

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6636436号  
(P6636436)

(45) 発行日 令和2年1月29日 (2020.1.29)

(24) 登録日 令和1年12月27日 (2019.12.27)

(51) Int. Cl.

F I

**C 1 2 N 15/115 (2010.01)**  
**A 6 1 K 31/7088 (2006.01)**  
**A 6 1 K 31/7115 (2006.01)**  
**A 6 1 K 31/712 (2006.01)**  
**A 6 1 K 31/704 (2006.01)**

C 1 2 N 15/115 Z N A Z  
A 6 1 K 31/7088  
A 6 1 K 31/7115  
A 6 1 K 31/712  
A 6 1 K 31/704

請求項の数 20 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-550266 (P2016-550266)  
(86) (22) 出願日 平成27年2月5日 (2015.2.5)  
(65) 公表番号 特表2017-506074 (P2017-506074A)  
(43) 公表日 平成29年3月2日 (2017.3.2)  
(86) 国際出願番号 PCT/AU2015/050039  
(87) 国際公開番号 W02015/117201  
(87) 国際公開日 平成27年8月13日 (2015.8.13)  
審査請求日 平成30年2月5日 (2018.2.5)  
(31) 優先権主張番号 2014900347  
(32) 優先日 平成26年2月5日 (2014.2.5)  
(33) 優先権主張国・地域又は機関  
オーストラリア (AU)

(73) 特許権者 515030141  
ディーキン・ユニバーシティー  
オーストラリア・ビクトリア・3216・  
ウォアーン・ボンズ・ピドンズ・ロード・  
75  
(74) 代理人 100108453  
弁理士 村山 靖彦  
(74) 代理人 100110364  
弁理士 実広 信哉  
(74) 代理人 100133400  
弁理士 阿部 達彦  
(72) 発明者 ウェイ・デュアン  
オーストラリア・3216・ヴィクトリア  
・ハイトン・ベル・ヴュー・アヴェニュー  
・111

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アプタマー構築体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CD133に特異的に結合し、配列5'-X-ACGUUAUACUUAU-Y-3' (配列番号1)を含むアプタマーであって、X及びYの配列が、塩基対形成することができるように相補的であり、X及びYが個々に、インターカレーションにより少なくとも1つの部分構造の付加を可能とするのに十分な少なくとも4つの交互のCGヌクレオチドを含み、前記交互のCGヌクレオチドが対を形成する際に前記アプタマーのステム領域を含む、アプタマー。

【請求項 2】

X及びYが4から15の間の交互のCGヌクレオチドを含む、請求項1に記載のアプタマー。

【請求項 3】

配列5'-CGCGCGCCGCACGUUAUACUUAUGCGGCGCGCG-3' (配列番号2)を含む、又は配列番号2の配列からなる、請求項1又は2に記載のアプタマー。

【請求項 4】

前記部分構造が、DNA染色、又は化学療法処置に用いられる分子である、請求項1から3のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 5】

前記分子が、ドキソルピシン、アドリアマイシン、ベルベリン、プロフラビン、ミトキサントロン、ダウノルピシン、サリドマイド、ダクチノマイシン、ダウノマイシン、アクチノマイシンD、9-アミノアクリジン、アムルピシン、アムサクリン、アントラマイシン、ベルビン、ブレオマイシン、エリブチシン、エピルピシン、イダルピシン、メタピリロ

10

20

、ミトラマイシン、マイトマイシン、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ミトキサントロン、ピラルピシン、ピキサントロン、プリカマイシン、プロフラビン、プロディジオシン、サリドマイド、ボレロキシシン、バルルピシン、ゾルピシン、クロルフェニラミン、プロディシオシン、メタピリリノ、マイトマイシン、ジスタマイシン、ダンチノマイシン、ジスタマイシン、カルボプラチン、シスプラチン及び他のプラチナ誘導体、Hoechst 33258、ベレニル、DAPI、又は臭化エチジウムからなる群から選択される、請求項4に記載のアプタマー。

【請求項 6】

化学療法処置において使用される前記分子が、アプタマーのステム領域にインターカレートされる際に、CD133に対して約24nM以下の平衡解離定数( $K_D$ )を示す、請求項4又は5に記載のアプタマー。

10

【請求項 7】

アプタマー安定性を高める1つ又は複数の修飾を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 8】

配列5'-ACGUUAUACUUAU-3' (配列番号3)である、ループ領域におけるピリミジンヌクレオチド塩基(C及び/又はU)が、2'-フルオロ(2'-F)修飾されている、請求項1から7のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 9】

3'末端を、リン酸基、リン酸エステル、又は逆向きdT(inv dT-3')と結合させた、請求項1から8のいずれか一項に記載のアプタマー。

20

【請求項 10】

配列5'-X-A(2'fC)G(2'-fU)A(2'fU)A(2'fC)(2'fU)A(2'fU)-Y-(inv dT)-3' (配列番号4)を含み、Cが5-メチルdCであり、f=2'-フルオロであり、inv dT=逆向きdTである、請求項1から9のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 11】

配列5'-mCGmCGmCGmCmCGmCA(2'fC)G(2'-fU)A(2'fU)A(2'fC)(2'fU)A(2'fU)GmCGGmCGmCGmCG-(inv dT)-3' (配列番号5)を含み、C=5-メチルdCであり、f=2'-フルオロであり、inv dT=逆向きdTである、請求項1から10のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 12】

30

in vitroでCD133<sup>+</sup>細胞に特異的に結合する、請求項1から11のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 13】

前記CD133<sup>+</sup>細胞が癌幹細胞である、請求項12に記載のアプタマー。

【請求項 14】

前記細胞が、対象から得られた生体試料中に存在する、請求項12又は13のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 15】

請求項1から14のいずれか一項に記載のアプタマーを含む診断剤又はセラノスティック剤。

40

【請求項 16】

Doxがアプタマーのステム領域にインターカレートしている、アプタマー-Doxコンジュゲートである、請求項15に記載のセラノスティック剤。

【請求項 17】

癌を有する、又は癌を有することが疑われる対象から得られた生体試料中のCD133発現細胞及び/又は癌幹細胞を同定するin vitro方法であって、前記細胞を、検出可能な標識と結合させた請求項1から11のいずれか一項に記載のアプタマーと接触させる工程を含む方法。

【請求項 18】

免疫グロブリン若しくはそのフラグメント、治療剤、薬剤若しくは生理活性剤、毒素、

50

又は放射性核種、siRNA、DNAザイム、又はリボザイムからなる群から選択される活性がある部分構造と更に結合させた、請求項1から14のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 19】

それを必要とする対象における癌の処置において使用するための、請求項1から13のいずれか一項に記載のアプタマーを含む組成物又は請求項15若しくは16に記載のセラノスティック剤。

【請求項 20】

請求項1から13のいずれか一項に記載のアプタマー又は請求項15若しくは16に記載のセラノスティック剤の治療的に有効な量を、医薬的に許容可能なキャリア及び/又は賦形剤と共に含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願及び参照による組込み

本明細書中で引用又は参照される全ての文献は、本明細書中で言及されるあらゆる製品のあらゆる製造者の説明書、記載、製品仕様書、及び製品シート、又は本明細書中に参照によって組み込まれるあらゆる文献と共に、それらの全体が参照によって本明細書中に組み込まれる。

【0002】

本出願は、2014年2月5日出願のAU 2014900347(表題「Aptamer construct」)の優先権を主張する。

【0003】

本開示は、アプタマー及びその使用、特に、CD133に特異的に結合し、且つ癌の診断及び/又は処置に特に有用であるアプタマーに関する。

【背景技術】

【0004】

Prominin-1としても知られているCD133は、細胞膜中のコレステロールと会合した、高度にグリコシル化された膜糖タンパク質のペントスパンである。このタンパク質は、体性幹細胞及び前駆細胞を含めた、細胞の幅広い集団を定義することが知られており、種々の成長中の上皮分化細胞において発現されるが、その正確な機能は今もなお解明中である。しかしながらそれは、二値的な細胞運命、腸上皮の分化、及びリンパ球新生に重要であるNotchシグナリング経路と関連づけられている(Ulasovら 2011. Mol Med 17:103-12)。いくつかの癌における癌幹細胞(CSC)のマーカーであると思われることから、近年、この分子により多くの関心が示されてきた。実際に、より多くの証拠により、CD133は、いくつかの癌におけるCSC上に発現されること、そして免疫不全マウスにおいてCD133+細胞の腫瘍形成能力はネガティブ対応物に対し増強されていることが示された(Dittfeldら 2009. Radiother Oncol 92:353-61)。

【0005】

近年、免疫治療は、癌の処置に大きな影響を及ぼしてきた。しかしながら、抗体の使用は、ヒト化抗体でさえ、致命的となり得る有害な副作用の原因となる虞がある(Hanselら 2010. Nat Rev Drug Discov 9:325-38)。これにより、「より大きく、且つより良好な」選択肢の探索に至った。治療薬として核酸を用いるいくつかの試みがなされてきたが、これらは期待外れの結果に直面してきた。というのも、とりわけ、これらの核酸が細胞に入れなかったためである(Shigdarら 2011. Br J Haematol 155:3-13)。

【0006】

アプタマーと呼ばれる化学抗体が、この20年、臨床用途に益々利用されてきた。実際に、一アプタマーであるペガプタニブ(抗VEGFアプタマー)がFDAによって認可され、そして更にいくつかが臨床試験中である。治療のためのアプタマーの使用に対する関心が、免疫原性を示さない、化学的に合成されるためにバッチ間の変動が殆どない、そして従来の抗体よりも安定しているという事実を含めたいくつかの理由によって、高まっている。アプ

10

20

30

40

50

タマーはまた、サイズが小さいために、優れた腫瘍浸透を示す。しかしながら、その最も重要な特徴は、機能を損なうことなく、アプタマーをナノ粒子、薬剤、イメージング剤、又は他の核酸治療薬に付加できることである(Mengら 2012. PLoS One 7: e33434)。この機能化が、新しく、より標的化された易い(more targeted)治療をもたらしており、現在の処置モダリティよりも副作用が少ない(上記Mengら 2012)。大いに受動的なプロセスである従来の処置と比較すると、標的送達系ははるかに効果的である。アプタマーが効果的な薬剤送達剤となるためには、アプタマーは細胞表面上の標的に結合しなければならず、且つ短期間で内在化されなければならない。したがって、当該技術において、アプタマーの結合特性及び腫瘍浸透を向上させる必要性がある。

【先行技術文献】

10

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第2004/081574号

【特許文献2】米国特許第5773598号

【特許文献3】米国特許第6028186号

【特許文献4】米国特許第6110900号

【特許文献5】米国特許第6127119号

【特許文献6】米国特許第6171795号

【特許文献7】米国特許第5,475,096号

【特許文献8】米国特許第5,270,163号

20

【特許文献9】国際出願PCT/US91/04078号

【特許文献10】米国特許第7602495号

【特許文献11】米国特許第6562627号

【特許文献12】米国特許出願公開第2012/00445849号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Ulasovら 2011. Mol Med 17:103-12

【非特許文献2】Dittfeldら 2009. Radiother Oncol 92:353-61

【非特許文献3】Hanselら 2010. Nat Rev Drug Discov 9:325-38

【非特許文献4】Shigdarら 2011. Br J Haematol 155:3-13

30

【非特許文献5】Mengら 2012. PLoS One 7: e33434

【非特許文献6】Sambrook, Fritsch及びManiatis、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratories社、New York、第2版(1989)、全I、II、及びIII巻

【非特許文献7】DNA Cloning: A Practical Approach、I及びII巻(D. N. Glover編、1985)、IRL Press社、Oxford

【非特許文献8】Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (M. J. Gait編、1984) IRL Press社、Oxford

【非特許文献9】4. Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (B. D. Hames及びS. J. Higgins編、1985) IRL Press社、Oxford

40

【非特許文献10】Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach (1986) IRL Press社、Oxford

【非特許文献11】Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)

【非特許文献12】Methods In Enzymology (S. Colowick及びN. Kaplan編、Academic Press社)、全シリーズ

【非特許文献13】Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E.L及びFenichel, R.L. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 73 336-342

【非特許文献14】Merrifield, R.B. (1963). J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154

【非特許文献15】Barany, G.及びMerrifield, R.B. (1979), The Peptides (Gross, E. 及びMeienhofer, J. 編)、2巻、1 -284頁、Academic Press社、New York.

50

【非特許文献16】12. Wuensch, E. 編(1974) Synthese von Peptiden, Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie (Mueler, E. 編)、15巻、第4版、1及び2部

【非特許文献17】Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag社、Heidelberg

【非特許文献18】Bodanszky, M. 及び Bodanszky, A. (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag社、Heidelberg

【非特許文献19】Bodanszky, M. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25、449-474

【非特許文献20】Handbook of Experimental Immunology、I-IV巻(D. M. Weir 及び C. C. Blackwell 編、1986、Blackwell Scientific Publications社)

【非特許文献21】Animal Cell Culture: Practical Approach、第3版(John R. W. Masters 編、2000)、ISBN 0199637970 10

【非特許文献22】Burkeら(1996)、J. Mol. Biol. 264:650-666

【非特許文献23】Ellington 及び Szostak (1990)、Nature 346:818-22

【非特許文献24】Hiraoら(1998)、Mol Divers. 4:75-89

【非特許文献25】Jaegerら(1998)、EMBO Journal 17:4535

【非特許文献26】Kenschら(2000)、J. Biol. Chem 275:18271 -8

【非特許文献27】Schneiderら(1995)、Biochemistry 34:9599-9610

【非特許文献28】Shigdar Sら(2013) Cancer Letters 330:84-95

【非特許文献29】Caceci, M. ら、Byte (1984) 9:340-362

【非特許文献30】Wong 及び Lohman、(1993). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90、5428-54 20  
32

【非特許文献31】Stoltenburg Rら(2005) Anal Bioanal Chem 383:83-91

【非特許文献32】Tran DTら(2010) Molecules 15、1127-1140

【非特許文献33】Cho Mら(2013) PNAS 110(46): 18460-18465

【非特許文献34】Zein Nら(1988). Science 240:1 198-201

【非特許文献35】Chu TCら(2006) Cancer Res 6(12)5989-5992

【非特許文献36】Barthら(1990). Scientific American Oct 1990:100-107

【非特許文献37】Waldmann、Science、252:1657-62 (1991)

【非特許文献38】Chuら(2006) Nucleic Acids Res 34、e73

【非特許文献39】McNamaraら(2006) Nat Biotechnol 24、1005-1015 30

【非特許文献40】Wullnerら(2008). Curr. Cancer Drug Targets 8:554-565

【非特許文献41】Dharら(2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:17356-17361

【非特許文献42】Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Mac Publishing社(1980)

【非特許文献43】Shigdar Sら(2011). Cancer Sci 102(5): 991-998

【非特許文献44】Kreso A 及び O'Brien CA、Current Protocols in Stem Cell Biology (John Wiley and Sons社、2007)

【非特許文献45】Zeppernick Fら(2008) Clin Cancer Res 14:123-129

【非特許文献46】Zhuang Xら(2012) BMC Cancer 12:1-16

【非特許文献47】Poljakova Jら(2008) Interdisciplinary toxicology 1:186-189 40

【非特許文献48】Shen Fら(2008) The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 324:95-102

【非特許文献49】Oudard Sら(1991) Cancer chemotherapy and pharmacology 28:259-265

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

癌幹細胞が、腫瘍組織の形成及び増殖の原因となり、本来化学療法に対して耐性を示すことが最近理解されてきており、従来の化学療法が最初に腫瘍を縮小し得るものの、完全に根絶することができず、最終的に再発する理由が説明される。癌幹細胞仮説に従えば、 50

CD133陽性細胞(CD 133<sup>+</sup>)が、長期の腫瘍増殖を決定するので、臨床成果に影響すると疑われている。クラスタ中のCD133陽性細胞の割合及びその位相構造の双方が、腫瘍悪性度、切除の程度又は患者の年齢から独立した、有害な無増悪生存及び全生存に関する重要な予後因子であることが最近わかった。

【0010】

CD133陽性癌幹細胞を標的とする現在の技術は、従来の抗体ベースの系を用いるが、入手可能な抗CD133抗体のサイズ、及び組織に浸透できないというその相対的な不能のため、感度を欠いている。

【0011】

したがって、CD133+細胞に対するアプタマーの生成は、癌の根絶において有利であろう。これは、本発明者によって取り組まれてきて、迅速に内在化され、且つ優れた腫瘍浸透を示す、CD133に特異的なアプタマーが生じた。特に、本開示のアプタマーは、特に有効なセラノスティック剤である。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本開示は、CD133に特異的に結合するアプタマーを提供する。一例において、アプタマーはオリゴヌクレオチドである。一例において、オリゴヌクレオチドは、RNA、DNA若しくはハイブリッドRNA/DNAアプタマーであってよく、且つ/又はアデニン、シトシン、グアニン、チミン及びウラシル以外のヌクレオチドを含んでよい。

