

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-513919

(P2015-513919A)

(43) 公表日 平成27年5月18日(2015.5.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/115 (2010.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A H	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 C 0 7 6
<b>C 1 2 N 15/113 (2010.01)</b>	C 1 2 N 15/00 G	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 47/36 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/36	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 47/48 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/48	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-505732 (P2015-505732)  
 (86) (22) 出願日 平成25年3月13日 (2013. 3. 13)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年12月8日 (2014. 12. 8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/031074  
 (87) 国際公開番号 W02013/154735  
 (87) 国際公開日 平成25年10月17日 (2013. 10. 17)  
 (31) 優先権主張番号 61/622, 375  
 (32) 優先日 平成24年4月10日 (2012. 4. 10)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514259107  
 ロッシ, ジョン, ジェイ  
 アメリカ合衆国 9 1 7 3 7 カリフォル  
 ニア州, アルタロマ, ブリドル・プレイス  
 5 0 4 4  
 (71) 出願人 514259118  
 ヨーン, ソラ  
 アメリカ合衆国 9 1 7 0 9 カリフォル  
 ニア州, チノヒルズ, カムデン・アヴェニ  
 ュー 1 4 9 1 7  
 (74) 代理人 100107766  
 弁理士 伊東 忠重  
 (74) 代理人 100070150  
 弁理士 伊東 忠彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍細胞への治療的送達および診断的送達のためのRNAアプタマー

## (57) 【要約】

いくつかの実施例では、腫瘍細胞に特異的に結合するアプタマーが提供される。そのようなアプタマーは腫瘍細胞表面タンパク質に特異的に結合するRNA分子を含み得る。特定の実施形態では、アプタマーとして使用されるRNA分子は、G A A U G C C C (配列番号：8) のヌクレオチド配列を含み得る。他の実施例において、RNA分子は配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、または配列番号：6 のヌクレオチド配列を含み得る。特定の実施形態では、アプタマーは1つまたは複数の治療薬（例えばshRNA分子、siRNA分子、mRNA分子またはmiRNA分子）、1つまたは複数の診断用薬剤、またはそれらの組合せに結合され得る。アプタマーとそれらの複合体は腫瘍細胞に治療薬を送達するために、および/または腫瘍を治療もしくは診断するための方法において使用され得る。

Figure 1

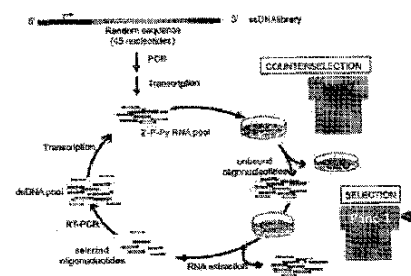


Figure adopted from PLoS One. 2009 Nov 24;4(11):e7971.

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

膵癌細胞表面タンパク質に特異的に結合するRNA分子を含む膵癌細胞アプタマー。

**【請求項 2】**

前記RNA分子はG A A U G C C C（配列番号：8）のヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の膵癌細胞アプタマー。

**【請求項 3】**

前記RNA分子は配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6のヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の膵癌細胞アプタマー。

10

**【請求項 4】**

1つまたは複数の治療薬に結合される、請求項1に記載の膵癌細胞アプタマー。

**【請求項 5】**

前記1つまたは複数の治療薬は、shRNA分子、siRNA分子、mRNA分子およびmiRNA分子から選択される、請求項4に記載の膵癌細胞アプタマー。

**【請求項 6】**

1つまたは複数の診断用薬剤に結合される、請求項1に記載のアプタマー。

**【請求項 7】**

前記1つまたは複数の診断用薬剤は、ナノ粒子、放射性物質、色素、造影剤、蛍光性分子、生物発光性分子、酵素および増強剤から選択される、請求項6に記載の膵癌細胞アプタマー。

20

**【請求項 8】**

医薬担体をさらに含む医薬組成物の一部である、請求項1に記載の膵癌細胞アプタマー。

**【請求項 9】**

前記医薬組成物は、1つまたは複数の追加の治療薬をさらに含む、請求項8に記載の膵癌細胞アプタマー。

**【請求項 10】**

膵癌細胞へ治療薬を送達する方法であって、膵癌細胞と膵癌細胞アプタマー複合体とを接触させるステップ、を含み、前記膵細胞アプタマー複合体は、膵細胞アプタマー構成要素および治療薬構成要素とを含み、

30

前記膵細胞アプタマー構成要素は、膵癌細胞表面タンパク質に特異的に結合するRNA分子であり、前記膵細胞アプタマー複合体の細胞内移行を生じさせる、方法。

**【請求項 11】**

前記治療薬構成要素は、shRNA分子、siRNA分子、mRNA分子またはmiRNA分子を含む、請求項10に記載の方法。

40

**【請求項 12】**

前記RNA分子は、G A A U G C C C（配列番号：8）のヌクレオチド配列を含む、請求項10に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記RNA分子は、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6のヌクレオチド配列を含む、請求項10に記載の方法。

**【請求項 14】**

膵癌細胞を膵癌細胞アプタマー複合体と接触させる前記ステップは、前記膵癌細胞アプタマー複合体を被験者の静脈内に（intravenously）投与することにより行われる、

50

請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

膵癌の治療のための方法であって、

膵細胞アプタマーを治療上有効量投与するステップを含み、

前記膵細胞アプタマーは、膵癌細胞表面タンパク質に特異的に結合する RNA 分子を含み、

前記膵細胞アプタマーは、膵細胞リガンドの結合を妨げる、方法。

【請求項 16】

前記 RNA 分子は、G A A U G C C C (配列番号：8) のヌクレオチド配列を含む、

請求項 15 に記載の方法。

10

【請求項 17】

前記 RNA 分子は、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5 または配列番号：6 のヌクレオチド配列を含む、

請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記膵細胞アプタマーは、1 つまたは複数の治療薬に結合される、

請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 1 つまたは複数の治療薬は、shRNA 分子、siRNA 分子、mRNA 分子および miRNA 分子から選択される、

請求項 18 に記載の方法。

20

【請求項 20】

前記膵癌は、腺房細胞癌、腺癌、腺扁平上皮癌、巨細胞腫瘍、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN)、ムチン性嚢胞腺癌、膵芽腫、漿液性嚢胞腺癌、充実性偽乳頭腫瘍、ガストリノーマ (ゾリンジャーエリソン症候群)、グルカゴノーマ、膵島細胞腺腫、非機能性島細胞腫瘍、ソマトスタチノーマ、多発性内分泌腺腫症 1 型由来の二次性腫瘍、または血管作動性腸ペプチド放出腫瘍である、

請求項 15 に記載の方法。

【請求項 21】

膵細胞アプタマーを含む医薬組成物であって、

前記膵細胞アプタマーは、膵癌細胞表面タンパク質に特異的に結合する RNA 分子および薬学的に許容可能な担体を含む、

医薬組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連案件の相互参照

本出願は、2012 年 4 月 10 日に提出された米国仮特許出願 61/622,375 号の優先権を主張し、その内容を本明細書に援用し、本明細書にある記載と同様に扱う。

40

【背景技術】

【0002】

膵管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma: PDAC) は、アメリカ合衆国において癌による死亡原因の第 4 位となっており、年間 30,000 人に上る人が死亡する (Jemal ら、2009)。膵癌は病状の進行が速く、特定の症状も無いことから、早期の診断および有意義な治療を行うことが難しい (Stathis および Moore、2010; Schneider ら、2005)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

50

膵癌患者への治療の改善に対して積極的な試みがなされてきたが、大きな進歩は見られていない (Stathis および Moore、2010; Pancreatic Cancer UK 2011)。ターゲット療法および全身療法の発展を通して改善がなされているが、膵癌の予後および治療は未だ不十分である。その理由は、症状が現れるのが遅いことと、効果的な治療方法が無いことである (Lira、2004)。その結果、手術後に単独投与されるゲムシタピンが、現在の標準治療のままである。切除不能膵癌に対して緩和療法として、または切除術の補助療法として投与される他の化学療法薬または生物学的治療薬との組み合わせについては、大きな進歩は見られない (Klinkenbijsら、1999; Neoptolemusら、2004; Oettleら、2007)。膵癌患者の5年生存率は、第III相試験が数多くなされているにもかかわらず、切除術後5%未満のままである (Vincentら、2011; Alexakis、2004; Ghaneh、2007, BSG、2005)。大多数の患者は、切除術および術後化学療法の後、2年以内に局所または全身再発を呈する (Vincentら、2011; Alexakis、2004; Ghaneh、2007)。現在、最も効果的な単剤であるゲムシタピンは、1年生存率を16から19%まで増加させる。ゲムシタピンまたは5-フルオロウラシル (5-FU) のような従来の治療では、生存期間中央値はわずか数か月である (Saif、2009; Riveraら、2009)。ランダム化研究では Tarceva (登録商標) (erlotinib) を投与することで全生存率の中央値が11日間伸びた。 (Cunningham、2009; Heinemann、2012)。

10

20

#### 【0004】

このように従来の治療が限定的な効果しかもたらさないのは、PDAC細胞が抗癌剤に対して強い耐性を有するからであり、これは化学療法薬に対する効果的な防御から生じる (Wong および Lemoine、2009; Fulda、2009)。そのため、この破壊的な疾患に対する新しい治療方法の開発が重要である。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0005】

いくつかの実施形態では、特異的に膵癌細胞に結合するアプタマーが提供される。そのような膵癌細胞アプタマーは、膵癌細胞表面タンパク質に特異的に結合するRNA分子を含み得る。本明細書に記述された実施例によるアプタマーとして使用されるRNA分子は、GAAGCC (配列番号: 8) のヌクレオチド配列を含み得る。特定の実施形態において、RNA分子は、配列番号: 1、配列番号: 2、配列番号: 3、配列番号: 4、配列番号: 5 または配列番号: 6 のヌクレオチド配列を含み得る。特定の実施形態において、アプタマーは、1つまたは複数の治療薬、1つまたは複数の診断用薬剤、またはそれらの組み合わせと結合され得る。いくつかの態様において、1つまたは複数の治療薬は、shRNA分子、siRNA分子、mRNA分子およびmiRNA分子から選択され得る。

30

#### 【0006】

いくつかの実施形態では、膵癌細胞に治療薬を送達するための方法が提供される。そのような方法は、膵癌細胞と膵癌細胞アプタマー複合体とを接触させるステップを含み得る。膵癌細胞アプタマー複合体は、膵細胞アプタマー構成要素および治療薬構成要素を含み得る。いくつかの態様において、膵細胞アプタマー構成要素は、膵癌細胞表面タンパク質に特異的に結合するRNA分子を含み、本明細書に記述したような膵細胞アプタマー複合体の内部移行が生じる。治療薬構成要素には、mRNA分子と結合可能なあらゆる適切な治療薬が含まれてよく、shRNA分子、siRNA分子、mRNAの分子、miRNA分子等を含むがこれらに限らない。

40

#### 【0007】

他の実施例において、膵癌の治療のための方法が提供される。そのような方法は、膵細胞アプタマーを治療上有効量投与するステップを含み得る。ここで膵細胞アプタマーは膵癌細胞表面タンパク質に特異的に結合するRNA分子を含み、また、膵細胞アプタマーは膵細胞リガンドの結合を妨げる。本明細書に記述された実施例によるアプタマーとして使用されるRNA分子は、GAAGCC (配列番号: 8) のヌクレオチド配列を含み得

