

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-533404
(P2020-533404A)

(43) 公表日 令和2年11月19日(2020.11.19)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 47/54 (2017.01)	A61K 47/54	4C076
A61K 47/64 (2017.01)	A61K 47/64	4C084
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4C085
A61P 31/12 (2006.01)	A61P 31/12	
A61P 31/04 (2006.01)	A61P 31/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2020-534821 (P2020-534821)	(71) 出願人	520070932 グラディエーター バイオサイエンシーズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 94941 カリフォルニア州, ミルバレー, イースト ストロベリー ドライブ 305
(86) (22) 出願日	平成30年9月5日 (2018.9.5)	(74) 代理人	110001656 特許業務法人谷川国際特許事務所
(85) 翻訳文提出日	令和2年4月30日 (2020.4.30)	(72) 発明者	ハーミストン, テリー アメリカ合衆国 94941 カリフォルニア州, ミルバレー, イースト ストロベリー ドライブ 305
(86) 國際出願番号	PCT/US2018/049624		
(87) 國際公開番号	W02019/051002		
(87) 國際公開日	平成31年3月14日 (2019.3.14)		
(31) 優先権主張番号	62/569,411		
(32) 優先日	平成29年10月6日 (2017.10.6)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/554,530		
(32) 優先日	平成29年9月5日 (2017.9.5)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

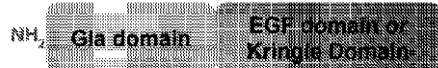
(54) 【発明の名称】細胞内送達法

(57) 【要約】

本開示は、細胞内への進入を促進するためにGLAドメインを利用した、分子の細胞内送達法に関する。

【選択図】 図1E

Figure 1E An embodiment of a GLA-component



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞内ペイロード送達法であって、

a) カルボキシグルタミン酸成分 (GLA成分) に連結されたペイロード、
を含む分子と細胞を接触させる工程を含み、

前記GLA成分はGLAドメインまたはその活性断片を含むが、GLAタンパク質由來の活性触媒ドメインは含まない、

前記方法。

【請求項 2】

GLAドメインまたはその活性断片が、トロンビン、第VII因子、第IX因子、第X因子、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、オステオカルシン、マトリックスGLAタンパク質、GAS6、トランスサイレチン (Transthretein)、ペリオスチン、プロリンリッチGLA1、プロリンリッチGLA2、プロリンリッチGLA3、およびプロリンリッチGLA4から独立して選択される、請求項1に記載の方法。 10

【請求項 3】

GLAドメインまたはその活性断片がプロテインS由来である、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記構築物が、トロンビン、第VII因子、第IX因子、第X因子、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、オステオカルシン、マトリックスGLAタンパク質、GAS6、トランスサイレチン (Transthretein)、ペリオスチン、プロリンリッチGLA1、プロリンリッチGLA2、プロリンリッチGLA3、およびプロリンリッチGLA4から選択されるEGFドメインを含む、請求項1～3のうちのいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 5】

前記構築物がプロテインSから選択されるEGFドメインを含む、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記GLA成分が、配列番号6に示される配列またはHisタグを持たないその誘導体を含む、請求項1～5のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記GLAドメイン成分がクリングルドメインをさらに含む、第1項～第6項のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 8】

前記クリングルドメインが、活性化転写因子2 (ATF)；第XII因子 (F12)；トロンビン (F2)；ヒアルロナン結合タンパク質2 (HABP2)；肝細胞増殖因子 (HGF)；肝細胞増殖因子アクチベーター (HGFAC)；Kremenタンパク質1 (KREME1)；KREME2；リポ蛋白 (a) (LPA)；LPAL2；マクロファージ活性化タンパク質 (Macrophage-stimulating protein) (MSPまたはMST1)；ホスホイノシド3キナーゼ相互作用タンパク質1 (Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1) (PIK3IP1)；組織プラスミノーゲン活性化物質 (Tissue plasminogen activator) (PLAT)；ウロキナーゼ (PLAU)；プラスミン (PLG)；PRSS12；膜貫通受容体型チロシンキナーゼROR1 (Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR1) (ROR1)；および膜貫通受容体型チロシンキナーゼROR2 (Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR2) (ROR2)を含む群から選択されるタンパク質由来である、請求項7に記載の方法。 40

【請求項 9】

インビトロで実施される、請求項1～8のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞内送達がインビトロの細胞に対するものであり、例えば前記GLA成分とペイロードとを含む分子が患者に投与される、請求項1～8のうちのいずれか一項に記載の方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 1 1】

前記細胞が非アポトーシス性である、請求項 1 ~ 1 0 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記細胞がアポトーシス性であり、例えば、がん細胞、病原体感染細胞（ウイルス感染細胞、細菌感染細胞、または寄生虫感染細胞など）のような異常細胞である、請求項 1 ~ 1 0 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記細胞が幹細胞であり、係る成体幹細胞は前駆細胞を含む、請求項 1 ~ 1 2 のうちのいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 1 4】

前記幹細胞が表面マーカー CD 3 4 を有する、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記幹細胞ががん幹細胞である、請求項 1 3 または請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記幹細胞が造血幹細胞（haemopoietic stem cell）である、請求項 1 3 ~ 1 5 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記造血幹細胞（haemopoietic stem cell）が非がん性である、請求項 1 6 に記載の方法。 20

【請求項 1 8】

前記 GLA 成分が前記ペイロードと複合体形成している、請求項 1 ~ 1 7 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記ペイロードが薬剤または生物学的治療薬を含み、例えば、抗ウイルス剤、抗細菌剤、抗寄生虫剤、抗がん剤、抗がん剤治療（化学療法剤など）を含む、請求項 1 ~ 1 8 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記ペイロードが、毒素、高分子（例えば、合成高分子または天然高分子）、生物学的に活性なタンパク質（例えば酵素、他の抗体または抗体フラグメント）、薬剤（小分子（化学成分）、化学療法剤）、放射性核種（特に放射性ヨウ化物、放射性同位元素、例えば^{9 9 m}Tc）、金属キレート化剤、ナノ粒子、およびレポーター基（蛍光標識もしくは発光標識、または NMR 分光法もしくは ESR 分光法で検出できる化合物など）を含む、請求項 1 ~ 1 9 のうちのいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 2 1】

前記 GLA 成分とペイロードとを含む分子をがん患者に投与することを含む、請求項 1 ~ 3 0 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記がんが上皮がんであり、例えば、結腸直腸がん、精巣がん、肝臓がん、胆道がん、前立腺がん、膀胱がん、グリア芽腫、メラノーマ、乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、子宮がん、胃がん、食道がん、甲状腺がん、腎がん、膀胱がん、脳がん、頭頸部がん、もしくは肺がんである、または、前記がんが血液のがんであり、例えば、白血病、リンパ腫、骨髄腫、および慢性骨髄増殖性疾患であり、例えば AML であり得る、請求項 3 1 に記載の方法。 40

【請求項 2 3】

前記薬剤が抗ウイルス剤、抗寄生虫剤、または抗菌剤である、請求項 1 9 ~ 3 2 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記薬剤が抗ウイルス剤である、請求項 3 3 ~ 3 7 のうちのいずれか一項に記載の方法

50

。

【請求項 25】

前記抗寄生虫剤が、抗マラリア剤（キニーネおよび関連物質、クロロキン（chloroquine）、アモジアキン、ピリメタミン、プログアニル、スルホンアミド類、メフロキン、アトバコン、ブリマキン、アルテミシニン（artemisinin）およびその誘導体、ハロファントリル、ドキシサイクリン、クリンダマイシンなど）、スルファジアジン、チニダゾール、パロモマイシン（アメーバ症、ジアルジア症、レーシュマニア症、および条虫をはじめとする治療に用いられ得る）、およびこれらの2つ以上の組み合わせから選択される、請求項19～40のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記ペイロードが前記細胞の内部で活性型に変換される、請求項1～42のうちのいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、細胞内への進入を促進するためにGLAドメインを利用した、分子の細胞内送達法に関する。

【背景技術】

【0002】

GLAドメインは、トロンビン、第VII因子、第IX因子、第X因子、プロテインC、プロテインS（PrS）、プロテインZ、オステオカルシン、マトリックスGLAタンパク質、GAS6、トランスサイレチン（Transthrelin）、ペリオスチン、プロリンリッチGLA1、プロリンリッチGLA2、プロリンリッチGLA3、およびプロリンリッチGLA4などの多くのGLAタンパク質に含まれている。

【0003】

いわゆるGLAタンパク質のGLAドメインは、がん細胞や病原体感染細胞のような、アポトーシス細胞の表面上のホスファチジルセリン（PtdS、別名PS）と結合することができる。この触媒ドメインを除いた、ホスファチジルセリンと特異的に結合する分子が、国際公開第2014/151535号および同第2014/151683号（参照によって本明細書に援用される）で開示されている。

【0004】

GLAドメイン（ビタミンK依存性カルボキシル化/カルボキシグルタミン酸ドメイン）は、アミノ配列（amino sequence）中のグルタミン酸残基がビタミンK依存性翻訳後カルボキシル化によって修飾されてカルボキシグルタミン酸（G1a）となった、タンパク質ドメインである。

【0005】

前記GLAドメインは、2つのカルボン酸残基の間でカルシウムイオンのキレート化によってカルシウムイオンと結合する。これらの残基が、成熟型G1aタンパク質のN末端の端から始まり、保存された芳香族残基で終わる、領域の一部となる。この結果、保存されたG1a-X(3)-G1a-X-Cysモチーフが、前記ドメインの中央に存在することとなり、これが、カルボキシラーゼによる基質認識に重要と考えられる。

【0006】

アネキシンVも、ホスファチジルセリンと結合し、細胞内に内部移行されると考えられている。これは、アネキシンVの三量体構造が細胞膜を変形させて、新規の細胞侵入門を開けるためである。例えば、Kenis et al The Journal of Biological Chemistry Vol 279, No. 50, Issue of December 10, pp. 52623-52629, 2004を参照されたい。興味深いことに、アネキシンVの単量体変異体は細胞内に侵入しない。しかし、驚くべきことに、本発明者らによって、GLAドメインを含む特定の構築物を用いることで、本開示の分子が単量体である場合であっても、迅速に分子を、比較的大型の分子であっても、細胞内に輸送できることが確認された。

10

20

30

40

50

【0007】

本開示の分子はアネキシンVと同様の結合をしない。本発明者らは、本GLA成分がアネキシンVと同じ結合特性を有していないことを示唆する証拠を有している。すなわち、ホスファチジルセリンのターゲティングには微妙な差異がある。

【0008】

これは、既知および既存の薬剤およびエフェクター／レポーター分子をより効果的に送達することができ、例えば、有効性を増加させ、および／またはオフターゲットな作用を減少させることができるために、治療用途および／または診断用途に重要な意味を持つ。

【0009】

さらに、治療薬は、細胞内でのみ活性化される「プロ」形態で提供される場合があり、これは、治療濃度域を増大させ、例えば、より大きな用量を送達することを可能にし、および／またはオフターゲット効果をさらに減少させ得る。

【0010】

さらに、細胞内病原体、例えばウイルス、細菌（結核など）および寄生虫（プラスモディウムなど）を、以前に可能であったよりも効果的に標的にできる。細胞内病原体は、一度細胞内に入ると細胞の防御機構によって保護されるため、効果的な治療が従来から非常に困難であった。

【0011】

さらに、本開示の方法は、細胞内標的を標識し、それにアクセスし、および／またはそれをモニターすることを可能にする。

【0012】

さらに、がん細胞に「選択的」ながん治療の細胞内送達は、がん細胞に深刻なストレスを与え、例えばアポトーシスまたは壊死を介して細胞死を強制する可能性がある。がん細胞のストレスとなる物理的な内部攻撃に対してがん細胞が耐性を持つことは困難である。従って、本開示の技術は、がんの治療にプラスの影響を与える可能性がある。

【発明の概要】

【0013】

以下、本開示を下記項目に要約する：

1 a .

細胞内ペイロード送達法であって、

カルボキシグルタミン酸成分（GLA成分）に連結されたペイロードを含む分子と細胞を接触させる工程を含み、

前記GLA成分はGLAドメインまたはその活性断片を含むが、GLAタンパク質由來の活性触媒ドメインは含まない、

前記方法。

1 b .

カルボキシグルタミン酸成分（GLA成分）に連結されたペイロードを含む分子であって、

前記GLA成分はGLAドメインまたはその活性断片を含むが、GLAタンパク質由來の活性触媒ドメインは含まない、

細胞内治療および／または細胞内診断で使用される前記分子。

1 c .

カルボキシグルタミン酸成分（GLA成分）に連結されたペイロードを含む分子であって、

前記GLA成分はGLAドメインまたはその活性断片を含むが、GLAタンパク質由來の活性触媒ドメインは含まない、

細胞内治療用且つ／または細胞内診断用の医薬の製造で使用される前記分子。

2 .

GLAドメインまたはその活性断片が、トロンビン、第VII因子、第IX因子、第X因子、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、オステオカルシン、マトリックスG

10

20

30

40

50

L A タンパク質、G A S 6、トランスサイレチン (Transthretin)、ペリオスチン、プロリンリッチG L A 1、プロリンリッチG L A 2、プロリンリッチG L A 3、およびプロリンリッチG L A 4 から独立して選択される、第1a項、第1b項、または第1c項に記載の方法またはその用途の分子。

3.

G L A ドメインまたはその活性断片が、トロンビン、第V I I 因子、第I X 因子、第X 因子、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、およびG A S 6、例えばプロテインS、から独立して選択され、特に配列番号1に示される配列を含む、第2項に記載の方法またはその用途の分子。

4.

前記G L A 成分がE G F ドメイン、例えばカルシウム結合E G F ドメイン、をさらに含む、第1a項、第1b項、または第1c項～第3項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

5.

前記E G F ドメインが、トロンビン、第V I I 因子、第I X 因子、第X 因子、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、オステオカルシン、マトリックスG L A タンパク質、G A S 6、トランスサイレチン (Transthretin)、ペリオスチン、プロリンリッチG L A 1、プロリンリッチG L A 2、プロリンリッチG L A 3、およびプロリンリッチG L A 4 から選択される、第4項に記載の方法またはその用途の分子。

6.

前記E G F ドメインが、トロンビン、第V I I 因子、第I X 因子、第X 因子、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、およびG A S 6、例えばプロテインS、から選択される、第5項に記載の方法またはその用途の分子。

7.

前記G L A 成分が、配列番号6に示される配列またはH i s タグを持たないその誘導体、特に配列番号6、を含む、第1a項、第1b項、または第1c項～第6項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

8.

前記G L A ドメイン成分がクリングルドメインをさらに含む、第1a項、第1b項、または第1c項～第7項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

9.

前記クリングルドメインが、活性化転写因子2 (A T F)；第X I I 因子 (F 1 2)；トロンビン (F 2)；ヒアルロナン結合タンパク質2 (H A B P 2)；肝細胞増殖因子 (H G F)；肝細胞増殖因子アクチベーター (H G F A C)；K r e m e n タンパク質1 (K R E M E N 1)；K R E M E N 2；リポ蛋白 (a) (L P A)；L P A L 2；マクロファージ活性化タンパク質 (Macrophage-stimulating protein) (M S P またはM S T 1)；ホスホイノシチド3キナーゼ相互作用タンパク質1 (Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1) (P I K 3 I P 1)；組織プラスミノーゲン活性化物質 (Tissue plasminogen activator) (P L A T)；ウロキナーゼ (P L A U)；プラスミン (P L G)；P R S S 1 2；膜貫通受容体型チロシンキナーゼR O R 1 (Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR1) (R O R 1)；および膜貫通受容体型チロシンキナーゼR O R 2 (Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR2) (R O R 2) を含む群から選択されるタンパク質由来である、第8項に記載の方法またはその用途の分子。

10.

インビトロで実施される、第1a項、第1b項、または第1c項～第9項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

11.

前記細胞内送達がインビボの細胞に対するものであり、例えば前記G L A 成分とペイロードとを含む分子が患者に投与される、第1項～第9項のいずれか一項に記載の方法また

10

20

30

40

50

はその用途の分子。

12.

前記細胞が非アポトーシス性である、第1a項、第1b項、第1c項～第11項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

13.

前記細胞がアポトーシス性であり、例えば、がん細胞、病原体感染細胞（ウイルス感染細胞、細菌感染細胞、または寄生虫感染細胞など）のような異常細胞（diseases cell）である、第1a項、第1b項、第1c項～第11項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

14.

前記細胞が幹細胞であり、そのような成体幹細胞としては前駆細胞が挙げられる、第1a項、第1b項、または第1c項～第13項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

15.

前記幹細胞が表面マーカーCD34を有する、第14項に記載の方法またはその用途の分子。

16.

前記幹細胞ががん幹細胞である、第14項または第15項に記載の方法またはその用途の分子。

17.

前記幹細胞が造血（haemopoietic）幹細胞、例えば造血（haemopoietic）がん幹細胞、である、第14項～第16項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

18.

前記造血幹細胞が非がん性である、第17項に記載の方法またはその用途の分子。

19.

前記GLA成分がペイロードと複合体形成している、第1a項、第1b項、または第1c項～第18項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

20.

前記ペイロードが、薬剤または生物学的治療薬、例えば、抗ウイルス剤、抗細菌剤、抗寄生虫剤、抗がん剤、抗がん剤治療または化学療法剤、ウイルスまたはウイルスベクター（腫瘍溶解性ウイルスなど）を含む、第1a項、第1b項、または第1c項～第19項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

21.

前記ペイロードが、毒素、高分子（例えば、合成高分子または天然高分子）、生物学的に活性なタンパク質（例えば酵素、他の抗体または抗体フラグメント）、薬剤（小分子（化学成分））、化学療法剤、放射性核種（特に放射性ヨウ化物、放射性同位元素、例えば^{99m}Tc）、金属キレート化剤、ナノ粒子、およびレポーター基（蛍光標識もしくは発光標識、またはNMR分光法もしくはESR分光法で検出できる化合物など）を含むから選択される、第1a項、第1b項、または第1c項～第20項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

22.

前記毒素が、アウリスタチン（例えば、MMAE（モノメチルアウリスタチンE）、MMAF（モノメチルアウリスタチンF））、ピロロベンゾジアゼピン（PBD）、ドキソルビシン、デュオカルマイシン、メイタンシノイド（例えば、N2' - デアセチル - N2' - (3 - メルカプト - 1 - オキソプロピル) - メイタンシン（DM1）、N2' - デアセチル - N2' - (4 - メルカプト - 1 - オキソペンチル) - メイタンシン（DM3）、およびN2' - デアセチル - N2' - (4 - メチル - 4 - メルカプト - 1 - オキソペンチル) - メイタンシン（DM4））、カリケアマイシン（calicheamicin）、ドラスタチン、メイタンシン、 - アマニチン、緑膿菌外毒素（PE38）、リシンA鎖、ジフテリア毒素、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質（PAP）、サポリン、ゲロニン、およびツブリシ

10

20

30

40

50

ンから選択される、第21項に記載の方法またはその用途の分子。

23.

前記化学療法剤が、テモゾロミド、エポシロン類、メルファラン、カルムスチン、ブスルファン、ロムスチン、シクロホスファミド、ダカルバジン、ポリフェプロサン、イホスファミド、クロラムブシル、メクロレタミン、ブスルファン、シクロホスファミド、カルボプラチニン、シスプラチニン、チオテバ、カペシタビン、ストレプトゾシン、ビカルタミド、フルタミド、ニルタミド、酢酸ロイプロリド、塩酸ドキソルビシン、硫酸ブレオマイシン、塩酸ダウノルビシン、ダクチノマイシン、リポソーム化クエン酸ダウノルビシン、リポソーム化塩酸ドキソルビシン、塩酸エピルビシン、塩酸イダルビシン、マイトマイシン、ドキソルビシン、バルルビシン、アナストロゾール、クエン酸トレミフェン、シタラビン、フルオロウラシル、フルダラビン、フロクスウリジン、インターフェロン-2b、プリカマイシン、メルカプトプリン、メトトレキサート、インターフェロン-2a、酢酸メドロキシプロゲステロン、リン酸エストラムスチンナトリウム、エストラジオール、酢酸ロイプロリド、酢酸メゲストロール、酢酸オクトレオチド、ジエチルスチルベストロール(deethylstilbestrol)ニリン酸、テストラクトン、酢酸ゴセレリン、リン酸エトポシド、硫酸ビンクリスチン、エトポシド、ビンプラスチン、エトポシド、硫酸ビンクリスチン、テニポシド、トラスツズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、リツキシマブ、エキセスタン、塩酸イリノテカン(irinotecan hydrochloride)、アスパラギナーゼ、塩酸ゲムシタビン、アルトレタミン、塩酸トポテカン、ヒドロキシ尿素、クラドリビン、ミトタン、塩酸プロカルバジン、酒石酸ビノレルビン、ペントスタチンナトリウム(pentostatin sodium)、ミトキサントロン、ペガスパルガーゼ、デニロイキンジフチトクス(denileukin diftitox)、アリトレチノイン(alretinoin)、ポルフィマー、ベキサロテン、パクリタキセル、ドセタキセル、三酸化ヒ素、トレチノイン、およびこれらの2つ以上の組み合わせから選択される、第20項または第21項に記載の方法またはその用途の分子。

24.

前記化学療法剤が、アルキル化剤、代謝拮抗剤(チミジル酸合成酵素阻害剤を含む)、タキサン、アントラサイクリン、微小管阻害剤(植物性アルカロイドを含む)、およびこれらの2つ以上の組み合わせから選択される、第20項～第23項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

25.

前記化学療法剤が、パクリタキセル、ドセタキセル、アブラキサン、カバジタキセル(carbazitaxel)、これらのうちいずれか1つの誘導体、および上記のいずれかの2つ以上の組み合わせから選択される、第24項に記載の方法またはその用途の分子。

26.

前記アルキル化剤が、ナイトロジエンマスター、ニトロソ尿素、テトラジン、アジリジン、プラチナ製剤およびその誘導体、非古典的アルキル化剤、並びにこれらの2つ以上の組み合わせから選択される、第24項または第25項に記載の方法またはその用途の分子。

27.

前記プラチナ製剤が、シスプラチニン、カルボプラチニン、オキサリプラチニン、サトラプラチニン、ピコプラチニン、ネダプラチニン、トリプラチニン、リポプラチニン、およびこれらの2つ以上の組み合わせから選択される、第26項に記載の方法またはその用途の分子。

28.

前記アルキル化(alkylating)が、葉酸代謝拮抗剤(例えば、メトレキサートおよびペメトレキセド)、プリン類似体(例えば、チオプリン類、例えば、アザチオプリン、メルカプトプリン、チオプリン、フルダラビン(リン酸エステル形態を含む)、ペントスタチン、およびクラドリビン)、ピリミジン類似体(例えば、フルオロピリミジン、例えば、5-フルオロウラシル、およびそのプロドラッグ、例えばカペシタビン[Xeloda(登録商標)]、フロクスウリジン、ゲムシタビン、シタラビン、デシタビン、ラルチ

10

20

30

40

50

トレキセド（トムデックス）塩酸塩、クラドリビン、および 6 - アザウラシル、並びにこれらの 2 つ以上の組み合わせから選択される代謝拮抗剤である、第 24 項～第 27 項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

29.

前記アントラサイクリンが、ダウノルビシン（ダウノマイシン）、ダウノルビシン（リポソーム化）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、ドキソルビシン（リポソーム化）、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、およびこれらの 2 つ以上の組み合わせから選択され、特にドキソルビシンである、第 23 項～第 28 項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

30.

前記薬剤が、例えば、トボイソメラーゼ阻害剤、PARP 阻害剤、およびこれらの以上の組み合わせから選択される抗がん剤である、第 20 項～第 29 項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

31.

前記抗がん剤治療が、例えば、Y-90、P-32、I-131、In-111、Sr-89、Re-186、Sm-153、Sn-117m、およびこれらの 2 つ以上の組み合わせから選択される放射性核種である、第 20 項～第 30 項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

32.

前記GLA 成分とペイロードとを含む分子をがん患者に投与することを含む、第 1a 項、第 1b 項、または第 1c 項～第 31 項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

33.

前記がんが上皮がんであり、例えば、結腸直腸がん、精巣がん、肝臓がん、胆道がん、グリア芽腫、メラノーマ、前立腺がん、膵がん、乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、子宮がん、胃がん、食道がん、甲状腺がん、腎がん、膀胱がん、脳がん、頭頸部がん、もしくは肺がんである、または、前記がんが血液のがんであり、例えば、白血病、リンパ腫、骨髄腫、および慢性骨髄増殖性疾患であり、例えばAML、ALL、CML、およびCLL であり得る、第 32 項に記載の方法またはその用途の分子。

34.

前記薬剤が抗ウイルス剤、抗寄生虫剤、または抗菌剤である、第 20 項～第 33 項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

35.

抗菌剤が、ペニシリン、セファロスポリン、カルバペネム類、ポリミキシン、リファマイシン、リビアルマイシン、キノロン、スルホンアミド、マクロライド、リンコマイシン、テトラサイクリン、アミノグリコシド、環状リポペプチド（ダフトマイシンなど）、グリシルサイクリン類（チゲサイクリンなど）、オキサゾリジノン類（リネゾリドなど）、およびリピアルマイシン類（フィダキソマイシンなど）から選択される、第 34 項に記載の方法またはその用途の分子。

36.

アシネットバクター（多剤耐性アシネットバクターを含む）、カンジダ（フルコナゾール耐性カンジダを含む）；カンピロバクター（カンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）、カンピロバクター・コリ（*Campylobacter coli*）、およびこれらのうちのいずれか 1 つの薬剤耐性型；クラミジア（*Clamidia*）；ボツリヌス菌（*Clostridium botulinum*）；クロストリジウム・ディフィシル（*Clostridium difficile*）；シトロバクター；腸内細菌科（カルバペネム耐性腸内細菌科および広域スペクトル腸内細菌科（extended spectrum Enterobacteriaceae）を含み、特に、エンテロバクター、大腸菌（*Escherichia coli*）、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ（非チフスサルモネラおよびチフス菌、並びにこれらのうちのいずれか 1 つの薬剤耐性型）、セラチア、赤痢菌（この薬剤耐性型を含む）、ペスト菌（*Yersinia pestis*）、エンテロコッカス（パンコマイシン耐性工

10

20

30

40

50

ンテロコッカスを含む) ; 淋病(淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)を含む) ; リステリア菌(*Listeria monocytogenes*) ; ヒト型結核菌(これらの薬剤耐性型を含む) ; シュードモナス(緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)を含み、特に、この多剤耐性型) ; ブドウ球菌属(例えば、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus Aureus*)、特に、これらのうちいずれか1つのメチシリン耐性型)、連鎖球菌(肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumonia*) (特に薬剤耐性肺炎連鎖球菌)に起因する、蜂巣炎、毛包炎、膿瘍、せつ(boil)、および肺炎など) ; 梅毒；並びにビブリオから選択される細菌感染症に対して、前記G L A成分とペイロードとを含む分子を患者に投与することを含む、第34項または第35項に記載の方法またはその用途の分子。

37.

10

前記抗菌剤が、ピラジンアミド、エタンブトール、リファブチン、カナマイシン、アミカシン、カブレオマイシン、ストレプトマイシン(streptomycin)、レボフロキサシン、モキシフロキサシン、オフロキサシン、パラアミノサリチル酸(para-aminosalicylic)、シクロセリン、テリジドン、チオナミド、プロチオナミド、クロファジミン、リネゾリド、アモキシシリン/クラブラン酸(clavulanate)、チオアセタゾン、イミペネム/シラスタチン、高用量イソニアジド、クラリスロマイシン、およびこれらの2つ以上の組み合わせから選択される、第34項～第36項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

38.

20

前記G L A成分とペイロードとを含む分子を、結核が耐性を有している患者を含む結核患者に投与することを含む、第37項に記載の方法またはその用途の分子。

39.

前記患者が潜伏結核患者を有する、第38項に記載の方法またはその用途の分子。

40.

前記患者が活動性結核患者を有する、第39項に記載の方法またはその用途の分子。

41.

前記T B患者が合併性、例えば寄生虫感染症および/またはウイルス感染症、を有する、請求項38～40のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

42.

30

前記抗菌剤がメトロニダゾールである、第34項～第41項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

43.

前記薬剤が抗ウイルス剤である、第20項～第42項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

44.

40

前記抗ウイルス剤が、下記群、アバカビル、アシクロビル、アシクロビル、アデホビル、アマンタジン、アンプレナビル、アンプリゲン、アルビドール、アタザナビル、アトリプラ、ボセブレビルテット、シドホビル、コンビビル、ダルナビル、デラビルジン、ジダノシン、ドコサノール、エドクスジン、エファビレンツ、エムトリシタシン、エンフビルチド、エンテカビル、侵入阻害剤、ファムシクロビル、ファビピラビル、ホミビルセン、ホスアンプレナビル、ホスカルネット、ホスホネット、ガンシクロビル、イバシタシン、イムノビル、イドクスウリジン、イミキモド、インジナビル、イノシン、インテグラーゼ阻害剤、I I I型インターフェロン、I I型インターフェロン、I型インターフェロン、インターフェロン、ラミブジン、ロピナビル、ロビリド、マラビロック、モロキシジン、メチサゾン、ネルフィナビル、ネビラピン、ネクサビル、ヌクレオシド類似体、オセルタミビル、ペグインターフェロン-2a、ペンシクロビル、ペラミビル、ブレコナリル、ポドフィロトキシン、プロテアーゼ阻害剤、ラルテグラビル、逆転写酵素阻害剤、リバビリン、リマンタジン、リトナビル、ピラミジン(Pyramidine)、サキナビル、スタブジン、相乗増強剤(Synergistic enhancer)(抗レトロウイルス剤)、チャノキ油、テラブレビル、テノホビル、テノホビルジソプロキシル、チプラナビル、トリフルリジン、トリ

50

ジビル、トロマンタジン、ツルバダ、バラシクロビル、バルガンシクロビル、ビクリビロック、ビダラビン、ビラミジン、ザルシタビン、ザナミビル、ジドブジン、およびこれらの組み合わせ、から選択される、第42項に記載の方法またはその用途の分子。

45.

前記ウイルス感染症が、呼吸器合胞体ウイルスまたはインフルエンザウイルス、例えば、A型インフルエンザウイルス (H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、およびH7N9など)、B型インフルエンザウイルスもしくはC型インフルエンザウイルス、またはインフルエンザウイルス、例えば、A型インフルエンザウイルス (H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、およびH7N9など)、B型インフルエンザウイルスもしくはC型インフルエンザウイルス、またはインフルエンザウイルス、例えば、A型インフルエンザウイルス (H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、およびH7N9など)、B型インフルエンザウイルスもしくはC型インフルエンザウイルスである、第43項または第44項に記載の方法またはその用途の分子。

46.

前記抗寄生虫剤が、抗マラリア剤 (キニーネおよび関連物質、クロロキン (chloroquine)、アモジアキン、ピリメタミン、プログアニル、スルホンアミド類、メフロキン、アトバコン、ブリマキン、アルテミシニン (artemisinin) およびその誘導体、ハロファンリン、ドキシサイクリン、クリンダマイシンなど)、スルファジアジン、チニダゾール、パロモマイシン (アーベ症、ジアルジア症、レーシュマニア症、および条虫をはじめとする治療に用いられ得る)、およびこれらの2つ以上の組み合わせから選択される、第34項～第45項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

47.

前記GLA成分とペイロードとを含む分子をマラリア患者に投与することを含む、第46項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

48.

前記ペイロードが前記細胞の内部で活性型に変換される、第1項～第47項のいずれか一項に記載の方法またはその用途の分子。

49.

前記活性型への変換が酵素によって行われる、第48項に記載の方法。

50.

前記酵素が、カルボキシリエステラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase)、パラオキソナーゼ (パラオキソナーゼ2など)、マトリクスマタロプロテアーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -グルクロニダーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、ラクタマーゼ (例えば、ヒト型結核菌およびカンサシ菌によって產生されるもの) およびシトシンデアミナーゼ (cytosine deminase) から選択される、第49項に記載の方法または分子。

【0014】

1つの実施形態では、前記GLA成分は、細胞の表面に露出したホスファチジルセリンと結合し、その後内部移行する。

【0015】

理論に束縛されることを望むものではないが、本発明者らは、生物学的観点から全てのホスファチジルセリンが均等なものであるとは限らないと考えている。本発明者らは、T MEM16F酵素によって曝されるホスファチジルセリンが、免疫抑制に関与しており、本開示の分子によって「見られる」ものである、と考えている。

【0016】

1つの実施形態では、前記細胞はアポトーシス細胞 (すなわち、病気の、傷害を受けた、異常な、且つ/または感染した細胞) である。

【0017】

10

20

30

40

50

1つの実施形態では、前記G L A成分は幹細胞、例えば非アポトーシス細胞、である。

【0018】

すなわち、1つの実施形態では、本開示で開示される分子は細胞内の病原体の治療に利用される。

【0019】

本開示はまた、G L Aドメインまたはその活性断片を含むが、G L Aタンパク質由来の活性触媒ドメインは含まない、細胞内標的化および送達（細胞内ペイロード送達を含む）のための、G L A成分の使用を包含する。

【0020】

前記触媒ドメインが存在しないと、前記分子が細胞に進入することが可能となると思われる。前記触媒ドメインが存在すると、細胞内への進入が阻止され、前記分子が治療目的および診断目的に有用なものになることを妨げる天然の生物学的メカニズムが刺激される。

【0021】

本開示はまた、G L Aドメインまたはその活性断片を含むが、G L Aタンパク質由来の活性触媒ドメインは含まない、細胞内標的化および送達（細胞内ペイロード送達を含み、特に、ペイロードが治療用実体／分子を含む細胞内ペイロード送達）用の医薬の製造のための、G L A成分の使用を包含する。

【発明を実施するための形態】

【0022】

細胞内送達とは、本明細書で使用される場合、ペイロードなどを細胞内部に運ぶことを指す。

【0023】

ペイロードとは、本明細書で使用される場合、G L Aドメインに連結された、特に細胞内送達を目的とした分子を指す。この連結は、溶媒曝露リジンに部分を固定するために例えばマレイミドの化学作用またはクリックケミストリーを用いる化学的結合を通じた連結であり得る。あるいは、この連結は融合であり、例えば、連結された成分がG L A成分を有する融合タンパク質として発現されるペプチド結合であり、例えば、これは蛍光タンパク質または抗体といった特定の検出可能な標識に好適であり得る。リンカーはG L A成分とペイロードとの間に使用され得る。

【0024】

1つの実施形態では、1つのG L A成分につき、1、2、3、4、または5種のペイロードが連結される。

【0025】

G L A成分（本明細書ではカルボキシグルタミン酸成分とも称する）とは、G L Aタンパク質（プロテインSなど）由来のG L Aドメインを含むが、触媒ドメインは含まない、ポリペプチドを指す。前記ポリペプチドはEGFドメインおよび／クリングルドメインをさらに含む場合があり、例えば前記EGFドメインはプロテインS由来である。1つの実施形態では、前記G L A成分は30～300個のアミノ酸残基を含み、例えば、50個、60個、70個、80個、90個、100個、110個、120個、130個、140個、150個、160個、170個、180個、190個、200個、210個、220個、230個、240個、250個、260個、270個、280個、290個、または300個の残基を含む。1つの実施形態では、前記G L A成分は4.5～30kDaの範囲内である。1つの実施形態では、前記G L A成分は配列番号1に示される配列を含む。1つの実施形態では、前記G L A成分は、配列番号6に示される配列またはHisタグを持たないその誘導体を含み、特に配列番号6を含む。

【0026】

G L Aドメイン（ビタミンK依存性カルボキシル化／カルボキシグルタミン酸ドメイン）とは、本明細書で使用される場合、アミノ配列（amino sequence）中のグルタミン酸残基がビタミンK依存性翻訳後カルボキシル化によって修飾されてカルボキシグルタミ

10

20

30

40

50

ン酸 (G1a) となった、タンパク質ドメインである。1つの実施形態では、本開示の分子中に使用されるGLAドメインは、未修飾（野生型）のGLAドメイン由来の30～45個の連続残基を含む。1つの実施形態では、前記GLAドメインは、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、または15個のGLA残基を含む。

【0027】

1つの実施形態では、前記GLA成分の30%以下がGLA残基である。

【0028】

1つの実施形態では、前記GLA成分は1～5個のジスルフィド結合を含み、例えば、1個、2個、3個、4個、または5個のジスルフィド結合を含む。

10

【0029】

前記GLAドメインは、2つのカルボン酸残基の間でカルシウムイオンのキレート化によってカルシウムイオンと結合する。これらの残基が、成熟型G1aタンパク質のN末端の端から始まり、保存された芳香族残基で終わる、領域の一部となる。この結果、保存されたG1a-x(3)-G1a-x-Cysモチーフが、前記ドメインの中央に存在することとなり、これが、カルボキシラーゼによる基質認識に重要と考えられる。

【0030】

GLAドメインは、本明細書で使用される場合、未修飾GLAドメインのアミノ酸のうちの1～10%（1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%または10%など）が置換および欠失を受けている場合があるタンパク質であって、ただし、適切なインビトロアッセイにおいて、修飾後のドメインはネイティブGLAドメイン（未修飾GLAドメイン）のネイティブ状態の活性の少なくとも70%（75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%など）を保持している、前記タンパク質も包含する。1つの実施形態では、完全長の未修飾（野生型）GLAドメインが使用される。

20

【0031】

EGFドメインは、本明細書で使用される場合、保存されたタンパク質ドメインを指すである。EGFドメインは、30～40個程度のアミノ酸残基を含み、動物性タンパク質の大多数で見出されている。EGF様ドメインの出現が最も多く見られるのは、膜結合型タンパク質の細胞外ドメイン、または分泌されることが知られているタンパク質である。EGF様ドメインは6個のシステイン残基を含む。EGF様ドメインの主要構造は、二本鎖シートからループ、そして短いC末端二本鎖シートへと続く構造である。これら2つのシートは通常、大（N末端）シートおよび小（C末端）シートと表される。EGF様ドメインはタンパク質中に多数の直列型コピーとして頻繁に現れ、これらのリピートは通常一緒に折り畳まれて、機能単位としての、一本鎖の直鎖状のソレノイド型ドメインプロックを形成する。1つの実施形態では、使用されるドメインは完全長の未修飾ドメインである。

30

【0032】

EGFドメインは、本明細書で使用される場合、未修飾EGFドメインのアミノ酸のうちの1～10%（1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%または10%など）が置換および欠失を受けている場合があるタンパク質であって、ただし、適切なインビトロアッセイにおいて、修飾後のドメインはネイティブEGFドメイン（未修飾EGFドメイン）のネイティブ状態の活性の少なくとも70%（75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%など）を保持している、前記タンパク質も包含する。1つの実施形態では、前記たんぱく質は完全長の未修飾（野生型）ドメインである。

40

【0033】

クリングルドメインとは、本明細書で使用される場合、3つのジスルフィド結合により安定化された大型ループへと折り畳まれる、自律的なタンパク質ドメインを指す。クリングルドメインは、多数の水素結合と小型の逆平行シートとによって定義される高次構造

50

を有する、三重ループ、3-ジスルフィド架橋構造、を特徴とする。クリングルドメインは血液凝固タンパク質およびフィブリン溶解性タンパク質の全体に見られ、また、M E R O P S ペプチダーゼファミリー S 1 A に属するセリンプロテアーゼである、プロトロンビンおよびウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子をはじめとするいくつかの血漿タンパク質中に種々のコピー数で見られる。

【0034】

クリングルドメインは、本明細書で使用される場合、未修飾クリングルドメインのアミノ酸のうちの 1 ~ 10 % (1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % または 10 % など) が置換および欠失を受けている場合があるタンパク質であって、ただし、適切なインピトロアッセイにおいて、修飾後のドメインはネイティブクリングルドメイン (未修飾クリングルドメイン) のネイティブ状態の活性のうちの少なくとも 70 % (75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % または 100 % など) を保持している、前記タンパク質も包含する。1 つの実施形態では、前記たんぱく質は完全長の未修飾 (野生型) ドメインである。

10

【0035】

本明細書で使用されるタンパク質の活性断片は、未修飾タンパク質の全体に満たないもの (または関連ドメイン) であって、適切なインピトロアッセイにおいて、未修飾の完全長のドメインまたはタンパク質の活性の少なくとも 50 % (60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % または 100 % など) を保持するものである。

20

【0036】

触媒ドメインとは、本明細書で使用される場合、例えば図 1 A に図示されるような、C 末端方向の E G F ドメインの下流にある、ドメイン (または断片) である。

【0037】

腫瘍溶解性ウイルスとは、本明細書で使用される場合、がん細胞に優先的に感染してそれを殺滅する、またはそのがん細胞中で選択的に複製する (例えば、その複製が p 53 などのがん細胞でアップレギュレートされている遺伝子に依存しているため) 、ウイルスを指す。

30

【0038】

ウイルスベクターとは、本明細書で使用される場合、複製欠損性ウイルスを指し、通常は導入遺伝子をコードしているものを指す。1 つの実施形態では、ウイルスベクターは導入遺伝子を含んでおり、例えば治療用導入遺伝子を含む。

【0039】

すなわち、前記腫瘍溶解性ウイルスは、複製可能 (例えば複製適格性または条件付き複製性) または複製欠損性であり得る。通常、前記腫瘍溶解性ウイルスは複製適格性または条件付き複製性となり、特に複製適格性である。感染されたがん細胞は、腫瘍崩壊によって破壊されるので、新たな感染性ウイルス粒子またはビリオンを放出し、残存する腫瘍の破壊を促す。腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍細胞の直接的な破壊を引き起こすだけではなく、宿主の抗腫瘍免疫応答も刺激すると考えられている。1 つの実施形態では、前記腫瘍溶解性ウイルスは導入遺伝子を含んでおり、例えば治療用導入遺伝子を含む。

40

【0040】

1 つの実施形態では、本開示の方法で使用されるウイルスまたはベクターは導入遺伝子を含み、例えば、前記導入遺伝子は、細胞内の欠陥遺伝物質の置換、細胞内での新たな機能もしくは増強された機能の提供、細胞の治療に対する感度増加、細胞内の機能の遮断、または治療用のタンパク質もしくはペプチドの発現のための、導入遺伝子である。

【0041】

インピトロとは、本明細書で使用される場合、ヒトまたは動物の身体で実施されない、実験室での研究を指す。

【0042】

50

インビボとは、本明細書で使用される場合、生体、特にヒトまたは動物における、研究／検査／処置を指す。

【0043】

幹細胞とは、本明細書で使用される場合、分化が可能である未分化細胞を指し、胚性幹細胞および成体幹細胞が含まれ、特に成体幹細胞であり、例えば、前駆細胞、および造血幹細胞 (haemopoietic stem cell) 、筋原幹細胞、骨芽幹細胞 (osteoprogenitor stem cell) 、神経幹細胞、間葉系幹細胞が含まれ、例えば、衛星細胞、放射状グリア細胞、骨髓間質細胞、骨膜、臍臍前駆細胞、内皮前駆細胞、芽細胞、および栄養膜幹細胞などである。

【0044】

1つの実施形態では、前記方法は哺乳類幹細胞、例えばヒト幹細胞、に関する。本明細書で説明される幹細胞は主にヒト幹細胞である。しかし、当業者は必要に応じて、他の哺乳類の、関連性のあるまたは対応する幹細胞集団を特定することができる。例えば、SSEA-1はマウス胚性幹細胞、ヒト生殖系列細胞および胚性癌腫細胞のマーカーであり；SSEA-3は靈長類胚性幹細胞、ヒト胚性生殖系列細胞、ヒト胚性幹細胞および胚性癌腫細胞のマーカーであり；SSEA-4は靈長類胚性幹細胞、ヒト胚性生殖細胞、ヒト幹細胞、胚性癌腫細胞のマーカーであり；CD324はヒトおよびマウスの胚性幹細胞、胚性がん細胞のマーカーであり；CD90はヒトおよびマウスの胚性幹細胞、造血幹細胞、胚性癌腫細胞のマーカーであり；CD117はヒトおよびマウスの胚性幹細胞、造血幹・前駆細胞、神経堤由来メラニン細胞、始原生殖細胞、胚性癌腫細胞のマーカーであり；CD326はヒトおよびマウスの胚性幹細胞、胚性癌腫細胞のマーカーであり；CD9はヒトおよびマウスの胚性幹細胞 (embryonic stems) のマーカーであり；CD24はヒトおよびマウスの胚性幹細胞のマーカーであり；CD29はヒトおよびマウスの胚性幹細胞のマーカーであり；CD59はヒトおよびマウスの胚性幹細胞のマーカーであり；CD133はヒトおよびマウスの胚性幹細胞、胚性癌腫細胞、造血幹細胞のマーカーであり；CD31はヒトおよびマウスの胚性幹細胞のマーカーであり；TRA-1-60はヒト胚性幹細胞、奇形癌 (teratocarcinoma) 、胚性生殖細胞、胚性癌腫細胞のマーカーであり；TRA-1-81はヒト胚性幹細胞、奇形癌 (teratocarcinoma) 、胚性生殖細胞、胚性癌腫細胞のマーカーであり；幹細胞因子 (SCF) はヒトおよび胚性幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、胚性癌腫細胞のマーカーであり；Cripptoはヒトおよびマウスの胚性幹細胞、心筋細胞および胚性癌腫細胞のマーカーである。

【0045】

造血幹細胞 (HSC) または血球芽細胞は、造血発生のプロセスを通じて他の全ての血液細胞を生じる幹細胞である。造血幹細胞は中胚葉から派生し、大部分の骨の芯に含まれる赤色骨髓に局在している。

【0046】

がん幹細胞とは、本明細書で使用される場合、正常幹細胞に関連する特徴、具体的には特定のがん試料中に存在する全ての細胞型を生じる能力、を持つ、腫瘍形成性細胞 (すなわち、腫瘍または血液がんの中に見出されるがん細胞) を指す。例えば、Identification and Targeting of Cancer Stem Cells, Bioessays 2009 Oct; 31 (10) 1038-1049を参照されたい。がん幹細胞は、以下の3つの明確な特性によって定義される：i) 選択的に腫瘍を惹起し腫瘍性増殖を駆動する能力、ii) 自己複製を通じてそれ自体のコピーを限なく生成する能力、および、iii) 分化を通じてより成熟した、幹細胞以外のがん性子孫を生じる能力。がん幹細胞は必ずしも健常幹細胞由来である必要はなく、分化細胞由来であってもよい。

【0047】

CD34は、造血前駆細胞抗原CD34としても知られており、細胞間接着因子としての機能を有する。CD34は、幹細胞集団 (stem population) を濃縮するためのマーカーとして使用することができる。

10

20

30

40

50

【0048】

分子とは、本明細書で使用される場合、最も広い意味で使用され、合成の化学分子を包含するが、たんぱく質、高分子（天然高分子または合成高分子）、標識などの巨大分子も包含する。

【0049】

文脈上特に指示がない限り、タンパク質はポリペプチドを包含する。

【0050】

ペイロードは、薬剤、毒素、高分子、生物学的に活性なタンパク質、放射性核種、金属キレート化剤、標識および／またはレポーター基を含み得る。

【0051】

薬剤とは、本明細書で使用される場合、文脈上特に指示がない限り、低分子量の化学成分、例えば有機化学法によって合成された低分子量化学成分、特に治療用途、特にヒトでの治療用途、が承認または認可または認可途中の分子、を指すことが意図される。本明細書で使用される薬剤は、抗ウイルス性化合物、抗生物質、および抗がん剤治療を包含する。

【0052】

抗ウイルス性化合物（抗ウイルス剤）とは、本明細書で使用される場合、具体的にはウイルス感染症の治療用の医薬クラスを指し、広域抗ウイルス剤だけでなく、特定のウイルスまたは特定のウイルス科に特異的な「狭」域抗ウイルス剤も包含する。

【0053】

抗生物質とは、本明細書で使用される場合、細菌の増殖を阻害する、または細菌を破壊する医薬または薬剤を指す。文脈上特に指示がない限り、抗菌性物質と抗生物質は本明細書においては交換可能とする。

【0054】

抗寄生虫剤とは、本明細書で使用される場合、寄生虫の増殖を阻害する、寄生虫を破壊する、または寄生虫を宿主から除去する、医薬または薬剤を指す。

【0055】

抗がん剤治療は、抗がん剤、化学療法、放射線療法、がん免疫療法などを包含する広義語である。

【0056】

抗がん剤とは、本明細書で使用される場合は通常、小分子がん治療を指す。

【0057】

化学療法とは、本明細書においては、通常は細胞傷害性薬剤を指し、抗悪性腫瘍薬を包含する。

【0058】

生物学的治療薬（別名、バイオ医薬品、生物製剤、または生物学的製剤）は、生物源に「由来」する治療用製品であり、例えば組換えタンパク質および組換え断片であり、抗体、抗体結合性フラグメント（antibody binding fragment）および多特異的抗体分子、並びにこれらの物質を組み合わせた複合体といった抗体分子を包含する。生物学的に活性なタンパク質は生物学的治療薬のサブグループであり、組換えタンパク質およびその活性断片（抗体分子を含む）を包含する。

【0059】

抗体分子は、本明細書で使用される場合、完全長の重鎖および軽鎖を有する完全抗体またはその断片、並びに上記のいずれか1つを含む分子、例えば、Fab、修飾Fab、Fab'、修飾Fab'、F(ab')2、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、シングルドメイン抗体（例えば、VHまたはVLまたはVHH）、scFv、二価抗体、三価抗体、または四価抗体、Bis-scFv、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、並びに上記のいずれかのエピトープ結合性フラグメントを包含する（例えば、Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217を参照）。これらの抗体フラグメントを生成お

10

20

30

40

50

より製造するための方法は当該技術分野において周知である（例えば、Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181を参照）。本発明で使用される他の抗体フラグメントとしては、国際特許出願第2005/003169号、同第2005/003170号および同第2005/003171号に記載のFabおよびFab'フラグメントが挙げられる。多価抗体は、複数の特異性（例えば二重特異性）を含んでもよいし、または単一特異性であってもよい（例えば、国際公開第92/22853号および同第05/113605号）。この例では、2種類の独立した標的タンパク質を中和することが目的であるため、二重特異性抗体および多特異的抗体のバリエントが特に考慮される。

【0060】

抗体およびその結合性フラグメント、特にドメイン抗体、VHH、一本鎖Fv(scfv)、ds-scfvおよびdsFvなどの低分子量抗体フラグメントが、本発明の技術を用いて細胞内に送達され得る。

【0061】

1つの実施形態では、前記抗体またはその結合性フラグメントはチェックポイント阻害剤であり、例えば抗PD-1阻害剤または抗PD-L1阻害剤である。

【0062】

1つの実施形態では、前記抗体分子はヒト抗体またはヒト化抗体である。

【0063】

毒素は有毒物質であり、特に天然源由来のものであり、特にタンパク質である。カリチアマイシンなど、多くの毒素ががん治療に使用されている。さらに、化学療法剤は毒性がある（すなわち毒素）と見なされる場合がある。そのため、毒素の定義は本明細書における他の定義と重複している。しかし、ヘビ毒のような神経毒は毒素ではあるが、化学療法剤ではない。しかし、当業者はこれらの技術的定義に精通しており、本開示との関連意味を理解することができる。

【0064】

診断薬とは、本明細書で使用される場合、診断するための、または疾病状態をモニターもしくは理解するための、分析またはイメージングに使用される薬剤である。診断薬は通常、何らかの方法で可視化、測定、またはモニターできる標識などのレポーター分子を含む。モニターは直接的であっても間接的であってもよい。

【0065】

1つの実施形態では、本開示の分子は細胞内標的、例えば核、を標識することができる。

【0066】

本開示での使用に好適な放射性核種としては、タリウム-201、テクネチウム-99m、ヨウ素-123、ヨウ素131、ヨウ素-125、フッ素-18、および酸素-15が挙げられる。

【0067】

1つの実施形態では、RASまたはRASシグナル経路内のタンパク質と相互作用し阻害する抗体がペイロードに使用される。RAS遺伝子はHRAS、NRAS、およびKRASを含む多重遺伝子族を構成する。RASタンパク質は、細胞内の重要なシグナル伝達のハブとして機能する低分子量グアノシンヌクレオチド結合型GTPアーゼである。RAS/MAPK経路は、その体細胞調節不全ががんの主因の1つであることから、腫瘍形成に関連して広範囲に研究されている。RASはおよそ20%の悪性腫瘍で体細胞変異している（Bos JL, Cancer Res. 49: 4682-4689, 1989）。この特定の場合では、例えば、前記GLA成分はRAS細胞内抗体に融合されることが企図され（Cetin M et al., J Mol Biol. 429:562-573, 2017に記載）、すなわち前記構築物は組換えタンパク質法によって発現され得る。

【0068】

異常細胞とは、本明細書で使用される場合、正常な健常細胞と差異がある、特に1また

10

20

30

40

50

は複数のマーカーの変異またはアップレギュレーションがある、例えば、状態もしくは疾患の素因または状態もしくは疾患の発生に関連付けられる異常；前がん細胞、がん、鎌状赤血球貧血などの状態または疾患と関連付けられる異常がある、細胞を指す。

【0069】

アポトーシスとは、本明細書で使用される場合、正常且つ制御下の役割として生物の成長を引き起こす細胞死経路である。アポトーシスによる細胞死は、壊死などの細胞死機構ほど周辺組織にダメージを与えない。

【0070】

壊死とは、本明細書で使用される場合、疾患または傷害による細胞死である。壊死によって、周辺組織にサイトカインおよび因子が放出され、これが周辺細胞にダメージを与える。壊疽は壊死による細胞死の一例である。

10

【0071】

化学療法剤

文脈上特に指示がない限り、化学療法剤および化学療法または細胞傷害性物質は本明細書では同義的に使用される。

【0072】

化学療法は、本明細書で使用される場合、悪性細胞および悪性組織にとって「選択的に」有害な特定の抗悪性腫瘍性化学物質または薬剤を指すことが意図されており、例えば、アルキル化剤、チミジル酸合成酵素阻害剤を含む代謝拮抗剤、アントラサイクリン系薬剤、植物性アルカロイドを含む微小管阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、PARP阻害剤および他の抗腫瘍剤である。これらの薬剤の多くは重篤な副作用を当然有しているので、この文脈中の選択的は大まかに使用されている。

20

【0073】

好みしい用量は、治療されるがんの性質に基づいて実施者が選択してよい。

【0074】

本開示の方法で使用され得るアルキル化剤の例としては、ナイトロジエンマスター、ニトロソ尿素類、テトラジン類、アジリジン類、プラチン類および誘導体、ならびに非古典的アルキル化剤といったアルキル化剤が挙げられる。

【0075】

白金含有化学療法剤（プラチン類とも称される）の例としては、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、サトラプラチン、ピコプラチン、ネダプラチン、トリプラチン（*triplatin*）およびリポプラチン（*lipoplatin*）（シスプラチンのリポソーム体）、特にシスプラチン、カルボプラチンおよびオキサリプラチンが挙げられる。

30

【0076】

シスプラチンの用量はがんの種類に応じて約20～約270mg/m²の範囲を取る。用量は約70～約100mg/m²の範囲内となる場合が多い。

【0077】

ナイトロジエンマスターとしては、メクロレタミン、シクロホスファミド、メルファン、クロラムブシル、イホスファミドおよびブスルファンが挙げられる。

【0078】

ニトロソ尿素類としては、N-ニトロソ-N-メチル尿素（MNU）、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）およびセムスチン（MeCCNU）、フォテムスチンおよびストレプトゾトシンが挙げられる。テトラジン類としては、ダカルバジン、ミトゾロミドおよびテモゾロミドが挙げられる。

40

【0079】

アジリジン類としては、チオテバ、マイトイシンおよびジアジクオン（AZQ）が挙げられる。

【0080】

本開示の方法で使用され得る代謝拮抗剤の例としては、葉酸代謝拮抗剤（例えば、メトレキサートおよびペメトレキセド）、プリン類似体（例えば、チオプリン類、例えば、

50

アザチオプリン、メルカプトプリン、チオプリン、フルダラビン（リン酸塩形態も含む）、ペントスタチンおよびクラドリビン）、ピリミジン類似体（例えば、フルオロピリミジン、例えば、5-フルオロウラシルおよびそのプロドラッグ、例えばカペシタビン〔ゼローダ（登録商標）〕）、フロクスウリジン、ゲムシタビン、シタラビン、デシタビン、ラルチトレキセド（トムデックス）塩酸塩、クラドリビン並びに6-アザウラシルが挙げられる。

【0081】

本開示の方法で使用され得るアントラサイクリン系薬剤の例としては、ダウノルビシン（ダウノマイシン）、ダウノルビシン（リポソーム体）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、ドキソルビシン（リポソーム体）、エピルビシン、イダルビシン、バルルビシン（現在では膀胱がんの治療にのみ使用されている）およびミトキサントロン、アントラサイクリン類似体、特にドキソルビシン、が挙げられる。

10

【0082】

本開示の方法で使用され得る微小管阻害剤の例としては、ピンカアルカロイド類およびタキサン類が挙げられる。

【0083】

ピンカアルカロイド類としては、完全天然化学薬品、例えばピンクリスチンおよびピンプラスチン、さらに、半合成ピンカアルカロイド類、例えばビノレルビン、ピンデシン、およびピンフルニン、が挙げられる。

20

【0084】

タキサン類としては、パクリタキセル、ドセタキセル、アブラキサン、カバジタキセルおよびその誘導体が挙げられる。本明細書で使用されるタキサン類の誘導体としては、タキソールのようなタキサン類の改質剤（reformulation）が挙げられ、例えばミセル製剤中のものがあり、誘導体としてはまた、合成化学を用いてタキサンである出発物質が改変された化学的誘導体も挙げられる。

【0085】

本開示の方法で使用され得るトポイソメラーゼ阻害剤としては、I型トポイソメラーゼ阻害剤、II型トポイソメラーゼ阻害剤およびII型トポイソメラーゼ毒が挙げられる。I型阻害剤としては、トポテカン、イリノテカン、インドテカン（indotecan）およびインジミテカン（indimotecan）が挙げられる。II型阻害剤としては、ゲニステインおよび以下の構造を有するICRF193が挙げられる。

30

【0086】

II型毒としては、アムサクリン、エトポシド、リン酸エトポシド、テニポシドおよびドキソルビシン並びにフルオロキノロン系抗生物質が挙げられる。

【0087】

1つの実施形態では、化学療法剤はPARP阻害剤である。

【0088】

本開示でペイロードとして使用するのに好適なウイルス

1つの実施形態では、本開示で使用されるウイルスはエンベロープウイルスであり、例えば、ヘルペスウイルス（単純ヘルペス1型など）、ポックスウイルス（ワクシニアウイルス（vaccinia virus）など）、ヘパドナウイルス、フラビウイルス、トガウイルス、コロナウイルス、D型肝炎、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルス（麻疹ウイルスまたはニューカッスル病ウイルスなど）、ラブドウイルス、ブニアウイルス、フィロウイルス、およびラブドウイルス科（水疱性口内炎ウイルスインディアナ株（VSV）など）から選択されるエンベロープウイルスである。

40

【0089】

1つの実施形態では、本開示で使用されるウイルスは非エンベロープウイルスであり、例えば、アデノウイルス科（アデノウイルスなど）、パピローマウイルス科（papillomaviridae）、ピコルナウイルス科（コクサッキーウイルスまたはセネカバレーウイルス（例えば、セネカウイルス属）など）、レオウイルスから選択される非エンベロープウイルス

50

である。

【0090】

1つの実施形態では、前記ウイルスはアデノウイルスであり、例えば、B群ウイルス(特に、Ad3、Ad7、Ad11、Ad14、Ad16、Ad21、Ad34、Ad35、Ad51、またはこれらのキメラ(chimeria)、例えばEnadenotucirev)、C群ウイルス(特に、Ad1、Ad2、Ad5、Ad6、またはこれらのキメラ(chimeria))、D群ウイルス(特に、Ad8、Ad10、Ad13、Ad15、Ad17、Ad19、Ad20、Ad22、Ad30、Ad32、Ad33、Ad36、Ad37、Ad38、Ad39、Ad42、Ad43、Ad44、Ad45、A46、Ad47、Ad48、Ad49、Ad50、またはこれらのキメラ(chimeria))、E群ウイルス(特に、Ad4)、F群ウイルス(特に、Ad40、Ad41、またはこれらのキメラ(chimeria))、並びにB群、C群、D群、E群またはF群ウイルスの2つ以上のキメラ(chimeria)などから選択されるヒトアデノウイルスである。

10

【0091】

ウイルスの大多数が、標的細胞の認識および取り込みと関連した、十分な報告がなされているタンパク質を有している。腫瘍溶解性ウイルスへの、再指示するための、またはより選択的な腫瘍ターゲティングを可能にするための、指向性の変更は、Verheijen and Rottier, *Adv. Virology* 2012: 798526, 2012におけるレビューに記載されている方法を用いて導入され得る。

20

【0092】

未改変ウイルスのターゲティングに関与していない更なるウイルス性細胞表面タンパク質に、遺伝子工学的に、標的化用モチーフを持たせることができる(例えば、Adビリオンマイナーコートタンパク質IX Salisch et al., *PLoS One* 12: e0174728, 2017)。

【0093】

エンベロープウイルスはウイルスカプシドを被覆する外膜(エンベロープ)を有する。エンベロープは通例、宿主細胞膜の部位に由来するが(リン脂質およびタンパク質)、いくつかのウイルスタンパク質も含む。エンベロープ表面上の糖タンパク質は、宿主膜上の受容体部位を特定し結合する働きをする。ウイルスエンベロープはその後、宿主の膜と融合し、カプシドおよびウイルスゲノムを宿主に侵入・感染させる。

30

【0094】

様々な腫瘍溶解性ウイルスが国際公開大2014/13834号(参照によって本明細書に援用される)で開示されている。

【0095】

単純ヘルペスウイルス(HSV)は、4種の重要な糖タンパク質、gD、gH/gL、gB、を利用して細胞に侵入するが、これらは、gDがその受容体、nectin1およびHVEM、のうちの1つに結合することでカスケード様式で活性化される。リガンドおよびscFvをgCおよび/またはgDタンパク質またはgHに挿入することにより、HSVの再ターゲティングが達成されている(Campadelli-Fiume, G et al., *Med Virol* 21: 213-226, 2011, Gatta, V *PLoS Pathog* 11: e1004907, 2015におけるレビュー(Rev))。腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス1型ベクターが臨床用に開発された。これらのウイルスは、複製適格性であり、ウイルス複製、神経病原性、および免疫回避能に影響する遺伝子に変異を有しており、例えば、NV1020(R7020)、d1sptk、d18.36tk、hrR3、R3616、1716などの第一世代ウイルス、G207(MGH-1)、3616UB、SUP、NV1023などの第二世代ウイルス、G47などの第三世代ウイルス、G92A、d12.CALP、Myb34.5などの転写発現ベクター、rRP450などの導入遺伝子発現ベクター、およびタリモジーン・ラハーパレブベック(Talimogene laherparepvec)(T-Vec)などの他のウイルスが挙げられる。HSV-1ベクターは、例えば神経膠腫、メラノーマ、乳がん、前立腺がん、結腸がん、卵巣がん、および肺がんを含む、広範な固形腫瘍の治療に有用であると考えられている。HSV-1ウイルスは、広範な細胞型および細胞種に感染し、生来の細胞溶解性であり、そ

40

50

の複製生活環により宿主細胞の破壊をもたらし、十分に特徴付けられた巨大ゲノム（152K）を有するが、治療用遺伝子を挿入するための最大30,000のスペースを与える多くの非必須遺伝子を含有している。通常、HSVウイルスは安全性の理由から、チミジンキナーゼ遺伝子は変異されない。タリモジーン・ラハーパレプベックは腫瘍溶解性ヘルペスウイルスであり、メラノーマ治療における使用が承認されている。他のヘルペスベースのウイルス（herpes bases virus）としては以下が挙げられる：G207、SEPREH VIR（HSV-1716）（ウイルツ・バイオロジクス社（Virttu Biologics）製）、HSV-1 R3616変異株、HSV-1 1716変異株、NV1020（R7020）、R3616変異株（RL1欠失）、KM100変異株（UL48遺伝子（トランス活性化因子テグメントタンパク質pUL48[VPI6]をコードする）およびRL2遺伝子に挿入を有する）、G92A、Myb34.5変異株およびrQNestin34.5変異株。
10

【0096】

ポックスウイルス：改変ワクシニアアンカラ（MVA）のようなワクシニアウイルスが使用でき（Galmiche MC et al., J Gen Virol 78: 3019-3027, 1997）、MVAは腫瘍関連抗原MUC-1に対するscFvが挿入されたp14融合分子で置換できる（Paul, S et al., Viral Immunol 20: 664-671, 2007）。また、レビュー、Liang L et al., Viruses 6: 3787-3808, 2014、Hsiao JC et al., J Virol 73: 8750-8761, 1999、レビュー、Chen TL and Roffler S, Med Res. Rev. 28: 885-928, 2008、およびKinoshita T et al., J Biochem 144: 287-294, 2008も参照されたい。ジェネレックス社製（Jennerex）のJX-594は、チミジンキナーゼ欠失ワクシニアウイルス+GM-CSFである。GL-ONC1は、前臨床マウスモデルにおいて広範な固形腫瘍の退縮および消失を引き起こす弱毒化ワクシニアウイルス（リステリア菌株）である。
20

【0097】

パラミクソウイルス（麻疹ウイルスまたはニューカッスル病ウイルスなど）、

【0098】

麻疹ウイルス（MeV）は、パラミクソウイルス科の麻疹ウイルス属の一本鎖マイナス鎖エンベロープ（非分節）RNAウイルスである。麻疹ウイルスは2つのエンベロープ糖タンパク質、赤血球凝集素（H）付着タンパク質および融合（F）タンパク質、を有する。付着、侵入、およびその後の細胞間融合は、2つの麻疹受容体、CD46、およびシグナル伝達リンパ球活性化分子（SLAM）を介して起こる。例えば、レビュー、Msouel P et al., Methods Mol Biol 797: 141-162, 2012、Robinson S. and Galanis, E. Expert Opin Biol Ther. 17: 353-363, 2017、Aref S et al., Viruses 8. pii:E294, 2016；（レビュー、Chen TL and Roffler S, Med Res. Rev. 28: 885-928, 2008およびKinoshita T et al., J Biochem 144: 287-294, 2008）、および（Russell SJ and Peng KW, Curr Topic Microbiol. Immunol 330: 213-241, 2009、Robinson S and Galanis, E Expert Opin Biol. Ther 17: 353-363, 2017, Aref S et al., Viruses 8. pii: E294, 2016）を参照されたい。ヒト甲状腺ナトリウム・ヨウ素共輸送体をコードする麻疹ウイルス、すなわちMV-NISは、麻疹ウイルスの弱毒化腫瘍溶解性Edmonston（Ed）株である。放射性ヨウ素イメージングはNISの遺伝子発現をモニターするための新規の手法を提供する。
30

【0099】

ニューカッスル病ウイルスが使用されてもよい。

【0100】

アデノウイルス科：アデノウイルスは、腫瘍溶解性薬剤として使用されている、最も広く研究されているウイルスの1つである。様々なペプチドおよびタンパク質が、ビリオン関連ウイルスタンパク質に組み込まれることで、アデノウイルスの未改変状態の指向性が変化された（レビュー、Verheij MH and Rottier PJM Adv Virol 2012: 798526, 2012）。しかし、これらは全て、核内でのウイルスの構築に依存しており、これが大きな課題となっている。
40
50

【 0 1 0 1 】

他の無エンベロープウイルスとしては、コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、およびレオウイルスが挙げられる。例えは、レビュー、Altan-Bonnet, N, Curr Opin Microbiol 32: 77-81, 2016、およびChen YH et al., Cell 160: 619-630, 2015、レビュー、Chen TL and Roffler S, Med Res. Rev. 28: 885-928, 2008、およびKinoshita T et al., J Biochem 144: 287-294, 2008、およびレビュー、Verheijen MH and Rottier PJM Adv Virol 2012: 798526, 2012を参照されたい。

【 0 1 0 2 】

多数のアデノウイルスが存在し、例えは、Ad 5 - y CD / mut T K S R 3 9 r e p - h I L 1 2 (例えは、前立腺がんの治療の治療用)、オンコス・セラピュティックス社 (Oncos Therapeutics) 製の C G T G - 1 0 2 (Ad 5 / 3 - D 2 4 - G M C S F) (例えは軟部肉腫の治療用)、Oncorine (H 1 0 1)、C G 0 0 7 0 、E n a d e n o t u c i r e v (E n A d) (国際公開第2005/118825号)、O v A d 1 およびO v A d 2 (国際公開第2008/080003号で開示)、ONCOS - 1 0 2 (例えは切除不能な悪性胸膜中皮腫用)、並びにD N X - 2 4 0 1 (例えは、神経膠腫用)がある。

【 0 1 0 3 】

C a v a t a k は、悪性黒色腫の治療に有用な野生型コクサッキーウイルスA 2 1 の製剤の商品名である。セネカバレーウイルス (N T X - 0 1 0) および (S V V - 0 0 1) は、例えは小細胞肺がんおよび神経芽細胞腫用である。

【 0 1 0 4 】

レオウイルス : R e o l y s i n (登録商標) (ペラレオレプ (pelareorep) ; 野生型レオウイルス ; 血清型3株D e a r i n g ; オンコライティクス・バイオテック社 (Oncolytics Biotech)) は、例えは、種々のがんおよび細胞増殖性疾患の治療用である。

【 0 1 0 5 】

水疱性口内炎ウイルス (V S V) : V S V は腫瘍溶解性薬剤として研究されている別のエンベロープウイルスである。例えは、Betancourt D et al., J Virol 89: 11786-11800, 2015、およびレビュー、Hastie E and Grdzelishvili VZ J Gen Virol 93: 2529-2545, 2012を参照されたい。

【 0 1 0 6 】

ウイルスにコードされるタンパク質

1つの実施形態では、本開示の方法で使用されるウイルスまたはベクターは導入遺伝子を含み、例えは、前記導入遺伝子は、細胞内の欠陥遺伝物質の置換、細胞内での新たな機能もしくは増強された機能の提供、細胞の治療に対する感度増加、細胞内の機能の遮断、または治療用のタンパク質もしくはペプチドの発現のための、導入遺伝子である。

【 0 1 0 7 】

1つの実施形態では、本開示に係るペイロードとして使用されるウイルスは、例えは、R N A i 配列、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチド (例えは、抗体分子もしくはその結合性フラグメント、ケモカイン、サイトカイン、免疫調節剤、蛍光タグ、または酵素) から独立して選択される作用剤をコードする、1または複数の導入遺伝子を含む。

【 0 1 0 8 】

この作用剤としては、限定はされないが、前臨床で有望であることが示されていたが、効率的且つ経済的な送達手段を欠いていた、独特なフォーマット、例えはペプチド、細胞内抗体、および代替足場 (alternative scaffold) (レビュー、Boldicke T, Protein Sci 26: 925-945, 2017、Marschall and Dubel, Comput Struct Biotechnol J 14: 304-308, 2016、Miersch and Sidhu F1000Res 5.pii.F1000 Faculty Rev. 1947, 2016、Peptides, Tsomaia Eur J Med Chem 94:459-470, 2015、Marschall ALJ et al, Mabs 7: 1010-1035, 2015、AIDeghaither D et al., J Clin Pharmacol. 55: S4-S20, 2015) 、並びに、腫瘍細胞、腫瘍幹細胞、腫瘍関連内皮、および腫瘍関連間質に対して治療効果を有する作用剤が挙げられる。特に興味深いのは、例えは治療薬、バイオマーカーおよび/または診断

10

20

30

40

50

薬として、多機能性を発揮し得る分子である。単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子は、臨床において承認されたプロドラッグ (ガンシクロビル (GCV)) を有する、確立されたプロドラッグ変換酵素である (例えば、Holder et al., Cancer Res. 53: 3475-3485, 1993, Touraine RL et al., Gene Therapy 5: 1705-1711, 1998を参照)。

【0109】

さらに、前記チミジンキナーゼタンパク質の発現は、治療中のウイルス療法の活性のイメージングおよび追跡に利用することもできる。陽電子断層撮影法および単一光子放射型コンピュータ断層撮影法は共に、がんの検出およびモニタリング並びにがん治療にルーチン的に使用されている方法であり、共に、適切なチミジンキナーゼ基質が投与された場合にチミジンキナーゼタンパク質の発現を検出する実用的な手段である (Wang JQ et al., Bioorg Med Chem 13: 549-556, 2005, Tjuvajev JG et al., J Nucl Med 43: 1072-1083, 2002)。あるいは、NIS 遺伝子が用いられる場合があり、TK に酷似した、腫瘍溶解性ウイルス内の、診断目的および治療目的の作用剤として利用されている (Miller A and Russell S Expert Opin Biol Ther 16: 15-32, 2016, Ravera S et al., Annu Rev Physiol 79: 261-289, 2017, Portulano et al., Endocr Rev. 35: 106-149, 2014)。

10

【0110】

1つの実施形態では、RAS または RAS シグナル経路内のタンパク質と相互作用しそれを阻害する抗体が、例えば GLA 成分との融合タンパク質として、本開示のウイルスにコードされる。RAS 遺伝子は HRAS、NRAS、および K-RAS を含む多重遺伝子族を構成する。例えば、Bos JL, Cancer Res. 49: 4682-4689, 1989; および Cetin M et al., J Mol Biol. 429: 562-573, 2017 を参照されたい。

20

【0111】

標識

1つの実施形態では、前期ペイロードは蛍光ラベル、化学発光標識、放射性標識、酵素、色素またはリガンドを含む。

【0112】

本開示における標識は、アッセイを用いて検出できるあらゆる部分と定義される。レポーター分子の非限定例としては、酵素、放射標識、ハプテン、蛍光ラベル、リン光性分子、化学発光性分子、発色団、光親和性分子、着色粒子またはビオチンなどのリガンドが挙げられる。標識は、本明細書で使用される場合、タグ、例えば His タグ、Flag タグなど、も包含する。標識はビオチンを包含し、ビオチンはアビジンの基質となる。

30

【0113】

標識は複合または融合により GLA 成分に連結され得る。標識はペイロード単独であってもよいし、治療用ペイロードのように別の独立体が追加されてもよい。

【0114】

標識複合体は診断薬としての使用に好適である。診断薬は通常、インビトロ診断に用いられるクラスと、「指向性イメージング (directed imaging)」として一般に知られているインビオ診断プロトコルに用いられるクラスとの、2つのクラスに分類される。多くの適切なイメージング剤が当該技術分野において公知であり、それらをペプチドおよびポリペプチドに結合するための方法も同様である (例えば、米国特許第 5,021,236 号; 同第 4,938,948 号; および同第 4,472,509 号を参照)。使用されるイメージング部分は、常磁性イオン、放射性同位元素、蛍光色素、NMR で検出可能な物質、および X 線造影剤とすることができます。

40

【0115】

常磁性イオンの場合、例として、クロム (III) イオン、マンガン (II) イオン、鉄 (III) イオン、鉄 (II) イオン、コバルト (II) イオン、ニッケル (II) イオン、銅 (II) イオン、ネオジム (III) イオン、サマリウム (III) イオン、イッテルビウム (III) イオン、ガドリニウム (III) イオン、バナジウム (IV) イオン、テルビウム (III) イオン、ジスプロシウム (III) イオン、ホルミウム (I)

50

I I) イオン、および / またはエルビウム (I I I) イオンなどのイオンを挙げることができ、ガドリニウムが特に好ましい。X線造影のような他の状況で有用なイオンとしては、ランタン (I I I) イオン、金 (I I I) イオン、鉛 (I I) イオン、そして特にビスマス (I I I) が挙げられるが、これらに限定はされない。

【 0 1 1 6 】

治療用途および / または診断用途の放射性同位元素の場合では、アスタチン ^{2 1 1}、¹
⁴ 炭素、^{5 1} クロム、^{3 6} 塩素、^{5 7} コバルト、^{5 8} コバルト、銅 ^{6 7}、^{1 5 2} Eu、ガリウム ^{6 7}、³ 水素、ヨウ素 ^{1 2 3}、ヨウ素 ^{1 2 5}、ヨウ素 ^{1 3 1}、インジウム ^{1 1 1}、^{5 9} 鉄、^{3 2} リン、レニウム ^{1 8 6}、レニウム ^{1 8 8}、^{7 5} セレン、^{3 5} 硫黄、テクネチウム (technicium) ^{9 9 m} および / またはイットリウム ^{9 0} を挙げることができる。^{1 2} 10

⁵ I は特定の実施形態での使用するのに好適であり、テクネチウム (technicium) ^{9 9 m} および / またはインジウム ^{1 1 1} はそれらのエネルギーの低さと長期検出への適合性から特に好適である。放射標識されたペプチドおよびポリペプチドは、当該技術分野において周知の技術に従って作製され得る。例えば、ペプチドおよびポリペプチドは、ヨウ化ナトリウムおよび / またはヨウ化カリウム、並びに、次亜塩素酸ナトリウムなどの化学的酸化剤、またはラクトペルオキシダーゼなどの酵素的酸化剤との接触により、ヨウ素化することが可能である。ペプチドは、配位子交換法により、例えば、第一スズ溶液で過テクネチウム酸を還元し、還元したテクネチウムをセファデックスカラム上にキレート化し、このカラムにペプチドをアプライすることにより、テクネチウム ^{9 9 m} 標識され得る。あるいは、例えば、過テクネチウム酸、SNC _{1 2} などの還元剤、フタル酸ナトリウム - カリウム溶液などの緩衝溶液、およびペプチドをインキュベートすることによる、直接標識法が使用され得る。金属イオンとして存在する放射性同位元素をペプチドに結合するためにしばしば使用される介在官能基は、ジエチレントリアミン五酢酸 (D T P A) またはエチレンジアミン四酢酸 (E D T A) である。²⁰

【 0 1 1 7 】

ペイロードとして使用するのに好適な蛍光ラベルとしては、Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630 / 650、BODIPY 650 / 665、BODIPY - FL、BODIPY - R6G、BODIPY - TMR、BODIPY - TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5, 6 - FAM、フルオレセインイソチオシアネート、HEX、6 - JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、Rhodamine Green、Rhodamine Red、Renographin、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン、および / またはTexas Red が挙げられる。³⁰

【 0 1 1 8 】

別のタイプのペイロードとして、インビトロでの使用に好適なペイロードがあり、その場合、ペプチドは、発色基質との接触により有色産物を生成する二次結合リガンドおよび / または酵素 (酵素タグ) に連結される。好適な酵素の例としては、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、(セイヨウワサビ) ハイドロゲンペルオキシダーゼ、またはグルコースオキシダーゼが挙げられる。好適な二次結合リガンドは、ビオチンと、アビジンおよびストレプトアビジン化合物である。このような標識の使用は当業者に周知であり、例えば、米国特許第 3,817,837 号、同第 3,850,752 号、同第 3,939,350 号、同第 3,996,345 号、同第 4,277,437 号、同第 4,275,149 号、および同第 4,366,241 号に記載されている。⁴⁰

【 0 1 1 9 】

ペプチドをその「複合体化パートナー」に連結するための他の結合法も当該技術分野において公知である。いくつかの結合法は、抗体に結合された、例えば、ジエチレントリアミン五酢酸無水物 (D T P A) ; エチレントリアミン五酢酸 ; N - クロロ - p - トルエンスルホンアミド ; および / またはテトラクロロ - 3 - 6 - ジフェニルグリコウリル - 3 などの有機キレート化剤を含む、金属キレート錯体の使用を含む (米国特許第 4,4750)

2, 509号および同第4, 938, 948号)。ペプチドまたはポリペプチドは、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩などのカップリング剤の存在下で酵素と反応させてもよい。フルオレセインマーカーとの複合体は、例えば、これらのカップリング剤の存在下で、または、イソチオシアニン酸塩との反応によって作製される。

【0120】

1つの実施形態では、前記標識は幹細胞の核を染色または標識することができる。

【0121】

併用療法

1つの実施形態では、前記GLA成分は第二の治療法、例えば抗がん剤治療、と組み合わせて使用される。これは、前記GLA成分とは別々に投与される治療法である(すなわち、GLA成分とは連結されない)。

10

【0122】

1つの実施形態では、使用される化学療法剤の組合せは、例えば、プラチン、および5-FUまたはそのプロドラッグ、例えばシスプラチンまたはオキサプラチン(oxaplatin)、およびカペシタビンまたはゲムシタビン、例えばFOLFOX、である。

【0123】

1つの実施形態では、前記化学療法は化学療法薬剤の併用を含み、特に細胞障害性化学療法剤の併用を含む。

【0124】

1つの実施形態では、前記化学療法の併用は、プラチン(シスプラチンなど)およびフルオロウラシルまたはカペシタビンを含む。

20

【0125】

1つの実施形態では、前記化学療法の併用は、カペシタビンおよびオキサリプラチン(ゼロックス(Xelox))である。

【0126】

1つの実施形態では、前記化学療法は、フォリン酸および5-FUの併用であり、所望によりオキサリプラチンを組み合わせてもよい。

【0127】

1つの実施形態では、化学療法は、所望によりオキサリプラチン(FOLFIRINOX)を組み合わせた、フォリン酸、5-FUおよびイリノテカンド(FOLE)の併用である。投与計画は以下から成る:イリノテカンド(180mg/m²、90分間かけてIV)、同時にフォリン酸(400mg/m² [または2×250mg/m²]、120分間かけてIV);その後、フルオロウラシル(400~500mg/m²、IVボーラス)、次にフルオロウラシル(2400~3000mg/m²、46時間かけて点滴静注)。通例、このサイクルを2週間毎に繰り返す。上記の投与量はサイクル毎に変更してもよい。

30

【0128】

1つの実施形態では、前記化学療法の併用は、微小管阻害剤を使用し、例えば、硫酸ビンクリスチン、エポシロンA、N-[2-[4-(ヒドロキシフェニル)アミノ]-3-ピリジニル]-4-メトキシベンゼンスルホンアミド(ABT-751)、タキソール由来化学療法剤、例えばパクリタキセル、アブラキサン、もしくはドセタキセル、またはこれらの組合せを使用する。

40

【0129】

1つの実施形態では、前記併用はmTOR阻害剤を使用する。mTOR阻害剤の例としては、エベロリムス(RAD001)、WYE-354、KU-0063794、パパマイシン(papamycin)(シロリムス)、テムシロリムス、デフォロリムス(MK-8669)、AZD8055およびBEZ235(NVP-BEZ235)が挙げられる。

【0130】

1つの実施形態では、前記併用はMEK阻害剤を使用する。MEK阻害剤の例としては、AS703026、CI-1040(PD184352)、AZD6244(セルメチ

50

ニブ)、P D 3 1 8 0 8 8、P D 0 3 2 5 9 0 1、A Z D 8 3 3 0、P D 9 8 0 5 9、U 0 1 2 6 - E t O H、B I X 0 2 1 8 9 または B I X 0 2 1 8 8 が挙げられる。

【0 1 3 1】

1つの実施形態では、前記併用は A K T 阻害剤を使用する。A K T 阻害剤の例としては、M K - 2 2 0 6 および A T 7 8 6 7 が挙げられる。

【0 1 3 2】

1つの実施形態では、前期併用はオーロラキナーゼ阻害剤を使用する。オーロラキナーゼ阻害剤の例としては、オーロラ A 阻害剤 I、V X - 6 8 0、A Z D 1 1 5 2 - H Q P A (バラセルチブ (Barasertib))、S N S - 3 1 4 メシリル酸塩、P H A - 6 8 0 6 3 2、Z M - 4 4 7 4 3 9、C C T 1 2 9 2 0 2 およびヘスペラジン (Hesperadin) が挙げられる。

10

【0 1 3 3】

1つの実施形態では、前記併用は p 3 8 阻害剤を使用し、例えば、N - [4 - ({ 4 - [3 - (3 - t e r t - プチル - 1 - p - トリル - 1 H - ピラゾール - 5 - イル) ウレイド] ナフタレン - 1 - イルオキシ } メチル) ピリジン - 2 - イル] - 2 - メトキシアセトアミドなどの、国際公開第 2 0 1 0 / 0 3 8 0 8 6 号で開示された p 3 8 阻害剤を使用する。

【0 1 3 4】

1つの実施形態では、前記併用は B c 1 - 2 阻害剤を使用する。B c 1 - 2 阻害剤の例としては、メシリル酸オバトクラックス、A B T - 7 3 7、A B T - 2 6 3 (ナビトクラックス) および T W - 3 7 が挙げられる。

20

【0 1 3 5】

1つの実施形態では、前記化学療法の併用は、カペシタビン (ゼローダ)、リン酸フルダラビン、フルダラビン (フルダラ (fludara))、デシタビン、ラルチトレキセド (トムデックス)、塩酸ゲムシタビンおよびクラドリビンなどの代謝拮抗物質を含む。

【0 1 3 6】

1つの実施形態では、前記併用は、免疫応答および / または腫瘍血管新生 (tumour vas culation) の制御を支援し得るガンシクロビルを含む。

【0 1 3 7】

1つの実施形態では、前記化学療法は P A R P 阻害剤を含む。

30

【0 1 3 8】

1つの実施形態では、前記併用療法は、特異的な D H O D H 酵素活性阻害によるがん代謝の阻害剤を含む。

【0 1 3 9】

1つの実施形態では、本明細書における前記方法で使用される 1 または複数の治療法は、低用量の抗がん剤を用いた継続的または高頻度の治療であり、他の治療法と同時に与えられる場合が多い、メトロノミック療法である。

【0 1 4 0】

1つの実施形態では、例えば 2 回、3 回、4 回、5 回、6 回、7 回、8 回の、複数サイクルの治療 (化学療法など) の使用が提供される。

40

【0 1 4 1】

1つの実施形態では、前記化学療法は 2 8 日サイクルで使用される。

【0 1 4 2】

本開示の G L A 成分は以下の感染症の 1 または複数の治療に適用することができる：アシネットバクター感染症 (アシネットバクター・バウマンニ (Acinetobacter baumannii))、放線菌症 (イスラエル放線菌 (Actinomyces israelii))、アクチノマイセス・ゲレンセリアエ (Actinomyces gerencseriae) およびプロピオニバクテリウム・プロピオニクス (Propionibacterium propionicus))、アフリカ睡眠病、別名アフリカトリパノソーマ症 (ブルセイトリパノソーマ (Trypanosoma brucei)) エイズ (後天性免疫不全症候群) (H I V (ヒト免疫不全ウイルス))、アメーバ症 (赤痢アメーバ (Entamoeba histolytic

50

a)) 、アナプラズマ症（アナプラズマ属菌種）、広東住血線虫症（アンギオストロンギルス）、アニサキス症（アニサキス）、炭疽（炭疽菌（*Bacillus anthracis*））、溶血性アルカノバクテリア（*Arcanobacterium haemolyticum*）感染症（溶血性アルカノバクテリア（*Arcanobacterium haemolyticum*））、アルゼンチン出血熱（フニンウイルス）、回虫症（回虫（*Ascaris lumbricoides*））、アスペルギルス症（アスペルギルス属菌種）、アストロウイルス感染症（アストロウイルス科）、バベシア症（バベシア属菌種）、セレウス菌感染症（セレウス菌（*Bacillus cereus*））、細菌性肺炎（複合細菌）、細菌性膿炎（細菌性膿炎微生物叢）、バクテロイデス感染症（バクテロイデス）、バランチジウム症（大腸バランチジウム（*Balantidium coli*））、バルトネラ症（バルトネラ）、バイリスアスカリス感染症（バイリスアスカリス）、B Kウイルス感染症（B Kウイルス）、黒色砂毛症（ピエドライア・ホルタ（*Piedraia hortae*））、プラストシスチス感染症（*Blastocystosis*）（プラストシスチス）、プラストミセス症（プラストミセス・デルマティティディス（*Blastomyces dermatitidis*））、ボリビア出血熱（マチュポウイルス）、ボツリヌス中毒および乳児ボツリヌス症（ボツリヌス菌（*Clostridium botulinum*）；注：ボツリヌス中毒はボツリヌス菌（*Clostridium botulinum*）による感染症ではなく、ボツリヌス毒素の摂取により引き起こされる）、ブラジル出血熱（サビアウイルス）、ブルセラ症（ブルセラ）、腺ペスト（腸内細菌科）、バークホルデリア感染症（バークホルデリア）、ブルーリ潰瘍（マイコバクテリウム・ウルセラヌス（*Mycobacterium ulcerans*））、カリシウイルス感染症（カリシウイルス科（ノロウイルスおよびサボウイルス））、カンピロバクター症（カンピロバクター）、カンジダ症、別名鶯口瘡（カンジダ）、毛細虫症（フィリピン毛頭虫（*Capillaria philippinensis*）による腸疾患、肝毛頭虫（*Capillaria hepatica*）による肝疾患、および肺毛頭虫（*Capillaria aerophila*）による肺疾患）、カリオン病（バルトネラ・バシリホルミス（*Bartonella bacilliformis*））、ネコ引っ掻き病（ヘンセラ菌（*Bartonella henselae*））、蜂巣炎（通常、A群レンサ球菌およびブドウ球菌）、シャーガス病、別名アメリカトリパノソーマ症（クルーズトリパノソーマ）、軟性下疳（軟性下疳菌（*Haemophilus ducreyi*））、ニワトリ痘（水痘帶状疱疹ウイルス）、チクングンヤ熱（アルファウイルス）、クラミジア（トラコーマクラミジア（*Chlamydia trachomatis*））、肺炎クラミジア（*Chlamydophila pneumoniae*）感染症、別名T W A R（肺炎クラミジア（*Chlamydophila pneumoniae*））、コレラ（コレラ菌（*Vibrio cholerae*））、黒色分芽菌症（フォンセセア・ペドロソイ（*Fonsecaea pedrosoi*））、ツボカビ症（バトラコキトリウム・デンドロバチディス（*Batrachochytrium dendrobatidis*））、肝吸虫症（肝吸虫（*Clonorchis sinensis*））、クロストリジウム・ディフィシル大腸炎（クロストリジウム・ディフィシル（*Clostridium difficile*））、コクシジオイデス症（コクシジオイデス・イミチス（*Coccidioides immitis*）およびコクシジオイデス・ポサダシ（*Coccidioides posadasii*））、コロラドダニ熱（コロラドダニ熱ウイルス）、感冒／急性ウイルス性鼻咽頭炎／急性コリーザ（通常、ライノウイルスおよびコロナウイルス）、クリミア コンゴ出血熱（クリミア コンゴ出血熱ウイルス）、クリプトコッカス症（クリプトコッカス・ネオフォルマンス（*Cryptococcus neoformans*））、クリプトスピリジウム症（クリプトスピリジウム）、皮膚幼虫移行症（通常、ブラジル鉤虫（*An cylostoma brasiliense*）および多数の他の寄生虫）、シクロスボラ症（シクロスボラ・カエタネンシス（*Cyclospora cayetanensis*））、囊虫症（有鉤条虫（*Taenia solium*））、サイトメガロウイルス感染症（サイトメガロウイルス）、デング熱（D E N - 1、D E N - 2、D E N - 3 およびD E N - 4 などのデングウイルス）、二核アメーバ症（二核アメーバ（*Dientamoeba fragilis*））、ジフテリア（ジフテリア菌（*Corynebacterium diphtheriae*））、裂頭条虫症（裂頭条虫）、メジナ虫症（メジナ虫（*Dracunculus medinensis*））、エボラ出血熱（エボラウイルス）、エキノコックス症（エキノコックス）、エーリキア症（エーリキア）、腸内細菌科（カルバペネム耐性腸内細菌科）、蟻虫症（蟻虫（*Enterobius vermicularis*））、エンテロコッカス感染症（エンテロコッカス）、腸内ウイルス（腸内ウイルス）、発疹チフス（*Rickettsia prowazekii*）、伝染性紅斑（バルボウイルスB 19）、突発性発疹（ヒトヘルペスウイルス6（H H V - 6）およびヒトヘル

ペスウイルス7 (H HV - 7)) 、肝蛭症 (Fasciolasis) (肝蛭 (Fasciola hepatica) および巨大肝蛭 (Fasciola gigantica)) 、肥大吸虫症 (ブスキ肥大吸虫 (Fasciolopsis buski)) 、フィラリア症 (フィラリア上科) 、ウェルシュ菌 (Clostridium perfringens) による食中毒 (ウェルシュ菌 (Clostridium perfringens)) 、自由生活アメーバ感染症 (種々の病原体) 、フソバクテリウム感染 (フソバクテリウム) 、ガス壊疽 (通常、ウェルシュ菌などのクロストリジウム) 、ジオトリクム症 (ジオトリクム・カンジダム (Geotrichum candidum)) 、ジアルジア症 (ランブル鞭毛虫 (Giardia lamblia)) 、鼻疽 (鼻疽菌 (Burkholderia mallei)) 、顎口虫症 (有棘顎口虫 (Gnathostoma spinigerum) および剛棘顎口虫 (Gnathostoma hispidum)) 、淋病 (淋菌 (Neisseria gonorrhoeae)) 、単径部肉芽腫 (クレブシエラ・グラヌロマティス (Klebsiella granulomatis)) 、
10 A群連鎖球菌感染症 (化膿性連鎖球菌 (Streptococcus pyogenes)) 、B群連鎖球菌感染症 (ストレプトコッカス・アガラクチア (Streptococcus agalactiae)) 、インフルエンザ菌感染症 (インフルエンザ菌 (Haemophilus influenzae)) 、手足口病 (腸内ウイルス、主にコクサッキーA群ウイルスおよびエンテロウイルス71 (EV71)) 、ハンタウイルス肺症候群 (シンノンブレウイルス) 、ハートランドウイルス病 (ハートランドウイルス) 、ピロリ菌感染症 (ピロリ菌 (Helicobacter pylori)) 、溶血性尿毒症症候群 (大腸菌 (Escherichia coli) 、例えはO157:H7、O111およびO104:H4) 、腎症候性出血熱 (ブニヤウイルス科) 、A型肝炎 (A型肝炎ウイルス) 、B型肝炎 (B型肝炎ウイルス) 、C型肝炎 (C型肝炎ウイルス) 、D型肝炎 (D型肝炎ウイルス) 、E型肝炎 (E型肝炎ウイルス) 、単純ヘルペス (単純ヘルペスウイルス1型および2型 (HSV-1およびHSV-2)) 、ヒストプラズマ症 (ヒストプラズマ・カプスラーツム (Histoplasma capsulatum)) 、鉤虫感染症 (ズビニ鉤虫 (Ancylostoma duodenale) およびアメリカ鉤虫 (Necator americanus)) 、ヒトボカウイルス感染症 (ヒトボカウイルス) 、ヒトエールリヒア・エウインギ症 (Human ewingii ehrlichiosis) (エールリヒア・エウインギ (Ehrlichia ewingii)) 、ヒト顆粒球性アナプラズマ症 (アナプラズマ・ファゴサイトフィルム (Anaplasma phagocytophilum)) 、ヒトメタニューモウイルス感染症 (ヒトメタニューモウイルス) 、ヒト単球エールリヒア症 (エールリヒア・シャフェン시스 (Ehrlichia chaffeensis)) 、ヒトパピローマウイルス感染症 (ヒトパピローマウイルス) 、ヒトパラインフルエンザウイルス感染症 (ヒトパラインフルエンザウイルス) 、
20 膜様条虫症 (小型条虫 (Hymenolepis nana) および縮小条虫 (Hymenolepis diminuta)) 、エプスタイン・バーウイルス伝染性单核球症 (エプスタイン・バーウイルス) 、インフルエンザ (オルトミクソウイルス科) 、イソス포ーラ症 (戦争イソス포ーラ (Isospora belli)) 、川崎病、角膜炎 (種々の病原体) 、キンゲラ・キング感染症 (キンゲラ・キンゲ (Kingella kingae)) 、ラッサ熱 (ラッサ熱ウイルス) 、レジオネラ症、別名在郷軍人病 (在郷軍人病菌 (Legionella pneumophila)) 、レジオネラ症、別名ポンティアック熱 (在郷軍人病菌 (Legionella pneumophila)) 、レーシュマニア症 (リーシュマニア) 、ハンセン病 (らい菌 (Mycobacterium leprae) およびマイコバクテリウム・レプロマトシス (Mycobacterium lepromatosis)) 、レブトスピラ症 (レブトスピラ) 、リステリア症 (リステリア菌 (Listeria monocytogenes)) 、ライム病ボレノア (ライム病菌 (Borrelia burgdorferi) 、ボレリア・ガリニ (Borrelia garinii) 、およびボレリア・アフゼリ (Borrelia afzelii)) 、リンパ系フィラリア症 (バンクロフト糸状虫 (Wuchereria bancrofti) およびマレー糸状虫 (Brugia malayi)) 、リンパ球性脈絡膜炎 (リンパ球性脈絡膜炎ウイルス) 、マラリア (プラスモジウム) 、マールブルグ出血熱 (マールブルグウイルス) 、麻疹 (麻疹ウイルス) 、中東呼吸器症候群 (中東呼吸器症候群コロナウイルス) 、類鼻疽 (類鼻疽菌 (Burkholderia pseudomallei)) 、髄膜炎 (多種) 、髄膜炎菌性疾患 (髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis)) 、横川吸虫症 (通常、横川吸虫 (Metagonimus yokagawai)) 、微胞子虫症 (微胞子虫門) 、伝染性軟属腫 (伝染性軟属腫ウイルス) 、サル痘 (サル痘ウイルス) 、流行性耳下腺炎 (流行性耳下腺炎ウイルス) 、発疹熱 (発疹熱リケッチャ (Rickettsia typhi)) 、マイコプラズマ肺炎 (肺炎マイコプラズマ (Mycoplasma pneumoniae)) 、菌腫 (放線菌腫) および真菌腫) 、ハエ幼虫症 (寄
30
40
50

生性双翅目ハエ幼虫)、新生児結膜炎(最も一般的には、トラコーマクラミジア(*Chlamydia trachomatis*)および淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*))、ノロウイルス感染症(ノロウイルス)、ノカルジア症(ノカルジア、例えばノカルジア・アステロイデス(*N. asteroides*))、オンコセルカ症(回旋糸状虫(*Onchocerca volvulus*))、オピストルキス症(タイ肝吸虫(*Opisthorchis viverrini*)およびネコ肝吸虫(*Opisthorchis felineus*))、パラコクシジオイデス症(南アメリカ分芽菌(*Paracoccidioides brasiliensis*))、肺吸虫症(肺吸虫、例えばウエステルマン肺吸虫(*Paragonimus westermani*))、パツツレラ症(パツツレラ)、骨盤腹膜炎(種々の病原体)、百日咳(百日咳菌(*Bordetella pertussis*))、ペスト(ペスト菌(*Yersinia pestis*))、肺炎球菌感染症(肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*))、ニューモシスチス肺炎(ニューモシスチス・イロベチ(*Pneumocystis jirovecii*))、肺炎(種々の病原体)、灰白髄炎(ポリオウイルス)、プレボテラ感染症(プレボテラ)、原発性アーバ性髄膜脳炎(通常、フォーラーネグレリア(*Naegleria fowleri*))、進行性多巣性白質脳症(JCウイルス)、オウム病(オウム病クラミジア(*Chlamydophila psittaci*))、Q熱(Q熱コクシエラ(*Coxiella burnetii*))、狂犬病(狂犬病ウイルス)、回帰熱(ボレリア、例えばボレリア・ヘルムシ(*B. hermsii*))および回帰熱ボレリア(*B. recurrentis*))、呼吸器合胞体ウイルス感染症(呼吸器合胞体ウイルス)、リノスボリジウム症(リノスボリジウム・セーベリ(*Rhinosporidium seeberi*))、ライノウイルス感染症(ライノウイルス)、リケッチア感染症(リケッチア属菌種)、リケッチア痘症(痘瘡リケッチア(*Rickettsia akari*))、リフトバレー熱(リフトバレー熱ウイルス)、ロッキー山紅斑熱(*Rickettsia rickettsii*)、ロタウイルス感染症(ロタウイルス)、風疹(風疹ウイルス)、サルモネラ症(サルモネラ)、重症急性呼吸器症候群(SA 10
RSコロナウイルス)、住血吸虫症(住血吸虫)、敗血症(種々の病原体)、細菌性赤痢(赤痢菌)、帯状疱疹(水痘帯状疱疹ウイルス)、天然痘(大痘瘡または小痘瘡)、スプロトリコシス(スプロトリックス・シェンキイ(*Sporothrix schenckii*))、ブドウ球菌性食中毒(ブドウ球菌属)、ブドウ球菌感染症(ブドウ球菌)、糞線虫症(糞線虫(*Strongyloides stercoralis*))、亜急性硬化性全脳炎(麻疹ウイルス)、梅毒(梅毒トレポネーマ(*Treponema pallidum*))、条虫症(条虫)、テタヌス(破傷風菌(*Clostridium tetani*))、須毛白癬(通常、白癬菌)、頭部白癬(トリコフィトン・トンズランス(*Trichophyton tonsurans*))、体部白癬(通常、白癬菌)、股部白癬(通常、有毛表皮糸状菌(*Epidermophyton floccosum*))、紅色白癬菌(*Trichophyton rubrum*)、および毛瘡白癬菌(*Trichophyton mentagrophytes*))、手白癬(*Tinea manum*)、紅色白癬菌(*Trichophyton rubrum*))、黒癬(通常、ホルタエア・ウェルネキイ(*Hortaea werneckii*))、足白癬(通常、白癬菌)、爪白癬(通常、白癬菌)、癩風(マラセジア)、トキソカラ症(イヌ回虫(*Toxocara canis*)またはネコ回虫(*Toxocara cati*))、トラコーマ(トラコーマクラミジア(*Chlamydia trachomatis*))、トキソプラズマ症(トキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*))、旋毛虫症(旋毛虫(*Trichinella spiralis*))、トリコモナス症(腔トリコモナス(*Trichomonas vaginalis*))、鞭虫症(鞭虫(*Trichuris trichiura*))、結核(通常、ヒト型結核菌)、野兎病(野兎病菌(*Francisella tularensis*))、腸チフス(チフス菌(*Salmonella enterica* subsp. *enterica*, serovar *typhi*))、発疹チフス(リケッチア)、ウレアプラズマ・ウレアリチカム感染症(ウレアプラズマ・ウレアリチカム(*Ureaplasma urealyticum*))、渓谷熱(コクシジオイデス・イミチス(*Coccidioides immitis*)またはコクシジオイデス・ポサダシ(*Coccidioides posadasii*))、ベネズエラウマ脳炎(ベネズエラウマ脳炎ウイルス)、ベネズエラ出血熱(グアリトウイルス)、ビブリオ・バルニフィカス感染症(ビブリオ・バルニフィカス(*Vibrio vulnificus*))、腸炎ビブリオ腸炎(腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*))、ウイルス性肺炎(種々のウイルス)、西ナイル熱(西ナイルウイルス)、白色砂毛症(トリコスボロン・ベイゲリ(*Trichosporon beigelii*))、仮性結核菌感染症(仮性結核菌(*Yersinia pseudotuberculosis*))、エルシニア症(エンテロコリチカ菌(*Yersinia enterocolitica*))、黄熱(黄熱病ウイルス)、並びに接合菌症(接合菌類)。 20
30
40
50

【0143】

細胞内病原体

病原体が細胞内部に一度入り込むと、細胞環境によるある程度の保護がその病原体にかかり得るため、細胞内病原体は治療が最も困難なものであり得る。

【0144】

病原体は、ウイルス、細菌、真菌、原生動物などであり得る。本開示の分子は細胞内病原体、特に本明細書で開示される細胞内病原体、の治療に特に有用である。

【0145】

有名な細胞内細菌としては、ヘンセラ菌 (*Bartonella henselae*)、野兎病菌 (*Francisella tularensis*)、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、チフス菌 (*Salmonella typhi*)、ブルセラ属、レジオネラ属、マイコバクテリウム属 (ヒト型結核菌など)、ノカルジア属、ロドコッカス・エクイ (*Rhodococcus equi*)、エルシニア属、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) が挙げられる。10

【0146】

本開示の方法で使用するのに好適な細胞内病原体の治療に使用される 1 または複数の抗生素は、エリスロマイシン、ドキシサイクリン、アジスロマイシン、リファンピン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、ドキシサイクリン、シプロフロキサシン、アンピシリン、トリメトプリムスルファメトキサゾール、クロラムフェニコール、T M P - S M Z (トリメトプリムスルファメトキサゾール)、レボフロキサシン、モキシフロキサシン、クラリスロマイシン、テトラサイクリン類、グリシルサイクリン類、エタンブトール、リファブチン、イミペネム、セフォタキシム、アミカシン、バンコマイシン、ミノサイクリン、ペニシリン G、アンピシリン、フルオロキノロン、アズトレオナム、およびこれらの 2 つ以上の組み合わせから選択される。20

【0147】

ヒト型結核菌は治療が困難であることで有名である。1 つの独立した態様において、本開示は、1 または複数の T B 薬がペイロードとして本明細書に記載の G L A 成分と複合体形成された、潜伏結核および / または活動性結核の治療用の分子を提供する。

【0148】

本開示の分子は、マイコバクテリウムが位置している細胞内部に送達することによって、現在の医薬の有効性を大きく増加させることができ得る。30

【0149】

T B の治療は、T B が潜在か活動性か、患者が成人か、小児か、妊婦か、H I V 陽性か、上記の組み合わせであるかを含む、いくつかの要因に依存している。以下の詳細は、本発明の全ての態様、例えば、どのような分子を調製し、患者を治療するためにそれらをどのように使用するか、に関する。

【0150】

H I V 患者および 2 ~ 11 歳の小児における潜在性結核の治療は、6 ~ 9 か月間、1 日 1 回のイソニアジドである。妊婦患者は 1 日 1 回ではなく週 2 回治療され得る。

【0151】

すなわち、1 つの実施形態では、本開示の分子において、前記 G L A 成分はイソニアジドまたはその均等物を含むペイロードに連結されている。40

【0152】

複雑化する要因のない 12 歳齢以上の患者における潜在性 T B の治療は、3 か月間、週 1 回のイソニアジドおよびリファベンチンの投与であり得る。あるいは、リファンピンは 4 か月間、1 日 1 回投与され得る。

【0153】

すなわち、1 つの実施形態では、前記ペイロードはリファベンチンをさらに含む。

【0154】

あるいは、本明細書に記載の G L A ドメインがリファベンチンを含むペイロードに連結された分子が提供され得る。本開示の分子の組み合わせも治療用に提供され得る。50

【0155】

活動性結核の第一選択治療は、イソニアジド、リファンピン、エタンブトール、ピラジンアミド、およびこれらの2つ以上の組み合わせから選択される場合が多い。

【0156】

すなわち、リファンピンを含むペイロードに連結された本明細書に記載のGLA成分を含む、本開示の分子が提供される。

【0157】

また、エタンブトールを含むペイロードに連結された本明細書に記載のGLA成分を含む、本開示の分子が提供される。

【0158】

別の実施形態では、ピラジンアミドを含むペイロードに連結された本明細書に記載のGLA成分を含む、本開示の分子が提供される。

【0159】

TBの治療に使用されるペイロードは、例えば以下などの、2種以上、例えば3種の薬剤または4種の薬剤を含み得ることが、明示的に企図される：イソニアジドとリファマイシン、イソニアジドとピラキシナミド、イソニアジドとエタンブトール、リファマイシンとピラキシナミド、リファマイシンとエタンブトール、ピラキシナミドとエタンブトール、イソニアジドとリファマイシンとピラキシナミド、イソニアジドとリファマイシンとエタンブトール、および、イソニアジドとリファマイシンとピラキシナミドとエタンブトール。

10

20

【0160】

ウイルス病原体としては、インフルエンザ、ヒト免疫不全ウイルス、デングウイルス、西ナイルウイルス、天然痘ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、韓国型出血熱ウイルス、ニワトリ痘、水痘帯状疱疹ウイルス、単純ヘルペスウイルス1型または2型、エプスタイン・バーウイルス、マールブルグウイルス、ハンタウイルス、黄熱病ウイルス、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎またはE型肝炎、エボラウイルス、ヒトパピローマウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、狂犬病ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ロタウイルス、HTLV (HTLV-1およびHTLV-2など)が挙げられる。

30

【0161】

抗ウイルス剤は以下のうちの1または複数から独立して選択され得るGLA成分に連結され得る：アバカビル、アシクロビル、アシクロビル、アデホビル、アマンタジン、アンプレナビル、アンプリゲン、アルビドール、アタザナビル、アトリプラ、ボセプレビレルテット、シドホビル、コンビビル、ダルナビル、デラビルジン、ジダノシン、ドコサノール、エドクスジン、エファビレンツ、エムトリシタビン、エンフビルチド、エンテカビル、侵入阻害剤、ファムシクロビル、ホミビルセン、ホスアンプレナビル、ホスカルネット、ホスホネット、ガンシクロビル、イバシタビン、イムノビル、イドクスウリジン、イミキモド、インジナビル、イノシン、インテグラーゼ阻害剤、I型インターフェロン、II型インターフェロン、I型インターフェロン、インターフェロン、ラミブジン、ロピナビル、ロビリド、マラビロック、モロキシジン、メチサゾン、ネルフィナビル、ネビラピン、ネクサビル、ヌクレオシド類似体、オセルタミビル、ペグインターフェロン-a、ペニシクロビル、ペラミビル、ブレコナリル、ボドフィロトキシン、プロテアーゼ阻害剤、ラルテグラビル、逆転写酵素阻害剤、リバビリン、リマンタジン、リトナビル、ピラミジン (Pyramidine)、サキナビル、スタブジン、相乗増強剤 (Synergistic enhancer) (抗レトロウイルス剤)、チャノキ油、テラプレビル、テノホビル、テノホビルジソブロキシル、チプラナビル、トリフルリジン、トリジビル、トロマンタジン、ツルバダ、バラシクロビル、バルガンシクロビル、ビクリビロック、ビダラビン、ビラミジン、ザルシタビン、ザナミビル、およびジドブジン。

40

【0162】

抗ウイルス剤が、例えば有効性を増大させるために、組み合わせて使用され得ることは

50

、当該技術分野において周知である。

【0163】

すなわち、1つの実施形態では、本発明の分子は、原生動物疾患、例えばマラリア、アフリカ睡眠病など、を治療するためのペイロードを含んで提供される。

【0164】

有名な寄生原生動物としては、プラスモディウムタイプの寄生虫が挙げられ、例えばマラリアである。マラリアの治療に使用される薬物としては、例えば、キニーネおよび関連物質、クロロキン(chloroquine)、アモジアキン、ピリメタミン、プログアニル、スルホンアミド類、メフロキン、アトバコン、ブリマキン、アルテミシニン(artemisinin)およびその誘導体、ハロファントリル、ドキシサイクリン、クリンダマイシン、スルファジアジン、並びにこれらの2つ以上の組み合わせなどがある。

10

【0165】

すなわち、実施形態において、本明細書に記載のGLA成分が1または複数の抗マラリア薬を含むペイロードに連結されている、本開示の分子が提供される。

【0166】

1つの実施形態では、本開示の分子は、賦形剤、希釈剤および/または担体を含む医薬組成物に含まれた状態で提供される。1つの実施形態では、前記組成物は非経口製剤としての組成物である。

20

【0167】

非経口製剤とは、胃腸管を通じて送達されないように設計された製剤を意味する。通例、非経口送達経路には注射、移植、または注入が含まれる。

【0168】

1つの実施形態では、前記非経口製剤は注射剤の形態である。注射には、静脈内注射、皮下注射、頭蓋内注射、くも膜下腔内注射、腫瘍内注射、または筋肉内注射が含まれる。注射とは、本明細書で用いられる場合、注射器を介した身体内への液体の挿入を意味する。

30

【0169】

1つの実施形態では、前記非経口製剤は点滴の形態をとる。

【0170】

注入とは、本明細書で用いられる場合、点滴、注入ポンプ、シリンジポンプ、または均等デバイスによる、より低速の液体の投与を意味する。1つの実施形態では、注入は、1.5分間～120分間の範囲の期間に亘って、例えば、およそ、3分、4分、5分、6分、7分、8分、9分、10分、11分、12分、13分、14分、15分、16分、17分、18分、19分、20分、25分、30分、35分、40分、45分、50分、55分、60分、65分、70分、65分、80分、85分、90分、95分、100分、105分、110分、または115分間に亘って投与される。

30

【0171】

1つの実施形態では、前記製剤は静脈内(IV)投与用である。この経路は、大部分の臓器および組織に迅速にアクセス可能であるため特に有効であり、また、転移の治療、例えば確立した転移の治療に特に有用であり、とりわけ、肝臓および肺などの高度に血管が発達した領域に位置する転移の治療に有用である。

40

【0172】

治療用製剤は通例、製造および貯蔵の条件下で無菌且つ安定となる。前記組成物は、液剤、マイクロエマルジョン、リポソーム、またはヒトへの投与に好適な他の非経口製剤として製剤化することができ、注射器またはバイアルなどの充填済みデバイスとして、特に単回投与として、製剤化できる。

40

【0173】

前述の通り、前記製剤は通常、薬剤的に許容できる希釈剤または担体を含むことになり、例えば、ウイルスと適合性があり、且つウイルスがその中で必要な期間安定である、無毒の等張担体を含む。

50

【0174】

前記担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびその適切な混合物、を含有する溶媒または分散媒とすることができます。適切な流動性は、分散剤または界面活性剤、例えばレシチンまたは非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80またはポリソルベート40、の使用などによって維持することができる。分散液中で、必要な粒径の維持を、界面活性剤の存在によって補助してもよい。等張剤の例としては、組成物中の、糖類、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムが挙げられる。

【0175】

10

1つの実施形態では、本開示のGLA成分と、当該GLA成分に連結されたまたは連結されていないペイロードと、を含むパーツからなるキットが提供される。

【0176】

本明細書の文脈での「含む」は、「包含する」を意味することが意図されている。技術的に適切であれば、本発明の実施形態は組み合わせてもよい。各実施形態は特定の特徴/要素を含むものとして本明細書に記載されている。本開示は、前記特徴/要素を含む、またはそれから本質的になる、別の実施形態も包含する。

【0177】

特許および出願などの技術参考文献は参照によって本明細書に援用される。

【0178】

20

技術背景は本明細書の技術開示の一部であり、そこでの議論は、当該分野および本技術の適用で遭遇した技術的問題の議論も含んでおり、先行技術の議論に限定されないので、補正の基礎として使用される場合がある。

【0179】

本明細書で具体的かつ明示的に記載されたあらゆる実施形態は、単独で、または1もしくは複数の別の実施形態と組み合わせて、権利放棄の根拠を形成する場合がある。

【0180】

以下の実施例を参照して本発明を説明するが、これらの実施例は単なる例示であり、本発明の範囲を限定するものとは決して解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

30

【0181】

【図1A】図1A～図1DはGLAタンパク質構造の種々の表現を示している。

【図1B】同上。

【図1C】同上。

【図1D】同上。

【図1E】図1Eは本開示本開示のGLA成分の実施形態を示している。

【図2】図2Aは過酸化物処理によりアポトーシス誘導された乳がん細胞株のプロテインS (PrS) およびアネキシンの染色を示している。過酸化物処理され、FITC-PrSで染色されたヒトMDA-231細胞。図2BはAと同様に染色された未処理MDA-231細胞。図2Cはアネキシン染色された処理後MDA-231細胞。図2Dは過酸化物処理され、PrSで染色されたヒトMCF-7細胞。図2EはDと同様に染色されたマウスMET-1細胞。図2FはDと同様に染色されたマウス4T1細胞。

40

【図3】図3Aは重なっているが、別々の、PrSとアネキシンの細胞局在を示している。過酸化物で処理され、Cy5-PrS（赤）およびFITC-アネキシン（緑）で染色された、マウス4T1細胞。明るい矢印、共局在シグナル；赤い矢印、PrSでは染色されたがアネキシンでは染色されなかった細胞；緑色の矢印、アネキシンで比較的明るく染色され、PrSではより暗く染色された細胞染色であって、結合パターンの違いを示している（挿入図はPrS染色とアネキシン染色を別々に示している）。図3BはFITC-PrSおよびCy5-アネキシンで染色された処理後の4T1細胞。緑色の矢印、PrSでは染色されたがアネキシンでは染色されなかった細胞染色。図3Cは1,000倍

50

過剰な冷アネキシンとプレインキュベートされた、処理後の 4 T 1 細胞の Cy 5 アネキシン染色。

【図 4】図 4 は Pr S およびアネキシンによるアポトーシス COS - 1 細胞の染色を示している。細胞を、記載の通りに t - B H P で処理し、 FITC アネキシン（左）および Cy 5 Pr S（右）で染色した。矢印はアポトーシス小体と推定される細胞下構造を示している。

【図 5】図 5 は Pr S およびアネキシンによる細胞外小胞の染色の差異を示している。細胞外小胞を 4 T 1 細胞から用意し、 FITC Pr S（緑）および Cy 5 アネキシン（赤）で染色した。矢印は、アネキシンのみ（赤色矢印）、 Pr S のみ（緑色矢印）および両方のタンパク質（明るい矢印）で染まっている小胞を示している。

【図 6】図 6 A は Pr S およびアネキシンの細胞内局在を示している。アポトーシス 4 T 1 細胞を FITC Pr S（緑色矢印）および Cy 5 アネキシン（赤色矢印）で染色した；明るい矢印は共局在である。図 6 C は予想アポトーシス小体。

【図 7】図 7 A は Pr S の 5 分間以内の内部移行を示している。アポトーシス 4 T 1 細胞を FITC Pr S（緑）および Cy 5 アネキシン（赤）で染色し、これらのタンパク質を添加した 10 分以内にイメージングした。マージ画像。図 7 B はヘキスト核染色のみ。

【図 8】図 8 はマウスの 4 T 1 腫瘍の BLI 画像を示している。

【図 9】図 9 は放射性標識した Pr S およびアネキシンを用いた、4 T 1 腫瘍に対するドキソルビシンの作用の SPECT イメージング。4 T 1 乳がん腫瘍を有するマウスを、99mTc Pr S（A および B）、またはアネキシン（C および D）を用いて、ドキソルビシンの前（A および C）およびドキソルビシンの 24 時間後（B および D）にイメージングした。

【図 10】図 10 はシクロヘキサミド処置マウスの SPECT イメージングを示している。処置前（A および C）および処置の 24 時間後（B および D）の 5 匹 / パネルのマウスが示されている。マウスのイメージングを、99mTc Pr S（A および B）、またはアネキシン（C および D）のいずれかを用いて行い、矢印は肝臓シグナルの増加を示している。

【図 11】図 11 は Cy 5 Pr S の感染脾臓への局在を示している。CD1 マウスを生物発光性リストリアに感染させ、感染後 2 日目にイメージングした。このマウスには屠殺の 30 分前に Cy 5 Pr S を注射し、その脾臓を摘出し、凍結した。軽微に感染したマウス（A）および未感染の対照マウス（C）が示されている。Cy 5 チャネルにおける、各マウスの感染脾臓（B）および未感染脾臓（D）の切片が、位相差画像とマージされて示されている。

【図 12】図 12 はドキソルビシンで処理された腫瘍への Cy 5 Pr S の局在を示している。4 T 1 乳がん腫瘍を移植したマウスを、ドキソルビシンで処置するか（右パネル）、または左は未処置（左パネル）とした。24 時間後、マウスに Cy 5 Pr S を静脈内注射し、30 分後に屠殺した。腫瘍を摘出し、凍結し、蛍光顕微鏡法用に切片化した。4 匹の異なるマウスのマージ後の Cy 5 / 位相差画像が示されている。

【図 13】図 13 は TSC の分化を示している。TSC を増殖因子の存在下（左）または非存在下（右）で培養した。右パネルの矢印は分化に特徴的な巨細胞を示している。

【図 14】図 14 は栄養膜幹細胞および分化後のトロホblast の Pr S 染色を示している。栄養膜幹細胞（左）は増殖因子の中止によりトロホblast 巨細胞（右）に分化した。これらの細胞を Cy 5 Pr S で染色し、イメージングした。

【図 15】図 15 は MSC の分化を示している。MSC に、脂肪細胞（上段パネル）または骨芽細胞（下段パネル）へと分化させるための、本明細書に記載の通りの処理を行った。それぞれの場合で分化細胞は予想通りの形態を示した。

【図 16】図 16 は Pr S（緑）、アネキシン（赤）、およびヘキスト（青）で染色された MSC を示している。細胞は染色混合物の添加の 10 分以内にイメージングした。

【図 17】図 17 は Pr S（緑、最も明るい領域）、アネキシン（赤、細胞膜の周りの明

10

20

30

40

50

るい領域)、およびヘキスト(青)で染色されたTSCを示している。細胞は染色混合物の添加の5分以内にイメージングした。

【図18】図18はTSC小胞の染色の差異を示している。TSCを図17と同様に染色した。このグループの細胞は、アネキシン(赤)で染まるがPrS(緑)では染まらない大型の小胞を分泌している。

【図19】図19はC17.2神経前駆細胞のPrS染色を示している。細胞をPrS-FITCで染色し、標準的(共焦点以外の)顕微鏡法でイメージングした。

【図20】図20は4CにおけるTSCへのPrSの内部移行を示している。FITC PrS(緑)およびCy5アネキシン(赤)を4CでTSCに添加し、共焦点顕微鏡でイメージングした。

【図21】図21はマウス骨髄由来のリネージネガティブな(lineage-negative)、SCA-1/c-kit染色細胞を示している。細胞は分析のこの時点ではPI(ヨウ化プロピジウム;死細胞の検出用)でもPrSでも染色されなかった。造血系が染色されていないこと(左パネル)と、c-kitおよびSCA1が染色されていること(右パネル)は、緑(最も明るい領域)で示される、HSC集団を定義している。

【図22】図22は長期のHSCのPrS染色。HSCを図1と同様に単離し、FITC PrSで染色した。Cy7を用いてSLAMパターンを求めた(X軸)。

【図23】図23は短期のHSCのPrS染色。HSCを図1と同様に単離し、FITC PrSで染色した。Cy7を用いてSLAMパターンを求めた(X軸)。

【図24】図24は長期のHSCにおけるPrSの内部移行を示している。HSCを記載の通りに準備し、PrS染色し、共焦点顕微鏡で観察した。緑(最も明るい領域)、FITC PrS;青、ヘキスト核染色;赤、PI。なお、PI染色が核から除かれた場合、その細胞が生きていることを示している。

【図25】図25は核内PIを示す死んだHSCの例を示している。

【図26】図26はGLAを介した取り込みは細胞にとって無毒である。

【実施例】

【0182】

本明細書は付属の配列表の配列1~6も包含する。

【0183】

本プロジェクトにより、SPECT(単光子コンピュータ断層撮影法)用のインビオイメージング剤としての標識された組み換えPrSの試験が開始された。驚くべきことに、前記分子はアポトーシス細胞に迅速に内部移行することが分かった。この予期せぬ発見から、この現象をさらに研究することとなり、そこで、PrSも、いくつかの種類の非アポトーシス性の幹細胞サブセットに内部移行されることが分かった。

【0184】

PrSは配列番号6に示されるプロテインSGLAドメインおよびプロテインSEGFDドメインである。

【0185】

方法

蛍光のために、Cy5およびFITCの複合体化を、それぞれAmersham(GEヘルスケア社)およびMolecular Probes(インビトロジエン社)標識化キットを製造業者の説明書に従って用いて達成した。両キットは未結合のフルオロフォアを除去するためのカラムを提供している。まず、アポトーシス細胞への結合の特異性を調べるために、1ml中0.77mgのPrS(第2画分)および1ml中0.77mgのアネキシンをFITCで標識した。共局在および競合の研究のために、1ml中0.68mgのPrS(第3画分)および0.68mgのアネキシンをCy5で標識した。共焦点顕微鏡法のために、第二の積荷(second shipment)からの0.76mgのPrSをFITCで標識し、以前に標識したCy5結合型アネキシンを用いた。なお、正確な標識効率は測定されておらず、標識化キットの製造業者の説明書によれば、カラムからの回収率は85%と推定されていた。従って、いずれの場合においても、2つのタンパク質の相対的

な染色強度は、これらの偶発性を反映している可能性がある。細胞は最初 30 分間染色したが、後に、5 分未満で十分であることが確認された。アポトーシス細胞特異性について PrS を試験するために、まず、4 種の乳がん細胞株、ヒト MDA - 231 およびヒト MCF7、並びにマウス 4T1 およびマウス MET - 1、を使用した。その後、サル腎細胞の COS - 1 も使用した。アポトーシスは過酸化水素または tert - ブチルヒドロペルオキシド (t - BHP) で誘導した。細胞を 24 ウェルプレートに 6×10^4 細胞 / ウェルで播種するか、または Ependorf チャンバースライドに 1×10^4 細胞 / ウェルで播種し、翌日、30 分 ~ 2 時間の時点において 2 mM の H₂O₂ または t - BHP を用いてアポトーシスを誘導した。誘導後、ウェルを Annexin Binding Buffer (AB; サンタクルーズ・バイオテクノロジー社) で洗浄し、標識タンパク質で染色した。過去の経験および文献から、5.5 μg / ml のアネキシンタンパク質を染色に用いた。この量は、提供されたゲル画像に基づいてアネキシンの分子量を 36 kD、組み換え PrS の分子量を 30 kD と仮定して、PrS と等モルの添加量となるよう調整した。細胞は 15 分間染色した。核酸の可視化のために Hoechst 33342 色素を用いた。次に、ウェルを AB で洗浄し、EVOS 蛍光顕微鏡で生細胞のまま観察した。共焦点顕微鏡法のために、スタンフォード細胞科学イメージング施設 (Stanford Cell Sciences Imaging Facility) のライカ社製 SP8 顕微鏡を利用した。次に、ウェルを AB で洗浄し、ライカ社製 SP8 顕微鏡で観察した。核の可視化のために Hoechst 33342 色素を用いた。毒性試験のために、PrS を栄養膜幹細胞 (TSC) に添加し、ネクセロム社製 Cellometer を用いて、トリパンブルーにより生存率を試験した。

【0186】

腫瘍を検出する能力について標識タンパク質を試験するために、 5×10^4 個の 4T1 - 1uc 細胞を 5 匹 / 群の雄 BALB/c マウスの、左腋窩脂肪パッドに移植した。マウスは、移植の 1 週間後から開始して、腫瘍成長をモニターするために、毎日インビボ生物発光イメージング (BLI) でイメージングした。次に、マウスを移植後 11 日目に 13 mg / kg 体重の腹腔内 (IP) ドキソルビシンで処置し、翌日に BLI を行った。腫瘍を有する対照マウスはドキソルビシンによる処置を行わなかった。処置の 48 時間後、静脈内トレーサー注射 (1.3 g / kg のウレタンで IP 麻酔) の 1 時間後に、シングルヘッド A - SPECT ガンマカメラ (ガンマ・メディカ社 (Gamma Medica)) を用いてマウスをイメージングした (1 mm ピンホールコリメータ、128 工程で 128×128 イメージングマトリックス、15 秒 / 工程、2.7 cm ROR; FOV = 胸郭上部 / 頸部)。各タンパク質の注射量は $160 \mu l$ ($800 \mu Ci$) であった。その後、動物を屠殺し、体内分配を実施した。シクロヘキサミド処置実験は、5 匹 / 群の若齢 (7 週齢) 雄 Swiss Webster マウスを麻酔 (1.3 g / kg のウレタン IP) し、50 mg / kg のシクロヘキシミドを静脈内注射した。シクロヘリキシミド注射の 1 時間 45 分後に、トレーサーを注入した (PrS = $180 \mu l$ / $1.2 mCi$ / 投与; アネキシン V = $170 \mu l$ / $1.05 mCi$ / 投与)。トレーサー注射の 45 分後、マウスを、A - SPECT ガンマカメラ上のシングルヘッド平行孔コリメータ (128×128 マトリックス) を用いて、10 分間の静止全身画像を撮像した。

【0187】

生きた動物の感染によるアポトーシス部位への蛍光 PrS の特異的局在を調べるために、CD1 マウスに生物発光性リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) を静脈内注射した。この病原性微生物は脾臓を含む多くの臓器に感染し、単球や顆粒球の広範なアポトーシスを引き起こす。感染後の特定の時期において、脾臓は細菌複製の主要な場所であるため、脾臓における細菌由来 BLI シグナルは、アポトーシス用のプローブの局在と相關させることができる。マウスを感染させ、毎日撮像した。脾臓シグナルが明確になったら (8 週齢 CD1 雌マウスにおいて 2×10^5 コロニー形成単位の細菌の感染後 2 日目)、300 mg / kg 体重の Cy5 PrS をマウスに注射し、30 分後に動物を屠殺し、脾臓を摘出し、OCT で凍結し、蛍光顕微鏡法用に切片化した。未感染の対照マウスを使用した。

10

20

30

40

50

【0188】

フローサイトメトリーは、アーヴィング・ワイズマン研究室の Charles Chan によって実施された。上記のように作製された、新たに標識した FITC-PrS を使用した。マウス造血幹細胞 (HSC) はこの研究室でルーチンで純化されている。細胞は、c-Kit+、リネージネガティブな細胞を染色することにより、正常なマウス骨髄から単離した。細胞をさらに特徴付けるために、SLAMマーカー染色も実施した。これらのマーカーは自己複製および分化を行う細胞を染色するが、非染色の HSC は分化のみが可能である。結果に示されているように、その後の FITC-PrS による染色で、SLAM染色細胞の陽性率が明らかとなった。その後、FITCについて細胞をソーティングし、核の可視化のために Hoechst 33342 を使用して共焦点顕微鏡で調べた。

10

【0189】

結果

細胞培養におけるアポトーシス状況下で PrS 結合特異性を評価するために、いくつかのヒトおよびマウス乳がん細胞株を用いた。上記のように過酸化物でアポトーシスを誘導し、FITC-PrS 結合を評価した。これらの実験の例を図 2 に示す。未処理細胞は図 2 のパネル B に示されるような最小限の結合を示した。過酸化物の濃度およびインキュベーション時間は、濃度が高く且つ / またはインキュベーション時間が長くなるほど細胞が剥離し、染色および顕微鏡法が不可能となるため、一部の細胞のみが影響を受けるように選択した。さらに、多くの影響を受けていない細胞の存在は、各視野内の内部陰性対照の役割を果たした。FITC-アネキシンは、PrS と同様のアポトーシス特異性を示し、内部陽性対照として機能した。次に、この 2 つのタンパク質の共局在および競合的結合について試験した。共局在化については、FITC 標識した PrS およびアネキシン、並びに Cy5 標識した PrS およびアネキシンの両方を作製した。4T1 細胞を過酸化物で処理し、Cy5 標識した PrS およびアネキシン、並びに FITC 標識した PrS およびアネキシンで染色することで、両方のフルオロフォアの組み合わせを用いた。次に、EVS 蛍光顕微鏡で細胞を可視化した。結果を図 3 に示す。試験した条件下では、明るく染まっている細胞全てが、両方のタンパク質による染色を示した。しかし、Cy5 を使用したか FITC を使用したかにかかわらず、PrS は、弱いながらも、アネキシンが染色しなかつたいくつかの細胞を染色したようであった(図 3)。各タンパク質による異なる細胞の相対的な染色強度は、2 つのプローブの間で異なることがあった。すなわち、アネキシンが 2 つの細胞を同じ強度で染色し、PrS が染色しないこともあれば、その逆もあった(図 3 A、緑色の矢印および挿入図)。このように、両プローブは概して同じ細胞を染色しても、微妙な違いを示すように思われた。競合アッセイでは、漸増する過剰量の未標識アネキシンをアポトーシス 4T1 細胞と共に 15 分間プレインキュベートした後、細胞を Cy5-PrS で染色した。驚くべきことに、これらのタンパク質は露出した PrS という同じ標的分子に結合すると考えられているが、PrS の染色は、試験された最多過剰量である 1,000 倍の過剰アネキシンによってさえも遮断されなかった(図 3 C)。アネキシンと PrS の共染色は、多くの細胞型で確認された。この 2 つのタンパク質は概して各細胞型で同じ細胞を染色したが、他の差異が明らかになった。特に、細胞よりも小さな物体の中には、染色に違いがあるものがあった(図 4)。これらの物体は、過酸化物処理後に存在数が増加し、アポトーシス体、すなわちアポトーシス細胞が断片化する際に生じた膜結合型細胞断片と解釈された。図 4 に示すように、これらの物体の一部は両方のタンパク質で染まったが、PrS はこれらの実体を染色したが、アネキシンは染色しなかった。この観察は予想外のものであった。細胞内実体の染色の差異をさらに調べるために、標準的な遠心分離プロトコルを用いて、4T1 マウス腫瘍細胞から細胞外小胞 (EV) を調製した。この 2 つのタンパク質は、これらの小胞の染色にも差異があり(図 5)、この結果は、生物学的および治療的な意味合いを持つ可能性がある。

20

30

40

【0190】

EV、具体的にはエキソソーム、微小小胞体 (MVE)、アポトーシス小体 (AB) は、生体分子の細胞間移動を介した細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たして

50

いると推定されている。これらの種類のEVの生合成は異なっており、エンドソーム（エキソソーム）もしくは原形質膜（MV）のいずれかに由来するか、またはプログラム細胞死の産物（AB）である。全ての哺乳類細胞はEVを分泌すると考えられている。各種EVは、隣接する細胞と離れた細胞の両方にカーゴ（cargo）分子を移動させることで、腫瘍の発生や進行に関与するような細胞の行動に影響を与える。実際、EVは、増殖シグナルの維持、増殖抑制の回避、細胞死への抵抗、エネルギー代謝の再プログラミング、ゲノム不安定性の獲得、および腫瘍微小環境の発達といった、がんのほぼすべての特徴に関与している可能性がある。また、EVは血管新生の誘導、浸潤の制御、前転移ニッチの惹起、炎症の持続、および免疫監視機構の回避とも関連付けられている。免疫細胞もEVを介して連絡していると思われ、EVを腫瘍細胞、感染組織、創傷からのシグナルとして認識し得る。EVのバイオロジーとがんの特徴へのその貢献をより深く理解することは、がんの診断と治療の新たな可能性に繋がる。この分野の発展には、さらなるEV表面マーカーの開発が不可欠であり、PrSはそのような決定因子になり得る。

【0191】

蛍光顕微鏡法によるこれらの研究に続いて、PrSおよびアネキシンによる染色の細胞内局在を共焦点顕微鏡で評価した。マウス4T1細胞（Luc-GFPレポーター欠損）を、8分割チャンバースライド上に 1×10^4 細胞/チャンバで播種し、翌日に2mM H₂O₂またはt-BHP（2時間曝露）でアポトーシスを誘導した。その後、細胞を洗浄し、PrSおよびアネキシンで15分間染色した。Hoechst 33342色素を用いて核酸を染色した。全ての場合において、最も明るく染まった細胞は両方のプローブで染色されていた。しかし、多くの細胞で、細胞質に標識PrSが見られたが、標識アネキシンは見られなかった（図6）。アネキシンは内部移行され、少数の細胞の小胞内にあると思われるが、表面局在化したPrSと、内部移行したアネキシンは同一細胞内で一緒に観察されなかった。この2つのタンパク質は共にPSと結合すると推定されているため、これらの結果は予想外の結果であった。PrSの内部移行をさらに研究するために、タイムコース実験を実施した。アポトーシス4T1細胞を、Cy5アネキシンおよびFITC PrSで5分間染色し、プローブの添加から5分以内に観察した。PrSは、これらの細胞の細胞質に直ちに観察され、5分以内の内部移行が示された（図7）。また、タイムコース画像により、PrSとアネキシンが、初期の時点では同じ細胞を必ずしも等しくは染色しないことが示された。図7の細胞は異なる段階のアポトーシス中と思われ、左側の細胞は見かけ上インタクトな核膜に囲まれた凝集していない核を示しており、右の細胞は、アポトーシスプロセスの後半に起こる染色体凝縮の特徴となる場合が多い強い染色を示している。このような染色パターンは、PrSがアネキシンよりもアポトーシスのより早期に結合することを示している可能性がある。この時点では単なる推測ではあるが、このような選好性は、これまでに確認されたこれらのタンパク質間の違いの多くを説明するだろう。例えば、図3Aおよび図3Bのように、一部の細胞がPrSによっては染色されるが、アネキシンでは染色されないのは、アポトーシスのプロセスの早期にPrSが結合しているからである可能性がある。生きた動物におけるPrSの局在を調べるために、いくつかの実験を実施した。これらの研究では、アポトーシスを誘導することが知られているドキソルビシンで処理した腫瘍へのPrSの局在化に加え、in vivoでの化学的および感染によるアポトーシス誘導を用いた。HYNIC標識したPrSおよびアネキシンを用いたSPECTイメージングを、4T1Luc乳腺腫瘍を与え、ドキソルビシンで処置した動物で実施した。4T1腫瘍はルシフェラーゼで標識されているため、インビオ生物発光画像法（BLI）を用いることで4T1腫瘍をマウスでイメージングすることができる。この実験から得られた画像の1つを図8に示す。この方法は、腫瘍の移植を評価し、個々の動物における進行を経時的に追跡することに用いることができる。次に、⁹^{9m}Tc標識したPrSおよびアネキシンを、ドキソルビシンおよび対照で処理した動物のSPECTイメージングに使用した。結果の一例を図9に示す。2匹の動物の頭部および胸郭の画像は、唾液腺におけるPrSプローブの非特異的な蓄積を示しており、このプローブを用いた場合のS/N比の低さを示している。したがって、示されているPrS画

10

20

30

40

50

像の表示の閾値を下げる、バックグラウンドをより多く取り除いた結果、より明るい着色画像が得られた。S/N比の低さは、1mgのタンパク質のみのHYNIC標識が最適以下であること、また、HYNIC:タンパク質標識比の対照試験を実施できないことに起因すると考えられる。

【0192】

また、肝臓でアポトーシスを誘導するシクロヘキサミドで処置したマウスのSPECTイメージングを実施した(図10)。図10では、5匹のマウスの全身画像が各パネルに示されている。多くの放射性標識プローブと同様に、バックグラウンドが腎臓に見られる。マウスをシクロヘキサミドで処置した場合、肝臓におけるアネキシンSPECTシグナルが増加した。ここでも、PrSはアネキシンと比較して低いシグナルを示した。アネキシンはシクロヘキサミド処置マウスのアポトーシスを起こした肝臓を検出することができたが、PrSは処置による肝臓におけるシグナル増加をごくわずかに示しただけであった。SPECTイメージングとは独立してアポトーシス組織および処置腫瘍へのPrSの局在化を調べるために、またHYNIC標識の付随する合併症を調べるために、アポトーシス応答を誘導する細菌に感染したマウスおよび腫瘍担持マウスにCy5-PrSを注射した。感染には、ルシフェラーゼで標識され、BLIについてよく特徴付けられた病原性微生物であるリステリア菌(*Listeria monocytogenes*)を使用した。脾臓からの特徴的なBLIシグナルは、良好な共局在研究を可能にする。CD1マウスを上記と同様に感染させ、感染後2日目にBLIでイメージングした。その後、マウスにCy5-PrSを注射し、30分後に屠殺し、切片作製と蛍光顕微鏡法のために脾臓を摘出した(図11)。全ての場合において、感染マウスからの脾臓切片は、対照よりもはるかに大きなCy5蛍光シグナルを示した。図11において、図示されている感染マウスは光子数が少なかったが、このことは、この動物では感染がまだそれほど進行していないことを示している。多くのマウスはこの日に脾臓からこの10倍のシグナル強度を示した。しかし、Cy5チャネルの蛍光は、図示されている未感染対照と比較しても、非常に強いものであった。顆粒球およびマクロファージがこのような動物におけるアネキシンシグナルの主な供給源であることが示されている(これらの細胞は、組織の破壊を制限するためにアポトーシスをプログラムしている)ことから、この結果は、感染に対し進行中の自然免疫応答を反映している可能性がある。

【0193】

次に、ドキソルビシンで処置した4T1腫瘍への蛍光PrSの局在性を試験した。腫瘍を移植したマウスを、上述と同様にドキソルビシンで処置し、Cy5-PrSを静脈内注射し、30分後に屠殺し、切片作製および蛍光顕微鏡法のために腫瘍を摘出した。結果を図12に示す。強い染色領域が処置動物で観察されたのに対し、未処置の腫瘍切片からはそれよりも控えめなシグナルが観察された。いくつかの未処置腫瘍は、バックグラウンドよりもシグナルが高い小領域を示したが、未処置切片のいずれにおいても、処置腫瘍と同様の強度のシグナルは観察されなかった。

【0194】

幹細胞は、分化細胞とは表現型が異なり、免疫応答の誘導を避けるために非アポトーシス的にPSを発現することがある。栄養膜幹細胞(TSC)は、培養下でいくつかの種類のトロホblastに分化する。TSCは、マウス子宮擦過標本から、線維芽細胞増殖因子、アクチビン、およびヘパリンの存在下での増殖により作製される。これらの因子を培地から除去すると、TSCは自然に巨大細胞に分化する(図13)。TSCはPrSで染まつたが、培養下でこれらの細胞から派生した分化後トロホblastは染まらなかった(図14)。また、PrSがアポトーシス誘導なしで幹細胞に内部移行されることも確認した。この結果は、アポトーシスが誘導された癌化細胞株での観察結果を裏付けるものである。アポトーシスが誘導されない場合、腫瘍細胞で観察された染色は最小限のものであった。幹細胞内への内部移行を調べるために、間葉系幹細胞(MSC)とTSCを使用した。MSCはマウス骨髄から用意した。マウスから骨髄をフラッシュし、成長因子の非存在下で6日間培養した。このインキュベーションの間、MSCおよび造血幹細胞(HSC)は

10

20

30

40

50

複製するが、一方、線維芽細胞は接着するが、数世代を超えては増殖しない。6日後には、単層が見えるようになる。トリプシン処理により継代すると、接着したMSCは保持されるが、浮遊状態で増殖するHSCは失われる。線維芽細胞は、増殖因子がないために持続性がなく、保持もされない。従って、この単純な手順によって、ほぼ均質なMSCの集団が得られる。これらの細胞の同一性を確認するために、培養物をデキサメタゾンとグリセロールリン酸（骨芽細胞への分化を誘導する）またはデキサメタゾンとインドメタシン（脂肪細胞への分化を誘導する）で別々に処理した。結果を図15に示す。上記の処理に応答して、分化後の細胞は、それぞれの細胞の外観を示した。脂肪細胞は大きな脂肪小胞を含み、骨芽細胞は特有の細胞内コラーゲンとミネラル化を伴って黒色を呈した。

【0195】

10

細胞内染色パターンを評価するために、未分化MSCをPrSおよびアネキシン、並びにHoechst核染色試薬で染色し、共焦点顕微鏡で観察した。観察の結果を図16に示す。PrSは急速に内部移行した。MSCの場合、約20個に1個の割合でPrSで染まり、以前のデータと一致したが、染色の正確な割合は求めなかった。MSCの形態は不均一であり、これらの細胞は培地中に大量の物質を分泌し、その一部がチャンバースライドの表面に接着して、画像の一部にバックグラウンドを生じる。それでもなお、データは、表面にアネキシンを添加した5分以内の、PrSの内部移行を明確に示している。また、TSCをMSCで行ったように染色およびイメージングした。観察により、これらの細胞への内部移行が同様に確認され、この内部移行も、タンパク質添加の5分以内に生じている。結果を図17に示す。TSCは、形態学的に非常に可変的であり、図から分かるように、分化がない場合には多核であることがある。MSCと同様、これらの初代細胞は培地中に大量の物質を放出しており、その一部は細胞外小胞と確認されている（以前のデータ）。ここでも、この物質によりイメージングが困難となる。いくつかのEVはPrSでは染まるが、アネキシンでは染まらず、この現象は、図18の、TSCにおいて確認できる。このTSCのクラスターの画像では、細胞によって放出されている小胞は、アネキシンでは染まるが、内部化されるPrSでは染まらない。これらのパターンから、PrSおよびアネキシンの特異性および結合標的に関する、興味深い疑問が提起される。この2つのタンパク質はどちらもPSと結合すると言われている。しかし、EVへの結合性の差異や細胞内局在パターンの違いから、両者は全く同じ様式で結合しているわけではないことが示唆される。この違いの根拠を明らかにするにはさらなる研究が必要となるが、その重要性が証明される可能性がある。また、インビトロでアストロサイトおよび他の神経細胞への分化が可能な形質転換細胞株である、神経前駆細胞株C17.2のPrS染色を観察した（図19）。この割合は推定値であるが、これらの形質転換細胞の約5%が染まった。驚くべきことに、TSCへの侵入は、細胞が4℃に冷やされた場合でも発生した（図20）。しかしながら、チャンバーを顕微鏡上に置いてから、継続的に冷やすことができなかつたことには留意されたい。それにもかかわらず、イメージング手順の5分間の時間枠内では、温度はそれほど上昇できなかった。この結果は、刺激的ではあるが、明らかに、より制御された条件の下で反復される必要がある。この発見が証明されれば、そのメカニズムは非常に興味深いものになることであろう。

【0196】

20

30

40

我々は造血幹細胞（HSC）をPrSで染色することに成功した。フローサイトメトリーを用いて、HSCがPrSで染まっていることを確認し、これらの細胞におけるPrSの内部移行を共焦点顕微鏡で観察した。HSCを同定し、蛍光標識細胞分取（FACS）を用いて単離した。この細胞は、骨髄において、リネージュネガティブな、SCA/c-kit陽性細胞として同定された（図21）。次に、これらをFITC-PrSで染色した。短期および長期の2つのHSC集団は、SLAMマーカー染色のパターンで同定することができる。SLAM（Signaling Lymphocyte Activation Molecule）マーカーであるCD48、CD150、CD229、およびCD244は、SLAMパターン陽性の染色は自己複製と分化の両方の能力を示すのに対し、SLAMパターン陰性のHSCは分化のみ可能であることを示すというように、造血幹細胞の染色に特徴的なパターンで差異が生じ

50

る。PrSは長期のHSCサブセットを染め(図22)、短期のHSC(図23)も染めた。図示されている細胞はヨウ化プロピジウム(PI)陰性であり、これは、これらの細胞が全て生細胞であることを意味している。この結果は、幹細胞サブセットがアポトーシスの誘導なしでPrSで染まることを示す以前の実験を裏付けるものである。

【0197】

次に我々は、PrSのHSCへの内部移行についての試験へと進んだ。この実験は多くの要因により複雑なものとなつた。おそらく、最も困難であったのは、一晩の間に培地内で大量に死んでしまう、HSCの培養下での生存であった。従って、フローサイトメトリー解析と共に焦点顕微鏡観察が同じ日に行われるよう実験の時間を設定する必要があった。さらに、この細胞は接着しないため、顕微鏡観察が最適なものにならない。顕微鏡観察をより効率的なものとするために、細胞を培地小滴中に再懸濁した。最後に、顕微鏡法で分析したPrS染色細胞がまだ生きていることを確認する必要があった。多くのHSCは、分析および単離の過程で死滅した。そのため、Hoechst核染色に加えてPIを添加してスキャンし、別のチャネルを使用した。PIで明るい核の存在により、死細胞が示された。このようにタイミングは困難で複雑であったが、実験を行うことができ、生きたHSCへのPrSの内部移行が確認された(図24)。核内PI染色がないことにより、細胞の生存が確認された。しかし、図25に示すように、一部の細胞は死滅したか、死滅しつつあった。図示された実験は複雑さで長期のものであったが、結果は内部移行を示している。

【0198】

最後に、図26では、TSCの予備的な毒性試験を行っており、135μg/mlの濃度では、PBSと比較して、30分後に生存率が78%から74%へと、ごく最小限の範囲でのみ低下することが確認された。このレベルでは、培養液量の10%がPrS含有液であったことを考慮すると、この結果は、PrSは基本的に幹細胞に無毒であり、観察された軽度の毒性は調製物それ自体の汚染内容物に起因する可能性が高いという、定性的な観察を裏付けるものであった。PrSの濃度が低い場合は、生存率に対する影響は示されなかった。試験した最高レベルのタンパク質は、染色に使用した濃度の1000倍超であった。この毒性試験は正式にはこのプロジェクトの一部ではなく、完全な毒性研究にはより広範な試験が必要となるが、この毒性試験では、PrSはほとんど毒性を示さなかつた。

【0199】

要約

以上の結果から、PrSが様々な種類の幹細胞を含む様々なPrS発現細胞に迅速に内部移行することが示されたが、このことは、PrSが治療薬の開発を目的とした操作に適したユニークな特徴を持っていることを示唆している。また、図3および図7などから分かる、PrSとアネキシンの特異性の差異は、これら2つのタンパク質の間では結合それ自体が異なることを示唆している。アネキシンが四量体であり、PrSが単量体であるという事実だけでは、これらの違いを説明することはできず、これらのデータは、細胞表面上のいくつかの他の成分がPrSの結合に関与している可能性を示唆している。PrSの結合、特異性、および内部移行の機構、並びにモジュラー操作性は、多くの可能性を提供している。

【0200】

実施例2

幹細胞は、分化細胞とは表現型が異なり、免疫応答の誘導を避けるために非アポトーシス的にPSを発現することがある。幹細胞を、アポトーシスを誘導せずに、蛍光標識のペイロードを含む本開示のGLAドメイン分子で染色した。

【0201】

胎盤内の数種類のトロホブラストに分化する栄養膜幹細胞(図14)は、プロテインSで染まったが、培養下のこれらの細胞から派生した分化後のトロホブラストは染まらなかった。この染色によって、インビボで分化した幹細胞とインビトロで分化した細胞を区別

10

20

30

40

50

することができた。

【0202】

このデータから、本開示の分子は、インビボの標的細胞に対して、またはエキソビボの試料中で、使用することができる。

【0203】

結論

様々な細胞型を用いて、プロテインSがアポトーシス細胞と結合することが示された。非アポトーシス対照細胞のバックグラウンド染色は最小限であった。また、いくつかの細胞タイプを用いて、プロテインSの染色がアネキシンの染色と比較された。興味深いことに、プロテインSは、アネキシンでは全く染まらなかつた見かけのアポトーシス小体を染めることができた。この結果は予想外であり、プロテインSとアネキシンは共にPSと結合するため、特異性に違いがあるとは予想されていなかつた。このような違いを示す更なる証拠として、1,000倍の過剰アネキシンがプロテインSの結合を阻止できなかつたことがある。繰り返しになるが、この結果は、この2つのタンパク質が全く同じ分子標的に結合するならば、理解が困難なものであった。共焦点顕微鏡を用いて、プロテインSとアネキシンの細胞内局在を研究したところ、同じ細胞内であつても、これら2つのタンパク質には顕著な違いが示された。種々の細胞型で、アネキシンが主に表面に局在していたのに対し、プロテインSはほとんどの場合で細胞内に存在していた。このことは、プロテインSがバイオデリバリービヒクルとして開発できることを示唆している。タイムコース実験では、プロテインSは結合後10分以内に内部移行することが明らかになった。これらの実験ではまた、プロテインSがアポトーシスの過程でアネキシンよりも早期に結合するという可能性の証拠も得られている。この急速な取り込みについて、この興味深いメカニズムの更なる研究が必要であることは明らかであり、プロテインSのバイオデリバリー剤としての開発に重要な意味を持つ可能性がある。また、アポトーシス腫瘍や化学的に誘導された肝臓のアポトーシスのSPECTイメージングのために、プロテインSをHYNIC結合型の^{99m}Tcで標識し、同様に標識したアネキシンと比較したところ、シクロヘキサミド処置した動物では、^{99m}TcプロテインSの肝臓シグナルのわずかな増加が観察された。リストリアモデルと乳がんモデルの両方において、Cy5プロテインSはアポトーシス組織に優先的に局在し、どちらの場合も強い信号対雑音を示した。

【0204】

要約すると、プロテインSは細胞培養液中および生体内でアポトーシスに対して特異性を示した。注目すべきことに、このタンパク質は、アネキシンと比較した場合に、異なる特異性と細胞内局在性を示し、プロテインSの内部移行は迅速に起こり、これは、さらなる研究に値する側面である。

10

20

30

40

50

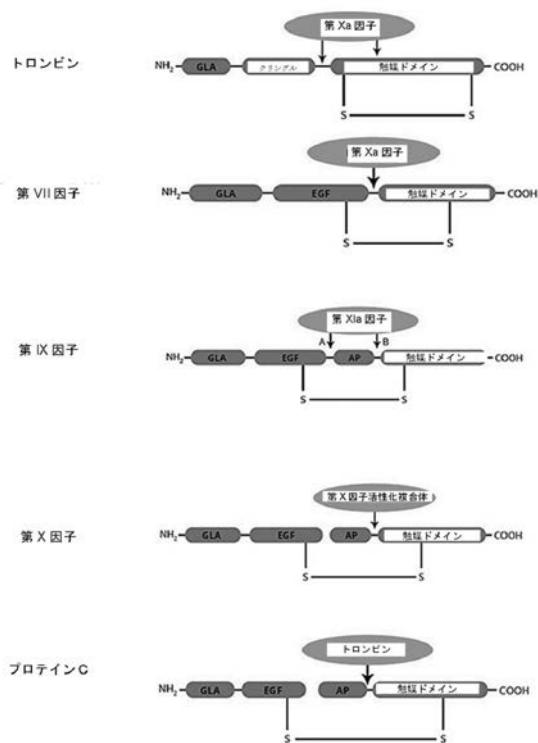
参考文献

1. Thompson, W.W., et al., Estimates of US influenza-associated deaths made using four different methods. *Influenza Other Respir Viruses*, 2009. 3(1): p. 37-49.
2. Osterholm, M.T., et al., Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 2012. 12(1): p. 36-44. 20
3. Dixit, R., et al., Emergence of oseltamivir resistance: control and management of influenza before, during and after the pandemic. *Infect Disord Drug Targets*, 2013. 13(1): p. 34-45.
4. Jefferson, T., et al., Oseltamivir for influenza in adults and children: systematic review of clinical study reports and summary of regulatory comments. *BMJ*, 2014. 348: p. g2545.
5. Godfrey, C., et al., Delivery is key: lessons learnt from developing splice-switching antisense therapies. *EMBO Mol Med*, 2017. 9(5): p. 545-557.
6. Kaczmarek, J.C., P.S. Kowalski, and D.G. Anderson, Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality. *Genome Med*, 2017. 9(1): p. 60. 30
7. Ling, H., Non-coding RNAs: Therapeutic Strategies and Delivery Systems. *Adv Exp Med Biol*, 2016. 937: p. 229-37.
8. Poon, I.K., et al., Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol*, 2014. 14(3): p. 166-80.
9. Birge, R.B., et al., Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ*, 2016. 23(6): p. 962-78.
10. Amara, A. and J. Mercer, Viral apoptotic mimicry. *Nat Rev Microbiol*, 2015. 13(8): p. 461-9. 40
11. Moller-Tank, S. and W. Maury, Phosphatidylserine receptors: enhancers of enveloped virus entry and infection. *Virology*, 2014. 468-470: p. 565-80.
12. Ludwig, S., et al., MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants. *FEBS Lett*, 2004. 561(1-3): p. 37-43.
13. Sharma, R., et al., Detection of phosphatidylserine-positive exosomes for the diagnosis of early-stage malignancies. *Br J Cancer*, 2017. 117(4): p. 545-552.
14. Azuma, K., et al., Liver-specific gamma-glutamyl carboxylase-deficient mice display bleeding diathesis and short life span. *PLoS One*, 2014. 9(2): p. e88643.
15. Hjortoe, G., et al., Factor VIIa binding and internalization in hepatocytes. 50

- J Thromb Haemost, 2005. 3(10): p. 2264-73.
16. Meliopoulos, V.A., et al., Host gene targets for novel influenza therapies elucidated by high-throughput RNA interference screens. FASEB J, 2012. 26(4): p. 1372-86.
17. Pleschka, S., et al., Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. Nat Cell Biol, 2001. 3(3): p. 301-5.
18. Makkoch, J., et al., Human microRNAs profiling in response to influenza A viruses (subtypes pH1N1, H3N2, and H5N1). Exp Biol Med (Maywood), 2016. 241(4): p. 409-20.
19. Wolf, S., et al., MicroRNA Regulation of Human Genes Essential for Influenza A (H7N9) Replication. PLoS One, 2016. 11(5): p. e0155104. 10
20. Skalickova, S., et al., Perspective of Use of Antiviral Peptides against Influenza Virus. Viruses, 2015. 7(10): p. 5428-42.
21. Matsubara, T., et al., Sialic acid-mimic peptides as hemagglutinin inhibitors for anti-influenza therapy. J Med Chem, 2010. 53(11): p. 4441-9.
22. Wunderlich, K., et al., Identification of a PA-binding peptide with inhibitory activity against influenza A and B virus replication. PLoS One, 2009. 4(10): p. e7517.
23. Ozcan, G., et al., Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. Adv Drug Deliv Rev, 2015. 87: p. 108-19. 20
24. Mack, S., et al., Pseudo-Ligandless Click Chemistry for Oligonucleotide Conjugation. Curr Protoc Chem Biol, 2016. 8(2): p. 83-95.
25. Paredes, E. and S.R. Das, Click chemistry for rapid labeling and ligation of RNA. Chembiochem, 2011. 12(1): p. 125-31.
26. Zheng, Y. and P.A. Beal, Synthesis and evaluation of an alkyne-modified ATP analog for enzymatic incorporation into RNA. Bioorg Med Chem Lett, 2016. 26(7): p. 1799-802.
27. Jain, N., et al., Current ADC Linker Chemistry. Pharm Res, 2015. 32(11): p. 3526-40.

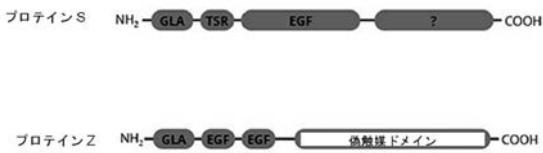
【図 1 A】

図 1A



【図 1 B】

図 1B



【図 1 C】

図 1C

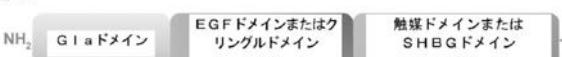
○H-ループ ジスルフィド ループ 水性スティック領域

PS: ANS-LLVYVTKCGNLYR/C1-GLCNKYYAR/VF/NDP-YTDYEVYPKYL
PZ: AGSYLLVYVLP-YGNLYK/CYVY-ICVYVYAR/VF/NVVVDYFWRRMK
PT: ANT-ELVYVVRKGNLYR/CVYV-TCSYVYAFYAL/SSTATDVEWAKYT
FVII: ANA-ELVYVLRPGSLYR/CYVY/QCSFVYAR/TEDDA-RTEKLEFWISYS
B0178: ANA-ELVYVLRPGSLYR/CYVY/QCSFVYAR/YIEYDA-RTEKLEFWISYS

Modified from Hansson and Stenflo, Journal of Thrombosis and Haemostasis

【図 1 D】

図 1D

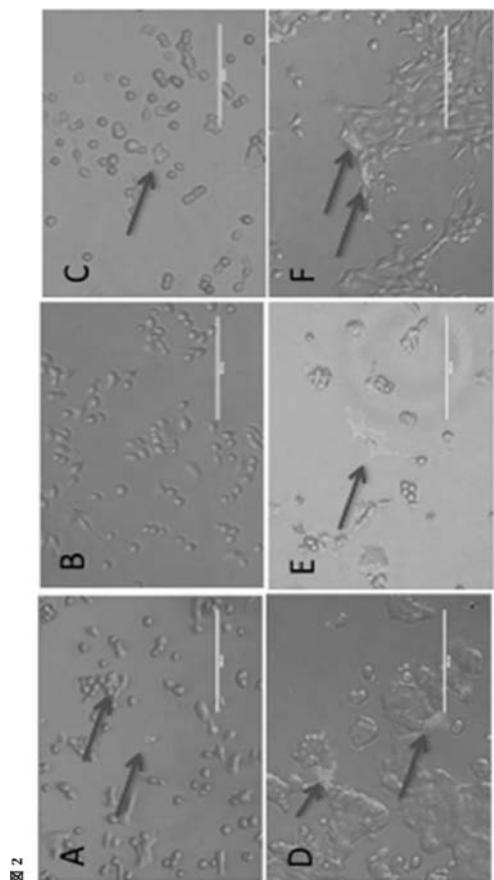


【図 1 E】

図 1E GLA 成分の実施形態

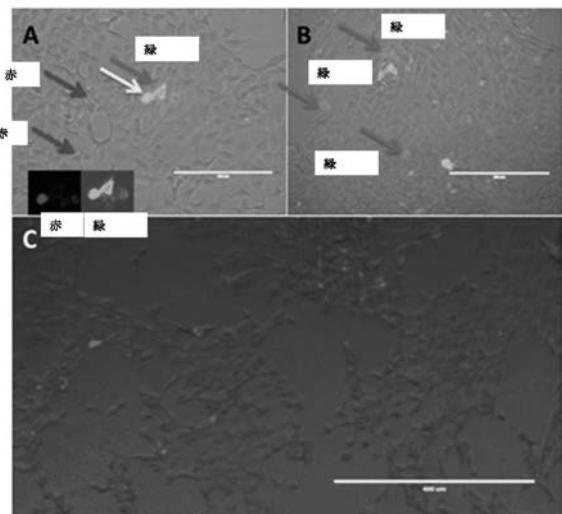


【図 2】



【図 3】

図 3



【図4】

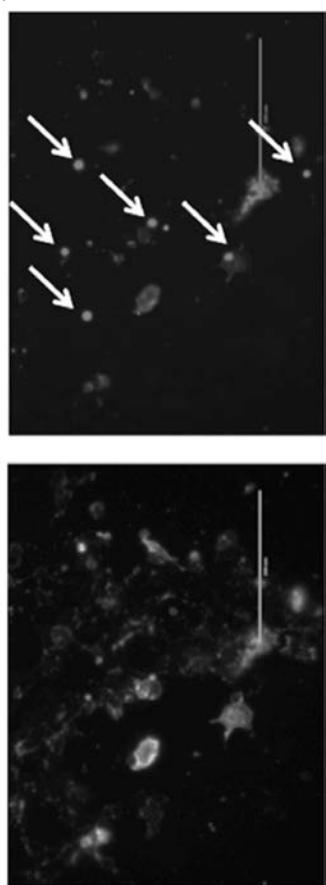


図4

【図5】

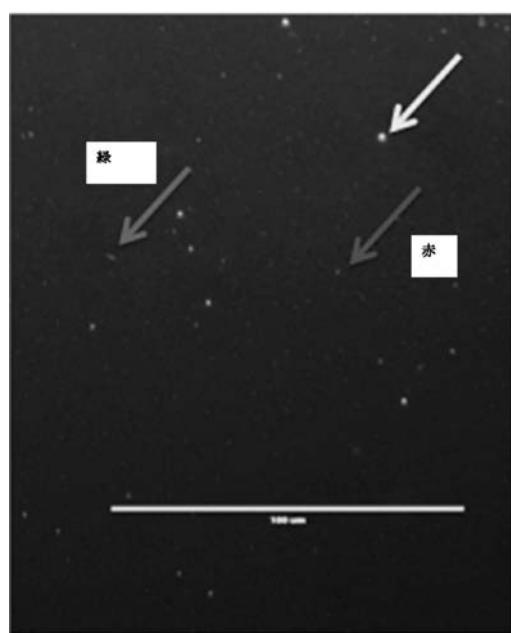


図5

【図6】

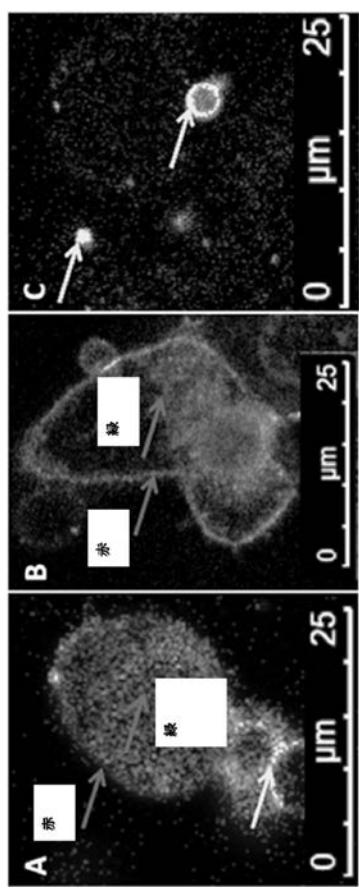


図6

【図7】

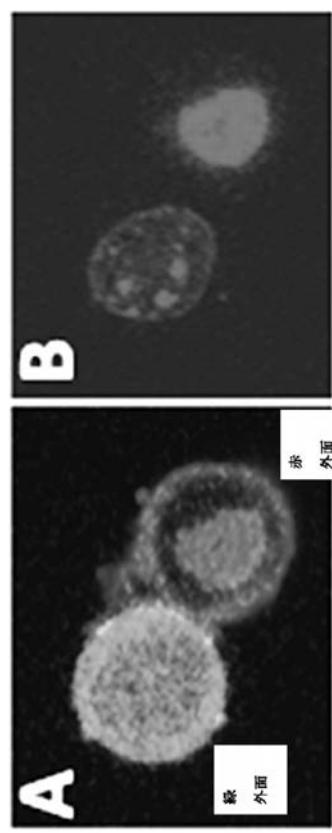


図7

【図8】

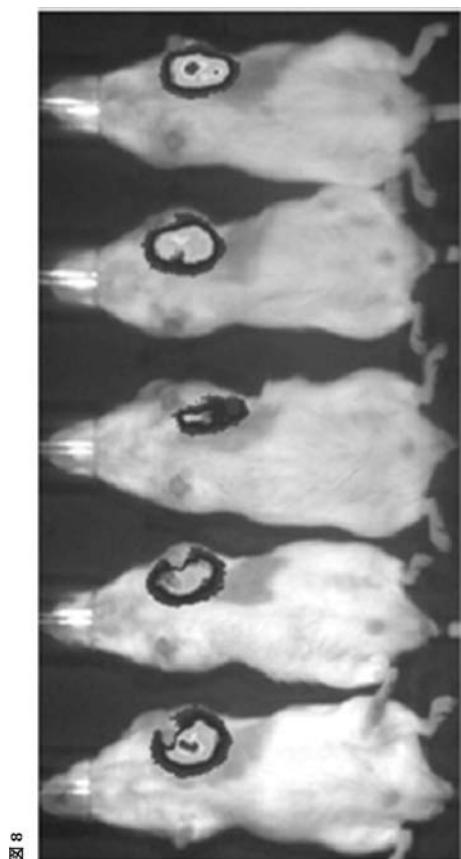


図8

【図9】

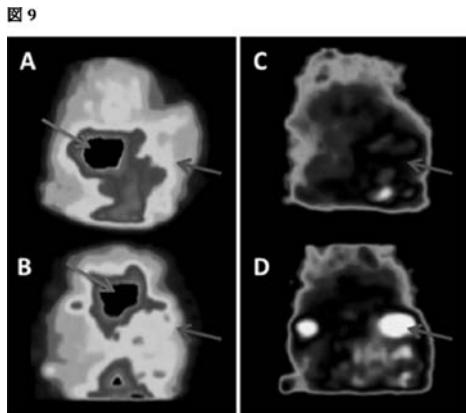


図9

【図10】

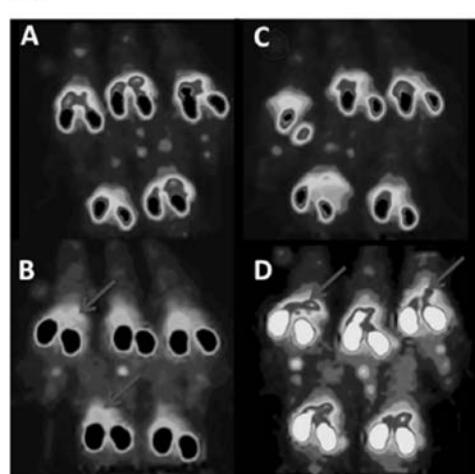


図10

【図11】

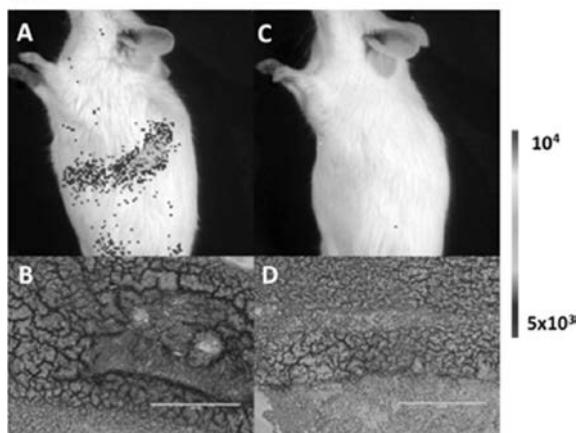


図11

【図 1 2】

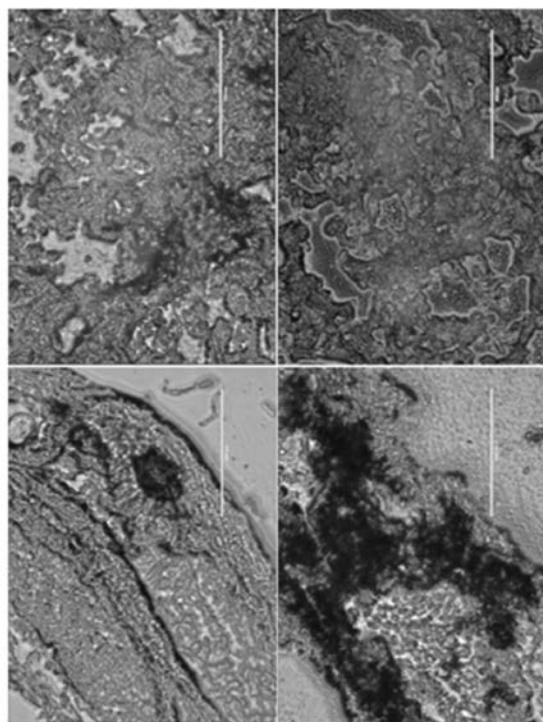


図 12

【図 1 3】

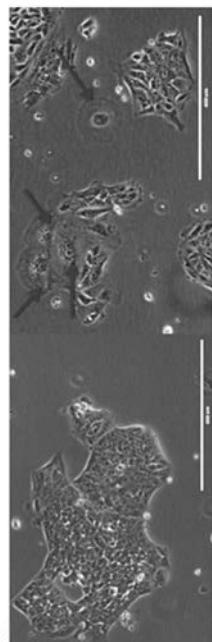


図 13

【図 1 4】

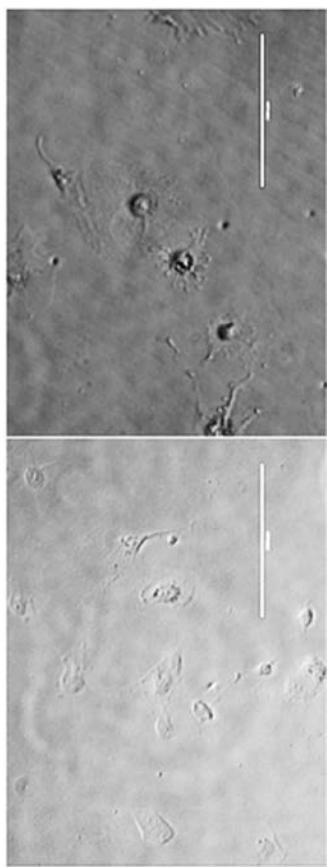


図 14

【図 1 5】

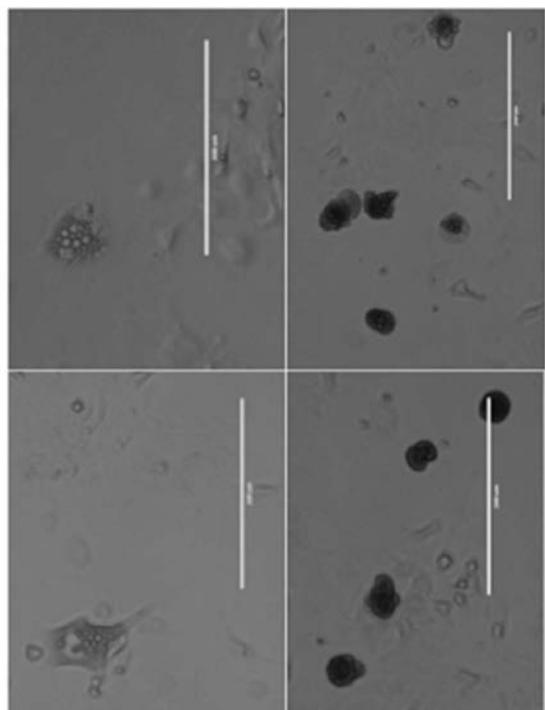
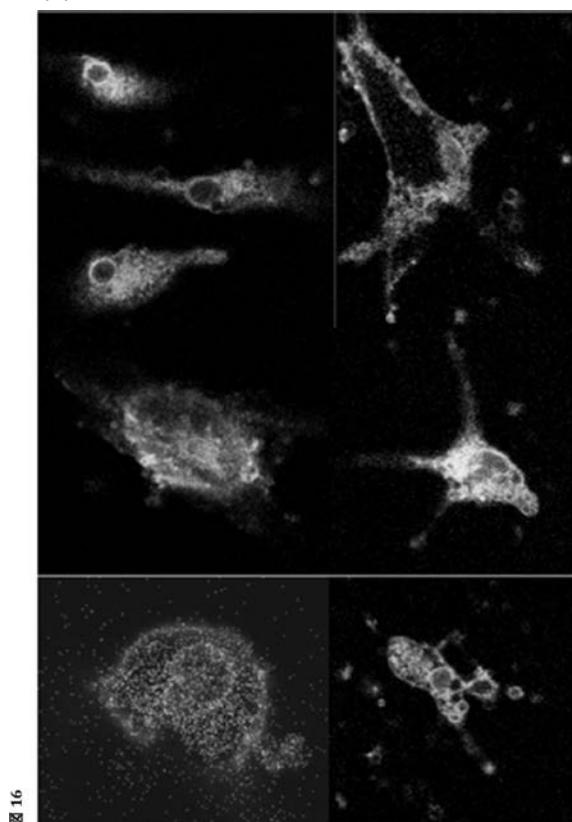
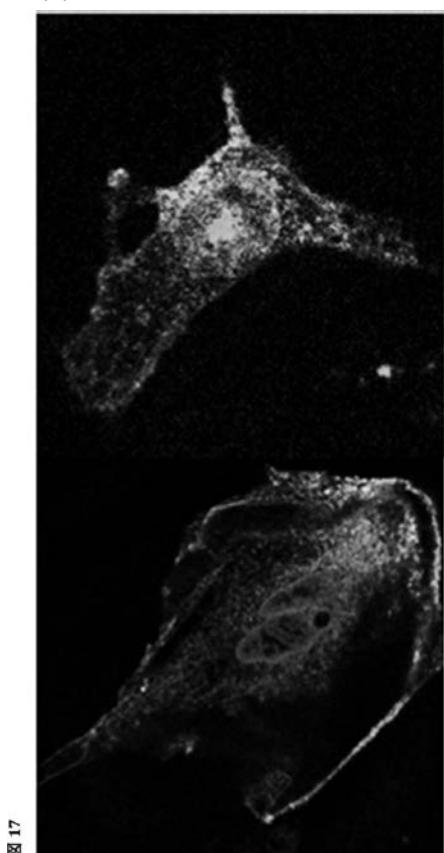


図 15

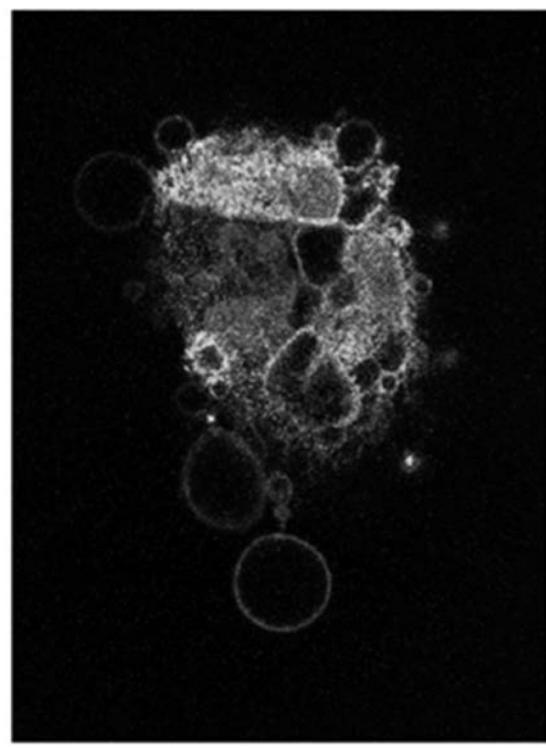
【図 16】



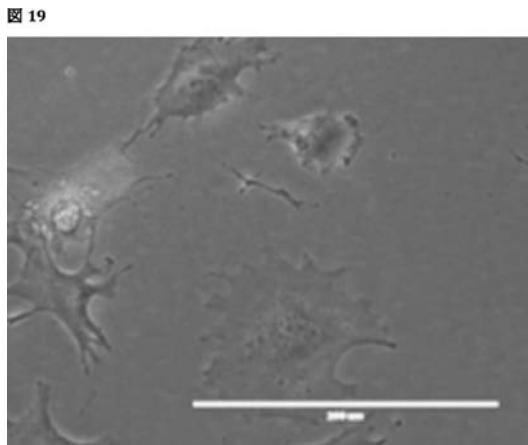
【図 17】



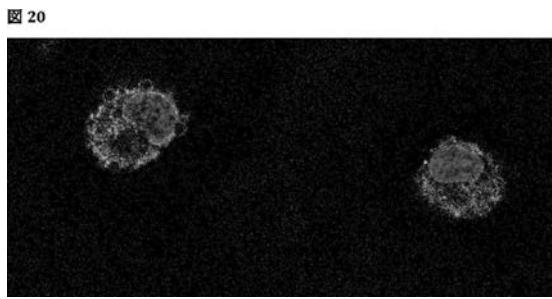
【図 18】



【図 19】

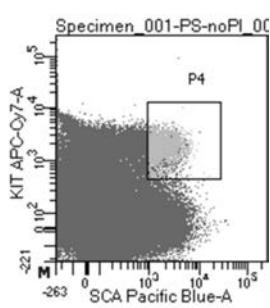
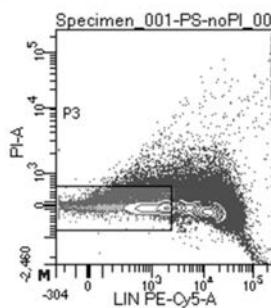


【図 20】



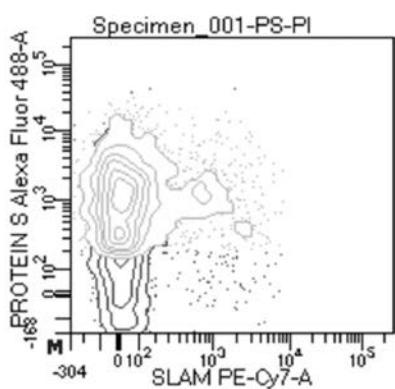
【図21】

図21



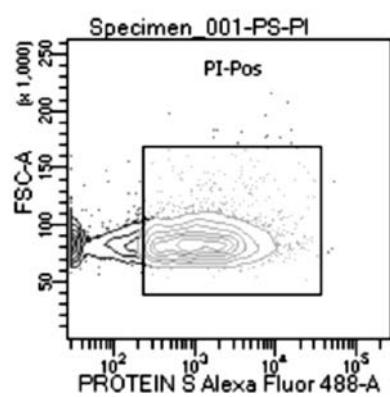
【図22】

図22



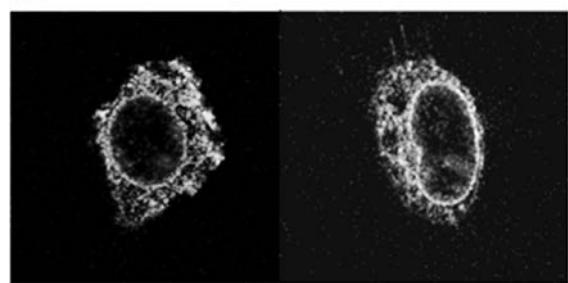
【図23】

図23



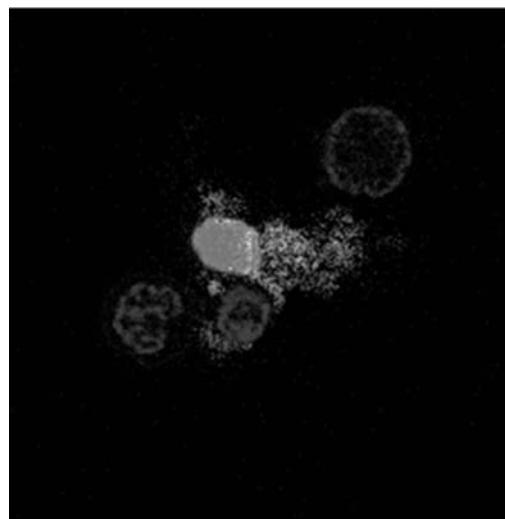
【図24】

図24

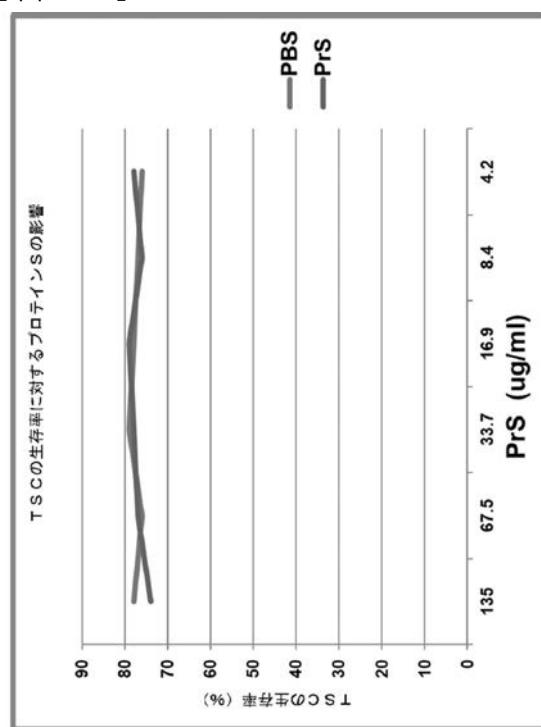


【図25】

図25



【図26】



【配列表】

2020533404000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				
				International application No PCT/US2018/049624
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/09 C12N9/74 C12N9/64 C07K14/755 C07K19/00 C12N5/071 C12N5/0775 C12N5/0789 C12N5/073 ADD. <small>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</small>				
B. FIELDS SEARCHED <small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> C12N C07K				
<small>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</small>				
<small>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</small> 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	WO 2014/151535 A1 (BAYER HEALTHCARE LLC [US]) 25 September 2014 (2014-09-25) cited in the application page 3; claims 1-9; example 1; sequence 6 -----	1-26		
A	KRISTOF SCHUTTERS ET AL: "Phosphatidylserine targeting for diagnosis and treatment of human diseases", APOPTOSIS ; AN INTERNATIONAL JOURNAL ON PROGRAMMED CELL DEATH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, vol. 15, no. 9, 4 May 2010 (2010-05-04), pages 1072-1082, XP019812780, ISSN: 1573-675X page 1072 page 1076; table 1 ----- -/-	1-26		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<small>* Special categories of cited documents :</small> <small>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</small> <small>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</small> <small>"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)</small> <small>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</small> <small>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</small>				
<small>"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</small> <small>"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</small> <small>"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</small> <small>"&" document member of the same patent family</small>				
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report		
19 November 2018		05/12/2018		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Paresce, Donata		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/049624

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011/159571 A1 (BARRY MICHAEL A [US] ET AL) 30 June 2011 (2011-06-30) page 1 - page 2; example 1 -----	1-26
A	LEMKE GREG: "Phosphatidylserine Is the Signal for TAM Receptors and Their Ligands", TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 42, no. 9, 19 July 2017 (2017-07-19), pages 738-748, XP085195731, ISSN: 0968-0004, DOI: 10.1016/J.TIBS.2017.06.004 page 738 - page 740 -----	1-26
A	MINGDONG HUANG ET AL: "Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins", NATURE STRUCTURAL BIOLOGY, vol. 10, no. 9, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 751-756, XP055092113, ISSN: 1072-8368, DOI: 10.1038/nsb971 the whole document -----	1-26
A	KENIS HEIDI ET AL: "Cell surface-expressed phosphatidylserine and annexin A5 open a novel portal of cell entry", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 279, no. 50, 20 September 2004 (2004-09-20), pages 52623-52629, XP002408648, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M409009200 cited in the application -----	1-26
A	WO 2014/018535 A1 (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI [US]; XETRIOS THERAPEUTICS INC [US]) 30 January 2014 (2014-01-30) page 16 - page 17 -----	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2018/049624

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2014151535 A1	25-09-2014	AU	2014233885 A1	17-09-2015
		AU	2014236990 A1	10-09-2015
		CA	2905972 A1	25-09-2014
		CA	2905986 A1	25-09-2014
		CN	105008397 A	28-10-2015
		CN	105164152 A	16-12-2015
		EP	2970429 A1	20-01-2016
		EP	2970442 A1	20-01-2016
		HK	1215263 A1	19-08-2016
		HK	1216649 A1	25-11-2016
		JP	2016513463 A	16-05-2016
		JP	2016516037 A	02-06-2016
		PE	20052015 A1	29-01-2016
		PE	20202015 A1	29-01-2016
		RU	2015144097 A	24-04-2017
		RU	2015144107 A	28-04-2017
		SG	11201506307X A	29-09-2015
		SG	11201506880W A	29-09-2015
		US	2016008482 A1	14-01-2016
		US	2016106806 A1	21-04-2016
		US	2017296624 A1	19-10-2017
		WO	2014151535 A1	25-09-2014
		WO	2014151683 A1	25-09-2014
		ZA	201507670 B	29-11-2017
		ZA	201507674 B	30-08-2017
US 2011159571 A1	30-06-2011	US	2011159571 A1	30-06-2011
		WO	2010006136 A2	14-01-2010
WO 2014018535 A1	30-01-2014	CA	2879542 A1	30-01-2014
		EP	2877211 A1	03-06-2015
		EP	3184121 A2	28-06-2017
		US	2015164800 A1	18-06-2015
		US	2017129947 A1	11-05-2017
		WO	2014018535 A1	30-01-2014

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 33/00	(2006.01)	A 6 1 P 33/00
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 K 49/00	(2006.01)	A 6 1 K 49/00
C 1 2 N 15/11	(2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z N A Z

(31) 優先権主張番号 62/569,403

(32) 優先日 平成29年10月6日(2017.10.6)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31) 優先権主張番号 62/584,565

(32) 優先日 平成29年11月10日(2017.11.10)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31) 優先権主張番号 62/593,014

(32) 優先日 平成29年11月30日(2017.11.30)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31) 優先権主張番号 62/554,533

(32) 優先日 平成29年9月5日(2017.9.5)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T, J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(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, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT)

(72) 発明者 ポーソン, マキシーン

アメリカ合衆国 94547 カリフォルニア州, ハーキュリーズ, パーク ストリート 103
3

(72) 発明者 コンタグ, クリストファー, エイチ.

アメリカ合衆国 95129 カリフォルニア州, サンホセ, ボーリンガー ロード 6110

(72) 発明者 ハーディ, ジョナサン

アメリカ合衆国 48823 ミシガン州, イーストランシング, エスティーイー 249, イースト グランド リバー アベニュー 2843

(72) 発明者 ブランケンベルグ, フランシス ジェラルド

アメリカ合衆国 94028 カリフォルニア州, ポートラバレー, ベア ガルチ ドライブ 1
5

F ターム(参考) 4C076 AA95 BB11 CC27 CC32 CC34 CC35 CC50 DD51 EE41 EE59

FF32 FF68

4C084 AA17 MA66 NA13 ZB261 ZB262 ZB331 ZB332 ZB351 ZB352 ZB371
ZB372 ZC781 ZC782

4C085 AA40 EE05 GG01 HH11 KA27 KB55 KB56 LL20