

(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2016-528299

(P2016-528299A)

(43) 公表日 平成28年9月15日(2016.9.15)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A61K 51/00</b> (2006.01)	A 61 K 49/02	B 4 C 076
<b>A61K 9/08</b> (2006.01)	A 61 K 49/02	C 4 C 084
<b>A61K 47/48</b> (2006.01)	A 61 K 9/08	4 C 085
<b>A61K 47/24</b> (2006.01)	A 61 K 47/48	
<b>A61P 35/00</b> (2006.01)	A 61 K 47/24	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-536494 (P2016-536494)	(71) 出願人	516053981 ロバート・ドイル Robert DOYLE アメリカ合衆国 13104 ニューヨーク州 マンハッタン、レッド・スブルース・レイン 4495番
(86) (22) 出願日	平成26年8月22日 (2014.8.22)	(74) 代理人	100101454
(85) 翻訳文提出日	平成28年4月18日 (2016.4.18)	(74) 代理人	弁理士 山田 卓二
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/052381	(74) 代理人	弁理士 青山 葉
(87) 國際公開番号	W02015/027205	(74) 代理人	100106518
(87) 國際公開日	平成27年2月26日 (2015.2.26)	(74) 代理人	弁理士 松谷 道子
(31) 優先権主張番号	61/868,841	(74) 代理人	100156144
(32) 優先日	平成25年8月22日 (2013.8.22)	(74) 代理人	弁理士 落合 康
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ビタミンB<sub>12</sub>および内因子を含む組成物およびその使用方法

## (57) 【要約】

ビタミンB<sub>12</sub>結合タンパク質である内因子に関して、キュビリン受容体を標的とする癌細胞検出系。B<sub>12</sub>結合体と内因子とを、患者の血中に注入する。内因子のキュビリンへの結合により、受容体を介するエンドサイトーシスおよび癌細胞による細胞の内在化が可能になり、それにより、造影を介する検出または処置が可能になる。

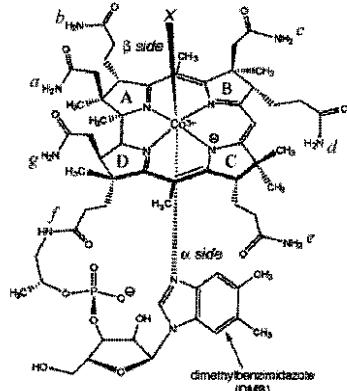


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

非経腸投与用の医薬製剤であって、内因子および、B<sub>1-2</sub>またはその類似体、ならびに非経腸投与用の無菌の薬学的に許容される担体を含み、該B<sub>1-2</sub>またはその類似体が検出可能な標識および/または治療剤に結合している、医薬製剤。

**【請求項 2】**

静脈内投与用の医薬製剤であって、内因子および、B<sub>1-2</sub>またはその類似体、ならびに静脈内投与用の薬学的に許容される担体を含み、B<sub>1-2</sub>またはその類似体が検出可能な標識および/または治療剤に結合している、医薬製剤。

**【請求項 3】**

内因子がB<sub>1-2</sub>またはその類似体に結合している、請求項1または2記載の組成物。

**【請求項 4】**

検出可能な標識が放射性核種である、請求項1または2記載の組成物。

**【請求項 5】**

放射性核種が銅-64、ジルコニウム-89、イットリウム-86、イットリウム-90、テクネチウム-99m、ヨウ素-125、ヨウ素-131、ルテチウム-177、レニウム-186およびレニウム-188からなる群から選択される、請求項1または2記載の組成物。

**【請求項 6】**

放射性核種が治療剤でもある、請求項4記載の組成物。

**【請求項 7】**

1種以上の薬学的に許容される希釈剤、賦形剤および/または担体を含む、請求項1または2記載の組成物。

**【請求項 8】**

B<sub>1-2</sub>の結合の部位が、e位、b位、リボシリル基上の5'ヒドロキシリル残基およびコバルトの位置からなる群から選択される、請求項1または2記載の組成物。

**【請求項 9】**

リンカーをさらに含む、請求項1または2記載の組成物。

**【請求項 10】**

対象における腫瘍の検出方法であって:

- 該対象に内因子およびB<sub>1-2</sub>を含む組成物を投与することを含み、ここで、該B<sub>1-2</sub>は検出可能な標識に結合しており;
- 対象において、該組成物がキュビリンに結合していることを検出するために検出可能な標識を検出することを含み、ここで、典型的にはキュビリンを発現しない組織中に検出可能な標識が存在することが、該対象に腫瘍が存在することを示す、方法。

**【請求項 11】**

対象における腫瘍の検出方法であって:

- 内因子およびB<sub>1-2</sub>を含む組成物を対象に投与することを含み、ここで、該B<sub>1-2</sub>は検出可能な標識に結合しており;
- 対象において該組成物がキュビリンに結合していることを検出するために検出可能な標識を検出することを含み、ここで、キュビリンを発現することが知られている細胞を含む組織において検出可能な標識が非対称に存在することが、該対象に腫瘍が存在することを示す、方法。

**【請求項 12】**

腫瘍が肺癌を含む、請求項10記載の方法。

**【請求項 13】**

腫瘍が腎細胞癌を含む、請求項11記載の方法。

**【請求項 14】**

該腫瘍がキュビリンを発現する、請求項10または11記載の方法。

**【請求項 15】**

10

20

30

40

50

投与が静脈内投与を含む、請求項 10 または 11 記載の方法。

【請求項 16】

検出可能な標識が放射性核種である、請求項 10 または 11 記載の方法。

【請求項 17】

検出が、ポジトロン放出断層撮影、単一光子放射断層撮影、ガンマカメラライミングまたは直線形スキャンを用いて放射性核種標識を検出することを含む、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

工程 (a) より前または同時に遊離の  $B_{1-2}$  が投与される、請求項 10 または 11 記載の方法。

10

【請求項 19】

該組成物が腎臓中の腎細胞に結合することを防ぐために、工程 (a) より前または同時に L-リジンが投与される、請求項 10 または 11 記載の方法。

【請求項 20】

転移性の腎細胞癌の検出を可能にするために、工程 (a) より前または同時に L-リジンが投与される、請求項 13 記載の方法。

【請求項 21】

対象における腫瘍を処置する方法であって、内因子および  $B_{1-2}$  を含む組成物を対象に投与することを含み、該  $B_{1-2}$  が治療剤に結合している、方法。

20

【請求項 22】

該腫瘍が、肺癌および腎細胞癌からなる群から選択される腫瘍を含む、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

該腫瘍が腎細胞癌を含む、請求項 22 記載の方法。

【請求項 24】

該腫瘍がキュビリンを発現する、請求項 21 記載の方法。

【請求項 25】

投与が静脈内投与を含む、請求項 21 記載の方法。

【請求項 26】

該治療剤が放射性核種である、請求項 21 記載の方法。

30

【請求項 27】

該組成物の投与より前または同時に、遊離の  $B_{1-2}$  が投与される、請求項 21 記載の方法。

【請求項 28】

腎臓中の腎細胞に該組成物が結合することを防ぐために、該組成物の投与の前または同時に、L-リジンが投与される、請求項 21 記載の方法。

【請求項 29】

転移性腎細胞癌の検出を可能にするために、該組成物の投与の前または同時に、L-リジンが投与される、請求項 23 記載の方法。

【請求項 30】

対象においてキュビリンを発現する細胞に  $B_{1-2}$  を送達する方法であって、IF および  $B_{1-2}$  の複合体を対象に静脈内投与することを含む、方法。

40

【請求項 31】

細胞が癌細胞である、請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】

$B_{1-2}$  が検出可能な標識および/または治療剤に結合している、請求項 30 記載の方法。

【請求項 33】

キュビリンの機能を調節する方法であって、IF および  $B_{1-2}$  の複合体を該対象に静脈内投与することを含む、方法。

50

**【請求項 3 4】**

B<sub>1 2</sub> が治療剤に結合している、請求項 3 3 記載の方法。

**【請求項 3 5】**

キュビリンの機能が遮断されている、請求項 3 3 記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】****関連出願との相互引用**

本出願は、米国仮出願第 6 1 / 8 6 8, 8 4 1 号（2013 年 8 月 22 日出願）に基づく優先権を主張するものであり、その全体は引用により本明細書に包含される。

10

**【0 0 0 2】**

本発明は、放射性標識された B<sub>1 2</sub> 結合体および内因子を含む、非経口投与用の、診断および/治療用組成物および方法に関する。

**【背景技術】****【0 0 0 3】**

腎がん学会によれば、米国では、2012 年に、130 万人を超える人が癌と診断された。これらの人々のうち、50000 人が腎がんに罹患していると診断され、腎細胞癌 (RCC) が最も一般的な種類である。RCC は、初期段階ではごく僅かしか症状を示さないため、腫瘍が大きく成長するか、または腫瘍細胞が体の他の部分に転移するまで、検出されないことがしばしばである。RCC 患者の 30 ~ 40 % は、転移した腫瘍を有し、未処置の転移腫瘍を有する患者の 5 年生存率は最大で 18 % であることから、初期の検出が非常に重要である。

20

**【0 0 0 4】**

腫瘍組織の部位特異的な薬物標的化は、処置応答を高める大きな可能性があり、同時に、副作用を軽減させる可能性がある。B<sub>1 2</sub> 取り込み経路は、特異的に薬物を送達する可能性があるため、ここ数年間で関心が高まっている。B<sub>1 2</sub> は、DNA のメチル化およびメチオニンの産生において機能するため、細胞成長および増殖に重要な、非毒性の水溶性ビタミンである。

**【0 0 0 5】**

従来の診断用造影技術は、潜在的に腫瘍を有している可能性のあるブタ、マウス、イヌおよびヒトにおける B<sub>1 2</sub> 要求の増大を追うために、単一光子放射断層撮影 (SPECT) を用いていた。これは、インジウム-111 およびテクネチウム-99m で標識した B<sub>1 2</sub> 結合体を用いて行った。PET 画像法は近年、TCII/CD320 エンドサイトシスを介した B<sub>1 2</sub>-Cu<sup>64</sup> の細胞取り込みを検出するのに用いられている。

30

**【0 0 0 6】**

がん細胞は、その過剰増殖のために、栄養素をより多く必要とする特徴がある。これらの栄養素にはビタミン B<sub>1 2</sub> (B<sub>1 2</sub>) が含まれる。B<sub>1 2</sub> は、消化の間に吸収され、3 つの結合タンパク質：ハプトコリン (HC)、トランスコバラミン II (TCII) および内因子 (IF) を介して血漿に輸送される。血中にいると、B<sub>1 2</sub> は、TCII または HC に結合する。該 TCII 受容体によって、B<sub>1 2</sub> を細胞内に取り込むことが可能になる。

40

**【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0 0 0 7】**

B<sub>1 2</sub> 標識された Cu<sup>64</sup> は、TCII 受容体である、CD320 を標的とするのに用いられている。しかし、TCII 受容体は全身で発現するため、造影では高いバックグラウンドが観察された。したがって、高いバックグラウンドという問題を解決し、それにより癌を正確に検出するための新しい造影技術が必要とされている。

**【課題を解決するための手段】****【0 0 0 8】**

50

局面の一において、本明細書は、非経腸投与用の医薬製剤を含む。該医薬製剤は、内因子およびB<sub>1,2</sub>またはその類似体ならびに非経腸投与用の薬学的に許容される担体を含み、ここで、B<sub>1,2</sub>またはその類似体は、検出可能な標識および/または治療剤に結合している。

## 【0009】

他の局面において、本明細書は、静脈内投与用の医薬製剤を含む。該医薬製剤は、内因子およびB<sub>1,2</sub>またはその類似体、ならびに、静脈内投与用の薬学的に許容される担体を含み、ここで、該B<sub>1,2</sub>またはその類似体は、検出可能な標識および/または治療剤に結合している。

## 【0010】

さらに他の局面において、本明細書は、対象における腫瘍の検出方法を含む。該方法は、内因子およびB<sub>1,2</sub>を含む組成物を対象に投与することおよび、対象におけるキュビリンへの該組成物の結合を検出することを含み、ここで、B<sub>1,2</sub>は検出可能な標識に結合しており、典型的にはキュビリンを発現しない組織における、検出可能な標識の存在は、該対象中に腫瘍が存在することを示す。

## 【0011】

なおさらなる他の局面において、本明細書は、対象における腫瘍の検出方法を含む。該方法は、該対象に内因子およびB<sub>1,2</sub>を含む組成物を投与することおよび、対象中のキュビリンへの該組成物の結合を検出することを含み、ここで、B<sub>1,2</sub>は検出可能な標識に結合しており、キュビリンを発現することが知られている細胞を含む組織に検出可能な標識が非対称に存在することは、対象に腫瘍が存在することを示す。

## 【0012】

異なる局面において、本明細書は、対象における腫瘍の処置方法を含む。該方法は、内因子およびB<sub>1,2</sub>を含む組成物を対象に投与することを含み、ここで、B<sub>1,2</sub>は治療剤に結合している。

## 【0013】

他の局面において、本明細書は、対象において、キュビリンを発現する細胞にB<sub>1,2</sub>を送達する方法を含む。該方法は、IFおよびB<sub>1,2</sub>の複合体を対象に静脈内投与することを含む。

## 【0014】

さらなる局面において、本明細書は、キュビリンの機能を遮断する方法を含む。該方法は、IFおよびB<sub>1,2</sub>の複合体を対象に静脈内投与することを含む。

## 【0015】

本願ファイルは、少なくとも1つの、カラーで出力された図を含む。カラー図を含むこの出願公開の複製は、要求に応じて、必要な費用を支払えば特許庁より提供される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0016】

【図1】コリン環の4つの窒素原子、ジメチルベンゾイミダゾール(DMB)および、シアニド、メチルまたはデオキシアデノシル基であってよい、X基で配位されているCo(II)原子を示すビタミンB<sub>1,2</sub>の構造を示す。

【図2】B<sub>1,2</sub>の摂食による取り込み経路を示すスキームを表す(HC=ハプトコリン、IF=内因子、CB=キュビリン、AM=アムニオンレス、MRP1=多剤耐性関連タンパク質1、MG=メガリン)。

【図3】IF-B<sub>1,2</sub>プローブ合成のスキームを表す。

【図4】1,1-ビスチアゾレート-(1,4)-ジアミノブタン反応のスキームを表す。i. 16時間、アルゴン下、無水DCE中のNaBH(COOCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; ii. 3時間、水中の10%TFA、10%MeOH。

## 【図5】Tr(4.39分間)を用いた、RP-HPLCトレースを表す。

【図6】400MHz NMRによる、D<sub>2</sub>O中の1の<sup>1</sup>H-NMRを表す。†はMeOH不純物である。

10

20

30

40

50

【図7】Tr(11.9分間)を用いた、2のRP-HPLCを表す。

【図8】0.1%TFAを添加したCHCAマトリクス(10mg/mLCHCA)を用いた2のMALDI-ToFを表す。予測したm/zは1640m/zであり、実際のm/zは1639.923であった。

【図9】400MHzNMR機器による、D<sub>2</sub>O中の2の<sup>1</sup>H-NMRを表す。B<sub>1,2</sub>についての特徴的な5つのピークが6~7.5ppmに存在する。

【図10】Tr(5.28分間)を用いた、2'のRP-HPLCを表す。

【図11】0.1%TFAを添加したCHCAマトリクス(10mg/mLCHCA)を用いた、2'のMALDI-ToFを表す。予測されるm/zは1907m/zであり、実際のm/z値は1907.615m/zであった。

10

【図12】488nmで発光し、<sub>max</sub>が566nmであるときの、2'の発光プロファイルを表す。スリットの幅は4nmであった。

【図13】対象に投与する前に、内因子に事前に結合していてよい放射性標識したB<sub>1,2</sub>結合体の態様のスキームを表す。

【図14】金属とキレート化しているL-プロパルギルグリシンの構造を表す。「M」は、<sup>99</sup>mTcであってよい。

【図15】5'-OHリボースが結合した、B<sub>1,2</sub>結合体の構造を示す。

【図16】b位に結合を有するB<sub>1,2</sub>結合体の構造を示す。

【図17】コバルト-C結合を有する、B<sub>1,2</sub>結合体の構造を示す。

【図18】種々のB<sub>1,2</sub>結合体の構造を示す。(A)1は、リボースの5'-OH上で修飾されたB<sub>1,2</sub>結合体の構造である。(B)2は、コバルトイオン上で修飾されたB<sub>1,2</sub>結合体の構造である。(C)3は、b位で修飾されたB<sub>1,2</sub>結合体の構造である。(D)4は、リボースの5'-OH上で修飾されたB<sub>1,2</sub>結合体の構造である。

20

【図19】>160kDaのB<sub>1,2</sub>結合体系の、受容体介在性の取り込みを示す。(A)蛍光性のタグを付した抗キュビリン抗体を用いた免疫染色。(B)CypHer5E蛍光色素でタグ付けした1(1<sub>C5E</sub>)の取り込み。(C)1<sub>C5E</sub>(赤)とIF<sub>405</sub>(青)の共局在。共局在の領域は紫で示される。(D)BeWo細胞における2<sub>C5E</sub>(赤)およびIF<sub>405</sub>(青)の取り込み。共局在の領域は紫で示される。

【発明を実施するための形態】

【0017】

30

本発明は、キュビリン/IF介在取り込みシステムを用いた、キュビリン発現細胞を標的とするための組成物を含む。とりわけ、IFおよびB<sub>1,2</sub>結合体を含む組成物は、対象の血液を介して投与される。該組成物は、癌細胞の造影および/または処置に使用し得る。本出願以前には、IF-B<sub>1,2</sub>を非経口経路(すなわち静脈内)で投与し、キュビリンに有効に結合させ得ることは知られていなかった。B<sub>1,2</sub>の摂食による取り込み経路において、B<sub>1,2</sub>は口腔内で食物から放出されるときに、ハプトコリン(HC)がB<sub>1,2</sub>に結合し、胃を通って小腸まで輸送する。pHの上昇およびプロテアーゼの存在により、HCはB<sub>1,2</sub>を放出し、次いで、B<sub>1,2</sub>に内因子(IF)が結合する。その後、該IF-B<sub>1,2</sub>は、十二指腸内の回腸細胞上に見られるキュビリン受容体に結合するまで小腸を移動する。B<sub>1,2</sub>取り込み経路において、IFが血中に存在することはなく; IFは消化管内にのみ存在する。したがって、静脈内投与したIF-B<sub>1,2</sub>が消化管の外側に存在し、キュビリン(すなわち非回腸キュビリン)に結合できることは予期できることであった。

【0018】

40

本発明の発明者は、キュビリン受容体に結合することができる、IFに事前に結合した標識化B<sub>1,2</sub>プローブが、標的特異性ならびにバックグラウンド発光の有意な低下の両方を達成することを見出した。キュビリンはトランスクバラミン(II)(TCII)と異なり、全ての組織には発現しないため、部位特異的な取り込みについて、キュビリン受容体を標的化することにより、従来のB<sub>1,2</sub>受容体介在性取り込み系よりも特異性が上昇し得る。例えば、IFに結合していないB<sub>1,2</sub>プローブは、体中に存在するTCIIに結合することにより高いバックグラウンドをもたらし、特異性が低い。

50

## 【0019】

## I. 組成物

本発明は、内因子およびB<sub>1-2</sub>またはその類似体を含む組成物を含み、ここで、B<sub>1-2</sub>またはその類似体は、検出可能な標識および/または治療剤に結合している。B<sub>1-2</sub>類似体は、非修飾バージョンと比較して、生体利用可能性、可溶性、安定性、扱いやすさまたはそれらの組み合わせを改善するために修飾されていてよい。したがって、他の局面において、本発明の組成物は、修飾された、B<sub>1-2</sub>またはB<sub>1-2</sub>類似体を含む。さらに他の局面において、本発明の組成物は、B<sub>1-2</sub>またはB<sub>1-2</sub>類似体のプロドラッグを含む。

## 【0020】

本発明の組成物は、薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤をさらに含んでいてよい。さらに本発明の組成物は、保存料、溶解剤、安定化剤、塩（本発明の物質は、それ自体が薬学的に許容される塩の形態で提供されてよい）、緩衝剤または抗酸化剤を含んでいてよい。

## 【0021】

(a) ビタミンB<sub>1-2</sub>（コバラミン）

ビタミンB<sub>1-2</sub>は、高度に複雑な構造を有する水溶性のビタミンであり、中心コバルト(III)原子に結合する4つのピロリンエレメントで構成される中央平面コリン環を含む。本明細書を通じて、ビタミンB<sub>1-2</sub>、B<sub>1-2</sub>およびコバラミンは、互変可能的に用いてよく、これを図1に表す。

## 【0022】

ビタミンB<sub>1-2</sub>の構造において、中心コバルト(III)原子は6配位性であり、エクアトリアル位がコリン巨大環の窒素原子で占められている。「下位」、「」軸部位は（通常）、5',6'-ジメチルベンズイミダゾール（DMB）塩基由来のイミダゾール窒素原子が占めており、一方、「上位」「」軸部位は、種々のX基（例えばCN<sup>-</sup>、CH<sub>3</sub><sup>-</sup>、Ado<sup>-</sup>、SCN<sup>-</sup>、SeCN<sup>-</sup>、SO<sub>3</sub><sup>-</sup>およびチオ尿素）が占めていてよい。該コリン環は、7つのアミド側鎖、3つのアセトアミド（a、c、g）および4つのプロピオンアミド（b、d、e、f）を取り込む。4つのピロール環は、通常、図1に示すように、A、B、CおよびDと示される。