50

る。特定の実施形態において、RNA分子は、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6のヌクレオチド配列を含み得る。特定の実施形態において、アプタマーは、1つまたは複数の治療薬、1つまたは複数の診断用薬剤、またはそれらの組み合わせと結合され得る。いくつかの実施形態では、アプタマーは、膵癌を治療する本方法で使用される医薬組成物の一部であり得る。当該医薬組成物は、1つまたは複数の追加の治療薬（例えば、化学療法剤）をさらに含み得る。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】いくつかの実施例による膵癌細胞特異的アプタマーを選択するための選択/対抗選択試験管内進化法（systematic evolution of ligands by exponential enrichment：SELEX）プロセスを説明する模式図である。手短に言えば、対抗選択ステップ  
10  
では、2' F - Py RNAの一群を非膵癌細胞株（Hu h 7 肝臓癌細胞株）または正常な膵細胞株と共にインキュベートした。選択ステップでは、結合しなかったオリゴヌクレオチド配列を回収し、膵癌細胞株（Panc - 1）と共にインキュベートした。結合しなかった配列を廃棄し、結合した配列をトータルRNA抽出法により回収した。その後、選択ステップにより濃縮した配列を、後続の選択サイクルの前に増幅した（Espositoら（2011）が採用した方法に基づくSELEX方法）。

【図2A】いくつかの実施例による、ランダムN40 RNAライブラリーから選択されたRNAアプタマー（A）配列番号：1の二次構造を示す図である。二次構造は、Mfold  
20  
プログラムを使用して予測した。

【図2B】いくつかの実施例による、ランダムN40 RNAライブラリーから選択されたRNAアプタマー（B）配列番号：2の二次構造を示す図である。二次構造は、Mfold  
プログラムを使用して予測した。

【図2C】いくつかの実施例による、ランダムN40 RNAライブラリーから選択されたRNAアプタマー（C）配列番号：3の二次構造を示す図である。二次構造は、Mfold  
プログラムを使用して予測した。

【図2D】いくつかの実施例による、ランダムN40 RNAライブラリーから選択されたRNAアプタマー（D）配列番号：4の二次構造を示す図である。二次構造は、Mfold  
プログラムを使用して予測した。

【図2E】いくつかの実施例による、ランダムN40 RNAライブラリーから選択されたRNAアプタマー（E）配列番号：5の二次構造を示す図である。二次構造は、Mfold  
30  
プログラムを使用して予測した。

【図2F】いくつかの実施例による、ランダムN40 RNAライブラリーから選択されたRNAアプタマー（F）配列番号：6の二次構造を示す図である。二次構造は、Mfold  
プログラムを使用して予測した。

【図3】フローサイトメトリーにより、細胞型特異的結合および取込みを示すグラフである。Cy3標識RNAを、Panc - 1および対照細胞のHu h 7への結合についてテストした。選択されたアプタマーは、細胞型特異的な結合親和性を示した。結果は平均±標準偏差（standard deviation：S.D.）として記載した。アスタリスクは、対応する  
40  
分析において値が最初のRNAライブラリー対照に対する値とは有意に異なることを示す。P値は $P = 0.001$ （\*\*）～ $0.01$ （\*）である。P値は、95%の信頼区間の両側の対応のあるt検定を用いて算定された。示したデータは、3回繰り返したものの平均である。また、エラーバーは、平均の標準誤差を表す。データは、3回繰り返したものの平均値を表す。最初のRNAライブラリーをLib、Panc - 1をPC、Hu h 7をNCとして示す。

【図4】共焦点顕微鏡法による、標的細胞での細胞内移行を示す写真である。細胞は35  
mmシャーレで増殖させ、Cy3標識RNA 100nMと共にインキュベートした。1時  
間のインキュベーション後に、細胞を洗浄し、 $\times 40$ 倍率で画像を撮影した。（A）最初のRNAライブラリーをPanc - 1とHu h 7でインキュベートした。（B）ア  
プタマーのクローンをそれぞれPanc - 1でインキュベートした。赤色はCy3標識RN  
50

Aを示し、青色はHoechst 33342（生細胞に対する核染色剤）を示す。

【図5A - B】共焦点顕微鏡法による、他のタイプの膵癌細胞での細胞内移行を示す写真である。Cy3で標識したRNAアプタマーのクローンを、それぞれ異なるタイプの膵癌細胞に適用した。細胞は35mmシャーレで増殖させ、RNA 100 nMと共にインキュベートした。1時間のインキュベーション後に、細胞を洗浄し、 $\times 40$ 倍率で画像を撮影した。（A）はAsPC-1の結果を示し、（B）はCFPAC-1の結果を示す。赤色はCy3標識RNAを示し、青色はHoechst 33342（生細胞に対する核染色剤）を示す。アプタマーは全てのタイプの膵癌細胞において細胞内移行した。

【図5C - E】共焦点顕微鏡法による、他のタイプの膵癌細胞での細胞内移行を示す写真である。Cy3で標識したRNAアプタマーのクローンを、それぞれ異なるタイプの膵癌細胞に適用した。細胞は35mmシャーレで増殖させ、RNA 100 nMと共にインキュベートした。1時間のインキュベーション後に、細胞を洗浄し、 $\times 40$ 倍率で画像を撮影した。（C）はBxPC-1の結果を示し、（D）はCapan-1の結果を示し、（E）はMIA PaCa-2の結果を示す。赤色はCy3標識RNAを示し、青色はHoechst 33342（生細胞に対する核染色剤）を示す。アプタマーは全てのタイプの膵癌細胞において細胞内移行した。

【図6A】共焦点顕微鏡法による、正常な初代膵細胞への細胞内移行を示す写真である。Cy3で標識したRNAアプタマーのクローンを、あるタイプの正常膵細胞に適用した。細胞は35mmシャーレで増殖させ、RNA 100 nMと共にインキュベートした。1時間のインキュベーション後に、細胞を洗浄し、 $\times 40$ 倍率で画像を撮影した。赤色はCy3標識RNA（確認できない）を示し、青色はHoechst 33342（生細胞に対する核染色剤）を示す。正常膵細胞は、RNAアプタマーを内部移行させなかった。

【図6B】共焦点顕微鏡法による、正常な初代膵細胞への細胞内移行を示す写真である。Cy3で標識したRNAアプタマーのクローンを、図6Aとは異なるタイプの正常膵細胞に適用した。細胞は35mmシャーレで増殖させ、RNA 100 nMと共にインキュベートした。1時間のインキュベーション後に、細胞を洗浄し、 $\times 40$ 倍率で画像を撮影した。赤色はCy3標識RNA（確認できない）を示し、青色はHoechst 33342（生細胞に対する核染色剤）を示す。正常膵細胞は、RNAアプタマーを内部移行させなかった。

【図7】P19、P15およびP1アプタマーの結合親和性を示すグラフである。解離定数（ $K_D$ ）の測定は、Cy3標識アプタマーを様々な濃度（15.6 ~ 500 nM）で使用して、カルル・ツァイス社（Zeiss）社のLSMの生理学的機能により実施した。P19、P15、P1の親和性はそれぞれ64.76 nM、70.72 nM、112.2 nMだった。

【図8】共焦点顕微鏡法による細胞内移行の競合実験の結果を示すグラフである。Panc-1細胞を、蛍光標識P19 RNA（200 nM）と、標識RNAに対する競合剤としての各非標識アプタマー（1  $\mu$ M）と共にインキュベートした。多量の競合剤の存在下で共焦点顕微鏡法を使用して蛍光強度を測定し、統計的に分析した。

【図9】P1およびP19アプタマーで処理した細胞に対する細胞増殖分析を示すグラフである。細胞増殖はWST-1試薬によりメーカーのガイドラインに従って定量化した。Panc-1（ $2.5 \times 10^5$ 細胞）は、Panc-1においてP1およびP19を1処理当たり9  $\mu$ g使用して、4回処理した。WST-1試薬を1:100希釈でプレートに使用し、1時間インキュベートした。酵素反応は、BioTek社製のELISAリーダーを使用して、450 nmで計測した。

【図10】生体内（in vivo）実験の結果を示すグラフである。Panc-1膵癌細胞を、NOD/SCIDマウス5匹の側腹部に皮下（subcutaneously: s.c.）注射した。2週後に、マウスを2群に分けた。1群を未処理対照として使用し、他方の群ではP19と組み合わせたP1を10  $\mu$ g注射した。アプタマーを尾静脈注射した。1動物当たり合計4回注入した。スチューデントt検定を統計分析に使用した。\* TTEST: P値 < 0.05。

10

20

30

40

50

【図 1 1】ゲムシタピン耐性腫瘍の動物実験の結果を示すグラフである。5 週齢の雌の N O D / S C I D マウス 1 2 匹に、ゲムシタピン耐性 A S P C - 1 細胞 ( $2.8 \times 10^6$  個) を側腹部に皮下 (s . c .) 注射した。3 週間後にマウスを 4 群に分けた。1 群を未処理対照として使用し、他はそれぞれ P 1、P 1 9、P 1 9 と組み合わせた P 1 (P 1 + P 1 9) を注射した。アプタマーを尾静脈注射した。1 動物当たり 2 日毎に合計 4 回注射し、9 日目に屠殺した。対照と比較して、3 処理群は全て有意な抗腫瘍効果を示した (\* P < 0 . 0 5 )。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本明細書において、膵癌細胞アプタマー、細胞特異的送達用システムおよびそれらの利用のための方法が提供される。本明細書に記載された実施例によれば、膵癌細胞アプタマーは単独で使用してもよく、或いは、治療用または診断用の薬剤ならびに膵癌の治療、診断およびモニタリング用の分子と組み合わせて使用してもよい。

10

【0010】

アプタマー

一実施形態において、膵癌細胞を標的とするアプタマーを提供する。当該アプタマーは、膵細胞癌、悪性腫瘍の治療のため、或いは膵細胞に関連する他の疾患または症状を対象として、使用されてよい。「アプタマー」は、小分子、タンパク質、核酸、細胞、組織、生物体等の標的に特異的に結合する核酸、ペプチド分子等のあらゆる適切な小分子である。特異的な細胞表面タンパク質を標的とするアプタマーは、特定の細胞型を標的とする送達分子として使用でき、それによって非特異的な効果等の望ましくない副作用が低減される。さらに、特異的な細胞表面タンパク質への結合によって、アプタマー自体も治療薬として使用されてよい。

20

【0011】

いくつかの実施形態では、アプタマー（またはアプタマー構成要素）は核酸アプタマーである。このようなナノモル範囲の結合親和性を有するアプタマーは、診断から治療的分析形式まで幅広く柔軟に適用して使用できる (Z h o u および R o s s i、2009)。さらに、特異的な細胞表面タンパク質を標的とするアプタマーは、特定の細胞型を標的とする送達分子として使用することができ、それによって非特異的な効果等の望まない副作用が低減される (Z h o u ら、2008)。特定の実施形態において、核酸アプタマーは R N A アプタマーである。R N A アプタマーは、独立した分子としてで使用する適切な任意の R N A 分子であってよく、或いは、多様な機能を有するより大型の R N A 分子（例えばいくつかの実施例による R N A 干渉分子）の一部として組み込まれてもよい。例えば、膵細胞アプタマーは s h R N A 分子の露出領域（例えば、s h R N A 分子のループ領域）に位置して、s h R N A または m i R N A 分子が標的細胞上の表面レセプターと結合できるようにしてよい。膵細胞アプタマーは細胞内移行した後、標的細胞の R N A 干渉経路によって処理される。

