

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-516668

(P2020-516668A)

(43) 公表日 令和2年6月11日 (2020.6.11)

| | | |
|-------------------------------------|------------------|-------------|
| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 N | 4 C 0 7 6 |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 K 47/68 (2017.01) | A 6 1 K 47/68 | 4 C 0 8 5 |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 C | 4 H 0 4 5 |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 D | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く | | |

| | | | |
|--------------------|------------------------------|----------|--------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2019-556226 (P2019-556226) | (71) 出願人 | 519365207 |
| (86) (22) 出願日 | 平成30年4月13日 (2018.4.13) | | ガママブス ファルマ |
| (85) 翻訳文提出日 | 令和1年12月6日 (2019.12.6) | | フランス国, 3 1 1 0 6 トゥールーズ, |
| (86) 国際出願番号 | PCT/EP2018/059548 | | ブラス ピエール ポティエ オンコ |
| (87) 国際公開番号 | W02018/189379 | | ポール アントレ ベー, サントル ピエ |
| (87) 国際公開日 | 平成30年10月18日 (2018.10.18) | | ール ポティエ 1 |
| (31) 優先権主張番号 | 17305445.3 | (71) 出願人 | 506413937 |
| (32) 優先日 | 平成29年4月14日 (2017.4.14) | | アンスティテュート キュリー |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 欧州特許庁 (EP) | | フランス国, 7 5 2 4 8 パリ セデック |
| | | | ス O 5, リュ ダルム 2 6 |
| | | (74) 代理人 | 100085545 |
| | | | 弁理士 松井 光夫 |
| | | (74) 代理人 | 100118599 |
| | | | 弁理士 村上 博司 |
| 最終頁に続く | | | |

(54) 【発明の名称】 癌を予防又は処置する為のAMHR I I 結合性化合物

(57) 【要約】

本発明は、結腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、胃腸癌、膀胱癌、膵癌、頭頸部癌、腎臓癌、脂肪肉腫、線維肉腫、胸膜中皮腫、メラノーマ、肉腫、脳癌、骨癌、乳癌、前立腺癌、及び白血病を含む癌の群から選択される癌を予防又は処置する為の方法で使用する為のヒトAMHR I I 結合性剤に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非婦人科癌を予防又は処置する為の方法で使用する為のヒト A M H R I I 結合性剤。

【請求項 2】

前記非婦人科癌が、結腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、胃腸癌、膀胱癌、膵癌、頭頸部癌、腎臓癌、脂肪肉腫、線維肉腫、胸膜中皮腫、メラノーマ、肉腫、脳癌、骨癌、乳癌、前立腺癌、及び白血病を含む群から選択される、請求項 1 に記載の方法で使用する為のヒト A M H R I I 結合性剤。

【請求項 3】

モノクローナル抗 A M H R I I 抗体及びその A M H R I I 結合性フラグメントからなる群から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の方法で使用する為のヒト A M H R I I 結合性剤。

10

【請求項 4】

下記の抗体からなる群から選択されるモノクローナル抗体である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法で使用する為のヒト A M H R I I 結合性剤：

- a) 配列番号 2 を含む軽鎖及び配列番号 4 を含む重鎖（リーダーを有さない 3 C 2 3 V L 及び V H 配列）；
- b) 配列番号 6 を含む軽鎖及び配列番号 8 を含む重鎖（リーダーを有さない 3 C 2 3 K V L 及び V H 配列）；
- c) 配列番号 10 を含む軽鎖及び配列番号 12 を含む重鎖（リーダーを有さない 3 C 2 3 軽鎖及び重鎖）；
- d) 配列番号 14 を含む軽鎖及び配列番号 16 を含む重鎖（リーダーを有さない 3 C 2 3 K 軽鎖及び重鎖）。

20

【請求項 5】

下記の配列を含む複数の C D R を含むモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の方法で使用する為のヒト A M H R I I 結合性剤：

C D R L - 1 : R A S X 1 X 2 V X 3 X 4 X 5 A (配列番号 6 5)、ここで、X 1 及び X 2 は独立して S 又は P であり、X 3 は R 又は W 又は G であり、X 4 は T 又は D であり、及び X 5 は I 又は T である；

C D R L - 2 は、P T S S L X 6 S (配列番号 6 6) であり、ここで、X 6 は K 又は E である；並びに

30

C D R L - 3 は、L Q W S S Y P W T (配列番号 6 7) である；

C D R H - 1 は、K A S G Y X 7 F T X 8 X 9 H I H (配列番号 6 8) であり、ここで、X 7 は S 又は T であり、X 8 は S 又は G であり、及び X 9 は Y 又は N である；

C D R H - 2 は、W I Y P X 10 D D S T K Y S Q K F Q G (配列番号 6 9) であり、ここで、X 10 は G 又は E である、並びに

C D R H - 3 は、G D R F A Y (配列番号 7 0) である。

【請求項 6】

上記結合性剤が、抗体薬物コンジュゲートからなる、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法で使用する為のヒト A M H R I I 結合性剤。

40

【請求項 7】

A M H R I I 結合性の操作された受容体である、請求項 1 に記載の方法で使用する為のヒト A M H R I I 結合性剤。

【請求項 8】

A M H R I I 結合性の操作された受容体を発現する細胞である、請求項 1 に記載の方法で使用する為のヒト A M H R I I 結合性剤。

【請求項 9】

A M H R I I 結合性の操作された受容体を発現する C A R T 細胞又は N K T 細胞である、請求項 8 に記載の方法で使用する為のヒト A M H R I I 結合性剤。

【請求項 10】

50

別の抗癌処置と組み合わせられる、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法で使用する為のヒト A M H R I I 結合性剤。

【請求項 1 1】

個体が、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の A M H R I I 結合性剤での癌処置に応答性であるかを判断する方法であって、上記個体から予め得られた腫瘍組織サンプルが、細胞表面において A M H R I I タンパク質を発現するかを決定する工程を含む上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、癌処置の分野に関する。

10

【背景技術】

【0 0 0 2】

世界人口における主要な死亡原因の 1 つは、癌又は悪性腫瘍であり、その死亡率ランキングは、肺癌、胃癌、肝臓癌、結腸直腸癌、乳癌、及び子宮頸癌の順である。米国単独でも、全個体の三分の一が癌を発症する。早期の診断及び療法が進歩した結果、5 年生存率が劇的にほぼ 5 0 % 上昇したものの、米国では、癌は死因として心疾患に次いで 2 番目になおも留まっている。米国人の 2 0 % が癌により死亡し、その半分以上が肺、乳房、及び結腸直腸の癌に起因する。更に、皮膚癌が、依然として健康を脅かしている。

【0 0 0 3】

癌患者に対する有効な処置の設計には重大な課題があった。外科切除、体外ビーム放射線療法、及び / 又は全身化学療法といった現在のレジメンは、ある種の悪性腫瘍において部分的に奏功したが、その他の腫瘍では満足のいく結果を生み出さなかった。更に、このようなアプローチは、多くの場合許容されない毒性を有する。

20

【0 0 0 4】

放射線及び手術のいずれも、同じ理論的欠点がある。たった一つのクローン原性悪性細胞であっても、宿主を殺傷するのに十分な子孫を生み出すことができることから、新生細胞の集団全体が根絶されなければならないことが認識されている。一般的には、Goodman and Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics (Pergamon Press, 8th Edition) (pp. 1202-1204) を参照。この「全細胞殺傷」の概念は、治癒を実現したければ、腫瘍の全体的な切除が外科学的アプローチにとって必要であること、及び全

30

全ての癌細胞の完全な破壊が放射線アプローチにおいて必要とされることを示唆する。現実的には、これはほとんど不可能であり、実際、転移が認められれば不可能である。

【0 0 0 5】

更に、従来の化学療法的癌処置もまた腫瘍の完全寛解をもたらすことはほとんどなく、せいぜい中程度の応答を生成するのに必要とされる意味のある投与レベルは、多くの場合許容されない毒性を伴う。抗癌剤は、不良な血液学的効果（例えば、有糸分裂の停止、及び骨髓、リンパ系組織における形成された要素の分解）、及び免疫抑制作用（例えば、細胞数の抑制）、並びに上皮組織（例えば、腸粘膜）、生殖組織（例えば、精子形成障害）、及び神経系に対する重篤な影響を一般的に有する。P. Calabresi and B. A. Chabner, In: Goodman and Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics (Pergamon Press, 8th Edition) (pp. 1209-1216)。用量レベルが高いこととその結果もたらされる毒性は、抗癌剤それ自体が標的特異性を欠くことに大部分起因する。薬物は、癌性の宿主細胞と癌性ではない宿主細胞との間を区別する必要がある。大部分の抗癌剤は、このレベルにおいて無差別的であり、また重大な固有毒性を有する。チェックポイント阻害剤として知られている免疫療法を用いた抗癌手段が、最近注目されている。それらの製品（抗 P D 1、抗 P D L 1、抗 C T L A 4）は、癌細胞が免疫監視機構及び細胞殺傷から逃れる機構を妨害することにより、免疫系をロック解除することができる。このような製品は、幾つかの癌（メラノーマ及び肺癌等）において顕著な長期結果をもたらしたという事実にもかかわらず、応答例のパーセント（%）は低～中程度のままであり、またその適応スペクトルは比較的限定されたままである（DM. Pardoll, Nature Review 2

40

50

012年)。

【0006】

従来の外科療法、放射線療法、及び化学療法に対する代替的又は補完的な抗癌療法について、必要性が認められる。そのような有望な代替療法又は補完療法の1つは、腫瘍細胞により発現される抗原の処置剤による認識を通じて、癌細胞を特異的に標的とすることにある。2017年には、そのような腫瘍細胞特異的処置戦略が、抗体に基づく療法である二重特異性抗体、及び免疫細胞の関与、例えばNK及びマクロファージ(糖鎖工学によって操作された抗体(glyco-engineered antibodies)等)、又は例えばキラーTリンパ球(CD3二重特異性フォーマット等)を増加させる為に操作されることが出来るCAR-T細胞に基づく療法により主に例証されている。抗体は、抗体薬物コンジュゲート(ADC: Antibody Drug Conjugate)のフォーマットに基づく様々な細胞毒性剤によりやはり武装化されることが出来る。最終的に、T細胞それ自体が腫瘍細胞を直接認識し、TCRシグナリング(CAR-T細胞)を活性化させる為に遺伝子操作されることが出来る。薬剤が強力であればあるほど、腫瘍選択的な標的に対する要求も高まる。

10

【0007】

癌に対する抗体に基づく療法は、過去15年において確立されることとなったが、今日では、血液学的悪性疾患及び固形腫瘍を有する患者を処置する為の最も成功した重要な戦略の1つである。重要な課題は、抗体に基づく処置薬に好適な抗原を識別することであった。そのような処置薬は、抗原又は受容体機能(例えば作動薬又はアンタゴニスト機能)における変化への関与、免疫系の調節(例えば、Fc機能及びT細胞活性化の変更)、又は特異抗原を標的とする抗体にコンジュゲートした特異的薬物の送達を通じて機能することが出来る(Van den Eynde, B. J. & Scott, A. M. Encyclopedia of Immunology (eds Roitt, D. P. J. & Roitt, I. M.) 2424-2431 (Academic Press, London, 1998年)., Scott, A. M. et al. A Phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptor. Proc. Natl Acad. Sci. USA 104, 4071-4076 (2007年)., Hughes, B. Antibody-drug conjugates for cancer: poised to deliver? Nature Rev. Drug Discov. 9, 665-667 (2010年)., Weiner, L. M., Surana, R. & Wang, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. Nature Rev. Immunol. 10, 317-327 (2010年))。抗体薬物動態、エフェクター機能、サイズ、及び免疫原性を変化させることが出来る分子技術が、新たな抗体に基づく療法の開発における重要な要素として登場した。癌患者を対象とした抗体の臨床トライアルから得られたエビデンスは、抗体の親和性及びアビディティ、抗体コンストラクト、処置アプローチの選択(例えば、シグナリング抑止又は免疫エフェクター機能)を含む、抗原標的及び最適な抗体を選択する為の反復アプローチの重要性、並びに初期の臨床トライアルにおいて抗体の薬物動態及び薬力学的特性を入念に調べることの必要性を明らかにした。このレビューは、モノクロナール抗体(mAb)をヒト用の試薬に変換するのに必要な工程、癌患者の処置における抗体の成功例、標的及びコンストラクトの選択における課題、並びに抗体療法における免疫系の重要な役割について要約する。1986年に、処置用モノクロナール抗体が初めて市販されて以降、このクラスのバイオ医薬製品は飛躍的に増加し、その結果、2014年の終わりまでに、47個ものモノクロナール抗体が、特に癌を処置する為に米国内又は欧州において承認されている。2020年までに約70個のモノクロナール抗体が上市されるものと期待される。

20

30

40

【0008】

CAR-T細胞療法は、キメラ抗原T細胞受容体(CAR)の製造に基づく。キメラ抗原受容体は、免疫エフェクター細胞上に新たな特異性を付与する、遺伝子操作された受容体である。これは、T細胞上にモノクロナール抗体の特異性を付与するのに一般的に使用される。CAR-T細胞は、癌を目的とする療法として検討されている。一般的に、CAR-T療法は、T細胞の細胞膜上でキメラ抗原受容体を発現させる、操作されたT細胞の輸液と関係する。この受容体は、特定の腫瘍抗原を認識するように設計される外部標的結

50

合性ドメインと、CAR-Tが抗原標的と結合した際にT細胞の活性化に關与する内部活性化ドメインとを含む。癌の処置を目的としたCAR-T臨床トライアルは、重症形態の癌において最大94%の顕著な寛解率を示したが、トライアル応募患者のほとんどが、そのような形態の癌について、その他の利用可能な処置すべてに対して応答しなかったことを考慮すれば、特に印象深い。2017年までに、約300件のCAR-T臨床トライアルが実施された。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

特定の種類の癌を処置する為の既存療法の代替でありうる又はそれを補完しうる、癌の療法の為の更なるツールに対する必要性が、当技術分野においてなお認められる。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、非婦人科癌を予防又は処置する為の方法で使用する為のヒトAMHRII結合性剤に關する。

【0011】

特に、本発明は、結腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、胃腸癌、膀胱癌、膵癌、頭頸部癌、腎臓癌、脂肪肉腫、線維肉腫、胸膜中皮腫(pleuramesothelioma)、メラノーマ、肉腫、脳癌、骨癌、乳癌、前立腺癌、及び白血病を含む癌の群から選択される、非婦人科癌を予防又は処置する方法で使用する為のヒトAMHRII結合性剤に關する。結腸癌は結腸直腸癌を含む。腎臓癌は腎細胞癌を含む。

20

【0012】

幾つかの実施態様において、上記ヒトAMHRII結合性剤は、抗AMHRIIモノクロナール抗体からなる。

【0013】

幾つかの実施態様において、上記ヒトAMHRII結合性剤は、抗体薬物コンジュゲート(ADC:Antibody Drug Conjugate)からなる。

【0014】

幾つかの実施態様において、上記ヒトAMHRII結合性剤は、AMHRII結合性の操作された受容体からなる。

30

【0015】

幾つかの実施態様において、上記ヒトAMHRII結合性剤は、AMHRII結合性の操作された受容体を発現する細胞、例えば、AMHRII結合性の操作された受容体を発現するCAR-T細胞又はNK-T細胞、からなる。

【0016】

本発明はまた、個体が、上記で定義されたAMHRII結合性剤での癌処置に対して適格性を有するかどうか、すなわち個体が、上記で定義されたAMHRII結合性剤での癌処置に応答性であるかを判断する方法であって、上記個体から予め得られた腫瘍組織サンプルが、細胞表面においてAMHRIIタンパク質を発現するか決定する工程を含む上記方法に關する。

40

【0017】

従って、本発明は、個体が上記で定義されたAMHRII結合性剤での癌処置に対して応答性であるかを判断する方法であって、上記個体から予め得られた腫瘍組織サンプルが、細胞表面においてAMHRIIタンパク質を発現するか決定する工程を含む上記方法に關する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1A】図1A及び図1Bは、3C23モノクロナール抗体の複数の変異体(variants)について、そのVH及びVLドメインのアミノ酸配列を例証する図である。図1Aは、各抗体変異体のVHドメインを例証する。

50

【図 1 B】図 1 A 及び図 1 B は、3 C 2 3 モノクローナル抗体の複数の変異体について、その V H 及び V L ドメインのアミノ酸配列を例証する図である。図 1 B は、各抗体変異体の V L ドメインを例証する。

【図 2 A】図 2 A ~ 図 2 F は、様々な癌細胞株による A M H R I I 発現を例証する図である。図 2 A は、癌細胞株による A M H R I I m R N A 発現を例証する。横座標：図 2 A の左側から右側：H C T 1 1 6（結腸直腸癌）、C O V 4 3 4 - W T（ヒト卵巣の顆粒膜腫瘍）、K 5 6 2（ヒト骨髄性白血病）、及び O V 9 0（ヒト悪性乳頭状漿液性腺癌）。縦座標：R T - q P C R（R Q）によりアッセイされた A M H R I I m R N A 発現レベル（任意単位表示）。

【図 2 B】図 2 A ~ 図 2 F は、様々な癌細胞株による A M H R I I 発現を例証する図である。図 2 A と同一の癌細胞株による A M H R I I タンパク質膜発現：H C T 1 1 6（図 2 B）。横座標：蛍光シグナル強度（F L 2 - A 色素）（任意単位表示）。縦座標：細胞数。

【図 2 C】図 2 C は、様々な癌細胞株による A M H R I I 発現を例証する図である。図 2 A と同一の癌細胞株による A M H R I I タンパク質膜発現：C O V 4 3 4 - W T（図 2 C）。横座標：蛍光シグナル強度（F L 2 - A 色素）（任意単位表示）。縦座標：細胞数。

【図 2 D】図 2 A ~ 図 2 F は、様々な癌細胞株による A M H R I I 発現を例証する図である。図 2 A と同一の癌細胞株による A M H R I I タンパク質膜発現：K 5 6 2（図 2 D）。横座標：蛍光シグナル強度（F L 2 - A 色素）（任意単位表示）。縦座標：細胞数。

【図 2 E】図 2 A ~ 図 2 F は、様々な癌細胞株による A M H R I I 発現を例証する図である。図 2 A と同一の癌細胞株による A M H R I I タンパク質膜発現：N C I - H 2 9 5 R（図 2 E）。横座標：蛍光シグナル強度（F L 2 - A 色素）（任意単位表示）。縦座標：細胞数。

【図 2 F】図 2 A ~ 図 2 F は、様々な癌細胞株による A M H R I I 発現を例証する図である。図 2 A と同一の癌細胞株による A M H R I I タンパク質膜発現：O V 9 0（図 2 F）。横座標：蛍光シグナル強度（F L 2 - A 色素）（任意単位表示）。縦座標：細胞数。

【図 3】図 3 は、様々なヒト腫瘍一次組織サンプルにおける A M H R I I 表面発現を例証する図である。横座標：癌の種類；図 3 の左側から右側：結腸癌、肝臓癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、膀胱癌、脾癌、頭頸部癌。縦座標：A M H R I I グローバルスコアが 1 . 5 であることにより定義された A M H R I I 陽性インデックス。このグローバル組織学的スコアは、細胞質スコア + 細胞膜スコアの平均により規定された。これらのスコアのそれぞれは、頻度 × 平均強度スコア（0 ~ 3）を使用している。頻度は、A M H R I I を発現する細胞のパーセント（%）として定義され、また強度は下記のスコアリングシステムを通じて腫瘍細胞膜又は細胞質の明白な褐色標識として分類された：陰性の場合、標識の強度は 0、弱い場合は 1、中程度の場合は 2、及び C O V 4 3 4 陽性対照で示されるように強い場合には 3 として定義される；各バーの上に位置する数字：試験されたヒト集団内の対応する癌における A M H R I I 発現の頻度。

【図 4】図 4 は、様々なヒト腫瘍異種移植による A M H R I I 表面発現を例証する図である。横座標、図 4 の左側から右側：白血病、骨肉腫、胃腸癌、脳癌、肉腫、メラノーマ、胸膜中皮腫、脂肪肉腫、精巣癌、結腸癌、腎臓癌。縦座標：A M H R 2 グローバルスコア（任意単位表示）。

【図 5】図 5 は、ヒト肝臓癌（H C C）の P D X モデルに対する 3 C 2 3 K 抗体のイン・ビボ（i n v i v o）での抗腫瘍活性を例証する図である。横座標：処置開始後の期間（日数）。縦座標：腫瘍体積（mm³）。：ビヒクル（v e h i c l e）； 2 0 m g / k g の用量での 3 C 2 3 K 抗体； 5 0 m g / k g の用量での 3 C 2 3 K 抗体； 5 0 m g / k g の用量でのソラフェニブによる比較処置。縦座標：腫瘍体積（mm³）。横座標：ビヒクル； 2 0 m g / k g の用量での 3 C 2 3 K 抗体； 5 0 m g / k g の用量での 3 C 2 3 K 抗体； 5 0 m g / k g の用量でのソラフェニブ。

【図 6】図 6 は、P C T 出願番号 国際公開第 2 0 1 7 / 0 2 5 4 5 8 号で開示される、3 C 2 3 K 抗体細胞毒性コンジュゲート（G M 1 0 3 と呼ばれる）からなる抗体薬物コン

10

20

30

40

50

ジュゲート (ADC) の、ヒト肝臓癌 (HCC) の PD X モデルに対するイン・ビボ (in vivo) での抗腫瘍活性を例証する図である。横座標：処置開始後の期間 (日数)。縦座標：腫瘍体積 (mm^3)。：ビヒクル； 1 mg / kg の用量での GM 103 ADC； 5 mg / kg の用量での GM 103 ADC； 10 mg / kg の用量での GM 103 ADC；

【図 7 A】図 7 A ~ 図 7 D は、フローサイトメトリー (FACS) により測定された、結腸直腸癌に作用された患者 4 例 (図 7 A；図 7 B、図 7 C、図 7 D) から得られた腫瘍サンプルに由来する腫瘍細胞による AMHRII 膜発現を例証する図である。横座標：蛍光シグナル強度 (FL2 - A 色素) (任意表示)。縦座標：細胞数。図 7 A、図 7 B、図 7 C、図 7 D において：(i) 左側のピーク：無関係のアイソタイプ抗体と共にインキュベートした細胞；(ii) 右側のピーク：3C23K 抗 AMHRII 抗体と共にインキュベートした細胞。

10

【図 7 B】図 7 A ~ 図 7 D は、フローサイトメトリー (FACS) により測定された、結腸直腸癌に作用された患者 4 例 (図 7 A；図 7 B、図 7 C、図 7 D) から得られた腫瘍サンプルに由来する腫瘍細胞による AMHRII 膜発現を例証する図である。横座標：蛍光シグナル強度 (FL2 - A 色素) (任意表示)。縦座標：細胞数。図 7 A、図 7 B、図 7 C、図 7 D において：(i) 左側のピーク：無関係のアイソタイプ抗体と共にインキュベートした細胞；(ii) 右側のピーク：3C23K 抗 AMHRII 抗体と共にインキュベートした細胞。

【図 7 C】図 7 A ~ 図 7 D は、フローサイトメトリー (FACS) により測定された、結腸直腸癌に作用された患者 4 例 (図 7 A；図 7 B、図 7 C、図 7 D) から得られた腫瘍サンプルに由来する腫瘍細胞による AMHRII 膜発現を例証する図である。横座標：蛍光シグナル強度 (FL2 - A 色素) (任意表示)。縦座標：細胞数。図 7 A、図 7 B、図 7 C、図 7 D において：(i) 左側のピーク：無関係のアイソタイプ抗体と共にインキュベートした細胞；(ii) 右側のピーク：3C23K 抗 AMHRII 抗体と共にインキュベートした細胞。

