

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年5月9日(09.05.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/088176 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) *A61K 31/5377* (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01) *A61K 31/7036* (2006.01)
A61K 31/439 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)
A61K 31/496 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/040536

(22) 国際出願日: 2018年10月31日(31.10.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2017-211011 2017年10月31日(31.10.2017) JP

(71) 出願人: 国立大学法人神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 - 1 Hyogo (JP).

(72) 発明者: 松岡 広 (MATSUOKA, Hiroshi);
〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 - 1
国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).

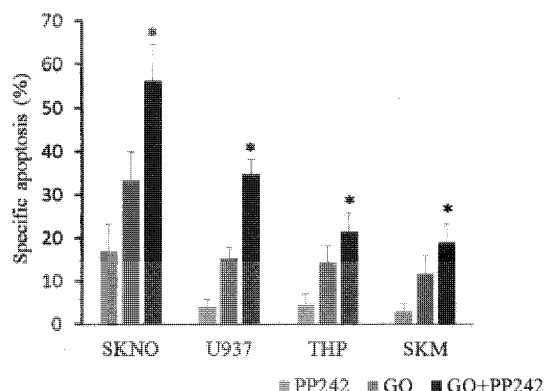
(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 1 - 7 - 1 北浜 T N Kビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, KG, 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, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: ENHANCER OF EFFECT OF ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

(54) 発明の名称: 抗体薬物複合体効果増強剤

[図2]



(57) Abstract: Provided is a method for enhancing the effect of an antibody-drug conjugate such as GO (gemtuzumab ozogamicin). More specifically provided is an enhancer of the effect of an antibody-drug conjugate, which contains a lysosome activator.

(57) 要約: G O (ゲムツズマブ・オゾガマイシン) 等の抗体薬物複合体の効果増強方法が提供される。具体的には、リソソーム活性化剤を含有する、抗体薬物複合体効果増強剤が提供される。

[続葉有]

WO 2019/088176 A1

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：抗体薬物複合体効果増強剤

技術分野

[0001] 本発明は、抗体薬物複合体の効果を増強する手段等に関する。

背景技術

[0002] 急性骨髄性白血病（AML）に対する化学療法の結果は満足すべきものではなく、5年生存率は40%弱に留まっている。分子標的薬ゲムツズマブ・オゾガマイシン（Gemtuzumab Ozogamicin：GO）は、抗CD33モノクローナル抗体と強力な殺細胞効果を持つカリケアマイシンを結合させた抗体薬物複合体（Antibody-Drug Conjugates：ADC）であり、CD33はAML症例の約90%で発現が認められるため、AMLに対する画期的な分子標的薬として期待を集めた。2000年に米国にて再発・難治性高齢者AMLに対して承認され、2005年には我が国においても再発・難治性AMLに対して単剤でのGO投与が承認された。ただ、再発・難治性AMLに対する単剤での5年生存率は30%弱に留まっていた。そこで、初発AMLに対する従来の標準治療法Daunorubicin+AraCへGOを上乗せすることにより効果増強を図るべく臨床試験（第三相臨床試験（SWOG S0106試験））が行われたが、GO上乗せ群でAMLに対する効果は変わらず、むしろ致死的な副作用発現が多かったことから、2010年に発売元Pfizer社は米国市場からGOを自主的に取り下げた（なお、その後、GOは2017年9月14日にFDAによって再承認されている）。ただし、日本では承認続行となっていて使用されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第2008/026603号

特許文献2：国際公開第2009/041643号

非特許文献

- [0004] 非特許文献1: *Leukemia* (2013) 27, 233-235
非特許文献2: *Clin Cancer Res.* 2015 August 1; 21(15): 3412-3419
非特許文献3: *Cell Research* (2013) 23:508-523

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明は、GO（ゲムツズマブ・オゾガマイシン）の効果増強方法の提供を課題とする。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者らは、リソソームを活性化（特に細胞内リソソーム数を増加させる）ことで、GOのゲムツズマブとオゾガマイシンとを結合するリンカー（ヒドラゾンリンカー）が効果的に切断されること、リソソームを活性化（特に細胞内リソソーム数を増加させる）ためにmTOR阻害剤を好適に用い得ること、を見出した。そして、抗体薬物複合体（Antibody-Drug Conjugate: ADC）は抗体が認識した細胞に結合した後、通常エンドサイトーシスにより細胞に取り込まれ、さらにリソソームにおいて抗体と薬物とを結合するリンカーが切断され、分離した薬物が細胞内で薬効を発揮することから、リソソームを活性化させることで、GOに限らず抗体薬物複合体の効果を増強できることを認識し、さらに改良を重ねて本発明を完成させるに至った。

- [0007] 本発明は例えば以下の項に記載の主題を包含する。

- [0008] 項A-1.

リソソーム活性化剤を含有する、抗体薬物複合体効果増強剤。

項A-2.

リソソーム活性化剤が、mTOR阻害剤である、項A-1に記載の増強剤。

項 A-3.

リソソーム活性化剤が、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、P P 2 4 2、T o r i n 1、A Z D 2 0 1 4、及び M L N 0 1 2 8 からなる群より選択される少なくとも 1 種である、項 A-1 に記載の増強剤。

項 A-4.

前記抗体薬物複合体の薬物が抗ガン剤（例えば、カリケアマイシン、エスペラマイシン、エムタンシン、a u r i s t a t i n F-H P A (F-hydroxy propylamide)、a d e r i v a t i v e o f D X-8 9 5 1 (D X d)、及びモノメチルアウリスタチン E (M M A E) からなる群より選択される少なくとも 1 種) である、項 A-1 ~ A-3 のいずれかに記載の増強剤。

項 A-5.

前記抗体薬物複合体の抗体と薬物とが、リソソーム内で切断されるリンカー（好ましくは、酸性状態で切断されるリンカーにより結合されているか、あるいはリソソーム内酵素により切断されるリンカー）で結合されている、項 A-1 ~ A-4 のいずれかに記載の増強剤。

項 A-6.

前記抗体薬物複合体の抗体と薬物とが、ヒドラゾンリンカー、マレイミドリリンカー、チオエーテルリンカー、ペプチドリリンカー、及びこれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも 1 種により結合されている、項 A-1 ~ A-4 のいずれかに記載の増強剤。

項 A-7.

前記抗体薬物複合体の抗体が、ゲムツズマブ、トラスツズマブ、ブレンツキシマブ、イノツズマブ、リツキシマブ、オフアツムマブ、モガムリズマブ、及びアレムツズマブからなる群より選択される、少なくとも 1 種である、項 A-1 ~ A-4 のいずれかに記載の増強剤。

[0009] 項 B-1.

リソソーム活性化剤が投与された状態若しくは投与される状態の患者に投与

されるように用いられる、抗体薬物複合体組成物。

項 B-2.

リソソーム活性化剤が、mTOR 阻害剤である、項 B-1 に記載の抗体薬物複合体組成物。

項 B-3.

リソソーム活性化剤が、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、PPP242、Torin1、AZD2014、及びMLN0128からなる群より選択される少なくとも1種である、項 B-1 に記載の抗体薬物複合体組成物。

項 B-4.

前記抗体薬物複合体の薬物が抗ガン剤（例えば、カリケアマイシン、エスペラマイシン、エムタンシン、auristatin F-HPA (F-hydroxy propylamide)、a derivative of DX-8951 (DXd)、及びモノメチルアウリスタチンE (MMAE) からなる群より選択される少なくとも1種) である、項 B-1 ~ B-3 のいずれかに記載の抗体薬物複合体組成物。

項 B-5.

前記抗体薬物複合体の抗体と薬物とが、リソソーム内で切断されるリンカー（好ましくは、酸性状態で切断されるリンカーにより結合されているか、あるいはリソソーム内酵素により切断されるリンカー）で結合されている、項 B-1 ~ B-4 のいずれかに記載の抗体薬物複合体組成物。

項 B-6.

前記抗体薬物複合体の抗体と薬物とが、ヒドラゾンリンカー、マレイミドリリンカー、チオエーテルリンカー、ペプチドリリンカー、及びこれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1種により結合されている、項 B-1 ~ B-4 のいずれかに記載の抗体薬物複合体組成物。

項 B-7.

前記抗体薬物複合体の抗体が、ゲムツズマブ、トラスツズマブ、ブレントキ

シマブ、イノツズマブ、リツキシマブ、オフアツムマブ、モガムリズマブ、及びアレムツズマブからなる群より選択される、少なくとも1種である項B-1～B-4のいずれかに記載の抗体薬物複合体組成物。

[0010] 項C.

項A-1～A-7のいずれかに記載の増強剤と、項B-1～B-7のいずれかに記載の抗体薬物複合体組成物と、を備えた、前記抗体薬物複合体の薬物が治療対象とする疾患の治療用組成物若しくは治療用キット。

[0011] 項D-1.

リソソーム活性化剤が投与された状態若しくは投与される状態の患者に投与されるように用いられる、抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体を含有する白血病治療組成物。

項D-2.

リソソーム活性化剤が、mTOR阻害剤である、項D-1に記載の白血病治療組成物。

項D-3.

mTOR阻害剤が、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、PP242、Torin1、AZD2014、及びMLN0128からなる群より選択される少なくとも1種である、項D-1又はD-2に記載の白血病治療組成物。

項D-4.

白血病が急性骨髄性白血病(AML)である、項D-1～D-3のいずれかに記載の白血病治療組成物。

項D-5.

DNA切断抗ガン剤がカリケアマイシン又はエスペラマイシンである、項D-1～D-4のいずれかに記載の白血病治療組成物。

項D-6.

抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体が、ゲムツズマブ・オゾガマイシンである、項D-1～D-5のいずれかに記載の白血病治療組成物。

項D-7.

抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体と、リソソーム活性化剤と、を含む、抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体効果増強組成物。

項D-8.

抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体と、リソソーム活性化剤と、を備えた、白血病治療用キット。

項D-9.

リソソーム活性化剤を含む、抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体効果増強剤。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、GO（ゲムツズマブ・オゾガマイシン）の治療効果はもちろんのこと、GOに限らない抗体薬物複合体の治療効果を増強させることができ、また副作用の懸念も少ない。

図面の簡単な説明

[0013] [図1a]各濃度PP242で細胞処理した時の死細胞割合（specific apoptosis）%を示す。

[図1b]各濃度PP242で細胞処理した時のAKTタンパク質及びS6Kタンパク質のリン酸化の程度をウエスタンブロットで解析した結果を示す。

[図2]各AML細胞株に対して、PP242単独処理、GO（ゲムツズマブ・オゾガマイシン）単独処理、又はPP242及びGOの併用処理を行った際の、死細胞割合（specific apoptosis）%を評価した結果を示す。

[図3]各AML細胞株（処理なし、PP242単独処理、GO単独処理、又はPP242及びGO併用処理）を蛍光色素LysoTracker（登録商標）により染色し解析した結果を示す。

[図4]GO（ゲムツズマブ・オゾガマイシン）の作用機序を示す。

[図5a]急性骨髄性白血病細胞株（U937）に対して、AZD2014単独処理、GO（ゲムツズマブ・オゾガマイシン）単独処理、又はAZD201

4 及び G O の併用処理、を行い、36 時間培養後に A n n e x i n V - P I (p r o p i d i u m i o d i d e) 染色を施行して、フローサイトメトリーを用いて、死細胞割合 (s p e c i f i c a p o p t o s i s) % を評価した結果を示す。

[図5b]急性骨髄性白血病細胞株 (S K M - 1) に対して、A Z D 2 0 1 4 単独処理、G O (ゲムツズマブ・オゾガマイシン) 単独処理、又は A Z D 2 0 1 4 及び G O の併用処理、を行い、36 時間培養後に A n n e x i n V - P I (p r o p i d i u m i o d i d e) 染色を施行して、フローサイトメトリーを用いて、死細胞割合 (s p e c i f i c a p o p t o s i s) % を評価した結果を示す。

[図6]U 9 3 7 細胞株 (処理なし、A Z D 2 0 1 4 単独処理、G O 単独処理、又は A Z D 2 0 1 4 及び G O 併用処理) を蛍光色素 L y s o T r a c k e r (登録商標) により染色し解析した結果を示す。

[図7]AML 患者 6 名から初代培養細胞 (プライマリーセル) を調製し、当該 AML 初代培養細胞 (A M L c e l l 1 ~ 6) を用いて、A Z D 2 0 1 4 と G O との併用により G O 効果の増強が認められるかを検討した結果 (死細胞割合) を示す。

[図8]S K M - 1 細胞を用いて、48 時間培養後に A n n e x i n V - P I (p r o p i d i u m i o d i d e) 染色を施すことにより、I N K 1 2 8 と G O との併用により G O 効果の増強が認められるかを検討した結果 (死細胞割合) を示す。