## 【0023】

いくつかの官能基は、B<sub>1-2</sub>上での修飾に容易に利用可能であり、該官能基としては、プロピオンアミド、アセトアミド、ヒドロキシル基、コバルト(III)イオンおよびリン酸基が挙げられる。したがって、本発明のB<sub>1-2</sub>結合体は、B<sub>1-2</sub>がIFに結合するものであれば、プロピオンアミド、アセトアミド、ヒドロキシル基、コバルト(III)イオンおよびリン酸基上で修飾されていてよい。本発明のB<sub>1-2</sub>結合体の修飾部位の非限定的な例としては、A環上のa位またはb位、B環上のc位またはd位、C環上のe位、D環上のg位、f位、リン酸基、リボース上の5'-または2'-ヒドロキシルおよびコバルトイオンが挙げられる。修飾の好みい部位としては、A環上の部位、例えばb位、C環上の部位、例えばe位、リボースユニット上の部位、例えば5'-ヒドロキシル基、およびコバルトイチオンが挙げられる。特に、該e位は、IFとの相互作用が可能になるように修飾されていてよい。あるいは、該b位は、TCII結合を特異的に妨害するように修飾されていてよい。しかし、B<sub>1-2</sub>のIFに対する結合親和性が維持されなければ、他の修飾部位を用いてもよい。好みい修飾は、IFに対する結合親和性は維持するが、TCIIに対する結合親和性を低下させるものであり得る。例えば、B<sub>1-2</sub>とTCIIの間の相互作用は、b-モノカルボン酸の修飾後のb-プロピオンアミド部位を用いることによって妨害し得る。該修飾は、健康な細胞への、FCIIベースの結合体の取り込みの割合を低下させ得る。

## 【0024】

B<sub>1-2</sub>を修飾する方法は当該分野で公知である。修飾方法の非限定的な例を次に示す。合成化学の分野で一般的である他の修飾方法も使用し得ることが考えられる。例えば、酸性条件下における、注意深く制御されたシアノコバラミンの部分的な加水分解により、所

10

20

30

40

50

望のbおよびeの酸を得ることができる。5'-OHの官能化の方法は、不安定なエーテルを提供する、シアノコバラミン((CN)C<sub>b</sub>1)と無水物の反応によるものであってよい。結合の他の方法はRussell-Jones(国際公開第1999/065390号、引用によりその全体が本明細書に包含される)が記載しているように、カルバメートまたはカルボネート方法であってよい。端的には、5'位のヒドロキシル基が最初にカルボニル基等価物-1,1'-カルボニルジイミダゾール(CDI)または1,1'-カルボニルビス(1,2,4-トリアゾール)(CDT)-と反応した後、アミンまたはアルコールで処理することで、リボーステイルの5'-位にそれぞれカルバメートおよびカルボネートが得られる。あるいは、該5'-OH基は、2-ヨードキシ安息香酸(IBX) / 2-ヒドロキシピリジン(HYP)系を酸化剤として用いて、相当するカルボン酸に酸化した後、アミンと結合させてよい。他の有効な方法は、[1,3]双極子環状付加によるものであってよい。該5'-OHは、好ましい脱離基に変換された後、アジドで置換される。得られた「クリック可能な」アジドは安定であり、アルキンへの銅触媒性およびストレイン促進[1,3]双極子環状付加(CuAACまたはSPAAC)において高い活性を示す。この方法は、Chominski et al, Chem Eur J 2013; 19: 5141-5148に詳述されており、当該文献は引用によりその全体が本明細書に包含される。特定の態様において、該5'-OHはアジドに変換される。その後、アルキン含有グリシンを、「クリック」化学を用いて付加し、これを次いで、金属とキレート化させてよい。他の特定の態様において、アルキン含有グリシンをb位に付加し、これを金属とキレート化させてよい。さらになお他の特定の態様において、アルキル鎖リンカーを、金属キレート化に重要な基の前に付加してよい。

10

20

30

【0025】  
遷移金属の電子対供与体として作用させ、二金属錯体を得るために、コバルトイオンの官能化をアルキル化またはシアニド配位子性を用いて行ってよい。有機金属種の合成には、コバルト(II)のコバルト(I)B<sub>1,2</sub>への還元およびそれに続く、求電子剤: ハロゲン化アルキル、ハロゲン化アシル、マイケル受容体、エポキシド等の反応が必要である。あるいは、還元は必要でない場合もあり、その代わりに、Cu(I)塩の存在下における、(CN)C<sub>b</sub>1と末端アルキンとの直接の反応により、優れた収率でアセチリドを提供することができる。この方法により、2つの部分がB<sub>1,2</sub>に結合することが可能になり、さらなる詳細はChominski et al, J Org Chem 2014; 79: 7532-7542に記載されており、当該文献は引用によりその全体が本明細書に包含される。したがって、2つの検出可能な標識および/または治療剤がB<sub>1,2</sub>に結合し得ることが考えられる。端的には、この方法を用いて、[1,3]双極子アジド-アルキン環状付加を介したさらなる官能化に有用な要素である、「ダブルクリック可能な」ビタミンB<sub>1,2</sub>を製造することができる。AAC(CuAACおよびSPAAC)をカルバメート法と組み合わせることにより、中心コバルトイオンおよび5'-位の両方での結合が可能になる。特定の態様において、アルキンを含むグリシンを、コバルトイオン上で付加してよく、これを、金属とキレート化させてよい。他の特定の態様において、アルキル鎖リンカーを、金属キレート化に機能する基の前に付加してもしなくてもよい。

30

【0026】  
B<sub>1,2</sub>またはその類似体および検出可能な標識および/または治療剤は: i) 互いに直接結合している; ii) B<sub>1,2</sub>またはその類似体と、検出可能な標識および/または治療剤との間に距離をおくために「リンカー」によって離されているか; またはiii) 担体内で、結合していない所望の検出可能な標識および/または治療剤と結合することのできる担体に結合している。検出可能な標識および治療剤のさらなる詳細は、セクションI(b)およびセクションI(c)にそれぞれ記載する。

40

【0027】  
局面の一において、B<sub>1,2</sub>またはその類似体は、共有結合を介して直接的にまたは電子間相互作用を介して間接的に、検出可能な標識および/または治療剤に結合していくよい。電子間相互作用の非限定的な例としては、イオン結合、疎水性結合、水素結合またはファンデルワールス力が挙げられる。B<sub>1,2</sub>またはその類似体が検出可能な標識および/ま

50

たは治療剤に直接結合している様において、リンカーを用いてもまたは用いなくてもよい。

#### 【0028】

他の局面において、B<sub>1,2</sub>またはその類似体は、担体内で、結合していない、所望の検出可能な標識および/または治療剤と結合することのできる担体に結合していてよい。適当な担体の非限定的な例としては、キレート剤が挙げられる。例えば、B<sub>1,2</sub>またはその類似体は、所望の検出可能な標識および/または治療剤と結合できるキレート剤と結合していてよい。該キレート剤は、B<sub>1,2</sub>またはその類似体に直接結合していても、またはB<sub>1,2</sub>またはその類似体に結合しているリンカーに結合していてよい。本明細書において、「キレート剤」は、単一の金属原子と複数の化学結合を形成する分子である。結合の形成前には、該基キレート剤は、1対を超える非共有原子対を有する。原子対を金属原子と共有することによって結合が形成される。

10

#### 【0029】

キレート剤の例としては、イミノジカルボキシルおよびポリアミノポリカルボキシル反応基、ジエチレントリアミンペニタ酢酸(DTPA)、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-テトラ酢酸(DOTA)、テトラメチルヘプタンジオネート(TMHD)、2,4-ペンタンジオン、エチレンジアミンテトラ酢酸二ナトリウム塩(EDTA)、エチレングリコール-O,O'-ビス(2-アミノエチル)-N,N,N',N'-テトラ酢酸(EGTA)、N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン-N,N',N'-トリ酢酸三ナトリウム塩(HEDTA)、ニトリロトリ酢酸(NTA)、および1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン-N,N',N",N''-テトラ酢酸(TETA)、デフェロキサミン(DFO)、1,4,7-トリアザシクロノナン-1,4,7-トリ酢酸(NOTA)、有機酸およびアミノ酸、例えばクエン酸、酒石酸、グルコン酸およびグリシンならびにその誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

20

#### 【0030】

キレート剤は、当該分野で一般的に知られている方法を用いてB<sub>1,2</sub>またはその類似体に結合させてよい。キレート剤を結合する方法の非限定的な例を次に示す。合成化学の分野で一般的な、他の種々のキレート剤の結合方法も使用し得ると考えられる。例えば、B<sub>1,2</sub>またはその類似体は、B<sub>1,2</sub>またはその類似体の遊離アミノ基を、キレート剤の適当な官能基、例えばカルボキシル基または活性化エステルと反応させることにより、キレート剤に結合し得る。例えば、B<sub>1,2</sub>またはその類似体は、エチレン鎖上でカルボキシル置換基により官能化されているときは、配位化学でよく用いられるキレート剤である、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)に結合し得る。この種類のEDTA誘導体の合成は、Arya et al., (Bioconjugate Chemistry. 2:323, 1991)により報告されており、ここで、配位している4カルボキシル基は、それぞれ、t-ブチル基で遮断され、一方、エチレン鎖上のカルボキシル置換基は、B<sub>1,2</sub>またはその類似体のアミノ基と自由に反応でき、それにより結合体を形成する。

30

#### 【0031】

B<sub>1,2</sub>またはその類似体は、ペプチド性である、すなわち、固相ペプチド合成と競合性である金属キレート剤成分に結合していてよい。この場合、該キレート剤は、上述のEDTAと同じ方法でB<sub>1,2</sub>またはその類似体に結合していてよい。

40

#### 【0032】

B<sub>1,2</sub>またはその類似体は、結合しているキレート剤を介して、検出可能な標識と複合化してよく、それにより、間接的に標識されたB<sub>1,2</sub>またはその類似体との結合体が得られる。同様に、細胞傷害剤または治療剤も、キレート基を介してB<sub>1,2</sub>またはその類似体に結合してよい。したがって、該キレート剤は、検出可能な標識または治療剤に直接結合していてよい。あるいは、介入するアミノ酸配列またはリンカーを用いて検出可能な標識または治療剤を該キレート剤に結合させてもよい。

#### 【0033】

他の局面において、B<sub>1,2</sub>またはその類似体ならびに検出可能な標識および/または治

50

療剤は、B<sub>1-2</sub>またはその類似体と検出可能な標識および/または治療剤との間に距離ができるようにリンカーによって離されていてよい。B<sub>1-2</sub>またはその類似体の、検出可能な標識および/または治療剤に対する結合は、B<sub>1-2</sub>またはその類似体のIFに対する結合または検出可能な標識および/または治療剤の機能のいずれかに有害な影響を与えないものであることは、理解されるべきことである。適当なリンカーとしては、例えばB<sub>1-2</sub>またはその類似体ならびに検出可能な標識および/または治療剤の両方に結合できるように反応性の基によって官能化されたアミノ酸鎖およびアルキル鎖が挙げられるが、これらに限定されない。

【0034】

態様の一において、該リンカーは、アミノ酸側鎖を含んでいてよく、これはペプチドリンカーと称する。したがって、B<sub>1-2</sub>またはその類似体を都合良く検出可能な標識および/または治療剤または担体に付加することができるリンカーを得る目的で、アミノ酸残基をB<sub>1-2</sub>またはその類似体に付加してよい。アミノ酸残基のリンカーは、通常、少なくとも1残基であり、40残基以上であってよく、1~10残基であることがしばしばである。連結に用いられる典型的なアミノ酸残基は、チロシン、システイン、リジン、グルタミン酸およびアスパラギン酸等である。

【0035】

他の態様において、アルキル鎖連結基は、B<sub>1-2</sub>またはその類似体に、例えば、B<sub>1-2</sub>またはその類似体のアミノ基の、該アルキル鎖上の最初の官能基、例えばカルボキシル基または活性化エステルとの反応によって結合していてよい。続けて、キレート剤をアルキル鎖に結合させて、アルキル鎖上の第二の官能基をキレート剤上の適当な基と反応させることにより、複合体の形成を完了させてよい。アルキル鎖の第二の官能基は、キレート剤上の官能基とは反応性を示すが、B<sub>1-2</sub>またはその類似体とは反応性でない置換基から選択される。例えば、キレート剤が官能基、例えばカルボキシル基または活性化エステルを取り込むとき、該アルキル鎖連結基の第二の官能基はアミノ基であってよい。結合体の形成が、所望しない生成物の形成を避けるために、存在する官能基の保護および脱保護を必要とする場合があることは理解されることである。保護および脱保護は、有機合成の分野で一般的である保護基、反応剤および手法を用いて行われる。あるいは、連結基は最初にキレート剤に結合した後、B<sub>1-2</sub>またはその類似体に結合してもよいことは理解される。アルキル鎖連結基は、炭素1~40個またはそれ以上の長さであってよく、炭素1~10個の長さであることがしばしばである。特定の態様において、アルキル鎖連結基は、1、2、3、4、5、6または7炭素原子の長さであってよい。他の特定の態様において、アルキル鎖連結基は、3炭素原子の長さであってよい。さらなる他の特定の態様において、アルキル鎖連結基は4炭素原子の長さであってよい。なおさらに他の特定の態様において、アルキル鎖連結基は5炭素原子の長さであってよい。

【0036】

アルキル鎖に対する他の化学連結基は、ポリエチレングリコール(PEG)であり、これは、上述の、アルキル鎖の結合体への取り込みと同じ方法により官能化される。B<sub>1-2</sub>またはその類似体は、全身性の半減期の改善および投与の頻度を低下させるためにPEG化していてよい。態様の一において、PEGをリンカーに付加してよい。したがって、B<sub>1-2</sub>またはその類似体は、リンカーおよびPEGを含んでいてよい。例えば、B<sub>1-2</sub>またはその類似体は、アルキルリンカー、1種以上のキレート剤およびPEGを含んでいてよい。

【0037】

(b) 検出可能な標識

局面の一において、B<sub>1-2</sub>またはその類似体は、検出可能な標識に結合していてよい。検出可能な標識は、B<sub>1-2</sub>またはその類似体に直接結合していても、またはB<sub>1-2</sub>またはその類似体に間接的に結合していてもよい。態様の一において、検出可能な標識は、B<sub>1-2</sub>またはその類似体に結合しているキレート剤と複合体化していてよい。他の局面において、検出可能な標識は、B<sub>1-2</sub>またはその類似体と結合しているリンカーと結合している

10

20

30

40

50

キレート剤と複合体化していてよい。さらに他の態様において、検出可能な標識は、B<sub>1,2</sub>またはその類似体に結合しているリンカーに結合していてよい。なおさらに他の態様において、検出可能な標識は、該標識の、第二の分子によって特異的に結合される性質によって、B<sub>1,2</sub>またはその類似体に間接的に結合していてよい。この種類の、間接的に結合した標識の一例としては、第二の分子であるストレプトアビジンが特異的に結合することができるビオチン標識が挙げられる。単一の、二重のまたは多数の標識が有用である場合もある。

【0038】

本明細書において、「検出可能な標識」とは、B<sub>1,2</sub>またはその類似体に結合したときに、B<sub>1,2</sub>またはその類似体を検出可能なものにする任意の種類の標識である。検出可能な標識はまた、細胞に対して毒性を示すか、または細胞毒性を示すものであってもよい。したがって、検出可能な標識はまた、治療剤であっても細胞毒性剤であってもよい。一般的に、検出可能な標識としては、発光分子、化学発光分子、蛍光色素、フルオロフォア、蛍光クエンチング剤、有色分子、放射性同位体、放射性核種、シンチラント、巨大標識、例えば金属原子（質量変化による検出用）、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、プロテインA、プロテインG、抗体またはその断片、Grb2、ポリヒスチジン、Ni<sup>2+</sup>、Flagタグ、mycタグ、重金属、酵素、アルカリリンホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、電子供与体/受容体、アクリジニウムエステルおよび比色分析基質が挙げられる。当業者は、上述していないが、本発明の実施に用い得る他の有用な標識を容易に認識できる。

10

20

30

40

【0039】

検出可能な標識は、シグナル伝達機構によって検出可能なシグナルを発する。例えば検出可能な標識が放射性核種であるような場合において、検出可能な標識はシグナルを自発的に発することができる。他の場合、例えば、検出可能な標識が緩和金属である場合には、外場から刺激を受けた結果として、検出可能な標識がシグナルを放出する。シグナルの例としては、線、X線、可視光、赤外線エネルギーおよび電波が挙げられるが、これらに限定されない。シグナル伝達機構の例としては、ガンマカメラ、例えばSPECT/CTデバイス、PETスキャナー、蛍光光度計および磁気共鳴画像法(MRI)機器が挙げられるが、これらに限定されない。したがって、検出可能な標識は、磁気共鳴画像法、シンチグラフィーイメージング、超音波または蛍光を用いて検出することができる標識を含む。特定の態様において、検出可能な標識は、ポジトロン放出断層撮影、単一光子放射断層撮影、ガンマカメライメージングまたは直線形スキャンを用いて検出し得る標識を含む。

【0040】

適当なフルオロフォアとしては、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、フルオレセインチオセミカルバジド、ローダミン、Texas Red、CyDye(例えばCy3、Cy5、Cy5.5)、Alexa Fluor(例えばAlexa488、Alexa555、Alexa594; Alexa647)、近赤外(NIR)(700~900nm)蛍光色素およびカルボシアニンおよびアミノスチリル色素が挙げられるが、これらに限定されない。B<sub>1,2</sub>またはその類似体は、当該分野でよく知られている技術を用いて、フルオロフォアを用いて該剤を標識することにより、蛍光検出のための標識化を行ってもよい(例えば、Lohse et al., Bioconj Chem 8:503-509(1997)参照)。例えば、多くの公知の色素が、NH<sub>2</sub>-末端基に結合することができる。あるいは、蛍光色素、例えばフルオロセインを、ペプチドリンカーのリジン残基に結合させてよい。特定の態様において、アルキン修飾色素、例えばAlexa Fluor色素を、例えばSharpless click chemistry(Kolb et al., Angew Chem Int Ed 2001; 40: 2004-2021、引用により全体が本明細書に包含される)を用いてアジド修飾B<sub>1,2</sub>にクリック結合させてよい。

【0041】

放射性核種は、-放射性の放射性核種、オージェ電子放射性の放射性核種、-放射性の放射性核種、-放射性の放射性核種または陽電子放射性の放射性核種であってよい。放射性核種は、検出可能な標識および/または治療剤であってよい。適当な放射性核種

50

の非限定的な例としては、炭素-111、窒素-13、酸素-15、フッ素-18、フルオロデオキシグルコース-18、リン-32、スカンジウム-47、銅-64、65および67、ガリウム-67および68、臭素-75、77および80m、ルビジウム-82、ストロンチウム-89、ジルコニウム-89、イットリウム-86および90、ルテニウム-95、97、103および105、レニウム-99m、101、105、186および188、テクネチウム-99m、ロジウム-105、水銀-107、パラジウム-109、インジウム-111、銀-111、インジウム-113m、ランタニド-114m、スズ-117m、テルル-121m、122mおよび125m、ヨウ素-122、123、124、125、126、131および133、プラセオジム-142、プロメチウム-149、サマリウム-153、ガドリニウム-159、ツリウム-165、167および168、ジスプロシウム-165、ホルミウム-166、ルテチウム-177、レニウム-186および188、イリジウム-192、白金-193および195m、金-199、タリウム-201、チタン-201、アスタチン-211、ビスマス-212および213、鉛-212、ラジウム-223、アクチニウム-225ならびに、それ由来のニトリドまたはオキシド形態が挙げられる。特定の態様において、放射性核種は、銅-64、ジルコニウム-89、イットリウム-86、イットリウム-90、テクネチウム-99m、ヨウ素-125、ヨウ素-131、ルテチウム-177、レニウム-186およびレニウム-188からなる群から選択される。

## 【0042】

種々の金属原子を、検出可能な標識として使用し得る。該金属原子は、一般的に、20以上の原子数を有する金属を含む金属原子の群から選択してよい。例えば、該金属原子は、カルシウム原子、スカンジウム原子、チタン原子、バナジウム原子、クロム原子、マンガン原子、鉄原子、コバルト原子、ニッケル原子、銅原子、亜鉛原子、ガリウム原子、ゲルマニウム原子、ヒ素原子、セレン原子、臭素原子、クリプトン原子、ルビジウム原子、ストロンチウム原子、イットリウム原子、ジルコニウム原子、ニオブ原子、モリブデン原子、テクネチウム原子、ルテニウム原子、ロジウム原子、パラジウム原子、銀原子、カドミウム原子、インジウム原子、スズ原子、アンチモン原子、テルル原子、ヨウ素原子、キセノン原子、セシウム原子、バリウム原子、ランタン原子、ハフニウム原子、タンタル原子、タンゲステン原子、レニウム原子、オスミウム原子、イリジウム原子、白金原子、金原子、水銀原子、タリウム原子、鉛原子、ビスマス原子、フランシウム原子、ラジウム原子、アクチニウム原子、セリウム原子、プラセオジム原子、ネオジム原子、プロメチウム原子、サマリウム原子、ユーロピウム原子、ガドリニウム原子、テルビウム原子、ジスプロシウム原子、ホルミウム原子、エルビウム原子、ツリウム原子、イッテルビウム原子、ルテチウム原子、トリウム原子、プロトアクチニウム原子、ウラン原子、ネプツニウム原子、プルトニウム原子、アメリシウム原子、キュリウム原子、バークリウム原子、カリホルニウム原子、AINスタイニウム原子、フェルミウム原子、メンデレビウム原子、ノーベリウム原子またはローレンシウム原子であってよい。いくつかの態様において、該金属原子は、20を超える原子数を有するアルカリ金属を含む群から選択してよい。他の態様において、該金属原子は、20を超える原子数を有するアルカリ土類金属を含む群から選択してよい。態様の一において、該金属原子は、ランタノイドを含む金属の群から選択してよい。他の態様において、該金属原子は、アクチニドを含む金属の群から選択してよい。さらに他の態様において、該金属原子は、遷移金属を含む金属の群から選択してよい。さらに他の態様において、該金属原子は、貧金属を含む金属の群から選択してよい。他の態様において、該金属原子は、金原子、ビスマス原子、タンタル原子およびガドリニウム原子を含む群から選択してよい。好ましい態様において、該金属原子は、原子番号53(すなわちヨウ素)~83(すなわちビスマス)の金属を含む群から選択してよい。他の態様において、該金属原子は、磁気共鳴画像法に適当な原子であってよい。他の態様において、該金属原子は、CTのX-線エネルギーバンドにK-エッジを有する金属からなる群から選択してよい。好ましい金属原子としては、マンガン、鉄、ガドリニウム、金およびヨウ素が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0043】

