

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7525999号
(P7525999)

(45)発行日 令和6年7月31日(2024.7.31)

(24)登録日 令和6年7月23日(2024.7.23)

| | | | |
|------------------------|-------------------------------|----------|-------------------------|
| (51)国際特許分類 | | F I | |
| A 6 1 K | 31/337 (2006.01) | A 6 1 K | 31/337 |
| A 6 1 K | 9/19 (2006.01) | A 6 1 K | 9/19 |
| A 6 1 K | 39/395 (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 L |
| A 6 1 K | 45/00 (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 N |
| A 6 1 K | 47/42 (2017.01) | A 6 1 K | 39/395 T |
| 請求項の数 28 (全45頁) 最終頁に続く | | | |
| (21)出願番号 | 特願2019-511962(P2019-511962) | (73)特許権者 | 511281899 |
| (86)(22)出願日 | 平成29年8月31日(2017.8.31) | | マヨ ファウンデーション フォー メデ |
| (65)公表番号 | 特表2019-526578(P2019-526578 A) | | ィカル エデュケーション アンド リサ |
| (43)公表日 | 令和1年9月19日(2019.9.19) | | ーチ |
| (86)国際出願番号 | PCT/US2017/049746 | | MAYO FOUNDATION FOR |
| (87)国際公開番号 | WO2018/045239 | | MEDICAL EDUCATION A |
| (87)国際公開日 | 平成30年3月8日(2018.3.8) | | ND RESEARCH |
| 審査請求日 | 令和2年8月18日(2020.8.18) | | アメリカ合衆国 ミネソタ州 5 5 9 0 5 |
| 審査番号 | 不服2022-5376(P2022-5376/J1) | | ロチェスター ファースト ストリート |
| 審査請求日 | 令和4年4月11日(2022.4.11) | | エス ダブリュー 2 0 0 |
| (31)優先権主張番号 | 62/382,731 | (74)代理人 | 100078282 |
| (32)優先日 | 平成28年9月1日(2016.9.1) | | 弁理士 山本 秀策 |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) | (74)代理人 | 100113413 |
| | | | 弁理士 森下 夏樹 |
| | | (74)代理人 | 100181674 |
| 最終頁に続く | | | |

(54)【発明の名称】 キャリヤー - P D - L 1 結合剤組成物及び癌を処置する為にそれを使用する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

PD-L1を発現する癌を患っている患者を処置する為の組成物又はキットであって、該組成物又はキットが、

(a)複数のナノ粒子を含むナノ粒子組成物、ここで、該ナノ粒子のそれぞれは、アルブミン、および該ナノ粒子の表面に非共有結合している約100～約1000のアテゾリズマブ、及びパクリタキセルを含み、該ナノ粒子はPD-L1に結合することができる；並びに

(b)PD-1免疫療法剤を含む、上記組成物又はキット。

【請求項 2】

PD-L1を発現する癌を患っている患者の免疫療法処置の治療有効性を増加させる為の組成物又はキットであって、該組成物又はキットが、(a)治療的に有効量のナノ粒子組成物、及び(b)PD-1免疫療法剤を含み、ここで、該ナノ粒子組成物は、アルブミン、および該ナノ粒子の表面に非共有結合している約100～約1000のアテゾリズマブ、及びパクリタキセルを含む1以上のナノ粒子を含み、該ナノ粒子はPD-L1に結合することができる、上記組成物又はキット。

【請求項 3】

該PD-1免疫療法剤が、PD-1に結合することができる第2の結合剤を含む、請求項 1 又は 2 に記載の組成物又はキット。

【請求項 4】

該第2の結合剤が遊離の結合剤である、請求項 3 に記載の組成物又はキット。

【請求項 5】

該第2の結合剤は、キャリアタンパク質及び該第2の結合剤及び、任意的に第2の治療剤、を含むナノ粒子上及び／又はその中に組み込まれている、請求項 3 に記載の組成物又はキット。

【請求項 6】

該第2の結合剤が抗PD-1抗体である、請求項 3 に記載の組成物又はキット。

【請求項 7】

該抗PD-1抗体が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピディリズマブ、PDR001又はそれらの後発生物製剤である、請求項 6 に記載の組成物又はキット。

【請求項 8】

該第2の結合剤が融合タンパク質である、請求項 3 に記載の組成物又はキット。

【請求項 9】

該融合タンパク質が、AMP-224又はAMP-514である、請求項 8 に記載の組成物又はキット。

【請求項 10】

該ナノ粒子組成物が凍結乾燥されており、且つ投与の前に水性溶液中で該ナノ粒子組成物が再構成される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物又はキット。

【請求項 11】

該ナノ粒子組成物及び該第2の結合剤が逐次に投与されるものである、請求項 3 に記載のキット。

【請求項 12】

該ナノ粒子組成物が該第2の結合剤の投与の前に投与されるものである、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

該第2の結合剤が該ナノ粒子組成物の投与の前に投与されるものである、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 14】

該ナノ粒子組成物及び該第2の結合剤が同時に投与されるものである、請求項 3 に記載の組成物又はキット。

【請求項 15】

アビラテロン、ベンダムスチン、ボルテゾミブ、カルボプラチン、カバジタキセル、シスプラチン、クロラムブシル、ダサチニブ、ドセタキセル、ドキソルビシン、エピルビシン、エルロチニブ、エトポシド、エベロリムス、ゲムシタビン、ゲフィチニブ、イダルビシン、ヒドロキシウレア、イマチニブ、ラパチニブ、リュープロレリン、メルファラン、メトトレキサート、ミトキサントロン、ネダプラチン、ニロチニブ、オキサリプラチン、パゾパニブ、ペメトレキセド、ピコプラチン、ロミデプシン、サトラプラチン、ソラフェニブ、ベムラフェニブ、スニチニブ、テニポシド、トリプラチン、ビンブラスチン、ビンレリピン、ビンクリスチン又はシクロホスファミドから選択される追加の治療剤をさらに含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の組成物又はキット。

【請求項 16】

PD-L1を発現する癌を患っている患者を処置する為のナノ粒子であって、該ナノ粒子がPD-L1に結合することができるように、

a. アルブミン、

b. 該ナノ粒子の表面に非共有結合している約100 ~ 約1000のアテゾリズマブ、及び

c. パクリタキセル

を含む、上記ナノ粒子。

【請求項 17】

請求項 16 に記載のナノ粒子を含む、PD-L1を発現する癌を患っている患者を処置する為のナノ粒子組成物。

【請求項 18】

凍結乾燥されており、且つ水性溶液で再構成すると、該ナノ粒子がPD-L1に結合することができる、請求項17に記載のナノ粒子組成物。

【請求項19】

アビラテロン、ベンダムスチン、ボルテゾミブ、カルボプラチン、カバジタキセル、シスプラチン、クロラムブシル、ダサチニブ、ドセタキセル、ドキソルピシン、エピルピシン、エルロチニブ、エトポシド、エベロリムス、ゲムシタピン、ゲフィチニブ、イダルビシン、ヒドロキシウレア、イマチニブ、ラパチニブ、リュープロレリン、メルファラン、メトトレキサート、ミトキサントロン、ネダプラチン、ニロチニブ、オキサリプラチン、パゾパニブ、ペメトレキセド、ピコプラチン、ロミデプシン、サトラプラチン、ソラフェニブ、ベムラフェニブ、スニチニブ、テニポシド、トリプラチン、ピンブラスチン、ピノレルピン、ピンクリスチン又はシクロホスファミドから選択される追加の治療剤をさらに含む、請求項16に記載のナノ粒子。

10

【請求項20】

請求項17に記載のナノ粒子組成物及びPD-1免疫療法剤を含む、PD-L1を発現する癌を患っている患者を処置する為のキット。

【請求項21】

該PD-1免疫療法剤が、PD-1に結合することができる第2の結合剤を含む、請求項20に記載のキット。

【請求項22】

該第2の結合剤が遊離の結合剤である、請求項21に記載のキット。

20

【請求項23】

該第2の結合剤が、アルブミン及び該第2の結合剤を含むナノ粒子上及び/又はその中に組み込まれている、請求項21に記載のキット。

【請求項24】

該第2の結合剤が抗PD-1抗体である、請求項21に記載のキット。

【請求項25】

該抗体が、ビディリズマブ、PDR001、ペンブロリズマブ若しくはニボルマブ、又はそれらの後発生物製剤を含む、請求項24に記載のキット。

【請求項26】

該PD-1免疫療法剤が融合タンパク質である、請求項20に記載のキット。

30

【請求項27】

該融合タンパク質が、AMP-224、AMP-514又はそれらの後発生物製剤である、請求項26に記載のキット。

【請求項28】

該ナノ粒子組成物が凍結乾燥されている、請求項20に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、結合剤及びキャリアタンパク質の新規な組成物、並びにそれらを特に癌治療剤として製造し及び使用する方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

化学療法は、メラノーマを含む多くの種類の癌に対する全身治療の頼みの綱であり続けている。ほとんどの化学療法剤は腫瘍細胞に対してわずかしき選択的でなく、そして健康な増殖細胞に対する毒性が高い可能性があり(Allen TM. (2002年) Cancer 2: 750-763)、しばしば用量の減少及びさらには処置の中止さえも必要とする。理論的には、化学療法の毒性問題を克服し並びに薬効を改善する方法の一つの方法は、腫瘍細胞によって選択的に発現される(又は過剰発現される)タンパク質に特異的である抗体を用いて化学療法薬物を腫瘍に標的化して、該標的化された薬物を該腫瘍に引きつけることであり、それによって化学療法の体内分布が変化し、そしてより多くの薬物が該腫瘍に行き渡り且つ健康な組織

50

への影響が少なくなるということを結果として生じる。しかしながら、30年にも及び研究にも拘わらず、特異的標的化が治療的状况で成功することはめったにない。

【0003】

慣用的な抗体依存性化学療法(ADC: antibody dependent chemotherapy)は、合成プロテアーゼで切断可能なリンカーを介して標的抗体に結合された毒性物質を用いて設計される。そのようなADC治療の有効性は、抗体に結合する為の標的T細胞の能力、切断されるべきリンカー、及び毒性物質の標的T細胞への取り込みに依存する(Schrama, D. 等(2006年) Nature reviews. Drug discovery 5: 147-159)。

【0004】

抗体標的化化学療法は、それが標的化能力、複数の細胞傷害剤、及び潜在的に低い毒性を伴う改善された治療能力の組み合わせを提供するので、慣用的な治療を超える利点を約束した。広範な研究にもかかわらず、臨床的に有効な抗体標的化化学療法はわかりにくいままである: 主な障害は、抗体と化学療法薬物との間のリンカーが不安定であること、該抗体に結合された場合の化学治療剤の腫瘍毒性が低下されること、及び該複合体が腫瘍細胞に結合し且つそれに入ることができないことを含む。さらに、これらの治療法は、抗体-薬物複合体のサイズに対する制御を許さなかった。

【0005】

先行技術の治療よりも信頼性があり且つ改善された抗腫瘍有効性を提供する為に、標的化された薬物送達のための細胞傷害性効果を保持する抗体に基づく癌について、当分野における必要性が依然としてある。

【0006】

プログラム細胞死タンパク質-1(PD-1, CD279としても知られている, 以下「PD-1」)受容体は、活性化T細胞、B細胞並びに骨髄系細胞の表面上で発現される。PD-1リガンドはプログラム細胞死リガンド-1(PD-L1, B7-H1, CD274としても知られている, 以下「PD-L1」)及び(PD-L2, B7-DC及びCD273としても知られている, 以下「PD-L2」)プログラム細胞死リガンド-2を含み、且つ樹状細胞又はマクロファージの表面上に一般に発現される。PD-L1は、様々な器官、例えば頭頸部、肺、胃、結腸、脾臓、乳房、腎臓、膀胱、卵巣、子宮頸部、において展開する癌並びにメラノーマ、膠芽腫、多発性骨髄腫、リンパ腫及び様々な白血病を含む多くの腫瘍で発現される。PD-L1は一般に、腫瘍細胞、例えば転移性の非小細胞肺癌(NSLC: non-small cell lung carcinomas)、の表面上で過剰発現される。

【0007】

活性化T細胞のPD-1受容体に結合すると、PD-L1を発現する腫瘍細胞はPD-1経路の抑制性シグナリング(inhibitory signaling)を利用することができ、それによってT細胞からの宿主自身の抗腫瘍免疫応答を制限又は停止させることができる。この抑制性シグナリングの反対側では、PD-1のPD-L1/PD-L2への相互作用の阻止又は妨害が、該経路によってシグナル伝達される阻止を妨害するだろう。かくして、PD-1、PD-L1又はPD-L2に対する抗体に基づく免疫療法剤は、腫瘍のそのような免疫反応抵抗力を克服すること、及び腫瘍に対する宿主自身の免疫機構を回復又は再刺激することを目的とする。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

従って、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者を発現する癌を患っている患者の免疫療法処置の治療的有效性を増大させる必要がある。

【発明の効果】

【0009】

PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者の免疫療法処置の治療有効性が、(a)本明細書に記載されたナノ粒子又はナノ粒子組成物の治療的に有効量、ここで該ナノ粒子はPD-L1又はPD-L2に結合することができる、及び(b)PD-1免疫療法剤の投与によって増加されることができるとは意外にも驚くべきことである。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

抗PD-1及び抗PD-L1抗体の両方が、様々な癌を処置する為に開発され且つ承認されている。抗PD-1抗体は以下を含むが、これらに限定されない：ニボルマブ(OPDIVO(登録商標))、Bristol-Myers Squibb U.S.によって開発され、且つ転移性黒色腫及び扁平上皮NSCLCの処置の為にU.S.において承認された；ペンブロリズマブ(KEYTRUDA(登録商標))、Merck U.S.によって開発され、且つ転移性黒色腫の処置の為に承認された。抗PD-L1抗体は以下を含むが、これらに限定されない：アテゾリズマブ(Tecentriq(登録商標))、Roche、スイス(Genentech U.S.)によって開発され、且つ最も一般的な種類の膀胱癌、すなわち尿路上皮癌、の処置の為に承認された；BMS-936559 / MDX-1105(Bristol Myers Squibb)、eDI4736(MedImmune / AstraZeneca)及びMSB00100718C(EMD Serono)。例えばPhilips and Atkins “Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies” International Immunology Vol. 27(1) pp. 39-46を参照。

10

【 0 0 1 1 】

アテゾリズマブは、それによってシグナル伝達される免疫チェックポイント阻害を阻止するようにPD-1経路を標的とするヒト化モノクローナル抗体である。本明細書において、該PD-1経路は、PD-1及びPD-L1 / PD-L2の相互作用の際のT細胞免疫応答の阻害のシグナル伝達を云う。例えば非扁平上皮NSCLC、腎細胞癌及び膀胱癌を含む様々な他の種類の癌を処置する為の他の抗PD-L1抗体(例えば、アベルマブ、デュルバルマブ、BMS 936559)を用いる治療法が同様に研究開発中である。

【 0 0 1 2 】

PD-L1と同様に、PD-L2はPD-1に結合する。ヒトD-L1及びPD-L2は互いに約41パーセントのアミノ酸配列同一性を共有し、且つ類似の機能性を有すると報告されている。PD-L2のPD-1との結合がまた、T細胞増殖並びにサイトカイン産生を阻害し、T細胞免疫応答の同様の抑制的調節を証明している。例えば非扁平上皮NSCLC、腎細胞癌及び膀胱癌を含む様々な他の種類の癌を処置する為の抗PD-L2抗体を用いる治療法がまた、研究開発中である。

20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 3 】

本発明に従うと、該ナノ粒子は、(a)キャリアータンパク質、(b)第1の結合剤、及び(c)任意的に、治療剤を含み、ここで、該ナノ粒子はPD-L1又はPD-L2に結合することができる。好ましい実施態様において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の成分(キャリアータンパク質、結合剤及び / 又は治療剤)のうちの1以上の間の非共有結合によって一緒に保存される。

30

【 0 0 1 4 】

一つの観点において、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者を処置する為の方法が提供され、該方法は、(a)複数のナノ粒子(又は、ナノ粒子を含むナノ粒子組成物)、ここで、該ナノ粒子のそれぞれは、キャリアータンパク質、抗原結合部分を有する第1の結合剤を含み、ここで、該抗原は、PD-L1又はPD-L2及び、任意的に少なくとも1つの治療剤、であり、ここで、該ナノ粒子はPD-L1又はPD-L2に結合することができる、及び(b)PD-1免疫療法剤を患者に投与することを含む。一つの実施態様において、該PD-1免疫療法剤は、PD-1に結合することができる第2の結合剤を含む。

40

また別の一つの観点において、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者を処置する為の組成物又はキットであって、該組成物又はキットが、 (a)複数のナノ粒子を含むナノ粒子組成物、ここで、該ナノ粒子のそれぞれは、アルブミン、PD-L1又はPD-L2に結合することができる結合剤、及びパクリタキセルを含み、該ナノ粒子はPD-L1又はPD-L2に結合することができる；並びに (b)PD-1免疫療法剤 を含む、上記組成物又はキットが提供される。

【 0 0 1 5 】

他の観点において、本発明は、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者の免疫療法処置の治療有効性を増加させる為の方法であって、(a)治療的に有効量の本明細書に記載されたナノ粒子組成物、及び(b)PD-1免疫療法剤を患者に投与することを含む上記方法

50

に関する。一つの実施態様において、該PD-1免疫療法は、PD-1に結合することができる第2の結合剤を投与することを含む。

また別の他の観点において、本発明は、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者の免疫療法処置の治療有効性を増加させる為の組成物又はキットであって、該組成物又はキットが、(a)治療的に有効量の本明細書に記載されたナノ粒子組成物、及び(b)PD-1免疫療法剤を含む上記組成物又はキットに関する。一つの実施態様において、該PD-1免疫療法剤が、PD-1に結合することができる第2の結合剤を含む。

【0016】

一つの観点において、本発明は、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者を処置する方法であって、(a)複数のナノ粒子(又は、ナノ粒子を含むナノ粒子組成物)、ここで、該ナノ粒子のそれぞれは、アルブミン、抗原結合部分を有する抗体を含み、ここで、該抗原は、PD-L1又はPD-L2、及びパクリタキセルであり、該ナノ粒子はPD-L1又はPD-L2に結合することができる、及び(b)PD-1免疫療法剤を患者に投与することを含む上記方法に関する。一つの実施態様において、該PD-1免疫療法剤は、PD-1に結合することができる第2の抗体(抗PD-1抗体)を含む。一つの実施態様において、該抗体は抗PD-L1抗体である。一つの実施態様において、該抗体は抗PD-L2抗体である。

10

また、別の他の観点において、本発明は、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者の免疫療法処置の治療有効性を増加させる為の組成物又はキットであって、該組成物又はキットが、(a)治療的に有効量のナノ粒子組成物、及び(b)PD-1免疫療法剤を含み、ここで、該ナノ粒子組成物は、アルブミン、PD-L1又はPD-L2に結合することができる結合剤、及びパクリタキセルを含む1以上のナノ粒子を含み、該ナノ粒子はPD-L1又はPD-L2に結合することができる、上記組成物又はキットが提供される。

20

【0017】

幾つかの実施態様において、CTLA-4免疫療法剤は、PD-L1又はPD-L2を結合することができる該ナノ粒子と組み合わせて患者に投与される。一つの実施態様において、該CTLA-4免疫療法剤は、該PD-1免疫療法剤に追加して投与される。一つの実施態様において、該CTLA-4免疫療法剤は、該PD-1免疫療法剤の代わりに投与される。一つの実施態様において、該CTLA-4免疫療法剤は、抗CTLA-4抗体である。