[図9]D a u d i 細胞を用いて、m T O R 阻害剤 P P 2 4 2 を 4 0 0 n M、及び抗体薬物複合体イノツズマブ オゾガマイシン (I O) を 2 n g / m l を単独使用又は併用し、これらの併用により I O 効果の増強が認められるかを検討した結果 (死細胞割合) を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明の各実施形態について、さらに詳細に説明する。

[0015] 本発明には、リソソーム活性化剤を含有する、抗体薬物複合体効果増強剤

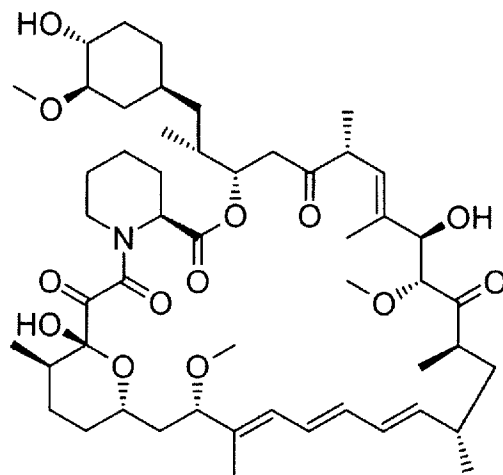
が包含される。（「本発明の増強剤」ということがある。）抗体薬物複合体（Antibody-Drug Conjugate：ADC）は抗体が認識した細胞に結合した後、通常エンドサイトーシスにより細胞に取り込まれ、さらにリソソームにおいて抗体と薬物とを結合するリンカーが切断され、分離した薬物が細胞内で薬効を発揮することから、リソソームを活性化させることで、抗体薬物複合体の効果を増強することができる。

[0016] リソソーム活性化剤としては、特に細胞当たりのリソソームの数を増加させるもの（リソソーム数増加剤）が好ましい。このようなリソソーム活性化剤としては、例えば、mTOR阻害剤が好ましく挙げられる。一部のmTOR阻害剤には細胞当たりのリソソームの数を増加させる効果があることが、上記非特許文献3で示唆されている。mTORは哺乳類におけるラパマイシン標的タンパク質（mammalian target of rapamycin）であり、細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質キナーゼ（セリン・スレオニンキナーゼ）の1種である。mTORは、複数のタンパク質による複合体（complex）を形成し、複合体はmTORCと呼ばれる。mTORは機能的に異なる2種類の複合体、mTOR複合体1（mTORC1）とmTOR複合体2（mTORC2）を形成する。mTOR阻害剤としては、mTORC1阻害剤、mTORC2阻害剤、又はmTORCデュアル阻害剤（すなわち、mTORC1及びmTORC2の両方を阻害する阻害剤）であってよく、mTORCデュアル阻害剤が好ましい。

[0017] mTOR阻害剤としては、公知のmTOR阻害剤を用いることができる。より具体的には、例えば、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、PP242（トルキニブ）、Torin1、AZD2014、MLN0128、ダクトリシブ（BEZ235）、AZD8055、SF2523、CZ415、PI-103、KU-0063794、タクロリムス、リダフォロリムス、Voxtalisisib（SAR245409，XL765）Analogue、オミパリシブ（GSK2126458，GSK458）、OSI-027、PF-04691502、アピトリシブ（GDC-0

980, RG7422)、GSK1059615、ゲダトリシブ、WYE-354、Torin2、WYE-125132 (WYE-132)、BGT226 (NVP-BGT226)、P529、PP121、WYE-687、WAY-600、ETP-46464、GDC-0349、ゾタロリムス (ABT-578)、Voxtalisisb (XL765, SAR245409)、クリソファニック酸、CC-223、LY3023414、3BDO、MHY1485等を用いることができる。なお、ラパマイシン、テムシロリムス、及びエベロリムスはmTORC1阻害剤であり、PP242、Torin1、AZD2014、及びMLN0128はmTORCデュアル阻害剤である。mTOR阻害剤は市販品を購入して用いることができる。

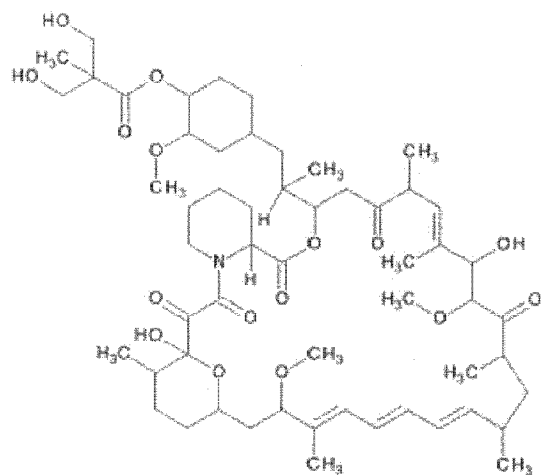
[0018] [化1]



<ラパマイシン>

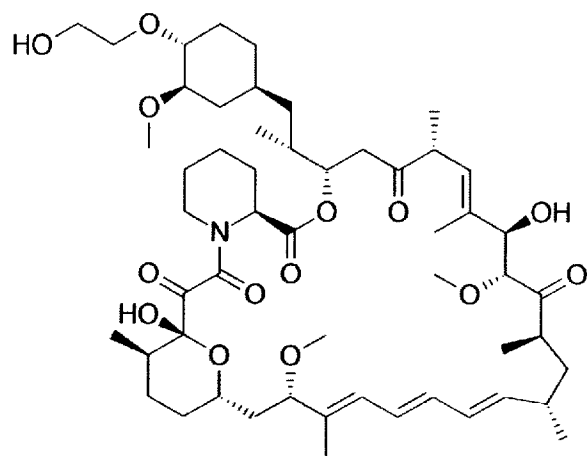
[0019]

[化2]



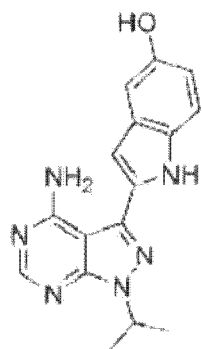
<テムシロリムス>

[0020] [化3]



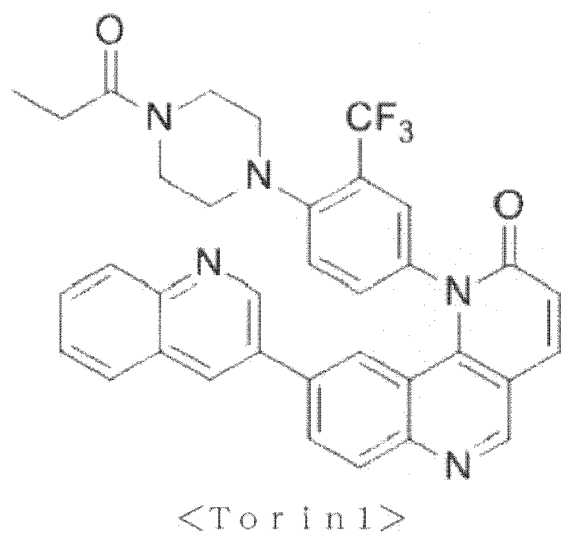
<エベロリムス>

[0021] [化4]

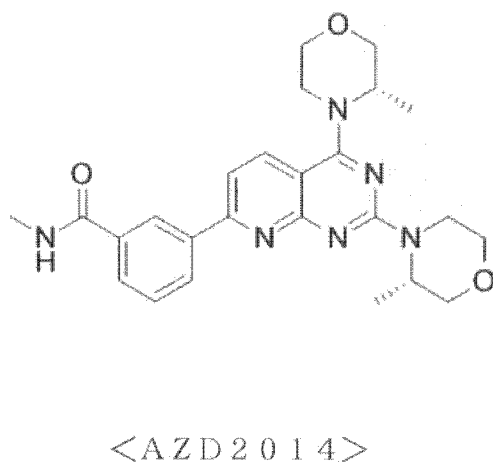


<PP242>

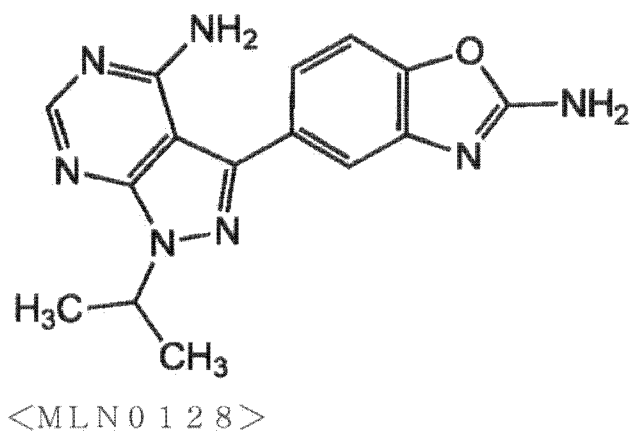
[0022] [化5]



[0023] [化6]

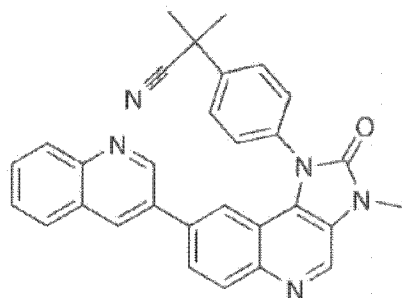


[0024] [化7]



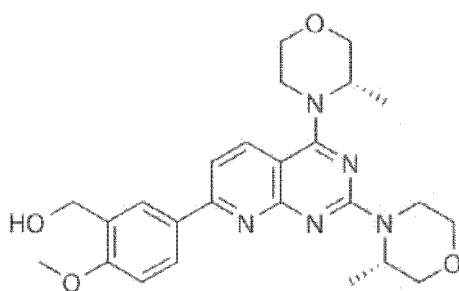
[0025]

[化8]



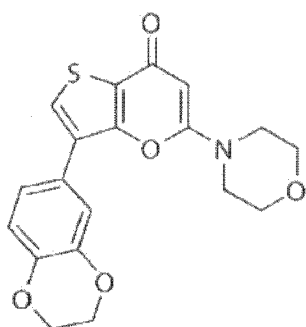
<ダクトリシブ>

[0026] [化9]



<AZD8055>

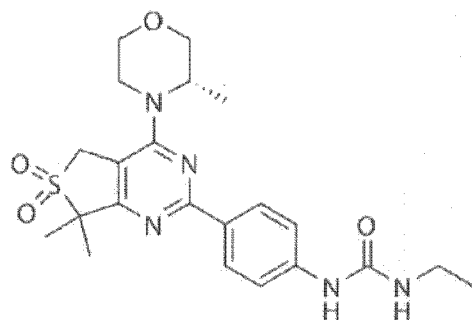
[0027] [化10]



<SF2523>

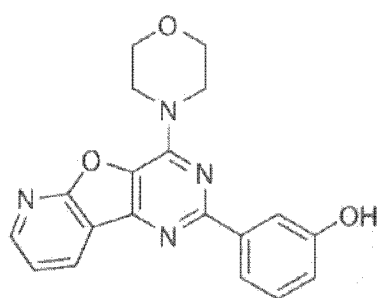
[0028]

[化11]



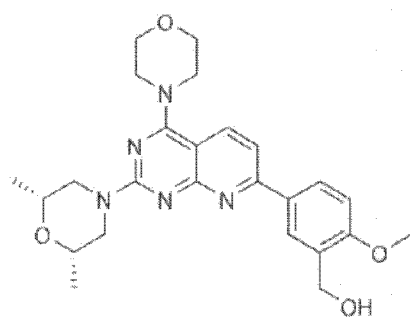
<CZ415>

[0029] [化12]



<PI-103>

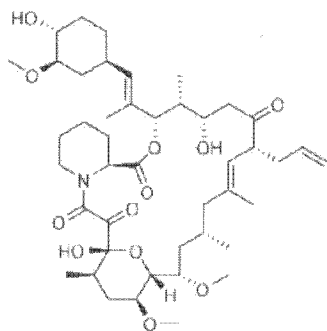
[0030] [化13]



<KU-0063794>

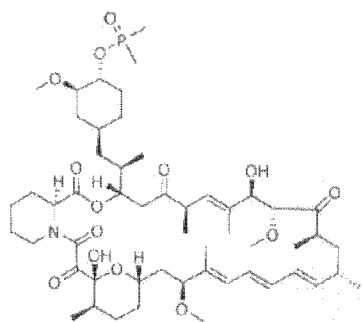
[0031]

[化14]



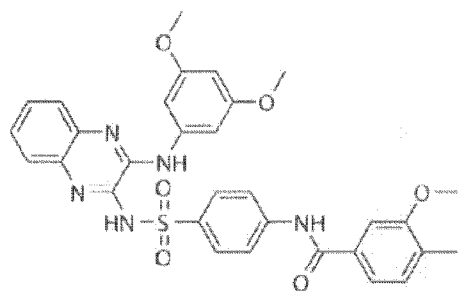
＜タクロリムス＞

[0032] [化15]