20

【図 7 D】図 7 A ~ 図 7 D は、フローサイトメトリー (FACS) により測定された、結腸直腸癌に作用された患者 4 例 (図 7 A；図 7 B、図 7 C、図 7 D) から得られた腫瘍サンプルに由来する腫瘍細胞による AMHRII 膜発現を例証する図である。横座標：蛍光シグナル強度 (FL2 - A 色素) (任意表示)。縦座標：細胞数。図 7 A、図 7 B、図 7 C、図 7 D において：(i) 左側のピーク：無関係のアイソタイプ抗体と共にインキュベートした細胞；(ii) 右側のピーク：3C23K 抗 AMHRII 抗体と共にインキュベートした細胞。

30

【図 8 A】図 8 A ~ 図 8 D は、マウスを対象として、フローサイトメトリー (FACS) により測定された、4つの異なる結腸直腸癌ヒト異種移植 (図 8 A、図 8 B、図 8 C、図 8 D) による AMHRII 膜発現を例証する図である。横座標：蛍光シグナル強度 (FL2 - A 色素) (任意表示)。縦座標：細胞数。図 8 A、図 8 B、図 8 C、図 8 D において：(i) 左側のピーク：無関係のアイソタイプ抗体と共にインキュベートした細胞；(ii) 右側のピーク：3C23K 抗 AMHRII 抗体と共にインキュベートした細胞。

【図 8 B】図 8 A ~ 図 8 D は、マウスを対象として、フローサイトメトリー (FACS) により測定された、4つの異なる結腸直腸癌ヒト異種移植 (図 8 A、図 8 B、図 8 C、図 8 D) による AMHRII 膜発現を例証する図である。横座標：蛍光シグナル強度 (FL2 - A 色素) (任意表示)。縦座標：細胞数。図 8 A、図 8 B、図 8 C、図 8 D において：(i) 左側のピーク：無関係のアイソタイプ抗体と共にインキュベートした細胞；(ii) 右側のピーク：3C23K 抗 AMHRII 抗体と共にインキュベートした細胞。

40

【図 8 C】図 8 A ~ 図 8 D は、マウスを対象として、フローサイトメトリー (FACS) により測定された、4つの異なる結腸直腸癌ヒト異種移植 (図 8 A、図 8 B、図 8 C、図 8 D) による AMHRII 膜発現を例証する図である。横座標：蛍光シグナル強度 (FL2 - A 色素) (任意表示)。縦座標：細胞数。図 8 A、図 8 B、図 8 C、図 8 D において：(i) 左側のピーク：無関係のアイソタイプ抗体と共にインキュベートした細胞；(ii) 右側のピーク：3C23K 抗 AMHRII 抗体と共にインキュベートした細胞。

50

i) 右側のピーク：3C23K抗AMHRII抗体と共にインキュベートした細胞。

【図8D】図8A～図8Dは、マウスを対象として、フローサイトメトリー（FACS）により測定された、4つの異なる結腸直腸癌ヒト異種移植（図8A、図8B、図8C、図8D）によるAMHRII膜発現を例証する図である。横座標：蛍光シグナル強度（FL2-A色素）（任意表示）。縦座標：細胞数。図8A、図8B、図8C、図8Dにおいて：(i) 左側のピーク：無関係のアイソタイプ抗体と共にインキュベートした細胞；(ii) 右側のピーク：3C23K抗AMHRII抗体と共にインキュベートした細胞。

【図9A】図9A及び図9Bは、フローサイトメトリー（FACS）により測定された、腎細胞癌に作用された患者2例（図9A；図9B）から得られた腫瘍サンプルに由来する腫瘍細胞によるAMHRII膜発現を例証する図である。横座標：蛍光シグナル強度（FL2-A色素）（任意単位）。縦座標：細胞数。図9A、9Bにおいて：(i) 左側のピーク：無関係のアイソタイプ抗体と共にインキュベートした細胞；(ii) 右側のピーク：3C23K抗AMHRII抗体と共にインキュベートした細胞。

【図9B】図9A及び図9Bは、フローサイトメトリー（FACS）により測定された、腎細胞癌に作用された患者2例（図9A；図9B）から得られた腫瘍サンプルに由来する腫瘍細胞によるAMHRII膜発現を例証する図である。横座標：蛍光シグナル強度（FL2-A色素）（任意単位）。縦座標：細胞数。図9A、9Bにおいて：(i) 左側のピーク：無関係のアイソタイプ抗体と共にインキュベートした細胞；(ii) 右側のピーク：3C23K抗AMHRII抗体と共にインキュベートした細胞。

【図10】図10は、ヒト結腸直腸癌（CRC）のPDXモデルに対する抗AMHRII抗体GM102のイン・ビボ（in vivo）での抗腫瘍活性を例証する図である。横座標：処置開始後の期間（日数）。縦座標：腫瘍体積（ mm^3 ）。：ビヒクル；20mg/kgの用量でのGM102；100mg/kgの用量でのイリノテカン。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明者等は、AMHRII、AMH受容体が、複数の様々な非婦人科癌組織の細胞膜において発現していることを思いがけずに明らかにした。

【0020】

語「AMHR-II」は、ヒト抗ミュー管ホルモンII型受容体を表す。ヒトAMHR-IIの配列は、本明細書では配列番号（SEQ ID NO.）18として記載されている（シグナルペプチドMLGSLGLWALLPTAVEA（配列番号17）を欠いている）。

【0021】

本明細書で使用される場合、「非婦人科」癌は、語「婦人科」癌に含まれないあらゆる癌を含む。

【0022】

本明細書で使用される場合、「婦人科」癌は、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、妊娠性絨毛性疾患の癌（絨毛癌）、子宮肉腫、膣癌、外陰部の癌、及び卵管癌からなる群から選択される。

【0023】

次に、本明細書で使用される場合、「非婦人科」癌は、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、妊娠性絨毛性疾患の癌、子宮肉腫、膣癌、外陰部の癌、及び卵管癌からなる群から選択される癌から構成されない癌からなる。

【0024】

本明細書で使用される場合、語「PDX」は、「患者由来の異種移植（Patient-Derived Xenograft）」という表現に対する頭文字である。患者由来の異種移植は、癌のイン・ビボ（in vivo）モデルにおいて、特にヒト癌のイン・ビボ（in vivo）モデルにおいて、高頻度で使用され、患者の腫瘍に由来する組織又は細胞が移植される、すなわち免疫不全のヒト以外の哺乳動物、例えば免疫不全マウス、に「グラフトされる」。

【0025】

10

20

30

40

50

本明細書の実施例に示されるように、本発明者等は、AMHRIIは、非婦人科癌組織の細胞膜において発現しており、その頻度は検討される非婦人科の癌型に応じて変化することを見出した。実例として、本明細書の実施例に示されるように、AMHRIIは、頭頸部癌に作用された患者を起源とする腫瘍組織に由来する癌細胞によるよりも、副腎皮質癌に作用された患者を起源とする腫瘍組織に由来する癌細胞によって、頻繁に発現されている。これは、これら2種類の癌はAMHRIIを標的とする抗癌処置に対して適格性を有するが、しかしそのような抗癌処置は、頭頸部癌に作用された患者の処置に係る頻度はより低くなることを意味する。

【0026】

本明細書の実施例に示されるように、任意の婦人科癌、例えば肝臓癌、結腸直腸癌又は腎臓癌、は、AMHRII結合性剤によって処置され得、但し、上記非婦人科腫瘍に由来する腫瘍細胞がその膜でAMHRIIを発現し、従って腫瘍細胞の膜でのAMHRIIタンパク質の存在が、任意の方法に従い検出又は決定できる。

10

【0027】

従って、本明細書の実施例に提供される実験データは、AMHRII結合性剤、ここでは抗AMHRIIモノクローナル抗体が同一であっても、AMHRII標的タンパク質が腫瘍細胞膜において発現していれば、複数の異なる種類の癌を処置する為に有効であることを示す。

【0028】

ところで、標的結合性分子、例えば標的結合性抗体、からなる抗癌有効成分の分野において、同一の有効成分が異なる複数の癌を処置する為に有効である状況は前例がない。実例として、ペンブロリズマブと命名された抗PD1抗体は、異なる様々な種類の癌（但し、上記癌は同一の生理学的特性を共有する）の処置において有用な有効成分として、米国食品医薬品局（FDA）により承認された。

20

【0029】

従って、非婦人科癌に作用された個体は、上記個体から予め集められた腫瘍細胞によるAMHRII膜発現が適切な方法により検出される、さもなければ決定されるとき、本明細書に記載されているAMHRII結合性剤を用いて上記癌について処置されうる。

【0030】

幾つかの実施態様において、癌細胞の細胞膜におけるAMHRIIの発現は、上記癌細胞がAMHRIIを、所定の定量可能なレベルで、又は上記定量可能なレベルよりも高いレベルで発現することを含む。

30

【0031】

従って、幾つかの実施態様に従うと、非婦人科癌に作用された個体のAMHRII結合分子での処置に対する応答性は、上記個体から予め集められたサンプルに由来する非婦人科癌細胞がその膜でAMHRIIを発現するかを判断することにより評価されうる。

【0032】

幾つかの実施態様に従うと、非婦人科癌に作用された個体のAMHRII結合性分子での処置に対する応答性は、上記個体から予め集められたサンプルに由来する非婦人科癌細胞が、AMHRIIを、その膜において決定済みの閾値を上回り発現するか判断することにより評価されうる。

40

【0033】

非婦人科癌に作用された患者のAMHRII結合性剤、例えば抗AMHRII抗体、での処置に対する応答性を判断する為の幾つかの実施態様で使用されうるAMHRII膜発現レベルは、様々な技法を用いて評価され得、そのような技法は、(i)腫瘍細胞膜でAMHRIIを発現する、腫瘍サンプルに含まれる腫瘍細胞のパーセント(%)、(ii)腫瘍細胞膜に位置するAMHRIIタンパク質の平均数、及び(iii)試験される腫瘍細胞サンプルに含まれる腫瘍細胞のFACS AMHRIIシグナルプロファイルを含む。

【0034】

50

幾つかの実施態様に従うと、非婦人科癌に作用された個体において予め集められた腫瘍サンプルに含まれる癌細胞は、膜性AMHRIIが上記腫瘍サンプルに含まれる腫瘍細胞の5%又はそれ超において検出されるとき、膜性AMHRIIを発現するものとして評価されうる。

【0035】

従って、幾つかの実施態様において、非婦人科癌に作用された個体は、上記個体から予め集められた腫瘍サンプルに含まれる腫瘍細胞の5%又はそれ超が、その膜でAMHRIIを発現するとき、AMHRII結合性剤での処置に応答しているものと判断される。

【0036】

膜AMHRIIタンパク質を発現する腫瘍細胞の頻度（例えば、パーセント（%））を決定する為の方法は、本明細書の実施例を含め、本明細書において別途で開示される。

【0037】

幾つかの実施態様に従うと、非婦人科癌に作用された患者のAMHRII結合性剤、例えば抗AMHRII抗体、での癌処置に対する応答性は、上記患者から予め集められた腫瘍サンプルに含まれる腫瘍細胞の膜に存在するAMHRIIタンパク質の平均数を決定することにより評価されうる。

【0038】

幾つかの実施態様において、非婦人科癌に作用された患者は、上記患者から予め集められた腫瘍サンプルに含まれる腫瘍細胞により発現される膜AMHRIIタンパク質の平均数が、AMHRIIタンパク質10000個又はそれ超であるとき、AMHRII結合性剤での処置に対して応答性である、例えば抗AMHRII抗体での処置に対して応答性であるものとして分類されうる。

【0039】

腫瘍細胞膜において発現されるAMHRIIタンパク質の数の評価は、（a）患者から予め集められた腫瘍組織サンプルに由来する細胞を含有するサンプルを、AMHRIIタンパク質と特異的に結合する検出可能な化合物、例えば蛍光標識された抗AMHRII抗体、と共にインキュベートする工程、及び更に（b）上記サンプルに由来する各試験対象細胞に結合した上記検出可能な化合物の数、例えば蛍光標識された抗AMHRII抗体の数を決定する工程を含む従来法を使用することにより実施されうる。腫瘍細胞膜において発現されるAMHRIIタンパク質の数の評価は、本明細書の実施例に示されるように、例えば、周知の蛍光活性化セルソーティング（FACS：fluorescence activated cell sorting）技術を使用することにより実施されうる。

【0040】

なおも別の実施態様において、非婦人科癌に作用された患者は、上記患者から予め集められた腫瘍サンプルに含まれる腫瘍細胞のAMHRII FACSプロファイルの分析により、AMHRII結合性剤での処置に対して応答性であるとして分類されうる、例えば抗AMHRII抗体での処置に対して応答性であるとして分類されうる。

【0041】

これらのなおもその他の実施態様に従うと、非婦人科癌に作用された患者は、蛍光活性化セルソーティング（FACS：fluorescence activated cell sorting）の方法において、（i）抗AMHRII蛍光標識抗体と共にインキュベートされた腫瘍細胞の平均蛍光強度と、（ii）アイソタイプ蛍光標識抗体と共にインキュベートされた腫瘍細胞から得られた平均蛍光強度（MFI：mean fluorescence intensity）値との比が1.5又はそれ超であるとき、AMHRII結合性剤での処置に対して応答性であるとして分類されうる、例えば抗AMHRII抗体での処置に対して応答性であるとして分類されうる。

【0042】

上記平均蛍光強度比を判断するには、アイソタイプ抗体及び抗AMHRII抗体の両方が、本明細書の実施例に示されるように、同一の蛍光剤、例えばThermoFisher Scientific社により商品化されているAlexa Fluor 488色素、で標識される。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

幾つかの更なる実施態様において、非婦人科癌の個体の A M H R I I 結合性剤での処置に対する応答性は、(i) A M H R I I 結合性剤で処置されうる、癌由来の膜 A M H R I I 発現癌細胞と、(i i) A M H R I I 結合性剤で処置されえない、癌由来の膜 A M H R I I 発現癌細胞との間を区別することを可能にする A M H R I I 発現スコアを計算することにより決定されうる。

【 0 0 4 4 】

従って、本発明者等は、本明細書に記載されている非婦人科癌に作用された患者、特に本明細書に記載されている A M H R I I 結合性剤での癌処置に対して適格性を有する患者、すなわち本明細書に記載されている A M H R I I 結合性剤での癌処置に対して特に応答性である患者は、細胞膜で A M H R I I を、関連する細胞標的の破壊を構成するのに十分高いレベルで発現する癌腫瘍を有する患者を包含することを明確にした。

10

【 0 0 4 5 】

次に、このような更なる実施態様に従うと、本発明者等は、非婦人科癌患者から得られた癌細胞サンプル中で測定された A M H R I I の発現が最低限度のレベルにあれば、それは、上記患者が A M H R I I 結合性剤での処置に対して応答性であること、従って上記患者は本明細書に記載されている A M H R I I 結合性剤で処置されうることを確認しうることを明確にした。

【 0 0 4 6 】

従って、上記個体から予め集められたサンプルに含まれる癌細胞による A M H R I I 発現レベルが、(i) 膜性 A M H R I I を発現する腫瘍細胞の頻度、例えばその膜で A M H R I I を発現する腫瘍細胞のパーセント(%)、及び(i i) 上記腫瘍細胞による A M H R I I 膜発現のレベル、例えば細胞 1 個当たりの膜性 A M H R I I タンパク質の平均数の両方について判断することにより評価されるときにも、非婦人科癌に作用された個体の A M H R I I 結合性剤での処置に対する応答性がやはり判断されうる。

20

【 0 0 4 7 】

従って、このような更なる実施態様の幾つかにおいて、非婦人科癌に作用された患者の、上記患者から予め集められた腫瘍細胞のサンプルにおけるヒト A M H R I I 結合性剤、例えば抗ヒト A M H R I I 抗体に対する応答性は、(i) 上記サンプルに含まれる腫瘍細胞がその膜におけるヒト A M H R I I タンパク質について最低限度の平均数を示すこと、及び(i i) その膜においてヒト A M H R I I を発現する細胞の頻度、例えばその膜においてヒト A M H R I I を発現する細胞のパーセント(%)が少なくとも閾値にあるかどうかを決定することにより評価されうる。

30

【 0 0 4 8 】

従って、(i) A M H R I I 結合性剤での癌処置に対して適格性を有さない非婦人科癌患者、すなわち A M H R I I 結合性剤での癌処置に対して非応答性である非婦人科癌患者と、(i i) A M H R I I 結合性剤での癌処置に対して適格性を有する非婦人科癌患者、すなわち A M H R I I 結合性剤での癌処置に対して応答性である非婦人科癌患者との間の区別を可能にする特別な A M H R I I 発現スコア値を決定する為にも使用されうる、更なる方法についても本明細書において記載される。

40

【 0 0 4 9 】

より正確には、上記方法の実施態様に従うと、本明細書に記載されている非婦人科癌に作用された患者で、本明細書に記載されている A M H R I I 結合性剤で抗癌処置されうる患者は、好ましくは A M H R I I 発現スコアが 1 . 0 又はそれ超であることが確認された患者であり得、A M H R I I 発現スコアが 1 . 5 又はそれ超であることが確認された患者を含む。

【 0 0 5 0 】

膜性 A M H R I I 発現スコアは、試験対象の癌細胞による A M H R I I 発現の免疫組織化学的評価に基づきうるが、その場合、所与の癌細胞サンプルに対する個々の膜性 A M H R I I スコアには、(i) A M H R I I 発現が検出不能な場合には「 0 」が割り振られ、

50

(i i) 有意な A M H R I I 発現が検出される場合には「 1 」が割り振られ、及び (i i i) 高い A M H R I I 発現が検出される場合には「 2 」が割り振られ、及び (i v) A M H R I I の過剰発現が検出される場合には「 3 」が割り振られる。

【 0 0 5 1 】

実際、(i) 上記免疫組織化学的評価を通じて膜性 A M H R I I 発現レベルに割り振られたスコアと (i i) 癌細胞 1 個について発現される A M H R I I タンパク質の平均数との間には関連性が存在する。個々の膜性 A M H R I I スコアの割り振りを可能にする膜性 A M H R I I 発現レベルは、非婦人科癌に作用された患者から予め集められた腫瘍細胞のサンプルから開始して、細胞 1 個当たりの膜性 A M H R I I タンパク質の平均数を決定することによりやはり評価されうることも本明細書の実施例において明らかにされる。

10

【 0 0 5 2 】

非婦人科癌に作用された個体の A M H R I I 結合性剤での処置に対する、すなわち抗 A M H R I I 抗体での処置に対する応答性を判断する上記実施態様に従うと、膜性 A M H R I I 発現スコアは、所与の癌細胞サンプルについて、(i) 上記癌細胞サンプル内の A M H R I I 発現細胞の頻度、及び (i i) 上記 A M H R I I 発現細胞による A M H R I I 発現のレベルの両方を考慮することによって決定される。一般的に、所与の癌細胞サンプルの A M H R I I 発現スコアは、下記の式 (I) :

$E \text{ スコア} = F R E Q \times A M H R I I \text{ __ } L E V E L$ 、

によって決定される。ここで、式中

E スコアは、所与の癌細胞サンプルに対する A M H R I I 発現スコア値を意味し、

20

F R E Q は、膜性 A M H R I I 発現が検出される上記癌細胞サンプルに含まれる細胞の頻度を意味し、

A M H R I I __ L E V E L は、上記所与の癌細胞サンプルに含まれる A M H R I I 発現細胞による A M H R I I の発現レベルを意味する。

【 0 0 5 3 】

実例として、(i) 細胞の 5 0 % が A M H R I I を発現し (F R E Q 値 = 0 . 5)、及び (i i) A M H R I I 発現レベル (A M H R I I __ L E V E L) = 2 であるときに、E スコア = 1 . 0 が所与の癌細胞サンプルについて決定される。

【 0 0 5 4 】

好ましい実施態様において、A M H R I I 発現スコア (すなわち E スコア) は、本明細書の実施例に示されるように免疫組織学的方法によって決定される。これらの好ましい実施態様に従うと、A M H R I I 膜発現は、A M H R I I に対して特異的な検出可能抗体を使用すること、並びに (i) 細胞に結合した上記抗 A M H R I I 抗体を有する上記細胞の頻度を決定すること、及び (i i) 上記検出可能抗 A M H R I I 抗体が膜発現した A M H R I I に結合した後に、その抗体により生み出されるシグナルの強度を決定することにより評価される。

30

【 0 0 5 5 】

本明細書の実施例に示されるように、頻度が異なるにもかかわらず、1 . 5 又はそれ超の A M H R I I 発現スコアを有する A M H R I I 発現癌細胞が、様々な癌について確認された。実例として、結腸腫瘍に由来する癌細胞は、A M H R I I 陽性 (すなわち、1 . 5 又はそれ超の A M H R I I スコアを有する) として分類され、頭頸部癌に由来する癌細胞よりも高い頻度を有することを、本発明者等は本明細書に示した。

40

【 0 0 5 6 】

A M H R I I 膜発現のレベルを決定する場合、細胞膜における A M H R I I の検出は、A M H R I I に対して高い親和性及び高い特異性を有する抗 A M H R I I モノクローナル抗体を使用することにより最も好ましく実施されるはずであり、それは 3 C 2 3 K 抗 A M H R I I モノクローナル抗体による実施例において例証される。

【 0 0 5 7 】

更に、A M H R I I スコアを決定するという観点から免疫組織化学的方法により A M H R I I 発現を決定することは、最も好ましくは、上記サンプルを適切な検出試薬 (例えば

50

、高親和性抗AMHRIIモノクローナル抗体、例えばAMHRIIへの結合について55.3 pMのKd値を有するモノクローナル3C23K抗体)と接触させる前に、組織サンプルを慎重に事前処理することと関係する。サンプルを事前処理すれば、細胞表面において発現されるAMHRII分子の検出試薬に対する利用能を高めることができるはずである。実例として、本明細書の実施例において示されるように、染色法は、特別な工程、例えば(i)マイクロウェーブ発生源への曝露により高温で脱蠟する工程、と、(ii)AMHRII結合性の試薬、例えばストレプトアビジンコンジュゲート検出可能試薬とその後複合体化するビオチン化された抗AMHRII抗体、の結合により生み出されるシグナルを増幅する為のシステムとの適切な組み合わせを含む。脱蠟する事前処理工程は、事前の組織固定工程に起因する検出シグナル消衰効果を逆転させるのに重要と思われる。本発明者等は、AMHRII検出可能性は、組織固定工程で使用するホルマリンの作用に対して特に敏感であることを明らかにした。

10

【0058】

本発明の文脈において、これは、AMHRII結合性剤、例えば抗AMHRII抗体は、頭頸部癌に作用された患者を処置することよりも、結腸癌に作用された患者を処置することの方がより高頻度で有用な処置剤となることを意味する。これは、AMHRII結合性剤は、頭頸部癌に作用された患者の処置において意義のある処置剤でありうるものの、特定の患者が本明細書に記載されているAMHRII結合性剤による投与を受けることを判断する際には、腫瘍由来の癌細胞のAMHRII発現について予め試験するのが好ましいことも意味する。

20

【0059】

更に、本発明者等は、抗AMHRII抗体が、非婦人科癌を処置する為に有利に使用されうることを明らかにした。

【0060】

従って、本発明者等は、AMHRIIを標的とする医薬品が、非婦人科癌を予防又は処置する為の新規な処置ツールとして有用であることを、本明細書において明らかにした。

【0061】

本発明に従うと、「を含む(comprising)」という表現、例えば「の工程を含む」、は、「からなる(consisting of)」、例えば「の工程からなる」、としても理解され、「からなる(consisting of)」、例えば「の工程からなる」、としても理解される。

30

【0062】

AMH受容体(AMHR又はAMHR2又はAMHRII)は、TGF-ベータ関連タンパク質に対するII型受容体のファミリーに属する単一の膜貫通ドメインを有するセリン/トレオニンキナーゼである。II型受容体はそれ自体リガンドと結合するが、しかしシグナル伝達にはI型受容体の存在を必要とする。Imbeaudら(1995年, Nature Genet, Vol. 11: 382-388)は、ヒトAMHRII型受容体遺伝子をクローン化した。ヒトAMH受容体タンパク質は、573個のアミノ酸からなる: 573個のアミノ酸のうちの17、127、26、及び403個が、シグナル配列、細胞外ドメイン(ECD: extracellular domain)、膜貫通ドメイン、及びセリン/トレオニンキナーゼドメインを含有する細胞内ドメインをそれぞれ形成する。

