

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7409741号  
(P7409741)

(45)発行日 令和6年1月9日(2024.1.9)

(24)登録日 令和5年12月25日(2023.12.25)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 K	49/14 (2006.01)	A 6 1 K	49/14
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
請求項の数 71 (全167頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-515154(P2020-515154)	(73)特許権者	509316350
(86)(22)出願日	平成30年9月14日(2018.9.14)		エーザイ インク .
(65)公表番号	特表2020-534276(P2020-534276 A)		アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 7
(43)公表日	令和2年11月26日(2020.11.26)		1 1 0 , ナットリー , メトロ プール
(86)国際出願番号	PCT/US2018/051165	(74)代理人	バード 2 0 0
(87)国際公開番号	WO2019/055840		100078282
(87)国際公開日	平成31年3月21日(2019.3.21)	(74)代理人	弁理士 山本 秀策
審査請求日	令和3年9月7日(2021.9.7)		100113413
(31)優先権主張番号	62/559,432	(74)代理人	弁理士 森下 夏樹
(32)優先日	平成29年9月15日(2017.9.15)		100181674
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	弁理士 飯田 貴敏
			100181641
		(74)代理人	弁理士 石川 大輔
			230113332
		(74)代理人	弁護士 山本 健策
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 クロロトキシシン薬剤及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

方法において使用するための組成物であって、前記組成物は、クロロトキシシンポリペプチドを含み、前記方法は、

ニューロピリン 1 を発現する腫瘍を有する対象に前記組成物を投与するステップを含み、

ここで、前記クロロトキシシンポリペプチドは、配列番号 1 との全配列同一性が少なくとも 9 0 % であり、

ここで、前記クロロトキシシンポリペプチドは、カルボキシル化 C 末端アルギニン残基を含む、組成物。

【請求項 2】

前記クロロトキシシンポリペプチドが、複合体化のための部位として利用可能なリジンの含有上限数が 1 である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記リジンが、配列番号 1 の位置 1 5、配列番号 1 の位置 2 3、及び配列番号 1 の位置 2 7 からなる群から選択される位置に対応する位置に存在する、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記リジンが、配列番号 1 の位置 2 7 に対応する位置に存在する、請求項 3 に記載の組成物。

## 【請求項 5】

配列番号 1 の位置 1 5、位置 2 3、及び位置 2 7 に対応するアミノ酸残基の少なくとも 1 つがリジンではない、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 6】

配列番号 1 の位置 1 5、位置 2 3、及び位置 2 7 に対応する少なくとも 1 つのアミノ酸残基がアラニンである、請求項 5 に記載の組成物。

## 【請求項 7】

配列番号 1 の位置 1 5、位置 2 3、及び位置 2 7 に対応する少なくとも 1 つのアミノ酸残基がアルギニンである、請求項 5 または請求項 6 に記載の組成物。

## 【請求項 8】

前記クロロトキシシンポリペプチドが、配列番号 1 の位置 1 5、位置 2 3、または位置 2 7 に対応する少なくとも 1 つのアミノ酸を含まない、請求項 2 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 9】

前記クロロトキシシンポリペプチドが、単一のリジン残基を含む、請求項 2 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 10】

前記クロロトキシシンポリペプチドが、リジン残基を有さない、請求項 2 に記載の組成物。

## 【請求項 11】

前記クロロトキシシンポリペプチドが、共有結合で結び付いたペンダント部分を少なくとも 1 つ含む、請求項 2 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 12】

前記ペンダント部分が、PEG (ポリエチレングリコール)、PEG 二酸、PEG チオール酸、PEG マレイミド酸、ジペプチド、アミド、ジメチル基、トリメチル基、アルキル基、ブチル基、プロピル基、及びエチル基のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 11 に記載の組成物。

## 【請求項 13】

前記投与が、異常な血管新生によって特徴付けられる疾患もしくは病状を有するか、またはその疑いのある対象への投与を含み、その結果、前記クロロトキシシンポリペプチドが、血管新生の程度を低減する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 14】

前記対象が、抗がん治療を受けている、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 15】

前記対象が受けている前記抗がん治療が、前記クロロトキシシンポリペプチドを使用せずに前記抗がん治療を施すための参照レジメンと比較して低減された投薬レジメンに従うものである、請求項 14 に記載の組成物。

## 【請求項 16】

前記投与が、前記組成物及び抗がん治療を施すことを含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 17】

前記対象から得られる試料における検出によって、前記腫瘍がニューロピリン 1 を発現することが決定されている、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 18】

前記試料が、組織試料、血漿試料、タンパク質試料、または核酸試料である、請求項 17 に記載の組成物。

## 【請求項 19】

前記クロロトキシシンポリペプチドが、ペイロードと結び付けられている、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 20】

前記クロロトキシシンポリペプチドが、前記ペイロードと直接的に共有結合で結び付けら

10

20

30

40

50

れているか、または

前記クロロトキシンポリペプチドが、リンカーを介して前記ペイロードと共有結合で結び付けられている、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記クロロトキシンポリペプチドが、単一のリジン残基を含み、前記ペイロードが、前記単一のリジン残基を介して前記クロロトキシンポリペプチドと直接的に共有結合で結び付けられている、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記クロロトキシンポリペプチドが、単一のリジン残基を含み、前記ペイロードが、前記単一のリジン残基を介して前記クロロトキシンポリペプチドとリンカーを介して共有結合で結び付けられている、請求項 20 に記載の組成物。

10

【請求項 23】

前記クロロトキシンポリペプチドが、単一のリジン残基を含み、前記ペイロードが、前記クロロトキシンポリペプチドの N 末端を介して前記クロロトキシンポリペプチドと直接的に共有結合で結び付けられている、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 24】

前記クロロトキシンポリペプチドが、単一のリジン残基を含み、前記ペイロードが、前記クロロトキシンポリペプチドの N 末端を介して前記クロロトキシンポリペプチドとリンカーを介して共有結合で結び付けられている、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 25】

20

前記ペイロードが、治療部分であるか、または治療部分を含む、請求項 19 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 26】

前記治療部分が、抗がん薬剤であるか、または抗がん薬剤を含む、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記抗がん薬剤が、BCNU、シスプラチン、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、パクリタキセル、テモゾロミド、トポテカン、フルオロウラシル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、プロカルバジン、デカルバジン (decarbazine)、アルトレタミン、メトトレキサート、メルカプトプリン、チオグアニン、リン酸フルダラビン、クラドリビン、ペントスタチン、シタラビン、アザシチジン、エトポシド、テニポシド、イリノテカン、ドセタキセル、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、イダルビシン、プリカマイシン、マイトマイシン、ブレオマイシン、タモキシフェン、フルタミド、ロイプロリド、ゴセレリン、アミノグルテチミド、アナストロゾール、アムサクリン、アスパラギナーゼ、ミトキサントロン、ミトタン、アミホスチン、オフアツムマブ、ペバシズマブ、トシツモマブ、アレムツズマブ、セツキシマブ、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、パニツムマブ、イブリツモマブチウキセタン、及びそれらの組み合わせ、からなる群から選択される、請求項 26 に記載の組成物。

30

【請求項 28】

前記抗がん薬剤が、がん細胞に対する選択性 / 特異性が不十分な抗がん薬剤、がん細胞による取り込みが不十分な抗がん薬剤、がん細胞における保持が不十分な抗がん薬剤、難水溶性を示す抗がん薬剤、がん細胞において早期に不活性化される抗がん薬剤、がん細胞において活性化が弱められる抗がん薬剤、細胞で多大な分解を受ける抗がん薬剤、及び薬物抵抗性と結び付く抗がん薬剤からなる群のメンバーである、請求項 26 に記載の組成物。

40

【請求項 29】

前記抗がん薬剤が、難水溶性を示し、及び / または

前記抗がん薬剤が、タキサンである、請求項 26 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 30】

前記タキサンが、パクリタキセル、ドセタキセル、及びそれらの組み合わせ、からなる群から選択される、請求項 29 に記載の組成物。

50

## 【請求項 3 1】

前記治療部分が、放射性同位体、酵素、プロドラッグ活性化酵素、放射線増感剤、核酸分子、干渉RNA、スーパー抗原、抗血管新生薬剤、アルキル化薬剤、プリンアンタゴニスト、ピリミジンアンタゴニスト、植物アルカロイド、挿入抗生物質、アロマトラーゼ阻害剤、代謝拮抗剤、有糸分裂阻害剤、増殖因子阻害剤、細胞周期阻害剤、酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、生物学的応答修飾物質、抗ホルモン剤、及び抗アンドロゲン剤からなる群のメンバーである、請求項 2 5 に記載の組成物。

## 【請求項 3 2】

前記核酸分子が、DNA、酵素RNA、RNA：DNAハイブリッド、三本鎖DNA、ssRNA、dsRNA、tRNA、mRNA、rRNA、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 3 1 に記載の組成物。

10

## 【請求項 3 3】

前記ペイロードが、標的化部分であるか、または標的化部分を含む、請求項 1 9 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 3 4】

前記標的化部分が、抗体または抗体断片を含む、請求項 3 3 に記載の組成物。

## 【請求項 3 5】

前記標的化部分が、ポリペプチド、糖、及び核酸からなる群から選択される、請求項 3 3 に記載の組成物。

## 【請求項 3 6】

前記クロトキシポリペプチドが、画像化部分または検出可能部分とさらに結び付けられている、請求項 2 5 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

## 【請求項 3 7】

前記ペイロードが、画像化部分もしくは検出可能部分であるか、または画像化部分もしくは検出可能部分を含む、請求項 1 9 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 3 8】

前記画像化部分または検出可能部分が、蛍光標識、放射性または常磁性の同位体またはイオン、リガンド、化学発光薬剤、生物発光薬剤、光増感剤、量子ドット、微粒子、金属ナノ粒子、ナノクラスター、酵素、比色標識、ハプテン、モレキュラービーコン、アプタマービーコン、ビオチン、及びジオキシゲニン ( d i o x i g e n i n ) からなる群から選択される、請求項 3 7 に記載の組成物。

30

## 【請求項 3 9】

前記画像化部分または検出可能部分が、蛍光標識であるか、または蛍光標識を含む、請求項 3 7 に記載の組成物。

## 【請求項 4 0】

前記画像化部分または検出可能部分が、放射性同位体であるか、または放射性同位体を含む、請求項 3 7 に記載の組成物。

## 【請求項 4 1】

前記画像化部分または検出可能部分が、常磁性の同位体もしくはイオンであるか、または常磁性の同位体もしくはイオンを含む、請求項 3 7 に記載の組成物。

40

## 【請求項 4 2】

前記画像化部分または検出可能部分が、アクリジニウムエステル及び安定化ジオキセタンからなる群から選択される化学発光薬剤であるか、または前記化学発光薬剤を含む、請求項 3 7 に記載の組成物。

## 【請求項 4 3】

前記画像化部分または検出可能部分が、ポルフィリン、ポルフィリン誘導体、メタロポルフィリン、メタロフタロシアニン、アンゲリシン、カルコゲナピリリウム ( c h a l c o g e n a p y r r i l l i u m ) 色素、クロロフィル、フラビン、アロキサジン、リボフラビン、フラレン、フェオホルバイド、ピロフェオホルバイド、フェオフィチン、サフィリン、テキサフィリン、ブルプリン、ポルフィセン、フェノチアジニウム、メチレン

50

ブルー誘導体、ナフタルイミド、ナイルブルー誘導体、キノン、ペリレンキノン、ソラレン、レチノイド、チオフェン、バーディン (verdin)、キサンテン色素、ポルフィリン二量体、ポルフィリンオリゴマー、及び5 - アミノレブリン酸からなる群から選択される光増感剤であるか、または前記光増感剤を含む、請求項 3.7 に記載の組成物。

【請求項 4.4】

前記画像化部分または検出可能部分が、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、銅ナノ粒子、及び白金ナノ粒子からなる群から選択される金属ナノ粒子であるか、または前記金属ナノ粒子を含む、請求項 3.7 に記載の組成物。

【請求項 4.5】

前記画像化部分または検出可能部分が、色素及び金コロイドからなる群から選択される比色標識であるか、または前記比色標識を含む、請求項 3.7 に記載の組成物。

10

【請求項 4.6】

前記画像化部分または検出可能部分が、水素の同位体、炭素の同位体、フッ素の同位体、リンの同位体、銅の同位体、ガリウムの同位体、イットリウムの同位体、テクネチウムの同位体、インジウムの同位体、ヨウ素の同位体、レニウムの同位体、タリウムの同位体、ビスマスの同位体、アスタチンの同位体、サマリウムの同位体、及びルテチウムの同位体からなる群から選択される放射性もしくは常磁性の同位体であるか、または前記放射性もしくは常磁性の同位体を含む、請求項 3.7 に記載の組成物。

【請求項 4.7】

前記画像化部分または検出可能部分が、 $^3\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{129}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{135}\text{I}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{187}\text{Re}$ 、 $^{201}\text{Tl}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、及び $^{177}\text{Lu}$ からなる群から選択される放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンであるか、または前記放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンを含む、請求項 3.7 に記載の組成物。

20

【請求項 4.8】

前記画像化部分または検出可能部分が、ヨウ素 -  $^{131}\text{I}$  ( $^{131}\text{I}$ )、ヨウ素 -  $^{125}\text{I}$  ( $^{125}\text{I}$ )、ビスマス -  $^{212}\text{Bi}$  ( $^{212}\text{Bi}$ )、ビスマス -  $^{213}\text{Bi}$  ( $^{213}\text{Bi}$ )、アスタチン -  $^{221}\text{At}$  ( $^{221}\text{At}$ )、銅 -  $^{67}\text{Cu}$  ( $^{67}\text{Cu}$ )、銅 -  $^{64}\text{Cu}$  ( $^{64}\text{Cu}$ )、レニウム -  $^{186}\text{Re}$  ( $^{186}\text{Re}$ )、レニウム -  $^{188}\text{Re}$  ( $^{188}\text{Re}$ )、リン -  $^{32}\text{P}$  ( $^{32}\text{P}$ )、サマリウム -  $^{153}\text{Sm}$  ( $^{153}\text{Sm}$ )、テクネチウム -  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )、ガリウム -  $^{67}\text{Ga}$  ( $^{67}\text{Ga}$ )、及びタリウム -  $^{201}\text{Tl}$  ( $^{201}\text{Tl}$ ) からなる群から選択される放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンであるか、または前記放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンを含む、請求項 3.7 に記載の組成物。

30

【請求項 4.9】

前記画像化部分または検出可能部分が、ガドリニウム III ( $\text{Gd}^{3+}$ )、クロム III ( $\text{Cr}^{3+}$ )、ジスプロシウム III ( $\text{Dy}^{3+}$ )、鉄 III ( $\text{Fe}^{3+}$ )、マンガン II ( $\text{Mn}^{2+}$ )、及びイッテルビウム III ( $\text{Yb}^{3+}$ ) からなる群から選択される放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンであるか、または前記放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンを含む、請求項 3.7 に記載の組成物。

40

【請求項 5.0】

前記画像化部分または検出可能部分が、炭素 -  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$ ) 及びフッ素 -  $^{19}\text{F}$  ( $^{19}\text{F}$ ) からなる群から選択される放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンであるか、または前記放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンを含む、請求項 3.7 に記載の組成物。

【請求項 5.1】

前記画像化部分または検出可能部分が、ルテチウム ( $\text{Lu}$ ) の同位体であるか、またはルテチウム ( $\text{Lu}$ ) の同位体を含む、請求項 3.7 に記載の組成物。

【請求項 5.2】

ルテチウム ( $\text{Lu}$ ) の前記同位体が、ルテチウム -  $^{177}\text{Lu}$  ( $^{177}\text{Lu}$ ) であるか、また

50

はルテチウム - 177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) を含む、請求項 5.1 に記載の組成物。

【請求項 5.3】

前記画像化部分または検出可能部分が、インジウム ( $\text{In}$ ) の同位体であるか、またはインジウム ( $\text{In}$ ) の同位体を含む、請求項 3.7 に記載の組成物。

【請求項 5.4】

インジウム ( $\text{In}$ ) の前記同位体が、インジウム - 111 ( $^{111}\text{In}$ ) であるか、またはインジウム - 111 ( $^{111}\text{In}$ ) を含む、請求項 5.3 に記載の組成物。

【請求項 5.5】

前記画像化部分または検出可能部分が、フルオレセイン色素、ローダミン色素、クマリン色素、OREGON GREEN (登録商標) 色素、シアニン色素、ALEXA FLUOR (登録商標) 色素、BODIPY (登録商標) 色素、IRDYE (登録商標)、スチリル色素、オキソノール色素、カルボシアニン、メロシアニン、フィコエリトリン、エリスロシン、エオシン、TEXAS RED (登録商標)、TEXAS RED (登録商標) - X、SPECTRUM RED (商標)、及び SPECTRUM GREEN (商標) からなる群から選択される蛍光標識であるか、または前記蛍光標識を含む、請求項 3.7 に記載の組成物。

【請求項 5.6】

前記蛍光標識が、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアニン、ナフトフルオレセイン、4', 5' - ジクロロ - 2', 7' - ジメトキシフルオレセイン、及び 6 - カルボキシフルオレセインからなる群から選択されるフルオレセイン色素であるか、または前記フルオレセイン色素を含む、請求項 5.5 に記載の組成物。

【請求項 5.7】

前記蛍光標識が、カルボキシテトラメチル - ローダミンもしくは TAMRA (商標)、カルボキシローダミン 6 G、カルボキシ - X - ローダミン (ROX (商標))、リサミンローダミン B、ローダミン 6 G、ローダミングリーン、ローダミンレッド、及びテトラメチルローダミンからなる群から選択されるローダミン色素であるか、または前記ローダミン色素を含む、請求項 5.5 に記載の組成物。

【請求項 5.8】

前記蛍光標識が、クマリン、メトキシクマリン、ジアルキルアミノクマリン、ヒドロキシクマリン、及びアミノメチルクマリンからなる群から選択されるクマリン色素であるか、または前記クマリン色素を含む、請求項 5.5 に記載の組成物。

【請求項 5.9】

前記蛍光標識が、OREGON GREEN (登録商標) 488、OREGON GREEN (登録商標) 500、及び OREGON GREEN (登録商標) 514 からなる群から選択される OREGON GREEN (登録商標) 色素であるか、または前記 OREGON GREEN (登録商標) 色素を含む、請求項 5.5 に記載の組成物。

【請求項 6.0】

前記蛍光標識が、CY (登録商標) 3、CY (登録商標) 5、CY (登録商標) 3.5、及び CY (登録商標) 5.5 からなる群から選択されるシアニン色素であるか、または前記シアニン色素を含む、請求項 5.5 に記載の組成物。

【請求項 6.1】

前記蛍光標識が、ALEXA FLUOR (登録商標) 350、ALEXA FLUOR (登録商標) 488、ALEXA FLUOR (登録商標) 532、ALEXA FLUOR (登録商標) 546、ALEXA FLUOR (登録商標) 568、ALEXA FLUOR (登録商標) 594、ALEXA FLUOR (登録商標) 633、ALEXA FLUOR (登録商標) 660、及び ALEXA FLUOR (登録商標) 680 からなる群から選択される ALEXA FLUOR (登録商標) 色素であるか、または前記 ALEXA FLUOR (登録商標) 色素を含む、請求項 5.5 に記載の組成物。

【請求項 6.2】

前記蛍光標識が、BODIPY (登録商標) FL、BODIPY (登録商標) R6G、

10

20

30

40

50

BODIPY（登録商標）TMR、BODIPY（登録商標）TR、BODIPY（登録商標）530/550、BODIPY（登録商標）558/568、BODIPY（登録商標）564/570、BODIPY（登録商標）576/589、BODIPY（登録商標）581/591、BODIPY（登録商標）630/650、及びBODIPY（登録商標）650/665からなる群から選択されるBODIPY（登録商標）色素であるか、または前記BODIPY（登録商標）色素を含む、請求項55に記載の組成物。

【請求項63】

前記蛍光標識が、IRD40、IRD700、及びIRD800からなる群から選択されるIRDYE（登録商標）であるか、または前記IRDYE（登録商標）を含む、請求項55に記載の組成物。

10

【請求項64】

前記画像化部分または検出可能部分が、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ - グルクロニダーゼ、ベータ - D - グルコシダーゼ、ウレアーゼ、及びグルコースオキシダーゼからなる群から選択される酵素であるか、または前記酵素を含む、請求項37に記載の組成物。

【請求項65】

前記画像化部分または検出可能部分が、ホウ素ナノ粒子、ホウ素及び炭素のナノ粒子、炭化ホウ素ナノ粒子、ホウ素を含むポリマー、ホウ素及び炭素を含むポリマー、炭化ホウ素ポリマー、またはこれらのナノ粒子もしくはポリマーのいずれかであって、さらにガドリニウムを含む前記ナノ粒子もしくはポリマーであるか、あるいは前記ナノ粒子またはポリマーを含む、請求項37に記載の組成物。

20

【請求項66】

前記画像化部分または検出可能部分が、磁気共鳴画像法（MRI）、核磁気共鳴分光法（MRS）、単一光子放射断層撮影（SPECT）、ガンマカメラによる画像化、または陽電子放射断層撮影（PET）によって検出可能または画像化可能である、請求項37に記載の組成物。

【請求項67】

前記画像化部分または検出可能部分が、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、または化学的な検出または画像化によって検出可能または画像化可能である、請求項37に記載の組成物。

30

【請求項68】

前記方法が、クロロトキシンによって画像化可能な組織を画像化することを含む、請求項37～67のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項69】

前記方法が、クロロトキシンによって検出可能ながんを診断することを含む、請求項37～67のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項70】

前記方法が、クロロトキシンによって検出可能な組織を検出すること、及び前記クロロトキシンポリペプチドによって検出された前記がん性組織を除去すること、を含む、請求項37～67のいずれか1項に記載の組成物。

40

【請求項71】

前記方法が、手術中に腫瘍を検出することを含む、請求項37～67のいずれか1項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

クロロトキシンは、サソリ（*Leiurus quinquestratus*）由来の毒液のペプチド成分である。クロロトキシンは、腫瘍細胞に特異的に結合することが示されている。クロロトキシンは、転移性腫瘍及び脳腫瘍を含む、さまざまな腫瘍にペイロード薬剤（例えば、治療薬剤及び/または検出可能薬剤）を送達するための標的化部分

50

として使用されている。クロロトキシシン - ペイロード結合体及びクロロトキシシン - ペイロード複合体は、さまざまなものが知られており、例えば、がんの検出（例えば、画像化）及び／または治療に使用され得る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0002】

本発明は、とりわけ、ニューロピリン1（NRP1）を発現するがん（例えば、1つまたは複数の腫瘍）の検出及び／または治療に関する組成物及び方法を提供する。本発明は、対象（例えば、がん（いくつかの実施形態では、NRP1を発現するがんであり得る）に罹患しているか、または易罹患性の対象）にクロロトキシシン薬剤を投与することを含むがんの治療方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明に従って使用するためのクロロトキシシン薬剤は、クロロトキシシンポリペプチド及びペイロード部分であり得るか、またはこれらを含み得る（これらは、例えば、共有結合複合体としてのものである）。

10

【0003】

ある特定の実施形態では、WO2007/117467、WO2005/099774、WO2003/101474、WO03/101475、WO97/24619、WO00/62807、WO2009/021136、WO2009/049184、WO2009/117018、WO2009/140599、WO2011/097533（例えば、US9,018,347も併せて参照のこと）、WO2011/142858、及びWO2013/003507（これらの文献はそれぞれ、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）のうちの1つまたは複数に記載のクロロトキシシン薬剤が、本発明に従って利用される。

20

【0004】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用するためのクロロトキシシン薬剤は、C末端アルギニン残基を含むアミノ酸配列を有するクロロトキシシンポリペプチド（「C末端アルギニン残基含有クロロトキシシンポリペプチド」）、複合体化に利用可能なリジン残基の含有数が0、1、もしくは2であるクロロトキシシンポリペプチド（「リジン残基数低減型クロロトキシシンポリペプチド」）、または両方（リジン残基数低減型C末端アルギニン残基含有クロロトキシシンポリペプチド）であるか、これを含むか、あるいはこれから（例えば、複合体化によって）調製される。

30

【0005】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用するためのクロロトキシシンポリペプチドは、適切な参照ポリペプチド（例えば、配列番号1のポリペプチド）またはその関連断片との同一性が少なくとも85%であるアミノ酸配列を有し、ある特定のそのような実施形態では、クロロトキシシンポリペプチドは、参照ポリペプチドまたはその関連断片のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、クロロトキシシンポリペプチドは、C末端アルギニン残基含有クロロトキシシンポリペプチド、リジン残基数低減型クロロトキシシンポリペプチド、もしくはリジン残基数低減型C末端アルギニン残基含有クロロトキシシンポリペプチドであるか、またはこれを含む。いくつかの実施形態では、複合体化に利用可能なリジンを1つのみ有するクロロトキシシンポリペプチドは、配列番号1の位置15、配列番号1の位置23、及び配列番号1の位置27を含む群から選択される位置に対応する位置にリジンを有する。特定の実施形態では、リジンは、配列番号1の位置27に対応する位置に存在し得る。いくつかの実施形態では、配列番号1の位置15、位置23、及び位置27に対応するアミノ酸残基の少なくとも1つは、リジンではあり得ない。例えば、ある特定の実施形態では、配列番号1の位置15、位置23、及び位置27に対応する少なくとも1つのアミノ酸残基は、アラニンであり得るか、または配列番号1の位置15、位置23、及び位置27に対応する少なくとも1つのアミノ酸残基は、アルギニンであり得る。場合によっては、クロロトキシシンポリペプチドは、配列番号1の位置15、位置23、または位置27に対応する少なくとも1つのアミノ酸を含まない。さまざまな場合において、クロロトキシシンポリペプチドは、単一のリジン残基を含むか、ま

40

50



たはクロロトキシンポリペプチドは、リジン残基を有さない。いくつかの実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、24～48個のアミノ酸の範囲の長さを有する。いくつかの実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、33～39個のアミノ酸の長さを有し、例えば、36個のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、35個以下のアミノ酸の長さを有する。

【0006】

いくつかの実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、1つまたは複数のペンダント部分を含む。ある特定の実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、当該ポリペプチドのN末端、当該ポリペプチドのC末端、内部残基、またはそれらの任意の組み合わせにおける1つまたは複数のアミノ酸側鎖を用いて結び付けられる。本明細書に記載のさまざまな実施形態において、クロロトキシンポリペプチドは、PEG（ポリエチレングリコール）、PEG二酸、PEGチオール酸、PEGマレイミド酸、ジペプチド、アミド、ジメチル基、トリメチル基、アルキル基、ブチル基、プロピル基、及びエチル基から選択される少なくとも1つのペンダント部分を含む。ペンダント部分は、クロロトキシンポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸側鎖に共有結合で連結され得、当該アミノ酸側鎖は、当該ポリペプチドのN末端、当該ポリペプチドのC末端、またはそれらの任意の組み合わせに位置する。

【0007】

本発明は、ニューロピリン1を発現するがん（例えば、1つまたは複数の腫瘍）を有する対象に対してクロロトキシン薬剤（例えば、クロロトキシンポリペプチド（C末端アルギニン残基含有クロロトキシンポリペプチド、リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチド、またはリジン残基数低減型C末端アルギニン残基含有クロロトキシンポリペプチドなど））を投与するステップを含む方法を提供し、当該クロロトキシン薬剤は、単独で投与されるか、またはペイロード部分（例えば、検出可能部分（例えば、画像化可能部分）、治療部分、もしくは標的化部分）と結び付けて（例えば、複合体化させて）投与される。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

（項目1）

ニューロピリン1を発現する腫瘍を有する対象にクロロトキシン薬剤を投与するステップを含む方法。

（項目2）

前記クロロトキシン薬剤が、クロロトキシンポリペプチドであるか、またはクロロトキシンポリペプチドを含む、項目1に記載の方法。

（項目3）

前記クロロトキシンポリペプチドが、複合体化のための部位として利用可能なリジンの含有上限数が1である、項目2に記載の方法。

（項目4）

前記クロロトキシンポリペプチドが、配列番号1との全配列同一性が少なくとも85%である、項目2または項目3に記載の方法。

（項目5）

前記リジンが、配列番号1の位置15、配列番号1の位置23、及び配列番号1の位置27からなる群から選択される位置に対応する位置に存在する、項目3または項目4に記載の方法。

（項目6）

前記リジンが、配列番号1の位置27に対応する位置に存在する、項目5に記載の方法。

（項目7）

配列番号1の位置15、位置23、及び位置27に対応するアミノ酸残基の少なくとも1つがリジンではない、項目3～6のいずれか1項に記載の方法。

（項目8）

配列番号1の位置15、位置23、及び位置27に対応する少なくとも1つのアミノ酸

10

20

30

40

50

残基がアラニンである、項目 7 に記載の方法。

(項目 9)

配列番号 1 の位置 1 5、位置 2 3、及び位置 2 7 に対応する少なくとも 1 つのアミノ酸残基がアルギニンである、項目 7 または項目 8 に記載の方法。

(項目 1 0)

前記クロロトキシンポリペプチドが、配列番号 1 の位置 1 5、位置 2 3、または位置 2 7 に対応する少なくとも 1 つのアミノ酸を含まない、項目 2 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 1)

前記クロロトキシンポリペプチドが、単一のリジン残基を含む、項目 2 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

(項目 1 2)

前記クロロトキシンポリペプチドが、リジン残基を有さない、項目 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 3)

前記クロロトキシンポリペプチドが、共有結合で結び付いたペンダント部分を少なくとも 1 つ含む、項目 2 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 4)

前記ペンダント部分が、P E G (ポリエチレングリコール)、P E G 二酸、P E G チオール酸、P E G マレイミド酸、ジペプチド、アミド、ジメチル基、トリメチル基、アルキル基、ブチル基、プロピル基、及びエチル基のうちの少なくとも 1 つを含む、項目 1 3 に記載の方法。

20

(項目 1 5)

前記クロロトキシンポリペプチドが、アミド化 C 末端アルギニン残基またはカルボキシル化 C 末端アルギニン残基を含む、項目 2 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 6)

前記クロロトキシン薬剤が、クロロトキシンポリペプチド断片であるか、またはクロロトキシンポリペプチド断片を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記クロロトキシンポリペプチド断片のアミノ酸配列が、5 ~ 2 5 個のアミノ酸の長さを有し、配列番号 1 における同じ長さの連続アミノ酸区間との同一性が少なくとも 8 5 % である、項目 1 6 に記載の方法。

30

(項目 1 8)

前記クロロトキシンポリペプチド断片が、単一のリジン残基を有する、項目 1 6 または項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記クロロトキシンポリペプチド断片が、リジン残基を有さない、項目 1 6 または項目 1 7 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記クロロトキシンポリペプチド断片が、少なくとも 1 つのペンダント部分を含む、項目 1 6 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

(項目 2 1)

前記ペンダント部分が、P E G (ポリエチレングリコール)、P E G 二酸、P E G チオール酸、P E G マレイミド酸、ジペプチド、アミド、ジメチル基、トリメチル基、アルキル基、ブチル基、プロピル基、及びエチル基のうちの少なくとも 1 つを含む、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記クロロトキシンポリペプチド断片が、アミド化 C 末端アルギニン残基またはカルボキシル化 C 末端アルギニン残基を含む、項目 1 6 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 3)

50

前記投与が、異常な血管新生によって特徴付けられる疾患もしくは病状を有するか、またはその疑いのある対象への投与を含み、その結果、前記クロロトキシシン薬剤が、血管新生の程度を低減する、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 2 4 )

前記対象が、抗がん治療を受けている、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 2 5 )

前記対象が受けている前記抗がん治療が、前記クロロトキシシン薬剤を使用せずに前記抗がん治療を施すための参照レジメンと比較して低減された投薬レジメンに従うものである、項目 2 4 に記載の方法。

( 項目 2 6 )

前記投与が、前記クロロトキシシン薬剤及び抗がん治療を施すことを含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 2 7 )

前記投与が、前記クロロトキシシン薬剤を送達する組成物を投与することを含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 2 8 )

前記対象から得られる試料における検出によって、前記腫瘍がニューロピリン 1 を発現することが決定されている、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 2 9 )

前記試料が、組織試料、血漿試料、タンパク質試料、または核酸試料である、項目 2 8 に記載の方法。

( 項目 3 0 )

前記クロロトキシシン薬剤またはクロロトキシシンポリペプチド断片が、ペイロードと結び付けられる、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 3 1 )

前記クロロトキシシンポリペプチドが、前記ペイロードと直接的に共有結合で結び付けられるか、または

前記クロロトキシシンポリペプチドが、リンカーを介して前記ペイロードと共有結合で結び付けられる、項目 3 0 に記載の方法。

( 項目 3 2 )

前記クロロトキシシンポリペプチドが、単一のリジン残基を含み、前記ペイロードが、前記単一のリジン残基を介して前記クロロトキシシンポリペプチドと直接的に共有結合で結び付けられる、項目 3 1 に記載の方法。

( 項目 3 3 )

前記クロロトキシシンポリペプチドが、単一のリジン残基を含み、前記ペイロードが、前記単一のリジン残基を介して前記クロロトキシシンポリペプチドとリンカーを介して共有結合で結び付けられる、項目 3 1 に記載の方法。

( 項目 3 4 )

前記クロロトキシシンポリペプチドが、単一のリジン残基を含み、前記ペイロードが、前記クロロトキシシンポリペプチドの N 末端を介して前記クロロトキシシンポリペプチドと直接的に共有結合で結び付けられる、項目 3 1 に記載の方法。

( 項目 3 5 )

前記クロロトキシシンポリペプチドが、単一のリジン残基を含み、前記ペイロードが、前記クロロトキシシンポリペプチドの N 末端を介して前記クロロトキシシンポリペプチドとリンカーを介して共有結合で結び付けられる、項目 3 1 に記載の方法。

( 項目 3 6 )

前記ペイロードが、治療部分であるか、または治療部分を含む、項目 3 0 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 3 7 )

前記治療部分が、抗がん薬剤であるか、または抗がん薬剤を含む、項目 3 6 に記載の方

10

20

30

40

50

法。

(項目 3 8)

前記抗がん薬剤が、BCNU、シスプラチン、ゲムシタピン、ヒドロキシ尿素、パクリタキセル、テモゾロミド、トポテカン、フルオロウラシル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、プロカルバジン、デカルバジン (decarbazine)、アルトレタミン、メトトレキサート、メルカプトプリン、チオグアニン、リン酸フルダラビン、クラドリビン、ペントスタチン、シタラビン、アザシチジン、エトポシド、テニポシド、イリノテカン、ドセタキセル、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、イダルビシン、プリカマイシン、マイトマイシン、ブレオマイシン、タモキシフェン、フルタミド、ロイプロリド、ゴセレリン、アミノグルテチミド、アナストロゾール、アムサクリン、アスパラギナーゼ、ミトキサントロン、ミトタン、アミホスチン、オフアツムマブ、ベバシズマブ、トシツモマブ、アレムツズマブ、セツキシマブ、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、パニツムマブ、イブリツモマブチウキセタン、及びそれらの組み合わせ、からなる群から選択される、項目 3 7 に記載の方法。

10

(項目 3 9)

前記抗がん薬剤が、がん細胞に対する選択性 / 特異性が不十分な抗がん薬剤、がん細胞による取り込みが不十分な抗がん薬剤、がん細胞における保持が不十分な抗がん薬剤、難水溶性を示す抗がん薬剤、がん細胞において早期に不活性化される抗がん薬剤、がん細胞において活性化が弱められる抗がん薬剤、細胞で多大な分解を受ける抗がん薬剤、及び薬物抵抗性と結び付く抗がん薬剤からなる群のメンバーである、項目 3 7 に記載の方法。

20

(項目 4 0)

前記抗がん薬剤が、難水溶性を示し、及び / または

前記抗がん薬剤が、タキサンである、項目 3 7 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 1)

前記タキサンが、パクリタキセル、ドセタキセル、及びそれらの組み合わせ、からなる群から選択される、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記治療部分が、放射性同位体、酵素、プロドラッグ活性化酵素、放射線増感剤、核酸分子、干渉 RNA、スーパー抗原、抗血管新生薬剤、アルキル化薬剤、プリンアンタゴニスト、ピリミジンアンタゴニスト、植物アルカロイド、挿入抗生物質、アロマトラーゼ阻害剤、代謝拮抗剤、有糸分裂阻害剤、増殖因子阻害剤、細胞周期阻害剤、酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、生物学的応答修飾物質、抗ホルモン剤、及び抗アンドロゲン剤からなる群のメンバーである、項目 3 6 に記載の方法。

30

(項目 4 3)

前記核酸分子が、DNA、酵素 RNA、RNA : DNA ハイブリッド、三本鎖 DNA、ssRNA、dsRNA、tRNA、mRNA、rRNA、またはそれらの任意の組み合わせを含む、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記ペイロードが、標的化部分であるか、または標的化部分を含む、項目 3 0 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

(項目 4 5)

前記標的化部分が、抗体または抗体断片を含む、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記標的化部分が、ポリペプチド、糖、及び核酸からなる群から選択される、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 7)

前記クロロトキシノポリペプチドが、画像化部分または検出可能部分とさらに結び付けられる、項目 3 6 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 8)

前記ペイロードが、画像化部分もしくは検出可能部分であるか、または画像化部分もし

50

くは検出可能部分を含む、項目 30 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 49)

前記画像化部分または検出可能部分が、蛍光標識、放射性または常磁性の同位体またはイオン、リガンド、化学発光薬剤、生物発光薬剤、光増感剤、量子ドット、微粒子、金属ナノ粒子、ナノクラスター、酵素、比色標識、ハプテン、モレキュラービーコン、アプタマービーコン、ビオチン、及びジオキシゲニン (dioxigenin) からなる群から選択される、項目 48 に記載の方法。

(項目 50)

前記画像化部分または検出可能部分が、蛍光標識であるか、または蛍光標識を含む、項目 48 に記載の方法。

10

(項目 51)

前記画像化部分または検出可能部分が、放射性同位体であるか、または放射性同位体を含む、項目 48 に記載の方法。

(項目 52)

前記画像化部分または検出可能部分が、常磁性の同位体もしくはイオンであるか、または常磁性の同位体もしくはイオンを含む、項目 48 に記載の方法。

(項目 53)

前記画像化部分または検出可能部分が、アクリジニウムエステル及び安定化ジオキセタンからなる群から選択される化学発光薬剤であるか、または前記化学発光薬剤を含む、項目 48 に記載の方法。

20

(項目 54)

前記画像化部分または検出可能部分が、ポルフィリン、ポルフィリン誘導体、メタロポルフィリン、メタロフタロシアニン、アンゲリシン、カルコゲナピリリウム (calcogenapyrillium) 色素、クロロフィル、フラビン、アロキサジン、リボフラビン、フラベン、フェオホルバイド、ピロフェオホルバイド、フェオフィチン、サフィリン、テキサフィリン、ブルプリン、ポルフィセン、フェノチアジニウム、メチレンブルー誘導体、ナフタルイミド、ナイルブルー誘導体、キノン、ペリレンキノン、ソラレン、レチノイド、チオフェン、バーディン (verdine)、キサンテン色素、ポルフィリン二量体、ポルフィリンオリゴマー、及び 5 - アミノレブリン酸からなる群から選択される光増感剤であるか、または前記光増感剤を含む、項目 48 に記載の方法。

30

(項目 55)

前記画像化部分または検出可能部分が、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、銅ナノ粒子、及び白金ナノ粒子からなる群から選択される金属ナノ粒子であるか、または前記金属ナノ粒子を含む、項目 48 に記載の方法。

(項目 56)

前記画像化部分または検出可能部分が、色素及び金コロイドからなる群から選択される比色標識であるか、または前記比色標識を含む、項目 48 に記載の方法。

(項目 57)

前記画像化部分または検出可能部分が、水素の同位体、炭素の同位体、フッ素の同位体、リンの同位体、銅の同位体、ガリウムの同位体、イットリウムの同位体、テクネチウムの同位体、インジウムの同位体、ヨウ素の同位体、レニウムの同位体、タリウムの同位体、ビスマスの同位体、アスタチンの同位体、サマリウムの同位体、及びルテチウムの同位体からなる群から選択される放射性もしくは常磁性の同位体であるか、または前記放射性もしくは常磁性の同位体を含む、項目 48 に記載の方法。

40

(項目 58)

前記画像化部分または検出可能部分が、 $^3\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{129}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{135}\text{I}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{187}\text{Re}$ 、 $^{201}\text{Tl}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、及び  $^{177}\text{Lu}$  からなる群から選択される放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンであるか、または前記放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンを含む、項目 48 に記

50

載の方法。

(項目59)

前記画像化部分または検出可能部分が、ヨウ素 - 131 ( $^{131}\text{I}$ )、ヨウ素 - 125 ( $^{125}\text{I}$ )、ビスマス - 212 ( $^{212}\text{Bi}$ )、ビスマス - 213 ( $^{213}\text{Bi}$ )、アスタチン - 221 ( $^{221}\text{At}$ )、銅 - 67 ( $^{67}\text{Cu}$ )、銅 - 64 ( $^{64}\text{Cu}$ )、レニウム - 186 ( $^{186}\text{Re}$ )、レニウム - 188 ( $^{188}\text{Re}$ )、リン - 32 ( $^{32}\text{P}$ )、サマリウム - 153 ( $^{153}\text{Sm}$ )、テクネチウム - 99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )、ガリウム - 67 ( $^{67}\text{Ga}$ )、及びタリウム - 201 ( $^{201}\text{Tl}$ ) からなる群から選択される放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンであるか、または前記放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンを含む、項目48に記載の方法。

10

(項目60)

前記画像化部分または検出可能部分が、ガドリニウムIII ( $\text{Gd}^{3+}$ )、クロムIII ( $\text{Cr}^{3+}$ )、ジスプロシウムIII ( $\text{Dy}^{3+}$ )、鉄III ( $\text{Fe}^{3+}$ )、マンガンII ( $\text{Mn}^{2+}$ )、及びイッテルビウムIII ( $\text{Yb}^{3+}$ ) からなる群から選択される放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンであるか、または前記放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンを含む、項目48に記載の方法。

(項目61)

前記画像化部分または検出可能部分が、炭素 - 13 ( $^{13}\text{C}$ ) 及びフッ素 - 19 ( $^{19}\text{F}$ ) からなる群から選択される放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンであるか、または前記放射性もしくは常磁性の同位体もしくはイオンを含む、項目48に記載の方法。

20

(項目62)

前記画像化部分または検出可能部分が、ルテチウム ( $\text{Lu}$ ) の同位体であるか、またはルテチウム ( $\text{Lu}$ ) の同位体を含む、項目48に記載の方法。

(項目63)

ルテチウム ( $\text{Lu}$ ) の前記同位体が、ルテチウム - 177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) であるか、またはルテチウム - 177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) を含む、項目62に記載の方法。

(項目64)

前記画像化部分または検出可能部分が、インジウム ( $\text{In}$ ) の同位体であるか、またはインジウム ( $\text{In}$ ) の同位体を含む、項目48に記載の方法。

(項目65)

インジウム ( $\text{In}$ ) の前記同位体が、インジウム - 111 ( $^{111}\text{In}$ ) であるか、またはインジウム - 111 ( $^{111}\text{In}$ ) を含む、項目64に記載の方法。

30

(項目66)

前記画像化部分または検出可能部分が、フルオレセイン色素、ローダミン色素、クマリン色素、OREGON GREEN (登録商標) 色素、シアニン色素、ALEXA FLUOR (登録商標) 色素、BODIPY (登録商標) 色素、IRDYE (登録商標)、スチリル色素、オキソノール色素、カルボシアニン、メロシアニン、フィコエリトリン、エリスロシン、エオシン、TEXAS RED (登録商標)、TEXAS RED (登録商標) - X、SPECTRUM RED (商標)、及びSPECTRUM GREEN (商標) からなる群から選択される蛍光標識であるか、または前記蛍光標識を含む、項目48に記載の方法。

40

(項目67)

前記蛍光標識が、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアニン、ナフトフルオレセイン、4', 5' - ジクロロ - 2', 7' - ジメトキシフルオレセイン、及び6 - カルボキシフルオレセインからなる群から選択されるフルオレセイン色素であるか、または前記フルオレセイン色素を含む、項目66に記載の方法。

(項目68)

前記蛍光標識が、カルボキシテトラメチル - ローダミンもしくはTAMRA (商標)、カルボキシローダミン6G、カルボキシ - X - ローダミン (ROX (商標))、リサミンローダミンB、ローダミン6G、ローダミングリーン、ローダミンレッド、及びテトラメ

50

チルローダミンからなる群から選択されるローダミン色素であるか、または前記ローダミン色素を含む、項目 6 6 に記載の方法。

(項目 6 9)

前記蛍光標識が、クマリン、メトキシクマリン、ジアルキルアミノクマリン、ヒドロキシクマリン、及びアミノメチルクマリンからなる群から選択されるクマリン色素であるか、または前記クマリン色素を含む、項目 6 6 に記載の方法。

(項目 7 0)

前記蛍光標識が、OREGON GREEN (登録商標) 4 8 8、OREGON GREEN (登録商標) 5 0 0、及びOREGON GREEN (登録商標) 5 1 4 からなる群から選択されるOREGON GREEN (登録商標) 色素であるか、または前記OREGON GREEN (登録商標) 色素を含む、項目 6 6 に記載の方法。

10

(項目 7 1)

前記蛍光標識が、CY (登録商標) 3、CY (登録商標) 5、CY (登録商標) 3 . 5、及びCY (登録商標) 5 . 5 からなる群から選択されるシアニン色素であるか、または前記シアニン色素を含む、項目 6 6 に記載の方法。

(項目 7 2)

前記蛍光標識が、ALEXA FLUOR (登録商標) 3 5 0、ALEXA FLUOR (登録商標) 4 8 8、ALEXA FLUOR (登録商標) 5 3 2、ALEXA FLUOR (登録商標) 5 4 6、ALEXA FLUOR (登録商標) 5 6 8、ALEXA FLUOR (登録商標) 5 9 4、ALEXA FLUOR (登録商標) 6 3 3、ALEXA FLUOR (登録商標) 6 6 0、及びALEXA FLUOR (登録商標) 6 8 0 からなる群から選択されるALEXA FLUOR (登録商標) 色素であるか、または前記ALEXA FLUOR (登録商標) 色素を含む、項目 6 6 に記載の方法。

20

(項目 7 3)

前記蛍光標識が、BODIPY (登録商標) FL、BODIPY (登録商標) R 6 G、BODIPY (登録商標) TMR、BODIPY (登録商標) TR、BODIPY (登録商標) 5 3 0 / 5 5 0、BODIPY (登録商標) 5 5 8 / 5 6 8、BODIPY (登録商標) 5 6 4 / 5 7 0、BODIPY (登録商標) 5 7 6 / 5 8 9、BODIPY (登録商標) 5 8 1 / 5 9 1、BODIPY (登録商標) 6 3 0 / 6 5 0、及びBODIPY (登録商標) 6 5 0 / 6 6 5 からなる群から選択されるBODIPY (登録商標) 色素であるか、または前記BODIPY (登録商標) 色素を含む、項目 6 6 に記載の方法。

30

(項目 7 4)

前記蛍光標識が、IRD 4 0、IRD 7 0 0、及びIRD 8 0 0 からなる群から選択されるIRDYE (登録商標) であるか、または前記IRDYE (登録商標) を含む、項目 6 6 に記載の方法。

(項目 7 5)

前記画像化部分または検出可能部分が、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ - グルクロニダーゼ、ベータ - D - グルコシダーゼ、ウレアーゼ、及びグルコースオキシダーゼからなる群から選択される酵素であるか、または前記酵素を含む、項目 4 8 に記載の方法。

40

(項目 7 6)

前記画像化部分または検出可能部分が、ホウ素ナノ粒子、ホウ素及び炭素のナノ粒子、炭化ホウ素ナノ粒子、ホウ素を含むポリマー、ホウ素及び炭素を含むポリマー、炭化ホウ素ポリマー、またはこれらのナノ粒子もしくはポリマーのいずれかであって、さらにガドリニウムを含む前記ナノ粒子もしくはポリマーであるか、あるいは前記ナノ粒子またはポリマーを含む、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 7 7)

前記画像化部分または検出可能部分が、磁気共鳴画像法 (MRI)、核磁気共鳴分光法 (MRS)、単一光子放射断層撮影 (SPECT)、ガンマカメラによる画像化、または陽電子放射断層撮影 (PET) によって検出可能または画像化可能である、項目 4 8 に記

50

載の方法。

(項目78)

前記画像化部分または検出可能部分が、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、または化学的な検出または画像化によって検出可能または画像化可能である、項目48に記載の方法。

(項目79)

前記クロロトキシンポリペプチドが、治療部分に共有結合でカップリングされる、項目48～78のいずれか1項に記載の方法。

(項目80)

前記クロロトキシンポリペプチドが、標的化部分に共有結合でカップリングされる、項目48～78のいずれか1項に記載の方法。

10

(項目81)

前記方法が、クロロトキシンによって画像化可能な組織を画像化することを含む、項目48～80のいずれか1項に記載の方法。

(項目82)

前記方法が、クロロトキシンによって検出可能ながんを診断することを含む、項目48～80のいずれか1項に記載の方法。

(項目83)

前記方法が、クロロトキシンによって検出可能な組織を検出すること、及び前記クロロトキシン薬剤によって検出された前記がん性組織を除去すること、を含む、項目48～80のいずれか1項に記載の方法。

20

(項目84)

前記方法が、手術中に腫瘍を検出することを含む、項目48～80のいずれか1項に記載の方法。

(項目85)

5～25個のアミノ酸の長さのアミノ酸配列を有し、配列番号1における同じ長さの連続アミノ酸区間との同一性が少なくとも85%であるクロロトキシンポリペプチド断片。

(項目86)

前記クロロトキシンポリペプチド断片が、単一のリジン残基を有する、項目85に記載のクロロトキシンポリペプチド断片。

30

(項目87)

前記クロロトキシンポリペプチド断片が、リジン残基を有さない、項目85に記載のクロロトキシンポリペプチド断片。

(項目88)

前記クロロトキシンポリペプチド断片が、アミド化C末端アルギニン残基またはカルボキシル化C末端アルギニン残基を含む、項目85～87のいずれか1項に記載のクロロトキシンポリペプチド断片。

(項目89)

5～25個のアミノ酸の長さのアミノ酸配列を有し、配列番号1における同じ長さの連続アミノ酸区間との同一性が少なくとも85%であるクロロトキシンポリペプチド断片と、

40

ペイロードと、を含む複合体。

(項目90)

前記クロロトキシンポリペプチド断片が、単一のリジン残基を有する、項目89に記載の複合体。

(項目91)

前記クロロトキシンポリペプチド断片が、リジン残基を有さない、項目89に記載の複合体。

(項目92)

前記クロロトキシンポリペプチド断片が、アミド化C末端アルギニン残基またはカルボ

50



キシル化C末端アルギニン残基を含む、項目89～91のいずれか1項に記載の複合体。

(項目93)

クロロトキシシンポリペプチド断片を送達する医薬組成物であって、前記クロロトキシシンポリペプチド断片が、

(i) アミド化C末端アルギニン残基またはカルボキシル化C末端アルギニン残基を有し、

(ii) 5～25個のアミノ酸の長さのアミノ酸配列を有し、

(iii) 配列番号1における同じ長さの連続アミノ酸区間との同一性が少なくとも85%であるアミノ酸配列を有する前記医薬組成物。

(項目94)

前記クロロトキシシンポリペプチド断片が、単一のリジン残基を有する、項目93に記載の医薬組成物。

(項目95)

前記クロロトキシシンポリペプチド断片が、リジン残基を有さない、項目93に記載の医薬組成物。

【0008】

定義

約：「約」という用語は、値を参照して本明細書で使用されるとき、文脈に応じて値が当該参照値に近いことを指す。一般に、文脈になじみのある当業者なら、その文脈中の「約」が包含する適切な分散度を理解するであろう。例えば、いくつかの実施形態では、「約」という用語は、言及値の25%以内、20%以内、19%以内、18%以内、17%以内、16%以内、15%以内、14%以内、13%以内、12%以内、11%以内、10%以内、9%以内、8%以内、7%以内、6%以内、5%以内、4%以内、3%以内、2%以内、1%以内、またはそれ未満の値の範囲を包含し得る。

【0009】

投与：本明細書で使用される「投与」という用語は、典型的には、組成物を対象または系に投与することで、例えば、当該組成物である薬剤、当該組成物に含まれる薬剤、または当該組成物によってその他の状態で送達される薬剤、の送達を達成することを指す。

【0010】

薬剤：一般に、本明細書で使用される「薬剤」という用語は、実体（例えば、脂質、金属、核酸、ポリペプチド、多糖、小分子など、または複合体、組み合わせ物、混合物もしくは系、または現象（例えば、熱、電流もしくは電場、磁力もしくは磁場など）を指すために使用される。本明細書で使用される「クロロトキシシン薬剤」という用語は、クロロトキシシンポリペプチドを含む任意の薬剤である。

【0011】

軽快：本明細書で使用される軽快は、状態の予防、低減、もしくは緩和、または対象の状態の改善を指す。軽快には、疾患、障害、または病状（例えば、放射線障害）の完全な回復または完全な予防が含まれるが、こうした回復または予防が完全なものである必要はない。

【0012】

アミノ酸：本明細書で使用されるアミノ酸は、その広い意味では、ポリペプチド鎖に組み込まれ得る任意の化合物及び/または物質を指し、こうした組み込みは、例えば、1つまたは複数のペプチド結合の形成を介して行われる。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、 $H_2N-C(H)(R)-COOH$ という一般構造を有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、天然起源のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、非天然アミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、D-アミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、L-アミノ酸である。「標準アミノ酸」は、天然起源のペプチドに共通して見られる20個の標準的なL-アミノ酸のいずれかを指す。「非標準アミノ酸」は、それが合成的に調製されるものであるか、または天然源から得られるものであるかとは無関係に、標準アミノ酸以外の任意のアミノ酸を指す。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態では、アミノ酸は、ポリペプチドにおけるカルボキシ末端アミノ酸及び／またはアミノ末端アミノ酸を含めて、典型的または正準的なアミノ酸構造と比較すると構造修飾を含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般構造と比較すると、メチル化、アミド化、アセチル化、peg化、グリコシル化、リン酸化、及び／または置換（例えば、アミノ基、カルボン酸基、1つもしくは複数のプロトン、及び／またはヒドロキシル基に対するもの）によって修飾され得る。いくつかの実施形態では、そのような修飾は、例えば、修飾を有さないこと以外は同一の非修飾アミノ酸を含むポリペプチドと比較して、修飾アミノ酸を含むポリペプチドの循環半減期を変化させ得る。いくつかの実施形態では、そのような修飾は、修飾を有さないこと以外は同一の非修飾アミノ酸を含むポリペプチドと比較して、修飾アミノ酸を含むポリペプチドの関連活性を顕著に変化させない。文脈から明らかであるが、いくつかの実施形態では、「アミノ酸」という用語は、遊離アミノ酸を指すために使用され得、いくつかの実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸残基を指すために使用され得る。

### 【0013】

抗体：本明細書で使用する「抗体」という用語は、特定の標的抗原に対する特異的な結合性を付与する上で十分な正準的免疫グロブリン配列要素を含むポリペプチドを指す。当該技術分野では知られることであるが、天然に生じるインタクトな抗体は、2つの同一の重鎖ポリペプチド（それぞれ約50kD）と、2つの同一の軽鎖ポリペプチド（それぞれ約25kD）と、から構成される約150kDの四量体物質であり、これらの重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドは、互いに結び付くことで、「Y字型」構造と一般に称されるものになる。重鎖はそれぞれ、少なくとも4つのドメイン（それぞれ約110個のアミノ酸の長さを有する）から構成されており、これらの少なくとも4つのドメインは、アミノ末端可変（VH）ドメイン（Y字構造の先端に位置する）の後に、3つの定常ドメイン（CH1、CH2、及びカルボキシ末端CH3（Y字の基部の底部に位置する））が続く順序で存在する。「スイッチ」として知られる短い領域は、重鎖可変領域と重鎖定常領域とを連結する。「ヒンジ」は、CH2ドメイン及びCH3ドメインを抗体の残部に連結する。このヒンジ領域における2つのジスルフィド結合は、インタクトな抗体では2つの重鎖ポリペプチドを互いに連結する。軽鎖はそれぞれ、2つのドメインから構成されており、これら2つのドメインは、アミノ末端可変（VL）ドメインの後に、カルボキシ末端定常（CL）ドメインが続く順序で存在しており、別の「スイッチ」によって互いに分断されている。インタクトな抗体四量体は、単一のジスルフィド結合によって重鎖と軽鎖とが互いに連結された2つの重鎖-軽鎖二量体から構成されており、2つの他のジスルフィド結合は、重鎖ヒンジ領域を互いに連結し、その結果、当該二量体を互いに連結し、四量体が形成される。天然に生じる抗体は、グリコシル化もされており、このグリコシル化は、典型的には、CH2ドメインに対してなされる。天然の抗体におけるドメインはそれぞれ、圧縮逆平行ベータバレル中に互いに相対してパッキングされた2つのベータシート（例えば、3つの鎖のシート、4つの鎖のシート、または5つの鎖のシート）から形成される「免疫グロブリンフォールド」によって特徴付けられる構造を有する。可変ドメインはそれぞれ、「相補性決定領域」として知られる3つの超可変ループ（CDR1、CDR2、及びCDR3）と、幾分か不変の4つの「フレームワーク」領域（FR1、FR2、FR3、及びFR4）と、を含む。抗体フォールドが天然のものであるとき、FR領域は、ドメインに対して構造フレームワークを与えるベータシートを形成し、重鎖と軽鎖との両方に由来するCDRループ領域は、三次元空間において一緒になり、その結果、Y字構造の先端に位置する単一の超可変抗原結合部位を創出する。天然起源の抗体のFc領域は、補体系の要素に結合すると共に、エフェクター細胞上の受容体にも結合する。こうしたエフェクター細胞には、例えば、細胞傷害性を媒介するエフェクター細胞が含まれる。当該技術分野では知られることであるが、Fc受容体に対するFc領域の親和性特性及び／または他の結合特性は、グリコシル化または他の修飾を介して調節され得る。いくつかの実施形態では、本発明に従って生成及び／または利用される抗体は、グリコシル化Fcドメインを含み、こうしたグリコシル化Fcドメインには、そのようなグリコシル化が修飾また

10

20

30

40

50

は操作されたFcドメインが含まれる。ある特定の実施形態では、十分な免疫グロブリンドメイン配列（例えば、天然の抗体に見られるもの）を含むポリペプチドまたはポリペプチドの複合体はいずれも、そのようなポリペプチドが、天然に生じるものであるか（例えば、抗原に反応する生物によって生成されるもの）、あるいは組換え操作、化学合成、または他の人工的な系もしくは方法論によって生成されるものであるかとは無関係に、「抗体」と称され、及び/または「抗体」として使用され得る。いくつかの実施形態では、抗体は、ポリクローナルであり、いくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナルである。いくつかの実施形態では、抗体は、マウス、ウサギ、霊長類、またはヒトの抗体に特徴的な定常領域配列を有する。いくつかの実施形態では、抗体配列要素は、ヒト化されたもの、霊長類化されたもの、キメラのものなどであり、これらは、当該技術分野において知られている。さらに、本明細書で使用される「抗体」という用語は、適切な実施形態では（別段の記載がないか、または文脈上明らかでない限り）、抗体の構造特徴及び機能特徴を代替様式において利用することを目的として当該技術分野で知られるか、または開発されたコンストラクトまたは形式のいずれかを指し得る。例えば、ある特定の実施形態では、本発明に従って利用される抗体は、限定されないが、インタクトなIgA抗体、IgG抗体、IgE抗体、またはIgM抗体、二重特異性抗体または多重特異性抗体（例えば、Zybodies（登録商標）など）、抗体断片（Fab断片、Fab'断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fd'断片、Fd断片、及び単離CDRまたはそのセットなど）、一本鎖Fv、ポリペプチド-Fc融合体、単ドメイン抗体（例えば、サメの単ドメイン抗体（IgNARまたはその断片など）、ラクダ抗体、遮蔽型抗体（例えば、Probodies（登録商標））、小型モジュラー免疫医薬（「SMIPs（商標）」）、一本鎖ダイアボディまたはタンデムダイアボディ（TandAb（登録商標））、VHH、Anticalins（登録商標）、Nanobodies（登録商標）ミニボディ、BiTE（登録商標）、アンキリンリピートタンパク質またはDARPinS（登録商標）、Avimers（登録商標）、DART、TCR様抗体、Adnectins（登録商標）、Affilins（登録商標）、Trans-bodies（登録商標）、Affibodies（登録商標）、TrimerX（登録商標）、マイクロタンパク質、Fynomers（登録商標）、Centyrins（登録商標）、ならびにKALBITOR（登録商標）、から選択される形式のものである。いくつかの実施形態では、抗体は、天然に生じる抗体なら有することが特徴的な共有結合修飾（例えば、グリカンとの結び付き）を含み得ない。いくつかの実施形態では、抗体は、共有結合修飾を含み得る。

#### 【0014】

抗体薬剤：本明細書で使用される「抗体薬剤」という用語は、特定の抗原に特異的に結合する薬剤を指す。いくつかの実施形態では、この用語は、特異的な結合性を付与する上で十分な免疫グロブリン構造要素を含む任意のポリペプチドまたはポリペプチド複合体を包含する。抗体薬剤の例としては、限定されないが、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が挙げられる。いくつかの実施形態では、抗体薬剤は、マウス、ウサギ、霊長類、またはヒトの抗体に特徴的な定常領域配列を1つまたは複数含み得る。いくつかの実施形態では、抗体薬剤は、当該技術分野において知られるヒト化された配列要素、霊長類化された配列要素、キメラ配列要素などを1つまたは複数含み得る。多くの実施形態では、「抗体薬剤」という用語は、抗体の構造特徴及び機能特徴を代替様式において利用することを目的として当該技術分野で知られるか、または開発されたコンストラクトまたは形式の1つまたは複数を目指すために使用される。例えば、いくつかの実施形態では、本発明に従って利用される抗体薬剤は、限定されないが、インタクトなIgA抗体、IgG抗体、IgE抗体、またはIgM抗体、二重特異性抗体または多重特異性抗体（例えば、Zybodies（登録商標）など）、抗体断片（Fab断片、Fab'断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fd'断片、Fd断片、及び単離CDRまたはそのセットなど）、一本鎖Fv、ポリペプチド-Fc融合体、単ドメイン抗体（例えば、サメの単ドメイン抗体（IgNARまたはその断片など）、ラクダ抗体、遮蔽型抗体（例えば、Probodies（登録商標））、小型モジュラー免疫医薬（「SMIPs（商標）」）、一本鎖ダイアボディま

10

20

30

40

50

たはタンデムダイアボディ (TandAb (登録商標))、VHH、Anticalins (登録商標)、Nanobodies (登録商標) ミニボディ、BiTE (登録商標)、アンキリンリピートタンパク質またはDARPINS (登録商標)、Avimers (登録商標)、DART、TCR様抗体、Adnectins (登録商標)、Affilins (登録商標)、Trans-bodies (登録商標)、Affibodies (登録商標)、TrimerX (登録商標)、マイクロタンパク質、Fynomers (登録商標)、Centyrins (登録商標)、ならびにKALBITOR (登録商標)、から選択される形式のものである。いくつかの実施形態では、抗体は、それが天然に生じるのであれば有することになる共有結合修飾 (例えば、グリカンとの結び付き) を含み得ない。いくつかの実施形態では、抗体は、共有結合修飾 (例えば、グリカンとの結び付き、または他のペンダント基 (例えば、ポリエチレングリコールなど) との結び付き) を含み得る。多くの実施形態では、抗体薬剤は、当業者が相補性決定領域 (CDR) と認識する構造を1つもしくは複数含むアミノ酸配列を有するポリペプチドであるか、または当該ポリペプチドを含み、いくつかの実施形態では、抗体薬剤は、参照抗体に見られるCDRと実質的に同一の少なくとも1つのCDR (例えば、少なくとも1つの重鎖CDR及び/または少なくとも1つの軽鎖CDR) を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドであるか、あるいは当該ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、含有CDRは、参照CDRと比較すると、配列が同一であるか、または含有CDRが含むアミノ酸置換の数が1~5であるという点において、参照CDRと実質的に同一である。いくつかの実施形態では、含有CDRは、参照CDRとの配列同一性が少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%であるという点において、参照CDRと実質的に同一である。いくつかの実施形態は、含有CDRは、参照CDRとの配列同一性が少なくとも96%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%であるという点において、参照CDRと実質的に同一である。いくつかの実施形態では、含有CDRは、含有CDR内のアミノ酸の少なくとも1つが参照CDRと比較して欠失、追加、または置換されているが、こうした欠失、追加、または置換を有さなければ参照CDRのものと同じのアミノ酸配列を含有CDRが有するという点において、参照CDRと実質的に同一である。いくつかの実施形態では、含有CDRは、含有CDR内のアミノ酸の1~5つが参照CDRと比較して欠失、追加、または置換されているが、こうした欠失、追加、または置換を有さなければ参照CDRと同一のアミノ酸配列を含有CDRが有するという点において、参照CDRと実質的に同一である。いくつかの実施形態では、含有CDRは、含有CDR内のアミノ酸の少なくとも1つが参照CDRと比較して置換されているが、こうした置換を有さなければ参照CDRのものと同じのアミノ酸配列を含有CDRが有するという点において、参照CDRと実質的に同一である。いくつかの実施形態では、抗体薬剤は、当業者が免疫グロブリン可変ドメインと認識する構造要素を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドであるか、または当該ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、抗体薬剤は、免疫グロブリン結合ドメインに相同的または大部分が相同的な結合ドメインを有するポリペプチドタンパク質である。

#### 【0015】

抗体断片：本明細書で使用される「抗体断片」は、本明細書に記載の抗体または抗体薬剤の一部分を指し、典型的には、抗原結合部分またはその可変領域を含む一部分を指す。抗体断片は、任意の手段によって生成され得る。例えば、いくつかの実施形態では、抗体断片は、インタクトな抗体または抗体薬剤を断片化させることによって酵素的または化学

10

20

30

40

50

的に生成され得る。あるいは、いくつかの実施形態では、抗体断片は、組換えで（すなわち、操作された核酸配列を発現させることによって）生成され得る。いくつかの実施形態では、抗体断片は、完全または部分的に合成で生成され得る。いくつかの実施形態では、抗体断片（具体的には、抗原結合抗体断片）は、少なくとも約 50 個、少なくとも約 60 個、少なくとも約 70 個、少なくとも約 80 個、少なくとも約 90 個、少なくとも約 100 個、少なくとも約 110 個、少なくとも約 120 個、少なくとも約 130 個、少なくとも約 140 個、少なくとも約 150 個、少なくとも約 160 個、少なくとも約 170 個、少なくとも約 180 個、少なくとも約 190 個、またはこれを超える数のアミノ酸の長さを有し得、いくつかの実施形態では、少なくとも約 200 個のアミノ酸の長さを有し得る。

#### 【0016】

と結び付く：2つの事象または実体は、一方の存在、レベル、及び/または形態がもう一方のものと相関するのであれば、当該用語が本明細書で使用されるように、互いに「結び付く」。例えば、特定の実体（例えば、ポリペプチド、遺伝子シグネチャー、代謝物、微生物など）は、（例えば、関連集団にわたって）その存在、レベル、及び/または形態が特定の疾患、障害、または病状の発症率及び/または易罹患性と相関するのであれば、当該疾患、障害、または病状と結び付くと考えられる。いくつかの実施形態では、2つ以上の実体は、互いに物理的な近接性を有し、及び/または互いの物理的な近接性が保持されるように直接的または間接的に相互作用するのであれば、互いに物理的に「結び付く」。いくつかの実施形態では、互いに物理的に結び付く2つ以上の実体は、互いに共有結合で連結され、いくつかの実施形態では、物理的に互いに結び付く2つ以上の実体は、互いに共有結合では連結されないが、例えば水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、磁性、及びそれらの組み合わせによって、非共有結合で結び付けられる。

#### 【0017】

アナログ：本明細書で使用される「アナログ」という用語は、1つまたは複数の特定の構造的な特徴、要素、成分、または部分を参照物質と共有する物質を指す。典型的には、「アナログ」は、参照物質との顕著な構造類似性を示す（例えば、コア構造またはコンセンサス構造を参照物質と共有する）だけでなく、ある特定の個別点が異なりもする。いくつかの実施形態では、アナログは、例えば参照物質の化学的な処理によって、参照物質から生成され得る物質である。いくつかの実施形態では、アナログは、参照物質を生成する合成プロセスと（例えば、複数のステップを共有する）実質的に同様の合成プロセスを実施することによって生成され得る物質である。いくつかの実施形態では、アナログは、参照物質の生成に使用される合成プロセスとは異なる合成プロセスを実施することによって生成されるか、または生成され得る。

#### 【0018】

結合：本明細書で使用される「結合」という用語は、典型的には、2つ以上の実体の間または中での非共有結合性の結び付きを指すことが理解されよう。「直接的な」結合は、部分間の物理的な接触を伴い、間接的な結合は、1つまたは複数の中間実体との物理的な接触による物理的相互作用を伴う。2つ以上の実体の間の結合は、典型的には、さまざまな状況のいずれかにおいて評価することができ、こうした状況には、相互作用部分が単離された状況で試験される場合、または相互作用部分がより複雑な系の状況（例えば、共有結合もしくはその他の結合様式で担体実体と結び付いた状況、及び/または生物学的系もしくは細胞における状況）において試験される場合が含まれる。