＜リダフロロリス＞

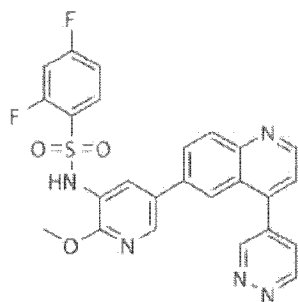
[0033] [化16]



<Voxtalisib (SAR245409, XL765) Analogue>

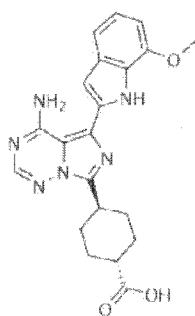
[0034]

[化17]



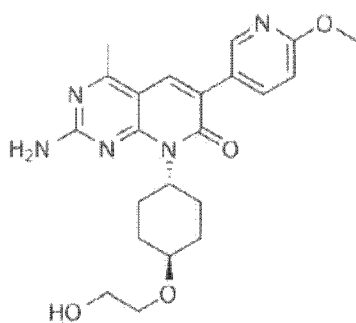
<オミパリシブ>

[0035] [化18]



<OSI-027>

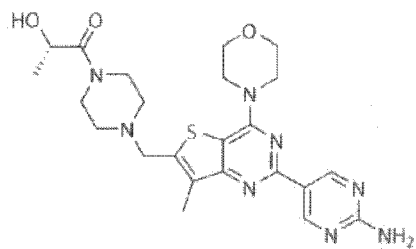
[0036] [化19]



<PF-04691502>

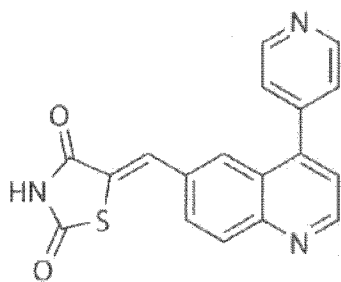
[0037]

[化20]



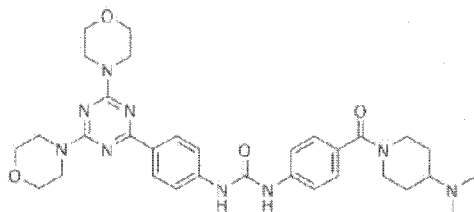
<アピトリシブ>

[0038] [化21]



<GSK1059615>

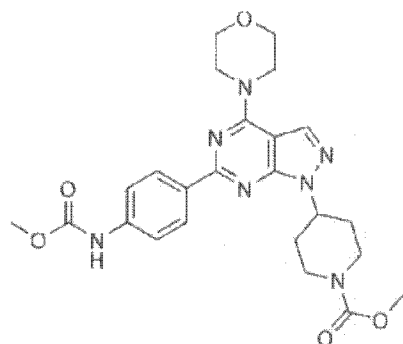
[0039] [化22]



<ゲダトリシブ>

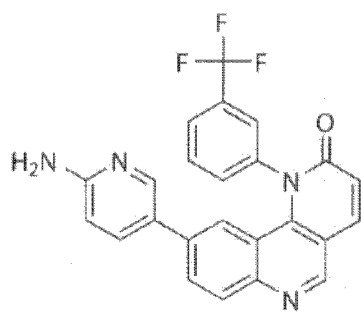
[0040]

[化23]



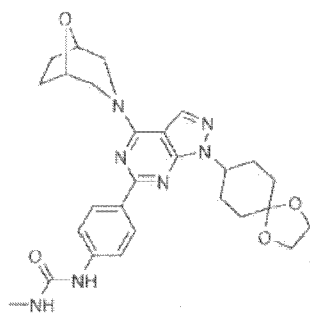
<WYE-354>

[0041] [化24]



<Torin2>

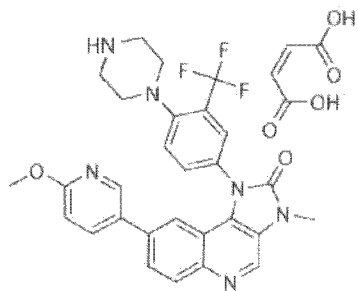
[0042] [化25]



<WYE-125132>

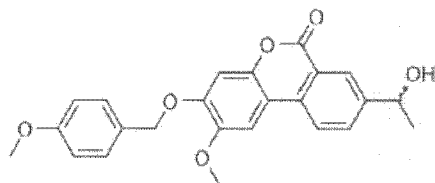
[0043]

[化26]



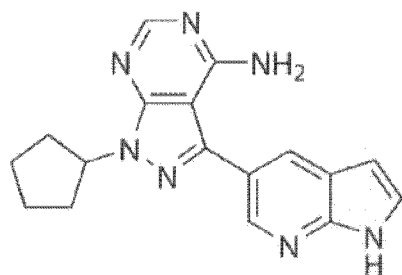
<BGT 226>

[0044] [化27]



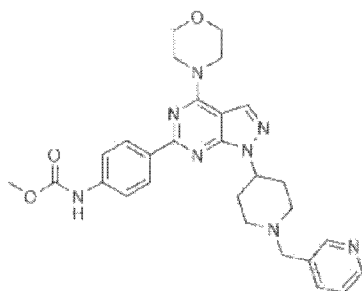
<P 529>

[0045] [化28]



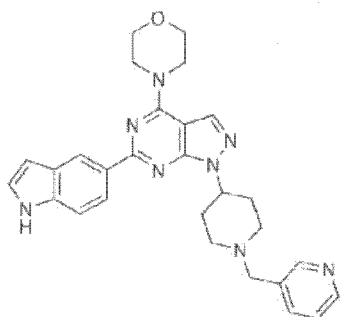
<PP 121>

[0046] [化29]



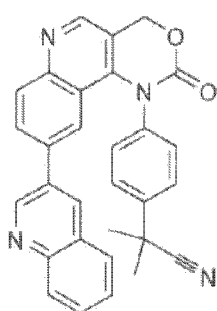
<WYE-687>

[0047] [化30]



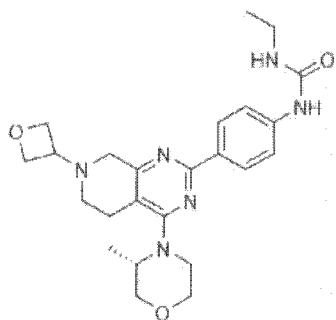
<WAY-600>

[0048] [化31]



<ETP-46464>

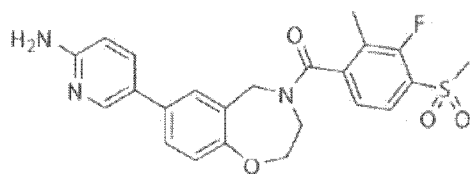
[0049] [化32]



<GDC-0349>

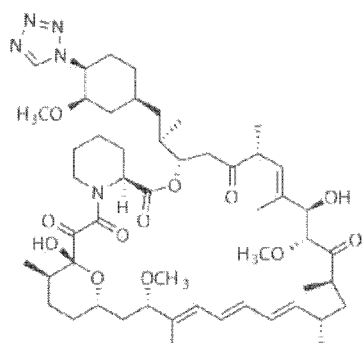
[0050]

[化33]



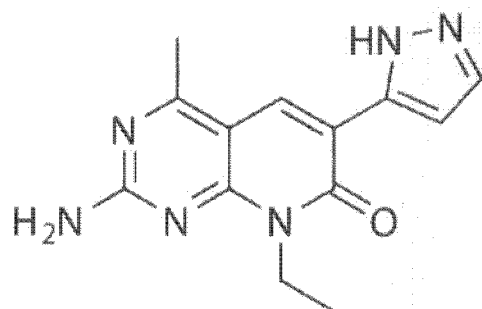
<XL388>

[0051] [化34]



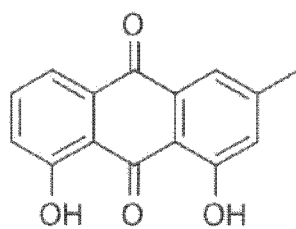
<ゾタロリムス>

[0052] [化35]



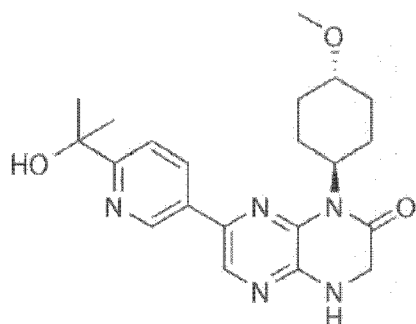
<Voxtalisib>

[0053] [化36]



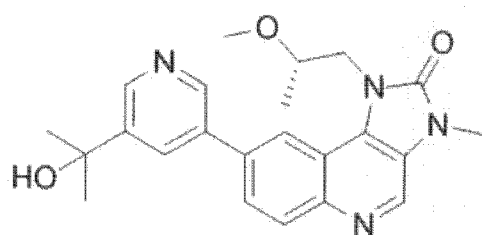
<クリソファニック酸>

[0054] [化37]



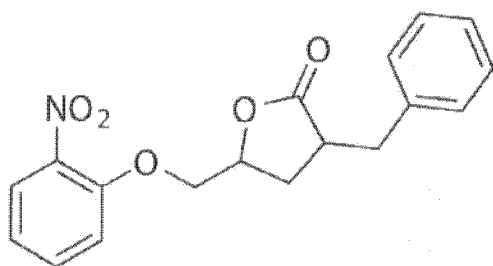
<CC-223>

[0055] [化38]



<LY3023414>

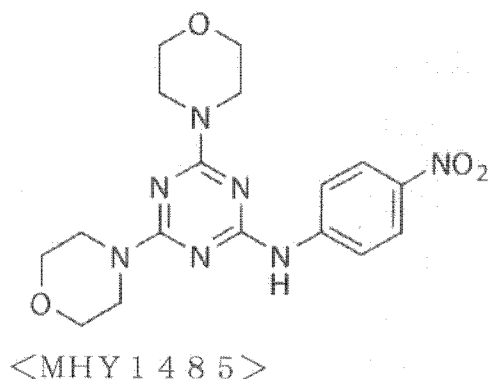
[0056] [化39]



<3BDO>

[0057]

[化40]



[0058] リソソーム活性化剤は1種単独で又は2種以上を組み合わせて用いることができる。

[0059] 抗体薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugate: ADC) としては、特に制限はされず、例えば公知の抗体薬物複合体を用いることができる。抗体薬物複合体において、抗体と薬物はリンカーにより結合されている。当該リンカーとしては、例えばリソソーム内で切断されるリンカーが好ましい。リソソーム内で切断されるリンカーとしては、例えば、酸性状態で切断されるリンカーにより結合されているか、あるいはリソソーム内酵素により切断されるリンカーが挙げられる。このようなリンカーは、当該分野（特に抗体薬物複合体分野）において公知のリンカーや、あるいは開発中のリンカーを用いることができる。このようなリンカーとしては、より具体的には、例えば、ヒドラゾンリンカー（例えばセミカルバゾンリンカー）、マレイミドリンカー、チオエーテルリンカー、ペプチドリンカー（例えば、valine-citrulline (vc) dipeptide リンカー、valine-alanine (va) dipeptide リンカー、phenylalanine-lysine (Phe-Lys) dipeptide リンカー、glycyl-glycyl-phenylalanine-glycyl (GGFG) peptide リンカー等）等が挙げられる。また、これらの組み合わせにより構成されるリンカーも好ましい。例えば、ペプチドリンカーとマレイミドリンカーを組み合わせ一つのリンカーとして用いる（例えば、抗体とペプチドリンカーとの間にマレイミドリンカーを配置する）こともできる。なお、これらのリンカーは、それぞれに

記載される構造（セミカルバゾン、マレイミド、ヒドラゾン、チオエーテル、valine-citrulline dipeptide、valine-alanine dipeptide、glycyl-glycyl-phenylalanine-glycyl (GGFG) peptide等）が含まれた構造を有するリンカーである。ヒドラゾンリンカーは血清中では安定で、細胞内への内在化の後、リソソーム内の酸性環境で加水分解される。ペプチドリンカーはリソソーム内プロテアーゼ（例えばカテプシンB等）によって、分解される。チオエーテルリンカーは容易に切断されず、血清中での安定性に優れ、血清中で薬物をリリースしにくいため、副作用が出にくいと考えられている。腫瘍細胞に取り込まれた後、リソソーム内で抗体全体が分解されてトキシンが遊離するとされる。あるいはまた、当該リンカーとして、Fleximerリンカー（Mersana Therapeutics社）等のリンカーを用いることもできる。

[0060] また、例えば、Int J Mol Sci. 2016 Apr; 17(4): 561に挙げられる公知のリンカー又は当該公知のリンカーから容易に想到できるリンカーを用いることができる。