【0013】

本開示はまた、配列5'-X-ACGUUAUACUAU-Y-3' (配列番号1)を含むアプタマーを提供し、ここで、X及びYの配列は、塩基対形成することができるように相補的であり、X及びYは個々に、少なくとも1つの部分構造の付加を可能とするのに十分な長さのCG対形成ヌクレオチドを含む。

【0014】

本開示のアプタマーに従えば、X及びYは個々に、少なくとも4CG対形成ヌクレオチド(4CG対)を含んでよい。別の例において、X及びYは個々に、少なくとも5CG対形成ヌクレオチド、少なくとも6CG対形成ヌクレオチド、少なくとも7CG対形成ヌクレオチド、少なくとも8CG対形成ヌクレオチド、少なくとも9CG対形成ヌクレオチド、少なくとも10CG対形成ヌクレオチド、少なくとも11CG対形成ヌクレオチド、少なくとも12CG対形成ヌクレオチド、少なくとも13CG対形成ヌクレオチド、少なくとも14CG対形成ヌクレオチド、又は少なくとも15CG対形成ヌクレオチドを含んでよい。

【0015】

別の例において、アプタマーは、4から15の間のCG対形成ヌクレオチド(4~15CG対)を含んでよい。別の例において、アプタマーは、2から12の間のCG対形成ヌクレオチドを含んでよい。別の例において、アプタマーは、2から10の間の対形成ヌクレオチド、2から8の間の対形成ヌクレオチド、又は2から6の間の対形成ヌクレオチドを含んでよい。

【0016】

CG対形成ヌクレオチドは、アプタマーのステム領域を含むことが、当業者によって理解されよう。

【0017】

一例において、アプタマーは、CD133に対して約24nM以下の平衡解離定数( $K_D$ )を示す。別の例において、アプタマーは、CD133に対して約24nMの解離定数( $K_D$ )を示す。別の例において、アプタマーは、CD133に対して24nMの解離定数( $K_D$ )を示す。別の例において、解離定数は、HT29細胞上に発現されたCD133に対するアプタマーの結合を測定することによって決定される。

【0018】

一例において、アプタマーは、ハイブリッドRNA/DNAアプタマーである。別の例において、アプタマーは、単離されたアプタマーである。別の例において、アプタマーは、当該技術の知られている方法(例えばSELEX)に従って合成される。

10

20

30

40

50

## 【0019】

一例において、本開示のアプタマーは、CD133に特異的に結合する。別の例において、本開示のアプタマーは、CD133に選択的に結合する。

## 【0020】

一例において、アプタマーは、配列5'-CGCGCGCCGCACGUUAUACUAUGCGGCGCGCG-3' (配列番号2)を含む。一例において、アプタマーは、配列番号2の配列を含み、配列は、DNAである10 GC対形成ヌクレオチドを含む。更なる例において、アプタマーは、RNAである配列5'-ACGU AUACUAU-3' (配列番号3)を含む。更に別の例において、アプタマーは、配列番号3の配列を含む配列番号2の配列を含み、配列番号3はRNAであり、残りの配列はDNAである。一例において、ステム領域は、図1に示されるアプタマーの予測される二次元構造のステム領域である。

10

## 【0021】

一例において、アプタマーは、配列番号2の配列から本質的になる。アプタマーは代わりに、配列番号2の配列からなってもよい。本開示の、又は配列番号2のアプタマーは、さらなる配列を含んでもよい。本開示のアプタマーは、配列番号2との同一性が少なくとも95%、同一性が少なくとも90%、同一性が少なくとも92%、同一性が少なくとも85%、同一性が少なくとも80%、同一性が少なくとも75%、又は同一性が少なくとも70%である配列を含んでもよい。

## 【0022】

一例において、部分構造の付加は、インターカレーションによる。別の例において、付加はコンジュゲーションによる。別の例において、付加は静電結合による。別の例において、付加はリンカーを介する。

20

## 【0023】

本開示の部分構造は、DNA染色、若しくは化学療法処置に用いられる分子、又は双方の機能を実行することができる分子であってよい。本開示のアプタマー中にインターカレートすることができる適切な分子の例が、ドキソルビシン、アドリアマイシン、ベルベリン、プロフラビン、ミトキサントロン、ダウノルビシン、サリドマイド、ダクチノマイシン、ダウノマイシン、アクチノマイシンD、9-アミノアクリジン、アムルピシン、アムサクリン、アントラマイシン、ベルピン、ブレオマイシン、エリブチシン、エピルピシン、イダルピシン、メタピリロ(methpyrillo)、ミトラマイシン、マイトマイシン、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ミトキサントロン、ピラルピシン、ピキサントロン、プリカマイシン、プロフラビン、プロディジオシン、サリドマイド、ボレロキシン、バルルピシン、ゾルピシン、クロルフェニラミン、プロディシオシン(prodisiosin)、メタピリリノ(methapyrillino)、マイトマイシン、ジスタマイシン、ダンチノマイシン(dantinomycin)、ジスタマイシン、カルボプラチン、シスプラチン及び他のプラチナ誘導体、Hoechst 33258、ベレニル、DAPI、又は発癌物質(アフラトキシンB1のエキソ8,9エポキシド、アクリジン、例えばプロフラビン若しくはキナクリン、又は臭化エチジウムを含む)から選択され得る。他のGCインターカレート剤が、本発明の技術における当業者によく知られているであろうし、本開示の範囲内に含まれることが意図される。好ましい例において、分子はドキソルビシン(DOX)である。

30

40

## 【0024】

X及びYの配列は、塩基対を形成することで、アプタマーのステム領域を提供することができる。理論に拘束されることを望むものではないが、部分構造は好ましくは、塩基対形成されたX及びY DNA配列中のCpG部位間にインターカレートすることによって、本開示のアプタマーに付加することができる。DOXに関して、平均で、全てのCpG部位についてDOXは約2.5分子あり、言い換えれば、配列番号2の配列中にインターカレートすることができるDOXは約2.5分子ある。

## 【0025】

アプタマーの全長は、19から101ヌクレオチドの間、21から85ヌクレオチドの間、25から75ヌクレオチドの間、31から65ヌクレオチドの間、41から55ヌクレオチドの間、又は31

50

から41ヌクレオチドの間であってよい。本開示は、少なくとも15CG対形成ヌクレオチドを含むアプタマーを記載する一方、残りのステム配列は、交互のCG対形成ヌクレオチド以外にRNA又はDNA配列を含んでよいことが、当業者によって理解されよう。

【0026】

本開示のアプタマーは更に、アプタマーの結合ループを維持する配列内に、1つ又は複数のヌクレオチド置換を含んでよい。一例において、配列は、本明細書中に開示されるアプタマーのステム領域内に、又は配列番号1若しくは配列番号2のアプタマー配列内に、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つの置換を含む。置換の数は、アプタマーの長さに依存し、アプタマーが依然としてドキシソルピシン等の分子を付加することができる程度までは許容されることが理解されよう。

10

【0027】

一例において、アプタマーは更に、アプタマー安定性を(in vitro且つ/又はin vivoで)向上させる1つ又は複数の修飾を含む。一例において、ループ領域におけるピリミジンヌクレオチド塩基(C及び/又はU)は、2'-フルオロ(2'-F)修飾されている。疑問の回避のため、ループ領域は、配列5'-ACGUUAUACUUAU-3'(配列番号3)である。更なる例において、アプタマーステム領域中のC塩基(デオキシシチジン、dC)は、5-メチルデオキシシチジン(5-メチルdC)に修飾されている。dCが5-メチルdCに置換されると、アプタマーのT<sub>m</sub>は、1挿入あたり0.5 も上昇し得る。理論に拘束されることを望むものではないが、CpGモチーフ中の5-メチルdCの存在は、オリゴヌクレオチドがin vivo投与されると普通であれば起こる不要な免疫応答を、防止又は制限することができ、これは、in vivo診断法及び治療法にとって特に重要である。別の例において、アプタマーの3'末端は、ヌクレアーゼ消化から保護するように修飾されてよい。別の例において、アプタマーは、3'末端をリン酸基、リン酸エステル又は逆向き(inverted)dT(inv dT-3')で修飾することによって、修飾される。別の例において、5'末端は、色素、例えばピオチン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、シアニン(Cy3又はCy5)と結合させてよい。さらなる修飾が、当業者によく知られているであろうし、本開示によって包含されることが考えられる。

20

【0028】

一例において、本開示は、配列5'-X-A(2'fC)G(2'-fU)A(2'fU)A(2'fC)(2'fU)A(2'fU)-Y-(inv dT)-3'(配列番号4)を含むハイブリッドRNA/DNAアプタマーを提供し、ここで、X及びYは、塩基対形成することができるよう相補的であり、X及びYは個々に、ある長さのCG対形成ヌクレオチドを含み、f=2'-フルオロであり、inv dT=逆向きdT(反転連結)であり、X及びYの長さは、少なくとも1つの部分構造の付加を可能とするのに十分である。特定の例において、X及びYはDNAである。

30

【0029】

一例において、本開示は、配列5'-mCGmCGmCGmCGmCA(2'fC)G(2'-fU)A(2'fU)A(2'fC)(2'fU)A(2'fU)GmCGmCGmCGmCG-(inv dT)-3'(配列番号5)を含むハイブリッドRNA/DNAアプタマーを提供し、ここで、C=5-メチルdCであり、f=2'-フルオロであり、inv dT=逆向きdT(反転連結)である。この例に従えば、アプタマーは、逆向きである3'末端Gを含む。

【0030】

別の例において、ハイブリッドRNA/DNAアプタマーは、配列番号4又は配列番号5の配列から本質的になる。別の例において、ハイブリッドRNA/DNAアプタマーは、配列番号4又は配列番号5の配列からなる。

40

【0031】

本開示のアプタマーは、配列番号4若しくは配列番号5との同一性が少なくとも95%、同一性が少なくとも90%、同一性が少なくとも92%、同一性が少なくとも85%、同一性が少なくとも80%、同一性が少なくとも75%、又は配列番号4若しくは配列番号5との同一性が少なくとも70%である配列を含んでよい。

【0032】

アプタマーは更に、3'又は5'色素、例えばCy3又はCy5を含んでよい。

【0033】

50



2'-フルオロ修飾RNA塩基を調製する方法が、当該技術において知られている。一例において、2'-フルオロ修飾塩基は、RNA転写物の合成中に直接組み込まれる。

【0034】

本開示はまた、配列番号1、配列番号2、配列番号4、又は配列番号5の配列を含むアプタマーと実質的に同じ、CD133への結合能力を有するアプタマーを提供する。

【0035】

一例において、本開示のアプタマーは、CD133<sup>+</sup>細胞に特異的に結合する。別の例において、本開示のアプタマーは、CD133<sup>+</sup>細胞に選択的に結合する。CD133<sup>+</sup>細胞は、幹細胞であってよい。幹細胞は、精製又は単離された幹細胞であってよく、一例において、癌幹細胞であってよい。一例において、癌幹細胞は、(i)CD133を発現する、(ii)腫瘍形成性である、(iii)自己再生することができる、(iv)分化することができる、且つ(v)従来の治療によるアポトーシスに耐性を示すとして特徴付けられる。

10

【0036】

癌幹細胞は代わりに、生体試料等の源から単離され、濃縮され、又は精製されると記載され得る。別の例において、癌幹細胞は、CD133<sup>+</sup>発現に基づいて濃縮された細胞の集団を表す。別の例において、細胞の集団は、癌幹細胞を少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は95%含む。

【0037】

一例において、CD133発現細胞及び/又は癌幹細胞は、*in vivo*にある。別の例において、CD133発現細胞及び/又は癌幹細胞は、*in vitro*にある。更なる例において、CD133発現細胞及び/又は癌幹細胞は、対象から得られた生体試料中に存在する。アプタマーの結合は、好都合なあらゆる方法で検出されてよく、例えば、アプタマーを伴う標識を検出すること、アプタマーをイメージングすること、又は結合したアプタマーの量を決定することによる。適切な方法が、例えば、国際公開第2004/081574号に記載されている。

20

【0038】

別の例において、本開示のCD133発現細胞及び/又は癌幹細胞は、CD44、ABCG2、 $\alpha$ -カテニン、CD117、ALDH、VLA-2、CD166、CD201、IGFR、EpCAM、及びEGF1Rからなる群から個々に、又は一括して選択される1つ又は複数のマーカーを発現し得る。

【0039】

「個々に」が意味するところは、本開示が、列挙されたマーカー又はマーカーの群を別々に包含すること、そして、個々のマーカー又はマーカーの群が、本明細書中で別々に記載されていない場合があるにも拘らず、添付の特許請求の範囲が、そのようなマーカー又はマーカーの群を互いと別々に、且つ区別可能に定義し得ることである。

30

【0040】

「一括して」が意味するところは、本開示が、列挙されたマーカー若しくはマーカーの群のあらゆる数又は組合せを包含すること、そして、そのようなマーカー若しくはマーカーの群の数又は組合せが本明細書中に具体的に記載されていない場合があるにも拘らず、添付の特許請求の範囲が、マーカー又はマーカーの群のあらゆる他の組合せから別々に、且つ区別可能にそのような組合せ又は部分的組合せを定義し得ることである。

40

【0041】

別の例において、本開示の癌幹細胞は、脳癌幹細胞、転移性脳癌幹細胞、乳癌幹細胞、前立腺癌幹細胞、膵癌幹細胞、結腸癌幹細胞、肝癌幹細胞、肺癌幹細胞、卵巢癌幹細胞、皮膚癌幹細胞、又は黒色腫幹細胞である。

【0042】

本開示のアプタマーは、処置又は診断に用いられてよい。更に、DOXは、本来蛍光性であるので、治療及び診断のために同時に(すなわち、セラノスティック剤として)用いられ得る。

【0043】

本開示はまた、本開示のアプタマーを含む診断剤又はセラノスティック剤を提供する。一例において、アプタマーは、配列番号1、配列番号2、配列番号4、又は配列番号5のアブ

50

タマーである。別の例において、診断剤は、検出可能な標識と結合させた本開示のアプタマーを含む。一例において、診断剤は、*in vivo*又は*in vitro*でCD133発現癌幹細胞を検出するのに用いられる。一例において、セラノスティック剤は、アプタマー-Doxコンジュゲートである。

【0044】

本開示はまた、癌を有する、又は癌を有することが疑われる対象又は対象から得られた生体試料中のCD133発現細胞及び/又は癌幹細胞を同定又は検出する方法を提供し、当該方法は、細胞を、本明細書中に記載される診断剤又はセラノスティック剤と接触させる工程を含む。

【0045】

10

一例において、本開示の診断剤又はセラノスティック剤は、腫瘍を有する、又は腫瘍を有することが疑われる対象又は対象から得られた生体試料中のCD133発現細胞及び/又は癌幹細胞の存在を検出するために用いられてよい。必要であれば、検出は、検出可能な標識にアプタマーを結合させることによって促進されてよい。検出可能な標識の例として、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、電子高密度標識、MRI用の標識、及び放射性物質が挙げられる。

【0046】

本開示はまた、生体試料の組織学的検査に用いる、本明細書中に記載されるアプタマー、又は本明細書中に記載される診断剤を提供する。組織学的試料を調製する方法は、当業者によく知られているであろう。

20

【0047】

本開示のアプタマーは更に、活性がある部分構造であってよい部分構造に結合させてもよい。部分構造は、リガンド、例えば更なるアプタマー又は代替リガンドであってよい。部分構造は、免疫グロブリン、免疫グロブリンのフラグメント若しくは一部、治療剤、別の薬剤若しくは生理活性剤、毒素、又は放射性核種であってよい。代わりに、部分構造として、siRNA、DNAザイム、又はリボザイムが挙げられ得る。前述の部分構造のいずれの組合せも、本開示に含まれる。

【0048】

本開示はまた、本明細書中に記載されるアプタマーをコードする発現ベクターを提供する。配列番号1から配列番号5のうちのいずれか1つと相補的な、特に配列番号1から配列番号5のうちのいずれか1つと相補的なヌクレオチド配列もまた提供される。

30

【0049】

本開示はまた、それを必要とする対象において癌を処置する方法であって、対象に、本明細書中に記載されるアプタマー又はセラノスティック剤を与える工程を含む方法を提供する。処置される対象は、典型的には、本開示のアプタマー又はセラノスティック剤による処置から恩恵を受けるであろう対象である。一例において、対象は、癌を有すると診断されている。或いは、対象は、癌を有すると疑われており、その場合にセラノスティック剤を投与することが適切であり得る対象である。本明細書中に記載される部分構造と結合させた本開示のアプタマー、又は本明細書中に記載されるセラノスティック剤は、対象をモニターし且つ/又は処置するために、数週、数ヶ月、又は数年にわたって対象に投与されてよい。

40

【0050】

本開示の対象は、脳癌、乳癌、前立腺癌、膀胱癌、結腸癌、肝癌、肺癌、卵巣癌、皮膚癌、黒色腫、若しくは、CD133+細胞が存在する他のあらゆる癌から選択される癌を有する、又は有すると疑われる対象であってよい。一例において、癌は、CD133発現細胞及び/若しくは癌幹細胞が存在する、又は存在すると疑われるあらゆる癌である。