【0018】

一つの観点において、該ナノ粒子組成物の該ナノ粒子のそれぞれは、約400～約1000の第1の結合剤を含む。

30

【0019】

幾つかの観点において、該第1の結合剤はアプタマーである。幾つかの観点において、該PD-1免疫療法剤の該第2の結合剤はアプタマーである。

【0020】

幾つかの観点において、該第1の結合剤は、抗体(例えば、抗PD-L1抗体又は抗PD-L2抗体)である。幾つかの観点において、該PD-1免疫療法剤の該第2の結合剤は、抗体(例えば、抗PD-1抗体)である。幾つかの観点において、該抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ビディリズマブ、PDR001又はそれらの後発生物製剤を含む。幾つかの観点において、該抗PD-L1抗体は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ又はBMS 936559(MDX1105)である。幾つかの観点において、該CTLA-4免疫療法剤の該結合剤は抗CTLA-4抗体である。一つの実施態様において、該抗CTLA-4抗体はイピリムマブである。

40

【0021】

幾つかの観点において、該第1の結合剤及び/又は該第2の結合剤は、融合タンパク質である。一つの実施態様において、該融合タンパク質は、AMP-224(PD-L2 IgG2a融合タンパク質; Amplimmune / GlaxoSmith Klein); AMP-514 (MEDI0680)(PD-L2融合タンパク質; Amplimmune / GlaxoSmith Klein)、又はそれらの後発生物製剤である。

【0022】

幾つかの観点において、該ナノ粒子又はナノ粒子組成物は凍結乾燥されている。幾つかの観点において、該PD1免疫療法剤の該第2の結合剤は遊離の結合剤であり、ここで、該

50

遊離の結合剤は、ナノ粒子組成物と複合体化されていない、又はナノ粒子組成物上及び／又はその中に組み込まれてない。

【 0 0 2 3 】

幾つかの観点において、PD-1免疫療法剤は、ナノ粒子組成物と複合体化された第2の結合剤又はナノ粒子組成物上及び／又はその中に組み込まれた第2の結合剤を含む免疫療法ナノ粒子組成物であり、ここで、該免疫療法ナノ粒子組成物は、キャリアタンパク質及び該第2の結合剤を含む。

【 0 0 2 4 】

幾つかの観点において、該免疫療法ナノ粒子組成物の該第2の結合剤は、抗体である。幾つかの観点において、該免疫療法ナノ粒子組成物の該第2の結合剤は、抗PD-1抗体である。幾つかの観点において、該免疫療法ナノ粒子組成物の該抗体は、アテゾリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、アベルマブ若しくはデュルバルマブ、ピディリズマブ、BMS936559、PDR001、又はそれらの後発生物製剤を含む。

10

【 0 0 2 5 】

幾つかの観点において、該免疫療法ナノ粒子組成物の該第2の結合剤は、融合タンパク質である。一つの実施態様において、該融合タンパク質は、AMP-224(PD-L2 IgG2a融合タンパク質；Amplimmune / GlaxoSmith Klein)；AMP-514(MEDI0680) (PD-L2融合タンパク質；Amplimmune / GlaxoSmith Klein)、又はそれらの後発生物製剤である。

【 0 0 2 6 】

幾つかの観点において、該免疫療法ナノ粒子組成物の該第2の結合剤が、アプタマーである。幾つかの観点において、該免疫療法ナノ粒子組成物の該第2の結合剤が、PD-1アプタマーである。

20

【 0 0 2 7 】

幾つかの観点において、該免疫療法ナノ粒子及び／又はナノ粒子組成物が凍結乾燥されている。

【 0 0 2 8 】

幾つかの観点において、該ナノ粒子組成物及び該PD-1免疫療法剤は、逐次に投与される。幾つかの観点において、該ナノ粒子組成物は、該PD-1免疫療法剤の投与の前に投与される。幾つかの観点において、該PD-1免疫療法剤は、該ナノ粒子組成物の投与の前に投与される。幾つかの観点において、該ナノ粒子組成物及び該PD-1免疫療法剤は、同時に投与される。

30

【 0 0 2 9 】

幾つかの実施態様において、本発明は、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者の免疫療法処置の治療有効性を増加させる為の方法に関する。一つの実施態様において、該方法は、該患者に、本明細書に記載されたナノ粒子又はナノ粒子組成物の治療的に有効量、及び第2の結合剤を含むPD-1又はCTLA-4免疫療法剤を投与することを含む。一つの実施態様において、該第2の結合剤は、PD-1又はCTLA-4に結合することができる。一つの実施態様において、PD-1又はCTLA-4免疫療法剤は、キャリアタンパク質(例えば、アルブミン)及び該第2の結合剤及び、任意的に治療剤(例えば、パクリタキセル)、を含むナノ粒子を含む。

40

【 0 0 3 0 】

幾つかの実施態様において、本発明は、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者を処置する為の方法に関する。幾つかの実施態様において、該方法は、該患者に、本明細書に記載されたナノ粒子組成物の治療的に有効量を投与すること、そして該患者に、第2の結合剤を含む免疫療法剤を投与することを含み、ここで、該ナノ粒子組成物の該結合剤はPD-L1、PD-L2又はPD-1に結合されることができ、且つ該免疫療法剤の該第2の結合剤はPD-L1、PD-L2又はPD-1に結合されることができ。

【 0 0 3 1 】

理論に縛られることなしに、該結合剤は、疎水性相互作用を介してキャリアタンパク

50

質によって結合されると考えられており、それはその性質上弱い。それでも、個々の成分の活性並びに該ナノ粒子中のそれらの相対的關係は、凍結乾燥及び該組成物の再構成にかかわらず維持される。キャリアータンパク質への結合、例えば該結合剤のキャリアータンパク質への複合体形成は、結合剤上のアルブミン結合モチーフ及び／又はキャリアータンパク質上の抗体結合モチーフを介して生じるとなおさらに考えられる。アルブミン結合モチーフ及び抗体結合モチーフは、2017年8月4日に出願された国際特許出願PCT/US17/45643号に記載されており、その全体が参照によって本明細書内に取り込まれる。幾つかの実施態様において、該結合剤は、非治療的且つ非内因性のヒト抗体、融合タンパク質又はアプタマーである。

【0032】

該ナノ粒子は治療において使用される為に、更なる挑戦が課される。

【0033】

該ナノ粒子中の疎水性成分の再配列は成分間の共有結合を通じて軽減されうるが、そのような共有結合は癌処置におけるナノ粒子の治療的使用に課題をもたらす。該結合剤、キャリアータンパク質及び追加の治療剤は典型的には、腫瘍内の異なる位置で且つ異なる機構を通じて作用する。非共有結合は、該ナノ粒子の成分が腫瘍で解離することを許す。従って、共有結合は凍結乾燥には有利でありうるが、治療用途には不利でありうる。

【0034】

ナノ粒子のサイズ及びサイズの分布がまた重要である。ナノ粒子は、それらのサイズに従って異なる挙動をしよう。大きなサイズでは、ナノ粒子又は該粒子の凝集は血管を閉塞させる可能性があり、そのどちらも該組成物の性能及び安全性に影響を及ぼすことができる。

【0035】

静脈内に投与される場合、大きな粒子(例えば、 $1\mu\text{m}$ 超)は、それらが肺の微小血管系に留まることがあるので、典型的には好ましくはない。同時に、より大きな粒子が、腫瘍又は特定の臓器に蓄積することができる。例えば、放射線塞栓形成としても知られている放射線元素の送達のための、肝臓の腫瘍に栄養を与える冠動脈に注入される20~60ミクロンのガラス粒子であるTHERASPHERE(登録商標)が、肝臓癌の為に臨床的に使用されている。

【0036】

それ故に、静脈内投与の為に、 $1\mu\text{m}$ 以下の粒子が使用される。 $1\mu\text{m}$ 超の粒子はより典型的には、腫瘍内に直接投与される(直接注入)か又は腫瘍の部位に栄養補給する動脈内に投与される。

【0037】

最後に、抗凍結剤及び凍結乾燥工程を助ける剤は、安全であり且つ治療的使用の為に耐えられなければならない。

【0038】

理論に縛られることなしに、該結合剤は、疎水性相互作用を介してキャリアータンパク質によって結合されると考えられており、それはその性質上、弱い。それでもなお、個々の成分の活性、並びにナノ粒子中のそれらの相対的な関係は、該組成物の凍結乾燥及び再構成にもかかわらず、依然として達成される。

【0039】

一つの観点において、ナノ粒子を含むナノ粒子組成物が本明細書において提供され、ここで、該ナノ粒子のそれぞれは、キャリアータンパク質、結合剤及び、任意的に少なくとも1つの治療剤、を含み、該結合剤は、該ナノ粒子の表面から外側に配置されており、及び該ナノ粒子は、イン・ピボでPD-L1、PD-L2又はPD-1に結合されることができる。

【0040】

他の観点において、ナノ粒子を含むナノ粒子組成物が本明細書において提供され、ここで、該ナノ粒子のそれぞれは、アルブミンでないキャリアータンパク質及び、任意的に少なくとも1つの治療剤、を含み、該結合剤は、ナノ粒子の外側表面上に配置されており、

10

20

30

40

50

及び該ナノ粒子は、イン・ビボでPD-L1、PD-L2又はPD-1に結合されることができる。一つの実施態様において、該ナノ粒子は、約100～約1000の結合剤、好ましくは約400～約800の結合剤、を含む。ナノ粒子が多量体化すると、結合剤の数が比例して増加する。例えば、160nmのナノ粒子が400の結合剤を含む場合に、320nmの二量体は約800の結合剤を含む。

【0041】

他の観点において、ナノ粒子を含むナノ粒子組成物が本明細書において提供され、ここで、該ナノ粒子のそれぞれは、キャリアタンパク質、結合剤、及び任意的に、パクリタキセルでない少なくとも1つの治療剤、を含み、該ナノ粒子は、イン・ビボでPD-L1、PD-L2又はPD-1に結合されることができる。一つの実施態様において、該ナノ粒子はさらに、パクリタキセルを含む。一つの実施態様において、該結合剤は、該結合剤の結合部分（例えば、抗体の可変領域）がその表面から外側に向くように、該ナノ粒子の表面に配置される。

10

【0042】

他の実施態様において、該ナノ粒子は、多量体化し、例えば二量体化する。多量体化は、単位分子の重量又はサイズの倍数として観察され、例えば160nmの粒子は、約320nm、約480nm、約640nmなどに多量化する。幾つかの実施態様において、集団中の20%未満のナノ粒子が多量体である。幾つかの実施態様において、集団中の80%超のナノ粒子が多量体である。

【0043】

20

一つの実施態様において、キャリア結合薬物の結合剤に対する重量比（例えば、アルブミン結合パクリタキセルと抗PD-L1又は抗PD-L2抗体）は、約5：1～約1：1である。一つの実施態様において、キャリア結合薬物の結合剤に対する重量比は、約10：4である。一つの実施態様において、該結合剤は、該ナノ粒子の表面の全部又は一部上の実質的に単層である。一つの実施態様において、該組成物における0.01%未満のナノ粒子は、200nm超、300nm超、400nm超、500nm超、600nm超、700nm超及び800nm超から選択されるサイズを有する。より大きいサイズは、幾つかのナノ粒子の多量化の結果であると考えられており、それぞれは、コア及び、各ナノ粒子の表面の全部又は一部上をコーティングする結合剤を含む。

【0044】

30

本発明はさらに、凍結乾燥組成物、及び新たに調製されたナノ粒子の性質と実質的に異なる又はそれらと同じである凍結乾燥組成物を含む。特に、凍結乾燥組成物は、水性溶液中での再懸濁に応じて、粒子サイズ、粒子サイズ分布、癌細胞に対する毒性、結合剤親和性、及び結合剤特異性に関して、該新鮮な組成物と類似又は同一である。驚くことに、凍結乾燥されたナノ粒子は、これらの粒子中に2つの異なるタンパク質成分の存在にも拘わらず、再懸濁液後に、新たに製造されたナノ粒子の特性を保持する。

【0045】

一つの観点において、本発明は、複数のナノ粒子を含む凍結乾燥されたナノ粒子組成物であって、該複数のナノ粒子のそれぞれはキャリア結合薬物コア及びPD-L1、PD-L2又はPD-1を結合する結合剤の量を含む、上記組成物に関する。一つの実施態様において、該結合剤は、該結合剤の結合部分が表面から外側に向けられるように該コアの表面に配置され、該結合剤は、水性溶液で再構成すると、該ナノ粒子の外側表面とのそれらの会合を維持する。一つの実施態様において、該凍結乾燥組成物は、室温で、少なくとも約3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月又はそれ以上の間、安定である。一つの実施態様において、該凍結乾燥組成物は、室温で、少なくとも3ヶ月の間、安定である。一つの実施態様において、該再構成されたナノ粒子は、治療剤の活性を保持し且つイン・ビボで標的に結合することができる。他の実施態様において、該組成物は、約20 ～ 約25 で、約12ヶ月以上まで安定である。

40

【0046】

一つの実施態様において、再構成されたナノ粒子の平均サイズは、約90nm～約1μmで

50

ある。好ましい実施態様において、該再構成されたナノ粒子の平均サイズは、約100nm～約200nm、より好ましくは約100nm～約160nm、である。一つの実施態様において、該再構成されたナノ粒子の平均サイズは800nm超～約3.5 μ mであり、これは、より小さいナノ粒子の多量体、例えば90～200nmのナノ粒子の多量体、を含む。一つの実施態様において、コアの結合剤に対する重量比は、1：1超～約1：3である。一つの実施態様において、該再構成されたナノ粒子の平均サイズは、約90nm～約225nmである。

【0047】

一つの観点において、本開示書は、凍結乾燥された複数のナノ粒子又は複数のナノ粒子を含む凍結乾燥されたナノ粒子組成物に関し、ここで、該ナノ粒子のそれぞれは、(a)アルブミン結合パクリタキセルコア、及び(b)該結合剤の結合部分がその表面から外側に向けられるようにアルブミン結合パクリタキセルコアの表面上に配置されたPD-L1、PD-L2又はPD-1を結合する結合剤を含み、該結合剤は、水性溶液で再構成すると、該ナノ粒子の外側表面とのそれらの会合を維持し、該凍結乾燥された組成物は約20～約25で、少なくとも3ヶ月安定であり、且つ該再構成されたナノ粒子はイン・ビボでPD-L1、PD-L2又はPD-1に結合することができる。

10

【0048】

一つの実施態様において、該再構成されたナノ粒子の平均サイズは、新たに調製されたナノ粒子の粒子サイズと実質的に異ならない。幾つかの実施態様において、該平均粒子サイズは90nm～800nmであり、例えば90、100、110、130、150、160、200、300、400、500、600、700又は800nmを含む。他の実施態様において、該平均粒子は、例えば800nm超～約3.5 μ mよりも大きい。幾つかの実施態様において、該粒子はナノ粒子の多量体である。幾つかの実施態様において、該ナノ粒子は、ナノ粒子製造直後又は凍結乾燥及び注射に適した水性溶液における再懸濁後のいずれかで、約90nm～約225nmの平均粒子サイズを有する。

20

【0049】

幾つかの実施態様において、アルブミン結合パクリタキセルの結合剤に対する重量比は、約5：1～約1：1である。他の実施態様において、アルブミン結合パクリタキセルの結合剤に対する重量比は、約10：4である。更なる実施態様において、アルブミン結合パクリタキセルの結合剤に対する重量比は、1：1超～約1：3である。

【0050】

30

幾つかの実施態様において、該コアはアルブミン結合パクリタキセル(例えば、アブラキサン(ABRAXANE)(登録商標))であり、且つ該結合剤は、PD-L1又はPD-L2を選択的に認識する結合剤から選択される。幾つかの実施態様において、該コアは、アルブミン結合パクリタキセル(例えば、アブラキサン(登録商標))であり、且つ該結合剤は、PD-1を選択的に認識する。幾つかの実施態様において、該コアはアルブミン結合パクリタキセル(例えばアブラキサン(登録商標))であり、且つ該結合剤は、CTLA-4選択的に認識する。

【0051】

幾つかの実施態様において、該少なくとも1つの治療剤は、該ナノ粒子の内部に位置する。他の実施態様において、該少なくとも1つの治療剤は、該ナノ粒子の外側表面に位置する。なお他の実施態様において、該少なくとも1つの治療剤は、該ナノ粒子の内部に且つ該ナノ粒子の外側表面に位置する。

40

【0052】

幾つかの実施態様において、該ナノ粒子は、1超の種類の治療剤を含む。例えば、タキサン及びプラチナ薬物、例えばパクリタキセル及びシスプラチン。

【0053】

幾つかの実施態様において、該結合剤は、アテゾリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、アベルマブ若しくはデュルバルマブ、ビディリズマブ、BMS936559又はそれらの後発生物製剤を含む。幾つかの実施態様において、該結合剤は、該ナノ粒子の表面の全部又は一部上の実質的に単層の結合剤である。

【0054】

50

更なる実施態様において、該抗体は、天然のヒト抗体において通常見られるよりもグリコシル化が少ない。そのようなグリコシル化は、例えば、発現系、又は発現中のグリコシル化阻害剤の存在によって影響されうる。幾つかの実施態様において、抗体又は他の結合剤のグリコシル化状態は、酵素作用又は化学作用を通じて変化される。

【0055】

幾つかの実施態様において、該少なくとも1つの治療剤は、アビラテロン、ベンダムスチン、ボルテゾミブ、カルボプラチン、カバジタキセル、シスプラチン、クロラムブシル、ダサチニブ、ドセタキセル、ドキソルビシン、エピルビシン、エルロチニブ、エトポシド、エベロリムス、ゲムシタピン、ゲフィチニブ、イダルビシン、イマチニブ、ヒドロキシウレア、ラパチニブ、リュープロレリン、メルファラン、メトトレキサート、ミトキサントロン、ネダプラチン、ニロチニブ、オキサリプラチン、パクリタキセル、パゾパニブ、ペメトレキセド、ピコプラチン、ロミデプシン、サトラプラチン、ソラフェニブ、ベムラフェニブ、スニチニブ、テニポシド、トリプラチン、ビンブラスチン、ビノレルピン、ピンクリスチン及びシクロホスファミドから選択される。

10

【0056】

幾つかの実施態様において、該結合剤、キャリアータンパク質、及び存在する場合には、治療剤は、非共有結合を介して結合される。

【0057】

幾つかの実施態様において、該キャリアータンパク質は、ゼラチン、エラスチン、グリアジン、レグミン、ゼイン、大豆タンパク質、ミルクタンパク質及びホエータンパク質から選択される。他の実施態様において、該キャリアータンパク質は、アルブミン、例えばヒト血清アルブミン、である。幾つかの実施態様において、該キャリアータンパク質は、組み換えタンパク質、例えば組み換えヒト血清アルブミン、である。

20

【0058】

幾つかの実施態様において、該ナノ粒子組成物は静脈内送達用に製剤化されている。他の実施態様において、該ナノ粒子組成物は腫瘍内への直接注入又は灌流用に製剤化されている。

【0059】

幾つかの実施態様において、該免疫療法剤の該第2の結合剤は静脈内送達用に製剤化されている。他の実施態様において、該免疫療法剤の該第2の結合剤は腫瘍内への直接注入又は灌流用に製剤化されている。

30

【0060】

幾つかの実施態様において、該ナノ粒子組成物における平均ナノ粒子サイズは、800nm超～約3.5 μm である。

【0061】

幾つかの実施態様において、該ナノ粒子は、解離定数約 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ～約 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ を有する。

【0062】

他の観点において、ナノ粒子組成物を製造する方法が本明細書において提供され、ここで、該方法は、該キャリアータンパク質及び、任意的に少なくとも1つの治療剤、を、所望のナノ粒子の形成を許すであろう条件及び成分の比の条件下で、5.0～7.5のpH且つ約5～約60、約23～約60又は約55～約60の温度有する溶液中の抗体と接触させることを含む。一つの実施態様において、該ナノ粒子は、55～60且つpH7.0で作成される。他の観点において、ナノ粒子組成物が本明細書において提供され、ここで、該方法は、(a)該キャリアータンパク質及び、任意的に該少なくとも1つの治療剤、を接触させてコアを形成すること、そして(b)該コアを、所望のナノ粒子の形成を許すであろう条件及び成分の比の条件下で、約5.0～約7.5pH且つ約5～約60、約23～約60又は約55～約60の温度有する溶液中の抗体と接触させることを含む。

40

【0063】

成分(例えば、キャリアータンパク質、抗体、治療剤又はそれらの組み合わせ)の量は、

50

所望のナノ粒子の形成を提供する為に制御される。成分の量が薄すぎる組成物は、本明細書において記載されたナノ粒子を形成しないであろう。好ましい実施態様において、キャリアータンパク質の結合剤に対する重量比は、10：4である。幾つかの実施態様において、キャリアータンパク質の量は、約1mg/mL～約100mg/mLである。幾つかの実施態様において、結合剤の量は、約1mg/mL～約30mg/mLである。例えば、幾つかの実施態様において、キャリアータンパク質：結合剤：溶液の比は、1mLの溶液(例えば、食塩水)中、およそ9mgのキャリアータンパク質((例えば、アルブミン)対4mgの結合剤である。ある量の治療剤(例えば、パクリタキセル)がまた、該キャリアータンパク質に加えられることができる。

【0064】

10

本明細書に記載されているナノ粒子は予め形成されており、該キャリアータンパク質(例えば、アルブミン)、治療剤(例えば、パクリタキセル)及び結合剤(例えば、抗体)は、患者への投与の前に(及び/又は該ナノ粒子の凍結乾燥前に)、該ナノ粒子の形成を許す条件下、イン・ビトロで混合されることを意味する。幾つかの実施態様において、該予め形成されたナノ粒子は、患者への投与の前に水性溶液中に希釈される。非限定的な例として、該予め形成されたナノ粒子は、患者への投与の、5、10、20、30、45分間若しくは60分間以下前に、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12若しくは24時間前に希釈されうる。

【0065】

更なる実施態様において、該ナノ粒子は上記のように製造され、そして次に凍結乾燥される。

20

【0066】

他の観点において、癌細胞を処置する為の方法が本明細書において提供され、該方法は、該細胞を、本明細書において開示されたナノ粒子組成物及び免疫療法剤の有効量と接触させて、癌細胞を処置することを含む。

【0067】

他の観点において、必要とする患者において腫瘍を処置する為の方法が本明細書において提供され、該方法は、該腫瘍を、本明細書において開示されたナノ粒子組成物及び免疫療法剤の有効量と接触させて、該腫瘍を処置することを含む。幾つかの実施態様において、該腫瘍の大きさが縮小される。

30

【0068】

一般に、該免疫療法剤(PD-1免疫療法剤及び/又はCTLA-4免疫療法剤)は、標準的な臨床プロトコルと一致する方法、例えばFDA-(又は他の規制機関)承認ラベルと一致する方法、において投与される。

【0069】

幾つかの実施態様において、本明細書において提供される方法は、a)該ナノ粒子組成物及び免疫療法剤を週に1回、3週間投与すること；b)該ナノ粒子組成物及び免疫療法剤の投与を1週間中止すること；及びc)癌又は腫瘍を処置する為に、必要に応じて工程a)及びb)を繰り返すことの工程を含む：

【0070】

40

関連する実施態様において、該処置は、該免疫療法剤の投与の前に、該ナノ粒子組成物を投与することを含む。一つの実施態様において、該ナノ粒子組成物は、該免疫療法剤の投与の約6～48又は12～48時間前に投与される。他の実施態様において、該ナノ粒子組成物は、該免疫療法剤の投与の6～12時間前に投与される。なお他の実施態様において、該ナノ粒子組成物は、該免疫療法剤の投与の2～8時間前に投与される。なお他の実施態様において、該ナノ粒子組成物は、該免疫療法剤の投与の1週間前に投与される。

【0071】

関連する実施態様において、該処置は、該ナノ粒子組成物の投与の前に該免疫療法剤を投与することを含む。一つの実施態様において、該免疫療法剤は、該ナノ粒子組成物の投与の約6～48又は12～48時間前に投与される。他の実施態様において、該免疫療法剤は

50

、該ナノ粒子組成物の投与の6～12時間前に投与される。なお他の実施態様において、該免疫療法剤は、該ナノ粒子組成物の投与の2～8時間前に投与される。なお他の実施態様において、該免疫療法剤は、該ナノ粒子組成物の投与の1週間前に投与される。

【0072】

幾つかの実施態様において、該ナノ粒子組成物の治療的に有効量は、約75mg/m²～約175mg/m²の該キャリアータンパク質(すなわち、患者の1m²当たり、ミリグラムのキャリアータンパク質)を含む。他の実施態様において、該治療的に有効量は、治療剤(例えばパクリタキセル)の約75mg/m²～約175mg/m²を含む。他の実施態様において、該治療的に有効量は、該結合剤の約30mg/m²～約70mg/m²を含む。なお他の実施態様において、該治療的に有効量は、ペバシズマブの約30mg/m²～約70mg/m²を含む。

10

【0073】

一つの実施態様において、該凍結乾燥組成物は、約75mg/m²～約175mg/m²のキャリアータンパク質(好ましくは、アルブミンである)；約30mg/m²～約70mg/m²の結合剤；及び約75mg/m²～約175mg/m²のパクリタキセルを含む。

【0074】

幾つかの実施態様において、本発明は、(a)本明細書に定義された該ナノ粒子組成物の量、(b)PD-1に結合することができる免疫療法剤の量及び、任意的に(c)使用の為の説明書、を含むキットに関する。

【0075】

下記の図は、本発明の代表例に過ぎず且つ限定として意図されるものでない。一貫性の為、アブラキサン(登録商標)及びリツキシマブを用いるナノ粒子が、「AR」を用い、且つARの後の数字、例えばAR160、は、これらのナノ粒子の平均粒子サイズ(ナノメートルで、Mastersizer 2000分析に基づく)を与えることが意味される。同様に、該結合剤がアテゾリズマブである場合に、頭文字は「AA」であり、且つその後の数字は、該ナノ粒子の平均粒子サイズである(ナノメートルで、Malvern Nanosight分析に基づく)。

20

【図面の簡単な説明】

【0076】

【図1】図1は、CD20陽性ダウディ(Daudi)リンパ腫細胞が、パネルF及びAそれぞれにおいて、蛍光でタグ付けされた抗ヒトCD20又はアイソタイプ適合対照でラベル付けされ、そしてフローサイトメトリーによって分析された実験の結果を示す。他のパネルにおいて、該ダウディ細胞は、CD20標識の前に、アブラキサン(登録商標)(ABX)、ABX-リツキシマブのナノ粒子(AR160)、凍結乾燥されそして再懸濁されたAR160(AR160L)又はリツキシマブで前処理された。CD20結合は、AR160ナノ粒子及びリツキシマブによって特異的に阻止されたが、ABX単独では阻止されなかったことから、AR160及びAR160Lは、これらの細胞上のCD20を結合し、且つ蛍光抗CD20抗体の結合を阻止することを示す。

30

【図2】図2は、図1の散布図のヒストグラムオーバーレイである。

【図3A】図3Aは、ABX単独の、ABX/リツキシマブのナノ粒子(AR;図3A)との比較を示し、両方が新たに作成され、そして凍結乾燥され/再懸濁された。

【図3B】図3A～図3Bは、ABX単独の、ABX/トラスツズマブのナノ粒子(AT;図3B)との比較を示し、両方が新たに作成され、そして凍結乾燥され/再懸濁された。

40

【図4】図4は、ダウディ細胞増殖アッセイにおけるABX及びAR粒子の毒性を比較する。

【図5A】図5A～図5Cは、ラベル付けされたアブラキサン(登録商標)、非特異的(ペバシズマブ)抗体(AB IgG)で被覆された、ラベル付けされたアブラキサン(登録商標)、又はリツキシマブ(AR160)で被覆された、ラベル付けされたアブラキサン(登録商標)のいずれかで処置されたマウスにおいて得られた結果を示す。図5Aは、各腫瘍内の関心領域(ROI: regions of interest)(ROI 2, 3及び4)における並びにバックグラウンド領域(ROI 1, 5及び6)における蛍光蓄積を示す。ROI 1, 5及び6は、バックグラウンド参照として役立つ。該データは、AR160ナノ粒子の投与が、アブラキサン(登録商標)単独又は非特異的な抗体で被覆されたアブラキサン(登録商標)と比較して、増加した蛍光を結果として生じることを実証する。

50

【図5B】図5A～図5Cは、ラベル付けされたアブラキサン(登録商標)、非特異的(ペバシズマブ)抗体(AB IgG)で被覆された、ラベル付けされたアブラキサン(登録商標)、又はリツキシマブ(AR160)で被覆された、ラベル付けされたアブラキサン(登録商標)のいずれかで処置されたマウスにおいて得られた結果を示す。図5Bは、3つの全ての処置群におけるマウスの腫瘍単位面積当たりの平均蛍光の棒グラフであり、且つ総腫瘍送達を示す。該データは、AR160ナノ粒子の投与が、アブラキサン(登録商標)単独又は非特異的な抗体で被覆されたアブラキサン(登録商標)と比較して、増加した蛍光を結果として生じることを実証する。

【図5C】図5A～図5Cは、ラベル付けされたアブラキサン(登録商標)、非特異的(ペバシズマブ)抗体(AB IgG)で被覆された、ラベル付けされたアブラキサン(登録商標)、又はリツキシマブ(AR160)で被覆された、ラベル付けされたアブラキサン(登録商標)のいずれかで処置されたマウスにおいて得られた結果を示す。図5Cは、腫瘍に送達された薬物对身体の割合を与える為に、バックグラウンドROIによって正規化された、腫瘍領域の単位当たりの平均蛍光の棒グラフである。該データは、AR160ナノ粒子の投与が、アブラキサン(登録商標)単独又は非特異的な抗体で被覆されたアブラキサン(登録商標)と比較して、増加した蛍光を結果として生じることを実証する。

【図6】図6は、食塩水、BEV24(24mg/kgで、ペバシズマブ)、ABX30(30mg/kgで、ABX)、AB160(12mg/kgのBEV及び30mg/kgのABX)及びAB225(24mg/kgのBEV及び30mg/kgのABX)の単回投与で処置されたマウスの生存率を示す。投与後30日で、AB225で及びAB160で処置されたマウスの生存率は、BEV単独で又はアブラキサン(登録商標)単独で処置されたマウスの生存率をはるかに超えている。

【図7】図7は、アテゾリズマブとABXとの間の結合親和性を示す。Kdは、 1.462×10^{-9} であると決定された。バイオレイヤー・インターフェロメトリー(BLI: Biolayer interferometry)(Forte Bioscience)が、ストレプトアビジン・プローブを用いて行われた。

【図8A】図8Aは、Mastersizer NS300によって決定された、ABX単独(90nmの平均サイズ)及びABX-アテゾリズマブのナノ粒子(AA; 129nmの平均サイズ)の粒子サイズ分布を示す。

【図8B】図8Bは、図8AからのABX-アテゾリズマブのナノ粒子の写真である。

【図9A】図9Aは、PD-L1陽性ヒトメラノーマ細胞株、C8161への結合の為に、ラベル付けされた抗PD-L1抗体と競合するABX-アテゾリズマブのナノ粒子(AA130)のフローサイトメトリーを示す。C8161細胞がアイソタイプ対照抗体(図9A)で前処理され、次に、蛍光的にラベル付けされた抗PD-L1抗体でラベル付けされた。

【図9B】図9Bは、PD-L1陽性ヒトメラノーマ細胞株、C8161への結合の為に、ラベル付けされた抗PD-L1抗体と競合するABX-アテゾリズマブのナノ粒子(AA130)のフローサイトメトリーを示す。C8161細胞が処理無しの前処理(図9B)、次に、蛍光的にラベル付けされた抗PD-L1抗体でラベル付けされた。

【図9C】図9Cは、PD-L1陽性ヒトメラノーマ細胞株、C8161への結合の為に、ラベル付けされた抗PD-L1抗体と競合するABX-アテゾリズマブナノ粒子(AA130)のフローサイトメトリーを示す。C8161細胞がアブラキサン(登録商標)(図9C)で前処理され、次に、蛍光的にラベル付けされた抗PD-L1抗体でラベル付けされた。

【図9D】図9Dは、PD-L1陽性ヒトメラノーマ細胞株、C8161への結合の為に、ラベル付けされた抗PD-L1抗体と競合するABX-アテゾリズマブのナノ粒子(AA130)のフローサイトメトリーを示す。C8161細胞がアテゾリズマブ(図9D)で前処理され、次に、蛍光的にラベル付けされた抗PD-L1抗体でラベル付けされた。

【図9E】図9Eは、PD-L1陽性ヒトメラノーマ細胞株、C8161への結合の為に、ラベル付けされた抗PD-L1抗体と競合するABX-アテゾリズマブのナノ粒子(AA130)のフローサイトメトリーを示す。C8161細胞がAA130(図9E)で前処理され、次に、蛍光的にラベル付けされた抗PD-L1抗体でラベル付けされた。

【図10】図10は、C8161細胞に対するABX(実線)及びAA130(破線)の用量依存毒性を示す。

10

20

30

40

50

【図 1 1 A】図 11A は、 2×10^6 の PD-L1 陽性 C8161 メラノーマ腫瘍細胞を注射され、次に、1 回、食塩水での 100 μ l の IV 尾静脈注射(図 11A)によって処置されたマウスにおける腫瘍体積の経時変化を示す。腫瘍成長は週に 3 回モニターされた。腫瘍サイズは、下記の式で計算された： $(\text{長さ} \times \text{幅}^2) / 2$ 。

【図 1 1 B】図 11B は、 2×10^6 の PD-L1 陽性 C8161 メラノーマ腫瘍細胞を注射され、次に、1 回、アテゾリズマブ単独(18mg / kg ; 図 11B)によって処置されたマウスにおける腫瘍体積の経時変化を示す。腫瘍成長は週に 3 回モニターされた。腫瘍サイズは、下記の式で計算された： $(\text{長さ} \times \text{幅}^2) / 2$ 。

【図 1 1 C】図 11C は、 2×10^6 の PD-L1 陽性 C8161 メラノーマ腫瘍細胞を注射され、次に、1 回、ABX 単独(45mg / kg ; 図 11C)によって処置されたマウスにおける腫瘍体積の経時変化を示す。腫瘍成長は週に 3 回モニターされた。腫瘍サイズは、下記の式で計算された： $(\text{長さ} \times \text{幅}^2) / 2$ 。

10

【図 1 1 D】図 11D は、 2×10^6 の PD-L1 陽性 C8161 メラノーマ腫瘍細胞を注射され、次に、1 回、AA130(18mg / kg のアテゾリズマブ及び 45mg / kg の ABX ; 図 11D)によって処置されたマウスにおける腫瘍体積の経時変化を示す。腫瘍成長は週に 3 回モニターされた。腫瘍サイズは、下記の式で計算された： $(\text{長さ} \times \text{幅}^2) / 2$ 。

【図 1 2】図 12 は、図 11A ~ 11D において示された実験からのマウスの生存を示す。 Kaplan・マイヤー(Kaplan Meier)曲線が、グラフ・パッド(Graph Pad)ソフトウェアを用いて作成された。各群の生存期間中央値は、食塩水、アテゾリズマブ、アブラキサン及び AA130 についてそれぞれ、14、13、16 及び 21.5 日であった。AA130 と全ての他の群との間の生存の差は有意であり、p 値は食塩水について 0.0008、アテゾリズマブについて 0.0015 及び ABX について 0.0113 であった。

20

【発明を実施するための形態】

【0077】

本明細書を読んだ後に、様々な代替の実施形態及び代替の用途において本発明を如何に実施するかは当業者に明らかになるであろう。しかしながら、本発明の様々な全ての実施態様は本明細書において記載されていないだろう。本明細書に提示された実施態様は例としてのみ提示され、限定ではないことが理解されるであろう。従って、様々な代替の実施態様のこの詳細な説明は、以下に記載される本発明の範囲又は広さを限定すること解釈されるべきではない。

30

【0078】

本発明が開示され且つ記載される前に、以下に記載される観点は特定の組成物、そのような組成物を調製する方法に限定されないこと、又はそれらのそれ自体の使用は勿論変わりうるということが理解されるべきである。本明細書において使用される語は特定の態様を説明することのみであること且つ限定することを意図されていないことがまた理解されるべきである。

【0079】

本発明の詳細な説明は、読者の便宜の為にのみ様々な項に分割されており、且つ任意の項に見られる開示は他の項に見られる項と組み合わせられうる。タイトル又はサブタイトルは、読者の便宜の為に本明細書において使用されることがあり、それらは本発明の範囲に影響を及ぼすことを意図されるものでない。

40

【0080】

定義

【0081】

他に定義されない限り、本明細書において用いられる技術用語及び科学用語の全ては、本発明が属する当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書において且つ添付の特許請求の範囲において、以下の意味を有すると定義されるべき幾つかの語を参照するだろう。

【0082】

本明細書で用いられる語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、且

50

つ本発明を限定することを意図されるものでない。本明細書で用いられる場合に、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかにそうでないことを示さない限り、複数形も含むことを意図されている。

【0083】

「任意の」又は「任意的に」は、後で説明される事象若しくは状況が起こり得る若しくは起こり得ないこと、及びその記述が事象若しくは状況が起こる場合とそれが起こらない場合を含むことを意味する。

【0084】

範囲を含む数字表示、例えば、温度、時間、量、濃度などの前に使用される場合に、語「約」は、(+)又は(-)10%、5%、1%、又はそれらの間の任意の部分範囲若しくは部分値で変化しうる近似値を示す。好ましくは、投与量に関して用いられる場合に、語「約」は、投与量が+/-10%変わりうることを意味する。例えば、「約400~約800の結合剤」は、ナノ粒子の外側表面が360~880の粒子の結合剤の量を含むことを示す。

【0085】

「含んでいる」「含む」は、組成物及び方法が列挙された要素を含むが他を除外しないことを意味することを意図されている。組成物及び方法を定義するために使用される場合に、「本質的に~なる」は、言及された目的の為に組み合わせに対してとって本質的に重要な意味の他の要素を除外することを意味するものとする。従って、本明細書において定義された要素の本質的になる組成物は、特許請求の範囲に記載された発明の基本的且つ新規な1以上の特徴に実質的に影響を及ぼさない他の物質又は工程を排除するものでない。「~からなる」は、他の成分の微量以上の要素及び実質的な方法の工程を除外することを意味する。これらの遷移語のそれぞれによって定義される実施態様は、本発明の範囲内である。

【0086】

本明細書において使用される場合に、語「ナノ粒子」又は「ナノ粒子複合体」は、5ミクロン未満である少なくとも1つの寸法を有する粒子を云う。好ましい実施態様において、例えば静脈内投与について、該ナノ粒子は1ミクロン未満である少なくとも1つの寸法を有する。直接投与について、該ナノ粒子はより大きいことができる。もっとより大きな粒子でさえも本発明によって明確に企図される。

【0087】

粒子の集団において、個々の粒子のサイズは平均的に分布している。それ故に、該集団についての粒子サイズは、平均値によって、及びまたパーセンタイルによって表されることができる。D50は、50%の粒子が落ちるサイズ未満の粒子サイズである。10%の粒子はD10値よりも小さく、且つ90%の粒子はD90よりも小さい。不明な場合は、「平均」サイズはD50と同等である。それ故に、例えば、AB160及びAR160は、160ナノメートル(nm)の平均サイズを有するナノ粒子を云う。

【0088】

語「ナノ粒子」はまた、より小さい単位のナノ粒子の離散多量体を含みうる。例えば、320nmの粒子は、単位160nmのナノ粒子の二量体を含む。それ故に、160nmのナノ粒子について、多量体は、およそ320nm、480nm、640nm、800nm、960nm、1120nmなどであらう。

【0089】

本明細書において使用される場合に、語「キャリアータンパク質」は、結合剤及び/又は治療剤を輸送する為の機能を有するタンパク質を云う。本開示書の結合剤は、キャリアータンパク質に可逆的に結合することができる。キャリアータンパク質の例は、以下により詳細に説明される。

【0090】

本明細書において使用される場合に、語「コア」は、キャリアータンパク質、キャリアータンパク質及び治療剤、若しくは他の剤又は剤の組み合わせからなりうるナノ粒子の中央部又は内側部を云う。幾つかの実施態様において、該結合剤の部分は、コアに関連付け

10

20

30

40

50

られうる(例えば、コアに非共有結合されうる)。

【0091】

本明細書において使用される場合に、語「治療剤」は、治療的に有用である剤、例えば、病状、生理学的状態、症状若しくは病因的因子の処置、寛解若しくは減弱の為に、又はそれらの評価若しくは診断のための剤を意味する。治療剤は、化学療法剤、例えば分裂抑制剤、トポイソメラーゼ阻害剤、ステロイド、抗腫瘍抗生物質、代謝拮抗剤、アルキル化剤、酵素、プロテアソーム阻害剤、又はそれらの任意の組み合わせ、でありうる。

【0092】

本明細書において使用される場合に、語「結合剤」、「～に特異的な結合剤」又は「～に特異的に結合する結合剤」は、標的抗原に結合し且つ無関係の化合物に有意に結合しない剤を云う。開示された方法において効果的に用いられることができる結合剤の例は、レクチン、タンパク質及び抗体、例えばモノクローナル抗体、例えばヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体又はポリクローナル抗体、又はそれらの抗原-結合フラグメント、並びにアプタマー、融合タンパク質、及びアプタマーを含むがこれらに限定されない。一つの実施態様において、該結合剤は、外因性抗体である。外因性抗体は、哺乳動物免疫系によって、特定の哺乳動物において、例えばヒトにおいて、天然に産生されない抗体である。

【0093】

本明細書において使用される場合に、語「1つの抗体」又は「複数の抗体」は、免疫グロブリン分子及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、抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子)を云う。該語はまた、2つの免疫グロブリン重鎖及び2つの免疫グロブリン軽鎖からなる抗体、並びに完全長抗体及びその一部を含む様々な形態を云う；例えば、免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、CDRグラフト化抗体、ヒト化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド結合されたFv、scFv、単ドメイン抗体(dAb)、二重特異性抗体(diabody)、多重特異的抗体、二重特異的抗体(dual specific antibody)、抗イディオタイプ抗体、二重特異性抗体(bispecific antibody)、それらの機能的に活性なエピトープ-結合フラグメント、二機能性ハイブリッド抗体例えば、Lanzavecchia等、Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987年))、及び単鎖(例えば、Huston等、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85, 5879-5883 (1988年))及びBird等、Science 242, 423-426 (1988年))など(該文献は参照によって本明細書内に取り込まれる)を参照)、を含む。(一般に、Hood等、Immunology, Benjamin, N. Y., 第2版 (1984年); Harlow及びLane, Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988年); Hunkapiller及びHood, Nature, 323, 15-16 (1986年)、該文献は参照によって本明細書内に取り込まれる、を参照)。該抗体は、任意の種類(例えば、IgG、IgA、IgM、IgE又はIgD)でありうる。好ましくは、該抗体はIgGである。抗体は、非ヒト(例えば、マウス、ヤギ又は他の任意の動物)、完全ヒト、ヒト化またはキメラでありうる。「1つの抗体」又は「複数の抗体」は、本明細書において開示された抗体の任意の1以上のバイオシミラーを含む。本明細書において使用される場合に、バイオシミラーは、品質、安全性、及び有効性において、革新企業によって販売されている参照製品と同等であると見なされるバイオ医薬品を云う(公衆衛生法(Public Health Service Act)(42 U.S.C. 262(i)のSection 351(i))。 40

【0094】

「Kd」としてまた言及される語「解離定数」は、特定の物質が個々の成分(例えば、タンパク質キャリアー、抗体、及び任意の治療剤)に分離する程度を表す量を云う。

【0095】

本明細書において使用される場合に、語「凍結乾燥された」、「凍結乾燥」などは、乾燥されるべき物質(例えば、ナノ粒子)が最初に凍結され、そして次に、氷又は凍結された溶媒が真空環境における昇華によって除かれる方法を云う。添加剤は、保存時の凍結乾燥された製品の安定性を高めるために、予備凍結乾燥製剤に任意的に含まれる。幾つかの実施態様において、該ナノ粒子は、治療薬として使用する前に、凍結乾燥された成分(キャリアータンパク質、抗体及び任意の治療剤)から形成されることができる。他の実施態様にお

10

20

30

40

50

いて、該キャリアータンパク質、結合剤、例えば抗体、及び任意の治療剤がナノ粒子に最初に組み合わされて、そして次に凍結乾燥される。該凍結乾燥されたサンプルはさらに、追加の添加剤を含みうる。

【0096】

語「充填剤」は、凍結乾燥製品の構造を提供する剤を含む。充填剤の為に使用される一般的な例は、マンニトール、グリシン、ラクトース及びスクロースを含む。薬学的に洗練されたケーキを提供することに加えて、充填剤がまた、崩壊温度を改変し、凍結融解保護を提供し、且つ長期保存にわたるタンパク質安定性を高めることに關して有用な品質を与えることができる。これらの剤はまた、張性調節剤として役立ちうる。幾つかの実施態様において、本明細書において記載された該凍結乾燥組成物は充填剤を含む。幾つかの実施態様において、該凍結乾燥組成物は充填剤を含まない。

10

【0097】

語「バッファー」は、凍結乾燥前に許容範囲内に溶液のpHを維持する剤を包含し、及びコハク酸塩(ナトリウム又はカリウム)、ヒスチジン、リン酸塩(ナトリウム又はカリウム)、トリス(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)、ジエタノールアミン、クエン酸(ナトリウム)などを含みうる。本発明のバッファーは、約5.5～約6.5の範囲のpH、好ましくは約6.0のpH、を有する。この範囲のpHを制御するだろうバッファーの例は、コハク酸塩(例えば、コハク酸ナトリウム)、グルコン酸塩、ヒスチジン、クエン酸塩及び他の有機酸バッファーを含む。

【0098】

語「抗凍結剤」は一般に、おそらくタンパク質表面から優先的に排除されることによって、凍結誘発ストレスに対して、タンパク質に安定性を提供する剤を含む。それらはまた、一次乾燥及び二次乾燥並びに長期の製品貯蔵の間に保護を提供しうる。例が、ポリマー、例えばデキストラン及びポリエチレングリコール；糖類、例えばスクロース、グルコース、トレハロース及びラクトース；界面活性剤、例えばポリソルベート；並びにアミノ酸、例えばグリシン、アルギニン及びセリン、である。

20

【0099】

語「凍結防止剤」は、おそらく非晶質ガラス状マトリックスを提供することによって、及び乾燥プロセス中に除去される水分子を置換して、水素結合を介してタンパク質と結合することによって、乾燥又は「脱水」工程(一次及び二次の乾燥サイクル)中にタンパク質に安定性を提供する剤を含む。これは、タンパク質の立体配座を維持すること、凍結乾燥サイクルの間のタンパク質分解を最小限に抑えること、且つ長期的な製品を改善することに役立つ。例は、ポリオール、又は糖類、例えばスクロース及びトレハロース、を含む。

30

【0100】

語「医薬製剤」は、活性成分が有効になることを許すような形態であり、及び該製剤が投与されるであろう対象にとって毒性であるさらなる成分を含まない製剤を云う。

【0101】

「薬学的に許容される」添加剤(ビヒクル、添加物)は、使用される有効成分の有効量を提供する為に対象哺乳動物に合理的に投与されることができるものである。

【0102】

「再構成時間」は、凍結乾燥された製剤を溶液中に再水和する為に必要とされる時間である。

40

【0103】

「安定な」製剤は、その中のタンパク質が貯蔵時にその物理的安定性及び/又は化学的安定性及び/又は生物学的活性を本質的に保持しているものである。例えば、タンパク質安定性を測定する為の様々な分析技術が当該技術分野において利用可能であり、且つ下記の文献において概説されている: Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee編, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991年)、及びJones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993年)。安定性は、選択された温度で、選択された期間に亘って測定されることができる。

50

【0104】

本明細書において使用される場合に、語「エピトープ」は、結合剤、例えば抗体、によって認識される抗原の部分を云う。エピトープは、タンパク質（例えば抗体）又はリガンドとの特異的相互作用を可能にする短いアミノ酸配列又はペプチド（任意的に、グリコシル化されているか又は他の方法で修飾されている）を含むが、これらに限定されない。例えば、エピトープは、結合剤の抗原結合部位が付着する分子の一部でありうる。

【0105】

語「処置する」又は「処置」は、対象、例えばヒト、における疾病又は障害（例えば、癌）の処置を包含し、且つ(i)疾病又は障害を抑制すること、すなわち、その発症を阻止すること；(ii)疾病又は障害を軽減すること、すなわち疾病又は障害を後退させること；(iii)疾病又は障害の進行を遅らせること；及び/又は(iv)疾病又は障害の1以上の症状の進行を抑制、緩和若しくは進行を遅らせることを含む。幾つかの実施態様において、「処置する」又は「処置」は、癌細胞を殺すことを云う。

10

【0106】

癌処置に関連して語「殺す」は、その癌細胞又は癌細胞の集団の少なくとも一部の死をもたらすであろう任意の種類ของการ操作を含むことに向けられている。

【0107】

語「アプタマー」は、標的分子、例えばポリペプチド、に結合することができる核酸分子を云う。例えば、本発明のアプタマーは、PD-L1、PD-L2、PD-1又はCTLA-4に特異的に結合することができる。特定の結合特異性を有する抗体の生成及びアプタマーの治療的使用は、当分野において十分に確立されている。例えば米国特許第5,475,096号、米国特許第5,270,163号、5,582,981、米国特許第5,840,867号、米国特許第6,011,020号、米国特許第6,051,698号、米国特許第6,147,204号、米国特許第6,180,348号及び国特許第6,699,843号、並びに加齢黄斑変性を処置する為のMacugen(登録商標)(Eyetechnology, ニューヨーク)の治療的有効性を参照(それらのそれぞれは、全体を参照によって本明細書内に取り込まれる)。

20

【0108】

本明細書において使用される語「オリゴマー」又は「オリゴマーの」又は「オリゴマー化された」は、2以上のモノマーからなるオリゴマーを云う。

【0109】

融合タンパク質は、望ましい構造機能特性及び重要な治療上の可能性を持つ分子を生成する為に、一つのペプチド(例えば、抗体の結晶化可能フラグメント(Fc)ドメイン)を他の生物学的に活性な剤、例えばタンパク質ドメイン、ペプチド、又は核酸若しくはペプチドアプタマー、と結合させる生物学によって作られたポリペプチドである。ガンマ免疫グロブリン(IgG)アイソタイプは、好ましい特徴、例えばエフェクター機能の動員及び増加された血漿半減期、のために、Fc-融合タンパク質を生成するための基礎としてしばしば使用される。融合パートナーとして使用することができるアプタマー（ペプチド及び核酸の両方）の範囲を考慮すると、融合タンパク質は、多数の生物学的及び薬学的用途を有する。

30

【0110】

本明細書において使用される場合に、語「逐次に」は、任意の順序で2以上の処置を次々に投与することを云う。幾つかの実施態様において、該処置は、互いに48時間を超えて投与される。幾つかの実施態様において、該処置は、互いに約48時間以内、互いに約36時間以内、互いに約24時間以内、互いに約12時間以内、互いに約10時間以内、互いに約8時間以内、互いに約6時間以内、互いに約4時間以内、互いに約2時間以内、互いに約1時間以内、に投与される。

40

【0111】

本明細書において使用される場合に、語「同時に」は、任意の順序で実質的にほぼ同時に投与される2以上の処置を云う。

【0112】

本明細書において使用される場合に、語「PD-1」は、CD279としてもまた知られてい

50

るプログラム細胞死タンパク質-1を云い、それは、活性化T細胞、B細胞並びに骨髄系細胞の表面上に発現される。

【0113】

本明細書において使用される場合に、語「PD-L1」は、B7-H1又はCD274としてもまた知られているプログラム死リガンド1を云い、樹状細胞又はマクロファージの表面上に一般的に発現されるPD-1リガンドである。

【0114】

本明細書において使用される場合に、語「PD-L2」は、B7-DC又はCD273としてまた知られているプログラム細胞死リガンド-2を云い、樹状細胞又はマクロファージの表面上に一般的に発現されるPD-1リガンドである。

【0115】

本明細書において使用される場合に、語「後発生物製剤」(biosimilar)又は「後発生物製剤」(biosimilar)はまた、「後続生物製剤」(follow-on biologic)又は「その後の生物製剤」(subsequent entry biologic)としても知られており、それは規制当局によって承認された製品の実質的に同一のコピーである生物製剤を云う。

【0116】

本明細書において使用される場合に、語「相乗作用」又は「相乗効果」又は「相乗的に有効な量」又は「相乗的な効果」は、少なくとも2つの剤の投与によってもたらされる相加的より大きい治療効果を云い、それは他の剤を投与すること無しに剤のうちの1つを投与したことから生じるであろうものを超える。例えば、該ナノ粒子組成物の治療効果は、増加が結合剤及び該ナノ粒子組成物が単独投与時の相加効果よりも大きいという条件で、相乗効果をもたらす為に結合剤と逐次に又は同時に投与される場合に増加される。語「相乗的治療量」は典型的に一方又は両方の治療剤の標準の治療量未満を云い、それは治療剤が単独で使用される場合よりも所望の治療有効性の為に必要な量が少ないことを意味する。相乗的治療量はまた、ある治療剤が標準的な治療用量で与えられ、別の治療剤が標準的な治療用量未満で投与される場合も含む。

【0117】

本明細書において使用される場合に、ナノ粒子組成物又は結合剤の語「治療的に有効量」又は「治療有効性」は、少なくとも疾病又は障害の生理学的効果が改善されるナノ粒子組成物又は結合剤レベルを云う。治療的に有効量は、1以上の錠剤、カプセル又は他の医薬単位を用いた1以上の投与において与えられることができる。治療的に有効量を構成する該ナノ粒子組成物又は結合剤の量は、該ナノ粒子組成物又は結合剤、障害及びその重症度、並びに処置されるべき対象の一般的な健康状態、年齢、性別、体重及び薬物に対する耐性に応じて変わるだろうが、当業者によってルーチン的に決定されることができる。幾つかの実施態様において、語「治療的に有効量」は相乗的に有効な量又は相乗的治療量を云う。

【0118】

さらに、本明細書において用いられている幾つかの語は、下記でより具体的に定義されている。

【0119】

概要

【0120】

本発明は、キャリアタンパク質、PD-L1又はPD-L2結合ドメインを有する結合剤、例えば抗体、アプタマー又は融合タンパク質、並びに治療剤を含む任意的に凍結乾燥されたナノ粒子が患者に対する毒性を最小限に抑えながら、腫瘍に対して標的化治療を提供するという驚くべき発見に部分的に基づく。従って、本明細書に記載の該ナノ粒子は、慣用的なADCと比較して有意な改善である。

【0121】

本発明はさらに、免疫チェックポイント阻害剤免疫療法剤（例えば、PD-1免疫療法剤及び/又はCTLA-4免疫療法剤）のナノ粒子との相乗作用に部分的に基づく。理論に縛られ

10

20

30

40

50

ることなく、本明細書に記載の該結合剤(例えば抗体)によるPD-L1又はPD-L2の結合は、T細胞上でPD-1を結合する為に利用可能なPD-L1又はPD-L2の量を枯渇又は減少させると考えられ、それによってPD-1に基づく免疫療法剤の治療有効性を高める。ナノ粒子を単独での投与又はPD-1免疫療法剤と組み合わせた投与は、PD-1経路媒介阻害を受けないT細胞の数が増加させ、且つPD-L1又はPD-L2を発現する癌に対する患者の免疫応答を回復させる。

【0122】

慣用的なADCが有効であるためには、リンカーが体循環中で解離しないが、腫瘍部位での十分な薬物放出を許すのに十分安定であることが重要である(Alley, S. C., 等 (2008年) Bioconjug Chem 19:759-765)。これは、効果的な薬物複合体を開発する際の大きな障害であることが証明されている(Julien, D. C., 等 (2011年) MAbs 3:467-478; Alley, S. C., 等 (2008年) Bioconjug Chem 19:759-765); それ故に、本明細書において記載されたナノ粒子の魅力的な特徴は、生化学的リンカーが必要とされないことである。

【0123】

現在のADCもう1つの欠点は、腫瘍内へのより高い薬物浸透性が、ヒト腫瘍において実質的に証明されていないことである。マウスモデルにおけるADCの早期試験は、抗体での腫瘍ターゲティングが腫瘍中の高濃度の活性剤を結果として生じることを示唆した(Deguchi, T. 等 (1986年) Cancer Res 46:3751-3755); しかしながら、これは、ヒトの疾病の処置に相関していない。なぜなら、ヒトの腫瘍はマウスの腫瘍よりも透過性がはるかに不均一であるためと思われる(Jain, R. K., 等 (2010年) Nat Rev Clin Oncol 7:653-664)。また、ナノ粒子のサイズは、血管系から腫瘍内への血管外漏出に重要である。ヒト結腸腺癌異種移植モデルを用いたマウス研究において、血管孔はリポソームに対して最大400nmまで透過性であった(Yuan, F., 等 (1995年) Cancer Res 55:3752-3756)。腫瘍孔サイズ及び透過性の別の研究は、退行性腫瘍及び頭蓋腫瘍が200nm未満の粒子に対して透過性であり、両方の特徴が腫瘍の位置及び成長状態に依存したことを実証した(Hobbs, S. K., 等 (1998年) Proc Natl Acad Sci USA 95:4607-4612)。本明細書に記載されたナノ免疫コンジュゲート(ナノ粒子)は、200nm未満のインタクトである大きな複合体が全身循環において腫瘍組織を容易に透過することができるより小さな機能単位に部分的に解離されるという事実によってこの問題を克服する。その上、さらに、コンジュゲートが腫瘍部位に到達すると、より小さな毒性ペイロード(payload)が放出されることができ、且つコンジュゲート全体ではなく、毒性部分のみが腫瘍細胞によって取り込まれる必要がある。

【0124】

治療剤(すなわち、アブラキサン(登録商標))を含むアルブミンナノ粒子で被覆された抗体(すなわち、AVASTIN(登録商標))の出現は、イン・ビボで、2以上の治療剤の所定の部位への指向性送達の新しいパラダイムをもたらしている。国際公開公報WO2012/154861号パンフレット及び国際公開公報WO2014/055415号パンフレットを参照。当該パンフレットのそれぞれは、その全体を参照によって本明細書に取り込まれる。

【0125】

アルブミン及び結合剤、例えば抗体、の組成物が水性溶液中で、特定の濃度及び比と一緒に混合される場合に、本発明において有用な結合剤は、アルブミン内に及びその上に自発的に自己集合して、結合剤の複数のコピー(500以上まで)を有するナノ粒子を形成する。如何なる理論にも限定されないが、結合剤(例えば、抗体)は、該結合剤の1以上のアルブミン結合モチーフ、及び該キャリアタンパク質上の1以上の抗体結合モチーフを介してキャリアタンパク質(例えば、アルブミン)に非共有結合的に結合すると考えられる。そのようなモチーフの例は、国際特許出願第PCT/US17/45643号に見出されることができ、その全体を参照によって本明細書に取り込まれる。

【0126】

単一源のタンパク質を含むタンパク質組成物は一般に、それらが有意な有効期間を示す

凍結乾燥形態で貯蔵されるが、そのような凍結乾燥組成物は、疎水性 - 疎水性相互作用によって一緒に組み合わされた2つの異なるタンパク質の自己集合ナノ粒子を含まない。その上、結合剤の結合部分の大部分がナノ粒子の表面上に曝露されているナノ粒子構成は、そうでなければ良性と考えられる条件による移動又は再構成に影響を受けやすいことにふさわしい。例えば、凍結乾燥中に、タンパク質上のイオン電荷は脱水され、それによって基礎となる電荷が露出される。露出された電荷は、2つのタンパク質間の電荷 - 電荷相互作用を許し、それは各タンパク質の他方に対する結合親和性を変化させることができる。加えて、ナノ粒子の濃度は、溶媒（例えば、水）が除去されるにつれて有意に増加する。ナノ粒子のそのような増加された濃度は、不可逆的なオリゴマー化をもたらす可能性がある。オリゴマー化は、モノマー形態と比較してオリゴマーの生物学的特性を低下させ且つときには1ミクロン超の粒子のサイズを増大させるタンパク質の既知の特性である。

10

【0127】

他方で、安定な形態のナノ粒子組成物は、少なくとも3ヶ月の貯蔵寿命が必要とされ、そして6ヶ月又は9ヶ月超の貯蔵寿命が好ましい臨床的及び/又は商業的な使用に必要とされる。そのような安定な組成物は、静脈内注射に容易に利用可能でなければならず、イン・ビボで所定の部位にナノ粒子を向かわせる為に、静脈内注射の際にその自己組織化形態を保持しなければならず、血流中に送達されるときに如何なる虚血性事象を回避するために、1ミクロン未満の最大サイズでなければならず、及び最後に、注射に用いられる水性組成物と適合されなければならない。

【0128】

化合物

20

【0129】

本開示書を読むと当業者には明らかであるとおり、本開示書は、キャリアータンパク質、結合剤及び、任意的に少なくとも1つの治療剤、を含むナノ粒子の組成物であって、該組成物が任意的に凍結乾燥されている、上記組成物に関する。

【0130】

幾つかの実施態様において、該キャリアータンパク質は、アルブミン、ゼラチン、エラスチン(トポエラスチンを含む)又はエラスチン由来のポリペプチド(例えば -エラスチン及びエラスチン様ポリペプチド(ELPs: elastin-like polypeptides))、グリアジン、レグミン、ゼイン、大豆タンパク質(例えば、ダイズタンパク質単離物(SPI: soy protein isolate))、ミルクタンパク質(例えば、 -ラクトグロブリン(BLG: -lactoglobulin)及びカゼイン)、又はホエータンパク質(例えばホエータンパク質濃縮物(WPC: whey protein concentrates)及びホエータンパク質単離物(WPI: whey protein isolates))であることができる。好ましい実施態様において、該キャリアータンパク質はアルブミンである。好ましい実施態様において、該アルブミンは、卵白(オボアルブミン)、ウシ血清アルブミン(BSA: bovine serum albumin)などである。なおより好ましい実施態様において、該キャリアータンパク質は、ヒト血清アルブミン(HAS: human serum albumin)である。幾つかの実施態様において、該キャリアータンパク質は、組み換えタンパク質、例えば組み換えヒト血清アルブミン、である。幾つかの実施態様において、該キャリアータンパク質は、米国食品医薬品局(FDA: Food and Drug Administration)によって承認された一般に安全と見なされる(GRAS: generally regarded as safe)添加剤である。

30

【0131】

幾つかの実施態様において、該結合剤は抗体である。

【0132】

幾つかの実施態様において、該抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピディリズマブ、PDR001又はそれらの後発生物製剤を含む。幾つかの観点において、該抗PD-1抗体は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ又はBMS936559(MDX1105)である。幾つかの観点において、該CTLA-4免疫療法剤の該結合剤は抗CTLA-4抗体である。一つの実施態様において、該抗CTLA-4抗体はイピリムマブである。

40

50

【 0 1 3 3 】

幾つかの観点において、該第1の結合剤及び／又は該第2の結合剤は融合タンパク質である。一つの実施態様において、該融合タンパク質は、AMP-224(PD-L2 IgG2a融合タンパク質；Amplimmune / GlaxoSmith Klein)；AMP-514(MEDI0680)(PD-L2融合タンパク質；Amplimmune / GlaxoSmith Klein)、又はそれらの後発生物製剤である。AMP-224及びAMP-514はPD-1を標的とする。

【 0 1 3 4 】

幾つかの実施態様において、該抗体は、該ナノ粒子の表面の全部又は一部の実質的に単層の抗体である。

【 0 1 3 5 】

表1は、抗体の非限定的なリストの一覧を示す。

【 0 1 3 6 】

【表 1】

表 1：抗体例

| 一般名 | 商標名 | 型 | ありうる表示の例 |
|-----------------------------------|---------------------|---|---------------------------------|
| アベルマブ (MSB0010718C) | BAVENCIO (登録商標) | 抗 PD-L1；ヒト IgG1 mAb | 固形腫瘍、胃癌、メルケル細胞癌、非小細胞肺癌 |
| デュルバルマブ (MEDI4736) | IMFINZI(商標) | 抗 PD-L1；ヒト IgG1κ mAb | NSCLC、頭頸部、膀胱、胃、脾臓、肝臓、HCC 及び血液の癌 |
| ピディリズマブ (CT-011) | | 抗デルタ様 1(PD-1 の幾つかの種への二次結合)；ヒト化 IgG1 mAb | リンパ腫、骨髄腫、小児脳幹部グリオーマ |
| BMS 936559 / MDX-1105 | | 抗 PD-L1 mAb | メラノーマ、非小細胞肺癌 |
| ニボルマブ (BMS-936558) | OPDIVO(登録商標) | 抗 PD-1；ヒト IgG4 mAb | 転移性黒色腫；扁平上皮非小細胞肺癌；腎細胞癌 |
| アテゾリズマブ (RG7446； MPDL3280A) | TECENTRIQ (登録商標) | 抗 PD-L1 mAb | 膀胱癌、NSCLC、メラノーマ、乳房、腎細胞癌、リンパ腫 |
| イピリムマブ | YERVOY (登録商標) | 抗 CTLA-4；ヒト IgG1 mAb | メラノーマ |
| ペンブロリズマブ | KEYTRUDA (登録商標) | 抗 PD-1；ヒト IgG4 mAb | メラノーマ |

【 0 1 3 7 】

幾つかの実施態様において、該少なくとも1つの治療剤は、アビラテロン、ベンダムス

チン、ボルテゾミブ、カルボプラチン、カバジタキセル、シスプラチン、クロラムブシル、ダサチニブ、ドセタキセル、ドキシソルピシン、エピルピシン、エルロチニブ、エトポシド、エベロリムス、ゲムシタビン、ゲフィチニブ、イダルビシン、イマチニブ、ヒドロキシウレア、ラパチニブ、リュープロレリン、メルファラン、メトトレキサート、ミトキサントロン、ネダプラチン、ニロチニブ、オキサリプラチン、パクリタキセル、パゾパニブ、ペメトレキセド、ピコプラチン、ロミデプシン、サトラプラチン、ソラフェニブ、ベムラフェニブ、スニチニブ、テニポシド、トリプラチン、ピンブラスチン、ピノレルピン、ピンクリスチン及びシクロホスファミドから選択される。好ましくは、該治療剤はパクリタキセルである。追加の治療剤は、例えば国際公開公報WO2017/031368号パンフレットに列挙されているものが知られている。該公報は、その全体を参照によって本明細書内に取り込まれる。

10

【0138】

該治療剤は、該ナノ粒子の内側に、該ナノ粒子の外側表面に、又はその両方に位置しうることを理解されたい。該ナノ粒子は、1超の治療剤、例えば2つの治療剤、3つの治療剤、4つの治療剤、5つの治療剤、又はそれ以上を含みうる。その上、ナノ粒子は、該ナノ粒子の内側及び外側に同じ又は異なる治療剤を含みうる。

【0139】

一つの観点において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している少なくとも100の結合剤を含む。一つの観点において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している少なくとも200の結合剤を含む。一つの観点において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している少なくとも300の結合剤を含む。一つの観点において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している少なくとも400の結合剤を含む。一つの観点において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している少なくとも500の結合剤を含む。一つの観点において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している少なくとも600の結合剤を含む。

20

【0140】

一つの観点において該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している約100～約1000の結合剤を含む。一つの観点において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している約200～約1000の結合剤を含む。一つの観点において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している約300～約1000の結合剤を含む。一つの観点において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している約400～約1000の結合剤を含む。一つの観点において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している約500～約1000の結合剤を含む。一つの観点において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している約600～約1000の結合剤を含む。一つの観点において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している約200～約800の結合剤を含む。一つの観点において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している約300～約800の結合剤を含む。好ましい実施態様において、該ナノ粒子は、該ナノ粒子の表面に非共有結合している約400～約800の結合剤を含む。考えられる値は、終点を含む列挙された範囲の任意の範囲内の任意の値又は部分範囲を含む。

30

【0141】

一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約1 μ m未満である。一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約90nm～約1 μ mである。一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約90nm～約900nmである。一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約90nm～約800nmである。一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約90nm～約700nmである。一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約90nm～約600nmである。一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約90nm～約500nmである。一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約90nm～約400nmである。一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約90nm～約300nmである。一つの観点におい

40

50

て、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約90nm～約200nmである。好ましい実施態様において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約100nm～約180nmである。特に好ましい実施態様において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約130nm又は約160nmである。考えられる値は、終点を含む列挙された範囲の任意の範囲内の任意の値、部分範囲又は範囲を含む。一つの実施態様において、該ナノ粒子サイズは、Mastersizer 2000を用いて決定される。一つの実施態様において、該ナノ粒子サイズは、Malvern Nanosightを用いて決定される。

【0142】

一つの観点において、該ナノ粒子組成物は、静脈注射用に製剤化されている。虚血事象を避ける為に、静脈注射用に製剤化された該ナノ粒子組成物は、約1μm未満の平均粒子サイズを有するナノ粒子を含む。

10

【0143】

一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約1μmよりも大きい。一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約1μm～約5μmである。一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約1μm～約4μmである。一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約1μm～約3μmである。一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約1μm～約2μmである。一つの観点において、該ナノ粒子組成物における平均粒子サイズは、約1μm～約1.5μmである。考えられる値は、終点を含む列挙された範囲の任意の範囲内の任意の値、部分範囲又は範囲を含む。

20

【0144】

一つの観点において、該ナノ粒子組成物は、腫瘍内への直接注入用に製剤化されている。直接注入は、腫瘍部位内への又はその近傍への注射、腫瘍内への灌流などを含む。腫瘍内への直接注入用に製剤化されている場合、該ナノ粒子は、任意の平均粒子サイズを含みうる。理論に縛られることなしに、より大きな粒子(例えば、500nm超、1μm超など)が腫瘍内に固定化される可能性が高く、それによって有益な効果を提供することが信じられている。より大きな粒子は、腫瘍又は特定の器官において蓄積されることができる。例えば、(肝臓癌の臨床的用途において)TheraSphere(登録商標)と呼ばれる、肝臓の腫瘍に栄養を補給する肝臓の動脈に注入する為に使用される20～60ミクロンのガラス粒子を参照。それ故に、静脈内投与用に、1μm未満の粒子が典型的に使用される。1μm超の粒子はより典型的には、腫瘍内に直接投入される(「直接注入」)か又は腫瘍の部位に栄養補給する動脈内に投与される。

30

【0145】

一つの観点において、該組成物内の約0.01%未満のナノ粒子は、200nm超、300nm超、400nm超、500nm超、600nm超、700nm超、又は800nm超、の粒子サイズを有する。一つの観点において、該組成物内の約0.001%未満のナノ粒子は、200nm超、300nm超、400nm超、500nm超、600nm超、700nm超、又は800nm超、の粒子サイズを有する。好ましい実施態様において、該組成物内の約0.01%未満のナノ粒子は、800nm超の粒子サイズを有する。より好ましい実施態様において、該組成物内の約0.001%未満のナノ粒子は、800nm超の粒子サイズを有する。

40

【0146】

好ましい観点において、本明細書内に列挙されたサイズ及びサイズ範囲は、再構成された凍結乾燥ナノ粒子組成物の粒子サイズに関する。すなわち、凍結乾燥ナノ粒子は、水性溶液(例えば、水、他の薬学的に許容される添加剤、バッファーなど)内に再懸濁された後に、粒子サイズ又は平均粒子サイズが本明細書内に列挙された範囲内にある。

【0147】

一つの観点において、該ナノ粒子の少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%又は99.9%が、単一のナノ粒子として、再構成された組成物中に存在する。すなわち、該ナノ粒子の約50%未満、約40%未満、約30%未満などが二量体化又は多量体化(オリゴマー化)されている。

50

【0148】

幾つかの実施態様において、該組成物中のナノ粒子は、20%未満の二量体化数、10%未満の二量体化数、及び好ましくは5%未満の二量体化数を有する。

【0149】

幾つかの実施態様において、該ナノ粒子のサイズは、キャリアタンパク質の結合剤に対する量(例えば、比)を調節することによって制御されることができる。該ナノ粒子のサイズ及びサイズ分布がまた重要である。本発明の該ナノ粒子は、それらのサイズに従って異なる挙動をいう。大きいサイズでは、凝集が血管を塞ぎうる。それ故に、ナノ粒子の凝集は、該組成物の性能及び安全性に影響を及ぼすことができる。一方、より大きな粒子は、或る条件下(例えば、静脈内に投与されていない場合)で、より治療的でありうる。

10

【0150】

一つの観点において、該ナノ粒子組成物は、少なくとも1つの追加の治療剤を含む。一つの実施態様において、該少なくとも1つの追加の治療剤は、該ナノ粒子の外側表面に非共有結合している。一つの実施態様において、該少なくとも1つの追加の治療剤は、該ナノ粒子の外側表面に配置されている。一つの実施態様において、該少なくとも1つの追加の治療剤は、アピラテロン、ベンダムスチン、ボルテゾミブ、カルボプラチン、カバジタキセル、シスプラチン、クロラムブシル、ダサチニブ、ドセタキセル、ドキソルピシン、エピルピシン、エルロチニブ、エトポシド、エベロリムス、ゲムシタビン、ゲフィチニブ、イダルピシン、イマチニブ、ヒドロキシウレア、ラパチニブ、リユープロレリン、メルファラン、メトトレキサート、ミトキサントロン、ネダプラチン、ニロチニブ、オキサリプラチン、パゾパニブ、ペメトレキセド、ピコプラチン、ロミデプシン、サトラプラチン、ソラフェニブ、ベムラフェニブ、スニチニブ、テニポシド、トリプラチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、ピンクリスチン及びシクロホスファミドから選択される。一つの実施態様において、該少なくとも1つの追加の治療剤は、抗癌結合剤、例えば抗癌抗体、である。追加の抗癌抗体は、例えば国際公開公報WO2017/031368号パンフレットに列挙されているものが知られている。該公報は、その全体を参照によって本明細書内に取り込まれる。

20

【0151】

ナノ粒子の製造方法

【0152】

幾つかの観点において、本発明は、本明細書において記載されたナノ粒子組成物を製造する方法に関する。

30

【0153】

一つの観点において、該ナノ粒子組成物のナノ粒子は、キャリアタンパク質又はキャリアタンパク質治療剤粒子を結合剤と、約10:1~約10:30のキャリアタンパク質粒子又はキャリアタンパク質治療剤粒子 対 結合剤の比で接触させることによって形成される。一つの実施態様において、該比は約10:2~約10:25である。一つの実施態様において、該比は約10:2~約1:1である。好ましい実施態様において、該比は約10:2~約10:6である。特に好ましい実施態様において、該比は約10:4である。考えられる比は、終点を含む、列挙された範囲の任意の範囲内の任意の値、部分範囲又は範囲を含む。

40

【0154】

一つの実施態様において、ナノ粒子を形成する為に用いられる溶液又は他の液体媒体の量が特に重要である。ナノ粒子は、キャリアタンパク質(又は、キャリアタンパク質治療剤)及び抗体の過度に希釈された溶液中に形成されない。過度に濃縮された溶液は、構造化されていない凝集物を結果として生じるであろう。幾つかの実施態様において、用いられる溶液(例えば、滅菌水、食塩水、リン酸緩衝生理食塩水)の量は、約0.5mLの溶液~約20mLの溶液である。幾つかの実施態様において、キャリアタンパク質の量は、約1mg/mL~約100mg/mLの量である。幾つかの実施態様において、結合剤の量は、約1mg/mL~約30mg/mLである。例えば、幾つかの実施態様において、キャリアタンパク質:結合剤:溶液の比は、1mLの溶液(例えば、食塩水)中のおよそ9mgのキャリアタン

50

パク質(例えば、アルブミン)対4mgの結合剤、例えば抗体(例えば、BEV)である。治療剤(例えば、タキソール)の量はまた、キャリアータンパク質に加えられることができる。例えば、1mgのタキソールは、1mLの溶液中の、9mgのキャリアータンパク質(10mgのキャリアータンパク質治療薬)及び4mgの結合剤、例えば抗体、Fc融合分子又はアプタマーに加えられることができる。例えばおよそ1リットルの溶液と典型的なi.v.バッグを用いて、1mLで使用される量と比較して、1000倍量のキャリアータンパク質/キャリアータンパク質治療剤及び抗体を用いる必要があるだろう。従って、標準i.v.バッグにおいて本発明のナノ粒子を形成することができない。その上、成分が本発明の治療量で標準i.v.バッグに加えられる場合に、該成分はナノ粒子を形成する為に自己集合しない。

【0155】

一つの実施態様において、該キャリアータンパク質又はキャリアータンパク質治療剤粒子は、約4～約8のpHを有する溶液中で結合剤と接触される。一つの実施態様において、該キャリアータンパク質又はキャリアータンパク質治療剤粒子は、約4のpHを有する溶液中で結合剤と接触される。一つの実施態様において、該キャリアータンパク質又はキャリアータンパク質治療剤粒子は、約5のpHを有する溶液中で結合剤と接触される。一つの実施態様において、該キャリアータンパク質又はキャリアータンパク質治療剤粒子は、約6のpHを有する溶液中で一つの実施態様において、該キャリアータンパク質又はキャリアータンパク質治療剤粒子は、約7のpHを有する溶液中で結合剤と接触される。一つの実施態様において、該キャリアータンパク質又はキャリアータンパク質治療剤粒子は、約8のpHを有する溶液中で結合剤と接触される。好ましい実施態様において、該キャリアータンパク質又はキャリアータンパク質治療剤粒子は、約5～約7のpHを有する溶液中で結合剤と接触される。

【0156】

一つの実施態様において、キャリアータンパク質粒子又はキャリアータンパク質治療剤粒子は、約5～約60の温度、又は終点を含むその範囲の任意の範囲、部分範囲若しくは値を含む温度で、該結合剤とインキュベーションされる。好ましい実施態様において、該キャリアータンパク質粒子又はキャリアータンパク質治療剤粒子は、約23～約60の温度で結合剤と接触される。

【0157】

理論に縛られることなしに、該ナノ粒子組成物内のナノ粒子の安定性は、少なくとも部分的には、ナノ粒子が形成される温度及び/又はpH、並びに溶液中の成分(すなわち、キャリアータンパク質、結合剤及び、任意的に治療剤)の濃度に依存すると考えられている。一つの実施態様において、該ナノ粒子の K_d は、約 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ～約 $2 \times 10^{-5} \text{M}$ である。一つの実施態様において、該ナノ粒子の K_d は、約 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ～約 $2 \times 10^{-8} \text{M}$ である。一つの実施態様において、該ナノ粒子の K_d は、約 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ～約 $7 \times 10^{-9} \text{M}$ である。好ましい実施態様において、該ナノ粒子の K_d は、約 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ～約 $3 \times 10^{-8} \text{M}$ である。考えられる値は、終点を含む列挙された範囲の任意の範囲内の任意の値、部分範囲又は範囲を含む。

【0158】

凍結乾燥

【0159】

凍結乾燥、又はフリーズドライは、組成物から水を除く。この方法において、乾燥されるべき材料が最初に凍結され、そして次に、水又は凍結された溶媒が真空環境における昇華によって除かれる。添加剤が、凍結乾燥工程中の安定性を高める為に及び/又は保存時の凍結乾燥製品の安定性を改善する為に、予め凍結乾燥された製剤中に含まれうる(Pikal, M. Biopharm. 3(9)26-30 (1990年)及びArakawa等, Pharm. Res. 8(3): 285-291 (1991年))。

【0160】

タンパク質が凍結乾燥されうる間、凍結乾燥及び再構成の工程がタンパク質の特性に影響を及ぼしうる。タンパク質は伝統的な有機及び無機の薬物よりも大きく且つより複雑である(すなわち、複雑な三次元構造に加えて多数の官能基を有する)ので、そのようなタン

10

20

30

40

50

パク質の製剤は特別な問題を提起する。タンパク質が生物学的に活性なままである為には、製剤は、タンパク質の複数の官能基を分解から保護すると同時に、タンパク質のアミノ酸の少なくともコア配列の立体配座の完全性を維持しなければならない。タンパク質の分解経路は、化学的不安定性（すなわち、結合の形成又は開裂によるタンパク質の修飾をもたらす且つ新しい化学的実体を結果として生じる任意の工程）又は物理的不安定性（すなわち、タンパク質の高次構造の変化）を含むことができる。化学的不安定性は、脱アミド化、ラセミ化、加水分解、酸化、ベータ脱離又はジスルフィド交換に起因することができる。物理的不安定性は、例えば、変性、凝集、沈殿又は吸着によって生じることができる。3つの最も一般的なタンパク質分解経路は、タンパク質凝集、脱アミド化及び酸化である(Cleland等, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10(4): 307-377 (1993年))。

10

【0161】

本発明の凍結乾燥組成物は、安定剤、バッファーなどの存在下又は非存在下での標準的な凍結乾燥技術によって調製される。驚くべきことに、これらの条件は、該ナノ粒子の比較的脆い構造を変えない。その上、せいぜい、これらのナノ粒子は、凍結乾燥するとそれらのサイズ分布を保持し、且つより重要なことに、あたかも新しく作られたのと実質的に同じ形態及び比率でイン・ビボ投与（例えば、静脈内送達）用に再構成されることができる。

【0162】

製剤

20

【0163】

一つの観点において、該ナノ粒子組成物は、全身送達、例えば静脈内投与、用に製剤化される。

【0164】

一つの観点において、該ナノ粒子組成物は、腫瘍内への直接注入用に製剤化される。直接注入は、腫瘍部位内への又は腫瘍部位の近傍への注射、腫瘍内への灌流を含む。該ナノ粒子組成物は全身的に投与されないので、腫瘍内への直接注入用に製剤化されているナノ粒子組成物は、任意の平均粒子サイズを含みうる。理論に縛られることなしに、より大きな粒子(例えば、500nm超、1µm超など)は腫瘍内に固定化される可能性が高く、それによって良好な有益な効果であると考えられているものを提供すると考えられる。

30

【0165】

他の観点において、本明細書で提供される化合物を含む組成物、及び少なくとも1つの薬学的に許容される添加剤が本明細書において提供される。

【0166】

一般に、本明細書において提供される化合物は、許容される投与方法の任意のものによって患者に投与する為に製剤化されることができる。様々な製剤及び薬物送達システムが当技術分野において利用可能である。例えば、Gennaro, A. R. 編集 (1995年) Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Publishing Co.を参照。

【0167】

一般に、本明細書において提供されるナノ粒子は、下記の経路のいずれか一つによって医薬組成物として投与されるだろう：経口、全身(例えば、経皮的、鼻腔内、又は座薬による)又は非経口(例えば、筋肉内、静脈内又は皮下)投与。

40

【0168】

該組成物は一般に、少なくとも1つの薬学的に許容される添加剤と組み合わせた本発明のナノ粒子からなる。許容される添加剤は、非毒性であり、投与を助け、且つ特許請求された化合物の治療上の有効性に悪影響を及ぼさない。そのような添加剤は、任意の固体、液体、半固体であってもよく、又はエアロゾル組成物の場合には、当業者に一般的に入手可能な気体添加剤であってもよい。

【0169】

固形医薬添加剤は、デンプン、セルロース、タルク、グルコース、ラクトース、スクロ

50

ース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルクなどを含む。液体及び半固体の添加剤は、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール、及び、例えば石油、動物、植物又は合成起源、例えばピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油などを含む様々な油から選択されうる。好ましい液体キャリアー、特に注射溶液の為に液体キャリアー、は、水、食塩水、水性デキストロース及びグリコールを含む。他の適切な医薬添加剤及びそれらの製剤が、E. W. Martinにより編集されたるRemington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Company, 第18版, 1990年)において記載されている。

【0170】

本発明の組成物は、所望であれば、活性成分を含有する1以上の単位剤形を含むパック又はディスペンサー装置において提供されうる。そのようなパック又は装置は例えば、金属又はプラスチックのホイル、例えばブリスターパック、又はガラス、及びゴム栓、例えばバイアル内のゴム栓、を含みうる。該パック又はディスペンサー装置は、投与の為に説明書を添付されうる。適合性の医薬キャリアーにおいて処方された本発明のナノ粒子を含む組成物がまた調製され、適切な容器に入れられ、そして指示された状態の処置の為にラベル付けされた。

【0171】

処置方法

【0172】

本明細書に記載されたナノ粒子組成物は、PD-L1及び/又はPD-L2を発現する癌又は腫瘍を有する哺乳動物における癌細胞及び/又は腫瘍を処置するのに有用である。好ましい実施態様において、該哺乳動物は、ヒト(すなわち、ヒトの患者)である。好ましくは、凍結乾燥されたナノ粒子組成物が投与前に再構成される(水性添加剤中に懸濁される)。

【0173】

一つの観点において、癌細胞を処置する方法であって、該細胞を本明細書に記載された有効量のナノ粒子及び免疫療法剤(例えばPD-1又はCTLA-4)に接触させて、該癌細胞を処置することを含む上記方法を提供する。癌細胞の処置は、増殖の減少、該細胞を殺すこと、該細胞の転移を予防することなどを含むがこれらに限定されない。

【0174】

本明細書において使用される場合に、「一つの免疫療法」(Immune therapy)、「複数の免疫療法」(immune therapies)、「一つの免疫療法」(immunotherapy)又は「複数の免疫療法」(immunotherapies)は一般に、免疫応答を誘導する、高める又は抑制することによる疾病の処置を云う。或る場合において、一つの免疫療法又は複数の免疫療法は、免疫応答を引き出すか若しくは活性化するか若しくは増幅するか(「活性化免疫」としても知られている)、又は免疫応答を減少させるか若しくは抑制するか(「抑制免疫療法」としても知られている)のいずれかであることができる。例えば、癌免疫療法(cancer immune therapy)又は癌免疫療法(cancer immunotherapy)は、腫瘍又は癌細胞に対する免疫応答を刺激又は活性化することを試みる。当業者によって理解されるであろうように、免疫療法(immune therapy)又は免疫療法(immunotherapy)は、下記を含むがこれらに限定されない様々なアプローチ又はメカニズムを利用することができる：抗体、抗原；免疫応答性細胞、例えばリンパ球、マクロファージ、樹状細胞、他の抗原提示細胞、ナチュラルキラー細胞(NK細胞、例えばNK-92)、T細胞(例えばヘルパーT細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)など)、の使用及び/又は活性化；免疫調節剤を含む治療法(インターロイキン(例えばIL-2、IL-7、IL-12など)、サイトカイン(例えばインターフェロン、G-CSF、イミキモド(imiquimod)など)、ケモカイン(例えばCCL3、CCL26、CXCL7など)、免疫調節性イミド薬などを含むがこれらに制限されない)など。免疫療法(immune therapy)又は免疫療法(immunotherapy)は、1つの型の抗体又は複数の型の抗体の使用によって投与されることができる。免疫療法(immune therapy)又は免疫療法(immunotherapy)のアプローチはまた、例えば腫瘍に対する免疫応答を高める為に、単独で、又は他の

10

20

30

40

50

治療剤若しくはメカニズム、例えば化学療法剤など、と組み合わせて投与されることができる。

【0175】

一つの観点において、必要とする患者において腫瘍を処置する為の方法であって、該患者に、治療的に有効量のナノ粒子組成物及び本明細書に記載された免疫療法剤を投与して、該腫瘍を処置することを含む該方法が提供される。一つの実施態様において、該腫瘍のサイズが減少される。一つの実施態様において、該腫瘍サイズは、処置中及び／又は処置後の少なくとも一定期間増加(すなわち、進行)しない。

【0176】

一つの実施態様において、該ナノ粒子組成物は静脈内に投与される。一つの実施態様において、該ナノ粒子組成物は腫瘍に直接投与される。一つの実施態様において、該ナノ粒子組成物は、腫瘍への直接注入又は灌流によって投与される。

10

【0177】

一つの実施態様において、該免疫療法剤は、静脈内に投与される。一つの実施態様において、該免疫療法剤は腫瘍に直接投与される。一つの実施態様において、該免疫療法剤腫瘍への直接注入又は灌流によって投与される。

【0178】

一つの観点において、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者を処置する為の方法が提供され、該方法は、該患者に、ナノ粒子を含むナノ粒子組成物を投与することを含み、及び該ナノ粒子のそれぞれは、キャリアータンパク質、PD-L1又はPD-L2結合部分を有する結合剤、及び、任意的に少なくとも1つの治療剤、を含み、該ナノ粒子はPD-L1又はPD-L2に結合することができる。幾つかの実施態様において、該方法はさらに、該患者に、PD-1免疫療法剤を投与することを含む。一つの実施態様において、該PD-1免疫療法剤は、PD-1に結合することができる第2の結合剤を投与することを含む。

20

【0179】

他の観点において、本発明は、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者の免疫療法処置の治療有効性を増加させる為の方法であって、該患者に、本明細書に記載されたナノ粒子組成物の治療的に有効量を投与することを含む。幾つかの実施態様において、該方法はさらに、該患者に、PD-1免疫療法剤を投与することを含む。一つの実施態様において、該PD-1免疫療法剤は、PD-1に結合することができる第2の結合剤を投与することを含む。

30

【0180】

一つの実施態様において、該方法は、
a)該ナノ粒子組成物を1週間に1回、3週間投与すること；
b)該ナノ粒子組成物の投与を1週間中止すること；及び
c)任意的に、必要に応じて工程a)及びb)を繰り返して、該腫瘍の処置することを含む。

【0181】

一つの観点において、該PD-1免疫療法剤は、該ナノ粒子組成物と同時に投与される。一つの観点において、該PD-1免疫療法剤は、該ナノ粒子組成物の前に投与される。一つの観点において、該PD-1免疫療法剤は、該ナノ粒子組成物の後に投与される。一つの観点において、該PD-1免疫療法剤は、規制団体(例えば、FDA)によって承認されたラベルに従って投与される。

40

【0182】

幾つかの観点において、該ナノ粒子組成物の該ナノ粒子のそれぞれは、約400～約800の結合剤を含む。

【0183】

幾つかの観点において、該第1の結合剤(該ナノ粒子中の結合剤)はアプタマーである。幾つかの観点において、該PD-1免疫療法剤の該第2の結合剤はアプタマーである。

【0184】

50

幾つかの観点において、該第1の結合剤(該ナノ粒子中の結合剤)は抗体である。幾つかの観点において、該PD-1免疫療法剤の該第2の結合剤は抗体である。

【0185】

幾つかの観点において、該抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピディリズマブ、PDR001又はそれらの後発生物製剤を含む。幾つかの観点において、該抗PD-L1抗体は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ若しくはBMS936559(MDX1105)、又はそれらの後発生物製剤である。幾つかの観点において、該CTLA-4免疫療法剤の該結合剤は抗CTLA-4抗体である。一つの実施態様において、該抗CTLA-4抗体は、イピリムマブ又はそれらの後発生物製剤である。

【0186】

幾つかの観点において、該第1の結合剤及び/又は該第2の結合剤は融合タンパク質である。一つの実施態様において、該融合タンパク質はAMP-224(PD-L2 IgG2a融合タンパク質; Amplimmune / GlaxoSmith Klein); AMP-514(MEDI0680)(PD-L2融合タンパク質; Amplimmune / GlaxoSmith Klein)、又はそれらの後発生物製剤である。幾つかの観点において、該ナノ粒子組成物は凍結乾燥されている。

【0187】

幾つかの観点において、該PD-1免疫療法剤の該第2の結合剤は遊離の結合剤であり、該遊離の結合剤は、ナノ粒子組成物と複合体化されていない、又はナノ粒子組成物上及び/又はその中に組み込まれてない。

【0188】

幾つかの観点において、PD-1免疫療法剤は、ナノ粒子組成物と複合体化された又はナノ粒子組成物上及び/又はその中に組み込まれた第2の結合剤を含む免疫療法ナノ粒子組成物であり、該免疫療法ナノ粒子組成物はキャリアータンパク質及び該第2の結合剤を含む。幾つかの観点において、該免疫療法ナノ粒子組成物は凍結乾燥されている。

【0189】

幾つかの観点において、該免疫療法ナノ粒子組成物の該第2の結合剤は抗体である。幾つかの観点において、該免疫療法ナノ粒子組成物の該第2の結合剤は抗PD-1抗体である。幾つかの観点において、該抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピディリズマブ、PDR001又はそれらの後発生物製剤を含む。

【0190】

幾つかの観点において、免疫療法ナノ粒子組成物の該第2の結合剤はアプタマーである。幾つかの観点において、該免疫療法ナノ粒子組成物の該第2の結合剤はPD-1アプタマーである。

【0191】

幾つかの観点において、該免疫療法ナノ粒子組成物の該第2の結合剤は融合タンパク質である。幾つかの観点において、該免疫療法ナノ粒子組成物の該第2の結合剤は、PD-1を標的化する融合タンパク質である。一つの実施態様において、該融合タンパク質は、AMP-224(PD-L2 IgG2a融合タンパク質; Amplimmune / GlaxoSmith Klein); AMP-514(MEDI0680)(PD-L2融合タンパク質; Amplimmune / GlaxoSmith Klein)、又はそれらの後発生物製剤である。

【0192】

幾つかの観点において、該ナノ粒子組成物及び該PD-1免疫療法剤は、逐次に投与される。幾つかの観点において、該ナノ粒子組成物は、該PD-1免疫療法剤の投与の前に投与される。幾つかの観点において、該PD-1免疫療法剤は、該ナノ粒子組成物の投与の前に投与される。幾つかの観点において、該ナノ粒子組成物及び該PD-1免疫療法剤は同時に投与される。

【0193】

幾つかの実施態様において、本発明は、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者の免疫療法処置の治療有効性を増加させる方法に関する。該方法は、該患者に、本明細書に記載されたナノ粒子組成物の治療的に有効量、及び第2の結合剤を含むPD-1免疫療法

10

20

30

40

50

剤を投与することを含み、該ナノ粒子組成物の該結合剤がPD-L1及び／又はPD-L2に結合することができる場合、該免疫療法剤の該第2の結合剤はPD-1に結合することができ、且つ該ナノ粒子組成物の該結合剤がPD-1に結合することができる場合、該免疫療法剤の該第2の結合剤はPD-L1及び／又はPD-L2に結合することができる。

【0194】

幾つかの実施態様において、本発明は、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者を処置する為の方法に関する。該方法は、該患者に、本明細書に記載されたナノ粒子組成物の治療的に有効量、及び第2の結合剤を含む免疫療法剤を投与することを含み、該ナノ粒子組成物の該結合剤はPD-L1、PD-L2又はPD-1に結合することができ、且つ該免疫療法剤の該第2の結合剤はPD-L1、PD-L2又はPD-1に結合することができる。

10

【0195】

一つの実施態様において、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者を処置する為の方法は、該患者に、ナノ粒子を含むナノ粒子組成物、及びPD-1免疫療法剤を投与することを含む。該ナノ粒子組成物の該ナノ粒子のそれぞれは、(a)キャリアータンパク質、(b)PD-L1又はPD-L2結合部分を有する結合剤、及び(c)任意的に、少なくとも1つの治療剤、を含む。水性溶液で再構成すると、該ナノ粒子の該結合剤は、PD-L1又はPD-L2に結合することができる。

【0196】

一つの実施態様において、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者の免疫療法処置の治療有効性を増加させる為の方法であって、該患者に、(a)本明細書に記載されたナノ粒子組成物の治療的に有効量、及び(b)PD-1免疫療法剤を投与することを含む。幾つかの実施態様において、該ナノ粒子組成物は凍結乾燥されており、そして水性溶液で再構成すると、該ナノ粒子の該結合剤は、PD-L1又はPD-L2に結合することができる。

20

【0197】

幾つかの観点において、該ナノ粒子の量及び該第2の結合剤の量は、互いに相対比で決定される。

【0198】

幾つかの観点において、該ナノ粒子組成物及び該免疫療法剤の該第2の結合剤の相乗的に有効な量の比は、該免疫療法剤の有効性がその単独投与よりも実質的に大きいように、該免疫療法剤の治療有効性を増加させる。一つの観点において、該ナノ粒子組成物の該第2の結合剤に対する量の比は、約1:1、1:1.5、1:2、1:2.5、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9又は1:10～約1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:15又は約1:20であることができる。

30

【0199】

他の観点において、免疫療法剤の治療効力を増加させる為の方法は、患者に、本明細書に記載されたナノ粒子を投与することによって該免疫療法剤において必要とされる又は好ましい該第2の結合剤の治療的に有効な量を減らす。該ナノ粒子組成物の量及び該第2の結合剤の量の比は、約1:1～約1:10の範囲であり、及び／又はそのような組み合わせの投与の相乗的治療有効性は、該第2の結合剤の単回投与の治療有効性よりも少なくとも約5%又は約10%又は約15%又は約20%又は約25%又は約30%又は約35%又は約40%又は約45%又は約50%又は約55%又は約60%又は約又は約65%又は約70%又は約80%又は約90%又は約100%大きい相乗的治療有効性を達成することができる。他の観点において、そのような組み合わせの投与の相乗的治療有効性は、該ナノ粒子組成物又は該第2の結合剤のいずれかの単回投与の治療有効性よりも少なくとも約25%又は約30%又は約35%又は約40%又は約45%又は約50%大きい。

40

【0200】

一つの実施態様において、該免疫療法剤の該第2の結合剤は、約30分間～約60分間約60mg/mLを含む(例えばアテゾリズマブ)。

【0201】

一つの実施態様において、該免疫療法剤の該第2の結合剤は、約60分間の期間に亘って

50

静脈内送達の為に約1.0mg/kg～約3.0mg/kgを含む(例えばニボルマブ)。

【0202】

一つの実施態様において、該免疫療法剤の該第2の結合剤は、約30分間の期間に亘って静脈内送達の為に約2mg/kgを含む(例えばペンブロリズマブ)。

【0203】

幾つかの実施態様において、本発明は、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者の免疫療法処置の治療有効性を増加させる為の方法に関する。該方法は、該患者に、本明細書の上記に記載されたナノ粒子組成物の治療的に有効量、及び第2の結合剤を含む免疫療法剤を投与することを含み、ここで、該ナノ粒子の該結合剤がPD-L1及び/又はPD-L2に結合することができる場合、該免疫療法剤の該第2の結合剤はPD-1に結合することができ、且つ、該ナノ粒子の該結合剤がPD-1に結合することができる場合、該免疫療法剤の該第2の結合剤はPD-L1及び/又はPD-L2に結合することができる。

10

【0204】

幾つかの実施態様において、本発明は、PD-L1又はPD-L2を発現する癌を患っている患者を処置する為の方法に関する。該方法は、該患者に、本明細書の上記に記載されたナノ粒子組成物の治療的に有効量、及び第2の結合剤を含む免疫療法剤を投与することを含み、ここで、該ナノ粒子の該結合剤はPD-L1、PD-L2、PD-1に結合することができ、該免疫療法剤の該第2の結合剤は、該ナノ粒子の該結合剤と同じPD-L1、PD-L2、PD-1に結合することができる。

【0205】

幾つかの観点において、該ナノ粒子の量は、該ナノ粒子組成物の有効量である。幾つかの観点において、該ナノ粒子の量は、該患者単独に投与される場合に、該ナノ粒子組成物の有効量よりも少ない量である。

20

【0206】

幾つかの観点において、該第2の結合剤は有効量である。幾つかの観点において、該第2の結合剤は、該患者単独に投与される場合に、該有効量よりも少ない量である。

【0207】

一つの実施態様において、本明細書に記載されたナノ粒子の治療的に有効量は、約1mg/m²～約200mg/m²抗体、約2mg/m²～約150mg/m²、約5mg/m²～約100mg/m²、約10mg/m²～約85mg/m²、約15mg/m²～約75mg/m²、約20mg/m²～約65mg/m²、約25mg/m²～約55mg/m²、約30mg/m²～約45mg/m²又は約35mg/m²～約40mg/m²の抗体を含む。他の実施態様において、該治療的に有効量は、約20mg/m²～約90mg/m²の抗体を含む。一つの実施態様において、該治療的に有効量は、30mg/m²～約70mg/m²の抗体を含む。一つの実施態様において、本明細書に記載されたナノ粒子の治療的に有効量は、約50mg/m²～約200mg/m²のキャリアタンパク質又はキャリアタンパク質及び治療剤を含む。好ましい実施態様において、該治療的に有効量は、約75mg/m²～約175mg/m²のキャリアタンパク質又はキャリアタンパク質及び治療剤を含む。考えられる値は、終点を含む列挙された範囲の任意の範囲内の任意の値、部分範囲を又は範囲を含む。

30

【0208】

一つの実施態様において、該ナノ粒子組成物の治療的に有効量は、結合剤、例えば抗体、アプタマー又はFc融合の約20mg/m²～約90mg/m²を含む。好ましい実施態様において、該治療的に有効量は、結合剤、例えば抗体、アプタマー又はFc融合の30mg/m²～約70mg/m²を含む。考えられる値は、終点を含む列挙された範囲の任意の範囲内の任意の値、部分範囲を又は範囲を含む。

40

【0209】

本明細書に記載された組成物及び方法によって処置されることができる癌又は腫瘍は、胆道癌；脳癌、例えば神経膠芽腫及び髄芽細胞腫を含む；乳癌；子宮頸癌；絨毛癌；結腸癌；子宮内膜癌；食道癌、胃がん；血液腫瘍、例えば急性リンパ性白血病及び骨髄性白血病を含む血液腫瘍；多発性骨髄腫；エイズ関連白血病及び成人T細胞白血病リンパ腫；上

50

皮内腫瘍、例えばボーエン病及びパジェット病を含む上皮内腫瘍；肝癌(肝細胞癌)；肺癌；リンパ腫、例えばホジキン病及びリンパ球性リンパ腫を含むリンパ腫；神経芽細胞腫；口腔癌、例えば扁平上皮癌を含む口腔癌；卵巣癌、例えば上皮細胞、間質細胞、生殖細胞及び間葉細胞から生じるものを含む卵巣癌；膀胱癌；前立腺癌；直腸癌；肉腫、例えば平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫及び骨肉腫を含む肉腫；皮膚癌、例えばメラノーマ、カポジ肉腫、基底細胞癌及び扁平上皮癌を含む皮膚癌；精巣癌、例えば胚種腫瘍(germinal tumors)(精上皮腫、非精上皮腫[奇形腫、絨毛癌])、間質性腫瘍及び生殖細胞腫瘍を含む精巣癌；甲状腺癌、例えば甲状腺腺癌及び髓様癌を含む甲状腺癌；並びに、腎臓癌、例えば腺癌及びウィルムス腫瘍を含む腎臓癌を含むが、これらに限定されない。

【0210】

一般に、本発明の該化合物は、同様の用途に役立つ剤について、許容されている投与方法のいずれかによって治療有効量で投与されるであろう。本発明の化合物、すなわち該ナノ粒子、の実際の量は、多数の要因、例えば処置されるべき疾患の重症度、対象の年齢及び相対的な健康状態、用いられる化合物の効力、投与の経路及び形態、並びに当業者に周知の他の要因、に依存するだろう。

【0211】

そのような剤の有効量は、最も効果的で且つ便利な投与経路、及び最も適切な製剤と同様に、ルーチン的な実験によって容易に決定されることができる。様々な製剤及び薬物送達系が、当技術分野において利用可能である。例えばGennaro, A.R.等 (1995年) Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Publishing Co.を参照。

【0212】

剤、例えば本発明の化合物、の有効量又は治療的に有効量又は用量は、対象における症状の改善又は生存期間の延長をもたらす剤又は化合物の量を云う。そのような分子の毒性及び治療効力は、細胞培養物又は実験動物における標準的な薬学的手順によって、例えば、LD50(集団の50%に致命的な用量)及びED50(集団の50%に治療的に有効量)を決定することによって、決定されることができる。治療効果に対する毒性の用量比が治療指数であり、これはLD50/ED50比として表されることができる。高い治療指数を示す剤が好ましい。

【0213】

有効量又は治療的に有効量は、研究者、獣医師、医師又は他の臨床医によって求められている組織、系、動物又はヒトの生物学的又は医学的反応を誘発する化合物又は医薬組成物の量である。投与量は、使用される剤形及び/又は利用される投与経路に応じてこの範囲内で変わりうる。正確な製剤、投与経路、投与量及び投与間隔は、対象の状態の詳細を考慮して、当技術分野において公知の方法に従って選択されるべきである。

【0214】

投与量及び投与間隔は、所望の効果を達成するのに十分である活性部分の血漿レベル、すなわち最小有効濃度(MEC:minimal effective concentration)、を提供する為に個々に調整されうる。該MECは化合物ごとに異なるであろうが、例えばイン・ビトロデータ及び動物実験から推定されることができる。該MECを達成するのに必要な投与量は、個々の特性及び投与経路に依存するだろう。局所投与又は選択的摂取の場合、薬物の有効局所濃度は血漿中濃度に関係されないかもしれない。

【0215】

実施例

【0216】

本開示書は、コアとしてアルブミン結合パクリタキセル(すなわち、アブラキサン(登録商標))又はシスプラチンからなるナノ粒子、及びPD-L1を認識する抗体(例えば、アテゾリズマブ)を用いて説明される。当業者は、実施例の該ナノ粒子の製造及び使用は例示の目的のためだけであり、本開示書はこの例示によって限定されないことを理解するであろう。

【0217】

本明細書で使用される任意の略語は、通常の科学的意味を有する。特に記載がない限り、

10

20

30

40

50

全ての温度は である。本明細書において、下記の語は、他に定義されない限り下記の意味を有する。

【 0 2 1 8 】

【表 2】

| | | |
|-------------------|---|--|
| ABX | = | アブラキサン(ABRAXANE) (登録商標)(アルブミン結合パクリタキセル) |
| ADC | = | 抗体依存性化学療法 |
| BEV | = | ベバシズマブ |
| BSA | = | ウシ血清アルブミン |
| dH ₂ O | = | 蒸留水 |
| nM | = | ナノモル |
| EdU | = | 5-エチニル-2'-デオキシウリジン |
| FITC | = | フルオレセインイソチオシアネート |
| kD | = | キロダルトン |
| Kd | = | 解離定数 |
| kg | = | キログラム |
| M | = | モル |
| mg | = | ミリグラム |
| ml 又は mL | = | ミリリットル |
| m ² | = | 平方メートル |
| mm ³ | = | 立法ミリメートル |
| μg | = | マイクログラム |
| μl | = | マイクロリットル |
| μm | = | マイクロメーター／ミクロン |
| PBS | = | リン酸緩衝生理食塩水 |
| pK | = | 薬物動態 |
| RT | = | 室温 |
| rpm | = | 毎分回転数 |

【 0 2 1 9 】

実施例 1：凍結乾燥された AR160 の抗原結合

【 0 2 2 0 】

CD20 陽性のダウディリンパ腫細胞が、パネル F 及び A それぞれにおいて、蛍光でタグ付けされた抗ヒト CD20 又はアイソタイプ適合対照でラベル付けされ、そしてフローサイトメトリーによって分析された。他のパネルにおいて、該ダウディ細胞が、CD20 標識の前に、ABX、AR160、AR160L (AR160 が凍結乾燥され、そして注射用に適した溶液内に

再懸濁された)又はリツキサンで前処理された。図1は、CD20結合がAR粒子及びリツキサンによって特異的に阻止されたが、ABX単独では阻止されなかったことを実証する。これらの結果は、ARがこれらの細胞上でそのCD20リガンドに結合され、蛍光抗CD20の結合を阻止することを示唆する。

【0221】

図2は、図1に提示されたデータのヒストグラムオーバーレイである。

【0222】

図3A及び図3Bは、新しく作製され凍結乾燥されたAR(図3A)及びAT(図3B)と比較したABX単独の粒子サイズを示す。

【0223】

図4は、ABX粒子及びAR粒子の毒性を比較するダウディ増殖アッセイの結果を示す。該データは、凍結乾燥された及び凍結乾燥されていないナノ粒子がダウディアッセイにおいて本質的に同じ毒性を有することを実証する。

【0224】

実施例2：AlexaFluor750でラベル付けされたナノ粒子の腫瘍蓄積の蛍光分析

【0225】

マウスは、ラベル付けされたアブラキサン(登録商標)、非特異的抗体で被覆された、ラベル付けされたアブラキサン(登録商標)(AB IgG)、又はリツキシマブで被覆された、ラベル付けされたアブラキサン(登録商標)(AR160)のいずれかの等量の静脈内(IV)注射を施された。関心領域(ROI: Regions of interest)の2、3及び4(図5A)は蛍光閾値に基づいて腫瘍の蓄積を追跡し; ROIの1、5及び6(図5A)は、バックグラウンド参照として役立つ。蛍光が、注射の24時間後に上記ROIにおいて決定された。図5Bは、3つの全ての処置群におけるマウスの腫瘍面積の単位当たりの平均蛍光の棒グラフであり、総腫瘍送達を提供するために決定された。図5Cは、腫瘍に送達された薬物対身体の割合を与える為に、バックグラウンドROIによって正規化された、腫瘍領域の単位当たりの平均蛍光の棒グラフである。該データは、AR160ナノ粒子の投与が、アブラキサン(登録商標)単独又は非特異的な抗体で被覆されたアブラキサン(登録商標)と比較して、増加した蛍光を結果として生じることを実証する。

【0226】

実施例3：225nmのサイズを有するABX-リツキシマブのナノ粒子のイン・ビボ有効性

【0227】

225nmのサイズを有するナノ粒子を作製するために、該粒子は、国際公開公報WO2017/031368号パンフレット(その全体が参照によって本明細書内に取り込まれる)が、BEVのアブラキサン(登録商標)に対する比が4:5、すなわち4部のBEVと5部のアブラキサン、であった。この比は、225nmのサイズを有するナノ粒子(AB225)を生成した。AB225の効果は、国際公開公報WO2017/031368号パンフレットにおいて記載された通り、動物においてアッセイされた。図6は、食塩水、BEV、ABX、AB160及びAB225の単回投与で処置された並びにBEV前処理有りでAB160で処置されたマウスの生存率を示す。投与後30日目に、AB225で処置された並びにBEV前処理有り又は無しでAB1605で処置されたマウスの生存率は、アブラキサン(登録商標)単独のBEV単独で処置されたマウスの生存率をはるかに超える。

【0228】

実施例4：アテゾリズマブ-アブラキサン(登録商標)ナノ粒子の製造

【0229】

アテゾリズマブ及びアブラキサン(登録商標)(ABX)は、それぞれ4mg/mL及び10mg/mLの濃度で、室温で、30分間、同時インキュベーションされて、ナノ粒子、AA130、を形成した。

【0230】

アテゾリズマブ及びABXが相互作用してナノ粒子複合体を形成することができるかどうかを決定する為に、バイオレイヤー干渉法(BLItz: Biolayer interferometry)(Forte

10

20

30

40

50

Bioscience)は、ストレプトアビジン・プローブを用いて実行された。1xPBS中の100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のビオチン化アテゾリズマブは、ストレプトアビジン・プローブに結合された。該プローブから未結合アテゾリズマブを洗浄した後、該抗体結合プローブが、1xPBS中の100、500、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でABXに曝露された。PBSに曝露された抗体プローブはバックグラウンドとして使用され、そして該バックグラウンドが差し引かれた。BLItzソフトウェアが、解離定数を計算する為に使用された(図7)。Kdが 1.462×10^{-9} であると決定された。

【0231】

実施例5：アテゾリズマブ-アブラキサン(登録商標)ナノ粒子のサイズ測定

【0232】

Mastersizer NS300が、ABX単独と比較したアテゾリズマブ結合ABXの粒子サイズを決定する為に用いられた。ナノサイト(Nanosight)は、動的光散乱及びブラウン運動を用いて、粒子サイズを計算する。

【0233】

上記された通り、アテゾリズマブ及びABXは共にインキュベーションされて、ナノ粒子、AA130、を形成した。ABXが1：200に希釈され、且つアテゾリズマブ結合ABXが1：800に希釈された；3つの30秒ビデオクリップが、粒子サイズを決定する為に、キャプチャーされ、そして分析された(図8A)。図8Bは、AA130のビデオクリップのうちの1つからの静止画像である。アテゾリズマブ-ABXのナノ粒子の平均粒子サイズは約129nmであると決定された；ABX単独の平均サイズは約90nmである。

【0234】

実施例6：AA130はPD-L1を結合する

【0235】

フローサイトメトリーが行われて、リガンド、PD-L1、へのアテゾリズマブとアテゾリズマブ結合アブラキサンの結合を調べた。PD-L1陽性メラノーマ細胞株、C8161、が、この実験の為に用いられた。AA130が上記に記載された通りに作成され、そして一定分量のナノ粒子が、6000rpmで、10分間回転されて、任意の未結合アテゾリズマブを除去した。C8161細胞がそれぞれ、陰性対照及び陽性対照としてFITCでラベル付けされたアイソタイプ対照及び抗ヒトPD-L1で染色された。該C8161細胞は、ABX及びアテゾリズマブ単独及びAA130ナノ粒子とともに、30分間、インキュベーションされた。インキュベーション後、該細胞は、FITCでラベル付けされた抗ヒトPD-L1で30分間標識付けされ、そしてFACSバッファー(1xPBS+0.5%のBSA及び0.05%のアジ化ナトリウム)で洗われた。洗浄後、細胞が、Guava 8HT上で、フローサイトメーターによって分析され、データ解析がGuavasoftソフトウェア(Millipore)を用いて行われた。

【0236】

C8161細胞が、アイソタイプ対照抗体(図9A)、処理なし(図9B)、アブラキサン(登録商標)(図9C)、アテゾリズマブ(図9D)又はAA130(図9E)で前処理され、次に、蛍光的にラベル付けされた抗PD-L1抗体でラベル付けされた。130nm粒子の文脈におけるアテゾリズマブは、そのリガンド、PD-L1、に結合するその能力を保持する。

【0237】

実施例7：AA130の細胞毒性

【0238】

C8161メラノーマ細胞が、細胞毒性を決定するために、0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のパクリタキセル濃度で、一晚、ABX及びAA130に曝露された。該細胞はまた、チミジン類似体であるEdUと共にインキュベーションされた。翌日、該細胞が回収され、2%パラホルムアルデヒドで固定され、そして1%サポニンで透過性にされた。透過処理後、該細胞は、細胞増殖のパーセントを決定する為に、FITCでラベル付けされた抗EdU抗体で、30分間、インキュベーションされた。洗浄後、該細胞は、Guava 8HT上で、フローサイトメーターによって分析され、そしてデータ解析がGuavasoftソフトウェア(Millipore)を用いて行われた。増殖指数が処理無しの陽性対照に対する正規化によって計算された。

【 0 2 3 9 】

図10は、C8161細胞に対するABX(実線)及びAA130(破線)の用量依存毒性を示す。AA130は、ABX単独と同様の細胞毒性を有する。

【 0 2 4 0 】

実施例8：AA130ナノ粒子のイン・ビボでの有効性

【 0 2 4 1 】

無胸腺ヌードマウス(Harlan Sprague Dawley)は、 2×10^6 のPD-L1陽性C8161メラノーマ腫瘍細胞で注射された。該腫瘍は約600mm³まで成長され、そして食塩水、アテゾリズマブ単独(18mg/kg)、ABX単独(45mg/kg)及びAA130(18mg/kgのアテゾリズマブ及び45mg/kgのABX)で1回、100µlのIV尾静脈注射で処置された(図11A～図11D)。腫瘍増殖が、3回/週モニターされた。腫瘍サイズが下記の式を用いて計算された：(長さ×幅²)/2。

10

【 0 2 4 2 】

腫瘍増殖曲線(図12)は、食塩水及び個々の薬物単独と比較して、AA130で処置されたマウスにおける鈍化された腫瘍増殖を示す。カプラン・マイヤー(Kaplan Meier)曲線が、グラフ・パッド(Graph Pad)ソフトウェアを用いて生成された。各群についての生存期間中央値はそれぞれ、食塩水、アテゾリズマブ、ABX及びAA130について14、13、16及び21.5日であった。AA130と他の全ての群との生存の差は、食塩水で0.0008、アテゾリズマブで0.0015、及びアブラキサンで0.0113のp値で有意であった。

20

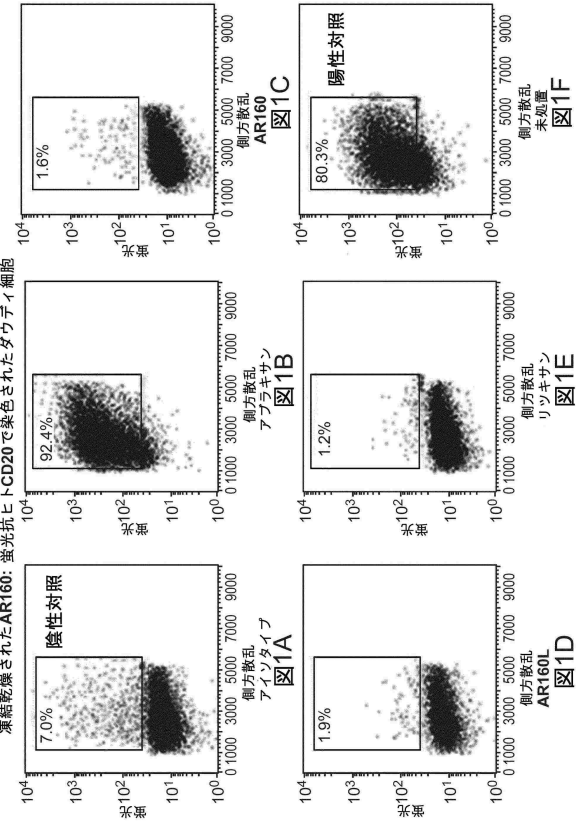
30

40

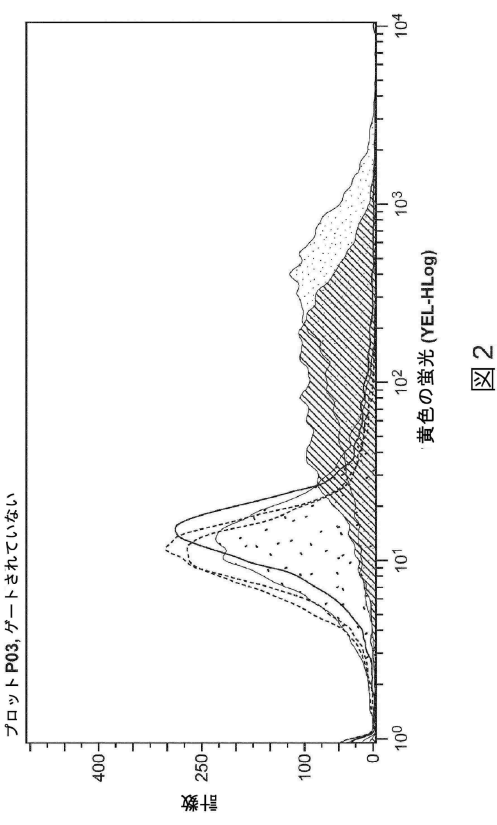
50

【図面】

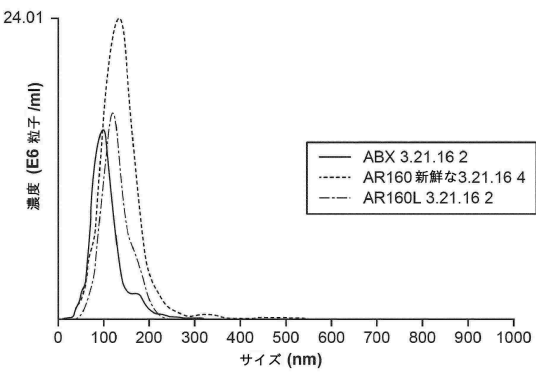
【図 1】



【図 2】



【図 3 A】



【図 3 B】

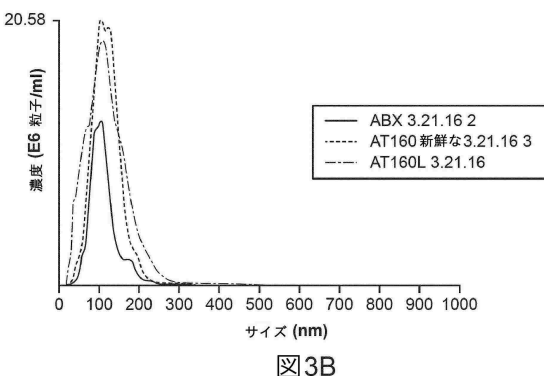


図 3A

図 3B

10

20

30

40

50

【 図 4 】

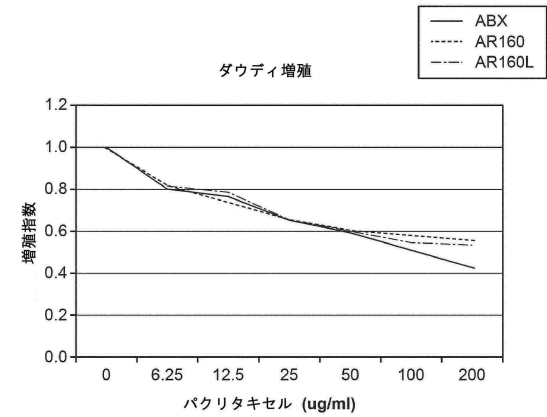


図 4

【 図 5 A 】

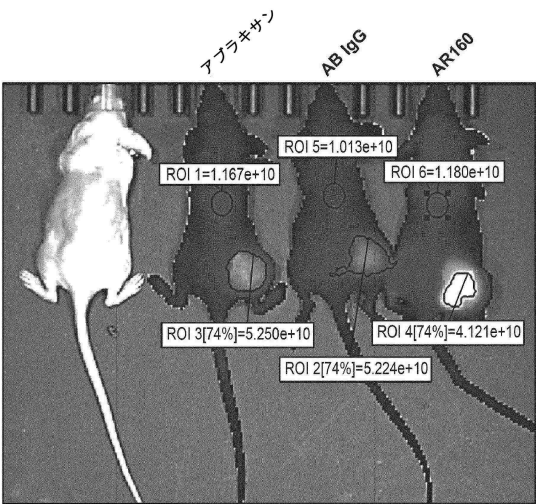


図 5A

【 図 5 B 】

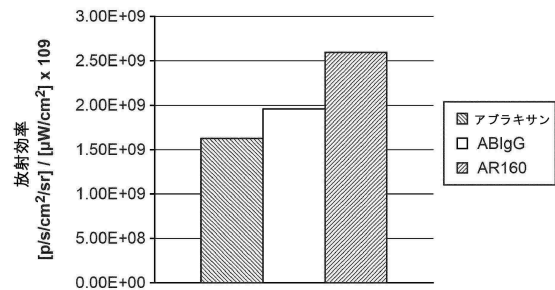


図 5B

【 図 5 C 】

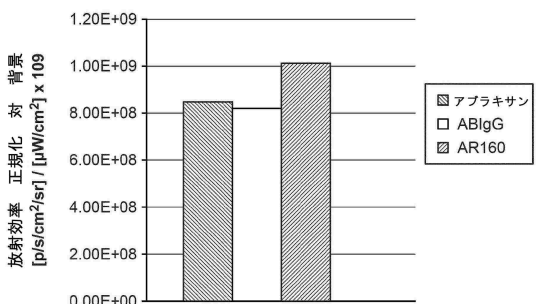


図 5C

10

20

30

40

50

【 図 6 】

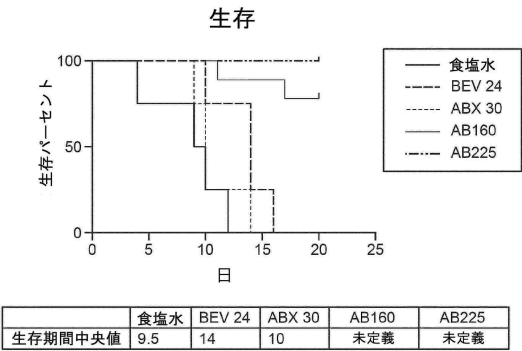


図 6

【 図 7 】

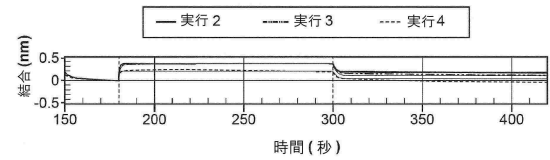


図 7

10

【 図 8 A 】

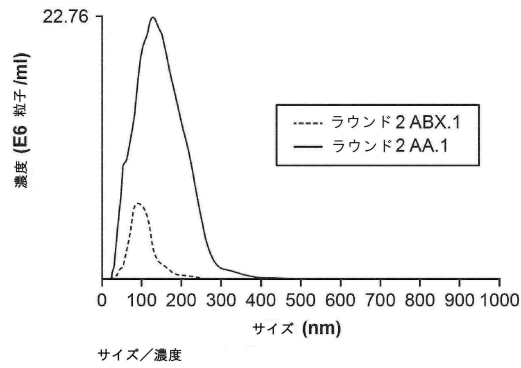


図 8A

【 図 8 B 】

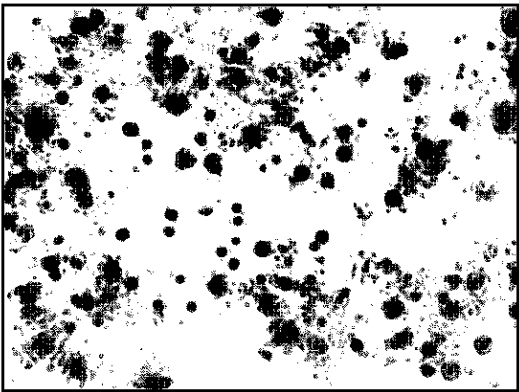


FIG. 8B

20

30

40

50

【図 9 A】

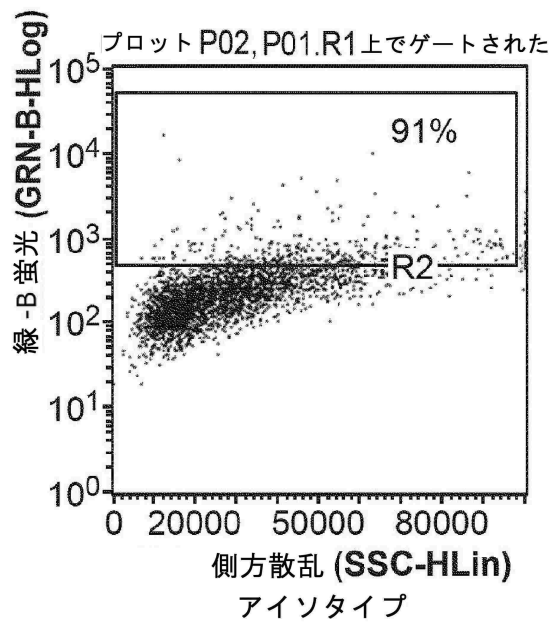


図9A

【図 9 B】

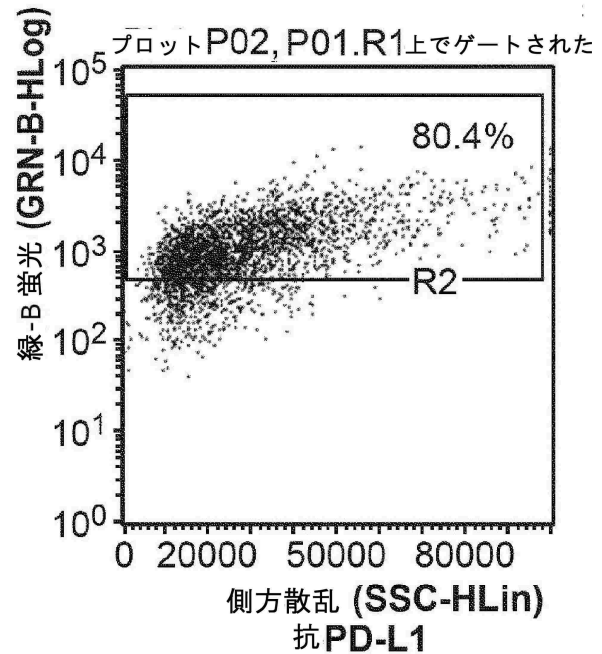


図9B

【図 9 C】

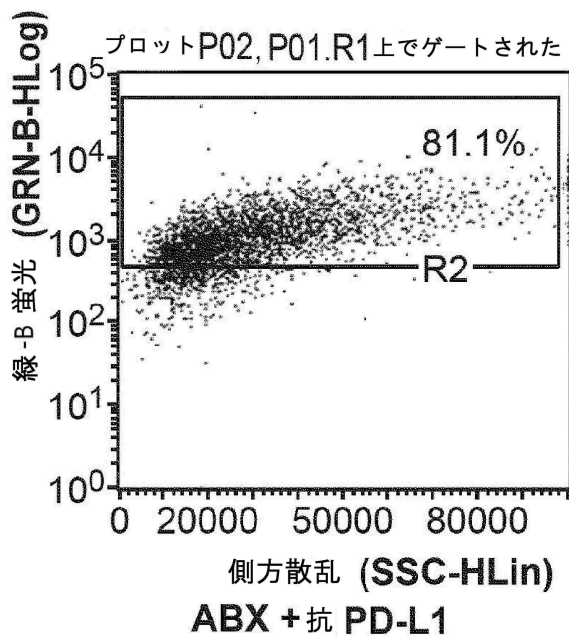


図9C

【図 9 D】

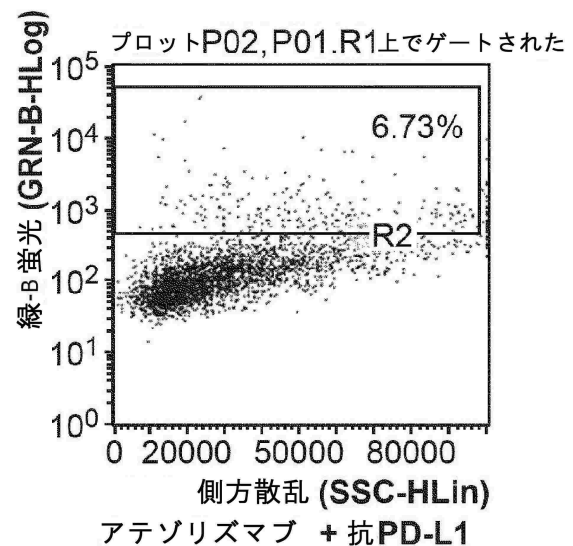


図9D

10

20

30

40

50

【図 9 E】

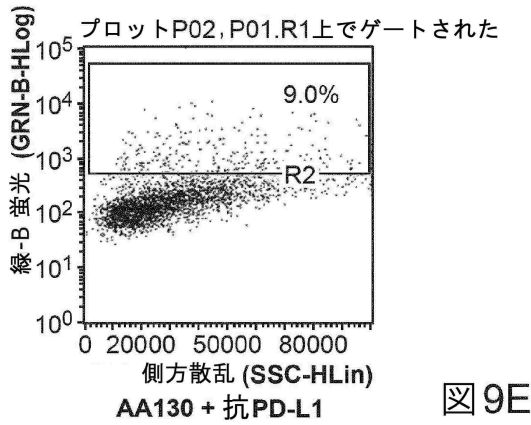


図 9E

【図 1 0】

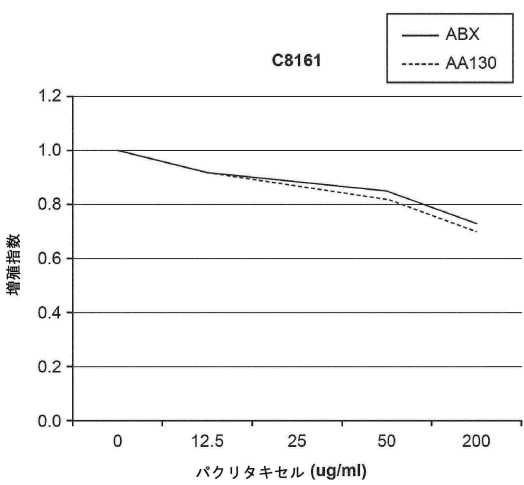


図 10

【図 1 1 A】

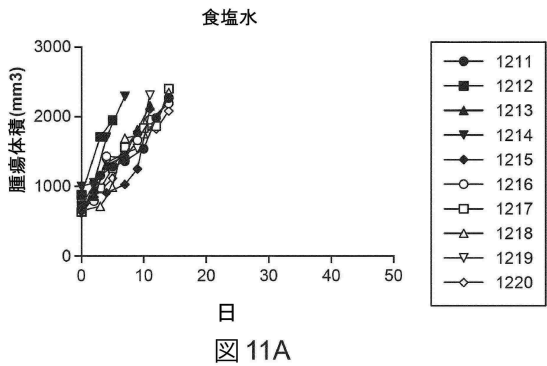


図 11A

【図 1 1 B】

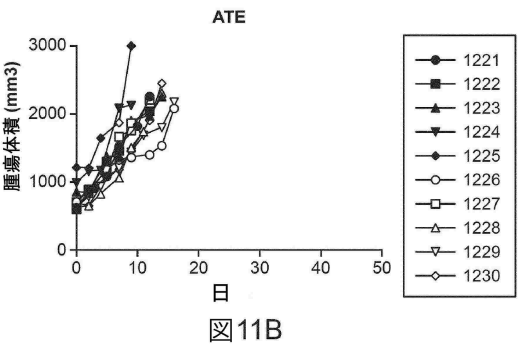


図 11B

10

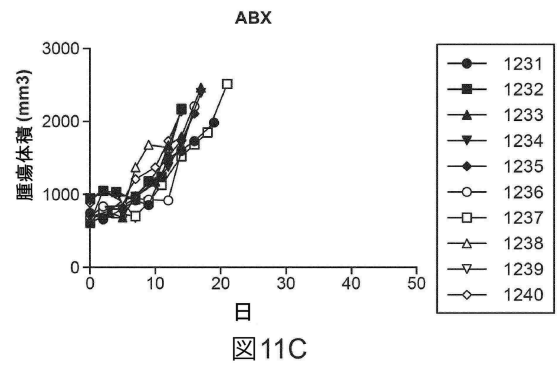
20

30

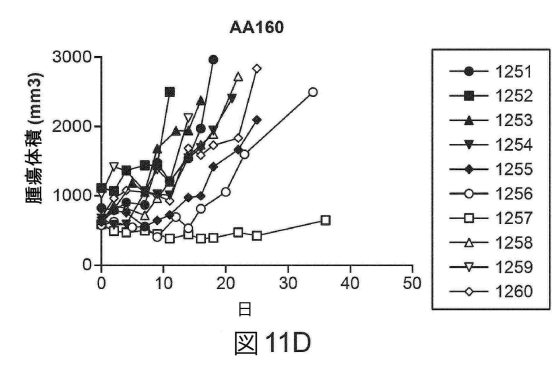
40

50

【図 1 1 C】

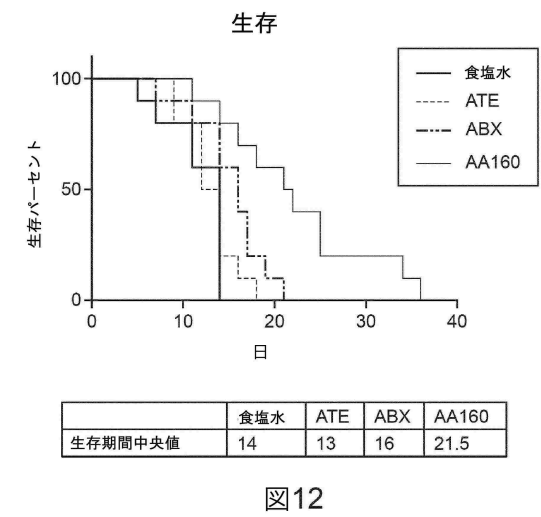


【図 1 1 D】



10

【図 1 2】



20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)

F I

A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 47/42
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00 1 2 1

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 マルコヴィッチ, スヴェトミール エヌ.

アメリカ合衆国, ミネソタ州 5 5 9 0 5, ロチェスター, エスダブリュ, ファースト ストリート
2 0 0, マヨ ファウンデーション フォー メディカル エデュケーション アンド リサーチ気付

(72)発明者 ネヴァラ, ウェンディ ケイ.

アメリカ合衆国, ミネソタ州 5 5 9 0 5, ロチェスター, エスダブリュ, ファースト ストリート
2 0 0, マヨ ファウンデーション フォー メディカル エデュケーション アンド リサーチ気付

合議体

審判長 原田 隆興

審判官 岩下 直人

審判官 前田 佳与子

(56)参考文献 特表2015-518826(JP, A)

SILAS INMAN, ATEZOLIZUMAB/NAB-PACLITAXEL COMBO SHOWS HIGH RESPONSE RATES IN TNBC, ONCLIVE, 2015年12月10日, PAGES 1-4, <http://www.onclive.com/conference-coverage/sabcs-2015/atezolizumab-nab-paclitaxel-combo-shows-high-response-rates-in-tnbc> [2019年11月6日検索]

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K31/00-33/44

A61K39/00-39/44

A61K9/00-9/72

A61K47/00-47/69

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)