

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7682104号
(P7682104)

(45)発行日 令和7年5月23日(2025.5.23)

(24)登録日 令和7年5月15日(2025.5.15)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	31/282 (2006.01)	A 6 1 K	31/282
A 6 1 K	31/519 (2006.01)	A 6 1 K	31/519
請求項の数 27 (全52頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-568309(P2021-568309)	(73)特許権者	500039463
(86)(22)出願日	令和2年5月14日(2020.5.14)		ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバ
(65)公表番号	特表2022-532402(P2022-532402 A)		ーシティ オブ テキサス システム
(43)公表日	令和4年7月14日(2022.7.14)		BOARD OF REGENTS, TH
(86)国際出願番号	PCT/US2020/032968		E UNIVERSITY OF TEX
(87)国際公開番号	WO2020/232292		AS SYSTEM
(87)国際公開日	令和2年11月19日(2020.11.19)		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス州
審査請求日	令和5年5月12日(2023.5.12)		, オースティン, ウェスト 7 番 ストリ
(31)優先権主張番号	62/848,123		ート 2 1 0
(32)優先日	令和1年5月15日(2019.5.15)		2 1 0 West 7 th Street
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		Austin, Texas 7 8 7 0 1
前置審査		(74)代理人	U. S. A.
			100102978
		(74)代理人	弁理士 清水 初志
			100205707
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 非小細胞肺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】

CD70標的指向性分子を含む薬学的組成物であって、
薬学的組成物が、
(a) EGFR TKI処置に耐性がある患者におけるEGFR変異体非小細胞肺がん(NSCLC)を処置するための、または
(b) EGFR TKI処置に耐性がある患者における上皮間葉転換(EMT)陽性NSCLCを処置するための
薬学的組成物であり、
CD70標的指向性分子が、抗CD70抗体またはそのCD70結合断片を含み、
抗CD70抗体またはそのCD70結合断片が、毒性分子にコンジュゲートされている、
前記薬学的組成物。

【請求項2】

(a) 患者が、EGFR変異体NSCLCを有すると決定されている、かつ/または
(b) NSCLCが肺腺がんを含む、かつ/または
(c) 患者が非喫煙者である、かつ/または
(d) EGFR変異体が活性化変異を含む、かつ/または
(e) EGFR変異がクラスI、IIもしくはIII EGFR変異を含む、かつ/または
(f) 患者が、がん細胞におけるCD70発現について試験されていないか、もしくは患者が、CD70発現がん細胞を有すると決定されている、

請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項3】

活性化変異がL858Rもしくはエクソン19における欠失を含む、請求項2(d)記載の薬学的組成物。

【請求項4】

(a) 患者が、NSCLCの処置を以前に受けている、かつ/または

(b) 以前の処置が、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)療法を含み、療法が、1つもしくは複数のEGFR TKIの投与を含む、かつ/または

(c) 以前の処置が単剤EGFR TKI療法を含むか、もしくは以前の処置が少なくとも2つのEGFR TKIの組み合わせの投与を含む、かつ/または

(d) 患者が、継続的なEGFR TKI療法を受けている間に、全身的な疾患進行があると決定された、

請求項1～3のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項5】

患者が以前の処置に対する耐性を獲得したと決定されている、請求項4(a)記載の薬学的組成物。

【請求項6】

EGFR TKI療法が、オシメルチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、およびブリガチニブのうちの1つまたは複数の投与を含む、請求項4(b)～4(d)のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項7】

さらなる療法と組み合わせて使用される、請求項1～6のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項8】

(a) さらなる療法が化学療法、放射線、外科手術、TKI療法、もしくは免疫療法を含む、かつ/または

(b) さらなる療法がデュルバルマブ、アテゾリズマブ、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、ネシツムマブ、およびベバシズマブのうちの1つもしくは複数の投与を含む、かつ/または

(c) さらなる療法がカルボプラチン、ペメトレキセド、nab-パクリタキセル、フォトリニ、シスプラチン、ドセタキセル、ゲムシタビン、パクリタキセル、およびビンORELビンのうちの1つもしくは複数の投与を含む、かつ/または

(d) さらなる療法がアレクチニブ、ロルラチニブ、およびセリチニブのうちの1つもしくは複数の投与を含む、かつ/または

(e) さらなる療法が、オシメルチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、およびブリガチニブのうちの1つもしくは複数の投与を含む、

請求項7記載の薬学的組成物。

【請求項9】

さらなる療法がオシメルチニブの投与を含む、請求項8記載の薬学的組成物。

【請求項10】

アジュバント療法および/またはネオアジュバント療法と組み合わせて使用される、請求項1～7および請求項8(a)～8(d)のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項11】

患者がALK変異体であると決定されているか、もしくは患者がALK変異体ではないと決定されている、請求項1～10のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項12】

さらなる療法が、毒性分子に連結された二次抗体の投与を含む、請求項11記載の薬学的組成物。

【請求項13】

二次抗体および毒性分子が、切断可能なリンカーを通じて連結されている、請求項12記

10

20

30

40

50

載の薬学的組成物。

【請求項 1 4】

- (i) 抗体がヒト化抗体もしくはキメラ抗体である、かつ/もしくは
- (ii) 抗体がクサツズマブもしくはボルセツズマブを含む、

請求項1～13のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 1 5】

(I) 毒性分子が、モノメチルアウリスタチンE (MMAE)、モノメチルアウリスタチンF (MMAF)、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)、もしくはデュオカルマイシンを含む、かつ/もしくは

(II) CD70標的指向性分子が、クサツズマブ-MMAE、ボルセツズマブ-MMAE、もしくはその組み合わせを含む、

請求項1～14のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 1 6】

(a) CD70標的指向性分子が、CD70抗体からの重鎖可変領域および/もしくは軽鎖可変領域を含む、かつ/または

(b) CD70標的指向性分子が、重鎖可変領域からのCDR1、CDR2およびCDR3、ならびに/もしくは軽鎖可変領域からのCDR1、CDR2およびCDR3を含む、かつ/または

(c) CD70標的指向性分子が、一本鎖可変断片(scFV)を含む、

請求項1～15のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 1 7】

患者由来の生物学的サンプルが、1つまたは複数のEMTマーカーに対して陽性であると決定されている、請求項1～16のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 1 8】

(a) 生物学的サンプルが腫瘍細胞および/もしくは腫瘍関連細胞を含む、かつ/または

(b) 生物学的サンプルが生検材料を含む、かつ/または

(c) 1つもしくは複数のEMTマーカーが、上皮マーカーの低減および/もしくは間葉マーカーの増加を含む、

請求項17記載の薬学的組成物。

【請求項 1 9】

EMTマーカーが、CDH1、VIM、AXL、ZEB1、およびZEB2のうちの1つまたは複数を含む、請求項17または18記載の薬学的組成物。

【請求項 2 0】

1つまたは複数のさらなる治療剤を含む、請求項1～19のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1】

(a) さらなる治療剤が化学療法、放射線、外科手術、免疫療法、もしくはその組み合わせを含む、かつ/または

(b) さらなる治療剤がデュルバルマブ、アテゾリズマブ、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、ネシツムマブ、およびベバシズマブのうちの1つもしくは複数を含む、かつ/または

(c) さらなる治療剤がカルボプラチン、ペメトレキセド、nab-パクリタキセル、フォトフリン、シスプラチン、ドセタキセル、ゲムシタビン、パクリタキセル、およびビンOREルビンのうちの1つもしくは複数を含む、

請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項 2 2】

(a) さらなる治療剤がアレクチニブ、ロルラチニブ、およびセリチニブのうちの1つもしくは複数を含む、かつ/または

(b) さらなる治療剤がオシメルチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、およびブリガチニブのうちの1つもしくは複数を含む、

請求項21記載の薬学的組成物。

【請求項 2 3】

10

20

30

40

50

さらなる治療剤がオシメルチニブを含む、請求項21または22記載の薬学的組成物。

【請求項24】

- (a) さらなる治療剤が、毒性分子に連結された二次抗体を含む、かつ/または
- (b) 抗体がヒト化抗体もしくはキメラ抗体である、かつ/または
- (c) 抗体がクサツズマブもしくはボルセツズマブを含む、かつ/または
- (d) 抗体が分子にコンジュゲートされている、

請求項21記載の薬学的組成物。

【請求項25】

二次抗体および毒性分子が切断可能なリンカーを通じて連結されている、請求項24(a)記載の薬学的組成物。

【請求項26】

分子が毒性分子である、請求項24または25記載の薬学的組成物。

【請求項27】

毒性分子が、モノメチルアウリスタチンE(MMAE)、デュオカルマイシン、モノメチルアウリスタチンF(MMAF)、もしくはピロロベンゾジアゼピン(PBD)を含む、かつ/もしくはCD70標的指向性分子が、クサツズマブ-MMAE、ボルセツズマブ-MMAE、もしくはその組み合わせを含む、請求項26記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2019年5月15日付で出願された米国特許仮出願第62/848,123号の優先権を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成金番号CA190628の下で政府の支援を受けてなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

1. 発明の分野

本発明は、分子生物学および医学の分野に関する。

【背景技術】

【0004】

2. 背景

非小細胞肺癌(NSCLC)は、小細胞肺癌(SCLC)以外のあらゆるタイプの上皮性肺癌である。NSCLCは全ての肺癌の約85%を占めている。クラスとして、NSCLCは小細胞肺癌と比較して、化学療法に比較的非感受性である。可能であれば、それらは治療を目的として外科的切除により主に処置されるが、術前(ネオアジュバント化学療法)と術後(アジュバント化学療法)の両方で化学療法が使われることが多くなっている。

【0005】

EGFR変異体NSCLCの患者は、最初はEGFR標的療法に応答する。しかしながら、耐性疾患が必然的に出現し、耐性症例のほぼ半数において、腫瘍はT790Mなどの二次EGFR変異を欠き、第2世代および第3世代のEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)に耐性である。当技術分野においてはさらなる治療アプローチが必要である。

【発明の概要】

【0006】

本開示の局面は、CD70標的指向性分子を患者に投与する段階を含む、患者におけるEGFR変異体非小細胞肺癌(NSCLC)を処置するための方法に関する。本開示のさらなる局面は、CD70標的指向性分子を患者に投与する段階を含む、患者における上皮間葉転換(EMT)陽性NSCLCを処置するための方法に関する。本開示のさらなる局面は、CD70標的指向性分子および1つまたは複数のさらなる治療剤を含む組成物に関する。

【0007】

いくつかの態様において、患者は、EGFR変異体NSCLCを有すると決定されている。い

10

20

30

40

50

くつかの態様において、NSCLCは肺腺がんを含む。いくつかの態様において、患者は非喫煙者である。いくつかの態様において、患者はヒトである。

【0008】

EGFR変異体がんという用語は、EGFR (上皮成長因子受容体)の発現または活性が変化したがんをいう。変異はEGFRのコード領域中にある可能性があり、内因性EGFRの発現レベルまたは結果として生じるタンパク質の活性レベルに影響を与える。変異はプロモーター領域、3'もしくは5' UTR、またはイントロン領域中などの、遺伝子の非コード部分中にもある可能性がある。いくつかの態様において、EGFR変異は機能獲得型変異である。いくつかの態様において、EGFR変異は機能喪失型である。いくつかの態様において、EGFR変異は活性化変異を含む。いくつかの態様において、活性化変異はL858Rを含む。いくつかの態様において、活性化変異はエクソン19における欠失を含む。いくつかの態様において、EGFR変異は、これらの他の変異の代わりにまたはそれに加えて、以下の変異のうちの1つまたは複数を含む: G719S (c.2155G> A)、G719C (c.2155G> T)、G719A (c.2156G> C)、S720F (c.2159C> T)、エクソン19欠失または部分欠失、D761Y (c.2281G> T)、D770_N771 (insNPG)、D770_N771 (insSVQ)、D770_N771 (insG)、V765A (c.2294T> C)、T783A (c.2347A> G)、S7681I (c.2303G> T)、T790M (c.2369C> T)、V769L (c.2305G> T)、N771T (c.2312A> C)、L858R (C.2573T> G)、L861Q (c.2582T> A)、L861R (c.2582T> G)。いくつかの態様において、EGFR変異はクラスI、IIまたはIII EGFR変異を含む。いくつかの態様において、EGFR変異はdelE746-A750、delL747-P753insS、delL747-T751、delL747-A750insP、p.L747_S752del、K754insANKG、delT751_I759insN、delL747_A750insP、delE746_T751insV、delT751_I759insS、delE746_T751insI、delL747_A755insSKG、delE746_T751insVA、delL747_T751insP、delE746_S752insV、およびdelE746_A750insAPの少なくとも1つを含む。いくつかの態様において、EGFR変異は、delE746-A750、delL747-P753insS、delL747-T751、delL747-A750insP、p.L747_S752del、K754insANKG、delT751_I759insN、delL747_A750insP、delE746_T751insV、delT751_I759insS、delE746_T751insI、delL747_A755insSKG、delE746_T751insVA、delL747_T751insP、delE746_S752insV、およびdelE746_A750insAPから選択される少なくとも1つのクラスI変異を含む。いくつかの態様において、EGFR変異は、エクソン19におけるインフレーム欠失または部分欠失を含む。いくつかの態様において、EGFR変異は、G719S (c.2155G> A)、G719C (c.2155G> T)、G719A (c.2156G> C)、S720F (c.2159C> T)、D761Y (c.2281G> T)、V765A (c.2294T> C)、T783A (c.2347A> G)、S7681I (c.2303G> T)、T790M (c.2369C> T)、V769L (c.2305G> T)、N771T (c.2312A> C)、L858R (C.2573T> G)、L861Q (c.2582T> A)、およびL861R (c.2582T> G)の少なくとも1つを含む。いくつかの態様において、EGFR変異は、G719S (c.2155G> A)、G719C (c.2155G> T)、G719A (c.2156G> C)、S720F (c.2159C> T)、D761Y (c.2281G> T)、V765A (c.2294T> C)、T783A (c.2347A> G)、S7681I (c.2303G> T)、T790M (c.2369C> T)、V769L (c.2305G> T)、N771T (c.2312A> C)、L858R (C.2573T> G)、L861Q (c.2582T> A)、およびL861R (c.2582T> G)から選択される少なくとも1つのクラスII変異を含む。いくつかの態様において、EGFR変異は、単一のヌクレオチド置換を含む。いくつかの態様において、EGFR変異は、D770_N771 (insNPG)、D770_N771 (insSVQ)、D770_N771 (insG)の少なくとも1つを含む。いくつかの態様において、EGFR変異は、D770_N771 (insNPG)、D770_N771 (insSVQ)、D770_N771 (insG)から選択される少なくとも1つのクラスIII変異を含む。いくつかの態様において、EGFR変異は、エクソン20におけるインフレーム重複または挿入を含む。これらの変異の少なくともまたは多くとも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、もしくは60 (またはその中で導出可能な任意の範囲)が、本明細書において記述される態様において決定され、知ら

10

20

30

40

50

れ、または使用されることが企図される。特定の態様において、これらの変異の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上が、1つの態様において除外されうる。

【0009】

いくつかの態様において、患者は、患者由来のがん細胞におけるCD70発現について試験されていない。いくつかの態様において、患者は、CD70発現がん細胞を有すると決定されている。いくつかの態様において、患者はNSCLCの処置を以前に受けている。いくつかの態様において、患者は、以前の処置に対する耐性を獲得したと決定されている。いくつかの態様において、以前の処置はEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)療法を含み、ここでこの療法は1つまたは複数のEGFR TKIを含む。いくつかの態様において、以前の処置は、単剤EGFR TKI療法を含む。いくつかの態様において、以前の処置は、少なくとも2つのEGFR TKIの組み合わせを含む。いくつかの態様において、患者は、少なくとも2つのEGFR TKIに耐性があると決定されている。いくつかの態様において、継続的なEGFR TKI療法を受けている間に、全身的な疾患進行があると決定された。いくつかの態様において、EGFR TKI療法は、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、およびブリガチニブのうちの1つまたは複数を含む。いくつかの態様において、EGFR TKI療法は、エルロチニブ、ゲフィチニブ、およびオシメルチニブのうちの1つまたは複数を含む。いくつかの態様において、EGFR TKI療法は、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、およびブリガチニブのうちの少なくとも2つを含む。いくつかの態様において、EGFR TKI療法は、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、およびブリガチニブのうちの少なくとも3つを含む。いくつかの態様において、EGFR TKI療法は、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、およびブリガチニブのうちの少なくとも4つを含む。これらの1つまたは複数がEGFR TKI療法として除外されることが特に企図される。

【0010】

いくつかの態様において、本方法はさらなる療法の実施をさらに含むか、または組成物はさらなる治療剤を含む。いくつかの態様において、さらなる療法または薬剤は、化学療法、放射線、外科手術、TKI療法、または免疫療法を含む。いくつかの態様において、さらなる療法または薬剤は、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、ネシツムマブ、およびベバシズマブのうちの1つまたは複数を含む。いくつかの態様において、さらなる療法または薬剤は、カルボプラチン、ペメトレキセド、nab-パクリタキセル、フォトリニ、シスプラチン、ドセタキセル、ゲムシタビン、パクリタキセル、およびビノレルビンのうちの1つまたは複数を含む。いくつかの態様において、さらなる療法または薬剤は、アレクチニブ、ロルラチニブ、およびセリチニブのうちの1つまたは複数を含む。いくつかの態様において、さらなる療法または薬剤は、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、ブリガチニブ、およびそれらの組み合わせのうちの1つまたは複数を含む。いくつかの態様において、さらなる療法または薬剤は、オシメルチニブを含む。いくつかの態様において、本方法は、アジュバント療法および/またはネオアジュバント療法の実施をさらに含む。いくつかの態様において、さらなる療法は、CD70標的指向性療法にコンジュゲートまたは連結されうる。いくつかの態様において、連結は化学的リンカーを介する。いくつかの態様において、連結はペプチド結合を介する(例えば、CD70標的指向性剤とさらなる治療剤とを含む融合タンパク質)。

【0011】

いくつかの態様において、患者は、ALK変異体であると決定されている。いくつかの態様において、患者は、ALK変異体ではないと決定されている。

【0012】

いくつかの態様において、CD70標的指向性分子は、抗CD70抗体またはそのCD70結合断片を含む。いくつかの態様において、抗体はヒト抗体またはキメラ抗体である。いくつかの態様において、抗体は分子にコンジュゲートされている。いくつかの態様において

10

20

30

40

50

、抗体は毒性分子にコンジュゲートされている。いくつかの態様において、毒性分子は、モノメチルアウリスタチンE (MMAE)、モノメチルアウリスタチンF (MMAF)、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)、デュオカルマイシン、またはそれらの組み合わせを含む。

【0013】

いくつかの態様において、CD70標的指向性分子は、CD70抗体からの重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、CD70標的指向性分子は、重鎖可変領域からのCDR1、CDR2およびCDR3、ならびに/または軽鎖可変領域からのCDR1、CDR2およびCDR3を含む。重鎖および軽鎖可変領域は、CD70抗体からのものであるか、またはCD70抗体に由来しうる。いくつかの態様において、CD70標的指向性分子は、一本鎖可変断片(scFv)を含む。scFvは抗CD70抗体由来の重鎖可変領域からのCDR1、CDR2およびCDR3、ならびに/または軽鎖可変領域からのCDR1、CDR2およびCDR3などの、超可変領域を含みうる。いくつかの態様において、抗体はクサツズマブまたはボルセツズマブを含む。いくつかの態様において、CD70標的指向性分子は、クサツズマブまたはボルセツズマブ由来の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、CD70標的指向性分子は、クサツズマブの重鎖可変領域からのCDR1、CDR2およびCDR3、ならびに/またはクサツズマブの軽鎖可変領域からのCDR1、CDR2およびCDR3を含む。いくつかの態様において、CD70標的指向性分子は、ボルセツズマブの重鎖可変領域からのCDR1、CDR2およびCDR3、ならびに/またはボルセツズマブの軽鎖可変領域からのCDR1、CDR2およびCDR3を含む。

【0014】

いくつかの態様において、本開示の方法および組成物におけるさらなる療法または薬剤は、毒性分子に連結された二次抗体を含む。例えば、併用療法は、毒性分子にコンジュゲートされたCD70標的指向性抗体に結合する二次抗体を含むコンジュゲートを含む薬剤と組み合わせた、CD70標的指向性抗体を含みうる。したがって、そのような薬剤の組み合わせは、二次抗体を通じて毒性分子に連結された抗体を送達する。いくつかの態様において、二次抗体および毒性分子は、切断可能なリンカーを通じて連結されている。

【0015】

いくつかの態様において、CD70標的指向性分子は、二重特異性T細胞エンゲージャ(BiTE)、キメラ抗原受容体(CAR)、CARを含むT細胞、または三重特異性ナチュラルキラー細胞エンゲージャ療法(TriNKET)を含む。いくつかの態様において、BiTE、CAR、またはTriNKETは、クサツズマブまたはボルセツズマブの重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域に由来する。いくつかの態様において、BiTE、CAR、またはTriNKETは、クサツズマブもしくはボルセツズマブのCDR1、CDR2、およびCDR3を含む重鎖、ならびに/またはクサツズマブもしくはボルセツズマブのCDR1、CDR2、およびCDR3を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、CD70標的指向性分子は、クサツズマブ-MMAE、ボルセツズマブ-MMAE、またはその組み合わせを含む。いくつかの態様において、CD70標的指向性分子はSGN-75、SGN-CD70A、AMG 172、および/またはARGX-110を含む。SGN-75はCD70遮断IgG1抗体-薬物コンジュゲート(ADC)であり、これはCD70発現腫瘍細胞への内部移行によって細胞死滅化剤を放出する。SGN-CD70Aは、細胞毒性薬を備えたCD70遮断抗体を含む。SGN-CD70Aは、CD70に対する抗体に安定的に連結された、非常に強力な細胞毒性であるピロロベンゾジアゼピン二量体を含む。AMG172はIgG1 ADCであり、CD70発現腫瘍細胞への結合と内部移行が中期停止を誘発し、続いて細胞アポトーシスおよび最終的には腫瘍細胞死を引き起こす。ARGX-110はCD70遮断IgG1モノクローナル抗体(mAb)を含み、その糖鎖工学的Fcドメインは、補体依存性細胞傷害(CDC)、抗体依存性細胞食作用(ADCP)特性および増強された抗体依存性細胞傷害(ADCC)を介してCD70発現腫瘍細胞の標的死滅化を媒介する。いくつかの態様において、患者由来の生物学的サンプルは、1つまたは複数のEMTマーカーに対して陽性であると決定されている。いくつかの態様において、1つまたは複数のEMTマーカーは、上皮マーカーの低減および/または間葉マーカーの増加を含む。いくつかの態様において、EMTマーカーは、CDH1、VIM、AXL、ZEB1、およびZEB2の1つ、2つ、3つ、4つ、または全5つを含む。いくつかの態様において、

10

20

30

40

50

生物学的サンプルは腫瘍細胞および/または腫瘍関連細胞を含む。

【0016】

本開示の方法および組成物において有用なCD70標的指向性分子は、当技術分野において公知である。例えば、CD70 CARが開発されており、本開示の態様において用いることができる。したがって、いくつかの態様において、CD70標的指向性分子はCTX130を含む。CTX130は、CRISPR Therapeuticsによって作出された、CD70を標的とする同種CRISPR/Cas9遺伝子編集CAR-T細胞療法である。いくつかの態様において、CD70標的指向性分子はALLO-316を含む。ALLO-316は、Allogeneによって開発されている抗CD70 AlloCAR T細胞療法である。さらなる態様はWang, QJ. et al., Clin Cancer Res. 2017 May 1;23(9):2267-2276に記述されており、これは参照により本明細書に組み入れられる。他の適応症に有用であると記述されているCD70標的指向性分子は、本開示の方法および組成物の態様において用いられうるものが企図される。いくつかの態様において、CD70標的指向性分子は、CD27などのCD70リガンドを含む。いくつかの態様において、CD70標的指向性分子は切断型CD27を含む。いくつかの態様において、CD70標的指向性分子は、41BBおよびCD3-ゼータなどの、CAR分子の膜貫通領域および細胞内シグナル伝達領域に融合されたCD27ポリペプチドであるCD27 CARを含む。CD27ポリペプチドは、完全長ポリペプチド、またはCD70と相互作用および結合するその断片もしくは切断型でありうる。本開示のCARは、T細胞またはNK細胞で発現されうる。

10

【0017】

いくつかの態様において、CD70標的指向性分子は、BiTE、CAR、またはTriNKETを含む細胞を含む。いくつかの態様において、細胞は幹細胞、前駆細胞、免疫細胞、またはナチュラルキラー(NK)細胞を含む。いくつかの態様において、細胞は造血幹細胞もしくは前駆細胞、T細胞、間葉系幹細胞(MSC)から分化した細胞、または人工多能性幹細胞(iPSC)を含む。いくつかの態様において、細胞は末梢血単核細胞(PBMC)から単離されるまたはそれに由来する。いくつかの態様において、T細胞は細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、CD8⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞、不変NK T (iNKT)細胞、ガンマ-デルタT細胞、NKT細胞、または調節性T細胞を含む。

20

【0018】

いくつかの態様において、生物学的サンプルは生検材料を含む。いくつかの態様において、生物学的サンプルは、細針吸引、コア針生検、真空補助下生検、切開生検、切除生検、パンチ生検、薄片生検または皮膚生検などの方法によって得られるものである。ある種の態様において、サンプルは、前述の生検方法のいずれかによる肺組織からの生検材料から得られる。他の態様において、サンプルは、非がん性またはがん性組織、および血清、胆嚢、粘膜、皮膚、心臓、肺、乳房、脾臓、血液、肝臓、筋肉、腎臓、平滑筋、膀胱、結腸、腸、脳、前立腺、食道、または甲状腺組織からの非がん性またはがん性組織を含むが、これらに限定されない、本明細書において提供される組織のいずれかより得られうる。あるいは、サンプルは、血液、汗、毛包、頬組織、涙、月経分泌物、糞便、または唾液を含むが、これらに限定されない、他の任意の供給源から得られうる。本方法のある種の局面において、医師、看護師または医療技術者などの、任意の医療専門家が、試験のために生物学的サンプルを得てもよい。さらに、生物学的サンプルは、医療専門家の支援なしに得ることができる。サンプルは、組織、細胞、または細胞由来のもしくは対象の細胞由来の生物学的材料を含みうるが、これらに限定されることはない。生物学的サンプルは、細胞または組織の不均一または均一な集団でありうる。生物学的サンプルは、本明細書において記述される分析方法に適したサンプルを提供できる当技術分野で知られている任意の方法を用いて得られうる。サンプルは、皮膚もしくは子宮頸部の掻き取り、頬の拭き取り、唾液採取、尿採取、糞便採取、月経分泌物、涙、または精液の採取を含むが、これらに限定されない、非侵襲的方法によって得られうる。サンプルは、当技術分野において公知の方法によって得られうる。ある種の態様において、サンプルは生検によって得られる。

30

40

【0019】

本明細書において用いられる場合、「または」および「および/または」という用語は、

50

複数の構成要素を組み合わせ、または互いに排他的に記述するために利用される。例えば、「x、y、および/またはz」は、「x」のみ、「y」のみ、「z」のみ、「x、y、およびz」、「(xおよびy)またはz」、「xまたは(yおよびz)」または「xまたはyまたはz」をいうことができる。x、y、またはzが態様から特に除外されることが特に企図される。

【0020】

本出願の全体を通じて、「約」という用語は、値にはその値を決定するために利用される装置または方法に対しての誤差の標準偏差が含まれることを示すために、細胞生物学の分野におけるその平易で通常の意味にしたがって用いられる。

【0021】

「含む(including)」、「含有する(containing)」または「によって特徴付けられる」と同義である「含む(comprising)」という用語は、包括的または自由形式であり、引用されていないさらなる要素または方法の段階を除外するものではない。「からなる」という語句は、指定されていない任意の要素、段階、または成分を除外する。「から本質になる」という語句は、記述された主題の範囲を、特定の材料または段階およびその基本かつ新規の特徴に実質的に影響を与えないものに限定する。「含む(comprising)」という用語の文脈のなかで記述された態様はまた、「からなる(consisting of)」または「から本質になる(consisting essentially of)」という用語の文脈のなかで実施されることが企図される。

【0022】

本発明の1つの態様に関して論じられた任意の制限が、本発明の他の任意の態様に適用されることが特に企図される。さらに、本発明の任意の組成物が本発明の任意の方法において用いられてもよく、本発明の任意の組成物を作出または利用するために本発明の任意の方法が用いられてもよい。実施例に記載された態様の局面はまた、異なる実施例中の他所にまたは本出願中の他所に、例えば発明の概要、態様の詳細な説明、特許請求の範囲、および図の凡例の説明に論じられている態様の文脈において実施されうべき態様である。

【0023】

[本発明1001]

CD70標的指向性分子を患者に投与する段階を含む、患者におけるEGFR変異体非小細胞肺癌(NSCLC)を処置するための方法。

[本発明1002]

CD70標的指向性分子を患者に投与する段階を含む、患者における上皮間葉転換(EMT)陽性NSCLCを処置するための方法。

[本発明1003]

患者が、EGFR変異体NSCLCを有すると決定されている、本発明1001または1002の方法。

[本発明1004]

NSCLCが肺腺がんを含む、本発明1001～1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

患者が非喫煙者である、本発明1001～1004のいずれかの方法。

[本発明1006]

EGFR変異体が活性化変異を含む、本発明1001～1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

活性化変異がL858Rまたはエクソン19における欠失を含む、本発明1006の方法。

[本発明1008]

EGFR変異がクラスI、IIまたはIII EGFR変異を含む、本発明1001～1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

患者が、がん細胞におけるCD70発現について試験されていない、本発明1001～1008のいずれかの方法。

[本発明1010]

10

20

30

40

50

患者が、CD70発現がん細胞を有すると決定されている、本発明1001～1008のいずれかの方法。

[本発明1011]

患者がNSCLCの処置を以前に受けている、本発明1001～1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

患者が、以前の処置に対する耐性を獲得したと決定されている、本発明1011の方法。

[本発明1013]

以前の処置がEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)療法を含み、該療法が1つまたは複数のEGFR TKIを含む、本発明1011または1012の方法。

[本発明1014]

以前の処置が、単剤EGFR TKI療法を含む、本発明1011～1013のいずれかの方法。

[本発明1015]

以前の処置が、少なくとも2つのEGFR TKIの組み合わせを含む、本発明1011～1013のいずれかの方法。

[本発明1016]

患者が、継続的なEGFR TKI療法を受けている間に、全身的な疾患進行があると決定された、本発明1011～1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

EGFR TKI療法が、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、およびブリガチニブのうちの1つまたは複数を含む、本発明1013～1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

さらなる療法の実施をさらに含む、本発明1001～1017のいずれかの方法。

[本発明1019]

さらなる療法が化学療法、放射線、外科手術、TKI療法、または免疫療法を含む、本発明1018の方法。

[本発明1020]

さらなる療法がデュルバルマブ、アテゾリズマブ、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、ネシツムマブ、およびバシズマブのうちの1つまたは複数を含む、本発明1018または1019の方法。

[本発明1021]

さらなる療法がカルボプラチン、ペメトレキセド、nab-パクリタキセル、フォトリニ、シスプラチン、ドセタキセル、ゲムシタビン、パクリタキセル、およびビノレルビンのうちの1つまたは複数を含む、本発明1018～1020のいずれかの方法。

[本発明1022]

さらなる療法がアレクチニブ、ロルラチニブ、およびセリチニブのうちの1つまたは複数を含む、本発明1018～1021のいずれかの方法。

[本発明1023]

さらなる療法がゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、およびブリガチニブのうちの1つまたは複数を含む、本発明1018～1022のいずれかの方法。

[本発明1024]

さらなる療法がオシメルチニブを含む、本発明1023の方法。

[本発明1025]

アジュバント療法および/またはネオアジュバント療法の実施をさらに含む、本発明1001～1022のいずれかの方法。

[本発明1026]

患者が、ALK変異体であると決定されている、本発明1001～1025のいずれかの方法。

[本発明1027]

患者が、ALK変異体ではないと決定されている、本発明1001～1025のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

[本発明1028]

CD70標的指向性分子が、抗CD70抗体またはそのCD70結合断片を含む、本発明1001～1027のいずれかの方法。

[本発明1029]

さらなる療法が、毒性分子に連結された二次抗体を含む、本発明1028の方法。

[本発明1030]

二次抗体および毒性分子が、切断可能なリンカーを通じて連結されている、本発明1029の方法。

[本発明1031]

抗体がヒト化抗体またはキメラ抗体である、本発明1028～1030のいずれかの方法。

10

[本発明1032]

抗体がクサツズマブまたはボルセツズマブを含む、本発明1028～1031のいずれかの方法。

[本発明1033]

抗体が分子にコンジュゲートされている、本発明1028～1032のいずれかの方法。

[本発明1034]

分子が毒性分子である、本発明1033の方法。

[本発明1035]

毒性分子が、モノメチルアウリスタチンE (MMAE)、モノメチルアウリスタチンF (MMAF)、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)、またはデュオカルマイシンを含む、本発明1034の方法。

20

[本発明1036]

CD70標的指向性分子が、クサツズマブ-MMAE、ボルセツズマブ-MMAE、またはその組み合わせを含む、本発明1034または1035の方法。

[本発明1037]

CD70標的指向性分子が、CD70抗体からの重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を含む、本発明1001～1036のいずれかの方法。

[本発明1038]

CD70標的指向性分子が、重鎖可変領域からのCDR1、CDR2およびCDR3、ならびに/または軽鎖可変領域からのCDR1、CDR2およびCDR3を含む、本発明1001～1037のいずれかの方法。

30

[本発明1039]

CD70標的指向性分子が、一本鎖可変断片(scFV)を含む、本発明1001～1038のいずれかの方法。

[本発明1040]

CD70標的指向性分子が、二重特異性T細胞エンゲージャ(BiTE)、キメラ抗原受容体(CAR)、CARを含むT細胞、または三重特異性ナチュラルキラー細胞エンゲージャ療法(TriNKET)を含む、本発明1001～1039のいずれかの方法。

[本発明1041]

CD70標的指向性分子が、BiTE、CAR、またはTriNKETを含む細胞を含む、本発明1040の方法。

40

[本発明1042]

細胞が幹細胞、前駆細胞、免疫細胞、またはナチュラルキラー(NK)細胞を含む、本発明1041の方法。

[本発明1043]

造血幹細胞もしくは前駆細胞、T細胞、間葉系幹細胞(MSC)から分化した細胞、または人工多能性幹細胞(iPSC)を含む、本発明1042の細胞。

[本発明1044]

末梢血単核細胞(PBMC)から単離されるまたはそれに由来する、本発明1042または1043の細胞。

50

[本発明1045]

T細胞が細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、CD8⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞、不変NK T (iNKT)細胞、ガンマ-デルタT細胞、NKT細胞、または調節性T細胞を含む、本発明1043または1044の細胞。

[本発明1046]

CD70標的指向性分子がCTX130またはALLO-316を含む、本発明1040～1045のいずれかの方法。

[本発明1047]

CD70標的指向性分子がCD27 CARを含む、本発明1040～1045のいずれかの方法。

[本発明1048]

CD70標的指向性分子がSGN-75、SGN-CD70A、AMG 172、および/またはARGX-110を含む、本発明1001～1039のいずれかの方法。

[本発明1049]

患者由来の生物学的サンプルが、1つまたは複数のEMTマーカーに対して陽性であると決定されている、本発明1001～1048のいずれかの方法。

[本発明1050]

生物学的サンプルが腫瘍細胞および/または腫瘍関連細胞を含む、本発明1049の方法。

[本発明1051]

生物学的サンプルが生検材料を含む、本発明1049または1050の方法。

[本発明1052]

1つまたは複数のEMTマーカーが、上皮マーカーの低減および/または間葉マーカーの増加を含む、本発明1049～1051のいずれかの方法。

[本発明1053]

EMTマーカーが、CDH1、VIM、AXL、ZEB1、およびZEB2のうちの1つまたは複数を含む、本発明1049または1052の方法。

[本発明1054]

CD70標的指向性分子および1つまたは複数のさらなる治療剤を含む、組成物。

[本発明1055]

さらなる治療剤が化学療法、放射線、外科手術、TKI療法、免疫療法、またはその組み合わせを含む、本発明1054の組成物。

[本発明1056]

さらなる治療剤がデュルバルマブ、アテゾリズマブ、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、ネシツムマブ、およびベバシズマブのうちの1つまたは複数を含む、本発明1054または1055の組成物。

[本発明1057]

さらなる治療剤がカルボプラチン、ペメトレキセド、nab-パクリタキセル、フォトリン、シスプラチン、ドセタキセル、ゲムシタビン、パクリタキセル、およびビノレルビンのうちの1つまたは複数を含む、本発明1054～1056のいずれかの組成物。

[本発明1058]

さらなる治療剤がアレクチニブ、ロルラチニブ、およびセリチニブのうちの1つまたは複数を含む、本発明1055～1057のいずれかの組成物。

[本発明1059]

さらなる治療剤がゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、およびブリガチニブのうちの1つまたは複数を含む、本発明1055～1058のいずれかの組成物。

[本発明1060]

さらなる治療剤がオシメルチニブを含む、本発明1059の組成物。

[本発明1061]

CD70標的指向性分子が、抗CD70抗体またはそのCD70結合断片を含む、本発明1055～1057のいずれかの組成物。

10

20

30

40

50

[本発明1062]

さらなる治療剤が、毒性分子に連結された二次抗体を含む、本発明1061の組成物。

[本発明1063]

二次抗体および毒性分子が、切断可能なリンカーを通じて連結されている、本発明1062の組成物。

[本発明1064]

抗体がヒト化抗体またはキメラ抗体である、本発明1061～1063のいずれかの組成物。

[本発明1065]

抗体がクサツズマブまたはボルセツズマブを含む、本発明1061～1064のいずれかの組成物。

[本発明1066]

抗体が分子にコンジュゲートされている、本発明1061～1065のいずれかの組成物。

[本発明1067]

分子が毒性分子である、本発明1066の組成物。

[本発明1068]

毒性分子が、モノメチルアウリスタチンE (MMAE)、デュオカルマイシン、モノメチルアウリスタチンF (MMAF)、またはピロロベンゾジアゼピン(PBD)を含む、本発明1067の組成物。

[本発明1069]

CD70標的指向性分子が、クサツズマブ-MMAE、ボルセツズマブ-MMAE、またはその組み合わせを含む、本発明1067または1068の組成物。

[本発明1070]

CD70標的指向性分子が、CD70抗体からの重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を含む、本発明1054～1069のいずれかの組成物。

[本発明1071]

CD70標的指向性分子が、重鎖可変領域からのCDR1、CDR2およびCDR3、ならびに/または軽鎖可変領域からのCDR1、CDR2およびCDR3を含む、本発明1054～1070のいずれかの組成物。

[本発明1072]

CD70標的指向性分子が、CD70に特異的に結合する一本鎖可変断片(scFV)を含む、本発明1054～1071のいずれかの組成物。

[本発明1073]

CD70標的指向性分子が、二重特異性T細胞エンゲージャ(BiTE)、キメラ抗原受容体(CAR)、CARを含むT細胞、または三重特異性ナチュラルキラー細胞エンゲージャ療法(TriNKE)を含む、本発明1054～1072のいずれかの組成物。

[本発明1074]

CD70標的指向性分子が、SGN-75、SGN-CD70A、AMG 172、および/またはARGX-110を含む、本発明1054～1073のいずれかの組成物。

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、詳細な説明および具体的な実施例は、本発明の好ましい態様を示しているが、この詳細な説明から本発明の趣旨および範囲の中でさまざまな修正および変更が当業者には明らかになるので、例示にすぎないことが理解されるはずである。

【図面の簡単な説明】

【0024】

以下の図面は、本明細書の一部を構成し、本発明のある種の局面をさらに実証するために含まれている。本発明は、これらの図面の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な説明と併せて参照することによってよりよく理解されうる。

【0025】

【図1】 HCC827およびHCC4006 (両方ともEGFR変異体)細胞は、EGFR TKI耐性(ER)変種と比較してエルロチニブおよびオシメルチニブを含むEGFR TKIに感受性である。

10

20

30

40

50

【図2】EGFR TKI耐性は、トランスクリプトミクスの変化、上皮間葉転換(EMT)およびCD70の上方制御に関連している。(A) 本発明者らは、RNA seqによる遺伝子発現を、親HCC827およびHCC4006細胞とEGFR TKIに対する獲得耐性を有する細胞との間で比較した。(B) Gene Set濃縮分析により、親細胞と比較してEGFR TKI耐性(ER)細胞でのEMTシグネチャーの増加が明らかである。ER細胞は、上皮マーカーCDH1の発現のレベルがより低く(C)、間葉マーカーVIM、AXL、ZEB1およびZEB2の発現を増加させた(D~G)。(H) EGFR TKI耐性細胞はCD70の発現を有意に上方制御した。

【図3】CD70のタンパク質レベルは、EGFR TKI耐性NSCLC細胞の表面上昇している。フローサイトメトリーにより、HCC827親細胞と比較して、EGFR TKI耐性細胞HCC827 ER1、ER3およびER6でのCD70のタンパク質レベルの増加が明らかである。

【図4】EMTの誘導は、EGFR TKI耐性を誘導するのに十分である。(A) HCC827 (EGFR TKI感受性)細胞におけるZEB1の発現誘導は、E-カドヘリンの喪失、ならびにN-カドヘリン、Axlおよびビメンチンの発現の増加によって実証されるように、間葉表現型へのシフトをもたらした。ZEB1の発現により、HCC827細胞はEGFR TKIエルロチニブ、オシメルチニブ、およびアファチニブに耐性とされた(B~D)。

【図5】ヒトNSCLCでは、EMTはCD70の高発現に関連している。CD70の発現は、NSCLC細胞株(A)およびTCGAの臨床検体(B)におけるEMT遺伝子発現シグネチャーと有意に関連している。

【図6】EGFR TKI耐性は、上皮間葉転換(EMT)に関連している。(A) 本発明者らは、RNA seqによる遺伝子発現を、親HCC827およびHCC4006細胞とEGFR TKIに対する獲得耐性を有する細胞との間で比較した。Gene Set濃縮分析により、親細胞と比較してEGFR TKI耐性(ER)細胞でのEMTシグネチャーが明らかである。ER細胞は、上皮マーカーCDH1の発現のレベルがより低く(C)、間葉マーカーVIM、AXL、ZEB1およびZEB2の発現を増加させた(B)。(CおよびD) エルロチニブ耐性(ER)およびオシメルチニブ耐性(OR)細胞を含むEGFR TKI耐性細胞は、逆相タンパク質アレイによって決定された場合に、EMTと一致するプロテオミクスシグネチャーを示した。

【図7】CD70は、T790M陰性EGFR TKI耐性細胞において上昇する。(A) RNAseq分析により、親EGFR TKI感受性細胞と比較してEGFR TKI耐性細胞におけるCD70の過剰発現が明らかにされた。(B~F) CD70の細胞表面発現をフローサイトメトリーによって評価した。親EGFR TKI感受性細胞株(HCC4006、HCC827、H1975)と比較して、エルロチニブ耐性(ER)およびオシメルチニブ耐性(OR)株を含むEGFR TKI耐性細胞において、CD70の発現が上昇した。CD70の発現は、EGFR TKIに対する獲得耐性が二次EGFR変異(T790M)またはMET増幅によって媒介された細胞では最小限であった。

【図8】CD70は、EGFR TKI耐性の遺伝子操作マウスモデル(GEMM)において上昇する。後天性EGFR非依存性NSCLCのマウスモデルを作出するために、ドキシサイクリン(DOX)を用いて、DOX誘導性L858R EGFRマウスモデルにおいてEGFR変異体NSCLC腫瘍を誘発した。CTイメージングで腫瘍が見えるようになったら、DOXを動物のサブセットから除去した。腫瘍退縮の期間の後、耐性腫瘍が再成長し始めた。動物を安楽死させ、CD70の免疫組織化学的染色のために腫瘍を収集した。CD70の発現は、EGFR非依存性を獲得した腫瘍において上昇した。

【図9】CD70は、EGFR TKI耐性の後にNSCLC臨床検体において上昇する。CD70の免疫組織化学的染色により、EGFR TKI処置を受けていないEGFR変異体NSCLC腫瘍での最小限のCD70発現が明らかにされた。しかしながら、CD70の発現は、EGFR TKI処置に対する治療抵抗性の後にEGFR変異体腫瘍で著しく上昇した。

【図10】EMTの誘導は、EGFR TKI耐性を誘導するのに十分である。(A) HCC827 (EGFR TKI感受性)細胞におけるZEB1の発現誘導は、E-カドヘリンの喪失、ならびにN-カドヘリン、Axlおよびビメンチンの発現の増加によって実証されるように、間葉表現型へのシフトをもたらした。(B) ZEB1の発現により、HCC827細胞はEGFR TKIエルロチニブ、オシメルチニブ、およびアファチニブに耐性になった。(C) ZEB1発現は、CD70 mRNA発現およびCD70の細胞表面発現の有意な上昇を誘導する。

【図11】ヒトNSCLC臨床検体およびNSCLC細胞株では、EMTはCD70の高発現に関連している。CD70の発現は、TCGAのNSCLC臨床検体(A)およびNSCLC細胞株(B)におけるEMT遺伝子発現シグネチャーおよびZEB1と有意に関連している。

【図12】CD70の刺激は、EGFR TKI耐性細胞でのシグナル伝達経路を活性化する。HCC4006オシメルチニブ耐性(OR)細胞を、CD70の結合パートナーである可溶性CD27で処理し、下流のシグナル伝達経路に及ぼす影響をウエスタンブロッティングによって評価した。CD70の活性化により、AktおよびERKのリン酸化が引き起こされた。

【図13】CD70のノックダウンは、EGFR TKI耐性細胞の増殖を損なう。CD70のsiRNAを介したノックダウン(A)により、H1975 OR5細胞の生存度の低下が引き起こされた(B)。HCC4006 OR細胞でも同様の結果が得られた(C)。

【図14】CD70抗体-薬物コンジュゲート(ADC)は、インビトロでCD70+ EGFR TKI耐性細胞を標的とする。CD70 ADCクサツズマブMMAEおよびボルセツズマブ-MMAEは、H1975 OR5およびH1975 OR16を含むH1975オシメルチニブ耐性(OR)細胞に対して抗腫瘍細胞活性を実証した。(A)は、さまざまな細胞株におけるCD70陽性細胞率を示し、線グラフは、(B) クサツズマブ-MMAEおよび(C) ボルセツズマブ-MMAEの添加での細胞株の相対的な細胞生存度を示す。

【図15】CD70 ADCは、インビトロでEGFR TKI耐性細胞のオシメルチニブ(OSI)活性を増強する。棒グラフは、OSIとADCの組み合わせの相対的な細胞生存度を示す。

【図16】CD70 ADCは、インビトロでEGFR TKI耐性細胞に対して活性を有する。CD70 ADCクサツズマブ-MMAEおよびボルセツズマブ-MMAEは、H1975オシメルチニブ耐性(OR)細胞などに対して抗腫瘍細胞活性を実証した。

【発明を実施するための形態】

【0026】

例示的な態様の説明

EGFR変異体NSCLC患者はEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)に当初は応答するが、耐性疾患が必然的に現れる。本開示はNSCLCに対する新しい治療アプローチを提供する。さらなる態様を以下に記述する。

【0027】

I. 定義

「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」という用語は、遺伝子産物をいう場合、本明細書において互換的に用いられる。

【0028】

「相同性」または「同一性」は、2つのペプチド間または2つの核酸分子間の配列類似性をいう。同一性は、比較の目的のために整列されうる各々の配列中の位置を比較することにより決定することができる。比較される配列中の位置が、同じ塩基またはアミノ酸により占められている場合、分子はその位置において配列同一性を共有する。配列間の同一性の程度は、配列により共有される一致した位置または相同な位置の数の関数である。「無関係」または「非相同」な配列は、本開示の配列のうちの1つと60%未満の同一性、50%未満の同一性、40%未満の同一性、30%未満の同一性、または25%未満の同一性を共有する。

【0029】

本明細書において用いられる「アミノ部分」、「N末端」、「アミノ末端」などの用語は、ポリペプチドの領域の順序をいうために用いられる。さらに、何かが領域のN末端にある場合、それは必ずしもポリペプチド全体の末端(または端)にあるのではなく、領域またはドメインのN末端にあるだけである。同様に、本明細書において用いられる「カルボキシ部分」、「C末端」、「カルボキシ末端」などの用語は、ポリペプチドの領域の順序をいうために用いられ、何かが領域のC末端にある場合、それは必ずしもポリペプチド全体の末端(または端)にあるのではなく、領域またはドメインのC末端にあるだけである。

【0030】

「ポリヌクレオチド」、「核酸」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換的

10

20

30

40

50

に用いられ、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドまたはその類似体のいずれかの、任意の長さのヌクレオチドの重合体形態をいう。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有することができ、公知または未知の任意の機能を行いうる。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片(例えば、プローブ、プライマー、ESTまたはSAGEタグ)、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、dsRNA、siRNA、miRNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブおよびプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの、修飾ヌクレオチドを含むことができる。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリヌクレオチドの組み立て前または後に付与することができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断することができる。ポリヌクレオチドはさらに、標識成分を用いたコンジュゲーションによるような、重合の後で修飾することができる。この用語はまた、二本鎖および一本鎖分子の両方をいう。特に指定されないまたは要件とされない場合、ポリヌクレオチドである本発明の任意の態様は、二本鎖形態と、二本鎖形態を構成することが公知であるかまたは予測される2つの相補的な一本鎖形態の各々との両方を包含する。

【0031】

本明細書において用いられる場合、細胞または細胞の培養物が、ある種の試薬または要素、例えば血清、シグナル伝達阻害剤、動物成分もしくはフィーダー細胞、外来性遺伝要素、またはベクター要素を「実質的に含まない」のは、その要素の10%未満を有する場合であり、ある種の試薬または要素を「本質的に含まない」のは、その要素の1%未満を有する場合である。しかしながら、含まれる外来性遺伝要素またはベクター要素が細胞集団全体の0.5%未満または0.1%未満である細胞集団がさらに望ましい。

【0032】

細胞または細胞の培養物がある種の試薬または要素、例えば血清、シグナル伝達阻害剤、動物成分またはフィーダー細胞を「本質的に含まない」のは、培養物、マトリックス、または培地に含まれるこれらの試薬のレベルがそれぞれ、当業者に既知の従来の検出方法を用いて検出可能なレベル未満である場合か、あるいはこれらの試薬が培養物、マトリックス、または培地に外的に添加されていない場合である。無血清培地は、血清を本質的に含んでいなくてもよい。

【0033】

特定のタンパク質を「コード」する「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「コード領域」、「配列」、「セグメント」、「断片」、または「導入遺伝子」は、適正な調節配列の制御下に置かれた場合にインビトロまたはインビボにて転写され、また任意で遺伝子産物(例えばポリペプチド)に翻訳される核酸分子である。コード領域は、cDNA形態、ゲノムDNA形態、またはRNA形態のいずれかで存在する。核酸分子がDNA形態で存在する場合、核酸分子は一本鎖(すなわち、センス鎖)または二本鎖でありうる。コード領域の境界は、5' (アミノ)末端における開始コドンと3' (カルボキシ)末端における翻訳停止コドンとによって確定される。遺伝子は、原核生物mRNAまたは真核生物mRNA由来のcDNA、原核生物DNAまたは真核生物DNA由来のゲノムDNA配列、および合成DNA配列を含むことができるが、これらに限定されることはない。転写終結配列は、通例、遺伝子配列の3'側に位置する。

【0034】

「細胞」という用語は、本明細書では当技術分野におけるその最も広い意味で用いられ、ある生体をいうが、この生体は、多細胞生物の組織の構造単位であり、外部から隔離する膜構造によって囲われており、自己複製することができ、遺伝情報とそれを発現する機序とを有するものである。本明細書において用いられる細胞は、天然に存在する細胞であるか、または人工的に改変された細胞(例えば、融合細胞、遺伝子改変された細胞など)でありうる。

【0035】

本明細書において用いられる場合、「処置」および「処置する」などの用語は、所望の薬理学的作用および/または生理学的作用を得ることをいう。この作用は、疾患もしくは疾患の症候を完全にもしくは部分的に防ぐという点から予防的であってもよく、ならびに/または、疾患および/もしくは該疾患に起因する有害作用を部分的もしくは完全に治癒するという点から治療的であってもよい。本明細書において用いられる「処置」は哺乳類における、例えば、ヒトにおける疾患の任意の処置を包含し、(a) 疾患にかかりやすい素因を持ちうるが、疾患を有するとまだ診断されていない対象において疾患が生じるのを予防すること; (b) 該疾患を阻害すること、すなわち、その発症を阻止すること; および(c) 疾患を緩和すること、すなわち、疾患の退行を引き起こすことを含む。

【0036】

いくつかの態様において、本方法は、腫瘍のサイズおよび/または細胞数を低減するのに有用である。いくつかの態様において、本開示の方法は、対象における固体腫瘍などの腫瘍の増殖を阻害するのに有用である。

【0037】

「抗体」という用語は、ヒトのもの、マウスのもの、ヒト化されたもの、キメラのものでありうるか、または別の種に由来しうる、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二量体、多量体、多特異性抗体および抗体断片を含む。「モノクローナル抗体」は、特異的抗原部位に対して作製されている実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体である。

【0038】

「抗体またはその機能的断片は、特定の抗原またはエピトープに特異的に結合するか、それと免疫学的に反応する免疫グロブリン分子を意味し、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方を含む。抗体という用語は、イントラボディ、ペプチボディ、キメラ抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、およびヘテロコンジュゲート抗体(例えば、二重特異性抗体、ダイアボディ、トリアボディ、およびテトラボディ)などの、遺伝子操作されたまたは他の形で改変された免疫グロブリン形態を含む。抗体は、天然源に由来してもよく、または部分的もしくは全体的に合成により産生されてもよい。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルでありうる。抗体は、ヒトクラスのいずれかを含めて、任意の免疫グロブリンクラスのメンバー: IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEでありうる。機能的抗体断片という用語は、例えば、Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rlgG、およびscFv断片を含めて、抗体の抗原結合断片を含む。scFvという用語は、従来の2本鎖抗体の重鎖のおよび軽鎖の可変ドメインが連結されて、一本鎖を形成している、一本鎖Fv抗体をいう。抗体断片は、任意で一本鎖抗体断片であってもよい。あるいは、断片は、例えば、ジスルフィド結合によって一緒に連結されている複数鎖を含みうる。断片はまた、任意で多分子複合体であってもよい。機能的抗体断片は、完全な抗体に匹敵する親和性でその同種抗原に結合する能力を保持する。

【0039】

本明細書において用いられる「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体をいい、例えば、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在しうる変異、例えば、天然に存在する変異を除いて同一である。したがって、「モノクローナル」という修飾語句は、個別の抗体の混合物ではないという抗体の特徴を示す。ある種の態様において、そのようなモノクローナル抗体は、典型的には、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、ここで標的結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列からの単一の標的結合ポリペプチド配列の選択を含むプロセスによって得られたものである。例えば、選択プロセスは、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、または組換えDNAクローンのプールなどの、複数のクローンからの固有のクローンの選択であることができる。選択された標的結合配列は、例えば、標的に対する親和性を改善するために、標的結合配列をヒト化するために、細胞培養におけるその産生を改善するために、インビボでのその免疫原性を低減するために、多重特異性抗体を作出するためになど、さらに改変されうること、および改変された標的結合配列を含む抗体もまた、本開示のモノクローナル抗体であることが理解されるべきである。異なる決定基(エピトープ)に対して作

10

20

30

40

50

製されたいくつかの異なる抗体を通常含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して作製されている。モノクローナル抗体調製物は、その特異性に加えて、それらに通常、他の免疫グロブリンが混入していないという点で好都合である。

【0040】

「薬学的組成物」または「薬理的に許容される組成物」という語句は、必要に応じて、ヒトなどの動物に投与された場合に有害反応、アレルギー反応、または他の不都合な反応を生じない分子実体および組成物をいう。抗体またはさらなる活性成分を含む薬学的組成物の調製は、本開示に照らして当業者に公知であろう。さらに、動物(例えば、ヒト)への投与の場合、調製物は、FDAの生物学的基準局(FDA Office of Biological Standards)に求められるように無菌性、発熱性、一般安全性、および純度の基準を満たさなければならないことが理解されよう。

【0041】

本明細書において用いられる場合、「薬学的に許容される担体」は、当業者に公知であるように、ありとあらゆる水性溶媒(例えば、水、アルコール/水溶液、生理食塩水、塩化ナトリウムなどの非経口ビヒクル、およびリンゲルのデキストロース)、非水性溶媒(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステル)、分散媒、コーティング、界面活性剤、抗酸化剤、保存料(例えば、抗菌剤または抗真菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガス)、等張剤、吸収遅延剤、塩、薬物、薬物安定剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、香味剤、染料、液体および栄養補給剤、そのような同様の材料ならびにそれらの組み合わせを含む。薬学的組成物中のさまざまな成分のpHおよび正確な濃度は、周知のパラメータにしたがって調整されうる。

【0042】

「単位用量」または「投薬量」という用語は、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本明細書において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治療用組成物を含む。投与される量は、処置回数および単位用量の両方に応じて、所望される効果に依存する。患者または対象に投与される本態様の組成物の実際の投与量は、対象の体重、年齢、健康状態および性別、処置される疾患のタイプ、疾患浸透(disease penetration)の程度、以前または同時の治療的介入、患者の特発性疾患、投与経路、ならびに特定の治療用物質の効力、安定性、および毒性などの、身体的および生理的要因によって決定することができる。例えば、用量はまた、投与あたり約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /体重から約1000 mg/kg /体重(このような範囲は間に挟まれた用量を含む)またはそれ以上、およびその中で導出可能な任意の特定の用量を含みうる。本明細書において記載される数字から導出可能な範囲の非限定的な例では、約5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /体重から約100 mg/kg /体重、約5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /体重から約500 mg/kg /体重などの範囲のものを投与することができる。投与の責任を負う実務者が、いずれにせよ、組成物中の活性成分の濃度および個々の対象に適切な用量を決定するであろう。

【0043】

一本鎖可変断片(scFv)の使用は、特に関心対象である。scFvは、抗原結合ドメインをコードする免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖の可変領域が単一のポリペプチドへ操作されている組換え分子である。一般に、 V_H および V_L 配列はリンカー配列によって連結される。例えば、参照により本明細書に具体的に組み入れられる、Ahmad (2012) Clinical and Developmental Immunology Article ID 980250を参照されたい。単一のポリペプチドへ操作されているBCMA結合ドメインをコードする免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖の可変領域を含むBCMA特異的scFv分子が、本明細書において記述される。同様に、本明細書において記述されるCS1特異的scFv分子は、単一のポリペプチドへ操作されているCS1結合ドメインをコードする免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖の可変領域を含む。

【0044】

本明細書において用いられる場合、「結合親和性」という用語は、2つの作用物質の可逆的結合の平衡定数をいい、解離定数(Kd)として表される。結合親和性は、無関係のアミノ酸配列に対する抗体の結合親和性よりも、少なくとも1倍高い、少なくとも2倍高い、少なくとも3倍高い、少なくとも4倍高い、少なくとも5倍高い、少なくとも6倍高い、少なくとも7倍高い、少なくとも8倍高い、少なくとも9倍高い、少なくとも10倍高い、少なくとも20倍高い、少なくとも30倍高い、少なくとも40倍高い、少なくとも50倍高い、少なくとも60倍高い、少なくとも70倍高い、少なくとも80倍高い、少なくとも90倍高い、少なくとも100倍高い、もしくは少なくとも1000倍高い、またはそれ以上(あるいはその中で導出可能な任意の範囲)高いとすることができる。本明細書において用いられる場合、「結合力」という用語は、希釈後の、2つまたはそれ以上の作用物質の複合体の、解離に対する耐性をいう。「免疫反応性」および「選択的に結合する」という用語は、抗体および/または抗原結合断片に関して本明細書において互換的に用いられる。

10

【0045】

「結合」という用語は、例えば、塩橋および水橋などの相互作用を含む、共有結合性、静電気性、疎水性、およびイオン性および/または水素結合性の相互作用による、2つの分子間の直接的な会合をいう。

【0046】

「治療的有效量」または「有効量」は、疾患を処置するために哺乳動物または他の対象に投与された場合に、疾患のそのような処置を行うのに十分である薬剤の量、または2つの薬剤の合計量をいう。「治療的有效量」は、薬剤、疾患およびその重症度、ならびに処置される対象の年齢、体重などに応じて変化するであろう。

20

【0047】

「対象」および「患者」は、霊長目の動物、哺乳動物、および脊椎動物などの、ヒトまたは非ヒトのいずれかをいう。特定の態様において、対象はヒトである。

【0048】

本出願の全体を通じて、「約」という用語は、値にはその値を決定するために利用される装置、方法に固有の誤差の変動、または研究対象間に存在する変動が含まれることを示すために用いられる。

【0049】

30

II. CD70標的指向性剤

A. 抗体

本開示の局面はCD70標的指向性剤に関する。いくつかの態様において、CD70標的指向性剤は抗CD70抗体またはその断片を含む。「抗体」という用語は、標的抗原への特異的結合についてインタクトな抗体と競合できる任意のアイソタイプのインタクトな免疫グロブリン、またはその断片をいい、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、および二重特異性抗体を含む。本明細書において用いられる場合、「抗体」または「免疫グロブリン」という用語は互換的に用いられ、IgG、IgD、IgE、IgA、IgMおよび関連タンパク質を含めて、動物の免疫応答の一部として機能する構造的に関連するタンパク質のいくつかのクラスのいずれか、ならびに抗原結合活性を保持する抗体CDRドメインを含むポリペプチドをいう。

40

【0050】

「抗原」という用語は、抗体などの、選択的結合剤によって結合されうる分子または分子の一部分をいう。抗原は、異なる抗体と相互作用することができる1つまたは複数のエピトープを保有しうる。

【0051】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に結合することによって免疫応答を誘発することができる分子の任意の領域または部分を含む。エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニル基などの化学的に活性な表面基を含み、特定の三次元構造特性および/または特定の電荷特性を有しうる。一般に、特定の

50

標的抗原に特異的な抗体は、複合混合物内の標的抗原上のエピトープを選択的に認識する。

【0052】

所与のポリペプチドのエピトープ領域は、X線結晶構造解析、核磁気共鳴分光法、部位特異的変異誘発マッピング、タンパク質ディスプレイアレイを含む、当技術分野において周知である多くの異なるエピトープマッピング技法を用いて同定することができ、例えば、Epitope Mapping Protocols, (Johan Rockberg and Johan Nilvebrant, Ed., 2018) Humana Press, New York, N.Y.を参照されたい。そのような技法は当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第4,708,871号; Geysen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002 (1984); Geysen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:178-182 (1985); Geysen et al. Molec. Immunol. 23:709-715 (1986)に記述されている。例えば、Epitope Mapping Protocols, 前記を参照されたい。さらに、タンパク質の抗原性領域は、標準的な抗原性および疎水性プロットを用いて予測および同定することもできる。

【0053】

インタクトな抗体は一般に、2本の全長重鎖および2本の全長軽鎖で構成されるが、場合によっては、重鎖のみを含みうるラクダ科動物に天然に存在する抗体のような、より少ない鎖を含みうる。本明細書において開示される抗体は、単一の供給源のみに由来しうるか、または「キメラ」でありえ、すなわち、抗体の異なる部分が2つの異なる抗体に由来しうる。例えば、可変領域またはCDR領域は、ラットまたはマウス供給源に由来しうるが、定常領域はヒトなどの、異なる動物供給源に由来する。抗体または結合断片は、ハイブリドーマにおいて、組換えDNA技法によって、またはインタクトな抗体の酵素的もしくは化学的切断によって産生されうる。特に指示のない限り、「抗体」という用語は、その誘導体、変種、断片、およびムテインを含み、その例は以下に記述されている(Sela-Culang et al. Front Immunol. 2013; 4: 302; 2013)。

【0054】

「軽鎖」という用語は、結合特異性を付与するのに十分な可変領域配列を有する全長軽鎖およびその断片を含む。全長軽鎖は、25,000ダルトン前後の分子量を有し、可変領域ドメイン(本明細書においてVLと略される)、および定常領域ドメイン(本明細書においてCLと略される)を含む。カッパ(κ)およびラムダ(λ)と特定される、軽鎖の分類が2つある。

「VL断片」という用語は、CDRを含む、軽鎖可変領域の全部または一部を含むモノクローナル抗体の軽鎖の断片を意味する。VL断片は、軽鎖定常領域配列をさらに含むことができる。軽鎖の可変領域ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端にある。

【0055】

「重鎖」という用語は、結合特異性を付与するのに十分な可変領域配列を有する全長重鎖およびその断片を含む。全長重鎖は、50,000ダルトン前後の分子量を有し、可変領域ドメイン(本明細書においてVHと略される)、および3つの定常領域ドメイン(本明細書においてCH1、CH2、およびCH3と略される)を含む。「VH断片」という用語は、CDRを含む、重鎖可変領域の全部または一部を含むモノクローナル抗体の重鎖の断片を意味する。VH断片は、重鎖定常領域配列をさらに含むことができる。重鎖定常領域ドメインの数は、アイソタイプに依存するであろう。VHドメインはポリペプチドのアミノ末端にあり、CHドメインはカルボキシ末端にあり、CH3は-COOH末端に最も近い。抗体のアイソタイプは、IgM、IgD、IgG、IgA、またはIgEであることができ、5つの分類: それぞれミュー(μ)、デルタ(δ)、ガンマ(γ)、アルファ(α)、またはイプシロン(ϵ)鎖が存在する重鎖により定義される。IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含むが、これらに限定されない、いくつかのサブタイプを有する。IgMサブタイプはIgM1およびIgM2を含む。IgAサブタイプはIgA1およびIgA2を含む。

【0056】

抗体は、任意のアイソタイプもしくは分類の全免疫グロブリン、キメラ抗体、または2つもしくはそれ以上の抗原に対する特異性を有するハイブリッド抗体であることができる。それらはまた、ハイブリッド断片を含む断片(例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fvなど)

でありうる。免疫グロブリンは、特定の抗原に結合して複合体を形成することにより抗体のように作用する、天然タンパク質、合成タンパク質、または遺伝子操作されたタンパク質も含む。抗体という用語は、以下のような、遺伝子操作された、または他の方法で改変された形態の免疫グロブリンを含む。

【0057】

「単量体」という用語は、Igユニットを1つだけ含む抗体を意味する。単量体は抗体の基本的な機能単位である。「二量体」という用語は、抗体重鎖の定常ドメイン(Fc領域または断片結晶化可能な領域)を介して互いに結合した2つのIgユニットを含む抗体を意味する。複合体は、連結(J)鎖タンパク質によって安定化されうる。「多量体」という用語は、抗体重鎖の定常ドメイン(Fc領域)を介して互いに結合した2つ超のIgユニットを含む抗体を意味する。複合体は、連結(J)鎖タンパク質によって安定化されうる。

10

【0058】

「二価抗体」という用語は、2つの抗原結合部位を含む抗体を意味する。2つの結合部位は、同じ抗原特異性を有してもよく、またはそれらは二重特異性であってもよく、2つの抗原結合部位が異なる抗原特異性を有することを意味する。

【0059】

二重特異性抗体は、2つまたはそれ以上の異なるエピトープに対する異なる結合部位を有する2つのパラトープを持つ抗体のクラスである。いくつかの態様において、二重特異性抗体は、バイパラトピックであることができ、ここで、二重特異性抗体は、同じ抗原からの異なるエピトープを特異的に認識しうる。いくつかの態様において、二重特異性抗体は、「ナノボディ」と称される一対の異なる単ドメイン抗体から構築することができる。単ドメイン抗体は、軟骨魚類およびラクダ科動物から供給され、改変されている。ナノボディは、当業者にとっては通常の技法を用いリンカーによって一緒に連結されうる；ナノボディの選択および連結のためのそのような方法は、PCT公開番号W02015044386 A1、同番号W02010037838A2、およびBever et al., Anal Chem. 86:7875-7882 (2014)に記述されており、それらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に具体的に組み入れられる。

20

【0060】

二重特異性抗体は、IgG全体、Fab'2、Fab'PEG、ダイアボディとして、または代わりにscFvとして構築することができる。ダイアボディおよびscFvは、可変ドメインのみを用いFc領域なしで構築できるため、抗イディオタイプ反応の影響を低減できる可能性がある。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結を含むが、これらに限定されない、種々の方法によって産生されうる。例えば、Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)を参照されたく、それらはそれぞれ参照によりその全体が具体的に組み入れられる。

30

【0061】

ある種の局面において、抗原結合ドメインは、異なる抗原に結合するVHおよびVL領域対と多量体化することにより、多重特異的または異種特異的でありうる。例えば、抗体は、(a) 細胞表面抗原、(b) エフェクタ細胞の表面上のFc受容体、または(c) 少なくとも1つの他の成分に、結合するか、またはそれらと相互作用しうる。したがって、局面には、エピトープにおよびエフェクタ細胞上のFc受容体などの他の標的に向けられる、二重特異性、三重特異性、四重特異性、および他の多重特異性抗体またはそれらの抗原結合断片が含まれうるが、これらに限定されることはない。

40

【0062】

いくつかの態様において、多重特異性抗体は、当技術分野において公知の常法を用いて、使用され、可動性の短いポリペプチド鎖を介して直接連結されうる。そのような例の1つは、VHおよびVLドメインが単一のポリペプチド鎖で発現され、同鎖上のドメイン間の対合を可能にするには短すぎ、それによってドメインを別鎖の相補的ドメインと対合させ、2つの抗原結合部位を作出する、二価の二重特異性抗体であるダイアボディである。リ

50

ンカー機能性は、トリアボディ、テトラボディ、およびさらに高次の抗体多量体の態様に適用可能である(例えば、Hollinger et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993); Polijak et al., Structure 2:1121-1123 (1994); Todorovska et al., J. Immunol. Methods 248:47-66 (2001)を参照のこと)。

【0063】

二重特異性全抗体とは対照的に、二重特異性ダイアボディもまた、大腸菌(*E. coli*)において容易に構築および発現されうるため、有利でありうる。適切な結合特異性のダイアボディ(および抗体断片などの他のポリペプチド)は、ライブラリからのファージディスプレイ(WO94/13804)を用いて容易に選択することができる。ダイアボディの一方の腕部が一定に保たれている場合、例えば、タンパク質に対する特異性が保たれている場合、他方の腕部を変化させ、適切な特異性の抗体を選択するライブラリが作出されうる。二重特異性全抗体は、Ridgewayら(Protein Eng., 9:616-621, 1996)およびKrahら(N Biotechnol. 39:167-173, 2017)に記述されているように代替の操作方法によって作出されてもよく、それらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0064】

ヘテロコンジュゲート抗体は、異なる特異性を有する2つの共有結合したモノクローナル抗体で構成されている。例えば、参照により全体が本明細書に組み入れられる米国特許第6,010,902号を参照されたい。

【0065】

抗原のエピトープに高い特異性で結合する抗体分子のFv断片の部分は、本明細書において「パレート」といわれる。パレートは、抗原のエピトープと接触して抗原認識を促進するアミノ酸残基からなる。抗体の2つのFv断片の各々は、二量体化された構成での、2つの可変ドメインVHおよびVLで構成されている。可変ドメインの各々の一次構造は、フレームワーク領域(FR)により区切られ、隣接される3つの超可変ループを含む。超可変ループは、任意の哺乳動物からの抗体分子間で一次配列の変動性が最も大きい領域である。超可変ループという用語は、「相補性決定領域(CDR)」という用語と互換的に用いられることがある。超可変ループ(またはCDR)の長さは、抗体分子によって異なる。所与の哺乳動物からの全ての抗体分子のフレームワーク領域は、高い一次配列類似性/コンセンサスを有する。フレームワーク領域のコンセンサスは、フレームワーク領域と、フレームワーク領域の間に散在する超可変ループ(またはCDR)の両方を識別するために当業者によって使用されうる。超可変ループには、ポリペプチド内での位置と、それらが発生するドメインを区別する識別名が付けられている。VLドメイン中のCDRは、L1、L2、およびL3として識別され、L1が最遠位端に存在し、L3がCLドメインの最も近くに存在する。CDRには、CDR-1、CDR-2、およびCDR-3という名前も付されうる。L3 (CDR-3)は一般に、所与の生物によって産生される全ての抗体分子の中で最も変動性の高い領域である。CDRは、一次構造において直線的に配置され、フレームワーク領域によって互いに分離されたポリペプチド鎖の領域である。VL鎖のアミノ末(N末)端はFR1と名付けられている。FR2として識別される領域は、L1とL2超可変ループの間に存在する。FR3はL2とL3超可変ループの間に存在し、FR4領域はCLドメインに最も近い。この構造および命名法が、H1、H2およびH3として識別される3つのCDRを含むVH鎖に対して繰り返される。可変ドメイン、またはFv断片(VHおよびVL)におけるアミノ酸残基の大部分は、フレームワーク領域の一部(およそ85%)である。抗体分子の三次元または三次構造は、フレームワーク領域が分子のより内部にあり、分子の外面にCDRを備えた、構造の大部分を提供するようなものである。

【0066】

これらの領域の各々を構成する正確なアミノ酸を特定するために、いくつかの方法が開発されており、当業者によって用いられうる。これは、フレームワーク領域を構成する保存されたアミノ酸残基を特定する、いくつかの複数の配列アライメント方法およびアルゴリズムのいずれかを用いて行われ、それゆえ、長さが異なりうるが、フレームワーク領域間に位置するCDRを特定することができる。抗体のCDRの特定のために、一般的に使用される3つの方法が開発されている: Kabat (T. T. Wu and E. A. Kabat, 「AN ANALYSIS

10

20

30

40

50

OF THE SEQUENCES OF THE VARIABLE REGIONS OF BENCE JONES PROTEINS AND MYELOMA LIGHT CHAINS AND THEIR IMPLICATIONS FOR ANTIBODY COMPLEMENTARITY」, J Exp Med, vol. 132, no. 2, pp. 211-250, Aug. 1970に記述の通り); Chothia (C. Chothia et al., 「Conformations of immunoglobulin hypervariable regions」, Nature, vol. 342, no. 6252, pp. 877-883, Dec. 1989に記述の通り); およびIMGT (M.-P. Lefranc et al., 「IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains」, Developmental & Comparative Immunology, vol. 27, no. 1, pp. 55-77, Jan. 2003に記述の通り)。これらの方法は各々、可変領域を構成するアミノ酸残基の特定のための固有の付番システムを含む。大部分の抗体分子において、抗原のエピトープと実際に接触するアミノ酸残基はCDRに存在するが、場合によっては、フレームワーク領域内の残基が抗原結合に寄与する。

【0067】

当業者は、抗体のパラトープを決定するために、いくつかの方法のいずれかを用いることができる。これらの方法は以下を含む; 1) 抗体可変領域のアミノ酸配列の化学的性質およびエピトープの組成に基づく抗体/エピトープ結合相互作用の三次構造の計算による予測; 2) 水素-重水素交換および質量分析; 3) ポリペプチドの全長から複数の重複するペプチド断片を作出し、これらのペプチドのエピトープに対する結合親和性を評価する、ポリペプチド断片化およびペプチドマッピングアプローチ; 4) 哺乳動物の抗体Fab断片コード遺伝子が、ファージのコートに組み込まれるようにバクテリオファージによって発現される抗体ファージディスプレイライブラリ分析。次に、このFab発現ファージの集団が、固定化されているか、または異なる外因性発現系によって発現されうる抗原と相互作用させられる。非結合Fab断片は洗い流され、それによって特異的結合Fab断片のみが抗原に付着したままになる。結合Fab断片は容易に単離することができ、それらをコードする遺伝子を決定することができる。このアプローチは、必要に応じてFv断片または特定のVHおよびVLDメインを含むFab断片のさらに小さな領域にも用いることができる。

【0068】

ある種の局面において、親和性成熟抗体は、それらの改変を保有しない親抗体と比較して、標的抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす、その1つまたは複数のCDRにおける1つまたは複数の改変で増強される。ある種の親和性成熟抗体は、標的抗原に対するナノモルまたはピコモルの親和性を有する。親和性成熟抗体は、当技術分野において公知の手順により産生され、例えば、Marks et al., Bio/Technology 10:779 (1992)には、VHおよびVLDメインシャッフリングによる親和性成熟が記述されており、ファージディスプレイにおいて利用されるCDRおよび/またはフレームワーク残基のランダム突然変異誘発が、Tiller et al., Front. Immunol. 8:986 (2017)に実証されている計算方法と組み合わせでRajpal et al., PNAS. 24: 8466-8471 (2005)およびThie et al., Methods Mol Biol. 525:309-22 (2009)により記述されている。

【0069】

キメラ免疫グロブリンは、異なる種に由来する融合遺伝子の産物である; 「ヒト化」キメラは一般に、ヒト免疫グロブリンからのフレームワーク領域(FR)を有し、1つまたは複数のCDRは非ヒト供給源からのものである。

【0070】

ある種の局面において、重鎖および/または軽鎖の部分は、別の特定の種からのまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する対応配列と同一または相同であるが、鎖の残部は、別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体、および所望の生物学的活性を示す限り、そのような抗体の断片における対応配列と同一または相同である。米国特許第4,816,567号; およびMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984)。キメラ抗体に関する方法については、例えば、米国特許第4,816,567号; およびMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1985)を参照されたく、それらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に具体的に組み入れら

れる。CDRグラフト化は、例えば、米国特許第6,180,370号、同第5,693,762号、同第5,693,761号、同第5,585,089号、および同第5,530,101号に記述されており、これらは全て、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み入れられる。

【0071】

いくつかの態様において、非ヒト種からの抗体ポリペプチド配列を最小化することで、キメラ抗体機能が最適化され、免疫原性が低減される。非ヒト抗体の非抗原認識領域からの特定のアミノ酸残基は、ヒト抗体またはアイソタイプにおける対応残基と相同であるように改変される。1つの例は「CDRグラフト化」抗体であり、ここで該抗体は、特定の種からのまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する1つまたは複数のCDRを含むが、抗体鎖の残部は、別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応配列と同一または相同である。ヒトにおいて用いるためには、非ヒト免疫グロブリンからの軽鎖および重鎖変動領域の両方のCDR1、CDR2、および部分的CDR3で構成されるV領域が、ヒト抗体フレームワーク領域でグラフト化され、ヒト抗体の天然抗原受容体を非ヒトCDRに置き換える。場合によっては、対応する非ヒト残基がヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域残基に置き換わる。さらに、ヒト化抗体は、性能をさらに精緻化するために、レシピエント抗体またはドナー抗体には見られない残基を含みうる。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれを含みうる。例えば、Jones et al., *Nature* 321:522 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332:323 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593 (1992); Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma and Immunol.* 1:105 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23; 1035 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428 (1994); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-36 (1988) を参照されたい。

【0072】

イントラボディは、細胞外空間中の抗原に結合する分泌抗体とは対照的に、細胞内抗原に結合する細胞内に局在する免疫グロブリンである。

【0073】

ポリクローナル抗体調製物は、通常、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含む。ポリクローナル抗体を産生するために、ウサギまたはヤギなどの宿主を、一般にアジュバントとともに、必要に応じて、担体に結合させて、抗原または抗原断片で免疫する。その後、抗原に対する抗体を宿主の血清から回収する。ポリクローナル抗体を抗原に対してアフィニティー精製し、それを単一特異性に行うことができる。

【0074】

モノクローナル抗体または「mAb」は、唯一の親細胞からの均一な抗体の集団から得られた抗体をいい、例えば、集団は、少量で存在しうる天然変異を除いて同一である。各モノクローナル抗体は、単一の抗原決定基に対するものである。

【0075】

1. 機能的抗体断片および抗原結合断片

a. 抗原結合断片

ある種の局面は、炎症性メディエータに結合するおよび/または炎症性メディエータを中和する抗体断片などの、抗体断片に関する。機能的抗体断片という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の抗原結合断片を含む。これらの断片は、可変領域重鎖(VH)および/または軽鎖(VL)のさまざまな配置で構成されており;いくつかの態様において、定常領域重鎖1(CH1)および軽鎖(CL)を含む。いくつかの態様において、それらは、重鎖2(CH2)および3(CH3)ドメインで構成されるFc領域を欠いている。抗原結合断片およびその改変の態様は、以下を含みうる: (i) VL、VH、CL、およびCH1ドメインで構成されるFab断片タイプ; (ii) VHおよびCH1ドメインで構成されるFd断片タイプ; (iii) VHおよびVLドメインで構成されるFv断片タイプ; (iv) 単一のVHまたはVLドメインで構成される単一ドメイン断片タイプdAb (Ward, 1989; McCafferty et al., 1990; Holt et al., 2003); (v) 単離された相補性決定領域(CDR)領域。そのような用語は、例えば、Harlow a

nd Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1989); Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers, R. A. (ed.), New York: VCH Publisher, Inc.); Huston et al., Cell Biophysics, 22:189-224 (1993); Pluckthun and Skerra, Meth. Enzymol., 178:497-515 (1989)およびDay, E. D., Advanced Immunochimistry, 2d ed., Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y. (1990); Antibodies, 4:259-277 (2015)に記述されている。本段落での引用は全て参照により組み入れられる。

【0076】

抗原結合断片は、軽鎖可変領域からの正確に、少なくとも、または多くとも1つ、2つ、または3つの相補性決定領域(CDR)を保持する抗体の断片も含む。Fc領域(またはそのCH2もしくはCH3領域)へのCDR含有配列の融合は、例えば、本明細書に含まれるFc領域に、直接的または間接的に融合されたscFvを含めて、この定義の範囲内に含まれる。

【0077】

Fab断片という用語は、VL、VH、CLおよびCH1ドメインを含む抗体の一価の抗原結合断片を意味する。Fab'断片という用語は、Fab断片よりも大きいモノクローナル抗体の一価の抗原結合断片を意味する。例えば、Fab'断片は、VL、VH、CLおよびCH1ドメインならびにヒンジ領域の全部または一部を含む。F(ab')₂断片という用語は、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFab'断片を含むモノクローナル抗体の二価の抗原結合断片を意味する。F(ab')₂断片は、例えば、2つのVHおよびVLドメインの全部または一部を含み、2つのCLおよびCH1ドメインの全部または一部をさらに含むことができる。

【0078】

Fd断片という用語は、CDRを含む、VHの全部または一部を含むモノクローナル抗体の重鎖の断片を意味する。Fd断片は、CH1領域配列をさらに含むことができる。

【0079】

Fv断片という用語は、VLおよびVHの全部または一部を含み、CLおよびCH1ドメインのない、モノクローナル抗体の一価の抗原結合断片を意味する。VLおよびVHは、例えば、CDRを含む。一本鎖抗体(sFvまたはscFv)は、VL領域およびVH領域が可動性のリンカーによりつながれて、抗原結合断片を形成する、単一のポリペプチド鎖を形成するFv分子である。一本鎖抗体は、国際特許出願公開番号WO 88/01649ならびに米国特許第4,946,778号および同第5,260,203号に詳細に論じられており、それらの開示は参照により本明細書に組み入れられる。(scFv)₂という用語は、ヒンジ領域によってsFvから分離された、C末端にオリゴマー化ドメインを含む二価または二重特異性のsFvポリペプチド鎖を意味する(Pack et al. 1992)。オリゴマー化ドメインは、自己会合性α-ヘリックス、例えば、ロイシンジッパーを含み、これをさらなるジスルフィド結合によってさらに安定化することができる。(scFv)₂断片は、「ミニ抗体」または「ミニボディ」としても公知である。

【0080】

単ドメイン抗体は、VHまたはVLドメインのみを含む抗原結合断片である。場合によっては、2つまたはそれ以上のVH領域がペプチドリンカーで共有結合されて、二価ドメイン抗体を作出する。二価ドメイン抗体の2つのVH領域は、同じまたは異なる抗原を標的とする。

【0081】

b. 断片結晶化可能領域、Fc

Fc領域は、抗体のCH2およびCH3ドメインを含む2つの重鎖断片を含む。2つの重鎖断片は、2つまたはそれ以上のジスルフィド結合によっておよびCH3ドメインの疎水性相互作用によって一緒に保持されている。本明細書において用いられる「Fcポリペプチド」という用語は、抗体のFc領域に由来するポリペプチドの天然型およびムテイン型を含む。二量体化を促進するヒンジ領域を含むそのようなポリペプチドの切断型が含まれる。

【0082】

c. 抗体CDRおよびCDRを提示する足場ドメインを有するポリペプチド

相補性決定領域(CDR)などの、抗原結合ペプチド足場は、態様にしたがってタンパク質

10

20

30

40

50

結合分子を作出するために用いられる。一般に、当業者は、少なくとも1つのCDRをグラフト化するタンパク質足場のタイプを決定することができる。足場は、最適には、良好な系統発生的保存; 公知の三次元構造; 小さいサイズ; 転写後修飾がほとんどもしくは全くない; 生成、発現、および精製することが容易であるなどの、いくつかの基準を満たさなければならないことが知られている。Skerra, J Mol Recognit, 13:167-87 (2000)。

【0083】

タンパク質足場は、フィブロンекチンIII型FN3ドメイン(「モノボディ」として知られる)、フィブロンекチンIII型ドメイン10、リボカリン、アンチカリン、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)のプロテインAのZドメイン、チオレドキシンAまたは「アンキリンリピート」、「アルマジロリピート」、「ロイシンリッチリピート」および「テトラトリコペプチドリピート」などの繰り返しモチーフを有するタンパク質から供給することができるが、これらに限定されることはない。そのようなタンパク質は、米国特許出願公開第2010/0285564号、同第2006/0058510号、同第2006/0088908号、同第2005/0106660号、およびPCT公開番号W02006/056464に記述されており、それらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に具体的に組み入れられる。サソリ、昆虫、植物、軟体動物などからの毒素に由来する足場、およびニューロンNO合成酵素のタンパク質阻害剤(PIN)も用いられうる。

【0084】

B. キメラ抗原受容体

いくつかの態様において、CD70標的指向性剤は、CD70特異的CAR分子を含むおよび/または発現するT細胞などの、CD70特異的CAR分子または細胞を含む。キメラ抗原受容体T細胞、すなわちCAR T細胞は、シグナル伝達ドメインおよび共刺激分子とともに、腫瘍抗原に特異的なキメラ受容体を発現するように遺伝子改変されている、患者、ドナーに由来するか、またはインビトロで産生されたかのいずれかのT細胞である。抗体由来の一本鎖可変断片とT細胞の細胞内シグナル伝達ドメインとのこの融合は、MHCに制約されない形で腫瘍抗原を認識する能力をCAR T細胞に与える。

【0085】

CAR分子は、典型的には、1つまたは複数の抗体結合領域、細胞外スパーサー、膜貫通ドメイン、および細胞質領域を含む。これらについては、以下でさらに記述する。

【0086】

1. 抗原結合領域

抗原結合領域は、CD70抗体に由来する一本鎖可変断片(scFv)でありうる。「一本鎖Fv」または「scFv」抗体断片は、抗体のV_HおよびV_Lドメインを含み、ここでこれらのドメインは単一のポリペプチド鎖中に存在する。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、V_HドメインとV_Lドメインとの間にペプチドリinkerをさらに含み、これは、scFvが抗原結合に望ましい構造を形成するのを促進しうる。

【0087】

本開示のポリペプチドの抗原結合ドメインの可変領域を、V_Hおよび/またはV_L CDR 1、CDR 2および/またはCDR 3領域内のアミノ酸残基を変異させることにより改変して、抗体の1つまたは複数の結合特性(例えば、親和性)を改善することができる。「CDR」という用語は、それぞれB細胞およびT細胞によって作出される、免疫グロブリン(抗体)およびT細胞受容体における可変鎖の一部に基づく相補性決定領域をいい、これらの分子はその特異抗原に結合する。免疫グロブリンおよびT細胞受容体に関連するほとんどの配列変異はCDRにおいて見られるため、これらの領域は超可変領域といわれることもある。変異は、部位特異的変異誘発またはPCRを介した変異誘発によって導入することができ、抗体結合、または他の関心対象の機能特性に及ぼす効果を、適切なインビトロまたはインビボアッセイにおいて評価することができる。好ましくは、保存的修飾が導入され、典型的には、CDR領域内の1つ、2つ、3つ、4つまたは5つ以下の残基が改変される。変異はアミノ酸の置換、付加または欠失でありうる。

【0088】

例えば、1つまたは複数のフレームワーク残基を、対応する生殖系列配列に「復帰突然変異させる」ことにより、フレームワークの改変を抗体に加えて、免疫原性を低下させることができる。

【0089】

同じ抗原(多価)または異なる抗原(多重特異性)のいずれかに結合するVHおよびVL領域対で抗原結合ドメインを多量体化することにより、抗原結合ドメインが多重特異性または多価でありうることも企図される。

【0090】

2. 細胞外スパーサー

細胞外スパーサーは、抗原結合ドメインを膜貫通ドメインに連結させうる。それは、抗原結合ドメインが異なる方向に配向して抗原結合を促進できるようにするのに十分に可動性でなければならない。1つの態様において、スパーサーはIgGからのヒンジ領域である。代替案には、免疫グロブリンのCH2CH3領域およびCD3の一部分が含まれる。

【0091】

本明細書において用いられる場合、「ヒンジ」という用語は、構造的可動性および隣接するポリペプチド領域との間隔を提供する(本明細書において「ヒンジ領域」または「スパーサー」ともいわれる)可動性のポリペプチドコネクタ領域をいい、天然または合成のポリペプチドからなることができる。免疫グロブリン(例えば、IgG1)に由来する「ヒンジ」は一般に、ヒトIgG1のGlu216からPro230までのストレッチングとして定義される(Burton (1985) Molec. Immunol., 22: 161-206)。他のIgGアイソタイプのヒンジ領域は、重鎖間ジスルフィド(S-S)結合を形成する最初のシステイン残基および最後のシステイン残基を同じ位置に配することによってIgG1配列と整列されうる。ヒンジ領域は、天然に存在するものであってもよく、または天然に存在しないものであってもよく、米国特許第5,677,425号に記述されるような改変型ヒンジ領域を含むが、これに限定されることはない。ヒンジ領域には、CH1ドメインのものとは異なるクラスまたはサブクラスの抗体に由来する完全ヒンジ領域が含まれうる。「ヒンジ」という用語には、可動性および隣接する領域との間隔を提供する類似した機能を提供する、CD8およびその他の受容体に由来する領域も含まれうる。

【0092】

3. 膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインは、膜にまたがる疎水性のアルファヘリックスである。異なる膜貫通ドメインは、異なる受容体の安定性をもたらしうる。

【0093】

膜貫通ドメインは、細胞外スパーサーと細胞質領域との間に挿入される。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、細胞外スパーサーと1つまたは複数の共刺激領域との間に挿入される。いくつかの態様において、リンカーは、膜貫通ドメインと1つまたは複数の共刺激領域との間にある。いくつかの態様において、膜貫通ドメインはCD28、CD8、CD4、CD3ゼータ、CD134、またはCD7に由来する。

【0094】

4. 細胞質領域

抗原認識後、受容体がクラスター化し、細胞質領域を通じてシグナルが細胞に伝達される。いくつかの態様において、本明細書において記述される共刺激ドメインは、細胞質領域の一部である。

【0095】

本開示のポリペプチドでの使用に適した細胞質領域および/または共刺激領域は、抗原結合ドメインへの抗原の結合による活性化に応答して明確かつ検出可能なシグナル(例えば、細胞による1つまたは複数のサイトカインの産生の増加; 標的遺伝子の転写の変化; タンパク質の活性の変化; 細胞挙動の変化、例えば、細胞死; 細胞増殖; 細胞分化; 細胞生存; 細胞シグナル伝達応答の調節など)を提供する任意の所望のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、細胞質領域は、本明細書において記述されるように少なくとも1つ(

10

20

30

40

50

例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つなど)のITAMモチーフを含む。いくつかの態様において、細胞質領域は、DAP10/CD28タイプのシグナル伝達鎖を含む。

【0096】

本開示のポリペプチドでの使用に適した細胞質領域は、免疫受容活性化チロシンモチーフ(ITAM)を含んだ細胞内シグナル伝達ポリペプチドを含む。ITAMモチーフは $YX_1X_2(L/I)$ であり、ここで X_1 および X_2 は独立して任意のアミノ酸である。場合によっては、細胞質領域は1つ、2つ、3つ、4つ、または5つのITAMモチーフを含む。場合によっては、ITAMモチーフがエンドドメインで2回繰り返され、ここで第1および第2の事例のITAMモチーフは6~8個のアミノ酸だけ互いに分離され、例えば、 $(YX_1X_2(L/I))(X_3)_n(YX_1X_2(L/I))$ であり、ここで n は6から8までの整数であり、6~8個の X_3 の各々が任意のアミノ酸でありうる。

10

【0097】

適当な細胞質領域は、ITAMモチーフを含むポリペプチドに由来するITAMモチーフ含有部分でありうる。例えば、適当な細胞質領域は、任意のITAMモチーフ含有タンパク質由来のITAMモチーフ含有ドメインであることができる。したがって、適当なエンドドメインは、それが由来するタンパク質全体の配列全体を含む必要はない。適当なITAMモチーフ含有ポリペプチドの例としては、DAP12、DAP10、FCER1G (Fcイプシロン受容体Iガンマ鎖); CD3D (CD3デルタ); CD3E (CD3イプシロン); CD3G (CD3ガンマ); CD3ゼータ; およびCD79A (抗原受容体複合体関連タンパク質アルファ鎖)が挙げられるが、これらに限定されることはない。

20

【0098】

細胞質領域に含まれるものなどの、適当な共刺激領域の非限定的な例としては、4-1BB (CD137)、CD28、ICOS、OX-40、BTLA、CD27、CD30、GITR、およびHVEMからのポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0099】

C. 二重特異性T細胞エンゲージャ(BiTE)

二重特異性T細胞エンゲージャは、がんの処置を対象とした新しいクラスの免疫療法分子である。BiTEと称されるこれらの分子は、T細胞を腫瘍細胞に再標的指向させることにより、腫瘍に対する患者の免疫応答を増強する。BiTEは、可動性のリンカーによってタンデムに接続された2つの一本鎖可変断片(scFv)を含む。この構造および特異性により、BiTEはT細胞を腫瘍細胞に物理的に連結させ、最終的にT細胞活性化、腫瘍死滅およびサイトカイン産生を刺激する。態様にはCD70特異的scFvなどの、CD70特異的標的指向性領域を含むBiTEが含まれる。BiTEは、EGFRまたはAXLなどのさらなるがん関連分子に対する特異性をさらに含みうる。したがって、本開示の態様は、CD70特異的scFvおよびEGFR特異的scFvを含むBiTEに関する。本開示のさらなる態様は、CD70特異的scFvおよびAXL scFvを含むBiTEに関する。本開示のさらなる態様は、CD70特異的scFvおよび腫瘍抗原特異的scFvを含むBiTEに関する。いくつかの態様において、腫瘍抗原は、非小細胞肺癌に関連する腫瘍抗原を含む。さらなる態様は、CD70特異的標的指向性領域およびTCR特異的標的指向性領域を含むBiTEに関する。例えば、TCR特異的標的指向性領域は、CD3などの、T細胞上のTCRサブユニットを標的としうる。

30

40

【0100】

D. 三重特異性ナチュラルキラー細胞エンゲージャ療法(TriNKET)

TriNKETは、NK細胞活性化領域および抗原結合領域を含み、ここで抗原結合領域はCD70に結合する。TriNKETは、腫瘍およびNK細胞を架橋するようにデザインされている。いくつかの態様において、NK細胞活性化領域は、細胞を活性化することができる細胞表面分子などの、NK活性化分子を含む。NK細胞活性化領域および/または抗原結合領域は、それぞれ、NK活性化タンパク質に特異的なscFvおよびがん抗原に特異的なscFvを含みうる。いくつかの態様において、TriNKETはCD16に特異的なscFvドメインを含む。いくつかの態様において、TriNKETは、CD70に特異的に結合するscFvを含む。TriNKETは、IL-15またはIL-2分子をさらに含みうる。TriNKETは、(a) 細胞内シナプスの形成を促進する

50

ことによってNK細胞を腫瘍に向けるのに; (b) NK細胞上のCD16に結合してADCCを誘因するのに; および(c) IL-15またはIL-2の発現を通じてインビボでのNK細胞の増殖を推進するのに役立つ。

【0101】

III. 細胞

ある種の態様は、CD70標的指向性剤などの、本開示のポリペプチドまたは核酸を含む細胞に関する。いくつかの態様において、細胞は免疫細胞またはT細胞である。「T細胞」は、Tヘルパー細胞、細胞傷害性T細胞、T調節性細胞(Treg)ガンマ-デルタT細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、および好中球を含む、CD3を発現する全タイプの免疫細胞を含む。T細胞はCD4+またはCD8+ T細胞をいう。

10

【0102】

適当な哺乳動物細胞は、初代細胞および不死化細胞株を含む。適当な哺乳動物細胞株は、ヒト細胞株、非ヒト霊長類細胞株、げっ歯類(例えば、マウス、ラット)細胞株などを含む。適当な哺乳動物細胞株は、HeLa細胞(例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection; ATCC)番号CCL-2)、CHO細胞(例えば、ATCC番号CRL9618、CCL61、CRL9096)、ヒト胎児腎臓(HEK) 293細胞(例えば、ATCC番号CRL-1573)、Vero細胞、NIH 3T3細胞(例えば、ATCC番号CRL-1658)、Huh-7細胞、BHK細胞(例えば、ATCC番号CCL10)、PC12細胞(ATCC番号CRL1721)、COS細胞、COS-7細胞(ATCC番号CRL1651)、RAT1細胞、マウスL細胞(ATCC番号CCL1.3)、HLHepG2細胞、Hut-78、Jurkat、HL-60、NK細胞株(例えば、NKL、NK92、およびYTS)などを含むが、これらに限定されることはない。

20

【0103】

場合によっては、細胞は不死化細胞株ではなく、代わりに個体から得られた細胞(例えば、初代細胞)である。例えば、場合によっては、細胞は個人から得られた免疫細胞である。一例として、細胞は個体から得られたTリンパ球である。別の例として、細胞は個体から得られた細胞傷害性細胞である。別の例として、細胞は個体から得られた幹細胞または前駆細胞である。いくつかの態様において、患者の治療に用いられる細胞は自家である。いくつかの態様において、患者の処置に用いられる細胞は非自家である。

【0104】

IV. ゲノムDNAを改変するための方法

30

ある種の態様において、ゲノムDNAは、さらなる変異、挿入、もしくは欠失を含むように改変されるか、または構築体がゲノムDNAから発現されるように本開示のある種の分子構築体を組み込むように改変される。いくつかの態様において、本開示のポリペプチドをコードする核酸は、細胞のゲノムDNAに組み込まれる。いくつかの態様において、組み込みは、標的指向組み込みである。いくつかの態様において、標的指向組み込みは、部位特異的リコンビナーゼおよび/または標的指向性エンドヌクレアーゼなどの、DNA消化剤/ポリヌクレオチド修飾酵素の使用を通じて達成される。「DNA消化剤」という用語は、核酸のヌクレオチドサブユニット間の結合(すなわち、ホスホジエステル結合)を切断することができる薬剤をいう。1つの特定の標的はTRAC (T細胞受容体アルファ定常)遺伝子座である。例えば、細胞に最初、TRAC (T細胞受容体アルファ定常)遺伝子座を標的とする単一ガイドRNA (sgRNA)と複合体を形成したCas9タンパク質からなるリボヌクレオタンパク質(RNP)複合体をエレクトロポレーションする。エレクトロポレーション15分後に、CARをコードするHDR鋳型を保有するAAV6で細胞を処理する。

40

【0105】

それゆえ、1つの局面では、本開示は標的指向組み込みを含む。これを達成する1つの方法は、部位特異的リコンビナーゼおよび/または標的指向性エンドヌクレアーゼなどの、少なくとも1つのポリヌクレオチド修飾酵素に対する少なくとも1つの認識配列を含む外因性核酸配列(すなわち、ランディングパッド)の使用によるものである。部位特異的リコンビナーゼは当技術分野において周知であり、一般にインベルターゼ、レゾルバーゼ、またはインテグラーゼといわれる。部位特異的リコンビナーゼの非限定的な例としては、ラム

50

ダイニンググラゼ、Creリコンビナーゼ、FLPリコンビナーゼ、ガンマ-デルタレゾルバーゼ、Tn3レゾルバーゼ、ΦC31インテグラゼ、Bxb1-インテグラゼ、およびR4インテグラゼが挙げられうる。部位特異的リコンビナーゼは、特定の認識配列(もしくは認識部位)またはその変種を認識し、これらの全てが当技術分野において周知である。例えば、CreリコンビナーゼはLoxP部位を認識し、FLPリコンビナーゼはFRT部位を認識する。

【0106】

企図される標的指向性エンドヌクレアーゼには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、メガヌクレアーゼ、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR/Cas様エンドヌクレアーゼ、I-TevIヌクレアーゼもしくは関連する単量体ハイブリッド、または人工の標的DNA二重鎖切断誘導剤が含まれる。例示的な標的指向性エンドヌクレアーゼは、以下にさらに記述される。例えば、代表的には、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、DNA結合ドメイン(すなわち、ジンクフィンガー)および切断ドメイン(すなわち、ヌクレアーゼ)を含み、これらはともに以下に記述される。ポリヌクレオチド修飾酵素の定義には、DNA結合ドメインおよびヌクレアーゼを含みうるような、当業者に公知の任意の他の有用な融合タンパク質も含まれる。

【0107】

ランディングパッド配列は、部位特異的リコンビナーゼおよび/または標的指向性エンドヌクレアーゼなどの特異的ポリヌクレオチド修飾酵素によって選択的に結合および修飾される少なくとも1つの認識配列を含むヌクレオチド配列である。一般に、ランディングパッド配列中の認識配列は、改変される細胞のゲノム中に内因的に存在しない。例えば、改変されるべき細胞がCHO細胞である場合、ランディングパッド配列中の認識配列は、内因性CHOゲノム中に存在しない。標的指向組み込みの速度は、標的細胞のゲノム内に内因的に存在しない高効率ヌクレオチド修飾酵素の認識配列を選択することによって改善することができる。内因的に存在しない認識配列の選択はまた、オフターゲット組み込みの可能性を減少させる。他の局面において、改変されるべき細胞において天然である認識配列の使用が所望されうる。例えば、複数の認識配列がランディングパッド配列において用いられる場合、1つまたは複数の外因性であってよく、1つまたは複数の天然であってよい。

【0108】

当業者は、部位特異的リコンビナーゼおよび/または標的指向性エンドヌクレアーゼによって結合および切断された配列を容易に決定することができる。

【0109】

複数の認識配列が単一のランディングパッドに存在してもよく、これにより、2つまたはそれ以上の独特の核酸(とりわけ、受容体遺伝子および/または誘導性レポーターを含む)が挿入されうるようにランディングパッドを2つまたはそれ以上のポリヌクレオチド修飾酵素によって連続的に標的とすることが可能になる。あるいは、ランディングパッドにおける複数の認識配列の存在は、同じ核酸の複数のコピーがランディングパッドに挿入されることを可能にする。2つの核酸が単一のランディングパッドに標的とされる場合、ランディングパッドは、第1のポリヌクレオチド修飾酵素(例えば、第1のZFN対)のための第1の認識配列、および第2のポリヌクレオチド修飾酵素(例えば、第2のZFN対)のための第2の認識配列を含む。あるいは、またはさらに、1つまたは複数の認識配列を含む個々のランディングパッドは、複数の位置に統合されうる。タンパク質発現の増加は、ペイロードの複数のコピーで形質転換された細胞で観察される場合がある。別の方法として、複数のコピーを用いて変形された細胞において、異なる発現カセットを構成する複数の固有核酸配列を同一または別のランディングパッドに投入した場合に、複数の遺伝子産物を同時に発現することも可能である。核酸の数およびタイプに関係なく、標的指向性エンドヌクレアーゼがZFNである場合、例示的なZFN対は、hSIRT、hRSK4、およびhAAVS1を含み、認識配列を伴う。

【0110】

一般的に言えば、標的指向組み込みを容易にするために用いられるランディングパッドは、少なくとも1つの認識配列を含みうる。例えば、ランディングパッドは、少なくとも1

10

20

30

40

50

つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、または少なくとも10もしくはそれ以上の認識配列を含みうる。2つ以上の認識配列を含む態様において、認識配列は、互いに固有でありうる(すなわち、異なるポリヌクレオチド修飾酵素によって認識される)か、同じ反復配列、または反復配列と固有の配列との組み合わせでありうる。

【0111】

当業者は、ランディングパッドとして用いられる外因性核酸が、認識配列に加えて他の配列も含みうることを容易に理解する。例えば、抗生物質耐性遺伝子、代謝選択マーカー、または蛍光タンパク質のような、本明細書において記述されるような選択可能またはスクリーニング可能な遺伝子をコードする1つまたは複数の配列を含むことが好都合でありうる。転写調節要素および制御要素(すなわち、プロモーター、部分プロモーター、プロモータートラップ、開始コドン、エンハンサー、イントロン、インスレーターおよび他の発現要素)のような他の補足配列の使用があってもよい。

10

【0112】

適切な認識配列の選択に加えて、高い切断効率を有する標的指向性エンドヌクレアーゼの選択はまた、ランディングパッドの標的指向組み込みの速度を改善する。標的指向性エンドヌクレアーゼの切断効率は、例えば、CEL-1アッセイのようなアッセイまたはPCRアンプリコンにおける挿入/欠失(Indels)の直接配列決定を用いることを含め、当技術分野において周知の方法を用いて決定することができる。

【0113】

本明細書において開示される方法および細胞において用いられる標的指向性エンドヌクレアーゼのタイプは、変動しうるか、または変動する。標的指向性エンドヌクレアーゼは、天然に存在するタンパク質または操作されたタンパク質でありうる。標的指向性エンドヌクレアーゼの一例は、亜鉛フィンガーヌクレアーゼであり、これについては以下でさらに詳細に論じられる。

20

【0114】

使用することができる標的指向性エンドヌクレアーゼの別の例は、真核細胞の核へのエンドヌクレアーゼの侵入を可能にする、少なくとも1つの核局在化シグナルを含むRNA誘導エンドヌクレアーゼである。RNA誘導エンドヌクレアーゼはまた、少なくとも1つのヌクレアーゼドメインと、誘導RNAと相互作用する少なくとも1つのドメインとを含む。RNA誘導エンドヌクレアーゼは、RNA誘導エンドヌクレアーゼが特定の染色体配列を切断するように、誘導RNAによって特定の染色体配列に向けられる。誘導RNAは標的指向切断のための特異性を提供するので、RNA誘導エンドヌクレアーゼのエンドヌクレアーゼは普遍的であり、異なる標的染色体配列を切断するために異なる誘導RNAとともに用いられる。例示的なRNA誘導エンドヌクレアーゼタンパク質は、以下でさらに詳細に論じられる。例えば、RNA誘導エンドヌクレアーゼは、CRISPR/Casタンパク質またはCRISPR/Cas様融合タンパク質、クラスター化された規則的に点在する短パリンドローム繰り返し(CRISPR)/CRISPR関連(Cas)システムに由来するRNA誘導エンドヌクレアーゼであることができる。

30

【0115】

標的指向性エンドヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼであることもできる。メガヌクレアーゼは、大きな認識部位を特徴とするエンドデオキシリボヌクレアーゼであり、すなわち、認識部位は、一般に、約12塩基対〜約40塩基対の範囲である。この要件の結果として、認識部位は、一般に、任意の所定のゲノムにおいて1回のみ生じる。メガヌクレアーゼのなかで、「LAGLIDADG」と名付けられた内核解体ファミリーは、ゲノムとゲノム工学の研究のための貴重なツールとなった。メガヌクレアーゼは、当業者に周知の技法を用いてそれらの認識配列を修飾することによって、特定の染色体配列を標的とすることができる。例えば、Epinat et al., 2003, Nuc. Acid Res., 31(11):2952-62およびStoddard, 2005, Quarterly Review of Biophysics, pp. 1-47を参照されたい。

40

【0116】

使用することができる標的指向性エンドヌクレアーゼの別の例は、転写アクチベーター

50

様エフェクタ(TALE)ヌクレアーゼである。TALEは、植物病原体キサントモナス(*Xanthomonas*)由来の転写因子であり、これは、新しいDNA標的に結合するように容易に操作されうる。TALEまたはその切断型は、TALEヌクレアーゼまたはTALENと呼ばれる標的指向性エンドヌクレアーゼを作製するために、FokIなどのエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに連結されてもよい。例えば、Sanjana et al., 2012, Nature Protocols 7(1):171-192; Bogdanove A J, Voytas D F., 2011, Science, 333(6051):1843-6; Bradley P, Bogdanove A J, Stoddard B L., 2013, Curr Opin Struct Biol., 23(1):93-9を参照されたい。

【0117】

別の例示的な標的指向性エンドヌクレアーゼは部位特異的ヌクレアーゼである。特に、部位特異的ヌクレアーゼは、その認識配列がゲノム中にほとんど見られない「低頻度切断酵素」エンドヌクレアーゼでありうる。好ましくは、部位特異的ヌクレアーゼの認識配列は、ゲノム中に一度だけ見られる。あるいは、標的指向性ヌクレアーゼは、人工の標的指向DNA二重鎖破断誘導剤であってもよい。

【0118】

いくつかの態様において、標的指向組み込みは、インテグラーゼの使用によって達成することができる。例えば、phiC31インテグラーゼは、バクテリオファージphiC31のゲノム内にコードされる配列特異的リコンビナーゼである。phiC31インテグラーゼは、結合部位(att)と称される2つの34塩基対配列間の組換えを媒介し、一方はファージ中に見出され、他方は細菌宿主中に見出される。このセリンインテグラーゼは、哺乳動物細胞を含む多くの異なる細胞型において効率的に機能することが示されている。phiC31インテグラーゼの存在下で、attB含有ドナープラスミドは、天然attP部位(偽attP部位と称される)と配列類似性を有する部位での組換えを通じて、標的ゲノムに一方向に組み込まれる。phiC31インテグラーゼは、任意のサイズのプラスミドを単一コピーとして組み込むことができ、補因子を必要としない。組み込まれた導入遺伝子は、安定的に発現され、遺伝性である。

【0119】

1つの態様において、本開示のポリヌクレオチドのゲノム組み込みは、トランスポザーゼの使用によって達成される。例えば、脊椎動物の染色体中に、正確に定義されたDNA配列を導入するためにデザインされた合成DNAトランスポゾン(例えば、「スリーピングビューティー(Sleeping Beauty)」トランスポゾンシステム)を用いることができる。スリーピングビューティートランスポゾンシステムは、スリーピングビューティー(SB)トランスポザーゼと、脊椎動物のゲノム中へDNAの特定の配列を挿入するようにデザインされたトランスポゾンとで構成されている。DNAトランスポゾンは、単純なカットアンドペースト様式で、1つのDNA部位から別のDNA部位に転位する。転位は、定義されたDNAセグメントが、1つのDNA分子から切り出されかつ同じまたは異なるDNA分子またはゲノム中の別の部位に移動される、正確なプロセスである。

【0120】

全ての他のTc1/マリナー型トランスポザーゼがそうである通り、SBトランスポザーゼは、レシピエントDNA配列中のTAジヌクレオチド塩基対中にトランスポゾンを挿入する。挿入部位は、同じDNA分子中または別のDNA分子(または染色体)中の他の場所でありうる。ヒトを含めて、哺乳動物のゲノムには、およそ2億個のTA部位がある。TAの挿入部位は、トランスポゾン組み込みのプロセスにおいて複製される。このTA配列の重複は、転位の顕著な特徴であり、一部の実験における機構を確認するために用いられる。トランスポザーゼは、トランスポゾン内にコードされることができ、または、トランスポザーゼは、別の供給源によって供給されることができ、その場合では、トランスポゾンは非自律性要素になる。非自律性トランスポゾンは、遺伝子ツールとして最も有用である。なぜなら、挿入後、それらは、独立して切除および再挿入続けることができないためである。ヒトゲノムおよび他の哺乳動物のゲノムにおいて同定されたDNAトランスポゾンの全ては、非自律的である。なぜなら、それらは、トランスポザーゼ遺伝子を含んでいるとしても、

10

20

30

40

50

遺伝子が、非機能的であり、トランスポゾンをも動員することができるトランスポザーゼを作出することができないためである。

【0121】

I. 処置の方法

本開示の局面は、非小細胞肺癌などのがんを処置するための方法に関する。さらなる態様において、本明細書において記述されるCD70標的指向性分子は、免疫応答を刺激するために用いられる。免疫応答刺激はインビトロ、インビボ、またはエキスピボで行われる。いくつかの態様において、本明細書において記述されるCD70標的指向性分子は、再発を予防するためのものである。本方法は一般に、CD70標的指向性分子を患者に投与する段階を伴う。いくつかの態様において、CD70標的指向性分子は、CD70を標的とするポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、発現ベクター、またはRNA (例えば、インビトロで転写されたRNA) を有する遺伝子改変された哺乳動物細胞である。細胞は免疫細胞(例えば、Tリンパ球またはNK細胞)、幹細胞、前駆細胞などであることができる。いくつかの態様において、細胞は、本明細書において記述される細胞またはその後代である。

10

【0122】

本開示の態様は、エキスピボの方法を含む。例えば、Tリンパ球、幹細胞、もしくはNK細胞(または本明細書において記述される細胞)は、個体から得られ; 個体から得られた細胞は、本開示のCD70標的指向性分子を発現するように遺伝子改変される。場合によっては、遺伝子改変された細胞はエキスピボで活性化される。他の場合において、遺伝子改変された細胞は、個体(例えば、細胞が得られた個体)に導入され; 遺伝子改変された細胞はインビボで活性化される。

20

【0123】

いくつかの態様において、本方法は、がんの処置のための細胞もしくはCD70標的指向性分子の投与またはがんを有する人への投与に関する。いくつかの態様において、がんは非小細胞肺癌である。

【0124】

II. 薬学的組成物

本開示は、その必要のある対象において疾患を処置するためのおよび免疫応答を調節するための方法を含む。本開示は、免疫応答を誘導または改変するために用いることができる薬学的組成物の形態でありうる細胞を含む。

30

【0125】

本開示による組成物の投与は、通常、任意の一般的な経路によるものであろう。これには非経口、同所性、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、または静脈内注射が含まれるが、これらに限定されることはない。

【0126】

典型的には、本開示の組成物は、投与製剤と適合性のある方法で、治療的に有効かつ免疫修飾性であるような量で投与される。投与される量は、処置される対象に依存する。投与される必要のある活性成分の正確な量は、実務者の判断に依存する。

【0127】

適用の方法は大きく異なりうる。細胞成分を含む薬学的組成物の投与のための従来の方法のいずれも適用可能である。薬学的組成物の投与量は、投与経路に依存し、対象のサイズおよび健康状態に応じて異なるであろう。

40

【0128】

多くの場合には、多くとも約または少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の複数回投与を有することが望ましいであろう。投与は、2日から12週間の間隔、より一般的には1から2週間の間隔の範囲でありうる。投与の過程の後に、アロ反応性免疫応答およびT細胞活性のアッセイが続く。

【0129】

「薬学的に許容される」または「薬理学的に許容される」という語句は、動物またはヒ

50

トに投与される場合に有害反応、アレルギー反応または他の不都合な反応を生じることのない分子の実体および組成物をいう。本明細書において用いられる場合、「薬学的に許容される担体」とは、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌物質および抗真菌物質、等張剤および吸収遅延剤などを含む。薬学的活性物質のためのそのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野において周知である。任意の従来の媒体または薬剤が活性成分と不適合であるような場合を除き、免疫原性組成物および治療的組成物でのその使用が企図される。本開示の薬学的組成物は、薬学的に許容される組成物である。

【0130】

本開示の組成物は、非経口投与のために製剤化することができ、例えば、静脈内経路、筋肉内経路、皮下経路、またはさらに腹腔内経路による注射のために製剤化することができる。典型的には、そのような組成物は、液体溶液または液体懸濁液のいずれかとして、注射剤として調製することができ、調製物を乳化することもできる。

10

【0131】

注射用の使用に適した薬学的形態は、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を含む。また、製造および貯蔵の条件下で安定であるべきであり、微生物、例えば細菌および真菌の夾雑作用から保護されていなければならない。

【0132】

滅菌注射用液剤は、必要とされる量の活性成分(すなわち、本開示の細胞)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、ろ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媒体に組み込むことにより調製される。

20

【0133】

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。「単位用量」または「投薬量」という用語は、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本明細書において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したがって所望される結果および/または保護に依存する。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。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、種々の剤形で、例えば上記の型の注射用液剤で容易に投与される。

30

【0134】

V. さらなる治療法

本開示の方法および組成物は、当技術分野において公知のおよび/または本明細書において記述の1つまたは複数のさらなる治療法を含みうる。いくつかの態様において、さらなる治療法または薬剤は、さらなるがん処置を含む。そのような処置の例が本明細書において記述されている。

40

【0135】

A. 免疫療法

いくつかの態様において、さらなる治療法または薬剤は、がん免疫療法を含む。がん免疫療法(免疫腫瘍学と呼ばれることもあり、IOと略される)は、がんを処置するための免疫系の使用である。免疫療法は能動的、受動的またはハイブリッド(能動的および受動的)に分類することができる。これらのアプローチは、がん細胞がその表面に、腫瘍関連抗原(TAA)として知られる、免疫系により検出されうる分子を有することが多いという事実を利用しており; それらはタンパク質または他の高分子(例えば炭水化物)であることが多い。能動免疫療法は、TAAを標的とすることによって腫瘍細胞を攻撃するように免疫系に指令す

50

る。受動免疫療法は、既存の抗腫瘍応答を増強し、モノクローナル抗体、リンパ球およびサイトカインの使用を含む。免疫療法は当技術分野において公知であり、いくつかを以下に記述する。

【0136】

1. 共刺激分子の阻害

いくつかの態様において、免疫療法は共刺激分子の阻害剤を含む。いくつかの態様において、阻害剤は、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD28、ICOS、OX40 (TNFRSF4)、4-1BB (CD137; TNFRSF9)、CD40L (CD40LG)、GITR (TNFRSF18)の阻害剤、およびその組み合わせを含む。阻害剤は、阻害性の抗体、ポリペプチド、化合物、および核酸を含む。

10

【0137】

2. 樹状細胞療法

樹状細胞療法は、樹状細胞に腫瘍抗原をリンパ球へ提示させ、それによってリンパ球を活性化し、抗原を提示している他の細胞を死滅化するようにリンパ球を刺激することによって抗腫瘍応答を惹起する。樹状細胞は、哺乳動物免疫系における抗原提示細胞(APC)である。がん処置において、樹状細胞はがん抗原を標的とすることを助ける。樹状細胞に基づく細胞がん治療の一例は、シブリューセル-Tである。

【0138】

樹状細胞に腫瘍抗原を提示するように誘導する1つの方法は、自家腫瘍溶解物または短いペプチド(がん細胞上のタンパク質抗原に対応するタンパク質の小さな部分)をワクチン接種することによるものである。これらのペプチドは、免疫および抗腫瘍応答を高めるためにアジュバント(免疫原性の高い物質)と組み合わせて与えられることが多い。他のアジュバントは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)などの、樹状細胞を誘引および/または活性化するタンパク質または他の化学物質を含む。

20

【0139】

樹状細胞は腫瘍細胞にGM-CSFを発現させることによりインビボで活性化することもできる。これは、腫瘍細胞を遺伝子操作してGM-CSFを産生させることにより、またはGM-CSFを発現する腫瘍溶解性ウイルスを腫瘍細胞に感染させることにより達成することができる。

【0140】

別の戦略は、樹状細胞を患者の血液から除去し、それらを体外で活性化することである。樹状細胞は、単一の腫瘍特異的ペプチド/タンパク質または腫瘍細胞溶解物(破壊された腫瘍細胞の溶液)でありうる腫瘍抗原の存在下で、活性化される。これらの細胞(選択的なアジュバントを有する)が注入され、免疫応答を惹起する。

30

【0141】

樹状細胞療法は、樹状細胞の表面の受容体に結合する抗体の使用を含む。抗原を抗体に加えることができ、樹状細胞を成熟へ誘導し、腫瘍に対する免疫を提供することができる。TLR3、TLR7、TLR8またはCD40などの樹状細胞受容体が抗体標的として用いられている。

【0142】

3. CAR-T細胞療法

キメラ抗原受容体(キメラ免疫受容体、キメラT細胞受容体または人工T細胞受容体としても知られている、CAR)は、がん細胞を標的とする免疫細胞と新しい特異性を組み合わせた操作された受容体である。通常、これらの受容体はモノクローナル抗体の特異性をT細胞へ移植する。受容体は、異なる供給源からの部分が融合しているため、キメラと呼ばれる。CAR-T細胞療法は、がん治療のためにそのような形質転換細胞を用いる処置をいう。

【0143】

CAR-T細胞デザインの基本原理には、抗原結合機能とT細胞活性化機能を組み合わせた組換え受容体が含まれる。CAR-T細胞の一般的な前提は、がん細胞に見られるマーカーに標的とされるT細胞を人工的に作出することである。科学者らは人からT細胞を取り除き、

40

50

それらを遺伝的に改変し、がん細胞を攻撃するためにそれらを患者に戻すことができる。T細胞がCAR-T細胞になるように操作されると、それは「生きている薬物」として作用する。CAR-T細胞は、細胞外リガンド認識ドメインと細胞内シグナル伝達分子との間にリンクを作出し、これがT細胞を活性化する。細胞外リガンド認識ドメインは通常、一本鎖可変断片(scFv)である。CAR-T細胞療法の安全性の重要な局面は、正常細胞ではなく、がん性腫瘍細胞だけが標的とされることを確実にする方法である。CAR-T細胞の特異性は、標的とされる分子の選択によって決定される。

【0144】

例示的なCAR-T療法としてはチサゲンレクルユーセル(キムリア(Kymriah))およびアキシカブタゲンシロルユーセル(イエスカルタ(Yescarta))が挙げられる。いくつかの態様において、CAR-T療法はCD19を標的とする。

【0145】

4. サイトカイン療法

サイトカインは、腫瘍内に存在する多くのタイプの細胞によって産生されるタンパク質である。それらは免疫応答を調節することができる。腫瘍は、多くの場合、サイトカインを利用して腫瘍を成長させ、免疫応答を低減させる。これらの免疫調節効果により、免疫応答を惹起させる薬物としてそれらを用いることが可能になる。一般的に用いられる2つのサイトカインは、インターフェロンおよびインターロイキンである。

【0146】

インターフェロンは免疫系によって産生される。それらは通常、抗ウイルス応答に関与しているが、がんにも使われている。それらは3つの群に分類される: タイプI (IFN α およびIFN β)、タイプII (IFN γ)ならびにタイプIII (IFN λ)。

【0147】

インターロイキンは、数々の免疫系効果を有する。IL-2は例示的なインターロイキンサイトカイン療法である。

【0148】

5. 養子T細胞療法

養子T細胞療法は、T細胞の輸血(養子細胞移入)による受動免疫の一形態である。T細胞は血液および組織中に見られ、通常、外来病原体を見つけると活性化する。具体的には、T細胞の表面受容体が、表面抗原上に外来タンパク質の一部を提示する細胞に遭遇すると、T細胞は活性化する。これらは感染細胞または抗原提示細胞(APC)のいずれかであることができる。T細胞は正常組織中および腫瘍組織中に見られ、その場合、それらは腫瘍浸潤リンパ球(TIL)として知られている。それらは、腫瘍抗原を提示する樹状細胞などのAPCの存在により活性化される。これらの細胞は腫瘍を攻撃するが、腫瘍内の環境は免疫抑制性が高く、免疫介在性の腫瘍死を防ぐ。

【0149】

腫瘍を標的としたT細胞を産生および取得する複数の方法が開発されている。腫瘍抗原に特異的なT細胞は、腫瘍サンプルから取り出す(TIL)か、血液からろ過することができる。その後の活性化および培養はエクスピボで実施され、その結果、再注入される。活性化は、遺伝子治療を通じて、またはT細胞を腫瘍抗原に曝露することによって行うことができる。

【0150】

6. チェックポイント阻害剤および併用処置

いくつかの態様において、さらなる治療法または薬剤は、免疫チェックポイント阻害剤を含む。ある種の態様を以下にさらに記述する。

【0151】

a. PD-1、PDL1、およびPDL2阻害剤

PD-1は、T細胞が感染または腫瘍に遭遇する腫瘍微小環境において作用することができる。活性化されたT細胞はPD-1を上方制御し、末梢組織においてPD-1を発現し続ける。IFN- γ などのサイトカインは、上皮細胞および腫瘍細胞でのPDL1の発現を誘導する。P

10

20

30

40

50

DL2はマクロファージおよび樹状細胞に発現する。PD-1の主な役割は、末梢でのエフェクタT細胞の活性を制限し、免疫応答中の組織への過度の損傷を防ぐことである。本開示の阻害剤は、PD-1および/またはPDL1活性の1つまたは複数の機能を遮断しうる。

【0152】

「PD-1」の代替名には、CD279およびSLEB2が含まれる。「PDL1」の代替名には、B7-H1、B7-4、CD274、およびB7-Hが含まれる。「PDL2」の代替名には、B7-DC、Btdc、およびCD273が含まれる。いくつかの態様において、PD-1、PDL1、およびPDL2は、ヒトPD-1、PDL1、およびPDL2である。

【0153】

いくつかの態様において、PD-1阻害剤は、PD-1とそのリガンド結合パートナーの結合を阻害する分子である。特定の局面において、PD-1リガンド結合パートナーはPDL1および/またはPDL2である。別の態様において、PDL1阻害剤は、PDL1とそのリガンド結合パートナーの結合を阻害する分子である。特定の局面において、PDL1結合パートナーはPD-1および/またはB7-1である。別の態様において、PDL2阻害剤は、PDL2とそのリガンド結合パートナーの結合を阻害する分子である。特定の局面において、PDL2結合パートナーはPD-1である。阻害剤は抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、またはオリゴペプチドでもよい。例示的な抗体は米国特許第8,735,553号、同第8,354,509号、および同第8,008,449号に記述されており、全てが参照により本明細書に組み入れられる。本明細書において提供される方法および組成物で用いるための他のPD-1阻害剤は、米国特許出願公開第US2014/0294898号、同第US2014/022021号、および同第US2011/0008369号に記述のように当技術分野において公知であり、これらは全て参照により本明細書に組み入れられる。

【0154】

いくつかの態様において、PD-1阻害剤は抗PD-1抗体(例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体)である。いくつかの態様において、抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、およびピディリズマブからなる群より選択される。いくつかの態様において、PD-1阻害剤は、イムノアドヘシン(例えば、定常領域(例えば、免疫グロブリン配列のFc領域)と融合したPDL1またはPDL2の細胞外部分またはPD-1結合部分を含むイムノアドヘシン)である。いくつかの態様において、PDL1阻害剤はAMP-224を含む。ニボルマブはMDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558、およびOPDIVO(登録商標)としても知られ、WO2006/121168に記述の抗PD-1抗体である。ペンブロリズマブはMK-3475、Merck3475、ランブロリズマブ、KEYTRUDA(登録商標)、およびSCH-900475としても知られ、WO2009/114335に記述の抗PD-1抗体である。ピディリズマブはCT-011、hBAT、またはhBAT-1としても知られ、WO2009/101611に記述の抗PD-1抗体である。AMP-224はB7-DCIgとしても知られ、WO2010/027827およびWO2011/066342に記述のPDL2-Fc融合可溶性受容体である。さらなるPD-1阻害剤は、AMP-514としても知られるMEDI0680、およびREGN2810を含む。

【0155】

いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、MEDI4736としても知られるデュルバルマブ、MPDL3280Aとしても知られるアテゾリズマブ、MSB00010118Cとしても知られるアベルマブ、MDX-1105、BMS-936559、またはそれらの組み合わせなどのPDL1阻害剤である。ある種の局面において、免疫チェックポイント阻害剤は、rHlgM12B7などのPDL2阻害剤である。

【0156】

いくつかの態様において、阻害剤はニボルマブ、ペンブロリズマブ、またはピディリズマブの重鎖および軽鎖CDRまたはVRを含む。したがって、1つの態様において、阻害剤は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、またはピディリズマブのVH領域のCDR1、CDR2、およびCDR3ドメイン、ならびにニボルマブ、ペンブロリズマブ、またはピディリズマブのVL領域のCDR1、CDR2およびCDR3ドメインを含む。別の態様において、前記抗体は、前述した抗体と同じ、PD-1、PDL1、もしくはPDL2上のエピトープとの結合において競合

する、および/または前述した抗体と同じ、PD-1、PDL1、もしくはPDL2上のエピトープに結合する。別の態様において、前記抗体は、上述した抗体と少なくとも約70、75、80、85、90、95、97、もしくは99% (またはその中で導出可能な範囲)の可変領域アミノ酸配列同一性を有する。

【0157】

b. CTLA-4、B7-1、およびB7-2

本明細書において提供される方法において標的にされることができる別の免疫チェックポイントは、CD152としても知られる細胞傷害性Tリンパ球タンパク質4 (CTLA-4)である。ヒトCTLA-4の完全cDNA配列はGenbankアクセッション番号L15006を有する。CTLA-4はT細胞表面に見出され、抗原提示細胞の表面上のB7-1 (CD80)またはB7-2 (CD86)に結合すると「オフ」スイッチとして働く。CTLA4は、ヘルパーT細胞表面に発現し、阻害シグナルをT細胞に伝達する免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。CTLA4はT細胞補助刺激タンパク質であるCD28に類似し、両分子とも、抗原提示細胞上のB7-1およびB7-2に結合する。CTLA-4は阻害シグナルをT細胞に伝達するのに対して、CD28は刺激シグナルを伝達する。細胞内CTLA-4は調節性T細胞の中にも見出され、その機能にとって重要である可能性がある。T細胞受容体およびCD28を介してT細胞が活性化されると、B7分子に対する抑制性受容体であるCTLA-4の発現が増加する。本開示の阻害剤は、CTLA-4、B7-1、および/またはB7-2活性のうちの1つまたは複数の機能を遮断しうる。いくつかの態様において、阻害剤はCTLA-4およびB7-1相互作用を遮断する。いくつかの態様において、阻害剤はCTLA-4およびB7-2相互作用を遮断する。

【0158】

いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、抗CTLA-4抗体(例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、もしくはキメラ抗体)、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、またはオリゴペプチドである。

【0159】

本発明の方法で用いるのに適した抗ヒト-CTLA-4抗体(またはそれに由来するVHドメインおよび/もしくはVLドメイン)は、当技術分野において周知の方法を用いて作出することができる。あるいは、当技術分野において認められている抗CTLA-4抗体を用いることができる。例えば、米国特許第8,119,129号、WO01/14424、WO98/42752;WO00/37504 (CP675,206、トレメリムマブ; 以前はチシリムマブとしても知られる)、米国特許第6,207,156号; Hurwitz et al., 1998に開示される抗CTLA-4抗体は、本明細書において開示される方法において用いることができる。前述した刊行物のそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。CTLA-4との結合では、これらの当技術分野において認められている任意の抗体と競合する抗体も用いることができる。例えば、ヒト化CTLA-4抗体は、国際特許出願番号WO2001/014424、WO2000/037504、および米国特許第8,017,114号に記述されており、全てが参照により本明細書に組み入れられる。

【0160】

本開示の方法および組成物においてチェックポイント阻害剤として有用なさらなる抗CTLA-4抗体は、イピリムマブ(10D1、MDX-010、MDX-101、およびヤーボイ(Yervoy))(登録商標)としても知られる)またはその抗原結合断片および変種である(例えば、WO01/14424を参照されたい)。

【0161】

いくつかの態様において、阻害剤はトレメリムマブまたはイピリムマブの重鎖および軽鎖CDRまたはVRを含む。したがって、1つの態様において、阻害剤は、トレメリムマブまたはイピリムマブのVH領域のCDR1、CDR2、およびCDR3ドメイン、ならびにトレメリムマブまたはイピリムマブのVL領域のCDR1、CDR2およびCDR3ドメインを含む。別の態様において、前記抗体は、前述した抗体と同じ、PD-1、B7-1、もしくはB7-2上のエピトープとの結合において競合する、および/または前述した抗体と同じ、PD-1、B7-1、もしくはB7-2上のエピトープに結合する。別の態様において、前記抗体は、上述した抗体と少なくとも約70、75、80、85、90、95、97、もしくは99% (またはその中で導出可能な

範囲)の可変領域アミノ酸配列同一性を有する。

【0162】

B. 腫瘍溶解性ウイルス

いくつかの態様において、さらなる治療法または薬剤は、腫瘍溶解性ウイルスを含む。腫瘍溶解性ウイルスは、選択的にがん細胞に感染し、がん細胞を死滅化するウイルスである。感染したがん細胞が腫瘍溶解によって破壊されると、それらは新しい感染性ウイルス粒子またはビリオンを放出して、残存している腫瘍を破壊するのを助ける。腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍細胞の直接破壊を引き起こすだけでなく、長期免疫療法のために宿主の抗腫瘍免疫応答を刺激すると考えられている。

【0163】

C. 多糖類

いくつかの態様において、さらなる治療法または薬剤は多糖類を含む。キノコに見出されるある種の化合物、主に多糖類は、免疫系を上方制御することができ、抗がん特性を持ちうる。例えば、レンチナンなどのベータ-グルカン、マクロファージ、NK細胞、T細胞および免疫系サイトカインを刺激することが実験室での研究において示されており、免疫学的アジュバントとして臨床試験で調べられている。

【0164】

D. 新生抗原

いくつかの態様において、さらなる治療法または薬剤は新生抗原の投与を含む。多くの腫瘍は変異を発現している。これらの変異は、T細胞免疫療法で用いるための新しく標的とすることが可能な抗原(新生抗原)を潜在的に作出する。RNA配列決定データを用いて特定された、がん病変におけるCD8+ T細胞の存在は、変異負荷の高い腫瘍において高くなる。ナチュラルキラー細胞およびT細胞の細胞溶解活性に関連する転写物のレベルは、多くのヒト腫瘍における変異負荷と正の相関がある。

【0165】

E. 化学療法

いくつかの態様において、さらなる治療法または薬剤は化学療法を含む。化学療法剤の適当なクラスは、(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)、ニトロソ尿素(例えば、カルムスチン、ロムスチン、クロロゾトシン、ストレプトゾシン)およびトリアジン(例えば、ジカルバジン)、(b) 代謝拮抗薬、例えば葉酸類似体(例えば、メトトレキサート)、ピリミジン類似体(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)およびプリン類似体ならびに関連物質(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、例えばビンカアルカロイド(例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン)、エポドフィロトキシン(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キサントロン)、酵素(例えば、L-アスパラギナーゼ)、ならびに生物学的応答修飾物質(例えば、インターフェロン- α)、ならびに(d) 種々の作用物質(Miscellaneous Agents)、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、ヒドロキシ尿素)、メチルヒドラジン誘導体(例えば、プロカルバジン)、および副腎皮質抑制剤(例えば、タキソールおよびミトタン)を含む。いくつかの態様において、シスプラチンは特に適当な化学療法剤である。

【0166】

シスプラチンは、例えば、転移性精巣がんもしくは卵巣がん、進行性膀胱がん、頭頸部がん、子宮頸がん、肺がんまたは他の腫瘍などのがんを処置するために広く用いられてきた。シスプラチンは経口的に吸収されず、それゆえ、例えば、静脈内、皮下、腫瘍内または腹腔内注射などの他の経路を介して送達しなければならない。シスプラチンは単独または他の薬剤との組み合わせで用いることができ、ある種の態様では計3過程について3週

10

20

30

40

50

間ごとに5日間、約15 mg/m²から約20 mg/m²を含め臨床用途において用いられる有効用量が企図される。いくつかの態様において、治療用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結されたEgr-1プロモーターを含む構築体と併せて細胞および/または対象に送達されるシスプラチンの量は、シスプラチンを単独で用いる場合に送達されるであろう量よりも少ない。

【0167】

他の適当な化学療法剤は、抗微小管剤、例えば、パクリタキセル(「タキソール」)および塩酸ドキソルビシン(「ドキソルビシン」)を含む。アデノウイルスベクターおよびドキソルビシンを介して送達されるEgr-1プロモーター/TNF α 構築体の組み合わせは、化学療法および/またはTNF- α に対する耐性を克服するのに効果的であることが確認されており、このことから、構築体およびドキソルビシンによる併用処置がドキソルビシンおよびTNF- α の両方に対する耐性を克服することが示唆される。

【0168】

ドキソルビシンは吸収が不十分であり、好ましくは静脈内投与される。ある種の態様において、成体に適切な静脈内用量は、約21日間隔で約60 mg/m²から約75 mg/m²または約3週間から約4週間間隔で繰り返される2日もしくは3日連続のそれぞれで約25 mg/m²から約30 mg/m²または週に1回、約20 mg/m²を含む。以前の化学療法によって引き起こされた以前の骨髄抑制もしくは腫瘍性骨髄浸潤がある場合、または薬物が他の骨髄造血抑制薬と組み合わされている場合、高齢患者においては最低用量が用いられるべきである。

【0169】

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適当な化学療法剤である。ナイトロジェンマスタードは、メクロレタミン(HN2)、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を含みうるが、これらに限定されることはない。シクロホスファミド(シトキサン(CYTOXAN)(登録商標))はMead Johnsonから入手可能であり、NEOSTAR(登録商標)はAdriaから入手可能であり、別の適当な化学療法剤である。成体に適した経口用量は、例えば、約1 mg/kg/日から約5 mg/kg/日を含み、静脈内用量は、例えば、最初に約2日から約5日にわたり分割用量で約40 mg/kgから約50 mg/kg、または約7日から約10日ごとに約10 mg/kgから約15 mg/kgまたは週2回、約3 mg/kgから約5 mg/kg、または約1.5 mg/kg/日から約3 mg/kg/日を含む。胃腸への悪影響のため、静脈内経路が好ましい。薬物はまた、筋肉内に、浸潤によりまたは体腔内に投与されることもある。

【0170】

さらなる適当な化学療法剤は、シタラビン(シトシンアラビノシド)、5-フルオロウラシル(フルオロウラシル; 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)などの、ピリミジン類似体を含む。5-FUは、約7.5~約1000 mg/m²の投与量で対象に投与されうる。さらに、5-FU投薬スケジュールは種々の期間、例えば、最大6週間、または本開示が関連する当業者によって決定されるものでありうる。

【0171】

別の適当な化学療法剤であるゲムシタピンニリン酸(GEMZAR(登録商標), Eli Lilly & Co., 「ゲムシタピン」)は、進行性および転移性膀胱がんの処置に推奨され、それゆえ、同様にこれらのがんに対し本開示において有用であろう。

【0172】

患者に送達される化学療法剤の量は可変でありうる。1つの適当な態様において、化学療法剤は、化学療法が構築体とともに施される場合、宿主におけるがんの停止または退行を引き起こすのに有効な量で投与されうる。他の態様において、化学療法剤は、化学療法剤の化学療法有効量よりも2から10,000倍少ないいずれかの量で投与されうる。例えば、化学療法剤は、化学療法剤の化学療法有効量よりも約20倍少ない、約500倍少ない、またはさらには約5000倍少ない量で投与されうる。本開示の化学療法薬は、構築体との組み合わせでの所望の治療活性について、および有効な投与量の決定について、インビボで試

験することができる。例えば、そのような化合物はヒトでの試験の前に、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなどを含むが、これらに限定されない、適当な動物モデル系で試験することができる。実施例に記述されているように、インビトロ試験を用いて、適当な組み合わせおよび投与量を決定することもできる。

【0173】

F. 放射線療法

いくつかの態様において、さらなる治療法もしくは薬剤または以前の治療法は、電離放射線などの放射線を含む。本明細書において用いられる場合、「電離放射線」は、十分なエネルギーを有するか、または電離(電子の獲得もしくは喪失)を生み出すための核相互作用を介して十分なエネルギーを生み出すことができる粒子または光子を含む放射線を意味する。例示的なかつ好ましい電離放射線は、x線である。標的組織または細胞にx線を送達するための手段は、当技術分野において周知である。

【0174】

いくつかの態様において、電離放射線の量は20 Gyより大きく、1回の線量で投与される。いくつかの態様において、電離放射線の量は18 Gyであり、3回の線量で投与される。いくつかの態様において、電離放射線の量は少なくとも、多くとも、または正確に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、もしくは40 Gy (またはその中で導出可能な任意の範囲)である。いくつかの態様において、電離放射線は少なくとも、多くとも、または正確に1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10回(またはその中で導出可能な任意の範囲)の線量で投与される。2回以上の線量が投与される場合、線量は約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、あるいはその中で導出可能な任意の範囲の間隔を空けてもよい。

【0175】

いくつかの態様において、IRの量はIRの総線量として提示されてもよく、それが分割線量で投与される。例えば、いくつかの態様において、総線量は、各5 Gyの10回の分割線量で投与される50 Gyである。いくつかの態様において、総線量は、各2~3 Gyの20~60回の分割線量で投与される50~90 Gyである。いくつかの態様において、IRの総線量は少なくとも、多くとも、または約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、もしくは150 (またはその中で導出可能な任意の範囲)である。いくつかの態様において、総線量は少なくとも、多くとも、または正確に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、15、20、25、30、35、40、45、もしくは50 Gy (またはその中で導出可能な任意の範囲)の分割線量で投与される。いくつかの態様において、少なくとも、多くとも、または正確に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、もしくは100回の分割線量が投与される(またはその中で導出可能な任意の範囲)。いくつかの態様において、少なくとも、多くとも、または正確に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12回(またはその中で導出可能な任意の範囲)の分割線量が1日当たり投与される。いくつかの態様において、少なくとも、多くとも、または正確に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、1

1、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30回(またはその中で導出可能な任意の範囲)の分割線量が1週間当たり投与される。

【0176】

G. 外科手術

がんを有する人のおよそ60%は、予防手術、診断、または進行度診断のための手術、根治的手術、および緩和的手術を含む何らかの種類の外科手術を受ける。根治的手術は、がん組織の全てまたは一部が物理的に除去、切除、および/または破壊される切除を含み、本発明の態様の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法、および/または代替療法などの他の療法とともに用いられる場合がある。腫瘍切除とは、腫瘍の少なくとも一部の物理的除去をいう。腫瘍切除に加えて、外科手術による処置は、レーザー手術、凍結手術、電気手術、および顕微鏡的に管理される手術(モース術)を含む。

【0177】

がんの細胞、組織、または腫瘍の一部または全てを切除すると体内に空洞が形成されることがある。処置は、その領域にさらなる抗がん療法を灌流、直接注射、または局所塗布することによって行われてもよい。そのような処置は、例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは7日ごとに、または1週間、2週間、3週間、4週間、および5週間ごとに、または1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、もしくは12ヶ月ごとに繰り返されてもよい。これらの処置もさまざまな投与量の処置であってもよい。

【0178】

H. 他の作用物質

処置の治療有効性を改善するために、本発明の態様のある種の局面と組み合わせて他の作用物質が用いられうることが企図される。これらのさらなる作用物質には、細胞表面受容体およびギャップ結合の上方制御に影響を及ぼす作用物質、細胞分裂停止物質および分化物質、細胞接着阻害剤、アポトーシス誘導物質に対する過剰増殖性細胞の感受性を高める作用物質、または他の生物学的作用物質が含まれる。ギャップ結合数を増やすことで細胞間シグナル伝達を増大させると、付近の過剰増殖性細胞集団に対する抗過剰増殖作用が増大する。他の態様において、処置の抗過剰増殖有効性を改善するために、細胞分裂停止物質または分化物質は本発明の態様のある種の局面と組み合わせて用いることができる。細胞接着阻害剤は本発明の態様の有効性を改善することが企図される。細胞接着阻害剤の例は局所接着キナーゼ(FAK)阻害剤およびロバスタチンである。処置有効性を改善するために、アポトーシスに対する過剰増殖性細胞の感受性を高める他の作用物質、例えば、抗体c225を本発明の態様のある種の局面と併用できることがさらに企図される。

【0179】

VI. 治療用組成物の投与

本開示の方法は、治療剤の組み合わせの投与、ならびに/または、糞便物質(fecal matter)などの治療剤、および例えばステロイド療法もしくは抗インテグリン療法などの治療レジメンの投与を含む。治療は、当技術分野において公知の任意の適当な方法で投与される。例えば、治療は連続的に(異なる時間に)または同時に(同じ時間に)投与される。いくつかの態様において、治療は別個の組成物中である。いくつかの態様において、治療は同じ組成物中である。

【0180】

例えば、1つの治療法を「A」と指定し、別の治療法を「B」と指定して、治療法のさまざまな組み合わせが利用される。

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		

【0181】

10

20

30

40

50

健常対象からの糞便物質などの、本開示の治療法は、同じ投与経路によってまたは異なる投与経路によって投与されうる。いくつかの態様において、治療法は結腸内に、静脈内に、筋肉内に、皮下に、局所的に、経口的に、経皮的に、腹腔内に、眼窩内に、移植により、吸入により、髄腔内に、脳室内に、または鼻腔内に投与される。いくつかの態様において、微生物調節因子は静脈内に、筋肉内に、皮下に、局所的に、経口的に、経皮的に、腹腔内に、眼窩内に、移植により、吸入により、髄腔内に、脳室内に、または鼻腔内に投与される。

【0182】

投与される量は、処置の数および単位用量の両方に応じて、望まれる処置効果に依存する。有効用量は、特定の効果を達成するために必要な量をいうものと理解されている。ある種の態様における実践において、10 mg/kgから200 mg/kgの範囲内の用量が、これらの薬剤の防御能力に影響を与えうることが企図される。したがって、用量は、約0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、および200、300、400、500、1000 $\mu\text{g/kg}$ 、 mg/kg 、 $\mu\text{g/日}$ 、または mg/日 あるいはその中で導出可能な任意の範囲の用量を含むことが企図される。さらに、そのような用量は1日の間に、および/または複数の日、週、もしくは月に複数回で投与することができる。

【0183】

いくつかの態様において、ヒトに投与される治療用組成物の治療的に有効または十分な量は、1回または複数回の投与によるかどうかにかかわらず、約0.01から約50 mg/kg患者体重の範囲内であろう。いくつかの態様において、使用される治療剤は、例えば、毎日投与される約0.01～約45 mg/kg、約0.01～約40 mg/kg、約0.01～約35 mg/kg、約0.01～約30 mg/kg、約0.01～約25 mg/kg、約0.01～約20 mg/kg、約0.01～約15 mg/kg、約0.01～約10 mg/kg、約0.01～約5 mg/kg、または約0.01～約1 mg/kgである。いくつかの態様において、治療剤は15 mg/kgで投与される。しかしながら、他の投薬レジメンが有用でありうる。1つの態様において、本明細書において記述される治療剤は、21日周期の1日目に約100 mg、約200 mg、約300 mg、約400 mg、約500 mg、約600 mg、約700 mg、約800 mg、約900 mg、約1000 mg、約1100 mg、約1200 mg、約1300 mgまたは約1400 mgの用量で対象に投与される。用量は、注入などで、単回用量としてまたは複数回用量(例えば、2回もしくは3回の用量)として投与されうる。この治療法の進行は、従来の技法によって容易にモニタリングされる。

【0184】

ある種の態様において、薬学的組成物の有効用量は、約1 μM から150 μM の血中レベルを提供することができるものである。別の態様において、有効用量は、約4 μM ～100 μM ；もしくは約1 μM ～100 μM ；もしくは約1 μM ～50 μM ；もしくは約1 μM ～40 μM ；もしくは約1 μM ～30 μM ；もしくは約1 μM ～20 μM ；もしくは約1 μM ～10 μM ；もしくは約10 μM ～150 μM ；もしくは約10 μM ～100 μM ；もしくは約10 μM ～50 μM ；もしくは約25 μM ～150 μM ；もしくは約25 μM ～100 μM ；もしくは約25 μM ～50 μM ；もしくは約50 μM ～150 μM ；もしくは約50 μM ～100 μM (またはその中で導出可能な任意の範囲)の血中レベルを提供する。他の態様において、用量は、対象に投与される治療剤から生じる以下の薬剤血中レベルを提供することができる：約、少なくとも約、または多くとも約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、もしくは100 μM またはその中で導出可能な任意の範囲。ある種の態様において、対象に投与される治療剤は、代謝された治療剤に体内で代謝され、その場合、血中レベルはそ

の薬剤の量をいう。あるいは、治療剤が対象によって代謝されない範囲では、本明細書において論じられる血中レベルは、代謝されていない治療剤をいう。

【0185】

治療用組成物の正確な量も、実務者の判断に依存し、各個人に特有である。用量に影響を与える要因は、患者の身体的および臨床的状态、投与経路、意図する処置目標(症状の緩和か治癒か)、ならびに対象が受けている可能性のある特定の治療用物質または他の治療法の効力、安定性および毒性を含む。

【0186】

当業者は、 $\mu\text{g}/\text{kg}$ または mg/kg 体重の投与量単位を変換して、 $4\ \mu\text{M}$ から $100\ \mu\text{M}$ などの、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ または mM (血中レベル)の同等の濃度単位で表現できることを理解し、認識しているであろう。取り込みは種および器官/組織に依存することも理解されている。取り込みおよび濃度測定に関してなされる適用可能な変換因子および生理学的仮定は周知であり、当業者は、ある濃度測定値を別の濃度測定値に変換し、本明細書において記述される用量、有効性および結果に関して合理的な比較および結論を下すことができよう。

【0187】

VII. キット

本開示のある種の局面はまた、がんの検出、診断、または処置などの、本開示の方法を実施するためのキットを包含する。そのようなキットは、容易に入手できる材料および試薬から調製することができる。例えば、そのようなキットは、以下の材料のいずれか1つまたは複数を含むことができる: 酵素、反応管、緩衝液、界面活性剤、プライマー、プローブ、抗体。好ましい態様において、これらのキットは、実務者が血液、涙液、精液、唾液、尿、組織、血清、便、唾液、脳脊髄液および細胞溶解物からの上清中の新生物細胞のサンプルを得ることを可能にする。別の好ましい態様において、これらのキットは、RNA抽出、RT-PCR、およびゲル電気泳動を実施するために必要な機器を含む。アッセイを実施するための使用説明書をキットに含めることもできる。

【0188】

キットは、配列を評価するためにキットを用いるための使用説明書、予後診断を行うために配列データを変換および/または分析するための手段をさらに含む。バイオマーカー発現を測定するためのキット中の作用物質は、qRT-PCR用の複数のPCRプローブおよび/もしくはプライマー、ならびに/またはバイオマーカーの発現を評価するための複数の抗体もしくはその断片を含む。別の態様において、バイオマーカー発現を測定するためのキット中の作用物質は、本発明のバイオマーカーのmRNAに相補的なポリヌクレオチドのアレイを含む。発現データを発現値に変換するための、および発現値を分析して生存度または予後を予測するスコアを生成するための可能な手段も含まれる。

【0189】

キットは、ラベル付きの容器を含む。適当な容器は、例えば、ボトル、バイアル、および試験管を含む。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料で形成される。容器は、上記のような、予後または予後以外の用途に有用なプローブを含む組成物を保持する。容器のラベルは、組成物が特定の予後または予後以外の用途に用いられることを示し、また、上記のものなどの、インビボまたはインビトロのいずれかでの使用法を示す。キットは、上記の容器、ならびに緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、注射器、および使用説明書付きの添付文書を含めて、商業的観点および利用者の観点から望ましい材料を含む1つまたは複数の他の容器を含む。

【0190】

さらなるキットの態様は、本開示の治療用組成物を含むキットに関する。キットは、本開示の処置方法において有用であり、使用説明書を含む。

【実施例】

【0191】

VIII. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を実証するために含まれる。以下の実施例に関

10

20

30

40

50

示される技法は、本発明者らが発見した技法が本発明の実践において十分に機能することを示し、したがって、その実践に好ましい様式を構成すると考えられると当業者に理解されるはずである。しかしながら、本開示を考慮すれば、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、開示された特定の態様において多くの変更を加えることができ、それでもなお類似または同様の結果を得ることができると当業者に理解されるはずである。

【0192】

実施例1－EGFR TKI耐性は間葉表現型およびCD70の発現増加に関連している

本明細書で、本発明者らは、CD70がTKI耐性EGFR変異体腫瘍の治療標的であり、CD70-抗体薬物コンジュゲート、抗CD70 CAR-T細胞、もしくはTriNKET、EGFR-CD70 BiTE、Axl-CD70 BiTEなどのCD70を標的とするアプローチ、またはCD70を標的とする他のアプローチ(まとめてCD70指向性療法といわれる)が単独でまたは他の処置との組み合わせで、TKI耐性EGFR変異体腫瘍に有効でありうることを実証する。さらに、EGFR変異は、CD70を標的とする薬剤で処置される患者を選択するためのバイオマーカーである。さらに、本発明者らは、CD70標的指向性が間葉系NSCLC腫瘍の治療戦略であること、および遺伝子発現またはタンパク質マーカー(まとめて上皮間葉転換(EMT)バイオマーカーといわれる)によって決定される間葉系状態が、CD70標的指向性療法による処置に向けて患者を選択するためのバイオマーカーであることを記述する。

【0193】

TKI耐性EGFR変異体NSCLCにおける潜在的な標的を同定するための努力の一環として、本発明者らは、EGFR TKIエルロチニブ、ゲフィチニブおよびオシメルチニブに対する獲得耐性を有するNSCLC細胞株のパネルを導出した。トランスクリプトミクスおよびプロテオミクスプロファイリングにより、耐性細胞が上皮間葉転換(EMT)を起こしていたことが明らかにされた。遺伝子発現分析により、親(EGFR TKI感受性)細胞と比較してEGFR TKI耐性細胞において、CD70が有意に過剰発現していることが明らかにされた。CD70の遺伝子発現がEGFR TKIに対する獲得耐性を有するNSCLC細胞において高度に上方制御されたという本発明者らの知見は、フローサイトメトリーにより検証され、耐性細胞が親(EGFR TKI感受性)細胞と比較して細胞表面に高いレベルのCD70タンパク質を発現することを実証するものであった。EMTを起こしたNSCLC臨床検体においてCD70が増加しているかどうかを評価するために、本発明者らはTCGAからのRNAseqデータを評価した。CD70の発現は、NSCLC腫瘍検体における間葉系遺伝子シグネチャーと相関していた。

【0194】

CD70は、T細胞およびB細胞に、また白血病細胞および腎細胞がんを含む一部の悪性細胞に発現することが知られている。CD70の発現は、調節性T細胞に影響を及ぼし/誘引し、T細胞のアポトーシスおよび枯渇を促進することにより、免疫抑制環境に寄与すると考えられている。さらに、CD70を発現する腫瘍細胞は、抗CD70抗体-薬物コンジュゲートまたはCAR T細胞を用いて直接標的とすることができる。まとめると、本明細書において提示されるデータは、EGFR TKIに対する獲得耐性を有するNSCLC細胞においてCD70が過剰発現していることを実証し、かつCD70標的指向性がこの設定において有効な治療戦略でありうることを示唆している。

【0195】

EGFR変異体NSCLC患者は、最初はEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)に応答するが、耐性疾患が必然的に出現する。本発明者らは、EGFR TKIに対する獲得耐性を有するNSCLC細胞株のパネルを導出した。EGFR-TKI耐性(ER)細胞は、二次EGFR変異に対して陰性であり、EGFR TKIに耐性であった(図1)。RNAseqおよび遺伝子発現分析を用いて、本発明者らは、EGFR TKI耐性細胞が、上皮間葉転換(EMT)の主要なメディエータであるZEB1およびZEB2ばかりでなく、CDH1発現の喪失ならびにVIMおよびAXLの発現の増加を含めて間葉系遺伝子発現シグネチャーを示すことを確認した(図2A～G)。RNA発現分析から、EGFR TKI耐性細胞がCD70を高度に過剰発現したことがさらに明らかにされた(図2H)。フローサイトメトリー分析から、EGFR TKI感受性親細胞と比較してEGFR TKI耐性細胞の表面上のCD70タンパク質レベルの増加が明らかにされた(図3)。さらに、HCC827親(EGFR T

KI感受性)細胞におけるZEB1の強制発現によるEMTの誘導は、細胞をエルロチニブ、オシメルチニブまたはアファチニブによるEGFR阻害に耐性とするのに十分であった(図4)。EGFR TKI耐性がEMTに関連しているという知見、およびこれらの細胞がCD70を過剰発現するという知見を考慮して、本発明者らは次に、TCGAデータベースを用いて、CD70の発現がヒト肺腺がんにおける間葉表現型に関連するかどうかを評価した。本発明者らは、CD70発現が肺腺がんにおいておよびNSCLC細胞株の広範なパネルにおいてEMT遺伝子発現シグネチャーと有意に関連していることを見出した(図5)。CD70は通常、T細胞およびB細胞で発現されるが、一部の悪性細胞でも発現されうる。腫瘍細胞によるCD70の発現は、調節性T細胞に影響を及ぼし/誘引し、T細胞のアポトーシスおよび枯渇を促進することにより、免疫抑制環境に寄与すると考えられている。CD70の発現がEGFR TKI耐性細胞において増強されるというこれらの知見は、CD70標的指向性がEGFR TKI耐性NSCLCの設定において臨床的に有用でありうることを示唆している。

10

【0196】

実施例2: EGFR TKI耐性は間葉表現型およびCD70の発現増加に関連している

本実施例は、実施例1の重複データおよび/または再編データを含みうる。

【0197】

EGFR変異体NSCLC患者は、最初はEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)に応答するが、耐性疾患が必然的に出現する。本発明者らは、EGFR TKIに対する獲得耐性を有するNSCLC細胞株のパネルを導出した。EGFR-TKI耐性(ER)細胞は、二次EGFR変異に対して陰性であり、EGFR TKIに耐性であった(図1)。RNAseqおよび遺伝子発現分析を用いて、本発明者らは、EGFR TKI耐性細胞が、上皮間葉転換(EMT)の主要なメディエータであるZEB1およびZEB2ばかりでなく、CDH1発現の喪失ならびにVIMおよびAXLの発現の増加を含めて間葉系遺伝子発現シグネチャーを示すことを確認した(図6)。RNA発現分析から、EGFR TKI耐性細胞がCD70を高度に過剰発現したことがさらに明らかにされた(図7A)。フローサイトメトリー分析から、EGFR TKI感受性親細胞と比較してEGFR TKI耐性細胞の表面上のCD70タンパク質レベルの増加が明らかにされた(図7B~F)。CD70がEGFR TKI耐性の動物モデルにおいて上昇するかどうかを決定するために、本発明者らは、ドキシサイクリンの投与が変異体EGFR発現および肺腫瘍の発生をもたらすドキシサイクリン誘導性EGFR L858R GEMMモデルを利用した。CTイメージングによって腫瘍が視覚化されたら、ドキシサイクリンを動物のサブセットから除去して、EGFR阻害を模倣した。腫瘍退縮の期間の後、CTイメージングによって決定すると、腫瘍が再成長し始めた。動物をオシメルチニブで処置して、EGFR TKI耐性表現型を確認した。腫瘍を収集し、CD70発現を免疫組織化学によって分析した。CD70発現は、後天性EGFR非依存性の腫瘍において上昇した(図8)。次に、本発明者らは、EGFR変異体EGFR TKI未処置NSCLC臨床検体およびEGFR TKI耐性後に収集されたEGFR変異体NSCLC検体におけるCD70発現を評価した。処置を受けていない組織ではCD70の発現は最小限であったが、EGFR TKI耐性腫瘍においてCD70は高発現していた(図9)。

20

30

【0198】

次に、本発明者らは、EGFR変異体NSCLC細胞株におけるCD70発現に及ぼすEMTの影響について調べた。本発明者らは、HCC827親(EGFR TKI感受性)細胞におけるZEB1の強制発現を通じてEMTを誘導した。ZEB1発現は間葉表現型を誘導し、細胞をエルロチニブ、オシメルチニブまたはアファチニブによるEGFR阻害に耐性とするのに十分であった(図10AおよびB)。ZEB1の発現は、CD70 mRNAレベルおよびCD70の細胞表面発現の有意な増加を誘導した。本発明者らは次に、TCGAデータベースを用いて、CD70の発現がNSCLC細胞株およびヒト肺腺がんにおける間葉表現型に関連するかどうかを評価した。本発明者らは、CD70発現が肺腺がんにおいておよびNSCLC細胞株の広範なパネルにおいてEMT遺伝子発現シグネチャーおよびZEB1発現と有意に関連していることを見出した(図11)。

40

【0199】

CD27のCD70への結合は、CD70下流のシグナル伝達経路の活性化を誘導する。EGFR TKI耐性細胞に及ぼすCD70シグナル伝達の潜在的な影響を調べるために、本発明者らは組

50

換え可溶性CD27でEGFR TKI耐性細胞を刺激した。CD27処理は、EGFR TKI耐性において再活性化されることが知られている重要なシグナル伝達分子AktおよびERKの活性化をもたらした(図12)。次に、本発明者らは、siRNAを用いてCD70発現をノックダウンし、CD70のノックダウンがクローン原性アッセイによってEGFR TKI耐性細胞の増殖を損なうことを見出した(図13)。

【0200】

CD70抗体薬物コンジュゲート(ADC)がEGFR TKI耐性細胞を標的とするための有効なアプローチであるかどうかを判断するために、本発明者らはH1975細胞(CD70低かつEGFR TKI感受性)ならびにH1975 OR5およびH1975 OR16 (ともにEGFR TKI耐性かつCD70高)を漸増濃度のCD70 ADCクサツズマブ-MMAEまたはボルセツズマブ-MMAEで処理した。予想通り、H1975 OR5およびOR16細胞は、H1975親細胞よりもCD70 ADCに対して感受性が高かった(図14および図16)。本発明者らはさらに、オシメルチニブを抗CD70 ADCと組み合わせた場合に相加的な抗腫瘍細胞効果を観察した(図15)。

【0201】

CD70は通常、T細胞およびB細胞で発現されるが、一部の悪性細胞でも発現されうる。腫瘍細胞によるCD70の発現は、調節性T細胞に影響を及ぼし/誘引し、T細胞のアポトーシスおよび枯渇を促進することにより、免疫抑制環境に寄与すると考えられている。CD70の発現がEGFR TKI耐性細胞において増強されるというこれらの知見は、CD70標的指向性がEGFR TKI耐性NSCLCの設定において臨床的に有用でありうることを示唆している。

【0202】

本明細書において開示および主張される方法は全て、本発明を考慮すれば過度の実験なく作出および実施することができる。本発明の組成物および方法を好ましい態様に関して記述してきたが、本発明の概念、趣旨、および範囲から逸脱することなく、本明細書において記述される方法および本明細書において記述される方法の段階または段階の順序に変更を加えることができることは当業者に明らかである。さらに具体的には、本明細書において記述される薬剤の代わりに、化学的および生理学的に関連している、ある種の薬剤を用いることができ、それと同時に、同一の結果または類似の結果が得られることが明らかである。当業者に明らかな、このような類似の代用および変更は全て、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の趣旨、範囲、および概念の範囲内だと考えられる。本出願において記載される刊行物は、本明細書において記載されるものを補足する例示的な手順または他の詳細を提供する範囲で、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

10

20

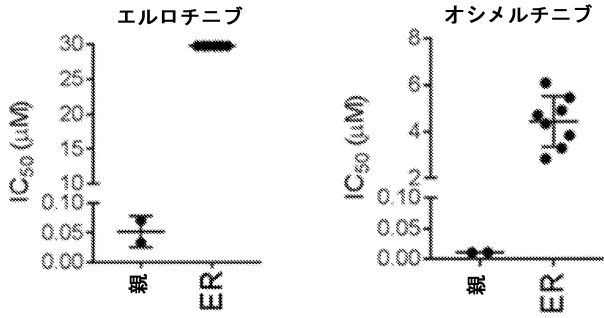
30

40

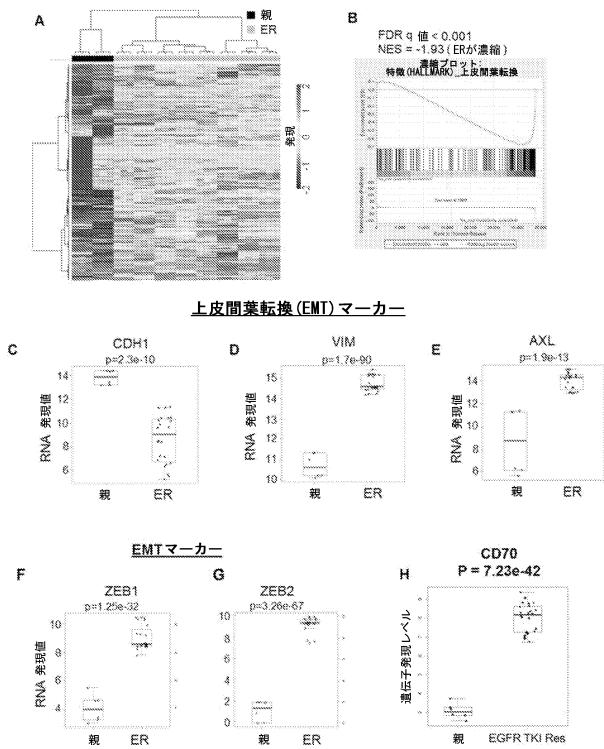
50

【図面】

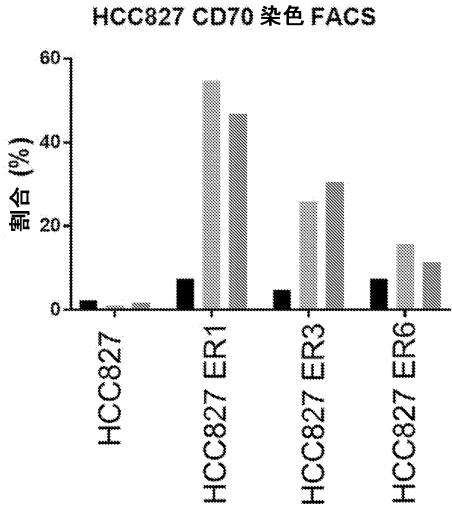
【図 1】



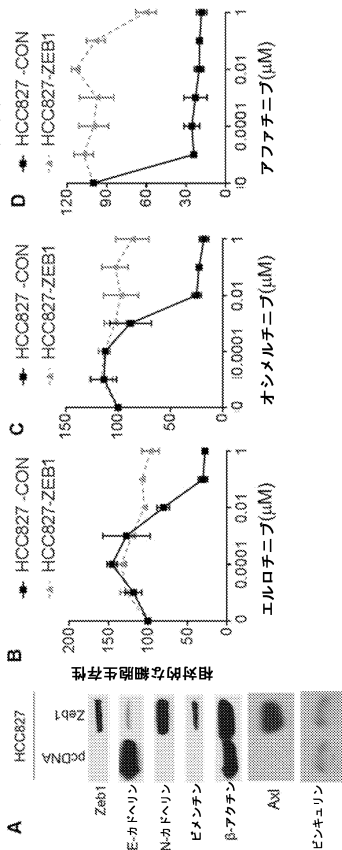
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

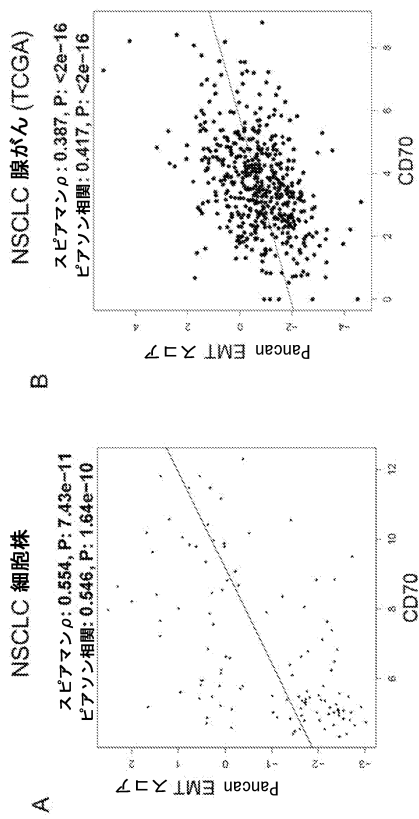
20

30

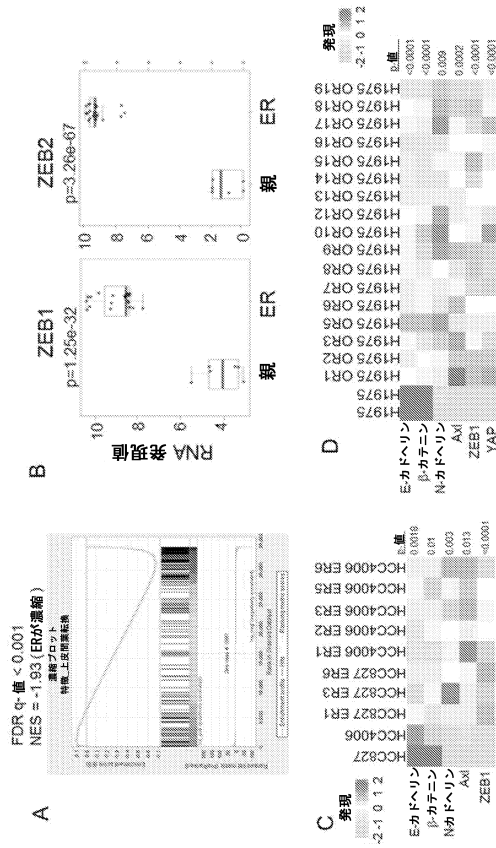
40

50

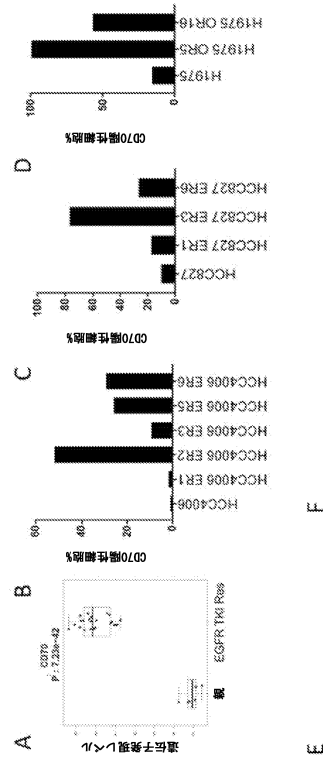
【図 5】



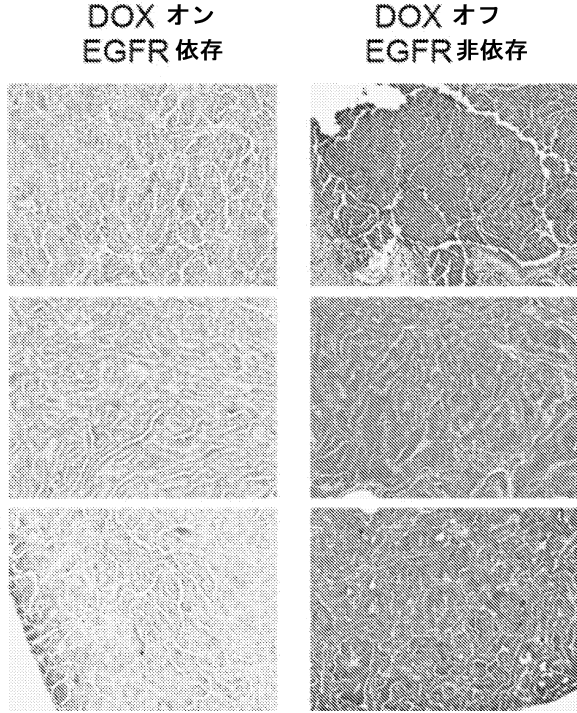
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

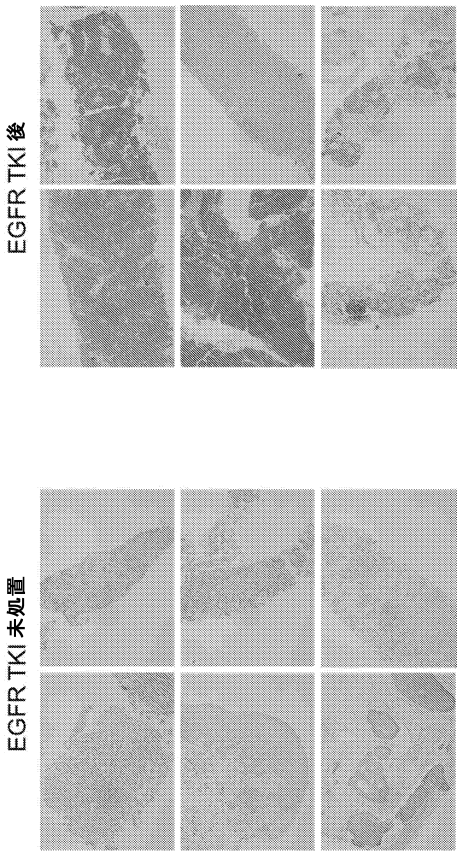
20

30

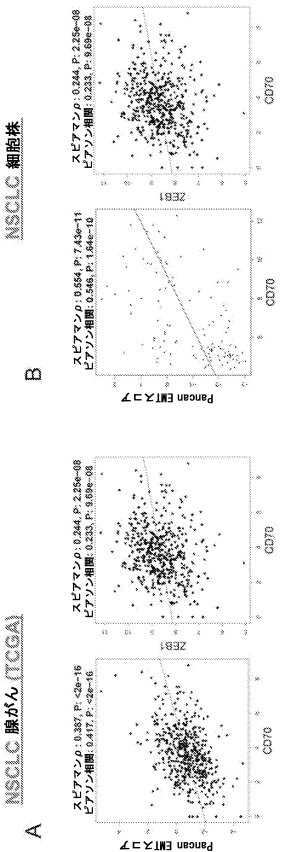
40

50

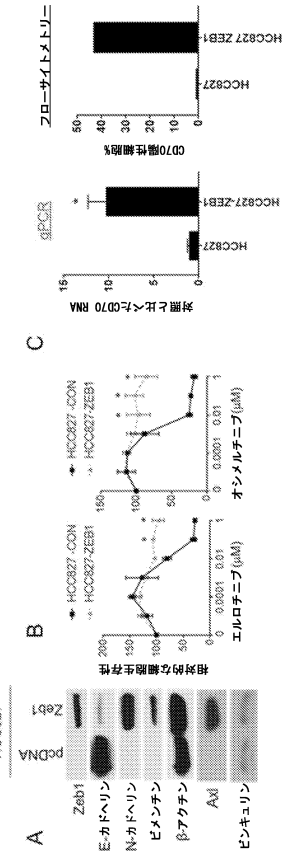
【図 9】



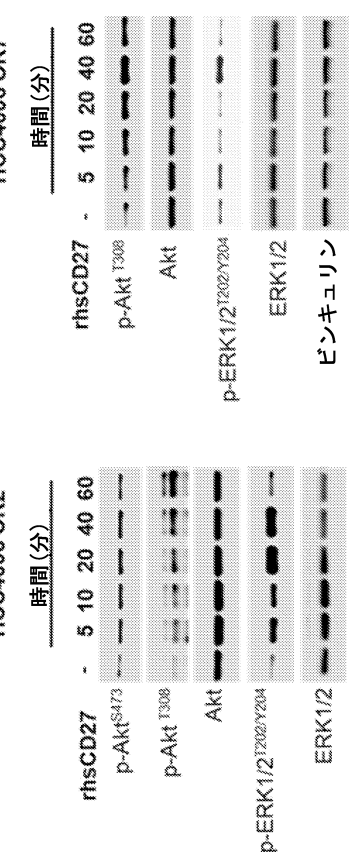
【図 11】



【図 10】



【図 12】



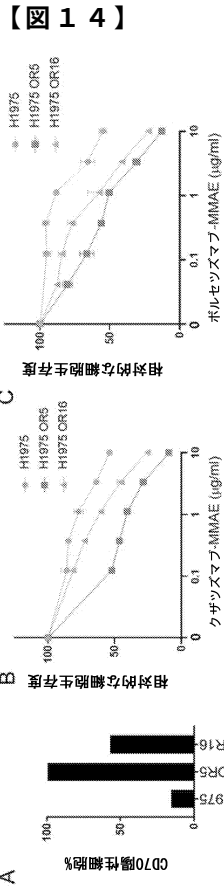
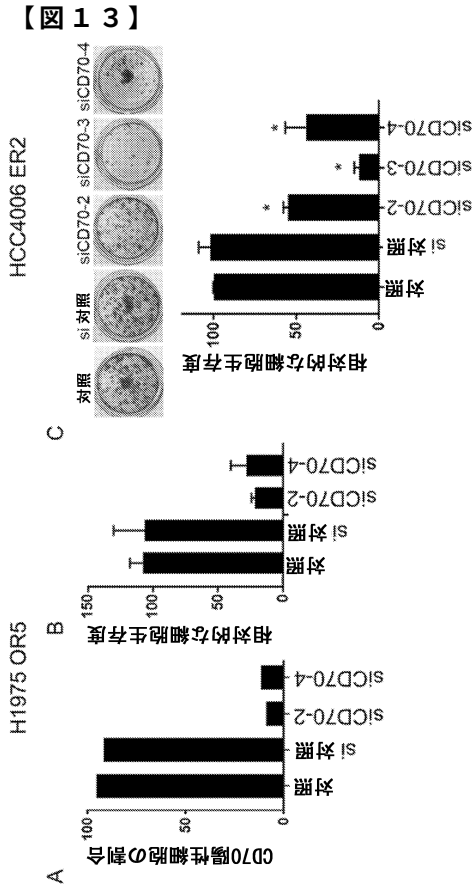
10

20

30

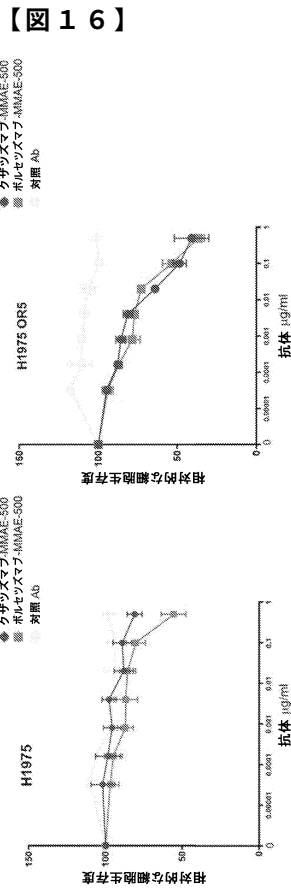
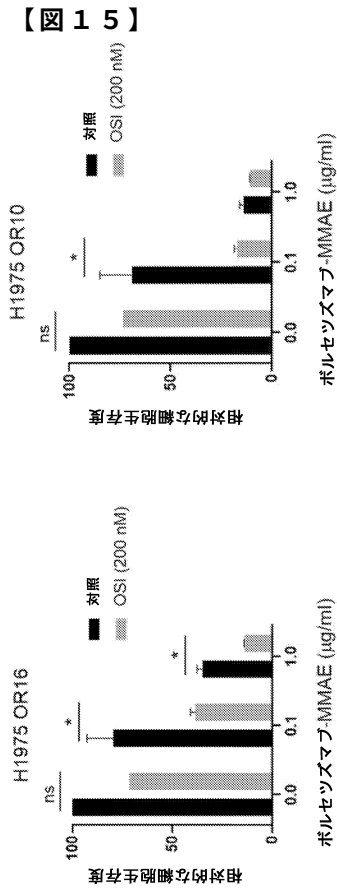
40

50



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	31/337(2006.01)	A 6 1 K	31/337
A 6 1 K	33/24 (2019.01)	A 6 1 K	33/24
A 6 1 K	31/7068(2006.01)	A 6 1 K	31/7068
A 6 1 K	31/475(2006.01)	A 6 1 K	31/475
A 6 1 K	31/409(2006.01)	A 6 1 K	31/409
A 6 1 K	31/5377(2006.01)	A 6 1 K	31/5377
A 6 1 K	31/4439(2006.01)	A 6 1 K	31/4439
A 6 1 K	31/506(2006.01)	A 6 1 K	31/506
A 6 1 K	31/517(2006.01)	A 6 1 K	31/517
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28
A 6 1 K	38/05 (2006.01)	A 6 1 K	38/05
A 6 1 K	38/10 (2006.01)	A 6 1 K	38/10
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(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 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ヘイマク ジョン ブイ.

アメリカ合衆国 7 7 0 3 0 テキサス州 ヒューストン ホルコム ブールバード 1 5 1 5 ユー.
ティー. エム. ディー. アンダーソン キャンサー センター 内

(72)発明者 ニルソン モニーク

アメリカ合衆国 7 7 0 3 0 テキサス州 ヒューストン ホルコム ブールバード 1 5 1 5 ユー.
ティー. エム. ディー. アンダーソン キャンサー センター 内

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 Oncogene, 2018年08月15日, Vol.38, pp.455-468

Oncotarget, 2015年04月19日, Vol.6, No.15, pp.13462-13475

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 4 5 / 0 0 - 4 5 / 0 8

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

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)