40

【0063】

本明細書で使用される場合、語「AMHRII」は、配列番号17のアミノ酸配列を有するヒト抗ミュー管ホルモンII型受容体を云う。

【0064】

抗ミュー管ホルモンホルモン受容体(AMHRII)の発現は、免疫骨髄細胞の大規模な浸潤を受ける腫瘍である婦人科癌の技術分野においてすでに記載されている。AMHRIIは、婦人科癌を処置する為の標的分子として識別されている。AMHRIIを標的とする抗体が、このような癌を処置する為の処置ツールとして製造されている。卵巣癌を処置する為の、PCT出願番号 国際公開第2008/053330号、及び同第2011/141653号に記載されている12G4抗AMHRII抗体及びその変異体、並び

50

に P C T 出願に記載されている 3 C 2 3 K 抗 A M H R I I 抗体が特に引用されうる。抗 A M H R I I 抗体薬物コンジュゲートの使用による卵巣癌に対する特異的処置戦略について開示した P C T 出願番号 国際公開第 2 0 1 7 / 0 2 5 4 5 8 号がまた言及されうる。

【 0 0 6 5 】

本発明者等は、A M H R I I が、結腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、胃腸癌、膀胱癌、膵癌、頭頸部癌、腎臓癌、脂肪肉腫、線維肉腫、胸膜中皮腫、メラノーマ、肉腫、脳癌、骨癌、乳癌、前立腺癌、及び白血病を含む様々なヒト癌細胞の表面において発現していることを、このたび思いがけず見出した。本発明者等は、(i) 癌細胞による A M H R I I 遺伝子発現と、(i i) 同じ癌細胞による細胞膜 A M H R I I タンパク質発現との間に関連性が認められないことをまた見出した。

10

【 0 0 6 6 】

ヒト癌細胞による A M H R I I 表面発現に関する本発明者等の知見は、癌患者から予め得られたヒト固形腫瘍組織サンプルを使用して実施された、抗 A M H R I I 抗体による免疫組織化学アッセイに特に由来する。また、ヒト癌細胞による A M H R I I 表面発現に係る本発明者等の知見は、マウスを対象として、ヒト一次癌細胞の異種移植に由来する腫瘍組織サンプルにおいて実施された、抗 A M H R I I 抗体による免疫組織化学アッセイからも得られた。

【 0 0 6 7 】

本発明者等は、抗 A M H R I I 抗体は、腫瘍細胞表面において A M H R I I を発現する非婦人科ヒト癌、特に本明細書で開示される A M H R I I 発現癌を処置する為に有用であることも明らかにした。特に、良好な抗癌活性が、細胞毒性分子にコンジュゲートした抗 A M H R I I 抗体を含むイムノコンジュゲートにより明らかにされている。

20

【 0 0 6 8 】

本発明者等は、当技術分野において A M H R I I 発現性の婦人科癌に対して証明済みの抗腫瘍能力を有した抗 A M H R I I 抗体は、A M H R I I 発現性の非婦人科癌、特に本明細書で開示される A M H R I I 発現癌の予防又は処置にも有用であることを明らかにした。

【 0 0 6 9 】

より正確には、3 C 2 3 K と命名された抗 A M H R I I 抗体は、ヒト肝臓癌に対してイン・ビボ (i n v i v o) で抗腫瘍活性を発揮することが、本明細書の実施例において明らかにされる。重要なこととして、ヒト肝臓癌に対する抗 A M H R I I 3 C 2 3 K 抗体のイン・ビボ (i n v i v o) の抗腫瘍活性は、肝臓癌、特に肝細胞癌を処置する為の周知である抗癌剤であるソラフェニブと同程度の活性である。

30

【 0 0 7 0 】

なお更に、本明細書の実施例はまた、抗 A M H R I I 3 C 2 3 K 抗体は、イン・ビボ (i n v i v o) で検出可能な毒性イベントを誘発しないが、同じイン・ビボ (i n v i v o) 条件でソラフェニブで処置すると、有意な体重減少を引き起こしたことを明らかにした。

【 0 0 7 1 】

また更に、本明細書に開示されている通り、抗 A M H R I I 3 C 2 3 K 抗体の毒性のイムノコンジュゲート誘導体 (A D C は抗体薬物コンジュゲートを表す) は、細胞表面において A M H R I I タンパク質を発現する癌に対する良好な抗癌活性を発揮する。

40

【 0 0 7 2 】

従って、本発明は、結腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、胃腸癌、膀胱癌、膵癌、頭頸部癌、腎臓癌、脂肪肉腫、線維肉腫、胸膜中皮腫、メラノーマ、肉腫、脳癌、骨癌、乳癌、前立腺癌、及び白血病を含む癌の群から選択される癌の予防又は処置に使用する為のヒト A M H R I I 結合性剤に関する。

【 0 0 7 3 】

本発明はまた、結腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、胃腸癌、膀胱癌、膵癌、頭頸部癌、腎臓癌、脂肪肉腫、線維肉腫、胸膜中皮腫、メラノーマ、肉腫、脳癌

50

、骨癌、乳癌、前立腺癌、及び白血病含む癌の群から選択される癌の予防又は処置を目的とする医薬を調製する為のヒトAMHRII結合性剤の使用に関する。

【0074】

本発明はまた、結腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、胃腸癌、膀胱癌、膵癌、頭頸部癌、腎臓癌、脂肪肉腫、線維肉腫、胸膜中皮腫、メラノーマ、肉腫、脳癌、骨癌、乳癌、前立腺癌、及び白血病を含む癌の群から選択される癌を予防又は処置する方法であって、それを必要としている個体に本明細書で開示されるAMHRII結合性剤を投与する工程を含む上記方法に関する。

【0075】

本発明に従い使用されうるAMHRII結合性剤は、MIS天然リガンド活性の模倣を必要としない。従って、本発明に従い使用されうるAMHRII結合性剤は、それがAMHRIIに結合する際に、何らかの細胞シグナル伝達経路を活性化させるという必要性は認められない。むしろ、上記薬剤は、抗AMHRII細胞毒性免疫コンジュゲート、ADC誘発性若しくはADC誘発性の抗AMHRII抗体、又はAMHRII結合性の操作された受容体を発現するCAR-T細胞を含む、細胞毒性誘発活性、例えば細胞毒性誘発物、をもつばら目的として使用されるので、上記薬剤がAMHRIIに結合する能力が唯一必要とされる。

【0076】

AMHRII結合性剤

本明細書で使用される場合、AMHRII結合性剤は、AMHRIIに特異的に結合する任意の薬剤を含み、適切に提示された場合、上記薬剤が細胞膜発現型AMHRIIに結合した後に、細胞表面においてAMHRIIを発現する標的細胞の死を引き起こす。

【0077】

本明細書に記載されている癌の処置で使用されるAMHRII結合性剤は、本明細書において「処置用AMHRII結合性剤」とも呼ばれうる。

【0078】

一般的に、AMHRII結合性剤は、AMHRIIに特異的に結合するタンパク質又は核酸を包含する。

【0079】

AMHRII結合性タンパク質は、抗AMHRII抗体、又は抗AMHRII抗体のAMHRII結合性フラグメントに由来する1以上の相補性決定領域(CDR: Complementary Determining Region)を含むタンパク質を主に包含し、上記AMHRII結合性タンパク質は、操作された細胞、例えばCAR-T細胞、CAR-NK細胞又はCARマクロファージ、により、キメラ抗原受容体(CAR: Chimeric Antigen Receptor)として発現されうるものと理解される。

【0080】

AMHRII結合性核酸は、AMHRIIに対するその特異的結合特性について特に選択された核酸アプタマーを主に包含する。

【0081】

幾つかの好ましい実施態様において、AMHRII結合性剤は、抗AMHRII抗体又はそのAMHRII結合性フラグメントである。

【0082】

最も好ましい実施態様において、AMHRII結合性剤は、抗AMHRIIモノクローナル抗体又はそのAMHRII結合性フラグメントである。

【0083】

これらの好ましい実施態様に従うと、抗AMHRIIモノクローナル抗体は、キメラ抗AMHRII抗体、ヒト化抗AMHRII抗体、及びヒトAMHRII抗体、並びにAMHRII結合性フラグメント、及びそのAMHRII結合性誘導体を包含する。

【0084】

様々なAMHRII抗体が、当技術分野において公知であり、且つAMHRII結合性

10

20

30

40

50

剤として本発明に従い使用されうる。本発明を実施する為に、当業者は、例証的には、Creative Biolabs社によって参照番号MHH-57として上市されている組換えヒト抗AMHRIIを使用しうる。

【0085】

幾つかの実施態様において、本発明に従い使用されうる抗AMHRII抗体は、PCT出願番号 国際公開第2008/053330号で開示されるヒト化12G4抗体である。

【0086】

幾つかのその他の実施態様において、上記抗AMHRII抗体は、PCT出願番号 国際公開第2011/141653号に記載されているヒト化抗体であり、そのヒト化抗体は3C23抗体並びにその変異体を含み、その変異体は3C23Kヒト化抗体を含む。

10

【0087】

なお更なる実施態様において、上記抗AMHRII抗体は、PCT出願番号 国際公開第2017/025458号に記載されている抗体である。これらの更なる実施態様に従うと、PCT出願番号 国際公開第2017/025458号は、上記抗AMHRII抗体が細胞毒性剤とリンクしている抗体薬物コンジュゲート(ADC)の形態にあるAMHRII結合性剤を開示した。

【0088】

ミュー管ホルモンII型受容体に対するモノクローナル抗体(及びそのヒト化誘導体)が、卵巣癌の処置を目的として当技術分野において開発されている(本明細書により参考としてそのまま援用されている欧州特許第2097453B1号明細書及び米国特許第8,278,423号明細書を参照)。

20

【0089】

本発明に従い使用されうるAMHRII結合性剤の中でも、当業者は、モノクローナル抗体12G4(mAb 12G4)、又はADCを形成する為に薬物若しくは検出可能な標識と共に誘導体化されたそのような抗体を含む、そのキメラ若しくはヒト化変異体を使用しうる。mAb 12G4を産生するハイブリドーマは、2006年9月26日付けのブダペスト条約の合意に基づき、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(CNCM、パスツール研究所、25 rue du Docteur Roux、75724 Paris Cedex 15、フランス)に保管されており、CNCM寄託番号1-3673を有する。mAb 12G4の軽鎖及び重鎖の可変ドメインは、mAb 12G4の相補性決定領域(CDR)と同様に配列決定されている(本明細書により参考としてそのまま援用されている欧州特許第2097453B1号明細書及び米国特許第8,278,423号明細書を参照)。mAb 12G4及びそのキメラ又はヒト化変異体は、本明細書に開示されている通り、ADCの製造で使用可能である。

30

【0090】

PCT出願番号 PCT/FR2011/050745号(国際公開番号 国際公開第2011/141653号)、及び米国特許第9,012,607号明細書は、そのそれぞれが本明細書により参照によってそのまま組み込まれており、マウス12G4抗体に由来する新規のヒト化抗体について開示する。このようなヒト化抗体は、本発明の目的に照らし、AMHRII結合性剤として使用されうる。PCT出願番号 国際公開第2011/141653号で開示される特別な実施態様において、抗体は、3C23及び3C23Kとして識別される抗体である。このような抗体の核酸配列及びポリペプチド配列は、本明細書において配列番号1~16として提供される。本発明の幾つかの観点において、目的とする抗AMHRII抗体は、「配列番号~を含む軽鎖、及び配列番号~を含む重鎖を含む」と呼ばれうる。従って、様々な実施態様において、特に好ましい抗体は、ADCの生成用を含め、

40

a) 配列番号2を含む軽鎖及び配列番号4を含む重鎖(リーダーを有さない3C23VL及びVH配列)；

50

b) 配列番号 6 を含む軽鎖及び配列番号 8 を含む重鎖 (リーダーを有さない 3 C 2 3 K V L 及び V H 配列) ;

c) 配列番号 10 を含む軽鎖及び配列番号 12 を含む重鎖 (リーダーを有さない 3 C 2 3 軽鎖及び重鎖) ;

d) 配列番号 14 を含む軽鎖及び配列番号 16 を含む重鎖 (リーダーを有さない 3 C 2 3 K 軽鎖及び重鎖)

を含む。

【0091】

その他の抗体 (例えば、ヒト化又はキメラ抗体) は、図 1 A 及び図 1 B に提示される重鎖及び軽鎖配列 (例えば、抗体、例えば図内に開示される C D R 配列を含有するヒト化又はキメラ抗体) に基づくことができ、A D C の形成を含め、それを目的として抗 M A H R I I 結合性剤として使用されることができる。従って、本発明はまた、下記の配列を含む (又はそれからなる) 複数の C D R を含む / 含有する抗 A M H R I I 抗体の使用に関する

10

C D R L - 1 : R A S X 1 X 2 V X 3 X 4 X 5 A (配列番号 65)、ここで、X 1 及び X 2 は独立して S 又は P であり、X 3 は R 又は W 又は G であり、X 4 は T 又は D であり、及び X 5 は I 又は T である ;

C D R L - 2 は、P T S S L X 6 S (配列番号 66) であり、ここで、X 6 は K 又は E である ; 並びに、

C D R L - 3 は、L Q W S S Y P W T (配列番号 67) である ;

20

C D R H - 1 は、K A S G Y X 7 F T X 8 X 9 H I H (配列番号 68) であり、ここで、X 7 は S 又は T であり、X 8 は S 又は G であり、及び X 9 は Y 又は N である ;

C D R H - 2 は、W I Y P X 10 D D S T K Y S Q K F Q G (配列番号 69) であり、ここで、X 10 は G 又は E である、並びに、

C D R H - 3 は、G D R F A Y (配列番号 70) である。

【0092】

本発明はまた、本明細書において特定されている非婦人科癌を処置する為の、そのような抗 A M H R I I 抗体を使用して生成される A D C の使用に関する。

【0093】

本出願の範囲内にある抗体 (例えば、キメラ又はヒト化の抗体) は、下記の表に開示される抗体を含む : 代替的には、A M H R - I I に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体が、A D C を調製する為に使用されることができる。3 C 2 3 K 抗体は、

30

V H アミノ酸配列について配列番号 19

V L アミノ酸配列について配列番号 36

によって定義される。

【0094】

下記の表 1 は、本発明に従い使用されうる抗 A M H R I I ヒト化抗体をリストする。

【0095】

【表 1】

表 1 : 抗AMHRII抗体

| 抗体 | 突然変異 | | | |
|-------|--------|-----------------|--------|-----------------|
| | VH突然変異 | 配列リスト内の 配列番号 | VL突然変異 | 配列リスト内の 配列番号 |
| 3C23K | | 19 | | 36 |
| 3C23 | | 19 | L-K55E | 37 |

| 抗体 | 突然変異 | | | |
|---------|----------------|-----------------|----------------------|-----------------|
| | VH突然変異 | 配列リスト内の 配列番号 | VL突然変異 | 配列リスト内の 配列番号 |
| 3C23KR | H-R3Q | 20 | | 36 |
| 6B78 | H-R3Q | 20 | L-T48I, L-P50S | 38 |
| 5B42 | H-R3Q, H-T73A | 21 | L-T48I, L-K55E | 39 |
| K4D-24 | H-Q1R | 22 | | 36 |
| 6C59 | H-Q1R | 22 | L-S27P, L-S28P | 40 |
| K4D-20 | H-Y32N | 23 | | 36 |
| K4A-12 | H-A16T | 24 | | 36 |
| K5D-05 | H-S31G | 25 | | 36 |
| K5D-14 | H-T28S | 26 | | 36 |
| K4D-123 | H-R44S | 27 | | 36 |
| K4D-127 | H-I69T | 28 | | 36 |
| 6C07 | H-I69T | 28 | L-M4L, L-T20A | 41 |
| 5C14 | H-I69F | 29 | | 36 |
| 5C26 | H-V67M | 30 | L-S27P | 42 |
| 5C27 | H-L45P | 31 | | 36 |
| 5C60 | H-E10K, H-K12R | 32 | | 36 |
| 6C13 | H-G53E | 33 | | 36 |
| 6C18 | H-T93A | 34 | | 36 |
| 6C54 | H-S84P | 35 | L-M4L, L-S9P, L-R31W | 43 |
| K4D-25 | | 19 | L-M4L | 44 |
| K4A-03 | | 19 | L-I33T | 45 |
| K4A-08 | | 19 | L-M4L, L-K39E | 46 |

10

20

30

40

| 抗体 | 突然変異 | | | |
|--------|--------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| | VH突然変異 | 配列リスト内の 配列番号 | VL突然変異 | 配列リスト内の 配列番号 |
| K5D-26 | | 19 | L-T22P | 47 |
| 5C08 | | 19 | L-Y32D | 48 |
| 5C10 | | 19 | L-S27P | 42 |
| 5C18 | | 19 | L-Q37H | 49 |
| 5C42 | | 19 | L-G97S | 50 |
| 5C44 | | 19 | L-S12P | 51 |
| 5C52 | | 19 | L-19A | 52 |
| 5C56 | | 19 | L-T72A | 53 |
| 6C03 | | 19 | L-R31W | 54 |
| 6C05 | | 19 | L-M4L, L-M39K | 55 |
| 6C16 | | 19 | L-I2N | 56 |
| 6C17 | | 19 | L-G63C, L-W91C | 57 |
| 6C28 | | 19 | L-R31G | 58 |
| 725C02 | | 19 | L-I75F | 59 |
| 725C17 | | 19 | L-I2T | 60 |
| 725C21 | | 19 | L-I2T, L-K42R | 61 |
| 725C33 | | 19 | L-Y49H | 62 |
| 725C42 | | 19 | L-M4L, L-T20S, L-K39E | 63 |
| 725C44 | | 19 | L-S27P | 42 |
| 725C57 | | 19 | L-T69P | 64 |

10

20

30

40

50

抗 A M H R I I 抗体、抗 A M H R I I 抗体の A M H R I I 結合性フラグメント又は A M H R I I 結合性誘導体

語「抗体」は、最も広い意味で使用され、モノクローナル抗体（完全長又は天然のモノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多価抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び所望の生物学的活性を示す限り、抗体フラグメント（下記参照）を含む。

【 0 0 9 7 】

従って、本明細書で使用される場合、語「抗体」は、例として、限定されることなく、任意の脊椎動物、例えば哺乳動物、例えばヒト、ヤギ、ウサギ、及びマウス、において免疫応答期間中に産生される I g A、I g D、I g E、I g G、及び I g M、その組み合わせ、及び類似した分子、並びに非哺乳動物の種、例えばサメ免疫グロブリン、を含む、免疫グロブリン又は免疫グロブリン様の分子を全体として指す。別途特に指摘されない限り、語「抗体」は、A M H R I I に特異的に結合し、その他の分子（すなわち、A M H R I I とは無関係である分子）との結合を実質的に排除する天然の免疫グロブリン及び「抗体フラグメント」又は「抗原結合性フラグメント」を含む。語「抗体」はまた、遺伝子操作された形態、例えばキメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）、ヘテロコンジュゲート抗体（例えば、二重特異性抗体）、を含む。P i e r c e 社のカタログ及びハンドブック、1 9 9 4 - 1 9 9 5 (P i e r c e C h e m i c a l C o . 社、R o c k f o r d、1 1 1) ; K u b y, J., I m m u n o l o g y, 7th E d., W. H. F r e e m a n & C o., N e w Y o r k, 2013年をまた参照。

【 0 0 9 8 】

本明細書で使用される場合、語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、微量に存在しうる自然に生じる突然変異の可能性はあるものの、それを除き同一である。モノクローナル抗体は、きわめて特異的であり、単一の抗原を標的とする。更に、異なる決定要素（エピトープ）を標的とする異なる抗体を一般的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定要素を標的とする。修飾語「モノクローナル」は、任意の特別な方法による抗体の製造を必要とするとは解釈されない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al, Nature 256:495 (1975年)により最初に記載されたハイブリドーマ法により作成されうる、又は組換え D N A 法により作成されうる（例えば、米国特許第 4, 8 1 6, 5 6 7 号明細書を参照）。「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson et al, Nature 352:624-628 (1991年) or Marks et al, J. Mol Biol. 222:581-597 (1991年)に記載されている技術を使用してファージ抗体ライブラリーからも単離されうる。

【 0 0 9 9 】

語「抗体フラグメント」は、天然の抗体の一部分を云い、また天然の抗体の抗原決定可変領域を云う。抗体フラグメントの例は、F a b、F a b'、F (a b')₂、及び F v フラグメント、直鎖抗体、s c F v 抗体、及び抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 0 0 】

本明細書で使用される場合、「抗体重鎖」は、抗体が自然に生じる立体構造を有するとき、その全抗体分子中に存在する 2 種類のポリペプチド鎖のうちのより大きな方を云う。

【 0 1 0 1 】

本明細書で使用される場合、「抗体軽鎖」は、抗体が自然に生じる立体構造を有するとき、その全抗体分子中に存在する 2 種類のポリペプチド鎖のうちのより小さい方を云い、及び 軽鎖は 2 つの主要な抗体軽鎖アイソタイプを云う。

【 0 1 0 2 】

本明細書で使用される場合、語「相補性決定領域」又は「C D R」は、特定の抗原を認識し、それに結合する抗体の 2 つの可変性の鎖（重鎖及び軽鎖）の部分を云う。C D R は、可変性の鎖の最も可変性の部分であり、抗体にその特異性を付与する。可変性の重鎖（

VH) 及び可変性の軽鎖 (VL) のそれぞれには3つのCDRが存在し、従って抗体分子1個当たり合計6つのCDRが存在する。CDRは、抗原のエピトープと結合する役割を主に有する。各鎖のCDRは、CDR1、CDR2、及びCDR3と一般的に呼ばれ、N末端から開始し連続して番号付けされ、また所定のCDRが位置する鎖によっても識別されるのが一般的である。従って、VHCDR3は、それが見出される抗体の重鎖の可変ドメインに位置する一方、VLCDR1は、それが見出される抗体の軽鎖の可変ドメインに由来するCDR1である。LHRと結合する抗体は、特定のVH領域及びVL領域の配列、従って特定のCDR配列を有する。異なる特異性(すなわち、異なる抗原に対する異なる結合性部位)を有する抗体は、異なるCDRを有する。抗体間で異なるのはCDRであるが、CDR内の限定された数のアミノ酸位置のみが抗原結合に直接関与する。CDR内のこのような位置は、特異性決定残基(SDR: specificity determining residue)と呼ばれる。

10

【0103】

「フレームワーク領域」(以下、FR)は、CDR残基以外の可変ドメイン残基である。各可変ドメインは、FR1、FR2、FR3、及びFR4として識別される4つのFRを一般的に有する。CDRが、Kabattに従い定義される場合、軽鎖FR残基は残基1~23(LCFR1)、35~49(LCFR2)、57~88(LCFR3)、及び98~107(LCFR4)あたりに配置され、また重鎖FR残基は、重鎖残基内の残基1~30(HCFR1)、36~49(HCFR2)、66~94(HCFR3)、及び103~113(HCFR4)あたりに配置される。

20

【0104】

「単鎖Fv」又は「scFv」抗体フラグメントは、抗体のVH及びVLドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般的に、Fvポリペプチドは、VHドメインとVLドメインとの間にポリペプチドリナーを更に含み、同リンカーはscFvが抗原と結合する為の所望の構造を形成するのを可能にする。scFvをレビューするには、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994年)を参照すること。

【0105】

語「ダイアボディ」は、2つの抗原結合性部位を有する小さな抗体フラグメントを云い、そのフラグメントは、同一のポリペプチド鎖(VH及びVL)内で、軽鎖可変ドメイン(VL)と繋がった重鎖可変ドメイン(VH)を含む。同一の鎖上において2つのドメイン間で対形成可能となるには短すぎるリンカーを使用することにより、それらのドメインは、別の鎖の相補的なドメインと対形成することを強いられ、2つの抗原結合性部位を創出する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404,097号明細書; 国際公開第93/11161号; 及びHollinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993年)により十分に記載されている。