30

【0012】

核酸アプタマーを形成する核酸は、天然のヌクレオシド、修飾ヌクレオシド、1 つもしくは複数のヌクレオシド間に挿入された炭化水素リンカー（例えば、アルキレン）もしくはポリエーテルリンカー（例えば、P E G リンカー）を有する天然のヌクレオシド、1 つもしくは複数のヌクレオシドの間に挿入された炭化水素もしくは P E G リンカーを有する修飾ヌクレオシド、またはそれらの組合せを含み得る。いくつかの実施形態では、核酸アプタマーの結合親和性および選択性が置換により実質的に減少しない場合、核酸アプタマーのヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを炭化水素リンカーまたはポリエーテルリンカーと置き換えることができる。

40

【0013】

本明細書に記載された実施例により、膵癌細胞を標的として選択的に結合するアプタマーが生成され選択される。アプタマーの選択は、試験管内進化法 (S E L E X) として知られる試験管内 (i n v i t r o) 選択法用に最適化された手順等の、当技術分野で既

50

知の任意の適切な方法によって達成される。S E L E X プロセスはアプタマー選択の一般的な技術として確立されているが、任意の標的に対する使用に対しては予測可能ではなく、標準化もされてはいない。むしろ、S E L E X プロセスは特定の標的分子それぞれに対し最適化されカスタマイズされなくてはならない。S E L E X 実験はそれぞれに困難さがあり、全ての標的に対して機能することは保証されていない。

#### 【0014】

アプタマー選択が成功するためには多くの因子が重要である。例えば、標的分子は安定していて、S E L E X の各ラウンドにおいて容易に複製可能である必要がある。なぜなら S E L E X プロセスでは核酸分子を濃縮するために、結合、選択および増幅を複数ラウンド繰り返すからである。さらに、標的分子に特異的に結合する核酸が最初のライブラリーの中に存在していなければならない。したがって、多様性の高い核酸のプールを生成することが有利となる。開始ライブラリーが標的分子に対するアプタマーを含むかどうかは保証されないため、単一の標的を対象とする S E L E X プロセスを異なる開始ライブラリーで繰り返す必要がある。S E L E X を使用するアプタマー選択は予測することができない。アプタマー選択を成功させるために因子を全て最適化しても、S E L E X プロセスでは全ての標的分子に対して有望なアプタマーを生成できるとは限らない。

10

#### 【0015】

いくつかの実施形態では、アプタマーの選択は、培地内の全生細胞 / 無傷細胞に対して S E L E X プロセスを適用し、標的細胞上に特異的に発現する抗原を選択的に標的とするアプタマーを獲得することで、達成され得る。全細胞 S E L E X プロセスには、対抗選択と選択の両方を含む手法があるが、細胞表面の腫瘍特異的な標的に対するアプタマーを濃縮するよう特別に設計される (図 1)。下記の実施例に詳述したように、S E L E X プロセスを用いて、膵癌細胞に結合できるが無関係な癌細胞や健康な細胞型には結合しない R N A アプタマーの集団を生成した。特定の実施形態において、膵癌細胞アプタマーは、配列番号: 1、配列番号: 2、配列番号: 3、配列番号: 4、配列番号: 5 または配列番号: 6 を含み得る配列を有する (各配列は次の実施例および図 2 A ~ 2 F に詳細に記載される)。

20

#### 【0016】

下記の実施例に詳述したように、少なくとも 2 つのアプタマーが腫瘍サイズの減少に効果的であることがわかった。これらのアプタマーは、共通のヌクレオチドモチーフ G A A U G C C C (配列番号: 8) を有する。したがって、本明細書に記述された実施例に従って使用された膵細胞アプタマーは、G A A U G C C C (配列番号: 8) のヌクレオチド配列を含んでよい。

30

#### 【0017】

本明細書に記述されたアプタマーは、膵癌細胞上で過剰発現する或いは膵癌細胞上でのみ特異的に発現する細胞表面分子またはエンドサイトーシス膜結合タンパク質 (例えば、膜レセプターまたは糖タンパク質) を標的とする。そのため、上述のアプタマー選択プロセスを用いて、既知の細胞表面分子およびエンドサイトーシス膜結合タンパク質に結合するアプタマーを開発してもよく、或いは、膵細胞のバイオマーカーとなり膵細胞に特異的である新規の細胞表面分子を発見してもよい。

40

#### 【0018】

本明細書に記載された実施例によれば、膵癌細胞アプタマーは、細胞特異的な送達手段、治療薬またはこの両方として機能することができる。さらに、これらのアプタマーは、レセプターまたは他の膜結合タンパク質をブロックして、リガンドの結合を阻害することにより、膵癌細胞の増殖を阻害または抑制でき、或いは癌の経路に干渉できる可能性がある。そのため、膵癌細胞アプタマーは少なくとも 2 つの機能、すなわち、膵癌細胞の増殖および生存の阻害の機能と、治療用および / または診断用薬剤の送達手段としての機能とに、使用され得る。以下に記載されるように、膵癌細胞アプタマーは、膵癌細胞株に治療用または診断用薬剤を効率的に送達することができる。

50

#### 【0019】



### アプタマー複合体

いくつかの実施例によれば、本明細書に記述されたアプタマーは治療薬に結合され、治療用アプタマー複合体を形成してよい。本明細書で使用される場合、「結合された」または「複合体」という表現は、直接的もしくは間接的な共有結合性または非共有結合性の相互作用によって連結される2つ以上の要素または2つ以上の要素の状態を指す。いくつかの実施形態では、結合は共有結合性である。いくつかの実施形態では、共有結合はリンカー部分によって媒介される。いくつかの実施形態では、結合は非共有結合性である（電荷相互作用、アフィニティー相互作用、金属配位、物理吸着、ホスト-ゲスト相互作用、疎水性相互作用、スタッキング相互作用、「結合しやすい配列（sticky sequence）」等の水素結合相互作用、ファンデルワールス相互作用、磁性相互作用、静電的相互作用、双極子間相互作用等）。この場合、本明細書に記述された膵癌細胞アプタマーは、膵癌細胞に治療用または診断用ペイロードを送達するための細胞特異的な送達手段として使用されてよい。

10

#### 【0020】

いくつかの実施例によれば、本明細書に記述された膵癌細胞アプタマーは、1つまたは複数の治療薬に結合されて、治療用アプタマー複合体を形成してよい。本明細書で使用される「治療薬」は、本明細書に記述された癌等の症状の治療に有用な原子、分子または化合物である。膵細胞アプタマーに結合され得る治療薬の例には、これらに限定するものではないが、薬剤、化学療法薬、治療的抗体およびそのフラグメント、毒物、放射性同位体、酵素（例えば腫瘍サイトでプロドラッグを切断して細胞毒にする酵素）、ヌクレアーゼ、ホルモン、免疫調節剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、核酸分子（例えば、mRNA分子、cDNA分子、siRNAやshRNA等のRNAi分子）、キレート剤、ホウ素化合物、光活性薬剤、色素が含まれる。治療薬にはまた、放射線増感剤として機能して標的細胞の放射線治療に対する感受性を正常細胞に比べて高くなるようにするキレート剤に結合される金属、合金、金属間化合物またはコアシェルナノ粒子が含まれる。さらに治療薬には、MRI造影剤（例えば、マグネタイトまたは $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ）に対する常磁性ナノ粒子が含まれてよく、他のタイプの治療法（例えば、光力学治療および温度療法）およびイメージング（例えば、蛍光イメージング（AuとCdSe））で使用されてよい。

20

#### 【0021】

特定の実施形態において、膵細胞アプタマーは、治療薬として機能する核酸分子に結合される。いくつかの実施形態では、アプタマーに結合される核酸分子はRNA分子である。本明細書に記述された実施形態によるアプタマーに結合され得るRNA分子の例には、これらに限定するものではないが、リボソームRNA（rRNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、低分子核内RNA（snRNA）、核小体低分子RNA（snoRNA）、低分子細胞質RNA（scRNA）、マイクロRNA（miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、低分子ヘアピン型RNA（shRNA）が含まれる。

30

#### 【0022】

一態様において、核酸分子はRNA干渉分子（例えば、siRNAやshRNA分子）であり、アプタマーによって標的細胞に送達された場合、細胞内移行し、1つもしくは複数の癌遺伝子、または癌に関係しているあらゆるタンパク質もしくはペプチドの発現を、mRNA分子を標的とすることにより抑制するか停止させるよう機能する。一実施形態において、RNA干渉分子は、(i) K-ras（v-Ki-ras 2カーステンラット肉腫ウイルスの癌遺伝子ホモログ）および/またはSHH（Sonic Hedgehog）をコードするmRNA分子を標的とする、siRNA、shRNA、miRNAまたは他のRNA分子、(ii) 抗アポトーシスタンパク質（例えば、Bcl-xL, Bcl-2, survivin, Hax-1, AKT2, Mcl-1）をコードするmRNA分子、または(iii) 癌に関係するタンパク質の発現を抑制するまたは促進する他のあらゆるRNA分子である。

40

#### 【0023】

50

別の実施形態では、核酸分子は、治療用または診断用ペイロードの一部として細胞内で発現される mRNA 分子である。或いは、mRNA 構成要素は、cDNA 分子を含んでよい。さらに、mRNA 構成要素は、標的細胞において完全な野生型タンパク質またはペプチドを発現してよく、或いは、少なくともそのようなタンパク質またはペプチドの生物学的に活性のある部分を発現してよい。標的細胞内に発現した場合、mRNA 分子は、標的細胞には存在しないタンパク質またはペプチドまたは改変されたタンパク質またはペプチド、標的細胞を破壊する細胞毒性タンパク質またはペプチド、アポトーシス誘導タンパク質またはペプチド、または他の癌治療タンパク質またはペプチドを発現することによって、治療薬として機能する。

#### 【0024】

本明細書に記述された実施例により使用され得る化学療法薬は多くの場合、本来細胞毒性かまたは細胞増殖抑制性であり、例としては、これらに限定するものではないが、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤ホルモン療法、標的治療法、免疫治療法が挙げられる。いくつかの実施形態では、本開示の実施例による治療薬として使用される化学療法薬の例には、これらに限定するものではないが、13-シス-レチノイン酸、2-クロロデオキシアデノシン、5-アザシチジン、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、アクチノマイシン D、アドリアマイシン、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アリトレチノイン、全トランス型レチノイン酸、アルファインターフェロン、アルトレタミン、アメトプテリン、アミフォスチン、アナグレリド、アナストロゾール、アラビノシルシトシン、三酸化二砒素、アムサクリン、アミノカンプトテシン、アミノグルテチミド、アスバラギナーゼ、アザシチジン、カルメットゲラン菌 (BCG)、ベンダムスチン、ベバシズマブ、ベクサロテン、ピカルタミド、ボルテゾミブ、プレオマイシン、プスルファン、ロイコボリンカルシウム、シトロボルム因子、カベシタピン、カネルチニブ、カルボプラチン、カルムスチン、セツキシマブ、クロランブシル、シスプラチン、クラドリビン、コーチゾン、シクロフォスファミド、シタラビン、ダルベポエチンアルファ、ダサチニブ、ダウノマイシン、デシタビン、デニロイキンディフチトクス、デキサメサゾン、デキサゾン、デクスラゾキサソ、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ダカルバジン、ドセタキセル、ドキソルビシン、ドキシフルリジン、エニルウラシル、エピルビシン、エポエチンアルファ、エルロチニブ、エベロリムス、エキセメスタン、エストラムスチン、エトポシド、フィルグラスチム、フルオキシメステロン、フルベストラント、フラボピリドール、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、フルタミド、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゲムツズマブオゾガミシン、ゴセレリン、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、ヘキサメチルメラミン、ハイドロコーチゾンヒドロキシウレア、イブリットマブ、インターフェロンアルファ、インターロイキン 2、インターロイキン 11、イソトレチノイン、イクサベピロン、イダルビシン、メシル酸イマチニブ、イホスファミド、イリノテカン、ラパチニブ、レナリドマイド、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、Ar - C リボソーム、ロムスチン、メクロレタミン、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メソトレキサート、メチルプレドニゾロン、マイトマイシン C、ミトタン、ミトキサントロン、ネララビン、ニルタミド、オクトレオチド、オブレルベキン、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペメトレキセド、パニツムマブ、PEG インターフェロン、ペガスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、PEG-L-アスバラギナーゼ、ペントスタチン、プリカミシン、プレドニゾロン、プレドニゾン、プロカルバジン、ラロキシフェン、リツキシマブ、ロミブロスチム、ラルチトレキセド、サバシタビン、サルグラモスチム、サトラブラチン、ソラフェニブ、スニチニブ、セムスチン、ストレプトゾトシン、タモキシフェン、テガフル、テガフルウラシル、テムシロリムス、テモゾロマイド、テニポシド、サリドマイド、チオグアニン、チオテバ、トボテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、トリメトレキサート、アムルビシン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン、ピノレルビン、ボリノスタット、ゾレドロン酸が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0025】

本開示の実施例による治療薬として使用され得る治療用抗体およびその機能的フラグメントの例には、これらに限定するものではないが、アテムツズマブ、ペバシズマブ、セツキシマブ、エドレコロマブ、ゲムツズマブ、イブリツモマブ・チウキセタン、パニツムマブ、リツキシマブ、トシツモマブ、およびトラスツズマブならびに本明細書に記載した特異的疾患に関連した他の抗体が含まれる。

## 【0026】

本開示の実施例による治療薬として使用され得る毒物の例にては、これらに限定するものではないが、リシン、アプリン、RNA分解酵素(RNase)、DNA分解酵素(DNase) I、ブドウ球菌エンテロトキシンA、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素、シュードモナス内毒素が含まれる。

10

## 【0027】

本開示の実施例により治療薬として使用され得る放射性同位体の例には、これらに限定するものではないが、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{53}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ が含まれる。

## 【0028】

他の実施例によれば、本明細書に記述された脾細胞アプタマーは、1つまたは複数の診断用薬剤(または「造影剤」)に結合されて、診断用アプタマー複合体を形成してよい。診断用アプタマー複合体は脾細胞を標的とし、生体内(in vivo)においてイメージング法(例えば、陽電子放射型断層撮影法(PET)、コンピューター断層装置(CAT)、単一光子放射断層撮影法、X線、蛍光透視法、核磁気共鳴画像法(MRI))によって脾細胞を可視化する。そのようなものとして、診断用アプタマー複合体は、脾臓に関係する疾患を診断し、モニタリングし、かつ/または可視化する方法において使用されてよい。

20

## 【0029】

いくつかの実施形態において、診断用またはイメージング用の薬剤の例には、これらに限定するものではないが、蛍光性、発光性または磁性のタンパク質、ペプチドまたはそれらの誘導体(例えば、遺伝子改変変異体)が含まれる。使用され得る蛍光タンパク質の例には、これらに限定するものではないが、緑色蛍光タンパク質(GFP)、高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)、赤色、青色、黄色、シアンおよび碧色の蛍光タンパク質、ならびにサンゴ蛍光タンパク質が含まれる。使用され得る発光タンパク質の例には、これらに限定するものではないが、ルシフェラーゼ、エクオリンおよびそれらの誘導体が含まれる。多数の蛍光性および、発光性色素およびタンパク質が当技術分野で知られている(例えば、米国特許出願公開第2004/0067503号明細書; Valeur, B., "Molecular Fluorescence: Principles and Applications," John WileyおよびSons, 2002; Invitrogenウェブサイト上で入手可能な、Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes, 9<sup>sup</sup>th edition, 2002; およびThe Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Invitrogen, 10th edition、; いずれも、本願に引用して援用し、本明細書にある記載と同様に扱う)。

30

40

## 【0030】

他の態様において、脾細胞アプタマーはさらに、非タンパク質の診断用薬剤または送達媒体に結合されてよく、そうでない場合は会合されてよい。診断用薬剤または送達媒体の例には、ナノ粒子、放射性物質(例えば、放射性同位体、放射性核種、放射標識または放射性トレーサ)、色素、造影剤、蛍光性化合物または分子、生物発光化合物または分子、酵素、増強剤(例えば、常磁性イオン)が含まれる。なお、一部のナノ粒子、例えば量子ドットおよび金属ナノ粒子(以下に記載)は、診断用薬剤または治療薬としての使用(例

50

えば温熱療法および光力学療法の使用、ならびに蛍光およびまたはMRI造影による診断用薬剤)にも適切である場合がある。

#### 【0031】

本開示の実施例による追加の診断用薬剤として使用され得る蛍光および発光物質の例には、これらに限定するものではないが、一般に「色素」、「標識」または「指示薬」と呼ばれる様々な有機または無機の小分子が含まれる。例えば、フルオレセイン、ローダミン、アクリジン色素、アレクサ色素、シアニン色素が挙げられる。

#### 【0032】

本開示の実施例による追加の診断用薬剤として使用され得る酵素の例には、これらに限定するものではないが、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、 $\alpha$ -ラクタマーゼが含まれる。このような酵素は、色原体、蛍光性化合物または発光性化合物と組み合わせて、検出可能な信号を生成するために使用されてよい。

#### 【0033】

本開示の実施例による追加の診断用薬剤として使用され得る放射性物質の例には、これらに限定するものではないが、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{45}\text{Ti}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{77}\text{As}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{105}\text{Pd}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{143}\text{Pr}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{154}\text{Gd}$ 、 $^{158}\text{Gd}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{169}\text{Er}$ 、 $^{175}\text{Lu}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{189}\text{Re}$ 、 $^{194}\text{Ir}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{211}\text{Pb}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ が含まれる。本開示の実施例による追加の診断用薬剤として使用され得る常磁性イオンの例には、これらに限定するものではないが、遷移金属およびランタニド金属(例えば、21~29、42、43、44、57~71の原子番号の金属)のイオンが含まれる。これらの金属は、Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、YbおよびLuのイオンを含む。

#### 【0034】

診断用薬剤が放射性金属または常磁性イオンである場合、この薬剤は、これらのイオンに結合するためのロングテールに付着した1つまたは複数のキレート基を有するロングテールがある別の試薬と反応してよい。ロングテールは、ポリリジン鎖、多糖鎖などのポリマー、或いは金属またはイオンに結合するために追加され得るペンダント基を有する他の誘導体化された鎖もしくは誘導体化可能な鎖であってもよい。本開示により使用し得るキレート基の例には、これらに限定するものではないが、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、DOTA、NOTA、NETA、ボルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、ビス-チオセミカルバゾン、ポリオキシム、および類似の基が含まれる。キレート剤は、通常、免疫反応性の喪失が最小限の状態、ならびに凝集および/または内部架橋が最小限の状態での分子への結合形成を可能にする基により、PSMA抗体または機能的抗体フラグメントに連結される。同じキレート剤がマンガン、鉄、ガドリニウム等の非放射性金属と複合される場合、本明細書に記載された抗体および担体と一緒に使用すればMRIに有用である。NOTA、DOTA、TEETA等の大環状キレートは、種々の金属および放射性金属と共に有益であり、これらは、以下に限らないが、ガリウム、イットリウムおよび銅のそれぞれの放射性核種を含む。大環状ポリエーテル等の他の環状キレートは、RAITに対する $^{223}\text{Ra}$ 等の核種に安定的に結合するという点が着目されるが、これを使用してもよい。特定の実施形態において、キレート部分は、PET分析での使用でAI- $^{18}\text{F}$ 複合体のようなPET診断用薬剤を標的分子に結合させるのに用いられ得る。

#### 【0035】

他の実施例において、アプタマーは、治療用および診断用薬剤の両方に結合されてよい

。したがって、上述の診断用薬剤および治療用薬剤のうちのいずれかを組み合わせて使用して、膵細胞を標的として診断用および治療用ペイロードを単回投与で送達するアプタマー複合体を形成してよい。

#### 【0036】

膵癌細胞アプタマーの治療的使用法

本明細書に記述されたアプタマーおよびアプタマー治療薬複合体は、膵癌治療の基盤となる少なくとも2つの機能を有する。第一に、いくつかの実施例によれば、膵細胞アプタマー自体が、膵癌細胞の増殖および生存を阻害または抑制するために使用されてよく、また、既存の原発性腫瘍または転移性腫瘍を根絶するために使用されてもよい。

#### 【0037】

したがって、膵癌細胞の増殖抑制の方法、膵癌細胞の腫瘍の根絶の方法、および膵癌または膵癌細胞の悪性病変の治療の方法が、本明細書に記述された実施例により提供される。本明細書に記述された方法を使用して治療され得る膵癌および腫瘍の例には、これらに限定するものではないが、腺房細胞癌、腺癌、腺扁平上皮癌、巨細胞腫瘍、膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）、ムチン性嚢胞腺癌、膵芽腫、漿液性嚢胞腺癌、充実性偽乳頭腫瘍、ガストリノーマ（ゾリンジャーエリソン症候群）、グルカゴノーマ、膵島細胞腺腫、非機能性島細胞腫瘍、ソマトスタチノーマ、多発性内分泌腺腫症1型に由来する二次性腫瘍、血管作動性腸ペプチド放出腫瘍（ビポーマまたはVerner-Morrison症候群）が含まれる。

#### 【0038】

病気を「治療すること」または「治療」は、病気を予防すること、病気の発症または進行の速度を遅らせること、病気が進行するリスクを低減すること、病気と関連する症状の進行を予防または遅延させること、病気と関連する症状を軽減または停止させること、病気を完全に或いは部分的に退行させること、またはそれらの組合せを意味する。例えば、本明細書に記述されたようなアプタマーまたはアプタマー複合体は、膵癌を治療するために使用されてよい。ここで治療とは、腫瘍の退行または根絶をもたらす、膵癌細胞の増殖速度の抑制、膵癌細胞死の増加、または腫瘍サイズの減少を指す。本明細書に記述された治療は、任意の適切な患者に使用されてよく、患者には、本明細書に記述された方法による治療を必要とするヒトの被検体またはあらゆる哺乳類もしくは鳥類の被検体（例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウサギ、マウス、ラット、ブタ、ウシ）が含まれる。

