

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7650814号
(P7650814)

(45)発行日 令和7年3月25日(2025.3.25)

(24)登録日 令和7年3月14日(2025.3.14)

(51)国際特許分類	F I			
A 6 1 K 31/517 (2006.01)	A 6 1 K	31/517	Z N A	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	

請求項の数 11 (全75頁)

(21)出願番号	特願2021-557927(P2021-557927)	(73)特許権者	500039463
(86)(22)出願日	令和2年3月27日(2020.3.27)		ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバ
(65)公表番号	特表2022-527788(P2022-527788 A)		ーシティ オブ テキサス システム
(43)公表日	令和4年6月6日(2022.6.6)		BOARD OF REGENTS, TH
(86)国際出願番号	PCT/US2020/025228		E UNIVERSITY OF TEX
(87)国際公開番号	WO2020/205521		AS SYSTEM
(87)国際公開日	令和2年10月8日(2020.10.8)		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3月27日(2023.3.27)		, オースティン, ウェスト 7 番 ストリ
(31)優先権主張番号	62/826,843		ート 2 1 0
(32)優先日	平成31年3月29日(2019.3.29)		2 1 0 West 7 th Street
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	Austin, Texas 7 8 7 0 1
			U . S . A .
		(74)代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74)代理人	100160923

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 E G F RまたはHER 2 エクソン 2 0 挿入を有するがん細胞に対する抗腫瘍活性を有する化合物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象においてがんを治療するための、ポジオチニブを含む薬学的組成物であって、該対象が、A 7 6 7 i n s T L A、V 7 6 9 i n s G V V、V 7 6 9 L、V 7 6 9 i n s G S V、V 7 6 9 i n s M A S V D、H 7 7 3 i n s A H、H 7 7 3 i n s H、およびV 7 7 4 i n s H Vからなる群より選択される、1つ以上のE G F Rエクソン 2 0 変異を有すると判定されている腫瘍を有する、薬学的組成物。

【請求項 2】

前記対象が、2つ、3つ、または4つのE G F Rエクソン 2 0 変異を有すると判定されている、請求項 1 記載の薬学的組成物。

【請求項 3】

前記対象が、E G F R変異T 7 9 0 Mおよび/またはC 7 9 7 Sを有していない、請求項 1 または 2 記載の薬学的組成物。

【請求項 4】

前記対象がチロシンキナーゼ阻害剤を以前に投与されたことがある、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】

前記対象が、以前に投与されたチロシンキナーゼ阻害剤に対して耐性を有する、請求項 4 記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が、ラパチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、イブルチニブ、ナザルチニブ、またはネラチニブである、請求項 5 記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

前記ポジオチニブが、8 mg、12 mg、または 16 mg の用量で投与される、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】

さらなる抗がん療法と組み合わせて用いられる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

前記さらなる抗がん療法が、化学療法、放射線療法、遺伝子療法、手術、ホルモン療法、抗血管新生療法、または免疫療法である、請求項 8 記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

前記がんが、口腔がん、中咽頭がん、上咽頭がん、呼吸器がん、泌尿生殖器がん、消化器がん、中枢神経系組織もしくは末梢神経系組織のがん、内分泌もしくは神経内分泌がんまたは造血系のがん、神経膠腫、肉腫、がん腫、リンパ腫、黒色腫、線維腫、髄膜腫、脳がん、中咽頭がん、上咽頭がん、腎臓がん、胆道がん、褐色細胞腫、膵島細胞がん、リー・フラウメニ腫瘍、甲状腺がん、副甲状腺がん、下垂体腫瘍、副腎腫瘍、骨肉腫、多発性神経内分泌腫瘍 I 型および II 型、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、肝臓がん、膀胱がん、胃がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がん、または皮膚がんである、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 11】

前記がんが非小細胞肺がんである、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項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、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、2019年3月29日に
出願された米国仮特許出願第 62 / 826 , 843 号の恩典を主張するものである。

【0002】

配列表の組み込み

「UTFCP1383WO.txt」という名称のファイル中に収容され、3.59 KB (Microsoft Windows で計算された場合) であり、2020年3月27日に作成された配列表が、本明細書と共に電子的に提出されており、参照により本明細書に組み入れられる。

【0003】

本発明は、National Institutes of Health により授与された認可番号 CA190628 の下、政府支援により行われた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0004】

1. 分野

本発明は全体として、分子生物学および医学の分野に関する。より具体的には、本発明は、EGFR および / または HER2 エクソン 20 変異、例えば挿入変異を有する患者を治療する方法に関する。

【背景技術】

【0005】

2. 関連技術の説明

NSCLC のおよそ 10 ~ 15 % は、活性化 EGFR 変異を保有する。腫瘍が「古典的 (classical)」感受性変異 (L858R およびエクソン 19 欠失) を有するこれらの患者の大部分では、ゲフィチニブおよびエルロチニブなどの TKI は、劇的な臨床

10

20

30

40

50

的有用性をもたらし、およそ70%で、客観的奏効(OR)、化学療法単独と比較しての無増悪生存期間(PFS)、および生活の質の改善を経験した(Maemondo et al., 2010)。しかしながら、EGFR変異体NSCLC腫瘍のおよそ10~12%は、EGFRのエクソン20内にインフレーム挿入を有し(Arcila et al., 2012)、概してEGFR TKIに対して耐性を有する。加えて、NSCLCにおけるHER2変異の90%はエクソン20変異である(Mazieres et al., 2013)。合わせると、EGFRおよびHER2エクソン20変異はNSCLC患者のおよそ4%を構成する。これまでのデータは、使用可能なHER2のTKI(アファチニブ、ラパチニブ、ネラチニブ、ダコミチニブ)は、HER2変異体腫瘍を有する患者では限定された活性を有し、多くの試験は40%を下回るOR率を報告している(Kosaka et al., 2017)が、いくらかの前臨床活性が、アファチニブで処置されたHER2マウスモデルで観察される(Perera et al., 2009)。

10

【0006】

EGFRおよびHER2のエクソン20は、2つの主な領域である、c-ヘリックス(EGFRにおける残基762~766、およびHER2における残基770~774)ならびにc-ヘリックスに続くループ(EGFRにおける残基767~774、およびHER2における残基775~783)を含む。EGFRエクソン20挿入D770insNPGの結晶学により、残基764の後への挿入において第1世代TKIに対する耐性を誘導する安定化されかつ強固な活性立体構造が明らかにされている。一方で、EGFR A763insFQEAのモデリングは、残基764の前の挿入はこのような作用を示さず、薬物耐性を誘導しないことを示した(Yasuda et al., 2013)。さらに、c-ヘリックスの後のループ中に挿入がある(EGFR H773insNPH)、EGFRエクソン20誘発NSCLCの患者由来異種移植片(PDX)モデルでは、第3世代EGFR TKI、オシメルチニブ(AZD9291)およびロシレチニブ(CO-1696)は最小活性を有することが認められた(Yang et al., 2016)。稀なEGFRおよびHER2エクソン20変異の最近の研究では、著者らは、ダコミチニブおよびアファチニブなどの共有結合型のキナゾリンベースの第2世代阻害剤に対する不均一な応答を見出したが;より多く見られるエクソン20挿入変異を標的とするのに必要とされる濃度は、臨床で達成可能な濃度を上回っていた(Kosaka et al., 2017)。したがって、EGFRおよびHER2中にエクソン20変異、特に挿入変異を保有するNSCLC腫瘍の自然薬物耐性(innate drug resistance)を克服する新たな治療を特定するという重大な臨床上のニーズが存在する。

20

30

【発明の概要】

【0007】

概要

本開示の実施形態は、EGFRおよび/またはHER2エクソン20変異、例えばエクソン20挿入変異を有する患者においてがんを治療するための方法および組成物を提供する。一実施形態では、対象においてがんを治療する方法であって、有効量のポジオチニブを対象に投与する工程を含み、対象が、1つ以上のEGFRエクソン20変異、例えば1つ以上のEGFRエクソン20挿入変異を有すると判定されている、方法が提供される。特定の態様では、対象はヒトである。

40

【0008】

いくつかの態様では、ポジオチニブはポジオチニブ塩酸塩としてさらに定義される。ある特定の態様では、ポジオチニブ塩酸塩は錠剤として製剤化される。いくつかの態様では、1つ以上のEGFRエクソン20変異は、デノボEGFR20挿入変異としてさらに定義される。

【0009】

ある特定の態様では、1つ以上のEGFRエクソン20変異は、アミノ酸763~778に1つ以上の点変異、挿入、および/または3~18個のヌクレオチドの欠失を含む。いくつかの態様では、対象は、2つ、3つ、または4つのEGFRエクソン20変異を有

50

すると判定されている。いくつかの態様では、1つ以上のEGFRエクソン20変異は、A763、A767、S768、V769、D770、N771、P772、H773、V774、およびR776からなる群より選択される1つ以上の残基に存在する。

【0010】

ある特定の態様では、対象は、残基C797および/またはT790にEGFR変異、例えばC797Sおよび/またはT790Mを有しないと判定されている。いくつかの態様では、1つ以上のエクソン20変異は、A763insFQEA、A763insLQEA、A767insASV、S768dupSVD、S768I、V769insASV、D770insSVD、D770insNPG、H773insNPH、N771delinsGY、N771delinsFH、N771dupNPH、A767insTLA、V769insGVV、V769L、V769insGSV、V769insMASVD、D770delinsGY、D770insG、D770insY H773Y、N771insSVDNR、N771insHH、N771dupN、P772insDNP、H773insAH、H773insH、V774M、V774insHV、R776H、およびR776Cからなる群より選択される。特定の態様では、エクソン20変異は、A763insFQEA、A767insASV、S768dupSVD、V769insASV、D770insSVD、D770insNPG、H773insNPH、N771delinsGY、N771delinsFH、および/またはN771dupNPHである。

10

【0011】

いくつかの態様では、対象は、以前に投与されたチロシンキナーゼ阻害剤に対して耐性を有するか、またはそれに対する耐性を示している。ある特定の態様では、チロシンキナーゼ阻害剤は、ラパチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、イブルチニブ、ナザルチニブ、またはベラチニブ(beratinib)である。

20

【0012】

ある特定の態様では、ポジオチニブは経口的に投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは、5~25mg、例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25mgの用量で投与される。ある特定の態様では、ポジオチニブは、8mg、12mg、または16mgの用量で投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは毎日投与される。ある特定の態様では、ポジオチニブは継続的に投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは28日サイクルで投与される。

30

【0013】

ある特定の態様では、患者由来のゲノム試料を分析することにより対象がEGFRエクソン20変異、例えば挿入変異を有すると判定された。いくつかの態様では、ゲノム試料は、唾液、血液、尿、正常組織、または腫瘍組織から単離される。特定の態様では、EGFRエクソン20変異の存在は、核酸配列決定(例えば、腫瘍組織のまたは血漿由来循環フリーDNAのDNA配列決定)またはPCR分析によって判定される。

【0014】

ある特定の態様では、方法は、さらなる抗がん療法を実施する工程をさらに含む。いくつかの態様では、抗がん療法は、化学療法、放射線療法、遺伝子療法、手術、ホルモン療法、抗血管新生療法、または免疫療法である。ある特定の態様では、ポジオチニブ投与および/または抗がん療法は、静脈内に、皮下に、骨内に、経口的に、経皮的に、持続型放出にて、制御型放出にて、遅延型放出にて、坐剤として、または舌下に、実施される。いくつかの態様では、ポジオチニブを投与することおよび/または抗がん療法を実施することは、局所的实施、局所的実施、または全身的实施を含む。特定の態様では、ポジオチニブ投与および/または抗がん療法は、2回以上、例えば、毎日、1日おきに、または毎週、実施される。

40

【0015】

いくつかの態様では、がんは、口腔がん、中咽頭がん、上咽頭がん、呼吸器がん、泌尿

50

生殖器がん、消化器がん、中枢神経系組織もしくは末梢神経系組織のがん、内分泌もしくは神経内分泌がんまたは造血系のがん、神経膠腫、肉腫、がん腫、リンパ腫、黒色腫、線維腫、髄膜腫、脳がん、中咽頭がん、上咽頭がん、腎臓がん、胆道がん、褐色細胞腫、膵島細胞がん、リー・フラウメニ腫瘍、甲状腺がん、副甲状腺がん、下垂体腫瘍、副腎腫瘍、骨肉腫、多発性神経内分泌腫瘍Ⅰ型およびⅡ型、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、肝臓がん、膀胱がん、胃がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がん、または皮膚がんである。特定の態様では、がんは非小細胞肺がんである。

【0016】

別の実施形態では、1つ以上のEGFRエクソン20変異、例えば1つ以上のEGFRエクソン20挿入変異を有すると判定された患者のための、ポジオチニブを含む薬学的組成物が提供される。ある特定の態様では、1つ以上のEGFRエクソン20変異は、アミノ酸763～778における、点変異、挿入、および/または3～18個のヌクレオチドの欠失を含む。ある特定の態様では、対象は、2つ、3つ、または4つのEGFR20変異を有すると判定されている。

10

【0017】

いくつかの態様では、ポジオチニブはポジオチニブ塩酸塩としてさらに定義される。ある特定の態様では、ポジオチニブ塩酸塩は錠剤として製剤化される。いくつかの態様では、1つ以上のEGFRエクソン20変異はデノボEGFR20挿入変異としてさらに定義される。

20

【0018】

いくつかの態様では、ポジオチニブは経口的に投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは、5～25mg、例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25mgの用量で投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは、8mg、12mg、または16mgの用量で投与される。ある特定の態様では、ポジオチニブは毎日投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは継続的に投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは28日サイクルで投与される。

【0019】

いくつかの態様では、対象は、以前に投与されたチロシンキナーゼ阻害剤に対して耐性を有するか、またはそれに対する耐性を示したことがある。ある特定の態様では、チロシンキナーゼ阻害剤は、ラパチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、イブルチニブ、ナザルチニブ、またはベラチニブである。

30

【0020】

いくつかの態様では、1つ以上のEGFRエクソン20挿入変異は、A763、A767、S768、V769、D770、N771、P772、およびH773からなる群より選択される1つ以上の残基に存在する。ある特定の態様では、対象は、残基C797および/またはT790にEGFR変異、例えばC797Sおよび/またはT790Mを有しないと判定されている。特定の態様では、1つ以上のエクソン20変異は、A763insFQEA、A763insLQEA、A767insASV、S768dupSVD、S768I、V769insASV、D770insSVD、D770insNPG、H773insNPH、N771delinsGY、N771delinsFH、N771dupNPH、A767insTLA、V769insGVV、V769L、V769insGSV、V769insMASVD、D770delinsGY、D770insG、D770insYH773Y、N771insSVDNR、N771insHH、N771dupN、P772insDNP、H773insAH、H773insH、V774M、V774insHV、R776H、およびR776Cからなる群より選択される。いくつかの態様では、患者は抗がん療法によって治療中である。

40

【0021】

さらに別の実施形態では、がんを有する対象におけるポジオチニブ単独または抗がん療

50

法と組み合わせたポジオチニブに対する応答性を予測する方法であって、患者から得られたゲノム試料においてEGFRエクソン20変異（例えば、EGFRエクソン20挿入変異）を検出する工程を含み、試料がEGFRエクソン20変異の存在について陽性である場合に、患者が、ポジオチニブ単独または抗がん療法と組み合わせたポジオチニブに対して好ましい応答性を有すると予測される、方法が提供される。いくつかの態様では、ゲノム試料は、唾液、血液、尿、正常組織、または腫瘍組織から単離される。ある特定の態様では、EGFRエクソン20変異の存在は、核酸配列決定またはPCR分析によって判定される。ある特定の態様では、EGFRエクソン20変異は、アミノ酸763～778に1つ以上の点変異、挿入、および/または3～18個のヌクレオチドの欠失を含む。いくつかの態様では、EGFRエクソン20変異は、残基A763、H773、A767、S768、V769、D770、N771、および/またはD773に存在する。いくつかの態様では、EGFRエクソン20変異は、A763insFQEA、A767insASV、S768dupSVD、V769insASV、D770insSVD、D770insNPG、H773insNPH、N771delinsGY、N771delinsFH、およびN771dupNPHからなる群より選択される。

10

【0022】

ある特定の態様では、ポジオチニブ阻害剤単独または抗がん療法と組み合わせたポジオチニブ阻害剤に対する好ましい応答性は、腫瘍の大きさもしくは腫瘍量の減少、腫瘍成長の阻止、腫瘍関連疼痛の軽減、がん関連病態の軽減、がん関連症状の軽減、がんの非進行、無病期間の延長、進行までの期間の延長、寛解の誘導、転移の減少、または患者の生存性の向上を含む。さらなる態様では、好ましい応答性を有すると予測された患者は、ポジオチニブを単独でまたは第2の抗がん療法と組み合わせて投与される。

20

【0023】

いくつかの態様では、ポジオチニブはポジオチニブ塩酸塩としてさらに定義される。ある特定の態様では、ポジオチニブ塩酸塩は錠剤として製剤化される。いくつかの態様では、1つ以上のEGFRエクソン20変異はデノボEGFR20挿入変異としてさらに定義される。

【0024】

いくつかの態様では、ポジオチニブは経口的に投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは、5～25mg、例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25mgの用量で投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは、8mg、12mg、または16mgの用量で投与される。ある特定の態様では、ポジオチニブは毎日投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは継続的に投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは28日サイクルで投与される。

30

【0025】

いくつかの態様では、対象は、以前に投与されたチロシンキナーゼ阻害剤に対して耐性を有するか、またはそれに対する耐性を示したことがある。ある特定の態様では、チロシンキナーゼ阻害剤は、ラパチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、イブルチニブ、ナザルチニブ、またはベラチニブである。

40

【0026】

さらなる実施形態は、患者においてがんを治療する方法であって、有効量のポジオチニブまたはアファチニブを対象に投与する工程を含み、対象が、A775insVG776C、A775insYVMA、G776V、G776C V777insV、G776C V777insC、G776delinsVV、G776delinsVC、P780insGSP、V777L、G778insLPS、V773M、Y772dupYVMA、G776delinsLC、G778dupGSP、V777insCG、G776V/S、V777M、M774dupM、A775insSVMA、A775insVA、およびL786Vからなる群より選択される1つ以上のHER2エクソン20変異を有すると判定されている、方法を提供する。いくつかの態様では、1つ以上のHER2エ

50

クソン20変異は、アミノ酸770～785に1つ以上の点変異、挿入、および/または3～18個のヌクレオチドの欠失をさらに含む。いくつかの態様では、1つ以上のHER2エクソン20変異は、残基Y772、A775、M774、G776、G778、V777、S779、P780、および/またはL786に存在する。いくつかの態様では、1つ以上のHER2エクソン20変異は、A775insVG776C、A775insYVMA、G776V、G776CV777insV、G776CV777insC、G776delinsVV、G776delinsVC、P780insGSP、V777L、G778insLPS、およびV773Mからなる群より選択される。いくつかの態様では、HER2エクソン20変異は、残基V773、A775、G776、S779、G778、および/またはP780に存在する。特定の態様では、対象はヒトである。

10

【0027】

いくつかの態様では、ポジオチニブはポジオチニブ塩酸塩としてさらに定義される。ある特定の態様では、ポジオチニブ塩酸塩は錠剤として製剤化される。いくつかの態様では、1つ以上のEGFRエクソン20変異は、デノボEGFR20挿入変異としてさらに定義される。

【0028】

いくつかの態様では、ポジオチニブは経口的に投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは、5～25mg、例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25mgの用量で投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは、8mg、12mg、または16mgの用量で投与される。ある特定の態様では、ポジオチニブは毎日投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは継続的に投与される。いくつかの態様では、ポジオチニブは28日サイクルで投与される。

20

【0029】

いくつかの態様では、対象は、以前に投与されたチロシンキナーゼ阻害剤に対して耐性を有するか、またはそれに対する耐性を示している。ある特定の態様では、チロシンキナーゼ阻害剤は、ラパチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、イブルチニブ、ナザルチニブ、またはベラチニブである。

【0030】

いくつかの態様では、方法は、mTOR阻害剤を投与する工程をさらに含む。ある特定の態様では、mTOR阻害剤は、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、リダフォロリムス、またはMLN4924である。特定の態様では、mTOR阻害剤はエベロリムスである。

30

【0031】

ある特定の態様では、ポジオチニブもしくはアファチニブおよび/またはmTOR阻害剤は、静脈内に、皮下に、骨内に、経口的に、経皮的に、持続型放出にて、制御型放出にて、遅延型放出にて、坐剤として、または舌下に、投与される。いくつかの態様では、患者は、患者由来のゲノム試料を分析することにより、HER2エクソン20変異を有すると判定された。ある特定の態様では、ゲノム試料は、唾液、血液、尿、正常組織、または腫瘍組織から単離される。いくつかの態様では、HER2エクソン20変異の存在は、核酸配列決定またはPCR分析によって判定される。

40

【0032】

追加の態様では、方法は、さらなる抗がん療法を実施する工程をさらに含む。いくつかの態様では、抗がん療法は、化学療法、放射線療法、遺伝子療法、手術、ホルモン療法、抗血管新生療法、または免疫療法である。

【0033】

いくつかの態様では、がんは、口腔がん、中咽頭がん、上咽頭がん、呼吸器がん、泌尿生殖器がん、消化器がん、中枢神経系組織もしくは末梢神経系組織のがん、内分泌もしくは神経内分泌がんまたは造血系のがん、神経膠腫、肉腫、がん腫、リンパ腫、黒色腫、線

50

維腫、髄膜腫、脳がん、中咽頭がん、上咽頭がん、腎臓がん、胆道がん、褐色細胞腫、脾島細胞がん、リー・フラウメニ腫瘍、甲状腺がん、副甲状腺がん、下垂体腫瘍、副腎腫瘍、骨肉腫、多発性神経内分泌腫瘍Ⅰ型およびⅡ型、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、肝臓がん、膀胱がん、胃がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がん、または皮膚がんである。ある特定の態様では、がんは非小細胞肺がんである。

【0034】

別の実施形態では、A775 ins V G776 C、A775 ins YVMA、G776 V、G776 C V777 ins V、G776 C V777 ins C、G776 del ins VV、G776 del ins VC、P780 ins GSP、V777 L、G778 ins LPS、V773 M、Y772 dup YVMA、G776 del ins LC、G778 dup GSP、V777 ins CG、G776 V/S、V777 M、M774 dup M、A775 ins SVM A、A775 ins VA、およびL786 Vからなる群より選択される1つ以上のHER2エクソン20変異を有すると判定された患者のための、ポジオチニブまたはアフアチニブを含む薬学的組成物が提供される。いくつかの態様では、1つ以上のHER2エクソン20変異は、アミノ酸770~785に1つ以上の点変異、挿入、および/または3~18個のヌクレオチドの欠失をさらに含む。いくつかの態様では、1つ以上のHER2エクソン20変異は、残基Y772、A775、M774、G776、G778、V777、S779、P780、および/またはL786に存在する。いくつかの態様では、1つ以上のHER2エクソン20変異は、A775 ins V G776 C、A775 ins YVMA、G776 V、G776 C V777 ins V、G776 C V777 ins C、G776 del ins VV、G776 del ins VC、P780 ins GSP、V777 L、G778 ins LPS、およびV773 Mからなる群より選択される。いくつかの態様では、HER2エクソン20変異は、残基V773、A775、G776、S779、G778、および/またはP780に存在する。いくつかの態様では、患者は抗がん療法によって治療中である。

【0035】

いくつかの態様では、ポジオチニブはポジオチニブ塩酸塩としてさらに定義される。ある特定の態様では、ポジオチニブ塩酸塩は錠剤として製剤化される。いくつかの態様では、1つ以上のEGFRエクソン20変異は、デノボEGFR20挿入変異としてさらに定義される。

【0036】

いくつかの態様では、ポジオチニブは、5~25 mg、例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25 mgの用量で組成物中に含まれる。いくつかの態様では、ポジオチニブは、8 mg、12 mg、または16 mgの用量である。

【0037】

いくつかの態様では、対象は、以前に投与されたチロシンキナーゼ阻害剤に対して耐性を有するか、またはそれに対する耐性を示している。ある特定の態様では、チロシンキナーゼ阻害剤は、ラパチニブ、アフアチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、イブルチニブ、ナザルチニブ、またはベラチニブである。

【0038】

さらに別の実施形態では、がんを有する患者においてポジオチニブ単独もしくはアフアチニブ単独または抗がん療法と組み合わせたポジオチニブもしくはアフアチニブに対する応答性を予測する方法であって、患者から得られたゲノム試料において、A775 ins V G776 C、A775 ins YVMA、G776 V、G776 C V777 ins V、G776 C V777 ins C、G776 del ins VV、G776 del ins VC、P780 ins GSP、V777 L、G778 ins LPS、V773 M、Y772 dup YVMA、G776 del ins LC、G778 dup GSP、V777 ins CG、G776 V/S、V777 M、M774 dup M、A775 ins SVM A、A7

10

20

30

40

50

75 insVA、およびL786Vからなる群より選択されるHER2エクソン20変異（例えば、HER2エクソン20挿入変異）を検出する工程を含み、試料がHER2エクソン20変異の存在について陽性である場合に、患者が、ポジオチニブ単独もしくはアファチニブ単独または抗がん療法と組み合わせたポジオチニブもしくはアファチニブに対して好ましい応答性を有すると予測される、方法が提供される。いくつかの態様では、1つ以上の変異は、A775 insV G776C、A775 insYVMA、G776C V777 insC、G776 del insVV、G776 del insVC、P780 insGSP、V777L、G778 insLPS、およびV773Mからなる群より選択される。いくつかの態様では、HER2エクソン20変異は、アミノ酸770～785に1つ以上の点変異、挿入、および/または3～18個のヌクレオチドの欠失をさらに含む。ある特定の態様では、HER2エクソン20変異は、残基V773、A775、G776、V777、G778、S779、および/またはP780に存在する。他の態様では、HER2エクソン20変異は、残基A775、G776、S779、および/またはP780に存在する。

10

【0039】

いくつかの態様では、ゲノム試料は、唾液、血液、尿、正常組織、または腫瘍組織から単離される。ある特定の態様では、HER2エクソン20変異の存在は、核酸配列決定またはPCR分析によって判定される。特定の態様では、抗がん療法はmTOR阻害剤である。いくつかの態様では、ポジオチニブ阻害剤単独もしくはアファチニブ阻害剤単独または抗がん療法と組み合わせたポジオチニブ阻害剤もしくはアファチニブ阻害剤に対する好ましい応答性は、腫瘍の大きさもしくは腫瘍量の減少、腫瘍成長の阻止、腫瘍関連疼痛の軽減、がん関連病態の軽減、がん関連症状の軽減、がんの非進行、無病期間の延長、進行までの期間の延長、寛解の誘導、転移の減少、または患者の生存性の向上を含む。さらなる態様では、好ましい応答性を有すると予測された患者は、ポジオチニブを単独でまたは第2の抗がん療法と組み合わせて投与される。

20

【0040】

本明細書では、ヒトがん細胞から単離された核酸；およびヒトEGFRまたはHER2コード配列のエクソン20の少なくとも第1の部分を増幅することができるプライマー対を含む組成物も提供される。いくつかの態様では、組成物は、ヒトEGFRまたはHER2コード配列中に変異が存在する場合に該配列のエクソン20の第1の部分に特異的にハイブリダイズすることができる、標識されたプローブ分子をさらに含む。ある特定の態様では、組成物は熱安定性DNAポリメラーゼをさらに含む。いくつかの態様では、組成物はdNTPSをさらに含む。いくつかの態様では、標識されたプローブは、A763 insFQEA、A763 insLQEA、A767 insASV、S768 dupSVD、S768I、V769 insASV、D770 insSVD、D770 insNPG、H773 insNPH、N771 del insGY、N771 del insFH、N771 dupNPH、A767 insTLA、V769 insGVV、V769L、V769 insGSV、V769 insMASVD、D770 del insGY、D770 insG、D770 insY H773Y、N771 insSVDNR、N771 insHH、N771 dupN、P772 insDNP、H773 insAH、H773 insH、V774M、V774 insHV、R776H、およびR776Cからなる群より選択される変異が存在する場合に、ヒトEGFRコード配列のエクソン20の第1の部分にハイブリダイズする。

30

40

【0041】

ある特定の態様では、標識されたプローブは、A775 insV G776C、A775 insYVMA、G776V、G776C V777 insV、G776C V777 insC、G776 del insVV、G776 del insVC、およびP780 insGSPからなる群より選択される変異が存在する場合に、ヒトHER2コード配列のエクソン20の第1の部分にハイブリダイズする。

【0042】

50

別の実施形態では、変異体EGFRタンパク質をコードする単離された核酸であって、該変異体タンパク質が、アミノ酸763～778に点変異、挿入、および/または3～18個のヌクレオチドの欠失を含む1つ以上のEGFRエクソン20変異だけ野生型ヒトEGFRと異なる、単離された核酸が提供される。いくつかの態様では、1つ以上のEGFRエクソン20変異は、A763、A767、S768、V769、D770、N771、P772、H773、V774、およびR776からなる群より選択される1つ以上の残基に存在する。ある特定の態様では、1つ以上のエクソン20変異は、A763 ins FQEA、A763 ins LQEA、A767 ins ASV、S768 dup SVD、S768 I、V769 ins ASV、D770 ins SVD、D770 ins NPG、H773 ins NPH、N771 del ins GY、N771 del ins FH、N771 dup NPH、A767 ins TLA、V769 ins GVV、V769 L、V769 ins GSV、V769 ins MASVD、D770 del ins GY、D770 ins G、D770 ins Y H773 Y、N771 ins SVDNR、N771 ins HH、N771 dup N、P772 ins DNP、H773 ins AH、H773 ins H、V774 M、V774 ins HV、R776 H、およびR776 Cからなる群より選択される。特定の態様では、核酸はSEQ ID NO: 8、9、10、11、または12の配列を含む。

【0043】

さらに別の実施形態では、変異体HER2タンパク質をコードする単離された核酸であって、該変異体タンパク質が、アミノ酸770～785に1つ以上の点変異、挿入、および/または3～18個のヌクレオチドの欠失を含む1つ以上のHER2エクソン20変異だけ野生型ヒトHER2と異なる、単離された核酸が提供される。いくつかの態様では、1つ以上のHER2エクソン20変異は、残基V773、A775、G776、V777、G778、S779、および/またはP780に存在する。ある特定の態様では、1つ以上のHER2エクソン20変異は、A775 ins V G776 C、A775 ins Y VMA、G776 V、G776 C V777 ins V、G776 C V777 ins C、G776 del ins VV、G776 del ins VC、P780 ins GSP、V777 L、G778 ins LPS、およびV773 Mからなる群より選択される。特定の態様では、核酸はSEQ ID NO: 14、15、16、17、または18の配列を含む。

【0044】

[本発明1001]

対象においてがんを治療する方法であって、有効量のボジオチニブを該対象に投与する工程を含み、該対象が、1つ以上のEGFRエクソン20変異を有すると判定されている、該方法。

[本発明1002]

前記ボジオチニブがボジオチニブ塩酸塩としてさらに定義される、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記ボジオチニブ塩酸塩が錠剤として製剤化される、本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記1つ以上のEGFRエクソン20変異が、EGFR20挿入変異としてさらに定義される、本発明1001～1004のいずれかの方法。

