

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-519377

(P2022-519377A)

(43)公表日 令和4年3月23日(2022.3.23)

| (51)国際特許分類        |                                    | F I            |                       | テーマコード (参考)    |                    |
|-------------------|------------------------------------|----------------|-----------------------|----------------|--------------------|
| <b>G 0 1 N</b>    | <b>33/68 (2006.01)</b>             | <b>G 0 1 N</b> | <b>33/68</b>          |                | <b>2 G 0 4 5</b>   |
| <b>A 6 1 K</b>    | <b>39/395 (2006.01)</b>            | <b>A 6 1 K</b> | <b>39/395</b>         | <b>L Z N A</b> | <b>4 B 0 6 3</b>   |
| <b>A 6 1 P</b>    | <b>35/00 (2006.01)</b>             | <b>A 6 1 P</b> | <b>35/00</b>          |                | <b>4 C 0 8 5</b>   |
| <b>C 1 2 Q</b>    | <b>1/68 (2018.01)</b>              | <b>C 1 2 Q</b> | <b>1/68</b>           |                | <b>4 H 0 4 5</b>   |
| <b>C 0 7 K</b>    | <b>16/30 (2006.01)</b>             | <b>C 0 7 K</b> | <b>16/30</b>          |                |                    |
|                   |                                    | 審査請求           | 未請求                   | 予備審査請求         | 未請求 (全156頁) 最終頁に続く |
| (21)出願番号          | 特願2021-546223(P2021-546223)        | (71)出願人        | 316012337             |                |                    |
| (86)(22)出願日       | 令和2年2月7日(2020.2.7)                 |                | メディシナ セラピューティクス インコ   |                |                    |
| (85)翻訳文提出日        | 令和3年10月1日(2021.10.1)               |                | ーポレイテッド               |                |                    |
| (86)国際出願番号        | PCT/CA2020/000013                  |                | カナダ国 エム4ダブリュー 3イー2    |                |                    |
| (87)国際公開番号        | WO2020/160639                      |                | オンタリオ トロント プロアー ストリ   |                |                    |
| (87)国際公開日         | 令和2年8月13日(2020.8.13)               |                | ート ウェスト 2 スイート 7 0 0  |                |                    |
| (31)優先権主張番号       | 62/802,652                         | (74)代理人        | 110000796             |                |                    |
| (32)優先日           | 平成31年2月7日(2019.2.7)                |                | 特許業務法人三枝国際特許事務所       |                |                    |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 |                                    | (72)発明者        | マーチャント ファハル           |                |                    |
|                   | 米国(US)                             |                | カナダ国 エム4エス 3イー2 オンタ   |                |                    |
| (81)指定国・地域        | AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA      |                | リオ トロント ヤング ストリート 2 0 |                |                    |
|                   | ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(   |                | 0-1920 シー/オー メディシナ    |                |                    |
|                   | AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A   |                | セラピューティクス インコーポレイテ    |                |                    |
|                   | T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR |                | ッド                    |                |                    |
|                   | ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, | (72)発明者        | マーチャント ローゼミナ          |                |                    |
|                   | 最終頁に続く                             |                | 最終頁に続く                |                |                    |

(54)【発明の名称】 がんのバイオマーカーとしての I L - 4 R

(57)【要約】

治療のための特許集団を決定する、疾患治療有効性を予測する、ならびに様々ながん、特に膠芽腫および再発性膠芽腫における疾患治療の予後を予測するためのバイオマーカーとして、ヒトインターロイキン-4受容体 (I L - 4) を使用するための方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

IL-4 標的化カーゴタンパク質により治療するためのがん患者集団を決定するための方法であって、前記方法が、

- a) 前記がん患者におけるがんまたは腫瘍から得られた生体試料中の IL-4 受容体 (IL-4 R) 発現のレベルを測定することと、
- b) 前記生体試料中の IL-4 R 発現の前記レベルの測定値を定量化することと、
- c) IL-4 R 発現の前記レベルが中程度または高い場合に、前記がん患者を IL-4 標的化カーゴタンパク質により治療することと、を含む、方法。

## 【請求項 2】

IL-4 標的化カーゴタンパク質による治療有効性を予測または決定するための方法であって、前記方法が、

- a) 前記がん患者におけるがんまたは腫瘍から得られた生体中の IL-4 受容体 (IL-4 R) 発現のレベルを測定することと、
- b) 生体試料中の IL-4 R 発現の前記レベルの測定値を定量化することと、
- c) IL-4 R の前記レベルを治療の前記有効性と相関させることであって、中程度または高レベルの IL-4 R 発現が、IL-4 標的化カーゴタンパク質による治療の治療有効性を示す、相関させることと、を含む、方法。

## 【請求項 3】

がんを有する患者の治療レジメンを変更するための方法であって、前記方法が、

- a) 前記がん患者におけるがんまたは腫瘍から得られた生体中の IL-4 受容体 (IL-4 R) 発現のレベルを測定することと、
- b) 生体試料中の IL-4 R 発現の前記レベルの測定値を定量化することであって、中程度または高レベルの IL-4 R 発現が、治療有効性を示す、定量化することと、
- c) IL-4 R 発現の前記レベルを治療の前記有効性と相関させることであって、高レベルの IL-4 R 発現が、IL-4 標的化カーゴタンパク質による治療についての前記治療レジメンを変更することを示す、相関させることと、
- d) 中程度または高レベルの IL-4 R 発現が測定される場合、IL-4 標的化カーゴタンパク質を含むように前記治療レジメンを変更することと、を含む、方法。

## 【請求項 4】

がん疾患の予後および／または進行を予測または決定するための方法であって、前記方法が、

- a) がん患者における腫瘍からの生体試料中の IL-4 受容体 (IL-4 R) 発現のレベルを測定することと、
- b) 前記生体試料中の IL-4 R 発現の前記レベルの測定値を定量化することであって、中程度または高レベルの IL-4 R 発現が、前記疾患の予後および／または進行を示す、定量化することと、
- c) IL-4 R 発現の前記レベルを前記疾患の予後および／または進行と相関させることであって、中程度または高レベルの IL-4 R 発現が、重度の疾患の予後および／または進行を示す、相関させることと、を含む、方法。

## 【請求項 5】

高レベルの IL-4 R 発現が測定される場合、前記方法が、前記がん患者を IL-4 標的化カーゴタンパク質により治療することをさらに含む、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

IL-4 R 発現の前記レベルが、高レベルの IL-4 R 発現である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

高レベルの IL-4 R 発現が、2 + 以上のパーセントスコアによって示される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

高レベルの I L - 4 R 発現が、3 + 以上のパーセントスコアによって示される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

中程度レベルの I L - 4 R 発現が、1 以上であるが 2 未満のパーセントスコアによって示される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

中程度レベルの I L - 4 R 発現が、76 ~ 150 の H スコアによって示される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

高レベルの I L - 4 R 発現が、151 ~ 225 の H スコアによって示される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

高レベルの I L - 4 R 発現が、226 ~ 300 の H スコアによって示される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

I L - 4 R 発現の前記レベルが、I L - 4 R α 発現のレベルを測定することによって測定される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

I L - 4 R 発現の前記レベルが、2 型 I L - 4 R ( I L - 4 R α および I L 13 R α 1 を含む、I I 型 I L - R 4 ) 発現のレベルである、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

I L - 4 R 発現の前記レベルが、I L - 4 R α 発現を含む、I L - 4 R の免疫組織化学的 ( I H C ) 染色を使用して測定される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記がんまたは腫瘍が、前立腺がん、卵巣がん、乳がん、子宮内膜がん、多発性骨髄腫、黒色腫、リンパ腫、小細胞肺癌を含む肺がん、腎臓がん、肝臓がん、結腸がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、および脳がん ( C N S 腫瘍を含む ) からなる群から選択される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記 C N S 腫瘍が、神経膠腫、膠芽腫 ( 多形性膠芽腫、G B M、および難治性多形性膠芽腫、r G B M を含む )、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫 ( c r a n i o p h a r y o g i o m a )、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、希突起膠細胞、髄膜腫 ( m e n a n g i o m a )、髄膜腫 ( m e n i n g i o m a )、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、髄芽腫、および成人下垂体腺腫からなる群から選択される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記 C N S 腫瘍が、膠芽腫である、請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 C N S 腫瘍が、再発性または難治性膠芽腫 ( 例えば、r G B M を含む ) である、請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記対象が、O 6 - メチルグアニン - メチルトランスフェラーゼ ( M G M T ) 陽性または陰性 C N S 腫瘍を有する、請求項 16 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記対象が、フューリン陽性 C N S 腫瘍を有する、請求項 16 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記 I L - 4 標的化カーゴタンパク質が、1 つ以上のカーゴ部分を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 23】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、毒素を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 24】

前記毒素が、細菌毒素、動物毒素、または植物毒素を含む、請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 25】

前記毒素が、孔形成毒素を含む、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 26】

前記孔形成毒素が、アエロリジンまたはプロアエロリジンを含む、請求項 25 に記載の方法。

10

## 【請求項 27】

前記植物毒素が、ボウガニンまたはリシンを含む、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 28】

前記細菌毒素が、Pseudomonas 外毒素、コレラ毒素、またはジフテリア毒素からなる群から選択される毒素を含む、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、BAX、BAD、BAT、BAK、BIK、BOK、BID、BIM、BMF、および BOK からなる群から選択される BCL-2 ファミリーのアポトーシス促進性メンバーを含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 30】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、MDNA55（配列番号 65）またはその誘導体もしくはバリエーションを含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 31】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、MDNA55 である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 32】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、標的化部分として IL-4 R 抗体を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 33】

前記 IL-4 R 抗体が、ヒト化抗体である、請求項 32 に記載の方法。

30

## 【請求項 34】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、融合タンパク質を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 35】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、腫瘍内に投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 36】

前記腫瘍内投与が、頭蓋内投与を含む、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 37】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、人工脳脊髄液（CSF）溶液およびアルブミン中の製剤であり、前記製剤が、それを必要とする対象に代理トレーサーと共投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 38】

前記代理トレーサーが、磁気共鳴画像法（MRI）造影剤である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 39】

前記代理トレーサーが、ガドリニウム結合トレーサーである、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 40】

前記代理トレーサーが、ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸（Gd-DTPA）

50

およびガドリニウム結合アルブミン（Gd-アルブミン）からなる群から選択される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記アルブミンが、ヒト血清アルブミンである、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記人工 CSF 溶液が、Elliott's B（登録商標）溶液である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、頭蓋内カテーテルを介して投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、対流強化送達（CED）によって投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、対流強化送達（CED）により、単回用量として投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、単回用量として投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、約  $90\text{ }\mu\text{g}$ （ $60\text{ mL}$  中  $1.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、約  $240\text{ }\mu\text{g}$ （ $40\text{ mL}$  中  $6\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、または約  $300\text{ }\mu\text{g}$ （ $100\text{ mL}$  中  $3\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の単回用量として投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、 $60\text{ mL}$  中  $1.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  の投与量で投与される、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、 $40\text{ mL}$  中  $6\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  の投与量で投与される、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、 $100\text{ mL}$  中  $3\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  の投与量で投与される、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、約  $1.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  ～ 約  $3\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  の単回用量として投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、または 8 日にわたって単回用量として投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、1、2、3、4、または 5 回の注入として投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記 IL-4 標的化カーゴタンパク質が、先行請求項のいずれか一項に従って投与され、次いで、約 1 日～約 8 日間投与を中止し、任意選択で 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、または 8 日投与を中止した後、先行請求項のいずれか一項に従って投与し、この投与および投与の中止のパターンを、前記 CNS 腫瘍の治療に必要な期間繰り返す、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

10

20

30

40

50

前記 I L - 4 標的化カーゴタンパク質が、1 ～ 3 つのカテーテルを含む 1 つ以上の頭蓋内カテーテルを介して投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法

【請求項 5 6】

前記 I L - 4 標的化カーゴタンパク質が、約  $5 \mu\text{L} / \text{分} / \text{カテーテル}$  ～ 約  $20 \mu\text{L} / \text{分} / \text{カテーテル}$  の流速または約  $15 \mu\text{L} / \text{分} / \text{カテーテル}$  の流速で、前記カテーテルを通して投与される、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記 I L - 4 標的化カーゴタンパク質が、 $1.5 \mu\text{g} / \text{mL}$  の濃度および約  $15 \mu\text{L} / \text{分} / \text{カテーテル}$  の流速で、前記カテーテルを通して投与される、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

ステロイドが、I L - 4 標的化カーゴタンパク質と組み合わせて使用される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記ステロイドが、 $4 \text{mg} / \text{日}$  以下で投与される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

先行請求項のいずれか一項に記載される I L - 4 標的化カーゴタンパク質を含むキットであって、前記キットが、I L - 4 R 抗体、免疫組織化学 (I H C) ベースのアッセイで前記 I L - 4 R 抗体を使用するための指示書、および前記パーセントスコアまたは前記 H スコアを決定するための指示書を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019 年 2 月 7 日に提出された米国仮出願第 62 / 802, 652 号に対する優先権を主張し、当該米国仮出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

原発性 G B の第一選択治療には、神経学的保存と一致する可能な限りのバルク腫瘍の外科的切除、その後における、新たに診断された G B の標準治療として確立された S t u p p プロトコルが含まれる (S t u p p e t a l . , 2005)。S t u p p レジメンでは、患者は、放射線療法と同時にテモゾロミド (T e m o d a r (登録商標)) を受け、次いで、放射線療法の完了後に再び受ける。テモゾロミドは、放射線療法との併用で新たに診断される G B に対して承認され、その後、維持療法として承認される (新薬承認申請第 021029 号、承認日: 1999 年 8 月 11 日)。

【0003】

新たに診断された G B 患者はまた、ニトロソ尿素レジメンまたはカルムスチンウエハー (G l i a d e l (登録商標)) の挿入などの代替化学療法により治療することができる。G l i a d e l (登録商標) は、カルムスチンで飽和した生分解性ポリマーウエハーである。細胞毒性治療に通常関連する全身毒性は、頭蓋内に局所的に移植することによって軽減され得る (W e s t p h a l e t a l . , 2006)。G l i a d e l (登録商標) は、新たに診断された高悪性度の悪性神経膠腫について外科手術および放射線療法の補助として、および再発性 G B について外科手術の補助として適応される (新薬承認申請第 020637 号、承認日: 2003 年 2 月 25 日)。腫瘍を完全に切除した後、術後の空洞に移植される。G l i a d e l は、約 4 ～ 8 週間のわずかな生存期間の延長をもたらす (W e s t p h a l e t a l . , 2003)。

【0004】

現在の治療パラダイムを使用すると、ほとんどの G B 患者は、標準的な一次治療後に腫瘍の再発 / 進行を経験する。再発性 G B を有する患者のための治療選択肢は非常に限られており、転帰は一般的に満足いくものではない。具体的には、再発性または進行性 G B の化学療法レジメンは成功しておらず、利益なしに毒性を生じさせる (W e l l e r

10

20

30

40

50

et al., 2013)。これは主に、組織特異性の欠如およびその結果としての正常組織への毒性によるものであり、その結果、狭い治療指数となる。全生存期間が悲観的なままであるため、再発性GBの治療には、より高い腫瘍特異性、より強力な細胞毒性メカニズム、および新しい送達技術を有する新しい抗がん様式が必要である。

#### 【0005】

再発性または進行性GBの患者のための治療選択肢は非常に限られており、長期間の陽性転帰はまれである。再発性GBの治療薬として現在米国で承認されている薬剤は、上記の第一選択治療薬であるGliadel（登録商標）およびベバシズマブ（Avastin（登録商標））である。腫瘍の外科的切除後にGliadelインプラントを腫瘍腔に直接配置する第3相試験では、再発性GB治療を受けた対象の56%が6ヶ月生存し、生存期間の中央値は26週間であった（Brem et al., 1995）。しかしながら、再発性GBを有する患者の大多数は追加の外科手術の候補者ではないため、この患者集団に対する大きな満たされていない必要性が生じている（Weller et al., 2013）。

10

#### 【0006】

Avastin（登録商標）は、血管内皮増殖因子受容体（VEGF）を標的化する抗血管新生抗体である。これは、再発性GBを有する成人患者に対する単一の薬剤として適応されているが（新薬承認申請第125085号、承認日：2004年2月26日）、疾患関連の症状または生存期間を改善することは示されていない。Avastin（登録商標）は、客観的奏効率（ORR26%）のエンドポイントに基づいて承認された（Genentech 2016、Cohen et al., 2009、Freidman et al., 2009）。2013年に、Avastin（登録商標）は新たに診断されたGB患者を対象とした確認試験を完了し、全生存期間の主要エンドポイントを満たさなかった。この試験の結果に基づいて、Genentechは、新たに診断されたGBについて欧州連合（EU）において承認を受けなかった。しかしながら、Avastin（登録商標）は米国および日本で再発性GBについて適応されている。それ以来、いくつかの研究で、有効性がAvastin（登録商標）または評価される併用アプローチと比較されている。

20

#### 【0007】

MDNA55は、触媒ドメインである切断型形態の強力な細菌毒素－Pseudomonas aeruginosa外毒素（PE）Aに融合した、結合ドメインであるインターロイキン－4（cpl-4）の生物学的循環置換（circularly permuted）形態からなる標的化免疫毒素である（Kreitman et al., 1994）である。MDNA55は、細胞表面上に発現しているインターロイキン4受容体（IL-4R）に結合し、複合体全体がエンドサイトーシスを受ける。がん細胞のエンドソームに高濃度で見られるフーリン様プロテアーゼによる切断および活性化後に、短縮型PEの触媒ドメインは、サイトゾルに放出され、該サイトゾルにおいて、伸長因子－2のADPリボシル化、およびカスパーゼ活性化によるアポトーシスの誘導により、細胞死を誘導する（Wedekind et al., 2001）。IL-4R標的を発現しない細胞は、MDNA55に結合せず、したがって、PE媒介性の細胞死を享受しない。PE部分は、触媒ドメインを保持するが、細胞結合ドメインは保持しないように操作された。

30

40

#### 【0008】

膠芽腫は、急速に進行し、ほぼ普遍的に致命的ながんであり、患者に壊滅的な打撃を与える。悪性度が高い（aggressive）この種類の脳腫瘍は、多くの場合に認知機能および精神運動機能の急速な悪化という形態で、大きな罹患率と関連しており、第一選択（front-line）治療が失敗した後の1年生存率は約25%である（Lamborn et al., 2008）。現在、有効な治療法はない。MDNA55は潜在的な治療の進歩を示す。MDNA55は、GBを有する患者の生存期間を延長する可能性のある、合理的に設計された標的化治療である。MDNA55の投与および注入に関連する有害事象は、深刻ではあるが、疾患の進行自体の影響と類似している。

50

## 【0009】

MDNA55は、腫瘍細胞が正常細胞よりも薬剤の毒性効果に感受性であることによる標的治療アプローチを提供する新しい治療薬である。標的であるIL-4Rは、非常に様々なヒトのがん腫で頻繁かつ強力に発現するため、がん治療薬の開発に理想的であるが十分に活用されていない標的である。IL-4Rの発現レベルは、健常かつ正常な細胞の表面では低い、がん細胞では数倍に増加する。再発性GB生検を含む、成人および小児の中枢神経系(CNS)腫瘍からのがん生検および剖検試料の大部分は、IL-4Rを過剰発現することが示されている。正常な成人および小児の脳組織では、IL-4Rの発現はほとんどまたは全くない(Joshi, et al., 2001; 参考文献の表2を参照されたい)。IL-4Rのこの差次的発現は、MDNA55に広い治療濃度域を提供する(IC50データについては参考文献の表4を参照されたい)。例えばMDNA55を含むIL-4標的化カーゴタンパク質は、IL-4Rを過剰発現する再発性GBおよび他のCNS腫瘍を含む、IL-4Rを過剰発現する腫瘍の治療に使用されることが見出されている。IL-4R標的を発現しない細胞は、MDNA55に結合せず、したがって、PE媒介性の効果を受けない。

10

## 【0010】

GBMの第3相試験に失敗した薬剤リストの拡大は、薬剤の作用機序に特異的に関連するバイオマーカーを同定する必要性を強調している。特に、再発性GBM(rGBM)の場合、脳腫瘍の最も一般的で均一に致命的な形態。GBM薬剤開発者にとっての重要な課題は、薬剤候補による治療に反応する可能性が最も高い特定の患者サブタイプを同定し、それによって臨床的成功の可能性を高めることである。例えば、研究により、MGMTプロモーターのメチル化を欠如するGBM患者は、テモゾロミド(TMZ)治療にも反応せず、予後が悪いことが示されている(Hegi ME, Dierens AC, Gorlia T, et al. N Engl J Med. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. 2005 Mar 10; 352(10)). 報告によると、これは脳腫瘍における最初の予測バイオマーカーであり、TMZおよび放射線療法による治療から利益を得る患者の選択を可能にする可能性がある。しかしながら、現在、MGMTプロモーターの過剰メチル化は、GBMを有する患者の治療戦略を誘導するものでない。GBMの予後に影響を与え得る別のバイオマーカーは、EGFRの変異型である上皮成長因子受容体バリエーションII(EGFRvII)である。GBM患者の約25~33%が、この遺伝子バリエーションを腫瘍に有していると考えられている(Johnson H, Del Rosario AM, Bryson BD, et al. Molecular characterization of EGFR and EGFRvIII signaling networks in human glioblastoma tumor xenografts. Mol Cell Proteomics. 2012 Dec; 11(12): 1724-40)。EGFR増幅の存在下でのEGFRvIIIの過剰発現は、腫瘍形成能の増強に重要な役割を果たし、GBM患者における低い生存率の強力な指標であることが示されている(Ushio Y, Tada K, Shiraiishi S, et al., Correlation of molecular genetic analysis of p53, MDM2, p16, PTEN, and EGFR and survival of patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma. Front Biosci. 2003 May 1; 8:e281-8)。このバリエーションは、新しい治療の有望な標的化して調べられており、その典型例は、Celldex Therapeuticsのがんワクチンであるリンドペピムト(rindopepimut)であり、現在、新たに診断されたGBMの第3相試験および再発性GBMの第2相試験で調べられている。

20

30

40

## 【0011】

同様に、GBMにおけるIL-4Rαの過剰発現(Husain SR, et al.,

50

Cancer Res. 1998; 58: 3649-3653、Joshi BH, et al. Cancer Res. 2001; 61: 8058-8061、Puri RK, et al., Cancer Res., 56: 5631-5637, 1999、および Puri RK, et al. Int J Cancer. 1994 Aug 15; 58 (4): 574-81) および神経膠腫微小環境におけるそのアップレギュレーション (Kohanbash G., et al. Cancer Res. 2013; 73 (21): 6413-23)。Burtらは、IL-4R $\alpha$ がヒト悪性胸膜中皮腫 (MPM) における腫瘍細胞によってインサイチューで高度に発現されることを見出し、IL-4R $\alpha$ の発現が高い中皮腫腫瘍はより臨床的に悪性度が高く、外科手術切除後の転帰が悪いことを観察した (Burt BM, et al., Clin. Cancer Res. 2012 Mar 15; 18 (6): 1568-77)。MDNA55のIL-4R標的は、膠芽腫 (「GBM」) を含む中枢神経系 (「CNS」) 腫瘍についての理想的であるが十分に活用されていない薬剤標的である。再発性GBMを含む成人および小児CNS腫瘍由来のがん生検試料の大部分はIL-4Rを過剰発現するが、正常な成人および小児の脳組織ではIL-4Rの発現はほとんどまたは全くない。4 IL-4Rの発現は、マウスモデルの腫瘍形成能の増加およびGBM2, 3を有する患者の臨床研究における低い長期的生存期間と相関している。さらに、IL-4Rは、骨髄由来サプレッサー細胞および腫瘍関連マクロファージによって発現されることが知られており、これらは、がんを死滅させる免疫細胞から腫瘍を隠す免疫抑制腫瘍微小環境 (TME) の重要な構成要素であることが知られている。(Roth F, De La Fuente AC, Vella J L, et al. Aptamer-mediated blockade of IL-4R $\alpha$  triggers apoptosis of MDSCs and limits tumor progression. Cancer Res. 2012; 72 (6): 1373-83、およびBankaitis KV and Fingleton B. Targeting IL-4/IL-4R for the treatment of epithelial cancer metastasis. Clin Exp Metastasis. 2015 Dec; 32 (8): 847-56。)

10

20

30

40

50

#### 【0012】

現在まで、これらの観察結果の予測的および予後的価値は、GBMなどのがんでは未だに決定されていない。IL-4R陽性患者がMDNA55 (または他のIL-4標的化カーゴタンパク質) に対してより良好に反応するかどうかを確認し、本発明で提供されるように、反応する可能性が非常に高い特定の患者サブタイプを特定することにより、これらの未解決の問題に対処するのに役立ち、患者の臨床転帰をさらなる改善をもたらす得る。全体として、これらのIL-4R発現腫瘍を治療するためのさらなる有効な方法に対する当該技術分野における必要性が未だ存在し、本発明によって記載される治療レジメンを決定および／または予測する際の予測および／または診断マーカーとしてのIL-4R発現のレベルの使用は、この必要性を満たす。

#### 【発明の概要】

#### 【0013】

本発明は、がんの治療におけるバイオマーカーおよび／またはコンパニオン診断薬としてIL-4R発現レベルを使用するための方法を提供する。

#### 【0014】

いくつかの実施形態では、本発明は、IL-4標的化カーゴタンパク質により治療するためのがん患者集団を決定するための方法であって、

- a) がん患者におけるがんまたは腫瘍から得られた生体試料中のIL-4受容体 (IL-4R) 発現のレベルを測定することと、
- b) 生体試料中のIL-4R発現のレベルの測定値を定量化することと、
- c) IL-4R発現のレベルが中程度または高い場合に、がん患者をIL-4標的化カーゴタンパク質により治療することと、を含む、方法を提供する。

#### 【0015】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＩＬ－４標的化カーゴタンパク質による治療有効性を予測または決定するための方法であって、

- a) がん患者におけるがんまたは腫瘍から得られた生体試料中のＩＬ－４受容体（ＩＬ－４Ｒ）発現のレベルを測定することと、
- b) 生体試料中のＩＬ－４Ｒ発現のレベルの測定値を定量化することと、
- c) ＩＬ－４Ｒのレベルを治療有効性と相関させることであって、中程度または高レベルのＩＬ－４Ｒ発現が、ＩＬ－４標的化カーゴタンパク質による治療の治療有効性を示す、相関させることと、を含む、方法を提供する。

【００１６】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者の治療レジメンを変更するための方法であって、

- a) がん患者におけるがんまたは腫瘍から得られた生体試料中のＩＬ－４受容体（ＩＬ－４Ｒ）発現のレベルを測定することと、
- b) 生体試料中のＩＬ－４Ｒ発現のレベルの測定値を定量化することであって、中程度または高レベルのＩＬ－４Ｒ発現は、治療有効性を示す、定量化することと、
- c) ＩＬ－４Ｒ発現のレベルを治療有効性と相関させることであって、高レベルのＩＬ－４Ｒ発現が、ＩＬ－４標的化カーゴタンパク質による治療のための治療レジメンを変更することを示す、相関させることと、
- d) 中程度または高レベルのＩＬ－４Ｒ発現が測定される場合に、ＩＬ－４標的化カーゴタンパク質を含むように治療レジメンを変更することと、を含む、方法を提供する。

【００１７】

いくつかの実施形態では、本発明は、がん疾患の予後および／または進行を予測または決定するための方法であって、

- a) がん患者における腫瘍からの生体試料中のＩＬ－４受容体（ＩＬ－４Ｒ）発現のレベルを測定することと、
- b) 生体試料中のＩＬ－４Ｒ発現のレベルの測定値を定量化することであって、中程度または高レベルのＩＬ－４Ｒ発現が、疾患の予後および／または進行を示す、定量化することと、
- c) ＩＬ－４Ｒ発現のレベルを疾患の予後および／または進行と相関させることであって、中程度または高レベルのＩＬ－４Ｒ発現が、重度の疾患の予後および／または進行を示す、相関させることと、を含む、方法を提供する。

【００１８】

いくつかの実施形態では、高レベルのＩＬ－４Ｒ発現が測定され、方法は、ＩＬ－４標的化カーゴタンパク質によりがん患者を治療することをさらに含む。

【００１９】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－４Ｒ発現のレベルは、高レベルのＩＬ－４Ｒ発現である。

【００２０】

いくつかの実施形態では、高レベルのＩＬ－４Ｒ発現は、２＋以上のパーセントスコアによって示される。

【００２１】

いくつかの実施形態では、高レベルのＩＬ－４Ｒ発現は、３＋以上のパーセントスコアによって示される。

【００２２】

いくつかの実施形態では、中程度レベルのＩＬ－４Ｒ発現は、１＋以上であるが２未満のパーセントスコアによって示される。

【００２３】

いくつかの実施形態では、中程度レベルのＩＬ－４Ｒ発現は、７６～１５０のＨスコアによって示される。

【００２４】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、高レベルの I L - 4 R 発現は、1 5 1 ~ 2 2 5 の H スコアによって示される。

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態では、高レベルの I L - 4 R 発現は、2 2 6 ~ 3 0 0 までの H スコアによって示される。

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態では、I L - 4 R 発現のレベルは、I L - 4 R α 発現のレベルを測定することによって測定される。

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態では、I L - 4 R 発現のレベルは、2 型 I L - 4 R ( I I 型 I L - R 4、I L - 4 R α、および I L - 1 3 R α 1 を含む) 発現のレベルである。

10

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態では、I L - 4 R 発現のレベルは、I L - 4 R α 発現を含む、I L - 4 R の免疫組織化学的 ( I H C ) 染色を使用して測定される。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、がんまたは腫瘍は、前立腺がん、卵巣がん、乳がん、子宮内膜がん、多発性骨髄腫、黒色腫、リンパ腫、小細胞肺癌を含む肺がん、腎臓がん、肝臓がん、結腸がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、および脳がん ( C N S 腫瘍を含む) からなる群から選択される。

【 0 0 3 0 】

20

いくつかの実施形態では、C N S 腫瘍は、神経膠腫、膠芽腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫 ( c r a n i o p h a r y o g i o m a )、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、希突起膠細胞、髄膜腫 ( m e n a n g i o m a )、髄膜腫 ( m e n i n g i o m a )、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、髄芽腫、および成人下垂体腺腫からなる群から選択される。

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態では、C N S 腫瘍は、膠芽腫である。

【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態では、C N S 腫瘍は、再発性または難治性膠芽腫である。

【 0 0 3 3 】

30

いくつかの実施形態では、対象は、O 6 - メチルグアニン - メチルトランスフェラーゼ ( M G M T ) 陽性または陰性の C N S 腫瘍を有する。

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態では、対象は、フューリン陽性 C N S 腫瘍を有する。

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態では、I L - 4 標的化カーゴタンパク質は、1 つ以上のカーゴ部分を含む。

【 0 0 3 6 】

いくつかの実施形態では、I L - 4 標的化カーゴタンパク質は、毒素を含む。

【 0 0 3 7 】

40

いくつかの実施形態では、毒素は、細菌毒素、動物毒素、または植物毒素を含む。

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態では、毒素は、孔形成毒素を含む。

【 0 0 3 9 】

いくつかの実施形態では、孔形成毒素は、アエロリジンまたはプロアエロリジンを含む。

【 0 0 4 0 】

いくつかの実施形態では、植物毒素は、ボウガニン ( b o u g a n i n ) またはリシンを含む。

【 0 0 4 1 】

いくつかの実施形態では、細菌毒素は、P s e u d o m o n a s 外毒素、コレラ毒素、ま

50

たはジフテリア毒素からなる群から選択される毒素を含む。

【0042】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、BAX、BAD、BAT、BAK、BIK、BOK、BID、BIM、BMF、およびBOKからなる群から選択されるBCL-2ファミリーのアポトーシス促進性メンバーを含む。

【0043】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、MDNA55（配列番号65）またはその誘導体もしくはバリエーションを含む。

【0044】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、MDNA55である。

10

【0045】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、標的化部分としてIL-4 R抗体に含まれる。

【0046】

いくつかの実施形態では、IL-4 R抗体は、ヒト化抗体である。

【0047】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、融合タンパク質である。

【0048】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、腫瘍内投与される。

【0049】

いくつかの実施形態では、腫瘍内投与は、頭蓋内投与を含む。

20

【0050】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、人工脳脊髄液（CSF）溶液およびアルブミン中の製剤であり、製剤は、それを必要とする対象に代理トレーサーと共投与される。

【0051】

いくつかの実施形態では、代理トレーサーは、磁気共鳴画像法（MRI）造影剤である。

【0052】

いくつかの実施形態では、代理トレーサーは、ガドリニウム結合トレーサーである。

【0053】

いくつかの実施形態では、代理トレーサーは、ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸（Gd-DTPA）およびガドリニウム結合アルブミン（Gd-アルブミン）からなる群から選択される。

30

【0054】

いくつかの実施形態では、アルブミンは、ヒト血清アルブミンである。

【0055】

いくつかの実施形態では、人工CSF溶液は、Elliotts B（登録商標）溶液である。

【0056】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、頭蓋内カテーテルを介して投与される。

40

【0057】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、対流強化送達（CED）によって投与される。

【0058】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、対流強化送達（CED）により単回用量として投与される。

【0059】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、単回用量として投与される。

50

## 【0060】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、約  $90 \mu\text{g}$  ( $60 \text{ mL}$  中  $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、約  $240 \mu\text{g}$  ( $40 \text{ mL}$  中  $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、または約  $300 \mu\text{g}$  ( $100 \text{ mL}$  中  $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) の単回用量として投与される。

## 【0061】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、 $60 \text{ mL}$  中  $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  の投与量で投与される。

## 【0062】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、 $40 \text{ mL}$  中  $6 \mu\text{g}/\text{mL}$  の投与量で投与される。

10

## 【0063】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、 $100 \text{ mL}$  中  $3 \mu\text{g}/\text{mL}$  の投与量で投与される。

## 【0064】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、約  $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  ~ 約  $3 \mu\text{g}/\text{mL}$  の単回用量として投与される。

## 【0065】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、または 8 日にわたって単回用量として投与される。

## 【0066】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、1、2、3、4、または 5 回の注入として投与される。

20

## 【0067】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、上記の請求項のいずれか一項に従って投与され、次いで、約 1 日 ~ 約 8 日間投与を中止し、任意選択で、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、または 8 日間投与を中止した後、上記の請求項のいずれか一項に従って投与し、CNS 腫瘍の治療に必要な限り、この投与および投与の中止のパターンを繰り返す。

## 【0068】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、1 ~ 3 つのカテーテルを含む、1 つ以上の頭蓋内カテーテルを介して投与される。

30

## 【0069】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、約  $5 \mu\text{L}/\text{分}/\text{カテーテル}$  ~ 約  $20 \mu\text{L}/\text{分}/\text{カテーテル}$  の流速または約  $15 \mu\text{L}/\text{分}/\text{カテーテル}$  の流速でカテーテルを通して投与される。

## 【0070】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度および約  $15 \mu\text{L}/\text{分}/\text{カテーテル}$  の流速で、カテーテルを介して投与される。

## 【0071】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、ステロイドと組み合わせて使用される。

40

## 【0072】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、 $4 \text{ mg}/\text{日}$  以下で投与されるステロイドと組み合わせて使用される。

## 【0073】

いくつかの実施形態では、本発明は、上記の請求項のいずれか一項に記載の IL-4 標的化カーゴタンパク質を含むキットであって、IL-4 R 抗体、免疫組織化学 (IHC) ベースのアッセイにおいて IL-4 R 抗体を使用するための指示書、およびパーセントスコアまたは Hスコアを決定するための指示書を含む、キットを提供する。

## 【図面の簡単な説明】

50

【0074】

【図1】IL-13R $\alpha$ 1およびIL-13R $\alpha$ 2-選択的IL-13バリエーションの比較分析ヒトIL-13ならびにIL-13R $\alpha$ 1およびIL-13R $\alpha$ 2選択的バリエーション配列が、示された残基番号について示される。速度論的および親和性パラメータは、表面プラズモン共鳴により決定された。

【図2A-2B】IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4配列の例を提供する。

【図3A-3C】本発明の組み合わせで使用するための例示的な抗PD-1抗体。

【図4A-4F】本発明の組み合わせで使用するための例示的な抗PD-L1抗体。

【図5A-5B】例示的な腫瘍溶解性ウイルス。

【図6】IL-4R $\alpha$ のアッセイトランスファー一致 (Assay Transfer Concordance) を示すデータ

10

【図7】CAP/CLIA感受性試験における膠芽腫のIL-4R $\alpha$ スコアを示すデータ。

【図8A-8D】8A) GBMにおけるHスコア値によるIL-4R $\alpha$ 陽性の閾値。8B) GBMにおける1+以上の強度の染色パーセントによるIL-4R $\alpha$ 陽性の閾値。8C) GBMにおける2以上の強度の染色パーセントによるIL-4R $\alpha$ 陽性の閾値。8D) GBMで3以上の強度の染色パーセントによるIL-4R $\alpha$ 陽性の閾値

【図9A-9B】9A) IHC手順-TechMateプロトコル。9B) 抗体の仕様およびアッセイ条件。

【図10】GBMにおけるIL-4R $\alpha$ およびウサギIgGの染色。GBM組織における様々なレベルのIL-4R $\alpha$ 反応性の代表的な画像。この図には、対応する代表的なウサギIgG陰性コントロールも含まれる。すべてのウサギIgGアイソタイプ陰性対照は、試験したGBM腫瘍の感受性パネル全体にわたって非反応性であった。

20

【図11】GBMにおけるIL-4R $\alpha$ のCAP/CLIA精度および再現性。

【図12A-12B】特異性試験のための多正常ヒト組織におけるIL-4R $\alpha$ スコア付け

【図13】GBMの治療経路の概略図。

【図14】ハイクロー画像誘導CEDを示す画像データにより、分布が改善される。

【図15】MDNA55軌道計画および分布分析を示す画像データ (Brainlab iPlan (登録商標) Flowソフトウェアを使用)。

30

【図16】rGBM (再発性GBM) について承認された治療法と比較した、低用量のMDNA55での有望な生存を示すデータ。

【図17】最初の診断で得られたGBM組織におけるIL-4R発現を示す画像データ。GBMの最初の診断で得られたアーカイブ (archived) 組織を、免疫組織化学 (IHC) によってIL-4R $\alpha$ の発現について分析する。Hスコア法を使用して、細胞質IL-4R $\alpha$ 反応性についてGBM試料をスコア付けする：0~75のHスコア=発現なし~低い発現。H-76~150のスコア=中程度の発現；H-151~225のスコア=高い発現；226~300までのHスコア=非常に高い発現。IL-4R陰性=Hスコア $\leq$ 75。IL-4R陽性=Hスコア $>$ 75。

【図18】IL-4R陽性は、より悪性度が高い疾患 (最初の診断から再発までのより短い時間) と関連している。MDNA55により治療された対象 (n=24) の初期診断から最初に再発するまでの時間。中程度から高いHスコア (Hスコア $>$ 75) を有する対象と比較した、低いHスコア (Hスコア $\leq$ 75) を有する対象の初期診断から最初の再発までの時間を示す Kaplan-Meier プロット。Hスコア $\leq$ 75対Hスコア $>$ 75を有する患者の1回目の再発までの期間の中央値は、それぞれ16.7ヶ月対10.3ヶ月である。ログランク (Mantel-Cox) 検定p値=0.2123。

40

【図19】IL-4R+対象は、MDNA55による治療後に、より良い生存転帰を示す。IL-4R Hスコアによる本研究における対象の生存 (n=24)。本研究の中程度から高いHスコア (Hスコア $>$ 75) を有する対象の生存と比較した、低いHスコア (Hスコア $\leq$ 75) を有する対象の生存を示す Kaplan-Meier プロット。Hスコア $\leq$ 75

50

対Hスコア $>75$ を有する対象のOS中央値は、それぞれ8.5ヶ月対15.2ヶ月である。ログランク(Mantel-Cox)検定p値 $=0.0909$ 。データ中断は、2019年1月16日である。

【図20】IL-4R+対象を示す画像データは、MDNA55治療後の腫瘍反応を示す。

【図21】MDNA55は、特にIL-4R+再発性GBMにおける有望な利益リスクプロファイルを示す。上部の黒長方形：IL-4R+は、より悪性度が高い疾患に関連している。下部の黒長方形：MDNA55は、IL-4R+rGBMの生存転帰を改善する

【図22】IL-4R Hスコアによる本研究における対象( $n=24$ )の無増悪生存期間。本研究の中程度から高いHスコア(Hスコア $>75$ )を有する対象のPFSと比較した、低いHスコア(Hスコア $\leq 75$ )を有する対象のPFSを示す Kaplan-Meier プロット。Hスコア $\leq 75$ 対Hスコア $>75$ を有する対象のPFSの中央値は、それぞれ1.9ヶ月および3.7ヶ月である。ログランク(Mantel-Cox)検定p値 $=0.1156$ 。

【図23A】MDNA55臨床試験設計の概要を示している。

【図23B】患者の人口統計を要約する。KPSは、カルノフスキーのパフォーマンススコアである。

【図24A】臨床試験に登録された最初の40人の対象の生存率を示す。

【図24B】高いまたは低いIL-4R発現を有する対象の生存率を示す。40人の対象のうちの36人をIL-4R発現について評価した。全生存期間の中央値(mOS)および12ヶ月の生存率(OS-12)を示す。

【図25A】MDNA55治療後のメチル化MGMT遺伝子プロモーターを有するまたは有しない対象の生存率を示している。

【図25B】MDNA55治療後の2つの群の対象の生存率を示している。一方の群は非メチル化MGMT遺伝子プロモーターおよび高レベルのIL-4R発現を有し、他方の群は非メチル化MGMT遺伝子プロモーターおよび低レベルのIL-4R発現を有していた。

【図26A】MDNA55治療後のステロイド使用量が多いまたは少ない対象の生存率を示している。

【図26B】MDNA55治療後の2つの群の対象の生存率を示している。一方の群は、ステロイドの使用量が少なく、IL-4Rの発現レベルが高く、他方の群は、ステロイドの使用量が少なく、IL-4Rの発現レベルが低かった。

【図27】MDNA55治療後の早期発症反応を示す対象の脳MRI画像を示している。患者は、野生型イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)、非メチル化MGMT遺伝子プロモーター、高いIL-4R発現、および2回の以前の再発を有する。

【図28】MDNA55治療後の、疑似進行後の発症反応の遅延を示す対象の脳MRI画像を示している。患者は、野生型イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)、メチル化MGMT遺伝子プロモーター、高いIL-4R発現、および1回の以前の再発を有する。

【図29】MDNA55治療後の、疑似進行後の発症反応の遅延を示す対象の脳MRI画像を示している。患者は、野生型イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)、メチル化MGMT遺伝子プロモーター、高いIL-4R発現、および1回の以前の再発を有する。矢印は、活動性の腫瘍塊を示している。

【図30】MDNA55により治療された対象の腫瘍体積変化の分布を示している。腫瘍体積の変化はMRIによって測定され、結果はベースラインから評価される。治療後、腫瘍の体積は縮小、安定、または進行する。腫瘍制御率は、腫瘍サイズが縮小または安定した対象の割合に基づいて計算される。

【図31】MDNA55による治療後の対象の腫瘍体積変化の分布を示す。腫瘍体積の変化はMRIによって測定され、結果は最下点から評価される。治療後、腫瘍の体積は縮小、安定、または進行する。腫瘍制御率は、腫瘍サイズが縮小または安定した対象の割合に基づいて計算される。

10

20

30

40

50

【図32A-32B】MDNA55治療後の対象の生存率を示し、対象は2つの群に分けられ、一方の群は治療後に腫瘍体積が縮小または安定し、他方の群は治療後に腫瘍体積が進行した。

【図33A】テモゾロミド（TMZ）、カルムスチン（商品名Gliadel（登録商標））、ロムスチン（LOM）、ペバシズマブ（商品名Avastin（登録商標））、またはMDNA55などの抗がん剤を含む治療後は全生存期間の中央値（月）を示す。

【図33B】テモゾロミド（TMZ）、カルムスチン（商品名Gliadel（登録商標））、ロムスチン（LOM）、ペバシズマブ（商品名Avastin（登録商標））、またはMDNA55などの抗がん剤治療後の対象の12ヶ月生存率を示す。nは、試験された対象の数を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0075】

本開示をより容易に理解するために、特定の用語および語句が、本明細書全体を通して以下で定義される。

【0076】

MDNA55は、対流強化送達（CED）を使用して、トレーサー（MRI造影剤）と共投与され、腫瘍内および腫瘍周辺の薬物分布をリアルタイムで監視することができる。MDNA55は、触媒ドメインである切断型形態の強力な細菌毒素-Pseudomonas aeruginosa外毒素（PE）Aに融合した、結合ドメインであるインターロイキン-4（cpl-4）の生物学的循環置換（circularly permuted）形態からなる標的化免疫毒素である（Kreitman et al., 1994）である。MDNA55は、細胞表面上に発現しているインターロイキン4受容体（IL-4R）に結合し、複合体全体がエンドサイトーシスを受ける。がん細胞のエンドソームに高濃度で見られるフューリン様プロテアーゼによる切断および活性化後に、短縮型PEの触媒ドメインは、サイトゾルに放出され、該サイトゾルにおいて、伸長因子-2のADPリボシル化、およびカスパーゼ活性化によるアポトーシスの誘導により、細胞死を誘導する（Wedekind et al., 2001）。IL-4R標的を発現しない細胞は、MDNA55に結合せず、したがって、PE媒介性の細胞死を享受しない。作用機序を図1に示す。PE部分は、触媒ドメインを保持するが、細胞結合ドメインは保持しないように操作されたことに注目すべきである。このアプローチの背景にある理論的根拠は、PEが意図せずにIL-4から切断された場合に、PEの結合ドメインが除去される結果、細胞内に取り込まれず、タンパク質合成を停止させるために、PEは毒性ではないという、安全メカニズムが構築されていることであった。しかしながら、患者集団、治療有効性、および患者集団における治療結果を決定するためのバイオマーカーの必要性が依然として存在する。本発明はその必要性を満たす。

20

30

【0077】

定義

本明細書で引用されたすべての参考文献は、完全に記載されているかのようにその全体が参照により組み込まれる。別に定義されない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001)、March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001)、および Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001)は、本開示で使用される多くの用語に対する一般的な指針を当業者に提供する。必要に応じて、市販のキットと試

40

50

薬の使用を伴う手順は、特に明記されていない限り、一般的に、製造元が定義したプロトコルおよび／またはパラメータに従って実施される。

【0078】

本明細書で使用される場合、本開示方法で使用される遺伝的にコードされたL-鏡像異性アミノ酸についての省略形は従来のものであり、表1において以下の通りである。

表1：アミノ酸の省略形

| アミノ酸     | 一文字記号 | 一般的な省略形 |
|----------|-------|---------|
| アラニン     | A     | Ala     |
| アルギニン    | R     | Arg     |
| アスパラギン   | N     | Asn     |
| アスパラギン酸  | D     | Asp     |
| システイン    | C     | Cys     |
| グルタミン    | Q     | Gln     |
| グルタミン酸   | E     | Glu     |
| グリシン     | G     | Gly     |
| ヒスチジン    | H     | His     |
| イソロイシン   | I     | Ile     |
| ロイシン     | L     | Leu     |
| リジン      | K     | Lys     |
| メチオニン    | M     | Met     |
| フェニルアラニン | F     | Phe     |
| プロリン     | P     | Pro     |
| セリン      | S     | Ser     |
| トレオニン    | T     | Thr     |
| トリプトファン  | W     | Trp     |
| チロシン     | Y     | Tyr     |
| バリン      | V     | Val     |

【0079】

「親水性アミノ酸」とは、Eisenberg et al., 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142の標準化コンセンサス疎水性尺度に従って、ゼロ未満の疎水性を示すアミノ酸を指す。遺伝的にコードされた親水性アミノ酸には、Thr (T)、Ser (S)、His (H)、Glu (E)、Asn (N)、Gln (Q)、Asp (D)、Lys (K)、およびArg (R)が含まれる。

## 【0080】

様々な用語および略語を表2に示す。

表2：略語および用語：

|       |                     |
|-------|---------------------|
| PA    | プロエアロリシン            |
| BAD   | 細胞死の BCL2 関連アゴニスト   |
| BAX   | BCL2 関連 X タンパク質     |
| EGF   | 表皮成長因子              |
| EpCAM | 上皮タンパク質細胞接着分子       |
| GMCSF | 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 |
| IL-4  | インターロイキン-4(IL4)     |
| IL-13 | インターロイキン-13(IL13)   |
| PSMA  | 前立腺特異的膜抗原           |

10

## 【0081】

以下の用語および方法の説明は、本開示をよりよく説明し、本開示の実施において当業者を導くために提供される。単数形の「a」、「an」、および「the」は、文脈が特段明示しない限り、1つ以上を指す。例えば、「IL-4 標的化カーゴタンパク質を含む」という用語は、単一または複数の IL-4 標的化カーゴタンパク質を含み、「少なくとも約1つの IL-4 標的化カーゴタンパク質を含む」という句と同等であるとみなされる。「または」という用語は、文脈が特段明示しない限り、記載された代替的要素のうちの単一の要素または2つ以上の要素の組み合わせを指す。本明細書で使用される場合、「含む (comprise)」は、「含む (include)」を意味する。したがって、「A または B を含む」とは、追加の要素を除外することなしに、「A、B、または A および B を含む」ことを意味する。

20

## 【0082】

特段示されない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。

30

## 【0083】

アクセッション番号：米国国立衛生研究所によって維持されている NCBI データベース（米国国立バイオテクノロジー情報センター）において様々な核酸およびアミノ酸配列に割り当てられた参照番号。この仕様に記載されるアクセッション番号は、本出願の出願日時点のデータベース内に提供されている通りに、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0084】

投与：IL-4 標的化カーゴタンパク質を含む組成物などの薬剤を対象に提供または付与する。例示的な投与経路には、経口、注射（皮下、筋肉内、皮内、腹腔内、腫瘍内、および静脈内など）、舌下、直腸または経直腸、経皮、鼻腔内、膣、子宮頸部、および吸入経路が含まれるが、これらに限定されない。特定の例では、腫瘍内には、局所的 (local)、局所的 (regional)、焦点的 (focal)、または対流強化送達が含まれる。他の特定の例では、投与には、経尿道投与または経会陰投与が含まれる。一例では、代理磁気共鳴画像トレーサー（例えば、ガドリニウム結合アルブミン (Gd-アルブミン)）を IL-4 標的化カーゴタンパク質と組み合わせて投与して、リアルタイムで分布を監視しながら、IL-4 標的化カーゴタンパク質が、治療用量で安全に、脳腫瘍などの腫瘍に送達されるかを決定することができる（例えば、Murad et al., Clin. Cancer Res. 12 (10): 3145-51 2006 を参照されたい）。

40

## 【0085】

50

抗体：免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、がん細胞および／またはがん幹細胞によって提示されるエピトープなどのエピトープに特異的に結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含む分子。抗体には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、およびヒト化抗体が含まれる。抗体にはアフィボディも含まれる。アフィボディは、機能においてモノクローナル抗体を模倣するが、プロテインAに基づく。アフィボディは、標的化部分に結合するための高親和性リガンドとして操作することができる。

#### 【0086】

天然に存在する抗体（例えば、IgG、IgM、IgD）には、ジスルフィド結合によって相互接続された2つの重鎖（H）鎖および2つの軽鎖（L）鎖である、4つのポリペプチド鎖が含まれる。抗体の抗原結合機能は、天然に存在する抗体の断片によって行われ得ることが示されている。したがって、これらの抗原結合断片はまた、「抗体」という用語によって指定されることを意図している。抗体という用語に含まれる結合断片の特定の非限定的な例は、(i) VLドメイン、VHドメイン、CLドメイン、およびCH1ドメインから構成されるFab断片と、(ii) VHドメインおよびCH1ドメインから構成されるFd断片と、(iii) 抗体のシングルアームのVLドメインおよびVHドメインから構成されるFv断片（scFv）ならびに二量体（ダイアボディ）または三量体（トリアボディ）を形成するための互いに連結したscFv分子と、(iv) VHドメインから構成されるdAb断片（Ward et al., Nature 341:544-546, 1989）と、(v) 単離相補性決定領域（CDR）と、(vi) ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab')<sub>2</sub>断片と、を含む。

#### 【0087】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の作製方法は、当業者に既知であり、多くの抗体が利用可能である。例えば、Coligan, Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, N. Y., 1991、ならびにHarlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, NY, 1989、Stites et al., (eds.) Basic and Clinical Immunology (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, Calif., およびその中で引用されている参考文献、Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed.) Academic Press, New York, N. Y., 1986、ならびにKohler and Milstein, Nature 256:495-497, 1975を参照されたい。抗体調製のための他の好適な技術には、ファージまたは類似のベクター中の組換え抗体のライブラリーの選択が含まれる。Huse et al., Science 246:1275-1281, 1989、およびWard et al., Nature 341:544-546, 1989を参照されたい。

#### 【0088】

免疫グロブリンおよびその特定のバリエーションは既知であり、多くが組換え細胞培養で調製されている（例えば、米国特許第4,745,055号、米国特許第4,444,487号、WO88/03565、EP256,654、EP120,694、EP125,023、Faoulkner et al., Nature 298:286, 1982、Morrison, J. Immunol. 123:793, 1979、Morrison et al., Ann Rev. Immunol. 2:239, 1984）。キメラ（ヒト化）抗体を調製するための詳細な方法は、米国特許第5,482,856号に見出すことができる。ヒト化および他の抗体の作製および工学技術に関する追加の詳細は、Borbaeck (ed), Antibody Engineering, 2nd Edition Freeman and Company, NY, 1995、McCaffre

rty et al., Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL at Oxford Press, Oxford, England, 1996、および Paul Antibody Engineering Protocols Humana Press, Towata, N. J., 1995に見出すことができる。

【0089】

いくつかの例では、抗体は、試料中の他の分子の結合定数よりも少なくとも  $10^3 \text{ M}^{-1}$  より大きい、 $10^4 \text{ M}^{-1}$  より大きい、または  $10^5 \text{ M}^{-1}$  より大きい結合定数で、標的タンパク質（例えば、IL4受容体などの細胞表面受容体）に特異的に結合する。いくつかの例では、特異的結合試薬（例えば、抗体（例えば、モノクローナル抗体）またはその断片）は、 $1 \text{ nM}$ 以下の平衡定数（ $K_d$ ）を有する。例えば、特定の結合剤は、少なくとも約  $0.1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約  $0.3 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約  $0.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約  $0.75 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約  $1.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約  $1.3 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約  $1.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、または少なくとも約  $2.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ の結合親和性で標的タンパク質に結合し得る。 $K_d$ 値は、例えば、競合ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、またはBiacore, Inc.、Piscataway, N. J. から入手できるBiacore T100などの表面プラズモン共鳴装置を用いて決定することができる。

10

【0090】

結合（bind）または結合（binding）：複合体の形成などの、2つ以上の分子が互いに物理的に近接している2つ以上の分子間の会合。例示的な複合体は、受容体—リガンドの対または抗体—抗原の対である。一般に、複合体中の分子の結合が強いほど、解離速度は遅くなる。特異的結合とは、薬剤と特定の標的との間の優先的な結合を指す。例えば、特異的結合とは、がん幹細胞抗原に特異的な標的化部分を含むIL-4標的化カーゴタンパク質ががん幹細胞に結合するが、標的をがん幹細胞の近くに表示しない他の細胞には有意に結合しない場合を指す。このような結合は、リガンドと受容体の間の特異的な非共有分子相互作用であり得る。特定の例では、結合は、IL-4標的化カーゴタンパク質をがん幹細胞と接触させた後、本明細書に記載の方法のうちの1つを使用してがん幹細胞増殖阻害を検出することによって評価される。

20

【0091】

このような相互作用は、結合パートナー間の（または、多くの場合、各結合パートナーの特定の領域または部分間の）1つまたは典型的にはより多くの非共有結合によって媒介される。非特異的結合部位とは対照的に、特異的結合部位は飽和可能である。したがって、特異的結合を特徴付ける1つの例示的な方法は、特異的結合曲線によるものである。特定の結合曲線は、例えば、第1の結合パートナー濃度の関数として、固定量の他の結合パートナーに結合した一方の結合パートナー（第1の結合パートナー）の量を示す。これらの条件下で第1の結合パートナー濃度が増加すると、結合した第1の結合パートナーの量が飽和する。非特異的結合部位とは別に対照的に、直接的な関連（例えば、タンパク質間相互作用）に互いに関与する特異的結合パートナーは、過剰量のいずれかの特定の結合パートナーによってそのような会合（例えば、タンパク質複合体）から競合的に除去（または置換）され得る。そのような競合アッセイ（または置換アッセイ）は、当該技術分野で非常に既知である。

30

40

【0092】

がん：分化の喪失、増殖速度の増加、周囲の組織への浸潤を伴う特徴的な退形成を行い、転移することができる悪性新生物。残存がんは、がんを軽減または根絶するために対象に行った任意の形態の治療後に対象に残存するがんであり、再発がんは、そのような治療後に再発するがんである。転移性がんは、転移性がんが由来する元の（原発性）がんの起源の部位以外の体内の1つ以上の部位にあるがんである。固形腫瘍に由来する転移性がんの場合、1つ以上の（例えば、多くの）追加の腫瘍塊が、元の腫瘍の部位に近い部位または離れた部位に存在し得る。「播種性転移性結節」または「播種性転移性腫瘍」という句は

50

、1つ以上の解剖学的部位に分散した複数の（通常は多数の）転移性腫瘍を指す。例えば、腹膜内の播種性転移性結節（すなわち、播種性腹腔内がん）は、腹膜内外にある臓器の腫瘍から生じ得、腹膜内の多数の部位に局在化し得る。このような転移性腫瘍は、それ自体が臓器の表面に別個に局在化し得、または下にある組織に浸潤し得る。

【0093】

カーゴ部分：がん幹細胞の増殖を大幅に減少または阻害するように機能することができるペプチド（例えば、タンパク質断片または完全長タンパク質）または他の分子。いくつかの例では、カーゴ部分は、細胞死（例えば、アポトーシス）を引き起こすことができる。例示的なカーゴ部分には、毒素、例えば、植物、微生物、および動物に由来する毒素が含まれる。他の例では、カーゴ部分は、通常、細胞のライフサイクルの制御に寄与するタンパク質であり、例えば、カーゴ部分は、アポトーシス経路または非アポトーシス経路などを介して細胞死を誘発する任意のタンパク質であり得る。いくつかの例では、カーゴ部分は、タンパク質ではなく、タプシガルギンなどのがん幹細胞の増殖を大幅に低減または阻害するように機能することができる別の分子である。いくつかの例では、カーゴ部分は、PSAなどの腫瘍関連プロテアーゼによって活性化される。例示的なカーゴ部分および例示的なGenBankアクセッション番号は、以下の表3に提供されている。天然のカーゴ配列に加えて、天然の配列よりも生物学的活性が高い変異体配列などの、バリエーション配列も使用することができる。

10

20

30

40

50

表 3：例示的なカーゴ部分の配列

| カーゴ部分                               | アクセッション番号*                                                                                                                 |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| アエロリジン                              | ABR14715.1;ABR14714.1                                                                                                      |
| プロエアロリシン                            | AAA21938.1;P09167.2;U.S.Pat.No.7,282,476<br>(参照により本明細書に組み込まれるプロエアロリシン配列)                                                   |
| ボウガニン                               | 米国特許第 6,737,511 号における AAL35962 および配列番号 9、ならびに米国特許第 7,339,031 号および WO2005/090579 で提供されるバリエント配列<br>(参照により本明細書に組み込まれるボウガニン配列) |
| Pseudomonas 外毒素                     | 1IKP A;AAB59097.1;AAF90003.1<br>(米国特許第 6,011,002 号の配列番号 1 も参照されたい)                                                         |
| BAD および BAX などの Bcl-2 アポトーシス促進タンパク質 | BAD:CAG46757;AAH01901.1;CAG46733.1;および<br>米国特許第 6,737,511 号で提供される配列                                                        |
|                                     | BAX:CAE52909.1;AAO22992.1;EAW52418.1                                                                                       |
| コレラ毒素                               | BAA06291.1;ACF35010.1;BAA06288.1;米国特許出願第 61/058,872 号に提供されるバリエント配列<br>(参照により本明細書に組み込まれる、該米国特許出願中のバリエントコレラ毒素配列)             |
| リボヌクレアーゼ A                          | BAA05124.1;NP_937877.1;NP_115961.2;Q5GAN4.1;および PCT 公開第 WO2007/041361 号に提供される配列<br>(参照により本明細書に組み込まれる、該 PCT 公開中の rapLR1 配列) |

\* GenBank 番号は、参照により本明細書に組み込まれ、それらの対応する核酸配列も同様である。

10

20

30

40

50

## 【0094】

接触 (contact) または接触 (contacting)：ある対象物が別の対象物に物理的に比較的近接することを指す。一般に、接触には、2つ以上の対象物を互いに物理的に近接して配置して、対象物が相互作用する機会を与えることが含まれる。例えば、IL-4 標的化カーゴタンパク質をがん幹細胞と接触させることは、細胞の近くに IL-4 標的化カーゴタンパク質 (溶液中にあり得る) を配置することによって、例えば、IL-4 標的化カーゴタンパク質をがんを有する対象に注射することによって達成することができる。同様に、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、例えば、細胞が増殖している培地に IL-4 標的化カーゴタンパク質を添加することにより、インビトロで細胞と接触させることができる。

## 【0095】

減少：あるものの質、量、または強度を低下させること。一例では、治療（IL-4 標的化カーゴタンパク質による治療など）は、例えば治療がない場合の反応と比較して、がん幹細胞集団（腫瘍のサイズ、腫瘍の体積、腫瘍の転移、がん細胞および／もしくはがん幹細胞の数を減少させること、またはそれらの組み合わせ）、またはがんに関連する1つ以上の症状を減少させる。特定の例では、治療は、治療後に、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約50%、またはさらには少なくとも約90%の減少など、腫瘍のサイズ、腫瘍の体積、がん細胞および／もしくはがん幹細胞の数、またはがんの転移、またはそれらの組み合わせを減少させる。そのような減少は、本明細書に開示される方法を使用して測定することができる。

【0096】

診断：例えば1つ以上の診断手順の結果から、病状または疾患を同定するプロセス。特定の例には、対象の予後を決定すること（例えば、6ヶ月、1年、または5年での生存確率など、ある期間にわたる生存確率）が含まれる。特定の例では、がんは、がん幹細胞表面上の1つ以上の標的を使用して、試料中のがん幹細胞の存在を検出することによって診断される。例えば、診断には、がんの特定の病期または転移部位の存在を決定することが含まれ得る。

【0097】

リンカー：1つ以上の薬剤を1つ以上の他の薬剤に接続するために使用される分子。例えば、リンカーを使用して、1つ以上のカーゴ部分を1つ以上の標的化部分に接続することができる。リンカーの特定の非限定的な例には、合成ポリマー、ペプチド、タンパク質、および炭水化物などのデンドリマーが含まれる。リンカーはさらに、1つ以上のプロテアーゼ切断部位を含むか、または酸化および／または還元による切断に感受性であり得る。

【0098】

薬学的に許容される担体：「薬学的に許容される担体」という用語は、本開示において有用な薬学的に許容される担体（ビヒクル）が従来のものであることを指す。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 15th Edition (1975) は、本明細書で提供される1つ以上のIL-4 標的化カーゴタンパク質分子などの、1つ以上の治療薬または診断薬の薬学的送達に好適な組成物および製剤について説明している。

【0099】

一般に、担体の性質は、使用される特定の投与様式に依存するであろう。例えば、非経口製剤は、ビヒクルとして、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどの薬学および生理学に許容される流体を含む注射可能な流体を含むことができる。生物学的に中性の担体に加えて、投与される薬学組成物は、湿潤剤または乳化剤、防腐剤、およびpH緩衝剤、例えば、酢酸ナトリウムまたはモノラウリン酸ソルビタン、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、およびオレイン酸トリエタノールアミンなどの少量の非毒性補助物質を含むことができる。

【0100】

医薬品または薬物：単独でまたは別の治療薬もしくは薬学的に許容される担体と組み合わせて、対象に投与されたときに所望の治療効果を誘導することができる化合物または組成物。特定の例では、薬剤（IL-4 標的化カーゴタンパク質を含むものなど）は、例えば、腫瘍のサイズを減少させること（例えば、がん細胞および／またはがん幹細胞の体積または数の減少）、がんの転移を減少させること、またはそれらの組み合わせにより、がんを治療する。

【0101】

組換え：組換え分子（組換え核酸分子またはタンパク質など）は、天然に存在しない配列を有するか、または2つの別で分離された配列セグメントの人工的な組み合わせによって作製される配列を有する。この人工的な組み合わせは、多くの場合、化学合成によって、またはより一般的には、核酸の単離されたセグメントの人工的な操作、例えば遺伝子工学

10

20

30

40

50

技術によって達成される。組換えタンパク質は、タンパク質をコードする組換え核酸を発現することから生じるものである。本開示のIL-4標的化カーゴタンパク質は、一般に組換えである。

#### 【0102】

試料：核酸分子、タンパク質、またはその両方などの生体分子を含む試料などの生物学的標本。例示的な試料は、対象からの細胞または細胞溶解物を含む試料、例えば、末梢血に存在する試料（または血清などのその一部）、尿、唾液、組織生検、口腔粘膜検体採取物、外科手術標本、穿刺吸引、子宮頸部試料、および剖検材料である。特定の例では、試料は、腫瘍（例えば、生検からの組織の切片）から得られ、これは、非がん細胞および／またはがん幹細胞の両方である腫瘍細胞、ならびにがん細胞および／またはがん幹細胞を含むことができる。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、中枢神経系（CNS）腫瘍からのものである。

10

#### 【0103】

配列同一性：2つ以上の核酸配列または2つ以上のアミノ酸配列間の同一性／類似性は、配列間の同一性または類似性について表される。配列同一性は、同一性パーセンテージ（percentage identity）について測定することができる、パーセンテージが高いほど、配列は同一である。配列類似性は、類似性パーセンテージ（percentage similarity）について測定することができ（保守的アミノ酸置換を考慮に入れる）、パーセンテージが高いほど、配列は類似する。核酸またはアミノ酸配列のホモログまたはオーソログは、標準的な方法を使用してアラインした場合、比較的高い程度の配列同一性／類似性を有する。