抗体薬物複合体に含まれるリンカーは、1種単独であってもよいし、2種以上が組み合わせられていてもよい。一つのリンカーに上記の各リンカーの1種又は2種以上が配置されていてもよい。また、一つの抗体薬物複合体において、抗体と薬物とを結合するリンカーが全て同一であってもよいし、2種以上のリンカーが用いられていてもよい。

[0061] また、抗体薬物複合体の薬物（ペイロード）としては、特に制限はされないが、抗ガン剤が好ましく例示される。抗ガン剤としては、例えばDNAを切断することで抗ガン効果を奏するもの（DNA切断抗ガン剤）が好ましく挙げられるが、特に限定はされない。また、抗ガン剤として、より具体的には、例えば、カリケアマイシン、エスペラマイシン、エムタンシン、auristatin F-HPA (F-hydroxypropylamide)、a derivative of DX-8951 (DXd)、モノメチルアウリスタチンE (MMAE) 等を挙げることができる。

[0062] また、抗体としては、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体

であってもよく、モノクローナル抗体が好ましい。また、本発明をヒトに適用する場合には、抗体はキメラ抗体、ヒト化抗体、又は完全ヒト化抗体（ヒト抗体）であることが好ましい。これら抗体は公知の方法か、又は公知の方法から容易に想到できる方法によって製造することができる。特に制限されないが、例えばWO2008/026603、WO2009/041643等に記載の内容を参考にすることができる。

[0063] 抗体薬物複合体を構成する抗体と薬物とは、お互いに関連していることが好ましい。すなわち、薬物の効果が特に必要とされる部位を抗体が認識することが好ましい。例えば、抗体薬物複合体の薬物が抗ガン剤である場合には、当該抗体薬物複合体の抗体はガン細胞を認識する抗体が好ましく、ガン細胞特異的に結合する抗体がより好ましい。このようなガン細胞を認識する抗体としては、公知のガン細胞マーカーを抗原として用いて適宜調製することができる。特に制限されないが、例えば、抗CD33抗体、抗CD30抗体、抗CD22抗体、抗Her2抗体等が挙げられる。ガンが白血病の場合には、抗CD33抗体、抗CD30抗体、抗CD22抗体などが特に好ましく、ガンが乳ガン等である場合には抗Her2抗体などが特に好ましい。

[0064] 特に制限されないが、抗体としては、より具体的には、ゲムツズマブ、トラスツズマブ、ブレンツキシマブ、イノツズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、モガムリズマブ、及びアレムツズマブ等が好ましく挙げられる。

[0065] また、特に制限されないが、抗体薬物複合体としては、より具体的には、例えば、ゲムツズマブ オゾガマイシン（製品名マイロターグ（登録商標））、トラスツズマブ エムタンシン（製品名カドサイラ（登録商標））、XMT-1522、DS-8201a、ブレンツキシマブ ベドチン（製品名アドセトリス（登録商標））、イノツズマブ オゾガマイシン（製品名Besponsa）等が挙げられる。但し、これらに特に限定はされない。例えば、

[表1]

<https://clinicaltrials.gov/>

において公知の抗体薬物複合体（antibody drug conjugate）を検索すること

ができ、検索結果として得られる公知の抗体薬物複合体についても本発明に好ましく用いることができる。また例えば、

[表2]

<https://adcreview.com/adc-university/adc-drugmap/>

には公知の抗体薬物複合体が纏められており、これらも本発明に好ましく用いることができる。

[0066] 本発明の増強剤は、リソソーム活性化剤のみからなるものであってもよいし、リソソーム活性化剤以外のその他成分を含有してもよい。その他成分としては特に制限されず、薬学的に許容される基剤、担体、添加剤（例えば賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、溶剤、甘味剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤、界面活性剤、保湿剤、保存剤、pH調整剤、粘稠化剤等）等が挙げられる。このような基材、担体、添加剤等は、例えば医薬品添加物辞典2016（株式会社薬事日報社）等に具体的に記載されており、例えばこれに記載されるものを用いることができる。また製剤形態も特に制限されず、常法により有効成分及びその他の成分を混合し、例えば錠剤、被覆錠剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、カプセル剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、ゼリー剤、チュアブル剤、ソフト錠剤等の製剤に調製することができる。また本発明の増強剤の投与経路としては、例えば経口投与又は静脈投与が好ましい。

[0067] 本発明の増強剤は、含有されるリソソーム活性化剤により、リソソームを活性化（特にリソソーム数を増加）できる量を患者に投与することが好ましく、活性化の程度を基準に各種リソソーム活性化剤の投与量及び投与経路を適宜設定することができる。そして、これに応じて、本発明の増強剤の投与量及び投与経路も適宜設定することができる。特に、既にヒト投与試験が行われているリソソーム活性化剤については、その投与試験で用いられた投与量及び投与経路を参考に適宜設定することもできる。例えば、AZD2014はアストラゼネカ社が治験中の経口投与可能な薬剤で、PK結果を含めたPhase 1試験結果は既に論文発表されており（上記非特許文献2）、当該試験で定められたヒトへの推奨投与量（recommended dos

e, RD) は50mgを1日2回投与であるので、これを参考とすることができる。例えば、成人一日あたり、50～200mg、60～180mg、70～160mg、80～140mg、又は90～120mg程度とすることができる。また、当該1日投与量を一度に投与してもよいし、1日に2、3、又は4回程度に分けて投与することもできる。

[0068] 本発明は、また、リソソーム活性化剤が投与された状態若しくは投与される状態の患者に投与されるように用いられる、抗体薬物複合体組成物（抗体薬物複合体を含有する組成物）をも包含する。当該抗体薬物複合体組成物は、抗体薬物複合体のみからなる組成物であってもよいし、その他の成分をさらに含んでいてもよい。その他成分としては、特に制限されず、例えば、上述したリソソーム活性化剤におけるその他成分と同様の成分を用いることができる。なお、薬学的に許容される担体としては、例えば、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤等が挙げられる。特に、注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。より具体的には、注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬（例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム）を含む等張液が挙げられる。適当な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート80（TM）、HCO-50等）を併用してもよい。また、油性液としてはゴマ油、大豆油等があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル及び／またはベンジルアルコールを併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液及び酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩酸プロカイン）、安定剤（例えば、ベンジルアルコール及びフェノール）、酸化防止剤と配合してもよい。

[0069] なお、当該抗体薬物複合体組成物に用いられるリソソーム活性化剤及び抗体薬物複合体については、上述したのと同じである。

[0070] 以下、当該抗体薬物複合体組成物として、特に抗CD33抗体－DNA切断抗ガン剤複合体（すなわち、抗CD33抗体とDNA切断抗ガン剤とが結合された複合体）を含有する組成物を好適な一例として挙げ、詳細に説明する。当該一例を用いた説明により、当業者はリソソーム活性化剤が投与された状態若しくは投与される状態の患者に投与されるように用いられる、抗体薬物複合体組成物全体について理解し得る。すなわち、当該一例を用いた説明中、当該一例のみならず他の抗体薬物複合体組成物についても適用可能な部分については、他の抗体薬物複合体組成物についても妥当する。

[0071] 白血病細胞認識抗体（好ましくは白血病細胞特異的抗体）－抗ガン剤複合体を有する組成物は、白血病治療組成物として有用である。以下、このような組成物を「本発明の白血病治療組成物」ということがある。中でも、抗CD33抗体－DNA切断抗ガン剤複合体を含有する組成物は、特に白血病治療組成物として有用である。以下、代表的に、抗CD33抗体－DNA切断抗ガン剤複合体を含有する組成物を詳細に説明するが、本発明の白血病組成物はこれに限定はされるものではなく、当業者であれば異なる抗体及び／又は薬物を用いた抗体薬物複合体組成物についても適用可能な部分については、異なる抗体及び／又は薬物を用いた抗体薬物複合体組成物についても妥当すると理解し得る。例えば、当該説明において、「抗CD33抗体－DNA切断抗ガン剤複合体」との記載は、「ガン細胞認識抗体（好ましくはガン細胞特異的抗体）－抗ガン薬物複合体」、「白血病細胞認識抗体（好ましくは白血病細胞特異的抗体）－抗ガン剤複合体」、「白血病細胞認識抗体（好ましくは白血病細胞特異的抗体）－DNA切断抗ガン剤複合体」等と読み替えることができる。

[0072] 抗CD33抗体は、CD33抗原を認識する抗体であればよく、CD33抗原を特異的に認識する抗体が好ましい。また、抗体はポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であってよく、モノクローナル抗体が好ましい。また、本発明をヒトに適用する場合には、抗体はキメラ抗体、ヒト化抗体、又は完全ヒト化抗体（ヒト抗体）であることが好ましい。これら抗体は公知の

方法か、又は公知の方法から容易に想到できる方法によって製造することができる。特に制限されないが、例えばWO 2008/026603、WO 2009/041643等に記載の内容を参考にすることができる。

[0073] DNA切断抗ガン剤は、DNAを切断することにより抗ガン作用を示す抗ガン剤である。このような抗ガン剤としては、公知のものを好ましく利用することができる。中でも、カリケアマイシン又はエスペラマイシンがこのましく、カリケアマイシン（特にオゾガマイシン）がより好ましい。

[0074] 抗CD33抗体とDNA切断抗ガン剤とは、酸性状態で切断（加水分解）されるリンカーにより結合されているか、あるいはリソソーム内酵素で切断されるリンカーにより結合されていることが好ましい。このようなリンカーとしては、上述したとおりであるが、例えば、マレイミドリンカー、ヒドラゾンリンカー（例えばセミカルバゾンリンカー）、チオエーテルリンカー等が挙げられ、中でもヒドラゾン結合が好ましい。

[0075] 抗CD33抗体－DNA切断抗ガン剤複合体としては、例えば前記抗CD33抗体が、前記結合により、前記DNA切断抗ガン剤と結合した構造を有する複合体を、好ましく用いることができる。特に、ゲムツズマブ・オゾガマイシン（GO：商品名「マイロターグ」（登録商標））が好ましい。

[0076] 本発明の白血病治療組成物による治療の対象となる白血病は、抗CD33抗原が発現している白血病細胞が存在する白血病（CD33陽性白血病）が好ましく、中でも急性骨髄性白血病（AML）ではCD33陽性白血病細胞の割合が多いため、治療対象として特に好ましい。

[0077] 抗CD33抗体－DNA切断抗ガン剤複合体は、1種単独で又は2種以上を組み合わせ用いることができる。

[0078] 本発明の白血病治療組成物は、リソソーム活性化剤が（i）投与された状態若しくは（ii）投与される状態の患者に投与されるように用いられる。つまり、本発明の白血病治療組成物は、（i）リソソーム活性化剤を既に投与された患者に投与されるように用いられてもよいし、（ii）リソソーム活性化剤が未だ投与されていないが投与されることが予定されている患者に

投与されるように用いられてもよい。いずれの場合であっても、リソソーム活性化剤と本発明の白血病治療組成物との投与間隔は、本発明の効果が損なわれない範囲であれば特に制限はされない。例えば、当該投与間隔は、2週間、1.5週間、1週間、6、5、4、3、2、又は1日程度であってもよい。また、リソソーム活性化剤により白血病細胞におけるリソソームが活性化されている（特にリソソーム数が増加している）状態において、本発明の白血病治療組成物に含まれる抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体が白血病細胞に到達できる程度の投与間隔としてもよい。例えば、リソソーム活性化剤と本発明の白血病治療組成物との投与間隔は、6、5、4、3、2、又は1時間以内であることが好ましく、30分以内であることがより好ましく、15分以内であることがさらに好ましく、3分以内に連続投与又は同時投与することがよりさらに好ましい。なお、上記（i i）の用いられかたはリソソーム活性化剤との同時投与を包含する。

[0079] 本発明の白血病治療組成物は、含有される抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体量を基準に、投与量を適宜設定することができる。つまり、含有される抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体が抗癌作用を発揮できる程度の投与量となるように、本発明の白血病治療組成物の投与量を調整すればよい。また、投与経路としては、静脈投与が好ましい。特に、抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体がGOである場合には、例えばGOの投与量が成人一日あたり1~20mg/m²となることが好ましく、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20mg/m²となることがより好ましい。また、複数回（例えば、2、3、4、又は5回）投与してもよいが、その場合は先の投与から2~4週間後に投与することが好ましい。

[0080] また、リソソーム活性化剤は、リソソームを活性化（特にリソソーム数を増加）できる量を患者に投与することが好ましく、活性化の程度を基準に各種リソソーム活性化剤の投与量及び投与経路を適宜設定することができる。特に、既にヒト投与試験が行われているリソソーム活性化剤については、そ

の投与試験で用いられた投与量及び投与経路を参考に適宜設定することもできる。例えば、A Z D 2 0 1 4 はアストラゼネカ社が治験中の経口投与可能な薬剤で、P K 結果を含めた P h a s e 1 試験結果は既に論文発表されており（上記非特許文献2）、当該試験で定められたヒトへの推奨投与量（r e c o m m e n d e d d o s e , R D）は50mgを1日2回投与であるので、これを参考とすることができる。例えば、成人一日あたり、50～200mg、60～180mg、70～160mg、80～140mg、又は90～120mg程度とすることができる。また、当該1日投与量を一度に投与してもよいし、1日に2、3、又は4回程度に分けて投与することもできる。また投与経路としては、経口投与又は静脈投与が好ましい。

[0081] A Z D 2 0 1 4 が投与された状態若しくは投与される状態の患者に投与されるように用いられる、G O を含有する組成物が、本発明の白血病治療組成物の特に好ましい一態様としてあげられる。この場合には、A Z D 2 0 1 4 の投与量を上記の投与量及び投与回数とし、G O の投与量も上記の投与量及び投与回数とすることが好ましい。例えば、G O は2週間に2又は3回の投与（一回の投与で9～10mg）としつつ、A Z D 2 0 1 4 は50mg程度を1日2回投与を毎日行う、という投与スケジュールを、好ましい一例として挙げることができる。

[0082] 本発明の白血病治療組成物には、抗C D 3 3 抗体－D N A 切断抗ガン剤複合体の他、薬学的に許容される担体等が含まれていてもよい。当該担体としては、例えば、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤等が挙げられる。特に、注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。より具体的には、注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬（例えばD－ソルビトール、D－マンノース、D－マンニトール、塩化ナトリウム）を含む等張液が挙げられる。適当な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）

、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート 80（TM）、HCO-50等）を併用してもよい。また、油性液としてはゴマ油、大豆油等があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル及び／またはベンジルアルコールを併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液及び酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩酸プロカイン）、安定剤（例えば、ベンジルアルコール及びフェノール）、酸化防止剤と配合してもよい。

[0083] また、本発明は、抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体と、リソソーム活性化剤と、を含む、抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体効果増強組成物（すなわち、抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体単独投与に比べて効果が増強された組成物）をも包含する。当該効果増強組成物に含まれる抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体及びリソソーム活性化剤については、上述したのと同じである。また、当該効果増強組成物には、抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体及びリソソーム活性化剤以外の他の成分が含まれていてもよい。このような他成分としては、例えば、上述した白血病治療組成物における薬学的に許容される担体と同じものを用いることができる。なお、当該効果増強組成物の投与経路については、静脈投与が好ましい。

なお、上述の通り、当該説明は、異なる抗体及び／又は薬物を用いた抗体薬物複合体組成物についても妥当する。すなわち、本発明は、抗体薬物複合体と、リソソーム活性化剤と、を含む、当該抗体薬物複合体効果増強組成物をも包含している。

[0084] また、本発明は、抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体と、リソソーム活性化剤と、を備えた、白血病治療用キットをも包含する。当該キットに備えられる抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体及びリソソーム活性化剤については、上述したのと同じである。また、当該キットには、抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体及びリソソーム活性化剤以外の備品が含まれていてもよい。このような備品としては、特に制限されないが、例えば、点滴用針や消毒液（例えばエタノール）等が挙げられる。

なお、上述の通り、当該説明は、異なる抗体及び／又は薬物を用いた抗体薬物複合体組成物についても妥当する。すなわち、本発明は、抗体薬物複合体と、リソソーム活性化剤と、を備えた、抗体薬物複合体の薬物が治療対象とする疾患の治療用キットをも包含している。

[0085] また、本発明は、リソソーム活性化剤を含む、抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体効果増強剤をも包含する。当該リソソーム活性化剤については、上述したのと同じである。また、効果増強対象である抗CD33抗体-DNA切断抗ガン剤複合体についても、上述したのと同じである。当該効果増強剤は、リソソーム活性化剤以外の他の成分を含んでいてもよい。このような他成分としては、例えば、上述した白血病治療組成物における薬学的に許容される担体と同じものを用いることができる。

なお、上述の通り、当該説明は、異なる抗体及び／又は薬物を用いた抗体薬物複合体組成物についても妥当する。すなわち、本発明は、リソソーム活性化剤を含む、抗体薬物複合体効果増強剤をも包含している。

[0086] なお、本明細書において「含む」とは、「本質的にからなる」と、「からなる」をも包含する (The term "comprising" includes "consisting essentially of" and "consisting of. ")。また、本明細書において挙げた文献及びウェブページに記載の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。また、上述した本発明の各実施形態について説明した各種特性（性質、構造、機能等）は、本発明に包含される主題を特定するにあたり、どのように組み合わせられてもよい。すなわち、本発明には、本明細書に記載される組み合わせ可能な各特性のあらゆる組み合わせからなる主題が全て包含される。

実施例

[0087] 以下、本発明をより具体的に説明するが、本発明は下記の例に限定されるものではない。なお、検討に用いた各種AML細胞の入手先を次に記載する。SKNO-1 (JCRB Cell Bank, Tokyo, Japan)、U937 (ATCC, Manassas, VA, USA)、THP-1 (ECACC, PD, UK)、SKM-1 (発明者により樹

立)。

[0088] mTOR阻害剤使用濃度の検討

一部のmTOR阻害剤には細胞当たりのリソソームの数を増加させる効果があることが、上記非特許文献3で示唆されている。当該文献で使用されているmTOR阻害剤であるPP242を本件等に用いるmTOR阻害剤として選択し、細胞障害を起こさず、且つmTOR阻害作用を示すPP242濃度を検討した。PP242は市販品を購入して使用した。なお、細胞は、培地としてRPMI1640を用い、37℃、CO₂5%で、48時間毎に継代して培養して、検討に用いた。

[0089] 具体的には、急性骨髄性白血病細胞株(U937)培養培地に、100～600nMのPP242を加えて24時間培養し、PP242を加えない場合(コントロール)と比較して細胞障害を起こさない濃度を検討した。細胞障害の程度は死細胞割合(specific apoptosis)%を比較することで決定した。当該死細胞割合の検討には、Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Nacalai Tesque, Inc., Japan)を用いた。なお、specific apoptosisは、フローサイトメトリーによる細胞死実測値からコントロールにおける自然な細胞死(細胞株の培養では通常4～5%ほど常に自然に細胞死が見られる)を差し引いて算出した死細胞割合である。より詳細には、Annexin V-FITC PI (Propidium Iodide)で細胞を二重染色し、フローサイトメトリーにて死細胞を判定した。当該検討は、キット: Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Nacalai Tesque, Inc., Japan)を用いて行った。

[0090] またさらに、各PP242濃度で培養した細胞において、mTOR阻害効果が得られているかを確認するため、AKTタンパク質及びS6Kタンパク質のリン酸化の程度をウエスタンブロットにより解析した。なお、mTORが阻害されることにより、AKTタンパク質及びS6Kタンパク質のリン酸

化が減少することがよく知られており、当該リン酸化がmTOR阻害検討のために広く用いられている。リン酸化S6Kの減少はmTORC1阻害を示し、リン酸化AKTの減少はmTORC2阻害を示す。なお、ウェスタンブロット解析に用いた抗体の入手先を次に記載する。Phospho-Akt (Ser473) Antibody (CST, #4060)、Akt Antibody (CST, #9272)、Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) Antibody (CST, #9205)、p70 S6K Antibodies (CST, #9202)。

[0091] 図1に、当該検討における、死細胞割合 (specific apoptosis) % (図1a)、及びウェスタンブロット解析結果 (図1b) を示す。図1aにおいて、「Ct r」はコントロールを示し、「P100」はPP242 100 nMを示し、他も同様である。また、図1bにおいて、「p-AKT」はリン酸化AKTタンパク質を示し、「(p-) 70S6k」は(リン酸化) S6Kタンパク質を示す。当該結果から、PP242 100~500 nMでは細胞障害がほとんど起こらず (図1a)、且つ200~500 nMでmTOR阻害効果が得られる (図1b) ことが確認できた。当該結果を踏まえ、以下の検討では特に断らない限り、PP242処理は濃度500 nMで行うこととした。

[0092] 各急性骨髄性白血病 (AML) 細胞株に対するPP242及びGOによる処理の検討

4つの急性骨髄性白血病細胞株 (SKNO-1、U937、THP-1、SKM-1) に対して、PP242単独処理、GO (ゲムツズマブ・オゾガマイシン) 単独処理、又はPP242及びGOの併用処理、を行い、36時間培養後にAnnexin V-PI (propidium iodide) 染色を施行して、フローサイトメトリーを用いて、死細胞割合 (specific apoptosis) %を評価した。結果を図2示す。4つの細胞株において、両剤併用における相乗効果を認めた。図2中、*は $p < 0.0$

0.1を示す。

[0093] なお、GO処理濃度は、THP-1及びSKNO-1に関しては $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、その他の細胞株は $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。この濃度設定は、次の事情による。GOの承認用量（ $9\text{mg}/\text{m}^2$ を14日間以上あけて2回投与）投与下での血中濃度（Pharmacokinetics, PK）が報告されている（マイロタグ（登録商標）インタビューフォーム）。PKデータからは、ヒトへの投与後8時間から24時間以上保たれる平均の最低血中濃度は約 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ であるため、GO $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ をAML細胞株へ投与することとした。但し、効果を強く認めた細胞株では $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ でGOを投与することとした。各AML細胞株に対する当該GO処理濃度は、特に断らない限り、以降の検討でも同様とした。

[0094] 急性骨髄性白血病（AML）細胞株におけるリソソームの解析

蛍光色素LysoTracker（登録商標）（Invitrogen社）によりAML細胞を染めてリソソームの検討を行った。当該蛍光色素は、細胞内の酸性構造物を染める働きがあり、正常の酸性のリソソームを染めるとされる。具体的には、当該蛍光式により、U937及びTHP-1のリソソームを染色した。結果を図3に示す。図3左図では、細胞角が青く、リソソームが赤く染色されている。また、図3右図は、赤い蛍光の強度をグラフ化したものである。当該結果から、AML細胞におけるLysoTracker蛍光スポットは大変少なく、よってリソソーム数が少ないと考えられた。また、PP242処理により、LysoTracker蛍光スポットはU937細胞株で約1.5倍に増強され、PP242及びGO併用処理でもほぼ変わらず、LysoTracker蛍光は増強されたままであることも分かった。THP-1細胞株でも同様の結果であった。

[0095] 抗体薬物複合体（Antibody-Drug Conjugates: ADC）であるGOの作用機序として、リソソームにおけるリンカーの消化がある。GOのリンカーは酸性環境下において加水分解されるヒドラゾンリンカーであり、当該リンカーが抗CD33モノクローナル抗体とカリケアマ

イシン（オゾガマイシン）を結合している。GOが白血病細胞に結合してGO-CD33抗原複合体を形成すると、細胞の本来機能によってGO-CD33抗原複合体は細胞内に取り込まれ、貪食胞内にGO-CD33抗原複合体が存在する状態となる（内在化）。この貪食胞がリソソームと融合して二次貪食胞となり、リソソーム内の酸性環境下においてリンカーが加水分解を受け、カリケアマイシンが遊離し活性型となる。遊離・活性型カリケアマイシンは核内のDNAと結合してDNA二重鎖切断を引き起こし、細胞死に至る（図4）。このように白血病細胞内のリソソーム機能が保持されていることがGO効果発現に重要である。

[0096] ところが、図2及び図3の結果から、実はAML細胞のリソソーム数は非常に少ないこと、及びmTOR阻害剤（ここでは具体的にはPP242）によりAML細胞のリソソーム数を増加させることができること、さらにはmTOR阻害剤とGOとの併用により、細胞死をより効果的に（相乗的に）誘導できることが分かった。また、当該効果は、mTOR阻害剤によりAML細胞におけるリソソーム数が増えたことによって、GOのヒドラゾンリンカーが効率的に切断され、より多くのカリケアマイシンがDNA二重鎖切断に寄与した結果であると推察された。

[0097] 各急性骨髄性白血病（AML）細胞株に対するAZD2014及びGOによる処理の検討 PP242をGOと併用した際にGO効果の増強が認められたため、PP242と同様のmTORCデュアル阻害剤であるAZD2014に注目した。AZD2014はアストラゼネカ社が治験中の薬剤で、PK結果を含めたPhase1試験結果は既に論文発表されており（上記非特許文献2）、かつ、試薬会社から購入可能である。AZD2014のPhase1試験で定められたヒトへの推奨投与量（recommended dose, RD）は50mgを1日2回投与である。50mg投与12時間後の平均のトラフ値（＝平均の最低値）として達成可能である血中濃度は、約250nMであった。また、250nMのAZD2014単独投与ではAML細胞株に対して強い殺細胞効果を示さなかった（代表的な細胞株であるU

937細胞株では500nMまで殺細胞効果を示さなかった)。さらに、上記と同様にしてウエスタンブロット解析によりmTORC1阻害効果を調べたところ、250nMのAZD2014単独処理で、リン酸化S6Kの減少(mTORC1阻害を示す)、リン酸化AKTの減少(mTORC2阻害を示す)を認めた。よって、AZD2014 250nMをAML細胞株へ投与することとした。(GOは、上述の通り、2.5μg/mlをU937細胞株へ投与した。)

急性骨髄性白血病細胞株(U937又はSKM-1)に対して、AZD2014単独処理、GO(ゲムツズマブ・オゾガマイシン)単独処理、又はAZD2014及びGOの併用処理、を行い、36時間培養後にAnnexinV-PI(propidium iodide)染色を施行して、フローサイトメトリーを用いて、死細胞割合(specific apoptosis)%を評価した。結果を図5a(U937)及び図5b(SKM-1)に示す。

[0098] さらにまた、上記と同様にして、蛍光色素LysoTracker(登録商標)(Invitrogen社)により各U937細胞(処理なし、AZD2014単独処理、GO単独処理、又はAZD2014及びGO併用処理)を染めてリソソームの検討を行った。結果を図6に示す。図6左図では、細胞核が青く、リソソームが赤く染色されている。また、図6右図は、赤い蛍光の強度をグラフ化(コントロールを1とした相対値)したものである。

[0099] 図5及び図6の結果から、mTOR阻害剤としてAZD2014を用いた場合も、GOとの併用によりGO効果の増強されることが確認できた。さらには、当該効果増強は、mTOR阻害剤によりAML細胞におけるリソソーム数が増えたことによって、GOのヒドラゾンリンカーが効率的に切断され、より多くのカリケアマイシンがDNA二重鎖切断に寄与した結果であると裏付けられた。

[0100] さらに、AML患者6名から初代培養細胞(プライマリーセル)を調製し、当該AML初代培養細胞(AML cell 1~6)を用いて、上記と同

様にして、AZD2014とGOとの併用によりGO効果の増強が認められるかを検討した。結果（死細胞割合）をグラフ化して図7に示す。当該結果からも、mTOR阻害剤（AZD2014）とGOとの併用により、GO効果が増強されることが確認できた。なお、初代培養細胞の調製は、上記非特許文献1（Leukemia（2013）27, 233-235）のsupplementary materials and methodsに記載の方法に従って行った。

[0101] 多種のmTOR阻害剤及び抗体薬物複合体との併用効果の確認

mTOR阻害剤として、PP242の代わりにMLN0128（INK128、若しくはTAK-228ともいう）を用いて、上記「急性骨髄性白血病（AML）細胞株におけるリソソームの解析」欄に記載の方法と同様（細胞はU937を使用）に検討したところ、INK128処理（濃度50nM）により、LysoTracke蛍光スポットはU937細胞株で増強され、INK128及びGO併用処理でもほぼ変わらず、LysoTracke蛍光は増強されたままであることが確認できた。

[0102] さらに、SKM-1細胞（骨髄異形成症候群、すなわち骨髄機能の異常による前白血病状態となった細胞由来）を用いて、48時間培養後にAnnexinV-PI（propidium iodide）染色を施行した点以外は上記と同様にして、INK128とGOとの併用によりGO効果の増強が認められるかを検討した。結果（死細胞割合）をグラフ化して図8に示す（** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ ；GO単独使用との比較）。当該結果からも、mTOR阻害剤（INK128）とGOとの併用により、GO効果が増強されることが確認できた。

[0103] またさらに、Daudi細胞（B細胞性腫瘍であるバーキットリンパ腫由来細胞）を用いて、mTOR阻害剤PP242を400nM、及び抗体薬物複合体イノツズマブ オゾガマイシン（IO）を2ng/mlを単独使用又は併用した以外は、上記と同様にして、これらの併用によりIO効果の増強が認められるかを検討した。結果（死細胞割合）をグラフ化して図9に示す（左：PP242、中央：IO、右：PP242+IO）。当該結果からも、

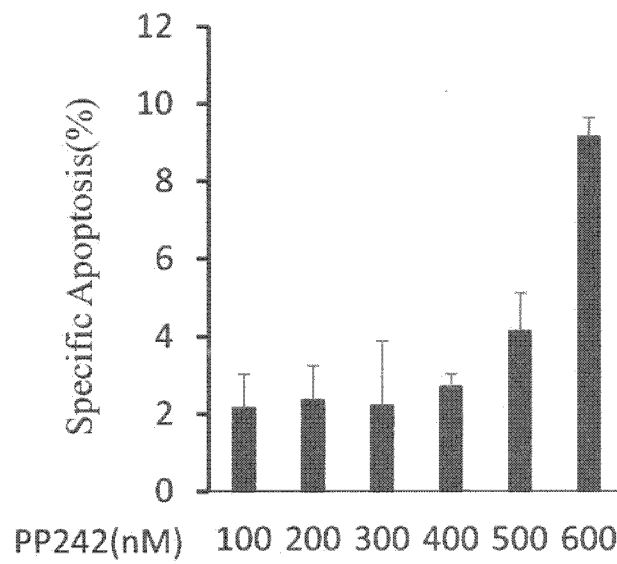
mTOR阻害剤（PP242）と抗体薬物複合体（IO）との併用により、抗体薬物複合体効果が増強されることが確認できた。

[0104] 以上の結果から、リソソーム活性化剤（特にmTOR阻害剤）は、抗体薬物複合体の効果を増強する効果を奏することが確認できた。

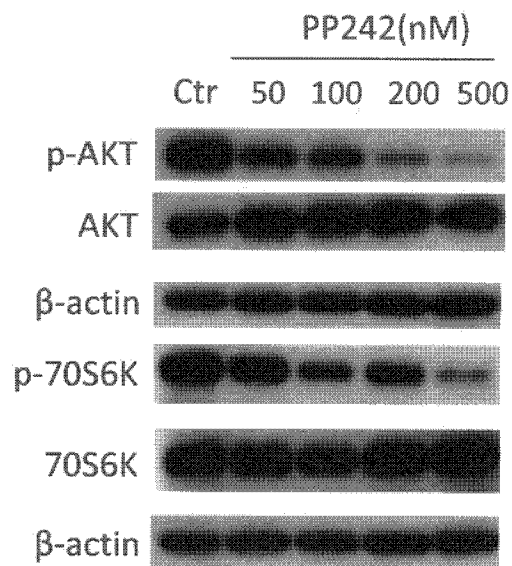
請求の範囲

- [請求項1] リソソーム活性化剤を含有する、抗体薬物複合体効果増強剤。
- [請求項2] リソソーム活性化剤が、mTOR阻害剤である、請求項1に記載の増強剤。
- [請求項3] リソソーム活性化剤が、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、PP242、Torin1、AZD2014、及びMLN0128からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項1に記載の増強剤。
- [請求項4] 前記抗体薬物複合体の薬物が抗ガン剤である、請求項1～3のいずれかに記載の増強剤。
- [請求項5] 前記抗体薬物複合体の抗体と薬物とが、リソソーム内で切断されるリンカーで結合されている、請求項1～4のいずれかに記載の増強剤。
- [請求項6] リソソーム活性化剤が投与された状態若しくは投与される状態の患者に投与されるように用いられる、抗体薬物複合体組成物。
- [請求項7] リソソーム活性化剤が、mTOR阻害剤である、請求項6に記載の抗体薬物複合体組成物。
- [請求項8] リソソーム活性化剤が、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、PP242、Torin1、AZD2014、及びMLN0128からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項6に記載の抗体薬物複合体組成物。
- [請求項9] 前記抗体薬物複合体の薬物が抗ガン剤である、請求項6～8のいずれかに記載の抗体薬物複合体組成物。
- [請求項10] 前記抗体薬物複合体の抗体と薬物とが、リソソーム内で切断されるリンカーで結合されている、請求項6～8のいずれかに記載の抗体薬物複合体組成物。
- [請求項11] 請求項1～5のいずれかに記載の増強剤と、請求項6～10のいずれかに記載の抗体薬物複合体組成物と、を備えた、前記抗体薬物複合体の薬物が治療対象とする疾患の治療用組成物若しくは治療用キット。

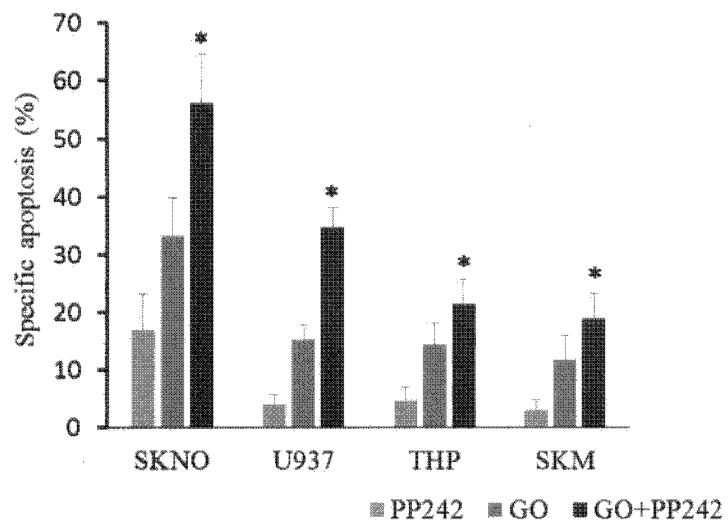
[図1a]



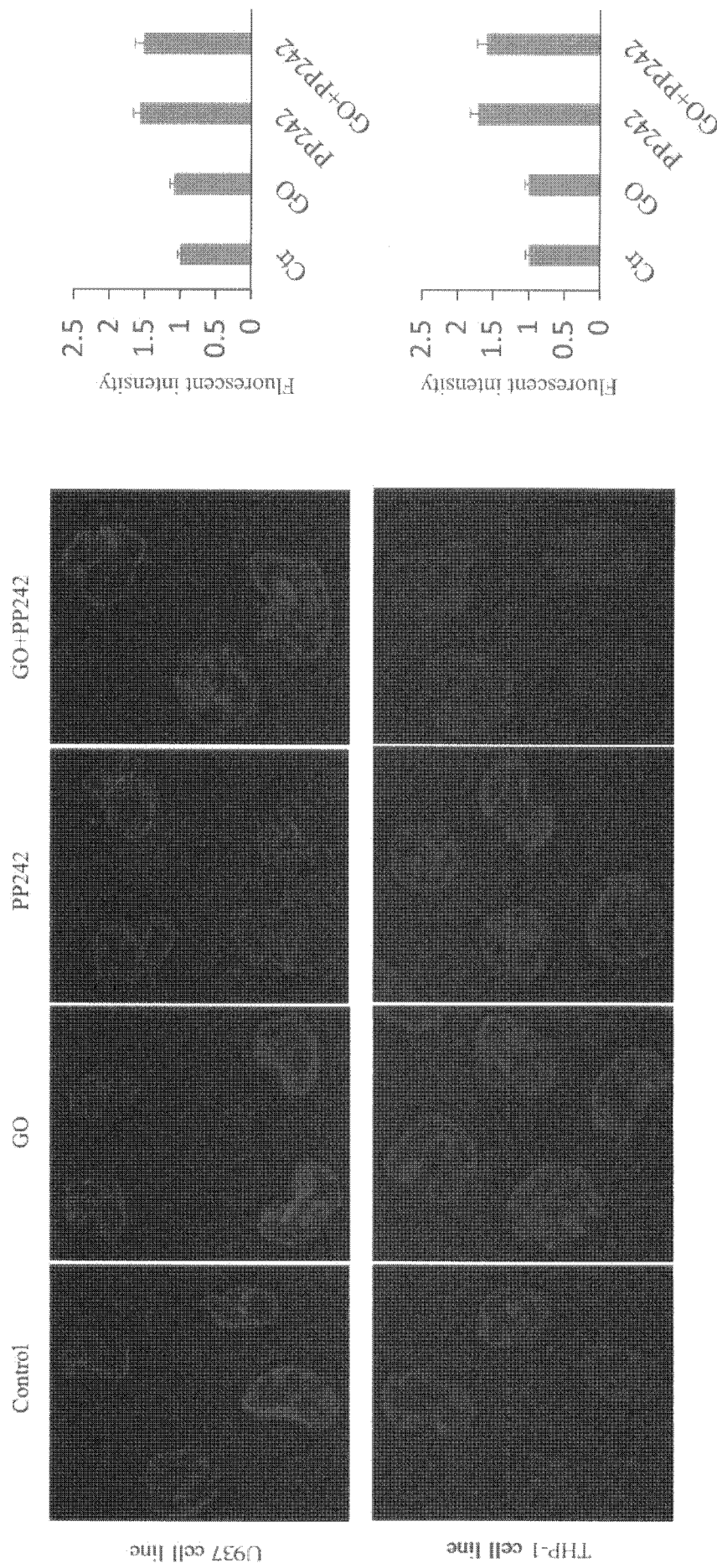
[図1b]



