

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-512860

(P2022-512860A)

(43)公表日 令和4年2月7日(2022.2.7)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	2 G 0 4 5
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	Z N A	4 B 0 6 3
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	4 B 0 6 5
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	E	4 C 0 7 6
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	39/395	T	4 C 0 8 4
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全48頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-523468(P2021-523468)	(71)出願人	591100596
(86)(22)出願日	令和1年11月5日(2019.11.5)		アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サ
(85)翻訳文提出日	令和3年6月25日(2021.6.25)		ンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メディカル
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/080174		フランス国、エフ - 7 5 0 1 3 パリ、
(87)国際公開番号	WO2020/094609		リュ・ドゥ・トルビアック 1 0 1
(87)国際公開日	令和2年5月14日(2020.5.14)	(71)出願人	510139564
(31)優先権主張番号	18306452.6		ユニヴェルシテ ポール サバティエ ト
(32)優先日	平成30年11月6日(2018.11.6)		ゥールーズ トロワ
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		フランス共和国 エフ - 3 1 0 6 2 トゥ
(31)優先権主張番号	18306549.9		ールーズ セデックス 9 , ルート ドゥ
(32)優先日	平成30年11月22日(2018.11.22)	(71)出願人	515034781
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		サントル・オスピタリエ・ユニヴェルシ
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		テール・ドゥ・トゥールーズ
	最終頁に続く		CENTRE HOSPITALIER
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 白血病幹細胞を根絶することによる急性骨髄性白血病の治療のための方法および医薬組成物

(57)【要約】

白血病幹細胞を根絶することによる急性骨髄性白血病の治療のための方法および医薬組成物
 集中的な化学療法後、薬剤耐性および/または幹細胞の特徴を備えた細胞の出現は、頻繁な再発および急性骨髄性白血病(AML)患者の転帰不良を説明する可能性がある。本明細書において、本発明者らは、アドレノメデュリン受容体CALCR Lが、正常細胞と比較してAML患者において、そして優先的に未成熟CD34+CD38-コンパートメントにおいて過剰発現されることを最初に明らかにした。次に、彼らは、in vivoでの白血病幹細胞機能の維持におけるその役割を実証した。さらに、CALCR Lの枯渇は、異種移植モデルの白血病の増殖に強く影響し、in vivoで化学療法剤のシタラピンに感作された。したがって、本発明者らは、ADM-CALCR L軸が、E2F1およびBCL2依存的に、細胞周期、DNAの完全性、および化学療法抵抗性のAML幹細胞の高いOXPHOS状態を駆動することを示した。さらに、CALCR Lの枯渇は細胞をシタラピンに感作させ、その発現はマウスのin vivoでの化学療法への反応を予測した。さらに、限界希釈アッセイ、診断時および再発時、ならびにNSGマウスへの移植前後の初代AMLサンプルの単一細胞RNA-seq分析の組み合わせを使用して、本発明者らは、CALCR L駆動の遺伝子シグネチャーを保持している化学療法抵抗性白血病幹細胞亜集団の存在を明らかにした。最後に、本発明者らは、化学療法抵抗性LSCがCALCR Lに依存することを強く実証した。これらのデータはすべて、幹細胞の生存、増殖、代謝におけるCALCR Lの重要な役割を強調し、この受容体を化学療法抵抗性の白血病幹細胞集団の新しいマーカーとして、またそれらを特異的に根絶し、AMLの再発を克服するための有望な治療標的として特定する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CALCR L に特異的に結合する治療有効量の抗体を対象に投与し、それにより前記白血病幹細胞を枯渇させることを含む、急性骨髄性白血病に罹患している対象において白血病幹細胞を枯渇させる方法。

【請求項 2】

治療有効量の CALCR L 活性または発現の阻害剤を対象に投与し、それにより前記白血病幹細胞を枯渇させることを含む、急性骨髄性白血病に罹患している対象において白血病幹細胞を枯渇させる方法。

【請求項 3】

CALCR L に特異的に結合する抗体を治療有効量で患者に投与することを含む、それを必要とする患者の化学療法抵抗性急性骨髄性白血病 (AML) を治療する方法。

【請求項 4】

抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項 1、2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

抗体が、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性を媒介する、請求項 1、2 または 3 に記載の方法。

【請求項 6】

抗体が、IgG1 抗体である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

抗体が、補体依存性細胞毒性を媒介する、請求項 1、2、または 3 に記載の方法。

【請求項 8】

抗体が、抗体依存性食作用を媒介する、請求項 1、2、または 3 に記載の方法。

【請求項 9】

抗体が、CALCR L に対して向けられた第 1 の抗原結合部位およびエフェクター細胞に対して向けられた少なくとも 1 つの第 2 の抗原結合部位を含む多重特異性抗体である、請求項 1、2、または 3 に記載の方法。

【請求項 10】

抗体が、細胞毒性部分にコンジュゲートされている、請求項 1、2 または 3 に記載の方法。

【請求項 11】

治療有効量の CALCR L 活性または発現の阻害剤を患者に投与することを含む、それを必要とする患者における化学療法抵抗性急性骨髄性白血病 (AML) を治療する方法。

【請求項 12】

阻害剤が、CALCR L の RAMP1 及び / 又は RAMP2 及び / 又は RAMP3 への結合を阻害する化合物 (たとえば、抗体) である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

阻害剤 (たとえば、抗体) が、アドレノメデュリンなどのそのリガンドの 1 つへの CALCR L の結合を阻害する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

阻害剤が、CALCR L、RAMP1、RAMP2、または RAMP3 発現の阻害剤である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 15】

CALCR L および幹細胞の少なくとも 1 つのマーカーを発現する細胞の集団を同定および選択することを含む、AML に罹患している対象から得られたサンプル中の白血病幹細胞を同定する方法。

【請求項 16】

AML に罹患している対象が再発のリスクがあるかどうかを決定するための請求項 15 に記載の方法の使用であって、前記白血病幹細胞の存在は、対象が再発のリスクがあること

10

20

30

40

50

を示す、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、白血病幹細胞を根絶することによって急性骨髄性白血病（AML）を治療するための方法および医薬組成物に関する。

【0002】

発明の背景：

急性骨髄性白血病（AML）は、自己複製白血病幹細胞（LSC）から発生し、免疫無防備状態のマウスでアッセイおよび異種移植すると、ヒトAMLを再増殖させることができる（たとえば、PDX; Bonnet and Dick, 1997）。これらの細胞がすべての白血病細胞のごく少数であるという事実にもかかわらず、幹細胞の表現型または機能に関連する遺伝子シグネチャーがAMLの予後不良に関連しているという事実は、それらの存在量が実際の臨床的影響を与えるという仮説を強く支持する（Gentles et al., 2010; Vergez et al., 2011; Eppert et al., 2011; Ng et al., 2016）。この臨床的関連性は、再発患者がLSC頻度の絶え間ない濃縮（Ho et al., 2016）およびLSC関連遺伝子シグネチャーの増加（Hackl et al., 2015）を示すことを示す研究によって裏付けられている。LSCは化学療法から免れることが最初に示されたが（Jordan et al., 2006; Ishikawa et al., 2007）、最近の研究は、シタラビン（Arac）がPDXモデルおよび患者のLSCプールに強い影響を与える可能性があることを示した（Farge et al., 2017; Boyd et al., 2018）。これらの結果は、2つの異なるLSC集団があり、一部は化学療法感受性（S-LSC）であり、したがって従来の治療によって根絶され、その他は化学療法抵抗性（R-LSC）が持続し、AMLを再生し、患者の再発を開始することを示唆している。したがって、これらのR-LSCをより適切に表現型および機能的に特徴づけることは、R-LSCを特異的に標的とする新しい治療戦略の開発を可能にするために重要である。

【0003】

LSCコンパートメントがヒトAML細胞のCD34⁺CD38⁻亜集団に限定されることが最初に提案されたが（Bonnet and Dick, 1997; Ishikawa et al., 2007）、その後、いくつかの研究により、LSCも表現型的に不均一であることが示された。たとえば、NPM1c変異標本からのCD38⁺AML細胞またはCD34⁻細胞は、NSG欠損マウスでアッセイした場合、疾患を連続的に再現することもできる（Taussig et al., 2008; Taussig et al., 2010; Sarry et al., 2011; Quek et al., 2016）。これは、LSCを十分に特徴づけるには、より機能的な研究が必要であることを強調しています（Eppert et al., 2011）。正常な造血幹細胞（HSC）を殺さずにR-LSCを根絶することは、AMLコンパートメントで過剰発現し機能的に関連するマーカーを特定することに依存します。近年、LSCとHSCを区別するための多くの研究努力がなされ、CD47、CD123、CD44、TIM-3、CD25、CD32、CD93などのいくつかの細胞表面マーカーの同定が可能になった（Majeti et al., 2009; Jin et al., 2009; Kikushige et al., 2010; Saito et al., 2010; Iwasaki et al., 2015）。これらの新しい膜マーカーに加えて、LSCはBCL2依存性酸化的リン酸化（OXPHOS）も特異的に増加し、ABT-199などのBCL2阻害剤による治療を通じて悪用される可能性のあるアキレスの踵（脆弱性）を明らかにすることが提案されている。（Lagadinou et al., 2013; Konopleva et al., 2016）。これは、ミトコンドリアのOXPHOSステータスが白血病の薬剤耐性に寄与することを示す最近の研究を含むいくつかの研究と一致している（Farge et al., 2017; Bosc et al., 2017; Kunst et al., 2017）。まとめると、これらすべての結果は、これらの細胞を根絶することを目的とした標的治療アプローチへの扉を開いたままにするR-LSCの特定の特徴を示唆している。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

発明の要約：

本発明は、白血病幹細胞を根絶することによって急性骨髄性白血病（AML）を治療するための方法および医薬組成物に関する。特に、本発明は、特許請求の範囲によって定義される。

【 0 0 0 5 】

発明の詳細な説明：

集中的な化学療法後、薬剤耐性および/または幹細胞の特徴を備えたAML細胞の出現と持続は、急性骨髄性白血病（AML）患者の頻繁な再発と転帰不良を説明する可能性がある。本明細書において、本発明者らは、アドレノメデュリン受容体CALCR Lが、正常細胞と比較してAML患者において、そして優先的に未成熟CD34⁺CD38⁻コンパートメントにおいて過剰発現されることを最初に明らかにした。次に、彼らは、*in vivo*での白血病幹細胞機能の維持におけるその役割を実証した。さらに、CALCR Lの枯渇は、異種移植モデルの白血病の増殖に強く影響し、*in vivo*で化学療法剤のシタラピンに感作された。したがって、本発明者らは、ADM-CALCR L軸が、E2F1およびBCL2依存の両方の方法で、細胞周期、DNAの完全性、および化学療法抵抗性のAML幹細胞の高いOXPHOS状態を駆動することを示した。さらに、CALCR Lの枯渇は細胞をシタラピンに感作させ、その発現はマウスの*in vivo*での化学療法への反応を予測した。さらに、限界希釈アッセイ、診断時および再発時、ならびにNSGマウスへの移植前後の初代AMLサンプルの単一細胞RNA-seq分析の組み合わせを使用して、本発明者らは、CALCR L駆動の遺伝子シグネチャーを保持している化学療法抵抗性白血病幹細胞亜集団の存在を明らかにした。最後に、本発明者らは、化学療法抵抗性LSCがCALCR Lに依存することを強く実証した。これらのデータはすべて、幹細胞の生存、増殖、代謝におけるCALCR Lの重要な役割を強調し、この受容体を化学療法抵抗性白血病幹細胞集団の新しいバイオマーカーであり、それらを特異的に根絶し、AMLの再発を克服する有望な治療標的として特定している。

10

20

【 0 0 0 6 】

したがって、本発明の第1の目的は、AMLCLに特異的に結合する治療有効量の抗体を対象に投与し、それにより前記白血病幹細胞を枯渇させることを含む、AMLに罹患している対象の白血病幹細胞を枯渇させる方法に関する。

30

【 0 0 0 7 】

本発明のさらなる目的は、治療有効量のCALCR L活性または発現の阻害剤を対象に投与し、それにより前記白血病幹細胞を枯渇させることを含む、AMLに罹患している対象の白血病幹細胞を枯渇させる方法に関する。

【 0 0 0 8 】

本明細書で使用される場合、「急性骨髄性白血病」または「急性骨髄性白血病」（「AML」）という用語は、骨髄に蓄積する異常な白血球の急速な増殖及び正常な血球の生成の妨害を特徴とする血球の骨髄性系統の癌を指す。

【 0 0 0 9 】

本明細書で使用される場合、「白血病幹細胞」という用語は、当技術分野でその一般的な意味を有し、無秩序な細胞分裂をもたらす遺伝的形質転換を特徴とする多能性骨髄幹細胞を指す。白血病幹細胞（LSC）は、自己複製能力、つまり母親と同様の娘細胞を生成する能力によって、他のすべてのAML細胞と区別される。広範な自己複製能力はLSCの固有の特性であり、白血病の発症に不可欠であることが示されている。

40

【 0 0 1 0 】

したがって、本発明の方法は、AMLの治療に特に適している。

【 0 0 1 1 】

本明細書で使用される場合、「治療」または「治療する」という用語は、予防的または予防的治療、ならびに疾患にかかるリスクのある患者または疾患にかかった疑いのある患者ならびに病気、または病気または病状に苦しんでいると診断された人の治療を含む、治療

50

的または疾患修飾的治療の両方を指し、臨床的再発の抑制が含まれる。

治療は、障害または再発性障害の1つまたは複数の症状を予防、治療、発症を遅らせる、重症度を軽減するまたは改善するために、またはそのような治療がない場合に予想されるよりも患者の生存を延長するために医学的障害を有する患者または最終的に障害を獲得する可能性がある患者に投与することができる。「治療レジメン」とは、病気の治療のパターン、例えば、治療中に使用される投薬のパターンを意味する。治療レジメンは、導入レジメンおよび維持レジメンを含み得る。「誘導レジメン」または「誘導期間」という句は、疾患の初期治療に使用される治療レジメン（または治療レジメンの一部）を指す。導入レジメンの一般的な目標は、治療レジメンの初期期間中に患者に高レベルの薬剤を提供することである。導入レジメンは、（部分的または全体的に）「ローディングレジメン」を
10
採用することができ、これは、メンテナンスレジメン中に医師が使用するよりも大量の薬物を投与すること、医師が薬物を投与するよりも頻繁に薬物を投与すること、またはその両方を含み得る。「維持レジメン」または「維持期間」という句は、疾患の治療中の患者の維持のために、例えば、患者を長期間（月または年）寛解状態に保つために使用される治療レジメン（または治療レジメンの一部）を指す。維持療法は、継続的治療（たとえば、定期的な間隔で、例えば、毎週、毎月、毎年などのように薬物を投与する）または断続的治療（たとえば、特定の所定の基準〔例えば、痛み、疾患の症状など〕）の中断された治療、断続的な治療、再発時の治療、または達成時の治療）を採用し得る。

【0012】

本発明の方法は、化学療法で治療されたAMLに罹患している患者の再発を予防するのに特に適している。
20

【0013】

本明細書で使用される場合、「再発」という用語は、癌が検出され得なかった改善期間後の癌の再発を指す。したがって、本発明の方法は、化学療法による治療が成功したと推定される後の再発を防ぐのに特に有用である。

【0014】

したがって、本発明のさらなる目的は、治療有効量のCALCLRに特異的に結合する抗体を患者に投与することを含む、それを必要とする患者における化学療法抵抗性急性骨髄性白血病（AML）を治療する方法に関する。

【0015】

したがって、本発明のさらなる目的は、治療有効量のCALCLR活性または発現の阻害剤を患者に投与することを含む、それを必要とする患者における化学療法抵抗性急性骨髄性白血病（AML）を治療する方法に関する。
30

【0016】

本明細書で使用される場合；「化学療法抵抗性急性骨髄性白血病」という用語は、急性骨髄性白血病に苦しむ患者の臨床状況を指し、患者に許容できる用量で、化学療法剤または通常AMLの治療に使用される化学療法剤の組み合わせによって癌細胞の増殖を予防または阻害することはできない。白血病は、化学療法の前に本質的に耐性がある可能性がある。または、最初は化学療法に敏感な白血病の治療中に耐性が獲得される可能性がある。

【0017】

本明細書で使用される場合、「化学療法剤」という用語は、癌の治療において治療的有用性を有する任意の化学剤を指す。本明細書で使用される化学療法剤は、化学的薬剤および生物学的薬剤の両方を包含する。これらの薬剤は、癌細胞が生存を継続するために依存する細胞活性を阻害するように機能する。化学療法剤のカテゴリーには、アルキル化剤/アルカロイド剤、代謝拮抗剤、ホルモンまたはホルモン類似体、およびその他の抗腫瘍薬が含まれる。これらの薬のすべてではないにしてもほとんどが癌細胞に直接毒性があり、免疫刺激を必要としない。適切な化学療法剤は、たとえば、Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Harrison's Principles of Internal medicine, 14th edition; Perry et al., Chemotherapeutic, Ch 17 in Abeloff, Clinical Oncology 2nd ed., 2000 ChurchillLivingstone, Inc.; Baltzer L.
40

10

20

30

40

50

and Berkery R. (eds): Oncology Pocket Guide to Chemotherapeutic, 2nd ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer D. S., Knobf M. F., Duriva ge HJ. (eds): The Cancer Chemotherapeutic Handbook, 4th ed. St. Louis, Mosby-Year Handbookに記載されている。

【0018】

いくつかの実施形態において、化学療法剤は、シタラピン(シタラピン、Ara-C、Cytosar-U)、キザルチニブ(AC220)、ソラフェニブ(BAY 43-906)、レスタウルチニブ(CEP-701)、ミドスタウリン(PKC412)、カルボプラチン、カルムスチン、クロランブシル、ダカルバジン、イフォスファミド、ロムスチン、メクロレタミン、プロカルバジン、ベントスタチン、(2'-デオキシコホルマイシン)、エトポシド、テニポシド、トポテカン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、パクリタキセル、デキサメタゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニソン、オールトランスレチノイン酸、三酸化ヒ素、インターフェロン、リツキシマブ(リツキサン(登録商標))、ゲムツズマブオゾガマイシン、メシル酸イマチニブ、シトサール-U)、メルファラン、ブスルファン(ミレラン(登録商標))、チオテパ、プレオマイシン、プラチナ(シスプラチン)、シクロホスファミド、サイトキサン(登録商標)、ダウノルピシン、ドキシルピシン、イダルピシン、ミトキサントロン、5-アザシチジン、クラドリピン、フルダラビン、ヒドロキシ尿素、6-メルカプトプリン、メトトレキサート、6-チオグアニン、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態において、白血病は、ダウノルピシン、またはイダルピシンとシタラピン(AraC)の組み合わせに対して耐性がある。

10

20

【0019】

いくつかの実施形態において、化学療法剤は、BCL2阻害剤である。いくつかの実施形態において、Bcl-2阻害剤は、4-(4-{[2-(4-クロロフェニル)-4,4-ジメチルシクロヘキサ-1-エン-1-イル]メチル}ピペラジン-1-イル)-N-(3-ニトロ-4-[(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルメチル)アミノ]フェニル}スルホニル)-2-(1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-5-イルオキシ)ベンズアミド(ベネトクラクス、またはABT-199、またはGDC-0199としても知られ、場合により本明細書で言及される。)またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、化学療法剤は、FLT3阻害剤である。FLT3阻害剤の例としては、N-(2-ジエチルアミノエチル)-5-[(Z)-(5-フルオロ-2-オキソ-1H-インドール-3-イリデン)メチル]-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボキサミド、スニチニブ、SU11248としても知られており、SUTENT(スニチニブマレート)として販売されている; 4-[4-[4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル]カルバモイルアミノ]フェノキシ]-N-メチル-ピリジン-2-カルボキサミド、ソラフェニブ(BAY 43-9006としても知られており、NEXAVAR(ソラフェニブ)として販売されている); (9S, 10R, 11R, 13R)-2,3,10,11,12,13-ヘキサヒドロ-10-メトキシ-9-メチル-11-(メチルアミノ)-9,13-エポキシ-1H,9H-ジインドロ[1,2,3-gh:3',2',1'-1m]ピロロ[3,4-j][1,7]ベンゾジアンゾニン-1-オン、ミドスタウリンまたはPKC412としても知られている; (5S, 6S, 8R)-6-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-5-メチル-7,8,14,15-テトラヒドロ-5H-16-オキサ-4b,8a,14-トリアザ-5,8-メタノジベンゾ[b,h]シクロオクタ[jkl]シクロペンタ[e]-アス-インダセン-13(6H)-オン、レスタウルチニブまたはCEP-701としても知られる; 1-(5-(tert-ブチル)イソオキサゾール-3-イル)-3-(4-(7-(2-モルホリノエトキシ)ベンゾ[d]イミダゾ[2,1-b]チアゾール-2-イル)フェニル)ウレア、キザルチニブまたはAC220としても知られている; 1-(2-{5-[(3-メチルオキセタン-3-イル)メトキシ]}-1H-ベンズイミダゾール-1-イル}キノリン-

30

40

50

8 - イル) ピペリジン - 4 - アミン、クレノラニブまたは CP - 868, 596 - 26 としても知られている; を含む。たとえば、Wander S.A., TherAdv Hematol. 5: 65-77 (2014) を参照。他の FLT3 阻害剤としては、ベキシダルチニブ (PLX - 3397)、Tap et al, N Engl J Med, 373:428-437 (2015); ギルテリチニブ (ASP 2215)、Smith et al., Blood: 126 (23) (2015); AMG - 925 としても知られる FLX - 925、Li et al. Mol. Cancer Ther. 14: 375-83 (2015); and G-749, Lee et al, Blood. 123: 2209-2219 (2014).

【0021】

いくつかの実施形態では、化学療法剤は、IDH (イソクエン酸デヒドロゲナーゼ) 阻害剤である。いくつかの実施形態では、IDH 阻害剤は、オキサゾリジノン (3 - ピリミジニル - 4 - イル - オキサゾリジン - 2 - オン) ファミリーのメンバーであり、IDH1 変異体の新形態活性の特異的阻害剤であり、化学名 (S) - 4 - イソプロピル - 3 - (2 - ((S) - 1 - (4 フェノキシフェニル) エチル) アミノ) ピリミジン - 4 - イル) オキサゾリジン - 2 - オンである。

10

【0022】

本明細書で使用される場合、「CALCRL」という用語は、当技術分野でその一般的な意味を有し、受容体のようなカルシトニン受容体 (遺伝子 ID: 10203) を指す。CALCRL は、CRLR または CGRP と呼ばれる。CALCRL は、機能的活動に不可欠な 3 つの単一膜貫通ドメイン受容体活性修飾タンパク質 (RAMP) の 1 つにリンクされている。CALCRL と異なる RAMP タンパク質との関連により、異なる受容体が生成される。i) RAMP1 との関連付け: CGRP 受容体の生成、ii) RAMP2 との関連付け: AM1 と呼ばれるアドレノメデュリン (AM) 受容体の生成、iii) RAMP3 との関連付け: AM2 と呼ばれる受容体デュアル CGRP / AM の生成。これらの受容体は、アデニル酸シクラーゼを活性化する G タンパク質 G にリンクされており、活性化により細胞内サイクリックアデノシンーリン酸 (cAMP) が生成される。CALCRL の例示的なアミノ酸配列は、配列番号 1 によって表される。

20

【0023】

【表 1】

```
SEQ ID NO: 1 >sp|Q16602|CALRL_HUMAN Calcitonin gene-related
peptide type 1 receptor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALCRL PE
=1 SV=2
MEKKCTLNFLVLLPFFMILVTAEELEESPEDSIQLGVTRNKIMTAQYECYQKIMQDPIQQA
EGVYCNRTWDGWLCWNDVAAGTESMQLCPDYFQDFDPSEKVTIKICDQDGNWFRHPASNRT
WTNYTQCNVNTHEKVKTALNLFYLTIIHGHLISIASLLISLGIFFYFKSLSCQRITLHKNL
FFSFVCNSVVTIIHLTAVANNQALVATNPVSVCKVSQFIHLYLMGCNYFWMLCEGIYHLTL
IVVAVFAEKQHLMWYYFLGWGFPLIPACIHAIARSLYNDNCWISSDTHLLYIIHGPICA
ALLVNLFFLLNIVRVLITKLKVTHQAESNLYMKAVRATLILVPLLGIEFVLIPWRPEGKI
AEEVYDYIMHILMHFQGLLVSTIFCFNGEVQAILRRNWNQYKIQFGNSFSNSEALRSAS
YTVSTISDGPYSHDCPSEHLNGKSIHDIENVLLKPENLYN
```

30

40

【0024】

本明細書で使用される場合、白血病幹細胞に関して「枯渇する」という用語は、対象における白血病幹細胞の数の測定可能な減少を指す。減少は、少なくとも約 10%、例えば、少なくとも約 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上であり得る。いくつかの実施形態では、この用語は、対象またはサンプル中の白血病幹細胞の数が検出可能な限界を下回る量まで減少することを指す。

【0025】

本発明によれば、抗体は、白血病幹細胞サブセット集団の枯渇を特異的に媒介し、造血細

50

胞の集団の枯渴を媒介しない。

【0026】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、当該技術分野における一般的な意味を有し、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、マルチスペシフィック抗体（たとえば、少なくとも2つの無傷の抗体から形成される二重特異性抗体）、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、一本鎖Fvs（scFv）、一本鎖抗体、シングルドメイン抗体、ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、所望の生物学的活性を示す抗体断片、ジスルフィド結合Fvs（sdFv）、および抗イデオタイプ（抗Id）抗体（例えば、以下を含む。本発明の抗体に対する抗Id抗体）、イントラボディ、および上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントが挙げられる。特に、抗体には、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片、すなわち、抗原結合部位を含む分子が含まれる。免疫グロブリン分子は、任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスであることができる。

10

【0027】

本発明によれば、抗体はCALCRLの少なくとも1つの細胞外ドメインに結合する。

【0028】

本明細書では、「結合する」という用語は、抗体が表面分子に対して親和性を有することを示す。また、本明細書では、「親和性」という用語は、エピトープに対する抗体の結合の強さを意味する。抗体の親和性は、解離定数K_dによって与えられ、 $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$ と定義される。ここで、 $[Ab-Ag]$ は、抗体-抗原複合体のモル濃度であり、 $[Ab]$ は、結合していない抗体のモル濃度であり、 $[Ag]$ は、結合していない抗原のモル濃度である。また、親和性定数K_aは $1/K_d$ で定義される。mAbsの親和性を決定するための好ましい方法は、Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), and Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983)があり、これらの文献は参照により完全に本明細書に組み込まれる。mAbsの親和性を決定するための当技術分野でよく知られている好ましい標準的な方法の1つは、Biacore機器の使用である。

20

30

【0029】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、モノクローナル抗体である。本明細書で使用する「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、微量に存在する可能性のある自然発生的な変異を除いて同一であることを意味する。モノクローナル抗体は、単一の抗原部位に特異的に作用する。さらに、従来のポリクローナル抗体は、異なる決定基（エピトープ）に対する抗体を含んでいるが、モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対する抗体である。モノクローナル抗体は、その特異性に加えて、他の免疫グロブリン産生細胞に汚染されていないハイブリドーマ細胞によって合成されるという利点がある。たとえば、モノクローナル抗体をコードする重鎖および軽鎖の遺伝子を安定的または一過性にトランスフェクトした細胞によって、モノクローナル抗体を生産することができる。

40

【0030】

モノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein (*Nature*, 256:495, 1975)の方法を用いて生成することができる。本発明に有用なモノクローナル抗体を調製するために、マウスまたは他の適切な宿主動物を、適切な抗原形態（すなわち、本発明のポリペプチド）で適切な間隔（例えば、週2回、週1回、月2回または月1回）で免疫する。動物は、犠牲にしてから1週間以内に、抗原の最終的な「ブースト」を投与してもよい。免疫化の際には、免疫学的アジュバントを使用することが望ましい場合が多い。適切な免疫学的アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、ミ

50

ヨウバン、Rib i アジュバント、Hunter ' s Titermax、QS21やQ u i l Aなどのサポニンアジュバント、またはC p G含有免疫刺激性オリゴヌクレオチドなどが挙げられる。他の適切なアジュバントは当該分野でよく知られている。動物は、皮下、腹腔内、筋肉内、静脈内、鼻腔内などの経路で免疫されてもよい。ある動物は、複数のルートで複数の形態の抗原で免疫されてもよい。簡単に言えば、本発明の組換えポリペプチドは、組換え細胞株を用いた発現によって提供されてもよい。ポリペプチドの組換え形態は、以前に記載された任意の方法を用いて提供されてもよい。免疫化レジメンに続いて、リンパ球を動物の脾臓、リンパ節または他の器官から分離し、ポリエチレングリコールなどの薬剤を用いて適切な骨髓腫細胞株と融合させてヒブリドーマを形成する。融合後、標準的な方法でハイブリドーマの増殖を許容する培地に細胞を置くが、融合相手の増殖は許容しない。ハイブリドーマを培養した後、細胞の上清を分析して、所望の特異性を持つ抗体、すなわち抗原に選択的に結合する抗体の存在を確認する。分析手法としては、E L I S A、フローサイトメトリー、免疫沈降、ウェスタンブロットティングなどが挙げられる。その他のスクリーニング技術は当該分野でよく知られている。好ましい技術は、非変性E L I S A、フローサイトメトリー、免疫沈降など、コンフォメーション的に無傷で、ネイティブに折り畳まれた抗原への抗体の結合を確認する技術である。

10

20

30

40

50

【0031】

いくつかの実施形態では、本発明のモノクローナル抗体は、キメラ抗体、特にキメラマウス/ヒト抗体である。本明細書では、「キメラ抗体」という用語は、非ヒト抗体のV HドメインおよびV Lドメインと、ヒト抗体のC HドメインおよびC Lドメインとからなる抗体を指す。いくつかの実施形態では、本発明のヒトキメラ抗体は、前述のようにV LドメインおよびV Hドメインをコードする核酸配列を入手し、それらをヒト抗体C Hおよびヒト抗体C Lをコードする遺伝子を有する動物細胞用の発現ベクターに挿入してヒトキメラ抗体発現ベクターを構築し、その発現ベクターを動物細胞に導入してコード配列を発現させることにより製造することができる。ヒトキメラ抗体のC Hドメインとしては、ヒト免疫グロブリンに属する領域であればどのようなものでもよいが、I g Gクラスのもの好適であり、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4などのI g Gクラスに属するサブクラスのいずれかを使用することもできる。また、ヒトキメラ抗体のC Lとしては、I gに属する領域であればどのようなものでもよく、カッパクラスやラムダクラスのものを用いることができる。キメラ抗体を製造する方法としては、従来組換えD N Aや遺伝子導入技術を用いる方法が当業界ではよく知られている(Morrison S L. et al. (1984)、および特許文献U S 5, 202, 238; およびU S 5, 204, 244参照)。

【0032】

いくつかの実施形態では、本発明のモノクローナル抗体は、ヒト化抗体である。特に、前記ヒト化抗体において、可変ドメインは、ヒトアクセプタフレームワーク領域、および任意に存在する場合はヒトコンスタントドメイン、およびマウスC D Rなどの非ヒトドナーC D Rからなる。本発明によれば、「ヒト化抗体」という用語は、ヒト抗体の可変領域フレームワークおよび定数領域を有するが、以前の非ヒト抗体のC D Rを保持している抗体を指す。本発明のヒト化抗体は、前述のように、C D Rドメインをコードする核酸配列を入手し、(i) ヒト抗体と同一の重鎖定数領域をコードする遺伝子、および(i i) ヒト抗体と同一の軽鎖定数領域をコードする遺伝子を有する動物細胞用の発現ベクターに挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞に導入して遺伝子が発現させることにより製造することができる。ヒト化抗体発現ベクターは、抗体重鎖をコードする遺伝子と抗体軽鎖をコードする遺伝子が別々のベクター上に存在するタイプ、または両遺伝子が同じベクター上に存在するタイプ(タンデム型)のいずれであってもよい。ヒト化抗体発現ベクターの構築のしやすさ、動物細胞への導入のしやすさ、動物細胞における抗体H鎖とL鎖の発現量のバランスなどの観点から、タンデム型のヒト化抗体発現ベクターが好ましい。タンデム型のヒト化抗体発現ベクターの例としては、p K A N T E X 93 (W O 97/10354)、p E E 18などが挙げられる。従来組換えD N Aや遺伝子導入技術に基づいてヒト化抗体を作製する方法は、当業界ではよく知られている(

例えば、Riechmann L. et al. 1988; Neuberger MS. et al. 1985参照)。抗体は、例えば、CDRグラフト化（EP 239,400; PCT公開WO91/09967; 米国特許第5,225,539号; 第5,225,539号; 第5,530,101号; および第5,585,089号など、当技術分野で知られている様々な技術を用いてヒト化することができる。）、ペニアリングまたはリサーフェシング（EP 592,106; EP 519,596; Padlan EA (1991); Studnicka GM et al. (1994); Roguska MA. et al. (1994)）; およびチェーンシャフリング（米国特許第5,565,332号）を含む、当該技術分野で知られている様々な技術を使用する。また、このような抗体を調製するための一般的な組換えDNA技術も知られている（欧州特許出願EP 125023および国際特許出願WO 96/02576参照）。

10

【0033】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体はヒト抗体である。本明細書で使用される用語「ヒト抗体」は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定数領域を有する抗体を含むことを意図している。本発明のヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダム変異または部位特異的変異誘発によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入された変異）を含んでもよい。ただし、本明細書で用いる「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳類種の生殖細胞に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列にグラフトされた抗体を含むことを意図していない。ヒト抗体は、当技術分野で知られている様々な技術を用いて製造することができる。ヒト抗体については、van Dijk and van de Winkel, *cur. Opin. Pharmacol.* 5; 368-74 (2001) and Lonberg, *cur. Opin. Immunol.* 20; 450-459 (2008)において一般的に記載されている。ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答してインタクトなヒト抗体またはヒト可変領域を有するインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって調製することができる。このような動物は、典型的には、ヒト免疫グロブリン遺伝子座のすべてまたは一部を含むか、または、その動物の染色体に染色体外に存在するか、ランダムに統合されている。このようなトランスジェニックマウスでは、内因性の免疫グロブリン遺伝子座は一般的に不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を取得する方法については、Lonberg, *Nat. Biotech.* 23; 1117-1125 (2005)を参照。また、例えば、XENOMOUSE™技術を記載した米国特許第6,075,181号および第6,150,584号、HUMAB（登録商標）技術を記載した米国特許第5,770,429号、K-M MOUSE（登録商標）技術を記載した米国特許第7,041,870号、およびVELOCI MOUSE（登録商標）技術を記載した米国特許出願公開第US 2007/0061900号を参照のこと。そのような動物によって生成された無傷の抗体からのヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定数領域と組み合わせることによって、さらに修飾することができる。ヒト抗体は、ハイブリドーマに基づく方法によっても作ることができる。ヒトモノクローナル抗体を製造するためのヒト骨髄腫細胞株およびマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞株が記載されている。（例えば、Kozbor J. *Immunol.*, 13: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); and Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)を参照のこと）。また、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を用いて作製されたヒト抗体は、Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)に記載されている。追加の方法としては、例えば、米国特許第7,189,826号（ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の製造について記載）およびNi, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006)（ヒト-ヒトハイブリドーマについて記載）に記載されているものがある。また、ヒトハイブリドーマ技術（トリオーマ技術）は、Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) and Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)に記載されている。完全なヒト抗体はまた、ファージディスプレイラ

20

30

40

50

イブラリから誘導することができる (Hoogenboom et al., 1991, J. Mol. Biol. 227:381; and Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581に開示されている)。ファージディスプレイ技術は、糸状バクテリオファージの表面に抗体レパートリーを表示し、その後、選択された抗原に結合することでファージを選択することにより、免疫選択を模倣するものである。このような技術の1つは、PCT公開番号WO 99/10494に記載されている。本明細書に記載のヒト抗体は、免疫時にヒト抗体反応が生じるようにヒト免疫細胞が再構成されたSCIDマウスを用いて調製することもできる。このようなマウスは、例えば、Wilsonらに対する米国特許第5,476,996号および同第5,698,767号に記載されている。

【0034】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害を媒介する。本明細書で使用される「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ADCC」という用語は、非特異的な細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）が標的細胞上の結合した抗体を認識し、その後、標的細胞の溶解を引き起こす細胞媒介反応を指す。特定の作用機序に限定されることを望むものではないが、ADCCを媒介するこれらの細胞傷害性細胞は、一般的にFc受容体（FcR）を発現している。

【0035】

本明細書で使用される「Fc領域」には、第一定位領域免疫グロブリンドメインを除く抗体の定位領域を構成するポリペプチドが含まれる。したがって、Fcは、IgA、IgD、IgGの最後の2つの定型領域免疫グロブリンドメイン、IgE、IgMの最後の3つの定型領域免疫グロブリンドメイン、およびこれらのドメインのN-末端にある柔軟なヒンジを指す。IgAおよびIgMの場合、FcはJ鎖を含んでいてもよい。IgGの場合、Fcは免疫グロブリンドメインCgamma2とCgamma3（C2とC3）およびCgamma1（C1）とCgamma2（C2）の間のヒンジからなる。Fc領域の境界は様々であるが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、通常、残基C226またはP230からそのカルボキシル末端までを含むと定義され、ここでの番号付けは、Kabataら（1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.）に記載のEUインデックスに従ったものである。Kabataらに記載のEUインデックス」とは、上述のKabataらに記載のヒトIgG1 EU抗体の残基番号付けを指す。Fcは、この領域を単独で指す場合と、抗体、抗体フラグメント、またはFc融合タンパク質の文脈におけるこの領域を指す場合がある。Fcバリエーションタンパク質は、抗体、Fc融合体、またはFc領域を構成する任意のタンパク質もしくはタンパク質ドメインであってもよい。特に好ましいのは、Fc領域の非自然発生的な変異体であるバリエーションFc領域からなるタンパク質である。非天然由来のFc領域のアミノ酸配列（本明細書では「バリエーションFc領域」とも呼ばれる）は、野生型のアミノ酸配列と比較して、少なくとも1つのアミノ酸残基の置換、挿入および/または欠失からなる。挿入または置換の結果として、バリエーションFc領域の配列に現れる新しいアミノ酸残基は、非天然由来のアミノ酸残基と呼ばれることがある。注：多型は、Kabata270、272、312、315、356、および358を含むがこれらに限定されない多くのFc位置で観察されており、したがって、提示された配列と先行技術の配列との間にわずかな差異が存在する可能性がある。

【0036】

「Fc受容体」または「FcR」という用語は、抗体のFc領域に結合する受容体を表すために使用される。ADCCの主要細胞であるNK細胞はFcRIIを発現しており、単球はFcRI、FcRII、FcRIIIおよび/またはFcRIVを発現している。造血細胞におけるFcRの発現については、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991)にまとめられている。分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号に記載されているようなインビトロADCCアッセイを行う。第5,500,362号または第5,821,337号に記載されてい

10

20

30

40

50

るようなインビトロADC Cアッセイを行うことができる。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。代わりに、または追加的に、対象となる分子のADC C活性を*in vivo*で評価してもよく、例えば、Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 95:652-656 (1998)に開示されているような動物モデルで評価することができる。

本明細書では、「エフェクター細胞」という用語は、1つまたは複数のFcRを発現し、エフェクター機能を果たす白血球である。この細胞は、少なくともFcRI、FcRII、FcRIIIおよび/またはFcRIVを発現し、ADC Cエフェクター機能を遂行する。ADC Cを媒介するヒト白血球の例としては、末梢血単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞障害性T細胞、好中球などが挙げられる。

10

【0037】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は完全長抗体である。いくつかの実施形態では、完全長の抗体はIgG1抗体である。いくつかの実施形態では、完全長の抗体はIgG3抗体である。

【0038】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、FcRIA、FcRIIA、FcRIIB、FcRIIIA、FcRIIIB、およびFcRIVに対する親和性が増加している変形Fc領域を含んでいる。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、少なくとも1つのアミノ酸置換、挿入または欠失を含むバリエーションFc領域を含み、前記少なくとも1つのアミノ酸残基の置換、挿入または欠失が、FcRIA、FcRIIAに対する親和性の増加をもたらす。FcRIIB、FcRIIIA、FcRIIIB、およびFcRIVに対する親和性が増加する、いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、少なくとも1つのアミノ酸置換、挿入または欠失を含むバリエーションFc領域を含み、前記少なくとも1つのアミノ酸残基は、以下からなる群から選択される。残基239、330、および332であり、アミノ酸残基は、EUインデックスに続いて番号が付けられている。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、少なくとも1つのアミノ酸置換を含むバリエーションFc領域を含み、ここで前記少なくとも1つのアミノ酸置換は、S239D、A330L、A330Y、および1332Eからなる群から選択され、ここで、アミノ酸残基は、EUインデックスのしたがって番号付けされる。

20

【0039】

いくつかの実施形態では、抗体のグリコシル化が修正される。例えば、アグリコシル化された抗体を作製することができる(すなわち、抗体はグリコシル化を欠いている)。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を高めるために変更することができる。このような糖鎖修飾は、例えば、抗体配列内の1つまたは複数のグリコシル化部位を変更することによって達成することができる。例えば、1つまたは複数の可変領域フレームワークのグリコシル化部位を排除する結果となる1つまたは複数のアミノ酸置換を行い、その部位でのグリコシル化を排除することができる。このようなアグリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高めることができる。このようなアプローチは、Coraによる米国特許第5,714,350号および第6,350,861号にさらに詳細に記載されている。さらにまたは代わりに、グリコシル化のタイプが変更された抗体、例えば、フコシル残基の量が減少した、またはフコシル残基を持たない低フコシル化または非フコシル化抗体、または二分したGlcNAc構造が増加した抗体を製造することができる。このようなグリコシル化パターンの変更は、抗体のADC C能力を高めることが実証されている。このような糖鎖修飾は、例えば、グリコシル化機構が変化した宿主細胞で抗体を発現させることによって達成できる。グリコシル化機構が変化した細胞は、当技術分野で記載されており、本発明の組換え抗体を発現させて、グリコシル化が変化した抗体を産生するための宿主細胞として使用することができる。例えば、HangらのEP1,176,195には、フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子が機能的に破壊された細胞株が記載されており、このような細胞株で発現された抗体は、低フコシル化を示すか、またはフコシル残基を欠くようになっている。したがって、いくつかの実施形態では、

30

40

50

本発明のヒトモノクローナル抗体は、ハイポフコシル化または非フコシル化パターンを示す細胞株、例えば、フコシルトランスフェラーゼをコードする FUT8 遺伝子の発現が欠損している哺乳類細胞株での組換え発現によって製造することができる。Prestaによる PCT 公開 WO 03/035835 は、Asn(297) 結合炭水化物にフコースを付着させる能力が低下した変異型 CHO 細胞株 Lec13 細胞を記載しており、その宿主細胞で発現される抗体の低フコシル化ももたらしめている (Shields, R.L. et al, 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740 も参照)。Umana らによる PCT 公開 WO 99/54342 には、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ (例えば、(1,4) - N アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ III (GnTIII)) を発現するように操作された細胞株が記載されており、操作された細胞株で発現された抗体は、抗体の ADC 活性を増加させる二分する GlcNAc 構造の増加を示す (Umana et al, 1999 Nat. Biotech. 17: 176-180 も参照)。Eureka Therapeutics はさらに、フコシル残基を含まない哺乳類のグリコシル化パターンが変化した抗体を産生できる遺伝子操作された CHO 哺乳類細胞を記載している (<http://www.eur ekainc.com/a&boutus/companyoverview.html>)。あるいは、本発明のヒトモノクローナル抗体は、哺乳類様のグリコシル化パターンに設計され、グリコシル化パターンとしてフコースを欠く抗体を産生することができる酵母または糸状菌で産生することができる (例えば EP 1297172 B1 参照)。

10

【0040】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、補体依存性細胞傷害性を媒介する。「補体依存性細胞毒性」または「CDC」とは、補体の存在下で、分子が補体の活性化を開始し、標的を溶解する能力を意味する。補体活性化経路は、補体系の第一成分 (C1q) が、同種の抗原と複合した分子 (例えば、抗体) に結合することで開始される。補体活性化を評価するには、CDC アッセイ、例えば、Gazzano-Santaro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996) に記載されている CDC アッセイを行うことができる。

20

【0041】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、抗体依存性の食作用を媒介する。本明細書では、「抗体依存性貪食」または「オプソニン化」という用語は、FcR を発現する非特異的細胞傷害性細胞が標的細胞上の結合した抗体を認識し、続いて標的細胞の貪食を引き起こす細胞媒介反応を意味する。

30

【0042】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、上述のように、CALCR1 に向けられた第1の抗原結合部位と、エフェクター細胞に向けられた少なくとも1つの第2の抗原結合部位とを含む多特異性抗体である。前記実施形態では、第2の抗原結合部位は、例えば、ヒトエフェクター細胞上に抗原を結合させるなど、殺傷メカニズムをリクルートするために使用される。一部の実施形態では、エフェクター細胞は、ナチュラルキラー細胞などの ADC を誘導することができる。例えば、FcR を発現する単球、マクロファージは、標的細胞の特異的な殺傷や、免疫系の他の構成要素への抗原の提示に関与する。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞は、標的抗原または標的細胞を貪食することができる。エフェクター細胞上の特定の FcR の発現は、サイトカインなどの体液性因子によって制御されることがある。エフェクター細胞は、標的抗原を貪食したり、標的細胞を貪食したり、溶解したりすることができる。適切な細胞毒性剤および第2の治療剤は、以下に例示され、毒素 (放射性標識ペプチドなど)、化学療法剤およびプロドラッグを含む。いくつかの実施形態では、第2の結合部位は、上記で定義された Fc 受容体に結合する。いくつかの実施形態では、第2結合部位は、NK 細胞の表面分子に結合し、前記細胞を活性化することができる。

40

【0043】

本発明の多特異性抗体分子の例示的なフォーマットとしては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。(i) 化学的ヘテロコンジュゲーションによって架橋された2つの抗体であって、1つは白血病幹細胞の特異的な表面分子に特異性を有し

50

、もう1つは第2の抗原に特異性を有する抗体；(ii) 2つの異なる抗原結合領域からなる単一の抗体；(iii) 2つの異なる抗原結合領域を含む単鎖抗体、例えば2つの異なる抗原結合領域からなる単鎖抗体、例えば、余分なペプチドリンカーによってタンデムに連結された2つのscFvs、(iv) 各軽鎖および重鎖が短いペプチド結合を介してタンデムに連結された2つの可変ドメインを含むデュアルバリアブルドメイン抗体(DVD-Ig)(Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)) (v) 化学的に結合した二重特異性(Fab') 2フラグメント、(vi) 2つの一本鎖ジアポディを融合して、それぞれの標的抗原に対して2つの結合部位を持つ4価の二重特異性抗体としたTandab、(vii) scFvsとジアポディを組み合わせて多価の分子としたflexibodyなどが挙げられる。viii) プロテインキナーゼAの「二量化・ドッキングドメイン」を利用した、いわゆる「ドック&ロック」分子で、これをFabsに適用すると、2つの同一のFabフラグメントが異なるFabフラグメントに結合した3価の二重特異性結合タンパク質が得られる。(ix) 例えば、ヒトのFabアームの両末端に融合した2つのscFvsを含む、いわゆるスコープオン分子、および(x) ダイアポディである。二重特異性抗体の別の例としては、ヘテロ二量化を強制するために相補的なCH3ドメインを持つIgG様分子が挙げられる。このような分子は、例えば、Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech)、Knob-into-Hole (Genentech)、CrossMAb (Roche) およびelectrostatic-match 20
ed (Amgen)、LUZ-Y (Genentech)、Strand Exchange Engineered Domain body (SEEDbody) (EMD Serono)、Biclonic (Merus) およびDuoBody (Genmab A/S) として知られている技術のような、既知の技術を用いて調製することができる。

【0044】

いくつかの実施形態では、ビスペシフィック抗体は、典型的にはDuoBody技術を用いて、制御されたFab-arm交換を介して得られる、または得られ得る。制御されたFab-arm交換によってビスペシフィック抗体を製造するインビトロの方法は、WO 2008 119353 およびWO 2011 131746 (いずれもGenmab A/Sによる) に記載されている。WO 2008 119353 に記載されている1つの例示的な方法では、還元条件下でのインキュベーション時に、両方ともIgG4様CH3領域からなる2つのモノスペシフィック抗体間の「Fab-arm」または「半分子」交換(重鎖と付着した軽鎖の交換)によって、ビスペシフィック抗体が形成される。その結果、異なる配列を含みうる2つのFabアームを有する二重特異性抗体が得られる。WO 2011 131746 に記載されている別の例示的な方法では、本発明のビスペシフィック抗体は、以下のステップを含む方法によって調製され、第1および第2の抗体の少なくとも1つは、本発明のヒトモノクローナル抗体：a) 免疫グロブリンのFc領域を含む第1の抗体を提供し、前記Fc領域は第1のCH3領域を含む；b) 免疫グロブリンのFc領域を含む第2の抗体を提供し、前記Fc領域は第2のCH3領域を含む；ここで、前記第1および第2のCH3領域の配列は異なり、前記第1および第2のCH3領域のヘテロ二量体相互作用が前記第1および第2のCH3領域のホモ二量体相互作用のそれぞれよりも強くなるようになっていることを特徴とする；c) 前記第1抗体を前記第2抗体とともに還元条件下でインキュベートする工程；およびd) 前記第1抗体が本発明のヒトモノクローナル抗体であり、前記第2抗体が異なる結合特異性を有するか、またはその逆である、前記ビスペシフィック抗体を得る工程である。還元条件は、例えば、2-メルカプトエチルアミン、ジチオスレイトールおよびトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンから選択される還元剤を添加することによって提供されてもよい。ステップd) は、例えば脱塩などにより還元剤を除去することで、非還元性または還元性の低い状態に戻すことをさらに含むことができる。好ましくは、第1および第2のCH3領域の配列は、前記第1および第2のCH3領域の間のヘテロ二量体相互作用が、前記第1および第2のCH3領域のホモ二量 30
40
50

体相互作用のそれぞれよりも強くなるような、少数の、かなり保存的な非対称の変異のみからなる、異なったものである。これらの相互作用とその実現方法についての詳細は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる WO 2011131746 に記載されている。以下は、そのようなアシメトリー変異の組み合わせの例示的な実施形態であり、任意に、一方または両方の Fc 領域が IgG1 アイソタイプである。いくつかの実施形態では、第1の Fc 領域は、以下からなる群から選択される位置にアミノ酸置換を有する。366、368、370、399、405、407 および 409 からなる群から選択される位置に、第2の Fc 領域がアミノ酸置換を有している。366、368、370、399、405、407、および 409 からなる群から選択される位置にアミノ酸の置換を有し、第1および第2の Fc 領域が同じ位置で置換されていないことを特徴とする。いくつかの実施形態では、前記第1の Fc 領域は、405 位にアミノ酸置換を有し、前記第2の Fc 領域は、以下からなる群から選択される位置にアミノ酸置換を有している。366、368、370、399、407 および 409、任意に 409。いくつかの実施形態では、前記第1の Fc 領域は、409 位にアミノ酸置換を有し、前記第2の Fc 領域は、以下からなる群から選択される位置にアミノ酸置換を有する。366、368、370、399、405、および 407、任意に 405 または 368 である。いくつかの実施形態では、第1および第2の Fc 領域の両方が IgG1 アイソタイプであり、第1の Fc 領域は 405 位に Leu を有し、第2の Fc 領域は 409 位に Arg を有している。

10

【0045】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、治療用部分、すなわち薬物と結合している。治療部位は、例えば、細胞毒素、化学療法剤、サイトカイン、免疫抑制剤、免疫刺激剤、溶解ペプチド、または放射性同位元素であり得る。このような結合体は、本明細書では「抗体-薬物結合体」または「ADC」と呼ばれる。

20

【0046】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、細胞毒性部位にコンジュゲートされている。細胞毒性部位は、例えば、タキソール；シトカラシン B；グラミシジン D；臭化エチジウム；エメチン；マイトマイシン；エトポシド；テノポシド；ピンクリスチン；ピンブラスチン；コルチシン；ドキシソルピシン；ダウノルピシン；ジヒドロキシアントラシンジオン；メイタンシンまたはその類縁体・誘導体などのチューブリン阻害剤；モノメチルアウリスタチン E または F またはその類縁体・誘導体などの抗ミトコンドリア剤；ドラスタチン 10 または 15 またはその類縁体；イリノテカンまたはその類縁体；ミトキサントロン；ミトラマイシン；アクチノマイシン D；1-デヒドロテストステロン；グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、プロマイシン、カリチマイシンまたはその誘導体、メトトレキサート、6メルカプトプリン、6チオグアニン、シタラピン、フルダラピン、5フルオロウラシル、デカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタピン、クラドリピンなどの代謝拮抗薬。メクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン (BSNU)、ロムスチン (CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン (DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシン C などのアルキル化剤；シスプラチン、カルボプラチンなどの白金誘導体；デュオカルマイシン A、デュオカルマイシン SA、ラシエルマイシン (CC-1065)、またはそれらのアナログもしくは誘導体；ダクチノマイシン、プレオマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、イダルピシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン (AMC) などの抗生物質；ピロロ [2, 1-c] [1, 4]-ベンゾジアゼピン (PDB)；ジフテリア毒素およびその活性フラグメントやハイブリッド分子などの関連分子、リシン A や脱グリコシル化されたリシン A 鎖毒素などのリシン毒素、コレラ毒素、SLT I、SLT II、SLT IIV などの志賀様毒素、LT 毒素、C3 毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、大豆ボーマン・ビルクプロテアーゼ阻害剤など、シュードモナス内毒素、alorin、サポリン、modeccin、ゲラニン、アブリン A 鎖、モデシン A 鎖、-サクリン、Aleurites fordii タンパク質、

30

40

50

dianthintanパク質、PAPI、PAPII、PAP-SなどのPhytolaccamericanaタンパク質、PAPII、PAP-S、momordicacharantiaインヒビター、curcin、croton、saponaria officinalisインヒビター、ゲロニン、ミトゲリン、restrictocin、フェノマイシンおよびエノマイシン毒素；リボヌクレアーゼ(RNase)、DNase I、ブドウ球菌エンテロトキシンA、ポークウィード抗ウイルスタンパク質、ジフテリア毒素、シュドモナス・エンドトキシンからなる群から選択することができる。

【0047】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、オーリスタチンまたはそのペプチドアナログ、誘導体またはプロドラッグと結合している。オーリスタチンは、微小管のダイナミクス、GTPの加水分解、および核と細胞の分裂を妨害することが示されている(Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584)、抗がん剤(US5663149)や抗真菌活性を有する(Pettit et al, (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42: 2961-2965)。例えば、オーリスタチンEをパラアセチル安息香酸またはベンゾイル吉草酸と反応させて、それぞれAEB、AEVBを製造することができる。その他の代表的なオーリスタチン誘導体としては、AFP、MMAF(モノメチルオーリスタチンF)、MMAE(モノメチルオーリスタチンE)などがある。適当なオーリスタチン、オーリスタチンのアナログ、誘導体、プロドラッグ、およびオーリスタチンをAbsにコンジュゲートするための適当なリンカーは、例えば、以下に記載されている。米国特許第5,635,483号、第5,780,588号、第6,214,345号、および国際特許出願公開WO02088172号、WO2004010957号、WO2005081711号、WO2005084390号、WO2006132670号、WO03026577号、WO200700860号、WO207011968号、およびWO205082023号に記載されている。

【0048】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、ピロロ[2,1-c][1,4]-ベンゾジアゼピン(PDB)またはそのアナログ、誘導体もしくはプロドラッグと結合している。適切なPDBおよびPDB誘導体、ならびに関連技術は、例えば、Hartley J. A.ら、Cancer Res 2010; 70(17): 6849-6858; Antonow D.ら、Cancer J 2008; 14(3): 154-169; Howard P.W.ら、Bioorg Med Chem Lett 2009; 19: 6463-6466およびSagnouら、Bioorg Med Chem Lett 2000; 10(18): 2083-2086に記載されている。

【0049】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、アントラサイクリン、メイタンシン、カリケアマイシン、デュオカルマイシン、ラシエルマイシン(CC-1065)、ドラスタチン10、ドラスタチン15、イリノテカン、モノメチルアウリスタチンE、モノメチルアウリスタチンF、PDB、またはそれらのいずれかのアナログ、誘導体、もしくはプロドラッグからなる群から選択される細胞毒性部位と結合している。

【0050】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、アントラサイクリンまたはそのアナログ、誘導体もしくはプロドラッグにコンジュゲートされている。いくつかの実施形態では、抗体は、メイタンシンまたはそのアナログ、誘導体、もしくはプロドラッグにコンジュゲートされている。一部の実施形態では、抗体は、カリチャマイシン、またはそのアナログ、誘導体、もしくはプロドラッグと結合している。一部の実施形態では、抗体は、デュオカルマイシンまたはそのアナログ、誘導体、もしくはプロドラッグに結合している。いくつかの実施形態では、抗体は、ラケルマイシン(CC-1065)またはそのアナログ、誘導体もしくはプロドラッグに結合される。いくつかの実施形態では、抗体は、ドラスタチン10またはそのアナログ、誘導体もしくはプロドラッグと結合している。一部の実施形態では、抗体は、ドラスタチン15またはそのアナログ、誘導体、もしくはプロドラッグと結合している。いくつかの実施形態では、抗体は、モノメチルアウリスタチンEまたはそ

のアナログ、誘導体、もしくはプロドラッグに結合されている。いくつかの実施形態では、抗体は、モノメチルアウリスタチンFまたはそのアナログ、誘導体もしくはプロドラッグに結合される。一部の実施形態では、抗体は、ピロロ[2,1-c][1,4]-ベンゾジアゼピンまたはそのアナログ、誘導体もしくはプロドラッグに結合している。いくつかの実施形態では、抗体は、イリノテカンまたはそのアナログ、誘導体、もしくはプロドラッグに結合している。

【0051】

分子を抗体に結合させる技術は、当技術分野ではよく知られている（例えば、Arnonら、"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld et al. eds., Alan Riss, Inc., 1985); Hellstromら、"Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (Robinson et al., Marcel Dekker, Inc., 2nd.) を参照のこと）、Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」、*Controlled Drug Delivery* (Robinsonら編、Marcel Dekker, Inc.第2版、1987年)、Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera et al. eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985); and Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62 :119-58を参照のこと。また、例えば、PCT公開WO 89/12624を参照のこと）。典型的には、核酸分子は、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルまたはマレイミド官能性を介して、それぞれ抗体上のリジンまたはシステインに共有結合している。人工的なシステインを用いたり、非天然アミノ酸を組み込んだりしてコンジュゲートの均質性を高める方法が報告されている（Axup, J.Y., Bajjuri, K.M., Ritland, M., Hutchins, B.M., Kim, C.H., Kazane, S.A., Halder, R., Forsyth, J.S., Santidrian, A.F., Stafin, K., et al. (2012). Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 16101-16106.; Junutula, J.R., Flagella, K.M., Graham, R.A., Parsons, K.L., Ha, E., Raab, H., Bhakta, S., Nguyen, T., Dugger, D.L., Li, G., et al. (2010)、ヒト上皮成長因子受容体2陽性の乳がんを標的とした治療指数を向上させた人工的なチオ-トラスツズマブ-DM1コンジュゲート。*Clin. Cancer Res.* 16, 4769-4778.）。Junutulaら（2008）は、システインをベースとした部位特異的なコンジュゲーションである「THIOMABS」（TDC）を開発し、従来のコンジュゲーション法と比較して改善された治療指数を示すと主張している。抗体に取り込まれた非天然アミノ酸へのコンジュゲーションもADCで検討されているが、このアプローチの一般性はまだ確立されていない（Axup et al., 2012）。特に、当業者は、アシルドナーグルタミン含有タグ（例えば、Gln含有ペプチドタグまたはQ-タグ）または内因性グルタミンでエンジニアリングされたFc含有ポリペプチドが、ポリペプチドエンジニアリングによって（例えば、ポリペプチド上のアミノ酸の欠失、挿入、置換、または突然変異を介して）反応性にされることも想定できる。次に、トランスグルタミナーゼは、アミンドナー剤（例えば、反応性アミンからなるか、または反応性アミンに結合した小分子）と共有結合して、アミンドナー剤がアシルドナーグルタミン含有タグまたはアクセス可能な/露出した/反応性のある内因性グルタミンを介してFc含有ポリペプチドに部位特異的に結合した、工学的Fc含有ポリペプチド結合体の安定した均質な集団を形成することができる（WO 2012059882）。

【0052】

いくつかの実施形態では、阻害剤は、CALCR LのRAMP1および/またはRAMP2および/またはRAMP3への結合を阻害する化合物（例えば、抗体）である。いくつかの実施形態では、阻害剤（例えば、抗体）は、アドレノメデュリンなどのリガンドの1

つに対するCALCRLの結合を阻害する。

【0053】

いくつかの実施形態では、阻害剤は、CALCRL、RAMP1、RAMP2、またはRAMP3の発現の阻害剤である。「発現の阻害剤」とは、遺伝子の発現を阻害する生物学的効果を有する天然または合成化合物をいう。本発明の好ましい実施形態では、前記遺伝子発現の阻害剤は、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムである。例えば、アンチセンスRNA分子およびアンチセンスDNA分子を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、CALCRL、RAMP1、RAMP2、またはRAMP3のmRNAに結合して、タンパク質の翻訳を妨げるか、またはmRNAの分解を増加させることにより、CALCRL、RAMP1、RAMP2、またはRAMP3のレベル、ひいては活性を細胞内で低下させることにより、CALCRL、RAMP1、RAMP2、またはRAMP3の翻訳を直接ブロックするように作用する。例えば、少なくとも約15塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、CALCRL、RAMP1、RAMP2、またはRAMP3をコードするmRNA転写配列の固有の領域に相補的なものは、例えば、従来のホスホジエステル技術によって合成することができる。配列が既知の遺伝子の発現を特異的に阻害するためにアンチセンス技術を使用する方法は、当技術分野でよく知られている（例えば、米国特許第6,566,135号を参照。第6,566,135号、第6,566,131号、第6,365,354号、第6,410,323号、第6,107,091号、第6,046,321号、および第5,981,732号））低分子阻害性RNA（siRNA）も、本発明で使用するための発現阻害剤として機能することができる。CALCRL、RAMP1、RAMP2、またはRAMP3遺伝子の発現は、CALCRL、RAMP1、RAMP2、またはRAMP3遺伝子の発現が特異的に阻害されるように、小二本鎖RNA（dsRNA）、または小二本鎖RNAの産生を引き起こすベクターもしくは構築物を対象者または細胞に接触させること（すなわち、RNA干渉またはRNAi）によって低減させることができる。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、およびリボザイムは、単独でまたはベクターと関連してin vivoで送達されてもよい。広義には、「ベクター」とは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、またはリボザイム核酸の細胞への移送を容易にすることができる任意のビヒクルであり、典型的にはCALCRL、RAMP1、RAMP2、またはRAMP3を発現する細胞である。典型的には、ベクターは、ベクターが存在しない場合に生じる分解の程度と比較して、分解を低減して核酸を細胞に輸送する。一般に、本発明で有用なベクターには、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、またはリボザイム核酸配列の挿入または組み込みによって操作されたプラスミド、ファージミド、ウイルス、ウイルス源または細菌源に由来する他のビヒクルが含まれるが、これらに限定されない。ウイルスベクターは、好ましいタイプのベクターであり、以下のウイルスからの核酸配列を含むが、これらに限定されない。レトロウイルス、例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス、Maus 乳腺腫瘍ウイルス、およびローウス肉腫ウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、SV40型ウイルス、ポリオーマウイルス、エプスタインバーウイルス、パピローマウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、およびレトロウイルスなどのRNAウイルス。また、名前は挙げられていないが、当技術分野で知られている他のベクターを容易に採用することができる。

【0054】

「治療上有効な量」とは、医療行為に適用可能な合理的なベネフィット/リスク比で十分な量の抗体または阻害剤を意味する。本発明の化合物および組成物の1日の総使用量は、主治医が健全な医学的判断の範囲内で決定することが理解される。特定の対象に対する特定の治療有効量レベルは、治療される疾患および疾患の重症度、採用される特定の化合物の活性、採用される特定の組成物、対象の年齢、体重、一般的な健康状態、性別および食生活、採用される特定の化合物の投与時間、投与経路および排泄率、治療期間、採用される特定のポリペプチドと組み合わせるまたは同時に使用される薬剤、および医療技術によ

く知られている同様の要因を含む様々な要因に依存する。例えば、所望の治療効果を得るために必要な量よりも少ない量から化合物の投与を開始し、所望の効果が得られるまで徐々に投与量を増やしていくことは、当業者であれば容易にできることである。しかし、製品の1日の投与量は、成人1人1日あたり0.01~1,000mgの広い範囲で変化させることができる。好ましくは、組成物は、治療すべき対象への投与量に対症療法的に調整するために、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、250、500mgの有効成分を含む。薬剤は、通常、約0.01mgから約500mgの有効成分を含み、好ましくは1mgから約100mgの有効成分を含む。有効量の医薬品は、通常、1日あたり0.0002mg/kgから約20mg/kgの体重、特に約0.001mg/kgから7mg/kgの体重の投与量で供給される。

【0055】

通常、本発明の抗体または阻害剤は、薬学的に許容される賦形剤、および任意に生分解性ポリマーなどの徐放性マトリクスと組み合わせて、医薬組成物を形成する。「薬学的に」または「薬学的に許容される」とは、哺乳類、特にヒトに投与したときに、適宜、有害反応、アレルギー反応、またはその他の不都合な反応を起こさない分子実体および組成物を指す。薬学的に許容される担体または賦形剤とは、非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、カプセル化材料または任意のタイプの製剤補助剤を指す。一般的に、医薬組成物は、注射可能な製剤として薬学的に許容されるビヒクルを含む。これらは、特に等張の無菌生理食塩水（リン酸ナトリウム、二ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなど、またはこれらの塩の混合物）、または乾燥した、特に凍結乾燥した組成物であり、場合によっては滅菌水または生理食塩水を加えることで、注射可能な溶液を構成することができる。注射に適した医薬形態には、滅菌水溶液または分散液、ゴマ油、ピーナツ油または水性プロピレングリコールを含む製剤、および滅菌注射液または分散液をすぐに調製するための滅菌粉末がある。いずれの場合も、無菌で、容易に注射できる程度の流動性がなければならない。また、製造および保管の条件下で安定していなければならない。滅菌注射液は、必要な量の有効成分を適切な溶媒に入れ、必要に応じて上に列挙した他の成分のいくつかと一緒に組み込み、続いて過滅菌することによって調製される。一般的に分散液は、基本的な分散媒体と必要な他の成分を含む無菌ビヒクルに、滅菌された様々な活性成分を組み込むことによって調製される。滅菌された注射用溶液を調製するための滅菌された粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分と任意の追加の所望の成分の粉末を、その前に滅菌濾過された溶液から得る真空乾燥および凍結乾燥技術である。

【0056】

本発明のさらなる目的は、CALCR Lおよび少なくとも1つの幹細胞のマーカーを発現する細胞の集団を特定して選択することを含む、AMLに罹患している被験者から得られたサンプル中の白血病幹細胞を特定する方法に関するものである。

【0057】

本発明の診断方法で使用するサンプルは、様々な供給源、特に血液から得ることができるが、場合によっては、骨髄、リンパ、脳脊髄液、滑液などのサンプルを使用してもよい。このようなサンプルは、分析の前に、遠心分離、溶出、密度勾配分離、アフレーシス、アフィニティセクション、パニング、FACS、Hypaqueによる遠心分離などによって分離することができます。サンプルが得られたら、そのまま使用したり、凍結したり、適切な培地で短期間維持したりすることができる。細胞を維持するために様々な培地を採用することができる。サンプルは、採血、静脈穿刺、生検など、任意の便利な方法で得ることができる。通常、サンプルは少なくとも約 10^2 個の細胞を含み、より通常は少なくとも約 10^3 個の細胞を含み、好ましくは 10^4 個、 10^5 個またはそれ以上の細胞を含む。細胞サンプルの分散や懸濁には、適切な溶液を使用することができる。そのような溶液は、一般に、バランス塩溶液、例えば、通常の生理食塩水、PBS、Hankのバランス塩溶液などであり、都合よく、子牛胎児血清または他の天然に存在する因子が補充

され、低濃度、一般に5～25 mMの許容可能な緩衝剤と併用される。便利な緩衝剤としては、HEPES、リン酸塩緩衝剤、乳酸塩緩衝剤などがある。

【0058】

白血病幹細胞は、初発の腫瘍サンプルから予測的に分離または同定することができます。特に、白血病幹細胞は、癌幹細胞の自己再生および分化のための機能的アッセイにおいて、癌幹細胞のユニークな特性を有する。白血病細胞と白血病幹細胞を分離する方法は、当技術分野ではよく知られており、典型的には、特定の細胞表面マーカーの存在または非存在を伴う。例えば、白血病幹細胞と正常な対応細胞であるヒト造血幹細胞(HSC)、これには表現型Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺；または表現型Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻を有する細胞が限定されずに含まれ、ヒト造血多能性前駆細胞(MPP)、これには表現型Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁻；または表現型Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁻CD45RA⁻を有する細胞が限定されずに含まれる、との間で比較を行うことができる。

10

【0059】

いくつかの実施形態では、細胞表面マーカーの有無を判定するには、対象となる細胞表面マーカーに特異的な結合パートナーのパネルを使用する。前記結合パートナーには、抗体、アプタマー、およびペプチドが含まれるが、これらに限定されない。結合パートナーを用いることで、マーカーを発現している細胞集団をスクリーニングすることができる。目的の細胞表面マーカーを発現する細胞集団をスクリーニングするために、様々な技術を利用することができる。典型的には、抗体をコートした磁気ビーズを用いた磁気分離、固体マトリックス(すなわち、プレート)に付着した抗体を用いた「パニング」、およびフローサイトメトリー(例えば、米国特許第5,985,660号およびMorrison et al. Cell, 96:737-49 (1999)を参照)が含まれる。

20

【0060】

いくつかの実施形態では、結合パートナーは、ポリクローナルまたはモノクローナル、好ましくはモノクローナルであって、1つの細胞表面マーカーに対して特異的に向けられた抗体である。本発明のポリクローナル抗体またはその断片は、適切な抗原またはエピトープを、例えば、ブタ、ウシ、ウマ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、およびマウスなどから選択された宿主動物に投与することにより、公知の方法に従って上げることができる。当技術分野で知られている様々なアジュバントを使用して、抗体産生を高めることができる。本発明の実施に有用な抗体は、ポリクローナルであってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。本発明のモノクローナル抗体またはその断片は、培養中の連続細胞株による抗体分子の産生を提供する任意の技術を用いて調製および単離することができる。生産および単離のための技術には、もともとハイブリドーマ技術；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術；およびEBV-ハイブリドーマ技術が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0061】

いくつかの実施形態では、結合パートナーのパネルは、CD33、CD34、CD36、CD38、CD39、CD45、CD81、CD90、およびCD123からなる群から選択される少なくとも1つの細胞表面マーカーに特異的であり、したがって、CALCRに特異的な少なくとも1つの結合パートナーを含んでいる。

40

【0062】

一般的に、結合パートナーは、分離に使用するためにラベルと結合している。ラベルには、直接的な分離を可能にする磁気ビーズ、支持体に結合したアビジンやストレプトアビジンで除去できるビオチン、蛍光活性化セルソーターなどで使用できる蛍光色素などがあり、特定の細胞タイプの分離を容易にすることができる。蛍光色素には、フィコエリスリンやアロフィコシアニンなどのフィコピリタンパク質、フルオレセイン、テキサスレッドなどがある。通常、各抗体は異なる蛍光色素で標識されており、マーカーごとに独立したソーティングが可能である。適切な蛍光検出要素としては、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチルクマリン、ピレン、マラカイトグリーン、スチルベン、ルシファーイエロー、カスケードブルー(登録商標

50

)、テキサスレッド、IAEDANS、DANS、BODIPY FL、LC Red 640、Cy 5、Cy 5.5、LC Red 705、オレゴングリーンなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。適切な光学色素は、Richard P. Haugland著「1996 Molecular Probes Handbook」に記載されており、ここに参照として明示的に組み込まれる。適切な蛍光標識にはまた、緑色蛍光タンパク質(GFP; Chalfieら、Science 263(5148):802-805(1994年2月11日); およびEGFP; Clontech-Genbank Accession Number U55762)、青色蛍光タンパク質(BFP; 1. Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal (Quebec) Canada H3H 1J9; 2. Stauber, R. H. Biotechniques 24(3):462-471(1998); 3. Heim, R. and Tsien, R. Y. Curr. Biol. 6:178-182(1996))、強化黄色蛍光タンパク質(EYFP; 1. Clontech Laboratories, Inc., 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, Calif. 94303)、ルシフェラーゼ(Ichiki, et al., J. Immunol. 150(12):5408-5417(1993))、 β -ガラクトシダーゼ(Nolan, et al., Proc Natl Acad Sci USA 85(8):2603-2607(April 1988))およびレニラWO 92/15673; WO 95/07463; WO 98/14605; WO 98/26277; WO 99/49019; U.S. Pat. 第5,292,658号; 第5,418,155号; 第5,683,888号; 第5,741,668号; 第5,777,079号; 第5,804,387号; 第5,874,304号; 第5,876,995号; および第5,925,558号)に記載されている。)が含まれる。上記の引用文献はすべて、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明で使用するための検出素子は以下を含む。Alexa-Fluor色素(Alexa Fluor(登録商標)350、Alexa Fluor(登録商標)405、Alexa Fluor(登録商標)430、Alexa Fluor(登録商標)488、Alexa Fluor(登録商標)500、Alexa Fluor(登録商標)514、Alexa Fluor(登録商標)532、Alexa Fluor(登録商標)546、Alexa Fluor(登録商標)555、Alexa Fluor(登録商標)568を含む例示的なリストである。Alexa Fluor(登録商標)594、Alexa Fluor(登録商標)610、Alexa Fluor(登録商標)633、Alexa Fluor(登録商標)647、Alexa Fluor(登録商標)660、Alexa Fluor(登録商標)680、Alexa Fluor(登録商標)700、Alexa Fluor(登録商標)750)、Cascade Blue、Cascade Yellow、R-phycoerythrin(PE)(Molecular Probes)(Eugene, Oreg.)、FITC、ローダミン、テキサスレッド(Pierce, Rockford, Ill.)、Cy5、Cy5.5、Cy7(Amersham Life Science, Pittsburgh, Pa.)がある。Cy5 PE、Cy5.5 PE、Cy7 PE、Cy5.5 APC、Cy7 APCのタンデムコンジュゲートプロトコルは当業界で知られている。抗体やその他の結合要素に結合した蛍光色素は、レーザーによって活性化され、異なる波長の光を再放出する。蛍光体から検出される光の量は、ビームを通過する細胞に関連する結合要素ターゲットの数に関連する。任意の実施形態における検出要素、例えば蛍光タグ付き抗体の任意の特定のセットは、研究対象の細胞の種類およびそれらの細胞内の活性化可能な要素の存在に依存し得る。複数の検出素子、例えば蛍光標識抗体を同時に使用することができるので、1つの細胞がレーザービームを通過する際に行われる測定は、散乱光強度と各蛍光標識からの光強度からなる。したがって、1つの細胞の特性評価は、多次元空間における座標位置として表される一連の測定された光の強さからなる。蛍光体からの光のみを考慮すると、蛍光タグ付き抗体などの検出素子のそれぞれに対応する1つの座標軸が存在する。座標軸の数(空間の次元)は、使用される蛍光色素の数である。最近のフローサイトメーターは、異なる蛍光色素に関連する複数の色を、1秒間に数千個の細胞を測定することができる。したがって、1人の被験者からのデータは、(典型的には)何千もの個々の細胞のそれぞれに対する抗原の数に関連する測定値の集まりによって記述することができるKrutzik et al., High-content single-cell drug screening with phosphospecific flow cytometry. Na

10

20

30

40

50

ture Chemical Biology, Vol.4 No.2, Pgs. 132-42, February 2008を参照。
 このような方法は、スループットを向上させ、消耗品の消費を抑えるために、オプション
 でバーコードを使用することができるKrutzik, P. and Nolan, G., Fluorescent cell
 barcoding in flow cytometry allows high-throughput drug screening and signaling profiling. Nature Methods, Vol.3 No.5, Pgs. 361-68, May 2
 006。

【0063】

いくつかの実施形態では、結合パートナーは、ランタノイドなどの金属化学元素と結合し
 ている。ランタノイドは、安定した同位体であること、最大で100個以上の異なるラベル
 が利用可能であること、比較的安定していること、質量分析を用いて検出する際に検出
 性が高く、検出チャンネル間で容易に分解できることなど、他のラベルに比べていくつかの
 利点がある。また、ランタノイドラベルは、検出のダイナミックレンジが広いのも特徴で
 ある。ランタノイドは高感度で、光や時間の影響を受けないため、非常に柔軟で堅牢であ
 り、様々な場面で利用することができる。ランタノイドは、原子番号57~71の15種
 類の金属化学元素からなる元素群である。また、希土類元素とも呼ばれる。ランタノイド
 は、CyTOF技術を用いて検出することができる。CyTOFは、誘導結合プラズマ飛
 行時間型質量分析装置(ICP-MS)である。CyTOF装置は、利用可能な安定同位
 体タグの数と同じ数のパラメータについて、1秒間に最大1000個の細胞を分析するこ
 とができる。

10

【0064】

典型的には、結合パートナーを細胞の懸濁液に加え、利用可能な細胞表面抗原を結合させ
 るのに十分な時間、インキュベートする。インキュベーションは、通常、少なくとも約5
 分、通常は約30分未満である。分離の効率が結合パートナーの不足によって制限されな
 いように、反応混合物中に十分な濃度の結合パートナーを有することが望ましい。適切な
 濃度は、滴定によって決定される。細胞を分離する培地は、細胞の生存率を維持する任意
 の培地とする。好ましい培地は、0.1から0.5%のBSAを含むリン酸緩衝生理食塩
 水である。培地は市販されており、細胞の性質に応じて、ダルベッコ変法イーグル培地(
 dMEM)、ハンクス塩基性塩溶液(HBSS)、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(d
 PBS)、RPMI、アイソープ培地、5mMEDTAを含むPBSなどを使用するこ
 とができ、子牛胎児血清、BSA、HSAなどを頻繁に補充することができる。

20

30

【0065】

本発明の診断方法は、前記白血病幹細胞の存在が、対象者が再発の危険性があることを示
 している、対象者が再発の危険性があるかどうかを判定するのに特に適している。また、
 いくつかの実施形態において、本発明の診断方法は、前記白血病幹細胞の存在が、対象者
 の生存期間が短いことを示している、対象者の生存期間を判定するのに特に適している。

【0066】

本発明は、以下の図および例によってさらに説明される。しかし、これらの実施例および
 図は、本発明の範囲を限定するものとして、いかなる意味でも解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1A】CALCR Lのダウンレギュレーションにより、*in vivo*での白血病の
 成長が損なわれる。白血病幹細胞の頻度を評価するための実験計画。*siCTR*または
*siCALCR L*で細胞を*ex vivo*処理した後、細胞濃度を低下させたもの(500
 , 000; 100, 000; 10, 000; 1000)をマウスの尾静脈に注射した(各
 群 $n = 4$)。そして、12週間後にマウスを解剖し、マウスの骨髄におけるヒト細胞の生
 着を評価した。ヒト細胞の割合が0.1%よりも優れている場合、骨髄はポジティブに生
 着したと考えられた。

40

【図1B】LICの頻度に対するCALCR Lの枯渇の影響。

【図1C】*in vivo*での白血病細胞の成長に対するCALCR Lの役割の調査。ド
 キサイクリン誘導性の*shCTR*、*shCAL # 1*または*shCAL # 2*を発現させた

50

2.106 MOLM-14またはOCI-AML3細胞をNSGマウスの尾静脈に注射した。注射した日に、1%のショ糖を添加した飲料水に0.2mg/mlのドキシサイクリンを加え、実験終了までshRNAの発現を誘導した。25日後、一部のマウスを犠牲にして、細胞の生着率(総細胞腫瘍負担量=骨髄+脾臓への芽球数)を測定し(1群5-6匹)、別の一部のマウスについては生存率を追跡した(1群7-9匹)。

【図1D】mCD45.1-/hCD45+/hCD33+/AnnV-マーカーを用いて全細胞の腫瘍負担を測定した。エラーバーはMean±SEMを示し、各群はウェルチ補正を用いた対応のない両側t検定で比較した。

【図1E】マウスの生存観察。log-rank(Mantel-Cox)検定を用いて比較した。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns有意差なし

10

【図2A】CALCR Lを枯渇させると細胞が化学療法に感作される。生体内での化学療法反応に対するCALCR Lの枯渇の影響を評価するための実験計画。指示された誘導性shRNAを発現させた2.106MOLM-14をNSGマウスの尾静脈に注射した。その10日後、病状が確立した時点で、マウスに30mg/kg/dのシタラピンを5日間投与した。

【図2B】mCD45.1-/hCD45+/hCD33+/AnnV-マーカーを用いて全細胞の腫瘍負担を測定した。

【図2C】マウスの生存観察。log-rank(Mantel-Cox)検定を用いて群間比較を行った。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, 有意差なし。

20

【図3A】CALCR Lの発現レベルは化学療法への反応を予測する。NSGベースのPDXモデルをAraCで治療するために使用した化学療法レジメンとスケジュールの模式図。8週間から18週間の間に末梢血の生着率を評価し、マウスを4~10匹の実験群に割り当て、各群の平均生着率を同様にした。マウスには、ビヒクル(PBS)または60mg/kg/dayのAraCを毎日腹腔内注射で5日間投与した。8日目に治療後のマウスを犠牲にして、生存している残存AML細胞を特徴づけた。

【図3B】hCD45、hCD33、および/またはhCD44を発現するヒト生存AML細胞の総数を、フローサイトメトリーを用いて分析し、PBS処理したAML-xenograftedマウスの骨髄と比較して定量化した。各AML患者サンプルについて、コントロール投与マウスと比較したAraC投与マウスの全細胞腫瘍負担のフォールド減少を個別に算出した。そして、患者を低反応者($FC > 10$)と高反応者($FC > 10$)の2つのカテゴリーに分けて免れた。

30

【図3C】低反応群と高反応群におけるCALCR L陽性細胞の割合を示すグラフ(細胞表面の発現は、ビヒクル処理した細胞をフローサイトメトリーで分析して決定した)。

【図3D】倍数減少とCALCR L陽性細胞の割合との相関関係。線形回帰を行い、 R^2 とp値を求めた。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, 有意差なし。

【図4A】CALCR Lを標的とすることで化学療法抵抗性の白血病幹細胞を根絶する。LSC陽性の化学療法抵抗性集団におけるCALCR Lの役割。初代AMLサンプルをマウスの血液中に注入した後、ビヒクル(PBS)または60mg/kg/dayのAraCを毎日腹腔内注射で5日間投与した。8日目にマウスを犠牲にして、PBSとAraCを投与した条件のヒト細胞に対して、ex vivoでsiRNAのトランスフェクションを行った。その後、濃度を下げた細胞をマウスの尾静脈に注入した(1グループあたり $n = 4$)。12週間後、マウスを解剖し、mCD45.1-/hCD45+/AnnV-マーカーを用いて、マウスの骨髄におけるヒト細胞の生着を評価した。ヒト細胞の割合が0.5%よりも優れていた場合、骨髄または脾臓はポジティブに移植されたと考えられた。

40

【図4B】骨髄および脾臓へのLICの頻度を示すグラフ。頻度と統計分析はL-calcソフトウェア(Stemcell technologies)を用いて行った。

50

【0068】

実施例：

材料と方法。

ヒト試験

AML初発患者の検体は、Toulouse University Hospital (TUH), Toulouse, Franceから入手した。TUHでAMLと診断された患者から、ヘルシンキ宣言に基づいて署名されたインフォームドコンセントの後、凍結サンプルを入手し、HIMIPコレクション(BB-0033-00060)に保管した。フランスの法律に従い、HIMIPバイオバンクコレクションは高等教育・研究省に申告され(DC2008-307、コレクション1)、倫理委員会(Comite de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II)の承認を経て、譲渡契約書(AC2008-129)を取得した。サンプルの臨床的および生物学的な注釈はCNIL(Comite National Informatique et Liberties ie Data processing and Liberties National Committee)に申告した。今回の研究で使用したヒト検体の年齢、性別、細胞遺伝学、変異の情報については、表S3を参照。

10

【0069】

In vivo動物実験

NSG(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1WjI/SzJ)マウス(Charles River Laboratories社製)をAML細胞株または初代AMLサンプルの移植に使用した。6週齢から9週齢のオスマたはメスのマウスを実験に供し、細胞注入や薬物治療の前に、マウスを無作為に実験群に割り当てた。マウスは、HEPAフィルター付きマイクロアイソレーターを用いて無菌状態で飼育し、放射線照射した餌と無菌水をToulouse(フランス)のCancer Research CenterのAnimal core facilityで与えた。すべての動物は、Region Midi-Pyrenees(フランス)のInstitutional Animal Care and Use Committee(動物管理・使用委員会)が審査・承認したプロトコルに従って使用された。

20

【0070】

細胞株および初代培養

初代ヒトAML細胞については、末梢血または骨髄サンプルを10% DMSOを含むFCSで凍結し、液体窒素で保存した。精製前にフローサイトメトリーと形態学的特徴により、芽球の割合を決定した。細胞は37°Cのウォーターバスで解凍し、IMDM、20% FBSからなる解凍用の培地で洗浄した。その後、すべての実験において、細胞をIMDM、20% FBS、1% Pen/Strep(GIBCO)で維持した。

30

【0071】

細胞株と培養条件

ヒトAML細胞株は、10% FBS(インビトロジェン社製)を添加したRPMIメディア(ギブコ社製)に、100 U/mLのペニシリンと100 µg/mLのストレプトマイシンを添加し、37°C、5% CO₂で培養した。培養した細胞は2~3日ごとに分割し、指数関数的な成長期に維持した。すべてのAML細胞株は、DSMZ社またはATCC社から購入し、2年ごとに液体窒素ストックを更新した。これらの細胞株は、実験室でマイコプラズマ汚染の検査が定期的に行われている。U937細胞は、2012年2月にDSMZから、2014年1月にATCCから入手した。MV4-11細胞およびHL-60細胞は、2012年2月および2016年にDSMZから入手した。KG1細胞は、2012年2月にDSMZから、2013年3月にATCCから入手した。KG1a細胞は、2016年2月にDSMZから入手した。MOLM14はPr.から入手した。Martin Carroll(University of Pennsylvania, Philadelphia, PA)から2011年に入手した。

40

50

【0072】

マウスゼノグラフトモデル

NSGマウスは、Charles River Laboratories社から入手したブリーダーを用いて、Toulouse (フランス)のGenotoul Anexplプラットフォームで生産した。移植されたマウスは、実験期間中、抗生物質 (Baytril) で治療された。PDXモデルの化学療法に対する反応を評価する実験では、白血病細胞を注入する24時間前に、マウス (6 - 9週齢) にブスルファン (30 mg / kg) を胸腔下投与した。白血病サンプルは37 のウォーターバスで解凍し、IMDM 20% FBSで洗浄後、ハンクス平衡塩溶液に $1 - 10 \times 10^6$ 細胞 / 200 μ L の最終濃度で懸濁し、NSGマウスに尾静脈注射した。AML細胞移植から8 ~ 18週後、マウスが生着した時点で (末梢血または骨髓吸引液のフローサイトメトリーで検査)、NSGマウスに60 mg / kgのAraCまたはピヒクル (PBS) を5日間毎日腹腔内投与した。AraCはTUHの薬局から提供された。8日目にマウスを犠牲にし、マウスの骨髓からヒト白血病細胞を採取した。AML細胞株については、白血病細胞を注入する24時間前にマウスをブスルファン (20 mg / kg) で処理した。その後、前述の方法で細胞を融解・洗浄し、200 μ Lあたり 2×10^6 個の最終濃度でHBSSに懸濁した後、NSGマウスの血流に注入した。誘導性shRNAを用いた実験では、細胞注入の当日または10日後から実験終了までの間、飲料水にドキシサイクリン (0.2 mg / ml + 1% ショ糖) を添加した。マウスは30 mg / kgのAraCを毎日腹腔内注射することで5日間治療し、8日目に犠牲にした。疾患の症状 (被毛の乱れ、猫背、脱力感、運動能力の低下) についてマウスを毎日モニターし、苦痛の兆候がある注射された動物の殺処分の時期を決定した。

【0073】

白血球移入の評価

実験終了後、NSGマウスを欧州の倫理規定に基づいて人道的に殺害した。骨髓 (脛骨と大腿骨から混合) と脾臓を解剖し、1% FBSを含むHBSSで洗浄した。骨髓、脾臓からのMNCを抗hCD33、抗mCD45.1、抗hCD45、抗hCD3および/または抗hCD44 (いずれもBD社製) 抗体で標識し、フローサイトメトリーを用いて、生存しているヒト芽球の割合 (hCD3 - hCD45 + mCD45.1 - hCD33 + hCD44 + AnnV - 細胞) を測定した。いくつかの実験では、AML幹細胞の特徴を明らかにするために、抗CALCR L、抗CD34、抗CD38も加えた。CALCR Lの細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体は、Biotem社 (フランス) の協力を得て研究室内で作製した。その後、Lightning-Linkキット (Expedeon社) を用いてR-Phycocerythrinで抗体を標識した。抗体はすべて、特異性と細胞密度に応じて1/50 ~ 1/200の濃度で使用した。解析は、LSRFortessafローサイトメーターとDIVAソフトウェア (BD Biosciences社)、またはCytOFLEXフローサイトメーターとCytExpertソフトウェア (Beckman Coulter社) を用いて行った。末梢血中のAML細胞数 / μ L、および全細胞腫瘍量 (骨髓および脾臓) 中のAML細胞数は、CountBrightビーズ (Invitrogen社) を用いて、記載されたプロトコルに従って測定した。

【0074】

LDA実験では、マウス骨髓中の細胞の少なくとも0.1%以上がhCD45 + mCD45.1 - hCD33 + であれば、ヒトの移植は陽性であるとみなした。AML # 31では、hCD45 + mCD45.1 - にのみ基づいて移植を測定したため、カットオフ値は0.5%以上に増加した。ELDAソフトウェアを用いて限界希釈分析を行った。

【0075】

ウェスタンブロット解析

4 ~ 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動用Bis-Trisゲル (Life Technology, Carlsbad, CA) を用いてタンパク質を分解し、ニトロセ

ルロース膜に電気泳動した。Tris - buffered saline (TBS) 0.1%, Tween 20%, 5% bovine serum albumin でブロッキングした後、適切な一次抗体で一晩免疫染色し、その後HRPに結合させた二次抗体でインキュベートした。免疫反応バンドはSyngeneカメラを用いた強化化学発光 (ECL Supersignal West Pico; Thermo Fisher Scientific) で可視化した。化学発光シグナルの定量は、Syngene社のGeneToolsソフトウェアを用いて行った。

【0076】

細胞死アッセイ

処理後、 5×10^5 個の細胞をPBSで洗浄し、200 μ LのAnnexin - V binding buffer (BD Biosciences) に再懸濁した。2 μ LのAnnexin - V - FITC (BD Biosciences) と7 - amino - actinomycin D (7 - AAD; Sigma Aldrich) を加え、室温、暗所で15分間処理した。すべてのサンプルは、LSRFortessaまたはCytoFLEXフローサイトメーターを用いて分析した。

【0077】

細胞周期解析

細胞を採取し、PBSで洗浄した後、氷冷した70%エタノールを用いて-20 で固定した。その後、0.25% Triton X - 100を含む1xPBSで細胞を透過処理し、10 μ g/mlのヨウ化プロピジウムと1 μ g/mlのRNaseを含む1xPBSで再懸濁し、37 で30分間インキュベートした。データはCytoFLEXフローサイトメーターで収集した。

【0078】

クロノジェニックアッセイ

AML患者の初代細胞を解凍し、100 μ LのNucleofector Kit V (Amaxa, Cologne, Germany) に再懸濁した。次に、製造者の指示書 (プログラムU - 001 Amaxa、ケルン、ドイツ) に従って、200 nMのsiRNAスクランブル (ON - TARGETplus Non - targeting siRNA #2, Dharmacon) または抗CALCRL (SMARTpool ON - TARGETplus CALCRL siRNA, Dharmacon) を用いて細胞をヌクレオフェクションした。細胞は、刺激剤として10%の5637 - CMを添加したH4230メチルセルロース培地 (STEMCELL Technologies社) で最終濃度 1×10^5 細胞/mlに調整した後、35mmシャーレに2枚ずつプレATINGし、加湿CO₂インキュベーター (5% CO₂, 37) で7日間増殖させた。7日目に、白血病コロニー (5個以上の細胞) をスコアリングした。

【0079】

shRNA、レンチウイルスの生産と白血病細胞への導入

shRNAの配列をpLKO - TET - ONに構築するか、pLKOベクターにクローニングした。各コンストラクト (6 μ g) を、psPax2 (4 μ g、パッケージングタンパクを提供) およびpMD2 - G (2 μ g、VSV - gエンベロープタンパクを提供) プラスミドと一緒に、10cmディッシュに入れたリポフェクタミン2000 (20 μ L) を用いて293T細胞に共導入し、レンチウイルス粒子を生成した。細胞トランスフェクションの24時間後に培地を除去し、10ml opti - MEM + 1% Pen/Strepを加えた。トランスフェクション後約72時間で、レンチウイルス粒子を含む293T培養上清を採取し、ろ過し、分注し、今後使用するために-80 のフリーザーに保存した。トランスダクション当日、解凍したばかりのレンチウイルス2mlに 2×10^6 個の細胞を混合し、最終濃度8 μ g/mlのポリブレンを加えて細胞を感染させた。感染後3日目に、1 μ g/mlのピューロマイシンを用いて、導入した細胞を選択した。

【0080】

EC50実験

実験の前日に、細胞を 3×10^5 cells/ml の最終濃度に調整し、96 ウェルプレートにプレATINGした (最終容量: $100 \mu\text{l}$)。半減期最大阻害濃度 (EC50) を測定するために、濃度を上げた AraC または イダルビシン を培地に添加した。2 日後、MTS 溶液 (Promega 社) を 1 ウェルあたり $20 \mu\text{l}$ 添加して 2 時間後、96 ウェルプレートリーダーで 490 nm の吸光度を記録した。細胞の生存率を 50% に低下させる用量 (EC50) を GraphPad Prism ソフトウェアを用いて Nonlinear regression log [inhibitor] vs. normalized response - variable slope で解析した。

【0081】

シーホースアッセイによる AML 培養細胞の酸素消費量の測定

10

すべての XF アッセイは、XFp Extracellular Flux Analyser (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA) を用いて行った。アッセイの前日、センサーカートリッジをシーホース・バイオサイエンス社から提供されたキャリブレーション用緩衝液に入れ、一晩水和させた。シーホース XFp マイクロプレートのウェルに、 $22.4 \mu\text{g/ml}$ の濃度で $50 \mu\text{l}$ の Cell-Tak (コーニング社、Cat# 354240) 溶液をコーティングし、4 で一晩保管した。その後、Cell-Tak をコートしたシーホースマイクロプレートのウェルを蒸留水で洗浄し、 11 mM のグルコース、 1 mM のピルビン酸、 2 mM のグルタミンを含む XF base minimal DMEM 培地を用いて、AML 細胞を 1 ウェルあたり 10^5 細胞の密度でプレATINGした。その後、 $180 \mu\text{l}$ の XF base minimal DMEM 培地を各ウェルに入れ、 80 g で 5 分間遠心分離してマイクロプレートを得た。CO₂ フリーの大気中で 37°C 、1 時間インキュベートした後、XFp アナライザーを用いて基礎的な酸素消費率 (OCR、ミトコンドリア呼吸指標として) と細胞外酸性化率 (ECAR、解糖指標として) を測定した。

20

【0082】

RNA マイクロアレイおよびバイオインフォマティクス解析

一次 AML サンプルでは、PBS 処理または AraC 処理した生着した BM マウス (3 例) から、セルソーターサイトメーターを用いてヒト CD45 + CD33 + を分離した。AML 細胞からの RNA は、Trizol (Invitrogen) または RNeasy (Qiagen) を用いて抽出した。MOLM-14 AML 細胞株については、RNeasy (Qiagen) を用いて 2.106 個の細胞から mRNA を抽出した。RNA の純度は NanoDrop 1ND-1000 分光光度計でモニターし、RNA の品質は Agilent 2100 Bionalyzer と RNA 6000 Nano assay kit で評価した。RNA の分解や汚染は検出されなかった (RIN > 9)。 100 ng の total RNA を、Affymetrix GeneChip (c) Human Gene 2.0 ST Array 上で、Affymetrix GeneChip (c) WT Plus Reagent Kit を用いて、メーカーの指示書 (Manual Target Preparation for GeneChip (登録商標) Whole Transcript (WT) Expression Arrays P/N 703174 Rev. 2) に従って分析した。アレイの洗浄とスキャンを行い、スキャナーで生成された生ファイルを R ソフトウェアに転送して、前処理 (Oligo パッケージの RMA 関数を使用)、品質管理 (ボックスプロット、クラスタリング、PCA)、および発現量の差分解析 (LIMMA パッケージの eBayes 関数を使用) を行った。発現解析の前に、遺伝子との関連がない転写産物のクラスターをすべて削除した。転写クラスターと遺伝子のマッピングは、Affymetrix が提供するアノテーション (HuGene-2_0-st-v1.na36.hg19.transcript.csv) と R/Bioconductor パッケージ hugene20sttranscriptcluster.db を用いて行った。eBayes 関数で生成した p 値は、Benajmin and Hochberg の手順を用いて偽発見を抑制するように調整した。[RMA] Irizarry ら、Biostatistics, 2003; [Oligo package] Carvalho and Irizarry, Bioinformatics, 2010; [LIMMA reference] Ritchie ら、Nucleic Acids Research, 2015

30

40

50

; hugene20sttranscriptcluster.db : MacDonald JW 2017, Affymetrix hugene20アノテーションデータ (チップhugene20sttranscriptcluster); [FDR]: Benjamini et al., Journal of the Royal Statistical Society, 1995.

【0083】

GSEA分析

GSEA解析は、GSEA version 3.0 (Broad Institute)を用いて行った。本研究で使用した遺伝子シグネチャーは、Broad Instituteのデータベース、文献、または自社で構築したものである。以下のパラメータを使用した。permutationsの数 = 1000、permutation type = gene_set。その他のパラメータはデフォルト値のままとした

10

【0084】

数値化と統計解析

2組のデータ間の差の統計解析は、ウェルチの補正を用いた両側(非方向性)のStudent's t testで評価した。生存分析には、Log-rank (Mantel-Cox)検定を用いた。Limit Dilution Assay実験では、L-calcソフトウェア(Stemcell technologies)を用いて頻度と統計解析を行った。p値が0.05未満の場合は有意であることを示す。* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001; ns, not significant. 各テストの詳細情報は、図の凡例に記載されている。

20

【0085】

結果

白血病幹細胞はその維持に必要なCALCR Lの発現が高い

臨床的に関連する化学療法モデルを用いて、我々は以前、LSCが必ずしもArac残存AMLに濃縮されていないことを示し、これらの細胞も化学療法の標的となり、化学感受性幹細胞と化学抵抗性幹細胞の両方のサブ集団が存在することを示唆した(Farge et al. 薬剤耐性LSCを同定するために、我々は3つの異なる研究から得られたトランスクリプトームデータを分析した: i) 機能的に定義されたLSCにおいて、正常な造血幹細胞のカウンターパートと比較して134の遺伝子が過剰発現していることを同定した(Eppert et al: ii) AMLにおいて高発現が予後不良と関連する114の遺伝子を明らかにした研究(the Cancer Genome Atlas, AML cohort, 2013): iii) 集中的化学療法後のペアワイズマッチした診断と比較して再発時に過剰発現する536の遺伝子を選択した研究(Hackl et al.)。意外なことに、これら3つのトランスクリプトームデータベースに共通するユニークな遺伝子が1つ見つかった。Gタンパク質共役型受容体をコードするCALCR Lで、がんやAMLではまだ記述されていない。独立して発表された3つのAML患者のコホート(TCGA、AMLコホート、GSE12417、GSE14468)を用いて、CALCR Lの発現が高い患者は、全生存率および無イベント生存率が有意に低いことを示した。さらに、再発患者のAML細胞では、診断時にマッチした細胞と比較してCALCR L遺伝子の発現が高く、また、白血病コンパートメントでは正常と比較して、さらに機能的および表現型的に定義されたLSC集団で高い発現が認められた。当研究室が開発したモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行ったところ、CALCR Lの細胞表面発現は、白血病バルク(n = 37)と正常バルク(n = 9)の間で有意に高く(Fold change, FC = 2.3)、AML患者の未熟なCD34 + CD38 - コンパートメントに濃縮されていることが確認された(それぞれ、FC AML CD34 + CD38 - vs AMLバルク = 1.4、FC AML CD34 + CD38 - vs 正常CD34 + CD38 - = 2.6)。興味深いことに、この受容体の陽性細胞の割合はすべての調査対象集団で同様であり、AML細胞の少数集団でCALCR Lが過剰発現していることを示している。次に、いくつかのがんモデルで、すでに報告されているCALCR LのリガンドであるADMの発現を評価するために、同様のアプローチを行った。その結果、ADM遺伝子は正常細胞に比

30

40

50

べてAML細胞で過剰に発現しており、AML患者の化学療法後の再発時にもその遺伝子発現は変化しないことがわかった。また、RNAマイクロアレイ、共焦点顕微鏡、ウェスタンブロッティングなどの手法を用いて、CALCR L、その3つの共同受容体であるRAM P 1、RAM P 2、RAM P 3、ADM（もう一つのリガンドであるCGRPは含まれない）が、試験したすべての細胞株で発現していること、そしてCALCR L受容体がこれらの細胞の細胞膜によく存在していることを確認した。これらの観察結果は、AMLの初代患者サンプルでも確認された。このように、未熟なAML細胞におけるCALCR Lの細胞内発現は、LSCの新たなマーカーとなり、LSCの生物学におけるこの受容体の役割が示唆された。

【0086】

10

次に、CALCR LとADMのタンパク質レベルが患者の転帰に与える影響について検討した。IHC解析により、198名のAML患者のコホートにおいて、CALCR LおよびADMのタンパク質レベルの上昇は、完全寛解率、5年全生存率、無イベント生存率の低下と関連していることが確認された。また、CALCR LとADMの発現量に応じて患者を4つのグループに分類したところ（-/- vs -/+ vs +/- vs +/+、データは示さず）、CALCR L high / ADM highグループでは全生存期間が大幅に短縮し、CALCR LまたはADMのみが高発現することでEFSと完全寛解率が劇的に低下することが確認された（データは示さず）。これらのデータは、ADM - CALCR L軸がAMLにおいてオートクライン様式で活性化され、予後の悪さに関係しているという仮説を裏付けるものであった。

20

【0087】

白血病幹細胞の維持に必要なCALCR L

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)アプローチを用いて、いくつかのLSC関連遺伝子シグネチャー（Eppertら、2011；Gentles、2010；Ngら、2016）が、CALCR Lの発現が最も高いAML患者では、CALCR Lの発現が最も低いAML患者と比較して濃縮されていることをまず確認しました。LSC機能の維持におけるCALCR Lの役割を具体的に調べるために、まず、初代AMLサンプルでCALCR Lをノックダウンした後、NSG免疫不全マウスに異なる用量の細胞を注入するex vivoアッセイを行った（図1A）。12週間後にマウスを犠牲にして、動物の骨髄中のヒト細胞の割合を評価した。その結果、CALCR Lを無効にすることで、二次移植における生体内のLSCsの頻度が有意に減少し（s iCTRでは1/62, 444、s iCALCR Lでは1/525, 000、図1B）、LSCsの機能を維持する上での必要性が示された。

30

【0088】

結果

CALCR Lはin vitroおよびin vivoでの細胞の成長と生存に必要であるCXCR 4やGPR 56など、AMLで同定されたいくつかのGPCRが細胞の生存や増殖に関与していることから（Chen et al. 2013）、ADM - CALCR L軸がこれらの特徴に影響を与えるかどうかを調べた。MOLM - 14細胞株およびOCI - AML 3細胞株において、CALCR LをshRNAでノックダウンした。その結果、CALCR Lを欠損させると、芽細胞の増殖が抑えられ、細胞死が増加し、プロアポトーシスマーカーであるカスパーゼ - 3とPARPが切断されることがわかった。さらに、アドレノメデュリンを標的としたshRNAは、MOLM - 14細胞およびOCI - AML 3細胞の細胞増殖およびアポトーシスに対するshCALCR Lの効果をフェノコピーした。これらの結果を生体内で確認し、標的の無効化を経時的に維持するために、テトラサイクリン誘導型のshRNAモデルを開発した。まず、CALCR Lの枯渇は、構成的shRNAによるアプローチと同様に、細胞増殖の低下とアポトーシスの増加を伴うことを確認した。マウスにAML細胞を注入した後、ドキシサイクリンにより初日からRNAの枯渇が活性化された（図1C）。移植後25日目に、マウスの骨髄と脾臓からのヒト白血病細胞の生着を、mCD 45 . 1 - hCD 45 + hCD 33 + AnV - マーカーで評価した（図1C）。

40

50

その結果、shCAL#1およびshCAL#2を注射したマウスでは、MOLM-14 (shCTR = 13.9M vs shCAL#1 = 0.3M vs shCAL#2 = 0.1M、図1D)およびOCI-AML3細胞 (shCTR = 17.2M vs shCAL#1 = 2.0M vs shCAL#2 = 1.7M、図1D)の両方において、AML芽球がshCTRよりも有意に少ないことが確認された。このように、細胞の腫瘍量が減少することで、マウスの骨髄が維持された。最後に、CALCRLをロックダウンすると、マウスの生存期間が有意に延長した (図1E)。この誘導可能なモデルを最大限に活用し、臨床的な妥当性を高めるために、CALCRLの枯渇が既存の疾患に与える影響を評価した。shRNAの発現は、両群の生着レベルが同等であることを確認し、群無作為化を行った後、shCTRまたはshCAL MOLM14細胞の移植後10日目に誘導した。この確立された疾患モデルにおいて、shCAL AML細胞を異種移植したマウスでは、疾患が進行したshCTRマウスコホートと比較して、骨髄芽球が著しく減少していることが確認された。さらに、CALCRLをダウンレギュレーションすることで、マウスの生存率が大幅に向上した。以上の結果から、CALCRLは、生体内でのAML細胞の増殖および維持に必要であることが明らかになった。

10

【0089】

次に、CALCRLとADMのタンパク質レベルが患者の転帰に与える影響について検討した。IHC解析により、198名のAML患者のコホートにおいて、CALCRLおよびADMのタンパク質レベルの上昇は、完全寛解率、5年全生存率、無イベント生存率の低下と関連していることが確認された。また、CALCRLとADMの発現量に応じて患者を4つのグループに分類したところ (-/- vs -/+ vs +/- vs +/+、データは示さず)、CALCRL high / ADM highグループでは全生存期間が大幅に短縮し、CALCRLまたはADMのみが高発現することでEFSと完全寛解率が劇的に低下することが確認された (データは示さず)。これらのデータは、ADM-CALCRL軸がAMLにおいてオートクライン様式で活性化され、予後の悪さに関係しているという仮説を裏付けるものであった。

20

【0090】

白血病幹細胞の維持に必要なCALCRL

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)アプローチを用いて、いくつかのLSC関連遺伝子シグネチャー (Eppertら、2011; Gentles、2010; Ngら、2016)が、CALCRLの発現が最も高いAML患者では、CALCRLの発現が最も低いAML患者と比較して濃縮されていることをまず確認した。LSC機能の維持におけるCALCRLの役割を具体的に調べるために、まず、初代AMLサンプルでCALCRLをロックダウンした後、NSG免疫不全マウスに異なる用量の細胞を注入するex vivoアッセイを行った (図1A)。12週間後にマウスを犠牲にして、動物の骨髄中のヒト細胞の割合を評価した。その結果、CALCRLを無効にすることで、二次移植における生体内のLSCsの頻度が有意に減少し (siCTRでは1/62, 444、siCALCRLでは1/525, 000、図1B)、LSCsの機能を維持する上での必要性が示された。

30

【0091】

CALCRLはin vitroおよびin vivoでの細胞の成長と生存に必要であるCXCR4やGPR56など、AMLで同定されたいくつかのGPCRが細胞の生存や増殖に関与していることから (Chen et al. 2013)、ADM-CALCRL軸がこれらの特徴に影響を与えるかどうかを調べた。MOLM-14細胞株およびOCI-AML3細胞株において、CALCRLをshRNAでロックダウンした。その結果、CALCRLを欠損させると、芽細胞の増殖が抑えられ、細胞死が増加し、プロアポトーシスマーカーであるカスパーゼ-3とPARPが切断されることがわかった。さらに、アドレノメデュリンを標的としたshRNAは、MOLM-14細胞およびOCI-AML3細胞の細胞増殖およびアポトーシスに対するshCALCRLの効果フェノコピーした。これらの結果を生体内で確認し、標的の無効化を経時的に維持するために、テトラサイクリン誘導

40

50

型の shRNA モデルを開発した。まず、CALCR L の枯渇は、構成的 shRNA によるアプローチと同様に、細胞増殖の低下とアポトーシスの増加を伴うことを確認した。マウスに AML 細胞を注入した後、ドキシサイクリンにより初日から RNA の枯渇が活性化した (図 1 C)。移植後 25 日目に、マウスの骨髄と脾臓からのヒト白血病細胞の生着を、mCD45⁺ - hCD45⁺ + hCD33⁺ + AnV - マーカーで評価した (図 1 C)。その結果、shCAL # 1 および shCAL # 2 を注射したマウスでは、MOLM - 14 (shCTR = 13.9 M vs shCAL # 1 = 0.3 M vs shCAL # 2 = 0.1 M、図 1 D) および OCI - AML3 細胞 (shCTR = 17.2 M vs shCAL # 1 = 2.0 M vs shCAL # 2 = 1.7 M、図 1 D) の両方において、AML 芽球が shCTR よりも有意に少ないことが確認された。このように、細胞の腫瘍量が減少することで、マウスの骨髄が維持された。最後に、CALCR L をロックダウンすると、マウスの生存期間が有意に延長した (図 1 E)。この誘導可能なモデルを最大限に活用し、臨床的な妥当性を高めるために、CALCR L の枯渇が既存の疾患に与える影響を評価した。shRNA の発現は、両群の生着レベルが同等であることを確認し、群無作為化を行った後、shCTR または shCAL MOLM14 細胞の移植後 10 日目に誘導した。この確立された疾患モデルにおいて、shCAL AML 細胞を異種移植したマウスでは、疾患が進行した shCTR マウスコホートと比較して、骨髄芽球が著しく減少していることが確認された。さらに、CALCR L をダウンレギュレーションすることで、マウスの生存率が大幅に向上した。以上の結果から、CALCR L は、生体内での AML 細胞の増殖および維持に必要であることが明らかになった。

10

20

【0092】

CALCR L を枯渇させると、AML において細胞のエネルギー状態、BCL2、細胞周期および DNA 修復経路が減少する。

CALCR L の下流にある制御経路を明らかにするために、shCTR vs shCALCR L MOLM - 14 細胞を作製し、トランスクリプトームおよび機能性の比較アッセイを行った。興味深いことに、CALCR L のロックダウンは、623 個の遺伝子の発現を有意に減少させ、278 個の遺伝子の発現を増加させた (FDR < 0.05、p 値 < 0.05)。ミトコンドリア代謝は、AML における細胞の増殖と生存の重要な調節因子として浮上していることから (Scotland ら、2013 年、Skrtic ら、2015 年、Molina ら、2018 年)、まず、CALCR L の枯渇がこの経路に与える影響を分析した。GSEA の結果、shCALCR L MOLM - 14 細胞では、ミトコンドリアの酸化代謝に関連する遺伝子シグネチャーが大幅に枯渇していた。さらに、OCR を測定したところ、基礎的な OCR は減少したが、最大呼吸は維持され、予備能力は増加した。このことは、細胞が必要に応じてミトコンドリアの利用を促進できる可能性を示唆している。また、ミトコンドリアの ATP 産生量の大幅な減少と、ミトコンドリアの転写因子 TFAM のダウンレギュレーションも観察された。最後に、CALCR L の非存在下では細胞の基礎エネルギー状態が低下しており、shCALCR L 細胞が増殖状態から静止状態へと移行していることが示唆された。この仮説と一致するように、データマイニング解析により、shCTR 細胞では、細胞周期および DNA インテグリティ経路に関する遺伝子が著しく濃縮されていることが示された。ウェスタンブロットングにより、CALCR L の枯渇が RAD51 の発現と CHEK1 および BCL2 のタンパク質レベルに影響を与えていることが確認された。これは、G0/G1 期の細胞の蓄積と関連していた。興味深いことに、CALCR L を欠損させると、E2F1、P53、FOXO1 など、重要な細胞周期制御因子とされるいくつかの転写因子の遺伝子情報に影響を与えることが、エンリッチメント解析により明らかになった。

30

40

【0093】

次に、最近、慢性骨髄性白血病由来の LSCs の生物学における重要性が議論されている E2F1 転写因子に着目した (Pellicano et al. 2018)。私たちはまず、CALCR L の枯渇が E2F1 の活性の著しい低下とよく関連していることを確認した。そして、E2F1 のロックダウンが、MOLM - 14 および OCI - AML3 の両方において、RA

50

D51、CHK1のタンパク質発現に影響を与え、細胞増殖、細胞周期の進行を阻害し、高い細胞死を誘導することを実証した。さらに、E2F1の枯渇は、細胞およびミトコンドリアのエネルギー状態に影響を与えた。これらの結果は、E2F1がCALCRLの下流に位置し、細胞の増殖、生存、代謝を支配していることを強く印象づけた。次に、CALCRLがAMLの初代細胞の増殖を制御しているかどうかを調べた。興味深いことに、まずCALCRLのタンパク質レベルがメチルセルロース中でのクローン形成能と正の相関関係にあることを確認した。予想通り、CALCRLを欠損させるとコロニー数が減少し、BCL2とRAD51のタンパク質レベルも低下した。これらの結果から、CALCRLはAML芽球の増殖に関与し、DNA修復プロセスに関わる重要な経路を制御していることが示唆された。

10

【0094】

CALCRLのダウンレギュレーションは白血病細胞を化学療法薬シタラピンとイダルビシンに感作する。

BCL2、CHK1、またはFOXO1など、CALCRLによってポジティブに制御されているタンパク質を考慮して(Davidら、2016年、Khanら、2017年、Konoplevaら、2016年)、CALCRLが化学療法抵抗性プロセスに関与しているという仮説を立てた。そこで、CALCRLの枯渇により、MOLM-14細胞およびOCI-AML3細胞は、細胞生存率、細胞死の誘導、アポトーシスタンパク質CASPASE-3およびPARPの切断の増加のいずれにおいても、シタラピンおよびイダルビシンに感作された。さらに、ADMやE2F1を枯渇させても、細胞が化合物に対して感作されることも明らかにした。これにより、ADM-CALCRL-E2F1軸が*in vitro*での薬剤耐性に関与していることが示された。これらの結果を生体内で確認するために、我々はCALCRLを標的とした誘導性shRNAのモデルを使用した。これらの誘導型shRNAが、構成型shRNAで観察された感作性をよく再現していることを*in vitro*で検証した後、shCTRまたはshCAL#2を導入したMOLM-14細胞をNSGマウスの血液中に注入した。10日後、shRNAの発現を活性化し、マウスに30mg/kg/dayのシタラピンを5日間投与した(図2A)。その結果、AraCとshCALCRLを併用することで、shCTR+/AraCおよびshCALCRL単独と比較して、全芽球数が有意に減少し(図2B)、より高い確率で細胞死が誘導され、マウスの生存期間が延長されたことを示すことができた(図2C)。

20

30

また、shCTRを発現させ、ビヒクルまたはAraCで処理したMOLM-14をフローサイトメトリーで選別し、さらなる実験のために*in vitro*でプレーティングした。興味深いことに、1週間の培養後、AraC処理マウスの細胞は、AraC(EC50:ビヒクル群2.238 μ M vs AraC処理群6.712 μ M)およびイダルビシン(EC50:ビヒクル群28.64nM vs AraC処理群60.55nM)に対してより耐性を示した。これらの結果は、両薬剤に共通する耐性メカニズムが時間の経過とともに持続することを強く示唆するものであった。次に、*in vivo*でAraCを投与した細胞では、CALCRLのタンパク質発現レベルが高くなるだけでなく、RAD51とBCL2がわずかに増加したが、CHK1は未投与と同様であったことを示した。この生体内で獲得した化学療法抵抗性におけるCALCRLの役割を評価するために、我々はこれらの細胞でCALCRLを枯渇させることに取り組んだ。その結果、CALCRLを2種類のshRNAでノックダウンすると、ビヒクルで処理した細胞もAraCで処理した細胞も、AraCとイダルビシンに感作された。驚くべきことに、AraCで処理した細胞にshCALCRL #1および#2を導入した場合のAraCおよびイダルビシンのEC50は、ビヒクルで処理したマウスのMOLM-14にshCTRを導入した場合に観察されたものと同様であった。これは、CALCRLとその下流のシグナル伝達経路の増加が、細胞の化学療法抵抗性を完全には説明できないものの、部分的には説明できることを示唆している。以上の結果から、CALCRLがAML細胞の化学療法抵抗性を促進することが明らかになった。

40

【0095】

50

CALCR L 依存的な BCL 2 の発現は、高いオキソ状態と化学療法剤に対する抵抗性を維持するために必要である。

我々は以前、AraC (シタラビン) 治療後、残存細胞は酸化代謝が悪化しており、従来の化学療法と組み合わせることでミトコンドリアを標的にすることがAMLにおける革新的な治療法になる可能性を提案した (Farge et al.) 我々の細胞におけるCALCR L の枯渇は酸化代謝を低下させたので、AraC と関連して細胞のエネルギー状態を評価した。その結果、CALCR L のノックダウンは、AraC に起因する基礎呼吸量、最大呼吸量または予備能力の増加を有意に打ち消した。さらに、ミトコンドリアのATP 産生量がAraC に反応して減少することも確認したが、ECAR には影響がなかった。この結果を受けて、私たちはBCL 2 に注目した。BCL 2 は、薬剤耐性やAML細胞の酸化状態の制御に関与していることがすでに報告されている。まず我々は、MOLM - 14 においてBCL 2 を過剰発現させても、OCR、ミトコンドリアATP 産生、ECAR は変化しないことを示し、BCL 2 の基礎レベルがミトコンドリアのエネルギー状態の制御に関与する必要がないことを示唆した。しかし、AraC 処理に反応して、BCL 2 を過剰発現させると、最大呼吸と同様の予備能力を救済するのに十分であることが確認されたが、基礎呼吸は救済されなかった。このことから、CALCR L - BCL 2 軸が、ミトコンドリアのAraC に対する応答能力を維持する役割を果たしていると考えられる。

また、ミトコンドリアのATP 産生やECAR も影響を受けなかったため、エネルギー産生とは無関係であった。最後に、BCL 2 の過剰発現は、CALCR L の枯渇、AraC やイダルビシンの併用によって誘導されるベースのアポトーシスを完全に阻害した。

10

20

【0096】

化学療法はCALCR L 陽性の白血病幹細胞を選択する

私たちは、AraC 投与マウスの臨床的に適切なPDXモデルを用いて、初代AMLサンプリングの化学療法に対するCALCR L の役割に取り組んだ (Farge et al., 2017)。NSGマウスの血液中に初代細胞を注入した後、生着が確認されたら、マウスを60 mg / kg / day のAraC で5日間治療し、8日目に犠牲にして最小残存病変を調べた (図3A)。10種類のPDXを試験し、AraC への反応性に応じて、低反応 (FC Vehicle / AraC < 10) または高反応 (FC > 10) にランク付けした (図3B)。CALCR L 陽性細胞の割合は、低反応群で2倍高く (3.578% 対 7.786%)、陽性細胞の割合と腫瘍縮小率の間には逆の線形相関が見られた ($R^2 = 0.418$) (図3C および 3D)。さらに、微小残存病変の細胞では、CALCR L 陽性の芽球の割合が有意に増加し (5.6% 対 23%)、調査したどのサブ集団でも観察された。

30

一方で、CALCR L 陽性細胞の平均蛍光強度は概ね一定であった。これらの結果は、化学療法によってCALCR L 陽性細胞が選択され、むしろ芽球のCALCR L 発現レベルが上昇したことを示唆している。化学療法に対するCALCR L の役割をLSCs の観点からさらに検討するために、診断時と再発時、免疫不全マウスへの注入後のシングルセルRNA-seq (scRNA-seq) アッセイと、CALCR L + 細胞とCALCR L - 細胞の幹細胞頻度の測定を組み合わせるアプローチを用いた。まず、診断時のscRNA-seq 解析では、異なる遺伝子発現シグネチャーを持つ2つの細胞クラスターが検出された。マウスへの注入後、クラスター1のみが存在していたことから、この遺伝子シグネチャーを持つ細胞のみがNSGマウスに移植できたことになる。さらに、GSEA解析により、このクラスターはCALCR L__UP (我々のトランスクリプトームで以前に定義されたもの) およびLSC +__UP (Epper tらにより機能的に定義されたもの) の遺伝子に富むことが示された。再発時には、クラスター1' (クラスター1に関連) のみが存在し、CALCR L__UP、LSC +__UP、Relapse__UP (Hackl et al.) の各遺伝子に濃縮されていた。最後に、診断時と再発時にCALCR L - 細胞集団とCALCR L + 細胞集団を選別した後、マウスに注入して実施したLDA研究では、CALCR L - 細胞集団に比べて、診断時にはCALCR L + 細胞集団が幹細胞に有意に富むことが示された。再発時には、CALCR L - とCALCR L + の細胞集団でLSCの頻度が全体的に増加していることが観察され、両集団が幹細胞の表現型を獲得してい

40

50

ることが示唆された。

【0097】

最近、Shlushらは、2つの状況からなる再発のエレガントなモデルを提案した。1つ目のモデルは、「再発の起源 - プライミティブ」(Rop)と呼ばれ、再発はHSPCや異種移植後にのみ検出される稀なLSCクローンから発生する。2つ目のモデルは「再発起源 - コミット」(Roc)と呼ばれ、再発クローンは免疫表現型的にコミットされた白血病細胞から発生し、バルク細胞は幹性の転写プロファイルを保持している(Shlush et al.)。私たちはこのトランスクリプトームデータベースを解析し、診断時に、Rop表現型よりもRoc表現型の芽球でCALCR Lの発現が高く、幹細胞の特徴を保有する細胞でのCALCR Lの発現と一致することを確認しました(データは示していない)。興味深いことに、Ropの患者では再発時にCALCR Lが強く増加しており、これはこの病期に幹細胞の特性を持つクローンが出現したと相関していた(データ未提示)。これらの観察結果は、CALCR Lを高レベルで発現している稀な(Rop)または豊富な(Roc)再発関連LSC集団が事前に存在しているという我々の仮説を支持するものであった。

10

【0098】

もう一つの課題は、LSCsの化学療法抵抗性におけるCALCR Lの役割を明らかにすることであった。初代AML細胞をNSGマウスに注入し、生着させてAraCで処理した後にヒト細胞を選別し、マウスに再注入する前にsiCTRまたはsiCALCR Lをトランスフェクトして、幹細胞の頻度を調べた(図4A)。その結果、骨髄でも脾臓でも、siCTRに比べてsiCALCR Lでは幹細胞の頻度が大幅に減少していることが確認された(図4B)。さらに、AraCを投与した条件では、ビヒクルを投与した条件に比べて有意な減少が見られたことから、残存する化学療法抵抗性幹細胞のCALCR Lへの依存性が高いことが示唆された。これらの結果は、化学療法によって、LSCに富み、CALCR Lに陽性の細胞集団が選択されるという仮説を強く支持するものである。

20

【0099】

考察

LSC集団の表現型(Taussigら、2010年、Eppertら、2011年、Sarryら、2011年)だけでなく、薬剤感受性(Fargeら、2017年、Boydら、2018年)についても高い可塑性と不均一性があるため、LSC選択的な標的療法の臨床的有効性はAML治療では証明されていない。しかし、化学療法への耐性など、この細胞集団の本質的な特性に焦点を当てた基礎研究は、AMLにおける改善されたより特異的な治療法の開発に決定的に必要である。

30

【0100】

本研究は、造血幹細胞の生物学と薬剤耐性に関する重要な知見を提供するとともに、ADM受容体CALCR Lが造血幹細胞のマスターレギュレーターであることを明らかにした。本研究では、LSCsを機能的に特徴づけるEppertの研究に基づき、CALCR L遺伝子が正常な細胞に比べて白血病コンパートメントで過剰に発現していることを初めて明らかにした。CALCR Lは、HIF1 やATF4などのLSC関連転写因子によって特異的にアップレギュレートされる可能性がある(Wangら、2011; van Galenら、2018)。実際、ADMとCALCR Lの両方は、5'フランキング領域にコンセンサスな低酸素応答要素(HRE)を有しており、HIF1 で制御される遺伝子である(Nikitenkoら、2003)。最近では、統合されたストレス応答と転写因子ATF4がAML細胞の増殖に関与し、HSCとLSCで特異的に活性化することが明らかにされている(van Galenら、2018年、Heydtら、2018年)。興味深いことに、定常状態ではなく増殖ストレス下にあるネズミのHSCsの維持は、CALCR Lシグナルに依存している(Suekane et al., 2019)。したがって、CALCR Lは、白血病の造血をサポートし、AML細胞の高い増殖率によって誘発されるストレスを克服する可能性がある。

40

【0101】

50

今回の研究結果は、CALCR Lの発現を標的とすることで、クローン形成能力、細胞周期の進行、およびDNA修復やゲノム安定性に関連する遺伝子に影響を与えることを明確に示している。癌幹細胞やLSCが主に静止していることで化学療法から保存されているとすれば、最近の研究では、LSCはより活発な循環表現型も示すことが示唆されている (Iwasakiら、2015年、Peiら、2018年)。C型レクチンCD93は、LSCの活動に富む、活発に循環する非静止期のAML細胞のサブセットに発現している (Iwasakiら、2015)。最近、Peiらは、AMPK-FIS1軸を標的にすることで、ミトファジーが阻害され、AMLの細胞周期停止が誘導され、初代AMLにおけるLSCの可能性が枯渇することを示した。これらの結果は、増殖状態が異なるLSCのサブ集団が存在することと一致している。さらに、FIS1を除去すると、いくつかの遺伝子 (CCND2、CDC25A、PLK1、CENPO、AURKBなど) や、CALCR Lノックダウン後にも確認されたE2F1遺伝子シグネチャーの発現低下が誘導される。近年、E2F1がCMLの幹/前駆細胞の増殖および生存状態の制御に極めて重要な役割を果たしていることが提唱されている (Pellicanoら、2018年)。いくつかのシグナル伝達経路、例えばMAPK、CDK/cyclinまたはPI3K/AKTは、ADM/CALCR L軸によって刺激されることが記載されており、pRB/E2F1複合体の活性を制御する可能性がある (Hallstromら、2008年; Wangら、1998年)。c-MycやCEBP など、LSCsで活性化される他のシグナルメディエーターは、E2F1の転写を調節し、E2F1タンパク質とE2F遺伝子プロモーターとの相互作用を可能にして、AMLにおけるG1/SでのDNA複製、細胞増殖および生存に不可欠な遺伝子を活性化する (Leungら、2008年、O'Donnellら、2005年、Rishiら、2014年)。このように、CALCR Lの下流の細胞内シグナルを解析することで、LSCsの維持と化学療法抵抗性に重要な新しい経路が明らかになった。

10

20

30

40

【0102】

再発時に存在する、化学療法によって消失したR-LSCの特徴を明らかにすることは、R-LSCを根絶するための新たな治療戦略を開発するために必要である。Boyd氏らは、LSCプールの回復を見送って疾患の再生を担う、Aracの即時かつ急性の反応中の一過性の状態のLeukemic Regenerating Cells (LRC)の存在を提唱している (Boydら、2018年)。この魅力的なモデルと化学療法後のMRDの動態において、CALCR L陽性のAML細胞はこのLRC亜集団の一部であり、CALCR Lは化学療法抵抗性の原発性AMLのLSCポテンシャルの維持に不可欠である。化学療法によってCALCR L陽性の細胞だけが助かるのか、あるいはストレスに対する適応反応を誘導してCALCR Lの発現を増加させるのかを明らかにするのは興味深いことである。化学療法に反応して活性化される転写因子を同定し、化学療法に対する急性反応に関する知識を深める必要がある。したがって、AMLのMRDを特異的に根絶し、再発を予防するために、CALCR Lを標的とした治療法を臨床的に検討すべきである。最後に、神経ペプチドCGRPのCALCR Lへの結合を防ぐいくつかの分子が他の疾患における治療のために開発されているため (Hutchingsら、2017年、Schuster and Rapoport、2017年)、これはAMLにおけるADM-CALCR L軸を拮抗させるための将来の薬理学的アプローチを促進する。

【0103】

以上のことから、我々のデータは、CALCR Lが*in vivo*でAMLの発生を維持するために必要な新しい幹細胞アクターであることを明確に示している。この受容体は化学療法抵抗性メカニズムに関連する遺伝子を制御しており、この受容体を欠損させると、*in vitro*および*in vivo*でシタラピンとアントラサイクリンの両方に対してAML細胞が感作される。このことは、これらの薬剤に抵抗性を示すLSCが、これらの抵抗性メカニズムに関連する共通の活性化経路を持っていることを示している。これらの結果は、CALCR Lが抗LSC療法のための新規かつ有望な治療標的候補であることを強く示唆している。

50

【 0 1 0 4 】

参考文献

本出願を通じて、様々な参考文献が、本発明が関連する技術の状態を説明している。これらの文献の開示内容は、参照により本開示に組み込まれる。

【 0 1 0 5 】

【表 2】

Boyd, A.L., Aslostovar, L., Reid, J., Ye, W., Tanasijevic, B., Porras, D.P., Shapovalova, Z., Almakadi, M., Foley, R., Leber, B., et al. (2018). Identification of Chemotherapy-Induced Leukemic-Regenerating Cells Reveals a Transient Vulnerability of Human AML Recurrence. *Cancer Cell* 34, 483–498.e5.

10

20

30

40

50

Chen, Y., Jacamo, R., Konopleva, M., Garzon, R., Croce, C., and Andreeff, M. (2013). CXCR4 downregulation of let-7a drives chemoresistance in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Invest.* *123*, 2395–2407.

David, L., Fernandez-Vidal, A., Bertoli, S., Grgurevic, S., Lepage, B., Deshaies, D., Prade, N., Cartel, M., Larrue, C., Sarry, J.-E., et al. (2016). CHK1 as a therapeutic target to bypass chemoresistance in AML. *Sci. Signal.* *9*, ra90-ra90. 10

Eppert, K., Takenaka, K., Lechman, E.R., Waldron, L., Nilsson, B., van Galen, P., Metzeler, K.H., Poepl, A., Ling, V., Beyene, J., et al. (2011). Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat. Med.* *17*, 1086–1093.

Farge, T., Saland, E., de Toni, F., Aroua, N., Hosseini, M., Perry, R., Bosc, C., Sugita, M., Stuani, L., Fraisse, M., et al. (2017). Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov.* *7*, 716–735. 20

Gentles, A.J. (2010). Association of a Leukemic Stem Cell Gene Expression Signature With Clinical Outcomes in Acute Myeloid Leukemia. *JAMA* *304*, 2706.

Hackl, H., Steinleitner, K., Lind, K., Hofer, S., Tosic, N., Pavlovic, S., Suvajdzic, N., Sill, H., and Wieser, R. (2015). A gene expression profile associated with relapse of cytogenetically normal acute myeloid leukemia is enriched for leukemia stem cell genes. *Leuk. Lymphoma* *56*, 1126–1128. 30

Hallstrom, T.C., Mori, S., and Nevins, J.R. (2008). An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death. *Cancer Cell* *13*, 11–22.

Heydt, Q., Larrue, C., Saland, E., Bertoli, S., Sarry, J.-E., Besson, A., Manenti, S., Joffre C., and Mansat-De Mas, V. (2018). Oncogenic FLT3-ITD supports autophagy via ATF4 in acute myeloid leukemia. *Oncogene* *37*, 787–797. 40

【 0 1 0 6 】

【表 3】

Hutchings, C.J., Koglin, M., Olson, W.C., and Marshall, F.H. (2017). Opportunities for therapeutic antibodies directed at G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 787–810.

wasaki, M., Liedtke, M., Gentles, A.J., and Cleary, M.L. (2015a). CD93 Marks a Non-Quiescent Human Leukemia Stem Cell Population and Is Required for Development of MLL-Rearranged Acute Myeloid Leukemia. *Cell Stem Cell* 17, 412–421. 10

Khan, I., Halasi, M., Zia, M.F., Gann, P., Gaitonde, S., Mahmud, N., and Gartel, A.L. (2017). Nuclear FOXM1 drives chemoresistance in AML. *Leukemia* 31, 251–255.

Konopleva, M., Pollyea, D.A., Potluri, J., Chyla, B., Hogdal, L., Busman, T., McKeegan E., Salem, A.H., Zhu, M., Ricker, J.L., et al. (2016). Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov.* 6, 1106–1117. 20

【 0 1 0 7 】

30

40

50

【表 4】

- Lagadinou, E.D., Sach, A., Callahan, K., Rossi, R.M., Neering, S.J., Minhajuddin, M., Ashton, J.M., Pei, S., Grose, V., O'Dwyer, K.M., et al. (2013). BCL-2 Inhibition Targets Oxidative Phosphorylation and Selectively Eradicates Quiescent Human Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12, 329–341.
- Leung, J.Y., Ehmann, G.L., Giangrande, P.H., and Nevins, J.R. (2008). A role for Myc in facilitating transcription activation by E2F1. *Oncogene* 27, 4172–4179. 10
- Molina, J.R., Sun, Y., Protopopova, M., Gera, S., Bandi, M., Bristow, C., McAfoos, T., Morlacchi, P., Ackroyd, J., Agip, A.-N.A., et al. (2018). An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat. Med.* 24, 1036–1046.
- Ng, S.W.K., Mitchell, A., Kennedy, J.A., Chen, W.C., McLeod, J., Ibrahimova, N., Arruda, A., Popescu, A., Gupta, V., Schimmer, A.D., et al. (2016). A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature* 540, 433–437. 20
- Nikitenko, L.L., Smith, D.M., Bicknell, R., and Rees, M.C.P. (2003). Transcriptional regulation of the CRLR gene in human microvascular endothelial cells by hypoxia. *FASEB J.* 17, 1499–1501.
- O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C. V., and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839–843.
- Pei, S., Minhajuddin, M., Adane, B., Khan, N., Stevens, B.M., Mack, S.C., Lai, S., Rich, J.N., Inguva, A., Shannon, K.M., et al. (2018). AMPK/FIS1-Mediated Mitophagy Is Required for Self-Renewal of Human AML Stem Cells. *Cell Stem Cell* 23, 86–100.e6. 30
- Pellicano, F., Park, L., Hopcroft, L.E.M., Shah, M.M., Jackson, L., Scott, M.T., Clarke, C.J., Sinclair, A., Abraham, S.A., Hair, A., et al. (2018). hsa-mir183/EGR1 –mediated regulation of E2F1 is required for CML stem/progenitor cell survival. *Blood* 131, 1532–1544.
- Rishi, L., Hannon, M., Salome, M., Hasemann, M., Frank, A.-K., Campos, J., Timoney, J., O'Connor, C., Cahill, M.R., Porse, B., et al. (2014). Regulation of Trib2 by an E2F1-C/EBP feedback loop in AML cell proliferation. *Blood* 123, 2389–2400. 40

Sarry, J., Murphy, K., Perry, R., Sanchez, P. V, Secreto, A., Keefer, C., Swider, C.R., Strzelecki, A., Cavelier, C., Récher, C., et al. (2011). Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD / SCID / IL2R γ c-deficient mice. 121.

Schuster, N.M., and Rapoport, A.M. (2017). Calcitonin Gene-Related Peptide-Targeted Therapies for Migraine and Cluster Headache. *Clin. Neuropharmacol.* 40, 169–174. 10

Suekane, A., Saito, Y., Nakahata, S., Ichikawa, T., Ogoh, H., Tsujikawa, K., and Morishita, K. (2019). CGRP-CRLR/RAMP1 signal is important for stress-induced hematopoiesis. *Sci. Rep.* 9, 429.

Taussig, D.C., Vargaftig, J., Miraki-Moud, F., Griessinger, E., Sharrock, K., Luke, T., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., Agrawal, S.G., et al. (2010). Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood* 115, 1976–1984. 20

Van Galen P., Hovestadt V, Wadsworth II MH, Hughes TK (2019). Single-Cell RNA-Seq Reveals AML Hierarchies Relevant to Disease Progression and Immunity. *Cell* 1265-1281.e24

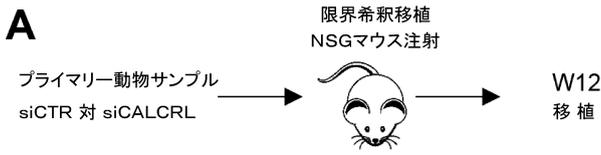
Wang, S., Ghosh, R.N., and Chellappan, S.P. (1998). Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 7487–7498. 30

Wang, Y., Liu, Y., Malek, S.N., Zheng, P., and Liu, Y. (2011). Targeting HIF1 α eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell* 8, 399–411.

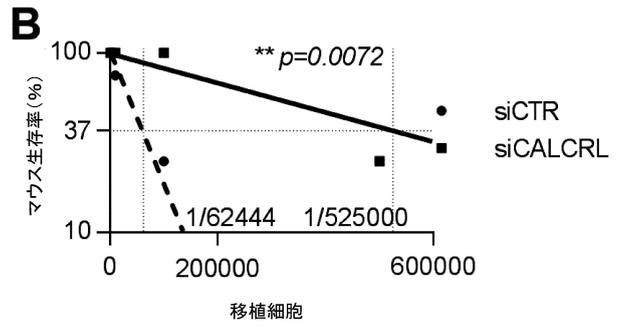
(2013). Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 368, 2059–2074. 40

【 図 面 】

【 図 1 A 】

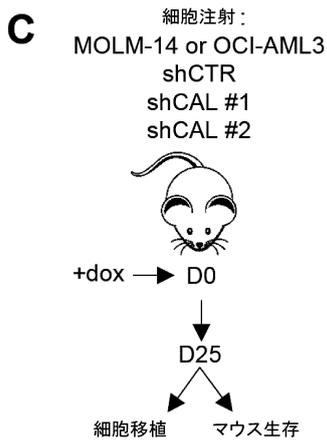


【 図 1 B 】

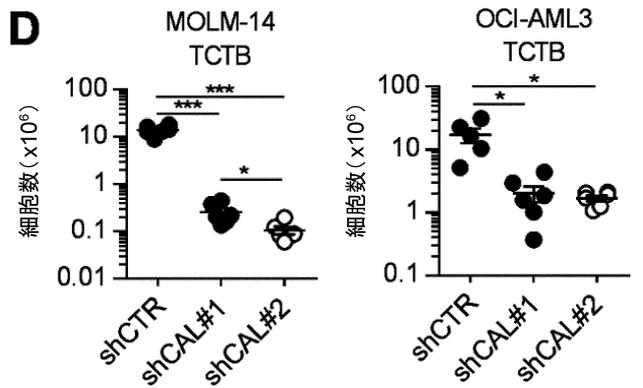


10

【 図 1 C 】

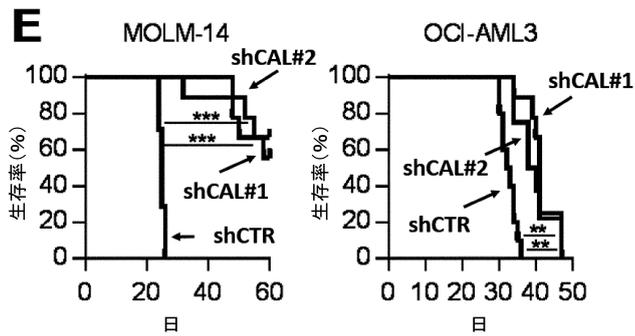


【 図 1 D 】

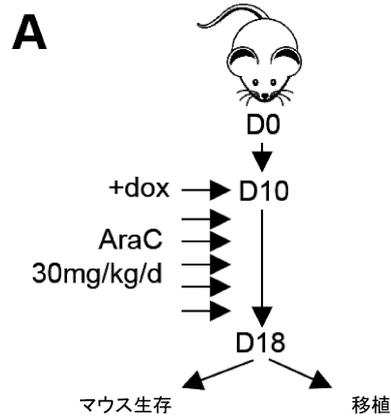


20

【 図 1 E 】



【 図 2 A 】

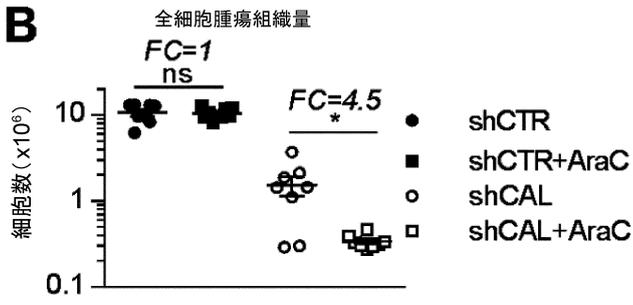


30

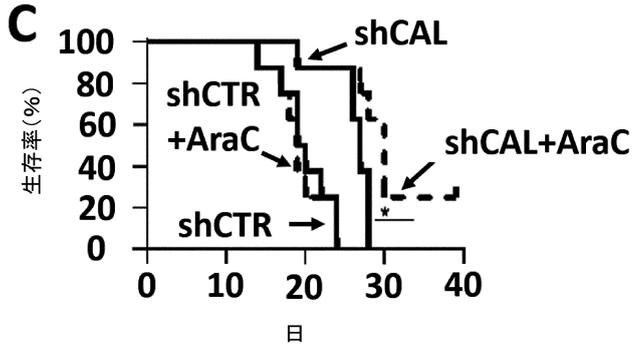
40

50

【 図 2 B 】

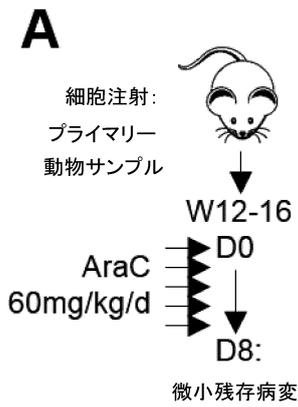


【 図 2 C 】

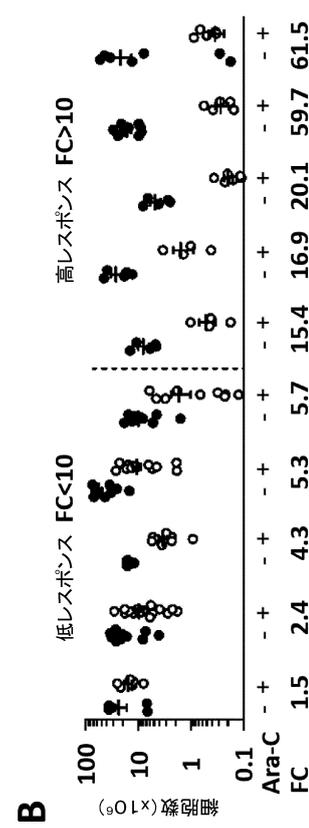


10

【 図 3 A 】



【 図 3 B 】



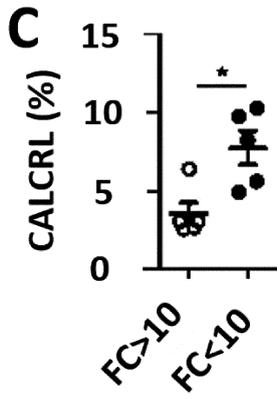
20

30

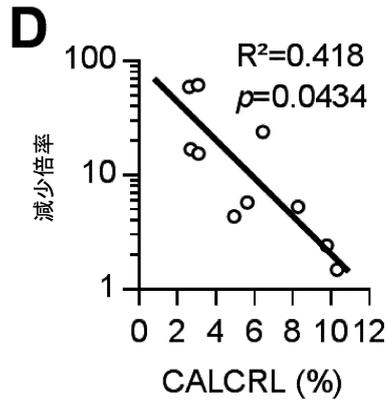
40

50

【 図 3 C 】

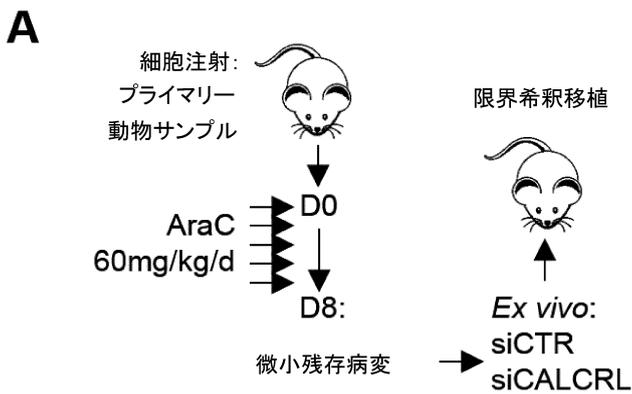


【 図 3 D 】

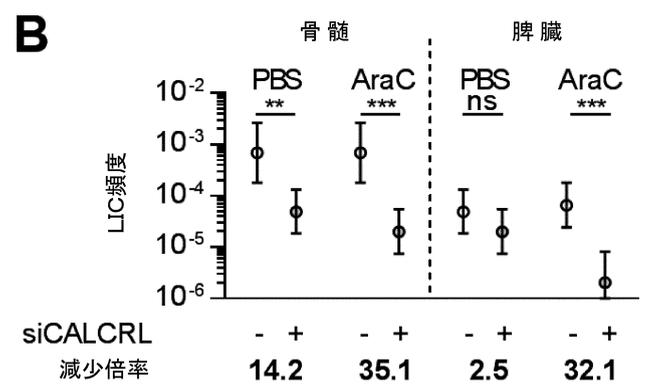


10

【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



20

【 配列表 】

2022512860000001.app

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2019/080174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/395 C12N5/00 A61P35/02 C12N15/113 ADD.		
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) C07K A61K C12N A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHATURVEDI, A ET AL: "Pan-mutant-IDH1 inhibitor BAY1436032 is highly effective against human IDH1 mutant acute myeloid leukemia in vivo", LEUKEMIA., vol. 31, no. 10, 31 January 2017 (2017-01-31), pages 2020-2028, XP055513616, US ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/leu.2017.46 abstract; figures 2-5 page 2021 - page 2027 -/--	2,11-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *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 10 January 2020		Date of mailing of the international search report 20/01/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schulz, Regine

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/080174

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	& FRANCESCA PELLICANO ET AL: "hsa-mir183/EGR1 -mediated regulation of E2F1 is required for CML stem/progenitor cell survival", BLOOD, vol. 131, no. 14, 5 April 2018 (2018-04-05), pages 1532-1544, XP055587087, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2017-05-783845 -----	
X	ITIDAL KAAFARANI ET AL: "Targeting adrenomedullin receptors with systemic delivery of neutralizing antibodies inhibits tumor angiogenesis and suppresses growth of human tumor xenografts in mice", THE FASEB JOURNAL, vol. 23, no. 10, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 3424-3435, XP055442463, US ISSN: 0892-6638, DOI: 10.1096/fj.08-127852 abstract; figures 1-5 page 3425, left-hand column, paragraph 3d full -----	1-14
A	TEJAL CHOKSI ET AL: "Comparison of the expression of calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) with CGRP and adrenomedullin binding in cell lines", BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 136, no. 5, 1 July 2002 (2002-07-01), pages 784-792, XP055586942, UK ISSN: 0007-1188, DOI: 10.1038/sj.bjp.0704761 abstract; figures 1-5; tables 1, 2 page 786, right-hand column, paragraph 1st full ----- -/--	1-16

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2019/080174

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FARGE THOMAS ET AL: "Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism", CANCER DISCOVERY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 7, no. 7, 30 June 2017 (2017-06-30), pages 716-735, XP009513011, ISSN: 2159-8274, DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0441 abstract; figures 1, S3-S6 page 718, left-hand column, paragraph 1st full - page 710</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	15,16
X	<p>DI LIDDO ROSA ET AL: "Adrenomedullin in the growth modulation and differentiation of acute myeloid leukemia cells", INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 48, no. 4, April 2016 (2016-04), pages 1659-1669, XP000951302, abstract; figures 1-8; table 1 page 1664 - page 1665 page 1667, left-hand column</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	15,16
X	<p>CANALES TANIA MARTIANEZ ET AL: "Specific Depletion of Leukemic Stem Cells: Can MicroRNAs Make the Difference?", CANCERS, vol. 9, no. 7, July 2017 (2017-07), XP009513008, ISSN: 2072-6694 abstract; figures 1-4; table 1 page 1 - page 3 page 7, last paragraph - page 8</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	2,11-16
X	<p>PRADEEP SINGH CHAUHAN ET AL: "Expression of genes related to multiple drug resistance and apoptosis in acute leukemia: response to induction chemotherapy", EXPERIMENTAL AND MOLECULAR PATHOLOGY, vol. 92, no. 1, 19 October 2011 (2011-10-19), pages 44-49, XP028464114, ISSN: 0014-4800, DOI: 10.1016/J.YEXMP.2011.09.004 [retrieved on 2011-10-19] abstract; figures 1, 2; tables 1-5 page 46 - page 48</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	15,16

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/080174

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	XINAN HOLLY YANG ET AL: "Systematic computation with functional gene-sets among leukemic and hematopoietic stem cells reveals a favorable prognostic signature for acute myeloid leukemia", BMC BIOINFORMATICS, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 16, no. 1, 24 March 2015 (2015-03-24), page 97, XP021220160, ISSN: 1471-2105, DOI: 10.1186/S12859-015-0510-7 abstract; figures 1-5; tables 1-4 -----	
X,P	SARRY JEAN-EMMANUEL ET AL: "Adrenomedullin Receptor Calcrl Drives Drug Resistance of Leukemic Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia", BLOOD, vol. 132, no. Suppl. 1, 29 November 2018 (2018-11-29), page 1449, XP009513009, & 60TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY (ASH); SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 01 -04, 2018 the whole document -----	2,11-16

10

20

30

40

1

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 9/08 (2006.01)
G 0 1 N 33/48 (2006.01)
 C 0 7 K 16/46 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 0 7 K 16/30 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/04 (2006.01)
 C 1 2 N 5/09 (2010.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 N 15/113 (2010.01)

F I

A 6 1 P 43/00 1 0 5
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 A 6 1 K 47/64
 A 6 1 K 9/08
 G 0 1 N 33/48 M
 C 0 7 K 16/46
 C 1 2 N 15/13
 C 0 7 K 16/30
 C 1 2 Q 1/04
 C 1 2 N 5/09
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 15/113 1 4 0 Z

テーマコード (参考)

4 C 0 8 5
 4 H 0 4 5

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
 K,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),O
 A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
 B,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

2 . T R I T O N

U N I V E R S I T A I R E D E T O U L O U S E

フランス国、エフ - 3 1 3 0 0 トゥールーズ、オテル - デュー・ボン・ヌフ、リュ・ヴィグエリ
 - 2

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72)発明者 サリー , ジャン - エマニュエル

フランス国、3 1 0 3 7 トゥールーズ、アヴニユ・ユベール・キュリアン 2、アンセルム / ユペ
 エス、セエールセテ・ユ 1 0 3 7

(72)発明者 ラルー , クレマン

フランス国、3 1 0 3 7 トゥールーズ - セデックス・1、セエス・5 3 7 1 7、アヴニユ・ユベ
 ール・キュリアン 2、ユ 1 0 3 7 - セエールセテ

(72)発明者 リシェ , クリステイアン

フランス国、3 1 0 3 7 トゥールーズ、アヴニユ・ユベール・キュリアン 2、セエールセテ・ユ
 1 0 3 7

F ターム (参考)

2G045 AA26

4B063 QA01 QA14 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ79 QQ96 QR48 QS33
 QS38

4B065 AA93X AB01 AC14 AC20 BA02 BB25 BB37 BC03 BC07 BC11
 BD08 BD09 BD12 BD39 CA23 CA44 CA46

4C076 AA11 AA12 BB11 CC27 EE59

4C084 AA17 MA17 MA66 NA14 ZB271 ZB272

4C085 AA13 AA14 BB11 BB36 CC02 CC23 EE01 GG01

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 BA72 CA40 DA76 EA20 EA51 FA74