20

#### 【0104】

比較のための配列のアラインメントの方法は、当該技術分野で既知である。様々なプログラムおよびアライメントアルゴリズムが、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988、Higgins & Sharp, Gene, 73:237-44, 1988、Higgins & Sharp, CA BIOS 5:151-3, 1989、Corpet et al., Nuc. Acid Res. 16:10881-90, 1988、Huang et al. Computer Appls. in the Biosciences 8, 155-65, 1992、およびPearson et al., Meth. Mol. Bio. 24:307-31, 1994、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990に記載され、配列アラインメント法および相同性計算の詳細な考察を示している。

30

#### 【0105】

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990) は、国立生物工学情報センター (National Center for Biological Information) (NCBI、医療図書館 (National Library of Medicine)、Building 38 A, Room 8N805, Bethesda, Md. 20894) を含むいくつかの情報源、および配列分析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastn、およびtblastxに関連して使用するためのインターネット上から入手可能である。追加情報は、NCBIのウェブサイトで見出すことができる。

40

#### 【0106】

BLASTNは、核酸配列を比較するために使用することができ、BLASTPは、アミノ酸配列を比較するために使用することができ、2つの核酸配列を比較するには、任意設定事項を次のように設定することができる：-iは、比較する最初の核酸配列を含むファイル（C：¥seq1.txtなど）に設定され、-jは、比較する2番目の核酸配

50

列を含むファイル（C：¥seq2.txtなど）に設定され、-pは、blastnに設定され、-oは、任意の所望するファイル名（C：¥output.txtなど）に設定され、-qは、-1に設定され、-rは、2に設定され、他のすべての任意設定事項は、デフォルト設定のままである。例えば、以下コマンドを使用して、2つの配列の間の比較を含む出力ファイルを生成することができる：C：¥B12seq-i c：¥seq1.txt-j c：¥seq2.txt-p blastn-o c：¥output.txt-q-1-r 2。

#### 【0107】

2つのアミノ酸配列を比較するために、B12seqの任意設定事項を次のように設定することができる：-iは、比較する最初のアミノ酸配列を含むファイル（C：¥seq1.txtなど）に設定され、-jは、比較する2番目のアミノ酸配列を含むファイル（C：¥seq2.txtなど）に設定され、-pは、blastpに設定され、-oは、任意の所望するファイル名（C：¥output.txtなど）に設定され、他のすべての任意設定事項は、デフォルト設定のままである。例えば、次のコマンドを使用して、2つのアミノ酸配列間の比較を含む出力ファイルを生成することができる：C：¥B12seq-i c：¥seq1.txt-j c：¥seq2.txt-p blastp-o c：¥output.txt。2つの比較配列が相同性を有する場合、指定された出力ファイルは、それらの相同性領域をアラインされた配列として提示する。2つの比較配列が相同性を有しない場合、指定された出力ファイルは、アラインされた配列を提示しない。

#### 【0108】

アラインされると、一致数は、同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基が両方の配列に存在する位置の数をカウントすることによって決定される。配列同一性パーセントは、一致数を、同定された配列中に記載された配列の長さ、または連結された長さ（articulated length）（同定された配列中に記載された配列由来の100個の連続するヌクレオチドまたはアミノ酸残基など）のいずれかで割り、続いて結果の値に100を掛けることによって決定される。例えば、1154個のヌクレオチドを有する試験配列とアラインされたときに1166個が一致する核酸配列は、試験配列と75.0パーセント同一である（ $1166 / 1554 * 100 = 75.0$ ）。配列同一性パーセント値は、切り捨てられて最も近い10分の1とする。例えば、75.11、75.12、75.13、および75.14は、切り捨てられて75.1とし、75.15、75.16、75.17、75.18、および75.19は、切り上げられて75.2とする。長さの値は常に整数になる。

#### 【0109】

約30アミノ酸を超えるアミノ酸配列の比較では、デフォルトパラメータに設定されたデフォルトBLOSUM62マトリックスを使用して、blast2配列関数が用いられる（ギャップ存在コストは11、残基当たりのギャップコストは1）。ホモログは、典型的には、nrまたはswissprotデータベースなどのデータベースを備えたギャップ付き（gapped）blastpであるNCBI Basic Blast 2.0を使用して、アミノ酸配列との完全長アラインメントについてカウントされた少なくとも70%の配列同一性を有することを特徴とする。blastnプログラムで検索された問い合わせは、DUSTでフィルタリングされる（Hancock and Armstrong, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:67-70）。他のプログラムはSEGを使用する。さらに、手動のアラインメントを行うことができる。さらに類似性の高いタンパク質は、この方法で評価したときに、本明細書で提供されるカーゴ部分または標的化部分と少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の配列同一性などの、増加した同一性を示す。

#### 【0110】

短いペプチド（約30アミノ酸未満）をアラインする場合、アラインメントは、blast2配列機能を使用し、デフォルトパラメータ（開始ギャップ9、伸長ギャップ1ペナル

10

20

30

40

50

ティ) に設定された P A M 3 0 マトリックスを使用して行われる。参照配列との類似性がさらに高いタンパク質は、この方法で評価したときに、本明細書で提供されるカーゴ部分または標的化部分と少なくとも約 6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、9 9 % の配列同一性などの、増加した同一性を示す。全配列よりも少ない配列が配列同一性について比較されている場合、相同性は、通常、1 0 ~ 2 0 アミノ酸の短いウィンドウにわたって少なくとも 7 5 % の配列同一性を有し、参照配列との同一性に応じて少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 % または 9 8 % の同一性を有する。そのような短いウィンドウでの配列の同一性を決定する方法は、N C B I の W e b サイトで説明されている。

#### 【0111】

対象：ヒトおよび非ヒト哺乳動物（実験室対象または獣医対象など）を含むカテゴリーである、生きている多細胞脊椎動物。

#### 【0112】

IL-4 標的化カーゴタンパク質：がん幹細胞に特異的に結合して、がん幹細胞の増殖を抑制もしくは阻害する、またはがん細胞および／もしくはがん幹細胞を死滅させる、任意のタンパク質。いくつかの例では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、がん細胞および／またはがん幹細胞ならびにがん細胞および／またはがん幹細胞ではない腫瘍（例えば、がん）細胞の両方を標的化することができる。IL-4 標的化カーゴタンパク質は、標的化部分およびカーゴ部分を含み、標的化部分は、がん幹細胞と特異的に結合し、カーゴ部分は、がん幹細胞の増殖を有意に減少もしくは阻害するか、またはがん幹細胞を死滅させる。いくつかの例では、カーゴ部分は、該カーゴ部分が会合するがん幹細胞の死を引き起こす。いくつかの例では、カーゴ部分は、化学療法剤などのタンパク質ではなく、いくつかの例では、標的化部分は、タンパク質ではなく、いくつかの例では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、実際にはタンパク質ではない。

#### 【0113】

標的化部分：がん幹細胞によって提示される分子（本明細書では標的と称する）に結合する任意の化合物、例えば標的化部分は、標的（例えば、受容体）に結合する抗体、受容体に結合するリガンド（例えば、サイトカインまたは成長因子）、受容体に結合する置換リガンド、または腫瘍関連プロテアーゼによる切断に感受性のペプチド配列であり得る。いくつかの例では、標的化部分は、P S A などの腫瘍関連プロテアーゼによって活性化される。典型的には、標的化部分は、標的を提示する他の種類の細胞に結合するよりもより有効的に、標的を提示するある種類の細胞に選択的に結合する。標的化部分は、がん細胞および／またはがん幹細胞などの腫瘍細胞のサブセットに選択的に結合するように選択することができる。標的化部分には、抗体などの特異的結合剤、IL-4 などの幹細胞上の標的の天然リガンド、そのような天然リガンドの誘導体、および免疫グロブリン A が含まれる。いくつかの例では、標的化部分は、生物学的に活性ではない（例えば、受容体を活性化することはできない）が、標的に結合する能力を保持し、したがって、IL-4 標的化カーゴタンパク質を適切な細胞に指向させる。

#### 【0114】

表 2 は、例示的な天然リガンド配列、および標的化部分として使用することができる他の抗原に関する情報を提供する。いくつかの例では、環状置換 IL-4 などの環状置換リガンドを使用して、がん細胞および／またはがん幹細胞に結合させることができる。追加の研究を行うことで、新しいがん幹細胞特異的標的が特定される。これらの追加のマーカーは、標的化部分に結合するための標的化して使用でき、そのようなリガンドを提示するがん細胞および／またはがん幹細胞の増殖を阻害（または死滅させる）するために、IL-4 標的化カーゴタンパク質を作製することができる。当業者は、マーカーが既知である場合、同定されたマーカーに対する抗体を作製する標準的な方法を使用して、がん幹細胞マーカーに特異的な標的化部分を作製し、したがって、特異的な IL-4 標的化カーゴタンパク質の開発を可能にすることができることを理解するであろう。

10

20

30

40

50

表 4：例示的な標的化部分配列

| 標的化される受容体または抗原 | アクセッション番号*                                                                                  |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| IL-4           | AAH70123;CAA57444.1;AAH67515.1<br>(米国特許第 6,011,002 号に記載される配列番号 2 および<br>様々な循環置換リガンドも参照されたい) |
| MDNA55         | 配列番号 65                                                                                     |
| IL-13          | AAH96141.2;AAH96138.1;AAH96139.1                                                            |

10

\*GenBank 番号は、参照により本明細書に組み込まれ、それらの対応する核酸配列も同様である。

#### 【0115】

がん細胞ならびに／またはがん細胞および／もしくはがん幹細胞上の標的には、がん細胞および／またはがん幹細胞の表面に提示される小分子が含まれる。そのような標的に対する抗体は、標的化部分ならびに標的の天然リガンドおよびその誘導体として使用することができる。

#### 【0116】

治療有効量：単独で、または薬学的に許容される担体もしくは 1 つ以上の追加の治療薬と一緒に、所望の応答を誘導する薬剤の量。IL-4 標的化カーゴタンパク質などの治療薬は、がん細胞および／またはがん幹細胞を含むがんを有することが既知である対象におけるがんの症状の軽減などの所望の応答を刺激する治療有効量で投与される。

20

#### 【0117】

治療薬の有効量は、がんを有する対象の生理学的状態の改善についてのアッセイなど、多くの異なる方法で決定することができる。有効量はまた、様々なインビトロ、インビボ、またはインサイチュアッセイによって決定することができる。

#### 【0118】

治療薬は、単回用量または複数回用量で、治療期間中、例えば、毎週、毎月、または隔月で投与することができる。しかしながら、有効量は、適用される供給源、治療される対象、治療される状態の重症度および種類、ならびに投与様式に依存し得る。

30

#### 【0119】

一例では、それは、対象におけるがんの症状を部分的または完全に軽減するのに十分な量である。治療は、がんの進行を一時的に遅延させることのみを含むことができるが、がんの進行を永久に停止または逆転させることも含むことができる。例えば、医薬製剤は、がんの 1 つ以上の症状（腫瘍のサイズもしくは腫瘍の数、またはがん細胞および／もしくはがん幹細胞の数など）を減少させることができ、例えば、治療製剤の非存在下の量と比較して、症状を少なくとも約 20 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 100 % 減少させることができる。

40

#### 【0120】

疾患の治療：がんの徴候または症状などの疾患または病的状態の徴候または症状を改善する治療的介入。治療はまた、がん、特に中枢神経系（CNS）のがんまたは腫瘍などの状態の寛解または治癒を誘発することができる。特定の例では、治療には、例えば、腫瘍転移の発症を予防するなど、疾患の完全な発症を阻害することによる疾患の予防が含まれる。疾患の予防は、異形成またはがんの完全な欠如を必要としない。例えば、少なくとも約 50 % の減少で十分であり得る。

#### 【0121】

腫瘍：既存の組織の細胞から発生する、炎症性ではない新生物または組織の異常な塊であ

50

る。腫瘍は、良性（非がん性）または悪性（がん性）のいずれかであり得る。血液腫瘍の例には、中枢神経系（CNS）のがんまたは腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。肉腫およびがん腫などの固形腫瘍の例には、脳腫瘍、およびCNS腫瘍（神経膠腫、膠芽腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫（*craniopharyngioma*）、上衣腫、松果体腫瘍、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫（*menangioma*）、髄膜腫（*meningioma*）、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫など）が含まれるが、これらに限定されない。腫瘍には、再発性および／または難治性CNS腫瘍が含まれる。

【0122】

難治性：試みられた治療形態に反応しない疾患または状態、例えば、標準的な治療法に反応しない腫瘍。

【0123】

十分な条件下：所望の活性を可能にする任意の環境を説明するために使用される句。一例では、IL-4 標的化カーゴタンパク質が試料中のがん幹細胞に特異的に結合することを可能にする条件下で、IL-4 標的化カーゴタンパク質を腫瘍幹細胞とインキュベートすることが含まれる。別の例では、所望の活性を可能にするのに十分な対象において、1つ以上のIL-4 標的化カーゴタンパク質を1つ以上のがん細胞および／またはがん幹細胞と接触させることが含まれる。特定の例では、所望の活性は、そのようながん細胞および／もしくはがん幹細胞の増殖または増殖を減少させること、またはがん細胞および／もしくはがん幹細胞を死滅させることである。

【0124】

単位用量：治療効果などの所望の効果を個別にまたは集合的に生成するように計算された所定量の活性物質（IL-4 標的化カーゴタンパク質など）を含む物理的に別個の単位。単一の単位用量または複数の単位用量を使用して、治療効果などの所望の効果を提供することができる。

【0125】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語には、薬学的投与に相容性のある、生理食塩水、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれるが、これらに限定されない。補助的な活性化合物（例えば、抗生物質）も組成物に組み込むことができる。

【0126】

本明細書で使用される場合、「抗PD-1抗体」という用語は、阻害性抗体を含む、PD-1に結合する任意の抗体を指す。「抗PD-1阻害剤」とは、PD-1に結合してそれを阻害する阻害剤を指す。そのような抗PD-1抗体および／または阻害剤には、とりわけ、ニボルマブ、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、AMP224、CT-011、およびMK-3475が含まれるが、これらに限定されない。

【0127】

本明細書で使用される場合、「がん」（または「がん性」）、「過剰増殖性」、および「新生物の」という用語は、自律成長（すなわち、急速に増殖する細胞成長を特徴とする異常な様子または状態）を有する細胞を指す。過剰増殖性および新生物の疾患状態は、病的として分類されてもよく（すなわち、疾患状態を特徴付けるまたは構成する）、またはそれらは非病的として分類されてもよい（すなわち、正常からの逸脱であるが疾患状態に関連しない）。この用語は、組織病理学的型または侵襲性の段階に関係なく、すべての型のがん性成長または発がんプロセス、転移組織または悪性形質転換細胞、組織、または臓器を含むことを意味する。「病的過剰増殖性」細胞は、悪性腫瘍の成長を特徴とする疾患状態で生じる。非病理学的過剰増殖性細胞の例には、創傷修復に関連する細胞の増殖が含まれる。「がん」または「新生物」という用語は、肺、乳房、甲状腺、リンパ腺およびリンパ組織、生殖系、胃腸器官、および泌尿生殖路に影響を及ぼすものを含む様々な臓器系の悪性腫瘍、ならびにほとんどの結腸がん、腎細胞がん、前立腺がんおよび／または精巣腫瘍、非小細胞肺癌、小腸のがんおよび食道のがんなどの悪性腫瘍を含むと一般に考えら

10

20

30

40

50

れている腺がんを指すために使用される。がんは一般に、前立腺がん、卵巣がん、乳がん、子宮内膜がん、多発性骨髄腫、黒色腫、リンパ腫、小細胞肺癌を含む肺がん、腎臓がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、および脳がんを含むことができる。

【0128】

「がん」という用語は、技術的に認識されており、呼吸器系がん腫、胃腸系がん腫、泌尿生殖器系がん腫、精巣がん腫、乳がん腫、前立腺がん腫、内分泌系がん腫、および黒色腫を含む上皮または内分泌組織の悪性腫瘍を指す。「腺がん」は、腺組織に由来するか、腫瘍細胞が認識可能な腺構造を形成するがん腫を指す。

【0129】

本明細書で使用される場合、「造血性新生物障害」という用語は、例えば骨髄、リンパ系または赤血球系、またはそれらの前駆細胞から生じる造血起源の過形成／新生物細胞を含む疾患を指す。好ましくは、疾患は低分化急性白血病（例えば、赤芽球性白血病および急性巨核芽球性白血病）から生じる。追加の例示的な骨髄障害には、急性前骨髄性白血病（APML）、急性骨髄性白血病（AML）、および慢性骨髄性白血病（CML）（Vaickus, L. (1991) Crit Rev. in Oncol. / Hemotol. 11: 267-97において総説されている）が含まれるが、これらに限定されず、リンパ系悪性腫瘍には、B系ALLおよびT系ALLを含む急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、前リンパ球性白血病（PLL）、有毛細胞白血病（HLL）、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症（WM）が含まれるが、これらに限定されない。悪性リンパ腫の追加の形態には、非ホジキンリンパ腫およびそれらの変異形、末梢T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病／リンパ腫（ATL）、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）、大顆粒リンパ球性白血病（LGF）、ホジキン病およびリード・システムバーグ病が含まれるが、これらに限定されない。

【0130】

本明細書で使用される「治療」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的および／または生理学的効果を得ることを指す。その効果は、疾患またはその症状を完全にまたは部分的に予防するという点で予防的であり、かつ／または疾患および／または疾患に起因する副作用の部分的または完全な治療という点で治療的であり得る。本明細書で使用される「治療」は、哺乳動物、特にヒトにおける疾患のあらゆる治療を包含し、以下：（a）疾患または疾患を獲得する危険性があると前診断されたが、未だに疾患を有すると診断されていない対象において疾患が生じるのを予防すること、（b）疾患を抑制すること、すなわち、疾患の発達を阻止すること、および（c）疾患を緩和すること、すなわち、疾患の退行を引き起こすこと、を含む。治療の有効量は、腫瘍数、腫瘍サイズを減少させる、および／または生存を増加させる量であり得る。

【0131】

「個体」、「対象」、および「患者」という用語は、本明細書では互換的に使用され、サルおよびヒト、スポーツ用哺乳動物（例えば、ウマ）、家畜用哺乳動物（例えば、ヒツジ、ヤギなど）、ペット用哺乳動物（イヌ、ネコなど）、およびげっ歯類（例えば、マウス、ラットなど）を含むヒトおよび非ヒト霊長類を含むがこれらに限定されない哺乳類を指す。

【0132】

「薬学的に許容される」および「生理学的に許容される」という用語は、1つ以上の投与経路、インビボ送達または接触に適した生物学的に許容される製剤、気体、液体または固体、またはそれらの混合物を意味する。「薬学的に許容される」または「生理学的に許容される」組成物は、生物学的またはその他の点で望ましくない材料ではなく、例えば、材料は、実質的に望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく対象へ投与することができる。したがって、そのような薬学的組成物は、例えば、IL-4ムテインを対象に投与する際に使用することができる。

【0133】

本明細書で使用される場合、「単位剤形」という語句は、治療される対象についての単位

10

20

30

40

50

用量として適した物理的に別個の単位を指し、各単位は、1つ以上の用量で投与された場合に、所望の効果（例えば、予防または治療効果）を生み出す薬学的担体（賦形剤、希釈剤、ビヒクルまたは充填剤）と任意に関連する所定量を含む。いくつかの実施形態では、治療効果は腫瘍の数を軽減することである。いくつかの実施形態では、治療効果は腫瘍の大きさを縮小することである。いくつかの実施形態では、治療効果は生存率を高めることである。

#### 【0134】

いくつかの実施形態では、単位剤形は、例えば、液体組成物、または凍結乾燥または凍結乾燥状態の組成物を含むアンプルおよびバイアル内であってもよく、例えば、滅菌液体担体は、インビボでの投与または送達の前に添加され得る。個々の単位剤形は、複数回投与キットまたは容器に含めることができる。抗PD-1抗体と組み合わせたIL-4ミテイン、およびその薬学的組成物は、投与の容易さおよび投与量の均一性のために単一または複数の単位剤形に包装することができる。

10

#### 【0135】

「治療の有効量」は、実験および／または臨床試験を通じて決定可能な比較的広い範囲に収まる。例えば、インビボ注射の場合、例えば、対象の組織または脈管構造（例えば、肝臓組織または静脈）への直接注射。他の有効な投与量は、用量反応曲線を確立する日常的な試行を通じて、当業者によって容易に確立され得る。

#### 【0136】

「有効量」または「十分な量」とは、単回投与または複数回投与で、単独または組み合わせて、1つ以上の他の組成物（薬物などの治療薬）、治療、プロトコル、または治療レジメン薬（例えば、ワクチンレジメンを含む）を用いて、任意の期間（長期または短期）の検出可能な応答、測定可能なまたは検出可能な程度の、または任意の期間（例えば、数分、数時間、数日、数ヶ月、数年、または治療までの間）の対象の期待されるまたは望ましい結果または利益を提供する量を指す。

20

#### 【0137】

治療のための「有効量」または「十分な量」の用量（例えば、改善または治療的利益または改良を提供するための）は、疾患の進行または悪化の減少、軽減、阻害、抑止、制限または制御も満足な結果ではあるが、典型的には、疾患の1つ、複数またはすべての有害症状、結果または合併症、例えば、疾患により引き起こされるかまたはそれに関連する1つ以上の有害症状、障害、病気、病理、または合併症に対して測定可能な程度の応答を提供するのに有効である。いくつかの実施形態では、有効量は、腫瘍の数を軽減するのに十分な量である。いくつかの実施形態では、有効量は、腫瘍の大きさを縮小するのに十分な量である。いくつかの実施形態では、有効量は、生存率を高めるのに十分な量である。

30

#### 【0138】

「予防」およびその文法的変形は、対象への接触、投与またはインビボ送達に疾患に先立つものである方法を意味する。対象への投与またはインビボ送達は、疾患により引き起こされるかまたはそれに関連する有害症状、状態、合併症などの発症前に実施することができる。例えば、スクリーニング（例えば、遺伝的）を使用して、そのような対象を記載の方法および使用の候補として特定することができるが、対象は疾患を発現しない場合がある。したがって、そのような対象が疾患の症状を発現しないとしても、そのような対象には、疾患に至る機能性遺伝子産物（タンパク質）の量の不足または欠損について、または異常な部分的機能性または非機能性遺伝子産物（蛋白質）の産生について、陽性とスクリーニングされた者、ならびに疾患に至る異常な、または欠陥のある（変異体）遺伝子産物（タンパク質）について陽性とスクリーニングされた対象を含む。

40

#### 【0139】

II. IL-4およびIL-13融合体

例えばMDNA55を含む、がん細胞および／またはがん幹細胞を標的化し、がん細胞および／またはがん幹細胞の増殖を阻害および／または死滅させる、IL-4および／またはIL-13融合タンパク質が本明細書に記載される。これらの分子は、本明細書では以

50

後まとめて、I L - 4 標的化カーゴタンパク質と称し、がん幹細胞によって提示される標的（例えば、いくつかの実施形態では、I L - 4 R）に結合する標的化部分、および細胞増殖阻害（または細胞死滅）活性を提供するカーゴ部分を含む。標的化部分は、直接に、または本明細書でさらに説明される様々なリンカーのうちの1つ以上を介して、カーゴ部分に結合することができる。がん細胞および／またはがん幹細胞は、一般に、自己複製する能力を有し、したがって、それら自体と同様の特性を有する子孫を生成する。いくつかの例では、開示されたI L - 4 標的化カーゴタンパク質は、がん細胞および／またはがん幹細胞ならびにがん細胞および／またはがん幹細胞ではない腫瘍（例えば、がん）細胞の両方を標的化することができる。したがって、いくつかの例では、I L - 4 標的化カーゴタンパク質は、がん細胞および／またはがん幹細胞ならびにがん細胞および／またはがん幹細胞ではない腫瘍（例えば、がん）細胞の増殖を死滅させるかまたはその増殖を阻害することができる。C D 1 3 3 に対する標的化部分などの他の例では、I L - 4 標的化カーゴタンパク質は、腫瘍におけるがん細胞および／またはがん幹細胞を死滅させるかまたはその増殖を阻害するが、がん細胞および／またはがん幹細胞ではない腫瘍細胞は死滅させるかまたはその増殖を阻害しない。

10

20

30

#### 【0140】

標的化部分には、がん幹細胞上の標的に特異的に結合するように機能するタンパク質および他の薬剤が含まれる（しかしながら、いくつかの例では、標的は他のがん細胞上にも存在してもよい）。標的化部分には、抗体、アフィボディ、または受容体リガンドなどの特異的結合剤が含まれる。いくつかの例では、標的化部分は、がん幹細胞によって提示される標的（例えば、細胞表面受容体）に対する天然リガンドに由来する。天然リガンドに由来する標的化部分は、リガンドの完全なアミノ酸配列（例えば、それが天然から単離された場合にリガンドが有するであろう同じ配列）を含むことができるか、または標的化部分のアミノ酸配列は、バリエーションが天然リガンドの生物学的活性を保持または増強している限り、天然リガンドと少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、または少なくとも約40%の配列同一性（例えば、表2に記載されるGenBankアクセッション番号に対して少なくともこの量の配列同一性）を有することができる。いくつかの例では、そのようなバリエーションは、天然のリガンドと比較して、それらの標的に対する増加した結合親和性を有する。天然のリガンドに由来する標的化部分はまた、がん幹細胞によって提示される標的に結合することができる天然配列の断片であり得る。いくつかの例では、リガンドは、天然リガンドの循環置換形態である（例えば、米国特許第6,011,002号を参照されたい）。循環置換分子には、線形分子（例えば、リガンド）の末端が直接にまたはリンカーを介して一緒に結合して環状分子を生成し、次いで、環状分子が別の場所で開かれて、元の分子における末端とは異なる末端を有する新しい線形分子を生成する、分子が含まれる。いくつかの例では、標的化部分は、標的へのリガンドの結合を増加させる変異など、標的への結合を変化させる1つ以上のアミノ酸変異（天然配列と比較して）を有する。

40

#### 【0141】

カーゴ部分は、がん細胞および／またはがん幹細胞の増殖を低減、阻害、および／または死滅させることができ、いくつかの例では、バルク（bulk）がん細胞（例えば、非幹がん細胞）の増殖を阻害、および／または死滅させることもできる。これらの分子は、天然タンパク質、または操作されたタンパク質、ならびにがん細胞および／またはがん幹細胞の増殖を阻害および／または死滅させ、いくつかの例では、バルクがん細胞（例えば、非幹がん細胞）の増殖を阻害および／または死滅させる他のタンパク質である。そのような分子の一例は、タブシガルギンなどの化学療法剤である。カーゴ部分は、がん細胞および／またはがん幹細胞に結合する標的化部分（連結されたカーゴ部分および標的化部分は、本明細書ではI L - 4 標的化カーゴタンパク質と称する）に連結することができる。したがって、標的化部分に連結されたカーゴ部分は、がん幹細胞に結合し、がん幹細胞の増殖を阻害する（または死滅させる）。いくつかの例では、カーゴ部分は、がん幹細胞死を

50

引き起こすことができ、いくつかの例では、がん幹細胞死は、アポトーシスによって引き起こされる。いくつかの例では、カーゴ部分は、毒素（植物または微生物由来の毒素を含む）、毒素の活性断片、または天然毒素と少なくとも約 95 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 50 %、もしくは少なくとも約 40 % の配列同一性を有し、天然毒素の生物学的活性を保持または増強する毒素の誘導体であり、例えば、カーゴ部分は表 1 に提供される。他の例では、カーゴ部分は、細胞のライフサイクルを調節するかまたは動物の自然な免疫応答の一部であるタンパク質に由来する。例えば、いくつかのカーゴ部分は、アポトーシスを誘導することが既知であるタンパク質に由来する。いくつかの例では、カーゴ部分は、アポトーシス促進性タンパク質、そのようなタンパク質の活性断片、またはバリエーションが天然部分の生物学的活性を保持または増強している限り、天然部分（配列のアクセッション番号については表 1 を参照されたい）と少なくとも約 95 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 70 %、約 60 %、少なくとも約 50 %、または少なくとも約 40 % の配列同一性を有するそのようなタンパク質の誘導体に由来する。追加の例では、カーゴ部分は、IL-4 標的化カーゴタンパク質の一部として投与された場合に不活性であり得、次いで、対象における別の分子に接触すると活性になる。カーゴ部分のより詳細な説明は、本明細書に提供されている。

10

#### 【0142】

該説明には、IL-4 標的化カーゴタンパク質によりがんを有する（または有していた）対象を治療する方法も含まれる。例えば、該方法は、1 つ以上の開示された IL-4 標的化カーゴタンパク質を対象に投与することを含むことができ、それにより、対象におけるがん細胞および／またはがん幹細胞を治療する（例えば、幹細胞の数または量を減らす）。例えば、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、再発性のがんまたは難治性のがんを有する対象を治療するために使用することができる。そのような例では、対象は、従来の抗がん治療、例えば、放射線、外科手術、または化学療法により治療され、次いで、治療有効性を決定するために検査される。従来の治療によってがんが所望するように変化しなかった場合、対象は、IL-4 標的化カーゴタンパク質により治療することができる。

20

#### 【0143】

いくつかの例では、IL-4 標的化カーゴタンパク質および追加の抗がん治療薬を含む治療レジメンを対象に投与することができる。IL-4 標的化カーゴタンパク質および追加の抗がん治療薬は、標的化されるがん幹細胞の種類に依存するであろう。

30

#### 【0144】

特定の例では、対象には、がん細胞および／またはがん幹細胞を治療するために、以下の特定の IL-4 標的化カーゴタンパク質のうちの 1 つ以上が投与される：循環置換 IL-4-Pseudomonas 外毒素（米国特許第 6,011,002 号を参照されたい）、IL-4-BAD、および MDNA55。

#### 【0145】

A. IL-4 および／または IL-13 ムテイン融合タンパク質

IL-4 および／または IL-13 ムテインは、対象 IL-4 および／または IL-13 ムテインおよび異種ポリペプチド（すなわち、IL-4 および／もしくは IL-13 またはそれらの変異体ではないポリペプチド）を含む融合またはキメラポリペプチドとして調製することができる（例えば、米国特許第 6,451,308 号を参照されたい）。例示的な異種ポリペプチドは、インビボでキメラポリペプチドの循環半減期を増加させることができ、したがって、変異体 IL-4 および／または IL-13 ポリペプチドの特性をさらに増強することができる。様々な実施形態では、循環半減期を増加させるポリペプチドは、ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン、PEG、PEG 誘導体、または IgG 重鎖可変領域を欠く抗体の IgG サブクラスの Fc 領域であり得る。例示的な Fc 領域は、補体固定および Fc 受容体結合を阻害する変異を含むことができ、または溶解性であってもよく、すなわち抗体依存性補体溶解（ADCC；USSN 08/355,502、1994 年 12 月 12 日出願）などの別の機序を介して補体に結合または細胞を溶解するこ

40

50

とができる。

【0146】

「Fc領域」は、IgGをパインで消化することにより生成されるIgGのC末端ドメインに相同である天然に生じるまたは合成のポリペプチドであり得る。IgG Fcは、約50kDaの分子量を有する。変異体IL-4および／またはIL-13ポリペプチドは、Fc領域全体、またはそれが一部であるキメラポリペプチドの循環半減期を延長する能力を保持するより小さな部分を含むことができる。さらに、全長または断片化されたFc領域は、野生型分子のバリエーションであり得る。いくつかの実施形態では、IL-4および／またはIL-13ムテイン融合タンパク質（例えば、本明細書に記載のIL-4および／またはIL-13ムテイン）は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fc領域を含む（例えば、図2A～2Bにおける配列を参照されたい）。いくつかの実施形態では、Fc領域は置換N297Aを含む。

【0147】

いくつかの実施形態では、IL-4および／またはIL-13ムテインは、異種融合ポリペプチドに直接または間接的に連結している。

【0148】

いくつかの実施形態では、IL-4および／またはIL-13ムテインは、Fc領域に直接連結している。いくつかの実施形態では、IL-4および／またはIL-13ムテインは、GGGSなどのリンカーペプチドを介してFc領域に連結している。いくつかの実施形態では、リンカーは(GGGGS)<sub>n</sub>であり、nは1～10の整数である。いくつかの実施形態では、リンカーはGGGSである。いくつかの実施形態では、リンカーはGGGS GGGS（配列番号70）である。いくつかの実施形態では、リンカーはGGGS GGGS GGGS GGGS（配列番号71）である。いくつかの実施形態では、リンカーはGGGS GGGS GGGS GGGS GGGS（配列番号72）である。いくつかの実施形態では、リンカーはGGGS GGGS GGGS GGGS GGGS GGGS（配列番号73）である。

【0149】

Fc領域は「溶解性」または「非溶解性」であり得るが、典型的には非溶解性である。非溶解性Fc領域は、通常、高親和性Fc受容体結合部位およびC'1q結合部位を欠いている。マウスIgG Fcの高親和性Fc受容体結合部位は、IgG Fcの235位にLeu残基を含む。したがって、Fc受容体結合部位は、Leu 235を変異または欠失させることにより破壊できる。例えば、Leu 235をGluで置換することにより、Fc領域が高親和性Fc受容体に結合する能力が阻害される。マウスのC'1q結合部位は、IgGのGlu 318、Lys 320、およびLys 322残基を変異または欠失させることにより、機能的に破壊することができる。例えば、Glu 318、Lys 320、およびLys 322をAla残基で置換することにより、IgG1 Fcは抗体依存性補体溶解を指示できなくなる。対照的に、溶解性IgG Fc領域は、高親和性Fc受容体結合部位およびC'1q結合部位を有する。高親和性Fc受容体結合部位はIgG Fcの235位のLeu残基を含み、C'1q結合部位はIgG1のGlu 318、Lys 320、およびLys 322残基を含む。溶解性IgG Fcは、これらの部位に野生型残基または保存的アミノ酸置換を有する。溶解性IgG Fcは、抗体依存性細胞傷害性または補体指向性細胞溶解(CDC)のために細胞を標的にすることができる。ヒトIgGについての適切な変異も知られている（例えば、Morrison et al., The Immunologist 2:119-124, 1994、およびBrekke et al., The Immunologist 2:125, 1994）を参照されたい）。

【0150】

他の実施形態では、キメラポリペプチドは、対象IL-4および／またはIL-13ムテイン、ならびにFLAG配列などの抗原タグとして機能するポリペプチドを含むことができる。FLAG配列は、本明細書に記載されているように、ビオチン化された高度に特異

10

20

30

40

50

的な抗FLAG抗体によって認識される (Blanar et al., Science 256:1014, 1992、LeClair et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8145, 1992も参照されたい)。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、C末端c-mycエピトープタグをさらに含む。

【0151】

他の実施形態では、キメラポリペプチドは、変異体IL-4および／またはIL-13ポリペプチドならびに変異IL-4および／またはIL-13ポリペプチドの発現を増強するか、またはそれらの細胞局在を指向させるように機能する異種ポリペプチド、例えば、Ag2p凝集素サブユニット (例えば、Boder and Wittrop, Nature Biotechnol. 15:553-7, 1997を参照されたい) を含む。

10

【0152】

他の実施形態では、変異体IL-4および／またはIL-13ならびに抗体またはその抗原結合部分を含むキメラポリペプチドを生成することができる。キメラタンパク質の抗体または抗原結合成分は、標的化部分として役立ち得る。例えば、キメラタンパク質を特定の細胞サブセットまたは標的分子に局在化させるために使用できる。サイトカイン抗体キメラポリペプチドを産生する方法は、例えば、米国特許第6,617,135号に記載されている。

【0153】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、PD-1受容体とそのリガンドであるPD-L1との間の相互作用を破壊し、かつ／もしくはPD-1／PD-L1シグナル伝達経路の成分に対する抗体である、抗体またはその抗原結合部分との融合体を含む。PD-1に結合し、PD-1とそのリガンドであるPD-L1との相互作用を破壊し、抗腫瘍免疫応答を刺激する当該技術分野で既知の抗体は、本明細書に開示されるキメラポリペプチドでの使用に適している。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合部分は、PD-1に特異的に結合する。例えば、PD-1を標的とし、本発明で使用できる抗体には、例えば、ニボルマブ (BMS-936558、Bristol-Myers Squibb)、ペンブロリズマブ (ランブロリズマブ、MK03475またはMK-3475、Merck)、ヒト化抗PD-1抗体JS001 (Shanghai Junshi)、モノクローナル抗PD-1抗体TSR-042 (Tesarro, Inc.)、ピジリズマブ (抗PD-1 mAb CT-011、Medivation)、抗PD-1モノクローナル抗体BGB-A317 (BeiGene)、および／または抗PD-1抗体SHR-1210 (Shanghai HengRui)、ヒトモノクローナル抗体REGN2810 (センプリマブ、Regeneron)、ヒトモノクローナル抗体MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb)、および／またはヒト化抗PD-1 IgG4抗体PDR001 (Novartis) が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、PD-1抗体はクローン：RMP1-14 (ラットIgG) - BioXcellカタログ番号BP0146に由来する。他の適切な抗体には、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,008,449号に開示されている抗PD-1抗体が含まれる。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合部分は、PD-L1に特異的に結合し、PD-1との相互作用を阻害し、それにより免疫活性を増加させる。PD-L1に結合し、PD-1とPD-L1との相互作用を破壊し、抗腫瘍免疫応答を刺激する当該技術分野で既知の任意の抗体は、本明細書に開示されるキメラポリペプチドでの使用に適している。例えば、PD-L1を標的とし、臨床試験中の抗体には、BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) およびMPDL3280A (Genentech) が含まれる。PD-L1を標的とする他の適切な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,943,743号に開示されている。PD-1またはPD-L1に結合し、PD-1／PD-L1相互作用を破壊し、抗腫瘍免疫応答を刺激する任意の抗体が本明細書に開示されるキメラでの使用に適していることは、当業者には理解されるであろう。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、抗PD-1抗体への融合を含む。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、抗PD-L1抗

20

30

40

50

体への融合を含む。

【0154】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、CTLA-4を標的とし、そのCD80およびCD86との相互作用を破壊する抗体またはその抗原結合部分への融合を含む。CTLA-4を標的とする例示的な抗体には、FDA承認済みのイピリムマブ（MDX-010、MDX-101、Bristol-Myers Squibb）、および現在ヒト試験中のトレメリムマブ（チシリムマブ、CP-675、206、Pfizer）が含まれる。CTLA-4を標的とする他の適切な抗体は、参照により本明細書に組み込まれるWO2012/120125、米国特許第6,984,720号、第6,682,736号、および米国特許出願第2002/0039581号、第2002/0086014号、および第2005/0201994号に開示されている。CTLA-4に結合し、そのCD80およびCD86との相互作用を破壊し、抗腫瘍免疫応答を刺激する任意の抗体が本明細書に開示されるキメラポリペプチドでの使用に適していることは、当業者には理解されよう。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、抗CTLA-4抗体への融合を含む。

10

【0155】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、LAG-3を標的とし、そのMHCクラスII分子との相互作用を破壊する抗体またはその抗原結合部分への融合を含む。LAG-3を標的とする例示的な抗体は、現在ヒト試験中のIMP321（Immutep）である。LAG-3を標的とする他の適切な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第2011/0150892号に開示されている。LAG-3に結合し、そのMHCクラスII分子との相互作用を破壊し、抗腫瘍免疫応答を刺激する任意の抗体が本明細書に開示されるキメラポリペプチドでの使用に適していることは、当業者には理解されよう。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、抗LAG-3抗体への融合を含む。

20

【0156】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、B7-H3またはB7-H4を標的とする抗体またはその抗原結合部分への融合を含む。B7ファミリーには任意の定義された受容体はないが、これらのリガンドは腫瘍細胞または腫瘍浸潤細胞にて上方制御される。B7-H3を標的とする例示的な抗体は、現在ヒト試験中のMGA271（Macrogenics）である。B7ファミリーメンバーを標的とする他の適切な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第2013/0149236号に開示されている。B7-H3またはH4に結合し、抗腫瘍免疫応答を刺激する任意の抗体が本明細書に開示されるキメラでの使用に適していることは、当業者には理解されるであろう。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、抗B7-H3またはB7-H4抗体への融合を含む。

30

【0157】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、TIM-3を標的とし、そのガレクチン9との相互作用を破壊する抗体またはその抗原結合部分への融合を含む。TIM-3を標的とする適切な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第2013/0022623号に開示されている。TIM-3に結合し、そのガレクチン9との相互作用を破壊し、抗腫瘍免疫応答を刺激する任意の抗体が本明細書に開示されるキメラポリペプチドでの使用に適していることは、当業者には理解されよう。いくつかの態様では、キメラポリペプチドは、抗TIM-3抗体への融合を含む。

40

【0158】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、4-1BB/CD137を標的とし、そのCD137Lとの相互作用を破壊する抗体またはその抗原結合部分への融合を含む。4-1BB/CD137に結合し、そのCD137Lまたは別のリガンドとの相互作用を破壊し、全体として抗腫瘍活性をもたらす抗腫瘍免疫応答または免疫刺激応答を刺激する抗体が本明細書に開示されるキメラポリペプチドでの使用に適していることは、当業者に

50

は理解されよう。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、抗 4-1BB/CD137 抗体への融合を含む。

【0159】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、GITRを標的とし、そのリガンドとの相互作用を破壊する抗体またはその抗原結合部分への融合を含む。GITRに結合し、そのGITRLまたは別のリガンドとの相互作用を破壊し、全体として抗腫瘍活性をもたらす抗腫瘍免疫応答または免疫刺激応答を刺激する抗体が本明細書に開示されるキメラポリペプチドでの使用に適していることは、当業者には理解されよう。いくつかの態様では、キメラポリペプチドは、抗GITR抗体への融合を含む。

【0160】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、OX40を標的とし、そのリガンドとの相互作用を破壊する抗体またはその抗原結合部分への融合を含む。OX40に結合し、そのOX40Lまたは別リガンドとの相互作用を破壊し、全体として抗腫瘍活性をもたらす抗腫瘍免疫応答または免疫刺激応答を刺激する抗体が本明細書に開示されるキメラポリペプチドでの使用に適していることは、当業者には理解されよう。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、抗OX40抗体への融合を含む。

【0161】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、CD40を標的とし、そのリガンドとの相互作用を破壊する抗体またはその抗原結合部分への融合を含む。CD40に結合し、そのリガンドとの相互作用を破壊し、全体として抗腫瘍活性をもたらす抗腫瘍免疫応答または免疫刺激応答を刺激する抗体が本明細書に開示されるキメラポリペプチドでの使用に適していることは、当業者には理解されよう。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、抗CD40抗体への融合を含む

【0162】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、ICOSを標的とし、そのリガンドとの相互作用を破壊する抗体またはその抗原結合部分への融合を含む。ICOSに結合し、そのリガンドとの相互作用を破壊し、全体として抗腫瘍活性をもたらす抗腫瘍免疫応答または免疫刺激応答を刺激する抗体が本明細書に開示されるキメラポリペプチドでの使用に適していることは、当業者には理解されよう。いくつかの態様では、キメラポリペプチドは、抗ICOS抗体への融合を含む。

【0163】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、CD28を標的とし、そのリガンドとの相互作用を破壊する抗体またはその抗原結合部分への融合を含む。CD28に結合し、そのリガンドとの相互作用を破壊し、全体として抗腫瘍活性をもたらす抗腫瘍免疫応答または免疫刺激応答を刺激する抗体が本明細書に開示されるキメラポリペプチドでの使用に適していることは、当業者には理解されよう。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、抗CD28抗体への融合を含む。

【0164】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、IFN $\alpha$ を標的とし、そのリガンドとの相互作用を破壊する抗体またはその抗原結合部分への融合を含む。IFN $\alpha$ に結合し、そのリガンドとの相互作用を破壊し、全体として抗腫瘍活性をもたらす抗腫瘍免疫応答または免疫刺激応答を刺激する抗体が本明細書に開示されるキメラポリペプチドでの使用に適していることは、当業者には理解されよう。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、抗IFN $\alpha$ 抗体への融合を含む。

【0165】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、腫瘍抗原または腫瘍抗原を標的とするポリペプチドへの融合を含む。一般に、腫瘍抗原は、腫瘍細胞をそれらの正常な細胞対応物から区別することを可能にし、例えば、腫瘍特異的抗原(TSA)および腫瘍関連抗原(TAA)を含み得る。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、がん原遺伝子および／または腫瘍抑制因子、ならびに過剰発現または異常発現した細胞タンパク質、発がん性ウイ

10

20

30

40

50

ルスによって産生される腫瘍抗原、がん胎児性抗原、細胞表面糖脂質および糖タンパク質の変化、および／または細胞型特異的分化抗原である。そのような腫瘍抗原には、黒色腫瘍抗原、がん精巣抗原、上皮腫瘍抗原、細胞周期調節タンパク質、前立腺特異的抗原（例えば、米国特許第5,538,866号に開示されているような前立腺がん腫瘍抗原を含む）、リンパ腫（米国特許第4,816,249号、第5,068,177号、および第5,227,159号）が含まれ得る。腫瘍抗原には、例えば、2G3および369F10に結合したHMWムチン、c-erbB-2関連腫瘍抗原（およそ42kDまたは55kDの糖タンパク質）、およそ113F1に結合した40、60、100および200kDの抗原、9-O-アセチルGD3、p97、アルファフェトプロテイン（AFP）（例えば、胚細胞腫瘍および／または肝細胞がんについての）、がん胎児性抗原（CEA）（例えば、腸がん、時に肺がんまたは乳がんについての）、CA-125（例えば、卵巣がんについての）、MUC-1（例えば、乳がんについての）、上皮腫瘍抗原（ETA）（例えば、乳がんについての）、チロシナーゼ（例えば、悪性黒色腫についての）、黒色腫関連抗原（MAGE）（例えば、悪性黒色腫についての）、がん／精巣抗原1（CTAG1B）、黒色腫関連抗原1（MAGEA1）、異常なRas産物、異常なp53産物、サイクリンの過剰発現（例えば、サイクリンB1を含む）、フィブロネクチンの変異、MUC1糖タンパク質の翻訳後変化、分泌腫瘍抗原（例えば、ガングリオシドを含む）が含まれ得るが、これらに限定されない。

10

#### 【0166】

#### B. IL-4 標的化カーゴタンパク質

20

IL-4 標的化カーゴタンパク質は、カーゴ部分に連結した標的化部分を含むタンパク質である。IL-4 標的化カーゴタンパク質は、がん細胞および／またはがん幹細胞に特異的に結合し、がん幹細胞の増殖を減少または抑制するように機能し、腫瘍微小環境（TME）における免疫抑制細胞を標的化する。いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、IL-4 R 標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、本明細書に記載されるIL-4またはそのバリエーションを含むIL-4 R 標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、MDNA55（配列番号65）またはそのバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、MDNA55（配列番号65）である。

30

#### 【0167】

IL-4 R 標的化部分は、IL-4 配列またはそのバリエーションを含むことができる。例示的なポリペプチド配列は、配列番号51～配列番号55、配列番号58～配列番号62、および配列番号64～配列番号69に提供される。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は、配列番号51～配列番号55、配列番号58～配列番号62、および／または配列番号64～配列番号66のうちのいずれか1つに提供されるものである。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号51である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号52である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号53である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号54である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号55である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号58である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号59である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号60である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号61である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号62である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号64である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号65である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号66である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号67である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号68である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号69である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は、配列番号51～

40

50

配列番号 55、配列番号 58～配列番号 62、および／または配列番号 64～配列番号 66 のうちのいずれか 1 つと 98 % 同一である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は、配列番号 51～配列番号 55、配列番号 58～配列番号 62、および／または配列番号 64～配列番号 66 のうちのいずれか 1 つと 99 % 同一である。いくつかの実施形態では、配列番号 51～配列番号 55、配列番号 58～配列番号 62、および／または配列番号 64～配列番号 66 のうちのいずれか 1 つは、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 51 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 52 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 53 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 54 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 55 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 58 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 59 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 60 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 61 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 62 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 64 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 65 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 66 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 67 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 68 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 69 は、IL-4R 標的化部分の一部である。

10

20

【0168】

構築物の IL-13 スーパーカインまたはムテイン成分は、少なくとも約 50 のアミノ酸の長さ、少なくとも約 75、少なくとも約 100、少なくとも約 110、少なくとも約 115 のアミノ酸の長さ、最大で膜貫通ドメインにおける野生型タンパク質の全長、すなわち約 116 のアミノ酸の長さであり得る。例えば、スーパーカインは、CAR のヒンジ、膜貫通、またはシグナル伝達ドメインに融合され得る。例示的なポリペプチド配列は、配列番号 2～配列番号 48、配列番号 56、配列番号 57、および配列番号 63 に提供される。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は、配列番号 2～配列番号 38 のうちのいずれか 1 つに提供される。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 2 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 2 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 3 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 4 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 5 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 6 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 7 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 8 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 9 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 10 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 11 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 12 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 13 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 14 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 15 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 16 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 17 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 18 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 19 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 20 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 21 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 22 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 23 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 24 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 25 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 26 である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド配列は配列番号 27 である

30

40

50

50

部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 41 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 43 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 44 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 45 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 46 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 47 は、IL-4R 標的化部分の一部である。いくつかの実施形態では、配列番号 48 は、IL-4R 標的化部分の一部である。

【0169】

IL-13 配列の表を以下に示す。

表 5 : IL-13 アミノ酸配列のリスト

| 配列番号<br>(情報)          | アミノ酸配列                                                                                                                       |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 1<br>(IL-13 野生型) | PGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVW<br>SINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGF<br>CPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLK<br>KLFREGQFN  |
| 配列番号 2                | PGPVPPSTAVRALIEELINITQNQKAPLCNGSMVW<br>SINRTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQDMLSGF<br>CPHKVSAGQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHLRT<br>LFREGQFN |
| 配列番号 3                | PGPVPPSTAIRELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWSI<br>NLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCP<br>HKVSAGQFSSLHVRGSKIEVAQFVKDLLHHLRALF<br>REGQFN |
| 配列番号 4                | PGPVPPSTAVRELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWS<br>INRTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFC<br>PHKVSAGQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHLRTL<br>FREGQFN |
| 配列番号 5                | PGPVPPSTALIELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWSI<br>NLTAGIYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPH<br>KVSAGQFSSLHVKGSKIEVAQFVKDLLHHLRALM<br>REGQFN |
| 配列番号 6                | PGPVPPSTAIRELIEELNITQNQKAPLCNGSMVWS<br>INLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFC<br>PHKVSAGQFSSLHVMKSKIEVAQFVKDLLHHLRA<br>LFREGQFN  |
| 配列番号 7                | PGPVPPSTAIRELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWSI<br>NLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCP<br>HKVSAGQFSSLHVRSSRIEVAQFVKDLLHHLRTL<br>FREGQFN |
| 配列番号 8                | PGPVPPSTALRELIEELINITQNEKAPLCNGSMVWS<br>INLTAGIYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCP<br>HKVSAGQFSSLHVTGSKIEVAQFVKDLLYHLRALF<br>REGQFN |
| 配列番号 9                | PGPVPPSTALSELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWS<br>INPTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFC<br>PHKVAAGQFSSLHDKGSMIEVAQFVKDLLYHLRT<br>LFREGQFN |

10

20

30

40

50

| 配列番号<br>(情報) | アミノ酸配列                                                                                                                       |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 10      | PGPVPSTATRELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWS<br>INLTADMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFC<br>PHKVSQFSSSLHVRGSKIEVAQFVKDLLYHLRTL<br>FREGQFN   |
| 配列番号 11      | PGPVPSTADIELIAELINITQNQKAPLCNGSMVWS<br>INLTADMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFC<br>PHKVSAGQFSSSLHVKKTRIEVAQFVKDLLHLKKL<br>FKEGQFN  |
| 配列番号 12      | PGPVPSTAARELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVW<br>SINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGF<br>CPHKVSAGQLSSSLHVTGKRIEVAQFVKDLLNHLR<br>ALFKEGQFN |
| 配列番号 13      | PGPVPSTAVRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVW<br>SINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGF<br>CPHKVSAGQFSSSLHVRDTRIEVAQFVKDLLNHLKE<br>LFTEGQFN |
| 配列番号 14      | PGPVPSTALSELMEELVNITQNQKAPLCNGSMV<br>WSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSG<br>FCPHKVSAGQFSSSLHVRDSKIEVAQFVKDLLNHLK<br>ALFKEGQFN |
| 配列番号 15      | GPVPPSTAFRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSI<br>NLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCP<br>HKVSPGQFSSSLHVTNSRIEVAQFVKDLLNHLKALF<br>KEGQYN |
| 配列番号 16      | GPVPPSTAHLELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWSI<br>NLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCP<br>HKVSAGQFSSSLHVKETRIEVAQFVKDLLNHLKTLF<br>KEGQFN |
| 配列番号 17      | PGPVPSTAHLELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWS<br>INPTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFC<br>PHKVSAGQFSSSLHVMDTRIEVAQFVKDLLHLKK<br>LFKEGQFN  |
| 配列番号 18      | PGPVPSTAHRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVW<br>SINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGF<br>CPHKVSAGQFSSSLHVTGRKIEVAQFVKDLLHLK<br>KLFKEGQFN  |

10

20

30

40

50

| 配列番号<br>(情報)                                                                                    | アミノ酸配列                                                                                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 19                                                                                         | PGPVPPSTAHRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVW<br>RINRTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGF<br>CPHKVSAGQFSSLHVMDSRIEVAQFVKDLLNHLR<br>ALFKEGQFN  |
| 配列番号 20                                                                                         | PGPVPPSTAARELIEELFNITQNQKAPLCNGSMVW<br>SINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTKRMLSGF<br>CPHKVSAGQFPSLVKKTRIEVAQFVKDLLIHLRK<br>LFKEGQFN   |
| 配列番号 21<br>(R11I、V18I、R86K、D87G、T88S、<br>L101H、K104R、K105A、F107M を含む例示<br>的な配列、本明細書では A5 と呼ばれる) | PGPVPPSTALIELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWSI<br>NLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCP<br>HKVSAGQFSSLHVKGSKIEVAQFVKDLLHHLRAL<br>MREGQFN  |
| 配列番号 22<br>(L10I、V18L、R86M、D87K、T88S、<br>L101H、K104R、K105A を含む例示的な配<br>列、本明細書では A6 と呼ばれる)       | PGPVPPSTAIARELIEELLNITQNQKAPLCNGSMVWS<br>INLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFC<br>PHKVSAGQFSSLHVMKSKIEVAQFVKDLLHHLRA<br>LFREGQFN |
| 配列番号 23<br>(L10I、V18I、D87G、T88S、L101H、<br>K104R、K105A を含む例示的な配列、本明細<br>書では<br>A7 と呼ばれる)         | PGPVPPSTAIARELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWSI<br>NLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCP<br>HKVSAGQFSSLHVRGSKIEVAQFVKDLLHHLRALF<br>REGQFN |
| 配列番号 24<br>(L10I、V18I、D87S、T88S、K89R、<br>L101H、K104R、K105T を含む例示的な配<br>列、本明細書では A8 と呼ばれる)       | PGPVPPSTAIARELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWSI<br>NLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCP<br>HKVSAGQFSSLHVRSSRIEVAQFVKDLLHHLRTL<br>FREGQFN |
| 配列番号 25<br>(L10V、V18I、D87S、T88S、L101F、<br>K104R、K105T を含む例示的な配列、本明細<br>書では A11 バリエント 1 と呼ばれる)   | PGPVPPSTAVRELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWS<br>INRTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFC<br>PHKVSAGQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHLRTL<br>FREGQFN  |
| 配列番号 25<br>(L10V、V18I、D87S、T88S、L101F、<br>K104R、K105T を含む例示的な配列、本明細<br>書では A11 バリエント 2 と呼ばれる)   | PGPVPPSTALRELIEELINITQNQKAPLCNGSMV<br>WSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLS<br>GFCPHKVSAGQFSSLHVTGSKIEVAQFVKDLLY<br>HLRALFREGQFN  |
| 配列番号 26<br>(V18I、R86T、D87G、T88S、L101Y、<br>K104R、K105A を含む例示的な配列、本明細<br>書では<br>B2 と呼ばれる)         | PGPVPPSTALRELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWS<br>INLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFC<br>PHKVSAGQFSSLHVTGSKIEVAQFVKDLLYHLRAL<br>FREGQFN  |

10

20

30

40

50

| 配列番号<br>(情報)                                                                                        | アミノ酸配列                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 27<br>(R11S、V18I、R86K、D87G、T88S、<br>K89M、L101Y、K104R、K105T を含む例示的<br>な配列、<br>本明細書では B4 と呼ばれる)  | PGPVPPSTALSELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWS<br>INLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFC<br>PHKVSAGQFSSLHVKGSMIEVAQFVKDLLYHLRT<br>LFREGQFN |
| 配列番号 28<br>(L10T、V18I、D87G、T88S、K89K、<br>L10Y1、K104R、K105T を含む例示的な配<br>列、本明細書では B6 と呼ばれる)           | PGPVPPSTATRELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWS<br>INLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFC<br>PHKVSAGQFSSLHVRGSKIEVAQFVKDLLYHLRTL<br>FREGQFN |
| 配列番号 29<br>(L10D、R11I、V18I、R86K、D87K、<br>K89R、R108K を含む例示的な配列、本明細<br>書では<br>C2 と呼ばれる)               | PGPVPPSTADIELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWSI<br>NLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCP<br>HKVSAGQFSSLHVKKTRIEVAQFVKDLLHLKLF<br>KEGQFN   |
| 配列番号 30<br>(L10A、R86T、D87G、T88K、K89R、<br>L101N、K104R、K105A、R108K を含む例示<br>的な配列、<br>本明細書では C3 と呼ばれる) | PGPVPPSTAARELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVW<br>SINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGF<br>CPHKVSAGQFSSLHVTGKRIEVAQFVKDLLNHLR<br>ALFKEGQFN |
| 配列番号 31<br>(L10V、K89R、L101N、K105E、R108T を<br>含む例示的な配列、本明細書では C4 と呼ば<br>れる)                          | PGPVPPSTAVRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVW<br>SINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGF<br>CPHKVSAGQFSSLHVRDTRIEVAQFVKDLLNHLKE<br>LFTEGQFN |
| 配列番号 32<br>(R11S、I14M、T88S、L101N、K105A、<br>R108K を含む例示的な配列、本明細書では<br>C7 と<br>呼ばれる)                  | PGPVPPSTALSELMEELVNITQNQKAPLCNGSMV<br>WSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSG<br>FCPHKVSAGQFSSLHVRDSKIEVAQFVKDLLNHLK<br>ALFKEGQFN |
| 配列番号 33<br>(L10H、R11L、V18I、R86K、D87E、<br>K89R、L101N、K105T、R108K を含む例示的<br>な配列、<br>本明細書では C9 と呼ばれる)  | PGPVPPSTAHLELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWS<br>INLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFC<br>PHKVSAGQFSSLHVKETRIEVAQFVKDLLNHLKTL<br>FKEGQFN |
| 配列番号 34<br>(L10H、R11L、V18I、R86M、K89R、<br>R108K を含む例示的な配列、本明細書では<br>C10 と<br>呼ばれる)                   | PGPVPPSTAHLELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWS<br>INLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFC<br>PHKVSAGQFSSLHVMDTRIEVAQFVKDLLHLKK<br>LFKEGQFN  |

10

20

30

40

50

| 配列番号<br>(情報)                                                                                                        | アミノ酸配列                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 35<br>(L10H、R86T、D87G、T88R、R108K を含む<br>例示的な配列、本明細書では C11 と呼ばれる)                                               | PGPVPPSTAHRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVW<br>SINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGF<br>CPHKVSAGQFSSLHVTGRKIEVAQFVKDLLLLHLK<br>KLFKEGQFN                                                                  |
| 配列番号 36<br>(L10H、R86M、T88S、K89R、L101N、<br>K104R、K105A、R108K を含む例示的な配<br>列、本明細書では C12 と呼ばれる)                         | PGPVPPSTAHRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVW<br>SINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGF<br>CPHKVSAGQFSSLHVMDSRIEVAQFVKDLLNHLR<br>ALFKEGQFN                                                                   |
| 配列番号 37<br>(L10A、V18F、R86F、D87F、K89R、<br>L101I、K104R、R108K を含む例示的な配列、<br>本明細書では D7 と呼ばれる)                           | PGPVPPSTAARELIEELFNITQNQKAPLCNGSMVW<br>SINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGF<br>CPHKVSAGQFSSLHVKKTRIEVAQFVKDLLIHLRK<br>LFKEGQFN                                                                   |
| 配列番号 38<br>(L10V、E12A、V18I、R65D、D87S、<br>T88S、L101F、K104R、K105T を含む例示的<br>な配列、<br>本明細書では IL-13dn と呼ばれる)             | PGPVPPSTAVRALIEELINITQNQKAPLCNGSMVW<br>SINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQDMLSGF<br>CPHKVSAGQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHLRT<br>LFREGQFN                                                                   |
| 配列番号 39<br><u>**シグナルペプチド**</u>                                                                                      | <u>MHPLLNP<del>LLL</del>ALGLMALLLT<del>TV</del>IALTCLGGFASPG</u><br>PVPSTAHRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSI<br>NLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCP<br>HKVSAGQFSSLHVTGRKIEVAQFVKDLLLLHLKKLF<br>KEGQFN |
| 配列番号 40<br>(L10V、E12A、V18I、R65D、D87S、<br>T88S、L101F、K104R、K105T を含む例示的<br>な配列、<br>本明細書では IL-13DN バリエント 1 と呼ばれ<br>る) | PGPVPPSTAVRALIEELINITQNQKAPLCNGSMV<br>WSINRTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQDMLS<br>GFCPHKVSAGQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFH<br>LRTLFRREGQFN                                                                  |
| 配列番号 41<br>(L10V、E12A、V18I、R65D、D87S、<br>T88S、L101F、K104R、K105T を含む例示的<br>な配列、<br>本明細書では IL-13DN バリエント 2 と<br>呼ばれる) | PGPVPPSTAVRALIEELINITQNQKAPLCNGSMVW<br>SINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQDMLSGF<br>CPHKVSAGQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHLRT<br>LFREGQFN                                                                   |

10

20

30

40

50

| 配列番号<br>(情報)                            | アミノ酸配列                                                                                                                              |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 42<br>N 末端に追加のメチオニンを含む野生型<br>IL-13 | MPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMV<br>WSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSG<br>FCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLLHLK<br>KLFREGQFN     |
| 配列番号 43<br>循環置換 IL-13                   | MYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSA<br>GQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLLHLKKLFREGQF<br>NGGSGPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNG<br>SMVWSINLTAG  |
| 配列番号 44<br>循環置換 IL-13                   | MYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSA<br>GQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLLHLKKLFREGQF<br>NGGSGMPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLC<br>NGSMVWSINLTAG |
| 配列番号 45<br>循環置換 IL-13 「A11」 バリエント       | MYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSA<br>GQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHLRTLRFREGQF<br>NGGSGPGPVPPSTAVRELIEELINITQNQKAPLCNG<br>SMVWSINRTAG  |
| 配列番号 46<br>循環置換 IL-13                   | MYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSA<br>GQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHLRTLRFREGQF<br>NGGSGMPGPVPPSTAVRELIEELINITQNQKAPLCN<br>GSMVWSINRTAG |
| 配列番号 47<br>循環置換 IL-13 「DN」 バリエント        | MYCAALESLINVSGCSAIEKTQDMLSGFCPHKVSA<br>GQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHLRTLRFREGQF<br>NGGSGPGPVPPSTAVRALIEELINITQNQKAPLCNG<br>SMVWSINLTAG  |
| 配列番号 48<br>循環置換 IL-13                   | MYCAALESLINVSGCSAIEKTQDMLSGFCPHKVSA<br>GQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHLRTLRFREGQF<br>NGGSGMPGPVPPSTAVRALIEELINITQNQKAPLCN<br>GSMVWSINLTAG |

10

20

30

40

50

【 0 1 7 0 】

I L - 4 配列の表を以下に示す。

表 6 : I L - 4 アミノ酸配列のリスト

| 配列番号<br>(情報)                           | アミノ酸配列                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 49<br>(シグナルペプチドを伴う IL-4<br>野生型)   | MGLTSQLLPPLFLLACAGNFVHGKCDITLQEIIKTL<br>NSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTEKETFCRAATV<br>LRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLD<br>RNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREK<br>YSKCSS                                                                                                               |
| 配列番号 50<br>N 末端の開始に追加のメチオニンを含む<br>IL-4 | MHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASK<br>DTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQF<br>HRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTL<br>ENFLERLKTIMREKYSKCSS                                                                                                                                       |
| 配列番号 51<br>KFR                         | KCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNT<br>TEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHR<br>HKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLEN<br>FLERLKTIMKEKFRKCSS                                                                                                                                         |
| 配列番号 52<br>RGA                         | MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQ<br>QFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQS<br>TLENFLERLRVIMQSKWFKCGAGGNGGHKCDITLQE<br>IITLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAAS                                                                                                                                    |
| 配列番号 53<br>循環置換野生型 IL-4                | MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQ<br>QFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQS<br>TLENFLERLKTIMREKYSKCSSGGNGGHKCDITLQEII<br>KTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAAS                                                                                                                                   |
| 配列番号 54<br>循環置換「KFR」IL-4 バリエント         | MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQ<br>QFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQS<br>TLENFLERLKTIMKEKFRKCSSGGNGGHKCDITLQEII<br>KTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASRQFYSHHEKDTR<br>CLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCP<br>VKEANQSTLENFLERLRVIMQSKWFKCGAGGNGGH<br>KCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAAS |
| 配列番号 55<br>循環置換「KF」IL-4 バリエント          | MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQ<br>QFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQS<br>TLENFLERLKTIMKEKFKCSSGGNGGHKCDITLQEIIK<br>TLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAAS                                                                                                                                    |

10

20

30

40

## 【 0 1 7 1 】

I L - 4 配列または I L - 1 3 配列のいずれかを含むサイトカイン融合体の表を以下に示す。

表 7 : アミノ酸配列のリスト

| 配列番号<br>(情報)                                                | アミノ酸配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 56<br>IL13-BAD(IL13Ra2 を標的化する;C11<br>と称される;GGGGS リンカー) | PGPVPPSTAHRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSI<br>NLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPH<br>KVSAGQFSSLHVTGRKIEVAQFVKDLLHLKLFKE<br>GQFNGGGGSMFQIPEFEPSEQEDSSSAERGLGPS<br>PAGDGPSGSGKHHRQAPGLLWDASHQQEQPTSSSH<br>HGGAGAVEIRSRHSAYPAGTEDDEGMGEEPPFRGR<br>SRAAPPNLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKKGLPRP<br>KSAGTATQMRQSSSWTRVFQSWWDRNLGRGSSAPS<br>Q                          |
| 配列番号 57<br>A11-BAD(A11 は IL13Ra1 アゴニスト<br>である;GGGGS リンカー)   | PGPVPPSTAVRELIEELINITQNQKAPLCNGSMVWSIN<br>RTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHK<br>VSAGQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHLRTLRFREGQ<br>FNGGGGSMFQIPEFEPSEQEDSSSAERGLGPS<br>PAGDGPSGSGKHHRQAPGLLWDASHQQEQPTSSSH<br>HGGAGAVEIRSRHSAYPAGTEDDEGMGEEPPFRGR<br>SRAAPPNLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKKGLPRP<br>KSAGTATQMRQSSSWTRVFQSWWDRNLGRGSSAPS<br>Q                       |
| 配列番号 58<br>KFR-BAD(KFR は 2 型 IL-4R を標的化<br>する;GGGGS リンカー)   | KCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA<br>ASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATA<br>QQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEAN<br>QSTLENFLERLKTIMKEKFRKCSSGGGSMFQIPEFE<br>PSEQEDSSSAERGLGPSPAGDGPSGSGKHHRQAPGLL<br>WDASHQQEQPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGTE<br>DDEGMGEEPPFRGRSRAAPPNLWAAQRYGRELRR<br>MSDEFVDSFKKGLPRPKSAGTATQMRQSSSWTRVFQ<br>SWWDRNLGRGSSAPSQ          |
| 配列番号 59<br>pKFR4-Bad-H6                                     | MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQ<br>QFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQS<br>TLENFLERLKTIMKEKFRKCSSGGNGGHKCDITLQEII<br>KTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASGSFQIPEFEPSEQ<br>EDSSSAERGLGPSPAGDGPSGSGKHHRQAPGLL<br>WDASHQQEQPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGTE<br>DDEGMGEEPPFRGRSRAAPPNLWAAQRYGRELRR<br>MSDEFVDSFKKGLPRPKSAGTATQMRQSSSWTRVFQ<br>SWWDRNLGRGSSAPSQHHHHHH |

10

20

30

40

50

| 配列番号<br>(情報)                                        | アミノ酸配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 60<br>cpKFR4-Bad 融合体;GS リンカー                   | MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQ<br>QFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQS<br>TLENFLERLKTIMKEKFRKCSSGGNGGHHKCDITLQEII<br>KTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASGSFQIPEFEPSEQ<br>EDSSSAERGLGPSPAGDGPSGSGKHHRQAPGLL<br>WDASHQQEQPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGTE<br>DDEGMGEEPPFRGRSRAAPPNLWAAQRYGRELRR<br>MSDEFVDSFKKGLPRPKSAGTATQMRQSSSWTRVFQ<br>SWWDRNLGRGSSAPSQ            |
| 配列番号 61<br>cpIL4-BAD;GS リンカー                        | MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGAT<br>AQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEA<br>NQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSSGGNGGHHKCDITL<br>QEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASGSFQIPEFEP<br>SEQEDSSSAERGLGPSPAGDGPSGSGKHHRQAPGLL<br>WDASHQQEQPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGTE<br>DDEGMGEEPPFRGRSRAAPPNLWAAQRYGRELRR<br>MSDEFVDSFKKGLPRPKSAGTATQMRQSSSWTRVFQ<br>SWWDRNLGRGSSAPSQ             |
| 配列番号 62<br>cpIL-4-BAD H6;GS リンカー                    | MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQ<br>QFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQS<br>TLENFLERLKTIMREKYSKCSSGGNGGHHKCDITLQEII<br>KTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASGSFQIPEFEPSEQ<br>EDSSSAERGLGPSPAGDGPSGSGKHHRQAPGLL<br>WDASHQQEQPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGTE<br>DDEGMGEEPPFRGRSRAAPPNLWAAQRYGRELRR<br>MSDEFVDSFKKGLPRPKSAGTATQMRQSSSWTRVFQ<br>SWWDRNLGRGSSAPSQH H H H H H |
| 配列番号 63<br>IL13-BAD(IL13Ra1 を標的化し、<br>IL13DN と称される) | PGPVPPSTAVRALIEELINITQNQKAPLCNGSMVWSI<br>NRTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQDMLSGFCPH<br>KVSAGQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHLRTLRFREG<br>QFNGGGGSGGGGSGGGGSFQIPEFEPSEQEDSSSAER<br>GLGPSPAGDGPSGSGKHHRQAPGLLWDASHQQEQP<br>TSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGTEDDEGMGEEPS<br>PFRGRSRAAPPNLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFK<br>KGLPRPKSAGTATQMRQSSSWTRVFQSWWDRNLGR<br>GSSAPSQ                    |

10

20

30

40

50

| 配列番号<br>(情報)                     | アミノ酸配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 64<br>IL-4-BclxL;GGGGS リンカー | KCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNT<br>TEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHR<br>HKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLEN<br>FLERLKTIMREKYSKCSSGGGGSMSQSNRELVV<br>DFLSYKLSQKGYSWSQFSDVEENRTEAPEGTESEME<br>TPSAINGNPSWHLADSPA VNGATGHSSSLDAREVIP<br>MAAVKQALREAGDEFELRYRRAFSDLTSQLHITPGT<br>AYQSFEQVVNELFRDGVNWGRIVAFFSFGGALCVES<br>VDKEMQVLVSRIAAWMATYLNHDHLEPWIQENGGW<br>DTFVELYGNNAAESRKGQERFNRWFLTGMTVAGV<br>VLLGSLFSRK                                                                                                                              |
| 配列番号 65<br>MDNA55                | MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQ<br>QFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQS<br>TLENFLERLKTIMREKYSKCSSGGNGGHKCDITLQEII<br>KTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKASGGPEGGS<br>LAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQ<br>RLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGDDLGE<br>AIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAA<br>NGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQ<br>NWTVERLLQHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSI<br>VFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQ<br>EPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTAAPE<br>AAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPL<br>AERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALP<br>DYASQPGKPPKDEL |
| 配列番号 66<br>cpS4-Bad-H6           | MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQ<br>QFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQS<br>TLENFLERLRVIMQSKWFKCGAGGNGGHKCDITLQE<br>IIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASGSFQIPEFEPSE<br>QEDSSSAERGLGPSPAGDGPSGSGKHHRQAPGLL<br>WDASHQQEQPTSSSHHGAGAVEIRSRHSAYPAGTE<br>DDEGMGEESPFRGRSRAAPPNLWAAQRYGRELRR<br>MSDEFVDSFKKGLPRPKSAGTATQMRQSSSWTRVFQ<br>SWWDRNLGRGSSAPSQHHHHHH                                                                                                                                                                                                  |

10

20

30

40

50

| 配列番号<br>(情報)           | アミノ酸配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 67<br>cpS4-Bad    | MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQ<br>QFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQS<br>TLENFLERLRVIMQSKWFKCGAGGNGGCHKDITLQE<br>IIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASGSFQIPEFEPSE<br>QEDSSSAERGLGPSPAGDGPSGSGKHHRQAPGLL<br>WDASHQQEQPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGTE<br>DDEGMGEESPFRGRSRAAPPNLWAAQRYGRELRR<br>MSDEFVDSFKKGLPRPKSAGTATQMRQSSSWTRVFQ<br>SWWDRNLGRGSSAPSQ        |
| 配列番号 68<br>IL-4-Bad-H6 | MHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASK<br>DTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQF<br>HRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTL<br>ENFLERLKTIMREKYSKCSSGSFQIPEFEPSEQEDSSS<br>AERGLGPSPAGDGPSGSGKHHRQAPGLLWDAS<br>HQQEQPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGTEDDEG<br>MGEESPFRGRSRAAPPNLWAAQRYGRELRRMSDEF<br>VDSFKKGLPRPKSAGTATQMRQSSSWTRVFQSWWD<br>RNLGRGSSAPSQH H H H H H |
| 配列番号 69<br>IL-4-Bad-H6 | MHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASK<br>DTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQF<br>HRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTL<br>ENFLERLKTIMREKYSKCSSGSFQIPEFEPSEQEDSSS<br>AERGLGPSPAGDGPSGSGKHHRQAPGLLWDAS<br>HQQEQPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGTEDDEG<br>MGEESPFRGRSRAAPPNLWAAQRYGRELRRMSDEF<br>VDSFKKGLPRPKSAGTATQMRQSSSWTRVFQSWWD<br>RNLGRGSSAPSQ            |

10

20

30

40

50

表 4 : 選択された融合パートナーの列挙

| 配列番号<br>(情報)                        | アミノ酸配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 38<br>BAD アミノ酸配列               | MFQIP EFEPSEQEDS SSAERGLGPS PAGDGPSGSG<br>KHHRQAPGLL WDASHQQEQP<br><br>TSSSHHGGAG AVEIRSRHSA YPAGTEDDEG<br>MGEEPSFPRG RSRAAPPNLW AAQRYGRELR<br><br>RMSDEFVDSF KKGLPRPKSA GTATQMRQSS<br>SWTRVFQSWW DRNLGRGSSA PSQ                                                                                                |
| 配列番号 39<br>Bcl-2 アミノ酸配列             | MAHAGRTGYD NREIVMKYIH YKLSQRGYEW<br>DAGDVGAAPP GAAPAPGIFS SQPGHTPHPA<br><br>ASRDPVARTS PLQTPAAPGA AAGPALSPVP<br>PVVHLTLRQA GDDFSRRYRR DFAEMSSQLH<br><br>LTPFTARGRF ATVVEELFRD GVNWGRIVAF<br>FEFGGVMCVE SVNREMSPLV DNIALWMTEY<br><br>LNRHLHTWIQ DNGGWDAFVE<br><br>LYGPSMRPLF DFSWLSLKTLL LSLALVGACI<br>TLGAYLGHK |
| 配列番号<br>>HsBAD_Q92934-1(UniProtKB)  | MFQIPEFEPS EQEDSSSAER GLGPSAGDG<br>PSGSGKHHRQ APGLLDWASH<br><br>QQEQPTSSSH HGGAGAVEIR SRHSSYPAGT<br>EDDEGMGEEP SPFRGRSRSR<br><br>PPNLWAAQRY GRELRMSDE FVDSFKKGLP<br>RPKSAGTATQ MRQSSSWTRV<br><br>FQSWWDRNLG RGSSAPSQ                                                                                            |
| 配列番号<br>>HsBAX_Q07812-1(UniProtKB)  | MDGSGEQPRG GGPTSSEQIM KTGALLLQGF<br>IQDRAGRMGG EAPELALDPV<br><br>PQDASTKKLS ECLKRIGDEL DSNMELQMI<br>AAVDTDSPRE VFFRVAADMF<br><br>SDGNFNWGRV VALFYFASKL VLKALCTKVP<br>ELIRTIMGWT LDFLRERLLG<br><br>WIQDQGGWDG LLSYFGTPTW QTVTIFVAGV<br>LTASLTIWKK MG                                                             |
| 配列番号<br>>HsBAK1_Q16611-1(UniProtKB) | MASGQGPGRP RQECGEPALP SASEEQVAQD<br>TEEVFRSYVF YRHQQEQEAE<br><br>GVAAAPADPEM VTLPLQPSST MGQVGRQLAI<br>IGDDINRRYD SEFQTMLQHL<br><br>QPTAENAYEY FTKIATSLFE SGINWGRVVA<br>LLGFGYRLAL HVYQHGLTGF<br><br>LGQVTRFVVD FMLHHCIARW IAQRGGWVAA<br>LNLNGNPILN VLVVLGVVLL<br><br>GQFVVRREFK S                               |

10

20

30

40

50

|                                    |                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号<br>>HsBIK_Q13323-1(UniProtKB) | MSEVRPLSRD ILMETLLYEQ LLEPPTMEVL<br>GMTDSEEDLD PMEDFDSLEC<br><br>MEGSDALALR LACIGDEMDV SLRAPRLAQL<br>SEVAMHSLGL AFIYDQTEDI<br><br>RDVLRSFMDG FTTTKENIMR FWRSPNPGSW<br>VSCEQVLLAL LLLLALLLPL<br><br>LSGGLHLLLK                                          |
| 配列番号<br>>HsBID_P55957-1(UniProtKB) | MDCEVNNNGSS LRDECITNLL VFGFLQSCSD<br>NSFRRELDAL GHELPVLAPQ<br><br>WEGYDELQTD GNRSSHRLG RIEADSESQE<br>DIIRNIARHL AQVGDSMDRS<br><br>IPPGLVNGLA LQLRNTSRSE EDRNRDLATA<br>LEQLLQAYPR DMEKEKTMV<br><br>LALLLAKKVA SHTPSLLRDV FHTTVNFINQ<br>NLRTYVRSLA RNGMD |

10

20

## 【0172】

## C. カーゴ部分

カーゴ部分は、がん幹細胞の増殖を減少もしくは阻害するか、またはがん細胞および／もしくはがん幹細胞を死滅させる。いくつかの例では、カーゴ部分は、タンパク質ではなく、がん幹細胞の増殖を低減もしくは阻害するか、またはがん細胞および／もしくはがん幹細胞を死滅させる、化学療法剤などの他の分子である。いくつかの例では、カーゴ部分はまた、バルクがん細胞の増殖を低減もしくは阻害するか、またはがん細胞を死滅させる。がん幹細胞の増殖を低減もしくは阻害するかまたはそのような細胞を死滅させるように機能する任意のタンパク質または他の薬剤を、カーゴ部分として使用することができる。例えば、細胞のライフサイクルを制御するように機能する毒素およびタンパク質は、カーゴ部分として使用することができる。カーゴ部分として使用することができる毒素には、微生物、植物、または動物によって作られる毒素、およびヒト細胞によって作られる毒素が含まれる。同様に、任意の天然の細胞増殖制御タンパク質をカーゴ部分として使用することができる。例えば、生物の通常のライフサイクル中に細胞死を引き起こすタンパク質は、カーゴ部分として使用することができる。いくつかの例では、腫瘍溶解性ウイルス（例えば、Allen et al., Mol. Ther. 16:1556-64, 2008）を参照されたい）または細胞毒性剤を担持するリポソーム（例えば、Madhankumar et al., Mol. Cancer. Ther. 5:3162-9, 2006を参照されたい）は、カーゴタンパク質として使用される。

30

40

## 【0173】

一例では、カーゴ部分は毒素である。使用することができる例示的な毒素には、孔形成毒素、および内在化時に細胞増殖を阻害する毒素が含まれる。他の例では、カーゴ部分は、アポトーシス誘発タンパク質であるタンパク質、および細胞増殖阻害タンパク質である。いくつかの例では、毒素は、得られた毒素が天然の毒素よりも免疫原性が低いように改変された細菌毒素である。改変された *Pseudomonas* 外毒素 A などのそのような改変毒素は、患者の免疫原性応答を低下させることができ、それにより、反復投与が可能となる。

## 【0174】

孔形成毒素は、細胞膜に孔を形成し、それにより、細胞溶解によって細胞を死滅させる毒

50

素である。例示的な孔形成毒素には、パーフォリンなどのヒト毒素またはアエロリジンなどの細菌毒素、ならびにアエロリジンまたはアエロリジン関連ポリペプチドなどの天然に存在する孔形成タンパク質毒素（n P P T）に由来する改変された孔形成タンパク質毒素が含まれるが、これらに限定されない。好適なアエロリジン関連 n P P T には、次の特徴：プロテアーゼ切断による阻害ドメインの除去によって活性化される孔形成活性、および 1 つ以上の結合ドメインを介して細胞膜上に存在する受容体に結合する能力を有する。いくつかの例では、リンカーは、プロテアーゼに感受性であるか、または化学的に不安定であるように操作することができる。カーゴ部分として使用することができる孔形成毒素の追加の例には、*Aeromonas hydrophila*、*Aeromonas trota*、および *Aeromonas salmonicida* 由来のプロアエロリシン、*Clostridium septicum* 由来のアルファ毒素、炭疽菌防御抗原、*Vibrio cholerae* VCC 毒素、*Clostridium perfringens* 由来のイブシロン毒素、および *Bacillus thuringiensis* デルタ毒素が含まれるが、これらに限定されない。プロアエロリシンの操作の詳細な説明は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 7, 282, 476 号に見出すことができる。

10

カーゴ部分として使用することができる追加の毒素には、細胞内で作用する毒素が含まれる。例えば、炭疽菌、ジフテリア、コレラ、およびボツリヌス毒素は、細胞質で作用する部分、および細胞表面に結合するように作用する部分を含む。これらの毒素またはそれらの一部は、標的化部分に連結され、がん幹細胞の増殖を阻害するために使用することができる。リボヌクレアーゼ A（RNase A）スーパーファミリーの選択されたメンバーは、強力な細胞毒素である。これらの細胞毒性リボヌクレアーゼは、細胞質ゾルに入り、そこで細胞の RNA を分解し、細胞死を引き起こす。

20

#### 【0175】

いくつかの例では、リボソーム不活性化タンパク質を毒素として使用することができる。これらの例では、カーゴ部分は、ゲロニン、ボウガニン、サポリン、リシン、リシン A 鎖、プリオジン、リストリクトシン（restrictocin）、およびそれらのバリエーションを含むがこれらに限定されない、リボソーム不活性化活性を有するポリペプチドである。ジフテリア毒素および *Pseudomonas* 外毒素 A は、伸長因子 2 の ADP リボシル化によってタンパク質合成を阻害する。カーゴ部分がリボソーム不活性化タンパク質であるか、または伸長因子 2 の ADP リボシル化によってタンパク質合成を阻害する場合、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、がん幹細胞に結合したときに内在化することができる。アポトーシスを誘導するカーゴ部分はまた、がん細胞および／またはがん幹細胞を標的化するために使用することができる。アポトーシスを誘導するカーゴ部分の例には、カスパーゼ、グランザイム、ならびに BCL-2 アポトーシス促進関連タンパク質、例えば、BAX（例えば、アクセッション番号：CAE52910）、BAD（例えば、アクセッション番号：CAG46757）、BAT（例えば、アクセッション番号：AA107425）、BAK（例えば、アクセッション番号：AAA74466）、BIK（例えば、アクセッション番号：CAG30276）、BOK（例えば、アクセッション番号：AAH06203）、BID（例えば、アクセッション番号：CAG28531）、BIM（例えば、アクセッション番号：NP\_619527）、および BMF（例えば、アクセッション番号：AAH69328）が含まれる。これらのカーゴ部分は、がん幹細胞の増殖を低減または阻害するために、単独で組み合わせて使用することができる。

30

40

#### 【0176】

アエロリジンは、プロアエロリジン（PA）と称する不活性なプロトキシンとして産生されるチャネル形成毒素である。IL-4 標的化カーゴタンパク質で使用することができる例示的なアエロリジンおよび PA 配列を表 1 に示す。PA タンパク質は、結合ドメイン、毒素ドメイン、およびプロテアーゼ活性化部位を含む C 末端阻害ペプチドドメインを含む、多くの別個の機能性部分を含み得る。結合ドメインは、Tリンパ球上の Thy-1 に見られるようなグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）膜アンカー、赤血球膜に

50

見られるPIGA遺伝子産物、および前立腺幹細胞抗原(PSCA)を認識して結合する。プロエアロリシン内の活性化またはタンパク質分解部位は、プロテアーゼのフューリンファミリーによってタンパク質分解基質として認識される6個のアミノ酸配列である。PAは、フューリンによるC末端阻害セグメントの加水分解時に活性化される。活性化されたエアロリジンは、細胞膜におけるGPiアンカー型(anchor ed)タンパク質に結合し、膜に挿入されるヘプタマーを形成して、約17オングストロームの明確に区別されるチャンネルを生成する。チャンネル形成は急速な細胞死をもたらす。野生型エアロリジンは、赤血球を含む哺乳動物細胞に対して、例えば1ナノモル以下で毒性がある。

【0177】

いくつかの例では、標的化カーゴタンパク質は、天然のフューリン部位が、前立腺特異的プロテアーゼ切断部位(例えば、PSA、PMSA、またはHK2などの前立腺特異的プロテアーゼの存在下でバリエーションPAの活性化を可能にする、PSA特異的切断部位)などの異なる切断部位で置き換えられたPA分子である。一例では、前立腺特異的プロテアーゼ切断部位がPAの天然のフューリン切断部位に挿入され、その結果、PAは、前立腺特異的プロテアーゼの存在下で活性化されるが、フューリンは活性化されない。別の例では、バリエーションPA分子は、機能的に欠失された結合ドメイン(例えば、天然のPAタンパク質配列のアミノ酸約1~83)をさらに含む。機能的欠失は、欠失、挿入、変異、または置換など、当該技術分野で既知である任意の方法を使用して行うことができる。いくつかの例では、IL-4標的化カーゴタンパク質は、天然の結合ドメインが機能的に欠失され、前立腺組織または他の組織特異的結合ドメインで置き換えられたバリエーションPA分子を含む。他の例では、バリエーションPA分子は、フューリン切断部位、および前立腺組織特異的結合ドメインで置き換えられた機能的に欠失された結合ドメインを含む。このようなバリエーションPA分子は、前立腺組織特異的結合ドメインを介して前立腺細胞を標的化し、フューリンの存在下で活性化される。

【0178】

Bouganinは、最初はBougainvillea spectabilisから単離されたりボソーム結合タンパク質である(米国特許第6,680,296号を参照されたい)。例示的な修飾ボウガニン、WO2005/090579および米国特許第7,339,031に記載されている。ボウガニンは、リボソームに損傷を与え、タンパク質合成の停止および細胞死を引き起こす。本開示のIL-4標的化カーゴタンパク質において使用することができる例示的なボウガニンタンパク質には、GenBankアクセッション番号AAL35962におけるもの、ならびに米国特許第6,680,296号、同7,339,031号、およびPCT公開WO2005/090579で提供されるそれらの天然および修飾ボウガニン配列(参照により本明細書に組み込まれるボウガニン配列)、ならびにそのような配列と少なくとも60%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、またはさらに少なくとも99%の配列同一性を有する配列が含まれる。細胞死のBCL2関連アゴニストであるBADは、プログラムされた細胞死(アポトーシス)の調節因子である。BADは、BCL-xLおよびBCL-2とヘテロダイマーを形成し、それらのデス(death)リプレッサー活性を逆転させることにより、細胞アポトーシスを正に調節する。BADのアポトーシス促進活性は、そのリン酸化によって調節される。本開示のIL-4標的化カーゴタンパク質において使用することができる例示的なBADタンパク質には、GenBankアクセッション番号Nos. CAG46757、AAH01901.1、およびCAG46733.1によって提供されるもの、および米国特許第6,737,511号に提供される配列(参照により本明細書に組み込まれる配列)、ならびにバリエーションが天然のBADタンパク質の生物活性を保持または増強している限り、そのような配列と少なくとも60%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、またはさらに少なくとも99%の配列同一性を有する配列が含まれる。

【0179】

BCL2 関連 X タンパク質である BAX は、プログラムされた細胞死（アポトーシス）の調節因子である。このタンパク質は、BCL2 とヘテロ二量体を形成し、アポトーシス活性化因子として機能する。BAX は、ミトコンドリア電位依存性陰イオンチャネル（VDAC）と相互作用し、その開口を増加させ、これにより、膜電位が低下し、シトクロム c が放出される。本開示の IL-4 標的化カーゴタンパク質において使用することができる例示的な BAX タンパク質には、GenBank アクセッション番号 CAE52909.1、AA022992.1、EAW52418.1、米国特許第 6,645,490 号によって提供されるもの（IL2-Bax 構築物における Bax は、本開示で使用する事ができる Bax-alpha バリエーションである）、およびバリエーションが天然の BAX タンパク質の生物活性を保持または増強している限り、そのような配列と少なくとも 60%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、またはさらに少なくとも 99% の配列同一性を有する配列が含まれる。

10

#### 【0180】

いくつかの例では、IL-4 標的化カーゴタンパク質の BAX タンパク質は、C 末端アンカードメインが欠失され、Caax 配列で置き換えられるように改変されてもよい。Caax は、配列システイン-a-a-X を有するペプチドであり、式中、「X」は任意のアミノ酸であり、「a」は脂肪族アミノ酸である。BAX の膜結合が最適なアポトーシス活性化に必要であるため、Caax などの膜結合ドメインを付加することにより、アポトーシス促進活性を増強することができる。Caax 配列を有するタンパク質は、ファルネシル化されている。ファルネシル化タンパク質は、膜を標的化する（例えば、Wright and Philip, J. Lipid Res., 2006, 47 (5): 883-91 を参照されたい）。Caax 配列を含む強力な BAX バリエーションは、C 末端アンカードメインを含んでもよいし、または含まなくてもよい。

20

#### 【0181】

Pseudomonas 外毒素 (PE) は、Pseudomonas によって分泌される毒素である。天然 PE は、受容体媒介性エンドサイトーシスによって細胞に侵入し、次いで、一連の細胞内プロセッシング工程後、細胞質ゾルおよび ADP リボシル化伸長因子 2 に移行する能力に起因して、哺乳動物細胞に対する細胞毒性がある。これにより、タンパク質合成および細胞死が阻害される。PE は、アミノ末端受容体結合ドメイン、中間移行ドメイン (middle translocation domain)、およびカルボキシル末端 ADP リボシル化ドメインの 3 つの機能性ドメインがある。修飾された PE 分子は、ドメイン Ia の欠如ならびにドメイン II および III の欠失を含むことができる。本開示の IL-4 標的化カーゴタンパク質において使用することができる例示的な PE タンパク質には、表 1 に提供されるもの、ならびにバリエーションが天然の PE タンパク質の生物学的活性を保持または増強している限り、そのような配列と少なくとも 60%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% の配列同一性を有する配列が含まれる。

30

#### 【0182】

タブシガルギンは、小胞体 (sarcoplasmic reticulum)  $Ca^{2+}$  ATP アーゼの阻害剤である。タブシガルギンは、セスキテルペンラクトンとして分類され、細胞がカルシウムを筋小胞体および小胞体に送り込む能力を遮断し、これにより、これらの貯蔵を枯渇させることによって、細胞質ゾルのカルシウム濃度を上昇させる。貯蔵枯渇は、原形質膜カルシウムチャネルを二次的に活性化することができ、細胞質ゾルへのカルシウムの流入を可能にする。

40

#### 【0183】

リボヌクレアーゼ A (RNAse A) は、一本鎖 RNA を切断するエンドヌクレアーゼである。RNAse A 毒素は、哺乳動物および爬虫類から得ることができる。本開示の IL-4 標的化カーゴタンパク質において使用することができる例示的な RNAse A タンパク質には、表 1 に提供されるもの、ならびにバリエーションが天然の RNAse A 毒素の

50

生物学的活性を保持または増強している限り、そのような配列と少なくとも60%の配列同一性、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有する配列が含まれる。

#### 【0184】

使用されるカーゴ部分は、天然配列（表1で参照され、上記に列挙された特許に存在する、GenBankアクセッション番号および配列など）、およびそのバリエーション、例えば、バリエーションが天然カーゴ部分の生物学的活性を保持または増強している限り、天然カーゴ部分と少なくとも98%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、または少なくとも60%の配列同一性（例えば、表1に記載され、上記に列挙されるGenBankアクセッション番号に対して少なくとも約この量の配列同一性）を有するバリエーションを含むことができる。いくつかの例では、バリエーション配列は、実質的に同じ量（またはそれ以上）のカーゴ部分の天然生物学的機能、例えば、がん幹細胞を死滅させるまたはその増殖を阻害する能力を保持する。カーゴ部分はまた、タンパク質の天然生物学的機能の相当な量を保持する天然配列の断片であり得る。

#### 【0185】

カーゴ部分は、該カーゴ部分を標的化部分に連結することによってがん細胞および／またはがん幹細胞を標的化するように操作されている。標的化部分には、がん幹細胞表面標的に結合することができる薬剤が含まれる。

#### 【0186】

#### D. 腫瘍溶解性ウイルス標的化部位

いくつかの例では、本発明のカーゴ部分は、腫瘍溶解性ウイルスを標的化するために使用することができる（例えば、Allen et al., Mol. Ther. 16:1556-64, 2008を参照されたい）。多数のウイルスを腫瘍溶解性ウイルスとして使用することができ、アデノウイルス、および例えば図17に提供されるようなものなどの自己複製アルファウイルス、ならびに腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが含まれる（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO2013038066を参照されたい）。

#### 【0187】

他の腫瘍溶解性ウイルスには、セネカバレーウイルス、ニューカッスル病ウイルス（ニューカッスルウイルスとも称される）、マラバウイルス、VSV、ヘルペスウイルス（HSV-1を含む）、麻疹ウイルス、ポリオウイルス、レオウイルス、コクサッキーウイルス、レンチウイルス、モルビリウイルス、インフルエンザウイルス、シンビスウイルス、粘液腫ウイルス、および／またはレトロウイルス（例えば、Twumasi-Boateng, et al., "Oncolytic viruses as engineering platforms for combination immunotherapy", Nature Reviews Cancer, 2018）、およびKaufman et al. Cancer Immunotherapy, 14:642-662 (2015)を参照されたい、これらはすべて、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）が含まれ得る。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、アデノウイルス、自己複製アルファウイルス、ワクシニアウイルス、セネカバレーウイルス、ニューカッスル病ウイルス、マラバウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、ヘルペスウイルス（HSV-1およびHSV-2を含む）、麻疹ウイルス、ポリオウイルス、レオウイルス、コクサッキーウイルス、レンチウイルス、モルビリウイルス、インフルエンザウイルス、シンビスウイルス、粘液腫ウイルス、およびレトロウイルスを含むが、これらに限定されない。他の腫瘍溶解性ウイルスには、例えば、がん細胞に優先的に感染する複製条件付き単純ヘルペスウイルスの腫瘍内注射を伴うoncoVex/T-VECが含まれ得る。また、GM-CSFを発現するように設計されたウイルスは、がん細胞内で複製してその溶解を引き起こし、新しいウイルスと一連の腫瘍抗原を放出し、その過程でGM-CSFを分泌する。そのような腫瘍溶解性ウイルスワクチンは、腫瘍微小環境におけるDCの機

10

20

30

40

50

能を強化して、抗腫瘍免疫応答を刺激する。これらの腫瘍溶解性ウイルスは、本明細書に記載の I L - 4 および / または I L - 1 3 ムテインを腫瘍に標的化または送達するために使用することができる。いくつかの実施形態では、I L - 4 および / または I L - 1 3 ムテインは、本明細書に開示される任意の I L - 4 および / または I L - 1 3 ムテインまたはバリエーションである。いくつかの実施形態では、I L - 4 および / または I L - 1 3 ムテイン配列は、配列番号 2 ~ 配列番号 4 8 および / または配列番号 5 1 ~ 配列番号 6 9 のうちのいずれか 1 つと 9 0 % 同一である。いくつかの実施形態では、I L - 4 および / または I L - 1 3 ムテインは、配列番号 2 ~ 配列番号 4 8 および / または配列番号 5 1 ~ 配列番号 6 9 のうちのいずれか 1 つを含む。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、本明細書に記載される I L - 4 および / または I L - 1 3 ムテインを発現することができる導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、配列番号 2 ~ 配列番号 4 8 および / または配列番号 5 1 ~ 配列番号 6 9 のうちのいずれか 1 つを含む I L - 4 および / または I L - 1 3 ムテインを発現することができる導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、配列番号 2 ~ 配列番号 4 8 および / または配列番号 5 1 ~ 配列番号 6 9 のうちのいずれか 1 つを含む I L - 4 および / または I L - 1 3 ムテインをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、治療用ペイロードとして発現される導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、治療用ペイロードは、本明細書に記載される I L - 4 および / または I L - 1 3 である。いくつかの実施形態では、治療用ペイロードは、I L - 4 および / または I L - 1 3 ムテインであり、配列番号 2 ~ 配列番号 4 8 および / または配列番号 5 1 ~ 配列番号 6 9 のうちのいずれか 1 つを含む。

10

20

#### 【0188】

いくつかの実施形態では、I L - 4 R 標的化部分は、腫瘍溶解性ウイルスが改善された治療利益を提供するために、腫瘍関連マクロファージおよび M D S C (骨髄由来免疫抑制細胞) などの T M E (腫瘍微小環境) の免疫抑制細胞を標的化する I L - 4 配列またはそのバリエーションを含むことができる。いくつかの実施形態では、I L - 4 R 標的化部分は、本明細書に記載される任意の I L - 1 3 および / または I L - 4 配列を含む。いくつかの実施形態では、I L - 4 R 標的化部分は、配列番号 2 ~ 配列番号 4 8 および / または配列番号 5 1 ~ 配列番号 6 9 のうちのいずれか 1 つを含む。いくつかの実施形態では、I L - 4 R 標的化部分は、2 型 I L - 4 R を標的化するものおよび / または腫瘍溶解性ウイルスを腫瘍抗原に指向させることができる I L 1 3 r a 2 を標的化するものを含む、I L - 1 3 バリエーション / I L - 1 3 スーパーカインを含む。いくつかの実施形態では、I L - 4 R 標的化部分は、配列番号 2 ~ 配列番号 4 8、配列番号 5 6、配列番号 5 7、および / または配列番号 6 3 に提供されるものを含む、I L - 1 3 バリエーション / I L - 1 3 スーパーカインを含み、また、腫瘍溶解性ウイルスを腫瘍抗原に指向させることができる。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、1 つのサイトカインによって標的化され、別のものを発現する。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、治療用ペイロードとして発現される導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、発現される治療用ペイロードは、本明細書に記載される I L - 4 配列である。いくつかの実施形態では、発現される治療用ペイロードは、本明細書に記載される I L - 1 3 配列である。

30

40

#### 【0189】

いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスである。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスベクターは、ウイルス粒子が細胞内成熟ウイルス (I M V)、細胞内エンベロープウイルス (I E V)、細胞関連エンベロープウイルス (C E V)、または細胞外エンベロープウイルス (E E V) 型であることを特徴とする。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ワクシニアウイルス粒子は、E E V または I M V 型である。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ワクシニアウイルス粒子は、E E V 型である。

#### 【0190】

一般的に、腫瘍細胞で優先的に複製し、少なくとも 1 つの導入遺伝子を発現して、抗腫瘍

50

効果およびアポトーシス誘導を促進し、かつ、対象における宿主免疫応答を調節する、該ベクターを含む腫瘍溶解性ワクシニアウイルス組換え体および細胞および薬学的組成物の構築。本発明によれば、腫瘍溶解性アデノウイルスおよび腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスまたは腫瘍溶解性アデノウイルスを標的化するために、本明細書に記載されるIL-4および／またはIL-13標的化部分と組み合わせることができる。腫瘍溶解は腫瘍抗原を放出し、共刺激の危険信号を提供する。ただし、ウイルスを武装することにより、有効性をさらに向上させることができる。例えば、CD40リガンド（CD40L、CD154）は、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することが知られており、それは、いくつかの免疫機構も引き起こす。これらの1つは、細胞傷害性T細胞の活性化と免疫抑制の低下につながるTヘルパー1型（Th1）応答である。本発明は、本発明のIL-4および／またはIL-13標的化部分で標的化される（例えば、「武装した（armed）」）腫瘍溶解性ウイルスを提供する。

10

#### 【0191】

いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、ワクシニアウイルスゲノムを含む、改変されたワクシニアウイルスベクター、ウイルス粒子、宿主細胞、薬学的組成物、およびキットであり、チミジンキナーゼ遺伝子が、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子における置換および／または部分的に欠失したチミジンキナーゼ遺伝子を提供する少なくとも1つのヌクレオチドの欠失を切除するオープンリーディングフレームによって不活性化され、ワクシニア成長因子遺伝子が欠失しており、改変されたワクシニアウイルスベクターが、非ウイルスタンパク質（例えば、本明細書に記載されるIL-4および／またはIL-13ムテイン）をコードする少なくとも1つの核酸配列を含む。別の態様では、対象における免疫応答の誘発のため、哺乳動物の悪性細胞増殖の阻害方法にて使用するため、がんの治療または予防における使用のため、対象における改変されたワクシニアウイルスの存在の検出のため、および場合によりアデノウイルスと組み合わせたインサイチューがんワクチンとして、がん治療のために使用することができる、改変されたワクシニアウイルスベクター、ウイルス粒子、薬学的組成物またはキットが提供される。いくつかの実施形態では、本発明は、ワクシニアウイルスゲノムを含む改変されたワクシニアウイルスを生成する方法であって、チミジンキナーゼ遺伝子が、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子における置換および／または部分的に欠失したチミジンキナーゼ遺伝子を提供する少なくとも1つのヌクレオチドの欠失を切除するオープンリーディングフレームによって不活性化され、ワクシニア成長因子遺伝子が欠失しており、改変されたワクシニアウイルスベクターが、非ウイルスタンパク質（例えば、本明細書に記載されるIL-4および／またはIL-13ムテイン）をコードする少なくとも1つの核酸配列を含み、ワクシニアウイルス粒子の産生を維持し、改変されたワクシニアベクターを運搬することができるプロデューサー細胞を提供する工程と、ウイルスの複製および生成に好適な条件下でプロデューサー細胞を培養する工程と、ウイルス粒子を収集する工程と、を含む方法を提供する。

20

30

#### 【0192】

一般に、本発明はまた、本明細書に記載されるIL-4および／またはIL-13部分で「武装された」または標的化された腫瘍溶解性ウイルスを投与する方法を提供する。投与経路は、当然、腫瘍の位置および性質により異なり、例えば、皮内、経皮、非経口、静脈内、筋肉内、鼻腔内、皮下、局所的（例えば、腫瘍に近接して、特に、血管系または隣接する血管系を用いて）、経皮、気管内、腹腔内、動脈内、膀胱内、腫瘍内、吸入、灌流、洗浄、および経口投与を含む。組成物は、特定の投与経路に対して製剤化される。

40

#### 【0193】

##### 1. 腫瘍溶解性ワクシニアウイルス

ワクシニアウイルスは、ポックスウイルス科（*Poxviridae*）のオルソポックスウイルス属の一員である。それは、大きな二本鎖DNAゲノム（約200kb、約200遺伝子）を有し、複雑な形態形成経路により、各感染細胞から異なる形態の感染性ビリオンが生成される。ウイルス粒子は、コアの周りに脂質膜を含有する。ウイルスコアは、ウイルス構造タンパク質、密に圧縮されたウイルスDNAゲノム、および転写酵素を含有す

50

る。ワクシニアウイルスの寸法は、約 360 x 270 x 250 nm であり、重量は約 5 – 10 fg である。遺伝子は、小さな非コーディング DNA で密に詰まっており、オープンリーディングフレーム (ORF) はイントロンを欠失している。3つのクラスの遺伝子 (初期、中間、後期) が存在する。初期遺伝子 (約 100 遺伝子; 即時および遅延型) は、主に免疫調節およびウイルス DNA 複製に関連するタンパク質をコードする。中間遺伝子は、後期遺伝子 (例えば、転写因子) の発現に必要な調節タンパク質をコードし、後期遺伝子は、次の感染を開始するために新しいビリオン内にパッケージ化されるウイルス粒子と酵素を作るのに必要なタンパク質をコードする。ワクシニアウイルスは細胞の細胞質内で複製する。

#### 【0194】

ワクシニアウイルスの様々な株が同定されている (一例として、コペンハーゲン、改変ウイルスアンカラ (MVA)、リスター (Lister)、ティアンタン (Tian Tan)、ワイス (Wyeth) (=New York City Board of Health)、ウェスタンリザーブ (Western Reserve) (WR))。WR ワクシニアのゲノム配列が決定されている (アクセッション番号 AY243312)。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、コペンハーゲン、改変ウイルスアンカラ (MVA)、リスター、ティアンタン、ワイス、またはウェスタンリザーブワクシニアウイルスである。

#### 【0195】

異なる形態のウイルス粒子は、ウイルス生活環において異なる役割を有する。いくつかの形態のウイルス粒子が存在する: 細胞内成熟ウイルス (IMV)、細胞内エンベロープウイルス (IEV)、細胞関連エンベロープウイルス (CEV)、細胞外エンベロープウイルス (EEV)。EEV 粒子には、トランスゴルジネットワークに由来する余分な膜がある。この外膜には2つの重要な役割がある: a) それは、内部 IMV を免疫攻撃から保護し、b) ウイルスの細胞表面への結合を仲介する。

#### 【0196】

CEV および EEV は、宿主由来の膜に包まれることにより、ウイルスが宿主抗体および補体を回避するのに役立つ。IMV および EEV 粒子は、生物学的特性にいくつかの違いがあり、ウイルスの生活環で異なる役割を果たす。EEV および IMV は異なる (未知の) 受容体に結合し (1)、それらは異なる機序で細胞に入る。EEV 粒子はエンドサイトーシスを介して細胞に入り、プロセスは pH 感受性である。内部移行後、EEV の外膜は酸性化されたエンドソーム内で破裂し、露出した IMV はエンドソーム膜と融合し、ウイルスコアは細胞質に放出される。一方、IMV は細胞膜とウイルス膜の融合により細胞に入り、このプロセスは pH に依存しない。これに加えて、CEV は細胞表面からアクチン尾部の形成を誘導し、これはビリオンを未感染の隣接細胞に向かって駆動させる。

#### 【0197】

さらに、EEV は抗体 (NAb) による中和と補体毒性に対して耐性があるが、IMV は耐性がない。したがって、EEV はインビトロおよびインビボでの長距離伝播を仲介する。コメット阻害試験は、遊離 EEV が EEV NAb で中和できない場合でも、感染細胞からの EEV の放出が EEV NAb によって阻止され、コメット形状のプラークが見られないため、EEV 特異抗体を測定する1つの方法となった。EEV は IMV 粒子と比較して特異的感染率がより高く (粒子 / pfu 比がより低い)、このため、EEV は治療用途の興味深い候補となる。しかし、EEV の外膜は非常に壊れやすい構造であり、EEV 粒子の取り扱いには注意が必要であり、治療用途に必要な量の EEV 粒子を入手することは困難である。EEV 外膜は低 pH (pH 約 6) で破裂する。EEV の外膜が破裂すると、エンベロープ内のウイルス粒子は IMV として完全な感染力を保持する。

#### 【0198】

一部の宿主細胞由来タンパク質は、EEV 調製物と共局在するが、IMV とは共局在せず、細胞由来タンパク質の量は、宿主細胞株とウイルス株に依存する。例えば、WR EEV は VV IHD-J 株と比較してより多くの細胞由来タンパク質を含む。宿主細胞由来

10

20

30

40

50

のタンパク質は、E E V 粒子の生物学的効果を改変することができる。一例として、E E V の表面に宿主膜タンパク質 C D 5 5 を組み込むと、補体毒性に対する耐性が得られる。本発明において、E E V 粒子の表面のヒト A 5 4 9 細胞由来タンパク質は、ウイルスをヒトがん細胞に標的化できることが示されている。同様の現象は、ヒト免疫不全ウイルス 1 型を用いた研究で実証されており、そこでは、宿主由来の I C A M - 1 糖タンパク質がウイルス感染性を増加させた。I E V 膜には少なくとも 9 つのタンパク質が含まれ、そのうち 2 つは C E V / E E V には存在しない。F 1 2 L および A 3 6 R タンパク質は、細胞表面への I E V 輸送に関与し、それらは後に残され、C E V / E E V ( 9 、 1 1 ) の一部ではない。( I E V ) / C E V / E E V では 7 つのタンパク質 F 1 3 L 、 A 3 3 R 、 A 3 4 R 、 A 5 6 R 、 B 5 R 、 E 2 、 ( K 2 L ) が共通である。ワクシニアウイルスのウェスタンリザーブ株の場合、通常、ウイルス粒子の最大 1 % が E E V であり、プロデューサー細胞の腫瘍溶解の前に培養上清に放出される。50 倍以上の E E V 粒子がワクシニアの国際保健部門 ( I n t e r n a t i o n a l H e a l t h D e p a r t m e n t ) ( I H D ) - J 株から放出される。ただし、I H D はヒトのがん治療での使用については研究されていない。I H D - W 表現型は、主に A 3 4 R E E V レクチン様タンパク質内の点変異に起因した。また、A 3 4 R の欠失は、放出される E E V の数を増加させる。E E V 粒子は、感染 6 時間後に細胞表面で最初に検出でき ( C E V として ) 、5 時間後に上清で検出できる ( I H D - J 株 ) 。低い感染多重度 ( M O I ) を伴う感染は、高ウイルス量と比較してより高い比率の E E V をもたらす。C E V と E E V のバランスは、宿主細胞とウイルス株の影響を受ける。

10

20

#### 【 0 1 9 9 】

ワクシニアは天然痘の撲滅のために使用され、その後、外来遺伝子の発現ベクターとして、および感染症やがんの組換え生ワクチンとして使用されてきた。ワクシニアウイルスは、ヒトで最も広く使用されているボックスウイルスであるため、ヒトで使用するための安全性データは広範囲にわたる。世界中の天然痘ワクチン接種プログラムの間に、何十万人もが改変ワクシニアウイルス株で安全にワクチン接種されており、非常にまれに重篤な有害事象が報告されている。それらは、全身性ワクシニア ( 体内でのワクシニアの全身性の広がり ) 、多形性紅斑 ( 毒性 / アレルギー反応 ) 、ワクシニア性湿疹 ( 皮膚の広範囲の感染 ) 、進行性ワクシニア ( 組織破壊 ) 、およびワクシニア後脳炎である。

30

#### 【 0 2 0 0 】

1 9 6 0 年代から 1 9 9 0 年代にかけて、44 人の黒色腫患者全員が野生型ワクシニアウイルスの初期臨床試験において治療を受け、注射された腫瘍の全体的な客観的反応率は 5 0 % だった。また、いくつかの有益な免疫学的反応が見られた ( 3 6 ) 。野生型ワクシニアウイルスは、膀胱がん、肺がん、腎臓がん、および骨髄腫の治療のためにも使用されており、軽度の有害事象のみが見られた。G M - C S F をコードする腫瘍溶解性ワイエス株ワクシニアウイルスである J X - 5 9 4 は、3 つの第 I 相試験で首尾よく評価され、無作為化第 I I 相試験の予備的な結果が科学会議で発表された。

#### 【 0 2 0 1 】

ワクシニアウイルスは、いくつかの特徴のために、がん遺伝子治療にとって魅力的である。それは、がん細胞に向かう天然の向性を持ち、ウイルス遺伝子の一部を欠失することで選択性を有意に高めることができる。本発明は、2 つのウイルス遺伝子、ウイルスチミジンキナーゼ ( T K ) およびワクシニア成長因子 ( V G F ) が少なくとも部分的に欠失している二重欠失ワクシニアウイルス ( v v d d ) の使用に関する。T K および V G F 遺伝子は、ウイルスが正常細胞で複製するために必要とされるが、がん細胞では必要とされない。部分的な T K 欠失は、活動を付与する T K 領域において設計することができる。

40

#### 【 0 2 0 2 】

T K 欠失ワクシニアウイルスは、D N A 合成および複製のために分裂細胞に存在する細胞ヌクレオチドプールに依存する。いくつかの実施形態では、T K 欠失は休止細胞におけるウイルス複製を有意に制限し、活発に分裂する細胞 ( 例えば、がん細胞 ) においてのみ効率的なウイルス複製が起こることを可能にする。V G F は感染細胞から分泌され、分裂促

50

進因子として作用することにより、周囲の細胞に対してパラクリンプライミング効果を有する。VGF欠失ワクシニアウイルスの複製は、休止（非がん）細胞で高度に弱毒化されている。TKおよびVGFの欠失の効果は相乗的であることが示されている。

【0203】

## 2. 腫瘍溶解性アデノウイルス

一般に、アデノウイルスは、36 kbの直線状、二本鎖DNAウイルスである（GrunhausおよびHorwitz, 1992）。「アデノウイルス」または「AAV」という用語は、AAV1型（AAV1）、AAV2型（AAV2）、AAV3型（AAV3）、AAV4型（AAV4）、AAV5型（AAV5）、AAV6型（AAV6）、AAV7型（AAV7）、AAV8型（AAV8）、AAV9型（AAV9）、AAV9\_hu14、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、およびヒツジAAVを含む。「霊長類AAV」は霊長類に感染できるAAVを指し、「非霊長類AAV」は非霊長類哺乳類に感染できるAAVを指し、「ウシAAV」はウシ哺乳類に感染できるAAVを指す。

【0204】

宿主細胞のアデノウイルス感染により、アデノウイルスDNAがエピソーム的に維持され、それにより、ベクターの組み込みに伴う潜在的な遺伝毒性が低下する。また、アデノウイルスは構造的に安定しており、大規模な増幅後にゲノムの再配列は検出されていない。アデノウイルスは、細胞周期の段階に関係なく、事実上すべての上皮細胞に感染することができる。（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるUS 2006/0147420を参照されたい。）さらに、アデノウイルスのE1aおよびE4領域は、ヒト細胞の効率的かつ生産的な感染に不可欠である。E1a遺伝子は、増殖性感染において転写される第1のウイルス遺伝子であり、その転写は他の任意のウイルス遺伝子産物の作用に依存しない。ただし、残りの初期ウイルス遺伝子の転写には、E1a遺伝子の発現が必要である。E1aプロモーターは、E1a遺伝子の発現の調節に加えて、ウイルスDNAの複製の開始に必要な部位だけでなく、ウイルスゲノムのパッケージングのためのシグナルも統合している。Schmid, S. I., およびHearing, P. in Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 199: pages 67-80 (1995)を参照されたい。

【0205】

いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは腫瘍溶解性アデノウイルスである。天然に生じるウイルスを操作して腫瘍細胞における腫瘍溶解効果をもたらすことが確立されている（Wildner, 2001、Jacotat, 1967、Kim, 2001、Georger et al., 2002、Yan et al., 2003、Vile et al., 2002、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる）。アデノウイルスの場合、アデノウイルスゲノム内の特定の欠失は、正常な静止細胞内で複製する能力を弱めることができるが、腫瘍細胞で複製する能力は保持する。そのような条件付き複製アデノウイルスの1つであるΔ24は、Fueyoら（2000）によって記載されており、米国特許出願第2003/0138405号でも参照され、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。Δ24アデノウイルスは、アデノウイルス5型（Ad-5）に由来し、E1A遺伝子のCR2部分に24塩基対の欠失を含有する。例えば、WO 2001/036650 A2（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0206】

腫瘍溶解性アデノウイルスは、デルタ24などの条件付き複製アデノウイルス（CRAD）を含み、それは、生物療法薬としての使用のための候補となるためのいくつかの特性を有する。そのような特性の1つは、許容細胞または組織で複製する能力であり、それは、腫瘍溶解性ウイルスの元の投入量を増幅し、直接的な抗腫瘍効果をもたらす隣接する腫瘍細胞に薬剤が広がるのを補助する。

【0207】

いくつかの実施形態では、デルタ24の腫瘍溶解性成分は、武装したデルタ24を生成するための導入遺伝子発現アプローチを伴う。武装したデルタ24アデノウイルスは、腫瘍内でのバスタンダー効果の生成または強化、ならびに／または患者または腫瘍関連組織および／もしくは細胞における腫瘍溶解性アデノウイルスの検出／画像の生成または強化に使用できる。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性アデノウイルスと様々な導入遺伝子戦略（例えば、IL-4および／またはIL-13部分による標的化）との組み合わせは、治療の可能性、例えば、様々な難治性腫瘍に対する潜在的能力を含む潜在的な治療能力を改善し、画像化能力の改善をもたらす。特定の実施形態では、腫瘍溶解性アデノウイルスは、複製欠損アデノウイルス、別の腫瘍溶解性ウイルス、複製コンピテントアデノウイルス、および／または野生型アデノウイルスとともに投与され得る。その各々を、他のアデノウイルスと同時に、その前または後に、投与することができる。

10

#### 【0208】

いくつかの実施形態では、E1aアデノウイルスベクターは、CAATボックス、TATAボックス、および転写開始のための開始部位を含む塩基性アデノウイルスE1aプロモーターを、腫瘍特異性を示し、好ましくはE2F応答性である、より好ましくは、ヒトE2F-1プロモーターである塩基性プロモーターで置換することを含む。したがって、このウイルスは、E2F応答性プロモーターからの転写を活性化する分子を欠失しているか、またはそのような分子が機能しない細胞で抑制される。転写因子E2Fとしてこのクラスに分類される正常な非分裂細胞または静止細胞は、pRbまたは網膜芽細胞腫タンパク質に結合し、そのため、E2FはE2F応答性プロモーターに結合して活性化するために利用できなくなる。対照的に、遊離E2Fを含有する細胞は、E2Fに基づく転写を支持するはずである。そのような細胞の一例は、生産的なウイルス感染の発生を可能にするpRb機能を欠く腫瘍細胞である。いくつかの実施形態では、E1aアデノウイルスベクターは、本明細書に記載されるIL-4および／またはIL-13部分を使用して標的化される。

20

#### 【0209】

E1aプロモーターにあるエンハンサー配列、パッケージングシグナル、およびDNA複製開始部位の保持により、pRb機能を欠く新生細胞でアデノウイルス感染が野生型レベルに進行することが確実となる。本質的に、改変されたE1aプロモーターは、腫瘍特異的な転写活性化を付与し、実質的な腫瘍特異的な殺傷をもたらすが、正常細胞での安全性を高める。

30

#### 【0210】

いくつかの実施形態では、E1aアデノウイルスベクターは、内因性E1aプロモーターをE2F応答性プロモーターで置き換えることにより調製され、アデノウイルス5ゲノムのヌクレオチド375の上流の要素はインタクトなままである。ヌクレオチド番号付けは、例えば、Schmid, S. I., and Haring, P. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 199: pages 67-80 (1995)により記載されている通りである。これには、ウイルスゲノムをパッケージングするために同定された7つのAリピートモチーフのすべてが含まれる（上記のSchmid and Haringの図2を参照されたい）。ヌクレオチド375からヌクレオチド536までの配列は、BsaAIからBsrBIまでの制限開始部位によって欠失されるが、E1Aタンパク質についての翻訳開始コードの上流にある23塩基対を保持している。既知の材料および方法を使用して、欠失された内因性E1aプロモーター配列の代わりに、E2F応答性プロモーター、好ましくはヒトE2F-1が使用される。E2F-1プロモーターは、実施例1に記載されるように単離され得る。

40

#### 【0211】

E4領域は、アデノウイルス感染の後期に起こる多くの事象に関与しており、効率的なウイルスDNA複製、後期mRNA蓄積およびタンパク質合成、スプライシング、および宿主細胞のタンパク質合成のシャットオフのために必要とされる。E4転写ユニットのほと

50

んどが欠損しているアデノウイルスは、深刻な複製欠陥があり、一般に、高力価を達成するにはE 4 補完細胞株において増殖させる必要がある。E 4 プロモーターはウイルスゲノムの右端近くに位置し、複数のオープンリーディングフレーム（ORF）の転写を支配している。このプロモーターでは、最大転写活性の媒介に重要な多くの調節要素が特徴付けられている。これらの配列に加えて、E 4 プロモーター領域は、ウイルスDNA複製に必要な調節配列を含有する。E 4 プロモーターおよびこれらの調節配列の位置の描写は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7, 001, 596号の図2および3に見ることができる。

#### 【0212】

いくつかの実施形態では、腫瘍特異性を示すことが実証されているもの、好ましくはE 2 F 応答性プロモーター、より好ましくはヒトE 2 F-1プロモーターで置換されたE 4 塩基性プロモーターを有するアデノウイルスベクター。E 4 発現を駆動するためにE 2 F 応答性プロモーターが好ましい理由は、E 1 aプロモーターがE 2 F 応答性プロモーターで置換されたE 1 aアデノウイルスベクターの文脈で上記で議論されたものと同じである。p R bの腫瘍抑制機能は、E 2 F-1プロモーターなどのE 2 F 応答性プロモーターを抑制する能力と相関する（Adams, P. D., and W. G. Kaelin, Jr. 1995, *Cancer Biol.* 6:99-108、Sellers, W. R., and W. G. Kaelin. 1996, published erratum appears in *Biochim Biophys Acta* 1996 Dec. 9; 1288 (3):E-1, *Biochim Biophys Acta*. 1288:M1-5. Sellers, W. R., J. W. Rodgers, and W. G. Kaelin, Jr. 1995, *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:11544-8）。ヒトE 2 F-1プロモーターは、広く特徴付けられており、p R b/p 107、E 2 F-1/-2/-3、およびG1サイクリン/cdk複合体、ならびにE 1 A（Johnson, D. G., K. Ohtani, and J. R. Nevins. 1994, *Genes Dev.* 8:1514-25、Neuman, E., E. K. Flemington, W. R. Sellers, and W. G. Kaelin, Jr. 1995, *Mol Cell Biol.* 15:4660、Neuman, E., W. R. Sellers, J. A. McNeil, J. B. Lawrence, and W. G. Kaelin, Jr. 1996, *Gene*. 173:163-9）を含む、p R bシグナル伝達経路に応答することが示されている。この制御のすべてではないにしてもそのほとんどは、E 2 F-1プロモーター内に存在する複数のE 2 Fサイトの存在に起因している。したがって、この（これらの）改変を運ぶウイルスは、インタクトな（野生型）p R b経路を含有する正常細胞では弱毒化されるが、p R bの抑制機能を欠く細胞では正常な感染／複製プロファイルを示すと予想される。この変異体ウイルスの正常な感染／複製プロファイルを維持するために、E 4プロモーターの遠位端において逆位末端反復（ITR）を保持したが、これにはウイルスDNA複製に必要な制御要素のすべてが含まれるためである（Hatfield, L. and P. Hearing. 1993, *J. Virol.* 67:3931-9、Rawlins, D. R., P. J. Rosenfeld, R. J. Wides, M. D. Challberg, and T. J. Kelly, Jr. 1984, *Cell*. 37:309-19、Rosenfeld, P. J., E. A. O'Neill, R. J. Wides, and T. J. Kelly. 1987, *Mol Cell Biol.* 7:875-86、Wides, R. J., M. D. Challberg, D. R. Rawlins, and T. J. Kelly. 1987, *Mol Cell Biol.* 7:864-74）。これにより、このウイルスに感染したp R b経路欠損腫瘍細胞で野生型レベルのウイルスの獲得が容易となる。

#### 【0213】

いくつかの実施形態では、E 4プロモーターは、ウイルスゲノムの右端近くに配置され、複数のオープンリーディングフレーム（ORF）の転写を統制する（Freyer, G. A., Y. Katoh, and R. J. Roberts. 1984, *Nucleic*

10

20

30

40

50

Acids Res. 12:3503-19、Tigges, M. A., and H. J. Raskas. 1984. Splice junctions in adenovirus 2 early region 4 mRNAs: multiple splice sites produce 18 to 24 RNAs. J. Virol. 50:106-17、Virtanen, A. P. Gildardi, A. Naslund, J. M. LeMoullec, U. Pettersson, and M. Perricaudet. 1984, J. Virol. 51:822-31)。多数の調節エレメントが、転写活性を媒介するこのプロモーターにおいて特徴付けられている (Berk, A. J. 1986, Annu Rev Genet. 20:45-79、Gildardi, P., and M. Perricaudet. 1986, Nucleic Acids Res. 14:9035-49、Gildardi, P., and M. Perricaudet. 1984, Nucleic Acids Res. 12:7877-88、Hanaka, S., T. Nishigaki, P. A. Sharp, and H. Handa. 1987, Mol Cell Biol. 7:2578-87、Jones, C., and K. A. Lee. 1991, Mol Cell Biol. 11:4297-305、Lee, K. A., and M. R. Green. 1987, Embo J. 6:1345-53)。これらの配列に加えて、E4プロモーター領域は、ウイルスDNA複製に  
関与するエレメントを含む (Hatfield, L., and P. Hearing. 1993, J Virol. 67:3931-9、Rawlins, D. R., P. J. Rosenfeld, R. J. Wides, M. D. Challberg, and T. J. Kelly, Jr. 1984, Cell. 37:309-19、Rosenfeld, P. J., E. A. O'Neill, R. J. Wides, and T. J. Kelly. 1987, Mol Cell Biol. 7:875-86、Wides, R. J., M. D. Challberg, D. R. Rawlins, and T. J. Kelly. 1987, Mol Cell Biol. 7:864-74)。E4プロモーターおよび  
これらの調節配列の位置の描写は、図1および2に見ることができる。また、Jones, C., および K. A. Lee. Mol Cell Biol. 11:4297-305 (1991) も参照されたい。これらの考慮事項を念頭に置いて、E4プロモーターシャトルは、ヌクレオチド35, 576のXhoI部位とヌクレオチド35, 815のSpeI  
部位の2つの新規制限エンドヌクレアーゼ部位を作成することにより設計された (図3  
を参照されたい)。XhoIとSpeIの両方で消化すると、35, 581から35, 817のヌクレオチドが除去される。これにより、E4転写に対して最大の影響を与えることが示されているすべての配列を含む、E4転写開始部位に対して-208~+29の塩基が効果的に除去される。特に、これは、プロモーター活性化に対して最も有意な効果があることが実証されているE4F結合部位の2つの逆方向反復を包含する。ただし、3つのSp1結合部位すべて、5つのATF結合部位のうち2つ、およびウイルスDNA複製に重要なNF1およびNFII/Oct-1結合部位の両方が保持される。

#### 【0214】

いくつかの実施形態では、E2F応答性プロモーターはヒトE2F-1プロモーターである。pRb経路に対する応答を媒介するE2F-1プロモーターにおける主要な調節エレメントは、インビトロおよびインビボの両方でマッピングされている (Johnson, D. G., K. Ohtani, and J. R. Nevins. 1994, Genes Dev. 8:1514-25、Neuman, E., E. K. Flemington, W. R. Sellers, and W. G. Kaelin, Jr. 1995, Mol Cell Biol. 15:4660、Parr, M. J., Y. Manome, T. Tanaka, P. Wen, D. W. Kufe, W. G. Kaelin, Jr., and H. A. Fine. 1997, Nat Med. 3:1145-9)。したがって、転写開始部位に対して塩基対-218~+51のヒトE2F-1プロモーター断片を、SpeI  
およびXhoI部位を組み込んだプライマーを用いたPCRによって単離した。これにより、E4プロモーターシャトル内に存在する同じ部位が作成され、E4プロモーターをE

2 F-1 プロモーターで直接置換可能となる。

【0215】

#### E. キメラ抗原受容体 (CAR)

標的免疫療法は、悪性腫瘍の治療における有望な研究分野として浮上しており、近年大きな関心を集めている。確かに、CD19 悪性細胞を標的とする組換えまたは遺伝子改変された T 細胞を用いる、リンパ腫患者の治療法が報告されている。これにより、遺伝子療法および免疫療法の標的としてがん細胞に存在する抗原への注目が高まっている。これらの CAR は、本明細書に記載の IL-4 ムテインを腫瘍に標的化もしくは送達するため、またはさらに全身 IL-4 ムテイン発現を可能にするために使用することができる。いくつかの実施形態では、IL-4 ムテインは、本明細書に開示される任意の IL-4 ムテインまたはバリエーションである。いくつかの実施形態では、IL-4 ムテイン配列は、本明細書で提供される IL-4 配列のうちのいずれか 1 つと 90% 同一である。

10

【0216】

特定の腫瘍抗原を特異的に標的とするための自己または同種 T 細胞または NK 細胞の遺伝子操作は、ほとんどの腫瘍細胞による細胞傷害性免疫応答誘導の失敗を回避する戦略を提供する。いくつかの実施形態では、これらの遺伝子操作された T 細胞または NK 細胞を使用して、例えば IL-4 ムテインが腫瘍位置で発現されるように、本明細書に記載の IL-4 ムテインを腫瘍に標的化することができる。これらの技術は、ヒト免疫細胞の遺伝的改変に基づいており、細胞は白血球アフェレーシスによって患者またはドナーから抽出することができる。特定の細胞、通常は T 細胞は精製され、目的のがん抗原を標的とする受容体を発現するように操作される。操作は、レトロウイルス、レンチウイルス、トランスポゾン、mRNA 電気穿孔などによる形質導入を利用してもよい。免疫細胞は、所望の用量まで拡大され、患者に導入され得る。操作された細胞は、細胞媒介性毒性 (細胞傷害性 T 細胞) を介して、および／または腫瘍の免疫認識、サイトカイン放出、免疫細胞動員によりがん細胞に対する免疫応答を誘発することにより、がん細胞を特異的に殺傷することができる。

20

【0217】

例えば、悪性腫瘍の免疫遺伝子療法へのキメラ抗原受容体 (CAR) の適用は、抗体またはリガンド結合ドメインが T 細胞受容体のゼータシグナル伝達鎖と融合する有望な戦略である。結果として生じる CAR 免疫細胞は、遺伝子改変 T 細胞受容体によって認識される表面抗原または受容体を発現する腫瘍を攻撃する新特異性によってリダイレクトされ、高度に調節された方法で正常な宿主免疫応答を介して腫瘍を攻撃する細胞療法を提供する。これらの細胞は脳および全身循環中を自由に循環し、共局在化およびバイオアベイラビリティの必要性を問題としない。