#### 【0019】

生物学的試料：本明細書で使用される「生物学的試料」という用語は、典型的には、本明細書に記載されるように、目的の生物学的供給源（例えば、組織または生物または細胞培養物）から得られるか、またはそれに由来する試料を指す。いくつかの実施形態では、目的の供給源は、生物（動物またはヒトなど）を含む。いくつかの実施形態では、生物学的試料は、生物学的な組織もしくは液体であるか、または生物学的な組織もしくは液体を含む。いくつかの実施形態では、生物学的試料は、骨髄、血液、血液細胞、腹水、組織生検試料または細針生検試料、細胞含有体液、浮遊核酸、痰、唾液、尿、脳脊髄液、腹水、

10

20

30

40

50

胸水、糞便、リンパ液、婦人科学的液体、皮膚スワブ、腔スワブ、口腔スワブ、鼻腔スワブ、すすぎ液または洗浄液（腺管洗浄液または気管支肺胞洗浄液など）、吸引物、擦過物、骨髓検体、組織生検検体、外科検体、糞便、他の体液、分泌物、及び／または排泄物、及び／またはそこから得られる細胞などであり得るか、またはこれを含み得る。いくつかの実施形態では、生物学的試料は、個体から得られる細胞であるか、または当該細胞を含む。いくつかの実施形態では、得られる細胞は、試料の採取元である個体に由来する細胞であるか、または当該細胞を含む。いくつかの実施形態では、試料は、任意の適切な手段によって目的の供給源から直接的に得られる「一次試料」である。例えば、いくつかの実施形態では、一次生物学的試料は、生検（例えば、細針吸引または組織生検）、手術、体液（例えば、血液、リンパ液、糞便など）の採取などからなる群から選択される方法によって得られる。いくつかの実施形態では、文脈から明らかであろうが、「試料」という用語は、一次試料の処理（例えば、1つもしくは複数の一次試料構成成分の除去及び／または一次試料への1つもしくは複数の薬剤の添加）によって得られる調製物を指す。例えば、半透膜を使用するフィルタリングが行われる。そのような「処理試料」は、例えば、試料から抽出される核酸またはタンパク質を含むか、あるいはmRNAの増幅または逆転写、ある特定の成分の単離及び／または精製などの手法に一次試料を供することによって得られる核酸またはタンパク質を含み得る。

10

#### 【0020】

バイオマーカー：「バイオマーカー」という用語は、存在、レベル、または形態が、目的とする特定の生物学的事実または生物学的状態と関連し、その結果、その事実または状態の「マーカー」と見なされる実体を指すために、当該技術分野における当該用語の使用に従って本明細書で使用される。例を少数挙げるにすぎないが、いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、特定の疾患状態に対するマーカー、または特定の疾患、障害、もしくは病状が発症、発生、もしくは再発し得る可能性に対するマーカーであり得るか、あるいは当該マーカーを含み得る。いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、特定の疾患転帰もしくは治療転帰またはその可能性に対するマーカーであり得るか、あるいは当該マーカーを含み得る。したがって、目的の関連生物学的事実または関連生物学的状態に関して、いくつかの実施形態では、バイオマーカーは予測的であり、いくつかの実施形態では、バイオマーカーは予後判定的であり、いくつかの実施形態では、バイオマーカーは診断的である。バイオマーカーは、任意の化学クラスの実体であり得る。例えば、いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、核酸、ポリペプチド、脂質、糖質、小分子、無機薬剤（例えば、金属もしくはイオン）、またはそれらの組み合わせであり得るか、あるいはこれを含み得る。いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、細胞表面マーカーである。いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、細胞内のものである。いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、細胞の外側に見られる（例えば、細胞の外側（例えば、血液、尿、涙液、唾液、脳脊髄液などの体液）に分泌されるか、またはその他の機構で生成するか、もしくは存在する）。

20

30

#### 【0021】

がん：本明細書で使用される「がん」という用語は、細胞の増殖が相対的に異常、無制御、及び／または自律的となり、その結果、細胞の増殖速度が異常に上昇し、及び／または細胞増殖の制御が著しく失われることによって特徴付けられる異常な増殖表現型を細胞が示す疾患、障害、または病状を指す。いくつかの実施形態では、がんは、1つまたは複数の腫瘍によって特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、がんは、前がん性（例えば、良性）、悪性、前転移性、転移性、及び／または非転移性の細胞であり得るか、あるいは当該細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、関連がんは、固形腫瘍によって特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、関連がんは、血液腫瘍によって特徴付けられ得る。一般に、当該技術分野において知られる異なる型のがんの例としては、例えば、造血系の癌（白血病、リンパ腫（ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫）、骨髓腫、ならびに骨髓増殖性疾患を含む）、固形組織の肉腫、メラノーマ、腺腫、癌腫、口、咽喉、喉頭、及び肺の扁平上皮癌、肝癌、泌尿生殖器癌（前立腺癌、子宮頸癌、膀胱癌、子宮癌、

40

50

及び子宮内膜癌など)、ならびに腎細胞癌、骨癌、膵癌、皮膚癌、皮膚メラノーマまたは眼球内メラノーマ、内分泌系の癌、甲状腺の癌、副甲状腺の癌、頭頸部癌、乳癌、胃腸癌及び神経系癌、良性病巣(乳頭腫など)、ならびに同様のものが挙げられる。

#### 【0022】

特徴的な部分：本明細書で使用される「特徴的な部分」という用語は、広い意味では、物質の一部であって、当該物質の特定の特徴、特性、または活性の存在(または不在)とその存在(または不在)が関連する一部分を指す。いくつかの実施形態では、物質の特徴的な部分は、当該物質と、特定の特徴、特性、または活性を共有する関連物質と、には見られるが、特定の特徴、特性、または活性を共有しない物質には見られない一部分である。ある特定の実施形態では、特徴的な部分は、少なくとも1つの機能特徴をインタクトな物質と共有する。例えば、いくつかの実施形態では、タンパク質またはポリペプチドの「特徴的な部分」は、アミノ酸が連続する区間を含むものであるか、またはアミノ酸が連続する区間が集合したものであり、これらのアミノ酸は、一緒になることでタンパク質またはポリペプチドに特徴的なものとなる。いくつかの実施形態では、そのような連続区間はそれぞれ、一般に、少なくとも2つ、少なくとも5つ、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも30個、少なくとも35個、またはこれを超える数のアミノ酸を含む。一般に、物質(例えば、タンパク質、抗体など)の特徴的な部分は、本明細書に明記される配列同一性及び/または構造同一性に加えて、関連するインタクトな物質と少なくとも1つの機能特徴を共有するものである。いくつかの実施形態では、特徴的な部分は、生物学的に活性であり得る。

#### 【0023】

特徴的な配列要素：本明細書で使用される「特徴的な配列要素」という語句は、ポリマー(例えば、ポリペプチドまたは核酸)に見られる配列要素であって、当該ポリマーの特徴的な部分となる配列要素を指す。いくつかの実施形態では、特徴的な配列要素の存在は、ポリマーの特定の活性または特性の存在またはレベルと関連する。いくつかの実施形態では、特徴的な配列要素の存在(または不在)は、特定のポリマーを、そのようなポリマーの特定のファミリーまたは群のメンバー(または非メンバー)として規定する。特徴的な配列要素は、典型的には、少なくとも2つのモノマー(例えば、アミノ酸またはヌクレオチド)を含む。いくつかの実施形態では、特徴的な配列要素は、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも30個、少なくとも35個、またはこれを超える数のモノマー(例えば、連続的に連結されたモノマー)を含む。いくつかの実施形態では、特徴的な配列要素は、モノマーが連続する第1の区間及び第2の区間を少なくとも含み、これらの区間は、1つまたは複数のスペーサー領域によって間隔があげられており、このスペーサー領域の長さは、当該配列要素を共有するポリマーによって差異の有無があり得る。

#### 【0024】

化学療法部分：本明細書で使用される「化学療法部分」という用語は、1つまたは複数のアポトーシス促進薬剤、細胞増殖抑制薬剤、及び/または細胞傷害性薬剤に関して当該用語が当該技術分野において理解される意味を有する。こうした薬剤には、例えば具体的には、望ましくない細胞増殖と結びつく1つまたは複数の疾患、障害、または病状の治療用途で利用及び/または推奨される薬剤が含まれる。多くの実施形態では、化学療法部分は、がんの治療において有用である。いくつかの実施形態では、化学療法部分は、1つもしくは複数のアルキル化薬剤、1つもしくは複数のアントラサイクリン、1つもしくは複数の細胞骨格破壊物質(例えば、微小管標的化部分(タキサン、マイタンシン、及びそのアナログなど))、1つもしくは複数のエポチロン、1つもしくは複数のヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤、1つもしくは複数のトポイソメラーゼ阻害剤(例えば、トポイソメラーゼI及び/またはトポイソメラーゼIIの阻害剤)、1つもしくは複数のキナーゼ阻害剤、1つもしくは複数のヌクレオチドアナログもしくはヌクレオチド前駆体

アナログ、１つもしくは複数のペプチド抗生物質、１つもしくは複数の白金ベースの薬剤、１つもしくは複数のレチノイド、１つもしくは複数のピンカアルカロイド、及び／または下記のものうちの１つもしくは複数の１つもしくは複数のアナログ（すなわち、関連する抗増殖活性を共有するもの）であり得るか、あるいはこれを含み得る。いくつかの特定の実施形態では、化学療法部分は、アクチノマイシン、全トランス型レチノイン酸、アウリスタチン、アザシチジン、アザチオプリン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、カルボプラチン、カペシタピン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、クルクミン、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキシソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イマチニブ、イリノテカン、マイタンシン及び／またはそのアナログ（例えば、DM1）、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、マイタンシノイド、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、トポテカン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ピノレルビン、ならびにそれらの組み合わせのうちの１つまたは複数であり得るか、あるいは当該１つまたは複数を含み得る。いくつかの実施形態では、化学療法部分は、抗体-薬物複合体の状況において利用され得る。いくつかの実施形態では、化学療法部分は、hLL1-ドキシソルビシン、hRS7-SN-38、hMN-14-SN-38、hLL2-SN-38、hA20-SN-38、hPAM4-SN-38、hLL1-SN-38、hRS7-Pro-2-P-Dox、hMN-14-Pro-2-P-Dox、hLL2-Pro-2-P-Dox、hA20-Pro-2-P-Dox、hPAM4-Pro-2-P-Dox、hLL1-Pro-2-P-Dox、P4/D10-ドキシソルビシン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ブレンツキシマブベドチン、トラストズマブエムタンシン、イノツズマブオゾガマイシン、グレムバツモマブ（glembatumomab）ベドチン、SAR3419、SAR566658、BIB015、BT062、SGN-75、SGN-CD19A、AMG-172、AMG-595、BAY-94-9343、ASG-5ME、ASG-22ME、ASG-16M8F、MDX-1203、MLN-0264、抗PSMA ADC、RG-7450、RG-7458、RG-7593、RG-7596、RG-7598、RG-7599、RG-7600、RG-7636、ABT-414、IMGN-853、IMGN-529、ボルセツズマブマホドチン、及びロルボツズマブメルタンシンからなる群から選択される抗体-薬物複合体に見られるものである。いくつかの実施形態では、化学療法部分は、ファルネシル-チオサリチル酸（FTS）、4-（4-クロロ-2-メチルフェノキシ）-N-ヒドロキシブタンアミド（CMH）、エストラジオール（E2）、テトラメトキシスチルベン（TMS）、-トカトリエノール（-tocatrienol）、サリノマイシン、もしくはクルクミンのうちの１つもしくは複数であり得るか、または当該１つもしくは複数を含み得る。

#### 【0025】

クロロトキシン複合体：本明細書で使用される「クロロトキシン複合体」という用語は、クロロトキシンポリペプチドがペイロード部分と結び付いたものを含む実体を指す。いくつかの実施形態では、ペイロード部分は、検出可能部分（例えば、画像化可能部分）、治療部分、標的化部分、もしくはそれらの組み合わせであるか、またはこれを含む。

#### 【0026】

クロロトキシンポリペプチド：本明細書で使用される「クロロトキシンポリペプチド」という用語は、適切な参照クロロトキシン（例えば、配列番号1のものまたはその関連断片）のアミノ酸配列との同一性が少なくとも45%であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、配列番号1またはその関連断片との同一性が少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なく

10

20

30

40

50



とも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または少なくとも 100%であるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、配列番号 1 またはその関連断片のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有するという点において、クロロトキシン変異体である。いくつかの実施形態では、クロロトキシン変異体は、配列番号 1 またはその関連断片と比較して異なる位置の上限数が 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 であるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、配列番号 1 の関連断片は、配列番号 1 の少なくとも 5 つの連続残基を含む。いくつかの実施形態では、配列番号 1 の関連断片は、配列番号 1 の対応区間との同一性が少なくとも 45% である配列を有する 5 ~ 25 個のアミノ酸の区間を含む。

10

#### 【0027】

併用療法：本明細書で使用される「併用療法」という用語は、2 つ以上治療レジメン（例えば、2 つ以上治療部分）が同時に対象に適用される状況を指す。いくつかの実施形態では、2 つ以上のレジメンは、同時に実施され得る。いくつかの実施形態では、そのようなレジメンは、連続して実施され得る（例えば、第 2 のレジメンのいずれかの用量が投与される前に、第 1 のレジメンの「用量」がすべて投与される）。いくつかの実施形態では、そのような薬剤は、重複する投薬レジメンにおいて投与される。いくつかの実施形態では、併用療法の「実施」は、1 つまたは複数の薬剤（複数可）またはモダリティ（複数可）を、その他の薬剤（複数可）またはモダリティ（複数可）が使用されている対象に併用するものであり得る。明確化すると、併用療法は、個々の薬剤を単一の組成物において一緒に投与することを必要とするものではない（または同時投与でさえ必ずしも必要ではない）が、いくつかの実施形態では、2 つ以上薬剤またはその活性部分が、組み合わせ組成物において一緒に投与されるか、または組み合わせ化合物においてさえ（例えば、単一の化学複合体もしくは共有結合実体の一部として）一緒に投与され得る。

20

#### 【0028】

同等：本明細書で使用される「同等」という用語は、2 つ以上の薬剤、実体、状況、状態セットなどが、互いに同一ではあり得ないが、観測される差異または類似性に基づいて合理的に結論を導くことが可能なことを当業者なら理解するであろうほどに十分に類似していることで、それらの間での比較が可能であることを指す。いくつかの実施形態では、状態、状況、個体、または集団の同等セットは、実質的に同一の特徴が複数存在し、異なる特徴の数が 1 つまたは少ないことによって特徴付けられる。2 つ以上のそのような薬剤、実体、状況、状態セットなどが任意の所与の状況において同等と見なされるにはどの程度の同一性が必要とされるかを、当業者なら文脈を加味して理解するであろう。例えば、状況、個体、もしくは集団の異なるセットの下で得られる結果もしくは観測される現象、または当該異なるセットで得られる結果もしくは観測される現象、における差異が、異なる特徴の変動によって生じるか、または当該変動の指標になるという合理的な結論が保証されるほどに、実質的に同一の特徴の数及び型が十分であることによって特徴付けられるとき、状況、個体、または集団のセットが互いに同等であることを当業者なら理解するであろう。

30

#### 【0029】

組成物：本明細書で使用される「組成物」という用語は、1 つまたは複数の特定の成分を含む個別の物理的実体を指すために使用され得ることを当業者なら理解するであろう。一般に、別段の指定がない限り、組成物は、任意の形態（例えば、ガス、ゲル、液体、固体など）のものであり得る。

40

#### 【0030】

含む：具体的に挙げられる要素またはステップを 1 つまたは複数「含む (comprising)」と本明細書に記載される組成物または方法は、オープンエンドであり、具体的に挙げられる要素またはステップが特定の態様または実施形態に必須ではあるが、他の要素またはステップが組成物または方法の範囲内に追加され得ることを意味する。冗長性

50

を回避するために、具体的に挙げられる要素またはステップを1つまたは複数「含む (comprising)」（または「含む (comprises)」）と記載される組成物または方法はいずれも、具体的に挙げられる同じ要素またはステップ「から本質的になる (consisting essentially of)」（または「から本質的になる (consists essentially of)」）対応するより限定的な組成物または方法も説明するものであり、こうした組成物または方法は、具体的に挙げられる本質的な要素またはステップに加えて、こうした組成物または方法の基本的かつ新規の特徴（複数可）に実質的に影響を与えない追加の要素またはステップも含み得ることを意味するとも理解される。1つまたは複数の具体的に挙げられる要素またはステップを「含む (comprising)」または当該要素またはステップ「から本質的になる (consisting essentially of)」と本明細書に記載される組成物または方法はいずれも、具体的に挙げられない他の要素またはステップがいずれも除外されることになる、具体的に挙げられる要素またはステップ「からなる (consisting of)」（または「からなる (consists of)」）より限定的なクロズドエンドの対応する組成物または方法も説明するものであるとも理解される。本明細書に開示の組成物または方法のいずれにおいても、具体的に挙げられる本質的な任意の要素またはステップの既知または開示の同等形態は、当該要素またはステップの代わりとなり得る。

#### 【0031】

に対応する：本明細書で使用される「に対応する」という用語は、適切な参照化合物または参照組成物との比較を通じて化合物または組成物における構造要素の位置／同一性を指定するために使用され得る。例えば、いくつかの実施形態では、ポリマーにおけるモノマー残基（例えば、ポリペプチドにおけるアミノ酸残基、またはポリヌクレオチドにおける核酸残基）は、適切な参照ポリマーにおける残基「に対応する」ものとして特定され得る。例えば、簡潔にするために、参照関連ポリペプチドに基づく標準的な番号付けシステムを使用してポリペプチドにおける残基が指定されることが多く、その結果、位置190の残基「に対応する」アミノ酸は、例えば、特定のアミノ酸鎖において実際に190番目のアミノ酸である必要はなく、参照ポリペプチドにおける190の位置に見られる残基に対応するものであることを当業者なら理解するであろうし、「対応する」アミノ酸をどのように特定するかを当業者なら容易に理解する。例えば、当業者なら、ソフトウェアプログラムを含めて、さまざまな配列アライメント方針を認識するであろう。こうしたソフトウェアプログラムは、例えば、BLAST、CS-BLAST、CUSASW++、DIAMOND、FASTA、GGSEARCH/GLSEARCH、Genoogler、HMMER、HHpred/HHsearch、IDF、Infernal、KLAST、USEARCH、parasail、PSI-BLAST、PSI-Search、ScalabLAST、Sequillab、SAM、SSEARCH、SWAPHI、SWAPHI-LS、SWIMM、またはSWIPEなどであり、こうしたソフトウェアプログラムを利用することで、例えば、本開示に従ってポリペプチド及び／または核酸における「対応」残基を特定することができる。

#### 【0032】

検出可能部分：本明細書で使用される「検出可能部分」という用語は、検出可能な任意の要素、分子、官能基、化合物、断片、または部分を指す。いくつかの実施形態では、検出可能部分は、単独で提供または利用される。いくつかの実施形態では、検出可能部分は、別の薬剤と結び付けて（例えば、連結して）提供及び／または利用される。検出可能部分の例としては、限定されないが、さまざまなリガンド、放射性核種（例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{19}\text{F}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{135}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{187}\text{Re}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ など）、蛍光色素（特定の蛍光色素例については、以下を参照のこと）、化学発光薬剤（例えば、アクリジニウムエステル、安定化ジオキセタン、及び同様のものなど）、生物発光薬剤、分光的に分解可能な無機蛍光半導体ナノ結晶（すなわち、量子ドット）、金属ナノ粒子（例えば、金、銀、銅、白金など）、ナノクラスター、常磁性金属イオン、酵素（特定の酵素例については、以下を

10

20

30

40

50

参照のこと）、比色標識（例えば、色素、金コロイド、及び同様のものなど）、ビオチン、ジオキシゲニン（dioxigenin）、ハプテン、ならびに抗血清またはモノクローナル抗体が利用可能なタンパク質が挙げられる。

#### 【0033】

投薬レジメン：「投薬レジメン」という用語は、対象に個別に投与され、典型的には、時間間隔をあけて投与される単位用量（典型的には、複数回）のセットを指すために使用され得ることを当業者なら理解するであろう。いくつかの実施形態では、所与の治療部分は、推奨投薬レジメンを有し、こうした推奨投薬レジメンは、単回または複数回の用量を含み得る。いくつかの実施形態では、投薬レジメンは、他の用量と時間間隔をあけてそれぞれが投与される複数回用量を含む。いくつかの実施形態では、個々の用量は、同じ長さの時間間隔を互いにあけて投与される。いくつかの実施形態では、投薬レジメンは、複数回用量を含み、個々の用量を隔てる異なる投与時間間隔を少なくとも2つ含む。いくつかの実施形態では、投薬レジメンに含まれる用量はすべて、同じ単位投薬量のものである。いくつかの実施形態では、投薬レジメンに含まれる異なる用量は、量が異なるものである。いくつかの実施形態では、投薬レジメンは、第1の投薬量の第1の用量と、その後に投与される、第1の投薬量とは異なる第2の投薬量の1回または複数回の追加用量と、を含む。いくつかの実施形態では、投薬レジメンは、第1の投薬量の第1の用量と、その後に投与される、第1の投薬量と同じ第2の投薬量の1回または複数回の追加用量と、を含む。いくつかの実施形態では、投薬レジメンは、関連集団にわたって実施されると、所望の転帰または有利な転帰と相関する（すなわち、治療的投薬レジメンである）。

#### 【0034】

操作された：一般に、「操作された」という用語は、人工的に処理されているという側面を指す。例えば、2つ以上の配列が天然ではその順序で一緒に連結されないものであり、人工的に処理されることで、操作されるポリヌクレオチドにおいて互いに直接的に連結されるとき、ポリヌクレオチドは、「操作された」と考えられる。例えば、本明細書に記載の実施形態のいくつかでは、第1のコード配列とは機能可能なように結び付いているが、第2のコード配列とは機能可能なように結び付いていない状態で天然には見られる制御配列であって、第2のコード配列と機能可能なように結び付くように人工的に連結された制御配列を、操作されたポリヌクレオチドは含む。同様に、細胞または生物は、その遺伝情報が改変されるように処理されている（例えば、それまでは存在しなかった新たな遺伝物質が、例えば、形質転換、接合、体細胞交雑、トランスフェクション、形質導入、または他の機構によって導入されているか、あるいは既に存在した遺伝物質が、例えば、置換もしくは欠失による変異または接合プロトコールによって改変または除去されている）のであれば、「操作された」と考えられる。慣行であり、当業者なら理解していることであるが、操作されたポリヌクレオチドまたは細胞の子孫は、実際の処理が前の実体に対して実施されたものであったとしても、典型的には、依然として「操作された」と称される。

#### 【0035】

断片：本明細書に記載の材料または実体の「断片」は、参照する全材料または全実体の個別部分を含むが、参照する全体物に見られる部分を1つまたは複数含まない構造を有する。いくつかの実施形態では、断片は、そのような個別部分からなる。いくつかの実施形態では、断片は、参照する全体物に見られる特徴的な構造要素もしくは構造部分からなるか、またはこれを含む。いくつかの実施形態では、ポリマー断片は、参照する全ポリマーに見られるモノマー単位（例えば、残基）を少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約25%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、もしくはこれを超える%含むか、または当該モノマー単位の当該%からなる。参照する全材料または全実体は、いくつかの実施形態では、断片の「親」と称さ

れ得る。

【 0 0 3 6 】

場合によっては、断片は、参照する全材料もしくは全実体または親材料もしくは親実体の物理的断片化によって生成される。場合によっては、断片は、参照する全材料もしくは全実体または親材料もしくは親実体の物理的断片化によって生成されない。したがって、場合によっては、断片は、デノボ合成によって生成されるか、あるいは参照する全材料もしくは全実体または親材料もしくは親実体の物理的断片化を必要としない別の手段によって生成される。例えば、ポリペプチドの断片は、参照する全ポリペプチドまたは親ポリペプチドのアミノ酸配列との同一性が少なくとも約 5 %、少なくとも約 1 0 %、少なくとも約 1 5 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、もしくはこれを超える % であるアミノ酸配列を含むポリペプチドであるか、または当該アミノ酸配列からなるポリペプチドであり得、参照する全ポリペプチドまたは親ポリペプチドの物理的断片化によって生成されることもされないこともあり得る。

10

【 0 0 3 7 】

遺伝子：本明細書で使用される「遺伝子」という用語は、染色体において産物（例えば、RNA 産物及び / またはポリペプチド産物）をコードする DNA 配列を指す。いくつかの実施形態では、遺伝子は、コード配列（すなわち、特定の産物をコードする配列）を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子は、非コード配列を含む。いくつかの特定の実施形態では、遺伝子は、コード配列（例えば、エクソン配列）も非コード配列（例えば、イントロン配列）も含み得る。いくつかの実施形態では、遺伝子は、1 つまたは複数の制御要素を含み得、当該制御要素は、例えば、遺伝子発現（例えば、細胞型特異的な発現、誘導性発現など）の側面の 1 つもしくは複数を制御するか、または当該 1 つもしくは複수에影響を与え得る。

20

【 0 0 3 8 】

遺伝子型：本明細書で使用される「遺伝子型」という用語は、所与の細胞または生物における所与の遺伝子座または関連遺伝子座のセットに位置する対立遺伝子の二倍体としての組み合わせを指す。ホモ接合型の対象は、同じ対立遺伝子のコピーを 2 つ保有し、ヘテロ接合型の対象は、2 つの異なる対立遺伝子を保有する。

30

【 0 0 3 9 】

遺伝子型判定：本明細書で使用される「遺伝子型判定」という用語は、1 つまたは複数の明確に定義された遺伝子座における個々の遺伝子型を区別するための実験的、計算的、または観測的なプロトコルを指す。遺伝子型判定を有用かつ効率的に実施し得るさまざまな技術を当業者なら認識するであろう。いくつかの実施形態では、遺伝子型判定は、核酸または核酸配列を直接的に検出するものである。いくつかの実施形態では、遺伝子型判定は、核酸または核酸配列を間接的に検出するものであり、この間接的な検出は、例えば、当該核酸または核酸配列の存在と相関する代理マーカーまたは事象を検出または分析することによって行われる。

40

【 0 0 4 0 】

相同性：本明細書で使用される「相同性」という用語は、ポリマー分子間（例えば、核酸分子間（例えば、DNA 分子間及び / または RNA 分子間）及び / またはポリペプチド分子間）の全関連性を指す。いくつかの実施形態では、ポリマー分子は、それらの配列が、少なくとも 2 5 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 3 5 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 4 5 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 5 5 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるならば、互いに「相同的」とあると考えられる。いくつかの実施形態では、ポリマー分子は、それらの配列

50

が、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、または少なくとも 99 % 類似するならば、互いに「相同的」であると考えられる。

#### 【0041】

同一性：本明細書で使用される「同一性」という用語は、ポリマー分子間（例えば、核酸分子間（例えば、DNA 分子間及び／または RNA 分子間）及び／またはポリペプチド分子間）の全関連性を指す。提供される 2 つのポリペプチド配列の間の同一性パーセントを計算するための方法は、当該技術分野において知られている。2 つの核酸配列またはポリペプチド配列の同一性パーセントの計算は、例えば、最適な比較を行うことを目的として 2 つの配列のアライメントをとることによって実施され得る（例えば、アライメントが最適化されるように第 1 の配列及び第 2 の配列の一方または両方にギャップが導入され得、非同一致配列は、比較目的では無視され得る）。次に、対応位置におけるヌクレオチドまたはアミノ酸の比較が行われる。第 1 の配列におけるある 1 つの位置が、第 2 の配列における対応位置と同じ残基（例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸）によって占有されているとき、それらの分子は、その位置において同一である。2 つの配列の間の同一性パーセントは、ギャップの数及びそれぞれのギャップの長さを任意選択で考慮に入れ、それらの配列によって共有される同一位置の数に応じて決定されるものであり、こうしたギャップは、それら 2 つの配列のアライメントが最適化されるように導入される必要があり得る。配列の比較及び 2 つの配列の間の同一性パーセントの決定は、BLAST（基本的局所アライメント検索ツール）などの数学アルゴリズムを使用して達成され得る。

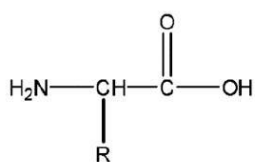
#### 【0042】

マーカー：本明細書で使用されるマーカーは、存在またはレベルが特定の状態または事象に特徴的な実体または部分を指す。いくつかの実施形態では、特定のマーカーの存在またはレベルは、疾患、障害、または病状の存在または病期に特徴的なものであり得る。一例を挙げるにすぎないが、いくつかの実施形態では、当該用語は、特定の腫瘍、腫瘍サブクラス、腫瘍の病期などに特徴的な遺伝子発現産物を指す。代替として、またはさらに、いくつかの実施形態では、特定のマーカーの存在またはレベルは、特定のシグナル伝達経路の活性（または活性レベル）と相関し、こうした活性（または活性レベル）は、例えば、特定のクラスの腫瘍に特徴的なものであり得る。マーカーの存在有無の統計学的有意性は、特定のマーカーに応じて異なり得る。いくつかの実施形態では、マーカーの検出は、腫瘍が特定のサブクラスのものである確率が高いことを反映するという点において、高度に特異的である。そのような特異性は、感度を犠牲にし得る（すなわち、その腫瘍がマーカーを発現すると想定される腫瘍であるとしても負の結果が生じ得る）。逆に、感度が高いマーカーは、感度がより低いマーカーと比較して特異性が低くあり得る。本発明によれば、有用なマーカーによって特定のサブクラスの腫瘍が 100 % の精度で区別される必要はない。

#### 【0043】

非天然アミノ酸：「非天然アミノ酸」という語句は、アミノ酸の化学構造（すなわち：

#### 【化 1】



）を有し、それ故に、少なくとも 2 つのペプチド結合に関与する能力を有するが、天然に見られるものとは異なる R 基を有する実体を指す。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、水素ではない第 2 の R 基も有し得、及び／またはアミノ部分もしくはカルボン酸

部分に対する他の置換を1つもしくは複数有し得る。

【0044】

核酸：本明細書で使用される核酸は、その広い意味では、オリゴヌクレオチド鎖に組み込まれる任意の化合物及び/または物質、あるいはオリゴヌクレオチド鎖に組み込まれ得る任意の化合物及び/または物質を指す。いくつかの実施形態では、核酸は、ホスホジエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖に組み込まれる化合物及び/または物質、あるいはホスホジエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖に組み込まれ得る化合物及び/または物質である。文脈から明らかであろうが、いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基（例えば、ヌクレオチド及び/またはヌクレオシド）を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基を含むオリゴヌクレオチド鎖を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」は、RNAであるか、またはRNAを含む。いくつかの実施形態では、「核酸」は、DNAであるか、またはDNAを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、1つもしくは複数の天然の核酸残基であるか、これを含むか、またはこれらなる。いくつかの実施形態では、核酸は、1つもしくは複数の核酸アナログであるか、またはこれを含む。いくつかの実施形態では、核酸アナログは、ホスホジエステル骨格を利用しないという点において、核酸とは異なる。例えば、いくつかの実施形態では、核酸は、1つもしくは複数の「ペプチド核酸」であるか、これを含むか、またはこれらなり、「ペプチド核酸」は、当該技術分野において知られており、骨格中にホスホジエステル結合の代わりにペプチド結合を有するものであり、こうした「ペプチド核酸」は、本明細書で提供される。代替として、またはさらに、いくつかの実施形態では、核酸は、ホスホジエステル結合ではなく、ホスホロチオエート結合及び/または5'-N-ホスホロアミダイト結合を1つまたは複数有する。いくつかの実施形態では、核酸は、1つもしくは複数の天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、及びデオキシシチジン）であるか、これを含むか、またはこれらなる。いくつかの実施形態では、核酸は、1つもしくは複数のヌクレオシドアナログ（例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロ-ピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、0(6)-メチルグアニン、2-チオシチジン、メチル化塩基、介在塩基（intercalated base）、及びそれらの組み合わせ）であるか、これを含むか、またはこれらなる。いくつかの実施形態では、核酸は、天然の核酸に見られる糖と比較して修飾された糖（例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、及びヘキソース）を1つまたは複数含む。いくつかの実施形態では、核酸は、機能性遺伝子産物（RNAまたはタンパク質など）をコードするヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、核酸は、1つまたは複数のイントロンを含む。いくつかの実施形態では、天然源からの単離、相補的テンプレートに基づく重合による酵素合成（インビボまたはインビトロ）、組換え細胞または組換え系における再産生、及び化学合成、のうちの1つまたは複数によって核酸が調製される。いくつかの実施形態では、核酸は、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも30個、少なくとも35個、少なくとも40個、少なくとも45個、少なくとも50個、少なくとも55個、少なくとも60個、少なくとも65個、少なくとも70個、少なくとも75個、少なくとも80個、少なくとも85個、少なくとも90個、少なくとも95個、少なくとも100個、少なくとも110個、少なくとも120個、少なくとも130個、少なくとも140個、少なくとも150個、少なくとも160個、少なくとも170個、少なくとも180個、少なくとも190個、少なくとも20個、少なくとも225個、少なくとも250個、少なくとも275

10

20

30

40

50

個、少なくとも300個、少なくとも325個、少なくとも350個、少なくとも375個、少なくとも400個、少なくとも425個、少なくとも450個、少なくとも475個、少なくとも500個、少なくとも600個、少なくとも700個、少なくとも800個、少なくとも900個、少なくとも1000個、少なくとも1500個、少なくとも2000個、少なくとも2500個、少なくとも3000個、少なくとも3500個、少なくとも4000個、少なくとも4500個、少なくとも5000、またはこれを超える数の残基の長さを有する。いくつかの実施形態では、核酸は、部分的に一本鎖であるか、または完全に一本鎖である。いくつかの実施形態では、核酸は、部分的に二本鎖であるか、または完全に二本鎖である。いくつかの実施形態では、核酸は、ポリペプチドをコードする少なくとも1つの要素を含むヌクレオチド配列を有するか、またはポリペプチドをコードする配列の相補配列である少なくとも1つの要素を含むヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、核酸は、酵素活性を有する。

10

#### 【0045】

医薬組成物：本明細書で使用される「医薬組成物」という用語は、1つまたは複数の医薬的に許容可能な担体と一緒に活性薬剤が製剤化される組成物を指す。いくつかの実施形態では、活性薬剤は、関連集団に投与されると所定の治療効果を達成する統計的に有意な確率を示す治療レジメンにおける投与に適した単位投薬量で存在する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、特定の形態（例えば、固体形態もしくは液体形態）での投与向けに特別に製剤化され得、及び/または例えば、以下の投与向けに特別に適合化され得る：経口投与（例えば、ドレンチ（水性または非水性の溶液または懸濁物）、錠剤、カプセル、ポーラス、粉末、顆粒、ペーストなどとしての経口投与であり、これらのものは、例えば、口腔吸収、舌下吸収、または全身性吸収向けに特別に製剤化され得る）、非経口投与（例えば、皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射、または硬膜外注射による非経口投与であり、こうした注射は、例えば、滅菌溶液もしくは滅菌懸濁液、または持続放出製剤などとして行われる）、局所適用（例えば、クリーム、軟膏、パッチ、または噴霧としての局所適用であり、こうしたものは、例えば、皮膚、肺、または口腔に適用される）、腔内投与または直腸内投与（例えば、ペッサリー、坐剤、クリーム、または泡沫としての投与）、点眼、経鼻投与、あるいは経肺投与など。

20

#### 【0046】

医薬的に許容可能：本明細書に開示の組成物の製剤化に使用される担体、希釈剤、または医薬品添加物に適用される、本明細書で使用される「医薬的に許容可能」という用語は、担体、希釈剤、または医薬品添加物が組成物の他の成分と適合し、そのレシピエントに有害であってはならないことを意味する。

30

#### 【0047】

医薬的に許容可能な担体：本明細書で使用される「医薬的に許容可能な担体」という用語は、ある臓器または体のある部分から別の臓器または体の別の部分への対象化合物の運搬または輸送に関与する医薬的に許容可能な材料、組成物、または媒体（液体または固体の賦形剤、希釈剤、医薬品添加物、または材料を封入する溶剤など）を意味する。担体はそれぞれ、製剤の他の成分と適合し、患者に有害ではないという意味において、「許容可能」でなくてはならない。医薬的に許容可能な担体として役立ち得る材料のいくつかの例としては、糖（ラクトース、グルコース、及びスクロースなど）、デンプン（コーンスターチ及びジャガイモデンプンなど）、セルロース及びその誘導体（カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、及び酢酸セルロースなど）、粉末化トラガカント、麦芽、ゼラチン、タルク、医薬品添加物（ココアバター及び坐剤ワックスなど）、油（ピーナッツ油、綿実油、ペニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、及び大豆油など）、グリコール（プロピレングリコールなど）、ポリオール（グリセリン、ソルビトール、マンニトール、及びポリエチレングリコールなど）、エステル（オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルなど）、寒天、緩衝薬剤（水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなど）、アルギン酸、発熱物質非含有水、等張生理食塩水、リンゲル液、エチルアルコール、pH緩衝液、ポリエステル、ポリカーボネート、及び/またはポリ酸無水物、ならびに

40

50

医薬製剤において用いられる他の非毒性適合物質が挙げられる。

【 0 0 4 8 】

ポリペプチド：本明細書で使用されるポリペプチドは、アミノ酸の任意のポリマー鎖を指す。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、天然に生じるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、天然には生じないアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、人工的に設計及び／または生成されるという点において、操作されたアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、もしくは両方を含むか、またはこれからなり得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、天然アミノ酸のみ、もしくは非天然アミノ酸のみ、を含むか、またはこれからなり得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、D - アミノ酸、L - アミノ酸、または両方を含み得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、D - アミノ酸のみを含み得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、L - アミノ酸のみを含み得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、当該ポリペプチドのN末端、当該ポリペプチドのC末端、もしくはそれらの任意の組み合わせに1つまたは複数のペンダント基または他の修飾（例えば、1つもしくは複数のアミノ酸側鎖を修飾するもの、または1つもしくは複数のアミノ酸側鎖と結び付くもの）を含み得る。いくつかの実施形態では、そのようなペンダント基または修飾は、アセチル化、アミド化、脂質化、メチル化、p e g 化など（それらの組み合わせを含む）からなる群から選択され得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、環式のものであり得、及び／または環式部分を含み得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、環式のものではなく、及び／またはいずれの環式部分も含まない。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、直鎖である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ステーブルポリペプチドであり得るか、またはステーブルポリペプチドを含み得る。いくつかの実施形態では、「ポリペプチド」という用語は、参照ポリペプチド、参照活性、または参照構造の名前に付加され得る。そのような場合、当該用語は、関連する活性または構造を共有し、それ故に、同じポリペプチドクラスまたは同じポリペプチドファミリーのメンバーと見なされ得るポリペプチドを指すために本明細書で使用される。そのようなクラスのそれぞれについて、アミノ酸配列及び／または機能が知られるクラスに属するポリペプチドの例を、本明細書は提供し、及び／または当業者なら認識するであろう。いくつかの実施形態では、そのようなポリペプチドの例は、ポリペプチドクラスまたはポリペプチドファミリーに対する参照ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドクラスまたはポリペプチドファミリーのメンバーは、当該クラスの参照ポリペプチド（いくつかの実施形態では、当該クラスに属するすべてのポリペプチド）と、顕著な配列相同性もしくは配列同一性を示し、共通の配列モチーフ（例えば、特徴的な配列要素）を共有し、及び／または共通の活性（いくつかの実施形態では、同等レベルのもの、もしくは指定範囲内のもの）を共有する。例えば、いくつかの実施形態では、メンバーポリペプチドは、参照ポリペプチドとの全体的な配列相同性もしくは配列同一性の程度が少なくとも約30～40%であり、多くの場合、約50%超、約60%超、約70%超、約80%超、約90%超、約91%超、約92%超、約93%超、約94%超、約95%超、約96%超、約97%超、約98%超、約99%超、もしくはこれを超える%であり、及び／またはメンバーポリペプチドは、配列同一性が非常に高く、多くの場合、90%超、もしくは95%超、96%超、97%超、98%超、もしくは99%超でさえある領域（例えば、いくつかの実施形態では特徴的な配列要素であり得る保存領域、もしくは特徴的な配列要素を含み得る保存領域）を少なくとも1つ含む。そのような保存領域は、通常、少なくとも3～4つのアミノ酸を含み、場合によっては、最大で20個以上のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、保存領域は、アミノ酸が少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個、11個、12個、13個、14個、15個、またはそれ以上連続する区間を少なくとも1つ含む。いくつかの実施形態では、関連ポリペプチドは、親ポリペプチドの断片を含むか、または当該断片からなり得る。

【 0 0 4 9 】

10

20

30

40

50



予防するまたは予防：本明細書で使用される予防するまたは予防は、疾患、障害、及び／または病状の発症と関連して使用されるとき、疾患、障害、及び／または病状の発症リスクの低減、及び／または疾患、障害、または病状の特徴または症状の１つまたは複数の発症の遅延、を指す。予防は、疾患、障害、または病状の発症が所定の期間遅延しているとき、完全であると考えられ得る。

【 0 0 5 0 】

タンパク質：本明細書で使用される「タンパク質」という用語は、ポリペプチド（すなわち、ペプチド結合によって互いに連結された少なくとも２つのアミノ酸の鎖）を指す。タンパク質は、アミノ酸以外の部分を含み得（例えば、糖タンパク質、プロテオグリカンなどであり得る）、及び／またはその他の形態のプロセッシングもしくは修飾を受け得る。

10

「タンパク質」は、細胞によって産生されるような完全なポリペプチド鎖（シグナル配列を有することも有さないこともある）であり得るか、またはその特徴的な部分であり得ることを当業者なら理解するであろう。タンパク質が複数のポリペプチド鎖（例えば、１つもしくは複数のジスルフィド結合によって連結されたもの、または他の手段によって結び付いたもの）を含むこともあり得ることを当業者なら理解するであろう。ポリペプチドは、L - アミノ酸、D - アミノ酸、または両方を含み得ると共に、当該技術分野において知られるさまざまなアミノ酸修飾またはアナログのいずれも含み得る。有用な修飾には、例えば、末端のアセチル化、アミド化、メチル化などが含まれる。いくつかの実施形態では、タンパク質は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、合成アミノ酸、及びそれらの組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、タンパク質は、抗体、抗体断片、その生物学的に活性な部分、及び／またはその特徴的な部分である。

20

【 0 0 5 1 】

参照：本明細書で使用される参照は、比較の実施対象である標準または対照を説明する。例えば、いくつかの実施形態では、目的の薬剤、動物、個体、集団、試料、配列、または値は、参照または対照の薬剤、動物、個体、集団、試料、配列、または値と比較される。いくつかの実施形態では、参照または対照は、目的の試験または決定と実質的に同時に試験及び／または決定される。いくつかの実施形態では、参照または対照は、歴史的な参照または対照であり、こうした歴史的な参照または対照は、任意選択で実際の媒体において具体化される。典型的には、当業者なら理解するであろうが、参照または対照は、評価されるものと同等の条件または状況の下で決定または特徴付けられる。特定の考え得る参照もしくは対照に対する信頼性及び／または当該参照もしくは対照との比較が正しいとの判断に至るのは、十分な類似性が存在するときであることを当業者なら理解するであろう。

30

【 0 0 5 2 】

不応性：本明細書で使用される「不応性」という用語は、提供される組成物の投与後に、医療関係従事者によって通常観測されるようには予測臨床効果を伴って応答しない任意の対象または病状を指す。

【 0 0 5 3 】

リスク：文脈から理解されるであろうが、疾患、障害、及び／または病状の「リスク」は、特定の個体が疾患、障害、及び／または病状を発症することになる可能性を指す。いくつかの実施形態では、リスクは、割合として表現される。いくつかの実施形態では、リスクは、０％以上、１％以上、２％以上、３％以上、４％以上、５％以上、６％以上、７％以上、８％以上、９％以上、１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、最大１００％である可能性の割合である。いくつかの実施形態では、リスクは、参照試料または参照試料群と結び付くリスクに対するリスクとして表現される。いくつかの実施形態では、参照試料または参照試料群は、既知の疾患リスク、障害リスク、病状リスク、及び／または事象リスクを有する。いくつかの実施形態では、参照試料または参照試料群は、特定の個体と同等の個体に由来する。いくつかの実施形態では、相対リスクは、参照試料と比較すると０倍、１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、またはそれ以上増加または減少する。

40

50

## 【 0 0 5 4 】

試料：本明細書で使用される「試料」という用語は、典型的には、本明細書に記載のように、目的の供給源から得られるか、またはそれに由来する材料の一定分量を指す。いくつかの実施形態では、目的の供給源は、生物学的または環境的な供給源である。いくつかの実施形態では、目的の供給源は、細胞もしくは生物（微生物、植物、もしくは動物（例えば、ヒト）など）であり得るか、またはこれを含み得る。いくつかの実施形態では、目的の供給源は、生物学的な組織もしくは液体であるか、またはこれを含む。いくつかの実施形態では、生物学的な組織または液体は、羊水、房水、腹水、胆汁、骨髓、血液、母乳、1つもしくは複数のがん細胞、脳脊髄液、耳垢、乳糜、粥状液、射精液、内リンパ液、滲出液、糞便、胃酸、胃液、リンパ液、粘液、心膜液、外リンパ液、腹水、胸水、膿汁、粘膜分泌物、唾液、皮脂、精液、血清、恥垢、痰、滑液、汗、涙液、1つもしくは複数の腫瘍細胞、尿、腔分泌物、硝子体液、嘔吐物、及び/またはそれらの組み合わせもしくは構成成分（複数可）であり得るか、あるいはこれを含み得る。いくつかの実施形態では、生物学的液体は、細胞内液、細胞外液、血管内液（血漿）、間質液、リンパ液、及び/または細胞透過液であり得るか、あるいはこれを含み得る。いくつかの実施形態では、生物学的液体は、植物滲出液であり得るか、または植物滲出液を含み得る。いくつかの実施形態では、生物学的な組織または試料は、例えば、吸引、生検（例えば、細針生検または組織生検）、スワブ（例えば、口腔スワブ、鼻腔スワブ、皮膚スワブ、または腔スワブ）、擦過、手術、すすぎまたは洗浄（例えば、気管支肺胞、腺管、鼻腔、眼、口腔、子宮、腔、または他のものに対するすすぎまたは洗浄）によって採取され得る。いくつかの実施形態では、生物学的試料は、個体から得られる細胞であるか、または当該細胞を含む。いくつかの実施形態では、試料は、任意の適切な手段によって目的の供給源から直接的に得られる「一次試料」である。いくつかの実施形態では、文脈から明らかであろうが、「試料」という用語は、一次試料の処理（例えば、1つもしくは複数の一次試料構成成分の除去、及び/または一次試料への1つもしくは複数の薬剤の添加）によって得られる調製物を指す。例えば、半透膜を使用するフィルタリングが行われる。そのような「処理試料」は、例えば、試料から抽出される核酸またはタンパク質を含むか、あるいは1つまたは複数の手法（核酸の増幅または逆転写、ある特定の成分の単離及び/または精製など）に一次試料を供することによって得られる核酸またはタンパク質を含み得る。

## 【 0 0 5 5 】

固形腫瘍：本明細書で使用される「固形腫瘍」という用語は、嚢胞または液体部分を通常は含まない異常な組織塊を指す。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、良性であり得る。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、悪性であり得る。異なる型の固形腫瘍は、典型的には、それを形成する細胞型にちなんで命名されることを当業者なら理解するであろう。固形腫瘍の例は、癌腫、リンパ腫、及び肉腫である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、副腎、胆管、膀胱、骨、脳、乳房、子宮頸部、結腸、子宮内膜、食道、眼、胆嚢、胃腸管、腎臓、喉頭、肝臓、肺、鼻腔、鼻咽頭、口腔、卵巣、陰茎、下垂体、前立腺、網膜、唾液腺、皮膚、小腸、胃、精巣、胸腺、甲状腺、子宮、腔、及び/または外陰部の腫瘍であり得るか、あるいはこれを含み得る。

## 【 0 0 5 6 】

特異的結合：本明細書で使用される「特異的結合」という用語は、結合が生じることになる環境において考え得る結合パートナーの間の違いを識別する能力を指す。他の潜在的標的が存在するときに、ある特定の標的と相互作用する結合薬剤は、それが相互作用する標的に「特異的に結合する」と言われる。いくつかの実施形態では、特異的結合は、結合薬剤とそのパートナーとの間の結び付きの程度を検出または決定することによって評価される。いくつかの実施形態では、特異的結合は、結合薬剤 - パートナー複合体の解離の程度を検出または決定することによって評価される。いくつかの実施形態では、特異的結合は、結合薬剤のパートナーと別の実体との間の別の相互作用と結合薬剤が競合する能力を検出または決定することによって評価される。いくつかの実施形態では、特異的結合は、そのような検出または決定をある一定の濃度範囲にわたって実施することによって評価さ

れる。

【 0 0 5 7 】

がんの病期：本明細書で使用する「がんの病期」という用語は、がんの進行レベルの定性的評価または定量的評価を指す。いくつかの実施形態では、がんの病期の決定に使用される基準には、限定されないが、体内のどこにがんが位置するか、腫瘍サイズ、がんがリンパ節に広がっているかどうか、1つまたは複数の異なる身体部位にがんが広がっているかなどが含まれ得る。いくつかの実施形態では、いわゆるT N Mシステムを使用してがんの病期分類を行うことができ、T N Mシステムによれば、Tは、主な腫瘍（通常は原発性腫瘍と呼ばれる）のサイズ及び程度を指し、Nは、がんを有する隣接リンパ節の数を指し、Mは、がんが転移しているかどうかを指す。いくつかの実施形態では、がんは、0期（異常細胞が存在するが、隣接組織には広がっていない。こうした異常細胞は、上皮内癌またはC I S（C I Sは、がんではないが、がんになり得る）とも呼ばれる）、I ~ I I I期（がんが存在しており、その数が増加し、腫瘍が肥大し、隣接組織への広がりが拡大している）、またはI V期（がんが体の遠隔部位に広がっている）と称され得る。いくつかの実施形態では、上皮内（異常細胞が存在するが、隣接組織に広がっていない）、限局（がんが、発生位置にとどまっており、広がっている徴候を有さない）、領域（がんが隣接リンパ節、隣接組織、または隣接臓器に広がっている）、遠隔（がんが体の遠隔部位に広がっている）、及び未知（がんの病期の特定に十分な情報が存在しない）からなる群から選択される病期にがんが割り当てられ得る。

10

【 0 0 5 8 】

に易罹患性：疾患、障害、または病状「に易罹患性」の個体は、疾患、障害、または病状を発症するリスクを有する。いくつかの実施形態では、疾患、障害、または病状に易罹患性の個体は、疾患、障害、または病状の症状のいずれも示さない。いくつかの実施形態では、疾患、障害、または病状に易罹患性の個体は、疾患、障害、及び/または病状を有すると診断されていない。いくつかの実施形態では、疾患、障害、または病状に易罹患性の個体は、疾患、障害、または病状の発症と結び付く条件にさらされている個体である。いくつかの実施形態では、疾患、障害、及び/または病状の発症リスクは、集団ベースのリスク（例えば、疾患、障害、または病状に罹患している個体のファミリーメンバー）である。

20

【 0 0 5 9 】

対象：本明細書で使用する「対象」という用語は、生物、典型的には、動物（例えば、ヒト）を指す。いくつかの実施形態では、対象は、関連する疾患、障害、または病状に罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、または病状に易罹患性である。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、または病状の症状または特徴の1つまたは複数を示す。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、または病状の症状または特徴のいずれも示さない。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、もしくは病状に易罹患性であることに特徴的な特徴、または疾患、障害、もしくは病状のリスクを有することに特徴的な特徴、を1つまたは複数有する個体である。いくつかの実施形態では、対象は、患者である。いくつかの実施形態では、対象は、診断及び/または治療が実施され、及び/または実施されたことがある個体である。

30

【 0 0 6 0 】

治療部分：本明細書で使用する「治療部分」という語句は、一般に、生物に投与されると所望の薬理作用を誘発する任意の薬剤を指す。いくつかの実施形態では、薬剤は、適切な集団にわたって統計学的に有意な作用を示すのであれば、治療部分であると考えられる。いくつかの実施形態では、適切な集団は、モデル生物の集団であり得る。いくつかの実施形態では、適切な集団は、ある特定の年齢群、性別、遺伝的背景、既往歴などのさまざまな基準によって定義され得る。いくつかの実施形態では、治療部分は、疾患、障害、及び/または病状の症状または特徴の1つまたは複数の軽減、軽快、緩和、抑制、予防、発症遅延、重症度低減、及び/または発症率低減に使用され得る物質である。いくつかの実施形態では、「治療部分」は、ヒトへの投与向けに市販され得る前に、政府機関によって

40

50

認可されているか、または認可されることが必要な薬剤である。いくつかの実施形態では、「治療部分」は、ヒトへの投与に処方箋が必要な薬剤である。

【0061】

治療的に有効な量：本明細書で使用される「治療的に有効な量」という用語は、所望の投与効果を生じさせる量を指す。いくつかの実施形態では、当該用語は、疾患、障害、及び/または病状に罹患しているか、または易罹患性の集団に対して治療的投薬レジメンに従って投与されたときに、疾患、障害、及び/または病状を治療する上で十分な量を指す。いくつかの実施形態では、治療的に有効な量は、疾患、障害、及び/または病状の症状の1つまたは複数の発症率及び/または重症度を低減し、及び/または当該1つまたは複数の発症を遅延させる量である。「治療的に有効な量」という用語は、特定の個体における治療の成功達成を実際に必要とするものではないことを当業者なら理解するであろう。むしろ、治療的に有効な量は、そのような治療を必要とする患者に投与されると顕著な数の対象において特定の所望の薬理応答を与える量であり得る。いくつかの実施形態では、治療的に有効な量に対する言及は、1つまたは複数の特定の組織（例えば、疾患、障害、もしくは病状の患部組織）または液体（例えば、血液、唾液、血清、汗、涙液、尿など）において測定される量に対する言及であり得る。いくつかの実施形態では、特定の薬剤または治療の治療的に有効な量は、単回用量において製剤化及び/または投与され得ることを当業者なら理解するであろう。いくつかの実施形態では、治療的に有効な薬剤は、（例えば、投薬レジメンの一部として）複数回用量において製剤化及び/または投与され得る。

10

【0062】

治療：本明細書で使用される「治療（treatment）」（及び「治療する（treat）」または「治療（treating）」）という用語は、特定の疾患、障害、及び/または病状の症状、特徴、及び/または原因の1つまたは複数の軽減、軽快、緩和、抑制、発症遅延、重症度低減、及び/または発症率低減を部分的または完全に生じさせる治療の実施、あるいはいずれかのそのような結果を達成することを目的として実施される治療の実施、を指す。いくつかの実施形態では、そのような治療は、関連する疾患、障害、及び/または病状の徴候を示さない対象に対して行われるものであるか、及び/または疾患、障害、及び/または病状の初期徴候のみを示す対象に対して行われるものであり得る。代替として、またはさらに、そのような治療は、関連する疾患、障害、及び/または病状の確立された徴候の1つまたは複数を示す対象に対して行われるものであり得る。いくつかの実施形態では、治療は、関連する疾患、障害、及び/または病状に罹患していると診断された対象に対して行われるものであり得る。いくつかの実施形態では、治療は、関連する疾患、障害、及び/または病状の発症リスクの上昇と統計学的に相関する1つまたは複数の易罹患性因子を有することが判明している対象に対して行われるものであり得る。さまざまな例では、治療は、がんに対して行われるものである。腫瘍：本明細書で使用される「腫瘍」という用語は、細胞または組織の異常な増殖を指す。いくつかの実施形態では、腫瘍は、前がん性（例えば、良性）、悪性、前転移性、転移性、及び/または非転移性の細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、腫瘍は、がんと結び付くか、またはがんの徴候である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、散在腫瘍であるか、または液性腫瘍であり得る。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍であり得る。

20

30

40

【0063】

単位用量：本明細書で使用される「単位用量」という表現は、医薬組成物の単回用量及び/または物理的に別の単位として投与される量を指す。多くの実施形態では、単位用量は、所定量の活性薬剤を含む。いくつかの実施形態では、単位用量は、全単回用量の薬剤を含む。いくつかの実施形態では、総単回用量を達成するために複数の単位用量が投与される。いくつかの実施形態では、意図される効果を達成するためには、複数の単位用量の投与が必要であるか、または必要であると想定される。単位用量は、例えば、1つまたは複数の治療部分を所定量で含むある一定体積の液体（例えば、許容可能な担体）、1つまたは複数の治療部分を所定量で含む固体形態、1つまたは複数の治療部分を所定量で含む持続放出製剤または薬物送達デバイスなどであり得る。単位用量が存在し得る製剤は、治

50

療部分（複数可）に加えてさまざまな成分のいずれかを含むことが理解されよう。例えば、許容可能な担体（例えば、医薬的に許容可能な担体）、希釈剤、安定剤、緩衝剤、保存剤などが、以下に記載のように含まれ得る。多くの実施形態では、特定の治療部分の適切な日々の総用量は、一部の単位用量を含むか、または複数の単位用量を含み得、例えば、健全な医学的判断の範囲内で主治医によって決定され得ることを当業者なら理解するであろう。いくつかの実施形態では、任意の特定の対象または生物に対する特定の有効用量レベルは、さまざまな因子に依存し得、こうした因子には、治療される障害及び障害の重症度、用いられる特定の活性化合物の活性、用いられる特定の組成物、対象の年齢、体重、全身健康状態、性別、及び食事、用いられる特定の活性化合物の投与時間及び排出速度、治療期間、用いられる特定の化合物（複数可）と併用または同時使用される薬物及び／または追加の治療、ならびに医学分野において広く知られる同様の因子が含まれる。

10

#### 【0064】

変異体：本明細書で使用される「変異体」という用語は、参照実体と比較すると、参照実体との構造同一性が著しいが、1つまたは複数の化学的部分の存在またはレベルにおいて参照実体と構造的に異なる実体を指す。多くの実施形態では、変異体は、その参照実体と機能的にも異なる。一般に、特定の实体が参照実体の「変異体」とであると適切に考えられるかどうかは、参照実体とのその構造同一性に基づく。当業者なら理解するであろうが、生物学的または化学的な参照実体はいずれも、ある特定の特徴的な構造要素を有する。変異体は、定義によって、そのような特徴的な構造要素を1つまたは複数共有する異なる化学的実体である。例を挙げると、特徴的なコア構造要素（例えば、大環状コア）及び／または1つもしくは複数の特徴的なペンダント部分を小分子が有し得、その結果、当該小分子の変異体が、コア構造要素及び特徴的なペンダント部分を共有するが、他のペンダント部分が異なり、及び／またはコア内に存在する結合の型（単結合と二重結合との対比、EとZとの対比など）が異なるものである例、直鎖または三次元区間において互いの相対的位置が指定されており、及び／または特定の生物学的機能に寄与する複数のアミノ酸から構成される特徴的な配列要素をポリペプチドが有し得る例、直鎖または三次元区間において互いの相対的位置が指定されている複数のヌクレオチド残基から構成される特徴的な配列要素を核酸が有し得る例、が挙げられるが、これらは少数例にすぎない。例えば、変異体ポリペプチドは、アミノ酸配列に差異が1つもしくは複数存在し（「アミノ酸変異体」）、及び／またはポリペプチド骨格と共有結合で結び付いた化学的部分（例えば、糖質、脂質、他のペンダント部分など）に差異が1つもしくは複数存在する結果として、参照ポリペプチドとは異なり得る。いくつかの実施形態では、変異体ポリペプチドは、参照ポリペプチドとの全配列同一性が少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、または少なくとも99%である。代替として、またはさらに、いくつかの実施形態では、変異体ポリペプチドは、少なくとも1つの特徴的な配列要素を参照ポリペプチドと共有しない。いくつかの実施形態では、参照ポリペプチドは、1つまたは複数の生物学的活性を有する。いくつかの実施形態では、変異体ポリペプチドは、参照ポリペプチドの生物学的活性の1つまたは複数と共有する。いくつかの実施形態では、変異体ポリペプチドは、参照ポリペプチドの生物学的活性の1つまたは複数と共有しない。いくつかの実施形態では、変異体ポリペプチドは、参照ポリペプチドと比較して1つまたは複数の生物学的活性のレベルが低減されている。多くの実施形態では、目的ポリペプチドは、少数の配列改変を特定の位置に有することを除けば当該目的ポリペプチドが親のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有するのであれば、親ポリペプチドまたは参照ポリペプチドの「変異体」とであると考えられる。いくつかの実施形態では、変異体は、親と比較して置換された残基を10個、9つ、8つ、7つ、6つ、5つ、4つ、3つ、2つ、または1つ有する。いくつかの実施形態では、変異体は、親と比較して、追加もしくは欠失の含有上限数が5、4、3、2、もしくは1であるか、または追加もしくは欠失を有さない。さまざまな実施形態において、追加または欠失の残基数は、約24以下、約19以下、

20

30

40

50

約 1.8 以下、約 1.7 以下、約 1.6 以下、約 1.5 以下、約 1.4 以下、約 1.3 以下、約 1.2 以下、約 0.9 以下、約 0.8 以下、約 0.7 以下、約 0.6 以下、約 0.5 以下、一般的には、約 0.4 以下、約 0.3 以下、約 0.2 以下、または約 0.1 以下である。いくつかの実施形態では、親ポリペプチドまたは参照ポリペプチドは、天然に見られるものである。

【図面の簡単な説明】

【0065】

【図 1】MIA PaCa-2 ヒト膵癌細胞を異種移植したマウスの腫瘍の平均腫瘍体積を示すチャートであり、1.25 mg/kg 用量の CTX - クリプトフィシン、2.5 mg/kg 用量の CTX - クリプトフィシン、または媒体対照でのマウスの処理を静脈内投与によって 4 日ごとに実施し、この処理を 3 回行った (Q4D × 3 スケジュール) 結果である。

10

【図 2】BxPC3 - Red - FLuc ヒト膵癌細胞を異種移植したマウスの腫瘍の平均腫瘍体積を示すチャートであり、2.3 mg/kg 用量の CTX - クリプトフィシン、1.2 mg/kg 用量の CTX - クリプトフィシン、または媒体対照でのマウスの処理を静脈内投与によって 4 日ごとに実施し、この処理を 3 回行った (Q4D × 3 スケジュール) 結果である。

【図 3】PC-3 ヒト前立腺癌細胞を異種移植したマウスの腫瘍の平均腫瘍体積を示すチャートであり、0.6 mg/kg 用量の CTX - クリプトフィシン、1.2 mg/kg 用量の CTX - クリプトフィシン、または媒体対照でのマウスの処理を静脈内投与によって 4 日ごとに実施し、この処理を 3 回行った (Q4D × 3 スケジュール) 結果である。

20

【図 4】腫瘍、及びクリプトフィシン代謝物 1 (CTX - クリプトフィシンの活性代謝物) の血漿中濃度を示すチャートのセットであり、MIA PaCa-2、BxPC3 - Red - FLuc、及び PC-3 の異種移植モデルに単回用量の CTX - クリプトフィシンを投与した結果である。

【図 5】腫瘍、及びクリプトフィシン代謝物 1 (CTX - クリプトフィシンの活性代謝物) の腎臓中濃度を示すチャートのセットであり、MIA PaCa-2、BxPC3 - Red - FLuc、及び PC-3 の異種移植モデルに単回用量の CTX - クリプトフィシンを投与した結果である。

【図 6】PC-3、BxPC3 - Red - FLuc、及び MIA PaCa-2 の異種移植片の溶解物におけるヒト NRP1 の mRNA 発現を示すグラフである。

30

【図 7】PC-3、BxPC3 - Red - FLuc、及び MIA PaCa-2 の異種移植片の溶解物における NRP1 のタンパク質発現を示すプロットであり、NRP1 の細胞質側末端に対する抗 NRP1 抗体 (ab8132) によって染色したものである。

【図 8】PC-3、BxPC3 - Red - FLuc、及び MIA PaCa-2 の異種移植片の溶解物における NRP1 のタンパク質発現を示すプロットであり、NRP1 の細胞外ドメインに対する CST 抗体 (カタログ番号 3725) によって染色したものである。

【図 9】N 末端ビオチン化 CTX のトリプシン消化によって生成されたペプチド断片の図である。

【図 10】C 末端アルギニン残基を有する 2 つのペプチドの図であり、これらのペプチドは、直鎖化した N 末端ビオチン化 CTX をトリプシン消化して得られたものである。

40

【図 11 - 1】選択したペプチド、実施例 8 において使用したそれぞれのペプチドの供給源、及び実施例 8 において測定したそれぞれのペプチドの NRP1 との結合を示す表である。

【図 11 - 2】選択したペプチド、実施例 8 において使用したそれぞれのペプチドの供給源、及び実施例 8 において測定したそれぞれのペプチドの NRP1 との結合を示す表である。

【図 11 - 3】選択したペプチド、実施例 8 において使用したそれぞれのペプチドの供給源、及び実施例 8 において測定したそれぞれのペプチドの NRP1 との結合を示す表である。

【図 12】NRP1 への、還元及びカップリングされた CTX (R - CONH<sub>2</sub>) の結合

50

(または結合が生じないこと)を示すグラフであり、実施例9において測定したものである。

【図13】NRP1へのCTX(R-COOH)の結合を示すグラフであり、実施例9において測定したものである。

【図14】CTX(R-COOH)によるNRP1へのビオチン化VEGF165の結合阻害を示すグラフである。

【図15】CTX(R-COOH)によるNRP1へのビオチン化VEGF165の結合阻害における直線的な用量依存的応答を示すグラフである。

【図16】CTX-クリプトフィシンまたはカルボキシル化CTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

10

【図17】CTX-クリプトフィシンまたはカルボキシル化CTX-クリプトフィシンでの処理について相対体重を接種後日数にわたって示すグラフである。

【図18】腫瘍体積を示すグラフのペアであり、SCIDマウスにおけるNRP1野生型またはNRP1ノックアウトのPC-3ヒト前立腺癌異種移植片をCTX-クリプトフィシンまたはカルボキシル化CTX-クリプトフィシンで処理した結果である。

【図19】クリプトフィシンペイロード単体(クリプトフィシン及びジスルフィドリンカーを含む)を示す図である。

【図20】NRP1野生型またはNRP1ノックアウトの腫瘍の処理について腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフのペアであり、この処理では、CTX-クリプトフィシン、カルボキシル化CTX-クリプトフィシン、またはクリプトフィシンペイロードを投与した。

20

【図21】ザリガニへの注射位置を示す図である。

【図22】無能力状態化を継時的に示すグラフである。

【図23】無能力状態化を継時的に示すグラフである。

【図24】NRP1野生型またはNRP1ノックアウトの腫瘍組織におけるカルボキシル化CTX-クリプトフィシン及びクリプトフィシン代謝物1をnmol/血漿mLまたはnmol/組織gで経時的に示すグラフのペアである。

【図25】CTX-クリプトフィシン単独での処理、または抗NRP1IgG抗体もしくは対照IgG抗体で処理した後のCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

30

【図26】CTX-クリプトフィシン単独での処理、または抗NRP1IgG抗体で処理した後のCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

【図27】クリプトフィシンペイロードでの単独処理、またはiRGDペプチドもしくはCTXペプチドとクリプトフィシンペイロードとでの併用処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

【図28】クリプトフィシンペイロードでの単独処理、またはiRGDペプチドもしくはCTXとクリプトフィシンペイロードとでの併用処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

【図29】クリプトフィシンペイロードの単独使用またはCTXペプチドとクリプトフィシンペイロードとの併用について平均腫瘍体積及び相対体重を接種後日数にわたって示すグラフのペアである。

40

【図30】クリプトフィシンペイロードでの単独処理、またはCTXペプチドとクリプトフィシンペイロードとでの併用処理を行ったさまざまな組織におけるカルボキシル化CTX-クリプトフィシンまたはクリプトフィシン代謝物1の増加倍数を示すチャートである。

【図31】CCLEデータベースから選択した細胞株におけるヒトNRP1の発現レベルを示すチャートである。

【図32】腫瘍溶解物におけるヒトNRP1の発現を示すチャートである。

【図33】腫瘍溶解物におけるマウスNRP1の発現を示すチャートである。

【図34】全長NRP1及び可溶性NRP1を示す模式図である。

50

【図35】細胞溶解物または腫瘍溶解物におけるNRP1の検出を示すウエスタンブロットである。

【図36】細胞溶解物または腫瘍溶解物におけるNRP1を、それぞれAbcam抗体またはCST抗体で検出したものを示すウエスタンブロットのペアである。

【図37】細胞溶解物または腫瘍溶解物におけるNRP1を、それぞれAbcam抗体またはCST抗体で検出したものを示すウエスタンブロットのペアである。

【図38】MIA-Paca-2異種移植モデルにおけるさまざまな用量のCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

【図39】BxPC3-Red-FLuc異種移植モデルにおけるCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

10

【図40】PC-3異種移植モデルにおけるCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

【図41】SK-N-MC異種移植モデルにおけるCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

【図42】TC-71異種移植モデルにおけるCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

【図43】MDA-MB-231異種移植モデルにおけるCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

【図44】HT-1080異種移植モデルにおけるCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

20

【図45】U-87MG異種移植モデルにおけるCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

【図46】COLO320DM異種移植モデルにおけるCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

【図47】LOX-IMVI異種移植モデルにおけるCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

【図48】HCT116異種移植モデルにおけるCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

【図49】CFPAC-1異種移植モデルにおけるCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

30

【図50】Hs695T異種移植モデルにおけるCTX-クリプトフィシンでの処理について平均腫瘍体積を接種後日数にわたって示すグラフである。

【図51】Hs695Tの細胞溶解物及び腫瘍溶解物を含む、細胞溶解物及び腫瘍溶解物におけるNRP1発現を示すウエスタンブロットである。

【図52】選択した腫瘍から得られたパラフィン包埋腫瘍切片の、IHCによる一連のNRP1染色画像である。

【図53】腫瘍溶解調製物のトータルイオンクロマトグラム(TIC)及びUV(215nm)クロマトグラムを示すグラフのペアである。

【図54】CTX処理マウスから得られた腫瘍溶解物に特有のCTX関連ペプチドを選択して示す表である。

40

【図55】CTX処理マウスから得られた腫瘍溶解物に特有のCTX関連ペプチドを選択して示す表である。

【図56】CTX処理マウスから得られた腫瘍溶解物に特有のCTX関連ペプチドを選択して示す表である。

【図57】CTX処理マウスから得られた腫瘍溶解物に特有のCTX関連ペプチドを特徴付けるグラフである。

【図58】CTX処理マウスの腫瘍溶解物において同定されたCTXペプチドを選択して示す表である。

【図59】CTX処理マウスの腫瘍溶解物において同定されたCTXペプチドを選択して示す表である。

50



## 【発明を実施するための形態】

## 【0066】

N R P 1 の発現によって特徴付けられるある特定のがんを含めて、ある特定のがんを、クロロトキシシン薬剤を投与することによって検出（例えば、画像化、特徴付け、もしくは診断）し、及び／または治療することができ、その際、いくつかの実施形態では、N R P 1 が低発現するか、または発現しない（すなわち検出されない）ことによって特徴付けられるある特定のがんと比較して高い効力が伴うという発見の本発明を含む。

## 【0067】

がんの検出及び／または治療に特に有用であり、及び／またはN R P 1 に結合するある特定のクロロトキシシン薬剤の発見も本発明を含む。例えば、ある特定の特に有用なクロロトキシシン薬剤が、C末端アルギニン残基（例えば、カルボキシル基を含むC末端アルギニン残基）を含むアミノ酸配列を有するクロロトキシシンポリペプチドであるか、当該クロロトキシシンポリペプチドを含むか、または当該クロロトキシシンポリペプチドから調製されるものであるという発見の本発明を含む。いくつかの実施形態では、特に有用なクロロトキシシン薬剤は、(R/K)XX(R/K)モチーフを含むことも含まないこともあり得る。ある特定の実施形態では、本発明に従って利用されるクロロトキシシン薬剤は、(R/K)XX(R/K)モチーフを含まない。ある特定の実施形態では、本発明に従って利用されるクロロトキシシン薬剤は、ペイロード部分と複合体化した（例えば、共有結合で連結された）クロロトキシシンポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、本発明に従って利用されるクロロトキシシン薬剤は、ペイロード部分（例えば、検出可能部分、治療部分、標的化部分、もしくはそれらの組み合わせ）と複合体化（例えば、共有結合で連結）されるか、またはペイロード部分との併用療法において使用されるC末端アルギニン残基含有クロロトキシシン薬剤、リジン残基数低減型クロロトキシシン薬剤、または両方（すなわち、リジン残基数低減型C末端アルギニン残基含有クロロトキシシン薬剤）である。さらに、いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、クロロトキシシンポリペプチド（例えば、C末端アルギニン残基を含まないクロロトキシシンポリペプチド）は、代謝されることで内部アルギニン残基または潜在アルギニン残基が露出し得、この露出した内部アルギニン残基または潜在アルギニン残基は、カルボキシル化アルギニン残基であり得る。

## 【0068】

いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、本開示は、ある特定のクロロトキシシン薬剤が、対象に投与されると、対象に存在するプロテアーゼによって消化され得ることを提唱する。そのようなプロテアーゼ消化は、投与されたクロロトキシシン薬剤からクロロトキシシンポリペプチドの断片を生じさせる。ある特定のそのようなクロロトキシシンポリペプチド断片は、C末端アルギニン残基を含む。ある特定のそのようなクロロトキシシンポリペプチド断片は、C末端アルギニン残基を有するある特定のクロロトキシシンポリペプチド断片を含めて、ニューロピリン1（N R P 1）の基質である。関連クロロトキシシンポリペプチド断片とN R P 1との相互作用は、N R P 1発現細胞へのクロロトキシシンポリペプチド断片（及び存在するのであれば、任意の結び付いたペイロード部分）の取り込みを増強し得る。断片とN R P 1との相互作用は、ある特定の場、断片のC末端アルギニン残基にカルボキシル基が存在することによって促進される。この理論の下では、クロロトキシシン薬剤によるがんの治療、検出、または標的化は、N R P 1を発現するがんに関して特に効果的である。この理論の下では、ある特定のクロロトキシシン薬剤によるがんの治療、検出、または標的化は、クロロトキシシン薬剤が、C末端アルギニン残基（例えば、C末端アルギニン残基は、カルボキシル基を含む）を含むアミノ酸配列を有するクロロトキシシンポリペプチドであるか、当該クロロトキシシンポリペプチドを含むか、または当該クロロトキシシンポリペプチドから調製される場合、特に効果的である。

## 【0069】

## ニューロピリン1

ニューロピリン1（N R P 1）は、クラスII I / IVセマフォリン、ある特定の血管内皮増殖因子アイソフォーム、及び形質転換増殖因子ベータを含む、いくつかの細胞外リ

10

20

30

40

50

ガンドに対する共受容体として働く膜貫通糖タンパク質である。N R P 1 がいくつかの他の細胞外リガンド（クラス3セマフォリン、T G F - 、H G F、F G F、及びP D G F など）に結合またはその活性を調節する能力は、さまざまな生理学的プロセス及び病理学的プロセスにN R P 1 が関与することを示唆している。N R P 1 は、軸索ガイダンス、血管新生、及び免疫応答に関与している。N R P 1 は、さまざまながん（前立腺癌、肺癌、膵癌、または結腸癌、メラノーマ、星状細胞腫、膠芽腫、及び神経芽腫）にも発現しており、このことは、腫瘍の進行における決定的な役割を示唆している。さらに、他のV E G F 受容体とは独立してN R P 1 が重要な機能を示し得ることが証拠によって示唆されている。特に、V E G F R - 1 / 2 が存在しない場合、N R P 1 は、V E G F - A 及びメタロプロテイナーゼの分泌を刺激し、特定のシグナル伝達経路を調節することによって、インテグリンを選択的に活性化することでメラノーマの浸潤性を促進する。治療標的として、N R P 1 は、例えば、N R P 1 発現腫瘍血管系、N R P 1 + 制御性T細胞（T r e g ）、及びN R P 1 + p D C を標的とすることを可能にする。抗N R P 1 モノクローナル抗体及び細胞透過性ペプチドの開発と相まって、N R P 1 は、がん治療のための有望な新標的となっている。

#### 【 0 0 7 0 】

N R P 1 は、腫瘍関連血管及びさまざまながんにおいて発現しており、このことは、がんの進行におけるある一定の役割を示唆している。N R P 1 レベルの上昇は、がんの攻撃性、病期の進行、及び予後不良と相関する。N R P 1 の上方制御は、がんの浸潤挙動及び転移能（例えば、メラノーマ及び乳癌におけるもの）と結びつくものであると思われる。N R P 1 は、がん細胞の増殖、生存、及び遊走に対するV E G F - A 及びセマフォリンの作用を媒介することに関与している。線維芽細胞、内皮細胞、及び免疫細胞を含む、さまざまな間質細胞もN R P 1 を発現しており、これらの細胞は、V E G F - A とは異なる増殖因子によって活性化され、がんの進行に寄与し得る。N R P 1 のがん促進作用は、ある特定の場合、V E G F - A に応答するV E G F 受容体（V E G F R ） - 2 の活性化を増強することに起因する。しかしながら、ある特定のがんは、N R P 1 を発現するが、V E G F R - 1 またはV E G F R - 2 のいずれも発現しない。原発性病巣及び転移性病巣に由来するヒトメラノーマ細胞株の大多数は、V E G F - A を分泌する上、その受容体（N R P 1 を含む）も発現する。N R P 1 は、V E G F - A / V E G F R - 2 オートクラインループの活性化を増強し、これによって、細胞外マトリックスへのメラノーマ細胞の浸潤が、例えばV E G F - A 及びメタロプロテイナーゼの分泌の上方制御を介して、促進される。N R P 1 が過剰発現すると、ヒトメラノーマ細胞のインビボの増殖速度が上昇する。N R P 1 は、メラノーマ細胞に対するP L G F の作用にも関与している可能性がある。メラノーマ細胞においてN R P 1 が発現すると、メラノーマ細胞の攻撃性及び細管様構造形成能力が増すことが最近示されている。N R P 1 は、がんの浸潤及び疾患の進行における決定的なステップである上皮間葉転換のプロモーターであることが示されている。同様の表現型転換プロセスは、メラノーマにおいても報告されており、転移性状態の促進に関与することから、N R P 1 が複数の発がん機能に関与するというさらなる証拠となっている。いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、こうした証拠は、N R P 1 が適切な標的（例えば、抗メラノーマ治療のためのもの）になり得るという仮説を支持するものである。

#### 【 0 0 7 1 】

ヒトN R P 1 遺伝子は、いくつかの異なる型のシグナル伝達経路（とりわけ、細胞遊走を制御するもの）への関与を可能にする特有のタンパク質ドメインを有するヒトニューロピリンをコードする。ニューロピリンは、補体結合ドメイン、凝固第V / V I I I 因子、及びメブリンドメインから構成される大きなN末端細胞外ドメインを含む。ニューロピリンは、短い膜貫通ドメイン及び小さな細胞質ドメインも含む。ニューロピリンは、多くのリガンドに加えてさまざまな型の共受容体とも結合し、細胞の生存、遊走、及び誘引に影響を与える。異なるタンパク質アイソフォームをコードする、選択的スプライシングを受けた転写変異体がいくつか報告されている。

10

20

30

40

50

## 【0072】

正準的なヒトNRP1タンパク質の1つは、UniProtKB/Swiss-Prot受入番号O14786.1に見られる923個のアミノ酸のタンパク質である。本明細書で使用されるNRP1は、NRP1タンパク質配列(UniProtKB/Swiss-Prot受入番号O14786.1)との配列同一性が少なくとも70%(例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%)であるタンパク質を含む。本明細書で使用されるNRP1は、O14786.2(UniParc-UPI00001F9122; 642-644: EFP/GIK, 645-923: 欠失; 可溶性)及びO14786.3(UniParc-UPI000013EECB; 587-621: 欠失; 642-644: EFP/GIK; 645-923: 欠失)などの既知の変異体を含む。本明細書で使用されるNRP1は、UniProtKB/Swiss-Protの受入番号O14786.2または受入番号O14786.3との配列同一性が少なくとも70%(例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%)であるタンパク質を含む。本発明が包含するさまざまなNRP1タンパク質は、下記の既知の変異及び/または他の変異の1つまたは複数のいずれかを含み得る: K26E、D219G、D749H、D855E、V179A、F561L、V733I、587-621: 欠失、642-644: EFP/GIK、645-923: 欠失。

10

20

## 【0073】

NRP1及びそのホモログであるNRP2は両方共、全長膜貫通受容体及びより短い可溶性形態へと選択的スプライシングによって変換される遺伝子によってコードされる糖タンパク質である。本明細書で使用されるNRP1は、NRP1膜貫通受容体を指す。NRP1膜貫通形態は、細胞外ドメイン、1回貫通型の膜貫通ドメイン、及びアミノ酸細胞質ドメインを含む。細胞外NRP1部分は、a1及びa2と呼ばれる2つのドメインからなり、これらのドメインは、補体成分に存在するCUB(補体, Uegf, BMP)ドメインに類似している。これらのドメインの下流には、b1ドメイン及びb2ドメインが存在し、これらのドメインは、凝固第V/VIII因子ドメインと類似している。cドメインは、MAM(メプリン/抗原5/受容体チロシンホスファターゼμドメイン)との相同性を有し、このcドメインによってその他の細胞外ドメインが膜貫通領域から分離されている。短い細胞内(細胞質)ドメインは、触媒的に不活性であるが、PDZドメインを含む細胞内タンパク質と相互作用するC末端SEA(セリン-グルタミン-アラニン)モチーフを含む。

30

## 【0074】

## クロロトキシシン薬剤

本発明に従って使用するためのクロロトキシシン薬剤には、クロロトキシシンポリペプチド(全長であるか、またはクロロトキシシンポリペプチド断片であるかは問われない)を含むペプチド及び複合体が含まれる。ある特定の実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、ペイロードと結び付いたクロロトキシシンポリペプチドを含む。

40

## 【0075】

## クロロトキシシンポリペプチド

クロロトキシシンは、3つのリジン残基を有する36個のアミノ酸のペプチド(配列番号1)であり、これらのリジン残基は、配列番号1の位置15、位置23、及び位置27に位置する。配列番号1の配列とは異なる配列を有するクロロトキシシンポリペプチドは、場合によっては、「変異体」と称され得る。

## 【0076】

いくつかの実施形態では、クロロトキシシンポリペプチドは、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、

50

47個、もしくは48個の連続アミノ酸であり及び/または当該連続アミノ酸を含み、当該連続アミノ酸は、クロロトキシシン（配列番号1）またはその関連断片の配列との全配列同一性が少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%である。ある特定の場合、クロロトキシシンポリペプチドは、24~40個（両端値を含む）のアミノ酸残基の長さを有するポリペプチドであって、配列番号1またはその関連断片との全配列同一性との全配列同一性が少なくとも45%であるポリペプチドである。

10

**【0077】**

ある特定の場合、配列番号1との差異の少なくとも1つは、配列番号1と比較したときのLys15、Lys23、またはLys27の置換または欠失を含むことになる。ある特定の場合、配列番号1との差異の少なくとも2つは、配列番号1と比較したときのLys15の置換または欠失、Lys23の置換または欠失、及びLys27の置換または欠失からなる群から選択されることになる。

**【0078】**

ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシシンポリペプチドは、C末端アルギニン残基を含む。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシシンポリペプチドのC末端残基は、アミド化されていない。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシシンポリペプチドのC末端残基は、カルボキシル化されている。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシシンポリペプチドのC末端残基は、アミド化されていないアルギニンである。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシシンポリペプチドのC末端残基は、カルボキシル化されたアルギニン残基である。

20

**【0079】**

いくつかの実施形態では、クロロトキシシンポリペプチドは、配列番号1と比較してリジン残基の含有数が低減される（例えば、配列番号1に見られるようにリジン残基を3つ含むのではなく、リジン残基の含有数が0、1、または2とされる）という点において、リジン残基数低減型クロロトキシシンポリペプチドである。

30

**【0080】**

いくつかの実施形態では、リジン残基数低減型クロロトキシシンポリペプチドは、リジン残基を1つのみ含む（「モノリジンクロロトキシシンポリペプチド」）。いくつかの実施形態では、そのようなクロロトキシシンポリペプチドは、クロロトキシシンにリジン残基が通常存在する位置（例えば、配列番号1の位置15、位置23、または位置27に対応する位置）にリジン残基を1つ有する（例えば、非限定例として配列番号14~23を参照のこと）。いくつかの実施形態では、モノリジンクロロトキシシンポリペプチドは、クロロトキシシンにリジン残基が通常存在する位置（すなわち、配列番号1の位置15、位置23、及び位置27に対応する位置に対応する位置）にはリジン残基を1つも有さないが、配列番号1の位置15、位置23、及び位置27のいずれにも対応しない位置にリジン残基を1つ有する。リジンを全く有さないクロロトキシシンポリペプチドと同様に、モノリジンクロロトキシシンポリペプチドは、配列番号1と比較すると、配列番号1の位置15、位置23、及び位置27に対応する1つもしくは複数の位置のアミノ酸が存在し得ず、及び/または配列番号1の位置15、位置23、及び位置27に対応する1つもしくは複数の位置にアミノ酸置換もしくはアミノ酸誘導体置換を有し得る。

40

**【0081】**

ある特定の実施形態では、リジン残基数低減型クロロトキシシンポリペプチドは、複合体化のための部位として利用可能なリジンの含有上限数が1である。いくつかのそのような実施形態では、1つのリジンが利用可能であり、この利用可能なリジンは、クロロトキシシンにリジンが存在する位置（すなわち、配列番号1の位置15、位置23、または位置2

50

7に対応する位置)に対応するクロロトキシンポリペプチド内の位置に存在する。いくつかの実施形態では、利用可能な単一のリジンは、配列番号1の位置15に対応する位置に存在する。いくつかの実施形態では、利用可能な単一のリジンは、配列番号1の位置23に対応する位置に存在する。いくつかの実施形態では、利用可能な単一のリジンは、配列番号1の位置27に対応する位置に存在する。

【0082】

ある特定の実施形態では、リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドは、配列番号1の位置15、位置23、または位置27に対応するアミノ酸残基を少なくとも1つ含まない。

【0083】

ある特定の実施形態では、リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドは、配列番号1の位置15、位置23、または位置27のいずれかに対応する位置のいずれにも、アミノ酸残基またはリジン残基を含まない。したがって、ある特定の実施形態では、リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドは、リジン残基を全く含まない(例えば、配列番号2、配列番号5、配列番号6、配列番号24、配列番号25、及び配列番号26を参照のこと)。

【0084】

いくつかの実施形態では、本発明において使用されるリジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドに存在する単一のリジンは、クロロトキシンにおいてはリジン残基を含まない部位に対応する位置に存在する(すなわち、配列番号1の位置15、位置23、または位置27のいずれかに対応する位置にも存在しない)。したがって、いくつかの実施形態では、リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシんにリジン残基が通常存在する位置(すなわち、配列番号1の位置15、位置23、及び位置27に対応する位置に対応する位置)にはリジン残基を1つも有さないが、配列番号1の位置15、位置23、及び位置27のいずれにも対応しない位置にリジン残基を1つ有する。

【0085】

リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドがリジン残基を全く含まない実施形態のいくつかでは、リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドの一方の末端または両方の末端(すなわち、N末端及び/またはC末端)は、複合体化のための部位として役立ち得るものであり、こうした複合体化は、例えば、治療部分、標的化部分、または検出可能部分(例えば、画像化可能部分)との複合体化であり、例えば、化学的複合体化によって行われる。ある特定の場合、末端(複数可)が利用可能であるかということは、用いられる特定の複合体化化学に依存し得る。リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドがリジン残基を全く含まない実施形態のいくつかでは、N末端のアルファアミノ基のみが、複合体化のための部位として利用可能である。

【0086】

クロロトキシンポリペプチドのリジン残基含有数が低減される場合はいずれも、配列番号1に存在するリジン残基の1つまたは複数がそれぞれ、配列番号1と比較して置換または欠失され得る。したがって、いくつかの実施形態では、クロロトキシんにリジン残基が通常見られる位置にアミノ酸が存在しない。いくつかの実施形態では、クロロトキシんに通常見られるリジン残基の1つまたは複数、別の(非リジン)アミノ酸残基及び/またはアミノ酸誘導体によって交換される。換言すれば、リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドに含まれるアミノ酸残基の中で、配列番号1の位置15、位置23、または位置27に対応するアミノ酸残基の少なくとも1つがリジンではない。

【0087】

いくつかの実施形態では、クロロトキシンポリペプチドの残基(例えば、1つまたは複数のリジン残基)は、置換され得る。いくつかの実施形態では、クロロトキシンポリペプチドの残基は、天然アミノ酸で置換され得る。いくつかの実施形態では、クロロトキシンポリペプチドの残基は、非天然アミノ酸で置換され得る。いくつかの実施形態では、クロロトキシンポリペプチドの残基の置換は、保存的であり得る。いくつかの実施形態では、

10

20

30

40

50

クロロトキシンポリペプチドの残基の置換は、非保存的である。

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数のリジン残基は、アルギニン及び/またはアラニンによって交換される。

【 0 0 8 9 】

配列番号1と比較して複数の残基（例えば、複数のリジン残基）が置換されるある特定の実施形態では、置換される残基はそれぞれ、同じまたは異なるアミノ酸残基（複数可）またはアミノ酸誘導体（複数可）によって置換され得る。例えば、リジン残基の交換に同じアミノ酸残基が使用されている例については配列番号17～22、リジン残基の交換に異なるアミノ酸残基が使用されている例については配列番号23を参照されたいが、これらの例に限定されない。

10

【 0 0 9 0 】

表1は、クロロトキシンの配列、及びある特定のリジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドの配列を示す。表1は、限定を意図するものではない。表1は、いくつかの実施形態では本発明に従って利用され得るある特定のリジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドを例示するものである。

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1 : クロロトキシンの配列、及び例示のリジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドの配列

クロロトキシン		
配列番号	コメント	配列 (N末端→C末端)
1	全長クロ トキシン	MEMPC FTTDH QMARK CDGCG GGRGR GRGCG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35

リジン残基数低減型ポリペプチドの例		
配列番号	コメント	配列 (N末端→C末端)
2	リジンなし	MEMPC FTTDH QMARK DDGCG GGRGC YGPQC LCR 5 10 15 20 25 30
3	配列番号 1 の 位置 15、位 置 23、また は位置 27 に リジンは存在 せず、N末端 にリジンが存 在する	KMEMP CFTTD HQMAR CDGCG GGRGR CYGPQ CLCR 5 10 15 20 25 30
4	配列番号 1 の 位置 15、位 置 23、また は位置 27 に リジンは存在 せず、C末端 にリジンが存 在する	MEMPC FTTDH QMARK DDGCG GGRGC YGPQC LCRK 5 10 15 20 25 30
5	配列番号 1 の 位置 15、位 置 23、及び 位置 27 のリ ジンはアラニ ンによって交 換されている	MEMPC FTTDH QMARK CDGCG GRGRG GRGCG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35
6	配列番号 1 の 位置 15、位 置 23、及び 位置 27 のリ ジンはアルギ ニンによって	MEMPC FTTDH QMARK CDGCG GGRGR GRGCG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

	交換されている	
7	配列番号1の位置15、位置23、及び位置27のリジンはアラニンによって交換されており、N末端にリジンが存在する	MSCHP CPTTD HQMAR ACDDC CGGAG HGACY GPQCL CR 5 10 15 20 25 30 35
8	配列番号1の位置15、位置23、及び位置27のリジンはアルギニンによって交換されており、N末端にリジンが存在する	MSCHP CPTTD HQMAR ACDDC CGGAG HGACY GPQCL CR 5 10 15 20 25 30 35
9	配列番号1の位置15、位置23、及び位置27のリジンはアラニンによって交換されており、C末端にリジンが存在する	MSCHP PTTDR QMAR CDDCC GGAGR GACYG PQCLC RK 5 10 15 20 25 30 35
10	配列番号1の位置15、位置23、及び位置27のリジンはアルギニンによって交換されており、C末端にリジンが存在する	MSCHP PTTDR QMAR CDDCC GGAGR GACYG PQCLC RK 5 10 15 20 25 30 35
11	配列番号1の位置15にリジンは存在しない	MSCHP PTTDR QMAR CDDCC GGAGR GACYG PQCLC RK 5 10 15 20 25 30 35
12	配列番号1の位置23にリ	MSCHP PTTDR QMAR CDDCC GGAGR GACYG PQCLC RK 5 10 15 20 25 30 35

10

20

30

40

50



【表 1 - 3】

	ジンは存在しない	
13	配列番号1の位置27にリジンは存在しない	MEMPC FTTDH QMARK CDCCG GGRGR GCTGP QCLCR 5 10 15 20 25 30 35
14	配列番号1の位置15及び位置23にリジンは存在しない	MEMPC FTTDH QMARK CDCCG GGRGR GCTGP QCLCR 5 10 15 20 25 30
15	配列番号1の位置15及び位置27にリジンは存在しない	MEMPC FTTDH QMARK CDCCG GGRGR GCTGP QCLCR 5 10 15 20 25 30
16	配列番号1の位置23及び位置27にリジンは存在しない	MEMPC FTTDH QMARK CDCCG GGRGR GCTGP QCLCR 5 10 15 20 25 30
17	配列番号1の位置15及び位置23のリジンはアラニンによって交換されている	MEMPC FTTDH QMARK CDCCG GGRGR GCTGP QCLCR 5 10 15 20 25 30 35
18	配列番号1の位置15及び位置27のリジンはアラニンによって交換されている	MEMPC FTTDH QMARK CDCCG GGRGR GCTGP QCLCR 5 10 15 20 25 30 35
19	配列番号1の位置23及び位置27のリジンはアラニ	MEMPC FTTDH QMARK CDCCG GGRGR GCTGP QCLCR 5 10 15 20 25 30 35

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

	ンによって交換されている	
20	配列番号1の位置15及び位置23のリジンはアルギニンによって交換されている	NCMPG FTTTH QMARH CEDCC GGGRH GRCTG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35
21	配列番号1の位置15及び位置27のリジンはアルギニンによって交換されている	NCMPG FTTTH QMARH CEDCC GGGRH GRCTG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35
22	配列番号1の位置23及び位置27のリジンはアルギニンによって交換されている	NCMPG FTTTH QMARH CEDCC GGGRH GRCTG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35
23	配列番号1の位置15のリジンはアルギニンによって交換されており、配列番号1の位置27のリジンはアラニンによって交換されている	NCMPG FTTTH QMARH CEDCC GGGRH GRCTG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35
24	配列番号1の位置15にリジンは存在せず、配列番号1の位置23及び位置27のリジンはアルギニンに	NCMPG FTTTH QMARH DDCCG GAGRG ACYGP QCLCR 5 10 15 20 25 30 35

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

	よって交換されている	
25	配列番号1の位置23にリジンは存在せず、位置15及び位置27のリジンはアルギニンによって交換されている	MMPC FTTDS QMARA CEEXC GGGGG ACYGF QCLCR 5 10 15 20 25 30 35
26	配列番号1の位置27にリジンは存在せず、位置15及び位置23のリジンはアルギニンによって交換されている	MMPC FTTDS QMARR CEECX GGGGG ACYGF QCLCR 5 10 15 20 25 30 35

【0091】

いくつかの実施形態では、リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドは、1つまたは複数のリジン残基（例えば、3つのリジン残基）を含むアミノ酸配列であって、それ  
でいてクロロトキシン（配列番号1）と比較して複合体化に利用可能なリジンの数が低減  
されたアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるリジン残  
基数低減型クロロトキシンポリペプチドにおける1つまたは複数のリジン残基は、クロロ  
トキシンポリペプチドに存在はするものの、複合体化のための部位としては利用不可能な  
状態にある。例えば、1つまたは複数のリジン残基（複数可）が化学的複合体化反応に関  
与しないように遮蔽される形で1つまたは複数のリジン残基（複数可）をペンダント部分  
と共有結合または非共有結合で結び付けることができ、その結果、複合体化のための部位  
として残る利用可能なリジン残基（複数可）の数が2以下、1以下、または0（すなわち  
、「低減型」リジン）となる。この様式で用いることが可能なリジン残基にペンダント部  
分を共有結合で結び付けることができる例としては、限定されないが、peg化（すなわ  
ち、ポリエチレングリコールポリマーと結び付けること）、メチル化（ジメチル化及びトリ  
メチル化を含む）、ならびに他のアルキル基（複数可）と結び付けることが挙げられる  
。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のリジン残基は、イプシロンNH<sub>2</sub>基におい  
てペンダント部分と結び付けられる。例えば、ペンダント部分をリジン残基と共有結合で  
結び付けるために所与のR基（例えば、ブチル基、プロピル基、またはエチル基）が使用  
されるのであれば、イプシロンNH<sub>2</sub>基は修飾されてNR<sub>2</sub>基またはNR<sub>3</sub>基となり得る。

【0092】

表2は、リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドを生成させるスキームの例を

いくつか示すものであるが、これらの例に限定されない。

【表 2】

表 2：修飾スキームの例

配列番号	コア配列 (N末端→C末端)	リジン残基 (複数可)の 位置 (複数可)
1	HCMPC FTTDH QMARK CDDCC GGNKR GKCYG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35	15、23、及び27 15及び23 15及び27 23及び27
11	HCMPC FTTDH QMARK DDDCC GGNKR KCYGP QCLCR 5 10 15 20 25 30 35	22及び26 22 26
12	HCMPC FTTDH QMARK CDDCC GGNKR KCYGP QCLCR 5 10 15 20 25 30 35	15及び26 15 26
13	HCMPC FTTDH QMARK CDDCC GGNKR KCYGP QCLCR 5 10 15 20 25 30 35	15及び23 15 23
27 (N末端にリジンが付加されている)	HCMPC FTTDH QMARK CDDCC GGNKR KCYGP PQCLC CR 5 10 15 20 25 30 35	16、24、及び28
28 (C末端にリジンが付加されている)	HCMPC FTTDH QMARK CDDCC GGNKR GKCYG PQCLC RK 5 10 15 20 25 30 35	15、23、及び27

【0093】

ある特定の実施形態では、特定のリジン残基の遮蔽は、リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドの合成の間の適切なステップの間に遮蔽リジン（遮蔽されなければ複合体化に利用可能な部位が既に遮蔽されているもの）を組み込むことによって達成される。遮蔽リジン残基は、商業的に容易に利用可能であり、当業者によって知られる日常的方法によって合成され得る。この様式で使用され得る遮蔽リジンの非限定的な例としては、限定されないが、二置換リジンまたは三置換リジン（例えば、N，N - R<sub>2</sub> - リジンまたはN，N，N - R<sub>3</sub> - リジンであり、式中、Rは、遮蔽基である）、及び自体と結び付いた短いPEG分子を有するリジンが挙げられる。Rは、リジンと共有結合で結び付いているときに化学的複合体化反応に関与しないようにリジン残基を遮蔽することに役立つと想定される任意の基であり得る。例えば、アルキル基（例えば、ブチル、メチル、及びエチル）は、遮蔽基として働き得る。例えば、N，N - ジメチル - リジン及び/またはN，N，N - トリメチル - リジンは、合成の間に使用され得る。

【0094】

ある特定の実施形態では、リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドの一方の末端または両方の末端（すなわち、N末端及び/またはC末端）は、化学的複合体化反応に一方の末端または両方の末端が関与することが阻止されるように遮蔽される。例えば、いくつかの実施形態では、少なくとも一方の末端が、遮蔽されなければ、複合体反応に関与すると想定されるか、またはそれへの関与に利用可能であると想定される複合体化化学が使用される。当該技術分野では、ポリペプチドのN末端及び/またはC末端を遮蔽する方法はさまざまなものが知られており、こうした方法には、限定されないが、アミンに対す

るアルキル基の共有結合付加（例えば、メチル化）が含まれる。

【0095】

本明細書に記載のリジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドを合成する方法は、当該技術分野において知られている。いくつかのペプチド合成法では、1つのアミノ酸（またはアミノ酸誘導体）のアミノ基は、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）などの試薬と反応させることによって活性化されている別のアミノ酸（またはアミノ酸誘導体）のカルボキシル基に連結される。遊離アミノ基が活性化カルボキシル基を攻撃すると、ペプチド結合が形成され、ジシクロヘキシル尿素が遊離する。そのような方法では、反応し得る他の基（N末端のアミノ酸またはアミノ酸誘導体の - アミノ基、及びC末端のアミノ酸またはアミノ酸誘導体のカルボキシル基など）は、化学反応に関与しないように遮蔽（「保護」）され得る。したがって、特定の活性基のみが反応し、その結果、所望の生成物が形成される。この目的に有用な遮蔽基には、例えば、アミン基を保護するための *tert*-ブトキシカルボニル基（*t*-Boc）及びベンゾイルオキシカルボニル基、ならびにカルボキシル基を保護するための単純なエステル（メチル基及びエチル基）ならびにベンジルエステルが含まれる。遮蔽基は、次に、典型的には、ペプチド結合がインタクトな状態で残る処理（例えば、希酸での処理）を用いて除去され得る。反応すべきでない反応基を保護し、カップリングによってペプチド結合を形成させ、反応基を脱保護するこのプロセスは、反復実施され得る。ペプチドは、伸長ペプチド鎖にアミノ酸を連続的に付加することによって合成され得る。本発明に従う使用には液相ペプチド合成法も固相ペプチド合成法も適する。固相ペプチド合成法では、伸長ペプチド鎖は、典型的には、カルボキシ末端アミノ酸を不溶性マトリックス（例えば、ポリスチレンビーズなど）に連結することによって当該マトリックスに連結される。合成の最終時点で、ペプチド結合を破壊しない切断試薬（フッ化水素酸（HF）など）を使用してペプチドがマトリックスから切り離され得る。保護基もまた、典型的には、この時点で除去される。自動化、ハイスループット、及び/または並行のペプチド合成法もまた、本発明に従って使用され得る。ペプチド合成法に関する追加情報については、例えば、Merrifield（1969）“Solid-phase peptide synthesis,” *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 32:221-96、Fridkin et al.（1974）*Annu Rev Biochem.*, 43(0):419-43、Merrifield（1997）“Concept and Early Development of Solid Phase Peptide Synthesis,” *Methods in Enzymology*, 289:3-13、Sabatino et al.（2009）“Advances in automatic, manual and microwave-assisted solid-phase peptide synthesis,” *Curr Opin Drug Discov Devel*, 11(6):762-70を参照のこと。これらの文献のそれぞれの内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0096】

いくつかの実施形態では、リジン残基を遮蔽するためにペンダント部分を結び付けることは、本明細書に記載の他の手段（例えば、別のアミノ酸もしくはアミノ酸誘導体とリジン残基を交換すること、及び/またはクロロトキシンにリジン残基が通常は見られる位置のリジン残基を欠失させること）と併用される。

【0097】

いくつかの実施形態では、N末端の保護基は、合成の最終時点で除去される。保護基（例えば、遮蔽N末端を有するリジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドの生成に役立ち得る保護基）は残され、それによって特定の化学的複合体化スキームにおける複合体化に利用可能な部位が限定される。

【0098】

さまざまな実施形態において、本明細書に記載のクロロトキシンポリペプチドは、C末端アルギニン残基を含む。さまざまな実施形態において、本明細書に記載のクロロトキシ

10

20

30

40

50

ンポリペプチドのC末端残基は、アミド化されていない。さまざまな実施形態において、本明細書に記載のクロロトキシンポリペプチドのC末端残基は、カルボキシル化されている。さまざまな実施形態において、本明細書に記載のクロロトキシンポリペプチドのC末端残基は、アミド化されていないアルギニンである。さまざまな実施形態において、本明細書に記載のクロロトキシンポリペプチドのC末端残基は、カルボキシル化されたアルギニン残基である。

#### 【0099】

クロロトキシンポリペプチド断片

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用するためのクロロトキシンポリペプチド断片は、配列番号1と比較してアミノ酸残基数が少ないクロロトキシンポリペプチドである。いくつかの実施形態では、クロロトキシンポリペプチド断片は、少なくとも5～約25個のアミノ酸の長さを有するポリペプチドであって、配列番号1との配列同一性が少なくとも45%である少なくとも5つの連続アミノ酸を含むポリペプチドであり得るか、または当該ポリペプチドを含み得る。したがって、クロロトキシンポリペプチド断片は、配列番号1との配列同一性が少なくとも少なくとも45%（例えば、配列番号1との全配列同一性が少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）である5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、または25個のアミノ酸を含み得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシンポリペプチド断片は、C末端アルギニン残基を含む。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシンポリペプチド断片のC末端残基は、アミド化されていない。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシンポリペプチド断片のC末端残基は、カルボキシル化されている。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシンポリペプチド断片のC末端残基は、アミド化されていないアルギニンである。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシンポリペプチド断片のC末端残基は、カルボキシル化されたアルギニン残基である。

#### 【0100】

ある特定の場合、クロロトキシンポリペプチド断片は、配列番号1との配列同一性が少なくとも45%（例えば、配列番号1との全配列同一性が少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）である5～20個のアミノ酸残基、5～18個のアミノ酸残基、5～16個のアミノ酸残基、5～14個のアミノ酸残基、5～12個のアミノ酸残基、5～10個のアミノ酸残基、5～8個のアミノ酸残基、6～20個のアミノ酸残基、6～18個のアミノ酸残基、6～16個のアミノ酸残基、6～14個のアミノ酸残基、6～12個のアミノ酸残基、6～10個のアミノ酸残基、6～8個のアミノ酸残基、8～20個のアミノ酸残基、8～18個のアミノ酸残基、8～16個のアミノ酸残基、8～14個のアミノ酸残基、8～12個のアミノ酸残基、8～10個のアミノ酸残基、10～20個のアミノ酸残基、10～18個のアミノ酸残基、10～16個のアミノ酸残基、10～14個のアミノ酸残基、10～12個のアミノ酸残基、12～20個のアミノ酸残基、12～16個のアミノ酸残基、12～14個のアミノ酸残基、14～20個のアミノ酸残基、14～18個のアミノ酸残基、または14～16個のアミノ酸残基を含み得る。したがって、ある特定の実施形態では、クロロトキシンポリペプチド断片は、配列番号1の5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個、11個、1

2 個、1 3 個、1 4 個、1 5 個、1 6 個、1 7 個、1 8 個、1 9 個、2 0 個、2 1 個、2 2 個、2 3 個、2 4 個、または 2 5 個の位置に対応する位置において配列番号 1 と同一であり得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシンポリペプチド断片は、C 末端アルギニン残基を含む。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシンポリペプチド断片の C 末端残基は、アミド化されていない。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシンポリペプチド断片の C 末端残基は、カルボキシル化されている。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシンポリペプチド断片の C 末端残基は、アミド化されていないアルギニンである。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシンポリペプチド断片の C 末端残基は、カルボキシル化されたアルギニン残基である。

10

**【 0 1 0 1 】**

ある特定の場、クロロトキシンポリペプチド断片は、5 ~ 2 5 個（両端値を含む）のアミノ酸残基の長さ（例えば、例えば、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0 個、1 1 個、1 2 個、1 3 個、1 4 個、1 5 個、1 6 個、1 7 個、1 8 個、1 9 個、2 0 個、2 1 個、2 2 個、2 3 個、2 4 個、または 2 5 個のアミノ酸残基の長さ）を有するペプチドである。ある特定の場、クロロトキシンポリペプチド断片は、5 ~ 2 0 個のアミノ酸残基、5 ~ 1 8 個のアミノ酸残基、5 ~ 1 6 個のアミノ酸残基、5 ~ 1 4 個のアミノ酸残基、5 ~ 1 2 個のアミノ酸残基、5 ~ 1 0 個のアミノ酸残基、5 ~ 8 個のアミノ酸残基、6 ~ 2 0 個のアミノ酸残基、6 ~ 1 8 個のアミノ酸残基、6 ~ 1 6 個のアミノ酸残基、6 ~ 1 4 個のアミノ酸残基、6 ~ 1 2 個のアミノ酸残基、6 ~ 1 0 個のアミノ酸残基、6 ~ 8 個のアミノ酸残基、8 ~ 2 0 個のアミノ酸残基、8 ~ 1 8 個のアミノ酸残基、8 ~ 1 6 個のアミノ酸残基、8 ~ 1 4 個のアミノ酸残基、8 ~ 1 2 個のアミノ酸残基、8 ~ 1 0 個のアミノ酸残基、1 0 ~ 2 0 個のアミノ酸残基、1 0 ~ 1 8 個のアミノ酸残基、1 0 ~ 1 6 個のアミノ酸残基、1 0 ~ 1 4 個のアミノ酸残基、1 0 ~ 1 2 個のアミノ酸残基、1 2 ~ 2 0 個のアミノ酸残基、1 2 ~ 1 6 個のアミノ酸残基、1 2 ~ 1 4 個のアミノ酸残基、1 4 ~ 2 0 個のアミノ酸残基、1 4 ~ 1 8 個のアミノ酸残基、または 1 4 ~ 1 6 個のアミノ酸残基の長さを有するペプチドである。

20

**【 0 1 0 2 】**

いくつかの実施形態では、クロロトキシンポリペプチド断片は、リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドの断片であり、及び / または適切な参照クロロトキシンポリペプチドもしくはクロロトキシンポリペプチド断片と比較してリジン残基の含有数がその他の様式で少ない。そのような断片は、「リジン残基数低減型 C t x P p t 断片」と本明細書で称され得る。

30

40

50

## 【表 3 - 1】

表 3 : クロロトキシシンポリペプチド断片の例

配列番号	配列
3 0	CMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCY GPQCLCR
3 1	MPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYG PQCLCR
3 2	PCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGP QCLCR
3 3	CFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQ CLCR
3 4	FTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQC LCR
3 5	TTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCL CR
3 6	TDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLC R
3 7	DHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR
3 8	HQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR
3 9	QMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR
4 0	MARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR
4 1	ARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR
4 2	RKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR
4 3	KCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR
4 4	CDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR
4 5	DDCCGGKGRGKCYGPQCLCR
4 6	DCCGGKGRGKCYGPQCLCR

10

20

30

40

50



【表 3 - 2】

4 7	CCGGKGRGKCYGPQCLCR
4 8	CGGKGRGKCYGPQCLCR
4 9	GGKGRGKCYGPQCLCR
5 0	GKGRGKCYGPQCLCR
5 1	KGRGKCYGPQCLCR
5 2	GRGKCYGPQCLCR
5 3	RGKCYGPQCLCR
5 4	GKCYGPQCLCR
5 5	KCYGPQCLCR
5 6	CYGPQCLCR
5 7	YGPQCLCR
5 8	GPQCLCR
5 9	PQCLCR
6 0	QCLCR
6 1	MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGR
6 2	CMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGR
6 3	MPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGR
6 4	PCFTTDHQMARKCDDCCGGKGR
6 5	CFTTDHQMARKCDDCCGGKGR
6 6	FTTDHQMARKCDDCCGGKGR
6 7	TTDHQMARKCDDCCGGKGR
6 8	TDHQMARKCDDCCGGKGR
6 9	DHQMARKCDDCCGGKGR
7 0	HQMARKCDDCCGGKGR
7 1	QMARKCDDCCGGKGR
7 2	MARKCDDCCGGKGR
7 3	ARKCDDCCGGKGR
7 4	RKCDDCCGGKGR
7 5	KCDDCCGGKGR
7 6	CDDCCGGKGR
7 7	DDCCGGKGR
7 8	DCCGGKGR
7 9	CCGGKGR
8 0	CGGKGR
8 1	MCMPCFTTDHQMAR
8 2	CMPCFTTDHQMAR
8 3	MPCFTTDHQMAR
8 4	PCFTTDHQMAR
8 5	CFTTDHQMAR
8 6	FTTDHQMAR
8 7	TTDHQMAR

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

8 8	TDHQMAR
8 9	DHQMAR
9 0	HQMAR
9 1	CMPCFTTDDHQMARACDDCCGGAGRGKCY GPQCLCR
9 2	MPCFTTDDHQMARACDDCCGGAGRGKCYG PQCLCR
9 3	PCFTTDDHQMARACDDCCGGAGRGKCYGP QCLCR
9 4	CFTTDDHQMARACDDCCGGAGRGKCYGPQ CLCR
9 5	FTTDDHQMARACDDCCGGAGRGKCYGPQC LCR
9 6	TTDDHQMARACDDCCGGAGRGKCYGPQCL CR
9 7	TDHQMARACDDCCGGAGRGKCYGPQCLC R
9 8	DHQMARACDDCCGGAGRGKCYGPQCLCR
9 9	HQMARACDDCCGGAGRGKCYGPQCLCR
1 0 0	QMARACDDCCGGAGRGKCYGPQCLCR
1 0 1	MARACDDCCGGAGRGKCYGPQCLCR
1 0 2	ARACDDCCGGAGRGKCYGPQCLCR
1 0 3	RACDDCCGGAGRGKCYGPQCLCR
1 0 4	KCDDCCGGAGRGKCYGPQCLCR
1 0 5	CDDCCGGAGRGKCYGPQCLCR
1 0 6	DDCCGGAGRGKCYGPQCLCR
1 0 7	DCCGGAGRGKCYGPQCLCR
1 0 8	CCGGAGRGKCYGPQCLCR
1 0 9	CGGAGRGKCYGPQCLCR
1 1 0	GGAGRGKCYGPQCLCR
1 1 1	GAGRGKCYGPQCLCR
1 1 2	KGRGKCYGPQCLCR
1 1 3	GRGKCYGPQCLCR
1 1 4	RGKCYGPQCLCR
1 1 5	GKCYGPQCLCR
1 1 6	KCYGPQCLCR
1 1 7	CYGPQCLCR
1 1 8	YGPQCLCR
1 1 9	GPQCLCR
1 2 0	PQCLCR
1 2 1	QCLCR

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

1 2 2	MCMPCFTTTHQMARACDDCCGGAGR	
1 2 3	CMPCFTTTHQMARACDDCCGGAGR	
1 2 4	MPCFTTTHQMARACDDCCGGAGR	
1 2 5	PCFTTTHQMARACDDCCGGAGR	
1 2 6	CFTTTHQMARACDDCCGGAGR	
1 2 7	FTTTHQMARACDDCCGGAGR	
1 2 8	TTTHQMARACDDCCGGAGR	10
1 2 9	TDTHQMARACDDCCGGAGR	
1 3 0	DHQMARACDDCCGGAGR	
1 3 1	HQMARACDDCCGGAGR	
1 3 2	QMARACDDCCGGAGR	
1 3 3	MARACDDCCGGAGR	
1 3 4	ARACDDCCGGAGR	
1 3 5	RACDDCCGGAGR	
1 3 6	KCDDCCGGAGR	
1 3 7	CDDCCGGAGR	20
1 3 8	DDCCGGAGR	
1 3 9	DCCGGAGR	
1 4 0	CCGGAGR	
1 4 1	CGGAGR	
1 4 2	MCMPCFTTTHQMAR	
1 4 3	CMPCFTTTHQMAR	
1 4 4	MPCFTTTHQMAR	
1 4 5	PCFTTTHQMAR	
1 4 6	CFTTTHQMAR	30
1 4 7	FTTTHQMAR	
1 4 8	TTTHQMAR	
1 4 9	TDTHQMAR	
1 5 0	DHQMAR	
1 5 1	HQMAR	

## 【0103】

## ペイロード含有薬剤

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用するためのクロロトキシシン薬剤は、ペイロード部分（検出可能部分、治療部分、または標的化部分など）と結び付いたクロロトキシシンポリペプチド（クロロトキシシン断片（例えば、本明細書に記載のもの）を含む）であり得るか、または当該クロロトキシシンポリペプチドを含み得る。いくつかの実施形態では、クロロトキシシンポリペプチドは、複数の部分と結び付けられる。いくつかの実施形態では、そのような結び付きは、共有結合であるか、または共有結合を含み、その結果、薬剤は、複合体であり得るか、または複合体を含み得る。

## 【0104】

## A. ペイロード

本明細書に記載されるように、ある特定の実施形態では、本発明において使用するため

10

20

30

40

50

のクロロトキシシン薬剤は、１つまたは複数の非クロロトキシシン部分（すなわち、ペイロード）を含み、当該ペイロードは、例えば、検出可能部分、治療部分、及び／または標的化部分を含み得る。さまざまなそのような部分のいずれを用いることもできる。ある特定の実施形態では、ペイロードは、薬剤を含む。ある特定の実施形態では、ペイロードは、薬剤と、ペイロードをクロロトキシシン薬剤と複合体化させるための部分、修飾、または他の特徴と、を含む。

#### 【 0 1 0 5 】

##### １．治療部分

ある特定の実施形態では、本発明において使用するためのクロロトキシシン薬剤は、以下に記載の１つまたは複数の治療実体または治療部分を含む。ある特定の実施形態では、W O 2 0 1 1 / 0 9 7 5 3 3（例えば、U S 9 , 0 1 8 , 3 4 7 も併せて参照のこと）及び W O 2 0 1 1 / 1 4 2 8 5 8（例えば、U S 2 0 1 3 / 0 1 9 5 7 6 0 も併せて参照のこと）の１つまたは複数の記載のクロロトキシシン薬剤が本発明に従って利用され、これらの文献はそれぞれ、その全体が参照によって組み込まれる。

#### 【 0 1 0 6 】

##### a．抗がん薬剤

さまざまな実施形態において、本発明において使用するための治療実体または治療部分は、抗がん薬剤であるか、または抗がん薬剤を含む。適切な抗がん薬剤には、がん細胞に対して直接的または間接的に毒性または害を与える多種多様な物質、分子、化合物、薬剤、または因子（例えば、細胞傷害性薬剤を含む）がいずれも含まれる。抗がん薬剤には、対象におけるがんを治療するか、対象におけるがんのサイズもしくは量を低減するか、対象におけるがんの増殖を抑制するか、対象におけるがんの発生もしくは可能性を低減するか、対象におけるがんを予防するか、対象におけるがんの転移を抑制するか、対象におけるがんの転移を低減するか、対象におけるがんの転移を予防するか、またはがんを有する対象の予後を改善することが知られる多種多様な薬剤がいずれも含まれる。本発明の実施における使用に適した抗がん薬剤は、合成または天然のものであり得る。抗がん薬剤には、単一分子、または異なる分子の複合体、セット、一連単位、もしくはレジメンが含まれ得る。

#### 【 0 1 0 7 】

適切な抗がん薬剤は、さまざまな化合物クラスのいずれかに属し得、こうした化合物クラスには、限定されないが、小分子、ペプチド、糖、ステロイド、抗体、融合タンパク質、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、低分子干渉RNA、ペプチド模倣体、及び同様のものが含まれる。同様に、適切な抗がん薬剤は、さまざまな抗がん薬剤クラスのいずれかの中にも見出すことができ、こうした抗がん薬剤クラスには、限定されないが、アルキル化薬剤、代謝拮抗剤、抗有糸分裂抗生物質、アルカロイド抗がん薬剤、ホルモン及び抗ホルモン剤、インターフェロン、非ステロイド性抗炎症剤、ならびにさまざまな他の抗がん薬剤が含まれる。

#### 【 0 1 0 8 】

ある特定の場、特に適した抗がん薬剤は、がん細胞に対する選択性／特異性が不十分であることに起因して望ましくない副作用を生じさせる薬剤、細胞への取り込み及び／または保持が皆無または不十分な薬剤、細胞の薬物抵抗性と結びつく薬剤、ならびに難水溶性、凝集、及び同様のものに起因してがん患者への投与用に製剤化することが容易になし得ない薬剤である。

#### 【 0 1 0 9 】

ある特定の場、治療部分は、放射性同位体、酵素、プロドラッグ活性化酵素、放射線増感剤、核酸分子、干渉RNA、スーパー抗原、抗血管新生薬剤、アルキル化薬剤、プリンアンタゴニスト、ピリミジンアンタゴニスト、植物アルカロイド、挿入抗生物質、アロマターゼ阻害剤、代謝拮抗剤、有糸分裂阻害剤、増殖因子阻害剤、細胞周期阻害剤、酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、生物学的応答修飾物質、抗ホルモン剤、及び抗アンドロゲン剤を含む群のメンバーであり得る。ある特定の実施形態では、核酸分子は、DNA、酵素

RNA、RNA：DNAハイブリッド、三本鎖DNA、ssRNA、dsRNA、tRNA、mRNA、rRNA、またはそれらの任意の組み合わせであるか、またはこれを含む。

【0110】

本発明において使用するためのクロロトキシン薬剤において使用されるか、または当該クロロトキシン薬剤と共に使用され得る適切な抗がん薬剤の例については、以下にさらに詳述される。ある特定の実施形態では、WO2011/097533（例えば、US9,018,347も併せて参照のこと）及びWO2011/142858（例えば、US2013/0195760も併せて参照のこと）の1つまたは複数に記載のクロロトキシン複合体が本発明に従って利用され、これらの文献はそれぞれ、その全体が参照によって組み込まれる。

10

【0111】

i. 難水溶性抗がん薬剤

ある特定の実施形態では、本発明のクロロトキシン薬剤に含められる抗がん薬剤は、難水溶性化合物である。当業者なら認識するであろうが、本発明における使用には、多種多様な難水溶性抗がん薬剤が適する。

【0112】

例えば、タキサンの中から抗がん薬剤を選択することができ、タキサンは、他の抗新生物薬剤には不応性の多くの固形腫瘍の治療に有効な薬剤として認識されている。現在認可されているタキサンは、パクリタキセル（TAXOL（商標））及びドセタキセル（TAXOTERE（商標））の2つである。パクリタキセル、ドセタキセル、及び他のタキサンは、紡錘体微小管の形成に必須のタンパク質であるチューブリンの重合を増強することによって作用する。チューブリンが重合すると、非常に安定な非機能性の細管が形成され、この細管によって細胞複製が阻害され、細胞死が生じる。

20

【0113】

パクリタキセルは、非常に難水溶性であり、それ故に、静脈内投与向けに水を用いて実用的に製剤化することが不可能なものである。CREMOPHOR EL（商標）（ポリオキシエチル化ヒマシ油）を薬物担体として使用することで、注射または静脈内注入向けのTAXOL（商標）製剤がいくつか開発されている。しかしながら、CREMOPHOR EL（商標）は、それ自体が毒性を有しており、そのような調製物の投与と結び付く過敏性反応（重度の皮疹、蕁麻疹、潮紅、呼吸困難、頻拍、及び他の症状）の原因に少なくとも部分的にはなっていると考えられる。そのような副作用を回避するために、CREMOPHOR（商標）を含むパクリタキセル製剤と併せて前投薬が処方されることが多い。ドセタキセルは、パクリタキセルのアナログであり、パクリタキセルと同様に難水溶性である。医薬用途向けにドセタキセルを溶解するために使用されるもので現在最も好ましい溶剤は、ポリソルベート80（TWEEN80）である。TWEEN80は、患者における過敏性反応を惹起することに加えて、PVCの送達器具と共に使用することができず、これは、TWEEN80がフタル酸ジエチルヘキシルを溶出させる傾向を有するためであり、フタル酸ジエチルヘキシルは、非常に毒性が高いものである。

30

【0114】

ある特定の実施形態では、タキサン及びクロロトキシンポリペプチドを含む本発明によるクロロトキシン薬剤は、患者において有害反応を誘導する溶剤及び担体の使用を回避するための改善された送達方法として使用され得る。

40

【0115】

いくつかの実施形態では、クロロトキシン薬剤の抗がん薬剤は、エンジン抗生物質ファミリーに属し得る。ファミリーとして、エンジン抗生物質は、特に強力な抗がん薬剤である。メンバーによっては、臨床的に使用される抗がん抗生物質の中で最も有効なものの1つであるアドリマイシンと比較して効力が1000倍である（Y. S. Zhen et al., J. Antibiot., 1989, 42: 1294-1298）。例えば、クロロトキシン薬剤に含められる抗がん薬剤は、カリケアマイシンのエンジンファミリーのメンバーであり得る。カリケアマイシンは、元々は、土壌微生物Micro

50

*nospora echinospora*の亜種である*calichensis*のプロス抽出物から単離されたものであり、強力なDNA損傷薬剤のスクリーニングにおいて検出された(M. D. Lee et al., J. Am. Chem. Soc., 1987, 109: 3464 - 3466、M. D. Lee et al., J. Am. Chem. Soc., 1987, 109: 3466 - 3468、W. M. Maiese et al., J. Antibiot., 1989, 42: 558 - 563、M. D. Lee et al., J. Antibiot., 1989, 42: 1070 - 1087)。

#### 【0116】

カリケアマイシンは、グリコシル結合を介してオリゴ糖鎖に連結された複雑かつ強固な二環式エンジンアリルトリスルフィドコア構造によって特徴付けられる。オリゴ糖部分は、いくつかの置換された糖誘導体、及び置換されたテトラヒドロピラン環を含む。カリケアマイシンのエンジン含有コア(またはアグリコン)及び糖質部分は、こうした分子の生物学的活性において異なる役割を担うことが報告されている。カリケアマイシンのコア部分はDNAを切断する一方で、カリケアマイシンのオリゴ糖部分は認識送達系として働き、当該薬物が自体を固定する二本鎖DNA副溝へと当該薬物を導くと一般に考えられている(“Enediyne Antibiotics as Antitumor Agents,” Doyle and Borders, 1995, Marcel-Dekker: New York)。二本鎖DNA切断は、細胞にとって通常は修復が不可能であるか、または修復が容易ではない型の損傷であり、多くの場合、致死性である。

#### 【0117】

カリケアマイシンアナログは、その化学的特性及び生物学的特性故に、有望な抗がん薬剤として前臨床モデルにおいていくつか試験されている。こうしたカリケアマイシンアナログは、治療のための治療用量範囲を制限する遅発性毒性を有するため、単一薬剤治療としてその開発を行うことは追求されていない。しかしながら、こうしたカリケアマイシンアナログは、その効力故に、標的化化学療法に特に有用なものとなっている。

#### 【0118】

適切な難水溶性抗がん薬剤の他の例としては、タモキシフェン及びBCNUが挙げられる。タモキシフェンは、とりわけ、さまざまなエストロゲン受容体陽性癌(乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌、卵巣癌、腎癌、メラノーマ、直腸結腸腫瘍、類腱腫、膀胱癌、及び下垂体腫瘍など)の治療に使用されており、この治療の奏功度はさまざまである。タモキシフェンを使用する化学療法は、難水溶性によって制限を受けることに加えて、細胞の薬物抵抗性などの副作用を惹起し得る。BCNU(1, 3 - ビス(2 - クロロエチル) - 1 - ニトロソ尿素)は、抗がん特性を有することが広く知られており、1972年以来、脳癌(例えば、脳腫瘍)、結腸癌、ホジキン病、肺癌、及び多発性骨髄腫に対して使用するものとして国立がん研究所(National Cancer Institute)によって定められている。しかしながら、この抗がん薬物の効率的な使用もまた、その溶解性が低いことによって制限されている。

#### 【0119】

##### i i . 薬物抵抗性と結び付く抗がん薬剤

本明細書に記載のある特定の実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、薬物抵抗性と結び付く抗がん薬剤を含む。本明細書で使用される「薬物抵抗性と結び付く抗がん薬剤」という用語は、がん細胞が抵抗性であるか、または抵抗性となり得る任意の化学療法剤を指す。本明細書で既に言及したように、抗がん薬剤に対する抵抗性は、多くの因子に起因し得、異なる機構によって機能し得る。クロロトキシシンポリペプチドと、薬物抵抗性と結び付く抗がん薬剤と、を含む本発明において使用するためのクロロトキシシン薬剤を投与すると、当該抗がん薬剤の細胞取り込みを増強し、がん細胞(例えば、抵抗性腫瘍細胞)に当該抗がん薬剤を送り込むことができる。

#### 【0120】

薬物抵抗性と結び付く抗がん薬剤は多種多様であり、こうした抗がん薬剤はいずれも、本発明における使用に適する。例えば、薬物抵抗性と結び付く抗がん薬剤は、メトトレキ

サートであり得る。メトトレキサートは、広く使用されるがん薬物であり、葉酸アナログである。メトトレキサートは、テトラヒドロ葉酸の合成における重要なステップを遮断するものであり、テトラヒドロ葉酸は、それ自体がチミジル酸の合成に利用される非常に重要な化合物源であり、チミジル酸は、DNA合成に特異的であるが故にDNA合成に特に重要な構成要素である。メトトレキサートによって誘導される薬物抵抗性は、細胞への当該薬物の取り込みが不十分であることと関連している。

#### 【0121】

適切な抗がん薬剤の他の例としては、酵素活性が減少することによって細胞内でその薬物の活性化が不十分となることに起因する薬物抵抗性と結びつくプリンアナログ及びピリミジンアナログが挙げられる。そのようなプリンアナログの例は、6-メルカプトプリン(6-MP)である。6-MPに対してがん細胞が抵抗性を獲得する一般的な原因は、6-MPをその対応ヌクレオチドである6-メルカプトホスホリボシルプリン(6-MPRP)(当該薬物の致死性形態)へと変換して活性化する酵素であるヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT)が減少することにある。理論に拘束されないが、6-MPRP自体が細胞に導入され得るのであれば、抵抗性を克服し得ると想定される。この化合物は、市販されてはいるものの、生細胞に適切に輸送されないがために、がん治療において未だに治療的使用がなされていない。本発明に従ってリジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチドに6-MPRPを結び付ければ、6-MPRPが細胞膜を横切る能力が劇的に向上すると想定される。チオグアニンは、HGPRT酵素が失われることに起因して薬物抵抗性と結びつく別の抗がん薬剤例である。

#### 【0122】

細胞内での活性化が不十分であることに起因して薬物抵抗性と結びつくピリミジンアナログの例としては、シトシンアラビノシド及びアデノシンアラビノシドが挙げられ、これらのアラビノシドは、それぞれ致死性形態のシトシンニリン酸及びアデノシンニリン酸へとデオキシシチジンキナーゼ(DOCK)酵素によって変換されることで活性される。そのようなピリミジンアナログの活性化形態とクロロトキシンポリペプチドをカップリングさせることで、細胞への当該活性化形態の取り込みを増強し、細胞の薬物抵抗性を克服することができる。

#### 【0123】

薬物抵抗性と結びつく抗がん薬剤の他の例としては、限定されないが、5-フルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、シトシン、アラビノシド、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、アクチノマイシン、及びブレオマイシンが挙げられる。

#### 【0124】

##### i i i . 他の抗がん薬剤

いくつかの実施形態では、抗がん薬剤は、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メルファラン、イホスファミド)、代謝拮抗剤(例えば、メトトレキサート)、プリンアンタゴニスト及びピリミジンアンタゴニスト(例えば、6-メルカプトプリン、5-フルオロウラシル、シタラビル(cytarabine)、ゲムシタピン)、紡錘体毒(例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、パクリタキセル)、ポドフィロトキシン(例えば、エトポシド、イリノテカン、トポテカン)、抗生物質(例えば、ドキソルビシン、ブレオマイシン、マイトマイシン)、ニトロソ尿素(例えば、カルムスチン、ロムスチン)、無機イオン(例えば、シスプラチン、カルボプラチン)、酵素(例えば、アスパラギナーゼ)、ならびにホルモン(例えば、タモキシフェン、ロイプロリド、フルタミド、及びメゲストロール)からなる群から選択されるが、例を少数挙げたにすぎない。最新のがん治療のより包括的な議論については、[www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs](http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs)及びThe Merck Manual, Seventeenth Ed., 1999を参照のこと。これらサイト及び文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

## 【0125】

i v . 核酸薬剤

ある特定の実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、核酸薬剤を含む。

## 【0126】

がん及び腫瘍の多くが、さまざまな程度の遺伝的機能障害（点変異、遺伝子欠失、または重複など）と結び付くことが示されている。多くの新たながん治療方針（「アンチセンス」、「アンチジーン」、及び「RNA干渉」と呼ばれているものなど）が、遺伝子の発現を調節するために開発されている（A. Kalota et al., *Cancer Biol. Ther.*, 2004, 3: 4-12、Y. Nakata et al., *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 2005, 15: 163-182、V. Wachek and U. Zangmeister-Wittke, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2006, 59: 65-73、A. Koluta et al., *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2006, 173: 173-196）。こうした手法では、例えば、アンチセンス核酸、リボザイム、三本鎖薬剤、または低分子干渉RNA（siRNA）が利用されることで、標的遺伝子の特定のmRNAまたはDNAの転写または翻訳が遮断され、この遮断は、アンチセンス核酸を用いた当該mRNAの遮蔽もしくは三本鎖薬剤を用いた当該DNAの遮蔽、リボザイムを用いたヌクレオチド配列の切断、またはRNA干渉の機構を介するmRNAの破壊、のいずれかによって行われる。こうした方針の多くでは、小分子及び他の構造も適用されてはいるものの、主にオリゴヌクレオチドが活性薬剤として使用される。遺伝子発現を調節するためのオリゴヌクレオチドベースの方針は、いくつかのがんの治療に非常に大きな潜在力を有するものの、オリゴヌクレオチドの薬理学的用途は、こうした化合物ががん細胞内のその作用部位に効率よく送達されないことが主因となって妨げられている（P. Herdewijn et al., *Antisense Nucleic Acids Drug Dev.*, 2000, 10: 297-310、Y. Shoji and H. Nakashima, *Curr. Charm. Des.*, 2004, 10: 785-796、A. W. T. ong et al., *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2005, 7: 114-124）。

## 【0127】

ある特定の実施形態では、提供されるクロロトキシシン薬剤は、クロロトキシシンポリペプチドと、治療（例えば、抗がん）薬剤として有用な核酸分子と、を含む。そのような方針には、さまざまな化学型及び構造形態の核酸が適し得る。こうしたものの例としては、限定されないが、DNA（一本鎖（ssDNA）及び二本鎖（dsDNA）を含む）、RNA（限定されないが、ssRNA、dsRNA、tRNA、mRNA、rRNA、酵素RNAを含む）、RNA：DNAハイブリッド、三本鎖DNA（例えば、短いオリゴヌクレオチドと結び付いたdsDNA）、ならびに同様のものが挙げられる。

## 【0128】

いくつかの実施形態では、核酸薬剤は、約5～2000個のヌクレオチドの長さを有する。いくつかの実施形態では、核酸薬剤は、少なくとも約6つ、少なくとも約7つ、少なくとも約8つ、少なくとも約9つ、少なくとも約10個、少なくとも約11個、少なくとも約12個、少なくとも約13個、少なくとも約14個、少なくとも約15個、少なくとも約16個、少なくとも約17個、少なくとも約18個、少なくとも約19個、少なくとも約20個、少なくとも約21個、少なくとも約22個、少なくとも約23個、少なくとも約24個、少なくとも約25個、少なくとも約26個、少なくとも約27個、少なくとも約28個、少なくとも約29個、少なくとも約30個、少なくとも約31個、少なくとも約32個、少なくとも約33個、少なくとも約34個、少なくとも約35個、少なくとも約36個、少なくとも約37個、少なくとも約38個、少なくとも約39個、少なくとも約40個、少なくとも約41個、少なくとも約42個、少なくとも約43個、少なくとも約44個、少なくとも約45個、少なくとも約46個、少なくとも約47個、少なくとも約48個、少なくとも約49個、少なくとも約50個、またはそれを超える数のヌクレ



オチドの長さを有する。いくつかの実施形態では、核酸薬剤は、約2000個未満、約1900個未満、約1800個未満、約1700個未満、約1600個未満、約1500個未満、約1400個未満、約1300個未満、約1200個未満、約1100個未満、約1000個未満、約900個未満、約800個未満、約700個未満、約600個未満、約500個未満、約450個未満、約400個未満、約350個未満、約300個未満、約250個未満、約200個未満、約150個未満、約100個未満、約50個未満、約45個未満、約40個未満、約35個未満、約30個未満、約25個未満、約20個未満、またはそれ未満の数のヌクレオチドの長さを有する。

#### 【0129】

いくつかの実施形態では、核酸薬剤は、プロモーター及び/または転写を制御する他の配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸薬剤は、複製起点及び/または複製を制御する他の配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸薬剤は、プロモーター及び/または複製起点を含まない。

10

#### 【0130】

本明細書に記載の発明の実施における使用に適した核酸抗がん薬剤には、腫瘍形成及び細胞増殖または細胞のがん化と結び付く遺伝子（例えば、細胞分裂を刺激するタンパク質をコードするがん原遺伝子）、血管新生遺伝子/抗血管新生遺伝子、がん抑制遺伝子（細胞分裂を抑制するタンパク質をコードするもの）、がんの増殖及び/またはがんの遊走と結び付くタンパク質をコードする遺伝子、ならびに自殺遺伝子（アポトーシスまたは他の形態の細胞死を誘導するもの）、特に、急速に分裂する細胞に最も活性な自殺遺伝子、を標的とする薬剤が含まれる。

20

#### 【0131】

腫瘍形成及び/または細胞のがん化と結び付く遺伝子の例としては、MLL融合遺伝子、BCR-ABL、TEL-AML1、EWS-FLI1、TLS-FUS、PAX3-FKHR、Bcl-2、AML1-ETO、AML1-MTG8、Ras、FosPDGF、RET、APC、NF-1、Rb、p53、MDM2、及び同様のもの、過剰発現遺伝子（多剤耐性遺伝子など）、サイクリン、ベータ-カテニン、テロメラーゼ遺伝子、c-myc、n-myc、Bcl-2、Erb-B1、及びErb-B2、ならびに変異遺伝子（Ras、Mos、Raf、及びMetなど）が挙げられる。がん抑制遺伝子の例としては、限定されないが、p53、p21、RB1、WT1、NF1、VHL、APC、DAPキナーゼ、p16、ARF、ニューロフィブロミン、及びPTENが挙げられる。抗がん治療において有用な核酸薬剤による標的となり得る遺伝子の例としては、がんの遊走と結び付くタンパク質（インテグリン、セレクチン、及びメタロプロテイナーゼなど）をコードする遺伝子、新たな血管の形成を促進するタンパク質（血管内皮増殖因子（VEGF）またはVEGFrなどをコードする抗血管新生遺伝子、血管新生を抑制するタンパク質（エンドスタチン、アンジオスタチン、及びVEGF-R2などをコードする抗血管新生遺伝子、ならびにインターロイキン、インターフェロン、線維芽細胞増殖因子（-FGF及び-FGF）、インスリン様増殖因子（例えば、IGF-1及びIGF-2）、血小板由来増殖因子（PDGF）、腫瘍壊死因子（TNF）、形質転換増殖因子（例えば、TGF-及びTGF-）、上皮増殖因子（EGF）、ケラチノサイト増殖因子（KGF）、幹細胞因子及びその受容体c-Kit（SCF/c-Kit）リガンド、CD40L/CD40、VLA-4、VCAM-1、ICAM-1/LFA-1、ヒアルリン（hyalurin）/CD44、ならびに同様のものなどのタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。当業者なら認識するであろうが、上述の例は、排他的なものではない。

30

40

#### 【0132】

発明における使用に適した核酸薬剤は、さまざまな用途のいずれも有し得、こうした用途には、例えば、抗がん部分または他の治療部分、プローブ、プライマーなどとしての用途が含まれる。核酸薬剤は、酵素活性（例えば、リボザイム活性）、遺伝子発現抑制活性（例えば、アンチセンス薬剤もしくはsiRNA薬剤などとしてのもの）、及び/または

50

他の活性を有し得る。核酸薬剤は、それ自体が活性を有し得るか、あるいは活性な核酸薬剤を送達するベクター（例えば、送達される核酸の複製及び／または転写を介すもの）であり得る。本明細書の目的では、そのようなベクター核酸は、それ自体が治療活性を有さないとしても、治療的に活性な薬剤をコードするか、またはその他の様式で送達するのであれば、「治療部分」であると考えられる。

#### 【0133】

ある特定の実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、アンチセンス化合物を含む核酸治療部分、またはアンチセンス化合物をコードする核酸治療部分を含む。「アンチセンス化合物またはアンチセンス薬剤」、「アンチセンスオリゴマー」、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」、及び「アンチセンスオリゴヌクレオチドアナログ」という用語は、本明細書で互換的に使用され、ワトソン・クリック塩基対形成によってRNAにおける標的配列にアンチセンス化合物がハイブリダイゼーションすることで、標的配列内にRNAオリゴマーヘテロ二本鎖を形成することを可能にするヌクレオチド塩基配列及びサブユニット間骨格を指す。オリゴマーは、標的配列内に正確な配列相補性を有するか、または似通った相補性を有し得る。そのようなアンチセンスオリゴマーは、標的配列を含むmRNAの翻訳を遮断もしくは抑制するか、または遺伝子転写を抑制し得る。アンチセンスオリゴマーは、二本鎖配列または一本鎖配列に結合し得る。

#### 【0134】

本発明の実施における使用に適したアンチセンスオリゴヌクレオチドの例としては、例えば、下記の概説において言及されるものが挙げられる：R. A. Stahel et al., Lung Cancer, 2003, 41: S81 - S88、K. F. Pirollo et al., Pharmacol. Ther., 2003, 99: 55 - 77、A. C. Stephens and R. P. Rivers, Curr. Opin. Mol. Ther., 2003, 5: 118 - 122、N. M. Dean and C. F. Bennett, Oncogene, 2003, 22: 9087 - 9096、N. Schiavone et al., Curr. Pharm. Des., 2004, 10: 769 - 784、L. Vidal et al., Eur. J. Cancer, 2005, 41: 2812 - 2818、T. Aboul-Fadi, Curr. Med. Chem., 2005, 12: 2193 - 2214、M. E. Gleave and B. P. Monia, Nat. Rev. Cancer, 2005, 5: 468 - 479、Y. S. Cho-Chung, Curr. Pharm. Des., 2005, 11: 2811 - 2823、E. Rayburn et al., Lett. Drug Design & Discov., 2005, 2: 1 - 18、E. R. Rayburn et al., Expert Opin. Emerg. Drugs, 2006, 11: 337 - 352、I. Tamm and M. Wagner, Mol. Biotechnol., 2006, 33: 221 - 238（これらの文献はそれぞれ、その全体が参照によって組み込まれる）。

#### 【0135】

適切なアンチセンスオリゴヌクレオチドの例としては、例えば、bc1-2のmRNAの開始コドン領域へと標的化されたホスホロチオエートオリゴマーであるオブリメルセンナトリウム（Genta, Inc., Berkeley Heights, N. J.によって開発されたGenasense（商標）またはG31239としても知られる）が挙げられる。Bc1-2は、アポトーシスの強力な阻害物質であり、濾胞性リンパ腫、乳癌、結腸癌、前立腺癌、及び中悪性度／高悪性度リンパ腫を含む、多くのがんにおいて過剰発現する（C. A. Stein et al., Semin. Oncol., 2005, 32: 563 - 573、S. R. Frankel, Semin. Oncol., 2003, 30: 300 - 304）。他の適切なアンチセンスオリゴヌクレオチドには、cAMP依存性タンパク質キナーゼA（PKA）に対する骨格混在型オリゴヌクレオチドであるGEM-231（HYB0165、Hybridon, Inc., Cambridge, Mass.）（S. Goel et al., Clin. Cancer Res., 2003, 9: 4069 - 4076）、PKCアルファのアンチセンス阻害剤であるAffinita

k (ISIS 3521 または アプリノカルセン、ISIS pharmaceuticals, Inc., Carlsbad, Calif.)、細胞周期、組織リモデリング、脂質輸送、及び細胞死の制御に関与し、乳癌、前立腺癌、及び結腸癌において過剰発現する糖タンパク質であるクラスタリンに対する 2'-メトキシエチル修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドである OGX-011 (ISIS 112989、ISIS Pharmaceuticals, Inc.)、c-raf-1 の mRNA の 3' 非翻訳領域の配列に相補的なホスホロチオエートオリゴヌクレオチドである ISIS 5132 (ISIS 112989、ISIS Pharmaceuticals, Inc.) (S. P. Henry et al., Anticancer Drug Des., 1997, 12: 409-420、B. P. Monia et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93: 15481-15484、C. M. Rudin et al., Clin. Cancer Res., 2001, 7: 1214-1220)、ヒト H-ras の mRNA 発現のホスホロチオエートオリゴヌクレオチドアンチセンス阻害剤である ISIS 2503 (ISIS Pharmaceuticals, Inc.) (J. Kurreck, Eur. J. Biochem., 2003, 270: 1628-1644)、アポトーシス経路の実質的部分を遮断する X 連鎖アポトーシス阻害タンパク質 (XIAP) を標的とするオリゴヌクレオチド (GEM 640 など) (AEG 35156、Aegera Therapeutics Inc. 及び Hybridon, Inc.)、またはアポトーシス阻害タンパク質 (IAP) である サバイピン を標的とするオリゴヌクレオチド (2'-O-メトキシエチルキメラオリゴヌクレオチドである ISIS 23722 など) (ISIS Pharmaceuticals, Inc.)、DNA メチルトランスフェラーゼを標的とする MG98、ならびにヒトリボヌクレオチド還元酵素の R2 小サブユニット成分の mRNA におけるコード領域に相補的な 20 マーのオリゴヌクレオチドである GTI-2040 (Lorus Therapeutics, Inc. Toronto, Canada) が含まれる。

#### 【0136】

他の適切なアンチセンスオリゴヌクレオチドには、Her-2/neu、c-Myb、c-Myc、及び c-Raf を標的として開発中のアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる (例えば、A. Biroccio et al., Oncogene, 2003, 22: 6579-6588、Y. Lee et al., Cancer Res., 2003, 63: 2802-2811、B. Lu et al., Cancer Res., 2004, 64: 2840-2845、K. F. Pirollo et al., Pharmacol. Ther., 2003, 99: 55-77、及び A. Rait et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 2003, 1002: 78-89 を参照のこと)。

#### 【0137】

ある特定の実施形態では、本発明において使用するためのクロロトキシン薬剤は、干渉 RNA 分子を含む核酸抗がん薬剤、または干渉 RNA 分子をコードする核酸抗がん薬剤を含む。「干渉 RNA」及び「干渉 RNA 分子」という用語は、本明細書で互換的に使用され、例えば RNA 干渉 (RNAi) を媒介することによって、配列特異的な様式で遺伝子発現を抑制もしくは下方制御するか、または遺伝子をサイレンシングし得る RNA 分子を指す。RNA 干渉 (RNAi) は、相補的な標的一本鎖 mRNA の分解、及び対応する被翻訳配列の「サイレンシング」を誘導する二本鎖 RNA (dsRNA) によって引き起こされる進化的に保存された配列特異的な機構である (McManus and Sharp, 2002, Nature Rev. Genet., 2002, 3: 737)。RNAi は、より長い dsRNA 鎖が酵素的に切断されて、約 21~23 個のヌクレオチドの長さの生物学的に活性な「低分子干渉 RNA」(siRNA) 配列へと変換されることによって機能する (Elbashir et al., Genes Dev., 2001, 15: 188)。RNA 干渉は、がんの治療のための有望な手法として浮上している。

#### 【0138】

本明細書に記載の発明の実施における使用に適した干渉 RNA は、いくつかの形態のい

10

20

30

40

50

ずれにおいても提供され得る。例えば、干渉RNAは、単離された低分子干渉RNA ( siRNA )、二本鎖RNA ( dsRNA )、マイクロRNA ( miRNA )、または低分子ヘアピン型RNA ( shRNA ) のうちの1つまたは複数として提供され得る。

#### 【0139】

本発明における使用に適した干渉RNA分子の例としては、例えば、下記の概説において引用されるiRNAが挙げられる：O. Milhavet et al., Pharmacol. Rev., 2003, 55: 629 - 648、F. Bi et al., Curr. Gene Ther., 2003, 3: 411 - 417、P. Y. Lu et al., Curr. Opin. Mol. Ther., 2003, 5: 225 - 234、I. Friedrich et al., Semin. Cancer Biol., 2004, 14: 223 - 230、M. Izquierdo, Cancer Gene Ther., 2005, 12: 217 - 227、P. Y. Lu et al., Adv. Genet., 2005, 54: 117 - 142、G. R. Devi, Cancer Gene Ther., 2006, 13: 819 - 829、M. A. Behlke, Mol. Ther., 2006, 13: 644 - 670、及びL. N. Putral et al., Drug News Perspect., 2006, 19: 317 - 324 (これらの文献のそれぞれの内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる)。

#### 【0140】

適切な干渉RNA分子の他の例としては、限定されないが、p53干渉RNA (例えば、T. R. Brummelkamp et al., Science, 2002, 296: 550 - 553、M. T. Hemman et al., Nat. Genet., 2003, 33: 396 - 400)、慢性骨髄性白血病及び急性リンパ芽球性白血病の発症と結び付くbcr - abl融合を標的とする干渉RNA (例えば、M. Scherr et al., Blood, 2003, 101: 1566 - 1569、M. J. Li et al., Oligonucleotides, 2003, 13: 401 - 409)、未分化大細胞型リンパ腫の75%に見られ、がんの形成と結び付く構成的に活性なキナーゼの発現を引き起こすタンパク質であるNPM - ALKの発現を抑制する干渉RNA (U. Ritter et al., Oligonucleotides, 2003, 13: 365 - 373)、Raf - 1 (T. F. Lou et al., Oligonucleotides, 2003, 13: 313 - 324)、K - Ras (T. R. Brummelkamp et al., Cancer Cell, 2002, 2: 243 - 247)、erbB - 2 (G. Yang et al., J. Biol. Chem., 2004, 279: 4339 - 4345)などのがん遺伝子を標的とする干渉RNA、過剰発現するとT細胞因子標的遺伝子のトランス活性化 (結腸直腸癌における主ながん化事象であると考えられる) を引き起こすb - カテニンタンパク質を標的とする干渉RNA (M. van de Wetering et al., EMBO Rep., 2003, 4: 609 - 615)が挙げられる。

#### 【0141】

ある特定の実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、リボザイムである核酸治療部分を含む。本明細書で使用される「リボザイム」という用語は、標的的特異的な様式で他のRNA分子を切断することが可能な触媒RNA分子を指す。リボザイムは、目的遺伝子の任意の望ましくない産物の発現を下方制御するために使用され得る。本明細書に記載の発明の実施において使用され得るリボザイムの例としては、限定されないが、ANGIOZYME (商標) (RPI. 4610、Sima Therapeutics, Boulder, Colo.)、ヒト、マウス、及びラットの血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) - 1のmRNAの保存領域を標的とするリボザイム、ならびにHerzyme (Sima Therapeutics) が挙げられる。

#### 【0142】

v. 光増感剤

ある特定の実施形態では、クロロトキシシン薬剤に含められる部分は、光線力学的治療 (PDT) において使用される光増感剤を含む。PDTでは、光増感剤が患者に局所投与ま

10

20

30

40

50

たは全身投与された後、治療対象の組織または臓器において光増感剤が吸収する光が照射される。光増感剤が光を吸収すると、細胞に有害な反応種（例えば、ラジカル）が生じる。効力を最大化するために、光増感剤は、典型的には、投与に適する形態をとるだけでなく、標的部位において細胞内移行を受け易くあり、この細胞内移行に際し、正常組織を上回る何らかの程度の選択性を伴い得ることが多い形態もとる。

#### 【0143】

いくつかの光増感剤（例えば、Photofrin（登録商標）、QLT, Inc., Vancouver, BC, Canada）は、単純な水溶液の一部としての送達が可能ではあるものの、そのような水溶液は、疎水性の光増感剤（テトラピロールベースの構造またはポリピロールベースの構造を有するものなど）には適し得ない。こうした薬物は、分子スタッキングによって凝集するという固有の傾向を有しており、こうした凝集が生じると、光増感プロセスの効率が著しく低下する（Siggel et al., J. Phys. Chem., 1996, 100: 2070 - 2075）。凝集を最小化するための手法には、リポソーム製剤（例えば、ベンゾポルフィリン誘導体—酸A、BPDMA、Verteporfin（登録商標）（QLT, Inc., Vancouver, Canada）、及び亜鉛フタロシアニン（CIBA-Geigy, Ltd., Basel, Switzerland）のためのもの）、ならびに生体適合性のブロックコポリマー（Peterson et al., Cancer Res., 1996, 56: 3980 - 3985）及び/または抗体（Omelyanenko et al., Int. J. Cancer, 1998, 75: 600 - 608）との光増感剤の複合体化が含まれる。

#### 【0144】

光増感剤と結び付いたクロロトキシンポリペプチドを含むクロロトキシン薬剤は、PDTにおける新たな送達系として使用され得る。本発明による光増感剤の送達は、光増感剤の凝集を低減することに加えて、他にも利点をもたらすものであり、こうした他の利点は、標的組織/標的臓器に対する特異性の向上、及び光増感剤の細胞内移行に対する特異性の向上などである。

#### 【0145】

本発明における使用に適した光増感剤には、PDTにおいて有用な光増感特性を有するさまざまな合成分子及び天然起源の分子がいずれも含まれる。ある特定の実施形態では、光増感剤の吸収スペクトルは、可視域に見られ、典型的には350 nm ~ 1200 nm、好ましくは400 nm ~ 900 nm（例えば、600 nm ~ 900 nm）に見られ。本発明による毒素とのカップリングが可能な適切な光増感剤には、限定されないが、ポルフィリン及びポルフィリン誘導体（例えば、クロリン、バクテリオクロリン、イソバクテリオクロリン、フタロシアニン、及びナフタロシアニン）、メタロポルフィリン、メタロフタロシアニン、アンゲリシン、カルコゲナピリリウム（chalcogenapyrillium）色素、クロロフィル、クマリン、フラビン及び関連化合物（アロキサジン及びリボフラビンなど）、フラベン、フェオホルバインド、ピロフェオホルバインド、シアニン（例えば、メロシアニン540）、フェオフィチン、サフィリン、テキサフィリン、プルプリン、ポルフィセン、フェノチアジニウム、メチレンブルー誘導体、ナフタルイミド、ナイルブルー誘導体、キノン、ペリレンキノン（例えば、ヒペリシン、ヒポクレリン、及びセルコスポリン）、ソラレン、キノン、レチノイド、ローダミン、チオフェン、バーディン（verdian）、キサンテン色素（例えば、エオシン、エリスロシン、ローズベンガル）、ポルフィリンの二量体形態及びオリゴマー形態、ならびにプロドラッグ（5-アミノレブリン酸など）（R.W. Redmond and J.N. Gamlin, Photochem. Photobiol., 1999, 70: 391 - 475）が含まれる。

#### 【0146】

本発明における使用に適した光増感剤の例としては、米国特許第5,171,741号、同5,171,749号、同5,173,504号、同5,308,608号、同5,405,957号、同5,512,675号、同5,726,304号、同5,831,088号、同5,929,105号、及び同5,880,145号に記載のものが挙げら

れる（これらの文献のそれぞれの内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）。

#### 【0147】

##### v i . 放射線増感剤

ある特定の実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、放射線増感剤を含む。本明細書で用いられる「放射線増感剤」という用語は、放射線療法に対するがん細胞の感受性を高める分子、化合物、または薬剤を指す。放射線療法を受けている患者に放射線増感剤が投与されると、一般に、放射線療法の効果が強化される。理想的には、放射線増感剤は、標的細胞に対してのみその機能を発揮する。使い勝手を向上させるには、放射線増感剤は、仮に全身性に投与されるとしても、標的細胞を見つけ出すことも可能であるべきである。しかしながら、現在利用可能な放射線増感剤は、典型的には、腫瘍に選択的ではなく、哺乳類の体内で拡散によって広がってしまうものである。本発明において使用するためのクロロトキシシン薬剤は、放射線増感剤のための新たな送達系として使用され得る。

10

#### 【0148】

当該技術分野では、さまざまな放射線増感剤が知られている。本発明における使用に適した放射線増感剤の例としては、限定されないが、パクリタキセル（TAXOL（登録商標））、カルボプラチン、シスプラチン、及びオキサリプラチン（Amorino et al., Radiat. Oncol. Investig., 1999; 7: 343 - 352、Choy, Oncology, 1999, 13: 22 - 38、Safran et al., Cancer Invest., 2001, 19: 1 - 7、Dionet et al., Anticancer Res., 2002, 22: 721 - 725、Civida lli et al., Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2002, 52: 1092 - 1098）、ゲムシタピン（Gemzar（登録商標））（Choy, Oncology, 2000, 14: 7 - 14、Mornex and Girard, Annals of Oncology, 2006, 17: 1743 - 1747）、エタニダゾール（Nitrolmidazole（登録商標））（Inanami et al., Int. J. Radiat. Biol., 2002, 78: 267 - 274）、ミソニダゾール（Tamulevicius et al., Br. J. Radiology, 1981, 54: 318 - 324、Palcic et al., Radiat. Res., 1984, 100: 340 - 347）、チラパザミン（Masunaga et al., Br. J. Radiol., 2006, 79: 991 - 998、Rischin et al., J. Clin. Oncol., 2001, 19: 535 - 542、Shulman et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1999, 44: 349 - 353）、ならびに核酸塩基誘導体（例えば、ハロゲン化されたプリンまたはピリミジン（5 - フルオロデオキシウリジンなど））（Buchholz et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1995, 32: 1053 - 1058）が挙げられる。

20

30

#### 【0149】

##### v i i . 放射性同位体

ある特定の実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、放射性同位体を含む。適切な放射性同位体の例としては、がん部位に局在すると細胞を破壊する任意の 線放射体、 線放射体、及び 線放射体が挙げられる（S. E. Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R. W. Baldwin et al. (Eds.), Academic Press, 1985）。そのような放射性同位体の例としては、限定されないが、ヨウ素 - 131 ( $^{131}\text{I}$ )、ヨウ素 - 125 ( $^{125}\text{I}$ )、ビスマス - 212 ( $^{212}\text{Bi}$ )、ビスマス - 213 ( $^{213}\text{Bi}$ )、アスタチン - 211 ( $^{211}\text{At}$ )、レニウム - 186 ( $^{186}\text{Re}$ )、レニウム - 188 ( $^{188}\text{Re}$ )、リ

40

50

ン - 32 ( $^{32}\text{P}$ )、イットリウム - 90 ( $^{90}\text{Y}$ )、サマリウム - 153 ( $^{153}\text{Sm}$ )、及びルテチウム - 177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) が挙げられる。

#### 【0150】

##### viii. スーパー抗原

ある特定の実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、スーパー抗原またはその生物学的に活性な部分を含む。スーパー抗原は、T細胞集団の大部分を活性化することに極めて有効な細菌タンパク質及びウイルスタンパク質の一群を構成する。スーパー抗原は、プロセッシングを受けることなく主要組織適合遺伝子複合体(MHC)に直接的に結合する。実際、スーパー抗原は、MHCクラスII分子上の抗原結合溝の外側にプロセッシングなしの状態

10

#### 【0151】

スーパー抗原ベースのがん治療手法は、固形腫瘍の治療において有用であり得る。この手法では、標的化部分(例えば、抗体または抗体断片)は、スーパー抗原と複合体化されることで、標的化スーパー抗原を与える。がん関連抗原を抗体または抗体断片が認識するのであれば、標的化スーパー抗原は、がん細胞に結合し、スーパー抗原で活性化した細胞傷害性T細胞が、スーパー抗原依存性の細胞傷害作用によってがん細胞を直接的に死滅させるように導き得る(例えば、Sogaard et al. (1996) "Antibody-targeted superantigens in cancer immunotherapy," Immunotechnology, 2(3): 151-162 (当該文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる)を参照のこと)。

20

#### 【0152】

スーパー抗原ベースのがん治療法は、いくらかの成功を収めている。例えば、野生型ブドウ球菌エンテロトキシシンA(SEA)との融合タンパク質は、結腸直腸癌及び膵癌の臨床試験において調べられており(Giantonio et al., J. Clin. Oncol., 1997, 15: 1994-2007, Alpaugh et al., Clin. Cancer Res., 1998, 4: 1903-1914, Cheng et al., J. Clin. Oncol., 2004, 22: 602-609 (これらの文献のそれぞれの内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる))、エンテロトキシシン遺伝子クラスター(egc)のブドウ球菌スーパー抗原は、非小細胞肺癌の治療向けに試験されており(Terman et al., Clin. Chest Med., 2006, 27: 321-324 (当該文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる))、ブドウ球菌エンテロトキシシンBは、表在性膀胱癌の膀胱内免疫療法向けに評価されている(Perabo et al., Int. J. Cancer, 2005, 115: 591-598 (当該文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる))。

30

#### 【0153】

スーパー抗原またはその生物学的に活性な部分をクロロトキシシンポリペプチドと結び付けることで、本発明によるクロロトキシシン薬剤を形成させ、本明細書に記載の治療(例えば、抗がん治療)において使用することができる。

#### 【0154】

本発明における使用に適したスーパー抗原の例としては、限定されないが、ブドウ球菌エンテロトキシシン(SE)(例えば、ブドウ球菌エンテロトキシシンA(SEA)またはブドウ球菌エンテロトキシシンE(SEE))、Streptococcus pyogenes外毒素(SPE)、Staphylococcus aureus毒素性ショック症候群毒素(TSST-1)、連鎖球菌分裂促進性外毒素(SME)、連鎖球菌スーパー抗原(SSA)、及びエンテロトキシシン遺伝子クラスターのブドウ球菌スーパー抗原が挙げられる。当業者には知られることであるが、上記のスーパー抗原の三次元構造は、Protein Data Bankから入手可能である。同様に、上記のスーパー抗原及び他のスーパー抗原の核酸配列及びアミノ酸配列は、GenBankから入手可能である。

40

#### 【0155】

50

## ix . プロドラッグ活性化酵素

ある特定の実施形態では、本発明において使用するためのクロロトキシシン薬剤は、指向化酵素プロドラッグ治療において使用され得る。指向化酵素プロドラッグ治療手法では、指向化 / 標的化酵素及びプロドラッグが対象に投与され、対象の体の一部に標的化酵素が特異的に局在化し、その場所で標的化酵素がプロドラッグを活性薬物に変換する。プロドラッグは、一段階で活性薬物に（標的化酵素によって）変換されるか、または複数段階で活性薬物に変換され得る。例えば、プロドラッグは、標的化酵素によって活性薬物の前駆体に変換され得る。次に、前駆体は、活性薬物に変換され得、この変換は、例えば、1つもしくは複数の追加の標的化酵素の酵素活性、対象に投与される1つもしくは複数の非標的化酵素の酵素活性、対象に内在するか、もしくは対象の標的部位に内在する1つもしくは複数の酵素（例えば、プロテアーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、もしくはポリメラーゼ）の酵素活性、対象に投与される薬剤、及び / または酵素的に触媒されない化学的プロセス（例えば、酸化、加水分解、異性化、エピマー化など）によって行われる。

## 【0156】

目的部位への酵素の指向化 / 標的化にはさまざまな手法が使用されている。例えば、ADEPT（抗体指向化酵素プロドラッグ治療）では、がん抗原に対して設計 / 開発された抗体が酵素に連結され、対象に注射されることで、酵素ががんを選択的に結合する。がんの酵素レベルと正常組織の酵素レベルと差異判別が十分であるとき、対象にプロドラッグが投与される。プロドラッグは、その活性形態へと、がん内にのみ存在する酵素によって変換される。選択性は、抗体のがん特異性によって達成されると共に、がんの酵素レベルと正常組織の酵素レベルとの間の差異が大きくなるまでプロドラッグの投与を遅らせることによって達成される。早期臨床試験は、有望なものであり、ADEPTが、がん関連抗体またはがん特異的抗体が知られるすべての固形がんに対して有効な治療となり得ることを示している。がんへの標的化は、プロドラッグ活性化酵素をコードする遺伝子でも行われている。この手法は、ウイルス指向化酵素プロドラッグ治療（VDEPT）、またはより一般的には、GDEPT（遺伝子指向化酵素プロドラッグ治療）と呼ばれており、研究室系では良好な結果が示されている。他のバージョンの指向化酵素プロドラッグ治療には、PDEPT（ポリマー指向化酵素プロドラッグ治療）、LEAPT（レクチン指向化酵素活性化プロドラッグ治療）、及びCDEPT（クロストリジウム指向化酵素プロドラッグ治療）が含まれる。本発明によるクロロトキシシン薬剤は、クロロトキシシンポリペプチドと結び付いたプロドラッグ活性化酵素を含むものなら、同様の様式で使用する事ができる。

## 【0157】

本発明における使用に適した酵素 / プロドラッグ / 活性薬物の組み合わせの例は、限定されないが、例えば、Bagshaw et al., Current Opinion in Immunology, 1999, 11: 579 - 583、Wilman, "Prodrugs in Cancer Therapy," Biochemical Society Transactions, 14: 375 - 382, 615<sup>th</sup> Meeting, Belfast, 1986、Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach To Targeted Drug Delivery," in "Directed Drug Delivery," Borchardt et al., (Eds), pp. 247 - 267 (Humana Press, 1985)に記載されている。酵素 / プロドラッグ / 活性抗がん薬物の組み合わせの例は、限定されないが、例えば、Rooseboom et al., Pharmacol. Reviews, 2004, 56: 53 - 102に記載されている。

## 【0158】

プロドラッグ活性化酵素の例としては、限定されないが、ニトロ還元酵素、チトクロムP450、プリン - スクレオシドホスホリラーゼ、チミジンキナーゼ、アルカリホスファターゼ、 - グルクロニダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、ペニシリンアミダーゼ、 - ラクタマーゼ、シトシンデアミナーゼ、及びメチオニンガンマ - リアーゼが挙げられる。



## 【0159】

プロドラッグ活性化酵素によってプロドラッグが活性化することによってインビボで形成され得る抗がん薬物の例としては、限定されないが、5 - (アジリジン - 1 - イル) - 4 - ヒドロキシル - アミノ - 2 - ニトロ - ベンズアミド、イソホスホロアミドマスタード、ホスホロアミドマスタード、2 - フルオロアデニン、6 - メチルプリン、ガンシクロビル - ミリン酸ヌクレオチド、エトポシド、マイトマイシンC、p - [N, N - ビス(2 - クロロエチル)アミノ]フェノール(POM)、ドキシソルピシン、オキサゾリジノン、9 - アミノカンプトテシン、マスタード、メトトレキサート、安息香酸マスタード、ドキシソルピシン、アドリアマイシン、ダウノマイシン、カミノマイシン(caminomycin)、プレオマイシン、エスペラマイシン、メルファラン、パリトキシシン、4 - デスアセチルビンブラスチン - 3 - カルボン酸ヒドラジド、フェニレンジアミンマスタード、4' - カルボキシフタレート(1, 2 - シクロヘキサン - ジアミン)白金、タキソール、5 - フルオロウラシル、メチルセレノール、及びカルボノチオニックジフルオリド(carbonothionic difluoride)が挙げられる。

## 【0160】

## b. 抗血管新生薬剤

ある特定の実施形態では、本発明において使用するためのクロロトキシシン薬剤に含められる治療(例えば、抗がん)薬剤には、抗血管新生薬剤が含まれる。本発明における使用に適した抗血管新生薬剤には、血管新生プロセス、または既存血管から生じることによって新たな血管が形成されるプロセス、を遮断、抑制、鈍化、または低減する任意の分子、化合物、または因子が含まれる。そのような分子、化合物、または因子は、血管新生に関与するステップのいずれかを遮断、抑制、鈍化、または低減することによって血管新生を遮断し得るものであり、こうしたステップには、(限定されないが)(1)起点となる血管の膜が溶解するステップ、(2)内皮細胞が遊走及び増殖するステップ、ならびに(3)遊走細胞によって新たな血管系が形成されるステップが含まれる。

## 【0161】

抗血管新生薬剤の例としては、限定されないが、ベバシズマブ(AVASTIN(登録商標))、セレコキシブ(CELEBREX(登録商標))エンドスタチン、サリドマイド、EMD121974(Cilengitide)、TNP - 470、スクアラミン、コンプレタスタチンA4、インターフェロン - 、抗VEGF抗体、SU5416、SU6668、PTK787/2K22584、マリミスタール(Marimistal)、AG3340、COL - 3、ネオバスタット、及びBMS - 275291が挙げられる。

## 【0162】

抗血管新生薬剤は、さまざまな治療状況において使用することができ、こうした治療状況には、限定されないが、抗がん治療、及び黄斑変性の治療が含まれる。

## 【0163】

当業者なら認識するであろうが、本明細書で引用される特定の治療部分例は、本明細書に記載の発明の実施における使用に適した治療部分をごく少数示すものにすぎない。

## 【0164】

## 2. 検出可能部分

ある特定の実施形態では、提供されるクロロトキシシン薬剤は、1つまたは複数の検出可能部分を含んでおり、すなわち、クロロトキシシンポリペプチドは、1つまたは複数のそのような部分で「標識」されている。いくつかのそのような実施形態では、そのようなクロロトキシシンポリペプチドは、診断用途または画像化用途において有用である。

## 【0165】

検出可能部分は多種多様であり、こうした検出可能部分のいずれも、本明細書に記載の実施形態において使用され得る。適切な検出可能部分には、限定されないが、さまざまなリガンド、放射性核種、蛍光色素、化学発光薬剤(例えば、アクリジニウムエステル、安定化ジオキセタン、及び同様のものなど)、生物発光薬剤、分光的に分解可能な無機蛍光半導体ナノ結晶(すなわち、量子ドット)、微粒子、金属ナノ粒子(例えば、金、銀、銅

10

20

30

40

50

、白金など)、ナノクラスター、常磁性金属イオン、酵素、比色標識(例えば、色素、金コロイド、及び同様のものなど)、ビオチン、ジオキシゲニン(dioxigenin)、ハプテン、ならびに抗血清またはモノクローナル抗体が利用可能なタンパク質が含まれる。

#### 【0166】

a. 放射性及び/または常磁性の同位体またはイオン

ある特定の実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、放射性及び/または常磁性の同位体またはイオンで標識される。例えば、クロロトキシンポリペプチドは、同位体的に標識され得る(すなわち、天然に通常見られる原子質量もしくは質量数とは異なる原子質量もしくは質量数を有する原子によって交換されている1つもしくは複数の原子を含み得る)か、または同位体とクロロトキシンポリペプチドとが結び付けられ得る。クロロトキシンポリペプチドに組み込まれ得る同位体の例としては、限定されないが、水素、炭素、フッ素、リン、銅、ガリウム、イットリウム、テクネチウム、インジウム、ヨウ素、レニウム、タリウム、ビスマス、アスタチン、サマリウム、及びルテチウムの同位体(すなわち、 $^3\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{mTc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{129}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{135}\text{I}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{187}\text{Re}$ 、 $^{201}\text{Tl}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ )が挙げられる。

#### 【0167】

ある特定の実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、単一光子放射断層撮影(SPECT)または陽電子放射断層撮影(PET)によって検出可能な放射性同位体を含む。そのような放射性核種の例としては、限定されないが、ヨウ素-131( $^{131}\text{I}$ )、ヨウ素125( $^{125}\text{I}$ )、ビスマス-212( $^{212}\text{Bi}$ )、ビスマス-213( $^{213}\text{Bi}$ )、アスタチン-221( $^{221}\text{At}$ )、銅-67( $^{67}\text{Cu}$ )、銅-64( $^{64}\text{Cu}$ )、レニウム-186( $^{186}\text{Re}$ )、レニウム-188( $^{188}\text{Re}$ )、リン-32( $^{32}\text{P}$ )、サマリウム-153( $^{153}\text{Sm}$ )、ルテチウム-177( $^{177}\text{Lu}$ )、テクネチウム-99m( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )、ガリウム-67( $^{67}\text{Ga}$ )、インジウム-111( $^{111}\text{In}$ )、及びタリウム-201( $^{201}\text{Tl}$ )が挙げられる。

#### 【0168】

ある特定の実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、ガンマカメラによって検出可能な放射性同位体で標識される。そのような放射性同位体の例としては、限定されないが、ヨウ素-131( $^{131}\text{I}$ )及びテクネチウム-99m( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )が挙げられる。

#### 【0169】

ある特定の実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、磁気共鳴画像法(MRI)における良好な造影増強剤である常磁性金属イオンで標識される。そのような常磁性金属イオンの例としては、限定されないが、ガドリニウムIII( $\text{Gd}^{3+}$ )、クロムIII( $\text{Cr}^{3+}$ )、ジスプロシウムIII( $\text{Dy}^{3+}$ )、鉄III( $\text{Fe}^{3+}$ )、マンガンII( $\text{Mn}^{2+}$ )、及びイッテルビウムIII( $\text{Yb}^{3+}$ )が挙げられる。ある特定の実施形態では、標識部分は、ガドリニウムIII( $\text{Gd}^{3+}$ )を含む。ガドリニウムは、MRI用にFDAが認可した造影薬剤であり、この造影薬剤は、異常組織に蓄積することで、こうした異常領域の明度を磁気共鳴画像上で非常に高める(増強する)。ガドリニウムは、体のさまざまな領域、具体的には脳において正常組織と異常組織との間のコントラストを高めることが知られている。

#### 【0170】

ある特定の実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、核磁気共鳴分光法(MRS)によって検出可能な安定常磁性同位体で標識される。適切な安定常磁性同位体の例としては、限定されないが、炭素-13( $^{13}\text{C}$ )及びフッ素-19( $^{19}\text{F}$ )が挙げられる。

#### 【0171】

いくつかの実施形態では、金属同位体は、キレート化によってクロロトキシンポリペプチドと非共有結合で結び付けられる。キレート化の例としては、クロロトキシンポリペプチドと融合したポリHis領域への金属同位体のキレート化が挙げられる。

## 【0172】

いくつかの実施形態では、ガドリニウム (Gd) などの金属は、本明細書に記載のように、共有結合形成またはキレート化を介してクロロトキシンポリペプチドに組み込まれる。

## 【0173】

## b. 蛍光色素

ある特定の実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、蛍光色素で標識される。多種多様な化学構造及び物理的特徴を有する蛍光色素が多数知られており、こうした蛍光色素は、本明細書に記載の発明の実施における使用に適する。適切な蛍光色素には、限定されないが、フルオレセイン及びフルオレセイン色素 (例えば、フルオレセインイソチオシアニンまたはFITC、ナフトフルオレセイン、4', 5'-ジクロロ-2', 7'-ジメトキシ 10 シフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、またはFAMなど)、カルボシアニン、メロシアニン、スチリル色素、オキソノール色素、フィコエリトリン、エリスロシン、エオシン、ローダミン色素 (例えば、カルボキシテトラメチル-ローダミンまたはTAMRA、カルボキシローダミン6G、カルボキシ-X-ローダミン (ROX)、リサミンローダミンB、ローダミン6G、ローダミングリーン、ローダミンレッド、テトラメチルローダミン (TMR) など)、クマリン及びクマリン色素 (例えば、メトキシクマリン、ジアルキルアミノクマリン、ヒドロキシクマリン、アミノメチルクマリン (AMCA) など)、Oregon Green色素 (例えば、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514 など)、Texas Red、Texas Red-X、SPECTRUM RED (商標)、SPECTRUM GR 20 EEN (商標)、シアニン色素 (例えば、CY-3 (商標)、CY-5 (商標)、CY-3.5 (商標)、CY-5.5 (商標) など)、ALEXA FLUOR (商標) 色素 (例えば、ALEXA FLUOR (商標) 350、ALEXA FLUOR (商標) 488、ALEXA FLUOR (商標) 532、ALEXA FLUOR (商標) 546、ALEXA FLUOR (商標) 568、ALEXA FLUOR (商標) 594、ALEXA FLUOR (商標) 633、ALEXA FLUOR (商標) 660、ALEXA FLUOR (商標) 680 など)、BODIPY (商標) 色素 (例えば、BODIPY (商標) FL、BODIPY (商標) R6G、BODIPY (商標) TMR、BODIPY (商標) TR、BODIPY (商標) 530/550、BODIPY (商標) 558/568、BODIPY (商標) 564/570、BODIPY (商標) 576/589、BODI 30 PY (商標) 581/591、BODIPY (商標) 630/650、BODIPY (商標) 650/665 など)、IRDye (例えば、IRD40、IRD700、IRD800 など)、ならびに同様のものが含まれる。適切な蛍光色素の追加例、ならびに蛍光色素を他の化学的実体 (タンパク質及びペプチドなど) にカップリングするための方法の追加例については、例えば、“The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products,” 9th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregonを参照のこと。蛍光標識薬剤の好ましい特性には、モル吸収係数が高いこと、蛍光量子収率が高いこと、及び光安定性を有することが含まれる。いくつかの実施形態では、標識フルオロフォアは、紫外スペクトル領域内 (すなわち、400 nm未満) ではなく、可視スペクトル領域内 (すなわち、400 ~ 750 nm) に吸収波長及び放出波長を有する。 40

## 【0174】

## c. 標的化部分

ある特定の実施形態では、本発明において使用するためのクロロトキシン薬剤は、1つまたは複数の標的化部分と結び付いたクロロトキシンポリペプチドを含む。

## 【0175】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の標的化部分は、抗体である。抗体は、がん細胞に結合する抗体であり得る。抗体は、がんのバイオマーカーに結合する抗体であり得る。がんのバイオマーカーには、例えば、細胞周期制御、DNA複製、転写、シグナル伝達、細胞増殖、浸潤、タンパク質分解、または転移に関与するタンパク質及び遺伝子が含 50

まれる。がんのバイオマーカーには、例えば、下記のタンパク質が含まれる：アルファ - フェトプロテイン、がん胎児性抗原、上皮増殖因子受容体、カリクレイン 3（前立腺特異的抗原）、血管内皮増殖因子 A、V E G F、アルブミン、C A 1 2 5、カルシトニン、クロモグラニン A（副甲状腺分泌タンパク質 1）、コルチコトロピン - A C T H 含有リポトロピン、エストロゲン受容体 1、ガストリン、プロゲステロン受容体、プロラクチン、S 1 0 0 アルファ鎖、ソマトスタチン、サイログロブリン、V - e r b - b 2、H e r 2 / n e u、モノクローナル抗体 K i - 6 7 によって同定される抗原、B 細胞性 C L L / リンパ腫 2、B C L 2 関連 X タンパク質、ベータ - 2 - ミクログロブリン、若年性乳癌 1、C A 1 5 . 3、C A 1 9 . 9、カドヘリン 1 1 型 E - カドヘリン（上皮）、カスパーゼ 3、C D 4 4 抗原、細胞腫瘍抗原 p 5 3、凝固因子 I I、プロトロンビン、コロニー刺激因子 2（顆粒球 - マクロファージ）、コロニー刺激因子 3（顆粒球）、C 反応性タンパク質、サイクリン D 1、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤 1、p 2 1、エリスロポエチン、フィブリノーゲンアルファ / アルファ - E 鎖、卵巣刺激ホルモン、ガンマエノラーゼ、インスリン、インターフェロンガンマ、インターロイキン 2、インターロイキン 6、k - r a s、ネブリライシン、C D 1 0、トランスフェリン、トリプシン、腫瘍壊死因子（T N F - アルファ）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 6、f a s、フォン・ヴィレブランド因子、ケモカインリガンド 5（C C L 5）、キチナーゼ - 3 様タンパク質 1、Y K L - 4 0、絨毛性ゴナドトロピンベータ鎖、コロニー刺激因子 1（マクロファージ）、ハプトグロビン - 1、肝細胞増殖因子、インヒビン、インターフェロン - アルファ / ベータ受容体アルファ鎖、インターフェロン - アルファ / ベータ受容体ベータ鎖、カリクレイン 1 0、カリクレイン 1 1、カリクレイン 6、マトリックスメタロプロテイナーゼ 3、低分子誘導性サイトカイン A 2 1（C C L 2 1）、可溶性 I L - 2 R アルファ、ソマトトロピン成長因子、成長ホルモン、若年性乳癌 2、カテニンベータ 1、カテプシン D、C D 1 5、デスミン、D N A - （脱プリン部位または脱ピリミジン部位）リアーゼ、A P E X、ルトロピンベータ鎖、黄体形成ホルモン、副甲状腺ホルモン、増殖細胞核抗原、腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー 8（C D 3 0 リガンド）、V - m y c 骨髄球腫症ウイルス癌遺伝子ホモログ（トリ）、腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー 8（C D 3 0）、1 7 ベータ - 水酸化ステロイドデヒドロゲナーゼ 1 型（1 7 H S D 1）、酸ホスファターゼ前立腺、アドレノメデュリン、アルドラーゼ A、骨特異的アルカリホスファターゼ、胎盤型アルカリホスファターゼ、アルファ - 1 - 酸性糖タンパク質 1、オロソムコイド、アルファ - 1 - アンチトリプシン、アルファ - 2 - H S - 糖タンパク質、アルファ - 2 - マクログロブリン、アルファ - ラクトアルブミン、アンギオゲニンリボヌクレアーゼ R N a s e A ファミリー 5、アンギオポエチン 1、アンギオポエチン 2、抗白血球プロテイナーゼ 1（A n t i l e u k o p r o t e i n a s e 1）、S L P I、アポリポタンパク質 A 1、アポリポタンパク質 A - I I、アポリポタンパク質 C - I、アポリポタンパク質 C - I I I、骨シアロタンパク質 I I、脳由来神経栄養因子、乳癌転移抑制因子 1、C A 2 7 . 2 9、C A 7 2 - 4、カテプシン B、C C ケモカイン 4、H C C - 4、C D 4 4 変異体 V 5 可溶性、セルロプラスミン、子宮頸癌 1 癌原遺伝子タンパク質 p 4 0、ケモカイン（C - C モチーフ）リガンド 4 低分子誘導性サイトカイン A 4（C C L 4）、M I P - 1 - ベータ、クローディン - 3、クローディン - 4、クラスタリン、凝固第 I I I 因子、凝固第 X I I I 因子 A 鎖、凝固第 X I I I 因子 B 鎖、I 型コラーゲン c 末端テロペプチド、補体第 3 成分、補体第 4 成分、補体第 7 成分、補体 H 因子関連タンパク質、サイクリン依存性キナーゼ 6、シクロオキシゲナーゼ - 2、シスタチン A、シスタチン B、シスタチン C、サイトケラチン 8、ジアゼパム結合阻害物質、エンドグリン、エンドセリン 1、上皮増殖因子、E - セレクチン、フェリチン H 鎖、フェリチン L 鎖、線維芽細胞増殖因子 2（塩基性）、フィブロネクチン 1、F l t - 3 リガンド、F m s 関連チロシンキナーゼ 1、V E G F R 1、フォリスタチン、フルクトース - ビスリン酸アルドラーゼ B、フルクトース - ビスリン酸アルドラーゼ C、ジェミニン、グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ、グリピカン - 3、n 末端、増殖停止及び D N A 損傷誘導性アルファ、免疫抑制酸性タンパク、インスリン様増殖因子 1（ソマトメジン C）、インスリン様増

10

20

30

40

50

殖因子2 (ソマトメジンA)、インスリン様増殖因子結合タンパク質1、インスリン様増殖因子結合タンパク質2、インスリン様増殖因子結合タンパク質3、細胞間接着分子1、インターフェロンアルファ1、インターロイキン1アルファ、インターロイキン1ベータ、インターロイキン10、インターロイキン12A、インターロイキン16、インターロイキン5、インターロイキン6受容体、インターロイキン6シグナル伝達物質、インターロイキン7、インターロイキン8、インターロイキン9、インターロイキン-1受容体アンタゴニストタンパク質、IRAP、カリクレイン14(hK14)、カリクレイン2(前立腺)、カリクレイン5、カリクレイン7、カリクレイン8、ケラチン18、細胞骨格I型ケラチン19(Keratin, type I cytoskeletal 19)、サイトケラチン19、Kitリガンド、ラクトトランスフェリン、レプチン、L-セレクチン、黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体、Mac-2結合タンパク質90K、マンマグロビンB、乳房血清抗原、マスト細胞/幹細胞増殖因子受容体、マトリックスメタロプロテイナーゼ2、マトリックスメタロプロテイナーゼ9、メラノーマ抑制活性、膜補助因子タンパク質、CD46抗原、メソテリン、ミッドカイン、MK-1タンパク質、Ep-CAM、筋芽細胞決定タンパク質1、神経成長因子ベータ、ネトリン-1、神経内分泌タンパク質-55、好中球デフェンシン1、好中球デフェンシン3、Nm23-H1、OVX1、OX40、p65がん胎児性タンパク質、膵分泌性トリプシン阻害物質、TATI、副甲状腺ホルモン関連タンパク質、Pcaf、P300/CBP関連因子、ペプシノーゲン-1、胎盤特異的組織タンパク質12、血漿レチノール結合タンパク質、プラスミノゲン(アンジオスタチン含有)、血小板内皮細胞接着分子、PECAM-1、血小板第4因子、血小板由来増殖因子ベータポリペプチド、血小板由来増殖因子受容体アルファポリペプチド、妊娠性血漿タンパク質、妊娠関連血漿タンパク質-A、前立腺分泌タンパク質PSP94、P-セレクチン、PSP94結合タンパク質、ビルビン酸キナーゼアイソザイムM1/M2、リボフラビン担体タンパク質、S100ベータ鎖、分泌型リン酸化タンパク質1、オステオポンチン、セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害剤クレードB、マスピン、セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害剤クレードE、PAI-1、血清アミロイドアルファ-1、血清パラオキシナーゼ/アリールエステラーゼ1、低分子誘導性サイトカインA14(CCL14)、低分子誘導性サイトカインA18(CCL18)、MIP-4、低分子誘導性サイトカインA2(CCL2)、低分子誘導性サイトカインA3(CCL3)、マクロファージ炎症性タンパク質1-アルファ、低分子誘導性サイトカインB5(CXCL5)、扁平上皮癌抗原1、扁平上皮癌抗原2、サバイピン、シンデカン-1、シヌクレイン-ガンマ、TEK内皮チロシンキナーゼ、Tie-2、テネシシン、テトラネクチン、TGF-ベータ受容体III型、細胞質型チオレドキシ還元酵素1、トロンボポエチン、トロンボスポンジン1、サイトゾル型チミジンキナーゼ、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1、組織メタロプロテアーゼ阻害物質2、組織型プラスミノゲン活性化因子(tPA)、トランスフェリン受容体(p90CD71)、形質転換増殖因子アルファ、形質転換増殖因子ベータ1、トランスサイレチン、トロポミオシン1アルファ鎖(アルファ-トロポミオシン)、腫瘍壊死因子(リガンド)スーパーファミリーメンバー5、CD154、腫瘍壊死因子(リガンド)スーパーファミリーメンバー6、Fasリガンド、腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー13B、TALL-1、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー11B、オステオプロテジェリン、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー1A p60 TNF-RI p55 CD120a、TNFR1、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー1B、TNFR2、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子表面受容体、U-PAR、血管細胞接着分子1、血管内皮増殖因子受容体2、血管作用性小腸ペプチド、VEGF(165)b、ビタミンK依存性タンパク質C、ビトロネクチン、Xbox結合タンパク質-1(がんバイオマーカーのリストについては、Polanski and Andersson 2006 Biomarker Insights 1:1-48(当該文献は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる)を参照のこと)。

【0176】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の標的化部分は、ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、ポリペプチド標的化部分は、がんバイオマーカーに結合するように選択または設計されたポリペプチドである。ある特定の実施形態では、ポリペプチド標的化部分は、受容体である。ある特定の実施形態では、ポリペプチド標的化部分は、リガンドである。

#### 【0177】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の標的化部分は、糖である。場合によっては、糖は、糖質薬物である。FDAに認可された処方薬物のいくつかは、糖質部分であるか、または糖質部分を含む。糖質薬物は、場合によっては、単糖複合体、二糖及び二糖複合体、三糖、オリゴ糖及び多糖、ならびにマクロライドという5つのカテゴリーに分類され得る。単糖複合体には、数あるメンバーの中でも特に、アントラサイクリン抗生物質及びアントラサイクリン薬剤（例えば、ドキソルピシン、ダウノルピシン、エピルピシン、イダルピシン）、ヌクレオチド及びヌクレオシドならびにそのアナログ（リン酸フルダラビン、スタブジン、アデノシン、ゲムシタピン、リバビリン、アカデシン）、ポリエン（アンホテリシンb）、ならびに他の薬剤（エトボシド、リンコマイシン、クリンダマイシン、及びペントスタチンなど）が含まれる（例えば、Klyosov, Anatole. "Carbohydrates and Drug Design." Glycobiology and Drug Design. American Chemical Society, 2012. Pages 3 - 22.（当該文献は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。

#### 【0178】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の標的化部分は、核酸である。ある特定の実施形態では、核酸標的化部分は、核酸アプタマーである。アプタマーには、タンパク質または他の細胞標的に特異的に結合する能力を有する二次構造及び三次構造を形成する短いRNA分子及び/またはDNA分子が含まれる。ある特定の実施形態では、核酸標的化部分は、がんバイオマーカーに結合する核酸アプタマーである。ある特定の実施形態では、アプタマー生成の開始点は、配列複雑性の高い核酸ライブラリー（RNA、DNA、または修飾RNA）を合成することであり、次に、『試験管内進化法』（SELEX）と呼ばれる簡単な手順を使用することで、高い親和性及び特異性で標的分子に結合することが可能なオリゴヌクレオチドが選択される。がん関連タンパク質を阻害または標的とするアプタマーの例は、当該技術分野において知られている（例えば、Cercchia et al. 2002 FEBS Letters 1 - 3 : 12 - 16を参照のこと）。

#### 【0179】

##### d. 酵素部分

ある特定の実施形態では、クロロトキシンポリペプチドは、酵素と結び付けられる。適切な酵素の例としては、限定されないが、ELISAにおいて使用される酵素が挙げられ、こうしたELISA用酵素は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼなどである。他の例としては、ベータ - グルクロニダーゼ、ベータ - D - グルコシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼなどが挙げられる。酵素は、リンカー基を使用してクロロトキシンポリペプチドと複合体化することができ、こうしたリンカー基は、カルボジイミド、ジイソシアネート、グルタルアルデヒド、及び同様のものなどである。

#### 【0180】

いくつかの実施形態では、特定の非クロロトキシン実体または非クロロトキシン部分は、複数の目的を果たし得ることを当業者なら認識するであろう。例えば、ある1つの部分は、治療目的及び検出目的（例えば、画像化または診断）の両方を有し得る。一例を挙げるにすぎないが、放射性ヨウ素（ $^{131}\text{I}$ など）は、クロロトキシン薬剤に含めることで、悪性神経腫瘍を含むさまざまながんの検出及び/または治療において放射標識としても細胞傷害性治療部分としても使用されている。放射性または常磁性の同位体またはイオンは、治療目的及び検出目的（例えば、画像化または診断）の両方を有し得る部分の例である。

## 【 0 1 8 1 】

## B . 複合体化

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の部分（例えば、1つまたは複数の検出可能部分（例えば、画像化可能部分）、治療部分、または標的化部分（すなわち、「ペイロード」））がクロロトキシンポリペプチドと結び付けられる。場合によっては、ペイロードは、クロロトキシンポリペプチドのリジン残基及び/または末端を介してクロロトキシンポリペプチドと結び付けられる。ある特定のそのような実施形態では、部分をクロロトキシンポリペプチドと結び付けること可能な位置（複数可）は、複合体化のための部位として利用可能なリジン残基の数によって制限される。例えば、単一のリジン残基（「モノリジン」）を有するクロロトキシンポリペプチドでは、単一の利用可能リジン残基に対して部分が結び付けられ得る。

10

## 【 0 1 8 2 】

ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、ペイロード部分と直接的に結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、ペイロード部分と間接的に結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、ペイロード部分と共有結合で結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、ペイロード部分と非共有結合で結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、リンカーを介してペイロード部分と結び付けられる。

## 【 0 1 8 3 】

ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのC末端を介してペイロード部分と結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのC末端と共有結合または非共有結合で結び付いたリンカーを介してペイロード部分と結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのC末端を介してペイロード部分と共有結合で結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのC末端を介してペイロード部分と非共有結合で結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのC末端を介してペイロード部分と直接的に結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのC末端を介してペイロード部分と間接的に結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドのC末端残基は、配列番号1の対応位置に見られるアミノ酸と同じである。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドのC末端残基は、配列番号1の対応位置に見られるアミノ酸とは異なる。

20

30

## 【 0 1 8 4 】

ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのN末端を介してペイロード部分と結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのN末端と共有結合または非共有結合で結び付いたリンカーを介してペイロード部分と結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのN末端を介してペイロード部分と共有結合で結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのN末端を介してペイロード部分と非共有結合で結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのN末端を介してペイロード部分と直接的に結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのN末端を介してペイロード部分と間接的に結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドのN末端残基は、配列番号1の対応位置に見られるアミノ酸と同じである。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドのN末端残基は、配列番号1の対応位置に見られるアミノ酸とは異なる。

40

## 【 0 1 8 5 】

ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのリジン残基を介してペイロード部分と結び付けられる。ある特定の状況、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのリジン残基と共有結合または非共有結合で結

50

び付いたリンカーを介してペイロード部分と結び付けられる。ある特定の場合、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのリジン残基を介してペイロード部分と共有結合で結び付けられる。ある特定の場合、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのリジン残基を介してペイロード部分と非共有結合で結び付けられる。ある特定の場合、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのリジン残基を介してペイロード部分と直接的に結び付けられる。ある特定の場合、クロロトキシンポリペプチドは、クロロトキシンポリペプチドのリジン残基を介してペイロード部分と間接的に結び付けられる。ある特定の場合、結び付けは、配列番号 1 のリジン残基の位置に対応する位置におけるクロロトキシンポリペプチドのリジン残基を介して行われる。ある特定の場合、結び付けは、配列番号 1 のリジン残基の位置に対応しない位置におけるクロロトキシンポリペプチドのリジン残基を介して行われる。ある特定の場合、クロロトキシンポリペプチドは、配列番号 1 の L y s 1 5、L y s 2 3、または L y s 2 7 に対応するリジン残基から選択されるクロロトキシンポリペプチドのリジン残基を介してペイロード部分と結び付けられる。

10

#### 【 0 1 8 6 】

当該技術分野では、さまざまな複合体化化学が知られており、こうした複合体化化学を、本発明において使用するためのクロロトキシン薬剤において使用することができる。ある特定の実施形態では、1 つまたは複数の実体（複数可）または部分（複数可）は、クロロトキシンポリペプチドのリジン残基のイプシロンアミノ基と結び付けられる。いくつかの実施形態では、複合体化化学は、N H S（N - ヒドロキシスクシンイミド）/ E D C（1 - エチル - 3 - [ 3 - ジメチルアミノプロピル ] カルボジイミド塩酸塩）化学に基づく。いくつかの実施形態では、複合体化化学は、チオール化化学（すなわち、トラウト試薬及び/または 2 - イミノチオランなどのチオール化薬剤を使用するもの）に基づく。

20

#### 【 0 1 8 7 】

直接的な共有結合は、さまざまな方法のいずれにおいても達成することができ、例えば、アミド結合、エステル結合、炭素間結合、ジスルフィド結合、カルバメート結合、エーテル結合、チオエーテル結合、尿素結合、アミン結合、またはカーボネート結合を介して達成される。共有結合は、例えば、実体（複数可）もしくは部分（複数可）及び/またはクロロトキシンポリペプチドに存在する官能基を利用することによって達成され得る。使用され得る適切な官能基には、限定されないが、アミン、無水物、ヒドロキシル基、カルボキシル基、チオール、及び同様のものが含まれる。ある特定の実施形態では、生成することになる複合体の一部分の官能基が、生成することになる複合体のその他の部分とのカップリングのために活性される。例えば、活性化薬剤（カルボジイミドなど）を使用してそのようなカップリングが実現され得る。当該技術分野では多種多様な活性化薬剤が知られており、こうした活性化薬剤は、本明細書に記載の複合体または他のクロロトキシン薬剤の形成に適する。

30

#### 【 0 1 8 8 】

非共有結合性の結び付きの例としては、限定されないが、疎水性相互作用、静電相互作用、双極子相互作用、ファンデルワールス相互作用、及び水素結合が挙げられる。

#### 【 0 1 8 9 】

40

いくつかの実施形態では、クロロトキシンポリペプチドと、1 つまたは複数の実体（複数可）または部分（複数可）とは、リンカー基を介して共有結合で互いに間接的に連結される。そのような間接的共有結合は、ホモ官能性薬剤及びヘテロ官能性薬剤を含めて、当該技術分野において多数知られる安定な二官能性薬剤のいずれを使用することによっても達成され得る。そのような薬剤の例については、限定されないが、例えば、P i e r c e のカタログ及びハンドブックを参照のこと。二官能性薬剤の使用は、活性化薬剤の使用とは異なり、これらの相違点は、前者では、得られる複合体に連結部分が存在するが、後者では、反応に関与する 2 つの部分の間に直接的なカップリングが生じるという点である。二官能性薬剤が役割を果たすことで、二官能性薬剤が関与しなければ不活性な 2 つの部分の間で反応を行うことが可能となり得る。代替として、またはさらに、二官能性薬剤は、

50



反応生成物の一部となるものであり、ある程度の立体配座的な柔軟性が複合体に備わるように選択され得る。例えば、二官能性薬剤は、いくつかの原子（例えば、2～10個の炭素原子）を含む直鎖のアルキル鎖を含み得る。代替として、またはさらに、二官能性薬剤は、クロロトキシンポリペプチドと、1つまたは複数の実体（複数可）または部分（複数可）と、の間に形成される結合が切断可能（例えば、加水分解性）となるように選択され得る（そのようなリンカーの例としては、限定されないが、例えば、米国特許第5,773,001号、同5,739,116号、及び同5,877,296号（これらの文献のそれぞれの内容は、参照によって本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。そのようなリンカーは、例えばクロロトキシンポリペプチドと複合体化される実体または部分が、クロロトキシンポリペプチドから加水分解された後に活性の上昇が観測される治療部分であるときに、使用され得る。切断を達成するための機構の例としては、リソソームの酸性pHにおける加水分解（ヒドラゾン、アセタール、及びシス-アコニット酸様アミド）、リソソーム酵素（例えば、カテプシン及び他のリソソーム酵素）によるペプチド切断、ならびにジスルフィドの還元が挙げられる。追加の切断機構には、細胞外または細胞内で生理学的pHにおいて生じる加水分解が含まれる。この機構は、クロロトキシンポリペプチドと1つまたは複数の実体（複数可）または部分（複数可）とのカップリングに使用される架橋リンカーが生分解性/生体内分解性の実体（ポリデキストラン及び同様のものなど）であるときに適用され得る。

10

#### 【0190】

例えば、1つまたは複数の治療部分を含む複合体については、所望の薬物遊離特性を与える導入カルボニル基を用いてヒドラゾン含有複合体が調製され得る。一方の末端にジスルフィド基を有し、もう一方の末端にヒドラジン誘導体を有するアルキル鎖を含むリンカーを用いても複合体が調製され得る。

20

#### 【0191】

ヒドラゾン以外の官能基を含むリンカーもまた、リソソームの酸性環境において切断される可能性を有する。例えば、細胞内で切断可能なヒドラゾン以外の基（エステル、アミド、及びアセタール/ケタールなど）を含むチオール反応性リンカーから複合体が調製され得る。含有酸素原子の一方が実体または部分と結び付いており、もう一方がクロロトキシンポリペプチドを結び付けるためのリンカーと結び付いたケタールを5～7員環ケトンから調製して使用することもできる。

30

#### 【0192】

pH感受性クラスのリンカーの別の例は、アミド基に並置されたカルボン酸基を有するシス-アコニット酸である。このカルボン酸は、酸性リソソームにおけるアミド加水分解を促進する。いくつかの他の型の構造で同様の型の加水分解速度促進を達成するリンカーも使用され得る。

#### 【0193】

リソソーム酵素による酵素的なペプチド加水分解もまた、クロロトキシン薬剤から部分を遊離させるために使用され得る。例えば、クロロトキシンポリペプチドは、パラ-アミノベンジルアルコールへのアミド結合を介して結び付けることができ、次に、ベンジルアルコールと実体または部分との間にカルバメートまたはカーボネートを形成させることができる。クロロトキシンポリペプチドが切断されると、アミノベンジルカルバメートまたはアミノベンジルカーボネートが崩壊し、実体または部分が遊離する。別の例として、カルバメートの代わりにリンカーを崩壊させることによってフェノールが切断され得る。さらに別の例として、パラ-メルカプトベンジルカルバメートまたはパラ-メルカプトベンジルカーボネートの崩壊を開始させるためにジスルフィド反応が使用される。

40

#### 【0194】

多くの治療部分、具体的には抗がん薬剤は、水への溶解性が存在するとしても非常に低く、このことによって、治療部分が凝集するため、クロロトキシン薬剤への薬物の組み込みが制限される。これを克服するための手法の1つは、リンカーに可溶化基を付加することである。PEG（ポリエチレングリコール）及びジペプチドからなるリンカーを用いて

50

調製されたクロロトキシシン薬剤を使用することができ、こうしたクロロトキシシン薬剤には、例えば、クロロトキシシンポリペプチドと結び付いたPEG二酸、PEGチオール酸、またはPEGマレイミド酸と、ジペプチドと、実体または部分に結合したアミドと、を有するクロロトキシシン薬剤が含まれる。PEG基を組み込む手法は、薬物組み込みにおける凝集及び制限を克服する上で有用であり得る。

【0195】

クロロトキシシン薬剤に含められる実体または部分が、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドである部分を含む実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、融合タンパク質であり得る。融合タンパク質は、2つ以上のタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドがそれらの個々のペプチド骨格を介して共有結合によって連結されたものを含む分子である。例えば、融合タンパク質は、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドであるペイロード部分に共有結合によって連結されたクロロトキシシンポリペプチドを含み得る。本発明において使用するための融合タンパク質は、当業者に知られる任意の適切な方法によって生成され得る。例えば、当該融合タンパク質は、ポリペプチド合成機を使用するタンパク質合成方法によって直接的に生成させることができる。あるいは、2つの連続遺伝子断片の間に相補的なオーバーハングを生じさせるアンカープライマーを使用して遺伝子断片のPCR増幅を実施することができ、その後、こうして生じた相補的オーバーハングを含む2つの連続遺伝子断片をアニーリングさせ、再度増幅することでキメラ遺伝子配列を得ることができる。融合タンパク質は、標準的な組換え方法によって得ることができる（例えば、Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2<sup>nd</sup> Ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, N.Y.（当該文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。そのような方法は、（1）所望の融合タンパク質をコードする核酸分子の構築、（2）組換え発現ベクターへの核酸分子の挿入、（3）発現ベクターでの適切な宿主細胞の形質転換、及び（4）宿主細胞における融合タンパク質の発現、を含み得る。そのような方法によって生成される融合タンパク質クロロトキシシン薬剤は、当該技術分野において知られるように、培地から直接的に回収及び単離されるか、または細胞の溶解によって回収及び単離され得る。形質転換された宿主細胞によって生じるタンパク質の精製方法は、当該技術分野において多くのものが広く知られている。こうした精製方法には、限定されないが、沈降、遠心分離、ゲル濾過、ならびにカラムクロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、及び親和性クロマトグラフィー）が含まれる。精製方法は他にも説明されている（例えば、Deutscher et al., "Guide to Protein Purification" in Methods in Enzymology, 1990, vol. 192, Academic Press（当該文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。

【0196】

クロロトキシシンポリペプチドと、検出可能部分（例えば、画像化可能部分）、治療部分、または標的化部分と、の間の結び付きの性質とは無関係に、こうした結び付きは、典型的には、腫瘍微小環境及び/または腫瘍細胞への輸送及び/またはその内部への輸送の前または間にクロロトキシシン薬剤が解離しないほど十分に選択的、特異的、かつ強力なものである。リジン残基数低減型クロロトキシシンポリペプチドと1つまたは複数の部分との間の結び付けは、当業者に知られる任意の化学的カップリング、生化学的カップリング、酵素的カップリング、または遺伝子的カップリングを使用して達成され得る。

【0197】

当業者なら容易に理解できることであるが、本発明において使用するためのクロロトキシシン薬剤は、任意の数のクロロトキシシンポリペプチドと、任意の数のペイロード部分と、が任意の数の異なる様式によって互いに結び付いたものを含み得る。クロロトキシシン薬剤の設計は、その意図される目的（複数可）と、その特定の使用状況において望ましい特性と、によって影響を受けることになる。クロロトキシシンポリペプチドを部分に結び付けて

10

20

30

40

50

または結合させてクロロトキシシン薬剤を形成させる方法の選択は、当業者の知識の範囲内であり、一般に、所望の結び付きの性質（例えば、共有結合的なものと非共有結合的なものとの対比、及び／または切断可能なものと切断不可能なものとの対比）、クロロトキシシンポリペプチド及び部分の性質、官能化学基の存在及び性質、ならびに同様のものに依存することになる。

【0198】

ある特定の実施形態では、WO2011/097533（例えば、US9,018,347も併せて参照のこと）及びWO2011/142858（例えば、US2013/0195760も併せて参照のこと）の1つまたは複数の記載のクロロトキシシン複合体またはペイロードが本発明に従って利用され、これらの文献はそれぞれ、その全体が参照によって組み込まれる。

10

【0199】

#### 医薬組成物

本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤は、そのままの形態及び／または医薬組成物の形態で投与され得る。いくつかの実施形態では、本発明において使用するための医薬組成物は、有効量の少なくとも1つのクロロトキシシン薬剤と、少なくとも1つの医薬的に許容可能な担体と、を含む。

【0200】

クロロトキシシン薬剤（例えば、クロロトキシシンポリペプチド）またはその医薬組成物は、少なくとも1つの所望の結果を達成する上で必要または十分な量及び時間で、本発明に従って投与され得る。例えば、クロロトキシシンポリペプチドまたはその医薬組成物は、それががん細胞を死滅させ、腫瘍サイズを低減し、腫瘍の増殖もしくは転移を抑制し、さまざまな白血病を治療し、及び／またはそうした疾患を有する哺乳類（ヒトを含む）の生存期間を延長させ、あるいはその他の様式で臨床効果を与えるような量及び時間で投与され得る。

20

【0201】

本発明において使用するための医薬組成物は、所望の治療効果の達成に有用な任意の投与量及び任意の投与経路を使用して投与され得る。

【0202】

医薬組成物の正確な投与量は、対象ごとに、対象の種、年齢、及び全身病状、病状の重症度、ならびに同様のもの（以下を参照のこと）に応じて異なることになる。

30

【0203】

最適な医薬製剤は、投与経路及び所望の用量に応じて異なり得る。そのような製剤は、投与化合物の物理的状態、安定性、インビボの放出速度、及びインビボのクリアランス速度に影響を与え得る。

【0204】

本発明において使用するための医薬組成物は、投与を簡便化し、用量を均一にするための単位剤形において製剤化され得る。本明細書で使用される「単位剤形」という表現は、治療対象患者のための物理的に個別のクロロトキシシン薬剤単位（1つまたは複数の追加薬剤の有無は問われない）を指す。しかしながら、本発明における組成物の日々の総使用量は、健全な医学的判断の範囲内で主治医によって決定されるであろうことが理解されよう。

40

【0205】

本発明において使用するための医薬組成物は、所望の用量において適切な生理学的に許容可能な担体（複数可）または医薬品添加物（複数可）を1つまたは複数用いて製剤化された後、任意の適切な経路によってヒトまたは他の哺乳類に投与され得る。さまざまな送達系が知られており、そのような組成物の投与に使用され得る。こうした送達系には、錠剤、カプセル、注射用溶液などが含まれる。投与方法には、限定されないが、経皮経路、皮内経路、筋肉内経路、腹腔内経路、静脈内経路、皮下経路、鼻腔内経路、経肺経路、硬膜外経路、点眼経路、及び経口経路が含まれる。組成物は、任意の簡便な経路またはその他の様式で適切な経路によって投与することができ（例えば、注入またはボラス注射、

50

内皮層または皮膚粘膜層（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜、及び腸粘膜など）を介した吸収によって投与することができる）、他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与することができる。投与は、全身性及び／または局所性のものであり得る。

#### 【0206】

注射用調製物（例えば、滅菌された注射用の水性懸濁物または油性懸濁物）は、適切な分散薬剤または湿潤薬剤と懸濁薬剤とを使用して当該技術分野の知見に従って製剤化され得る。滅菌された注射用調製物は、注射用の溶液、懸濁物、またはエマルションを非経口的に許容可能な無毒の希釈剤または溶剤に含めた滅菌物（例えば、2, 3 - ブタンジオール溶液としてのもの）でもあり得る。用いられ得る許容可能な媒体及び溶剤は、とりわけ、水、リンゲル液（米国薬局方（U.S.P.））、及び等張性塩化ナトリウム溶液である。さらに、滅菌された不揮発性油が溶液または懸濁媒体として慣習的に用いられる。この目的では、合成のモノグリセリドまたはジグリセリドを含めて、任意の無菌性の不揮発性油が用いられ得る。脂肪酸（オレイン酸など）もまた、注射用製剤の調製において使用され得る。滅菌液体担体は、非経口投与用の滅菌液体形態の組成物において有用である。

#### 【0207】

注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルターを介したる過によって滅菌されるか、または滅菌水もしくは他の滅菌された注射用媒体に溶解もしくは分散し得る形態の滅菌固形組成物へと使用前に滅菌薬剤を含めることによって滅菌され得る。滅菌溶液または滅菌懸濁物である液体医薬組成物は、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、または皮下注射によって投与され得る。注射は、単回で押し切るものであるか、または徐々に注入するもの（例えば、30分の静脈内注入）であり得る。必要な場合、局所麻酔剤を組成物に含めることで注射部位の痛みが緩和され得る。

#### 【0208】

薬物の作用を延長するためには、多くの場合、皮下注射または筋肉内注射に由来する薬物の吸収を遅延させることが望ましい。このことは、難水溶性の結晶性材料または非結晶性材料の液体懸濁物を使用することによって達成され得る。その際、薬物の吸収速度は、その溶解速度に依存し、ひいては、この溶解速度は、結晶サイズ及び結晶形態に依存し得る。あるいは、非経口的に投与された薬物形態の吸収遅延は、薬物を油媒体に溶解または懸濁することによって達成される。注射用デポ形態は、薬物を生分解性ポリマー（ポリ乳酸 - ポリグリコール酸など）にマイクロカプセル化したマトリックスを形成させることによって調製される。ポリマーに対する薬物の比、及び用いられる特定のポリマーの性質に応じて薬物の放出速度を制御することができる。他の生分解性ポリマーの例としては、ポリ（オルトエステル）及びポリ（無水物）が挙げられる。注射用デポ製剤は、体の組織に適合するリポソーム（脂質小胞としても知られる）またはマイクロエマルションに薬物を封入することによっても調製され得る。

#### 【0209】

経口投与のための液体剤形には、限定されないが、医薬的に許容可能なエマルション、マイクロエマルション、溶液、懸濁物、シロップ、エリキシル剤、及び圧縮組成物が含まれる。液体剤形は、活性成分（すなわち、複合体）に加えて、当該技術分野において一般に使用される不活性な希釈剤（例えば、水または他の溶剤、可溶化薬剤、及び乳化剤など）を含み得、こうした剤は、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1, 3 - ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（具体的には、綿実油、落花生油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、及びゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール、ならびにソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにそれらの混合物などである。経口組成物は、不活性な希釈剤の他に、補助剤も含み得、こうした補助剤は、湿潤薬剤、懸濁薬剤、保存剤、甘味薬剤、風味薬剤、及び香料薬剤、増粘薬剤、着色剤、粘性調整剤、安定剤、または浸透圧調整剤などである。経口投与のための液体担体の適切な例としては、水（添加剤を部分的に含むもの（例えば、セルロース誘導体を含むもの（カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液など）））、アルコ

10

20

30

40

50

ール（一価アルコール及び多価アルコール（グリコールなど）を含む）ならびにその誘導体、ならびに油（例えば、分画されたヤシ油及びラッカセイ油）が挙げられる。

#### 【0210】

経口投与のための固形剤形には、例えば、カプセル、錠剤、丸剤、粉末、及び顆粒が含まれる。そのような固形剤形では、少なくとも1つの生理学的に許容可能な不活性な医薬品添加物または担体（クエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウムなど）、及び以下の（a）～（i）に記載のものの1つまたは複数と活性成分が混合される：（a）賦形剤または増量剤（デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、及びケイ酸など）、（b）結合剤（例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、及びアカシアなど）、（c）保水剤（グリセロールなど）、（d）崩壊薬剤（寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモデンプンまたはタピオカデンプン、アルギン酸、ある特定のケイ酸、及び炭酸ナトリウムなど）、（e）溶液流動性低減薬剤（パラフィンなど）、（f）吸収促進剤（四級アンモニウム化合物など）、（g）湿潤薬剤（例えば、セチルアルコール及びモノステアリン酸グリセロールなど）、（h）吸収剤（カオリン及びベントナイト粘土など）、ならびに（i）滑沢剤（タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固形ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、及びそれらの混合物など）。固形製剤に適した追加または代替の医薬品添加物には、表面改変薬剤（非イオン性及び陰イオン性の表面改変薬剤など）が含まれる。表面改変薬剤の代表例としては、限定されないが、ポロクサマー188、塩化ベンザルコニウム、ステアリン酸カルシウム、セトステアリルアルコール、セトマクロゴール乳化ワックス、ソルビタンエステル、コロイド状二酸化ケイ素、ホスフェート、ドデシル硫酸ナトリウム、ケイ酸マグネシウムアルミニウム、及びトリエタノールアミンが挙げられる。カプセル、錠剤、及び丸剤の場合、剤形は、緩衝薬剤も含み得る。固形剤形当たりの固形担体の量は、大きく異なることになる。いくつかの実施形態では、固形剤形当たりの固形担体の量は、約25mg～約1gである。

#### 【0211】

同様の型の固形組成物は、医薬品添加物（ラクトースまたは乳糖ならびに高分子量ポリエチレングリコール及び同様のものなど）を使用する軟充填ゼラチンカプセル及び硬充填ゼラチンカプセルにおける賦形剤としても用いられ得る。錠剤、糖衣錠、カプセル、丸剤、及び顆粒の固形剤形は、コーティング及びシェル（腸溶コーティング、放出制御コーティング、及び医薬の製剤化分野において広く知られる他のコーティングなど）を用いて調製され得る。こうした固形剤形は、任意選択で乳白薬剤を含み得、ある特定の腸管部位のみで、またはある特定の腸管部位に選択的に、任意選択で遅延様式において、活性成分（複数可）を放出するような組成物のものでもあり得る。使用され得る包埋組成物の例としては、ポリマー物質及びワックスが挙げられる。

#### 【0212】

ある特定の実施形態では、診断及び/または治療が必要な領域に対して本発明の組成物を局所的に投与することが望ましくあり得る。このことは、例えば、とりわけ、手術中の局所注入、局所適用、注射、カテーテルを用いるもの、坐剤を用いるもの、または皮膚パッチもしくはステントもしくは他のインプラントを用いるものによって達成され得る。

#### 【0213】

いくつかの局所投与用組成物は、担体（水、グリセロール、アルコール、プロピレングリコール、脂肪アルコール、トリグリセリド、脂肪酸エステル、または鉱物油など）を含み得るゲル、軟膏、ローション、またはクリームとして製剤化され得る。他の局所用担体には、流動石油、パルミチン酸イソプロピル、ポリエチレングリコール、エタノール（95%）、ポリオキシエチレンモノラウレート含有水（5%）、またはラウリル硫酸ナトリウム含有水（5%）が含まれる。他の材料（抗酸化剤、保水剤、粘性安定剤、及び同様の薬剤など）が必要に応じて添加され得る。経皮浸透増強剤（Azononeなど）も含まれ得る。

#### 【0214】

さらに、ある特定の場合、皮膚の上部、内部、または下部に設置される経皮デバイス内に組成物が配置され得る。そのようなデバイスには、受動的または能動的な放出機構によって化合物を皮膚に放出するパッチ、インプラント、及び注射が含まれる。経皮投与には、上皮組織及び粘膜組織を含む、体表面及び体の通路の内層を横切る投与がすべて含まれる。そのような投与は、ローション、クリーム、泡沫、パッチ、懸濁物、溶液、ならびに坐剤（肛門坐剤及び膣坐剤）において本組成物を使用して実施され得る。

#### 【0215】

経皮投与は、例えば、活性成分（複数可）及び皮膚に無毒な担体を含み、皮膚を介して血流への全身性の吸収が生じるように活性成分（複数可）の少なくともいくつかを送達することを可能にする経皮パッチを使用することによって達成され得る。担体は、クリーム及び軟膏、ペースト、ゲル、ならびに閉鎖保持デバイスなどの任意の数の形態をとり得る。クリーム及び軟膏は、粘性液体であるか、または水中油型もしくは油中水型の半固形エマルションであり得る。活性成分（複数可）を含む石油または親水性石油に分散した吸収性粉末を含むペーストも適し得る。血流に活性成分（複数可）を放出するためにさまざまな閉鎖保持デバイスを使用することができ、こうした閉鎖保持デバイスは、担体ありもしくは担体なしで活性成分（複数可）を含む半透膜被覆型リザーバー、または活性成分を含むマトリックスを含む半透膜被覆型リザーバーなどである。

#### 【0216】

坐剤製剤は、坐剤の融点を変化させるためのワックスが添加または無添加の従来材料（ココアバターを含む）及びグリセリンから調製され得る。水溶性坐剤基材（さまざまな分子量のポリエチレングリコールなど）も使用され得る。

#### 【0217】

さまざまな製剤を生産するための材料及び方法が当該技術分野において知られており、こうした材料及び方法を本発明の実施に適合させることができる。

#### 【0218】

##### A. 封入薬剤

いくつかの実施形態では、本発明によって提供される組成物は、1つまたは複数の封入薬剤を含む。一般に、封入薬剤は、実体（クロロトキシシン薬剤など）または部分を封入するために使用され得る生理学的に忍容可能な任意の薬剤であり得る。「封入」は、封入薬剤が実体を包囲もしくは閉じ込め得ること、または「封入」される実体が、封入薬剤を含む材料内に部分的もしくは完全に包埋され得ること、が意図される。

#### 【0219】

いくつかの実施形態では、封入薬剤は、部分（治療部分など）の一部であり、クロロトキシシンポリペプチドは、封入薬剤と複合体化される。いくつかのそのような実施形態では、クロロトキシシンポリペプチドは、封入薬剤の外面と複合体化される。いくつかのそのような実施形態では、クロロトキシシンポリペプチドは、封入薬剤に対して外部の環境に露出している。クロロトキシシンポリペプチドは、直接的な相互作用（非共有結合性もしくは共有結合性のものであり得る）によって封入薬剤と複合体化され得るか、またはクロロトキシシンポリペプチドは、リンカーを介して封入薬剤と複合体化され得る。

#### 【0220】

いくつかの実施形態では、クロロトキシシンポリペプチド及び部分（例えば、治療部分）を含むクロロトキシシン薬剤は、封入薬剤によって閉じ込められる。クロロトキシシン薬剤は、封入薬剤によって規定及び/または創出される空間内または環境内（例えば、水性環境内）に部分的または完全に閉じ込められ得る。いくつかの実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、封入薬剤内に少なくとも部分的に包埋される。例えば、封入薬剤が脂質膜を含むのであれば、複合体は、膜における脂質分子の内部または間に少なくとも部分的に包埋され得る。いくつかの実施形態では、複合体は、封入薬剤内に完全に包埋される。

#### 【0221】

さまざまな型の封入薬剤が当該技術分野において知られており、薬物、生体分子、及び同様のものを封入するためのそのような薬剤の使用方法についても同様に知られている。

ある特定の実施形態では、封入薬剤には、コア及び表面を有する小粒子が含まれる。そのような封入薬剤には、限定されないが、リポソーム、ミセル、微粒子、ナノ粒子などが含まれる。

【0222】

リポソームは、典型的には、ほぼ球状の二重層の構造または小胞であり、天然または合成のリン脂質膜から少なくとも部分的には構成される。リポソームは、他の膜成分（コレステロール及びタンパク質など）をさらに含み得る。リポソームの内部コアは、典型的には、水溶液を含む。治療部分及び／またはクロロトキシン薬剤は、水溶液に溶解され得る。治療部分及びクロロトキシン薬剤は、リポソームの膜内に包埋され得る。リポソームは、阻害性RNA（siRNAなど）を含む、核酸薬剤（本明細書に記載のものなど）などの薬剤の送達に特に有用であり得る。

10

【0223】

ミセルは、一般に、リン脂質の単層から形成され、内部に水溶液を含まないこと以外は、リポソームと類似している。内部に水溶液を含むように調製される逆ミセルを、本発明に従って使用することもできる。

【0224】

いくつかの実施形態では、粒子は、その少なくとも1つの平均寸法が約1  $\mu$ m未満である微粒子である。例えば、粒子の最小寸法は、平均すると、約100 nm、約120 nm、約140 nm、約160 nm、約180 nm、約200 nm、約220 nm、約240 nm、約260 nm、約280 nm、約300 nm、約320 nm、約340 nm、約360 nm、約380 nm、約400 nm、約420 nm、約440 nm、約460 nm、約480 nm、約500 nm、約550 nm、約600 nm、約650 nm、約700 nm、約750 nm、約800 nm、約850 nm、約900 nm、または約950 nmであり得る。

20

【0225】

いくつかの実施形態では、粒子は、その少なくとも1つの平均寸法が約100 nm未満であるナノ粒子である。例えば、粒子の最小寸法は、平均すると、約1 nm、約2 nm、約3 nm、約4 nm、約5 nm、約6 nm、約7 nm、約8 nm、約9 nm、約10 nm、約11 nm、約12 nm、約13 nm、約14 nm、約15 nm、約16 nm、約17 nm、約18 nm、約19 nm、約20 nm、約22 nm、約24 nm、約26 nm、約28 nm、約30 nm、約32 nm、約34 nm、約36 nm、約38 nm、約40 nm、約42 nm、約44 nm、約46 nm、約48 nm、約50 nm、約55 nm、約60 nm、約65 nm、約70 nm、約75 nm、約80 nm、約85 nm、約90 nm、約95 nm、または約99 nmであり得る。

30

【0226】

いくつかの実施形態では、粒子のコアは、磁気共鳴活性を有する材料を含み、磁気共鳴活性は、検出用途及び／または治療用途において有利であり得る。磁気共鳴活性を有する材料には、金属及びその酸化物が含まれ、こうした金属は、アルミニウム、コバルト、インジウム、鉄、銅、ゲルマニウム、マンガン、ニッケル、スズ、チタン、パラジウム、白金、セレン、ケイ素、銀、亜鉛などを含有する金属などである。

40

【0227】

いくつかの実施形態では、治療部分は、核酸を含む。核酸は、封入薬剤内に完全に閉じ込められ得る。いくつかの実施形態では、核酸薬剤は、封入薬剤内に包埋される。例えば、封入薬剤は、リポソームであり得、核酸薬剤は、リポソーム内に閉じ込められ得る。核酸薬剤は、リポソームの脂質分子内に少なくとも部分的に包埋され得る。

【0228】

B. 医薬パックまたは医薬キット

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の医薬組成物の1つまたは複数の成分を含む1つまたは複数の容器（例えば、バイアル、アンプル、試験管、フラスコ、またはボトル）を含む医薬パックまたは医薬キットを提供することで、本発明において使用するための

50

クロロトキシシン複合体を投与することを可能にする。

【0229】

クロロトキシシン薬剤の使用

ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤の使用と関連するさまざまな技術を提供し、こうした技術には、例えば、1つまたは複数の細胞、組織、または生物（及び具体的にはヒトを含む）への投与及び／または送達を含む方法が含まれる。いくつかの実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、投与または送達されると修飾または代謝され得る。例えば、いくつかの実施形態では、ペイロードを含むクロロトキシシン薬剤が投与されると、（例えば、特定の部位に送達された時点で）クロロトキシシンポリペプチドからのペイロードの分離、及び／またはペイロード部分とクロロトキシシンポリペプチド部分との一方もしくは両方の他の修飾もしくは代謝、が最終的に達成される。いずれの特定の理論によっても拘束されることは望まないが、出願人は、いくつかの実施形態では、クロロトキシシンポリペプチドからペイロードが遊離することによって、細胞及び／または細胞内へのペイロードの送達が促進されるか、あるいはその他の様式で、当該送達への関与が生じるか、または当該送達が達成され得ることを提唱する。同様に、いずれの特定の理論によっても拘束されることは望まないが、出願人は、本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤の代謝または修飾（例えば、当該クロロトキシシン薬剤からのペイロードの遊離）が生じ得る特定の部位は、いくつかの実施形態では、腫瘍微小環境であり得るか、または腫瘍微小環境を含み得ることを提唱する。

10

【0230】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤の投与は、1つまたは複数の特定の細胞、細胞型、またはその成分の検出において特に有用であり得る。代替として、またはさらに、いくつかの実施形態では、投与によって、特定の標的部位、標的細胞、標的組織などへのクロロトキシシン薬剤（及び／またはそのような薬剤に含められ得る任意のペイロード、もしくはそのような薬剤にその他の様式で結び付けられ得る任意のペイロード）の送達が達成される。いくつかの実施形態では、そのような送達は、クロロトキシシンポリペプチドとNRP1との間の結合を伴い得るものであり、この結合は、例えば、部位、細胞、組織などにおいて生じる。

20

【0231】

いくつかの実施形態では、提供される技術は、がん罹患しているか、または易罹患性の対象（及び／またはその細胞もしくは組織）への投与及び／または送達を含み得る。いくつかの実施形態では、対象は、少なくとも1つの腫瘍を有する（またはいくつかの実施形態では、その疑いがあり得る）。いくつかの実施形態では、腫瘍を有する対象（及び／または1つもしくは複数の腫瘍細胞を含む系）へのクロロトキシシン薬剤の投与によって、クロロトキシシン薬剤（またはその成分もしくは代謝物）による腫瘍細胞への特異的結合が達成される。いくつかの実施形態では、がん罹患しているか、または易罹患性の対象（及び／またはその細胞もしくは組織）への投与及び／または送達は、がんの治療及び／または検出もしくは特徴付け（例えば、画像化、分類、診断など）に有用であり得る。

30

【0232】

いくつかの実施形態では、がんの治療は、対象（もしくは集団）が腫瘍を発症することになる可能性の低減、個体における1つもしくは複数の腫瘍のサイズが増加することになる可能性の低減、個体における1つもしくは複数の腫瘍が転移することになる可能性の低減、及び／または1つもしくは複数の腫瘍が任意の他の尺度（臨床的病期など）によって進行することになる可能性の低減であり得るか、またはこれを含み得る。

40

【0233】

いくつかの実施形態では、検出は、例えば、1つまたは複数のがんの体積、寸法、位置、向き、発生源、病期、型、クラス、数、分布、転移、臓器関与、組織関与、増殖速度もしくは退縮速度、増殖方向もしくは退縮方向、治療の進行、及び／または治療の効き易さを同定または決定することに関する情報の回収を含み得る。検出は、例えば、試料中、インビトロ、またはインビボで行われ得る。検出は、例えば、手術前、手術中、手術後、診

50



断時、治療前もしくは治療レジメンの開始時、治療期間中もしくは治療レジメンの過程中、治療もしくは治療レジメンの休止後、または日常的な検査の過程に行われ得る。

【0234】

画像化は、（例えば、1つまたは複数の蛍光標識を使用するか、またはその他の様式で検出可能な、本明細書に記載の標識もしくは本明細書には記載されない当該技術分野において知られる標識を使用することによって）検出可能な徴候を介して1つまたは複数のがんの体積、寸法、位置、向き、発生源、病期、型、クラス、数、分布、転移、臓器関与、組織関与、増殖速度もしくは退縮速度、増殖方向もしくは退縮方向、治療の進行、及び/または治療の効き易さを同定または決定することに関する情報の回収を含む検出の方法または使用を含む。

10

【0235】

特徴付けは、1つまたは複数のがんの体積、寸法、位置、向き、発生源、病期、型、クラス、数、分布、転移、臓器関与、組織関与、増殖速度もしくは退縮速度、増殖方向もしくは退縮方向、治療の進行、及び/または治療の効き易さを同定または決定することに関する情報の回収を含む検出の方法または使用を含むと共に、1つまたは複数のがんの、体積、寸法、位置、向き、発生源、病期、型、クラス、数、分布、転移、臓器関与、組織関与、増殖速度もしくは退縮速度、増殖方向もしくは退縮方向、治療の進行、及び/または治療の効き易さを同定または決定することをさらに含む。

【0236】

診断は、がんの存在有無を同定することに関する情報を与える検出の方法または使用を含む。診断は、1つまたは複数の考え得る型のがんとしてがんを同定することに関する情報を与える検出の方法または使用を含む。診断は、1つまたは複数の考え得る病期のがんとしてがんを同定することに関する情報を与える検出の方法または使用を含む。診断は、がんの予後を決定することに関する情報を与える検出の方法または使用を含む。診断は、転移性または非転移性としてがんを同定することに関する情報を与える検出の方法または使用を含む。診断は、良性または非良性としてがんを同定することに関する情報を与える検出の方法または使用を含む。診断は、1つまたは複数のがんの特徴または性質の1つまたは複数を同定することにつながり得る。いくつかの実施形態では、または場合によっては、1つまたは複数のがんの特徴または性質の1つまたは複数が、診断からは明らかになり得ない。

20

30

【0237】

ある特定の実施形態では、本発明において使用するための方法は、異常な血管新生によって特徴付けられる疾患もしくは病状を有するか、またはその疑いのある個体に対して本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤を含む組成物を投与するステップを含み、その結果、クロロトキシシン薬剤は、血管新生の程度を低減する。いくつかの実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、新生血管系の形成を阻止する。いくつかの実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、現存する新生血管系を退縮させる。

【0238】

A. 用量及び投与

クロロトキシシン薬剤またはその医薬組成物は、所望の効果（例えば、治療効果、検出、または本明細書で論じられる他の用途）を達成する上で有効な任意の投与経路を使用して投与され得る。投与は、局所性または全身性のものであり得る。

40

【0239】

本発明のある特定の実施形態では、クロロトキシシン薬剤（またはその医薬組成物）は、全身性に送達される。全身性の投与経路には、限定されないが、筋肉内経路、静脈内経路、経肺経路、及び経口経路が含まれる。ある特定の実施形態では、注射によって投与が行われ、この注射は、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、腫瘍内注射、腹腔内注射、及び同様のものであり得る。特定の実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、静脈内（IV）に投与される。全身投与は、例えば、注入もしくはボーラス注射によって実施されるか、内皮層もしくは皮膚粘膜層（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜、腸粘膜など）を介した吸収によ

50

っても実施され得る。

【0240】

ある特定の実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、頭蓋内（腔内を含む）、眼内、眼周囲、局所、経皮、皮内、鼻腔内、または硬膜外から選択される経路によって投与される。特定の実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、腔内投与によって投与され得る。

【0241】

ある特定の実施形態では、治療が必要な領域に対して細胞傷害性クロロトキシシン複合体を局所的に投与することが望ましくあり得る。例えば、脳腫瘍を治療するための化学療法薬剤の全身投与は、血液脳関門の通過が不可能であることによって制限を受けることが多い。結果として、全身性の有害作用を生じさせることなく脳において有効な治療濃度を達成することが困難となる。したがって、治療対象の腫瘍が脳に位置するある特定の実施形態では、細胞傷害性クロロトキシシン複合体は、局所的に投与される。

10

【0242】

脳（または脳の特定の領域）への局所投与は、例えば、限定されないが、局所注入（例えば、手術中のもの）、注射（例えば、脳室内注射）、カテーテルによるもの、あるいは手術中に腫瘍腔に設置される脳室リザーバーもしくは脳室ポンプによるもの、または頭皮に皮下移植され、出口カテーテルを介して脳へと繋がれる脳室リザーバーもしくは脳室ポンプによるもの、によって達成され得る。代替として、またはさらに、局所投与は、インプラントデバイス（例えば、活性成分を含むウエハーインプラント）を使用するか、または手術中に局所的に設定され得る薬物デポを使用することによって達成され得る。そのような系からは、薬物が持続的に放出される。

20

【0243】

以下に論じられるように、眼の血管新生疾患において血管新生の程度を低減するために本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤を利用することが望ましくあり得る。いくつかの実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、眼に送達され得る。眼への送達は、例えば、眼内経路及び／または眼周囲経路（硝子体内注射、結膜下注射など）を使用して達成され得る。例えば点眼を使用することで、眼へのクロロトキシシン薬剤の局所適用も達成され得る。

【0244】

眼への投与経路は、眼の血管新生疾患（黄斑変性など）の検出及び／または治療に特に有用であり得る。

30

【0245】

本発明によるクロロトキシシン薬剤組成物は、単回用量または複数回用量からなるレジメンに従って、ある一定期間にわたって投与され得る。

【0246】

投与は、1日に1回行うもの、1日に複数回行うもの、週に複数回行うもの、何らかの他の時間単位間隔、複数時間間隔、日単位間隔、もしくは複数日間隔をあけるもの、または断続的スケジュールで行うものであり得る。例えば、組成物は、週ベースで複数週間（例えば、4～10週間）、1日に1回または複数回投与され得る。あるいは、組成物は、1日に1回の投与を複数日間（例えば、1～10日間）行い、その後、投与なしの期間を数日間（例えば、1～30日間）とるようにして投与され得、このサイクルは、所与の回数（例えば、2～10サイクル）繰り返される。いくつかの実施形態では、少なくとも2回の用量、少なくとも3回の用量、少なくとも4回の用量、少なくとも5回の用量、または少なくとも6回の用量が投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも5週間、または少なくとも6週間、週に1回投与される。

40

【0247】

投与経路に応じて、治療すべき対象の臓器機能、体重、または体表面積に沿って有効用量が計算され得る。当業者なら、ヒトの臨床試験において観測された薬物動態データに照らして適切な用量を容易に最適化できる。最終的な用量レジメンは、薬物の作用を修飾するさまざまな因子を考慮して主治医が決定し得る。こうした薬物作用修飾因子は、例えば

50

、薬物の特定の活性、患者の損傷重症度及び応答性、患者の年齢、状態、体重、性別、及び食事、任意の現存する感染症の重症度、投与時期、併用治療の使用（または非使用）、ならびに他の臨床因子である。

【0248】

典型的な用量は、約  $1.0 \mu\text{g} / \text{体重 kg}$  ~ 約  $100 \text{ mg} / \text{体重 kg}$  の範囲のものである（用量は、本明細書では、クロロトキシシン薬剤のクロロトキシシンポリペプチド成分の重量に関して示される）。

【0249】

例えば、全身投与については、典型的な用量は、約  $100.0 \text{ ng} / \text{体重 kg}$  ~ 約  $10.0 \text{ mg} / \text{体重 kg}$  の範囲のものである。例えば、クロロトキシシン薬剤が静脈内投与されるある特定の実施形態では、薬剤の投与は、約  $0.001 \text{ mg} / \text{kg}$  ~ 約  $5 \text{ mg} / \text{kg}$ （例えば、約  $0.001 \text{ mg} / \text{kg}$  ~ 約  $5 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.01 \text{ mg} / \text{kg}$  ~ 約  $4 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.02 \text{ mg} / \text{kg}$  ~ 約  $3 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.03 \text{ mg} / \text{kg}$  ~ 約  $2 \text{ mg} / \text{kg}$ 、または約  $0.03 \text{ mg} / \text{kg}$  ~ 約  $1.5 \text{ mg} / \text{kg}$ ）のクロロトキシシン薬剤を含む単回または複数回の用量の投与を含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、単回または複数回の用量のクロロトキシシン薬剤を投与することができ、当該単回または複数回の用量はそれぞれ、約  $0.002 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.004 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.006 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.008 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.009 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.01 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.02 \text{ mg} / \text{kg}$ 、または  $0.02 \text{ mg}$  超 /  $\text{kg}$  のクロロトキシシン薬剤を含む。いくつかの実施形態では、単回または複数回の用量のクロロトキシシン薬剤を投与することができ、当該単回または複数回の用量はそれぞれ、約  $0.03 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.04 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.05 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.06 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.07 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.09 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.1 \text{ mg} / \text{kg}$ 、または  $1.0 \text{ mg}$  超 /  $\text{kg}$  のクロロトキシシン薬剤を含む。いくつかの実施形態では、単回または複数回の用量のクロロトキシシン薬剤を投与することができ、当該単回または複数回の用量はそれぞれ、約  $0.05 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.10 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.15 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.20 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.25 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.30 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.35 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.40 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.45 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.50 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.55 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.60 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.65 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.70 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.75 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.80 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.85 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.90 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $0.95 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $1.0 \text{ mg} / \text{kg}$ 、または約  $1 \text{ mg}$  超 /  $\text{kg}$  のクロロトキシシン薬剤を含む。さらに他の実施形態では、単回または複数回の用量のクロロトキシシン薬剤を投与することができ、当該単回または複数回の用量はそれぞれ、約  $1.0 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $1.05 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $1.10 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $1.15 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $1.20 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $1.25 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $1.3 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $1.35 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $1.40 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $1.45 \text{ mg} / \text{kg}$ 、約  $1.50 \text{ mg} / \text{kg}$ 、または約  $1.50 \text{ mg}$  超 /  $\text{kg}$  のクロロトキシシン薬剤を含む。そのような実施形態では、検出及び／または治療は、単回用量のクロロトキシシン薬剤の投与を含むか、または2回の用量、3回の用量、4回の用量、5回の用量、6回の用量、もしくは6回超の用量の投与を含み得る。1日の間隔、2日の間隔、3日の間隔、4日の間隔、5日の間隔、6日の間隔、7日の間隔、または7日超の間隔（例えば、10日、2週、または2週間超の期間）をあけて、2回の連続する用量が投与され得る。

【0250】

微量注入を介する、部位への直接的な投与については、典型的な用量は、約  $1 \text{ ng} / \text{体重 kg}$  ~ 約  $1 \text{ mg} / \text{体重 kg}$  の範囲のものである。

【0251】

クロロトキシシン薬剤が局所的に投与されるある特定の実施形態では、具体的には、脳への腔内投与の場合、クロロトキシシン薬剤の投与は、約  $0.01 \text{ mg}$  ~ 約  $100 \text{ mg}$ （例えば、約  $0.05$  ~ 約  $50 \text{ mg}$ 、約  $0.1 \text{ mg}$  ~ 約  $25 \text{ mg}$ 、約  $0.1 \text{ mg}$  ~ 約  $10 \text{ mg}$ 、約  $0.1 \text{ mg}$  ~ 約  $5 \text{ mg}$ 、または約  $0.1 \text{ mg}$  ~ 約  $1.0 \text{ mg}$ ）のクロロトキシシン薬剤を含む単回または複数回の用量の投与を含み得る。例えば、ある特定の実施形態では、単回

10

20

30

40

50

または複数回の用量のクロロトキシシン薬剤を投与することができ、当該単回または複数回の用量はそれぞれ、約 1 mg、約 1.5 mg、約 2 mg、約 2.5 mg、約 3 mg、約 3.5 mg、約 4 mg、約 4.5 mg、または約 5 mg のクロロトキシシン薬剤（クロロトキシシンポリペプチド）を含む。いくつかの実施形態では、単回または複数回の用量のクロロトキシシン薬剤を投与することができ、当該単回または複数回の用量はそれぞれ、約 0.1 mg、約 0.15 mg、約 0.2 mg、約 0.25 mg、約 0.3 mg、約 0.35 mg、約 0.4 mg、約 0.45 mg、約 0.5 mg、約 0.55 mg、約 0.6 mg、約 0.65 mg、約 0.7 mg、約 0.75 mg、約 0.8 mg、約 0.85 mg、約 0.9 mg、約 0.95 mg、または約 1 mg のクロロトキシシンポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、検出及び／または治療は、単回用量のクロロトキシシン薬剤の投与を含むか、または 2 回の用量、3 回の用量、4 回の用量、5 回の用量、6 回の用量、もしくは 6 回超の用量の投与を含み得る。1 日の間隔、2 日の間隔、3 日の間隔、4 日の間隔、5 日の間隔、6 日の間隔、7 日の間隔、または 7 日超の間隔（例えば、10 日、2 週、または 2 週間超の期間）をあけて、2 回の連続する用量が投与され得る。いくつかの実施形態では、複数回用量が投与され、投与されるクロロトキシシンポリペプチドの量は、用量ごとに同じではない。例えば、いくつかの実施形態では、用量は、主治医の決定に従って用量ごとに調整され得る（例えば、増量または減量される）。

10

#### 【0252】

本発明において使用するための医薬的な組み合わせは、追加の治療と併用され得ることが理解されよう（すなわち、本発明による検出及び／または治療のための投与は、1 つまたは複数の所望の治療法または医療処置と同時、その前、またはその後に実施され得る）。そのような併用レジメンにおいて用いるための特定の組み合わせの治療または医療処置（治療法及び／または処置）では、所望の治療法及び／または処置の適合性、ならびに達成すべき所望の治療効果が考慮されることになる。

20

#### 【0253】

例えば、本発明において使用するための方法及び組成物は、他の処置と一緒に用いることができ、こうした処置には、手術、放射線療法（例えば、ガンマ線照射、陽子線による放射線療法、電子線による放射線療法、陽子線治療、小線源治療、及び全身性の放射性同位体治療）、内分泌療法、温熱療法、ならびに寒冷療法が含まれる。

#### 【0254】

30

代替として、またはさらに、本発明において使用するための方法及び組成物は、任意の有害作用を減弱させるための他の薬剤（例えば、制吐剤）及び／または他の認可された化学療法薬物と一緒に用いることができ、こうした化学療法薬物には、限定されないが、アルキル化剤（メクロレタミン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メルファラン、イホスファミド）、代謝拮抗剤（メトトレキサート）、プリンアンタゴニスト及びピリミジンアンタゴニスト（6メルカプトプリン、5フルオロウラシル、シタラビル（cytarabine）、ゲムシタピン）、紡錘体毒（ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、パクリタキセル）、ポドフィロトキシシン（エトポシド、イリノテカン、トポテカン）、抗生物質（ドキシソルピシン、ブレオマイシン、マイトマイシン）、ニトロソ尿素（カルムスチン、ロムスチン）、無機イオン（シスプラチン、カルボプラチン）、酵素（アスパラギナーゼ）、ならびにホルモン（タモキシフェン、ロイプロリド、フルタミド、及びメゲストロール）が含まれるが、例を少数挙げたにすぎない。最新のがん治療のより包括的な議論については、[www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs](http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs) 及び The Merck Manual, Seventeenth Ed., 1999 を参照のこと。これらサイト及び文献のそれぞれの内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

40

#### 【0255】

本発明において使用するための方法及び組成物は、検出及び／または治療レジメンの一部として 1 つまたは複数の別の組み合わせの細胞傷害性薬剤と一緒に用いることもできる。いくつかの実施形態では、別の組み合わせの細胞傷害性薬剤は、下記のものから選択さ

50

れる：CHOPP（シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ビンクリスチン、プレドニゾン、及びプロカルバジン）、CHOP（シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ビンクリスチン、及びプレドニゾン）、COP（シクロホスファミド、ビンクリスチン、及びプレドニゾン）、CAP-BOP（シクロホスファミド、ドキシソルピシン、プロカルバジン、プレオマイシン、ビンクリスチン、及びプレドニゾン）、m-BACOD（メトトレキサート、プレオマイシン、ドキシソルピシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾン、及びロイコボリン）、ProMACE-MOPP（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキシソルピシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロエタミン（mechloethamine）、ビンクリスチン、プレドニゾン、及びプロカルバジン）、ProMACE-CytaBOM（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキシソルピシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、プレオマイシン、及びビンクリスチン）、MACOP-B（メトトレキサート、ドキシソルピシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、プレオマイシン、及びロイコボリン）、MOPP（メクロエタミン（mechloethamine）、ビンクリスチン、プレドニゾン、及びプロカルバジン）、ABVD（アドリアマイシン/ドキシソルピシン、プレオマイシン、ビンブラスチン、及びダカルバジン）、MOPP（メクロエタミン（mechloethamine）、ビンクリスチン、プレドニゾン、及びプロカルバジン）とABV（アドリアマイシン/ドキシソルピシン、プレオマイシン、及びビンブラスチン）との交互使用、MOPP（メクロエタミン（mechloethamine）、ビンクリスチン、プレドニゾン、及びプロカルバジン）とABVD（アドリアマイシン/ドキシソルピシン、プレオマイシン、ビンブラスチン、及びダカルバジン）との交互使用、Ch1VPP（クロラムブシル、ビンブラスチン、プロカルバジン、及びプレドニゾン）、IMVP-16（イホスファミド、メトトレキサート、及びエトポシド）、MIME（メチル-gag、イホスファミド、メトトレキサート、及びエトポシド）、DHAP（デキサメタゾン、高用量シタリビン（cytaribine）、及びシスプラチン）、ESHAP（エトポシド、メチルプレジゾロン（methylpredisolone）、高用量シタラビン、及びシスプラチン）、CEPP（B）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾン、及びプレオマイシン）、CAMP（ロムスチン、ミトキサントロン、シタラビン、及びプレドニゾン）、CVP-1（シクロホスファミド、ビンクリスチン、及びプレドニゾン）、ESHOP（エトポシド、メチルプレジゾロン（methylpredisolone）、高用量シタラビン、ビンクリスチン、及びシスプラチン）、EPOCH（ボーラス用量のシクロホスファミド及び経口プレドニゾンと共にエトポシド、ビンクリスチン、及びドキシソルピシンを96時間使用するもの）、ICE（イホスファミド、シクロホスファミド、及びエトポシド）、CEPP（B）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾン、及びプレオマイシン）、CHOP-B（シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ビンクリスチン、プレドニゾン、及びプレオマイシン）、CEPP-B（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、及びプレオマイシン）、ならびにP/DOCE（エピルピシンまたはドキシソルピシン、ビンクリスチン、シクロホスファミド、及びプレドニゾン）。

【0256】

B．徴候

本発明において使用するための組成物及び方法は、疾患または病状を治療及び/または検出するためにさまざまな抗増殖性及び/または抗血管新生の状況において使用され得る。

【0257】

1．NRP1関連病状

NRP1発現は、いくつかの既知の疾患、病状、障害、がん、及び腫瘍型と関連して検出されており、いくつかの細胞型において検出されている。本発明によれば、とりわけ、NRP1と結び付くそのような疾患、病状、障害、がん、腫瘍型、及び細胞型が、クロロトキシシン薬剤を投与することによって検出及び/または治療される。本発明によれば、とりわけ、NRPと結び付く疾患、病状、障害、がん、腫瘍型、または細胞型のNRP1発

10

20

30

40

50

現細胞が、クロロトキシシン薬剤を使用することで検出される。

【0258】

N R P 1 の発現と結び付く疾患、病状、及び障害には、眼疾患、血管新生眼疾患、加齢性黄斑変性 ( A M D ) 、虚血性網膜症における黄斑浮腫、酸素誘発性網膜症、肝線維症、シャルコー・マリー・トゥース病、循環器疾患、及びさまざまながん (例えば、さまざまな腫瘍) が含まれる。

【0259】

N R P 1 の発現と結び付くがん (例えば、腫瘍) には、例えば、メラノーマ、乳癌、肝癌、前立腺癌、肺癌、脳癌、癌腫、結腸癌、膵癌、星状細胞腫、膠芽腫、及び神経芽腫が含まれる。

【0260】

N R P 1 の発現と結び付く細胞型には、例えば、線維芽細胞、内皮細胞、及び免疫細胞を含む、間質細胞が含まれる。

【0261】

N R P 1 と結び付く疾患と関連するプロセスには、血管新生、がんの血管新生、炎症、軸索ガイダンス、免疫応答、転移、がんの浸潤性、メラノーマの浸潤性、がんの進行、がんの攻撃性、がんの病期の進行、がんの予後不良、転移能 (例えば、メラノーマ及び乳癌におけるもの)、がんの浸潤における上皮間葉転換が含まれる。

【0262】

さまざまな実施形態において、本発明は、がんが N R P 1 を発現するかどうかを決定するステップを含む。がんが N R P 1 を発現するかどうかの決定は、がんもしくは対象に存在する試料、またはがんもしくは対象に由来する試料 (組織、タンパク質、血漿、核酸試料、または他の生物学的試料など) から決定され得る。がんが N R P 1 を発現するかどうかを決定するための手法は、例えば、試料を分析することによるものであり、当該技術分野において知られている。こうした手法には、例えば、プロテオミクス解析、m R N A 分析、及び抗体ベースの方法が含まれる。

【0263】

2. 抗増殖状況

ある特定の実施形態では、本発明において使用するための組成物及び方法は、無制御な細胞増殖を伴う病状を治療及び/または検出するために使用され、こうした病状は、原発性及び/または転移性のがん、ならびに他のがん性の病状などである。例えば、本発明において使用するための組成物及び方法は、固形腫瘍のサイズの低減、がんの増殖もしくは転移の抑制、さまざまなリンパ性癌の治療、及び/またはこうした疾患に罹患している哺乳類 (ヒトを含む) の生存期間の延長に有用であろう。

【0264】

本発明に従って治療及び/または検出され得るがん及びがんの病状の例としては、限定されないが、脳及び中枢神経系の癌 (例えば、髄膜、脳、脊髄、脳神経、及び C N S の他の部分の腫瘍 (膠芽腫または髄芽腫など))、頭部及び/または頸部の癌、乳癌、循環系の癌 (例えば、心臓、縦隔及び胸膜、ならびに他の胸腔内臓器の癌、血管の癌、ならびに腫瘍関連血管組織)、血液及びリンパ系の癌 (例えば、ホジキン病、非ホジキン病リンパ腫、パーキットリンパ腫、A I D S 関連リンパ腫、悪性免疫増殖性疾患、多発性骨髄腫、及び悪性形質細胞新生物、リンパ性白血病、骨髄性白血病、急性または慢性のリンパ球性白血病、単球性白血病、特定の細胞型の他の白血病、詳細不明の細胞型の白血病、リンパ組織、造血組織、及び関連組織の詳細不明の悪性新生物 (びまん性大細胞型リンパ腫、T 細胞性リンパ腫、または皮膚 T 細胞性リンパ腫など))、排泄系の癌 (例えば、腎臓、腎盂、尿管、膀胱、及び他の泌尿器の癌)、胃腸管の癌 (例えば、食道、胃、小腸、結腸、結腸直腸、直腸 S 状結腸移行部、直腸、肛門、及び肛門管の癌)、肝臓及び肝内胆管、胆嚢、ならびに胆道の他の部分、膵臓、ならびに他の消化器が関与する癌、口腔の癌 (例えば、唇、舌、歯肉、口腔底、口蓋、耳下腺、唾液腺、扁桃腺、中咽頭、鼻咽頭、梨状陥凹、下咽頭、及び口腔の他の部位の癌)、生殖器系の癌 (例えば、外陰部、陰、子宮頸部、

10

20

30

40

50

子宮、卵巣、及び女性生殖器と結び付く他の部位、胎盤、陰茎、前立腺、精巣、及び男性生殖器と結び付く他の部位の癌)、気道の癌(例えば、鼻腔、中耳、副鼻腔、喉頭、気管、気管支、及び肺の癌(小細胞肺癌及び非小細胞肺癌など))、骨格系の癌(例えば、四肢の骨及び関節軟骨、骨関節軟骨、及び他の部位の癌)、皮膚の癌(例えば、皮膚の悪性メラノーマ、非メラノーマ皮膚癌、皮膚の基底細胞癌、皮膚の扁平上皮癌、中皮腫、カボジ肉腫)、ならびに他の組織(末梢神経系及び自律神経系、結合軟部組織、後腹膜及び腹膜、眼及び付属器、甲状腺、副腎、ならびに他の内分泌腺及び関連構造を含む)が関与する癌、リンパ節の続発性及び詳細不明の悪性新生物、呼吸器系及び消化器系の続発性悪性新生物、ならびに他の部位の続発性悪性新生物が挙げられる。

【0265】

10

いくつかの実施形態では、がんは、皮膚メラノーマまたは眼球内メラノーマである。いくつかの実施形態では、がんは、転移性メラノーマである。いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌である。いくつかの実施形態では、がんは、結腸癌または結腸直腸癌であり、例えば、転移性の結腸癌または結腸直腸癌である。

【0266】

いくつかの実施形態では、組成物及び方法は、神経外胚葉性癌の治療及び/または検出において有用である(例えば、米国特許第6,667,156号(当該文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる)を参照のこと)。いくつかの実施形態では、神経外胚葉性腫瘍は、神経膠腫である(例えば、米国特許第5,905,027号、同6,028,174号、同6,319,891号、同6,429,187号、及び同6,870,029号、ならびに国際特許出願公開WO03/101475、同WO09/021,136、及び同WO2009/140599(これらの文献のそれぞれの内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる)を参照のこと)。本発明の組成物及び方法が有用な型の神経膠腫には、限定されないが、多形性膠芽腫(WHO悪性度IV)、未分化星状細胞腫(WHO悪性度III)、低悪性度神経膠腫(WHO悪性度II)、毛様細胞性星状細胞腫(WHO悪性度I)、乏突起神経膠腫、神経節腫、髄膜腫、及び上衣腫が含まれる。いくつかの実施形態では、神経外胚葉性腫瘍は、髄芽腫、神経芽腫、褐色細胞腫、メラノーマ、末梢性未分化神経外胚葉性癌、肺の小細胞癌、ユーイング肉腫、及び脳における転移性がんからなる群から選択される。

20

【0267】

30

本明細書に記載の発明のある特定の実施形態では、組成物及び方法は、肉腫の治療及び/または検出において使用される。いくつかの実施形態では、本発明において使用するための組成物及び方法は、膀胱癌、乳癌、慢性リンパ腫白血病、頭頸部癌、子宮内膜癌、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、卵巣癌、脾癌、腎癌、及び前立腺癌の治療及び/または検出において使用される。いくつかの実施形態では、肉腫は、前立腺癌または乳癌からなる群から選択される(例えば、国際特許出願公開WO03/101474A1、同WO03/10475A2、及び同WO2009/140599(これらの文献のそれぞれの内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる)を参照のこと)。いくつかの実施形態では、肉腫は、脾癌である。

【0268】

40

本明細書に記載の発明のある特定の実施形態では、組成物及び方法は、骨髓増殖性疾患(例えば、骨髓起源の腫瘍)及び/またはリンパ増殖性疾患(例えば、リンパ起源の腫瘍)の治療及び/または検出において有用である(例えば、国際特許出願公開WO05/099774(当該文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる)を参照のこと)。

【0269】

本発明において使用するための組成物及び方法が有用な型の骨髓増殖性疾患には、限定されないが、真性赤血球増加症(PV)、本態性血小板血症(ET)、原発性骨髓線維症(AMM)(特発性骨髓線維症(IMF)とも称される)、及び慢性骨髓性白血病(CML)が含まれる。

50

## 【 0 2 7 0 】

いくつかの実施形態では、本発明において使用するための組成物及び方法は、リンパ増殖性疾患の治療及び／または検出（例えば、画像化もしくは診断）に使用される。いくつかの実施形態では、リンパ増殖性疾患は、非ホジキンリンパ腫である。いくつかの実施形態では、リンパ増殖性疾患は、B細胞性新生物であり、例えば、前駆B細胞性リンパ芽球性白血病／リンパ腫または成熟B細胞性新生物などである。成熟B細胞性新生物の型の例としては、限定されないが、B細胞性慢性リンパ球性白血病／小リンパ球性リンパ腫、B細胞性前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾辺縁帯B細胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、節外性辺縁帯B細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、節性辺縁帯リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、パーキットリンパ腫、形質細胞腫、及び形質細胞性骨髄腫が挙げられる。

10

## 【 0 2 7 1 】

いくつかの実施形態では、本発明において使用するための組成物及び方法は、T細胞性新生物の治療に使用される。T細胞性新生物の型の例としては、限定されないが、T細胞性前リンパ球性白血病、T細胞性大顆粒リンパ球性白血病、NK細胞性白血病、節外性NK／T細胞性リンパ腫、菌状息肉症、原発性皮膚未分化大細胞型リンパ腫、皮下脂肪織炎様T細胞性リンパ腫、腸症型腸管T細胞性リンパ腫、肝脾ガンマ・デルタT細胞性リンパ腫、血管免疫芽球性T細胞性リンパ腫、末梢性T細胞性リンパ腫、未分化大細胞型リンパ腫、及び成人T細胞性リンパ腫が挙げられる。

20

## 【 0 2 7 2 】

本発明において使用するための組成物及び方法を使用して治療され得るがんは、他の化学療法剤での検出及び／または治療に不応性であり得る。「不応性」という用語は、がんの治療に関して本明細書で使用されるとき、がん（及び／またはその転移）が、本発明の組成物以外の少なくとも1つの化学療法剤で治療されると、そのような化学療法部分による治療の後に抗増殖応答を全く示さないか、または当該抗増殖応答が非常に弱いものにとどまる（すなわち、がんの増殖の抑制が全く生じないか、または弱いものにとどまる）（すなわち、他の（好ましくは標準的な）化学療法剤ではがんを治療することが全くできないか、または当該治療の結果が満足のいかないものにとどまる）ことを意味する。本発明は、不応性のがん及び同様のものの治療について言及される場合、（i）患者の治療の間に1つまたは複数の化学療法剤が既に効果を示さなかったがん、だけでなく、（ii）他の手段（例えば、化学療法剤の存在下での生検及び培養）によって不応性であることが示され得るがん、も包含することが理解されよう。

30

## 【 0 2 7 3 】

本発明において使用するための組成物の投与によって治療され得るがん、または本発明において使用するための方法に従って治療され得るがんには、例えば、下記の型または組織のがんが含まれる：副鼻腔、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性リンパ球性白血病、付属器、副腎、副腎腫瘍神経芽腫、副腎褐色細胞腫、成人T細胞性リンパ腫、原発性骨髄線維症（AMM）（IMF）、AIDS関連リンパ腫、肛門管、肛門領域、未分化星状細胞腫、後頭葉の未分化上衣腫、頭頂葉の未分化上衣腫、未分化大細胞型リンパ腫、未分化乏突起神経膠腫、血管免疫芽球性T細胞性リンパ腫、肛門、四肢の関節軟骨、星状細胞腫、頭頂葉の星状細胞腫、自律神経系、B細胞性慢性リンパ球性白血病／小リンパ球性リンパ腫、B細胞性新生物、B細胞性前リンパ球性白血病、皮膚の基底細胞癌、良性前立腺肥大症、胆道、膀胱、膀胱（転移性）、芽腫、血液、骨、脳、乳房、乳房（転移性）、骨に転移した乳癌、肺に転移した乳癌、気管支、パーキットリンパ腫、ホスファチジルイノシトールリン脂質を発現するがん、癌腫、子宮頸部の癌、子宮内膜の癌、卵管の癌、腎盂の癌、性器及び生殖器の癌、腔の癌、外陰部の癌、細胞性前リンパ球性白血病、中枢神経系、子宮頸部、慢性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性リンパ腫白血病、慢性骨髄性白血病、循環系、CNS、CNSリンパ腫、結腸、結腸（転移性）、肝臓に転移した結腸癌、結腸直腸、脈絡膜新生血管が関与する病状、結合組織、脳神経、皮膚メラノーマ、皮膚T細胞性リンパ腫、胚芽異形成性神経上皮腫瘍、類腱腫、小脳の線維形成性髄芽腫、

40

50



糖尿病網膜症、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、消化器、内分泌系、子宮内膜癌 (endometrial cancer)、子宮内膜癌 (endometrial carcinoma)、腸症型腸管T細胞性リンパ腫、上衣腫、脳における表皮嚢胞、てんかん、食道、本態性血小板血症 (ET)、ユーイング肉腫、排泄系、節外性辺縁帯B細胞性リンパ腫、節外性NK/T細胞性リンパ腫、眼、女性生殖器、線維性星状細胞腫、口腔底、濾胞性リンパ腫、G26細胞、胆嚢、神経節腫、神経節腫、神経節細胞腫、胃腸管、膠細胞由来の腫瘍、膠芽腫、多形性膠芽腫、多形性膠芽腫 (再発性)、小脳橋の多形性膠芽腫、前頭葉の多形性膠芽腫、鞍上部脳室内の多形性膠芽腫、側頭葉の多形性膠芽腫、神経膠腫、神経膠腫 (再発性、転移性)、神経膠肉腫、グリオーシス、歯肉、造血組織及び関連組織、ヘアリー細胞白血病、頭部または頸部、心臓、肝脾ガンマ・デルタT細胞性リンパ腫、高悪性度神経膠腫、高悪性度神経膠腫 (再発性)、ホジキン病、肥大、下咽頭、特発性骨髄線維症 (IMF) (AMM)、炎症性疾患、中悪性度/高悪性度リンパ腫、頭蓋内膠芽腫、肝内胆管、眼内メラノーマ、胸腔内臓器、カポジ肉腫、腎臓 (健康な皮質への結合)、腎臓、腎癌、喉頭、白血病、唇、肝臓、肝腫瘍、低悪性度星状細胞腫 (WHO悪性度II)、低悪性度神経膠腫 (WHO悪性度Iまたは悪性度II)、低悪性度神経膠腫 (WHO悪性度II)、低悪性度原発性脳腫瘍 (WHO悪性度II)、脳の下部、肺、リンパ系、リンパ球性リンパ腫、リンパ、リンパ性白血病、リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、リンパ増殖性疾患、男性生殖器、後頭脳室周囲の悪性 (未分化) 星状細胞腫、悪性神経膠腫、悪性免疫増殖性疾患、皮膚の悪性メラノーマ、悪性形質細胞新生物、マントル細胞リンパ腫、成熟B細胞性新生物、縦隔、髄芽腫、甲状腺髄様癌、髄芽腫、後頭蓋窩の髄芽腫、メラノーマ、メラノーマ (転移性)、メラノーマ (原発性)、脳に転移したメラノーマ、CNSに転移したメラノーマ、肺に転移したメラノーマ、髄膜、髄膜腫、髄膜腫由来の新生物腫瘍組織、中皮腫、脳における神経外胚葉起源の転移性腫瘍、脳における転移性腫瘍、中耳、混合性神経膠腫、単球性白血病、多発性骨髄腫、菌状息肉症、骨髄、骨髄性白血病、骨髄増殖性疾患、鼻腔、鼻咽頭、中枢神経系 (CNS) の新生物、新生物疾患細胞、神経芽腫、神経外胚葉性癌、神経外胚葉由来の癌、NK細胞性白血病、節性辺縁帯リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、非メラノーマ皮膚癌、非小細胞肺癌、非小細胞肺癌 (転移性)、非小細胞肺癌、眼の血管新生、眼外傷、食道、乏突起神経膠腫、口腔、中咽頭、卵巣、卵巣癌、口蓋、腭臓、腭癌 (転移性)、腭癌、乳頭腫 (脳室)、傍神経節腫 (転移性)、傍神経節腫 (転移性)、副甲状腺、耳下腺、陰茎、末梢神経、末梢性未分化神経外胚葉性腫瘍、末梢性T細胞性リンパ腫、腹膜、褐色細胞腫、毛様細胞性星状細胞腫、小脳の毛様細胞性星状細胞腫、視床下部の毛様細胞性星状細胞腫、後頭蓋窩の毛様細胞性星状細胞腫、側頭葉の毛様細胞性星状細胞腫、視床の毛様細胞性星状細胞腫、下垂体、下垂体腺腫、胎盤、形質細胞性骨髄腫、形質細胞性骨髄腫T細胞性新生物、形質細胞腫、多形性黄色星状細胞腫、胸膜、毛様細胞性星状細胞腫、真性赤血球増加症 (PV)、前駆B細胞性リンパ芽球性白血病/リンパ腫、原発性皮膚未分化大細胞型リンパ腫、原発性神経外胚葉性腫瘍 (PNET)、前立腺、前立腺癌 (転移性)、骨に転移した前立腺癌、前立腺癌、弾性線維性仮性黄色腫、乾癬、梨状陥凹、直腸S状結腸移行部、直腸、腎細胞癌、腎盂、生殖器系、気道、再狭窄、後腹膜、唾液腺、肉腫、肉腫 (転移性)、軟部組織の肉腫、神経鞘腫、リンパ節の続発性及び詳細不明の悪性新生物、消化器系の続発性悪性新生物、呼吸器系の続発性悪性新生物、続発性悪性新生物、骨格系、皮膚、皮膚癌、小細胞肺癌、小細胞肺癌 (転移性)、小細胞肺癌、小腸、軟部組織、脊髄軸腫瘍、脊髄、脾辺縁帯B細胞性リンパ腫、皮膚の扁平上皮癌、胃、卵巣に転移した胃癌、脳卒中、右脚の皮下結節、皮下脂肪織炎様T細胞性リンパ腫、前頭葉の上衣下巨細胞性星状細胞腫、表在性膀胱癌、テント上、T細胞性大顆粒リンパ球性白血病、T細胞性新生物、T細胞性前リンパ球性白血病、T細胞性リンパ腫、精巣、血小板血症 (ET)、甲状腺、舌、扁桃腺、気管、移行上皮癌、移行上皮癌 (転移性)、神経外胚葉起源の腫瘍、神経外胚葉起源の腫瘍 (転移性)、悪性度未分類の神経膠腫、リンパの詳細不明の悪性新生物、脳の上部、尿管、尿道、泌尿器、子宮、腔、血管の癌、及び/または外陰部。

【0274】

10

20

30

40

50

本発明において使用するための組成物を投与することによって、または本発明において使用するための方法に従って、がん細胞型が治療され得るか、または治療され得るある特定のがんを代表し得るがん細胞型が治療され得る。治療され得るこうしたがん細胞型には、例えば、下記の細胞型のがんが含まれる：1299ヒト非小細胞肺癌細胞、2LMPヒト転移性乳癌細胞、9Lラット神経膠腫細胞、A172細胞、A27非小細胞肺癌細胞、A427ヒト肺癌細胞、A459肺上皮癌細胞、A549ヒト肺癌細胞、ACHNヒト腎細胞腺癌細胞、BABc3T3マウス線維芽細胞株、BT474ヒト乳癌、C6ラット神経膠腫細胞、Caco-2ヒト結腸癌細胞、Caki-1ヒト明細胞腎癌細胞、CCD986SKヒト皮膚線維芽細胞、CH-235MG GBM細胞、COS-2サル腎臓細胞株、Cr1:CD-1(登録商標)(ICR)BRマウス、D54-MGヒト神経膠腫細胞、Daudiヒトリンパ腫細胞、DU145ヒト前立腺癌細胞、DY3672ヒト乳癌細胞、E54-MG/SCIDマウスモデル、GL2g1マウス神経膠腫細胞、H1299ヒト非小細胞癌細胞、H1466細胞、H460ヒト肺腺癌細胞、HCN-2ヒト神経細胞、HCT116ヒト結腸癌細胞、Helaヒト子宮頸癌細胞、HepG2ヒト肝癌細胞、HL-60ヒト急性前骨髄球性白血病、HS683ヒト非浸潤性神経膠腫、HT29ヒト結腸癌細胞、培養ヒト原発性神経膠腫、IMR-32横紋筋肉腫細胞、LCC6ヒト乳癌細胞、LNCaPヒト前立腺癌細胞、Malme3Mヒト転移性メラノーマ細胞、MCF-10A乳房細胞、MCF-7ヒト乳癌細胞、MDA-MB-231ヒト乳腺癌細胞、MDA-MB-453ヒト乳癌細胞、MDA-MB-468ヒト乳腺癌細胞、急性リンパ芽球性白血病由来のMolt-4 Tリンパ芽球、マウスCNVモデル、NCI-H187ヒト小細胞肺癌細胞、NIH-H1466ヒト肺腺癌細胞、PaCa-2ヒト膵癌細胞、Panc-1ヒト膵癌細胞、PC-3ヒト前立腺癌細胞、PFSK-1ヒト未分化神経外胚葉性細胞、Rajiヒトリンパ腫細胞、SH-N-MCヒト神経芽腫細胞、SH-SY5Yヒト神経芽腫細胞、SK-BR-3ヒト乳腺癌細胞、SKM28メラノーマ細胞、SKMEL-28ヒトメラノーマ細胞、SKMEL-31ヒトメラノーマ細胞、SK-MG-1 GBM細胞、SK-N-SH横紋筋肉腫細胞、STTG1星状細胞腫細胞、SW948結腸直腸癌細胞、T98G細胞、TE671横紋筋肉腫細胞、U105MG GBM細胞、U138MG細胞、U251膠芽腫細胞、U373ヒト膠芽腫細胞、U87ヒト神経膠腫細胞、UAB12983低悪性度星状細胞腫細胞、UAB4613毛様細胞性星状細胞腫細胞、UAB4630 GBM細胞、UAB4663毛様細胞性星状細胞腫細胞、UAB4720未分化上衣腫細胞、UAB485923髓芽腫細胞、UAB8553 GBM細胞、及び/またはW62ヒト肺癌細胞。

#### 【0275】

ある特定の実施形態では、本発明において使用するためのクロロトキシシン薬剤は、本発明に従ってクロロトキシシン薬剤によって検出されたがんの治療に使用される。

#### 【0276】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤、及び特に、C末端アルギニン残基含有クロロトキシシンポリペプチド(例えば、C末端アルギニン残基含有クロロトキシシンポリペプチド断片を含む)であるクロロトキシシン薬剤、またはC末端アルギニン残基含有クロロトキシシンポリペプチドを含むクロロトキシシン薬剤は、CNS組織及び/または細胞への投与及び/または送達に特に有用であり得る。

#### 【0277】

本発明において使用される組成物の投与によって治療され得る他の徴候、または本発明において使用される方法に従って治療され得る他の徴候には、限定されないが、下記のものが含まれる：加齢性黄斑変性、アルツハイマー病の脳(結合なし)、関節炎、萎縮型黄斑変性、若年性黄斑変性、黄斑変性、近視、関節リウマチ、及び/または滲出型黄斑変性。

#### 【0278】

### 3. 抗血管新生状況

クロロトキシシンは、抗血管新生特性を発揮することが示されている。例えば、国際特許出願公開WO2009/117018を参照のこと。当該文献の内容は、その全体が参照

によって本明細書に組み込まれる。ある特定の実施形態では、本発明において使用するための組成物及び方法は、疾患または病状の治療、検出（例えば、画像化、診断、もしくは特徴付け）及び／または軽快に使用され、こうした疾患または病状は、例えば、がん（本明細書に記載の転移性がんを含む）、眼の血管新生（黄斑変性など）、炎症性疾患（関節炎など）などである。いくつかの実施形態では、病状または疾患は、脈絡膜新生血管によって特徴付けられる。そのような病状または疾患の例としては、限定されないが、黄斑変性（滲出型黄斑変性、加齢性黄斑変性などを含む）、近視、眼外傷、弾性線維性仮性黄色腫、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

#### 【0279】

黄斑変性は、65歳以上のアメリカ人の視力喪失及び失明の主な原因である。黄斑変性は、若年性黄斑変性も生じるものの、典型的には、加齢に伴う様式で生じる（AMDまたはARM Dと呼ばれることが多い）。黄斑は、網膜において中心視野の鮮明化を担う部分であり、AMD / ARM Dでは黄斑が変性する。黄斑変性は、典型的には、萎縮型（新生血管なし）または滲出型（新生血管あり）として診断される。

10

#### 【0280】

萎縮型黄斑変性では、主に黄斑周辺に由来する変質組織からの沈着物または残骸に端を発して、ドルーゼンとして知られる黄色みを帯びた斑点が蓄積し始める。中心視力の低下は、通常は徐々に進行し、滲出型黄斑変性で見られる視力喪失ほど激しいものではない。

#### 【0281】

滲出型黄斑変性は、「新生血管」という言葉が状態説明に選択されることもからも示唆されるように、新たな血管が異常に成長することによって特徴付けられ、この血管新生は、例えば、黄斑で生じる。そのような新たな血管は、網膜下で成長することから、血液及び液体の漏出を引き起こし得る。そのような漏出は、感光性網膜細胞に永続的な損傷を与え、その結果、損傷を受けた感光性網膜細胞は死滅し、中心視野に盲点を生じさせる。滲出型黄斑変性は、2つのカテゴリーへとさらに分類することができる。滲出型黄斑変性の潜在的形態では、網膜下での新たな血管の成長は、それほど顕著ではなく、漏出の顕性も低く、典型的には、生じる視力低下の程度は低い。滲出型黄斑変性の典型的形態では、血管の成長及び癒着に伴って、境界が非常に明瞭な輪郭が網膜下に観測可能となる。典型的な滲出型黄斑変性は、典型的な脈絡膜新生血管としても知られており、通常、より重度の視力喪失に至る。

20

30

#### 【0282】

多くのAMD / ARM D症例を含めて滲出型黄斑変性における血管新生の役割を考慮すると、本発明の組成物及び方法は、そのような障害の治療、検出（例えば、画像化もしくは診断）、及び／または軽快において有用であり得る。滲出型黄斑変性に対する現在の治療は、血管新生阻害剤（LUCENTIS（商標）、MACUGEN（商標）、及び／またはVISUDYNE（商標）など）を使用するものであり、任意選択で光線力学的治療（PDT）が併用されることで特定の細胞が薬物の標的とされる。光凝固術もまた、滲出型黄斑変性の治療に使用され、光凝固術では、高エネルギーのレーザー光が使用されることで、異常な血管を有する網膜領域に小さな熱傷が創出される。

#### 【0283】

40

いくつかの実施形態では、クロロトキシシン薬剤（またはその医薬組成物）は、滲出型黄斑変性及び／または加齢性黄斑変性に罹患している対象に投与される。滲出型黄斑変性に罹患している対象の中でも、とりわけ、対象が罹患している滲出型黄斑変性は、潜在的形態または典型的形態のものであり得る。いくつかの実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、現存する新生血管系を退縮させる。いくつかの実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、新たな血管の出現を阻止する。ある特定の実施形態では、クロロトキシシン薬剤は、滲出型黄斑変性のための他の治療（光凝固術、他の血管新生阻害剤での治療、光線力学的治療など）と併用される。

#### 【0284】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤は、血管新生と結び付

50

く疾患、障害、または病状の治療に推奨される１つまたは複数の治療レジメンを含む治療レジメンを併用して投与されるか、または当該治療レジメンの一部として投与される。いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、クロロトキシシン薬剤、クロロトキシシンポリペプチド、またはクロロトキシシン断片は、いくつかの実施形態では、血管内皮増殖因子（VEGF）（血管の形成を刺激する）とNRP1との相互作用を妨害し得ると仮定される。

【0285】

C. 併用療法

【0286】

さまざまな実施形態において、本発明において使用するためのクロロトキシシン薬剤は、クロロトキシシン薬剤ではない追加の治療薬剤または治療を１つまたは複数施すことをさらに含む治療の過程において対象に投与され得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤は、追加の薬剤または治療と一緒に投与され得る。ある特定の実施形態では、本発明のクロロトキシシン薬剤は、追加の薬剤または治療とは別に投与され得る。ある特定の実施形態では、追加の抗がん治療を含む治療レジメンを以前に受けたことがある対象、当該治療レジメンを受けることが予定されている対象、または当該治療レジメンの過程にある対象にクロロトキシシン薬剤が投与され得る。クロロトキシシンが投与されると、場合によっては、クロロトキシシン薬剤と併用される薬剤または治療の送達または効力が、例えばNRP1との相互作用を介して、改善され得る。

【0287】

クロロトキシシン薬剤と併用される薬剤または治療は、別の組成物の形態でクロロトキシシン薬剤と同時に、またはクロロトキシシン薬剤の投与とは時間的に異なる様式で、単一の治療組成物または用量においてクロロトキシシン薬剤と一緒に施され得る。クロロトキシシン薬剤が追加の薬剤と併用されることになると、クロロトキシシン薬剤は、追加の薬剤と一緒に製剤化され得るか、またはクロロトキシシン薬剤は、追加の薬剤の製剤とは別に製剤化され得る。例えば、それぞれのクロロトキシシン薬剤及び追加の薬剤組成物は、例えば、投与の直前に混合され、一緒に投与され得るか、または例えば同じ時間もしくは異なる時間に、別々に投与され得る。さまざまな実施形態において、本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤と組み合わせて施される追加の薬剤または治療は、クロロトキシシン薬剤と同じ時間、クロロトキシシン薬剤と同じ日、またはクロロトキシシン薬剤と同じ週に投与され得る。さまざまな実施形態において、本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤と組み合わせて施される追加の薬剤または治療は、クロロトキシシン薬剤の投与と、追加の薬剤または治療の実施とが、クロロトキシシン薬剤の投与前もしくは投与後の１時間もしくは数時間、クロロトキシシン薬剤の投与前もしくは投与後の１日もしくは数日、クロロトキシシン薬剤の投与前もしくは投与後の１週もしくは数週、またはクロロトキシシン薬剤の投与前もしくは投与後の１ヶ月もしくは数ヶ月によって分離されるように施され得る。さまざまな実施形態において、１つまたは複数の追加の薬剤の投与頻度は、クロロトキシシン薬剤の投与頻度と同じか、同様であるか、または異なり得る。

【0288】

クロロトキシシン薬剤を施すためのレジメン（例えば、タイミング及び用量）と、１つまたは複数の追加の薬剤または治療のいずれかを施すためのレジメンと、は独立して決定され、独立して実施され得るが、ある特定の状況では、用量は、一緒に調整されるか、相互依存적であるか、同時投与されるか、または当業者に知られる任意の他の関係性を有し得る。クロロトキシシン薬剤併用療法は、クロロトキシシン薬剤と１つまたは複数の追加の薬剤または治療との間で相乗効果を示し得、いくつかの実施形態では、相加効果を上回る効果を示し得ることが企図される。クロロトキシシン薬剤は、独立して決定される任意の有効量で投与されるか、または施される１つもしくは複数の追加の薬剤もしくは治療のいずれかとクロロトキシシン薬剤との協同作用によって決定される任意の有効量で投与され得る。クロロトキシシン薬剤の投与は、いくつかの実施形態では、クロロトキシシン薬剤を併用せずに追加の薬剤または治療を施すための参照レジメンと比較して、追加の薬剤または治療の治

療的に有効な用量、必要用量、または実施用量を低減し得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、これまでに実施されたことのある他の治療または現在実施されている他の治療を置き換えるか、または補強し得る。例えば、クロロトキシシン薬剤と共に治療を行うと、1つまたは複数の追加の薬剤または治療を施すことを中止または弱める（例えば、レベルを下げて施す）ことができる。

【0289】

併用療法には、本明細の記載の2つの異なるクロロトキシシン薬剤を投与することを含む治療レジメン、及び/または本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤を含む治療レジメンを複数の製剤及び/または投与経路によって実施することが包含される。

【0290】

ある特定の実施形態では、がんの治療方法は、本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤を投与すること、及びクロロトキシシン薬剤ではない抗がん薬剤または抗がん治療を施すこと、を含み得る。がんの治療については、さまざまな薬剤及び治療が当該技術分野において知られているか、または本明細書に記載されている。特定の実施形態では、がんを有する患者の治療において使用される薬剤及び治療には、例えば、ABRAXANE（登録商標）、BCNU、シスプラチン、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、パクリタキセル、テモゾロミド、トポテカン、フルオロウラシル、ピンクリスチン、ピンブラスチン、プロカルバジン、デカルバジン（decarbazine）、アルトレタミン、メトトレキサート、メルカプトプリン、チオグアニン、リン酸フルダラビン、クラドリピン、ペントスタチン、シタラビン、アザシチジン、エトポシド、テニポシド、イリノテカン、ドセタキセル、ドキシルピシン、ダウノルピシン、ダクチノマイシン、イダルビシン、プリカマイシン、マイトマイシン、ブレオマイシン、タモキシフェン、フルタミド、ロイプロリド、ゴセレリン、アミノグルテチミド、アナストロゾール、アムサクリン、アスパラギナーゼ、ミトキサントロン、ミトタン、アミホスチン、及びそれらの組み合わせ、ならびに本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる他のものが含まれる。本発明において使用するための抗がん薬剤には、生物製剤及び/または抗体療法が含まれ、こうした生物製剤及び/または抗体療法には、限定されないが、Arzerra（オフアツマブ）、Avastin（ベバシズマブ）、Bexxar（トシツモマブ）、Campath（アレムツズマブ）、Erbix（セツキシマブ）、Herceptin（トラスツズマブ）、Mylotarg（ゲムツズマブオゾガマイシン）、Rituxan（リツキシマブ）、Vectibix（パニツムマブ）、及びZevalin（イブリツモマブチウキセタン）が含まれる。本発明において使用するための抗がん薬剤には、がん免疫療法薬剤がさらに含まれる。推奨されるがん治療の例は、[www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs](http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs)において見つけることができる。治療レジメンは、化学療法、手術、及び/または放射線療法を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤は、がんの検出方法の一部として投与される。

【0291】

ある特定の実施形態では、黄斑変性の治療方法は、本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤を投与すること、及びクロロトキシシン薬剤ではない黄斑変性治療薬剤または黄斑変性治療を施すこと、を含み得る。黄斑変性の治療については、さまざまな薬剤及び治療が当該技術分野において知られているか、または本明細書に記載されている。特定の実施形態では、黄斑変性を有する患者の治療において使用される薬剤または治療には、例えば、ラニズマブ、ベバシズマブ、ペガブタニブ、アフリベルセプト、ベルテポルフィン、レーザー治療、植え込み型デバイス、及び本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる他のものが含まれる。特定の実施形態では、黄斑変性を有する患者の治療において使用される薬剤または治療には、例えば、抗VEGF療法が含まれる。

【0292】

ある特定の実施形態では、炎症性の病状（関節炎など）の治療方法は、本明細書に記載のクロロトキシシン薬剤を投与すること、及びクロロトキシシン薬剤ではない黄斑変性治療薬

10

20

30

40

50

剤または黄斑変性治療を施すこと、を含み得る。炎症性の病状（関節炎など）の治療については、さまざまな薬剤及び治療が当該技術分野において知られているか、または本明細書に記載されている。特定の実施形態では、関節炎を有する患者の治療において使用される薬剤または治療には、例えば、鎮痛剤、非ステロイド性抗炎症剤（NSAID）、反対刺激剤、疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARD）、生物学的応答修飾物質、副腎皮質ステロイド、関節修復、関節置換、関節固定、鍼、グルコサミン、ヨガ、太極拳、マッサージ、及び本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる他のものが含まれる。

#### 【実施例】

##### 【0293】

下記の実施例は、とりわけ、NRP1を発現するがんまたは腫瘍へとクロロトキシン薬剤がペイロードを送達し得ることを例示する。これらの実施例は、本明細書に記載のクロロトキシン薬剤によってがんが効果的に治療され得ることを例示する。これらの実施例は、本明細書に記載のクロロトキシンのポリペプチド断片、具体的には、カルボキシル化C末端アルギニン残基を含むクロロトキシンポリペプチド断片が、NRP1に結合し、がんの治療に寄与し得ることをさらに例示する。したがって、これらの実施例は、クロロトキシン薬剤（例えば、クロロトキシンポリペプチド、クロロトキシンポリペプチド断片、リジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチド、及びリジン残基数低減型クロロトキシンポリペプチド断片（これらは、ペイロード部分などのペイロードと任意選択で複合体化される））が、がんの治療方法において有用であり得ることを実証する。

##### 【0294】

いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、本明細書に記載のさまざまなデータは、カルボキシル化C末端アルギニンを含むペプチド断片へとクロロトキシンポリペプチドが腫瘍微小環境において代謝され、こうして生じたペプチドがNRP1に結合すると、腫瘍細胞上のNRP1へのこの結合によって、クロロトキシン薬剤とは別に投与される治療薬剤の取り込みが増強されるか、またはクロロトキシン複合体としての治療薬剤の取り込みが増強され得るという仮説を支持している。

##### 【0295】

本明細書の実施例及び図において使用される「CTX」（TM601）は、配列番号1のアミノ酸配列及びアミド化C末端アルギニンを有するクロロトキシンポリペプチドを指す。「CTX-クリプトフィシン」（ER-1135472）は、配列番号1によるクロロトキシンポリペプチドがジスルフィドリンカーを介してクリプトフィシンペイロードと結び付いたものを含む複合体を指す。「クリプトフィシン代謝物1」（ER-1143077）は、CTX-クリプトフィシンの活性なS-メチルクリプトフィシン代謝物を指す。「クリプトフィシン代謝物2」（ER-1143083）は、CTX-クリプトフィシンのグルタチオン-S-S-クリプトフィシン代謝物を指す。「クリプトフィシン代謝物3」（ER-1143080）は、CTX-クリプトフィシンのシステイン-S-S-クリプトフィシン代謝物を指す。「カルボキシル化CTX-クリプトフィシン」は、配列番号1によるクロロトキシンポリペプチド及びクリプトフィシンペイロードを含む複合体を指し、当該クロロトキシンポリペプチドは、カルボキシル化C末端アルギニン残基（C末端R-COOH）を有する。「クリプトフィシンペイロード」は、クリプトフィシンペイロード分子単体（クロロトキシンと複合体化していないもの）を指し、当該ペイロード分子は、クリプトフィシン及びジスルフィドリンカーを含む。

##### 【0296】

実施例1：ヒト膵癌MIA PaCa-2を皮下に異種移植したモデルにおけるCTX-クリプトフィシンの抗腫瘍活性

この実施例は、クロロトキシン（配列番号1）-クリプトフィシン複合体（CTX-クリプトフィシン）に対するMIA PaCa-2ヒト膵癌細胞の応答を評価する実験を示す。FBSを10%添加したRPMI-1640培地においてMIA PaCa-2ヒト膵癌細胞（ATCC（登録商標）CRL-1420（商標））を増殖させた。約6週齢の

10

20

30

40

50

免疫不全雌性NU/NUヌードマウス(Charles River Labs)のそれぞれに、 $5 \times 10^6$ 個のMIA PaCa-2がん細胞を接種した。体積0.1 mLに含めたがん細胞を、27ゲージ針を使用してマウスの右腋窩領域付近に皮下注射した。ノギスを使用して腫瘍の測定を少なくとも週に2回行い、腫瘍サイズに基づいてマウスを処理群に無作為化した。

【0297】

処理はすべて、腫瘍接種から14日後に開始し、処理開始時点の平均腫瘍サイズは、約400 mm<sup>3</sup>であった。この実験には、1.25 mg/kg用量のCTX-クリプトフィシンで処理するマウスを6匹、2.5 mg/kg用量のCTX-クリプトフィシンで処理するマウスを6匹、及び媒体で処理する対照マウスを6匹含めた。4日ごとに静脈内投与によって動物を処理し、この処理を3回行った(Q4D×3スケジュール)。薬物はすべて、EtOH含有率10%、Tween 80含有率5%、及び生理食塩水含有率85%の媒体に含めて投与した。腫瘍サイズ及び体重を週に2回測定した。

10

【0298】

2.5 mg/kg用量のCTX-クリプトフィシンで処理すると、すべてのマウスにおいて腫瘍が退縮し、腫瘍の持続的な治癒が生じた(図1)。最後の注射処理からの観察期間が3週間を超えても腫瘍が再増殖することはなかった。試験動物において有意な体重減少または他の毒性徴候は観測されなかった。

【0299】

3回の実験において観測された抗腫瘍活性は、用量応答性であった。2.5 mg/kg用量で生じた腫瘍の退縮及び腫瘍の治癒は、1.25 mg/kg用量で生じた比較的最小の腫瘍増殖抑制とは有意に異なるものであった。

20

【0300】

実施例2：ヒト膀胱癌BxPC3-Red-FLucを皮下に異種移植したモデルにおけるCTX-クリプトフィシンの抗腫瘍活性

この実施例は、CTX-クリプトフィシンに対するBxPC3-Red-FLucヒト膀胱癌細胞の応答を評価する実験を示す。FBSを10%添加したRPMI-1640培地においてBxPC3-Red-FLucヒト膀胱癌細胞(Perkin Elmerカタログ番号125058親細胞ATCC(登録商標)CRL-167(商標))を増殖させた。約6週齢の免疫不全雌性NU/NUヌードマウス(Charles River Labs)のそれぞれに、 $5 \times 10^6$ 個のBxPC3-Red-FLucがん細胞を接種した。体積0.1 mLに含めたがん細胞を、27ゲージ針を使用してマウスの右腋窩領域付近に皮下注射した。ノギスを使用して腫瘍の測定を少なくとも週に2回行い、腫瘍サイズに基づいてマウスを処理群に無作為化した。

30

【0301】

処理はすべて、腫瘍接種から8日後に開始し、処理開始時点の平均腫瘍サイズは、約200 mm<sup>3</sup>であった。この実験には、2.3 mg/kg用量のCTX-クリプトフィシンで処理するマウスを6匹、1.2 mg/kg用量のCTX-クリプトフィシンで処理するマウスを6匹、及び媒体で処理する対照マウスを6匹含めた。4日ごとに静脈内投与によって動物を処理し、この処理を3回行った(Q4D×3スケジュール)。薬物はすべて、EtOH含有率10%、Tween 80含有率5%、及び生理食塩水含有率85%の媒体に含めて投与した。腫瘍サイズ及び体重を週に2回測定した。

40

【0302】

2.3 mg/kgでCTX-クリプトフィシン処理を行うと、統計学的に有意な腫瘍増殖抑制(23日目の時点で $P < 0.0001$ 、一元配置ANOVA及びボンフェローニ多重比較を実施；図2)が生じた。1.2 mg/kg用量(1/2 MTD)でCTX-クリプトフィシンを投与すると抗腫瘍活性は観測されなかった。いずれの試験動物においても有意な体重減少または他の毒性徴候は観測されなかった。

【0303】

実施例3：ヒト前立腺癌PC-3を皮下に異種移植したモデルにおけるCTX-クリプト

50

### フィシンの抗腫瘍活性

この実施例は、CTX - クリプトフィシンに対するPC - 3ヒト前立腺癌細胞の応答を評価する実験を示す。FBSを10%添加したRPMI - 1640培地においてPC - 3ヒト前立腺癌細胞(ATCC CRL - 1435)を増殖させた。約6週齢の免疫不全雌性NU/NUヌードマウス(Charles River Labs)のそれぞれに、 $2 \times 10^6$ 個のPC - 3がん細胞を接種した。体積0.1mLに含めたがん細胞を、27ゲージ針を使用してマウスの右腋窩領域付近に皮下注射した。ノギスを使用して腫瘍の測定を少なくとも週に2回行い、平均腫瘍サイズが約180mm<sup>3</sup>に達したときに、腫瘍サイズに基づいてマウスを処理群に無作為化した。

#### 【0304】

処理はすべて、腫瘍接種から13日後に開始した。この実験には、0.6mg/kg用量のCTX - クリプトフィシンで処理するマウスを5匹、1.2mg/kg用量のCTX - クリプトフィシンで処理するマウスを5匹、及び媒体で処理する対照マウスを5匹含めた。4日ごとに静脈内投与によって動物を処理し、この処理を3回行った(Q4D x 3スケジュール)。薬物はすべて、EtOH含有率10%、Tween 80含有率5%、及び生理食塩水含有率85%の媒体に含めて投与した。腫瘍サイズ及び体重を週に2回測定した。

#### 【0305】

CTX - クリプトフィシンで処理すると、用量応答性の抗がん活性が生じた。1.2mg/kg用量では腫瘍の退縮が観測され、0.6mg/kg用量では腫瘍の増殖抑制が生じた(図3)。

#### 【0306】

CTX - クリプトフィシン処理群のそれぞれにおいて、腫瘍を有さないマウスが、試験の38日目に1匹観測された。いずれの試験動物においても有意な体重減少または他の毒性徴候は観測されなかった。

#### 【0307】

実施例4：ヒト異種移植片(MIA PaCa - 2、BxPC3 - Red - FLuc、及びPC - 3)に対して単回用量のCTX - クリプトフィシンを投与した後の生体内分布試験

この実施例は、血漿及び選択組織におけるCTX - クリプトフィシン及びその活性代謝物(クリプトフィシン代謝物1)の濃度を評価する実験を示す。MIA PaCa - 2、BxPC3 - Red - FLuc、及びPC - 3の異種移植モデルに単回用量のCTX - クリプトフィシンを投与した後にデータを収集した。血漿中レベルと腫瘍組織中レベルとを比較した。

#### 【0308】

MIA PaCa - 2ヒトがん異種移植モデル、BxPC3 Red - FLucヒトがん異種移植モデル、及びPC - 3ヒトがん異種移植モデルを作成するための移植は、それぞれ実施例1~3に記載のように雌性ヌードマウスに対して実施した。腫瘍サイズが約300~500mm<sup>3</sup>に達したときに、EtOH含有率10%、Tween 80含有率5%、及び生理食塩水含有率85%の媒体に2.5mg/kg用量のCTX - クリプトフィシンを含めたものの単回静脈内投与を行った。

#### 【0309】

処理から5分~96時間後の所定の時点でマウスを安楽死させた(各時点当たりのマウスn = 3)。安楽死させたマウスから全血(心穿刺)ならびに選択組織(すなわち、腫瘍、腎臓、肝臓、及び/または脳)を収集した。

#### 【0310】

血液試料を遠心分離して血漿を取得した後、分析実施まで-20℃以下で保管した。

#### 【0311】

腫瘍、腎臓、肝臓、及び/または脳をそれぞれ、周囲組織から切り離して収集した(肝臓についてはその一部のみを切り離した)。通常の生理食塩水で組織を直ちにすすぎ、水分をふき取った後、重量を測定し、分析実施まで-20℃以下で保管した。Covari

10

20

30

40

50



s Cryoprepシステム (Covaris, Inc.) を使用して組織を凍結粉碎した。試料の微粉碎が完了した時点で、1xのHalt (商標) プロテアーゼ阻害剤混合溶液及び1xのEDTA溶液を含む1xのPBS (Thermo Scientific、製品番号78430) に3:1 (v:w) で試料を溶解させた。

#### 【0312】

メタノール:アセトニトリルを1:1 (v:v) で含む0.1%酢酸含有溶液を3:1 (v:v) で用いてタンパク質を沈降させることによって血漿及びホモジナイズ済組織試料を抽出した。

#### 【0313】

抽出後、CTX-クリプトフィシン及び活性なS-メチル代謝物 (クリプトフィシン代謝物1) の濃度を、LC-MS/MS分析を使用して定量化した。グルタチオン-S-S-クリプトフィシン代謝物及びシステイン-S-S-クリプトフィシン代謝物 (それぞれクリプトフィシン代謝物2及びクリプトフィシン代謝物3) も定量化した。C3PO (Eisaai独自の化合物データベース及び薬物動態解析ツール) におけるノンコンパートメント解析を使用して薬物動態 (PK) パラメーターを計算した。平均PKパラメーターの計算には、血漿中及び組織中の平均濃度を使用した。

#### 【0314】

見て取れるように、CTX-クリプトフィシンを投与した後の血漿中PKは、3つの腫瘍モデルの間でいくらか可変であり、4時間時点または8時間時点を超えると検出限界を下回った。腫瘍が受けるCTX-クリプトフィシン曝露は全体的に同様であり、MIA PaCa-2モデルにおいて最も高かった。組織浸透指数は、MIA PaCa-2については1.59、PC-3については0.923、BxPC3-Red FLucについては0.426であった。

#### 【0315】

図4及び図5は、MIA PaCa-2、BxPC3-Red-FLuc、及びPC-3の異種移植モデルに対してCTX-クリプトフィシンを単回投与した後のS-メチルクリプトフィシン (クリプトフィシン代謝物1) のレベルを示す。CTX-クリプトフィシンの投与後、活性なS-メチルクリプトフィシン代謝物 (クリプトフィシン代謝物1) の腫瘍曝露 (AUC<sub>0-96時間</sub>) は、異なる腫瘍モデルの間で非常に類似していることが明らかとなった (MIA PaCa-2 (AUC<sub>0-48時間</sub>): 2202 pmol・時間/g、BxPC3-Red-FLuc: 2277 pmol・時間/g、及びPC-3: 2463 pmol・時間/g) (図4中、それぞれ左パネル、中央パネル、及び右パネル。これらの結果を重ねた図5中の左パネルも併せて参照のこと)。観測された半減期は長く、T<sub>max</sub>の範囲は24~48時間であった。

#### 【0316】

クリプトフィシン代謝物1が血漿中で検出されたのはPC-3モデル (AUC<sub>0-48時間</sub> = 93.6 pmol・時間/mL) のみであり、このことは、(MIA PaCa-2及びBxPC3-Red-FLucでは) 活性代謝物へのCTX-クリプトフィシンの代謝のほぼすべてが、または(PC-3では) 当該代謝の大部分が、血漿中ではなく組織中で生じることを示している (図4)。

#### 【0317】

腎臓中のクリプトフィシン代謝物1は、3つのモデルのすべてにおいてほぼ同一であった (図5の右パネル)。腎臓中半減期 (T<sub>max</sub>が2~8時間) は、腫瘍中半減期と比較して短かった。

#### 【0318】

CTX-クリプトフィシンは、MIA PaCa-2異種移植モデル及びBxPC3-Red-FLuc異種移植モデルと比較してPC-3異種移植モデルにおいて顕著に強力な抗腫瘍活性を有するが、観測されたクリプトフィシン代謝物1の腫瘍中レベルは、3つのモデルのすべてにおいて非常に類似していたことから、効力の上昇は、PC-3腫瘍における薬物代謝が異なることによる結果ではない。

10

20

30

40

50

## 【0319】

実施例5：ヒト異種移植片（PC-3、BxPC3-Red-FLuc、及びMIA PaCa-2）に由来するエクスピボの腫瘍の溶解物におけるニューロピリン1（NRP1）のmRNA発現レベル

この実施例は、PC-3、BxPC3-Red-FLuc、及びMIA PaCa-2の異種移植片の溶解物におけるNRP1のmRNA発現を評価する実験を示す。

## 【0320】

PC-3、BxPC3-Red-FLuc、及びMIA PaCa-2の異種移植片から腫瘍を収集し、液体窒素中で急速凍結させ、-80℃で保管した。製造者のプロトコールに従ってRNeasy Mini Kit（Qiagen, Germany）を使用してエクスピボの腫瘍（n=4）からRNAを抽出した。反応体積を20μlとして、総量2μgのRNAを、SuperScript VIL0 Master Mix（Life Technologies, USA）を使用してcDNAに変換した。このcDNAを、NRP1（Hs00826128\_\_m1）、GUSB（Hs99999908\_\_m1）、及びHPRT1（Hs00000009\_\_m1）に対するRNA特異的プライマーを使用するApplied Biosystems TaqMan発現アッセイを使用して増幅させた。Applied Biosystems 7900 Real-Time SystemでTaqMan Fast Advanced Master Mix（Life Technologies, USA）を用いて定量的PCR分析を実施し、この分析では、最初のステップでは50℃を2分間保持し、次に、95℃を2秒間保持した後、95℃を1秒間及び60℃を20秒間保持するサイクルを40回実施した。

## 【0321】

2-CT法を使用して2つの参照遺伝子（GUSB及びHPRT1）の幾何平均に対する正規化を行った後、相対的な遺伝子発現を計算した。計算は、Applied Biosystems SDS 2.4ソフトウェアを使用して実施し、スチューデントのt検定によってP<0.05となる値を統計学的に有意であると見なした。

## 【0322】

3つの腫瘍溶解物のすべてにおいてNRP1のmRNAが検出された（図6）。MIA PaCa-2溶解物及びBxPC3-Red-FLuc溶解物では共にレベルは低かったが、PC-3腫瘍では有意に高いレベルが観測された（それぞれ33倍超及び47倍超）。BxPC3-Ref-FLuc腫瘍またはMIA PaCa-2腫瘍と比較してPC-3腫瘍が有意に高いレベルでNRP1のmRNAを発現することを結果は示唆している。

## 【0323】

実施例6：ヒト異種移植片（PC-3、BxPC3-Red-FLuc、及びMIA PaCa-2）に由来するエクスピボの腫瘍の溶解物におけるニューロピリン1（NRP1）のタンパク質発現レベル

この実施例は、PC-3、BxPC3-Red-FLuc、及びMIA PaCa-2の異種移植片の溶解物におけるNRP1のタンパク質発現を評価する実験を示す。

## 【0324】

PC-3、BxPC3-Red-FLuc、及びMIA PaCa-2の異種移植片から腫瘍を収集し、液体窒素中で急速凍結させ、-80℃で保管した。Covaris Cryoprepシステム（Covaris, Inc.）を使用して組織を凍結粉砕した。試料の微粉砕が完了した時点で、Covaris Extraction Buffer Super Bに試料を溶解させた。溶解物を4℃で10分間、14,000rpmで遠心分離した。同様に処理した5つの腫瘍に由来する上清をプールし、一定分量を急速凍結させた。溶解物のタンパク質濃度は、BCAアッセイ（Thermo Fisher Scientific, Pierce）を使用して評価した。還元性かつ変性性の試料緩衝液において溶解物を100℃で3分間加熱した：50μgのタンパク質を8%のトリス-グリシンNovexゲル（Invitrogen）にロードし、当該ゲルでの電気泳動によって分離した。組換えヒトNRP1であるPhe22-Lys644（R&D System

ms) を正の対照として含めた。iBlot (商標) (Invitrogen) 装置を使用してタンパク質をニトロセルロースに転写した。Odyssey PBSブロッキング緩衝液 (LI-COR) でブロッキング処理を実施した後、ウサギモノクローナル抗NRP1の1:500希釈液 (D62C6, カタログ番号3725, Cell Signaling Technology、またはab8132 Abcam) で膜のプロービングを実施し、次に、抗チューブリン (Abcam, [YL1/2] ab6160) によって膜のプロービングを実施した。Odyssey 赤外画像化システム (LI-COR Biosciences) を使用して適切なIRDye 680RD 標識二次抗体及びIRDye 800CW 標識二次抗体 (LI-COR Biosciences) で免疫複合体を可視化した。

10

#### 【0325】

全長NRP1は約120kDaであり、細胞外ドメイン (可溶性NRP1) は、約70~80kDaの分子量を有する (ヒト組換えNRP1)。チューブリンは約50kDaの位置に分離される。

#### 【0326】

PC-3 腫瘍溶解物では、NRP1の細胞質側末端に対する抗NRP1抗体 (ab8132) によって約120kDaのNRP1バンドが染色されることが結果から示された (図7)。MIA PaCa-2 腫瘍溶解物またはBxPC3-Red-FLuc 腫瘍溶解物では、同じ抗体を使用してもNRP1は検出されなかった。

#### 【0327】

20

PC-3 溶解物では、NRP1の細胞外ドメインに対するCST抗体 (カタログ番号3725) によって2つのNRP1バンドが染色されることが結果から示され、これら2つバンドは、おそらく全長NRP1及び可溶性NRP1 (それぞれ70~80kDa及び120kDa) に相当するものであると思われる (図8)。ab8132抗体を用いたときと同様に、MIA PaCa-2 腫瘍溶解物及びBxPC3-Red-FLuc 腫瘍溶解物ではNRP1タンパク質は検出されなかった。

#### 【0328】

したがって、mRNA発現の結果と一致して、PC-3 腫瘍溶解物ではNRP1タンパク質が顕著に観測されたが、MIA PaCa-2 腫瘍及びBxPC3-Red-FLuc 腫瘍の溶解物においては、NRP1は観測されなかった。

30

#### 【0329】

実施例7: CTXをインビトロでトリプシン消化すると、C末端アルギニン残基を有するペプチドが生じる

実施例7~10では下記の試薬を利用した: CTX (CPC Scientific)、組換えクロロトキシン (Alomone; カタログ番号RTC-450)、トリプシン (Promega; カタログ番号V5280)、Dip and Readストレプトアビジンバイオセンサー (Forte Bio; カタログ番号18-5020)、EZ-Linkバイオチン (Thermo Scientific; カタログ番号28022)、Hisタグを有する組換えヒトNRP1 (Sino Biological Inc.; カタログ番号1001-H08H)、ビオチン化組換えヒトVEGF165 (ACRO Biosystems; カタログ番号VE5-H8210)、PBS (CaまたはMgを含まない) (Corning; カタログ番号21-040-CV)、BSA (Cell Signaling Technology; カタログ番号9998S)、及びTween-20 (Boston BioProducts; カタログ番号P-934)。

40

#### 【0330】

この実施例では、CTXのトリプシン消化について分析した。

#### 【0331】

天然の折り畳まれた立体構造 (ジスルフィド結合を4つ有するもの) を有するCTX、ならびにシステイン残基が還元及びキャッピングされた直鎖化CTX、に対してトリプシン消化を実施した。

50

## 【0332】

N末端がビオチン化されたCTX(10mg/mL)にトリプシン(約40μg/mL)を添加し、37℃、pH8.5で24時間インキュベートした。得られたペプチドのピークを分取HPLCによって分離し、ペプチド断片をMALDIによって特徴付けた。

## 【0333】

天然に折り畳まれたCTXを消化した結果、3つのペプチドがジスルフィド結合によって一緒に保持されたものに加えて、親分子に見られるものとは異なってシステインが対形成したジスルフィド結合を有する直鎖ペプチドが生じた(図9)。

## 【0334】

N末端ビオチン化CTXを、TCEPを用いてpH8で還元し、ヨードアセトアミドを使用してチオールをキャッピングした。得られた直鎖ペプチドをトリプシンで消化した。得られた混合物を分離し、ペプチド断片をMALDIによって同定した。

## 【0335】

直鎖化したN末端ビオチン化CTXをトリプシン消化した結果、C末端アルギニン残基を有するペプチドが2つ同定された(図10)。

## 【0336】

ビオチンを含めたことによって、ペプチド断片をトリプシン消化によって生じさせた後、Octet装置でNRP1への結合を決定するためのストレプトアビジンセンサーに当該ペプチド断片を結合させることが可能となった。

## 【0337】

見て取れるように、CTXをトリプシン介在性に消化すると、C末端アルギニン残基を有するペプチド断片が生じた。いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、そのようなペプチド断片は、NRP1と結合する能力を潜在的に有し得る。

## 【0338】

実施例8：NRP1に対するCTX由来断片の結合

この実施例は、CTX及びCTX由来のペプチド断片がNRP1に結合する能力を、Octet装置を使用して評価する実験を示す。Octet結合アッセイでは、NRP1に対するCTX及びCTX由来のペプチド断片の結合を、Octet Red 96システム(ForteBio, Pall)でのバイオレイヤー干渉(BLI)測定によって評価した。ストレプトアビジンバイオセンサー上に固定化したビオチン化CTXによる浮遊NRP1アナライトへの結合を測定した。アナライトが結合すると、光学的厚さが変化する結果、ナノメートルで測定される波長シフトが生じる。

## 【0339】

評価対象であるペプチド断片はすべてビオチン化されており(図11を参照のこと)。このビオチン化は、ストレプトアビジンセンサー上への固定化に必要なものである。アッセイ用のペプチドは、ビオチン化CTXのトリプシン消化またはデノボペプチド合成のいずれかによって得た(図11を参照のこと)。ビオチン化CTX及びビオチン化CTX由来断片を、事前に吸湿させたストレプトアビジン(SA)バイオセンサー上に捕捉して飽和させた(1分)。最初に、それぞれの断片について用量応答ローディング曲線を得ることで、ForteBioによって推奨されるものとほぼ同等の最適ローディング条件を与える用量を同定した。同定した最適なペプチド断片ローディング条件を使用してNRP1との結合に対するアッセイを実施した。

## 【0340】

センサーにペプチド断片をローディングした後、10μg/mLのEZ-Linkビオシチンを用いてセンサーのクエンチ処理を2分間実施し、次に、アッセイ緩衝液においてセンサーの洗浄処理を実施した(この洗浄処理は、BSA含有率1%及びTween20含有率0.05%のPBSにおいて1分間実施した)。組換えヒトNRP1を0~1750nMの濃度でアッセイ緩衝液に含めてウェルに添加した。組換えヒトNRP1に対する結合を、1分間の会合時間をとった後、アッセイ緩衝液において1分間の解離時間をとることによって評価した。この評価は、Octet Red 96システムで実施した。NR

10

20

30

40

50

P 1 の濃度範囲にわたって C T X との結合を測定することによって N R P 1 との結合定数  $K_D$  を評価した (O c t e t データ解析ソフトウェアバージョン 8 . 2 ) 。

【 0 3 4 1 】

見て取れるように、O c t e t 装置を使用して測定したところ、全長 C T X ペプチド ( アミド化 C 末端アルギニン を有する ) は、N R P 1 に結合しなかった ( 図 1 1 を参照のこと ) 。ビオチンが C T X 上のどこに位置しようとも、N R P 1 との結合は観測されなかった ( 図 1 1 を参照のこと ) 。システイン結合を還元及びキャッピングして C T X を直鎖化しても、N R P 1 との結合が生じないという結果は変わらなかった。

【 0 3 4 2 】

C T X から ( 酵素消化または合成によって ) 得られたペプチド断片は、遊離 ( カルボキシル化 ) C 末端アルギニン残基を有しており、これらのペプチド断片は N R P 1 に結合した。N R P 1 との結合親和性 (  $K_D$  ) は、V E G F 1 6 5 で観測されたものと比較して 2 . 5 ~ 7 倍低い範囲のものであった。結合は特異的であった。結合は、ペプチドの C 末端アミノ酸がアルギニン残基 ( カルボキシル化されているもの ) であるときに生じた。ペプチドの C 末端アミノ酸がリジン、ロイシン、またはグルタミン酸であるときには N R P 1 との結合は観測されなかった。

【 0 3 4 3 】

したがって、全長 C T X ペプチド ( アミド化 C 末端アルギニン を有する ) は、N R P 1 に結合しないことが、O c t e t 装置を使用した測定結果から示された。C T X から得られたいくつかのペプチドについて、N R P 1 との結合が示された。結合は特異的であり、ペプチドの C 末端アミノ酸がアルギニン残基 ( カルボキシル化されているもの ) であるときに結合が生じた。

【 0 3 4 4 】

実施例 9 : カルボキシル化 C 末端アルギニンを有する全長 C T X は、N R P 1 に結合する  
この実施例は、カルボキシル化 C 末端アルギニン残基またはアミド化 C 末端アルギニン残基のいずれかを有する全長 C T X ペプチド (  $\text{NH}_2$  - M C M P C F T T D H Q M A R K C D D C C G G K G R G K C Y G P Q C L C R ( 配列番号 1 ) -  $\text{CONH}_2$ 、 $\text{NH}_2$  - M C M P C F T T D H Q M A R K C D D C C G G K G R G K C Y G P Q C L C R ( 配列番号 1 ) -  $\text{COOH}$  ) を評価する実験を示す。

【 0 3 4 5 】

E s c h e r i c h i a c o l l i 由来の C 末端 R -  $\text{COOH}$  含有組換え C T X ( A l o m o n e ) を、塩基性条件下 (  $\text{pH} = 8 . 5$  ) で N H S 化学を使用してビオチン化した。得られた生成物の混合物を、T C E P を用いて  $\text{pH} 8$  で還元し、ヨードアセトアミドを使用してチオールをキャッピングした。同様の合成配列を使用して還元及びキャッピングされたビオチン化 C T X ( R -  $\text{CONH}_2$  ) を調製した。両方の誘導体 ( モノ - ビオチン化 C T X ) を H P L C で精製して過剰な試薬を除去した。ビオチン化は、主に L y s 2 7 及び L y s 2 3 に施されており、ペプチドの追加精製は実施しなかった。

【 0 3 4 6 】

ビオチン化、還元、及びキャッピングされた C T X ( R -  $\text{COOH}$  ) ( U M 1 9 3 6 - 0 3 9、2 . 5  $\mu\text{g} / \text{ml}$  ) または C T X ( R -  $\text{CONH}_2$  ) ( U M 1 9 3 6 - 0 4 7、1 . 2 5  $\mu\text{g} / \text{ml}$  ) を、事前に吸湿させたストレプトアビジン ( S A ) バイオセンサー上に捕捉して飽和させた ( 1 分 ) 。1 0  $\mu\text{g} / \text{ml}$  の E Z - L i n k ビオシチンを用いてセンサーのクエンチ処理を 2 分間実施し、次に、アッセイ緩衝液においてセンサーの洗浄処理を実施した ( この洗浄処理は、B S A 含有率 1 % 及び T w e e n 2 0 含有率 0 . 0 5 % の P B S において 1 分間実施した ) 。すべてのステップにおいて振とう機のスピードを 1 , 0 0 0 r p m とした。組換えヒト N R P 1 を 0 ~ 1 7 5 0 n M の濃度でアッセイ緩衝液に含めてウェルに添加した。組換えヒト N R P 1 に対する結合を、1 分間の会合時間をとった後、アッセイ緩衝液において 1 分間の解離時間をとることによって評価した。この評価は、O c t e t R e d 9 6 システムで実施した。N R P 1 の濃度範囲にわたって C T X との結合を測定することによって N R P 1 との結合定数  $K_D$  を評価した ( O c t e t

10

20

30

40

50

データ解析ソフトウェアバージョン 8.2)。

【0347】

見て取れるように、還元及びキャッピングされたCTX(R-CONH<sub>2</sub>)についてはNRP1との結合は観測されなかった一方で、CTX(R-COOH)についてはNRP1との用量応答性の結合が観測された(図12及び図13)。Octetデータ解析ソフトウェアを使用すると、NRP1との結合に対するK<sub>D</sub>は、CTX(R-COOH)については244 nM(R<sup>2</sup>0.9932)と計算された。観測されたK<sub>D</sub>は、正の対照で観測されたもの(ビオチン化VEGF165に対するNRP1の結合(K<sub>D</sub>40~98 nM))と比較して約2.5~5倍低かった。したがって、CTXペプチドは、そのC末端アルギニンがカルボキシル化されているとNRP1に結合するが、C末端アルギニンがアミド化されているとNRP1と結合しないことを結果は示している。NRP1に対するCTX(R-COOH)の結合親和性は、VEGF165で観測されものと同様の範囲に入るものである。

【0348】

実施例10:CTX(R-COOH)は、NRP1との結合についてVEGFと競合するが、CTX(R-CONH<sub>2</sub>)ではこの競合は生じない

NRP1に対する結合についてCTXペプチド(C末端アルギニン-COOHまたはC末端アルギニン-NH<sub>2</sub>)がヒト組換えVEGF165と競合する能力をOctet結合アッセイにおいて評価した。ビオチン化VEGF(5 µg/ml)を、事前に吸湿させたSAバイオセンサー上に捕捉し(60秒)、EZ-linkビオシチンでクエンチし(120秒、10 µg/ml)、アッセイ緩衝液において洗浄した(60秒)。C末端アルギニン-COOHまたはC末端アルギニン-NH<sub>2</sub>を有するCTXペプチドが、NRP1に対する結合についてセンサー結合済ビオチン化VEGF165と競合する能力を評価した。濃度上昇系列(0~800 µM)となるようにCTXペプチドを存在させた390 nMのNRP1を含むウェルにバイオセンサーを浸し、会合(60秒)を応答(nm)として測定した。解離(60秒)を生じさせるためにアッセイ緩衝液へとプローブを切り替える前の5秒間の結合応答を平均化することによって最大結合を定量化した。データの解析には、Octetデータ解析ソフトウェアバージョン8.2及びGraphPad Prismバージョン6.0を使用した。

【0349】

見て取れるように、NRP1に対するビオチン化VEGF165の結合を、CTX(R-COOH)が用量依存的に阻害した(図14)。観測された応答は直線的であった(R<sup>2</sup>=0.98、GraphPad Prism 6.0における直線回帰(図15))。CTX(R-CONH<sub>2</sub>)の存在濃度を上昇させても、NRP1に対するVEGF165の結合は阻害されなかった。したがって、NRP1との結合についてCTXペプチドはVEGF165と競合し得るが、この競合は、CTXペプチドのC末端アルギニンがカルボキシル化されているときにのみ生じることを結果は示している。C末端アルギニンがアミド化されていると競合は生じない。

【0350】

実施例11:胸腺欠損ヌードマウスにおけるCTX(カルボキシル化C末端アルギニンまたはアミド化C末端アルギニンを有するもの)-クリプトフィシン複合体の抗腫瘍作用の比較

この実施例では、CTXのC末端アルギニンがアミド化されたCTXとの複合体(CTX-クリプトフィシン)と、CTXのC末端アルギニンがカルボキシル化されたCTXとの複合体(カルボキシル化CTX-クリプトフィシン)と、が胸腺欠損NU/NUヌードマウスに皮下移植したヒト前立腺癌PC-3細胞の増殖に対して与える作用を比較した。

【0351】

CTXのC末端アルギニンがアミド化されたCTX-クリプトフィシン(CTX-クリプトフィシン)の3群(0.6 mg/kg、1.2 mg/kg、2.3 mg/kg)と、CTXのC末端アルギニンがカルボキシル化されたCTX-クリプトフィシン(カルボキ

10

20

30

40

50

シル化CTX - クリプトフィシン)の4群(0.6 mg/kg、1.2 mg/kg、2.3 mg/kg、3.0 mg/kg)と、を処理群に含めた。CTX - クリプトフィシン複合体を4日ごとに1回、静脈内投与し、この投与を3回行った。

【0352】

ウシ胎仔血清が10%添加されたRPMI - 1640増殖培地においてPC - 3細胞(ATCC(登録商標)CRL - 1435(商標))を、加湿インキュベーター中、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下、37℃、単層培養で維持した。接種日に、トリプシン消化によって細胞を収集し、洗浄し、氷冷PBS中に再浮遊させた。PBSに含めて体積を0.1 mLとした $2 \times 10^6$ 個のPC - 3がん細胞を、免疫不全胸腺欠損雌性マウスの右腋窩領域付近に27ゲージ針を使用して皮下接種した。処理はすべて、腫瘍接種から14日後に開始し、腫瘍サイズに基づいて処理群及び媒体対照群に動物を無作為化してから行った。平均腫瘍サイズは、180 mm<sup>3</sup>であった。

10

【0353】

80匹のマウスにPC - 3細胞を接種し、移植から14日目に腫瘍体積を測定し、腫瘍体積(平均180 mm<sup>3</sup>)に基づいて8つの処理群にマウスを無作為化した。無作為化の後、薬物処理を開始した(腫瘍接種から14日後)。

【0354】

この実施例では、マウスの処理を、CTX - クリプトフィシン(3つの異なる用量で単一の薬剤として実施)、カルボキシル化CTX - クリプトフィシン(4つの異なる用量で単一の薬剤として実施)、及び媒体対照を用いて実施した(表4)。EtOH含有率10%、Tween - 80含有率5%、及び生理食塩水含有率85%のもの(媒体)において複合体を製剤化し、こうして製剤化した複合体を4日ごとに1回、静脈内投与し、この投与を3回行った。用量は、体重に基づいて0.6 mg/kg、1.2 mg/kg、2.3 mg/kg、及び3.0 mg/kgとし、10 g当たり0.1 mLの用量体積とした。対照群は、媒体の静脈内投与によって4日ごとに1回処理し、この処理を3回行った。それぞれの群は、処理の初日に6匹のマウスから構成されるようにし、マウスの総数を48とした。

20

【0355】

マウスの全身健康状態を監視し、日々の死亡数を記録した。 $(l \times w^2) / 2 = \text{mm}^3$ という式(式中、 $l$ 及び $w$ は、それぞれの測定で収集した、長い方の垂直寸法及び短い方の垂直寸法を指す)を使用してノギス(Mitutoyo, Aurora, IL)測定値(mm)によって腫瘍体積を評価した。腫瘍寸法の記録は、薬物処理を開始した時点から始め、週に2回実施した。体重の記録は、処理の初日から開始し、週に2回実施した。相対体重は下記のように計算した: 相対体重 = (測定日の体重 / 処理初日の体重)。取得データには、それぞれの測定時点の群の平均腫瘍体積及び群の平均体重を含めた。腫瘍体積についての平均値 $\pm$ SEM、及び相対体重についての平均値 $\pm$ SEMをそれぞれの実験群ごとに計算した。

30

【0356】

用量依存性かつ薬物関連の体重減少が両方の複合体での処理で同様に観測されたが、この体重減少は最大でも約10%にすぎず、処理完了時には回復した。媒体で処理した動物では疾患重症度の増加と結びつく体重減少が36日目に観測され、腫瘍が肥大したことから、マウスを安楽死させた。

40

【0357】

最長軸での腫瘍測定値が2 cmに達した動物は、試験終了前に安楽死させた。媒体群のマウスは、腫瘍が肥大したため、36日目に安楽死させた。2.3 mg/kgでのCTX - クリプトフィシン処理群では2回目の用量の投与後に1匹の動物が死亡した。42日目に試験を終了した。

【0358】

腫瘍体積に対して一元配置分散分析(ANOVA)を実施し、その後、ダネットの多重比較検定を実施することによって統計解析を行った。この解析は、試験の36日目(媒体

50

エンドポイント)に実施した。データは、平均腫瘍体積 $\pm$ SEMを示す。 $P < 0.05$ の値を両側仮説下で統計学的に有意であると見なした。統計解析はすべて、GraphPad Prism 6ソフトウェア(Lake Forest, CA)を使用して実施した。

【表4】

表4：PC-3ヒト前立腺癌異種移植片におけるCTX-クリプトフィシン複合体の作用を胸腺欠損マウスにおいて調べるための処理群

群番号	処理	経路	スケジュール	動物数
A	CTX-クリプトフィシン 2.3 mg/kg	I V	Q 4 D $\times$ 3	6
B	CTX-クリプトフィシン 1.2 mg/kg	I V	Q 4 D $\times$ 3	6
C	CTX-クリプトフィシン 0.6 mg/kg	I V	Q 4 D $\times$ 3	6
D	カルボキシル化CTX-クリプトフィシン 3.0 mg/kg	I V	Q 4 D $\times$ 3	6
E	カルボキシル化CTX-クリプトフィシン 2.3 mg/kg	I V	Q 4 D $\times$ 3	6
F	カルボキシル化CTX-クリプトフィシン 1.2 mg/kg	I V	Q 4 D $\times$ 3	6
G	カルボキシル化CTX-クリプトフィシン 0.6 mg/kg	I V	Q 4 D $\times$ 3	6
H	媒体 (EtOH含有率10%、Tween-80含有率5%、及び生理食塩水含有率85%)	I V	Q 4 D $\times$ 3	6

【0359】

見て取れるように、CTX-クリプトフィシン及びカルボキシル化CTX-クリプトフィシンでの処理を1.2 mg/kg用量、2.3 mg/kg用量、及び3.0 mg/kg用量で行うと、すべての処理において、腫瘍が完全に退縮した(図16)。0.6 mg/kg用量では、両方の複合体について統計学的に有意な腫瘍増殖抑制が観測され、この用量では、CTX-クリプトフィシンと比較してカルボキシル化CTX-クリプトフィシンの方が腫瘍の増殖低減により効果的であることが判明した( $P < 0.0001$ 、36日目)。体重減少に基づく、これらの複合体は、同等に忍容性が高いものと思われる(図17)。したがって、0.6 mg/kg (1/4 MTD)という低用量では、CTXペプチドのC末端アルギニンがカルボキシル化されており、NRP1に容易に結合可能なカルボキシル化CTX-クリプトフィシン複合体は、アミド化C末端アルギニンを有するCTX-クリプトフィシンと比較して高い腫瘍増殖抑制効果を有していた。

【0360】

実施例12：NOD-SCIDマウスにおけるCTX(カルボキシル化C末端アルギニンまたはアミド化C末端アルギニンを有するもの)-クリプトフィシン複合体の抗腫瘍作用の比較

この実施例では、NOD-SCIDマウスに皮下移植したヒト前立腺癌PC-3細胞(ATCC(登録商標)CRL-1435(商標))の増殖に対するCTX-クリプトフィシン複合体の作用を比較した。このヒト前立腺癌PC-3細胞は、NRP1が野生型(野生型；PC-3-sg1-4野生型細胞(WuXi AppTecから入手した))またはノックアウト(ノックアウト；1.PC-3-sg1-9ノックアウト細胞(WuXi



A p p T e c から入手した ) ) となるように W u X i A p p T e c において操作された細胞である。

【 0 3 6 1 】

ウシ胎仔血清が 1 0 % 添加された R P M I - 1 6 4 0 増殖培地において、N R P 1 遺伝子型のみが異なる同系 P C - 3 細胞を、加湿インキュベーター中、5 % C O <sub>2</sub> 雰囲気下、3 7 °C、単層培養で維持した。接種日に、トリプシン消化によって細胞を収集し、洗浄し、氷冷 P B S 中に再浮遊させた。P B S : m a t r i g e l ( 1 : 1 希釈 ) に含めて体積を 0 . 1 m L とした  $5 \times 10^6$  個の P C - 3 がん細胞を、免疫不全雌性 N O D . S C I D マウス ( C h a r l e s R i v e r l a b o r a t o r i e s から入手した約 6 週齢の免疫不全 N O D . S C I D ) の右腋窩領域付近に 2 6 ゲージ針を使用して皮下接種した。モデル当たり全部で 3 0 匹のマウスに P C - 3 細胞を移植した。処理は、N R P 1 ノックアウト P C - 3 モデル及び N R P 1 野生型 P C - 3 モデルに腫瘍を接種してからそれぞれ 1 3 日後または 1 7 日後に開始し、腫瘍サイズに基づいて処理群及び媒体対照群に動物を無作為化してから行った。このとき、平均腫瘍サイズは、2 5 0 ~ 3 0 0 m m <sup>3</sup> であった。

10

【 0 3 6 2 】

2 つの同系細胞株の比較試験を処理群ごとに実施した。これらの処理群には下記の処理群が含まれる：( a ) C T X - クリプトフィシン ( C 末端 R - N H <sub>2</sub> を含む C T X ( すなわち、C T X ( R - C O N H <sub>2</sub> ) ) とクリプトフィシンとの複合体 ) を 0 . 6 m g / k g ( 1 / 4 M T D 相当 ) とする処理群、( b ) C T X - クリプトフィシンを 1 . 2 m g / k g ( 1 / 2 M T D 相当 ) とする処理群、( c ) カルボキシル化 C T X - クリプトフィシン ( C 末端 R - C O O H を含む C T X ( すなわち、C T X ( R - C O O H ) ) とクリプトフィシンとの複合体 ) を 0 . 6 m g / k g ( 1 / 4 M T D 相当 ) とする処理群、( d ) カルボキシル化 C T X - クリプトフィシンを 1 . 2 m g / k g ( 1 / 2 M T D 相当 ) とする処理群、及び ( e ) 媒体処理群 ( 表 5 を参照のこと ) 。E t O H 含有率 1 0 %、T w e e n - 8 0 含有率 5 %、及び生理食塩水含有率 8 5 % のもの ( 媒体 ) において複合体を製剤化し、こうして製剤化した複合体を 4 日ごとに 1 回、静脈内投与し、この投与を 3 回行った。体重に基づいて用量を定め、1 0 g 当たり 0 . 1 m L の濃度で投与した。対照群は、媒体の静脈内投与によって 4 日ごとに 1 回処理し、この処理を 3 回行った。N R P 1 野生型 P C - 3 を用いた試験では、それぞれの群を、処理の初日に 5 匹のマウスから構成されるようにし、マウスの総数を 2 5 とした。N R P 1 ノックアウト P C - 3 を用いた試験では、それぞれの群を、処理の初日に 6 匹のマウスから構成されるようにし、マウスの総数を 3 0 とした。

20

30

40

50

## 【表 5】

表 5：NRP1 遺伝子型のみが異なる同系 PC-3 ヒト前立腺癌異種移植片における CTX-クリプトフィシン複合体の作用を NOD、SCID マウスにおいて調べるための処理群

群	処理	経路	スケジュール	動物数*
A	媒体 (EtOH 含有率 10%、Tween-80 含有率 5%、及び生理食塩水含有率 85%)	IV	Q4D×3	5 または 6
B	CTX-クリプトフィシン 1.2 mg/kg	IV	Q4D×3	5 または 6
C	CTX-クリプトフィシン 0.6 mg/kg	IV	Q4D×3	5 または 6
D	カルボキシル化 CTX-クリプトフィシン 1.2 mg/kg	IV	Q4D×3	5 または 6
E	カルボキシル化 CTX-クリプトフィシン 0.6 mg/kg	IV	Q4D×3	5 または 6

\*NRP1 野生型 PC-3 を用いたモデルでは 5 であり、NRP1 ノックアウト PC-3 を用いたモデルでは 6 である。

## 【0363】

マウスの全身健康状態を監視し、日々の死亡数を記録した。 $(l \times w^2) / 2 = \text{mm}^3$  という式 (式中、 $l$  及び  $w$  は、それぞれの測定で収集した、長い方の垂直寸法及び短い方の垂直寸法を指す) を使用してノギス (Mitutoyo, Aurora, IL) 測定値 (mm) によって腫瘍体積を評価した。腫瘍寸法の記録は、薬物処理を開始した時点から始め、週に 2 回実施した。体重の記録は、処理の初日から開始し、週に 2 回実施した。相対体重は下記のように計算した：相対体重 = (測定日の体重 / 処理初日の体重)。取得データには、それぞれの測定時点の群の平均腫瘍体積及び群の平均体重を含めた。腫瘍体積についての平均値  $\pm$  SEM、及び相対体重についての平均値  $\pm$  SEM をそれぞれの実験群ごとに計算した。最長軸での腫瘍測定値が 2 cm に達した動物は、試験終了前に安楽死させた。統計解析は、腫瘍の肥大が原因で媒体群を安楽死させた日である 34 日目に実施した。

## 【0364】

腫瘍体積に対して二元配置分散分析 (ANOVA) を使用し、その後、チューキーの多重比較検定を使用することによって統計解析を実施した。この解析は、試験の 34 日目に実施した (媒体エンドポイント)。 $P < 0.05$  の値を両側仮説下で統計学的に有意であると見なした。統計解析はすべて、GraphPad Prism 6 ソフトウェア (Lake Forest, CA) を使用して実施した。

## 【0365】

図 18 は、NRP1 野生型または NRP1 ノックアウトの PC-3 ヒト前立腺癌異種移植片に対する CTX-クリプトフィシン及びカルボキシル化 CTX-クリプトフィシンの SCID マウスにおける作用を示す。データは、平均腫瘍体積  $\pm$  SEM を示す。NRP1 ノックアウト PC-3 移植細胞及び NRP1 野生型 PC-3 移植細胞について観測された腫瘍の増殖速度は同様であり、腫瘍は、ノックアウト PC-3 モデルでは 13 日目までに、野生型 PC-3 モデルでは 17 日目までに、平均腫瘍体積が 250 ~ 300  $\text{mm}^3$  に達した。両方の試験における媒体群のマウスは、腫瘍が肥大したため 34 日目に安楽死させた。

## 【0366】

見て取れるように、CTX - クリプトフィシン及びカルボキシル化CTX - クリプトフィシンのいずれの複合体で処理しても、1.2 mg/kg用量で処理した場合、両方のモデルにおいて腫瘍が完全に退縮した（すなわち、NRP1の有無は無関係であった）。しかしながら、0.6 mg/kgにおいては、NRP1野生型モデルにおいてのみ腫瘍の退縮が観測され、NRP1ノックアウトモデルでは腫瘍増殖に対する作用は最小限にとどまった。いずれの試験動物においても、有意な体重減少または他の急性徴候もしくは遅発性毒性は観測されなかった。

【0367】

図18に示される実験では、CTX（すなわち、CTX(R-CONH<sub>2</sub>)) - クリプトフィシン複合体においても、カルボキシル化CTX（すなわち、CTX(R-COOH)) - クリプトフィシン複合体においても、腫瘍退縮に対する同様の作用が観測された。実施例11は、SCIDマウスではなくNU/NUヌードマウスを使用したものであり、この実施例では、0.6 mg/mlの用量で投与が行われると、カルボキシル化CTX（すなわち、CTX(R-COOH)) - クリプトフィシン複合体が示した腫瘍退縮効力は、CTX（すなわち、CTX(R-CONH<sub>2</sub>)) - クリプトフィシンが示したものと比較して有意に大きいものであった。いずれの特定の理論によっても拘束されることは望まないが、SCIDマウスとヌードマウスとの比較において異なる結果が観測されたことに対して考え得る1つの説明は、この結果差異が系統間の差異を反映し得るというものであり、例えば、免疫不全度がより高いSCID系ではCTX - クリプトフィシンがカルボキシル化CTX - クリプトフィシンに変換され得ることに留意されたい。

【0368】

まとめると、本発明者らの発見は、CTX - クリプトフィシン複体の抗腫瘍活性においてNRP1が役割を担うことを示唆すると共に、CTX(R-CONH<sub>2</sub>)と比較してCTX(R-COOH)がより効率的にNRP1と相互作用し得ることをさらに示唆するものである。いずれの特定の理論によっても拘束されることは望まないが、CTXがNRP1に結合し得、細胞への取り込みを媒介または少なくとも促進し、それによってペイロードの送達が達成されることで抗腫瘍作用が伴い得ることを本発明者らは提唱する。

【0369】

実施例13：NOD SCIDマウスにおけるCTX（カルボキシル化C末端アルギニンまたはアミド化C末端アルギニンを有するもの） - クリプトフィシン複体の抗腫瘍作用の比較

この実施例は、NRP1野生型及びNRP1ノックアウトの同系PC-3異種移植片におけるCTX - クリプトフィシン、カルボキシル化CTX - クリプトフィシン、及びクリプトフィシンペイロード単独（ジスルフィドリンカーを有するクリプトフィシン）の抗腫瘍作用をSCIDマウスにおいて評価する実験を示す。

【0370】

この実施例には、CTX - クリプトフィシン処理群、カルボキシル化CTX - クリプトフィシン処理群、クリプトフィシンペイロード処理群、及び媒体対照処理群（n = 6、表6を参照のこと）を含めた。クリプトフィシンペイロード（図19）は、CTXを除いてCTX - クリプトフィシンの側面をすべて厳密に再現するように生成させた。したがって、クリプトフィシンペイロードは、CTX - クリプトフィシンにおいて使用したジスルフィドリンカーを有するクリプトフィシンから構成される。NRP1野生型及びNRP1ノックアウトの同系PC-3異種移植片において同一の実験を並行して実施した。

【0371】

ウシ胎仔血清が10%添加されたRPMI-1640増殖培地において、NRP1遺伝子型のみが異なる同系PC-3細胞を、加湿インキュベーター中、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下、37℃、単層培養で維持した。接種日に、トリプシン消化によって細胞を収集し、洗浄し、氷冷PBS中に再浮遊させた。PBS:matrigel（1:1希釈）に含めて体積を0.1 mLとした5 × 10<sup>6</sup>個のPC-3がん細胞を、免疫不全雌性NOD.SCIDマウス（Charles River laboratoriesから入手した約6週齢の

10

20

30

40

50

免疫不全NOD・SCID)の右腋窩領域付近に26ゲージ針を使用して皮下接種した。処理は、ノックアウトモデル及び野生型モデルに腫瘍を接種してからそれぞれ14日後または17日後に開始し、腫瘍サイズに基づいて処理群及び媒体対照群に動物を無作為化してから行った。平均腫瘍サイズは、150～200mm<sup>3</sup>であった。モデル当たり全部で40匹のマウスにPC-3細胞を移植した。

#### 【0372】

それぞれの群は、処理の初日に6匹のマウスから構成されるようにし、マウスの総数を30とした。EtOH含有率10%、Tween-80含有率5%、及び生理食塩水含有率85%のもの(媒体)において複合体及びペイロードを製剤化し、こうして製剤化した複合体及びペイロードを4日ごとに1回、静脈内投与し、この投与を3回行った。用量は、体重に基づいて0.6mg/kg(複合体)または0.2mg/kg(クリプトフィシン)とし、10g当たり0.1mLの用量体積とした。対照群は、媒体の静脈内投与によって4日ごとに1回処理し、この処理を3回行った。Q4D×3スケジュールで静脈内投与によって動物を処理した。腫瘍サイズ及び体重を週に2回測定した。

#### 【0373】

マウスの全身健康状態を監視し、日々の死亡数を記録した。 $(l \times w^2) / 2 = \text{mm}^3$ という式(式中、l及びwは、それぞれの測定で収集した、長い方の垂直寸法及び短い方の垂直寸法を指す)を使用してノギス(Mitutoyo, Aurora, IL)測定値(mm)によって腫瘍体積を評価した。腫瘍寸法の記録は、薬物処理を開始した時点から始め、週に2回実施した。体重の記録は、処理の初日から開始し、週に2回実施した。相対体重は下記のように計算した：相対体重=(測定日の体重/処理初日の体重)。取得データには、それぞれの測定時点の群の平均腫瘍体積及び群の平均体重を含めた。腫瘍体積についての平均値±SEM、及び相対体重についての平均値±SEMをそれぞれの実験群ごとに計算した。最長軸での腫瘍測定値が2cmに達した動物は、試験終了前に安楽死させた。

#### 【表6-1】

表6：NRP1遺伝子型のみが異なる同系PC-3ヒト前立腺癌異種移植片におけるCTX-クリプトフィシン複合体及びクリプトフィシンペイロード単独の作用をNOD・SCIDマウスにおいて調べるための処理群

群	処理	経路	スケジュール	動物数
---	----	----	--------	-----

#### 【表6-2】

A	媒体 (EtOH含有率10%、Tween-80含有率5%、及び生理食塩水含有率85%)	IV	Q4D×3	6
B	CTX-クリプトフィシン 0.6 mg/kg	IV	Q4D×3	6
C	カルボキシル化CTX-クリプトフィシン 0.6 mg/kg	IV	Q4D×3	6
D	クリプトフィシンペイロード 0.2 mg/kg	IV	Q4D×3	6

#### 【0374】

図20は、SCIDマウスにおけるNRP1野生型またはNRP1ノックアウトのPC-3ヒト前立腺癌異種移植片におけるCTX-クリプトフィシン及びカルボキシル化CT

X - クリプトフィシンの作用を示す。データは、平均腫瘍体積  $\pm$  S E M を示す。いずれの複合体での処理も、 $0.6 \text{ mg / kg}$  ( $1 / 4 \text{ M T D}$  相当)で行うと、N R P 1 野生型モデルでは有意な抗腫瘍作用が生じたが、N R P 1 ノックアウトモデルでは有意な抗腫瘍作用は生じなかった。対照的に、クリプトフィシンペイロード単独での処理では、両方のモデルに同様の抗腫瘍作用を与えた。

【 0 3 7 5 】

いずれの特定の理論によっても拘束されることは望まないが、S C I D マウスと N U / N U ノードマウス (実施例 1 1 で使用したもの) との比較において異なる結果が観測されたことに対して考え得る 1 つの説明は、この結果差異が系統間の差異を反映し得るというものであり、例えば、免疫不全度がより高い S C I D 系では C T X - クリプトフィシンがカルボキシル化 C T X - クリプトフィシンに変換され得ることに留意されたい。

10

【 0 3 7 6 】

まとめると、こうしたデータは、C T X - クリプトフィシン複合体の抗腫瘍効力において N R P 1 が役割を担うことを支持するものである。

【 0 3 7 7 】

実施例 1 4 : ザリガニにおけるクロロトキシンペプチドの生物活性アッセイ

ザリガニにおいて麻痺を誘導する能力について C T X ペプチドを評価した。このアッセイでは、麻痺が生物活性の指標である。このアッセイは、例えば、ペプチドバッチの品質管理試験において使用され得る。この試験では、アミド化 C 末端アルギニン残基またはカルボキシル化 C 末端アルギニン残基のいずれかを有し、天然の立体構造または還元及びアルキル化された形態のいずれかを有する C T X ペプチドを、ザリガニへの注射時に麻痺を誘導する能力について比較した。

20

【 0 3 7 8 】

C T X ペプチド及びさまざまな複合体の生物活性を評価するためのザリガニアッセイは、ミズーリ州の A B C L a b s において実施した。C T X ペプチドは、滅菌水において  $1 \text{ mg / mL}$  で製剤化してから配送し、使用するまで 4 で保管した。26 ゲージ針を使用して  $20 \mu \text{g}$  ペプチド ( $50 \mu \text{L}$ ) を胸部の腹側表面を介してザリガニの食道下神経節領域に注射した。注射は、体に対して約  $30 \sim 45$  度の角度でハサミの間に直接的に実施し、その際、刺入深度を尾部への方向に約  $5 \sim 10 \text{ mm}$  とした (図 2 1 (ザリガニへの注射位置を示す) を参照のこと)。

30

【 0 3 7 9 】

この実施例のそれぞれの試験では、群当たり 10 匹のザリガニに注射を実施し、物理的負荷に対するザリガニの応答を経時的に評価した。物理的負荷は、頭部から尾部へと体の複数部分を穏やかに複数回連続して無作為に刺激するものと定義した。応答は、回避、自体の姿勢を立て直す能力、及び防御的な様式でハサミを用いて挟む動作に基づくものとした。注射から完全な無能力状態に至る時間を記録した。ここで、完全な無能力状態は、被験ザリガニが物理的負荷を受けても応答しない状態と定義される。完全な無能力状態は、完全な麻痺ではない。これは、完全な無能力状態では、付属器官が依然として動作し得るためである。しかしながら、完全な無能力状態にあるザリガニは、物理的負荷に応じて動けないか、または物理的負荷からの防御動作を行うことができない。動物の応答監視時間は、注射から 6 分間 ( $360$  秒) とした。

40

【 0 3 8 0 】

完全な無能力状態に至る時間のデータは、カプラン・マイヤー生存解析 (G r a p h P a d P r i s m) に供し、(応答持続時間が最短または最長の動物を除いてから (最終的に  $n = 8$ )) それぞれの群ごとに時間の中央値を報告した。無能力状態に至るまでの時間の中央値が  $150$  秒以下であることを、C T X が生物学的に活性であると認定するための基準として選択した。

【 0 3 8 1 】

最初のザリガニ試験では、(a) 化学的に合成され、さまざまな商業的供給源 (C P C S c i e n t i f i c、C B L、B a c h e m) から入手した C T X ペプチド (これらの

50

C T X ペプチドは、C 末端アルギニン - アミドを有する)、( b ) 臨床グレードの C T X (例えば、化学的に合成されたもの)、ならびに( c ) カルボキシル化 C 末端アルギニンを有する組換えクロロトキシンポリペプチド( *Escherichia coli* 由来、A l o m o n e )、を比較した。天然の C T X ( C 末端アルギニンがアミド化されているもの)を、T C E P を用いて p H 8 で還元し、ヨードアセトアミドを使用してチオールをキャッピングした。ザリガニアッセイにおいて完全な無能力状態を誘導する能力について、還元及び直鎖化した C T X を天然のペプチドと比較した。

#### 【 0 3 8 2 】

見て取れるように、試験したクロロトキシンポリペプチドはすべて、ザリガニにおいて無能力状態を誘導し、生物活性を有すると見なされた。概して、完全な無能力状態は狭い時間範囲( 1 5 ~ 6 3 秒)の中で誘導され、時間中央値は約 2 5 秒であった(表 7、図 2 2)。さまざまな供給源から入手した C T X は、アッセイにおいて同様の挙動を示した。C 末端がアミド化されたペプチド( C P C、C B L、T M I、B a c h e m ) またはカルボキシル化アルギニンを有するペプチド( A l o m o n e、カタログ番号 R T C - 4 5 0 ) について観測された麻痺誘導に差異は存在しなかった。

#### 【表 7 - 1】

表 7

C T X 供給源	無能力状態に至る時間 (秒)
C P C	2 6 . 5
C B L	2 5
B a c h e m	2 6 . 5
	2 3
T M I , 臨床グレード	2 0

#### 【表 7 - 2】

T M I , 臨床グレード	2 1 . 5
A l o m o n e *	2 6
	3 2

\* 組換え C T X は、カルボキシル化 C 末端アルギニンを有する。

#### 【 0 3 8 3 】

天然のクロロトキシンポリペプチドが活性であることが明らかとなり、無能力状態に至る時間の中央値が 2 6 秒であったアッセイにおいて、還元及びアルキル化されたクロロトキシンポリペプチドは、麻痺を誘導しなかった(注射から 6 分間超監視した)(表 8、図 2 3)。

#### 【表 8】

表 8

ペプチド	無能力状態に至る時間 (秒)
C T X	2 6
還元及びアルキル化された C T X	> 3 6 0

#### 【 0 3 8 4 】

したがって、注射から非常に短時間のうちにクロロトキシンポリペプチドがザリガニにおいて無能力状態を誘導することが結果から示された。クロロトキシンポリペプチドの C

末端アルギニン残基の状態（アミド化とカルボキシル化との対比）は、ペプチドが無能力状態を誘導する能力に影響を与えない。このことは、NRP1へのクロロトキシンポリペプチドの結合にカルボキシル化C末端アルギニンが寄与するか、または必要であり得るという知見とは大きく異なるものである。直鎖化クロロトキシンポリペプチドは麻痺を誘導できなかったことから、ペプチドの三次元構造特徴の1つまたは複数が麻痺誘導に必要であり得ることが暗示され得る。この場合も先と同様に、このことは、直鎖化クロロトキシンポリペプチドが、C末端アルギニンがカルボキシル化されている限り、NRP1に結合するという知見から逸脱している。まとめると、このデータは、ペプチドの毒性関連機能が、そのNRP1結合能力と分離可能なものであると思われることを証明するものである。

#### 【0385】

実施例15：NRP1野生型またはNRP1ノックアウトの同系PC-3異種移植片を有するSCIDマウスにカルボキシル化CTX-クリプトフィシンを投与した後の、カルボキシル化CTX-クリプトフィシン及びクリプトフィシン代謝物1の生体内分布

NRP1野生型またはNRP1ノックアウトの同系PC-3腫瘍を有するSCIDマウスに単回用量の複合体を投与した後、CTX-クリプトフィシン複合体、カルボキシル化CTX-クリプトフィシン、及びその活性なS-メチルクリプトフィシン代謝物（クリプトフィシン代謝物1）の血漿中濃度及び腫瘍組織中濃度を測定及び比較した。

#### 【0386】

使用した細胞は、ヒト前立腺癌細胞であるPC-3（ATCC（登録商標）CRL-1435（商標））であり、これらのPC-3は、WuXi AppTecにおいて操作されることでNRP1野生型細胞株（PC-3-sg1-4野生型細胞）及びNRP1ノックアウト細胞株（PC-3-sg1-9ノックアウト細胞）の同系ペアとして得られたものである。使用したマウスは、Charles River laboratoriesから入手した約6週齢の免疫不全雌性NOD.SCIDマウスである。同系異種移植モデルにおいて同一の実験を並行して実施した。腫瘍サイズが約300～500mm<sup>3</sup>に達したときに薬物投与を実施した。EtOH含有率10%、Tween80含有率5%、及び生理食塩水含有率85%の媒体において単回用量のカルボキシル化CTX-クリプトフィシンを0.6mg/kgで静脈内投与した（これによって、効力差異が観測された用量を再現した）。投与から5分～96時間後の所定の時点で動物を安楽死させ、全血（心穿刺）及び腫瘍組織を収集した（時点当たりのマウスn=3）。血液試料を遠心分離して血漿を取得した後、分析実施まで-20℃以下で保管した。周囲組織から検体全体を切り離すことによって腫瘍を収集した。通常の生理食塩水で検体を直ちにすすぎ、水分をふき取った後、重量を測定し、分析実施まで-20℃以下で保管した。Covaris Cryoprepシステム（Covaris, Inc.）を使用して腫瘍組織を凍結粉碎した。試料の微粉碎が完了した時点で、1xのHalt（商標）プロテアーゼ阻害剤混合溶液及び1xのEDTA溶液を含む1xのPBS（Thermo Scientific、製品番号78430）に3:1（v:w）で試料を溶解させた。メタノール:アセトニトリルを1:1（v:v）で含む0.1%酢酸含有溶液を3:1（v:v）で用いてタンパク質を沈降させることによって血漿及びホモジナイズ済組織試料を抽出した。抽出の後、複合体（カルボキシル化CTX-クリプトフィシン）及び活性なS-メチル代謝物（クリプトフィシン代謝物1）の濃度を、LC-MS/MS分析を使用して定量化した。C3PO（Eisai独自の化合物データベース及び薬物動態解析ツール）におけるノンコンパートメント解析を使用して薬物動態（PK）パラメーターを計算した。平均PKパラメーターの計算には、血漿中及び組織中の平均濃度を使用した。

#### 【0387】

見て取れるように、血漿及び腫瘍において検出されたカルボキシル化CTX-クリプトフィシン複合体のレベルは、NRP1野生型またはNRP1ノックアウトの同系モデルにおいてほとんど同一であった。両方のモデルにおいて、複合体は、血漿からの排出半減期が長く、平均クリアランスが遅く、分布量が限られていたことに加えて、腫瘍への分布が少なかった。S-メチルクリプトフィシン（複合体から生成する活性代謝物であるクリプ

10

20

30

40

50

トフィシン代謝物 1) の血漿中レベルもまた、両方のモデルにおいて同様に低く測定された。しかしながら、NRP1 野生型腫瘍組織では、活性代謝物であるクリプトフィシン代謝物 1 が NRP1 ノックアウト腫瘍組織と比較して有意に高いレベルで観測された。活性代謝物の平均レベル (AUC<sub>0-96 時間</sub>) は、NRP1 野生型腫瘍及び NRP1 ノックアウト腫瘍において、それぞれ  $1494 \text{ pmol} \cdot \text{時間} / \text{g}$  または  $385 \text{ pmol} \cdot \text{時間} / \text{g}$  と測定された。NRP1 野生型腫瘍では  $t_{\text{max}} 48 \text{ 時間}$  で平均  $C_{\text{max}}$  が  $22.1 \text{ pmol} / \text{g}$  と測定されたのに対し、NRP1 ノックアウト腫瘍では  $t_{\text{max}} 24 \text{ 時間}$  で平均  $C_{\text{max}}$  が  $4.75 \text{ pmol} / \text{g}$  と測定された (図 24)。