10

20

30

40

50

該金属原子は、+1、+2または+3酸化状態の形態の金属イオンであつてよい。例えば、非限定的な例としては、Ba<sup>2+</sup>、Bi<sup>3+</sup>、Cs<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cr<sup>2+</sup>、Cr<sup>3+</sup>、Cr<sup>6+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Co<sup>3+</sup>、Cu<sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Cu<sup>3+</sup>、Ga<sup>3+</sup>、Gd<sup>3+</sup>、Au<sup>+</sup>、Au<sup>3+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、F<sup>3+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Mn<sup>3+</sup>、Mn<sup>4+</sup>、Mn<sup>7+</sup>、Hg<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Ni<sup>3+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Sr<sup>2+</sup>、Sn<sup>2+</sup>、Sn<sup>4+</sup>およびZn<sup>2+</sup>が挙げられる。該金属原子は、金属酸化物を含んでいてよい。例えば、金属酸化物の非限定的な例としては、酸化鉄、酸化マンガンまたは酸化ガドリニウムが挙げられる。さらなる例としては、マグネタイト、マグヘマイトまたはその組み合わせが挙げられる。

## 【0044】

10

局面の一において、キレート剤に直接的または間接的に結合しているB<sub>1,2</sub>またはその類似体は、放射性核種または金属原子を取り込み得る。放射性核種または金属原子の、B<sub>1,2</sub>またはその類似体-キレート剤複合体への取り込みは、配位化学の分野で一般的な種々の方法により行ってよい。例えば、該金属がテクネチウム-99mである場合、以下の一般的な手法を用いて、テクネチウム複合体を形成してよい。B<sub>1,2</sub>またはその類似体-キレート剤複合体溶液は、該複合体を最初に水性アルコール、例えばエタノールに溶解させることにより形成する。その後、該溶液を脱気して酸素を除き、次いで適当な反応剤、例えば水酸化ナトリウムを用いてチオール保護基を除いた後、有機酸、例えば酢酸(pH 6.0~6.5)で中和する。標識工程において、化学量論的に過剰な、モリブデンジエネレーターより得られた過テクネチウム酸ナトリウムを、テクネチウムを減少させるのに十分な量の還元剤、例えば塩化第一スズとともに、該複合体の溶液に添加し、加熱する。該標識化複合体は、クロマトグラフィー、例えばC-18 Sep Pak cartridgeによって混入物である<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>およびコロイド性<sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub>から分離し得る。

20

## 【0045】

他の方法において、標識は、トランスキレート反応によって行ってよい。テクネチウム源は、選択したキレート剤との配位子交換を促進する不安定な配位子と複合体化したテクネチウム溶液である。トランスキレート化に適当な配位子としては、グリシン、タータレート、シトロートおよびヘプタグルコネートが挙げられる。この場合、好ましい還元剤は、亜ジチオン酸ナトリウムである。該複合体は、上述の技術を用いて標識しても、あるいは、キレート剤自体が標識され、次いでB<sub>1,2</sub>またはその類似体に結合して複合体を形成してよく；この過程は「前標識配位子(prelabeled ligand)」法と称される。

30

## 【0046】

本発明の複合体を標識する他の方法は、B<sub>1,2</sub>またはその類似体-キレート剤複合体を、金属のキレート化に伴って切断される結合によって固相支持体上に固定することを含む。これは、キレート剤が該支持体上の官能基に、複合体化原子の1つによって結合する場合に行われる。好ましくは、複合体化硫黄原子を、硫黄保護基、例えばマレイミドで官能化された支持体に結合する。

## 【0047】

40

他の局面において、検出可能な標識は、キレート剤を用いずに、B<sub>1,2</sub>またはその類似体に直接的または間接的に結合していてよい。例えば、検出可能な標識は、B<sub>1,2</sub>またはその類似体に直接的に結合している。あるいは、検出可能な標識は、B<sub>1,2</sub>またはその類似体に結合しているリンカーに結合している。例えば、放射活性ヨウ素標識(例えば<sup>123</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>126</sup>I、<sup>127</sup>Iまたは<sup>131</sup>I)は、それぞれ、ペプチドリンカーセンに存在するD-もしくはL-TyrまたはD-もしくはL-4-アミノ-Phe残基に結合することができる。態様の一において、ペプチドリンカーセンのチロシン残基は、ハロゲン化されていてよい。ハロゲンとしては、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素およびアスタチンが挙げられる。該ハロゲン化B<sub>1,2</sub>またはその類似体は、該ハロゲンが放射性同位体、例えば<sup>18</sup>F、<sup>75</sup>Br、<sup>77</sup>Br、<sup>122</sup>I、<sup>123</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>129</sup>I、<sup>131</sup>Iまたは<sup>211</sup>Atである場合、検出可能のように標識されていてよい。ハロゲン化B<sub>1,2</sub>またはその類似体は、ペプチドリンカーセンに存在する少なくとも1つのアミノ酸、好

50

ましくは D-Tyr 残基に共有結合したハロゲンを含む。

【0048】

(c) 治療剤

局面の一において、B<sub>1-2</sub> またはその類似体は、治療剤に、該治療剤がキュビリン発現細胞を選択的に標的とするように結合していてよい。特定の態様において、該治療剤は、キュビリンを発現する腫瘍細胞を選択的に標的とし得る。該治療剤は、B<sub>1-2</sub> またはその類似体に直接的に結合していても、または B<sub>1-2</sub> またはその類似体に間接的に結合していてよい。態様の一において、該治療剤は、B<sub>1-2</sub> またはその類似体に結合したキレート剤と複合体化してよい。他の局面において、該治療剤は、B<sub>1-2</sub> またはその類似体に結合しているリンカーに結合しているキレート剤と複合体化してよい。さらに他の態様において、該治療剤は、B<sub>1-2</sub> またはその類似体に結合しているリンカーに結合していてよい。なおさらには他の態様において、該治療剤は、検出可能な標識と複合体化しており、B<sub>1-2</sub> と結合しているキレート剤と結合しているリンカーと結合していてよい。

【0049】

「治療剤」は、症状または疾患の検出、診断または処置に用いられる、当該分野で公知である任意の化合物である。該化合物は、天然起源であっても、修飾されていてもまたは合成されていてよい。治療剤の非限定的な例としては、天然の形態または、細胞への取り込みまたは吸着を亢進するために、疎水基または荷電された基で誘導体化された薬物、治療化合物、遺伝物質、金属(例えば放射活性同位体)、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、ステロイド、核酸ベースの物質、またはその誘導体、類似体または組み合わせが挙げられる。該治療剤は、水溶性であっても、または疎水性であってよい。治療剤の非限定的な例としては、免疫関連剤、甲状腺薬、呼吸器用製品、抗悪性腫瘍薬、駆虫薬、抗マラリア薬、有糸分裂阻害剤、ホルモン、抗原虫薬、抗結核薬、心血管用製品、血管用製品、生体応答修飾物質、抗真菌剤、ビタミン、ペプチド、抗アレルギー薬、抗凝固薬、循環器系作用薬、代謝増強薬、抗ウイルス薬、抗狭心症薬、抗生物質、抗炎症薬、抗リウマチ薬、麻薬、強心性配糖体、神経筋遮断薬、鎮静薬、局所麻酔薬、全身麻酔薬または放射性原子またはイオンが挙げられる。治療剤の非限定的な例は後に示す。特定の態様において、治療剤は、癌の検出、診断または処置に使用される化合物であってよい。該治療剤は、腫瘍の成長を低下させるかもしくは妨げるか、あるいは、体内または器官内の腫瘍の影響を低下させるのが好ましい。腫瘍による症状を軽減させるか、または腫瘍の成長を低下させる治療剤が、本発明に適当である。さらに、腫瘍細胞の成長に関連のある症状を軽減する任意の治療剤が、本発明の目的に有用である。

【0050】

B<sub>1-2</sub> またはその類似体は、1、2、3、4 または 5 種の治療剤に結合していてよい。B<sub>1-2</sub> またはその類似体に治療剤を結合するのに、リンカーを用いても用いなくてもよい。一般的に、該結合体は、内因子の B<sub>1-2</sub> またはその類似体への結合体を妨げるべきではなく、また、B<sub>1-2</sub>-IF のキュビリンへの結合を妨げるべきではない。いくつかの場合において、B<sub>1-2</sub> またはその類似体は、B<sub>1-2</sub> またはその類似体と、治療剤の間に切断可能な連結を有していてよい。該リンカーは、特定の細胞の部位における治療剤の放出を可能にし得る。

【0051】

本発明の治療剤は、低分子治療剤、治療用抗体、治療用核酸または化学療法剤であってよい。治療用抗体の非限定的な例としては、ムロモナブ(muromomab)、アブシキシマブ、リツキシマブ、ダクリズマブ、バシリキシマブ、パリビズマブ、インフリキシマブ、トラスツズマブ、エタネルセプト、ゲムツズマブ、アレムツズマブ、イブリツモマブ(ibritumomab)、アダリムマブ、アレファセプト、オマリズマブ、トシツモマブ、エファリズマブ、セツキシマブ、ベバシズマブ、ナタリズマブ、ラニビズマブ、パニツムマブ、エクリズマブおよびセルトリズマブが挙げられる。代表的な治療用核酸は、生体内で免疫応答および/または抗血管新生応答を起こすことのできるポリペプチドをコードしていてよい。免疫刺激効果を有する代表的な治療用タンパク質としては、サイトカイン(例えばイン

10

20

30

40

50

ターロイキン (IL)、例えばIL2、IL4、IL7、IL12、インターフェロン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、腫瘍壞死因子 (TNF- $\alpha$ )、免疫調節細胞表面タンパク質(例えばヒト白血球抗原(HLAタンパク質)、共刺激分子および腫瘍関連抗原が挙げられるが、これらに限定されない。Kirk & Mule, 2000; Mackensen et al., 1997; Walther & Stein, 1999; および当該文献中の引用文献を参照のこと。本明細書に記載の事項にしたがって使用できる、抗血管新生活性を有する代表的な化合物としては: トロンボスポンジンI (Kosfeld & Frazier, 1993; Tolsma et al., 1993; Dameron et al., 1994)、メタロスponジンタンパク質(Carpizo & Iruela-Arispe, 2000)、クラスIインターフェロン(Albini et al., 2000)、IL12 (Voest et al., 1995)、プロタミン(Ingber et al., 1990)、アンジオスタチン(O'Reilly et al., 1994)、ラミニン(Sakamoto et al., 1991)、エンドスタチン(O'Reilly et al., 1997)およびプロラクチン断片(Clapp et al., 1993)が挙げられる。さらに、いくつかの抗血管新生ペプチドが、これらのタンパク質より単離されている(Maione et al., 1990; Eijan et al., 1991; Woltering et al., 1991)。免疫調節活性および抗血管新生活性の両方を有する代表的なタンパク質としては、IL12、インターフェロン- $\alpha$ またはケモカインが挙げられる。他の、癌治療に有用であり得る治療用核酸としては、癌抑制遺伝子産物/抗原、代謝拮抗薬、自殺遺伝子産物をコードする核酸およびその組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0052】

化学療法剤は、癌の処置に有用な化合物を指す。該化合物は、一般的に、急速に分裂する細胞に影響を与える細胞毒性剤であっても、または癌細胞の制御されていないタンパク質に影響を与える標的化治療剤であってもよい。細胞毒性剤は、腫瘍細胞に対して毒性を示す、天然起源の、修飾された、または合成された任意の化合物である。該剤は、新生物の処置および、細胞増殖または過剰活性細胞集団により特徴付けられる他の症状または疾患の処置に有用である。化学療法剤は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗腫瘍抗生物質、抗細胞骨格剤、トポイソメラーゼ阻害剤、抗ホルモン剤、標的化治療剤、光線力学治療剤またはその組み合わせであってよい。例示的な態様において、該化学療法剤は、リポソーム性ドキソルビシンおよびナノ粒子アルブミンドセタキセルからなる群から選択される。

#### 【0053】

適当なアルキル化剤の非限定的な例としては、アルトレタミン、ベンゾドーパ(benzodopa)、ブスルファン、カルボプラチン、カルボコン、カルムスチン(BCNU)、クロラムプシル、クロルナファジン、コロホスファミド(cholophosphamide)、クロロゾトシン、シスプラチニン、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、ダカルバジン(DTIC)、エストラムスチン、ホテムスチン、イホスファミド、インプロスルファン、リポプラチニン、ロムスチン(CCNU)、マホスファミド、マンノスルファン、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、メツレドーパ(meturedopa)、ムスチン(メクロレタミン)、ミトプロニトール、ニムスチン、ノベンビチニン(novembichin)、オキサリプラチニン、フェネステリン、ピポスルファン、プレドニムスチン、ラニムスチン、サトラプラチニン、セムスチン、テモゾロミド、チオテパ、トレオスルファン、トリアジコン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド(TEPA)、トリエチレンチオホスホラミド(チオテパ)、トリメチロールメラミン(trimethylololomelamine)、トロホスファミド、ウラシルマスターDおよびウレドーパ(uredopa)が挙げられる。

#### 【0054】

適当な代謝拮抗薬としては、アミノブテリン、アンシタビン、アザシチジン、8-アザグアニン、6-アザウリジン、カペシタビン、カルモフルール(1-ヘキシルカルボモイル-5-フルオロウラシル)、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン(シトシンアラビノシド(Ara-C))、デシタビン、デノブテリン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、フルダラビン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア(ヒドロキシカルバミド)、ロイコボリン(フォリン酸)、6-メルカプトブリニン、メトレキサート、ナフォキシジン、ネララビン、オブリメルセン、ペメトレ

10

20

30

40

50

キセド、ブテロプロテリン、ラルチトレキセド、テガフル (tegofur)、チアゾフリン、チアミプリン、チオグアニン (チオグアニン) (tioguanine (thioguanine)) およびトリメトレキサートが挙げられるが、これらに限定されない。

【0055】

適当な抗腫瘍抗生物質の非限定的な例としては、アクラシノマイシン (aclacinomysin)、アクラルビシン、アクチノマイシン、アドリアマイシン、アウロスタチン (aurostatin) (例えば、モノメチルオーリスタチン E)、オースラマイシン (authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリチアマイシン、カラビシン (carabacin)、カミノマイシン (caminomycin)、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エボキソミシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミスラマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、プリカマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン (rodorubicin)、スバルソマイシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、バルルビシン、ウベニメクス、ジノスタチンおよびゾルビシンが挙げられる。

10

【0056】

適当な抗細胞骨格剤の非限定的な例としては、カバジタキセル、コルヒチン、デメコルチン、ドセタキセル、エポチロン、イクサベピロン、マクロマイシン (macromycin)、オマセタキシン メペサクシネット、オルタタキセル、パクリタキセル (例えばDHA-パクリタキセル)、タキサン、テセタキセル、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビンデシンおよびビノレルビンが挙げられる。

20

【0057】

適当なトポイソメラーゼ阻害剤としては、アムサクリン、エトポシド (VP-16)、イリノテカン、ミトキサントロン、RFS 2000、テニポシドおよびトポテカンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0058】

適当な抗ホルモン剤の非限定的な例としては、アミノグルテチミド、抗エストロゲン剤、アロマターゼ阻害 4(5)-イミダゾール、ビカルタミド、フィナステリド、フルタミド、フルベストラント、ゴセレリン、4-ヒドロキシタモキシフェン、ケオキシフェン、リュープロリド、LY117018、ミトタン、ニルタミド、オナプリストン、ラロキシフェン、タモキシフェン、トレミフェンおよびトリロスタンが挙げられる。

30

【0059】

標的化治療剤の例としては、モノクローナル抗体、例えばアレムツズマブ、カツマキソマブ (cartumaxomab)、エドレコロマブ、エプラツズマブ、ゲムツズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、グレムバツムマブ ベドチン、イプリツモマブ チウキセタン、レディタクス、リツキシマブ、トシツモマブおよびトラスツズマブ；プロテインキナーゼ阻害剤、例えばベバシズマブ、セツキシマブ、クリゾニブ (crizotinib)、ダサチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ラバチニブ、ムブリチニブ、ニロチニブ、パニツムマブ、パゾパニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、トセラニブおよびパンデタニブが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0060】

血管新生阻害剤の非限定的な例としては、アンジオスタチン、ベバシズマブ、デニロイキンジチトクス、エンドスタチン、エベロリムス、ゲニステイン、インターフェロン、インターロイキン-2、インターロイキン-12、パゾパニブ、ペガプロタニブ、ラニビズマブ、ラパマイシン (シロリムス)、テムシロリムスおよびサリドマイドが挙げられる。

【0061】

成長阻害ポリペプチドの非限定的な例としては、ボルテゾミブ (bortezomib)、エリスロポエチン、インターロイキン (例えば IL-1、IL-2、IL-3、IL-6)、白血病抑制因子、インターフェロン、ロミデプシン、トロンボポエチン、TNF-、CD30

50

リガンド、4-1BBリガンドおよびAPO-1リガンドが挙げられる。

【0062】

光力学療法剤の非限定的な例としては、アミノレブリン酸、アミノレブリン酸メチル、レチノイド(アリトレチノイン、タミバロテン、トレチノイン)およびテモポルフィンが挙げられる。

【0063】

他の抗腫瘍剤としては、アナグレリド、亜ヒ酸、アスパラギナーゼ、ベキサロテン、ブロピリミン、セレコキシブ、化学結合Fab、エファプロキシラル、エトグルシド、フェルギノール、ロニダミド(Ionidamide)、マソプロコール、ミルテホシン、ミトグアゾン、タランパネル(talapanel)、トラベクテジンおよびボリノスタットが挙げられる。

10

【0064】

上述の任意の剤の薬学的に許容される塩、または誘導体もまた含まれる。該化学療法剤の用量は、該剤および腫瘍または新生物の種類によって変動し得る。医師は、該化学療法剤の適当な用量を決定することができる。

【0065】

他の治療剤は、ウイルスまたはウイルスゲノム、例えば腫瘍溶解性ウイルスを含んでいてよい。腫瘍溶解性ウイルスは、細胞に入ったときに、標的組織中の細胞を(例えば溶解によって)殺傷することができる天然起源のウイルスを含む。

【0066】

(d) 内因子

20

内因子(IF)は、胃粘膜および臍臍から分泌されるグリコシル化タンパク質である。IFは、ピコモルの親和性で $B_{1,2}$ に結合する( $K_d$ : 約1pM)。 $B_{1,2}$ 取り込み経路において、該IFタンパク質は、腸管の腸細胞を介した $B_{1,2}$ の輸送を促進し、これは、頂端側に発現するIF- $B_{1,2}$ 受容体(キュビリン)で、受容体を介したエンドサイトーシスにより起こる。キュビリンは、アンカータンパク質であるアムニオンレス(AM)と協調して、 $B_{1,2}$ の輸送に機能する。経細胞輸送の後、最初の摂取の2.5~4時間後に、 $B_{1,2}$ は、第三の輸送タンパク質である、トランスクバラミンII(TCII)に結合した状態で、血漿中に現れる。上述の $B_{1,2}$ 取り込み経路に基づけば、IFは血中には存在せず、腸管にのみ存在する。したがって、従来、IF- $B_{1,2}$ が非経口経路(すなわち血流)を介して投与してよく、キュビリンに効果的に結合できることは知られていなかった。したがって、本発明の発明者が、静脈内投与されたIF- $B_{1,2}$ が、腸管の外側のキュビリン(すなわち、非回腸キュビリン)に結合できることを見出したことは、予期できないことである。

30

【0067】

局面の一において、IFは、 $B_{1,2}$ または本発明の $B_{1,2}$ 結合体に結合し、それにより複合体を形成する。該IFは、 $B_{1,2}$ またはその類似体が検出可能な標識および/または治療剤に結合する前後に、 $B_{1,2}$ またはその類似体に結合していてよい。特定の態様において、IFは、 $B_{1,2}$ またはその類似体が検出可能な標識および/または治療剤に結合した後に、 $B_{1,2}$ またはその類似体に結合してよい。態様の一において、IFは、溶液中で、該結合体にIFを結合させることによって、 $B_{1,2}$ または $B_{1,2}$ 結合体に事前に結合していてよい。非限定的な例としては、 $B_{1,2}$ または $B_{1,2}$ 結合体は、PBS(pH7.4)またはMES緩衝液(pH5.5)または水(pH8)の中、約25~37の温度でIFと結合し得る。結合するために、IFを $B_{1,2}$ または $B_{1,2}$ 結合体と少なくとも30分間接触させてよい。あるいは、IFは、 $B_{1,2}$ または $B_{1,2}$ 結合体に、少なくとも15分間、少なくとも30分間、少なくとも45分間、少なくとも1時間、少なくとも2時間、少なくとも3時間、少なくとも4時間、少なくとも5時間または少なくとも6時接触させてよい。IFと、 $B_{1,2}$ または $B_{1,2}$ 結合体を事前に結合させる種々の条件は、当業者が決定し得るものである。

40

【0068】

IFと $B_{1,2}$ または $B_{1,2}$ 結合体を事前に結合させるためには、IFおよび、 $B_{1,2}$ ま

50

たは  $B_{1,2}$  結合体を、溶液中で結合させてよい。IFは、 $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体に1対1で結合する。したがって、溶液に添加した  $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体に対するIFの比率は、1:1であってよい。しかし、IFの  $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体での飽和を促進するためには、 $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体に対して、より多くの量のIFを溶液に添加してもよい。例えば、 $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体に対するIFの比率は、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1または100:1であってよい。特定の態様において、 $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体に対するIFの比率は、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1または10:1であってよい。他の態様において、 $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体に対する5%以上過剰のIFを溶液に添加してよい。例えば、 $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体に対して、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%または15%過剰のIFを溶液に添加してよい。いくつかの態様においては、 $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体に対して過剰のIFを溶液に添加することが好ましい。しかし、結合していないIFを減少させるか、または除くために、IFに対して、より多量の  $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体を添加することが必要な場合もある。したがって、IFに対する  $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体の比率は、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1または100:1であってよい。特定の態様において、IFに対する  $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体の比率は、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1または10:1であってよい。他の態様において、IFに対して、5%以上過剰の  $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体を溶液に添加してもよい。例えば、IFに対して5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、80%、90%または100%過剰の  $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体を、溶液に添加してよい。特定の態様において、IFに対して、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%または15%過剰の  $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体を溶液に添加してよい。本発明の組成物を投与する前に、結合していないIFおよび/または結合していない  $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体を除くことが必要な場合もある。造影の場合、バックグラウンドを低下させるために、結合していない  $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体を除くことが必要な場合もある。