30

【0218】

多世代の CAR 免疫細胞が開発されている。CAR は、腫瘍特異的 scFv 抗体または他の細胞外リガンド結合ドメインと、TCR 関連 CD3 ζ シグナル伝達ドメインまたは共刺激タンパク質受容体からの別の細胞内シグナル伝達ドメインとの融合によって作成される。この構造により、CAR は B 細胞抗原受容体の腫瘍特異性を持ち、MHC 結合とは無関係に T 細胞抗原受容体を介して T 細胞を活性化することができる。第 1 世代の CAR には 1 つの細胞内シグナル伝達ドメインが含まれ、通常は TCR シグナル伝達を可能にする CD3 ζ シグナル伝達ドメインを伴う。第 2 世代 CAR は、2 つの細胞内シグナル伝達ドメイン: CD3 ζ シグナル伝達ドメインと結合した CD28 または 4-1BB シグナル伝達ドメインのいずれかを含む共刺激ドメインを有する。この配置により、CAR の scFv 領域による抗原認識時に T 細胞の活性化と増殖が可能となる。第 3 世代 CAR は、2 つの共刺激ドメインと 1 つの CD3 ζ シグナル伝達ドメインを有する。第 1 の共刺激ドメインは CD28 または 4-1BB ドメインのいずれかであり、第 2 の共刺激ドメインは CD28、4-1BB または OX40 ドメインのいずれかからなる。第 4 世代の「武装した CAR T 細胞」は、第 2 世代の CAR とサイトカインおよび共刺激リガンドを含む様々な遺伝子の追加を組み合わせて、CAR T 細胞の殺腫瘍効果を高める。例えば、Battle

40

50

vi et al. (2016) Nature Reviews Clinical Oncology 13:25-40を参照されたい。米国特許第7,741,465号および国際特許公開第WO2014/127261号も参照されたい。これらはすべて、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0219】

T細胞標的化への代替アプローチには、参照により本明細書に具体的に組み込まれる「Trifunctional T cell antigen Coupler and Methods and Uses thereof」と題する国際出願第WO2015/117229号に記載のT細胞抗原連結体(coupler)が含まれる。T細胞抗原連結体系は、3つの連結ドメイン：標的特異的ポリペプチドリガンド；TCR複合体に関連するタンパク質に結合するリガンド、例えば、T細胞活性化を刺激するCD3（TCR、T細胞受容体）に対するscFv結合；およびT細胞受容体シグナル伝達ドメイン、例えば、T細胞活性化を増幅するCD4膜貫通および細胞内ドメイン、を含む。TCRを介してT細胞の活性化を刺激することにより、TACはT細胞の重要な分子機構と連携するように操作された。

10

【0220】

抗体連結T細胞受容体は、T細胞標的化への別のアプローチである。ACTRは、CARおよび確立されたモノクローナル抗体腫瘍治療薬に対するハイブリッドアプローチである。ACTRは、Fc受容体CD16の高親和性バリエーションを介して抗体の重鎖に結合できる典型的なCAR構築物から構成されている。ACTR-T細胞は、特定のがん抗原を標的とするリガンドを結合することにより、腫瘍を標的化することができる。T細胞の活性化はCARモジュールによって実行される。

20

【0221】

二重特異性T細胞交換体(BiTE)は、T細胞のTCRに結合でき、2つのモジュール：がん標的化リガンド；およびT細胞を腫瘍に橋渡しするCD3結合scFvドメインを介して腫瘍細胞を標的化できる、二重特異性抗体である。

【0222】

IL13に結合した細菌毒素、ナノ粒子、腫瘍溶解性ウイルス、ならびにモノクローナル抗体、IL13Rα2パルス(IL13Rα2-pulsed)樹状細胞、およびIL13Rα2標的化キメラ抗原受容体を使用した免疫療法を含む、IL13Rα2に対する標的化治療が開発されている(Kahlon et al. (2004) Cancer Research. 64(24):9160-9166、Kong et al. (2012) Clinical Cancer Research. 18(21):5949-5960、Thaci et al. (2014) Neuro-Oncology、ならびに臨床試験NCT02208362、NCT00730613、およびNCT01082926を参照されたい)。いくつかの実施形態では、これらの標的化療法を使用して、IL-4ムテインを腫瘍に送達することができる。

30

【0223】

IL-13活性の選択的变化を提供する生物学的性質は、T細胞特異性の操作による特定のがんの治療を含む多くの治療目的にとって興味深い。本発明はこの問題に対処するものである。

40

【0224】

キメラ抗原受容体(CAR)、T細胞抗原連結体(TAC)、抗体共役T細胞受容体(ACTR)、およびIL-13またはIL-4スーパーカインが標的特異的リガンドを提供する二重特異性T細胞交換体(BiTE)を含むがこれらに限定されない標的組成物を用いて、抗腫瘍免疫エフェクター細胞、例えばT細胞、NK細胞などを増強するための方法および組成物が提供される。さらなる実施形態では、免疫エフェクター細胞はIL-4ムテインを発現する。

【0225】

IL-4ムテイン配列を含む免疫細胞標的化または発現構築物が提供され、本明細書に記

50

載される任意の I L - 4 配列を含むことができる。スーパーカインは、免疫細胞を少なくとも 1 つの受容体を発現する細胞、例えば腫瘍細胞に標的化するのに有用である。いくつかの実施形態では、I L - 4 ムテインは、本明細書に開示される任意の I L - 4 ムテインまたはバリエーションである。いくつかの実施形態では、I L - 4 ムテイン配列は、本明細書で提供される I L - 4 配列のうちのいずれか 1 つと 90 % 同一である。

#### 【0226】

構築物の I L - 4 またはムテイン成分は、少なくとも約 50 のアミノ酸の長さ、少なくとも約 75、少なくとも約 100、少なくとも約 110、少なくとも約 115 のアミノ酸の長さ、最大で膜貫通ドメインにある野生型タンパク質の全長、すなわち約 116 のアミノ酸の長さであり得る。例えば、スーパーカインまたはムテインは、C A R のヒンジ、膜貫通またはシグナル伝達ドメインに融合され得る。例示的なポリペプチド配列が提供される。

10

#### 【0227】

スーパーカインまたはムテインとして含まれるのは、これらの配列と 90 %、95 %、98 % または 99 % 同一であるアミノ酸および核酸コード配列、これらの配列を含むが 3' または 5' 末端に追加のヌクレオチドを含む、例えば、3、6、9、12 以上のヌクレオチドなどの任意の数の追加のヌクレオチドまたはコドン、または最大約 12、20、50 または 100 の追加のヌクレオチドを含むより長い配列、および遺伝暗号の縮重に起因してこれらの核酸と同じアミノ酸配列をコードする任意の配列である。特に、所望の宿主による発現のためにコドン最適化された (C O) 配列は、本発明の一部として企図される。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は 90 % 同一である。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は 95 % 同一である。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は 98 % 同一である。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は 99 % 同一である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、I L - 4 ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物に連結されている。いくつかの実施形態では、I L - 4 ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物は、C D 3 - ζ、C D 28、D A P 10、O X - 40、I C O S、および C D 137 に由来する 1 つ以上のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、I L - 4 ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物または発現は、C D 3 - ζ に由来する 1 つ以上のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、I L - 4 ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物は、C D 28 に由来する 1 つ以上のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、I L - 4 ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物は、D A P 10 に由来する 1 つ以上のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、I L - 4 ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物は、O X - 40 に由来する 1 つ以上のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、I L - 4 ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物は、C D 137 に由来する 1 つ以上のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、I L - 4 ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物は、本明細書で提供されるものを含む、I L - 4 バリエーション / I L - 4 ムテインを含む。いくつかの実施形態では、I L - 4 ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物は、本明細書で提供されるものを含む、I L - 4 バリエーション / I L - 4 ムテインを含む。

20

30

#### 【0228】

40

##### 1. NK 細胞

いくつかの実施形態では、免疫細胞はナチュラルキラー (NK) 細胞である。NK 細胞は、N K G 2 D、C D 16、および自然細胞傷害性受容体 (N C R)、例えば、N K p 44、N K p 46、N K p 30 を含む複数の細胞表面受容体を介して、感染または形質転換された細胞を認識する。これらの受容体は、パーフォリンおよびグランザイムを含有する細胞溶解性顆粒の放出を開始する免疫チロシン活性化モチーフ (I T A M) を含有し、ならびに I F N - γ および T N F - α などのサイトカインおよびケモカインの産生および放出を媒介する、D A P 10、D A P 12、C D 3 ζ などのシグナル伝達アダプタータンパク質を活性化。重要なことは、NK 細胞媒介細胞毒性は自己 H L A の提示に依存しないことである。したがって、NK 細胞は、同種環境で使用でき、市販の細胞製品を潜在的に

50

提供できるその能力のために、細胞に基づくがん治療法として著しい臨床的関心を保持している。

#### 【0229】

ナチュラルキラー細胞は、HLAマッチングを必要としないため、養子免疫療法についてT細胞の使用の代替となり、同種エフェクター細胞として使用することができる。養子移入された同種NK細胞の臨床試験は、これらの細胞が数週間から数ヶ月間患者で生存できることを示している。さらに、NK細胞でのCARの発現により、これらの細胞は、通常NK細胞感受性がより高い血液悪性腫瘍（特に、急性骨髄性白血病）と比較して、NK細胞媒介活性に抵抗することが多い固形腫瘍をより効果的に殺傷することができる。NK細胞標的化に有用なCARには、例えば、CD3ζを唯一のシグナル伝達ドメインとして含有する第1世代のCAR構築物が含まれる。第2および第3世代のCARもNK細胞で有用である。いくつかの実施形態では、NK細胞活性化受容体であるNKGD2の外部ドメインは、CD3ζに直接連結している。

10

#### 【0230】

改変用のNK細胞には、細胞株または末梢血NK細胞が含まれ、これらは、単純な採血またはより多くの細胞が必要な場合はアフエーシスによってドナーから単離できる。活性化されたPB-NK細胞は、CD16、NKp44、NKp46などのより広い範囲の活性化受容体、およびNK細胞ライセンシングに重要な役割を果たすKIRを発現する。さらに、PB-NK細胞は細胞に照射することなく投与できるため、インビボで拡大する能力を有する。CAR発現に適したNK細胞の別の源は、ヒト多能性幹細胞（人工多能性幹細胞（iPSC）またはヒト胚性幹細胞（hESC）の両方）に由来するNK細胞である。これらのNK細胞はPB-NK細胞と同様の表現型を示し、hESC/iPSC-NK細胞は臨床スケールで増殖させることができる。

20

#### 【0231】

##### 2. キメラ抗原受容体（CAR）

スーパーカイン配列に加えて、CARは、CD3ζについてのシグナル伝達ドメインと、CARを発現する免疫細胞のリサイクル、生存、および／または拡大をさらに促進する1つ以上の共刺激受容体のシグナル伝達ドメインとを含有している。共刺激受容体のシグナル伝達ドメインは、細胞内で活性化シグナルを生成する各受容体タンパク質の細胞内部分である。例としては、天然CD28分子のアミノ酸180～220および天然4-1BB分子のアミノ酸214～255が挙げられる。

30

#### 【0232】

スーパーカインをシグナル伝達領域に連結するための適切なヒンジおよび膜貫通領域の例には、免疫グロブリンの定常（Fc）領域、ヒトCD8a、および標的細胞への接近および結合を改善するために標的化部位を細胞表面から遠ざけるように働く人工リンカーが含まれ得るが、これらに限定されない。適切な膜貫通ドメインの例には、白血球CDマーカー、好ましくはCD4またはCD28の膜貫通ドメインが含まれる。細胞内受容体シグナル伝達ドメインの例には、T細胞抗原受容体複合体、好ましくはCD3のゼータ鎖が含まれるが、膜中にCARを固定するのに十分な任意の膜貫通領域を使用することができる。当業者は、多数の膜タンパク質において膜貫通ドメインを生成する多数の膜貫通領域および構造要素（親油性アミノ酸領域など）を認識しており、したがって、任意の都合の良い配列で代用することができる。CAR発現細胞の機能および活性を改善するのに適したT細胞共刺激シグナル伝達受容体には、CD28、CD137、およびOX-40が含まれるが、これらに限定されない。

40

#### 【0233】

CD28を介したシグナル伝達は、IL2の産生および増殖に必要であるが、T細胞の機能および活性を維持する上で主要な役割を果たしていない。CD137（CD28の活性化後に発現する腫瘍壊死因子受容体ファミリーのメンバー）およびOX-40は、T細胞の長期生存およびT細胞の蓄積を駆動するのに関与している。これらの受容体のリガンドは通常、樹状細胞や活性化マクロファージなどの専門的な抗原提示細胞上で発現されるが

50

、腫瘍細胞では発現されない。CD4<sup>+</sup>T細胞中にCD28および／または4-1BBシグナル伝達ドメインを組み込んだCARを発現させると、CD3 $\zeta$ シグナル伝達ドメインのみを含有するCARを発現するものと比較して、これらの細胞の活性および抗腫瘍効力が増強され、この構築物は、第2または第3世代CARと称することができる。

#### 【0234】

タンデムCARが目的のCAR構築物として含まれ、例えば、参照により本明細書に具体的に組み込まれるHegde et al. (2016) J. Clin. Invest. 126(8):3036-3052を参照されたい。そのような構築物では、腫瘍特異的抗原の結合部分がIL-13スーパーカインと縦列に組み合わせられる。結合部分は、例えば、当該技術分野で既知のHER-2、EGFR、CD20などを含むがこれらに限定されない腫瘍細胞抗原に特異的なscFvであってもよい。

#### 【0235】

様々な実施形態では、抗原結合ドメインは、標的細胞、例えばがん細胞上の抗原に結合する。抗原結合ドメインは、腫瘍標的抗原などであるがこれに限定されない抗原に結合することができる。場合によっては、抗原結合ドメインは1つ以上の抗原に結合する。例示的な抗原結合ドメインは、D19；CD123；CD22；CD30；CD171；CS-1（CD2サブセット1、CRACC、SLAMF7、CD319、および19A24とも呼ばれる）；C型レクチン様分子-1（CLL-1またはCLECL1）；CD33；上皮成長因子受容体バリエーションII（EGFRvII）；ガングリオシドG2（GD2）；ガングリオシドGD3；TNF受容体ファミリーB細胞成熟（BCMA）；Tn抗原（（Tn Ag）または（GalNAc $\alpha$  Ser/Thr））；前立腺特異的膜抗原（PSMA）；受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1（ROR1）；Fms様チロシンキナーゼ3（FLT3）；腫瘍関連糖タンパク質72（TAG72）；CD38；CD44v6；がん胎児性抗原（CEA）；上皮細胞接着分子（EPCAM）；B7H3（CD276）；KIT（CD117）；インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2（IL-13R $\alpha$ 2またはCD213A2）；メソセリン；インターロイキン11受容体アルファ（IL-11Ra）；前立腺幹細胞抗原（PSCA）；プロテアーゼセリン21（TestisinまたはPRSS21）；血管内皮成長因子受容体2（VEGFR2）；Lewis（Y）抗原；CD24；血小板由来成長因子受容体ベータ（PDGFR-ベータ）；ステージ特異的胚抗原-4（SSEA-4）；CD20；葉酸受容体アルファ；受容体チロシンプロテインキナーゼERBB2（Her2/neu）；ムチン1，細胞表面関連（MUC1）；上皮成長因子受容体（EGFR）；神経細胞接着分子（NCAM）；プロスターゼ（Prostate）；前立腺酸性ホスファターゼ（PAP）；伸長因子2変異（ELF2M）；エフリンB2；線維芽細胞活性化タンパク質アルファ（FAP）；インスリン様成長因子1受容体（IGF-I受容体）、炭酸脱水酵素IX（CAIX）；プロテアソーム（プロソーム、マクロパイン）サブユニット，ベータ型9（LMP2）；糖タンパク質100（gp100）；ブレークポイントクラスター領域（BCR）およびAbelsonマウス白血病ウイルスがん遺伝子ホモログ1（Abl）（bcr-abl）からなるがん遺伝子融合タンパク質；チロシンキナーゼ；エフリン型-A受容体2（EphA2）；フコシルGM1；シアリルルイス接着分子（sLe）；ガングリオシドGM3（aNeu5Ac（2-3）bDGalp（1-4）bDGlcp（1-1）Cer）；トランスグルタミナーゼ5（TGS5）；高分子量黒色腫関連抗原（HMWMAA）；o-アセチル-GD2ガングリオシド（OAcGD2）；葉酸受容体ベータ；腫瘍内皮マーカー1（TEM1/CD248）；腫瘍内皮マーカー7関連（TEM7R）；クローディン6（CLDN6）；甲状腺刺激ホルモン受容体（TSHR）；Gタンパク質共役受容体クラスCグループ5メンバーD（GPCR5D）；染色体Xオープンリーディングフレーム61（CXORF61）；CD97；CD179a；未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）；ポリシアル酸；胎盤特異的1（PLAC1）；globoHグリコセラミド（GlobO H）の六糖部分；乳腺分化抗原（NY-BR-1）；ウロプラキン2（UPK2）；A型肝炎ウイルス細胞受容体1（HAVCR1）；アドレナリン受容体ベータ

10

20

30

40

50

3 (ADRB3) ; パネキシン3 (PANX3) ; Gタンパク質共役受容体20 (GPR20) ; リンパ球抗原6複合体、遺伝子座K9 (LY6K) ; 嗅覚受容体51E2 (OR51E2) ; TCRガンマ代替リーディングフレームタンパク質 (TARP) ; ウィルムス腫瘍タンパク質 (WT1) ; がん／精巣抗原1 (NY-ESO-1) ; がん／精巣抗原2 (LAGE-1a) ; 黒色腫関連抗原1 (MAGE-A1) ; 12番染色体12p上に位置するETS転座バリエーション遺伝子6 (ETV6-AML) ; 精子タンパク質17 (SPA17) ; X抗原ファミリー、メンバー1A (XAGE1) ; アンジオポエチン結合細胞表面受容体2 (Tie2) ; 黒色腫がん精巣抗原-1 (MAD-CT-1) ; 黒色腫がん精巣抗原-2 (MAD-CT-2) ; Fos関連抗原1 ; 腫瘍タンパク質p53 (p53) ; p53変異体 ; プロスタイン ; 生存 (surviving) ; テロメラーゼ ; 前立腺がん腫瘍抗原-1 (PCTA-1またはGalectin8) ; T細胞1によって認識される黒色腫抗原 (MelanAまたはMART1) ; ラット肉腫 (Ras) 変異体 ; ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) ; 肉腫転座ブレークポイント ; アポトーシスの黒色腫阻害剤 (ML-IAP) ; ERG (膜貫通プロテアーゼ、セリン2 (TMPRSS2) ETS融合遺伝子) ; N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV (NA17) ; ペアボックスタンパク質Pax-3 (PAX3) ; アンドロゲン受容体 ; サイクリンB1 ; v-myc鳥類骨髄細胞腫ウイルス腫瘍遺伝子神経芽細胞腫由来ホモログ (MYCN) ; RasホモログファミリーメンバーC (RhoC) ; チロシナーゼ関連タンパク質2 (TRP-2) ; シトクロムP4501B1 (CYP1B1) ; CCCCCTC-結合因子 (ジンクフィンガータンパク質) 様 (BORISまたは刷り込み部位の調節因子の同胞、T細胞3により認識される扁平細胞がん腫抗原 (SART3) ; ペアボックスタンパク質Pax-5 (PAX5) ; プロアクロシン結合タンパク質sp32 (OY-TES1) ; リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ (LCK) ; Aキナーゼアンカータンパク質4 (AKAP-4) ; 滑膜肉腫、Xブレークポイント2 (SSX2) ; 高度糖化エンドポイントのための受容体 (RAGE-1) ; 腎遍在1 (RU1) ; 腎遍在2 (RU2) ; レグマイン ; ヒトパピローマウイルスE6 (HPVE6) ; ヒトパピローマウイルスE7 (HPVE7) ; 腸のカルボキシルエステラーゼ ; 熱ショックタンパク質70-2変異 (mut hsp70-2) ; CD79a ; CD79b ; CD72 ; 白血球関連免疫グロブリン様受容体1 (LAIR1) ; IgA受容体のFc断片 (FCARまたはCD89) ; 白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーAメンバー2 (LILRA2) ; CD300分子様ファミリーメンバーf (CD300LF) ; C型レクチンドメインファミリー12メンバーA (CLEC12A) ; 骨髄間質細胞抗原2 (BST2) ; EGF様モジュール含有ムテイン様ホルモン受容体様2 (EMR2) ; リンパ球抗原75 (LY75) ; グリピカン-3 (GPC3) ; Fc受容体様5 (FCRL5) ; ならびに免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1 (IGLL1) を含むがこれに限定されない抗原に結合できる。

10

20

30

40

50

#### 【0236】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、合成抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、非ヒト抗体、ナノボディ、単鎖可変断片 (scFv)、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fvなどを含む。抗原結合ドメインは、CARの膜貫通ドメイン結合され得る。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインをコードする核酸は、CARの膜貫通ドメインをコードする核酸に作動可能に連結される。

#### 【0237】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、膜結合または膜貫通タンパク質に由来し得る。特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、膜結合または膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインの野生型アミノ酸配列と比較して、1つ以上、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、またはそれ以上のアミノ酸改変 (例えば、置換、挿入、および欠失) を含む。CARの膜貫通ドメインの非限定的な例は、T細胞受容体、CD28、CD3イプシロン (CD3ξ)、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、またはエリスロポエチン受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖の少なくとも膜貫通領

域を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、ヒト免疫グロブリン（Ig）ヒンジ領域、例えば、IgG4Fcヒンジを含む。他の実施形態では、膜貫通ドメインは、疎水性アミノ酸残基（例えば、ロイシンおよびバリン）を含む組換えまたは合成ドメインである。場合によっては、膜貫通ドメインは、ドメインの片端または両端にフェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンを含む。

#### 【0238】

膜貫通ドメインは、抗原結合ドメインをCARの細胞内シグナル伝達ドメインに連結する。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインをコードする核酸は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸に作動可能に連結される膜貫通ドメインをコードする核酸に作動可能に連結される。

#### 【0239】

いくつかの実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、シグナル活性化またはシグナル伝達ドメインを含む。そのようなものとして、細胞内シグナル伝達ドメインは、シグナル、例えば、活性化シグナルを変換もしくは伝達するか、または細胞内の細胞応答を媒介するのに十分なタンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインの任意の部分を含む。非限定的な例には、TCR、CD2、CD3ゼータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD7、CD27、CD86、一般的なFcRガンマ、FcRベータ、CD79a、CD79b、FcガンマRIIa、DAP10、DAP12、T細胞受容体（TCR）、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83に特異的に結合するリガンド、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、NKP80（KLRF1）、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANSCENDANT/ RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（触覚）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（B220）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELP（CD162）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKP44、NKP30、NKP46、NKG2D、それらの任意の誘導体、バリエーション、または断片が含まれる。特定の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3、CD27、CD28、CD127、ICOS、4-1BB（CD137）、PD-1、T細胞受容体（TCR）、それらの任意の誘導体、またはそれらの任意のバリエーションなどからの共刺激分子の細胞内ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子（SLAMタンパク質）、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1（CD11a/CD18）、4-1BB（CD137）、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS（CD278）、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM（LIGHTR）、KIRDS2、SLAMF7、NKP80（KLRF1）、NKP44、NKP30、NKP46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB

10

20

30

40

50

1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (触覚)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、およびCD83に特異的に結合するリガンドからなる群から選択される。

【0240】

#### 1. B i T E S

二重特異性T細胞係合体 (B i - s p e c i f i c T - c e l l e n g a g e r) (B i T E) は、CD3に特異的に結合する抗体可変領域に融合したIL-13スーパーカインを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、単鎖可変断片 (s c F v) の抗体可変領域。スーパーカインは、リンカーを介して可変領域に融合され得る。場合によりFc領域が提供される。

【0241】

#### 2. T A C

TAC構築物は、TCR複合体に関連するタンパク質に結合するリガンドに融合されるIL-4ムテイン、T細胞受容体シグナル伝達ドメインポリペプチドに融合されるIL-4ムテインを含む。ドメインはリンカーで区切られてもよい。TCR複合体に関連するタンパク質はCD3であり得る。TCR複合体に関連するタンパク質に結合するリガンドは、単鎖抗体であり得る。TCR複合体に関連するタンパク質に結合するリガンドは、UCHT1またはそのバリエーションであり得る。T細胞受容体シグナル伝達ドメインポリペプチドは、細胞質ゾルドメインおよび膜貫通ドメインを含み得る。細胞質ゾルドメインは、CD4細胞質ゾルドメインであり、膜貫通ドメインは、CD4膜貫通ドメインであり得る。

【0242】

#### 3. A C T R

ACTRは、CARおよび確立されたモノクローナル抗体腫瘍治療薬に対するハイブリッドアプローチである。ACTRは、Fc受容体CD16の高親和性バリエーションを介して抗体の重鎖に結合できる典型的なCAR構築物から構成されている。スーパーカインは、CARによって認識される部分に融合され、これには、CD16に対して高い親和性を持つ抗体のFc領域が含まれるが、これに限定されない。

【0243】

免疫細胞標的化または発現構築物コード配列は、組換えDNA技術を含む、当該技術分野で知られている任意の手段によって生成することができる。キメラ受容体のいくつかの領域をコードする核酸は、当該技術分野で知られている分子クローニングの標準的な手法 (ゲノムライブラリースクリーニング、PCR、プライマー支援ライゲーション、部位特異的突然変異誘発など) により都合よく調製し、完全なコード配列に組み立てることができる。得られたコード領域を発現ベクターに挿入し、適切な発現宿主細胞株、例えば、初代培養、細胞株、iPSC由来細胞などを含む同種または自己Tリンパ球、同種または自己NK細胞の集団を形質転換するために使用できる。この方法は、インビトロ (例えば、無細胞系)、培養中、例えばインビトロまたはエクスピボの細胞において使用することができる。例えば、IL-4ムテインCAR発現細胞は、培養培地中でインビトロで培養および増殖させることができる。

【0244】

非IL-4ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物はまた、特定の腫瘍細胞を標的化するように免疫細胞に特異的に指向させるように使用することができる。CD4+またはCD8+エフェクターT細胞などの抗腫瘍エフェクター細胞は、CD3ζ、CD28、DAP10、OX-40、ICOS、CD137に由来する1つ以上のシグナル伝達ドメインを含むスーパーカイン免疫細胞標的化または発現構築物をT細胞に導入することにより、

10

20

30

40

50

そのような腫瘍細胞を認識するようにリダイレクトされるように生成される。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載のIL-4ムテインを発現することができる導入遺伝子をさらに含むことができる。IL-4ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物は、腫瘍細胞を含むIL-4R発現細胞を標的化するように免疫細胞を特異的に指向させることができる。抗腫瘍エフェクター細胞、例えば、CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>エフェクターT細胞は、CD3 $\zeta$ 、CD28、DAP10、OX-40、ICOS、およびCD137に由来する1つ以上のシグナル伝達ドメインを含む、IL-4ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物をT細胞に導入することにより、そのような腫瘍細胞を認識するために再指向性となるように生成される。

#### 【0245】

IL-4ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物は、例えば、当該技術分野で既知である非ウイルスプラスミドベクターおよび電気穿孔法；ウイルスベクターおよび感染方法などを使用して、ヒト免疫細胞に感染またはトランスフェクトされる。共刺激シグナル伝達ドメインを含むCARは、養子療法プロトコルの臨床的有効性を大幅に改善できる方法で、抗腫瘍活性の持続時間および／または保持を強化し得る。CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞エフェクター機能、ならびにNK細胞機能は、これらの受容体を介して駆動されることができ、したがって、これらの細胞型は本発明での使用が想定される。本発明のIL13スーパーカインCARを発現するCD8<sup>+</sup>T細胞は、これらの細胞の他の機能の中でも、標的細胞を溶解するために使用され得る。CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞のいずれかまたは両方での適切な共刺激CARの発現は、養子免疫療法のため、したがって、強化されたおよび／または長い生存期間および抗腫瘍活性を示す専門的なヘルパーおよびキラーT細胞のいずれかまたは両方からなる、最も効果的な細胞集団を提供するために使用される。いくつかの実施形態では、IL-4ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物は、図1で提供されるものを含む、IL-4バリエーション／IL-4ムテインを含む。いくつかの実施形態では、IL-4ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物は、本明細書で提供される任意のものを含む、IL-4バリエーション／IL-4ムテインを含む。

#### 【0246】

本発明のポリペプチドは、さらに改変することができ、例えば、様々な目的のために多種多様な他のオリゴペプチドまたはタンパク質に結合させることができる。例えば、プレニル化、アセチル化、アミド化、カルボキシル化、グリコシル化、ペグ化などにより翻訳後修飾される。このような修飾には、グリコシル化の修飾、例えば、その合成およびプロセッシングまたはさらなるプロセッシング工程中にポリペプチドのグリコシル化パターンを修飾することにより作成されるもの、例えば、哺乳類のグリコシル化または脱グリコシル化酵素などのグリコシル化に影響する酵素にポリペプチドを曝露させることにより作成されるものも含み得る。

#### 【0247】

当業者に既知の方法を使用して、コード配列および適切な転写／翻訳制御シグナルを含むT細胞標的化構築物発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えば、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ組換え／遺伝子組換えが含まれる。あるいは、目的のポリペプチドをコードできるRNAを化学的に合成してもよい。当業者は、本発明のポリペプチドのいずれかに適したコード配列を提供するために、既知のコドン使用表および合成方法を容易に利用することができる。核酸は、実質的な純度で単離および取得され得る。通常、DNAまたはRNAのいずれかとしての核酸は、他の天然に生じる核酸配列を実質的に含むことなく得られてもよく、一般に少なくとも約50%であり、通常は少なくとも約90%純粋であり、典型的には、例えば、天然に生じる染色体上では通常関連付けられない1つ以上のヌクレオチドが隣接している「組換え」型である。本発明の核酸は、線状分子として、または環状分子内に提供することができ、自律的に複製する分子（ベクター）内または複製配列のない分子内に提供することができる。核酸の発現は、それ自体または当該分野で既知の他の調節配列によって調節され得る。本発明の核酸は、当該分野で利用可能な種々の技術を使用して適切な宿主細胞に導入され得

10

20

30

40

50

る。

【0248】

本発明によれば、免疫細胞標的化または発現構築物ベクターおよび免疫細胞標的化または発現構築物改変細胞は、例えばヒトの治療などの治療用途に適した薬学的組成物で提供することができる。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物は、本発明の1つ以上の治療物質またはその薬学的に許容される塩、エステルもしくは溶媒和物を含む。いくつかの他の実施形態では、本発明の薬学的組成物は、別の治療薬、例えば別の抗腫瘍薬と組み合わせ、本発明の1つ以上の治療物質を含む。

【0249】

本発明の治療物質は、しばしば、活性治療薬および別の薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物として投与される。そのような製剤は、1つ以上の非毒性の薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤、および／またはアジュバントを含むことができる。好ましい形態は、意図される投与様式および治療用途に依存する。組成物は、所望の製剤に応じて、動物またはヒト投与用の薬学的組成物を製剤化するために一般的に使用されるビヒクルとして定義される、薬学的に許容される非毒性担体または希釈剤も含み得る。希釈剤は、組み合わせの生物活性に影響を与えないように選択される。そのような希釈剤の例は、蒸留水、生理的リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、およびハンス液である。さらに、薬学的組成物または製剤は、他の担体、アジュバント、または非毒性、非治療的、非免疫原性の安定剤などを含んでもよい。

【0250】

さらに他のいくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物は、タンパク質などの大きくゆっくりと代謝される高分子、キトサンなどの多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびコポリマー（例えば、ラテックス官能化セファロース（商標）、アガロース、セルロースなど）、高分子アミノ酸、アミノ酸コポリマー、および脂質凝集体（油滴またはリポソームなど）も含むことができる。

【0251】

CAR免疫細胞の最大耐量（MTD）は、臨床試験の開発中に決定されてもよく、例えば、経験的に決定されるように、最大約 $10^4$  T細胞/kg体重、最大約 $10^5$  細胞/kg体重、最大約 $10^6$  細胞/kg体重、最大約 $5 \times 10^6$  細胞/kg体重、最大約 $10^7$  細胞/kg体重、最大約 $5 \times 10^7$  細胞/kg体重、またはそれ以上である。いくつかの実施形態では、CAR免疫細胞の最大耐量（MTD）は、最大約 $10^4$  T細胞/体重kgである。いくつかの実施形態では、CAR免疫細胞の最大耐量（MTD）は、最大約 $10^5$  T細胞/体重kgである。いくつかの実施形態では、CAR免疫細胞の最大耐量（MTD）は、最大約 $10^6$  T細胞/体重kgである。いくつかの実施形態では、CAR免疫細胞の最大耐量（MTD）は、最大約 $10^7$  T細胞/体重kgである。いくつかの実施形態では、CAR免疫細胞の最大耐量（MTD）は、最大約 $5 \times 10^6$  T細胞/体重kgである。いくつかの実施形態では、CAR免疫細胞の最大耐量（MTD）は、最大約 $5 \times 10^7$  T細胞/体重kgである。

【0252】

本明細書に記載の細胞の毒性は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手法により、例えば、LD<sub>50</sub>（集団の50%致死量）またはLD<sub>100</sub>（集団の100%致死量）を決定することにより、決定することができる。毒性効果と治療効果との用量比が治療指数である。これらの細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトでの使用において毒性でない投与量範囲を策定する際に使用することができる。本明細書に記載の投与量は、毒性がほとんどまたは全くない有効量を含む循環濃度の範囲内にあることが好ましい。投与量は、用いられる投与剤形および利用される投与経路に応じて、この範囲内で変化し得る。正確な製剤、投与経路、および用量は、患者の状態を考慮して個々の医師が選択することができる。

【0253】

用量漸増試験の後、拡大コホートの患者はMTDの免疫細胞で治療される。例示的な治療

レジメンは、2週間に1回、または1か月に1回、または3～6か月に1回の投与を伴う。本発明の治療物質は通常、複数の機会に投与される。単回投与の間隔は、毎週、毎月、または毎年である。患者中の治療物質の血中濃度を測定することにより示されるように、間隔は不規則であり得る。

#### 【0254】

予防的用途では、例えば、患者の寛解を維持するために、比較的低い投与量が、長期間にわたって比較的まれな間隔で投与され得る。一部の患者は、生涯にわたって治療を受け続ける。他の治療用途では、疾患の進行が軽減または終了するまで、好ましくは、患者が疾患の症状の部分的または完全な改善を示すまで、比較的短い間隔で比較的高い投与量が必要になる場合がある。その後、特許に予防レジメンを実施することができる。

10

#### 【0255】

免疫細胞標的化または発現構築物とともに投与および／またはともに製剤化できる追加の治療薬の例には、宿主中の腫瘍細胞および他の望ましくない細胞を排除するために治療的に使用され、電離放射線の送達および化学療法剤の投与などの治療の使用を含む、抗増殖療法、または細胞減少療法が含まれる。化学療法剤は、当該技術分野で既知であり、従来の用量およびレジメンで、または低い用量もしくはレジメンで、使用され、例えば、化合物ダウノルビシン、アドリアマイシン（ドキソルビシン）、エピルビシン、イダルビシン、アナマイシン、MEN10755を含む、アントラサイクリンなどのトポイソメラーゼ阻害剤を含む。他のトポイソメラーゼ阻害剤には、ポドフィロトキシン類似体であるエトポシドおよびテニポシド、およびアントラセンジオン、ミトキサントロンおよびアムサクリンが含まれる。他の抗増殖剤は、微小管の集合を妨害し、例えば、ビンカアルカロイドのファミリーである。ビンカアルカロイドの例には、ビンブラスチン、ビンクリスチン；ビノレルビン（NAVELBINE）；ビンデシン；ビンドリン；ビンカミンなどが含まれる。DNA損傷剤には、ヌクレオチド類似体、アルキル化剤などが含まれる。アルキル化剤には、ナイトロジェンマスタード、例えば、メクロレタミン、シクロホスファミド、メルファラン（レーサルコリシン）など；およびニトロ源、例えば、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、セムスチン（メチル-CCNU）、ストレプトゾシン、クロロゾトシンなどが含まれる。ヌクレオチド類似体には、ピリミジン、例えば、シタラビン（CYTOSAR-U）、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル（5-FU）、フロクスウリジン（FUDR）など；プリン、例えば、チオグアニン（6-チオグアニン）、メルカプトプリン（6-MP）、ペントスタチン、フルオロウラシル（5-FU）など；および葉酸類似体、例えば、メトトレキサート、10-プロパルギル-5,8-ジデアザフォレート（PDDF、CB3717）、5,8-ジデアザテトラヒドロ葉酸（DDATHF）、ロイコボリンなどが含まれる。他の目的の化学療法剤には、金属複合体、例えば、シスプラチン（cis-DDP）、カルボプラチン、オキサリプラチンなど；尿素、例えば、ヒドロキシ尿素およびヒドラジン、例えば、N-メチルヒドラジンが含まれる。

20

30

#### 【0256】

例えば、電離放射線（IR）は、治療される領域の細胞を損傷または破壊するエネルギーを蓄積することにより、がん患者の約60%を治療するために使用され、本発明の目的のために、従来の用量およびレジメン、または低い用量で送達され得る。細胞への放射線損傷は非特異的であり、DNAに複雑な影響を及ぼす。治療の有効性は、正常細胞に対してよりも大きながん細胞に対する細胞傷害に依存する。放射線療法は、あらゆる種類のがんの治療に使用できる。放射線療法の種類によっては、X線やガンマ線などの光子が含まれる。がん細胞に放射線を照射するための別の技法は、内部放射線療法であり、これは、放射性インプラントを腫瘍または体腔に直接配置することにより、放射線量を小さな領域に集中させる。電離放射線の適切な線量は、少なくとも約2 Gy～約10 Gy以下の範囲、通常は約5 Gyであり得る。紫外線照射の適切な線量は、少なくとも約5 J/m<sup>2</sup>～約50 J/m<sup>2</sup>以下の範囲、通常は約10 J/m<sup>2</sup>であり得る。試料は、紫外線照射後少なくとも約4時間～約72時間以内、通常は約4時間で収集され得る。

40

50

## 【0257】

治療は、例えばCD40、OX40などの免疫共刺激分子を刺激する薬剤、および／または(iii)例えばCTLA-4、PD-1、PD-L1などの免疫抑制分子を拮抗する薬剤を含む免疫調節性調節剤と組み合わせてもよい。活性薬剤は、宿主内のがん細胞の枯渇に対して相加的または相乗的効果をもたらすために一定期間内に投与される。投与方法には、全身投与、腫瘍内投与などが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0258】

いくつかの実施形態では、がんはチェックポイント阻害剤、例えば、PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、CTLA4アンタゴニスト、TIM-3アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、VISTAアンタゴニスト、LAG3アンタゴニストなどに反応するがんタイプであるため、個々のがんが、併用療法による治療のために選択される。いくつかの実施形態では、そのような免疫調節剤は、CTLA-4、PD1またはPD-L1アンタゴニスト、例えば、アベルマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、イピリムマブなどである。いくつかのそのような実施形態では、がんは、黒色腫または小細胞肺がんであるが、これらに限定されない。いくつかのそのような実施形態では、がんは、高い新抗原、または突然変異誘発の負荷を有するタイプである(参照により本明細書に具体的に組み込まれるVogelstein et al. (2013) Science 339 (6127): 1546-1558を参照されたい)。

## 【0259】

いくつかの実施形態では、がんは免疫応答アゴニスト、例えば、CD28アゴニスト、OX40アゴニスト、GITRアゴニスト、CD137アゴニスト、CD27アゴニスト、HVEMアゴニストなどに応答するがんタイプであるため、個々のがんが、本発明の併用療法による治療のために選択される。いくつかの実施形態では、そのような免疫調節剤は、OX40、CD137、またはGITRアゴニスト、例えば、トレメリマブなどである。いくつかのそのような実施形態では、がんは、黒色腫または小細胞肺がんであるが、これらに限定されない。いくつかのそのような実施形態では、がんは、高い新抗原、または突然変異誘発の負荷を有するタイプである。

## 【0260】

いくつかの実施形態では、併用療法には、PD-1に結合し、PD-1およびそのリガンドPD-L1との相互作用を破壊して、抗腫瘍免疫応答を刺激する、当該技術分野で既知の抗体が含まれる。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合部分は、PD-1に特異的に結合する。例えば、PD-1を標的とし、本発明で利用できる抗体には、例えば、ニボルマブ(BMS-936558、Bristol-Myers Squibb)、ペンブロリズマブ(ランブロリズマブ、MK03475またはMK-3475、Merck)、ヒト化抗PD-1抗体JS001(Shanghai Junshi)、モノクローナル抗PD-1抗体TSR-042(Tesaro, Inc.)、ピジリズマブ(抗PD-1 mAb CT-011、Medivation)、抗PD-1モノクローナル抗体BGB-A317(Beigene)、および／または抗PD-1抗体SHR-1210(Shanghai Hengrui)、ヒトモノクローナル抗体REGN2810(Regeneron)、ヒトモノクローナル抗体MDX-1106(Bristol-Myers Squibb)、および／またはヒト化抗PD-1 IgG4抗体PDR001(Novartis)が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、PD-1抗体はクローン:RMP1-14(ラットIgG)-BioXcellカタログ番号BP0146に由来する。他の適切な抗体には、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,008,449号に開示されている抗PD-1抗体が含まれる。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合部分は、PD-L1に特異的に結合し、PD-1との相互作用を阻害し、それにより免疫活性を増加させる。PD-L1に結合し、PD-1とPD-L1との相互作用を破壊し、抗腫瘍免疫応答を刺激する当該技術分野で既知の任意の抗体は、本明細書に開示される併用治療法における使用に適している。例えば、PD-L1を標的とし、臨床試験中の抗体には、BMS-936559(Brist

10

20

30

40

50

o l - M y e r s S q u i b b ) および M P D L 3 2 8 0 A ( G e n e t e c h ) が含まれる。P D - L 1 を標的とする他の適切な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 7 , 9 4 3 , 7 4 3 号に開示されている。P D - 1 または P D - L 1 に結合し、P D - 1 / P D - L 1 相互作用を破壊し、抗腫瘍免疫応答を刺激する任意の抗体が本明細書に開示される併用治療法における使用に適していることは、当業者には理解されるであろう。

#### 【0261】

いくつかの実施形態では、併用療法には、C T L A - 4 に結合し、その C D 8 0 および C D 8 6 との相互作用を破壊する、当該技術分野で既知の抗体が含まれる。C T L A - 4 を標的とする例示的な抗体には、F D A 承認済みのイピリムマブ ( M D X - 0 1 0 、 M D X - 1 0 1 、 B r i s t o l - M y e r s S q u i b b ) 、および現在ヒト試験中のトレメリムマブ ( チシリムマブ、C P - 6 7 5 、 2 0 6 、 P f i z e r ) が含まれる。C T L A - 4 を標的とする他の適切な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる W O 2 0 1 2 / 1 2 0 1 2 5 、米国特許第 6 , 9 8 4 7 2 0 号、第 6 , 6 8 2 , 7 3 6 8 号、および米国特許出願第 2 0 0 2 / 0 0 3 9 5 8 1 号、第 2 0 0 2 / 0 0 8 6 0 1 4 号、および第 2 0 0 5 / 0 2 0 1 9 9 4 号に開示されている。C T L A - 4 に結合し、その C D 8 0 および C D 8 6 との相互作用を破壊し、抗腫瘍免疫応答を刺激する任意の抗体が本明細書に開示される併用治療法における使用に適していることは、当業者には理解されよう。いくつかの実施形態では、併用療法には、L A G - 3 に結合し、その M H C クラス II 分子との相互作用を破壊する、当該技術分野で既知の抗体が含まれる。L A G - 3 を標的とする例示的な抗体は、現在ヒト試験中の I M P 3 2 1 ( I m m u t e p ) である。L A G - 3 を標的とする他の適切な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第 2 0 1 1 / 0 1 5 0 8 9 2 号に開示されている。L A G - 3 に結合し、その M H C クラス II 分子との相互作用を破壊し、抗腫瘍免疫応答を刺激する任意の抗体が本明細書に開示される併用治療法における使用に適していることは、当業者には理解されよう。

#### 【0262】

いくつかの実施形態では、併用療法には、T I M - 3 に結合し、そのガレクチン 9 との相互作用を破壊する、当該技術分野で既知の抗体が含まれる。T I M - 3 を標的とする適切な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第 2 0 1 3 / 0 0 2 2 6 2 3 号に開示されている。T I M - 3 に結合し、そのガレクチン 9 との相互作用を破壊し、抗腫瘍免疫応答を刺激する任意の抗体が本明細書に開示される併用治療法における使用に適していることは、当業者には理解されよう。

#### 【0263】

いくつかの実施形態では、併用療法には、4 - 1 B B / C D 1 3 7 に結合し、その C D 1 3 7 L との相互作用を破壊する、当該技術分野で既知の抗体が含まれる。4 - 1 B B / C D 1 3 7 に結合し、その C D 1 3 7 L または別のリガンドとの相互作用を破壊し、全体として抗腫瘍活性をもたらす抗腫瘍免疫応答または免疫刺激応答を刺激する抗体が本明細書に開示される併用治療法における使用に適していることは、当業者には理解されよう。

#### 【0264】

いくつかの実施形態では、併用療法には、G I T R に結合し、そのリガンドとの相互作用を破壊する、当該技術分野で既知の抗体が含まれる。G I T R に結合し、その G I T R L または別のリガンドとの相互作用を破壊し、全体として抗腫瘍活性をもたらす抗腫瘍免疫応答または免疫刺激応答を刺激する抗体が本明細書に開示される併用治療法における使用に適していることは、当業者には理解されよう。

#### 【0265】

いくつかの実施形態では、併用療法には、O X 4 0 に結合し、そのリガンドとの相互作用を破壊する、当該技術分野で既知の抗体が含まれる。O X 4 0 に結合し、その O X 4 0 L または別のリガンドとの相互作用を破壊し、全体として抗腫瘍活性をもたらす抗腫瘍免疫応答または免疫刺激応答を刺激する抗体が本明細書に開示される併用治療法における使用に適していることは、当業者には理解されよう。

## 【0266】

いくつかの実施形態では、併用療法には、CD40に結合し、そのリガンドとの相互作用を破壊する、当該技術分野で既知の抗体が含まれる。CD40に結合し、そのリガンドとの相互作用を破壊し、全体として抗腫瘍活性をもたらす抗腫瘍免疫応答または免疫刺激応答を刺激する抗体が本明細書に開示される併用治療法における使用に適していることは、当業者には理解されよう。

## 【0267】

いくつかの実施形態では、併用療法には、ICOSに結合し、そのリガンドとの相互作用を破壊する、当該技術分野で既知の抗体が含まれる。ICOSに結合し、そのリガンドとの相互作用を破壊し、全体として抗腫瘍活性をもたらす抗腫瘍免疫応答または免疫刺激応答を刺激する抗体が本明細書に開示される併用治療法における使用に適していることは、当業者には理解されよう。

10

## 【0268】

いくつかの実施形態では、併用療法には、CD28に結合し、そのリガンドとの相互作用を破壊する、当該技術分野で既知の抗体が含まれる。CD28に結合し、そのリガンドとの相互作用を破壊し、全体として抗腫瘍活性をもたらす抗腫瘍免疫応答または免疫刺激応答を刺激する抗体が本明細書に開示される併用治療法における使用に適していることは、当業者には理解されよう。

## 【0269】

いくつかの実施形態では、併用療法には、IFN $\alpha$ に結合し、そのリガンドとの相互作用を破壊する、当該技術分野で既知の抗体が含まれる。IFN $\alpha$ に結合し、そのリガンドとの相互作用を破壊し、全体として抗腫瘍活性をもたらす抗腫瘍免疫応答または免疫刺激応答を刺激する抗体が本明細書に開示される併用治療法における使用に適していることは、当業者には理解されよう。

20

## 【0270】

「抗がん治療薬」とは、がん細胞の増殖および／または転移を予防または遅延させる化合物、組成物、または治療（手術など）である。そのような抗がん治療には、手術（例えば、腫瘍の全部または一部の除去）、化学療法薬の治療、放射線、遺伝子治療、ホルモン操作、免疫療法（例えば、治療抗体およびがんワクチン）、およびアンチセンスまたはRNAiオリゴヌクレオチド療法が含まれるが、これらに限定されない。有用な化学療法薬の例には、ヒドロキシ尿素、ブスルファン、シスプラチン、カルボプラチン、クロラムブシル、メルファラン、シクロホスファミド、イホスファミド、ダノルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、ミトキサントロン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ナベルピンRTM。（ビノレルビン）、エトポシド、テニポシド、パクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタビン、シトシン、アラビノシド、ブレオマイシン、ネオカルシノスタチン、スラミン、タキソール、マイトマイシンC、アバスチン、ハーセプチン、RTM、フルロウラシル、およびテモゾラミドなどが含まれるが、これらに限定されない。化合物は、2つ以上の化学療法剤を使用する標準的な併用療法での使用にも適している。抗がん治療には、将来開発される新規化合物または治療が含まれることを理解されたい。

30

## 【0271】

上記の薬学的組成物および／または製剤は、意図する目的を達成するのに有効な量の1つ以上の治療物質を含む。したがって、「治療的有效量」という用語は、がんの症状を改善する治療物質の量を指す。化合物の治療的有效な用量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。例えば、治療的有效量は、本明細書に記載されているような細胞培養アッセイまたは動物モデルのいずれかで最初に推定することができる。動物モデルを使用して、適切な濃度範囲および投与経路を決定することもできる。次いで、そのような情報を使用して、当業者に既知の標準的な方法を使用して、ヒトを含む他の動物における投与のための有用な用量および経路を決定することができる。

40

## 【0272】

本発明の組成物および使用説明書を含むキットも本発明の範囲内である。キットは、少な

50

くとも1つの追加試薬、例えば、化学療法薬、抗腫瘍抗体などをさらに含んでもよい。キットは通常、キットの内容物の使用目的を示すラベルを含む。ラベルという用語には、キット上またはキットに付属する任意の書面または記録材料、または他の方法でキットに付属するものが含まれる。

#### 【0273】

本発明を十分に説明してきたが、本発明の趣旨または範囲から逸脱することなく様々な変更および修正を行うことができることは当業者には明らかであろう。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載のIL-4バリエーション／IL-4ムテインを含むIL-4ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物を含む。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書で提供されるものを含む、IL-4バリエーション／IL-4ムテインを含むIL-4ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物を含む。いくつかの実施形態では、IL-4ムテイン免疫細胞標的化または発現構築物は、本明細書で提供されるものを含む、IL-4バリエーション／IL-4ムテインを含む。

10

#### 【0274】

##### F. がん幹細胞標的部分

標的化部分は、IL-4標的化カーゴタンパク質をがん細胞に標的化するIL-4標的化カーゴタンパク質の部分であり、がん細胞および／またはがん幹細胞ならびにバルクがん細胞を含む。標的化部分は、がん幹細胞に特異的に結合するように機能する。しかしながら、標的化部分は、IL-4標的化カーゴタンパク質ががん細胞および／またはがん幹細胞（およびいくつかの例ではまた、がん細胞）に高い特異性で結合することを可能にする限り、その天然の生物学的活性（例えば、受容体を活性化する能力、またはリガンドがその受容体に結合するのを防ぐ能力）を保持する必要がないことが理解される。特定の例では、標的化部分は、がん幹細胞によって提示される標的の天然リガンドまたは天然リガンドの誘導体である。他の例では、標的化部分は、がん幹細胞の表面上に提示される標的に特異的に結合する（例えば、受容体を標的化する）ヒト化抗体または抗体断片などの抗体である。標的化部分は、当該技術分野で既知である任意の方法を使用して、例えば、化学的または組換え技術により、カーゴ部分に連結することができる。

20

#### 【0275】

がん細胞および／またはがん幹細胞を標的化するために使用することができる化合物の非限定的な列挙には、1つ以上のがん細胞および／またはがん幹細胞に結合する抗体、天然リガンド、操作されたりガンド、およびそれらの組み合わせが含まれる。例示的なリガンドには、サイトカインおよび成長因子が含まれる。がん細胞および／またはがん幹細胞上の例示的な標的には、例えば、IL-4Rが含まれる。

30

#### 【0276】

特に興味深いのは、がん細胞および／またはがん幹細胞上の標的に対する天然リガンドまたは天然リガンドの誘導体である分子である標的化部分である。例えば、がん幹細胞がIL-4受容体（IL-4R）を発現する場合、IL-4リガンドを標的部分として使用することができる。IL-4は、本明細書に記載のカーゴ部分の1つ以上に化学的または組換え的に連結することができる。天然リガンドの誘導体の例には、参照により本明細書に組み込まれるPastanらの米国特許第6,011,002に記載される環状化サイトカインリガンドが含まれる。IL-4およびIL-13受容体はいくつかの配列および生物学的機能を共有しているため、IL-4リガンドに加えて、IL-13をリガンド標的化部分として使用することもできる。IL-4標的化カーゴタンパク質には、IL-4およびIL-13リガンドならびにそれらのバリエーションを含むものが含まれる。

40

#### 【0277】

いくつかの例では、IL-4Rを標的化する抗体（上記の断片、ヒト化抗体などを含む）。抗体は、Millipore、Bedford, Mass.などの様々な会社から市販され、またはカスタムメイド抗体は、Cambridge Research Biochemicals、Billingham, Clevelandなどの会社から注文することができる。当該技術分野で日常的な方法を使用して、必要に応じてそのような抗体を生

50

成することができる。このような抗体は、がん細胞および／またはがん幹細胞に特異的に結合し（およびバルクがん細胞にも結合し得）、カーゴ部分をがん幹細胞と接触させるように機能する。

#### 【0278】

IL-4は、活性化T細胞によって産生される多面発現（pleiotropic）サイトカインであり、IL-4受容体のリガンドである。IL-4受容体はまた、IL-13に結合する。したがって、IL-13はまた、IL-4受容体を標的化するための標的化部分として使用することができる。IL-4、IL-3、IL-5、IL-13、およびCSF2は、ヒト染色体5q上にサイトカイン遺伝子クラスターを形成し、この遺伝子は特にIL-13に近接している。本開示のIL-4標的化カーゴタンパク質において使用することができる例示的なIL-4およびIL-13タンパク質には、表2に提供されるもの、および、バリエーションがIL-4受容体に結合する能力を保持している限り、そのような配列と少なくとも60%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、またはさらに少なくとも99%の配列同一性を有する配列が含まれる。

10

#### 【0279】

使用することができる標的化部分には、天然の配列（表2において参照され、上記に列挙された特許に存在するGenBankアクセッション番号および配列など）、およびそれらのバリエーション、例えば、天然の標的化部分タンパク質と少なくとも98%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、または少なくとも60%の配列同一性（例えば、表2に列挙され、上記で列挙されたGenBankアクセッション番号に対して少なくとも約この量の配列同一性）を有するバリエーションが含まれ得る。いくつかの例では、バリエーション配列は、実質的に同じ量（またはそれ以上）の標的化部分タンパク質の天然の生物学的機能、例えば、細胞内シグナルカスケードを活性化する能力を保持している。しかしながら、バリエーション標的化部分分子は、いくつかの例では、天然の生物学的活性をほとんどまたは全く保持しないが、適切な標的に結合する（例えば、適切な細胞表面受容体またはタンパク質に結合する）能力を高い特異性で保持する。

20

#### 【0280】

いくつかの実施態様では、がん幹細胞は、神経膠腫、頭頸部がん、肺がん、乳がん、膵臓がん、子宮頸がん、前立腺がん、および軟部肉腫からなる群から選択されるがん由来する。

30

#### 【0281】

##### G. リンカー

カーゴ部分の標的化部分への連結は、カーゴ部分の一部が標的化部分の一部に直接結合していることを直接意味し得る。例えば、カーゴタンパク質のアミノ酸配列の一端は、標的化部分のアミノ酸配列の末端に直接結合することができる。例えば、カーゴタンパク質のC末端は、標的化部分のN末端に連結され得るか、または標的化部分のC末端は、カーゴタンパク質のN末端に連結され得る。そのような融合タンパク質を生成する方法は、例えば組換え分子生物学的方法を使用して、当該技術分野で日常的である。

#### 【0282】

別の例では、カーゴ部分は、リンカーを介して間接的に標的化部分に連結されている。リンカーは、例えば、単に2つの実体を連結するための好都合な方法として、2つの実体を空間的に分離するための手段として、IL-4標的化カーゴタンパク質に追加の機能を提供するための手段として、またはそれらの組み合わせとして機能することができる。

40

#### 【0283】

一般に、標的化部分およびカーゴ部分を結合するリンカーは、（1）2つの分子が折りたたまれて、互いに独立して作用することを可能にし、（2）2つの部分の機能ドメインに干渉する可能性のある秩序だった二次構造を発達させる傾向がなく、（3）機能タンパク質ドメインと相互作用する可能性のある最小限の疎水性もしくは荷電特性を有し、かつ／または（4）2つの領域の立体的分離を提供するように設計できる。例えば、いくつかの

50

場合では、標的部分が標的カーゴ部分の阻害活性を妨げること、および／またはカーゴ部分が標的化部分の標的活性を妨げること防ぐために、標的部分およびカーゴ部分を空間的に分離することが望ましいものであり得る。リンカーはまた、例えば、標的化部分とカーゴ部分との間の結合に対する不安定性、酵素切断部位（例えば、プロテアーゼの切断部位）、安定化配列、分子タグ、検出可能なラベル、またはそれらの様々な組み合わせを提供するために使用することができる。

#### 【0284】

リンカーは、二官能性または多官能性であり得、例えば、修飾されたカーゴ部分に結合するかまたはそれに結合するように改変することが可能であるリンカーの反対側の末端またはその近位において、標的化部分および第2の反応性官能基に結合するかまたは結合するように改変することが可能であるリンカーの第1の末端またはその近位において、少なくとも約第1の反応性官能基を含む。2つ以上の反応性官能基は、同じであり得る（すなわち、リンカーはホモ二官能性である）か、または異なり得る（すなわち、リンカーはヘテロ二官能性である）。アビジンおよびビオチンなどのリンカーとしての使用に好適な様々な二官能性または多官能性架橋剤（例えば、Chemical Co., Rockford, Ill. から市販されているもの）が、当該技術分野で既知である。あるいは、これらの試薬は、リンカーを標的化部分および／またはカーゴ部分に付加するために使用することができる。

10

#### 【0285】

リンカーの長さおよび組成は、分子架橋としての目的を果たすならば、大きく変えることができる。リンカーの長さおよび組成は、一般に、リンカーの意図される機能、および任意選択で、合成の容易性、安定性、特定の化学的および／または温度パラメータに対する耐性、および生体適合性などの他の要因を考慮して選択される。例えば、リンカーは、IL-4 標的化カーゴタンパク質をがん幹細胞に対して標的化する標的化部分の能力、または活性化、孔形成能力、もしくは毒素活性に関する IL-4 標的化カーゴタンパク質の活性を著しく妨げてはならない。

20

#### 【0286】

使用に好適なリンカーは、分岐、非分岐、飽和、または不飽和炭化水素鎖、ならびに上記のペプチドであり得る。さらに、リンカーがペプチドである場合、リンカーは、組換え DNA 技術を使用して、標的化部分および／またはカーゴ部分に結合させることができる。そのような方法は、当該技術分野で既知であり、この技術の詳細は、例えば、上記の Sambrook に見出すことができる。

30

#### 【0287】

一例では、リンカーは、1～100個の炭素原子を有する分岐または非分岐の飽和または不飽和炭化水素鎖であり、ここで、炭素原子のうちの1つ以上は、 $-O-$ または $-NR-$ によって任意選択で置き換えられ（式中、Rは、H、またはC1～C6アルキルである）、鎖は、(C1～C6)アルコキシ、(C3～C6)シクロアルキル、(C1～C6)アルカノイル、(C1～C6)アルカノイルオキシ、(C1～C6)アルコキシカルボニル、(C1～C6)アルキルチオ、アミド、アジド、シアノ、ニトロ、ハロ、ヒドロキシ、オキソ（. d b d . O）、カルボキシ、アリール、アリールオキシ、ヘテロアリール、およびヘテロアリールオキシの基から選択される1つ以上の置換基で炭素上において任意選択で置換されている。

40

#### 【0288】

好適なリンカーの例には、1～500アミノ酸残基（1～100、1～50、6～30、例えば30未満のアミノ酸など）の鎖長を有するペプチドが含まれるが、これらに限定されない。典型的には、柔軟なタンパク質領域における表面アミノ酸には、Gly、Asn、Serが含まれる。ThrおよびAlaなどの他の中性アミノ酸もリンカー配列において使用することができる。リンカー配列中に固有の制限部位を提供して、融合体の構築を容易にするために、追加のアミノ酸をリンカーに含めることができる。他の例示的なリンカーには、エタノールアミン、エチレングリコール、6～100個の炭素原子の鎖長を有

50

するポリエチレン、3～30個の繰り返し単位を有するポリエチレングリコール、フェノキシエタノール、プロパノールアミド、ブチレングリコール、ブチレングリコールアミド、プロピルフェニル、ならびにエチル、プロピル、ヘキシル、ステリル、セチル、およびパルミトイルアルキル鎖などの基に由来するものが含まれる。

【0289】

一例では、リンカーは、1～50個の炭素原子を有する分岐または非分岐の飽和または不飽和炭化水素鎖であり、炭素原子のうちの1つ以上が任意選択で—O—または—NR—に置き換えられ（式中、Rは上記で定義された通りである）、鎖は、(C1—C6)アルコキシ、(C1—C6)アルカノイル、(C1—C6)アルカノイルオキシ、(C1—C6)アルコキシカルボニル、(C1—C6)アルキルチオ、アミド、ヒドロキシ、オキソ(.dbd.O)、カルボキシ、アリール、およびアリールオキシの基から選択される1つ以上の置換基で炭素上において任意選択で置換される。

10

【0290】

特定の例では、リンカーは、1～40、1～20、または5～10アミノ酸残基などの、1～50アミノ酸残基の鎖長を有するペプチドである。

【0291】

一例では、補体系の酵素、ウロキナーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子、トリプシン、プラスミン、またはタンパク質分解活性を有する別の酵素による切断を受けやすいペプチドリンカーを使用することができる。別の例によれば、IL-4標的化カーゴタンパク質は、ウロキナーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子、プラスミン、トロンビン、またはトリプシンなどのタンパク質分解活性を有する酵素による切断を受けやすいリンカーを介して結合した標的化部分を含む。さらに、標的化部分は、ジスルフィド結合（例えば、システイン分子上のジスルフィド結合）によりカーゴ部分に結合され得る。多くの腫瘍は高レベルのグルタチオン（還元剤）を天然で放出するため、これはジスルフィド結合を還元することができ、その後、送達部位でカーゴ部分が放出される。

20

【0292】

一例では、IL-4標的化カーゴタンパク質は、切断可能なリンカー領域によって連結された標的化部分を含む。別の例では、切断可能なリンカー領域は、プロテアーゼ切断可能リンカーであるが、例えば小分子によって切断可能な他のリンカーを使用し得る。プロテアーゼ切断部位の例は、第Xa因子、トロンビン、およびコラゲナーゼによって切断される部位である。一例では、プロテアーゼ切断部位は、疾患に関連するプロテアーゼによって切断される部位である。別の例では、プロテアーゼ切断部位は、アップレギュレートされているか、または一般にがんに関連するプロテアーゼによって切断される部位である。そのようなプロテアーゼの例は、uPA、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)ファミリー、カスパーゼ、エラスターゼ、前立腺特異的抗原(PSA、セリンプロテアーゼ)、およびプラスミノゲンアクチベーターファミリー、ならびに線維芽細胞活性化タンパク質である。さらに別の例では、切断部位は、がん関連細胞によって分泌されるプロテアーゼによって切断される。これらのプロテアーゼの例には、マトリックスメタロプロテアーゼ、エラスターゼ、プラスミン、トロンビン、およびuPAが含まれる。別の例では、プロテアーゼ切断部位は、アップレギュレートされているか、または特定のがんに関連する部位である。正確な配列は、当該技術分野で利用可能であり、当業者は、好適な切断部位を選択するのに困難はない。一例として、第Xa因子によって標的化されるプロテアーゼ切断領域は、IEGRである。エンテロキナーゼによって標的化されるプロテアーゼ切断領域は、DDDDKである。トロンビンによって標的化されるプロテアーゼ切断領域は、LVPRGである。一例では、切断可能なリンカー領域は、細胞内プロテアーゼによって標的化される。

30

40

【0293】

当該技術分野で既知であるように、カーゴ部分へのリンカーの結合（または切断可能な要素へのリンカー要素の結合、または別のカーゴ部分への切断可能な要素の結合）は、特定の結合または反応様式である必要はない。

50

## 【0294】

H. 例示的なカーゴ部分／標的化部分の組み合わせ

## 1. MDNA55

MDNA55は、再発性／進行性膠芽腫（GB）の治療のために開発された。現在の治療パラダイムを使用すると、ほとんどのGB患者は、標準的な第一選択治療後に腫瘍の再発／進行を経験する。再発性GBを有する患者に対する治療選択肢は非常に限られており、結果は一般的に満足のものではない。具体的には、再発性または進行性GBの化学療法レジメンは成功しておらず、利益なしに毒性を生じさせる（Weller et al., 2013）。これは主に、組織特異性の欠如および結果として得られる正常組織への毒性に起因し、その結果、狭い治療指数に起因する。全生存期間が悲観的なままであるため、再発性GBの治療には、より高い腫瘍特異性、より強力な細胞毒性メカニズム、および新しい送達技術を有する新しい抗がん様式が必要である。

10

## 【0295】

MDNA55は、腫瘍細胞が正常細胞よりも薬剤の毒性効果に感受性である標的治療アプローチを提供する新しい治療薬である。標的であるIL-4Rは、非常に様々なヒトのがん腫で頻繁かつ強力に発現するため、がん治療薬の開発に理想的であるが十分に活用されていない標的である。IL-4Rの発現レベルは、健常かつ正常な細胞の表面では低い、がん細胞では数倍に増加する。再発性GB生検を含む、成人および小児の中枢神経系（CNS）腫瘍からのがん生検および剖検試料の大部分は、IL-4Rを過剰発現することが示されている。正常な成人および小児の脳組織では、IL-4Rの発現はほとんどまたは全くない（Joshi, et al., 2001；参考文献の表2）。IL-4Rのこの差次的発現は、MDNA55に広い治療濃度域を提供する（IC50データについては参考文献の表4を参照されたい）。この機能のみにより、MDNA55が、再発性GBおよびIL-4Rを過剰発現する他の中枢神経系腫瘍の治療に理想的な候補となる。IL-4R標的を発現しない細胞は、MDNA55に結合せず、したがって、PE媒介性の効果を受けない。

20

## 【0296】

## 2. 他の組み合わせ

本発明によれば、カーゴ部分およびIL-4ベース標的化部分の任意の組み合わせを使用することができる。この項目では、標的化部分およびカーゴ部分の例示的な組み合わせが提供される。すべての例では、その標的化部分は、完全ヒト化抗体などの、標的に特異的に結合する抗体であり得る。

30

## 【0297】

IL-4（IL-4循環置換リガンドおよびIL-13などの他のIL-4受容体結合タンパク質を含む）は、BAX、BAD、BAT、BAK、BIK、BOK、BID、BIM、BMF、およびBOKなどのBCL-2ファミリータンパク質、もしくはアエロリジン、プロアエロリジン、Pseudomonas外毒素などの毒素、またはそれらの組み合わせに連結することができる別の標的化部分である。IL-4の任意の形態または誘導体を標的化部分として使用することができる。例えば、IL-4またはIL-4受容体に結合するIL-4の断片を使用することができる。さらに、複数のカーゴ部分をIL-4に連結することができ、または複数のIL-4タンパク質をカーゴ部分に連結することができる。

40

## 【0298】

IL-4の任意の形態または誘導体を標的化部分として使用することができる。例えば、IL-4またはIL-4受容体に結合するIL-4の断片を使用することができる。さらに、複数のカーゴ部分をIL-4に連結することができ、または複数のIL-4タンパク質をカーゴ部分に連結することができる。

## 【0299】

循環置換リガンド、例えば、IL-4に由来する循環置換リガンドを標的化部分として使用することができる。Pseudomonas外毒素をカーゴ部分として使用することが

50

できる。循環置換 I L - 4 リガンドの任意の形態または誘導体を標的化部分として使用することができる。さらに、複数のカーゴ部分を環置換リガンドに連結することができ、または複数の循環置換リガンドタンパク質をカーゴ部分に連結することができる。

#### 【0300】

I . I L - 4 ムテインの組換え発現、発現ベクター、および宿主細胞

種々の実施形態では、本発明の実施において使用されるポリペプチドは合成であるか、または組換え核酸分子の発現により産生される。ポリペプチドがキメラ（例えば、少なくとも1つの変異体 I L - 4 ポリペプチドおよび異種ポリペプチドを含む融合タンパク質）である場合、それは、I L - 4 ムテインのすべてまたは一部をコードする1つの配列と、異種ポリペプチドのすべてまたは一部をコードする第2の配列とを含むハイブリッド核酸分子によってコードされ得る。例えば、本明細書に記載の対象 I L - 4 ムテインは、細菌で発現したタンパク質の精製を促進するヘキサヒスチジンタグ、または真核細胞で発現したタンパク質の精製を促進するヘマグルチニンタグに融合され得る。

10

#### 【0301】

I L - 4 ムテインをコードする D N A 配列を構築し、適切に形質転換された宿主でそれらの配列を発現させる方法には、P C R 支援突然変異誘発技術の使用が含まれるが、これに限定されない。I L - 4 ポリペプチドに対するアミノ酸残基の欠失または付加からなる変異も、標準的な組換え技術を使用して行うことができる。欠失または付加の場合、I L - 4 をコードする核酸分子は、適切な制限エンドヌクレアーゼで任意に消化される。得られた断片は、直接発現させるか、例えば、第2の断片にそれを連結することによりさらに操作することができる。核酸分子の2つの末端が互いに重なり合う相補的ヌクレオチドを含む場合、連結は促進され得るが、平滑末端断片も連結され得る。P C R で生成された核酸を使用して、様々な変異体配列を産生することもできる。

20

#### 【0302】

完全なアミノ酸配列を使用して、逆翻訳遺伝子を構築できる。I L - 4 ムテインをコードするヌクレオチド配列を含む D N A オリゴマーを合成することができる。例えば、所望のポリペプチドの部分をコードするいくつかの小さなオリゴヌクレオチドを合成し、次に連結することができる。個々のオリゴヌクレオチドは、通常、相補的なアセンブリのために5' または3' 突出部分を含有する。

#### 【0303】

組換え分子生物学的技術によって変更された核酸分子の発現を介して変異体ポリペプチドを生成することに加えて、対象 I L - 4 ムテインを化学的に合成することができる。化学合成ポリペプチドは、当業者によって日常的に産生される。

30

#### 【0304】

（合成、部位特異的突然変異誘発、または別の方法により）組み立てられると、I L - 4 ムテインをコードする D N A 配列が発現ベクターに挿入され、所望の形質転換された宿主において I L - 4 ムテインの発現に適した発現制御配列に作動可能に連結され得る。適切なアセンブリは、ヌクレオチド配列決定、制限マッピング、および適切な宿主における生物学的に活性なポリペプチドの発現によって確認することができる。当該分野で既知のように、宿主においてトランスフェクトされた遺伝子の高い発現レベルを得るために、遺伝子は、選択された発現宿主において機能する転写および翻訳発現制御配列に作動可能に連結される必要がある。

40

#### 【0305】

I L - 4 ムテインをコードする D N A 配列は、部位特異的突然変異誘発、化学合成または他の方法のいずれによって調製されたものであるかに関わらず、シグナル配列をコードする D N A 配列を含むこともできる。そのようなシグナル配列は、存在する場合、I L - 4 ムテインの発現のために選択された細胞によって認識されるものでなければならない。それは、原核生物、真核生物、またはその2つの組み合わせであり得る。それは、また、天然の I L - 4 のシグナル配列でもあり得る。シグナル配列の包含は、I L - 4 ムテインをそれが作られた組換え細胞から分泌することが望ましいかどうかによって依存する。選択された

50

細胞が原核細胞である場合、DNA配列はシグナル配列をコードしないことが一般に好ましい。選択された細胞が真核細胞である場合、一般的にシグナル配列をコードすることが好ましく、野生型IL-4シグナル配列を使用することが最も好ましい。

#### 【0306】

##### J. 変異体IL-4をコードする核酸分子

いくつかの実施形態では、単独または上記のようなキメラポリペプチドの一部としての対象IL-4ムテインは、核酸分子の発現により得ることができる。IL-4ムテインが野生型IL-4ポリペプチドとの同一性という点で説明できるように、それらをコードする核酸分子は必然的に野生型IL-4をコードする核酸分子と特定の同一性を有する。例えば、対象IL-4ムテインをコードする核酸分子は、野生型IL-4をコードする核酸と少なくとも50%、少なくとも65%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、最も好ましくは少なくとも95%（例えば、99%）同一であり得る。

10

#### 【0307】

提供される核酸分子は、天然に生じる配列か、または天然に生じるものとは異なるが、遺伝暗号の縮重のために、同じポリペプチドをコードする配列を含むことができる。これらの核酸分子は、RNAまたはDNA（例えば、ゲノムDNA、cDNA、またはホスホロアミダイトに基づく合成によって生成されるような合成DNA）、またはこれらの種の核酸内のヌクレオチドの組み合わせまたは改変からなり得る。さらに、核酸分子は、二本鎖または一本鎖（すなわち、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれか）であり得る。

#### 【0308】

核酸分子は、ポリペプチドをコードする配列に限定されず、コード配列（例えば、IL-4のコード配列）の上流または下流にある非コード配列の一部またはすべても含めることができる。分子生物学の当業者は、核酸分子を単離するための日常的な手順に精通している。それらは、例えば、制限エンドヌクレアーゼによるゲノムDNAの処理により、またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の実行により生成され得る。核酸分子がリボ核酸（RNA）である場合、分子は、例えば、インビトロ転写により生成され得る。

20

#### 【0309】

本開示の例示的な単離された核酸分子は、天然状態ではそのようなものとして見出されない断片を含み得る。したがって、本開示は、核酸配列（例えば、変異体IL-4をコードする配列）がベクター（例えば、プラスミドもしくはウイルスベクター）または異種細胞のゲノム（もしくは天然の染色体位置以外の位置にある相同細胞のゲノム）に組み込まれているものなどの組換え分子を包含する。

30

#### 【0310】

上記のように、対象IL-4ムテインはキメラポリペプチドの一部として存在し得る。上記の異種ポリペプチドに加えて、またはその代わりに、対象の核酸分子は、「マーカー」または「レポーター」をコードする配列を含有することができる。マーカーまたはレポーター遺伝子の例には、β-ラクタマーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、アデノシンデアミナーゼ（ADA）、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ（ネオ<sup>r</sup>、G418<sup>r</sup>）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）、ハイグロマイシンB-ホスホトランスフェラーゼ（HPH）、チミジンキナーゼ（TK）、lacZ（β-ガラクトシダーゼをコードする）、およびキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（XGPRT）が含まれる。当業者は、追加の有用な試薬、例えば、マーカーまたはレポーターの機能を果たすことができる追加の配列を認識するであろう。

40

#### 【0311】

対象の核酸分子は、哺乳動物の細胞などの任意の生物細胞から得られたIL-4をコードするDNAに変異を導入することにより得ることができる。したがって、対象核酸（およびそれらがコードするポリペプチド）は、マウス、ラット、モルモット、ウシ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウサギ、サル、ヒヒ、イヌ、またはネコのものであり得る。一実施形態では、核酸分子はヒトのものである。

#### 【0312】

50

### III. IL-4 標的化カーゴタンパク質の製造

IL-4 標的化カーゴタンパク質は、当該技術分野で既知である多くの日常的な方法によって調製することができる。IL-4 標的化カーゴタンパク質およびそれに対する改変は、例えば、組換え DNA 技術を使用して IL-4 標的化カーゴタンパク質をコードする核酸を操作することによって、またはペプチド合成によって行うことができる。IL-4 標的化カーゴタンパク質に対する改変は、例えば、化学改変および／または限定されたタンパク質分解を使用して、IL-4 標的化カーゴタンパク質ポリペプチド自体を改変することによってなされ得る。これらの方法の組み合わせはまた、IL-4 標的化カーゴタンパク質を調製するために使用することができる。

#### 【0313】

タンパク質のクローニング方法および発現方法は、当該技術分野で既知であり、組換えタンパク質の発現のための技術およびシステムの詳細な説明は、例えば、*Current Protocols in Protein Science* (Coligan, J. E., et al., Wiley & Sons, New York) に見出すことができる。当業者は、組換えタンパク質を提供するために多種多様な発現系を使用することができることを理解するであろう。したがって、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、原核生物宿主（例えば、*E. coli*、*A. salmonicida*、または *B. subtilis*）または真核生物宿主（例えば、*Saccharomyces* または *Pichia*；哺乳動物細胞、例えば、COS、NIH 3T3、CHO、BHK、293、もしくは HeLa 細胞、または昆虫細胞）において産生することができる。IL-4 標的化カーゴタンパク質は、当該技術分野で既知である標準的な技術によって宿主細胞から精製することができる。

#### 【0314】

様々な例示的なカーゴ部分および標的化部分の配列を表 1 および 2 に提供する。これらの配列のバリエーションおよびホモログは、代替の配列が所望される場合、標準的な技術を使用してクローニングすることができる [例えば、Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, NY (1997 and updates), Sambrook et al., 前出を参照されたい]。例えば、核酸配列は、mRNA を抽出し、次いで mRNA 鋳型から cDNA を合成することによって（例えば、RT-PCR によって）、またはゲノム DNA から遺伝子を PCR 増幅することによって、*Aeromonas hydrophila* などの好適な生物から直接得ることができる。あるいは、標的化部分またはカーゴ部分のいずれかをコードする核酸配列は、標準的な手順によって適切な cDNA ライブラリーから得ることができる。次いで、単離された cDNA を、クローニングベクターまたは発現ベクターなどの好適なベクターに挿入する。

#### 【0315】

変異（必要な場合）は、当該技術分野で既知のインビトロ部位特異的変異誘発技術によって、特定の予め選択された場所に導入することができる。変異は、コード配列を構成する適切なヌクレオチドのうちの 1 つ以上の欠失、挿入、置換、逆位、またはそれらの組み合わせによって導入することができる。

#### 【0316】

発現ベクターは、IL-4 標的化カーゴタンパク質をコードする配列の効率的な転写に必要な転写エレメントなどの調節エレメントをさらに含むことができる。ベクターに組み込むことができる調節エレメントの例には、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、およびポリアデニル化シグナルが含まれるが、これらに限定されない。遺伝子操作された IL-4 標的化カーゴタンパク質をコードする核酸配列に作動可能に連結された調節エレメントを含むベクターを使用して、IL-4 標的化カーゴタンパク質を産生することができる。

#### 【0317】

発現ベクターは、発現された IL-4 標的化カーゴタンパク質の精製を容易にする異種核酸

10

20

30

40

50

配列、例えば、親和性タグ（例えば、金属親和性タグ、ヒスチジンタグ、アビジン／ストレプトアビジンコード化配列、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）をコードする配列、およびビオチンをコードする配列）をさらに含み得る。一例では、そのようなタグは、IL-4 標的化カーゴタンパク質のN末端またはC末端に付加するか、またはIL-4 標的化カーゴタンパク質内に配置することができる。タグは、当該技術分野で既知である方法に従って使用する前に、発現されたIL-4 標的化カーゴタンパク質から除去することができる。あるいは、タグは、IL-4 標的化カーゴタンパク質ががん細胞および／またはがん幹を標的化して死滅させる（またはその増殖を減少させる）能力を妨げないという条件で、IL-4 標的化カーゴタンパク質上に保持することができる。

#### 【0318】

天然に存在する孔形成タンパク質に変異を導入するための指示されたアプローチの代替として、孔形成タンパク質を発現するクローン化された遺伝子は、当該技術分野で既知である技術によってランダム変異誘発に供され得る。このように生成されたタンパク質の変異体型のその後の発現およびスクリーニングは、標的化されたカーゴ部分の同定および単離を可能にするであろう。

#### 【0319】

IL-4 標的化カーゴタンパク質はまた、断片または融合タンパク質として調製することができる。融合タンパク質は、がん幹細胞増殖を選択的に標的化および阻害するまたはがん細胞および／もしくはがん幹細胞を死滅させるIL-4 標的化カーゴタンパク質の能力を阻害しない他のアミノ酸配列に連結されたIL-4 標的化カーゴタンパク質を含むものである。代替の例では、他のアミノ酸配列は、例えば、最大約5、約6、約7、約8、約9、約10、約20、約30、約50、または約100アミノ酸残基の長さの短い配列である。これらの短い配列は、上記のリンカー配列であり得る。

#### 【0320】

融合タンパク質を作製するための方法は、当業者に既知である。例えば、米国特許第6,057,133号は、第2のコロニー刺激因子、サイトカイン、リンホカイン、インターロイキン、造血成長因子、またはIL-3バリエーションに機能的に結合したヒトインターロイキン-3（hIL-3）バリエーションまたは変異体タンパク質から構成される融合分子を作製する方法を開示している。Davisらの米国特許第6,072,041は、治療用タンパク質に共有結合したトランスサイトシス受容体に対する単鎖Fv分子を含む融合タンパク質の生成を開示している。

#### 【0321】

IL-4 標的化カーゴタンパク質は、必要に応じて、1つ以上のリンカーおよび他の部分を含むことができる。これらには、融合タンパク質の精製およびプロセッシングに有用であり得る、アビジンまたはエプトープなどの結合領域またはポリヒスチジンタグなどのタグが含まれ得る。さらに、身体または細胞を通る融合タンパク質の輸送を好都合に監視することができるように、検出可能なマーカーを融合タンパク質に付加させることができる。そのようなマーカーには、放射性核種、酵素、フルオロフォア、発色団などが含まれる。

#### 【0322】

当業者は、コードされたタンパク質の生物学的活性に影響を与えることなく、DNAが多くの方法で変更され得ることを理解するであろう。例えば、IL-4 標的化カーゴタンパク質をコードするDNA配列のバリエーションを作成するために、PCRを使用することができる。IL-4 標的化カーゴタンパク質をコードするDNA配列のそのようなバリエーションは、タンパク質の発現に使用される宿主細胞中のコドン優先度を最適化するために使用することができ、または発現を促進する他の配列変化を含み得る。

#### 【0323】

標的部分のカーゴ部分への直接の、またはリンカーを介した共有結合は、当該技術分野で既知である様々な形態をとることができる。例えば、共有結合は、ジスルフィド結合の形態であり得る。構成要素のうちの1つをコードするDNAは、固有のシステインコドンを含むように操作することができる。第2の構成要素は、第1の構成要素のシステインと反

10

20

30

40

50

応するスルフヒドリル基で誘導体化することができる。あるいは、スルフヒドリル基は、それ自体で、またはシステイン残基の一部として、固相ポリペプチド技術を使用して導入することができる。例えば、ペプチドへのスルフヒドリル基の導入は、H i s k e y ( P e p t i d e s 3 : 1 3 7 , 1 9 8 1 ) によって記載されている。

#### 【0324】

タンパク質はまた、スルフヒドリル基を追加するために標準的な技術によって化学的に改変することができる。例えば、トラウト試薬 ( 2 - イミノチオラン - H C l ) ( P i e r c e C h e m i c a l s , R o c k f o r d , I l l . ) は、リジン残基またはN末端アミンなどの第一級アミンにスルフヒドリル基を導入するために使用することができる。次いで、トラウト試薬で改変されたタンパク質またはペプチドは、N - スクシンイミジル 3 - ( 2 - ピリジルジチオ ) プロピオネート ( S P D P ) またはスクシンイミジル 4 - ( N - マレイミドメチル ) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート ( S M C C ) ( P i e r c e C h e m i c a l s , R o c k f o r d , I l l . ) などの試薬で改変されたタンパク質またはペプチドと反応することができる。

#### 【0325】

成分はまた、M a i t i e t a l . , I n t . J . C a n c e r S u p p l . , 3 : 1 7 - 2 2 , 1 9 8 8 に記載されているような、ポリマーであるモノメトキシーポリエチレングリコール ( m P E G ) を使用して結合することができる。

#### 【0326】

標的化部分およびカーゴ部分はまた、カルボジイミド媒介カップリング (例えば、D C C 、 E D C 、または活性化 E D C ) などの当該技術分野で既知である標準的な結合化学の使用、ならびに、イブシロンアミノ基を架橋用のチオールに変換するための 2 - イミノチオラン、および架橋剤としての m - マレイミドベンゾイル - n - ヒドロキシスクシンイミジルエステル ( M B S ) の使用によって結合することができる。

#### 【0327】

I . I L - 4 標的化カーゴタンパク質の試験

I L - 4 標的化カーゴタンパク質は、当該技術分野で既知である標準的な技術を使用して試験することができる。候補 I L - 4 標的化カーゴタンパク質を試験する例示的な方法は、以下および本明細書に含まれる実施例に提供される。当業者は、I L - 4 標的化カーゴタンパク質を試験する他の方法が当該技術分野で既知であり、候補 I L - 4 標的化カーゴタンパク質を試験するのにも好適であることを理解するであろう。例えば、抗腫瘍活性を試験するための当該技術分野で既知である方法を使用することができる。I L - 4 標的化カーゴタンパク質は、一連のがん細胞株またはがん幹細胞株に対して最初にスクリーニングすることができる。R o c h e が販売している W S T - 1 キットなどの細胞増殖アッセイを使用することができる。がん細胞を阻害するか、またはがん細胞および／もしくはがん幹細胞を感作する薬剤の存在下または非存在下で、異なる薬物濃度を使用して、効力を評価することができる。最初のがん幹細胞スクリーニングから選択された薬剤候補は、追加のインビトロアッセイにより、関連する異種移植モデルでさらに特徴付けられ、抗腫瘍活性を調べることができる。

#### 【0328】

A . インビトロ

I L - 4 標的化カーゴタンパク質は、既知の方法を使用して、がん幹細胞を死滅させる能力、またはがん細胞および／もしくはがん幹細胞の増殖を大幅に減少または阻害する能力について試験することができる。例えば、細胞を死滅させるまたはその増殖を阻害する I L - 4 標的化カーゴタンパク質の能力は、好適な細胞、典型的には標的を発現する細胞株または幹がん細胞を使用して、インビトロでアッセイすることができる。一般に、選択された試験細胞株の細胞は適切な密度まで増殖され、候補 I L - 4 標的化カーゴタンパク質が添加される。I L - 4 標的化カーゴタンパク質は、約少なくとも 1 n g / m L 、少なくとも 1 μ g / m L 、または少なくとも 1 m g / m L 、例えば、約 0 . 0 1 μ g / m L ~ 約 1 m g / m L 、約 0 . 1 0 μ g / m L ~ 約 0 . 5 m g / m L 、約 1 μ g / m L ~ 約 0 . 4

mg/mLで培養物に添加することができる。いくつかの例では、段階希釈物を試験する。適切なインキュベーション時間（例えば、約48～72時間）の後、細胞の生存または増殖が評価される。細胞生存の決定方法は当該技術分野で既知であり、当該方法には、レサズリン還元試験（Fields & Lancaster Am. Biotechnol. Lab., 11:48-50, 1993、O'Brien et al., Eur. J. Biochem., 267:5421-5426, 2000および米国特許第5,501,959）、スルホローダミンアッセイ（Rubinstein et al., J. Natl. Cancer Inst., 82:113-118, 1999）またはニュートラルレッド染色試験（Kitano et al., Euro. J. Clin. Invest. 21:53-58, 1991、West et al., J. Investigative Derm., 99:95-100, 1992を参照されたい）、またはトリパンブルーアッセイが含まれるが、これらに限定されない。CellTiter 96・RTMAqueous One Solution細胞増殖アッセイ（Promega）などの多数の市販のキットも使用し得る。細胞毒性は、処理された培養物中の細胞生存を、1つ以上の対照培養物、例えば、未処理の培養物および／もしくは対照化合物（典型的には既知の治療薬）または他の適切な対照で前処理された培養物中の細胞生存と比較することによって決定される。がん細胞および／またはがん幹細胞を死滅させるまたは増殖を減少させるのに有効であるとみなされるIL-4標的化カーゴタンパク質は、細胞の生存または増殖を、例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、または少なくとも約50%減少させることができる。

10

20

#### 【0329】

いくつかの例では、IL-4標的化カーゴタンパク質は、非がん細胞および／またはがん幹細胞に対して有意に毒性ではないものであり得る。例えば、IL-4標的化カーゴタンパク質は、標的を提示しない（例えば、IL-4Rを発現しない）細胞とともに細胞培養中で少なくとも約1ng/mL、少なくとも1μg/mL、または少なくとも1mg/mL、例えば、約0.01μg/mL～約1mg/mL、約0.10μg/mL～約0.5mg/mL、約1μg/mL～約0.4mg/mLでインキュベートされた場合、50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、または約10%未満の非がん細胞および／またはがん幹細胞を死滅させる。いくつかの例では、IL-4標的化カーゴタンパク質は、標的を提示しない（例えば、IL-4Rを発現しない）細胞とともに細胞培養中で少なくとも約1ng/mL、少なくとも1μg/mL、または少なくとも1mg/mL、例えば、約0.01μg/mL～約1mg/mL、約0.10μg/mL～約0.5mg/mL、約1μg/mL～約0.4mg/mLでインキュベートされた場合、非がん細胞および／またはがん幹細胞に対して少なくとも10倍大きいLD<sub>50</sub>、例えば、非がん細胞および／またはがん幹細胞に対して少なくとも20倍大きい、少なくとも50倍大きい、または少なくとも100倍大きいLD<sub>sub.50</sub>を有する。

30

#### 【0330】

いくつかの例では、IL-4標的化カーゴタンパク質は、活性化配列に対する1つ以上の改変を含む毒素を含む。これらの活性化可能なIL-4標的化カーゴタンパク質は、適切な活性化剤によって切断されるその能力について、当該技術分野で既知である方法に従って試験することができる。例えば、1つ以上の改変が1つ以上のプロテアーゼ切断部位の追加をもたらす場合、IL-4標的化カーゴタンパク質は、様々な濃度の適切なプロテアーゼとともにインキュベートすることができる。インキュベーション生成物は、SDS-PAGEゲルで電気泳動することができ、IL-4標的化カーゴタンパク質の切断は、ゲル上のポリペプチドのサイズを調べることによって評価することができる。

40

#### 【0331】

プロテアーゼとともにインキュベートされた活性化可能なIL-4標的化カーゴタンパク質が孔形成活性を保持し、したがって細胞を死滅させる能力を保持するかどうかを決定するために、プロテアーゼとともにインキュベーションした後、反応生成物を当該技術分野で既知である溶血アッセイで試験することができる。好適なアッセイの例は、Howar

50

d and Buckley, J. Bacteriol., 163:336-40, 1985に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0332】

特定の種類のがんに対する選択性を与えるIL-4標的化カーゴタンパク質を、その特定のがん細胞種を標的化する能力について試験することができる。例えば、IL-4Rを提示するがん細胞および／またはがん幹細胞を標的化するIL-4を含むIL-4標的化カーゴタンパク質は、がん細胞および／またはがん幹細胞を死滅させるIL-4標的化カーゴタンパク質の能力を、正常細胞または異なる種類のがん細胞（例えば、IL-4Rを発現しないもの）を死滅させる能力と比較することにより、がん細胞および／またはがん幹細胞を選択的に標的化するその能力について評価することができる。あるいは、当該技術分野で既知であるようなフローサイトメトリー法を使用して、IL-4標的化部分を含むIL-4標的化カーゴタンパク質が特定の種類のがん幹細胞を選択的に標的化できるかどうかを決定することができる。結合したIL-4標的化カーゴタンパク質への標識抗体の結合は、標的へのIL-4標的化カーゴタンパク質の結合を示す。

10

#### 【0333】

候補IL-4標的化カーゴタンパク質の試験に好適な様々ながん細胞株は当該技術分野で既知であり、多くは市販されている（例えば、American Type Culture Collection、Manassas, Va. から）。一例では、候補化合物のインビトロ試験は、ヒトがん細胞株で行われる。別の例では、がん細胞および／またはがん幹細胞は、Stassiraの米国特許出願第2007/0292389号に記載されているように単離および培養される。培養された幹細胞は、IL-4標的化カーゴタンパク質の活性を試験するために使用される。標的化部分の最初の試験は、標的化部分を蛍光標識などの検出可能な標識に連結し、適切ながん細胞および／またはがん幹細胞を含むことが既知である試料を標的化部分と接触させ、がん幹細胞に結合する関連する蛍光標識を観察することによって行うことができる。

20

#### 【0334】

IL-4標的化カーゴタンパク質の追加のインビトロ試験は、所望の標的を発現するように操作された細胞株を使用して行うことができる。標的に特異的な抗体を使用して、標的が発現されていることを確認することができる。標的を発現する細胞に結合すると、IL-4標的化カーゴタンパク質は、当該技術分野で既知である方法を使用して検出することができる細胞溶解を引き起こし得る。

30

#### 【0335】

##### B. インビボ

インビボで腫瘍細胞を死滅させるIL-4標的化カーゴタンパク質の能力は、当該技術分野で既知である標準的技術を使用して、適切な動物モデルで決定することができる（例えば、Enna, et al., Current Protocols in Pharmacology, J. Wiley & Sons, Inc., New York, N. Y. を参照されたい）。

#### 【0336】

抗腫瘍化合物をスクリーニングするための現在の動物モデルには、ヒト腫瘍が動物に移植された異種移植モデルが含まれる。これらの技術を使用して、がん細胞および／またはがん幹細胞を移植することができ、結果として生じる腫瘍の存在、サイズ、および形態を評価することができる。ヒトがんの異種移植モデルの例には、皮下注射または移植によって移植され、腫瘍増殖アッセイで使用されるヒト固形腫瘍異種移植、脂肪パッド注射によって移植され、腫瘍増殖アッセイで使用されるヒト固形腫瘍同系移植片、関連する組織に直接移植され、腫瘍増殖アッセイで使用されるヒト固形腫瘍同所性異種移植片、生存アッセイで使用されるマウスのリンパ腫および白血病実験モデル、ならびにマウスの肺転移実験モデルが含まれるが、これらに限定されない。移植されたヒト腫瘍細胞に加えて、異種移植モデルは、抗がん免疫応答の評価を可能にする移植されたヒト末梢血白血球をさらに含むことができる。

40

50

## 【0337】

あるいは、抗腫瘍化合物のスクリーニングのために、マウスがんモデルを使用することができる。適切なマウスがんモデルの例は、当該技術分野で既知であり、当該例には、マウスがん細胞が静脈内、皮下、脂肪パッド、または同所性注射によって移植される移植モデル、マウス転移モデル、トランスジェニックマウスモデル、およびノックアウトマウスモデルが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0338】

IL-4 標的化カーゴタンパク質は、例えば、30～60 mg の腫瘍断片を両側に皮下移植するか、または適切な数（例えば、少なくとも10の3乗個、少なくとも10の4乗個、もしくは少なくとも10の6乗個のがん細胞および／もしくはがん幹細胞、例えば、約10～約10の5乗個、約50～約10の4乗個、もしくは約75～約10の3乗個のがん細胞および／もしくはがん幹細胞を移植したマウスを使用して、0日目に固形腫瘍においてインビボで試験することができる。腫瘍を有する動物は、様々な治療および対照を受ける前に無作為化される。進行した腫瘍の治療の場合、腫瘍は所望のサイズに発達することが許容され、腫瘍の発達が不十分な動物は排除される。選択された動物は、治療および対照を享受するために無作為に分けられる。腫瘍を有していない動物はまた、腫瘍に対する特定の効果から毒性効果を分けることができるようにするために、腫瘍を有する動物と同じ治療を受けることができる。化学療法は、腫瘍の種類に依存して、一般に移植後3日～22日で始まり、動物を毎日観察する。IL-4 標的化カーゴタンパク質は、例えば、腹腔内注射、静脈内注射、腫瘍（または腫瘍を有する器官）への直接注射、またはボーラス注入によって動物に投与することができる。注入されるIL-4 標的化カーゴタンパク質の量は、上記のインビトロ試験結果を使用して決定することができる。例えば、少なくとも約1 ng/kg 体重、少なくとも1 μg/kg 体重、または少なくとも1 mg/kg 体重、例えば、約0.01 μg/kg 体重～約1 mg/kg 体重、約0.10 μg/kg 体重～約1.0 g/kg 体重、約1 mg/kg 体重～4 mg/kg 体重。異なる動物群は、最大の体重減少が達成されるまで週に約3または4回体重測定され、その後、試験が終了するまで少なくとも週に1回体重測定される。

## 【0339】

腫瘍は、所定の期間後に測定されるか、あるいは腫瘍は、該腫瘍が所定のサイズおよび／または重量に達するまで、または該腫瘍が所定のサイズ／重量に達するまでに死亡が起こった場合は動物が死亡するまで、週に約2～3回測定することによって継続的に監視することができる。次いで、動物を犠牲死させ、腫瘍の組織学、サイズ、および／または増殖を評価する。同所異種移植モデルは、皮下モデルの代替であり、がんの発達過程をより正確に反映し得る。このモデルでは、腫瘍細胞は起源の器官の部位に移植され、内部で発達する。したがって、腫瘍サイズの毎日の評価は、皮下モデルよりも困難である。非侵襲的全身画像化において緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する腫瘍を使用する最近開発された技術は、この問題に対処するのに役立ち得る（Yang et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 1206-1211, 2000）。この技術は、非常に高レベルの緑色蛍光タンパク質（GFP）を安定して発現するヒトまたはマウスの腫瘍を利用する。GFPを発現する腫瘍は、外部に配置されたビデオ検出器を使用して視覚化することができ、腫瘍増殖、血管新生、および転移の広がりの詳細な監視が可能となる。血管新生は、腫瘍内の血管密度を監視することにより、経時的に測定することができる。したがって、このモデルを使用すると、腫瘍の進行に関連するいくつかの機能を同時に監視することが可能となり、前臨床と臨床との関連性が高くなる。

## 【0340】

白血病に対する組成物の効果の研究のために、動物に特定の数の細胞が移植され、対照と比較した処置マウスの生存時間の増加により抗腫瘍活性が決定される。

## 【0341】

腫瘍転移に対する特定のIL-4 標的化カーゴタンパク質の効果を研究するために、腫瘍細胞は、典型的には、エクスビボで組成物で処理され、次いで好適な試験動物に注射され

10

20

30

40

50

る。次いで、注射部位からの腫瘍細胞の広がり、好適な期間にわたって監視される。

【0342】

がん幹細胞の増殖を阻害するのに十分に有効なIL-4標的化カーゴタンパク質（インビトロ細胞生存アッセイ、転移阻害アッセイ、および／または異種移植モデルシステムによって示される）は、ヒトにおいて使用するために選択することができる。IL-4標的化カーゴタンパク質はまた、アッセイによって示される潜在的な治療用量範囲での相対的な毒性に基づいて、ヒトでの試験および最終的な治療用途に選択することができる。治療用量および毒性は、以下でさらに説明する。

【0343】

II. 製剤／組成物

薬学的組成物は、1つ以上のIL-4標的化カーゴタンパク質、および1つ以上の非毒性の薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤、および／または補助剤を含むことができる。必要に応じて、他の有効成分を組成物に含めてもよい。上記のように、そのような組成物は、がんの治療での使用に好適である。「薬学的に許容される担体」という用語は、有効成分の生物学的活性の有効性を妨害せず、宿主または患者に毒性がない担体媒体を指す。代表的な例を以下に示す。

【0344】

薬学的組成物は、例えば、約1%～約95%のIL-4標的化カーゴタンパク質を含み得る。単一用量での投与のために製剤化された組成物は、例えば、約20%～約90%のIL-4標的化カーゴタンパク質を含み得るが、単一用量ではない組成物は、例えば、約5%～約20%のIL-4標的化カーゴタンパク質を含み得る。最終製剤中のIL-4標的化カーゴタンパク質の濃度は、少なくとも1 ng/mL、例えば、少なくとも1 pg/mLまたは少なくとも1 mg/mLであり得る。例えば、最終製剤中の濃度は、約0.01 μg/mL～約1,000 μg/mLであり得る。一例では、最終製剤中の濃度は、約0.01 mg/mL～約100 mg/mLである。

【0345】

組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、徐放性製剤、または粉末であり得る。組成物は、トリグリセリドなどの従来の結合剤および担体を用いて、坐剤として製剤化することができる。

【0346】

IL-4標的化カーゴタンパク質は、薬学的に許容されるビヒクルと一緒に送達することができる。一例では、ビヒクルは、安定性および／または送達特性を増強し得る。したがって、本開示はまた、人工膜小胞（リポソーム、ノイソーム、ナノソームなどを含む）、微粒子もしくはマイクロカプセルなどの好適なビヒクルを用いた、または薬学的に許容されるポリマーを含むコロイド状製剤としての、IL-4標的化カーゴタンパク質の製剤を提供する。そのようなビヒクル／ポリマーの使用は、IL-4標的化カーゴタンパク質の持続放出を達成するのに有益であり得る。あるいはまたはさらに、IL-4標的化カーゴタンパク質製剤は、ヒト血清アルブミンなどのインビボでタンパク質を安定化するための添加物、または当該技術分野で既知であるタンパク質治療のための他の安定剤を含むことができる。IL-4標的化カーゴタンパク質製剤はまた、例えば注射またはカテーテルを介して投与されたときに製剤の逆流を防止するように作用する1つ以上の粘度増強剤を含むことができる。そのような粘度増強剤には、生体適合性グリコールおよびスクロースが含まれるが、これらに限定されない。

【0347】

水性懸濁液として製剤化された医薬組成物は、1つの好適な賦形剤、例えば、以下のような懸濁化剤、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルβ-シクロデキストリン、トラガカントゴム、およびアラビアゴム；分散剤または湿潤剤、例えば、天然に存在するリン脂質、例えば、レシチン、またはアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン、また

10

20

30

40

50

はエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物、例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、またはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールから誘導される部分エステルとの縮合生成物、例えば、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビトール、またはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトール無水物から誘導される部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレートと混合した、活性化合物を含む。水性懸濁液はまた、1つ以上の防腐剤、例えば、エチル、もしくはn-プロピルp-ヒドロキシ安息香酸、または1つ以上の着色剤を含んでもよい。

【0348】

薬学的組成物は、植物油、例えば、落花生油、オリーブ油、ゴマ油、もしくはヤシ油、または流動パラフィンなどの鉱油中に活性成分を懸濁させることによって製剤化することができる。油性懸濁液は、増粘剤、例えば、蜜蝋、硬質パラフィン、またはセチルアルコールを含有してもよい。これらの組成物は、アスコルビン酸などの抗酸化剤の添加によって保存することができる。

10

【0349】

薬学的組成物は、分散性粉末剤または顆粒剤として製剤化することができ、これは、その後、水の添加によって水性懸濁液を調製するために使用することができる。そのような分散性粉末剤または顆粒剤は、1つ以上の分散剤もしくは湿潤剤、懸濁化剤および／または防腐剤と混合された有効成分を提供する。好適な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤の例は、上で既に述べたものである。

【0350】

20

薬学的組成物はまた、水中油型エマルジョンとして製剤化することができる。油相は、植物油、例えば、オリーブ油もしくは落花生油、または鉱油、例えば、流動パラフィンであり得、あるいはそれらの混合物であり得る。これらの組成物に含めるのに好適な乳化剤には、天然に存在するゴム、例えば、アラビアゴムもしくはトラガカントゴム；天然に存在するリン脂質、例えば、大豆、レシチン、または脂肪酸およびヘキシトールから誘導されるエステルもしくは部分エステル；無水物、例えば、モノオレイン酸ソルビタン、ならびに上記部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物、例えば、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンが含まれる。

【0351】

1つ以上のIL-4標的化カーゴタンパク質を含む薬学的組成物は、当該技術分野で既知である方法に従い、上記で述べたものなどの、好適な1つ以上の分散剤もしくは湿潤剤および／または懸濁化剤を使用して、無菌の注射用水性または油性懸濁液として製剤化することができる。滅菌注射用調製物はまた、非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の滅菌注射用溶液または懸濁液、例えば、1, 3-ブタンジオール中の溶液であってもよい。使用することができる許容されるビヒクルおよび溶媒には、水、リンガー溶液、乳酸加リンガー溶液、および等張塩化ナトリウム溶液が含まれるが、これらに限定されない。他の例には、溶媒または懸濁媒体として従来から使用されている滅菌固定油、および例えば合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む様々な無刺激固定油が含まれる。オレイン酸などの脂肪酸も注射剤の調製に使用することができる。

30

【0352】

40

一例では、IL-4標的化カーゴタンパク質は、例えば、安定性もしくは循環半減期を増加させるか、または免疫原性を低下させるために、水溶性ポリマーに結合される。臨床的に許容される水溶性ポリマーには、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリプロピレングリコールホモポリマー（PPG）、ポリオキシエチル化ポリオール（POG）（例えば、グリセロール）、および他のポリオキシエチル化ポリオール、ポリオキシエチル化ソルビトール、またはポリオキシエチル化グルコース、ならびに他の炭水化物ポリマーが含まれるが、これに限定されない。ポリペプチドをPEGなどの水溶性ポリマーに結合させるための方法は、例えば、米国特許公開第20050106148号およびその中で引用されている参

50

考文献に記載されている。一例では、ポリマーは、酸性エンドソーム区画から細胞質への薬物の放出を増強するように設計されたpH感受性ポリマーである（例えば、Henry et al., *Biomacromolecules* 7 (8): 2407-14, 2006を参照されたい）。

【0353】

IL-4 標的化カーゴタンパク質はまた、1つ以上の抗がん治療薬と一緒に治療有効量で投与することができる。化合物は、抗がん治療薬による治療前、治療中、または治療後に投与することができる。

【0354】

「抗がん治療薬」とは、がん細胞の増殖および／または転移を予防または遅延させる化合物、組成物、または治療（手術など）である。そのような抗がん治療には、手術（例えば、腫瘍の全部または一部の除去）、化学療法薬の治療、放射線、遺伝子治療、ホルモン操作、免疫療法（例えば、治療抗体およびがんワクチン）、およびアンチセンスまたはRNAiオリゴヌクレオチド療法が含まれるが、これらに限定されない。有用な化学療法薬の例には、ヒドロキシ尿素、ブスルファン、シスプラチン、カルボプラチン、クロラムブシル、メルファラン、シクロホスファミド、イホスファミド、ダノルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、ミトキサントロン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ナベルピンRTM。（ビノレルビン）、エトポシド、テニポシド、パクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタビン、シトシン、アラビノシド、ブレオマイシン、ネオカルシノスタチン、スラミン、タキソール、マイトマイシンC、アバスチン、ハーセプチン、RTM、フルロウラシル、およびテモゾラミドなどが含まれるが、これらに限定されない。化合物は、2つ以上の化学療法剤を使用する標準的な併用療法での使用にも適している。抗がん治療には、将来開発される新規化合物または治療が含まれることを理解されたい。

【0355】

上記の薬学的組成物および／または製剤は、意図する目的を達成するのに有効な量の1つ以上のIL-4 標的化カーゴタンパク質を含む。したがって、「治療的有效な用量」という用語は、がんの症状を改善するIL-4 標的化カーゴタンパク質の量を指す。化合物の治療的有效な用量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。例えば、治療的有效量は、本明細書に記載されているような細胞培養アッセイまたは動物モデルのいずれかで最初に推定することができる。動物モデルを使用して、適切な濃度範囲および投与経路を決定することもできる。次いで、そのような情報を使用して、当業者に既知の標準的な方法を使用して、ヒトを含む他の動物における投与のための有用な用量および経路を決定することができる。

【0356】

治療効果および毒性はまた、例えば、有効用量の中央値またはED<sub>50</sub>（すなわち、集団の50%において治療的有效な用量）および致死用量の中央値またはLD<sub>50</sub>（すなわち、集団の50%に対して致死である用量）などの、標準的な薬学的手順によって決定することができる。治療効果と毒性効果との間の用量比は、LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>の比として表すことができる、「治療指数」として既知である。細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータを使用して、ヒトまたは動物で使用するための一連の投与量を定めることができる。そのような組成物に含まれる投与量は、通常、ED<sub>50</sub>を含む濃度の範囲内であり、毒性をほとんどまたは全く示さない。投与量は、使用する剤形、対象の感受性、および投与経路などに応じて、この範囲内で変動する。使用することができる例示的な投与量範囲には、少なくとも1 ng/g腫瘍、少なくとも1 μg/g腫瘍、または少なくとも1 mg/g腫瘍、例えば、約0.01 μg/g腫瘍～約50 μg/g腫瘍、約0.02 μg/g腫瘍～約40 μg/g腫瘍、約0.02 μg/g腫瘍～約35 μg/g腫瘍、0.03 μg/g腫瘍～約25 μg/g腫瘍、約0.04 μg/g腫瘍～約20 μg/g腫瘍、約0.04 μg/g腫瘍～約10 μg/g腫瘍、および約0.5 μg/g腫瘍～約2 μg/g腫瘍の投与量範囲が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0357】

当業者は、投与量が、特に、使用されるIL-4標的化カーゴタンパク質の種類および治療されるがん幹細胞の種類に依存することを理解するであろう。

## 【0358】

いくつかの実施形態では、IL-4標的化カーゴタンパク質は、配列番号65のMDNA55である：

MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKLRDRNLWGLAGL

NSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSSGGNGGHHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKT

LCTELTVTDIFAASKASGGPEGGSALAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPV

QRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTAAAEESERFV

RQGTGNDEAGAANGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVERRLLQHR

QLEERGYVFGYHGTFLAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEP

DARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEE

EGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKP

PKDEL

MDNA55はまた、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第2016/0271231号に記載されている。

## 【0359】

いくつかの実施形態では、IL-4標的化カーゴタンパク質は、人工CSFで希釈される。いくつかの実施形態では、MDNA55は、人工脳脊髄液（人工CSF）で希釈される。いくつかの実施形態では、人工CSFは、塩化カルシウム、デキストロース、硫酸マグネシウム、塩化カリウム、重炭酸ナトリウム、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、二塩基性を含み、水で希釈される。いくつかの実施形態では、人工CSFは、Elliott's B（登録商標）溶液である。いくつかの実施形態では、人工CSFは、3 µg/mLのMDNA55の最終組成を有する注入液を生成するために使用される。いくつかの実施形態では、人工CSFは、3 µg/mLのMDNA55の最終組成を有する注入液を生成するために使用される。いくつかの実施形態では、人工CSFは、3 µg/mLのMDNA55、0.02%のヒト血清アルブミン、および7 mMのガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸（Gd-DTPA、Magnevist（登録商標））の最終組成を有する注入液を生成するために使用される。

## 【0360】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤および投与経路は、腫瘍の約80%、約85%、約90%、約95%、または約100%およびその周囲の1 cmの縁（腫瘍の広がりリスクがある）を首尾よく覆うことを可能にする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤および投与経路は、腫瘍の約80%～約100%およびその周囲の1 cmの縁（腫瘍の広がりリスクがある）を首尾よく覆うことを可能にする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤および投与経路は、腫瘍の約85%～約100%およびその周囲の1 cmの縁（腫瘍の広がりリスクがある）を首尾よく覆うことを可能にする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤および投与経路は、腫瘍の約90%～約100%およびその周囲の1 cmの縁（腫瘍の広がりリスクがある）を首尾よく覆うことを可能にする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤および投与経路は、腫瘍の約95%～約100%およびその周囲の1 cmの縁（腫瘍の広がりリスクがあ

10

20

30

40

50

る)を首尾よく覆うことを可能にする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤および投与経路は、腫瘍の約100%およびその周囲の1cmの縁(腫瘍の広がりリスクがある)を首尾よく覆うことを可能にする。

表7：注入液の調製に使用される試薬

| 試薬                                        | 種類  | 等級      | 製造元/販売業者                              |
|-------------------------------------------|-----|---------|---------------------------------------|
| MDNA55                                    | 医薬品 | CGMP、滅菌 | Medicenna Therapeutics Inc.           |
| Elliotts B(登録商標)<br>溶液                    | 賦形剤 | USP、滅菌  | Lukare Medical,LLC                    |
| HSA 5%(水溶液)<br>溶液                         | 賦形剤 | USP、滅菌  | Octapharma                            |
| Gd-DTPA、<br>Magnevist(登録商標)<br>469.1mg/mL | 賦形剤 | USP、滅菌  | Bayer Healthcare Pharmaceuticals Inc. |

10

略語：CGMP、現在の医薬品適正製造基準；NDC、国家薬物コード；USP、米国薬局方

20

#### 【0361】

##### A. MDNA55製剤の実施形態

MDNA55の組成：医薬品は、13mmテフロン(登録商標)表面の栓で密封され、以下に示すラベルが付けられた、滅菌使い捨て2mLタイプ1USP脱水素化透明ガラスバイアル中に充填された、0.5mLのリン酸緩衝生理食塩水(10mMリン酸ナトリウム、500mM塩化ナトリウム、pH7.4±0.1)に含まれる500μg/mLの濃度のMDNA55の滅菌凍結溶液として供給される。

#### 【0362】

MDNA55バイアル：PRX-321は、0.5mLのMDNA55(500μg/mL)を含み、-70℃以下で保存する必要がある。バイアルには、「定位配置されたカテーテルを介した腫瘍内投与用の滅菌単回用量バイアル」というラベルが付いている。

30

#### 【0363】

保管：医薬品は、注入液の調製に必要なまで、二次包装中で-70℃+/-10℃で保管される。病院薬局の温度監視記録は、試験モニターによるレビューのために医薬品バイアルが保管されているすべての期間について提供する必要がある。

#### 【0364】

取り扱い：注入液は、事前に消毒された生物学的安全性(垂直流)キャビネットを使用した無菌技術を使用して調製される。注入液の調製後、使用済みの医薬品バイアルは、病院薬局の標準的な操作手順に従って廃棄する必要がある。

40

#### 【0365】

##### 賦形剤

出荷物を受け取った際、病院の薬剤師は輸送用コンテナを開け、薬剤師は内容物の状態を検査し、賦形剤キットに損傷がないことを確認する必要がある。薬剤師は、一時的なモニターデータをダウンロードするための出荷物に含まれる指示書に従う必要があり、かつ、出荷物とともに届いた受領証明書を完成/返送して、これにより受領状態を文書化する必要がある。病院の薬剤師は、賦形剤キットの在庫フォーム(付録3)を使用して出荷物の在庫を記録する必要がある。賦形剤キットの出荷の受領中に同定される問題があった場合、病院薬局は、このマニュアルの項目3.0で指定されている連絡先に直ちに通知する必要がある。

50

## 【0366】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、キットとして提供される。いくつかの実施形態では、MDNA55 は、キットとして提供される。いくつかの実施形態では、キットは、4つの構成要素を含む：

- ヒト血清アルブミン (HSA)
- Elliotts B 溶液
- Magnevist (Gd-DTPA)
- 空IVバッグ

## 【0367】

容器は、密封を確実にするために、開口端に不正開封防止シールを有する。1つの賦形剤キットは1つの注入液の調製に使用される。

## 【0368】

賦形剤キットの構成要素：

- 1 x 250 mL ボトル HSA 5% (水溶液) 溶液
- 1 x ユニット Elliotts B 溶液 (10 x 10 mL アンプル)
- Gd-DTPA の 5 mL バイアル x 1
- 1 x 空 (150 mL サイズ) IV バッグ

## 【0369】

賦形剤キットの構成要素は、本実施例に記載される MDNA55 注入液の調製に使用される。このキットは、単一 (1 x) MDNA55 注入液調製のための材料を提供する。

## 【0370】

保管：賦形剤キットは、注入液の調製に必要なまで、制御された室温で保管される。

## 【0371】

取り扱い：賦形剤キットは注意して取り扱い、右側を上にして保管する必要がある (キットのラベルは上部にある)。

## 【0372】

ヒト血清アルブミン

いくつかの実施形態では、ヒト血清アルブミン (HSA) は、注入アセンブリにおいて使用される注射器、チューブ、およびカテーテルの内面への MDNA55 の吸着を防ぐために、0.02% の最終濃度で注入液に添加される。

## 【0373】

供給：1 x 250 mL ボトル (Octapharma HSA 5% (水) 溶液、NCT # 68982-0623-02)

## 【0374】

保管：製造元が推奨する制御された室温で。

## 【0375】

取り扱い：HSA は、事前に消毒された生物学的安全キャビネットで無菌技術を使用して取り扱う必要がある。開封およびまたは使用したら、残りの HSA は、病院薬局の標準的な操作手順に従って廃棄する必要がある。

## 【0376】

緩衝化髄腔内電解質 / デキストロース注射 (Elliotts B (登録商標) 溶液)  
MDNA55 医薬品は、Elliotts B (登録商標) 溶液で希釈されている。

10

20

30

40

50

表 8：構成要素／成分の情報：

| 特定の化学的同一性     | CAS#       | 化学式                                                 | mL 当たりの量 |
|---------------|------------|-----------------------------------------------------|----------|
| 塩化カルシウム       | 10035-04-8 | $\text{CaCl}_2$                                     | 0.2mg    |
| デキストロース       | 50-99-7    | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$                 | 0.8mg    |
| 硫酸マグネシウム      | 10034-99-8 | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | 0.3mg    |
| 塩化カリウム        | 7447-40-7  | $\text{KCl}$                                        | 0.3mg    |
| 重炭酸ナトリウム      | 144-55-8   | $\text{NaHCO}_3$                                    | 1.9mg    |
| 塩化ナトリウム       | 7647-14-5  | $\text{NaCl}$                                       | 7.3mg    |
| リン酸ナトリウム、二塩基性 | 7782-85-6  | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.2mg    |
| 注射用水          | 7732-18-5  | $\text{H}_2\text{O}$                                | 1mL      |

10

## 【0377】

**E l l i o t t ' s B** 溶液に関する詳細情報。**E l l i o t t s B**（登録商標）溶液は、静菌性防腐剤を含まない無菌かつ非発熱性の等張液である。

**E l l i o t t s B** 溶液は、メトトレキサートナトリウムおよびシタラビンの髄腔内投与のための希釈剤である。**E l l i o t t s B** 溶液の各 10 mL には、以下が含まれている。

20

表 9：10 mL 当たりの組成

| 特定の化学的同一性                           | 10mL 当たりの量 |
|-------------------------------------|------------|
| 塩化ナトリウム、USP                         | 73mg       |
| 重炭酸ナトリウム、USP                        | 19mg       |
| デキストロース、USP                         | 8mg        |
| 硫酸マグネシウム・7H <sub>2</sub> O、USP      | 3mg        |
| 塩化カリウム、USP                          | 3mg        |
| 塩化カルシウム・2H <sub>2</sub> O、USP       | 2mg        |
| リン酸ナトリウム、二塩基性・7H <sub>2</sub> O、USP | 2mg        |
| 注射用水、USP qs 10mL                    | 10mL       |

30

表 10：電解質の濃度：

|        |             |      |              |
|--------|-------------|------|--------------|
| ナトリウム  | 149mEq/リットル | 重炭酸塩 | 22.6mEq/リットル |
| カリウム   | 4.0mEq/リットル | 塩素   | 132mEq/リットル  |
| カルシウム  | 2.7mEq/リットル | 硫酸塩  | 2.4mEq/リットル  |
| マグネシウム | 2.4mEq/リットル | リン酸塩 | 1.5mEq/リットル  |

40

50

表 1 1 : 成分の式および分子量 :

| 成分                              | 分子式                                                 | 分子量    |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------|--------|
| 塩化ナトリウム                         | NaCl                                                | 58.44  |
| 重炭酸ナトリウム                        | NaHCO <sub>3</sub>                                  | 84.01  |
| デキストロース                         | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>       | 180.16 |
| 硫酸マグネシウム・7H <sub>2</sub> O      | Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O  | 246.48 |
| 塩化カリウム                          | KCl                                                 | 74.55  |
| 塩化カルシウム・2H <sub>2</sub> O       | CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O                | 147.01 |
| リン酸ナトリウム、二塩基性・7H <sub>2</sub> O | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O | 268.07 |

10

## 【 0 3 7 8 】

E l l i o t t s B 溶液の pH は 6 . 0 ~ 7 . 5 であり、浸透圧は 1 リットル当たり 2 8 8 m O s m o l ( 計算値 ) である。

## 【 0 3 7 9 】

E l l i o t t s B 溶液は、メトトレキサートナトリウムおよびシタラビンの髄腔内投与のための希釈剤として使用するための緩衝化塩溶液を提供する。E l l i o t t s B 溶液は、pH、電解質組成、グルコース含有量、および浸透圧において脳脊髄液と適合性があることが実証されている。

20

表 1 2 : E l l i o t t s B 溶液および C S F 溶液の電解質組成、pH、および非電解成分の比較 :

| 溶液               | Na+<br>mEq/L | K+<br>mEq/L | Co++<br>mEq/L | Mg++<br>mEq/L | HCO <sub>3</sub> -<br>mEq/L | Cl-<br>mEq/L | pH      | リン<br>mg/dL | グルコース<br>mg/dL |
|------------------|--------------|-------------|---------------|---------------|-----------------------------|--------------|---------|-------------|----------------|
| 脳脊髄液             | 117~137      | 2.3~4.6     | 2.2           | 2.2           | 22.9                        | 113~127      | 7.31    | 1.2~2.1     | 45~80          |
| Elliotts B<br>溶液 | 149          | 4.0         | 2.7           | 2.4           | 22.6                        | 132          | 6.0~7.5 | 2.3         | 80             |

30

## 【 0 3 8 0 】

E l l i o t t s B 溶液のおおよその緩衝能は、チャレンジ溶液が 0 . 0 1 N H C l の場合は 1 . 1 X 1 0 <sup>-2</sup> 当量であり、チャレンジ溶液が 0 . 0 1 N N a O H の場合は 7 . 8 X 1 0 <sup>-3</sup> 当量である。メトトレキサートナトリウムおよびシタラビンとの適合性研究は、これらの薬剤が E l l i o t t s B 溶液と物理的に適合性があることを示している。

## 【 0 3 8 1 】

E l l i o t t ' s B 溶液は、注入液の調製に使用される希釈剤であり、pH、電解質組成、グルコース含有量、浸透圧、および緩衝能力において脳脊髄液に適合性がある。

40

## 【 0 3 8 2 】

ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸 ( G d - D T P A ) M a g n e v i s t ( 登録商標 )

いくつかの実施形態では、注入中のこの代理トレーサーの共注入により、MDNA 55 注入液分布のリアルタイム監視が可能になるので、G d - D T P A ( 約 1 : 7 0 に希釈 ) が造影剤として注入液に添加される。

## 【 0 3 8 3 】

供給 : G d - D T P A の 1 x 5 m L 使い捨てバイアル ( B a y e r H e a l t h C a r

50

e Pharmaceuticals Inc. Magnevist (登録商標) ; 469.1mg/mL、NDC#50419-188-05)。

【0384】

保管：製造元の指示書に従って保管される。

【0385】

取り扱い：Gd-DTPA (Magnevist (登録商標)) は、事前に消毒された生物学的安全キャビネットで無菌技術を使用して取り扱う必要がある。開封または使用したら、残りは、そのような材料の廃棄の扱いに関する規制および病院薬局の標準的な操作手順に従って廃棄する必要がある。

【0386】

B. 薬学的組成物および投与方法

いくつかの実施形態では、対象IL-4ムテインおよび核酸は、薬学的組成物を含む組成物に組み込むことができる。そのような組成物は、典型的には、ポリペプチドまたは核酸分子および薬学的に許容される担体を含む。そのような組成物は、抗PD-1抗体も含むことができる。いくつかの実施形態では、組成物は、融合タンパク質である、および／またはCAR-T構築物と関連する、および／または腫瘍溶解性ウイルスによって発現される、もしくはそれに関連する、IL-4ムテインを含む。

【0387】

抗PD-1抗体およびIL-4ムテインは、共組成物として、2つの別個の組成物として同時に、および／または2つの別個の組成物として連続的に投与することができる。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体または阻害剤およびIL-4ムテインは、単一の共組成物（すなわち、共製剤化される）として一緒に投与される。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体または阻害剤およびIL-4ムテインは、2つの別個の組成物（すなわち、別個の製剤）として同時に投与される。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体または阻害剤およびIL-4ムテインは、別個の組成物（すなわち、別個の製剤）として連続的に投与される。いくつかの態様では、抗PD-1抗体または阻害剤およびIL-4ムテインが別個の組成物として連続的に投与される場合、抗PD-1抗体または阻害剤はIL-4ムテインの前に投与される。いくつかの態様では、抗PD-1抗体または阻害剤およびIL-4ムテインが別々の組成物として連続的に投与される場合、IL-4ムテインは抗PD-1抗体または阻害剤の前に投与される。いくつかの態様では、抗PD-1抗体には、ニボルマブ、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、AMP224、CT-011、およびMK-3475が含まれるが、これらに限定されない。

【0388】

記載されている他の免疫療法薬およびIL-4ムテインは、共組成物として、2つの別個の組成物として同時に、および／または2つの別個の組成物として連続的に投与することができる。いくつかの実施形態では、他の免疫療法薬およびIL-4ムテインは、単一の共組成物（すなわち、共製剤化される）として一緒に投与される。いくつかの実施形態では、他の免疫療法薬およびIL-4ムテインは、2つの別個の組成物（すなわち、別個の製剤）として同時に投与される。いくつかの実施形態では、他の免疫療法薬およびIL-4ムテインは、別個の組成物（すなわち、別個の製剤）として連続的に投与される。いくつかの態様では、他の免疫療法薬およびIL-4ムテインが別個の組成物として連続的に投与される場合、抗PD-1抗体または阻害剤はIL-4ムテインの前に投与される。いくつかの態様では、他の免疫療法薬およびIL-4ムテインが別々の組成物として連続的に投与される場合、IL-4ムテインは他の免疫療法薬の前に投与される。

【0389】

薬学的組成物は、その意図された投与経路に適合するように製剤化される。本発明の抗PD-1抗体および／または変異体IL-4ポリペプチドは経口投与されてもよいが、例えば、静脈内投与を含む非経口経路を介して投与される可能性が高い。非経口投与経路の例には、例えば、静脈内、皮内、皮下、経皮（局所）、経粘膜、および直腸投与が含まれる。非経口用途に使用される溶液または懸濁液には、次の成分：注射用水、生理食塩水、固

10

20

30

40

50

定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたはその他の合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコールやメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの酸化防止剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などの緩衝液、および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張度調整剤が含まれる。pHは、一塩基性および／または二塩基性リン酸ナトリウム、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整することができる（例えば、約7.2～7.8、例えば、7.5のpHに）。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、または複数回投与用バイアルに封入できる。

#### 【0390】

注射用途に適した薬学的組成物には、滅菌水溶液（水溶性の場合）、または滅菌注射溶液もしくは分散液の即時調製用の分散液および滅菌粉末が含まれる。静脈内投与の場合、適切な担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF、Parasippany, N. J.）、またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が含まれる。すべての場合において、組成物は無菌でなければならず、注射を容易に可能とする程度に流動性である必要がある。それは、製造および貯蔵の条件下で安定している必要があり、細菌や真菌などの微生物の汚染作用から保護する必要がある。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散液の場合は必要とされる粒子サイズの維持、および界面活性剤、例えばドデシル硫酸ナトリウムの使用により、維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば糖、多価アルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましいだろう。注射可能な組成物の長期吸収は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることによりもたらすことができる。

#### 【0391】

滅菌注射液は、必要な量の活性化合物を、必要に応じて上記に列挙した成分の1つまたは組み合わせとともに適切な溶媒に組み込み、その後濾過滅菌することにより調製することができる。一般に、分散液は、活性化合物を滅菌ビヒクルに組み込むことにより調製され、滅菌ビヒクルは、基本的な分散媒および上に列挙したものからの必要な他の成分を含む。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより、以前に滅菌濾過されたその溶液から、活性成分および任意の追加の所望の成分の粉末が得られる。

#### 【0392】

経口組成物は、使用される場合、一般に不活性希釈剤または食用担体を含む。経口治療投与の目的のために、活性化合物を賦形剤と混合し、錠剤、トローチ、またはカプセル、例えばゼラチンカプセルの形態で使用する事ができる。経口用組成物は、うがい薬として使用するために液体担体を使用して調製することもできる。薬学的に適合する結合剤、および／またはアジュバント材料を組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル、トローチなどは、以下の成分、または類似の性質の化合物：微結晶セルロース、トラガカントゴム、ゼラチンなどの結合剤；デンプンまたはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、Primogel（商標）、またはコーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはSterotes（商標）などの潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤；ショ糖やサッカリンなどの甘味料；ペパーミント、サリチル酸メチル、オレンジ風味などの香味料のいずれかを含むことができる。

#### 【0393】

吸入による投与の場合、抗PD-1抗体および／またはIL-4ムテイン、またはそれらをコードする核酸は、適切な噴射剤、例えば、二酸化炭素などの気体を含む加圧容器また

10

20

30

40

50

はディスペンサー、またはネブライザーからエアゾールスプレーの形態で送達される。そのような方法には、米国特許第 6, 468, 798 号に記載されているものが含まれる。

【0394】

抗 PD-1 抗体および／または IL-4 ムテインまたは核酸の全身投与は、経粘膜または経皮手段によるものであってもよい。経粘膜または経皮投与の場合、浸透するバリアに適した浸透剤が製剤に使用される。そのような浸透剤は一般に当該技術分野で知られており、例えば、経粘膜投与の場合、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は、鼻スプレーまたは坐剤の使用により達成することができる。経皮投与の場合、活性化合物は、当該技術分野で一般的に知られているような軟膏、薬用軟膏、ゲル、またはクリームに製剤化される。

10

【0395】

いくつかの実施形態では、化合物（抗 PD-1 抗体および／または変異体 IL-4 ポリペプチドまたは核酸）は、直腸送達のために、坐薬（例えば、カカオバターおよび他のグリセリドなどの従来の坐薬基剤を伴う）または保留浣腸の形態で調製することもできる。

【0396】

いくつかの実施形態では、化合物（対象 IL-4 ムテインまたは核酸）はまた、McCaffrey et al. (Nature 418:6893, 2002)、Xia et al. (Nature Biotechnol. 20:1006-1010, 2002)、または Putnam (Am. J. Health Syst. Pharm. 53:151-160, 1996, erratum at Am. J. Health Syst. Pharm. 53:325, 1996) に記載されている方法を含むがこれらに限定されない、当該技術分野で既知である方法を使用したトランスフェクションまたは感染によって投与することができる。

20

【0397】

一実施形態では、抗 PD-1 抗体および／または IL-4 ムテインまたは核酸は、例えば、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系を含む放出制御製剤などの、抗 PD-1 抗体および／または変異体 IL-4 ポリペプチドが身体から迅速に排出されないように保護する担体とともに調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸などの生分解性の生体適合性ポリマーを使用することができる。そのような製剤は、標準的な技術を使用して調製することができる。材料は、Alza Corporation および Nova Pharmaceuticals, Inc から商業的にも入手可能である。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を用いて感染細胞に標的化されたリポソームを含む）も薬学的に許容される担体として使用可能である。これらは、例えば米国特許第 4, 522, 811 号に記載されているように、当業者に知られている方法に従って調製することができる。

30

【0398】

このような抗 PD-1 抗体、IL-4 ムテイン、または核酸化合物の用量、毒性、および治療効果は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手法により、例えば、LD<sub>50</sub>（集団の 50% 致死量）または ED<sub>50</sub>（集団の 50% に治療効果のある用量）を決定するために、決定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比が治療指数であり、これは、LD<sub>50</sub> / ED<sub>50</sub> の比として表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。有毒な副作用を示す化合物を使用してもよいが、感染していない細胞への潜在的な損傷を最小限に抑え、それにより副作用を減らすために、そのような化合物を罹患組織の部位に標的化する送達系を設計するように注意する必要がある。

40

【0399】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトでの使用のための投与量範囲を策定する際に使用することができる。かかる化合物の用量は、毒性がほとんどまたは全くない ED<sub>50</sub> を含む循環濃度の範囲内にあることが好ましい。投与量は、用いられる投与剤形および利用される投与経路に応じて、この範囲内で変化し得る。本発明の方法において使用される任意の化合物について、治療的有効量は、最初に細胞培養アッセイから

50

推定することができる。細胞培養において決定されるような IC<sub>50</sub>（すなわち、症状の最大半量の阻害に到達する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように、用量を動物モデルで策定することができる。かかる情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定され得る。

#### 【0400】

本明細書で定義されるように、対象 IL-4 ムテインの治療の有効量（すなわち、有効用量）および／または抗 PD-1 抗体または阻害剤は、選択されたポリペプチドまたは抗体に依存する。いくつかの実施形態では、IL-4 ムテインの単回投与量は、投与され得る患者の体重 1 kg 当たり約 0.001 mg/kg ~ 0.1 mg/kg の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、抗 PD-1 抗体または阻害剤の単回投与量は、投与され得る患者の体重 1 kg 当たり約 1 mg/kg ~ 20 mg/kg、または約 5 mg/kg ~ 約 15 mg/kg、または約 10 mg/kg の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、約 0.005 mg/kg、0.01 mg/kg、0.025 mg/kg、0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.25 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、5.0 mg/kg、10.0 mg/kg の抗 PD-1 抗体または阻害剤および／または IL-4 ムテインの用量が投与できる。いくつかの実施形態では、600, 000 IU/kg が投与される（IU は、リンパ球増殖バイオアッセイによって決定でき、インターロイキン-2（ヒト）について世界保健機構の第 1 の国際標準によって確立された国際単位（IU）で表される）。投与量は、PROLEUKIN（登録商標）について処方された量と同等であり得るが、それよりも少ないことが予想される。組成物は、1 日おきに 1 回を含む、1 日に 1 回以上 ~ 週に 1 回以上投与することができる。当業者は、疾患または障害の重症度、以前の治療、対象の一般的な健康および／または年齢、および存在する他の疾患を含むがこれらに限定されない、特定の因子が対象を効果的に治療するために必要な用量およびタイミングに影響を及ぼし得ることを理解するであろう。さらに、治療の有効量の対象 IL-4 ムテインによる対象の治療は、単一の治療を含むことができ、または一連の治療を含むことができる。一実施形態では、組成物は 8 時間ごとに 5 日間投与され、その後 2 ~ 14 日間、例えば 9 日間の休薬期間が続き、その後 8 時間ごとにさらに 5 日間の投与が続く。いくつかの実施形態では、投与は 4 日ごとに 3 回投与される。

#### 【0401】

薬学的組成物は、投与のための説明書とともに容器、パック、またはディスペンサー内に含めることができる。

#### 【0402】

以下の実施例は、本明細書で提供される本発明の特定の実施形態を説明するために提供され、限定するものとして解釈されるべきではない。

#### 【0403】

##### C. 管理および投与

IL-4 標的化カーゴタンパク質は、CNS がんと治療、安定化、または予防するために使用することができる。例えば、IL-4 標的化カーゴタンパク質 MDNA55 を含む。IL-4 標的化カーゴタンパク質はまた、低悪性度がん、局所再発がん、遠隔再発がん、および／または難治性がん（すなわち、他の抗がん治療に反応しなかったがん）を含む再発がん、転移性がん、局所進行がん、ならびに悪性度が高いがんの治療に使用することができる。これらに関連して、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、細胞毒性効果または細胞増殖抑制効果のいずれかを発揮し、例えば、がん細胞および／またはがん幹細胞の数または増殖の減少、腫瘍のサイズの減少、腫瘍のサイズの増加の遅延または防止、腫瘍の消失または除去とその再出現との間の無病生存期間の増加、腫瘍の最初またはその後の発生の防止（例えば細胞増殖抑制）、進行までの時間の増加、腫瘍に関連する 1 つ以上の有害な症状の減少、またはがんを有する対象の全生存期間の増加をもたらす得る。

#### 【0404】

典型的には、がんの治療において、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、例えば、ボーラ

ス注射または患者の血流への連続注入によって、患者に全身的に投与される。あるいは、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、腫瘍の部位で（腫瘍内に）局所的に投与され得る。IL-4 標的化カーゴタンパク質が腫瘍内に投与される場合、投与は、任意の経路、例えば、局所的（locally）、局所的（regionally）、局所的（focally）、全身的、対流強化送達、またはそれらの組み合わせにより行うことができる。

【0405】

1つ以上の既知の化学療法剤と組み合わせて使用される場合、化合物は、化学療法剤の投与の前もしくは後に投与することができ、またはそれらを同時に投与することができる。1つ以上の化学療法剤は、例えば、ボーラス注射または連続注入によって全身的に投与され得るか、またはそれらは経口的に投与され得る。

10

【0406】

動物への投与のために、薬学的組成物は、様々な経路による投与用に製剤化することができる。例えば、組成物は、局所、直腸、または非経口投与用に、または吸入もしくはスプレーによる投与用に製剤化することができる。本明細書で使用される非経口という用語は、皮下注射、静脈内、筋肉内、髄腔内、胸骨内注射または注入技術を含む。腫瘍への直接注射または注入も企図される。対流強化送達はまた、IL-4 標的化カーゴタンパク質を投与するために使用することができる。

【0407】

一例では、近接照射療法の複数回の注射アプローチと同様の投与アプローチを使用して、がんを有する対象にIL-4 標的化カーゴタンパク質を注射することができる。例えば、薬学的組成物または製剤の形態および適切な投与単位での精製されたIL-4 標的化カーゴタンパク質の複数のアリコート、針を使用して注射してもよい。IL-4 標的化カーゴタンパク質の代替の投与方法は、当業者に明らかであろう。そのような方法には、例えば、治療を必要とする対象にIL-4 標的化カーゴタンパク質の連続注入を提供するためのカテーテルまたは埋め込み型ポンプの使用が含まれる。

20

【0408】

当該技術分野で既知であるように、ソフトウェアプランニングプログラムは、例えば、脳腫瘍または他の局所性腫瘍を治療するためにIL-4 標的化カーゴタンパク質を注入するためのカテーテルの配置のために、近接照射療法治療および超音波と組み合わせて使用することができる。例えば、針の位置決めおよび配置は、一般に、超音波ガイダンスの下で達成することができる。総体積、したがって患者に投与される注射および沈着物の数は、例えば、治療される器官の体積または面積に応じて調整することができる。好適なソフトウェアプランニングプログラムの例は、近接照射療法治療プランニングプログラム Variseed 7.1 (Varian Medical Systems, Palo Alto, Calif.) である。そのようなアプローチは、特に、前立腺がんの治療において首尾よく行われてきた。

30

【0409】

IL-4 標的化カーゴタンパク質に対する全身性免疫応答を低下させる必要がある場合、免疫抑制治療薬をIL-4 標的化カーゴタンパク質と組み合わせて投与することができる。免疫抑制治療薬の例には、全身性または局所性コルチコステロイド (Suga et al., Ann. Thorac. Surg., 73:1092-7, 2002)、シクロスポリンA (Fang et al., Hum. Gene Ther., 6:1039-44, 1995)、シクロホスファミド (Smith et al., Gene Ther., 3:496-502, 1996)、デオキシスベルグアリン (Kaplan et al., Hum. Gene Ther., 8:1095-1104, 1997)、ならびにTおよび/またはB細胞に対する抗体 [例えば、抗CD40リガンド、抗CD4抗体、抗CD20抗体 (リツキシマブ)] (Manning et al., Hum. Gene Ther., 9:477-85, 1998) が含まれるが、これらに限定されない。このような薬剤は、IL-4 標的化カーゴタンパク質の投与前、投与中、または投与後に投与することができる。そのような薬剤は、約10mg/週～約1000mg/週、約40m

40

50

g／週～約700mg／週、または約200mg／週～約500mg／週で、2、3、4、5、6、または7週間投与することができる。対象が反応性を維持している場合（例えば、がんの症状が静止または減少している場合）、必要に応じて治療過程を繰り返すことができる。

#### 【0410】

IL-4 標的化カーゴタンパク質はまた、放射線増感剤などの増感剤と組み合わせて投与することができる（例えば、Diehn et al., J. Natl. Cancer Inst. 98:1755-7, 2006を参照されたい）。一般に、増感剤は、IL-4 標的化カーゴタンパク質の活性を増加させる任意の薬剤である。例えば、増感剤は、がん幹細胞の増殖を阻害するまたはがん細胞および／またはがん幹細胞を死滅させるIL-4 標的化カーゴタンパク質の能力を高める。例示的な増感剤には、IL-10に対する抗体、骨形成タンパク質、およびHDAC阻害剤が含まれる（例えば、Sakariss et al., Neoplasia 9(11):882-92, 2007を参照されたい）。これらの増感剤は、IL-4 標的化カーゴタンパク質による治療前または治療中に投与することができる。そのような増感剤の例示的な投与量には、少なくとも1μg/mL、例えば、少なくとも10μg/mL、少なくとも100μg/mL、例えば、5～100μg/mLまたは10～90μg/mLが含まれる。増感剤は、毎日、週に3回、週に2回、週に1回、または2週間に1回投与することができる。増感剤はまた、IL-4 標的化カーゴタンパク質による治療が終了した後に投与することができる。

10

#### 【0411】

IL-4 標的化カーゴタンパク質は、対象におけるがんを治療することを意図する、アジュバント療法レジメンの一部として、（一次療法に対する）ネオアジュバント療法の一部として使用され得る。IL-4 標的化カーゴタンパク質はまた、進行性および／または悪性度が高い新生物（例えば、外科手術または放射線療法などの局所的な治療法では治療しにくい対象における明白な疾患）、転移性疾患、局所進行性疾患および／または難治性腫瘍（例えば、治療に反応しなかったがんまたは腫瘍）の治療を含む、腫瘍の発生および進行の様々な段階で投与することができる。

20

#### 【0412】

「一次療法」は、対象におけるがんの最初の診断時の第1選択の治療を指す。例示的な一次療法は、外科手術、広範囲の化学療法、および放射線療法を含み得る。「アジュバント療法」とは、一次療法に続き、再発のリスクのある対象に投与される療法を指す。アジュバント全身療法は、再発を遅らせ、生存を延長し、または対象を治療するために、一次療法の直後、例えば最後の一次療法治療の2、3、4、5、または6週間後に開始される。上記のように、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、単独で、またはアジュバント療法の一部として1つ以上の他の化学療法剤と組み合わせて使用することができることが企図される。IL-4 標的化カーゴタンパク質と標準的な化学療法剤との組み合わせは、化学療法剤の有効性を改善するように作用し得、したがって、標準的ながん治療を改善するために使用することができる。この適用は、標準的な治療に反応しない薬剤耐性のがんの治療において特に重要になり得る。投与される投与量は、規定される制限の対象ではないが、通常は有効量である。組成物は、単位剤形で製剤化し得る。「単位剤形」という用語は、ヒト対象および他の哺乳動物のための単位投与量として好適な物理的に別個の単位を指し、各単位は、好適な医薬賦形剤と関連して、所望の治療効果を生み出すように計算された所定量の活性物質を含む。単位剤形は、1回で投与することができ、または複数の単位剤形を、例えば、臓器または固形腫瘍全体に投与することができる。各投与量単位におけるIL-4 標的化カーゴタンパク質の範囲の例は、約0.0005～約100mgであり、またはより一般的には、約1.0～約1000mgである。IL-4 標的化カーゴタンパク質の1日投与量は、典型的には、少なくとも1ng/kg体重、少なくとも1μg/kg体重、少なくとも1mg/kg体重であり、例えば、単回用量または分割用量で、約0.01～約100mg/kg体重の範囲内である。しかしながら、投与される化合物の実際の量は、治療される状態、選択される投与経路、投与される実際の化合物、個々の患者

30

40

50

の年齢、体重、および反応、ならびに患者の症状の重症度を含む関連する状況に照らして、医師によって決定されることが理解されよう。上記の投与量範囲は、例としてのみ与えられており、範囲を何ら制限することを意図するものではない。いくつかの場合では、前述の範囲の下限未満の投与量レベルが十分すぎる場合があり、他の場合には、例えば、一日全体にわたる投与のために、最初に大きい用量をいくつかの小さい用量に分割することによって、有害な副作用を引き起こすことなく、さらに大きい用量を使用する場合がある。

#### 【0413】

IL-4 標的化カーゴタンパク質は、がんを治療および／または管理するために使用することができ、方法は、それを必要とする対象に予防的または治療的に有効なレジメンを投与することを含み、該レジメンは、対象に1つ以上の療法を投与することを含み、該レジメンは、がん幹細胞集団の安定化または減少をもたらし、循環内皮細胞集団および／または循環内皮前駆体集団の減少をもたらさないか、またはわずかな減少をもたらすだけである。一例では、レジメンは、がん幹細胞集団の5%～40%、10%～60%、もしくは20～99%の減少、および／または循環内皮細胞集団の25%未満、15%未満、もしくは10%未満の減少を達成する。別の例では、レジメンは、がん幹細胞集団の5%～40%、10%～60%、もしくは20～99%の減少、および／または循環内皮前駆細胞集団の25%未満、15%未満、もしくは10%未満の減少を達成する。別の例では、レジメンは、がん幹細胞集団の5%～40%、10%～60%、もしくは20～99%の減少、ならびに／または循環内皮細胞集団および循環内皮前駆体集団の25%未満、15%未満、もしくは10%未満の減少を達成する。特定の例では、がん幹細胞集団の安定化または減少は、1つ以上の治療薬の1回以上の投与の2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、1年、2年、3年、4年以上後に達成される。特定の例では、がん幹細胞集団の安定化または減少は、当該技術分野で既知である任意の方法を使用して決定することができる。特定の例では、レジメンに従って、循環がん幹細胞集団、循環内皮細胞集団、および／または循環内皮前駆体集団を定期的に（例えば、治療薬のうちの1つ以上の2、5、10、20、30回以上投与後、または治療薬のうちの1つ以上を受けてから2週間、1ヶ月、2ヶ月、6ヶ月、1年以上後に）監視する。

#### 【0414】

いくつかの実施形態では、例えば、MDNA55などのIL-4 標的化カーゴタンパク質の単回注入は、1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （および最大3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の濃度で投与される（例えば、実施例1および2を参照されたい）。いくつかの実施形態では、注入体積およびパラメータは、可能な限り最大の程度で標的範囲を達成するために、各対象／患者に対して個別化することができる。いくつかの実施形態では、注入体積は、約7 mL（最小の腫瘍）～60 mL（最大の腫瘍）の範囲である。いくつかの実施形態では、注入の持続時間は、腫瘍体積、流速、およびカテーテルの数に応じて、約6～32時間である。いくつかの実施形態では、最大送達用量は90  $\mu\text{g}$ である。いくつかの実施形態では、投与量は頭蓋内投与される。いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、約90  $\mu\text{g}$ （60 mL中1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、約240  $\mu\text{g}$ （40 mL中6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、または約300  $\mu\text{g}$ （100 mL中3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の単回用量として投与される。いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、約1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の単回用量として投与される。

#### 【0415】

いくつかの実施形態では、投与は、対象当たり180  $\mu\text{g}$ 、または3  $\mu\text{g}/\text{mL} \times 60 \text{ mL}$ のMDNA55である。いくつかの実施形態では、投与は、約1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約3.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、投与は、約1.5  $\mu\text{g}/\text{m}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5～約3.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約3.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、投与量は、本明細書に記載の任意のIL-4 標的化カーゴタンパク質に対するものである。mL。いくつかの実施形態では、投与量は、MDNA55についてのものである。

## 【0416】

いくつかの実施形態では、投与流速は、約  $5 \mu\text{L}/\text{分}/\text{カテーテル}$  ～ 約  $20 \mu\text{L}/\text{分}/\text{カテーテル}$  である。いくつかの実施形態では、投与流速は、約  $10 \mu\text{L}/\text{分}/\text{カテーテル}$  ～ 約  $15 \mu\text{L}/\text{分}/\text{カテーテル}$  である。いくつかの実施形態では、投与流速は、約  $15 \mu\text{L}/\text{分}/\text{カテーテル}$  である。いくつかの実施形態では、1～4本のカテーテルが使用される。いくつかの実施形態では、1～3本のカテーテルが使用される。いくつかの実施形態では、1～3本のカテーテルが使用され、最大  $15 \mu\text{L}/\text{分}/\text{カテーテル}$  の流速である。いくつかの実施形態では、 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  は、1～3本のカテーテルおよび最大  $15 \mu\text{L}/\text{分}/\text{カテーテル}$  の流速を介して投与される。いくつかの実施形態では、 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  は、1～3本のカテーテルおよび最大  $15 \mu\text{L}/\text{分}/\text{カテーテル}$  の流速により投与され、総投与量は  $90 \mu\text{g}$  の MDNA55 である。

10

## 【0417】

## III. 治療的使用

本明細書に記載の IL-4 標的化カーゴタンパク質は、様々な治療目的に使用することができる。治療目的で投与する前に、IL-4 標的化カーゴタンパク質を特定の目的に合わせて改変または適合させる必要があり得、例えば、全身投与に必要な IL-4 標的化カーゴタンパク質の濃度は、局所投与に使用される濃度と異なり得る。同様に、治療薬の毒性は、投与様式および使用される全組成物（例えば、緩衝液、希釈剤、追加の化学療法剤など）に応じて変動し得る。

20

## 【0418】

## A. 毒性

治療用タンパク質は、対象に投与されたときにあるレベルの抗体応答を誘発し得、いくつかの場合では、望ましくない副作用を引き起こし得る。したがって、必要に応じて、IL-4 標的化カーゴタンパク質の抗原性は、当該技術分野で既知であり、かつ、以下に記載されるように評価することができる。さらに、潜在的な抗原性を低減する方法が記載されている。

## 【0419】

IL-4 標的化カーゴタンパク質のインビボ毒性効果は、治療中の動物の体重への効果を測定し、動物を犠牲死させた後に血液学的プロファイルおよび肝酵素分析を行うことによって評価することができる。IL-4 標的化カーゴタンパク質の一般的な毒性は、当該技術分野で既知である方法に従って試験することができる。例えば、IL-4 標的化カーゴタンパク質の全体的な全身毒性は、1回の静脈内注射後に 100% のマウス（すなわち LD100）を死滅させる用量を決定することによって試験することができる。ヒトなどの他の哺乳動物への投与のために、LD100 または LD50 よりも少なくとも約 2、5、または 10 倍少ない用量を選択することができる。

30

## 【0420】

本明細書に記載の IL-4 標的化カーゴタンパク質に対する抗体応答のキネティクスおよび大きさは、例えば、免疫コンピテントマウスで決定することができ、免疫コンピテントヒトで投与することができる投与レジメンの開発を容易にするために使用することができる。C57-BL6 株などの免疫コンピテントマウスに、IL-4 標的化カーゴタンパク質を静脈内投与する。マウスを様々な間隔で（例えば、単回用量後、複数回投与後）犠牲死させ、血清を得た。ELISA ベースのアッセイを使用して、抗 IL-4 標的化カーゴタンパク質抗体の存在を検出することができる。

40

## 【0421】

IL-4 標的化カーゴタンパク質の抗原性を低下させるために、カーゴ部分として使用される毒素の天然結合ドメインを機能的に欠失させ、例えば標的化部分で置き換えて、IL-4 標的化カーゴタンパク質を作製することができる。そのような IL-4 標的化カーゴタンパク質の抗原性は、上記の方法を使用して、天然結合ドメインの一部を欠失している様々なスケジュールの IL-4 標的化カーゴタンパク質への曝露後に決定することができる。完全ヒト化抗体を利用する IL-4 標的化カーゴタンパク質も、抗原性を最小限に抑

50

えるために使用することができる。

【0422】

IL-4 標的化カーゴタンパク質による継続的な治療を可能にするために使用することができる別の方法は、重複しない抗原性を有する他のカーゴタンパク質に由来する連続投与された代替 IL-4 標的化カーゴタンパク質を使用することである。例えば、プロエアロリシンに由来する IL-4 標的化カーゴタンパク質は、*Clostridium septicum* アルファ毒素または *Bacillus thuringiensis* デルタ毒素に由来する IL-4 標的化カーゴタンパク質と代替的に使用することができる。これらの IL-4 標的化カーゴタンパク質はすべて、がん細胞および／またはがん幹細胞を標的化するが、同じ抗体によって認識または中和されない。

10

【0423】

これらのマウス由来の血清試料は、当該技術分野で既知であるように、抗 IL-4 標的化カーゴタンパク質抗体の存在について評価することができる。別の例として Stickler, et al., J. Immunotherapy, 23:654-660, 2000 に記載されているように、エピトープマッピングを使用してタンパク質の抗原性を決定することもできる。簡単に説明すると、樹状細胞および CD4+T 細胞として知られる免疫細胞は、目的のタンパク質に曝露されていないコミュニティドナーの血液から分離される。次いで、タンパク質の長さに及ぶ小さな合成ペプチドが培養中の細胞に添加される。特定のペプチドの存在に応答した増殖は、T 細胞エピトープが配列に含まれていることを示唆している。このペプチド配列は、その後、IL-4 標的化カーゴタンパク質において欠失または改変され、それによってその抗原性を低下させることができる。

20

【0424】

B. 膠芽腫の治療

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、脳腫瘍の治療のために使用される。いくつかの実施形態では、脳腫瘍は膠芽腫 (GB) である。膠芽腫 (GB) は、未分化細胞の急速な増殖、広範な浸潤、および再発する傾向が高いことを特徴とする悪性度が高い脳腫瘍である (Hamstra et al., 2005)。これは急速に進行し、普遍的に致命的ながんである。テモゾロミド (Termodar (登録商標)) および放射線療法を併用して治療した成人の場合、生存期間の中央値は 14.6 ヶ月、2 年生存率は約 30%、5 年生存率は約 10% である。臨床的影響は、食事、歩行、会話などの日常の機能を行う能力に影響を与える急速な神経学的悪化によって定義される。気分、記憶、感情、知性など、性格およびアイデンティティの歪みも生じ得る。GB は、典型的には、CNS の外部に転移せず、通常、頭蓋内圧の上昇、および骨で覆われた脳腔内の腫瘍の不制御な増殖によって引き起こされるヘルニア形成が原因で死亡する。資源の豊富な国における原発性 GB の世界的な年間発生率は約 27,500 である (Decision Resources, 2013)。

30

【0425】

いくつかの実施形態では、IL-4 標的化カーゴタンパク質は、IL-4 R を過剰発現する脳腫瘍、例えば、混合性成人神経膠腫、混合性小児神経膠腫、びまん性内因性橋神経膠腫 (DIPG)、髄芽腫、成人下垂体腺腫、髄膜腫の治療に使用される。

40

【0426】

C. バイオマーカーおよび患者集団

例えば MDNA55 を含む、本発明の IL-4 標的化カーゴタンパク質は、再発性 GBM、脳転移、新たに診断された GBM、および特定の患者集団におけるびまん性内因性橋神経膠腫を含む GBM の治療に使用することができる。

【0427】

いくつかの実施形態では、がん生検および剖検試料は、成人および小児の CNS 腫瘍 (例えば、脳腫瘍) 由来である。いくつかの実施形態では、患者は、膠芽腫 (多形性膠芽腫 - GBM とも称される) を有する。いくつかの実施形態では、患者は、再発性 GBM を有する。いくつかの実施形態では、患者は、GBM からの脳転移を有する。いくつかの実施形

50

態では、患者は、新たに診断されたGBMを有する。いくつかの実施形態では、患者は、びまん性内因性橋神経膠腫を有する。いくつかの実施形態では、患者の腫瘍試料は、正常な成人および小児の脳組織におけるIL-4R発現がほとんどまたは全くないのと比較して、IL-4Rを過剰発現することが示されている（Puri et al., 1994a、Kawakami et al., 2002a、Joshi, et al., 2001、Konanbash et al., 2013）。理論に拘束されるものではないが、IL-4R標的を発現しない細胞は、MDNA55に結合せず、したがって、PE媒介性の影響を受けない（Kawakami et al., 2002）。

【0428】

いくつかの実施形態では、例えばMDNA55を含むIL-4標的化カーゴタンパク質は、増殖速度に依存しない腫瘍増殖死滅を誘導する（Li and Hall, 2010）。いくつかの実施形態では、静止がん細胞および／またはがん幹細胞、ならびに腫瘍微小環境（TME）のよりゆっくりと成長する非悪性細胞は、急速に分裂する腫瘍細胞と同じくらいMDNA55に対して感受性であり得る。

【0429】

いくつかの実施形態では、がん細胞は、O<sup>6</sup>-メチルグアニン-メチルトランスフェラーゼ（MGMT）陽性である。いくつかの実施形態では、がん細胞は、O<sup>6</sup>-メチルグアニン-メチルトランスフェラーゼ（MGMT）陰性である。いくつかの実施形態では、がん細胞は、メチル化MGMT遺伝子プロモーターを有する。いくつかの実施形態では、がん細胞は、非メチル化MGMT遺伝子プロモーターを有する。いくつかの実施形態では、O<sup>6</sup>-メチルグアニン-メチルトランスフェラーゼ（MGMT）陽性がん細胞（非メチル化MGMTプロモーターを有し、したがってテモゾロミドに耐性がある）は、MDNA55に感受性である。例示的な感受性CNSがん細胞株は、T98G（膠芽腫）を含み、MGMTを過剰発現することが示されている。このような細胞株は、テモゾロミドなどのアルキル化剤に耐性があるが（Huang et al., 2012、Kuo et al., 2007、Kokkinakis et al., 2003）、MDNA55に感受性であり得る。いくつかの実施形態では、メチル化されたMGMT遺伝子プロモーターを有するがん細胞は、MDNA55に感受性である。

【0430】

いくつかの実施形態では、IL-4R発現細胞株は、MDNA55に対してピコモル感受性を示す。例えば、Puri et al., 1996b、Kreitman et al., 1995、Shimamura et al., 2007を参照されたい。いくつかの実施形態では、IL-4R発現腫瘍は、本発明のIL-4標的化カーゴタンパク質に対してピコモル感受性を示す。いくつかの実施形態では、IL-4R発現腫瘍は、MDNA55に対してピコモル感受性を示す。いくつかの実施形態では、MGMT発現腫瘍は、本発明のIL-4標的化カーゴタンパク質に対して感受性を示す。いくつかの実施形態では、IL-4Rを発現する膠芽腫は、MDNA55に対して感受性を示す。いくつかの実施形態では、MGMTを発現する腫瘍は、MDNA55に対して感受性を示す。いくつかの実施形態では、MGMTを発現する膠芽腫は、MDNA55に対して感受性を示す。

【0431】

MDNA55のフューリン様のプロテアーゼ切断は、PE毒素の活性化をもたらす（Chironi et al., 1997、Shapira and Benhar, 2010）、膠芽腫はしばしばフューリンを発現する（Mercapide, et al., 2002、Wick et al., 2004）。正常細胞とは対照的に、神経膠腫細胞におけるフューリンのより高い発現レベルは、追加の腫瘍特異性を提供し、MDNA55に対するがん細胞の並外れたピコモル感受性の要因にも寄与する。いくつかの実施形態では、腫瘍はフューリンを発現する。いくつかの実施形態では、フューリンを発現する腫瘍は、正常な非腫瘍細胞よりも、MDNA55などのIL-4標的化カーゴタンパク質に対してより感受性である。

【0432】

IL-4Rは、CNS腫瘍だけでなく、免疫抑制性TMEの非悪性細胞（MDSCおよびTAM）によっても過剰発現している。いくつかの実施形態では、MDNA55を含むIL-4R IL-4標的化カーゴタンパク質は、悪性度が高い形態の原発性および転移性脳腫瘍を有する成人および小児患者の治療において使用を見出す。

#### 【0433】

GBMは、強力な免疫抑制TMEを有しており、腫瘍塊の最大40%を構成し得る（Kennedy et al., 2013）。最近、悪性神経膠腫は、Tヘルパー細胞2型（Th2）バイアスを有し、骨髄由来サプレッサー細胞（MDSC）および腫瘍関連マクロファージ（TAM）によって大きく浸潤され、IL4/IL-4Rバイアスがそれらの免疫抑制機能を媒介することが示された（Harshyne, et al., 2016）。さらに、IL-4Rは、神経膠腫浸潤骨髄細胞でアップレギュレートされるが、末梢または正常な脳ではアップレギュレートされない（Kohambash et al., 2013）。いくつかの実施形態では、MDNA55を含む本発明のIL-4標的化カーゴタンパク質を使用してTh2細胞、MDSC、およびTAMをパージすることは、がんに関連する免疫遮断（immune block）を緩和し得る。いくつかの実施形態では、免疫遮断の緩和は、抗腫瘍免疫を促進し、長期の疾患制御および／または疾患治療を助ける。

#### 【0434】

D. バイオマーカーまたはコンパニオン診断薬としてのIL-4R  
いくつかの実施形態では、IL-4R（「IL4R」とも称される）発現のレベルは、治療レジメンの決定ならびに治療効果の予測または決定において使用するためのバイオマーカーまたはコンパニオン診断薬として使用することができる。いくつかの実施形態では、2型IL-4R（IL-4RαおよびIL-13Rα1を含む、II型IL-R4）発現のレベルは、治療レジメンの決定、ならびに治療有効性の予測または決定に使用するためのバイオマーカーまたはコンパニオン診断薬として使用することができる。いくつかの実施形態では、IL-4Rαは、腫瘍細胞の細胞質において反応性である。しかしながら、IL-4Rαは血清で観察され、正常細胞および正常組織成分の細胞質で時折観察される。

#### 【0435】

いくつかの実施形態では、IL-4R発現のレベルは、IL-4Rα発現を測定することによって決定される。いくつかの実施形態では、IL-4Rα発現のレベルを含むIL-4R発現のレベルは、委員会認定の病理医によってスコア付けされる。いくつかの実施形態では、2型IL-4R（IL-4RαおよびIL-13Rα1を含む、II型IL-R4）の発現レベルは、IL-4Rα発現を測定することによって決定される。いくつかの実施形態では、2型IL-4R（IL-4RαおよびIL-13Rα1を含む、II型IL-R4）の発現のレベルは、委員会認定の病理医によってスコア付けされる。

#### 【0436】

悪性腫瘍細胞のスコア付けには、以下に説明するように、パーセントスコアおよびHスコア（差次的強度で記録されたパーセンテージから導かれる）の2つの主要な構成要素がある。いくつかの実施形態では、明らかに非腫瘍性である細胞で観察された任意のIL-4Rα染色を除外することができる。いくつかの実施形態では、細胞質腫瘍細胞の染色が認められれば、悪性細胞はIL-4Rαを発現しているとみなす。

#### 【0437】

パーセントスコア法

パーセントスコアは、 $\geq 1+$ 、 $\geq 2+$ 、または $\geq 3+$ のいずれかの腫瘍細胞の強度のパーセンテージを合計することによって計算される。したがって、スコアは0～100の範囲である。

●パーセントスコア $\geq 1+$  = (1+での%) + (2+での%) + (3+での%)

●パーセントスコア $\geq 2+$  = (2+での%) + (3+での%)

●パーセントスコア $\geq 3+$  = (3+での%)

10

20

30

40

50

## 【0438】

いくつかの実施形態では、高レベルのIL-4R発現は、2+以上のパーセントスコアによって示される。いくつかの実施形態では、高レベルのIL-4R発現は、3+以上のパーセントスコアによって示される。

## 【0439】

いくつかの実施形態では、中程度レベルのIL-4R発現は、1+以上であるが2未満のパーセントスコアによって示される。

## 【0440】

いくつかの実施形態では、検出不可能なレベルのIL-4R発現は、0パーセントスコアによって示される。いくつかの実施形態では、低レベルのIL-4R発現は、1+以上のパーセントスコアによって示される。

10

## 【0441】

## Hスコア法

Hスコアは、発現強度（茶色染色）を有する腫瘍細胞のパーセンテージに、それらの対応強度である4点の半定量的スケール（0、1+、2+、3+）を掛けたものを合計することによって計算される。したがって、スコアの範囲は0～300である。

●Hスコア = [ (<1での%) × 0 ] + [ (1+での%) × 1 ] + [ (2+での%) × 2 ] + [ (3+での%) × 3 ]

## 【0442】

パーセントスコア法およびHスコア法の両方において、4ポイントの半定量的強度スケールは次のように説明される：0-ゼロ（null）、陰性または非特異的染色、1+-低いまたは弱い染色、2+-中程度または中位の染色、および3+-高いまたは強い染色。各強度でのパーセンテージは直接推定され、典型的には次のいずれか1つとして報告されるが、他の増分も使用することができる：0、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%。

20

## 【0443】

いくつかの実施形態では、IL-4R発現レベルなしから低レベルのIL-4R発現は、0～75のHスコアによって示される（例えば、発現なしから低発現）。

## 【0444】

いくつかの実施形態では、中程度レベルのIL-4R発現は、76～150のHスコアによって示される（例えば、中程度の発現）。

30

## 【0445】

いくつかの実施形態では、高レベルのIL-4R発現は、151～225までのHスコアによって示される（例えば、高発現）。

## 【0446】

いくつかの実施形態では、高レベルのIL-4R発現は、226～300までのHスコアによって示される（例えば、非常に高い発現）。

## 【0447】

いくつかの実施形態では、中程度または高レベルのIL-4R発現は、Hスコア>75によって示される。いくつかの実施形態では、中程度または高レベルのIL-4R発現は、76～300のHスコアによって示される。いくつかの実施形態では、中程度または高レベルのIL-4R発現は、80～300のHスコアによって示される。いくつかの実施形態では、中程度または高レベルのIL-4R発現は、90～300のHスコアによって示される。いくつかの実施形態では、中程度または高レベルのIL-4R発現は、95～300のHスコアによって示される。いくつかの実施形態では、中程度または高レベルのIL-4R発現は、100～300のHスコアによって示される。いくつかの実施形態では、中程度または高レベルのIL-4R発現は、105～300のHスコアによって示される。いくつかの実施形態では、中程度または高レベルのIL-4R発現は、110～300のHスコアによって示される。いくつかの実施形態では、中程度または高レベルのIL

40

50

40

50

時折、GBM試料を含むがん試料には、良性組織全体にわたるバックグラウンドIL-4

R $\alpha$  染色が含まれる。存在する場合、そのような間質染色を1+、2+、または3+の平均強度スコアで捕捉し、腫瘍細胞の周囲に存在するバックグラウンド細胞質染色のレベルを記録した。存在しない場合、この値はNA（該当なし）として記録した。いくつかの実施形態では、高いバックグラウンド反応性は、腫瘍細胞でのより高いIL-4 R $\alpha$ 発現に寄与し得る。したがって、いくつかの実施形態では、悪性腫瘍細胞についての反応性スコアを評価するときに、間質染色スコアを考慮に入れる必要がある。

【0449】

#### E. キット

IL-4 Rの発現は、IHCまたはRT-PCR分析のいずれかを使用して検出することができる。いくつかの実施形態では、RT-PCRベースの方法および関連するキットを使用することができる。いくつかの実施形態では、検出のためのIL-4 R抗体ベースの方法および関連するキットを使用することができる。このようなキットで使用されるIL-4 Rに対する抗体には、市販の抗体および他の既知または開発されたIL-4 R抗体が含まれる。いくつかの実施形態では、IL-4 R抗体は、IL-4 R発現を検出するための免疫組織化学（IHC）ベースのアッセイにおいて使用することができる。いくつかの実施形態では、IL-4 Rは、IL-4 R $\alpha$ 鎖に対するモノクローナル抗体であり、Joshiら（Joshi BH, et al., In situ expression of interleukin-4 (IL-4) receptors in human brain tumors and cytotoxicity of a recombinant IL-4 cytotoxin in primary glioblastoma cell cultures. Cancer Res. 2001; 61: 8058-8061）は、IHCにより脳腫瘍組織の外科／生検試料における発現を評価した。GBM腫瘍の83%（Ichinose, M., et al., Cancer Res. 2002、およびJohnson H, et al., Mol. Cell Proteomics. 2012 Dec; 11 (12): 1724-40）は、IL-4 R $\alpha$ について中等度から強い陽性であり（Joshi BH, et al. In situ expression of interleukin-4 (IL-4) receptors in human brain tumors and cytotoxicity of a recombinant IL-4 cytotoxin in primary glioblastoma cell cultures. Cancer Res. 2001; 61: 8058-8061）、一方、11個の正常な脳試料のうちの11は、IL-4 Rについて検出可能な染色を示さず、これは腫瘍特異性を示している。

【0450】

いくつかの実施形態では、IL-4 Rのレベルは、本発明のIL-4 標的化カーゴタンパク質による治療的処置のために、IL-4 R陽性患者を選択するためのコンパニオン診断薬および／または予測マーカーとして使用することができる。いくつかの実施形態では、2型IL-4 R（IL-4 R $\alpha$ およびIL-13 R $\alpha$ 1を含む、II型IL-R4）のレベルは、本発明のIL-4 標的化カーゴタンパク質による治療的処置のために、IL-4 R陽性患者を選択するためのコンパニオン診断薬および／または予測マーカーとして使用することができる。

【0451】

いくつかの実施形態では、本発明は、IL-4 R発現を検出するためのキットを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、2型IL-4 R（IL-4 R $\alpha$ およびIL-13 R $\alpha$ 1を含む、II型IL-R4）発現を検出するためのキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、IL-4 R mRNA発現レベルのRT-PCRベースの検出のための構成要素を提供する。いくつかの実施形態では、キットは、IL-4 R発現を検出または測定するための免疫組織化学（IHC）ベースのアッセイのための構成要素を提供する。いくつかの実施形態では、キットは、IL-4 R抗体および免疫組織化学（IHC）ベースのアッセイにおいてIL-4 R抗体を使用するための指示書を含む。いくつかの実施形態では、キットは、パーセントスコアを決定するための指示書をさらに含む。い

いくつかの実施形態では、キットは、Hスコアを決定するための指示書をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、IL-4 R抗体、免疫組織化学（IHC）ベースのアッセイにおいてIL-4 R抗体を使用するための指示書、およびパーセントスコアを決定するための指示書を含む。いくつかの実施形態では、キットは、IL-4 R抗体、免疫組織化学（IHC）ベースのアッセイにおいてIL-4 R抗体を使用するための指示書、およびHスコアを決定するための指示書を含む。いくつかの実施形態では、キットは、IL-4 R $\alpha$ 抗体、免疫組織化学（IHC）ベースのアッセイにおいてIL-4 R $\alpha$ 抗体を使用するための指示書、およびパーセントスコアを決定するための指示書を含む。いくつかの実施形態では、キットは、IL-4 R $\alpha$ 抗体、免疫組織化学（IHC）ベースのアッセイにおいてIL-4 R $\alpha$ 抗体を使用するための指示書、およびHスコアを決定するための指示書を含む。

10

#### 【0452】

##### F. 対流強化送達（CED）

本発明は、治療薬を腫瘍に直接送達するためのCEDの使用を企図している。CEDは、Patel et al., Neurosurgery 56:1243-52, 2005（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。これにより、全身毒性を限定的にしながら、高い局所薬物濃度を達成することができる。この処置は、初期の臨床開発から安全性プロファイルが良好な第3相臨床試験まで、再発性GBMおよび他のCNS障害の治療に使用されてきた。いくつかの実施形態では、MDNA55は、対流強化送達（CED）によって腫瘍内送達される。いくつかの実施形態では、CEDは、一定の圧力下で頭蓋内カテーテル（腫瘍のサイズに応じて1つ以上）を介した直接注入によって行われる。いくつかの実施形態では、これは1～7日の期間にわたる。MDNA55の総用量は、約90～100  $\mu$ gである。いくつかの実施形態では、投与量は、5  $\mu$ g～1mgの範囲内で調整することができる。いくつかの実施形態では、注入前、注入中、および注入後のMRI画像法を使用して、薬物分布および腫瘍応答を監視する。いくつかの実施形態では、対象／患者は、治療後、継続的に臨床評価およびMRIによって監視される。

20

#### 【0453】

いくつかの実施形態では、CEDは、IL-4標的化カーゴタンパク質をCNS腫瘍に投与するために使用される。いくつかの実施形態では、CEDは、CNS腫瘍の治療のためにMDNA55を投与するために使用される。いくつかの実施形態では、CEDは、GBMの治療のためにMDNA55を投与するために使用される。いくつかの実施形態では、CEDは、進行性および／または再発性GBMの治療のためにMDNA55を投与するために使用される。

30

#### 【0454】

いくつかの実施形態では、CEDプロセスは、カテーテル留置を決定するために、プランニング高精度プランニングソフトウェア（例えば、iPlan（登録商標）フロー注入バージョン3.0.6、Brainlab AG）を使用する。いくつかの実施形態では、CEDプロセスは、脳での使用のために特別に設計されたカテーテルを使用する。いくつかの実施形態では、CEDプロセスは、意図された送達部位からの薬物漏出を起こしやすい大直径の心室カテーテルを使用しない（例えば、3を参照されたい）。

40

#### 【0455】

いくつかの実施形態では、CEDプロセスは、代理トレーサー、例えば、磁気共鳴画像法（MRI）造影剤の共注入を含み、腫瘍および浸潤境界の十分なカバーを確実にするMDNA55分布のリアルタイム監視を可能にする。

#### 【0456】

いくつかの実施形態では、代理トレーサー分子は、任意の磁気共鳴画像トレーサーを含むことができるが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、代理トレーサーは、ガドリニウム結合トレーサーである。いくつかの実施形態では、代理トレーサーは、ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸[Magnevist（登録商標）][Gd-DT

50

PA] (Bayer Healthcare Pharmaceuticals, Inc. から市販されている)、およびガドリニウム結合アルブミン (Gd-アルブミン) からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、CED中に使用される代理トレーサーは、薬物分布の効果的なリアルタイム監視を可能にする。いくつかの実施形態では、リアルタイム監視は、例えばMDNA55を含む、IL-4標的化カーゴタンパク質による腫瘍および腫瘍周囲の浸潤外縁の適切な包含を確実にすることを可能にする。いくつかの実施形態では、標的化カーゴタンパク質が脳腫瘍などの腫瘍に治療用量で安全に送達され、その分布をリアルタイムで監視するかどうかを決定するために、代理トレーサーは、標的化カーゴタンパク質と組み合わせて投与することができる。

【0457】

CEDおよび代理トレーサーの詳細については、例えば、Chittiboina et al., 2014、Jahangiri et al., 2016、およびMurad et al., Clin. Cancer Res. 12 (10): 3145-51, 2006) (これらはすべて、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) を参照されたい。

【0458】

#### G. 監視治療

IL-4標的化カーゴタンパク質を利用した治療の影響を評価するために、がん細胞および／またはがん幹細胞を検出および／または定量化することができる当該技術分野の通常の技術者に既知である、任意のインビトロまたはインビボ (エクスピボ) アッセイを使用して、がん細胞および／またはがん幹細胞を監視することができる。これらの方法を使用して、研究環境および臨床環境での影響を評価することができる。次いで、これらのアッセイの結果を使用して、標的化部分、カーゴタンパク質を変更するか、または対象の治療を変更してもよい。がん細胞および／またはがん幹細胞を同定するためのアッセイは、Stassiらの米国特許出願第2007/0292389号 (参照により本明細書に組み込まれる) に提供されている。

【0459】

がん細胞および／またはがん幹細胞は、通常、腫瘍細胞の亜集団である。がん細胞および／またはがん幹細胞は、細胞培養または対象に由来する生体試料 (腫瘍試料など) に見られる。水、塩、グリセリン、グルコース、抗菌剤、パラフィン、化学安定剤、ヘパリン、抗凝固剤、または緩衝剤などの様々な化合物を試料に添加することができる。試料には、血液、血清、尿、骨髄、または間質液が含まれ得る。別の例では、試料は組織試料である。特定の例では、組織試料は、乳房、脳、皮膚、結腸、肺、肝臓、卵巣、脾臓、前立腺、腎臓、骨または皮膚組織である。特定の例では、組織試料は、正常組織または腫瘍組織の生検である。対象から採取される生体試料の量は、生体試料の種類および使用される検出方法によって変動する。特定の例では、生体試料は、血液、血清、尿、または骨髄であり、対象から採取される血液、血清、尿、または骨髄の量は、0.1 mL、0.5 mL、1 mL、5 mL、8 mL、10 mLまたはそれ以上である。別の例では、生体試料は組織であり、対象から採取された組織の量は、10ミリグラム未満、25ミリグラム未満、50ミリグラム未満、1グラム未満、5グラム未満、10グラム未満、50グラム未満、または100グラム未満である。

【0460】

試験試料は、IL-4標的化カーゴタンパク質により治療された対象に由来する試料であり得る。試験試料には、対照試料も含め得る。いくつかの例では、対照試料は、IL-4標的化カーゴタンパク質による治療前の対象から得られ、他の例では、試験試料は、IL-4標的化カーゴタンパク質により治療された対象内の異なる場所から採取することができる。対照試料はまた、人工的に培養された細胞から誘導することができる。試料は、試料中のがん幹細胞集団の検出および／または測定の前に、1つ以上の前処理工程に供することができる。特定の例では、生体液は、遠心分離、濾過、沈殿、透析、もしくはクロマトグラフィーによって、またはそのような前処理工程の組み合わせによって前処理される

10

20

30

40

50

。他の例では、組織試料は、凍結、化学固定、パラフィン包埋、脱水、透過処理、もしくは均質化後の遠心分離、濾過、沈殿、透析、もしくはクロマトグラフィーによって、またはそのような前処理工程の組み合わせによって前処理される。特定の例では、試料は、試料から幹細胞もしくはがん細胞および／もしくはがん幹細胞以外の細胞を除去することによって、または試料中のがん細胞および／もしくはがん幹細胞の量を決定する前に試料から破片を除去することによって前処理される。

#### 【0461】

特定の例では、対象または対象由来の試料中のがん細胞および／またはがん幹細胞の量は、ベースラインを確立するために治療またはレジメンの前に評価される。他の例では、試料は、IL-4 標的化カーゴタンパク質を使用して治療された対象に由来する。いくつかの例では、試料は、対象が治療を開始または終了してから少なくとも約1、2、4、6、7、8、10、12、14、15、16、18、20、30、60、90日、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、または12ヶ月超の対象から採取される。特定の例では、がん細胞および／またはがん幹細胞の量は、特定の数の投与後（例えば、治療の2、5、10、20、30回またはそれ以上の投与後）に評価される。他の例では、がん細胞および／またはがん幹細胞の量は、1つ以上の治療を受けてから1週間、2週間、1ヶ月、2ヶ月、1年、2年、3年、4年以上後に評価される。

10

#### 【0462】

がん細胞および／またはがん幹細胞の標的は、正常な非がん性細胞でも発現される。したがって、いくつかの例では、がん細胞および／またはがん幹細胞の同定は、対照試料における標的結合から生成されるシグナルの相対量を比較し、それをがん細胞および／またはがん幹細胞の存在または非存在が決定されている試験試料と比較することによって行い得る。そのような例では、試料中のがん細胞および／またはがん幹細胞の数、量（quantity）、量（amount）、または相対量は、例えば、試料中の全細胞、全がん性細胞、または全幹細胞のパーセンテージとして表すことができる。

20

#### 【0463】

がん細胞および／もしくはがん幹細胞の存在および／または存在するがん細胞および／もしくはがん幹細胞の量についての試料の試験の結果は、使用される様々なIL-4 標的化カーゴタンパク質の変更を含む、治療レジメンを変更するために使用することができる。例えば、治療前後の試験により、がん細胞および／またはがん幹細胞の集団が増加した、および／または減少しなかったことが明らかになった場合、治療を変更することができる。例えば、治療薬の投与量を変更することができ、および／または別個の標的を標的化するように設計されたIL-4 標的化カーゴタンパク質に置き換えるか、もしくはそれを治療レジメンに追加することができる。

30

#### 【0464】

がん細胞および／またはがん幹細胞の量は、当業者に既知である標準的な技術を使用して監視／評価することができる。がん細胞および／またはがん幹細胞は、試料を取得して、試料中のがん細胞および／またはがん幹細胞を検出することにより、監視することができる。試料中のがん細胞および／またはがん幹細胞の量（例えば、全細胞または全がん細胞のパーセンテージとして表され得る）は、がん細胞および／またはがん幹細胞上の抗原の発現を検出することによって評価することができる。当業者に既知である任意の技術を使用して、がん細胞および／またはがん幹細胞の集団を評価することができる。抗原発現は、例えば、ウエスタンブロット、免疫組織化学、放射性免疫アッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射定量測定アッセイ、蛍光免疫アッセイ、免疫蛍光、プロテインA免疫アッセイ、フローサイトメトリー、およびFACS分析を含むがこれらに限定されない、免疫アッセイによってアッセイすることができる。そのような状況では、対象由来の試験試料中のがん細胞および／またはがん幹細胞の量は、結果を参照試料（例えば、検出可能ながんを有しない対象由来の試料）中の幹細胞の量、もしくは所定の参照範囲、またはより早い時点での患者自

40

50

身（例えば、治療前、または治療中）と比較することによって決定され得る。免疫アッセイの目的のために、がん幹細胞によって提示される標的のうちの1つ以上を免疫アッセイの標的として使用することができる。

【0465】

例えば、脳腫瘍細胞および／またはがん幹細胞は、CD133+標的、ならびに脳腫瘍細胞および／またはがん幹細胞上で発現されることが既知である他の標的を使用して同定することができる。追加の例示的なマーカーは、Sakarissen et al., Neoplasia 9(11):882-92, 2007およびVermeulen et al., Cell Death Differ. 15(6):947-58, 2008ならびに米国出願2008/0118518に見出すことができ、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0466】

いくつかの実施形態では、治療は、以下の次の項目で説明されるように、IL-4 Rバイオマーカー発現レベルを使用して監視することができる。

【0467】

#### H. 治療バリエーション

当業者は、がん細胞および／またはがん幹細胞上の標的が正常な健康細胞でも発現され得ることを理解するであろう。例えば、CD133は、原始造血幹細胞および前駆細胞ならびに網膜芽細胞腫で発現することが最初に示され、その後、がん細胞および／またはがん幹細胞で発現することが示された。したがって、がん幹細胞標的が非がん性細胞クラスで発現されるいくつかの例では、治療は、非がん性細胞の集団の除去、その後のがん幹細胞に対するIL-4標的化カーゴタンパク質治療、次いで、標的を発現する非がん性細胞の再導入を伴うことができる。

20

【0468】

別の例では、がん幹細胞集団の標的と同じ標的を発現する健康な細胞集団は、2つ以上のIL-4標的化カーゴタンパク質の使用によって保護される。第1のIL-4標的化カーゴタンパク質は、第1のがん幹細胞標的（例えば、CD133）を標的化するように設計される。第1のIL-4標的化カーゴタンパク質に含まれるカーゴタンパク質は、不活性型の毒素であり得る。第2のIL-4標的化カーゴタンパク質は、第2のがん幹細胞標的（CD24など）を標的化するように設計される。この第2のIL-4標的化カーゴタンパク質は、第1のIL-4標的化カーゴタンパク質を活性化することができるタンパク質配列を含む。したがって、第1のIL-4標的化カーゴタンパク質および第2のカーゴタンパク質の両方の標的を発現するがん幹細胞のみが、カーゴ部分の治療活性を受ける。

30

【0469】

別の治療上のバリエーションでは、対象は、がん幹細胞上に提示された標的に対するアゴニストにより治療される。次いで、がん細胞および／またはがん幹細胞は、増加したレベルの標的を提示する。次いで、アゴニストによる治療を、IL-4標的化カーゴタンパク質の投与前、投与中、または投与後に投与することができる。当業者は、投与の正確なタイミングが、選択された特定のアゴニストおよび特定のIL-4標的化カーゴタンパク質に依存することを理解するであろう。

40

【0470】

#### I. 変異体IL-4遺伝子産物の発現

上記の核酸分子は、例えば、ベクターで形質導入された細胞においてそれらの発現を指示することができるベクター内に含まれ得る。したがって、対象IL-4ムテインに加えて、対象IL-4ムテインをコードする核酸分子を含有する発現ベクターおよびこれらのベクターでトランスフェクトされた細胞は、好ましい実施形態に含まれる。

【0471】

もちろん、すべてのベクターおよび発現制御配列が、本明細書に記載のDNA配列を発現するために同等に首尾よく機能するとは限らないことを理解されたい。また、すべての宿主が同じ発現系で同等に首尾よく機能するとは限らない。しかしながら、当業者は、過度

50

の実験を行うことなく、これらのベクター、発現制御配列および宿主の中から選択することができる。例えば、ベクターを選択する場合、ベクターは宿主中で複製するため、宿主を考慮する必要がある。ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、および抗生物質マーカーなど、ベクターによってコードされた他のタンパク質の発現も考慮する必要がある。例えば、使用できるベクターには、IL-4ムテインをコードするDNAをコピー数で増幅できるものが含まれる。そのような増幅可能なベクターは、当該技術分野で既知である。それらには、例えば、DHFR増幅（例えば、Kaufman, 米国特許第4,470,461号、KaufmanおよびSharp, “Construction of a Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis of Signals Utilized for Efficient Expression”, Mol. Cell. Biol., 2, pp. 1304-19 (1982)を参照されたい）またはグルタミンシンターゼ（「GS」）増幅（例えば、米国特許第5,122,464号および欧州公開出願第338,841号を参照されたい）により増幅できるベクターが含まれる。

10

【0472】

いくつかの実施形態では、本開示のヒトIL-4ムテインは、ベクター、好ましくは発現ベクターから発現されるであろう。ベクターは、宿主細胞における自律複製に有用であるか、または宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより宿主ゲノムとともに複製される（例えば、非エピソード哺乳類ベクター）ことができる。発現ベクターは、作動可能に連結されているコーディング配列の発現を指示することができる。一般的に、組換えDNA技術で有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミド（ベクター）の形態である。しかしながら、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）などの他の形態の発現ベクターも含まれる。

20

【0473】

例示的な組換え発現ベクターは、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択され、発現される核酸配列に作動可能に連結された、1つ以上の調節配列を含むことができる。

【0474】

発現構築物またはベクターは、原核生物または真核生物の宿主細胞におけるIL-4ムテインまたはそのバリエーションの発現のために設計することができる。

【0475】

ベクターDNAは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術により、原核細胞または真核細胞に導入できる。宿主細胞の形質転換またはトランスフェクションに適した方法は、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.) および他の標準的な分子生物学実験マニュアルにおいて見出され得る。

30

【0476】

原核生物におけるタンパク質の発現は、構成的または誘導可能なプロモーターを含有するベクターを用いて大腸菌 (*Escherichia coli*) で最も頻繁に実施される。E. coliにおける組換えタンパク質発現を最大化するための戦略は、例えば、Gottesman (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, Calif.), pp. 119-128 および Wada et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20: 2111-2118 において見出され得る。IL-4ムテインまたはそのバリエーションを細胞から成長、収穫、破壊、または抽出するプロセスは、例えば、米国特許第4,604,377号、第4,738,927号、第4,656,132号、第4,569,790号、第4,748,234号、第4,530,787号、第4,572,798号、第4,748,234号、第4,931,543号に実質的に記載されており、これらは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

50

## 【0477】

いくつかの実施形態では、組換えIL-4ムテインまたはその生物学的に活性なバリエーションは、酵母またはヒト細胞などの真核生物で作製することもできる。好適な真核生物宿主細胞には、昆虫細胞（培養昆虫細胞（例えば、Sf9細胞）でタンパク質の発現に利用できるバキュロウイルスベクターの例には、pAcシリーズ（Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165）およびpVLシリーズ（Lucklow and Summers (1989) Virology 170:31-39）が含まれる）；酵母細胞（酵母*S. cerevisiae*での発現用ベクターの例には、pYepSec1（Baldari et al. (1987) EMBO J. 6:229-234）、pMFa（Kurjan and Herskowitz (1982) Cell 30:933-943）、pJRY88（Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123）、pYES2（Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.）、およびpPicZ（Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.）が含まれる）；または哺乳動物細胞（哺乳動物発現ベクターには、pCDM8（Seed (1987) Nature 329:840）およびpMT2PC（Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187:195））が含まれる）が含まれる。適切な哺乳動物細胞には、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞が含まれる。哺乳動物細胞では、発現ベクターの制御機能は多くの場合ウイルス調節要素によって提供される。例えば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。原核細胞および真核細胞の両方に適した他の発現系については、Chapters 16および17、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.)を参照されたい。Goeddel (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, Calif.)を参照されたい。

10

20

## 【0478】

本開示のヒトIL-4ムテインをコードする配列は、目的の宿主細胞における発現のために最適化され得る。配列のGC含有量は、宿主細胞で発現している既知の遺伝子を参照して計算されるような、特定の細胞宿主の平均レベルに調整できる。コドン最適化の方法は、当該技術分野で既知である。IL-4ムテインコード配列内のコドンは、宿主細胞での発現を高めるように最適化することができ、結果として、コード配列内のコドンの約1%、約5%、約10%、約25%、約50%、約75%、または最大100%が、特定の宿主細胞での発現のために最適化される。

30

## 【0479】

使用に好適なベクターには、細菌用のT7に基づくベクター（例えば、Rosenberg et al., Gene 56:125, 1987）を参照されたい）、哺乳動物細胞での使用のためのpMSXND発現ベクター（Lee and Nathans, J. Biol. Chem. 263:3521, 1988）、および昆虫細胞での使用のためのバキュロウイルス由来のベクター（例えば、Clontech, Palo Alto, Calif.からの発現ベクターpBacPAK9）が含まれる。

40

## 【0480】

いくつかの実施形態では、そのようなベクター中の対象IL-4ムテインをコードする核酸挿入物は、例えば、発現が求められる細胞型に基づいて選択されるプロモーターに作動可能に連結することができる。

## 【0481】

発現制御配列を選択する際には、様々な要因も考慮する必要がある。これらには、例えば、特に潜在的な二次構造に関して、配列の相対的強度、その制御性、および対象IL-4

50

ムテインをコードする実際のDNA配列との適合性が含まれる。宿主は、選択されたベクターとの適合性、本発明のDNA配列によってコードされる産物の毒性、分泌特性、ポリペプチドを正しく折りたたむ能力、発酵または培養要件、およびDNA配列によってコード化された産物の精製容易さを考慮して選択されるべきである。

#### 【0482】

これらのパラメータ内で、当業者は、例えばCHO細胞またはCOS7細胞を使用して、発酵または大規模動物培養で所望のDNA配列を発現する様々なベクター／発現制御配列／宿主の組み合わせを選択することができる。

#### 【0483】

いくつかの実施形態では、発現制御配列および発現ベクターの選択は、宿主の選択に依存し得る。多種多様な発現宿主／ベクターの組み合わせを使用することができる。真核生物宿主に有用な発現ベクターには、例えば、SV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス、およびサイトメガロウイルス由来の発現制御配列を含むベクターが含まれる。細菌宿主に有用な発現ベクターには、colE1、pCRI、pER32z、pMB9、およびそれらの誘導体を含むE. coli由来のプラスミドなどの細菌プラスミド、より広範な宿主プラスミド、例えば、RP4、phage DNA、例えば、ファージラムダの多数の誘導体、例えば、NM989、および他のDNAファージ、例えば、M13および糸状一本鎖DNAファージが含まれる。酵母細胞に有用な発現ベクターには、2μプラスミドおよびその誘導体が含まれる。昆虫細胞に有用なベクターには、pVL941およびpFastBac（商標）1（GibcoBRL、Gaithersburg、Md）Cate et al., "Isolation Of The Bovine And Human Genes For Mullerian Inhibiting Substance And Expression Of The Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, pp. 685-98 (1986)が含まれる。

#### 【0484】

さらに、これらのベクターでは、様々な任意の発現制御配列を使用できる。そのような有用な発現制御配列には、前述の発現ベクターの構造遺伝子に関連する発現制御配列が含まれる。有用な発現制御配列の例には、例えば、SV40またはアデノウイルスの初期および後期プロモーター、lac系、trp系、TACまたはTRC系、ファージラムダの主要なオペレーターおよびプロモーター領域、例えば、PL、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の解糖酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター、例えば、PhoA、酵母のα-交配系のプロモーター、バキュロウイルスの多面体プロモーター、および原核細胞または真核細胞またはそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御するために知られている他の配列、ならびにそれらの様々な組み合わせが含まれる。

#### 【0485】

T7プロモーターは細菌で使用でき、ポリヘドリンプロモーターは昆虫細胞で使用でき、サイトメガロウイルスまたはメタロチオネインプロモーターは哺乳類細胞で使用できる。また、高等真核生物の場合、組織特異的および細胞型特異的プロモーターが広く利用可能である。これらのプロモーターは、体内の所定の組織または細胞型で核酸分子の発現を指示する能力からそのように名付けられている。当業者は、核酸の発現を指示するために使用できる多くのプロモーターおよび他の調節要素を熟知しているだろう。

#### 【0486】

挿入された核酸分子の転写を促進する配列に加えて、ベクターは複製起点、および選択マーカーをコードする他の遺伝子を含むことができる。例えば、ネオマイシン耐性（neo<sup>r</sup>）遺伝子は、それが発現される細胞にG418耐性を付与し、トランスフェクトされた細胞の表現型選択を可能にする。当業者は、所定の調節要素または選択可能マーカーが特定の実験状況での使用に適しているかどうかを容易に決定することができる。

#### 【0487】

10

20

30

40

50

本発明で利用できるウイルスベクターには、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ベクター、ヘルペスウイルス、シミアンウイルス40 (SV40)、およびウシパピローマウイルスベクター (例えば、Gluzman (Ed.), Eukaryotic Viral Vectors, CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. を参照されたい) が含まれる。

【0488】

本明細書に開示される対象IL-4ムテインをコードする核酸分子を含有および発現する原核細胞または真核細胞も本発明の特徴である。本発明の細胞は、トランスフェクトされた細胞、すなわち核酸分子、例えば、変異体IL-4ポリペプチドをコードする核酸分子が組換えDNA技術によって導入された細胞である。そのような細胞の子孫も本発明の範囲内であるとみなされる。

10

【0489】

発現系の正確な成分は重要ではない。例えば、IL-4ムテインは、細菌E. coliなどの原核生物宿主において、または昆虫細胞 (例えば、Sf21細胞) もしくは哺乳動物細胞 (例えば、CHO、HEK293、COS細胞、NIH 3T3細胞、もしくはHeLa細胞) などの真核生物宿主において、産生させることができる。これらの細胞は、the American Type Culture Collection (Manassas, Va.) を含む多くの供給元から入手できる。発現系を選択する際に重要なのは、成分が相互に適合性があるかということのみである。専門家または当業者は、そのような決定を下すことができる。さらに、発現系の選択にガイダンスが必要な場合、当業者は、Ausubelら (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, N. Y., 1993) およびPouwelsら (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985 Suppl. 1987) を参考にしてもよい。

20

【0490】

発現されたポリペプチドは、通常の生化学的手順を使用して発現系から精製することができる。例えば、本明細書に記載の治療薬として使用することができる。

【0491】

いくつかの実施形態では、得られたIL-4ムテインは、ムテインを産生するために使用される宿主生物に応じてグリコシル化または非グリコシル化される。細菌が宿主として選択される場合、産生されるIL-4ムテインはグリコシル化されない。一方、真核細胞はIL-4ムテインをグリコシル化するが、おそらく天然IL-4がグリコシル化されるのと同じ方法ではない。形質転換された宿主によって産生されたIL-4ムテインは、任意の適切な方法に従って精製することができる。IL-4を精製するために様々な方法が知られている。例えば、Current Protocols in Protein Science, Vol. 2. Eds: John E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploehg, David W. Speicher, Paul T. Wingfield, Unit 6.5 (Copyright 1997, John Wiley and Sons, Inc. を参照されたい。IL-4ムテインは、陽イオン交換、ゲル濾過、および／または逆相液体クロマトグラフィーを使用して、E. coli中で産生された封入体から分離可能であり、または所定のムテインを産生する哺乳動物または酵母の培養液のいずれかからの馴化培地から分離可能である。

30

40

【0492】

IL-4ムテインをコードするDNA配列を構築する別の例示的な方法は、化学合成によるものである。これには、記載された特性を示すIL-4ムテインをコードするタンパク質配列の化学的手段によるペプチドの直接合成が含まれる。この方法は、IL-4とIL-4R $\alpha$ および／またはIL-13R $\alpha$ 1との相互作用に影響を与える位置に天然および非天然アミノ酸の両方を組み込むことができる。あるいは、所望のIL-4ムテインをコードする遺伝子は、オリゴヌクレオチド合成機を使用する化学的手段により合成すること

50

ができる。そのようなオリゴヌクレオチドは、所望の I L - 4 ムテインのアミノ酸配列に基づいて設計され、好ましくは、組換えムテインが産生される宿主細胞で好まれるコドンを選択する。これに関して、遺伝暗号が縮重していること、つまりアミノ酸が 2 つ以上のコドンによってコードされている可能性があることはよく認識されている。例えば、P h e ( F ) は、T I C または T T T の 2 つのコドンによってコード化され、T y r ( Y ) は、T A C または T A T によってコード化され、h i s ( H ) は、C A C または C A T によってコード化される。T r p ( W ) は、単一のコドン T G G によってコード化される。したがって、特定の I L - 4 ムテインをコードする所与の D N A 配列について、その I L - 4 ムテインをコードする多くの D N A 縮重配列が存在することが理解されよう。例えば、ムテイン H 9 の好ましい D N A 配列に加えて、示されている I L - 4 ムテインをコードする多くの縮重 D N A 配列が存在することが理解されよう。これらの縮重 D N A 配列は、本開示の範囲内であるとみなされる。したがって、本発明の文脈における「その縮重バリエーション」とは、特定のムテインをコードし、それにより発現を可能にするすべての D N A 配列を意味する。

10

#### 【0493】

I L - 4 ムテインの生物学的活性は、当該技術分野で既知である任意の好適な方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイには、P H A 芽球増殖および N K 細胞増殖が含まれる。