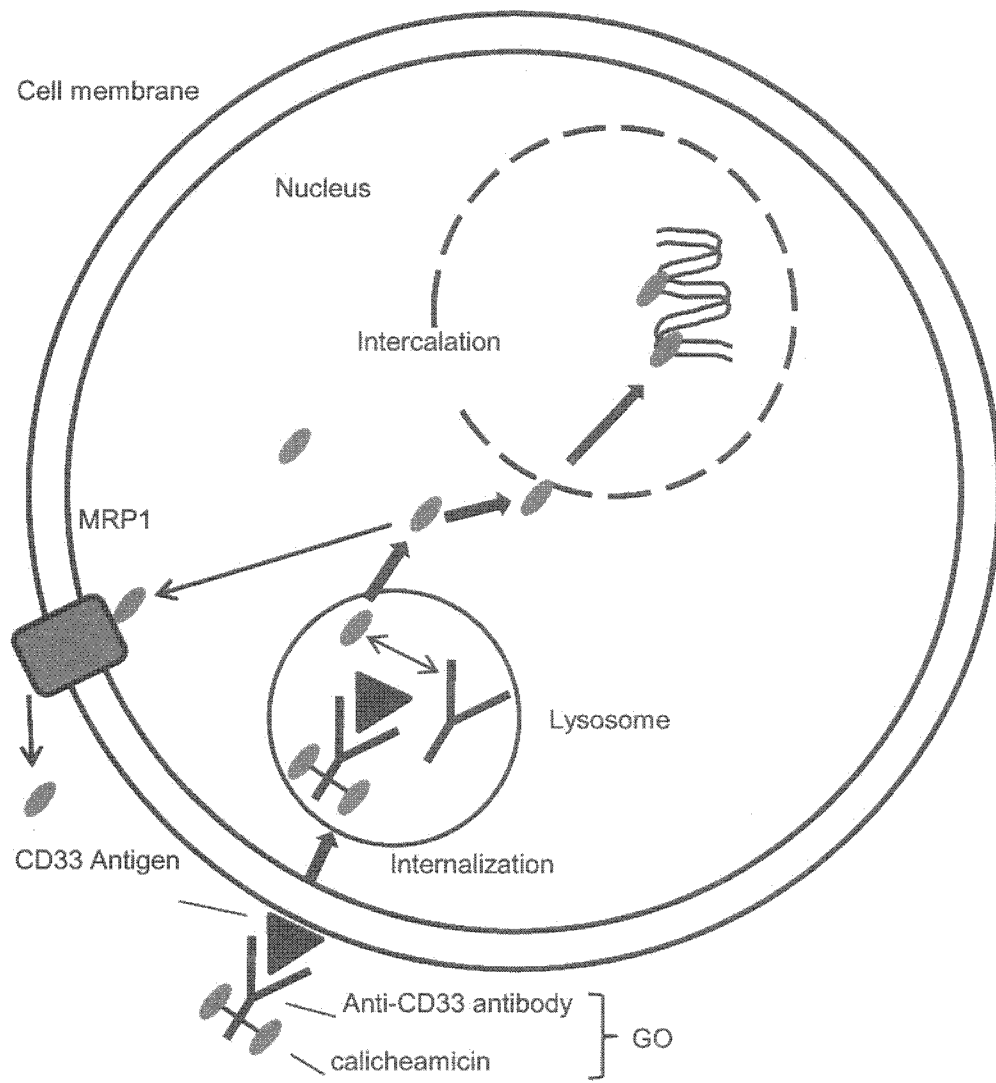
[図2]



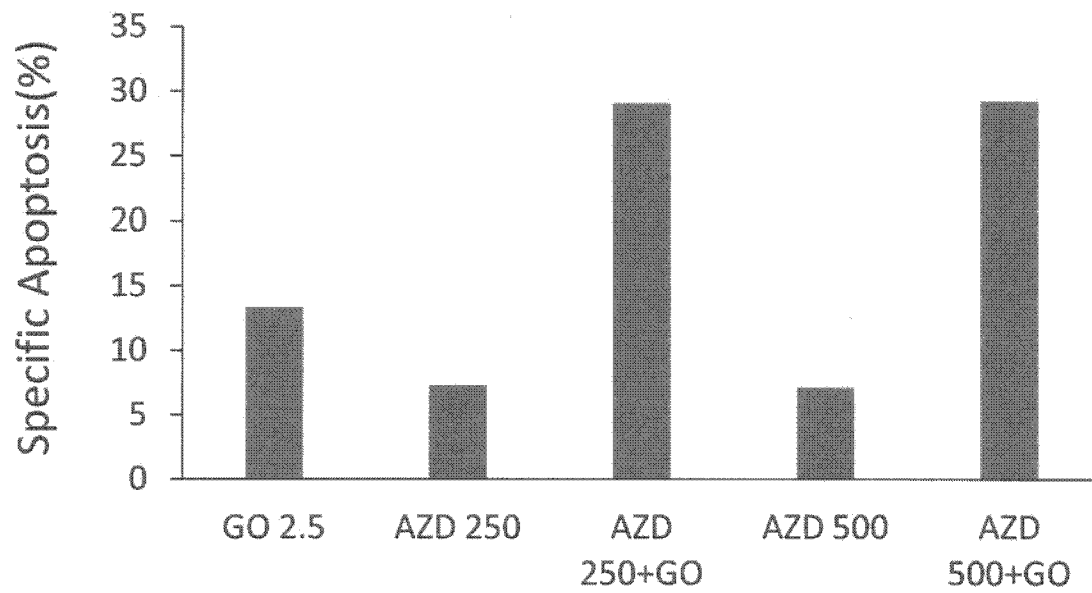
[図3]



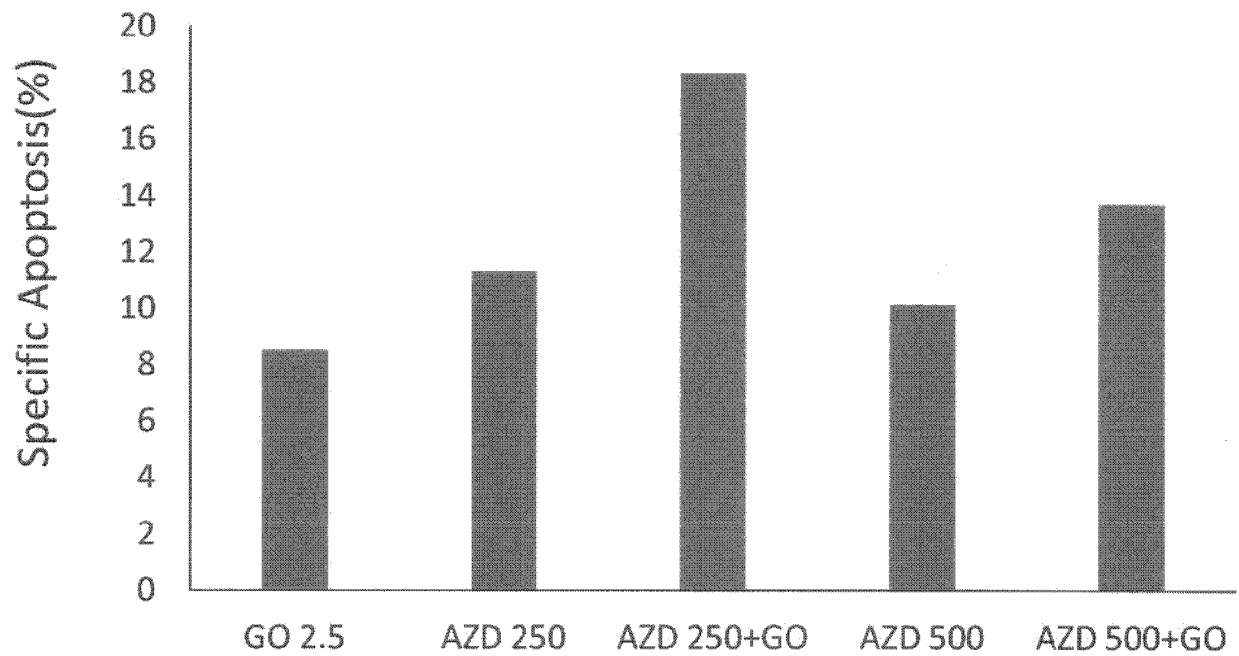
[図4]



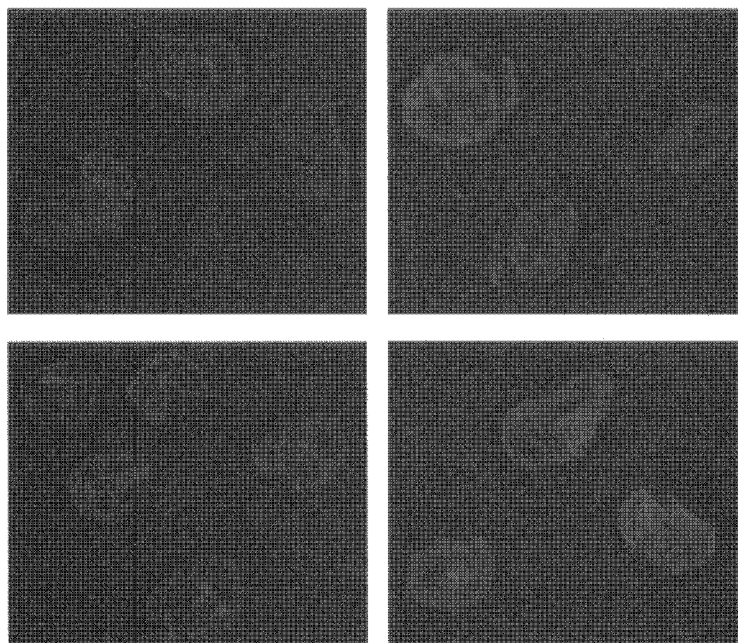
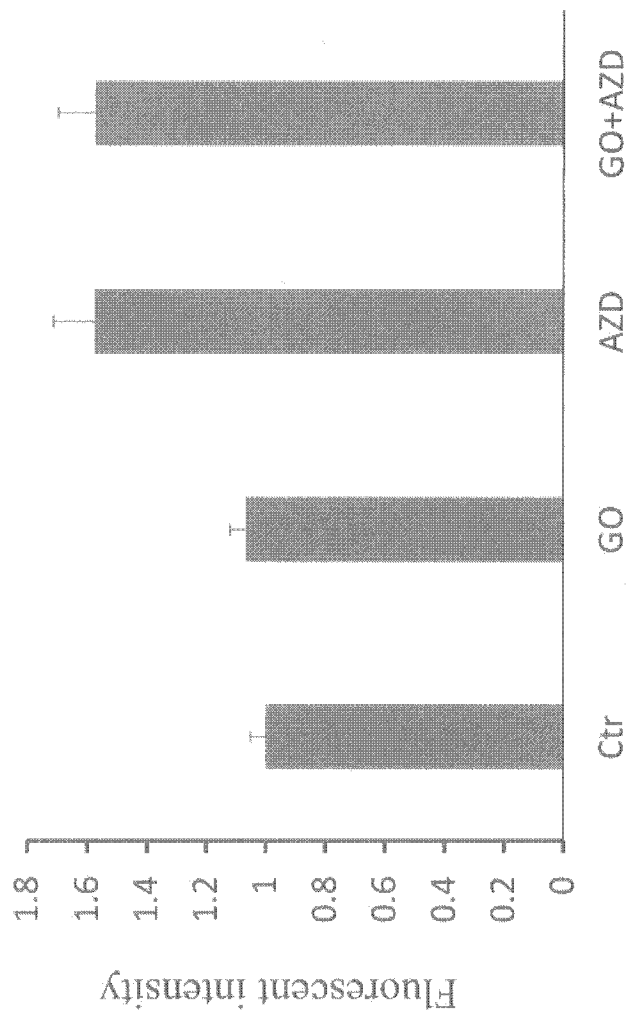
[図5a]