#### 【0039】

膵癌を治療するための本方法は、治療用組成物を治療上有効量投与するステップを含む。「有効量」、「治療上有効量」または「有効薬量」は、標的となる病気を予防もしくは治療する、病気に伴う症状を緩和するなどの、被検体において望ましい治療効果をもたらす組成物（治療用組成物、薬剤等）の量である。正確な治療上有効量は、所与の被検体における治療の有効性の点で最も効果的な結果をもたらす組成物の量である。この量は種々の要因、例えば、これらに限らないが、治療用化合物の特性（活性、薬物動態、薬物力学、生物学的利用能等）、被検体の生理的状态（年齢、性別、疾患のタイプおよびステージ、全身健康状態、所与の投薬に対する反応性、薬物療法のタイプ等）、製剤における薬学的に許容可能な担体の性質、投与経路等により変動し得る。臨床および薬理学の分野における当業者であれば、日常的な実験を通じ、つまり化合物の投与に対する患者の反応をモニタリングしそれに従って投薬量を調節することによって、治療上有効量を決定できであろう。さらなるガイダンスについては、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21<sup>st</sup> Edition, Univ. of Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott WilliamsおよびWilkins, Philadelphia, PA, 2005を参照のこと。

#### 【0040】

治療用組成物は、特に、アプタマー、治療薬、アプタマー-治療薬、またはそれらの組み合わせを含んでよい。本明細書に記述された実施例による使用に適切なアプタマー、治

10

20

30

40

50

療薬およびアプタマー - 治療薬の例には、限定するものではないが、上記のものと、下記の実施例において記述されるものが含まれる。例えば、いくつかの実施例において、治療用組成物の一部として使用される得るRNAアプタマーは、配列番号：8の配列を含んでよい。他の実施例において、RNAアプタマーは、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6（図2A～2F）の配列を含んでよい。

#### 【0041】

治療用組成物はまた、1つまたは複数の薬学的に許容可能な担体を含んでよい。「薬学的に許容可能な担体」は、身体のある組織、器官または一部分から身体別の組織、器官または一部分へ目的の化合物を送達または輸送する際に関与する、薬学的に許容可能な物質、組成物または溶媒を指す。例えば、担体は、液体または固体の充填剤、希釈剤、添加剤、溶媒、もしくは封入材料、またはそれらの一部の組合せであってよい。担体の各構成要素は「薬学的に許容可能」でなくてはならず、つまり製剤中の他の成分と適合しなくてはならない。さらに各構成要素は、送達され得る身体組織、器官または一部分との接触に適するものでなくてはならず、つまり、その治療の有益性を過度に上回る毒性、刺激、アレルギー反応、免疫原性、他の合併症等のリスクをもたらしてはならない。

10

#### 【0042】

本明細書に記述された治療用組成物は、いずれかの適切な投与経路によって投与され得る。投与経路は当技術分野で既知の任意の投与経路を指してもよく、例としては、これらに限定しないが、エアロゾル、経腸、経鼻、経眼、経口、非経口、経直腸、経皮（例えば、局所用クリームまたは軟膏、パッチ）、経膣が挙げられる。「経皮的」投与は、局所用クリームもしくは軟膏または経皮パッチを使用して投与されてよい。「非経口」は、通常注射に関連した投与経路を指し、眼窩下、点滴、動脈内、嚢内、心臓内、皮内、筋肉内、腹腔内、肺内、脊髄内、胸骨内、脊髄腔内、子宮内、静脈内、くも膜下、被膜下、皮下、口腔粘膜、または経気管を含む。

20

#### 【0043】

本明細書に記載された実施例によれば、医薬組成物は任意に、1つまたは複数のアプタマーまたはアプタマー複合体に加えて、1つまたは複数の追加の治療薬を含んでよい。例えば、抗癌剤、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗HIV薬、抗寄生虫薬、抗原生動物薬、麻酔剤、血液凝固阻止薬、酵素阻害剤、ステロイド薬、ステロイド性または非ステロイド性抗炎症薬、抗ヒスタミン剤、免疫抑制剤、抗腫瘍薬、抗原、ワクチン、抗体、うっ血除去薬、鎮静剤、オピオイド、鎮痛剤、解熱薬、避妊薬、ホルモン、プロスタグランジン、黄体ホルモン薬、抗緑内障薬、眼科用剤、抗コリン作動薬、鎮痛剤、抗うつ薬、抗精神病薬、神経毒、催眠薬、静穏剤、抗痙攣薬、筋弛緩薬、抗パーキンソン薬、鎮痙薬、筋肉収縮剤、チャンネル遮断薬、縮瞳薬、抗分泌性剤、抗血栓症剤、血液凝固阻止薬、抗コリン作用薬、  
- アドレナリン作動遮断物質、利尿薬、心血管活性剤、血管作用薬、血管拡張剤、抗昇圧薬、血管形成剤、細胞間マトリックス相互作用調整剤（細胞増殖阻害剤、抗接着分子等）、DNA、RNAまたはタンパク質合成の阻害剤を含んでよい。

30

#### 【0044】

膵癌の治療のための独立した機能に加えて、膵細胞アプタマーは、膵細胞特異的標的送達手段として使用されてよく、特定の細胞に治療用または診断用ペイロードを送達してよい。したがって、いくつかの実施例によれば、膵癌細胞に治療用ペイロード（または治療薬）を送達するための方法が提供される。そのような方法は、膵癌細胞と膵癌細胞アプタマー複合体とを接触させるステップを含んでよく、この膵癌細胞アプタマー複合体は、膵細胞アプタマー構成要素と治療薬構成要素（つまり治療用ペイロード）を含んでよい。上述のように、膵細胞アプタマー構成要素は任意の適切なアプタマー、例えば、核酸アプタマーであってよい。一実施形態において、核酸アプタマーは、膵癌細胞表面タンパク質または他の分子に特異的に結合するRNA分子であり、膵癌細胞による膵細胞アプタマー複合体の細胞内移行を生じさせる。

40

#### 【0045】

50

一実施形態において、治療薬構成要素（または治療用ペイロード）は、本明細書で記述したアプタマー-RNAキメラに関して述べたような、siRNA分子、miRNA分子、shRNA分子、またはmRNA分子であってよい。

#### 【0046】

別の態様において、膵細胞アプタマーまたはアプタマー複合体は、膵癌細胞または膵腫瘍細胞に診断用薬剤を送達するために使用されてよい。そのような態様において、膵細胞アプタマーまたはアプタマー複合体は、膵癌の診断法において使用されてよい。膵癌または膵臓の悪性腫瘍を診断する本方法は、膵癌または膵癌腫瘍の罹患の疑いがある被検体に、診断用薬剤に結合した膵癌細胞アプタマーを有効量投与するステップを含んでよい。診断用薬剤には、上述したような1つまたは複数の診断用薬剤が含まれてよい。本方法はさらに、被検体が画像診断術（例えば、MRI、PET、CT、SPECT、PET/CT、PET/MRI、または他の適切なイメージング法）を受けるステップを含み、膵癌細胞に送達される任意の診断用薬剤を可視化してよい。膵臓または肝臓等の膵癌（原発または転移癌）にかかりやすい臓器に局在する診断用薬剤を画像診断術により可視化することで、被検体が上述したような膵癌の形態を有すること、またはその可能性が明らかになる。

10

#### 【0047】

以下の実施例は本発明の様々な実施例を説明する目的で記述される。そのため、議論する特定の実施例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきものではない。当業者には明らかであるように、多数の均等物、変形および変更が本発明の範囲から逸脱することなく可能であり、そのような同等の実施形態は本明細書に含まれる。さらに、本開示において言及された参考文献は全て引用して援用され、本明細書にある記載と同様に扱う。

20

#### 【0048】

##### 実施例

試験管内選択法として指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化（SELEX）を使用して同定されるアプタマーは、複合体構造をとることができ、標的タンパク質に高度な親和性および特異性を持って結合する（EllingtonおよびSzostak 1990；Tuerk 1997）。上述のようにアプタマーを、培養細胞および全生物体内の小分子からタンパク質および核酸にいたる多様な標的を認識するために選択してもよい（Ulrichら、2002；Wangら、2000；Blankら、2001；Danielisら、2003；Hickeら、2001；WilsonおよびSzostak、1999）。下記の実施例では、膵癌細胞表面のバイオマーカーの同定および膵癌細胞内へのsiRNAの治療的送達のための細胞ベースのSELEX分析を記述する。

30

#### 【0049】

以下に記載した実施例において、2'-フルオロピリミジン-RNA（2'-F-RNA）コンビナトリアルライブラリーを使用して、侵襲性の強い膵癌細胞であるPanc-1細胞株に対する2'-F-RNAアプタマーを単離した。膵癌細胞内へ選択的に移行するアプタマーおよび選択されたアプタマーは、これらの細胞内への治療用siRNAおよび他の薬剤の標的化送達の候補となり得ることが観察された。

40

#### 【0050】

##### 実施例1：治療方法において使用される膵細胞アプタマーの産生

##### 材料と方法

細胞株。標的として無傷細胞を使用するために、Panc-1（CRL-1469）、Capan-1（HTB-79）、CFPAC-1（CRL-1918）、MIA PaCa-2（CRL-1420）、BxPC-3（CRL-1687）およびAsPC-1（CRL-1682）をATCCから購入し、標的無傷細胞として使用し、Huh7細胞をJCRBから購入した。初代ヒト膵臓上皮細胞はcell systemsで購入した。細胞バンクの指示に従い細胞を湿度5%のCO<sub>2</sub>インキュベーターで37℃培養した。

#### 【0051】

50

全細胞 S E L E X ( s y s t e m a t i c e v o l u t i o n o f l i g a n d s b y e x p o n e n t i a l e n r i c h m e n t )。T u e r k および G o l d ( 1 1 ) による記述に従い S E L E X サイクルを実施した。試験管内選択法を、この実験ではわずかに条件を変えて記述 ( H w a n g ら、2 0 0 9 年 ) に従い実施した。ランダム配列から 2' F - R N A アプタマーを選択した。5' - G G G A G A G C G G A A G C G U G C U G G G C C - N<sub>40</sub> - C A U A A C C C A G A G G U G A U G G A U C C C C C - 3' ( 配列番号 : 7 ) の配列を有する R N A オリゴヌクレオチドのランダムライブラリーを、N T P ( 2' F U T P、2' F C T P、G T P、A T P、E p i c e n t r e B i o t e c h n o l o g i e s , M a d i s s i o n , W I ) および T 7 R N A ポリメラーゼを用いて、合成 DNA 鋳型の i n v i t r o 転写によって構築した。N<sub>40</sub> は、各位置において A、G、C および U を等モル濃度で取り込んで形成した 40 個のヌクレオチド ( n t ) 配列を表す。ヌクレアーゼ抵抗性を増加させるために、2' F - P y R N A を使用した。第一ラウンドで、R N A ライブラリー 5 . 8 7 n m o l を結合バッファー ( P B S W / O C a<sup>2+</sup> および M g<sup>2+</sup>、5 m M M g C l<sub>2</sub>、0 . 0 1 % B S A ) 1 m l 中で標的細胞 ( P a n c - 1 ) と共に室温で 1 時間振とうしながらインキュベートした。標的細胞と結合した R N A 分子を回収し、R T - P C R および i n v i t r o 転写により増幅し、次の選択ラウンドで使用した。次のラウンドでは、R N A を 10 倍濃度希釈してインキュベーション時間を短くし、ストリンジェントな条件を作成した。非特異的に標的細胞に結合した R N A を除去するために、第 3 ラウンド毎に H u h 7 細胞を使用して対抗選択を行なった。S E L E X の 1 4 ラウンド後に、生じた c D N A を増幅した。増幅された D N A をクローニングし、D N A 塩基配列決定によって個別のクローンを同定した。http : / / w w w . b i o i n f o . r p i . e d u / a p p l i c a t i o n s / m f o l d / で利用可能な M F O L D ( Z u k e r 2 0 0 3 ) を使用し塩補正アルゴリズムおよび 2 5 °C の温度補正を適用して、アプタマーの構造を予測した。

10

20

30

40

#### 【 0 0 5 2 】

##### 結果と考察

無傷の標的細胞に対する R N A アプタマーの試験管内選択法。ヒト膵癌細胞 ( P a n c - 1 ) をアプタマー選択のため標的細胞として使用し、ヒト肝癌細胞株 ( H u h 7 ) を、膵癌細胞非特異的アプタマーを除去するために対抗選択ステップで使用した。2' フルオロピリミジン R N A ( 2' F R N A ) のライブラリーを、ヌクレアーゼ耐性を増加させかつアプタマーの折り畳みを強化するために使用した。無傷細胞に結合した 2' F R N A アプタマーを単離するため、定義された配列が隣接する 40 - n t - 長のランダム配列を含む、およそ 4<sup>40</sup> の異なる 2' F R N A 分子のライブラリーを S E L E X によりスクリーニングした。1 4 サイクルの選択後、高濃度のアプタマープールをクローン化した。4 7 クローンのヌクレオチド配列を決定した。

#### 【 0 0 5 3 】

個々の配列および構造の比較。アプタマー ( または「クローン」 ) の異なる 6 つの群 ( 群 I ~ V I ) を選択した。各群は 1 セットの反復配列を表す。1 4 ラウンドの選択後、4 7 クローンの配列を同定し、6 つのアプタマークローン各々の頻度を数で示した。下の表 1 に示す。



【表 1】

RNA アプタマーのアライメントおよび同定

群	名称	配列 (ランダム配列)	頻度 (%)
I	P15	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAAGUUG CGGCCCAACCGUUUAAUUCAGAAUAGUG UGAUGCCUUCGACAGGAGGCUACACAACA GGC (配列番号: 1)	19 (9/47)
II	P19	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAUGGCG <u>AAUGCCCGCCUAAUAGGGCGUUAUGACU</u> UGUUGAGUUCGACAGGAGGCUACACAACA GGC (配列番号: 2)	13 (6/47)
III	P1	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAUGCGC <u>UGAAUGCCCGAGCCGUGAAAGCGUCGAUU</u> UCCAUCCUUCGACAGGAGGCUACACAACA GGC (配列番号: 3)	13 (6/47)
IV	P11	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAUGAU UGCCCAUUCGGUUAUGCUUGCGCUUCCU AAAGAGCUUCGACAGGAGGCUACACAACA GGC (配列番号: 4)	9 (4/47)
V	P7	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAGGCCA <u>UGUUGAAUGCCCAACUAAGCUUUGAGCU</u> UUGGAGCUUCGACAGGAGGCUACACAACA GGC (配列番号: 5)	6 (3/47)
VI	P6	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAACAAUG GAGCGUUAACGUGAGCCAUUCGACAGG AGGCUACACAACAGGC (配列番号: 6)	4 (2/47)

10

20

30

## 【0054】

アプタマーの6つの群は非常に異なる配列を有するが、配列P19、P1およびP7は共通のモチーフGAAUGCCC (配列番号: 8) を含む。配列P15は、9回見出され、ランダム領域の長さは40ヌクレオチド (nt) だった。配列P19およびP1は、6回見出され、ランダム領域の長さは40ntだった。配列P11は、4回見出され、P7が3回見出された。両方ともランダム部位に40ntを有している。配列P6は、2回見出され、ランダム領域の長さは24ntであった。Mfold (Zuker, 2003) を使用して、選択されたアプタマーの最小エネルギー構造解析を実行した (図2A、2B、2C、2D、2Eおよび2F)。図2A~2Fで示すように、算定したRNAアプタマーの二次構造はステムループ領域をいくつか含んでいた。

40

## 【0055】

実施例2: 治療法で使用する膵癌への細胞特異的なアプタマー送達  
材料と方法

50

上述の実施例 1 の記載に加えて、標的細胞に対するアプタマーの能力を決定するために次の材料および方法を使用した。

【0056】

細胞内移行に関する生細胞の共焦点イメージング。選択された RNA アプタマーの標的細胞および他のタイプの膵癌細胞への移行をテストするため、細胞を 35 mm ガラス底培養皿 (MatTek, Ashland, MA, USA) 内で、培地中に細胞数  $1 \times 10^6$  で播種して 24 時間培養した。Cy3 Silencer siRNA labeling kit (Ambion, TX, USA) を使用して、メーカーの指示に従い RNA を Cy3 で標識した。Cy3 標識 RNA 100 nM を細胞に加え、1 時間インキュベートした。インキュベーション後に、生細胞核染色のための Hoechst 33342 (Molecular Probes, CA, USA) 5  $\mu$ g/ml で細胞を染色した。Zeiss LSM 510 Meta 倒立二光子共焦点顕微鏡システムを用いて、水浸下において  $\times 40$  倍率で画像を取得した。

10

【0057】

フローサイトメトリー分析による結合アッセイ。アプタマー結合と取込みをフローサイトメトリーでも評価した。アッセイのため、非酵素細胞解離溶液を使用して、細胞を解離させ PBS で洗浄し、結合バッファーに懸濁した。次に、Cy3 標識アプタマーを追加し、37 で 1 時間インキュベートした。個々のアプタマーまたは対照である開始プールの膵癌細胞への結合は、3 連で実施した。フローサイトメトリーは Guava (Millipore, Billerica, MA, USA) フローサイトメーターで実施し、データは FlowJo ソフトウェアで解析した。

20

【0058】

結合親和性および  $K_D$  測定。Panc-1 へのアプタマーの結合親和性を測定するために、Zeiss LSM 510 Meta 倒立二光子共焦点顕微鏡システムにより提供される生理学的マクロの  $K_D$  機能を使用した。細胞を 35 mm ガラス底培養皿 (MatTek, Ashland, MA, USA) 内で、培地中に細胞数  $1 \times 10^6$  で播種して 24 時間培養した。Cy3 Silencer siRNA labeling kit (Ambion, TX, USA) を使用して、メーカーの指示に従い RNA を Cy3 で標識した。様々な濃度の Cy3 標識 RNA を細胞に加え 1 時間インキュベートした。十分に洗浄した後、滴定曲線の各条件で 20 画像を取得した。解離定数は Graph Pad Prism の 1 サイト結合非線形回帰曲線を使用して算定した。

30

【0059】

細胞内移行競合アッセイ。共焦点顕微鏡法のため上述したように Panc-1 細胞を調製した。Cy3 標識 P19 アプタマー 200 nM を、37 にあらかじめ温めた  $1 \times$  結合バッファー中で非標識クロン (1  $\mu$ M) と競合させるため使用した。細胞を 3 回洗浄し、共焦点顕微鏡法で画像を取得した。

【0060】

WST-1 アッセイ。P1 と P19 を Panc-1 ( $2.5 \times 10^5$  細胞) において 1 処理当たり 9  $\mu$ g 使用し、4 回の処理後細胞増殖を定量化した。メーカーのガイドライン (Roche, UK) に従って WST-1 試薬を使用した。手短かに言えば、WST-1 試薬を 1 : 100 希釈でプレートに使用し 1 時間インキュベートした。酵素反応は、Bio-Tek ELISA リーダーを使用して 450 nm で計測した。

40

【0061】

動物実験。NOD/SCID マウス 5 匹に、PBS 0.05 ml 中の Panc-1 膵癌細胞をマトリゲル 0.15 ml と共に側腹部にて皮下注射 (s.c.) した。2 週後に、マウスを 2 群に分けた。1 群を未治療対照として使用し、もう一方は P19 と組み合わせた P1 を 10  $\mu$ g 注射した。アプタマーは 1 動物当たり合計 4 回、尾静脈 (i.v.) から注射した。動物は腫瘍が消失する前に屠殺した。

【0062】

ゲムシタピン耐性腫瘍テストのため、5 週齢の雌の NOD/SCID マウス 12 匹に、

50

PBS 0.05 ml 中の  $2.8 \times 10^6$  ASPC-1 膵癌細胞をマトリゲル 0.15 ml と共に側腹部にて皮下注射 (s.c.) した。3 週間後に、マウスを 4 群に分けた。1 群を未治療対照として使用し、他は P1 (1 注射当たり  $10 \mu\text{g}$ )、P19 (1 注射当たり  $10 \mu\text{g}$ ) および P19 と組み合わせた P1 (1 注射当たり P1 を  $5 \mu\text{g}$ 、P19 を  $5 \mu\text{g}$ ) を注射した。アプタマーは 1 動物当たり合計 4 回、尾静脈 (i.v.) から注射した (1、3、5 および 7 日目に)。動物は 9 日目に屠殺した。

#### 【0063】

##### 結果

RNA アプタマーは、膵癌細胞に特異的に結合し、細胞に内部移行する。個々のクローンのフローサイトメトリー分析により、標的細胞に結合したアプタマーが明らかとなった (図 3)。選択された異なる 6 つのアプタマーが、膵癌細胞へ内部移行したかどうかを判定するために、Cy3 標識 RNA 転写物で生細胞共焦点顕微鏡法を実施した。RNA アプタマーは、標的細胞 Panc-1 に特異的に内部移行した (図 4 B) が、Huh7 対照細胞へは内部移行しなかった (図 4 A)。最初の RNA ライブラリプールを Panc-1 と共にインキュベートした場合、非特異的な弱い結合が観察された。図 4 B はアプタマーが細胞質内に凝集することを示しており、RNA アプタマーが受容体依存性エンドサイトーシスによって細胞へ入ることが示唆される。アプタマーが異なるタイプの膵癌細胞を認識することをテストするために、5 つの異なる膵癌細胞株をアプタマー取込みに関してテストした。試験した全 6 種のアプタマーが全ての膵癌細胞へ内部移行した (図 5 A、5 B、5 C、5 D、5 E)。

#### 【0064】

上述のように、膵癌細胞を標的とする RNA アプタマーを同定するための方法が開発され、選択された RNA アプタマーが細胞内へ移行することが示された。これは本明細書に記述された RNA アプタマーを、siRNA または化学療法薬等の治療薬を膵癌細胞へ送達する標的化剤として使用し得ることを示している。