#### 【0069】

本発明のIFは、標準的な方法によって発現および精製してよい。特定の態様において、IFは、トランスジェニック植物、例えばシロイヌナズナから発現および精製を行ってよい。発現させ、精製したIFは、 $B_{1,2}$  または  $B_{1,2}$  結合体およびヒトキュビリンに結合するものであれば、任意の種由来であってよい。当業者は、種々の生物種でIFが見られることを理解できる。非限定的な例としては、ヒト(NP\_005133.2)、マウス(P52787.2)、ラット(NP\_058858.1)、イヌ(Q5XWD5.1)、ネコ(XP\_003993466.1)、ウシ(NP\_001193168.1)、非ヒト靈長類(EHH56203.1、XP\_004051305.1)およびウマ(XP\_008508117.1)が挙げられる。本発明が、他の生物におけるIFのホモログに関するものであり、ヒトタンパク質に限定されるものではないことは理解されることである。ホモログは、当該

10

20

30

40

50

分野で公知の方法により、他の生物種で見つけることができる。例えば、配列類似性は、典型的には適合率を最も高くするために、少數のギャップを導入することのできる、慣用されるアルゴリズムを用いて決定することができる。具体的には、2つのポリペプチドまたは2つの核酸配列の「%同一性」は、Karlin and Altschulのアルゴリズム (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1993) を用いて決定される。該アルゴリズムは、Altschul et al. (J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990) によるBLASTNおよびBLASTXプログラムに取り込まれている。本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るために、BLASTヌクレオチド検索を、BLASTNプログラムを用いて行ってよい。同様に、本発明のポリペプチドに相同のアミノ酸配列を得るために、BLASTタンパク質検索を、BLASTXプログラムを用いて行ってよい。比較目的のために、ギャップのある配列比較を得るために、Gapped BLASTをAltschul et al. (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997) に記載のように使用する。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを用いるとき、それぞれのプログラム(例えばBLASTXおよびBLASTN)のデフォルトのパラメーターを使用する。詳細については、www.ncbi.nlm.nih.gov参照のこと。いくつかの態様において、ホモログは、ヒトIFと、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%または89%の同一性を有する。他の態様において、ホモログは、ヒトIFと、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の同一性を有する。例えば、ホモログは、ヒトIFと少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%または89%の同一性を有する。他の態様において、ホモログは、IF配列アクセス番号NP\_005133.2と、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または少なくとも100%の同一性を有する。

#### 【0070】

特定の態様において、該IFは、アクセス番号NP\_005133.2に記載の配列を含む。他の態様において、該IFは、アクセス番号NP\_005133.2に記載の配列を含むが、1~10の、保存的なアミノ酸置換を含む。例えば、該IFは、アクセス番号NP\_005133.2に記載の配列を含むが、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10の保存的なアミノ酸置換を含む。本明細書において、「保存的なアミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置きかえられる置換を指す。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該分野において規定されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非電荷極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例えばグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、ヒスチジン)が挙げられる。該置換を含む、得られたペプチドは、類似した特徴または性質、例えばサイズ、疎水性等を有するため、該ペプチドの全体的な官能性が有意には変わらない。B<sub>1-2</sub>に結合したIFの構造は当該分野で公知であるため、当業者は、B<sub>1-2</sub>またはB<sub>1-2</sub>結合体に対する結合を確実にするために、B<sub>1-2</sub>結合に必須なアミノ酸を決定することができる。

#### 【0071】

##### (e) 医薬製剤

本明細書はまた、非経腸投与用の医薬製剤を提供する。該医薬製剤は、活性成分としての内因子およびB<sub>1-2</sub>またはB<sub>1-2</sub>結合体ならびに、少なくとも1つの、非経腸投与用の薬学的に許容される担体を含む。本明細書で用いる「非経腸」という語は、皮下、静脈内、筋肉内、真皮内、動脈内、骨内、腹腔内またはくも膜下腔内注射または点滴技術を含む

10

20

30

40

50

。態様の一において、本発明は、静脈内投与用の製剤であって、活性成分としての内因子およびB<sub>1-2</sub>またはB<sub>1-2</sub>結合体ならびに少なくとも1つの、静脈内投与用の薬学的に許容される担体を含む製剤を含む。

【0072】

該組成物は、種々の剤形に製剤してよく、有効成分を治療上の有効量を送達する多数の異なる方法により投与することができる。該組成物は、慣用される非毒性の薬学的に許容される担体、アジュバントおよびビヒクルを所望に応じて含む単位剤形で非経腸投与してよい。薬物の製剤は、例えばGennaro, A. R., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. (18<sup>th</sup> ed, 1995)およびLiberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker Inc., New York, N.Y. (1980)において議論されている。

10

【0073】

非経腸投与のためには、該製剤は、水性またはオイルベースの液剤であってよい。水性液剤は、無菌の希釈剤または賦形剤、例えば水、生理食塩水、薬学的に許容されるポリオール、例えばグリセロール、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；抗菌剤および/または抗真菌剤、例えばベンジルアルコール、メチルパラベン、クロロブタノール、フェノールおよびチメロサール等；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジアミンテトラ酢酸；緩衝剤、例えばアセテート、シトаратまたはホスフェート；および/または浸透圧調節剤、例えば塩化ナトリウム、デキストロースまたはポリアルコール、例えばマンニトールまたはソルビトールが挙げられる。水性液剤のpHは、酸または塩基、例えば塩酸または水酸化ナトリウムを用いて調節してよい。オイルベースの液剤または懸濁剤は、ゴマ油、ピーナッツ油、オリーブ油または鉛油をさらに含んでいてよい。該組成物は、単位用量であっても多回用量の容器、例えば密封アンプルおよびバイアル中にあってもよく、凍結乾燥状態で、使用の直前に、無菌液体担体、例えば注射用の水を添加しさえすればよい状態で保存してよい。即時注射用液剤または懸濁剤は、無菌粉末、顆粒および錠剤から調製してよい。

20

【0074】

特定の態様において、IFおよびB<sub>1-2</sub>結合体を含む組成物は、該化合物の標的細胞への送達への寄与、該組成物の安定性の上昇、または該組成物が毒性を有する可能性の最小化のために適当なビヒクル中に封入される。当業者には理解されることであるが、本発明の組成物の送達には、種々のビヒクルが適当である。適当な構造化流体送達系の非限定的な例としては、ナノ粒子、リポソーム、マイクロエマルジョン、ミセル、デンドリマーおよび他のリン脂質含有系が挙げられる。組成物を送達ビヒクルに取り込む方法は当該分野で公知である。

30

【0075】

他の態様の一において、リポソーム送達用ビヒクルを用いてよい。リポソームは、その構造および化学的な性質から、態様によって、IFおよびB<sub>1-2</sub>結合体の送達に適当である。一般的に、リポソームは、リン脂質の二層膜を有する球形の小胞である。リポソームの脂質二重層は、他の二重層（例えば細胞膜）と融合し、それにより、該リポソームの内容物を細胞に送達し得る。この方法により、該IFおよびB<sub>1-2</sub>結合体は、標的細胞の膜と融合するリポソームに封入することによって細胞に選択的に送達し得る。

40

【0076】

リポソームは、種々の長さの炭化水素鎖を有する種々のリン脂質を含んでいてよい。リン脂質は、一般的に、種々の極性基の1つにグリセロール3-リン酸を介して連結している2つの脂肪酸を含む。適当なリン脂質としては、ホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルグリセロール(PG)、ジホスファチジルグリセロール(DPG)、ホスファチジルコリン(PC)およびホスファチジルエタノールアミン(PE)が挙げられる。該リン脂質を含む脂肪酸鎖の長さは、約6～約26炭素原子の間で変動し、該脂質鎖は、飽和していても不飽和であってよい。適当な脂肪鎖としては、n-ドデカノエート(ラウレート)、n-テトラデカノエート(

50

ミリストート)、n-ヘキサデカノエート(パルミテート)、n-オクタデカノエート(ステアレート)、n-エイコサノエート(アラキデート)、n-ドコサノエート(ベヘナート)、n-テトラコサノエート(リグノセラート)、cis-9-ヘキサデセノエート(パルミトレート)、cis-9-オクタデカノエート(オレアート)、cis,cis-9,12-オクタデカンジエノアート(リノレアート)、all cis-9,12,15-オクタデカトリエノアート(リノレネート)およびall cis-5,8,11,14-エイコサテトラエノアート(アラキドネート)が挙げられる(括弧内は一般名を表す)。リン脂質の2つの脂肪酸鎖は同一であっても異なっていてよい。許容可能なリン脂質としては、ジオレオイルPS、ジオレオイルPC、ジステアロイルPS、ジステアロイルPC、ジミリストイルPS、ジミリストイルPC、ジパルミトイルPG、ステアロイル、オレオイルPS、パルミトイルおよびリノレニルPS等が挙げられる。

10

## 【0077】

該リン脂質は、任意の天然起源であってよく、そのため、リン脂質の混合物を含んでいてよい。例えば、卵黄は、PC、PGおよびPEが豊富であり、ダイズは、PC、PE、PIおよびPAを含み、動物の脳または脊髄はPSが豊富である。リン脂質は、合成起源であってもよい。種々の比率を示す個々のリン脂質の混合物を用いてよい。異なるリン脂質の混合により、有利な活性または安定な活性性質を有するリポソーム組成物が得られる。上述のリン脂質を最適な比率でカチオン性脂質、例えばN-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロライド、1,1'-ジオクタデシル-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニンペルクロラート、3,3'-デヘプチルオキサカルボシアニンヨーダイド、1,1'-デドデシル-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニンペルクロラート、1,1'-ジオレイル-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニンメタンスルホネート、N-4-(デリノレイルアミノスチリル)-N-メチルピリジニウムヨーダイドまたは1,1,-ジリノレイル-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニンペルクロラートと混合してよい。

20

## 【0078】

リポソームは、スフィンゴ脂質を含んでいてよく、スフィンゴ脂質では、スフィンゴシンは、グリセロールの構造上の対応物であり、動物の細胞膜の主要な成分であるホスホグリセリドまたはコレステロールの脂肪酸の1つである。リポソームは、PEG化脂質を含んでいてよく、PEG化脂質は、ポリエチレングリコール(PEG)のポリマーに共有結合した脂質である。PEGのサイズは約500～約10,000ダルトンで変動してよい。

30

## 【0079】

リポソームは、適當な溶媒をさらに含んでいてよい。該溶媒は、有機溶媒または無機溶媒であってよい。適當な溶媒としては、ジメチルスルホキシド(DMSO)、メチルピロリドン、N-メチルピロリドン、アセトニトリル、アルコール、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフランまたはその組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0080】

IFおよびB<sub>1,2</sub>結合体を保有する(すなわち、少なくとも1つのメチオニン化合物を有する)リポソームを、知られている任意の薬物送達用のリポソームの製造方法、例えば米国特許第4,241,046号、第4,394,448号、第4,529,561号、第4,755,388号、第4,828,837号、第4,925,661号、第4,954,345号、第4,957,735号、第5,043,164号、第5,064,655号、第5,077,211号および第5,264,618号(これらの文献の内容は引用によりその全体が本明細書に包含される)に記載の方法により製造してよい。例えば、リポソームは、脂質の水溶液中の超音波破碎、溶媒注入、脂質水和、逆相蒸散または凍結融解の繰り返しによる凍結乾燥により製造し得る。好ましい態様において、該リポソームは超音波破碎により形成される。該リポソームは、多層状であってタマネギのように多数の層を有していても、非多層状であってもよい。該リポソームは大きくて小さくてもよい。高せん断超音波破碎を続けることにより、より小さい単層リポソームが形成される傾向がある。

40

## 【0081】

50

当業者には明らかなことであるが、リポソーム形成を制御する全てのパラメーターは、変動し得る。これらのパラメーターとしては、温度、pH、メチオニン化合物の濃度、脂質の濃度および組成、多価カチオンの濃度、混合速度、溶媒の有無および濃度が挙げられるが、これらに限定されない。

【0082】

他の局面において、本発明の組成物は、マイクロエマルジョンとして細胞に送達され得る。マイクロエマルジョンは、水溶液、界面活性剤および「油」を含む、一般的に透明の熱力学的に安定の液体である。この場合、「油」は、超臨界流体層である。該界面活性剤は、油-水の界面に留まる。種々の界面活性剤のうちの任意のものが、本明細書に記載する、または当該分野で公知であるマイクロエマルジョン製剤で用いるのに適当である。本発明での使用に適当な水性マイクロドメインは、一般的に約5nm～約100nmの特徴的な構造寸法を有する。このサイズの凝集体は、可視光をあまり散乱させないため、これらの液体は、視覚的には透明である。当業者には理解されることであるが、マイクロエマルジョンは、球状、桿状またはディスク型の凝集体のような、多数の異なる顕微鏡的な構造をとり得る。態様の一において、該構造はミセルであってよく、これは、一般的に球形または円柱状である物体の最も単純なマイクロエマルジョン構造である。ミセルは、水中油滴状であり、逆ミセルは油中水滴状である。他の態様において、マイクロエマルジョン構造はラメラである。それは、界面活性剤の層により分離された、水と油の連続的な層を含む。マイクロエマルジョンの「油」は、リン脂質を含むのが最適である。リポソームについて上述したリン脂質のうち任意のものがマイクロエマルジョンに関する態様に適当である。該IFおよびB<sub>1,2</sub>結合体は、当該分野で一般的に知られている任意の方法によりマイクロエマルジョン中に封入されていてよい。

10

20

30

【0083】

さらなる他の態様において、IFおよびB<sub>1,2</sub>結合体は、樹状の巨大分子すなわちデンドリマーで送達されてよい。一般的に、デンドリマーは、分岐した樹状の分子であり、ここで、各分枝は、特定の長さの後で2つの新しい分枝（分子）に分岐する、分子の連結鎖である。この分岐は、分枝（分子）が密集して、キャノピーが球状の形態を形成するまで続く。一般的に、デンドリマーの性質はその表面の官能基により決定される。例えば、親水性の末端基、例えばカルボキシル基は、典型的に、水溶性のデンドリマーをもたらす。あるいは、皮膚を介した吸収を促進するために、デンドリマーの表面にリン脂質を取り込んでよい。リポソーム性の態様における使用について詳述されている任意のリン脂質が、デンドリマーの態様での使用に適当である。当該分野で一般的に知られている任意の方法を、デンドリマーの作製および本発明の組成物の該デンドリマーへの封入に用いてよい。例えば、デンドリマーは、反応工程の反復により作製してよく、反復を繰り返すごとに、より高次のデンドリマーが得られる。結果として、デンドリマーは、サイズおよび形態が殆ど均一な、規則的な、高度に分岐した3D構造を持つ。さらに、デンドリマーの最終的なサイズは、典型的には、合成の間に用いられる反復的な工程の数により制御される。種々のデンドリマーのサイズが、本発明での使用に適当である。一般的に、デンドリマーのサイズは、約1nm～約100nmで変動してよい。

40

【0084】

II. 方法

他の局面において、上述するように、本発明の組成物は、対象における癌および関連する疾患の処置、安定化および予防に使用し得る。「癌の処置、安定化または予防」は、腫瘍サイズの低下または癌細胞数の減少、腫瘍サイズの上昇または癌細胞増殖の遅延化または予防、腫瘍または他の癌が消滅してから、再発までの無病生存期間の増大、腫瘍または他の癌の初発または続発の予防または、腫瘍または他の癌に関連する有害な症状の低下を起こすことを指す。所望の態様において、処置を生き延びる腫瘍または癌細胞の%は、初期腫瘍または癌細胞数と比較して、任意の標準的な方法（例えばカスパーゼアッセイ、TUNELおよびDNA）を用いて測定して、少なくとも20、40、60、80または100%低い。本発明の組成物の投与により誘発される、腫瘍または癌細胞数の低下が、非

50

腫瘍または非癌細胞数の低下の、少なくとも 2、5、10、20 または 50 倍高いことが望ましい。本発明の方法は、腫瘍サイズまたは癌細胞の数において、標準的な方法で決定して、20、40、60、80 または 100% の低下を起こすことが望ましい。処置を受ける対象の少なくとも 20、40、60、80、90 または 95% が、腫瘍のエビデンスまたは癌が消滅する、完全な寛解を示すことが望ましい。該腫瘍または癌は、再発しないか、または少なくとも 5、10、15 または 20 年間は再発しないことが望ましい。

【 0 0 8 5 】

本発明の  $B_{1,2}$  は、放射線照射および治療を、腫瘍部位に特異的に送達するために、上述の放射性核種または治療剤に間接的または直接的に結合していてよい。例えば、静脈内投与された該  $IF-B_{1,2}$  結合体は、消化管の外側でキュビリンに結合する。該  $IF-B_{1,2}$  結合体は、その後、内在化し、検出可能な標識および/または治療剤は、キュビリンを発現する細胞内に集積する。この機構によって、本発明の組成物を、放射線照射および治療を、腫瘍部位に特異的に送達するために用いてよい。さらに、本発明の組成物は、組み合わせ療法の一部であってよい。組み合わせ療法は、本発明の組成物を、放射線療法または化学療法過程とともに用いることを含むのが好ましい。

10

【 0 0 8 6 】

さらに他の局面において、本発明は、対象における腫瘍の検出方法を提供する。該方法は、該対象に、 $IF$  および  $B_{1,2}$  を含む組成物を投与すること、および対象において該組成物のキュビリンへの結合を検出するために検出可能な標識を検出することを含み、ここで、該  $B_{1,2}$  は、検出可能な標識に結合しており、キュビリンを典型的には発現しない組織中の検出可能な標識の存在は、該対象に腫瘍が存在することを示す。他の態様において、該方法は、 $IF$  および  $B_{1,2}$  を含む組成物を対象に投与することおよび、対象における該組成物のキュビリンへの結合を検出するために検出可能な標識を検出することを含み、ここで、該  $B_{1,2}$  は、検出可能な標識に結合しており、キュビリンを発現することが知られている組織において、検出可能な標識が非対称に存在することは、該対象に腫瘍が存在することを示す。好ましい態様において、該方法は、対象における癌または腫瘍の診断または造影に用いてよい。他の態様において、該方法は、対象における胃腸管の外側のキュビリン発現の造影に用いてよい。いくつかの態様において、腫瘍を検出する方法は、(a) 腫瘍の疑いがある部位の生検；(c) 本発明の組成物を試験管内で腫瘍の疑いがある部分と接触させること；および(d) 典型的にはキュビリンを発現しない組織において検出可能な標識を検出することによって、腫瘍を診断すること、を含んでいてよい。

20

【 0 0 8 7 】

結合は、顕微鏡（蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡または電子顕微鏡）、磁気共鳴画像法（例えば  $MTI$ 、 $MRS$ 、 $DWI$  および  $fMRI$ ）、シンチグラフィー画像診断（ $SPECT$ （単一光子放射断層撮影）、 $PET$ （ポジトロン放出断層撮影）、ガンマカメライメージングおよび直線形スキャン）、 $X$  線検査または超音波を用いて検出してよい。検出可能な標識は、組織内、生体内、生体外および試験管内で検出可能であってよい。

30

【 0 0 8 8 】

さらになお他の局面において、本発明は、対象における、キュビリンを発現する細胞に  $B_{1,2}$  を送達する方法を提供する。該方法は、 $IF$  および  $B_{1,2}$  の複合体を、該対象に静脈内投与することを含む。したがって、 $IF$  および  $B_{1,2}$  の複合体は、細胞上に存在するキュビリンに結合し、それにより、 $B_{1,2}$  を細胞に送達し得る。態様の一において、該  $B_{1,2}$  は、検出可能な標識および/または治療剤に結合している。該方法は、対象においてキュビリンを発現する細胞を検出または処置するのに用いてよい。

40

【 0 0 8 9 】

なおさらに他の局面において、本発明は、キュビリンの機能を調節する方法を提供する。該方法は、 $IF$  および  $B_{1,2}$  の複合体を対象に静脈内投与することを含む。したがって、 $IF$  および  $B_{1,2}$  の複合体は、細胞上に存在するキュビリンに結合し、それによりキュビリンの機能を調節し得る。調節という語は、キュビリンの活性を変化させることを指す。例えば、該複合体は、キュビリンの機能を遮断し、それによりキュビリンの活性を阻害

50

し得る。静脈内投与を用いた場合、該方法は、濾過されたタンパク質、例えばアルブミン、トランスフェリン、ビタミンD結合タンパク質および他の重要な血漿担体の腎尿細管再吸收を調節し得る。例えば、IFおよびB<sub>1,2</sub>の複合体の投与は、キュビリン機能を調節し、それにより、腎毒性タンパク質の取り込みを低下または阻害し得る。腎毒性タンパク質の取り込みの低下または阻害は、急性腎障害を処置または予防し得る。本明細書において、「腎障害」という語は、腎機能の喪失を指す。当該分野で知られている腎障害の原因は数多くあるが、ネクローシス、虚血、血管損傷、腎臓に損傷を与える物質、例えば毒素、静脈造影剤、抗生物質、色素およびLPSへの暴露、尿路の閉塞および腎臓の外傷または挫滅が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、「腎障害」は、AKIN(Acute Kidney Injury Network)基準(Metha et al. Cri Care 2007参照)にしたがって定義される、急性腎障害を指す。例えば、IFおよびB<sub>1,2</sub>の複合体は、腎毒性を低下または除去するために、腎毒性剤の投与の前、同時または後に投与してよい。態様の一において、該B<sub>1,2</sub>は、検出可能な標識および/または治療剤に結合している。

10

#### 【0090】

組成物、B<sub>1,2</sub>およびIFは、セクションIに上述する通りである。キュビリン、対象、癌および組成物の投与については以下に記載する。

#### 【0091】

##### (a) キュビリン

キュビリンは、IF-B<sub>1,2</sub>複合体の消化管吸収および濾過されたタンパク質、例えばアルブミン、トランスフェリン、ビタミンD結合タンパク質および他の重要な血漿担体の近位尿細管再吸収などの多様な機能を果たす、大きいエンドサイトシス受容体である。

20

#### 【0092】

局面の一において、キュビリンを発現することが知られている細胞を含む組織中に検出可能な標識が非対称に存在することは、対象中に腫瘍が存在することを示し得る。他の局面において、典型的にはキュビリンを発現しない細胞を含む組織における、検出可能な標識の存在は、対象中に腫瘍が存在することを示す。キュビリンを発現することが公知である細胞の非限定的な例としては、乳腺上皮細胞、腎近位尿細管細胞、胆囊細胞、消化管細胞、刷子縁細胞、胎盤細胞、有足細胞ならびに内耳および卵黄嚢の上皮細胞が挙げられる。組織または細胞がキュビリンを発現することが公知であるか、または組織または細胞が典型的にはキュビリンを発現しないかを検知する方法は、当該分野で公知である。これらの方法に基づいて、組織を、検出可能な標識の非対称な存在について試験するのか、または検出可能な標識の存在について試験するのかを決定するのは、当業者がなし得ることの範囲内である。例えば、タンパク質発現を検出する方法は、当該分野でよく知られており、当業者に公知であるタンパク質発現量の適当な評価方法は全て、本発明の範囲内に含まれると考えられる。一般的に、該方法は、組織試料を得、該試料を試験管内で処理してタンパク質発現量を評価することを含む。タンパク質発現量の適当な評価方法の非限定的な例としては、エピトープ結合剤をベースとする方法および質量分析法をベースとする方法が挙げられる。いくつかの態様において、タンパク質発現の量を評価する方法は、エピトープ結合剤をベースとする方法である。本明細書において、「エピトープ結合剤」という語は、抗体、アブタマー、核酸、オリゴ核酸、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、脂質、代謝物、低分子または、キュビリンを認識し、結合することのできるその断片を指す。核酸としては、RNA、DNAおよび天然起源の、または合成された誘導体が挙げられる。

30

#### 【0093】

本明細書において、「抗体」という語は、一般的に、キュビリンのエピトープを認識し、結合することのできるポリペプチドまたはタンパク質を指す。本明細書において、抗体は、当該分野で理解されている完全抗体、すなわち、2つの重鎖および2つの軽鎖からなる完全抗体であっても、または、抗原結合領域を有する抗体様の分子であってもよく、抗体断片、例えばFab'、Fab、F(ab')2、單一ドメイン抗体、Fvおよび一本鎖Fvを含むが、これらに限定されない。抗体という語はまた、ポリクローナル抗体、モノ

40

50

クローナル抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体を指す。種々の抗体ベースのコンストラクトおよび断片を作製および使用する技術は当該分野でよく知られている。抗体を作製および特徴付けする方法もまた、当該分野でよく知られている(例えばAntibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988参照; 当該文献は引用によりその全体が本明細書に包含される)。

#### 【0094】

本明細書において、「アプタマー」という語は、生化学活性、分子認識または結合特性という意味で有用な生物学的活性を有するポリヌクレオチド、一般的にはRNAまたはDNAを指す。通常、アプタマーは、特定のエピトープ(領域)への標的分子の結合等の分子活性を有する。アプタマーはポリペプチドへの結合において特異性を示し、試験管内進化方法により合成および/または特定されてよいことは、一般的に受け入れられている。例えば体外進化法(*in vitro evolution method*)による、アプタマーの製造および特徴付けの方法は、当該分野でよく知られている(例えば米国特許第7,939,313号明細書参照; 当該文献は引用によりその全体が本明細書に包含される)。

10

#### 【0095】

一般的に、エピトープ結合剤をベースとした、タンパク質発現量の評価方法は、エピトープ結合剤とキュビリンの間に複合体が形成される程度に有効な条件下で、試料を、キュビリン特異的なエピトープ結合剤に接触させることを含む。エピトープ結合剤ベースの方法は、溶液中で行っても、またはエピトープ結合剤または試料を固体面に固定してもよい。適当な表面の非限定的な例としては、マイクロタイタープレート、試験管、レジンおよび他のポリマーが挙げられる。

20

#### 【0096】

エピトープ結合剤は、広範の方法で基質に結合でき、これは、当業者には理解できることである。該エピトープ結合剤は、最初に合成されて、次いで基質に結合しても、または、基質上で直接合成されてもよい。該基質およびエピトープ結合剤は、次いでその2つを結合させるために、化学官能基を用いて官能化されてもよい。例えば、該基質は、化学官能基、例えば非限定的な例としては、アミノ基、カルボキシル基、オキソ基またはチオール基を用いて誘導体化されていてよい。これらの官能基を用いることによって、該エピトープ結合剤は、官能基を用いて直接結合しても、またはリンカーを用いて間接的に結合してもよい。

30

#### 【0097】

該エピトープ結合剤は、また、非共有結合によって基質に結合させてもよい。例えば、ビオチン化されたエピトープ結合剤を製造し、これをストレプトアビシンで共有結合によりコートされた表面に結合させることにより、結合させてもよい。あるいは、エピトープ結合剤を、光重合およびフォトリソグラフィーのような技術を用いて表面上で合成してもよい。エピトープ結合剤を固体面に結合するさらなる方法および基質上で生体分子を合成する方法は、当該分野でよく知られており、すなわち、AffymetrixのVLSIPS technologyである(例えば、米国特許第6,566,495号明細書およびRockett and Dix, Xenobiotica 30(2):155-177参照引用、これらの文献はともに引用によりその全体が本明細書に包含される)。

40

#### 【0098】

有効な条件下で、複合体が形成するのに十分な時間、該試料をエピトープ結合剤と接触させることは、一般的に、該エピトープ結合剤組成物を試料に添加し、エピトープ結合剤が存在する任意のキュビリンに結合できるだけの時間、該混合物をインキュベーションすることを伴う。この後、該複合体を洗浄し、該複合体は、当該分野でよく知られている任意の方法により検出し得る。該エピトープ結合剤-キュビリン複合体の検出方法は、一般的に、標識またはマーカーの検出に基づくものである。本明細書において、「標識」という語は、エピトープ結合剤または他の基質物質に結合し、それにより該基質が、検出方法により検出できる任意の物質を指す。適当な標識の非限定的な例としては、発光分子、化学発光分子、蛍光色素、蛍光クエンチ剤、有色分子、放射性同位体、シンチラント(scin-

50

tillant)、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、プロテインA、プロテインG、抗体またはその断片、ポリヒスチジン、Ni<sup>2+</sup>、Flagタグ、mycタグ、重金属、および酵素(例えばアルカリリンホスファターゼ、ペルオキシダーゼおよびルシフェラーゼ)が挙げられる。標識またはマーカーの検出に基づく、エピトープ結合剤-キュビリン複合体の検出方法は、当該分野でよく知られている。

【0099】

いくつかの態様において、エピトープ結合剤ベースの方法は、ELISAである。他の態様において、エピトープ結合剤ベースの方法は、放射性免疫アッセイである。さらに他の態様において、エピトープ結合剤ベースの方法は、免疫プロットまたはウェスタンプロットである。異なる態様において、エピトープ結合剤ベースの方法は、免疫組織化学的検査(IHC)である。他の態様において、エピトープ結合剤ベースの方法は、アレイである。他の態様において、エピトープ結合剤ベースの方法はフローサイトメトリーである。

10

【0100】

「非対称」は、検出可能な標識が、組織を通じて均等に分散しているのではないことを指す。むしろ、非対称は、検出可能な標識が、組織の一部に集積していること、または組織の一部にランダムに局在していることを意味し得る。態様の一において、検出可能な標識が非対称に存在するということは、組織の残りの部分と比較して、シグナルが約5%以上異なることを意味し得る。例えば、検出可能な標識の非対称な存在は、組織の残りの部分と比較して、シグナルが約5%を超えて、約10%を超えて、約15%を超えて、約20%を超えて、約25%を超えて、約30%を超えて、約35%を超えて、約40%を超えて、約45%を超えて、約50%を超えて、約55%を超えて、約60%を超えて、約65%を超えて、約70%を超えて、約75%を超えて、約80%を超えて、約85%を超えて、約90%を超えて、約95%を超えてまたは約100%、シグナルに差異があることを意味し得る。

20

【0101】

(b) 対象

本発明の方法は、ヒト、家畜動物、コンパニオン動物、実験動物または動物園の動物である対象における腫瘍を検出または処置するのに使用し得る。態様の一において、該対象は、齧歯類、例えばマウス、ラット、ハムスター等であってよい。他の態様において、該対象は、家畜動物であってよい。適当な家畜動物の非限定的な例としては、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ラマおよびアルパカが挙げられる。さらに他の態様において、該対象はコンパニオン動物であってよい。コンパニオン動物の非限定的な例としては、ペット、例えばイヌ、ネコ、ウサギおよび鳥が挙げられる。さらに他の態様において、該対象は、動物園の動物であってよい。本明細書において、「動物園の動物」という語は、動物園で見られる動物を指す。該動物としては、非ヒト靈長類、大型ネコ科、オオカミおよびクマが挙げられる。好ましい態様において、該動物は実験動物である。実験動物の非限定的な例としては、齧歯類、イヌ、ネコおよび非ヒト靈長類が挙げられる。特定の態様において、該動物は齧歯類である。齧歯類の非限定的な例としては、マウス、ラット、ハムスター等が挙げられる。

30

【0102】

(c) 腫瘍

本発明の組成物は、新生物由来の腫瘍または癌の処置または認識に使用し得る。例えば、静脈内投与された該IF-B<sub>1,2</sub>結合体は、消化管の外側でキュビリンに結合する。該IF-B<sub>1,2</sub>結合体は、その後内在化し、検出可能な標識および/または治療剤が、キュビリン発現細胞に集積する。この機構により、本発明の組成物は、腫瘍の処置または認識に使用し得る。キュビリンは、IF-B<sub>1,2</sub>複合体の消化管吸収および濾過されたタンパク質、例えばアルブミン、トランスフェリン、ビタミンD結合タンパク質および他の重要な血漿担体の近位尿細管再吸収などの多様な機能を果たす、大きいエンドサイトーシス受容体である。したがって、キュビリンは通常、腸管および腎臓に発現する。重要なことに、キュビリンの過剰発現は、肺癌および腎臓癌で見られている。したがって、例示的な態様

40

50

において、本発明の方法は、肺癌および腎細胞癌の検出または処置に使用し得る。さらに、本発明の方法は、肺癌および腎細胞癌に関連のある転移の検出または処置に使用し得る。しかし、キュビリンを発現する他の任意の新生物もまた、本発明の方法に使用し得る。

【0103】

「新生物」は、過剰な細胞分裂の結果としての異常な成長に特徴付けられる任意の組織またはその細胞である。新生物は悪性であっても良性であってもよく、癌は原発性であっても転移性であってもよく；新生物または癌は、初期であっても後期であってもよい。処置または検出し得る新生物または癌の非限定的な例としては、次のものが挙げられるが、しかし、それらはキュビリンを発現するものである：急性リンパ芽球性白血病、急性骨髓性白血病、副腎皮質癌、AIDS関連癌、AIDS関連リンパ腫、肛門癌、虫垂癌、星細胞腫(小児性小脳または大脳)、基底細胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脳幹神経膠腫、脳腫瘍(小脳星細胞腫、大脳星細胞腫/悪性神経膠腫、上衣腫、髄芽腫、テント上原発性神経外胚葉腫瘍、視経路および視床下部膠腫)、乳癌、気管支腺腫/カルチノイド、バーキットリンパ腫、カルチノイド腫瘍(小児性、胃腸管系)、原発不明の癌、中枢神経系リンパ腫(原発性)、小脳星細胞腫、大脳星細胞腫/悪性神経膠腫、子宮頸癌、小児癌、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性骨髓増殖性疾患、結腸癌、皮膚性T細胞リンパ腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、子宮内膜癌、上衣腫、食道癌、ユーイング腫瘍のユーイング肉腫、頭蓋外胚細胞癌(小児性)、性腺外胚細胞癌、肝外胆管癌、眼癌(眼球内黒色腫、網膜芽細胞腫)、胆嚢癌、胃(gastric (胃(stomach)))癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、胚細胞腫瘍(小児性頭蓋外、性腺外、卵巣)、妊娠性絨毛腫瘍、神経膠腫(成人性、小児脳幹、小児大脳星細胞腫、小児視経路および視床下部膠腫)、胃カルチノイド、有毛細胞白血病、頭頸部癌、肝細胞(肝臓)癌、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、視床下部および視経路膠腫(小児性)、眼内黒色腫、膵島細胞癌、カポジ肉腫、腎臓癌(腎細胞癌)、喉頭癌、白血病(急性リンパ芽球性、急性骨髓性、慢性リンパ球性、慢性骨髓性、有毛細胞)、口唇癌および口腔癌、肝臓癌(原発性)、肺癌(非小細胞、小細胞)、リンパ腫(AIDS関連性、バーキット、皮膚性T細胞性、ホジキン、非ホジキン、原発性中枢神経系)、マクログロブリン血症(ワルデンシュトレーク)、骨悪性線維性組織球腫/骨肉腫、髄芽腫(小児性)、黒色腫、眼内黒色腫、メルケル細胞癌、中皮腫(成人性、小児性)、原発不明の転移性頸部扁平上皮癌、口腔癌、多発性内分泌腫瘍症候群(小児性)、多発性骨髓腫/形質細胞腫瘍、菌状息肉症、骨髓異形成症候群、骨髓異形成/骨髓増殖性疾患、骨髓性白血病(慢性)、骨髓性白血病(成人急性、小児急性)、多発性骨髓腫、骨髓増殖性疾患(慢性)、鼻腔および副鼻腔癌、上咽頭癌、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、口腔癌、中咽頭癌、骨肉腫/骨悪性線維性組織球腫、卵巣癌、卵巣上皮癌(表層上皮性-間質性腫瘍)、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、膵癌、膵癌(島細胞)、副鼻腔および鼻腔癌、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、褐色細胞腫、松果体星細胞腫、松果体胚腫、松果体芽腫およびテント上原発性神経外胚葉腫瘍(小児性)、下垂体腺腫、形質細胞腫瘍、胸膜肺芽細胞腫、中枢神経系リンパ腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌(腎臓癌)、腎孟および尿管移行細胞癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫(小児性)、唾液腺癌、肉腫(ユーイング腫瘍、カポジ肉腫、軟部肉腫、子宮肉腫)、セザリー症候群、皮膚癌(非黒色腫性、黒色腫性)、皮膚癌(メルケル細胞)、小細胞肺癌、小腸癌、柔組織肉腫、扁平上皮癌、原発不明の頸部扁平上皮癌(転移性)、胃癌、テント上原発性神経外胚葉性腫瘍(小児性)、T細胞リンパ腫(皮膚性)、精巣癌、咽頭癌、胸腺腫(小児性)、胸腺腫および胸腺癌、甲状腺癌、甲状腺癌(小児性)、腎孟および尿管の移行上皮癌、絨毛性腫瘍(妊娠性)、原発不明の癌(成人性、小児性)、尿管および腎孟の移行細胞癌、尿道癌、子宮癌(子宮内膜)、子宮肉腫、腔癌、視経路および視床下部膠腫(小児性)、外陰癌、ワルデンシュトレークマクログロブリン血症およびウィルムス腫瘍(小児性)。好ましい態様において、該癌は、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、食道癌、胃肉腫、神経膠腫、肺癌、リンパ腫、黒色腫、多発性骨髓腫、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、胃癌、頭頸部腫瘍および固形腫瘍からなる群から選択される。

【0104】

10

20

30

40

50

## (d) 投与

特定の局面において、薬理学的な有効量の本発明の組成物を対象に投与してよい。他の局面において、薬理学的な有効量の I F および薬理学的な有効量の B<sub>1-2</sub> または B<sub>1-2</sub> 結合体を、 I F および B<sub>1-2</sub> もしくは B<sub>1-2</sub> 結合体が生体内で結合するように、対象に個別に投与する。非経腸投与は、標準的な有効な技術を用いて行う。非経腸投与としては、皮下、静脈内、筋肉内、皮内、動脈内、骨内、腹腔内または髄腔内注射または点滴技術が挙げられるが、これらに限定されない。静脈内注射による、有効な非経腸全身送達は、対象への好ましい投与方法である。そのような注射に適当なビヒクルは、容易に理解できる。

## 【0105】

有効な投与用の医薬組成物は、選択した投与方法に適当なように計画的に設計されており、薬学的に許容される賦形剤、例えば適合性の分散剤、緩衝剤、界面活性剤、保存料、可溶化剤、等張剤、安定化剤等が適宜使用される。Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton Pa., 16Ed ISBN: 0-912734-04-3, 最新版（当該文献は、引用によりその全体が本明細書に包含される）には、一般的に専門家に知られている製剤技術の一覧が示されている。本発明で有用な組成物の可溶性の特性を変化させる、例えばリポソーム中に封入するか、または極性の基を遮断することによってより親油性にすることも実際に有用であり得る。

## 【0106】

治療適用には、治療有効量の本発明の組成物を対象に投与する。「治療有効量」は、測定可能な生物学的腫瘍応答（例えば免疫刺激性、抗血管新生応答、細胞毒性応答または腫瘍退行）をもたらすのに十分な、治療用組成物の量であってよい。あるいは、「治療有効量」は、キュビリンの機能の測定可能な低下（例えば尿中のアルブミン増加、急性腎障害の予防、急性腎障害の処置、腎毒性タンパク質、例えば軽鎖、ミオグロビンおよびヘモグロビンの取り込みの予防、腎毒性タンパク質の取り込みの低下）をもたらすのに十分な治療組成物の量であってよい。本発明の治療用組成物中の有効成分の実際の用量レベルは、特定の対象の所望の治療応答を達成するのに有効な有効化合物を投与するために変動してよい。選択された用量レベルは、治療用組成物の活性、製剤、投与経路、他の薬物または処置との組み合わせ、腫瘍サイズおよび寿命、ならびに処置する対象の身体的な症状および病歴などの種々の因子に依存する。いくつかの態様において、最小限の用量を投与し、用量を限定する毒性がない場合、用量を増加させる。治療上有効量の決定および調節ならびに該調節をいつどのように行うかは、医薬分野の当業者には公知のことである。

## 【0107】

診断適用には、検出可能な量の本発明の組成物を対象に投与する。本明細書において、診断用の組成物に関する「検出可能な量」は、該組成物の存在が生体内または試験管内で決定できるような、該組成物の用量を指す。検出可能な量は、種々の因子、例えば非限定的な例としては、標識されている薬物の化学的な特徴、検出可能な標識、標識方法、造影の方法および関連するパラメーター、対象中の標識された薬物の代謝、標識の安定性（例えば、放射性核種標識の半減期）、造影の前に、薬物および/または標識したペプチドを投与した後の経過時間、薬物投与の経路、対象の身体的な症状および病歴、ならびに腫瘍または腫瘍と疑われるもののサイズおよび寿命によって変わり得る。したがって、検出可能な量は、変動し得るものであり、特定の適用に合わせることができる。本発明の試験後、かかる検出可能な量を決定することは、当該分野の当業者に可能なことである。

## 【0108】

I F および、 B<sub>1-2</sub> または B<sub>1-2</sub> 結合体を含む組成物を、約 0.1 pM ~ 約 500 pM の濃度で投与してよい。例えば、 I F および、 B<sub>1-2</sub> または B<sub>1-2</sub> 結合体を含む組成物は、約 0.1 pM、約 0.2 pM、約 0.3 pM、約 0.4 pM、約 0.5 pM、約 0.6 pM、約 0.7 pM、約 0.8 pM、約 0.9 pM、約 1 pM、約 1.5 pM、約 2 pM、約 2.5 pM、約 3 pM、約 3.5 pM、約 4 pM、約 4.5 pM、約 5 pM、約 5.5 pM、約 6 pM、約 6.5 pM、約 7 pM、約 7.5 pM、約 8 pM、約 8.5 pM、約 9 pM、約 9.5 pM または約 10 pM の濃度で投与してよい。あるいは、 I F および、 B<sub>1-2</sub> または B<sub>1-2</sub> 結合体を含む組成物は、約 15 pM、約 20 pM、約 25 pM、約 30

10

20

30

40

50

pM、約35pM、約40pM、約45pM、約50pM、約55pM、約60pM、約65pM、約70pM、約75pM、約80pM、約85pM、約90pM、約95pM、約100pM、約150pM、約200pM、約250pM、約300pM、約350pM、約400pM、約450pMまたは約500pMの濃度で投与してよい。特定の態様において、IFおよび、B<sub>1-2</sub>またはB<sub>1-2</sub>結合体を含む組成物は、約1pMの濃度で投与してよい。他の特定の態様において、IFおよび、B<sub>1-2</sub>またはB<sub>1-2</sub>結合体を含む組成物は、約4pMの濃度で投与してよい。さらに他の特定の態様において、IFおよび、B<sub>1-2</sub>またはB<sub>1-2</sub>結合体を含む組成物は、約1pM～約10pMの濃度で投与してよい。なおさらに他の特定の態様において、IFおよび、B<sub>1-2</sub>またはB<sub>1-2</sub>結合体を含む組成物は、約10pM～約50pMの濃度で投与してよい。他の態様において、IFおよび、B<sub>1-2</sub>またはB<sub>1-2</sub>結合体を含む組成物は、約50pM～約500pMの濃度で投与してよい。

10

## 【0109】

IFおよび、B<sub>1-2</sub>またはB<sub>1-2</sub>結合体が別に投与される態様において、IFおよびB<sub>1-2</sub>またはB<sub>1-2</sub>結合体は、同じまたは異なる濃度で投与してよい。IFおよび/またはB<sub>1-2</sub>もしくはB<sub>1-2</sub>結合体は、約0.1pM～約500pMの濃度で投与してよい。例えば、IFおよび/またはB<sub>1-2</sub>もしくはB<sub>1-2</sub>結合体は、約0.1pM、約0.2pM、約0.3pM、約0.4pM、約0.5pM、約0.6pM、約0.7pM、約0.8pM、約0.9pM、約1pM、約1.5pM、約2pM、約2.5pM、約3pM、約3.5pM、約4pM、約4.5pM、約5pM、約5.5pM、約6pM、約6.5pM、約7pM、約7.5pM、約8pM、約8.5pM、約9pM、約9.5pMまたは約10pMで投与してよい。あるいは、IFおよび/またはB<sub>1-2</sub>もしくはB<sub>1-2</sub>結合体は、約1.5pM、約20pM、約25pM、約30pM、約35pM、約40pM、約45pM、約50pM、約55pM、約60pM、約65pM、約70pM、約75pM、約80pM、約85pM、約90pM、約95pM、約100pM、約150pM、約200pM、約250pM、約300pM、約350pM、約400pM、約450pM、または約500pMの濃度で投与してよい。特定の態様において、IFおよび/またはB<sub>1-2</sub>もしくはB<sub>1-2</sub>結合体は、約1pMの濃度で投与してよい。他の特定の態様において、IFおよび/またはB<sub>1-2</sub>もしくはB<sub>1-2</sub>結合体は、約4pMの濃度で投与してよい。さらに他の特定の態様において、IFおよび/またはB<sub>1-2</sub>またはB<sub>1-2</sub>結合体は、約10pM～約50pMの濃度で投与してよい。他の態様において、IFおよび/またはB<sub>1-2</sub>もしくはB<sub>1-2</sub>結合体は、約50pM～約500pMの濃度で投与してよい。異なる態様において、IFに対して過剰量のB<sub>1-2</sub>またはB<sub>1-2</sub>結合体が投与される。

20

30

## 【0110】

典型的な用量レベルは変動し得るものであり、標準的な臨床技術を用いて決定および最適化してよく、部分的には、用いる検出可能な標識および/または治療剤および投与方法に依存する。

40

## 【0111】

投与の頻度は、症状を有効に処置するのに必要であれば、1日に1回、2回、3回またはそれ以上、1週間毎または1ヶ月毎であってよい。疾患に関する処置のための投与のタイミングそのものならびに、処置期間は、当該症例を取り巻く条件により決定される。処置は、傷害部位に、救急医療スタッフによって投与されるように、すぐ開始してよい。処置は、病院または診療所で開始しても、または退院後、もしくは外来診療所での診察後に開始してもよい。処置期間は、1回投与される単回投与から生涯にわたる治療過程までの範囲で変わり得る。

## 【0112】

前述の方法が、適当な適用による該組成物の投与に最も都合良く、最も適当および効果的であるように考えられるが、適切な処方が用いられるのであれば、投与のための他の有効な技術を用いてもよい。

## 【0113】

さらに、生分解性のフィルムおよびマトリクスまたは浸透圧ミニポンプまたはデキスト

50

ランビーズ、アルギン酸またはコラーゲンに基づく送達系を用いて、徐放製剤を使用することが望ましい場合もある。

【0114】

(e) 付加的な投与

局面の一において、該方法は、遊離の  $B_{1,2}$  を投与することをさらに含んでいてよい。IF と TCI と結合した  $B_{1,2}$  の輸送は限定的である可能性が高いが、遊離の  $B_{1,2}$  の投与は、TCI を飽和させ、それにより、結合した  $B_{1,2}$  が、IF から TCI へ輸送されるのを、該輸送が低いレベルであっても阻止し得る。 $B_{1,2}$  の投与は当該分野では標準的である。典型的には、 $B_{1,2}$  は、経口、皮下、筋肉内または静脈内投与される。 $B_{1,2}$  は、約 1 ~ 2000  $\mu\text{g}$  の用量で投与してよい。投与する用量は、投与経路および対象の病歴に依存し得る。非限定的な例としては、1000  $\mu\text{g}$  を静脈内または筋肉内投与してよい。

10

【0115】

組成物の対象への投与は、本発明の組成物を投与する前、同時または後に、遊離  $B_{1,2}$  を投与することによって行ってよい。したがって、該遊離  $B_{1,2}$  は、いくつかの態様において、本発明の組成物または製剤の投与の 0 時間 ~ 約 24 時間前に投与され、いくつかの態様において、本発明の組成物または製剤の投与の約 0 時間 ~ 約 4 時間前に投与される。

【0116】

他の局面において、該方法は、L-リジンをさらに投与することを含んでいてよい。腎臓の取り込みが高くなると、腹部の造影の感受性が低下する。L-リジンの投与は、当該分野で標準的であり、腎臓の取り込みを遮断するのに使用し得る。L-リジンの投与は、腎臓の取り込みによるバックグラウンドを低下させるのに使用してよく、転移の可視化を促進し得る。例えば、RCC が疑われる態様において、L-リジンは、本発明の組成物の、腎臓の腎細胞への結合を遮断し、さらに同時に RCC 転移の検出を可能にするために投与してよい。典型的には、L-リジンは、経口または静脈内投与される。L-リジンは、約 100 mg/kg ~ 約 1000 mg/kg または約 200 mg/kg ~ 約 600 mg/kg の用量で投与してよい。

20

【0117】

組成物の対象への投与は、本発明の組成物の投与の前、同時または後に、L-リジンを投与することにより行ってよい。したがって、該 L-リジンは、いくつかの態様では、該組成物の投与の 0 時間 ~ 約 24 時間前に投与され、いくつかの態様では、該組成物の投与の約 0 時間 ~ 約 4 時間前に投与され、いくつかの態様では、該組成物の投与の約 30 分 ~ 1 時間前に投与される。

30

【0118】

次の実施例は、本発明の好ましい態様を示すことを含むものである。代表的な技術による実施例に記載の技術は、本発明の実施によく機能することが本発明者によって明らかにされたものであり、そのため、本発明の実施の好ましい方法を構成すると考え得ることは当業者が理解するべきことである。しかし、本明細書に記載の特定の態様は、本発明の精神および範囲から離れなければ、多くの変更がなされてよく、類似の結果を得ることができるものであることは、本明細書の記載から当業者が理解するべきことである。

40

【実施例】

【0119】

実施例 1. 内因子 (IF) -  $B_{1,2}$  イメージングプローブの原理および開発

ビタミン  $B_{1,2}$  は、コバラミンとも称され、多くの代謝プロセスの必須のコファクターである。図 1 は、 $B_{1,2}$  の構造を示す。該 Co (III) 原子は、コリン環に配位しており、該環は、この場合、7 つのアミド側鎖 (a ~ g) を有する環である<sup>6</sup>。平面コリン環内には、4 つの還元されたピロール環が存在する (A ~ D と表す)<sup>6</sup>。該コリン環では、窒素と  $sp^2$  炭素原子の間で 原子非局在化が起こる<sup>6</sup>。+3 状態のコバルト原子を有するコバラミンは、通常、ベースオン (base-on) 形態で X 位に配位子を有する正八面体形態を有し、このことは、ジメチルベンズイミダゾール基中の窒素がコバルトに配位しているこ

50

とを意味する<sup>6</sup>。

【0120】

$B_{1,2}$ は口から体内に入り、口内で食物から分離され、約5.8 kDaのタンパク質であるハプトコリン(HC)が結合する( $K_d = 0.01 \text{ pM}$ )<sup>6</sup>。次いで、該HC- $B_{1,2}$ 複合体は、胃へと移動し、ここで、胃の頂端細胞が、内因子(IF)を放出する。HC- $B_{1,2}$ が小腸に入ると、pHの上昇によりHCが部分的にアンフォールディングし、その後、プロテアーゼにより分解され、 $B_{1,2}$ を放出する。血中において、HCはコバラミンの約75%に結合し、トランスコバラミンが残りに結合する<sup>9</sup>。

【0121】

IFは、5.0 kDaのタンパク質であり、分解されたHCから放出されたときに、 $B_{1,2}$ に結合する( $K_d = 0.003 \text{ pM}$ )<sup>6</sup>。その後、IF- $B_{1,2}$ は、十二指腸に移動し、そこで高い親和性( $K_d$  約5 nm)でキュビリン(CUBN)に結合する。CUBNは、回腸突端の腸細胞の表面に発現する、46.0 kDaのグリコシル化された末梢性の膜タンパク質である<sup>7</sup>。具体的には、IF- $B_{1,2}$ は、Ca<sup>2+</sup>依存的に、CUBドメイン5~8に結合する<sup>7</sup>。CUBNは全部で27のCUBドメインを有し、これらは、IF- $B_{1,2}$ とともに、アルブミン、トランスフェリンおよびビタミンD(D結合タンパク質に結合)に結合する<sup>10</sup>。CUBNは膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインを持たないため、エンドサイトシスが可能であるためには、2つの異なる膜貫通タンパク質である、アムニオンレス(AMN)およびメガリン/LRP2が存在していなければならない<sup>7</sup>。回腸細胞の中に入ると、IFはリソソームにより分解され、 $B_{1,2}$ にトランスコバラミンII(TCII)(約4.4 kDa、 $K_d = 0.004 \text{ pM}$ )が結合する<sup>6</sup>。図2は、 $B_{1,2}$ の摂食による取り込み経路を表す。

【0122】

コバラミンは細胞増殖過程に必要であり、さらに、水溶性であり細胞毒性が知られていないといった有用性を有することから、このビタミンをイメージングプローブとして用いることは、明らかに予測できることである。ハプトコリン(HC)および内因子(IF)による $B_{1,2}$ の結合の結晶構造の研究に基づけば、天然の生物学的経路を妨害するのを避ける修飾に最も理想的な部位が $B_{1,2}$ 上に存在する。結合は、アミド側鎖の加水分解から生じるカルボン酸上またはリボシル基上の5'-ヒドロキシル残基上で起こり得る<sup>6</sup>。

【0123】

造影技術が非常に進歩する一方で、現在のイメージングプローブの最大の弱点は、バックグラウンド発光のレベルである。バックグラウンドという語は、造影を行うときに照射される試料中の、好ましい標的ではない任意の領域を表すのに用いられる。 $B_{1,2}$ は、腎臓および肝臓に集積する傾向があるために、造影の結果を歪曲させる。本質的には、 $B_{1,2}$ プローブについて見られるバックグラウンドは、全ての細胞が細胞増殖に $B_{1,2}$ を必要とするために、TCII受容体(MG、CD320)が全身に分布していることによるものである。この問題を回避するために、TCIIではなくキュビリン受容体を標的とするIF- $B_{1,2}$ プローブを設計した。現在、キュビリン受容体を有する、最も研究されている細胞は、十二指腸の腸細胞および腎細胞である<sup>9</sup>。腎細胞受容体が、L-リジンの混注によって遮断でき、したがって、腎臓の大きなバックグラウンドとは対照的に、転移性の腫瘍のみの造影が可能であることも示されている<sup>11</sup>。図3は、このプローブを合成するためのスキームを示す。

【0124】

実施例2. 1,1-ビスチアゾレート-(1,4)-ジアミノブタン(1)の合成

1,1-ビスチアゾレート-(1,4)-ジアミノブタン(1)を、無水ジクロロエタン(DCE)中、室温、アルゴン下で30分間、N-Boc-1,4-ブタンジアミン(300 mg、1.5 mmol)をチアゾール-4-カルボキシアルデヒド(3 mmol、300 mg)と反応させることにより合成した<sup>12</sup>。この最初の工程の後、DCE 5 mLを、ナトリウムトリアセトキシボロヒドリド(3 mmol、636 mg)とともに添加した。その後、この反応を16時間続け、次いで溶媒を減圧下で除き、生成物を水中の10%メタノール、10%トリフルオロ酢酸

10

20

30

40

40

50

(5 mL) に再懸濁した。Boc 保護基を除くために、この反応を室温で3時間行った。その後、溶媒を減圧下で除き、生成物を10%水中メタノールで再懸濁した。この反応は、9%の収率を示した。図4は、1,1-ビスチアゾレート-(1,4)-ジアミノブタン反応のスキームを表す。

#### 【0125】

実施例3. 1,1-ビスチアゾレート-(1,4)-ジアミノブタン(1)の精製および特徴付け

1,1-ビスチアゾレート-(1,4)-ジアミノブタンを、クォータナリポンプを備えたAgilent 1200シリーズの機器を用いて、UV検出254 nmで、C18 column (Agilent Eclipse XDB-C18)上で精製した。溶媒Aは、0.1% TFA/H<sub>2</sub>Oであり、溶媒Bはアセトニトリル(MeCN)であった。1,1-ビスチアゾレート-(1,4)-ジアミノブタンを精製するのに用いた勾配は、0~5% MeCN、30秒間であり、その後、5% MeCNで5分間維持した。図5は、この精製のトレースを示す。その後、図6に示すように、<sup>1</sup>H-NMRを行って、1,1-ビスチアゾレート-(1,4)-ジアミノブタンの特徴付けを行った。

#### 【0126】

実施例4. B<sub>1,2</sub>-ビスチアゾール(2)の合成

シアノコバラミン(196.53 mg) 0.145 mmolを、無水DMSO 5 mL中、50で、1,1'-カルボニル-ジ-(1,2,4-トリアゾール) (CDT) 0.725 mmolによって1時間活性化させた。DMSO中の1,1-ビスチアゾレート-(1,4)-ジアミノブタン0.159 mmol (37.738 mg)を該反応液に添加し、16時間反応させた。その後、生成物をエーテルおよびアセトンを用いて沈殿させた。この反応の収率を計算すると、0.5%であった。反応収率を上昇させるために、この反応を、無水DMSO中、50で、CDT (59.34 mg) 0.36 mmolによって1時間15分活性化させたシアノコバラミン(60.99 mg) 0.045 mmolを用いて繰り返した。その後、該反応液を室温に15分間静置して冷却した。無水DMSO 1 mL中の1,1-ビスチアゾレート-(1,4)-ジアミノブタン0.050 mmol (14 mg)を該反応混合物に添加し、16時間反応させた。この反応の収率は1.5%であった。該B<sub>1,2</sub>-ビスチアゾール反応は、収率を上げるために最適化してよい。

#### 【0127】

実施例5. B<sub>1,2</sub>-ビスチアゾールの精製および特徴付け

B<sub>1,2</sub>-ビスチアゾールを、勾配として0~5% MeCN 10分間の後、5~20% MeCN、6分間を用いて、クォータナリポンプを備えたAgilent 1100シリーズ機器を用いて、UV検出360 nmで、C18 column (Agilent Eclipse XDB-C18)上で精製した。溶媒Aは0.1% TFA/H<sub>2</sub>Oであり、溶媒Bはアセトニトリル(MeCN)であった。図7は、B<sub>1,2</sub>ビスチアゾールのRP-HPLCトレースを示す。

#### 【0128】

精製産物を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF)を用いて特徴付けした。図8は、1907.615 m/zにおける該生成物を表すデータを示す。その後、B<sub>1,2</sub>-ビスチアゾールを凍結乾燥し、D<sub>2</sub>O 500 μlに再懸濁し、図9に示すように、400 MHz <sup>1</sup>H-NMRで特徴付けを行った。

#### 【0129】

実施例6. 予備プローブモデルとしてのレニウム標識B<sub>1,2</sub>-ビスチアゾール

レニウムには、<sup>188</sup>Reおよび<sup>186</sup>Reの2つの同位体があり、これらは、造影目的で使用し得る。これらの同位体はともに<sup>188</sup>W (t<sub>1/2</sub> = 62日間)の崩壊を適用する発生装置から得られ、16.2時間のt<sub>1/2</sub>および2.1 MeVのE<sub>max</sub>を有する<sup>13</sup>。しかし、<sup>186</sup>Reは、89.2時間のt<sub>1/2</sub>および1.1 MeVのE<sub>max</sub>を有する<sup>13</sup>。

#### 【0130】

Re(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>Brは、事前に、dH<sub>2</sub>O中にRe(CO)<sub>5</sub>Brを溶解し、100を超える温度で24時間還流することにより合成した<sup>9</sup>。その後、該溶液を冷却し、セライトプラグに通して濾過した<sup>9</sup>。B<sub>1,2</sub>-ビスチアゾール(2) (0.1 mg, 6 x

10

20

30

40

50

$10^{-8}$  mol) および Re(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>Br (0.03 mg,  $6 \times 10^{-8}$  mol) を、メタノール中、60 で 3 時間還流した<sup>9</sup>。反応が完了した後、溶媒を減圧下で除き、10% 水中 MeOH に再溶解した。この反応の収率は、34% と算出された。B<sub>12</sub>-ビスチアゾールの、Re(I) による標識は、収率を上昇させるために最適化してよい。

### 【0131】

#### 実施例 7. B<sub>12</sub>-ビスチアゾール-Re(I) (2') の精製および特徴付け

B<sub>12</sub>-ビスチアゾール-Re(I) (2') を、クオータナリポンプを備えた Agilent 1100 シリーズ機器による HPLC を用いて、UV 検出 360 nm で、C18 column (Agilent Eclipse XDB-C18) 上で精製した。溶媒 A は 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O であり、溶媒 B はアセトニトリルであった。用いた方法は、0 ~ 15% B、5 分間の後、15 ~ 20% B、5 分間である。図 10 は、5.28 分における、B<sub>12</sub>-ビスチアゾール-Re(I) の Tr を用いた RP-HPLC トレースを表す。その後、B<sub>12</sub>-ビスチアゾール-Re(I) の特徴付けを、MALDI-ToF を用いて行った。予測される m/z は 1907 であり、実測された m/z は 1907.615 であった。図 11 は、B<sub>12</sub>-ビスチアゾール-Re(I) の MALDI-ToF スペクトルを示す。最後に、B<sub>12</sub>-ビスチアゾール-Re(I) についての蛍光スキャンを行い、質量変化を起こしたのは Re(I) であり、Re(I) が活性であることについての証拠を得た。図 12 は、蛍光スキャンのトレースを示す。このイメージングプローブの組織分布を観察するために、ラットにおける生体内試験を行ってよい。

### 【0132】

#### 実施例 8. 放射性金属としての<sup>99m</sup>Tc

<sup>99m</sup>Tc は、66 時間の  $t_{1/2}$  を有する  $\beta$ -放射体である <sup>99</sup>Mo の崩壊を介して形成される<sup>13</sup>。この 2 つの生成物は、電荷の違いにより、アルミナクロマトグラフィーカラムで容易に分離できる<sup>13</sup>。<sup>99m</sup>Tc は、 $\beta$ -放射体であるため、ガンマカメラを用いた造影に適用可能である<sup>13</sup>。<sup>99m</sup>Tc の基底状態への遷移状態は、核スピン禁止遷移であるため、<sup>99m</sup>Tc の半減期は、6 時間と比較的短く、患者における造影に最適な時間である<sup>13</sup>。該  $\beta$ -エネルギーは、140 keV であり、これは、生物組織を貫通できる程度の大きさであるが、患者に対する負荷を最小化できる程度に小さい<sup>13</sup>。B<sub>12</sub>-ビスチアゾールは、<sup>99m</sup>Tc で標識される。次いで、イメージングプローブの組織分布を観察するために、ラットにおける生体内試験を行う。

### 【0133】

#### 実施例 9. ビタミン B<sub>12</sub> 結合体である、<sup>64</sup>Cu で同位体標識された B<sub>12</sub>-en-Bz-NOTA

図 13 に見られるように、同位体標識された B<sub>12</sub> 結合体は、酸性条件 (pH 5.5) 下で、60 で 30 分間加熱して、<sup>64</sup>Cu で標識された、ビタミン B<sub>12</sub> 結合体 B<sub>12</sub>-en-Bz-NOTA を含んでいてよい。B<sub>12</sub>-en-Bz-NOTA は、2 段階のカップリング反応を介して、B<sub>12</sub> をエチレンジアミン(en) に共有結合させることにより合成でき、ここで、該 5'-OH 基は、キレート剤を取り込むためにアミン基で官能化されている。所望の B<sub>12</sub>-en を、カチオン交換クロマトグラフィーを用いて、未反応の B<sub>12</sub> から分離してよい。未反応の B<sub>12</sub> を、10 mM NaCl、32 分間で溶出しながら、フロースルーに溶出し得る。該 p-イソチオシアナートベンジル官能化 NOTA キレートを、B<sub>12</sub>-en と、モル当量比 1:1 で反応させ；所望の生成物である、B<sub>12</sub>-en-Bz-NOTA は、Eclipse XDB-C18 column で、保持時間 14.2 分間で単離した。MALDI-ToF MS を用いて、該生成物が、B<sub>12</sub> のシアノ基を除いた B<sub>12</sub>-en-Bz-NOTA と一致する、1867 m/z にピークを有することを確認するのに用いてよい。

### 【0134】

#### 実施例 10. 結合した B<sub>12</sub> の IF への結合

IF は B<sub>12</sub> に対してピコモルレベルの親和性を示すために、これらをともに溶液中にいれると結合するため、同位体標識を選択し B<sub>12</sub> に結合させたら、溶液中で該結合体を IF に結合させることにより、B<sub>12</sub> 結合体に IF を事前結合させてよい。例えば、放射性標識 B<sub>12</sub> 系を、PBS (pH 7.4) または MES 緩衝液 (pH 5.5) 中の IF と結合

10

20

30

40

50

させてよい。IF に事前に結合した放射性標識  $B_{1-2}$  結合体を、造影および/または処置の有効性を評価するために試験してよい。

【0135】

実施例 11. TCI および HC の存在下における、IF および  $B_{1-2}$  の結合の維持率を決定するための試験管内試験

本発明の有効性を確認するために、2つの試験管内試験を用いてよい。最初に、IF vs TCI/HC  $B_{1-2}$  結合アッセイを、1nM TCI/HC に添加した、3.3  $\mu$ M IF- $B_{1-2}$ -AF647 を用いて行ってよい。次に、1nM IF- $B_{1-2}$ -AF647 を1nM TCI/HC に添加する。 $B_{1-2}$  結合タンパク質が、 $B_{1-2}$ -Cu<sup>64</sup> と競合するための時間が経過した後、免疫沈降により培地から個別に捕捉する。各結合タンパク質の単離は、磁気微粒子に結合した抗ヒト IF/TCI/HC を用いて行う。各タンパク質をペレット化し、カウンターを用いて、放出を測定する。各タンパク質に結合した  $B_{1-2}$ -Cu<sup>64</sup> の濃度をカウント毎分 (cpm) で測定し、ホロ-IF/TCI/HC- $B_{1-2}$ -Cu<sup>64</sup> のキャリブレーションと比較する。これにより、どれだけの  $B_{1-2}$ -Cu<sup>64</sup> が IF- $B_{1-2}$ -Cu<sup>64</sup> から除かれたかを決定することができる。

10

【0136】

Cu<sup>64</sup> 3.3  $\mu$ M は、約 3.7 MBq (100  $\mu$ Ci) に相当し、PET 画像法で観察することのできる、検出可能な最も低いレベルである。TCI および HC は、血中に、pM の濃度で存在するため、 $B_{1-2}$ -Cu<sup>64</sup> が IF- $B_{1-2}$ -Cu<sup>64</sup> から除かれると、レベルが検出可能限界を下回り、すなわち、CD320 によるバックグラウンド像は観察されなくなる。

20

【0137】

実施例 12.  $B_{1-2}$ -IF プローブの生体内分布の決定のための生体内試験

本発明は、生体内試験によっても評価し得る。外来性の  $B_{1-2}$  による干渉を低下させるために、動物は、接種前 2 週間は、 $B_{1-2}$  を欠いた食餌を与えてよい。

【0138】

好ましくはラットを用いる第一の試験において、IF- $B_{1-2}$ -Cu<sup>64</sup> 結合体を、尾静脈注射を介して 3 匹のラットに投与する。特定のタイムポイント (2、6 および 24 時間) において、該結合体の取り込みを定量するために、PET 画像法によって該ラットをスキャンする。この試験の目的は、種々の組織にわたるキュビリンの生体内分布を観察することである。

30

【0139】

好ましくはラットを用いる競合阻害についての第二の試験において、予め決定した濃度の遊離  $B_{1-2}$  を、TCI および HC を血中に飽和させるために、前/共-注入する。その後、IF- $B_{1-2}$ -Cu<sup>64</sup> を、尾静脈注射により投与し、PET 画像法を、2、6 および 24 時間の時点で行う。該結合体の生体内分布を第一のラット試験と比較する。

【0140】

好ましくはラットを用いる腫瘍取りこみについての第三の試験は、n 匹のラットからなる群 A、B および C を用いて 3 回重複して行う必要がある。群 A には、キュビリンを発現することが知られている腎臓腫瘍細胞株を移植する。群 B には、キュビリンを発現することが知られている肺癌細胞株を移植する。群 C は、キュビリンを発現しないことが知られている癌細胞株を移植する。

40

【0141】

該試験により、IF- $B_{1-2}$ -Cu<sup>64</sup> が、キュビリンを発現する転移性腎腫瘍に局在しえることが示される。腫瘍造影において、従来の技術に対して、より特異性を示し、バックグラウンドが低下することが期待される。キュビリンは特定の組織、例えば腎臓および小腸で発現するため、これらの組織における取り込みおよび集積は、バックグラウンド像を形成し得る。したがって、該結合体の腎臓中での集積を、多数の方法で遮断してよい。最も一般的な方法である、カチオン性アミノ酸であるリジンの静脈注射は、従前に、腎臓の取り込みを遮断するか、または大幅に低下させるのに用いられて成功している。例えば

50

、  $^{113}\text{I}$  - 標識した結合体の 2 分前に、 L - リジン 50 mg を注射することにより、マウスにおける腎臓の取り込みが約 95 % 低下した。しかしながら、腎臓腫瘍の転移の最も一般的な部位の 1 つは肺であるため、腸内の集積が、腹部の上側領域の造影を妨げることはない。

【 0142 】

実施例 13. L - プロパルギルグリシンを用いた、標的化  $\text{B}_{1-2}$  結合体

$\text{B}_{1-2}$  結合体は、 L - プロパルギルグリシンを用いて作製してもよい。 L - プロパルギルグリシンを、次いで、金属、例えば  $^{99}\text{mTc}$  とキレート化させてよい (図 14)。 L - 立体配置は、金属の結合にとくに重要である。例えば、 5' - OH は、好適な遊離基へと変換され、次いで、アジドで置換される。得られた「クリック可能」なアジドは、安定であり、アルキンへの銅触媒性 [1, 3] およびストレイン促進 [1, 3] 双極子環状付加 (CuAAC または SPAAC) において高い活性を示す。この方法は、 Chrominski et al, Chem Eur J 2013; 19: 5141-5148 に詳述されている。次いで、アルキン含有グリシンを「クリック」化学を用いて付加する (図 15)。さらに、 4 に示すように、グリシンより前にアルキル鎖リンカーを、付加してもよい (図 18D)。

10

【 0143 】

あるいは、酸性条件下における、注意深く制御されたシアノコバラミンの部分加水分解により、所望の b および e の酸が得られる。例えば、 b 位におけるカルボン酸への変換の際に、アルキン含有グリシンを付加する (図 16)。一例において、 3 に示すように、グリシンより前に、アルキル鎖リンカーを付加する (図 18C)。

20

【 0144 】

さらに、 L - プロパルギルグリシンを用いて、コバルトイオンに  $\text{B}_{1-2}$  を結合させ、コバルト - C 結合を有する  $\text{B}_{1-2}$  結合体を得てよい。例えば、 (CN)C<sub>b</sub>1 を末端アルキンと、 Cu(I) 塩の存在下で直接反応させることにより、アセチリドを得ることができる。該生成物はさらに、 [1, 3] 双極子アジド - アルキン環状付加によって官能化してよい。特に、 L - プロパルギルグリシンを、アルキル鎖リンカーを用いてまたは用いずに付加してもよい (図 17 および図 18B)。

【 0145 】

実施例 14. > 160 kDa のビタミン  $\text{B}_{1-2}$  結合系の、受容体介在性の取り込み

30

本発明者は、キュビリンが大きいタンパク質の通過を促進できることを検討し、可視化することを望んでいた。  $\text{B}_{1-2}$  取り込み経路を用いた、結合体のサイズ限定は今日まで調べられていなかった。本実施例は、試験管内で、キュビリン受容体を介する  $\text{B}_{1-2}$  - 破傷風トキソイド結合体 (MW > 160 kDa) の取り込みが見られたことを示し、このことは、該取り込み経路が大きいタンパク質を送達することができるものであることを示すものである。

【 0146 】

$\text{B}_{1-2}$  を、無水 DMSO 中、 60 °C で、 CDT を用いて活性化した。該活性化  $\text{B}_{1-2}$  を、アリコートで、 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) 中の破傷風毒素 (TT) に 1 時間添加した。該 TT は、 CDT の理想的な結合経路をつくりだすリジン残基が豊富である。 2 つの異なる量 [1 mg (0.007 mmol) または 20 mg (0.0148 mmol)] の活性化  $\text{B}_{1-2}$  を 2400 L<sub>f</sub> の TT と反応させ、結合体 2 および 1 をそれぞれ得た。結合系の精製を、ゲル浸透クロマトグラフィーを用いて行った。  $\text{B}_{1-2}$  の異なる合成経路によって、同様のクロマトグラフィーの挙動が示され、 TT は、明らかに分離挙動の大部分を占めていた。

40

【 0147 】

TT 自体の重量を最初に決定し、質量分析 (MALDI-TOF) により、約 158 kDa と記録した。(アミノ酸配列に基づく) 予測値である 150 kDa より、 8 kDa 大きいのは、不活性プロセスの間にホルマリンおよびリジンを取り込んだことによるものである可能性が最も高い。これにより、分子量のベースラインが得られ、これを、 HPLC 分離による新しいピークと比較するのに用いた。質量分析によっても、 TT 試料中に、遊離の分離した軽い鎖および重い鎖が存在することが示された。

50

## 【0148】

結合体1の分子量は約170kDaであった。これは観察されたTTの分子量より12kDa高い。遊離のTTから結合しているTTへの質量の増加は、B<sub>12</sub>9分子に相当する。B<sub>12</sub>のTTに対する合成比率がより小さい反応を用いると、分子量163kDaが質量分析により観察された。結合体2については、遊離のTTと再び比較すると、分子量のシフトは5kDaに過ぎなかった。これは、4分子のB<sub>12</sub>の付加と一致する。

## 【0149】

該結合体の生物学的活性を確認するため、ELISAを行った。ウサギポリクローナル抗TT抗体を96ウェルプレートに結合させた。TT希釈標準をインキュベーションした後(240~0.002Lf/mL)、種々の濃度のマウスモノクローナル抗-TT(1~0.5μg/mL)をインキュベーションし、有効なアッセイに必要な適当な希釈率を決定した。次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合した二次抗体を、ウェル内でインキュベーションした。該アッセイには、直線の較正曲線をもたらすことが明らかになっている1Lf/ml~0.005Lf/mlの範囲の濃度を用いた。しかし、該較正曲線が直線であるのは、TTの濃度が約10Lf/mlになるまでである。該結合体および対照のELISAの結果が比較可能であることを確かめるために、各試料中のタンパク質濃度をプラッドフォードアッセイにより決定した。

## 【0150】

プラッドフォードアッセイの結果とELISAの結果を組み合わせることにより、該試料を、μgに対するLfの比率で表す。この値を、TT開始物質に対して行った、μgに対するLfの比率が0.32という結果をもたらしたプラッドフォードアッセイと比較した。結合体におけるLf/μgの比率は、TT開始物質より低い。

## 【0151】

その後、両方の結合体を、IFに暴露し、結合を、上述のように電子吸収分光によって経過観察した。両方の場合において、IF結合は、吸収の上昇によって示された。ゲル浸透クロマトグラフィーもまた、IF-結合体の結合と一致していた。

## 【0152】

BeWo細胞株におけるキュビリンの存在についてのベースラインを確立するために、キュビリンの免疫染色を行った。キュビリンに対する抗体を、Alexa Fluoro 405色素を用いてタグ付けした(CubAb<sub>405</sub>)。その後、該抗体を24時間透析し、過剰の色素を除いた(その後HPLCを行ったが、ここには示さない)。BeWo細胞を、CubAb<sub>405</sub>とともに45分間37℃でインキュベーションした後、共焦点顕微鏡を用いて試験した(図19A)。該細胞は、CubAb<sub>405</sub>の表面への結合および、いくらかの内在化を示した。該CubAb<sub>405</sub>をまた、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)とともにインキュベーションした。CHO細胞はキュビリン受容体を発現しないため、適当な陰性対照である。該CubAb<sub>405</sub>は、CHO細胞への結合または取り込みを示さなかった(データは示さない)。

## 【0153】

BeWo細胞において、TTを介した取り込みがある可能性を排除するために、該TTをAlexaFluoro 405タグ(TT<sub>405</sub>)に結合した。TT<sub>405</sub>を、IFの存在下で、BeWo細胞株とともにインキュベーションした。該BeWo細胞はTT<sub>405</sub>を取り込みず、B<sub>12</sub>介在する取り込みについての仮説が支持された。該TT<sub>405</sub>は、わずかな膜相互作用を示したが、決定的な内在化は全く見られなかった。

## 【0154】

該細胞株がキュビリンを含むこと、ならびにTTが取り込みを促進しないことを確認し、1および2をCypHer 5E色素と結合し、蛍光結合体(1<sub>C5E</sub>、2<sub>C5E</sub>)を作製した。これらの結合体についてCypHer 5Eを選択したのは、中性条件下において、該タグが蛍光反応を示さないことによる。該色素は、酸性pH、例えば5.5に暴露されたときに蛍光を示す。蛍光の観察により、取り込みが、受容体を介するエンドサイトーシスを介して進行していることが示される。1<sub>C5E</sub>を、最初にIFとともに30分間インキュベショ

ンした後、BeWo細胞とともに1時間インキュベーションした。その後、遊離の結合体を洗い流し、非特異的な膜相互作用を低下させるために、細胞をPBS(pH7.4)で3回洗浄し、pH3.0で1回洗浄した。その後、PBS(pH7.4)を該細胞に添加し、共焦点顕微鏡で、取り込みおよび内在化が起こっているかどうかを試験した(図19B参照)。 $1_{c5E}$ は明らかに、細胞への内在化を示す。

#### 【0155】

IFを介する $B_{12}$ 破傷風毒素結合体の取り込みを確認するために、蛍光標識タグIF(IF<sub>405</sub>)を用いて共局在試験を行った。IFをAlexa Fluor 405と1時間反応させた後、24時間透析し、タグ付きIF<sub>405</sub>系を得た。該IF<sub>405</sub>系を、 $B_{12}$ 、 $1_{c5E}$ および $2_{c5E}$ の結合体の存在下でインキュベーションした。Alexa Fluor 405フルオロフォアを選択したのは、励起および発光プロファイルがCypHer 5Eと重ならないためである。試験の間を通じて、少なくとも10倍過剰のIFを使用した。 $B_{12}$ とインキュベーションしたIF<sub>405</sub>は、BeWo細胞において取り込みを示す。

#### 【0156】

IF<sub>405</sub>を $1_{c5E}$ とともにインキュベーションしたとき、赤と青のシグナルの取り込みおよび共局在が見られ、このことにより、IFおよびTTが一緒に存在することが確認された。青色のシグナルは、通常、結合体由来の赤色シグナルの周辺に存在する(図19C)。これは、多数の $B_{12}$ 分子がTTの周辺に結合した後、IF<sub>405</sub>が結合することと一致する。該 $2_{c5E}$ 結合体はまた、取り込みおよび共局在を示したが、 $1_{c5E}$ について顕著であったIF<sub>405</sub>の封入効果は大幅に低下し、取り込みの上昇が観察された(図19D)。これは、TTに結合して $2_{c5E}$ を形成する $B_{12}$ の数が少なく、それによりIF<sub>405</sub>の結合が低くなっていることと一致する。

#### 【0157】

該 $1_{c5E}$ および $2_{c5E}$ 結合体はともに、細胞内に内在化している様子が観察される。これらの結合体の蛍光は、pH感受性のCypHer 5E色素による、受容体を介するエンドサイトーシスの取り込みを示す。TT $c5E$ 結合体が取り込みを全く示さないことは、TT単独では受容体介在性のエンドサイトーシスを誘発することができないことを示す。このことは、 $B_{12}$ 結合が、該結合体のエンドサイトーシスに必要であることを示す。IF<sub>405</sub>が、該結合体系と共に局在することにより、キュビリン受容体を介したエンドサイトーシスが起こっていることが支持される。本明細書に記載の実施例により、該取り込み経路が170kDaの結合体系を輸送することが可能であることが示される。

#### 【0158】

##### 実施例についての参考文献

1. About kidney cancer. (2013, January 29). Retrieved from <http://www.kidneycancer.org/knowledge/learn/about-kidney-cancer/>
2. Bhat, S. (2010). Role of surgery in advanced/metastatic renal cell carcinoma. Indian Journal of Urology. 26(2), 167-176.
3. Motzer, R.J., Bacik, J., Schwartz, L.H., Reuter, V., Russo, P., Marion, S., and Mazumdar, M. (2004). Prognostic Factors for Survival in Previously Treated Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. Journal of Clinical Oncology. 22(3), 454-463.
4. Griffin, N., Sohaib, S., and Martin Gore. (2007). Imaging in Metastatic Renal Cell Carcinoma. Oncologic Imaging. 189, 360-369.
5. Fass, L. (2008). Imaging and cancer: A review. Molecular oncology. (2), 115-152.
6. Randaccio, L., Geremia, S., Demitri, N., and Wuerges, J. (2010). vitamin B<sub>12</sub>: Unique Metalorganic Compounds and the Most Complex Vitamins. Molecules. (15), 3228-3259.
7. Kozyraki, R., Cases, O. (2013). vitamin B<sub>12</sub> absorption: Mammalian physiology and acquired and inherited disorders. Biochimie. (95), 1002-1007.

10

20

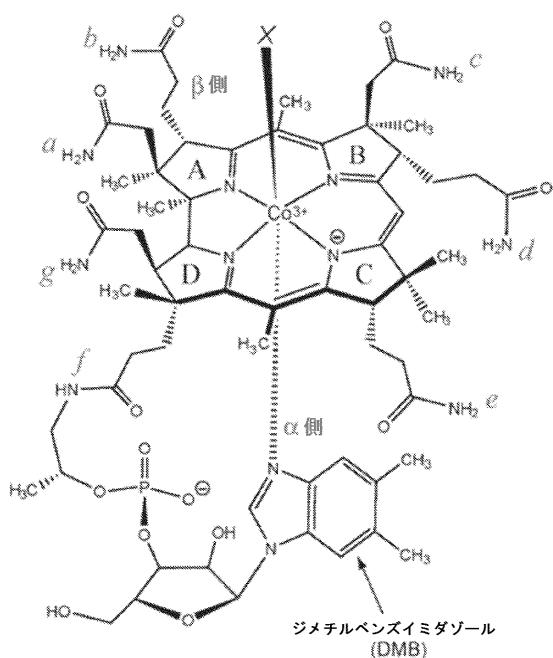
30

40

50

8. Waibel, R. (2008). New Derivatives of vitamin B<sub>12</sub> Show Preferential Targeting of Tumors. *Cancer Research.* (68), 2904-2911.
9. Furger E, Fedosov S.N., Launholt Lildballe D, Waibel R, Schibli R, Nexo, E., and Fischer, E. (2012) Comparison of Recombinant Human Haptocorrin Expressed in Human Embryonic Kidney Cells and Native Haptocorrin. *PLoS ONE.* 7(5): e37421.
10. Vortherms, A., Kahkoska, A., Rabideau, A., Zubieta, J., Andersen, L.L., Madson, M., Doyle, R. (2011) A water soluble vitamin B<sub>12</sub>-Re(I) fluorescent conjugate for cell uptake screens: use in the confirmation of cubilin in the lung cancer line A549. *Chem. Commun.* (47), 9792-9794.
11. Kobayashi, H., Yoo, T., Kim, I., et al. (1996). L-Lysine Effectively Blocks Renal Uptake of <sup>125</sup>I- or <sup>99m</sup>Tc-labeled Anti-Tac Disulfide stabilized Fv Fragment. *Cancer Res.* (56), 3788-3795.
12. Henry, K., Balasingham, R., Vortherms, A., Platts, J., Valliant, J., Coogan, M., Zubieta, J., Doyle, R. (2013) Emission wavelength variation with changes in excitation in a Re(I)-bisthiazole ligand complex that breaks the Kasha-Vavliov rule. *Chem. Sci.*, 2013, 4, 2490-2495.
13. Abram, U., Alberto, R. (2006). Technetium and Rhenium-Coordination Chemistry and Nuclear Medical Applications. *J. Braz. Chem. Soc.* (17) 1486-1500.

〔 図 1 〕



**FIG. 1**

〔 図 2 〕

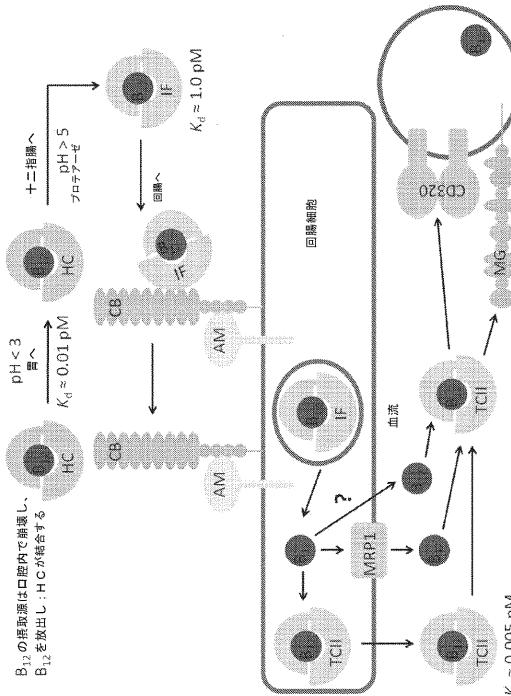
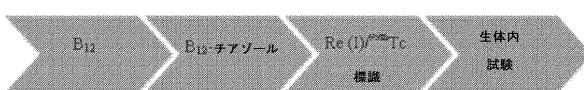