#### 【0388】

概して、血漿中 PK 及び腫瘍分布の結果は、カルボキシル化 CTX - クリプトフィシンについては、NRP1 野生型及び NRP1 ノックアウトの異種移植モデルでほぼ同等であり、AUC<sub>野生型</sub> / AUC<sub>ノックアウト</sub> 比は 1 に近かった。活性代謝物であるクリプトフィシン代謝物 1 の血漿中レベルもまた、2 つモデルで非常に類似していた。対照的に、クリプトフィシン代謝物 1 の活性代謝物の腫瘍中レベルでは約 4 倍の差異が観測された (AUC<sub>野生型</sub> / AUC<sub>ノックアウト</sub> = 3.9)。すなわち、PC-3 腫瘍における NRP1 がノックアウトされると、活性代謝物であるクリプトフィシン代謝物 1 のレベルが約 4 倍低下した。NRP1 ノックアウト腫瘍が受ける活性代謝物の曝露がこうして減少することは、NRP1 野生型腫瘍と比較したときに効力試験において複合体で観測された抗腫瘍活性の減少の原因であり得る。

#### 【0389】

実施例 16 : ヒト前立腺癌 PC-3 異種移植片における CTX - クリプトフィシン複合体の抗腫瘍効力に対する抗ヒト NRP1 遮断抗体及び抗マウス NRP1 遮断抗体の作用

この実施例は、胸腺欠損マウスに皮下移植したヒト前立腺癌 PC-3 細胞 (ATCC (登録商標) CRL-1435 (商標) ヒト前立腺癌細胞) に対する CTX - クリプトフィシンの抗腫瘍作用に対する抗 NRP1 抗体による前処理の効果を評価する実験を示す。実験には、媒体群、CTX - クリプトフィシン群、CTX - クリプトフィシンの投与の 30 分前に対照抗体で前処理する群、及び CTX - クリプトフィシンの投与の 30 分前に抗 NRP1 抗体で前処理する群を含めた。薬物はすべて、EtOH 含有率 10%、Tween-80 含有率 5%、及び生理食塩水含有率 85% の媒体に含めて投与した。Q4D x 3 スケジュールで静脈内投与によって動物を処理した。腫瘍サイズ及び体重を週に 2 回測定した。

#### 【0390】

ウシ胎仔血清が 10% 添加された RPMI-1640 増殖培地において PC-3 細胞を、加湿インキュベーター中、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37℃、単層培養で維持した。接種日に、トリプシン消化によって細胞を収集し、洗浄し、氷冷 PBS 中に再浮遊させた。PBS に含めて体積を 0.1 mL とした  $2 \times 10^6$  個の PC-3 がん細胞を、免疫不全胸腺欠損雌性マウス (Charles River Laboratories から入手した約 6 週齢の免疫不全 NU/NU ヌードマウス) の右腋窩領域付近に 27 ゲージ針を使用して皮下接種した。処理は、腫瘍接種から 20 日後に処理を開始し、腫瘍サイズに基づいて処理群及び媒体対照群に動物を無作為化してから行った。このとき、平均腫瘍サイズは、約  $500 \text{ mm}^3$  であった。

#### 【0391】

この実施例では、(a) CTX - クリプトフィシンの単独投与、(b) 抗 NRP1 IgG 抗体による前処理の後の CTX - クリプトフィシンの投与、(c) IgG 抗体による対照処理の後の CTX - クリプトフィシンの投与、及び (d) 媒体の投与、によってマウスを処理した (表 9)。CTX - クリプトフィシンは、単独で投与するか、または抗体 (抗 NRP1 抗体もしくは対照抗体) の投与から 30 分後に投与し、これらの CTX - クリプトフィシン投与は、 $0.9 \text{ mg} / \text{kg}$  で単一の薬剤として実施した。EtOH 含有率 10%、Tween-80 含有率 5%、及び生理食塩水含有率 85% のもの (媒体) において複合体を製剤化し、こうして製剤化した複合体を 4 日ごとに 1 回、静脈内投与し、この



投与を3回行った。CTX-クリプトフィシン用量は、体重に基づいて $0.9 \text{ mg/kg}$ とし、 $10 \text{ g}$ 当たり $0.1 \text{ mL}$ の用量体積とした。抗NRP1抗体での処理については、ヤギIgG抗ヒトNRP1ポリクローナル抗体及びヒツジIgG抗マウスNRP1ポリクローナル抗体を等量( $20 \mu\text{g}$ の抗ヒトNRP1抗体及び $20 \mu\text{g}$ の抗マウスNRP1抗体：カタログ番号AF566)で混合し、全部で $40 \mu\text{g}$ の抗NRP1抗体混合物を、CTX-クリプトフィシン投与の30分前に投与した。対照抗体については、 $20 \mu\text{g}$ のヤギIgG及び $20 \mu\text{g}$ のヒツジIgGを混合し、全部で $40 \mu\text{g}$ を、対照群に対してCTX-クリプトフィシン投与の30分前に投与した。媒体対照群は、媒体の静脈内投与によって4日ごとに1回処理し、この処理を3回行った。

# 【表9】

10

表9

群	処理	スケジュール
A	CTX-クリプトフィシン $0.9 \text{ mg/kg}$	Q4D×3
B	抗NRP1 ( $20 \mu\text{g}$ の抗ヒト及び $20 \mu\text{g}$ の抗マウス)の30分後にCTX-クリプトフィシン $0.9 \text{ mg/kg}$	Q4D×3
C	対照IgG ( $20 \mu\text{g}$ のヤギIgG及び $20 \mu\text{g}$ のヒツジIgG)の30分後にCTX-クリプトフィシン $0.9 \text{ mg/kg}$	Q4D×3
D	媒体 (EtOH含有率10%、Tween-80含有率5%、及び生理食塩水含有率85%)	Q4D×3

20

# 【0392】

マウスの全身健康状態を監視し、日々の死亡数を記録した。 $(l \times w^2) / 2 = \text{mm}^3$ という式(式中、 $l$ 及び $w$ は、それぞれの測定で収集した、長い方の垂直寸法及び短い方の垂直寸法を指す)を使用してノギス(Mitutoyo, Aurora, IL)測定値(mm)によって腫瘍体積を評価した。腫瘍寸法の記録は、薬物処理を開始した時点から始め、週に2回実施した。体重の記録は、処理の初日から開始して、週に2回実施した。取得データには、それぞれの測定における群の平均腫瘍体積 $\pm \text{SEM}$ 及び群の平均体重 $\pm \text{SEM}$ を含めた。最長軸での腫瘍測定値が $2 \text{ cm}$ に達した動物は、試験終了前に安楽死させた。統計解析は、腫瘍の肥大が原因で媒体処理動物を安楽死させた日である35日目に実施した。

30

# 【0393】

腫瘍体積に対して一元配置分散分析(ANOVA)を実施し、その後、ダネットの多重比較検定を実施することによって統計解析を行った。この解析は、試験の35日目(媒体エンドポイント)に実施した。 $P < 0.05$ の値を両側仮説下で統計学的に有意であると見なした。統計解析はすべて、GraphPad Prism 6ソフトウェア(Lake Forest, CA)を使用して実施した。

40

# 【0394】

図25に示されるデータは、CTX-クリプトフィシンの単独投与、または抗NRP1抗体もしくは対照IgGでの前処理後のCTX-クリプトフィシンの投与が、胸腺欠損マウスにおけるPC-3ヒト前立腺癌異種移植片の腫瘍増殖に与える作用を示す。データは、平均腫瘍体積 $\pm \text{SEM}$ を示す。CTX-クリプトフィシン単独で処理したマウスでは抗腫瘍作用が観測され、対照IgGで前処理した後にCTX-クリプトフィシンで処理したマウスにおいてもほぼ同一の作用が観測された。対照的に、抗NRP1抗体で異種移植片を前処理すると、CTX-クリプトフィシンの効力が鈍化し、活性の差異は、統計学的に有意であった。

50

## 【0395】

したがって、抗NRP1抗体でPC-3異種移植片を前処理すると、CTX-クリプトフィシンの抗腫瘍活性が鈍化する。いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、こうしたデータは、CTX-クリプトフィシン複合体の抗腫瘍効力においてNRP1が役割を担うことを示唆しており、CTXが腫瘍細胞上のNRP1に結合して取り込みが増えることで、抗腫瘍作用が増強されるという仮説を支持するものである。

## 【0396】

実施例17：ヒト前立腺癌PC-3異種移植片におけるCTX-クリプトフィシン複合体の抗腫瘍効力に対する抗ヒトNRP1遮断抗体の作用

この実施例は、胸腺欠損マウスに皮下移植したヒト前立腺癌PC-3細胞に対するCTX-クリプトフィシン複合体の効力を抗ヒトNRP1 Abが鈍化させる能力を評価すると共に、特定ロットの抗ヒトNRP1抗体を使用してその再現性を評価する実験を示す。

10

## 【0397】

この実験は、実施例16に記載のように実施し、抗体または対照IgGでの前処理を30分間行った後、CTX-クリプトフィシンの投与を0.9mg/kgで実施した。処理は、腫瘍接種から16日後に開始した。抗体は、実施例16において使用した抗ヒトNRP-1抗体と同じ採血（「採血1」）に由来するものを使用した。

## 【0398】

20μgの抗ヒトNRP1抗体での処理の後にCTX-クリプトフィシンで処理を行うと、対照IgGでの処理の後にCTX-クリプトフィシンで処理を行ったものと比較して抗腫瘍活性が統計学的に有意に低下した（図26）。抗ヒトNRP1抗体の用量を80μgにすると、抗体による鈍化作用が失われた。このデータは、ある特定の用量の抗ヒトNRP1抗体がCTX-クリプトフィシン複合体の活性を鈍化させることを示唆しており、このことは、CTX-クリプトフィシン複合体が抗腫瘍作用を媒介する上でNRP1が役割を担うことをさらに示唆している。

20

## 【0399】

さらに、抗ヒトNRP1 IgG抗体の低力価ロットを使用して実施した実験では、CTX-クリプトフィシンによる抗腫瘍応答が鈍化することは示されなかった（データ掲載なし）。この低力価ロットは、「採血1」を行ったものと同じ動物の2回目の採血に由来するものであるが、この低力価ロットは、細胞ベースのアッセイにおいてNRP1に対するVEGFの結合を遮断する能力によって測定すると、NRP1の遮断力価が1/2であることが明らかとなった。抗ヒトNRP1 IgGの低力価ロットから得られたこうしたデータは、VEGF遮断アッセイにおける抗体の力価がインビボアッセイでの能力と関連することを示唆している。

30

## 【0400】

概して、いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、抗NRP1抗体での前処理の後に観測された抗腫瘍作用の鈍化は、CTX-クリプトフィシン複合体の抗腫瘍活性においてNRP1が役割を担うという仮説を支持するものである。

## 【0401】

実施例18：ヒト前立腺癌PC-3を皮下に異種移植したモデルにおけるクリプトフィシンペイロードとCTXとの同時投与

40

腫瘍透過ペプチドiRGD（CRGDK/RGPD/EC）は、薬物と化学的に複合体化されるか、または薬物と同時に投与されると、当該薬物を血管外腫瘍組織の奥深くに送り込むことができる。薬物浸透性の増加は、腫瘍特異的かつNRP1依存性である。iRGDは、 $\alpha$ 5 $\beta$ 1インテグリンを発現する腫瘍内皮細胞に結合し、次に、腫瘍においてタンパク質分解によって切断されることでCRGDK/Rを生じる。こうして生じる切断型ペプチドは、そのインテグリン結合活性の大部分を失うが、C末端に条件的C末端則（CendR）モチーフ（R/KXXXR/K）が露出するため、NRP1に対する親和性を獲得する。NRP1との結合は組織透過を引き起こすが、切断が生じるにはペプチドが先にインテグリンに結合することが必要であるため、この組織透過は腫瘍特異的に生じる。こうした

50

特徴は、i R G Dと薬物とが併用療法の別々の成分として投与されるときにがん薬物の送達及び活性を増強する腫瘍特異的組織透過活性をi R G Dに与えるものである。切断型i R G Dペプチド（vインテグリン結合性を有さない）でもまた、腫瘍特異的な取り込みが亢進することが示された（S u g a h a r a K N e t a l . 2 0 1 0 . S c i e n c e 3 2 8 : 1 0 3 1 - 3 5 ）。

#### 【 0 4 0 2 】

いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、クロトキシシン及び/またはその断片は、（少なくともアルギニンC末端がカルボン酸であるとき）切断型i R G Dと同様にN R P 1に結合し、それによってN R P 1発現腫瘍への薬物の浸透を増強し得る。下記のC T X併用試験では、P C - 3異種移植片におけるC T Xまたはi R G Dとクリプトフィシンペイロードとの同時投与について調べた。

#### 【 0 4 0 3 】

この試験では、クリプトフィシンペイロードを、単独使用（ペプチド媒体対照と共に単一の薬剤として使用）、i R G Dペプチド（C P C S c i e n t i f i c ; ロット番号C K - 1 1 - 0 1 0 4 2 ）との併用、またはC T Xとの併用について評価した。この実験には、媒体処理対照群も含めた（表10）。i R G Dの用量及び投与スケジュールは、S u g a h a r a K N e t a l . 2 0 1 0 . S c i e n c e 3 2 8 : 1 0 3 1 - 3 5 に公開されたものに基づいた。

#### 【表10】

表10：クリプトフィシンアナログ単独の作用、またはi R G DペプチドもしくはC T Xペプチドとの併用時のクリプトフィシンアナログの作用を、P C - 3ヒト前立腺癌異種移植片を有する胸腺欠損マウスにおいて調べるための処理群

群	処理	経路	スケジュール	動物数
A	媒体（E t O H含有率10%、T w e e n - 8 0含有率5%、及び生理食塩水含有率85%）	I V	Q 2 D × 3	5
B	クリプトフィシンペイロード 0.4 mg/kg + 媒体	I V	Q 2 D × 3	5
C	クリプトフィシンペイロード 0.4 mg/kg + i R G D 3.8 mg/kg	I V	Q 2 D × 3	5
D	クリプトフィシンペイロード 0.4 mg/kg + C T X 16 mg/kg	I V	Q 2 D × 3	5

#### 【 0 4 0 4 】

F B Sを10%添加したR P M I - 1 6 4 0培地においてP C - 3ヒト前立腺癌細胞（A T C C C R L - 1 4 3 5 ）を増殖させた。接種については、体積0.1 mLに含めた $2 \times 10^6$ 個のP C - 3がん細胞を、27ゲージ針を使用してマウスの右腋窩領域付近に皮下注射した。使用したマウスは、C h a r l e s R i v e r L a b sから入手した約6週齢の免疫不全雌性N U / N Uヌードマウスである。ノギスを使用して腫瘍の測定を少なくとも週に2回行い、平均腫瘍サイズが約 $180 \text{ mm}^3$ に達したときに、腫瘍サイズに基づいてマウスを処理群に無作為化した。処理はすべて、腫瘍接種から17日後に開始した。この実験には、媒体処理群及び薬物処理群（n = 5）を含めた。C T Xは、生理食塩水に溶解し、クリプトフィシンペイロードは、媒体（E t O H含有率10%、T w e e n 8 0含有率5%、及び生理食塩水含有率85%）に溶解し、i R G Dペプチドは、10×保存溶液として最初に100% E t O Hに溶解した後、さらなる希釈には生理食塩水を使用した。併用投与については、クリプトフィシン及びペプチドを最初に2×保存溶液として調製した後、投与前に1 : 1（v / v）で共に混合した。薬物はすべて、Q 2 D × 3スケジュールで静脈内投与した。それぞれの群は、5匹のマウスから構成されるようにした

。薬物は、2日ごとに1回、静脈内投与し、この投与を3回行った。用量については、体重に基づいてクリプトフィシンは0.4 mg/kg、iRGDは4 mg/kg、CTXは16 mg/kg (iRGDペプチドのモル等量用量)とし、10 g当たり0.1 mLの用量体積とした。

#### 【0405】

マウスの全身健康状態を監視し、日々の死亡数を記録した。 $(l \times w^2) / 2 = \text{mm}^3$ という式(式中、 $l$ 及び $w$ は、それぞれの測定で収集した、長い方の垂直寸法及び短い方の垂直寸法を指す)を使用してノギス(Mitutoyo, Aurora, IL)測定値(mm)によって腫瘍体積を評価した。腫瘍寸法の記録は、薬物処理を開始した時点から始め、週に2回実施した。体重の記録は、処理の初日から開始し、週に2回実施した。相対体重は下記のように計算した: 相対体重 = (測定日の体重 / 処理初日の体重)。取得データには、それぞれの測定時点の群の平均腫瘍体積及び群の平均体重を含めた。腫瘍体積についての平均値 $\pm$ SEM、及び相対体重についての平均値 $\pm$ SEMをそれぞれの実験群ごとに計算した。最長軸での腫瘍測定値が2 cmに達した動物は、試験終了前に安楽死させた。

10

#### 【0406】

腫瘍体積に対して一元配置分散分析(ANOVA)を実施し、その後、ボンフェローニの多重比較検定を実施することによって統計解析を行った。解析は、試験の60日目に実施した。 $P < 0.05$ の値を両側仮説下で統計学的に有意であると見なした。統計解析はすべて、GraphPad Prism 6ソフトウェア(Lake Forest, CA)を使用して実施した。

20

#### 【0407】

クリプトフィシンペイロードを0.4 mg/kgでPC-3異種移植片に投与すると、有意な抗腫瘍活性が生じることを結果は示す(図27)。媒体群の動物は、腫瘍サイズが肥大したため45日目に安楽死させたが、薬物処理群では、腫瘍は非常に小さいままであった。すべての処理群において腫瘍の退縮が観測され、その後、最後の投与から3~4週間後の時点で腫瘍の再増殖が始まった。ペプチドとの併用処理を行った群の両方において腫瘍の再増殖は遅延した。この腫瘍再増殖遅延は、CTXとの併用について明白性及び統計学的有意性がより高かったことから、CTXとの併用は、iRGDとの併用と比較してより有効であると思われる。こうした結果は、クリプトフィシンペイロードの用量を0.2 mg/kgに下げることによってこの実施例のプロトコルを改変すると再現せず、0.2 mg/kg用量では、クリプトフィシンペイロードでの単独処理とクリプトフィシンペイロードとiRGDとでの併用処理との間、またはクリプトフィシンペイロードでの単独処理とクリプトフィシンペイロードとCTXとでの併用処理との間で、腫瘍の再増殖に有意差は示されなかった(データ掲載なし)。

30

#### 【0408】

クリプトフィシンとiRGDペプチドまたはCTXペプチドと併用すると、クリプトフィシンペイロードでの単独処理と比較してPC-3異種移植片における腫瘍の進行が遅延した。CTX/ペイロードの組み合わせでは、iRGD/ペイロードと比較して腫瘍の進行が鈍化した。CTX/ペイロードで処理した後の腫瘍サイズは、クリプトフィシンペイロード単独で処理した後の腫瘍サイズと比較して有意に異なったが、iRGD/ペイロードで処理した後の腫瘍サイズを同様に比較したときには、有意差は存在しなかった。

40

#### 【0409】

実施例19: ヒト前立腺癌PC-3を皮下に異種移植したモデルにおけるクリプトフィシンペイロードとさまざまな用量のCTXとの同時投与

この実施例は、クリプトフィシンペイロードとの同時投与について複数のCTX用量を評価する実験を示す。

#### 【0410】

この実験については、実施例18に記載のように材料、方法、薬物、及びモデルを使用した。ノギスを使用してPC-3腫瘍の測定を少なくとも週に2回行い、平均腫瘍サイズ

50

が約  $250\text{ mm}^3$  に達したときに腫瘍サイズに基づいてマウスを処理群に無作為化した。処理はすべて、腫瘍接種から 17 日後に開始した。実験は、媒体処理群及び薬物処理群 ( $n = 5$ ) からなるようにした。薬物はすべて、Q 2 D  $\times$  3 スケジュールで静脈内投与した。  
【0411】

クリプトフィシンペイロードを、単一の薬剤としての使用、i R G D ペプチドとの併用、及び C T X ペプチドとの併用について評価した (表 11)。それぞれの群には、5 匹のマウスを含めた。処理は、2 日ごとに 1 回、静脈内投与によって実施し、この投与を 3 回行った。体重に基づいて  $4\text{ mg/kg}$  の i R G D、 $16\text{ mg/kg}$  (i R G D ペプチドのモル等量用量) の C T X、または媒体を併用してクリプトフィシンを  $0.2\text{ mg/kg}$  で、用量体積を  $10\text{ g}$  当たり  $0.1\text{ mL}$  として動物に投与した。さらに、 $2\text{ mg/kg}$  用量、 $4\text{ mg/kg}$  用量、及び  $64\text{ mg/kg}$  用量で C T X を投与することで、クリプトフィシン活性が増強されるか評価した。

【表 11 - 1】

表 11：クリプトフィシンアナログ単独の作用、または i R G D ペプチドもしくは C T X ペプチドとの併用時のクリプトフィシンアナログの作用を、P C - 3 ヒト前立腺癌異種移植片を有する胸腺欠損マウスにおいて調べるための処理群

群	処理	経路	スケジュール	動物数
A	媒体 (E t O H 含有率 10%、T w e e n - 80 含有率 5%、及び生理食塩水含有率 85%)	I V	Q 2 D $\times$ 3	5
B	クリプトフィシンペイロード $0.4\text{ mg}$	I V	Q 2 D	5

【表 11 - 2】

	/k g + 媒体		$\times 3$	
C	クリプトフィシンペイロード $0.4\text{ mg}$ /k g + i R G D $3.8\text{ mg/kg}$	I V	Q 2 D $\times 3$	5
D	クリプトフィシンペイロード $0.4\text{ mg}$ /k g + C T X $16\text{ mg/kg}$	I V	Q 2 D $\times 3$	5
E	クリプトフィシンペイロード $0.4\text{ mg}$ /k g + C T X $64\text{ mg/kg}$	I V	Q 2 D $\times 3$	5
F	クリプトフィシンペイロード $0.4\text{ mg}$ /k g + C T X $4\text{ mg/kg}$	I V	Q 2 D $\times 3$	5
G	クリプトフィシンペイロード $0.4\text{ mg}$ /k g + C T X $2\text{ mg/kg}$	I V	Q 2 D $\times 3$	5

【0412】

Q 4 D  $\times$  3 スケジュールでクリプトフィシンペイロードを  $0.4\text{ mg/kg}$  で P C - 3 異種移植片に単独で投与すると、有意な抗腫瘍活性が生じた (図 28)。媒体群の動物は、腫瘍サイズが肥大したため 42 日目に安楽死させたが、薬物処理群では、腫瘍は非常に小さいままであった。すべての処理群において腫瘍の退縮が観測され、その後、最後の薬物投与から 2 ~ 3 週間後の時点で腫瘍の再増殖が始まった。

【0413】

C T X を  $16\text{ mg/kg}$  で併用してクリプトフィシンで処理した D 群では、クリプトフィシンでの単独処理 (B 群) と比較して、腫瘍の再増殖が統計学的に有意 ( $t$  検定で  $P < 0.05$ ) に遅延することが観測された (図 28)。この試験では、クリプトフィシンに

i R G Dを加えて併用しても、クリプトフィシンの抗腫瘍活性に対する影響は認められなかった（図28）。

#### 【0414】

C T Xを16 mg / k gで併用したときとは対照的に、C T Xの用量を2 mg / k g及び4 mg / k gとすると、腫瘍の再増殖は有意に遅延しなかった（図29）。C T Xの用量を64 mg / k gとしてクリプトフィシンと共に投与すると、有意な体重減少が観測されたため、26日目に動物を安楽死させた。この群での64 mg / k gよりも用量がはるかに高くても、C T Xが単独ならマウスによる忍容性は良好であった。したがって、毒性が観測されたことは、クリプトフィシンの作用が増強されたことに起因する可能性がある。終了前には、こうした動物は、神経学的な便秘（確立されたクリプトフィシン誘導性副作用）を有することも観測され、このことは、腫瘍以外の組織へのクリプトフィシンの取り込みが増加したことを示唆している。概して、結果は、C T Xがクリプトフィシンの活性を増強するという知見を支持するものである。

10

#### 【0415】

実施例20：ヒト前立腺癌P C - 3を皮下に異種移植したモデルにおけるC T Xとクリプトフィシンペイロードとの同時投与

この実施例は、クリプトフィシン及びその活性代謝物の組織分布を、試験を重複実施して評価する実験を示す。P C - 3異種移植片において単回用量のクリプトフィシンペイロードを単独使用またはC T Xと併用した後、クリプトフィシンペイロード及び生じ得るその代謝物であるクリプトフィシン代謝物1について、血漿、肝臓、腫瘍、腎臓、心臓、脳、小腸、皮膚、及び骨格筋における濃度を測定した。

20

#### 【0416】

この実験については、実施例21に記載のように材料、方法、薬物、及びモデルを使用した。単回用量のクリプトフィシンペイロードを、単独使用するか、またはC T Xを16 mg / k gで併用して、0.4 mg / k gでヌードマウスに静脈内投与した。静脈内投与後、所定の時点で心穿刺を介して全血試料を採取した（時点当たりのマウスn = 3）。血液試料を遠心分離して血漿を取得した後、分析実施まで-20℃以下で保管した。さらに、それぞれの時点で、周囲組織から検体全体を切り離すことによって腎臓、肝臓、小腸、脳、心臓、及び腫瘍を収集した（肝臓及び小腸についてはその一部のみを切り離した）。切り離しの後、通常の生理食塩水で組織をすすぎ（小腸は中身を空にした）、清潔な吸水ティッシュで拭いて乾かした。乾いた時点で、検体を重量測定し、分析実施まで-20℃以下で保管した。抽出後、L C - M S / M Sを使用して血漿及び組織におけるクリプトフィシンペイロード及びクリプトフィシン代謝物1の濃度を評価した。薬物動態（P K）パラメーターを計算した。平均P Kパラメーターの計算には、血漿中及び組織中の平均濃度を使用した。皮膚及び骨格筋は、ホモジナイズすることが困難であったため評価しなかった。

30

#### 【0417】

単独投与群のための媒体は、エタノールを10%、T w e e n 80を5%、生理食塩水を85%含むものとした。併用処理のための媒体は、エタノールを5%、T w e e n 80を2.5%、生理食塩水を92.5%含むものとした。

40

#### 【0418】

表12～15には、血漿（n g / m L）及び組織（n g / g）において観測されたクリプトフィシンペイロード及びクリプトフィシン代謝物1の濃度が示される。表16及び表17には、クリプトフィシンペイロードを0.4 mg / k gで単独投与した後、または0.4 mg / k gのクリプトフィシンペイロードと16 mg / k gのC T Xとを同時投与した後のクリプトフィシンペイロード及びクリプトフィシン代謝物1のP Kパラメーターが示される。

#### 【0419】

クリプトフィシンペイロードの単独投与後、クリプトフィシンペイロードの平均血漿曝露量（A U C<sub>0-∞</sub>）は154 n g ・時間 / m Lであり、半減期（t<sub>1/2</sub>）は1.13時

50

間と中程度であり、クリアランス (CL) は  $2.60 \text{ L / 時間 / kg}$  と中程度であり、 $V_{ss}$  は  $1.15 \text{ L / kg}$  と中程度であった。肝臓 ( $AUC_{0-6 \text{ 時間}}$ )、腫瘍 ( $AUC_{0-}$ )、腎臓 ( $AUC_{0-}$ )、心臓 ( $AUC_{0-}$ )、脳 ( $AUC_{0-}$ )、及び小腸 ( $AUC_{0-6 \text{ 時間}}$ ) におけるクリプトフィシンペイロードの平均曝露量は、それぞれ  $9.65 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $28.8 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $826 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $38.9 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $3.57 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、及び  $81.6 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$  と測定され、 $0.083$  時間の  $t_{max}$  におけるそれぞれの平均  $C_{max}$  値は、それぞれ  $6.02 \text{ ng / g}$ 、 $11.6 \text{ ng / g}$ 、 $533 \text{ ng / g}$ 、 $63.2 \text{ ng / g}$ 、 $8.32 \text{ ng / g}$ 、及び  $53.3 \text{ ng / g}$  であった。

#### 【0420】

クリプトフィシンペイロードの単独投与後、クリプトフィシン-S-メチル代謝物 (クリプトフィシン代謝物1) の血漿における平均曝露量 ( $AUC_{0-}$ ) は  $40.7 \text{ ng} \cdot \text{時間 / mL}$  であり、 $0.083$  時間の  $t_{max}$  における平均  $C_{max}$  は  $23.6 \text{ ng / mL}$  であった。肝臓 ( $AUC_{0-}$ )、腫瘍 ( $AUC_{0-24 \text{ 時間}}$ )、腎臓 ( $AUC_{0-}$ )、心臓 ( $AUC_{0-}$ )、脳 ( $AUC_{0-6 \text{ 時間}}$ )、及び小腸 ( $AUC_{0-}$ ) におけるクリプトフィシン代謝物1の平均曝露量は、それぞれ  $1870 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $117 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $1750 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $396 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $4.42 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、及び  $314 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$  と測定され、それぞれ  $0.08$  時間、 $6.00$  時間、 $0.50$  時間、 $0.08$  時間、 $0.08$  時間、及び  $0.50$  時間の  $t_{max}$  における  $C_{max}$  値は、それぞれ  $2710 \text{ ng / g}$ 、 $5.33 \text{ ng / g}$ 、 $361 \text{ ng / g}$ 、 $87.1 \text{ ng / g}$ 、 $1.46 \text{ ng / g}$ 、及び  $29.7 \text{ ng / g}$  であった。

#### 【0421】

クリプトフィシンペイロードの単独投与後に生じるクリプトフィシンペイロード曝露の観測量が多いものから少ないものの順に組織を並べると、腎臓 > 小腸 > 心臓 > 腫瘍 > 肝臓 > 脳 (TPIは、それぞれ  $5.36 \text{ mL / g}$ 、 $0.268 \text{ mL / g}$ 、 $0.253 \text{ mL / g}$ 、 $0.187 \text{ mL / g}$ 、 $0.0631 \text{ mL / g}$ 、及び  $0.0208 \text{ mL / g}$ ) となった。組織へのクリプトフィシン-S-メチル代謝物 (クリプトフィシン代謝物1) の分布について、曝露量が多いものから少ないものの順に組織を並べると、肝臓 > 腎臓 > 心臓 > 小腸 > 腫瘍 > 脳となった。

#### 【0422】

クリプトフィシンペイロードとCTXとの同時投与後、クリプトフィシンペイロードの平均血漿曝露量 ( $AUC_{0-}$ ) は  $129 \text{ ng} \cdot \text{時間 / mL}$  であり、半減期 ( $t_{1/2}$ ) は  $0.848$  時間と短く、クリアランスは  $3.11 \text{ L / 時間 / kg}$  と中程度であり、 $V_{ss}$  は  $2.28 \text{ L / kg}$  と高かった。肝臓 ( $AUC_{0-6 \text{ 時間}}$ )、腫瘍 ( $AUC_{0-6 \text{ 時間}}$ )、腎臓 ( $AUC_{0-}$ )、心臓 ( $AUC_{0-}$ )、脳 ( $AUC_{0-2 \text{ h}}$ )、及び小腸 ( $AUC_{0-}$ ) におけるクリプトフィシンペイロードの平均曝露量は、それぞれ  $15.1 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $42.7 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $1230 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $62.0 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $3.69 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、及び  $36.4 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$  と測定され、それぞれ  $1.00$  時間、 $0.08$  時間、 $0.50$  時間、 $0.08$  時間、 $0.08$  時間、及び  $0.08$  時間の  $t_{max}$  におけるそれぞれの  $C_{max}$  値は、それぞれ  $7.13 \text{ ng / g}$ 、 $12.5 \text{ ng / g}$ 、 $411 \text{ ng / g}$ 、 $47.3 \text{ ng / g}$ 、 $3.97 \text{ ng / g}$ 、及び  $19.8 \text{ ng / g}$  であった。

#### 【0423】

クリプトフィシンペイロードとCTXとの同時投与の後、血漿におけるクリプトフィシン代謝物1の平均曝露量 ( $AUC_{0-}$ ) は  $53.2 \text{ ng} \cdot \text{時間 / mL}$  であり、 $1.0$  時間の  $t_{max}$  における  $C_{max}$  は  $12.4 \text{ ng / mL}$  であった。肝臓 ( $AUC_{0-}$ )、腫瘍 ( $AUC_{0-24 \text{ 時間}}$ )、腎臓 ( $AUC_{0-24 \text{ 時間}}$ )、心臓 ( $AUC_{0-}$ )、脳 ( $AUC_{0-6 \text{ 時間}}$ )、及び小腸 ( $AUC_{0-}$ ) におけるクリプトフィシン代謝物1の平均曝露量は、それぞれ  $2930 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $259 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $2720 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $620 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、 $5.38 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$ 、及び  $316 \text{ ng} \cdot \text{時間 / g}$  と測定され、それぞれ  $0.08$  時間、 $6.00$  時間、 $2.00$  時間、 $0.08$  時間、 $2.00$  時間

、及び1.00時間の $t_{max}$ におけるそれぞれの $C_{max}$ 値は、それぞれ1540 ng/g、12.2 ng/g、370 ng/g、107 ng/g、1.09 ng/g、及び26.9 ng/gであった。

#### 【0424】

クリプトフィシンペイロードとCTXとの同時投与後の組織へのクリプトフィシンペイロードの分布について、曝露量が多いものから少ないものの順に組織を並べると、腎臓>心臓>腫瘍>小腸>肝臓>脳となり、TPIは、それぞれ9.53 mL/g、0.481 mL/g、0.334 mL/g、0.282 mL/g、0.118 mL/g、及び0.0315 mL/gであった。組織へのクリプトフィシン代謝物1の分布について、曝露量が多いものから少ないものの順に組織を並べると、肝臓>腎臓>心臓>小腸>腫瘍>脳という曝露順になった。

10

#### 【0425】

クリプトフィシンペイロードを単独投与した後の組織曝露量に対する併用処理後の組織曝露量の倍率変化(AUC併用/AUC単一薬剤)を計算し、それぞれの組織ごとにプロットした(図30)。

#### 【0426】

一般に、クリプトフィシンペイロードの単独投与と比較して、クリプトフィシンペイロードとCTXとを同時投与した後にクリプトフィシンペイロード及びクリプトフィシン代謝物1の増加が観測された。腫瘍で観測された曝露量の増加が最も大きかった(すなわち、表16及び表17に示されるように、AUCがそれぞれ3.1倍及び2.2倍に増加した)。

20

#### 【0427】

まとめると、クリプトフィシンペイロードとCTXとをPC-3異種移植マウスに同時投与した後に、親であるクリプトフィシンペイロード及び代謝物であるクリプトフィシン代謝物1に対する曝露量(AUC)が増加することが、小腸を除くすべての組織において観測された。腫瘍を除くすべての組織について曝露量比(併用/クリプトフィシン単独)は1~約1.5であった一方で、平均血漿曝露量は1に近いままであった(クリプトフィシンペイロード及びクリプトフィシン代謝物1について、それぞれ0.8倍及び1.3倍)。同時投与の後に腫瘍組織において観測された曝露量の増加は、単一の薬剤の投与後に観測されたものと比較して有意に大きく、CTXが存在すると、クリプトフィシンペイロード及びクリプトフィシン代謝物1が3.1及び2.2の倍率で増加した。

30

#### 【0428】

PC-3腫瘍は、NRP1を高発現する。C末端側ペプチドがNRP1に結合すると、同時投与された薬物の組織深部浸透性が向上することが報告されている(Sugahara KN et al. 2010. Science 328:1031-35)。この試験では腫瘍特異的な様式でCTXがクリプトフィシンの送達を増強したと思われ、このことは、CTXがNRP1にインビボで結合するという理論を支持するものである。いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、こうしたデータは、PC-3異種移植片の併用処理で観測された効力増強に対して考え得る機構的基礎も与えるものである。

40

#### 【表12-1】

表12:クリプトフィシンペイロードを単回用量で静脈内注射するか、またはCTXと共にクリプトフィシンペイロードを単回用量で静脈内注射した後の血漿及び組織におけるクリプトフィシンペイロードの平均濃度

用量 (mg/kg)	時間 (時間)	クリプトフィシンペイロードの濃度 (ng/血漿mL、ng/組織g)		
		血漿	肝臓	腫瘍

50



【表 1 2 - 2】

		平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
0.4 mg/kg ER-001157271	0.083	493	250	6.02	2.52	11.6	4.46
	0.5	36.3	1.96	1.92	1.30	4.11	2.28
	1	11.0	3.05	3.32	2.95	2.14	0.929
	2	5.30	0.317	1.29	NA <sup>a</sup>	2.41	0.414
	6	0.492	0.135	0.948	NA <sup>a</sup>	1.03	0.365
	24	BLQ	NA	BLQ	NA	0.335	0.0854
0.4 mg/kg ER-001157271 + 16 mg/kg CTX	0.083	268	119	3.89	2.83	12.5	9.22
	0.5	37.9	7.85	7.13	4.26	10.3	0.653
	1	43.8	29.9	7.13	1.47	9.46	1.28
	2	7.53	1.93	2.13	0.611	10.1	6.21
	6	0.537	0.293	0.632	NA <sup>a</sup>	2.80	0.937
	24	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ	NA

BLQ = 定量限界未満 (< 0.05 ng/血漿mL、< 0.2 ng/組織g)。

IV = 静脈内注射。

NA = 非適用。

a : n = 2 のため、標準偏差の評価なし。

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 1】

表 1 3 : クリプトフィシンペイロードを単回用量で静脈内注射するか、または C T X と共にクリプトフィシンペイロードを単回用量で静脈内注射した後の血漿及び組織におけるクリプトフィシンペイロードの平均濃度

用量 ( m g / k g )	時間 (時間)	クリプトフィシンペイロードの濃度 ( n g / 血漿 m L 、 n g / 組織 g )							
		腎臓		心臓		脳		小腸	
		平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
0 . 4 m g / k g E R - 0 0 1 1 5 7 2 7 1	0 . 0 8 3	5 3 3	4 5 . 4	6 3 . 2	2 5 . 1	8 . 3 2	4 . 0 9	5 3 . 3	4 6 . 5
	0 . 5	3 2 0	2 4 . 5	1 8 . 9	8 . 4 7	1 . 4 2	0 . 3 4 2	1 3 . 6	3 . 3 0
	1	1 5 8	1 5 . 5	7 . 9 1	1 . 7 9	0 . 6 7 3	0 . 1 0 6	6 . 5 5	1 . 1 0
	2	9 3 . 8	4 . 0 1	3 . 2 8	3 . 4 4	0 . 4 3 6	0 . 0 3 3	6 . 4 1	5 . 1 6
	6	2 0 . 4	2 . 4 3	0 . 8 8 5	0 . 1 7 0	B L Q B L Q	N A N A	2 . 1 7	0 . 8 5 9

10

20

【表 1 3 - 2】

0 . 4 m g / k g E R - 0 0 1 1 5 7 2 7 1 + 1 6 m g / k g C T X	2 4	3 . 7 9	2 . 7 5	B L Q	N A	B L Q	N A	2 . 3 1	1 . 9 1
	0 . 0 8 3	3 8 9	3 1 3	4 7 . 3	3 9 . 9	3 . 9 7	2 . 5 1	1 9 . 8	1 5 . 1
	0 . 5	4 1 1	5 0 . 0	4 1 . 3	1 2 . 7	2 . 0 9	0 . 0 7 4	1 3 . 4	3 . 6 3
	1	3 1 7	3 0 . 2	1 8 . 7	1 . 2 9	2 . 0 7	0 . 6 8 7	1 5 . 5	4 . 3 4
	2	1 7 9	2 8 . 2	6 . 3 7	2 . 1 4	0 . 7 0 3	0 . 2 0 2	5 . 6 6	2 . 8 7
	6	3 5 . 9	1 6 . 0	1 . 3 9	0 . 1 2 6	B L Q B L Q	N A N A	0 . 8 7 3	0 . 1 2 4
	2 4	3 . 3 9	0 . 6 2 1	B L Q	N A	B L Q	N A	B L Q	N A

30

40

B L Q = 定量限界未満 ( $< 0 . 0 5 \text{ n g / 血漿 m L}$ 、 $< 0 . 2 \text{ n g / 組織 g}$ )。

I V = 静脈内注射。

N A = 非適用。

a : n = 2 のため、標準偏差の評価なし。

【表 1 4 - 1】

表 1 4 : クリプトフィシンペイロードを単回用量で静脈内注射するか、または C T X と共にクリプトフィシンペイロードを単回用量で静脈内注射した後の血漿及び組織におけるクリプトフィシン代謝物 1 の平均濃度

用量 (m g / k g)	時間 (時間)	クリプトフィシン代謝物 1 の濃度 (n g / 血漿 m L、n g / 組織 g)					
		血漿		肝臓		腫瘍	
		平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
0 . 4 m g / k g E R - 0 0 1 1 5 7 2 7 1	0 . 0 8 3	2 3 . 6	7 . 3 6	2 7 1 0	5 4 6	2 . 3 6	1 . 3 7
	0 . 5	8 . 3 7	2 . 6 6	4 9 9	2 3 5	3 . 2 7	3 . 0 9
	1	6 . 4 6	0 . 2 6 3	3 1 0	9 6 . 1	3 . 4 1	1 . 3 5
	2	4 . 3 2	0 . 7 4 9	1 9 4	3 8 . 6	4 . 0 1	2 . 1 4
0 . 4 m g / k g E R - 0 0 1 1 5 7 2 7 1 + 1 6 m g / k	6	1 . 8 6	0 . 2 5 8	3 7 . 2	1 0 . 5	5 . 3 3	0 . 5 5 1
	2 4	0 . 1 4 1	0 . 0 4 4 5	7 . 8 9	4 . 3 2	4 . 9 1	0 . 3 2 4
	0 . 0 8 3	1 0 . 8	1 0 . 6	1 5 4 0	1 5 6 0	2 . 6 1	N A <sup>a</sup>
	0 . 5	8 . 1 0	1 . 7 7	1 0 0 0	2 7 4	2 . 6 9	0 . 2 6 0
	1	1 2 . 4	1 1 . 1	1 3 7 0	1 1 2 0	3 . 9 0	0 . 1 7 6
	2	5 . 1 2	0 . 4 9 1	3 3 5	1 6 6	9 . 6 6	5 . 8 8
	6	2 . 1 5	0 . 7 5 7	5 3 . 6	1 5 . 3	1 2 . 2	0 . 9 8

【表 1 4 - 2】

g C T X							2
	2 4	0 . 3 8 4	0 . 1 4 6	5 . 1 5	0 . 7 2 9	1 0 . 8	2 . 1 6

B L Q = 定量限界未満 (< 0 . 0 5 n g / 血漿 m L、< 0 . 2 n g / 組織 g)。

I V = 静脈内注射。

N A = 非適用。

a : N = 2 のため、標準偏差の評価なし。

【表 15】

表 15：クリプトフィシンペイロードを単回用量で静脈内注射するか、またはCTXと共にクリプトフィシンペイロードを単回用量で静脈内注射した後の血漿及び組織におけるクリプトフィシン代謝物 1 の平均濃度

用量 (mg / kg)	時間 (時間)	クリプトフィシン代謝物 1 の濃度 (ng / 血漿 mL, ng / 組織 g)							
		腎臓		心臓		脳		小腸	
		平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD
0.4 mg / kg ER - 001 157 271	0.08 3	225	59.3	87.1	40.6	1.46	0.879	22.2	12.4
	0.5	361	113	80.2	13.5	0.895	0.327	29.7	12.1
	1	294	49.2	70.3	21.8	0.983	0.282	24.3	6.20
	2	249	25.4	52.8	47.3	0.887	0.335	23.1	4.16
	6	91.2	2.72	25.4	2.87	0.412	0.085	26.1	8.54
	24	4.88	1.76	0.387	0.150	BLQ	NA	1.50	0.942
0.4 mg / kg ER - 001 157 271 +	0.08 3	115	94.5	107	14.1	0.622	NA <sup>a</sup>	10.4	8.72
	0.5	252	13.2	94.9	35.1	0.641	0.183	18.5	5.09
	1	285	48.8	77.1	14.0	1.07	0.147	26.9	6.46
	2	370	37.1	87.9	19.0	1.09	0.174	21.8	1.72
1.6 mg / kg CTX	6	191	97.6	43.7	16.2	0.725	0.190	14.8	0.917
	24	9.65	1.77	0.763	0.467	BLQ	NA	4.02	1.87

BLQ = 定量限界未満 (< 0.05 ng / 血漿 mL, < 0.2 ng / 組織 g)。

IV = 静脈内注射。

NA = 非適用。

a : N = 2 のため、標準偏差の評価なし。

【表 16 - 1】

表 16：クリプトフィシンペイロードを単回用量で投与するか、またはCTXと共にクリプトフィシンペイロードを単回用量で投与した後のクリプトフィシンペイロードの血漿及び組織における平均PKパラメーター

用量 (mg/kg)	マトリックス	$C_{max}$	$t_{max}$	$t_{1/2}$	AUC (0-t)	AUC (0-∞)	Vss	CL	TPI <sub>a</sub>	AUC 同時投与 /AUC 単独投与 <sup>b</sup>
	(血漿)	(ng/mL)	(時間)	(時間)	(ng・時間/mL)	(ng・時間/mL)	(L/kg)	(L/時間/kg)	(NA)	(NA)
	(組織)	(ng/g)	(時間)	(時間)	(ng・時間/g)	(ng・時間/g)	(NA)	(NA)	(mL/g)	(NA)
0.4 mg/kg クリプト フィシン ペイロード	血漿	NA	NA	1.13	153	154	1.15	2.60	NA	NA
	肝臓	6.02	0.08	NR	9.65	NR	NA	NA	0.0631 <sup>c</sup>	NA
	腫瘍	11.6	0.08	8.43	24.9	28.8	NA	NA	0.187	NA
	腎臓	533	0.08	4.70	804	826	NA	NA	5.36	NA
	心臓	63.2	0.08	1.71	36.8	38.9	NA	NA	0.253	NA
	脳	8.32	0.08	0.941	3.02	3.57	NA	NA	0.0208 <sup>d</sup>	NA
	小腸	53.3	0.08	NR	81.6	NR	NA	NA	0.268 <sup>c</sup>	NA
0.4 mg/kg クリ プト フィ シン ペイ ロー	血漿	NA	NA	0.848	128	129	2.28	3.11	NA	0.8
	肝臓	7.13	1.0	NC	15.1	NC	NA	NA	0.118 <sup>c</sup>	1.6 <sup>e</sup>
	腫瘍	12.5	0.08	NR	42.7	NR	NA	NA	0.334 <sup>c</sup>	3.1 <sup>e</sup>
	腎臓	411	0.50	4.19	1210	1230	NA	NA	9.53	1.5
	心臓	47.3	0.08	1.44	59.2	62.0	NA	NA	0.481	1.6

10

20

30

40

50

【表 16 - 2】

ド + 16 mg / kg g C T X	脳	3.9 7	0.0 8	NR	3.6 9	NR	NA	NA	0.0 315 <sub>d</sub>	1.2 f
	小腸	19. 8	0.0 8	1.2 7	34. 9	36. 4	NA	NA	0.2 82	0.9 e

I V = 静脈内注射。

NA = 非適用。

NC = 排泄相の定義が不良であったため計算なし。

NR = AUC 0 - ∞ の外挿率が 20 % を超えたため報告なし。

a : 別段の記載がない限り、 $TPI = AUC 0 - \infty \text{ 組織} / AUC 0 - \infty \text{ 血漿}$ 。

b : 別段の記載がない限り、AUC 0 - ∞ を比の決定に使用した。

c :  $TPI = AUC 0 - 6 \text{ 時間組織} / AUC 0 - 6 \text{ 時間血漿}$  (このとき、 $AUC 0 - 6 \text{ 時間小腸} = 41.0 \text{ 時間} \cdot \text{ng} / \text{g}$ )。

d :  $TPI = AUC 0 - 2 \text{ 時間組織} / AUC 0 - 2 \text{ 時間血漿}$  (このとき、単独投与試験及び同時投与試験について、それぞれ  $AUC 0 - 2 \text{ 時間血漿} = 145 \text{ 時間} \cdot \text{ng} / \text{mL}$  または  $117 \text{ 時間} \cdot \text{ng} / \text{mL}$ )。

e : AUC 0 - 6 時間を比の決定に使用した (このとき、腫瘍及び小腸について、それぞれ  $AUC 0 - 6 \text{ 時間単独投与} = 14.0 \text{ ng} \cdot \text{時間} / \text{g}$  及び  $41.0 \text{ ng} \cdot \text{時間} / \text{g}$ )。

f : AUC 0 - 2 時間を比の決定に使用した。

10

20

30

40

50

【表 17 - 1】

表 17 : クリプトフィシンペイロードを単回用量で投与するか、またはCTXと共にクリプトフィシンペイロードを単回用量で投与した後のクリプトフィシン代謝物 1 の血漿及び組織における平均PKパラメーター

用量 (mg/kg)	マトリックス	$C_{max}$	$t_{max}$	$t_{1/2}$	$AUC_{(0-t)}$	$AUC_{(0-\infty)}$	$V_s$	CL	$T_{PI}^a$	$AUC_{\text{同時投与}} / AUC_{\text{単独投与}}^b$
	(血漿)	(ng/mL)	(時間)	(時間)	(ng・時間/mL)	(ng・時間/mL)	(L/kg)	(L/時間/kg)	(NA)	(NA)
	(組織)	(ng/g)	(時間)	(時間)	(ng・時間/g)	(ng・時間/g)	(NA)	(NA)	(mL/g)	(NA)
0.4 mg	血漿	23.6	0.08	4.57	39.8	40.7	NA	NA	NA	NA
	肝臓	2710	0.08	4.77	1820	1870	NA	NA	NA	NA

10

20

30

40

50

【表 17 - 2】

／ k	腫瘍	5 . 3	6 .	NC	1 1 7	NC	NA	NA	NA	NA
g		3	0 0							
クリ	腎臓	3 6 1	0 .	3 .	1 7 2 0	1 7	NA	NA	NA	NA
プト			5 0	9 9		5 0				
フィ	心臓	8 7 .	0 .	3 .	3 9 4	3 9	NA	NA	NA	NA
シン		1	0 8	0 6		6				
ペイ	脳	1 . 4	0 .	NR	4 . 4 2	NR	NA	NA	NA	NA
ロー		6	0 8							
ド	小腸	2 9 .	0 .	5 .	3 0 2	3 1	NA	NA	NA	NA
		7	5 0	1 5		4				
0 .	血漿	1 2 .	1 .	6 .	4 9 . 9	5 3 .	NA	NA	NA	1 . 3
4		4	0 0	2 4		2				
m g	肝臓	1 5 4	0 .	4 .	2 9 0 0	2 9	NA	NA	NA	1 . 6
／ k		0	0 8	0 4		3 0				c
g	腫瘍	1 2 .	6 .	NC	2 5 9	NC	NA	NA	NA	2 . 2
クリ		2	0 0							c
プト	腎臓	3 7 0	2 .	NC	2 7 2 0	NC	NA	NA	NA	1 . 6
フィ			0 0							c
シン	心臓	1 0 7	0 .	3 .	6 1 6	6 2	NA	NA	NA	1 . 6
ペイ			0 8	1 7		0				
ロー	脳	1 . 0	2 .	NC	5 . 3 8	NC	NA	NA	NA	1 . 2
ド		9	0 0							d
+										
1 6										
m g	小腸	2 6 .	1 .	9 .	2 6 3	3 1	NA	NA	NA	1 . 0
／ k		9	0 0	1 8		6				
g										
C T										
X										

I V＝静脈内注射。

NA＝非適用。

NC＝排泄相の定義が不良であったため計算なし。

NR＝AUC 0－∞の外挿率が20%を超えたため報告なし。

a：別段の記載がない限り、TPI＝AUC 0－∞組織／AUC 0－∞血漿。

b：別段の記載がない限り、AUC 0－∞を比の決定に使用した。

c：AUC 0－24時間を比の決定に使用した。

d：AUC 0－6時間を比の決定に使用した（このとき、腫瘍及び小腸について、それぞれAUC 0－6時間単独投与＝14.0 ng・時間／g及び41.0 ng・時間／g）。

## 【0429】

実施例 21：異種移植モデルにおけるNRP1のmRNA発現

CTX-クリプトフィシン複合体での処理に対する腫瘍の感受性は異なり得る。具体的には、MIA PaCa-2異種移植モデル及びBxPC3-Red-FLuc異種移植モデルにおけるもの（MTDにおいてのみ活性が観測された）と比較してPC-3異種移植モデルで観測されたCTX-クリプトフィシンの治療域は著しく広がった（MTD、1/2MTD、1/4MTD）。PC-3腫瘍は、NRP1を高発現する。いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、NRP1は、CTXの存在下で複合体の取り込みをCTX依存性に増加させることに寄与し、それによって抗腫瘍活性の増強に



寄与し得る。M I A P a C a - 2 腫瘍溶解物においても、B x P C 3 - R e d - F L u c 腫瘍溶解物においても、N R P 1 のレベルはほぼ検出不可能なほど低かった。治療域と N R P 1 の発現レベルとの間の相関をさらに評価するために、N R P 1 の発現レベル及び C T X - クリプトフィシン処理に対する感受性について追加の異種移植モデルをいくつか評価した。

【 0 4 3 0 】

ある一定範囲で N R P 1 を発現する異種移植腫瘍は、C T X - クリプトフィシン複合体の抗腫瘍活性の評価において有用であり得る。がん細胞株百科事典 ( 9 4 7 のヒトがん細胞株から収集された遺伝子発現、染色体コピー数、及びシーケンシングデータのデータベース ( C C L E ) ) から得た N R P 1 遺伝子の発現値を使用して目的モデルを選択した。

10

【 0 4 3 1 】

腫瘍が確立した時点で、異種移植モデル ( n = 3 ~ 7 ) から腫瘍を収集し、N R P 1 の m R N A の定量的 P C R に供した。収集した腫瘍におけるヒト及びマウスの N R P 1 の m R N A レベルを、種特異的プライマーを使用して測定することで、それぞれ腫瘍細胞及び腫瘍血管系における発現を反映させた。

【 0 4 3 2 】

C C L E 細胞株における N R P 1 の発現データは、H 3 B 独自ソフトウェアを使用してダウンロードした。目的細胞株の発現データは、G r a p h P a d P r i s m 6 ソフトウェアを使用してグラフ化した。さまざまな異種移植モデルから複数の腫瘍を収集し ( 表 1 8 )、直ちに液体窒素中で急速凍結してから - 8 0 で保管した。乳鉢及び乳棒を使用して凍結腫瘍組織を粉碎し、R N e a s y M i n i K i t ( Q i a g e n ) を使用して R N A を単離した。S u p e r S c r i p t V I L O M a s t e r M i x ( T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c ) を使用して全 m R N A から c D N A を生成させた。ヒト及びマウスの N R P 1 ( h S 0 0 8 2 6 1 2 8 \_ m 1、m m 0 0 4 3 5 3 7 9 \_ m 1 ) に対する T a q M a n ( 商標 ) 定量的 P C R アッセイを実施し、その際、G U S B ( h s 9 9 9 9 9 0 8 \_ m 1、m m 0 0 4 6 9 5 3 \_ m 1 ) 及び H P R T 1 ( h S 0 0 0 0 0 0 0 0 \_ m 1、m m 0 0 4 4 6 9 6 8 \_ m 1 ) を内在性対照として含めた。データ解析は、R Q M a n a g e r ソフトウェア ( T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c ) を使用して実施した。2 - <sup>C<sub>T</sub></sup> 値を生成させるために D a t a A s s i s t ( 商標 ) ソフトウェアに生データをエクスポートした。ヒト N R P 1 のデータは、ヒトの内在性対照に正規化し、マウス N R P 1 のデータは、マウスの内在性対照に正規化した。グラフ作成のために G r a p h P a d P r i s m 6 ソフトウェアに平均遺伝子発現レベルをエクスポートした。

20

30

【表 1 8 - 1】

表 1 8

異種移植モデル	新鮮凍結腫瘍数
---------	---------

40

【表 18 - 2】

M I A P a C a - 2	4
B x P C 3 - R e d - F L u c	4
P C - 3	4
S K - N - M C	5
T C - 7 1	4
M D A - M B - 2 3 1	4
H T - 1 0 8 0	
U - 8 7 M G	
C O L O 3 2 0 D M	4
H s 6 9 5 T	7
C F P A C - 1	6
L O X I M V I	3
H C T 1 1 6	3

10

20

## 【0433】

図31には、CCLEデータベースから選択した細胞株におけるヒトNRP1の発現レベルが示される。NRP1の発現範囲が広くなるように細胞株を選択した。PC-3は、CCLEにおけるNRP1の発現レベルが最も高いものの1つである一方で、13の細胞株のうちの6つは、NRP1を低発現するか、または全く発現しない。CTX-クリプトフィシンの抗腫瘍活性評価に使用した異種移植モデルから腫瘍を収集し、収集した腫瘍におけるNRP1のmRNA発現レベルを測定した。CCLEの細胞株データと一致して、腫瘍溶解物において広い範囲に及ぶヒトNRP1発現が観測された(図32)。こうしたデータは、腫瘍細胞上のNRP1レベルを反映するものである。発現レベルは、CCLEデータと密接に相関しているが、例外が1つ存在する。すなわち、Hs695T腫瘍で検出されたNRP1レベルは非常に低いものであったが、CCLEにおいては、この細胞株はNRP1をかなり高いレベルで発現することが報告されている。マウスのNRP1については、そのレベルははるかに均一なものであり、すべての異種移植片にわたって観測レベルは同等であった(図33)。マウス特異的なプローブで検出されたNRP1は、おそらく腫瘍血管系のマウス内皮細胞上に発現するNRP1に相当するものであり、このNRP1発現は、評価したすべての異種移植片にわたっておおむね一貫している。SK-N-MC腫瘍、TC-71腫瘍、LOX IMVI腫瘍、HT-1080腫瘍、及びU-87MG腫瘍については、ヒト及びマウスのNRP1のmRNAレベルの評価は行わなかった。

30

## 【0434】

見て取れるように、ヒト細胞株及びこうした細胞を使用して確立した腫瘍異種移植片は、mRNA発現によって検出すると、広い範囲に及ぶNRP1レベルを有している。NRP1の発現差異は、腫瘍細胞上のヒトNRP1の発現を反映するものである一方で、血管系の内皮細胞上のマウスNRP1の発現レベルは、すべてのモデルにわたって同様であった。異種移植モデルにおけるNRP1発現が広い範囲に及ぶことは、効力との相関試験を可能にするものである。NRP1を高発現するモデルには、PC-3前立腺癌、CFPAC-1膵癌、MDA-MB-231乳癌、LOX IMVIメラノーマ、HT-1080線維肉腫、及びU-87MG膠芽腫が含まれる。MIA PaCa-2膵癌及びBxPC3-Red-Fluc膵癌、HCT-116結腸癌及びCOLO320DM結腸癌、Hs695Tメラノーマ、ならびにSK-N-MCユーイング肉腫及びTC-71ユーイング

40

50

肉腫のモデルでは、N R P 1 が低発現するか、または全く発現しないことが観測された。

#### 【 0 4 3 5 】

実施例 2 2 : 異種移植モデルにおける N R P 1 のタンパク質発現

この実施例は、異種移植モデルにおける N R P 1 のタンパク質レベルを評価する実験を示す。異種移植片（それぞれの試験に由来する 3 ~ 5 匹の動物）から腫瘍を収集し、直ちに液体窒素中で急速凍結し、溶解させるまで - 8 0 で保管した。C o v a r i s C r y o p r e p システム（C o v a r i s , I n c . ）を使用して凍結腫瘍組織を凍結粉碎した。微粉碎が完了した時点で、S u p e r B タンパク質抽出緩衝液（C o v a r i s ）または細胞溶解緩衝液（C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y、カタログ番号 9 8 0 3 : S u p e r B タンパク質抽出緩衝液、C o v a r i s カタログ番号 5 2 0 1 1 2、細胞溶解緩衝液）においてプロテアーゼ阻害剤存在下で試料を氷上で溶解させた。溶解物を 4 で 1 0 分間、1 4 , 0 0 0 r p m で遠心分離した。試験当たり 3 ~ 5 つ腫瘍から得た上清をプールし、一定分量を急速凍結した。溶解物のタンパク質濃度は、B C A アッセイを使用して評価した（P i e r c e ; T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c、カタログ番号 2 3 2 2 5）。還元性かつ変性性の試料緩衝液において溶解物を 1 0 0 で 3 分間加熱した：5 0 μ g のタンパク質を 8 % のトリス - グリシン N o v e x ゲル（I n v i t r o g e n ; T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c、カタログ番号 E C 6 0 1 5 B O X）にロードし、当該ゲルでの電気泳動によって分離した。組換えヒト N R P 1 である P h e 2 2 - L y s 6 4 4（R & D S y s t e m s カタログ番号 3 8 7 0 - N 1 : P h e 2 2 - L y s 6 4 4（オリゴマー化せず、膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインを含まない））、及び H U V E C（ヒト臍帯静脈内皮細胞（ドナー由来のプール物）；L o n z a、カタログ番号 C 2 5 1 9 A）（N R P 1 を高発現する内皮細胞）由来の細胞溶解物を正の対照としてゲルでの分析に含めた。i B l o t（商標）（I n v i t r o g e n）装置を使用してタンパク質をニトロセルロースに転写した。O d y s s e y P B S ブロッキング緩衝液（L I - C O R）でブロッキング処理を実施した後、ウサギモノクローナル抗 N R P 1 抗体の 1 : 5 0 0 希釈液または 1 : 1 0 0 0 希釈液（D 6 2 C 6、カタログ番号 3 7 2 5、C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y）で膜のプロベリングを実施してから、抗チューブリン抗体（A b c a m、[ Y L 1 / 2 ] A b c a m a b 6 1 6 0）によって膜のプロベリングを実施した。この実験において利用する抗体には、A b c a m ウサギ m A b（E P R 3 1 1 3、カタログ番号 a b 8 1 3 2 1（ヒト N R P 1 のアミノ酸 9 0 0 から N R P 1（細胞内）C 末端までに対応する合成ペプチド免疫原を使用して生成されており、したがって N R P の細胞質領域を標的とする））を含めた。A b c a m 抗 N R P 1 抗体は、ヒト及びマウスの N R P 1 と反応するものであるが、オリゴマー化せず、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを含まない組換え N R P 1 は認識しない。この実験において利用する抗体には、C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y（C S T）ウサギ m A b（D 6 2 C 6、カタログ番号 3 7 2 5（マウス N R P 1 の複数残基に対応する G S T - 融合タンパク質で動物を免疫化することによって生成されたもの））も含めた。C S T の抗 N R P 1 抗体は、N R P 1 の細胞外ドメインに結合するものであり、それ故に、組換え N R P 1 を認識する。C S T の抗 N R P 1 抗体は、ヒト及びマウスの N R P 1 と反応する。

#### 【 0 4 3 6 】

O d y s s e y 赤外画像化システム（L I - C O R B i o s c i e n c e s）を使用して適切な I R D y e 6 8 0 R D 結合型二次抗体及び I R D y e 8 0 0 C W 結合型二次抗体（L I - C O R B i o s c i e n c e s）で免疫複合体を可視化した。全長 N R P 1 は約 1 2 0 k D a であり、細胞外ドメイン（可溶性 N R P 1）は、約 7 0 ~ 8 0 k D a の分子量を有する（ヒト組換え N R P 1）（図 3 4）。チューブリンは約 5 0 k D a の位置に分離される。

#### 【 0 4 3 7 】

見て取れるように、A b c a m の抗 N R P 1 抗体及び C S T の抗 N R P 1 抗体の両方をを用いることで、H U V E C 細胞溶解物及び特定の腫瘍溶解物において N R P 1 が検出され

た。A b c a m抗体では、約120～140 k D aの二重またはスメアなバンドが検出され、このバンドは、全長N R P 1に相当する。C S T抗体では、バンドは約120 k D aならびに約70～80 k D aの位置で検出され、小さい方のバンドは、N R P 1の可溶形態に相当する。組換えN R P 1は、C S T A bでのみ観測され、その検出位置は約80 k D a（すなわち、可溶性／細胞外ドメインN R P 1）であった。図35～37には、代表的なウエスタンブロットが示される（図36及び図37のパネルA及びパネルBは、それぞれA b c a m抗体及びC S T抗体で検出したものを示す）。

#### 【0438】

調べたすべての溶解物の中で、検出されたN R P 1レベルが最も高かったのはP C - 3腫瘍であった。B x P C 3 - R e d - F L u c腫瘍、M I A P a C a - 2腫瘍、S K - N - M C腫瘍、T C - 7 1腫瘍、H s 6 9 5 T腫瘍、及びC O L O 3 2 0 D M腫瘍に由来する溶解物においては、N R P 1は低発現するか、または全く発現しないことが明らかとなった。N R P 1の高発現は、M D A - M B - 2 3 1腫瘍溶解物、L O X I M V I腫瘍溶解物、及びC F P A C - 1腫瘍溶解物においても観測された（図35、図36のパネルA、図36のパネルB、図37のパネルA、及び図37のパネルB）。表19には、N R P 1発現のまとめが示される。注目すべきは、C F P A C - 1腫瘍溶解物では、約120 k D aの位置に全長N R P 1が観測されたことに加えて、約55 k D a（C S T A b）の顕著なバンドが観測されたことであるが、このバンドの正体は不明である。

#### 【表19 - 1】

表19

異種移植モデル	N R P 1 発現
M I A P a C a - 2	—
B x P C 3 - R e d - F L u c	—
P C - 3	++++

#### 【表19 - 2】

S K - N - M C	—
T C - 7 1	—
M D A - M B - 2 3 1	++
H T - 1 0 8 0	n d
U - 8 7 M G	n d
C O L O 3 2 0 D M	+ / —
H s 6 9 5 T	+ / —
C F P A C - 1	+ *
L O X I M V I	++
H C T 1 1 6	n d

n d = 評価なし

\* 全長に相当するバンドに加えて、C S T A bで約55 k D aのバンドが観測された。

## 【 0 4 3 9 】

まとめると、腫瘍モデル由来の腫瘍溶解物における N R P 1 の発現が広い範囲に及ぶことが、タンパク質の発現データから示された。腫瘍細胞上での N R P 1 の発現は、m R N A の発現データと密接に相関する。この試験における抗体は両方共、ヒト及びマウスの N R P 1 と反応する。

## 【 0 4 4 0 】

ウエスタンブロットのデータは、血管系におけるマウスの N R P 1 と比較してヒト N R P 1 が（発現している場合）有意に高いレベルで腫瘍細胞上に存在することを示唆している。

## 【 0 4 4 1 】

マウスの N R P 1 の m R N A は、すべてのモデルにわたって同様のレベルで発現していた（一方、ウエスタンブロットによって検出すると、腫瘍の約 5 0 % がマウスの N R P 1 を低発現するか、または全く発現しない）。

## 【 0 4 4 2 】

異種移植モデルにおけるヒト N R P 1 のタンパク質発現は広い範囲に及ぶことから、N R P 1 の発現と腫瘍処理効率との間の相関を調べることが可能である。N R P 1 のタンパク質レベルが高い腫瘍には、P C - 3、M D A - M B - 2 3 1、L O X I M V I、及び C F P A C - 1 が含まれ、N R P 1 のタンパク質レベルの高さは、m R N A のデータに対応している。M I A P a C a - 2 腫瘍溶解物、B x P C 3 - R e d - F L u c 腫瘍溶解物、H C T - 1 1 6 腫瘍溶解物、C O L O 3 2 0 D M 腫瘍溶解物、S K - N - M C 腫瘍溶解物、及び T C - 7 1 の腫瘍溶解物では、N R P 1 が低発現するか、または全く発現しないことが観測され、このことは、発現データにも対応していた。H s 6 9 5 T 溶解物において検出された N R P 1 タンパク質のレベルは低く、このことは、腫瘍の m R N A データと一致するが、細胞株または C C L E のデータとは異なっていた。

## 【 0 4 4 3 】

実施例 2 3：異種移植モデルにおける C T X - クリプトフィシン複合体の抗腫瘍作用

この実施例は、ある一定範囲で N R P 1 を発現する異種移植腫瘍の C T X - クリプトフィシン複合体感受性を評価する実験を示す。

## 【 0 4 4 4 】

表 2 0 には、異種移植細胞型、それぞれの細胞型の供給源、及び組織型が示される。材料、方法、薬物、及びモデル確立は、実施例 1 ~ 3 に記載のものと同様に行った。細胞は、推奨培地において培養した。接種については、体積 0 . 1 m L に含めたがん細胞を、27 ゲージ針を使用してマウスの右腋窩領域付近に皮下注射した。表 2 1 には、接種のための細胞数、マウスの系統、及び異種移植モデルの確立に関する追加詳細が示される。ノギスを使用して腫瘍の測定を少なくとも週に 2 回行い、腫瘍サイズに基づいてマウスを処理群に無作為化した。平均腫瘍サイズが約 2 0 0 m m <sup>3</sup> となったときに処理を開始した。それぞれのモデルの投与開始日（細胞接種からの日数）については表 2 1 を参照のこと。それぞれのモデルでは、媒体処理群及び薬物処理群（n = 5 または 6、表 2 1）から実験がなるようにした。薬物はすべて、E t O H 含有率 1 0 %、T w e e n 8 0 含有率 5 %、及び生理食塩水含有率 8 5 % の媒体に含めて投与した。Q 4 D x 3 スケジュールで静脈内投与によって動物を処理した。腫瘍サイズ及び体重を週に 2 回測定した。

10

20

30

40

【表 20 - 1】

表 20

異種移植モデル	がん型	細胞株の供給源			
		ATCC（登録商標）	Perkin Elmer	NCI	DSMZ
MIA PaCa-2	膵臓	CRL-1420（商標）			
BxPC3-Red-FLuc	膵臓		BW125058		
PC-3	前立腺	CRL-1435（商標）			
SK-N-MC	ユーイング肉腫	HTB-10（商標）			
TC-71	ユーイング肉腫				ACC516
MDA-MB-231	乳房	HTB-26（商標）			
HT-1080	線維肉腫	CCL-121（商標）			
U-87 MG	膠芽腫	HTB-14（商標）			
COLO 320DM	結腸	CCL-220（商標）			
Hs695T	メラノーマ	HTB-137（商標）			
CFPAC-1	膵臓	CRL-1918（商標）			
LOX IMV	メラノーマ			NCI	

【表 20 - 2】

I				I	
HCT 116	結腸	CCL-247（商標）			

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 2 1

異種移植モデル	接種のための細胞数	マウスの系統*、供給源	試験識別子	試験識別子	n
M I A P a C a - 2	$5 \times 10^6$	Nu/Nu, CRL	JW1142	14日目	6
B x P C 3 - R e d - F L u c	$5 \times 10^6$	Nu/Nu, CRL	JE0002	8日目	6
P C - 3	$2 \times 10^6$	Nu/Nu, CRL	JW1147	13日目	5
S K - N - M C	$5 \times 10^6$	Nu/Nu, CRL	JE0010	19日目	5
T C - 7 1	$5 \times 10^6$	Nu/Nu, CRL	JE0011	12日目	5
M D A - M B - 2 3 1	$5 \times 10^6$ + Matrigel	Nu/Nu, CRL	JW1158	15日目	5
H T - 1 0 8 0	$1 \times 10^6$ + Matrigel	C. B. 17-S CID, CRL	JW1175	10日目	6
U - 8 7 M G	$5 \times 10^6$ + Matrigel	NCr, CRL	KCH270	20日目	6
C O L O 3 2 O D M	$5 \times 10^6$	NOD SCID, CRL	JW1146	9日目	6
C O L O 3 2 O D M	$5 \times 10^6$	NOD SCID, CRL	JE0009	7日目	6
H s 6 9 5 T	$5 \times 10^6$	Nu/Nu, CRL	JW1152	27日目	5
H s 6 9 5 T	$5 \times 10^6$	NOD SCID, CRL	JW1154	13日目	5
C F P A C - 1	$10 \times 10^6$	Nu/Nu, CRL	JW1157	7日目	6
L O X I M V I	$2 \times 10^6$	Nu/Nu, CRL	JW1160	5日目	5
H C T 1 1 6	$2 \times 10^6$	Nu/Nu, CRL	JW1135	6日目	5

\*マウスはすべて雌性であり、受け入れ時の週齢は6～8週齢である。

CRL, Charles River Laboratories

## 【0445】

表 2 2 には、さまざまな異種移植モデルにおける C T X - クリプトフィシンの抗腫瘍活性のまとめが示され、個々のデータは、図 3 8 ~ 5 0 に示される。0 . 6 m g / k g 、 1 . 2 m g / k g 、 及び 2 . 3 m g / k g ( 1 / 4 M T D 、 1 / 2 M T D 、 M T D に相当する ) を含む、さまざまな用量で複合体の活性を評価した ( 但し、用量に関する例外として、M I A P a C a - 2 モデルの投与では、2 . 5 m g / k g 用量及び 1 . 2 5 m g / k g 用量を投与した ) 。データは、平均腫瘍体積 ± S E M を示す。

## 【0446】

多くの場合、2 . 3 m g / k g M T D 用量またはそれに近い用量で C T X - クリプトフ

10

20

30

40

50

ィシンを投与すると、いくつかのモデルでは強固な抗腫瘍活性（腫瘍の増殖停止または退縮）が生じ、長期間にわたってマウスが腫瘍を有さないことが観測された（M I A P a C a - 2、P C - 3、M D A - M B - 2 3 1、U - 8 7 M G、及びH s 6 9 5 T）。対照的に、S K - N - M C異種移植片、T C - 7 1異種移植片、C O L O 3 2 0 D M異種移植片、及びC F P A C - 1異種移植片（H C T - 1 1 6異種移植片では試験していない）においてM T Dで観測された抗腫瘍作用は最小限のものであった。M I A P a C a - 2モデル、B x P C 3 - R e d - F l u cモデル、及びL O X I M V Iモデルでは、C T X - クリプトフィシンは、M T Dでは活性であったが、1 / 2 M T D用量（0 . 6 m g / k g）では抗腫瘍活性は観測されなかった。対照的に、P C - 3モデル、M D A - M B - 2 3 1モデル、H T - 1 0 8 0モデル、U - 8 7 M Gモデル、及びH s 6 0 9 5 Tモデルについては、統計学的に有意な抗腫瘍活性が1 / 2 M T D用量で観測された。さらに、P C - 3、H s 6 9 5 T、M D A - M B - 2 3 1、及びU - 8 7 M Gでは1 / 4 M T D用量で活性が生じたことから、こうしたモデルでは複合体の治療域が広いことが示された。

【表 2 2 - 1】

表 2 2

異種移植モデル	抗腫瘍活性、複合体の用量		
	M T D	1 / 2 M T D	1 / 4 M T D
M I A P a C a - 2	++++	—	n d
B x P C 3 - R e d - F l u c	++	—	n d
P C - 3	++++	++++	++
S K - N - M C	—	n d	n d
T C - 7 1	—	n d	n d
M D A - M B - 2 3 1	++++	+	+
H T - 1 0 8 0	+++	++	—
U - 8 7 M G	+++	++	+ / —
C O L O 3 2 0 D M	+ / —	—	n d
H s 6 9 5 T	++++	+++	+
C F P A C - 1	+	—	—

【表 2 2 - 2】

L O X I M V I	++	—	—
H C T 1 1 6	n d	—	n d

n d = 評価なし

【 0 4 4 7】

実施例 2 4：さまざまな異種移植モデルにおける C T X - クリプトフィシン複合体の抗腫瘍活性と N R P 1 発現との相関

表 2 3 には、1 3 の異種移植片について、N R P 1 発現と治療活性との相関が示される。1 3 のモデルのうちの 1 0 のモデル（7 7 %）について、N R P 1 発現と治療活性との間に正の相関が観測された。腫瘍の N R P 1 発現が中程度～高度であると、複合体の抗腫



瘍活性について観測される治療域が広がったことを結果は示している。N R P 1 の発現レベルが低いことは、治療域が狭いか、または複合体の抗腫瘍活性の欠如と結び付いていた。いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、こうしたデータによって、腫瘍への C T X 媒介性のクリプトフィシンの取り込み、及びその後の効力に対して腫瘍細胞上での N R P 1 の発現レベルが影響を与える可能性があることが支持された。

#### 【 0 4 4 8 】

1 3 のモデルのうちの 1 0 のモデルについて N R P 1 発現と C T X - クリプトフィシンの抗腫瘍活性との相関が観測されたが、H s 6 9 5 T、C F P A C - 1、及び L O X I M V I についてはこの相関は観測されなかった。この傾向から外れた 3 つのモデル ( H s 6 9 5 T、C F P A C - 1、及び L O X I M V I ) については、以下に詳細に論じられる。

#### 【表 2 3 - 1】

表 2 3

異種移植モデル	抗腫瘍活性			ヒト N R P 1 の発現	効力と N R P 1 との相関
	MTD	1 2 M D	1 4 M D		
M I A P a C a - 2	+++ +	—	n d	低	あり
B x P C 3 - R e d - F L u c	++	—	n d	低	あり
P C - 3	+++ +	+ + ++	++	高	あり
S K - N - M C	—	n d	n d	低	あり
T C - 7 1	—	n d	n d	低	あり
M D A - M B - 2 3 1	+++ +	+	+	高	あり
H T - 1 0 8 0	+++	++	—	高	あり
U - 8 7 M G	+++	++	+ —	高	あり
C O L O 3 2 0 D M	+ / —	—	n d	低	あり

#### 【表 2 3 - 2】

H s 6 9 5 T	+++ +	+ + +	+	低 <sup>a</sup>	なし <sup>a</sup>
C F P A C - 1	+	—	—	高 <sup>b</sup>	なし <sup>b</sup>
L O X I M V I	++	—	—	高	なし <sup>c</sup>
H C T 1 1 6	n d	—	n d	低	あり

#### 【 0 4 4 9 】

H s 6 9 5 T

H s 6 9 5 T モデルでは、C T X - クリプトフィシンについて観測された治療域は広いものであったが、腫瘍溶解物において検出された N R P 1 の発現レベルは低いものにすぎ

なかった。このH s 6 9 5 Tモデルは、C C L E細胞株データベースではN R P 1を高発現するとされることに基づいて選択した。モデルへの接種用の細胞株培養物もまた、N R P 1を高レベルで発現したが、腫瘍における発現は、細胞株培養物と比較すると少ないものと思われた(図5 0及び図5 1)。腫瘍の収集時期は移植後のさまざまな時点(2 1 ~ 3 5日目)であった上、腫瘍サイズも2 4 0 ~ 約1, 0 0 0 m m<sup>3</sup>の範囲に及んだことから、N R P 1の発現はマウスでの腫瘍増殖の初期に失われ、おそらくC T X - クリプトフィシンを投与した時点ではN R P 1は発現していなかったものと思われる。このデータに基づくと、H s 6 9 5 Tにおいて観測された治療活性域が広いことにおいてN R P 1は明確な役割を有さないものと思われる。この予想外の抗腫瘍活性が生じた理由は不明である。

#### 【0 4 5 0】

##### C F P A C - 1

C F P A C - 1腫瘍溶解物ではN R P 1が十分なレベルで発現しているにもかかわらず、C T X - クリプトフィシンについて観測された抗腫瘍活性は不十分なものであった。M T Dで観測された活性は中程度のものにすぎず、用量を下げると活性は観測されなかった(図4 9を参照のこと)。本明細書に記載されるように、より小さな強く反応する約5 0 k D aのバンドがC S Tの抗N R P 1 A bによって同定されており、このバンドは、全長N R P 1のバンドに加えて観測された(図3 7を参照のこと)。このより小さなタンパク質の正体及びそのN R P 1との関連性は不明である。腫瘍におけるN R P 1の発現をさらに調べるために、C F P A C - 1を含めて、腫瘍の一部から調製したパラフィン包埋腫瘍切片に対してI H Cを実施した(図5 2)。P C - 3腫瘍ではN R P 1が腫瘍切片全体で検出されたのとは対照的に、C F P A C - 1切片では間質細胞においてのみ、強いN R P 1染色が観測された。この間質細胞のN R P 1が、ウエスタンブロットによって腫瘍溶解物において観測されたN R P 1タンパク質の大部分を構成している可能性がある。腫瘍細胞がN R P 1を発現しないことが、複合体について観測された抗腫瘍活性が不十分であったことの説明となり得る。N R P 1 - C T X相互作用を介すことでおそらく間質細胞への複合体の取り込みは増加するものと想定されるが、クリプトフィシン活性は細胞増殖依存性であるため、細胞周期が活発に回らなければ、その作用は最小限のものになるであろう。

#### 【0 4 5 1】

C F P A C - 1腫瘍溶解物からウエスタンブロットによって検出されたN R P 1タンパク質のレベルは、間質起源のものであると思われる。C F P A C - 1細胞のN R P 1の発現レベルは非常に低く、このことは、C T X - クリプトフィシンの治療指数が不十分であることの説明となり得る。

#### 【0 4 5 2】

##### L O X I M V I

L O X I M V I腫瘍溶解物ではN R P 1が十分なレベルで発現しているにもかかわらず、C T X - クリプトフィシンについて観測された抗腫瘍活性は不十分なものであった。C T X - クリプトフィシンについてM T Dでは活性が幾分観測されたが、用量を下げると活性は観測されなかった。このモデルは、非常に侵襲性であり、媒体で処理した腫瘍は、3回目のC T X - クリプトフィシン用量を投与する前にそのサイズが既に約2 0 0 0 m m<sup>3</sup>に達していた。別に説明がつかないとすれば、このモデルは侵襲性が非常に高く、増殖が速すぎるため、N R P 1レベルが十分であるにも関わらず複合体が作用できなかったということがあり得る。接種細胞数を減らし、薬物投与時期を早めた追加試験をして確認する必要がある。

#### 【0 4 5 3】

実施例2 5 : C T X 処理マウスの腫瘍溶解物におけるC T X 断片

いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、C T X またはその断片は、腫瘍細胞の表面上のN R P - 1に結合し得る。この試験では、P C - 3異種移植腫瘍を凍結粉碎し、H P L C 及びM S によって腫瘍溶解物を分析してC T X 関連ペプチドを同定した。

10

20

30

40

50

## 【 0 4 5 4 】

C T X 処理に特有の C T X ペプチドの帰属を特定するために、C T X で処理した動物から得られた結果を、媒体対照で処理した動物から得られた結果と比較した。C T X は、通常、アミド化 C 末端を有するが、インビボでは脱アミド化され得る。

## 【 0 4 5 5 】

図 5 3 には、腫瘍溶解調製物のトータルイオン ( T I C ) クロマトグラム及び U V ( 2 1 5 n m ) クロマトグラムが比較して示される。U V クロマトグラム及び T I C クロマトグラムには、媒体処理マウスの腫瘍のものと C T X 処理マウスの腫瘍のものとの間でわずかな差異が存在した。

## 【 0 4 5 6 】

図 5 4 ~ 5 6 には、C T X 処理マウスから得られた腫瘍溶解物に特有の C T X 関連ペプチドが示される。図 5 4 ~ 5 6 はそれぞれ、対照で処理したマウスから得られた腫瘍と比較したときに C T X 処理したマウスから得られた腫瘍の腫瘍溶解物に特有であり、M S 強度が最も高い 2 0 個の C T X 関連ペプチドをそれぞれ示す。図 5 4 ~ 5 6 はそれぞれ、異なる特定の腫瘍から得られた結果を示しており、これらの腫瘍は、それぞれ腫瘍 4、腫瘍 5、及び腫瘍 6 と称され得る。

## 【 0 4 5 7 】

図 5 7 は、C T X 処理マウスに特有の C T X 関連ペプチドの相対強度を特定のクラスに分類したグラフをさらに示す。観測された C T X - ペプチドの大部分は、C 末端がアミド化された全長のものではあった ( 全体の 3 5 % ~ 7 4 % )。ペプチドの約 5 % は、C 末端カルボキシル基 ( 脱アミド化されたもの ) を含む全長のものではあった。C 末端が A r g - 1 4 及び A r g - 2 5 である断片も観測された。

## 【 0 4 5 8 】

実施例 2 6 : C T X の投与後に腫瘍に見られたペプチドであって、末端に R を有し、N R P 1 に結合するペプチドの追加例

この実施例では、1 5 0 m g / k g の C T X または媒体をマウスに投与し、その 1 時間後に腫瘍を収集した。表 2 4 には、C T X 処理マウスの腫瘍溶解物において同定された C 末端 A r g 残基含有 C T X 関連ペプチドを選択したものが存在量の順に示される。

10

20

30

40

50

## 【表 2 4】

表 2 4

配列番号	ペプチド
1	MCMP C F T T D H Q M A R K C D D C C G G K G R G K C Y G P Q C L C R (残基 1 ~ 3 6 ; C 末端 - アミド化)
1 9 9	C M P C F T T D H Q M A R K C D D C C G G K G R G K C Y G P Q C L C R (残基 2 ~ 3 6 C 末端 - 脱アミド化)
1	MCMP C F T T D H Q M A R K C D D C C G G K G R G K C Y G P Q C L C R (残基 1 ~ 3 6 C 末端 - 脱アミド化)
1 9 9	C M P C F T T D H Q M A R K C D D C C G G K G R G K C Y G P Q C L C R (残基 2 ~ 3 6 C 末端 - アミド化)
2 0 0	C M P C F T T D H Q M A R K C D D C C G G K G R (残基 2 ~ 2 5)
2 0 1	P C F T T D H Q M A R K C D D C C G G K G R G K C Y G P Q C L C R (残基 4 ~ 3 6 C 末端 - 脱アミド化)
2 0 1	P C F T T D H Q M A R K C D D C C G G K G R G K C Y G P Q C L C R (4 ~ 3 6 C 末端 - アミド化)

## 【 0 4 5 9】

図 5 8 及び図 5 9 には、追加の C T X 関連ペプチドが示される。

## 【 0 4 6 0】

実施例 2 7 : クロロトキシンの抗血管新生活性及び N R P 1 の役割

C T X が抗血管新生特性を有することがさまざまな知見から示されている。例えば、多くの因子によって刺激される血管新生を C T X は抑制し、ベバシズマブの抗血管新生作用を増強する。増殖する血管内皮細胞に C T X が結合すると、ヒト臍帯静脈内皮細胞 ( H U V E C ) の浸潤が減少し、M M P - 2 の分泌が低減される。ニワトリ漿尿膜 ( C A M ) アッセイを使用したところ、8 つの血管新生促進因子によって刺激される血管新生を C T X が抑制した。C T X をベバシズマブと同時投与すると、この併用は、ベバシズマブ用量を 1 0 倍に増やすよりも著しく強力なものであった。C T X は、インビトロでは腫瘍または血管内皮細胞の増殖を変化させることはなかったが、C A M 上で増殖する腫瘍を C T X で処理すると、腫瘍の増殖及び腫瘍内ヘモグロビンレベルが減少した。m a t r i g e l プラグアッセイでは、C T X を静脈内注射すると、マウスにおける新たな血管の成長が著しく減少することが示された。

## 【 0 4 6 1】

N R P 1 は、神経系及び血管系の両方の発達に寄与する多機能性受容体である。胚形成の時期に、N R P 1 は、C N S におけるセマフォリン 3 A リガンドと結合し、プレキシン共受容体と共に働いて軸索ガイダンスを制御する。同時に、N R P 1 は、V E G F 及び P 1 G F を含む V E G F リガンドファミリーのメンバーと結合して血管新生を媒介する。N R P 1 機能が失われると、血管のリモデリング及び分岐異常が引き起こされる。N R P 1 は、内皮細胞上に高発現しており、E C の運動性を調節する重要な役割を担っている。N R P 1 機能を遮断すると、抗 V E G F が腫瘍増殖を遮断する能力が増強されることから、

NRP1は、抗VEGFとの抗腫瘍併用療法の標的と見なされている。NRP1は、腫瘍細胞上にも発現し得、直接的な腫瘍標的としても報告されていることから、腫瘍細胞の生存及び増殖を制御するものと思われる。画期的な医薬品であるMNRP1685A (Genentech, Inc.) は、NRP1を標的とする組換えヒトIgG1モノクローナル抗体であり、抗血管新生薬剤として臨床試験において試験された (Weekes et al. 2014. A phase I study of the human monoclonal anti-NRP1 antibody MNRP1685A in patients with advanced solid tumors. Invest New Drugs 32: 653 - 660)。

【0462】

10

神経膠腫細胞及び神経外胚葉起源の他の腫瘍には結合するが、がん化していない正常細胞及び組織には結合しないという選択的な結合特性をCTXが有することが、Lyons et al.によって最初に報告された (Lyons SA, O'Neal J and Sontheimer H. 2002. Chlorotoxin, a scorpion derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin. Glia 39: 162 - 173)。さらに、血管内皮細胞を除く16以上の正常ヒト組織においてクロロトキシンの結合が生じないことも示された。

【0463】

20

眼の血管新生においてCTXが活性を有することを示す特定の証拠が存在する。眼内注射、静脈内注射、または眼周囲注射によってCTXが投与されると、ブルッフ膜における断裂部位での脈絡膜NVの発生がCTXによって著しく抑制された。確立された脈絡膜NVをCTXで処理すると、内皮細胞のアポトーシス及びNVの退縮が生じた。CTXは、虚血誘導性及びVEGF誘導性の網膜NVを抑制し、VEGFによって誘導される過剰な血管透過性を低減した。

【0464】

30

CTXは、眼のNVを抑制及び退縮させ、血管漏出を低減することから、失明疾患 (新生血管加齢性黄斑変性及び糖尿病網膜症など) に対する新たな治療を与え得るものである。いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、CTXの抗血管新生特性は、CTXがNRP1に結合することでVEGFの結合が遮断され、それによって血管新生におけるNRP1機能が抑制され得るということによって説明され得る。NRP1シグナル伝達に対して高用量のCTX (C末端R - COOH) がVEGFと競合し、それによって血管新生シグナル伝達を低減するということが考えられる。そのようなCTX活性にはC末端R - COOH (インビボでR - NH<sub>2</sub>から生じ得る) が必要であり得る。

追加の参考文献:

1. Jacoby DB et al. 2010. Potent pleiotropic anti-angiogenic effects of CTX, a synthetic chlorotoxin peptide. Anticancer Res 30: 37 - 46.

2. Lima e Silva R, et al. 2010. Agents that bind annexin A2 suppress ocular neovascularization. J Cell Physiol 1225 (3): 855 - 64

40

3. Pan Q, et al. 2007. Blocking Neuropilin-1 Function Has an Additive Effect with Anti-VEGF to Inhibit Tumor Growth. Cancer Cell 11, 53 - 67

【0465】

実施例28: クロロトキシンの損傷/創傷治癒、及びNRP1の役割

物理的手段または化学療法のいずれかによって損傷が生じた後に、CTXが取り込まれるか、またはCTX複合体の抗腫瘍活性が上昇することが観測された。こうしたデータは

50

、損傷に応じてN R P 1 標的が上方制御され、このことが、ひいては、取り込みまたは活性の増加につながることを示唆している。N R P 1 は、血管新生において重要な役割を担っていることから、おそらく何らかの損傷に対する応答において非常に重要なものであると思われる。いずれの特定の科学理論によっても拘束されることは望まないが、N R P 1 が増加は、損傷と結び付いており、及び/または損傷モデルにおいて生じる可能性があり、ひいては、C T X の取り込みの増加につながると想定される。

【 0 4 6 6 】

他の実施形態

本発明者らは、本発明の実施形態をいくつか説明したが、本発明者らの基本的な開示内容及び実施例は、本発明の化合物及び方法を利用する他の実施形態を与えるように改変可能であることは明らかである。したがって、本発明の範囲は、例として示されている特定の実施形態によってではなく、添付の特許請求の範囲によって定義されるものであることが理解されよう。

【 0 4 6 7 】

本明細書で引用される参考文献はすべて、参照によって本明細書に組み込まれる。

10

20

30

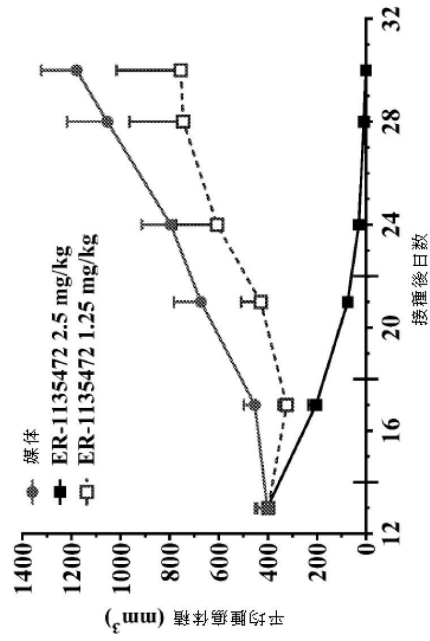
40

50

【図面】

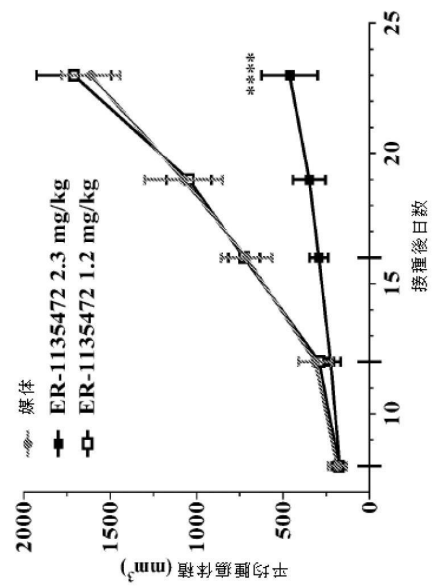
【図 1】

【図 1】



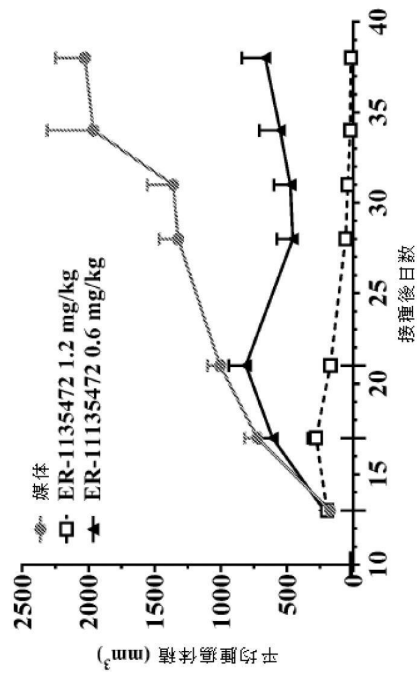
【図 2】

【図 2】



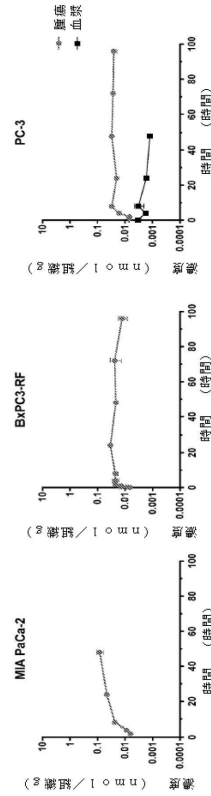
【図 3】

【図 3】



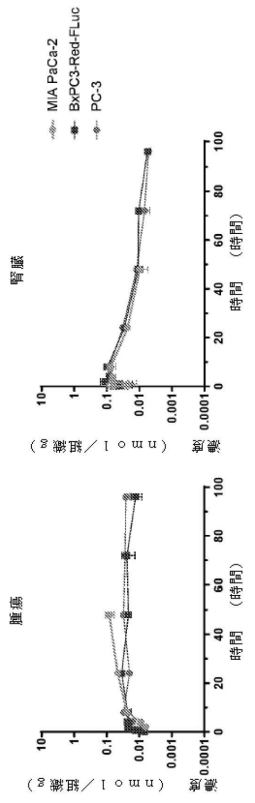
【図 4】

【図 4】



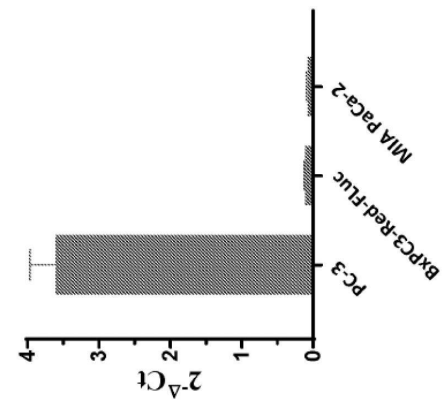
【図 5】

【図 5】



【図 6】

【図 6】

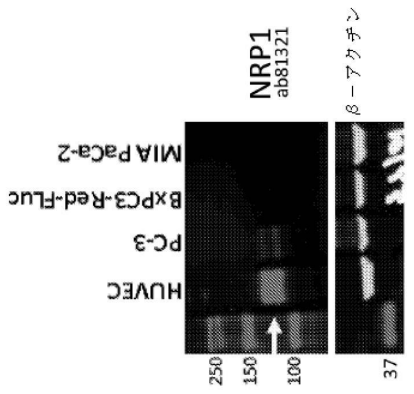


10

20

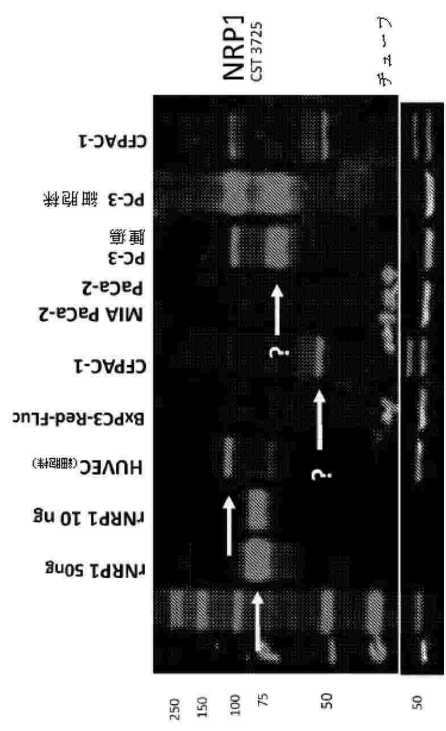
【図 7】

【図 7】



【図 8】

【図 8】



30

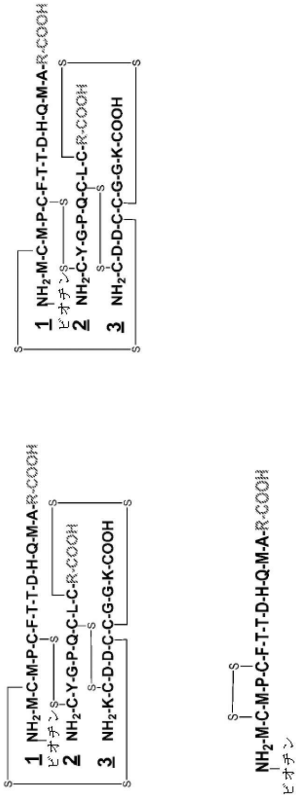
40

50



【 図 9 】

【 図 9 】



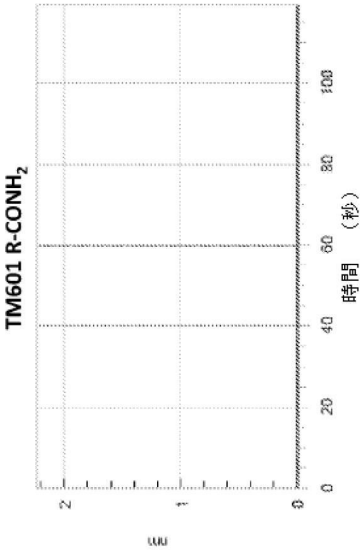
【図 1 1 - 3】

【図 1 1】の続き

ペプチド	供給源	NRPI 結合 $K_D$
$\text{NH}_2\text{-C-Y-G-P-Q-C-L-C-R-COOH}$ ビオチン	ペプチド合成 (ER-1174837)	410 nM 顕著な結合なし
$\text{NH}_2\text{-Y-G-P-Q-C-L-C-R-COOH}$ ビオチン	ペプチド合成 UM-1637-067 (ER-1174688)	300 nM 294 nM
$\text{NH}_2\text{-G-P-Q-C-L-COOH}$ ビオチン	ペプチド合成 (ER-1177939)	顕著な結合なし
$\text{NH}_2\text{-C-Y-G-P-Q-COOH}$ ビオチン	ペプチド合成 (ER-1177941)	顕著な結合なし
$\text{NH}_2\text{-C-L-C-R-COOH}$ ビオチン	ペプチド合成 (ER-1174991)	335 nM
VEGF-I65-ビオチン	ACRO Biosystems	43 nM 26 nM 75 nM 98 nM 18 nM 26 nM

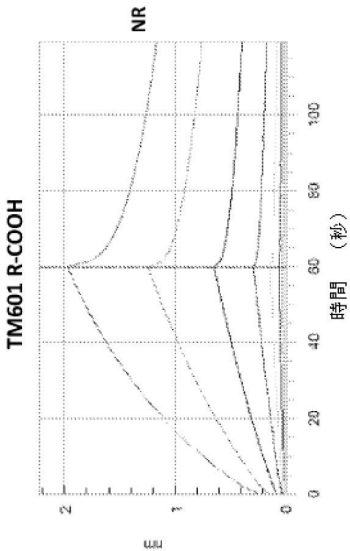
【図 1 2】

【図 1 2】



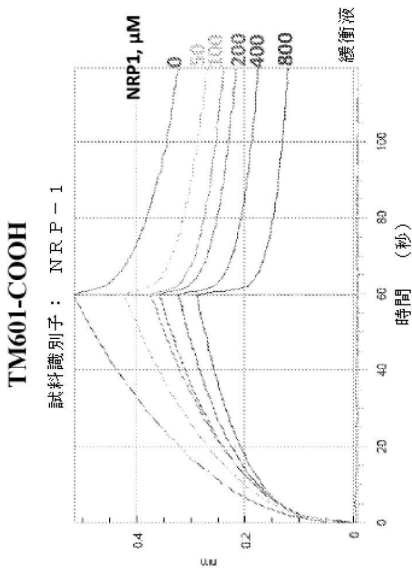
【図 1 3】

【図 1 3】



【図 1 4】

【図 1 4】



10

20

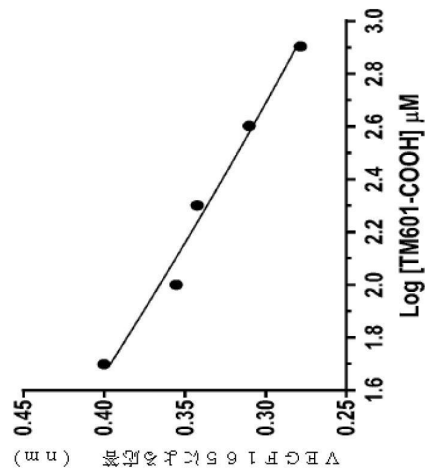
30

40

50

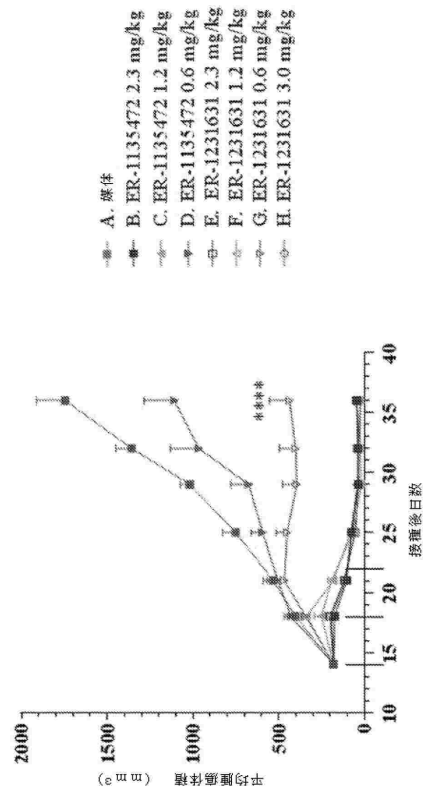
【図 15】

【図 15】



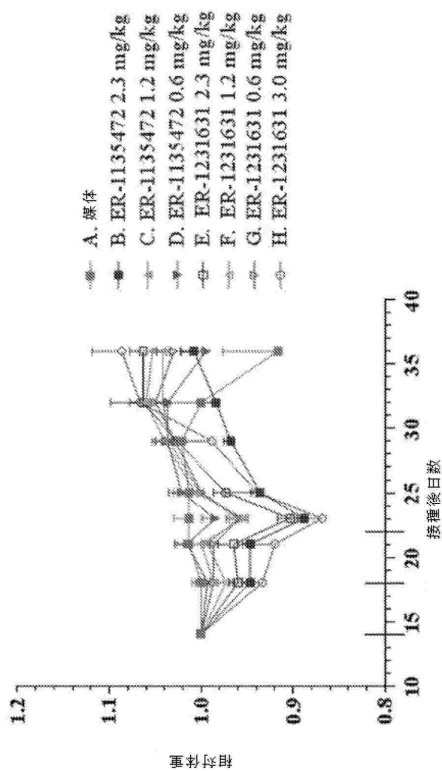
【図 16】

【図 16】



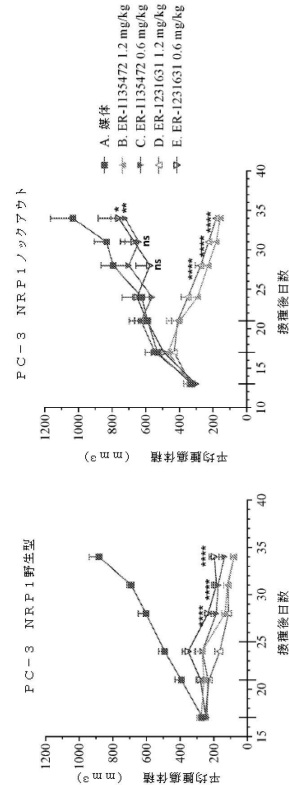
【図 17】

【図 17】



【図 18】

【図 18】



10

20

30

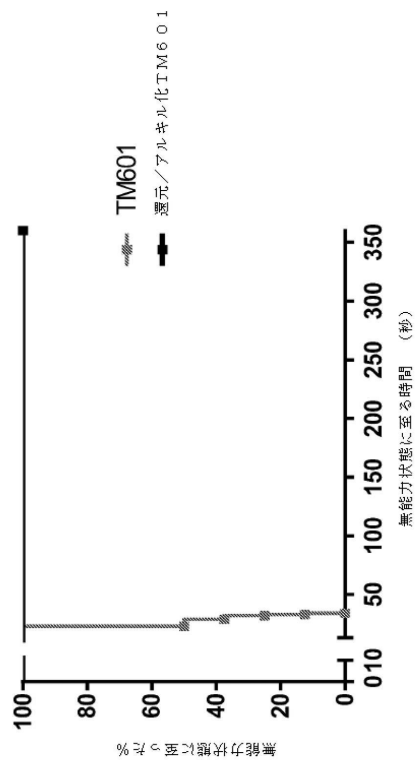
40

50



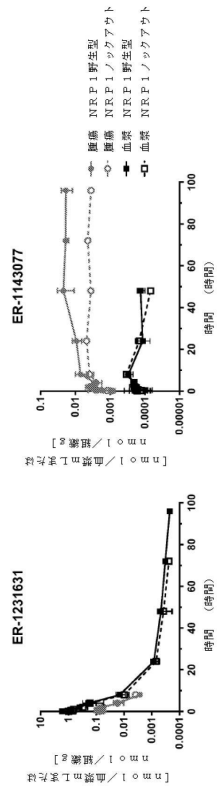
【図 2 3】

【図 2 3】



【図 2 4】

【図 2 4】

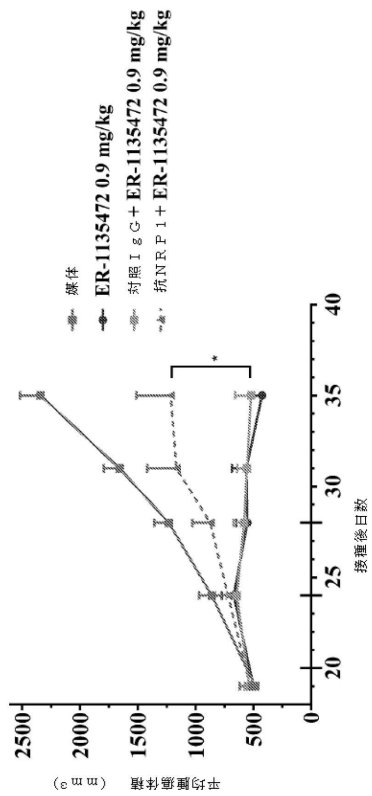


10

20

【図 2 5】

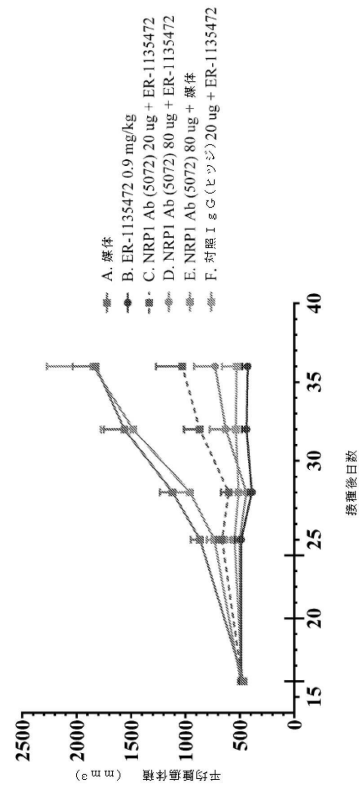
【図 2 5】



\*一元配置ANOVAの後にはネットの多重比較検定を実施して  $P \leq 0.05$

【図 2 6】

【図 2 6】



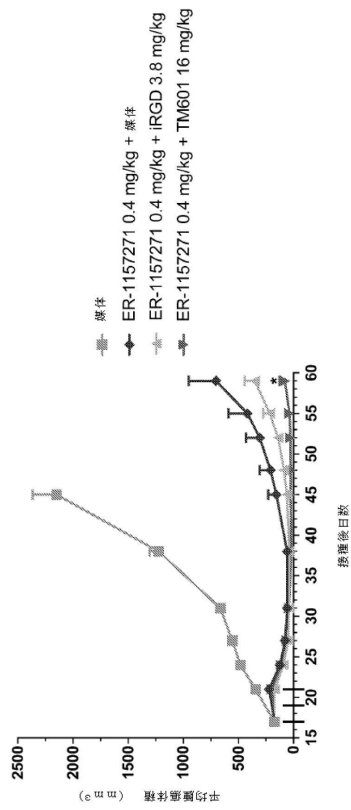
30

40

50

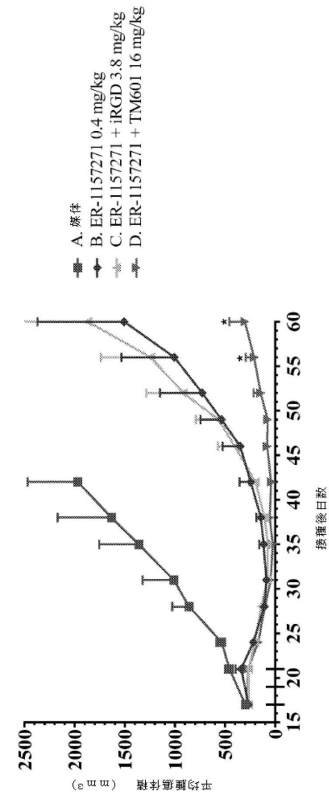
【図 27】

【図 27】



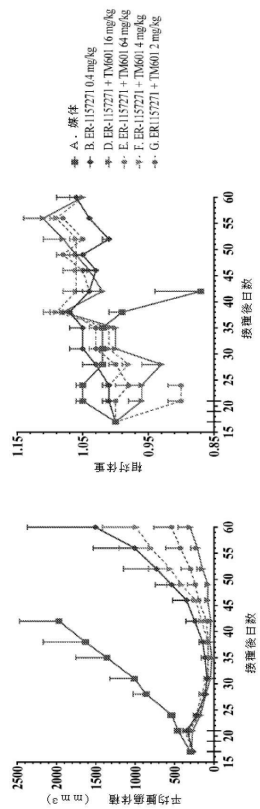
【図 28】

【図 28】



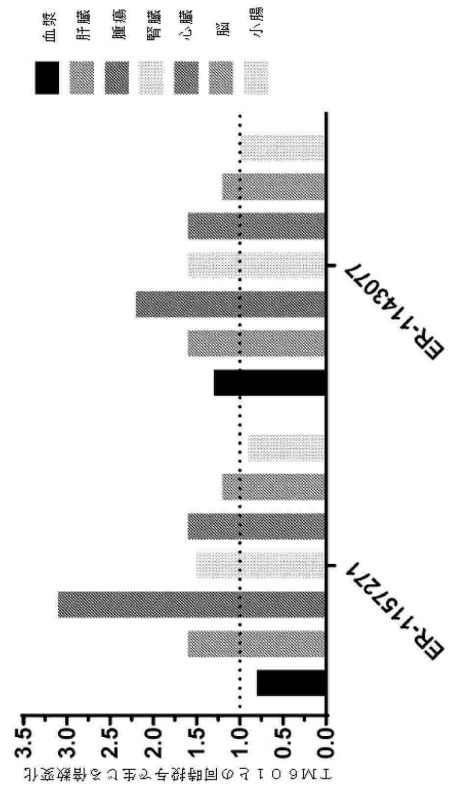
【図 29】

【図 29】



【図 30】

【図 30】



10

20

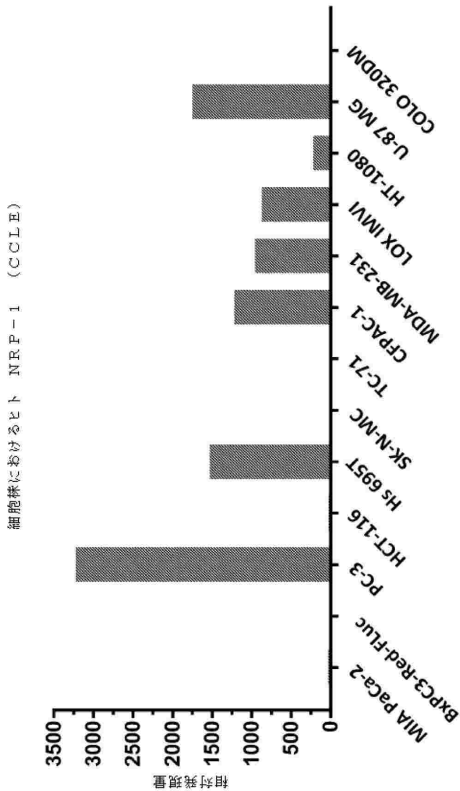
30

40

50

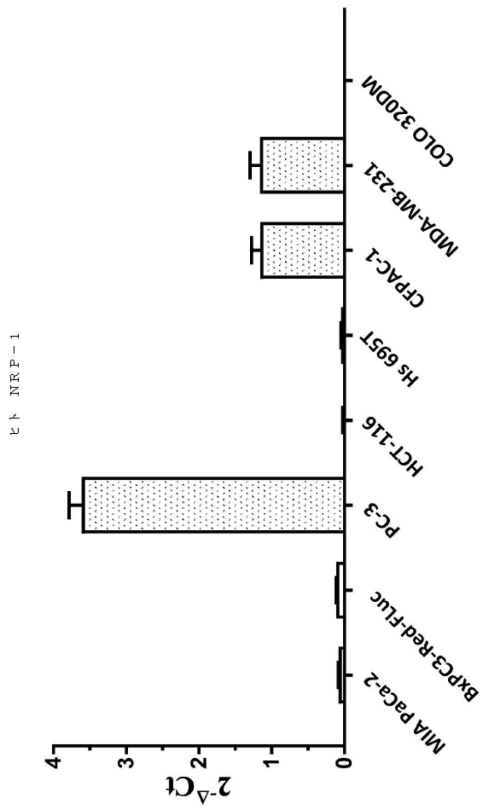
【図 3 1】

【図 3 1】



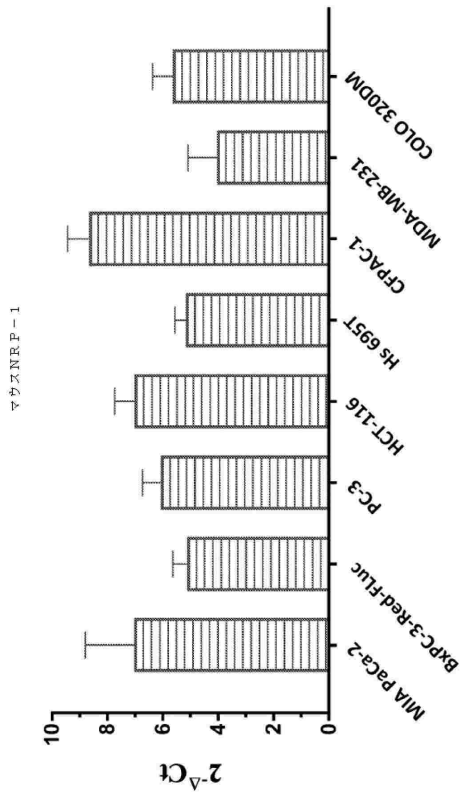
【図 3 2】

【図 3 2】



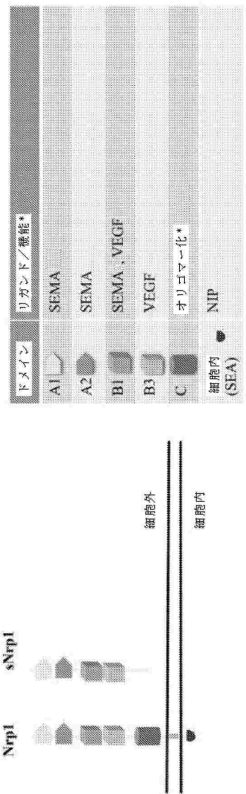
【図 3 3】

【図 3 3】



【図 3 4】

【図 3 4】



10

20

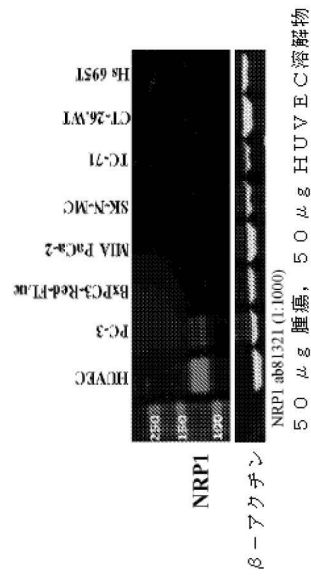
30

40

50

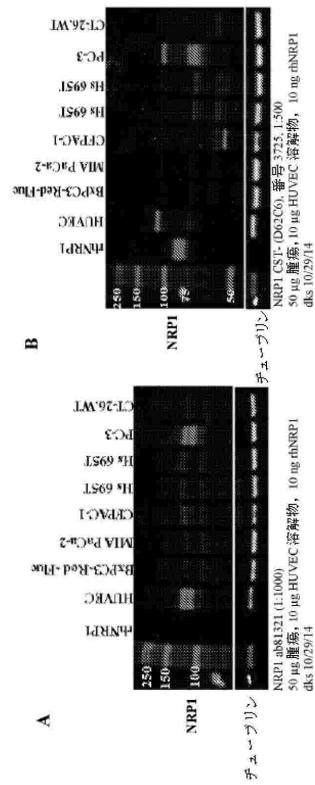
【図 3 5】

【図 3 5】



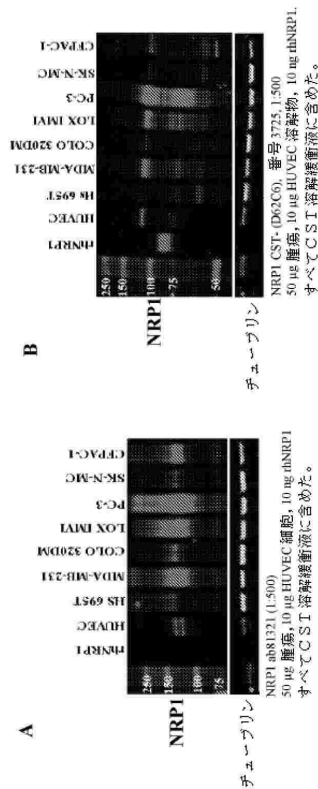
【図 3 6】

【図 3 6】



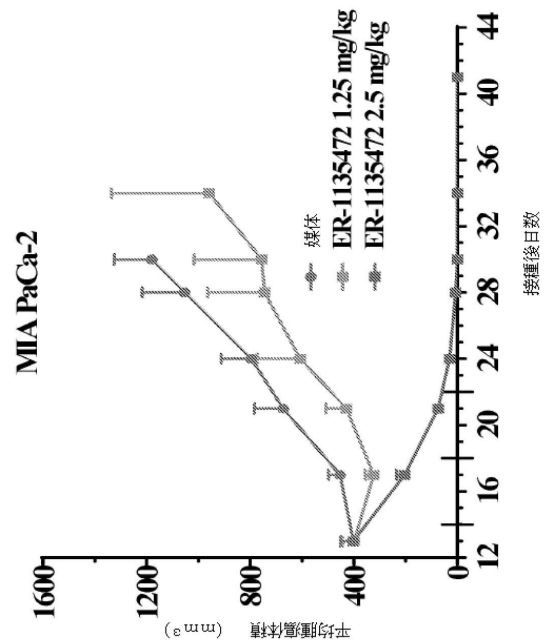
【図 3 7】

【図 3 7】



【図 3 8】

【図 3 8】



10

20

30

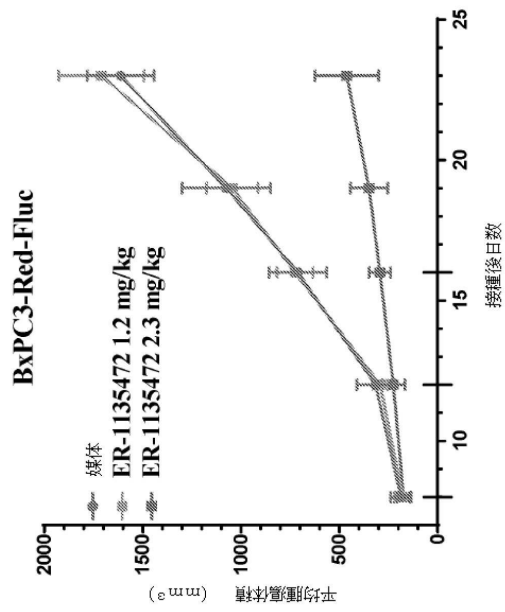
40

50



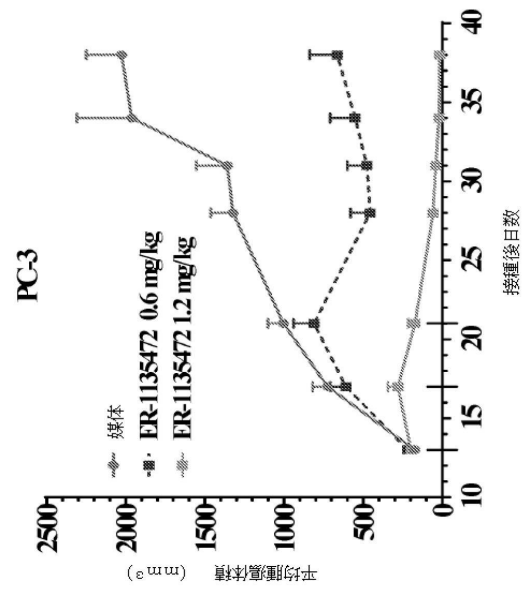
【図 3 9】

【図 3 9】



【図 4 0】

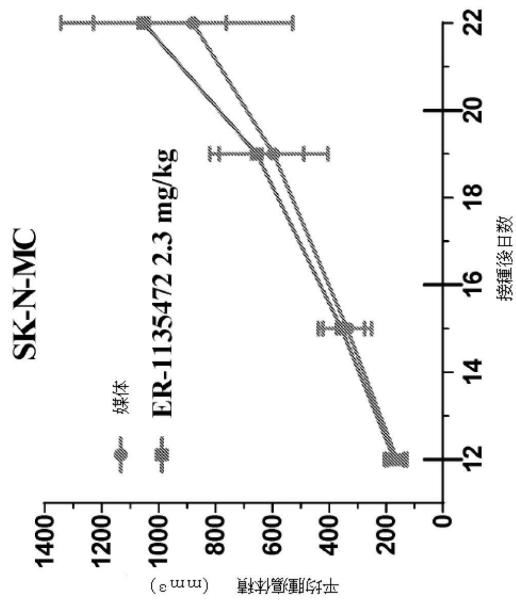
【図 4 0】



10

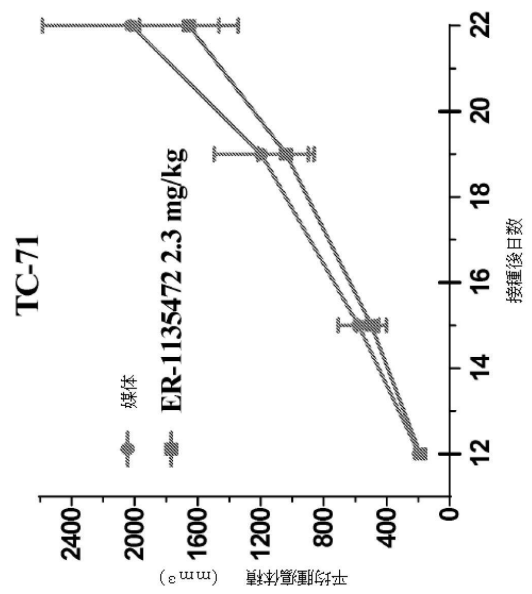
【図 4 1】

【図 4 1】



【図 4 2】

【図 4 2】



20

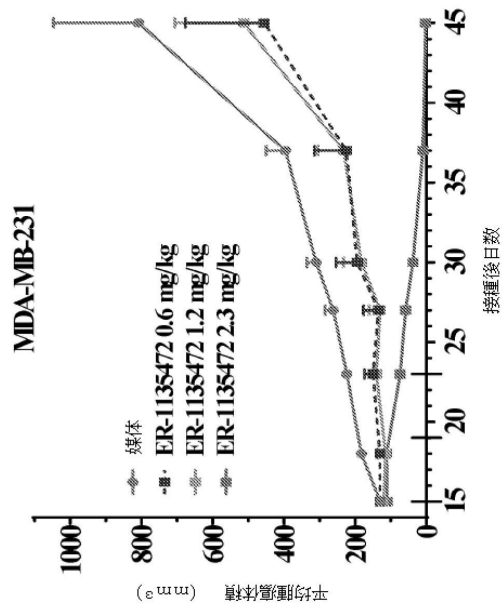
30

40

50

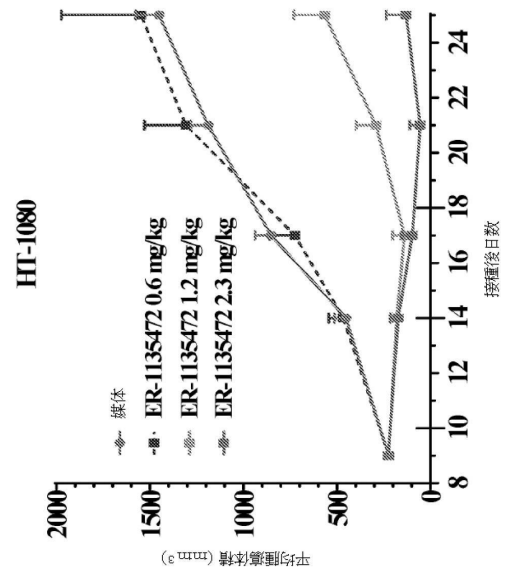
【図 4 3】

【図 4 3】



【図 4 4】

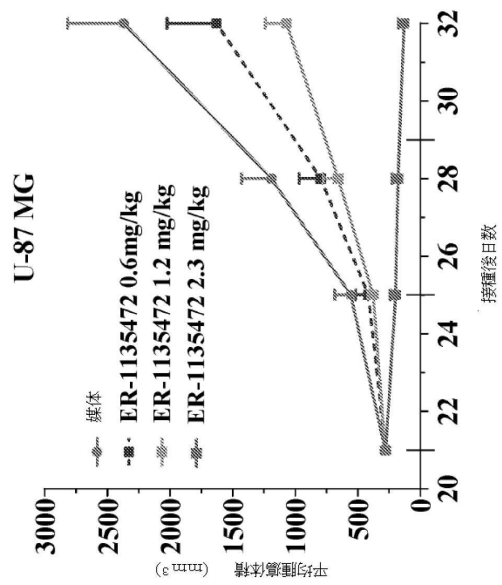
【図 4 4】



10

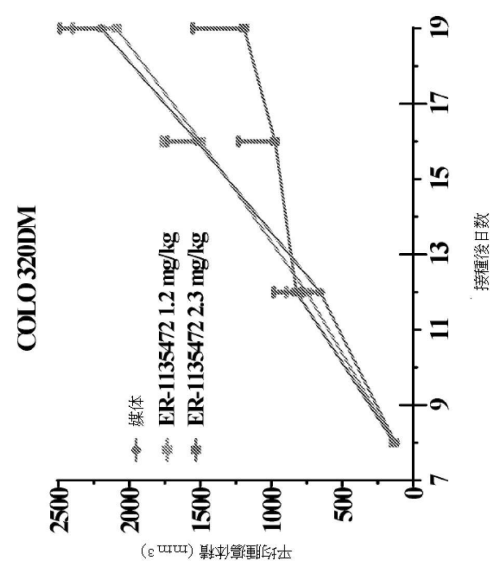
【図 4 5】

【図 4 5】



【図 4 6】

【図 4 6】



20

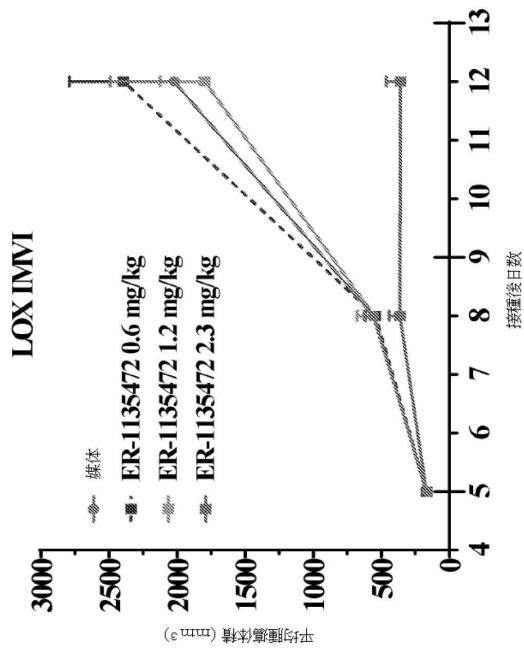
30

40

50

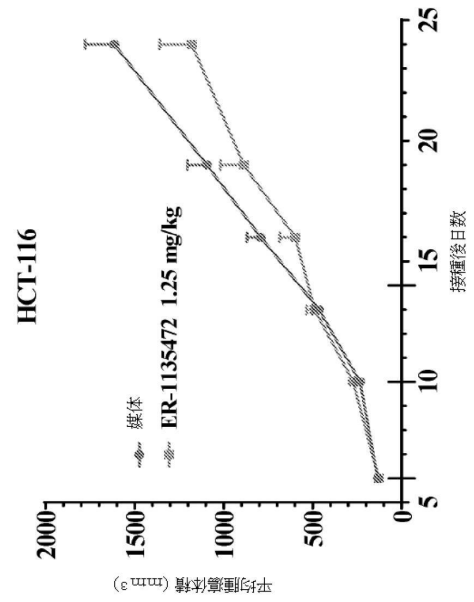
【図 4 7】

【図 4 7】



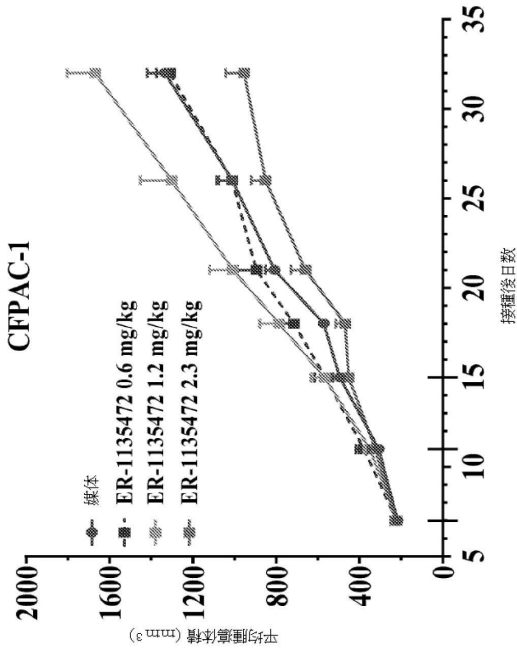
【図 4 8】

【図 4 8】



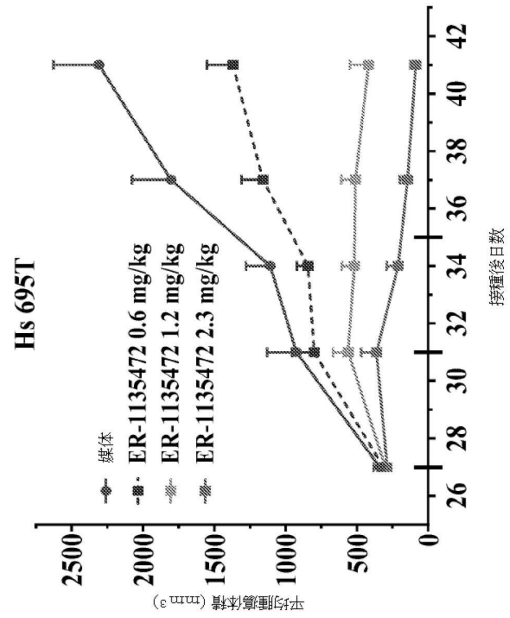
【図 4 9】

【図 4 9】



【図 5 0】

【図 5 0】



10

20

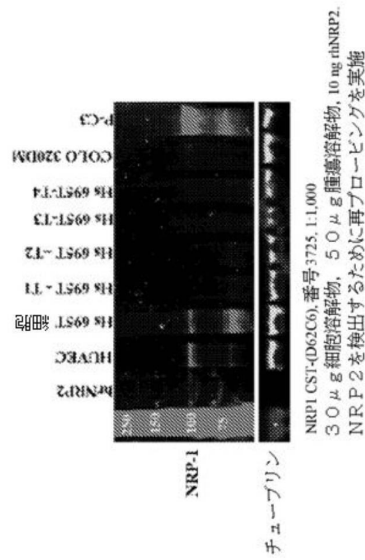
30

40

50

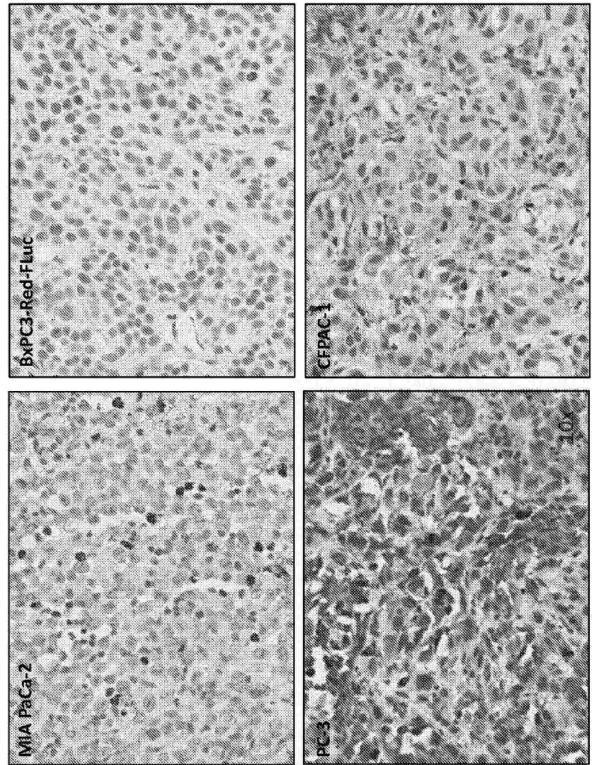
【図 5 1】

【図 5 1】



【図 5 2】

【図 5 2】

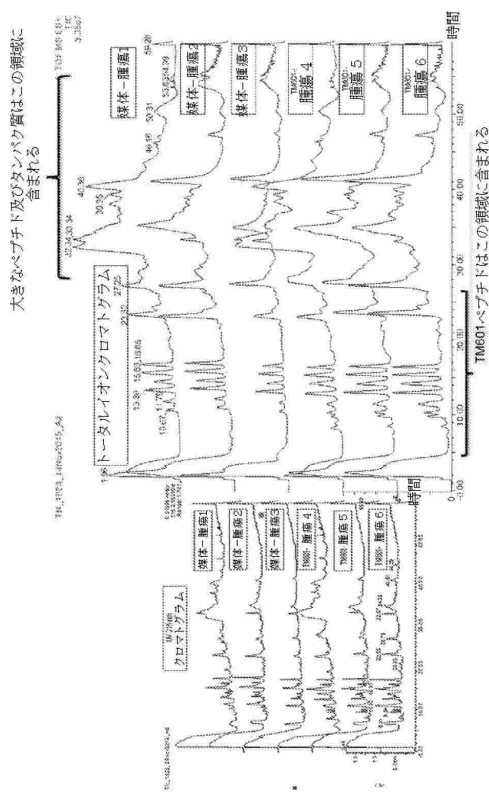


10

20

【図 5 3】

【図 5 3】



【図 5 4】

【図 5 4】

ベプチド	始まり	終わり	残基	保持時間 (分)	強度 (カウント)
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1)	18.6	549241
YGPOCLGR	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (2)	16	106490
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	14.7	30624
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	10.2	18026
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	4.1	16527
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	4.1	15372
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	14	14664
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	15.9	13403
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	8.7	13323
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	8.6	10049
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	15.5	9831
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	13	8168
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	4.6	6745
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	10.1	5172
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	14.6	4292
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	11.6	3920
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	4.1	3750
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	16.6	3101
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	18.3	2481
MCMPCTTTHQMARKDDKCGGKGRGK	1	36	カルバミドメチルC (8), アミド化C末端 (1), 酸化DM (1)	15.4	2173

30

40

50





## フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/574 (2006.01)

G 0 1 N 33/574

D

(72)発明者 マゴニーグル, シャロン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 1 0 , アンドーバー, チェスナット ストリート 7 0

(72)発明者 マジウムダー, ウトパル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 7 6 , テュークスベリー, ブラッドフォード ロード  
1 1 7

(72)発明者 ポステマ, マールテン エイチ. ディー.

アメリカ合衆国 ニューハンプシャー 0 3 4 4 4 , ダブリン, フォーブッシュ ロード 5

審査官 深草 亜子

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 7 / 1 3 6 7 6 9 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 1 3 / 0 0 3 5 0 7 ( W O , A 1 )

Oncogene, 2017年01月, Vol.36, pp.3417-3427

ONCOTARGET, 2016年03月, VOL:7, NR:9, PAGE(S):9801-9814, <https://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.6877>

Molecular Cancer Therapeutics, 2006年, Vol.5, pp.1099-1107

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

C A / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )