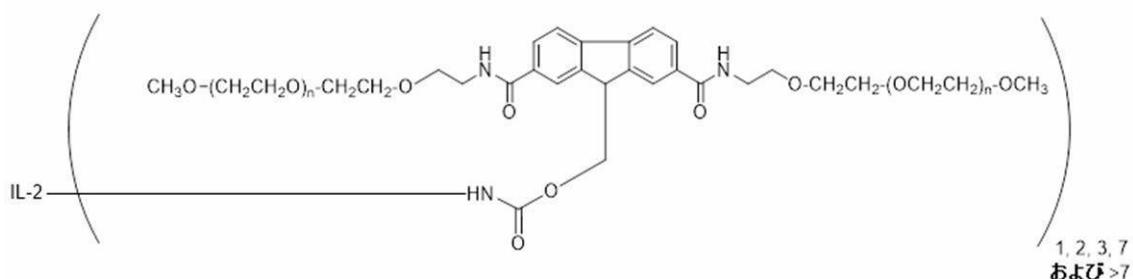


【化6】



(式中、IL-2はIL-2の残基である)

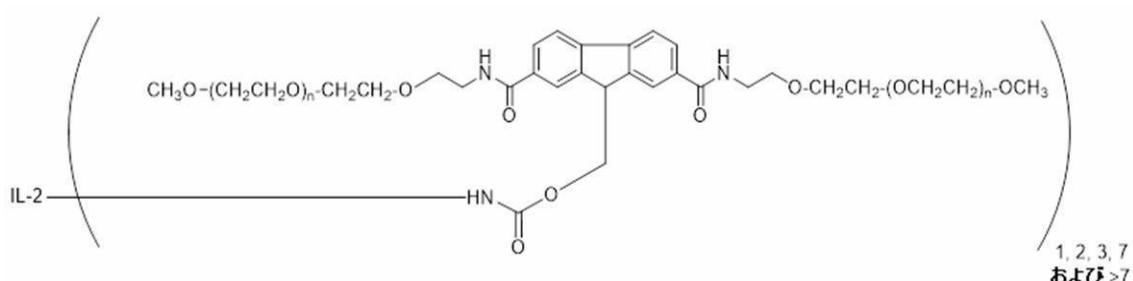
10

に包含される化合物またはその薬学的に許容される塩を10モル%以下含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の組み合わせ物または組成物。

【請求項14】

前記長時間作用型IL-2R選択的作動薬が、以下の式

【化7】



20

(式中、IL-2はIL-2の残基である)

に包含される化合物またはその薬学的に許容される塩を5モル%以下含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の組み合わせ物または組成物。

【請求項15】

前記長時間作用型IL-2R選択的作動薬が、mPEG-C2-FMOC部分を含み、前記長時間作用型IL-2R選択的作動薬に含まれる前記mPEG-C2-FMOC部分が、約20キロダルトンの分子量を有する、請求項1～14のいずれか1項に記載の組み合わせ物または組成物。

30

【請求項16】

前記IL-2が、プロロイキンである、請求項1～15のいずれか1項に記載の組み合わせ物または組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2014年10月29日に出願されたインド特許出願第3087/DEL/2014号明細書、及び2014年2月21日に出願されたインド特許出願第499/DEL/2014号明細書に対する優先権の利益を主張するものであり、これらの特許出願の開示は全体として参照により本明細書に援用される。

40

【0002】

本発明は(特に)癌化学療法の分野に関し、長時間作用型IL-2R選択的作動薬を別の薬理活性剤と併用して患者に投与することによる、癌に罹患している個体の治療を含む。

【背景技術】

【0003】

インターロイキン2受容体(IL-2R)は、リンパ球などの特定の免疫細胞の表面上

50

に発現するヘテロ三量体タンパク質であって、IL-2 サイトカインに結合し、且つそれに応答する。IL-2 受容体は 3 つのサブユニット、即ち IL-2R_α、IL-2R_β、及び IL-2R_γ で構成され、IL-2R_α 及び IL-2R_γ の各々は IL-2 に結合親和性を有するが、一方 IL-2R_β は、単独では認め得るほどの親和性を有しない。Theze et al. (1994) Immunol. Today 17 (10) : 481 - 486。さらに、IL-2R_α ヘテロ二量体は、いずれの鎖単独と比べても IL-2 との結合時の会合速度が速く、解離速度が遅い。Liparoto et al. J. Mol. Recognit. 12 (5) : 316 - 321。

【0004】

免疫応答の抑制に関する CD4⁺ 調節性 T 細胞は、IL-2R_α 型の IL-2R を優先的に発現する。従って、IL-2R_α の作動薬である化合物の投与は免疫応答を抑制すると予想し得る。 10

【0005】

免疫応答の増強に関する CD8⁺ 記憶 T 細胞は、IL-2R_β 型の IL-2R を優先的に発現する。従って、IL-2R_β の作動薬である化合物の投与は免疫応答を（例えば CD8⁺ 記憶 T 細胞の増殖を高めることによって）増強すると予想し得る。 20

【0006】

従って、IL-2R_γ 選択的作動薬の投与は、そうすることにより調節性 T 細胞の免疫抑制効果が低下する一方で CD8⁺ 記憶 T 細胞が増加し、それによって患者自身の免疫系が癌細胞の排除に動員されると予想されるため、特定の癌に罹患している患者にとって有益となり得る。最適には、かかる IL-2R_γ 選択的作動薬は投与後に比較的長い曝露も呈し得るため、治療に対する患者の反応がさらに向上し得る。 20

癌の治療における IL-2R_γ 選択的作動薬の投与による癌患者の免疫系の動員（これは直接の免疫活性化である）は、免疫抑制経路の拮抗薬（例えば、CTLA-4 及び PD-1 の拮抗薬）を投与することによってさらに増強し得る。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献 1】 Theze et al. (1994) Immunol. Today 17 (10) : 481 - 486 30

【非特許文献 2】 Liparoto et al. J. Mol. Recognit. 12 (5) : 316 - 321

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

従って、本発明は、（特に）より有効性の高い癌治療を提供する継続的必要性に対し、例えば、癌に罹患している患者に IL-2B 選択的作動薬を薬理学ベースの免疫抑制経路拮抗薬と併用して投与することにより対処しようとするものである。 40

【0009】

この及び当該技術分野における他の必要性が本発明によって対処される。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の 1 つ又は複数の実施形態において、方法が提供され、本方法は、(a) IL-2R 活性化量の長時間作用型 IL-2R 選択的作動薬；及び (b) CTLA-4 経路阻害量の抗 CTLA-4 抗体又は PD-1 経路阻害量の抗 PD-1 抗体を癌患者に投与するステップを含む。明確にしておくと、この方法におけるステップの順序に関して、特に指示されない限り本方法はこのステップの順序に限定されず、ステップ (a) がステップ (b) の実施前、その実施後又はその実施と同時に実施されてもよい。

【0011】

以下の説明及び特許請求の範囲に、本発明のさらなる実施形態を示す。 50

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

癌に罹患している患者に投与する方法であって、(a) IL-2R 活性化量の長時間作用型 IL-2R 選択的作動薬；及び (b) CTLA-4 経路阻害量の抗 CTLA-4 抗体又は PD-1 経路阻害量の抗 PD-1 抗体のステップを含む方法。

(項目2)

前記患者がヒトである、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記癌が固形癌である、項目1又は2に記載の方法。

(項目4)

前記固形癌が、乳癌、卵巣癌、結腸癌、結腸直腸癌、胃癌、悪性黒色腫、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、甲状腺癌、腎癌、胆管癌、脳癌、子宮頸癌、上頸洞癌、膀胱癌、食道癌、ホジキン病及び副腎皮質癌からなる群から選択される、項目1又は2に記載の方法。

(項目5)

前記癌が結腸癌である、項目3に記載の方法。

(項目6)

前記癌が乳癌である、項目3に記載の方法。

(項目7)

ステップ(a)がステップ(b)を行う前に行われる、項目1又は2に記載の方法。

(項目8)

(a)がステップ(b)を行った後に行われる、項目1又は2に記載の方法。

(項目9)

ステップ(a)及び(b)が同時に行われる、項目1又は2に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】CT26腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用における受容体選択的長時間作用型IL-2作動薬の有効性試験（この試験は実施例2にさらに記載される）に関連した、それぞれ平均腫瘍容積、相対腫瘍容積及び体重のプロットである。

【図2】CT26腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用における受容体選択的長時間作用型IL-2作動薬の有効性試験（この試験は実施例2にさらに記載される）に関連した、それぞれ平均腫瘍容積、相対腫瘍容積及び体重のプロットである。

【図3】CT26腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用における受容体選択的長時間作用型IL-2作動薬の有効性試験（この試験は実施例2にさらに記載される）に関連した、それぞれ平均腫瘍容積、相対腫瘍容積及び体重のプロットである。

【図4】EMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用における受容体選択的長時間作用型IL-2作動薬の有効性試験（この試験は実施例3にさらに記載される）に関連した、それぞれ30日間の平均腫瘍容積、106日間の平均腫瘍容積、及び体重のプロットである。

【図5】EMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用における受容体選択的長時間作用型IL-2作動薬の有効性試験（この試験は実施例3にさらに記載される）に関連した、それぞれ30日間の平均腫瘍容積、106日間の平均腫瘍容積、及び体重のプロットである。

【図6】EMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用における受容体選択的長時間作用型IL-2作動薬の有効性試験（この試験は実施例3にさらに記載される）に関連した、それぞれ30日間の平均腫瘍容積、106日間の平均腫瘍容積、及び体重のプロットである。

【図7】EMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体を伴うProleukinと比較した抗CTLA-4抗体との併用における受容体選択的長時間作用型IL-2作動薬の有効性試験（この試験は実施例4にさらに記載される）に関連した、それぞれ腫瘍容積及

10

20

30

40

50

び体重のプロットである。

【図8】EMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体を伴うProleukinと比較した抗CTLA-4抗体との併用における受容体選択的長時間作用型IL-2作動薬の有効性試験（この試験は実施例4にさらに記載される）に関連した、それぞれ腫瘍容積及び体重のプロットである。

【図9】EMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用における受容体選択的長時間作用型IL-2作動薬のフローサイトメトリー解析を含む有効性試験（この試験は実施例5にさらに記載される）に関連した、11日間のそれぞれ腫瘍容積及び体重のプロットである。

【図10】EMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用における受容体選択的長時間作用型IL-2作動薬のフローサイトメトリー解析を含む有効性試験（この試験は実施例5にさらに記載される）に関連した、11日間のそれぞれ腫瘍容積及び体重のプロットである。 10

【図11】各々、実施例5にさらに記載されるフローサイトメトリー解析に対応する免疫細胞集団のそれぞれ腫瘍及び脾臓のグラフを含む。

【図12】各々、実施例5にさらに記載されるフローサイトメトリー解析に対応する免疫細胞集団のそれぞれ腫瘍及び脾臓のグラフを含む。

【図13】CT26腫瘍モデルに対する抗PD-1抗体との併用における受容体選択的長時間作用型IL-2作動薬の有効性試験（この試験は実施例6にさらに記載される）に関連した、それぞれ平均腫瘍容積及び体重のプロットである。 20

【図14】CT26腫瘍モデルに対する抗PD-1抗体との併用における受容体選択的長時間作用型IL-2作動薬の有効性試験（この試験は実施例6にさらに記載される）に関連した、それぞれ平均腫瘍容積及び体重のプロットである。

【図15】実施例7にさらに記載される3フェーズ再攻撃試験のフェーズI後の平均腫瘍容積及び体重の2つのプロットを示す。

【図16】実施例7にさらに記載される3フェーズ再攻撃試験のフェーズI後の相対平均腫瘍容積及び体重変化の2つのプロットを示す。

【図17】実施例7にさらに記載される3フェーズ再攻撃試験のフェーズII後の相対体重変化のプロットを示す。

【図18】実施例7にさらに記載される3フェーズ再攻撃試験のフェーズII後の平均腫瘍容積及び体重の2つのプロットを示す。 30

【図19】実施例7にさらに記載される3フェーズ再攻撃試験のフェーズIII後の平均腫瘍容積のプロットを示す。

【図20】実施例7にさらに記載される3フェーズ再攻撃試験のフェーズIIIの体重変化及び相対体重変化の2つのプロットを示す。

【図21】実施例7にさらに記載される3フェーズ再攻撃試験の経過にわたる平均腫瘍容積及び個々の腫瘍容積の2つのプロットを示す。

【図22】実施例8にさらに記載されるRSLAIL-2及び抗CTLA-4併用試験に関連して0日目～11日目の平均腫瘍容積及び体重の2つのプロットを示す。

【図23】実施例8にさらに記載されるRSLAIL-2及び抗CTLA-4併用試験に関連して0日目～11日目の相対平均腫瘍容積及び体重の2つのプロットを示す。 40

【図24】実施例8にさらに記載されるRSLAIL-2及び抗PD-1併用試験に関連して0日目～11日目の平均腫瘍容積及び体重の2つのプロットを示す。

【図25】実施例8にさらに記載されるRSLAIL-2及び抗PD-1併用試験に関連して0日目～11日目の相対平均腫瘍容積及び体重の2つのプロットを示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本明細書で使用されるとき、単数形「a」、「a n」、及び「t h e」には、文脈上特に明確に指示されない限り複数の指示対象が含まれる。

【0014】

10

20

30

40

50

本発明の記載及び特許請求の範囲においては、以下に記載する定義に従い以下の用語を使用する。

【0015】

「水溶性非ペプチドポリマー」は、室温で水に対して少なくとも35%（重量基準）可溶であり、好ましくは70%超（重量基準）、より好ましくは95%超（重量基準）可溶であるポリマーを指す。典型的には、「水溶性」ポリマーの末過水溶液調製物は、ろ過後の同じ溶液によって透過される光の量の少なくとも75%、より好ましくは少なくとも95%を透過する。しかしながら、水溶性ポリマーは水に対して少なくとも95%（重量基準）可溶であるか又は水に対して完全に可溶であることが最も好ましい。「非ペプチド性」であることに関して、ポリマーは、それが有するアミノ酸残基が35%未満（重量基準）であるとき非ペプチド性である。

10

【0016】

用語「単量体」、「単量体サブユニット」及び「単量体ユニット」は、本明細書では同義的に使用され、ポリマーの基本構造単位の1つを指す。ホモポリマーの場合、単一の繰り返し構造単位がポリマーを形成する。コポリマーの場合、2つ以上の構造単位が-あるパターンで又はランダムに-繰り返すことでポリマーを形成する。本発明との関連において使用される好ましいポリマーはホモポリマーである。水溶性非ペプチドポリマーは、連続的に結合された1つ以上の単量体を含んで単量体の鎖を形成する。

【0017】

「PEG」又は「ポリエチレングリコール」は、本明細書で使用されるとき、任意の水溶性ポリ（エチレンオキシド）を包含することが意図される。特に指示されない限り、「PEGポリマー」又はポリエチレングリコールは、実質的に全ての（好ましくは全ての）単量体サブユニットがエチレンオキシドサブユニットであるものであり、しかしながらポリマーは、例えばコンジュゲーション用に、個別のエンドキャッピング部分又は官能基を含有してもよい。本発明で使用されるPEGポリマーは、1つ又は複数の末端酸素が例えば合成変換中に置換されたか否かに応じて、以下の2つの構造のうちの一方を含み得る：「-（CH₂CH₂O）_n-」又は「-（CH₂CH₂O）_{n-1}CH₂CH₂-」。前述のとおり、PEGポリマーについては、変量（n）は約3～4000の範囲であり、末端基及びPEG全体の構造は様々であり得る。

20

【0018】

ポリマーの幾何学的配置又は全体構造に関して「分枝状」は、分岐点から延在する2つ以上のポリマー「アーム」を有するポリマーを指す。

30

【0019】

「生理学的に切断可能な」又は「加水分解性の」又は「分解性の」結合とは、生理学的条件下で水と反応する（即ち加水分解される）比較的不安定な結合である。結合が水中で加水分解する傾向は、所与の分子内で2つの原子をつなぐ一般的な種類の結合に依存するのみならず、それらの原子に結合した置換基にもまた依存し得る。加水分解に不安定な又は弱い適切な結合としては、限定はされないが、カルボン酸エステル、リン酸エステル、無水物、アセタール、ケタール、アシルオキシアルキルエーテル、イミン、オルトエステル、ペプチド、オリゴヌクレオチド、チオエステル、及びカーボネートが挙げられる。

40

【0020】

「酵素分解性の結合」は、1つ以上の酵素により分解を受ける結合を意味する。

【0021】

「安定な」結合（linkage）又は結合（bond）は、水中で実質的に安定な化学結合、即ち、長期間にわたり生理学的条件下でいかなる認め得る程度の加水分解も受けない結合を指す。加水分解に安定な結合の例としては、限定はされないが、以下が挙げられる：炭素-炭素結合（例えば脂肪族鎖中の）、エーテル類、アミド類、ウレタン類、アミン類など。概して、安定な結合は、生理学的条件下で1日約1～2%未満の加水分解速度を呈するものである。代表的な化学結合の加水分解速度は、多くの標準的な化学テキストブックを参照することができる。

50

【0022】

「実質的に」又は「本質的に」とは、ほぼ全体的にまたは完全に、例えば、ある所与の分量の95%以上、より好ましくは97%以上、さらにより好ましくは98%以上、さらにより好ましくは99%以上、なおもさらにより好ましくは99.9%以上を意味し、99.99%以上が最も好ましい。

【0023】

「薬学的に許容可能な賦形剤」又は「薬学的に許容可能な担体」は、患者に有意な有害毒性効果を引き起こさない本発明の組成物に含まれ得る成分を指す。

【0024】

用語「患者」は、本明細書に記載されるとおりの本発明の化合物の投与によって予防又は治療することのできる病態に罹患している又はそれに罹り易い生物を指し、ヒト及び動物の両方を含む。

10

【0025】

上記に指摘したとおり、本発明は、(特に)癌に罹患している患者に投与する方法に関し、本方法は、(a) IL-2R 活性化量の長時間作用型 IL-2R 選択的作動薬；及び(b) CTLA-4 経路阻害量の抗 CTLA-4 抗体又は PD-1 経路阻害量の抗 PD-1 抗体のステップを含む。ステップ(a)及びステップ(b)の投与に関して、これらの投与ステップはいずれの順序でも(並びに同時に)実施することができ、本発明はこの点で限定されない。本発明の1つ又は複数の実施形態では、ステップ(a)の投与がステップ(b)の投与の前に行われ得る。本発明の1つ又は複数の実施形態では、ステップ(b)の投与がステップ(a)の投与の前に行われ得る。1つ又は複数の実施形態では、ステップ(a)及び(b)の投与の両方が同時に行われ得る。さらに、1つ又は複数の実施形態では、ステップ(a)及び/又は(b)は繰り返し投与され得る。加えて、又は複数の実施形態において、ステップ(a)及び(b)は1回のみ行われ得る。

20

【0026】

本明細書に記載される治療方法は、患者ケアを監督する臨床医がその治療方法を有効であると見なす限り継続され得る。その治療方法が有効であることの指標となる非限定的なパラメータには、以下が含まれる：腫瘍縮小(重量及び/又は容積の点で)；個別の腫瘍コロニーの数の減少；腫瘍消失；及び無進行生存。

30

【0027】

特許請求される方法における治療コースに関する例示的時間の長さには、約1週間；2週間；約3週間；約4週間；約5週間；約6週間；約7週間；約8週間；約9週間；約10週間；約11週間；約12週間；約13週間；約14週間；約15週間；約16週間；約17週間；約18週間；約19週間；約20週間；約21週間；約22週間；約23週間；約24週間；約7ヶ月；約8ヶ月；約9ヶ月；約10ヶ月；約11ヶ月；約12ヶ月；約13ヶ月；約14ヶ月；約15ヶ月；約16ヶ月；約17ヶ月；約18ヶ月；約19ヶ月；約20ヶ月；約21ヶ月；約22ヶ月；約23ヶ月；約24ヶ月；約30ヶ月；約3年；約4年及び約5年が含まれる。

【0028】

長時間作用型 IL-2R 選択的作動薬の投与頻度に関して、当業者は適切な頻度を決定することが可能であろう。例えば、臨床医は、長時間作用型 IL-2R 選択的作動薬を比較的低頻度で(例えば2週間に1回)投与し、患者が忍容性を示すことに伴い投薬間の期間を徐々に短縮することに決めてよい。抗 CTLA-4 抗体及び抗 PD-1 抗体の投与頻度に関して、これらの薬剤の頻度も同様にして決定することができる。加えて、一部の長時間作用型 IL-2R 選択的作動薬、抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体は高次臨床試験中であるか、或いは市販されているため、適切な投与頻度を把握するため文献を参照することもまた可能である(治療レジメンの併用効果を考慮して幾らかの調整が必要となり得ることに留意する)。

40

【0029】

本明細書に記載される方法は、長時間作用型 IL-2R 選択的作動薬の投与を含む。

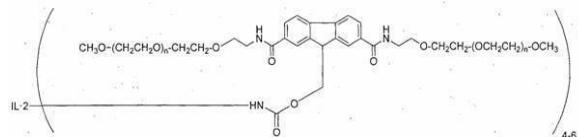
50

この点で、本発明は、その作動薬が同じインピトロモデルにおける IL-2R に対する結合親和性の少なくとも 5 倍高い（より好ましくは少なくとも 10 倍高い）IL-2R に対するインピトロ結合親和性を呈し、且つ IL-2（生体内消失 IL-2 に基づく半減期）より少なくとも 10 倍長い有効生体内半減期を有する限り、いかなる特定の長時間作用型 IL-2R 選択的作動薬にも限定されない。例として、標準として IL-2 に対する結合親和性を計測することが可能である。この点で、本開示の実施例 1 において言及される RSLAIL-2 は、IL-2R に対する親和性について IL-2 の約 60 分の 1 の低さを呈するが、親和性 IL-2R については IL-2 の約 5 分の 1 の低さに過ぎない。

【 0 0 3 0 】

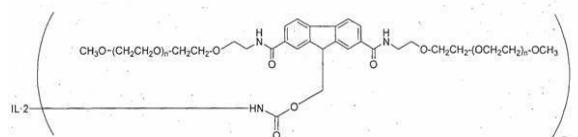
長時間作用型 IL - 2 R 選択的作動薬の非限定的な例は、国際公開第 2012 / 065086 号パンフレットに記載される。例示的長時間作用型 IL - 2 R 選択的作動薬は、本願の実施例 1 で言及される RSLAIL - 2 である。この点で、RSLAIL - 2 は、以下の式に包含される化合物：

【化 1 】



(式中、IL-2はIL-2の残基である)、及びその薬学的に許容可能な塩を含む組成物である。1つ又は複数の実施形態において、この組成物は、10%以下(モル量基準で)、好ましくは5%以下(モル量基準で)の以下の式に包含される化合物

【化 2】



(式中、IL-2はIL-2の残基であり、(n)は1、2、3、7及び>7からなる群から選択される整数である)、及びその薬学的に許容可能な塩を含む。

(0 0 3 1)

本明細書に記載される方法は、抗 C T L A - 4 抗体又は抗 P D - 1 抗体の投与を含む。抗 C T L A - 4 抗体に関して、これらは公知であり、トレメリムマブ及びイピリムマブが含まれる。抗 P D - 1 抗体に関して、これらは公知であり、ニボルマブ及びランプロリズマブ、AMP - 224、MDPL3280A、MED14736及びMSB0010718Cが含まれる。

【 0 0 3 2 】

所与の化合物が抗CTLA-4抗体又は抗PD-1抗体として作用し得るかどうかを決定するためのアッセイは、当業者が常法の実験によって決定することができる。

【 0 0 3 3 】

本明細書に記載される方法において、長時間作用型 I L - 2 R 選択的作動薬は、 I L - 2 R 活性化量で患者に投与される。当業者は、どのくらいの所与の長時間作用型 I L - 2 R 選択的作動薬が I L - 2 R において臨床的に有意味な作動活性をもたらすのに十分であるかを決定することができる。例えば、当業者は文献を参照してもよく、及び／又は一連の漸增量の長時間作用型 I L - 2 R 選択的作動薬を投与して、どの量が I L - 2 R の臨床的作動活性をもたらすかを決定してもよい。

【 0 0 3 4 】

しかしながら、1つ以上の例において、IL-2R 活性化量は以下の範囲の1つ以上に含まれる量である：約0.01~1mg/kg；約0.01mg/kg~約0.1mg/kg

g / kg ; 約 1 mg / kg ~ 約 1 0 0 0 mg / kg ; 約 2 mg / kg ~ 約 9 0 0 mg / kg ; 約 3 mg / kg ~ 約 8 0 0 mg / kg ; 約 4 mg / kg ~ 約 7 0 0 mg / kg ; 約 5 mg / kg ~ 約 6 0 0 mg / kg ; 約 6 mg / kg ~ 約 5 5 0 mg / kg ; 約 7 mg / kg ~ 約 5 0 0 mg / kg ; 約 8 mg / kg ~ 約 4 5 0 mg / kg ; 約 9 mg / kg ~ 約 4 0 0 mg / kg ; 約 5 mg / kg ~ 約 2 0 0 mg / kg ; 約 2 mg / kg ~ 約 1 5 0 mg / kg ; 約 5 mg / kg ~ 約 1 0 0 mg / kg ; 約 1 0 mg / kg ~ 約 1 0 0 mg / kg ; 及び約 1 0 mg / kg ~ 約 6 0 mg / kg 。

【 0 0 3 5 】

本明細書に記載される方法において、 C T L A - 4 経路阻害量の抗 C T L A - 4 抗体が投与され、又は P D - 1 経路阻害量の抗 P D - 1 抗体が投与される。当業者は、どのくらいの所与の抗 C T L A - 4 抗体又は抗 P D - 1 抗体がそれぞれ C T L A - 4 経路又は P D - 1 経路の臨床的に有意味な阻害をもたらすのに十分であるかを決定することができる。例えば、当業者は文献を参照してもよく、及び / 又は一連の漸增量の抗 C T L A - 4 抗体又は抗 P D - 1 抗体を投与して、どの量が C T L A - 4 経路又は P D - 1 経路の臨床的に有意味な阻害をもたらすかを決定してもよい。

【 0 0 3 6 】

しかしながら、1つ以上の例において、 C T L A - 4 及び P D - 1 経路阻害量は以下の範囲の1つ以上に包含される量である：約 1 mg / kg ~ 約 1 0 0 0 mg / kg ; 約 2 mg / kg ~ 約 9 0 0 mg / kg ; 約 3 mg / kg ~ 約 8 0 0 mg / kg ; 約 4 mg / kg ~ 約 7 0 0 mg / kg ; 約 5 mg / kg ~ 約 6 0 0 mg / kg ; 約 6 mg / kg ~ 約 5 5 0 mg / kg ; 約 7 mg / kg ~ 約 5 0 0 mg / kg ; 約 8 mg / kg ~ 約 4 5 0 mg / kg ; 約 9 mg / kg ~ 約 4 0 0 mg / kg ; 約 5 mg / kg ~ 約 2 0 0 mg / kg ; 約 2 mg / kg ~ 約 1 5 0 mg / kg ; 約 5 mg / kg ~ 約 1 0 0 mg / kg ; 約 1 0 mg / kg ~ 約 1 0 0 mg / kg ; 及び約 1 0 mg / kg ~ 約 6 0 mg / kg 。

【 0 0 3 7 】

確認のために言えば、それぞれ C T L A - 4 及び P D - 1 経路阻害量の抗 C T L A - 4 抗体又は抗 P D - 1 抗体に関して本明細書で使用されるとき、阻害の量及び程度は大きく異なり、それらの一方と長時間作用型 I L - 2 R 選択的作動薬との併用がなおも有効であり得る。例えば、それぞれ C T L A - 4 又は P D - 1 経路をごく最小限だけ阻害する抗 C T L A - 4 抗体又は抗 P D - 1 抗体の量は、特許請求される本発明の方法が臨床的に意味のある応答を生じさせる限りはなおも本明細書で使用されるときの阻害量であり得る。同様に、 I L - 2 R で十分に長期間にわたりごく最小限の作動薬活性を呈する長時間作用型 I L - 2 R 選択的作動薬の量は、特許請求される本発明の方法が臨床的に意味のある応答を生じさせる限りはなおも長時間作用型 I L - 2 R 選択的作動薬であり得る。ある場合には、（例えば）相乗的反応に起因して、長時間作用型 I L - 2 R 選択的作動薬の存在下では C T L A - 4 又は P D - 1 経路の阻害は最小限だけ要求され得るに過ぎない。さらに他の場合には、（例えば）相乗的反応に起因して、 C T L A - 4 及び P D - 1 経路阻害の存在下では I L - 2 R の作動薬活性は最小限だけ要求され得る。

【 0 0 3 8 】

実際の投与用量は、対象の年齢、体重、及び全身状態並びに治療下の病態の重症度、医療専門家の判断、及び投与されるコンジュゲートに応じて異なり得る。

【 0 0 3 9 】

本発明は、（特に）本化合物による治療に応答する病態に罹患している患者の治療に有用な方法を提供する。例えば、患者は、個別の薬剤単独にも、また併用にも応答し得るが、併用に対する応答性がより高い。さらなる例として、患者は個別の薬剤の一つに対して非応答性であり得るが、併用には応答する。さらに別の例として、患者はいずれの個別の薬剤単独に対しても非応答性であり得るが、併用には応答する。

【 0 0 4 0 】

本方法は、治療有効量の活性薬剤を注射によって投与するステップを含む。肺内、鼻内、頬側、直腸、舌下及び経皮など、他の投与方法もまた企図される。本明細書で使用され

10

20

30

40

50

るとき、用語「非経口」には、皮下、静脈内、動脈内、腹腔内、心臓内、くも膜下腔内、及び筋肉内注射、並びに点滴注射が含まれる。本方法の各薬理成分は別々に投与することができる。或いは、2つの薬理成分の投与が同時であることが所望される（及び2つの薬理成分が互いに及び所与の製剤で適合する）場合、単一剤形／製剤の投与（例えば、両方の薬理活性剤を含有する静脈内製剤の静脈内投与）によって同時投与を実現することができる。当業者は、2つの所与の薬理成分が互いに及び所与の製剤で適合するかどうかを常法の試験によって決定することができる。

【0041】

先述の方法は、この方法によって治癒又は予防し得る任意の病態に罹患している患者の治療に用いることができる。例示的病態は、癌、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーリング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、囊胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胚性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣癌、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黑色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫及び白血病である。

10

【0042】

本明細書において参照される全ての論文、書籍、特許、特許公報及び他の刊行物は、全体として参照により援用される。本明細書の教示と参照によって援用される技術との間に不一致が生じた場合、その教示の意味及び本明細書の定義が（特に本明細書に添付される特許請求の範囲で用いられる用語に関して）優先するものとする。例えば、本願及び参照によって援用される刊行物が同じ用語を別様に定義する場合、定義が載せられている文書の教示の範囲内でその用語の定義が維持されるものとする。

20

【実施例】

【0043】

本発明は特定の好ましい具体的な実施形態と併せて説明されているが、前述の説明並びに以下の例は例示を意図するもので、本発明の範囲を限定する意図はないことが理解されるべきである。本発明が関係する技術分野の当業者には、本発明の範囲内の他の態様、利点及び変形例が明らかであろう。

30

【0044】

実施例2～7において言及される抗CTL A - 4抗体は、UC10-4F10-11ハイブリドーマ細胞株（ATCC）から精製した抗マウスCLTA-4抗体に相当する。細胞をPFHM-II培地（Invitrogen）に $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mLの密度に維持した。精製前に培地を遠心して細胞を取り除いた。培地のpHをNaOHで8に調整し、水で希釈することによりその伝導率を7mS/cmに低下させた。pH/伝導率を調整した培地をQ-FFカラムにロードし、NaCl勾配を用いて抗マウスCLTA-4抗体を溶出させた。

【0045】

抗CTL A - 4のその抗原に対する親和性を表面プラズモン共鳴（Biacore）によって決定し、20pMであると決定された。

40

【0046】

抗PD-1はBiologeから購入した。これは、以下の特性を有する溶液として入手された：濃度：4.76mg/mL；エンドトキシン： $< 0.63 \text{ EU/mg}$ ；配合：PBS pH7；純度： $> 95\%$ ；アイソタイプ：ラットIgG2a；及び消衰係数：1.33。抗PD-1のその抗原に対する親和性を表面プラズモン共鳴（Biacore）によって計測し、1nMであることが分かった。購入した抗体の純度をSDS-PAGE及びSEC-HPLCによって確かめ、さらなるワークアップなしに有効性試験に十分な純度であると決定された。

【0047】

50

実施例 1

m P E G 2 - C 2 - f m o c - 2 0 K - N H S による r I L - 2 の P E G 化

m P E G 2 - C 2 - f m o c - 2 0 K - N H S による r I L - 2 の P E G 化については、以前、国際公開第 2 0 1 2 / 0 6 5 0 8 5 号パンフレットの実施例 2 に報告されている。そこでは、合成によって 4 m e r 、 3 m e r 、 2 m e r 及び 1 m e r の混合物が生じることが報告された。しかしながら、反応物をさらに分析すると、より高度な結合（例えば、 5 m e r 、 6 m e r 及び 7 m e r ）もまた生成されたことが明らかになった。本合成は、m P E G 2 - C 2 - f m o c - 2 0 K - N H S によって I L - 2 を P E G 化するスケールアップした手法に相当する。

【 0 0 4 8 】

1 . 4 4 m g / m l の精製 r I L - 2 (1 0 6 . 4 m L) を第 1 の容器に入れ、続いて 5 3 . 6 m L の製剤化緩衝液 (1 0 m M 酢酸ナトリウム、p H 4 . 5 、 5 % トレハロース) を加えた。p H を測ると 4 . 6 2 であり、温度を測ると 2 1 . 2 であった。P E G 試薬の C 2 - P E G 2 - F M O C - N H S - 2 0 K (国際公開第 2 0 0 6 / 1 3 8 5 7 2 号パンフレットに記載されるとおり利用可能) (1 3 . 1 g) を第 2 の容器に入れ、続いて 7 3 . 3 m L の 2 m M H C l を加えた。得られた溶液を手動で 2 5 分間かき混ぜた。第 1 の容器にホウ酸ナトリウム (0 . 5 M 、p H 9 . 8) を加えて p H を約 9 . 1 に上昇させ、次に P E G 試薬が入った第 2 の容器を 1 ~ 2 分間かけて第 1 の容器に加えた。次に 8 . 1 m L の 2 m M H C l を第 2 の容器に入れることによってリンスステップを行い、第 1 の容器に加えた。コンジュゲーション反応では、最終的な r I L - 2 濃度は 0 . 6 m g / m L であり、ホウ酸ナトリウム濃度は 1 2 0 m M であり、p H は 9 . 1 ± 0 . 2 であり、温度は 2 0 ~ 2 2 であった。試薬の活性（置換レベル）を調整した後の P E G 試薬と r I L - 2 とのモル比は 3 5 : 1 である。コンジュゲーション反応を 3 0 分間進行させ、次に 7 5 m L の 2 N 酢酸を使用した酸性化反応（ここでは p H が 4 . 0 1 に低下する）で停止させた。反応の生成物を水で希釈し、希釈した P E G 化 r I L - 2 溶液を 0 . 2 ミクロンフィルタを使用してろ過した。ろ過した生成物は滅菌容器に入れる。

【 0 0 4 9 】

その後、S P セファロース F F 樹脂 (G E H e a l t h c a r e) を充填したクロマトグラフィーカラムに溶液をロードすることにより、希釈した P E G 化 r I L - 2 溶液を精製した。洗浄ステップ後、塩化ナトリウム勾配を用いて P E G 化 r I L - 2 を溶出させる。1 m e r 、 2 m e r 又は 3 m e r を含む画分は取り除き、一方、 4 m e r 、 5 m e r 、 6 m e r 、 7 m e r 及び任意のそれより高度な P E G 化を含む画分はプールし、それにより主として 4 m e r 、 5 m e r 及び 6 m e r を有する組成物を得る (8 m e r 及びそれより高度な P E G 化は、クロマトグラフィーに関連する洗浄ステップの間に取り除かれることが分かった)。この組成物が、実施例 2 ~ 6 に関連して使用されるものであり、それらの実施例の中では「 R S L A I L - 2 」と称する。

【 0 0 5 0 】

この例に記載される手法を用いると、 4 m e r 、 5 m e r 及び 6 m e r の収率は (1 m e r 、 2 m e r 及び 3 m e r の低下を相伴って) 増加することが分かった。

【 0 0 5 1 】

実施例 2

雌 B A L B / c マウスの C T 2 6 腫瘍モデルに対する抗 C T L A - 4 抗体との併用における R S L A I L - 2 の有効性の判定

この試験の目的は、雌 B A L B / c マウスの C T 2 6 マウス結腸癌腫瘍モデルで抗 C T L A - 4 抗体との併用における R S L A I L - 2 の抗腫瘍活性を判定することであった。

【 0 0 5 2 】

各群に 1 2 匹の動物を含む 5 群とした。0 、 4 、 9 及び 1 4 日目に治療される媒体対照群、2 つの単剤群 (0 、 4 、 9 、 1 4 及び 1 8 日目に治療される抗 C T L A - 4 抗体又は 0 及び 9 日目に治療される R S L A I L - 2) 及び 2 つの併用免疫療法群 (抗 C T L A - 4 抗体 + R S L A I L - 2) (ここで一方の群の抗 C T L A - 4 抗体 (0 、 4 、 9 、 1 4)

10

20

30

40

50

及び 18 日目に投与)の治療は R S L A I L - 2 (0、4 及び 9 日目に投与)と同じ時点で開始し、及び他方の群については、R S L A I L - 2 治療開始 (4、13 及び 22 日目に投与)の 4 日前に開始した)を組み入れた。この試験の治療開始は、 2×10^6 細胞/部位で 0.1 mL 注入容積の C T 2 6 細胞接種の 7 日後に行った。腫瘍細胞は腹部に皮下注射した。それに応じて Study Log (登録商標) ソフトウェアによって生成された無作為化に基づき動物を分配した。治療日 (0 日目) の平均腫瘍容積は $111 \pm 9 \text{ mm}^3$ ~ $115 \pm 10 \text{ mm}^3$ (平均値 \pm SEM) の範囲であった。

【0053】

腫瘍容積 (mm³ 単位) 及び体重 (グラム単位) を週 2 ~ 3 回モニタした。治療スケジュールの詳細と共にそれぞれ図 1 及び図 2 に提供する。試験開始時の個々の腫瘍容積に対して計算した、且つ成長率として提供される標準化値である対応する相対腫瘍値を図 1 (0 日目 ~ 30 日目) に要約する。無腫瘍動物は腫瘍再増殖に関して 106 日間モニタし、体重は治療開始から測った。

【0054】

11 日目 (媒体対照動物がいた最後の日) の媒体対照動物と治療動物との腫瘍容積をチューキーの事後検定による一元配置 ANOVA (GraphPad Prism バージョン 6.03 for Windows, GraphPad Software, San Diego California) によって比較すると、全ての治療群が媒体対照群と有意に異なることが示された。

【0055】

11 日目 (対照動物がいた最後の日) に、以下の式を用いることによって平均腫瘍成長阻害 (% TGI) を評価した：

$$\% \text{TGI} = (1 - (\text{相対腫瘍容積 (\%)} \text{ 治療群} \div \text{相対腫瘍容積 (\%)} \text{ 対照群})) \times 100$$

【0056】

抗 C T L A - 4 抗体 (群 2) で治療した腫瘍について 53 % 及び R S L A I L - 2 群 (群 3) について 58 % の平均阻害があった。併用免疫療法共投与 (0 日目に同じ時点で開始した R S L A I L - 2 及び抗 C T L A - 4 抗体) は 74 % の阻害を生じた。抗 C T L A - 4 抗体を 0 日目に開始して、及び R S L A I L - 2 治療を 4 日目に開始した併用免疫療法 (群 5) は、88 % のこれらの治療の中で最も高い阻害を生じた。

【0057】

群 4 の 12 匹中 1 匹 (1 / 12 匹) の動物が 14 日目までに無腫瘍であった。合計 4 匹の動物が 28 日目までに無腫瘍であった。群 5 では、2 匹 (2 / 12 匹) の動物が 14 日目までに無腫瘍であり、合計 8 匹の動物が 25 日目までに無腫瘍であった。表 1 を参照のこと。群 4 及び群 5 のこれらの動物は全て、試験終了 (治療開始から 106 日) まで無腫瘍のままであった。

【0058】

【表 1】

治療	用量	N	腫瘍容積 (平均値 \pm SEM mm ³ 単位)		平均腫瘍成長阻害 (%) (エンドポイント: 18 日)	平均腫瘍遷延 (日)	終了時の無腫瘍動物
			治療開始時の腫瘍容積 (0 日目) (平均値 \pm SEM)	11 日目の腫瘍容積 (平均値 \pm SEM)			
1. 媒体対照	NA	12	111 ± 9	1499 ± 196	NA	1 / 12 匹 (18 日目)	
2. 抗 C T L A - 4 抗体	100 ug	12	115 ± 10	732 ± 165	53.3	1 / 12 匹 (18 日目)	
3. R S L A I L - 2	0.8 mg/kg	12	111 ± 11	600 ± 143	58.4	1 / 12 匹 (18 日目)	
4. R S L A I L - 2 (0 日目) + 抗 C T L A - 4 抗体 (0 日目)	100 ug 0.8 mg/kg	12	113 ± 12	414 ± 115	74.2	4 / 12 匹 (106 日目)	
5. R S L A I L - 2 (4 HII) + 抗 C T L A - 4 抗体 (0 日目)	0.8 mg/kg 100 ug	12	111 ± 9	170 ± 27	88.1	8 / 12 匹 (106 日目)	

¹この群(この動物を含む)は 18 日日にまとめて試験から除外した

【0059】

治療日の平均体重は $17.4 \pm 0.3 \text{ g}$ ~ $18.2 \pm 0.3 \text{ g}$ (平均値 \pm SEM) の範囲であった。いずれの治療群からも、治療フェーズ中のベースラインを下回る有意な平均

10

20

30

40

50

体重減少は観察されなかった（図3）。

【0060】

実施例3

雌BALB/cマウスのEMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用におけるRSLAIL-2の有効性の判定

この試験の目的は、雌BALB/cマウスのEMT6マウス乳癌腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用におけるRSLAIL-2の抗腫瘍活性を判定することであった。

【0061】

各群に各々12匹の動物を含む5群とした。0、4、9及び14日目に治療される媒体対照群、2つの単剤群（0、4、9、14及び18日目に治療される抗CTLA-4抗体又は0及び9日目に治療されるRSLAIL-2）及び2つの併用免疫療法群（抗CTLA-4抗体+RSLAIL-2）（ここで一方の群の抗CTLA-4抗体（0、4、9、14及び18日目に投与）の治療はRSLAIL-2（0、4及び9日目に投与）と同じ時点で開始し、及び他方の群については、RSLAIL-2治療開始（4、13及び22日目に投与）の4日前に開始した）を組み入れた。この試験の治療開始は、 2×10^6 細胞/部位で0.1mL注入容積のEMT6細胞接種の7日後に行った。腫瘍細胞は腹部に皮下注射した。それに応じてStudy Log（登録商標）ソフトウェアによって生成された無作為化に基づき動物を分配した。治療日（0日目）の平均腫瘍容積は $144 \pm 8\text{ mm}^3$ ～ $147 \pm 10\text{ mm}^3$ （平均値±SEM）の範囲であった。

10

【0062】

腫瘍容積（mm³単位）及び体重（グラム単位）を週2～3回モニタした。腫瘍容積データは治療スケジュールの詳細と共に図4（0日目～30日目）に提供する。無腫瘍動物は腫瘍再増殖に関して治療開始から106日間モニタした（これは図5に提供する）。

【0063】

18日目（媒体対照動物がいた最後の日）の媒体対照動物と治療動物との腫瘍容積をチューキーの事後検定による一元配置ANOVA（GraphPad Prismバージョン6.03 for Windows、GraphPad Software、San Diego California）によって比較すると、媒体対照（群1）と群2（抗CTLA-4抗体治療）及び群5（0日目に開始した抗CTLA-4抗体+4日目に開始したRSLAIL-2）との間に有意な差が示された。群1（媒体対照）と群3（RSLAIL-2単独）及び群4（両治療ともに0日目に開始したRSLAIL-2+抗CTLA-4抗体）との間には、統計学的差異は認められなかった。

30

【0064】

18日目（対照動物がいた最後の日）に、以下の式を用いることによって平均腫瘍成長阻害（%TGI）を評価した：

$$\% \text{TGI} = (1 - (\text{相対腫瘍容積 (\%)}_{\text{治療群}} \div \text{相対腫瘍容積 (\%)}_{\text{対照群}})) \times 100$$

【0065】

抗CTLA-4抗体（群2）で治療した腫瘍について55%及びRSLAIL-2群（群3）について22%の平均阻害があった。併用免疫療法共投与（0日目に同じ時点で開始したRSLAIL-2及び抗CTLA-4抗体）は27%の阻害を生じた。抗CTLA-4抗体を0日目に開始して、及びRSLAIL-2治療を4日目に開始した併用免疫療法（群5）は、92%のこれらの治療の中で最も高い阻害を生じた。媒体対照群の1匹の動物の腫瘍は11日目までに完全に自然退縮したことが観察された。それにも関わらず、平均腫瘍容積は、この群をまとめて試験から除外した18日目までに $1789\text{ mm}^3 \pm 196$ （平均値±SEM、N=12匹）であった。群4の12匹中1匹の動物もまた18日目までに無腫瘍であった。この群の残りの動物の平均腫瘍容積は、群全体を試験から除外した時点（18日目）で $1361 \pm 214\text{ mm}^3$ であった。

40

【0066】

群5の12匹中5匹（5/12匹）の動物が14日目までに無腫瘍であった。合計10

50

匹の動物が 18 日目までに無腫瘍であった。10 匹全ての動物が試験終了（治療開始から 106 日）まで無腫瘍のままであった。表 2 を参照のこと。

【0067】

【表 2】

治療	用量	N	表 2 腫瘍容積 (平均値 \pm SEM mm ³ 単位)		
			治療開始時の 腫瘍容積 (0 日目) (平均値 \pm SEM)	18 日目の 腫瘍容積 (平均値 \pm SEM)	平均腫瘍 成長阻害 (%) (エンド ポイント: 18 日)
6. 媒体対照	NA	12	147 \pm 10	1789 \pm 196	NA
7. 抗 CTLA-4	100 ug	12	145 \pm 9	824 \pm 185	55 なし
8. RSLAIL-2	0.8 mg/kg	12	144 \pm 11	1405 \pm 13	22 なし
9. RSLAIL-2 (0 日目) + 抗 CTLA-4 抗体 (0 日目)	100 ug + 0.8 mg/kg	12	145 \pm 10	1361 \pm 214	27 1/12 匹 (18 日目)
10. RSLAIL-2 (4 日目) + 抗 CTLA-4 抗体 (0 日目)	0.8 mg/kg + 100 ug	12	144 \pm 8	155 \pm 83	92 10/12 匹 (107 日目)

¹この群(この動物を含む)は 18 日目にまとめて試験から除外した

【0068】

治療日の平均体重は 17.8 \pm 0.3 g ~ 18.4 \pm 0.4 g (平均値 \pm SEM) の範囲であった (図 6)。いずれの治療群からも、有意な体重減少は観察されなかった。

【0069】

実施例 4

雌 BALB/c マウスの EMT6 腫瘍モデルに対する抗 CTLA-4 抗体を伴う Proleukin 治療と比較した抗 CTLA-4 抗体との併用における RSLAIL-2 の有効性の判定

この試験の目的は、雌 BALB/c マウスの EMT6 マウス乳癌腫瘍モデルに対する抗 CTLA-4 抗体との併用における RSLAIL-2 の抗腫瘍活性を判定し、それを Proleukin と比較することである。

【0070】

各 10 匹の動物を含む 7 群とした。抗体対照 (群 1) 0、4、8 及び 13 日目に投与) 及び 3 つの単剤群を組み入れた。これらの単剤群は、0、4、8、13 及び 18 日目に投与した抗 CTLA-4 抗体 (群 2)、0 ~ 4 日目、次に 7 ~ 11 日目に投与した Proleukin (群 3) 及び 0 及び 9 日目に投与した RSLAIL-2 (群 4) であった。また、3 つの併用免疫療法群も組み入れた。抗 CTLA-4 抗体を Proleukin と共に使用する併用免疫療法群 (群 5) 及び異なる治療スケジュールで抗 CTLA-4 抗体を RSLAIL-2 と共に使用する 2 つの併用治療群 (群 6 及び群 7)。群 6 について、抗 CTLA-4 抗体レジメンは 4 日目に開始して 9 日目及び 13 日目に再び投与し、一方、RSLAIL-2 は 0 日目に開始して 9 日目に再び投与した。群 7 の抗 CTLA-4 抗体療法は 0 日目に開始して 4、8 及び 13 日目に再び投与し、一方、RSLAIL-2 は 4 日目に開始して 13 日目及び 22 日目に再び投与した。治療開始 (0 日目) は、マウスに対する 2×10^6 細胞 / 部位で 0.1 mL 注入容積の EMT6 細胞接種の 7 日後に指定した。腫瘍細胞は腹部に皮下注射した。それに応じて 0 日目に Study Log (登録商標) ソフトウェアによって生成された無作為化に基づき動物を分配した。治療日の平均腫瘍容積は 159 \pm 7 mm³ ~ 170 \pm 8 mm³ (平均値 \pm SE) の範囲であった。

【0071】

腫瘍容積 (mm³ 単位) 及び体重 (グラム単位) を週 2 ~ 3 回モニタした。それぞれ図 7 及び図 8 に提供する (0 日目 ~ 28 日目)。無腫瘍動物の再増殖及び健康状態を (治療開始から) 99 日間モニタした。

【0072】

18 日目 (媒体対照動物がいた最後の日) の対照動物と治療動物との腫瘍容積をチューキーの事後検定による一元配置 ANOVA (GraphPad Prism バージョン 6.03 for Windows, GraphPad Software, San Diego California) によって比較すると、群 5 (抗 CTLA-4 抗体 + P

10

20

30

40

50

roleukin) 及び群7(抗CTLA-4抗体+RSLAIL-2)のみが対照と有意に異なることが示された。しかしながら、対照とは有意に異なるものの、これらの2つの治療群の互いの平均腫瘍容積に有意な差はなかった。

【0073】

18日目(対照動物がいた最後の日)に、以下の式を用いることによって平均腫瘍成長阻害(%TGI)を評価した:

$$\% \text{TGI} = (1 - (\text{相対腫瘍容積 (\%)}_{\text{治療群}} \div \text{相対腫瘍容積 (\%)}_{\text{対照群}})) \times 100$$

【0074】

抗CTLA-4抗体治療単独(群2)について27%の平均阻害があった。腫瘍成長の阻害はProleukin(群3)によって24%及びRSLAIL-2(群4)によって5%であり、抗CTLA-4抗体及びProleukinによる併用免疫療法(群5)は26%の阻害を生じ、抗CTLA-4抗体を伴うRSLAIL-2治療(群6)は2%の阻害をもたらした一方、群7(RSLAIL-2を伴う抗CTLA-4抗体)は94%の阻害を生じた。

【0075】

幾つかの動物は18日目までに無腫瘍であったことが観察された。群5に3匹(3/10匹)、群6に1匹(1/10匹)及び群7に5匹(5/10匹)あった。試験終了(99日目)までに、群5、群6及び群7の無腫瘍動物の総数はそれぞれ4/10匹、1/10匹及び7/10匹であった。表3を参照のこと。

【0076】

【表3】

治療群	用量	N	腫瘍容積(平均値±SE mm ³ 単位)		
			治療開始時の腫瘍容積(0日目)(平均値±SEM)	18日目の腫瘍容積(平均値±SEM)	平均腫瘍成長阻害(%)(エンドポイント:18日)
1. 抗体対照 (0.4,8,13日目)	100 ug	10	166±6	1803±174	NA
2. 抗CTLA-4抗体 (0.4,8,13日目)	100 ug	10	166±7	1294±122	27
3. Proleukin (0.4, 7-11日目)	0.5 mg/kg	10	165±7	1335±236	24
4. RSLAIL-2	0.8 mg/kg	10	167±8	1040±78	5
5. 抗CTLA-4抗体(0日目) + Proleukin (4日目)	0.8 mg/kg 0.5 mg/kg	10	159±7	155±83	76
6. RSLAIL-2(0日目) + 抗CTLA-4抗体 (4日目)	0.8 mg/kg 100 ug	10	165±7	1701±229	2
7. 抗CTLA-4抗体(0日目) + RSLAIL-2 (4日目)	100 ug 0.8 mg/kg	10	170±8	108±56	94

【0077】

実施例5

雌BALB/cマウスのEMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用におけるRSLAIL-2を調べる有効性試験(フローサイトメトリー解析のため0、3及び11日目に試料採取)

前出の併用RSLAIL-2及び抗CTLA-4抗体有効性試験は、EMT6マウス乳房モデルにおける相乗作用を示唆している。この試験の目的は、雌BALB/cマウスのEMT6マウス乳癌腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用におけるRSLAIL-2の抗腫瘍活性を判定/評価することであった。加えて、併用による有効性に関する免疫集団を同定するため、治療開始後0、3及び11日目に組織(腫瘍及び脾臓)を採取し、処理した。組織に浸潤した免疫細胞の同定及び定量化は、フローサイトメトリー解析によって判定した。治療群間で結果を比較した。

【0078】

インビボフェーズ

この試験では、各群3~10匹の動物を含む6治療群とした。抗体対照、0、4、及び8日目に100ug/マウスで投与されるIgG2a(群1)；4及び8日目に100ug/マウスで投与される抗CTLA-4抗体治療(群2)；4日目~8日目に0.5mg

10

20

30

40

50

/ kg で投与される Proleukin 治療（群 3）；及び 4 日目に 0.8 mg / kg で単回投与される RSLAIL-2 治療（群 5）を組み入れた。また、抗 CTLA-4 抗体（0、4、及び 8 日目に投与される 100 ug / マウス）と Proleukin（4 日目～8 日目に投与される 0.5 mg / kg）との併用（群 4）又は RSLAIL-2（4 日目に投与される 0.8 mg / kg）との併用（群 6）で治療される 3 群も組み入れた。

【0079】

治療は、動物に 2×10^6 細胞 / 部位で EMT6 マウス乳癌細胞（0.1 mL）を腹部領域に皮下接種した 7 日後に開始した。マウスは腫瘍容積に従い治療群に分配した。

【0080】

0 日目（未処置対照）、3 日目（群 1 及び群 6）に動物を犠牲にして組織（腫瘍及び脾臓）を採取し、この時点で群 6 の 3 日目の動物には抗 CTLA-4 抗体のみが投与されており、RSLAIL-2 の追加は 4 日目に開始し、治療開始後 11 日目にも試料採取した（全ての群）。各採取日に 3 匹の動物を選択した。選択された動物は、インタクトな腫瘍（非壊死）及びその日の群平均腫瘍容積を最も良く近似する容積を有した。

10

【0081】

平均腫瘍容積は未処置群について治療 0 日目に $164 \pm 10 \text{ mm}^3$ であった。3 日目、平均腫瘍容積は群 1 及び群 6 についてそれぞれ $282 \pm 7 \text{ mm}^3$ 及び $333 \pm 26 \text{ mm}^3$ （平均値 \pm SEM）であった。11 日目、平均腫瘍容積は群 1 について $843 \pm 138 \text{ mm}^3$ 、群 2 について $1059 \pm 135 \text{ mm}^3$ 、群 3 について $814 \pm 70 \text{ mm}^3$ 、群 4 について $832 \pm 262 \text{ mm}^3$ 、群 5 について $620 \pm 103 \text{ mm}^3$ 、及び群 6 について $255 \pm 11 \text{ mm}^3$ （平均値 \pm SEM）であった。図 9 を参照のこと。

20

【0082】

動物の体重を少なくとも週 1 回測った。治療日（0 日目）の平均体重は、群 1、群 2、群 3、群 4、群 5、及び群 6 について、それぞれ 18.9 ± 0.3 、 18.6 ± 0.3 、 19.2 ± 0.2 、 18.7 ± 0.2 、 17.8 ± 0.3 、 18.9 ± 0.3 グラムであった。3 日目、群 1 及び群 6 の平均体重はそれぞれ 19.1 ± 0.7 及び 19 ± 0.3 グラムであった。11 日目の平均体重は、群 1、群 2、群 3、群 4、群 5、及び群 6 について、それぞれ 19.8 ± 0.2 、 19.4 ± 0.2 、 19.9 ± 0.2 、 20 ± 0.5 、 19.6 ± 0.4 及び 19.5 ± 0.4 グラム（平均値 \pm SEM）であった。図 10 を参考のこと。

30

【0083】

エキソビオフェーズ

採取した組織試料を、メスを使用して手作業で細かく刻み、続いて 37 度インキュベートして 13 分間酵素消化させた。消化緩衝液の成分は、PBS / BSA 中 $2.5 \text{ mg} / \text{mL}$ コラゲナーゼ I I 型（GIBCO BRL）、 $2.5 \text{ mg} / \text{mL}$ コラゲナーゼ I V 型（GIBCO BRL）、及び $0.5 \text{ mg} / \text{mL}$ DNase（Sigma - Aldrich）であった。インキュベーション後、10% FBS（熱失活；GIBCO BRL）を含有するウェイマス MB（GIBCO BRL）を添加することによって消化をクエンチし、 70 uM ナイロンフィルタ（Falcon）でろ過して単一細胞懸濁液を得た。細胞を HSSS で洗浄して遠心し、次に新鮮な HSSS 中に再懸濁した。各試料からカウント用のアリコートを取り、次に eFlour - 450 生細胞染色剤で染色した。次に試料を 96 ディープウェルプレートにプレーティングし、染色してフローサイトメトリー解析用に収集した。

40

【0084】

腫瘍及び脾臓細胞試料は最初に固定可能生細胞指示薬で処理し、次に生存免疫細胞、CD3、CD4、CD8、CD25、CD44、CD122、Foxp3（内部染色）、DX5 及び NKp46 表面抗原に関して染色した。

【0085】

試料（治療群につき 3 つ）の各々について生存免疫細胞の総量をカウントし、治療群の各々についての脾臓に関する CD4+、TREG+ 細胞、CD8+、記憶エフェクター C

50

D 8 + 細胞、全 N K 細胞、成熟 N K 細胞（これは腫瘍組織の 1 立方ミリメートルに正規化した）の全イベントのゲーティング / 収集並びに総細胞カウントに使用した。一次カウントをフローサイトメーター読取りの要約生データから導出し、FlowJo を使用して分析した。

【 0 0 8 6 】

フローサイトメトリー

0 日目に 3 匹の未処置動物を犠牲にした。3 日目に群 1 (アイソタイプ対照の投与を受けた) 及び群 6 (抗 CTLA - 4 抗体治療のみの投与を受けた) の 3 匹の動物を犠牲にし、及び治療開始後 11 日目に全ての群 1 ~ 6 の 3 匹の動物を犠牲にした。

【 0 0 8 7 】

図 11 及び図 12 に、それぞれ腫瘍及び脾臓における 11 日目のデータのグラフ表示を見ることができる。

【 0 0 8 8 】

抗 CTLA - 4 抗体単独で治療したとき、CD 4 + 又は調節性 T 細胞集団 (3 日目 ~ 11 日目) に差はない。抗 CTLA - 4 抗体による前治療と、続く Proleukin 又は RSLAIL - 2 治療では CD 4 + 集団が増加する；しかしながら、調節性 T 細胞集団に差はない (抗 CTLA - 4 抗体対抗 CTLA - 4 抗体 + RSLAIL - 2 又は Proleukin)。RSLAIL - 2 + 抗 CTLA - 4 抗体対 RSLAIL - 2 単独において CD 4 + 細胞に差はない；しかしながら、RSLAIL - 2 + 抗 CTLA - 4 抗体では RSLAIL - 2 と比較したとき調節性 T 細胞集団が減少する。RSLAIL - 2 + 抗 CTLA - 4 抗体群に、説明のつかない CD 4 + 細胞の大集団がある；これらの結果は、これらの細胞の大多数が Treg ではないことを示唆している。

【 0 0 8 9 】

抗 CTLA - 4 抗体による前治療と、続く RSLAIL - 2 治療では、CD 8 + 集団 (P = 0.0078)、記憶エフェクター CD 8 細胞 (P = 0.0058) が有意に増加する (両側 t 検定 抗 CTLA - 4 抗体 + RSLAIL - 2 対抗 CTLA - 4)。加えて、RSLAIL - 2 + 抗 CTLA - 4 抗体では、RSLAIL - 2 単独と比較したとき CD 8 + 及び記憶エフェクター CD 8 細胞が有意に増加する。

【 0 0 9 0 】

抗 CTLA - 4 抗体単独は、全 N K 細胞集団に何ら傾向のある効果を有しなかった；しかしながら、成熟 N K 細胞は有意に減少した (P = 0.0278 3 日目から 11 日目まで)。抗 CTLA - 4 抗体による前治療と、続く RSLAIL - 2 治療では、全 N K 集団及び成熟 N K 細胞集団が増加する。RSLAIL - 2 群と比較したとき、RSLAIL - 2 + 抗 CTLA - 4 抗体群における成熟 N K 細胞に差はない。

【 0 0 9 1 】

実施例 6

雌 BALB / c マウスの CT 26 マウス結腸癌腫瘍成長に対する RSLAIL - 2 及び抗 PD - 1 抗体による併用免疫療法の有効性

この試験の目的は、雌 BALB / c マウスの CT 26 マウス結腸癌腫瘍モデルに対する RSLAIL - 2 及び抗 PD - 1 抗体による併用免疫療法の抗腫瘍活性を判定することであった。

【 0 0 9 2 】

各 10 匹の動物を含む 4 群とした。媒体対照群 (群 1)、抗 PD - 1 抗体治療群、RSLAIL - 2 治療群 (群 3) 及び初めに抗 PD - 1 抗体 (200 μg) で数日治療し、且つ 4 日後に RSLAIL - 2 (0.8 mg / kg) で治療した併用治療群を組み入れた。マウスに対し、 2×10^6 細胞 / 部位で 0.1 mL 注入容積の CT 26 細胞を腹部に皮下移植した。治療は腫瘍細胞接種の 7 日後に開始した (0 日目)。それに応じて 0 日目に Study Log (登録商標) ソフトウェアによって生成された無作為化に基づき動物を分配した。治療日 (0 日目) の平均腫瘍容積は $123 \pm 5 \text{ mm}^3$ ~ $127 \pm 6 \text{ mm}^3$ (平均値 \pm S E) の範囲であった。

10

20

30

40

50

【0093】

腫瘍容積 (mm³ 単位) 及び体重 (グラム単位) を週 2 ~ 3 回モニタした。それぞれ図 13 及び図 14 に提供する。この試験は 16 日間モニタした。

【0094】

12 日目 (媒体対照動物がいた最後の日) の対照動物と治療動物との腫瘍容積をチュー キーの事後検定による一元配置 ANOVA (GraphPad Prism バージョン 6.03 for Windows, GraphPad Software, San Diego California) によって比較すると、全ての治療群の腫瘍容積が未治療対照と有意に異なることが示された。

【0095】

10

以下の式を使用してパーセント腫瘍成長阻害 (% TGI) を計算した：

$$\% \text{TGI} = (1 - (\text{相対腫瘍容積 (\%)}_{\text{治療群}} \div \text{相対腫瘍容積 (\%)}_{\text{対照群}})) \times 100$$

【0096】

抗 PD-1 抗体 (群 2) 及び RSLAIL-2 (群 3) でそれぞれ 55 % 及び 58 % の平均腫瘍成長阻害が観察された。両方の治療を併用して受けた群 (群 4) の腫瘍成長阻害は 83 % と観察された。群 4 の 5 匹 (5 / 10 匹) の動物が、試験終了時に 0 日目のその初期容積より小さい容積の腫瘍を有した。

【0097】

非線形二次多項式分析 (GraphPad Prism バージョン 6.03 for Windows, GraphPad Software, San Diego California) を使用して平均腫瘍容積四倍化時間 (TVQT) (腫瘍がその初期容積の 4 倍に成長するのにかかる日単位の時間) を内挿することにより、腫瘍成長遅延 (TGD) を評価した。平均腫瘍容積四倍化時間は対照腫瘍について 5.2 日、群 3 (抗 PD-1 抗体) について 7.6 日、群 3 (RSLAIL-2) について 8.2 日及び併用免疫療法群 (群 4) について 15.6 であった。群 2、群 3 及び群 4 の平均腫瘍成長遅延はそれぞれ 2.4 日、3.0 日及び 10.4 日であった。表 4 を参照のこと。

20

【0098】

【表 4】

表 4
腫瘍容積 (平均値 \pm SE mm³ 単位)

治療	用量	N	治療開始時の腫瘍容積 (0 日目) (平均値 \pm SE)	12 日目の腫瘍容積 (平均値 \pm SE)	平均腫瘍成長阻害 (%) (エンドポイント: 12 日)	群平均 TVQT (日)	群平均 TGD (日)
1. 抗体対照 (0.4,8,13 日目)	200 ug	10	125 \pm 5	1983 \pm 248	NA	5.2	NA
2. 抗 PD1 抗体 (0.4,8,13 日目)	200 ug	10	126 \pm 5	897 \pm 82	55	7.6	2.4
3. RSLAIL-2 (0.9 日目)	0.8 mg/kg	10	127 \pm 6	833 \pm 176	58	8.2	3.0
4. 抗 PD1 抗体 (0.4,8,13 日目) + RSLAIL-2 (0.9 日目)	200 ug 0.8 mg/kg	10	123 \pm 5	334 \pm 109	83	15.6	10.4

30

【0099】

0 日目の平均体重は 17.5 \pm 0.2 g ~ 18.1 \pm 0.2 g (平均値 \pm SEM) の範囲であった (図 13)。群 2 の 1 匹の動物 (これは 12 日目に試験から除外した) を除いては、有意な体重減少は観察されなかった (図 14)。剖検により、肺腔に転移性病変が明らかになった。

40

【0100】

抗 PD-1 及び RSLAIL-2 の併用を受けた動物では、いずれかの単剤で治療した動物と比べてより高い腫瘍成長阻害 (TGI) 及び腫瘍成長遅延 (TGD) が観察された。

【0101】

実施例 7

再攻撃試験：

RSLAIL-2 及び抗 CTLA-4 による有効な併用免疫療法後の EMT6 マウス乳癌腫瘍による無腫瘍動物の再攻撃

50

この例の目的は、EMT6 乳癌腫瘍を移植したマウスを RSLAIL-2 及び市販のげつ歯類抗 CTLA-4 チェックポイント遮断抗体を使用した併用免疫療法で治療したときの有効性の程度及び持続時間を判定することであった。既に実施例 2 ~ 6 で実証されたとおり、この併用によって有意な無腫瘍動物が生じ、EMT6 腫瘍細胞又は CT26 腫瘍細胞で無腫瘍動物を再攻撃することによって、この併用が腫瘍特異的応答を誘発する能力が判定される。

【0102】

この再攻撃試験は 3 フェーズで行った。

【0103】

本試験の最初のパート（「フェーズ I」）は、EMT6（マウス乳癌）腫瘍を有する 80 匹の雌 BALB/c マウスを使用した。10 匹（10 / 80 匹）の動物を無作為に選択し、抗体対照群（100 μg、0、4、9、13 日目 i.p.）に割り当てた。残りの動物（70 / 80 匹）は、抗 CTLA-4 i.p.（100 μg、0、4、9、13 及び 18 日目）と RSLAIL-2 i.v.（0.8 mg / kg、4、13 及び 22 日目）との併用で治療した。

10

【0104】

治療開始（0 日目）は、 2×10^6 細胞 / 部位で腹部に皮下注射した 0.1 mL 注入容積の EMT6 細胞接種の 7 日後に指定した。治療開始時の平均腫瘍容積は媒体対照群及び治療群についてそれぞれ 206 ± 15 及び 222 ± 8 （平均値 \pm S.E.）であった。

【0105】

20

フェーズ I は 48 日目までモニタした。腫瘍容積（mm³ 単位）及び体重（グラム単位）を週 2 ~ 3 回計測し、図 15 に提供した。試験開始時（0 日目）の個々の腫瘍容積に対して計算した、且つ成長率として提供される標準化値である対応する相対腫瘍容積、及び体重の相対変化を図 16 に要約する。

【0106】

本試験のフェーズ I の結果は、14 日目（全ての対照動物がいた最後の日）の対照動物（69.8%）と治療動物（18.9%）との間の平均相対腫瘍容積を用いて計算し、次にウエルチ補正係数による対応のない t 検定（GraphPad Prism バージョン 6.03 for Windows、GraphPad Software、San Diego California）を用いて比較したところ、73% の腫瘍成長阻害（TG I）（P < 0.0001）を示した。

30

【0107】

併用免疫療法に完全奏効を呈しなかったフェーズ I における動物（N = 39 匹）の平均腫瘍成長遅延（TGD）は 12.7 日（P < 0.0001）であった。二次多項式非線形回帰分析（GraphPad Prism）で内挿された個々の腫瘍の 400% に成長するまでの時間を用いることにより、腫瘍容積四倍化時間（TVQT）を計算した。無腫瘍動物（完全奏効レスポンダー）は TGD の評価に入れなかった。

【0108】

フェーズ I では、1 回目及び 2 回目の RSLAIL-2 投与の約 5 日後に治療動物に粗い被毛（僅か）が観察された。粗い被毛は 3 回目の投与後には観察されなかった。有意な体重減少は観察されなかった（図 16）。

40

【0109】

本試験のフェーズ I の結果の概要を表 5 に提供する。

【0110】

【表5】

治療	用量	N	フェーズI結果概要(平均値±SE)					
			治療開始時の腫瘍容積 (mm ³)	14日目の 平均相対 腫瘍容積 (%)	14日目の 平均腫瘍 成長阻害 (%)	TVQT (日)	腫瘍 成長遅延 (日)	48日目 までの 無腫瘍 動物
抗体対照 (0.4,8,13日目)	NA	10	206±15	69±60	NA	9.7	NA	NA
RSLAIL-2 (4,13,22日目) + 抗CTLA-4 (0.4,9,13,18日目)	0.8 mg/kg 100 ug	70	222±8	189±25 (P<0.0001)	73 12.4 (P<0.0001)	12.7 31 (44%)		

¹部分奏効の動物のみを内挿し。完全奏効(即ち無腫瘍)の動物は含めなかった
²平均腫瘍成長阻害(%TGI)は、18日目対照動物がいた最後の日に式: %TGI=(1-(相対腫瘍容積^{(%)_{対照}}÷相対腫瘍容積^{(%)_{対照}}))×100を使用して評価した

【0111】

10

本試験の次のパート(「フェーズII」)は49日目に開始した。合計40匹の動物(10匹の年齢適合未処置動物及びRSLAIL-2+抗CTLA-4併用免疫療法に完全奏効を示した30匹の動物)を3群に使用し、表6に記載するとおり分配した。

【0112】

【表6】

フェーズII試験設計	
1群	N
EMT6細胞で攻撃した年齢適合未処置動物	10
CT26で再攻撃したEMT6無腫瘍動物	10
EMT6で再攻撃したEMT6無腫瘍動物	20

¹無腫瘍動物は、RSLAIL-2+抗CTLA-4療法に完全奏効を示したフェーズIの
EMT6腫瘍担持動物を指す

20

【0113】

49日目、動物にEMT6又はCT26のいずれかの腫瘍細胞(0.1mL媒体中2×10⁶個)を腹部領域に皮下注射して移植した。

【0114】

本試験のフェーズIIの結果は、接種5日後(54日目)に動物における腫瘍の取込み及び成長が明らかであったことを示した。群1(年齢適合未処置)及び群2(CT26で再攻撃したEMT6無腫瘍動物)の全ての動物が、それぞれ167±22及び177±11(平均値±SE)の平均容積の腫瘍を担持していた。群3(EMT6で再攻撃したEMT6無腫瘍動物)では、接種5日後の腫瘍取込み率が85%に過ぎないことが観察された。他の群と比べて腫瘍容積が比較的小さいことが観察された。平均腫瘍容積は62±8m³であった。再攻撃の17日後にこの群の20匹中14匹(70%)の動物が無腫瘍であり(EMT6腫瘍移植を完全に拒絶した)、フェーズIIの終了(109日目)まで無腫瘍のままであった。

30

【0115】

フェーズIでの併用免疫療法後の、CT26腫瘍で再攻撃したEMT6無腫瘍動物である群2の動物は、再攻撃14日後の平均腫瘍容積が1257±201(平均値±SE)及び1000mm³容積に成長するまでの平均時間が13.6±0.8であった。腫瘍成長はフェーズIの療法の影響を受けないように見えたことから、免疫応答の腫瘍型特異性が示唆される。表7に提供される本試験のフェーズIIの結果の概要を参照のこと。

40

【0116】

群1の1匹の動物が14日目に止息していることが分かった。剖検から、肺に転移性病変と見られるもの(組織学による検証はしていない)及び胸腔に血の混じった体液が明らかになった。これの他には、他の臨床所見又は有意な体重減少は認められなかった。図17を参照のこと。

【0117】

年齢適合未処置動物(1541±144mm³)とEMT6で再攻撃したEMT6無腫瘍動物(192±107)との平均腫瘍容積(図18)を移植の21日後に比較し、TGI(87.5%)を評価した。

【0118】

ベースライン腫瘍容積出発点がなかったため、TVQTは評価することができなかった

50

。その代わり、腫瘍担持動物の各々について 1000 mm^3 容積になるまでの腫瘍成長時間を (Graph Pad Prismの二次多項式非線形回帰分析を使用して) 内挿することによって評価を補助し、腫瘍成長遅延を近似した。 1000 mm^3 腫瘍容積に成長するまでにかかる時間(日)は、群1及び群2についてそれぞれ 16.9 ± 1 日及び 13.6 ± 0.8 日(平均値 \pm SE)であった。群3においてはEMT6再攻撃を完全には拒絶しなかった動物(6/20匹)のみについて 1000 mm^3 成長時間を評価し、これは 30.3 ± 5.5 であった。これらの動物の 1000 mm^3 になるまでの腫瘍成長の平均遅延は、 13.4 日であると計算された。

【0119】

【表7】

10

表7
フェーズII結果概要(平均値 \pm SE)

治療	N	5日目の平均腫瘍容積	1000 mm ³ に成長するまでにかかる時間(日)	腫瘍成長遅延(1000 mm ³ になるまでの日数)	腫瘍移植21日後の平均腫瘍容積(mm ³)	21日目の平均腫瘍容積(mm ³)	109日目までの成長阻害(%)	109日目までの無腫瘍動物
EMT6で攻撃した年齢適合未処置動物	10	167 ± 22	16.9 ± 1	NA	1541 ± 144	NA	NA	NA
CT26で再攻撃したEMT6腫瘍無動物	10	177 ± 11	13.6 ± 0.8	NA	NA	NA	NA	NA
EMT6で再攻撃したEMT6腫瘍無動物	20	62 ± 8 (6/20匹動物)	30.3 ± 5.5 (6/20匹動物)	13.4	192 ± 107	87.5	14	

【0120】

本試験の最後のパート(フェーズIII)は109~168日目の間と指定された。フェーズIIからのEMT6再攻撃を完全に拒絶した動物(N=14匹)を 2×10^6 EMT6腫瘍細胞で再接種/再攻撃し(109日目)(群2)、59日間モニタした。年齢適合動物(N=5匹)もまた対照(群1)として同じ時点で接種した。

20

【0121】

本試験の最後のパートから、接種の3日後に腫瘍の取込み及び成長が明らかであったことが観察され、平均腫瘍容積は群1及び群2についてそれぞれ 101 ± 14 及び 69 ± 6 であった。2回目の再攻撃を受けた動物は腫瘍細胞移植の21日後に完全に無腫瘍であった(完全に拒絶した)一方、その年齢適合対応動物の5匹全てが $1550 \pm 401 \text{ mm}^3$ の平均腫瘍容積を有した。群2の動物は試験終了(168日目)まで無腫瘍のままで、有意な体重減少は観察されなかった。

30

【0122】

この試験は、EMT6マウス乳癌腫瘍におけるRSLAIL-2及び抗CTLA-4を使用した併用免疫療法の有効性(フェーズI)、並びに治療に良好に応答する動物における応答の持続性及び特異性、並びに療法の長期効果(フェーズII及びフェーズIII)を実証している。本試験の初めから終わりまでの概要及び各フェーズの個々の腫瘍成長については図21を参照のこと。

30

【0123】

実施例8

インビボ枯渇試験:

RSLAIL-2と抗CTLA-4又は抗PD-1による有効な併用免疫療法後に細胞傷害性免疫細胞集団がEMT6マウス乳癌腫瘍に対する抗腫瘍免疫に及ぼす寄与の評価

40

この例の目的は、RSLAIL-2をCTLA-4又はPD-1の抗体遮断による免疫チェックポイント阻害と併用したときの抗腫瘍有効性に対するナチュラルキラー(NK)細胞及びCD8⁺細胞傷害性Tリンパ球の相対的寄与を評価することであった。

【0124】

この試験には、EMT6(マウス乳癌)腫瘍を担持する58匹の雌BALB/cマウスを利用した。10匹(10/58匹)の動物を無作為に選択し、媒体対照群(0、4、8日目、i.p.)に割り当てた。8匹(8/58匹)の動物を、抗CTLA-4 i.p.(100 μg 0、4、及び8日目)とRSLAIL-2 i.v.(0.8 mg/kg 4日目)との併用を受ける治療群に割り当てた。8匹(8/58匹)の動物をCD8

50

枯渴群に割り当て、この群は、R S L A I L - 2 及び抗 C T L A - 4 の治療に加えて、ラット抗マウス C D 8 a の連続注射 (100 μg i.p. - 2, 0, 7 日目) によって C D 8 T 細胞を枯渴させた。8匹 (8 / 58匹) のさらなる動物を N K 枯渴群に割り当て、この群は、R S L A I L - 2 及び抗 C T L A - 4 の治療に加えて、ウサギ抗ウシアシアロ G M 1 の連続注射 (50 μl i.p. - 2, 0, 7 日目) によって N K 細胞を枯渴させた。

【0125】

8匹 (8 / 58匹) の動物を、抗 P D - 1 i.p. (100 μg, 0, 4、及び8日目) 及び R S L A I L - 2 i.v. (0.8 mg / kg, 4日目) の併用を受ける治療群に割り当てた。8匹 (8 / 58匹) の動物を C D 8 枯渴群に割り当て、この群は、R S L A I L - 2 及び抗 P D - 1 の治療に加えて、ラット抗マウス C D 8 a の連続注射 (100 μg i.p. - 2, 0, 7 日目) によって C D 8 T 細胞を枯渴させた。8匹 (8 / 58匹) のさらなる動物を N K 枯渴群に割り当て、この群は、R S L A I L - 2 及び抗 P D - 1 の治療に加えて、ウサギ抗ウシアシアロ G M 1 の連続注射 (50 μl i.p. - 2, 0, 7 日目) によって N K 細胞を枯渴させた。

10

【0126】

治療開始 (0日目) は、 2×10^6 細胞 / 部位で腹部に皮下注射した 0.1 mL 注入容積の E M T 6 細胞接種の 7 日後に指定し、試験期間は 11 日間とした。腫瘍容積 (mm³ 単位) 及び体重 (グラム単位) を週 2 ~ 3 回計測した。表 8 は、各群の初期腫瘍容積及び 11 日目の平均相対腫瘍容積を提供する。R S L A I L - 2 と抗 C T L A - 4 とによる併用については、腫瘍容積及び体重を図 2 2 に提供し、一方、0日目からの相対腫瘍容積及びパーセント体重変化を図 2 3 に提供する。R S L A I L - 2 と抗 P D - 1 とによる併用については、腫瘍容積及び体重を図 2 4 に提供し、一方、0日目からの相対腫瘍容積及びパーセント体重変化を図 2 5 に提供する。

20

【0127】

本試験の結果は、一元配置 A N O V A 及びチューキーの多重比較事後検定 (Graph Pad Prism バージョン 6.03 for Windows, Graph Pad Software, San Diego California) を利用して 11 日目の対照動物 (55.3%) 及び治療動物 (12.8%) の平均相対腫瘍容積を用いて計算すると、R S L A I L - 2 及び抗 C T L A - 4 治療群において 76.9% (p < 0.05) の腫瘍成長阻害 (T G I) を示した。

30

【0128】

R S L A I L - 2 及び抗 C T L A - 4 の治療を、細胞傷害性 C D 8 T 細胞のインビボ 枯渴を生じさせる中和 C D 8 a 抗体の連続注射と併用したとき、その結果は治療有効性の消失であり、11日目に 52.0% の平均相対腫瘍容積及び 5.98% の腫瘍成長阻害となつた (媒体対照と比較して統計的有意性に達しなかった)。

【0129】

R S L A I L - 2 及び抗 C T L A - 4 の治療を、N K 細胞のインビボ 枯渴を生じさせる中和抗アシアロ G M 1 抗体の連続注射と併用したとき、その結果は治療有効性の消失であり、11日目に 48.3% の平均相対腫瘍容積及び 12.7% の腫瘍成長阻害となつた (媒体対照と比較して統計的有意性に達しなかった)。

40

【0130】

R S L A I L - 2 を抗 P D - 1 と併用したとき、100日目の平均相対腫瘍容積は 28.5% であり、48.5% の腫瘍成長阻害 (T G I) をもたらした (p < 0.05)。

【0131】

R S L A I L - 2 及び P D - 1 の治療を中和 C D 8 a 抗体の連続注射と併用したとき、その結果は治療有効性の消失であり、11日目に 53.9% の平均相対腫瘍容積及び 2.53% の腫瘍成長阻害となつた (媒体対照と比較して統計的有意性に達しなかった)。

【0132】

R S L A I L - 2 及び抗 P D - 1 の治療を中和抗アシアロ G M 1 抗体の連続注射と併用

50

したとき、その結果は治療有効性の消失であり、11日目に36.4%の平均相対腫瘍容積及び34.2%の腫瘍成長阻害となつた（媒体対照と比較して統計的有意性に達しなかつた）。

【0133】

RSLAIL-2からは、抗CTLA-4又は抗PD-1と併用したとき、又はこの治療をCD8又は抗アシアロGM1抗体アブレーションの追加と併用したとき有意な体重減少は観察されなかつたが、抗アシアロGM1との併用では、RSLAIL-2及び抗CTLA-4の投与も受ける群において2匹の動物が試験8日目に止息していることが分かり、RSLAIL-2及び抗PD-1の投与も受ける群において3匹の動物が試験8日目に止息していることが分かつた。

【0134】

【表8】

表8 フェーズI結果概要(平均値±SE)						
治療	用量	N	治療開始時の 腫瘍容積 (mm ³)	11日目の 平均相対 腫瘍容積 (%)	11日目の 平均腫瘍 成長阻害 ¹ (%)	p値 ²
媒体対照 (0,4,8日目)	NA	10	177±10	553±49	NA	NA
RSLAIL-2 (4日目) + 抗CTLA-4 (0,4,8日目)	0.8 mg/kg + 100 µg	8	198±16	128±24	76.9	<0.05
RSLAIL-2 (4日目) + 抗CTLA-4 (0,4,8日目) + 抗CD8a (-2,0,7日目)	0.8 mg/kg + 100 µg + 100 µg	8	195±14	520±46	5.98	NS ³
RSLAIL-2 (4日目) + 抗CTLA-4 (0,4,8日目) + 抗アシアロGM1 (-2,0,7日目)	0.8 mg/kg + 100 µg + 50µl	8	177±13	483±51	12.7	NS
RSLAIL-2 (4日目) + 抗PD-1 (0,4,8日目)	0.8 mg/kg + 100 µg	8	184±10	285±46	48.5	<0.05
RSLAIL-2 (4日目) + 抗PD-1 (0,4,8日目) + 抗CD8a (-2,0,7日目)	0.8 mg/kg + 100 µg + 100 µg	8	176±10	539±45	2.53	NS
RSLAIL-2 (4日目) + 抗PD-1 (0,4,8日目) + 抗アシアロGM1 (-2,0,7日目)	0.8 mg/kg + 100 µg + 50µl	8	223±15	364±65	34.2	NS

¹平均腫瘍成長阻害(%TGI)は、式: %TGI = (1 - (相対腫瘍容積 (%)_{対照} + 相対腫瘍容積 (%)_{試験}) / 2) × 100 を使用して18日目(対照動物がいた最後の日)に評価した

²多重比較、チューキーの事後検定による一元配置ANOVA

³NSは、統計的有意性に達しなかつた。

【0135】

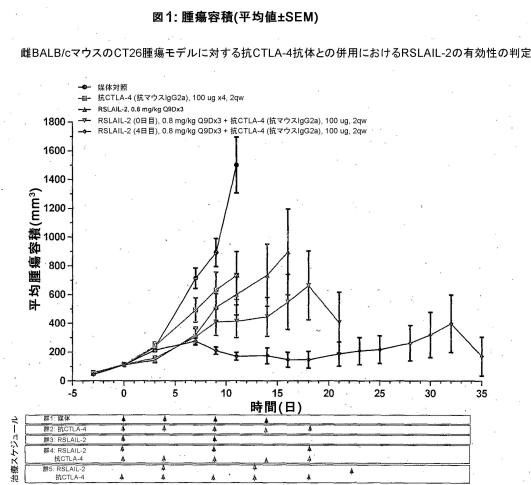
この試験は、EMT6マウス乳癌腫瘍におけるRSLAIL-2及び抗CTLA-4又はRSLAIL-2及び抗PD-1を使用した併用免疫療法の有効性を実証している。加えて、NK細胞及びCD8⁺T細胞のインビオ枯渇後の抗腫瘍有効性の喪失は、この有効性における両方の細胞型の役割を示唆している。

10

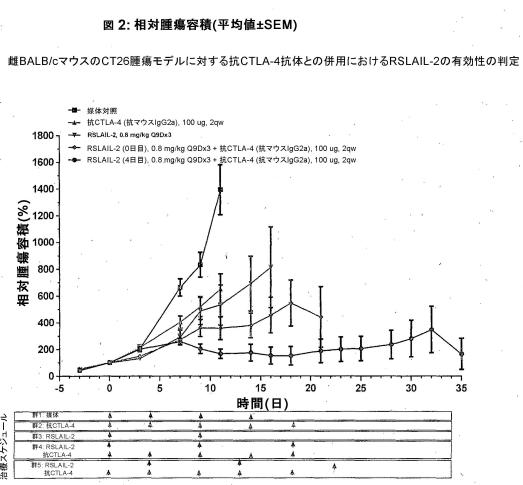
20

30

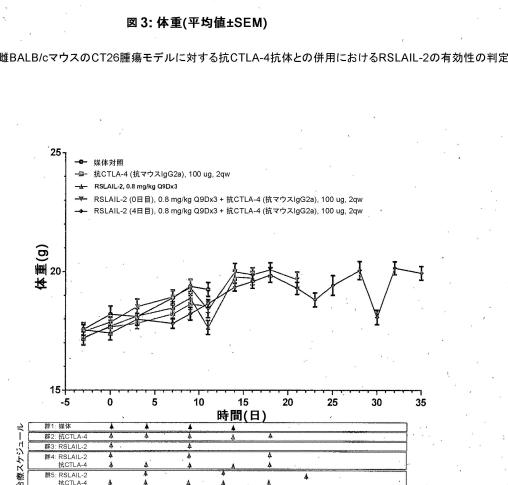
【図1】



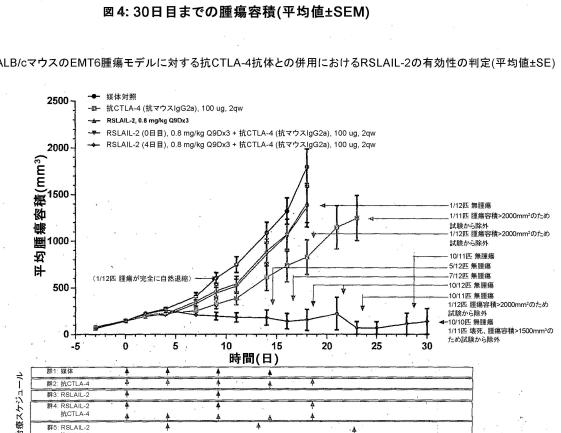
【図2】



【図3】



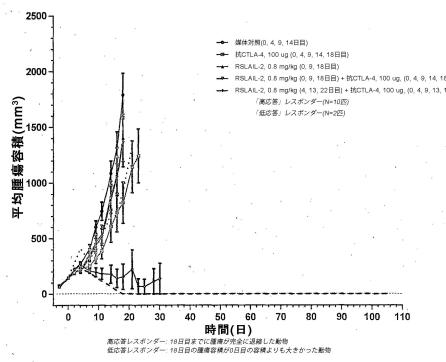
【図4】



【図5】

図5: 106日目までの腫瘍容積(平均値±SEM)

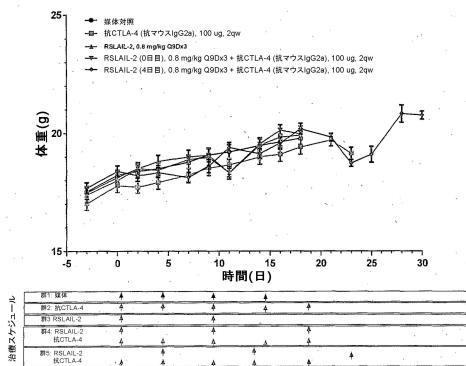
雌BALB/cマウスのEMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用におけるRSLAIL-2の有効性の判定(平均値±SE)



【図6】

図6: 体重(平均値±SEM)

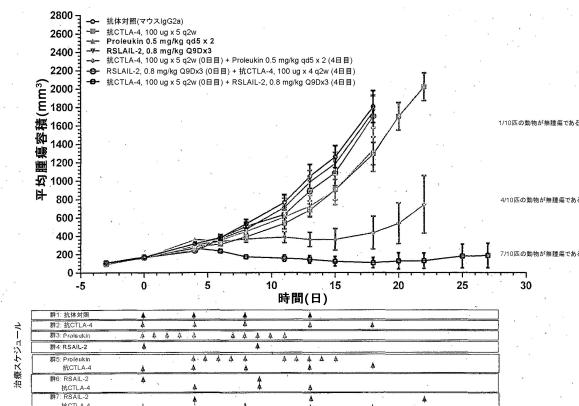
雌BALB/cマウスのEMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用におけるRSLAIL-2の有効性の判定(平均値±SE)



【図7】

図7: 27日目までの腫瘍容積(平均値±SEM)

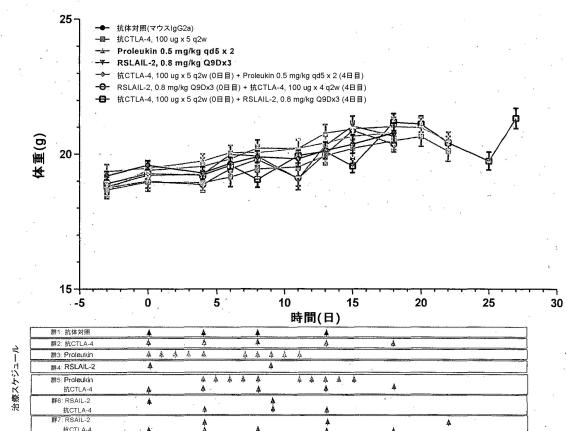
雌BALB/cマウスのEMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体治療を伴うProleukinと比較した抗CTLA-4抗体との併用におけるRSLAIL-2の有効性の判定



【図8】

図8: 27日目までの体重(平均値±SEM)

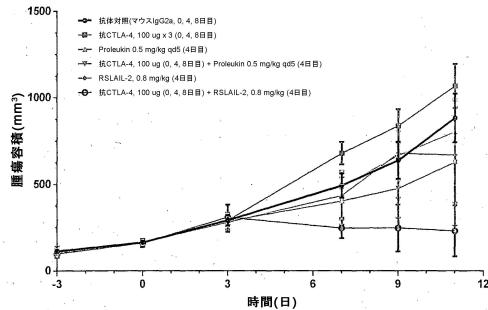
雌BALB/cマウスのEMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体治療を伴うProleukinと比較した抗CTLA-4抗体との併用におけるRSLAIL-2の有効性の判定



【図9】

図9: 11日目までの腫瘍成長

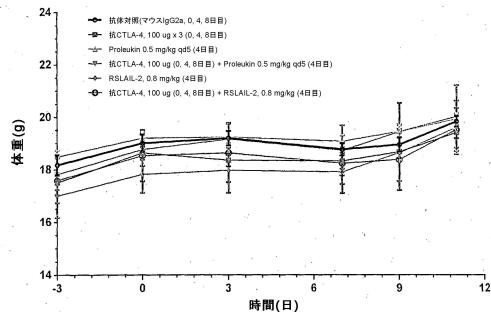
雌BALB/cマウスのEMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用におけるRSLAIL-2を調べる有効性試験



【図10】

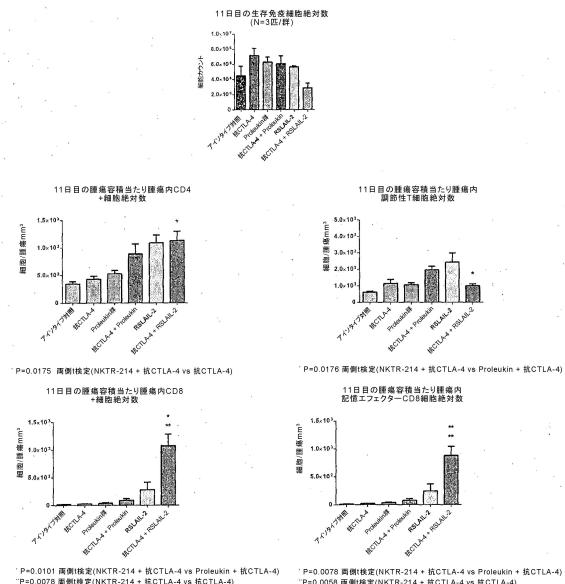
図10: 11日目までの体重及び%体重変化

雌BALB/cマウスのEMT6腫瘍モデルに対する抗CTLA-4抗体との併用におけるRSLAIL-2を調べる有効性試験



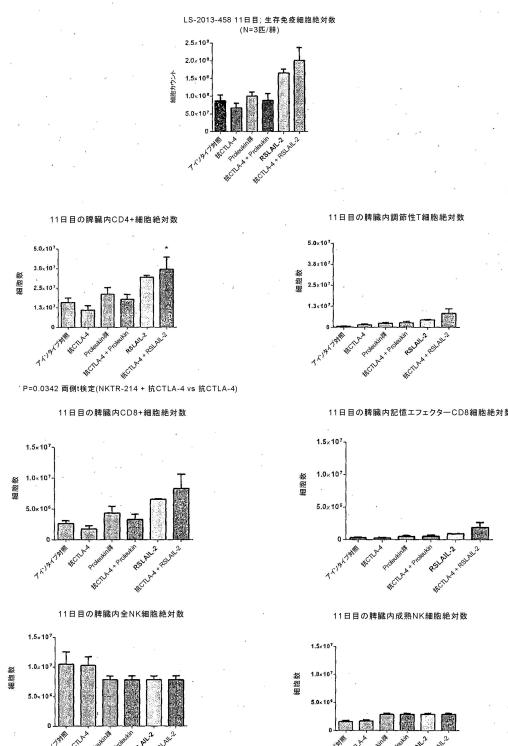
【図11】

図11: 11日目の腫瘍における免疫細胞集団



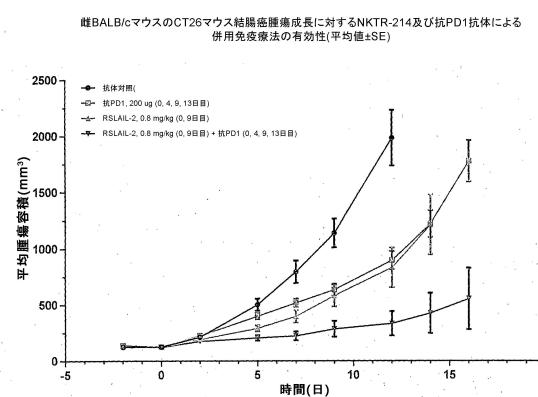
【図12】

図12: 11日目の脾臓における免疫細胞集団



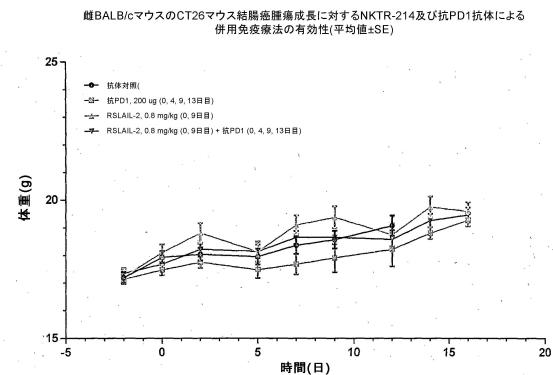
【図13】

図13: 肿瘍容積データ(平均値±SEM)



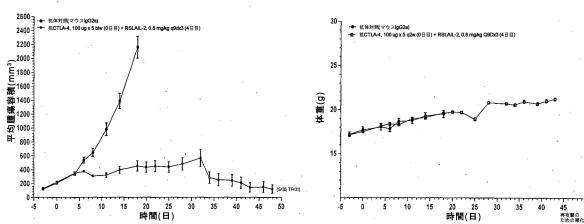
【図14】

図14: 体重データ(平均値±SEM)



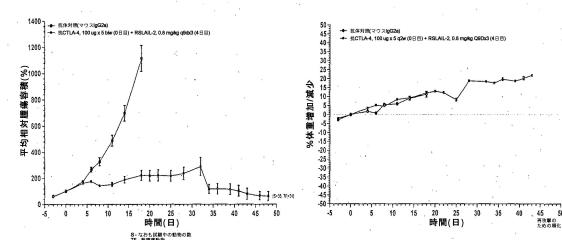
【図15】

図15: フェーズI 肿瘍容積及び体重(平均値±SE)



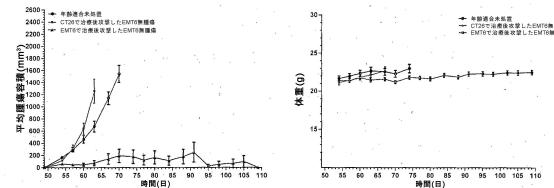
【図16】

図16: フェーズI 相対腫瘍容積及び体重変化



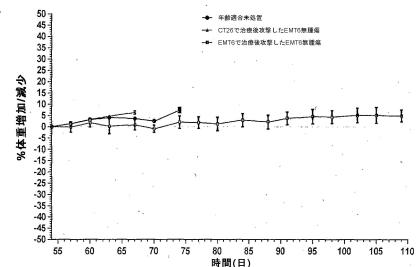
【図18】

図18: フェーズII 肿瘍容積及び体重(平均値±SE)



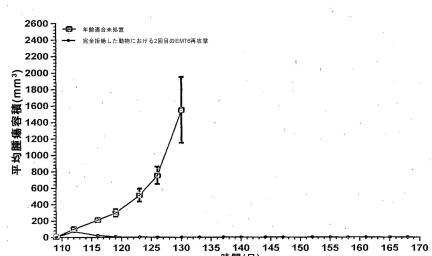
【図17】

図17: 相対体重変化

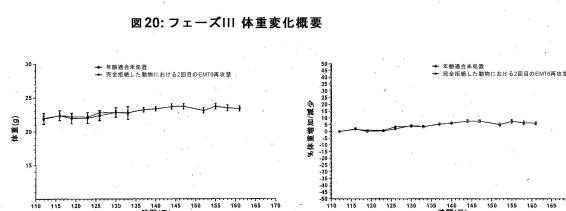


【図19】

図19: フェーズIII 肿瘍容積概要

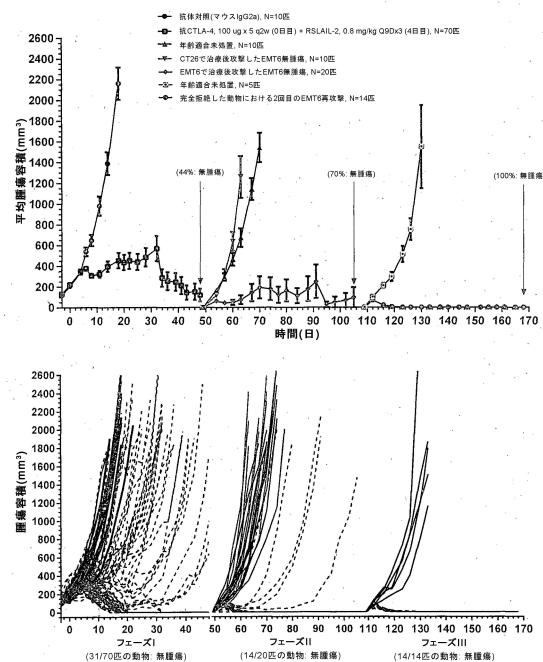


【図20】

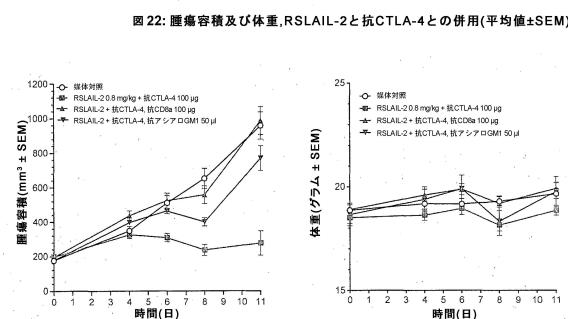


【図21】

図21: 肿瘍容積全概要(-3日目～168日目)

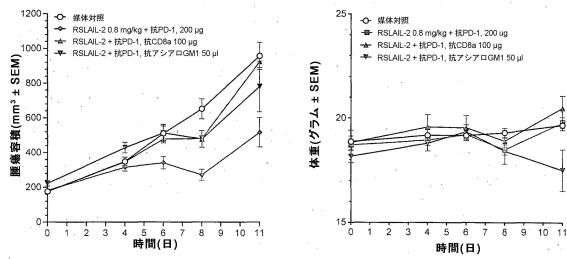


【図22】

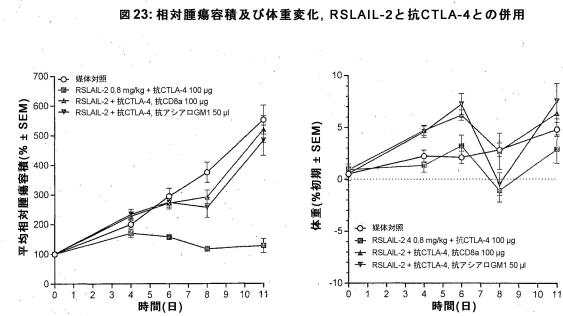


【図24】

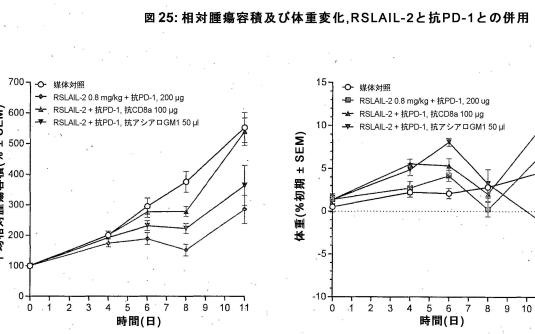
図24: 肿瘍容積及び体重, RSLAIL-2と抗PD-1との併用(平均値±SEM)



【図23】



【図25】



フロントページの続き

(51)Int.CI.	F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
	A 6 1 P 43/00 1 1 1
	A 6 1 P 43/00 1 2 1

(31)優先権主張番号 3087/DEL/2014

(32)優先日 平成26年10月29日(2014.10.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

インド(IN)

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 アダパリ, ムラリ クリスナ

インド国 5 0 0 0 1 5 アンドーラ プラデシュ, シカンデラバード, ティーチャーズ
コロニー, ジュピター コロニー, プロット ナンバー4

(72)発明者 チャリッチ, デボラ エイチ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7 0 6, オールバニー, テイラーストリート 9 0
9

(72)発明者 カンタック, シーマ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 4 4, パシフィカ, シェイラ レーン 1 2 3 0

(72)発明者 リー, スティーブン ロバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 7 8, サン レアンドロ, イースト 1 4 ティーエ
イチ ストリート 1 5 9 5 6 ナンバー2 0 9

合議体

審判長 井上 典之

審判官 岡崎 美穂

審判官 富永 みどり

(56)参考文献 国際公開第2012/065086 (WO, A1)

特開2006-340714 (JP, A)

Journal of Investigative Dermatology, 2013年,
Vol. 133, No. 3, p751-758

(58)調査した分野(Int.CI., DB名)

A61K 38/00-38/58, 41/00-45/08, 48/00

B I O S I S, E M B A S E, M E D L I N E, W P I