30

【0106】

ダイアボディ又は二重特異性抗体は、免疫グロブリンG(IgG)様分子と非IgG様分子の2つの分類に概ね分割されることができる。IgG様bsAbは、Fc媒介式のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)、補体依存性細胞毒性(CDC: complement-dependent cytotoxicity)、及び抗体依存性細胞食作用(ADCP: antibody-dependent cellular phagocytosis)、を保持する(Spiess et al., 2015年, Mol Immunol., Vol. 67(2): 95-106)。bsAbのFc領域は、精製を容易にし、また溶解度及び安定性を改善する。IgG様フォーマットの二重特異性抗体は、そのより大きなサイズ及びFcRn媒介式のリサイクリングに起因してより長い血清半減期を通常有する(Kontermann et al., 2015年, Bispecific antibodies. Drug Discov Today Vol. 20(7): 838-47)。非IgG様のbsAbは、サイズがより小型であり、組織貫通性が強化されている(Kontermann et al., 2015年, Bispecific antibodies. Drug Discov To

40

50

day Vol. 20(7) : 838-47)。

【0107】

幾つかの好ましい実施態様に従うと、本発明に従う二重特異性抗体は、(i) AMHRII と結合する第1の抗原結合性部位、及び(ii) AMHRII とは異なる標的抗原、特に癌細胞又は腫瘍微環境の免疫細胞、例えばT細胞、NK又はマクロファージ、により発現されうる標的抗原と結合する第2の抗原結合性部位を備える。幾つかの実施態様において、そのような二重特異性抗体では、上記第2の抗原結合性部位は、CD3である標的抗原と結合し、T細胞の関与を可能にする。この標的抗原は、PD1がT細胞又はCD16をロック解除してNK又はマクロファージを活性化させることも可能にする。

【0108】

本明細書で定義されるモノクローナル抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の部分が、特定の種に由来する、又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体内の対応する配列と同一又は相同である一方、鎖(複数可)の残りの部分は、別の種に由来する、又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体内の対応する配列と同一又は相同である「キメラ」抗AMHRII抗体(免疫グロブリン)、並びに所望の生物学的活性を示す限り、そのような抗体のフラグメントを特に含む(米国特許第4,816,567号明細書;及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :6851-6855 (1984年))。

【0109】

本明細書で定義されるモノクローナル抗体は、ヒト化抗AMHRII抗体も含む。ヒト以外(例えば、マウス)の抗体の「ヒト化」形態は、ヒト以外の免疫グロブリンに由来する最低限度の配列を含有するキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高度可変領域に由来する残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するヒト以外の種(ドナー抗体)、例えばマウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類、の高度可変領域に由来する残基に置き換わっているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。幾つかの事例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、対応するヒト以外の残基に置き換わっている。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体において見出されない残基を含みうる。このような改変は、抗体性能を更に精緻化する為になされる。一般的に、ヒト化抗体は、高度可変ループのすべて又は実質的にすべてが、ヒト以外の免疫グロブリンの高度可変ループに対応し、FR領域のすべて又は実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリン配列のFR領域である、少なくとも1つ、一般的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含む。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)、一般的にはヒト免疫グロブリンのFcの少なくとも一部分も任意選択で含む。更なる詳細については、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986年); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988年); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992年)を参照すること。

【0110】

本明細書で定義されるモノクローナル抗AMHRII抗体は、抗AMHRIIヒト抗体を更に含む。「ヒト抗体」は、ヒトにより産生される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有し、及び/又は本明細書に開示されるヒト抗体を作成する為の任意の技術を使用して作成された抗体である。ヒト抗体のこの定義は、ヒト以外の抗原結合性残基を含むヒト化抗体を特に除外する。ヒト抗体は、当技術分野において公知の様々な技術を使用して製造されることができる。1つの実施態様において、ヒト抗体はファージライブラリーから選択され、その場合、ファージライブラリーがヒト抗体を発現する(Vaughan et al Nature Biotechnology 14:309-314 (1996年); Sheets et al Proc. Natl. Acad. Sci. 95:6157-6162 (1998年)); Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol, 227:381 (1991年); Marks et al, J. Mol. Biol, 222:581 (1991年))。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を遺伝子導入動物、例えば内因性の免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されているマウスに導入することによって作成されることができる。免疫を誘発すると、遺伝子の再配列、アセンブリ、及び抗体レバ

10

20

30

40

50

ートリーを含むあらゆる点で、ヒトに認められるものに酷似しているヒト抗体生成が観察される。このアプローチは、例えば、米国特許第 5,545,807 号明細書；同第 5,545,806 号明細書；同第 5,569,825 号明細書；同第 5,625,126 号明細書；同第 5,633,425 号明細書；同第 5,661,016 号明細書、及び下記の科学出版物：Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992年)；Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994年)；Morrison, Nature 368:812-13 (1994年)；Fishwild et al., Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996年)；Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996年)；Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995年)に記載されている。或いは、ヒト抗体は、標的抗原を標的とする抗体を産生するヒト B リンパ球の不活化により調製されうる（そのような B リンパ球は個体から回収されうる、又は *in vitro* で免疫化される場合もある）。例えば、Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985年)；Boerner et al., J. Immunol, 147 (1):86-95 (1991年)；及び米国特許第 5,750,373 号明細書を参照すること。

10

20

30

40

50

【0111】

本明細書で使用される場合、「抗体突然変異体」又は「抗体変異体」は、種依存性抗体のアミノ酸残基のうちの 1 以上が改変されている、種依存性抗体のアミノ酸配列変異体を云う。そのような突然変異体は、種依存性抗体と 100% に欠ける配列同一性又は類似性を必然的に有する。1 つの実施態様において、抗体突然変異体は、種依存性抗体の重鎖又は軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列と少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 85%、より好ましくは少なくとも 90%、及び最も好ましくは少なくとも 95%、のアミノ酸配列同一性又は類似性を有するアミノ酸配列を有する。この配列に関する同一性又は類似性は、配列をアライメントし、配列同一性のパーセント (%) が最大となるように、必要な場合にはギャップを導入した後の、種依存性抗体残基と同一である（すなわち、同一残基）、又は類似している（すなわち、一般的な側鎖特性に基づき同一の群に属するアミノ酸残基、下記参照）候補配列内のアミノ酸残基のパーセント (%) として本明細書において定義される。可変ドメイン外の抗体配列の N 末端、C 末端、又は内部において延長、欠損、又は挿入があっても、いずれも配列同一性又は類似性に影響を及ぼすとはみなされない。

【0112】

ヒト化抗体は、当技術分野において公知の技術に従い、CDR ドメインをコードする核酸配列を取得し、ヒト化抗体を構築すること製造されうる。従来の組換え DNA 及び遺伝子トランスフェクション技術に基づくヒト化抗体を製造する為の方法は当技術分野において周知である（例えば、Riechmann L. et al. 1988年；Neuberger M. S. et al. 1985を参照）。抗体は、例えば、CDR - グラフティング（欧州特許第 239,400 号明細書；PCT 公報 国際公開第 91/09967 号；米国特許第 5,225,539 号明細書；同第 5,530,101 明細書；及び同第 5,585,089 明細書）、ペニヤリング又はリサーフェイシング（欧州特許第 592,106 号明細書；同第 519,596 号明細書；Padlan E. A. (1991)；Studnicka G. M. et al. (1994年)；Roguska M. A. et al. (1994年)）、及びチェーンシャフリング（米国特許第 5,565,332 号明細書）を含む、当技術分野において公知の様々な技術を使用してヒト化されることができる。そのような抗体を調製する為の一般的な組換え DNA 技術も公知である（欧州特許出願 欧州特許第 125023 号明細書及び国際特許出願 国際公開第 96/02576 号を参照）。

【0113】

例えば、抗体の抗原依存性細胞媒介性細胞毒性 (ADCC) 及び / 又は補体依存性細胞毒性 (CDC) を増強する為に、本明細書で定義される抗 AMHRII 抗体をエフェクター機能に関して改変するのが望ましい場合もある。これは、抗体の Fc 領域内に 1 以上のアミノ酸置換を導入することにより達成されうる。代替的又は付加的に、システイン残基（複数可）が Fc 領域に導入され得、これによりこの領域における鎖間ジスルフィド結合

形成が可能となる。そのように生成されるホモ二量体抗体は、改善した内部移行能力、並びに / 又は増加した補体媒介式の細胞殺傷及び抗体依存性細胞性細胞毒性活性 (A D C C) を有しうる。Caron et al, J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992年) and Shope s, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照。抗腫瘍活性が強化されたホモ二量体抗体は、Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993年)に記載されるように、ヘテロ二機能性架橋剤を使用しても調製されうる。或いは、デュアル F c 領域を有し、これにより強化された補体溶解及び A D C C 能力を有しうる抗体が操作されることができる。Stevenson et al. Anti- Cancer Drug Design 3:219-230 (1989年)を参照。国際公開第 0 0 / 4 2 0 7 2 号 (P r e s t a , L .) は、ヒトエフェクター細胞の存在下で A D C C 機能が改善している抗体で、その F c 領域内にアミノ酸置換を含む抗体について記載する。好ましくは、A D C C が改善している抗体は、F c 領域の位置 2 9 8、3 3 3、及び / 又は 3 3 4 において置換を含む (E u の残基ナンバリング)。好ましくは、変化した F c 領域は、これらの位置の 1、2、又は 3 箇所において置換を含む又はそれからなるヒト I g G 1 F c 領域である。そのような置換は、C I q 結合及び / 又は C D C を増加させる置換 (複数可) と組み合わせられる。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 4 】

C I q 結合性及び / 又は補体依存性細胞毒性 (C D C) が変化している抗体は、国際公開第 9 9 / 5 1 6 4 2 号、米国特許第 6 , 1 9 4 , 5 5 1 B 1 号、同第 6 , 2 4 2 , 1 9 5 B 1 号、同第 6 , 5 2 8 , 6 2 4 B 1 号、及び同第 6 , 5 3 8 , 1 2 4 号 (I d u s o g i e ら) に記載されている。抗体は、その F c 領域のアミノ酸位置 2 7 0、3 2 2、3 2 6、3 2 7、3 2 9、3 1 3、3 3 3、及び / 又は 3 3 4 のうちの 1 以上においてアミノ酸置換を含む (E u の残基ナンバリング)。

【 0 1 1 5 】

幾つかの実施態様において、A M H R I I 結合性剤は、糖鎖工学によって操作された (glyco-engineered) 抗 A M H R I I 抗体を含む。

【 0 1 1 6 】

本明細書で使用される場合、語「糖鎖工学によって操作する (glycoengineering) 」は、結合性タンパク質組成物のグリコフォームプロファイルを変化させる為の当該技術分野において承認されている任意の方法を云う。そのような方法は、宿主細胞 (例えば、C H O 細胞) が異種のグリコシルトランスフェラーゼ又はグリコシダーゼを発現するように遺伝子操作され、その遺伝子操作された宿主細胞内で結合性タンパク質組成物を発現させることを含む。その他の実施態様において、糖鎖工学法は、特定のグリコフォームプロファイルに偏った条件下で宿主細胞を培養することを含む。

【 0 1 1 7 】

本明細書で使用される場合、「糖鎖工学によって操作された抗体」は、(i) ハイパーガラクトシル化 F c フラグメントを含む抗体、(i i) アマンノシル化 F c フラグメント含む、ハイポマンノシル化 F c フラグメントを含む抗体、及び (i i i) アフコシル化 F c フラグメントを含む、ハイポフコシル化 F c フラグメントを含む抗体を含む。本明細書で使用される場合、糖鎖工学によって操作されたフラグメントは、下記の変化したグリコシル化：(i) ハイパーガラクトシレーション、(i i) ハイポマンノシレーション、及び (i i i) ハイポフコシレーションのうちの 1 以上を含む群内から選択される変化したグリコシル化を有する F c フラグメントを含む。従って、本発明に従い使用される抗 A M H R I I 抗体に由来する、糖鎖工学によって操作された F c フラグメントは、ハイパーガラクトシル化、ハイポマンノシル化、及びハイポフコシル化 F c フラグメントの例を含む。

【 0 1 1 8 】

当業者は、非改変型 F c フラグメントよりも高い親和性を伴いながら F c 受容体に結合することが公知である、ハイパーガラクトシル化 F c フラグメント、ハイポマンノシル化 F c フラグメント、及びハイポフコシル化 F c フラグメントを含む抗 A M H R I I 抗体を取得する為の周知技術を参照しうる。

【 0 1 1 9 】

糖鎖工学によって操作された抗AMHRII抗体は、「低フコース」Fcフラグメントとも呼ばれるハイポフコシル化Fcフラグメントを含む抗AMHRII抗体を含む。

【0120】

イムノコンジュゲート、特に抗体薬物コンジュゲート(ADC)

本発明の為に使用されうるAMHRII結合性剤は、細胞毒性剤、例えば化学療法剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物、若しくは動物起源の酵素的に活性な毒素又はその断片)、又は放射性同位体(すなわち、ラジオコンジュゲート)、にコンジュゲートした、本明細書で定義される抗体を含む。そのような抗体コンジュゲートは、PCT出願番号 国際公開第2017/025458号に記載されているコンジュゲートを含む。PCT出願番号 国際公開第2017/025458号は、抗AMHRII 3C23K抗体、並びに 3C23K ADCコンジュゲートについて特に開示したが、それらについて、非婦人科ヒト癌に対するイン・ビボ(in vivo)での抗癌活性が本明細書において明らかにされる。

10

【0121】

細胞毒性剤は、酵素的に活性な毒素を含む。使用されることができ酵素的に活性な毒素及びその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性の活性な断片、エキソトキシンA鎖(緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、-サルシン、シナアブラギリ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ダイアンシントンタンパク質、アメリカヤマゴボウ(*Phytolacca americana*)タンパク質(PAP I、PAP II、及びPAP-S)、ニガウリ(*Momordica charantia*)阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ(*Saponaria officinalis*)阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコセセンスを含む。

20

【0122】

様々な放射性核種が、ラジオコンジュゲート抗体を製造する為に利用可能である。

【0123】

抗体と細胞毒性剤とのコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えばPCT出願番号 国際公開第2017/025458号において開示されているカップリング剤、を使用して作成される。

【0124】

抗AMHRII ADC抗体コンジュゲートの好ましいイムノコンジュゲートは、PCT出願番号 国際公開第2017/025458号に記載されているコンジュゲートである。

30

【0125】

CAR T細胞、CAR NK細胞、及びCARマクロファージを含むCAR細胞

幾つかの実施態様において、ヒトAMHRII結合性剤は、AMHRII結合性受容体、又はAMHRII結合性受容体を発現する細胞、特にAMHRII結合性受容体を発現する、CAR T細胞、AMHRII結合性受容体CAR NK細胞又はAMHRII結合性受容体を発現するCARマクロファージ、である。

【0126】

従って、幾つかの実施態様において、ヒトAMHRII結合性剤は、AMHRII結合性の操作された受容体、最も好ましくは、そのAMHRII結合性領域が本明細書で開示されるモノクローナル抗AMHRII抗体に由来する、AMHRII結合性の操作された受容体、である。

40

【0127】

一般的に、AMHRII結合性の操作された受容体は、(i)細胞外ドメイン、(ii)膜貫通ドメイン、及び(iii)細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR: Chimeric Antigen Receptor)から構成され、その場合、細胞外ドメインは、本明細書で開示される抗AMHRIIモノクローナル抗体に由来するAMHRII結合性部分である。幾つかの実施態様において、上記AMHRII結合性の操作された受容体の細胞外ドメインは、(i)本明細書で開示される抗AMHRIIモノクローナル抗体に由来するCD

50

Rを含む抗体VH鎖、及び(i i)本明細書で開示される抗AMHRIIMモノクローナル抗体に由来するCDRを含む抗体VL鎖を含む。幾つかの実施態様において、上記AMHRII結合性の操作された受容体の細胞外ドメインは、本明細書で開示される抗AMHRIIMモノクローナル抗体のVH鎖及びVL鎖を含む。幾つかの実施態様において、上記AMHRII結合性の操作された受容体の細胞外ドメインは、本明細書で開示される抗AMHRIIMモノクローナル抗体のVH鎖及びCH鎖に由来するCDRをそれぞれ含むScFvである。幾つかの実施態様において、上記AMHRII結合性の操作された受容体の細胞外ドメインは、本明細書で開示される抗AMHRIIMモノクローナル抗体のVH鎖及びCH鎖をそれぞれ含むScFvである。

【0128】

そのようなAMHRII結合性受容体を発現する細胞、特にそのようなAMHRII結合性受容体を発現する、CAR T細胞、CAR NK細胞又はCARマクロファージからなるAMHRII結合性剤、がまた本明細書に包含される。

【0129】

本明細書で使用される場合、語「キメラ抗原受容体」(CAR)は、抗原に結合する能力を有する細胞外ドメイン、細胞外ドメインの起源であるポリペプチドとは異なるポリペプチドに由来する膜貫通ドメイン、及び少なくとも1つの細胞内ドメインを含む融合タンパク質を云う。「キメラ抗原受容体(CAR)」は、時に「キメラ受容体」、「T-ボディ」、又は「キメラ免疫受容体(CIR: chimeric immune receptor)」と呼ばれる。「AMHRIIに結合する能力を有する細胞外ドメイン」は、AMHRIIに結合することができる任意のオリゴペプチド又はポリペプチドを意味する。「細胞内ドメイン」は、細胞内でシグナルを伝達して生物学的プロセスの活性化又は阻害を引き起こすドメインとして機能することが知られている任意のオリゴペプチド又はポリペプチドを意味する。「膜貫通ドメイン」は、細胞膜に分布することが知られており、また細胞外ドメインとシグナリングドメインとをリンクさせるように機能することができる任意のオリゴペプチド又はポリペプチドを意味する。キメラ抗原受容体は、細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間のリンカーとして機能する「ヒンジドメイン」を任意選択で含みうる。

【0130】

CAR T細胞は、単鎖抗体フラグメント(s c F v)又はリガンドがT細胞の活性化を促進する能力を有するT細胞シグナリングドメインに連結している、遺伝子操作された自系のT細胞である(Maher, J. (2012年) ISRN Oncol.2012:278093; Curran, K.J. et al. (2012年) J. Gene Med.14:405-415; Fedorov, V.D. et al. (2014年) Cancer J.20:160-165; Barrett, D.M. et al. (2014年) Annu. Rev. Med. 65:333-347)。

【0131】

「細胞内シグナリングドメイン」は、T細胞内部に見出される、又は見出されるように操作されたCARの部分の意味する。「細胞内シグナリングドメイン」は、T細胞の原形質膜内でCARを繋ぎ止める「膜貫通ドメイン」を含有する場合もあれば、含有しない場合もある。1つの実施態様において、「膜貫通ドメイン」及び「細胞内シグナリングドメイン」は、同一のタンパク質(例えば、CD3)に由来するが、その他の実施態様において、細胞内シグナリングドメイン及び膜貫通ドメインは、異なるタンパク質に由来する(例えば、CD3の膜貫通ドメイン及びCD28分子の細胞内シグナリングドメイン、又はその逆)。

【0132】

「同時刺激エンドドメイン」は、T細胞同時刺激分子に由来する細胞内シグナリングドメイン又はそのフラグメントを意味する。T細胞同時刺激分子の非限定的なリストは、CD3、CD28、OX-40、4-1BB、CD27、CD270、CD30、及びICOSを含む。同時刺激エンドドメインは、同一の又は異なる同時刺激エンドドメインに由来する膜貫通ドメインを含む場合もあれば、含まない場合もある。

【0133】

「細胞外抗原結合性ドメイン」は、AMHRIIを特異的に認識し、それと結合するCARの部分を意味する。

【0134】

好ましい実施態様において、「細胞外結合性ドメイン」は、抗AMHRIIモノクローナル抗体に由来する。例えば、「細胞外結合性ドメイン」は、モノクローナル抗体に由来するFabドメインの全部又は一部を含みうる。特定の実施態様において、「細胞外結合性ドメイン」は、特定の抗AMHRIIモノクローナル抗体の相補性決定領域を含む。なお別の実施態様において、「細胞外結合性ドメイン」は、本明細書で定義される抗AMHRIIモノクローナル抗体から得られる単鎖可変性フラグメント(scFv)である。

【0135】

好ましい実施態様において、細胞外結合性ドメインは、本明細書に記載されている抗AMHRIIモノクローナル抗体のうちの任意の1つ、特に3C23K抗AMHRIIモノクローナル抗体に由来する。

【0136】

I. 細胞外抗原結合性ドメイン

1つの実施態様において、本発明のCARは、本明細書に記載されている抗AMHRIIモノクローナル抗体のうちの1つに由来する細胞外抗原結合性ドメインを含む。

【0137】

1つの実施態様において、細胞外結合性ドメインは、下記のCDR配列を含む：

CDRL-1は、RASX1X2VX3X4X5A（配列番号65）であり、ここで、X1及びX2は独立にS又はPであり、X3はR又はW又はGであり、X4はT又はDであり、及びX5はI又はTであり；

CDRL-2は、PTSSLX6S（配列番号66）であり、ここで、X6は、K又はEであり；

CDRL-3は、LQWSSYPWT（配列番号67）であり；

CDRH-1は、KASGYX7FTX8X9HIH（配列番号68）であり、ここで、X7はS又はTであり、X8はS又はGであり、X9はY又はNであり、

CDRH-2は、WIYPX10DDSTKYSEQKFG（配列番号69）であり、ここで、X10はG又はEであり、

CDRH-3は、GDRFAY（配列番号70）である。

【0138】

II. Mab scFvのVLドメインとVHドメインとの間のリンカー

更なる実施態様において、抗AMHRII VLは、可撓性リンカーを介して抗AMHRII VHとリンクしている。特に、可撓性リンカーは、約10～30個のアミノ酸（例えば、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、又は5個のアミノ酸）からなるグリシン/セリンリンカーであり、構造(Gly4Ser)³を含む。

【0139】

III. 細胞外抗原結合性ドメインと細胞内シグナリングドメインとの間のスペーサー

細胞外抗原結合性ドメインは、「スペーサー」の使用により、細胞内シグナリングドメインとリンクしている。スペーサーは、抗原の認識及びそれとの結合が容易となるように抗原結合性ドメインが配向可能となるのに十分可撓性であるように設計される。スペーサーは、抗AMHRII免疫グロブリンそれ自体に由来しうるが、またIgG1ヒンジ領域、又はIgGのCH2及び/若しくはCH3領域を含みうる。

【0140】

IV. 細胞内シグナリングドメイン

細胞内シグナリングドメインは、CD3鎖の全部又は一部を含む。CDは、CD247としても知られているが、CD4又はCD8のT細胞コレセプターと共に、細胞外抗原認識を細胞内シグナルカスケードに結びつける役割を有する。

【0141】

10

20

30

40

50

C D 3 シグナリングドメインを含めることに付加して、同時刺激分子を組み込むことにより、マウスモデル及び臨床トライアルにおいてC A R T細胞活性が増強することが明らかにされている。C D 2 8、4 - I B B、I C O S、C D 2 7、C D 2 7 0、C D 3 0、及びO X - 4 0を含むいくつかが検討されている。

【0142】

特定の実施態様において、(i) 単離された細胞の集団にC A Rをコードする核酸配列を形質導入する工程と、(i i) 工程(i) の上記核酸配列が瑕疵なく形質導入された細胞の部分集団を選択する工程とを含む、或いはそれらの工程から実質的になるC A R 発現細胞を生み出す方法が開示される。幾つかの実施態様において、単離された細胞は、T細胞、動物のT細胞、哺乳動物のT細胞、ネコのT細胞、イヌのT細胞、又はヒトのT細胞であり、これによりC A R T細胞が生成する。特定の実施態様において、単離された細胞は、N K細胞、例えば動物のN K細胞、哺乳動物のN K細胞、ネコのN K細胞、イヌのN K細胞、又はヒトのN K細胞であり、これによりC A R N K細胞が生成する。

10

【0143】

C A R T細胞、C A R N細胞、及びC A Rマクロファージの療法への応用

本明細書に記載されているC A R T細胞、C A R N K細胞、及びC A Rマクロファージを含むC A R細胞は、非婦人科のA M H R I I 発現腫瘍を処置する為に使用されうる。本発明のC A R細胞は、好ましくは本明細書に記載されている1つの癌に作用された患者内のA M H R I I 発現腫瘍を処置する為に使用される。好ましい実施態様において、本発明のC A R細胞は、好ましくは結腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、胃腸癌、膀胱癌、膵癌、頭頸部癌、腎臓癌、脂肪肉腫、線維肉腫、胸膜中皮腫、メラノーマ、肉腫、脳癌、骨癌、乳癌、前立腺癌、及び白血病を含む群から選択される癌を処置する為に使用される。

20

【0144】

本発明のC A R細胞は、単独で、或いは賦形剤、公知の抗癌処置薬、及び/又はその他のコンポーネント、例えばサイトカイン若しくは免疫賦活性であるその他の細胞集団、と組み合わせて投与されうる。

【0145】

本開示の方法の観点では、それを必要としている対象において腫瘍の増殖を阻害し、及び/又はそれを必要としている癌患者を処置する方法と関連する。幾つかの実施態様において、腫瘍は、固形腫瘍である。幾つかの実施態様において、腫瘍/癌は、甲状腺、乳房、卵巣、又は前立腺の腫瘍/癌である。

30

【0146】

本明細書に開示されるC A R細胞は、単独で、或いは賦形剤、公知の抗癌処置薬、及び/又はその他のコンポーネント、例えばサイトカイン若しくは免疫賦活性であるその他の細胞集団、と組み合わせて投与されうる。C A R細胞は、第1ライン、第2ライン、第3ライン、第4ライン、又は更なる療法でありうる。C A R細胞は、その他の療法と組み合わせられることができる。そのような療法の非限定的な例は、化学療法剤又は生物学的製剤を含む。適切な処置レジメンは、処置担当医師又は獣医師によって決定される。

【0147】

本発明のC A Rを含む医薬組成物は、処置される又は阻止される疾患に適する方式で投与されうる。適切な用量は臨床トライアルにより決定され得、投与の量及び頻度は、患者の状態、並びに患者の疾患の型及び重症度等の因子によって決定されるだろう。

40

【0148】

療法への応用

本明細書で別途すでの開示されているように、(i) 本明細書で開示される抗A M H R I I 抗体、(i i) 本明細書で開示される抗体薬物コンジュゲート、及び(i i i) 本明細書で開示されるC A R細胞(C A R T細胞、C A R N K細胞、及びC A Rマクロファージを含む)を含む、本明細書で開示されるA M H R I I 結合性剤は、非婦人科のA M H R I I 発現癌、特に結腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、胃腸癌、膀

50

膀胱癌、膵癌、頭頸部癌、腎臓癌、脂肪肉腫、線維肉腫、胸膜中皮腫、メラノーマ、肉腫、脳癌、骨癌、乳癌、前立腺癌、及び白血病を含む群から選択される癌を予防又は処置する為に使用されうる有効成分からなる。

【0149】

抗腫瘍抗原抗体又は抗腫瘍抗原CAR細胞を利用する癌処置法は、当業者に周知である。

【0150】

幾つかの実施態様において、癌患者は、AMHRII結合性剤、例えば抗AMHRII抗体、抗AMHRIIADC、抗AMHRIICART細胞、抗AMHRIICARNL細胞、又は抗AMHRIICARマクロファージ、での処置を実施する前に、患者の腫瘍細胞がAMHRIIをその表面において発現しているか判断する為に試験される。

10

【0151】

AMHRIIの膜発現を検出する為のそのような予備的なテストは、低頻度でAMHRIIを発現する癌の処置にとって好ましい。対照的に、AMHRIIの膜発現を検出する為のそのような予備的なテストは、高頻度でAMHRIIを発現する癌の処置では実施されない場合もある。

【0152】

従って、幾つかの実施態様において、本発明は、結腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、胃腸癌、膀胱癌、膵癌、頭頸部癌、腎臓癌、脂肪肉腫、線維肉腫、胸膜中皮腫、メラノーマ、肉腫、脳癌、骨癌、乳癌、前立腺癌、及び白血病を含む群から選択されるAMHRII陽性癌に作用された個体の予防又は処置に使用する為の本明細書で定義されるAMHRII結合性剤に関する。

20

【0153】

本発明は、結腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、胃腸癌、膀胱癌、膵癌、頭頸部癌、腎臓癌、脂肪肉腫、線維肉腫、胸膜中皮腫、メラノーマ、肉腫、脳癌、骨癌、乳癌、前立腺癌、及び白血病を含む群から選択されるAMHRII陽性癌に作用された個体の予防又は処置用の医薬を調製する為のAMHRII結合性剤の使用に関する。

【0154】

本発明はまた、結腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、胃腸癌、膀胱癌、膵癌、頭頸部癌、腎臓癌、脂肪肉腫、線維肉腫、胸膜中皮腫、メラノーマ、肉腫、脳癌、骨癌、乳癌、前立腺癌、及び白血病を含む群から選択されるAMHRII陽性癌に作用された個体を予防又は処置する方法であって、上記個体に抗AMHRII結合性剤を投与する工程を含む上記方法に関する。

30

【0155】

個体から予め得られた癌組織サンプル上で細胞表面AMHRIIタンパク質発現を検出する方法を実施することにより、上記個体は、AMHRII陽性癌に作用された個体として指定されうる。細胞表面AMHRIIタンパク質発現の検出は、当業者に周知である様々な方法に従い実施されうる。細胞表面AMHRIIタンパク質発現の検出法は、特に本明細書の実施例において例証される免疫組織化学法並びに蛍光活性化セルソーティング法を含む。

40

【0156】

本発明はまた、個体が、AMHRII結合性剤での癌処置に対して適格性を有する（すなわち、反応性である）かを判断する方法であって、上記個体から予め得られた腫瘍組織サンプルが細胞表面においてAMHRIIタンパク質を発現するか決定する工程を含む上記方法に関する。

【0157】

従って、本発明はまた、結腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、胃腸癌、膀胱癌、膵癌、頭頸部癌、腎臓癌、脂肪肉腫、線維肉腫、胸膜中皮腫、メラノーマ、肉腫、脳癌、骨癌、乳癌、前立腺癌、及び白血病を含む群から選択される癌に作用された個

50

体が、AMHRII結合性剤での癌処置に対して適格性を有する、すなわちAMHRII結合性剤での癌処置に対して応答性であるか判断する為の方法であって、

a) 上記患者から得られた癌細胞がその膜でAMHRIIを発現しているか決定する工程と、

b) 上記癌細胞によるAMHRIIの膜発現が工程a)において確認された場合には、上記患者は、AMHRII結合性剤での癌処置に対して適格性を有する、すなわちAMHRII結合性剤での癌処置に対して応答性であると結論付ける工程とを含む上記方法に関する。

【0158】

上記方法の好ましい実施態様において、(i) AMHRII発現スコア値が工程a)において決定されるとき、及び(ii) 上記AMHRII発現スコア値が閾値スコア値又はそれ超であるとき、上記患者は、AMHRII結合性剤での癌処置に対して適格性を有する(すなわち、反応性である)と、工程b)において結論される。AMHRIIスコア値は、最も好ましくは、本明細書で別途記載されている式(I)を使用することにより計算される。

【0159】

従って、好ましい実施態様に従うと、方法の工程a)は、免疫組織化学法、例えば本明細書の実施例において示される方法、により実施される。

【0160】

工程a)において使用される癌細胞は、上記癌患者から予め集められた生検組織サンプルに由来するのが一般的である。

【0161】

好ましくは、工程a)は、本明細書に特に記載されているもののなかから選択された抗AMHRII抗体、特に3C23K抗体を使用することにより実施され、そのAMHRII結合性は、周知の抗体検出技術、例えば本明細書の実施例において開示される技術、に従い、二次標識抗体を使用することにより検出されうる。

【0162】

好ましくは、
下記の式(I)：

$$E \text{ スコア} = FREQ \times AMHRII_LEVEL$$

(式中、

Eスコアは、所与の癌細胞サンプルに対するAMHRII発現スコア値を意味し、

FREQは、膜AMHRII発現が検出される上記癌細胞サンプルに含まれる細胞の頻度を意味し、

AMHRII_LEVELは、上記所与の癌細胞サンプルに含まれるAMHRII発現細胞によるAMHRIIの発現レベルを意味する)

に従い、Eスコア値の決定を可能にするスコアリング法を実施したときに、上記癌患者に由来する癌細胞サンプルにおいて、AMHRII発現スコア値1.0又はそれ超、最も好ましくはAMHRII発現スコア値1.5又はそれ超、と決定されたとき、上記癌の群に含まれる癌に作用された患者は、AMHRII結合性剤での癌処置に対して適格性を有するものとして判断される、すなわちAMHRII結合性剤での癌処置に対して応答性であるものと判断される。

【0163】

本発明は更に、結腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、胃腸癌、膀胱癌、膵癌、頭頸部癌、腎臓癌、脂肪肉腫、線維肉腫、胸膜中皮腫、メラノーマ、肉腫、脳癌、骨癌、乳癌、前立腺癌、及び白血病を含む群から選択される癌に作用された患者を処置する為の方法であって、

a) 上記個体から予め得られた腫瘍組織サンプルが、細胞表面においてAMHRIIタンパク質を発現するか決定する工程と、

b) AMHRIIの細胞表面発現が工程a)において確認された場合には、上記個体

10

20

30

40

50

を、AMHRII結合性剤で処置する工程とを含む上記方法に関する。

【0164】

幾つかの好ましい実施態様において、上記腫瘍サンプルが、上記式(I)に従い計算されたAMHRII発現スコア値(Eスコア)について、1.0又はそれ超(1.5又はそれ超のEスコア値を含む)を有するとき、AMHRII発現が工程a)において確認される。

【0165】

上記方法の最も好ましい実施態様において、上記AMHRII結合性剤は、本明細書で定義される抗AMHRII抗体若しくはそのフラグメント、又は本明細書で定義されるCAR細胞(例えば、CAR T細胞若しくはCAR NK細胞)からなる。

10

【0166】

幾つかの実施態様において、上記AMHRII結合性剤は、唯一の抗癌有効成分として使用される。

【0167】

幾つかのその他の実施態様において、上記AMHRII結合性剤による抗癌処置は、上記個体に、放射線療法処置及び化学療法処置を含む1以上の更なる抗癌処置を実施することを含む。

【0168】

従って、そのようなその他の実施態様に従うと、上記AMHRII結合性剤による抗癌処置は、上記個体に1以上の更なる抗癌有効成分を投与することを含む。

20

【0169】

従って、本明細書に記載されている使用の為のAMHRII結合性剤の幾つかの実施態様に従うと、上記AMHRII結合性剤は、別の抗癌処置と組み合わせられており、例えば1以上の他の抗癌活性剤と組み合わせられている。

【0170】

「抗癌剤」は、例えば、高分子(DNA、RNA、タンパク質等)の生合成を妨害する、又は細胞の増殖を阻害する、又はアポトーシス又は細胞毒性により細胞死をもたらすことができる任意の分子として定義される。抗癌剤のなかでも、アルキル化剤、トポイソメラーゼ阻害剤、及び挿入剤、代謝抵抗物質、切断試薬、チューブリンを妨害する薬剤、モノクローナル抗体が言及されうる。

30

【0171】

特別な観点に従うと、本発明は、薬学的に許容されるビヒクルと組み合わせて、有効成分として、抗癌剤、及びAMHR-IIに結合する抗体、特に本明細書に記載されている抗AMHRII抗体、を含む医薬組成物に関する。

【0172】

「薬学的に許容されるビヒクル」は、生体系、例えば細胞、細胞培養物、組織、又は微生物、と適合性である無毒性の物質を云う。

【0173】

幾つかの実施態様において、本発明は、薬学的に許容されるビヒクルと組み合わせて、有効成分として、抗癌剤、及びAMHR-IIに結合する抗体、特に本明細書に記載されている抗AMHRII抗体、を含む医薬組成物に関する。

40

【0174】

幾つかの実施態様において、本発明は、薬学的に許容されるビヒクルと組み合わせて、有効成分として、抗癌剤、及びAMHR-IIに結合する抗体を含む医薬組成物であって、該抗癌剤が、ドセタキセル、シスプラチン、ゲムシタピン、及びシスプラチンとゲムシタピンの組み合わせを含む群から選択される、上記医薬組成物に関する。

【0175】

抗AMHRII抗体と組み合わせて使用されうる他の抗癌剤は、パクリタキセル、又は白金塩、例えばオキサリプラチン、シスプラチン、及びカルボプラチン、を包含する。

50

【0176】

抗癌剤はまた、白金塩、小分子、モノクローナル抗体、さもないと抗血管新生ペプチボディ以外の化学療法剤から選択されうる。

【0177】

白金塩以外の化学療法剤は、挿入剤（DNAの複製及び転写を遮断する）、例えばアントラサイクリン（ドキソルビシン、PEG化されたりボソームドキソルビシン）、トポイソメラーゼ阻害剤（カンプトテシン及び誘導体：カレニテシン、トポテカン、イリノテカン）、さもないとS J G - 136、ヒストンデアセチラーゼの阻害剤（ポリノスタット、ベリノスタット、パルプロ酸）、アルキル化剤（ベンダムスチン、ゲルホスファミド、テモゾロミド）、抗有糸分裂性植物アルカロイド、例えばタキサン（ドセタキセル、パクリタキセル）、ピンカアルカロイド（ビノレルビン）、エポチロン（Z K - エポチロン、イクサベピロン）、代謝抵抗物質（ゲムシタビン、エラシタラビン、カベシタビン）、キネシンスピンドルタンパク質（K S P）阻害剤（イスピネシブ）、トラベクテジン、さもないとオンブラプリン（コンプレタスタチンA - 4誘導体）を含む。

【0178】

小分子の中では、ポリ（ADP - リボース）ポリメラーゼ（PARP）阻害剤：オラパリブ、イニパリブ、ベリパリブ、ルカパリブ、CEP - 9722、MK - 4827、BMN - 673、キナーゼ阻害剤、例えばチロシンキナーゼ阻害剤（TKI）が挙げられ、そのなかでも、抗VEGFR分子（ソラフェニブ、スニチニブ、セジラニブ、バンデタニブ、パゾパニブ、BIBF 1120、セマクサニブ、カボザンチニブ、モテサニブ）、抗HER2 / EGF分子（エルロチニブ、ゲフィチニブ、ラパチニブ）、抗PDGFR分子（イマチニブ、BIBF 1120）、抗FGFR分子（BIBF 1120）、オーロラキナーゼ / チロシンキナーゼ阻害剤（ENMD - 2076）、Src / Ablキナーゼ阻害剤（サラカチニブ）、又はベリホシン、テムシロリムス（mTOR阻害剤）、アルボシジブ（サイクリン依存性キナーゼ阻害剤）、ボラセルチブ（PLK1（polo様キナーゼ1）タンパク質の阻害剤）、LY2606368（チェックポイントキナーゼ1（chk1）の阻害剤）、GDC - 0449（ヘッジホッグ経路阻害剤）、ジボテンタン（ETA受容体のアンタゴニスト）、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ（プロテアソーム阻害剤）、サイトカイン、例えばIL - 12、IL - 18、IL - 21、INF - 、INF - 、が言及されうる。

【0179】

抗体のなかでも、抗VEGF：ベバシズマブ、抗VEGFR：ラムシルマブ、抗HER2 / EGF分子：トラスツズマブ、ベルツズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、MGAH22、マツズマブ、抗PDGFR：IMC - 3G3、抗葉酸受容体：ファールツズマブ、抗CD27：CDX - 1127、抗CD56：BB - 10901、抗CD105：TRC105、抗CD276：MGA271、抗AGS - 8：AGS - 8M4、抗DRS：TRA - 8、抗HB - EGF：KHK2866、抗メソテリン：アマツキシマブ、BAY94 - 9343（免疫毒素複合体）、カツマキシマブ（EpCAM / CD3二重特異性抗体）、抗IL2R：ダクリズマブ、抗IGF - 1R：ガニツマブ、抗CTLA - 4：イピリムマブ、抗PD1：ニボルマブ及びペンブロリズマブ、抗CD47：Weissman社B6H12及びHu5F9、Novimmune社5A3M3、INHIBRX2A1、Frazier社VxP037 - 01LC1抗体、抗Lewis Y：Hu3S193、SGN - 15（免疫毒素複合体）、抗CA125：オレゴボマブ、抗HGF：リロツムマブ、抗IL6：シルツキシマブ、抗TR2：ティガツズマブ、抗51インテグリン：ボロキシマブ、抗HB - EGF：KHK2866が言及されうる。抗血管新生ペプチボディは、AMG386及びCVX - 241より選択される。

【0180】

より具体的には、薬学的に許容されるビヒクル、抗癌剤、及びAMHR - IIに結合する抗体と組み合わせて、有効成分として含む医薬組成物が、本明細書において記載され、その場合、該抗癌剤は、ドセタキセル、シスプラチン、ゲムシタビン、及びシスプラチン

とゲムシタピンとの組み合わせを含む群から選択される。

【0181】

よりいっそう具体的には、本明細書では、薬学的に許容されるビヒクルと組み合わせて、有効成分として、抗癌剤、及びAMHR-I Iに結合する抗体を含む医薬組成物であって、突然変異したヒト化モノクローナル抗体が本明細書において3C23Kと呼ばれ、該抗癌剤が、ドセタキセル、シスプラチン、ゲムシタピン、及びシスプラチンとゲムシタピンの組み合わせを含む群から選択される、上記医薬組成物が記載される。

【0182】

本明細書に開示されるAMHR-I I結合性剤、特に本明細書に開示される抗AMHR-I I抗体、は、経口投与、皮下投与、及び静脈内投与を含む様々な方法で投与されうる。

10

【0183】

語「処置有効量」は、哺乳動物において疾患又は障害を処置する為に有効な薬剤の量を云う。癌の場合、薬物の処置有効量は、癌細胞の数を低下させ；腫瘍サイズを低下させ；癌細胞が末梢臓器に浸潤するのを阻害し（すなわち、ある程度低速化させ、好ましくは停止させ）；腫瘍転移を阻害し（すなわち、ある程度低速化させ、好ましくは停止させ）；腫瘍増殖をある程度阻害し；及び/又は障害と関連した症状のうちの1以上をある程度緩和しうる。薬物が増殖を阻止し、及び/又は既存の癌細胞を殺傷しうる範囲で、薬物は、細胞増殖抑制性及び/又は細胞毒性でありうる。癌療法では、イン・ビボ（*in vivo*）での有効性は、例えば、生存期間、無増悪生存（PFS: progression free survival）期間、応答率（RR: response rate）、応答期間、及び/又は生活の質、を評価することにより測定されることができる。

20

【0184】

本発明に従って使用される薬剤の処置用製剤（例えば、抗体）は、任意選択的な薬学的に許容される担体、添加物、又は安定剤{Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980年)}と共に、所望の純度を有する抗体を混合することにより、凍結乾燥された製剤又は水溶液の形態で保管用として調製される。許容される担体、添加物、又は安定剤は、レシipientに対して採用された用量及び濃度において非毒性であり、バッファー、例えばホスフェート、シトレート、及びその他の有機酸；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメチウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチル又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペントノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、又はデキストリンを含むその他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロース、又はソルビトール；造塩性対イオン、例えばナトリウム；金属錯体{例えば、Zn-タンパク質複合体}；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えばツイーン（TWEEN）（商標）、プルロニック（PLURONICS）（商標）、又はポリエチレングリコール（PEG）、を含む。

30

40

【0185】

有効成分は、例えばコアセルベーション技術により、又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中、コロイド薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル）中、或いはマクロエマルジョン中に封入されうる。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980年)に開示されている。

【0186】

50

イン・ビボ (in vivo) での投与で使用される製剤は無菌でありうる。これは、滅菌濾過膜を通じた濾過により容易に実現される。

【0187】

別の特別な観点において、本発明は、抗癌剤、及びAMHR-ⅠⅠに結合する抗体を含む、本明細書に記載されている非婦人科癌を予防又は処置する際に医薬品として使用される組成物であって、静脈内又は腹腔内経路により投与することを目的とする製剤としての上記組成物に関する。

【0188】

別の特別な観点において、本発明は、抗癌剤及びAMHR-ⅠⅠに結合する抗体を含む、本明細書に記載されている非婦人科癌を予防又は処置する際に医薬品として使用される組成物であって、モノクローナル抗体及び該抗癌剤が、分離、同時、又は連続して投与することを目的とする、上記組成物に関する。

10

【0189】

抗体及び抗癌剤は、1つの同じ医薬組成物内で組み合わせられうる、又は同時若しくは連続して投与されうる、分離した医薬組成物の形態で使用されうる。特に、製品は分離して、すなわち同時に、又は例えば時間間隔を設けて独立に投与されうる。

【0190】

より具体的には、本発明は、抗癌剤及びAMHR-ⅠⅠに結合する抗体を含む、本明細書に記載されている非婦人科癌を予防又は処置する際に医薬品として使用される組成物であって、上記抗体及び該抗癌剤が、同一の医薬組成物内で組み合わされている、上記組成物に関する。

20

【0191】

別の特別な観点に従うと、本発明は、抗癌剤及びAMHR-ⅠⅠに結合する抗体を含む、本明細書に記載されている非婦人科癌を予防又は処置する際に医薬品として使用される組成物であって、患者に投与される抗AMHRⅠⅠ抗体の処置有効量が、約0.07mg～約35000mg、好ましくは約0.7mg～約7000mg、好ましくは約0.7mg～約1400mg、好ましくは約0.7mg～約700mg、より好ましくは約0.7mg～約70mg、の範囲内にある上記組成物に関する。

【0192】

別の特別な観点に従うと、本発明は、抗癌剤及びAMHR-ⅠⅠに結合する抗体を含む、本明細書に記載されている非婦人科癌を予防又は処置する際に医薬品として使用される組成物であって、患者に投与される抗癌剤の処置有効量が、約10mg～約700mgの範囲内、好ましくは約20mg～約350mg、の範囲内にあり、好ましくは約110mgである、上記組成物に関する。

30

【0193】

別の特別な観点に従うと、本発明は、抗癌剤及びAMHR-ⅠⅠに結合する抗体を含む、本明細書に記載されている非婦人科癌を予防又は処置する際に医薬品として使用される組成物であって、患者に投与される抗体の処置有効量が約70mgであり、患者に投与される抗癌剤の用量が約110mgである、上記組成物に関する。

【0194】

本発明は、下記の実施例により更に例示されるが、いかなる場合においてもそれに限定されない。

40

【実施例1】

【0195】

実施例1：差次的なAMHRⅠⅠ遺伝子発現及びAMHRⅠⅠタンパク質発現

A. 材料及び方法

A. 1. 細胞株及び培養

COV434 WT細胞株 (ECACC 番号 07071909) が、10%のFBS、ペニシリン (100U/ml)、及びストレプトマイシン (100µg/ml) で補充されたDMEM/Glutamax (Gibco社) 内で維持された。400µg/mlの

50

ジェネテシス (Gibco 社) が、COV434 MISRII トランスフェクト細胞株に添加された。赤白血病 K562 細胞株 (ATCC (登録商標) CCL-243 (商標) が、10% の FBS 及びペニシリン/ストレプトマイシンで補充された IMDM 培地 (Sigma-Aldrich 社) 内、懸濁状態で培養され、T75 フラスコ内、細胞 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個/ml の間の密度において維持された。OV90 細胞株 (ATCC (登録商標) CRL-11732 (商標)、卵巣漿液性腺癌) が、最終濃度 1.5 g/l の重炭酸ナトリウムを含有する MCDB105 培地 (Sigma-Aldrich 社) と、15% の FBS 及びペニシリン/ストレプトマイシンで補充された、最終濃度 2.2 g/l の重炭酸ナトリウムを含有する培地 199 (Sigma-Aldrich 社) との 1:1 混合物中で培養された。NCI-H295R 細胞株 (副腎皮質癌、ATCC (登録商標) CRL-2128 (商標)) が、iTSS⁺ Premix (Corning 社)、2.5% の Nu-Serum (Falcon 社)、及びペニシリン/ストレプトマイシンで補充された DMEM:F12 培地 (Sigma-Aldrich 社) 内で維持された。細胞は、8% の CO_2 を含む加湿雰囲気、37 °C において増殖され、そして培地は、細胞株に応じて 1 週間に 1 回又は 2 回交換された。

【0196】

A. 2. RT-qPCR による AMHR2 mRNA の相対的定量

RNA の抽出。 $1 \sim 5 \times 10^6$ 個の細胞ペレットから得られた全 RNA が、製造業者の指示に従い、Trizol (登録商標) Plus RNA Purification Kit (Ambion 社) を使用して調製された。要するに、フェノール/クロロホルム抽出後、溶解した細胞の RNA がシリカマトリックスに吸着され、DNAse 処理され、次に $30 \mu\text{l}$ の RNAse フリーの水で洗浄及び溶出された。RNA 濃度及び品質は、分光光度計 (NanoDrop、ThermoFisher Scientific 社) を用いて評価された。

【0197】

cDNA 合成。Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Ambion 社)、及びオリゴ dT プライマーを使用して、プライミングについて 25 °C で 10 分間、及び逆転写について 50 °C で 15 分間、その後逆転写酵素の不活性化について 85 °C で 5 分間インキュベーションすることにより、RNA ($1 \mu\text{g}$) が逆転写された。

【0198】

定量的 PCR。最終体積が $20 \mu\text{l}$ の Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Ambion 社) を使用して、96 ウェルマイクロプレート内、Light Cycler 480 (Roche 社) において定量的 PCR が実施された。下記のプライマーが使用された：AMHR2 の場合、フォアワード 5' - TCTGGATGGCACTGGTGCTG - 3' (配列番号 71)、及びリバー 5' - AGCAGGGCCAAAGATGATGCT - 3' (配列番号 72)；TBP の場合、フォアワード 5' - TGCACAGGAGCCAAAGAGTGAA - 3' (配列番号 73)、及びリバー 5' - CACATCACAGCTCCCCACCA - 3' (配列番号 74)。cDNA テンプレート (RNA 100 ng に相当) 及び下記のプロトコール：UDG 事前処理、50 °C で 2 分間；変性、95 °C で 10 分間；その後、95 °C で 15 秒間 / 60 °C で 30 秒間 / 70 °C で 30 秒間からなる 40 回のサイクル、を使用して増幅が実施された。ゲノム DNA 及び二量体プライマーの存在しないことを管理する為に、各実験の終了時に融解曲線分析が実施された。cDNA サンプル及び対照 (「無テンプレートサンプル」及び「無逆転写産物 RNA」) のそれぞれが二重で試験された。サイクル閾値 (C_t) の平均値が計算され、AMHR2 の相対的定量 (RQ) が、 2^{-C_t} (式中、 $C_t = C_{t_{\text{sample}}} - C_{t_{\text{calibrator}}}$ 、及び $C_t = C_{t_{\text{AMHR2}}} - C_{t_{\text{TBP}}}$) として表された。HCT116 サンプルが、キャリブレーションとして、TBP が標準化用の 하우스キーピング遺伝子として使用された。

【0199】

下記の表 2 は、上記 Q - P C R 法を使用した試験細胞株内の A M H R I I 発現レベルを表す。

【 0 2 0 0 】

【表 2】

表 2

| 細胞株 | Ct _{amhr2} の 平均値 | Ct _{TBP} の 平均値 | RQ |
|-----------|------------------------------|----------------------------|-------|
| HCT116 | 34.27 | 22.25 | 1 |
| COV434 WT | 31.34 | 22.82 | 11.3 |
| K562 | 25.31 | 21.36 | 268.7 |
| NCI-H295R | 26.16 | 22.83 | 413.0 |
| OV90 | 25.65 | 22.67 | 526.4 |

10

【 0 2 0 1 】

20

A . 3 . フローサイトメトリー分析による膜 A M H R 2 発現の評価

蛍光活性化セルソーティング (F A C S) 分析では、細胞 4×10^5 個を、 $25 \mu\text{g} / \text{ml}$ の 3 C 2 3 K と共に 4 で 30 分間インキュベートした。P B S - B S A (2 %) を用いて洗浄した後、蛍光物質にコンジュゲートした抗種二次抗体により一次抗体が検出された。3 C 2 3 K が、フィコエリトリンにコンジュゲートした抗ヒト F (a b ') ₂ により検出された (1 : 1 0 0 0 、 B e c k m a n - C o u l t e r 社、I M 0 5 5 0) 。 P B S で洗浄した後、再懸濁された細胞の F A C S 分析が、B D A c c u r i (商標) C 6 フローサイトメーター (B D B i o s c i e n c e 社) の F L 2 チャンネルにおいて実現された。

【 0 2 0 2 】

30

B . 結果

結果は図 2 に示される。結果は、C O V 4 3 4 - W T 細胞株はヒト A M H R I I タンパク質について明白な膜発現レベルを有するものの、組換え細胞株 C O V 4 3 4 - W T の A M H R I I 遺伝子発現レベルは、細胞株 N C I - H 2 9 5 R について測定された A M H R I I 遺伝子発現レベルの約 3 % に過ぎないことを示した。

【 0 2 0 3 】

このような結果は、A M H R I I 遺伝子発現と膜 A M H R I I タンパク質発現との間において、厳密には相関関係が認められないことを示した。

【 0 2 0 4 】

実施例 2 : 非婦人科癌 (ヒト腫瘍サンプル) における A M H R I I 発現

40

A . 材料及び方法

A . 1 . 目的

ビオチン化された 3 C 2 3 K モノクローナル抗体を使用して抗ミューラー管ホルモン受容体 2 型 (A M H R 2) の発現を検出する為の、マウス (P D X) を対象としたヒト癌細胞異種移植の免疫組織化学試験。

【 0 2 0 5 】

A . 2 . プロトコール及び試験法

細胞株 : ホルムアルデヒド酢酸アルコール (A F A) 中において、セルブロックの構成で固定化された。

ヒト腫瘍 : 外部サンプルについてホルマリン中で固定、及びキュリー研究所 (C u r i

50

e Institute) から入手したスライドについて A F A 中で固定

免疫組織化学 (IHC: Immunohistochemistry) 技術は、サンプルを脱蠟し、pH 9 でアンマスキングした後に可能であった (EZ Retriever マイクロウェーブ中、90 で 15 分間、その後 20 分間冷却)。

免疫ペルオキシダーゼ技術、及び DAB 発色基質の顕在化による抗ミューラー管ホルモン受容体 II 型の検出。

内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした後、スライドは、希釈されたビオチン化一次抗体 (1/800、8 µg/mL) と共に室温で 90 分間インキュベートされた。組織切片は、次に PBS で洗浄され、アビジン/ビオチン ABC [Vector 社] 複合体と共に 30 分間インキュベートされた。免疫反応シグナルが DAB 基質溶液を使用して検出された (DAB + 基質バッファー/液体 DAB + クロモゲン、10 分間インキュベーション)。最終的に、切片は、Mayer のヘマトキシリン (Lillie の変法) を用いて軽度に対比染色された。

免疫組織化学染色手順において、陰性対照が、一次抗体をアイソタイプの対照免疫グロブリン (R565) 又は抗体希釈剤単独 (陰性バッファー対照) と置換することにより取得された。

陽性対照が、AMHR2 トランスフェクト COV434 細胞及びヒト顆粒膜腫瘍サンプルを使用することにより取得された。

処理後、Philips IMS によるデジタル化により、切片が観察された。全ての試料は、病理学者 2 名により独立にスコア化された。

標識の局在化が詳記された：細胞質及び/又は膜。

強度が、下記のスコアリングシステムを通じて腫瘍細胞膜及び/又は細胞質の明白な褐色標識として分類された：標識の強度は、陰性の場合 0、弱い場合 1、中程度の場合 2、及び COV434 陽性対照で示されるように強い場合には 3 として定義された。

頻度は、AMHRII を発現する細胞のパーセント (%) として定義された。壊死性のエリアは分析から除外された。グローバル組織学的スコアが、頻度 × 膜発現と細胞質発現とを足し合わせた強度スコアの平均値 (0 ~ 3) を使用することにより規定された。

全てのスライドが遅滞なく保管された。

【0206】

B. 結果

様々な一次ヒト癌細胞による AMHRII 膜発現の結果が図 3 にも表され、AMHRII 発現スコアが、異なる癌細胞型のパネルについて提示されている。

【0207】

結果が、図 3 に表されている。結果は、結腸癌、肝臓癌、精巣癌、甲状腺癌、胃癌、膀胱癌、膵癌、並びに頭頸部癌を含む、複数の様々な非婦人科ヒト癌において、AMHRII が細胞表面で発現していることを示した。

【0208】

実施例 3：非婦人科癌 (ヒト腫瘍異種移植) における AMHRII 発現

A. 材料及び方法

A. 1. 目的

ビオチン化された 3C23K モノクローナル抗体を使用して、抗ミューラー管ホルモン受容体 2 型 (AMHR2) の発現を検出する為の、マウス (PDX) を対象としたヒト癌細胞異種移植の免疫組織化学試験

【0209】

A. 2. プロトコール及び試験法

細胞株：ホルムアルデヒド酢酸アルコール (AFA) 中において、セルブロックの構成で固定化された

ヒト腫瘍：外部サンプルについてホルマリン中で固定、及びキュリー研究所から入手したスライドについて AFA 中で固定

免疫組織化学 (IHC) 技術は、サンプルを脱蠟し、pH 9 でアンマスキングした後に

10

20

30

40

50

可能であった (EZ Retriever マイクロウェーブ中、90 で 15 分間、その後 20 分間冷却)。

免疫ペルオキシダーゼ技術、及び DAB 発色基質の顕在化による抗ミューラー管ホルモン受容体 I I 型の検出。

内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした後、スライドは、希釈されたビオチン化一次抗体 (1 / 800、8 µg / mL) と共に室温で 90 分間インキュベートされた。組織切片は、次に PBS で洗浄され、アビジン / ビオチン ABC [Vector 社] 複合体と共に 30 分間インキュベートされた。免疫反応シグナルが DAB 基質溶液を使用して検出された (DAB + 基質バッファー / 液体 DAB + クロモゲン、10 分間インキュベーション)。最終的に、切片は、Mayer のヘマトキシリン (Lillie の変法) を用いて軽度に対比染色された。

10

免疫組織化学染色手順において、陰性対照が、一次抗体をアイソタイプの対照免疫グロブリン (R565) 又は抗体希釈剤単独 (陰性バッファー対照) と置換することにより取得された。

陽性対照が、AMHR2 トランスフェクト COV434 細胞及びヒト顆粒膜腫瘍サンプルを使用することにより取得された。

処理後、Philips IMS によるデジタル化により、切片が観察された。全ての試料は、病理学者 2 名により独立にスコア化された。

標識の局在化が詳記された：細胞質及び / 又は膜。

強度が、下記のスコアリングシステムを通じて腫瘍細胞膜及び / 又は細胞質の明白な褐色標識として分類された：標識の強度は、陰性の場合 0、弱い場合 1、中程度の場合 2、及び COV434 陽性対照で示されるように強い場合には 3 として定義された。

20

頻度は、AMHRII を発現する細胞のパーセント (%) として定義された。壊死性のエリアは分析から除外された。グローバル組織学的スコアが、頻度 × 膜発現と細胞質発現とを足し合わせた強度スコアの平均値 (0 ~ 3) を使用することにより規定された。

全てのスライドが遅滞なく保管された。

【0210】

B. 結果

a) 対照

陰性対照及びアイソタイプ対照は、腫瘍細胞上で反応性が欠損していた。

30

陽性対照サンプル (増幅された COV434 AMHRII) は、拡散性の細胞免疫染色を示した (強度スコア：3)。標識は均質であり (頻度スコア：100%)、細胞質及び膜の局在化が認められた。

陽性の顆粒膜対照サンプルは、強い腫瘍細胞の免疫染色を示した (強度スコア 3)。標識は均質であり (頻度スコア：100%)、細胞質及び膜の局在化が認められた。

【0211】

b) 患者由来の異種移植 (PDX) サンプルのスクリーニング。

指摘すべき重要事項は、AFA 中で処理されたサンプルと比較して、サンプルがホルマリン中で固定化されたとき、AMHR2 の膜発現が過小評価されるように思われることを含む。

40

【0212】

マウス内の様々なヒト腫瘍異種移植による AMHRII 膜発現の結果が、図 4 に表され、AMHRII 発現スコアが、異なる癌細胞型のパネルについて提示されている。

【0213】

ヒト腫瘍異種移植による AMHRII 発現の結果の一部が、下記の表 3 にまとめられている。

【0214】

【表 3】

表 3：ヒト腫瘍異種移植におけるAMHRII発現

| 腫瘍型 | 腫瘍の陽性率 (陽性PDXのパーセント(%)) | 試験された PDXの数 |
|-----|----------------------------|----------------|
| 結腸 | 35% | 6 |
| 肝臓 | 44% | 3 |
| 腎臓 | 84% | 13 |

10

【0215】

c) 結論

20

AMHR2タンパク質発現が、AMHR2転写について陽性のPDXモデル6例のうち4において確認された。これらのPDXは、神経膠腫(ODA14-RAV)及び結腸(TC306-BAU)癌から調製された。発現のレベルは中程度であったが、しかし有意であり、グローバルスコア1～1.5により特徴付けられた。このようなデータは、婦人科癌以外の癌がAMHR2を発現した可能性があることを示唆する。

【0216】

このようなモデルは、抗AMHR2療法を特徴付ける為に将来使用されることができると考えられる。

【0217】

実施例4：AMHRII発現性の非婦人科癌に対する抗AMHRII抗体のイン・ビボ(in vivo)での有効性

30

A. 材料及び方法

A.1. 略号

このプロトコールで一般的に使用される略号が、表4及び表5の両方に示されている。

【0218】

【表 4】

表 4. 投与関連の略号

| 投与スケジュール | |
|-------------------------------------|-----------------|
| Bid | 1日2回 |
| Qd | 毎日 |
| Q2d | 1日置き(Qodも同じ) |
| Q3d | 3日置き(1日投与、2日休薬) |
| Q4d | 4日置き(1日投与、3日休薬) |
| BIW | 1週間に2回 |
| QW | 毎週 |
| Q3W | 3週間置き |
| 投与経路(ROA : Route of administration) | |
| i.p. | 腹腔内(腹腔内的に) |
| i.v. | 静脈内(静脈内的に) |
| p.o. | 経口(経口的に) |
| s.c. | 皮下(皮下的に) |

10

20

30

【 0 2 1 9 】

【表 5】

表 5. この実施例で使用されるその他の一般的な略号

| 略号 | 全文及び説明 |
|-------|---|
| ANOVA | 分散分析 (Analysis of variance) |
| BW | 体重 (Body weight) |
| BWL | 体重減少 (Body weight loss) |
| GLP | 医薬品安全性試験実施基準 (Good Laboratory Practice) |
| MTD | 最大耐用量 (Maximum tolerated dose) |
| MTV | 平均腫瘍体積 (Mean tumor volume) |
| TV | 腫瘍体積 (Tumor volume) |
| TGI | 腫瘍増殖阻害率 (Tumor growth inhibition)、 $\%TGI = (1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)) \times 100$; Tiは測定日における処置群の平均腫瘍体積; T0はD1における処置群の平均腫瘍体積; Viは測定日における対照群の平均腫瘍体積; V0はD1における対照群の平均腫瘍体積。 |
| T-C | T-Cは、処置群の平均腫瘍サイズが事前に決定されたサイズ(例えば 1000mm^3)に到達するのに必要とされる時間(日)であるTと、対照群の平均腫瘍サイズが同様サイズに到達するのに要する時間(日)であるCを用いて計算される。 |
| T/C | T/C値(%)は、処置に対する腫瘍応答のインジケータであり、一般的に用いられる抗腫瘍活性エンドポイントの1つである; T及びCは、それぞれ所定日における処置された群と対照群の平均腫瘍体積である。 |
| REG | REG(%)値は、式: $\%REG = [(VTr_{day0} - VTr_{dayx}) / VTr_{day0}] \times 100$ を使用して計算される。 |
| SOC | 所定の疾患に対して臨床現場で使用される標準処置 (Standard of care used in clinic setting for a specific disease) |
| FFPE | ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin fixed paraffin embedded) |

【0220】

A. 2. 試験の目的

Balb/cヌードマウスを対象として行われるHuPrime(登録商標)HCC異種移植モデルLI1097の処置において、GM102と命名されるGamaMabs社の抗AMHR2モノクローナル抗体のイン・ビボ(in vivo)での有効性を前臨床的に評価すること。RNAseq(トランスクリプトーム配列決定法)を使用して、CrownBio社により処理されたAMHR2転写についてスクリーニングを行った後に、

モデル L I 1 0 9 7 が選択された。更に、このモデルの A M H R 2 膜タンパク質発現が、キュリー研究所 (I n s t i t u t C u r i e)、フランス、により I H C を使用して確認された。

【 0 2 2 1 】

A . 3 . 実験設計

【 0 2 2 2 】

【表 6】

表 6 . 有効性試験の治験設計

| 群 | N | 処置 | 用量 レベル (mg/kg) | 投与 経路 | 投与頻度 |
|---|---|-------------------------|----------------------|-------------|-----------|
| 1 | 8 | ビヒクル (溶媒(Solvent)対照) | - | <i>i.v.</i> | BIW x 4週間 |
| 2 | 8 | <i>GamaMabs's Ab</i> | 20mg/kg | <i>i.v.</i> | BIW x 4週間 |
| 3 | 8 | <i>GamaMabs's Ab</i> | 50mg/kg | <i>i.v.</i> | BIW x 4週間 |
| 4 | 8 | ソラフェニブ | 50mg/kg | <i>p.o.</i> | QD x 4週間 |

注記：N：1 群当たりの動物数；

【 0 2 2 3 】

A . 4 . 動物

系統：B A L B / c ノード

年齢：7 ~ 8 週齢 (処置開始時)

性別：メス

総数：マウス 3 2 匹 + スペア

【 0 2 2 4 】

A . 5 . 動物収容具

マウスは、換気された個別ケージ (1 ケージ当たり 4 匹) 内、下記の条件で収容される：

温度：2 0 ~ 2 6

湿度：3 0 ~ 7 0 %

照光時間：明光 1 2 時間及び暗光 1 2 時間

ポリスルホンケージ (サイズ 3 2 5 mm x 2 1 0 mm x 1 8 0 mm)

寝床材は、トウモロコシの穂軸であり、毎週交換される。

飼料：動物は、全試験期間を通じて照射滅菌された乾燥顆粒飼料に自由にアクセスできる。

水：動物は滅菌飲料水に自由にアクセスできる。

ケージ識別ラベル：動物の数、性別、系統、受け入れ日、処置、試験番号、群番号、及び処置開始日

動物の識別：動物は耳タグによりマークされた。

【 0 2 2 5 】

A . 6 . H u P r i m e (登 録 商 標) モ デ ル プ ロ フ ァ イ ル

男性HCC患者に由来するHuPrime (登録商標) 肝臓癌モデルLI1097が、この有効性試験の為に選択された。このモデルは、イノキュレーション後、20～25日のうちに1000mm³に達した。

【0226】

A . 7 . テ ス ト 品 及 び 陽 性 対 照 品

製品識別情報：GamaMabs社のAb(3C23K)

製造業者：GamaMabs Pharma社

ロット番号：R18H2-LP01

バッチ：04GAM140513API

必要とされる量：動物BW25gに基づき255mg、50%のスペアを含む

パッケージ及び保管条件：[30ml/チューブ]、30ml、[2～8]

濃度：10.1g/L

製品識別情報：ソラフェニブ

製造業者：Melonepharma社

ロット番号：D1111A

必要とされる量：動物BW25gに基づき300mg、50%のスペアを含む

パッケージ及び保管条件：400mg、[RT]

【0227】

A . 8 . 実 験 方 法 及 び 手 順

A . 8 . 1 . 腫 瘍 の イ ノ キ ュ レ シ ョ ン 及 び 群 の 分 配

選択された一次ヒト癌組織でイノキュレーションされたストックマウスに由来する腫瘍断片が採取され、BALB/cヌードマウスにイノキュレーションするのに使用された。2015年6月9日に、各マウスは、腫瘍を発現させる為に、一次ヒトHCCモデルLI1097断片(R12P4、直径2～4mm)を右脇腹の皮下にイノキュレーションされた。親マウス番号は、#80150、#80151、及び#80153であった。2015年6月24日、平均腫瘍サイズが約145mm³に達したときにマウスが群に分けられた。マウスは、その腫瘍サイズに基づき、4つの実験群に無作為に割り振られた。各群は、1ケージ当たりマウス4匹で、マウス8匹から構成された。その日付は0日目として表された。セクション1.1実験設計に示される事前に決定されたレジメンに従い、試験品が、0日目(2015年6月24日)～27日目(2015年7月21日)まで担腫瘍マウスに投与された。

【0228】

A . 8 . 2 . 投 与 停 止 レ ジ メ ン

個々のマウスの体重が20%以上減少したとき、マウスには、その体重がベースラインまで回復するまで投与中断日(複数可)が設けられる。この試験では、いずれの投与も中止されなかった。

【0229】

A . 8 . 3 . 観 察 所 見

この試験における動物の取り扱い、飼育、及び処置と関連する全ての手順は、実験動物の飼育に関する評価認証協会(AAALAC: Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)のガイダンスを順守して、CrownBio社の施設内動物の飼育・使用委員会(IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee)により承認されたガイドラインに従い実施された。ルーチンモニタリングの時に、動物は、腫瘍増殖が正常な挙動に及ぼすあらゆる効果、例えば運動性、飼料及び水の消費(目視のみ)、体重増加/減少、眼/毛のつやびけ、及び任意のその他の異常な効果、についてチェックされた。各サブセット内の動物数に基づき、死亡及び観察された臨床徴候が記録された。

【0230】

A . 8 . 4 . 腫 瘍 測 定 及 び エ ン ド ポ イ ン ト

腫瘍サイズが、カリパスを使用して二次元で1週間に2回測定され、体積は式： $TV = 0.5 a \times b^2$ （式中、 a 及び b は、それぞれ腫瘍の長径及び短径である）を使用して mm^3 で表される。腫瘍サイズは、次に略号の表2内の説明に従い、TGI、T/C、及びT-C値の計算で使用される。

【0231】

A. 8. 5. 終了

試験は、28日間の処置後に終了し、マウスは殺された。

【0232】

下記の条件に基づき、個々の動物又は群全体の存命実験が、死亡前又は昏睡状態に到達する前に人道的安楽死により終了する。

重度の苦痛及び/又は疼痛の重度の臨床徴候を伴う継続的悪化状態にあり、飼料又は水を適切に摂取できない；

有意な体重（衰弱）（ $> 20\%$ ）；

個々のマウスについて、 $3000 mm^3$ を上回る腫瘍サイズ、又は $MTV > 2000 mm^3$ が認められる。

【0233】

A. 8. 6. 統計分析

平均値及び平均値の標準誤差（SEM）を含む要約統計量が、各時点における各群の腫瘍体積について提供される。群間の腫瘍体積の差異の統計分析が、一元ANOVAとその後のGames-Howellを使用する多重比較を使用して評価された。全てのデータがSPSS 16.0を使用して分析された。 $P < 0.05$ は統計的に有意とみなされた。

【0234】

B. 結果

B. 1. 体重

担腫瘍マウスにおける体重及び体重変化の結果が測定された。全てのマウスが、投与中断日が設けられることなくその処置を完了した。GammaMabs社のAbで処置されたマウスでは、動物の死亡又は有意な体重減少は認められなかったが、しかしソラフェニブで処置されたマウスにおいて、7%の体重減少が認められた。

【0235】

B. 2. 腫瘍体積

異なる時点における異なる群の腫瘍サイズが表7に示されている。

【0236】

10

20

30

【表 7】

表 7 異なる処置群における腫瘍サイズ

| 日数 | 腫瘍体積(mm ³) | | | |
|----|------------------------|---|---|-----------------------------------|
| | ビヒクル, BIW x 2週間 | GamaMabs's Ab, 20 mg/kg, BIW x 4 週間 | GamaMabs's Ab, 50 mg/kg, BIW x 4 週間 | ソラフェニブ, 50 mg/kg, QD x 4 週間 |
| 0 | 145.08±17.70 | 145.15±16.79 | 145.24±16.38 | 145.18±16.97 |
| 2 | 439.23±54.14 | 358.57±51.86 | 297.78±46.32 | 321.35±45.66 |
| 6 | 937.83±99.91 | 665.09±85.00 | 532.71±104.17 | 493.84±65.13 |
| 9 | 1556.55±248.13 | 952.12±171.45 | 751.81±176.15 | 695.20±66.81 |
| 13 | 2269.46±356.55 | 1179.90±232.26 | 1117.12±302.85 | 891.50±103.33 |
| 16 | | 1479.51±292.49 | 1476.74±407.93 | 1135.40±133.62 |
| 20 | | 1973.13±372.07 | 1602.61±481.85 | 1478.84±189.62 |
| 23 | | 1814.59±231.17 | 1148.22±381.49 | 1627.4±202.91 |
| 27 | | 2081.67±213.28 | 1454.47±479.27 | 1829.66±256.4 |

注記:データは平均±s e mとして表されている。

10

20

【0237】

30

B . 2 . 腫瘍増殖阻害

腫瘍増殖阻害が表 8 に要約されている。

【0238】

【表 8】

表 8 **HuPrime**（登録商標）肝臓異種移植モデル **LI1097** を対象とした、テスト化合物、**GamaMabs** 社の **Ab** 及びソラフェニブ処置の抗腫瘍活性

| 処置 | 腫瘍サイズ (mm ³) ^a | 腫瘍サイズ(mm ³) ^a | TGI (%) | T/C (%) | 1000 mm ³ での T-C (日数) | P値 ^b |
|---|--|--------------------------------------|---------|---------|---|-----------------|
| | 0日目 | 13日目 | | | | |
| G1 ビヒクル | 145.08±17.70 | 2269.46±356.55 | - | - | - | - |
| G2 GamaMabs's Ab , 20 mg/kg | 145.15±16.79 | 1179.90±232.26 | 51.3% | 48.7% | 3 | 0.100 |
| G3 GamaMabs's Ab , 50 mg/kg | 145.24±16.38 | 1117.12±302.85 | 54.3% | 45.7% | 5 | 0.111 |
| G4 ソラフェニブ, 50 mg/kg | 145.18±16.97 | 891.50±103.33 | 64.9% | 35.1% | 8 | 0.024* |

注記：a. 平均±s e m

b. Games-Howellを使用する多重比較によりビヒクルと比較した。

* G1 ビヒクルと比較して、P<0.05

【0239】

B. 3. 腫瘍増殖曲線

異なる群の腫瘍増殖曲線が図5に示されている。

【0240】

図5は、**HuPrime**（登録商標）肝臓異種移植モデル **LI1097** を対象としたテスト化合物、**GamaMabs** 社の **Ab** 及びソラフェニブでの処置中の、異なる群内のマウスの腫瘍体積を表す。

【0241】

B. 4. 結果の要約及び考察

この試験では、テスト化合物、**GamaMabs** 社の **Ab** 及び陽性対照薬物ソラフェニブの有効性が、メス **BALB/c** ノードマウスを対象として、**HuPrime**（登録商標）**HCC** 異種移植モデル **LI1097** の処置において評価された。

【0242】

群1（ビヒクル、**BIW** × 2週間、i.v.）、群2（**GamaMabs** 社の **Ab**、20 mg/kg、**BIW** × 4週間、i.v.）、群3（**GamaMabs** 社の **Ab**、50 mg/kg、**BIW** × 4週間、i.v.）、及び群4（ソラフェニブ、50 mg/kg、**QD** × 4週間、p.o.）では、試験終了時の体重変化は、それぞれ0.67%、2.68%、-0.38%、及び-7.63%であった。20 mg/kg 及び 50 mg/kg でのテスト化合物、**GamaMabs** 社の **Ab** は、**LI1097** 担腫瘍マウスにおいて良好な忍容性を示した。ソラフェニブ、50 mg/kg 処置群のマウスは、処置27日目に平均最大7.63%の体重減少を示した。

【0243】

ビヒクル処置されたマウスの平均腫瘍サイズは、13日目に2269.46 mm³ に達した。群2（**GamaMabs** 社の **Ab**、20 mg/kg）及び群3（**GamaMabs** 社の **Ab**、50 mg/kg）は、ビヒクル処置に対して50%の抗腫瘍応答を生み出し、

TGIはそれぞれ51.3%及び54.3%であった(P=0.100及び0.111)。群4(ソラフェニブ、50mg/kg)は有意な抗腫瘍活性を生み出し、処置13日目のTGIは64.9%であった(P=0.024)。表8及び図5に提示されている処置後の異なる時点、異なる群における腫瘍サイズの結果は、群2及び群3(GamaMabs社のAB、それぞれ20mg/kg及び50mg/kg)の処置に対する応答は、ソラフェニブと同様に、少なくとも27日間維持されることを示している。しかし、群2及び群3の腫瘍応答は、より良好な統計的有意性を得るにはばらつきが大き過ぎた可能性がある。

【0244】

まとめとして、この試験では、テスト化合物GamaMabs社のAbは、一次HuPrime(登録商標)HCC異種移植モデルLI1097に対して、この病理学に対する標準的な医療であるソラフェニブにより誘発された活性とほぼ同様の抗腫瘍活性を生み出した。更に、ソラフェニブ処置が最大平均7%の体重減少を誘発した一方、GM102の抗腫瘍活性には、毒性イベントは一切付随しなかった。

【0245】

実施例5：AMHRII発現性の非婦人科癌に対する抗AMHRIIイムノコンジュゲートのイン・ビボ(in vivo)での有効性

A.材料及び方法

A.1.略号

この実施例で一般的に使用される略号は、実施例4の表3及び表4のものと同一である。

【0246】

A.2.目的

メスBALB/cヌードマウスを対象として行われるPDXモデルLI1097の処置において、GamaMabs社の化合物GM103のイン・ビボ(in vivo)での有効性を前臨床的に評価すること。

【0247】

A.3.実験設計

【0248】

【表9】

表9. 有効性試験の治験設計

| 群 | N | 処置 | 用量 レベル (mg/kg) | 投与 容量 (ml/kg) | 経路 | スケジュール |
|---|---|-------|----------------------|---------------------|----|---------|
| 1 | 8 | ビヒクル | - | 10 | IV | 1回の単一用量 |
| 2 | 8 | GM103 | 1 | 10 | IV | 1回の単一用量 |
| 3 | 8 | GM103 | 5 | 10 | IV | 1回の単一用量 |
| 4 | 8 | GM103 | 10 | 10 | IV | 1回の単一用量 |

注記：N：1群当たりの動物数

【0249】

A . 4 . 材 料

A . 4 . 1 . 動 物

系 統 : B A L B / c ヌ ー ド

年 齢 : 6 ~ 8 週 齢

性 別 : メ ス

総 数 : マ ウ ス 3 2 匹 + ス ペ ア

【 0 2 5 0 】

A . 4 . 2 . 動 物 収 容 具

マウスは、換気された個別ケージ（1ケージ当たり4～5匹）内、下記の条件で収容される：

温 度 : 2 0 ~ 2 6

湿 度 : 3 0 ~ 7 0 %

照 光 時 間 : 明 光 1 2 時 間 及 び 暗 光 1 2 時 間

ポリスルホンケージ（サイズ325mm×210mm×180mm）

寝床材は、トウモロコシの穂軸であり、毎週交換される。

飼 料 : 動 物 は、全 試 験 期 間 を 通 じ て 照 射 滅 菌 さ れ た 乾 燥 顆 粒 飼 料 に 自 由 に ア ク セ ス で き る。

水：動物は滅菌飲料水に自由にアクセスできる。

ケージ識別ラベル：動物の数、性別、系統、受け入れ日、処置、プロジェクトID、群番号、動物ID、及び処置開始日

動物の識別：動物は耳タグによりマークされた。

【 0 2 5 1 】

A . 4 . 3 . モ デ ル 情 報

HuPrime（登録商標）肝臓癌異種移植モデルLI1097が、この有効性試験の為に選択された。

【 0 2 5 2 】

A . 4 . 4 . テ ス ト 品 及 び 対 照 品

製品識別情報：GM103

製造業者：GamaMabs Pharma社

物理的説明：溶液

バッチ番号：GAM100-NC005-4

必要とされる量：動物のBW25gに基づき4.48mg、40%のスペアを含む。

パッケージ及び保管条件：4.3mg / 1.3ml / バイアル、4℃で保管される。

【 0 2 5 3 】

A . 5 . 実 験 方 法

A . 5 . 1 . 腫 瘍 イ ノ キ ュ レ ー シ ョ ン

各マウスは、腫瘍を発現させる為に、一次ヒト肝臓癌異種移植モデルLI1097断片（直径2～3mm）を用いて右脇腹の皮下にイノキュレーションされる。

【 0 2 5 4 】

A . 5 . 2 . 群 の 割 り 振 り

平均腫瘍サイズがおおよそ200mm³に達したとき、マウスは、表3に示す4つの群に無作為に割り振られる。各群はマウス8匹を含有する。

【 0 2 5 5 】

A . 5 . 3 . 試 験 品 投 与 溶 液 の 調 製

容量タイプ：体重に応じて投与容量を調整する（投与容量 = 10μL / g）

【 0 2 5 6 】

10

20

30

40

【表 10】

表 10. 処方化及び保存に関する詳細な説明

| 化合物 | 用量 (mg/kg) | 調製 | 濃度 (mg/ml) | 保管 |
|-----------|---------------|---|---------------|----------|
| GM103 (1) | 1 | 2.327mlの生理食塩水又はPBS?で、0.073mlのGM103ストック溶液(3.308mg/ml)を希釈する | 0.1 | 新たに調製する。 |
| GM103 (2) | 5 | 2.037mlの生理食塩水又はPBS?で、0.363mlのGM103ストック溶液(3.308mg/ml)を希釈する | 0.5 | 新たに調製する。 |
| GM103 (3) | 10 | 1.674mlの生理食塩水又はPBS?で、0.726mlのGM103ストック溶液(3.308mg/ml)を希釈する | 1 | 新たに調製する。 |

10

【0257】

A. 5. 4. 観察所見

20

腫瘍をイノキュレーションした後、動物は疾病及び死亡について毎日チェックされる。ルーチンモニタリング時に、動物は、正常な挙動、例えば運動性、飼料及び水の消費、体重の増減、眼ノ毛のつやびけ、に対する腫瘍増殖及び処置のあらゆる効果並びに任意のその他の異常な効果についてチェックされる。死亡及び観測された臨床徴候は、各サブセット内の動物の数に基づき記録される。

【0258】

腫瘍サイズは、カリパスにより二次元で週2回測定される。腫瘍体積は、式： $TV = 0.5 a \times b^2$ （式中、a及びbは、それぞれ腫瘍の長径及び短径である）を使用して mm^3 で表される。

【0259】

30

体重は、週2回測定される。

【0260】

A. 5. 5. エンドポイント

次の分析が終了時に適用される：TGI（腫瘍増殖インデックス）及びTC。

【0261】

A. 5. 6. 終了

下記の条件に基づき、個々の動物又は群全体の存命実験が、死亡前又は昏睡状態に達する前に人道的安楽死により終了する。

重度の苦痛及び/又は疼痛の重度の臨床徴候を伴う継続的悪化状態にあり、飼料又は水を適切に摂取できない；

40

有意な体重減少（衰弱）（ $> 20\%$ ）；

個々のマウスについて $3000 mm^3$ を上回る腫瘍サイズ、又は群全体のマウスについて $MTV > 2000 mm^3$ が認められる。

【0262】

A. 5. 7. 統計分析

3群又はそれ超の群についてそれらを比較する場合、一元ANOVAが実施され、多重比較がそれに後続する。全てのデータがSPSS 16.0を使用して分析される。 $P < 0.05$ は統計的に有意とみなされる。

【0263】

A. 6. コンプライアンス

50

この試験内の動物の飼育及び使用と関係するプロトコール及びあらゆる修正（複数可）又は手順は、実施前にCrown Bio社の動物の飼育・使用委員会（IACUC）によりレビュー及び承認される。試験期間中、動物の飼育及び使用が、実験動物の飼育に関する評価認証協会（AAALAC）の規定に基づき実施される。

【0264】

B．結果

図6の結果は、5mg/kg又はそれ超の用量におけるGM103 ADCイムノコンジュゲートのイン・ビボ（in vivo）での抗癌活性を示す。

【0265】

実施例6：更なる非婦人科癌におけるAMHRII発現

10

A．材料及び方法

A．1．フローサイトメトリーによるAMHRII膜発現分析

分析用の細胞の調製

組織は、手術1時間内に切除され、1～mm²の断片に細分化され、ペニシリン（10%）、ストレプトマイシン（10%）、及びゲンタマイシン（0.1mg/mL；Sigma-Aldrich社）を含有するRPMI内で洗浄された。

組織断片は、コラゲナーゼ及びDNase（2mg/mL；Sigma-Aldrich社）を用いて、37℃において高速振盪させながら2～4時間消化された。

粘液及び大きなデブリは、40-1m細胞ストレーナーを通じた濾過により除去された。

20

生存細胞が、フィコールグラジエント遠心分離により取得された。

【0266】

再懸濁腫瘍細胞上のAMHRII結合性部位の定量は、QuantumTM Simply Cellular（Bangs Laboratory社）を使用して、製造業者の指示に従い実施された：

要するに、ヒトIgG抗体のFc部分に対して特異的なマウス抗ヒトIgGを用いて、その異なる校正済みの量で標識された4つのマイクロビーズ集団が、AlexaFluor 488コンジュゲート抗AMHRII 3C23Kで染色された。FACSチューブにおいて、キットに含まれる各バイアルの一滴が、PBS 1×（50μl）に添加される：

30

1 - ビーズB（ブランク）

2 - ビーズ1 + 3C23K - AF、10μg/mL

3 - ビーズ2 + 3C23K - AF、10μg/mL

4 - ビーズ3 + 3C23K - AF、10μg/mL

5 - ビーズ4 + 3C23K - AF、10μg/mL（必要な場合には、濃度は25μg/mLまで高めることができた）

各ビーズ集団は、異なる量のAlexaFluor 488コンジュゲート抗AMHRII 3C23Kと結合して、対応する蛍光強度を生成し、その強度はFACS Cantot IIサイトメーター（BD社）上で分析される。

校正曲線は、その割り振られた抗体結合能（ABC：Antibody Binding Capacity）に対して各ビーズ集団の平均蛍光強度をプロットिंगすることにより生成された。

40

【0267】

細胞は、エッペンドルフチューブ（1.5mL）内で通常染色された。

全ての遠心分離工程は、4℃において実施された。

全てのインキュベーション工程は、抗体の内部移行を回避する為に4℃で実施された。

細胞3.5百万個（トリプシン処理されたCOV434-MISRII又は新たに解離させた腫瘍細胞）が、200～300gで5分間遠心分離され、PBS（1チューブ当たり500μl）で1回洗浄された。

氷冷PBS/2%FBSを用いて洗浄され（200～300gで3分間）、700μlのPBS 1×中に再懸濁され、下記の表11に記載されている条件の為にFACSチュ

50

ープにより 100 μ l 分配する：

【0268】

【表11】

表 1 1

| COV434-MISRII | 新鮮な腫瘍細胞 |
|--|---------|
| 抗体無し | |
| R565-AF (アイソタイプ対照) 10 μ g/mL | |
| 3C23K-AF 1 ng/mL | |
| 3C23K-AF 10 ng/mL | |
| 3C23K-AF 100 ng/mL | |
| 3C23K-AF 1 μ g/mL | |
| 3C23K-AF 10 μ g/mL (必要ならば、最高25 μ g/mlまで) | |

10

20

【0269】

PBS / 1% FBS 中の抗体 3C23K - AF 488 と共に、4 で 30 分間インキュベーションする

PBS / 2% BSA 中で 2 回洗浄する (200 ~ 300 g で 3 分間)

PBS 中で 2 回洗浄する (200 ~ 300 g で 3 分間)

PBS (300 ~ 400 μ l) を添加し、できる限り速やかに FACS 上で分析する

30

。

このプロトコールは、膜の完全性を維持する為に、細胞外染色する為の固定工程を一切含まない。従って、膜 AMHRII のみが検出される。

【0270】

A. 2. 免疫蛍光による AMHRII 膜発現

間接的免疫蛍光検査法が、従って Alexa Fluor (登録商標) 488 にコンジュゲートした抗 AMHRII 3C23K 抗体を用いて開発された。次にウサギ抗 AF 488 抗体、及び Alexa Fluor (登録商標) 647 にコンジュゲートしたヤギ抗ウサギ抗体を用いて、シグナル増幅が 2 工程で実施された。

40

【0271】

凍結組織切片が、クリオスタット Leica CMD 1950 を用いて -20 に保つことにより作成される。凍結された組織は、OCT 化合物と共に金属ディスク上に取り付けられ、凝固したら、ディスクホルダー上に取り付けられた。7 μ m の切片が実現し、Superfrost Plus スライド (Menzel Glaser 社) 上に配置され、-20 で速やかに保管された。

【0272】

凍結切片スライドが PBS 1x で再水和され、次に 300 μ l の冷却アセトン (VWR ProLabo 社) を用いてそれを覆うことにより、-20 で 10 分間固定化され、全ての組織が溶液により全部回収されることを保証する為にパラフィルムを用いて回収さ

50

れた。PBSでリンスした後、スライドは、抗体と組織コンポーネントとの間の非特異的な相互作用をブロックする為に、300 μ lのブロッキングバッファー（PBS 1x - BSA（2%） - ヤギ血清（10%） - トリトンX100（0.1%））を用いて、加湿ボックス内、RTにおいて1時間処理された。ブロッキングバッファー中で10 μ g/mlに希釈された3C23K - AF488又はアイソタイプ対照R565 - AF488が、加湿ボックス内、RTにおいて30分間適用された。PBS 1x - トリトンX100（0.1%）で3回洗浄（3x10分間）後、ブロッキングバッファー中で1/500に希釈された抗AF488抗体（Invitrogen社）が、RTで30分間インキュベーションする為に（300 μ l）添加された。PBS 1x - トリトンX100（0.1%）で3回洗浄（3x10分間）後、ブロッキングバッファー中で1/500に希釈されたAF647コンジュゲート抗ウサギ抗体（Invitrogen社）が、RTで30分間インキュベーションする為に（300 μ l）添加された。PBS 1x - トリトンX100（0.1%）による洗浄（3x10分間）が行われ、次に0.5 μ g/mlのDAPI（Sigma - Aldrich社）が10分間適用された。PBS及びH₂Oでリンスした後、スライド切片が、気泡を回避しながらDAKO社蛍光封入剤1滴（50 μ l）と共にカバースリップ（24x50mm、Knittel Glass社）の下に取り付けられ、画像化されるまで暗光、4℃で保管された。

【0273】

画像取得が、Metavue software（Molecular Devices社）により制御されたCoolSnap EZ CCDカメラが装備された蛍光顕微鏡Leica DM5000Bを使用して実施された。画像の後処理が、ImageJフリーソフトウェア（<http://imagej.nih.gov/ij/>）を使用して実施される。

【0274】

B．結果

B．1．新鮮なヒト結腸直腸サンプルにおけるAMHRII発現

結腸直腸癌に作用された異なる個体4例から予め集められた腫瘍サンプルからのAMHRII膜発現のFACS分析が、図に7A、7B、7C、及び7Dに示されている。結果は、腫瘍サンプル中に含まれる腫瘍細胞（CD3 - Epcam+）が、その膜でAMHRIIを発現することを示している。

【0275】

結腸直腸癌に作用された異なる個体20例から予め集められた腫瘍サンプルの結果が、表12に提示されている。

【0276】

表12では、(i)腫瘍細胞膜に存在するAMHRIIタンパク質の平均数を決定すること、及び(ii)腫瘍サンプル内の膜性AMHRII陽性細胞のパーセント(%)を決定することにより、各腫瘍サンプル中のAMHRII発現が評価された。対応する腫瘍サンプルが「陽性」又は「陰性」のどちらに設定されるかの表示は、表12の左カラムに提示されている。「陽性」の表示は、AMHRIIが腫瘍細胞膜において有意に発現されていることを意味する。「陰性」の表示は、細胞膜におけるAMHRII発現は有意に検出されないことを意味する。

【0277】

表12の結果は、腫瘍サンプル20例のうち15例が、発現レベルこそ様々ではあるが、膜性AMHRIIを発現したことを示している。

【0278】

腫瘍サンプルに応じて、腫瘍細胞1個当たりの膜性AMHRIIタンパク質の平均数（表12では「細胞（腫瘍）1個当たりの受容体の数」と呼ばれる）は、540～155000以上変化した。

【0279】

腫瘍サンプルに応じて、膜性AMHRIIタンパク質を発現する細胞の頻度（表12で

は「AMHRII陽性細胞(Epcam+)のパーセント(%)」と呼ばれる)は、20%~100%まで変化した。

【0280】

表12の結果は、腫瘍細胞1個当たりの膜性AMHRIIの平均数と膜性AMHRIIを発現する腫瘍細胞の頻度との間において相関関係を示さなかった。

【0281】

B.2. ヒト結腸直腸腫瘍異種移植(患者由来の異種移植)におけるAMHRII発現

ヒト腫瘍異種移植サンプルが実施例3で開示されるように取得され、腫瘍細胞によるAMHRII発現が、材料及び方法のセクションで開示されている方法を使用して評価された。

10

【0282】

結腸直腸癌に作用された異なる個体4例から予め収集され、次にマウスに異種移植された腫瘍サンプルからのAMHRII膜発現のFACS分析が、図8A、8B、8C、及び8Dに示されている。結果は、異種移植された腫瘍サンプルに含まれる腫瘍細胞(CD3-Epcam+)はその膜でAMHRIIを発現することを示している。

【0283】

結腸直腸癌に作用された異なる個体12例から予め収集され、次にマウスに異種移植された腫瘍サンプルの結果が、表13に提示されている。

【0284】

表13では、(i)腫瘍細胞膜に存在するAMHRIIタンパク質の平均数を決定すること、及び(ii)異種移植腫瘍サンプル内の膜性AMHRII陽性細胞のパーセント(%)を決定することにより、各異種移植腫瘍サンプルにおけるAMHRII発現が評価された。

20

【0285】

表13の結果は、異種移植腫瘍サンプル12例のうち6例が、発現レベルこそ様々ではあるが、膜性AMHRIIを発現したことを示している。

【0286】

異種移植腫瘍サンプルに応じて、細胞1個当たりの膜性AMHRIIタンパク質の平均数(表13では「細胞(Epcam+)1個当たりの受容体の数」と呼ばれる)は、16000以上~約100000まで変化した。

30

【0287】

腫瘍サンプルに応じて、膜性AMHRIIタンパク質を発現する細胞の頻度(表13では「AMHRII陽性細胞(Epcam+)のパーセント(%)」と呼ばれる)は、0.5%~87%まで変化した。

【0288】

表13の結果は、腫瘍細胞1個当たりの膜性AMHRIIの平均数と膜性AMHRIIを発現する腫瘍細胞の頻度との間において明確な相関関係を示さなかった。

【0289】

対応する腫瘍サンプルが「陽性」又は「陰性」のどちらに設定されるかの表示は、表13の左カラムに提示されている。「陽性」の表示は、AMHRIIが腫瘍細胞膜において有意に発現されないことを意味する。「陰性」の表示は、腫瘍細胞による膜AMHRII発現は有意に検出されないことを意味する。

40

【0290】

B.3. 新鮮な腎細胞癌サンプルにおけるAMHRII膜発現

材料及び方法のセクションで開示される方法を用いてヒト腎細胞癌腫瘍サンプルが取得され、腫瘍細胞(Epcam+)による膜AMHRII発現がFACS分析により評価された。

【0291】

結果は、図9A及び9Bに示されている。

【0292】

50

腎細胞癌に作用された異なる個体 2 例から予め集められた腫瘍サンプルからの AMHR II 膜発現の FACS 分析は、図 9 A 及び 9 B に示されている。結果は、腎細胞癌腫瘍サンプルに含まれる腫瘍細胞 (CD3 - Epcam+) が、その膜で AMHR II を発現していることを示す。

【0293】

実施例 7：AMHR II 発現性の婦人科癌に対する抗 AMHR II 抗体のイン・ビボ (in vivo) での有効性

A. 材料及び方法

ストックマウス (Envigo 社から入手した胸腺欠損のヌード - Foxn1^{nu}) に、Champions Tumor Graft (登録商標) モデル CTG-0401 に由来する腫瘍断片が移植された。腫瘍が 1000 ~ 1500 mm³ に達した後、該腫瘍が採取され、腫瘍断片がメス試験マウスの左側腹部内に SC 移植された。各動物は、CTG-0401 について特定のパッセージロット：パッセージ 6 を用いて移植された。腫瘍増殖は、デジタルカリパスを使用して 1 週間に 2 回モニタリングされ、式 ($0.52 \times [\text{長さ} \times \text{幅}^2]$) を使用して腫瘍体積 (TV) が計算された。腫瘍体積が $175 \pm 7 \text{ mm}^3$ に達した後、その腫瘍サイズに基づきマウスが選択され、1 群当たり動物 12 匹からなる 4 つの群に無作為に割り振られた (0 日目)。0 日目に投与が開始された後、動物は、デジタルスケールを使用して 1 週間に 2 回秤量され、TV が 1 週間に 2 回、及び試験の最終日にも測定された。ビヒクル対照群内の平均腫瘍体積が 1500 mm³ に達したとき、又は最長 60 日に達したときのうち、いずれかが最初に到来したときに試験は終了した。治験設計は下記の表 13 に要約されている。

【0294】

【表 12】

表 13：ヒト結腸直腸癌のモデル CTG-0401 における有効性試験の設計

| 群 | n | 薬剤 | 用量 (mg/kg) | 投与 容量 (mL/kg) | 経路 | 投与スケ ジュール | 総投与 回数 |
|---|----|-------------|---------------|---------------------|----|--------------|-----------|
| 1 | 12 | ビヒクル GM102 | 0 | 10 | IP | BIWx4 | 8 |
| | | ビヒクル イリノテカン | 0 | 10 | IP | Q7Dx3 | 3 |
| 2 | 12 | GM102 | 20 | 10 | IP | BIWx4 | 8 |
| 3 | 12 | イリノテカン | 100 | 10 | IP | Q7Dx3 | 3 |

イリノテカン又はイリノテカンビヒクルの前に、GM102又はGM102ビヒクルが投与された。

【0295】

B. 結果

この実験の結果が、図 10 に示されている。

【0296】

図 10 の結果は、抗 AMHR II 抗体 GM102 は、AMHR II 発現性のヒト結腸直

腸腫瘍に対して有効なイン・ビボ (i n v i v o) での抗腫瘍効果を有することを示す。

【 0 2 9 7 】

とりわけ、抗 A M H R I I 抗体 G M 1 0 2 は、主に使用される抗結腸癌分子イリノテカン (C A S 番号 : 1 0 0 2 8 6 - 9 0 - 6) とは区別できない抗腫瘍効果を発揮する。

【 0 2 9 8 】

【表 1 3】

表 1 2：新鮮なヒト結腸直腸腫瘍サンプルにおけるAMHRII発現

| サンプル | Id | 組織学的な型 | 細胞(腫瘍)1個当たりの受容体の数 | AMHRII陽性細胞(Epcam+)のパーセント(%) | 陽性／陰性 |
|------|----|------------------|-------------------|-----------------------------|-------|
| # 1 | C1 | AdenoK | 15.600 | 100% | + |
| # 2 | I1 | AdenoK | 155.954 | 20% | + |
| # 3 | E1 | AdenoK | 23.548 | 100% | + |
| # 4 | A2 | AdenoK | 12.680 | 26% | + |
| # 5 | N1 | AdenoK (左結腸) | 116.704 | 50% | + |
| # 6 | N2 | AdenoK (左結腸) | 7.578 | | - |
| # 7 | N3 | AdenoK (右結腸) | 34.677 | 100% | + |
| # 8 | N4 | AdenoK (左結腸) MSI | 1.605 | | - |
| # 9 | A1 | 粘液性AdenoK(S状結腸) | 540 | | - |
| # 10 | E2 | AdenoK | 57.209 | 100% | + |
| # 11 | I2 | AdenoK | 155.473 | 27% | + |
| # 12 | I3 | AdenoK | 102.275 | 68% | + |
| # 13 | N6 | AdenoK (左結腸) | 47.464 | 100% | + |

10

20

30

40

| サンプル | Id | 組織学的な型 | 細胞(腫瘍)1個当たりの受容体の数 | AMHRⅡ陽性細胞(Epcam+)のパーセント(%) | 陽性／陰性 |
|------|----|---------------|-------------------|----------------------------|-------|
| # 14 | N7 | AdenoK (左結腸) | 61.870 | 100% | + |
| # 15 | E3 | AdenoK | 4.090 | | - |
| # 16 | E4 | AdenoK | 32.153 | 75% | + |
| # 17 | A3 | AdenoK (S状結腸) | 6.400 | | - |
| # 18 | E5 | AdenoK | 13.152 | 37% | + |
| # 19 | E6 | AdenoK | 21.962 | 25% | + |
| # 20 | A4 | AdenoK | 42.596 | 56% | + |

10

20

30

40

50

【 0 2 9 9 】
【 表 1 4 】

表 1 3 : 異種移植されたヒト腫瘍に由来する腫瘍細胞中のAMHRII

| 参照番号 | 番号 | 組織学的 な型 | 細胞(Epcam+)1個当 たりの受容体の数 | AMHRII陽性細胞(Epcam+)のパー セント(%) | 陽性/陰性 |
|----------|----|---------------|---------------------------|---------------------------------|-------|
| CO14452B | #1 | Muc adenoK | 63.181 | 16% | + |
| CO14744C | #2 | AdenoK | 25.269 | 1,5% | - |
| CO13196D | #3 | AdenoK | 21.313 | 4% | - |
| CO11291 | #4 | AdenoK | 20.629 | 0,5% | - |
| CO10619 | #5 | AdenoK | 16.327 | 0,5% | - |
| CO11690 | #6 | AdenoK | 17.802 | 1% | - |
| CO10069 | #7 | AdenoK | 44.511 | 2% | - |
| CO14592 | #8 | AdenoK | 83.762 | 87% | + |
| CO10708 | #9 | AdenoK | 43.109 | 7% | + |

10

20

30

40

50

| 参照番号 | 番号 | 組織学的 な型 | 細胞(Epcam+)1個当 たりの受容体の数 | AMHRII陽性細胞(Epcam+)のパー セント(%) | 陽性/陰性 |
|---------|-----|------------|---------------------------|---------------------------------|-------|
| CO7935 | #10 | AdenoK | 99.959 | 73% | + |
| CO11101 | #11 | AdenoK | 28.951 | 44% | + |
| CO10748 | #12 | AdenoK | 29.821 | 56% | + |

10

20

30

40

【 図 2 D 】

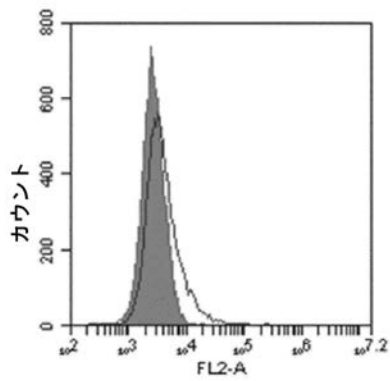


図 2D

【 図 2 E 】

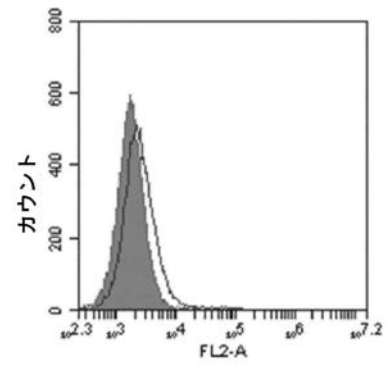


図 2E

【 図 2 F 】

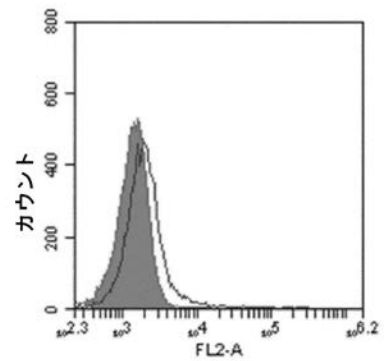


図 2F

【 図 3 】

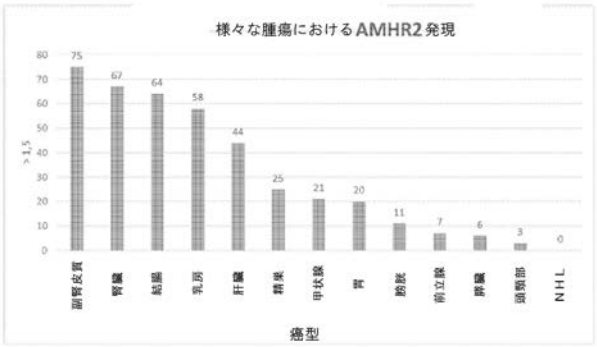


図 3

【 図 4 】

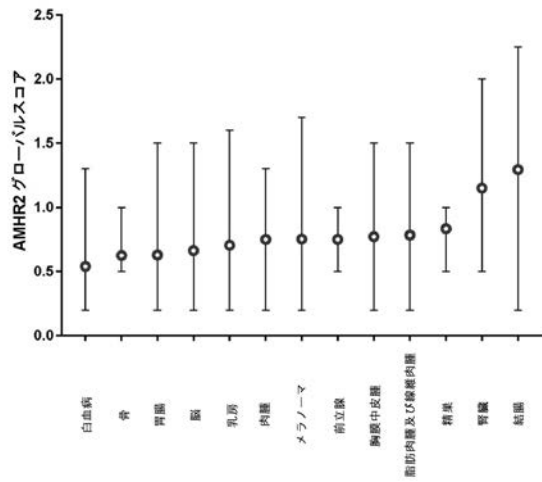


図 4

【 図 5 】

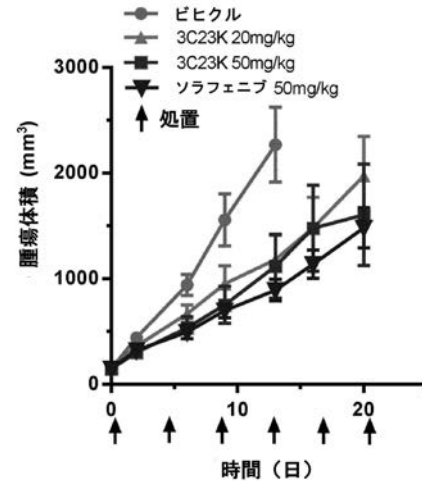


図 5

【 図 6 】

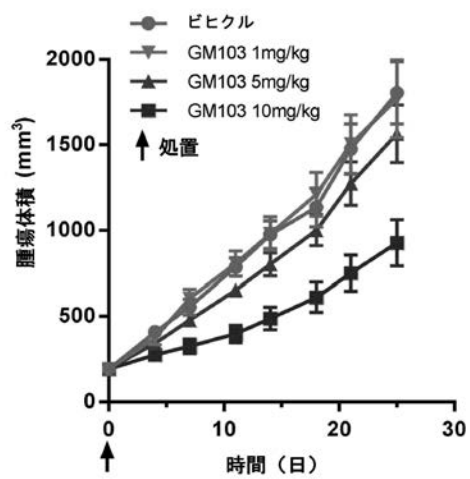


図 6

【 図 7 A 】

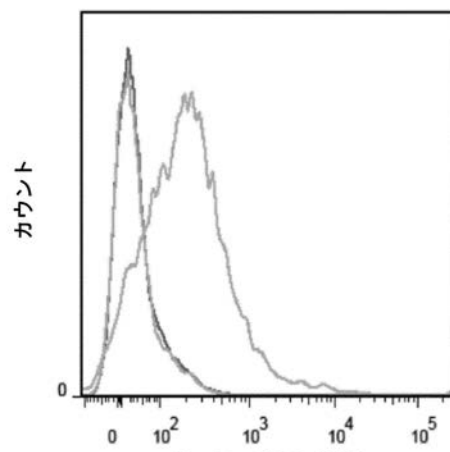


図 7A

【図 7 B】

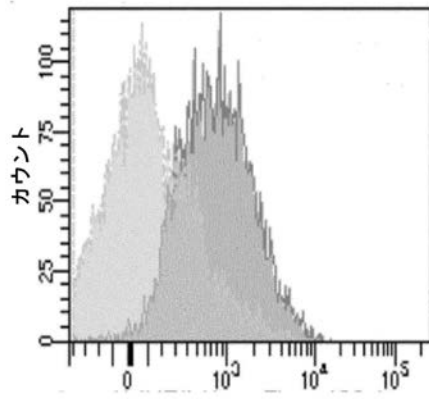


図 7B

【図 7 C】

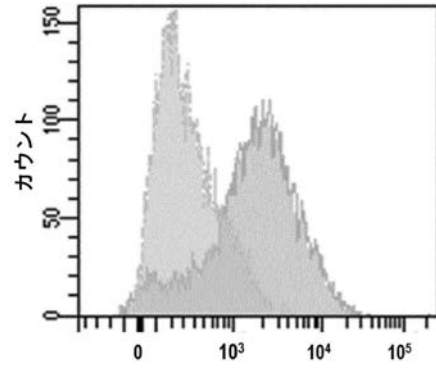


図 7C

【図 7 D】

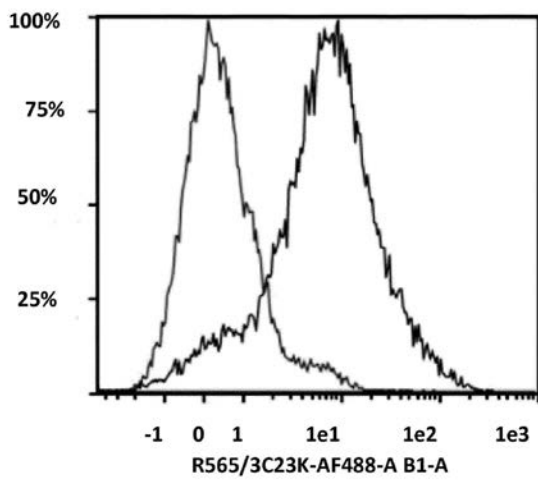


図 7D

【図 8 A】

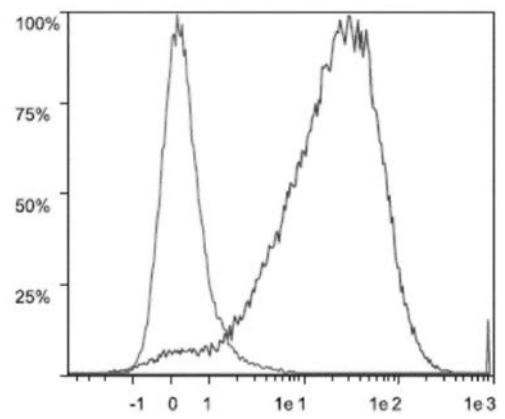


図 8A

【図 8 B】

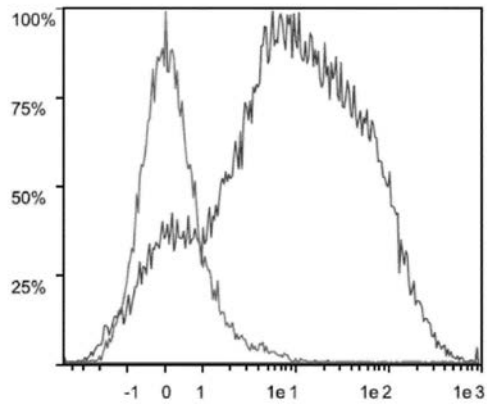


図 8B

【図 8 C】

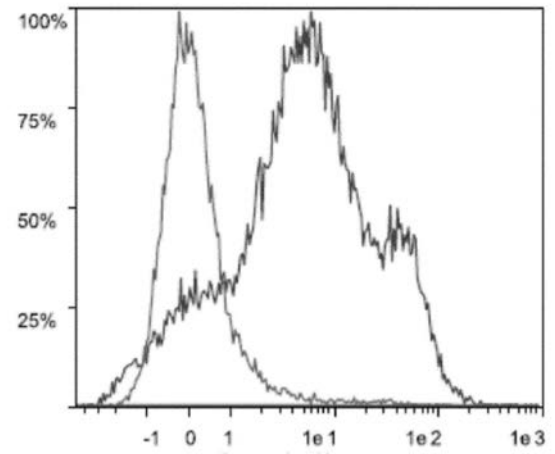


図 8C

【図 8 D】

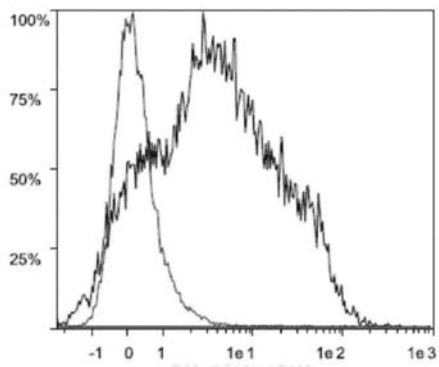


図 8D

【図 9 A】

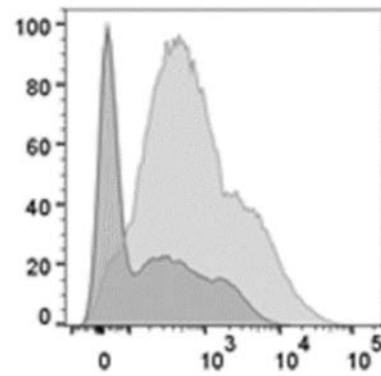


図 9A

【図 9 B】

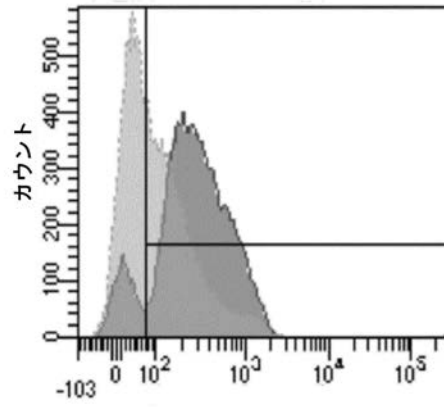


図 9B

【図 10】

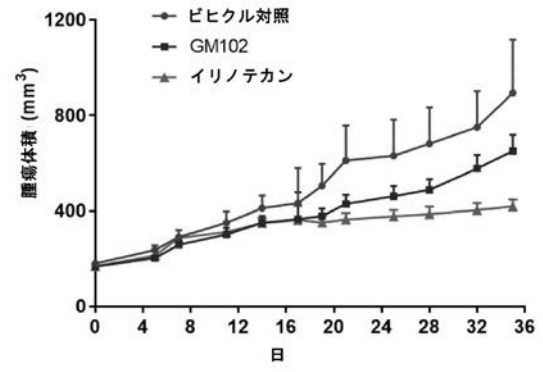


図 10

【配列表】

2020516668000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/059548

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 G01N33/574
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K G01N A61K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | ESTUPINA PAULINE ET AL: "The anti-tumor efficacy of 3C23K, a glyco-engineered humanized anti-MISRII antibody, in an ovarian cancer model is mainly mediated by engagement of immune effector cells.", ONCOTARGET 06 JUN 2017, vol. 8, no. 23, 24 February 2017 (2017-02-24), pages 37061-37079, XP002773585, ISSN: 1949-2553 page 37062, left-hand column, last paragraph - right-hand column, last paragraph Bridging paragraph; page 37064 - page 37065 ----- -/-- | 1-10 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 May 2018

Date of mailing of the international search report

01/06/2018

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Sitch, David

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/059548

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 2013/136743 A1 (BEHRENS CHRISTIAN [FR] ET AL) 30 May 2013 (2013-05-30) page 4, paragraph 100 - paragraph 107 page 9, paragraph 272 - paragraph 286 ----- | 1-10 |
| A | ALEX FRANÇOISO ET AL: "Immunotherapy for the treatment of colorectal tumors: focus on approved and in-clinical-trial monoclonal antibodies", DRUG DESIGN, DEVELOPMENT AND THERAPY, vol. Volume11, 1 January 2017 (2017-01-01) , pages 177-184, XP055405054, DOI: 10.2147/DDDT.S119036 page 177 abstract ----- | 1 |
| A | WO 2017/025458 A1 (GAMAMABS PHARMA [FR]) 16 February 2017 (2017-02-16) page 55; example 1 page 58 - page 59; example 7 ----- | 1 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/059548

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 2013136743 A1 | 30-05-2013 | AR 081159 A1 | 04-07-2012 |
| | | CA 2798336 A1 | 17-11-2011 |
| | | CN 103119059 A | 22-05-2013 |
| | | DK 2569333 T3 | 26-03-2018 |
| | | EP 2569333 A1 | 20-03-2013 |
| | | ES 2661080 T3 | 27-03-2018 |
| | | FR 2959994 A1 | 18-11-2011 |
| | | JP 6043998 B2 | 14-12-2016 |
| | | JP 2013534408 A | 05-09-2013 |
| | | JP 2017029139 A | 09-02-2017 |
| | | US 2013136743 A1 | 30-05-2013 |
| | | US 2015232563 A1 | 20-08-2015 |
| | | WO 2011141653 A1 | 17-11-2011 |
| WO 2017025458 A1 | 16-02-2017 | EP 3331569 A1 | 13-06-2018 |
| | | US 2017035903 A1 | 09-02-2017 |
| | | WO 2017025458 A1 | 16-02-2017 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------------|----------------|------------|
| G 0 1 N 33/574 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | L |
| C 1 2 N 15/13 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | |
| C 0 7 K 16/28 (2006.01) | G 0 1 N 33/53 | D |
| | G 0 1 N 33/574 | A |
| | C 1 2 N 15/13 | Z N A |
| | C 0 7 K 16/28 | |

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

- (72)発明者 バレット, ジャン - マルク
フランス国 8 1 1 0 0 カストル, リュ デュ トレゾール, 5
- (72)発明者 プロスト, ジャン - フランソワ
フランス国, 7 8 0 0 0 ベルサイユ, アベニュー ヴィルヌーヴ レタン, 2 1
- (72)発明者 ラマー, メディ
フランス国, 7 8 2 2 0 ヴィロフレー, リュ デュ プレ オ ボワ, 1 5 4
- (72)発明者 デゴヴェ, ステファン
フランス国, 9 3 5 0 0 パンタン, リュ ジュール オフレ 2 1
- (72)発明者 デュブレイク, オリヴィエ
フランス国, 3 1 1 9 0 モーレサック, リュ デ マロニエ, 1
- (72)発明者 ニコラ, アンドレ
フランス国, 7 5 0 2 0 パリ, リュ ソルビエ, 3 4
- (72)発明者 ムジュール, ディディエ
フランス国, 7 5 0 1 2 パリ, リュ ラソン, 1 3

F ターム(参考) 4C076 AA95 CC27 EE59 FF31
4C084 AA19 NA05 ZB261 ZB262
4C085 AA13 AA14 AA21 BB11
4H045 AA11 AA30 BA10 BA51 DA76 EA28