#### 【0494】

J. 抗 P D - 1 抗体および組み合わせ

20

本明細書に記載される発明および方法に従って使用するための抗 P D - 1 抗体には、ニボルマブ、B M S - 9 3 6 5 5 8、M D X - 1 1 0 6、O N O - 4 5 3 8、A M P 2 2 4、C T - 0 1 1、および M K - 3 4 7 5 (ペンブロリズマブ)、セミプリマブ (R E G N 2 8 1 0)、S H R - 1 2 1 0 (C T R 2 0 1 6 0 1 7 5 および C T R 2 0 1 7 0 0 9 0)、S H R - 1 2 1 0 (C T R 2 0 1 7 0 2 9 9 および C T R 2 0 1 7 0 3 2 2)、J S - 0 0 1 (C T R 2 0 1 6 0 2 7 4)、I B I 3 0 8 (C T R 2 0 1 6 0 7 3 5)、B G B - A 3 1 7 (C T R 2 0 1 6 0 8 7 2)、ならびに米国特許公開第 2 0 1 7 / 0 0 8 1 4 0 9 号で列挙されている P D - 1 抗体を含むが、これらに限定されない。承認された 2 つの抗 P D - 1 抗体、ペンブロリズマブ (K e y t r u d a (登録商標); M K - 3 4 7 5 - 0 3 3)、およびニボルマブ (O p d i v o (登録商標); C h e c k M a t e 0 7 8 )、ならびに開発中のさらに多くのものが存在し、これらは本明細書に記載の組み合わせにおいて使用できる。例示的な抗 P D - 1 抗体配列は図 1 0 に示されており、これらのうちのいずれもが、本明細書に記載の I L - 4 との併用方法において使用することができる。

30

#### 【0495】

K. 抗 P D - L 1 抗体および組み合わせ

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の I L - 4 ムテインのいずれかを抗 P D - 1 抗体と組み合わせ使用することができる。3 つの承認された抗 P D - L 1 抗体、アテゾリズマブ (T E C E N T R I Q (登録商標); M P D L 3 2 8 0 A)、アベルマブ (B A V E N C I O (登録商標); M S B 0 0 1 0 7 1 8 C)、およびデュルバルマブ (M E D I 4 7 3 6)、ならびに開発中の他の抗 P D - L 1 抗体が存在する。多数の抗 P D - L 1 抗体が利用可能であり、またさらに多くのものが開発中であり、これらは本明細書に記載の抗 I L - 4 ムテインと組み合わせ使用することができる。いくつかの実施形態において、P D - L 1 抗体は、米国特許公開第 2 0 1 7 / 0 2 8 1 7 6 4 号、ならびに国際特許公開第 W O 2 0 1 3 / 0 7 9 1 7 4 (アベルマブ)、および W O 2 0 1 0 / 0 7 7 6 3 4 (または米国特許出願第 2 0 1 6 0 2 2 2 1 1 7 号、もしくは米国特許第 8, 2 1 7, 1 4 9 号; アテゾリズマブ) に記載されるものである。いくつかの実施形態において、P D - L 1 抗体は、配列番号 3 4 の重鎖配列、および配列番号 3 6 の軽鎖配列 (U S 2 0 1 7 / 2 8 1 7 6 4 から) を含む。いくつかの実施形態において、P D - L 1 抗体はアテゾリズマブ (T E C E N T R I Q (登録商標); M P D L 3 2 8 0 A; I M p o w e r 1 1 0

40

50

）である。いくつかの実施形態において、PD-L1抗体はアベルマブ（BAVENCIO（登録商標）；MSB0010718C）である。いくつかの実施形態において、PD-L1抗体はデュルバルマブ（MEDI4736）である。いくつかの実施形態では、PD-L1抗体は、例えば、アテゾリズマブ（IMpower133）、BMS-936559/MDX-1105、および／またはRG-7446/MPDL3280A、および／またはYW243.55.S70、ならびに本明細書の図11に提供される例示的な抗PD-L1抗体のいずれかを含む。

#### 【0496】

治療方法について本明細書で開示されるIL-4ムテインと組み合わせて使用するための抗PD-1抗体には、ニボルマブ、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、AMP224、CT-011、およびMK-3475が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0497】

L. 他の免疫療法の組み合わせ

本発明の方法に従って使用するための他の抗体および／または免疫療法には、イピリムマブ、トレメリムマブなどの抗CTLA4 mAb；BMS-936559/MDX-1105、MEDI4736、RG-7446/MPDL3280Aなどの抗PD-L1アンタゴニスト抗体；IMP-321などの抗LAG-3；CP-870, 893、ルカツムマブ、ダセツズマブなどの抗CD40 mAbを含む免疫刺激タンパク質を標的とするアゴニスト抗体；BMS-663513ウレウマブ（抗4-1BB抗体；例えば、米国特許第7, 288, 638号および第8, 962, 804号を参照されたい。それらの全体は参照により本明細書に組み込まれる）などの抗CD137 mAb（抗4-1BB抗体）；リリルマブ（抗KIR mAb；IPH2102/BMS-986015；NK細胞阻害性受容体を阻止する）およびPF-05082566（ウトミルマブ；例えば、米国特許第8, 821, 867号；第8, 337, 850号；および第9, 468, 678号、ならびに国際特許出願公開第WO2012/032433号を参照されたい。それらの全体は参照により本明細書に組み込まれる）；抗OX40 mAb（例えば、WO2006/029879またはWO2010/096418を参照されたい。それらの全体は参照により本明細書に組み込まれる）；TRX518などの抗GITR mAb（例えば、米国特許第7, 812, 135号を参照されたい。その全体は参照により本明細書に組み込まれる）；ベリルマブCDX-1127などの抗CD27 mAb（例えば、WO2016/145085および米国特許公開第US2011/0274685号および第US2012/0213771号を参照されたい。それらの全体は参照により本明細書に組み込まれる）抗ICOS mAb（例えば、MEDI-570、JTX-2011、および抗TIM-3抗体（例えば、WO2013/006490または米国特許公開第2016/0257758号を参照されたい。それらの全体は参照により本明細書に組み込まれる））が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0498】

他の抗体には、前立腺がん、卵巣がん、乳がん、子宮内膜がん、多発性骨髄腫、黒色腫、リンパ腫、小細胞肺がんを含む肺がん、腎臓がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、および脳がんに対するモノクローナル抗体も含まれる（一般的にwww.clinicaltrials.govを参照されたい）。

#### 【0499】

M. 抗体にはまた、抗体依存性細胞媒介細胞傷害（ADCC）用の抗体が含まれる。治療の方法

いくつかの実施形態では、対象IL-4ムテイン、および／またはそれらを発現する核酸を対象に投与して、異常アポトーシスまたは分化プロセスに関連する障害（例えば、能動免疫または受動免疫を生じることによる、例えば、がんなどの細胞増殖性障害または細胞分化障害）を治療することができる。そのような疾患の治療において、開示されたIL-4ムテインは、血管漏出症候群の減少などの有利な特性を有し得る。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

では、IL-4 ムテインは、本明細書に開示される任意の IL-4 ムテインまたはバリエーションである。いくつかの実施形態では、IL-4 ムテイン配列は、本明細書に開示される配列のうちのいずれか1つと90%同一である。

#### 【0500】

細胞増殖および／または分化障害の例には、がん（例えば、がん腫、肉腫、転移性障害、または造血性腫瘍性障害、例えば、血病）が含まれる。転移性腫瘍は、前立腺がん、卵巣がん、乳がん、子宮内膜がん、多発性骨髄腫、黒色腫、リンパ腫、小細胞肺がんを含む肺がん、腎臓がん、肝臓がん、結腸がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、および脳がんのものを含むがこれらに限定されない多数の原発腫瘍型から生じる可能性がある。

#### 【0501】

変異体 IL-4 ポリペプチドを使用して、腎がん腫または黒色腫を含むあらゆる種類のがん、またはあらゆるウイルス性疾患を発症している、その発症が疑われる、または発症する危険性が高い患者を治療することができる。例示的ながん腫には、子宮頸部、肺、前立腺、乳房、頭頸部、結腸および卵巣の組織から形成されるものが含まれる。この用語にはがん肉腫も含まれ、これにはがん性および肉腫性組織で構成される悪性腫瘍が含まれる。

#### 【0502】

増殖性疾患の追加の例には、造血性腫瘍性疾患が含まれる。

#### 【実施例】

#### 【0503】

実施例1：IL-4 RAのアッセイおよびデータ

材料および方法

IL-4 R $\alpha$ の免疫組織化学的（IHC）染色では、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）標本中のインターロイキン4受容体タンパク質（IL-4 R $\alpha$ ）のアルファ鎖を検出することができる Abcam からのウサギポリクローナル抗体（カタログ# ab203398）（表2）を使用する。以下に簡単に概説するように、IHC手順には4つの工程がある。

#### 【0504】

工程1：FFPE組織ブロックを4～5  $\mu$ mの厚さに切断し、切片を正に帯電したキャピラリーギャップスライドガラス上に備え付ける。スライドを使用前に焼き付けする（60℃、乾熱）。

#### 【0505】

工程2：組織切片を、有機溶媒（100%キシレン、4回交換）および蒸留水へと落ちる一連のアルコール（100%、70%、30%エタノール）を使用して脱脂し、組織を十分に水和させ、一次抗体および他の検出試薬の適切な結合を可能にする。必要な場合、SHIER（蒸気熱誘導エピトープ回復）溶液および熱を使用して脱脂した後、抗原の回収を行う。IL-4 R $\alpha$ の場合、抗原のアンマスキング（unmasking）に寄与せず、結合のためにエピトープを曝露する必要がないため、熱およびSHIER溶液による抗原回収は使用されない（SHIERなしと称される）。

#### 【0506】

工程3：試料を空の顕微鏡スライドとペアにしてキャピラリーギャップを形成し、TechMate 機器プラットフォームおよびMIPプログラム（Proteinase Kによる酵素消化を含まない）を使用して、表1に概説される一般的な手順に従ってIHCによって試験する。抗体の連続的な検出は、抗原または一次抗体に対して高レベルの特異性でIHC中に使用される。一次抗体の位置は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）の存在下で抗原の部位に別個の不溶性反応生成物を沈殿させる、比色色原体（DAB）の適用によって最終的に視覚化される。細胞および組織の形態を評価するために、ヘマトキシリン（青色染色）を使用して核を対比染色する。

#### 【0507】

工程4：スライドをペアリングせず、蒸留水ですすぎ、一連のアルコール（70%、95%、100%エタノール）および有機溶媒（100%キシレン、4回交換）で脱水し、次

10

20

30

40

50

いで、説明および保管のために C y t o S e a l（または同等のもの）を使用して永久的にカバーガラスで覆う。スライドを顕微鏡で検査して、染色を評価する。

【0508】

脱脂後、QMLワークメイトソフトウェア v 3.96 を実行する T e c h M a t e I n s t r u m e n t ( R o c h e D i a g n o s t i c s ) を使用して、プロセス工程を自動化する。この自動化されたプラットフォームは、対比染色までおよびこれを含むすべての試薬交換、ならびに介在するバッファー洗浄のための、キャピラリーギャッププロセスを使用する。すべての工程は、25℃の室温 ( R T ) で行う。

【0509】

ヤギ血清を含む試薬製造バッファー ( R M B ) を使用して、I L - 4 R α 一次抗体、種一致陽性対照 (ウサギ C D 3 )、およびアイソタイプ一致陰性対照 (ウサギ I g G ) のワーキング希釈液を調製する。F F P E 切片中の抗原一次抗体相互作用の部位での I L - 4 R α の標的認識は、ウサギ一次抗体の検出用に設計された G B I 実験室からの P o l i n k - 2 P l u s H R P キットの検出試薬を使用する。抗体の仕様および I H C アッセイ条件については、表 2 を参照されたい。

【0510】

対照細胞株／組織および内部プロセス対照

I L - 4 R α 発現のための陽性対照は、以前に試験したホルマリン固定パラフィン包埋 ( F F P E ) S W 4 8 0 細胞株、および Q u a l T e k 組織バンクからのヒト多形性膠芽腫 ( G B M ) 組織 ( Q 1 3 6 0 - 3 ) を含んでいた。これらの試料は、QMLプロジェクト # 1 3 9 7 で試験したときに I L - 4 R α の高発現を示したため、本研究 ( QML プロジェクト # 1 4 2 1 ) に陽性対照として含められた。

【0511】

I L - 4 R α 発現の陰性対照は、以前に試験した F F P E H U V E C 細胞株 ( P 1 3 9 7 Q 0 0 0 1 )、および Q u a l T e k 組織バンクからの正常ヒト皮質組織 ( Q 2 9 0 8 ) を含んでいた。これらの試料は非反応性であるか、または試験したときに非常に低い I L - 4 R α 染色を示したため、本研究では陰性対照として含められた。

【0512】

対照組織において確立されたシグナル強度を有する種一致陽性対照 (標準抗体) を各実施で使用して、適切な検出試薬の性能を確認した。このプロジェクトの期間全体にわたって使用した標準的な陽性対照は、Q u a l T e k 組織バンクからの F F P E 対照扁桃腺組織で実施される C D 3 (ウサギ由来) であった。

【0513】

ウサギ I g G アイソタイプ一致陰性対照を使用して、検出試薬または組織に固有の任意の非特異的染色を決定し、これらの供給源由来の任意の可能なバックグラウンド反応性を定めるのに役立てた。I L - 4 R α アッセイでは、組織の前処理は不要であった。この研究では、陰性対照は、D A B 染色から色素を区別するのにも有用であった。ウサギ I g G アイソタイプ一致陰性対照染色の代表的な画像は、この報告の結果項目全体にわたる図において観察できる。

【0514】

ヒト試験組織

感受性試験のために、Q u a l T e k により、42 個のホルマリン固定パラフィン包埋 ( F F P E ) 試料を I L - 4 R α 発現についてスクリーニングした。すべての組織はヒト標本であった。1 つの試料 ( 1 7 1 3 - r g b m、0 5 2 2 0 6 4 3 C # # S ) は、多形性膠芽腫 ( G B M ) として確認できなかった。そのため、これは要約データ表に含めなかった。合計 41 個の試料が評価可能な G B M 標本であると決定された。これらの試料の一般的な説明を図 6 に示す。各 G B M 試料の詳細情報は、結果項目における感受性スコア表に含まれている。これらの試料のサブセット ( Q 1 3 6 0 - 3、Q 3 3 6 2、Q 9 4 6 7、Q 9 4 6 2、Q 9 4 6 4、Q 1 3 5 1 - 5、Q 1 3 4 8 - 1 ) をアッセイ転送 ( a s s a y t r a n s f e r ) および／または検証試験に使用した。

10

20

30

40

50

## 【0515】

IL-4R $\alpha$  特異性試験のために、FDA 多正常ヒト組織マイクロアレイ (FDA multi-normal human tissue microarray) (TMA) スライドを Pantomics, Inc (カタログ # MNO961) から購入した。TMA (P1421Q0001 と命名) には、35 個の異なる臓器または部位に由来する 96 個の異なる試料が含まれている。

## 【0516】

## スコア付けスキーム

IL-4R $\alpha$  は腫瘍細胞の細胞質で反応する。しかしながら、それは血清でも観察され、正常細胞および正常組織成分の細胞質でも時折観察される。腫瘍細胞で観察され、かつ、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 多形性膠芽腫 (GBM) 試料において IHC によって良性組織での間質バックグラウンドとして観察される、細胞質 IL-4R $\alpha$  染色のスコア付けに使用されるガイドラインは次のとおりである。

● IL-4R $\alpha$  の発現は、委員会認定の病理医によってスコア付けされる。悪性腫瘍細胞をスコア付けするための主な構成要素には、以下に説明するパーセントスコアおよび Hスコア (差次的強度で記録されたパーセンテージから導かれる) が含まれる。

● 可能な限り、パーセントスコア法および Hスコア法を使用して、明らかに悪性の腫瘍細胞 (大きな多形性細胞) のみが IL-4R $\alpha$  陽性についてスコア付けされる。すなわち、明らかに非腫瘍性である細胞で観察された任意の IL-4R $\alpha$  染色は除外される。形態学的には、GBM 試料の新生物細胞と非新生物細胞とを区別するのは難しい場合がある。

● 細胞質腫瘍細胞の染色が認められれば、悪性細胞は IL-4R $\alpha$  を発現しているとみなす。

● 存在する場合、腫瘍細胞周辺の良性組織で観察された細胞質バックグラウンド染色は、本明細書に記載されているように、間質シグナルの平均強度として捕捉される。

● GBM 試料全体の IL-4R $\alpha$  発現を完全に理解し、患者集団の層別化に役立てるために、標準のパーセントスコアおよび Hスコアの両方のアプローチを使用して、明らかに悪性である腫瘍細胞で観察された染色パターンを捕捉した。これらの方法を以下に説明する。

## 【0517】

## パーセントスコア法

パーセントスコアは、 $\geq 1+$ 、 $\geq 2+$ 、または  $\geq 3+$  のいずれかでの、腫瘍細胞における強度のパーセンテージを合計することによって計算される。したがって、スコアは 0 ~ 100 の範囲である。

● パーセントスコア  $\geq 1+ = (1+ \text{での} \%) + (2+ \text{での} \%) + (3+ \text{での} \%)$

● パーセントスコア  $\geq 2+ = (2+ \text{での} \%) + (3+ \text{での} \%)$

● パーセントスコア  $\geq 3+ = (3+ \text{での} \%)$

## 【0518】

## Hスコア法

Hスコアは、発現強度 (茶色染色) を有する腫瘍細胞のパーセンテージに、それらの対応強度である 4 点の半定量的スケール (0、1+、2+、3+) を掛けたものを合計することによって計算される。したがって、スコアは 0 ~ 300 の範囲である。

● Hスコア = [ $(<1 \text{ での} \%) \times 0$ ] + [ $(1+ \text{での} \%) \times 1$ ] + [ $(2+ \text{での} \%) \times 2$ ] + [ $(3+ \text{での} \%) \times 3$ ]

## 【0519】

パーセントスコア法および Hスコア法の両方において、4 ポイントの半定量的強度スケールは次のように説明される: 0-ゼロ、陰性または非特異的染色、1+-低いまたは弱い染色、2+-中程度または中位の染色、および 3+-高いまたは強い染色。各強度でのパーセンテージは直接推定され、典型的には次のうちのいずれか 1 つとして報告されるが、他の増分も使用することができる: 0、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、9

10

20

30

40

50

5、96、97、98、99、または100%。

#### 【0520】

時折、GBM試料は、良性組織全体のバックグラウンドIL-4R $\alpha$ 染色を含んでいた。存在する場合、そのような間質染色を1+、2+、または3+の平均強度スコアで捕捉し、腫瘍細胞の周囲に存在するバックグラウンド細胞質染色のレベルを記録した。存在しない場合、この値はNA（該当なし）として記録した。高いバックグラウンド反応性は、腫瘍細胞におけるより高いIL-4R $\alpha$ 発現に寄与し得る。そのため、悪性腫瘍細胞の反応性スコアを評価する際には、間質染色スコアを考慮に入れる必要がある。

#### 【0521】

結果

CLIA実験室へのアッセイ転送

QualTek組織バンクからのホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）多形性膠芽腫（GBM）試料を、実験室間のCAP/CLIA一致試験に使用した。IL-4R $\alpha$ 染色の範囲（低い、中程度、高い）を示すために、4つの試料（Q1360-3、Q3362、Q9467、Q9462）を選択した。IL-4R $\alpha$  IHCアッセイを使用し、複数の実施者による反復試験を含む最初の精度および再現性試験の一部として、この試料セットを染色した。

#### 【0522】

差次的強度（0～3+）で染色された腫瘍細胞のパーセンテージを記録したHスコアおよびパーセントスコアアプローチを使用して、スライドをスコア付けした。このスコア付けは、GBM腫瘍の大きな感受性セットを検討する前、およびGBM適応症についての最終的なスコア付けスキームの前に行った。

#### 【0523】

QML-Newtown（非CLIA、GLP）およびQML-Santa Barbara（CAP/CLIA）で染色されたGBM試料を比較したスコア付けデータを図7に示す。この表には、GBM腫瘍細胞のHスコアおよび1+以上の強度のパーセントスコアが含まれている。

#### 【0524】

膠芽腫におけるCAP/CLIA感受性スクリーニング

合計42個のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）多形性膠芽腫（GBM）試料を、上記のIHCアッセイを使用してIL-4R $\alpha$ 感受性についてスクリーニングした。1つ試料は多形性膠芽腫（GBM）として確認できなかった。したがって、合計41の試料が評価可能なGBM標本であると判断された。

#### 【0525】

GBM適応症由来の代表的な試料セット全体の染色強度の範囲およびIL-4R $\alpha$ 反応性のパターンを理解するために、感受性スクリーニングを行った。すべての試料を、形態学的評価のためにH&Eで染色し、IL-4R $\alpha$ アッセイ条件に対応するウサギIgGアイソタイプ一致陰性対照を使用してIHCによって試験した。

#### 【0526】

上記のスコア付けスキームを使用して、このCAP/CLIA IL-4R $\alpha$ 感受性スクリーニングで42個の試料を評価した。スコア付けアプローチには、半定量的パーセントスコア[強度 $\geq$ 1+、 $\geq$ 2+、および $\geq$ 3+のパーセンテージを合計することによって計算され、0～100の範囲の値である]およびHスコア[各パーセンテージスコア（0～100%）に、対応する強度スコア（0、1+、2+、3+）を掛けた合計として計算され、0～300の範囲の値である]も含まれていた。一連の42個の組織におけるIL-4R $\alpha$ 反応性の完全なスコア付け結果を図7に示す。

#### 【0527】

GBM適応症における様々なレベルのIL-4R $\alpha$ 反応性の代表的な画像を図1に示す。この図には、バイオマーカーアッセイのための対応する代表的なウサギIgG陰性対照も含まれている。すべてのウサギIgGアイソタイプ陰性対照は、試験したGBM腫瘍の感

10

20

30

40

50

受性パネル全体にわたって非反応性であった。

#### 【0528】

潜在的な反応性閾値によってグループ化された41個の評価可能なGBM試料におけるIL-4R $\alpha$ 発現の要約された結果は、Hスコア値については図8Aの上部パネルに示され、1+以上の強度の染色パーセントについては図8Bの第2パネルに示され、2以上の強度の染色パーセントについては図8Cの第3パネルに示され、3以上の強度の染色パーセントについては図8Dの第4パネルに示されている。これらの表は、陽性の理論的閾値に基づいてデータを分け、患者集団の層別化に役立てることを意図としている。

#### 【0529】

試験したGBM試料のほとんどは、腫瘍細胞における中程度から高いIL-4R $\alpha$ 細胞質反応性を示した。Hスコア分析(表6)によると、GBM症例の95%(39/41)において50以上のHスコアが観察され、GBM症例の51%(21/41)において200以上のHスコアが観察され、GBM症例の24%(10/41)において250以上のHスコアが観察された。Hスコアによる追加の分類が表6に含まれており、他の閾値も考慮することができる。

#### 【0530】

パーセントスコア分析によると、GBM症例の95%は、腫瘍細胞の50%以上において1+以上の強度を有し(39/41)(表7)、GBM症例の71%は、腫瘍細胞の50%以上において2以上の強度を有し(29/41)(表8)、GBM症例の49%は、腫瘍細胞の50%以上において3+以上の強度を有した(20/41)(図8D)。パーセントスコアによる追加の分類は図8B~8Dに含まれており、他の閾値も考慮することができる。

#### 【0531】

この実施例で示されたIL-4R $\alpha$ 反応性の潜在的な閾値は、臨床試験のためのGBMにおけるIL-4R $\alpha$ 陽性の適切なカットオフの決定に役立った。

#### 【0532】

膠芽腫におけるCAP/CLIA精度および再現性(パートC)

感受性スクリーニングの結果は、GBMにおけるIL-4R $\alpha$  IHCアッセイの精度および再現性を試験するための適切な組織を同定するのに役立った。この検証のために、IL-4R $\alpha$ の高発現(Q9464)、中程度の発現(Q1351-5)、および低発現(Q1348-1、Q3362)を示す4つの腫瘍試料を使用のために選択した。

#### 【0533】

選択された各GBM試料を、図9のIHCアッセイに従って3重で実施し、IL-4R $\alpha$ (精度)については1回の実施とした。連続しない日に実施された2つの別々の実施では、同じ試料をIL-4R $\alpha$ を使用して3重で実施した。各染色の実施には、適切な陽性および陰性対照が含まれていた。(例えば、図10を参照されたい。)

#### 【0534】

IL-4R $\alpha$ についてのパーセントスコアアプローチを使用して、検証試料をスコア付けし、該アプローチでは、差次的強度の染色を決定した。GBMにおけるこの精度および再現性の試験の目的のため、腫瘍細胞の25%以上において染色強度が2+以上のIL-4R $\alpha$ 陽性のカットオフが使用された。すなわち、試料が25%以上の腫瘍細胞において2+または3+の強度の染色を示した場合、試料を陽性(POS)と称した。染色が存在しない場合、腫瘍細胞の25%未満に存在する場合、または1+の強度でのみ存在する場合、試料を陰性(NEG)と称した。

#### 【0535】

各複製は、各GBM組織に対して一致したかつ再現可能な細胞質IL-4R $\alpha$ 染色を示した(データは示していない)。対応するウサギIgG陰性対照(非反応性)の画像を含めた(データは示していない)。

#### 【0536】

IL-4R $\alpha$ のIHCアッセイについての検証の承認/拒否を、染色パターンの一致の評

価、半定量的スコアの統計分析、および一致 (agreement) / 一致 (concordant) 推定の割合によって決定した。

【0537】

完全な検証スコアの結果 (図10) は、すべてのGBM複製において観察されたIL-4Rα反応性の同等の細胞パターンを反映している。

【0538】

IL-4Rαの陽性測定に使用された基準点は、この実施例で使用された腫瘍の25%以上における2+以上の染色のカットオフであった。

【0539】

正常組織での特異性試験

標的に対するIL-4Rαの特異性を、FDA推奨の多正常ヒト組織の組織マイクロアレイ (TMA) を使用して記載されたIHC法で試験した。特異性試験に使用されるTMA (P1421Q0001と命名) は、Pantomics, Inc (カタログ#MNO961、多正常ヒト組織、FDA、96個の試料、3個体由来の35個の臓器/部位、1.5mm) から購入した。TMAの切片を、ヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) で組織学的に染色し、IL-4RαおよびウサギIgGでIHC染色した。

【0540】

多正常TMAのすべての染色スライドを上記のパーセントスコアおよびHスコア法を使用して評価し、(腫瘍ではなく) 正常組織成分を評価した。この特異性試験のスコア付けデータには、差次的強度、Hスコア、およびIL-4Rα染色が1+以上の細胞の合計パーセンテージが含まれる (図11A~11B)。正常ヒト組織におけるIL-4RαおよびウサギIgG (対応するアイソタイプ対照) 染色を示す代表的な一連の画像を得た (データは示していない)。

【0541】

全体として、IL-4Rαは、正常ヒト組織成分において陰性 (非反応性) または低い染色を示した。存在する場合、染色は、一般に1+強度のバックグラウンドレベルであった (Hスコア $\leq$ 50)。正常な乳房および正常な食道 (筋肉を含む) の管において低い染色が観察された。心臓の心筋、肝臓の肝細胞、胃の腺房細胞などのいくつかの正常組織成分において、2+強度 (Hスコア $\geq$ 90) の反応性を含むIL-4Rα染色のいくつかの上昇が観察された。このような染色は、IL-4Rα反応性の基礎レベルを反映し得る。ウサギIgGアイソタイプ一致陰性対照は、多正常TMAで実施され、試験されたすべての正常ヒト組織において非反応性であった。(データは表示されていない。)

【0542】

この特異性試験は、IL-4Rα抗体およびIHCアッセイが、バックグラウンドを超える閾値で腫瘍細胞中の標的に主として特異的であることを示している。IL-4Rαは、正常組織および腫瘍性組織成分において、一般的には低レベルで、反応性である場合がある。

【0543】

実施例2：膠芽腫のバイオマーカーおよび免疫療法の標的としてのIL-4受容体：局所投与されるIL-4誘導毒素であるMDNA55による予備的証拠

この実施例では、IL-4誘導毒素による治療のためのバイオマーカーとしてのIL-4受容体 (IL-4R) の使用について説明する。IL-4誘導毒素は、循環置換インターロキン-4 (cpIL-4) を含む腫瘍標的化ドメイン、およびPseudomonas外毒素A (PE) の触媒ドメインを含む腫瘍死滅「細胞毒性」ドメインを含み、この構築物はMDNA55とも称される。

【0544】

この実施例は、52人の再発性GBM患者での研究をさらに説明する。この研究は、次の4つのフェーズで構成される：

● 診断：遡及的IL-4R発現分析；1回目または2回目の再発時のGBM；KPS $\geq$ 70。

10

20

30

40

50

- プランニング：MRI－腫瘍のサイズおよび位置。最適なカテーテル軌道。
- 治療：画像誘導カテーテル留置；MDNA55分布のリアルタイム監視；低用量および高用量のコホート。
- フォローアップ：患者の安全（patient safety）；生存；腫瘍反応；生活の質；有効性とIL-4R発現との相関。

#### 【0545】

本研究では、MDNA55に起因する死亡なし。18～180  $\mu\text{g}$ の投与後の全身毒性なし。臨床的に重大な検査所見の異常なし。薬物関連の有害事象は、主に、GBMに特徴的な既存の神経障害（neurological deficit）の神経学的／悪化であり、一般的に標準的な手段で管理可能であった。この研究で以前に使用したMDNA55の2つの濃度（すなわち、1.5  $\mu\text{g}/\text{mL} \times 60\text{mL}$ 対3.0  $\mu\text{g}/\text{mL} \times 60\text{mL}$ ）と以前の研究で調査した一連のより高い濃度（最大15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の間で神経毒性の割合が異なるという証拠なし。GBMの最初の診断で得られたアーカイブ組織は、実施例1および以下でさらに詳細に記載されるように、免疫組織化学（IHC）により、IL-4R $\alpha$ 発現について分析される。

10

#### 【0546】

##### 序文

MDNA55は、再発性／進行性多形性膠芽腫（GBM）の治療のために開発されている。現在の治療パラダイムを使用すると、ほとんどのGBM患者は、標準的な一次治療後に腫瘍の再発／進行を経験する。再発性GBMを有する患者のための治療選択肢は非常に限られており、転帰は一般的に満足のものではない。具体的には、再発性または進行性GBMの化学療法レジメンは成功しておらず、利益なしに毒性を生じさせる（Weller et al., 2013）。これは主に、組織特異性の欠如およびその結果としての正常組織への毒性によるものであり、その結果、狭い治療指数となる。全生存期間が悲観的なままであるため、再発性GBMの治療には、より高い腫瘍特異性、より強力な細胞毒性メカニズム、および新しい送達技術を有する新しい抗がん様式が必要である。

20

#### 【0547】

MDNA55は、腫瘍細胞が正常細胞よりも薬剤の毒性作用に感受性である標的化治療アプローチを提供する、そのような新しい治療法の1つである。標的であるIL-4Rは、非常に様々なヒトのがん腫で頻繁かつ強力に発現するため、がん治療薬の開発に理想的であるが十分に活用されていない標的である。IL-4Rの発現レベルは、健常かつ正常な細胞の表面では低い、がん細胞では数倍に増加する。再発性GBM生検を含む、成人および小児の中枢神経系（CNS）腫瘍からのがん生検および剖検試料の大部分は、IL-4Rを過剰発現することが示されている。正常な成人および小児の脳組織においてIL-4Rの発現はほとんどまたは全くない（Joshi, et al., 2001；表1）。

30

#### 【0548】

IL-4Rのこの差次的発現は、MDNA55に広い治療域を提供する。この機能のみにより、MDNA55が、再発性GBおよびIL-4Rを過剰発現する他の中枢神経系腫瘍の治療に理想的な候補となる。IL-4R標的を発現しない細胞は、MDNA55に結合せず、したがって、PE媒介性の効果を受けない。

40

表 1 3 : 成人および小児の脳腫瘍および正常な脳における I L - 4 R 発現の要約

| がんの種類                     | 方法     | 生検試料<br>(N) | 結果<br>(陽性%)            | 参考文献                  |
|---------------------------|--------|-------------|------------------------|-----------------------|
| 脳腫瘍                       |        |             |                        |                       |
| 成人再発GB                    | IHC    | 25          | 96%                    | Merchantら<br>(未発表データ) |
| 新たに診断されたGB/再発<br>GB(一致ペア) | IHC    | 13/14       | 93%/93%                | Merchantら<br>(未発表データ) |
| 混合性成人神経膠腫                 | IHC    | 32          | 83%(GBM)<br>86%(星状細胞腫) | Joshiら、2001           |
| 成人GBM                     | RT-PCR | 21          | 76%                    | Puriら、1996            |
| 混合性小児神経膠腫                 | IHC    | 58          | 76%                    | Kawakamiら、2004        |
| 小児DIPG                    | IHC    | 17          | 71%                    | Berlowら、2018          |
| 髄芽腫                       | RT-PCR | 5           | 100%                   | Joshiら、2002           |
| 成人下垂体腺腫                   | RT-PCR | 30          | 100%                   | Chenら、2007            |
| 髄膜腫                       | RT-PCR | 35          | 77%                    | Puriら、2005            |
| 正常な脳                      |        |             |                        |                       |
| 正常な脳組織                    | IHC    | 3           | 0%                     | Joshiら、2001           |
| 正常な脳組織                    | RT-PCR | 6           | 0%                     | Puriら、1996a           |

10

20

30

40

50

## 【 0 5 4 9 】

## M D N A 5 5 臨床試験における I L - 4 R 分析

M D N A 5 5 第 2 b 相臨床試験におけるバイオマーカー評価の一部として、G B M の最初の診断時に得られたアーカイブ組織からの I L 4 受容体 ( I L - 4 R ) 発現の遡及的分析を行って、治療応答および患者の転帰に対する I L - 4 R バイオマーカーの役割を決定し、将来の臨床研究のための潜在的な患者選択戦略を導くのに役立たせる。この目的から、アーカイブ切除腫瘍組織／生検試料での I L - 4 R α バイオマーカーの発現を検出するための免疫組織化学 ( I H C ) ベースのアッセイが開発された。このアッセイは、単一サイトの C L I A 準拠のリファレンス実験室 ( Q u a l T e k M o l e c u l a r L a b o r a t o r i e s , S a n t a B a r b a r a , C A ) での使用について検証している。実施例 1 を参照されたい。

## 【 0 5 5 0 】

このアッセイでは、I L - 4 R α に対するウサギポリクローナル抗体 ( A b c a m , a b 2 0 3 3 9 8 ) を使用する。G B M 組織および正常皮質 ( 陰性対照 ) を染色するために抗 I L - 4 R α の段階希釈を使用して、抗体の範囲および直線性試験を評価した。6 つの異なる抗体濃度を試験し、アッセイでの使用に最適な濃度を決定した。特異性および感受性の試験は、一連の正常なヒト組織および組織バンクからの G B M の症例を使用して行った。

## 【 0 5 5 1 】

検証試験に基づいて、スコア付けアプローチを決定した：発現強度 ( 3 , 3 ' - ジアミノベンジン、D A B による茶色の染色 ) を有する腫瘍細胞のパーセンテージに、それらの対応強度である 4 点の半定量的スケール ( 0 、 1 + 、 2 + 、 3 + ) を掛けたものを合計することによって計算された H スコア法を使用して、各 G B M 試料を I L - 4 R α 発現についてスコア付けした。

## 【0552】

GBM試料は、Hスコア法を使用して、細胞質IL-4R $\alpha$ 反応性についてスコア付けされる：Hスコア = [ (<1での%) x 0 ] + [ (1+での%) x 1 ] + [ (2+での%) x 2 ] + [ (3+での%) x 3 ]。このアプローチを使用して、Hスコアは0～300の範囲であり、IL-4R発現のレベルを次のように分類した：

- 0～75のHスコア＝発現なしから低い発現
- 76～150のHスコア＝中程度の表現
- 151～225のHスコア＝高い発現
- 226～300のHスコア＝非常に高い発現

## 【0553】

IL-4R陰性＝Hスコア $\leq$ 75；IL-4R陽性＝Hスコア>75

## 【0554】

図10は、GBM組織における様々なレベルのIL-4R発現の代表的な画像を示している。

## 【0555】

本研究では、低いHスコア（Hスコア $\leq$ 75）の対象と比較して中程度から高いHスコア（Hスコア>75）の対象の間のベースラインパラメータの比較は、中程度／高いHスコアが再発までの時間が短くなることと関連していることを除き、一般的によく一致した（図17）。

## 【0556】

IL-4Rの発現はより悪性度が高い疾患および良好でない臨床転帰に関連しているため（Kohambash, et al., 2013、Han and Puri, 2018）、我々の研究における中程度／高いHスコアの対象に見られる最初の診断から再発までの時間が短くなることは、公表された発見と一致している。

## 【0557】

IL-4R状態による全生存期間

全生存期間でIL-4R Hスコアを評価する場合、中程度／高いHスコア（Hスコア>75）の対象は、低いHスコアの対象（（Hスコア $\leq$ 75；mOS＝8.5ヶ月）よりも生存期間が長い傾向を示す（mOS＝15.2ヶ月）（図19）。6、9、および12ヶ月の生存率も、低いHスコアの対象とは対照的に、中程度から高いHスコアの対象が高かった（表14）。

表14. IL-4R Hスコアによる本研究における対象の生存率

| IL-4R Hスコア<br>(範囲 0~300) | mOS<br>(n=24) | OS-6<br>(n=24) | OS-9<br>(n=24) | OS-12<br>(N=21) |
|--------------------------|---------------|----------------|----------------|-----------------|
| 0~75                     | 8.5 カ月        | 73%            | 36%            | 30%             |
| >75                      | 15.2 カ月       | 100%           | 69%            | 55%             |

## 【0558】

IL-4R状態による無増悪生存期間

PFSでIL-4R Hスコアを評価する場合、中程度／高いHスコアの対象は、低いHスコアの対象（mPFS＝1.9ヶ月）よりも長いPFSの傾向を示す（mPFS＝3.7ヶ月）（図22）。6、9、および12ヶ月のPFS率も、中程度から高いHスコアの対象がより高かった（表15）。

10

20

30

40

50

表 15. IL-4R Hスコアによる本研究における対象のPFS率

| IL-4R H スコア<br>(範囲 0~300) | mPFS<br>(n=24) | PFS-6<br>(n=24) | PFS-9<br>(n=24) | PFS-12<br>(n=21) |
|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| 0~75                      | 1.9 カ月         | 36%<br>(n=11)   | 0%<br>(n=11)    | 0%<br>(n=10)     |
| >75                       | 3.7 カ月         | 44%<br>(n=13)   | 35%<br>(n=13)   | 27%<br>(n=11)    |

10

## 【0559】

## 要約および結論

再発性GBMを有する患者の治療選択肢は非常に限られており、肯定的な結果は非常にまれなままである。IL-4Rは、GBMを含む様々なヒトのがん腫で頻繁かつ強力に発現しており、悪性度が高い疾患および低い生存率に関連している。MDNA55は、再発性GBMの単一治療として、MRI誘導対流強化送達により腫瘍内に投与される、新規なIL-4R標的化融合毒素である。特にMDNA55治療後に非常に良好な生存転帰を示すIL-4R陽性の対象において、低用量のMDNA55での臨床的利益の初期の証拠がある。最初のアプローチとして、Hスコアのカットオフポイントを実利的に決定し、治療データセットが拡充および成熟するにつれて、MDNA55治療からの治療利益と最もよく相関するように調整が必要になり得る。したがって、IL-4Rは、再発性GBMの合理的なバイオマーカーおよび免疫療法の標的として機能し得る。

20

## 【0560】

これは腫瘍細胞に対して強力な毒性があり、同時に腫瘍微小環境(TME)を取り除き、対流強化送達(CED)によりBBBをバイパスする。

## 【0561】

200超の分析された患者生検は、IL-4Rの過剰発現を示している(Joshi BH, et al. Cancer Res 2001; 61: 8058-8061, Puri RK, et al., Cancer Res 1996; 56: 5631-5637, Kawakami M, et al., Cancer. 2004 Sep 1; 101(5): 1036-42, Berlow NE, et al. PLoS One. 2018 Apr 5; 13(4): e0193565, Joshi BH, et al. British J of Cancer (2002) 86, 285-291, Chen L, et al. Neurosci Lett. 2007 Apr 24; 417(1): 30-5, およびPuri S, et al., Cancer. 2005 May 15; 103(10): 2132-42)。膠芽腫の76%; 混合性成人神経膠腫の83%超、混合性小児神経膠腫の76%; 小児DIPGの71%; 髄芽腫の100%; 成人下垂体腺腫の100%; 髄膜腫の77%; および0%の正常な脳組織。

30

## 【0562】

IL-4Rの存在は、GBM(膠芽腫)における低い生存率を予測する(例えば、Han J. and Puri R. J of Neuro-Oncology (2018) 136: 463-47を参照されたい)。

40

## 【0563】

TME浸潤MDSCは、IL-4Rを発現し、GBMにおける低い生存率も予測する(例えば、Kamran N, et al., (2017). Mol Ther 25: 232-248およびOtvos B et al., (2016). Stem Cells 34: 2026-2039を参照されたい)。

## 【0564】

GBMおよび他のIL-4R発現腫瘍に対する現在の治療法は、重要な課題、例えば、以

50

下に提供される課題に対処しておらず、該課題は、本実施例に提供される IL-4 構築物によって対処される。

表 16：課題

|                                        |                                                                  |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 治療上の課題                                 | MDNA55 の理論的根拠                                                    |
| GBM の 55% はテモダール耐性である 1                | MDNA55 はテモダール耐性腫瘍を標的化する 3                                        |
| 免疫抑制性腫瘍微小環境(TME)は GBM 腫瘍塊の 40% を構成する 2 | IL-4R は GBM およびその TME(骨髄由来 サプレッサー細胞)で過剰発現しているが、正常な脳では過剰発現していない 4 |
| 血液脳関門(BBB)は腫瘍への治療薬の輸送を遮断する             | MDNA55 の CED 注入による送達 は BBB をバイパスする                               |
| 全身毒性を引き起こす BBB に起因して高用量が必要である          | 正確な送達は全身曝露なしで高用量を達成する                                            |

1.Hegi ME(2005).N Engl J Med;352(10):997-1003.

2.Kennedy B,et al(2013).J Oncol.Vo;2013:486912.

3.Shimamura,et al.(2007.Cancer Res;67:9903-9912.

4.Kohanbash et al(2013).Cancer Res.;73(21):6413-23

10

20

#### 【0565】

再発性 GBM を有する患者の治療選択肢は非常に限られており、肯定的な結果は非常にまれなままである。

#### 【0566】

IL-4R は、GBM を含む様々なヒトのがん腫で頻繁かつ強力に発現しており、悪性度が高い疾患および低い生存率に関連している。

#### 【0567】

MDNA55 は、再発性 GBM の単一治療として、MRI 誘導対流強化送達により腫瘍内に投与される、新規な IL-4R 標的化融合毒素である。

30

#### 【0568】

低用量の MDNA55 での臨床的利益および生存率の改善の初期の証拠がある。

#### 【0569】

IL-4R+ の対象は、MDNA55 治療後に非常に良好な生存転帰を示す。

#### 【0570】

IL-4R は、再発性 GBM のバイオマーカーおよび免疫療法の標的として機能し得る。

#### 【0571】

参考文献

Berlow NE, Svalina MN, Quist MJ, Settelmeyer TP, Zherebitskiy V, Kogiso M, Qi L, Du Y, Hawkins CE, Hulleman E, Li XN, Gultekin SH, Kessler C. IL-13 receptors as possible therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. PLoS One. 2018 Apr 5;13(4):e0193565.

40

#### 【0572】

Chen L, Liu Y, Hou Y, Kato Y, Sano H, Kanno T. Expression and structure of interleukin 4 receptor (IL-4R) complex in human invasive pituitary adenomas. Neurosci Lett. 2007

50

Apr 24; 417 (1) : 30-5. Epub 2007 Mar 2.

[0573]

Han J and Puri RK. Analysis of the cancer genome atlas (TCGA) database identifies an inverse relationship between interleukin-13 receptor  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  gene expression and poor prognosis and drug resistance in subjects with glioblastoma multiforme. J Neurooncol. 2018 Feb; 136 (3) : 463-474.

[0574]

Joshi BH, Leland P, Asher A, Prayson RA, Varicchio F, Puri RK. In situ expression of interleukin-4 (IL-4) receptors in human brain tumors and cytotoxicity of a recombinant IL-4 cytotoxin in primary glioblastoma cell cultures. Cancer Res 2001; 61: 8058-8061.

[0575]

Joshi BH, Leland P, Silber J, Kreitman RJ, Pastan I, Berger M, Puri RK. IL-4 receptors on human medulloblastoma tumours serve as a sensitive target for a circular permuted IL-4-Pseudomonas exotoxin fusion protein. British Journal of Cancer (2002) 86, 285-291.

[0576]

Kawakami M, Kawakami K, Puri RK. Interleukin-4-Pseudomonas exotoxin chimeric fusion protein for malignant glioma therapy. J Neurooncol. 2003 Oct; 65 (1) : 15-25.

[0577]

Kohanbash G, McKaveney K, Sakaki M, Ueda R, Mintz AH, Amankulor N, Fujita M, Ohlfest JR, Okada H. GM-CSF promotes the immunosuppressive activity of glioma-infiltrating myeloid cells through interleukin-4 receptor- $\alpha$ . Cancer Res. 2013 Nov 1; 73 (21) : 6413-23.

[0578]

Lewis O, Woolley M, Johnson D, et al. Chronic, intermittent convection-enhanced delivery devices. J Neurosci Methods. 2016 Feb 1; 259 : 47-56.

[0579]

Puri RK, Hoon DS, Leland P, Snoy P, Rand RW, Pastan I, and Kreitman RJ. Preclinical development of a recombinant toxin containing circularly permuted interleukin 4 and truncated Pseudomonas exotoxin for therapy of malignant astrocytoma. Cancer Res 1

10

20

30

40

50

996;56:5631-5637.

【0580】

Puri S, Joshi BH, Sarkar C, Mahapatra AK, Hussain E, Sinha S. Expression and structure of interleukin 4 receptors in primary meningeal tumors. Cancer. 2005 May 15;103(10):2132-42.

【0581】

Vogelbaum MA, Brewer C, Barnett GH, et al. First-in-human evaluation of the Cleveland Multiport Catheter for convection-enhanced delivery of topotecan in recurrent high-grade glioma: results of pilot trial 1. J Neurosurg. 2018 Apr 1:1-10.

10

【0582】

Weller M, Cloughesy T, Perry J, Wick W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma—are we there yet? Neuro-Oncology 15(1):4-27, 2013.

20

【0583】

実施例3:MDNA55の第2B相再発性膠芽腫試験からの臨床データ—IL-4R陽性患者に現れる強力な中間生存傾向(15.2ヶ月対8.5ヶ月)

この実施例では、再発性膠芽腫(「rGBM」)の治療のためのMDNA55の進行中の第2b相試験からの中間データについて説明する。MDNA55は、GBM患者のほとんどで過剰発現しているが健康な脳では過剰発現していないバイオマーカーであるII型インターロイキン-4受容体(IL-4RαおよびIL-13Rα1からなる)を標的化するように設計された融合タンパク質である。陽性の2型IL-4Rプロファイルを有するGBM患者は、典型的には、低い長期生存など、膠芽腫集団全体よりも予後が不良である。結果は、特に悪性度が高い形態のGBMを有する再発患者において、臨床的利益の有望な兆候を実証している。

30

【0584】

MDNA55は、特にIL-4R陽性腫瘍、脳腫瘍および腫瘍微小環境で高度に発現し、悪性度が高い疾患に関連することが既知であるマーカーにおいて、非常に良好な長期生存を提供する。これまで低用量のMDNA55により治療された試験参加者に臨床的有益性の証拠が見られることは、この集団についての全体的な予後不良および現在の治療に対する反応を考えると、rGBMを有する患者に有望である。

【0585】

結果の要約

低用量のMDNA55による治療後、IL-4R陽性群は、IL-4R陰性群での8.5ヶ月と比較して、15.2ヶ月の全生存期間中央値(「mOS」)の顕著な増加を示した。6、9、および12ヶ月の生存率は、IL-4R陽性群および陰性群で、それぞれ100%、67%、および55%、対73%、40%、および30%であった。

40

【0586】

IL-4Rの発現に関係なく、mOSは低用量のMDNA55による単回治療後、すべての患者で11.8ヶ月であり、全生存率は6ヶ月で89%、9ヶ月で59%、12ヶ月で46%であり、rGBMの承認された薬剤について報告された画期的なmOSおよび生存率を超えていた(mOSは、アバスチンおよびロムスチンで8ヶ月であり、6、9、および12ヶ月での生存率は、それぞれ62%、38%、26%、および65%、43%、30%である)。(Taal et al, Lancet Oncol 2014 Aug;15(9):943-53.)

50

## 【0587】

上記の参加者では、IL-4R陽性腫瘍を有する患者は、IL-4Rの発現が低いか全くない患者（16.7ヶ月）と比較して、GBMの最初の診断後の再発までの時間が短い（10.3ヶ月）ことを示し、2型IL-4Rは、より悪性度が高い形態のGBMの重要なバイオマーカーであることを示す公表された研究を裏付けている。（Kohanbash G, McKaveney K, Sakaki M, Ueda R, Mintz AH, Amandulor N, Fujita M, Ohlfest JR, Okada H. GM-CSF promotes the immunosuppressive activity of glioma-infiltrating myeloid cells through interleukin-4 receptor- $\alpha$ . Cancer Res. 2013 Nov 1; 73 (21): 6413-23、および Han J and Puri RK. Analysis of the cancer genome atlas (TCGA) database identifies an inverse relationship between interleukin-13 receptor  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  gene expression and poor prognosis and drug resistance in subjects with glioblastoma multiforme. J Neurooncol. 2018 Feb; 136 (3): 463-474。）

10

## 【0588】

IL-4R発現が陽性のMDNA55治療を受けた対象の生存期間中央値が長いことを示すこれらの予備データは非常に有望であり、どの対象がMDNA55治療から最適な治療効果を楽しむかを決定するのに役立つ。我々の試験の後半は高用量のMDNA55で登録することを継続しているので、rGBMの重要なバイオマーカーおよび免疫療法の標的としてIL-4Rを裏付けし、かつ、MDNA55により治療された対象の利益リスクプロファイルを改善するデータが得られると予想される。MDNA55の安全性および認容性は、一般的に以前の研究で確立されたプロファイルの範囲内で維持されている。

20

## 【0589】

## MDNA55-05臨床試験

MDNA55-05は、化学療法なしでの外科手術および放射線療法を含む治療後、かつ、任意の以前の標準治療または試験治療の中止後の最初または2回目の再発（relapse）／再発（recurrence）（この再発を含む）での原発性（デノボ）GBMを有する患者における、IL-4R指向性（directed）毒素であるMDNA55の46人の対象の非盲検試験である。この研究では、研究者は、対流強化送達（CED）として既知である技術を使用して、MDNA55を脳腫瘍に直接1回だけ投与する。CEDにより、MDNA55を腫瘍組織および浸潤性腫瘍細胞を含む周囲の健康な脳に直接正確に送達できると同時に、身体他の部分への曝露を回避できる。最初の診断で得られたGBM組織の遡及的分析をIL-4Ra発現の免疫組織化学によって行う。生検試料は、IL-4Raの発現レベル（高または低）に基づいて分類され、生存結果と比較される。研究設計の要約を図23Aに示す。臨床試験に登録された患者の人口統計を図23Bに示す。

30

40

## 【0590】

投与されるMDNA55の用量は18~240  $\mu$ gの範囲である。MDNA55の安全性プロファイルは患者において評価され、最大耐性量は240  $\mu$ gであることが確立された。MDNA55に起因する死亡はなく、全身毒性は見られず、臨床的に重要な検査所見の異常は見出されず、MDNA55関連の有害事象は、主にGBMに特徴的な既存の神経障害の神経学的／悪化であり、一般的に標準的な手段で管理可能であった。

## 【0591】

MDNA55の投与後に患者の生存率を測定した。図24Aに示すように、最初の40人の登録患者の全生存期間の中央値（mOS）は11.6ヶ月であった。12ヶ月生存率（OS-12）は45%であった。40人の患者のうち36人もまた、IL-4R発現につ

50

いて評価した。図 2 4 B に示すように、I L - 4 R の発現が低い患者と比較して、I L - 4 R の発現が高い患者の生存率は改善した。I L - 4 R が高い患者の m O S は 1 5 ヶ月で、O S - 1 2 は 5 2 % であった。I L - 4 R が低い患者の m O S は 8 . 4 ヶ月で、O S - 1 2 は 3 3 % であった。データカットポイントは 2 0 1 9 年 1 0 月 3 1 日であった。

#### 【 0 5 9 2 】

O 6 - メチルグアニン - D N A メチルトランスフェラーゼ ( M G M T ) 遺伝子プロモーターのメチル化状態も、登録された最初の 4 0 人の患者のうちの 3 6 人で評価した。1 8 人の患者がメチル化 M G M T 遺伝子プロモーターを有することが見出され、2 0 人の患者が非メチル化 M G M T 遺伝子プロモーター有することが見出された。M G M T 遺伝子プロモーターのメチル化状態は、M D N A 5 5 治療後の生存率に有意な影響を与えなかった ( 図 2 5 A ) 。さらに、I L - 4 R 発現レベルを、非メチル化 M G M T 遺伝子プロモーターを有していた 2 0 人の患者のうちの 1 8 人で評価した。図 2 5 B に示すように、非メチル化 M G M T を有するが I L - 4 R 発現レベルが高い患者は、非メチル化 M G M T を有し、かつ I L - 4 R 発現レベルが低い患者と比較して、大幅に改善された生存率を示した。

10

#### 【 0 5 9 3 】

臨床試験に登録された患者の何人かは、M D N A 5 5 による治療中にステロイドを使用した。3 9 人の患者のうち、1 9 人は 4 m g / 日以上以上のステロイドを使用し、2 0 人は 4 m g / 日以下のステロイドを使用した。図 2 6 A に示すように、少ないステロイドの使用 ( 例えば、4 m g 以下 / 日 ) は、M D N A 5 5 治療後のより長い生存期間と関連する。4 m g 以下 / 日のステロイドを使用した 2 0 人の患者のうち、I L - 4 R 発現レベルが高い患者は、I L - 4 R 発現レベルが低い患者と比較して、生存率の改善を示した ( 図 2 6 B ) 。

20

#### 【 0 5 9 4 】

M D N A 5 5 治療後の反応のタイムラインは患者間で異なる。図 2 7 、図 2 8 、および図 2 9 は、M D N A 5 5 による治療後の応答の初期または後期の発症例を示している。M D N A 5 5 により治療された患者の 5 0 % ~ 8 2 % は、縮小または安定した腫瘍体積を示した ( 図 3 0 ~ 3 1 ) 。さらに、腫瘍体積の縮小および安定化は、より高い生存率と関連している ( 図 3 2 A ~ 3 2 B ) 。

#### 【 0 5 9 5 】

全体として、M D N A 5 5 は、テモゾロミド ( T M Z ) 、カルムスチン ( 商品名 G l i a d e l ( 登録商標 ) ) 、ロムスチン ( L O M ) 、ベバシズマブ ( 商品名 A v a s t i n ( 登録商標 ) ) などの既存の治療薬と比較して、G B M ( 再発性 G B M を含む ) 患者の治療において、特に、高レベルの I L - 4 R を発現する G B M 患者に対して、より良好な有効性を示す ( 図 3 3 A ~ 3 3 B ) 。さらに、M D N A 5 5 は、G B M ( 再発性 G B M を含む ) 患者を治療するために低用量のステロイドと組み合わせで有効である。

30

#### 【 0 5 9 6 】

上記の実施例は、当業者に、本発明の組成物、システム、および方法の実施形態をどのように作製および使用するかについての完全な開示および説明を与えるために提供されており、本発明人らが自身の発明とみなすものの範囲を限定するようには意図されていない。当業者に明らかである本発明を実施するための上記の様式の修正は、以下の特許請求の範囲内にあるよう意図されている。本明細書中で言及されているすべての特許および刊行物は、本発明が関係する当業者の技術水準を示している。本開示において引用されたすべての参考文献は、あたかも各参考文献が参照によりその全体が個別に組み込まれているのと同程度に参照により組み込まれる。

40

#### 【 0 5 9 7 】

すべての見出しおよび節の表記は、明確さおよび参照目的のために使用されているにすぎず、決して限定するものとみなされるべきではない。例えば、当業者であれば、本明細書に記載の本発明の趣旨および範囲に従って、必要に応じて異なる見出しおよび節からの様々な態様を組み合わせることの有用性を認識するであろう。

#### 【 0 5 9 8 】

50

本明細書に引用されるすべての参考文献は、各個々の刊行物または特許または特許出願が参照によりその全体がすべての目的のために組み込まれているかのように具体的かつ個別に示されるのと同程度に、参照によりそれらの全体がすべての目的のために本明細書に組み込まれる。

**【 0 5 9 9 】**

当業者に明らかであるように、本出願の趣旨および範囲から逸脱することなく、本出願の多くの修正および変形が加えられてもよい。本明細書に記載の特定の実施形態および実施例はほんの一例として提供されており、本出願は、特許請求の範囲が権利を与えられる等価物の全範囲に加えて、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ限定されるべきである。

【図面】

【図 1】

【図 2 A】

| 11-139.01 胎前産後 |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |     |     | 11-139.02 胎前産後 |          |          |          |          |          |         |
|----------------|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|
|                | 10 | 11 | 14 | 86 | 87 | 88 | 89 | 101 | 104 | 105 | 107 | 108 | K (M-H)        | K (e-1)  | KD (150) | KL (H-)  | K (e-1)  | KD       |         |
|                | L  | R  | I  | V  | D  | T  | K  | L   | K   | K   | F   | R   |                |          |          |          |          |          |         |
| A5             | I  | I  | M  | G  | S  | H  | R  | A   | M   |     |     |     | 2.80E+06       | 8.20E-03 | 2.54     | 1.9 M    | -        | 50 M     |         |
| A6             | I  | L  | K  | S  | H  | R  | A  |     |     |     |     |     | 1.77E+06       | 3.30E-03 | 1.9 M    |          | 1.07E+07 | 2.80E-03 | 0.267 M |
| A7             | I  | I  | G  | S  | H  | R  | A  |     |     |     |     |     | 2.90E+06       | 3.40E-03 | 1.18M    |          | 1.80E+07 | 4.10E-03 | 0.218 M |
| A8             | I  | I  | S  | S  | H  | R  | T  | A   |     |     |     |     | 1.64E+06       | 3.30E-03 | 2.051 M  |          | 1.01E+07 | 2.60E-03 | 0.263 M |
| A11            | I  | I  | S  | S  | F  | R  | T  | A   |     |     |     |     | 1.64E+07       | 1.30E-03 | 0.084 M  |          | 1.62E+07 | 6.00E-03 | 0.391 M |
| B2             | I  | T  | G  | S  | Y  | R  | A  |     |     |     |     |     | 6.30E+06       | 1.70E-03 | 0.275 M  |          | 7.80E+06 | 1.00E-02 | 1.5 M   |
| B4             | S  | I  | K  | G  | S  | Y  | R  | T   |     |     |     |     | 1.36E+06       | 2.40E-03 | 18 M     |          | -        | -        | 100 M   |
| B6             | I  | I  | G  | S  | K  | Y  | R  | T   |     |     |     |     | 1.40E+06       | 8.20E-03 | 5.9 M    |          | -        | -        | 53 M    |
| C2             | D  | I  | I  | T  | K  | G  | R  | N   | A   | K   |     |     | -              | -        | 4000 M   | 6.00E+06 | 1.50E-04 | 0.025 M  |         |
| C3             | I  | K  | K  | R  | N  | R  | A  | K   |     |     |     |     | -              | -        | 35000 M  | 2.00E-03 | 0.379 M  | -        |         |
| C4             | C  | V  | S  | M  | N  | E  | T  |     |     |     |     |     | -              | -        | 36000 M  | 1.94E+06 | 7.64E-04 | 0.393 M  |         |
| C7             | H  | L  | I  | K  | E  | R  | N  | A   | K   |     |     |     | -              | -        | 35000 M  | 2.10E+06 | 5.70E-04 | 0.272 M  |         |
| C8             | H  | L  | I  | M  | R  | N  | T  |     |     |     |     |     | -              | -        | 36000 M  | 1.94E+06 | 7.64E-04 | 0.393 M  |         |
| C9             | H  | L  | I  | M  | R  | N  | T  |     |     |     |     |     | -              | -        | 36000 M  | 1.94E+06 | 6.10E-03 | 5 M      |         |
| C10            | H  | L  | I  | M  | R  | N  | T  |     |     |     |     |     | -              | -        | 36000 M  | 6.51E+06 | 9.18E-02 | 0.0001 M |         |
| C11            | T  | G  | R  |    |    |    |    |     |     |     |     |     | -              | -        | 15000 M  | 7.61E+06 | 4.04E-04 | 0.003 M  |         |
| C12            | F  | K  | K  | S  | R  | N  | R  | A   | K   |     |     |     | -              | -        | 4000 M   | 6.00E+06 | 1.50E-04 | 0.025 M  |         |
| D7             | F  | K  | K  | K  |    |    |    |     |     |     |     |     | -              | -        | 15000 M  | 1.77E+07 | 5.37E-05 | 0.003 M  |         |

| CHI      |   | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 |     |
|----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| EUインデックス |   | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 |     |
| lg61     | A | S   | T   | K   | G   | P   | S   | V   | F   | P   | L   | A   | P   | S   | S   | K   | S   | T   | S   | E   | G   | S   |     |
| lg62     | A | S   | T   | K   | G   | P   | S   | V   | F   | P   | L   | A   | P   | C   | S   | R   | S   | T   | S   | E   | S   |     |     |
| lg63     | A | S   | T   | K   | G   | P   | S   | V   | F   | P   | L   | A   | P   | C   | S   | R   | S   | T   | S   | G   | G   |     |     |
| lg64     | A | S   | T   | K   | G   | P   | S   | V   | F   | P   | L   | A   | P   | C   | S   | R   | S   | T   | S   | E   | S   |     |     |
| EUインデックス |   | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 |     |
| lg61     | T | A   | A   | L   | G   | C   | L   | V   | K   | D   | Y   | F   | P   | E   | P   | V   | T   | V   | S   | W   | N   |     |     |
| lg62     | T | A   | A   | L   | G   | C   | L   | V   | K   | D   | Y   | F   | P   | E   | P   | V   | T   | V   | S   | W   | N   |     |     |
| lg63     | T | A   | A   | L   | G   | C   | L   | V   | K   | D   | Y   | F   | P   | E   | P   | V   | T   | V   | S   | W   | N   |     |     |
| lg64     | T | A   | A   | L   | G   | C   | L   | V   | K   | D   | Y   | F   | P   | E   | P   | V   | T   | V   | S   | W   | N   |     |     |
| EUインデックス |   | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 |     |
| lg61     | S | G   | A   | L   | T   | S   | G   | V   | H   | T   | F   | P   | A   | V   | L   | Q   | S   | S   | G   | L   | Y   |     |     |
| lg62     | S | G   | A   | L   | T   | S   | G   | V   | H   | T   | F   | P   | A   | V   | L   | Q   | S   | S   | G   | L   | Y   |     |     |
| lg63     | S | G   | A   | L   | T   | S   | G   | V   | H   | T   | F   | P   | A   | V   | L   | Q   | S   | S   | G   | L   | Y   |     |     |
| lg64     | S | G   | A   | L   | T   | S   | G   | V   | H   | T   | F   | P   | A   | V   | L   | Q   | S   | S   | G   | L   | Y   |     |     |
| EUインデックス |   | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 201 |     |
| lg61     | S | L   | S   | S   | V   | V   | T   | V   | P   | S   | S   | L   | G   | T   | Q   | T   | Y   | I   | C   | N   |     |     |     |
| lg62     | S | L   | S   | S   | V   | V   | T   | V   | P   | S   | S   | N   | F   | G   | T   | Q   | T   | Y   | T   | C   | N   |     |     |
| lg63     | S | L   | S   | S   | V   | V   | T   | V   | P   | S   | S   | S   | L   | G   | T   | Q   | T   | Y   | T   | C   | N   |     |     |
| lg64     | S | L   | S   | S   | V   | V   | T   | V   | P   | S   | S   | S   | L   | G   | T   | K   | T   | Y   | T   | C   | N   |     |     |
| EUインデックス |   | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 |     |     |     |
| lg61     | V | N   | H   | K   | P   | S   | N   | T   | K   | V   | D   | K   | K   | V   | E   | P   | K   | S   | C   |     |     |     |     |
| lg62     | V | D   | H   | K   | P   | S   | N   | T   | K   | V   | D   | K   | T   | V   | E   | R   | K   | C   | C   |     |     |     |     |
| lg63     | V | N   | H   | K   | P   | S   | N   | T   | K   | V   | D   | K   | R   | V   | E   | L   | K   | T   | P   |     |     |     |     |
| lg64     | V | D   | H   | K   | P   | S   | N   | T   | K   | V   | D   | K   | R   | V   | E   | S   | K   | Y   | G   |     |     |     |     |
| ヘンジ      |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| EUインデックス |   | 221 |     |     |     | 222 | 223 | 224 | 225 | 226 | 227 | 228 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| lg61     | D |     |     |     | K   | T   | H   | T   | C   | P   | P   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| lg62     |   |     |     |     | V   |     | E   |     | C   | P   | P   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| lg63     | L | G   | D   |     | T   | H   | T   |     | C   | P   | R   | C   | P   | E   | P   | K   | S   | C   | D   | T   | P   | P   |     |
| lg64     |   |     |     |     |     | P   | P   |     | C   | P   | S   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| EUインデックス |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| lg61     |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| lg62     |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| lg63     | P | C   | P   | R   | C   | P   | E   | P   | K   | S   | C   | D   | T   | P   | P   | P   | C   | P   | R   | C   | P   |     |     |
| lg64     |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| EUインデックス |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| lg61     |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Fc  | >   |     |     |     |     |     |     |
| lg62     |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 |
| lg63     |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | C   | P   | A   | P   | E   | L   | L   | G   |
| lg64     |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | C   | P   | A   | P   | V   | A   |     |     |
| lg61     |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | C   | P   | A   | P   | E   | L   | L   | G   |
| lg62     |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | C   | P   | A   | P   | E   | F   | L   | G   |
| lg63     | E | P   | K   | S   | C   | D   | T   | P   | P   | P   | C   | P   | R   |     |     | C   | P   | A   | P   | E   | F   | L   | G   |
| lg64     |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | C   | P   | A   | P   | E   | F   | L   | G   |

10

20

30

40

50

【図 2 B】

| CH2      |      | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 |
|----------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| E.U.インフラ | lg01 | G   | P   | S   | V   | F   | L   | F   | P   | P   | K   | P   | K   | L   | T   | L   | M   | I   | S   | R   | T   | P   |
|          | lg02 | G   | P   | S   | V   | F   | L   | F   | P   | P   | K   | H   | K   | P   | K   | L   | T   | L   | M   | I   | S   | P   |
|          | lg03 | G   | P   | S   | V   | F   | L   | F   | P   | P   | K   | P   | P   | K   | P   | K   | L   | T   | L   | M   | I   | S   |
|          | lg04 | G   | P   | S   | V   | F   | L   | F   | P   | P   | K   | P   | K   | P   | K   | L   | T   | L   | M   | I   | S   | R   |
| E.U.インフラ |      | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 | 276 | 277 | 278 |
| lg01     | E    | V   | T   | C   | V   | V   | V   | D   | V   | S   | H   | E   | D   | P   | T   | I   | V   | K   | F   | H   | N   | W   |
|          | lg02 | E   | V   | T   | C   | V   | V   | D   | V   | S   | H   | E   | D   | P   | T   | I   | V   | K   | F   | H   | N   | W   |
|          | lg03 | E   | V   | T   | C   | V   | V   | D   | V   | S   | H   | E   | D   | P   | T   | I   | V   | K   | F   | H   | N   | W   |
|          | lg04 | E   | V   | T   | C   | V   | V   | D   | V   | S   | G   | E   | D   | P   | T   | I   | V   | K   | F   | H   | N   | W   |
| E.U.インフラ |      | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 |
| lg01     | V    | D   | G   | V   | E   | H   | N   | A   | K   | T   | K   | P   | R   | E   | E   | Q   | F   | H   | S   | T   |     |     |
|          | lg02 | V   | D   | G   | V   | E   | H   | N   | A   | K   | T   | K   | P   | R   | E   | E   | Q   | F   | H   | S   | T   |     |
|          | lg03 | V   | D   | G   | V   | E   | H   | N   | A   | K   | T   | K   | P   | R   | E   | E   | Q   | F   | H   | S   | T   |     |
|          | lg04 | V   | D   | G   | V   | E   | H   | N   | A   | K   | T   | K   | P   | R   | E   | E   | Q   | F   | H   | S   | T   |     |
| E.U.インフラ |      | 300 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 |
| lg01     | V    | R   | V   | V   | S   | V   | L   | T   | V   | L   | H   | Q   | D   | W   | L   | N   | G   | K   | E   | Y   | K   |     |
|          | lg02 | V   | R   | V   | V   | S   | V   | L   | T   | V   | L   | H   | Q   | D   | W   | L   | N   | G   | K   | E   | Y   | K   |
|          | lg03 | V   | R   | V   | V   | S   | V   | L   | T   | V   | L   | H   | Q   | D   | W   | L   | N   | G   | K   | E   | Y   | K   |
|          | lg04 | V   | R   | V   | V   | S   | V   | L   | T   | V   | L   | H   | Q   | D   | W   | L   | N   | G   | K   | E   | Y   | K   |
| E.U.インフラ |      | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 |     |
| lg01     | C    | H   | V   | S   | N   | K   | A   | L   | P   | A   | P   | A   | I   | E   | K   | T   | I   | S   | K   | T   |     |     |
|          | lg02 | C   | H   | V   | S   | N   | K   | A   | L   | P   | A   | P   | A   | I   | E   | K   | T   | I   | S   | K   | T   |     |
|          | lg03 | C   | H   | V   | S   | N   | K   | A   | L   | P   | A   | P   | A   | I   | E   | K   | T   | I   | S   | K   | T   |     |
|          | lg04 | C   | H   | V   | S   | N   | K   | A   | L   | P   | A   | P   | A   | I   | E   | K   | T   | I   | S   | K   | T   |     |
| CH3      |      | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 |     |
| E.U.インフラ | lg01 | G   | Q   | P   | R   | E   | P   | Q   | V   | V   | T   | L   | P   | S   | G   | E   | M   | T   | K   | N   |     |     |
|          | lg02 | G   | Q   | P   | R   | E   | P   | Q   | V   | V   | T   | L   | P   | S   | G   | E   | M   | T   | K   | N   |     |     |
|          | lg03 | G   | Q   | P   | R   | E   | P   | Q   | V   | V   | T   | L   | P   | S   | G   | E   | M   | T   | K   | N   |     |     |
|          | lg04 | G   | Q   | P   | R   | E   | P   | Q   | V   | V   | T   | L   | P   | S   | G   | E   | M   | T   | K   | N   |     |     |
| E.U.インフラ |      | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 |
| lg01     | G    | Q   | V   | S   | L   | T   | C   | L   | V   | K   | G   | F   | Y   | P   | S   | D   | I   | A   | V   | E   | W   | E   |
|          | lg02 | G   | Q   | V   | S   | L   | T   | C   | L   | V   | K   | G   | F   | Y   | P   | S   | D   | I   | A   | V   | E   | W   |
|          | lg03 | G   | Q   | V   | S   | L   | T   | C   | L   | V   | K   | G   | F   | Y   | P   | S   | D   | I   | A   | V   | E   | W   |
|          | lg04 | G   | Q   | V   | S   | L   | T   | C   | L   | V   | K   | G   | F   | Y   | P   | S   | D   | I   | A   | V   | E   | W   |
| E.U.インフラ |      | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 | 401 | 402 |
| lg01     | S    | N   | G   | O   | P   | E   | N   | N   | Y   | K   | T   | T   | P   | P   | V   | L   | D   | S   | D   | O   | S   |     |
|          | lg02 | S   | N   | G   | O   | P   | E   | N   | N   | Y   | K   | T   | T   | P   | P   | V   | L   | D   | S   | D   | O   | S   |
|          | lg03 | S   | N   | G   | O   | P   | E   | N   | N   | Y   | K   | T   | T   | P   | P   | V   | L   | D   | S   | D   | O   | S   |
|          | lg04 | S   | N   | G   | O   | P   | E   | N   | N   | Y   | K   | T   | T   | P   | P   | V   | L   | D   | S   | D   | O   | S   |
| E.U.インフラ |      | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 |
| lg01     | F    | F   | L   | Y   | S   | K   | L   | T   | V   | D   | K   | S   | R   | W   | G   | Q   | G   | N   | V   | F   | S   |     |
|          | lg02 | F   | F   | L   | Y   | S   | K   | L   | T   | V   | D   | K   | S   | R   | W   | G   | Q   | G   | N   | V   | F   | S   |
|          | lg03 | F   | F   | L   | Y   | S   | K   | L   | T   | V   | D   | K   | S   | R   | W   | G   | Q   | G   | N   | V   | F   | S   |
|          | lg04 | F   | F   | L   | Y   | S   | K   | L   | T   | V   | D   | K   | S   | R   | W   | G   | E   | G   | N   | V   | F   | S   |
| E.U.インフラ |      | 424 | 425 | 426 | 427 | 428 | 429 | 430 | 431 | 432 | 433 | 434 | 435 | 436 | 437 | 438 | 439 | 440 | 441 | 442 | 443 | 444 |
| lg01     | C    | S   | V   | M   | H   | E   | A   | L   | H   | N   | H   | T   | Y   | Q   | K   | S   | L   | S   | L   | S   | P   |     |
|          | lg02 | C   | S   | V   | M   | H   | E   | A   | L   | H   | N   | H   | T   | Y   | Q   | K   | S   | L   | S   | L   | S   | P   |
|          | lg03 | C   | S   | V   | M   | H   | E   | A   | L   | H   | N   | H   | T   | Y   | Q   | K   | S   | L   | S   | L   | S   | P   |
|          | lg04 | C   | S   | V   | M   | H   | E   | A   | L   | H   | N   | R   | F   | Y   | Q   | K   | S   | L   | S   | L   | S   | P   |
| E.U.インフラ |      | 445 | 446 | 447 | 448 | 449 | 450 | 451 | 452 | 453 | 454 | 455 | 456 | 457 | 458 | 459 | 460 | 461 | 462 | 463 | 464 | 465 |
| lg01     | O    | K   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|          | lg02 | O   | K   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|          | lg03 | O   | K   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|          | lg04 | O   | K   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

【 図 3 B 】

[illegible]

【図 3 A】

[illegible]

【図 3 C】

[illegible]

【図 4 A】

[illegible]

【図 4 C】

|                                                              |                                                              |                                                              |                                                              |                                                              |            |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------|
| 何の<br>重鎖<br>(US20160222117から<br>の配列番号20)                     | 何の<br>重鎖<br>(US20160222117<br>の配列番号21)                       | 何の<br>重鎖<br>(US20160222117<br>の配列番号22)                       | 何の<br>重鎖<br>(US20160222117<br>の配列番号23)                       | 何の<br>重鎖<br>(US20160222117<br>の配列番号24)                       | 配列番号       |
| EVOLVSGGGLVPGGSLRLSCAASGFTSDSIHWIRQAPGKLEWAWISGVGGSTYADSVKGR | EVOLVSGGGLVPGGSLRLSCAASGFTSDSIHWIRQAPGKLEWAWISGVGGSTYADSVKGR | EVOLVSGGGLVPGGSLRLSCAASGFTSDSIHWIRQAPGKLEWAWISGVGGSTYADSVKGR | EVOLVSGGGLVPGGSLRLSCAASGFTSDSIHWIRQAPGKLEWAWISGVGGSTYADSVKGR | EVOLVSGGGLVPGGSLRLSCAASGFTSDSIHWIRQAPGKLEWAWISGVGGSTYADSVKGR | 配列番号<br>25 |
| FTISRTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARRHWPGFGFDWGQGLTIVSA            | FTISRTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARRHWPGFGFDWGQGLTIVSA            | FTISRTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARRHWPGFGFDWGQGLTIVSA            | FTISRTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARRHWPGFGFDWGQGLTIVSA            | FTISRTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARRHWPGFGFDWGQGLTIVSA            | 配列番号<br>26 |
| DIOMTQPSLSASVGRVITTCASQDVSTAAWYQKQKAPKLLYSASFVSGVPRFSQSGSGT  | DIOMTQPSLSASVGRVITTCASQDVSTAAWYQKQKAPKLLYSASFVSGVPRFSQSGSGT  | DIOMTQPSLSASVGRVITTCASQDVSTAAWYQKQKAPKLLYSASFVSGVPRFSQSGSGT  | DIOMTQPSLSASVGRVITTCASQDVSTAAWYQKQKAPKLLYSASFVSGVPRFSQSGSGT  | DIOMTQPSLSASVGRVITTCASQDVSTAAWYQKQKAPKLLYSASFVSGVPRFSQSGSGT  | 配列番号<br>27 |
| DFTLTLSLPEDFATYYCQQLYHPATFGSGTVEIKR                          | DFTLTLSLPEDFATYYCQQLYHPATFGSGTVEIKR                          | DFTLTLSLPEDFATYYCQQLYHPATFGSGTVEIKR                          | DFTLTLSLPEDFATYYCQQLYHPATFGSGTVEIKR                          | DFTLTLSLPEDFATYYCQQLYHPATFGSGTVEIKR                          | 配列番号<br>28 |

【図 4 B】

[illegible]

【図 4 D】

[illegible]

【図 4 E】

| 何の                                | 配列                                                                                                           | 配列番号 |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| US20160222117から (GENENTECH, INC.) |                                                                                                              |      |
| 軽鎖 (US20160222117の配列番号35)         | DIQMTQSPSSLSASVGRDVITTCRASQDVSTAVAWYQOKPKAPKLLYSASFYSGLVPSRFSGSGSGT<br>DFTLTISLQPEDFATYCCQSLYPTPTFGGQTKVEIKR |      |
| 重鎖 (US20160222117の配列番号36)         | DIQMTQSPSSLSASVGRDVITTCRASQDVSTAVAWYQOKPKAPKLLYSASFYSGLVPSRFSGSGSGT<br>DFTLTISLQPEDFATYCCQSLYPTPTFGGQTKVEIKR |      |
| 軽鎖 (US20160222117の配列番号37)         | DIQMTQSPSSLSASVGRDVITTCRASQDVSTAVAWYQOKPKAPKLLYSASFYSGLVPSRFSGSGSGT<br>DFTLTISLQPEDFATYCCQSWYHPPTFGGQTKVEIKR |      |
| 重鎖 (US20160222117の配列番号38)         | DIQMTQSPSSLSASVGRDVITTCRASQDVSTAVAWYQOKPKAPKLLYSASFYSGLVPSRFSGSGSGT<br>DFTLTISLQPEDFATYCCQYFYPTPTFGGQTKVEIKR |      |
| 軽鎖 (US20160222117の配列番号39)         | DIQMTQSPSSLSASVGRDVITTCRASQDVSTAVAWYQOKPKAPKLLYSASFYSGLVPSRFSGSGSGT<br>DFTLTISLQPEDFATYCCQYWTPTPTFGGQTKVEIKR |      |
| 重鎖 (US20160222117の配列番号40)         | DIQMTQSPSSLSASVGRDVITTCRASQDVSTAVAWYQOKPKAPKLLYSASFYSGLVPSRFSGSGSGT<br>DFTLTISLQPEDFATYCCQSYFPTPTFGGQTKVEIKR |      |

【図 4 F】

| 何の                                      | 配列                                                                                                                    | 配列番号 |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| US8217149から (Hoffman-La Roche; アテナリズマブ) |                                                                                                                       |      |
| 軽鎖 (VH) (US8217149の配列番号20)              | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDSWIHWVQAPGKLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGR<br>FTSAQTSKNTATYLOMNSLRADETAVYYCARRHWPGFDYWGQGLTVTSA |      |
| 重鎖 (VL) (US8217149の配列番号21)              | DIQMTQSPSSLSASVGRDVITTCRASQDVSTAVAWYQOKPKAPKLLYSASFYSGLVPSRFSGSGSGT<br>FTLTISLQPEDFATYCCQYLYHPATFGGQTKVEIKR           |      |
| アテナリズマブ (代替配列)                          |                                                                                                                       |      |
| 軽鎖 (MHGエプイデーターベースまたはDargBankデータベースから)   | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDSWIHWVQAPGKLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGR<br>FTSAQTSKNTATYLOMNSLRADETAVYYCARRHWPGFDYWGQGLTVTSA |      |
| 重鎖 (MHGエプイデーターベースまたはDargBankデータベースから)   | DIQMTQSPSSLSASVGRDVITTCRASQDVSTAVAWYQOKPKAPKLLYSASFYSGLVPSRFSGSGSGT<br>FTLTISLQPEDFATYCCQYLYHPATFGGQTKVEIKR           |      |

【図 5 A】

| 腫瘍溶解剤として使用されるアデノウイルス                                                                           |                                                                                                                                               |                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 名称 (血清型)                                                                                       | 腫瘍選択的増殖の根拠                                                                                                                                    | 治療特性                                                   |
| 野生型抗体 (顕性血清型)<br>Ad5/IFN (Ad5)                                                                 | なし                                                                                                                                            | 腫瘍溶解性                                                  |
| A1520または<br>Onyx015<A42/5><br>AdTK <sup>RC</sup>                                               | E1b55kDa欠失はp53の結合を無効にする<br>E1bSSkDa欠失はp53の結合を無効にする                                                                                            | 腫瘍溶解性および免疫刺激遺伝子治療<br>腫瘍溶解性<br>腫瘍溶解性および自殺遺伝子治療 (TK)     |
| Ad-5-CD-TKrep<br>またはFGR (a45)                                                                  | E1b55kDa欠失はp53の結合を無効にする                                                                                                                       | 腫瘍溶解性 f t 自殺遺伝子治療 (CD+TK)                              |
| AdvEIAΔB-F/K20 (Ad5)                                                                           | E1bSSkDa欠失はp53の結合を無効にする                                                                                                                       | 感染力が増強された腫瘍溶解                                          |
| AsEIAΔB (Ad5)<br>& AdCAhIL-2 (Ad5)<br>AdD34 (Ad5)<br>CN706 (Ad5)<br>CN763 (Ad5)<br>CN764 (Ad5) | E1bSSkDa欠失はp53の結合を無効にする<br>E1aの欠失はRb結合を無効にする<br>PSPAプロモーター下のE1aの調節<br>カリクレイン2プロモーター下のE1aの調節<br>PSPAプロモーター下のE1aの調節およびカリクレイン2<br>プロモーター下のE1bの調節 | 腫瘍溶解性および免疫平消化遺伝子治療<br>腫瘍溶解性<br>腫瘍溶解性<br>腫瘍溶解性<br>腫瘍溶解性 |
| CV739                                                                                          | ラットプロバシンプロモーターでのE1aの調節およびヒト<br>PSPAプロモーター下のE1の調節                                                                                              | 腫瘍溶解性                                                  |

| 腫瘍溶解剤として使用されるアデノウイルス                                    |                                                                     |                                             |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 名称 (血清型)                                                | 腫瘍選択的増殖の根拠                                                          | 治療特性                                        |
| CV787                                                   | ラットプロバシンプロモーター下のE1aの調節およびヒト<br>PSPAプロモーター下のE1bの調節                   | 腫瘍溶解性 (Eの存在により、CV739と比較して増強)                |
| AvEla041<br>GT5610 (Ad5) +<br>AdHB (Ad5)<br>DI337 (Ad5) | AFPプロモーター下のE1aの調節<br>AFPプロモーター下のE1aの調節<br>なし                        | 腫瘍溶解性<br>腫瘍溶解性<br>腫瘍溶解性 (E1b-19kDaの欠失により増強) |
| DI316 (Ad5)                                             | E1aの完全な欠失により、この変異体はN r i n s i c<br>またはML-6誘導性に依存するようになる            | 腫瘍溶解性                                       |
| D1118 (Ad5)                                             | E1bの完全な欠失により、p53の結合が無効になるが、<br>E1a誘導性アポトーシスはE1b-19kDaによって<br>阻害されない | 腫瘍溶解性                                       |

【図 5 B】

| 臨床試験における複製選択的ウイルス             |                           |       |                     |                                                                                                                       |                                                                         |
|-------------------------------|---------------------------|-------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 表紙                            | 薬剤                        | 臨床段階  | 腫瘍学的                | 遺伝的変化                                                                                                                 | 選択的複製を可能にする<br>細胞表現型                                                    |
| 操作されている                       |                           |       |                     |                                                                                                                       |                                                                         |
| アデノウイルス<br>(2/5キメラ)           | ⑤1520⑤                    | I-III | SCCHN<br>結腸直腸<br>肺癌 | E1B-55-kD遺伝子の欠失<br>E3-10、4/14、5欠失<br>P53変異によって駆動されるE1A発現<br>カサカサシリアレーターによって駆動されるE1A/<br>P53によって駆動されるE1B/プロモーター/コンセンサス | p53機能 (例えば、欠失、変異) を欠く議論<br>を引き起こす細胞、その他?                                |
| アデノウイルス<br>(血清型5)             | CN706<br>CN787            | I     | 前立腺                 | E1B-55-kD遺伝子の欠失<br>H5V-1k/C/D融合遺伝子の挿入<br>リボスチレオチドレダクターゼ能調<br>(1C2P遺伝子のLo c z挿入)                                       | 前立腺細胞 (悪性、正常)<br>p53機能 (例えば、欠失、変異) を欠く議論<br>を引き起こす細胞、その他?               |
| アデノウイルス<br>(2/5キメラ)           | Ad5-CDtk-rep              | I     | 前立腺                 | 神経原性遺伝子変異<br>(γ-34、5遺伝子) 一方のコピー                                                                                       | 増殖細胞                                                                    |
| 単純ヘルペス<br>ウイルス-1              | G207                      | I-II  | GBM                 | 神経原性遺伝子変異<br>(γ-34、5遺伝子) 一方のコピー                                                                                       | 増殖細胞                                                                    |
| 単純ヘルペス<br>ウイルス-1<br>ワタシニアウイルス | NV1020<br>野生型ニ<br>GM-CSEF | I     | 結腸直腸<br>黒色腫         | 神経原性遺伝子変異<br>(γ-34、5遺伝子) 一方のコピー                                                                                       | 増殖細胞                                                                    |
| 操作されていない                      |                           |       |                     |                                                                                                                       |                                                                         |
| ニューカッスル病<br>ウイルス              | 73-T                      | I     | 結核<br>SCCHN<br>肺癌   | 不明<br>(腫瘍細胞の複製阻害)                                                                                                     | 腫瘍細胞におけるIFN応答の喪失                                                        |
| 自律型バレルボウイルス                   | H-1                       | I     |                     | なし                                                                                                                    | 前立腺細胞<br>↑増殖<br>↓分化<br>ras、p53変異<br>Ras誘導性細胞 (例えば、ras変異、<br>EGFRシグナル伝達) |
| レオウイルス                        | Reolysin                  | I     | SCCHN               | なし                                                                                                                    |                                                                         |

10

20

30

40

50

【図 6】

| 11-R444アッペイトラフスカラーオーダー表 |         |          |    |    |    |                         |             |  |                    |
|-------------------------|---------|----------|----|----|----|-------------------------|-------------|--|--------------------|
| 組織の種類                   | Q#      | 原色の濃淡の強度 |    |    |    | 補色<br>パーセント<br>80/20/10 | 補色<br>HLSのA |  | コメント               |
|                         |         | 0        | 1+ | 2+ | 3+ |                         |             |  |                    |
| GBM                     | Q1360-3 | 99       | 0  | 1  | 0  | 1                       | 2           |  | 補色の赤色色色            |
| GBM                     | Q1360-3 | 0        | 90 | 10 | 0  | 100                     | 110         |  |                    |
| GBM                     | Q1360-3 | 0        | 89 | 10 | 1  | 100                     | 112         |  |                    |
| GBM                     | Q3362   | 100      | 0  | 0  | 0  | 0                       | 0           |  |                    |
| GBM                     | Q3362   | 100      | 0  | 0  | 0  | 0                       | 0           |  | 補色の赤色色色            |
| GBM                     | Q3362   | 80       | 20 | 0  | 0  | 20                      | 20          |  |                    |
| GBM                     | Q9467   | 0        | 80 | 10 | 10 | 100                     | 130         |  | ボーダーライン1+          |
| GBM                     | Q9467   | 0        | 90 | 5  | 5  | 100                     | 115         |  |                    |
| GBM                     | Q9467   | 0        | 30 | 20 | 50 | 100                     | 220         |  |                    |
| GBM                     | Q9462   | 0        | 60 | 20 | 20 | 100                     | 160         |  | 補色と反応性正交を区別するのが難しい |
| GBM                     | Q9462   | 0        | 40 | 30 | 30 | 100                     | 190         |  | 補色と反応性正交を区別するのが難しい |
| GBM                     | Q9462   | 10       | 30 | 30 | 30 | 90                      | 180         |  | 補色と反応性正交を区別するのが難しい |

【圖 7】

[illegible]

【図 8】

8.A. C/BMIにおけるH<sub>2</sub>コア値による1L-4Rの割合の図表

|                         | H <sub>2</sub> コア値>0 |      | H <sub>2</sub> コア値≤50 |      | H <sub>2</sub> コア値≤100 |      | H <sub>2</sub> コア値≤150 |      | H <sub>2</sub> コア値≤200 |      | H <sub>2</sub> コア値≤250 |      |
|-------------------------|----------------------|------|-----------------------|------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|------|
|                         | No.                  | Pct. | No.                   | Pct. | No.                    | Pct. | No.                    | Pct. | No.                    | Pct. | No.                    | Pct. |
| 1. 100%<br>可測/可感<br>ケース | 41                   | 100% | 39                    | 95%  | 38                     | 93%  | 30                     | 73%  | 21                     | 51%  | 10                     | 24%  |

8B. GBMにおける1以上の強度の染色パーセントによるIL-4R $\alpha$ 陽性の閾値

| 利用可能な<br>ケース | 利用可能の5%まで<br>1以上の効果 |      | 利用可能の10%以上で<br>4以上の効果 |      | 利用可能の25%以上で<br>7以上の効果 |      | 利用可能の50%以上で<br>1以上の効果 |      | 利用可能の90%以上で<br>1以上の効果 |      |
|--------------|---------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|------|
|              | No.                 | Pct. | No.                   | Pct. | No.                   | Pct. | No.                   | Pct. | No.                   | Pct. |
| 41           | 41                  | 100% | 41                    | 100% | 39                    | 95%  | 38                    | 93%  | 36                    | 88%  |

8C. GBMにおける2以上の強度の染色パーセントによるIL-4Ra陽性の閾値

| 対前年度比の増減率 | 対前年度比の増減率 | 対前年度比の増減率 | 対前年度比の増減率 | 対前年度比の増減率 | 対前年度比の増減率 | 対前年度比の増減率 | 対前年度比の増減率 | 対前年度比の増減率 | 対前年度比の増減率 | 対前年度比の増減率 | 対前年度比の増減率 | 対前年度比の増減率 | 対前年度比の増減率 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 41        | 41        | 105%      | 41        | 100%      | 34        | 83%       | 29        | 71%       | 16        | 39%       | 10        | 26%       |           |

8D, GBMにおける3以上の強度の染色パーセントによる1L-4Ra陽性の閾値

| 調査対象の<br>グループ | 継続保証のみの契約で<br>3以上の割合 |      | 継続保証の10%以上で<br>3以上の割合 |      | 継続保証の25%以上で<br>3以上の割合 |      | 継続保証の50%以上で<br>3以上の割合 |      | 継続保証の75%以上で<br>3以上の割合 |      |
|---------------|----------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|------|
|               | No.                  | Pct. | No.                   | Pct. | No.                   | Pct. | No.                   | Pct. | No.                   | Pct. |
| 調査対象全<br>グループ | 41                   | 37   | 34                    | 83%  | 24                    | 59%  | 20                    | 49%  | 6                     | 15%  |

【圖 9】

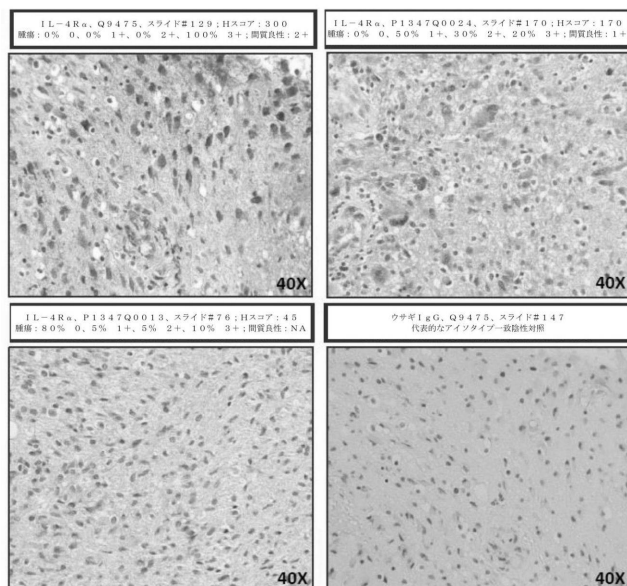
9 A. IHC手順-TechMateプロトコル

| TechMate<br>配列 | 試薬                                 |
|----------------|------------------------------------|
| 1              | 黒色化試薬－15分                          |
| 2              | 一次抗体－1時間                           |
| 3              | Polink-2および二次抗体－25分                |
| 4              | 過酸化水素ブロッキング－3 x 2, 5分              |
| 5              | Polink-2および西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)－25分 |
| 6              | DAB色原体－3 x 5分                      |
| 7              | ヘマトキシリン対比染色－1分                     |

9 B. 抗体の仕様およびアッセイ条件

| 抗体             | IL-4R $\alpha$                                                                  |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 販売業者           | Abcam                                                                           |
| カタログ番号         | ab203398                                                                        |
| 販売業者ロット番号      | 316106                                                                          |
| QualiTek ロット番号 | NT2513                                                                          |
| 供給源/アイソタイプ     | ウサギ IgG                                                                         |
| クローン           | ポリクローナル                                                                         |
| 免疫原            | キーホールリンベックヘモシアン (KLH) に結合したヒト IL-4 R $\alpha$ a a 2 0 0 - 2 3 2 内 的 合 成 ペ プ チ ド |
| 希釈             | 2.5ug/mL                                                                        |
| インキュベーション時間    | 1 時間                                                                            |
| 前処理            | なし (S H I E R な し)                                                              |
| プロトコル          | MIIP                                                                            |
| 検出システム         | P o l i n k - 2 お よ び H R P ウ ザ ギ                                               |
| 免疫原            | DAB                                                                             |

【図 10】



【図 11】

[illegible]

【図 12 A】

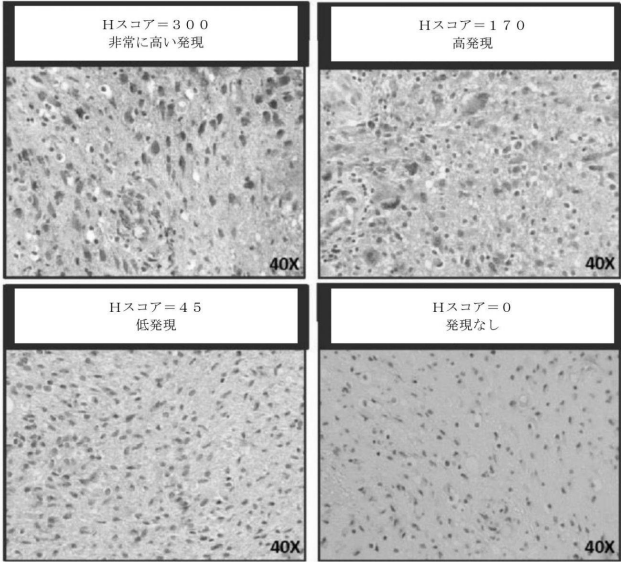
| 固有の種   | 直染の濃度 |    |    |    | バーベント<br>スコア 5以上 | 目立たず | コメント   |
|--------|-------|----|----|----|------------------|------|--------|
|        | 0     | 1+ | 2+ | 3+ |                  |      |        |
| 苗管     | 80    | 20 | 0  | 0  | 20               | 20   | 好染色    |
| 苗管     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    | 赤色染色   |
| 苗管     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 樹皮、根   |       |    |    |    |                  |      | 組織なし   |
| 樹皮、根   | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    | 赤色染色   |
| 樹皮、根   | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    | 赤色染色   |
| 骨、掌骨   | 95    | 5  | 0  | 0  | 5                | 5    |        |
| 根      |       |    |    |    |                  |      | 組織なし   |
| 根      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 乳房     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 乳房     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 乳房     | 50    | 50 | 0  | 0  | 50               | 50   | 管の褐色染色 |
| 骨、小腸   | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 骨、小腸   | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 骨、小腸   | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 骨、大腸直管 | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 骨、大腸直管 | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 骨、大腸直管 | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 骨管     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    | 押押しなし  |
| 骨管     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 骨管     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    | 赤色染色   |
| 食道     | 50    | 50 | 0  | 0  | 50               | 50   |        |
| 食道     | 50    | 50 | 0  | 0  | 50               | 50   | 筋肉のみ   |
| 胃      | 0     | 50 | 50 | 0  | 50               | 50   |        |
| 胃      | 25    | 0  | 75 | 0  | 75               | 150  | 壊れた組織  |
| 胃      | 10    | 30 | 30 | 30 | 90               | 180  |        |
| 腸、小腸   | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    | 筋肉のみ   |
| 腸、小腸   | 50    | 50 | 0  | 0  | 50               | 50   |        |
| 腸、小腸   | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 腸、結腸   | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 腸、結腸   | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 腸、結腸   | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 腸、直腸   | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 腸、直腸   | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 心臓     | 20    | 80 | 0  | 0  | 80               | 80   |        |
| 心臓     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 心臓     | 20    | 50 | 30 | 0  | 80               | 110  |        |
| 腎臓     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 腎臓     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    | 赤色染色   |
| 腎臓     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    | 赤色染色   |
| 腎臓     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 腎臓     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 腎臓     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 肝臓     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 肝臓     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 肝臓     | 30    | 50 | 20 | 0  | 70               | 90   |        |
| 肝      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 肝      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |
| 肝      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0                | 0    |        |

【図 12 B】

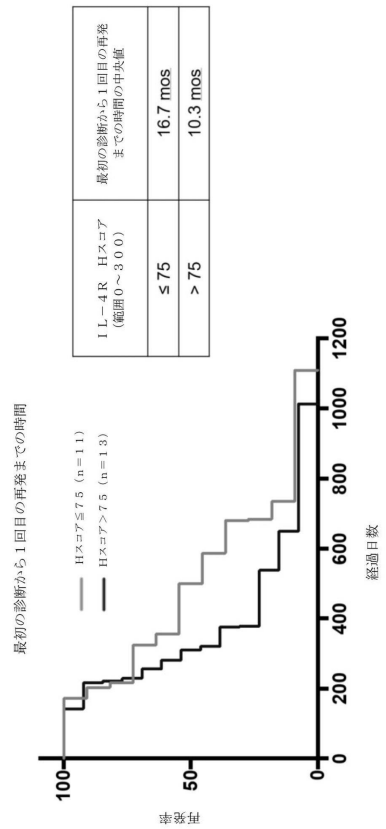
| 固有の種    | 差次の強度 |    |    |    | バーセアツト | ヒスロア | コメント |
|---------|-------|----|----|----|--------|------|------|
|         | 0     | 1+ | 2+ | 3+ | スコア±1+ |      |      |
| 跡果      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 跡果      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 跡果      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 跡織      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 跡織      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 跡織      | 70    | 20 | 10 | 0  | 30     | 40   |      |
| 跡甲状腹    | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 跡下条体    | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    | 赤色染色 |
| 跡下条体    | 50    | 50 | 0  | 0  | 50     | 50   | 赤色染色 |
| 筋盤      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 筋盤      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 筋盤      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 筋立類     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 筋立類     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 筋立類     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 皮膚      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 皮膚      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    | 赤色染色 |
| 骨盤      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 骨盤      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 骨盤      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 骨盤      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    | 赤色染色 |
| 骨格筋     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    | 赤色染色 |
| 骨格筋     | 95    | 3  | 2  | 0  | 5      | 7    |      |
| 骨格筋     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    | 赤色染色 |
| 精巣      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 精巣      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    | 赤色染色 |
| 精巣      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    | 赤色染色 |
| 胸腺      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    | 赤色染色 |
| 胸腺      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    | 赤色染色 |
| 胸腺      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    | 赤色染色 |
| 甲状腺     | 90    | 10 | 0  | 0  | 10     | 10   |      |
| 甲状腺     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    | 赤色染色 |
| 甲状腺     | 95    | 5  | 0  | 0  | 5      | 5    |      |
| 扁桃腺     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 扁桃腺     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 扁桃腺     | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 尿管      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 尿管      | 95    | 5  | 0  | 0  | 5      | 5    | 赤色染色 |
| 尿管      | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 子宮、子宮頸部 | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    | 赤色染色 |
| 子宮、子宮頸部 | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 子宮、子宮頸部 | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 子宮、子宮内腔 | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    | 赤色染色 |
| 子宮、子宮内腔 | 100   | 0  | 0  | 0  | 0      | 0    |      |
| 子宮、子宮内腔 | 80    | 20 | 0  | 0  | 20     | 20   |      |



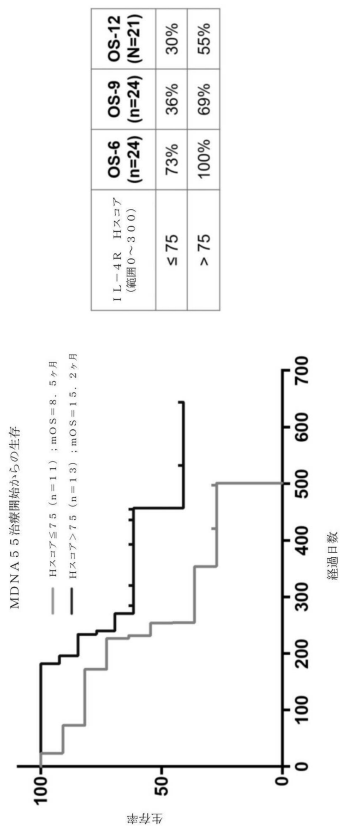
【図 1 7】



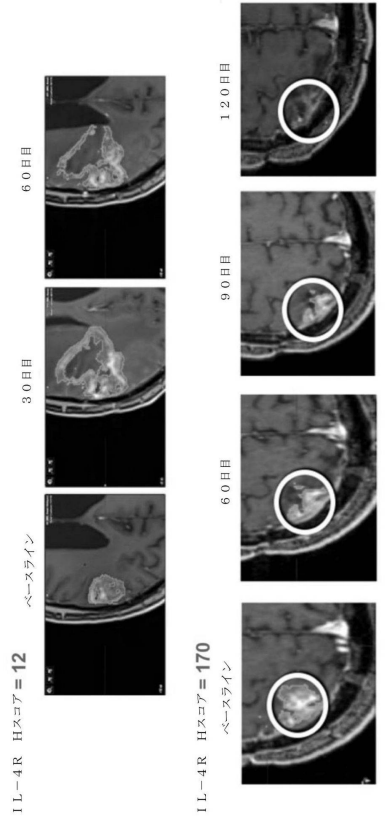
【図 1 8】



【図 1 9】



【図 2 0】



10

20

30

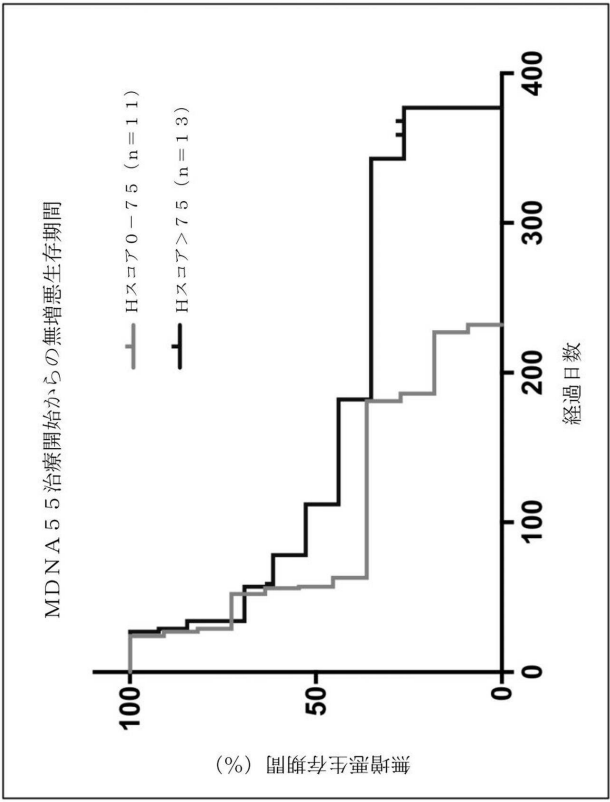
40

50

【図 2 1】

| 最初のDxから1回目の再発までの時間（中央値） |            |        |      |       |  |
|-------------------------|------------|--------|------|-------|--|
| すべての対象                  |            | 11.3ヶ月 |      |       |  |
| IR-4R+対象                |            | 10.3ヶ月 |      |       |  |
| IR-4R-対象                |            | 16.7ヶ月 |      |       |  |
| MDNA55による治療後の生存         |            |        |      |       |  |
|                         | mOS (mos.) | OS-6   | OS-9 | OS-12 |  |
| すべての対象                  | 11.8       | 89%    | 59%  | 46%   |  |
| IR-4R+対象                | 15.2       | 100%   | 69%  | 55%   |  |
| IR-4R-対象                | 8.5        | 73%    | 36%  | 30%   |  |

【図 2 2】



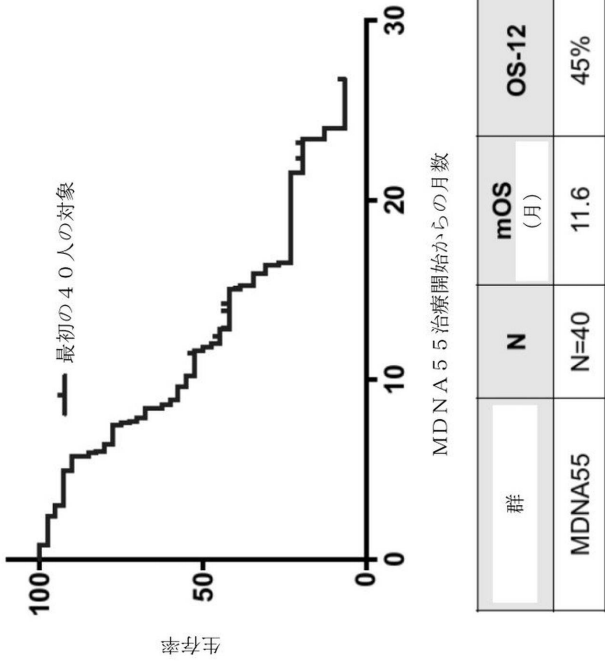
【図 2 3 A】

| 診断                                                                                                                                                        | プランニング                                                                             | 治療                                                                                                                                       | フォローアップ                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>初回Dxからの副反的IL4R分岐</li><li>初回診断時のデノボGBM</li><li>IDH野生型のみ</li><li>1回目または2回目の再発</li><li>切除なし</li><li>KPS ≥ 70</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>MR1-腫瘍のサイズおよび位置</li><li>最適なカテーテル軌道</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>画像誘導カテーテル留置</li><li>Magnevist (登録商標) の再注入により、MDNA55の分布をリアルタイムで監視する</li><li>24-48時間続く車回注入</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>1° エンドポイント</li><li>mOS</li><li>2° エンドポイント</li><li>ORR</li><li>PFS</li><li>mOS対IL4R発現</li><li>安全性</li></ul> |

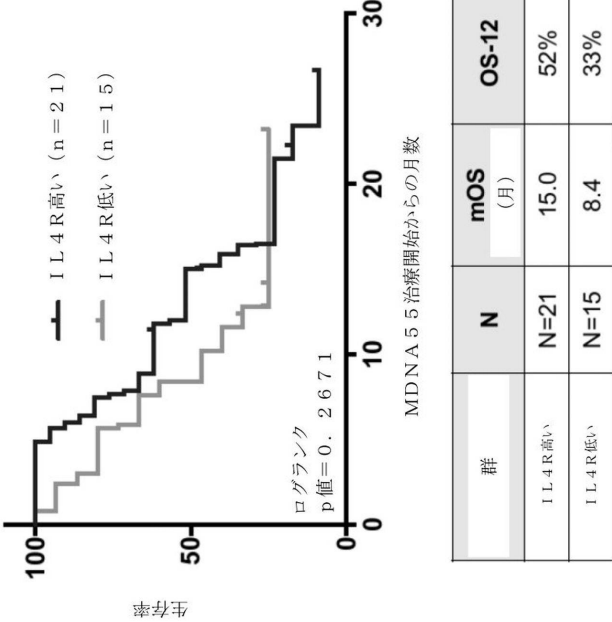
【図 2 3 B】

| 生存可能                   | 値                              |
|------------------------|--------------------------------|
| 総患者数                   | 46                             |
| 年齢                     | 56歳 (35-78)                    |
| 性別 (男性)                | 29 / 46 (63%)                  |
| 登録時のKPS:               | 22 / 46 (48%)<br>24 / 46 (52%) |
| 70, 80<br>90, 100      |                                |
| デノボGBM                 | 46 / 46 (100%)                 |
| 反復手術の候補が少ない            | 46 / 46 (100%)                 |
| IDH野生型                 | 37 / 37 (100%)                 |
| 非メチル化MGMT              | 24 / 42 (57%)                  |
| IL4Rの過剰発現              | 23 / 42 (55%)                  |
| 研究中のステロイド使用 > 4 mg / 日 | 25 / 45 (56%)                  |
| 最大腫瘍直径                 | 28 mm (10-64)                  |
| #以前の再発: 1, 2           | 37 (80%), 9 (20%)              |

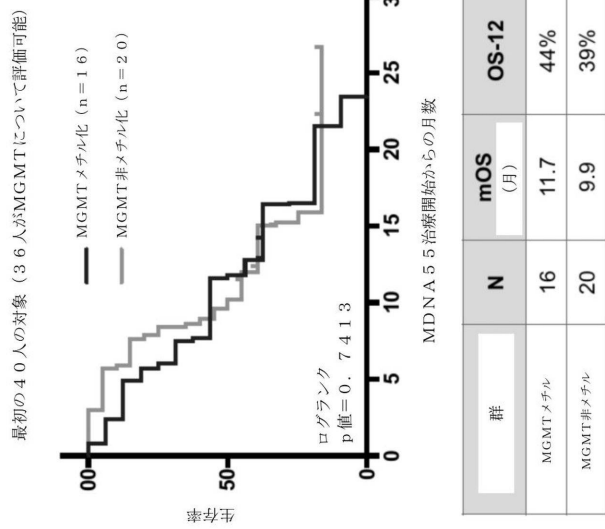
【図 2 4 A】



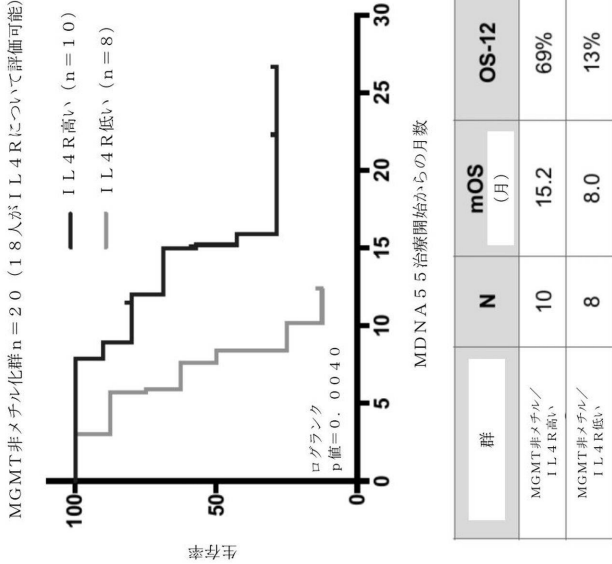
【図 2 4 B】



【図 2 5 A】



【図 2 5 B】



10

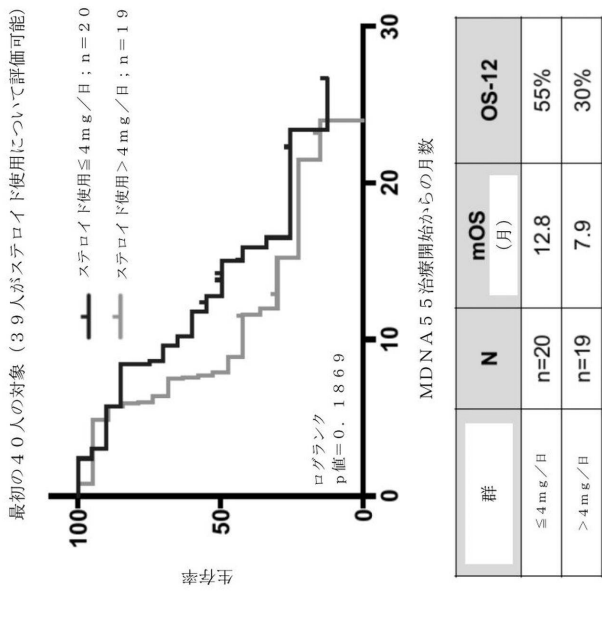
20

30

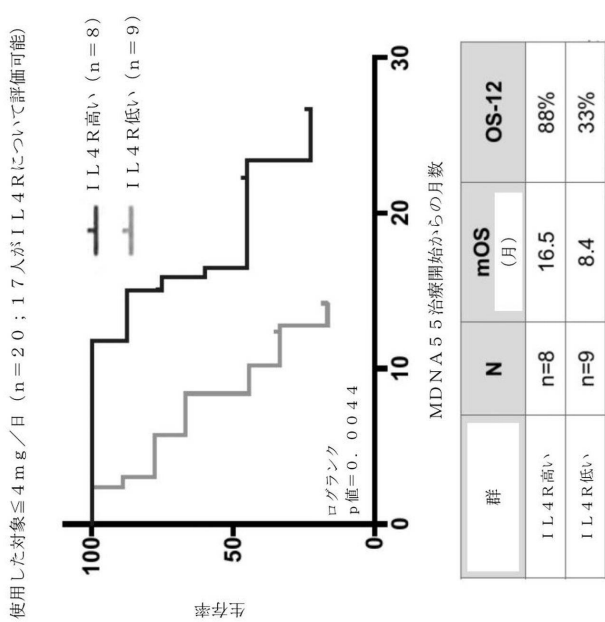
40

50

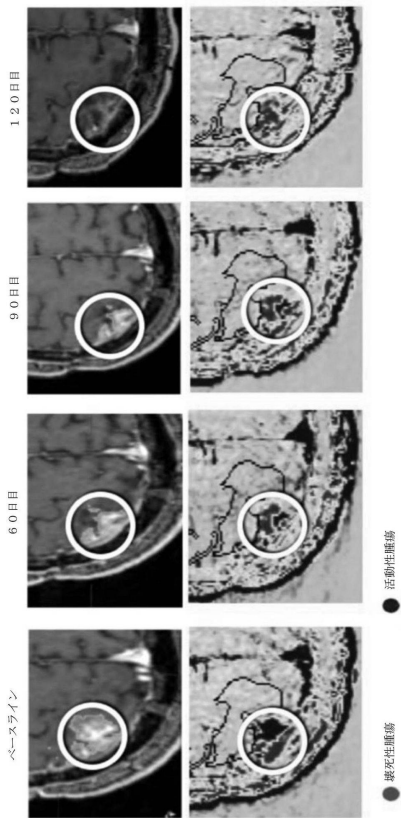
【図 2 6 A】



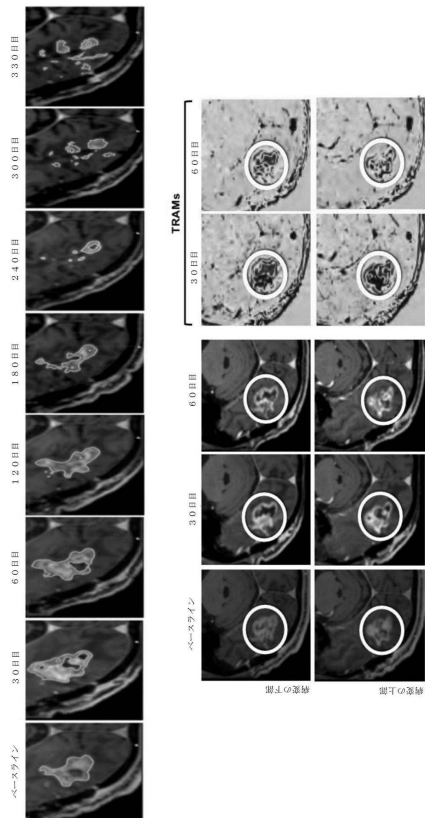
【図 2 6 B】



【図 2 7】



【図 2 8】



10

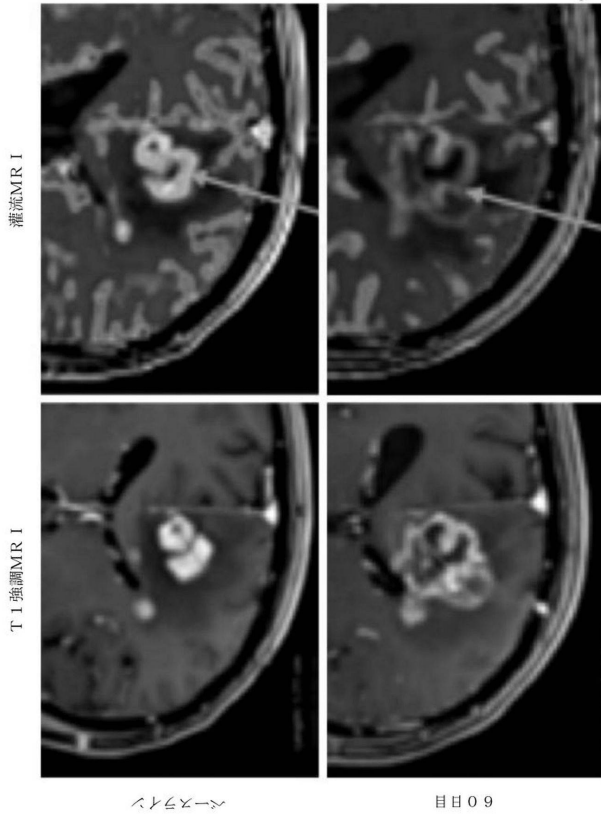
20

30

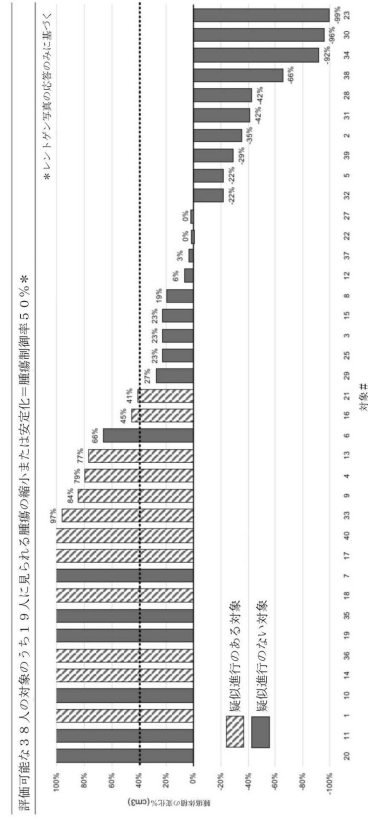
40

50

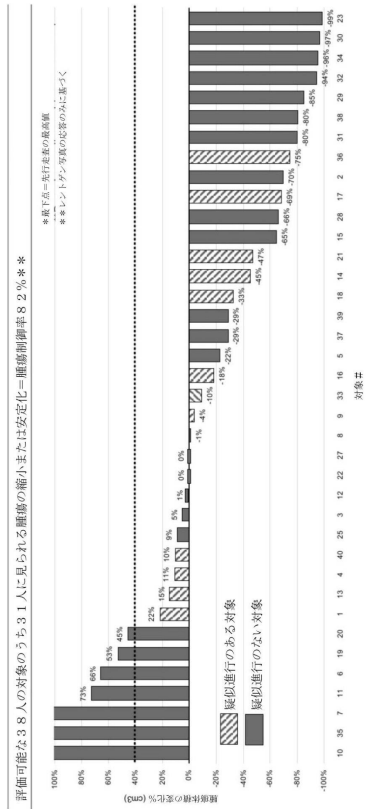
【図 29】



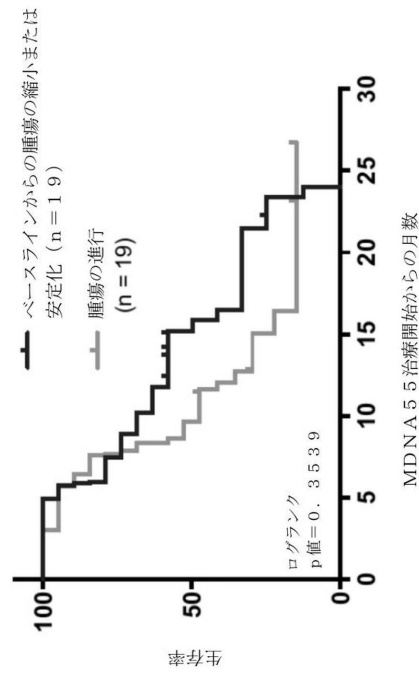
【図 30】



【図 31】



【図 32 A】



|                |            |       |
|----------------|------------|-------|
| ベースラインからの最良の応答 | mOS<br>(月) | OS-12 |
| 腫瘍の収縮または安定化    | 15.2       | 58%   |
| 腫瘍の進行          | 9.6        | 42%   |

10

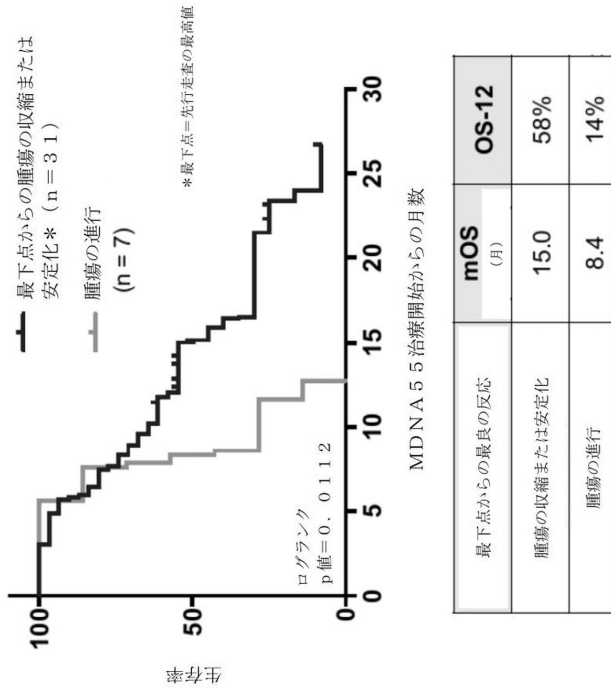
20

30

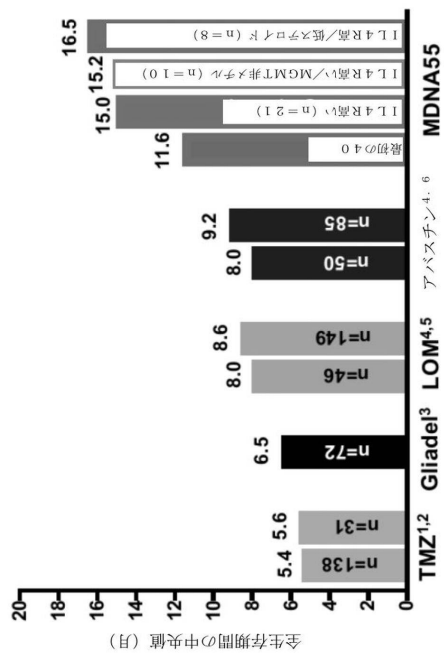
40

50

【図 3 2 B】

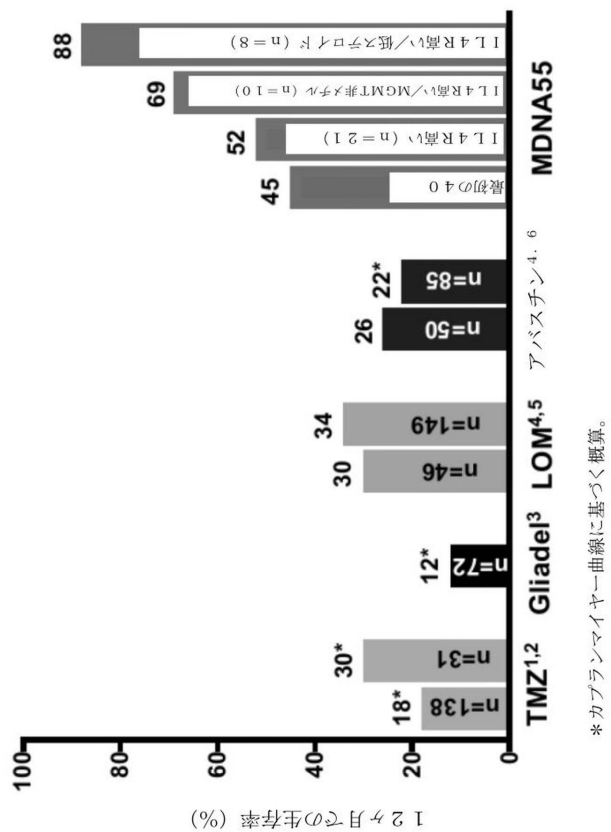


【図 3 3 A】



- 1 Brada et al., Ann Oncol. 2001;12(2):259-266.
- 2 Kim et al., J Clin Neurosci 22 (2015) 468-473, 2015.
- 3 Gliadel FDA Label 2018
- 4 Taat et al., Lancet Oncol 2014 Aug;15(9):943-53.
- 5 Wick et al., N Engl J Med. 2017 Nov 16;377(20):1954-1963.
- 6 Friedman et al., J Clin Oncol. 2009 Oct 1;27(28):4733-40.

【図 3 3 B】



\*カプランマイヤー曲線に基づく概算。

【配列表】

2022519377000001.app

10

20

30

40

50

## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | International application No.<br><b>PCT/CA2020/000013</b>                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC: <b>G01N 33/48</b> (2006.01), <b>A61K 47/68</b> (2017.01), <b>A61P 35/00</b> (2006.01), <b>C07K 14/195</b> (2006.01), <b>C07K 14/21</b> (2006.01), <b>C07K 14/415</b> (2006.01) (more IPCs on the last page)<br><br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                |
| Keywords used across the whole IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                |
| Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)<br>Questel-Orbit, Scopus, CIPOL Library Discovery Tool, Google<br>Search terms: interleukin-4 receptor IL-4R glioblastoma cancer tumor staging prognosis expression                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Relevant to claim No.                                                          |
| X<br>-----<br>Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | GARLAND, L. et al., "Phase I trial of intravenous IL-4 Pseudomonas Exotoxin protein (NBI-3001) in patients with advanced solid tumors that express the IL-4 receptor". Journal of Immunotherapy, 2005, Vol. 28, No. 4, pp. 376-381<br>* see entire document *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 1-3, 6-9, 13, 15-19, 22-28, 34, 35, 53, 60<br>-----<br>4, 5                    |
| X<br>-----<br>Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | US 2016/0271231 A1 (MERCHANT, F.) 22 September 2016 (22-09-2016)<br>* see entire document *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 1-3, 6-59<br>-----<br>4, 5                                                     |
| X<br>-----<br>Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | US 2012/0294931 A1 (KIM, I.S. et al.) 22 November 2012 (22-11-2012)<br>* see entire document *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 1-3, 6-17, 22-24, 46-54<br>-----<br>4, 5                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"D" document cited by the applicant in the international application<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                |
| Date of the actual completion of the international search<br>20 April 2020 (20-04-2020)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Date of mailing of the international search report<br>15 May 2020 (15-05-2020) |
| Name and mailing address of the ISA/CA<br>Canadian Intellectual Property Office<br>Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT<br>50 Victoria Street<br>Gatineau, Quebec K1A 0C9<br>Facsimile No.: 819-953-2476                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Authorized officer<br><br>Kathryn Blackwell (819) 639-5049                     |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
**PCT/CA2020/000013**

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*      | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Relevant to claim No.      |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| X<br>----<br>Y | BURT, B.M et al., " <i>Expression of Interleukin-4 Receptor Alpha in Human Pleural Mesothelioma Is Associated with Poor Survival and Promotion of Tumor Inflammation</i> ".<br>Clinical Cancer Research, 15 March 2012 (15-03-2012), Vol. 18, No.6, pp. 1568-1577<br>* see entire document *                                                                                                                            | 4, 13, 15<br>-----<br>4, 5 |
| Y              | HAN, J. et al., " <i>Analysis of the cancer genome atlas (TCGA) database identifies an inverse relationship between interleukin-13 receptor <math>\alpha 1</math> and <math>\alpha 2</math> gene expression and poor prognosis and drug resistance in subjects with glioblastoma multiforme</i> ".<br>Journal of Neuro-Oncology, 22 November 2017 (22-11-2017), Vol. 136, No. 3, pp. 463-474<br>* see entire document * | 4, 5                       |
| P, X           | WO 2019/073299 A1 (MERCHANT, F.) 18 April 2019 (18-04-2019)<br>* see entire document *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1-60                       |
| P, X           | WO 2019/051204 A1 (HUSAIN, S.R. et al.) 14 March 2019 (14-03-2019)<br>* see entire document *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 1-60                       |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/CA2020/000013**

| Patent Document<br>Cited in Search Report | Publication<br>Date            | Patent Family<br>Member(s)                                                                                                                                                                                                    | Publication<br>Date                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| US2016271231A1                            | 22 September 2016 (22-09-2016) | EP2352526A1<br>US2011171219A1<br>US2014193358A1<br>WO2010031185A1                                                                                                                                                             | 10 August 2011 (10-08-2011)<br>14 July 2011 (14-07-2011)<br>10 July 2014 (10-07-2014)<br>25 March 2010 (25-03-2010)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| US2012294931A1                            | 22 November 2012 (22-11-2012)  | US9833464B2<br>CN102724966A<br>CN102724966B<br>EP2520281A2<br>EP2520281A4<br>EP2520281B1<br>JP2013515767A<br>JP5676643B2<br>KR20110076836A<br>KR101270878B1<br>TW201121583A<br>TW1397428B<br>WO2011081443A2<br>WO2011081443A3 | 05 December 2017 (05-12-2017)<br>10 October 2012 (10-10-2012)<br>23 July 2014 (23-07-2014)<br>07 November 2012 (07-11-2012)<br>25 February 2015 (25-02-2015)<br>25 April 2018 (25-04-2018)<br>09 May 2013 (09-05-2013)<br>25 February 2015 (25-02-2015)<br>06 July 2011 (06-07-2011)<br>05 June 2013 (05-06-2013)<br>01 July 2011 (01-07-2011)<br>01 June 2013 (01-06-2013)<br>07 July 2011 (07-07-2011)<br>01 December 2011 (01-12-2011) |
| WO2019073299A1                            | 18 April 2019 (18-04-2019)     | None                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| WO2019051204A1                            | 14 March 2019 (14-03-2019)     | None                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/CA2020/000013**

*C07K 14/54* (2006.01), *C07K 16/28* (2006.01), *C07K 19/00* (2006.01), *G01N 33/574* (2006.01),  
*C07K 14/715* (2006.01)

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

## テーマコード (参考)

**G 0 1 N 33/53 (2006.01)****G 0 1 N****33/53****Y****G 0 1 N 33/574 (2006.01)****G 0 1 N****33/574****A**

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

カナダ国 エム 4 エス 3 イー 2 オンタリオ トロント ヤング ストリート 2 0 0 - 1 9 2 0 シ  
 ー / オー メディシナ セラピューティクス インコーポレイテッド

## F ターム (参考)

**2G045 AA26 CB02 DA36 FB03****4B063 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QR32 QR36 QR73 QR77 QS25****4C085 AA27 BB11 BB18 DD62 EE01 GG01****4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA42 DA76 EA51 FA74**