【0051】

本開示はまた、癌の検出又は診断用の診断試薬の製造における、本明細書中に記載されるアプタマーの使用を提供する。

【0052】

50

本開示はまた、対象において癌を処置するための医薬の製造における、本開示のアプタマー又は本開示のセラノスティック剤の使用を提供する。

【0053】

本開示はまた、医療における、本開示のアプタマー又は本開示のセラノスティック剤の使用を提供する。

【0054】

本開示はまた、対象において癌を処置するための、本開示のアプタマー、又は本開示のセラノスティック剤の使用を提供する。

【0055】

本開示はまた、本開示のアプタマー又はセラノスティック剤の治療的に有効な量を、医薬的に許容可能なキャリア及び/又は賦形剤と共に含む組成物を提供する。一例において、組成物は医薬組成物である。

【0056】

本明細書中に記載されるアプタマー、セラノスティック剤、又は組成物は、単独で、又は他の処置モダリティと組み合わせて用いてもよい。例えば、アプタマー又は医薬組成物は、放射線療法又は他の化学療法の剤と組み合わせて用いてもよい。理論に拘束されることを望むものではないが、放射線療法剤及び/又は化学療法剤は、典型的には癌幹細胞の後代細胞である迅速に分裂する細胞を主として標的とすることによって腫瘍を縮小するために用いることができると仮定される。本明細書中に記載されるアプタマー、セラノスティック剤、又は組成物は、腫瘍の部位に投与して、癌幹細胞を特異的に枯渇させることができる。したがって、本明細書中に記載されるアプタマーセラノスティック剤又は組成物は、放射線療法又は化学療法と共に用いてもよいし、化学療法又は放射線療法処置の後に用いてもよい。更に、本明細書中に記載されるアプタマー、セラノスティック剤又は組成物は、外科手術の後に残存した虞のあるあらゆる残存癌細胞を除去するために、腫瘍の切除術後に用いてもよい。

【0057】

別の例において、アプタマーは、リポソームの表面上に提供される。当該リポソームは、薬剤を含有してよい。適切な薬剤の例として、化学療法剤、免疫チェックポイント阻害剤(例えばPD-1)、抗生物質、免疫グロブリン若しくは抗体、ステロイド、又は鎮痛薬が挙げられる。

【0058】

アプタマー又はアプタマーを含む組成物は、当該技術において知られている方法によって、対象に投与されてよい。一例において、アプタマー又は組成物は、非経口的に、例えば静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、又は局所注射によって投与される。

【0059】

また、本明細書中に記載されるアプタマー、セラノスティック剤、又は組成物は、癌幹細胞上に存在する抗原を標的とする1つ又は複数のさらなるアプタマーと組み合わせられてよいと考えられる。

【0060】

本開示の各例は、対象において癌を処置、予防、又は改善する方法との関係で準用するととられるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】修飾CD133アプタマーへのDOXの予測されるインターカレーションの概略図である。(A)VIENNAソフトウェアによって決定されたアプタマーの二次構造(左)及びドキソルビシンの分子構造(右)。(B)二本鎖G-C対合との薬剤の高い親和性による、アプタマーとDOX間の考えられるインターカレーションの説明。

【図2】CD133RNA-DNAハイブリッドアプタマーへのDOXの予測されるインターカレーションの概略図である。(A)VIENNAソフトウェアによって決定されたアプタマーの二次構造(左)及びドキソルビシンの分子構造(右)。(B)二本鎖G-C対合との薬剤の高い親和性による、

10

20

30

40

50

アプタマーとDOX間の考えられるインターカレーションの説明。

【図3】蛍光強度とDOX濃度間の関係を決定した図である。DOXの種々の濃度が、蛍光強度を測定するために用いられた。示されるデータは、平均±SE、n=3である。

【図4】CD133アプタマー中へのDOXのインターカレーション後の蛍光消光(quenching)曲線である。コンジュゲートした後、アプタマー-Doxコンジュゲートを精製した。DOXの蛍光は、495nmの波長でのUV吸収によって決定された。示されるデータは、平均±SE、n=3である。

【図5】PBS中で3日にわたってコンジュゲートからDOXが放出された図である。吸光度(Y軸)は、透析カセット内で、DOX蛍光強度に相関する。強度が大きくなるにつれ、コンジュゲートからより多くのDOXが放出された。示されるデータは、平均±SE、n=3である。

【図6】CD133陰性HEK2932及びCD133陽性HT29細胞においてCD133アプタマー-Doxコンジュゲートの解離定数を決定した図である。結合は、蛍光標識化CD133アプタマー及びCD133アプタマー-Doxコンジュゲートを0~200nMに及ぶ濃度で用いて研究された。(A)陽性CD133アプタマー-Doxコンジュゲートで処置したHEK293T細胞株、(B)Doxコンジュゲートされたネガティブコントロールアプタマーで処置したHEK2932、(C)陽性CD133アプタマー(コンジュゲートされていない)で処置したHT29、及び(D)Doxコンジュゲートされた陽性CD133アプタマーで処置したHT29細胞。示されるデータは、平均±SE、n=3である。

【図7】CD133アプタマー-Doxコンジュゲートの解離定数の決定に用いられたCD133アプタマーである。(A)陽性CD133アプタマー-Doxコンジュゲート、(B)ネガティブコントロールCD133アプタマー-Doxコンジュゲートは、2'-フルオロ化学修飾の代わりに2'-O-メチル修飾であることを除いて、陽性アプタマーと同一の核酸配列を有し、CD133への結合を無効にする三次元構造の変更をもたらす、そして(C)コンジュゲートされていない陽性CD133アプタマー。

【図8】内在化されたDOX及びアプタマーを共焦点顕微鏡検査した図である。(A~C)陽性CD133HT29細胞株。(A)CD133アプタマー。(B)CD133アプタマー-Doxコンジュゲート。(C)ネガティブコントロールアプタマー-Doxコンジュゲート。(D)CD133アプタマー-Doxコンジュゲートとインキュベートされたネガティブコントロール細胞株HEK293T。(E)遊離DOXとインキュベートされたHT29細胞株。スケールバー=20 µm。

【図9】DOX及びアプタマーの内在化の共焦点顕微鏡検査評価に関する処置の図である:(a)CD133アプタマー、(b)CD133アプタマー-Doxコンジュゲート、及び(c)遊離DOXとインキュベートされたネガティブコントロール。

【図10】腫瘍塊(Tumoursphere)サイズである。96ウェルプレートにおける500細胞由来の塊が測定された。細胞は、塊コントロール培地、遊離DOX、及びアプタマー-Doxコンジュゲート中でコンディショニングされた。塊サイズの減少は、コントロールとコンジュゲート間で、全3濃度において見られた(P<0.01)。示されるデータは、平均±SE、n=3である。

【図11】様々な条件内の様々な細胞濃度にて形成される塊の数によって測定された塊形成の図である。1 µMは50細胞にて変化を示さなかったが、10細胞にてコントロールとコンジュゲート形成で明確な差異を示した(P<0.01)。従来の薬剤及び新規の薬剤の濃度を高めると、コントロールとコンジュゲート間で塊形成の障害がより大きくなる(P<0.001)。この効果は、濃度が2 µMに増大すると、50細胞にて見られた(P<0.001)。これらの全てにおいて、CD133アプタマー-Doxコンジュゲートは、遊離DOXと比較して、腫瘍塊障害の差異が有意である(P<0.01)。

【図12】6ウェルのウルトラローアタッチメントプレート(ultralow attachment plate)を用いて腫瘍塊を視覚化した図である。

【発明を実施するための形態】

【0062】

一般的な技術及び選択された定義

用語「及び/又は」、例えば、「X及び/又はY」は、「X及びY」又は「X又はY」のいずれかを意味すると理解されるものとし、双方の意味又はいずれか一方の意味への明確な支持

10

20

30

40

50

を与えらるものとされるものとする。

【0063】

本明細書中に含まれた文献、行為、材料、装置、物品等のあらゆる議論は、これらの物質のいずれか又は全てが、本出願の各請求項の優先日前に存在したとして、先行技術の基礎の一部を形成する、又は、本開示に関連する分野において共通の一般的知識であったという承認としてとられるべきでない。

【0064】

本明細書の全体を通じて、特に具体的に述べられない限り、又は文脈上別段の解釈を要しない限り、単一の工程、物質組成物、工程の群、又は物質組成物の群への言及が、工程、物質組成物、工程の群、又は物質組成物の群の1つ及び複数(すなわち、1つ又は複数)を包含するととられるものとする。

10

【0065】

本明細書中に記載される各例は、特に具体的に述べられない限り、本開示の他の各例及びあらゆる例に、必要な修正をして適用されてよい。

【0066】

当業者は、本開示が、具体的に記載される以外の変形及び修飾の影響を受け易いと理解するであろう。本開示は、そのような全ての変形及び修飾を含むと理解されるべきである。本開示はまた、本明細書において言及され、又は示される工程、特徴、組成物、及び化合物の全てを、個々に、又は一括して、そして前記工程若しくは特徴の任意の組合せ、及び全ての組合せ、又は任意の2つ以上を含む。

20

【0067】

本開示は、本明細書中に記載される具体例による範囲に限定されるべきでない。それらの具体例は、例示を目的とするだけである。機能的に同等の産物、組成物、及び方法は、明らかに本開示の範囲内である。

【0068】

本開示は、特に示されない限り、分子生物学、組換えDNA技術、細胞生物学、及び免疫学の従来の技術を用いて、過度の実験なく実行される。そのような手順は、例えば、Sambrook, Fritsch及びManiatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories社、New York、第2版(1989)、全I、II、及びIII巻; DNA Cloning: A Practical Approach、I及びII巻(D. N. Glover編、1985)、IRL Press社、Oxford、全テキスト; Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (M. J. Gait編、1984) IRL Press社、Oxford、全テキスト、特にその中の論文Gait、1-22頁; Atkinsonら、35-81頁; Sproatら、83-115頁; 及びWuら、135-151頁; 4. Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (B. D. Hames及びS. J. Higgins編、1985) IRL Press社、Oxford、全テキスト; Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach (1986) IRL Press社、Oxford、全テキスト; Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Methods In Enzymology (S. Colowick及びN. Kaplan編、Academic Press社)、全シリーズ、Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E.L及びFenichel, R.L. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 73 336-342; Merrifield, R.B. (1963). J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154; Barany, G.及びMerrifield, R.B. (1979), The Peptides (Gross, E.及びMeienhofer, J.編)、2巻、1-284頁、Academic Press社、New York. 12. Wuensch, E.編(1974) Synthese von Peptiden, Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie (Mueler, E.編)、15巻、第4版、1及び2部、Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag社、Heidelberg; Bodanszky, M.及びBodanszky, A. (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag社、Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25, 449-474; Handbook of Experimental Immunology、I-IV巻(D. M. Weir及びC. C. Blackwell編、1986、Blackwell Scientific Publications社); 並びにAnimal Cell Culture: Practical Approach、第3版(John R. W. Masters編、2000)、ISBN 0199637970、全テキストに記載されている。

30

40

【0069】

50

本明細書の全体を通じて、文脈上別段の解釈を要しない限り、文言「含む(comprise)」、又は「含む(comprises)」若しくは「含んでいる(comprising)」等の変形は、述べられた工程、要素若しくは整数、又は工程、要素若しくは整数の群の包含を意味するが、他のあらゆる工程、要素若しくは整数、又は工程、要素若しくは整数の群の排除を意味しないと理解されよう。

【0070】

用語「からなる」又は「からなっている」は、方法、プロセス、又は物質組成物(例えばアプタマー配列)が、列挙される工程及び/又は成分を有するが、さらなる工程も成分も有しないことを意味すると理解されるものとする。

【0071】

本明細書中で用いられる核酸配列の文脈において、用語「から本質的になる」又は「から本質的になっている」は、非網羅的に解釈されるべきであり、ヌクレオチド配列であって、さらなるヌクレオチド塩基が存在してよく、前記さらなる塩基が、総ヌクレオチド配列の約10%以下を構成する、ヌクレオチド配列を意味すると理解される。

【0072】

質量、時間、用量その他の量等の測定可能な値に言及する場合に本明細書中で用いられる用語「約」は、指定された量から $\pm 20\%$ 又は $\pm 10\%$ 、より好ましくは $\pm 5\%$ 、更により好ましくは $\pm 1\%$ 、より一層好ましくは $\pm 0.1\%$ の変動を包含することを意味する。

【0073】

本明細書中で用いられる用語「アプタマー」又は「オリゴヌクレオチドアプタマー」は、一般に、単一の定義された配列のオリゴヌクレオチド、又は前記オリゴヌクレオチドの混合物のいずれかを指し、混合物は、CD133に特異的に結合する性質を保持する。本明細書中で用いられる「アプタマー」は、一本鎖の核酸を指す。構造的に、本開示のアプタマーは、特異的に結合するオリゴヌクレオチドである。アプタマーは、RNA、DNA、又はRNA及びDNAの双方を含んでよい。アプタマーは、当該技術で知られている方法を用いて、合成的に生産されてよい。代わりに、アプタマーは、組換えにより生産されてよい。

【0074】

本明細書中で用いられる用語「オリゴヌクレオチド」は、ポリデオキシリボヌクレオチド(2'-デオキシ-D-リボース又はその修飾された形態を含有する)、すなわちDNA、ポリリボヌクレオチド(Dリボース又はその修飾された形態を含有する)、すなわちRNA、及びプリン若しくはピリミジン塩基、又は修飾プリン若しくはピリミジン塩基のN-グリコシド又はC-グリコシドである他のあらゆるタイプのポリヌクレオチド、或いは脱塩基ヌクレオチドの総称である。本開示に従えば、用語「オリゴヌクレオチド」は、従来の塩基、糖残基、及びヌクレオチド間の連結を有するものだけでなく、これらの3つの部分構造のいずれか、又は全ての修飾を含有するものも含む。

【0075】

本明細書中で用いられる用語「CG対形成ヌクレオチド」は、二本鎖構成で存在する場合の相補的なC及びGヌクレオチドの塩基対を指すと理解される。例えば、単一のCG対形成ヌクレオチドは、相補鎖上のGと対形成されている元の鎖(ne strand)の塩基のCに相当する。4CG対形成ヌクレオチドは、CGCG又はGCGCが、一方の鎖上に直鎖状配列で存在し、且つ相補鎖上の相補的配列GCGC又はCGCGと塩基対形成されている構成を指す。

【0076】

本明細書中で用いられる用語「CpG部位」は、塩基の直鎖状配列においてその全長に沿ってシトシンヌクレオチドがグアニンヌクレオチドの隣に起こるDNAの領域を指すと理解される。用語CpGは、C-リン酸-G、すなわち、1つのリン酸のみによって分離されたシトシン及びグアニンの省略である。CpG表記は、シトシン及びグアニンのCG塩基対形成から直鎖状配列を区別するのに用いられる。

【0077】

本明細書中で用いられる用語「RNA-DNAハイブリッドアプタマー」は、リボヌクレオシドユニット及びデオキシリボヌクレオシドユニット又は塩基を含むアプタマーである。

10

20

30

40

50

## 【0078】

本明細書中で用いられる用語「ピリミジン」は、シトシン(C)、チミジン(T)、又はウラシル(U)塩基を指す。チミン(T)は通常、DNAにおいて見出されるが、RNAにおいて現れる場合がある。シトシンはRNA及びDNAの双方において見出され、ウラシルは通常、RNAにおいて見出されるが、DNAにおいて現れる場合がある。

## 【0079】

本明細書中で用いられる用語「結合親和性」は、標的に結合する、又は標的に結合しないアプタマーの傾向を指すことが意図され、標的に結合するアプタマーの結合の強度又は親和性の尺度を記載する。前記相互作用のエネルギー論は、「結合親和性」において重要である。なぜなら、相互作用するパートナーの必須濃度、その濃度にてこれらのパートナーが会合することができる速度、並びに溶液中の結合分子及び遊離分子の相対濃度を定義するからである。エネルギー論は、とりわけ、解離定数 $K_d$ の決定によって、本明細書中で特徴付けられる。当該技術において知られているように、低い解離定数は、分子の互いの結合及び親和性がより強いことを示す。