FIG. 2

〔 図 3 〕



**FIG. 3**

【図4】

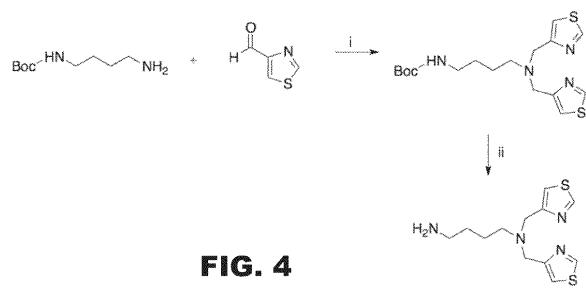


FIG. 4

【図5】

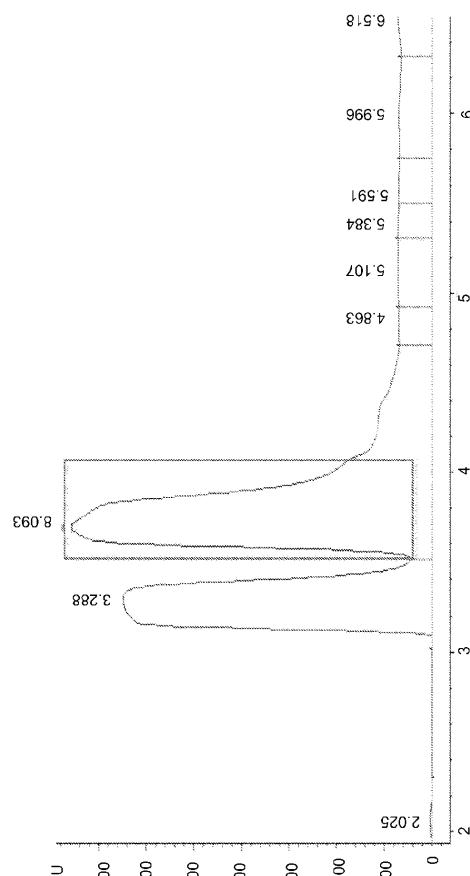


FIG. 5

【図6】

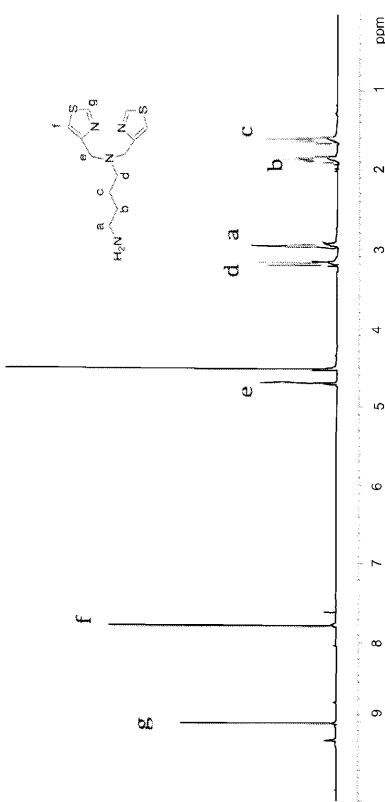


FIG. 6

【図7】

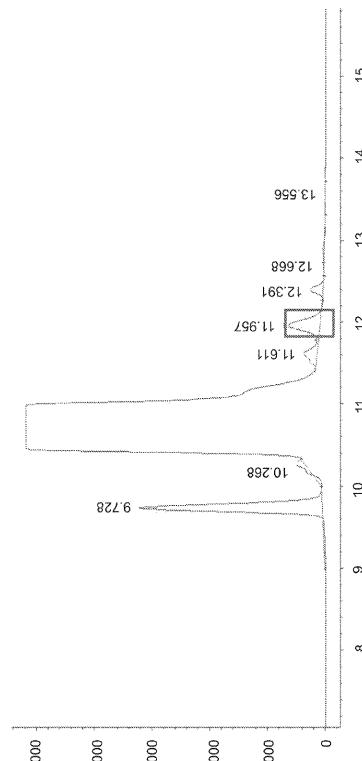


FIG. 7

【図8】

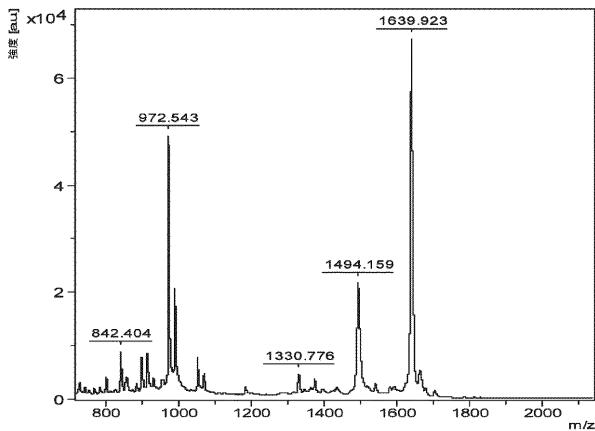


FIG. 8

【図6】

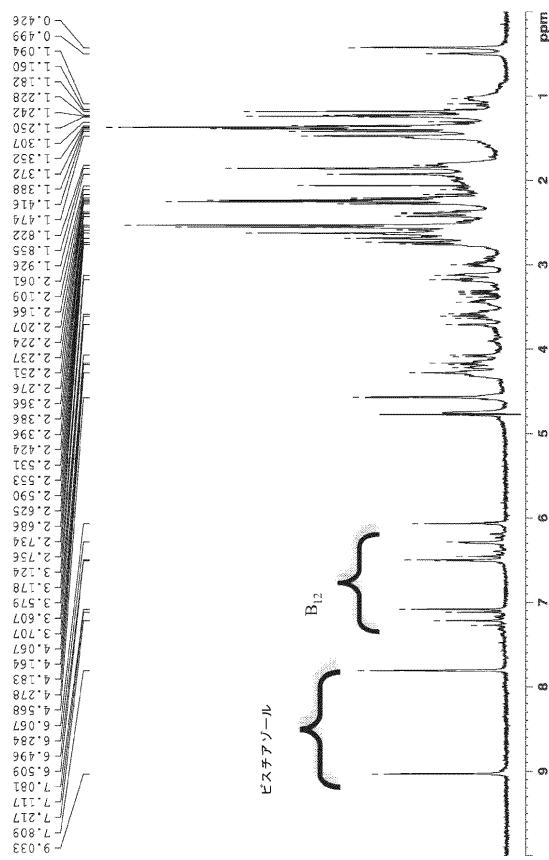


FIG. 9

【図10】

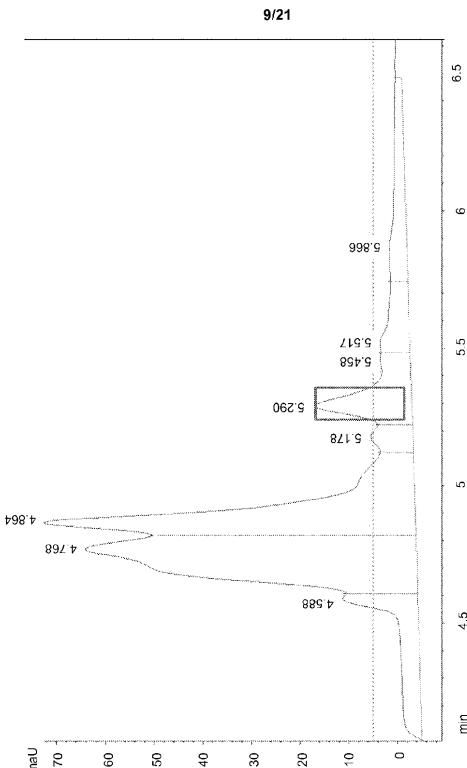


FIG. 10

【図11】

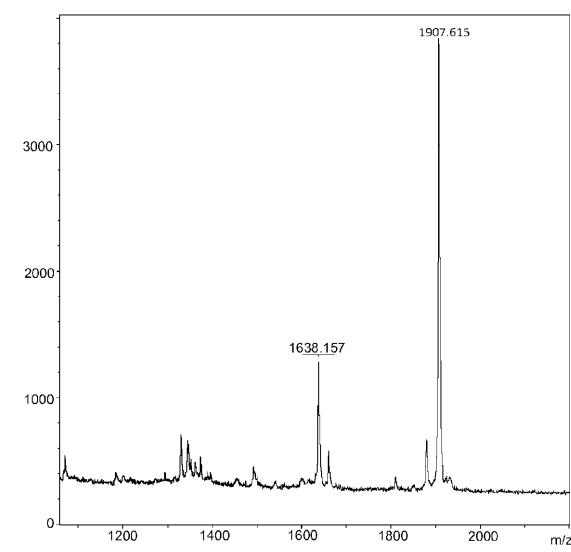


FIG. 11

【図12】

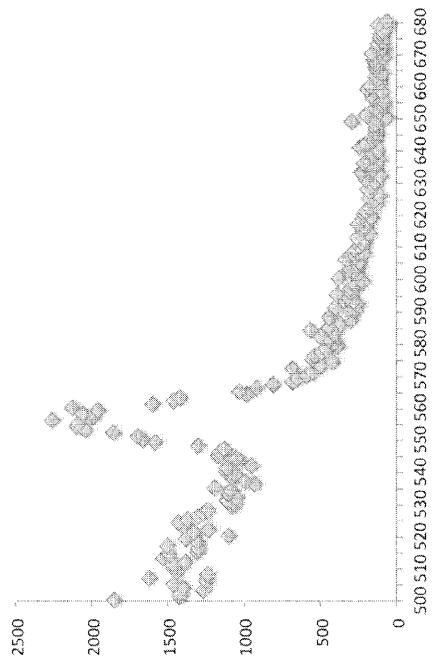


FIG. 12

【図13】

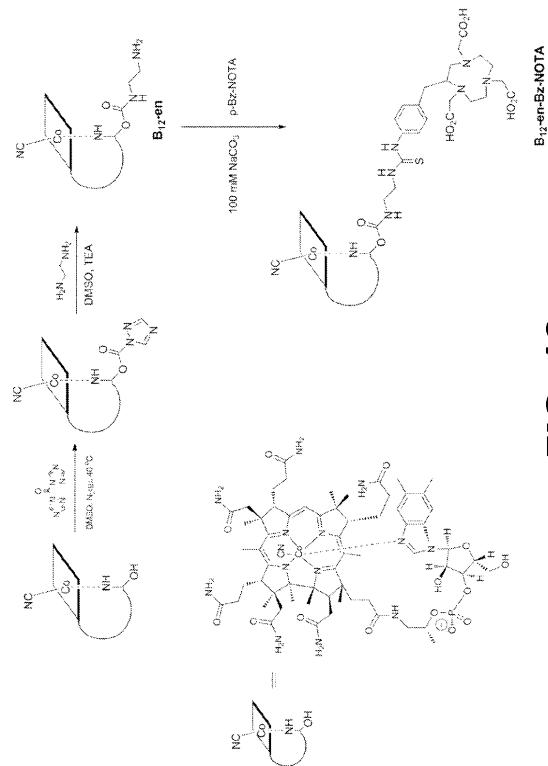
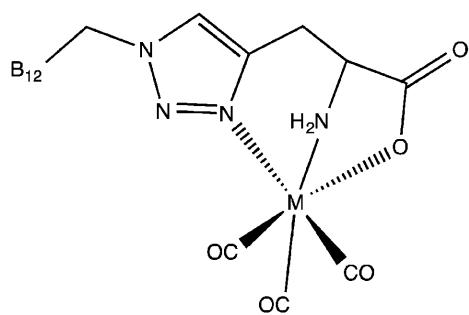


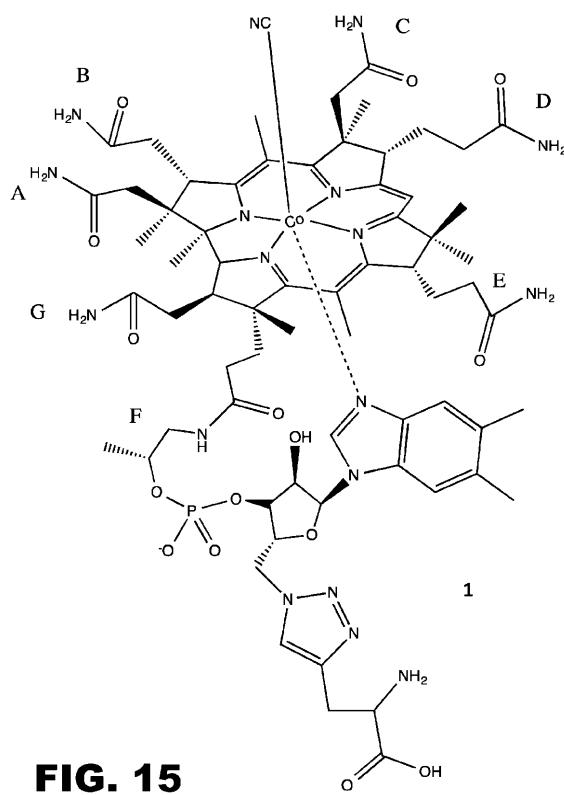
FIG. 13

【 図 1 4 】



**FIG. 14**

【 図 1 5 】



**FIG. 15**

【図 16】

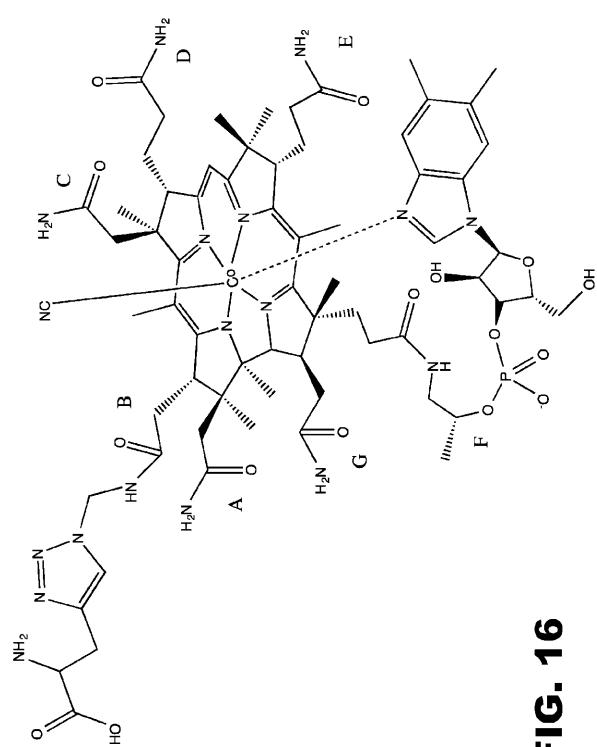


FIG. 16

【図 17】

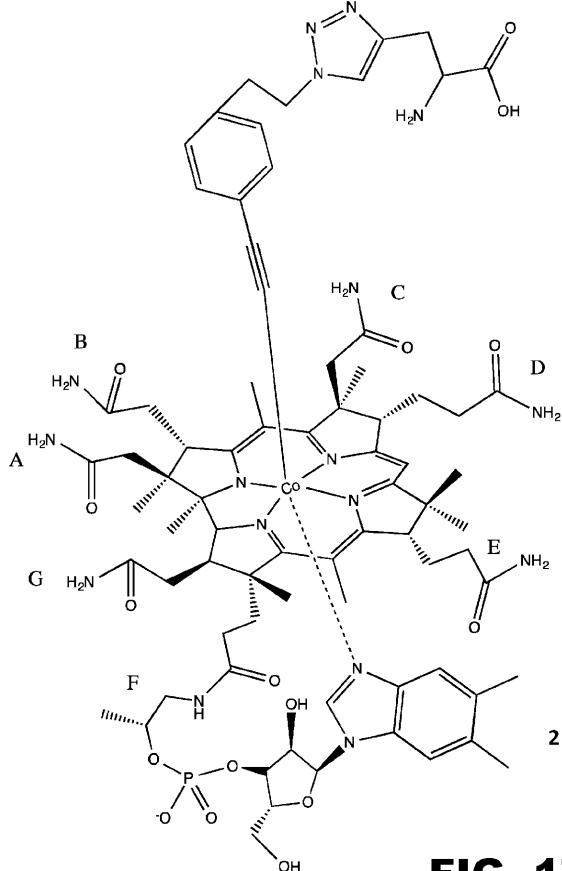


FIG. 17

【図 18 A】

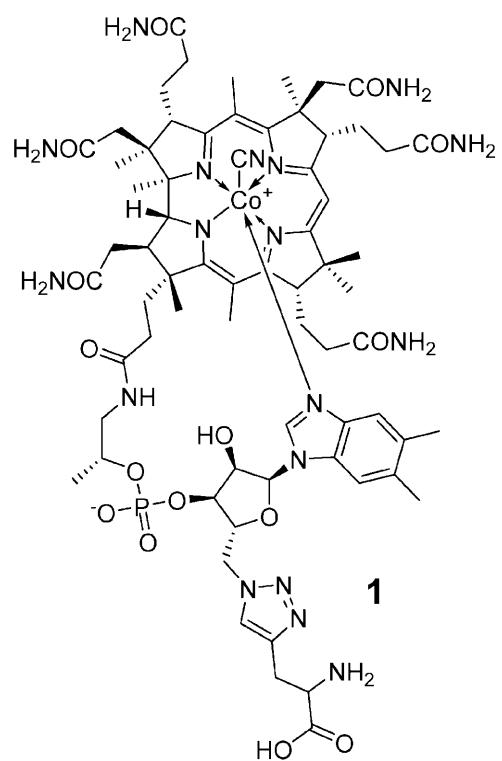


FIG. 18A

【図 18 B】

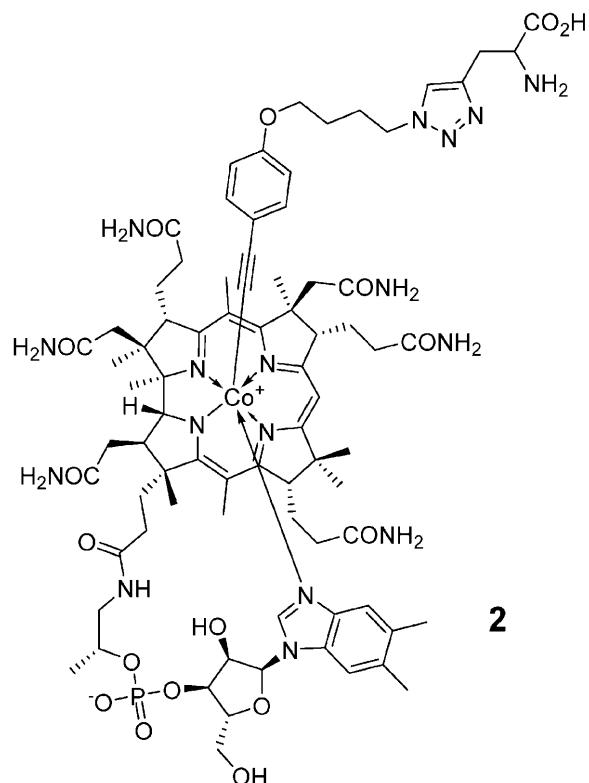
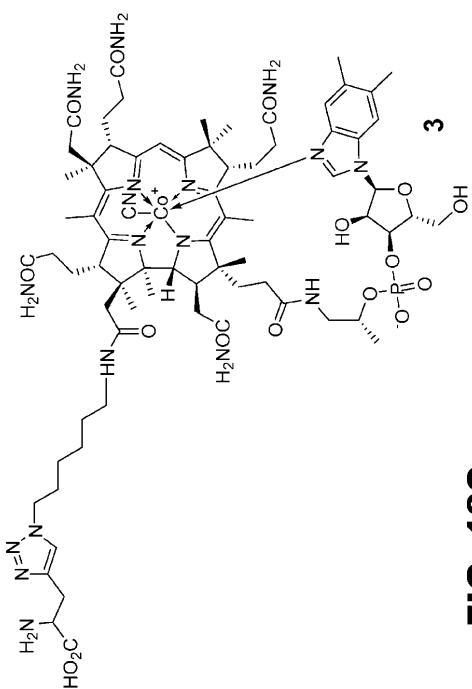
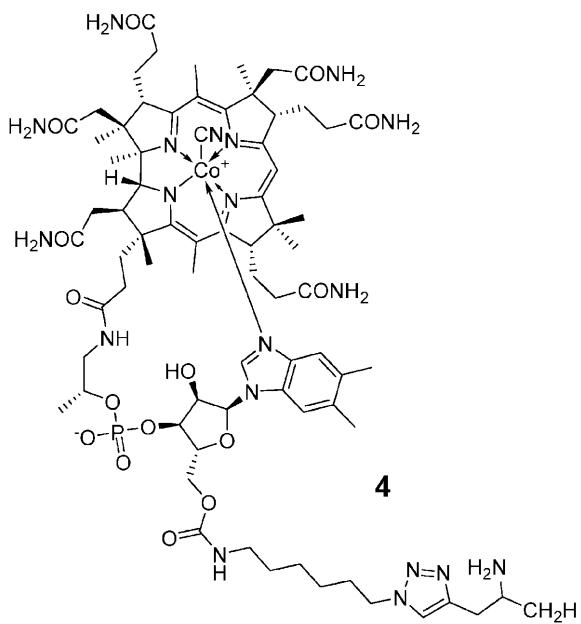


FIG. 18B

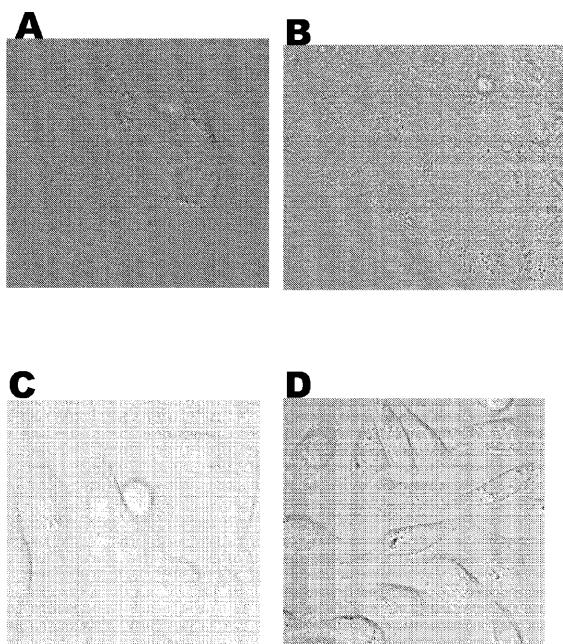
【図 18C】

**FIG. 18C**

【図 18D】

**FIG. 18D**

【図 19】

**FIG. 19**

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/052381
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61P 35/04 (2014.01) CPC - A61K 31/714 (2014.11) 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) - A61P 35/00, 35/04; C07K 14/47; G01N 33/567, 33/574, 33/82 (2014.01) USPC - 435/7.93, 7.94; 436/503, 504, 505; 514/15.4, 19.3		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 31/714, 47/48746, 51/0406, 51/0491, 51/08, 51/088, 51/109; C07H 23/00; G01N 33/57423, 33/57438, 33/57484, 33/57488 (2014.11) (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, PubMed, Google Patents, Google Search terms used: vitamin B12 cobalamin cubilin intestinal intrinsic factor receptor gp280 MGA1 IFCR cubilin intrinsic factor cancer		
<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 5,574,018 A (HABBERFIELD et al) 12 November 1996 (12.11.1996) entire document	1-9
X	WO 2003/026674 A1 (COLLINS et al) 03 April 2003 (03.04.2003) entire document	21, 25-27, 30-32
Y		10-25, 28, 29, 34
X	BIRN et al. 'Characterization of an Epithelial ~460-kDa Protein That Facilitates Endocytosis of Intrinsic Factor-Vitamin B12 and Binds Receptor-associated Protein,' Journal of Biological Chemistry, 17 October 1997 (17.10.1997), Vol. 272, No. 42, Pgs. 26947-26501. entire document	33
Y	VIOLA-VILLEGAS et al. 'Targeting the Cubilin Receptor through the Vitamin B12 Uptake Pathway: Cytotoxicity and Mechanistic Insight through Fluorescent Re(I) Delivery,' Journal of Medicinal Chemistry, 22 July 2009 (22.07.2009), Vol. 52, Pgs. 5253-5261. entire document	34, 35
Y	US 2004/0204357 A1 (BRAUTIGAM et al) 14 October 2004 (14.10.2004) entire document	10-20, 24, 35
Y	US 2007/0276231 A1 (LOW et al) 29 November 2007 (29.11.2007) entire document	13, 20, 22, 23, 29
Y	KOBAYASHI et al. 'L-Lysine Effectively Blocks Renal Uptake of 125I- or 99m Tc-labeled Anti-Tac Disulfide-stabilized Fv Fragment,' Cancer Research, 15 August 1996 (15.08.1996), Vol. 56, Pgs. 3788-3795. entire document	17
P, X	US 2014/0161813 A1 (BAUER et al) 12 June 2014 (12.06.2014) entire document	1-35
<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		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
14 November 2014	17 DEC 2014	
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: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

## 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 45/00</b> (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 K 47/42</b> (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
	A 6 1 K 47/42	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R 0, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG

(72) 発明者 ロバート・ドイル

アメリカ合衆国 1 3 1 0 4 ニューヨーク州マンハッタン、レッド・スブルース・レイン 4 4 9 5 番

F ターム(参考) 4C076 AA12 AA95 BB13 CC27 DD65 EE59 FF11

4C084 AA02 AA17 MA02 MA66 NA13 ZB262

4C085 HH03 JJ02 KA09 KA29 KB09 KB11 KB12 KB18 KB46 KB97

LL18