[本発明1005]

前記1つ以上のEGFRエクソン20変異が、デノボEGFR20挿入変異としてさらに定義される、本発明1001～1004のいずれかの方法。

[本発明1006]

前記1つ以上のEGFRエクソン20変異が、アミノ酸763～778に点変異、挿入、および/または3～18個のヌクレオチドの欠失を含む、本発明1001～1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

10

20

30

40

50

前記対象が、2つ、3つ、または4つのEGFRエクソン20変異を有すると判定されている、本発明1001~1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

前記1つ以上のEGFRエクソン20変異がT790Mおよび/またはC797Sではない、本発明1001~1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

前記対象がチロシンキナーゼ阻害剤を以前に投与されたことがある、本発明1001~1008のいずれかの方法。

[本発明1010]

前記対象が、以前に投与されたチロシンキナーゼ阻害剤に対して耐性を有する、本発明1009の方法。

10

[本発明1011]

前記チロシンキナーゼ阻害剤が、ラパチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、イブルチニブ、ナザルチニブ、またはベラチニブ(beratinib)である、本発明1010の方法。

[本発明1012]

前記1つ以上のEGFRエクソン20変異が、A763、A767、S768、V769、D770、N771、P772、H773、およびV774からなる群より選択される1つ以上の残基に存在する、本発明1001~1011のいずれかの方法。

[本発明1013]

20

前記1つ以上のEGFRエクソン20変異が、A763、A767、S768、V769、D770、N771、P772、H773、V774、およびR776からなる群より選択される1つ以上の残基に存在する、本発明1001~1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

前記対象が、残基C797にEGFR変異を有しないと判定されている、本発明1001~1013のいずれかの方法。

[本発明1015]

前記1つ以上のエクソン20変異が、A763insFQEA、A767insASV、S768dupSVD、V769insASV、D770insSVD、D770insNPG、H773insNPH、N771delinsGY、N771delinsFH、N771dupNPH、A767insTLA、V769insGVV、V769L、V769insGSV、V769insMASVD、D770delinsGY、D770insG、D770insY、H773Y、N771insSVDNR、N771insHH、P772insDNP、H773insAH、H773insH、およびV774insHVからなる群より選択される、本発明1001~1014のいずれかの方法。

30

[本発明1016]

前記1つ以上のエクソン20変異が、A763insFQEA、A763insLQE A、A767insASV、S768dupSVD、S768I、V769insASV、D770insSVD、D770insNPG、H773insNPH、N771delinsGY、N771delinsFH、N771dupNPH、A767insTLA、V769insGVV、V769L、V769insGSV、V769insMASVD、D770delinsGY、D770insG、D770insY、H773Y、N771insSVDNR、N771insHH、N771dupN、P772insDNP、H773insAH、H773insH、V774M、V774insHV、R776H、およびR776Cからなる群より選択される、本発明1001~1015のいずれかの方法。

40

[本発明1017]

前記エクソン20変異がD770insNPGである、本発明1001~1016のいずれかの方法。

50

[本発明 1018]

患者由来のゲノム試料を分析することにより、前記対象がEGFRエクソン20変異を有すると判定された、本発明1001～1017のいずれかの方法。

[本発明 1019]

前記ゲノム試料が、唾液、血液、尿、正常組織、または腫瘍組織から単離される、本発明1019の方法。

[本発明 1020]

EGFRエクソン20変異の存在が、核酸配列決定またはPCR分析によって判定される、本発明1001～1019のいずれかの方法。

[本発明 1021]

前記ボジオチニブが経口的に投与される、本発明1001～1020のいずれかの方法。

10

[本発明 1022]

前記ボジオチニブが5～25mgの用量で投与される、本発明1001～1021のいずれかの方法。

[本発明 1023]

前記ボジオチニブが、8mg、12mg、または16mgの用量で投与される、本発明1001～1022のいずれかの方法。

[本発明 1024]

前記ボジオチニブが毎日投与される、本発明1001～1023のいずれかの方法。

[本発明 1025]

前記ボジオチニブが継続的に投与される、本発明1001～1024のいずれかの方法。

20

[本発明 1026]

前記ボジオチニブが28日サイクルで投与される、本発明1001～1025のいずれかの方法。

[本発明 1027]

さらなる抗がん療法を実施する工程をさらに含む、本発明1001～1026のいずれかの方法。

[本発明 1028]

前記さらなる抗がん療法が、化学療法、放射線療法、遺伝子療法、手術、ホルモン療法、抗血管新生療法、または免疫療法である、本発明1027の方法。

30

[本発明 1029]

前記ボジオチニブ投与および/または抗がん療法が、静脈内に、皮下に、骨内に、経口的に、経皮的に、持続型放出にて、制御型放出にて、遅延型放出にて、坐剤として、または舌下に、実施される、本発明1027または1028の方法。

[本発明 1030]

前記ボジオチニブを投与することおよび/または抗がん療法を実施することが、局所的実施、局部的実施、または全身的实施を含む、本発明1027～1030のいずれかの方法。

[本発明 1031]

前記ボジオチニブ投与および/または抗がん療法が2回以上実施される、本発明1027～1031のいずれかの方法。

40

[本発明 1032]

前記がんが、口腔がん、中咽頭がん、上咽頭がん、呼吸器がん、泌尿生殖器がん、消化器がん、中枢神経系組織もしくは末梢神経系組織のがん、内分泌もしくは神経内分泌がんまたは造血系のがん、神経膠腫、肉腫、がん腫、リンパ腫、黒色腫、線維腫、髄膜腫、脳がん、中咽頭がん、上咽頭がん、腎臓がん、胆道がん、褐色細胞腫、膵島細胞がん、リー・フラウメニ腫瘍、甲状腺がん、副甲状腺がん、下垂体腫瘍、副腎腫瘍、骨肉腫、多発性神経内分泌腫瘍I型およびII型、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、肝臓がん、膀胱がん、胃がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がん、または皮膚がんである、本発明1001～1031の

50

いずれかの方法。

[本発明 1 0 3 3]

前記がんが非小細胞肺癌である、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 3 2 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 3 4]

前記患者がヒトである、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 3 3 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 3 5]

1 つ以上の E G F R エクソン 2 0 変異を有すると判定された対象において使用するための、ポジオチニブを含む薬学的組成物。

[本発明 1 0 3 6]

経口組成物としてさらに定義される、本発明 1 0 3 5 の組成物。

10

[本発明 1 0 3 7]

5 ~ 2 5 m g のポジオチニブを含む、本発明 1 0 3 5 または 1 0 3 6 の組成物。

[本発明 1 0 3 8]

8 m g、1 2 m g、または 1 6 m g のポジオチニブを含む、本発明 1 0 3 5 ~ 1 0 3 7 のいずれかの組成物。

[本発明 1 0 3 9]

前記ポジオチニブがポジオチニブ塩酸塩としてさらに定義される、本発明 1 0 3 5 ~ 1 0 3 8 のいずれかの組成物。

[本発明 1 0 4 0]

錠剤として製剤化されている、本発明 1 0 3 5 ~ 1 0 3 9 のいずれかの組成物。

20

[本発明 1 0 4 1]

前記 1 つ以上の E G F R エクソン 2 0 変異が、E G F R 2 0 挿入変異としてさらに定義される、本発明 1 0 3 5 ~ 1 0 4 0 のいずれかの組成物。

[本発明 1 0 4 2]

前記 1 つ以上の E G F R エクソン 2 0 変異が、デノボ E G F R 2 0 挿入変異としてさらに定義される、本発明 1 0 3 5 ~ 1 0 4 1 のいずれかの組成物。

[本発明 1 0 4 3]

前記 1 つ以上の E G F R エクソン 2 0 変異が、アミノ酸 7 6 3 ~ 7 7 8 に点変異、挿入、および/または 3 ~ 1 8 個のヌクレオチドの欠失を含む、本発明 1 0 3 5 ~ 1 0 4 2 のいずれかの組成物。

30

[本発明 1 0 4 4]

前記対象が、2 つ、3 つ、または 4 つの E G F R エクソン 2 0 変異を有すると判定されている、本発明 1 0 3 5 ~ 1 0 4 3 のいずれかの組成物。

[本発明 1 0 4 5]

前記 1 つ以上の E G F R エクソン 2 0 変異が T 7 9 0 M および/または C 7 9 7 S ではない、本発明 1 0 3 5 ~ 1 0 4 4 のいずれかの組成物。

[本発明 1 0 4 6]

1 つ以上の E G F R エクソン 2 0 挿入変異が、A 7 6 3、A 7 6 7、S 7 6 8、V 7 6 9、D 7 7 0、N 7 7 1、P 7 7 2、H 7 7 3、および V 7 7 4 からなる群より選択される 1 つ以上の残基に存在する、本発明 1 0 3 5 ~ 1 0 4 5 のいずれかの組成物。

40

[本発明 1 0 4 7]

前記 1 つ以上の E G F R エクソン 2 0 挿入変異が、A 7 6 3、A 7 6 7、S 7 6 8、V 7 6 9、D 7 7 0、N 7 7 1、P 7 7 2、H 7 7 3、V 7 7 4、および R 7 7 6 からなる群より選択される 1 つ以上の残基に存在する、本発明 1 0 3 5 ~ 1 0 4 6 のいずれかの組成物。

[本発明 1 0 4 8]

前記対象が、残基 C 7 9 7 に E G F R 変異を有しないと判定されている、本発明 1 0 3 5 ~ 1 0 4 7 のいずれかの組成物。

[本発明 1 0 4 9]

前記 1 つ以上のエクソン 2 0 変異が、A 7 6 3 i n s F Q E A、A 7 6 7 i n s A S V

50

S768dupSVD、V769insASV、D770insSVD、D770insNPG、H773insNPH、N771delinsGY、N771delinsFH、N771dupNPH、A767insTLA、V769insGVV、V769L、V769insGSV、V769insMASVD、D770delinsGY、D770insG、D770insY H773Y、N771insSVDNR、N771insHH、P772insDNP、H773insAH、H773insH、およびV774insHVからなる群より選択される、本発明1035～1048のいずれかの組成物。

[本発明1050]

前記1つ以上のエクソン20変異が、A763insFQEA、A763insLQEA、A767insASV、S768dupSVD、S768I、V769insASV、D770insSVD、D770insNPG、H773insNPH、N771delinsGY、N771delinsFH、N771dupNPH、A767insTLA、V769insGVV、V769L、V769insGSV、V769insMASVD、D770delinsGY、D770insG、D770insY H773Y、N771insSVDNR、N771insHH、N771dupN、P772insDNP、H773insAH、H773insH、V774M、V774insHV、R776H、およびR776Cからなる群より選択される、本発明1035～1049のいずれかの組成物。

[本発明1051]

患者が抗がん療法によって治療中である、本発明1035～1050のいずれかの組成物。

[本発明1052]

がんを有する対象において、ポジチニブ単独または第2の抗がん療法と組み合わせたポジチニブに対する応答性を予測する方法であって、患者から得られたゲノム試料においてEGFRエクソン20変異を検出する工程を含み、該試料が該EGFRエクソン20変異の存在について陽性である場合に、該患者が、ポジチニブ単独または抗がん療法と組み合わせたポジチニブに対して好ましい応答性を有すると予測される、該方法。

[本発明1053]

前記EGFRエクソン20変異がエクソン20挿入変異としてさらに定義される、本発明1052の方法。

[本発明1054]

前記ゲノム試料が、唾液、血液、尿、正常組織、または腫瘍組織から単離される、本発明1052または1053の方法。

[本発明1055]

EGFRエクソン20変異の存在が、核酸配列決定またはPCR分析によって判定される、本発明1052～1054のいずれかの方法。

[本発明1056]

前記EGFRエクソン20変異が、アミノ酸763～778に点変異、挿入、および/または3～18個のヌクレオチドの欠失を含む、本発明1052～1055のいずれかの方法。

[本発明1057]

1つ以上の前記EGFRエクソン20変異がT790Mおよび/またはC797Sではない、本発明1052～1056のいずれかの方法。

[本発明1058]

前記EGFRエクソン20変異が、残基A763、A767、S768、V769、D770、N771、P772、H773、および/またはV774に存在する、本発明1052～1057のいずれかの方法。

[本発明1059]

前記EGFRエクソン20変異が、残基A763、A767、S768、V769、D

10

20

30

40

50

770、N771、P772、H773、V774、および/またはR776に存在する、本発明1052~1058のいずれかの方法。

[本発明1060]

前記EGFRエクソン20変異が、A763insFQEA、A767insASV、S768dupSVD、V769insASV、D770insSVD、D770insNPG、H773insNPH、N771delinsGY、N771delinsFH、N771dupNPH、A767insTLA、V769insGVV、V769L、V769insGSV、V769insMASVD、D770delinsGY、D770insG、D770insY H773Y、N771insSVDNR、N771insHH、P772insDNP、H773insAH、H773insH、およびV774insHVからなる群より選択される、本発明1052~1059のいずれかの方法。

10

[本発明1061]

前記EGFRエクソン20変異が、A763insFQEA、A763insLQEA、A767insASV、S768dupSVD、S768I、V769insASV、D770insSVD、D770insNPG、H773insNPH、N771delinsGY、N771delinsFH、N771dupNPH、A767insTLA、V769insGVV、V769L、V769insGSV、V769insMASVD、D770delinsGY、D770insG、D770insY H773Y、N771insSVDNR、N771insHH、N771dupN、P772insDNP、H773insAH、H773insH、V774M、V774insHV、R776H、およびR776Cからなる群より選択される、本発明1052~1060のいずれかの方法。

20

[本発明1062]

ポジオチニブ単独または抗がん療法と組み合わせたポジオチニブに対する好ましい応答性が、腫瘍の大きさもしくは腫瘍量の減少、腫瘍成長の阻止、腫瘍関連疼痛の軽減、がん関連病態の軽減、がん関連症状の軽減、がんの非進行、無病期間の延長、進行までの期間の延長、寛解の誘導、転移の減少、または患者の生存性の向上を含む、本発明1052~1061のいずれかの方法。

[本発明1063]

好ましい応答性を有すると予測された前記患者に、ポジオチニブを単独でまたは第2の抗がん療法と組み合わせて投与する工程をさらに含む、本発明1052~1062のいずれかの方法。

30

[本発明1064]

前記ポジオチニブが経口的に投与される、本発明1052~1063のいずれかの方法。

[本発明1065]

前記ポジオチニブが5~25mgの用量で投与される、本発明1052~1064のいずれかの方法。

[本発明1066]

前記ポジオチニブが8mg、12mg、または16mgの用量で投与される、本発明1062~1065のいずれかの方法。

40

[本発明1067]

前記ポジオチニブがポジオチニブ塩酸塩としてさらに定義される、本発明1062~1066のいずれかの方法。

[本発明1068]

前記ポジオチニブ塩酸塩が錠剤として製剤化される、本発明1062~1067のいずれかの方法。

[本発明1069]

対象においてがんを治療する方法であって、有効量のポジオチニブまたはアフアチニブを該対象に投与する工程を含み、該対象が、A775insV G776C、A775i

50

nsYVMA、G776V、G776C V777insV、G776C V777insC、G776del insVV、G776del insVC、P780insGSP、V777L、G778insLPS、V773M、Y772dupYVMA、G776del insLC、G778dupGSP、V777insCG、G776V/S、V777M、M774dupM、A775insSVMA、A775insVA、およびL786Vからなる群より選択される1つ以上のHER2エクソン20変異を有すると判定されている、該方法。

[本発明1070]

前記1つ以上のHER2エクソン20変異が、A775insV G776C、A775insYVMA、G776V、G776C V777insV、G776C V777insC、G776del insVV、G776del insVC、P780insGSP、V777L、G778insLPS、およびV773Mからなる群より選択される、本発明1069の方法。

10

[本発明1071]

前記ボジオチニブが経口的に投与される、本発明1069または1070の方法。

[本発明1072]

前記ボジオチニブが5~25mgの用量で投与される、本発明1069~1071のいずれかの方法。

[本発明1073]

前記ボジオチニブが、8mg、12mg、または16mgの用量で投与される、本発明1069~1072のいずれかの方法。

20

[本発明1074]

前記ボジオチニブがボジオチニブ塩酸塩としてさらに定義される、本発明1069~1073のいずれかの方法。

[本発明1075]

前記ボジオチニブ塩酸塩が錠剤として製剤化される、本発明1069~1074のいずれかの方法。

[本発明1076]

前記1つ以上のHER2エクソン20変異が、アミノ酸770~785に1つ以上の点変異、挿入、および/または3~18個のヌクレオチドの欠失をさらに含む、本発明1069~1075のいずれかの方法。

30

[本発明1077]

前記1つ以上のHER2エクソン20変異が、残基Y772、A775、M774、G776、G778、V777、S779、P780、および/またはL786に存在する、本発明1069~1076のいずれかの方法。

[本発明1078]

前記1つ以上のHER2エクソン20変異が、残基V773、A775、G776、V777、G778、S779、および/またはP780に存在する、本発明1069~1076のいずれかの方法。

[本発明1079]

前記HERエクソン20変異がHER2エクソン20挿入変異としてさらに定義される、本発明1069~1078のいずれかの方法。

40

[本発明1080]

前記HERエクソン20挿入変異がA775insYVMAである、本発明1069~1079のいずれかの方法。

[本発明1081]

mTOR阻害剤を投与する工程をさらに含む、本発明1069~1080のいずれかの方法。

[本発明1082]

前記mTOR阻害剤が、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、リダフォロリ

50

ムス、またはMLN4924である、本発明1081の方法。

[本発明1083]

前記mTOR阻害剤がエベロリムスである、本発明1081の方法。

[本発明1084]

前記ボジオチニブもしくはアフアチニブおよび/または前記mTOR阻害剤が、静脈内に、皮下に、骨内に、経口的に、経皮的に、持続型放出にて、制御型放出にて、遅延型放出にて、坐剤として、または舌下に、投与される、本発明1081の方法。

[本発明1085]

患者由来のゲノム試料を分析することにより、前記対象がHER2エクソン20変異を有すると判定された、本発明1069～1084のいずれかの方法。

10

[本発明1086]

前記ゲノム試料が、唾液、血液、尿、正常組織、または腫瘍組織から単離される、本発明1085の方法。

[本発明1087]

HER2エクソン20変異の存在が、核酸配列決定またはPCR分析によって判定される、本発明1069～1086のいずれかの方法。

[本発明1088]

さらなる抗がん療法を実施する工程をさらに含む、本発明1069～1087のいずれかの方法。

[本発明1089]

20

前記さらなる抗がん療法が、化学療法、放射線療法、遺伝子療法、手術、ホルモン療法、抗血管新生療法、または免疫療法である、本発明1069～1088のいずれかの方法。

[本発明1090]

前記がんが、口腔がん、中咽頭がん、上咽頭がん、呼吸器がん、泌尿生殖器がん、消化器がん、中枢神経系組織もしくは末梢神経系組織のがん、内分泌もしくは神経内分泌がんまたは造血系のがん、神経膠腫、肉腫、がん腫、リンパ腫、黒色腫、線維腫、髄膜腫、脳がん、中咽頭がん、上咽頭がん、腎臓がん、胆道がん、褐色細胞腫、膵島細胞がん、リー・フラウメニ腫瘍、甲状腺がん、副甲状腺がん、下垂体腫瘍、副腎腫瘍、骨肉腫、多発性神経内分泌腫瘍I型およびII型、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、肝臓がん、膀胱がん、胃がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がん、または皮膚がんである、本発明1069～1089のいずれかの方法。

30

[本発明1091]

前記がんが非小細胞肺癌である、本発明1069～1090のいずれかの方法。

[本発明1092]

前記対象がヒトである、本発明1069～1091のいずれかの方法。

[本発明1093]

A775insV、G776C、A775insYVMA、G776V、G776C、V777insV、G776C、V777insC、G776delinsVV、G776delinsVC、P780insGSP、V777L、G778insLPS、V773M、Y772dupYVMA、G776delinsLC、G778dupGSP、V777insCG、G776V/S、V777M、M774dupM、A775insSVMA、A775insVA、およびL786Vからなる群より選択される1つ以上のHER2エクソン20変異を有すると判定された対象において使用するための、ボジオチニブまたはアフアチニブを含む薬学的組成物。

40

[本発明1094]

前記1つ以上のHER2エクソン20変異が、A775insV、G776C、A775insYVMA、G776V、G776C、V777insV、G776C、V777insC、G776delinsVV、G776delinsVC、P780insGSP、V777L、G778insLPS、およびV773Mからなる群より選択される、本

50

発明 1093 の組成物。

[本発明 1095]

前記 HER2 エクソン 20 変異が HER2 エクソン 20 挿入変異としてさらに定義される、本発明 1093 または 1094 の組成物。

[本発明 1096]

前記 HER2 エクソン 20 変異が、アミノ酸 770 ~ 785 に 1 つ以上の点変異、挿入、および / または 3 ~ 18 個のヌクレオチドの欠失をさらに含む、本発明 1093 ~ 1095 のいずれかの組成物。

[本発明 1097]

前記 1 つ以上の HER2 エクソン 20 変異が、残基 Y772、A775、M774、G776、G778、V777、S779、P780、および / または L786 に存在する、本発明 1093 ~ 1096 のいずれかの組成物。

10

[本発明 1098]

前記 1 つ以上の HER2 エクソン 20 変異が、残基 V773、A775、G776、V777、G778、S779、および / または P780 に存在する、本発明 1093 ~ 1096 のいずれかの組成物。

[本発明 1099]

患者が抗がん療法によって治療中である、本発明 1093 ~ 1098 のいずれかの薬学的組成物。

[本発明 1100]

がんを有する対象において、ポジオチニブ単独もしくはアフアチニブ単独または抗がん療法と組み合わせたポジオチニブもしくはアフアチニブに対する応答性を予測する方法であって、該対象から得られたゲノム試料において、A775 ins V G776 C、A775 ins YVMA、G776 V、G776 C V777 ins V、G776 C V777 ins C、G776 del ins VV、G776 del ins VC、P780 ins GSP、V777 L、G778 ins LPS、V773 M、Y772 dup YVMA、G776 del ins LC、G778 dup GSP、V777 ins CG、G776 V/S、V777 M、M774 dup M、A775 ins SVMA、A775 ins VA、および L786 V からなる群より選択される HER2 エクソン 20 変異を検出する工程を含み、該試料が HER2 エクソン 20 変異の存在について陽性である場合に、患者が、ポジオチニブ単独もしくはアフアチニブ単独または抗がん療法と組み合わせたポジオチニブもしくはアフアチニブに対して好ましい応答性を有すると予測される、該方法。

20

30

[本発明 1101]

前記 HER2 エクソン 20 変異が HER2 エクソン 20 挿入変異としてさらに定義される、本発明 1100 の方法。

[本発明 1102]

前記ゲノム試料が、唾液、血液、尿、正常組織、または腫瘍組織から単離される、本発明 1100 または 1101 の方法。

[本発明 1103]

HER2 エクソン 20 変異の存在が、核酸配列決定または PCR 分析によって判定される、本発明 1100 ~ 1102 のいずれかの方法。

40

[本発明 1104]

前記抗がん療法が mTOR 阻害剤である、本発明 1100 ~ 1103 のいずれかの方法。

[本発明 1105]

ポジオチニブ阻害剤単独もしくはアフアチニブ阻害剤単独または抗がん療法と組み合わせたポジオチニブ阻害剤もしくはアフアチニブ阻害剤に対する好ましい応答性が、腫瘍の大きさもしくは腫瘍量の減少、腫瘍成長の阻止、腫瘍関連疼痛の軽減、がん関連病態の軽減、がん関連症状の軽減、がんの非進行、無病期間の延長、進行までの期間の延長、寛解の誘導、転移の減少、または患者の生存性の向上を含む、本発明 1100 ~ 1104 のいずれかの方法。

50

[本発明 1106]

好ましい応答性を有すると予測された前記患者に、ポジオチニブもしくはアフアチニブを単独でまたは第2の抗がん療法と組み合わせて投与する工程をさらに含む、本発明 1100 ~ 1105 のいずれかの方法。

[本発明 1107]

(a) ヒトがん細胞から単離された核酸；および
(b) ヒトEGFRまたはHER2コード配列のエクソン20の少なくとも第1の部分を増幅することができるプライマー対を含む、組成物。

[本発明 1108]

前記ヒトEGFRまたはHER2コード配列中に変異が存在する場合に該配列のエクソン20の前記第1の部分に特異的にハイブリダイズすることができる、標識されたプローブ分子をさらに含む、本発明 1107 の組成物。

[本発明 1109]

熱安定性DNAポリメラーゼをさらに含む、本発明 1107 または 1108 の組成物。

[本発明 1110]

dNTPSをさらに含む、本発明 1107 ~ 1109 のいずれかの組成物。

[本発明 1111]

A763insFQEA、A767insASV、S768dupSVD、V769insASV、D770insSVD、D770insNPG、H773insNPH、N771delinsGY、N771delinsFH、N771dupNPH、A767insTLA、V769insGVV、V769L、V769insGSV、V769insMASVD、D770delinsGY、D770insG、D770insYH773Y、N771insSVDNR、N771insHH、P772insDNP、H773insAH、H773insH、およびV774insHVからなる群より選択される変異が存在する場合に、前記標識されたプローブが前記ヒトEGFRコード配列のエクソン20の前記第1の部分にハイブリダイズする、本発明 1108 ~ 1110 のいずれかの組成物。

[本発明 1112]

A763insFQEA、A763insLQEA、A767insASV、S768dupSVD、S768I、V769insASV、D770insSVD、D770insNPG、H773insNPH、N771delinsGY、N771delinsFH、N771dupNPH、A767insTLA、V769insGVV、V769L、V769insGSV、V769insMASVD、D770delinsGY、D770insG、D770insYH773Y、N771insSVDNR、N771insHH、N771dupN、P772insDNP、H773insAH、H773insH、V774M、V774insHV、R776H、およびR776Cからなる群より選択される変異が存在する場合に、前記標識されたプローブが前記ヒトEGFRコード配列のエクソン20の前記第1の部分にハイブリダイズする、本発明 1108 ~ 1111 のいずれかの組成物。

[本発明 1113]

A775insVG776C、A775insYVMA、G776V、G776CV777insV、G776CV777insC、G776delinsVV、G776delinsVC、P780insGSP、V777L、G778insLPS、V773M、Y772dupYVMA、G776delinsLC、G778dupGSP、V777insCG、G776V/S、V777M、M774dupM、A775insSVMA、A775insVA、およびL786Vからなる群より選択される変異が存在する場合に、前記標識されたプローブが前記ヒトHER2コード配列のエクソン20の前記第1の部分にハイブリダイズする、本発明 1108 ~ 1111 のいずれかの組成物。

10

20

30

40

50

[本発明 1114]

変異体 E G F R タンパク質をコードする単離された核酸であって、該変異体タンパク質が、アミノ酸 763 ~ 778 に点変異、挿入、および/または 3 ~ 18 個のヌクレオチドの欠失を含む 1 つ以上の E G F R エクソン 20 変異だけ野生型ヒト E G F R と異なる、該単離された核酸。

[本発明 1115]

前記 1 つ以上の E G F R エクソン 20 変異が、A 763、A 767、S 768、V 769、D 770、N 771、P 772、H 773、および V 774 からなる群より選択される 1 つ以上の残基に存在する、本発明 1114 の単離された核酸。

[本発明 1116]

前記 1 つ以上の E G F R エクソン 20 変異が、A 763、A 767、S 768、V 769、D 770、N 771、P 772、H 773、V 774、および R 776 からなる群より選択される 1 つ以上の残基に存在する、本発明 1114 または 1115 の単離された核酸。

[本発明 1117]

前記 1 つ以上のエクソン 20 変異が、A 763 ins FQEA、A 767 ins ASV、S 768 dup SVD、V 769 ins ASV、D 770 ins SVD、D 770 ins NPG、H 773 ins NPH、N 771 del ins GY、N 771 del ins FH、N 771 dup NPH、A 767 ins TLA、V 769 ins GVV、V 769 L、V 769 ins GSV、V 769 ins MASVD、D 770 del ins GY、D 770 ins G、D 770 ins Y H 773 Y、N 771 ins SVDNR、N 771 ins HH、P 772 ins DNP、H 773 ins AH、H 773 ins H、および V 774 ins HV からなる群より選択される、本発明 1114 ~ 1116 のいずれかの単離された核酸。

[本発明 1118]

前記 1 つ以上のエクソン 20 変異が、A 763 ins FQEA、A 763 ins LQE A、A 767 ins ASV、S 768 dup SVD、S 768 I、V 769 ins ASV、D 770 ins SVD、D 770 ins NPG、H 773 ins NPH、N 771 del ins GY、N 771 del ins FH、N 771 dup NPH、A 767 ins TLA、V 769 ins GVV、V 769 L、V 769 ins GSV、V 769 ins M ASVD、D 770 del ins GY、D 770 ins G、D 770 ins Y H 773 Y、N 771 ins SVDNR、N 771 ins HH、N 771 dup N、P 772 ins DNP、H 773 ins AH、H 773 ins H、V 774 M、V 774 ins HV、R 776 H、および R 776 C からなる群より選択される、本発明 1114 ~ 1117 のいずれかの単離された核酸。

[本発明 1119]

SEQ ID NO: 8、9、10、11、または 12 の配列を含む、本発明 1114 ~ 1118 のいずれかの単離された核酸。

[本発明 1120]

変異体 H E R 2 タンパク質をコードする単離された核酸であって、該変異体タンパク質が、アミノ酸 770 ~ 785 に 1 つ以上の点変異、挿入、および/または 3 ~ 18 個のヌクレオチドの欠失を含む 1 つ以上の H E R 2 エクソン 20 変異だけ野生型ヒト H E R 2 と異なる、該単離された核酸。

[本発明 1121]

前記 1 つ以上の H E R 2 エクソン 20 変異が、残基 Y 772、A 775、M 774、G 776、G 778、V 777、S 779、P 780、および/または L 786 に存在する、本発明 1120 の単離された核酸。

[本発明 1122]

前記 1 つ以上の H E R 2 エクソン 20 変異が、A 775 ins V G 776 C、A 775 ins YVMA、G 776 V、G 776 C V 777 ins V、G 776 C V 777 in

10

20

30

40

50

s C、G 7 7 6 d e l i n s V V、G 7 7 6 d e l i n s V C、P 7 8 0 i n s G S P、V 7 7 7 L、G 7 7 8 i n s L P S、V 7 7 3 M、Y 7 7 2 d u p Y V M A、G 7 7 6 d e l i n s L C、G 7 7 8 d u p G S P、V 7 7 7 i n s C G、G 7 7 6 V / S、V 7 7 7 M、M 7 7 4 d u p M、A 7 7 5 i n s S V M A、A 7 7 5 i n s V A、および L 7 8 6 V からなる群より選択される、本発明 1 1 2 0 または 1 1 2 1 の単離された核酸。

[本発明 1 1 2 3]

S E Q I D N O : 1 4、1 5、1 6、1 7、または 1 8 の配列を含む、本発明 1 1 2 0 ~ 1 1 2 2 のいずれかの単離された核酸。

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となるだろう。しかしながら、本明細書の詳細な説明から、本発明の精神および範囲の範囲内でのさまざまな変更および修飾が当業者には明らかとなることから、詳細な説明および特定の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すものの、例示のみを目的としていることが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0045】

添付の図面は、本明細書の一部を形成するものであり、本発明のある特定の態様をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書において提示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせて、これらの図面の1つまたは複数を参照することによって、よりよく理解され得る。

【図1】図1A~1J:エクソン20挿入変異は、共有結合型および非共有結合型TKIに対してデノボ耐性を誘導する。(図1A)古典的およびエクソン20EGFR変異を有する患者の無増悪生存期間(PFS)は、第一選択療法に対して抵抗性を示す。エクソン20挿入を有する患者はパーセント生存率が低下している。(図1B)安定Ba/F3モデルにおいて作製されたEGFRおよびHER2エクソン20挿入変異の概略図。第1世代、第2世代、および第3世代TKIで72時間処理されたEGFR(図1C~E)および(図1F~H)HER2エクソン20挿入変異を発現するBa/F3細胞株の細胞生存率の用量反応曲線。(図1C~H)6つの細胞株の平均値±SEMを各濃度についてプロットする(n=3)。(図1I)EGFR D770insNPGおよびT790Mの3-Dモデリング。P-ループおよび-c-ヘリックスの結合ポケット内へのシフトは、結合ポケットからAZD9291を押し出す立体障害をもたらす。(図1J)HER2 A775insYVMAおよびWTの3-Dモデリング。P-ループおよび-c-ヘリックスの結合ポケット内への全体的なシフトは、結合ポケットのサイズの全体的な低下をもたらす。

【図2】図2A~2G:ポジオチニブは、EGFRおよびHER2エクソン20挿入変異を強力に阻害する。ポジオチニブで72時間処理したEGFR(図2A)およびHER2(図2B)エクソン20挿入変異を発現するBa/F3細胞株の細胞生存率の用量反応曲線。各個別の細胞株の平均値±SEMを各濃度についてプロットした(n=3)。(図2C)ウエスタンブロッティングは、ポジオチニブ処理の2時間後のBa/F3細胞株におけるp-EGFRおよびp-HER2の阻害を確認する(n=2)。(図2D)Ba/F3EGFRエクソン20挿入位置のアミノ酸位置との相関性(n=2)。ピアソン相関係数およびp値を、GraphPad Prismを用いて決定した。(図2E)ポジオチニブまたはアフマチニブで72時間処理したEGFR A767dupASVを発現する患者由来細胞株CUTO14および(図2F)EGFR N771del insFHを発現するYUL0019の細胞生存率の用量反応曲線(n=3)。(図2F)アフマチニブ、オシメルチニブ、ロシレチニブ、またはポジオチニブとの72時間のインキュベーション後のBa/F3EGFR T790M細胞株のIC50値に対して正規化したEGFR変異体Ba/F3細胞のIC50値(n=3)。(図2G)バーは平均値±SEMを表す。1を超える値はT790Mと比較してより低い強度の阻害を表し、1未満の値は、T790Mと比較してエクソン20挿入のより強い阻害を表す。

【図3】図3A~3H:ポジオチニブは、EGFRおよびHER2エクソン20挿入変異

10

20

30

40

50

マウスモデルにおいて腫瘍量を低下させる。EGFR D770insNPG (図3A) またはHER2 A775insYVMA (図3B) マウスを毎日、ビヒクル (EGFR $n=5$ およびHER2 $n=4$)、20 mg/kgのアファチニブ (EGFR $n=4$)、または10 mg/kgのポジオチニブ (EGFR $n=5$ およびHER2 $n=6$) で4週間処置した。MRIによって測定された腫瘍体積変化のウォーターフォールプロット (Waterfall plot) は、EGFRおよびHER2 GEMMにおいて4週でポジオチニブによる85%および60%の腫瘍抑制をそれぞれ示す。(図3A~B) 両側学生t-検定を用いてp値を計算した。4週間のポジオチニブ処置前および処置後のEGFR (図3C) およびHER2 (図3D) GEMMの代表的なMRI画像は、強い腫瘍退縮を示す。10 mg/kgのポジオチニブ5日/週で12週間処置したEGFR D770insNPG (図3E) ($n=4$) およびHER2 A775insYVMA (図3F) ($n=6$) の腫瘍体積のプロットは、マウスがポジオチニブ処置に継続して反応することを示す。(図3G) アファチニブまたはポジオチニブで処置したYUL-0019 (EGFR N771delinsFH) 細胞。10 mg/kgポジオチニブで処置した細胞は最も低い腫瘍体積を有し、5 mg/kgで処置した細胞は2番目に低い腫瘍体積を有した。(図3H) EGFR H773insNPH PDXマウスを、ビヒクル対照 ($n=6$)、5 mg/kg ($n=6$)、または10 mg/kg ($n=3$) のポジオチニブで処置した。ポジオチニブで処置したマウスは腫瘍体積を低下させた。ウォーターフォールプロットは、腫瘍量が、全てのポジオチニブ処置マウスにおいて>85%減少し、9匹のポジオチニブ処置マウスのうち8匹では、異種移植片が残存塊 (residual bulk) まで完全に縮小した。一元配置ANOVA分析をTukey検定と組み合わせて用いて、統計学的有意性を判定した、***、 $p < 0.0001$ 。

10

20

【図4】図4A~4C: EGFRおよびHER2エクソン20挿入変異は活性化変異である。(図4A) EGFRエクソン20挿入を有する個々の患者のウォーターフォールプロットは、エルロチニブ、ゲフィチニブ、またはアファチニブに対するデノボ耐性を示す。患者の変異を各代表的なバーの下に列記する。(図4B) EGFRエクソン20挿入変異を発現する安定Ba/F3細胞株は、空のベクターを発現するBa/F3細胞またはEGFR WTを発現するBa/F3細胞とは異なり、IL-3非依存性条件で生存可能であり、EGFRエクソン20挿入が活性化変異であることを示す。(図4C) 異なるHER2変異を発現する11種類の安定Ba/F3細胞株のIL-3非依存性増殖は、HER2活性化変異の大多数がHER2のエクソン20内に存在することを示す。L755Pを除いて、全ての活性化変異はHER2エクソン20挿入変異であった。(図4B~C) 細胞生存度をCell Titer Gloアッセイによって測定した。平均値±SEMを各細胞株についてプロットした ($n=3$)。

30

【図5】第1世代、第2世代、および第3世代TKIで72時間処理したEGFRエクソン20挿入変異を発現する個々のBa/F3細胞株の細胞生存率の用量反応曲線。平均値±SEMを各濃度についてプロットした ($n=3$)。

【図6】第1世代、第2世代、および第3世代TKIで72時間処理したHER2エクソン20挿入変異を発現する個々のBa/F3細胞株の細胞生存率の用量反応曲線。平均値±SEMを各濃度についてプロットした ($n=3$)。

40

【図7】図7A~7D: 残基A763後のEGFRおよびHER2エクソン20挿入変異は、第1世代および第3世代TKIに対して耐性を有する。EGFRエクソン20挿入を有するBa/F3細胞を1時間血清飢餓させ、次いで表示した用量の(図7A) エルロチニブまたは(図7C) オシメルチニブで2時間処理した ($N=2$)。(図7B) エルロチニブ処理および(図7D) オシメルチニブ処理後のp-EGFRおよびp-HER2レベルを、Photoshopを用いて定量化した。値をGraphpad Prismでプロットした、バーは平均値±SEMを表す。 ($N=2$) $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), または $p < 0.001$ (***)。

【図8】図8A~8E: EGFRおよびHER2エクソン20挿入変異は、ポジオチニブに対してインビトロで感受性を有する。(図8A) 表示したBa/F3細胞株における2

50

時間のポジチニブ処理後の p - E G F R および p - H E R 2 のウエスタンブロットを、Photoshopを用いて定量化した。値をGraphpad Prismでプロットした、バーは平均値 ± S E M を表す。(N = 2) (図 8 B) 3 時間の表示した用量のアファチニブまたはポジチニブ後の C U T O - 1 4 患者由来細胞株のウエスタンブロット (N = 3)。(図 8 C) C U T O - 1 4 細胞株における 3 時間の表示した用量のアファチニブまたはポジチニブ後のウエスタンブロットからの p - E G F R の定量化。ポジチニブ処理は、減少した p - E G F R をもたらした。(図 8 D) B a / F 3 細胞株の相対的発現に対する I C 5 0 値の線形回帰プロットは、発現とポジチニブに対する感受性との間には相関性がなかったことを示した (n = 2)。(図 8 E) H E R 2 受容体内の変異の位置に対する I C 5 0 値の線形回帰プロットは、H E R 2 変異体 B a / F 3 細胞株において位置とポジチニブに対する感受性との間には相関性がなかったことを示した (n = 2)。ピアソン相関係数および p 値を、Graphpad prismを用いて計算した。p < 0 . 0 5 (*)、p < 0 . 0 1 (* *)、または p < 0 . 0 0 1 (* * *)。

10

【図 9】C 7 9 7 S および E M T は、インビトロでのポジチニブ耐性の 2 つの別個のメカニズムである。ポジチニブで 7 2 時間処理した E G F R 変異体 B a / F 3 細胞株の細胞生存率の用量反応曲線。平均値 ± S E M を各濃度についてプロットした (n = 3)。

【図 1 0】表示した T K I で処理した M C F 1 0 A H E R 2 G 7 7 6 d e l i n s V C 細胞株の細胞生存率の用量反応曲線。

【図 1 1 A】ポジチニブまたは表示した T K I で 7 2 時間処理した E G F R 変異体 B a / F 3 細胞株の細胞生存率の用量反応曲線。

20

【図 1 1 B】ポジチニブまたは表示した T K I で 7 2 時間処理した E G F R 変異体 B a / F 3 細胞株の細胞生存率の用量反応曲線。

【図 1 1 C】ポジチニブまたは表示した T K I で 7 2 時間処理した、耐性変異を含む E G F R 変異体 B a / F 3 細胞株の細胞生存率の用量反応曲線。

【図 1 1 D】ポジチニブまたは表示した T K I で 7 2 時間処理した、耐性変異を含む E G F R 変異体 B a / F 3 細胞株の細胞生存率の用量反応曲線。

【図 1 2】ポジチニブまたは表示した T K I で 7 2 時間処理した H E R 2 変異体 B a / F 3 細胞株の細胞生存率の用量反応曲線。

【図 1 3】図 1 3 A ~ 1 3 B : H E R 2 変異は、多種多様ながんの種類において生じ、受容体全体にわたって変異ホットスポットが生じる。がんごとの H E R 2 変異 (A) および H E R 2 エクソン 2 0 変異 (B) の頻度の加重平均の棒グラフ。バーは加重平均 ± S E M を表す。ドットのサイズは、各データベースにおける患者の数を表す。Guardant Healthによって報告された c f D N A により検出された H E R 2 変異の頻度は、O d e g a a r d e t a l 2 0 1 8 において報告されるように臨床的感度について補正した。

30

【図 1 4】図 1 4 A ~ 1 4 H : H E R 2 変異ホットスポットはがんの種類ごとに変化する。c B i o p o r t a l および M D A n d e r s o n データベースで報告された (A) 全てのがん (N = 2 3 3 8)、(B) 肺がん (N = 1 7 7)、(C) 乳がん (N = 1 4 3)、および (D) 結腸直腸がん (N = 2 1 9) での H E R 2 変異位置の頻度の円グラフ。(E) c B i o P o r t a l および M D A n d e r s o n で報告された全てのがんで最も高い頻度で見られる 1 0 種類の H E R 2 変異のロリポッププロット (L o l l i p o p p l o t) (N = 2 3 3 8 H E R 2 変異)。バーの長さは変異の頻度と相関する。(E ~ H) c B i o P o r t a l および M D A n d e r s o n データベースにおける N S C L C (F、N = 1 7 7)、乳がん (G、N = 1 4 3)、および結腸直腸がん (H、N = 2 1 9) で最も高い頻度で見られる 1 0 種類の H E R 2 変異のロリポッププロット；バーの長さは、報告された変異の頻度と相関する。

40

【図 1 5】図 1 5 A ~ 1 5 C : チロシンキナーゼドメインで最も高い頻度で見られる H E R 2 バリエーションは活性化変異である。I L - 3 を含まない条件下で 1 4 日間増殖させた、H E R 2 エクソン 1 9 (A)、H E R 2 エクソン 2 0 (B)、および H E R 2 エクソン 2 1 (C) 変異を発現する安定 B a / F 3 細胞株の細胞生存度。細胞生存度は、C e l l

50

Titer Gloアッセイによって3日毎に測定された。平均値 \pm SEMを各細胞についてプロットした($n=3$ 、生物学的に独立した実験)。

【図16】図16A~16F: ポジオチニブは、Ba/F3細胞においてHER2変異について試験した最も強力な阻害剤であった。(A)薬物処理の72時間後の表示した変異を安定的に発現するBa/F3細胞および薬物についての、GraphPadで計算した $\log IC_{50}$ 値のヒートマップ。細胞生存度をCell Titer Gloアッセイによって測定した($N=3$)。アファチニブ、ネラチニブ、タルロキソチニブ(tarloxotinib)-TKI、またはポジオチニブで72時間の薬物処理後の、HER2変異を発現する全てのBa/F3細胞株(B)、HER2エクソン19変異体細胞株(C)、HER2エクソン20変異体細胞株(D)、またはHER2エクソン21変異体細胞株(E)についての平均 IC_{50} 値。バーは平均値 \pm SEM($N=3$)を表す。(C~E)Dunnの多重比較検定による一元配置ANOVAを用いて、群間の統計学的有意性を判定した。(F)表示した阻害剤によるL755SまたはL755Pを発現するBa/F3細胞の平均 IC_{50} 値。ドットは平均値 \pm SEM($N=3$)を表す。統計学的有意性を対応のあるt検定によって判定した。

10

【図17】図17A~17D: HER2変異体の分子動力学シミュレーションは、Y772dupYVMAおよびL755P変異について薬物感受性が低下する推定メカニズムを示している。(A)150ns加速分子動力学シミュレーション時のHER2 V777LおよびY772dupYVMAエクソン20変異体についての-C-ヘリックス位置。(B)-C-ヘリックスの「イン(in)」の立体構造対「アウト(out)」の立体構造でのHER2エクソン20変異体についての分子動力学スナップショットの部分分布。(C)V777LおよびY772dupYVMA変異体の分子動力学スナップショット。P-ループおよびキナーゼヒンジ立体構造においてわずかな差異が存在した一方で、-C-ヘリックス位置では有意なシフトが存在した。(D)L755PおよびL755S HER2変異体の分子動力学スナップショット。L755P変異体は、V790による骨格水素結合を欠き、キナーゼヒンジの不安定化および結合部位に向けてのP-ループの収縮をもたらす。

20

【図18】図18A~18F: HER2変異を発現するヒト細胞株もまた、ポジオチニブに対して最も高い感受性を有する。表示した阻害剤で72時間処理した、エクソン20挿入変異、HER2 G776delinsVC(A)、HER2 Y772dupYVMA(B)、HER2 G778dupGSP(C)を発現するMCF10A細胞の用量反応曲線。(D)MCF10A HER2選択性インデックスの棒グラフ。変異体細胞株の IC_{50} 値を、各表示した薬物に対するHER2 WT発現細胞株の平均 IC_{50} 値によって除算した。ドットは各細胞株の平均値 \pm SEMを表し、バーは全3種類の細胞株の平均値 \pm 最小/最大(各細胞株ごとに $N=3$)を表す。(E)表示した阻害剤で72時間処理した、HER2エクソン19変異L755Sを保有するCW-2大腸細胞の用量反応曲線。(A~C、E)曲線は中央値 \pm SEM、 $N=3$ を表す。(F)21日目でのCW-2腫瘍体積の棒グラフ。マウスをビヒクル対照($N=5$)、30mg/kgネラチニブ($N=5$)、20mg/kgアファチニブ($N=5$)、または5mg/kgポジオチニブ($N=5$)で5日/週で処置し、腫瘍を350mm³で無作為化し、点線によって表示した。ドットは個々の腫瘍を表し、バーは平均値 \pm SEMを表す。統計学的有意性を一元配置ANOVAによって判定した。

30

40

【図19】図19A~19D: HER2変異を有するNSCLC患者はポジオチニブに対して42%の確定奏効率を有する。(A)臨床試験NCT03066206での最初の12名のHER2エクソン20患者の奏効のウォーターフォールプロット(Waterfall plot)。客観的部分奏効が示され(左から7、8、10、11、および12番目のバー)、未確定の奏効が示され(9番目のバー)、安定が示され(3~6番目のバー)、かつ進行が示される(1~2番目のバー)。(B)最初の12名のHER2エクソン20患者の無増悪生存期間のカプラン・マイヤープロットは、mPFSが2018年12月時点で5.6ヶ月であったことを示す。(C)ポジオチニブ処置の1日前および治療の

50

8週後のHER2 Y772dupYVMA変異を有する患者のCTスキャン。(D) ポジオチニブ処置の1日前および4週後のHER2 L755P変異体NSCLCを有する患者のPETスキャン。患者は、トラスツズマブ、ニボルマブ、および抗TDM1との組み合わせでの白金ベースの化学療法で以前に処置されており、かつそれによって進行しているが、ポジオチニブ処置により標的病変において-12%の減少を有した。

【図20】図20A~20G: ポジオチニブ処置は細胞表面上でのHER2の蓄積を誘導し、ポジオチニブとT-DM1処置との組み合わせは抗腫瘍活性を増強する。(A) 10nMポジオチニブ処置の24時間後の、HER2 Y772dupYVMA、HER2 G778dupGSP、およびHER2 G776delinsVCを発現するMC10A細胞株上のHER2受容体発現のFACS分析。バーは平均値±SEMを表し、有意差がDMSO処置群とポジオチニブ処置群との間のスチューデントt-検定により判定された。(B) ポジオチニブ、T-DM1、またはポジオチニブと表示した用量のT-DM1で処置した、HER2 Y772dupYVMA、HER2 G778dupGSP、およびHER2 G776delinsVCを発現するMCF10A細胞株のIC₅₀値の棒グラフ。バーは平均値±SEM(n=3、独立した実験)を表し、有意差が一元配置ANOVAおよびDunnの多重比較事後分析により判定された。(C) 表示した阻害剤で処置したHER2 Y772dupYVMA NSCLC PDXの腫瘍成長曲線。ポジオチニブ処置は1週間に5日実施され、T-DM1は処置の開始時に1回投与された。(D) PFSが最良効果からの腫瘍倍加として定義される、無増悪生存期間(PFS)のカプラン・マイヤー曲線。マンテル・コックスのログランク検定を用いて、群間の有意差を判定した。(E) 15日目での表示した阻害剤で処置したマウスの腫瘍体積のパーセント変化のドットプロット。(F) 15日目および45日目での各群における担腫瘍マウスの数の図表。(G) 表示した阻害剤で処置したHER2 Y772dupYVMAマウスの腫瘍体積のスパイダープロット。赤色の点線は無作為化の点(300mm³)を示す。

10

20

【図21】図21A~21D: エクソン20挿入変異の多様性は、Guardant、cBioPortal、およびMD Andersonのデータベースにおいてがんの種類ごとに異なる。(A) 全てのがんの種類、N=517におけるHER2エクソン20挿入変異の頻度の円グラフ。エクソン20挿入変異の頻度を、がんの種類ごとにさらに分析した:(B) 肺がん、N=362、(C) 乳がん、N=30、および(D) その他のがん、N=125。

30

【図22】図22A~22B: よく見られるHER2変異は恒常的にリン酸化されており、p-HER2発現は薬物感受性と相関しない。(A) 相対的p-HER2発現を、ELISAにより決定された総HER2に対するp-HER2の比率を用いることによって測定した。バーは平均値±SEM、およびn=3を表す。ND=検出限界未満。(B) 相対的HER2の相関関係を、Ba/F3 HER2変異体細胞株についてポジオチニブIC₅₀値に対してプロットした。ピアソン相関係数およびp値をGraphPad Prism(n=3)によって決定した。

【図23】図23A~23B: 分子モデリングにより、HER2変異体は結合ポケットサイズが異なることが明らかにされている。(A) HER2キナーゼドメインエクソン19、20、および21タンパク質骨格をそれぞれ、青色、ピンク色、およびオレンジ色に着色した。鋳型X線構造(PDB 3PP0)由来のリガンドが緑色のバーで描かれ、ラベルが変異残基/挿入位置に与えられる。(B) 加速分子動力学シミュレーションから得られたHER2変異体についての結合ポケット体積のプロファイル。

40

【図24】ポジオチニブはHER2変異体細胞株においてp-HER2を阻害する。表示した薬物および用量の処置の2時間後のG776delinsVCを発現するMCF10A細胞のウエスタンプロット。

【図25】ポジオチニブは、エクソン19変異体結腸直腸がんの異種移植片における腫瘍成長を抑制する。HER2 L755S変異を保有するCW-2細胞を、6週齢の雌のnu/nuヌードマウスの側腹部に注入した。腫瘍が350mm³に到達したときに、マウ

50

スを4群：20 mg / kg アファチニブ、5 mg / kg ポジオチニブ、30 mg / kg ネラチニブ、またはビヒクル対照に無作為化した。腫瘍体積を週に3回測定し、マウスは月曜日～金曜日（週に5日）に薬物を受けた。記号は各時点での平均値 ± SEMを表す。Tukeyの多重比較検定による二元配置ANOVAを用いて、統計学的有意性を判定した。アスタリスクはビヒクルとポジオチニブまたはネラチニブとの間の有意性を示す。各比較でのP値は下段に列記され、有意差が最初に検出された10日目から始めた。

【図26】ポジオチニブは、EGFR S768dupSVD PDXモデルにおいて、高用量オシメルチニブより効果的である。雌のNSGマウス6～8週齢に、EGFR S768dupSVD変異を保有する患者NSCLC腫瘍断片を移植し、腫瘍が300 mm³に到達したときに、マウスを以下の4群に無作為化した：ビヒクル対照、ポジオチニブ2.5 mg / kg、オシメルチニブ5 mg / kg、またはオシメルチニブ25 mg / kg。薬物を週に5日マウスに投与し、腫瘍体積を週に3回測定した。記号は各時点での平均値 ± SEM腫瘍体積を表す。ドットプロットは、21日目での平均腫瘍体積のパーセント変化を表し、各ドットは1匹のマウスを表す。

10

【図27】ポジオチニブは、Y772dupYVMAを保有するNSCLCのPDXモデルにおいてネラチニブより高い抗腫瘍活性を有する。雌のNSGマウス6～8週齢に、HER2 Y772dupYVMA変異を保有する患者NSCLC腫瘍断片を移植し、腫瘍が300 mm³に到達したときに、マウスを以下の3群に無作為化した：ビヒクル対照、ポジオチニブ2.5 mg / kg、またはネラチニブ30 mg / kg。薬物を週に5日マウスに投与し、腫瘍体積を週に3回測定した。記号は各時点での平均値 ± SEM腫瘍体積を表す。ドットプロットは、21日目での平均腫瘍体積のパーセント変化を表し、各ドットは1匹のマウスを表す。ANOVAを用いて、処置の最終時点での表示したバーに対するp値を決定した。

20

【図28】単剤ポジオチニブは、V777Lを保有する乳がんPDXにおいてネラチニブより有効である。雌のNSGマウス6～8週齢に、HER2 V777L変異を保有する患者乳がん腫瘍断片を移植し、腫瘍が300 mm³に到達したときに、マウスを以下の3群に無作為化した：ビヒクル対照、ポジオチニブ2.5 mg / kg、またはネラチニブ30 mg / kg。薬物を週に5日マウスに投与し、腫瘍体積を週に3回測定した。記号は各時点での平均値 ± SEM腫瘍体積を表す。ドットプロットは、30日目での平均腫瘍体積のパーセント変化を表し、各ドットは1匹のマウスを表す。ANOVAを用いて、処置の最終時点での表示したバーに対するp値を決定した。

30

【図29】ポジオチニブは、種々のEGFRおよびHER2エクソン20変異体インビボモデルにおいて抗腫瘍活性を有する。PDXモデルでは、雌のNSGマウス6～8週齢に、種々のEGFRまたはHER2エクソン20変異を保有する表示した腫瘍断片を移植し、腫瘍が300 mm³に到達したときに、マウスを以下の2群に無作為化した：ビヒクル対照またはポジオチニブ5 mg / kg。薬物を週に5日マウスに投与し、腫瘍体積を週に3回測定した。バーは4週での平均腫瘍体積のパーセント変化を表し、各ドットは1匹のマウスを表す。GEMMでは、腫瘍をドキシサイクリン食によって誘導し、MRIによる腫瘍立体構造によって、マウスをビヒクルまたはポジオチニブ10 mg / kgで4週間毎日処置した。バーは4週での平均腫瘍体積のパーセント変化を表し、各ドットは1匹のマウスを表し、腫瘍体積はMRIにより測定された。

40

【発明を実施するための形態】

【0046】

例示的な実施形態の説明

上皮増殖因子受容体(EGFR)変異体非小細胞肺癌(NSCLC)の活性化変異の大多数は、使用可能なEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)に対して感受性を有するが、EGFRおよびHER2のエクソン20に変化を有するサブセットは本質的に耐性を有する。本研究は、インシリコ、インピトロ、およびインビボ試験を用いて、これらのエクソン20変異により誘導される構造変化をモデル化し、効果的な阻害剤を同定した。3-Dモデリングにより、薬物結合ポケットの大きさを制限し、大きく剛性の阻害剤の結

50

合に制約を課す、重大な変化が明らかにされた。ポジオチニブは、その小さなサイズおよび柔軟性により、これらの立体的変化を回避することができ、EGFRまたはHER2エクソン20変異体タンパク質の強力かつ相対的に選択的な阻害剤であることが見いだされた。ポジオチニブはまた、変異体エクソン20EGFRまたはHER2 NSCLC患者由来異種移植片(PDX)モデルおよび遺伝子改変マウスモデルにおいて強力な活性を有する。したがって、これらのデータは、EGFR/HER2エクソン20変異の強力で臨床的に活性のある阻害剤としてポジオチニブを同定し、これらの挿入により誘導された立体変化を回避し得るキナーゼ阻害剤の分子的特徴を解明する。

【0047】

したがって、本開示のある特定の実施形態は、EGFRおよび/またはHER2エクソン20変異、例えばエクソン20挿入を有するがん患者を治療するための方法を提供する。具体的には、本方法は、EGFRおよび/またはHER2エクソン20挿入変異を有すると同定された患者へのポジオチニブ(HM781-36Bとしても知られる)またはアフアチニブの投与を含む。ポジオチニブの大きさおよび柔軟性は、立体障害を克服し、低ナノモル濃度でEGFRおよびHER2エクソン20変異体を阻害する。したがって、ポジオチニブまたはアフアチニブならびに構造的に類似する阻害剤は、不可逆的第2世代および第3世代TKIに対して耐性を有するEGFRおよびHER2エクソン20挿入の両方を標的とするために用いることができる、強力なEGFRまたはHER2阻害剤である。

10

【0048】

I. 定義

本明細書において用いられるとき、「1つの(a)」または「1つの(an)」は、1つまたは複数を含み得る。本明細書の請求項において用いられるとき、「含む」という語と併せて使用されるとき、「1つの(a)」または「1つの(an)」という語は、1つまたは複数を含み得る。

20

【0049】

本開示は代替物のみならびに「および/または」を指す定義を支持しているが、代替物のみを指すかまたは代替物が相互に排他的であると明確に示されていない限り、特許請求の範囲における用語「または」の使用は「および/または」を意味するために使用される。本明細書において用いられるとき、「別の」は、少なくとも第2のもの、またはそれ以上のものを意味し得る。

30

【0050】

用語「約」は示された値 \pm 5%を意味する。

【0051】

「治療」または「治療する」は、(1)疾患の病態もしくは総体症状を経験するもしくは示す対象もしくは患者において疾患を阻害すること(例えば、病態および/または総体症状のさらなる進行を阻止すること)、(2)疾患の病態もしくは総体症状を経験するもしくは示す対象もしくは患者において疾患を改善すること(例えば、病態および/または総体症状を後退させること)、および/または(3)疾患の病態もしくは総体症状を経験するもしくは示す対象もしくは患者において任意の測定可能な疾患の減少に作用すること、を含む。例えば、治療は、有効量のポジオチニブの投与を含み得る。

40

【0052】

「予防的に処置する」は、(1)疾患の危険性を有し、かつ/または疾患に罹りやすい可能性があるが、まだ疾患の病態もしくは総体症状のいずれかもしくは全てを経験も示してもいない対象もしくは患者において疾患の発症の危険性を低減または緩和すること、および/または(2)疾患の危険性を有するか、および/または疾患に罹りやすい可能性があるが、まだ疾患の病態もしくは総体症状のいずれかもしくは全てを経験も示してもいない対象もしくは患者において、疾患の病態もしくは総体症状の開始を遅らせること、を含む。

【0053】

本明細書において用いられるとき、用語「患者」または「対象」は、生存している哺乳

50

類生物、例えば、ヒト、サル、ウシ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット、またはそれらの遺伝子組み換え種を指す。特定の実施形態では、患者または対象は、霊長類である。ヒト患者の非限定的な例は、成人、未成年、幼児、および胎児である。

【0054】

用語「有効な」は、この用語が本明細書および/または請求項で使用されるとき、所望の、期待された、または意図された結果を達成するために十分であることを意味する。化合物を用いて患者もしくは対象を治療するという文脈において使用されるとき、「有効量」、「治療有効量」、または「薬学的有効量」は、化合物の量が、疾患を治療もしくは予防するために対象もしくは患者に投与されたときに、疾患のかかる治療もしくは予防に作用するのに十分な量であることを意味する。

10

【0055】

本明細書において用いられるとき、用語「IC₅₀」は、得られた最大応答の50%である、阻害的用量を指す。この定量的測定は、特定の生物学的、生化学的、もしくは化学的プロセス（またはプロセスの構成要素、すなわち、酵素、細胞、細胞受容体、もしくは微生物）を半分阻害するのにどの程度の量の特定の薬物、または他の物質（阻害剤）が必要であるかを示す。

【0056】

「抗がん」剤は、例えば、がん細胞の殺傷を促進し、がん細胞のアポトーシスを誘導し、がん細胞の増殖速度を低減し、転移の発生率もしくは数を低減し、腫瘍の大きさを縮小し、腫瘍の成長を阻害し、腫瘍もしくはがん細胞への血液供給を削減し、がん細胞もしくは腫瘍に対する免疫応答を促進し、がんの進行を予防もしくは阻害し、またはがんを有する対象の生存期間を延長することにより、対象におけるがん細胞/腫瘍に負の影響を与えることができる。

20

【0057】

用語「挿入」または「挿入変異」は、DNA配列への1個以上のヌクレオチド塩基対の付加を指す。例えば、EGFRのエクソン20の挿入変異は、アミノ酸767~774に約2~21塩基対の挿入変異を生じ得る。別の例では、HER2エクソン20挿入変異は、アミノ酸770~785に3~18個のヌクレオチドの1つ以上の挿入を含む。例示的なEGFRおよびHER2エクソン20挿入変異を本開示の図1に図示する。

