

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7419070号
(P7419070)

(45)発行日 令和6年1月22日(2024.1.22)

(24)登録日 令和6年1月12日(2024.1.12)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 U
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	39/395 E
C 0 7 K	14/475 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/64
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	C 0 7 K	14/475 Z N A
請求項の数 19 (全102頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2019-557434(P2019-557434)	(73)特許権者	399019892
(86)(22)出願日	平成30年4月20日(2018.4.20)		ザ・ユニバーシティ・オブ・シカゴ
(65)公表番号	特表2020-517658(P2020-517658 A)		THE UNIVERSITY OF C H I C A G O
(43)公表日	令和2年6月18日(2020.6.18)		アメリカ合衆国 6 0 6 3 7 イリノイ州シ
(86)国際出願番号	PCT/US2018/028505		カゴ、サウス・エリス・アベニュー 5 8
(87)国際公開番号	WO2018/195386		0 1 番
(87)国際公開日	平成30年10月25日(2018.10.25)	(74)代理人	100102978
審査請求日	令和3年4月16日(2021.4.16)		弁理士 清水 初志
(31)優先権主張番号	62/487,823	(74)代理人	100160923
(32)優先日	平成29年4月20日(2017.4.20)		弁理士 山口 裕孝
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74)代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 免疫療法用抗体と連結させた E C M 親和性ペプチドを用いてがんを処置するための方法および組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO:1 のアミノ酸配列を含むペプチドに機能的に連結させた抗 CTLA4 抗体、抗 P D-L1 抗体、または抗 PD-1 抗体を含む、組成物。

【請求項 2】

前記ペプチドが前記抗体と共有結合している、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

前記ペプチドが二官能性リンカーによって前記抗体に架橋されている、請求項 1 または 2 記載の組成物。

【請求項 4】

前記抗体が、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、アテゾリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アベルマブ、またはデュルバルマブを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 5】

前記抗体がヒト化抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 6】

ペプチド対抗体の比が約 1:1 ~ 10:1 である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 7】

SEQ ID NO:1 のアミノ酸配列を含むペプチドに機能的に連結させた第 2 の免疫療法用抗体をさらに含み、任意で、SEQ ID NO:1 のアミノ酸配列を含むペプチドに機能的に連結させ

たCTLA4抗体およびSEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含むペプチドに機能的に連結させたPD-L1抗体を含むかまたはSEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含むペプチドに機能的に連結させたCTLA4抗体およびSEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含むペプチドに機能的に連結させたPD-1抗体を含む、請求項1～6のいずれか一項記載の組成物。

【請求項8】

請求項1～7のいずれか一項記載の組成物を含む、対象におけるがんを処置するための医薬。

【請求項9】

全身投与用であるか、または腫瘍内注射、腫瘍周囲注射、動脈内注射もしくは経カテーテル注射による投与用である、請求項8記載の医薬。

【請求項10】

前記ペプチドに機能的に連結させた前記抗体の投与量が、該ペプチドなしで投与される該抗体の最小有効量より少ないこと、任意で、該ペプチドに機能的に連結させた該抗体の投与量が、該ペプチドなしで投与される該抗体の最小有効量より少なくとも10%少ないことを特徴とする、請求項8または9記載の医薬。

【請求項11】

前記対象が、がん免疫療法薬で以前に処置されたことがあり、任意で、以前のがん免疫療法薬がチェックポイント阻害性抗体を含むものであった、かつ/または該対象が、以前のがん免疫療法薬によるグレード2、3もしくは4の副作用を経験した、請求項8～10のいずれか一項記載の医薬。

【請求項12】

前記対象が、がんと診断されている、請求項8～11のいずれか一項記載の医薬。

【請求項13】

前記がんが、肺がん、前立腺がん、卵巣がん、精巣がん、脳のがん、膠芽細胞腫、小児腫瘍、胚細胞腫瘍、黒色腫、結腸がん、直腸がん、胃がん、食道がん、気管がん、頭頸部がん、膵がん、肝がん、乳がん、子宮頸がん、および外陰がんを含む、任意で、該がんが黒色腫または乳がんを含む、請求項8～12のいずれか一項記載の医薬。

【請求項14】

前記がんが非血液系である、請求項8～12のいずれか一項記載の医薬。

【請求項15】

前記がんが固形腫瘍を含む、請求項8～14のいずれか一項記載の医薬。

【請求項16】

追加のがん治療と組み合わせて用いられることを特徴とし、任意で、該追加のがん治療が、放射線、ワクチン接種、化学療法、養子T細胞療法、サイトカイン療法、抗CD47抗体、抗GD2抗体、もしくは免疫アジュバントを含み、かつ/または、該追加のがん治療が、MUC-1阻害薬、CD40活性化薬、IDO阻害薬、およびOX86アゴニストのうちの1つもしくは複数を含み、さらに任意で、該追加のがん治療が、インドキシモド、GDC-0919、1-メチル-D-トリプトファン、ノルハルマン塩酸塩、ノルハルマン、CAY10581、INCB024360、および2-ベンジル-2-チオブソイド尿素塩酸塩のうちの1つもしくは複数を含み、請求項8～15のいずれか一項記載の医薬。

【請求項17】

SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含むペプチドに機能的に連結させた第2の免疫療法用抗体と組み合わせて用いられることを特徴とし、任意で、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含むペプチドに機能的に連結させたCTLA4抗体およびSEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含むペプチドに機能的に連結させたPD-L1抗体を組み合わせてなるか、またはSEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含むペプチドに機能的に連結させたCTLA4抗体およびSEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含むペプチドに機能的に連結させたPD-1抗体を組み合わせてなる、請求項8～16のいずれか一項記載の医薬。

【請求項18】

前記追加のがん治療の有効性が、前記医薬なしでの該追加のがん治療の実施と比べて高

10

20

30

40

50

い、請求項16記載の医薬。

【請求項19】

前記がんが、少なくとも第1の腫瘍と第2の腫瘍を含む転移がんであり、任意で、前記医薬が第1の腫瘍に対して腫瘍周囲投与または腫瘍内投与され、第2の腫瘍に対しては腫瘍周囲投与も腫瘍内投与もされず、全身投与もされないように用いられることを特徴とし、さらに任意で、第2の腫瘍が有効に処置される、請求項8～18のいずれか一項記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる2017年4月20日に出願された米国特許仮出願第62/487,823号の優先権の恩典を主張する。

【0002】

I. 発明の分野

本発明は一般的に薬の分野に関する。より詳しくは、本発明は、ヌクレオチド構築物、抗体を含むタンパク質、および免疫療法を伴う、がんを処置するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

II. 背景

感染性因子とよく似て、腫瘍細胞は、正常細胞と区別される特異的抗原を発現しており、腫瘍内へのT細胞浸潤は、いろいろながんを有する患者における全生存率(OS)と関連している。しかしながら、がん細胞は、さまざまな機構によって免疫応答を回避し、悪性細胞が増殖して拡散することを可能にする。実際、免疫不全の患者は高いがん発生率を有し得、より悪性腫瘍が発生しやすい。患者の免疫系と腫瘍細胞との間には動的関係が存在する。通常、免疫系は腫瘍細胞を消失させることができる。しかしながら、患者の免疫系が不全であるかまたは抑制されているほど、腫瘍細胞が回避的手法を用いて免疫系を逃れる可能性が高くなる。

【0004】

がんがどのようにして免疫による破壊を回避するかを理解はかなり進んできたが、腫瘍が逃れることに對抗するための手段は追いついていない。腫瘍は免疫を回避するためにいくつかの免疫過程を利用しており、免疫回避のたった1つの過程を標的化する治療法では、がんの増殖、特に急速進行性のがんの増殖を相殺するには充分でない場合があり得る。当技術分野において、免疫回避の多局面を標的化する治療法の必要性が存在している。例えば、免疫系は、健常細胞に対する免疫系の過剰活性化を回避するために多くのチェックポイントまたは「免疫学的ブレーキ」に依存する。腫瘍細胞は多くの場合、このようなチェックポイントを利用して免疫系による検出を逃れる。チェックポイント阻害薬は当技術分野において報告されている。しかしながら、このような治療薬の多くは、非毒性の有効量での投与を禁じる副作用を伴う。当技術分野において、このような組成物の有効量を毒性を伴わずに送達することができる治療法の必要性が存在している。

【発明の概要】

【0005】

本明細書に記載の方法および組成物は、腫瘍内または腫瘍周囲に特異的に標的化されかつ/または保持される抗体を用いた治療のための組成物および方法を提供し、全身性曝露を限定的にして副作用を少なくすることにより当技術分野における必要性に対処する。したがって、本開示の諸局面は、細胞外マトリックス(ECM)親和性ペプチドに機能的に連結させた免疫療法用抗体を含む組成物に関する。ECM親和性ペプチドは細胞外マトリックスタンパク質に対する親和性を有するものである。

【0006】

一態様において、ECM親和性ペプチドは胎盤増殖因子-2(PIGF-2)に由来するペプチ

10

20

30

40

50

ドを含む。一態様において、該ECM親和性ペプチドは、SEQ ID NO:1~13を含む本明細書に開示のECM親和性ペプチドのうちの1つの、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50個（あるいはその中の任意の導出可能な範囲）の連続アミノ酸を含む。本明細書に開示のいずれかのECM親和性ペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個の連続アミノ酸（あるいはその中で導出可能な任意の範囲）は該ペプチドにおいて除外される場合があり得ることが一部の態様において具体的に想定される。一態様において、ECM親和性ペプチドは、SEQ ID NO:1~16のうちの1つとまたはSEQ ID NO:1~16内のペプチドと、少なくともまたは最大70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、99または100%の同一性（あるいはその中で導出可能な任意の範囲）を有するペプチドを含む。一部の態様では、該ペプチドはSEQ ID NO:1と少なくとも85%同一である。一部の態様では、該ペプチドはSEQ ID NO:1を含むか、またはSEQ ID NO:1からなる。一部の態様では、ECM親和性ペプチドはCXCL-12ペプチドを含む。一部の態様では、CXCL-12ペプチドはCXCL-12 ペプチドを含む。一部の態様では、該ペプチドはSEQ ID NO:2（CXCL-12-69-98）と少なくとも85%同一である。一部の態様では、ECM親和性ペプチドはデコリンペプチドを含む。一部の態様では、デコリンペプチドはSEQ ID NO:16と少なくとも85%同一であるか、またはSEQ ID NO:16を含む。一態様において、ECM親和性ペプチドはフォン・ヴィレブランド因子（VWF）ペプチドを含む。一部の態様では、VWFペプチドはVWF A1またはA3ペプチドである。一部の態様では、VWFペプチドは、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、またはそれらの断片と少なくとも85%同一のペプチドを含む。一部の態様では、VWFペプチドはSEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11もしくはSEQ ID NO:14を含むか、またはそれらの断片である。

【0007】

一部の態様では、ペプチドは抗体に共有結合されている。一部の態様では、ペプチドは二官能性リンカーによって抗体に架橋されている。リンカー、例えばアミノ酸またはペプチド模倣物の配列が該ペプチドおよび/または抗体の配列間に挿入され得る。一態様では、フィノマー（fynomer）ドメインが重（H）鎖または軽（L）鎖に、該重（H）鎖または軽（L）鎖のアミノ（NH₂）末端またはカルボキシ（C）末端の最後のアミノ酸のすぐ後に接合される。リンカーは1つまたは複数の特性を有していてもよく、該特性としては、柔軟なコンホメーション、規則的な二次構造を形成できないこと、またはいずれかのドメインを増進し得るかもしれないかもしくはいずれかのドメインと相互作用し得る疎水性もしくは荷電性の性質が挙げられる。柔軟性のタンパク質領域に典型的にみられるアミノ酸の例としてはGly、AsnおよびSerが挙げられ得る。また、他のほぼ中性のアミノ酸、例えばThrおよびAlaもリンカー配列に使用され得る。リンカー配列の長さは、融合タンパク質の機能または活性に有意に影響を及ぼすことなく変動し得る（例えば、米国特許第6,087,329号を参照のこと）。特定の局面では、ペプチドと抗体の重鎖または軽鎖を、約1~25個のアミノ酸残基を有するペプチド配列によって接合する。また、リンカーの例としては、化学部分およびコンジュゲート剤、例えばスルホ-スクシンイミジル誘導体（スルホ-SMCC、スルホ-SMPB）、スベリン酸ジスクシンイミジル（DSS）、グルタル酸ジスクシンイミジル（DSG）および酒石酸ジスクシンイミジル（DST）も挙げられ得る。リンカーの例には、線状炭素鎖、例えばC_N（ここで、N=1~100個の炭素原子、例えば、C、CC、CCC、CCCC、CCCCC、CCCCCC、CCCCCCC、CCCCCCCC）もさらに含まれる。一部の態様では、リンカーがジペプチドリナー、例えばバリン-シトルリン（val-cit）、フェニルアラニン-リシン（phe-lys）リンカー、またはマレイミドカプロン酸-バリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル（vc）リンカーであり得る。一部の態様では、リンカーがスルホスクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート（smcc）である。スルホ-smccコンジュゲーションは、スルフヒドリル（チオール、-SH）と反応するマレイミド基を介して行なわれるが、そのスルホ-NHSエステルは第1級アミン（リシン

10

20

30

40

50

およびタンパク質またはペプチドのN末端にみられるような)に対して反応性である。さらに、リンカーはマレイミドカプロイル(mc)であり得る。

【0008】

一部の態様では、免疫療法用抗体は免疫チェックポイント阻害性抗体を含む。一部の態様では、チェックポイント阻害性抗体は、抗CTLA4抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体、抗TIM3抗体、抗ICOS抗体、抗CD39抗体、抗BTLA抗体、抗KIR抗体、抗LAG3抗体、抗VISTA抗体、抗LAG-3抗体、抗TIGIT抗体または抗CD47抗体を含む。一部の態様では、チェックポイント阻害性抗体はペンブロリズマブ、ニボルマブ、アテゾリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アベルマブまたはデュルバルマブを含む。一部の態様では、免疫療法用抗体はCD-40アゴニスト抗体を含む。一部の態様では、免疫療法用抗体は、GITRアゴニスト抗体、CD134アゴニスト抗体、CD137アゴニスト抗体、CD27アゴニスト抗体、CD28アゴニスト抗体またはCD122アゴニスト抗体を含む。一部の態様では、免疫療法用抗体は本明細書に記載の抗体を含む。一部の態様では、該抗体はヒト化抗体、完全ヒト抗体、キメラ抗体および/または組換え抗体である。

10

【0009】

一部の態様では、ペプチド対抗体の比は約1:1~10:1である。一部の態様では、ペプチド対抗体の比は、少なくとも、最大で、または厳密に約1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1または100:1(あるいはその中の任意の導出可能な範囲)である。

20

【0010】

一部の態様では、組成物は、細胞外マトリックス(ECM)親和性ペプチドに機能的に連結させた第2の免疫療法用抗体をさらに含む。一部の態様では、組成物は、ECM親和性ペプチドに機能的に連結させたCTLA4抗体およびECM親和性ペプチドに機能的に連結させたPD-L1抗体を含む。一部の態様では、組成物は、ECM親和性ペプチドに機能的に連結させたCTLA4抗体およびECM親和性ペプチドに機能的に連結させたPD-1抗体を含む。一部の態様では、組成物は、ECM親和性ペプチドに機能的に連結させた第3の免疫療法用抗体をさらに含む。一部の態様では、組成物は、ECM親和性ペプチドに機能的に連結させたGITR抗体、ECM親和性ペプチドに機能的に連結させたCD134抗体、およびECM親和性ペプチドに機能的に連結させたCD137抗体を含む。

30

【0011】

さらなる局面は、本開示の組成物を対象に投与する段階を含む、対象におけるがんを処置するための方法に関する。一部の態様では、該組成物は全身投与されるか、または腫瘍内注射、腫瘍周囲注射、動脈内注射もしくは経カテーテル注射によって投与される。一部の態様では、本明細書に記載のPIGF-2またはCXCL-12ペプチド(すなわち、SEQ ID NO:1、2、4~10または12)は腫瘍内または腫瘍周囲に投与される。一部の態様では、本明細書に記載のVWFペプチド(すなわち、SEQ ID NO:3、11、13、14または15)は全身投与される。全身投与は、例えば非経口または静脈内であり得る。一部の態様では、がんを処置するための該方法は、複数種の本開示の組成物を対象に投与する段階を含む。ECM親和性ペプチドに機能的に連結させた2種類以上の免疫療法用抗体を投与する態様では、該抗体を、同じ組成物の一部として一緒に投与してもよく、または異なる組成物の一部として別々に投与してもよい。

40

【0012】

一部の態様では、ペプチドに機能的に連結させた抗体の投与量は、該ペプチドなしで投与される該抗体の最小有効量より少ない。一部の態様では、ペプチドに機能的に連結させた抗体の投与量は、該ペプチドなしで投与される該抗体の最小有効量より少なくとも10%少ない。一部の態様では、ペプチドに機能的に連結させた抗体の投与量は、該ペプチドなしで投与される該抗体の最小有効量より少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75または80%(あるいはその中の任意の導出可能な範囲)少ない。

50

【 0 0 1 3 】

一部の態様では、患者は、がん免疫療法薬で以前に処置されたことがある。一部の態様では、以前のがん治療はチェックポイント阻害性抗体を含むものであった。一部の態様では、対象は、以前のがん治療によるグレード2、3または4の副作用を経験した。一部の態様では、該対象はがんと診断されている。一部の態様では、該がんは肺がん、前立腺がん、卵巣がん、精巣がん、脳のがん、膠芽細胞腫、小児腫瘍、胚細胞腫瘍、黒色腫、結腸がん、直腸がん、胃がん、食道がん、気管がん、頭頸部がん、膵がん、肝がん、乳がん、子宮頸がんおよび外陰がんを含む。一部の態様では、該がんは黒色腫または乳がんを含む。一部の態様では、該がんは非血液系である。一部の態様では、該がんは固形腫瘍を含む。一部の態様では、該がんは遠隔転移を含む。一部の態様では、該がんは転移がんである。一部の態様では、転移がんは少なくとも第1の腫瘍と第2の腫瘍を含み、そのいずれかが原発腫瘍の転移であり得る。一部の態様では、第2の腫瘍は第1の腫瘍から遠い部位に存在する。一部の態様では、第2の腫瘍は、第1の腫瘍とは異なる器官もしくは異なる身体部分に存在するか、または第1の腫瘍から少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90もしくは100 cm離れた箇所に存在する。一部の態様では、例えば腫瘍周囲注射または腫瘍内注射による第1の腫瘍への組成物の局所投与により、免疫療法用抗体が第2の腫瘍と全く接触しないにもかかわらず、または第2の腫瘍付近の免疫療法用抗体の濃度がそれ自体では第2の腫瘍が有効に処置されるのに不十分であるにもかかわらず、例えば、サイズが小さくなること、増殖が止まること、または増殖速度が低下することによって第2の腫瘍が有効に処置され得る。したがって、一部の態様では、該組成物が、第1の腫瘍に対して腫瘍周囲投与または腫瘍内投与され、第2の腫瘍に対しては腫瘍周囲投与も腫瘍内投与もされず、全身投与もされない。一部の態様では、第2の腫瘍が第1の腫瘍に対する局所投与によって有効に処置される。

10

20

【 0 0 1 4 】

一部の態様では、該方法は、追加のがん治療の実施をさらに含む。一部の態様では、該追加のがん治療は放射線、ワクチン接種、化学療法、養子T細胞療法、サイトカイン療法、抗CD47抗体、抗GD2抗体または免疫アジュバントを含む。一部の態様では、該追加のがん治療はMUC-1阻害薬、CD40活性化薬、IDO阻害薬およびOX86アゴニストのうちの1つまたは複数を含む。一部の態様では、該追加のがん治療はインドキシモド、GDC-0919、1-メチル-D-トリプトファン、ノルハルマン塩酸塩、ノルハルマン、CAY10581、INCB 024360および2-ベンジル-2-チオプソイド尿素塩酸塩のうちの1つまたは複数を含む。一部の態様では、該追加のがん治療の有効性は、該組成物なしでの該追加のがん治療の実施と比べて高い。該組成物の投与により、腫瘍が、該組成物なしで想定され得るよりも特定の処置法に対して感受性となり得、そのため、追加のがん治療は、単独で使用した場合には比較的効果は少ないであろうが、該組成物と併用して使用した場合は有効であり得る。

30

【 0 0 1 5 】

一部の態様では、該方法は、細胞外マトリックス (ECM) 親和性ペプチドに機能的に連結させた第2の免疫療法用抗体の投与をさらに含む。一部の態様では、該方法は、ECM親和性ペプチドに機能的に連結させたCTLA4抗体の投与とECM親和性ペプチドに機能的に連結させたPD-L1抗体の投与を含む。一部の態様では、該方法は、ECM親和性ペプチドに機能的に連結させたCTLA4抗体の投与とECM親和性ペプチドに機能的に連結させたPD-1抗体の投与を含む。一部の態様では、本明細書に開示の組成物の投与により全身性の腫瘍免疫が誘導される。

40

【 0 0 1 6 】

さらなる局面は、ECM親和性ペプチドに機能的に連結させたCD40アゴニスト抗体を投与する段階を含む、患者におけるがんを処置する方法であって、患者が免疫チェックポイント療法に対して抵抗性のがんを有する、方法に関する。本明細書に開示の任意のECM親和性ペプチドまたはタンパク質を、本方法においてCD40アゴニスト抗体と組み合わせて使用してもよい。また、上記の処置方法の特徴を、この処置方法とともに使用してもよい。一部の態様では、患者は、免疫チェックポイント療法に抵抗性であることがわかってい

50

るがんと診断されている。一部の態様では、患者は免疫チェックポイント療法を以前に受けたことがある。一部の態様では、該がんは該免疫チェックポイント療法に抵抗性であった。一部の態様では、患者は、免疫チェックポイント療法に対して低レスポnderであると判定された。

【0017】

本明細書に開示の任意の態様は本明細書に開示の任意の他の態様とともに実施され得るか、または他の態様と組み合わせられ得、例えば、化合物の諸態様の諸局面が組み合わせられ得る、および/または置き換えられ得、本明細書に記載の任意の方法の状況において任意のあらゆる化合物で実施され得る。同様に、方法の任意の態様の諸局面が本明細書に開示の方法の任意の他の態様と組み合わせられ得る、および/または置き換えられ得る。さらに、本明細書に開示の任意の方法は、該方法がなされるための「組成物の使用」の形態で記載されている場合があり得る。本発明の一態様に関して論考した限定はいずれも、本発明の任意の他の態様にも適用され得ることが具体的に想定される。さらに、本発明の任意の組成物は本発明の任意の方法に使用され得、本発明の任意の方法は本発明の任意の組成物を作製するため、または利用するために使用され得る。

10

【0018】

一部の態様では、方法を提供する。該方法は、本明細書に開示の任意の組成物を投与する段階を含む。

【0019】

用語「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において遺伝子産物に言及している場合、互換的に用いられる。

20

【0020】

用語「対象」、「哺乳動物」および「患者」は互換的に用いられる。一部の態様では、対象は哺乳動物である。一部の態様では、対象はヒトである。一部の態様では、対象はマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ロバまたは実験用被験動物、例えばショウジョウバエ、ゼブラフィッシュなどである。

【0021】

一部の態様では、患者は、がんを以前に処置されたことがある。一部の態様では、対象は以前のがん処置に対して抵抗性であった。一部の態様では、対象は該がん処置に対して低レスポnderであると判定された。

30

【0022】

方法および組成物は本明細書に記載のいずれかの態様の除外を含むことが想定される。

【0023】

用語「1つの(a)」および「1つの(an)」は、本開示において明らかにそうでないことが求められない限り1または複数と定義される。

【0024】

用語「実質的に」は、当業者には理解されるように、主として明記されているものであるが必ずしも完全に明記されているものではない(完全に明記されているものを含む)と定義される。本開示の任意の態様において、用語「実質的に」は、明記されているもの「の[あるパーセンテージ]以内」で置き換えられ得、ここで、パーセンテージとしては0.1、1、5および10パーセントが挙げられる。

40

【0025】

用語「～を含む(comprise)」(およびcompriseの任意の形態、例えば「comprises」および「comprising」)、「～を有する(have)」(およびhaveの任意の形態、例えば「has」および「having」)、「～を含む(include)」(およびincludeの任意の形態、例えば「includes」および「including」)ならびに「～を含む(contain)」(およびcontainの任意の形態、例えば「contains」および「containing」)は非限定の連結動詞である。その結果、1つまたは複数の要素を「含む(comprises)」、「有する(has)」、「含む/includes)」または「含む/contains)」本発明の方法およびシステムは、該1つまたは複数の要素を有するが、該1つまたは複数の要素のみを有することに限

50

定されない。同様に、1つまたは複数の特徴を「含む (comprises)」、「有する (has)」、「含む (includes)」または「含む (contains)」本発明の方法またはシステムの要素は、該1つまたは複数の特徴を有するが、該1つまたは複数の特徴のみを有することに限定されない。

【0026】

ある態様の1つまたは複数の特徴は、記載または図示されていない場合であっても、本開示または該態様の本質によって明らかに禁じられない限り他の態様にも適用され得る。

【0027】

本発明の任意の方法またはシステムは、本記載の任意の要素および/または特徴および/または段階を含む (comprise/include/contain) /有するのではなく、これらからなる、またはこれらから本質的になるものであってもよい。したがって、任意の請求項において、用語「～からなる (consisting of)」または「～から本質的になる (consisting essentially of)」は、所与の請求項の範囲を、通常なら非限定の連結動詞が使用されるであろう範囲から変えるために、上記の非限定の連結動詞のいずれかで置き換えられ得る。「本質的に」記載の要素「からなる」組成物は、任意のさらなる活性成分を排除するが、薬学的賦形剤、バッファー、構成成分などは排除しない。

[本発明1001]

細胞外マトリックス (ECM) 親和性ペプチドに機能的に連結させた免疫療法用抗体を含む組成物。

[本発明1002]

前記ECM親和性ペプチドが胎盤増殖因子-2 (PlGF-2) に由来するペプチドを含む、本発明1001の組成物。

[本発明1003]

前記ペプチドがSEQ ID NO:1と少なくとも85%同一である、本発明1002の組成物。

[本発明1004]

前記ペプチドがSEQ ID NO:1を含む、本発明1002の組成物。

[本発明1005]

前記ペプチドがフォン・ウィレブランド因子 (VWF) ペプチドを含む、本発明1001の組成物。

[本発明1006]

前記VWFペプチドがVWF A1またはA3ペプチドである、本発明1005の組成物。

[本発明1007]

前記VWFペプチドがSEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11またはそれらの断片と少なくとも85%同一のペプチドを含む、本発明1006の組成物。

[本発明1008]

前記VWFペプチドがSEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:11を含む、本発明1007の組成物。

[本発明1009]

前記ペプチドがCXCL-12ペプチドを含む、本発明1001の組成物。

[本発明1010]

前記CXCL-12ペプチドがCXCL-12 ペプチドを含む、本発明1009の組成物。

[本発明1011]

前記ペプチドがSEQ ID NO:2と少なくとも85%同一である、本発明1010の組成物。

[本発明1012]

前記ペプチドが前記抗体と共有結合している、本発明1001～1011のいずれかの組成物。

[本発明1013]

前記ペプチドが二官能性リンカーによって前記抗体に架橋されている、本発明1001～1012のいずれかの組成物。

[本発明1014]

前記免疫療法用抗体が免疫チェックポイント阻害性抗体を含む、本発明1001～1013のいずれかの組成物。

10

20

30

40

50

[本発明1015]

前記免疫チェックポイント阻害性抗体がCTLA4抗体、PD-L1抗体またはPD-1抗体を含む、本発明1014の組成物。

[本発明1016]

前記免疫チェックポイント阻害性抗体がペンブロリズマブ、ニボルマブ、アテゾリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アベルマブまたはデュルバルマブを含む、本発明1014または1015の組成物。

[本発明1017]

前記免疫療法用抗体がCD-40アゴニスト抗体を含む、本発明1001～1013のいずれかの組成物。

10

[本発明1018]

前記抗体がヒト化抗体である、本発明1001～1017のいずれかの組成物。

[本発明1019]

ペプチド対抗体の比が約1:1～10:1である、本発明1001～1018のいずれかの組成物。

[本発明1020]

細胞外マトリックス（ECM）親和性ペプチドに機能的に連結させた第2の免疫療法用抗体をさらに含む、本発明1001～1019のいずれかの組成物。

[本発明1021]

ECM親和性ペプチドに機能的に連結させたCTLA4抗体およびECM親和性ペプチドに機能的に連結させたPD-L1抗体を含む、本発明1020の組成物。

20

[本発明1022]

ECM親和性ペプチドに機能的に連結させたCTLA4抗体およびECM親和性ペプチドに機能的に連結させたPD-1抗体を含む、本発明1020の組成物。

[本発明1023]

本発明1001～1022のいずれかの組成物を対象に投与する段階を含む、対象におけるがんを処置するための方法。

[本発明1024]

前記組成物が全身投与されるか、または腫瘍内注射、腫瘍周囲注射、動脈内注射もしくは経カテーテル注射によって投与される、本発明1023の方法。

[本発明1025]

前記ペプチドに機能的に連結させた前記抗体の投与量が、該ペプチドなしで投与される該抗体の最小有効量より少ない、本発明1023または1024の方法。

30

[本発明1026]

前記ペプチドに機能的に連結させた前記抗体の投与量が、該ペプチドなしで投与される該抗体の最小有効量より少なくとも10%少ない、本発明1025の方法。

[本発明1027]

患者が、がん免疫療法薬で以前に処置されたことがある、本発明1023～1026のいずれかの方法。

[本発明1028]

以前のがん免疫療法薬がチェックポイント阻害性抗体を含むものであった、本発明1027の方法。

40

[本発明1029]

前記対象が、以前のがん免疫療法薬によるグレード2、3または4の副作用を経験した、本発明1027または1028の方法。

[本発明1030]

前記対象が、がんと診断されている、本発明1023～1029のいずれかの方法。

[本発明1031]

前記がんが肺がん、前立腺がん、卵巣がん、精巣がん、脳のがん、膠芽細胞腫、小児腫瘍、胚細胞腫瘍、黒色腫、結腸がん、直腸がん、胃がん、食道がん、気管がん、頭頸部がん、膵がん、肝がん、乳がん、子宮頸がんおよび外陰がんを含む、本発明1023～1030の

50

いずれかの方法。

[本発明1032]

前記がんが黒色腫または乳がんを含む、本発明1031の方法。

[本発明1033]

前記がんが非血液系である、本発明1001～1030のいずれかの方法。

[本発明1034]

前記がんが固形腫瘍を含む、本発明1023～1033のいずれかの方法。

[本発明1035]

追加のがん治療の実施をさらに含む、本発明1023～1034のいずれかの方法。

[本発明1036]

前記追加のがん治療が放射線、ワクチン接種、化学療法、養子T細胞療法、サイトカイン療法、抗CD47抗体、抗GD2抗体または免疫アジュバントを含む、本発明1035の方法。

[本発明1037]

前記追加のがん治療がMUC-1阻害薬、CD40活性化薬、IDO阻害薬およびOX86アゴニストのうちの1つまたは複数を含む、本発明1035または1036の方法。

[本発明1038]

前記追加のがん治療がインドキシモド、GDC-0919、1-メチル-D-トリプトファン、ノルハルマン塩酸塩、ノルハルマン、CAY10581、INCB024360および2-ベンジル-2-チオブソイド尿素塩酸塩のうちの1つまたは複数を含む、本発明1037の方法。

[本発明1039]

細胞外マトリックス（ECM）親和性ペプチドに機能的に連結させた第2の免疫療法用抗体の投与をさらに含む、本発明1023～1038のいずれかの方法。

[本発明1040]

ECM親和性ペプチドに機能的に連結させたCTLA4抗体の投与とECM親和性ペプチドに機能的に連結させたPD-L1抗体の投与を含む、本発明1039の方法。

[本発明1041]

ECM親和性ペプチドに機能的に連結させたCTLA4抗体の投与とECM親和性ペプチドに機能的に連結させたPD-1抗体の投与を含む、本発明1039の方法。

[本発明1042]

前記追加のがん治療の有効性が、前記組成物なしでの該追加のがん治療の実施と比べて高い、本発明1035～1038のいずれかの方法。

[本発明1043]

前記がんが、少なくとも第1の腫瘍と第2の腫瘍を含む転移がんである、本発明1023～1042のいずれかの方法。

[本発明1044]

前記組成物が第1の腫瘍に対して腫瘍周囲投与または腫瘍内投与され、第2の腫瘍に対しては腫瘍周囲投与も腫瘍内投与もされず、全身投与もされない、本発明1043の方法。

[本発明1045]

第2の腫瘍が有効に処置される、本発明1044の方法。

[本発明1046]

前記免疫療法用抗体が GITR抗体、CD134抗体またはCD137抗体を含む、本発明1001～1013のいずれかの組成物。

[本発明1047]

ECM親和性ペプチドに機能的に連結させた第2の免疫療法用抗体、および任意でECM親和性ペプチドに機能的に連結させた第3の免疫療法用抗体をさらに含む、本発明1001～1013のいずれかの組成物。

[本発明1048]

ECM親和性ペプチドに機能的に連結させた GITR抗体、ECM親和性ペプチドに機能的に連結させた CD134抗体、およびECM親和性ペプチドに機能的に連結させた CD137抗体のうちの少なくとも2つを含む、本発明1047の組成物。

10

20

30

40

50

[本発明1049]

前記チェックポイント阻害性抗体がTIGIT抗体、TIM-3抗体、CD47抗体、ICOS抗体、CD39抗体、BTLA抗体、KIR抗体、LAG3抗体またはVISTA抗体を含む、本発明1014の組成物。

[本発明1050]

前記ECM親和性ペプチドがデコリンペプチドを含む、本発明1001の組成物。

[本発明1051]

前記デコリンペプチドがSEQ ID NO:16を含むか、またはSEQ ID NO:16と少なくとも85%同一であるペプチドを含む、本発明1050の組成物。

[本発明1052]

前記VWFペプチドがSEQ ID NO:14を含むか、またはSEQ ID NO:14と少なくとも85%同一であるペプチドを含む、本発明1006の組成物。

[本発明1053]

本発明1046～1052のいずれかの組成物を対象に投与する段階を含む、対象におけるがんを処置するための方法。

[本発明1054]

細胞外マトリックス（ECM）親和性ペプチドに機能的に連結させたCD40アゴニスト抗体を投与する段階を含む、患者におけるがんを処置する方法であって、該患者が免疫チェックポイント療法に対して抵抗性のがんを有する、方法。

[本発明1055]

前記患者が、免疫チェックポイント療法に抵抗性であることがわかっているがんと診断されている、本発明1054の方法。

[本発明1056]

前記患者が免疫チェックポイント療法を以前に受けたことがある、本発明1054または1055の方法。

[本発明1057]

前記がんが前記免疫チェックポイント療法に抵抗性であった、本発明1056の方法。

【図面の簡単な説明】

【0028】

以下の図面は、本明細書の一部を構成し、本発明の一部の特定の局面の実例をさらに示すために含まれている。本発明は、この図面の1つまたは複数を本明細書に提示した具体的な態様の詳細説明と併せて参照することによってよりよく理解され得よう。

【0029】

【図1】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチドコンジュゲートIgG（PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-IgG）はECMタンパク質に高親和性で無差別に結合し、プラスミンによって放出される。（A）PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチド（PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄）とIgG AbのコンジュゲーションによってECMタンパク質に対する結合がもたらされる模式図。（B）PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-ラットIgG2aおよびwt-ラットIgG2aを還元条件下でのSDS-PAGEによりクマシーブルー染色を用いて解析した。ECMタンパク質に対する（C）PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4（クローンUC10-4F10-11:4F10）の結合および（D）PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1の結合（ELISAによって測定）。A450 nmは450 nmの吸光度を表す。ウシ血清アルブミン（BSA）を陰性対照として使用した（n = 6, 平均 ± SD）。（E）フィブロネクチン、I型コラーゲン、rmCTLA4および/またはrmPD-L1に対するPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-およびwt-CTLA4（2種類のクローン:4F10および9H10）ならびにPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-およびwt-PD-L1の親和性（K_d値を示す）をELISAによって測定した（n = 4）。N.D. = シグナルが弱いので測定されず。（F）PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-ラットIgG2aは、0.1 U/mLのプラスミンによる切断後、フィブロネクチンおよびコラーゲンIへの結合能を失った（ELISAによって測定）（n = 4, 平均 ± SD）。統計解析はANOVAをチューキーの検定とともに用いて行なった。* * p < 0.01。

【図2】図2A～G：PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションによりAbに対する全身性曝露および処置関連組織損傷の潜在的 가능성이低減される。5 × 10⁵個のB16F10細胞を0日目に

10

20

30

40

50

接種した。(A,B) PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4とPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1 (100 µgずつ)、 CTLA4と PD-L1 (100 µgずつ)、またはPBSを4日目に投与した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-AbおよびPBSはp.t.注射し、wt Abはi.p.またはp.t.のいずれかで注射した。5、7、9および11日目に血漿を収集した。(A) CTLA4および(B) PD-L1の血漿中の濃度(ELISAによって測定)(n=8,平均±SEM)。(C~G) PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4およびPD-L1またはwt- CTLA4および PD-L1 (500 µgずつ/注射)を4日目および7日目にp.t.注射した。9日目、血清を収集し、(C) TNF、(D) IFN、(E) IL2、(F) ALTレベルの血清中の濃度を測定した(平均±SEM)。(G) 8日目、肝臓組織内のリンパ球浸潤スポットの数を計数し、面積に対して正規化した(平均±SEM)。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ 。図2H: 16週齢の雄NOD/ShiLtJマウスに100 µgの PD-L1を0日目と2日目に投与した。Ab注射はすべて、背中 of 皮膚の皮内であった。臨床的糖尿病は連続3日間の血糖の読み値が250 mg/dLと規定した。実験終了時まで糖尿病を発症したマウスの数/全マウスは図に記載されている。統計解析はログランク(マンテル・コックス)検定を用いて行なった。 $**p < 0.01$ 。

【図3】 PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1によりB16F10黒色腫の増殖速度が低下した。(A,B) 1×10^6 個のB16F10-OVA細胞または(C~H) 5×10^5 個のB16F10細胞を0日目に接種した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1 (PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab)、 CTLA4 + PD-L1 (Ab)、Ab + 非架橋PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチド、またはPBSを(A~F) 4、7、10日目に投与、または(G,H) 4、6日目に300 µgおよび9、12日目に100 µgで投与した。Abはi.p.またはp.t.のいずれかで注射した。投与1回あたりのAb用量を図に示している。 CTLA4クローンとして、(A~D)では4F10および(E~H)では9H10を使用した。グラフは、(A、C、E、G)最初にマウスが死亡したときまでの腫瘍体積、および(B、D、F、H)生存率を示す。腫瘍体積を平均±SEMで示す。(A、B、C、D) $n > 6$ 、(E、F) $n > 9$ 、(G,H) $n > 5$ 。統計解析は、腫瘍サイズにはANOVAをテューキーの検定とともに用いて、生存曲線にはログランク(マンテル・コックス)検定を用いて行なった。 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ 。

【図4】 PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1処置によってT細胞の活性化が誘起され、B16F10黒色腫浸潤性CD8⁺T細胞の増加がもたらされる。 5×10^5 個のB16F10細胞を0日目に接種した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1 (PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab)、 CTLA4 + PD-L1 (Ab)、またはPBSを4日目および7日目に投与した。Abは100 µgずつ/注射で、i.p.またはp.t.のいずれかで注射した。クローン9H10を CTLA4として使用した。腫瘍およびtd-LNを8日目に採取した後、FACS解析を行なった。CD8⁺CD3⁺腫瘍浸潤性T細胞の(A)数および(B)頻度。CD8⁺CD3⁺腫瘍浸潤性T細胞のうちの(C)CD62L⁻CD44⁺エフェクター細胞の頻度および(D)PD-1⁺細胞。CD4⁺CD3⁺腫瘍浸潤性T細胞の(E)数および(F)頻度。CD4⁺CD3⁺腫瘍浸潤性T細胞のうちの(G)CD62L⁻CD44⁺エフェクター細胞の頻度および(H)Foxp3⁺CD25⁺Treg細胞。(I~L)T細胞を腫瘍から抽出し、CD28およびCD3で6時間刺激した。グラフは、CD8⁺CD3⁺T細胞のうちの(I)Gzmb⁺、(J)IL2⁺、(K)TNF⁺および(L)IFN⁺の%を示す。(M~P)グラフは、td-LNにおける(M)CD8⁺CD3⁺T細胞のうちのCD62L⁻CD44⁺エフェクター細胞、(N)CD4⁺CD3⁺T細胞のうちのFoxp3⁺CD25⁺Treg細胞、(O)CD62L⁺CD44⁺記憶、および(P)CD8⁺CD3⁺T細胞のうちのPD-1⁺細胞の%を示す。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ 。

【図5】 PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1処置により全身性抗腫瘍免疫が誘導される。(A)実験全体を通しての腫瘍接種およびAb投与のスケジュール。 5×10^5 個のB16F10細胞を0日目にマウス背中 of 皮膚の左側の皮内に接種し、次いで、2日目に右側で繰り返した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1 (PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab)、 CTLA4 + PD-L1 (Ab)またはPBSを4、7および10日目に投与した。Abは100 µgずつ/注射で、i.p.またはp.t.のいずれかで注射した。p.t.注射は左側腫瘍

付近のみに行ない、右側の腫瘍には行なわなかった。(B)左側背部の1つ目の腫瘍および(C)右側背部の2つ目の腫瘍の腫瘍体積を測定した($n = 9$, 平均 \pm SEM)。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。 $**p < 0.01$ 。

【図6】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1は臨床的に重要ながんモデルにおいて抗腫瘍活性を示す。(A) Tyr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl}マウスに50 μ gの4-OH-タモキシフェンを背中 of 皮膚に投与し、黒色腫の発生を誘導した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1 (PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab)、CTLA4 + PD-L1 (Ab) またはPBSを腫瘍が視認可能になった後0、3および6日目にp.t.注射した。Abは100 μ gずつ/注射で注射した。(BC) MMTV-PyMT細胞は、FVB-Tg (MMTV-PyMT) トランスジェニックマウスに自然に発生した乳がんから採取し、インビトロで培養した。8 $\times 10^5$ 個のMMTV-PyMT細胞を右側の乳腺脂肪体内に接種した。7、10および13日後、Abを100 μ gずつ/注射でp.t.注射した。(D) 最初の腫瘍接種の30日後、8 $\times 10^5$ 個のMMTV-PyMT細胞をPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab処置無腫瘍生存動物または無処置マウスの左側の乳腺脂肪体内に再度接種した。数値は、全マウスのうち実験終了時にどれだけ多くのマウスが無腫瘍のままであることを示す。グラフは、(A、B、D) 最初にマウスが死亡したときまでの腫瘍体積、および(C) 生存率を示す。CTLA4クローン9H10を使用した。腫瘍体積を平均 \pm SEMで示す。(A) $n > 6$ 、(BC) $n > 12$ 、(C) $n > 6$ 。統計解析は、腫瘍サイズにはANOVAをテューキーの検定とともに用いて、生存曲線にはログラंक (マンテル・コックス) 検定を用いて行なった。 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ 。

【図7】MALDI-TOF MS解析により、CTLA4 (4F10) および PD-L1とのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションによって分子量が増えていることが確認された。(A) wt 4F10、(B) PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-4F10、(C) PD-L1および(D) PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1。X軸は質量電荷比 (m/z) であり、Y軸は二重荷電イオンの強度%である。平均分子量のシフトは、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲート形態とそのwt形態との比較によって算出する。

【図8】(A) wt-CTLA4 (4F10) および(B) PD-L1のECMタンパク質に対する結合 (ELISAによって測定)。450 nmの吸光度 (A450 nm) を測定した。ウシ血清アルブミン (BSA) を対照として使用した ($n = 6$, 平均 \pm SD)。

【図9】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 (2種類のクローン: (AB) 4F10および(CD) 9H10) ならびに(EF) PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1のフィブロネクチンおよびコラーゲンIに対する親和性。グラフは、ELISAによって得られた結合曲線を示す ($n = 4$, 平均 \pm SEM)。シグナルを非線形回帰によってフィッティングし、吸光度A450 nm = $B_{max} * [ECMタンパク質] / (K_d + [ECMタンパク質])$ を用いてK_dを得た。K_d値を図1Eに示す。

【図10】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-またはwt-CTLA4 (2種類のクローン: (A) 4F10および(B) 9H10) ならびに(C) PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-またはwt-PD-L1のその抗原に対する親和性。グラフは、ELISAによって得られた結合曲線を示す ($n = 4$, 平均 \pm SEM)。シグナルを非線形回帰によってフィッティングし、A450 nm = $B_{max} * [抗原] / (K_d + [抗原])$ を用いてK_dを得た。K_d値を図1Eに示す。

【図11】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4およびwt-CTLA4はT33.1細胞株に結合し、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1およびwt-PD-L1はB16F10細胞に同様のレベルで結合する。(A) 1 $\times 10^5$ 個のT細胞ハイブリドーマ (T33.1細胞) をPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4またはwt-CTLA4とともにインキュベートした。(B) 1 $\times 10^5$ 個のB16F10細胞をPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1またはwt-PD-L1とともにインキュベートした。次いで細胞を二次抗体で染色した。結合した抗体をフローサイトメトリーによって検出した。CTLA4として4F10を使用した。細胞表面上の残存ECMタンパク質の影響を回避するため、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1またはwt-PD-L1とともにインキュベーションしながらB16F10細胞を10 μ Mヘパリンで30分間処理した。灰色, アイソタイプ対照抗体。黒, CTLA4またはPD-L1。

【図12】ヘパリンはPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abのフィブロネクチン結合を阻害する。数種類の濃度のヘパリンの存在下におけるPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-ラットIgG2aのフィブロネクチンに対する親和性。グラフは、ELISAによって得られた結合曲線を示す ($n = 4$, 平均 \pm SEM)。

【図13】SDS-PAGEゲルによって観察されたプラスミン切断されたPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄。1

10

20

30

40

50

0 $\mu\text{g/mL}$ のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-ラットIgG2aを0.1 U/mLのプラスミンとともに37 °Cで一晩インキュベートした。この溶液を還元条件下でSDS-PAGEに供し、クマシーブルー染色によって解析した。

【図14】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abはインビトロでコラーゲン組織中に保持される。重合コラーゲンシート上におけるPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1の保持とwt- PD-L1の保持の対比。コラーゲンマトリックスを10 $\mu\text{g/mL}$ の抗体の存在下で3時間インキュベートし、2 mLの生理学的バッファー中で5日間さらにインキュベートした。バッファーを毎日交換し、5日目に0.1 U/mLのプラスミンを用いて抗体を放出させた。PD-L1レベルをそれぞれの日にELISAによって定量した ($n = 4$, 平均 \pm SEM)。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。* * $p < 0.01$ 。

10

【図15】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションにより、CTLA4 + PD-L1注射によって誘導される肝臓障害が低減される。5 $\times 10^5$ 個のB16F10細胞を0日目に接種した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1、CTLA4 + PD-L1 (500 μg ずつ)、またはPBSを4日目と7日目に注射した。8日目と10日目の組織検査肝臓切片。スケールバー = 400 μm 。5匹のマウスの群の代表的な切片。

【図16】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40またはwt- CD40の組換えマウスCD40タンパク質に対する親和性。グラフは、ELISAによって得られた結合曲線を示す ($n = 4$, 平均 \pm SEM)。シグナルを非線形回帰によってフィッティングし、 $A_{450\text{ nm}} = B_{\text{max}} * [\text{抗原}] / (K_d + [\text{抗原}])$ を用いて K_d を得た。 K_d 値を図に示す。

【図17】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションにより、p.t.注射後のCD40の血漿中の濃度が低下する。5 $\times 10^5$ 個のB16F10細胞を0日目に接種した。50 μg のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40、CD40 またはPBSを4日目にp.t.注射した。5、7および9日目に血漿を収集した。CD40の血漿中の濃度をELISAによって測定した ($n = 5$, 平均 \pm SEM)。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて、それぞれの日の値を用いて行なった。* * $p < 0.01$ 。

20

【図18】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションにより、CD40注射によって誘導される肝臓障害が低減される。5 $\times 10^5$ 個のB16F10細胞を0日目に接種した。50 μg のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40またはCD40を4日目に注射した。(A) 血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) レベルを、表示の日に測定した ($n > 8$, 平均 \pm SEM)。(B) 50 μg のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40、CD40またはPBSのp.t.注射の3日後の組織検査肝臓切片。スケールバー = 400 μm 。3匹のマウスの群の代表的な切片。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて、それぞれの日の値を用いて行なった。* $p < 0.05$; N.S. = 有意でない。

30

【図19】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4もPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1も、いずれの単剤処置も腫瘍の増殖に影響を及ぼさない。C57BL/6マウスに1 $\times 10^6$ 個のB16F10-OVA細胞を0日目に皮内注射した。4、7および10日目に、マウスを50 μg /用量のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1、CTLA4、PD-L1またはPBSで処置した。グラフは、最初にマウスが死亡したときまでの腫瘍体積および生存率を示す。CTLA4クローンとして4F10を使用した。腫瘍体積を平均 \pm SEMで示す。統計解析は、腫瘍サイズにはANOVAをテューキーの検定とともに用いて、生存曲線にはログラंक (マンテル・コックス) 検定を用いて行なった。N.S. = 有意でない。

40

【図20】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abの単回注射によって腫瘍の増殖が抑制される。C57BL/6マウスに5 $\times 10^5$ 個のB16F10細胞を0日目に皮内注射した。4日目に、マウスをPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4およびPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1 (PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab)、CTLA4およびPD-L1 (Ab) (100 μg ずつ)、またはPBSで処置した。腫瘍サイズを11日目に測定した。CTLA4クローンとして9H10を使用した。データを平均 \pm SEMで示す。統計解析は腫瘍サイズについてANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。* $p < 0.05$; * * $p < 0.01$ 。

【図21】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abは脾臓内のT細胞を活性化させる。5 $\times 10^5$ 個のB16F10細胞を0日目に接種した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4およびPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1 (PIG

50

F-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab)、CTLA4およびPD-L1(Ab)、またはPBSを4日目および7日目に投与した。Abを100 μgずつ/注射でp.t.注射した。クローン9H10をCTLA4として使用した。脾臓を8日目に採取した後、FACS解析を行なった。(A~D)グラフは、脾臓内の(A)CD8⁺T細胞のうちのCD62L⁺CD44⁺エフェクター細胞、(B)CD4⁺T細胞のうちのFoxp3⁺CD25⁺Treg細胞(C)CD62L⁺CD44⁺記憶および(D)CD8⁺T細胞のうちのPD-1⁺細胞の%を示す。バーは平均±SEMを示す。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。*p<0.05; **p<0.01。

【図22】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abは、B16F10-OVAモデルで試験したtd-LNにおいて腫瘍抗原特異的T細胞を活性化する。1×10⁶個のB16F10-OVA細胞を0日目に接種した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4およびPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1(PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab)、CTLA4およびPD-L1(Ab)、またはPBSを4日目および7日目に投与した。Abを100 μgずつ/注射でp.t.注射した。クローン9H10をCTLA4として使用した。腫瘍、td-LN、非td-LN(反対側のLN)および脾臓を8日目に採取した後、FACS解析を行なった。(A~D)グラフは、(A)td-LN、(B)非td-LN、(C)脾臓および(D)腫瘍内のOVA₂₅₇₋₂₆₄(SIINFPEKL)特異的CD8⁺T細胞の%を示す(SIINFPEKL-MHCIペンタマー染色によって測定)。バーは平均±SEMを示す。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。**p<0.01。

【図23】図5の個々の腫瘍の増殖曲線。5×10⁵個のB16F10細胞を0日目に左側背部の皮内に接種し、次いで、2日目に右側背部で繰り返した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4+PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1(PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab)、CTLA4+PD-L1(Ab)またはPBSを4、7および10日目に投与した。Abは100 μgずつ/注射で、i.p.またはp.t.のいずれかで注射した。p.t.注射は左側腫瘍付近のみに行ない、右側の腫瘍には行なわなかった。グラフは、(A)左側および(B)右側の腫瘍の個々の増殖を示す。CTLA4クローン9H10を使用した。

【図24】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチドはB16F10細胞の増殖に影響を及ぼさない。5×10⁴個のB16F10黒色腫細胞を、表示の濃度のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチドの存在下または非存在下、24ウェルプレート内で培養した。3日間のインキュベーション後、細胞数を計数した。(n=4,平均±SD)。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。N.S.=有意でない。

【図25】CXCL-12はECMタンパク質に、CXCL-12と比べて強く結合する。ECMタンパク質に対するCXCL-12の結合(ELISAによって測定)。ELISAプレートを10 μg/mLのECMタンパク質(フィブロネクチンおよびフィブリノゲン)でコートし、1 μg/mLの組換えヒトCXCL-12またはCXCL-12とともにさらにインキュベートした。結合したCXCL-12を、CXCL-12に対する特異的抗体を用いて検出した。A450 nmは450 nmの吸光度を表す。ウシ血清アルブミン(BSA)を陰性対照として使用した(n=3,平均±SD)。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。**p<0.01。

【図26】CXCL-12₆₉₋₉₈ペプチドコンジュゲートIgG(CXCL-12₆₉₋₉₈-IgG)はECMタンパク質に結合する。ECMタンパク質に対するCXCL-12₆₉₋₉₈-IgGの結合(ELISAによって測定)。ELISAプレートを10 μg/mLのECMタンパク質(フィブロネクチン、フィブリノゲン、I型コラーゲンおよびII型コラーゲン)でコートし、10 μg/mLの組換えヒトCXCL-12₆₉₋₉₈ペプチドコンジュゲートIgG(CXCL-12₆₉₋₉₈-IgG)または野生型IgGとともにさらにインキュベートした。結合したIgGを、IgGに対する特異的抗体を用いて検出した。A450 nmは450 nmの吸光度を表す(n=3,平均±SD)。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。**p<0.01。

【図27】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置により、B16F10黒色腫の増殖速度がCD40処置と比べてさらに低下する。CD40は、抗原提示細胞(APC)、例えば樹状細胞(DC)、単球およびB細胞上に発現される腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーのメンバーである。DC上のCD40へのリガンド結合により、共刺激分子および主要組織適合複合体(MHC)分子の細胞表面発現の増大ならびに炎症促進サイトカインの産生が誘導される。これによりT細胞の活性化の増強がもたらされる。ここで、本発明者らは、腫瘍の増殖を抑制す

10

20

30

40

50

ることが示されている抗CD40アゴニスト抗体（CD40）を使用し、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチドコンジュゲーションによって腫瘍に対するその治療効果が向上するかどうかを試験した。5×10⁵個のB16F10細胞を0日目に接種した。50 μgのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40、CD40またはPBSを4日目に投与した。Abをp.t.注射した。グラフは、各群で最初にマウスが死亡したときまでの腫瘍体積を示す。腫瘍体積を平均±SEMで示す。n>8。統計解析はANOVAをテューキーの検定またはスチューデントのt-検定とともに用いて行なった。* * p<0.01。

【図28】CBDタンパク質コンジュゲート抗体はコラーゲンIおよびIIIに高い親和性で結合し、その標的に対する結合を保持する。(A) vWF A3組換えタンパク質のIgG抗体とのコンジュゲーションによってコラーゲンに対する結合がもたらされる模式図。(B) I型コラーゲンおよびIII型コラーゲン、rmCTLA4および/またはrmPD-L1に対するCBD-および非修飾PD-L1ならびにCBD-および非修飾CTLA4の親和性(K_D値を示す)をELISAによって測定した。N.D.=シグナルが弱いため測定されず。

10

【図29】CBDタンパク質はi.v.注射後、コラーゲン親和性によって腫瘍に局在する。5×10⁵個のMMTV-PyMT細胞を接種した。(A) 腫瘍体積が500 mm³に達したら、50 μgのDyLight 800標識CBDをi.v.注射した。各臓器の蛍光解析により、注射の48時間後のCBDタンパク質の体内分布が明らかになった。CBDタンパク質の分布%を、関心対象の臓器の放射強度/試験した臓器の全放射強度として算出し、臓器重量に対して正規化した。(B) 腫瘍体積が100 mm³に達したら、100 μgのDyLight 594標識CBD-PD-L1および100 μgのDyLight 488標識コラーゲンIをi.v.注射した。注射の30分後、腫瘍を採取し、解析した。

20

【図30】CBD融合により、免疫薬に対する全身性曝露および処置関連毒性が低減される。5×10⁵個のB16F10細胞を0日目に接種した。(A,B) CBD-CTLA4およびCBD-PD-L1(100 μgずつ)、CTLA4およびPD-L1(100 μgずつ)、またはPBSを4日目にi.v.注射した。5、6、8および10日目に血清を収集した。(A) CTLA4および(B) PD-L1の濃度をELISAによって測定した(n=8,平均±SEM)。(C~G) CBD-CTLA4およびPD-L1または非修飾CTLA4およびPD-L1(100 μgずつ/注射)を4日目および7日目にi.v.注射した。(C~D) 8日目に、血漿中のサイトカイン濃度(C) TNFおよび(D) IL-6を測定した(平均±SEM)。(E~F) 10日目に、組織検査の(E) 肺および(F) 肝臓切片内のリンパ性浸潤スポットの数を計数し、面積で割り算した(平均±SEM)。(G) 10日目に、血清を収集し、ALTレベルを測定した(平均±SEM)。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。二つ組の実験。* p<0.05; * * p<0.01; N.S.=有意でない。

30

【図31】CBD-CPI処置により、3種類のマウス腫瘍モデルにおいて腫瘍の増殖速度が低下する。(A) 5×10⁵個のB16F10細胞、(B) 5×10⁵個のCT26細胞、(C~D) 5×10⁵個のMMTV-PyMT細胞を0日目に接種した。CBD-CTLA4+ CBD-PD-L1(CBD-CPI)、CTLA4+ PD-L1(CPI)またはPBSを(A) 4日目、(B) 5日目、(C~D) 7日目に投与した。CBD-CPIおよび非修飾CPIはi.v.注射し、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CPIは腫瘍周囲(p.t.)注射した。1回の投与あたりの抗体用量を図に示す。(A~C) グラフは、最初にマウスが死亡したときまでの腫瘍体積および(D) 生存率を示す。(E) 最初の腫瘍接種の30日後、5×10⁵個のMMTV-PyMT細胞をCBD-CPI処置無腫瘍生存動物または無処置マウスの右側の乳腺脂肪体内に再度接種した。数値は、腫瘍再負荷刺激の40日後に全マウスのうちどれだけ多くのマウスが無腫瘍のままであるかを示す。(A) n=9。(B) PBS, n=11; CPI 25 μg, n=11; CPI 100 μg, n=10; CBD-CPI 25 μg, n=10; CBD-CPI 100 μg, n=9。(C) n=8。(D) CBD-CPI, n=12; 他の処置群, n=11。(E) n=6。腫瘍体積を平均±SEMで示す。三つ組の実験。統計解析は、腫瘍サイズにはANOVAをテューキーの検定とともに用いて、生存曲線にはログラंक(マンテル・コックス)検定を用いて行なった。* p<0.05; * * p<0.01。

40

【図32】CBDとCPIのコンジュゲーションはB16F10腫瘍の増殖抑制に不可欠である。5×10⁵個のB16F10黒色腫細胞を背中の皮膚内に0日目に接種した。100 μgのCBD-PD-

50

L1 + 100 μ gのCBD- PD-L1の組合せ、または100 μ gの PD-L1 + 100 μ gの PD-L1 + CBDタンパク質（コンジュゲーションなし）、またはPBSを4日目に投与した（ $n = 4 \sim 5$ ）。抗体はi.v.注射した。グラフは、最初にマウスが死亡したときまでの腫瘍体積を示す。腫瘍体積を平均 \pm SEMで示す。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。* * $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

【図33】CBD-CPI処置により、B16F10黒色腫浸潤性細胞傷害性CD8⁺T細胞が増加する。5 $\times 10^5$ 個のB16F10細胞を0日目に接種した。CBD- CTLA4 + CBD- PD-L1（CBD-CPI）、CTLA4 + PD-L1（CPI）、またはPBSを4日目に投与した。CPIを100 μ gずつでi.v.注射した。腫瘍を8日目に採取した後、フローサイトメトリー解析を行なった。CD45⁺リンパ球のうちの（A）CD8⁺CD3⁺および（B）CD4⁺CD3⁺腫瘍浸潤性T細胞の頻度。（C）CD4⁺CD3⁺腫瘍浸潤性T細胞のうちのFoxp3⁺CD25⁺Treg。（D）CD62L⁺CD44⁺CD8⁺CD3⁺エフェクターT細胞対Foxp3⁺CD25⁺Tregの比。（E~G）T細胞を腫瘍から抽出し、CD28およびCD3で6時間刺激した。グラフは、CD8⁺CD3⁺T細胞のうちの（E）IL-2⁺、（F）TNF⁺、（G）IFN⁺の%を示す。バーは平均 \pm SEMを表す。二つ組の実験。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。* $p < 0.05$; * * $p < 0.01$ 。

【図34】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲート CD40はECMタンパク質に結合し、長期の注射部位における組織内保持を示す。（A）PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40および非修飾 CD40を還元条件下でのSDS-PAGEによりクマシーブルー染色を用いて解析した。（B）PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40および非修飾 CD40のフィブロネクチン、ビトロネクチンおよびコラーゲンIに対する結合親和性をELISAによって測定した。A450 nmは450 nmの吸光度を表す。BSAを陰性対照として使用した（ $n = 6$, 平均 \pm SD）。（C）PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40および非修飾 CD40の組換えマウスCD40に対する結合親和性をELISAによって測定した。A450 nmは450 nmの吸光度を表す（ $n = 4$, 平均 \pm SD）。（D）PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40の皮膚組織内保持をインビボ・イメージング・システムで試験した。Cyanine 7標識PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40および非修飾 CD40を胸腺欠損ヌードマウスの背中の皮膚内に注射した後、24時間毎にイメージングを行なった。グラフは、関心領域（ROI）解析を行なうことによるシグナル強度の定量的時間座標図を表す。ROIを測定することによる蛍光強度を初期蛍光強度に対して正規化した（ $n = 5$, 平均 \pm SEM）。二つ組の実験。統計解析はスチューデントの両側t-検定を用いて行なった。* * $p < 0.01$ 。

【図35】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションにより、CD40に対する全身性曝露および処置関連毒性が低減される。10⁵個のB16F10細胞を0日目に接種した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40（50 μ g）、CD40またはPBSを4日目にp.t.投与した。（A）4日目（注射の4時間後）、6日目および8日目に血清を収集した。CD40の血清中の濃度をELISAによって測定した（ $n = 6$, 平均 \pm SEM）。（B~C）IL-6およびTNFの血清中の濃度をELISAによって測定した（ $n = 6$, 平均 \pm SEM）。（D）血清中のALTレベルを測定した（ $n = 9 \sim 14$, 平均 \pm SEM）。（E）50 μ gのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40、CD40またはPBSのp.t.注射の3日後の組織検査肝臓切片。スケールバー = 400 μ m。3匹のマウスの群の代表的な切片。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて、それぞれの日の値を用いて行なった。二つ組の実験。* $p < 0.05$; * * $p < 0.01$; N.S. = 有意でない。

【図36】肝細胞はCD40をほとんど発現しない。CD40の発現を、無処置C57BL/6マウスの初代肝細胞および全LN細胞においてqPCRによって測定した。 -アクトリンに対する相対遺伝子発現レベルを示す（ $n = 3$, 平均 \pm SEM）。

【図37】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40は、非修飾 CD40と比べて多様な腫瘍の増殖を抑制する。（A~B）5 $\times 10^5$ 個のB16F10黒色腫細胞を背中の皮膚内に0日目に接種した。（A）10 μ gまたは（B）50 μ gのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40、CD40またはPBSを4日目に投与した（A; $n = 8 \sim 9$, B; $n = 8 \sim 9$ ）。（C）5 $\times 10^5$ 個のCT26結腸癌細胞を背中の皮膚内に0日目に接種した。10 μ gのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40、CD40またはPBSを5日目に投与した（ $n = 6 \sim 7$ ）。（D）8 $\times 10^5$ 個のMMTV-PyMT乳がん細胞を右側の乳腺脂肪体内に接種した。50 μ gのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40、CD40またはPBSを7日目に投与した

($n = 7 \sim 9$)。抗体はp.t.注射した。グラフは、各群で最初にマウスが死亡したときまでの腫瘍体積を示す。腫瘍体積を平均 \pm SEMで示す。統計解析はANOVAをテューキーの検定またはスチューデントのt-検定とともに用いて行なった。 $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ 。

【図38】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置により、腫瘍内のT細胞、B細胞、DCおよびマクロファージが活性化される。 5×10^5 個のB16F10細胞を0日目に接種した。 $50 \mu\text{g}$ のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40、CD40またはPBSを4日目に投与した。CD40はp.t.注射した。A~L,腫瘍およびtd-LNを9日目に採取した後、フローサイトメトリー解析を行なった。グラフは、(A)腫瘍内のCD45⁺リンパ球のうちのCD11c⁺DC、(B)td-LN内のCD45⁺リンパ球のうちのCD11c⁺DC、(C)腫瘍内のCD11c⁺DCのうちのMHCII^{High}CD86⁺細胞、(D)td-LN内のCD11c⁺DCのうちのMHCII^{High}CD86⁺細胞、(E)腫瘍内のF4/80⁺マクロファージのうちのMHCII^{High}CD86⁺細胞、(F)td-LN内のF4/80⁺マクロファージのうちのMHCII^{High}CD86⁺細胞、(G)腫瘍内のCD45⁺リンパ球のうちのCD8⁺CD3⁺T細胞、(H)腫瘍内のCD8⁺CD3⁺T細胞のうちのCD62L⁻CD44⁺エフェクター細胞、(I)腫瘍内のCD45⁺リンパ球のうちのCD4⁺CD3⁺T細胞、(J)腫瘍内のCD4⁺CD3⁺T細胞のうちのCD25⁺Foxp3⁺Treg細胞、(K)腫瘍内のCD62L⁻CD44⁺CD8⁺CD3⁺エフェクターT細胞/CD25⁺Foxp3⁺CD4⁺CD3⁺Treg細胞の細胞数の比、(L)腫瘍内のCD8⁺CD3⁺T細胞のうちのPD-1⁺細胞の%を示す。(M~O)腫瘍、td-LNおよび血漿を11日目に採取した。(M)腫瘍内のB220⁺B細胞のうちのMHCII^{High}CD86⁺細胞。(N)td-LN内のB220⁺B細胞のうちのMHCII^{High}CD86⁺細胞。(O)内因性抗B16F10細胞抗体のフローサイトメトリーによる平均蛍光強度。バーは平均 \pm SEMを示す。二つ組の実験。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ 。

【図39】CD40処置によってNK細胞の頻度は変わらなかった。 5×10^5 個のB16F10細胞を0日目に接種した。 $50 \mu\text{g}$ のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40、CD40またはPBSを4日目に投与した。CD40はp.t.注射した。腫瘍およびtd-LNを9日目に採取した後、フローサイトメトリー解析を行なった。グラフは、(A)腫瘍内および(B)td-LN内のCD45⁺細胞のうちのNK1.1⁺細胞の%を示す(平均 \pm SEM)。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。

【図40】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置により全身性抗腫瘍免疫が誘導される。(A) 5×10^5 個のB16F10細胞を0日目に、マウス背中の皮膚の左側と右側の両方の皮内に接種した。 $50 \mu\text{g}$ のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40、CD40またはPBSを4日目に投与した。p.t.注射は左側腫瘍付近のみに行ない、右側の腫瘍には行なわなかった。左側背部の腫瘍および右側背部の腫瘍の腫瘍体積を測定した($n = 9$, 平均 \pm SEM)。(B) 5×10^5 個のB16F10黒色腫細胞をBatf3^{-/-}マウスの背中の皮膚内に0日目に接種した。 $10 \mu\text{g}$ のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40またはPBSを4日目に投与した。腫瘍体積を平均 \pm SEMで示す($n = 9$)。二つ組の実験。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ 。

【図41】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置では、-カテンン発現遺伝子操作原発性黒色腫に対して抗腫瘍活性が示される。Tyr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl} Cat^{STA}マウスに $50 \mu\text{g}$ の4-OH-タモキシフェンを背中の皮膚に投与し、黒色腫の発生を誘導した。腫瘍が最初に視認可能となった時点を0日目と規定する。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40、CD40またはPBSを0日目と7日目にp.t.注射した。CD40を $10 \mu\text{g}$ ずつ/注射で注射した。(A)腫瘍サイズを示す($n = 6$, 平均 \pm SEM)。(B)生存率を示す($n = 6$)。(C)Tyr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl} Cat^{STA}腫瘍中のCD8⁺CD3⁺T細胞の密度を示す(平均 \pm SEM)。腫瘍1つあたり3~4つの視野の画像を撮影し、平均T細胞密度を算出した。二つ組の実験。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。単回比較では、スチューデントの両側t-検定を使用した。生存曲線にはログランク(マンテル・コックス)検定。 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ 。

【図42】PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ox40、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD137およびPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-GITRの併用での腫瘍周囲注射によりB16F10腫瘍の増殖が抑制された。

【図43】CBD- O_x40、CBD- CD137およびCBD- GITRの併用での静脈内注射によりB16F10腫瘍の増殖が抑制された。

【図44】CPIにコンジュゲートさせたデコリンおよびvWF A1ペプチドは、増強した抗腫瘍活性を有する。PBSまたは4種類の処置薬のうちの1種類をi.v.投与した：(1) vWF A1- CTLA4とvWF A1- PD-L1 (25 μgずつ)；(2) vWF A3- CTLA4とvWF A3- PD-L1 (25 μgずつ)；(3) デコリン- CTLA4とデコリン- PD-L1 (25 μgずつ)；および(4) CTLA4と PD-L1 (100 μgずつ)。最初にマウスが死亡したときまでの腫瘍体積 (平均 ± SEM) を示す。二つ組の実験。* p < 0.05; ** p < 0.01。

【発明を実施するための形態】

【0030】

詳細な説明

免疫療法用抗体は相当な抗腫瘍活性を示すことが示されているが、以前の試験では重度の処置関連有害事象の事例が報告されている。本明細書に記載の方法および組成物により、腫瘍内または腫瘍周囲に保持される抗体での局所療法が提供され、全身性曝露が限定的になり、一部の場において治療を中止しなければならないか、または耐容性でもある有効量が得られないかのいずれかであるほど重度であり得る副作用が少なくなる。本明細書に示した実施例により、ECM親和性ペプチドとのコンジュゲーション後の組織内保持の向上および血漿抗体濃度の低下、全身性副作用、例えば肝臓障害の低減を実証している。本明細書に記載の組成物の腫瘍周囲 (p.t.) 注射により、黒色腫および乳がんのマウスモデルで、対照と比べて腫瘍の増殖が有意に遅延され、生存期間が長くなった。改変操作されたECM結合性抗体の変換可能なこのアプローチは免疫療法における新規なアプローチである。

【0031】

A. 免疫療法用抗体

本開示の免疫療法用抗体としては、CD40および免疫チェックポイント阻害抗体が挙げられる。本明細書および特許請求の範囲で用いる場合、用語「抗体」または「免疫グロブリン」は互換的に用いられており、動物またはレシピエントの免疫応答の一部として機能するいくつかのクラスの構造的に関連している任意のタンパク質をいい、該タンパク質としてはIgG、IgD、IgE、IgA、IgMおよび関連タンパク質が挙げられる。

【0032】

通常の生理学的条件下では、抗体は血漿中および他の体液中ならびに一部の特定の細胞の膜内にみられ、B細胞と呼ばれる型のリンパ球またはその機能的等価物によって産生される。IgGクラスの抗体は、ジスルフィド結合によって一体に連結された4つのポリペプチド鎖で構成されている。インタクトなIgG分子のこの4つの鎖は、H鎖と称される2つの同一の重鎖と、L鎖と称される2つの同一の軽鎖である。

【0033】

ポリクローナル抗体を作製するためには、宿主、例えばウサギまたはヤギを、一般的にはアジュバントとともに、必要に応じて担体と結合させた抗原または抗原断片で免疫処置する。続いて、この抗原に対する抗体を宿主の血清から収集する。このポリクローナル抗体を該抗原に対してアフィニティ精製し、単一特異性にしてもよい。

【0034】

モノクローナル抗体は、抗原による適切なドナーの過剰免疫処置によって、またはエキスビボでの脾細胞もしくは脾臓由来の細胞株の初代培養物の使用によって作製され得る (Anavi, 1998; Huston et al., 1991; Johnson et al., 1991; Mernaugh et al., 1995)。

【0035】

本明細書および特許請求の範囲で用いる場合、抗体という用語は、抗体の重鎖および軽鎖ならびにその免疫学的一部分を包含している。語句「抗体の免疫学的一部分」としては、抗体のFab断片、抗体のFv断片、抗体の重鎖、抗体の軽鎖、抗体の重鎖と軽鎖からなるヘテロ二量体、抗体の軽鎖の可変領域断片、抗体の重鎖の可変領域断片、および抗体の単鎖変異体 (これはscFvとしても知られている) が挙げられる。また、この用語は、異なる

10

20

30

40

50

種に由来する融合遺伝子の発現産物であって、該種的一方がヒトであり得るキメラ免疫グロブリンも包含しており、この場合、キメラ免疫グロブリンはヒト化されているといわれる。典型的には、抗体の免疫学的一部分は、該一部分が由来するインタクトな抗体と、抗原に対する特異的結合について競合する。

【0036】

任意で、抗体または好ましくは抗体の免疫学的一部分を、他のタンパク質との融合タンパク質に化学的にコンジュゲートさせるか、または他のタンパク質との融合タンパク質として発現させてもよい。本明細書および添付の特許請求の範囲の解釈上、かかる融合タンパク質はすべて、抗体または抗体の免疫学的一部分という定義に包含される。

【0037】

本明細書で用いる場合、用語「免疫原性因子」または「免疫原」または「抗原」は、レシピエントに単独で、アジュバントとともに、またはディスプレイ媒体に提示された状態のいずれかで投与されたときに自身に対する免疫学的応答を誘導することができる分子を示すために互換的に用いられる。

【0038】

「免疫チェックポイント阻害薬」は、直接または間接的に免疫チェックポイント経路を部分的または完全に阻害する任意の分子である。なんら特定の理論に拘束されることを望まないが、免疫チェックポイント経路は、免疫系の局面、特にT細胞をオンまたはオフにする機能を果たすと一般的に考えられている。T細胞の活性化後、適切な時点で免疫応答を抑制するためにいくつかの阻害性受容体が上方調節され、T細胞の表面上に存在し得る。例えば、慢性ウイルス感染などによる持続的な免疫刺激の場合では、免疫チェックポイント経路は免疫応答を抑制し、免疫疲弊をもたらし得る。免疫チェックポイント経路の例としては、非限定的に、PD-1/PD-L1、CTLA4/B7-1、TIM-3、LAG3、By-He、H4、HAVCR2、IDO1、CD276、VISTA、VTCN1、ICOS、CD39、TIGIT、CD47、KIRおよびBTLAが挙げられる。PD-1/PD-L1免疫チェックポイント経路の場合では、阻害薬はPD-1またはPD-L1に結合し、この受容体とリガンドとの間の相互作用を妨げ得る。したがって、該阻害薬は抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体であり得る。同様に、CTLA4/B7-1免疫チェックポイント経路の場合では、阻害薬はCTLA4またはB7-1に結合し、この受容体とリガンドとの間の相互作用を妨げ得る。免疫チェックポイント阻害薬の例は、例えばWO2014/144885をみるとよい。かかる免疫チェックポイント阻害薬は参照により本明細書に組み入れられる。

【0039】

PD-1 (CD279としても知られている) は、T細胞およびプロB細胞上に発現されるIgスーパーファミリーの細胞表面受容体である。PD-1は免疫チェックポイントとしての機能を果たし、そのリガンドであるPD-L1またはPD-L2のうち的一方に結合するとT細胞の活性化を阻害する。したがって、腫瘍微小環境内におけるPD-L1またはPD-L2の過剰発現は腫瘍内免疫応答の阻害をもたらす。抗PD-1/PD-L1抗体はリガンド結合に干渉し、したがってT細胞の失活を抑止する。

【0040】

CTLA-4は、CD152としても知られ、T細胞の表面上のタンパク質受容体である。抗原提示細胞の表面上に存在するCD80 (B7-1) およびCD86 (B7-2) に結合すると、CTLA-4はT細胞を失活させる。アンタゴニスト抗体によってCTLA-4を遮断すると、この機構が干渉され、したがってT細胞の活性が保持される。

【0041】

さらなる免疫チェックポイント阻害薬は、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO)、TIM3、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG3)、Tigit、BおよびTリンパ球アテニュエーター (BTLA)、VISTA、ICOS、CD39、KIRならびにCD47に対する阻害薬である。

【0042】

提供する方法、組成物またはキットのいずれか1つの一部の態様では、免疫チェックポイント阻害薬は、免疫チェックポイント経路を阻害するポリペプチドである。提供する方

10

20

30

40

50

法、組成物またはキットのいずれか1つの一部の態様では、該阻害薬は融合タンパク質である。提供する方法、組成物またはキットのいずれか1つの一部の態様では、免疫チェックポイント阻害薬はヒト化モノクローナル抗体である。一部の態様では、該チェックポイント阻害薬はヒト抗体である。

【0043】

免疫チェックポイント阻害薬の非限定的な例としては、完全ヒトモノクローナル抗体、例えばRG7446、BMS-936558/MDX-1106、BMS-936559（抗PDL1抗体）、ヤーボイ/イピリムマブ（抗CTLA-4チェックポイント阻害薬）、およびトレメリマブ（CTLA-4遮断抗体）；ヒト化抗体、例えばピジリズマブ（CT-011,CureTech Ltd.）およびキートルーダ/ペムブロリズマブ（MK-3475,Merck,PD-1遮断薬）；ならびに融合タンパク質、例えばAMP-224（Merck）が挙げられる。チェックポイント阻害薬の他の例としては、PD-L1モノクローナル抗体である抗B7-H1（MEDI4736/デュルバルマブ）、ニボルマブ（BMS-936558,Bristol-Myers Squibb,抗PD1抗体）、CT-011（抗PD1抗体）、BY55モノクローナル抗体、MPLDL3280A/アテゾリズマブ（抗PDL1抗体）、およびMSB0010718C/アベルマブ（抗PDL1抗体）が挙げられ、MDX-1105（Medarex）、MPDL3280A（Genentech）、抗KIR抗体、例えばリルルマブ（Innate Pharma）およびIPH2101（Innate Pharma）はNK細胞において同様の機能を果たし得る。免疫チェックポイント阻害薬のさらなる例としては、IDO阻害薬（エパカドスタット）、TIM3抗体（MBG453）、抗LAG3モノクローナル抗体（LAG525）、BMS-986016（さらなる抗LAG3抗体）、JNJ-61610588（完全ヒトIgG1 抗VISTA）、MEDI-570（ICOSに対するモノクローナル抗体）、およびOREG-103/BY40（CD39遮断抗体）が挙げられる。さらなる免疫チェックポイント阻害薬はWO2010027423、WO2010027828、WO2012145493、WO2014179664、WO2011159877、WO2015112900、WO2010029434、WO2010029435、WO2012135408、WO2010089411、WO2015200119、WO2015036394、WO2015112800、WO2015058573、WO2011110604、WO2015195163、WO2015112805、WO2015181342、WO2014100079、WO2014055897、WO2010036959、WO2016011160、WO2015155738、WO2015119930、WO2015119923、WO2013019906、WO2013181452、WO2015119944、WO2015088847、WO2015009856、WO2015103602、WO2015095404、WO2015095423、WO2015095410、WO2012120125、WO2014207064、WO2010097597、WO2012142237、WO2014150677、WO2014150646、WO2015031295、WO2015006520、WO2015002918およびWO2011045340に記載されている。

【0044】

本明細書に開示の組成物中に含められ得る、本明細書に開示の方法に使用され得る、および/またはECM親和性ペプチドに連結もしくはコンジュゲートされ得る免疫療法治抗体の非限定的な例としてはアブシキシマブが挙げられる。

【0045】

アダリムマブ、アレムツズマブ、アリロクマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、バシリキシマブ、ベリムマブ、ベバシズマブ、ベズロトクスマブ、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、プロダルマブ、カナキヌマブ、カプロマブペンデチド、カツマキシマブ、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、シクスツムマブ、ダクリズマブ、ダラツムマブ、デノスマブ、ジヌツキシマブ、デュピルマブ、デュルバルマブ、エクリズマブ、エロツズマブ、エルツマキシマブ、エタラシズマブ、エボロクマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、ギレンツキシマブ、ゴリムマブ、グセルクマブ、イブリツモマブチウキセタン、イダルシズマブ、イムシロマブ、インフリキシマブ、イピリムマブ、イキセキズマブ、メボリズマブ、ナタリズマブ、ネシツムマブ、ニボルマブ、オビルトキサキシマブ、オビヌツズマブ、オクレリズマブ、オフアツムマブ、オララツマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペムブロリズマブ、ペルツズマブ、ラムシルマブ、ラニピズマブ、ラキシバクマブ、レスリズマブ、リツキシマブ、ロベリズマブ、ルブリズマブ、セクキヌマブ、シルツキシマブ、トシリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、トラスツズマブエムタ

ンシン、ウステキヌマブ、ベドリズマブ、エタネルセプト、およびMK-3475。

【 0 0 4 6 】

B.ECM親和性ペプチド

本開示の諸態様はECM親和性ペプチドに関する。一部の態様では、ECM親和性ペプチドはPIGF-2に由来するペプチドを含む。PIGF-2は以下の配列を有する。

PIGF2:

MPVMRLFPCFLQLLAGLALPAVPPQQWALSAGNGSSEVEVVPFQEVWGRSYCRALE
RLVDVVSEYPSEVEHMFSPSCVSLLRCTGCCGDENLHCVPVETANVTMQLLKIRSGD
RPSYVELTFSQHVRCECRPLREKMKPERRRPKGRGKRRREKQRPTDCHLCGDAVPR
R (SEQ ID NO:4)

10

【 0 0 4 7 】

例示的なPIGF-2 ECM親和性ペプチドとしては、

RRRPKGRGKRRREKQRPTDCHLCGDAVPRR (SEQ ID NO:5);
RRRPKGRGKRRREKQRPTDCHL (SEQ ID NO:1); RRPKGRGKRRREKQRPTD (SEQ ID
NO:6); RRRPKGRGKRRREKQ (SEQ ID NO:7); GKRRREKQ (SEQ ID NO:8);
RRRPKGRG (SEQ ID NO:9); およびRRKTKGKRKRSRNSQTEEPHP (SEQ ID NO:10)

20

が挙げられる。

【 0 0 4 8 】

一部の態様では、ECM親和性ペプチドはCXCL-12 に由来するペプチドである。CXCL-12 の配列は以下:

CXCL-12 γ :

KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKW
IQEYLEKALNKGRREEKVGKKEKIGKKKRQKKRKAQAQKRKN (SEQ ID NO:12)

30

である。例示的なペプチドは、SEQ ID NO:12の全部または一部および以下のペプチド:
GRREEKVGKKEKIGKKKRQKKRKAQAQKRKN (SEQ ID NO:2)

を含む。

【 0 0 4 9 】

一部の態様では、ECM親和性ペプチドはフォン・ヴィレブランド因子 (VWF) に由来するペプチドである。ヒトVWFの配列は、以下:

40

50

MIPARFAGVL

LALALILPGT	LCAEGTRGRS	STARCSLFGS	DFVNTFDGSM	YSFAGYCSYL
LAGGCQKRSF	SIIGDFQNGK	RVSLSVYLGE	FFDIHLFVNG	TVTQGDQRRVS
MPYASKGLYL	ETEAGYYKLS	GEAYGFVARI	DGSGNFQVLL	SDRYFNKTCG
LCGNFNIFAE	DDFMTQEGTL	TSDPYDFANS	WALSSGEQWC	ERASPPSSSC
NISSGEMQKG	LWEQCQLLKS	TSVFARCHPL	VDPEPFVALC	EKTLCECAGG
LECACPALLE	YARTCAQEGM	VLYGWDHSA	CSPVCPAGME	YRQCVSPCAR
TCQSLHINEM	CQERCVDGCS	CPEGQLLDEG	LCVESTECPC	VHSGKRYPPG
TLSRDCNTC	ICRNSQWICS	NEECPGECLV	TGQSHFKSFD	NRYFTFSGIC
QYLLARDCQD	HSFSIVIETV	QCADDRDAVC	TRSVTVRLPG	LHNSLVKLKH
GAGVAMDGQD	VQLPLLKGDL	RIQHTVTASV	RLSYGEDLQM	DWDGRGRLLV
KLSPVYAGKT	CGLCGNYNGN	QGDDFLTPSG	LAEPRVEDFG	NAWKLHGDCQ
DLQKQHSDPC	ALNPRMTRFS	EEACAVLTSP	TFEACHRAVS	PLPYLRNCRY
DVCSCSDGRE	CLCGALASYA	AACAGRGVRV	AWREPGRCEL	NCPKGQVYLQ
CGTPCNLTCR	SLSYPDEECN	EACLEGCFCP	PGLYMDERGD	CVPKAQCPCY
YDGEIFQPED	IFSDHHTMCY	CEDGFMHCTM	SGVPGSLLPD	AVLSSPLSHR
SKRSLSCRPP	MVKLVCPADN	LRAEGLECTK	TCQNYDLECM	SMGCVSGCLC
PPGMVRHENR	CVALERCPCF	HQGKEYAPGE	TVKIGCNTCV	CRDRKWNCTD
HVCDATCSTI	GMAHYLTFDG	LKYLFPGECQ	YVLVQDYCGS	NPGTFRILVG
NKGCSHPSVK	CKKRVTILVE	GGEIELFDGE	VNVKRPMKDE	THFEVVESGR
YIILLGKAL	SVVWDRHLSI	SVVLKQTYQE	KVCGLCGNFD	GIQNNDLTSS
NLQVEEDPVD	FGNSWKVSSQ	CADTRKVPLD	SSPATCHNNI	MKQTMVDSSC
RILTSDVFQD	CNKLVDPPEY	LDVCIYDTCS	CESIGDCACF	CDTIAAYAHV
CAQHKGKVVW	RTATLCPQSC	EERNLRENGY	ECEWRYNSCA	PACQVTCQHP
EPLACPVQCV	EGCHAHCPPG	KILDELLQTC	VDPEDCPVCE	VAGRRFASGK

10

20

30

40

50

KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP GGLVVPPTDA PVSPTTLYVE
 DISEPPLHDF YCSRLLDLVF LLDGSSRLSE AEFEVLKAFV VDMMERLRIS
 QKWVRVAVVE YHDGSHAYIG LKDRKRPESEL RRIASQVKYA GSQVASTSEV
 LKYTLFQIFS KIDRPEASRI TLLLMASQEP QRMSRNFVRY VQGLKKKKVI
 VIPVGIGPHA NLKQIRLIEK QAPENKAFVL SSVDELEQQR DEIVSYLCDL
 APEAPPPTLP PDMAQVTVGP GLLGVSTLGP KRNSMVLDA FVLEGSDKIG
 EADFNRSEKF MEEVIQRMDV GQDSIHVTVL QYSYMTVEY PFSEAQSKGD
 ILQRVREIRY QGGNRTNTGL ALRYLSDHSF LVSQGDREQA PNLVYMTGN
 PASDEIKRLP GDIQVVPIGV GPNANVQELE RIGWPNAPIL IQDFETLPRE
 APDLVLQRCC SGEGLQIPTL SPAPDCSQPL DVILLLDGSS SFPASYFDEM
 KSFAKAFISK ANIGPRLTQV SVLQYGSITT IDVPWNVPE KAHLLSLVDV
 MQREGGPSQI GDALGFAVRY LTSEMHGARP GASKAVVILV TDVSVDSVDA
 AADAARSNRV TVFPIGIGDR YDAAQLRILA GPAGDSNVVK LQRIEDLPTM
 VTLGNSFLHK LCSGFVRICM DEDGNEKRPG DVWTLPDQCH TVTCQPDGQT
 LLKSHRVNCD RGLRPSCPNS QSPVKVEETC GCRWTCPCVC TGSSTRHIVT
 FDGQNFKLTG SCSYVLFQNK EQDLEVLHN GACSPGARQG CMKSIEVKHS
 ALSVELHSDM EVTVNGRLVS VPYVGGNMEV NVYGAIMHEV RFNHLGHIFT
 FTPQNNEFQL QLSPKTFASK TYGLCGICDE NGANDFMLRD GTVTTDWKT
 VQEWTVQRPQ QTCQPILEEQ CLVPDSSHQ VLLLPLFAEC HKVLAPATFY
 AICQQDSCHQ EQVCEVIASY AHLCRTNGVC VDWRTPDFCA MSCPPSLVYN
 HCEHGCPRHC DGNVSSCGDH PSEGCFPPD KVMLEGSCVP EEACTQCIGE
 DGVQHQFLEA WVPDHQPCQI CTCLSGRKVN CTTQPCPTAK APTCGLCEVA
 RLRQNADQCC PEYECVCDPV SCDLPPVPHC ERGLQPTLTN PGECRPNFTC
 ACRKEECKRV SPPSCPPHRL PTLRKTQCCD EYECACNCVN STVSCPLGYL
 ASTATNDCGC TTTTCLPDKV CVHRSTIYPV GQFWEEGCDV CTCTDMEDAV
 MGLRVAQCSQ KPCEDSCRSG FTYVLHEGEC CGRCLPSACE VVTGSPRGDS
 QSSWKSQSG WASPENPCLI NECVRVKEEV FIQQRNVSCP QLEVPVCPSPG
 FQLSCKTSAC CPSCRCERME ACMLNGTVIG PGKTMIDVC TTCRCMVQVG
 VISGFKLECR KTTNCPCLG YKEENNTGEC CGRCLPTACT IQLRGGQIMT
 LKRDETLQDG CDTHFCKVNE RGEYFWEKRV TGCPPEDEHK CLAEKGKIMK
 IPGTCCDTCE EPECNDITAR LQYVKVGSK SEVEVDIHYC QGKCASKAMY
 SIDINDVQDQ CSCCSPTRTE PMQVALHCTN GSVVYHEVLN AMECKCSPRK CSK
 (SEQ ID NO:13)

10

20

30

40

を含む。一部の態様では、該ペプチドはVWF A3ドメインに由来する。VWF A3ドメインはヒト配列の残基1670～1874（成熟VWFの907～1111）から得られ、以下の配列：
 CSGEGLQIPTLSPAPDCSQPLDVILLLDGSSSFPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQ
 VSVLQYGSITTIDVPWNVPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGDALGFAVRYLTSEMH
 GARP GASKAVVILVTDVSVDSVDAAADAARSNRVTVFPIGIGDRYDAAQLRILAGPA
 GDSNVVKLQRIEDLPTMVTGNSFLHKLCSG (SEQ ID NO:3)

50

を有する。一部の態様では、該ペプチドは残基1686～1881（成熟VWFの923～1118）を含み、以下の配列：

CSQPLDVILLLDGSSSFPA SYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSITTIDVP
WNVVPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGDALGFVRYLTSEMHGARPGASKAVVILV
TDVSVDSVDAADAARSNRVTVPFIGIGDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRIEDL
PTMVTLGNSFLHKLC SGFVRICTG (SEQ ID NO:14)

を有する。例示的なペプチドは、SEQ ID NO:13の全部もしくは一部、SEQ ID NO:3の全部もしくは一部、またはSEQ ID NO:14の全部もしくは一部を含む。一部の態様では、該ペプチドはVWF A1ドメインに由来する。VWF A1ドメインはヒト配列の残基1237～1458（成熟VWFの474～695）から得られ、以下の配列：

CQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEV
LKAFVVDMMERLRISQKWVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSLRRIASQVKYA
GSQVASTSEVLKYTLFQIFSKIDRPEASRITLLLMASQEPQRMSRNFVRYVQGLKKKK
VIVIPVGIGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSSVDELEQQRDEIVSYLC (SEQ ID
NO:11)

を有する。

【0050】

一部の態様では、ECM親和性ペプチドはデコリンに由来する。デコリンペプチドは残基17～359を含み得、以下の配列：

GPFQQRGLFDFMLEDEASGIGPEVPDDRDFEPSLGPVCPFRCQCHLRVVQCSDLGLD
KVPKDLPPDTLLDLQNNKITEIKDGD FKNLKNLHALILVNNKISKVSPGAFTPLVKL
ERLYLSKNQLKELPEKMPKTLQELRAHENEITKVRKVTFNGLNQMIVIELGTNPLKSS
GIENGAFQGMKKLSYIRIADTNITSIPQGLPPSLTELHLDGNKISRVDAA SLKGLNNLA
KLGLSFNSISAVDNGSLANTPHLRELHLDNNKLTRVPGGLAEHKYIQV VYLHNNNIS
VVGSSDFCPPGHNTKKASYSGVSLFSNPVQYWEIQPSTFRCVYVRS AIQLGNYK (SEQ
ID NO:16)

を有する。例示的なペプチドはSEQ ID NO:16の全部または一部を含む。

【0051】

ECM親和性ペプチドは、本開示のペプチドと75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性（あるいはその中の任意の導出可能な範囲）を有するペプチドであり得る。該ペプチドまたはポリペプチドは、1つまたは複数の保存的置換または非保存的置換を有していてもよい。置換変異体は、典型的にはタンパク質内の1つまたは複数の部位に、あるアミノ酸から別のアミノ酸への交換を含んでおり、該ポリペプチドの1つまたは複数の特性が、他の機能または特性の低下を伴ってまたは伴わずにモジュレートされるように設計され得る。置換は保存的であり得る、すなわち、あるアミノ酸が同様の形状および電荷のもので置き換えられる。保存的置換は当技術分野において周知であり、例えば、アラニンがセリンに；アルギニンがリシンに；アスパラギンがグルタミンまたはヒスチジンに；アスパラギン酸がグルタミン酸に；システインがセリンに；グルタミンがアスパラギンに；グルタミン酸がアスパラギン酸に；グリシンがプロリンに；ヒスチジンがアスパラギンまたは

グルタミンに;イソロイシンがロイシンまたはバリンに;ロイシンがバリンまたはイソロイシンに;リシンがアルギニンに;メチオニンがロイシンまたはイソロイシンに;フェニルアラニンがチロシン、ロイシンまたはメチオニンに;セリンがトレオニンに;トレオニンがセリンに;トリプトファンがチロシンに;チロシンがトリプトファンまたはフェニルアラニンに;およびバリンがイソロイシンまたはロイシンに、という変化が挙げられる。あるいはまた、置換は、ポリペプチドの機能または活性が影響を受けるような非保存的であり得る。非保存的变化は、典型的にはある残基の化学的に異なる残基による置換、例えば、極性または荷電のアミノ酸の無極性または非荷電のアミノ酸による置換、およびその逆の置換を伴う。

【 0 0 5 2 】

本明細書に記載のポリペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個またはそれ以上（あるいはその中の任意の導出導可能な範囲）の変異アミノ酸を、本開示のペプチドまたはポリペプチドの少なくともまたは最大3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、300、400、500、550、1000個またはそれ以上の連続アミノ酸内、あるいはその中で導出可能な任意の範囲内に、含み得る。

【 0 0 5 3 】

本明細書に記載のポリペプチドセグメントは、本開示のペプチドまたはポリペプチドの3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、23

10

20

30

40

50

9、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、300、400、500、550、1000個またはそれ以上の連続アミノ酸、あるいはその中で導出可能な任意の範囲を含み得る。

【0054】

本明細書に記載のポリペプチドは、少なくとも、最大で、または厳密に5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、300、400、500、550、1000個またはそれ以上のアミノ酸の固定長（あるいはその中の任意の導出可能な範囲）であり得る。

【0055】

抗体-ペプチド構築物にリンカー配列が含まれ得る。例えば、少なくとも、最大で、または厳密に3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100個またはそれ以上のアミノ酸（あるいはその中の任意の導出可能な範囲）を有するリンカーによって該抗体と該ペプチドが隔てられ得る。

【0056】

本開示のECM親和性ペプチドは、細胞外マトリックスの1種類または複数種の成分、例えばフィブロネクチン、コラーゲン、（I型コラーゲン、III型コラーゲンおよび/またはIV型コラーゲン）、テネシシンC、フィブリノゲンならびにフィブリンに対する親和性を有し得る。

【0057】

C. 核酸

一部の特定の態様において、本開示は、免疫療法用抗体に機能的に連結させた本発明のタンパク質、ポリペプチドおよびペプチド、例えばECM親和性ペプチドをコードしている組換えポリヌクレオチドに関する。したがって、一部の特定の態様は、免疫療法用抗体またはその断片、例えば重鎖または軽鎖と融合させたECM親和性ポリペプチドおよび/またはECM親和性ポリペプチドをコードしているヌクレオチドに関する。

【0058】

本出願において用いる場合、用語「ポリヌクレオチド」は、組換え体であるか、または全ゲノム核酸から単離されているかのいずれかである核酸分子をいう。用語「ポリヌクレオチド」には、オリゴヌクレオチド（長さが100残基以下の核酸）、組換えベクター、例

10

20

30

40

50

えばプラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスなどが包含される。ポリヌクレオチドは、一部の特定の局面では、天然に存在するその遺伝子またはタンパク質コード配列から実質的に分離された調節配列を含む。ポリヌクレオチドは、一本鎖（コードまたはアンチセンス）であっても二本鎖であってもよく、RNA、DNA（ゲノム、cDNAもしくは合成）、そのアナログ、またはその組合せであり得る。さらなるコード配列または非コード配列をポリヌクレオチド内に存在させてもよいが、存在させなくてもよい。

【0059】

これに関連して、用語「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードしている核酸（適正な転写、翻訳後修飾または局在に必要とされる任意の配列を含む）をいうために用いられる。当業者には理解されるように、この用語は、タンパク質、ポリペプチド、ドメイン、ペプチド、融合タンパク質および変異型を発現するか、または発現するように適合され得るゲノム配列、発現カセット、cDNA配列および改変操作された小型核酸セグメントを包含している。ポリペプチドの全部または一部をコードしている核酸は、本明細書に記載または本明細書で参照している1つまたは複数のアミノ酸配列をコードしているポリヌクレオチドの、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1095、1100、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、9000、10000個またはそれ以上のヌクレオチド、ヌクレオシドまたは塩基対（その間のあらゆる値および範囲を含む）の連続核酸配列を含み得る。また、1つの特定のポリペプチドが、わずかに異なる核酸配列を有する多様性を含むが、それでもなお、同じかまたは実質的に同様のタンパク質をコードしている複数の核酸にコードされている場合があり得ることも想定される。

【0060】

特定の態様において、本発明は、本開示のポリペプチドまたはペプチドをコードしている核酸配列が組み込まれた単離された核酸セグメントおよび組換えベクターに関する。用語「組換え」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとともに使用され得、一般的に、インビトロで作製および/または操作された、あるいはかかる分子の複製産物であるポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。

【0061】

他の態様において、本発明は、本開示のポリペプチドまたはペプチドをコードしている核酸配列が組み込まれた単離された核酸セグメントおよび組換えベクターに関する。

【0062】

本開示において使用される核酸セグメントには、他の核酸配列、例えばプロモーター、ポリアデニル化シグナル、さらなる制限酵素部位、マルチクローニングサイト、他のコードセグメントなどが結合され得、そのため、その全長はかなり多様であり得る。したがって、ほぼいかなる長さの核酸断片も使用され得ることが想定され、全長は好ましくは、意図された組換え核酸プロトコルにおける調製および使用の容易性によって制限される。一部の 경우에는、核酸配列は、例えば、ポリペプチドの精製、輸送、分泌、翻訳後修飾を可能にするため、または治療有益性、例えば標的化もしくは有効性のためのさらなる異種コード配列を有するポリペプチド配列をコードし得る。上記に論考しているように、修飾されたポリペプチドコード配列にタグまたは他の異種ポリペプチドを付加してもよく、ここで、「異種」は、修飾された該ポリペプチドとは同じでないポリペプチドをいう。

【0063】

一部の特定の態様では、本開示により、本明細書に開示の配列と実質的な同一性を有するポリヌクレオチド変異体;本明細書に記載の方法(例えば、標準的なパラメータを用いたBLAST解析)を用いて本開示のポリヌクレオチド配列と比較したとき少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%またはそれより高い配列同一性(その間のあらゆる値および範囲を含む)を含むものを提供する。

【0064】

また、本開示では、上記のあらゆるポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドの使用も想定している。

【0065】

1.ベクター

本開示のポリペプチドは、ベクター内に含まれた核酸分子にコードされ得る。用語「ベクター」は、細胞内に導入されて該細胞で複製および発現され得る異種核酸配列が内部に挿入され得る担体核酸分子をいうために用いられる。核酸配列は「異種」であり得、これは、該核酸配列が、ベクターが導入されている細胞にとって、または組み込まれている核酸にとって外来の状況であることを意味し、該細胞または核酸内の配列に相同だが該宿主細胞または核酸において通常はみられない位置にある配列を含む。ベクターとしては、DNA、RNA、プラスミド、コスミド、ウイルス(バクテリオファージ、動物ウイルス、および植物ウイルス)、ならびに人工染色体(例えば、YAC)が挙げられる。当業者であれば、標準的な組換え手法によってベクターを構築するための十分な設備を整えられよう(例えば、Sambrook et al.,2001;Ausubel et al.,1996、ともに参照により本明細書に組み入れられる)。ベクターは、本開示のポリペプチドをコードしていることに加えて、他のポリペプチド配列、例えば1種類または複数種の他の細菌ペプチド、タグまたは免疫原性増強ペプチドをコードしていてもよい。かかる融合タンパク質をコードしている有用なベクターとしては、後の精製および分離または切断のための、pINベクター(Inouye et al.,1985)、ヒスチジン鎖をコードしているベクター、およびグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)可溶性融合タンパク質の作製における使用のためのpGEXベクターが挙げられる。

【0066】

用語「発現ベクター」は、転写されることが可能な遺伝子産物の少なくとも一部分をコードしている核酸配列を含むベクターをいう。一部の 경우에는、RNA分子がその後、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドに翻訳される。発現ベクターには、さまざまな「制御配列」が含有され得、制御配列は、機能的に連結されたコード配列の、特定の宿主生物体での転写および場合によっては翻訳に必要な核酸配列をいう。転写および翻訳を支配する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターに、他の機能も果たし、本明細書に記載のものである核酸配列を含有させてもよい。

【0067】

2.プロモーターおよびエンハンサー

「プロモーター」は制御配列である。プロモーターは典型的には、転写の開始と速度を制御する核酸配列領域である。これは、調節タンパク質および調節分子、例えばRNAポリメラーゼおよび他の転写因子が結合し得る遺伝子エレメントを含有し得る。語句「機能的に配置された」、「機能的に連結された」、「制御下の」および「転写制御下の」は、プロモーターが、核酸配列に対して転写の開始および該配列の発現を制御するのに正しい機能的な位置および/または向きであることを意味する。プロモーターは、「エンハンサー」とともに使用してもしなくてもよく、エンハンサーは、核酸配列の転写活性化に関与するシス作用性調節配列をいう。

【0068】

当然、発現用に選択した細胞型または生物体におけるDNAセグメントの発現を有効に指令するプロモーターおよび/またはエンハンサーを使用することが重要であり得る。一般的に、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサーおよび細胞型の組合せの使用は、分子生物学の当業者には公知である(Sambrook et al.,2001参照、参照により本明細

10

20

30

40

50

書に組み入れられる)。使用されるプロモーターは、構成的、組織特異的または誘導性であり得、一部の特定の態様では、指定の条件下で、例えば組換えタンパク質またはペプチドの大規模生産において、導入されたDNAセグメントの高レベル発現を指令し得る。

【 0 0 6 9 】

種々のエレメント/プロモーターが本発明の状況において遺伝子の発現を調節するために使用され得る。特定の刺激に応答して活性化され得る核酸配列領域であるかかる誘導性エレメントの例としては、非限定的に、免疫グロブリン重鎖 (Banerji et al., 1983; Gilles et al., 1983; Grosschedl et al., 1985; Atchinson et al., 1986, 1987; Imler et al., 1987; Weinberger et al., 1984; Kiledjian et al., 1988; Porton et al., 1990)、免疫グロブリン軽鎖 (Queen et al., 1983; Picard et al., 1984)、T細胞受容体 (Luria et al., 1987; Winoto et al., 1989; Redondo et al., 1990)、HLA DQ および/またはDQ (Sullivan et al., 1987)、インターフェロン (Goodbourn et al., 1986; Fujita et al., 1987; Goodbourn et al., 1988)、インターロイキン-2 (Greene et al., 1989)、インターロイキン-2受容体 (Greene et al., 1989; Lin et al., 1990)、MHCクラスII 5 (Koch et al., 1989)、MHCクラスII HLA-DR (Sherman et al., 1989)、 α -アクチン (Kawamoto et al., 1988; Ng et al., 1989)、筋肉クレアチンキナーゼ (MCK) (Jaynes et al., 1988; Horlick et al., 1989; Johnson et al., 1989)、プレアルブミン (トランスサイレチン) (Costa et al., 1988)、エラスターゼI (Ornitz et al., 1987)、メタロチオネイン (MTII) (Karin et al., 1987; Culotta et al., 1989)、コラゲナーゼ (Pinkert et al., 1987; Angel et al., 1987)、アルブミン (Pinkert et al., 1987; Tronche et al., 1989, 1990)、 α -フェトプロテイン (Godbout et al., 1988; Campere et al., 1989)、 α -グロビン (Bodine et al., 1987; Perez-Stable et al., 1990)、 β -グロビン (Trudel et al., 1987)、c-fos (Cohen et al., 1987)、c-Ha-Ras (Triesman, 1986; Deschamps et al., 1985)、インスリン (Edlund et al., 1985)、神経細胞接着分子 (NCAM) (Hirsh et al., 1990)、1-アンチトリパイン (Antitrypsin) (Latimer et al., 1990)、H2B (TH2B) ヒストン (Hwang et al., 1990)、マウスおよび/またはI型コラーゲン (Ripe et al., 1989)、グルコース調節タンパク質 (GRP94およびGRP78) (Chang et al., 1989)、ラット成長ホルモン (Larsen et al., 1986)、ヒト血清アミロイドA (SAA) (Edbrooke et al., 1989)、トロポニンI (TN I) (Yutzey et al., 1989)、血小板由来増殖因子 (PDGF) (Pech et al., 1989)、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Klamut et al., 1990)、SV40 (Banerji et al., 1981; Moreau et al., 1981; Sleight et al., 1985; Firak et al., 1986; Herr et al., 1986; Imbra et al., 1986; Kadesch et al., 1986; Wang et al., 1986; Ondek et al., 1987; Kuhl et al., 1987; Schaffner et al., 1988)、ポリオーマ (Swartzendruber et al., 1975; Vasseur et al., 1980; Katinka et al., 1980, 1981; Tyndell et al., 1981; Dandolo et al., 1983; de Villiers et al., 1984; Hen et al., 1986; Satake et al., 1988; Campbell et al., 1988)、レトロウイルス (Kriegler et al., 1982, 1983; Levinson et al., 1982; Kriegler et al., 1983, 1984a, b, 1988; Bosze et al., 1986; Miksicsek et al., 1986; Celander et al., 1987; Thiessen et al., 1988; Celander et al., 1988; Choi et al., 1988; Reisman et al., 1989)、パピローマウイルス (Campo et al., 1983; Lusky et al., 1983; Spandidos and Wilkie, 1983; Spalholz et al., 1985; Lusky et al., 1986; Cripe et al., 1987; Gloss et al., 1987; Hirochika et al., 1987; Stephens et al., 1987)、B型肝炎ウイルス (Bulla et al., 1986; Jameel et al., 1986; Shaul et al., 1987; Spandau et al., 1988; Vannice et al., 1988)、ヒト免疫不全ウイルス (Muesing et al., 1987; Hauber et al., 1988; Jakobovits et al., 1988; Feng et al., 1988; Takebe et al., 1988; Rosen et al., 1988; Berkhout et al., 1989; Laspia et al., 1989; Sharp et al., 1989; Braddock et al., 1989)、サイトメガロウイルス (CMV) IE (Weber et al., 1984; Boshart et al., 1985; Foecking et al., 1986)、テナガザル白血病ウイルス (Holbrook et al., 1987; Quinn et al., 1989) が挙げられる。

【 0 0 7 0 】

誘導性エレメントとしては、非限定的に、MT II-ホルボールエステル (TFA) / 重金属 (Palmiter et al., 1982; Haslinger et al., 1985; Searle et al., 1985; Stuart et al., 1985; Imagawa et al., 1987; Karin et al., 1987; Angel et al., 1987b; McNeall et al., 1989); MMTV (マウス乳腺腫瘍ウイルス) - グルココルチコイド (Huang et al., 1981; Lee et al., 1981; Majors et al., 1983; Chandler et al., 1983; Lee et al., 1984; Pontal et al., 1985; Sakai et al., 1988); - インターフェロン-ポリ (rI) x / ポリ (rc) (Tavernier et al., 1983); アデノウイルス 5 E2-EIA (Imperiale et al., 1984); コラゲナーゼ-ホルボールエステル (TPA) (Angel et al., 1987a); ストロメリシン-ホルボールエステル (TPA) (Angel et al., 1987b); SV40-ホルボールエステル (TPA) (Angel et al., 1987b); マウス MX 遺伝子-インターフェロン, ニューカッスル病ウイルス (Hug et al., 1988); GRP78 遺伝子-A23187 (Resendez et al., 1988); -2-マクログロブリン-IL-6 (Kunz et al., 1989); ビメンチン-血清 (Rittling et al., 1989); MHC クラス I 遺伝子 H-2 b-インターフェロン (Blancar et al., 1989); HSP70-EIA/SV40 ラージ T 抗原 (Taylor et al., 1989, 1990a, 1990b); プロリフェリン-ホルボールエステル/TPA (Mordacq et al., 1989); 腫瘍壊死因子-PMA (Hensel et al., 1989); および甲状腺刺激ホルモン 遺伝子-甲状腺ホルモン (Chatterjee et al., 1989) が挙げられる。

【0071】

本発明のペプチドまたはタンパク質コードポリヌクレオチドの発現を制御するために使用される具体的なプロモーターは、該プロモーターが、標的化細胞、好ましくは細菌細胞において該ポリヌクレオチドを発現させ得る限り、重要でないと考えられる。ヒト細胞が標的化される場合、該ポリヌクレオチドのコード領域を、ヒト細胞において発現させ得るプロモーターに隣接させて該プロモーターの制御下に配置することが好ましい。一般的に言うと、かかるプロモーターとしては、細菌プロモーター、ヒトプロモーターまたはウイルスプロモーターのいずれかが挙げられ得よう。

【0072】

3. 開始シグナルおよび内部リボソーム結合部位 (IRES)

また、特定の開始シグナルがコード配列の効率的な翻訳のために必要とされる場合があり得る。このようなシグナルとしては、ATG 開始コドンまたは隣接配列が挙げられる。外来性の翻訳制御シグナル、例えば ATG 開始コドンを備える必要があり得る。当業者であれば、これを判断して必要なシグナルを付与することが容易にできよう。

【0073】

本発明の一部の特定の態様では、内部リボソーム進入部位 (IRES) エレメントの使用が、多重遺伝子メッセージまたはポリシストロニックメッセージを生成するために用いられる。IRES エレメントは、5' メチル化 Cap 依存性翻訳のリボソームスキヤニングモデルを回避し、内部部位で翻訳を開始し得る (Pelletier and Sonenberg, 1988; Macejak and Sarnow, 1991)。IRES エレメントは、異種オープンリーディングフレームと連結され得る。各々が IRES によって隔てられた複数のオープンリーディングフレームと一緒に転写され、ポリシストロニックメッセージが生成され得る。1つのメッセージを転写するための1つのプロモーター/エンハンサーを用いて複数の遺伝子が効率的に発現され得る (米国特許第 5,925,565 号および第 5,935,819 号参照、参照により本明細書に組み入れられる)。

【0074】

4. 選択マーカーおよびスクリーニング可能マーカー

本発明の一部の特定の態様では、本開示の核酸構築物を含む細胞は、スクリーニング可能マーカーまたは選択マーカーを発現ベクターにコードすることによりインビトロまたはインビボで同定され得る。転写されて翻訳されるとマーカーは、該細胞に同定可能な変化を付与し、該発現ベクターを含む細胞の容易な同定を可能にする。一般的に、選択マーカーは、選択を可能にする特性を付与するものである。陽性選択マーカーは、マーカーの存在によって選択を可能にするものであり、一方、陰性選択マーカーは、その存在によって選択が妨げられるものである。陽性選択マーカーの一例は薬物耐性マーカーである。

【0075】

5. 宿主細胞

本明細書で用いる場合、用語「細胞」、「細胞株」および「細胞培養物」は互換的に用いられ得る。また、これらの用語はすべて、その任意のあらゆる後続世代の子孫も包含している。意図的または偶発的な変異のため、すべての子孫が同一にはなり得ないことは理解されよう。異種核酸配列の発現との関連において、「宿主細胞」は、原核生物細胞または真核生物細胞をいい、ベクターを複製し得るか、またはベクターにコードされた異種遺伝子を発現し得る任意の形質転換可能な生物体を包含している。宿主細胞は、ベクターまたはウイルスのレシピエントとして使用することができ、使用されている。宿主細胞は「トランスフェクト」または「形質転換」され得、これは、外来性核酸、例えば組換えタンパク質コード配列が該宿主細胞内に移入または導入される過程をいう。形質転換細胞には対象の初代細胞およびその子孫が包含される。

10

【0076】

宿主細胞は、原核生物または真核生物に由来し得、ベクターの複製用または核酸配列（複数可）の一部もしくは全部の発現用の細菌、酵母細胞、昆虫細胞および哺乳動物細胞が挙げられる。数多くの細胞株および細胞培養物が宿主細胞としての使用に利用可能であり、これらは、生体培養物および遺伝子材料の保管所としての機能を果たす組織であるAmerican Type Culture Collection (ATCC) から入手できる (www.atcc.org)。

【0077】

6. 発現系

上記に論考した組成物の少なくとも一部または全部を含む数多くの発現系が存在している。原核生物ベースの系および/または真核生物ベースの系が、核酸配列、またはその対応するポリペプチド、タンパク質およびペプチドを作製するために本発明での使用のために使用され得る。かかる系の多くは市販されており、広く入手可能である。

20

【0078】

昆虫細胞/バキュロウイルス系は、異種核酸セグメントの高レベルのタンパク質発現をもたらし得、例えば米国特許第5,871,986号、第4,879,236号（どちらも参照により本明細書に組み入れられる）に記載されており、例えば、名称Bac-to-Bac（登録商標）Baculovirus Expression SystemでThermoFisherから、およびBacPAK（商標）Baculovirus Expression SystemでTakara（登録商標）から購入することができる。

【0079】

本開示の本発明の発現系に加えて、発現系の他の例としては、合成エクジソン誘導性受容体を伴うSTRATAGENE（登録商標）のCOMPLETE CONTROL（商標）Inducible Mammalian Expression System、またはそのpET Expression System（大腸菌（E.coli）発現系）が挙げられる。誘導性発現系の別の例はThermoFisher（登録商標）から入手可能であり、これは、完全長CMVプロモーターが使用される哺乳動物の誘導性発現系であるT-REx（商標）（テトラサイクリン調節型発現）Systemを有する。また、ThermoFisher（登録商標）は、ピキア属の酵母における組換えタンパク質の高レベル生産のために設計された酵母発現系も提供している。当業者であれば、核酸配列またはその対応するポリペプチド、タンパク質もしくはペプチドを作製するためにベクター、例えば発現構築物をどのようにして発現させるかがわかるであろう。

30

【0080】

D. 併用療法

本開示の組成物および関連する方法、特に、免疫療法用抗体に機能的に連結させたECM親和性ペプチドの投与はまた、追加の治療の実施、例えば本明細書に記載の追加の治療薬の投与と併用して、または当技術分野で公知の他の従来の治療薬と併用して使用され得る。

【0081】

本明細書に開示の治療用組成物および処置は別の処置または剤の前、それと同時におよび/またはその後であり得、数分間から数週間の範囲の間隔があげられ得る。剤が細胞、組織または生物体に別々に適用される態様では、一般的に、治療剤がなお細胞、組織または生物体に対して好都合な併用効果を奏することができ得るように各送達時点同士の間の重要

40

50

な期間を過ぎないことが確実にされるであろう。例えば、かかる場合では、細胞、組織または生物体が2、3、4種類またはそれ以上の剤または処置と実質的に同時に（すなわち、約1分未満以内に）接触され得ることが想定される。他の局面では、1種類または複数種の治療剤または処置が、別の治療剤の投与または処置の実施の前および/または後の1分、5分、10分、20分、30分、45分、60分、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間、25時間、26時間、27時間、28時間、29時間、30時間、31時間、32時間、33時間、34時間、35時間、36時間、37時間、38時間、39時間、40時間、41時間、42時間、43時間、44時間、45時間、46時間、47時間、48時間、1日、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間、21日間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間もしくは8週間以内にまたはそれ以上の範囲内で、およびその中で導出可能な任意の範囲内で投与または提供され得る。

【0082】

治療剤および処置の種々の併用レジメンが使用され得る。かかる併用の非限定的な例を以下に示すが、ここで、治療剤、例えば本明細書に開示の組成物は「A」であり、本明細書に記載または当技術分野で公知の第2の剤、例えば追加の剤、化学療法薬またはチェックポイント阻害薬は「B」である。

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

【0083】

一部の態様では、2つ以上の治療過程が使用され得る。複数過程が実施され得ることが想定される。

【0084】

1. 化学療法薬

用語「化学療法剤」は、とりわけがんを処置するために使用され得る治療用化合物および/または薬物をいう。例えば、化学療法剤としては、非限定的に、細胞分裂を妨害するか、微小管の正常な機能を破壊するか、代謝産物の利用を阻害するか、ヌクレオチドアナログの細胞内DNAへの置き換えを行うか、またはDNAの複製に必要な酵素を阻害する任意の剤が挙げられ得る。

【0085】

化学療法剤の好適な種類としては、(a)アルキル化剤、例えばナイトロジェンマスタード（例えば、メクロレタミン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル）、エチレンイミンおよびメチルメラミン（例えば、ヘキサメチルメラミン、チオテパ）、アルキルスルホネート（例えば、ブスルファン）、ニトロソウレア（例えば、カルムスチン、ロムスチン、クロロゾトシン（chlorozoticin）、ストレプトゾシン）およびトリアジン（例えば、ダカルバジン（dicarbazine））、(b)代謝拮抗薬、例えば葉酸アナログ（例えば、メトトレキサート）、ピリミジンアナログ（例えば、5-フルオロウラシル、フロクスウリジン、シタラビン、アザウリジン）およびプリンアナログならびに関連物質（例えば、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、ペントスタチン）、(c)天然産物、例えばピンカアルカロイド（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン）、エピポドフィロトキシシン（例えば、エトポシド、テニポシド）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシンおよびミトザントロン）、酵素（例えば、L-アスパラギナーゼ）、および生物学的応答修飾剤（例えば、インターフェロン- α ）、ならびに(d)多岐にわたる剤、例えば白金配位錯体

(例えば、シスプラチン、カルボプラチン)、置換尿素(例えば、ヒドロキシウレア)、メチルヒドラジン(methylhydrazine)誘導体(例えば、プロカルバジン)、ならびに副腎皮質抑制薬(例えば、タキソールおよびミトタン)が挙げられる。一部の態様では、シスプラチンが特に好適な化学療法剤である。

【0086】

他の好適な化学療法剤としては、抗微小管剤、例えば、パクリタキセル(「タキソール」)およびドキソルピシン塩酸塩(「ドキソルピシン」)が挙げられる。

【0087】

ナイトロジェンマスタードは本開示の方法において有用な別の好適な化学療法剤である。ナイトロジェンマスタードとしては、非限定的に、メクロレタミン(HN_2)、シクロホスファミドおよび/またはイホスファミド、メルファラン(L-サルコリシン)ならびにクロラムブシルが挙げられ得る。シクロホスファミド(West-Wardから入手可能)は別の好適な化学療法剤である。成人に対する好適な経口用量としては、例えば約1 mg/kg/日~約5 mg/kg/日が挙げられ、静脈内用量としては、例えば、最初に約40 mg/kg~約50 mg/kgを分割用量で約2日間~約5日間にわたって、または約10 mg/kg~約15 mg/kgを約7日~約10日毎または約3 mg/kg~約5 mg/kgを週2回または約1.5 mg/kg/日~約3 mg/kg/日が挙げられる。胃腸への有害作用のため、静脈内経路が好ましい。また、薬物は、場合によっては筋肉内に、浸潤によって、または体腔内に投与される。

【0088】

さらなる好適な化学療法剤としては、ピリミジンアナログ、例えばシタラビン(シトシンアラビノシド)、5-フルオロウラシル(フルオウラシル;5-FU)およびフロクスウリジン(フルオロデオキシウリジン;FudR)が挙げられる。5-FUは対象に、約7.5~約1000 mg/m²の間のいずれかの投薬量で投与され得る。さらに、5-FU投薬スケジュールはさまざまな期間、例えば6週間までであり得るか、または本開示に関する当業者によって判断されるとおりであり得る。

【0089】

ゲムシタビン二リン酸(GEMZAR(登録商標),Eli Lilly & Co.,「ゲムシタビン」)は別の好適な化学療法剤であり、進行性および転移性の膵がんの処置に推奨され、したがって本開示において、このようながんに対して同様に有用である。

【0090】

患者に送達される化学療法剤の量はいろいろであり得る。好適な一態様では、化学療法が本構築物とともに実施される場合、化学療法剤は、宿主のがんの停止または退縮を引き起こされるのに有効な量で投与され得る。他の態様では、化学療法剤が、該化学療法剤の化学療法有効量の2分の1~10,000分の1の間のいずれかの量で投与され得る。例えば、化学療法剤は、該化学療法剤の化学療法有効量の約20分の1、約500分の1、またはさらには約5000分の1の量で投与され得る。本開示の化学療法薬はインピボで、本構築物との併用での所望の治療活性について、ならびに有効投薬量の決定のために試験され得る。例えば、かかる化合物は、ヒトでの試験の前に、適当な動物モデル系、例えば非限定的に、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなどで試験され得る。また、本実施例に記載のように、インビトロ試験を用いて適当な組合せおよび投薬量を決定してもよい。

【0091】

本開示の方法における活性成分の実際の投薬量レベルは、具体的な患者、組成物および投与様式で該患者に対して毒性になることなく所望の治療応答が得られるのに有効な活性成分量が得られるように変更され得る。選択される投薬量レベルは、さまざまな要素、例えば、選択される化学療法剤の活性、投与経路、投与のタイミング、化学療法剤の排出速度、処置の持続期間、他の薬物、具体的な化学療法剤と併用して使用される化合物および/または物質、処置対象の患者の年齢、性別、体重、体調、一般健康状態および既往歴、ならびに医療分野で周知の同様の要素に依存する。

【0092】

化学療法の効果と本治療用ポリペプチドの発現とを組み合わせることにより、単独で使

10

20

30

40

50

用した場合（すなわち、該治療用ポリペプチドが直接投与され、化学療法剤の存在によって誘導されない場合）のこれらの剤の各々の抗腫瘍効果を増強し得ることが想定される。当技術分野における通常の技能を有する医師は、必要とされる本構築物と化学療法剤の有効量を容易に決定し、処方することができよう。例えば、医師であれば、構築物および/または化学療法の用量を、所望の治療効果を得るために必要とされるものより低いレベルで開始し、所望の効果が得られるまで投薬量を漸増することができ得よう。

【 0 0 9 3 】

2. 電離放射線

本明細書で用いる場合、「電離放射線」は、電離（電子の獲得または喪失）をもたらすのに十分なエネルギーを有するか、または電離をもたらすのに十分なエネルギーを核の相互作用によって生じ得る粒子または光子を含む放射線を意味する。例示的な好ましい電離放射線の一例はx線である。x線を標的の組織または細胞に送達するための手段は当技術分野において周知である。

【 0 0 9 4 】

一部の態様では、電離放射線の量は20グレイより多く、1回投与される。一部の態様では、電離放射線の量は18 Gyであり、3回投与される。一部の態様では、電離放射線の量は少なくとも、最大で、または厳密に2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、18、19、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または40 Gy（あるいはその中の任意の導出可能な範囲）である。一部の態様では、電離放射線は、少なくとも、最大で、または厳密に1、2、3、4、5、6、7、8、9または10回（あるいはその中の任意の導出可能な範囲）投与される。2回以上投与される場合、各回は約1、4、8、12もしくは24時間または1、2、3、4、5、6、7もしくは8日間または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14もしくは16週間、あるいはその中の任意の導出可能な範囲、空けられ得る。

【 0 0 9 5 】

一部の態様では、IRの量はIRの総線量として提示され、次いでこれが分割線量で投与され得る。例えば、一部の態様では、総線量は、5 Gyずつの10回分割線量で投与される50 Gyである。一部の態様では、総線量は、2～3 Gyずつの20～60回分割線量で投与される50～90 Gyである。一部の態様では、IRの総線量は、少なくとも、最大で、またはおよそ20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、125、130、135、140または150（あるいはその中の任意の導出可能な範囲）である。一部の態様では、総線量は、少なくとも、最大で、または厳密に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、15、20、25、30、35、40、45または50 Gy（あるいはその中の任意の導出可能な範囲）の分割線量で投与される。一部の態様では、少なくとも、最大で、または厳密に2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100回の分割線量（あるいはその中の任意の導出可能な範囲）が投与される。一部の態様では、1日あたり少なくとも、最大で、または厳密に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12回（あるいはその間の任意の誘導可能な範囲）の分割線量が投与される。一部の態様では、1週間あたり少なくとも、最大で、または厳密に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、

24、25、26、27、28、29または30回（あるいはその中の任意の導出可能な範囲）の分割線量が投与される。

【0096】

一部の態様では、IRレジメンおよび/または総IR線量が医者または担当医療従事者によって処方される。医療従事者は、IRの投与全体を通して患者の経過をモニタリングおよび/もしくは入手し得る、ならびに/または医療従事者は、処方されたIR線量の投与終了時に患者をみて、評価に基づいてIRの新たな用量/レジメンを処方し得る。

【0097】

3.追加の剤

一部の態様では、本方法は追加の剤の投与をさらに含む。一部の態様では、該追加の剤は免疫賦活薬である。用語「免疫賦活薬」は、本明細書で用いる場合、対象の免疫応答を刺激することができる化合物をいい、アジュバントを含む場合もある。一部の態様では、免疫賦活薬は、特異的抗原を構成しないが抗原に対する免疫応答の強度と長さを増大させることができる剤である。かかる免疫賦活薬としては、非限定的に、パターン認識受容体の刺激薬、例えばToll様受容体、RIG-1およびNOD様受容体（NLR）の刺激薬、鉱物塩、例えばミョウバン、ミョウバンと例えば大腸菌（*Escherichia coli*）、サルモネラ・ミネソタ（*Salmonella minnesota*）、サルモネラ・ティフィムリウム（*Salmonella typhimurium*）もしくはシゲラ・フレクスナー（*Shigella flexneri*）などのエンテロバクター属のモノホスホリルリピド（MPL）Aとの組合せ、または特に、上記の個々の細菌のMPL AであるMPL.RTM.との組合せ（ASO4）、サポニン、例えばQS-21、Quil-A、ISCOM、ISCOMATRIX、乳剤、例えばMF59、Montanide、ISA 51およびISA 720、ASO2（QS 21 + スクアレノ + MPL.）、リポソームおよびリポソーム製剤、例えばASO1、合成または特別に調製されたマイクロ粒子およびマイクロキャリア、例えば淋菌（*N.gonorrhoeae*）、クラミジア・トラコマチス（*Chlamydia trachomatis*）などの細菌由来外膜小胞（OMV）またはキトサン粒子、デポ形成剤、例えばプルロニックブロックコポリマー、特別に修飾または調製されたペプチド、例えばムラミルジペプチド、アミノアルキルグルコサミニド4-ホスフェート、例えばRC529、またはタンパク質、例えば細菌トキソイドもしくは毒素断片が挙げられ得る。

【0098】

一部の態様では、該追加の剤は、パターン認識受容体（PRR）のアゴニスト、例えば非限定的に、Toll様受容体（TLR）、具体的にはTLR 2、3、4、5、7、8、9および/またはその組合せのアゴニストを含む。一部の態様では、追加の剤は、Toll様受容体3のアゴニスト、Toll様受容体7および8のアゴニスト、またはToll様受容体9アゴニストを含み;好ましくは、記載の免疫賦活薬は、イミダゾキノリン;例えばR848;アデニン誘導体、例えば米国特許第6,329,381号、米国特許出願公開2010/0075995もしくはWO2010/018132に開示されているもの;免疫賦活性DNA;または免疫賦活性RNAを含む。また、一部の態様では、該追加の剤は、免疫賦活性RNA分子、例えば非限定的に、dsRNA、ポリI:CもしくはポリI:ポリC12U（Ampligen.RTM.として入手可能、ポリI:CおよびポリI:ポリC12UはともにTLR3刺激剤として知られている）、および/またはF.Heil et al., “Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8” Science 303 (5663), 1526-1529 (2004); J.Vollmer et al., “Immune modulation by chemically modified ribonucleosides and oligoribonucleotides” WO2008033432 A2; A.Forsbach et al., “Immunostimulatory oligoribonucleotides containing specific sequence motif(s) and targeting the Toll-like receptor 8 pathway” WO2007062107 A2; E.Uhlmann et al., “Modified oligoribonucleotide analogs with enhanced immunostimulatory activity” 米国特許出願公開US 2006241076; G.Lipford et al., “Immunostimulatory viral RNA oligonucleotides and use for treating cancer and infections” WO2005097993 A2; G.Lipford et al., “Immunostimulatory G,U-containing oligoribonucleotides, compositions, and screening methods” WO 2003086280 A2に開示されているものを含み得る。一部の態様では、追加の剤は、TLR

10

20

30

40

50

-4アゴニスト、例えば細菌のリポ多糖（LPS）、VSV-Gおよび/またはHMGB-1であり得る。一部の態様では、追加の剤は、TLR-5アゴニスト、例えばフラジェリン、またはその一部分もしくは誘導体、例えば非限定的に、米国特許第6,130,082号、同第6,585,980号および同第7,192,725号に開示されているものを含み得る。

【0099】

一部の態様では、追加の剤は、壊死細胞から放出される炎症促進性刺激物質（例えば、尿酸結晶）であり得る。一部の態様では、追加の剤は補体カスケード（例えば、CD21、CD35など）の活性型成分であり得る。一部の態様では、追加の剤は免疫複合体の活性型成分であり得る。また、追加の剤としては、補体受容体アゴニスト、例えば、CD21またはCD35に結合する分子も挙げられる。一部の態様では、補体受容体アゴニストは、補体による合成ナノキャリアの内因性オプソニン化を誘導する。一部の態様では、免疫賦活薬はサイトカインであり、これは、細胞によって放出され、細胞間の相互作用、連絡および他の細胞の挙動に対して特異的効果を有する小型のタンパク質または生物学的因子（5 kDa ~ 20 kDaの範囲）である。一部の態様では、サイトカイン受容体アゴニストは小分子、抗体、融合タンパク質またはアプタマーである。

【0100】

一部の態様では、該追加の剤は抗体-薬物コンジュゲートである。一部の態様では、該抗体-薬物コンジュゲートは、ゲムツズマブオゾガマイシン、プレントキシマブベドチンおよびトラスツズマブエムタンシンから選択される。

【0101】

一部の態様では、該追加の剤はキメラ抗原受容体（CAR）である。CARは、免疫エフェクター細胞に特異性を付加した人工T細胞受容体である。このような分子の最も一般的な形態は、モノクローナル抗体に由来する単鎖可変領域断片（scFv）をCD3- 膜貫通部および細胞内ドメインと融合させた融合体である。かかる分子により、scFvによるその標的の認識に応答してゼータシグナルの伝達をもたらされる。かかる構築物の一例は14g2a-であり、これは、ハイブリドーマ14g2a（これはジシアロガングリオシドGD2を認識する）に由来するscFvの融合体である。T細胞がこの分子を発現している場合（通常、オンコレトロウイルスベクターによる形質導入によってなされる）、これは、GD2を発現している標的細胞（例えば、神経芽細胞腫細胞）を認識して死滅させる。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖の可変領域部分は柔軟性のリンカーによって融合されてscFvが形成される。このscFvは、新生タンパク質を小胞体に向け、続いて表面発現を指令するシグナルペプチド（これは切断される）の前に置かれる。柔軟性のスペーサーにより、scFvが、抗原結合を可能にするいろいろな方向に向くことが可能になる。膜貫通ドメインは、通常、シグナル伝達する細胞内ドメインの元の分子に由来し、該細胞内に陥入して所望のシグナルを伝達する典型的な疎水性のヘリックスである。

【0102】

E. 治療方法

本方法および組成物は、がんを処置するための方法に関する。一部の態様では、該がんは固形腫瘍を含む。一部の態様では、該がんは非リンパ系である。一部の態様では、該がんは乳がんまたは黒色腫である。

【0103】

本開示の組成物は、インビボ、インビトロまたはエクスビボでの投与に使用され得る。該組成物の投与経路は、例えば腫瘍内、皮内、皮下、静脈内、リンパ管内および腹腔内投与であり得る。一部の態様では、投与は腫瘍内またはリンパ管内または腫瘍周囲である。一部の態様では、該組成物は、がん組織またはリンパ節内に直接投与される。

【0104】

「腫瘍」は、本明細書で用いる場合、悪性であれ良性であれ、あらゆる新生細胞の成長および増殖、ならびにあらゆる前がん性およびがん性の細胞および組織をいう。用語「がん」、「がん性」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」および「腫瘍」は、本明細書で言及している場合、相互に排他的でない。

【 0 1 0 5 】

処置に適したがんとしては、非限定的に、あらゆる型、位置、サイズおよび特徴の腫瘍が挙げられる。本開示の方法および組成物は、例えば以下の処置に適している：脾がん、結腸がん、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌、AIDS関連がん、AIDS関連リンパ腫、肛門がん、虫垂がん、星状細胞腫、小児の小脳または大脳の基底細胞癌、胆管がん、肝外膀胱がん、骨のがん、骨肉腫/悪性線維性組織球腫、脳幹膠腫、脳腫瘍、小脳の星状細胞腫脳腫瘍、大脳の星状細胞腫/悪性膠腫脳腫瘍、上衣細胞腫脳腫瘍、髄芽細胞腫脳腫瘍、テント上原始神経外胚葉腫瘍脳腫瘍、視覚伝導路および視床下部の膠腫、乳がん、特定の乳がん、例えば非浸潤性乳管癌、浸潤性乳管癌、乳房の管状腺癌、乳房の髄様癌、乳房の粘液性癌腫、乳房の乳頭状癌、乳房の篩状癌、浸潤性小葉癌、炎症性乳がん、非浸潤性小葉癌、男性の乳がん、乳頭のページェット病、乳房の葉状腫瘍、再発性および/または転移性乳がん、ルミナルAまたはB型乳がん、トリプルネガティブ/基底細胞様乳がん、およびHER2過剰型乳がん、リンパ系のがん、気管支腺腫/カルチノイド、気管がん、バーキットリンパ腫、カルチノイド腫瘍、小児のカルチノイド腫瘍、原発不明の胃腸の癌、中枢神経系のリンパ腫、原発性の小脳の星状細胞腫、小児の大脳の星状細胞腫/悪性膠腫、小児の子宮頸がん、小児のがん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性障害、皮膚T細胞性リンパ腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、子宮内膜がん、上衣細胞腫、食道がん、ユーイング、小児の性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管がん、目のがん、網膜芽細胞腫、胆嚢がん、胃（gastric/stomach）がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、胚細胞腫瘍：頭蓋外、性腺外または卵巣、妊娠性絨毛性腫瘍、脳幹の膠腫、膠腫、小児の大脳の星状細胞腫、小児の視覚伝導路および視床下部の膠腫、胃カルチノイド、ヘアリー細胞白血病、頭頸部がん、心臓のがん、肝細胞（肝）がん、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、視床下部および視覚伝導路の膠腫、小児の眼内黒色腫、睪島細胞癌（内分泌睪）、カボジ肉腫、腎がん（腎細胞がん）、喉頭がん、白血病、急性リンパ芽球性（急性リンパ性白血病とも称される）白血病、急性骨髄性（myeloid）（急性骨髄性（myelogenous）白血病とも称される）白血病、慢性リンパ性（慢性リンパ性白血病とも称される）白血病、慢性骨髄性（myelogenous）（慢性骨髄性（myeloid）白血病とも称される）白血病、ヘアリー細胞口唇および口腔のがん、脂肪肉腫、肝がん（原発性）、非小細胞肺癌がん、小細胞肺癌がん、リンパ腫、AIDS関連リンパ腫、バーキットリンパ腫、皮膚T細胞性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキン（ホジキン以外のすべてのリンパ腫の古い分類）リンパ腫、中枢神経原発リンパ腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、骨の悪性線維性組織球腫/骨肉腫、小児の髄芽細胞腫、眼内（目の）黒色腫、メルケル細胞癌、成人の悪性中皮腫、小児の中皮腫、転移性頸部扁平上皮（squamous neck）癌、口腔（mouth）がん、多発性内分泌腫瘍症、多発性骨髄腫/形質細胞腫瘍、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、骨髄異形成/骨髄増殖性疾患、慢性骨髄性白血病、成人の急性骨髄性白血病、小児の急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、慢性骨髄増殖性障害、鼻腔および副鼻腔のがん、鼻咽腔癌、神経芽細胞腫、口腔（oral）がん、口腔咽頭がん、骨肉腫/骨の悪性線維性組織球腫、卵巣がん、卵巣上皮がん（表層上皮性・間質性腫瘍）、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、脾がん、睪島細胞副鼻腔および鼻腔のがん、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、褐色細胞腫、松果体の星状細胞腫、松果体胚腫、松果体芽腫およびテント上原始神経外胚葉腫瘍、小児の下垂体腺腫、形質細胞腫瘍/多発性骨髄腫、胸膜肺芽細胞腫、中枢神経原発リンパ腫、前立腺がん、直腸がん、腎細胞癌（腎がん）、腎盂および尿管の移行上皮がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、小児の唾液腺がん肉腫、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍、カボジ肉腫、軟部組織肉腫、子宮のセザリー症候群肉腫、皮膚がん（非黒色腫）、皮膚がん（黒色腫）、皮膚癌、メルケル細胞小細胞肺癌がん、小腸のがん、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、原発不明の頸部扁平上皮癌、転移性胃がん、テント上原始神経外胚葉腫瘍、小児のT細胞リンパ腫、精巣がん、喉のがん、胸腺腫、小児の胸腺腫、胸腺癌、甲状腺がん、尿道がん、子宮がん、子宮内膜の子宮肉腫、膣がん、視覚伝導路および視床下部の膠腫、小児の外陰がん、ならびにウィルムス腫瘍（腎がん）。

【 0 1 0 6 】

10

20

30

40

50

F.薬学的組成物および方法

一部の態様では、薬学的組成物が対象に投与される。いろいろな局面が、有効量の組成物を対象に投与することを伴う。一部の態様では、阻害薬を含む組成物が対象または患者に、がんを処置するため、または腫瘍の大きさを小さくするために投与され得る。さらに、かかる化合物を、追加のがん治療と併用して投与してもよい。

【0107】

組成物是非経口投与のために製剤化され得る、例えば、静脈内、経カテーテル注射、動脈内注射、筋肉内、皮下またはさらには腹腔内経路による注射のために製剤化され得る。典型的には、かかる組成物は、液状の液剤または懸濁剤のいずれかとしての注射用剤として調製され得る;また、注射前に液体を添加して液剤または懸濁剤を調製するための使用に適した固形形態を調製してもよく;また、該調製物を乳化させてもよい。かかる製剤の調製は、本開示に鑑みると当業者にはわかるであろう。他の投与経路としては、腫瘍内、腫瘍周囲、リンパ管内、がん組織内への注射およびリンパ節内への注射が挙げられる。一部の態様では、投与は全身性である。

10

【0108】

他の投与経路もまた想定される。例えば、本構築物および剤は担体を伴って投与され得る。一部の態様では、担体はナノ粒子またはマイクロ粒子である。一部の態様では、ナノ粒子またはマイクロ粒子は腫瘍指向性ナノ粒子またはマイクロ粒子である。例えば、担体は、該担体を腫瘍に指向する標的化部分をさらに含み得る。該標的化部分は、腫瘍細胞を特異的に認識する結合剤（例えば抗体、例えばscFvなど、または他の抗原結合剤）であり得る。一部の態様では、構築物は担体内に封入される。一部の態様では、構築物は担体表面に共有結合または非共有結合される。一部の態様では、担体はリボソームである。

20

【0109】

粒子は、ミクロスフェア、マイクロ粒子、ナノ粒子、ナノスフェアまたはリボソームとして種々の公知のいろいろな寸法の構造を有し得る。かかる微粒状製剤は、構築物の該粒子との共有結合性または非共有結合性カップリングによって形成され得る。

【0110】

「粒子」、「マイクロ粒子」、「ビーズ」、「ミクロスフェア」および文法的等価物は、本明細書では、対象に投与可能な小さな離散型粒子を意図する。一部の特定の態様では、粒子は実質的に球状の形状である。用語「実質的に球状の」とは、本明細書で用いる場合、粒子の形状が球体から約10%より大きく外れないことを意味する。

30

【0111】

粒子は典型的には、実質的に球状のコアと任意で1つまたは複数の層からなる。コアはサイズおよび組成がさまざまであり得る。コアに加えて、粒子は、関心対象の用途に適切な機能性をもたらすための1つまたは複数の層を有し得る。層（存在する場合）の厚さは、具体的な用途の必要性に応じてさまざまであり得る。例えば、層は有用な光学特性を付与し得る。

【0112】

また、層は、化学的または生物学的機能性を付与し得、本明細書において化学的活性層または生物学的活性層と称し、このような機能性のため、1つまたは複数の該層は典型的には、厚さが約0.001マイクロメートル（1ナノメートル）～約10マイクロメートルまたはそれ以上（所望の粒子直径に応じて）の範囲であり得、このような層は、典型的には粒子の外面上に適用される。

40

【0113】

コアおよび層の組成はさまざまであり得る。粒子またはコアの好適な材料としては、非限定的に、ポリマー、セラミック、ガラス、鉱物などが挙げられる。例としては、非限定的に、標準ガラスおよび特殊ガラス、シリカ、ポリスチレン、ポリエステル、ポリカーボネート、アクリルポリマー、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、フルオロポリマー、シリコーン、セルロース、シリコン、金属（例えば、鉄、金、銀）、鉱物（例えば、ルビー）、ナノ粒子（例えば、金ナノ粒子、コロイド粒子、金属酸化物、

50

金属硫化物、金属セレン化物、および磁性材料、例えば酸化鉄)、ならびにその複合材が挙げられる。コアは、所望される特性に応じて均一な組成であっても、2種類以上の種類の材料の複合材であってもよいであろう。一部の特定の局面では、金属ナノ粒子が使用される。このような金属粒子または金属ナノ粒子はAu、Pt、Pd、Cu、Ag、Co、Fe、Ni、Mn、Sm、Nd、Pr、Gd、Ti、Zr、SiおよびIn、前駆体、その二元合金、その三元合金ならびにその金属間化合物で形成され得る。米国特許第6,712,997号(これは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)を参照のこと。

【0114】

先に記載のように、粒子はコアに加えて1つまたは複数の層を含み得る。マイクロ粒子に層を含める目的はさまざまであり得る。あるいはまた、粒子表面を直接官能化してもよい。層は、化学結合部位またはカップリング部位のための化学官能部を結合させるのに好適な表面をもたらし得る。

【0115】

層はマイクロ粒子上に、当業者に公知のさまざまな様式で作製され得る。例としては、例えばIler(1979);Brinker and Scherer(1990)に記載のゾル-ゲルケミストリー手法が挙げられる。粒子上に層を作製するためのさらなるアプローチとしては、例えばPartch and Brown(1998);Pekarek et al.(1994);Hanprasopwattana(1996);Davies(1998);およびこれらに記載の参考文献に記載の表面化学および封入の手法が挙げられる。また、蒸着手法も使用され得る;例えば、Golman and Shinohara(2000);および米国特許第6,387,498号を参照のこと。さらに他のアプローチとしては、例えばSukhorukov et al.(1998);Caruso et al.(1998);Caruso et al.(1999);米国特許第6,103,379号およびこれらに挙げられた参考文献に記載の交互積層法手法が挙げられる。

【0116】

粒子は、米国特許第4,589,330号または第4,818,542号に教示されているように、構築物およびポリマーを含む水性相と非水性相とを接触させた後、非水性相をエバポレーションして水性相の粒子の融着を引き起こすことにより形成され得る。かかる調製物のための好ましいポリマーは、ゼラチン寒天、デンプン、アラビノガラクトン、アルブミン、コラーゲン、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコリド-L(-)ラクチドポリ(-カプロラクトン、ポリ(-カプロラクトン-コ-乳酸)、ポリ(-カプロラクトン-コ-グリコール酸)、ポリ(-ヒドロキシ酪酸)、ポリエチレンオキシド、ポリエチレン、ポリ(アルキル-2-シアノアクリレート)、ポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリアミド、ポリ(アミノ酸)、ポリ(2-ヒドロキシエチルDL-アスパルタミド)、ポリ(エステルウレア)、ポリ(L-フェニルアラニン/エチレングリコール/1,6-ジイソシアナトヘキサン)およびポリ(メチルメタクリレート)からなる群より選択される天然または合成のコポリマーまたはポリマーである。特に好ましいポリマーはポリエステル、例えばポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコリド-L(-)ラクチドポリ(-カプロラクトン、ポリ(-カプロラクトン-コ-乳酸)およびポリ(-カプロラクトン-コ-グリコール酸)である。ポリマーを溶解させるために有用な溶媒としては:水、ヘキサフルオロイソプロパノール、メチレンクロライド、テトラヒドロフラン、ヘキサン、ベンゼンまたはヘキサフルオロアセトンセスキ水合物が挙げられる。

【0117】

注射用の使用に適した医薬形態としては、滅菌された水性の溶液または分散液;ゴマ油、ピーナッツ油または水性プロピレングリコールを含む配合物;および滅菌注射用液剤または分散剤の即時調製のための滅菌粉末が挙げられる。すべての場合において、該形態は、滅菌していなければならない、容易に注射され得る程度に流動性でなければならない。また、製造および保存の条件下で安定であるのがよく、微生物、例えば細菌および真菌の汚染作用から保護されていなければならない。

【0118】

また、担体は、例えば水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液状ポリエチレングリコールなど)、その適当な混合物ならびに植物油を含む溶媒または分散媒であり得る。適正な流動性は、例えば、コーティング、例えば

10

20

30

40

50

レシチンの使用によって、分散剤の場合は必要とされる粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の抑制は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらされ得る。多くの場合、等張性剤、例えば糖類、塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射用組成物の長期吸収は、該組成物中における吸収遅延剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらされ得る。

【0119】

滅菌注射用液剤は、必要とされる量の活性化化合物を、上記に列挙した種々のその他の成分を必要に応じて有する適切な溶媒中に組み込んだ後、濾過滅菌することにより調製される。一般的に、分散剤は、種々の滅菌活性成分を、ベースの分散媒および上記に列挙したもののうちの必要とされるその他の成分を含む滅菌ビヒクルに組み込むことにより調製される。滅菌注射用液剤の調製用の滅菌粉末剤の場合、好ましい調製方法は真空乾燥および凍結乾燥手法であり、これにより、活性成分+さらなる所望の成分(あれば)の粉末が、先に滅菌濾過したその溶液から得られる。

10

【0120】

本明細書で用いる場合、用語「薬学的に許容される」とは、化合物、物質、組成物および/または投薬形態が、正しい医学的判断の範囲内において、人間および動物の組織との接触に適しており、過度な毒性、刺激、アレルギー応答または問題となる他の合併症がなく、妥当な便益/リスク比と釣り合っていることをいう。用語「薬学的に許容される担体」は、化学剤の担持または輸送に關与する薬学的に許容される物質、組成物または媒体、例えば液状または固形の増量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒または封入材を意味する。

20

【0121】

本明細書で用いる場合、「薬学的に許容される塩」は、親化合物を、存在している酸部分または塩基部分をその塩形態に変換させることにより修飾した本開示の化合物の誘導体をいう。薬学的に許容される塩の例としては、非限定的に、アミンなどの塩基性残基の鉍酸または有機酸の塩;カルボン酸などの酸性残基のアルカリ塩または有機塩;などが挙げられる。薬学的に許容される塩としては、例えば非毒性の無機酸または有機酸で形成される親化合物の慣用的な非毒性の塩または第4級アンモニウム塩が挙げられる。薬学的に許容される塩を、塩基性部分または酸性部分を含む親化合物から、慣用的な化学的方法によって合成してもよい。

30

【0122】

対象の体調に応じて投薬量におけるいくらかの変動が必然的に生じる。投与を担う人は、任意の事象において個々の対象に適切な用量を決定する。治療用または予防用組成物の有効量は、意図された目的に基づいて決定される。用語「単位用量」または「投薬量」は、対象における使用に適した物理的に独立した単位をいい、各単位は、その投与、すなわち適切な経路およびレジメンを伴って上記に論考した所望の応答がもたらされるように計算された所定量の該組成物を含む。投与される量は、処置回数および単位用量の両方によって所望される効果に依存する。また、該組成物の厳密な量は実務者の判断にも依存し、各個体に固有である。用量に影響を及ぼす要素としては、対象の身体の状態および臨床状態、投与経路、意図される処置目的(症状の緩和か治療か)、ならびに具体的な組成物の効力、安定性および毒性が挙げられる。

40

【0123】

液剤は、製剤化されたら、投薬製剤に適合する様式で、治療的または予防的に有効であるような量で投与される。製剤は、さまざまな剤形で、例えば上記の型の注射用液剤で容易に投与される。

【0124】

典型的には、ヒト成人(およそ70キログラムの体重)に対して、約0.1 mg~約3000 mg(その間のあらゆる値および範囲を含む)、または約5 mg~約1000 mg(その間のあらゆる値および範囲を含む)、または約10 mg~約100 mg(その間のあらゆる値および範囲を含む)の化合物が投与される。このような投薬量範囲は一例にすぎないこと、およ

50

び投与は、当業者に公知の要素に応じて調整され得ることが理解されよう。

【0125】

一部の特定の態様では、対象におよそ、少なくとも約、または最大約0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、15.5、16.0、16.5、17.0、17.5、18.0、18.5、19.0、19.5、20.0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、410、420、425、430、440、441、450、460、470、475、480、490、500、510、520、525、530、540、550、560、570、575、580、590、600、610、620、625、630、640、650、660、670、675、680、690、700、710、720、725、730、740、750、760、770、775、780、790、800、810、820、825、830、840、850、860、870、875、880、890、900、910、920、925、930、940、950、960、970、975、980、990、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、6000、7000、8000、9000、10000ミリグラム（mg）またはマイクログラム（mcg）または $\mu\text{g/kg}$ またはマイクログラム/kg/分またはmg/kg/分またはマイクログラム/kg/時またはmg/kg/時で、あるいはその中で導出可能な任意の範囲で投与される。

【0126】

投薬は頓用で行われ得るか、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18もしくは24時間毎に（あるいはその中で導出可能な任意の範囲）または1日に1、2、3、4、5、6、7、8、9回もしくはそれ以上（あるいはその中で導出可能な任意の範囲）行われ得る。投薬は、病状の徴候の前または後に最初に行われてもよい。一部の態様では、患者は、レジメンの初回投薬を、該患者が病状の徴候または症状を起こすかまたは示してから1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12時間後（あるいはその中で導出可能な任意の範囲）または1、2、3、4または5日後（あるいはその中で導出可能な任意の範囲）に行われる。患者は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10日間もしくはそれ以上（あるいはその中で導出可能な任意の範囲）、または病状の症状が消失もしくは低減されるまで、または感染の症状が消失もしくは低減してから6、12、18もしくは24時間後または1、2、3、4もしくは5日後まで、処置され得る。

【実施例】

【0127】

II. 実施例

10

20

30

40

50

以下の実施例は、本開示の好ましい態様を実証するために含めている。当業者には、以下の実施例に開示した手法が、本発明者が、本開示の実施において十分に機能を果たすと見出した手法であり、したがって、その実施のための好ましい形態を構成しているとみなされ得ることが認識されよう。しかしながら、当業者は、本開示に鑑みると、開示している具体的な態様において、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく多くの変更が行なわれ得るが、それでもなお同様または類似の結果が得られることが認識されるはずである。

【0128】

実施例1-免疫チェックポイント遮断抗体と細胞外マトリックス結合ペプチドのコンジュゲーションにより抗腫瘍療法の有効性が向上する

免疫チェックポイント遮断は相当な抗腫瘍活性を示すが、以前の試験では重度の処置関連有害事象の事例が報告されている。本発明者らは、腫瘍内または腫瘍周囲に保持される抗体 (Ab) 形態を用いて局所免疫チェックポイント遮断を利用し、全身性曝露を限定的にすることを模索した。これを達成するため、胎盤増殖因子-2に由来する細胞外マトリックス (ECM) 超親和性ペプチド (PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄) をチェックポイント遮断Abにコンジュゲートさせた。この実施例では、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーション後、組織内保持が向上し、Ab血漿濃度が低下して、全身性副作用、例えば肝臓障害が低減されることを実証する。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-抗CTLA4 AbおよびPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-抗PD-L1 Abの腫瘍周囲 (p.t.) 注射により、マウス黒色腫および乳がんモデルにおいて野生型 (wt) 形態と比べて腫瘍の増殖が有意に遅延され、生存期間が長くなった。このようなPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abは腫瘍浸潤性の活性型のCD8⁺およびCD4⁺T細胞を増やし、遠位腫瘍の増殖の遅延も同様にもたらす。改変操作されたECM結合性Abの変換可能なこのアプローチは、チェックポイント遮断の新規なアプローチを提示する。

【0129】

免疫チェックポイントは、特に免疫系が活性化状態であるときに宿主組織を損傷から保護するために免疫系が使用する阻害性経路である。最近、悪性腫瘍がこの機構を利用して免疫媒介性拒絶を回避することが示された。これに基づいて、免疫チェックポイント遮断が、がん治療のための将来有望なアプローチであることが実証されている。

【0130】

細胞傷害性Tリンパ球抗原4 (CTLA4、CD152) は、制御性T細胞 (Treg) および活性化CD8⁺T細胞上に発現される膜貫通型タンパク質である。これは、抗原提示細胞 (APC) 上のCD80またはCD86に結合することにより免疫抑制性シグナルの誘導因子としての機能を果たす。したがって、CTLA4遮断抗体 (Ab) (CTLA4) はT細胞の不活性化を阻害する。臨床では、CTLA4 (イピリムマブ) 処置によって黒色腫患者の生存率の改善がもたらされた。一部の腫瘍細胞は、活性化T細胞上のPD-1に結合させることによって免疫応答を回避するための経路内の鍵となる分子であるプログラム細胞死リガンド1 (PD-L1、CD274、B7-H1) を発現している。PD-L1とPD-1の結合によりT細胞のサイトカイン産生の減少、増殖の阻害およびアポトーシスがもたらされる。抗PD-L1 (PD-L1:アテゾリズマブ、アベルマブおよびデュルバルマブ) 遮断抗体では、いくつかの型のがんに対する抗腫瘍有効性が示されている。さらに、ニボルマブ (PD-1) とイピリムマブを用いた併用療法では、生存期間の有意な延長が示され、米食品医薬品局 (FDA) により、進行した黒色腫の処置に対して承認されている。

【0131】

複数のチェックポイント遮断抗体を用いた臨床試験が承認されている。しかしながら、患者の68.7%でグレード3または4の副作用が示された。特に、これらの患者の36.4%は、処置関連有害事象のため治療を継続することができなかった。処置の有効性の観点では、客観的奏効率は57.6%であった。また、急速進行性マウス腫瘍モデルB16F10黒色腫を用いた試験において、このようなAbでの処置では完全退縮が誘導されないことが報告され、その治療効果の改善の余地が示唆された。

【0132】

10

20

30

40

50

いくつかの増殖因子 (GF) に存在するヘパリン結合ドメイン (HBD) は、さまざまな細胞外マトリックス (ECM) タンパク質に結合する。さまざまなECMタンパク質に対するGFの結合をスクリーニングすることにより、本発明者らは、胎盤増殖因子-2のHBD (PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄) が、複数のECMタンパク質に対して並外れて高い親和性を有することを見出した。本発明者らは、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-ドメインをGFに融合させることにより、皮膚および骨の再生のマウスモデルにおいて、その組織内保持および治療有効性が向上したことを示した。この実施例では、がん免疫療法のための、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチドとコンジュゲートさせた免疫チェックポイント遮断抗体 (または「Ab」) を説明する。腫瘍組織周囲におけるチェックポイント遮断Abの保持の向上により、T細胞の活性化が増強すること、および全身性曝露の低減により治療の副作用が減少することによって、抗腫瘍有効性が改善されるであろうという仮説をたてる。

10

【0133】

A. 結果

1. PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチドコンジュゲートAbはECMタンパク質および標的に結合する。

まず、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲートAbがインビトロでECMタンパク質に結合する能力を調べた。IgG Abをスルホ-スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (スルホ-SMCC) と混合した後、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチドをこのAbに共有結合によって架橋させた (図1A)。SDS-PAGEにより、IgGの軽鎖と重鎖の両方の分子量が増えていることが示された (図1B)。平均で6.3個および6個のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチドが、それぞれモノクローナル CTLA4 (4F10) およびモノクローナル PD-L1に結合していた (MALDI-TOF MSにより算出) (図7)。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4およびPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1はどちらも、8種類の異なるECMタンパク質: フィブロネクチン、フィブリノゲン、ビトロネクチン、オステオポンチン、I型コラーゲン、II型コラーゲン、III型コラーゲンおよびIV型コラーゲンに結合した。比較において、wtの CTLA4も PD-L1も、試験したECMタンパク質には結合しなかった (図1CDおよび図8)。皮膚ECMの主成分であるフィブロネクチンおよびI型コラーゲンに対するPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 (9H10および4F10) ならびにPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1の強い結合親和性 (nM範囲の解離定数 (K_d) 値) が観察された (図1Eおよび図9)。重要なことに、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4およびPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1はその標的抗原を、野生型 (wt) 形態と同様のK_d値で認識した (図1Eおよび図10)。また、FACS解析でも、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-4F10はT細胞ハイブリドーマに結合し、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1はB16F10細胞ならびにその対応wtに結合することが示された (図11)。総合すると、このようなデータにより、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abは、その抗原認識能を損なうことなくECMタンパク質に結合することが示された。

20

30

【0134】

2. PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abは、ヘパリンとの競合またはプラスミンによる切断によってECMタンパク質に対する親和性を失う。

次に、ECMタンパク質からのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abの放出を調べた。過剰のヘパリンの添加により、フィブロネクチンに対するPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-IgGの結合が用量依存的様式で低減され、これは以前の観察結果と整合する (図12)。プラスミンの添加によりPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-IgGのそのECM結合活性が失われ、SDS-PAGEにおける移動度シフトが付随して起こった (図1Fおよび図13)。このようなデータは、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abがヘパリンによって、またはPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチド内の部位のプラスミン媒介性切断によって、ECMタンパク質から放出され得ることを示唆する。

40

【0135】

3. PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abは腫瘍周囲に保持される。

次いで、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abの組織内保持能を調べた。密性ウシコラーゲンシートをインビトロ組織模倣モデルとして使用し、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1またはwt-PD-L1とともにインキュベートした。4回のバッファー交換後、プラスミン消化により、結合PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1の47.1%が放出されたが、wt-PD-L1の放出は<0.1%であり、PIGF

50

-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1はコラーゲンマトリックス中に保持されることが示唆された（図14）。次に、組織学的解析を行ない、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abが腫瘍周囲（p.t.）注射後、インビボで内因性ECMへの結合によって注射部位に長期間、残存するかどうかを調べた。その結果、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4およびPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1はどちらも、注射の6日後に、腫瘍組織内で検出された。比較において、wt CTLA4およびwt PD-L1はどちらもこの時点で検出されなかった。総合すると、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションにより、CTLA4およびPD-L1はどちらも、p.t.注射した場合にその腫瘍組織内保持が向上した。

【0136】

4. PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションによって処置関連有害事象が減少する。

10

PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abが注射部位付近における長期保持を示したため、血漿中の該Ab濃度はwt Abと比べて低いであろうという仮説をたてた。この仮説を試験するため、血漿中の該Abの濃度を経時的に測定した（図2A～B）。B16F10細胞を接種後、マウスに、CTLA4およびPD-L1の単回投与（100 μgずつ）を4日目に行なった。濃度は、すべての群で注射後、初日に最も高かった。さらに、p.t.および腹腔内（i.p.）投与経路によるwt Abの注射では同様の血漿濃度が示された。どちらのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abの血漿濃度も、そのwt形態と比べて有意に低く、注射の3日後では辛うじて検出され、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションによってCTLA4/ PD-L1の全身毒性が低減され得ることが示唆された。次に副作用を調べた。CTLA4およびPD-L1を腫瘍接種の4日後と7日後に投与し、次いで、血清中のサイトカイン濃度および臨床使用されている肝臓障害マーカー（すなわち、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）活性）を調べた。wt Ab投与ではTNF およびIFN のどちらの血清中濃度も、2回目の注射の2日後に上昇していたが、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abでは上昇していなかった（図2CD）。興味深いことに、IL2血清濃度は、wt-AbおよびPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abのどちらの処置後も維持された（図2E）。さらに、wt Ab処置では、2回目の注射の2日後に、血清におけるALT活性が上昇していたが、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab処置では上昇していなかった（図2F）。さらに、組織学的解析により、wt Abは肝臓においてリンパ球浸潤および壊死性構造物を誘導することが示された（図2Gおよび図15）。対照的に、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲートAb処置後では、組織構造は維持された。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションによる全身毒性の低減をさらに確認するため、本発明者らは、報告によるとPD-L1投与後、膵島細胞に対するPD-L1結合によって自己免疫性糖尿病を発症する非肥満糖尿病（NOD）マウスを使用した。wt PD-L1投与により、6日目まで、16週齢のNOD雄マウスすべてに糖尿病が誘導されたが、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1ではAb処置の開始の15日後に0%であった（図2H）。総合すると、このような結果により、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションによってチェックポイント遮断Abの全身毒性が減少することが示された。

20

30

【0137】

毒性の低減に対するPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションの影響を調べるための別のモデルとして、APC成熟の促進薬として公知の抗CD40アゴニスト抗体（CD40）を使用した。重要なことに、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄のCD40とのコンジュゲーションでは、p.t.注射後、その抗原認識能は損なわれず、血漿中濃度が低下した（図16～17）。wt CD40ではALTレベルがPBS処置群と比べて有意に上昇したが、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40では上昇しなかった（図18A）。肝臓の組織学的解析により、肝細胞の壊死および白血球浸潤によって明示されるように、CD40は顕著な形態構造の変化を誘導することが示された（図18B）。対照的に、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置後では、組織構造は維持された。このような結果により、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションにより免疫チェックポイントAbの全身毒性が減少することが示された。

40

【0138】

5. PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-AbはB16F10腫瘍の増殖をwt Abと比べて有意に抑制する。

PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1の併用療法の抗腫瘍活性を調べた。オボアルブミン（OVA）発現B16F10細胞の接種の4日後に、CTLA4 + PD-L1（

50

25 μ gずつ/注射)を3日毎に3回投与した。wt Abはi.p.注射もp.t.注射も、この用量および処置レジームでは抗腫瘍効果を示さなかった。対照的に、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1のp.t.投与では治療効果が示され、腫瘍の増殖が遅くなり、生存期間が長くなった(図3A~B)。重要なことに、CTLA4 + PD-L1 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチド(コンジュゲーションなし)の投与では抗腫瘍効果は示されず、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄とAbとのコンジュゲーションがこの作用に不可欠であることが示された。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-もしくはwt-CTLA4またはPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-もしくはwt-PD-L1の単剤処置ではすべて、PBS処置対照と同様の増殖曲線が示され(図19)、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1の併用での投与が極めて重要であることが示唆された。本発明者らは、両Abの投与を、wt、すなわちOVA導入遺伝子がないB16F10細胞を接種したマウスを用いて繰り返した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄併用Abで同じく生存期間が延長され、腫瘍の進行が遅くなったが、wt Abではそうではなかった(図3C~D)。高用量(100 μ gずつ/注射)を、Treg枯渇を誘導するCTLA4クローン9H10と併用すると腫瘍の増殖がさらに抑制され、生存期間が延長された(図3E~F)。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1の単回p.t.注射であっても、腫瘍サイズは有意に小さくなった(図20)。用量をさらに増やすと(300 μ gずつ2回、次いで100 μ gずつ2回)、この場合も、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab処置群において腫瘍の増殖が遅くなった(図3G~H)。総合すると、このようなデータにより、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1での局所処置によってそのwt形態と比べてロバストな抗腫瘍効果が媒介されることが示された。

【0139】

6.腫瘍浸潤性活性化CD8⁺T細胞の数はPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1処置によって増加する。

PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab処置の治療作用の背後にある機構を調べるため、T細胞応答をwt B16F10腫瘍担持マウスにおいて特性評価した。Abを2回、p.t.またはi.p.で、腫瘍接種後4日目および7日目に注射した。8日目に、白血球を腫瘍、腫瘍流入領域リンパ節(td-LN)および脾臓から抽出した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1により、腫瘍内のCD8⁺CD3⁺T細胞の数および頻度がwt AbおよびPBS注射と比べて有意に増大した(図4AB)。CD8⁺T細胞中のエフェクター集団(CD62L⁻CD44⁺と規定する)およびPD-1⁺細胞のパーセンテージはPBS処置と比べて高くなり、CD8⁺T細胞の活性化が示された(図4CD)。また、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄併用Abでも腫瘍中のCD4⁺T細胞の数が増加した(図4EF)。また、エフェクターCD4⁺T細胞のパーセンテージも高くなった(図4G)。同時に、CD4⁺T細胞集団中のCD25⁺Foxp3⁺Tregのパーセンテージは維持された(図4H)。腫瘍浸潤性CD8⁺T細胞が活性化されて腫瘍抑制性サイトカインを産生し得るかどうかを試験するため、CD8⁺T細胞を抽出し、CD3およびCD28を用いてエキスビボで刺激した。その結果、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1処置群では、PBS処置群と比べてCD8⁺腫瘍浸潤性T細胞中のIFN⁺、IL2⁺、TNF⁺およびGzmb⁺細胞の%の増加が示された(図4I~L)。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1は、td-LNおよび脾臓におけるTregおよびエフェクターCD8⁺T細胞のパーセンテージには影響しなかったが、セントラルメモリーおよびPD-1⁺CD8⁺T細胞は増加した。これにより、このようなPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab処置により、腫瘍抗原感作T細胞が全身的に増加したことが示唆される(図4M~Pおよび図21)。最後に、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1処置により、B16F10-OVAモデルで試験したtd-LN内のOVA₂₅₇₋₂₆₄抗原特異的CD8⁺T細胞が増加した(図22)。まとめると、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1処置によって腫瘍浸潤性T細胞が有効に活性化され、図3で観察された治療効果が有効にもたらされる。

【0140】

7.PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab処置により全身性抗腫瘍免疫が誘導される。

PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1処置後の腫瘍における全身のセントラルメモリーおよびPD-1⁺CD8⁺T細胞ならびに刺激応答性サイトカイン産生CD8⁺T細胞の増加により、本発明者らは、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abが遠位腫瘍における抗腫瘍応答を

10

20

30

40

50

媒介し得るかどうかを調べるに至った。B16F10細胞をマウスの左側背部に0日目に、マウスの右側背部に2日目に接種した(図5A)。続いて、該Abを左側腫瘍付近にp.t.注射するか、または4、7および10日目にi.p.注射した。その結果、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4+PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1のp.t.注射では、左(同側)および右(反対側)の両方の腫瘍の成長増大が遅くなった(図5B~Cおよび図23)。反対に、wt Abは、p.t.またはi.p.によって注射した場合、いずれの腫瘍に対してもほとんど治療効果を有しなかった。このようなデータは、ある腫瘍付近でのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4+PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1処置によって全身性抗腫瘍作用が増強することを示す。

【0141】

8. PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab処置は臨床的に重要な黒色腫および乳がんモデルに対して治療効果を有する。

10

臨床的に重要な黒色腫モデルとして、黒色腫患者に一般的に観察される変異を有するTyrr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl}マウスを使用した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4+PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1の3回のp.t.注射をp.t.投与によって行なうと、PBSまたはwt Ab処置群と比べて腫瘍サイズの縮小がもたらされた(図6A)。また、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄併用Abでは、上皮様乳がん細胞であるMMTV-PyMTの増殖が有意に抑制され、生存期間が長くなった(図6B~C)。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab投与により17匹のうち11匹のマウスでがんの根絶が誘導されたが、wt Ab処置では15匹のうち5匹のマウスで腫瘍が根絶された。長期間の抗がん免疫防御を確かめるため、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄併用Ab処置によって腫瘍が根絶したマウスをMMTV-PyMT細胞で再負荷刺激した。その結果、9匹のうち1匹だけのマウスに触知可能な腫瘍が発生したが、無処置マウスではすべてに検出可能な腫瘍が増殖し、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄併用Abは免疫記憶を誘導することが確認された(図6D)。このようなデータは、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4+PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1治療効果が多くの型のがんに適用可能であることを示す。

20

【0142】

B. 考察

有効性があるにもかかわらず、イピリムマブ(CTLA4)およびアテゾリズマブ(PD-L1)の副作用が深刻な問題であると認定されている。本発明者らは、腫瘍限局性治療が実現可能であり得る場合に、これらのAbのマトリックス結合形態でのかかる局所治療が有益であり得るかどうかを検討することを模索した。本試験では、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲートAbの副作用がwt Ab処置と比べて低減された。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abは腫瘍組織付近に局在したままであり、したがって血液循環濃度が低下し、これにより、非腫瘍抗原特異的T細胞に対する影響が回避されることによって全身免疫の恒常性が維持されるはずである(図2)。また、wt Abは効果を有しなかった低投薬量において腫瘍増殖の遅延が示されたため、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションにより投与量の減量が可能となり得る(図3)。このようなデータは、関連する副作用のためチェックポイント遮断治療を中止した患者、ならびに全身性の化学療法に適さない患者の処置に関して有望である。

30

【0143】

本発明者らは、B16F10の増殖が、慣用的なCTLA4およびPD-L1での治療の使用では高用量で投与した場合であっても遅らせることが困難であることを示した(図3および5)。したがって、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4+PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1による局所抗腫瘍活性によってB16F10の増殖がこのようになり遅延されたという、本実施例に報告したようなペプチドコンジュゲーションアプローチのみによって達成される効果は注目に値する。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄自体はVEGF受容体に結合せず、腫瘍の増殖にはインビトロでもインビボでも影響しなかったため(図3および図24)、低速で局所的な放出により、内因性T細胞の効率的な活性化によってCTLA4およびPD-L1の治療効果が劇的に改善されることが示される。免疫抑制腫瘍をより効率的に根絶するため、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4+PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1を他の治療(例えば、放射線、ワクチン接種または他のタンパク質)と組み合わせて使用してもよい。MMTV-PyMT乳がんの場合、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄併用Abによって65%のマウスでがんが根絶し、がんの再負荷刺激からの保護がもたらさ

40

50

れた。このようなデータは、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1が多くの型のがんの増殖を有効に抑制することを示唆する。

【 0 1 4 4 】

また、局所療法により、注射部位と反対側の腫瘍の増殖も抑制され、これは先の観察結果と整合する（図5）。このデータは、転移性腫瘍を有する患者がPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1の投与によって処置されることの実現可能性を強く示す。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲートAbの血液中の濃度が低いことと活性化CD8⁺T細胞の増加の組合せにより、遠位腫瘍の処置の機構は、おそらく、有効な腫瘍抗原特異的CD8⁺T細胞の活性化によるものである（図2、4および5）。i.p.またはp.t.投与によって全身に分布した野生型（wt）抗体（Ab）は、この試験で使用した投薬量ではB16F10腫瘍の増殖を有意に抑制しなかった。wt Abのp.t.注射では、腫瘍内のCD8⁺T細胞のGzmb⁺およびIFN⁺の増加、ならびにtdLN内のCD8⁺T細胞のセントラルメモリーおよびPD-1⁺の増加がもたらされた。しかしながら、腫瘍浸潤性CD8⁺およびCD4⁺T細胞の数はPBS処置と比べて増えなかった。重要なことに、刺激に応答してIL2を産生するCD8⁺T細胞のパーセンテージはwt Abと比べてPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲートAbの方が高かった。IL2⁺CD8⁺T細胞は抗腫瘍免疫応答に極めて重要な役割を果たすことが報告されているため、これが、なぜ、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1のp.t.注射では同側腫瘍と反対側の腫瘍の両方の腫瘍成長増大が抑制されたが、wt Abでは抑制されなかったかの理由であると理論づけられる。

【 0 1 4 5 】

PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-IgGはさまざまなECMタンパク質に結合し、これがその注射部位での長期組織内保持に寄与しているはずである（図1）。結合したPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abはプラスミンまたはヘパリンによって放出され得る。がん細胞は報告によると、正常細胞より多くプロテアーゼを分泌する。例えば、B16F10細胞は、プラスミノゲンをプラスミンに活性化する組織型プラスミノゲンアクチベーターを発現する。したがってインビボでも、がん由来のプロテアーゼがECMからのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab放出の一因かもしれないと理論づけられる。

【 0 1 4 6 】

2種類の CTLA4クローン（9H10および4F10）を使用し、Treg枯渇が腫瘍の抑制に寄与するかどうかを調べた。どちらのクローンも腫瘍の増殖を抑制したため、Treg枯渇ではなく、CTLA4によるリガンドの遮断が、この試験で観察された抗腫瘍活性に主に寄与したと思われる（図3）。

【 0 1 4 7 】

PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abを合成することの主な利点の1つは、反応が水性条件下でわずか90分間で行なわれ得るため、作製の簡単さである。このスキームの制限は、ペプチドコンジュゲーション部位の制御がなされないことである。しかしながら、この実施例では、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションによって、コンジュゲートされたAbのその抗原に対する親和性が変わらなかったという、予想され得なかった結果を実証する（図1）。

【 0 1 4 8 】

結論として、CTLA4および PD-L1は、ECM結合特性を組み込むと、その抗腫瘍活性が増強することがわかった。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄のコンジュゲーションにより、コンジュゲートされたAbの注射部位における組織内保持が向上した。全身性副作用の低減が実証され、Abの血漿中濃度の低下と関連しており、観察された肝臓組織に対する損傷も少なくなった。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CTLA4 + PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1のp.t.注射では腫瘍浸潤性T細胞が有意に活性化され、腫瘍増殖の遅延がもたらされ、生存期間が長くなった。重要なことに、この局所療法では、遠位腫瘍および腫瘍再負荷刺激モデルにおける増殖も抑制された。改変操作されたECM結合性Abのこのアプローチは、がん治療のための臨床的免疫チェックポイント遮断に有用である。

【 0 1 4 9 】

C.材料および方法

10

20

30

40

50

1. PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abの合成

ラット抗マウスPD-L1 (クローン:10F.9G2, Bio X Cell)、ハムスター抗マウスCTLA4 (クローン:UC10-4F10-11もしくは9H10, Bio X Cell)、ラット抗マウスCD40 (クローン:FGK45, Bio X Cell) またはラットIgG2a対照抗体 (BioLegend) を15当量のスルホ-SMCCとともに室温で30分間インキュベートした。過剰のスルホ-SMCCを、Zebaスピン脱塩カラム (Thermo Fisher Scientific) を用いて除去した。次いで、15当量のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチド (RRRPKGRGKRREKQRPTDCHL) を添加し、4 で1時間反応させた。ペプチドは、GenScriptにより>95%純度で合成されたものであった。

【0150】

2. ドデシル硫酸ナトリウムアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

10

SDS-PAGEは、4%から20%までの勾配のゲル (Bio-Rad) で、Abを10 mM DTTで還元した後に行なった。電気泳動後、ゲルをSimplyBlue SafeStain (Thermo Fisher Scientific) で、製造業者の使用説明書に従って染色した。ゲルの画像はChemiDoc XRS + システム (Bio-Rad) を用いて収集した。

【0151】

3. MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS解析はEPFLのプロテオミクスコア施設で行なわれた。抗体溶液を透析してバッファーを50 mM重炭酸アンモニウムに交換した。抗体試料 (5~10 µg) をC4フィルター付きピペットチップ (自家製250 µg容量) で脱塩し、次いで、85%のアセトニトリル、0.1%のトリフルオロ酢酸を含む水を用いて溶出した。洗浄したAbをspeed-vac 内で10分間乾燥させ、2%のアセトニトリル、0.1%のトリフルオロ酢酸を含む水5 µL中に再可溶化させた。MALDI-TOFによる解析は、Applied Biosystems 4800 MALDI TOF/TOF質量分析計で、高質量リニアポジティブモードを用いて実施した。典型的には、1000~1500レーザーショットのスペクトルを積算して最終スペクトルを得た。メタノール中70 mg/mLのMALDI Matrix 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (Applied Biosystems) をすべての実験で使用した。0.5 µLの被検物質と1 µLのマトリックス溶液をステンレス鋼ターゲット上に付着させ、マイクロピペットを用いて混合し、風乾させ、共結晶性試料/マトリックス複合体を形成した。測定値を、炭酸デヒドラターゼ、エノラーゼおよびウシ血清アルブミン (BSA, Sigma-Aldrich) の混合物を用いて3点で外部校正した。

20

【0152】

4. ECMタンパク質に対する抗体結合の検出

30

96ウェルELISAプレート (Greiner Bio One) を10 µg/mLの組換えヒトECMタンパク質、フィブロネクチン (Sigma-Aldrich)、フィブリノゲン (VWFおよびフィブロネクチン枯渇型, Enzyme Research Laboratories)、オステオポンチン (Sigma-Aldrich)、ピトロネクチン (Sigma-Aldrich)、コラーゲンI (EMD Millipore)、コラーゲンII (EMD Millipore)、コラーゲンIII (EMD Millipore) またはコラーゲンIV (EMD Millipore) (PBS中) で37 にて1時間コートした後、2%のBSAを含む0.05%のTween 20含有PBS (PBS-T) で室温にて1時間ブロックした。次いでウェルをPBS-Tで洗浄し、10 µg/mLのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abまたはwt-Abとともに室温で1時間さらにインキュベートした。PBS-Tでの3回の洗浄後、ウェルを室温で1時間、ラットIgGまたはハムスターIgGに対するHRPコンジュゲートAb (Jackson ImmunoResearch) とともにインキュベートした。洗浄後、結合したAbを、テトラメチルベンジジン基質を用いて450 nmの吸光度を測定し、570 nmの吸光度を差し引くことによって検出した。

40

【0153】

5. 結合親和性アッセイ

96ウェルELISAプレート (Greiner Bio One) を10 µg/mLのフィブロネクチン、コラーゲンI、組換えマウス (rm) CTLA4 (Sino Biological)、rmCD40 (Sino Biological) またはrmPD-L1 (Sino Biological) (PBS中) で37 にて1時間コートした後、2%のBSA含有PBS-Tで室温にて1時間ブロックした。次いでウェルをPBS-Tで洗浄し、漸増濃度のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abまたはwt-Abとともに室温で1時間さらにインキュベートした。P

50

BS-Tでの3回の洗浄後、ウェルを室温で1時間、ハムスターIgGまたはラットIgGに対するHRPコンジュゲートAbとともにインキュベートした。洗浄後、結合したAbを、テトラメチルベンジジン基質を用いて450 nmの吸光度を測定し、570 nmの吸光度を差し引くことによって検出した。見かけの解離定数 (K_d) 値を、Prismソフトウェア (v7, GraphPad Software) の非線形回帰解析により得た (1つの部位に特異的に結合すると仮定する)。

【0154】

6.細胞表面上の抗原の認識

1×10^5 個のB16F10またはT33.1細胞を $1 \mu\text{g/mL}$ のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ Ab、非コンジュゲートAbまたはアイソタイプ対照とともに、2%のFBSを含むPBS中で4 にて30分間インキュベートした。洗浄後、Alexa Fluor 488コンジュゲート抗ハムスターまたは抗ラット抗体 (Jackson ImmunoResearch) を添加し、4 で30分間インキュベートした。次いで細胞をヨウ化プロピジウムで染色し、フローサイトメトリーによって解析した。

10

【0155】

7.ヘパリンによるフィブロネクチンに対するPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ab結合の阻害

96ウェルELISAプレートを $10 \mu\text{g/mL}$ のフィブロネクチン (PBS中) で37 にて1時間コートし、2%のBSA含有PBS-Tで室温にて1時間さらにブロックした。次いでウェルをPBS-Tで洗浄し、 $10 \mu\text{g/mL}$ のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲートラットIgG2a対照抗体 (0.1%のBSAを含むPBS-T中) とともに、漸増濃度のヘパリンを用いて室温で1時間インキュベートした。PBS-Tでの3回の洗浄後、結合したAbを、HRPコンジュゲートヤギ抗ラット二次抗体 (Jackson ImmunoResearch) を用いて検出した。

20

【0156】

8.プラスミンによるPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄の切断

1 mg/mL のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Abを 0.1 U/mL のプラスミンとともに37 で一晩インキュベートした。プラスミンによるPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄の切断はSDS-PAGEによって検出した。プラスミン処理抗体のECM結合親和性はELISAにより上記のようにして得た。

【0157】

9.コラーゲンゲルからのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1および PD-L1の放出プロフィール

コラーゲンゲルを、8.5 mLのウシコラーゲン (5 mg/mL , Symatase) を $800 \mu\text{L}$ の10 × MEM (Life Technologies) と混合した後、1.8 mLのNaOH (0.1 M) と混合することにより調製した。 $500 \mu\text{L}$ の中和コラーゲン溶液を、1.5 mL容タンパク質低結合チューブ (Thermo Fisher Scientific) 内でゲル化させた。15分間のゲル化後、 $10 \mu\text{g/mL}$ のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- PD-L1または PD-L1を $800 \mu\text{L}$ の放出バッファー (0.1%のBSA含有PBS) 中で3時間インキュベートした後、放出バッファーで洗浄した。その後、 $800 \mu\text{L}$ の放出バッファーを各コラーゲンゲルに添加し、37 ($5\% \text{ CO}_2$) でインキュベートした。24時間毎に、放出バッファーのアリコートを採取して凍結させた後、新しい放出バッファーをコラーゲンゲルに添加した。この放出バッファー工程を5回繰り返した。5回目のバッファー交換後、コラーゲンゲルをプラスミンとともに12時間インキュベートした (0.1 U/mL , Roche)。コラーゲンゲルからのAbの放出プロフィールを得るため、収集したすべての放出試料を解凍し、濃度をELISAにより上記のようにして得た。

30

【0158】

10.マウスおよび細胞株

特に記載のない限り、8~12週齢のC57BL/6マウスおよびFVBマウスはCharles River (フランスまたはUSA) から入手した。非肥満糖尿病 (NOD) /ShiLtJマウスはThe Jackson Laboratoryから入手し、シカゴ大学の動物施設内で飼育した。6~12週齢のBraf^{V600E}/Pten^{-/-}はT.Gajewski教授 (シカゴ大学) により提供された。実験は、Veterinary Authority of the Canton de Vaud (スイス) およびシカゴ大学の研究施設内委員会 (IACUC) の承認を得て行なった。B16F10細胞およびB16F10-OVA細胞はAmerican Type Culture Collectionから入手し、使用説明書に従って培養した。T33.1細胞はJ.Blum教授 (Indiana University) により提供された。MMTV-PyMT細胞はFVB-Tg (MMTV-PyVT) トランスジェニックマウス (ポリオーマミドルT抗原癌遺伝子発現をマウス乳腺腫

40

50

瘍ウイルスプロモーターによって誘導した)に自然に発生した乳がんから採取し、インビトロで培養した。細胞株はすべて、マイコプラズマ汚染について確認した。

【0159】

11.皮膚組織切片のAb保持の解析および免疫組織化学検査

C57BL/6マウスをイソフルラン(導入用は4%および維持用は1.5%)で麻酔し、その背部を剃毛した。50 μ LのPBS中に再懸濁した合計 5×10^5 個のB16F10細胞を各マウスの背部の左側に皮内注射した。4日後、マウスに10 μ gのCTLA4(4F10)およびPD-L1を注射した(p.t.)。組織学的解析は、黒色腫の中央部に到達するまでの連続切片(10 μ mの凍結切片)で行なった。4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定し、2%のBSAでブロックした低温切片を、Alexa Fluor 488コンジュゲート抗ハムスターまたは抗ラット抗体(ともにJackson ImmunoResearch製)およびビオチン化抗S100抗体(Invitrogen)とともに室温で1時間インキュベートした後、Alexa Fluor 647コンジュゲートストレプトアビジン(BioLegend)で染色した。画像はDMi8顕微鏡(Leica)を用いて撮影した。

10

【0160】

12.抗体濃度の解析

5×10^5 個のB16F10黒色腫細胞を各マウスの背部の左側に皮内注射した。4日後、マウスに100 μ gのCTLA4(9H10)、100 μ gのPD-L1(p.t.もしくはi.p.)または50 μ gのCD40を注射した。血液試料をヘパリン添加チューブ内に、頬袋の顎下腺静脈から4-mmランセットを用いて腫瘍接種の5、7および9日後に収集した。CTLA4、PD-L1およびCD40の血漿中の濃度をELISAにより上記のようにして測定した。

20

【0161】

13.血清サイトカイン濃度の解析

5×10^5 個のB16F10黒色腫細胞を12週齢の各C57BL/6マウス(The Jackson Laboratory)の背部の左側に皮内注射した。4日後および7日後、マウスに500 μ gのCTLA4およびPD-L1を2回投与した。血液試料をチューブ内に収集した後、4で一晩インキュベーションした。血清中のサイトカイン濃度を、マウスTNFおよびマウスIFN用のReady-SET-Go! ELISAキット(eBioscience)ならびにマウスIL2 DuoSet ELISAキット(R & D Systems)により、製造業者のプロトコルに従って測定した。

【0162】

14.ALTアッセイ

5×10^5 個のB16F10黒色腫細胞を各マウスの背部の左側に皮内注射した。4日後、マウスに500 μ gのCTLA4およびPD-L1の2回の投与、または50 μ gのCD40の単回注射(p.t.)を行なった。血液試料をチューブ内に収集した後、4で>4時間インキュベーションした。血清におけるALT活性をALTアッセイキット(Sigma-Aldrich)により製造業者のプロトコルに従って測定した。

30

【0163】

15.肝臓の組織学的検査

5×10^5 個のB16F10黒色腫細胞を各マウスの背部の左側に皮内注射した(0日目)。4日後、マウスに50 μ gのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄またはwt-CD40の単回注射(p.t.)を行なった。腫瘍接種の7日後に、肝臓を収集し、4%PFAで固定した。パラフィン中に包埋した後、ブロックを5 μ m切片に切断し、続いてヘマトキシリンとエオシンで染色した。画像は、EVOS FL Auto顕微鏡(Life Technologies)を用いて取り込んだ。PD-L1処置後、NODマウスの糖尿病をモニタリングした。

40

【0164】

16週齢の雄NODマウスに100 μ gのPD-L1を0日目と2日目に投与した。Ab注射はすべて背中皮膚の皮内であった。臨床的糖尿病は連続3日間の血糖の読み値が250 mg/dLと規定した。血糖はAlpha TRAK 2 Glucose Meter(Abbott Animal Health)によって測定した。血糖値は、処置の開始の2日後からマウスを殺するまで毎日モニタリングした。

50

【 0 1 6 5 】

16. B16F10腫瘍接種およびAb注射

50 μ LのPBS中に再懸濁した合計 1×10^6 個のB16F10-OVAまたは 5×10^5 個のB16F10細胞を、各C57BL/6マウスの背部の左側の皮内に接種した。4、7または10日後、マウスに、25、50、100または300 μ gのCTLA4および/またはPD-L1を皮内に腫瘍付近にp.t.またはi.p.で注射した。遠位腫瘍実験では、 5×10^5 個のB16F10細胞を各マウスの背部の左側に0日目に、および右側に2日目に皮内注射した。4、7および10日目、マウスに100 μ gのCTLA4およびPD-L1を注射した(p.t.)。腫瘍をデジタルキャリパーで測定し(最初の腫瘍接種の4日後に開始)、体積を楕円体として算出した。ここで、 $V = 4/3 \times 3.14 \times \text{奥行}/2 \times \text{幅}/2 \times \text{高さ}/2$ 。いずれかの腫瘍体積が500 mm^3 超に達した時点でマウスを殺した。

10

【 0 1 6 6 】

17. 組織および細胞の調製ならびにT細胞サブセットの解析

2×10^5 個のB16F10黒色腫細胞を各C57BL/6マウスの背部の左側に皮内注射した。4日後および7日後、マウスに100 μ gのCTLA4およびPD-L1を注射した(p.t.またはi.p.)。マウスを8日目に殺した。脾臓、LNおよび腫瘍を採取した。腫瘍を、2%のFBS、2 mg/mLのコラーゲナーゼDおよび40 μ g/mLのDNase I (Roche) を補給したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で、37 $^{\circ}\text{C}$ にて30分間消化させた。70-mmセルストレーナーによって器官を穏やかに破壊することにより、単細胞懸濁液を得た。赤血球を、ACK溶解バッファー(Quality Biological)を用いて溶解させた。細胞を計数し、10%のFBSおよび1%のペニシリン/ストレプトマイシンを補給したイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)(完全培地;すべてLife Technologies製)中に再懸濁させ、フローサイトメトリーでの染色およびエクスピボT細胞刺激に使用した。

20

【 0 1 6 7 】

18. フローサイトメトリーおよびAb

脾臓、LNおよび腫瘍の単細胞懸濁液を上記のようにして調製した。洗浄工程後、およそ 2×10^6 個の細胞を抗体染色に使用した。本文書全体を通して特に記載のない限り、以下の分子:CD3 (145-2C11, BD Biosciences)、CD4 (RM4-5, BD Biosciences)、CD8 (53-6.7, BD Biosciences)、CD25 (PC61, BD Biosciences)、CD45 (30-F11, BD Biosciences)、CD44 (IM7, BD Biosciences)、CD62L (MEL-14, BD Biosciences)、PD-1 (29F.1A12, BioLegend)、Foxp3 (MF23, BD Biosciences)、IL2 (JES6-5H4, BD Biosciences)、IFN γ (XMG1.2, BD Biosciences)、TNF (MP6-XT22, eBioscience) およびGrzb (NGZB, eBioscience) に対するAbを使用した。固定による生/死細胞の識別を、Fixable Viability Dye eFluor 455 (eBioscience) を製造業者の使用説明書に従って用いて行なった。染色は、特に記載のない限り氷上で20分間実施し、細胞内染色は、Foxp3-染色キットを製造業者の使用説明書(BioLegend)に従って用いて行なった。OVA特異的細胞の染色は、フィコエリトリン(PE)とコンジュゲートさせたSIINFEKL-MHCIペンタマー(Proimmune)を用いて行なった。染色では、ペンタマーを2%のFBSを含むPBS中で1:10に希釈し、室温で20分間インキュベートした。洗浄工程後、細胞を特異的Abで20分間、氷上で染色した後、固定した。フローサイトメトリー解析はすべて、Gallios (Beckman Coulter) またはFortessa (BD Biosciences) フローサイトメーターを用いて行ない、Kaluza (Beckman Coulter) またはFlowJoソフトウェア(Tree Star)を用いて解析した。

30

40

【 0 1 6 8 】

19. エクスピボT細胞刺激

腫瘍、脾臓およびLNの単細胞懸濁液を上記のようにして調製した。腫瘍試料では、CD8⁺ T細胞を、EasySepキット(STEMCELL Technologies)を製造業者の使用説明書に従って用いて単離した。96ウェル細胞培養プレート(BD Falcon)をPBS中10 μ g/mLのCD3 (145-2C11, BioLegend) で37 $^{\circ}\text{C}$ にて一晚コートした。合計 2×10^6 個の脾臓、腫瘍細胞または 5×10^5 個のLN細胞を96ウェルプレート内にプレーティングし、完全培地中

50

で37℃にて6時間、最後の3時間は2 µg/mLの CD28 (EL-4, BioLegend) および5 µg/mLのプレフェルジンA (Sigma-Aldrich) の存在下で培養した。細胞を採取し、染色し、フローサイトメトリーによって上記のようにして解析した。

【0169】

20. Tyr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl} 黒色腫の誘導およびAb注射

8~12週齢のTyr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl}マウスの背部を剃毛し、5 µLの10 mg/mLの4-OH-タモキシフェン (Sigma-Aldrich) を既報のとおり経表面適用し (例えば、Spranger, S. et al., Nature 523, 231-235 (2015) を参照のこと)。視認可能な腫瘍の発生から0、3および6日後に、マウスに100 µgの CTLA4および PD-L1をp.t. で合計3回の注射にて注射した。体積は、体積 = 表面積 * Zとしてコンピュータ計算した。式中、表面積はImageJ解析によってコンピュータ計算され、Zは、デジタルキャリパーで測定した腫瘍の厚さである。腫瘍体積が1000 mm³超に達した時点でマウスを殺した。

10

【0170】

21. MMTV-PyMT腫瘍の接種およびAb注射

FVBマウスをイソフルラン (導入用は4%および維持用は1.5%) で麻酔し、FVBマウスの乳腺周囲の毛を剃った。50 µLのPBS中に再懸濁した合計8 × 10⁵個のMMTV-PyMT細胞を各マウスの右側の乳腺内に皮下注射した。7、10または13日後、マウスに100 µgの CTLA4および PD-L1を注射した (p.t.)。腫瘍をデジタルキャリパーで上記のようにして測定した。腫瘍体積が500 mm³超に達したらマウスを殺した。

20

【0171】

22. 細胞増殖アッセイ

B16F10黒色腫細胞を24ウェルプレート内に5 × 10⁴細胞/ウェルの密度でプレーティングし、10%のFBSを補給したDMEM中で37℃にて一晩インキュベートした。次いで、1、10および100 µg/mLのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチドを添加した。3日間のインキュベーション後、細胞数を、血球計算盤を用いて計数した。

【0172】

23. 統計解析

実験群間の統計学的有意差を一元配置ANOVAの後にチューキーのHSD事後検定により、Prismソフトウェア (v7, GraphPad) を用いて調べた。記号*および**は、それぞれ0.05未満および0.01未満のP値を示す; N.S., 有意でない。

30

【0173】

実施例2-抗体と連結させたCXCL12ペプチド (ECM親和性ペプチド) はECMタンパク質に結合する。

以下の方法を使用し、抗体と連結させたCXCL-12ペプチドはECMタンパク質に結合することがわかり、局所保持されることのがん治療用途に対するその有効性が示された。

【0174】

CXCL-12のヒトECMタンパク質との結合の検出: 96ウェルELISAプレート (中結合: Greiner Bio-One) を10 µg/mLの組換えヒトECMタンパク質、フィブロネクチン (Sigma-Aldrich)、フィブリノゲン (VWFおよびフィブロネクチン枯渇型, Enzyme Research Laboratories) でコートした。PBS-T含有2% BSA溶液でブロックした後、1 µg/mLの組換えヒトCXCL-12 (Peprotech) またはCXCL-12 (R and D systems) を添加した。結合したCXCL-12を1 µg/mLのマウス抗ヒトCXCL-12抗体 (R and D systems) で検出した。1時間のインキュベーション後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲートヤギ抗マウス抗体 (1:2000に希釈, Dako) を添加し、さらに1時間インキュベートした。次いで、50 µLのテトラメチルベンジジン基質 (Sigma) を添加した。反応を25 µLの2N H₂SO₄の添加によって停止した。続いて、570 nmの参照を用いて450 nmの吸光度を測定した。

40

【0175】

CXCL-12 69-98-Abの合成: ラットIgG2a対照抗体 (BioLegend) を15当量のスルホ-

50

SMCCとともに室温で30分間インキュベートした。過剰のスルホ-SMCCを、Zebaスピン脱塩カラム (Thermo Fisher Scientific) を用いて除去した。次いで、C末端システインを有するCXCL-12₆₉₋₉₈ (GRREEKVGKKEKIGKKRQKKRKAQKRKNC)

ペプチドを15当量添加し、4℃で1時間反応させた。ペプチドは、GenScriptにより>95%純度で合成されたものであった。

【0176】

ECMタンパク質に対する抗体結合の検出:96ウェルELISAプレート (Greiner Bio One) を10 µg/mLの組換えヒトECMタンパク質、フィブロネクチン (Sigma-Aldrich)、フィブリノゲン (VWFおよびフィブロネクチン枯渇型, Enzyme Research Laboratories)、コラーゲンI (EMD Millipore) またはコラーゲンII (EMD Millipore) (PBS中) で37℃にて1時間コートした後、2%のBSAを含む0.05%のTween 20含有PBS (PBS-T) で室温にて1時間ブロックした。次いでウェルをPBS-Tで洗浄し、10 µg/mLのCXCL-12₆₉₋₉₈またはwt-Abとともに室温で1時間さらにインキュベートした。PBS-Tでの3回の洗浄後、ウェルを室温で1時間、ラットIgG (Jackson ImmunoResearch) に対するHRPコンジュゲートAbとともにインキュベートした。洗浄後、結合したAbを、テトラメチルベンジジン基質を用いて450 nmの吸光度を測定し、570 nmの吸光度を差し引くことによって検出した。

【0177】

実施例3-免疫調節抗体の腫瘍コラーゲン標的化

焦点の1つは、腫瘍微小環境内に存在するECMに対する免疫調節抗体、例えばチェックポイント遮断抗体の結合を増強することである。本発明者らは、腫瘍微小環境内に豊富に存在するコラーゲンに結合する免疫調節抗体のコンジュゲートを設計して作製する。

【0178】

コラーゲンはECMタンパク質であり、種々の結合組織内に存在する。27種類の型のコラーゲンが同定されており、I型コラーゲンはヒトの身体に最も豊富にあるコラーゲンと報告されている。コラーゲンは、細胞のさまざまな生物学的機能、例えば増殖、分化および接着を調節する。フォン・ヴィレブランド因子 (VWF) Aドメインは、非細菌起源のタンパク質/ペプチドの中でもコラーゲンに対して特異的親和性を有する。このようなタンパク質/ペプチドのうち、VWF A1~A3ドメイン (特に、A3ドメイン) は、いくつかの型のコラーゲン、例えばI型コラーゲン、III型コラーゲンおよびIV型コラーゲンに対して並外れて高い親和性を有する。VWFはインビボでは、血管が損傷してコラーゲンが露出した場合にコラーゲンに結合する。この結合により血栓形成カスケードの開始がもたらされる。

【0179】

ここで、本発明者らは、VWF A3もしくはA1ドメイン組換えタンパク質 (VWF A3もしくはA1) またはデコリンと免疫調節抗体との化学的コンジュゲーションまたは組換え融合により腫瘍微小環境内での抗体の局在および保持が改善されるという仮説をたてる。その後、本発明者らがECM結合ペプチドコンジュゲート抗体において上記で提案しているように、VWF A3コンジュゲーションにより抗腫瘍有効性が向上し、全身性副作用が低減され得る。このようなVWF A3コンジュゲート免疫調節抗体 (VWF A3-抗体) は腫瘍内/腫瘍周囲注射後も抗腫瘍効果を有することが期待され得るが、より一般的に臨床適用可能な全身投与 (すなわち、静脈内 (i.v.) またはi.p.) 後に、さらに大きな有用性が機能することが想定される。本発明者らは、ECM親和性ペプチドとしてVWF A3 (ヒトVWF₁₆₇₀₋₁₈₇₄, 配列は上記) に着目する;しかしながら、本発明者らは、A1ドメイン (ヒトVWF₁₂₃₇₋₁₄₅₈, 配列は後述) およびデコリンもまた、そのコラーゲンに対する結合性のため教示する。

【0180】

VWF A3の作製および精製:VWF A3をコードしている配列を細菌発現ベクターpGEX6P-1内にクローニングおよびサブクローニングする。GST-VWF A3組換えタンパク質を大腸菌BL21内で発現させる。GST-融合VWF A3組換えタンパク質をGSTカラムを用いて精製

する。GSTタグをGSTタグに対する特異的酵素によって除去する。

【0181】

VWF A3コンジュゲート抗体の合成:抗マウスPD-L1、抗マウスCTLA4、抗マウスCD40またはラットIgG2a対照抗体をスルホ-SMCCとともにインキュベートする。過剰のスルホ-SMCCを脱塩カラムを用いて除去する。次いで組換えVWF A3タンパク質を添加し、インキュベートする。また、他のチェックポイント遮断抗体を使用してもよい。

【0182】

腫瘍接種および局所投与 (p.t.注射) による免疫調節抗体での処置:腫瘍細胞 (例えば、B16F10) を皮内に (i.d.) 接種する。腫瘍が視認可能になったら、マウスにVWF A3-またはwt-CTLA4、PD-L1および/またはCD40のp.t.注射を行なう。腫瘍サイズを、安楽死基準に達するまでモニタリングする。ここで、本発明者らは、VWF A3コンジュゲーションにより、局所注射した場合に腫瘍微小環境内のコラーゲンとの結合によって抗体の腫瘍組織における局在および保持が向上し、血漿中の抗体濃度が低下すると予測する。これにより、免疫調節抗体での処置によって引き起こされる副作用の発生が低減される。VWF A3-抗体により、本発明者らがPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲート抗体において観察したように、非腫瘍抗原特異的T細胞に対する影響が回避されることによって全身免疫の恒常性が維持されるはずである。抗腫瘍有効性に関して、腫瘍微小環境付近の抗体濃度の上昇により、有効な腫瘍抗原特異的CD8⁺T細胞の活性化がもたらされる。対照的に、p.t.投与によって全身に分布されたwt抗体は腫瘍の増殖を効率的に抑制しない。

【0183】

腫瘍接種および全身投与 (i.v.注射) による免疫調節抗体での処置:腫瘍細胞 (例えば、B16F10) をi.d.で接種する。腫瘍が視認可能になったら、マウスにVWF A3-またはwt-CTLA4、PD-L1および/またはCD40のi.v.注射を尾静脈から行なう。腫瘍サイズを、安楽死基準に達するまでモニタリングする。ここで、本発明者らは、VWF A3-抗体のi.v.注射により、i.v.注射した場合であっても腫瘍微小環境内のコラーゲンとの結合によって腫瘍組織における局在および保持の向上ならびに血漿中の抗体濃度の低下が示されると予測する。p.t.注射で上記したものと同様の機構により、VWF-A3コンジュゲーションによって腫瘍微小環境内の抗体濃度が上昇し、副作用の発生の低減がもたらされ、免疫調節抗体の抗腫瘍有効性が向上する。対照的に、i.v.注射によって投与されたwt抗体は腫瘍微小環境に有意に濃縮されず、腫瘍の増殖をそれほど効率的に抑制せず、VWF A3-抗体と比べて多くの副作用事例を示す。

【0184】

実施例4-コラーゲン親和性による標的指向型抗体がん免疫療法

免疫チェックポイント阻害薬 (CPI) を用いた免疫療法は高頻度に有害事象を伴う。本発明者らはこれに対して、このような免疫療法用分子を腫瘍に、フォン・ヴィレブランド因子由来のコラーゲン結合ドメイン (CBD) とのコンジュゲーションまたは融合によって標的化し、腫瘍の血管系の漏出性による腫瘍間質コラーゲンの血液成分への曝露を活用することによって対処した。本実施例は、静脈内投与されたCBDタンパク質が主に腫瘍内に蓄積され、内皮が有窓性である肝臓および腎臓内への曝露が少ないことを示す。黒色腫担持動物では、CBDのコンジュゲーションまたは融合によってCPIの全身毒性が低下した。CBD-CPIにより、多くのマウスがんモデルで、腫瘍の増殖がその非修飾形態と比べて有意に抑制された。CBD-CPIにより腫瘍浸潤性CD8⁺T細胞が増加した。

【0185】

CPI療法は有望であることが示されているが、一部の 경우에는、免疫関連有害事象などの重度の副作用も示されている (48~58)。併用療法では、患者の96%に有害事象が起こり、患者の36%が有害事象のため治療を中止した (55)。このような免疫療法薬は免疫応答を活性化させる機能を果たすため、免疫活性化によって引き起こされる副作用は、典型的には腫瘍オプターゲット薬物作用により生じる (59~63)。この問題に対処するための戦略の1つは、薬物を、これが必要とされる箇所のみを送達し、それによりその作用を疾患部位に集中させようとする薬物標的化アプローチによるものである。上

10

20

30

40

50

記の実施例1において、本発明者らは、マトリックス結合ペプチドにコンジュゲートさせたCPI抗体の腫瘍周囲 (p.t.) 投与により抗腫瘍有効性が向上し、オフターゲット効果が低減されることを実証した。腫瘍付近への注射は、上記に実証したように転帰の改善をもたらすが、多くの状況では、薬物を全身投与し、これを血液中から腫瘍部位に標的化させることが好都合な場合もあり得よう。

【0186】

コラーゲンは、哺乳動物の身体に最も豊富にあるタンパク質であり、ほぼすべての組織に存在している (65)。ECMタンパク質であるコラーゲンは、血管の内皮下腔ならびに腫瘍間質に高含有量で存在する。生理学的条件における不溶性のため、コラーゲンは血液中にはほとんど存在しない (66,67)。腫瘍の血管系は、異常な構造のため正常な血管と比べて透過性亢進状態である (68)。したがって、この漏出性により、腫瘍内のコラーゲンは、血流中で運ばれた分子に対して他の組織より優先的に曝露され得る (69~73)。さらに、多くの腫瘍組織には正常組織と比べて増大した量のコラーゲンが含まれている (74,75)。

【0187】

止血因子であるフォン・ヴィレブランド因子 (vWF) はIとIIIの両方の型のコラーゲンに結合する (76,77)。血管が傷ついた場合、内皮細胞下のコラーゲンが血液中のタンパク質に曝露され、vWF-コラーゲン結合によって血栓形成カスケードが開始される (77,78)。vWF Aドメインはコラーゲンに対して、報告されている非細菌起源タンパク質/ペプチドの中で最も高い親和性を有する (79)。特にAドメイン内でも、vWFのA3ドメインはコラーゲン結合ドメインであると報告されている (CBD, この略号の使用は 具体的にはvWF A3コラーゲン結合ドメインを示す) (80)。

【0188】

A. 結果

1. CBD融合CPIはコラーゲンおよび標的に結合する

本発明者らはまず、CBDコンジュゲートCPI (CBD-CPI) がコラーゲンにインビトロで結合する能力を調べた。CPI抗体をスルホ-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (スルホ-SMCC) と混合して該抗体のリシンアミン部位をスクシンイミジル基との反応によって官能基化した後、内在システイン残基を有するvWF A3ドメイン組換えタンパク質をこの官能基化抗体に、マレイミド基との反応によって共有結合により架橋させた (図28A)。I型およびIII型コラーゲンに対するCBD-CTLA4およびCBD-PD-L1の強い結合親和性 (nM範囲の解離定数 (K_D) 値) が観察された (図28B)。重要なことに、CBD-CTLA4およびCBD-PD-L1はその標的抗原を非修飾形態と同様の K_D 値で認識した (図28B)。したがって、このようなデータは、CBD-CPI抗体は、その標的に対する結合能を損なうことなくコラーゲンに結合することを示す。

【0189】

2. CBDタンパク質は腫瘍内に局在する

インビボ体内分布解析を行ない、CBDが静脈内 (i.v.) 注射後、内在性コラーゲンとの結合によって腫瘍微小環境内に局在するかどうかを調べた。MMTV-PyMT乳がんをFVBマウスに接種した。腫瘍体積が500 mm³に達したら、DyLight 800標識CBDタンパク質を注射した。注射の2日後に、腫瘍ならびに心臓、肺、腎臓、肝臓、脾臓および胃を含む臓器を採取した。蛍光検出により、CBDタンパク質は腫瘍内に優先的に局在し、内皮が有窓性である肝臓および腎臓内への局在は微量であることが示された (図29A)。次いで、本発明者らは、注射されたCBD-PD-L1のMMTV-PyMT乳がん内における局在を解析した (図29B)。100 µgのDyLight 594標識CBD-PD-L1および100 µgのDyLight 488標識コラーゲンIをi.v.注射した。注射の30分後、CBD-PD-L1とコラーゲンIは腫瘍血管周囲に共局在していた。CBD-PD-L1は内皮下腔に局在したがコラーゲンIは内皮下腔に局在せず、CBD-PD-L1の浸透性はコラーゲンIと比べて高いことが示唆された。このようなデータは、CBDのi.v.注射後における腫瘍血管系標的化を実証している。

【0190】

3. CBDコンジュゲーションによって処置関連有害事象が減少する

B16F10腫瘍担持マウスにおける注射されたCPIおよびCBD-CPIの血漿中濃度を経時的に測定した(図30A~B)。CBD-CTLA4およびCBD-PD-L1のどちらの血漿中濃度も、その非修飾形態と比べて有意に低かった。次に副作用を調べた。B16F10腫瘍担持マウスへのCTLA4およびPD-L1投与後、血清、肺および肝臓を収集した。非修飾CPIの投与では、TNFおよびIL-6の血清濃度はどちらも有意に高かったがCBD-CPIではそうではなかった(図30C~D)。組織学的解析により、非修飾CPIでは肺および肝臓における顕著な形態構造の変化およびリンパ球浸潤が誘導される(図30E~F)が、CBD-CPI処置後の組織構造は比較的維持されることが示された。さらに、非修飾CPIでは、臨床使用されている肝臓障害マーカーのアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性が血清において高かったがCBD-CPI処置ではそうではなかった(図30G)。総合すると、このような結果は、CBDコンジュゲーションによってCPI免疫療法の全身毒性が低下することを示す。

【0191】

4. CBD-CPIによって多くの腫瘍の増殖がその非修飾形態と比べて有意に抑制される

CBD-CTLA4 + CBD-PD-L1併用療法の抗腫瘍有効性を、B16F10黒色腫、CT26結腸癌およびMMTV-PyMT乳がんモデルを用いて調べた。B16F10黒色腫では、非修飾CPIでの処置においてこのレジメンで抗腫瘍効果は示されなかった。対照的に、CBD-CPIでは治療効果が示され、25 µgおよび100 µgの両方の単回投薬で腫瘍の増殖が有意に遅くなった(図31A)。重要なことに、コンジュゲーションなしでのCPI + CBDタンパク質の投与では抗腫瘍効果は示されず、CBDのCPIとのコンジュゲーションがこの作用に不可欠であることが示された(図32)。また、CBD-CPIをECM結合PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CTLA4およびPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-PD-L1の局所(p.t.)投与と比較した。CBD-CPI分子の全身性標的化ではPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CPI分子の局所投与と同様の有効性が得られた(図31A)。CT26腫瘍の場合、単回投薬の非修飾CPIによって腫瘍の進行が遅くなり、CBD-CPI処置では腫瘍の増殖が有意にさらに抑制された(図31B)。また、CBD-CPIは、MMTV-PyMT乳がんに対しても非修飾CPIと比べて高い抗腫瘍有効性を示し、マウスの生存期間が延長された(図31C~D)。驚いたことに、CBD-CPIにより12匹のうち6匹のマウスで完全寛解がもたらされ、MMTV-PyMT細胞で再負荷刺激したマウスに触知可能な腫瘍は発生しなかったが、無処置マウスはすべて、検出可能な腫瘍が増殖し、CBD-CPIは免疫記憶を誘導することが示された(図31E)。

【0192】

5. CBD-CPI処置によって腫瘍浸潤性活性化CD8 + T細胞の数が増加する

CBD-CPI処置の治療作用の背後にある機構を調べるため、T細胞応答をB16F10腫瘍担持マウスにおいて特性評価した。CBD-CPIでは、非修飾CPIおよびPBS注射と比べて腫瘍内のCD45 + 細胞のCD8 + CD3 + T細胞の頻度が有意に高く(図33A)、一方、CD4 + CD3 + T細胞の頻度はすべての群で維持された(図33B)。CBD-CPI処置では、CD4 + T細胞集団におけるCD25 + Foxp3 + Tregのパーセンテージが有意に減少したがCPI処置では減少せず、本発明者らはTreg枯渇能を有するCTLA4を利用したため、CBD-CTLA4の腫瘍標的化能力が裏付けられた(81)(図33C)。その結果、CBD-CPI処置により、非修飾CPIおよびPBS処置と比べて、治療有効性の予測値(82)である腫瘍内のエフェクター(CD62L-CD44 +)CD8 + T細胞対Treg比が有意に向上した(図33D)。腫瘍浸潤性CD8 + T細胞によってより高レベルのエフェクターサイトカインが産生されるかどうかを試験するため、CD8 + T細胞をCD3およびCD28を用いてエキスビボで刺激した。CBD-CPI処置ではCD8 + 腫瘍浸潤性T細胞におけるIFN +、IL2 + およびTNF + 細胞のパーセンテージがPBS処置群と比べて有意に増大したが、非修飾CPIでの処置では増大しなかった(図33E~G)。まとめると、CBD-CTLA4 + CBD-PD-L1併用処置では腫瘍浸潤性T細胞が有効に活性化され、図31A~Eに観察される治療効果に対応する。

【0193】

6. vWF A1ドメインおよびデコリンポリペプチドとCPIとのコンジュゲーションでも抗腫瘍活性が増強する

10

20

30

40

50

他のコラーゲン結合ドメイン、すなわちvWF A1ドメインおよびデコリンを有するCPI (CTLA4とPD-L1の併用) コンジュゲートの抗腫瘍効果を試験した。vWF A1ドメインおよびデコリンもまたコラーゲンに対して高い親和性を有し、vWF A3ドメインは結合しないVI型コラーゲンに特異的に結合する。これらの3種類のCBDタンパク質はコラーゲン上において異なる結合部位を有する。デコリンタンパク質およびvWF A1ドメインタンパク質を、vWF A3ドメインの場合と同じ手順に従って作製し、精製した。vWF A1ドメインおよびデコリンをCPI抗体に、vWF A3ドメインタンパク質とCPIとのコンジュゲーションと同じ手順に従ってコンジュゲートさせた。

【0194】

5×10^5 個のB16F10細胞を0日目に接種した。vWF A1ドメイン、vWF A3ドメインおよびデコリンをCBD-CPI抗体コンジュゲートのCBDとして使用した。PBSまたは4種類の処置薬: (1) vWF A1-CTLA4とvWF A1-PD-L1 (25 μ gずつ); (2) vWF A3-CTLA4とvWF A3-PD-L1 (25 μ gずつ); (3) デコリン-CTLA4とデコリン-PD-L1 (25 μ gずつ); および (4) CTLA4とPD-L1 (100 μ gずつ) のうちの1つを4日目にi.v.投与した。図44は、最初にマウスが死亡したときまでの腫瘍体積 (平均 \pm SEM) を示す。統計解析はANOVAをチューキーの検定とともに用いて行なった。二つ組の実験。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。図44は、vWF A1ドメイン-CPIコンジュゲートおよびデコリン-CPIコンジュゲートの抗腫瘍活性がvWF A3ドメイン-CPIコンジュゲートと同程度に高いが非修飾CPIよりは高いことを示す。

【0195】

B. 考察

標的指向型がん治療戦略は能動的ターゲティングまたは受動的ターゲティングとして分類され得る (83)。抗体-薬物コンジュゲートは能動的ターゲティングの一例である。ターゲティングは、腫瘍特異的または腫瘍細胞特異的である特異的リガンド (例えば、抗体) に対する薬物の結合に基づき (84)、腫瘍細胞表面へのがんの薬の特異的な送達を助長する。受動的ターゲティングの一例はナノ粒子担体内に包埋させた薬物である。ナノ粒子は血中で長い半減期を有し、血管系が漏出性である腫瘍内において透過性および保持効果の向上により蓄積をもたらすことが予測される (85,86)。したがって、受動的ターゲティングは、薬学的担体の血中での長寿命および変則的な血管系を有する病的部位内への蓄積、したがって蓄積の向上に基づく。

【0196】

CBDベース薬物ターゲティングアプローチは能動的ターゲティングと受動的ターゲティングのハイブリッドである。これは、分子親和性に基づいて腫瘍コラーゲンを標的化するという点で能動的ターゲティングと同様であるが、受動的ターゲティングの場合のように腫瘍血管の漏出性構造も利用する (68)。CBD-薬物は腫瘍微小環境特異的であるが、腫瘍内に特異的に存在する分子を標的化することによるものではなく、むしろ、腫瘍特異的到達可能性を利用することによるものである。したがって、CBDは、腫瘍抗原の事前の調査なしで使用可能であり得る。さらに、CBDは腫瘍細胞特異的標的に結合しないため、エンドサイトーシスによる除去の対象にならない。そのため、CBDアプローチは腫瘍の内皮下および間質を薬物標的と薬物レザーバの両方にする。

【0197】

報告によると非細菌起源の天然リガンドの中でもI型およびIII型コラーゲンに結合するタンパク質は数種類しかない (79)。vWFは、これらのコラーゲンに対して特に高い親和性を示す (79)。vWF A3ドメインとコラーゲンの会合は血栓形成カスケードの開始因子であり、したがって、この結合はヒトの体内で一般的に起こる。この実施例では、vWF A3ドメインをコラーゲン結合ドメインとして用いて腫瘍微小環境を標的化した。以前、腫瘍特異的フィブロネクチンスプライス変異体ドメインに対する一本鎖抗体断片とサイトカインを融合させる腫瘍マトリックスタージェティングアプローチが動物モデルおよび臨床試験において試験されている (87~89)。具体的には、マウスモデルにおいて、フィブロネクチンのエクストラドメインA (EDA) およびEDBドメインに対する一本鎖抗体を腫瘍

組織内に局在させると、この一本鎖抗体とIL-2の融合タンパク質により、非修飾IL-2と比べて向上した抗腫瘍有効性が示された(87,90)。本実施例で実証されたように、代わりにコラーゲン親和性を使用することは、腫瘍内にはおそらくEDAまたはEDBフィブロンectinよりコラーゲンの方が多く存在するという点、およびvWF A3ドメインは複数の型のコラーゲンに結合する(79)という点で、多くの特異的リガンド、例えばペプチド、抗体または抗体断片とは違って好都合であり得る。さらに、本実施例で使用するリガンドは、免疫原性の可能性を有する改変操作型タンパク質ではなくヒトタンパク質である。コラーゲンの標的化により、遍在性であるがその血管系の漏出性のため腫瘍組織内でのみ到達可能な結合部位へと向けられる。また、本発明者らは、内皮下周囲においてコラーゲンIと比べてCBD- PD-L1のより深部への浸透を観察し、これは、腫瘍血管系を標的化するのにコラーゲンと比べてvWF A3ドメインの使用の利点を示唆し得る。したがって、本実施例で採用したアプローチは、方法論(体内に天然に存在するタンパク質に由来する高親和性タンパク質ドメイン)および生物学的アプローチ(体内に豊富に存在するがその血管系の漏出性により腫瘍内のみで曝露されるタンパク質を標的化する)の両方において斬新である。

【0198】

C.材料および方法

1.組換えvWF A3ドメインの作製および精製

ヒトvWF A3ドメイン残基1686~1881(成熟VWFの923~1118)(SEQ ID NO:14)をコードする配列は、Genscriptで合成され、哺乳動物発現ベクターpcDNA3.1(+)内にサブクローニングされた。組換えタンパク質のさらなる精製のため、6個のHisをコードする配列をN末端に付加した。発現されたA3ドメインタンパク質の配列は以下のとおりであった(SEQ ID NO:15):

CSQPLDVILLLDGSSSFPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSITTIDVP
WNVVPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGDALGFAVRYLTSEMHGARPGASKAVVILV
TDVSVDSVDAADAARSNRVTVPFIGIGDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRIEDL
PTMVTLGNSFLHKLCSGFVRICTGHHHHHH

【0199】

懸濁に適合させたHEK-293F細胞を無血清FreeStyle 293 Expression Medium(Gibco)中に常套的に維持した。トランスフェクションの日、細胞を新鮮培地中に、 1×10^6 細胞/mlの密度で接種した。2 μ g/mlのプラスミドDNA、2 μ g/mlの線状25 kDaポリエチレンイミン(Polysciences)およびOptiPRO SFM培地(4%終濃度,Thermo Fisher)を逐次添加した。培養フラスコを135 rpmでのオービタルシェイキングより、5%CO₂の存在下、37℃でアジテーションした。トランスフェクションの6日後に、細胞培養培地を遠心分離によって収集し、0.22 μ mフィルターに通して濾過した。培養培地を、AKTA pure 25(GE Healthcare)を用いてHisTrap HP 5 ml容カラム(GE Healthcare)にロードした。カラムを洗浄バッファー(20 mMイミダゾール,20 mM NaH₂PO₄,0.5 M NaCl,pH7.4)で洗浄した後、タンパク質を500 mMイミダゾール(20 mM NaH₂PO₄,0.5 M NaCl(pH7.4)中)の勾配で溶出した。溶出液をサイズ排除クロマトグラフィーにより、HiLoad Superdex 200PGカラム(GE Healthcare)を用いてさらに精製した。精製工程はすべて4℃で行なった。vWF A3ドメインの発現をウエスタンブロッティングにより抗Hisタグ抗体(BioLegend)を用いて調べ、SDS-PAGEによりタンパク質が>90%純粋であることを確認した。

【0200】

2.CBD-CPI抗体の合成

ラット抗マウスPD-L1(クローン:10F.9G2,Bio X Cell)、ハムスター抗マウスCTLA4(クローン:9H10,Bio X Cell)を15当量のスルホ-SMCCとともに室温で30分間インキュベートした。過剰のスルホ-SMCCを、Zebaスピン脱塩カラム(Thermo Fisher Scientific

ic)を用いて除去した。次いで、5当量のCBDタンパク質(vWF A3ドメイン、N末端システイン残基を有する)を添加し、室温で1時間反応させた。

【0201】

3. コラーゲンおよび標的タンパク質に対するCPI抗体結合の検出

96ウェルELISAプレート(Greiner Bio One)を10 µg/mLのコラーゲンI(EMD Millipore)、コラーゲンIII(EMD Millipore)、組換えマウス(rm)CTLA4(Sino Biological)またはrmPD-L1(Sino Biological)(PBS中)で37℃にて1時間コートした後、2%のBSAを含む0.05%のTween 20含有PBS(PBS-T)で室温にて1時間ブロックした。次いでウェルをPBS-Tで洗浄し、10 µg/mLのCBD-CPIまたは非修飾CPIとともに室温で1時間さらにインキュベートした。PBS-Tでの3回の洗浄後、ウェルを室温で1時間、ラットIgGまたはシリアンハムスターIgG(Jackson ImmunoResearch)に対するHRPコンジュゲート抗体とともにインキュベートした。洗浄後、結合したCPIを、テトラメチルベンジジン基質を用いて、450 nmの吸光度を測定し、570 nmにおける測定値を差し引くことによって検出した。見かけの解離定数(K_D)値を、Prismソフトウェア(v7, GraphPad Software)の非線形回帰解析により得た(1つの部位に特異的に結合すると仮定する)。

【0202】

4. マウスおよび細胞株

8~12週齢のC57BL/6およびBalb/cはJackson Laboratoriesから入手した。8~12週齢のFVBマウスはCharles Riverから入手した。6~12週齢のTyr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl}マウスは既報のとおりに作製され(91)、シカゴ大学の動物施設で施設内ガイドライン(91)に従って飼育され、T. Gajewski教授(シカゴ大学)により提供された。実験は、シカゴ大学の研究施設内委員会の承認を得て行なった。B16F10細胞およびCT26細胞はAmerican Type Culture Collectionから入手し、使用説明書に従って培養した。MMTV-PyMT細胞はFVB-Tg(MMTV-PyVT)トランスジェニックマウス(ポリオマミドルT抗原癌遺伝子発現をマウス乳腺腫瘍ウイルスプロモーターによって誘導した)に自然に発生した乳がんから採取し、インビトロで培養した。細胞株はすべて、マイコプラズマ汚染について、病原体試験IMPACT I(IDEXX BioResearch)によって確認した。

【0203】

5. インビボ体内分布試験

vWF A3ドメインタンパク質をDyLight 800 NHSエステル(Thermo Fisher)を用いて蛍光標識し、未反応色素をZebaspinsピнкаラム(Thermo Fisher)により、製造業者の使用説明書に従って除去した。50 µLのPBS中に再懸濁した合計 5×10^5 個のMMTV-PyMT細胞を各FVBマウスの右側の乳腺脂肪体内に皮下注射した。腫瘍が500 mm³に達したら、50 µgのDyLight 800標識CBDをi.v.注射した。注射の48時間後に臓器を取り出し、Xenogen IVIS Imaging System 100(Xenogen)により以下の条件下:エフストップ:2;光学フィルター 励起 740 nm;励起 800 nm;露光時間:5秒;ビニング設定small(small binning)でイメージングした。

【0204】

6. 腫瘍内の注射されたCBD- PD-L1の組織学的解析

50 µLのPBS中に再懸濁した合計 5×10^5 個のMMTV-PyMT細胞を各FVBマウスの右側の乳腺脂肪体内に皮下注射した。腫瘍が100 mm³に達したら、100 µgのDyLight 594標識CBD- PD-L1および100 µgのDyLight 488標識 コラーゲンI(Abcam)をi.v.注射した。30分後、腫瘍を採取し、冷PBS中で洗浄し、2%PFAで室温にて10分間固定し、PBS中で洗浄した。次いで、腫瘍を12ウェルプレート内の2%アガロースゲル(LE Quick Dissolve Agarose, GeneMate)に注入した。腫瘍を含むゲルプラグに方向の印を付け、バッファートレイを備えた振動刃ミクロトーム(VT1200S, Leica)に載せた。切片を順に冷PBS中に収集し、2%パラホルムアルデヒド含有PBSで室温にて5分間固定した。DyLight 633-抗マウスCD31抗体での腫瘍の染色および顕微鏡結像は、Leica SP5 AOBS IIタンデムスキャナスペクトル共焦点顕微鏡を用いて既報のとおり(92)に行なった。

【0205】

7.抗体濃度の解析

5×10^5 個のB16F10黒色腫細胞を各マウスの背部の左側に皮内注射した。4日後、マウスに100 μ gずつのCPIをi.v.注射した。腫瘍接種の5、6および8日後に血液試料をチューブ内に収集した。血清中のCPIの濃度をELISAにより上記のようにして測定した。

【0206】

8.血清サイトカイン濃度の解析

5×10^5 個のB16F10黒色腫細胞を15週齢の各C57BL/6マウスの背部の左側に皮内注射した。4日後、マウスに100 μ gずつのCPIを2回投与した。5、6および8日目、血液試料をチューブ内に収集した後、4 で一晩インキュベーションした。血清中のサイトカイン濃度をReady-SET-Go! ELISAキット (eBioscience) により製造業者のプロトコルに従って測定した。

10

【0207】

9.ALT活性の解析

B16F10腫瘍担持マウスに100 μ gのCPIの注射を、腫瘍接種の4日後と7日後に行なった。10日目、血液試料をチューブ内に収集した後、4 で>4時間のインキュベーションを行なった。同じ日に、血清を収集し、ALT活性をALTアッセイキット (Sigma-Aldrich) により製造業者のプロトコルに従って測定した。

【0208】

10.組織学的検査

B16F10腫瘍担持マウスにCPI注射 (PD-L1および CTLA4を100 μ gずつ) を、腫瘍接種の4日後と7日後に行なった。腫瘍接種の10日後に、肝臓と肺を収集し、2%PFAで固定した。パラフィン中に包埋した後、ブロックを5 μ m切片に切断し、続いてヘマトキシリンとエオシンで染色した。画像は、EVOS FL Auto顕微鏡 (Life Technologies) を用いて取り込んだ。リンパ性浸潤の定量のため、10の高倍率視野 (400倍) におけるリンパ球浸潤巢の数を光学顕微鏡法 (BX53,Olympus) により計数した。スライドを、処置について知らない2人の病理医 (H.A.とM.Y.) が独立して評価した。顕微鏡画像はカラーCCDカメラ (DP27,Olympus) で取り込んだ。

20

【0209】

11.B16F10腫瘍に対するCPIの抗腫瘍有効性

50 μ LのPBS中に再懸濁した合計 5×10^5 個のB16F10細胞を、各C57BL/6マウスの背部の左側の皮内に接種した。4日後、マウスにCPI (PD-L1および CTLA4を25 μ gまたは100 μ gずつ) をi.v.注射した。腫瘍をデジタルキャリパーで測定し (腫瘍接種の4日後に開始)、体積を楕円体として算出した。ここで、 $V = 4/3 \times 3.14 \times \text{奥行}/2 \times \text{幅}/2 \times \text{高さ}/2$ 。いずれかの腫瘍体積が500 mm^3 超に達した時点でマウスを 殺した。

30

【0210】

12.CT26腫瘍に対するCPIの抗腫瘍有効性

50 μ LのPBS中に再懸濁した合計 5×10^5 個のCT26細胞を、各Balb/cマウスの背部の左側の皮内に接種した。5日後、マウスにCPI (PD-L1および CTLA4を25 μ gまたは100 μ gずつ) をi.v.注射した。腫瘍をデジタルキャリパーで上記のようにして測定した (腫瘍接種の5日後に開始)。いずれかの腫瘍体積が500 mm^3 超に達した時点でマウスを 殺した。

40

【0211】

13.組織および細胞の調製ならびにT細胞サブセットの解析

5×10^5 個のB16F10黒色腫細胞を各C57BL/6マウスの背部の左側に皮内注射した。マウスにCPI (PD-L1および CTLA4を100 μ gずつ) を4日目にi.v.注射した。マウスを8日目に 殺した。腫瘍を採取し、2%のFBS、2 mg/mLのコラーゲナーゼDおよび40 μ g/mLのDNase I (Roche) を補給したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で37 にて30分間消化させた。70-mmセルストレーナーによって器官を穏やかに破壊することにより、単細胞懸濁液を得た。赤血球を、ACK溶解バッファー (Quality Biological) を用

50

いて溶解させた。細胞を計数し、10%のFBSおよび1%のペニシリン/ストレプトマイシンを補給したイスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM) (完全培地;すべてLife Technologies製) 中に再懸濁させ、フローサイトメトリーでの染色に使用した。

【0212】

14. フローサイトメトリーおよび抗体

腫瘍の単細胞懸濁液を上記のようにして調製した。洗浄工程後、およそ 2×10^6 個の細胞を抗体染色に使用した。本文書全体を通して特に記載のない限り、以下の分子:CD3 (145-2C11, BD Biosciences)、CD4 (RM4-5, BD Biosciences)、CD8 (53-6.7, BD Biosciences)、CD25 (PC61, BD Biosciences)、CD45 (30-F11, BD Biosciences)、CD44 (IM7, BD Biosciences)、CD62L (MEL-14, BD Biosciences)、PD-1 (29F.1A12, BioLegend)、Foxp3 (MF23, BD Biosciences) に対する抗体を使用した。固定による生/死細胞の識別を、Fixable Viability Dye eFluor 455 (eBioscience) を製造業者の使用説明書に従って用いて行なった。染色は、特に記載のない限り氷上で20分間実施し、細胞内染色は、Foxp3-染色キットを製造業者の使用説明書 (BioLegend) に従って用いて行なった。洗浄工程後、細胞を特異的抗体で20分間、氷上にて染色した後、固定した。フローサイトメトリー解析はすべて、Fortessa (BD Biosciences) フローサイトメーターを用いて行ない、FlowJoソフトウェア (Tree Star) を用いて解析した。

【0213】

15. エクスピボT細胞刺激

腫瘍の単細胞懸濁液を上記のようにして調製した。CD8⁺T細胞をEasySepキット (STEMCELL Technologies) を用いて、ビオチン化 CD105 (12403, BioLegend) を Easy Sep CD8⁺T cell Isolation Cocktail に添加してB16F10黒色腫細胞を除去したこと以外は製造業者の使用説明書に従って単離した。96ウェル細胞培養プレート (BD Falcon) をPBS中10 μ g/mLの CD3 (145-2C11, BioLegend) で37℃にて一晚コートした。腫瘍から抽出されたT細胞を96ウェルプレート内にプレーティングし、完全培地中で37℃にて6時間、2 μ g/mLの CD28 (EL-4, BioLegend) および5 μ g/mLのプレフェルジンA (Sigma-Aldrich) の存在下で培養した。細胞を採取し、染色し、フローサイトメトリーによって上記のようにして解析した。

【0214】

16. 統計解析

必要なサンプルサイズの事前決定には統計法を使用せず、サンプルサイズはパイロット実験の推定値および以前に公表された結果に基づいて、適切な統計学的検定によって有意な結果が得られ得るように選択した。CBD-CPIの合成および腫瘍の処置は、再現性が確保されるように複数の人によって行なわれた。実験はすべて、研究所内で少なくとも2回反復される。動物試験のため、マウスを最初のCPI注射の直前にケージ内の処置群に無作為化し、同様に処置した。腫瘍サイズがB16F10、CT26およびMMTV-PyMT腫瘍では500 mm³超ならびにTyr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl} Cat^{STA}腫瘍では1000 mm³超になったときを生存率エンドポイントとした。統計計算に使用したn値は図の説明に示している。実験は盲検様式で行なわなかった。実験群間の統計学的有意差をPrismソフトウェア (v7, GraphPad) を用いて調べた。一元配置ANOVAの後にテューキーのHSD事後検定を使用した場合、群間分散はブラウン・フォーサイス検定により同様であることがわかった。ノンパラメトリックデータでは、クラスカル・ウォリス検定の後、ダンの多重比較検定を使用した。単回比較では、スチューデントの両側t-検定を使用した。生存曲線を、ロジランク (マンテル・コックス) 検定を使用することによって解析した。記号 * および ** は、それぞれ0.05未満および0.01未満のP値を示す; N.S., 有意でない。

【0215】

実施例5-細胞外マトリックス親和性による抗CD40アゴニスト抗体の有効性および安全性の改善

CD40 (腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー5:TNFRSF5) は、抗原提示細胞 (APC) によって発現される48 kDaのI型膜貫通型タンパク質である (1)。CD40は、主に活性

10

20

30

40

50

化ヘルパーT細胞によって発現されるCD40L (CD154) と結合すると、APCに対する活性化シグナルを媒介する。

【0216】

CD40に対するアゴニスト抗体 (CD40) は腫瘍の増殖を抑制することがマウスモデルおよび臨床試験の両方で示されている (2~11)。DC上において、CD40は共刺激分子および主要組織適合複合体 (MHC) 分子の細胞表面発現を高め、炎症促進サイトカインを誘導し、B細胞およびT細胞の活性化の増強をもたらす (2,12~14)。濾胞B細胞上への

CD40結合により増殖、免疫グロブリンクラススイッチおよび抗腫瘍抗体の分泌が誘導される (4,15)。B細胞枯渇により、マウス悪性中皮腫においてCD40処置の抗腫瘍有効性が一部損なわれる (4)。腫瘍随伴マクロファージでは、CD40処置によりM2型からM1型への表現型の転換が駆動され、これは、細胞傷害性T細胞の誘導および腫瘍に対するナチュラルキラー (NK) 細胞応答を伴う (6,7)。したがって、CD40処置により、直接 (APC、例えばB細胞) および間接的 (T細胞、NK細胞) の両方によるいくつかの細胞型の活性化によって抗腫瘍効果が誘導され得る。

【0217】

いくつかのCD40アゴニスト抗体がヒトがん免疫療法のために開発されており (例えば、CP-870,893、ダセツズムマブ (dacetuzumumab)、ADC-1013およびChi Lob 7/4)、黒色腫、膵癌、中皮腫およびリンパ腫において良好な抗腫瘍応答が示されている (1,8,9)。しかしながら、CD40療法には改善すべきことがたくさん残っており;例えば、処置関連有害事象、例えばインターロイキン-6 (IL-6) および腫瘍壊死因子- (TNF-) サイトカイン放出症候群および肝毒性がクリニックでCD40処置後に報告されており (11)、CD40処置薬の投薬量が制限されている (1)。このような問題に対処するため、いくつかのマウス腫瘍モデルでCD40の局所注射、例えば腫瘍内または腫瘍周囲 (p.t.) 注射が試験され、全身注射 (例えば、静脈内または腹腔内注射) と比べて高い抗腫瘍有効性が示されている (2,16~19)。

【0218】

免疫チェックポイント阻害薬 (CPI) 療法、例えば細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4/プログラム細胞死1 (CTLA4/PD-1) 阻害はクリニックで相当な抗腫瘍活性が示されている (20~22)。CTLA4/PD-1阻害療法の主な機構が抗腫瘍T細胞の活性化であるため、CPI療法の好成績は腫瘍内へのT細胞浸潤に大きく依存する (23,24)。しかしながら、一部で不十分なT細胞浸潤のため、相当数の患者がCPI療法に奏功性でない。進行した黒色腫に対する単独療法での奏功率はCTLA4 (イピリムマブ) での19%からPD-1 (ニボルマブ) での44%までの範囲である (25)。したがって、腫瘍内へのT細胞浸潤を向上させるための単独療法または補助療法としての代替ストラテジーの開発が腫瘍免疫療法に必要とされている。

【0219】

本実施例では、局所投与した場合、CD40の効果を向上させる胎盤増殖因子由来超親和性ペプチド (PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄) を介して細胞外マトリックスに結合するCD40変異体を記載する。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40抗体の腫瘍周囲注射により注射部位における長期組織内保持が示され、全身性曝露がかなり減少し、肝臓毒性の減少がもたらされた。4匹のマウス腫瘍モデルにおいて、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40抗体でその非修飾形態と比べて向上した抗腫瘍有効性が実証され、腫瘍内および腫瘍流入領域リンパ節内の活性化樹状細胞、B細胞およびT細胞と相関していた。さらに、チェックポイント阻害薬が奏功しない遺伝子操作されたBraf^{V600E} Cat^{STA}黒色腫モデルにおいて、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40抗体処置により腫瘍内へのT細胞浸潤が向上し、腫瘍の増殖が遅くなった。総合すると、このような結果は、がん免疫療法のための治療薬として、抗CD40アゴニスト抗体にマトリックス結合ドメインを改変操作することの顕著な治療的利点を実証する。

【0220】

A. 結果

1. PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチドコンジュゲーションによりCD40のECM結合が向上し、組

10

20

30

40

50

織内保持が長くなる

PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40のECM結合特性をインビトロで特性評価した。SDS-PAGEにより、CD40の軽鎖と重鎖の両方の分子量が増えていることが示された(図34A)。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40は、主要なECMタンパク質として試験したフィブロネクチン、ビトロネクチンおよびコラーゲンIに結合した(図34B)。比較において、非修飾CD40は、試験したECMタンパク質に結合しなかった。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40は組換えマウスCD40を、非修飾抗体と同様のK_d値で認識した(図34C)。このようなデータは、CD40のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄修飾により、その抗原認識が損なわれることなく強いECM結合がもたらされたことを示す。

【0221】

次に、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40の組織内保持能を調べた。インビボイメージング解析を使用し、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40が注射部位に長期間、内因性ECM分子との結合によって保持されることが示された。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40のシグナルは注射部位で注射後96時間検出可能であったが、非修飾CD40のシグナルは注射の48時間後に非常に低くなった。このデータは、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションによって注射部位の組織におけるCD40の保持が向上したことを示す(図34D)。

【0222】

2. PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションによりCD40全身性曝露が低下し、処置関連有害事象が抑制される

PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40は注射部位における長期保持を示したため、本発明者らは、注射されたPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40の血清中の濃度は、注射部位の腫瘍内における保持のため、非修飾CD40と比べて低いであろうという仮説をたてた。血清中のCD40濃度を、接種後4日目のB16F10腫瘍内へのCD40の腫瘍周囲(p.t.)単回投与(50 µg)後に経時的に測定した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40の血清中の濃度は、すべての時点でCD40と比べて低かった(図35A)。この全身性曝露の低下により、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションによってCD40の全身毒性が減少するかもしれないことが示唆される。

【0223】

次に、処置関連有害事象を調べた。CD40をB16F10腫瘍接種の4日後にp.t.注射し、次いで血清を収集した。非修飾CD40の投与ではIL-6とTNFの両方の血清中濃度が有意に高かったが、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40では高くなかった(図35B~C)。肝毒性を、臨床使用されている肝臓障害マーカーのALT活性を測定することにより調べた。非修飾CD40ではPBS処置群と比べてALT活性レベルが高かったが、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40では高くなかった(図35D)。また、肝臓の組織学的解析により、CD40は、肝壊死および白血球浸潤によって明示されるように、顕著な形態構造の変化を誘導することが示された(図35E)。対照的に、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置後では壊死領域は観察されなかったが、やはり血管周囲に幾分のリンパ性浸潤は観察された。肝細胞内にCD40のmRNAは検出されず(図36)、直接的ではなく免疫学的な肝毒性機構と整合した(31)。総合すると、このような結果は、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションによって、おそらく全身性曝露の低減によりCD40の全身毒性が低減されることを示す。

【0224】

3. PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40により、多くの腫瘍モデルで非修飾CD40と比べて高い抗腫瘍有効性が示された

本発明者らは、T細胞浸潤を示し、したがってCPIに対してある程度奏功性であるマウスモデルにおけるPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置の抗腫瘍有効性を試験した。B16F10細胞接種の4日後に、CD40(10または50 µg/注射)をp.t.投与した。10 µg/注射の用量において、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置では腫瘍の増殖を統計学的に有意に遅らせたが、非修飾CD40は抗腫瘍効果を示さなかった(図37A)。高用量(50 µg/注射)では、非修飾CD40は腫瘍の増殖を有意に遅らせ、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40は、非修飾抗体よりも有意に大幅に、さらに小さい腫瘍サイズを誘導した(図37B)。次に、本発明者らはCT26結腸癌に対する抗腫瘍有効性を調べた(図37C)。CT26細胞を接種してから5日後に、

10

20

30

40

50

CD40を10 µg/注射でp.t.投与した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置では腫瘍の増殖を統計学的に有意に遅らせたが、非修飾 CD40は抗腫瘍効果を示さなかった（図37C）。同様に、MMTV-PyMT遺伝子操作乳がんモデルにおけるPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40の抗腫瘍活性を調べ（32）、この場合も、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40（50 µg/注射）のp.t.投与により、その非修飾形態より有意に強く腫瘍の増殖が抑制されることがわかった（図37D）。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40投与により、9匹のうち2匹のマウスで腫瘍の根絶が誘導され、非修飾 CD40処置では8匹のうち1匹のマウスで腫瘍が根絶された。このようなデータにより、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40での局所処置は、多くの腫瘍型において、非修飾形態での局所処置と比べて卓越した抗腫瘍有効性を示すことが示された。

【0225】

4. PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置により腫瘍およびtd-LN内のT細胞、B細胞およびDCが有効に活性化される

PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置の治療作用の背後にある機構を調べるため、T細胞およびAPCの応答をB16F10腫瘍担持マウスにおいて解析した。50 µgの CD40を腫瘍接種後4日目にp.t.注射した。9日目、白血球を腫瘍およびtd-LNから抽出した。腫瘍内のCD45⁺細胞のパーセンテージとしてのDCの頻度は、非修飾 CD40処置によりわずかに低下した（図38A）。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40および非修飾 CD40ではどちらも、td-LN内のCD11c⁺ DCの頻度は有意に高かった（図38B）。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40および非修飾 CD40のどちらの処置でも、腫瘍内のCD11c⁺ DCのMHCII^{High}CD86⁺の頻度は有意に低かったが、td-LN内の頻度は高く、CD11c⁺ DCの成熟が示された（図38C）。同様に、F4/80⁺ マクロファージ内のMHCII^{High}CD86⁺の頻度は、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40および非修飾 CD40のどちらの処置でも、腫瘍内では有意に低かったがtd-LN内では有意に高く、CD40処置によってマクロファージの活性化が誘導されることが示唆された（図38E~F）。

【0226】

T細胞に関して、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置では、腫瘍内のCD45⁺細胞のCD8⁺CD3⁺ T細胞の頻度がPBS処置群と比べて有意に高かったが、非修飾 CD40処置では高くなかった（図38G）。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置では腫瘍内のCD8⁺CD3⁺ T細胞のエフェクター集団（CD62L⁺CD44⁺と規定する）の頻度が、PBS処置群および非修飾 CD40処置群と比べて有意に高く、CD8⁺ T細胞のより高い活性化が示された（図38H）。非修飾 CD40処置でもPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲート CD40処置でもCD45⁺細胞のCD4⁺CD3⁺ T細胞の頻度は変化しなかった（図38I）。腫瘍内のCD4⁺CD3⁺ T細胞のCD25⁺Foxp3⁺ Treg集団の頻度はすべての処置群で維持された（図38J）。したがって、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置により、腫瘍内のエフェクターCD8⁺ T細胞/Treg細胞の数の比がPBS処置群および非修飾 CD40処置群と比べて有意に高くなった（図38K）。非修飾 CD40処置では、腫瘍内のCD8⁺CD3⁺ T細胞のPD-1⁺の頻度がPBS処置群と比べてわずかに低く（図38L）、CD40処置によってPD-1⁺ 消耗腫瘍浸潤T細胞が活性細胞に逆転されることを示す以前の研究と整合する（33）。

【0227】

B細胞活性化に関して、腫瘍および血液を11日目に解析した。B細胞内のMHCII^{High}CD86⁺の頻度は、腫瘍内およびtd-LN内の両方においてPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40によって有意に向上したが、CD40処置ではtd-LN内のみにおいてB細胞内のMHCII^{High}CD86⁺の頻度が高かった（図38M~N）。このデータは、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置によってB細胞の活性化が誘導されたことを示唆する。非常に重要なことに、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置ではB16F10細胞に対する内因性細胞表面結合抗体の誘導が有意に増大したが、非修飾 CD40処置では増大せず（図38O）、B細胞媒介性抗腫瘍機構もまた示唆された。

【0228】

腫瘍内のNK細胞の頻度は、すべての処置群間で維持された（図39）。td-LN内のNK細胞の頻度は非修飾 CD40処置でわずかに高かった（図39）。

【0229】

10

20

30

40

50

まとめると、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置によって腫瘍内またはtd-LN内のT細胞、DC、B細胞およびマクロファージが有効に活性化され、図37に報告した治療効果の増大と整合した。

【0230】

5. PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置によりCD8⁺T細胞プライミングによって全身性抗腫瘍免疫が誘導される

PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置後の成熟APCおよび活性化CD8⁺T細胞の増加に鑑み、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40が、ある腫瘍に局所投与した場合に、遠位腫瘍における抗腫瘍応答を媒介し得るかどうかを調べた。B16F10細胞をマウスの左側背部と右側背部の両方に0日目に接種した(図40A)。続いて、CD40(50 μg/注射)形態を左側腫瘍のみの付近に4日目にp.t.注射した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40のp.t.注射では左(同側)および右(反対側)の両方の腫瘍の成長増大が遅くなった;非修飾 CD40では、同様ではなかったが有意により少ない程度に遅くなった。このようなデータは、ある腫瘍付近での局所PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置により、全身性で腫瘍の増殖を低減できる全身性抗腫瘍免疫学的活性が増強することを示す。

【0231】

PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置の抗腫瘍効果がCD103⁺DCまたはCD8⁺DCに依存性であるかどうかを調べるため、Batf3遺伝子ノックアウトマウスを使用した。Batf3は、塩基性ロイシンジッパー転写因子であり、クロスプレゼンテーションDC、例えばCD103⁺DCの発生およびCD8⁺DCの発生に必須である(34~36)。Batf3^{-/-}マウスでは、このようなクロスプレゼンテーションDCが存在しないことにより、CD8⁺T細胞のクロスプライミングがひどく抑制される(37)。Batf3^{-/-}マウスにB16F10細胞を接種して4日後に、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40(10 μg/注射)をp.t.投与し、野生型C57BL6マウスを図37Aのように処置した。野生型マウスとは対照的に、Batf3^{-/-}マウスにおいてPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置ではB16F10腫瘍の増殖は遅くならなかった(図40B)。このデータは、CD8⁺T細胞のCD103⁺DC媒介性またはCD8⁺DC媒介性のクロスプライミングがB16F10黒色腫モデルのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置の抗腫瘍効果に極めて重要な役割を果たすことを示唆する。

【0232】

6. PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置では -カテニン発現遺伝子操作原発性黒色腫の増殖が遅くなる

上記のデータにより、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置によってB16F10腫瘍内へのCD8⁺T細胞浸潤が誘導されることが実証された(図38)。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置により、T細胞非浸潤腫瘍がT細胞浸潤腫瘍に変換されることによって、T細胞浸潤が少なく(したがって、CPI療法に非奏功性の)腫瘍に対する抗腫瘍有効性が示され得るかどうかを試験するため、Tyr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl} Cat^{STA}マウスを使用した。このマウスは、活性B-RafのCre誘導性発現およびPTEN(ヒト黒色腫において一般的に改変されている分子経路)の二対立遺伝子欠失を有し、安定化 -カテニンの誘導性発現を有するように遺伝子操作されている(28)。-カテニン経路の発現は、CD103⁺DCの浸潤を低減させ、腫瘍内の微小環境内において少ないT細胞およびCPI療法に対する非奏功性をもたらすことが示されている(28)。4-OH-タモキシフェンの局所適用による腫瘍誘導後、非修飾型またはPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40をp.t.注射によって投与した。注目すべきことに、非修飾 CD40のp.t.投与ではこの腫瘍の増殖を遅らせた(図41A)。より重要なことには、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40のp.t.投与処置では、PBS処置群および非修飾 CD40処置群と比べて腫瘍の増殖を遅らせた(図41A)。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置により生存期間が長くなったが CD40処置ではならなかった(図41B)。

【0233】

PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置ではB16F10黒色腫内のCD8⁺T細胞の頻度が高く(図38G)、CD8⁺T細胞はPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40処置による抗腫瘍効果に不可欠である(図37Aおよび40B)ため、Tyr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl} Cat^{STA}腫瘍内のT細胞

10

20

30

40

50

の数を解析した(図41C)。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置では、腫瘍微小環境内CD8⁺T細胞の頻度がPBS処置および非修飾CD40処置と比べて統計学的に有意に高かった。このようなデータは、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置では、CPI非奏功性の腫瘍内であっても抗腫瘍効果が示され、非修飾CD40の場合よりも大きな抗腫瘍効果が示されることを実証しており、B16F10モデルで観察された活性化T細胞の高値と整合する。

【0234】

B. 考察

がん免疫療法薬としてのCD40には有害事象が付随し、これにより、クリニックで安全に使用され得るCD40の投薬量が制限されている(11,38)。本実施例では、かかる有害事象の発生が、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄のCD40とのコンジュゲーションにより、これをPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲートCPI抗体と同様に(27)p.t.投与すると低減された。注射部位の腫瘍組織付近に局在したままのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40は、非腫瘍抗原特異的TまたはB細胞に対する影響を回避し、肝臓内に存在する骨髄系細胞に対する影響を低減させることにより、正常な全身免疫の恒常性をより厳重に維持するはずである(31)。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40投与後に観察された低肝毒性および全身性サイトカイン放出は、この全身性曝露の低減のためであった可能性が高い。注目すべきことに、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄コンジュゲーションにより、非修飾CD40は効果を有しなかった低局所投薬量で腫瘍増殖の遅延が示されたため、投与量の低減すら可能かもしれない。このようなデータは、かかる有害事象のため治療を中止した患者、ならびに全身性治療に適さない患者を処置できる可能性を示唆する。

【0235】

特に重要なのは、CD40処置によって、CPI療法非奏功性腫瘍であるTyr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl} Cat^{STA}黒色腫の増殖が抑制されたという観察結果である(28)。主に低T細胞浸潤のためCPI療法に奏功性でない患者が相当数いる(22)。クリニックにおいて、報告によると、非T細胞浸潤黒色腫の48%が活性化-カニニンシグナル伝達を示す(28)。対応する遺伝子操作マウス腫瘍モデルにおいて有効性を示す処置戦略の開発は、このような患者がその処置戦略の恩恵を被るであろうことを示す。上記のデータは、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置によりTyr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl} Cat^{STA}黒色腫の腫瘍微小環境内へのT細胞浸潤が誘導されたことを示す。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置動物の腫瘍において統計学的に高値のCD8⁺T細胞数がみられたこと、およびCD103⁺/CD8⁺DC陰性Batf3^{-/-}マウスでは治療に対する奏功がないことを考慮すると、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置では、腫瘍抗原のクロスプレゼンテーションによる抗原特異的CD8⁺T細胞応答の誘導により、非修飾CD40処置より効率的に抗腫瘍応答が駆動されると結論付けることができる。

【0236】

上記に実証した局所療法は注射部位と反対側の腫瘍の増殖もまた抑制し、これは、全身免疫の誘導という以前の観察結果と整合する(2,39~41)。上記のデータは、到達可能な腫瘍部位にPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40を注射することが転移がんの処置にも有効であり得ることを示す。血中におけるPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40の低濃度と腫瘍内の活性化CD8⁺T細胞の増加および誘導された抗腫瘍細胞抗体の血中レベルの増大を併せると、遠位腫瘍における作用機構は、一方の腫瘍から他方の腫瘍へのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40の漏出によるものではなく、おそらく、有効な腫瘍抗原特異的免疫細胞の活性化により細胞傷害性Tリンパ球および抗腫瘍細胞抗体が全身に広がるためである。p.t.投与によって全身に分布した非修飾CD40は、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40ほど大きくB16F10腫瘍の増殖を有意に抑制しなかった。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置によってtd-LN内のCD11c⁺DC、マクロファージおよびB細胞が活性化されたため、CD40のp.t.注射による抗腫瘍B細胞およびT細胞の有効な活性化により、同側腫瘍と反対側の腫瘍の両方において腫瘍成長増大の抑制がもたらされたと考えられる。

【0237】

局所がん免疫療法は、クリニックでは黒色腫、結腸直腸がんおよびリンパ腫で試験され

10

20

30

40

50

、治療薬の全身投与と比べて同等またはより高い抗腫瘍有効性が示されている(2,17,39~43)。結腸癌および胸腺腫のマウスモデルにおいて、CD40の低速放出製剤(例えば、マイクロ粒子ポリマー、リボソームおよびモンタニド油性乳剤)での局所投与により、抗腫瘍有効性を維持または向上させながらの低用量での抗体の使用が可能になった(2,17,44)。本実施例において、本発明者らは、どちらかという、分子工学的アプローチを利用し、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチドコンジュゲーションによって、したがって腫瘍間質または腫瘍周囲間質を抗体保持の貯蔵部として使用してCD40の抗腫瘍効果をさらにいっそう改善した。これにより、p.t.注射した場合に多くの腫瘍モデルで有効性と安全性の両方に対して良好な効果がもたらされる。

【0238】

要約すると、CD40のECM結合変異体の局所注射は、p.t.投与した場合、その非修飾形態と比べて高い抗腫瘍活性を有することがわかった。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄のコンジュゲーションによりCD40の注射部位における組織内保持がもたらされた。全身性副作用の明白な低減、例えばサイトカイン放出症候群の低減および肝毒性の低減は、体循環中の低いCD40濃度と関連していることが実証された。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40の腫瘍周囲注射によって腫瘍微小環境が改変され、APC(CD103⁺およびまたはCD8a⁺DCは必須である)が有意に活性化され、腫瘍増殖の遅延がもたらされ、生存期間が長くなる。また、この局所療法によって遠位腫瘍の増殖も抑制された。重要なことに、CPI耐性黒色腫モデルにおいて良好な有効性が観察された;PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40処置により、そうでなければT細胞浸潤が起こらないこの腫瘍内へのT細胞腫瘍浸潤が向上した。

【0239】

C.材料および方法

1.PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40の合成

ラット抗マウスCD40(クローン:FGK4.5、BioXCell)を15当量のスルホ-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)とともに室温で30分間インキュベートした。過剰のスルホ-SMCCを、Zebaスピン脱塩カラム(Thermo Fisher Scientific)を用いて除去した。次いで、15当量のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチド(RRRPKGRGKRREKQRPTDCHL)

を添加し、C残基上のチオール部分とのコンジュゲーションのために室温で1時間反応させた。ペプチドはGenscriptで>95%純度で合成されたものであった。

【0240】

2.ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

SDS-PAGEは、4%から20%までの勾配のゲル(Bio-Rad)で、CD40を10 mMのDTTで還元した後に行なった。電気泳動後、ゲルをSimplyBlue SafeStain(Thermo Fisher Scientific)で、製造業者の使用説明書に従って染色した。ゲルの画像はChemiDoc XRS+システム(Bio-Rad)を用いて収集した。

【0241】

3.結合アッセイ

96ウェルELISAプレート(Greiner Bio One)を10 µg/mLの組換えヒトECMタンパク質、フィブロネクチン(Sigma-Aldrich)、ビトロネクチン(Sigma-Aldrich)、コラーゲンI(EMD Millipore)、または1 µg/mLの組換えマウス(rm)CD40(Sino Biological)(リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中)で37 °Cにて1時間コートした後、2%ウシ血清アルブミン(BSA)(0.05%のTween 20含有PBS(PBS-T)中)で室温にて1時間ブロックした。次いでウェルをPBS-Tで洗浄し、PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD40または非修飾CD40(ECMタンパク質は10 µg/mL)とともに室温で1時間さらにインキュベートした。PBS-Tでの3回の洗浄後、ウェルを室温で1時間、ラットIgGに対するホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲート抗体(Jackson ImmunoResearch)とともにインキュベートした。洗浄後、結合したCD40をテトラメチルベンジジン基質を用いて450

10

20

30

40

50

nmの吸光度を測定し、570 nmのシグナルを差し引くことによって検出した。

【0242】

4. マウスおよび細胞株

8~12週齢の胸腺欠損ヌード（イメージング用）、C57BL/6（B16F10黒色腫モデル用）、Balb/c（CT26結腸癌モデル用）およびFVB（MMTV-PyMT乳がんモデル用）マウスはJackson Laboratoriesから入手した。8~12週齢のBatf3^{-/-}マウスは、Justin Kline博士（シカゴ大学）のご厚意による戴き物であった。6~12週齢のTyr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl} Cat^{STA}マウスは既報のとおりに作製し、シカゴ大学の動物施設で施設内ガイダンスに従って飼育した（28）。実験は、シカゴ大学の研究施設内委員会の承認を得て行なった（プロトコル番号72470）。B16F10細胞およびCT26細胞はAmerican Type Culture Collectionから入手し、使用説明書に従って培養した。MMTV-PyMT細胞はFVB-Tg（MMTV-PyVT）トランスジェニックマウス（ポリオマミドルT抗原癌遺伝子発現をマウス乳腺腫瘍ウイルスプロモーターによって誘導した）に自然に発生した乳がんから採取し、インビトロで培養した。この試験で使用した細胞株はすべて、マイコプラズマ汚染について、IMPACT I病原体試験（IDEXX BioResearch）によって確認した。

【0243】

5. CD40の皮膚保持の解析

CD40を、スルホ-Cyanine 7 NHSエステル（Lumiprobe）を製造業者の使用説明書に従って用いて蛍光標識した。N末端がCyanine 7で標識されたPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチドは、Thermo Fisher Scientificで>90%純度で化学合成された。Cyanine 7標識PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄をCD40に上記のようにしてコンジュゲートさせた。胸腺欠損ヌードマウスに40 µgのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-または非修飾のCyanine 7標識CD40を皮内（i.d.）注射した。マウスを、注射後24時間毎にXenogen IVIS Imaging System 100（Xenogen）により以下の条件下:エフ/ストップ:2;光学フィルター 励起 710 nm;励起 780 nm;露光時間:1秒;ピニング設定smallでイメージングした。

【0244】

6. 抗体濃度の解析

循環中の抗体濃度の測定は既報のとおりに行なった（27）。5 × 10⁵個のB16F10黒色腫細胞を12週齢の各C57BL/6マウスの背部の左側に皮内注射した。4日後、マウスに50 µgのCD40を腫瘍周囲に（p.t.）注射した。腫瘍接種の4日後（接種後のこの日はCD40注射の4時間後）、6日後および8日後に血液試料をチューブ内に収集した。CD40の血清中の濃度をELISAにより上記のようにして測定した。

【0245】

7. 血清サイトカイン濃度の解析

5 × 10⁵個のB16F10黒色腫細胞を12週齢の各C57BL/6マウスの背部の左側に皮内注射した。4日後、マウスに50 µgのCD40を2回投与した。4日目（CD40注射の4時間後）、5日目、6日目および8日目に、血液試料をチューブ内に収集した後、4で一晩インキュベーションした。血清中のサイトカイン濃度をReady-SET-Go! ELISAキット（eBioscience）により製造業者のプロトコルに従って測定した。

【0246】

8. ALT活性の解析

血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）活性は既報のとおりに測定した（27）。B16F10腫瘍担持マウスに50 µgのCD40注射を腫瘍接種の4日後に行なった。5、7および9日目、血液試料をチューブ内に収集した後、4で>4時間インキュベーションした。血清におけるALT活性はALTアッセイキット（Sigma-Aldrich）により製造業者のプロトコルに従って測定した。

【0247】

9. 組織学的検査

肝臓の組織学的検査は既報のとおりに行なった（27）。B16F10腫瘍担持マウスに50 µgのCD40注射を腫瘍接種の4日後に行なった。腫瘍接種の7日後に、肝臓を収集し、2

10

20

30

40

50

%パラホルムアルデヒドで固定した。パラフィン中に包埋した後、ブロックを5 μ m切片に切断し、続いてヘマトキシリンとエオシンで染色した。画像は、EVOS FL Auto顕微鏡 (Life Technologies) を用いて取り込んだ。

【0248】

10.RNA抽出およびCD40の遺伝子発現解析

リンパ節 (LN) 細胞および肝細胞をC57BL/6マウスから既報のとおり新鮮単離した (29,30)。全RNAをLN細胞および肝細胞から、RNeasyマイクロキット単離プロトコル (Qiagen) を製造業者の使用説明書に従って用いて抽出した。cDNAを、SuperScript II First Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies) を製造業者の使用説明書に従って用いて行なわれる全RNAの逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって得た。遺伝子発現解析は、CD40 (Mm00441891_m1) および β -アクチン (Mm01268569_m1) に特異的なTaqMan遺伝子発現アッセイ (Life Technologies) によりLightCycler 96 System (Roche) で行なった。相対遺伝子発現を、式 (遺伝子発現倍数変化) = $2^{-(Cq \text{ アクチン} - Cq \text{ CD40})}$ を使用し、 β -アクチンを参照遺伝子として用いて定量した。

10

【0249】

11.B16F10黒色腫に対する CD40の抗腫瘍有効性

50 μ LのPBS中に再懸濁した合計 5×10^5 個のB16F10細胞を、各C57BL/6マウスまたはBatf3^{-/-}マウスの背部の左側の皮内に接種した。4日後、マウスに10 μ gまたは50 μ gのCD40をp.t.注射した。遠位腫瘍実験では、 5×10^5 個のB16F10細胞を各マウスの背部の左側と右側に、0日目に皮内注射した。4日目、マウスに50 μ gのCD40を左側腫瘍付近のみにp.t.注射した。腫瘍をデジタルキャリパーで測定し (最初の腫瘍接種の4日後に開始)、体積を楕円体として算出した。ここで、 $V = 4/3 \times 3.14 \times \text{奥行}/2 \times \text{幅}/2 \times \text{高さ}/2$ 。いずれかの腫瘍体積が500 mm³超に達した時点でマウスを殺した。

20

【0250】

12.CT26結腸癌に対する CD40の抗腫瘍有効性

50 μ LのPBS中に再懸濁した合計 5×10^5 個のCT26結腸癌細胞を、各Balb/cマウスの背部の左側の皮内に接種した。5日後、マウスに10 μ gのCD40を皮内にp.t.注射した。腫瘍をデジタルキャリパーで上記のようにして測定した (腫瘍接種の5日後に開始)。いずれかの腫瘍体積が500 mm³超に達した時点でマウスを殺した。

【0251】

30

13.MMTV-PyMT乳がんに対する CD40の抗腫瘍有効性

50 μ LのPBS中に再懸濁した合計 8×10^5 個のMMTV-PyMT細胞を各FVBマウスの右側の乳腺脂肪体内に皮下注射した。7日後、マウスに50 μ gのCD40をp.t.注射した。腫瘍をデジタルキャリパーで上記のようにして測定した。腫瘍体積が500 mm³超に達したらマウスを殺した。

【0252】

14.組織および細胞の調製ならびにT細胞サブセットの解析

5×10^5 個のB16F10黒色腫細胞を各C57BL/6マウスの背部の左側に皮内注射した。4日後および7日後、マウスに50 μ gのCD40をp.t.注射した。マウスを8日目に殺した。脾臓、LNおよび腫瘍を採取した。腫瘍を、2%のFBS、2 mg/mLのコラーゲナーゼDおよび40 μ g/mLのDNase I (Roche) を補給したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で、37 $^{\circ}$ Cにて30分間消化させた。70-mmセルストレーナーによって組織を穏やかに破壊することにより、単細胞懸濁液を得た。赤血球を、ACK溶解バッファー (Quality Biological) を用いて溶解させた。細胞を計数し、10%のFBSおよび1%のペニシリン/ストレプトマイシンを補給したイスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM) (完全培地; すべてLife Technologies製) 中に再懸濁させ、フローサイトメトリーでの染色に使用した。

40

【0253】

15.フローサイトメトリーおよび抗体

脾臓、td-LNおよび腫瘍の単細胞懸濁液を上記のようにして調製した。洗浄工程後、およそ 2×10^6 個の細胞を抗体染色に使用した。抗体は、特に記載のない限りBD Bioscienc

50

esから購入した:CD3 (145-2C11)、CD4 (RM4-5)、CD8 (53-6.7)、CD11c (HL3)、CD25 (M-A251)、CD44 (IM7)、CD45 (30-F11)、CD62L (MEL-14)、CD86 (GL-1)、F4/80 (T45-2342)、Foxp3 (MF23)、NK1.1 (PK136)、MHCII (M5/114.15.2, BioLegend)、PD-1 (29F.1A12, BioLegend)。固定による生/死細胞の識別を、Fixable Viability Dye eFluor 455 (eBioscience) を製造業者の使用説明書に従って用いて行なった。染色は、特に記載のない限り氷上で20分間実施し、細胞内染色は、Foxp3-染色キットを製造業者の使用説明書 (BioLegend) に従って用いて行なった。洗浄工程後、細胞を特異的抗体で20分間、氷上にて染色した後、固定した。フローサイトメトリ解析はすべて、Fortessa (BD Biosciences) フローサイトメーターを用いて行ない、FlowJoソフトウェア (FlowJo, LLC.) を用いて解析した。

10

【0254】

16. 内因性抗体の検出

B16F10腫瘍担持マウスに10 µgの CD40注射を腫瘍接種の4日後に行なった。11日目、血漿試料をヘパリン添加チューブ内に収集した。B16F10細胞を処置マウス (11日目) のPBS中10%の血漿とともに4 で60分間インキュベートし、PBSで2回洗浄し、次いで、Alexa-Fluor-647標識ラット抗マウスIgG (Jackson ImmunoResearch) とともに4 で30分間インキュベートした。細胞をPBS中で洗浄した後、平均蛍光強度をFortessaサイトメーターを用いて解析した。

【0255】

17. Tyr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl} Cat^{STA} 黒色腫の誘導および抗体の注射 6~12週齢のTyr:Cre-ER⁺/LSL-Braf^{V600E}/Pten^{fl/fl} Cat^{STA}マウスの背部を剃毛し、5 µLの10 mg/mLの4-OH-タモキシフェン (Sigma-Aldrich) を経表面適用した。視認可能な腫瘍発生の直後 (0日目) および7日目に再度、マウスに10 µgの CD40をp.t.注射した。体積を、体積 = 表面積 * Zとして算出した。式中、表面積はImageJ解析によってコンピュータ計算され、Zは、デジタルキャリパーで測定した腫瘍の厚さである。腫瘍体積が1000 mm³超に達した時点でマウスを 殺した。

20

【0256】

18. 腫瘍浸潤性T細胞密度の解析

腫瘍担持マウスの安楽死後、腫瘍の一部を亜鉛系固定剤で固定した。組織学的解析は、黒色腫の中央部の連続切片 (7 µmの凍結切片) で行なった。TBS-Tを含むtris緩衝生理食塩水中2%のBSAでブロックした低温切片を、ハムスター抗マウス抗CD31抗体 (2H8, Abcam)、ウサギ抗マウス抗CD3抗体 (SP7, Abcam) およびラット抗マウス抗CD8抗体 (53-6.7, BioLegend) とともにインキュベートした。TBS-Tで洗浄後、切片をAlexa Fluor 488コンジュゲート抗ハムスター抗体、Alexa Fluor 594コンジュゲート抗ウサギ抗体またはAlexa Fluor 647コンジュゲート抗ラット抗体 (Jackson ImmunoResearch) とともに室温で1時間インキュベートした。画像はIX83顕微鏡 (Olympus) を用いて撮影した。画像を撮影した後、腫瘍浸潤性CD8⁺T細胞の数を、ImageJソフトウェアを用いて計数した。腫瘍浸潤性CD8⁺T細胞は、CD8およびCD3について二重陽性 (共局在) と規定し、CD31⁺血管内にある細胞は除外した。腫瘍内領域は明視野像を用いて特定し、算出した。

30

40

【0257】

19. 統計解析

再現性が確保されるように複数バッチのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄- CD40が複数の人によって合成され、腫瘍の処置は複数の人によって行なわれた。動物試験のため、マウスを最初のCD40注射の直前にケージ内の処置群に無作為化し、同様に処置した。実験群間の統計学的有意差をPrismソフトウェア (v7, GraphPad) を用いて調べた。一元配置ANOVAの後にテューキーのHSD事後検定を使用した場合、群間分散はブラウン・フォーサイス検定により同様であることがわかった。単回比較では、スチューデントの両側t-検定を使用した。生存曲線を、ログランク (マンテル・コックス) 検定を使用することによって解析した。実験はすべて、少なくとも2回反復される。記号 * および ** は、それぞれ0.05未満お

50

よび0.01未満のP値を示す;N.S.,有意でない。

【0258】

実施例6-追加のECM標的指向型アゴニスト抗体

本実施例において、CD40以外のアゴニスト抗体がECMに標的化され、増強した抗腫瘍活性を有することを示す。このようなアゴニスト抗体としてはCD134(Ox40)、CD137(4-1-BB)およびGITRが挙げられ、他の作用機構、例えば共刺激分子によるT細胞の直接活性化を有する。Ox40は活性化CD4⁺およびCD8⁺T細胞を標的化して、抗原特異的エフェクターT細胞の生成を増強させ、T細胞寛容の誘導を抑制する(45)。CD137はNK細胞の細胞傷害性を高め、CD8⁺T細胞の増殖を引き起こし、DCの抗原提示を高める(46)。GITRはT細胞を活性化し、エフェクター機能活性、例えばサイトカイン産生を増強させ、T細胞記憶を生じさせる(47)。

10

【0259】

1.PIGF-2ペプチドにコンジュゲートさせたアゴニスト抗体は腫瘍の増殖を阻害する

5×10⁵個のB16F10黒色腫細胞をマウスの背中の皮膚内に0日目に接種した。50μgのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-Ox40、50μgのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-CD137および50μgのPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄-GITRの組合せまたはPBSを4日目に投与した(n=4~5)。抗体を腫瘍周囲(p.t.)注射した。図42は、最初にマウスが死亡したときまでの腫瘍体積を示し、抗体の併用によって腫瘍の増殖が有意に阻害されたことを示す。腫瘍体積を平均±SEMで示す。統計解析はスチューデントのt-検定を用いて行なった。* * p<0.01。

【0260】

20

2.CBDにコンジュゲートさせたアゴニスト抗体は非修飾抗体より大幅に腫瘍の増殖を阻害する

5×10⁵個のB16F10黒色腫細胞をマウスの背中の皮膚内に0日目に接種した。50μgのCBD-Ox40、50μgのCBD-CD137および50μgのCBD-GITRの組合せ、または50μgのOx40、50μgのCD137および50μgのGITRの組合せ、またはPBSを4日目に投与した(n=4~5)。抗体をi.v.注射した。図43は、最初にマウスが死亡したときまでの腫瘍体積を示し、CBDコンジュゲート抗体の併用によって、腫瘍の増殖が非修飾抗体の併用より有効に阻害されことを示す。腫瘍体積を平均±SEMで示す。統計解析はANOVAをテューキーの検定とともに用いて行なった。* * p<0.01, * p<0.05。

【0261】

30

ラット抗マウスCD134抗体(クローン:OX-86,Bio X Cell)、ラット抗マウスCD137抗体(クローン:3H3,Bio X Cell)およびラット抗マウスGITR抗体(クローン:DTA-1,Bio X Cell)を使用した。PIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチドを抗体にコンジュゲートさせるため、CD134、CD137またはGITRを15当量のスルホ-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)とともに室温で30分間インキュベートした。過剰のスルホ-SMCCを、Zebaスピン脱塩カラム(Thermo Fisher Scientific)を用いて除去した。次いで、15当量のPIGF-2₁₂₃₋₁₄₄ペプチド(RRRPKGRGKRRREKQRPTDCHL)

を添加し、C残基上のチオール部分とのコンジュゲーションのために室温で1時間反応させた。ペプチドはGenscriptで>95%純度で合成されたものであった。CBDを抗体にコンジュゲートさせるため、CD134、CD137またはGITRを15当量のスルホ-SMCCとともに室温で30分間インキュベートした。過剰のスルホ-SMCCを、Zebaスピン脱塩カラム(Thermo Fisher Scientific)を用いて除去した。次いで、5当量のCBDタンパク質(vWF A3ドメイン、N末端システイン残基を有する)を添加し、室温で1時間反応させた。

40

【0262】

一部の特定の態様を、ある程度具体的に、または1つもしくは複数の個々の態様を参照しながら上記に説明したが、当業者であれば、本開示の態様に対して、本発明の範囲を逸脱することなく数多くの変形を行なうことができよう。さらに、適切な場合は、上記の任意の実施例の諸局面を記載の任意のその他の実施例の諸局面と組み合わせて、同等または

50

異なる特性を有し、同じまたは異なる問題に対処するさらなる実施例が形成され得る。同様に、上記の有益性および利点は一態様に関連していてもよく、いくつかの態様に関連していてもよいことは理解されよう。特許出願公開公報または他の刊行物に対する言及はいずれも、該公開公報/刊行物の開示内容の参照により本明細書に具体的に組み入れられるものである。特許請求の範囲は、ミーンズ-プラス-ファンクション限定またはステップ-プラス-ファンクション限定を、所与の請求項にそれぞれ「～のための手段 (means for)」または「～のための段階 (step for)」なる語句を用いて明示していない限り、かかる限定を含むと解釈されるべきでない。

【 0 2 6 3 】

参考文献

10

実施例5に関する参考文献:

1. Vonderheide RH, Glennie MJ. Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. *Clin Cancer Res* **2013**;19:1035-43
2. Fransen MF, Sluijter M, Morreau H, Arens R, Melief CJ. Local activation of CD8 T cells and systemic tumor eradication without toxicity via slow release and local delivery of agonistic CD40 antibody. *Clin Cancer Res* **2011**;17:2270-80
3. White AL, Chan HC, Roghanian A, French RR, Mockridge CI, Tutt AL, *et al.* Interaction with FcγRIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody. *J Immunol* **2011**;187:1754-63
4. Jackaman C, Cornwall S, Graham PT, Nelson DJ. CD40-activated B cells contribute to mesothelioma tumor regression. *Immunol Cell Biol* **2011**;89:255-67
5. Lum HD, Buhtoiarov IN, Schmidt BE, Berke G, Paulnock DM, Sondel PM, *et al.* In vivo CD40 ligation can induce T-cell-independent antitumor effects that involve macrophages. *J Leukoc Biol* **2006**;79:1181-92
6. Rakhmilevich AL, Alderson KL, Sondel PM. T-cell-independent antitumor effects of CD40 ligation. *Int Rev Immunol* **2012**;31:267-78
7. Rakhmilevich AL, Buhtoiarov IN, Malkovsky M, Sondel PM. CD40 ligation in vivo can induce T cell independent antitumor effects even against immunogenic tumors. *Cancer Immunol Immunother : CII* **2008**;57:1151-60
8. Hassan SB, Sorensen JF, Olsen BN, Pedersen AE. Anti-CD40-mediated cancer immunotherapy: an update of recent and ongoing clinical trials. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **2014**;36:96-104
9. Johnson P, Challis R, Chowdhury F, Gao Y, Harvey M, Geldart T, *et al.* Clinical and biological effects of an agonist anti-CD40 antibody: a Cancer Research UK phase I study. *Clin Cancer Res* **2015**;21:1321-8

20

30

40

50

10. Beatty GL, Chiorean EG, Fishman MP, Saboury B, Teitelbaum UR, Sun W, *et al.* CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* **2011**;331:1612-6
11. Vonderheide RH, Flaherty KT, Khalil M, Stumacher MS, Bajor DL, Hutnick NA, *et al.* Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893, a novel CD40 agonist monoclonal antibody. *J Clin Oncol* **2007**;25:876-83
12. Gladue RP, Paradis T, Cole SH, Donovan C, Nelson R, Alpert R, *et al.* The CD40 agonist antibody CP-870,893 enhances dendritic cell and B-cell activity and promotes anti-tumor efficacy in SCID-hu mice. *Cancer Immunol Immunother: CII* **2011**;60:1009-17 10
13. Kikuchi T, Moore MA, Crystal RG. Dendritic cells modified to express CD40 ligand elicit therapeutic immunity against preexisting murine tumors. *Blood* **2000**;96:91-9
14. Nimanong S, Ostroumov D, Wingerath J, Knocke S, Woller N, Gurlevik E, *et al.* CD40 signaling drives potent cellular immune responses in heterologous cancer vaccinations. *Cancer Res* **2017**;77:1918-26
15. Hojer C, Frankenberger S, Strobl LJ, Feicht S, Djermanovic K, Jagdhuber F, *et al.* B-cell expansion and lymphomagenesis induced by chronic CD40 signaling is strictly dependent on CD19. *Cancer Res* **2014**;74:4318-28 20
16. Mangsbo SM, Broos S, Fletcher E, Veitonmaki N, Furebring C, Dahlen E, *et al.* The human agonistic CD40 antibody ADC-1013 eradicates bladder tumors and generates T-cell-dependent tumor immunity. *Clin Cancer Res* **2015**;21:1115-26
17. Rahimian S, Fransen MF, Kleinovink JW, Amidi M, Ossendorp F, Hennink WE. Polymeric microparticles for sustained and local delivery of antiCD40 and antiCTLA-4 in immunotherapy of cancer. *Biomaterials* **2015**;61:33-40 30
18. Sandin LC, Orlova A, Gustafsson E, Ellmark P, Tolmachev V, Totterman TH, *et al.* Locally delivered CD40 agonist antibody accumulates in secondary lymphoid organs and eradicates experimental disseminated bladder cancer. *Cancer Immunol Res* **2014**;2:80-90
19. 32nd annual meeting and pre-conference programs of the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC 2017): part one National Harbor, MD, USA. 8-12 November 2017 Abstracts. *J Immunother Cancer* **2017**;5:86
20. Allison JP. Immune checkpoint blockade in cancer therapy: The 2015 Lasker-DeBakey clinical medical research award. *JAMA* **2015**;314:1113-4 40

21. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* **2015**;348:56-61
22. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* **2015**;27:450-61
23. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther* **2015**;14:847-56
24. Wang X, Teng F, Kong L, Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther* **2016**;9:5023-39 10
25. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, *et al.* Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* **2015**;2015:23-34
26. Martino MM, Briquez PS, Guc E, Tortelli F, Kilarski WW, Metzger S, *et al.* Growth factors engineered for super-affinity to the extracellular matrix enhance tissue healing. *Science* **2014**;343:885-8
27. Ishihara J, Fukunaga K, Ishihara A, Larsson HM, Potin L, Hosseini P, *et al.* Matrix-binding checkpoint immunotherapies enhance antitumor efficacy and reduce adverse events. *Sci Transl Med* **2017**;9 20
28. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* **2015**;523:231-5
29. Liu W, Hou Y, Chen H, Wei H, Lin W, Li J, *et al.* Sample preparation method for isolation of single-cell types from mouse liver for proteomic studies. *Proteomics* **2011**;11:3556-64
30. Broggi MA, Schmalzer M, Lagarde N, Rossi SW. Isolation of murine lymph node stromal cells. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2014**:e51803 30
31. Byrne KT, Leisenring NH, Bajor DL, Vonderheide RH. CSF-1R-Dependent Lethal Hepatotoxicity When Agonistic CD40 Antibody Is Given before but Not after Chemotherapy. *J Immunol* **2016**;197:179-87
32. Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol* **1992**;12:954-61
33. Ngiow SF, Young A, Blake SJ, Hill GR, Yagita H, Teng MW, *et al.* Agonistic CD40 mAb-driven IL12 reverses resistance to anti-PD1 in a T-cell-rich tumor. *Cancer Res* **2016**;76:6266-77 40

34. Martinez-Lopez M, Iborra S, Conde-Garrosa R, Sancho D. Batf3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against *Leishmania* major infection in mice. *Eur J Immunol* **2015**;45:119-29
35. Edelson BT, Kc W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, *et al.* Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med* **2010**;207:823-36
36. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, *et al.* Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* **2008**;322:1097-100 10
37. Patel R, Sad S. Transcription factor Batf3 is important for development of CD8+ T-cell response against a phagosomal bacterium regardless of the location of antigen. *Immunol Cell Biol* **2016**;94:378-87
38. Vonderheide RH, Bajor DL, Winograd R, Evans RA, Bayne LJ, Beatty GL. CD40 immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother : CII* **2013**;62:949-54
39. Fransen MF, van der Sluis TC, Ossendorp F, Arens R, Melief CJ. Controlled local delivery of CTLA-4 blocking antibody induces CD8+ T-cell-dependent tumor eradication and decreases risk of toxic side effects. *Clin Cancer Res* **2013**;19:5381-9 20
40. Steiner M, Neri D. Antibody-radionuclide conjugates for cancer therapy: historical considerations and new trends. *Clin Cancer Res* **2011**;17:6406-16
41. Ellmark P, Mangsbo SM, Furebring C, Norlen P, Totterman TH. Tumor-directed immunotherapy can generate tumor-specific T cell responses through localized co-stimulation. *Cancer Immunol Immunother : CII* **2017**;66:1-7
42. Fransen MF, Ossendorp F, Arens R, Melief CJ. Local immunomodulation for cancer therapy: Providing treatment where needed. *Oncoimmunology* **2013**;2:e26493 30
43. Marabelle A, Kohrt H, Caux C, Levy R. Intratumoral immunization: a new paradigm for cancer therapy. *Clin Cancer Res* **2014**;20:1747-56
44. Kwong B, Liu H, Irvine DJ. Induction of potent anti-tumor responses while eliminating systemic side effects via liposome-anchored combinatorial immunotherapy. *Biomaterials* **2011**;32:5134-47
45. Aspeslagh, S., *et al.* Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 52, 50-66 (2016).
46. Yonezawa, A., Dutt, S., Chester, C., Kim, J. & Kohrt, H.E. Boosting Cancer Immunotherapy with Anti-CD137 Antibody Therapy. *Clinical cancer research : an* 40

- official journal of the American Association for Cancer Research* 21, 3113-3120 (2015).
47. Knee, D.A., Hewes, B. & Brogdon, J.L. Rationale for anti-GITR cancer immunotherapy. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 67, 1-10 (2016).
 48. Allison, J.P. Immune checkpoint blockade in cancer therapy: The 2015 Lasker-DeBakey clinical medical research award. *JAMA* **314**, 1113-1114 (2015).
 49. Sharma, P. & Allison, J.P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* **348**, 56-61 (2015). 10
 50. Topalian, S.L., Drake, C.G. & Pardoll, D.M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* **27**, 450-461 (2015).
 51. Grosso, J.F. & Jure-Kunkel, M.N. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immun* **13**, 5 (2013).
 52. Hodi, F.S., *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**, 711-723 (2010).
 53. Brahmer, J.R., *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* **366**, 2455-2465 (2012). 20
 54. Alsaab, H.O., *et al.* PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol* **8**, 561 (2017).
 55. Larkin, J., *et al.* Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* **2015**, 23-34 (2015).
 56. Boutros, C., *et al.* Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nature reviews. Clinical oncology* **13**, 473-486 (2016). 30
 57. Miyoshi, Y., Ogawa, O. & Oyama, Y. Nivolumab, an anti-programmed cell death-1 antibody, induces fulminant type 1 diabetes. *Tohoku J Exp Med* **239**, 155-158 (2016).
 58. June, C.H., Warshauer, J.T. & Bluestone, J.A. Is autoimmunity the Achilles' heel of cancer immunotherapy? *Nature medicine* **23**, 540-547 (2017).
 59. The double edge of cancer immunotherapy. *Nature medicine* **23**, 137 (2017).
 60. Okamoto, M., *et al.* Fulminant type 1 diabetes mellitus with anti-programmed cell death-1 therapy. *J Diabetes Investig* **7**, 915-918 (2016).
 61. Mellati, M., *et al.* Anti-PD-1 and anti-PDL-1 monoclonal antibodies causing type 1 diabetes. *Diabetes Care* **38**, e137-138 (2015). 40

62. Atkins, M.B., *et al.* High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **17**, 2105-2116 (1999).
63. Klapper, J.A., *et al.* High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma : a retrospective analysis of response and survival in patients treated in the surgery branch at the National Cancer Institute between 1986 and 2006. *Cancer* **113**, 293-301 (2008). 10
64. Ishihara, J., *et al.* Matrix-binding checkpoint immunotherapies enhance antitumor efficacy and reduce adverse events. *Sci Transl Med* **9**(2017).
65. Ricard-Blum, S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a004978 (2011).
66. Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Merrill-Skoloff, G., Furie, B. & Furie, B.C. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood* **107**, 3902-3906 (2006).
67. Bergmeier, W. & Hynes, R.O. Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a005132 (2012). 20
68. Nagy, J., Chang, S., Dvorak, A. & Dvorak, H. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *British journal of cancer* **100**, 865 (2009).
69. Liang, H., *et al.* A collagen-binding EGFR single-chain Fv antibody fragment for the targeted cancer therapy. *J Control Release* **209**, 101-109 (2015).
70. Liang, H., *et al.* A collagen-binding EGFR antibody fragment targeting tumors with a collagen-rich extracellular matrix. *Sci Rep* **6**, 18205 (2016).
71. Yasunaga, M., Manabe, S., Tarin, D. & Matsumura, Y. Cancer-stroma targeting therapy by cytotoxic immunoconjugate bound to the collagen 4 network in the tumor tissue. *Bioconjugate chemistry* **22**, 1776-1783 (2011). 30
72. Xu, J., *et al.* Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *The Journal of cell biology* **154**, 1069-1080 (2001).
73. Swartz, M.A. & Lund, A.W. Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: linking mechanobiology with immunity. *Nat Rev Cancer* **12**, 210-219 (2012).
74. Zhou, Z.H., *et al.* Reorganized collagen in the tumor microenvironment of gastric cancer and Its association with prognosis. *J Cancer* **8**, 1466-1476 (2017). 40

75. Provenzano, P.P., *et al.* Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med* **6**, 11 (2008).
76. Lenting, P.J., Casari, C., Christophe, O.D. & Denis, C.V. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **10**, 2428-2437 (2012).
77. Shahidi, M. Thrombosis and von Willebrand Factor. *Advances in experimental medicine and biology* **906**, 285-306 (2017). 10
78. Wu, D., *et al.* Inhibition of the von Willebrand (VWF)-collagen interaction by an antihuman VWF monoclonal antibody results in abolition of in vivo arterial platelet thrombus formation in baboons. *Blood* **99**, 3623-3628 (2002).
79. Addi, C., Murschel, F. & De Crescenzo, G. Design and use of chimeric proteins containing a collagen-binding domain for wound healing and bone regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews* (2016).
80. Ribba, A.S., *et al.* Ser968Thr mutation within the A3 domain of von Willebrand factor (VWF) in two related patients leads to a defective binding of VWF to collagen. *Thrombosis and haemostasis* **86**, 848-854 (2001). 20
81. Simpson, T.R., *et al.* Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* **210**, 1695-1710 (2013).
82. Quezada, S.A., Peggs, K.S., Curran, M.A. & Allison, J.P. CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *J Clin Invest* **116**, 1935-1945 (2006).
83. Danhier, F., Feron, O. & Preat, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* **148**, 135-146 (2010). 30
84. Chari, R.V., Miller, M.L. & Widdison, W.C. Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl* **53**, 3796-3827 (2014).
85. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* **65**, 271-284 (2000).
86. Swartz, M.A. & Fleury, M.E. Interstitial flow and its effects in soft tissues. *Annu Rev Biomed Eng* **9**, 229-256 (2007). 40

87. Carnemolla, B., *et al.* Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood* **99**, 1659-1665 (2002).
88. Eigentler, T.K., *et al.* A dose-escalation and signal-generating study of the immunocytokine L19-IL2 in combination with dacarbazine for the therapy of patients with metastatic melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 7732-7742 (2011). 10
89. Ferrari, M., Onuoha, S.C. & Pitzalis, C. Going with the flow: harnessing the power of the vasculature for targeted therapy in rheumatoid arthritis. *Drug Discov Today* **21**, 172-179 (2016).
90. Rybak, J.N., Roesli, C., Kaspar, M., Villa, A. & Neri, D. The extra-domain A of fibronectin is a vascular marker of solid tumors and metastases. *Cancer Res* **67**, 10948-10957 (2007).
91. Spranger, S., Bao, R. & Gajewski, T.F. Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* **523**, 231-235 (2015). 20
92. Lee, S.S., Bindokas, V.P. & Kron, S.J. Multiplex three-dimensional optical mapping of tumor immune microenvironment. *Sci Rep* **7**, 17031 (2017).

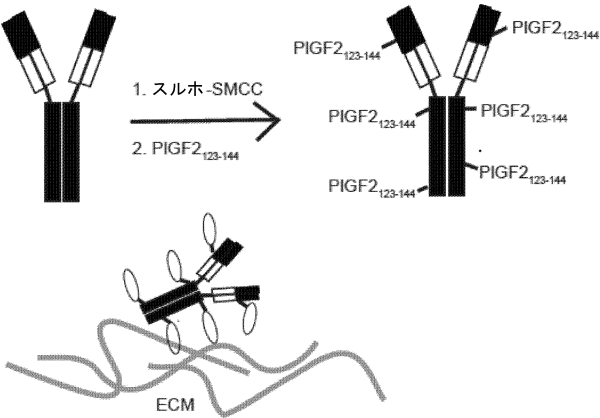
30

40

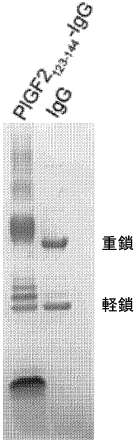
50

【図面】

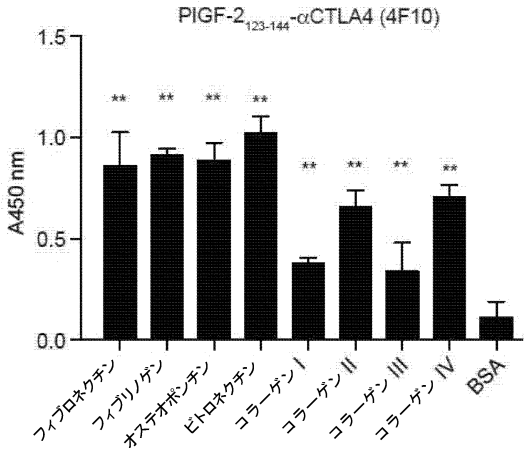
【図 1 A】



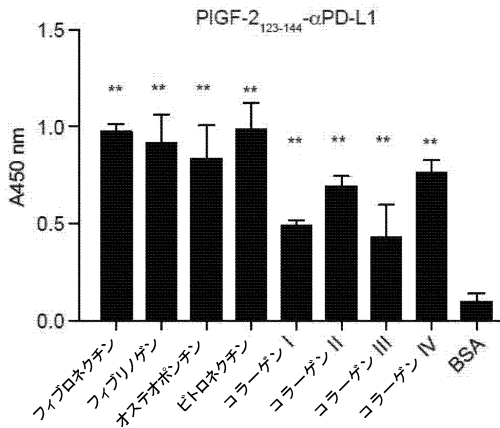
【図 1 B】



【図 1 C】



【図 1 D】



10

20

30

40

50

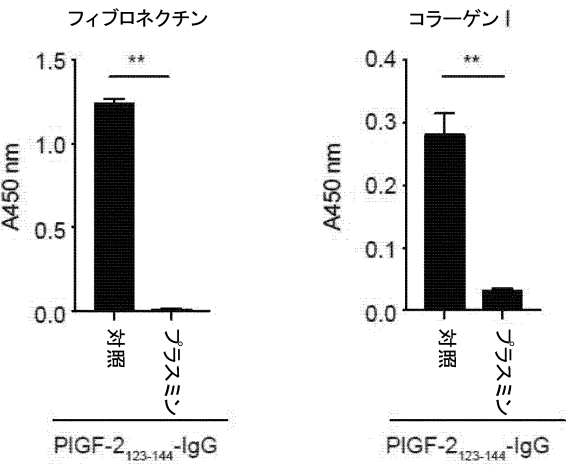
【図 1 E】

Kd (nM)	フィブロネクチン	コラーゲン I	rmCTLA4
PIGF-2 ₁₂₃₋₁₄₄ -4F10	4.7	26.7	1.6×10^{-1}
4F10	N.D.	N.D.	1.0×10^{-1}

Kd (nM)	フィブロネクチン	コラーゲン I	rmCTLA4
PIGF-2 ₁₂₃₋₁₄₄ -9H10	8.7×10^{-1}	1.3	5.7
9H10	N.D.	N.D.	15

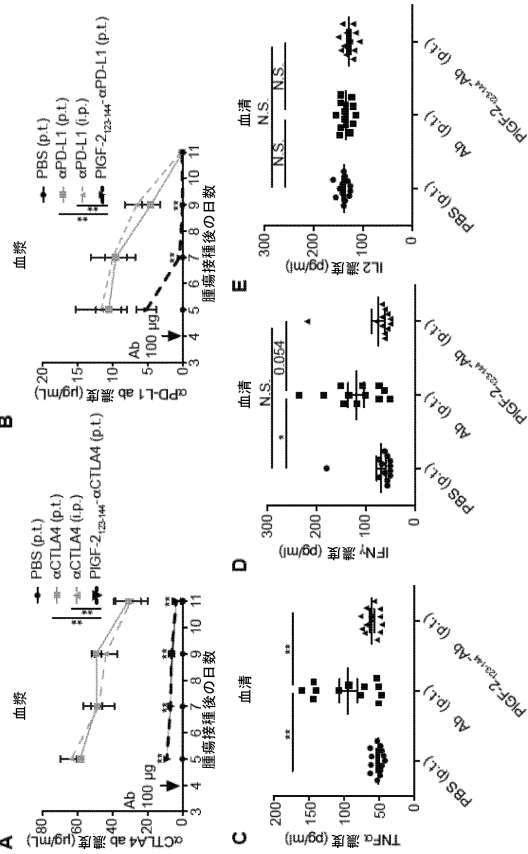
Kd (nM)	フィブロネクチン	コラーゲン I	rmPD-L1
PIGF-2 ₁₂₃₋₁₄₄ -αPD-L1	3.7	5.1	1.7×10^{-1}
αPD-L1	N.D.	N.D.	9.5×10^{-2}

【図 1 F】

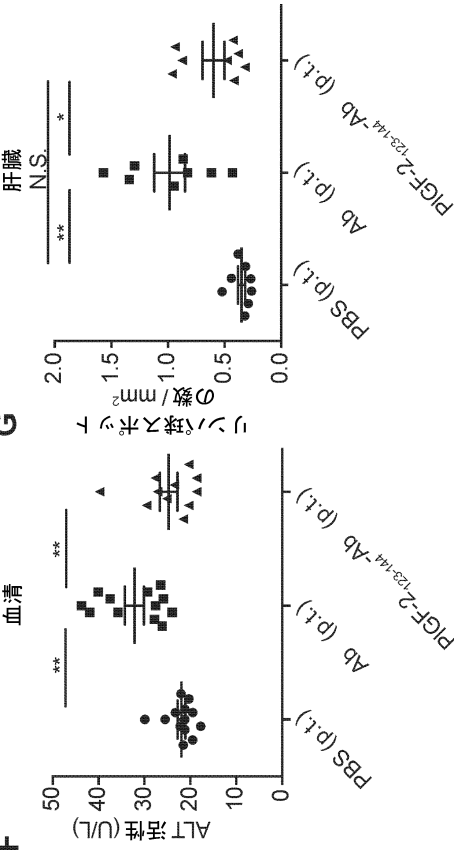


10

【図 2 - 1】



【図 2 - 2】



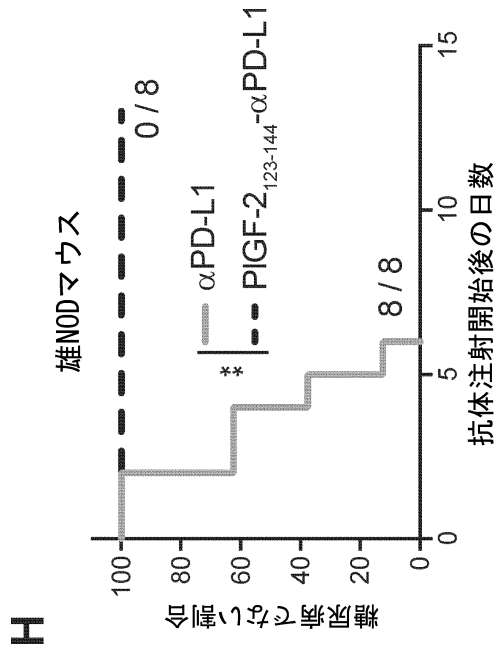
20

30

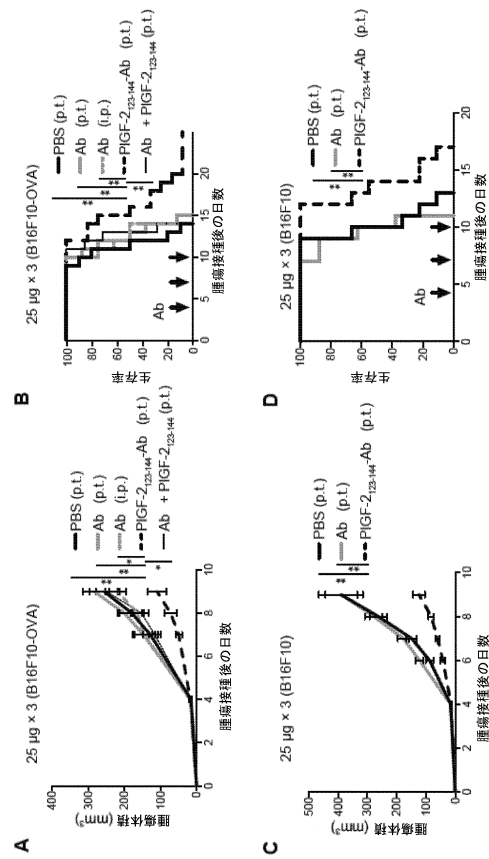
40

50

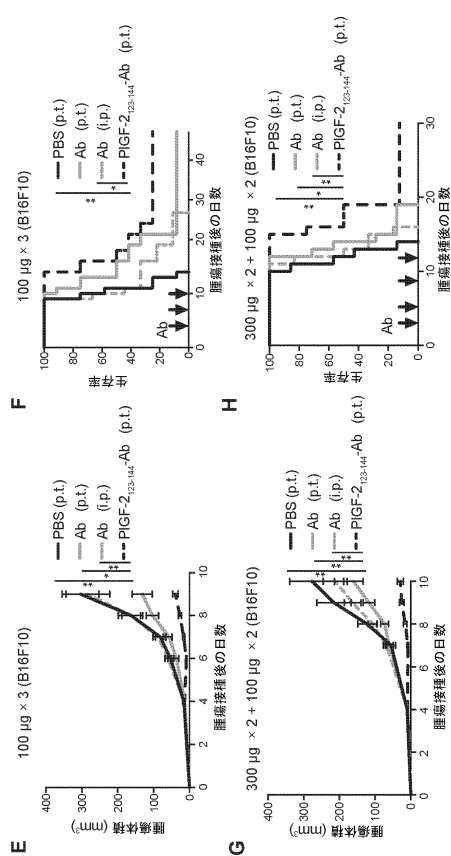
【図 2 - 3】



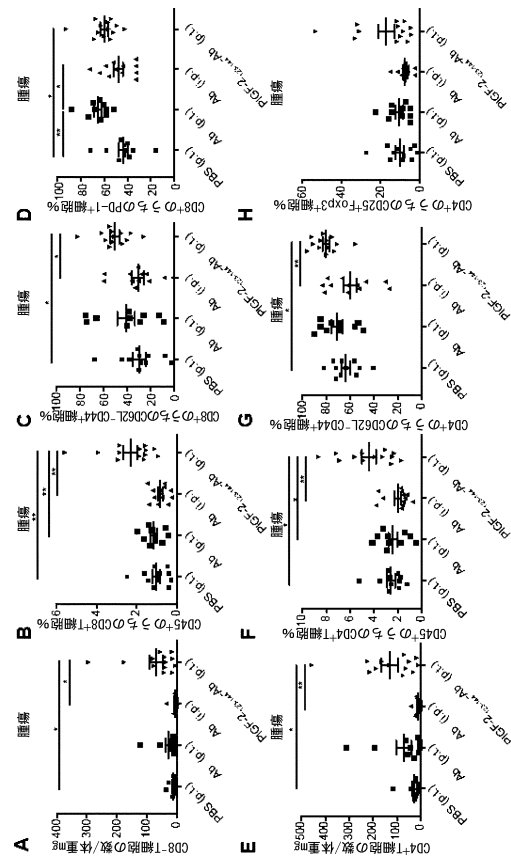
【図 3 - 1】



【図 3 - 2】



【図 4 - 1】



10

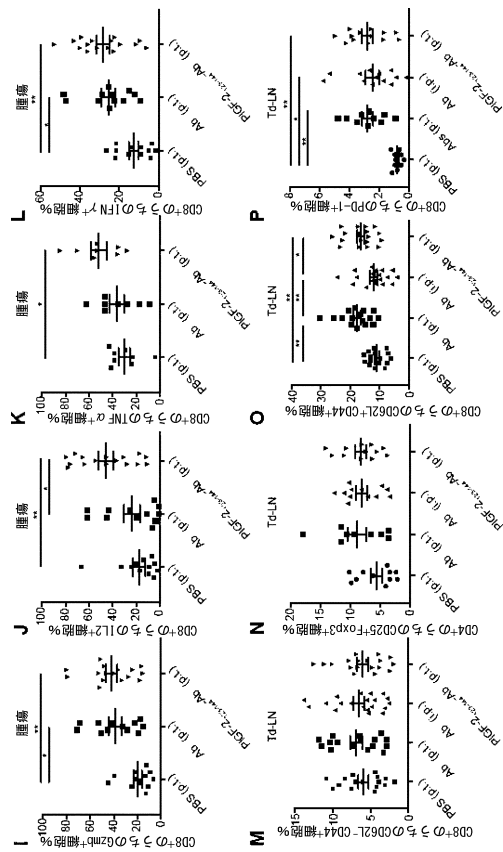
20

30

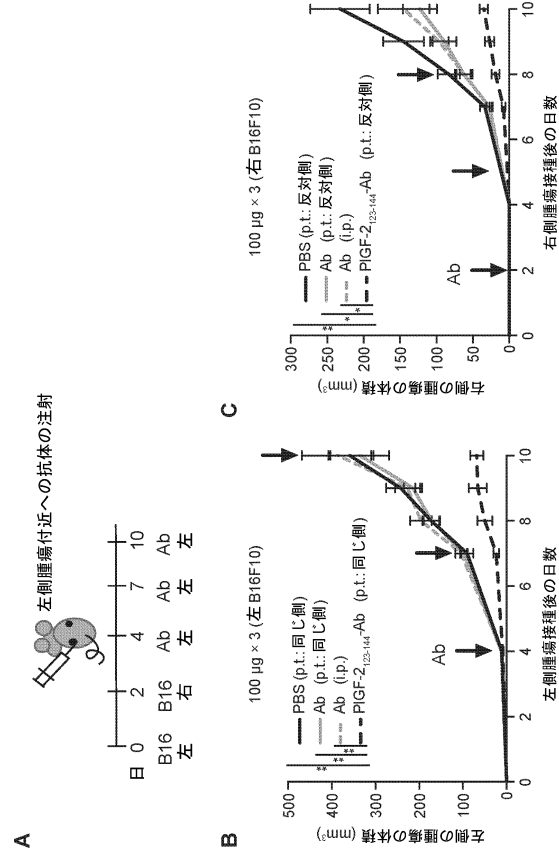
40

50

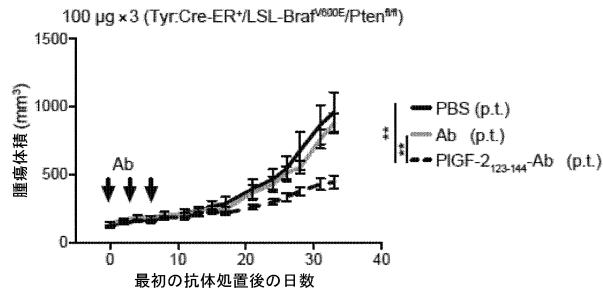
【図 4 - 2】



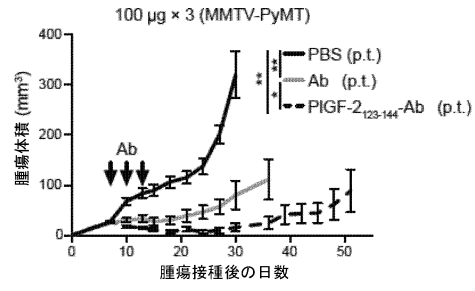
【図 5】



【図 6 A】



【図 6 B】



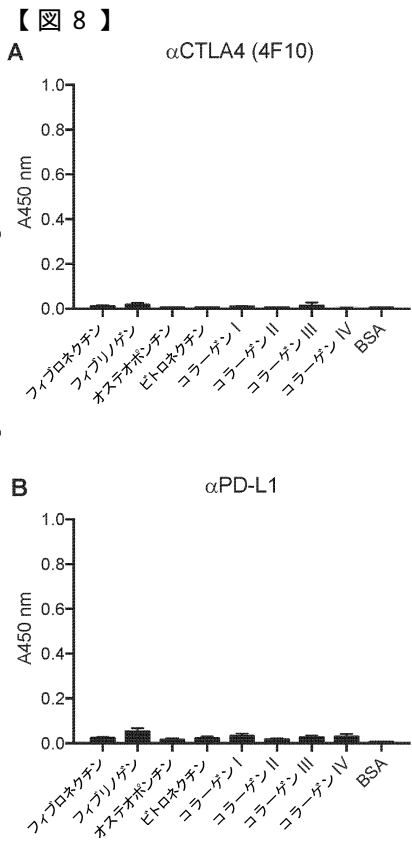
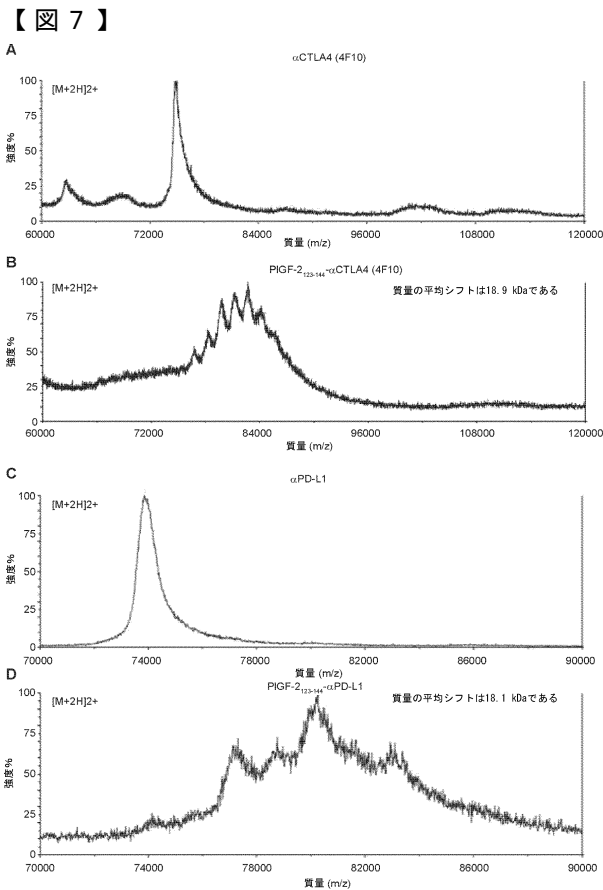
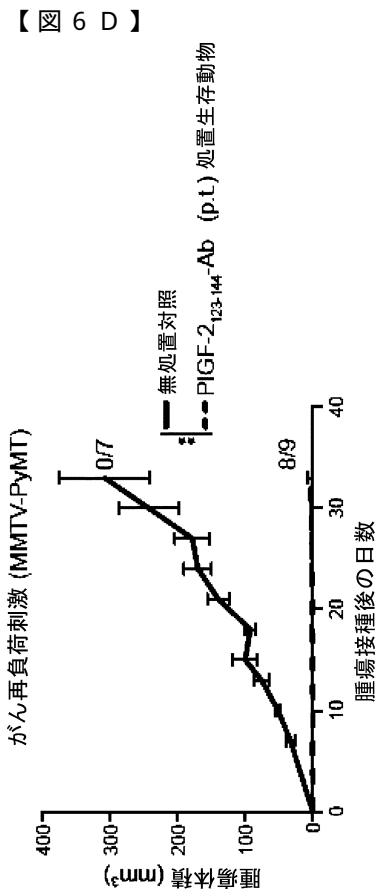
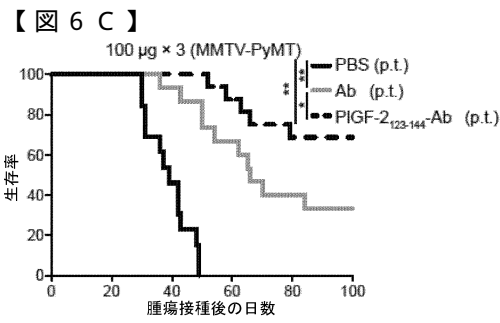
10

20

30

40

50



10

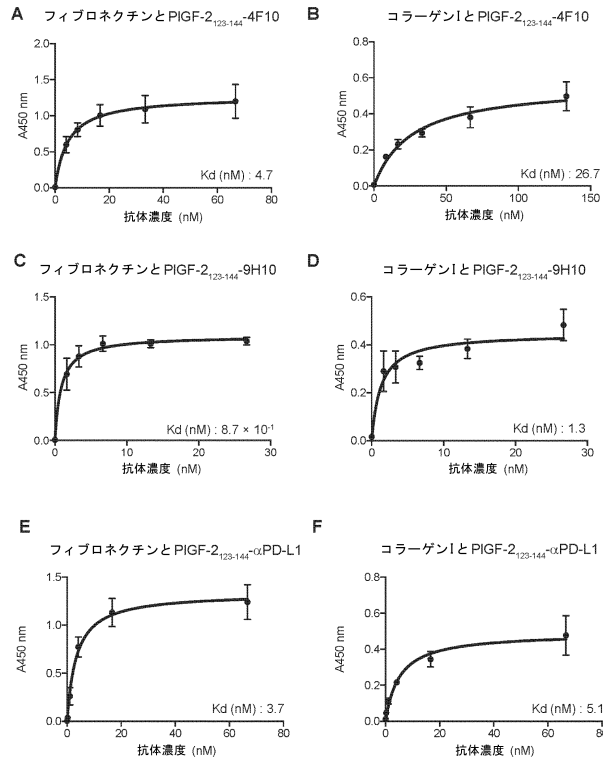
20

30

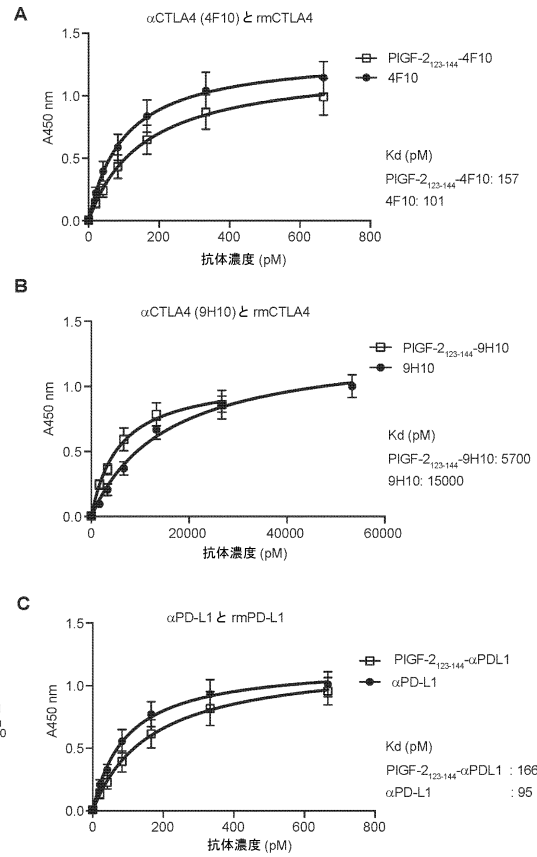
40

50

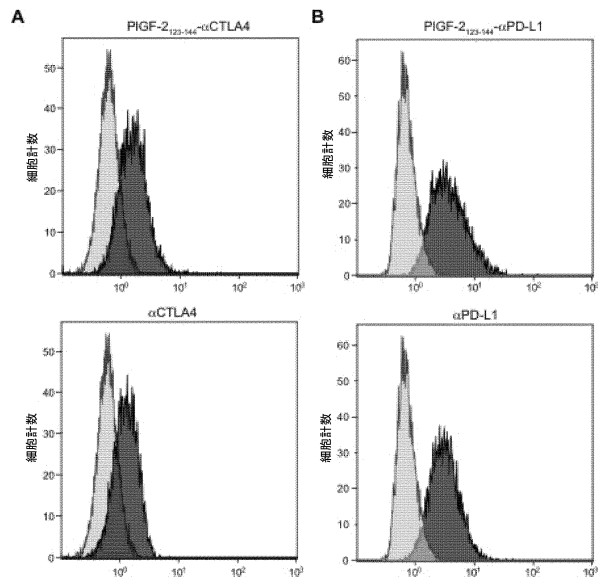
【図 9】



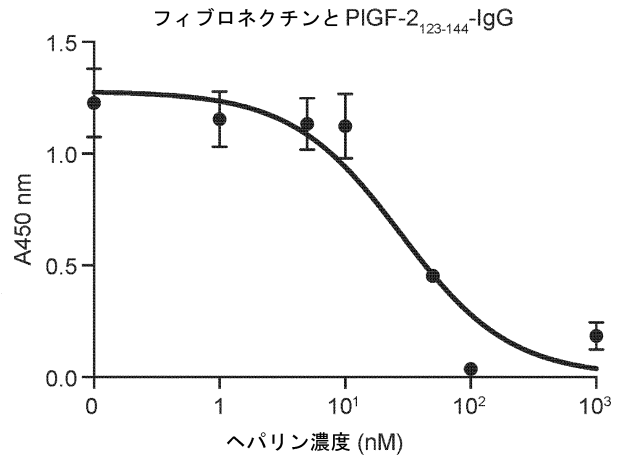
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

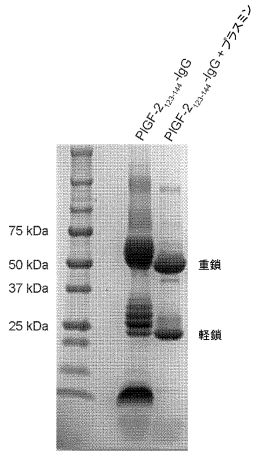
20

30

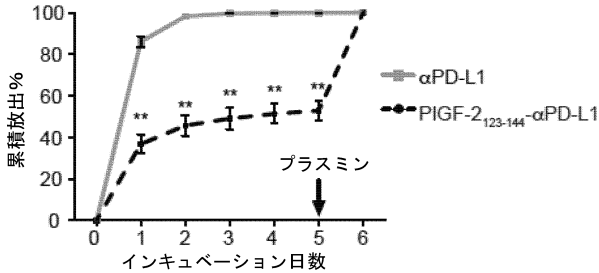
40

50

【図 1 3】

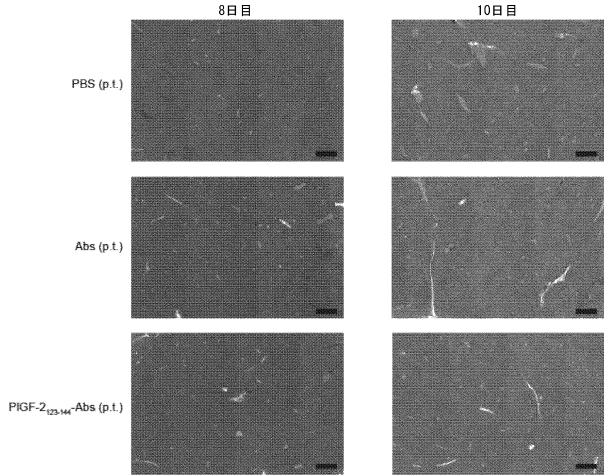


【図 1 4】

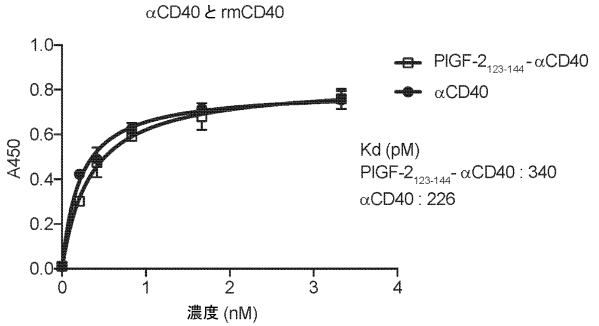


10

【図 1 5】



【図 1 6】



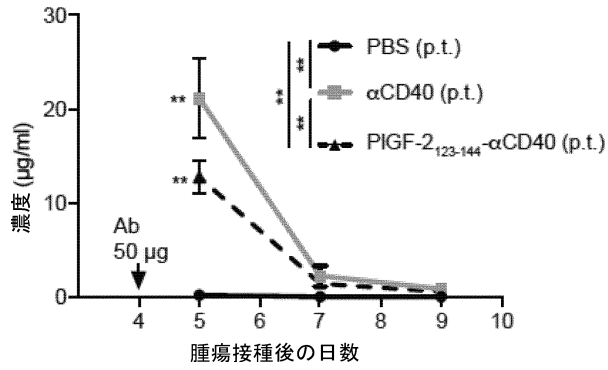
20

30

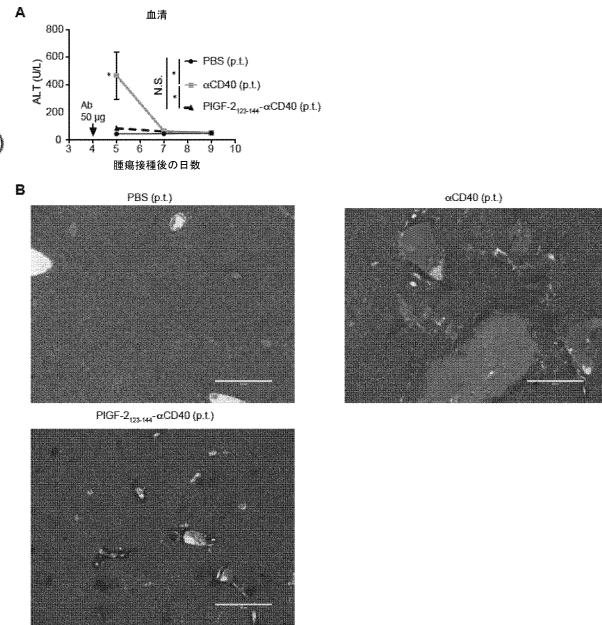
40

50

【図 17】

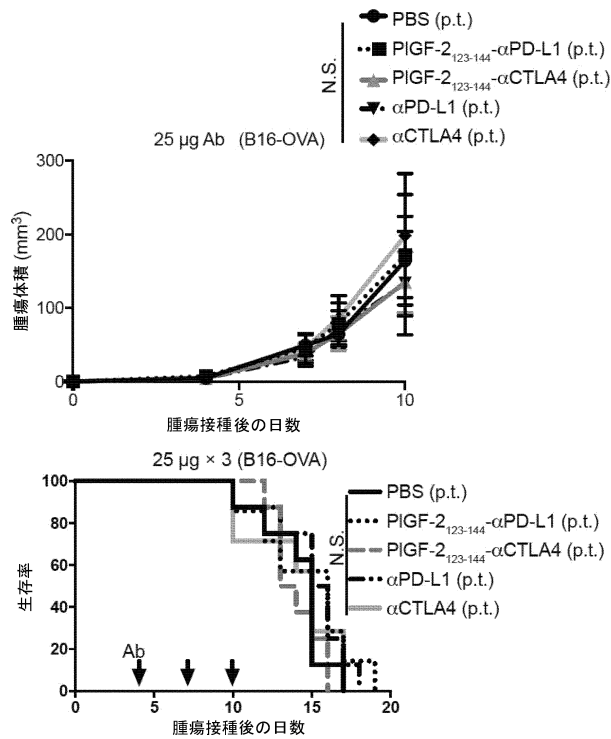


【図 18】

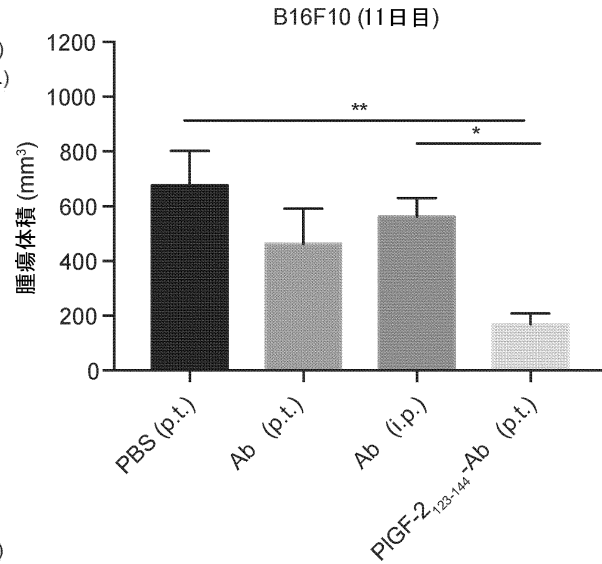


10

【図 19】



【図 20】

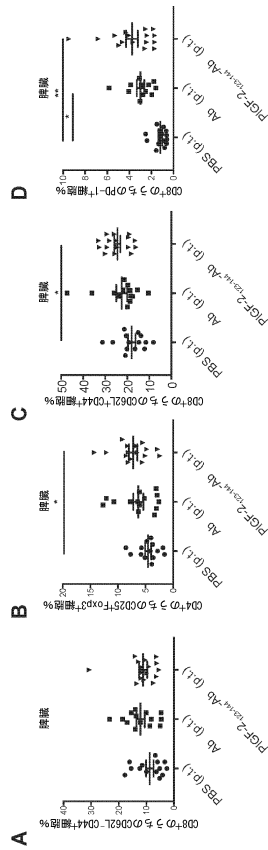


30

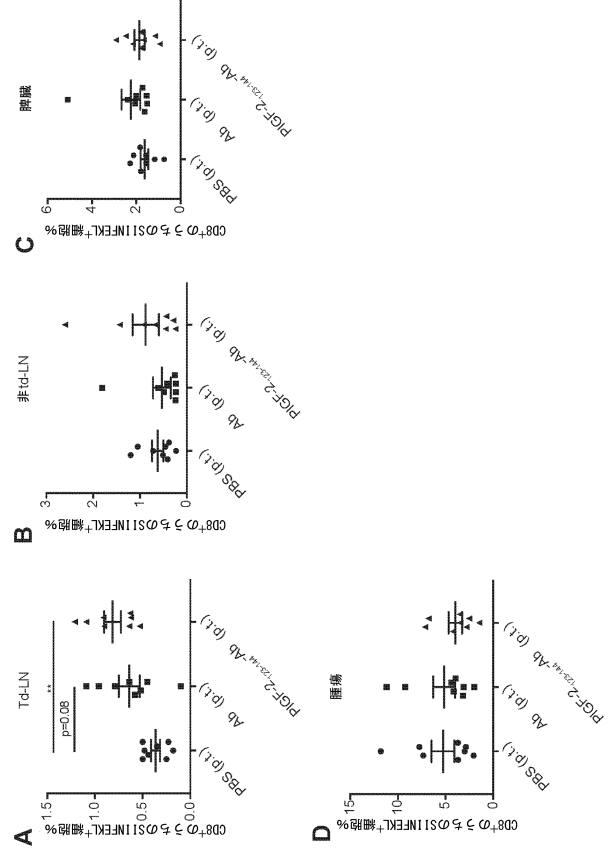
40

50

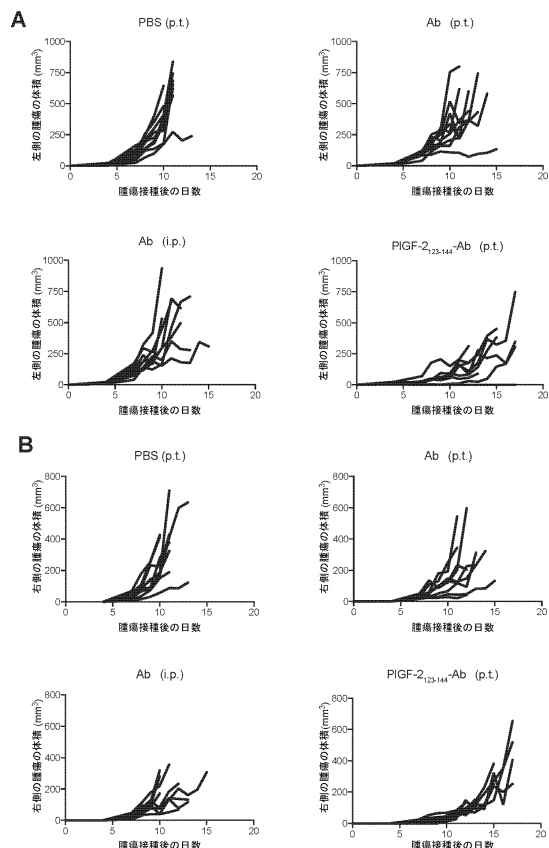
【図 2 1】



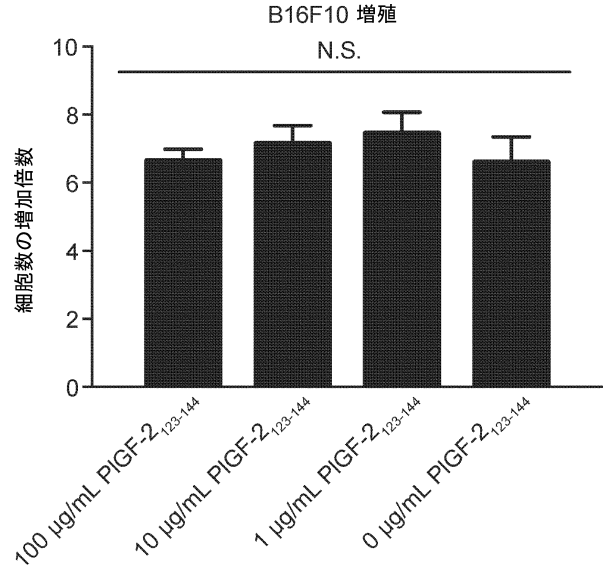
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



10

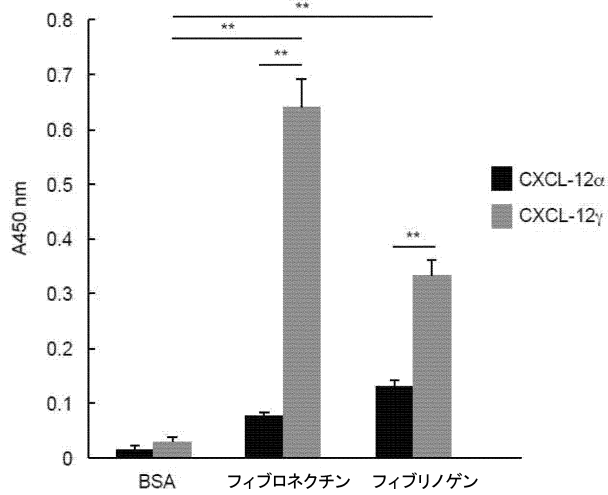
20

30

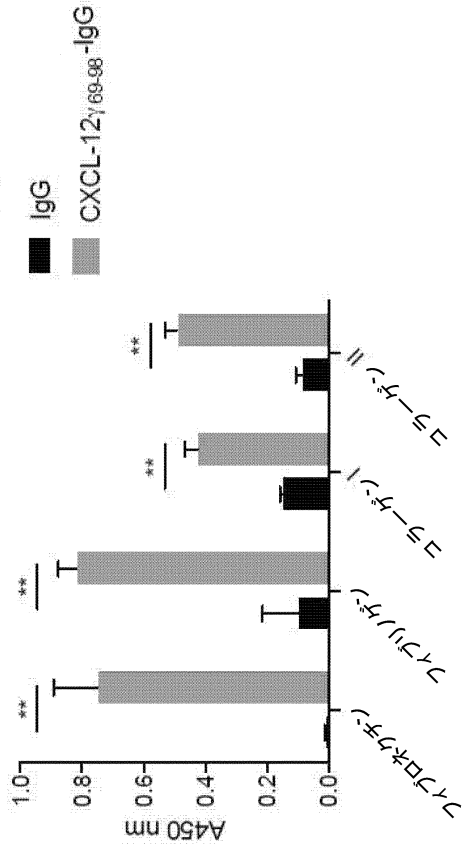
40

50

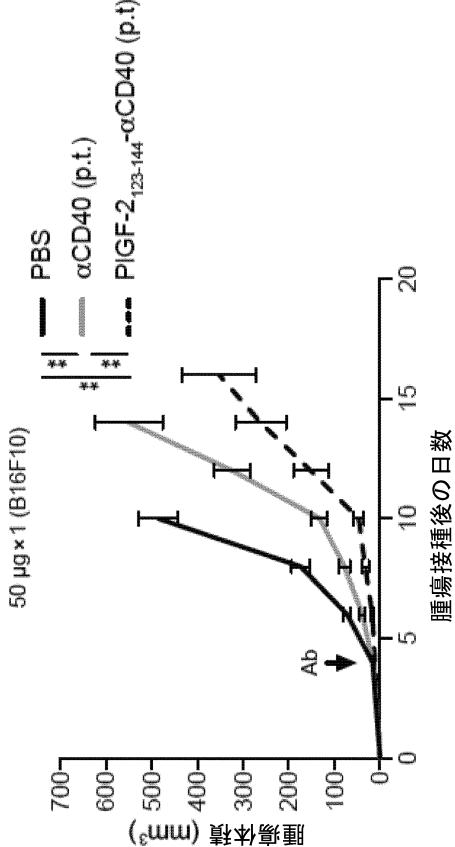
【図 2 5】



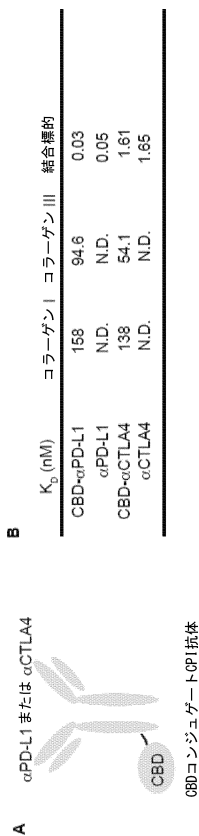
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



10

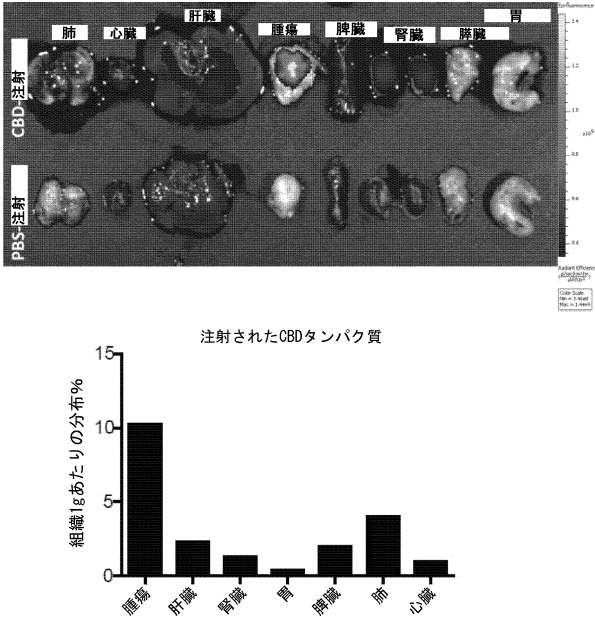
20

30

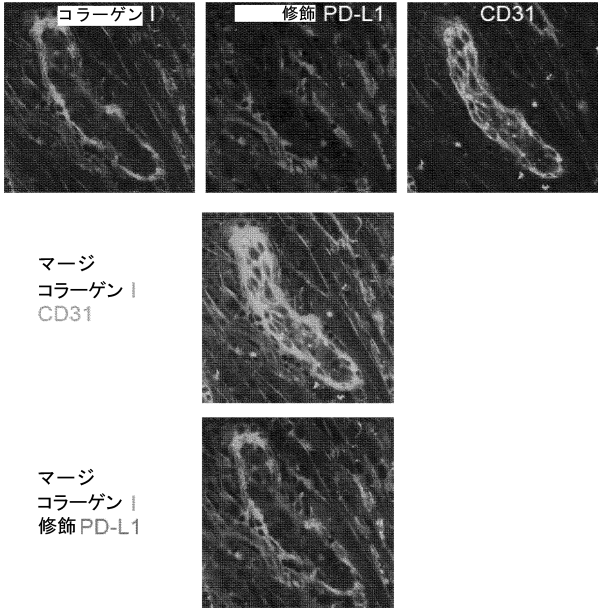
40

50

【図 29 A】

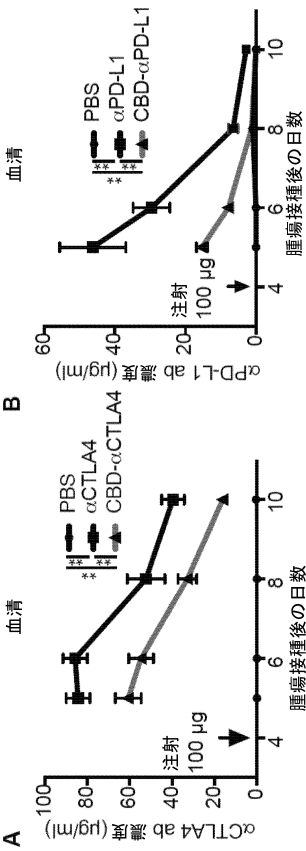


【図 29 B】

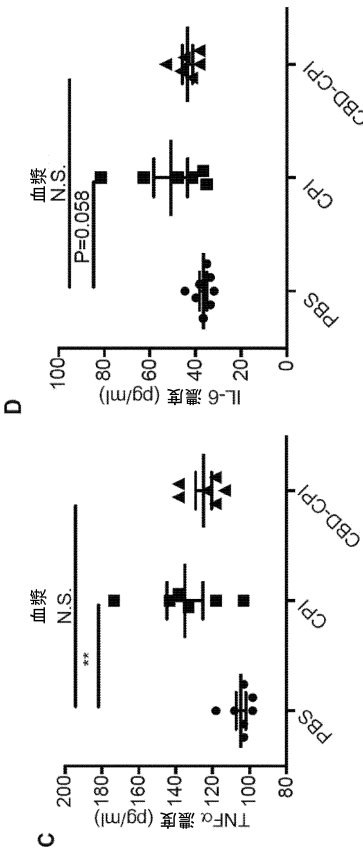


10

【図 30 - 1】



【図 30 - 2】



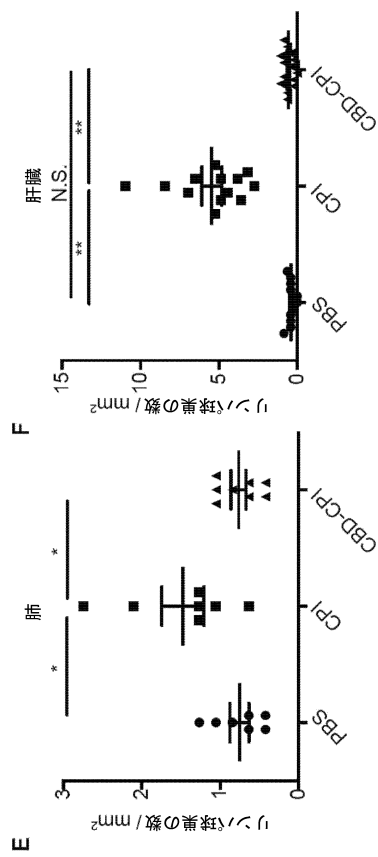
20

30

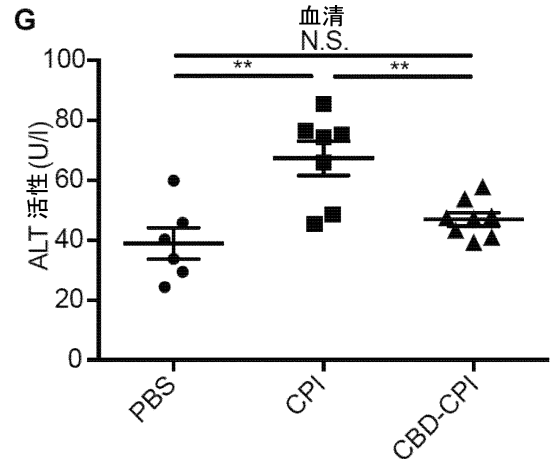
40

50

【図 3 0 - 3】



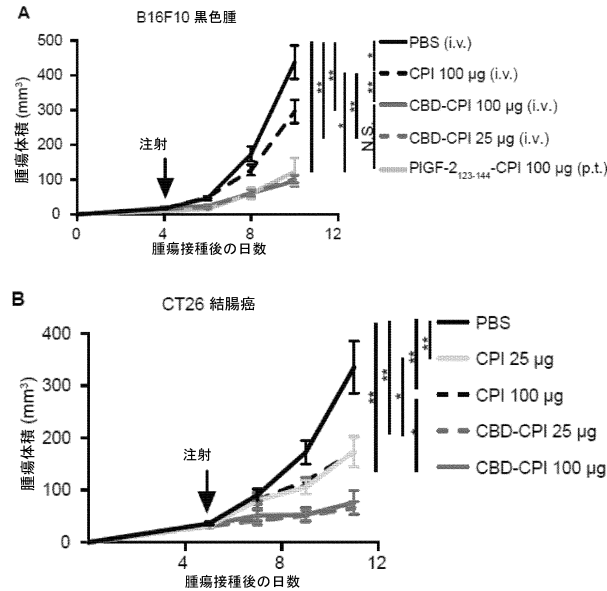
【図 3 0 - 4】



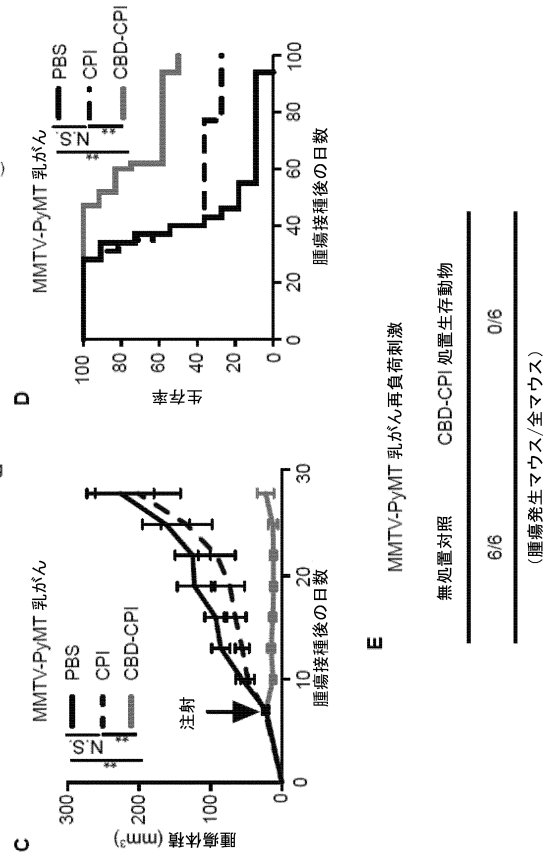
10

20

【図 3 1 - 1】



【図 3 1 - 2】

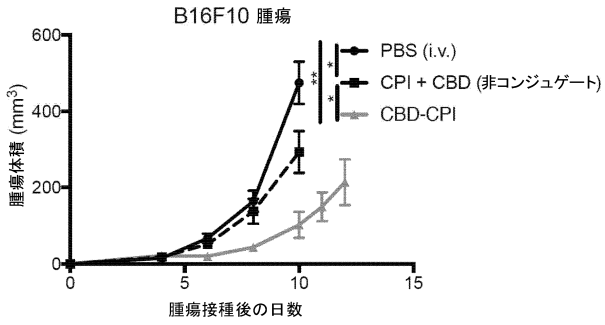


30

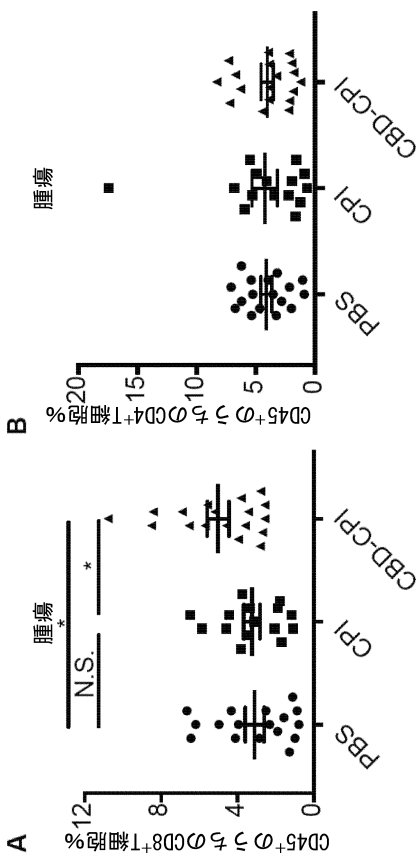
40

50

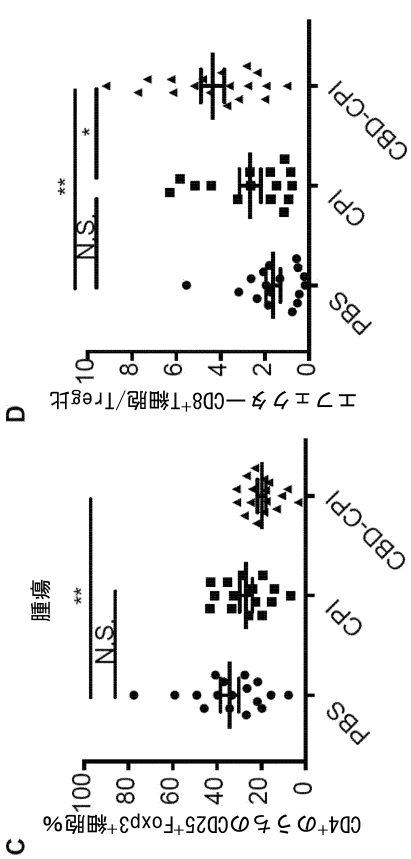
【図 3 2】



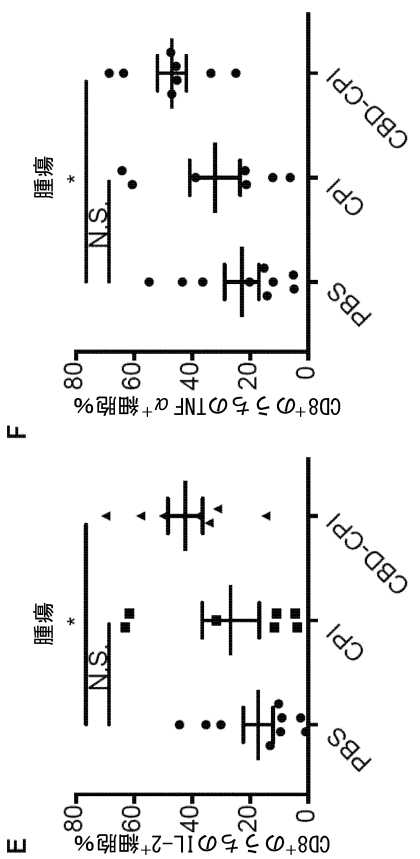
【図 3 3 - 1】



【図 3 3 - 2】



【図 3 3 - 3】



10

20

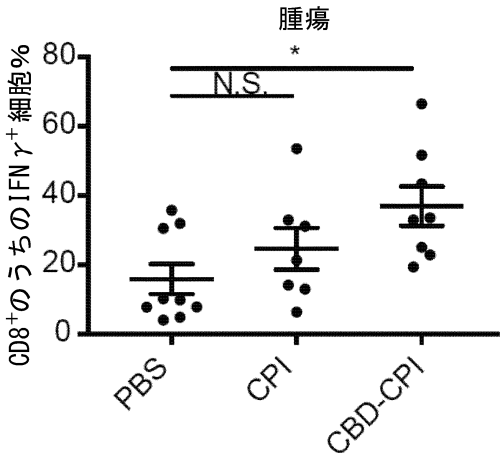
30

40

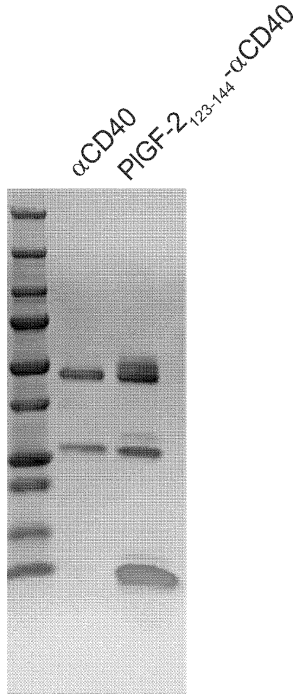
50

【図 3 3 - 4】

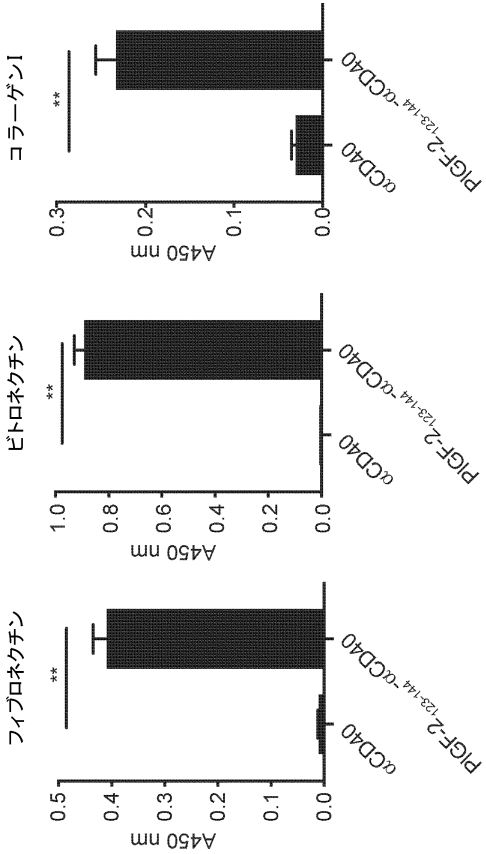
G



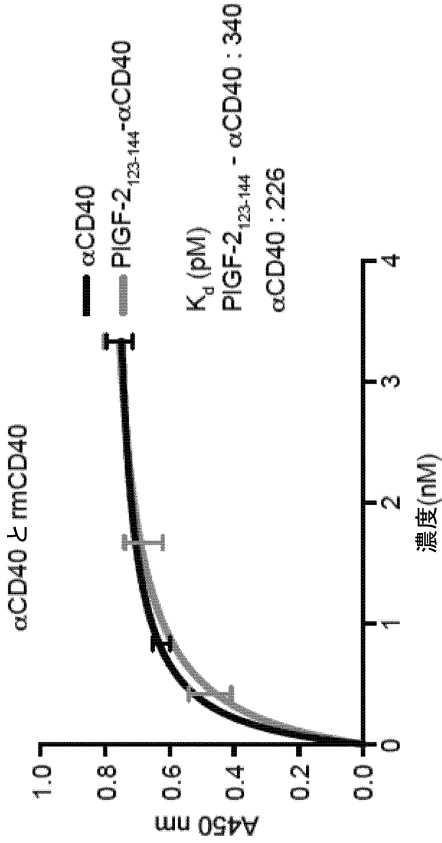
【図 3 4 A】



【図 3 4 B】



【図 3 4 C】



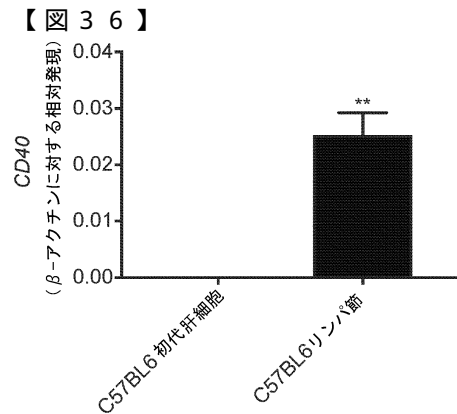
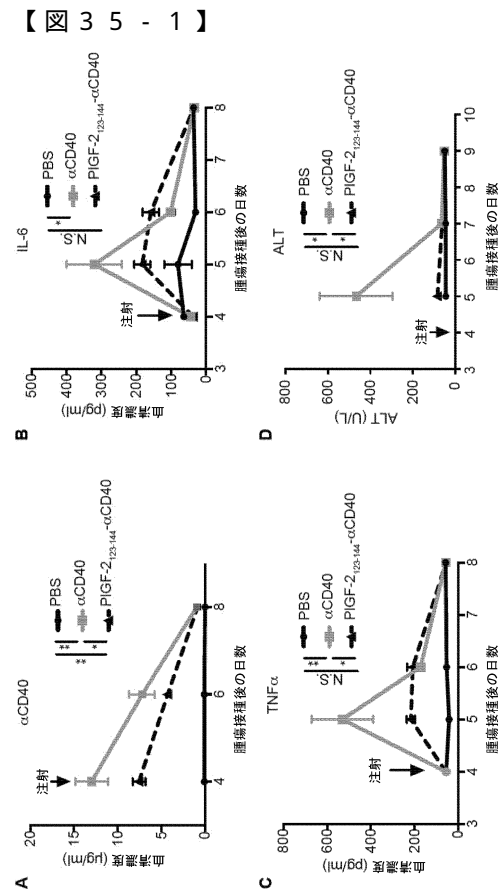
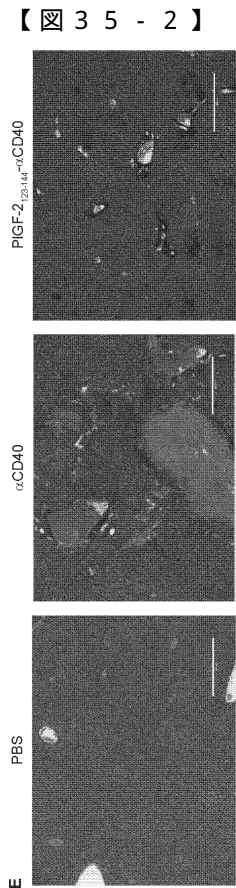
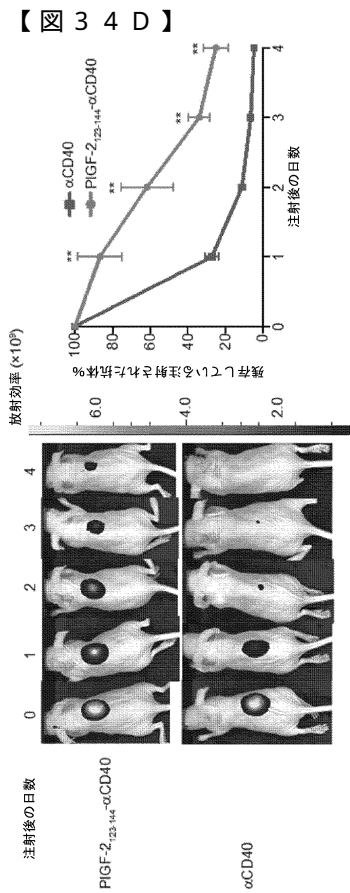
10

20

30

40

50



10

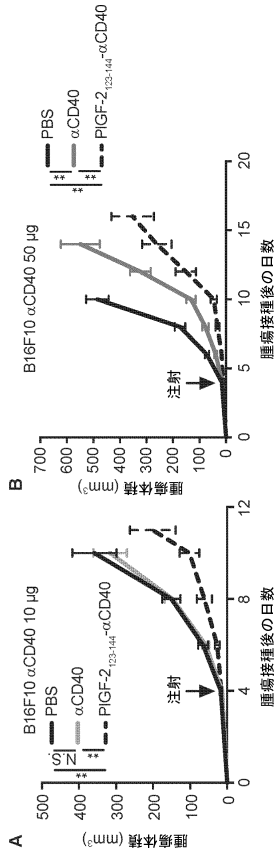
20

30

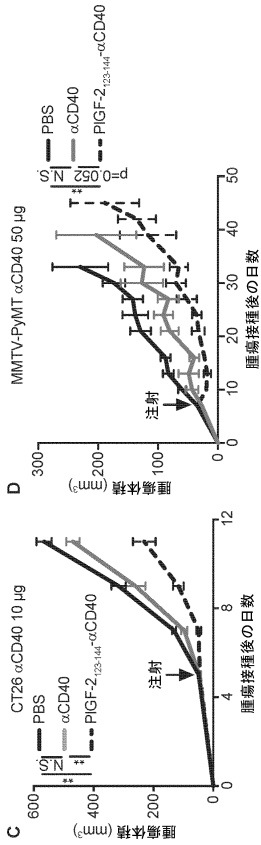
40

50

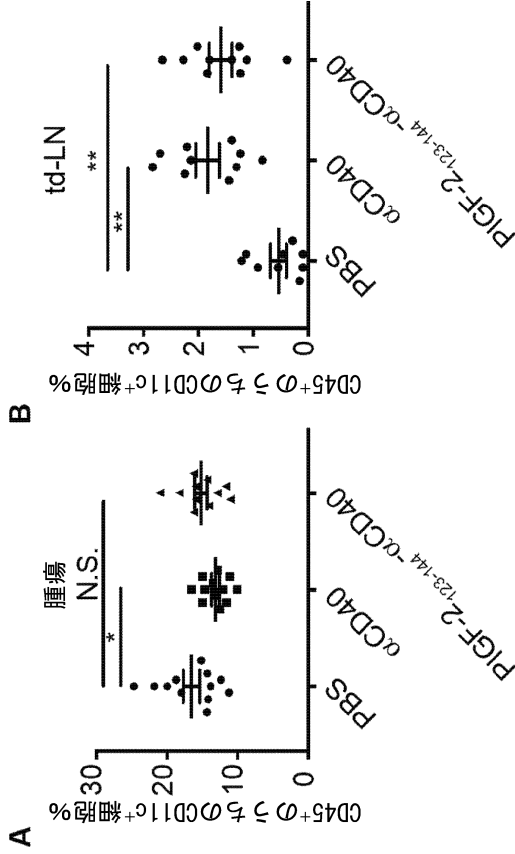
【図 3 7 - 1】



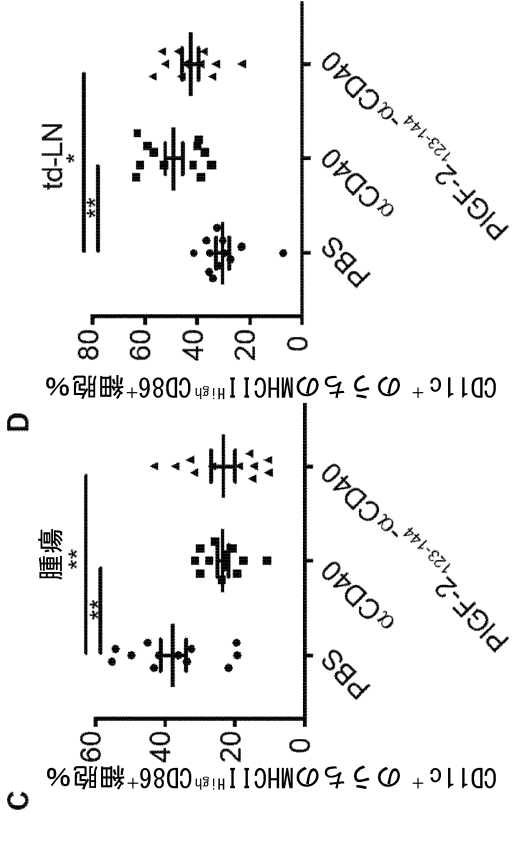
【図 3 7 - 2】



【図 3 8 - 1】



【図 3 8 - 2】



10

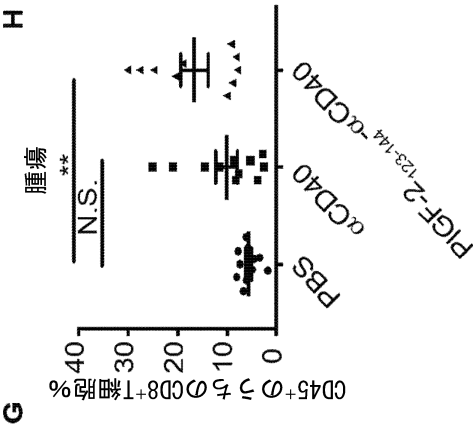
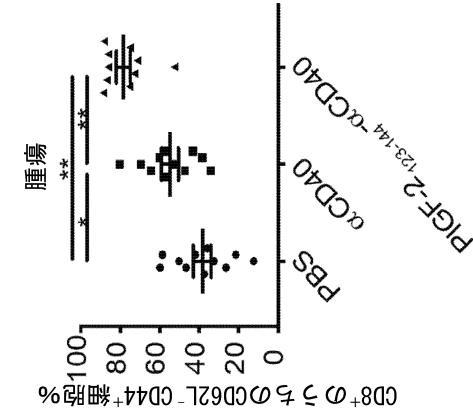
20

30

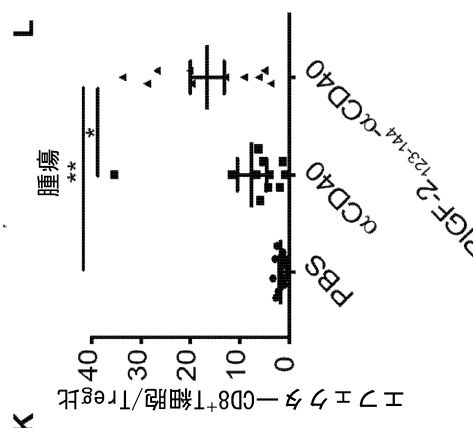
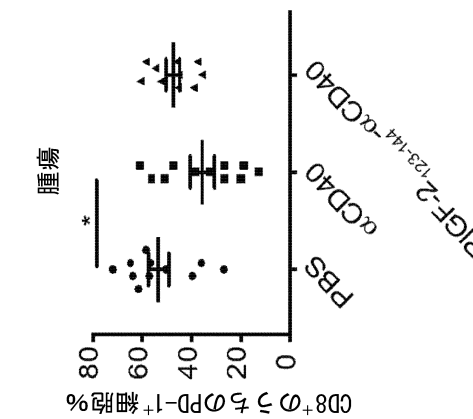
40

50

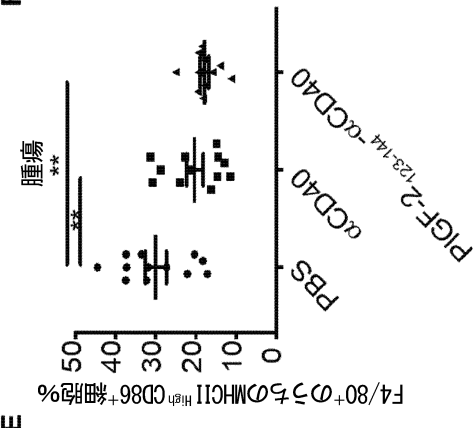
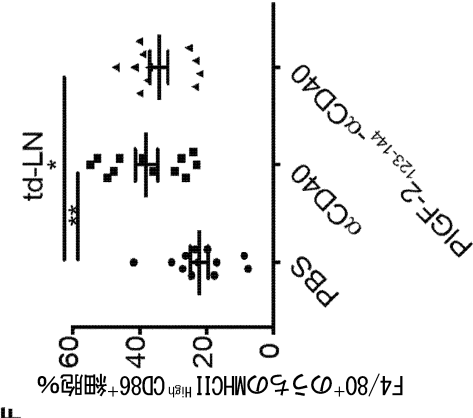
【図 38 - 4】



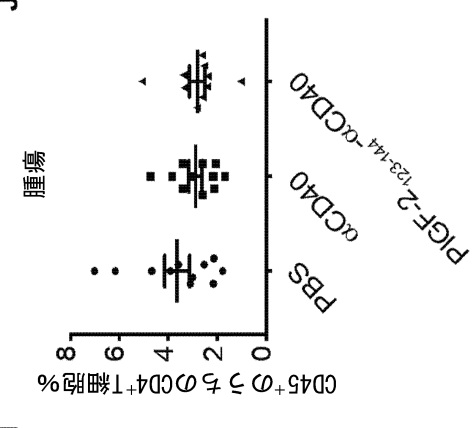
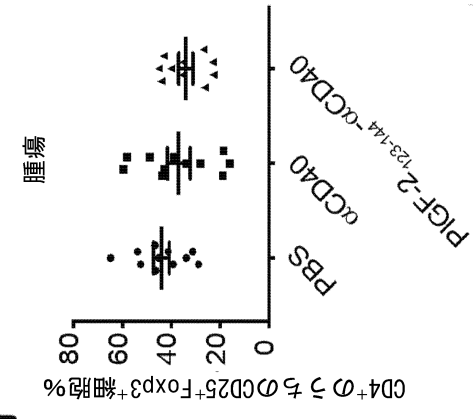
【図 38 - 5】



【図 38 - 3】



【図 38 - 6】



10

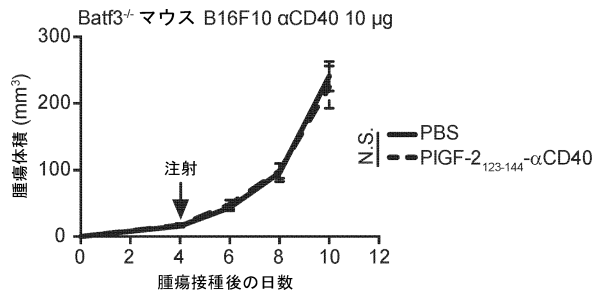
20

30

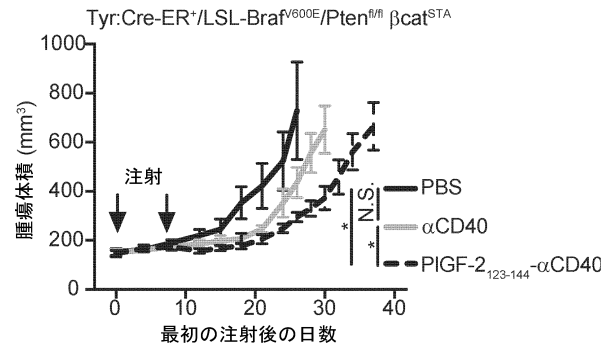
40

50

【図 4 0 B】

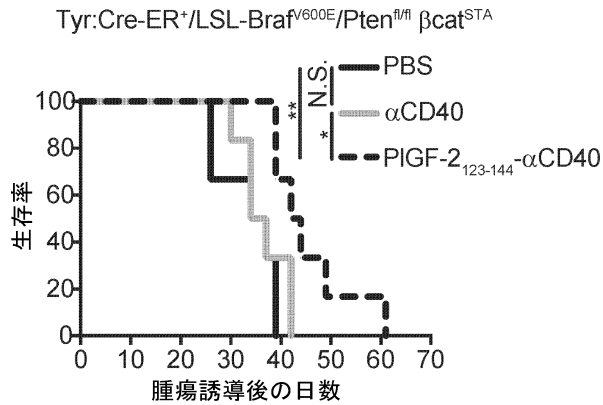


【図 4 1 A】

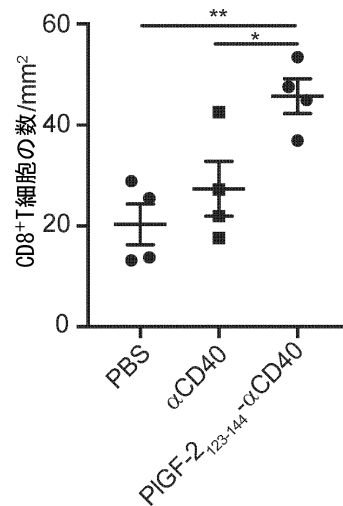


10

【図 4 1 B】

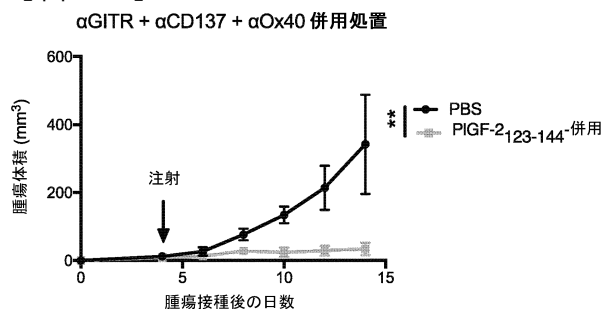


【図 4 1 C】

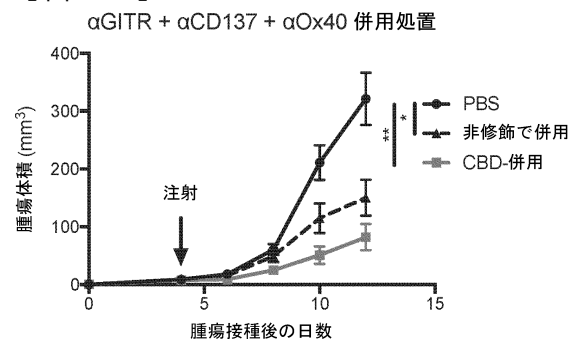


20

【図 4 2】



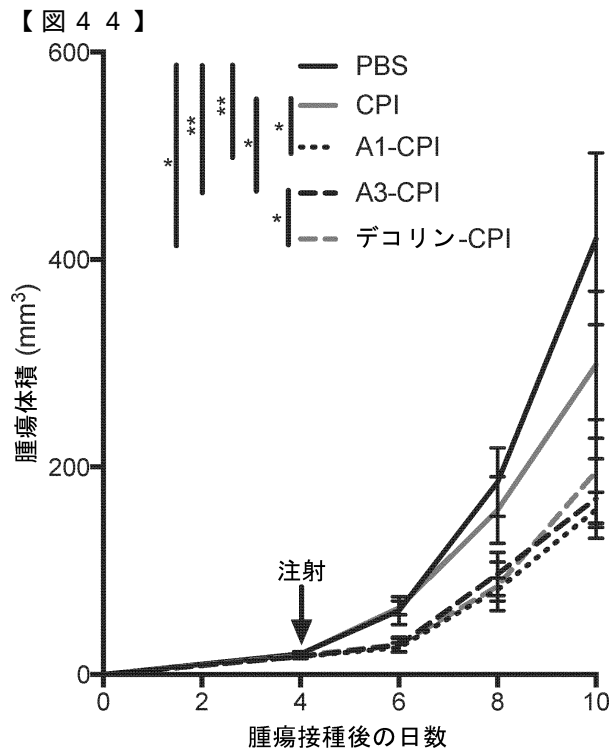
【図 4 3】



30

40

50



【配列表】

[0007419070000001.app](#)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	38/19	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	38/19	
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
			C 0 7 K	16/28	
			C 0 7 K	19/00	

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ハッベル ジェフリー エイ .
アメリカ合衆国 6 0 6 1 5 イリノイ州 シカゴ サウス ハーパー アベニュー 5 1 1 3 スイート 2シー ユニバーシティー オブ シカゴ ポリスキー センター フォア アントゥレプレナーシップ アンド イノベーション

(72)発明者 石原 純
アメリカ合衆国 6 0 6 1 5 イリノイ州 シカゴ サウス ハーパー アベニュー 5 1 1 3 スイート 2シー ユニバーシティー オブ シカゴ ポリスキー センター フォア アントゥレプレナーシップ アンド イノベーション

(72)発明者 石原 亜香
アメリカ合衆国 6 0 6 1 5 イリノイ州 シカゴ サウス ハーパー アベニュー 5 1 1 3 スイート 2シー ユニバーシティー オブ シカゴ ポリスキー センター フォア アントゥレプレナーシップ アンド イノベーション

(72)発明者 福永 和人
アメリカ合衆国 6 0 6 1 5 イリノイ州 シカゴ サウス ハーパー アベニュー 5 1 1 3 スイート 2シー ユニバーシティー オブ シカゴ ポリスキー センター フォア アントゥレプレナーシップ アンド イノベーション

(72)発明者 シュワルツ メロディー
アメリカ合衆国 6 0 6 1 5 イリノイ州 シカゴ サウス ハーパー アベニュー 5 1 1 3 スイート 2シー ユニバーシティー オブ シカゴ ポリスキー センター フォア アントゥレプレナーシップ アンド イノベーション

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 0 5 4 1 0 7 (W O , A 1)

特表 2 0 1 5 - 5 2 7 3 0 7 (J P , A)

特表 2 0 0 3 - 5 3 2 6 8 1 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 7 / 0 0 9 8 4 2 (W O , A 2)

国際公開第 2 0 1 6 / 0 5 4 5 5 5 (W O , A 2)

Science , 2014年 , 343 , pp.885-888

The Journal of Biological Chemistry , 1995年 , 270(18) , pp.10822-10827

J Mol Biol. , 2016年11月24日 , 2017, 429 , pp. 32-47

(58)調査した分野 Scientific Reports , 2016年02月17日 , 6 , 18205, pp.1-14
(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K

C 0 7 K

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 / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)