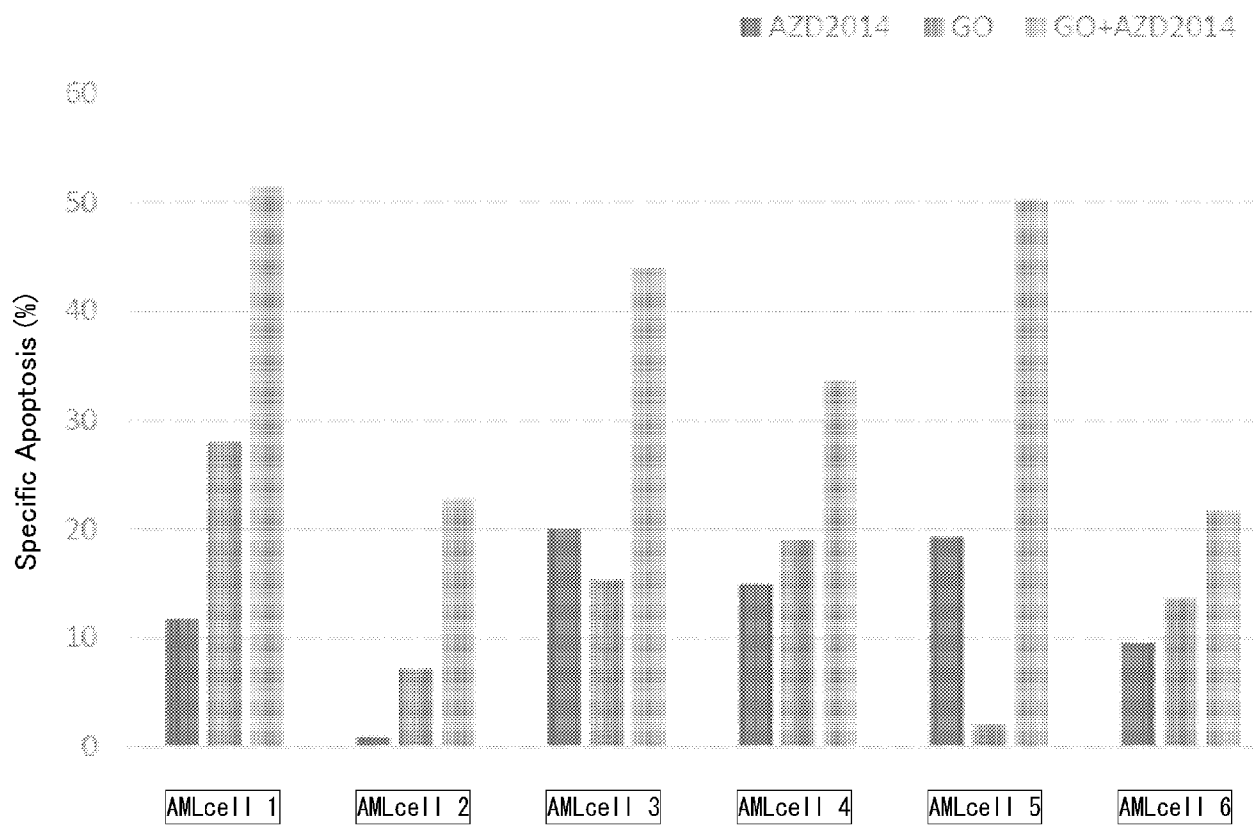
[図5b]



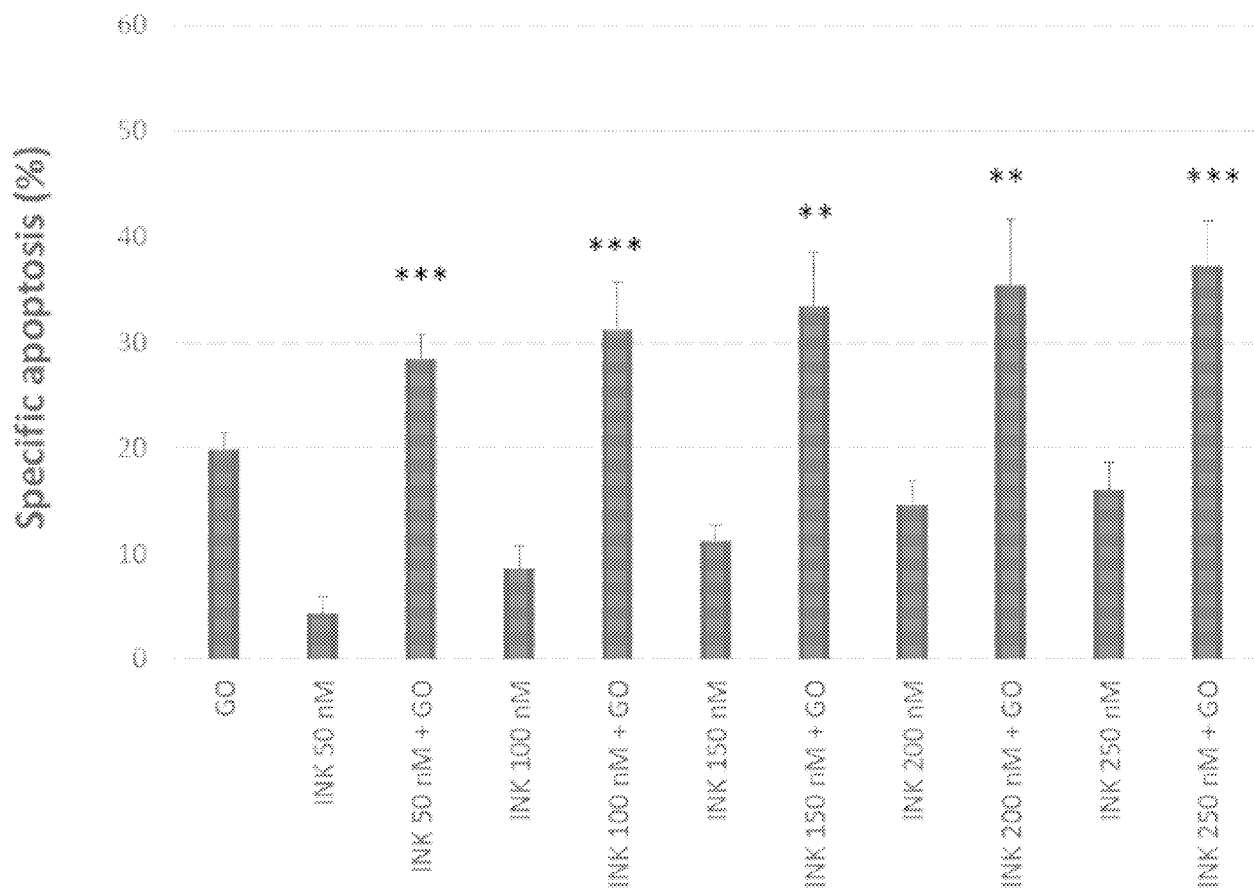
[図6]



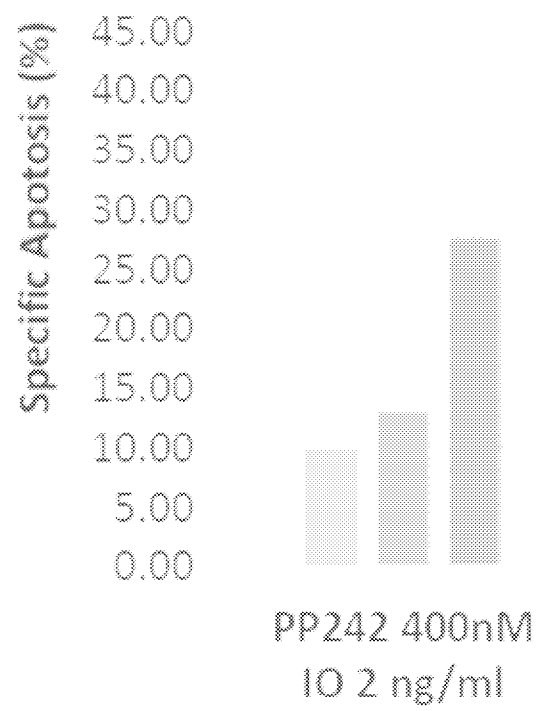
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/040536

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/436(2006.01)i, A61K31/439(2006.01)i,
A61K31/4745(2006.01)i, A61K31/496(2006.01)i, A61K31/519(2006.01)i,
A61K31/5377(2006.01)i, A61K31/7036(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,
A61K47/68(2017.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. A61K45/00, A61K31/436, A61K31/439, A61K31/4745, A61K31/496, A61K31/519,
A61K31/5377, A61K31/7036, A61K39/395, A61K47/68, A61P35/00, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2017-101041 A (SEATTLE GENETICS, INC.) 08 June 2017, claims 1, 22, 24, 27, paragraphs [0054]-[0057], examples 5- 10 & US 2013/0209496 A1 & US 2016/0220693 A1 & WO 2012/054748 A2 (claims 1, 22, 24, 27, paragraphs [0061]- [0064], examples 5-10) & EP 2629801 A2	1-11 5, 10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" 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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 November 2018 (20.11.2018)

Date of mailing of the international search report
11 December 2018 (11.12.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/040536

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2015-078168 A (PSMA DEVELOPMENT COMPANY, LLC) 23 April 2015, claims 1, 2, 16, 136, fig. 1, example 1, paragraph [0262] & US 2015/0110814 A1 & WO 2015/057250 A1 (claims 1, 2, 16, 136, fig. 1, example 1, page 58, paragraph [0001]) & EP 3057614 A1	1-11 5, 10
X	JP 2017-530983 A (PFIZER INC.) 19 October 2017, claims 1, 5, examples 9-11 & US 2018/0228769 A1 & WO 2016/055907 A1 (claims 1, 5, examples 9-11) & EP 3204005 A1	1-11
X Y	RIOS-LUCI, Carla et al., "Resistance to the Antibody-Drug Conjugate T-DM1 Is Based in a Reduction in Lysosomal Proteolytic Activity", Cancer Research, September 2017, vol. 77, no. 17, pp. 4639-4651, page 4639, right column, paragraph [0002], page 4647, right column, paragraph [0002], page 4650, left column, bottom paragraph to right column, paragraph [0001]	1, 4-6, 9-11 2, 3, 7, 8
Y	ZHOU, Jing, et al., "Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion", Cell Research, 2013, vol. 23, no. 4, pp. 508-523, abstract, page 509, left column, paragraph [0003] to right column, paragraph [0002]	2, 3, 7, 8
P, X	MAIMAITILI, Yimamu et al., "An mTORC1/2 kinase inhibitor enhances the cytotoxicity of gemtuzumab ozogamicin by activation of lysosomal function", Leukemia Research, 02 October 2018, vol. 74, pp. 68-74	1-11
P, X	MAIMAITILI, Yimamu et al., "An mTORC1/2 Kinase Inhibitor Remarkably Enhances the Cytotoxicity of Gemtuzumab Ozogamicin By Activating Lysosomal Function and Cell Cycle Promotion in AML Cells", blood, December 2017, vol. 130, no. supply 1, abstract no. 1374	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/436(2006.01)i, A61K31/439(2006.01)i, A61K31/4745(2006.01)i, A61K31/496(2006.01)i, A61K31/519(2006.01)i, A61K31/5377(2006.01)i, A61K31/7036(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K47/68(2017.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. A61K45/00, A61K31/436, A61K31/439, A61K31/4745, A61K31/496, A61K31/519, A61K31/5377, A61K31/7036, A61K39/395, A61K47/68, A61P35/00, A61P43/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X A	JP 2017-101041 A (シアトルジェネティクス, インコーポレーテッド) 2017.06.08, 請求項1、22、24、27、[0054] - [0057]、実施例5-10 & US 2013/0209496 A1 & US 2016/0220693 A1 & WO 2012/054748 A2 (Claims 1, 22, 24 and 27, [0061] - [0064], examples 5-10) & EP 2629801 A2	1-11 5, 10	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 20.11.2018		国際調査報告の発送日 11.12.2018	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 菊池 美香	4 U 3 9 5 4
		電話番号 03-3581-1101	内線 3439

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	JP 2015-078168 A (ピーエスエムエー ディベロップメントカンパニー, エルエルシー) 2015.04.23, 請求項1、2、16、136、図1、実施例1、[0262] & US 2015/0110814 A1 & WO 2015/057250 A1 (Claims 1, 2, 16 and 136, Fig.1, Example 1, p.58 1st para.) & EP 3057614 A1	1-11 5, 10
X	JP 2017-530983 A (ファイザー・インク) 2017.10.19, 請求項1、5、実施例9-11 & US 2018/0228769 A1 & WO 2016/055907 A1 (Claims 1 and 5, Examples 9-11) & EP 3204005 A1	1-11
X Y	RIOS-LUCI, Carla et al., Resistance to the Antibody-Drug Conjugate T-DM1 Is Based in a Reduction in Lysosomal Proteolytic Activity, Cancer Research, 2017.09, Vol.77, No. 17, pp.4639-4651, 第4639頁右欄第2段落、第4647頁右欄第2段落、第4650頁左欄最終段落-右欄第1段落	1, 4-6, 9-11 2, 3, 7, 8
Y	ZHOU, Jing, et al., Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion, Cell Research, 2013, Vol.23, No.4, pp.508-523, Abstract、第509頁左欄第3段落-右欄第2段落	2, 3, 7, 8
P, X	MAIMAITILI, Yimamu et al., An mTORC1/2 kinase inhibitor enhances the cytotoxicity of gemtuzumab ozogamicin by activation of lysosomal function, Leukemia Research, 2018.10.02, Vol.74, pp.68-74	1-11
P, X	MAIMAITILI, Yimamu et al., An mTORC1/2 Kinase Inhibitor Remarkably Enhances the Cytotoxicity of Gemtuzumab Ozogamicin By Activating Lysosomal Function and Cell Cycle Promotion in AML Cells, blood, 2017.12, Vol. 130, No.Suppl 1, Abstract No. 1374	1-11