【0058】

「ハイブリダイズする」または「ハイブリダイゼーション」は、核酸同士の結合を指す。ハイブリダイゼーションの条件は、結合する核酸の配列相同性に応じて様々であり得る。よって、対象とする核酸間の配列相同性が高い場合、ストリンジентな条件が用いられる。配列相同性が低い場合、中程度の条件が用いられる。ハイブリダイゼーション条件がストリンジентである場合、ハイブリダイゼーション特異性は増大し、ハイブリダイゼーション特異性のこの増大は、非特異的ハイブリダイゼーション産物の産生を減少させる。しかしながら、中程度のハイブリダイゼーション条件下では、ハイブリダイゼーション特異性は低下し、ハイブリダイゼーション特異性のこの低下は、非特異的ハイブリダイゼーション産物の産生を増大させる。

30

【0059】

「プローブ」は、少なくとも8個のヌクレオチドの長さを有し、かつプローブ中の少なくとも1つの配列と標的領域中の配列との相補性のために標的配列と共にハイブリッド構造を形成する、ポリヌクレオチドを指す。ポリヌクレオチドは、DNAおよび/またはRNAで構成され得る。プローブは、ある特定の実施形態では、検出可能に標識される。プローブの大きさは有意に異なり得る。一般的に、プローブの長さは、例えば、少なくとも8~15個のヌクレオチドの長さである。他のプローブの長さは、例えば、少なくとも20、30、または40ヌクレオチド長である。さらなる他のプローブの長さは、幾分かより長く、少なくとも、例えば、50、60、70、80、または90ヌクレオチド長である。プローブはまた、前記範囲の範囲内にある任意の特定の長さのものであり得る。好ましくは、プローブは、ポリメラーゼ連鎖反応中に標的配列をプライミングするために用い

40

50

られる配列に相補的な配列を含まない。

【0060】

「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」は、非修飾RNAもしくはDNAまたは修飾RNAもしくはDNAであり得る、一本鎖または二本鎖デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのポリマーを指す。

【0061】

「修飾リボヌクレオチド」またはデオキシリボヌクレオチドは、核酸において天然塩基の代わりに使用することができる分子を指し、これらに限定されないが、修飾プリンおよびピリミジン、微量塩基、コンバーチブルヌクレオシド、プリンおよびピリミジンの構造的アナログ、標識された、誘導体化された、および修飾されたヌクレオシドおよびヌクレオチド、コンジュゲートされたヌクレオシドおよびヌクレオチド、配列修飾因子、末端修飾因子、スパーサー修飾因子、ならびに骨格修飾されたヌクレオチドを含み、これらに限定されないが、リボース修飾ヌクレオチド、ホスフォラミダート、ホスホロチオエート、ホスフォナミジト、メチルホスフォナート、メチルホスフォラミジト、メチルホスフォナミジト、5'-シアノエチルホスフォラミジト、メチレンホスフォナート、ホスフォロジチオエート、ペプチド核酸、光学不活性および中性ヌクレオチド間結合を含む。

10

【0062】

「バリエーション」は、それぞれ、1つ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の交換、欠失、または挿入によって、野生型または個々の集団において最も多くみられる形態と比較して異なる、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。交換、欠失、または挿入されるヌクレオチドまたはアミノ酸の数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれより多い、例えば、25、30、35、40、45、または50個であり得る。

20

【0063】

「プライマー」または「プライマー配列」は、核酸合成反応をプライミングするために標的核酸配列（例えば、増幅されるべきDNA鋳型）にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、DNAオリゴヌクレオチド、RNAオリゴヌクレオチド、またはキメラ配列であり得る。プライマーは、天然、合成、または修飾ヌクレオチドを含み得る。プライマーの長さの上限および下限はいずれも経験的に決定される。プライマーの長さの下限は、核酸増幅反応条件下での標的核酸とのハイブリダイゼーション時に安定な二本鎖を形成するのに必要とされる最低限の長さである。非常に短いプライマー（通常、3～4未満のヌクレオチド長）は、そのようなハイブリダイゼーション条件下で標的核酸と熱力学的に安定な二本鎖を形成しない。上限は、多くの場合、標的核酸中の予め決定された核酸配列以外の領域において二本鎖形成を有する可能性により決定される。一般的に、適切なプライマーの長さは、約10～約40ヌクレオチド長の範囲内である。ある特定の形態では、例えば、プライマーは、10～40、15～30、または10～20ヌクレオチド長であり得る。プライマーは、適切な条件下に置かれたときに、ポリヌクレオチド配列上の合成開始点として作用することができる。

30

【0064】

「検出」、「検出可能な」、およびそれらの文法的等価物は、標的核酸配列の存在、および/または量、および/または相同性を決定する方法を指す。いくつかの実形態では、検出は、標的核酸配列の増幅を生じる。他の実施形態では、標的核酸の配列決定は、標的核酸を「検出する」ことを特徴とすることができる。プローブに結合した標識は、例えば、化学的もしくは物理的手段により検出可能である、当技術分野において周知である多種多様な標識の任意のものを含み得る。プローブに結合させることが可能である標識は、例えば、蛍光および発光材料を含む。

40

【0065】

「増幅する」、「増幅」、およびそれらの文法的等価物は、直線的もしくは指数関数的のいずれかで核酸配列を増幅するための広範な技法を含むがこれらに限定されない、鋳型依存的な様式で標的核酸配列の少なくとも一部を複製する任意の方法を指す。増幅工程を

50

実施するための例示的な手段は、リガーゼ連鎖反応 (L C R)、リガーゼ検出反応 (L D R)、Q - レプリカーゼ増幅が後に続くライゲーション、P C R、プライマー伸長、鎖置換増幅 (S D A)、ハイパーランチ鎖置換増幅、複数置換増幅 (M D A)、核酸鎖に基づく増幅 (N A S B A)、2工程多重増幅、ローリングサークル増幅 (R C A)、リコンビナーゼ - ポリメラーゼ増幅 (R P A) (T w i s t D x、C a m b r i d g、U K)、および自立配列複製 (3 S R)、ならびにそれらの多重バージョンまたは組み合わせ、例えば、O L A / P C R、P C R / O L A、L D R / P C R、P C R / P C R / L D R、P C R / L D R、L C R / P C R、P C R / L C R (複合連鎖反応 - C C Rとしても知られる) を含むがこれらに限定されないもの、などを含む。かかる技法の説明は、他の場所、S a m b r o o k ら、M o l e c u l a r C l o n i n g、3^{r d} E d i t i o n) に

10

【 0 0 6 6 】

「 E G F R 」または「 上皮増殖因子受容体 」または「 E G F R 」は、チロシンキナーゼ細胞表面受容体を指し、かつ G e n B a n k アクセッション番号 N M _ 0 0 5 2 2 8 . 3、N M _ 2 0 1 2 8 2 . 1、N M _ 2 0 1 2 8 3 . 1、および N M _ 2 0 1 2 8 4 . 1 として表される 4 種類の選択的転写産物の 1 つによってコードされる。E G F R のバリエーションには、エクソン 2 0 における挿入が含まれる。

【 0 0 6 7 】

「 H E R 2 」または「 E R B B 2 」は、E G F R / E r b B ファミリーのメンバーであり、G e n B a n k アクセッション番号 N M _ 0 0 4 4 4 8 . 2 として表される。H E R 2 のバリエーションには、エクソン 2 0 における挿入が含まれる。

20

【 0 0 6 8 】

一般的に本明細書にて使用されるとき、「薬学的に許容される」は、合理的な利益 / リスクの比率を伴い、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を伴うことのない、健全な医学的判断の範疇において、ヒトおよび動物の組織、器官、および / または体液と接触させて使用するのに好適な化合物、材料、組成物、および / または投薬形態を指す。

【 0 0 6 9 】

「薬学的に許容される塩」は、上記のような薬学的に許容され、所望の薬理活性を有する、本発明の化合物の塩を意味する。かかる塩の非限定的な例は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、およびリン酸などの無機酸を用いて形成された酸付加塩；または 1, 2 - エタンジスルホン酸、2 - ヒドロキシエタンスルホン酸、2 - ナフタレンスルホン酸、3 - フェニルプロピオン酸、4, 4 - メチレンビス (3 - ヒドロキシ - 2 - エン - 1 - カルボン酸)、4 - メチルピシクロ [2 . 2 . 2] オクタ - 2 - エン - 1 - カルボン酸、酢酸、脂肪族モノ - およびジカルボン酸、脂肪族硫酸、芳香族硫酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、カンファ - スルホン酸、炭酸、ケイ皮酸、クエン酸、シクロペンタンプロピオン酸、エタンスルホン酸、フマル酸、グルコヘプトン酸、グルコン酸、グルタミン酸、グリコール酸、ヘプタン酸、ヘキササン酸、ヒドロキシナフトエ酸、乳酸、ラウリル硫酸、マレイン酸、リンゴ酸、マロン酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、ムコン酸、o - (4 - ヒドロキシベンゾイル) 安息香酸、シュウ酸、p - クロロベンゼンスルホン酸、フェニル - 置換アルカン酸、プロピオン酸、p - トルエンスルホン酸、ピルピン酸、サリチル酸、ステアリン酸、コハク酸、酒石酸、第 3 級ブチル酢酸、およびトリメチル酢酸などの有機酸を用いて形成された酸付加塩を含む。薬学的に許容される塩は、存在する酸性プロトンが無機または有機塩基と反応可能である場合に形成され得る塩基付加塩も含む。許容される無機塩基は、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アルミニウム、および水酸化カルシウムを含む。許容される有機塩基の非限定的な例は、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、および N - メチルグルカミンを含む。本発明の任意の塩の一部を形成する特定のアニオンまたはカチオンは、その塩が全体として薬理的に許容される限りは、危険ではない、ということが認識されるべきである。薬学的に許容される塩ならびにそれらの調製および使用方法のさらなる例は

30

40

50

、 Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (P. H. Stahl & C. G. Wermuth eds., Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002)において提供される。

【0070】

II. EGFRおよびHER2エクソン20変異

本開示の特定の実施形態は、対象が、1つ以上のEGFRおよび/またはHER2エクソン20変異、例えば、挿入変異、特に図1に図示されている1つ以上の挿入変異を有するかどうかを判定することに関する。対象は、2つ、3つ、4つ、またはそれより多くのEGFRエクソン20変異および/またはHER2エクソン20変異を有していてもよい。変異検出方法は、当技術分野において公知であり、PCR分析および核酸配列決定ならびにFISHおよびCGHが含まれる。特定の態様では、エクソン20変異は、例えば、腫瘍または血漿由来循環遊離DNAなどから、DNA配列決定により検出される。

10

【0071】

EGFRエクソン20変異は、アミノ酸763~778に1つ以上の点変異、挿入、および/または3~18個のヌクレオチドの欠失を含み得る。1つ以上のEGFRエクソン20変異は、A763、A767、S768、V769、D770、N771、P772、H773、V774、およびR776からなる群より選択される1つ以上の残基に位置し得る。

【0072】

EGFRエクソン20挿入には、H773_V774 ins H、A767_v769 ASV、N771_P772 ins H、D770_N771 ins G、H779_V774 ins H、N771 del ins HH、S768_D770 dup DVD、A767_V769 dup ASV、A767_V769 dup ASV、P772_H773 dup、N771_H773 dup NPH、S768_D770 dup SVD、N771 del ins GY、S768_D770 del ins SVD、D770_D770 del ins GY、A767_V769 dup ASV、H773 dup、A767 ins TLA、V769 ins GVV、V769 L、V769 ins GSV、V769 ins MASVD、D770 del ins GY、D770 ins G、D770 ins Y H773 Y、N771 ins SVDNR、N771 ins HH、P772 ins DNP、H773 ins AH、H773 ins H、および/またはV774 ins HVが含まれ得る。特定の態様では、エクソン20変異は、A763 ins FQEA、A767 ins ASV、S768 dup SVD、V769 ins ASV、D770 ins SVD、D770 ins NPG、H773 ins NPH、N771 del ins GY、N771 del ins FH、および/またはN771 dup NPHである。

20

30

【0073】

いくつかの態様では、対象は、ボジオチニブなどのTKIに対して耐性をもたらし得る、EGFR残基C797での変異を有するか発生していてもよい。したがって、ある特定の態様では、対象は、EGFR C797および/またはT790に変異、例えばC797Sおよび/またはT790Mを有しないと判定される。いくつかの態様では、T790変異、例えばT790Mを有する対象はオシメルチニブを投与されてもよく、C797変異、例えばC797Sを有する対象は化学療法および/または放射線療法を実施されてもよい。

40

【0074】

HER2エクソン20変異は、アミノ酸770~785に1つ以上の点変異、挿入、および/または3~18個のヌクレオチドの欠失を含んでもよい。1つ以上のHER2エクソン20変異は、残基Y772、A775、M774、G776、G778、V777、S779、P780、および/またはL786に存在してもよい。1つ以上のHER2エクソン20変異は、A775 ins V G776 C、A775 ins YVMA、G776 V、G776 C V777 ins V、G776 C V777 ins C、G776 del i

50

nsVV、G776del insVC、P780insGSP、V777L、G778 insLPS、V773M、Y772dupYVMA、G776del insLC、G778dupGSP、V777insCG、G776V/S、V777M、M774dupM、A775insSVMA、A775insVA、および/またはL786Vであってもよい。

【0075】

患者試料は、対象における肺がん由来する核酸を含む、任意の体の組織または液体であり得る。特定の実施形態では、試料は、循環腫瘍細胞または細胞フリーDNAを含む血液試料である。他の実施形態では、試料は、組織、例えば、肺組織であり得る。肺組織は、腫瘍組織に由来することができ、新鮮凍結、またはホルマリン固定、パラフィン包埋 (FFPE) されてもよい。特定の実施形態では、肺腫瘍FFPE試料が得られる。

10

【0076】

本明細書において記載される方法における使用に好適な試料には、遺伝子材料、例えば、ゲノムDNA (gDNA) が含まれる。ゲノムDNAは典型的に、血液、または口腔粘膜の粘膜スクレーピングなどの生物試料から抽出されるが、尿、腫瘍、もしくは去痰薬を含む他の生物試料から抽出することもできる。試料それ自体は、典型的に、正常または腫瘍組織を含む、対象から取り出された有核細胞 (例えば、血液もしくは類側細胞) または組織を含む。試料を入手し、処理し、分析するための方法および試薬は、当技術分野において周知である。いくつかの実施形態では、試料は、医療機関の協力の下、例えば血液を採取することにより、得られる。いくつかの実施形態では、試料は、医療機関の協力を伴わずに得られ、例えば、試料は、類側綿棒もしくはブラシを用いて得られる類側細胞を含む試料、または口腔洗浄液試料のように、非侵襲的に得られる。

20

【0077】

いくつかの場合において、生物試料は、DNA単離のために処理することができる。例えば、細胞または組織試料中のDNAは、試料の他の成分から分離することができる。細胞は、当技術分野において周知の技術を用いて、生物試料から回収することができる。例えば、細胞は、細胞試料を遠心分離し、ペレット化した細胞を再懸濁することにより、回収することができる。細胞は、リン酸緩衝食塩水 (PBS) などの緩衝液中に再懸濁することができる。細胞懸濁液を遠心分離して、細胞ペレットを得た後、細胞を溶解して、DNA、例えば、gDNAを抽出することができる。例えば、Ausubelら (2003) を参照されたい。試料を濃縮および/または精製して、DNAを単離することができる。あらゆる種類のさらなる処理に供されるものを含む、対象から得られた全ての試料は、対象から得られたものと考えられる。例えば、フェノール抽出を含む、慣例的な方法を用いて、生物試料からゲノムDNAを抽出することができる。あるいは、ゲノムDNAは、QIAamp (登録商標) 組織キット (Qiagen, Chatsworth, Calif.)、およびWizard (登録商標) ゲノムDNA精製キット (Promega) などのキットを用いて抽出することができる。試料の源の非限定的な例は、尿、血液、および組織を含む。

30

【0078】

本明細書に記載されるようなEGFRまたはHER2エクソン20変異、例えばエクソン20挿入変異の存在または不在は、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。例えば、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、サイズ排除クロマトグラフィ、配列決定、および/またはアレイを用いて、挿入変異の存在または不在を検出することができる。望ましい場合には、核酸の増幅は、当技術分野において周知の方法、例えば、PCRを用いて成し遂げることができる。一例において、試料 (例えば、ゲノムDNAを含む試料) は、対象から得られる。次いで、試料中のDNAを試験して、本明細書に記載されるような挿入変異の特性を決定する。挿入変異は、本明細書に記載される任意の方法により、例えば、配列決定により、またはゲノムDNA、RNA、もしくはcDNA中の遺伝子の核酸プローブ、例えば、DNAプローブ (cDNAおよびオリゴヌクレオチドプローブを含む) もしくはRNAプローブに対するハイブリダイゼーションにより、検出す

40

50

ることができる。核酸プローブは、特定の変異体と特異的または優先的にハイブリダイズするように設計することができる。

【0079】

プローブのセットは、典型的に、本開示の実施可能な推奨治療において用いられる標的遺伝子変異（例えば、EGFRおよび/またはHER2エクソン20変異）を検出するために用いられる、プライマーのセット（通常は、プライマー対）および/または検出可能に標識されたプローブを指す。プライマー対は、前記遺伝子のそれぞれについての標的遺伝子変異についての領域にわたるアンプリコンを定義するために、増幅反応において用いられる。アンプリコンのセットは、マッチしたプローブのセットにより検出される。例示的な実施形態では、本方法は、標的遺伝子変異のセット、例えばEGFRおよび/またはHER2エクソン20変異を検出するために、TaqMan（商標）（Roche Molecular Systems, Pleasanton, Calif.）アッセイを使用することができる。一実施形態では、プローブのセットは、次世代配列決定反応などの核酸配列決定反応により検出されるアンプリコンを産生するために用いられるプライマーのセットである。これらの実施形態では、例えば、AmpliSeq（商標）（Life Technologies / Ion Torrent, Carlsbad, Calif.）またはTruSeq（商標）（Illumina, San Diego, Calif.）技術を用いることができる。

10

【0080】

核酸マーカの分析は、配列分析および電気泳動分析を含むがこれらに限定されない、当技術分野において周知の技術を用いて実施することができる。配列分析の非限定的な例は、Maxam-Gilbert配列決定、Sanger配列決定、キャピラリアレイDNA配列決定、サーマルサイクル配列決定（Searsら、1992）、固相配列決定（Zimmermanら、1992）、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析（MALDI-TOF/MS；Fuら、1998）などの質量分析を伴う配列決定、ならびにハイブリダイゼーションによる配列決定（Cheeら、1996；Drmanacら、1993；Drmanacら、1998）を含む。電気泳動分析の非限定的な例は、スラブゲル電気泳動、例えば、アガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動、キャピラリ電気泳動、および変性勾配ゲル電気泳動を含む。さらに、次世代配列決定法は、the Life Technologies / Ion Torrent PGMまたはProton、the Illumina HiSeqまたはMiSeq、およびthe Roche / 454次世代配列決定システムなどの会社から商業的に入手可能なキットおよび装置を用いて実施することができる。

20

30

【0081】

核酸分析の他の方法は、直接手動配列決定（ChurchおよびGilbert、1988；Sangerら、1977；米国特許第5,288,644号）；自動化蛍光配列決定；一本鎖形態多型アッセイ（SSCP）（Schafferら、1995）；クランプ変性ゲル電気泳動（CDGE）；二次元ゲル電気泳動（2DGEもしくはTDGE）；形態感受性ゲル電気泳動（CSGE）；変性勾配ゲル電気泳動（DGGE）（Sheffieldら、1989）；変性高速液体クロマトグラフィ（DHPLC、Underhillら、1997）赤外線マトリックス支援レーザー脱離/イオン化（IR-MALDI）質量分析（WO99/57318）；移動度シフト分析（Oritaら、1989）；制限酵素分析（Flavelら、1978；Geeverら、1981）；定量的リアルタイムPCR（Racaら、2004）；ヘテロ二本鎖分析；化学的ミスマッチ分解（CMC）（Cottonら、1985）；RNase保護アッセイ（Myersら、1985）；ヌクレオチドミスマッチを認識するポリペプチド、例えば、大腸菌（E.coli）mutSタンパク質の使用；アレル特異的PCR、ならびにかかる方法の組み合わせを含み得る。例えば、米国特許出願公開第2004/0014095号を参照されたい。この特許は、参照によりその全てが本明細書に組み込まれる。

40

【0082】

50

一例において、試料におけるEGFRおよび/またはHER2変異を同定する方法は、かかる試料に由来する核酸を、変異したEGFRまたはHER2タンパク質をコードする核酸、または変異を含むその断片に特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブと接触させること、およびそのハイブリダイゼーションを検出すること、を含む。特定の一実施形態では、かかるプローブは、例えば、放射性同位体 (^3H 、 ^{32}P 、もしくは ^{33}P)、蛍光剤 (ローダミン、もしくはフルオレセイン)、または発色剤を用いて、検出可能に標識される。特定の一実施形態では、プローブは、アンチセンスオリゴマー、例えば、PNA、モルフォリノ-ホスホラミダート、LNA、または2'-アルコキシアルコキシである。プローブは、約8個のヌクレオチド~約100個のヌクレオチド、または約10~約75個、または約15~約50個、または約20~約30個であり得る。別の態様では、本開示のかかるプローブは、試料におけるEGFRまたはHER2変異を同定するためのキット中で提供され、かかるキットは、EGFRまたはHER2遺伝子における変異部位に特異的にハイブリダイズするか、またはそれらに隣接するオリゴヌクレオチドを含む。キットはさらに、キットを用いるハイブリダイゼーション試験の結果に基づいてポジオチニブまたはアフアチニブを用いてEGFRまたはHER2挿入変異を含む腫瘍を有する患者を治療するための指示を含む。

10

【0083】

別の態様では、試料におけるエクソン20変異を検出するための方法は、かかるEGFR遺伝子またはHER2のエクソン20に対応するかかる核酸試料または変異を含むと考えられるその断片を増幅すること、および増幅した核酸の電気泳動移動度を、対応する野生型EGFRまたはHER2遺伝子またはその断片の電気泳動移動度と比較すること、を含む。移動度における差異は、増幅した核酸配列における変異の存在を示す。電気泳動の移動度は、ポリアクリルアミドゲル上で測定できる。

20

【0084】

あるいは、核酸は、酵素的変異検出 (EMD) (Del Tittoら、1998) を用いて変異の検出について分析することができる。EMDは、点変異、挿入、および欠失に起因する塩基対ミスマッチにより引き起こされる構造ひずみを検出および分解するまで、二本鎖DNAに沿ってスキャンする、バクテリオファージリゾルバーゼT4エンドヌクレアーゼVIIを使用する。リゾルバーゼ分解により、例えば、ゲル電気泳動により形成される2つの短い断片の検出は、変異の存在を示す。EMD方法の利点は、PCR反応から直接アッセイされ、試料精製の必要性を排除し、ハイブリダイゼーション時間を短縮し、シグナル対ノイズ比を増大させる、点変異、欠失、および挿入を同定するための単一のプロトコルである。通常のDNAの最大20倍の発現と最大4kbの大きさの断片とを含む混合した試料をアッセイすることができる。しかし、EMDスキャンは、変異陽性試料中に生じる特定の塩基変化を同定せず、必要な場合には、変異を同定するためにさらなる配列決定手順が必要となる。米国特許第5,869,245号において実証されているように、CELI酵素をリゾルバーゼT4エンドヌクレアーゼVIIと同様に使用することができる。

30

【0085】

III. 治療方法

本明細書では、個体におけるがんの進行を治療するまたは遅延させるための方法であって、有効量のポジオチニブ、アフアチニブ、または構造的に同様の阻害剤を、その個体に、EGFRおよび/またはHER2エクソン20変異、例えばエクソン20挿入を有すると判定された対象に投与する工程を含む、方法がさらに提供される。対象は、1つ以上のEGFRおよび/またはHER2エクソン20変異を有し得る。

40

【0086】

治療のために企図されるがんの例には、肺がん、頭頸部がん、乳がん、膵臓がん、前立腺がん、腎臓がん、骨がん、精巣がん、子宮頸がん、消化器がん、リンパ腫、肺の前腫瘍性病変、結腸がん、黒色腫、および膀胱がんが含まれる。特定の態様では、がんは、非小細胞肺がんである。

50

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態では、対象は、哺乳類、例えば、霊長類、好ましくは、高等霊長類、例えば、ヒト（例えば、本明細書に記載された障害を有するか、またはそれらの障害を有する危険性のある患者）である。一実施形態では、対象は、免疫応答を強化する必要がある。特定の実施形態では、対象は、易感染性であるか、その危険性がある。例えば、対象は、化学療法的治療および/または放射線療法を受けているか、または受けたことがある。あるいは、または組み合わせて、対象は、感染の結果として、易感染性であるか、またはその危険性がある。

【 0 0 8 8 】

ある特定の実施形態は、EGFRまたはHER2エクソン20変異、例えばエクソン20挿入を有すると判定された対象へのポジチニブ（HM781-36B、HM781-36、および1-[4-[4-(3,4-ジクロロ-2-フルオロアニリノ)]-7-メトキシキナゾリン-6-イル]オキシピペリジン-1-イル]プロップ-2-エン-1-オンとしても知られている）の投与に関する。ポジチニブは、HER1、HER2、およびHER4を含むチロシンキナーゼ受容体のHERファミリーを介するシグナル伝達を不可逆的に阻止する、キナゾリン系pan-HER阻害剤である。ポジチニブまたは構造的に類似する化合物（例えば、米国特許第8,188,102号および米国特許出願公開第2013/0071452号；参照により本明細書に組み入れられる）が、本発明の方法において用いられてもよい。

【 0 0 8 9 】

ポジチニブ、ポジチニブ塩酸塩は、例えば錠剤で、経口的に投与されてもよい。ポジチニブは、4~25mgの用量で、例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24mgの用量で投与されてもよい。投与は、毎日、1日おき、3日毎、または週に1回であってもよい。投与は、継続的なスケジュールで、例えば28日サイクルであってもよい。

【 0 0 9 0 】

いくつかの態様では、T790変異、例えばT790Mを有する対象は、オシメルチニブを投与され得る、C797変異、例えばC797Sを有する対象は、本明細書において記載されるような化学療法および/または放射線療法を実施され得る。オシメルチニブ投与、化学療法、および/または放射線投与は、単独でまたはポジチニブと組み合わせて実施され得る。オシメルチニブは、25から100mg、例えば、約40または80mgの用量で投与され得る。投与は、毎日、1日おき、2日毎、3日毎、または週に1回であってもよい。オシメルチニブは、例えば錠剤で、経口的に投与され得る。

【 0 0 9 1 】

アフアチニブは、10~50mg、例えば、10、20、30、40、または50mgの用量で投与され得る。アフアチニブは投与され得る。

【 0 0 9 2 】

B. 薬学的組成物

本明細書では、EGFRまたはHER2エクソン20変異、例えばエクソン20変異を有すると判定された対象のための、ポジチニブまたはアフアチニブと薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物および製剤も提供される。

【 0 0 9 3 】

本明細書に記載される薬学的組成物および製剤は、所望の程度の純度を有する活性成分（例えば、抗体またはポリペプチド）を、凍結乾燥製剤または水溶液の形態の1つ以上の任意の薬学的に許容される担体（Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd edition, 2012）と混合することにより、調製することができる。薬学的に許容される担体は、一般的に、使用される用量および濃度において受容者に対して非毒性であり、緩衝液、例えば、ホスフェート、シトレート、および他の有機酸；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤、例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；塩化ベンザ

10

20

30

40

50

ルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルもしくはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む、単糖類、二糖類、および他の炭水化物；キレート化剤、例えば、EDTA；糖類、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、亜鉛-タンパク質錯体）；および/または非イオン性界面活性剤、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）を含むが、これらに限定されない。本明細書では、例示的な薬学的に許容される担体は、介在性（*interstitial*）薬剤分散剤、例えば、可溶性中性-活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（*sHASEGP*）、例えば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば、*rHuPH20*（*HYLENEX*（登録商標）、*Baxter International, Inc.*）をさらに含む。*rHuPH20*を含む、ある例示的な*sHASEGP*および使用方法は、米国特許出願公開第2005/0260186号および同第2006/0104968号に記載されている。一態様では、*sHASEGP*は、1つ以上のさらなるグルコサミノグリカナーゼ、例えば、コンドロイチナーゼと組み合わせられる。

10

【0094】

20

C. 併用療法

特定の実施形態では、本実施形態の組成物および方法は、少なくとも1つのさらなる治療法と組み合わせたポジオチニブまたはアフアチニブを含む。さらなる治療法は、放射線療法、手術（例えば、乳腺腫瘍摘出術および乳房切除術）、化学療法、遺伝子療法、DNA療法、ウイルス療法、RNA療法、免疫療法、骨髄移植、ナノセラピー、モノクローナル抗体療法、または前記の組み合わせであり得る。さらなる治療法は、アジュバントまたはネオアジュバント療法の形態であり得る。

【0095】

いくつかの実施形態では、さらなる治療法は、小分子酵素阻害剤または転移抑制剤の投与である。いくつかの実施形態では、さらなる治療法は、副作用を減じた薬剤（例えば、治療の副作用の発生および/または重篤度を減少させることを意図した薬剤、例えば、制吐剤など）の投与である。いくつかの実施形態では、さらなる治療法は、放射線療法である。いくつかの実施形態では、さらなる治療法は、手術である。いくつかの実施形態では、さらなる治療法は、放射線療法と手術との組み合わせである。いくつかの実施形態では、さらなる治療法は、ガンマ照射である。いくつかの実施形態では、さらなる治療法は、PBK/AKT/mTOR経路を標的とする治療法、HSP90阻害剤、チューブリン阻害剤、アポトーシス阻害剤、および/または化学予防剤である。さらなる治療法は、当技術分野において周知の1つ以上の化学療法剤であり得る。

30

【0096】

ポジオチニブまたはアフアチニブは、免疫チェックポイント療法などのさらなるがん治療法の前、その間、その後、またはそれらと種々に組み合わせて、投与され得る。投与は、同時投与から、数分間隔、数日間隔、数週間隔までの範囲であり得る。ポジオチニブまたはアフアチニブがさらなる治療剤とは別々に患者に提供される実施形態では、2つの化合物が患者に対してなお有利な併用効果を与えることができるように、一般的に、各送達時間の間に有意期間が終了しないことを確実にする。かかる場合において、互いの約12~24または72時間以内に、より特定的には、互いの約6~12時間以内に、患者に抗体療法および抗がん療法を提供してもよいことが企図される。いくつかの状況において、それぞれの投与の間に数日間（2、3、4、5、6、または7日間）から数週間（1、2、3、4、5、6、7、または8週間）の間隔をもたせ、治療のための期間を有意に延長することが望ましいこともある。

40

50

【 0 0 9 7 】

様々な組み合わせが用いられ得る。以下の例において、ポジオチニブまたはアフアチニブは「A」であり、抗がん療法は「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

【 0 0 9 8 】

患者に対する本実施形態の任意の化合物の投与または治療の実施は、存在する場合には薬剤の毒性を考慮に入れて、かかる化合物の投与のための一般的なプロトコールに従う。したがって、いくつかの実施形態では、組み合わせ療法に起因する毒性をモニタリングする工程がある。