#### 【0065】

膵癌細胞とは対照的に、アプタマーは正常な膵細胞内へは移行しない。選択されたアプタマーが正常な膵細胞に結合するかどうか判断するため、初代膵臓上皮細胞を上述したような Cy3 標識アプタマーと共にインキュベートした。図 6 A および 6 B に示すように、いずれの Cy3 標識アプタマーも正常な膵細胞内へは移行しなかった。これは、アプタマーが、膵癌細胞上に発現しているが正常な膵細胞上には発現していない細胞表面分子 (例えば、細胞表面タンパク質) に特異的に結合することを示す。

#### 【0066】

標的細胞への RNA アプタマー結合親和性。RNA アプタマーの親和性を測定するために、共焦点顕微鏡法の生理学的機能を使用した。P19、P15 および P1 の解離定数 ( $K_D$ ) はそれぞれ、 $64.76 \text{ nM}$ 、 $70.72 \text{ nM}$ 、および  $112.2 \text{ nM}$  (図 7) であった。各アプタマーが同一または異なる細胞表面タンパク質を介して膵癌細胞に結合するかどうかを判断するために、Panc-1 細胞を、蛍光標識 P19 RNA ( $100 \text{ nM}$ ) と標識キメラに対する競合剤として多量の各非標識アプタマー ( $1 \mu\text{M}$ ) と共にインキュベートした (図 8)。標識 RNA の蛍光強度を多量の競合剤の存在下で共焦点顕微鏡法を使用して測定した。非標識 P19 と競合させた P19 の強度は有意に減少した (同一の標的に対する競合を示す)；一方他は軽微な変化しか示さなかった。これは、各 RNA アプタマーは同一の標的上に異なる結合部位を有しているか、または異なる標的に結合することを示す。

#### 【0067】

選択された RNA アプタマーの抗腫瘍効果。抗腫瘍効果を調べるために、3 つのアプタマクローン (P19、P15 および P1) を SCID マウスの静脈内に注射した (i.v.)。P19 および P1 はインビトロで細胞増殖を阻止した (図 9)。P19 および P1 はまた、i.v. 注射によって投与した場合 Panc-1 移植マウスの腫瘍サイズを有意に減少させ (図 10)、耐ゲムシタピン耐性の膵癌でさえ腫瘍サイズを有意に減少させ

た(図11)。これらの結果に基づいて、選択されたP19およびP1アプタマーは、それらの抗癌作用、腫瘍退行作用のため、それら自身が膵癌に効果があるものとして使用されてもよい。さらに、P19およびP1アプタマーは効果的に膵癌細胞を標的とし内部移行することが示されたため、膵癌細胞にペイロード(例えば、治療薬)を送達できるという点で二重の機能を有しており、さらなる抗癌効果をもたらすことができる。

#### 【0068】

いくつかの実施例によれば、P19およびP1アプタマーはしたがって、送達剤として、K-ras(V-Ki-ras2カーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ)およびSHH(Sonic Hedgehog)を標的とする、1つまたは複数の治療薬の送達に使用されてもよい。それらの独立した抗腫瘍効果および治療用ペイロードを送達する能力を両方利用することで、P19およびP1アプタマーの抗腫瘍効果は、治療用ペイロードを送達する能力のみと比較して増加するであろう。

10

#### 【0069】

さらに、膵癌細胞は前癌状態においても肝臓に広がる可能性があることが発見されている(Rhimら、2012)。そのため、全身療法として使用されるアプタマーの点滴静脈投与は、診断時には腫瘍が遠隔伝搬している可能性が高いため、大多数の膵癌患者にとって特に重要である。静脈投与において、膵癌に特異的なRNAアプタマーは薬剤または医薬組成物の一部として全身療法に使用されてもよく、さらに膵癌の診断および病期分類に使用されてもよい。

20

#### 【0070】

結論として、上記の実施例において説明されたように、膵癌細胞を標的とするRNAアプタマーを同定するための方法が開発され、また選択されたRNAアプタマーが細胞内へ移行することが示された。さらに、RNAアプタマーそれ自身が単独で抗腫瘍効果を有し、また膵癌細胞を特異的に標的とし、正常な膵細胞は標的としないことが示された。これは、膵癌の早期発見と膵癌細胞を標的とすることによる治療の臨床適用への利点となる。したがって、本明細書に記述されたRNAアプタマーは、膵癌細胞へ治療薬(例えば、siRNAもしくは化学療法剤)または診断用薬剤を送達する標的化剤として使用されてもよい。

#### 【0071】

##### 参考文献

30

以下に記載する参考文献、特許および公表された特許出願、ならびに、本明細書において引用された参考文献の全てが、本明細書に完全に記載されたものとして、その全体が参照により援用される。

Alexakis, N., et al. Current standards of surgery for pancreatic cancer. The British journal of surgery 91, 1410-1427 (2004).

Blank, M., Weinschenk, T., Priemer, M. and Schluesener, H. (2001) Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen. J Biol Chem, 276, 16464-16468.

40

Cunningham, D., et al. Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 27, 5513-5518 (2009).

50

Daniels, D.A., Chen, H., Hicke, B.J., Swiderek, K.M. and Gold, L. (2003) A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15416-15421.

Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346, 818-822.

Esposito et al. A Neutralizing RNA Aptamer against EGFR Causes Selective Apoptotic Cell Death. *PLoS One*. 2011; 6(9): e24071.

Fulda, S. (2009) Apoptosis pathways and their therapeutic exploitation in pancreatic cancer. *J Cell Mol Med*, 13, 1221-1227.

Ghaneh, P., Costello, E. & Neoptolemos, J.P. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut* 56, 1134-1152 (2007).

Guidelines for the management of patients with pancreatic cancer periampullary and ampullary carcinomas. *Gut* 54 Suppl 5, v1-16 (2005)

Heinemann, V., Haas, M. & Boeck, S. Systemic treatment of advanced pancreatic cancer. *Cancer treatment reviews* 38, 843-853 (2012).

Hicke, B.J., Marion, C., Chang, Y.F., Gould, T., Lynott, C.K., Parma, D., Schmidt, P.G. and Warren, S. (2001) Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein. *J Biol Chem*, 276, 48644-48654.

Hwang, B., Lim, J.H., Hahm, B., Jang, S.K. and Lee, S.W. (2009) hnRNP L is required for the translation mediated by HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun*, 378, 584-588.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J. and Thun, M.J. (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 59, 225-249.

Klinkenbijl, J.H., et al. Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Annals of surgery*

10

20

30

40

50

- 230, 776-782; discussion 782-774 (1999).
- Li, D., Xie, K., Wolff, R. and Abbruzzese, J.L. (2004) Pancreatic cancer. *Lancet*, 363, 1049-1057.
- Neoptolemos, J.P., et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *The New England journal of medicine* 350, 1200-1210 (2004).
- Oettle, H., et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 297, 267-277 (2007).
- Pancreatic cancer in the UK. *Lancet* 378, 1050 (2011).
- Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Mittra, A., Bailey, J.M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide R.H., Leach S.D., Stanger B.Z. (2012) EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, 148, 349-361.
- Rivera, F., Lopez-Tarruella, S., Vega-Villegas, M.E. and Salcedo, M. (2009) Treatment of advanced pancreatic cancer: from gemcitabine single agent to combinations and targeted therapy. *Cancer Treat Rev*, 35, 335-339.
- Saif, M.W. (2009) Adjuvant treatment of pancreatic cancer in 2009: where are we? Highlights from the 45th ASCO annual meeting. Orlando, FL, USA. May 29-June 2, 2009. *JOP*, 10, 373-377.
- Schneider, G., Siveke, J.T., Eckel, F. and Schmid, R.M. (2005) Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology*, 128, 1606-1625.
- Sebolt-Leopold, J.S. and English, J.M. (2006) Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules. *Nature*, 441, 457-462.
- Stathis, A. and Moore, M.J. (2010) Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol*, 7, 163-172.
- Tuerk, C. (1997) Using the SELEX combin

atorial chemistry process to find high affinity nucleic acid ligands to target molecules. *Methods Mol Biol*, 67, 219-230. Ulrich, H., Magdesian, M.H., Alves, M.J. and Colli, W. (2002) In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *J Biol Chem*, 277, 20756-20762.

Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R.H. & Goggins, M. Pancreatic cancer. *Lancet* 378, 607-620 (2011).

10

Wang, J., Jiang, H. and Liu, F. (2000) In vitro selection of novel RNA ligands that bind human cytomegalovirus and block viral infection. *RNA*, 6, 571-583.

Wilson, D.S. & Szostak, J.W. (1999) In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu Rev Biochem*, 68, 611-647.

Wong, H.H. and Lemoine, N.R. (2009) Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 6, 412-422.

20

Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 31, 3406-3415.

Zhou J, Li H, Li S, Zaia J, Rossi JJ. Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV-1 therapy. *Mol Ther*. 2008;16(8):1481-1489.

30

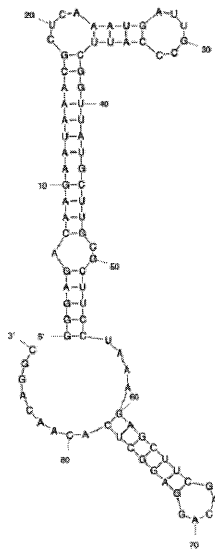
Zhou J, Rossi JJ. The therapeutic potential of cell-internalizing aptamers. *Curr Top Med Chem*. 2009;9(12):1144-1157.





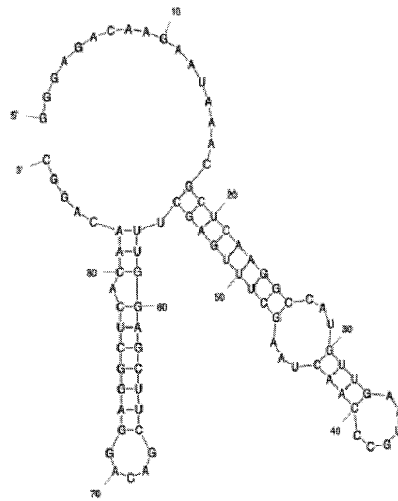
## 【 図 2 D 】

Figure 2D



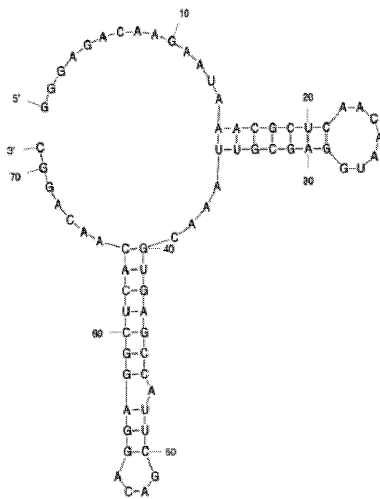
## 【 図 2 E 】

Figure 2E

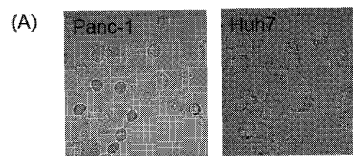


## 【 図 2 F 】

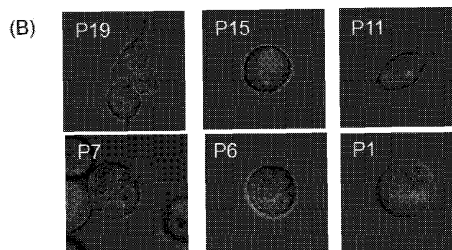
Figure 2F



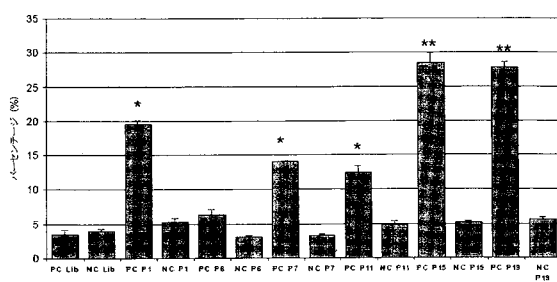
## 【 図 4 ( A ) 】



## 【 図 4 ( B ) 】

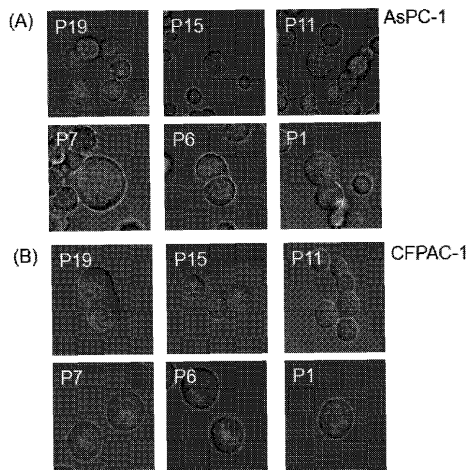


## 【 図 3 】



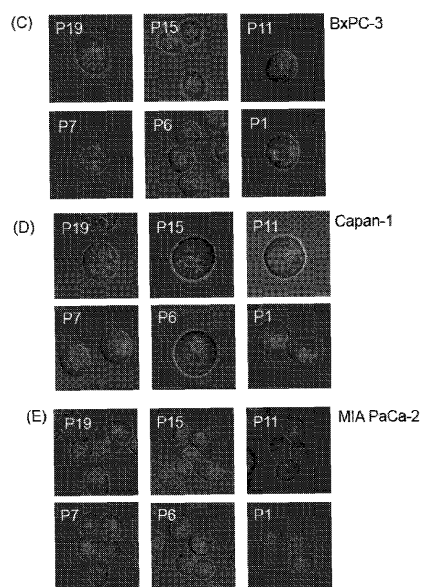
## 【図 5 A - B】

Figure 5A-B



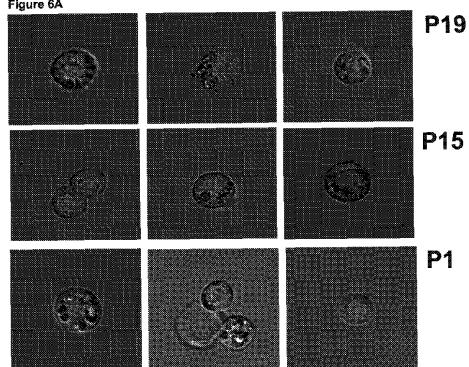
## 【図 5 C - E】

Figure 5C-E



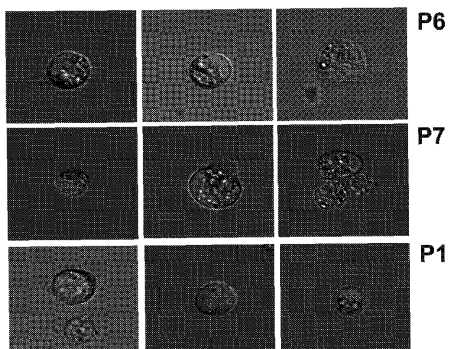
## 【図 6 A】

Figure 6A

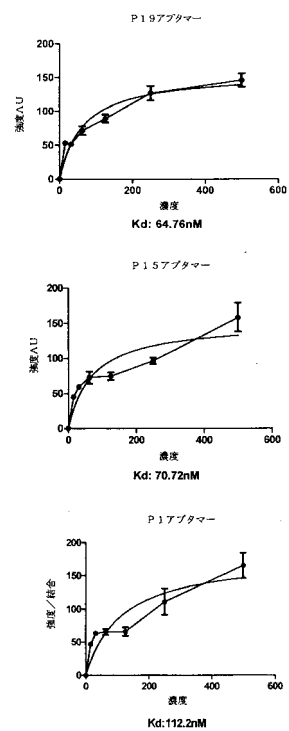


## 【図 6 B】

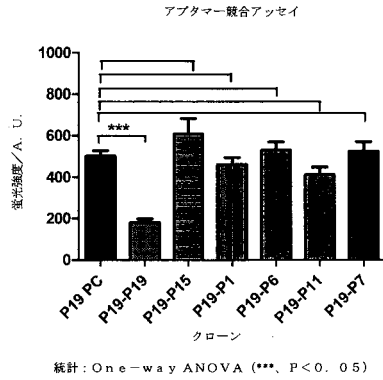
Figure 6B



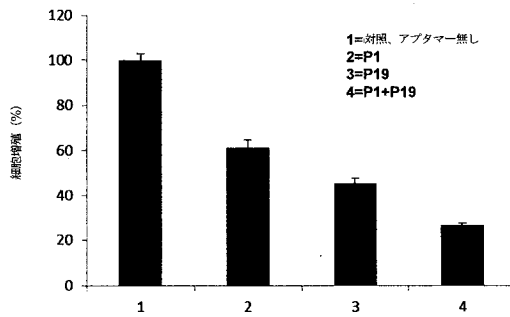
## 【図 7】



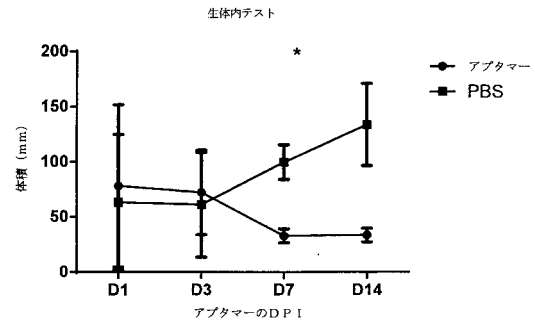
【図 8】



【図 9】

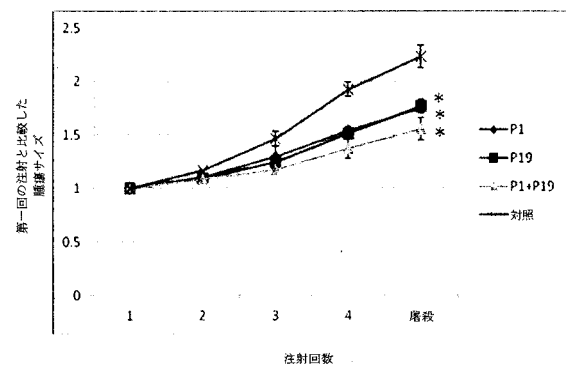


【図 10】



SCIDマウスへの腫瘍移植後2週間  
10  $\mu$ g P1+P19注射、注射4回、癌体積 (mm<sup>3</sup>) を測定  
\*TTEST:  $P < 0.05$

【図 11】



【配列表】

2015513919000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/31074

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C07H 21/02; C12N 15/115; C12Q 1/68; A61K 31/7088 (2013.01) USPC - 536/23.1; 514/44R, 19.3; 424/1.73 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C07H 21/02, 00; C12N 15/115, 12, 113, 11, 10, 9; C12Q 1/68; A61K 31/7052, 7088, 7105, 7115, 712, 7125, 713, 702 (2013.01) USPC: 536/24.1, 24.5, 23.1, 22.1, 18.7, 1.11; 514/44R, 43, 42, 23, 19.3, 19.2, 1; 424/9.1, 1.73 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google; Google Scholar; DialogPRO; The Ellington Lab Aptamer Database; 'pancreatic cancer,' 'tumor, neoplas', 'malignant', 'aptamer', 'RNA,' 'cell surface, protein, antigen, receptor, 'shRNA,' 'siRNA,' 'mRNA,' 'miRNA,' 'internaliz', 'intravenous		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/0254901 A1 (SMITH, CL), October 7, 2010; abstract; paragraphs [0002], [0004], [0010], [0016], [0019], [0043], [0044], [0054], [0055], [0059], [0066]	1, 4-11, 14, 15, 20, 21
A	US 2009/0286854 A1 (MISSAILIDIS, S et al.), November 19, 2009; abstract; paragraphs [0005], [0008], [0010], [0013]	1, 4-11, 14, 15, 21
A	US 2011/0052697 A1 (FAROKHZAD, OC et al.), March 3, 2011; abstract; paragraphs [0004], [0005], [0010], [0012], [0013], [0021], [0090]	1, 4-11, 14, 15, 21
A	WO 1999/065928 A2 (ROBERTS, BL et al.), December 23, 1999; page 4, lines 1-10; page 19, line 31 to page 20, line 4; page 130, Table 1	2, 12, 16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 August 2013 (29.08.2013)		Date of mailing of the international search report 09 SEP. 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

~~15/061074-09.09.2013~~

International application No.

PCT/US13/31074

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-\*\*\*-Please See Supplemental Page-\*\*\*-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
  
Groups I-: Claims 1-21 and SEQ ID NO: 8. Claims 3, 13 and 17 contained sequences other than SEQ ID NO: 8, and, accordingly, were not searched or analyzed.

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US13/31074  
International application No.

PCT/US13/31074

-Continued from Box No. III: Observations Where Unity of Invention Is Lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: Claims 1, 2, 4-12, 14-18, 18-21 and SEQ ID NO: 8 are directed toward a pancreatic cancer cell aptamer comprising an RNA molecule that specifically binds a pancreatic cancer cell surface protein.

SEQ ID NO: 8 will be searched without the payment of any additional fees. Additional SEQ ID NOs can be searched upon the payment of additional fees. An Exemplary Election would be: SEQ ID NO: 1. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

Groups I+ share the technical features including a pancreatic cancer cell aptamer comprising an RNA molecule that specifically binds a pancreatic cancer cell surface protein.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2010/0254901 A1 (SMITH) (hereinafter 'Smith'). Smith discloses a pancreatic cancer cell aptamer (Claims 41-43) comprising an RNA molecule (Claims 1, 9) that specifically binds a pancreatic cancer cell (Claims 41-43) surface protein (paragraph [0073]; Claims 1, 2, 54; CEA is a highly glycosylated cell-surface protein).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Smith reference, unity of invention is lacking.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/7105 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7105	
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 1/18 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/18	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74) 代理人 100091214

弁理士 大貫 進介

(72) 発明者 ロッシ, ジョン, ジェイ

アメリカ合衆国 9 1 7 3 7 カリフォルニア州, アルタロマ, ブリドル・プレイス 5 0 4 4

(72) 発明者 ヨーン, ソラ

アメリカ合衆国 9 1 7 0 9 カリフォルニア州, チノヒルズ, カムデン・アヴェニュー 1 4 9 1 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04 GA11 HA01  
 HA11 HA17  
 4C076 AA95 CC27 CC41 EE30 EE59 FF31 FF34  
 4C084 AA13 MA05 NA13 ZA66 ZB26  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 NA13 ZA66 ZB26