10

## 【0080】

本明細書中で用いられる用語「生体試料」は、対象由来の細胞、細胞集団、又はある量の組織若しくは流体を指す。最も多くの場合、試料は対象から取り出されたものであるが、用語「生体試料」は、*in vivo*分析される細胞又は組織も指し得、すなわち対象から取り出されない。多くの場合、「生体試料」は、対象由来の細胞を含有することとなる。本開示において、「生体試料」は、CD133発現細胞を含むこととなる。生体試料として、限定されないが、組織生検、ニードル生検、スクレイプ(例えば口内スクレイプ)、全血、血漿、血清、リンパ、骨髓、尿、唾液、痰、細胞培養体、胸水、心嚢水、腹水、又は脳脊髄液が挙げられる。生体試料としてまた、組織生検及び細胞培養体が挙げられる。生体試料又は組織試料は、個体から単離された組織又は流体の試料を指してよく、限定されないが、例えば、血液、血漿、血清、腫瘍生検、尿、糞便、痰、髄液、胸水、乳頭吸引液、リンパ液、皮膚、呼吸器、腸、及び尿生殖器管の外側部、涙液、唾液、乳、細胞(血球を含むが、限定されない)、腫瘍、臓器、並びに*in vitro*細胞培養構成成分の試料が挙げられる。一部の実施形態において、試料は、原発性腫瘍若しくは転移性腫瘍、又は胸水由来の細胞ブロック(cellblock)の切除、気管支鏡検査生検、又はコアニードル生検由来である。また、穿刺吸引試料が用いられてもよい。試料は、パラフィン包埋組織であっても凍結組織であってもよい。試料は、細胞の試料を対象から取り出すことによって得られてよい。

20

30

## 【0081】

用語「少なくとも1つの部分構造の付加を可能とするのに十分な」は、幅広い解釈が与えられるべきである。当該用語は、直接的な付加若しくは結合、非直接的な付加若しくは結合(例えば共有結合又は静電相互作用)、又は可逆的包含(reversible inclusion)若しくは挿入(例えばインターカレーション)を包含する。別の例において、付加はコンジュゲーションによる、又はリンカーの使用による。

## 【0082】

本明細書中で用いられる用語「と結合させた」は、アプタマーが、本明細書中に記載される3'若しくは5'ターミナル剤(例えばinvdT)、又は本明細書中に記載される部分構造に連結されている、付加されている、又は繋がれているあらゆる構造を包含することが意図される。

40

## 【0083】

用語「実質的に同じ能力を有する」は、アプタマーが、本開示のアプタマーの、CD133上のエピトープへの結合を競合的に阻害することができることを意味すると理解される。アプタマーが、本開示のアプタマーの、CD133への結合を競合的に阻害することができるかを判定する方法が、当該技術において知られている競合結合アッセイを含んでよい。

## 【0084】

本明細書中で用いられる用語「単離された」は、(例えば、SELEX法を用いて)アプタマーを生成且つ精製するプロセス中に存在し得る他の成分又は化学物質から精製されたアプ

50

タマーを指すことが意図される。細胞の文脈において、当該用語はまた、それが自然に生じ得る環境中の他の成分から単離可能な、又は精製された細胞を指す。単離された細胞は、その自然に得られ得る状態に対して、任意の程度にまで精製され得る。

【0085】

用語「免疫グロブリンのフラグメント」は、「抗原結合フラグメント」と互換的に用いられ得、無傷抗体の1つ又は複数の可変領域を指すと理解される。抗体フラグメントの例として、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>及びFvフラグメント；二機能性抗体；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子、及び抗体フラグメントから形成された多特異的抗体が挙げられる。

【0086】

本明細書中で用いられる用語「治療的に有効な量」は、本開示のアプタマー又は医薬組成物の、CD133発現癌幹細胞の数を減らす、且つ/又は癌の1つ若しくは複数の徴候を和らげるのに十分な量を意味するととられるものとする。当業者は、そのような量が、例えば、特定の対象、及び/又は疾患のタイプ、重篤度若しくはレベルに応じて変わることとなることに気付くであろう。当該用語は、本開示を特定のアプタマー量に限定するものと解釈されるべきでない。

【0087】

本明細書中で用いられる用語「処置する」、「処置」又は「処置している」は、本明細書中に開示されるアプタマー又は医薬組成物の治療的に有効な量を投与すること、そして癌を伴う、又は癌によって引き起こされる臨床状態の少なくとも1つの症状を和らげることを意味すると理解されるものとする。

【0088】

本明細書中で用いられる用語「特異的に結合する」は、アプタマーが、代替の細胞若しくは物質と反応又は会合するよりも頻繁に、迅速に、持続期間が長く、且つ/又は親和性が大きく、特定の細胞若しくは物質と反応又は会合することを意味するととられるものとする。例えば、標的タンパク質に特異的に結合するアプタマーは、無関係なタンパク質及び/若しくはエピトープ又はその免疫原性フラグメントに結合するよりも親和性、アビディティが大きく、容易に、且つ/又は持続期間が長く、タンパク質若しくはエピトープ又はその免疫原性フラグメントに結合する。また、この定義を読むことによって、例えば、第1の標的に特異的に結合するアプタマーが、第2の標的に特異的に結合してもよいし結合しなくてもよいと理解される。したがって、「特異的結合」は、別の標的の排他的な結合又は検出不能な結合を必ずしも必要とするというわけではなく、これは、用語「選択的結合」によって包含される。通常、必ずではないが、結合への言及は、特異的結合を意味する。結合の特異性は、アプタマー、及び環境中の他の物質又は一般に無関係な分子に関する解離定数(Kd)と比較した、標的に対するアプタマーの、比較上の解離定数の観点から定義される。典型的に、標的に対するアプタマーのKdは、標的、及び環境中の無関係な物質又は付随する物質に関するKdよりも2倍、5倍又は10倍小さいであろう。更により好ましくは、Kdは50倍、100倍又は200倍小さいであろう。

【0089】

用語「選択的結合」は、マーカー、又は細胞上に発現された抗原への、アプタマーの排他的結合又は検出不能な結合を意味するととられるものとする。マーカー又は抗原は、CD133以外である。

【0090】

本明細書中で用いられる用語「CD133<sup>+</sup>」又は「CD133発現細胞」は、互換的に用いられ得る。当該用語は、任意の適切な手段によって検出され得るCD133抗原の細胞表面発現を包含する。一例において、細胞が、与えられたマーカーについて陽性であることへの言及は、マーカーが細胞表面上に存在する程度に応じて、マーカーの低い(10又は暗い)発現因子又は高い(明るい、bri)発現因子のいずれかであり得ることを意味する。用語は蛍光の強度に関する。

【0091】

本明細書中で用いられる用語「セラノスティックである」又は「セラノスティック剤」

10

20

30

40

50



は、診断機能及び治療機能の双方を組み込むアプタマーを意味すると理解される。そのような実体は、同時の標的薬剤の送達及び放出、並びに、疾患進行及び治療に対する反応をモニターすることを含む診断に用いられ得る。より詳細には、本開示のセラノスティック剤は、化学療法分子、例えばドキソルピシンが、アプタマーにコンジュゲートして、アプタマー-Doxコンジュゲートを形成しているものである。用語「アプタマー-Doxコンジュゲート」は、図1に示されるように、1つ又は複数のドキソルピシン分子がアプタマーシステム配列内にインターカレートされている、本開示のCD133アプタマーを指すと理解される。

#### 【0092】

本明細書中で用いられる用語「対象」は、ヒト対象又は非ヒト対象を含めたあらゆる対象を意味するととられるものとする。非ヒト対象として、非ヒト霊長類、有蹄動物(ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、緩衝液ロー、及びバイソン)、イヌ、ネコ、ウサギ(ラビット、ノウサギ、及びナキウサギ)、齧歯類(マウス、ラット、モルモット、ハムスター、及びスナネズミ)、鳥類、及び魚類が挙げられ得る。一例において、対象はヒトである。

#### 【0093】

##### アプタマー

アプタマーは、いくつかの固有の性質により、幅広い分子生物学用途に用いられる、潜在的医薬剤としての魅力的なツールとなる。第一に、殆どのアプタマーは、高い親和性で標的に結合し、ピコモルからナノモルの範囲の典型的な解離定数が実証される。アプタマーの結合部位は、標的分子の裂け目(cleft)及び溝(groove)を含み、拮抗活性が、現在入手可能な多くの医薬剤と非常に類似する。第二に、アプタマーは、広範囲の温度及び保存条件の全体にわたって構造的に安定し、その固有の三次構造を形成する能力が維持される。第三に、アプタマーは、モノクローナル抗体を産生するのに必要とされる高価で作業集約的な生物系と対照的に、化学的に合成され得る。

#### 【0094】

理論に拘束されることを望むものではないが、RNAアプタマーは一般に、その標的タンパク質に対するRNAアプタマーの理論的に高い親和性、及び非修飾RNAよりも大きい修飾RNAの血漿安定性のため、多くのグループによって好まれる。

#### 【0095】

本明細書中に開示されるのは、癌を処置する化学療法分子等の剤の効果的な細胞内送達に用いられ得る、CD133抗原に特異的に結合するアプタマー分子である。本開示のそのようなアプタマー分子は、治療剤、診断剤、及びセラノスティック剤として特に有用である。

#### 【0096】

アプタマーは、特定の標的分子、例えばタンパク質又は小分子に結合する一本鎖オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体である。ゆえに、アプタマーは、オリゴヌクレオチドによる、抗体の類似体である。一般に、アプタマーは、約15から約100ヌクレオチド、好ましくは約15から約40ヌクレオチド、より好ましくは約20から約40ヌクレオチドを含み、これらの範囲内に入る長さのオリゴヌクレオチドは、従来技術によって調製され得る。

#### 【0097】

アプタマー結合は、アプタマーオリゴヌクレオチドによって形成される二次構造にかなり依存する。RNAアプタマー及び一本鎖DNA(又は類似体)アプタマーの双方が知られている。例えば、Burkeら(1996)、J. Mol. Biol. 264:650-666; Ellington及びSzostak (1990)、Nature 346:818-22; Hiraoら(1998)、Mol Divers. 4:75-89; Jaegerら(1998)、EMBO Journal 17:4535; Kenschら(2000)、J. Biol. Chem 275:18271-8; Schneiderら(1995)、Biochemistry 34:9599-9610;並びに米国特許第5773598号;米国特許第6028186号;米国特許第6110900号;米国特許第6127119号;及び米国特許第6171795号参照。

#### 【0098】

本開示のアプタマーとして、アプタマーの結合(すなわち、ループ)領域がRNAであり、ステム領域がDNAであるハイブリッドRNA/DNAアプタマーが挙げられる。理論に拘束される

10

20

30

40

50

ことを望むものではないが、DNAステム領域は、二本鎖DNA CG対に対する分子の高い親和性により、ドキシソルピシン等の分子のインターカレーションのための部位を提供すると考えられる。

#### 【0099】

##### アプタマー生成

本開示のアプタマーを調製する種々の方法が、当業者によく知られているであろう。Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment、「SELEX(商標)」は、例えば米国特許第5,475,096号及び米国特許第5,270,163号、並びに国際出願PCT/US91/04078号(それぞれ、参照によって本明細書中に具体的に組み込まれる)に記載される、所望されるあらゆる標的用の核酸リガンドを製造する方法である。

10

#### 【0100】

SELEX(商標)技術は、核酸が、種々の二次元構造及び三次元構造を形成する十分な能力、並びにそのモノマー内の利用可能な、リガンド(サイズが大きいにせよ小さいにせよ実質的にあらゆる化合物である)として作用する(すなわち、特異的結合対を形成する)のに十分な化学的汎用性を有するという事実に基づいている。

#### 【0101】

当該方法は、結合親和性及び選択性の実質的にあらゆる所望の基準を達成するための、同じ一般的な選択テーマを用いた、候補の混合物からの選択、及び構造向上の段階的反復(step-wise iterations)を含む。ランダムな配列のセグメントを好ましくは含む、核酸の混合物から出発して、SELEX(商標)法は、結合に好都合な条件下で混合物を標的と接触させる工程と、標的分子に結合した核酸から、結合しなかった核酸を分画する工程と、核酸-標的対を解離させる工程と、核酸のリガンドが濃縮された混合物を与えるために、核酸-標的対から解離させた核酸を増幅する工程と、その後、結合工程、分画工程、解離工程、及び増幅工程を、所望されるサイクル数繰り返す工程を含む。

20

#### 【0102】

可能性のある多数の配列及び構造を含有する核酸混合物内の、与えられた標的に対する結合親和性は広範囲である。例えば、ランダムな20のヌクレオチドセグメントを含む核酸混合物は、 $4^{20}$ の候補可能性を有し得る。標的に対する親和定数がより高いものが、標的に結合する可能性が最も高い。分画、解離、及び増幅の後、第2の核酸混合物が生じ、より高い結合親和性候補が濃縮される。選択のさらなるラウンドによって、最も良いリガンドを次第に有利になり、結果として生じる核酸混合物が、1つのみ、又は少数の配列で支配的に構成される。これらはその後、純粋なリガンドとして、クローニングされ、配列決定され、且つ結合親和性について個々に試験されてよい。

30

#### 【0103】

所望の目標が達成されるまで、選択及び増幅のサイクルが繰り返される。最も一般的な場合において、サイクルの繰返しに関して結合強度の顕著な向上が達成されなくなるまで、選択/増幅は続けられる。当該方法は、約 $10^{18}$ もの異なる核酸種を試すのに用いられ得る。試験混合物の核酸は好ましくは、ランダムな配列部分だけでなく、効率的な増幅に必須の保存配列も含む。ランダムな核酸配列の合成、及びランダムに切断された細胞核酸からのサイズ選択を含むいくつかの方法で、核酸配列変異体が生産されてよい。可変的な配列部分は、完全に、又は部分的にランダムな配列を含有してよい;また、ランダムな配列が組み込まれた保存配列のサブ部分を含有してもよい。試験核酸における配列変動が、選択/増幅の反復前又は反復中に、突然変異誘発によって導入されてもよいし、増大してもよい。

40

#### 【0104】

選択中のアプタマー候補の濃縮は、Shigdar Sら(2013) Cancer Letters 330:84-95に記載されるように、制限酵素断片長多型(RFLP)及びフローサイトメトリを用いてモニターしてもよい。

#### 【0105】

##### アプタマーの結合親和性

50

結合親和性は、分子の互いとの結合又は親和性の強度の尺度を記載する。標的及び他の分子に関する本明細書中のアプタマーの結合親和性は、 $K_d$ の観点から定義される。解離定数は、当該技術において知られている方法によって決定され得、例えば、Caceci, M.ら、Byte (1984) 9:340-362に記載されるような方法によって、複雑な混合物であっても算出され得る。解離定数を測定する例が、例えば、表面プラスモン共鳴分析を記載する米国特許第7602495号、並びに米国特許第6562627号及び米国特許出願公開第2012/00445849号に記載されている。別の例において、 $K_d$ は、例えばWong及びLohman、(1993). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90、5428-5432によって開示される二重フィルターニトロセルロースフィルター結合アッセイを用いて確立される。アプタマーの結合親和性を決定する方法はまた、例えば、Stoltenburg Rら(2005) Anal Bioanal Chem 383:83-91、Tran DTら(2010) Molecules 15、1127-1140、及びCho Mら(2013) PNAS 110(46): 18460-18465に記載されている。

10

#### 【0106】

しかしながら、一部の小さなオリゴヌクレオチドについて、 $K_d$ の直接的な決定が困難であり、誤解を招く程高い結果に至る虞があることが観察された。この状況下では、標的分子又は他の候補物質についての競合結合アッセイが、標的又は候補に結合することが知られている物質に対して行われてよい。50%の阻害が起こる濃度の値( $K_i$ )は、理想的な条件下で、 $K_d$ に等しい。しかしながら、いかなる場合も、 $K_i$ は $K_d$ よりも小さくならない。ゆえに、 $K_i$ の決定は、択一的に、 $K_d$ の値について最大値を設定する。技術的な困難が $K_d$ の正確な測定を妨げる状況下で、 $K_i$ の測定が好都合に代用されて、 $K_d$ の上限が与えられてよい。 $K_i$ 値はまた、本開示のアプタマーがCD133に結合することを確認するのに用いられてもよい。

20

#### 【0107】

##### アプタマー安定性の向上

ホスホジエステルの形態のオリゴヌクレオチドが、所望の効果が顕在化する前に、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼ等の細胞内酵素及び細胞外酵素によって体液中で急速に分解する虞があるという点で、治療薬としての核酸の使用における1つの潜在的問題に直面した。本開示はまた、ヌクレアーゼ消化からの保護等の、アプタマーの1つ又は複数の特性を向上させるように設計された、本明細書中に記載される類似体、及び/又はさらなる修飾を含む。

30

#### 【0108】

本開示において考えられるオリゴヌクレオチドアプタマーの修飾として、限定されないが、さらなる電荷、分極性、疎水性、水素結合、静電相互作用、及びフラクショナルリティーを組み込む他の化学基を、核酸リガンド塩基又は核酸リガンド全体に提供する修飾が挙げられる。

#### 【0109】

また、ヌクレアーゼに耐性を示すオリゴヌクレオチドアプタマーをもたらし修飾として、1つ又は複数の、ヌクレオチド間の連結の代用、糖の変更、塩基の変更、又はそれらの組合せも挙げられ得る。そのような修飾として、2'-位糖修飾、5'-位ピリミジン修飾、8'-位プリン修飾、環外アミンでの修飾、4-チオウリジンの置換、5-プロモ又は5-ヨード-ウラシルの置換、骨格修飾、ホスホロチオエート又はアルキルリン酸エステル修飾、メチル化、通常でない塩基対組合せ、例えばイソ塩基イソシチジン及びイソグアノシン;3'及び5'修飾、例えばキャッピング;高分子量の非免疫原性化合物へのコンジュゲーション;親油性化合物へのコンジュゲーション;並びにリン酸骨格修飾が挙げられる。

