように、または本明細書に記載されるように実行され得る。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、及び医薬品化学（medicinal and pharmaceutical chemistry）に関連して利用される学名、ならびにこれらの実験室の手順及び技術は、当該技術分野で周知であり一般的に使用されるものである。標準的な技術は、化学合成、化学分析、医薬品の調製、配合、及び送達、ならびに患者の治療に使用され得る。

20

【0122】

実施例

【0123】

ここで一般に記載される本発明は、次の実施例を参照することによって、より容易に理解されるであろう。これらは、単に本発明のある特定の態様及び実施形態を例示する目的で含まれ、本発明を限定することを意図するものではない。

30

【0124】

実施例 1

【0125】

NEO-201は、様々なヒトがん腫細胞株に結合する。

【0126】

フローサイトメトリー分析を使用して、NEO-201結合についてヒトがん腫細胞株のパネルのプロファイルを作成した。染色プロファイルを表1にまとめ、高、中、低、及び陰性の染色を有する細胞株からの代表的なヒストグラムを図1A～Cに示す。NEO-201の結合活性の評価では、3/6（50%）の結腸癌細胞株及び4/5（80%）の膵癌細胞株において陽性率が高いことが明らかになった。様々な組織学的サブタイプの非小細胞肺癌（NSCLC）細胞株のプロファイルを作成したところ、腺癌細胞株の3/5（60%）がNEO-201と反応したが、扁平上皮癌細胞株では1/4（25%）のみが陽性であることが判明した。乳癌細胞株のスクリーニングも行った。エストロゲン受容体（ER）またはプロゲステロン受容体（PR）のいずれかを発現した細胞株のうち、単独か、またはHER2との組み合わせかにかかわらず、NEO-201に対して2/4（50%）が陽性染色された。HER2+細胞株のうち、単独またはERまたはPRとの組み合わせにかかわらず、3/4（75%）がNEO-201によって認識された。しかし、NEO-201染色は、トリプルネガティブ乳癌細胞株のわずか1/4（25%）において低レベルで発見された。全体で、検査された腫瘍細胞株の15/30（50%）がN

40

50

EO-201によって認識された。これらのデータは、NEO-201が広範囲の *in vitro* 培養腫瘍細胞株に対して反応性があることを示しており、腫瘍サブタイプに基づいて抗体反応性に明確な差異が生じ得ることを示している。

【0127】

実施例 2

【0128】

NEO-201 組織染色は腫瘍特異性が高い

【0129】

免疫組織化学を使用して、各がん型について数十の試料を表す組織マイクロアレイを使用して、ヒト腫瘍試料からの NEO-201 反応性を調査した。図 2 A に示すように、NEO-201 との免疫反応性 (7, 829, 678) は、正常な結腸、膵臓、及び肺組織にはまったく存在しなかったが、これらの臓器由来の腫瘍組織では陽性率が高かった。驚くべきことに、周囲の間質細胞は染色されなかったため、染色は腫瘍細胞上でのみ見られた (図 2 A)。IHC 染色及びマイクロアレイ試料では、NEO-201 は、結腸癌 (72%)、膵癌 (80%)、胃癌 (71%)、肺癌 (61%)、乳癌 (55%)、及び子宮癌 (54%) に対して非常に反応性が高いと判断された。さらに、かなり少数の卵巣癌 (26%) の試料も陽性染色を呈したが、前立腺癌組織ではいかなる染色も観察されなかった (図 2 B)。全体として、サンプリングされた腫瘍組織の 258 / 345 (74.7%) が NEO-201 に対して陽性染色した。重要なことに、NEO-201 の反応性は、正常な健康組織 (表 2)、ならびに一部の子宮及び卵巣の試料 (図 2 C) を除く正常な腫瘍隣接組織ではほぼ完全にない。しかし、この一連の子宮及び卵巣組織では、組織の数が制限されていた (それぞれ、試料 5 個及び 9 個)。まとめると、これらのデータは、NEO-201 が様々ながん腫からの腫瘍組織を認識し、かつ腫瘍特異性が高いことを示している。

【0130】

実験例 3

【0131】

NEO-201 は、ADCC 及び CDC を媒介して腫瘍細胞を死滅させる

【0132】

NEO-201 は、ヒト化 IgG1 抗体として、NEO-201 抗原を発現する腫瘍細胞を死滅させるために、ADCC を媒介できることが理論化されている。この潜在的な作用機序を調査するために、2 名の異なる健康なドナー由来 PBMC から単離したヒトナチュラルキラー (NK) 細胞を利用する ADCC アッセイは、NEO-201 染色に対して陽性率の高い細胞株 (CFPAC-1 及び ASPC-1) で行った。NEO-201 による治療では、CFPAC-1 及び ASPC-1 の両方の細胞の死滅が、対照の IgG1 治療腫瘍細胞の死滅よりも 2 ~ 6 倍高いレベルまで高まることが観察された (図 3 A)。滴定アッセイも実施し、NEO-201 が 0.1 µg / mL ほどの低用量で ADCC を有意に誘導する能力を保持していることが明らかになった (図 3 B)。

【0133】

CDC は、抗体結合標的細胞を溶解する膜攻撃複合体の活性化に至る、タンパク質分解性切断の複合体カスケードである。特定のヒト IgG1 抗体は、CDC を媒介できるが、CDC は抗体の抗原特異性に依存する。CDC アッセイでは、NEO-201 が、mAb 用量及びインキュベーション時間の両方に依存する状態で ASPC-1 細胞の補体媒介性溶解を誘導することが明らかになった (図 3 C)。まとめると、これらのデータは、NEO-201 が自然免疫エフェクターメカニズムに効果的に係合し、*in vitro* で抗体結合腫瘍細胞を特異的に溶解させることを示している。

【0134】

実施例 4

【0135】

NEO-201 は、単独で、及びヒト PBMC エフェクター細胞と組み合わせて、腫瘍

異種移植片の成長を抑制する。

【0136】

NEO-201の潜在的な抗腫瘍効果を決定するために、免疫不全のNU/NUヌードマウスで腫瘍異種移植片としてCFPAC-1細胞を成長させた。これらの細胞は、NEO-201抗原の発現レベルが高く、NEO-201媒介ADCCに対する感受性が高いことに基づいて選択した。CFPAC-1腫瘍のサイズが約100mm³まで成長したら、腫瘍担持マウスに生理食塩水、250μgヒトIgG1、100μg NEO-201、または250μg NEO-201を3回注入し、その後1.0×10⁷ IL-2活性化(200U/mL)ヒトPBMCを3回注入して、ADCC媒介エフェクター細胞として機能させた。図4Aに示すように、NEO-201+PBMCにより、生理食塩水+PBMCまたはヒトIgG+PBMC対照群のいずれかと比較して、両方の用量レベルで腫瘍成長の実質的な低減が誘導された。36日目では対照群のいずれのマウスにも腫瘍がなかったのに対し、10匹中1匹(10%)及び10匹中4匹(40%)のマウスについては、それぞれ、NEO-201 100μg+PBMC及びNEO-201+250μg PBMCでは触知可能な腫瘍が残存していなかった(図4B)。さらに、マウスの別の群にヒトPBMCを追加せずにNEO-201を投与したところ、対照群と比較して腫瘍の成長の有意な減少が観察された(図4A、C)。重要なことは、腫瘍担持マウスの体重を監視したところ、いずれの治療群においても体重の減少がないことが明らかになった(図4D)。まとめると、これらの結果は、NEO-201が、ADCCメカニズム及び非ADCCメカニズム(CDCなど)の両方を介して、マウスにおいて重大な毒性を誘発することなく、腫瘍の成長を大幅に低減できることを示している。

10

20

【0137】

実施例5

【0138】

NEO-201は、異種移植腫瘍部位に局在する

【0139】

体内分布研究は、確立されたCFPAC-1異種移植腫瘍を有する雌及び雄のNU/NUヌードマウスで放射性標識NEO-201を利用して行った。これらのマウスに放射性標識抗体を静脈注射し、注射後の様々な時点で分析するために血液、臓器、腫瘍を採取した。すべての時点で、雄及び雌の両方のマウスの脾臓、脾臓、腎臓、肝臓、胃、腸、及び肺において、低レベルの放射能が発見された(図5A、B)。しかし、正規化された放射能の取り込みは、すべての時点で他のすべての組織と比較して腫瘍で大幅に高く、腫瘍の放射能は7日目までの血液の放射能よりも20~30倍高いレベルまで徐々に上昇した(図5A、B)。雌及び雄の両方のマウスで、定量的に同様の結果が得られた。これらの結果は、NEO-201が優先的に標的抗原を発現する悪性組織に局在し、正常組織には蓄積しないことを示している。

30

【0140】

実施例6

【0141】

非ヒト霊長類におけるNEO-201の薬物動態及び毒性評価

40

【0142】

NEO-201の薬物動態及び関連する毒性を決定するために、飼育目的カニクイザルにおいて単回投与試験を実施した。カニクイザルは、系統発生的及び生理学的の両方においてヒトと密接に関連しており、非臨床毒性評価に一般的に使用されている種であるため、選択した。雄及び雌の動物に、生理食塩水で希釈したNEO-201を5mg/kg、20mg/kg、及び49mg/kgの用量で1回静脈内注入した。これは、注入量あたりの達成可能な最高用量であった。注射前及び注射後の最大14日間の様々な時点で、すべての動物において血液試料を採取し、NEO-201レベルについて、ELISAにより血清調製物を評価した。表3に示すとおり、NEO-201の定量可能な、用量依存的な血清濃度が最後の収集時点(投与後14日)で観察された。静脈内投与について予測

50

されたように、 T_{max} 値は、 5 mg/kg 群の雄 1 匹及び雌 1 匹を除いて、すべての群の大半の動物 ($10/12$ 、 83%) は 10 分でピークに達した。評価された用量範囲にわたって、ピーク (C_{max}) 曝露は用量比例であった。総 (AUC) 曝露は、最低用量での用量比例より大きく、約 $20\text{ mg/kg} \sim 49\text{ mg/kg}$ でほぼ比例した。最低用量での曝露の違いは、平均クリアランス (CL) より約 2 倍大きく、分布量 (V_z) が少ないことに起因していた。平均半減期 (HL) は、高用量で 167 (20 mg/kg) 時間または 170 (49 mg/kg) 時間であり、 5 mg/kg 用量 (46.2 時間) よりも約 3.7 倍長かった。性差は観察されなかった。

【0143】

14 日間の研究の過程で毒性を決定するための以下の観察及び検査を含む。1) 定期的な臨床評価; 2) 摂食量及び体重の測定; ならびに 3) 尿検査及び血液検査 (尿検査、血液学、凝固検査、血清化学、及び毒物動態学など)。図 6 A に示すとおり、いずれの投与量群も、注射前の体重から 3% 超える体重の変化を経験しておらず、個々のサルはいずれも 7% を超える変化を経験しなかった。11 日目のみ摂食量が少ない 5 mg/kg 用量群での 2 匹を除くすべての動物について摂食量は変化しなかった。血清化学、尿検査、または凝固検査のいずれにおいても、ベースライン ($NEO-201$ 注射前) から 15 日目までに有意な変化はなかった (詳細については、材料及び方法を参照されたい)。実験室での血球数の主な変化は、ベースラインと比較した好中球数の減少であった (図 6 B)。減少は、軽度から顕著なものまで様々な程度であり、明確な用量反応は明らかにならなかった。大部分の動物にとって、改善が通常 8 日目までに認められたため、これは一時的な所見であった (図 6 B)。15 日目までに、好中球数は 5 mg/kg 群または 20 mg/kg 群と 49 mg/kg 群のそれぞれで、ほぼ全体または部分的に回復することが観察された (図 6 B)。15 日目までの好中球数の回復は、 0 mg/kg 動物との統計的比較に反映されている。 0 mg/kg 動物は、3 つのすべての投与量レベルで 2 日目に有意差があった ($p < 0.05$) が、3 つの投与群のうち 2 つについては 8 日目及び 15 日目において有意差はなかった ($p > 0.05$) (図 6 C)。

【0144】

実施例 7

【0145】

材料及び方法

【0146】

細胞株及び培養

【0147】

以下のヒトがん腫細胞株は、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から入手した: 結腸 (COLO 205、HT-29、LS174T、SW1116、SW1463、SW480、SW620)、膵臓 (ASPC-1、CFPAC-1、PANC-1)、乳房 (AU-565、BT-474、BT-549、HCC1500、HCC1937、HCC38、MDA-MB-231、MDA-MB-468、SK-BR-3、T-47D、ZR-75-1)、及び肺 (CALU-1、H1703、H226、H441、H520、H522、H596、HCC4006、HCC827、SK-LU-1)。すべての細胞培養は、伝播及び維持のために供給業者によって指定されている RPMI 1640、DMEM、または IMDM 培養培地 (Corning, Corning, NY) で維持された。培養培地には、規定の 10% の米国産熱不活化 HyClone ウシ胎仔血清 (GE Healthcare Life Sciences, Issaquah, WA, USA)、 100 U/mL ペニシリン、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシン (Corning Life Science, Manassas, VA, USA) を補充した。健康なボランティアドナー由来の PBMC は、National Institutes of Health Clinical Center Blood Bank (NCT00001846) から、適切な治験審査委員会の承認及びインフォームドコンセントの下で得た。

【0148】

ヒト化NEO-201モノクローナル抗体の作製

【0149】

Hollinshead 結腸癌特異的ワクチンは、マウスでモノクローナル抗体を生成するための免疫原性物質として使用した。腫瘍関連タンパク質及びペプチドを調製するための方法は、以前に記載されている (Hollinshead, US 4810781, 1989)。簡潔に言えば、がん組織を細かく切り刻み、単一の細胞懸濁液を生成するために使用し、その後、低張食塩水膜の抽出、一連の遠心分離ステップ、その後の低周波超音波処理を行った。得られた膜抽出タンパク質を Sephadex G-200 樹脂または電気泳動法で分画し、次いで、濃縮し、定量した (Hollinshead et al., 1970; Hollinshead et al., 1972; Hollinshead et al., 1985)。TAA 調製物を完全フロイントアジュバントと混合し、BALB/c マウスに皮下注射した。これに続いて、2~3 週間の間隔をあけて、不完全フロイントアジュバントでの 3 回のブースター注射を行った。免疫化抗原に対する抗体応答についてマウス血清を ELISA でテストし、強力な応答のあるマウスを使用して、脾臓からのマウス B 細胞を SP2/0-Ag14 骨髓腫細胞株と融合させ、成長させ、マウス免疫グロブリン (IgG) を生成した細胞を選択することにより、不死化ハイブリドーマ細胞を生成した。これらのマウス IgG から、マウスの 16C3 クローン (m16C3) を、ELISA により決定された LS174T または HT-29 細胞由来の結腸腫瘍細胞膜抽出物との反応性に基づいて選択した。重鎖及び軽鎖 IgG1 をコードする cDNA は、ハイブリドーマクローン 16C3 E12 から単離された RNA から決定され、ユニークであることが示された (Bristol & Kantor, US 7829678, 2010)。m16C3 タンパク質配列は、h16C3 としてヒト化され、NEO-201 と命名された。ヒト化は、重鎖及び軽鎖タンパク質の両方の Fab 領域の相補性決定領域 (CDR) の外側のマウス配列をヒト Fab 配列で置き換え、各鎖から 3 つのマウス CDR 配列を保持することによりインシリコで行った。重鎖及び軽鎖の Fc 領域は、他のヒト化承認済み mAb 産生物で使用されているヒト IgG1 アイソタイプから選択した。アミノ酸配列は、CHO 細胞でのタンパク質発現用に最適化された DNA に逆翻訳させた。次に、重鎖及び軽鎖 h16C3 の DNA を化学合成し、哺乳動物発現プラスミドにクローニングし、哺乳動物細胞株 (HEK293T 及び CHO) にトランスフェクトした。組換え h16C3 を発現するいくつかの安定した CHO 細胞株を誘導させ、保存した。精製された組換え h16C3 は、ヒト化 16C3 抗体が元の m16C3 抗体と同様の特性を有していることを確認する研究において再検査した (Bristol & Kantor, US 7829678, 2010)。

【0150】

これらの実施例で使用されている NEO-201 抗体配列は、次の図に含まれている。

【数1】

10

20

30

40

50

H16C3-Abb* 重鎖

MGWSCHFFLVATATGVHS/QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYA
MHWVRQAPGQRLEWMGLISTYSGDTKYNQNFQGRVTMTVDKSASTAYMELS
 SLRSEDNAVYYCARGDYSGRYWFAYWGQGLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSK
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号28)

10

H16C3-Abb* 軽鎖

MGVPTQLLLLWLTVVVVRC/DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASENIYGALN
 WYQRKPGKSPKLLIYGASNLATGMPSRFSGSGSGTDYFTISSLPEDIATYYC
QQVLSSPYTFGGGTGLEIKR/TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号29)

【0151】

発現リーダー配列、可変領域、及び定常領域の間の境界は、各配列においてスラッシュ
 (「/」) で区切られ、CDR配列は、太字の下線付き文字列で示される。使用された抗
 体配列は、示されている可変及び定常領域を含んでいた。これらの領域としては、配列番
 号32の重鎖CDR1、配列番号33の重鎖CDR2、配列番号34の重鎖CDR3、配
 列番号35の軽鎖CDR1、配列番号36の軽鎖CDR2、及び配列番号37の軽鎖CD
 R3が挙げられる。

20

【0152】

フローサイトメトリー

【0153】

NEO-201のヒトがん腫細胞株への結合をフローサイトメトリーで分析した。細胞
 (1.0×10^6) を検査ごとに1 μ L LIVE/DEAD Fixable Aqua
 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 30
 を含む1Xリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で、4℃で、30分間インキュベートして、
 生細胞対死細胞の区別を得た。次に細胞を遠心分離し、冷PBSで2回洗浄し、次に、P
 acific BlueコンジュゲートNEO-201抗体(BioLegend, San
 Diego, CA)を含む1XPBS+1%BSA(Teknova, Hollister
 , CA, USA)で、4℃で30分間染色した。染色後、細胞を冷PBSで2回洗浄し
 、FACSVerseフローサイトメーター(BD Biosciences, San J
 ose, CA, USA)を使用して検査した。BD FACSuiteソフトウェアを使用
 して細胞蛍光の分析を実施した(BD Biosciences, San Jose, C
 A, USA)。染色値>10%陽性は、NEO-201発現に対して陽性に見なした。陽
 性細胞株は、定量化させた発現レベル(陽性率% \times MFI)に従ってランク付けし、低(
 <200)、中(200~1000)、及び高(>1000)発現の群に分類した。

30

40

【0154】

免疫組織化学(IHC)

【0155】

結腸試料(CO808、CO951)の組織マイクロアレイは、US Biomax(
 ロックビル、MD)から入手し、結腸(A303(I))、脾臓(A207(II))、A
 307)、胃(A209)、肺(A206(V)、A306)、乳房(A202(VI))
 、A712)、子宮(A212)、卵巣(A212、A213(II))、前立腺(A3
 02(IV))、及び様々な正常(A103(VII))試料のAccuMax組織マイ
 クロアレイは、Accurate Chemical and Scientific C

50

orporation (Westbury, NY) から入手した。NEO-201 は、製造業者の指示に従って、ピオチンタンパク質標識キット (Roche, Basel, Switzerland) を使用してピオチン化させた。スライドを 60 で 20 分間焼成し、キシレンにより脱パラフィンし、段階的エタノール系列で再水和した。スライドは、ペルオキシダーゼ I 溶液 (Biocare Medical, Concord, CA) を使用して 2 分間過酸化ブロッキングに供し、アビジン溶液 (Biocare Medical, Concord, CA) を使用して 10 分間アビジンブロッキングに供し、ピオチン溶液 (Biocare Medical, Concord, CA) を使用して 10 分間ピオチンブロッキングに供し、CAS-Block 組織化学試薬 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用して 10 分間タンパク質ブロッキングに供した。次に、スライドを室温で、陰性対照のピオチン化ヒト IgG1 カップ (Ancell, Bayport, MN) または 1X PBS で希釈した $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ のピオチン化 NEO-201 と 2 時間インキュベートした。検出は、Dako ストレプトアビジン-HRP コンジュゲート (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を 1:300 で 30 分間、DAB ペルオキシダーゼ基質 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で 1~3 分間インキュベートし、ヘマトキシリンで対比染色して有効にした。各マイクロアレイ組織スポットは、以下のスケールを使用して、細胞染色強度について光学顕微鏡により評価した: 0 (陰性)、± (境界域)、1+ (弱い)、2+ (中程度)、3+ (強い)。+1 以上の強度で染色された細胞を含む組織スポットは、陽性として記録した。

10

20

【0156】

抗体依存性細胞傷害 (ADCC) アッセイ

【0157】

ADCC アッセイは、前述の手順の変更を使用して実行した (Boyerinas et al., 2015)。製造業者のプロトコルに従って、EasySep Human NK Cell Isolation Kit (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) を使用して、正常なヒトドナー PBMC からの NK 細胞の陰性選択を行った。精製した NK 細胞を、L-グルタミン、10% FBS、及び抗生物質を添加した RPMI-1640 培地で一晩インキュベートした。アッセイの日に、標的細胞 (CFPAC-1、ASPC-1) を $10 \mu\text{M}$ カルセイン AM 細胞浸透性色素 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で 30 分間標識した後、 3.0×10^3 細胞/ウェルで 3 回、黒壁の平底 96 ウェル培養プレート (#655090 Greiner bio-one, Germany) に播種した。その後、腫瘍細胞を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ のヒト IgG1 アイソタイプ対照抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) または NEO-201 で治療し、特に指定がない限り、エフェクター対標的 (E:T) 比 12.5:1 及び 25:1 で NK 細胞を加えた。37 で 4 時間のインキュベーション後、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ のヨウ化プロピジウム (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を各ウェルに加え、Celigo Imaging Cytometer を使用してプレートをイメージングし、分析した (Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, MA, USA)。生きた標的細胞 (カルセイン AM/PI-) を各ウェルで数え、特定の ADCC 溶解を次のように計算した: 特異的溶解率% = $100 - [(\text{平均の生きた標的数}_{\text{experimental}} / \text{平均の生きた標的数}_{\text{control}}) \times 100]$ 。

30

40

【0158】

補体依存性細胞毒性 (CDC) アッセイ

【0159】

CDC アッセイは、前述の手順の変更を使用して実行した (Konishi et al., 2008)。ASPC-1 標的細胞を上記のように Calcein AM で標識し、 5.0×10^3 細胞/ウェルで黒壁の 96 ウェルプレートに播種した。次に、細胞を 0 .

50

5 または $5.0 \mu\text{g/mL}$ NEO-201 で、37 で15分間処理して細胞をオプソニン化し、精製したウサギ補体 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) を各ウェルに1:8の希釈で加えた。37 で30分間、60分間、または120分間インキュベートした後、ヨウ化プロピジウムを加え、CeliGo Imaging Cytometer を使用してプレートイメージングし、分析し、ADCC 活性について上記のように比溶解を計算した。

【0160】

異種移植抗腫瘍アッセイ

【0161】

腫瘍は、6週齢の雌の無胸腺NU/NUヌードマウス (Charles River Laboratories International, Wilmington, MA) で、培養腫瘍細胞含有1XPBS懸濁液を、マウスの右側腹部に皮下移植することによって確立された。腫瘍のサイズが約 100mm^3 に到達すると、マウスを腫瘍体積で選別し、ランダムに5つの群に分けた (動物 $n = 10$)。次に、マウスにビヒクルのみ (生理食塩水)、ヒトIgG1 ($250 \mu\text{g}$)、またはNEO-201 ($100 \mu\text{g}$ 及び $250 \mu\text{g}$) を移植後13日目、17日目、及び20日目に腹腔内注射した。マウスはまた、免疫エフェクター細胞の供給源として、14日、18日、及び21日に、IL-2で活性化された約 1.0×10^7 のヒトPBMCの腹腔内注射 (200U/mL 、培養で一晩処理) を受けた。マウスの1つの群は、NEO-201で同様に処理したが、ヒトPBMCの投与は受けなかった。腫瘍はデジタルキャリパーで2~3日ごとに測定し、腫瘍体積は式 (幅² × 長さ) / 2 = mm^3 によって計算した。ここで、幅は2つの測定値のうち短い値とした。マウスはまた一般的な健康の総計として毎週体重を量った。IACUCガイドラインに従って、腫瘍体積が 2000mm^3 を超えるマウスは 殺した。

【0162】

生体分布分析

【0163】

以前に記載された手順 (Patel et al., 2013) を用いて、放射性標識NEO-201 (Comparative Biosciences, Sunnyvale, CA) を使用して、腫瘍担持マウスで生体内分布研究を評価した。簡潔に述べると、雄及び雌の無胸腺NU/NUヌードマウス (Charles River Laboratories International, Wilmington, MA) の脇腹に、 4.0×10^6 CFPAC-1細胞を含む $200 \mu\text{L}$ 1XPBS懸濁液を皮下注射した。生着後14日目に、マウスに $20 \mu\text{Ci}$ の ^{125}I 標識NEO-201を静脈内注射し、1日後、2日後、4日後、または7日後に剖検した。血液、腫瘍組織、及び内臓 (肺、腎臓、肝臓、脾臓、膵臓、腸、及び胃) を各時点 (動物 $n = 4$) で採取し、すべての組織の重量を量り、ガンマカウンターを用いて、組織内の放射能を測定した。各マウスのデータは最初に cpm/mg 組織として計算し、次に組織 cpm 値を血中 cpm 値に対して正規化した。

【0164】

カニクイザルにおける単回投与毒性試験

【0165】

NEO-201の単回投与後の薬物動態及び毒性についてNEO-201を試験するために、単回投与毒性試験を飼育目的カニクイザルで実施した。研究期間は、用量投与から15日であり、サルを研究室に順応させるために用量投与前にさらに14日間隔離した。注入ポンプ及びカテーテル延長チューブ付きのプラスチック製使い捨てシリンジを使用して、 0mg/kg 、 5mg/kg 、 20mg/kg 、及び 49mg/kg の用量レベルで (これは、抗体の達成可能な最高濃度であった)、生理食塩水で希釈したNEO-201をゆっくりと静脈内注入 (約30分 ± 5分の注入) して、8匹の雄及び雌の動物 (2匹/性別/群) に投与した。以下の時点でNEO-201を受けたすべての動物から血液試料を採取した: 投与前、10分、1時間、2時間、4時間、6時間、24時間、48時間、

72時間、96時間、168時間、及び336時間。血清は、薬物動態学分析及び毒物学分析のために血液試料から調製した。全血を細胞分析に使用した。血清中のNEO-201レベルは、製造業者の指示に従って、Human Therapeutic IgG1 ELISA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) を用いてELISAで測定した。

【0166】

臨床検査には、血液学及び凝固（ベースライン（BL）、2、8、15日目）；CBC及び差分、活性化部分トロンボプラスチン時間、フィブリノーゲン及びプロトロンビン時間；血清化学（BL、2、8、15日目）：アルブミン、アルカリホスファターゼ、ALT、AST、総ビリルビン、カルシウム、総コレステロール、クレアチンキナーゼ、クレアチニン、グルコース、無機リン、総タンパク質、トリグリセリド、ナトリウム、カリウム、塩化物、グロブリン、アルブミン/グロブリン比、BUN；尿検査（BL、15日目）：色、透明度、グルコース、ケトン、潜血、タンパク質、ビリルビン、亜硝酸塩、pH、ウロビリノーゲン、白血球、体積、比重；生物分析（ELISAを使用）-（BL、10分、1時間、2時間、4時間、6時間、24時間、48時間、72時間、96時間、168時間、及び336時間）、Phoenix WinNonlinバージョン6.1ソフトウェア（Certara USA, Princeton, NJ）を用いて、2群～4群を含めた。動物の体重測定値を記録し（BL、7、及び14）、好中球数を評価した（BL、2、8、15日目）。

10

【0167】

統計分析

20

【0168】

データはGraphPad Prismを使用して分析した（GraphPad Software, La Jolla, CA）。2つの群間の比較はT検定によって行い、 $p < 0.05$ は統計的に有意であると見なした。グラフは、三連で行った1つの代表的な実験からの平均 \pm SDを示している。

【0169】

実施例 8

【0170】

ALT-803は、NEO-201媒介ADCCを強化する

30

【0171】

ALT-803は、IL-15受容体 / IgG1 Fc融合タンパク質に結合したIL-15変異体（IL-15N72D）からなる新規のIL-15スーパーアゴニスト複合体である。本実施例では、ALT-803がNEO-201によってADCCを調節する能力について試験を行う。

【0172】

方法

【0173】

NK細胞は、正常なドナーから単離され、エフェクター細胞として使用される前に48時間様々な濃度のALT-803で処理され、NEO-201抗原を発現するヒトがん腫細胞株を、*in vitro*非放射性ADCCアッセイにおいて標的として利用した。ALT-803がNK細胞の表現型に影響を及ぼし、NK細胞の遺伝子発現を調節する能力を、フローサイトメトリーとNanostring分析をそれぞれ使用して評価した。

40

【0174】

結果

【0175】

ALT-803での処理により、NEO-201陽性のがん腫細胞に対して、NEO-201によって媒介されるADCC活性が有意に増強された（図8、図11）。ALT-803の効果は用量依存的であり、ビヒクル対照処理と比較して、試験を行ったすべての用量で統計的有意性を達成した。ALT-803によりNK細胞を処理することで、AD

50

ＣＣ活性が最小限であるドナーからのＡＤＣＣ活性も増強され、未処理のＮＫ細胞と比較して、ＡＤＣＣ応答を開始するために必要とされるＮＥＯ－２０１の有効量が減少した（図１２）。さらに、抗ＣＤ１６ブロッキング抗体及び抗ＴＩＭ３ブロッキング抗体を使用することにより、ＡＤＣＣ活性のブロックが可能になる（図１２）。

【０１７６】

２５ｎｇ／ｍｌのＡＬＴ－８０３で４８時間処理したＮＫ細胞の表現型分析は、ＡＬＴ－８０３がＴＩＭ３及びＮＫＧ２Ｄの発現ならびにＣＤ１６／ＣＤ５６陽性ＮＫ細胞におけるグランザイムＢ及びＣＤ１０７ａの平均蛍光強度（ＭＦＩ）を増強することを示した（図９）。

【０１７７】

ＡＬＴ－８０３を様々な濃度で４８時間処理したヒトＮＫ細胞のＮａｎｏｓｔｒｉｎｇ分析は、ＡＬＴ－８０３が６２遺伝子のｍＲＮＡ発現を調節できることを示した（ビヒクル対照と比較して１．６ ｌｏｇ₂の倍率変化が有意であると見なした）。

【０１７８】

ＡＬＴ－８０３処理により、ＮＫ活性化受容体、ＮＫ細胞毒性に関与する因子、サイトカイン及びその受容体など４３の遺伝子のｍＲＮＡ発現が上方制御され、ＮＫ阻害受容体、及びアポトーシスの活性化に関与する因子など１９の遺伝子のｍＲＮＡ発現が下方制御された。

【０１７９】

したがって、ＡＬＴ－８０３により、ＮＥＯ－２０１によって媒介されるヒトがん腫細胞に対するＡＤＣＣ活性が増強される。ＡＤＣＣ活性の増強は、一部は、ＴＩＭ３、ＮＫＧ２Ｄ、グランザイムＢ、及びＣＤ１０７ａ陽性ＮＫ細胞の発現の増加、ならびにＮＫの活性化及び細胞毒性に関与する転写産物の調節が要因であり得る。

【０１８０】

要約すると、正常なドナーから単離されたＮＫ細胞をＡＬＴ－８０３により処理することで、ＮＥＯ－２０１によって媒介されるＡＤＣＣ活性が増強され得る。正常なドナーから単離されたＡＬＴ－８０３処理ＮＫ細胞の表現型分析により、ＡＬＴ－８０３がＣＤ１６／ＣＤ５６陽性ＮＫ細胞でのＴＩＭ－３及びＮＫＧ２Ｄの発現が増強され得ることが示された。正常なＮＫ細胞をＡＬＴ－８０３で処理することにより、ＣＤ１６／ＣＤ５６陽性ＮＫ細胞におけるグランザイムＢのＭＦＩも増加する。正常なＮＫ細胞をＡＬＴ－８０３で処理することにより、試験を行った２名のドナーのうちの１名で、ＣＤ１６／ＣＤ５６陽性ＮＫ細胞のＣＤ１０７ａのＭＦＩも増加する。ＴＩＭ－３は、インターフェロンガンマ産生を増強する誘導性ヒトＮＫ細胞受容体である。また、成熟マーカーでもある。ＡＬＴ－８０３による処理後のＮＥＯ－２０１によって媒介されたＡＤＣＣ活性の増強は、ＴＩＭ－３陽性、ＮＫＧ２Ｄ陽性のグランザイムＢ陽性、及びＣＤ１０７ａ陽性のＮＫ細胞の発現の増加が要因の一部であり得るが、この理論は、制限することを意図するものではない。ＮＫ細胞をＡＬＴ－８０３で処理することにより、低濃度のＮＥＯ－２０１によって媒介されるＡＤＣＣ活性が増強され得る。低濃度のＭａｂは、ＮＫ細胞がＡＬＴ－８０３で処理されたときにＡＤＣＣ活性を媒介するために使用することができ、また高濃度のＮＥＯ－２０１を使用したＡＬＴ－８０３処理を行わない場合のＮＫ細胞と比較して、同等レベルの細胞毒性となり得る。この結果は、がん治療のための臨床試験において、より少ない用量のＭａｂをＡＬＴ－８０３と組み合わせて使用できることを示唆している。

【０１８１】

実施例 ９

【０１８２】

ＮＥＯ－２０１は、阻害性ＣＥＡＣＡＭ５／ＣＥＡＣＡＭ１免疫チェックポイント経路のブロックを介して、腫瘍細胞のＮＫ細胞依存性死滅を増強する。

【０１８３】

ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４などのエフェクター細胞阻害性受容体を標的とするチェックポイントブロッキング抗体を使用した免疫療法では、いくつかの腫瘍型において、いくつ

10

20

30

40

50

かの劇的で耐久性のある応答が引き出される。がん胎児性抗原関連細胞接着分子 1 (CEACAM1) は、免疫細胞及び腫瘍細胞によって発現される細胞表面タンパク質であり、PD-1 及びCTLA-4 と同様にT細胞機能を阻害できる。CEACAM1 は、ナチュラルキラー (NK) 細胞機能の強力な阻害剤でもある。NK細胞上のCEACAM1 と腫瘍細胞上のCEACAM1 またはCEACAM5 との間での結合は、NKGD2Dによる活性化シグナル伝達を阻害し、これにより、NK細胞の細胞溶解を防ぎ、腫瘍細胞がNK死滅を回避できるようになる。

【0184】

NEO-201 は、CEACAMファミリーのメンバーに結合し、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 及び補体依存性細胞傷害 (CDC) などの自然免疫機構を活性化して、腫瘍細胞を死滅させることができる。この調査は、NEO-201 がCEACAM1 阻害経路をブロックして、NK細胞に抗腫瘍機能を回復させるか否かを判断するために設計した。

【0185】

方法

【0186】

ヒト腫瘍細胞株を用いた *in vitro* アッセイを実施して、NEO-201 が結合したCEACAMファミリーのメンバーを特定した。機能アッセイを実施して、CEACAM1 を発現し、CD16 がなく、かつADCCを媒介する能力のない、NK細胞株NK-92による腫瘍細胞の *in vitro* 死滅を強化するNEO-201 の能力を評価した。

【0187】

死滅アッセイは、前述の手順の変更を使用して、実施した (David et al., 2017)。簡潔に述べると、肺癌 (ASPC-1、BxPC-3、CFPAC-1) 及び結腸癌 (LS174T) 由来の標的細胞を、10 μ M のカルセインAM細胞浸透性色素 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で30分間標識し、その後、三連で3.0 $\times 10^3$ 細胞/ウェルで、黒壁の平底96ウェル培養プレートに播種した。その後、腫瘍細胞を10 μ g/mL のヒトIgG1アイソタイプ対照抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) またはNEO-201 で処理し、エフェクター対標的 (E:T) 比1.56:25:1、3.125:1、6.25:1、及び12.5:1 でナチュラルキラー (NK) 細胞株NK-92を加えた。37 $^{\circ}$ C で16時間のインキュベーション後、ヨウ化プロピジウム (PI; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を最終濃度1.67 μ g/mL で各ウェルに加え、プレートを遠心し、Celigo Imaging Cytometer (Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, MA, USA) を使用してイメージングし、GraphPad Prism 7ソフトウェア (GraphPad Software, La Jolla, CA) を用いて分析した。生きた標的細胞 (カルセインAM/PI-) を各ウェルで数え、特異的溶解を次のように計算した: 特異的溶解率% = $100 - [(\text{平均の生きた標的数}_{\text{experimental}} / \text{平均の生きた標的数}_{\text{control}}) \times 100]$ 。

【0188】

結果

【0189】

NEO-201 は、CEACAM5 及びCEACAM6 の異なるバリエーションには反応するが、CEACAM1 またはCEACAM8 には反応しないことが判明した。発現プロファイリングでは、様々なNEO-201 + 細胞株細胞により、異なるレベルのCEACAM5/6 の陰性形態及びこれらの分子のNEO-201 反応性バリエーション形態が発現することが明らかになった。機能的に、NEO-201 処理により、CEACAM5 を発現したNEO-201 + 腫瘍細胞に対してNK-92細胞の細胞溶解活性が増強されたが、CEACAM6 のみを発現したNEO-201 + 細胞に対しては増強されなかった (図13)。

【0190】

結論

【0191】

NEO-201は、CEACAM5/6の腫瘍関連バリエーションと反応し、腫瘍細胞CEACAM5とNK細胞CEACAM1との間の相互作用をブロックして、NK細胞毒性のCEACAM1依存性阻害を逆行させ得る。

【0192】

略語

抗体依存性細胞傷害(ADCC)、時間0から無限大までの血漿中濃度時間曲線下面積(AUC_{inf})、時間0から無限大までの血漿中濃度-時間曲線下の線量正規化面積(AUC_{inf}/D)、ベースライン(BL)、補体依存性細胞毒性(CDC)、クリアランス(CL)、観察された最大血漿中濃度(C_{max})、用量正規化測定最大血漿濃度(C_{max}/D)、エストロゲン受容体(ER)、半減期(HL)、免疫組織化学(IHC)、ナチュラルキラー(NK)、非小細胞肺癌(NSCLC)、末梢血単核細胞(PBMC)、プロゲステロン受容体(PR)、腫瘍関連抗原(TAA)、観察された最大血漿濃度時間(T_{max})、分布容積(V_z)。

【0193】

参考文献

以下のリストの各文書を含む、本明細書で引用される各文書は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1; 136(5):E359-86.
2. Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE. Human cancer detection and immunotherapy with conjugated and non-conjugated monoclonal antibodies. *Anticancer Res*. 1996 Mar-Apr; 16(2):661-74.
3. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases - elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014 Apr; 27:16-25. doi:10.1016/j.coi.2014.01.004.
4. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:329-60.
5. Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2001 Nov; 1(2):118-29.
6. Hodge JW, Greiner JW, Tsang KY, Sabzevari H, Kudo-Saito C, Grosenbach DW, Gulley JL, Arlen PM, Marshall JL, Panicali D, Schlom J. Costimulatory molecules as adjuvants for immunotherapy. *Front Biosci*. 2006 Jan 1; 11:788-803.
7. Vergati M, Huen NY, Schlom J, Tsang KY.

10

20

30

40

50

Strategies for cancer vaccine development . J Biomed Biotechnol . 2010 ; 2010 (596432) .

8. Gabitzsch ES TK, Palena C, David JM, Fantini M, Kwilas A, Rice AE, Latchman Y, Hodge JW, Gulley JL, Madan RA, Heery CR, Balint JP Jr, Jones FR, Schlom J. The generation and analyses of a novel combination of recombinant adenovirus vaccines targeting three tumor antigens as an immunotherapeutic. Oncotarget . 2015 ; 6 (31) : 31344 - 59 .

10

9. Topalian SL, Weiner GJ, Pardoll DM. Cancer immunotherapy comes of age. J Clin Oncol . 2011 Dec 20 ; 29 (36) : 4828 - 36 .

10. Hollinshead A, Glew D, Bunnag B, Gold P, Herberman R. Skin-reactive soluble antigen from intestinal cancer-cell-membranes and relationship to carcinoembryonic antigens . Lancet . 1970 ; 1 (7658) : 1191 - 1195 .

11. Hollinshead AC, McWright CG, Alford TGD, Gold P, Herberman RB. Separation of skin reactive intestinal cancer antigen from the carcinoembryonic antigen of Gold. Science . 1972 ; 177 (4052) : 887 - 889 .

20

12. Hollinshead A, Elias EG, Arlen M, Buda B, Mosley M, Scherrer J. Specific active immunotherapy in patients with adenocarcinoma of the colon utilizing tumor-associated antigens (TAA). A phase I clinical trial. Cancer . 1985 ; 56 (3) : 480 - 489 .

13. Hollinshead AC. Methods of preparing epitopes of tumor associated antigens. US 4810781 . 1989 .

30

14. Bristol JA, Kantor JA. Recombinant monoclonal antibodies and corresponding antigens for colon and pancreatic cancers. US 7829678 . 2010 .

15. Hollinshead A. Active specific immunotherapy and immunochemotherapy in the treatment of lung and colon cancer. Semin Surg Oncol . 1991 Jul - Aug ; 7 (4) : 199 - 210 .

40

16. Luka J, Arlen PM, Bristol A. Development of a serum biomarker assay that differentiates tumor-associated MUC5AC (NPC-1C ANTIGEN) from normal MUC5AC. J Biomed Biotechnol . 2011 ; 2011 : 934757 . doi : 10.1155/2011/934757 . Epub 2010 Dec 16 . PubMed PMID : 21197415

17. Patel SP, Bristol A, Saric O, Wang XP, Dubeykovskiy A, Arlen PM, Morse MA. Anti-tumor activity of a novel monoclonal antibody, NPC-1C, optimized for recognition of tumor

50

antigen MUC5AC variant in preclinical models. *Cancer Immunol Immunother*. 2013 Jun; 62 (6): 1011-9.

18. Beg MS, Azad NS, Patel SP, Torrealba J, Mavroukakis S, Beatson MA, Wang XP, Arlen PM, Morse MA. A phase 1 dose-escalation study of NEO-102 in patients with refractory colon and pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016 Sep; 78(3): 577-84.

19. Kim RD, Arlen PM, Tsang KY, Mavroukakis SA, Zaki A, Cui K, Azad NS, Tan Jr. BR, Poplin E, Morse MA, Beg MS. Ensituximab (E) in patients (pts) with refractory metastatic colorectal cancer (mCRC): Results of a phase 1/2 clinical trial. *J Clin Oncol* 35, 2017 (suppl; abstr 3081).

10

20. Zeligs K, Arlen PM, Tsang K, Hernandez L, Fantini M, Annunziata CM. Abstract 3025: Preclinical characterization of a novel monoclonal antibody targeting a neo-antigen expressed in ovarian and GI malignancies. *Cancer Res* July 1 2017 (77) (13 Supplement) 3025.

20

21. Seidel UJ, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol*. 2013 Mar 27; 4: 76.

22. Petricevic B, Laengle J, Singer J, Sachet M, Fazekas J, Steger G, Bartsch R, Jensen-Jarolim E, Bergmann M. Trastuzumab mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis to the same extent in both adjuvant and metastatic HER2/neu breast cancer patients. *J Transl Med*. 2013 Dec 12; 11: 307.

30

23. Dall'Ozzo S, Tartas S, Piantaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, Watier H, Thibault G. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res*. 2004 Jul 1; 64(13): 4664-9.

40

24. Levy EM, Sycz G, Arriaga JM, Barrio MM, von Euw EM, Morales SB, Gonzalez M, Mordoh J, Bianchini M. Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells. *Innate Immun*. 2009 Apr; 15(2): 91-100.

25. Kawaguchi Y, Kono K, Mimura K, Sugai H, Akaike H, Fujii H. Cetuximab induce antibody-

50

- dependent cellular cytotoxicity against EGFR-expressing esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2007 Feb 15; 120(4): 781-7.
26. Lopez-Albaitero A, Lee SC, Morgan S, Grandis JR, Gooding WE, Ferrone S, Ferris RL. Role of polymorphic Fc gamma receptor IIIa and EGFR expression level in cetuximab mediated, NK cell dependent in vitro cytotoxicity of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2009 Nov; 58(11): 1853-64. doi: 10.1007/s00262-009-0697-4. 10
27. Boyerinas B, Jochems C, Fantini M, Heery CR, Gulley JL, Tsang KY, Schlom J. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells. *Cancer Immunol Res*. 2015 Oct; 3(10): 1148-57. 20
28. Meyer S, Leusen JH, Boross P. Regulation of complement and modulation of its activity in monoclonal antibody therapy of cancer. *MAbs*. 2014; 6(5): 1133-44.
29. Strome SE, Sausville EA, Mann D. A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. *Oncologist*. 2007 Sep; 12(9): 1084-95.
30. Hayes J, Frostell A, Karlsson R, Muller S, Millan-Martin S, Pauers M, Reuss F, Cosgrave E, Anneren C, Davey GP, Rudd PM. Identification of Fc gamma receptor glycoforms that produce differential binding kinetics for rituximab. *Mol Cell Proteomics*. 2017 Jun 2. pii: mcp.M117.066944. doi: 10.1074/mcp.M117.066944. [Epub ahead of print] 30
31. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood*. 1997 Aug 1; 90(3): 1109-14. PubMed PMID: 9242542. 40
32. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, Salmon JE, Kimberly RP. A novel polymorphism of Fc gammaRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. 1997 Sep 1; 100(5): 1059-70. PubMed PMID: 9276722
33. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo 50

D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbi ni A, Camisa R, Bisagni G, Neri TM, Ardizzoni A. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 10; 26(11):1789-96.

34. Hank JA, Robinson RR, Surfus J, Mueller BM, Reisfeld RA, Cheung NK, Sondel PM. Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following in vivo therapy with recombinant interleukin 2. *Cancer Res*. 1990 Sep 1; 50(17):5234-9.

10

35. Watanabe M, Kono K, Kawaguchi Y, Mizukami Y, Mimura K, Maruyama T, Fujii H. Interleukin-21 can efficiently restore impaired antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2010 Feb 2; 102(3):520-9.

20

36. Han KP, Zhu X, Liu B, Jeng E, Kong L, Yovandich JL, Vyas VV, Marcus WD, Chavaille PA, Romero CA, Rhode PR, Wong HC. IL-15:IL-15 receptor alpha superagonist complex: high-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization. *Cytokine*. 2011 Dec; 56(3):804-10.

37. Gomes-Giacoaia E, Miyake M, Goodison S, Sriharan A, Zhang G, You L, Egan JO, Rhode PR, Parker AS, Chai KX, Wong HC, Rosser CJ. Intravesical ALT-803 and BCG treatment reduces tumor burden in a carcinogen induced bladder cancer rat model; a role for cytokine production and NK cell expansion. *PLoS One*. 2014 Jun 4; 9(6):e96705.

30

38. Mathios D, Park CK, Marcus WD, Alter S, Rhode PR, Jeng EK, Wong HC, Pardoll DM, Lim M. Therapeutic administration of IL-15 superagonist complex ALT-803 leads to long-term survival and durable antitumor immune response in a murine glioblastoma model. *Int J Cancer*. 2016 Jan 1; 138(1):187-94.

40

39. Rhode PR, Egan JO, Xu W, Hong H, Webb GM, Chen X, Liu B, Zhu X, Wen J, You L, Kong L, Edwards AC, Han K, Shi S, Alter S, Sacha JB, Jeng EK, Cai W, Wong HC. Comparison of the Superagonist Complex, ALT-803, to IL15 as Cancer Immunotherapeutics in Animal Models. *Cancer Immunol Res*. 2016 Jan; 4(1):49-60.

40. Kim PS, Kwilas AR, Xu W, Alter S, Jeng EK,

50

Wong HC, Schlom J, Hodge JW. IL-15 superagonist/IL-15R Sushi-Fc fusion complex (IL-15S A/IL-15R Su-Fc; ALT-803) markedly enhances specific subpopulations of NK and memory CD8+ T cells, and mediates potent anti-tumor activity against murine breast and colon carcinomas. *Oncotarget*. 2016 Mar 29; 7(13):16130-45.

41. Felices M, Chu S, Kodal B, Bendzick L, Ryan C, Lenvik AJ, Boylan KLM, Wong HC, Skubitz APN, Miller JS, Geller MA. IL-15 super-agonist (ALT-803) enhances natural killer (NK) cell function against ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2017 Jun; 145(3):453-461. 10
42. Rosario M, Liu B, Kong L, Collins LI, Schneider SE, Chen X, Han K, Jeng EK, Rhode PR, Leong JW, Schappe T, Jewell BA, Keppel CR, Shah K, Hess B, Romee R, Piwnicka-Worms DR, Cashen AF, Bartlett NL, Wong HC, Fehniger TA. The IL-15-Based ALT-803 Complex Enhances Fc RIIa-Triggered NK Cell Responses and In Vivo Clearance of B Cell Lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2016 Feb 1; 22(3):596-608. 20
43. Seya T, Matsumoto M, Hara T, Hatanaka M, Masaoka T, Akedo H. Distribution of C3-step regulatory proteins of the complement system, CD35 (CR1), CD46 (MCP), and CD55 (DAF), in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*. 1994 Feb; 12(5-6):395-400.
44. Niehans GA, Cherwitz DL, Staley NA, Knapp DJ, Dalmaso AP. Human carcinomas variably express the complement inhibitory proteins CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay-accelerating factor), and CD59 (protectin). *Am J Pathol*. 1996 Jul; 149(1):129-42. 30
45. Donin N, Jurianz K, Ziporen L, Schultz S, Kirschfink M, Fishelson Z. Complement resistance of human carcinoma cells depends on membrane regulatory proteins, protein kinases and sialic acid. *Clin Exp Immunol*. 2003 Feb; 131(2):254-63. 40
46. Hsu YF, Ajona D, Corrales L, Lopez-Picazo JM, Gurpide A, Montuenga LM, Pio R. Complement activation mediates cetuximab inhibition of non-small cell lung cancer tumor growth in vivo. *Mol Cancer*. 2010 Jun 7; 9:139.
47. Konishi E, Kitai Y, Kondo T. Utilization of complement-dependent cytotoxicity to measure low levels of antibodies: application to nonstructural protein 1 in a model o 50

f Japanese encephalitis virus. Clin Vaccine Immunol. 2008 Jan; 15(1): 88-94.

48. David JM, Dominguez C, McCampbell KK, Gullley JL, Schlom J, Palena C. A novel bifunctional anti-PD-L1/TGF-Trap fusion protein (M7824) efficiently reverts mesenchymalization of human lung cancer cells. OncoImmunology. 2017 Jul 13; 6(10): e1349589.

【表1】

表1：様々な固形腫瘍型に由来する培養腫瘍細胞株へのNEO-201結合のフローサイトメトリー分析。陽性細胞のパーセンテージ及び平均蛍光強度（MFI）値は、各細胞株について詳細に記載する。NEO-201陽性細胞株は太字で示す。NEO-201陽性は、陽性率%10%超と定義した。

細胞株	腫瘍型	陽性率 (%)	MFI
COLO 205	結腸	10.33	245
HT-29	結腸	38.40	352
LS174T	結腸	46.46	345
SW1116	結腸	2.36	194
SW1463	結腸	1.23	278
SW480	結腸	1.70	575
ASPC-1	膵癌	79.26	8927
BXPC-3	膵癌	97.25	2584
CAPAN-2	膵癌	29.69	327
CFPAC-1	膵癌	97.79	9281
PANC-1	膵癌	3.29	289
H441	NSCLC(腺癌)	69.16	675
H522	NSCLC(腺癌)	1.38	238
HCC4006	NSCLC(腺癌)	99.27	9899
HCC827	NSCLC(腺癌)	77.46	692
SK-LU-1	NSCLC(腺癌)	1.77	685
CALU-1	NSCLC(扁平上皮)	4.22	571
H1703	NSCLC(扁平上皮)	4.16	111
H226	NSCLC(扁平上皮)	4.83	209
H520	NSCLC(扁平上皮)	61.78	443
AU-565	乳癌(HER2+)	50.04	227
BT-474	乳癌(PR+/HER2+)	68.79	591
HCC1500	乳癌(ER+/PR+)	1.53	597
SK-BR-3	乳癌(HER2+)	1.61	329
T-47D	乳癌(ER+/PR+)	8.00	161
ZR-75-1	乳癌(ER+/PR+/HER2+)	68.80	550
BT-549	乳癌(ER-/PR-/HER2-)	1.47	477
HCC1937	乳癌(ER-/PR-/HER2-)	19.14	510
HCC38	乳癌(ER-/PR-/HER2-)	2.15	226
MDA-MB-468	乳癌(ER-/PR-/HER2-)	6.33	344

10

20

30

40

50

【表 2】
表 2：正常なヒトマイクロアレイ組織の NEO-201 染色の IHC プロファイル。

組織の種類	陽性/合計	組織の種類	陽性/合計
大脳皮質	0/2	脾臓	0/2
小脳	0/2	リンパ節	0/2
大脳基底核	0/2	扁桃腺	0/2
海馬	0/2	胸腺	0/2
脊髄	0/2	耳下腺	0/2
心臓	0/2	骨格筋	0/2
肺	0/2	尿管	0/2
気管支	0/2	子宮頸陰部	2/2, 弱い
舌	2/2, 弱い	子宮頸内膜	0/2
食道	0/2	プロ子宮内膜 (Pro-endometrium)	0/2
胃	0/2	Sec 子宮内膜 (Sec-endometrium)	0/2
乳房	0/2	子宮筋	0/2
肝臓	0/2	臍帯	0/2
前立腺	0/2	軟組織	0/2
精巣	0/2	胎盤: 羊膜	0/2
卵巣	0/2	胎盤: chorionvilli	0/2
輸卵管	0/2	胎盤: 基底板	0/2

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3：カニクイザルにおける単回用量NEO-201投与の薬物動態学的結果。8匹の雄及び8匹の雌動物（2匹／性／群）に、0mg/kg（生理食塩水）または5mg/kg、20mg/kg、または49mg/kgのNEO-201を静脈内注射した。様々な時点（投与前、投与後10分、1時間、2時間、4時間、6時間、24時間、48時間、72時間、96時間、168時間、及び336時間）でNEO-201を受けたすべての動物から血液試料を採取し、血清調製物からの薬物動態測定はELISAによって得た。表の値は、2匹／性別／群（M、F）または4匹すべて（すべて）の平均を表す。

10

略語：時間0から無限大までの血漿中濃度時間曲線下面積（AUCinf）、時間0から無限大までの血漿中濃度－時間曲線下の用量正規化面積（AUCinf/D）、クリアランス（CL）；観察された最大血漿中濃度（Cmax）；用量正規化測定最大血漿濃度（Cmax/D）；半減期（HL）；観察された最大血漿濃度の時間（Tmax）；分布容積（Vz）。

用量 レベル	性別	HL (時間)	Tmax (時間)	Cmax (µg/mL)	Cmax/D (µg/mL/mg)	AUCinf (hr×µg/mL)	AUCinf/D (hr×µg/mL/mg)	CL (mL/hr)	Vz (mL)
5mg/kg	M	58.5	0.584	135	10.4	8,210	640	1.67	137
	F	34.0	0.584	142	12.4	8,230	720	1.41	69.8
	全て	46.2	0.584	138	11.4	8,220	680	1.54	103
20mg/kg	M	176	0.167	639	12.3	77,600	1,500	0.669	171
	F	158	0.167	518	10.1	62,700	1,230	0.823	187
	全て	167	0.167	579	11.2	70,100	1,360	0.746	179
49mg/kg	M	122	0.167	1,460	11.6	126,000	1,000	1.00	174
	F	219	0.167	1,470	11.9	187,000	1,520	0.658	208
	全て	170	0.167	1,470	11.8	157,000	1,260	0.830	191

20

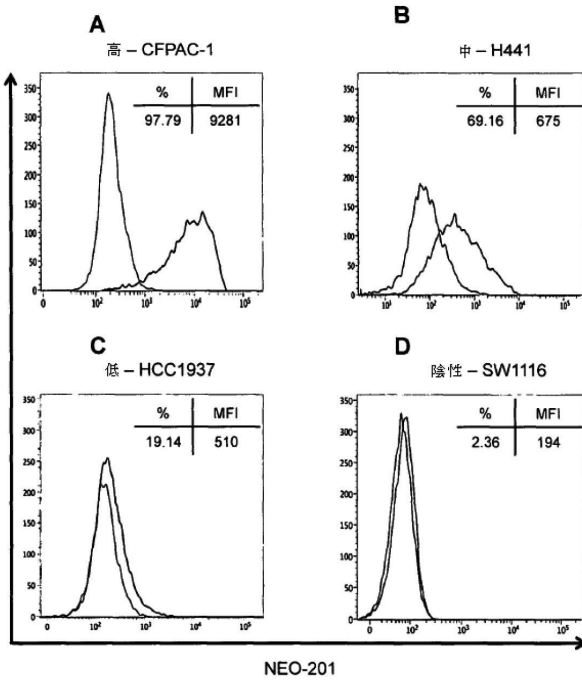
30

40

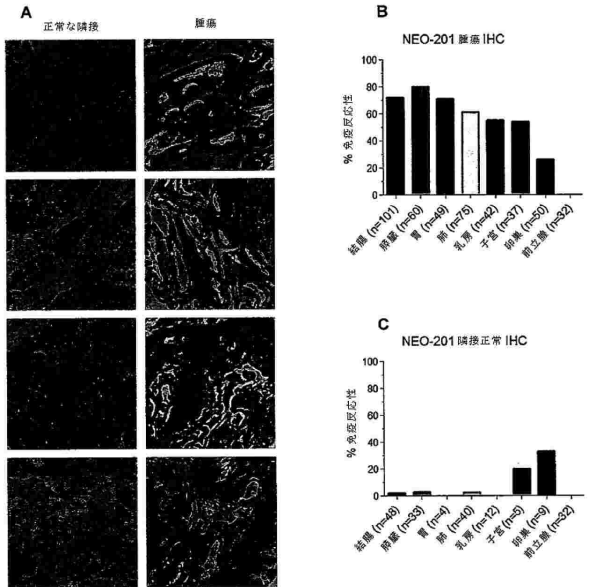
50

【図面】

【図 1】



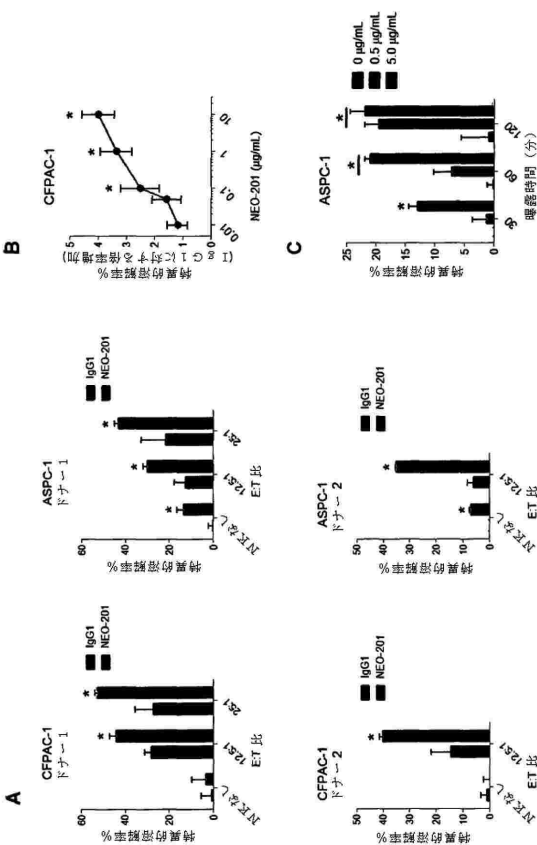
【図 2】



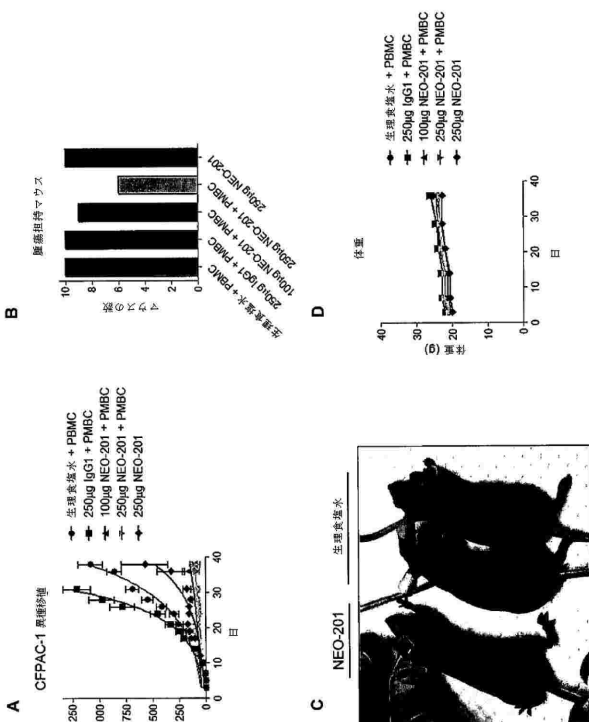
10

20

【図 3】



【図 4】

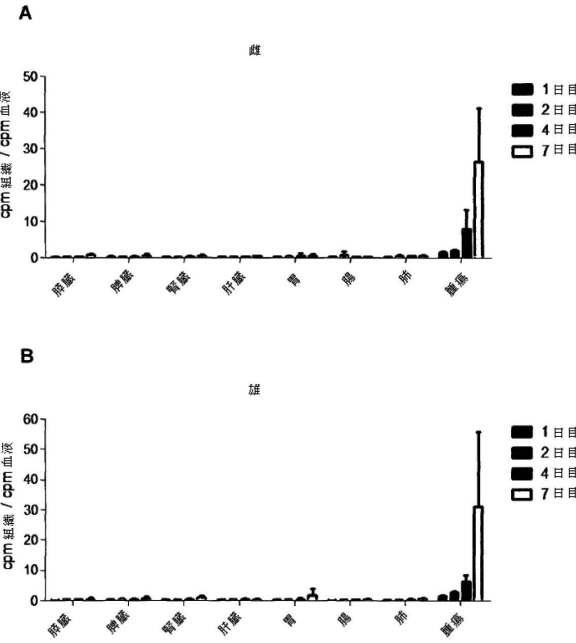


30

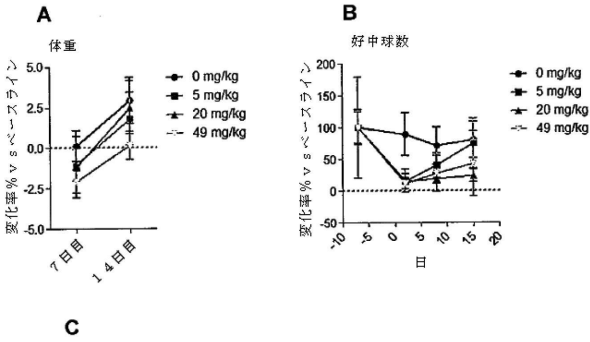
40

50

【図 5】

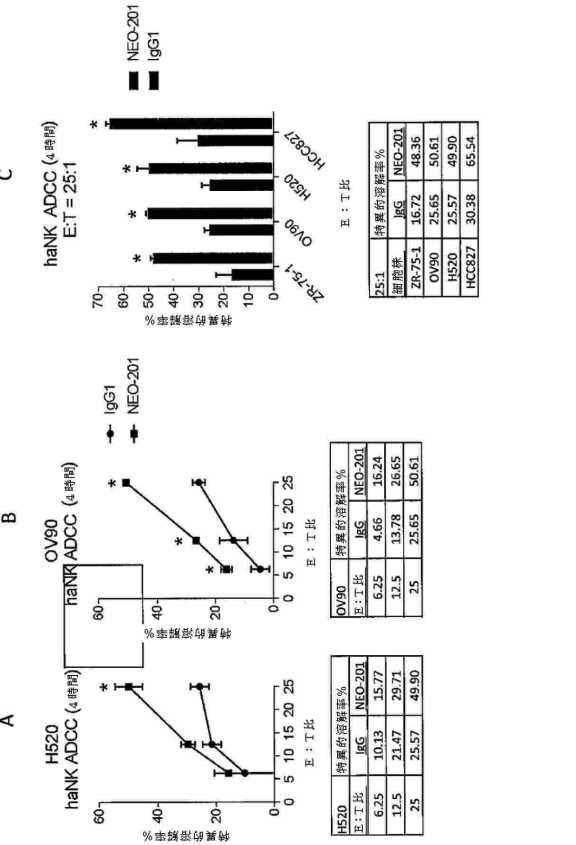


【図 6】



10

【図 7】



【図 8】

ALT-803による処理により、NEO-201によって媒介されるADCC活性が増強される

	ALT-803 (25ng/ml)	抗体 (10µg/ml)	E:T = 25:1	E:T = 12.5:1	E:T = 6.25:1
ND#1	-	NEO-201	19.4 (0.9)	ND	ND
ND#1	+	NEO-201	30.3 (1.3)	ND	ND
ND#2	-	NEO-201	69.1 (1.9)	47.6 (1.5)	29.3 (1.0)
ND#2	+	NEO-201	87.6 (2.8)	79.0 (1.6)	65.1 (2.8)

20

30

40

50

ALT-803による処理により、低濃度NEO-201によって媒介されるADCC活性が増強される

【 図 1 1 】

抗体	ALT-803 (25ng/ml)	抗体 (10μg/ml)	抗体 (1μg/ml)	抗体 (0.1μg/ml)
NEO-201	-	23.8 (1.7)	24.8 (1.3)	14.9 (2.9)
NEO-201	+	37.3 (1.5)*	37.4 (1.3)*	37.4 (1.5)*

ALT-803による処理により、正常のドナー（ND#8）のADCC活性を増強し、NEO-201によって媒介されるADCC活性が最小となる。この活性は、抗CD16及び抗TIM-3抗体によってプロダクトされる

【 図 1 2 】

ALT-803 (25ng/ml)	なし	抗-CD16 (30μg/ml)	抗-CD16 (15μg/ml)	抗-TIM-3 (30μg/ml)	抗-TIM-3 (15μg/ml)
-	1.3 (1.4)	0.1 (1.9)	1.8 (2.5)	3.2 (2.5)	0.6 (2.2)
+	12.3 (1.1)*	4.4 (0.9)*	6.3 (2.3)*	5.7 (2.7)*	13.5 (1.9)

ALT-803による処理により、ヒトNK細胞でのTIM-3及びNKG2Dの発現が増強された


【 図 9 】

マーカー	未処理	ALT-803により48時間処理 (25ng/ml)
CD16*/CD56*	9.51 (52/3,457)	9.03 (84/15,419)
CD16*/CD56*	89.27 (7,434/1,048)	90.97 (6,915/3,605)
TIM-3*/CD16*/CD56*	42.87 (843/8,078/1,197)	81.56 (2,972/6,039/2,820)
NKG2D*/CD16*/CD56*	87.99 (317/7,341/1,070)	78.33 (590/5,829/2,463)
TIM-3*/NKG2D*/CD16*/CD56*	43.95 (799/307/8,028/1,204)	74.68 (3,011/500/6,123/2,937)
CD107a*/CD16*/CD56*	99.99 (887/7,439/1,050)	99.91 (2,711/5,739/2,305)
グランザイムB*/CD16*/CD56*	98.84 (474/7,512/1,045)	99.88 (1,348/5,743/2,305)
PD-1*/CD16*/CD56*	12.82 (907/3,770/532)	16.18 (1,272/4,749/674)
CD158d*/CD16*/CD56*	14.58 (167/6,302/2,654)	17.68 (1,064/2,951/3,237)

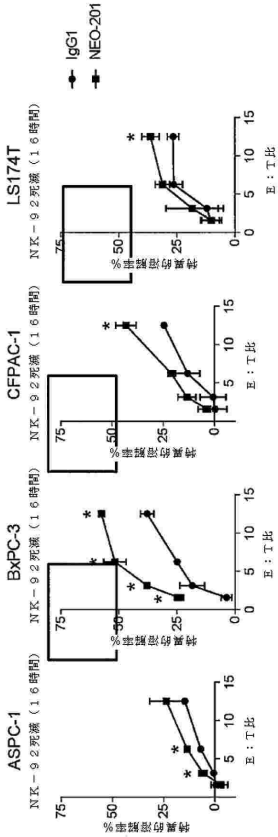
ALT-803による処理により、ヒトNK細胞でのTIM-3及びNKG2Dの発現が増強された

【 図 1 0 】

マーカー	未処理	ALT-803により48時間処理 (25ng/ml)
CD16*/CD56*	12.27 (83/908)	13.23 (91/757)
CD16*/CD56*	87.73 (6,425/3,043)	86.77 (5,848/7,810)
TIM-3*/CD16*/CD56*	33.92 (827/6,901/3,040)	92.14 (2,462/5,903/8,080)
NKG2D*/CD16*/CD56*	79.46 (465/6,444/3,094)	95.40 (1,152/5,939/8,074)
TIM-3*/NKG2D*/CD16*/CD56*	24.85 (853/511/6,925/3,117)	85.30 (2,517/1,190/6,051/8,385)
CD107a*/CD16*/CD56*	99.95 (13,775/6,425/3,043)	100 (10,365/5,848/7,810)
グランザイムB*/CD16*/CD56*	99.75 (1,157/6,430/3,042)	100 (2,457/5,848/7,810)
PD-1*/CD16*/CD56*	5.36 (211/7,113/3,278)	3.87 (229/5,976/5,872)
CD158d*/CD16*/CD56*	12.72 (227/19,155/4,833)	11.00 (219/9,661/8,955)

【 1 3】

NEO-201を使用したNK-92死滅アッセイ (16時間)



ASPC-1		BxPC-3		CFPAC-1		LS174T	
E : T 比	log	E : T 比	log	E : T 比	log	E : T 比	log
1.5625	-0.52	3.76	24.18	-0.21	3.46	10.50	10.24
3.125	0.65	21.50	37.88	0.68	13.40	12.11	18.47
6.25	6.84	27.77	51.80	13.08	21.16	26.36	31.14
12.5	14.56	40.16	57.58	24.65	43.25	26.63	36.34

【配列表】

0007437307000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 特表 2 0 1 7 - 5 2 1 4 1 0 (J P , A)

ZELIGS, K. et al. , Cancer Res , 2017年07月 , Vol. 77, Issue 13, Suppl. , Abstract No. 3025

NEUMAN, M.K. et al. , Cancer Res , 2016年 , Vol. 76, No. 14, Suppl. , Abstract No. 1496

GEISLER, J.P. et al. , Gynecol Oncol , 2016年 , Vol. 141 , p. 95-96

VIDARSSON, G. et al. , Front Immunol , 2014年 , Vol. 5, Article No. 520 , pp. 1-17

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)