10

【 0 0 9 9 】

1. 化学療法

本実施形態に従って、多様な化学療法剤を使用することができる。用語「化学療法」は、がんを治療するための薬物の使用を指す。「化学療法剤」は、がんの治療において投与される化合物または組成物を示すために使用される。これらの薬剤または薬物は、細胞内のそれらの活性モード、例えば、それらが細胞周期に影響するかどうか、およびそれらが細胞周期のどの段階に影響するか、により分類される。あるいは、薬剤は、そのDNAに直接架橋する能力、DNA中に介入する能力、または核酸合成に作用することにより染色体および有糸分裂異常を誘導するための能力に基づいて特徴付けられてもよい。

20

【 0 1 0 0 】

化学療法剤の例には、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロホスファミド：スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパ；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスフォラミド、トリエチレンチオホスフォラミド、およびトリメチロロメラミンを含む、エチレンイミンおよびメチラメラミン；アセトゲニン（特に、プラタシンおよびプラタシノン）；カンプトテシン（合成アナログトポテカンを含む）；プリオスタチン；カチスタチン；CC-1065（そのアゾゼレシン、カルゼレシンおよびピゼレシン合成アナログを含む）；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成アナログ、KW-2189およびCB1-TM1を含む）；エリユテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、クロホスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベムピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、およびウラシルマスタード；ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムヌスチン；抗生剤、例えば、エンジイン抗生剤（例えば、カリチアマイシン、特に、カリチアマイシガンマ1IおよびカリチアマイシンオメガI1）；ダイネマイシンAを含む、ダイネマイシン；ビスホスホネート、例えば、クロドロネート；エスペラマイシン；ならびにネオカルチノスタチン発色団および関連する色素タンパク質エンジイン抗生剤発色団、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラマイシン（authrarnycin）、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン（モルフォリノ-ドキシソルピシン、シアノモルフォリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシンおよびデオキシドキシソルピシンを含む）、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えば、マイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラマイシン（nogalarnycin）

30

40

50

、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、およびゾルピシン；抗代謝物質、例えば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸アナログ、例えば、デノプテリン、プテロプテリン、およびトリメトトレキサート；プリンアナログ、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、およびチオグアニン；ピリミジンアナログ、例えば、アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモファー、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフフリジン、エノシタピン、およびフロックスウリジン；アンドロゲン、例えば、カルステロン、ドロモスタノロンプロピオナート、エピチオスタノール、メピチオスタン、およびテストラクトン；抗副腎、例えば、ミトタンおよびトリロスタン；葉酸補充物質、例えば、フォリン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エルフォルミチン；エリプチニウムアセテート；エポチロン；エトグルシッド；ガリウムニトレート；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニンメイタンシノイド、例えば、メイタンシンおよびアンサミトシン；ミトグアゾン；ミトキサトロン；モピダンモール；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK多糖複合体；ラゾキサン；リゾキシニン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン(特に、T-2毒素、ベラクリンA、ロリジンA、およびアングイジン)；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン；アラビノシド(「Ara-C」)；シクロホスファミド；タキソイド、例えば、パクリタキセルおよびドセタキセルゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；プラチナ配位錯体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチン；ピンブラスチン；プラチナ；エトプシド(VP-16)；イフォスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ノバントロン；テニボシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼロダ；イバンドロナート；イリノテカン(例えば、CPT-11)；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロジフルオロメチルオルニチン(DMFO)；レチノイド、例えば、レチノイン酸；カペシタピン；カルボプラチン、プロカルバジン、プリコマイシン、ゲムシタピエン、ナベルピン、ファネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランスプラチナ、ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が含まれる。

【0101】

2. 放射線療法

DNA損傷を引き起こし、かつ幅広く用いられている他の因子は、線、X線として知られているもの、および/または腫瘍細胞に対する放射性同位体の指向性送達を含む。DNA損傷因子の他の形態も企図され、例えば、電子レンジ、陽子ビーム照射(米国特許第5,760,395号および同第4,870,287号)、ならびにUV照射が挙げられる。これらの因子の全ては、DNAに対して、DNAの前駆体に対して、DNAの複製および修復に対して、ならびに染色体の集合および維持に対して、広範囲の損傷に影響を与える可能性が高い。X線についての線量範囲は、長期間(3~4週間)についての50~200レントゲンの1日線量から、2000~6000レントゲンの単一線量までの範囲にわたる。放射性同位体についての線量範囲は、広く異なり、同位体の半減期、放出された放射線の強度および種類、ならびに新生物細胞による取込みに依存する。

【0102】

3. 免疫療法

当業者は、さらなる免疫療法が、本実施形態の方法と組み合わせてまたは連動させて用いられ得ることを理解するだろう。がん治療の文脈において、免疫療法は、一般的に、がん細胞を標的とし、それを破壊するために、免疫エフェクター細胞および分子の使用に依

10

20

30

40

50

存する。リツキシマブ（RITUXAN（登録商標））は、その一例である。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上にあるいくつかのマーカーに特異的な抗体であり得る。抗体単独を治療法のエフェクターとして使用することもでき、または、抗体が、細胞殺傷に実際に作用する他の細胞を動員してもよい。抗体はまた、薬物または毒素（化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など）にコンジュゲートされ、分子標的剤として機能することができる。あるいは、エフェクターは、直接的または間接的に腫瘍細胞標的と相互作用する表面分子を有するリンパ球であり得る。様々なエフェクター細胞は、細胞傷害性T細胞およびNK細胞を含む。

【0103】

抗体-薬物コンジュゲートは、がん治療の開発において画期的なアプローチとして出現した。がんは、世界中において、主な死因の一つである。抗体-薬物コンジュゲート（ADC）は、細胞を殺傷する薬物に共有結合したモノクローナル抗体（MAb）を含む。このアプローチは、MAbのそれらの抗原標的に対する高い特異性と、高度に強力な細胞傷害性薬物とを組み合わせしており、ペイロード（薬物）を豊富なレベルの抗原と共に腫瘍細胞に送達する「武装した」MAbsをもたらす。薬物の標的指向性送達はまた、正常組織中への薬物の曝露を最小限にし、毒性の軽減および治療指標の改善をもたらす。2つのADC薬物の認可、FDAにより2011年に認可されたADCETRIS（登録商標）（ブレツキシマブベドチン）および2013年に認可されたKADCYLA（登録商標）（トラスツズマブエムタンシンまたはT-DM1）は、このアプローチを確証している。現在、30種類を超えるADC薬物候補が、がん治療のための臨床試験の様々な段階にある（Lealら、2014）。抗体エンジニアリングおよびリンカー-ペイロード最適化が、益々成熟しているために、新規ADCの創薬および開発は、このアプローチと標的指向性MAbの生成とに好適な新規標的の同定および検証に大いに依存する。ADCの標的についての2つの基準は、腫瘍細胞および頑強な内部移行における、上方制御された/高レベルの発現である。

【0104】

免疫療法の一態様では、腫瘍細胞は、標的指向化に適している（すなわち、他の細胞の大部分において存在しない）いくつかのマーカーを有する必要がある。多くの腫瘍マーカーが存在し、これらのいずれもが、本実施形態の文脈における標的指向化に好適であり得る。一般的な腫瘍マーカーは、CD20、がん胎児性抗原、チロシナーゼ（p97）、gp68、TAG-72、HMFG、Sialyl Lewis X抗原、MucA、MucB、PLAP、ラミニン受容体、erbB、およびp155を含む。免疫療法の代替的な一態様は、抗がん効果と免疫刺激効果とを組み合わせることである。サイトカイン、例えば、IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、ガンマ-IFN、ケモカイン、例えば、MIP-1、MCP-1、IL-8、および増殖因子、例えば、FLT3リガンドを含む、免疫刺激分子も存在する。

【0105】

免疫療法の例には、免疫アジュバント、例えば、マイコバクテリウムボビス、熱帯熱マラリア原虫、ジニトロクロロベンゼン、および芳香族化合物（米国特許第5,801,005号および同第5,739,169号；HuiおよびHashimoto、1998；Christodoulidesら、1998）；サイトカイン療法、例えば、インターフェロン、および、IL-1、GM-CSF、およびTNF（Bukowskiら、1998；Davidsonら、1998；Hellstrandら、1998）；遺伝子療法、例えば、TNF、IL-1、IL-2、およびp53（Qinら、1998；Austin-WardおよびVillaseca、1998；米国特許第5,830,880号および同第5,846,945号）；ならびにモノクローナル抗体、例えば、抗CD20、抗ガングリオシドGM2、および抗p185（Hollander、2012；Hanibuchiら、1998；米国特許第5,824,311号）が含まれる。1つ以上の抗がん療法が本明細書に記載の抗体療法と共に使用され得ることが企図される。

【0106】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤であり得る。免疫チェックポイントは、シグナル（例えば、共刺激分子）を強くするか、またはシグナルを弱くする。免疫チェックポイント妨害により標的とされ得る阻害性免疫チェックポイントは、アデノシンA2A受容体（A2AR）、B7-H3（CD276としても知られている）、BおよびTリンパ球減衰剤（BTLA）、細胞傷害性T-リンパ球関連タンパク質4（CTLA-4、CD152としても知られている）、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）、キラー細胞免疫グロブリン（KIR）、リンパ球活性化遺伝子-3（LAG3）、プログラム死1（PD-1）、T細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン3（TIM-3）、ならびにT細胞活性化のVドメインIg抑制剤（VISTA）を含む。特に、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1系および/またはCTLA-4を標的とする。

10

【0107】

免疫チェックポイント阻害剤は、薬物、例えば、小分子、リガンドもしくは受容体の組換え形態であることができ、または特に、抗体、例えば、ヒト抗体（例えば、国際特許公報番号WO2015/016718；Pardoll, Nat Rev Cancer, 12(4):252-64, 2012；両文献は参照により本明細書に取り込まれる）である。免疫チェックポイントタンパク質またはそのアナログの既知の阻害剤が用いられてもよく、特に、キメラ、ヒト化、またはヒト形態の抗体が用いられてもよい。当業者には、代替的および/または等価な名称が、本開示において言及された特定の抗体のために使用されてもよいことが分かるであろう。かかる代替的および/または等価な名称は、本明細書の文脈において互換的である。例えば、ランブロリズマブは、代替的および等価な名称としてMK-3475およびペンブロリズマブとしても知られていることが知られている。

20

【0108】

いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、PD-1のそのリガンド結合パートナーに対する結合を阻害する分子である。特定の一態様では、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。別の実施形態では、PDL1結合アンタゴニストは、PDL1のその結合パートナーに対する結合を阻害する分子である。特定の一態様では、PDL1結合パートナーは、PD-1および/またはB7-1である。別の実施形態では、PDL2結合アンタゴニストは、PDL2のその結合パートナーに対する結合を阻害する分子である。特定の一態様では、PDL2結合パートナーは、PD-1である。アンタゴニストは、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あり得る。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号に記載されており、これらの全ては参照により本明細書に組み込まれる。本明細書にて提供される方法において使用するための他のPD-1系アンタゴニストは、当技術分野において周知であり、例えば、米国特許出願公開第US2014/0294898号、同第US2014/022021号、および同第US2011/0008369号に記載されており、これらの全ては参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0109】

いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、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。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、およびCT-011からなる群より選択される。いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、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）に融合したPDL1またはPDL2の細胞外またはPD-1結合部分を含むイムノアドヘシン）である。いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、AMP-224である。MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558、およびOPDIVO（登録商標）としても知られているニボルマブは、WO2006/121168に記載されている抗PD-1抗体である。MK-3475、Merck3475、ランブロリズマブ、KEYTRUDA（登録商標）、およびSCH-900475としても知られてい

40

50

るペンブロリズマブは、WO 2 0 0 9 / 1 1 4 3 3 5 に記載されている抗PD - 1抗体である。hBATまたはhBAT - 1としても知られているCT - 0 1 1は、WO 2 0 0 9 / 1 0 1 6 1 1 に記載されている抗PD - 1抗体である。B7 - DCIgとしても知られているAMP - 2 2 4は、WO 2 0 1 0 / 0 2 7 8 2 7 およびWO 2 0 1 1 / 0 6 6 3 4 2 に記載されているPDL2 - Fc融合可溶性受容体である。

【0110】

本明細書において提供される方法において標的とされ得る別の免疫チェックポイントは、CD152としても知られている、細胞傷害性T - リンパ球 - 関連タンパク質4 (CTLA - 4) である。ヒトCTLA - 4の完全なcDNA配列は、Genbankアクセッション番号L15006を有する。CTLA - 4は、T細胞の表面上で見出され、抗原 - 提示細胞の表面上のCD80またはCD86に結合されると、「オフ」スイッチとして作用する。CTLA4は、ヘルパーT細胞の表面上で発現され、阻害性シグナルを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細胞共刺激タンパク質、CD28に類似しており、両分子は、抗原 - 提示細胞上のそれぞれB7 - 1およびB7 - 2とも呼ばれるCD80およびCD86に結合する。CTLA4は、阻害性シグナルをT細胞に伝達し、一方で、CD28は、刺激性シグナルを伝達する。細胞内CTLA4は、調節性T細胞においても見出され、それらの機能にとって重要であり得る。T細胞受容体およびCD28を介するT細胞活性化は、CTLA - 4、B7分子についての阻害性受容体の発現増大に至る。

【0111】

いくつかの実施形態では、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。

【0112】

本方法において使用するのに好適な抗ヒトCTLA - 4抗体（またはそれらに由来するVHおよび/もしくはVLドメイン）は、当該分野において周知の方法を用いて作成することができる。あるいは、当該分野において認識される抗CTLA - 4抗体を使用することができる。例えば、米国特許第8,119,129号；国際特許公報番号WO 0 1 / 1 4 4 2 4、同WO 9 8 / 4 2 7 5 2、および同WO 0 0 / 3 7 5 0 4 (CP 6 7 5, 2 0 6、トレメリムマブ；以前のチシリムマブとしても知られている)；米国特許第6,207,156号；Hurwitzら、1998；Camachoら、2004；ならびにMokyrら、1998において開示された抗CTLA - 4抗体を、本明細書において開示される方法において使用することができる。前記刊行物のそれぞれの教示内容は、参照により本明細書に組み込まれる。CTLA - 4に対する結合について当該分野において認識されるこれらの抗体と競合する抗体を使用することもできる。例えば、ヒト化CTLA - 4抗体は、国際特許出願番号WO 2 0 0 1 / 0 1 4 4 2 4、および同WO 2 0 0 0 / 0 3 7 5 0 4、および米国特許第8,017,114号に記載されており、これらの全ては、参照により本明細書に組み込まれる。

【0113】

例示的な抗CTLA - 4抗体は、イピリムマブ(10D1、MDX - 010、MDX - 101、およびYervoy (登録商標)としても知られている)またはその抗原結合断片およびバリエーションである(例えば、WO 0 1 / 1 4 4 2 4を参照されたい)。他の実施形態では、抗体は、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、一実施形態では、抗体は、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。別の実施形態では、抗体は、上記の抗体と同じCTLA - 4上のエピトープとの結合および/またはそれらへの結合について競合する。別の実施形態では、抗体は、上記の抗体と少なくとも約90%の変領域アミノ酸配列相同性(例えば、イピリムマブと少なくとも約90%、95%、または99%の変領域相同性)を有する。

【0114】

10

20

30

40

50

CTLA-4を調節するための他の分子は、CTLA-4リガンドおよび受容体、例えば、米国特許第5,844,905号、同第5,885,796号、および国際特許番号WO1995/001994および同WO1998/042752に記載のもの；全て参照により本明細書に取り込まれる、ならびにイムノアドヘンシ、例えば、米国特許第8,329,867号に記載のもの、参照により本明細書の取り込まれる、を含む。

【0115】

4. 手術

がんを有する人の約60%は、予防的、診断的または病期分類的、治療的、および緩和的手術を含む、ある種の手術を受ける。治療的手術は、がん組織の全てまたは一部が物理的に除去されるか、切除されるか、および/または破壊される切除術を含み、また他の治療法、例えば、本実施形態の治療、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/または代替的な治療法と併用することができる。腫瘍切除術は、腫瘍の少なくとも一部の物理的除去を指す。腫瘍切除術に加えて、手術による治療は、レーザー手術、冷凍外科手術、電気手術、および顕微鏡制御された手術（モース手術）を含む。

10

【0116】

がん細胞、組織、または腫瘍の一部または全てを切除すると、体内に腔が形成される場合がある。治療は、さらなる抗がん療法を用いる領域の灌流、直接注入、または局所適用により成し遂げることができる。かかる治療は、例えば、1、2、3、4、5、6もしくは7日ごとに、または1、2、3、4および5週ごとに、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12ヶ月ごとに繰り返すことができる。これらの治療は、用量を変化させたものであってもよい。

20

【0117】

5. 他の薬剤

治療の治療効果を改善するために本実施形態の特定の態様と組み合わせて他の薬剤を用いてもよいことが企図される。これらのさらなる薬剤には、細胞表面受容体およびGAPジャンクションの上方制御に作用する薬剤、細胞増殖抑制剤および分化剤、細胞接着の阻害剤、過剰増殖細胞のアポトーシス誘導剤への感受性を増大させる薬剤、または他の生物学的薬剤が含まれる。GAPジャンクションの数を高めることによる細胞内シグナリングの増大は、隣接する過剰増殖細胞集団に対する抗過剰増殖効果を増大し得る。他の実施形態では、細胞増殖抑制剤または分化剤は、治療の抗過剰増殖効果を改善するために本実施形態の特定の態様と組み合わせて用いることができる。細胞接着の阻害剤は、本実施形態の効果を改善するために企図される。細胞接着阻害剤の例は、接着斑キナーゼ（FAK）阻害剤およびロバスタチンである。抗体c225などの過剰増殖細胞のアポトーシスに対する感受性を増大させる他の薬剤が、治療効果を改善するために本実施形態の特定の態様と組み合わせて用いられ得ることがさらに企図される。

30

【0118】

IV. キット

EGFRおよび/またはHER2エクソン20変異、例えば、本明細書において開示されるもの等を検出するためのキットも、本開示の範囲の範囲内である。そのようなキットの一例は、エクソン20変異に特異的なプライマーのセットを含み得る。キットはさらに、本明細書に記載される特定のEGFRおよび/またはHER2エクソン20変異の存在または不在を検出するためにプライマーを使用するための指示書を含み得る。キットはさらに、がん患者由来の試料における本明細書に記載のEGFRおよび/またはHER2エクソン20変異について陽性であると同定することが、チロシンキナーゼ阻害剤であるボジオチニブまたはアフアチニブまたは構造的に類似する阻害剤に対する感受性の指標となることを示す、診断目的のための指示書を含み得る。キットはさらに、がん患者由来の試料における本明細書に記載のEGFRおよび/またはHER2エクソン20変異について陽性であると同定することが、患者がボジオチニブ、アフアチニブ、または構造的に類似する阻害剤を用いて治療されるべきであることを示すことを示す、指示書を含み得る。

40

【実施例】

50

【 0 1 1 9 】

V . 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。当業者であれば、後に続く本実施例において開示された技術は、本発明の実施において十分に機能することが本発明者により見出された技術であり、それ故に、その実施のための好ましいモードを構成するものとして考慮することができる、ということを理解するべきである。しかし、当業者であれば、本開示に照らして、本明細書において開示された特定の実施形態において多数の変更を加えることができること、そして本発明の精神および範囲から逸脱することなく同様または類似する結果を依然として得ることができること、を理解するべきである。

10

【 0 1 2 0 】

実施例 1 - E G F R または H E R エクソン 2 0 挿入を有するがん細胞に対する薬物の同定 T K I に対する臨床応答を、臨床データベースにおいて E G F R エクソン 2 0 挿入を保有する腫瘍を有する患者において調べ；単剤エルロチニブ、ゲフィチニブまたはアファチニブで治療された E G F R 変異体 N S C L C を有する 2 8 0 名の患者のうち、1 2 9 名の患者が古典的 E G F R 変異（エクソン 1 9 欠失、L 8 5 8 R、および L 8 6 1 Q）を有すると特定され、9 名の患者が E G F R エクソン 2 0 挿入を有すると特定された。古典的 E G F R 変異を有する N S C L C 患者は 1 4 ヶ月の中央値 P F S を有したのに対して、E G F R エクソン 2 0 挿入を有する患者は 2 ヶ月のみの中央値 P F S を有した（ $p < 0 . 0 0 0 1$ 、ログランク検定；図 1 A）。9 名の E G F R エクソン 2 0 挿入患者のうち、O R が、アファチニブを受けた S 7 6 8 d e l - i n s I L 変異を保有する 1 名の患者のみで観察された（図 4 A）。この臨床データは、E G F R エクソン 2 0 挿入誘発 N S C L C では使用可能な E G F R T K I の活性が限定されることを示し、代替治療戦略がこれらの特定の腫瘍では必要とされることを確認する。

20

【 0 1 2 1 】

薬物スクリーニングの最初の段階として、7 種類の E G F R 変異および 1 1 種類の H E R 2 変異を B a / F 3 細胞において発現させた。E G F R および H E R 2 エクソン 2 0 変異の位置を図 1 B に要約する。E G F R および H E R 2 のどのエクソン 2 0 変異が活性化しているかを評価するために、B a / F 3 細胞株を I L - 3 非依存性生存についてスクリーニングを行った。試験した全ての E G F R エクソン 2 0 挿入が活性化変異であり（図 4 B）、6 種類の H E R 2 エクソン 2 0 変異およびエクソン 1 9 中に位置している L 7 5 5 P が活性化変異であった（図 4 C）ことが認められた。次に、可逆的 T K I（第 1 世代）、不可逆的 T K I（第 2 世代）、および不可逆的変異体特異的 T K I（第 3 世代）を含む、臨床評価を受けたことがある E G F R および H E R 2 T K I に対する感受性を、エクソン 2 0 挿入について試験し、次いで、古典的感受性変異である E G F R L 8 5 8 R に対する感受性と比較した。E G F R A 7 6 3 i n s F Q E A を除いて、E G F R エクソン 2 0 挿入（ $n = 6$ ）は、第 1 世代（図 1 C、 $I C_{50} = 3 . 3 \sim > 1 0 \mu M$ ）、第 2 世代（図 1 d、 $I C_{50} = 4 0 \sim 1 3 5 n M$ ）、および第 3 世代（図 1 e、 $I C_{50} = 1 0 3 \sim 8 5 0 n M$ ）E G F R T K I に対して耐性を有した（図 5、表 1）。加えて、H E R 2 エクソン 2 0 変異体（ $n = 6$ ）は、第 1 世代（図 1 F、 $I C_{50} = 1 . 2 \sim 1 3 \mu M$ ）および第 3 世代（図 1 H、 $I C_{50} = 1 1 4 \sim 5 0 5 n M$ ）T K I に対して耐性を有した。第 2 世代 T K I は、B a / F 3 H E R 2 エクソン 2 0 変異体細胞株に対していくらかの活性を有する（図 1 G、 $I C_{50} = 1 0 \sim 1 2 n M$ 、図 6、表 1）。より低い用量で部分的阻害を示した E G F R A 7 6 3 i n s F Q E A を除いて、薬物スクリーニングと一致して、ウエスタンブロットリングは、エルロチニブおよびオシメルチニブは、E G F R エクソン 2 0 挿入変異において p - E G F R 2 を有意に阻害せず、5 0 0 n M でのみ H E R 2 エクソン 2 0 挿入変異体において p - H E R 2 有意に阻害した（図 7 A ~ D）。

30

40

【 0 1 2 2 】

（表 1）E G F R / H E R 2 T K I による、E G F R および H E R 2 エクソン 2 0 挿入の $I C_{50}$ 値

50

		平均 EGFR エクソン20挿入 (N=6 細胞株)	平均 HER2 エクソン20挿入 (N=6 細胞株)
第1世代 TKI	エルロチニブ	3,310 nM	3,250 nM
	ゲフィチニブ	>10,000 nM	12,900 nM
	ラパチニブ	-	1,190 nM
	L858R + エルロチニブ	17.0 nM	
第2世代 TKI	アファチニブ	39.9 nM	11.7 nM
	ダコミチニブ	61.1 nM	12.4 nM
	ネラチニブ	135 nM	10.4 nM
	L858R + アファチニブ	0.876 nM	
第3世代 TKI	オシメルチニブ	103nM	444 nM
	ロシレチニブ	850nM	505 nM
	イブルチニブ	143 nM	114 nM
	オルムチニブ	204 nM	352 nM
	ナザルチニブ	198 nM	233 nM
	L858R/T790M + オシメルチニブ	9.00 nM	

【 0 1 2 3 】

エクソン20挿入が第1世代および第3世代EGFR TKIに対して耐性を有する理由を調べるために、EGFR T790Mの解析された結晶構造に対してEGFR D770 i n s N P GおよびEGFR WTとの3-Dモデリングを行い、薬物結合ポケット内の変化を可視化した。モデリングにより、EGFRエクソン20挿入は、ゲートキーパー残基T790のアライメントにおけるT790M変異と類似しており、ATPに対する親和性の増大と第1世代阻害剤の結合の低下をもたらし、これらの変異を非共有結合型阻害剤に対して耐性とすることが明らかにされた。加えて、HER2エクソン20挿入は、恒常的に活性な立体構造を誘導し、不活性な立体構造のHER2に結合する非共有結合型HER2阻害剤ラパチニブの結合を妨げた。さらに、EGFRおよびHER2エクソン20挿入は、薬物結合ポケットに対して劇的な作用を有する。EGFR (図1 I) およびHER2 (図1 J) エクソン20挿入のインシリコモデリングにより、 α -c-ヘリックスのうね状の (r i d g e d) 配置を内側の活性化位置に強制的に移動させる、 α -c-ヘリックスのC末端での挿入による α -c-ヘリックスの薬物結合ポケット内への有意なシフト (矢印) (図1 J) が明らかにされた。加えて、3-Dモデリングは、両方の受容体の薬物結合ポケット (図1 I、1 J) 内へのP-ループの有意なシフトも示した。これらのシフトは合わせて、EGFRおよびHER2エクソン20変異体タンパク質の両方において2つの方向から薬物結合ポケットの立体障害をもたらす。上述のインビトロでの試験と一致して、3-Dモデリングは、アファチニブがオシメルチニブより効果的にエクソン20挿入を阻害するという観察を裏付ける。オシメルチニブは、剛性のピリミジンコアに直接連結された大きな末端1-メチルインドール基を有する。この大きな柔軟性のない基は、EGFRエクソン20挿入においてアファチニブと同程度に効率的にC797残基に到達するオシメルチニブの能力を低下させる (図1 I) 。あるいは、アファチニブは、二級アミン基を介してキナゾリンコアに間接的に連結されるより小さな1-クロロ-2-フルオロベンゼン環末端基を有し、アファチニブが立体障害を有する結合ポケット内に適合できるようにする。さらに、立体障害は、オシメルチニブのHER2 A775 i n s Y V M A への結合を妨げる。まとめると、インビトロデータおよびインシリコモデリングは、小さく柔軟なキナゾリン誘導体はEGFR/HER2エクソン20挿入を標的とすることができる可能性があることを示す。

10

20

30

40

50

【0124】

次に、エクソン20挿入に対して活性が増強されているTKIを同定するよう探索を行った。ポジチニブは、アファチニブと同様に、小さな末端基および柔軟なキナゾリンコアを含む。一方で、ポジチニブは、アファチニブと比較して、マイケルアクセプター基 (Michael Acceptor group) をキナゾリンコアに連結するより小さな置換基、およびアファチニブと比較して末端ベンゼン環の増加したハロゲン化を有する。この電子豊富な部分はまた、EGFRの塩基性の残基、例えばK745と相互作用し、その結合をさらに安定化する。そのために、ポジチニブをBa/F3系において試験した。インビトロで、ポジチニブはEGFRエクソン20変異体Ba/F3細胞株(図2A)およびHER2エクソン20変異体Ba/F3細胞(図2B)の増殖を強力に阻害した。ポジチニブは、EGFRエクソン20変異体Ba/F3細胞株において1.0nMの平均IC₅₀値を有し、ポジチニブはインビトロで、オシメルチニブよりおよそ100倍超強力でありかつアファチニブより40倍超強力であった。さらに、ポジチニブは、HER2エクソン20変異体Ba/F3細胞株において1.9nMの平均IC₅₀値を有し、ポジチニブはインビトロで、オシメルチニブより200倍超強力でありかつアファチニブより6倍超強力であった。これらの結果は、ポジチニブが5nMの低濃度でEGFRおよびHER2のリン酸化を阻害したウエスタンブロットティングにより検証された(図2C、8A)。さらに、ポジチニブ感受性がEGFRまたはHER2変異体の発現のレベルを原因としたものではないことを検証するために、各変異体の発現をELISAにより測定し、次いで、IC₅₀値に対してプロットした(図8D)。IC₅₀と発現との間で相関性は認められなかった(R = -0.056、p = 0.856)が、EGFRではポジチニブ感受性とEGFRの変異の位置との間では相関性が認められ(R = 0.687、p = 0.044)(図2D)、挿入が-c-ヘリックスからさらに遠ざかるとIC₅₀がより高くなることが示唆された。興味深いことに、この相関性は、挿入位置よりもむしろ挿入の大きさがより大きく変化している、HER2エクソン20変異では認められなかった(図8E)。この相関性は、変異の厳密な位置が薬物結合ポケットに対して様々な作用を有し、認められる薬物応答の不均一性に寄与することを示唆する。加えて、ポジチニブは、患者由来の細胞株CUTO14(EGFR A767dupASV)およびYUL0019(EGFR N771del insFH)の増殖をそれぞれ1.84nMおよび0.30nMの平均IC₅₀値で効果的に阻害し、これは、CUTO14でのアファチニブより15倍超強力であり、かつYUL0019でのアファチニブより100倍超強力であった(図2E、F)。CUTO14細胞株のウエスタンブロットティングは、10nMポジチニブ処置でp-EGFRの有意な阻害があったが、p-EGFRはアファチニブによって1000nMまで有意に阻害されなかったと判定した(図8B、C)。

【0125】

T790M変異体と比較したエクソン20変異体を阻害するポジチニブの特異性を判定するために、エクソン20変異体でのアファチニブ、オシメルチニブ、ロシレチニブ、およびポジチニブのIC₅₀値を、EGFR T790M変異体Ba/F3細胞株におけるアファチニブ、オシメルチニブ、ロシレチニブ、およびポジチニブのIC₅₀値と比較した。IC₅₀値を単一EGFR T790M変異に対して正規化して表示する、1未満の値はT790Mと比較してエクソン20挿入に対する特異性を示す(図2G)。EGFR T790M変異体と比較して、EGFRエクソン20挿入はポジチニブに対して65倍超の感受性を有した。さらに、EGFRエクソン20挿入変異は、EGFR T790M変異体よりアファチニブに対して1.4倍超の耐性、オシメルチニブに対して5.6倍超の耐性、およびロシレチニブに対して2.4倍超の耐性を有した(図2G)。

【0126】

ポジチニブは、T790M変異と比較してエクソン20変異体を選択的かつ強力に阻害するが、オシメルチニブなどの第3世代TKIはそうではない理由を調べるために、3-Dモデリングを実施し、薬物結合ポケットの変化がどのように薬物結合に影響を及ぼすかを判定した。オシメルチニブは、EGFR T790M変異体受容体の薬物結合ポケッ

10

20

30

40

50

トに適合し(図2H)、エクソン20変異体では、結合ポケット内の大きな変化(図2I)が、第3世代阻害剤の結合を立体的に妨げた。一方で、ポジオチニブはより小さく、より優れた柔軟性を有し、ポジオチニブが立体障害を有するエクソン20結合ポケット内に適合するのを可能にする(図2I)。さらに、ポジオチニブおよびアフアチニブとのEGFR D770insNPGの3-Dモデリングは、薬物結合ポケット内にシフトしたP-ループが、ポジオチニブをアフアチニブより強固に結合ポケット内に結合させることを示唆する。構造モデリングの計算は、ポジオチニブでの結合の自由エネルギー(London G)がアフアチニブより低いことを示し、ポジオチニブのより強い結合親和性を示す。オシメルチニブとのWT HER2の3-Dモデリングは、WT HER2の結合ポケットがHER2 A775insYVMAの結合ポケットより大きいことを示す。したがって、ポジオチニブは、HER2 A775insYVMAの立体障害を有する薬物結合ポケット内深くに強固に結合し、エクソン20挿入により誘導される構造変化を克服する。

10

【0127】

EGFRおよびHER2エクソン20挿入誘発NSCLCのGEMモデルを用いて、ポジオチニブの有効性をインビボで試験した。肺腫瘍を、以前に記載されたEGFR D770insNPG(Choe et al, 2013)およびHER2 A775insYVMA(Perera et al, 2009)マウスにおいて誘導し、動物に、ポジオチニブ(10mg/kg)またはビヒクル対照を毎日4週間にわたって受けさせた。MRIにより決定されたように、ポジオチニブは、EGFRエクソン20 GEMMでは85%(図3A、C)、HER2エクソン20 GEMMでは60%(図3B、D)、同じGEMモデルにおいてアフアチニブで以前に観察された37%より高い阻害レベルで腫瘍量を低下させた。ポジオチニブの前および後の腫瘍の代表的なMRI画像を、EGFRおよびHER2 GEMM両方について示す(図3C、D)。EGFRおよびHER2 GEMモデル両方において、10mg/kgポジオチニブで処置したマウスは、12週で進行の徴候なしに、持続的な退縮を示した(図3E、F)。加えて、ポジオチニブ処置(5または10mg/kg)は、EGFRエクソン20挿入PDXモデルLU0387(H773insNPH)において14日までに腫瘍を完全に減少させた(>85%阻害)(図3G)。

20

【0128】

ポジオチニブが、他の不可逆阻害剤と同様に、C797で共有結合するかどうかを判定するために、オシメルチニブ耐性を有する患者の約30%で観察される(Thress et al, 2015)C797S変異を有するBa/F3細胞株を作製した。C797S変異が $>10\mu\text{M}$ のIC₅₀値でポジオチニブに対する耐性を誘導したことが認められた。これらの試験を合わせると、ポジオチニブが他の第3世代TKIと類似の獲得耐性のメカニズムの影響を受けやすい可能性があることが示唆された。

30

【0129】

上記の知見を検証するために、HER2 G776del insVCを有する乳がん細胞株MCF10Aを用いて、試験を行った。細胞をさまざまな用量での異なる阻害剤で処理し、乳がん細胞株が試験した他の細胞株で認められたようにポジオチニブに対して感受性を有することが認められた(図10)。したがって、ポジオチニブは、エクソン20変異を有する他のがんの処置で用いることができる。

40

【0130】

このように、エクソン20変異体は、第1世代、第2世代、および第3世代TKIに対してデノボ耐性を示すことが認められた。EGFR D770insNPGおよびHER2 A775insYVMAの3-Dモデリングを用いて、エクソン20における挿入によって誘導される薬物結合ポケット内の変化を克服し得る構造的特徴を有するとして、ポジオチニブを特定した。さらに、ポジオチニブの予測活性が、これらの変異を有する細胞におけるポジオチニブの強力な抗腫瘍活性を実証する、インビトロおよびインビボモデルを用いて確認された。

【0131】

50

ポジオチニブは、EGFRエクソン20変異体においてアファチニブよりおよそ40倍超強力でありかつダコミチニブより65倍超強力であることが認められた。さらに、ポジオチニブは、インビトロでHER2エクソン20変異体においてアファチニブおよびダコミチニブより6倍超強力であった。まとめると、これらのデータは、ポジオチニブは、アファチニブおよびダコミチニブと類似のキナゾリン骨格を共有するが、前記キナーゼ阻害剤のさらなる特徴が、より多く見られるT790M変異と比較してEGFRエクソン20変異に対して増加した活性および相対的特異性をもたらすことを示す。

【0132】

3-Dモデリングは、ポジオチニブのより小さなサイズ、ハロゲン化の増加、および柔軟性が、エクソン20変異体EGFR/HER2の立体障害を有する薬物結合ポケットにおいて前記阻害剤に競合的利点を与えることを示唆する。負の相関性が、*c*-ヘリックスからの変異の距離と薬物感受性との間に観察された。この関連性は、変異の厳密な位置が、薬物結合ポケットおよび/またはTKIの結合親和性に影響を及ぼすことを示唆する。さらに、データは、挿入のサイズもまた、薬物感受性に影響を及ぼすことを示した。さらに、1アミノ酸だけ純増していた患者由来細胞株、YUL0019 (N771delinsFH)は、より大きなEGFRエクソン20挿入を有する細胞よりキナゾリンベースの汎HER阻害剤に対してより高い感受性を有した。

【0133】

実施例2 - 材料および方法

患者集団および統計解析：前向きに収集されたMD Anderson Lung Cancer Moon Shot GEMINIデータベースに登録されているEGFR変異体NSCLCを有する患者を特定した。日常的な臨床ケアで用いられる50、134または409遺伝子のパネルのPCRベースの次世代配列決定の1つを用いて、EGFR変異状態を判定した。カプラン・マイヤー法を用いて、PFSを計算した。PFSは、EGFR TKIの開始から放射線学的進行または死亡までの時間として定義される。病期再分類 (Restaging) スキャンを処置中6~8週の間隔で得、固形がんの治療効果判定 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) (RECIST)、バージョン1.1にしたがって遡及的に評価し、EGFRエクソン20挿入NSCLCを有する患者における奏効率を判定した。

【0134】

細胞株作製およびIL-3欠乏：Ba/F3細胞株を、無菌条件下で、L-グルタミン、10%熱失活FBS (Gibco)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Sigma Life Science)、および10ng/mlのマウスIL-3 (R&D systems)を追加した完全RPMI-1640 (R8758; Sigma Life Science)培地中で培養した。12時間のBa/F3細胞株のレトロウイルス形質導入により、安定細胞株を作製した。リポフェクタミン2000 (Invitrogen)を用いて、表2に要約されているpBabe-Puroベースのベクター (AddgeneおよびBioinnovatise)をPhoenix 293T amphotropic細胞株 (Orbigen)にトランスフェクトすることにより、レトロウイルスを作製した。形質導入の72時間後、2μg/mlピューロマイシン (Invitrogen)を培地に添加した。5日間の選択の後、FITC-HER2 (Biolegend)またはPE-EGFR (Biolegend)を用いて細胞を染色し、FACSにより選別した。次いで、IL-3の非存在下で細胞株を15日間増殖させ、Cell Titer Gloアッセイ (Promega)を用いて3日毎に細胞生存度を測定した。結果として得られた安定細胞株を、IL-3を含まない上記の完全RPMI-1640培地中で維持した。HCC827およびHCC4006肺がん細胞株をATCCから入手し、無菌条件下で10%RPMI培地中で維持した。PowerPlex 1.2キット (Promega)を用いるショートタンデムリピートによるDNAフィンガープリンティングにより、細胞株の同一性を確認した。フィンガープリンティングの結果を、細胞株の初代供給源によって維持される参照フィンガプリントと比較した。全ての細胞株はマイコプラズマ不含

であった。エルロチニブ耐性細胞株を作製するために、HCC827およびHCC4006（両方ともEGFR変異体）細胞を、耐性パリアントが出現するまで増加濃度のエルロチニブと培養した。

【0135】

（表2）安定細胞株を作製するために用いられるベクター

名前	変異	ベンダー
EGFR A763insFQEA (SEQ ID NO:1)	c.2290_2291insTCCAGGAAG CCT (SEQ ID NO:2)	AddgeneのpBabe-puro-EGFR WT (#11011)からBioinnovatiseによって作製
EGFR A767insASV	c.2302_2303insGCCAGCGTG	Addgeneから購入(#32066)
EGFR S768dupSVD	c.2303_2304dupAGCGTGGAC	AddgeneのpBabe-puro-EGFR WT (#11011)からBioinnovatiseによって作製
EGFR V769insASV	c.2308_2309insCCAGCGTGG	AddgeneのpBabe-puro-EGFR WT (#11011)からBioinnovatiseによって作製
EGFR D770insNPG	c.2310_2311insAACCCCGGC	Addgeneから購入(#11016)
EGFR D770insSVD	c.2311_2312insGCGTGGACA	AddgeneのpBabe-puro-EGFR WT (#11011)からBioinnovatiseによって作製
EGFR H773insNPH	c.2319_2320insAACCCCCAC	AddgeneのpBabe-puro-EGFR WT (#11011)からBioinnovatiseによって作製
EGFR T790M		Addgeneから購入(#32070)
EGFR T790M L858R		Addgeneから購入(#32073)
EGFR T790M Ex19del		Addgeneから購入(#32072)
EGFR T790M L858R C797S	c.2389T>A	AddgeneのpBabe-puro-EGFR L858R/T790M (#32073)からBioinnovatise によって作製
EGFR T790M Ex19del C797S	c.2389T>A	AddgeneのpBabe-puro-EGFR Del11/T790M (#32072)からBioinnovatiseによって 作製
HER2 S310F	c.929C>T	Addgeneから購入(#40991)
HER2 S310Y	c.929C>A	Addgeneから購入(#40992)
HER2 C311R	c.931T>C	Addgeneから購入(#40980)
HER2 L755P	c.2263_2264delinsCC	AddgeneのpBabe-puro-HER2 WT (#40978)からBioinnovatiseによって作製
HER2 A775insV G776C	c.2323-2324insTTT	Addgeneから購入(#40979)
HER2 A775insYVMA (SEQ IDNO:3)	c.2323_2324insTATGTCATGG CT (SEQ ID NO:4)	Addgeneから購入(#40982)
HER2 G776V	c.2327G>T	AddgeneのpBabe-puro-HER2 WT (#40978)からBioinnovatiseによって作製
HER2 G776C V777insV	c.2326G>T, c.2331_2332insTGT	AddgeneのpBabe-puro-HER2 WT (#40978)からBioinnovatiseによって作製
HER2 G776del insVV	c.2327delinsTTGT	AddgeneのpBabe-puro-HER2 WT (#40978)からBioinnovatiseによって作製
HER2 G776del insVC	c.2326_2328insTCT	AddgeneのpBabe-puro-HER2 WT (#40978)からBioinnovatiseによって作製
HER2 P780insGSP	c.2339_2340insTGGCTCCCC	AddgeneのpBabe-puro-HER2 WT (#40978)からBioinnovatiseによって作製

【0136】

細胞生存度アッセイおよびIC₅₀推定：Cell Titer Gloアッセイ（Promega）を用いて、細胞生存度を測定した。細胞を懸濁培地から収集し、300×gで5分間遠沈し、新鮮なRPMI培地で再懸濁し、Countess自動細胞計数器およ

10

20

30

40

50

びトリパブルー (Invitrogen) を用いて計数した。384 ウェルプレート (Greiner Bio-One) に、1 ウェルあたり 1500 個の細胞を技術的に三連で播種した。細胞を、1 ウェルあたり 40 μ L の最終体積で段階 3 倍希釈した TKI での 7 種類の異なる濃度の阻害剤またはビヒクル単独で処理した。72 時間後、11 μ L の Cell Titer Glo を各ウェルに添加した。プレートを 10 分間振とうし、FLUOstar OPTIMA マルチモードマイクロプレートリーダー (BMG LABTECH) を用いて、生物発光を測定した。生物発光の値を DMSO 処理細胞に対して正規化し、正規化した値を、可変傾斜を用いる正規化データに対する非線形回帰フィットを用いて GraphPad Prism でプロットした。IC₅₀ 値を、50% 阻害で GraphPad Prism により計算した。明記されていない限り、各実験を 3 回反復した。

10

【0137】

チロシンキナーゼ阻害剤：ラパチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、AZD9291、CO-1686、EGF816、イブルチニブ、および HM781-36B を Selleck Chemical から購入した。エルロチニブおよびゲフィチニブを The University of Texas MD Anderson Cancer Center の施設内薬局から入手した。BI-694 は Boehringer-Ingelheim によって提供された。全ての阻害剤を 10 mM の濃度での DMSO で溶解し、-80 で保管した。

【0138】

3-D モデリング：EGFR D770insNPG タンパク質の構造を検索し (Protein Data Bank エントリーコード：4LRM)、それを鋳型として用いて、EGFR D770insNPG の分子 3-D 構造モデルを構築した。HER2 A775insYVMA を、Shen et al. において以前に発表されたモデルを用いて構築した。相同モデルを、MODELLER 9v6 を用いて構築し、Molecular Operating Environment ソフトウェアパッケージ (Chemical Computing Group, Montreal, Canada) を用いてさらにエネルギー的に最小化した。TKI のエクソン 20 変異体 EGFR および HER2 への分子ドッキングを、他に記載のない限り、GOLD ソフトウェアを用いてデフォルトのパラメーターにより実施した。ドッキングプロセスにおいて早期終了は禁止された。拘束 (restraint) を用いて、受容体と阻害剤との間の共有結合形成をモデル化した。結合ポケット内の残基の柔軟性に、GOLD ソフトウェアを用いて対応した。EGFR/HER2 と阻害剤との間の相関性を示す図を、PYMOL を用いて可視化した。

20

30

【0139】

Ba/F3 変異体のウエスタンブロットティング：ウエスタンブロットティングでは、細胞をリン酸緩衝食塩水で洗浄し、タンパク質溶解緩衝液 (ThermoFisher) およびプロテアーゼ阻害剤カクテル錠 (Roche) で溶解した。タンパク質 (30 ~ 40 μ g) を BioRad から購入したゲルにロードした。BioRad セミドライトランスファを用い、次いで、pEGFR (#2234)、EGFR (#4267)、pHER2 (#2247)、HER2 (#4290) (1:1000; Cell Signaling) に対する抗体によりプローブした。プロットをローディング対照として - アクチン (Sigma-Aldrich, #A2228) またはピンクリン (Sigma-Aldrich, #V4505) に対する抗体でプローブし、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher) および BioRad の ChemiDoc Touch Imaging System または X 線撮影用フィルムを用いて曝露した。2 つの異なるタンパク質単離の代表的な画像を示し、プロットを二度繰り返して実行する。ウエスタンブロットティングの定量化を Photoshop で完了し、(背景平均強度 - 試料平均強度) (ピクセルの数) = バンド強度として計算した。試料を最初にローディング対照 (- アクチンまたはピンクリン) に対して正規化し、次いで DMSO に対して正規化し、GraphPad Prism でグラフ化した。DMSO からの有意性を GraphPad Prism で計算した。

40

50

【0140】

Ba/F3変異体のELISAおよび相関性：親Ba/F3細胞株および上記に記載される活性化変異であることが認められるBa/F3エクソン20変異体の各々から、タンパク質を回収した。総EGFR (Cell signaling, #7250) および総HER2 (Cell Signaling, #7310) について製造元の指示書に記載されているようにELISAを実施した。ELISAにより測定された相対的発現を、上記に記載したように計算したIC₅₀値に対してプロットした。ピアソン相関係数およびp値をGraphPad Prismによって決定した。

【0141】

患者由来の細胞株の試験：CUTO14細胞を、以前に記載された培養法 (Davies et al, 2013) を用いて、インフォームド Consent 後の肺腺がんを有する患者の胸水から作製した。細胞株を表示した用量のアファチニブまたはポジオチニブで72時間処理し、細胞生存度をMTSアッセイ (Promega) によって測定した。IC₅₀を以前に記載されたように計算した (n=3)。患者由来の細胞株によるウエスタンブロッティングを、以前に記載されたように完了した (Hong et al, 2007) (n=3)。細胞を表示した用量のアファチニブまたはポジオチニブで2時間処理した。総EGFR (BD Transduction Laboratories) およびGAPDH (Calbiochem) を除いて、全ての抗体をCell Signaling Technologyから購入した。

【0142】

YUL0019細胞株を、肺の進行した腺がんを有する患者から得た悪性心膜液から、IRB承認プロトコール下で確立した。細胞株を、10%熱失活ウシ胎仔血清 (Atlanta Biologicals) および1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Corning) を追加したRPMI + L-グルタミン (Corning) 中で培養した。EGFR変異の存在を確認するために、RNeasy miniキット (Qiagen #74104) を用いて製造元の指示書により、RNAを細胞ペレットから抽出した。cDNAを、Superscript III First-Strand cDNA Synthesisキット (Invitrogen #18080-051) を用いて合成してEGFRを増幅させるための鋳型として用いた。PCR産物を、以下のプライマー：
EGFR-2080F: CTTACACCC AGTGGAGAAGC

(SEQ ID NO:5) および EGFR-2507R ACCAAGCGACGGTCCTCCAA (SEQ ID NO:6)

を用いて、Sanger配列決定により配列決定した。フォワードおよびリバース配列トレースを手動で見直した。患者由来の細胞株で検出されたバリエーションは、EGFRのエクソン20での複合挿入であり、771位のアミノ酸アスパラギンの2個のアミノ酸、フェニルアラニンおよびヒスチジンによる置換をもたらした (N771delinsFH)。細胞生存度およびIC₅₀推定を上記に記載のように実施した。

【0143】

患者由来異種移植片 (PDX) の試験：LU0387 PDX試験をCrown Bio Sciencesによって完了した。簡単に説明すると、EGFR H773insNP H発現腫瘍からの腫瘍断片を、5~6週齢の雌のnu/nuヌードマウスに接種した。腫瘍が100~200mm³に到達したときに、マウスを以下の3群に無作為化した：5mg/kgポジオチニブ、10mg/kgポジオチニブ、またはビヒクル対照 (dH₂O中に20%PEG-400、3%Tween-80)。腫瘍体積および体重を週に2回測定した。5mg/kgポジオチニブを受けるマウスは、4~5日間にわたって薬物を受け、次いで4日間休薬し、次いでさらに4日の投与を受けた。次に、マウスを投与なしでさらに2日間観察した。10mg/kgポジオチニブを受けるマウスは3~4日間薬物を受け、次いで、投与なしで10日間観察された。腫瘍量と無関係のイベントのために人道的に安楽死させたマウスは、最終分析から除いた。

【0144】

10

20

30

40

50

遺伝子操作したマウスモデル (Genetically Engineered Mouse Model) (GEMM) の試験: EGFR D770insNPGおよびHER2 A775insYVMA GEMMを以前に記載された (Perera et al, 2009; Cho et al, 2013) ように作製した。マウスは、Office of Laboratory Animal Welfareにより規定されたGood Animal Practicesに従って取り扱われ、Dana-Farber Cancer Institute Institutional Animal Care and Use Committee (Boston, MA) の承認下で行われた。マウスに、6週齢から連続的なドキシサイクリン食を与えた。腫瘍体積を、以前に記載されたようにMRIにより決定した (Perera et al, 2009; Cho et al, 2013) 。等しい初回腫瘍体積を有するマウスを、MRIにより決定された明白な腫瘍形成に基づいて、ピヒクルおよび一日あたり10mg/kgポジオチニブに非盲検的に無作為化した。腫瘍量と無関係のイベントのために人道的に安楽死させたマウスは、最終分析から除いた。

10

【0145】

実施例3 - HER2エクソン21変異を有するがん細胞に対する薬物の同定

HER2変異は膀胱、胃、および胆管のがんにおいて最も高い頻度で生じる: がんの種類間でのHER2変異の多様性を理解するために、cBioPortal、MD Anderson Cancer Center、およびFoundation Medicineからのコホート、ならびにGuardant HealthからのcfDNAコホートを含む、複数のデータベースを照会した。全データベースにわたって、全ての非同義HER2変異を25種類の異なるがんの種類範囲内で分析した (表4)。HER2変異についての加重平均頻度を計算した。AACR GENIEデータベース (Meric-Bernstam et al, 2018) で観察されたものと同様に、HER2変異は、膀胱 (8.3%)、胆管 (5.3%)、および胃 (4.5%) のがんにおいて最も高い頻度で生じ (図13A); かつHER2エクソン20変異は、小腸 (1.8%)、肺 (1.5%)、および乳房 (0.9%) のがんにおいて最も高い頻度で生じた (図13B)。

20

【0146】

HER2変異はHER2のチロシンキナーゼドメインにおいて最も高い頻度で生じ、かつ変異ホットスポットは悪性腫瘍ごとに異なる: 次に、変異の頻度を、cBioPortalおよびMD Andersonで報告されたHER2受容体のさまざま領域の範囲内で分析した。全てのがんの種類にわたって、HER2変異は、チロシンキナーゼドメイン (46%) において最も高い頻度で生じ、それには、エクソン20 (20%)、エクソン19 (11%)、およびエクソン21 (9%) での変異が含まれた (図14A)。加えて、細胞外ドメイン変異は37%がHER2変異で構成された。照会した全てのがんにわたって、最もよく見られるHER2変異は、p.S310F/Y (11.0%)、p.Y772__A775dupYVMA (5.7%)、p.L755P/S (4.6%)、p.V842I (4.4%)、およびp.V777L/M (4.0%) であった (図14E)。肺がんでは、HER2変異の大部分はエクソン20内で生じ (48%)、Y772__A775dupYVMAは全HER2変異の34%を含んだ (図14B、14F)。乳がんでは、HER2変異の大部分はエクソン19内で生じ (37%)、L755変異がHER2変異の22%で最も高い保有率であった (図14C)。一方で、1つのバリエントが優勢であった肺がんとは異なり、乳がんでは、エクソン19変異内により多くの変異多様性が存在した (図14G)。結腸直腸がんでは、HER2変異は、エクソン21 (23%) および細胞外ドメイン (23%) において最も高い頻度で生じ、エクソン21におけるV842Iバリエントが最も高い保有率であった (19%) (図14D、14H)。

30

40

【0147】

Y772dupYVMAはがんの種類全てにわたって最もよく見られるHER2エクソン20挿入変異である: HER2エクソン20変異は、HER2のチロシンキナーゼドメイン内で最もよく生じる変異であり (全HER2変異の16%かつチロシンキナーゼドメ

50

イン変異の43%)、HER2エクソン20挿入変異は依然として臨床上の課題である。エクソン20挿入の多様性および保有率を理解するために、HER2エクソン20挿入配列の頻度を、cBioportalデータベース、MD Andersonデータベース、およびGuardant Healthデータベースにおいてがんの種類ごとに分析した。Y772dupYVMA挿入は、全HER2エクソン20挿入の70%を含む最もよく見られるHER2エクソン20挿入であり、p.G778dupGSP(14%)およびp.G776delinsVC(9%)挿入は、2番目および3番目に高い頻度で生じた(図21A)。NSCLC(N=362)におけるエクソン20挿入変異はエクソン20挿入変異の最大の多様性を示し(図21B)、乳がん(N=30)におけるエクソン20挿入変異は、挿入配列の多様性はほとんど示さず、3種類の異なるバリエーションのみが報告された(図21C)。その他のがんの種類では、さらなる挿入変異はわずかにしか認められず、Y772およびG778での重複が分析した全てのがんの種類において最も高い頻度で生じた(図21D)。

10

【0148】

頻繁に検出されるHER2の変化は活性化変異である：よく見られるHER2変異の機能的影響を評価するために、エクソン19、20、および21間で最も頻繁に検出された16個のHER2変異をBa/F3細胞に安定して発現させた。試験した全16個のHER2変異は、Ba/F3細胞のIL-3非依存的な生存を誘導することが認められた(図15A~C)。さらに、これら16個のHER2変異の発現は、リン酸化HER2の発現をもたらした(図22A)、これらの変異が受容体活性化をもたらすことを示した。

20

【0149】

ポジオチニブは、試験した最も強力なTKIであり、かつ最もよく見られるHER2変異をインビトロで阻害した：最近の報告は、HER2変異体疾患の前臨床モデルにおける共有結合型のキナゾリンアミンベースのTKI(すなわち、アファチニブ、ダコミチニブ、ポジオチニブ、ネラチニブ)の有効性を強調しているが、アファチニブ、ダコミチニブ、およびネラチニブの臨床試験は低いORR、ならびに患者アウトカムにおいてがん特異的な差異およびバリエーション特異的な差異を有している。最もよく検出されるHER2バリエーション間での薬物感受性を体系的に評価するために、HER2変異体Ba/F3細胞のパネルを、11種類の共有結合型および非共有結合型のEGFRおよびHER2 TKIに対してスクリーニングを行った。HER2変異体は、非共有結合型阻害剤、ラパチニブおよびサパチニブ(sapatiniib)に対して強力な耐性を示した(図16A)。共有結合型TKIオシメルチニブ、イブルチニブ、およびナザルチニブは、エクソン20変異を発現する細胞における細胞生存度を抑制するのに有効ではなかった；しかしながら、これらのTKIは、D769バリエーションを発現する細胞に対しては活性を示した(図16A)。比較して、共有結合型のキナゾリンアミンベースのTKI、アファチニブ、ネラチニブ、ダコミチニブ、タルロキシチニブ-TKI、およびポジオチニブは、3つのエクソン全てにわたってHER2変異体に対する阻害性の活性を有した(図16A)。試験した全てのHER2変異バリエーションおよびTKIの間で、ポジオチニブが最も低い平均IC₅₀を有し、かつアファチニブ、ネラチニブ、またはタルロキシチニブ-TKIより細胞生存度を低下させるのに有意に効果的であった(図16B)。加えて、ポジオチニブは、HER2エクソン19および20変異に対してアファチニブ、ネラチニブ、またはタルロキシチニブ-TKIのいずれかより有意に有効であったが、エクソン21変異体に対する平均IC₅₀には有意差はなく(図16C~E)、変異位置が薬物結合に影響を与えることを示唆した。さらに、エクソン19内のL755SおよびL755Pバリエーションは、試験したTKI全てにわたって薬物感受性において有意差を有し(図16F)、この部位での特定のアミノ酸変化が薬物結合親和性に影響を与えたことを示した。

30

40

【0150】

HER2変異の位置およびアミノ酸変化は薬物結合親和性に影響を及ぼす：変異の位置およびアミノ酸変化がどのように薬物結合親和性および抑制効果に影響を及ぼすことができるかをさらに理解するために、分子動力学シミュレーションを用いて、これらの変異が

50

HER2キナーゼドメインの構造およびダイナミクスにどのように影響を及ぼすかを調べた。L755S、L755P、Y772dupYVMA、およびV777L HER2変異体の分子モデル(図23A)を、鋳型として公的に入手可能であるX線構造(PDB 3PP0)を使用して構築し、加速分子動力学に供し、タンパク質立体構造サンプリングを増やした。特にP-ループおよび-C-ヘリックス位置に関する、サンプリングしたタンパク質立体構造の範囲は、これらのHER2変異体間で異なっていた。エクソン20変異間ですら、特に-C-ヘリックス領域において、差は明白であり、-C-ヘリックスの立体構造の持続が「イン」(より小さな結合ポケットを有する活性な立体構造)と「アウト」(より大きな結合ポケットを有する不活性な立体構造)との間で異なっていた。V777L変異体は「アウト」の立体構造を多数サンプリングした一方で、Y772dupYVMA変異体は「イン」と「アウト」の両方の立体構造をサンプリングした(図17A)。全体的に見て、これらの立体構造状態の差は、V777L変異体より10倍を上回る頻度で「イン」の立体構造(図17B)で存在するY772dupYVMA変異体、および平均して、V777Lと比較してY772dupYVMAでのより小さな結合ポケット(図17Cおよび23B)をもたらした。加えて、ネラチニブは-C-ヘリックスに向けて方向づけられたピリジル環を含むことから、Y772dupYVMAのより小さな結合ポケットは、V777Lと比較してY772dupYVMAに対するネラチニブの効力を弱める原因になる可能性がある。

10

【0151】

HER2変異体結合ポケット体積のさらなる分析(図22B)は、同じ残基での変異がタンパク質立体構造に対して劇的に異なる作用を有し得ることを実証した。具体的には、L755P変異のプロリン残基は、水素結合ドナーを欠いており、それぞれL755とV790との間の3鎖と5鎖との間の骨格水素結合を破壊する。これらの2本の鎖間の安定化の欠如は、-シートの不安定化およびキナーゼヒンジ領域における構造的再配列をもたらした(図17D)。具体的には、L755PのL800残基が活性部位内に突出し、ポケットサイズを大幅に低下させた。3鎖立体構造の変化はまた、P-ループを内向きに崩壊させ、ポケット体積をさらに低下させ、多くのTKIに対するこの変異体の感受性をより低下させた。さらに、ヒンジ可動性の変化はまた、キナーゼ活性化において役割を果たす可能性がある。L755P変異体立体構造のこれらの明らかな変化は、L755S変異体の挙動と対照的であり、野生型HER2により類似している立体構造とポケット体積プロファイルを有した(図23B)。

20

30

【0152】

HER2変異体ヒトがん細胞株はポジオチニブに対して増強された感受性を示した: HER2阻害剤を試験した臨床研究によって、がんの種類特異的な薬物感受性の差が明らかにされている(Hyman et al, 2018)。共有結合型のキナゾリンアミンベースのTKIがHER2変異体疾患のモデルにおいて活性を有するかどうかを判定するために、EGFR/HER2 TKIのパネルをヒトがん細胞株において試験した。前腫瘍性MCF10A乳腺上皮細胞にHER2エクソン20変異をトランスフェクトし、12種類のEGFR/HER2 TKIに対する感受性をインビトロで評価した。G776delinsVC、Y772dupYVMA、またはG778dupGSP HER2変異を発現するMCF10A細胞はポジオチニブに対して最も感受性を有し、それぞれ12 nM、8.3 nM、および4.5 nMのIC₅₀値であった(186A~C)。比較して、タルロキシチニブ-TKIおよびネラチニブはそれぞれ、21 nMおよび150 nMの平均IC₅₀値を生じ(図18A~C)、ポジオチニブは、タルロキシチニブ-TKIおよびネラチニブよりそれぞれ2.6倍および1.9倍超強力であることを示した(p < 0.001)。さらに、ポジオチニブおよびネラチニブによるMCF10A HER2 G776delinsVC細胞のウエスタンブロッティングは、ポジオチニブは10 nMでp-HER2を完全に抑制するが、ネラチニブはそうではないことを示した(図24A)。野生型(WT)HER2は、Ba/F3細胞をIL-3非依存的に成長するように形質転換しないことから、MCF10A細胞を用いて、WT HER2と比較した変異体HER2につい

40

50

でのTKIの選択性を判定した。この目的のために、選択性インデックス(SI、IC₅₀値 変異体 / IC₅₀値 WT)を各阻害剤について計算し、ポジチニブがMCF10A細胞株において試験した最も変異体選択的なTKI(SI = 0.028)であり、ピロチニブ(SI = 0.063)およびタルロキソチニブ-TKI(SI = 0.111)がそれに続くことが認められた(図18D)。Ba/F3細胞を用いて得られたデータ(図15C)と一致して、HER2エクソン19変異体結腸直腸がんのモデル(CW-2)において、ポジチニブ、タルロキソチニブ-TKI、およびネラチニブ間の感受性の差はあまり劇的ではないが、有意であり(p = 0.02およびp = 0.0004)、それぞれ3.19 nM、4.24 nM、および68.8 nMの平均IC₅₀値であった(図18E)。さらに、CW-2結腸直腸細胞の異種移植片マウスモデルでは、21日目に、ポジチニブ(5 mg/kg)で処置した動物は、ビヒクル処置群と比較して腫瘍体積で58%の低減を示していた(p = 0.011)。これと比較して、ネラチニブ(30 mg/kg)で処置した動物は、ビヒクル対照と比較して増加した腫瘍体積(28%)を示し(p = 0.023)、かつアフアチニブ(20 mg/kg)処置は、ビヒクル対照と比較して腫瘍成長に有意な影響を及ぼさなかった(図18F、25)。

10

【0153】

ポジチニブはHER2変異を有するNSCLC患者において抗腫瘍活性を有する：これらの前臨床データおよびエクソン20変異に対する以前に発表された研究(Robichaux et al, 2018)に基づき、EGFRおよびHER2エクソン20変異体NSCLCにおけるポジチニブの医師主導型第II相臨床試験(NCT03066206)を開始した。進行、死亡、または脱落まで、患者を毎日経口でのポジチニブ16 mgにより処置した。客観的奏効をRECIST v1.1に基づき8週毎に評価した。HER2エクソン20挿入変異を保有する最初の12名の評価可能な患者のうち、6/12(50%)の患者は部分奏効(PR)の最良効果を有した。この奏効は、2ヶ月後に連続スキャンによって5/12で確認された(確定客観的奏効率、42%)(図19A)。これらの12名の患者のうち、2名の患者は、最初の効果判定時に進行(PD)を有し、83%の病勢コントロール率(DCR)が得られた。2018年12月の時点で、12名の患者のうち10名が継続中であり、最初の12名の患者の中央値PFSは5.6ヶ月であった(図19B)。これまで、この試験に含まれる全ての患者は、2つの最もよく見られるHER2エクソン20挿入、Y772dupYVMAおよびG778dupGSPのうち一方を保有した(図19A)。Y772dupYVMA変異を有する1名のNSCLC患者の処置前および処置後(8週)の代表的な画像は、右肺において強い腫瘍の縮小を示した(図19C)。前治療歴の数を含む患者特性は表3に認められる。加えて、HER2エクソン19点変異、L755を保有する1名の多数の前処置を受けたNSCLC患者は、コンパッションエートケア使用プロトコル(C-IND18-0014)で処置された。患者は毎日16 mg ポジチニブで処置され、4週で腫瘍の縮小を有した(図19D、白枠)。患者は、RECIST v1.1に準拠する安定(SD)(標的病変での-12%減少)を有した。患者は、明らかな疾患進行が画像化され、ポジチニブが中止されるまで、7ヶ月超にわたり病勢コントロールを有しポジチニブを続けた。患者は、ポジチニブ処置の最後に臨床的に良好であり、続けてさらなる全身治療を受けた。

20

30

40

【0154】

ポジチニブとT-DM1処置との組み合わせは抗腫瘍活性を増強する：HER2陽性乳がんモデルにおけるHER2 TKIラパチニブおよびEGFR変異体NSCLCモデルにおけるEGFR阻害剤の以前の試験は、TKI処置が細胞表面上での受容体蓄積の増加をもたらすこと、および増加した細胞表面HER2/EGFRが抗体依存性細胞障害(ADCC)に対する感受性を増加させることを示している。ポジチニブ処置が細胞表面上の総HER2受容体発現を増加させるかどうかを判定するために、細胞表面HER2発現を、低用量ポジチニブ処置の24時間後にFACSにより分析した。平均して、ポジチニブ処置が細胞表面HER2発現を2倍増加させる(図20A、p < 0.0001)ことが認められた。次に、ポジチニブとT-DM1との組み合わせが細胞生存度をイン

50

ピトロで低減させ得るかどうかを試験した、T - DM 1 単独は MCF 10 A HER 2 変異体細胞株の生存度を抑制しなかったが、T - DM 1 とポジオチニブとの組み合わせは、用量依存的にいずれかの作用物質単独より有意に低い IC₅₀ 値をもたらしたことが認められた (図 20 B)。これらの知見をインビボで検証するために、低用量のポジオチニブと単回用量の T - DM 1 との組み合わせを HER 2 変異体 NSCLC PDX モデル、HER 2 Y 7 7 2 dup Y VMA で試験した (図 20 C)。治療に対する反応を評価するために、最良効果からの腫瘍倍加までの時間として定義される、無増悪生存期間 (PFS) を決定した。ビヒクル対照を受けたマウスは、3 日の中央値 PFS (mPFS) を有したのに対して、低用量のポジオチニブまたは T - DM 1 を受けたマウスはそれぞれ、15 日および 27 日の mPFS を有した。しかしながら、低用量ポジオチニブとの組み合わせでの単回用量の T - DM 1 を受けた (14 / 20) マウスは、45 日目に無腫瘍状態のままであった (図 20 D)。さらに、最良効果の時点、15 日目に、低用量ポジオチニブ (2.5 mg / kg) と単回用量の T - DM 1 (10 mg / kg) の組み合わせは、T - DM 1 単独を受けた 2 / 9 マウスまたは低用量ポジオチニブを受けた 0 / 12 マウスと比較して、20 / 20 マウス (100%) で完全な腫瘍の退縮をもたらした (図 20 C ~ F)。30 日目までに、腫瘍成長は T - DM 1 単独を受けた全てのマウスで始まったが ; しかしながら、組み合わせ処置を受けた 14 / 20 マウスでは、腫瘍再発のエビデンスはなかった (図 20 F、G)。

10

【 0 1 5 5 】

さらなる試験によって、他の TKI と比較したポジオチニブの有効性を検証した。ポジオチニブが、EGFR S 7 6 8 dup SVD PDX モデルにおいて高用量のオシメルチニブより効果的であったことが認められた (図 26)。また、ポジオチニブが、Y 7 7 2 dup Y VMA を保有する NSCLC の PDX モデルにおいてネラチニブより高い抗腫瘍活性を有したことも示された (図 27)。単剤ポジオチニブは、V 7 7 7 L を保有する乳がん PDX モデルにおいてネラチニブより有効であった (図 28)。さまざまな EGFR および HER 2 エクソン 20 変異体インビボモデルにおけるポジオチニブ抗腫瘍活性の有効性の概要を図 29 に示す。

20

【 0 1 5 6 】

(表 3) 表示した EGFR エクソン 20 変異を発現する Ba / F 3 細胞についての平均 IC₅₀ 値の表。IC₅₀ 値を決定するために、Ba / F 3 細胞を作製した。細胞を、1 ウェルあたり 2,000 個の細胞で 384 ウェルプレート中に技術的に三連で播種した。24 時間後、細胞を、150 nM から 0.01 nM の範囲の 7 種類の異なる用量のポジオチニブで処理した。パーセント生存率を決定し、DMSO 処理した対照に対して正規化した。各生物学的反復実験 (biological replicate) についての IC₅₀ 値を、GraphPad Prism での非線形回帰モデリングを用いて計算した。平均値および SEM は、3 つの独立した実験の代表値である。

30

40

50

よびインビボでの抗腫瘍活性を増強させることを確立した。

【0158】

汎がん分析は、HER2変異ホットスポットは、がんの種類ごとに異なっており、かつインビトロでHER2 TKIに対して異なる感受性を有し、臨床的有効性に影響を及ぼす可能性があることを示している。SUMMIT試験では、ネラチニブは、乳がん患者において最も高い有効性を生じ、応答者の大部分がL755S、V777L、またはL869R変異について陽性であった。インビトロでのBa/F3薬物スクリーニングでは、これらの変異は低IC₅₀値と相関した。これに対して、結腸直腸がんを有する患者はネラチニブに反応しなかった。この臨床的観察と一致して、V842I変異は結腸直腸がんの症例で最もよく見られるHER2変異であり、この特異的な変異は薬物スクリーニングアッセイにおいてネラチニブに対して感受性を有さなかったことが認められた。これらのデータは、悪性腫瘍間での異なるTKI感受性が、一部において、がん特異的な変異ホットスポットによって説明され、薬物感受性に直接影響を及ぼす可能性があることを示唆する。しかしながら、HER2変異の分布が腫瘍型ごとに異なっている理由、およびある特定の変異が異なる腫瘍型でも類似の薬物応答を生じるかどうかについて、重大な問題が残っている。SUMMIT試験からのデータは、特定のエクソン20挿入は乳がん患者におけるネラチニブ感受性と関連したものの、これらの同一の変異は、全ての他のがんの種類では耐性と関連していることを示し、さらなる調査に値する感受性のこれらの腫瘍型特異的な差の根底にある潜在的なメカニズムが存在し得ることを示した。

10

【0159】

エクソン20挿入変異およびエクソン19 L755P変異は、ほとんどのHER2 TKIに対して耐性を有する。インビトロでの薬物スクリーニングは、エクソン20挿入変異およびL755P変異が、試験した各TKIで最も高いIC₅₀値を有したことを示した。分子動力学シミュレーションによって、これらの変異が、薬物結合ポケットの全体のサイズおよび可動性に影響を及ぼす立体構造の変化を誘導することが明らかにされた。まとめると、これらのインビトロおよびインシリコでの知見は、HER2エクソン20挿入変異を有する患者は歴史的にTKIに対する反応が乏しかったという臨床的観察と一致する。エクソン20挿入が高い頻度で生じる肺がんでは、HER2エクソン20挿入変異を保有する患者は、ネラチニブ、ダコミチニブ、およびアフアチニブに対してそれぞれ、0%、11.5%、および18.2%~18.8%の奏効率を有した。さらに、L755S変異はネラチニブに対して反応することが示されている一方で、L755P変異は、TKIおよび抗体-薬物コンジュゲートの両方に対して強い耐性を有する。

20

30

【0160】

実施例4 - 材料および方法

HER2変異保有率およびバリエーション頻度の分析：MD Anderson Cancer Center、cBioPortal、Foundation Medicine、またはGuardant Healthからのデータベースで報告された各HER2変異の頻度を決定するために、各データベースを個別に照会し、次いで、頻度を各データベースにおける患者の総数によって加重し、加重平均として報告する。cBioPortalにおけるがんの種類間でのHER2変異の頻度を決定するために、全非重複(all non-overlapping)試験を選択し、エクスポートした。重複(overlapping)試験では、最大のデータセットのみを用いた。MD Anderson Cancer CenterでのHER2変異頻度を決定するために、Institute for Personalized Cancer Therapyデータベースを、がんの種類に非依存的に全てのHER2変異について照会した。Foundation MedicineからのHER2エクソン20変異の頻度を決定するために、HER2欠失、フレームシフト、挿入、および点変異を有する患者の数の非特定化されたデータを表にし、5つ未満の変異を有するがんの種類を除外した。最後に、Guardant HealthでのHER2エクソン20変異の頻度を決定するために、Guardant360臨床データベースを、ERBB2エクソン20変異を有する2015年10月から2018年5

40

50

月の間に試験した試料(70から73遺伝子パネル)について照会した。Guardant 360(登録商標)は、73種類までの遺伝子におけるSNV、indel、融合、およびSNVを報告する、CLIA認証を受けたCAP/NYS DOH認可の網羅的cfDNA NGS検査である。次いで、Odeggaard et al 2018で報告されたように、Guardant Healthから報告された頻度を正規化し、臨床的感度を補正した。具体的には、頻度をパーセント臨床的感度、85.9%で除算した。

【0161】

Ba/F3細胞株作製およびIL-3欠乏：Ba/F3細胞株を以前に記載されているように確立した。簡単に説明すると、12時間にわたるBa/F3細胞株のレトロウイルス形質導入によって、安定Ba/F3細胞株を作製した。リポフェクタミン2000(Invitrogen)を用いて、表1に要約したpBabe-Puroベースのベクター(AddgeneおよびBioinnovatise)をPhoenix 293T-ampho細胞(Orbigen)にトランスフェクトすることによって、レトロウイルスを作製した。形質導入の3日後に、2µg/mlピューロマイシン(Invitrogen)をRPMI培地に添加した。5日間の選択の後、細胞をFITC-HER2(Biolegend)で染色し、FACSにより選別した。次いで、IL-3の非存在下で細胞株を2週間増殖させ、Cell Titer Gloアッセイ(Progenia)を用いて3日毎に細胞生存度を評価した。結果として得られた安定細胞株を、IL-3を含まない10%FBS含有RPMI-1640培地中で維持した。

【0162】

細胞生存度アッセイおよびIC₅₀推定：以前に記載された(Robichaux et al, 2018)のように、Cell Titer Gloアッセイ(Promega)を用いて細胞生存度を測定した。簡単に説明すると、384ウェルプレート(Greiner Bio-One)に、1ウェルあたり2000~3000個の細胞を技術的に三連で播種した。細胞を、1ウェルあたり40µLの最終体積で7種類の異なる濃度のチロシンキナーゼ阻害剤またはビヒクル単独で処理した。3日後、11µLのCell Titer Gloを各ウェルに添加した。プレートを15分間振とうし、FLUOstar OPTIMAマルチモードマイクロプレートリーダー(BMG LABTECH)を用いて、生物発光を測定した。生物発光の値をDMSO処理細胞に対して正規化し、正規化した値を、可変傾斜を用いる正規化データに対する非線形回帰フィットを用いてGraphPad Prismにてプロットした。IC₅₀値を50%阻害でGraphPad Prismにより計算した。

【0163】

リン酸化HER2および総HER2についてのELISAならびにIC₅₀値との相関関係：上記に記載される親Ba/F3細胞株およびHER2変異を発現するBa/F3細胞株の各々から、タンパク質を回収した。5µg/mlのタンパク質を各ELISAプレートに添加し、リン酸化HER2(Cell signaling、#7968)および総HER2(Cell Signaling、#7310)について製造元の指示書に記載されているようにESLISAを実施した。ELISAにより決定された総HER2に対するp-HER2の比率を得ることによって、相対的p-HER2発現を測定した。相対的p-HER2比率を、上記のように計算したボジオチニブIC₅₀値に対してプロットした。ピアソン相関係数およびp値をGraphPad Prismによって決定した。

【0164】

チロシンキナーゼ阻害剤およびT-DM1：MedChem Expressから購入したEGF816およびピロチニブを除いて、全ての阻害剤をSelleck Chemicalから購入した。全ての阻害剤をDMSOで10mMの濃度にて溶解し、-80で貯蔵した。阻害剤は、2回の凍結融解サイクルの後には廃棄されるように制限した。T-DM1は、M.D. Anderson Cancer Centerの施設内薬局から購入し、再構成した。

【0165】

10

20

30

40

50

分子動力学シミュレーション：HER2変異体のタンパク質構造モデルを、MOEコンピュータプログラム（Chemical Computing Group）を用いて、インシリコ変異をPDB 3PP0 X線構造に導入することによって構築した。NAMDSシミュレーションパッケージを用いて、古典および加速分子動力学シミュレーションを実施した。さらなる詳細を補足情報（Supplemental Information）欄において提供する。

【0166】

ヒト細胞株：MCF10A細胞をATCCから購入し、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、5%ウマ血清（sigma）、20ng/ml EGF、0.5mg/mlヒドロコルチゾン、および10μg/mlインスリンを追加したDMEM/F12培地で培養した。レトロウイルス形質導入によって、安定発現細胞株を作出し、リポフェクタミン2000（Invitrogen）を用いて表1に要約したpBabe-Puroベースのベクター（Addgene and Bioinnovatise）をPhoenix 293T-ampho細胞（Orbigen）にトランスフェクトすることによって、レトロウイルスを作製した。形質導入の2日後、0.5μg/mlピューロマイシン（Invitrogen）をRPMI培地に添加した。14日間の選択の後、細胞を上記のような細胞生存度アッセイで試験した。CW-2細胞はMTA下でRiken細胞株データベースによって提供され、10%FBSおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI中で維持された。

【0167】

インビオ異種移植片試験：CW-2細胞株異種移植片を、50%マトリゲル中の1×10⁶個の細胞を6週齢のメスnu/nuヌードマウスに注入することによって、作出した。腫瘍が350mm³に達したら、マウスを4群：20mg/kgアファチニブ、5mg/kgポジオチニブ、30mg/kgネラチニブ、またはビヒクル対照（dH₂O中に、0.5%メチルセルロール、2%Tween-80）に無作為化した。腫瘍体積を週に3回測定した。マウスは月曜日～金曜日（週に5日）薬物を受けたが、水曜日に投与を始め、最初の3日の投与後に2日の休薬日を与えた。

【0168】

Y772dupYVMA PDXマウスをJax Labsから購入した（Model # TM01446）。HER2 Y772dupYVMAを発現する腫瘍由来の断片を、5～6週齢のメスNSGマウス（Jax Labs #005557）に接種した。マウスを週に3回測定し、腫瘍が200～300mm³の体積に達したら、マウスを以下の4つの処置群に無作為化した：ビヒクル対照（dH₂O中に、0.5%メチルセルロール、0.05%Tween-80）、2.5mg/kgポジオチニブ、10mg/kg T-DM1、または2.5mg/kgポジオチニブと10mg/kg T-DM1との組み合わせ。腫瘍体積および体重を週に3回測定した。2.5mg/kgポジオチニブで処置されるマウスは、薬物を月曜日～金曜日（週に5日）に経口で受けた。10mg/kg T-DM1で処置されるマウスは、無作為化の日にT-DM1の1回の静脈内（IV）投与を受けた。ポジオチニブとT-DM1との組み合わせで処置されるマウスは、T-DM1の1回IV投与を受け、T-DM1の投与の3日後に、週に5日2.5mg/kgポジオチニブを開始した。マウスの体重が10%を上回って低下するか、または20グラム未満に低下した場合には、マウスに投与の休みを与えた。無増悪生存期間は、2回の連続する測定での最良奏効から腫瘍倍加までとして定義された。完全退縮は、腫瘍量の95%を上回る減少として定義され、完全退縮を伴うマウスでは、腫瘍倍加は、3回以上の連続する測定で75mm³を上回ると定義された。実験は、Good Animal Practicesにしたがって、MD Anderson Cancer Center Institutional Animal Care and Use Committee（Houston, TX）の承認を得て、完了した。

【0169】

（表3）安定細胞株を作製するために用いられるベクター

名前	変異	ベンダー
HER2 L755S	c.2264T>C	AddgeneのpBabe-puro HER2 WT (#40978) から Bioinnovatiseによって作製
HER2 D769H	c.2305G>A	AddgeneのpBabe-puro HER2 WT (#40978) から Bioinnovatiseによって作製
HER2 D769N	c.2305G>C	AddgeneのpBabe-puro HER2 WT (#40978) から Bioinnovatiseによって作製
HER2 D769Y	c.2305G>T	AddgeneのpBabe-puro HER2 WT (#40978) から Bioinnovatiseによって作製
HER2 Y772dupYVMA	c.2323_2324insTATGTCATGGCT	Addgeneから購入 (#40982)
HER2 G776del insVC	c.2326_2328insTCT	AddgeneのpBabe-puro HER2 WT (#40978) から Bioinnovatiseによって作製
HER2 G776del insVV	c.2327delinsTTGT	AddgeneのpBabe-puro HER2 WT (#40978) から Bioinnovatiseによって作製
HER2 G776del insLC	c.2326G>TTGT	AddgeneのpBabe-puro HER2 WT (#40978) から Bioinnovatiseによって作製
HER2 V773M	c.2317G>A	AddgeneのpBabe-puro HER2 WT (#40978) から Bioinnovatiseによって作製
HER2 V777L	c.2329G>T	AddgeneのpBabe-puro HER2 WT (#40978) から Bioinnovatiseによって作製
HER2 G778insLPS	c.2332_2333insGGCTCCCCA	AddgeneのpBabe-puro HER2 WT (#40978) から Bioinnovatiseによって作製
HER2 P780insGSP	c.2339_2340insTGGCTCCCC	AddgeneのpBabe-puro HER2 WT (#40978) から Bioinnovatiseによって作製
HER2 L786V	c. 2356C>G	AddgeneのpBabe-puro HER2 WT (#40978) から Bioinnovatiseによって作製
HER2 V842I	c.2524G>A	AddgeneのpBabe-puro HER2 WT (#40978) から Bioinnovatiseによって作製
HER2 L869R	c.2606T>G	AddgeneのpBabe-puro HER2 WT (#40978) から Bioinnovatiseによって作製

10

20

【 0 1 7 0 】

(表4) データベース全体でのがんの種類ごとの患者の総数

30

40

50

がんの種類	総N	HER2変異の 加重 平均頻度	HER2 エクソン20 変異の 加重 平均頻度
胆管	829	5.307%	0.724%
膀胱	3146	8.295%	0.858%
脳	10105	0.350%	0.040%
乳房	29609	3.115%	0.882%
子宮頸部	1301		0.384%
結腸直腸	33302	2.185%	0.287%
早期胃がん	341	3.812%	0.293%
子宮内膜	4962	2.156%	0.181%
食道	4824	2.902%	0.435%
頭頸部	3428	1.083%	0.146%
腎臓	3600	1.164%	0.167%
白血病	2451	0.122%	0.082%
非小細胞肺がん	7859	2.150%	1.525%
黒色腫	7409	0.892%	0.165%
神経内分泌	60085	0.896%	0.121%
卵巣	11762	2.380%	0.188%
膵臓	7988	0.964%	0.100%
腹膜	693	0.937%	0.433%
前立腺	5319	1.154%	0.019%
唾液腺	962	0.303%	0.832%
肉腫	3198	0.534%	0.063%
小細胞	2380		0.336%
小腸	1028	4.730%	1.751%
胃	2969	4.515%	0.370%
甲状腺	2175	0.181%	0.046%

10

20

30

40

【 0 1 7 1 】

(表5) 患者特性および前治療歴の数

50

年齢	性別	前治療の数	変異
57	F	1	Y772_A775dupYVMA
64	F	6	Y772_A775dupYVMA
54	F	1	A775_G776insYVMA
59	F	0	Y772_A775dupYVMA
58	F	3	Y772_A775dupYVMA
60	F	1	G778_P780dupGSP
61	F	3	G778_P780dupGSP
62	F	0	A775_G776insYVMA
55	F	2	G778_P780dupGSP
61	M	4	Y772_A775dupYVMA
63	M	1	Y772_A775dupYVMA
60	F	3	Y772_A775dupYVMA

10

【0172】

FACS: HER2 変異を過剰発現する MCF10A 細胞を 6 ウェルプレート中に一晚播種し、次いで、10 nM ポジオチニブで処理した。24 時間後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、トリプシン処理した。次いで、細胞を PBS 中 0.5% の FBS で再懸濁し、Biolegend (#324404) からの抗 HER2 - FITC 抗体により氷上で 45 分間染色した。細胞を PBS 中 0.5% FBS で 2 回洗浄し、フローサイトメトリーにより分析した。IgG および未染色対照をゲーティングに用いた。

20

【0173】

ウエスタンブロッティング: ウエスタンブロッティングのために、細胞を PBS で洗浄し、RIPA 溶解バッファー (ThermoFisher) およびプロテアーゼ阻害剤カクテル錠 (Roche) で溶解した。タンパク質 (30 ~ 40 µg) を、BioRad から購入したゲルにロードした。BioRad セミドライトランスファーを用い、次いで、pHER2、HER2、pPI3K、PI3K、p-AKT、AKT、p-ERK1/2、および ERK1/2 (1:1000; Cell Signaling) に対する抗体を用いてプローブした。プロットを、ローディング対照としてピンクリンまたは - アクチンに対する抗体 (Sigma-Aldrich) でプローブし、ECL ウエスタンブロッティング基質 (Promega) を用いて曝露した。

30

【0174】

HER2 発現レベルおよび Ba/F3 変異体 IC50 との相関性: タンパク質を Ba/F3 細胞株から回収し、総 HER2 について製造元の指示書により記載されるように ELISA を実施した (Cell Signaling, #7310)。ELISA により測定された相対的発現を、上記のように計算された IC50 値に対してプロットした。ピアソン相関係数および p 値を GraphPad Prism によって決定した。

40

【0175】

臨床試験および CIND 識別番号: 患者は、コンパッショネート使用プロトコール (MD Anderson Cancer Center CIND-18-0014) または臨床試験 NCT03066206 のいずれかでのポジオチニブによる処置に対する書面でのインフォームドコンセントを提出した。プロトコールは MD Anderson Cancer Center 施設内審査委員会およびアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration) の両方により認可を受けている。

【0176】

本明細書において開示され、特許請求される方法の全ては、本開示に照らして、過度の

50

実験を行うことなく、構築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は、好ましい実施形態に関連して説明されてきたが、当業者には、本発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく、本明細書において記載された方法および工程、または方法の工程の順序に変更が適用されてもよいことが、明らかであろう。より具体的には、化学的および生理的に関連する特定の薬剤が本明細書に記載の薬剤の代わりに用いられてもよく、それらが同じまたは同様の結果に到達し得ることは、明らかであろう。当業者には明らかである全てのかかる同様の置換および修飾は、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の精神、範囲、および概念の範囲内であるとみなされる。

【 0 1 7 7 】

参考文献

以下の参考文献は、本明細書に示された参考文献を補足する例示的な手順的なまたは他の詳細を提供するものであり、参照により本明細書に具体的に取り込まれる。

10

20

30

40

50

- Arcila *et al.*, *Clin Cancer Res* 18:4910-8, 2012.
- Arcila *et al.*, *Mol Cancer Ther* 12(2):220-229, 2013.
- Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.
- Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, 2003.
- Bukowski *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.
- Camacho *et al.* *J Clin Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206), 2004. 10
- Cha *et al.* *Int J Cancer* 130:2445-54, 2012.
- Chee *et al.*, *Science*, 274:610-614, 1996.
- Cho *et al.*, *Cancer Res* 73:6770-9, 2013.
- Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.
- Church and Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995 (1988).
- Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397-4401 (1985).
- Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998. 20
- Davies *et al.*, *Plos One* 8, 2013.
- Del Tito *et al.*, *Clinical Chemistry* 44:731-739, 1998.
- Drmanac *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 16:54-58, 1998.
- Drmanac *et al.*, *Science*, 260:1649-1652, 1993.
- Flavell *et al.*, *Cell* 15:25 (1978).
- Fu *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 16:381-384, 1998/
- Geever *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5081 (1981). 30
- Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
- Hellstrand *et al.*, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.
- Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.
- Hong *et al.*, *J Biol Chem* 282:19781-7, 2007.
- Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.
- Hurwitz *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071, 1998. 40

40

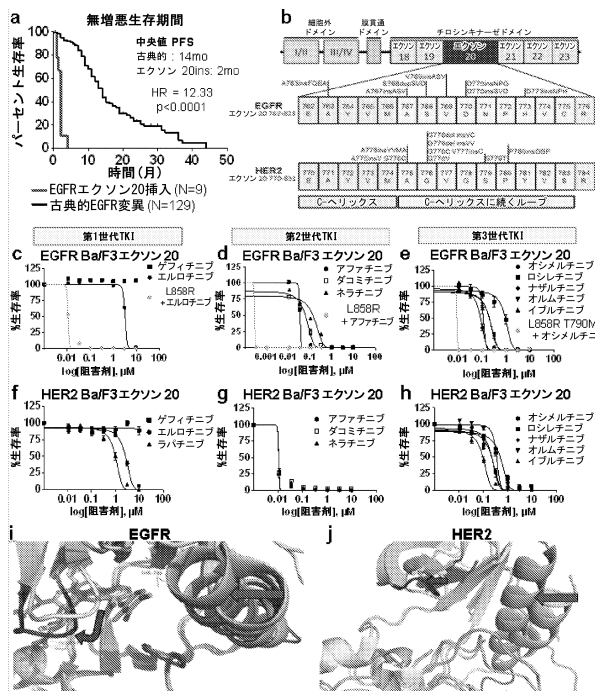
50

- Hyman *et al.*, *Nature* 554:189-94, 2018.
- 国際特許公報番号 WO 99/57318
- 国際特許公報番号 WO1995001994
- 国際特許公報番号 WO1998042752
- 国際特許公報番号 WO2000037504
- 国際特許公報番号 WO2001014424
- 国際特許公報番号 WO2009/101611
- 国際特許公報番号 WO2009/114335 10
- 国際特許公報番号 WO2010/027827
- 国際特許公報番号 WO2011/066342
- 国際特許公報番号 WO2015016718
- 国際特許公報番号 WO 00/37504
- 国際特許公報番号 WO01/14424
- 国際特許公報番号 WO98/42752
- Kosaka *et al.*, *Cancer Res* 2017.
- Leal, M., *Ann NY Acad Sci* 1321, 41-54, 2014. 20
- Lynch *et al.*, *N Engl J Med.* 350(21):2129-2139, 2004.
- Maemondo *et al.*, *N Engl J Med* 362:2380-8, 2010.
- Meric-Bernstam *et al.*, *Clin Cancer Res*, 2018.
- Mitsudomi and Yatabe, *Cancer Sci.* 98(12):1817-1824, 2007.
- Mokyr *et al.* *Cancer Res* 58:5301-5304, 1998.
- Oxnard *et al.*, *J Thorac Oncol.* 8(2):179-184, 2013.
- Paez *et al.*, *Science* 304(5676):1497-1500, 2004.
- Pao *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 101(36):13306-13311, 2004.
- Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012. 30
- Perera *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:474-9, 2009.
- Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
- Raca *et al.*, *Genet Test* 8(4):387-94 (2004).
- Robichaux *et al.*, *Nat Med* 24:638-46, 2018.
- Sanger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467 (1977).
- Sears *et al.*, *Biotechniques*, 13:626-633, 1992.
- Sheffield *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:232-236 (1989).
- Shen *et al.*, *J Recept Signal Transduct Res* 36:89-97, 2016.
- Thress *et al.*, *Nat Med* 21:560-2, 2015. 40

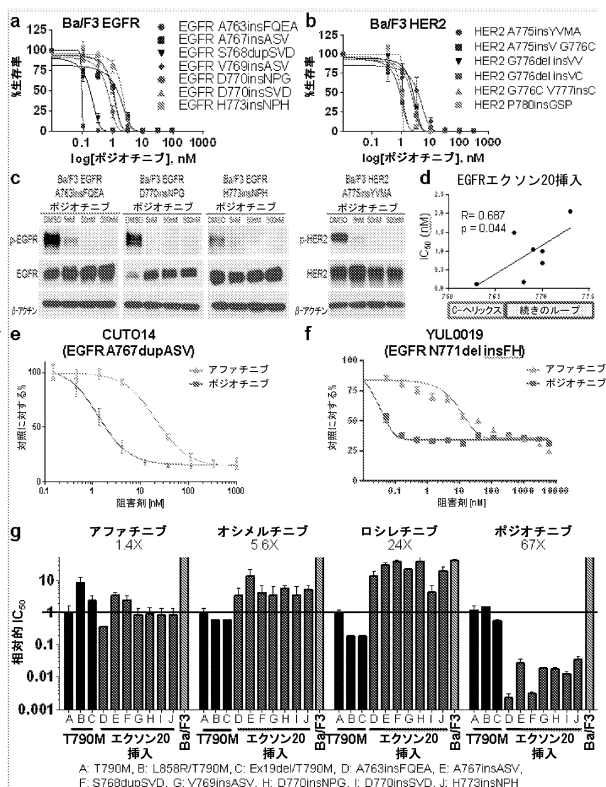
米国特許第 4,870,287 号	
米国特許第 5,288,644 号	
米国特許第 5,739,169 号	
米国特許第 5,760,395 号	
米国特許第 5,801,005 号	
米国特許第 5,824,311 号	
米国特許第 5,830,880 号	10
米国特許第 5,844,905 号	
米国特許第 5,846,945 号	
米国特許第 5,869,245 号	
米国特許第 5,885,796 号	
米国特許第 6,207,156 号	
米国特許第 8,008,449 号	
米国特許第 8,017,114 号	
米国特許第 8,119,129 号	20
米国特許第 8,188,102 号	
米国特許第 8,329,867 号	
米国特許第 8,354,509 号	
米国特許第 8,735,553 号	
米国特許出願公開第 2004/0014095 号	
米国特許出願公開第 2005/0260186 号	
米国特許出願公開第 2006/0104968 号	30
米国特許出願公開第 20110008369 号	
米国特許出願公開第 20130071452 号	
米国特許出願公開第 2014022021 号	
米国特許出願公開第 20140294898 号	
Underhill <i>et al.</i> , <i>Genome Res.</i> 7:996-1005 (1997).	
Yang <i>et al.</i> , <i>Int J Cancer</i> 2016.	
Yasuda <i>et al.</i> , <i>Sci Transl Med</i> 5(216):216ra177, 2013.	
Zimmerman <i>et al.</i> , <i>Methods Mol. Cell. Biol.</i> , 3:39-42, 1992.	40

【図面】

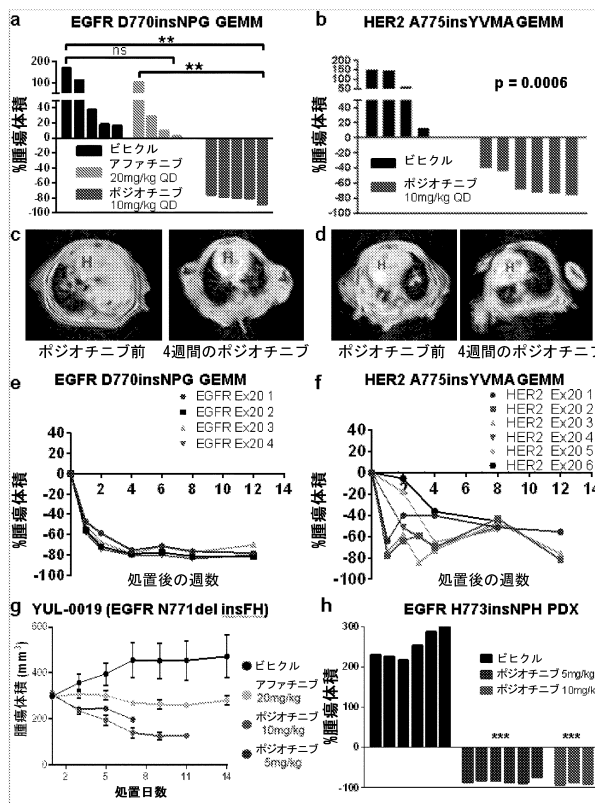
【図1】



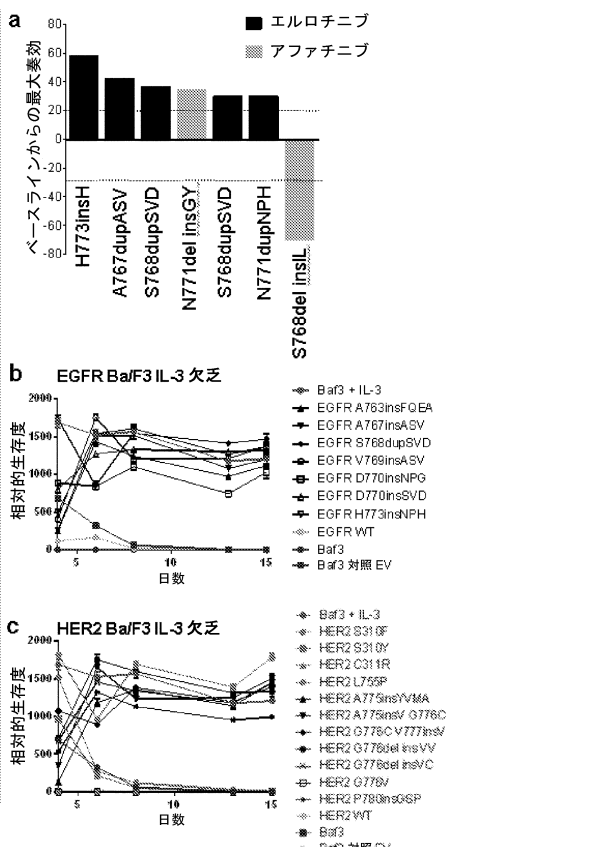
【図2】



【図3】



【図4】



10

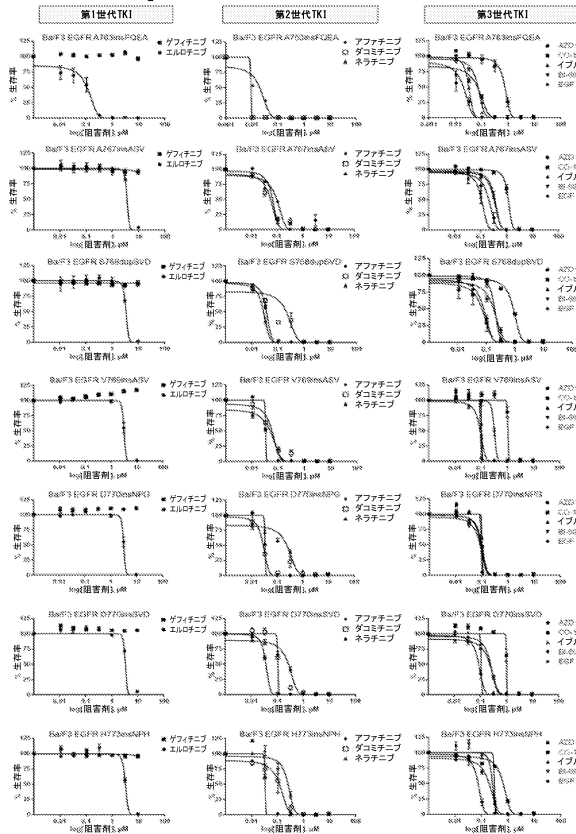
20

30

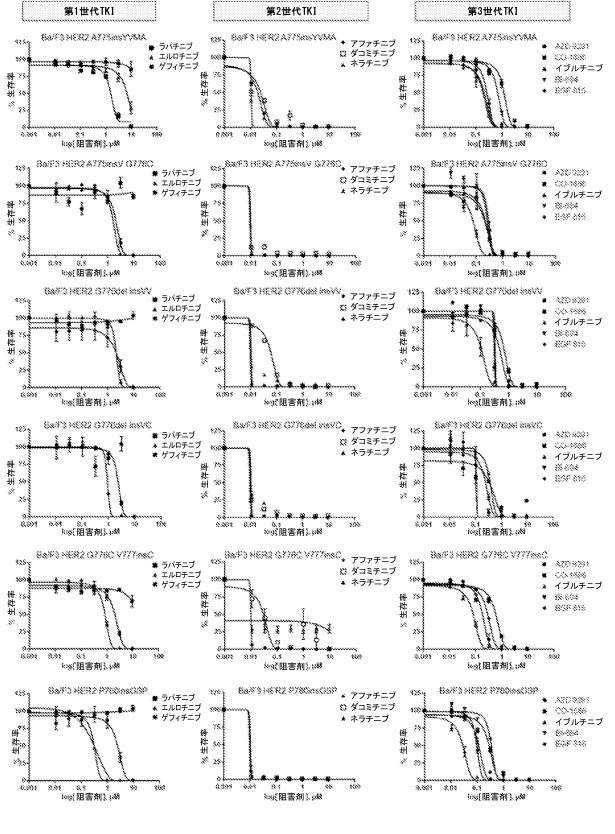
40

50

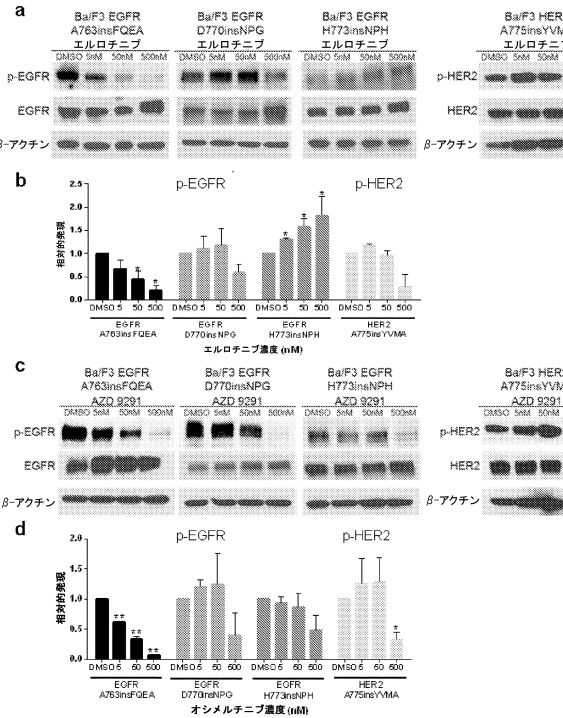
【図5】



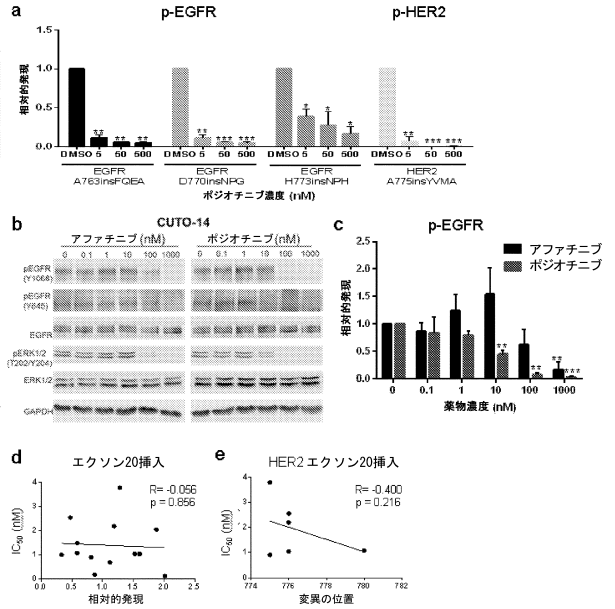
【図6】



【図7】



【図8】



10

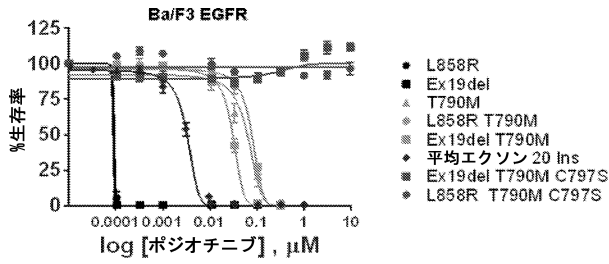
20

30

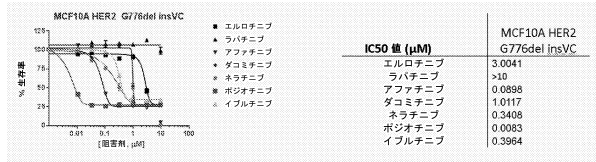
40

50

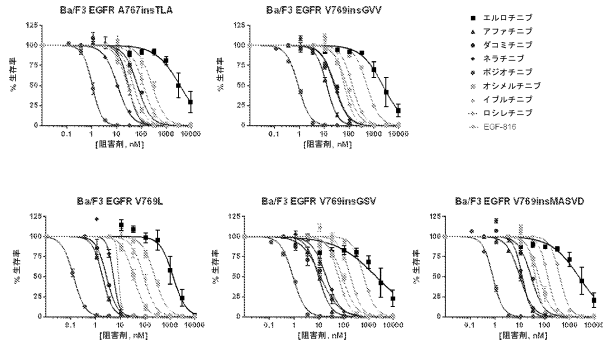
【図 9】



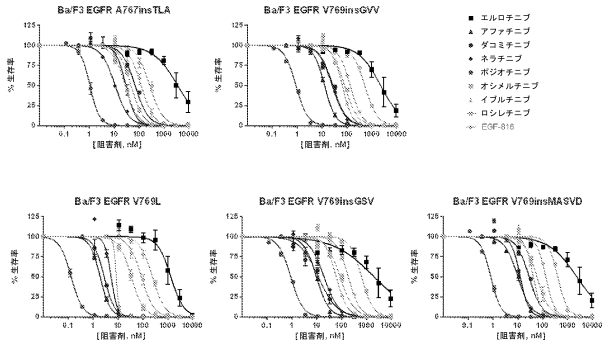
【図 10】



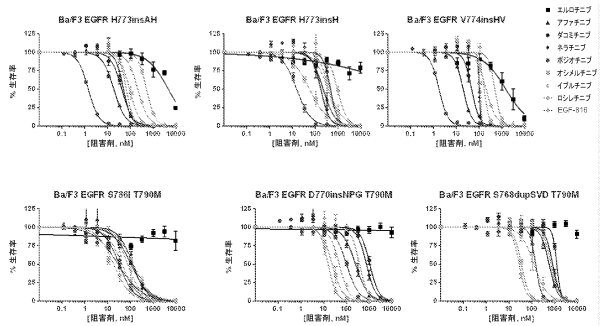
【図 11 A】



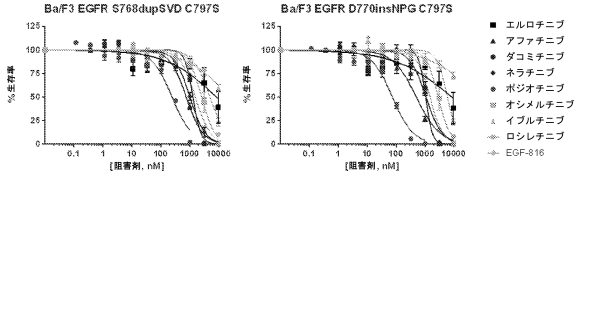
【図 11 B】



【図 11 C】



【図 11 D】



10

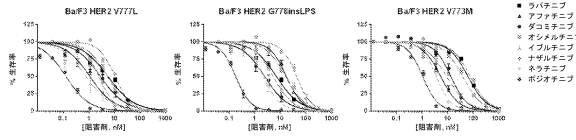
20

30

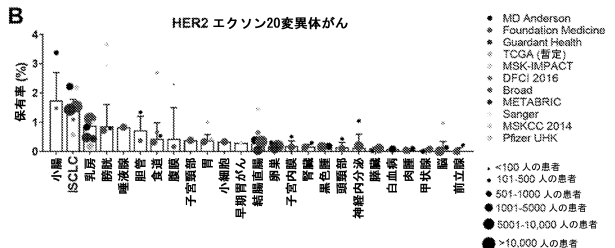
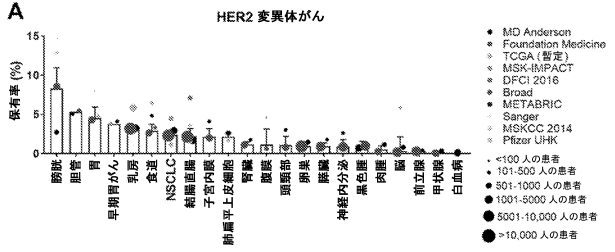
40

50

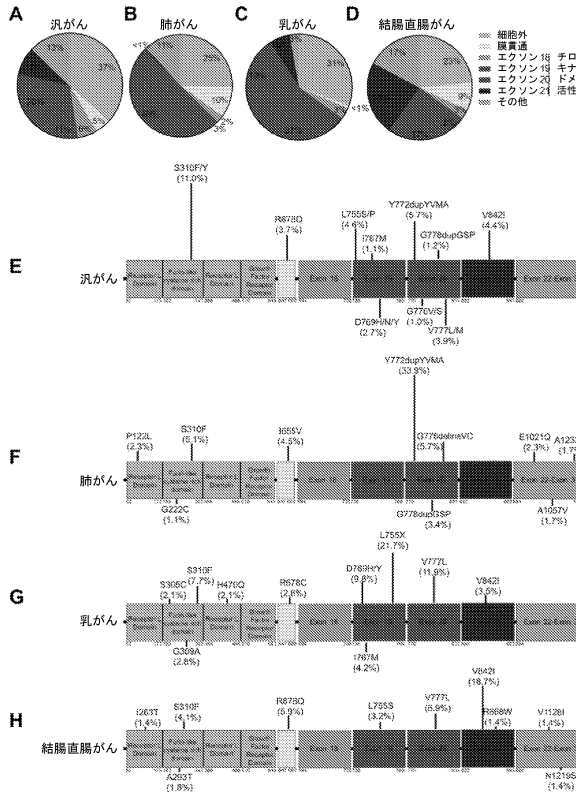
【図12】



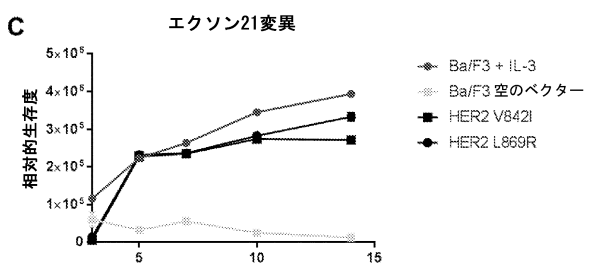
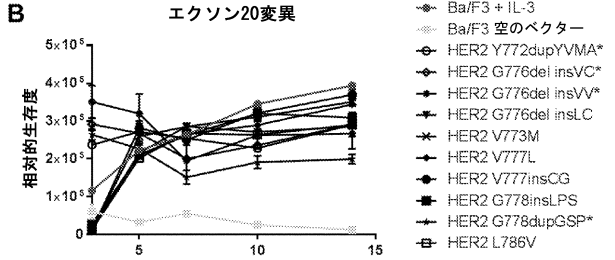
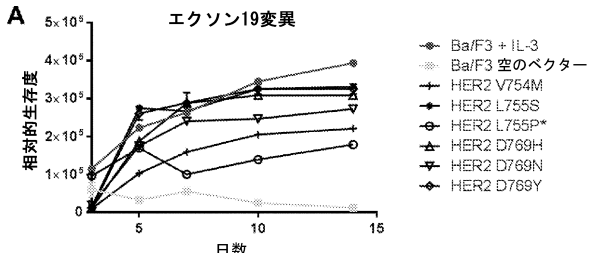
【図13】



【図14】



【図15】



10

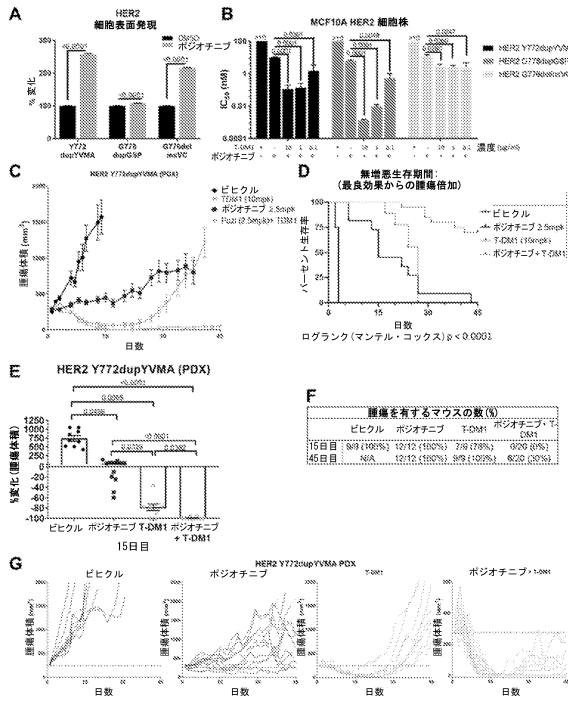
20

30

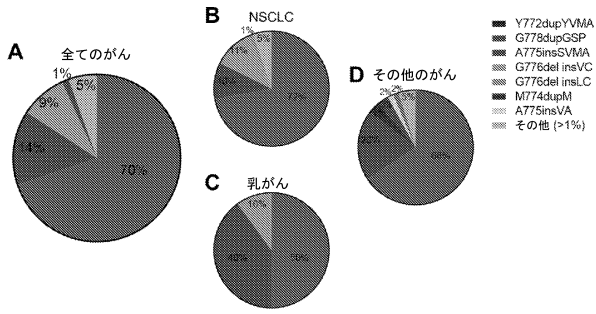
40

50

【 2 0 】

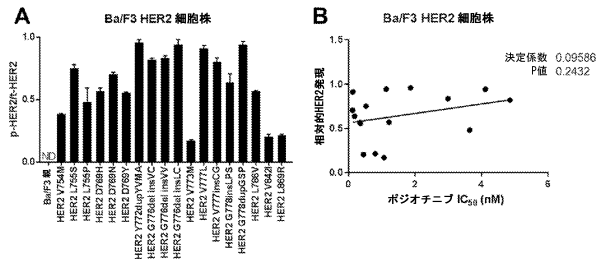


【 2 1 】

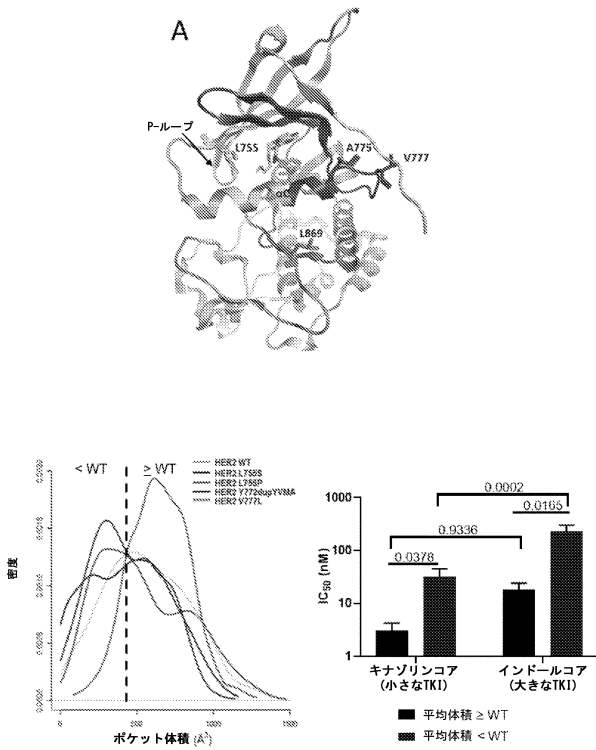


10

【 2 2 】



【 2 3 】



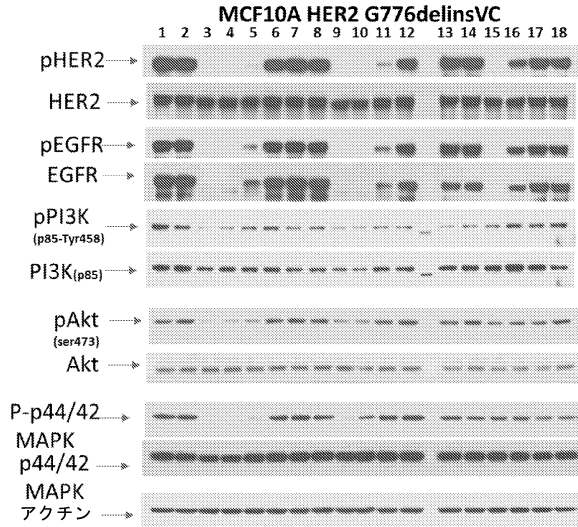
20

30

40

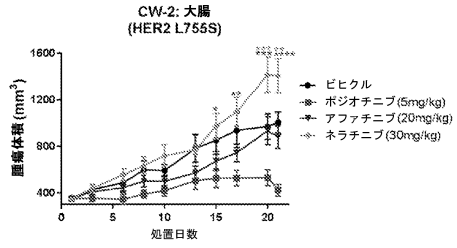
50

【 図 2 4 】



#1-6: なし、DMSO、1000、100、10、および1 nMのポジオチニブ
 #7-12: なし、DMSO、1000、100、10、および1 nMのネラチニブ
 #13-18: なし、DMSO、1000、100、10、および1 nMのラパチニブ

【 図 2 5 】

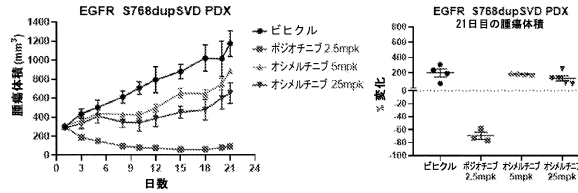


Tukeyの多重比較検定	要約	調整済みP値
10日目		
ビヒクル対ポジオチニブ(5 mg/kg)	ns	0.3888
ビヒクル対アファチニブ(20 mg/kg)	ns	0.6492
ビヒクル対ネラチニブ(30 mg/kg)	ns	0.6826
ポジオチニブ(5 mg/kg)対アファチニブ(20 mg/kg)	ns	0.8898
ポジオチニブ(5 mg/kg)対ネラチニブ(30 mg/kg)	*	0.0393
アファチニブ(20 mg/kg)対ネラチニブ(30 mg/kg)	ns	0.2222
13日目		
ビヒクル対ポジオチニブ(5 mg/kg)	ns	0.057
ビヒクル対アファチニブ(20 mg/kg)	ns	0.2593
ビヒクル対ネラチニブ(30 mg/kg)	ns	0.9986
ポジオチニブ(5 mg/kg)対アファチニブ(20 mg/kg)	ns	0.9298
ポジオチニブ(5 mg/kg)対ネラチニブ(30 mg/kg)	ns	0.0737
アファチニブ(20 mg/kg)対ネラチニブ(30 mg/kg)	ns	0.3041
16日目		
ビヒクル対ポジオチニブ(5 mg/kg)	**	0.0152
ビヒクル対アファチニブ(20 mg/kg)	ns	0.391
ビヒクル対ネラチニブ(30 mg/kg)	ns	0.7291
ポジオチニブ(5 mg/kg)対アファチニブ(20 mg/kg)	ns	0.5209
ポジオチニブ(5 mg/kg)対ネラチニブ(30 mg/kg)	***	0.0503
アファチニブ(20 mg/kg)対ネラチニブ(30 mg/kg)	*	0.0422
17日目		
ビヒクル対ポジオチニブ(5 mg/kg)	**	0.0512
ビヒクル対アファチニブ(20 mg/kg)	ns	0.3218
ビヒクル対ネラチニブ(30 mg/kg)	ns	0.5026
ポジオチニブ(5 mg/kg)対アファチニブ(20 mg/kg)	ns	0.155
ポジオチニブ(5 mg/kg)対ネラチニブ(30 mg/kg)	****	<0.0001
アファチニブ(20 mg/kg)対ネラチニブ(30 mg/kg)	*	0.0116
20日目		
ビヒクル対ポジオチニブ(5 mg/kg)	***	0.0005
ビヒクル対アファチニブ(20 mg/kg)	ns	0.8896
ビヒクル対ネラチニブ(30 mg/kg)	ns	0.0507
ポジオチニブ(5 mg/kg)対アファチニブ(20 mg/kg)	**	0.0015
ポジオチニブ(5 mg/kg)対ネラチニブ(30 mg/kg)	****	<0.0001
アファチニブ(20 mg/kg)対ネラチニブ(30 mg/kg)	***	0.0002
21日目		
ビヒクル対ポジオチニブ(5 mg/kg)	****	<0.0001
ビヒクル対アファチニブ(20 mg/kg)	ns	0.6886
ビヒクル対ネラチニブ(30 mg/kg)	**	0.0228
ポジオチニブ(5 mg/kg)対アファチニブ(20 mg/kg)	***	0.0005
ポジオチニブ(5 mg/kg)対ネラチニブ(30 mg/kg)	****	<0.0001
アファチニブ(20 mg/kg)対ネラチニブ(30 mg/kg)	****	<0.0001

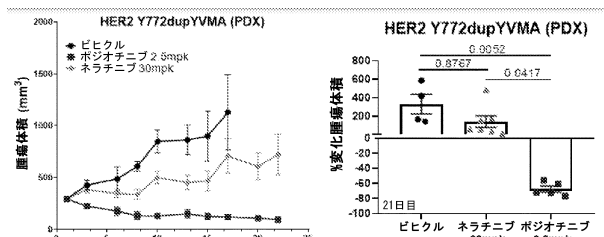
10

20

【 図 2 6 】



【 図 2 7 】

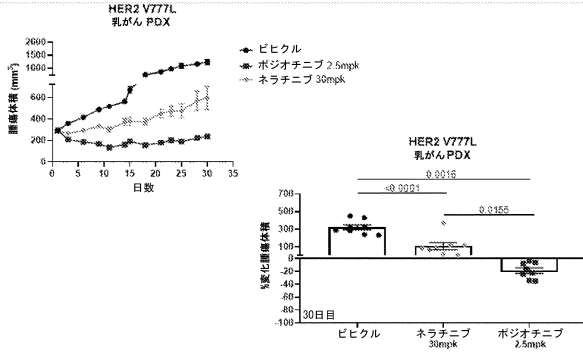


30

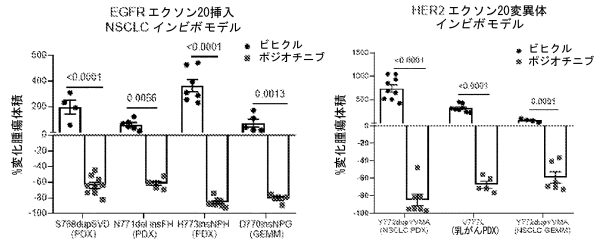
40

50

【図 28】



【図 29】



【配列表】

0007650814000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 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 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 ロビショー ジャクリーン
 アメリカ合衆国 77030 テキサス州 ヒューストン ホルコム ブールバード 1515 ザ ユ
 ニバーシティ オブ テキサス 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 77030 テキサス州 ヒューストン ホルコム ブールバード 1515 ザ ユ
 ニバーシティ オブ テキサス 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 ヘイマツハ ジョン ブイ .
 アメリカ合衆国 77030 テキサス州 ヒューストン ホルコム ブールバード 1515 ザ ユ
 ニバーシティ オブ テキサス エムディー アンダーソン キャンサー センター内
 審査官 新熊 忠信
 (56)参考文献 国際公開第2018/094225 (WO, A1)
 Journal of Thoracic Oncology, 2018年, Vol.13, No.10, pp.1560-1568
 (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
 A61K 31/00 - 33/44
 A61K 45/00 - 45/08
 A61P 35/00
 A61P 43/00
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(ST
 N)