40

#### 【0110】

一例において、本開示のアプタマーにコンジュゲートする非免疫原性の高分子量化合物は、ポリアルキレングリコール、好ましくはポリエチレングリコールである。一例において、骨格修飾は、リン酸骨格中への1つ又は複数のホスホロチオエートの組込みを含む。別の例において、本開示のアプタマーは、リン酸骨格中への10未満、6未満、又は3未満のホスホロチオエートの組込みを含む。

50

## 【0111】

適切な場合には、さらなる修飾として、以下の、2'-デオキシ、2'-ハロ(2'-フルオロを含む)、2'-アミノ(好ましくは、非置換、1置換、又は2置換)、2'-モノ-、ジ-又はトリ-ハロメチル、2'-O-アルキル、2'-O-ハロ-置換アルキル、2'-アルキル、アジド、ホスホロチオエート、スルフヒドリル、メチルホスホネート、フルオレセイン、ローダミン、ピレン、ピオチン、キサンチン、ヒポキサンチン、2,6-ジアミノプリン、6-位にて硫黄と、又は5位にてハロ若しくはC15アルキル基と置換された2-ヒドロキシ-6-メルカプトプリン及びピリミジン塩基、脱塩基リンカー、3'-デオキシ-アデノシン及び他の利用可能な「鎖ターミネータ」又は「伸長不能」類似体(RNAの3'-末端にて)、或いは32P、33P等の標識の少なくとも1つが挙げられ得る。前述の全ては、本明細書中に開示される標準的な合成技術を用いてアプタマー中に組み込まれ得る。

10

## 【0112】

## アプタマーの有用性

本開示のアプタマー分子は、標的分子(例えば、癌幹細胞を有するCD133)を分離且つ精製するための親和性リガンドとして、標的分子(例えば、癌幹細胞を有するCD133)を追跡、モニター、検出、且つ定量化するための、又は、治療効果を達成するために、生理的に関連する反応を阻害、許容、活性化、若しくは触媒するためのプローブとして、用いられ得る。これらは、医薬剤として作用し、特定の標的に結合し、且つ特定の分子を所望される部位へと導くことができる。

## 【0113】

20

本開示のアプタマー分子は、in vitroプロセスに、例えば、標的分子(例えば、癌幹細胞を有するCD133)を精製するためのアフィニティ精製混合物に用いられてよい。アプタマーは、混在物からの標的分子(例えば、癌幹細胞を有するCD133)のクロマトグラフィー分離に、そして細胞培養体又は細胞抽出物からの標的分子の精製に理想的である。

## 【0114】

一例において、本開示のアプタマー分子は、標的(例えば、癌幹細胞を有するCD133)を固相支持体に結合又は固定させるための捕捉剤として用いられてよい。固相支持体は、フィルター、ウエハー、ウエハーチップ、膜、及び薄膜を一般的に伴う構造及び組成を有する基質から構成されてよい。しかしながら、固相支持体は、診断、検出、又は定量研究用の試薬を捕捉若しくは固定するために、限定されないが、樹脂、親和性樹脂、磁気、若しくはポリマービーズを含めた、基質、又は診断に役立つあらゆる検出試薬から構成され得ると考えられる。

30

## 【0115】

固相支持体は、所望の用途に応じたあらゆる材料を含んでよく、限定されないが、ガラス、金属表面及び金属材料、例えばスチール、セラミック、若しくはポリマー材料、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、及びポリフッ化ビニリデン等、又はそれらの組合せが挙げられる。

## 【0116】

## CD133抗原

AC133として当初知られていたCD133は、糖タンパク質(Prominin 1としても知られている)である。これは、細胞突起に特異的に局在するペントスパン膜貫通糖タンパク質のメンバーである。CD133は、造血幹細胞、内皮前駆細胞、神経膠芽腫、ニューロン幹細胞及びグリア幹細胞、カリエス小児脳腫瘍(carious pediatric brain tumor)、並びに成体の腎臓、乳腺、気管、唾液腺、胎盤、消化管、精巣、及び他の細胞型において発現される。

40

## 【0117】

## CD133発現癌幹細胞への結合

幹細胞の分化による成体細胞再生の最もよく知られている例は、造血系である。造血幹細胞及び前駆細胞等の発生的に未熟な前駆体は、分子シグナルに応答して、変化に富む血液細胞型及びリンパ球様細胞型を徐々に形成する。幹細胞は、上皮組織及び間葉組織を含めた、他の組織においても見出される。癌幹細胞は、例えば、正常な幹細胞における遺伝

50

的障害の結果として、又は、幹細胞及び/若しくは分化細胞の調節異常増殖によって、これらのいずれの細胞型からも生じ得る。

【0118】

癌幹細胞は、腫瘍形成性の幹細胞、すなわち、大規模に、又は際限なく増殖する能力を有し、大部分の癌細胞を生じさせる細胞を含む任意の癌に由来し得る。定着腫瘍内で、殆どの細胞は、大規模に増殖し新たな腫瘍を形成する能力を失い、ほんの一部の癌幹細胞が、増殖することによって癌幹細胞を再生するだけでなく、腫瘍形成能力が欠如した腫瘍細胞を生じさせる。癌幹細胞は、非対称的に、且つ対称的に分裂し得、そして可変的な増殖速度を示し得る。癌幹細胞は、幹細胞の性質を再び得たTA(transit amplifying)細胞又は前駆細胞を含み得る。

10

【0119】

幹細胞が単離され得る代表的な癌として、固形腫瘍によって特徴付けられる癌が挙げられ、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉種、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、滑膜腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、膵癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌腫、基底細胞癌腫、腺癌腫、汗腺癌腫、脂腺癌腫、乳頭癌腫、乳頭腺癌腫、嚢胞腺癌腫、骨髄癌腫、気管支癌腫、腎細胞癌腫、肝癌、胆管癌腫、絨毛膜癌腫、精上皮腫、胎児性癌腫、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌腫、小細胞肺癌腫、膀胱癌腫、上皮癌腫、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、及び網膜芽腫が挙げられる。

20

【0120】

本開示に従って幹細胞が単離又は濃縮され得るさらなる代表的な癌として、造血悪性腫瘍、例えばB細胞リンパ腫及び白血病が挙げられ、低悪性度/濾胞状非ホジキンリンパ腫(NHL)、小リンパ球性(SL)NHL、中悪性度/濾胞状NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽球性NHL、高悪性度非切断小細胞NHL、巨大病変NHL、及びワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症、慢性白血球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、単球性白血病、骨髄性白血病、及び前骨髄球性白血病が挙げられる。

【0121】

CD133を有する癌幹細胞が、本明細書中に記載されるアプタマー分子を用いて選択され得る。例えば、蛍光色素と結合させたアプタマーが、癌幹細胞のポジティブ選択に用いられてよい。CD133はまた、一部の正常な細胞において発現されることも知られている。しかしながら、CD133発現は、癌幹細胞においてアップレギュレートされると考えられている。癌幹細胞マーカーは典型的に、同じ起源の分化細胞又は非腫瘍形成性細胞よりも少なくとも約5倍多い、例えば、少なくとも約10倍高い、少なくとも約15倍高い、少なくとも約20倍高い、少なくとも約50倍高い、又は少なくとも約100倍高いレベルで発現される。選択プロセスはまた、癌幹細胞でない、集団中の癌細胞の除去のために用いられ得るネガティブ選択マーカーを含んでもよい。

30

【0122】

本開示を実行する際に、CD133を有する細胞の分離が、いくつかの異なる方法によってもたらされてよいことが理解されよう。例えば、本開示のアプタマーは、固相支持体に付加してよく、粗分離が可能となる。有効性が異なる種々の技術が、分離の効率、関連する細胞毒性、実行の簡便性及び速度、並びに洗練された装置及び/又は技術力の必要性に応じて、利用されてよい。単離又は精製のための手順として、限定されないが、アプタマーコーティングされた磁気ビーズを用いた磁気分離、親和性クロマトグラフィー、及び固相マトリックスに付加したアプタマーによる「パニング」が挙げられ得る。正確な単離又は精製を提供する技術として、限定されないが、FACSが挙げられる。FACSを準備する方法は、当業者に明らかであろう。

40

【0123】

CD133発現癌幹細胞の濃縮

50

本開示のアプタマーは、対象から得られた生体試料由来の癌幹細胞を濃縮するのに用いられてよい。典型的に、対象は、腫瘍を有する、又は癌幹細胞を含有する腫瘍を有することが疑われる対象である。用語「濃縮された」若しくは「濃縮」又はその変形は、本明細書中で、細胞(例えば試料中の細胞)の未処置集団と比較した場合に、ある特定の細胞型(すなわち、癌幹細胞)の割合が増大している細胞集団を記載するために用いられる。

#### 【0124】

一例において、癌幹細胞が濃縮された集団は、CD133を有する(陽性である)癌幹細胞を、少なくとも約0.1%、0.5%、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、50%、75%、80%、85%、90%、又は95%含む。この点に関して、用語「癌幹細胞を含む濃縮された細胞集団」は、用語「癌幹細胞をX%含む細胞の集団(X%は、本明細書中で列挙されるパーセンテージである)」に明確な支持を提供するためにとられることとなる。

10

#### 【0125】

一例において、細胞の集団は、CD133+細胞を含む細胞調製物から、選択可能な形態で濃縮される。この点に関して、用語「選択可能な形態」は、細胞が、CD133を有する細胞の選択を可能にするマーカー(例えば細胞表面マーカー)を発現することを意味すると理解されよう。

#### 【0126】

アプタマー分子を用いた癌の診断/検出

本開示のアプタマーは、診断目的及び/又は検出目的でin vitroにおいて用いて、悪性組織における癌幹細胞の存在を判定することができる。本方法は、CD133+癌幹細胞の存在について生体試料を調査することを含む。例えば、生体試料は、本開示の標識付きアプタマー、又は本開示のアプタマー-Doxと接触してよく、試料中で細胞に特異的に結合するアプタマーの能力が判定される。結合は、CD133を有する癌幹細胞の存在を示す。本開示のアプタマーはまた、対象に、検出可能なシグナルを与えるリポーター基で標識化されている本開示のアプタマーを投与することによって、腫瘍をin vivoで局在化させるのに用いられてもよい。代わりに、又は加えて、ドキシソルピシンが(特に遠赤外波長にて)固有の蛍光活性を有するので、この特徴が診断に利用されてよい。その後、結合アプタマーは、フローサイトメトリ、顕微鏡検査、外部シンチグラフィ、放射断層撮影、光学イメージング、又は放射性核(radionuclear)走査を用いて検出されてよい。本方法は、疾患の程度に関して対象において癌を病期分類するのに、そして治療に応じた変化をモニターするのに用いられてよい。

20

30

#### 【0127】

癌幹細胞の検出は、アプタマーを検出可能な標識と結合させることによって容易にされ得る。検出可能な標識の例として、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、電子高密度標識、MRI用の標識、及び放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例として、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。適切な補欠分子族複合体の例として、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンが挙げられる。適切な蛍光物質の例として、ウンベリフェロン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、又はフィコエリトリンが挙げられる。発光物質の例として、ルミノールが挙げられる。生物発光物質の例として、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられ、適切な放射性物質の例として $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{94}\text{mTc}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{150}\text{}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{82}\text{Rb}$ 、又は $^3\text{H}$ が挙げられる。

40

#### 【0128】

アプタマーの3'末端での標識化は、例えば、クレノーポリメラーゼを用いたテンプレート伸長によって、T4リガーゼ媒介ライゲーションによって、そして末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによって達成され得る。5'末端での標識化は、in vitro転写ミックスへの過剰GTP- $\gamma$ -Sの補完によって達成され得、このチオールがその後、ビオチンを付加するのに用いられ得る。また、5'末端又は3'末端のいずれかに対する適切な基の直接

50

的な化学コンジュゲーションが、アプタマーを標識化するのに用いられてよい。

【0129】

癌処置及びテラノスティクスにおけるアプタマーの使用

本開示のアプタマーは、部分構造と結合させることができ、当該部分構造をCD133+細胞、好ましくは癌幹細胞へと導くのに用いられてよい。部分構造の例として、癌幹細胞を殺すのに用いられ得る毒素、放射性核種、又は化学療法剤が挙げられる。

【0130】

部分構造及びアプタマーが化学的に合成されることによって、又は、別個に生産されたアプタマーと部分構造とを繋ぐために用いられるコンジュゲーション、例えば非ペプチド共有結合、例えば非アミド結合によって、アプタマーは、部分構造、例えば毒素に融合することができる。代わりに、適切なリンカーペプチドによってアプタマーと部分構造とを繋いでもよい。

10

【0131】

有用な毒素分子としてペプチド毒素が挙げられ、これは、細胞内に存在する場合、かなり細胞に有毒である。毒素の例として、細胞毒素、酵素活性を崩壊させることによって癌幹細胞を殺す代謝崩壊剤(阻害剤及び活性化剤)、及びエフェクタ部分の定義された範囲内の全細胞を殺す放射性分子が挙げられる。代謝崩壊剤は、正常な機能が変更されるように細胞の代謝を変える分子、例えば、酵素又はサイトカインである。概して、用語毒素は、腫瘍細胞に死を引き起こすあらゆるエフェクタを含む。

【0132】

20

多くのペプチド毒素は、一般化された真核生物受容体結合ドメインを有する;これらの例において、毒素は、CD133を有していない細胞を殺すのを防止するように(例えば、未修飾毒素の受容体を有しているが、CD133を有していない細胞を殺すのを防止するように)修飾されなければならない。そのような修飾は、分子の細胞毒性機能を保存するようになされなければならない。潜在的に有用な毒素として、限定されないが、ジフテリア毒素、コレラ毒素、リシン、0-志賀様毒素(SLT-I、SLT-II、SLT-III)、LT毒素、C3毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、シュードモナス外毒素、アロリン、サボニン、モデシン、及びガラニンが挙げられる。他の毒素として、腫瘍壊死因子アルファ(TNFアルファ)及びリンホトキシン(LT)が挙げられる。抗腫瘍活性を有する別の毒素として、腫瘍に対して相当な効力を有するジイン-エン含有抗腫瘍抗生物質であるカリケアマイシンガンマ1がある(Z

30

【0133】

一例として、ジフテリア毒素(その配列は知られている)は、本開示のアプタマーにコンジュゲートすることができる。ジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheriae*)によって分泌される天然のジフテリア毒素分子は、当該分子のアミノ末端から出発して、酵素的に活性があるフラグメントA(AA 1-193)、並びに転座ドメイン及び一般化された細胞結合ドメイン(AA 475-535)を含むフラグメントB(AA 194-535)として特徴付けられ得るいくつかの機能ドメインからなる。

【0134】

アプタマー及び毒素部分構造は、当業者に知られていよういくつかの方法のいずれかで連結されてよい。例えば、アプタマーを毒素(ゲロニン)に結合する方法が、Chu TCら(2006) Cancer Res 6(12)5989-5992に記載されている。

40

【0135】

部分構造はまた、生体の免疫系を局所レベルで活性化又は阻害する免疫系の調節因子であってもよい。例えば、腫瘍に送達されるサイトカイン、例えばIL-2等のリンホカインは、腫瘍の近くで細胞毒性Tリンパ球又はナチュラルキラー細胞の増殖を引き起こし得る。

【0136】

部分構造又はリポーター基は、放射性分子、例えば放射性ヌクレオチド、又はいわゆる感作物質、例えば、特定の条件下で放射性になる前駆体分子、例えば、Barthら(1990). Scientific American Oct 1990:100-107に記載されるいわゆる「ホウ素中性子捕捉治療」(

50

BNCT)において、低エネルギー中性子のビームに曝される場合のホウ素であってもよい。そのような放射性エフェクタ部分を有する化合物が、腫瘍における癌幹細胞の増殖を阻害するために、そしてイメージング目的で癌幹細胞を標識化する双方のために用いられてよい。

#### 【0137】

放射性ヌクレオチドは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、又は $\gamma$ 粒子のいずれかを放出し得る単一原子の放射性分子である。アルファ粒子エミッターは、 $\beta$ 又は $\gamma$ 粒子エミッターよりも好ましい。なぜなら、より短い距離にわたってはるかにより高い放射エネルギーを放出するため、正常な組織に著しく浸透することなく、且つ正常な組織を傷つけることなく、効率的であるからである。適切な $\alpha$ 粒子放出放射性核種として、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、及び $^{212}\text{Bi}$ が挙げられる。

10

#### 【0138】

放射性分子は、直接的に、又は二官能キレートによって、アプタマーにしっかりと連結し得る。このキレートは、溶出を、そしてそれ故にin vivoでの放射性分子の時期尚早の放出を許してはいけな。Waldmann, Science, 252:1657-62 (1991)。一例として、BNCTを本発明に適合させるために、ホウ素の安定同位体、例えば、ホウ素10が、化合物の抗腫瘍部分構造又はエフェクタ部分として選択されてよい。ホウ素は、癌幹細胞へのアプタマーの特異的結合によって、腫瘍細胞に送達されて、腫瘍細胞において濃縮されることとなる。十分量のホウ素が蓄積するのを可能にする時間の後、腫瘍はイメージングされてよく、約0.025eVのエネルギーを有する低エネルギー中性子のビームで照射される。この中性子照射は、それ自体で、腫瘍を取り囲む健全な組織にも腫瘍それ自体にも殆ど障害を引き起こさない一方、(例えば、腫瘍細胞の表面上の)ホウ素10が、中性子を捕捉することによって不安定な同位体、ホウ素11を形成することとなる。ホウ素11は即座に核分裂して、リチウム7核、及び約279万eVのエネルギーを有する $\alpha$ 粒子が生じる。これらの重粒子は高度に致死性であるが、強く局在化される形態の放射線である。というのも、粒子の経路長が、ほんの約1細胞径(10ミクロン)しかないからである。

20

#### 【0139】

本開示のアプタマーに付加し得る適切な化学療法剤は、ドキソルビシン、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1ジヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びピューロマイシン、代謝拮抗薬[メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシル、ダカルバジン、ヒドロキシア尿素、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、クラドリピン等)、アルキル化剤(メクロレタミン、チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、カルマステイン(BSNU)、ロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン(DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン及び他のプラチナ誘導体、例えばカルボプラチン等)、抗生物質[ダクチノマイシン(以前のアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ダウノルビシン(以前のダウノマイシン)、イダルビシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン(AMC)等]から選択されてよい。

30

40

#### 【0140】

代わりに、部分構造は、アプタマーのステム領域配列中にインターカレートすることができる化学療法分子又は他の分子である。例えば、化学療法分子がドキソルビシンである場合、当該分子は、アプタマーステムのDNA中のCpG部位にインターカレートすることができる。ドキソルビシン等の化学療法剤は本質的に蛍光であり、種々のイメージング技術により局在をプロービング且つ視覚化するのに都合がよい。DOX分子内で組み合わされた治療能力及びイメージング能力は、セラノスティック剤としての使用に適したものとなる。したがって、本開示のアプタマーは、癌幹細胞にドキソルビシンを送達するセラノスティック剤として用いられてよい。水溶解度を高めるために、ドキソルビシン中の糖のアミノ

50



基は、DOX塩酸塩を形成することによってプロトン化されてよい。

【0141】

本開示のアプタマー中にインターカレートすることができる部分構造として、ドキソルビシン、アドリアマイシン、ベルベリン、プロフラビン、ミトキサントロン、ダウノルビシン、サリドマイド、ダクチノマイシン、ダウノマイシン、アクチノマイシンD、9-アミノアクリジン、アムルピシン、アムサクリン、アントラマイシン、ベルピン、プレオマイシン、エリブチシン、エピルピシン、イダルピシン、メタピリロ、ミトラマイシン、マイトマイシン、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ミトキサントロン、ピラルピシン、ピキサントロン、プリカマイシン、プロフラビン、プロディジオシン、サリドマイド、ボレロキシシン、バルルピシン、ゾルピシン、クロルフェニラミン、プロディシオシン、メタピリリノ、マイトマイシン、ジスタマイシン、ダンチノマイシン、ジスタマイシン、カルボプラチン、シスプラチン及び他のプラチナ誘導体、Hoechst 33258、ベレニル、DAPI、又は発癌物質(アフラトキシンB1のエキソ8,9エポキシド、アクリジン、例えばプロフラビン若しくはキナクリン、又は臭化エチジウムを含む)が挙げられる。他のGCインターカレート剤が、本発明の技術における当業者によく知られているであろうし、本開示の範囲内に含まれることが意図される。

10

【0142】

本開示のアプタマーはまた、細胞中へのsiRNA、リボザイム、又はDNAザイムの送達に用いられてもよい。

【0143】

20

適切なsiRNA、リボザイム、又は治療剤の例は、状況に左右されることとなる。本開示の使用に適しているsiRNA又はリボザイムの例として、ATP結合カセット膜トランスポーター、幹細胞性(stemness)遺伝子(Bmi-1、Notch 1、Sox 2、Oct-4、Nanog、 $\beta$ -カテニン、Smo、ネスチン、ABCG2、Wnt2、及びSCFその他)、GAPDH(グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ)、及びスルピピンを標的とするものが挙げられる。

【0144】

一例として、これは、抗PSMAアプタマーを用いて先行技術において実証された。PSMAがクラスリン被覆ピットを介してエンドソームに内在化されるという知識に基づいて、抗PSMAアプタマーは、PSMAを発現する細胞に、付加したsiRNAを運ぶであろうし、PSMAタンパク質に結合したアプタマー-siRNAは、内在化を介して細胞にアクセスするであろうと仮定された。次に、siRNA部分は、ダイサー複合体によるプロセッシングを受けて、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)媒介遺伝子サイレンシング経路中に送り込まれるであろう。これを達成するために、3つのグループが異なる戦略を利用した。Chuら(2006) Nucleic Acids Res 34, e73は、抗PSMAアプタマー及びsiRNAをアセンブルするために、ビオチン-ストレプトアビジン架橋媒介コンジュゲーション方法を記載している。McNamaraら(2006) Nat Biotechnol 24, 1005-1015は、アプタマー及びsiRNAを連結させるために、「RNAのみの」アプタマー-siRNAキメラアプローチを用いた。Wullnerら(2008). Curr. Cancer Drug Targets 8:554-565による以降の研究において、著者らは、抗PSMAアプタマーを用いて、真核生物伸長因子2(EEF2)siRNAをPSMA陽性前立腺癌細胞に送達し、二価PSMAアプタマーがこの目的のために用いられた。著者らは、一価の抗PSMA-siRNAキメラと比較して、二価アプタマー構築体の遺伝子ノックダウン効力が優れていることを実証した。

30

40

【0145】

本開示のアプタマーはまた、種々の固形腫瘍におけるCD133<sup>+</sup>癌幹細胞中にカーゴを送達するために用いられてもよい。ゲロニンは、タンパク質合成のプロセスを阻害し得るリボソーム毒素であり、細胞に有毒である。しかしながら、これは膜不浸透性であり、その細胞エントリのためにはアッシャを必要とする。ゆえに、本開示のアプタマーは、膜不浸透性の毒性ペイロードを癌幹細胞に送達するために利用されてよい。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、それ自体で癌幹細胞を標的とすることができないDNAインターカレティング化学療法剤であるドキソルビシン(DOX)を、CD133<sup>+</sup>癌幹細胞に送達するのに用いられてよい。

50

## 【0146】

細胞毒性化学療法剤に対する腫瘍耐性は、不十分な送達及び吸収に、そしてより重要なことには癌細胞による流出に一部起因する。Dharら(2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:17356-17361に記載されるように、ポリ(D,L-乳酸-co-グリコール酸)PLGAから誘導される生物分解性ナノ粒子(NP)が、この問題に対処するために用いられた。簡潔に、シスプラチンが、2つのアルキル鎖を導入することによって、そのプロドラッグ、Pt(IV)化合物に変換された。これは、化合物の疎水性を高めて、NPの疎水性コア内へのパッケージングのプロセスを容易にした。ポリエチレングリコール(PEG)が、ナノ沈澱工程中のコポリマーとして用いることで、PLGA-PEGナノ粒子が合成された。PLGA-PEG-NP表面は、PSMA(前立腺特異的膜抗原)アプタマーで装飾された。NPは、LNCaP細胞とインキュベートされた場合にエンドサイトーシスを受け、アルキル化されたプロドラッグは、細胞質ゾル還元プロセスによってシスプラチンに変換された。

10

## 【0147】

本開示はまた、同時の薬剤送達及びイメージングの剤(テラノスティクス)としてのアプタマー分子の使用にまで拡張する。これは、蛍光量子ドット(QD)の表面にアプタマーをコンジュゲートすることによって達成され得る。次に、QD-アプタマーコンジュゲートは、Doxとインキュベートされて、QD-アプタマー-Doxナノ粒子が形成される。Dox及びQDは双方とも蛍光分子である。しかしながら、QD-アプタマー-Doxナノ粒子中の近接性のために、互いの蛍光が、二蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)機構によって消される。ゆえに、QD-アプタマー-Doxナノ粒子は、非蛍光である。しかしながら、前立腺癌細胞におけるPSMA媒介エンドサイトーシスを介したQD-アプタマー-Doxナノ粒子の内在化は、QD-アプタマー-Doxナノ粒子からのDoxの放出を引き起こし、Dox及びQDの双方による蛍光の回復をもたらす。

20

## 【0148】

## 医薬組成物

本開示は更に、本明細書中に記載されるように、アプタマー、診断剤、又はセラノスティック剤を含む医薬組成物を提供する。本開示の医薬組成物として、アプタマーの医薬的に有効な量を医薬的に許容可能なキャリア及び/又は賦形剤中に含む、保存又は投与のために調製された組成物が挙げられる。組成物の賦形剤又は他の要素の選択は、投与のために用いられる経路及び装置に従って適合され得る。

## 【0149】

用語「キャリア」及び「賦形剤」は、活性化合物の保存、投与及び/又は生物活性を促進するために当該技術において従来用いられている物質組成物を指す[例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Mac Publishing社(1980)参照]。キャリアはまた、活性化合物のあらゆる不所望の副作用を軽減し得る。適切なキャリアは、例えば、安定しており、例えば、キャリア中の他の成分と反応することができない。一例において、キャリアは、処置に利用される投与量及び濃度にて、レシピエントにおいて顕著な局所性副作用も全身性副作用ももたらさない。

30

## 【0150】

本開示に適したキャリアとして、従来用いられているキャリアが挙げられ、例えば、水、生理食塩水、水性デキストロース、ラクトース、リンガー溶液、緩衝溶液、ヒアルロナン、及びグリコールが、特に(等張性の場合の)溶液用の、例示的な液体キャリアである。適切な医薬キャリア及び賦形剤として、デンプン、セルロース、グルコース、ラクトース、シュークロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、塩化ナトリウム、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール等が挙げられる。

40

## 【0151】

他の一般的な添加剤、例えば、抗酸化剤、緩衝溶液、静菌剤等が加えられてよい。注射可能な溶液、ピル、カプセル、顆粒、又はタブレットを調製するために、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤、及び潤滑剤が追加的に加えられてもよい。

## 【0152】

50

本開示のアプタマー及びその製剤は、当該技術において一般に知られているように、患者、標的組織、又は臓器に直接的に、又は局所的に(例えば、局在的に)投与されてよい。例えば、組成物は、対象への投与のための、リポソームを含めた送達ビークルを含んでよい。核酸分子は、当業者に知られている種々の方法によって細胞に投与されてよく、限定されないが、リポソーム内への封入、イオン導入、他のビークル、例えば生物分解性ポリマー、ヒドロゲル、シクロデキストリンポリ(乳酸-co-グリコール酸)(PLGA)及びPLCAマイクロスフェア、生物分解性ナノカプセル、並びに生体接着性マイクロスフェア中への組み込み、又はタンパク質様ベクターが挙げられる。

【0153】

本開示のアプタマーに用いられ得る送達系は、例えば、水性ゲル及び非水性ゲル、クリーム、多重エマルジョン、マイクロエマルジョン、リポソーム、軟膏、水性溶液及び非水性溶液、ローション、エアロゾル、炭化水素のベース及び粉末を含み、賦形剤、例えば可溶化剤、透過エンハンサ(例えば、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪アルコール、及びアミノ酸)、及び親水性ポリマー(例えば、ポリカルボフィル及びポリビニルピロリドン)を含有してよい。一実施形態において、医薬的に許容可能なキャリアは、リポソーム又は経皮エンハンサである。

【0154】

本開示の医薬組成物は、細胞、又は例えばヒトを含めた対象中への投与、例えば全身投与又は局所投与に適した形態である。適切な形態は、部分的に、使用又はエントリの経路、例えば経口、経皮、又は注射によって決まる。他の要因が当該技術において知られており、毒性、及び組成物がその影響を発揮するのを防止する形態等の考慮点が挙げられる。

【0155】

本開示のアプタマー又は当該アプタマーを含む組成物は、非経口的に投与されてよい(例えば、静脈内注射、皮下注射、局所注射、又は腹膜注射)。アプタマーの有効な投与量は、体重、年齢、性、健康状態、食事、投与頻度、投与方法、排泄、及び疾患の重篤度に従って決定されてよい。一例において、本明細書中に記載されるアプタマー又はセラノスティック剤は、アプタマーを10~95質量%含有する。別の例において、アプタマー又はセラノスティック剤は、アプタマーを25~75質量%含有する。

【0156】

通常、0.1mg/体重kg/日から100mg/体重kg/日の間の量の活性成分が投与される。

【0157】

経口使用用の製剤は、活性成分が不活性の固形希釈剤、例えば炭酸カルシウム、リン酸カルシウム若しくはカオリンと混合されている硬質ゼラチンカプセルとして、又は活性成分が水若しくは油媒体、例えばピーナッツ油、流動パラフィン若しくはオリーブ油と混合されている軟質ゼラチンカプセルとして示されてもよい。

【0158】

水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に適した賦形剤との混合物中にアプタマーを含有する。そのような賦形剤は、懸濁化剤、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピル-メチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム、及びアラビアゴムである;分散剤又は湿潤剤は、天然のリン脂質、例えば、レシチン、脂肪酸とのアルキレンオキシドの縮合物、例えばポリオキシエチレンステアレート、長鎖脂肪族アルコールとのエチレンオキシドの縮合物、例えばヘプタデカエチレンオキシセタノール、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート等の脂肪酸及びヘキシトールに由来する部分エステルとのエチレンオキシドの縮合物、又は脂肪酸及び無水ヘキシトールに由来する部分エステルとのエチレンオキシドの縮合物、例えばポリエチレンソルビタンモノオレエートであってよい。水性懸濁液はまた、1つ又は複数の防腐剤、例えばp-ヒドロキシ安息香酸エチル又はp-ヒドロキシ安息香酸n-プロピル、1つ又は複数の着色剤、1つ又は複数の賦香剤、及び1つ又は複数の甘味剤、例えばシュクロース又はサッカリンを含有してもよい。

【0159】

油状懸濁液は、植物油、例えばラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油若しくはココヤシ油、又は鉱物油、例えば液体パラフィン中にアプタマーを懸濁させることによって製剤化されてよい。油状懸濁液は、濃化剤、例えば蜜蝋、硬質パラフィン、又はセチルアルコールを含有してよい。甘味剤及び賦香剤は、口当たりがよい経口調製物を提供するために加えられてよい。これらの組成物は、酸化防止剤、例えばアスコルビン酸の添加によって保存されてよい。

#### 【0160】

水の添加による水性懸濁液の調製に適した分散可能な粉末及び顆粒は、分散剤又は湿潤剤、懸濁剤、及び1つ若しくは複数の防腐剤との混合物中アプタマーを提供する。適切な分散剤、湿潤剤又は懸濁剤が、既に先に述べられるものによって例示される。さらなる賦形剤、例えば甘味料、賦香剤、及び着色剤が存在してもよい。

10

#### 【0161】

本発明の医薬組成物はまた、水中油エマルジョンの形態であってもよい。油性相は、植物油若しくは鉱物油、又はこれらの混合物であってもよい。適切な乳化剤が、天然のゴム、例えばアラビアゴム又はトラガカントゴム、天然のリン脂質、例えばダイズ、レシチン、脂肪酸及びヘキシトールに由来するエステル又は部分エステル、無水物、例えばソルピタンモノオレエート、並びにエチレンオキシドとの前記部分エステルの縮合物、例えばポリオキシエチレンソルピタンモノオレエートであってもよい。エマルジョンはまた、甘味剤及び賦香剤を含有してもよい。

#### 【0162】

20

注射可能な滅菌調製物はまた、非毒性の非経口的に許容可能な希釈剤又は溶媒中の注射可能な滅菌溶液又は懸濁液、例えば1,3-ブタンジオールの溶液であってもよい。利用されてよい許容可能なピークル及び溶媒は、水、リンガー溶液、等張塩化ナトリウム溶液、並びに塩化ナトリウム及び塩化カリウムを含有する等張塩溶液である。また、滅菌固定油が、溶媒又は懸濁媒体として、従来通り利用される。この目的のために、合成モノグリセリド又はジグリセリドを含めた任意の無刺激固定油(bland fixed oil)が利用されてよい。また、オレイン酸等の脂肪酸が、注射可能薬物の調製における用途を見出す。

#### 【0163】

任意の特定の対象のための特定の用量レベルが、利用される特定の化合物の活性、年齢、体重、全体的な健康、性別、食事、投与の時間、投与の経路、排泄速度、薬剤の組合せ、及び治療を受けている特定の疾患の重篤度を含めた種々の要因によって決まると理解される。投与頻度は、毎日、毎週、又は毎月1回から数回であってもよい。

30

#### 【0164】

##### アプタマーの組合せ

本開示のアプタマー分子は、本明細書中に開示される任意の方法に従って、単独で、又は、1つ若しくは複数のさらなるアプタマーと組み合わせて用いられてよい。一例において、本開示のアプタマー分子は、癌幹細胞の検出、精製又は濃縮を促進するアプタマーと組み合わされてよい。一例において、さらなるアプタマーは、Shigdar Sら(2011). *Cancer Sci* 102(5): 991-998に記載される配列EpDT3 5' -GCGACUGGUUACCCGUCG-3'を含む。別の例において、さらなるアプタマーは、異なる標的、例えばEpCAMに結合する。

40

#### 【0165】

本開示はまた、5'及び/又は3'末端にてリンカーを介して別のアプタマーと並べ(line)得るアプタマーを包含する。適切なリンカーが当該技術において知られており、PEG等のポリマーが挙げられ得る。

#### 【0166】

##### キット

本開示はまた、本明細書中に開示される方法を実行するための診断キットを提供する。一例において、診断キットは、CD133発現細胞(例えば、癌幹細胞)を検出するための、本明細書中に記載されるアプタマー又は診断剤を含む。

#### 【0167】

50

キットはまた、緩衝剤及び安定化剤等の補助剤を含んでもよい。診断キットは更に、バックグラウンド干渉を軽減する剤、コントロール試薬、及び試験を行うための装置を含んでもよい。診断キットの使い方に関する説明書もまた一般に含まれる。

#### 【0168】

本開示の広く一般的な範囲から逸脱することなく、先に記載される実施形態に対して多数の変形及び/又は修飾がなされてよいことが当業者によって理解されよう。したがって、本実施形態は、あらゆる点において、限定としてではなく実例として考えられるべきである。

#### 【実施例】

#### 【0169】

方法

細胞株及び細胞培養

アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC、米国、VA、Manassas)から購入したHT-29(ヒト結腸直腸癌細胞)及びHEK293T(ヒト胎児腎臓細胞)を、ダルベッコ修飾イーグル培地(DMEM、Invitrogen社、豪州、Victoria)中で維持し、10%胎仔ウシ血清(FCS、米国、Hyclone社)を補った。細胞を、5%CO<sub>2</sub>の水飽和大気中で37℃にてインキュベートした。

#### 【0170】

CD133アプタマーの生成

出発CD133アプタマーの生成は、Shigdar Sら(2013) Cancer Letters 330:84-95に記載されているように行った。アプタマーのステム領域配列を、図1に示すDNAステムに置き換えた。

#### 【0171】

アプタマー-Doxコンジュゲートの開発

CD133アプタマーの二次元構造を、VIENNAソフトウェア(<http://rna.tbi.univie.ac.at/>)を用いて予測した。この構造は、アプタマー-薬剤コンジュゲートの特徴付けについて、より正確且つ効率的な調製を導いた。化学療法剤ドキソルビシン(DOX)(SIGMA-ALDRICH社)とのコンジュゲーションのために設計したCD133アプタマーを、IBA社(独逸)から合成し、-80℃にて保存した。コンジュゲーションの前に、アプタマーを85℃での5分間の加熱によって折り畳み、10分間にわたってゆっくり室温に冷却してから、37℃にて15分間インキュベートした。その後、DOXを、50mM NaCl及び2.5mM MgCl<sub>2</sub>を含有するコンジュゲーション緩衝液中でアプタマーとよく混合し、オービタルミキサー/インキュベータ(RATEK社)中で75r.p.m.にて2時間37℃にてインキュベートした。その後、コンジュゲートを、Sephadex(登録商標)G-50カラム(SIGMA-ALDRICH社)に通し、アプタマー-Doxコンジュゲートを、遊離DOXから分離した。アプタマー-DOXコンジュゲートはしたがって、アプタマーのステム領域のDNA配列中にインターカレートされている1つ又は複数のDOX分子を含有する。

#### 【0172】

DOXとアプタマーのモル比の決定

DOXの本来の蛍光、及びCD133アプタマーとのインターカレーション後の続く消光を、紫外線分光法(UV-Spec)によって、DOXコンジュゲーション及び安定性の程度の測定に利用した。コンジュゲーションプロセスは、様々なアプタマー-Doxモル比(0、0.01、0.04、0.08、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、及び0.6)を用いて研究し、遊離DOXの標準曲線に基づいて、UV-Spec又は蛍光プレートリーダーを用いて分析した。

#### 【0173】

HPLCによるDOXロード効率の評価

様々なアプタマー/DOXモル比でのDOXロード効率を、コンジュゲート中のDOXをアセトニトリルで抽出してから、HPLCを用いてDOXを定量化することによって決定した。簡潔に、Sephadex G-50カラムから溶出した30マイクロリットルのアプタマー-Doxコンジュゲートを、90µlのアセトニトリルで希釈して、1分間ボルテックスした。その後、この溶液を、21000×gにて5分間遠心分離し、上澄みの50µlを150µl PBS中に希釈してよく混合してから、21000×gにて5分間の別の遠心分離にかけた。100マイクロリットルの上澄みを回収し、

10

20

30

40

50

逆相クロマトグラフィーにかけ、HPLCを用いたC-18カラムによって、DOX濃度を決定した。DOXは、HPLCにおいて、オンラインUV検出器を用いて定量化した。較正標準曲線を、標準DOX溶液により同じ条件下で作成した。薬剤ロード効率(DLE)を以下の式によって算出した：

【 0 1 7 4 】

【 数 1 】

$$\text{DLE (\%)} = \frac{\text{DOX loaded in conjugate}}{\text{DOX added}} \times 100\%$$

10

【 0 1 7 5 】

アプタマー-薬剤放出の分析

アプタマー-DOXコンジュゲートからのDOXのin vitro放出を、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette(分子量カットオフ3.5kDa、Thermo SCIENTIFIC社、カタログ番号：66333)による透析法を用いて決定した。アプタマー-Doxコンジュゲート(400 µL、1 µg/ml DOX)をカセット中に加えた。透析カセットを、PBS、及び10% FCSを有するPBSに対して、pH 8、7.4又は5.0にて37 °Cで、暗所において穏やかに撹拌しながら透析した。種々の時点(10分、0.5時間、1時間、4時間、8時間、24時間及び48時間)にて、媒体の30マイクロリットルアリコートをし、放出動態の分析用に外部緩衝液から回収し、30 µLの新鮮な媒体に置き換えた。DOX濃度は、DOX濃度対その蛍光強度の標準曲線に従って、蛍光強度をDOXの質量に変換することによって、蛍光プレートリーダー(PerkinElmer Life and Analytical Sciences社)を用いて決定した。アプタマー-DoxからのDOXの累積的放出を、放出されたDOXのパーセンテージとして表し、時間の関数としてプロットした。

20

【 0 1 7 6 】

アプタマー-Doxコンジュゲートとその標的細胞間の平衡解離の決定

非特異的結合を最小にするために、1 × 10<sup>5</sup> HT29又はHEK293T細胞を最初に、ブロッキング緩衝液(10% FCS、1% BSA、及び1% tRNAを有するPBS)と20分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄緩衝液(5% FBS及び2.5mM MgCl<sub>2</sub>を含有するPBS)で2回洗浄し、CD133アプタマー、ネガティブコントロールアプタマー、CD133アプタマー-Doxコンジュゲート、又はネガティブコントロールアプタマー-Doxコンジュゲート[全て、コンジュゲーション緩衝液(50mM NaCl及び2.5mM MgCl<sub>2</sub>)中でCy5により標識化した]と氷上で1時間インキュベートした。

30

【 0 1 7 7 】

フローサイトメトリ分析の前に、細胞を再び洗浄緩衝液で2回洗浄してから、150 µl 洗浄緩衝液中に懸濁させた。その後、フローサイトメーター(FACS CANTO II、Becton Dickinson社)を用いてデータを収集して、アプタマーの蛍光強度を測定し、この蛍光強度を、ネガティブコントロールアプタマーの蛍光強度由来の蛍光バックグラウンドにより標準化し、その後Graph Pad Prismソフトウェアを用いて導き出すことによって、結合親和性を決定した。

【 0 1 7 8 】

アプタマー-Doxコンジュゲートの内在化

共焦点顕微鏡検査に備えて24時間、HT29及びHEK293Tの双方について、8チャンバスライド内のウェルあたり8 × 10<sup>5</sup>細胞を播種した。細胞を、ブロッキング緩衝液(10% FCS、1mg/mL BSA、0.1mg/mL tRNAを有するPBS)で20分間インキュベートした後に、洗浄緩衝液(5% FBS、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、及び5mM NaClを含有するPBS)で2回洗浄してから、コンジュゲーション緩衝液中200nMアプタマー、ネガティブコントロールアプタマー、アプタマー-Doxコンジュゲート、又はネガティブコントロールアプタマー-Doxコンジュゲートと37 °Cにて30分間インキュベートした。インキュベーションの最終15分の間に、Bisbenzimidazole Hoechst 33342(3mg/ml)(Sigma社)を細胞に加えた。アプタマー溶液を除去し、細胞をそれぞれPBS中で5分間3回洗浄してから、FluoView FV10iレーザースキャン共焦点顕微鏡(Olympus社)を用

40

50

いて視覚化した。

【0179】

CSC頻度のin vitro分析

細胞をトリプシン消化により80%コンフルエンスにて収穫し、遠心分離(1000×g 5分間)の後、DMEM/F12無血清培地中に単一細胞として再懸濁させた。細胞を、96ウェルのウルトラローアタッチメントプレート中に、ウェルあたり5、10、50、100、500、及び1000細胞、又は腫瘍塊形成のためには、6ウェルのウルトラローアタッチメントプレート中に4000細胞/ウェルの密度でプレーティングした。3つの実験群を用いた:腫瘍塊培地コントロール、遊離DOX処置(1、1.5、及び2 $\mu$ g/ml)、及びアプタマー-DOX処置(遊離DOXの同濃度に等しい1、1.5、及び2 $\mu$ g/ml)。37℃にて24時間のインキュベーションの後、上澄みを取り出し、等容量の新鮮なCSC培地に置き換えた。腫瘍塊は、直径が50 $\mu$ mを超え、境界が明瞭な細胞凝集体と定義した。腫瘍塊の形成頻度及びサイズは、播種の3日後に記録した。CSCの頻度は、ELDAウェブサイト(<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/index.html>)を用いて算出した。6ウェルインキュベーションにおける腫瘍塊形成頻度は、式F=生じた腫瘍塊の数/プレーティングした単一細胞の数(Fは、腫瘍塊形成頻度である)に従って算出した。

10

【0180】

データ分析

データ及び結果は、特に明記しない限り、平均及び標準偏差(平均 $\pm$ S.D.)として報告した。異なる群間の平均値の差異は、SPSS 13.0プログラムを用いた一元配置分散分析法(ANOVA)を用いて分析した。0.05未満のP値を、統計的に有意であるものとみなした。

20

【0181】

(実施例1)

CD133アプタマーとのDOXのコンジュゲーション

現在の癌治療薬の主な問題は、癌幹細胞(CSC)を標的とできないことである。新規のCSC標的剤を開発するために、それ自体でCSCを標的とすることができない、一般的に使用されている化学療法薬DOXを、CD133細胞表面マーカーに対するアプタマーにコンジュゲートした。アプタマーの結合親和性及び特異性、並びに薬剤の細胞毒性を評価することによって、機能性を維持するコンジュゲートされたアプタマーの能力を試験した。

【0182】

CD133アプタマーの二次構造を、VIENNAソフトウェア(<http://rna.tbi.univie.ac.at/>)を用いて予測した(図1)。本発明者は以前に、CD133とアプタマー間の相互作用が、アプタマーのループを介して起こることを確かめた(Shigdar Sら(2013) Cancer Letters 330:84-95)。更に、ドキソルビシン(DOX)は、DNA中のGC塩基対中にインターカレートすることが知られている(図1B)。したがって、CD133アプタマーにおけるRNAステムを、10bp DNAステムに置き換えて、DOXローディングのためのプラットフォームを提供した。アプタマーの標的結合部及びDOX-DNAコンジュゲートの双方の安定性を増大させるために、DNAステム内の5'メチル-dCを用いて、その本来の対応物よりも強い塩基対を提供した。

30

【0183】

DOXローディングのためのアプタマー中の最適モル比を、アプタマーの、DOXモル比に対する逐次的な増大によるコンジュゲーションアッセイによって決定した。この半定量分析を実行するために、種々の濃度でのDOX蛍光の定量的評価を、UV-Spec及びHPLCを用いて最初に決定した(図2)。これは、測定される蛍光強度と遊離DOXの実際の濃度間の相関関係を提供する。CD133アプタマー中へのDOXのインターカレーションは、UV-Spec及び高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によってモニターした。図3は、インターカレーション時のDOXの本来の蛍光及び以降の最大消光を示し、CD133アプタマーの、DOXに対するモル比が0.4:1である。アプタマーに対するDOXのローディングは、用いたアプタマーの濃度を増大させるにつれ増大し、0.4にてプラトーに到着した。このデータ、及び標準曲線内の遊離DOXのベースラインにより、アプタマーに対するDOXのコンジュゲーションを、消光のパーセンテージとしてモニターすることができた(図3)。

40

【0184】

50

## (実施例2)

## DOX-アプタマーコンジュゲートのin vitro安定性

薬剤放出の制御及び維持は、薬剤送達系にとって重要である。本発明者は以前に、アプタマーがエンドサイトーシスを介して、おそらく、pHが6.0から5.09であるエンドソーム及びリソソームコンパートメント中に内在化されることを示した[Shigdar Sら(2011) Cancer science 102:991-998]。したがって、あるpH範囲でのアプタマー-DoxコンジュゲートからのDOXのin vitro放出プロファイルを、PBS及び胎仔ウシ血清(FCS)を有するPBS中で調査した。図4及び図5に示すように、アプタマー-Doxからのin vitroにおけるDOX放出はpHに依存し、若干の初期バースト放出を伴う、安定に継続する放出パターンを示した。pH 7.4(循環系において見出される生理的pH)にて、インターカレートしたDOXの、アプタマーからの最小放出が、PBS中で48時間後に検出された。同様に、アプタマー-DoxからのDOX放出は、pH 8.0ではかなり低かった。しかしながら、pH 5.0では、DOXの放出は、PBS中で劇的に増大した。循環における条件を模倣するために、DOX放出を、FCSを補ったPBS中で測定し(図5)、様々なpHに対するDOX放出に関して、図4と一致することがわかった。このようなpH依存放出挙動は望ましい。というのも、DOXが、in vivo全身循環の中性環境においてアプタマーとコンジュゲートしたままであるはずであり、そして腫瘍細胞中への内在化の後に、後期エンドソーム/リソソームの酸性環境において放出されるはずであるからである。

【0185】

## (実施例3)

## アプタマーコンジュゲートの平衡解離定数の決定

DOXの結合がCD133に対するアプタマーの結合親和性及び特異性を妨げるかを判定するために、蛍光標識化Cy5アプタマー-Doxコンジュゲートを、HT29結腸直腸癌細胞とインキュベートして、フローサイトメトリ分析によって平衡解離定数( $K_D$ )を決定した(図6)。解離定数の研究に用いたCD133アプタマーを図7に示す。

【0186】

2つの細胞株、HT29及びHEK293Tを研究用に選択した。HT29は高レベルのCD133を発現するが、HEK293細胞株はCD133を発現せず、CD133結合の特異性についてのネガティブコントロールとして用いた。図6Aに示すように、アプタマー-Doxコンジュゲートは、ネガティブコントロール細胞(HEK293T)に対する親和性が、 $K_D > 1000\text{nM}$ を示したことから、極僅かであった。CD133アプタマーが、核酸とCD133間の非特異的結合ではなく特異的分子相互作用を介してCD133に結合することを確認するために、ネガティブコントロールアプタマー-Doxコンジュゲートによる実験を繰り返した(図6B)。このネガティブコントロールアプタマーは、2'-フルオロ化学修飾の代わりに2'-O-メチル修飾であることを除いて、陽性アプタマーと同一の核酸配列を有する。

【0187】

したがってこのネガティブコントロールアプタマーでは、CD133への結合を無効にする三次元構造の変更がある。ネガティブコントロールアプタマー-Doxも、HT29細胞株への結合を示さず、平衡解離が $K_D > 1000\text{nM}$ であった。対照的に、CD133アプタマー(図6C)及びCD133アプタマー-Doxコンジュゲート(図6D)はそれぞれ、84.81nM及び23.89nMの高い親和性でHT29細胞に結合し、ステム中にインターカレートされたDOXとの親和性の保持及び親和性の向上の双方が示唆された。

【0188】

## (実施例4)

## アプタマー-Doxコンジュゲートの細胞内在化

細胞中に受動的に拡散する遊離の薬剤を流出させる、細胞膜上に存在するABC輸送体の発現の上昇は、CSCにおいて化学療法抵抗性の基礎をなす重要な機構の1つである。そのような防御力を克服する一方法が、エンドサイトーシスを介して細胞毒性薬剤を送達することによって、細胞膜ベースの薬剤流出ポンプを迂回することである。細胞内に薬剤を効率的に送達するCD133アプタマー-Doxコンジュゲートの能力を評価するために、コンジュゲ



ートの内在化を、共焦点顕微鏡検査によって定性的に分析した(図8)。内在化の評価のために用いたアプタマー及びDOX処置を図9に示す。

【0189】

DOXの励起及び発光波長はそれぞれ480及び580nmである。一方、アプタマーを、発光及び励起波長が645/664nmであるCy5で標識化した。これは、共焦点フローサイトメトリ分析での異なる蛍光チャンネルによって、コンジュゲート内のDOX及びアプタマーをはっきりと同定することができるようにするためである。HT29細胞を最初に、Cy5で標識化したCD133アプタマーとインキュベートし、1時間のインキュベーション後、首尾よく内在化することが示された(図8A)。次に、DOXのインターカレーションが内在化に影響を及ぼし得るかを判定するために、アプタマー-Doxコンジュゲートによる実験を繰り返した(図8B)。図8A及び図8Bに示すように、このコンジュゲートは、CD133アプタマーのみの対応物に類似する内在化レベルを示した。やはり、ネガティブコントロールアプタマー及び細胞株(293T)によって、親和性結果と同様に、コンジュゲートの特異性を確認した(図8C～図8D)。更に、TRITCチャンネルを用いて測定したDOXの細胞内蛍光レベルは、図8Eに示す遊離DOXのレベルと比較して、はるかに高かった。

【0190】

(実施例5)

in vitro自己再生細胞を除去する際のアプタマー-Doxコンジュゲートの能力の確立

表現型発現ではなく、機能的能力が、CSCを分析するのに重要である。これは、CSCの特性が、癌型、腫瘍増殖のステージ、及び集団内の異質性に依拠して変化し得る一方、細胞の完全な後代を自己再生し、且つ生じさせる能力は保持されるためである[Kreso A及びO'Brien CA, Current Protocols in Stem Cell Biology (John Wiley and Sons社、2007)]。自己再生(CSCの重要な性質)を促進する条件下で細胞をコンディショニングし、且つ最終分化細胞を除去することによって、腫瘍塊のin vitro形成は、自己再生能力の良好な指標となる(上記Kresoら)。先の研究は、DOXがCSCを殺すのに効果的でないことを確認した(Zeppernick Fら(2008) Clin Cancer Res 14:123-129、Zhuang Xら(2012) BMC Cancer 12:1-16)。CD133アプタマーコンジュゲートがCSCに対するDOXの細胞毒性能力を向上させることができたかを評価するために、腫瘍塊形成アッセイを、先に記載するように実行した。従来の薬剤DOXと新たに開発したアプタマー-Doxコンジュゲート間のCSC標的化の差異を分析するために、公開されているIC50値に基づくDOXの濃度を用いた[Poljakova Jら(2008) Interdisciplinary toxicology 1:186-189; Shen Fら(2008) The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 324:95-102; Oudard Sら(1991) Cancer chemotherapy and pharmacology 28:259-265]。この目的で、種々の濃度のHT29細胞を、ウルトラローアタッチメントプレート内に播種した。96ウェルのウルトラローアタッチメントプレートでは、細胞を、500/ウェル、200/ウェル、100/ウェル、50/ウェル、10/ウェル、及び5/ウェルの連続希釈密度で播種した。6ウェルのウルトラローアタッチメントプレートでは、細胞を2000/ウェル又は4000/ウェルの密度で播種した。細胞を、1、1.5若しくは2µMの遊離DOX、又は等しい濃度のアプタマー-Doxとインキュベートした。3日後、腫瘍塊のサイズ(図10)及び腫瘍塊を形成したウェルの数(図11)を評価した。より高い細胞播種量では塊形成の明らかな阻害はなかったが(図11)、アプタマー-Doxで処置した細胞とコントロール及び遊離DOXで処置した細胞との間に腫瘍塊サイズの有意な低下があった(図10)。

【0191】

in vitroでのアプタマー-Doxコンジュゲートの真の有効性を得るために、細胞のより低い播種量(10又は5細胞/ウェル)を用いた(図11)。遊離DOXで処置した細胞は、5細胞/ウェル以下の細胞播種量のものを除いて、腫瘍塊形成の頻度の有意な低下を示さなかった。対照的に、アプタマー-Doxコンジュゲートで処置した細胞は、PBSコントロール及び遊離DOXと比較して、腫瘍塊形成の頻度の相当な低下を示した。96ウェル超低アドヘレントプレートで得た結果を更に確かめるために、第2の(6ウェル)バージョンの腫瘍塊アッセイを用いて、得られた結果の再現性があることを確認した(図12)。96ウェルアッセイと6ウェルアッセイ間の実験の差異は、前者の単一腫瘍塊と比較して、後者が多数の腫瘍塊の形成を可

能にすることである。96ウェルプレート条件と同様に、アプタマー-Doxで処置した6ウェルにおける腫瘍塊形成は、遊離DOX又はコントロールで処置したものと比較して、劇的な低下があった。

【配列表フリーテキスト】

【0192】

配列番号1は、ある長さの交互のCG対形成ヌクレオチドによって5'及び3'末端がフランキングされるCD133アプタマーのループ領域のコアヌクレオチド配列である。

配列番号2は、DOXをコンジュゲートすることができるCD133アプタマーの配列である。

配列番号3は、CD133アプタマーのループ領域のコアヌクレオチド配列である。

配列番号4は、ある長さの交互のCGヌクレオチドによって5'及び3'がフランキングされるハイブリッドRNA/DNA CD133アプタマーの配列であり、3'逆向きdTを含有する。

配列番号5は、ハイブリッドRNA/DNA CD133アプタマーの配列である。

10

【図1】

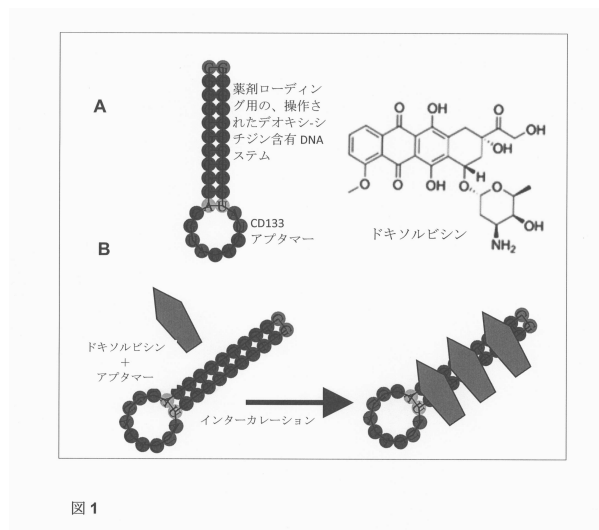


図 1

【図2】

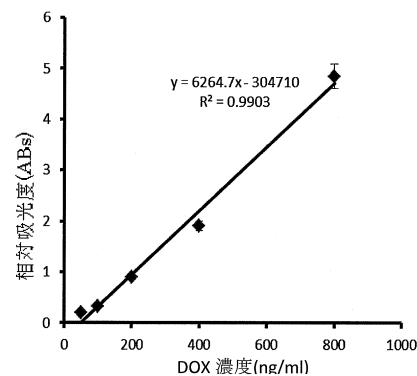


図 2

【図 3】

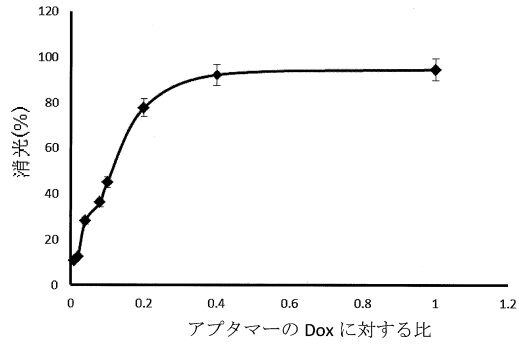


図 3

【図 4】

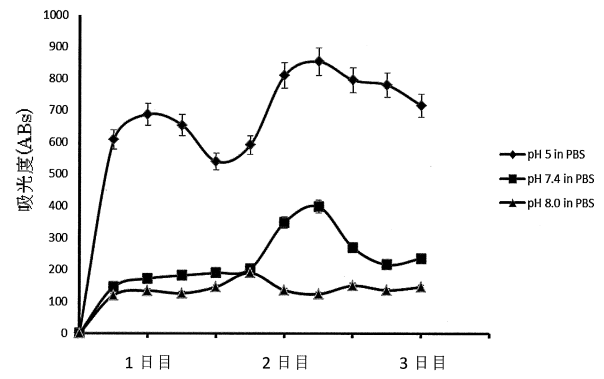


図 4

【図 5】

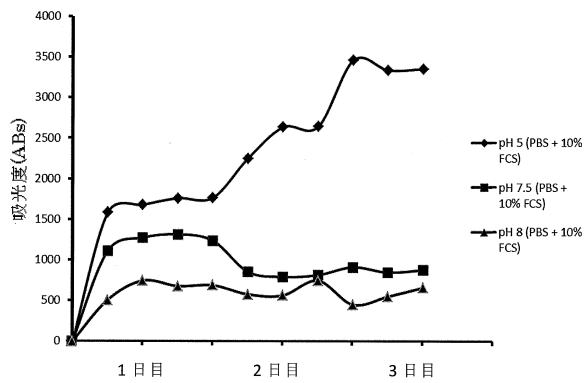


図 5

【図 6】

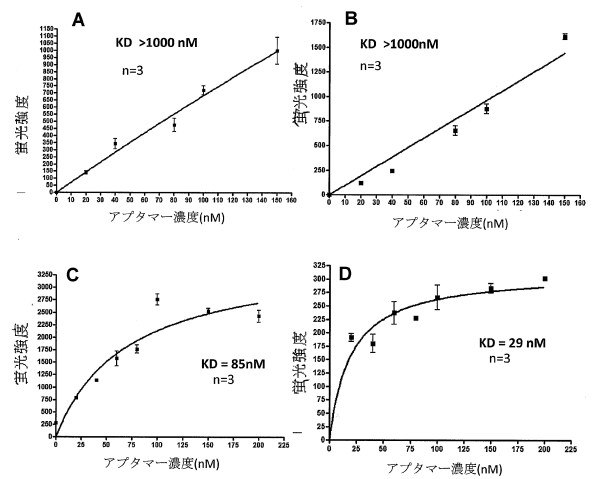
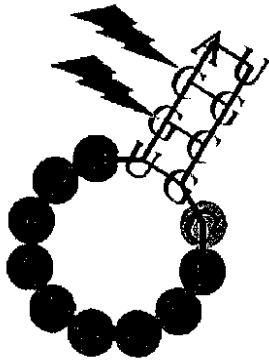
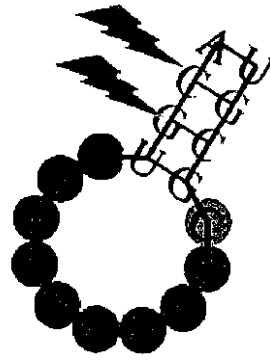


図 6

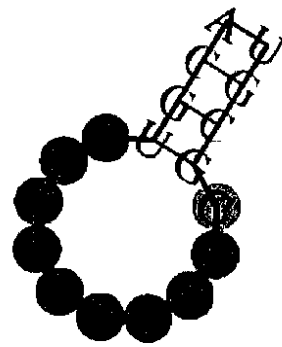
【図 7 A】

**A**

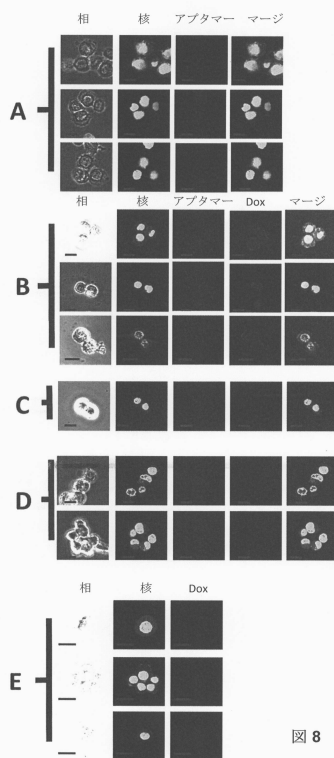
【図 7 B】

**B**

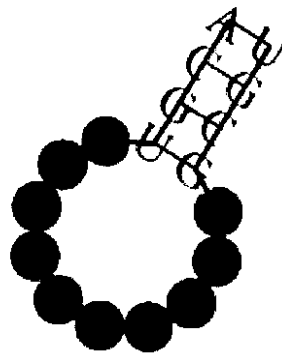
【図 7 C】

**C**

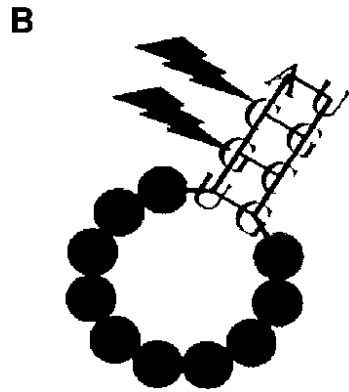
【図 8】



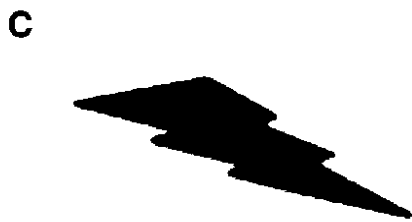
【図 9 A】

**A**

【図 9 B】



【図 9 C】



【図 10】

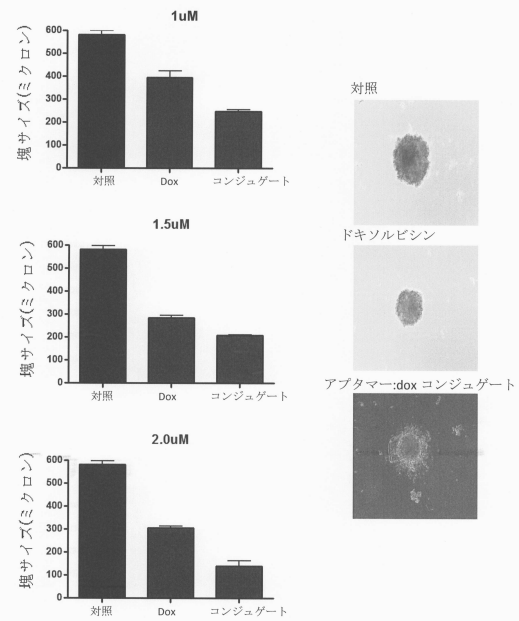


図 10

【図 11】

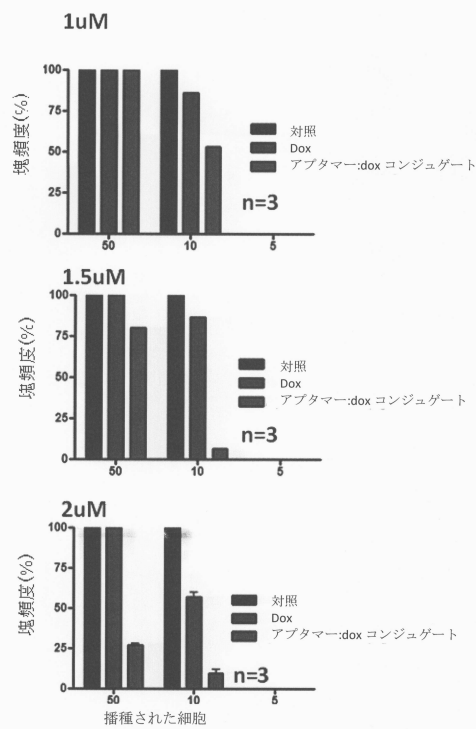


図 11

【図 12】



図 12

【配列表】

0006636436000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)		C 1 2 Q 1/68

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 国際公開第2007/137117(WO, A1)  
 特許第6279573(JP, B2)  
 SHIGDAR S. et al., Cancer Letters, Vol.330(2013), pp.84-95  
 BAGALKOT V. et al., Angew. Chem. Int. Ed., Vol.45(2006), pp.8149-8152  
 SHIGDAR S. et al., Sensors, 13(2013), pp.13624-13637  
 WANG R. E. et al., Current Medicinal Chemistry, Vol.18, No.27(2011), pp.4126-4138

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 C 1 2 N 15 / 115  
 C 1 2 Q 1 / 68  
 A 6 1 K 31 / 704  
 A 6 1 K 31 / 7088 - 31 / 712  
 A 6 1 P 35 / 00  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
 CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS  
 (STN)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq