

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6715491号
(P6715491)

(45) 発行日 令和2年7月1日(2020.7.1)

(24) 登録日 令和2年6月11日(2020.6.11)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 U
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E
	A 6 1 K 39/395 T
	A 6 1 P 39/02

請求項の数 12 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-527851 (P2016-527851)	(73) 特許権者 513130157 I D A Cセラノスティクス株式会社 東京都文京区本郷一丁目34-5 寿々屋ビル6階
(86) (22) 出願日 平成27年6月10日(2015.6.10)	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2015/066790	(73) 特許権者 504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(87) 国際公開番号 W02015/190538	
(87) 国際公開日 平成27年12月17日(2015.12.17)	(74) 代理人 110001656 特許業務法人谷川国際特許事務所
審査請求日 平成30年6月4日(2018.6.4)	(72) 発明者 伊藤 哲 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学ア ントレプレナープラザ I D A Cセラノス ティクス株式会社内
(31) 優先権主張番号 特願2014-120245 (P2014-120245)	
(32) 優先日 平成26年6月11日(2014.6.11)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-178909 (P2014-178909)	
(32) 優先日 平成26年9月3日(2014.9.3)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫チェックポイント制御剤の副作用低減方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞傷害活性を有する抗CD4抗体、又は細胞毒成分を結合させた抗CD4抗体若しくはその抗原結合性断片を有効成分として含有する、免疫チェックポイント制御剤の副作用低減剤であって、前記抗CD4抗体は、ヒトCD4に対するヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体であり、前記細胞傷害活性を有する抗CD4抗体は、抗CD4抗体6G5よりも高いADCC活性又は抗CD4抗体OKT4よりも高いCDC活性を有し、前記免疫チェックポイント制御剤は、CTLA-4、PD-L1、PD-1、及びLAG-3から選択される抑制性の免疫チェックポイント分子に対するアンタゴニストから選択される少なくとも1種である、副作用低減剤。

【請求項2】

細胞傷害活性を有する抗CD4抗体、又は細胞毒成分を結合させた抗CD4抗体若しくはその抗原結合性断片を有効成分として含有する、免疫チェックポイント制御剤の副作用低減剤であって、前記抗CD4抗体は、ヒトCD4に対するヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体であり、前記細胞傷害活性を有する抗CD4抗体は、コアフコースを有しない抗CD4抗体であり、前記免疫チェックポイント制御剤は、CTLA-4、PD-L1、PD-1、及びLAG-3から選択される抑制性の免疫チェックポイント分子に対するアンタゴニストから選択される少なくとも1種である、副作用低減剤。

【請求項3】

細胞傷害活性を有する抗CD4抗体、又は細胞毒成分を結合させた抗CD4抗体若しくはその抗原結合性断片を有効成分として含有する、免疫チェックポイント制御剤の副作用低減剤

であって、前記抗CD4抗体は、ヒトCD4に対するヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体であり、前記細胞傷害活性を有する抗CD4抗体は、0.01 µg/mLの濃度でADCC活性を示す抗CD4抗体であり、前記免疫チェックポイント制御剤は、CTLA-4、PD-L1、PD-1、及びLAG-3から選択される抑制性の免疫チェックポイント分子に対するアンタゴニストから選択される少なくとも1種である、副作用低減剤。

【請求項4】

前記免疫チェックポイント制御剤が、CTLA-4に対するアンタゴニスト、及びPD-L1に対するアンタゴニストからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の副作用低減剤。

【請求項5】

前記免疫チェックポイント制御剤が、LAG-3に対するアンタゴニストである、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の副作用低減剤。

【請求項6】

前記免疫チェックポイント制御剤が、PD-1に対するアンタゴニストである、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の副作用低減剤。

【請求項7】

免疫チェックポイント制御剤が、免疫チェックポイント分子に対する抗体である、請求項1ないし6のいずれか1項に記載の副作用低減剤。

【請求項8】

免疫チェックポイント分子に対する抗体が、抗PD-L1抗体、及びアンタゴニスト性抗CTLA-4抗体から選択される少なくとも1種である、請求項7に記載の副作用低減剤。

【請求項9】

免疫チェックポイント分子に対する抗体が、アンタゴニスト性抗LAG-3抗体である、請求項7に記載の副作用低減剤。

【請求項10】

免疫チェックポイント分子に対する抗体が、アンタゴニスト性抗PD-1抗体である、請求項7に記載の副作用低減剤。

【請求項11】

高い細胞傷害活性を有する抗CD4抗体を有効成分として含有する、請求項1ないし10のいずれか1項に記載の副作用低減剤。

【請求項12】

免疫チェックポイント制御剤は、抗がん剤として用いられる、請求項1ないし11のいずれか1項に記載の副作用低減剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫チェックポイント制御剤の副作用低減方法に関する。

【背景技術】

【0002】

がん免疫療法が盛んにニュースになっている。2013年、2014年の米国がん治療学会ではこのニュースが紙面をにぎわしている。ゲノム解析が進展し、個々の患者のがん遺伝子異常と薬剤の効果が明瞭に議論できる時代になってきた。しかし、遺伝子異常と薬剤効果をリンクするのは良いが、該当しない患者に対してどういった治療方針が提示できるかが問題である。がん免疫療法では、直接がんをターゲットとする既存の制がん剤（含分子標的剤）とは異なり、免疫細胞系をターゲットにする治療法である。即ち発がんに関わる遺伝子変異が直接薬剤の効果と相関している事はない。しかしながら同様に、がん免疫療法も全ての患者に有効であるわけではない事が明らかになってきている。有効性を高める方策の研究開発が急務とされ、異種薬剤の併用効果・相乗効果を狙った治療法が開発されつつあり、FDAでも日本の審査機構であるPMDAでも併用療法を念頭においた治験手法に対するガイドライン作成を急いでいる。

10

20

30

40

50

【0003】

これまでの制がん剤はがん細胞を直接ターゲットにする手法であり、正常細胞に対しても作用を及ぼすために、患者への負担・副作用が極めて重篤であることが知られていたにも係らず、実際の延命効果という点では副作用軽減は後回しにされ、患者の満足を得られるものではなかった。近年がん免疫療法に注目が集まってきたが、がんペプチドワクチン等は限定的な患者にしかその効果が認められなかったことから、別の手法が模索されてきた。即ち免疫療法、中でも抗体医薬の中で特に免疫系に係る分子を標的とする医薬品の開発が盛んになってきた。がんサイズの縮小効果はそれほど大きくはないが、延命効果に特徴を持つという観点から注目を浴びている。

【0004】

既に抗CTLA-4抗体は米国FDAが医薬品として承認し、続いて抗PD-1抗体の開発が進み既に承認申請がでている。CTLA-4、PD-1分子共に免疫チェックポイントで作用する分子として機能が理解されているため、各分子に対する抗体は免疫チェックポイント阻害剤として認知されている（非特許文献1）。しかしながら臨床開発の途中で、種々の重篤な副作用が確認されるに至っている（非特許文献2）。これまでの制がん剤が有していた、正常細胞に対しても無差別に攻撃する為に引き起こされていた副作用とは質的に異なる、ある種自己免疫疾患様の副作用が起こっている。「がん」という直接命にかかわる事象の制御が最優先されるという観点から、重篤な副作用も治療効果がある事を前提にがん制御選択肢になっているが、患者からすれば副作用はないに越したことはない。従って少しでも副作用を軽減できる手法の提供は望まれるところである。当該薬剤の投与量を減じる、個別化医療の手法で効果が期待できる患者へのみ投与を試みる、或いは、別の薬剤との組合せで軽減可能な薬剤を選択する等、副作用低減への選択肢はいくつか存在する。

【0005】

制がん剤の分野でも、分子標的薬の登場により、既存の制がん剤に比べるとまだ比較的副作用の少ない抗がん剤が開発されてきている。しかしながら生体が受けるネガティブな作用は避けて通れない。免疫療法の一環であるペプチドがんワクチンの研究開発が進んできたが、効果があまり高くない（有効性を示す患者の頻度が低い）ため、注目度はあまり高くないのが現状である。その後、抗体医薬品（例えばher2/neuという分子に対する抗体：ハーセプチン）が登場し、合成医薬品ではない分子標的薬として脚光を浴びてきたが、再発・薬剤耐性の問題等も新たな議論になっている。このような結合阻害型抗体の登場で、患者は期待をしてきたが、なおその有効性といえは若干の延命効果を示すにとどまっているに過ぎない。

【0006】

次に登場してきたのが抗体医薬の中でも、特に免疫チェックポイント阻害・活性化剤である。例えばメラノーマという比較的免疫原性が強いがんとして知られているがんに対して、CTLA-4（制御性T細胞サブセット上に発現している分子）をターゲットとする抗体のメラノーマの退縮効果はそれほど高くないが、生存率で見ると有意な延長が認められるに至り、がぜん注目を浴びている所である（非特許文献3）。がんが有する免疫抑制状態を解除する事で、殺傷性免疫細胞が活躍できる環境を増強するものと理解されている。同様な分子の一つがPD-1分子であり、その分子に対する抗体医薬は著効として固形がん（例えば肺癌）でさえ約30%程度の患者で効果が認められている（非特許文献2）。

【0007】

既に米国では承認されている抗CTLA-4抗体（ipilimumab；商品名Yervoy）の副作用として報告されているものには、自己免疫様症状を呈するもの、或いはその関連症状類似のものが知られている（非特許文献4）。なかでも皮膚炎、肝炎、腸炎、下垂体炎、ブドウ膜炎は有名で、副作用程度を示すgrade 1～grade 4までが報告されている。Grade 4の腸炎では致死的な例も存在しており要注意である。同様に抗PD-1抗体の副作用としての報告も同様な副作用が報告されているが、上記症例にはない呼吸器系への障害も報告がある（非特許文献5）。また抗PD-L1抗体の臨床治験例では上記様症状以外に甲状腺機能低下、内眼炎、筋無力症が報告されている（非特許文献6）。またB細胞性慢性リンパ性白血病

10

20

30

40

50

をもターゲットとして開発されていたanti-CD28抗体は治験中に多臓器不全という安全性面から深刻な事件が発生したために試験実施承認が取り消された（非特許文献9）。このCD28というターゲット分子も免疫チェックポイント分子であり、アゴニスティックな作用を有するものである。

【0008】

これらの副作用の低減には、簡単なアプローチとして投与量の削減、投与回数の低減（非特許文献7）、全身投与ではなく局所投与とする（非特許文献8）等が試みられているが、本質的なアプローチとは言えない。更に本質的な解決策が求められている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

【0009】

【非特許文献1】Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2012; 12(4): 252-64.

【非特許文献2】Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *The New England journal of medicine*. 2013; 369(2): 134-44.

【非特許文献3】Prieto PA, Yang JC, Sherry RM, Hughes MS, Kammula US, White DE, et al. CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012; 18(7): 2039-47.

20

【非特許文献4】Della Vittoria Scarpati G, Fusciiello C, Perri F, Sabbatino F, Ferrone S, Carlomagno C, et al. Ipilimumab in the treatment of metastatic melanoma: management of adverse events. *OncoTargets and therapy*. 2014; 7: 203-9.

【非特許文献5】Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England journal of medicine*. 2012; 366(26): 2443-54.

【非特許文献6】Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England journal of medicine*. 2012; 366(26): 2455-65.

【非特許文献7】Camacho LH, Antonia S, Sosman J, Kirkwood JM, Gajewski TF, Redman B, et al. Phase I/II trial of tremelimumab in patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009; 27(7): 1075-81.

30

【非特許文献8】Sandin LC, Eriksson F, Ellmark P, Loskog AS, Totterman TH, Mangsbo SM. Local CTLA4 blockade effectively restrains experimental pancreatic adenocarcinoma growth in vivo. *Oncoimmunology*. 2014; 3(1): e27614.

【非特許文献9】Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltsis N. *The New England journal of Medicine*. 2006; 355(10): 1018-28.

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、免疫チェックポイント制御剤の副作用を低減する手段を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

我々は、免疫チェックポイント抗体のマウスモデルでの挙動を確認するところから検討を始めた。その際に、既に我々のところで抗がん作用が認められている抗CD4抗体をコントロールとして用いた。また実験系のネガティブコントロールとして無治療（あるいは非特異的IgG投与）という比較実験を行った。その結果、免疫チェックポイント抗体投与群

50

において、ネガティブコントロールよりも早期に死亡例（非腫瘍死）が生じることを見出した。中でも特に抗CTLA-4抗体、抗OX40抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体で非腫瘍死が顕著であった。一方、抗CD4抗体によるがん制御能力が優れていたため、併用効果を狙って抗CD4抗体とこれら免疫チェックポイント抗体との併用を検討したところ、どの組合せでも非腫瘍死が抑制され、顕著な延命効果が確認できた。この効果はマウスモデルではあるが、臨床治験データが公表されている抗CTLA-4抗体・抗PD-1抗体の組み合わせによる生存率よりも優れていた。即ち、抗CD4抗体の併用により、副作用死が全て解除され、ネガティブコントロールよりも生存率も改善されていた。

【0012】

本願発明者らは、広くCD4陽性細胞を除去できる、高い細胞傷害活性を有するヒト型化抗CD4抗体の樹立に成功しており、その抗体をベースとした併用の組み合わせで効果が広く認められる手法開発を念頭に、モデルマウスレベルでの研究を上記の通りに鋭意努力し、今回の発明に至った。

【0013】

すなわち、本発明は、細胞傷害活性を有する抗CD4抗体、又は細胞毒成分を結合させた抗CD4抗体若しくはその抗原結合性断片を有効成分として含有する、免疫チェックポイント制御剤の副作用低減剤であって、前記抗CD4抗体は、ヒトCD4に対するヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体であり、前記細胞傷害活性を有する抗CD4抗体は、抗CD4抗体6G5よりも高いADCC活性又は抗CD4抗体OKT4よりも高いCDC活性を有し、前記免疫チェックポイント制御剤は、CTLA-4、PD-L1、PD-1、及びLAG-3から選択される抑制性の免疫チェックポイント分子に対するアンタゴニストから選択される少なくとも1種である、副作用低減剤を提供する。また、本発明は、細胞傷害活性を有する抗CD4抗体、又は細胞毒成分を結合させた抗CD4抗体若しくはその抗原結合性断片を有効成分として含有する、免疫チェックポイント制御剤の副作用低減剤であって、前記抗CD4抗体は、ヒトCD4に対するヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体であり、前記細胞傷害活性を有する抗CD4抗体は、コアプコースを有しない抗CD4抗体であり、前記免疫チェックポイント制御剤は、CTLA-4、PD-L1、PD-1、及びLAG-3から選択される抑制性の免疫チェックポイント分子に対するアンタゴニストから選択される少なくとも1種である、副作用低減剤を提供する。さらに、本発明は、細胞傷害活性を有する抗CD4抗体、又は細胞毒成分を結合させた抗CD4抗体若しくはその抗原結合性断片を有効成分として含有する、免疫チェックポイント制御剤の副作用低減剤であって、前記抗CD4抗体は、ヒトCD4に対するヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体であり、前記細胞傷害活性を有する抗CD4抗体は、0.01 µg/mLの濃度でADCC活性を示す抗CD4抗体であり、前記免疫チェックポイント制御剤は、CTLA-4、PD-L1、PD-1、及びLAG-3から選択される抑制性の免疫チェックポイント分子に対するアンタゴニストから選択される少なくとも1種である、副作用低減剤を提供する。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、ヒト体内のCD4陽性細胞に対して十分に細胞傷害活性を発揮できるヒト型化された抗CD4抗体等を用いて、抗がん剤等として用いられる免疫チェックポイント制御剤による副作用を軽減することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】ヒト末梢血単核球中のCD4陽性細胞に対する抗CD4ヒト化抗体IT1208のADCC活性を市販のアッセイキットで測定した結果である。

【図2】B16F10細胞株を移植したC57BL/6マウスの各抗体投与群について、生存率を調べた結果である（抗PD-L1抗体単独投与と抗PD-L1抗体＋抗CD4抗体GK1.5併用投与との比較）。

【図3】B16F10細胞株を移植したC57BL/6マウスの各抗体投与群について、生存率を調べた結果である（抗CTLA-4抗体単独投与と抗CTLA-4抗体＋抗CD4抗体GK1.5併用投与との比較）。

10

20

30

40

50

)。

【図4】B16F10細胞株を移植したC57BL/6マウスの各抗体投与群について、生存率を調べた結果である(抗OX40抗体単独投与と抗OX40抗体+抗CD4抗体GK1.5併用投与との比較)。

【図5】B16F10細胞株を移植したC57BL/6マウスの各抗体投与群について、生存率を調べた結果である(抗CTLA-4抗体+抗PD-1抗体併用)。

【図6】B16F10細胞株を移植したC57BL/6マウスの各抗体投与群について、生存率を調べた結果である(抗BTLA抗体単独投与と抗BTLA抗体+抗CD4抗体GK1.5併用投与との比較)。

【図7】B16F10細胞株を移植したC57BL/6マウスの各抗体投与群について、生存率を調べた結果である(抗GITR抗体単独投与と抗GITR抗体+抗CD4抗体GK1.5併用投与との比較)。

【図8】B16F10細胞株を移植したC57BL/6マウスの各抗体投与群について、生存率を調べた結果である(抗LAG-3抗体単独投与と抗LAG-3抗体+抗CD4抗体GK1.5併用投与との比較)

10

【図9】B16F10細胞株を移植したC57BL/6マウスの各抗体投与群について、生存率を調べた結果である(抗TIM-3抗体単独投与と抗TIM-3抗体+抗CD4抗体GK1.5併用投与との比較)

【図10】B16F10細胞株を移植したC57BL/6マウスの各抗体投与群について、生存率を調べた結果である(抗PD-L1抗体+抗LAG-3抗体併用)。

【図11】Renca細胞株を移植したBALB/cマウスの各抗体投与群について、生存率を調べた結果である(抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体の単独投与と抗CD4抗体GK1.5併用投与との比較)。

20

【図12】4T1細胞株を移植したBALB/cマウスの各抗体投与群について、生存率を調べた結果である(抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体の単独投与と抗CD4抗体GK1.5併用投与との比較)。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明による免疫チェックポイント制御剤の副作用を低減する剤は、以下のいずれかを有効成分とする。両者を組み合わせて用いてもよい。以下、本明細書において、(1)及び(2)の有効成分を総称して「抗CD4成分」と呼ぶことがある。

(1) 高い細胞傷害活性を有する抗CD4抗体

(2) 細胞毒成分が結合された、抗CD4抗体又はその抗原結合性断片

30

【0017】

上記(1)及び(2)のいずれの場合も、抗CD4抗体は、典型的にはヒトCD4に対する抗体であり、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体(非ヒト由来抗体のCDR領域をヒト抗体の相当する領域に移植したもの)、又はヒト抗体(非ヒト動物又はヒト細胞株を用いて製造される、ヒトの体内で産生されるものと同じ抗体)である。

【0018】

抗体が有する細胞傷害活性には、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC活性)と補体依存性細胞傷害活性(CDC活性)がある。抗CD4成分が上記(1)の場合、抗CD4抗体はADCC活性とCDC活性のいずれを有するものであってもよいが、CD4陽性細胞に対し十分に高い殺傷能力を発揮できる、高い細胞傷害活性を有する抗体を用いる必要がある。

40

【0019】

「高い細胞傷害活性」とは、ADCC活性の場合、公知の測定方法を用いてCD4発現細胞に対するADCC活性を測定したときに、ADCC活性を有することが知られている公知の抗CD4抗体6G5やCE9.1よりも高いADCC活性を有することをいう。また、CDC活性の場合、公知の測定方法を用いて、同一の補体を用いた実験系でCD4発現細胞に対するCDC活性を測定したときに、CDC活性を有することが知られている公知の抗CD4抗体OKT4よりも強いCDC活性を示すことをいう。

【0020】

抗体のADCC活性やCDC活性を測定方法は、Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)等に記載され公知であり、また市販のキット類も存在する。そのような市販のキットを

50

用いて、公知の抗CD4抗体よりも細胞傷害活性が高いかどうかを評価してよい。市販のキットを用いた細胞傷害活性の測定方法の具体例が下記実施例に記載されている。あるいは、ヒト末梢血単核球と抗CD4抗体を混合して37℃で数時間反応させ、フローサイトメトリック解析によりCD3+細胞及びCD8+細胞を測定し、反応液中のCD3+細胞に対するCD8+細胞の割合（CD8+細胞/CD3+細胞）又はCD8+細胞に対するCD3+細胞の割合（CD3+細胞/CD8+細胞）を算出し、得られた値を、ADCC活性を有しない抗CD4抗体や上記した公知の抗CD4抗体を用いた場合の算出値と比較することにより、抗CD4抗体のADCC活性の強さを評価することができる。ADCC活性が強いほど、反応液中のCD4+細胞数は少なくなる。末梢血ではCD4+細胞数とCD8+細胞数の合計がCD3+細胞数とほぼ同一なので、反応液のCD8+細胞/CD3+細胞を算出した場合、CD4+細胞が少ないほど数値が大きくなり、反応液のCD3+細胞/CD8+細胞を算出した場合、CD4+細胞が少ないほど数値が小さくなる。

10

【0021】

好ましくは、高い細胞傷害活性を有する抗CD4抗体は、公知の抗CD4抗体6G5やCE9.1の10倍以上、より好ましくは100倍以上のADCC活性を有するか、公知の抗CD4抗体OKT4の10倍以上、より好ましくは100倍以上のCDC活性を有する。ここでいう「10倍以上」とは、例えば、一定量の細胞に対して細胞傷害活性を示す抗体濃度の最小値が、公知の上記抗体のその1/10以下であることを意味する。なお、抗CD4抗体のCD4に対するアフィニティーについては、抗体結合活性 K_D が 1×10^{-9} M程度以下であればよい。

【0022】

高い細胞傷害活性を有する抗CD4抗体は、例えば、公知の手法により作出したモノクローナル抗CD4抗体又は既に確立されている公知の抗CD4抗体から、この分野で公知の手法によりその細胞傷害活性を高めることによって作出することができる。あるいは、細胞表面に発現するCD4を特異的に認識し、かつ強力な細胞傷害活性を有する抗CD4抗体が公知であれば、そのような抗体を本発明の剤の有効成分として利用してもよい。例えば、WO 2010/074266には、従来の抗CD4抗体よりもADCC活性が高められた抗CD4抗体が開示されている。

20

【0023】

モノクローナル抗体の作製方法自体はこの分野で周知の常法である。例えば、周知のハイブリドーマ法により作製する場合、CD4タンパク質ないしはその適当な断片（細胞外領域、例えばCD4のN末より394番目までの領域）を免疫原として用いて動物（ヒトを除く）に免疫し、該動物から脾細胞やリンパ球のような抗体産生細胞を採取し、これをミエロマ細胞と融合させてハイブリドーマを調製し、CD4タンパク質と結合する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、これを増殖させて培養上清から抗CD4モノクローナル抗体を得ることができる。CD4の遺伝子配列、アミノ酸配列及び立体構造等の情報は、公的データベースに登録されており、例えばNCBIのGenBankにはM12807のアクセッション番号で登録されている。免疫原として用いるCD4タンパク質ないしはその適当な断片は、このような配列情報に基づいて周知の遺伝子工学的手法により容易に調製することができる。

30

【0024】

キメラ抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体の作製方法も、この分野で周知の方法として確立している。例えば、抗CD4ヒト抗体は、CD4認識を担保するCDR配列断片をカセット改変法にて調製することができる。

40

【0025】

抗体の細胞傷害活性を高める手法も公知であり、いずれの手法を用いてもよい。公知の手法の一例を以下に記載する。

【0026】

ADCC活性を増強する方法の一つとして、抗体のFc部分に存在している糖鎖に含まれるフコース（コアフコース）を除去するポテリジェント（登録商標）技術が挙げられる（Yama-ne-Ohnuki N, Satoh M, Production of therapeutic antibodies with controlled fucosylation, MAbs2009; 1: 230-236.）。このコアフコースを付加する酵素はFucT-8（Fut-8）と称される遺伝子にコードされているので、Fut-8をノックアウトした動物細胞内で組

50

換え抗体をコードする遺伝子を発現させることにより、ADCC活性が増強された抗体分子を得ることができる (Yamane-Ohnuki N, et al., Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity, *Biotechnol Bioeng* 2004; 87: 614-622.)。フコース基質供与を遮ってしまう手法も存在するが、コアフコースに限らず全てのフコースを除去してしまうためコアフコース特異的な手法ではなく、上記したポテリジェント (登録商標) 技術がより好ましい。

【 0 0 2 7 】

ADCC活性を増強する他の方法として、抗体のFc部位に存在する糖鎖を変換する方法が挙げられる。当該方法では、アンテナ型分岐糖鎖部のGlcNAcをGnT-III遺伝子操作で導入することによりコアフコース付加を回避する (M. Schuster et al., Improved effector functions of a therapeutic monoclonal Lewis Y-specific antibody by glycoform engineering, *Cancer Res* 2005; 65: 7934-7941.)。このような手法により作出されたADCC活性が増強された抗CD4抗体を用いてもよい。

10

【 0 0 2 8 】

CDC活性を増強する方法としては、例えば、アイソタイプIgG1の一部にアイソタイプIgG3の配列を組み合わせてCDC活性を高めるコンプリジェント (登録商標) 技術が知られている (Natsume A, In M, Takamura H, et al. Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities, *Cancer Res.* 2008; 68: 3863-3872.)

20

【 0 0 2 9 】

さらに、上記したポテリジェント (登録商標) 技術とコンプリジェント (登録商標) 技術を組み合わせて抗体の細胞傷害活性を強力に高めるアクリタマブ (登録商標) 技術も知られている (Natsume A, et al., Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC, *Drug Des Devel Ther.* 2009; 3: 7-16)。このような手法でADCC活性及びCDC活性の両者を高めた抗CD4抗体を用いてもよい。

【 0 0 3 0 】

抗CD4抗体に細胞毒成分を結合して用いる場合、該抗体は高い細胞傷害活性を有していなくてよく、細胞毒成分によってCD4陽性細胞が傷害される。CD4との結合性を維持した抗体断片 (抗原結合性断片) に細胞毒成分を結合させたものも、本発明の剤の有効成分として使用可能である。

30

【 0 0 3 1 】

本発明において、細胞毒成分とは、生細胞を破壊する活性を有する物質をいい、生物由来の毒物、化学物質、放射性物質等が包含される。

【 0 0 3 2 】

抗原結合性断片は、もとの抗体の対応抗原に対する結合性 (抗原抗体反応性) を維持している限り、いかなる抗体断片であってもよい。具体例としては、Fab、F(ab')₂、scFv等を挙げることができるが、これらに限定されない。FabやF(ab')₂は、周知の通り、モノクローナル抗体をパパインやペプシンのようなタンパク分解酵素で処理することにより得ることができる。scFv (single chain fragment of variable region、単鎖抗体) の作製方法も周知であり、例えば、上記の通りに作製したハイブリドーマのmRNAを抽出し、一本鎖cDNAを調製し、免疫グロブリンH鎖及びL鎖に特異的なプライマーを用いてPCRを行なって免疫グロブリンH鎖遺伝子及びL鎖遺伝子を増幅し、これらをリンカーで連結し、適切な制限酵素部位を付与してプラスミドベクターに導入し、該ベクターで大腸菌を形質転換してscFvを発現させ、これを大腸菌から回収することにより、scFvを得ることができる。

40

【 0 0 3 3 】

本発明において、「免疫チェックポイント制御剤」とは、免疫チェックポイント分子の機能を制御することでT細胞の活性化を促進する物質である。「免疫チェックポイント分子」という語には、免疫チェックポイントとして機能する受容体とリガンドの両者が包含される。

50

【 0 0 3 4 】

免疫チェックポイントとは、免疫系が自己の体を攻撃しないための免疫逃避機構である。T細胞上には免疫チェックポイント受容体が存在し、抗原提示細胞上に発現しているリガンドと相互作用する。T細胞はMHC分子上に提示された抗原を認識して活性化し、免疫反応を起こすが、並行して生じる免疫チェックポイント受容体 - リガンドの相互作用によりT細胞の活性化が調節を受ける。免疫チェックポイント受容体には共刺激性のものと抑制性のものがあり、両者のバランスによってT細胞の活性化及び免疫反応が調節を受けている。

【 0 0 3 5 】

免疫チェックポイント制御剤は、典型的には、抗がん剤として用いられる。従って、本発明の副作用低減剤は、典型的には、免疫チェックポイント制御による抗がん剤の副作用を低減する剤である。がん細胞は、抑制性の免疫チェックポイント受容体に対するリガンドを発現し、該受容体を利用して細胞傷害性T細胞による破壊から逃避している。従って、抑制性の受容体に対するアンタゴニストを投与することで、がん細胞による免疫チェックポイント機構の利用を妨害し、CD8+T細胞によるがん細胞の殺傷を促進することができる。また、共刺激性の免疫チェックポイント受容体に対するアゴニストを投与することで、免疫反応を促進し、それによりCD8+T細胞によるがん細胞の殺傷を促進することも可能である。

10

【 0 0 3 6 】

免疫チェックポイントの制御による抗がん剤として、メラノーマ、肺がん、白血病、胃がん、リンパ腫、腎臓がん等を対象に、抗CTLA-4抗体や抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体等の開発が進んでいるが、このような免疫チェックポイント抗体には自己免疫疾患様その他の副作用があることが知られており、致死的な例も報告されている。抗CD4成分を免疫チェックポイント制御剤と併用することで、そのような重篤な副作用を低減し、免疫チェックポイント制御による抗がん剤の延命効果を高めることができる。免疫チェックポイント制御剤による治療を開始した初期段階のみならず、いずれの時期に抗CD4成分の併用を開始しても、副作用軽減の効果を得ることができる。今後も固形がん、血液がんを問わず様々ながんを対象に免疫チェックポイントの制御による抗がん剤が開発されるものと考えられ、本発明により副作用の問題が解決されれば、その実用化が大いに促進されると期待される。なお、抗CD4成分が免疫チェックポイント制御剤による副作用を低減する機序の詳細は不明であり、本発明の範囲は理論に拘束されるものではないが、以下のことが推察される。免疫チェックポイント制御剤による副作用として、自己免疫疾患様の症状が知られている。一方、下記実施例4では、4T1担癌マウスモデルで見られる免疫チェックポイント抗体の副作用がアナフィラキシーであることが示されている。自己免疫疾患様の症状もその機序はアレルギー反応と同一である。抗CD4成分の投与により、CD4陽性の免疫細胞を体内から除去することで、上記症状の発生に関与しているであろう因子（例えば過剰に応答したT細胞など）の発生ないしは作用を抑え、その結果として副作用が低減されると考えられる。

20

30

【 0 0 3 7 】

本発明において、「アンタゴニスト」という語には、受容体とリガンドとの結合による受容体の活性化を妨害する各種の物質が包含される。例えば、受容体に結合して受容体 - リガンド間の結合を妨害する物質、及びリガンドに結合して受容体 - リガンド間の結合を妨害する物質を挙げることができる。

40

【 0 0 3 8 】

例えば、「抑制性の免疫チェックポイント分子に対するアンタゴニスト」は、抑制性の免疫チェックポイント分子（抑制性の受容体又は該受容体のリガンド）と結合するアンタゴニスト性抗体、抑制性の免疫チェックポイントリガンドに基づいて設計された、受容体を活性化しない可溶性のポリペプチド、又は該ポリペプチドを発現可能なベクター等であり得る。対象となる抑制性の免疫チェックポイント分子として、受容体としてはPD-1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、BTLA等を挙げることができ、リガンドとしてはPD-L1（PD-1のリガ

50

ンド)、PD-L2 (PD-1のリガンド)、CD80 (CTLA-4のリガンド)、CD86 (CTLA-4のリガンド)、GAL9 (TIM-3のリガンド)、HVEM (BTLAのリガンド)等を挙げることができる。抗体の製造方法、化学合成又は遺伝子工学的的手法によるポリペプチドの製造方法は、この分野で周知の常法であり、当業者であれば上記のような抑制性の免疫チェックポイント分子に対するアンタゴニストを常法により調製することができる。

【0039】

「共刺激性の免疫チェックポイント分子に対するアゴニスト」は、共刺激性の免疫チェックポイント受容体と結合する、アゴニスト活性を有する抗体、共刺激性の免疫チェックポイントリガンドに基づいて設計された、受容体を活性化作用を有する可溶性のポリペプチド、又は該ポリペプチドを発現可能なベクター等であり得る。対象となる共刺激性の免疫チェックポイント分子として、受容体としてはCD137、OX40、GITR等を挙げることができ、リガンドとしてはCD137L (CD137のリガンド)、OX40L (OX40のリガンド)、TNFSF18 (GITRのリガンド)等を挙げることができる。

10

【0040】

免疫チェックポイント制御剤が対象とする免疫チェックポイント分子は、例えば、CTLA-4、PD-L1、OX40、CD80、CD86、PD-1、LAG-3、TIM-3、BTLA、及びGITRから選択される少なくとも1種、あるいはCTLA-4、PD-L1、OX40、CD80、CD86、及びPD-1から選択される少なくとも1種、あるいはCTLA-4、PD-L1、OX40、BTLA、GITR、LAG-3、及びTIM-3からなる群より選択される少なくとも1種、あるいはCTLA-4、PD-L1、及びOX40から選択される少なくとも1種、あるいはBTLA、GITR、LAG-3、及びTIM-3からなる群より選択される少なくとも1種であり得る。CTLA-4、PD-L1、OX40、BTLA、GITR、LAG-3、及びTIM-3に対する各抗体は、抗免疫チェックポイント分子抗体の中でも特に副作用が重篤であること、抗CD4成分の併用により重篤な副作用が軽減され、担癌生体の生存率が高まることが具体的に確認されている(下記実施例参照)。なお、上記した通り、CD80及びCD86はCTLA-4のリガンドであり、PD-1はPD-L1の受容体である。

20

【0041】

免疫チェックポイント制御剤は、免疫チェックポイント分子に対する抗体であり得る。免疫チェックポイント制御剤の具体例を挙げると、アンタゴニスト抗体としては、受容体に結合して該受容体へのリガンドの結合を阻害する、抗PD-1抗体、抗CTLA-4抗体、抗LAG-3抗体、抗TIM-3抗体、抗BTLA抗体等を挙げることができ、アゴニスト抗体としては、受容体に結合して下流のシグナル経路を作動させる活性を有する、抗CD137抗体、抗OX40抗体及び抗GITR抗体等を挙げることができる。さらなる具体例として、抑制性の免疫チェックポイント受容体に対するリガンドに結合して該リガンドの受容体への結合を阻害する、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CD80抗体、抗CD86抗体、抗GAL9抗体、及び抗HVEM抗体等を挙げることができる。免疫チェックポイント制御剤の好ましい具体例として、抗PD-L1抗体、アンタゴニスト性抗CTLA-4抗体、及びアゴニスト性抗OX40抗体を挙げることができ、好ましい他の具体例として抗CD137抗体を挙げることができるが、これらに限定されない。

30

【0042】

免疫チェックポイント制御剤は、上記の通り典型的には抗がん剤として利用される。その作用機序から、あらゆる種類のがんに対して免疫チェックポイント制御剤は有効であると考えられる。免疫チェックポイント制御剤の投与経路及び投与量は、例えば抗がん剤として免疫チェックポイント制御剤を用いる場合に通常採用されている通りでよい。抗CD4成分と組み合わせて用いることで、免疫チェックポイント制御剤の重篤な副作用が懸念される場合であっても、その投与量を大幅に減らすことなく、十分な治療効果を得ることができる。

40

【0043】

「併用する」、あるいは「組み合わせて用いる」とは、複数の薬剤を患者に対し同時に、順次に、又は別々に投与することを意味する。組み合わせて用いられる複数の薬剤は、別々の製剤として提供されてもよいし、同時に投与される場合には、同一の製剤中に複数の薬剤が含有された形態であってもよい。

50

【0044】

抗CD4成分と併用する免疫チェックポイント制御剤の数は特に限定されない。抗CD4成分と1種類の免疫チェックポイント制御剤を併用してもよいし、抗CD4成分と2種類の免疫チェックポイント制御剤を併用してもよく、さらには抗CD4成分と3種類又はそれ以上の免疫チェックポイント制御剤を併用してもよい。

【0045】

好ましい組み合わせの具体例として、例えば、抗CD4成分と、アンタゴニスト性抗PD-1抗体と、アンタゴニスト性抗CTLA-4抗体の3種の組み合わせや、抗CD4成分と、抗PD-L1抗体と、アンタゴニスト性抗CTLA-4抗体の3種の組み合わせを挙げることができる。もっとも、本発明において使用可能な抗体の組み合わせは上記に限定されない。

10

【0046】

抗CD4成分の投与経路は、経口投与でも非経口投与でもよいが、筋肉内投与、皮下投与、静脈内投与、動脈内投与等の非経口投与が好ましい。免疫チェックポイント制御剤を固形がんに対する抗がん剤として用いる場合、抗CD4成分は、固形がん組織の近傍に局所投与してもよく、あるいは固形がん近傍の所属リンパ節に投与してもよいが、全身投与で用いることが好ましい。

【0047】

抗CD4成分の投与量は、免疫チェックポイント制御剤の副作用の軽減に有効な量であればよい。有効量は、免疫チェックポイント制御剤が対象とする疾患の症状（がんであれば腫瘍の大きさや症状等）、患者の年齢や体重等に応じて適宜選択される。特に限定されないが、抗CD4成分の投与量は、対象の患者に対し1日当たりの有効量として体重1kg当たり0.001mg/kg～1000mg/kg程度、例えば0.01mg/kg～100mg/kg程度であり得る。1日の投与は1回でもよく、数回に分けて投与してもよい。また、免疫チェックポイント制御剤による治療期間中の抗CD4成分の投与は1回でもよく、あるいは数日間毎日、又は数日、数週若しくは数月おきに複数回投与してもよい。免疫チェックポイント制御剤の投与を開始する前に抗CD4成分の投与を行なってもよい。

20

【0048】

本発明が対象とする患者は哺乳動物であり、典型的にはヒトである。患者は、典型的にはがん患者である。また、患者は、免疫チェックポイント制御剤の投与を現に受けている、又は受けようとする患者である。

30

【0049】

抗CD4成分は、各投与経路に適した、薬剂的に許容される担体、希釈剤、賦形剤等の添加剤と適宜混合して製剤することができる。製剤形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤などの経口剤や、吸入剤、注射剤、座剤、液剤などの非経口剤などを挙げることができる。製剤方法及び使用可能な添加剤は、医薬製剤の分野において周知であり、いずれの方法及び添加剤をも用いることができる。

【実施例】

【0050】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

40

【0051】

実施例1：高いADCC活性を有する抗CD4ヒト化抗体の作製

WO 2010/074266に記載された方法により、ADCC活性が増強された抗ヒトCD4ヒト化抗体IT1208（可変領域としてWO 2010/074266に記載のHV2及びLV0を含む、サブタイプはIgG1）を作製した。Biacore T100を用いて測定された抗体結合活性は K_D (nM) < 0.009であり、高い結合活性を有していた。

【0052】

IT1208のADCC活性の測定は、プロメガ社が市販している、ADCC活性測定キットのプロトコールに従って次の条件で実施した。健康人由来PBMC12500個、anti-CD4mAb（IT1208）、およびプロメガキットに含まれているADCC Bioassay Effector cellの75000個を加え穏や

50

かによく混ぜたのち、CO₂インキュベーター中で37℃、6時間培養し、発光試薬Bio-Glo reagentを加え、室温で20分培養し、発光プレートリーダーで化学発光を測定した。

【 0 0 5 3 】

その結果を図 1 に示す。IT1208は1nM以上でADCC活性を示し、濃度依存的に増強し50nMで最大値に達している。コントロール抗体として使用したリツキシマブ (antiCD20) は、ADCC活性がみられ始めた濃度が10nM以降で、かつ、最大に達する濃度も1µM以降であった。

【 0 0 5 4 】

実施例 2 - 1 : メラノーマ細胞に対する抗CD4抗体 + 免疫チェックポイント抗体併用での抗腫瘍効果 (その 1)

10

C57BL/6系統マウス (雌、7週齢、n=8) の右側腹部にマウスメラノーマ細胞株B16F10 (5x10⁵ cells/mouse) を皮下移植した後、下記の通りに抗体投与を行なった (Day0 = がん細胞移植日)。免疫チェックポイント抗体として、抗PD-1抗体 (J43、アンタゴニスト性抗体、BioXcell社製)、抗PD-L1抗体 (10F.9G2、BioXcell社製)、抗OX40抗体 (OX-86、アゴニスト性抗体、BioXcell社製)、及び抗CTLA-4抗体 (9D9、アンタゴニスト性抗体、BioXcell社製) を用いた。

【 0 0 5 5 】

【 表 1 】

陰性対照群	抗体投与なし(溶媒のPBSを投与)
抗CD4抗体単独群	Day5およびDay9に抗CD4抗体(GK1.5、CDC活性によりマウス体内のCD4陽性細胞を枯渇させることができることが知られている抗体、BioXcell社製)0.2mgを腹腔内に2回投与
免疫チェックポイント抗体単独群	Day4、Day8、Day14およびDay18にいずれかの免疫チェックポイント抗体0.2mgを腹腔内に4回投与
抗CD4+免疫チェックポイント抗体併用群	Day5およびDay9に抗CD4抗体0.2mgを腹腔内に2回投与し、かつ、Day4、Day8、Day14およびDay18にいずれかの免疫チェックポイント抗体0.2mgを腹腔内に4回投与

20

【 0 0 5 6 】

図 2 ~ 4 は、B16F10細胞株を移植したC57BL/6マウスの各群について、生存率を調べた結果である。

30

【 0 0 5 7 】

抗PD-L1抗体、抗OX40抗体、または抗CTLA-4抗体を単独投与した場合、対照群よりも早期に1~3匹の死亡例が出た。なお、この死亡例の増加は、抗PD-1抗体 (J43、アンタゴニスト性抗体、BioXcell社製) と抗CTLA-4抗体との併用においても見られていた (図 5)。

【 0 0 5 8 】

それに対して、抗PD-L1抗体、抗OX40抗体、または抗CTLA-4抗体に抗CD4抗体を併用すると、著しく生存率の改善が見られ、免疫チェックポイント抗体による副作用が顕著に改善されることが明らかになった。

40

【 0 0 5 9 】

実施例 2 - 2 : メラノーマ細胞に対する抗CD4抗体 + 免疫チェックポイント抗体併用での抗腫瘍効果 (その 2)

C57BL/6系統マウス (雌、7週齢、n=8) の右側腹部にマウスメラノーマ細胞株B16F10 (5x10⁵ cells/mouse) を皮下移植した後、下記の通りに抗体投与を行なった (Day0 = がん細胞移植日)。免疫チェックポイント抗体として、抗BTLA抗体 (6A6、アンタゴニスト性抗体、BioXcell社製)、抗GITR抗体 (DTA-1、アゴニスト性抗体、BioXcell社製)、抗LAG-3抗体 (C9B7W、アンタゴニスト性抗体、BioXcell社製)、及び抗TIM-3抗体 (RMT3-23、アンタゴニスト性抗体、BioXcell社製) を用いた。

【 0 0 6 0 】

50

【表 2】

陰性対照群	抗体投与なし(溶媒のPBSを投与)
抗CD4抗体単独群	Day5およびDay9に抗CD4抗体(GK1.5、CDC活性によりマウス体内のCD4陽性細胞を枯渇させることができることが知られている抗体、BioXcell社製)0.2mgを腹腔内に2回投与
免疫チェックポイント抗体単独群	Day4、Day8、Day14およびDay18にいずれかの免疫チェックポイント抗体0.2mgを腹腔内に4回投与
抗CD4+免疫チェックポイント抗体併用群	Day5およびDay9に抗CD4抗体0.2mgを腹腔内に2回投与し、かつ、Day4、Day8、Day14およびDay18にいずれかの免疫チェックポイント抗体0.2mgを腹腔内に4回投与

10

【0061】

図6～10は、B16F10細胞株を移植したC57BL/6マウスの各群について、生存率を調べた結果である。

【0062】

抗BTLA抗体、抗GITR抗体、抗LAG-3抗体、または抗TIM-3抗体を単独投与した場合、対照群よりも早期に1～3匹の死亡例が出た。なお、この死亡例の増加は、抗PD-L1抗体(10F.9G2、BioXcell社製)と抗LAG-3抗体との併用(抗CD4抗体は併用せず)においても見られていた(図10)。

20

【0063】

それに対して、抗BTLA抗体、抗GITR抗体、抗LAG-3抗体、または抗TIM-3抗体に抗CD4抗体を併用すると、著しく生存率の改善が見られ、免疫チェックポイント抗体による副作用が顕著に改善されることが明らかになった。

【0064】

実施例3：腎がん細胞に対する抗CD4抗体+免疫チェックポイント抗体併用での抗腫瘍効果

BALB/c系統マウス(雄、8週齢、n=9)の右側腹部にマウス腎がん細胞株Renca(2×10^5 cells/mouse)を皮下移植した後、下記の通りに抗体投与を行なった(Day0=がん細胞移植日)。免疫チェックポイント抗体として、抗PD-1抗体(J43、アンタゴニスト性抗体、BioXcell社製)、抗PD-L1抗体(10F.9G2、BioXcell社製)を用いた。

30

【0065】

【表 3】

陰性対照群	抗体投与なし(溶媒のPBSを投与)
抗CD4抗体単独群	Day5およびDay9に抗CD4抗体(GK1.5、CDC活性によりマウス体内のCD4陽性細胞を枯渇させることができることが知られている抗体、BioXcell社製)0.2mgを腹腔内に2回投与
免疫チェックポイント抗体単独群	Day4、Day8、Day14およびDay18にいずれかの免疫チェックポイント抗体0.2mgを腹腔内に4回投与
抗CD4+免疫チェックポイント抗体併用群	Day5およびDay9に抗CD4抗体0.2mgを腹腔内に2回投与し、かつ、Day4、Day8、Day14およびDay18にいずれかの免疫チェックポイント抗体0.2mgを腹腔内に4回投与

40

【0066】

図11は、Renca細胞株を移植したBALB/cマウスの各群について、生存率を調べた結果である。

【0067】

抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体を単独投与した場合、対照群よりも早期に1～2匹の死亡例が出た。

50

【 0 0 6 8 】

それに対して、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体に抗CD4抗体を併用すると、著しく生存率の改善が見られ、免疫チェックポイント抗体による副作用が顕著に改善されることが明らかになった。

【 0 0 6 9 】

実施例 4：乳がん細胞に対する抗CD4抗体 + 免疫チェックポイント抗体併用での抗腫瘍効果

BALB/c系統マウス（雌、8週齢、n=10）の乳腺脂肪組織にマウス乳がん細胞株4T1（ 1×10^5 cells/mouse）を皮下移植した後、下記の通りに抗体投与を行なった（Day0 = がん細胞移植日）。免疫チェックポイント抗体として、抗PD-1抗体（J43、アンタゴニスト性抗体、BioXcell社製）、抗PD-L1抗体（10F.9G2、BioXcell社製）を用いた。

【 0 0 7 0 】

【表 4】

陰性対照群	抗体投与なし(溶媒のPBSを投与)
抗CD4抗体単独群(その1)	Day5およびDay9に抗CD4抗体(GK1.5、CDC活性によりマウス体内のCD4陽性細胞を枯渇させることができることが知られている抗体、BioXcell社製)0.2mgを腹腔内に2回投与
抗CD4抗体単独群(その2)	Day13およびDay17に抗CD4抗体(GK1.5、BioXcell社製)0.2mgを腹腔内に2回投与
免疫チェックポイント抗体単独群	Day4、Day8、Day14およびDay18にいずれかの免疫チェックポイント抗体0.2mgを腹腔内に4回投与
抗CD4+免疫チェックポイント抗体併用群	Day5およびDay9に抗CD4抗体0.2mgを腹腔内に2回投与し、かつ、Day4、Day8、Day14およびDay18にいずれかの免疫チェックポイント抗体0.2mgを腹腔内に4回投与

【 0 0 7 1 】

表 5 は、4T1細胞株を移植したBALB/cマウスの各群について、アレルギー症状を調べた結果である。Day14の3回目投与から2時間までの間に見られた症状を評価した。表中の数値は該当するマウスの個体数を示す。

【 0 0 7 2 】

【表 5】

4T1担癌マウスにおける抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体によるアナフィラキシーの評価と抗CD4抗体による抑制作用(Day14)

	体温低下			鎮静(活動性低下)		
	-	+	+++	-	+	+++
対照群	10	0	0	10	0	0
抗CD4抗体	10	0	0	10	0	0
抗PD-1抗体	0	1	9	0	0	10
抗CD4/抗PD-1抗体	10	0	0	0	0	0
抗PD-L1抗体	0	2	8	0	0	10
抗CD4/抗PD-L1抗体	9	1	0	0	0	0

評価基準	体温低下	活動性低下
-	正常(対照群と同等)	正常
+	冷たく感じる	動きが鈍い
+++	体温を感じない	触れても動かない、停止

【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

50

抗PD-1抗体および抗PD-L1抗体は、単独投与した場合、Day14の3回目投与においても、Day18の4回目投与後にも、投与の数分後から投与マウスの全例に重篤なアナフィラキシーが起こり、一部あるいは全部のマウスが死亡した。投与後2時間以内ですべての死亡例が観察され、死亡を免れたマウスは、この後数時間をかけて回復した。

【0074】

なお、対照群および抗CD4抗体単独投与群では、溶媒のPBSおよび抗CD4抗体をそれぞれ同様に腹腔内投与しているが、アレルギー症状も死亡例も全くみられなかった。

【0075】

また、4T1腫瘍マウスモデルでアナフィラキシーが起こることは、我々が別途予備的に行ったエバンスブルーによる能動皮膚アナフィラキシー試験で確認しており（データ省略）、さらに他のグループにより学会でもすでに発表されている。

10

【0076】

これに対して、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体に抗CD4抗体を併用すると、アレルギー症状としての主症状である、体温低下および活動性低下の著しい改善が見られた。以上、免疫チェックポイント抗体による副作用が抗CD4抗体の併用により顕著に改善されることが明らかになった。

【0077】

図12は、4T1細胞株を移植したBALB/cマウスの各群について、生存率を調べた結果である。

【0078】

20

抗PD-1抗体は、単独投与において、Day14の3回目投与後に7匹、Day18の4回目投与後に3匹の死亡例が出た。抗PD-L1抗体は、単独投与において、Day14の3回目投与後に5匹、Day18の4回目投与後に3匹の死亡例が出た。これらの死亡は、投与の数分後から投与マウス全例に起こったアナフィラキシーによるもので、投与後2時間以内にすべての死亡例が観察され、死亡を免れたマウスは、この後数時間をかけて回復し生存した。

【0079】

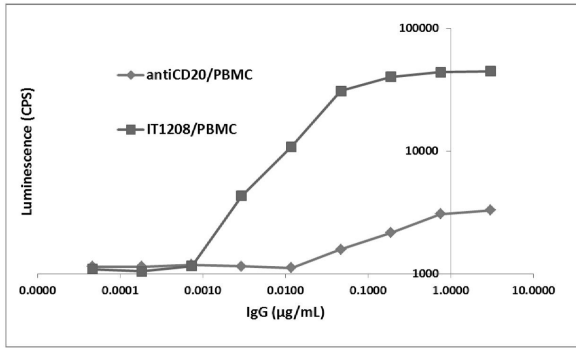
なお、対照群および抗CD4抗体単独投与群では、溶媒のPBSおよび抗CD4抗体をそれぞれ同様に腹腔内投与しているが、アレルギー症状も死亡例も全くみられなかった。

【0080】

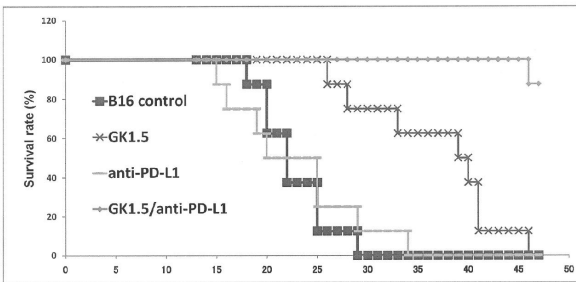
それに対して、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体に抗CD4抗体を併用すると、著しく生存率の改善が見られ、抗PD-1抗体との併用群では全例が生存し、抗PD-L1抗体との併用群ではDay14投与時に死亡例が1例、Day18投与時に死亡例が2例に減少し、最終的に7例生存した。以上、免疫チェックポイント抗体による副作用が抗CD4抗体の併用により顕著に改善されることが明らかになった。

30

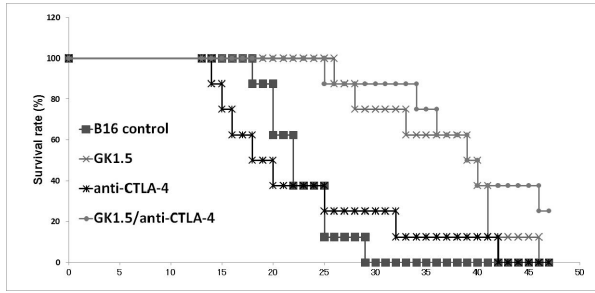
【 1 】



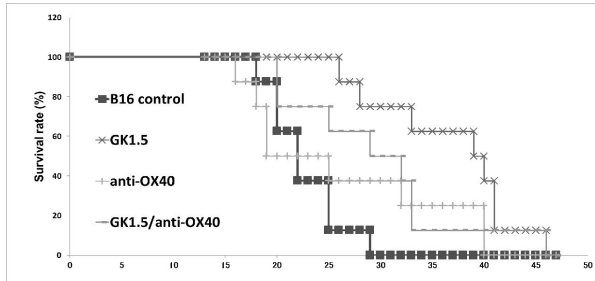
【 2 】



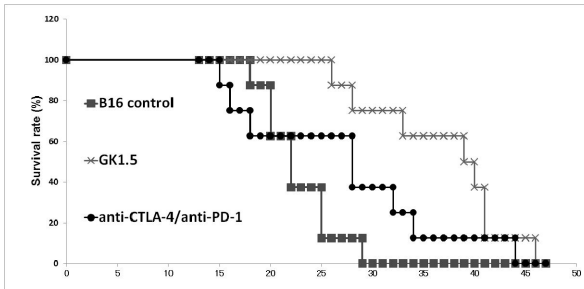
【 3 】



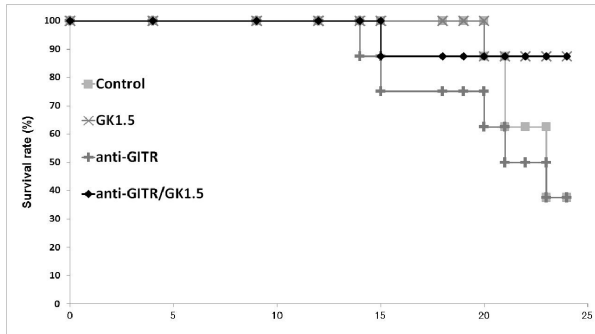
【 4 】



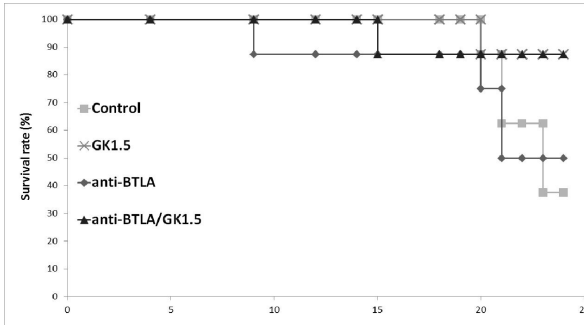
【 5 】



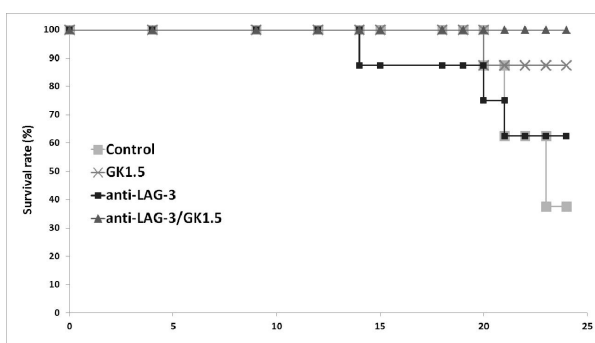
【 7 】



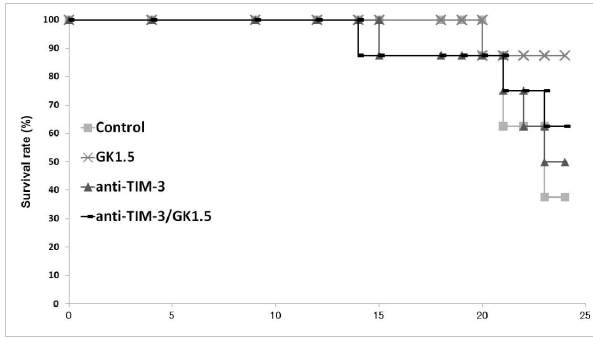
【 6 】



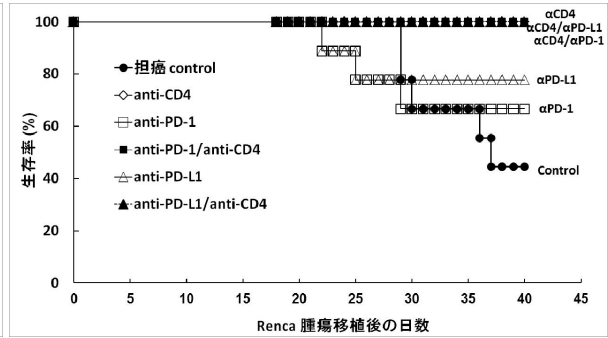
【 8 】



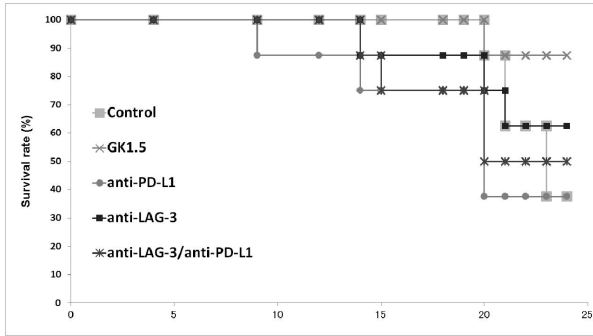
【 9 】



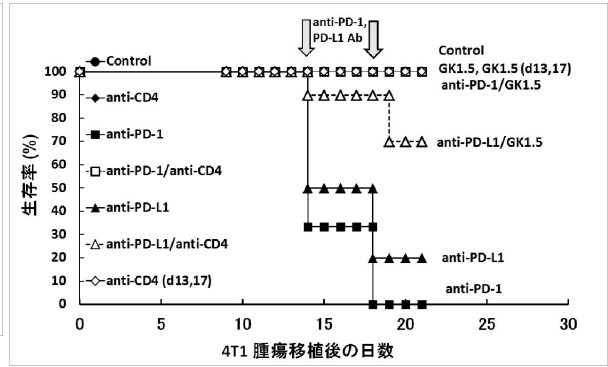
【 1 1 】



【 1 0 】



【 1 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 35/00

(72)発明者 横地 祥司
東京都文京区本郷7-3-1 東京大学アントレプレナープラザ IDACセラノスティクス株式会社内

(72)発明者 松島 綱治
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 上羽 悟史
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 石渡 義郎
東京都文京区本郷7-3-1 東京大学アントレプレナープラザ IDACセラノスティクス株式会社内

審査官 大西 隆史

(56)参考文献 国際公開第2010/074266(WO, A1)
国際公開第2010/067671(WO, A1)
特表2013-521311(JP, A)
MURPHY, J. T. et al., Blood, 2014年 4月 3日, Vol. 123, No. 14, p. 2172-2180, Supplemental Data
COHEN, Adam D. et al., Cancer Research, 2006年 5月, Vol. 66, Issue 9, pp. 4904-4912, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2813
RONCHETTI, Simona et al., The Scientific World Journal, 2012年, Vol. 2012, Article ID: 308265, DOI: 10.1100/2012/308265
Choi BK, et al., Mechanisms Involved in Synergistic Anticancer Immunity of Anti-4-1BB and Anti-CD4 Therapy, Cancer Res, 2007年, Vol.67(18), p.8891-8899
松島 綱治, 癌・免疫疾患治療への新たな挑戦:CCR4とCD4抗体, 日本臨床免疫学会会誌, 2011年, Vol.34, No.4, ランチタイム教育講演6
Zhang P, et al., Prevention of GVHD without losing GVL effect: windows of opportunity, Immunol Res, 2011年, Vol.49, p.49-55
Paradoll DM, The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy, Nature Reviews Cancer, 2012年, Vol.12, p.252-264

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 5 1 / 1 2

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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