

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6728056号
(P6728056)

(45) 発行日 令和2年7月22日(2020.7.22)

(24) 登録日 令和2年7月3日(2020.7.3)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/409 (2006.01)	A 6 1 K 31/409
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704 Z N A
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00

請求項の数 15 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-560809 (P2016-560809)	(73) 特許権者	513268380
(86) (22) 出願日	平成27年4月4日 (2015.4.4)		シーダーズーシナイ メディカル センタ
(65) 公表番号	特表2017-514800 (P2017-514800A)		ー
(43) 公表日	平成29年6月8日 (2017.6.8)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 90
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/024400		048, ロサンゼルス, 8700 ベバリ
(87) 国際公開番号	W02015/154059		ー ブールバード
(87) 国際公開日	平成27年10月8日 (2015.10.8)	(74) 代理人	100114775
審査請求日	平成30年3月30日 (2018.3.30)		弁理士 高岡 亮一
(31) 優先権主張番号	61/975, 687	(74) 代理人	100121511
(32) 優先日	平成26年4月4日 (2014.4.4)		弁理士 小田 直
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100202751
			弁理士 岩堀 明代
		(74) 代理人	100191086
			弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HER3標的ナノ粒子によりトラスツズマブ耐性HER2+乳癌を標的にすること

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

患者における三種陰性乳癌の治療に使用するための組成物であって、

(a) ヘレグリン - の受容体結合ドメインに由来するHerセグメントと、ペン
ンベースセグメントと、正電荷を持つドメインと、を含むポリペプチド分子、ならびに

(b) (1) 前記ポリペプチドの配列に静電相互作用により結合された核酸分子、お
よび前記核酸分子に非共有結合により連結された化学療法薬；または(2) 前記ポリペ
チド分子に結合されたコロール分子、

を含む薬物送達分子を含み、

前記三種陰性乳癌はHER3を発現する、
組成物。

【請求項2】

前記正電荷を持つドメインがポリリジンモチーフである、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記正電荷を持つドメインがデカリジンである、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記ポリペプチド分子はHerPBK10である、請求項1~3のいずれか1項に記載
の組成物。

【請求項5】

前記薬物送達分子が、前記ポリペプチドの配列に静電相互作用により結合された核酸分

子と、前記核酸分子に非共有結合により連結された化学療法薬と、を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記核酸分子が、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 に記載されるポリヌクレオチド配列またはそれらの組み合わせを含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記核酸分子は二本鎖オリゴヌクレオチドである、請求項 5 または 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記二本鎖オリゴヌクレオチドは前記ポリペプチド分子に静電相互作用により結合されている、請求項 7 に記載の組成物。

10

【請求項 9】

前記化学療法薬はドキソルピシンまたはその薬学的等価物である、請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記化学療法薬は、前記核酸分子にインターカレートされている、請求項 5 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記薬物送達分子は、前記ポリペプチド分子に結合されたコロール分子を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記コロール分子がスルホン化コロール分子である、請求項 11 に記載の組成物。

20

【請求項 13】

前記コロール分子は、マンガン (Mn)、鉄 (Fe) またはガリウム (Ga) を含む、請求項 11 または 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記薬物送達分子は Her Mn、Her Fe または Her Ga である、請求項 1 ~ 4 および 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 15】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2014年4月4日に、Lali K. MEDINA - KAUWEらにより出願され、「HER3 標的ナノ粒子によりトラスツズマブ耐性 HER2 + 乳癌を標的にすること (“TARGETING TRASTUZUMAB RESISTANT HER2 + BREAST CANCER WITH A HER3 - TARGETING NANOPARTICLE”）」と題する米国仮特許出願第 61 / 975, 687 号 (図面を含むその全開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる) について優先権を主張する。

40

【0002】

配列表

本出願は、EFS - Web を介して ASCII 形式で提出され、これによりその全体が参照により組み込まれる配列表を含む。2015年4月4日に作成された前記 ASCII コピーは EOS006 PCT__SEQUENCING .txt と指定され、サイズが 17 キロバイトである。

【0003】

政府権利

50

本明細書で開示される対象物は、国立衛生研究所／国立癌研究所により与えられた認可番号 NIH / NCI R01 CA140995号および NIH / NCI R01 CA129822号の助成金を受け、政府支援によりなされた。米国政府は開示された対象物において一定の権利を有する。

【0004】

発明の分野

本発明は、治療学の分野、より特定的には癌治療の分野に含まれる。

【背景技術】

【0005】

細胞中の HERファミリーの受容体、例えば HER1 (EGFR)、HER2、HER3、および HER4 受容体の過剰発現により、細胞において強く、一定の増殖シグナル伝達が引き起こされ、これにより、最終的に特定の型の癌、例えば乳癌の発症が引き起こされることがよく知られている。HER2 陽性乳癌は侵襲性乳癌のほぼ4分の1に相当し、低い患者の生存を示す。トラスツズマブは HER2 / neu 受容体を妨害するモノクローナル抗体である。それは、現在のところ、特定の乳癌の治療のために、いくつかの商標名、例えばハーセプチン（登録商標）で市販されている。ペルツズマブは別のモノクローナル抗 HER2 抗体であり、これは癌治療に使用される。ラパチニブは乳癌において治療効果を発揮する小分子有機化合物である。これらの療法は一般に、他の治療レジメンが失敗した後、癌に対する最後のとりでとして使用される。不運なことに、HER2 陽性乳癌を有する多くの患者は、最初、これらの抗 HER2 治療に応答するが、かなり患者がこれらの療法に耐性を示すようになる。いったん、後期治療に対する耐性が現れると、実際、治療の選択肢は非常に少なくなる。その結果として、これらの療法に対して非応答性であるか、または耐性となったこれらの HER2 + 腫瘍に対して有効な新しい薬物を開発することが大いに必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

患者において癌を治療する方法が本明細書で開示され、方法は、抗 HER2 療法による治療に耐性がある患者を同定すること；ならびに患者に、ある型の細胞を標的にように、かつ／またはこれに浸透するように適合されたポリペプチド分子；ポリペプチド配列に、静電相互作用により結合された核酸分子；ならびに核酸配列に非共有結合により連結された化学物質、を含む薬物送達分子を投与することを含む。抗 HER2 療法耐性 HER2 + 乳癌細胞においてアポトーシスを誘導する方法もまた開示され、方法は、抗 HER2 療法耐性 HER2 + 乳癌細胞を薬物送達分子と接触させることを含む。

【0007】

さらに、患者において癌を治療する方法が本明細書で開示され、方法は、抗 HER2 療法に耐性がある患者を同定すること；ならびに患者に治療的有効量の、ある型の細胞を標的にように、かつ／またはこれに浸透するように適合されたポリペプチド分子；ならびにポリペプチド配列に結合されたスルホン化コロール分子を含む、薬物送達分子を投与することを含む。最後に抗 HER2 療法耐性 HER2 + 乳癌細胞においてアポトーシスを誘導する方法が本明細書で開示され、方法は、抗 HER2 療法耐性 HER2 + 乳癌細胞を、ある型の細胞を標的にように、かつ／またはこれに浸透するように適合されたポリペプチド分子；ならびにポリペプチド配列に結合されたスルホン化コロール分子を含む薬物送達分子と接触させることを含む。

【0008】

図25は、HerDoxは腫瘍標的送達をインピトロおよびインピボで媒介することを示す。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】本発明の一実施形態による送達系を示す図である。

【図2】本発明の一実施形態による、DoxをHER2 + 乳癌細胞に送達するように構成

10

20

30

40

50

された送達系を示す図である。工程(1)は細菌において組換え融合タンパク質として産生および精製されたHERPBK10を示す。工程(2)は非共有結合インターカレーション相互作用により形成されたDNA-Doxを示す。工程(3)は、DNA-Doxは非共有結合性電荷相互作用によりHerPBK10に結合することを(アニオン性DNAリン酸は求電子的にカチオン性ポリリジンに結合する)を示す。

【図3】本発明の一実施形態による、DoxをHER2+乳癌細胞に送達するように構成された送達系の動作の概略図であり、(1)細胞膜での受容体結合、(2)複合体のインターナリゼーション、(3)インターカレーション相互作用により、dsDNAに非共有結合により結合された化学療法薬(Dox)のサイトゾル放出、ならびに(4)化学療法薬およびdsDNAの核侵入が含まれる。

【図4A】DNA-Doxアセンブリ中の濾液中の相対Doxを示す図である。相補的な30bpオリゴヌクレオチドをアニールすることにより調製したds-オリゴを1時間室温で、Doxと共に1:16モル比DNA:Doxでインキュベートした。遊離Doxを10MWカットオフスピニングカラムを通して濾過することにより除去した。最初のDox除去スピン(洗浄1)後、フィルタを後4回、HEPES緩衝生理食塩水(HBS)で洗浄した(洗浄2~5)。

【図4B】DNA-Doxアセンブリ中の濾液および残余分のUV/V吸光度を示す図である。

【図5】HerDoxアセンブリを示す図である。DNA-DoxをHerPBK10と、氷上で2時間、9:1モル比HerPBK10:DNA-Doxでインキュベートした。混合物を、サイズ排除HPLCに供し、画分を、SDS-PAGEで6~10分で収集し、免疫プロットした。HerDoxを、6分ピークから収集した。HerDox中のDoxの濃度を、480nm(Dox吸収波長)で吸光度を測定することにより評価した。HerDox画分1~5のHPLC精製は、6~10分に収集した試料に対応する。画分1~5の免疫プロットはまた、HerPBK10を同定するために使用したペントンス抗体と共に図示される。

【図6A】異なる貯蔵条件下、または血清中でのコンジュゲート安定性を示す図である。HerDoxを12日まで4℃、室温、または37℃でインキュベートした。試料を、限外濾過スピニングカラムを通して一日おきに濾過した。残余分および濾液吸光度を480nmで測定し、それぞれ、コンジュゲートからの相対Dox保持または放出を決定した。

【図6B】培地中でのHerDoxの細胞への長期曝露を模倣する。Ni-NTAビーズ上に固定されたHerDoxを、ウシ血清と共にDMEM中で、示された時間の間、37℃でインキュベートし、その後、各試料をベレット化した。上清(濾液)およびビーズ溶解液(残余分)の吸光度を480nmで測定し、Doxを検出した。血清における相対Dox放出または保持は、対照に対して正規化されたものとして表される(血清を欠く対応する試料)。N=3/時間点。対照と比較した試料のT検定(P<0.05)は有意の差を示さなかった。

【図7】標的毒性を示す図である。各細胞株をrHerDox(0.5μM Dox control)、Dox単独(0.5μM)、またはHerPBK10単独に、4時間、37℃で完全(すなわち血清含有)培地中で曝露し、続いて、吸引して遊離コンジュゲートを除去し、新鮮培地を添加し、その間細胞を連続して増殖させた。細胞力価を代謝(すなわちMTT)アッセイにより決定した。図7上パネルは、MDA-MB-231(HER2-)およびMDA-MB-435(HER2+)細胞生存に関するHerDoxの効果を示す。相対生存細胞数は、対応する未処置細胞の%として表される。図7下パネルはHerDox、Dox単独、またはHerPBK10単独のHER2-およびHER2+細胞生存に関する比較を示す。処置の第3日の相対生存(未処置細胞の%として)が示される。

【図8】受容体特異性を示す図である。MDA-MB-435(HER2+)細胞を、遊離リガンド(eHRG)と共に、HerDoxの10xモル過剰で1時間、4℃にてインキュベートした。培地を吸引して、遊離eHRGを除去し、HerDox(0.5μM)を含む新鮮培地を細胞に添加した。細胞生存を、MTTアッセイにより測定し、相対未処

10

20

30

40

50

置細胞数の%として表した。

【図9A】混合細胞培養におけるターゲティングを示す図である。等しい数のMDA-MB-435およびGFP(+)-MDA-MB-231細胞をDox単独(0.5 μ M)、Her-Dox(0.5 μ M Doxを含む)、またはHerPBK10(1.2 μ g/ウェル、HerDoxにおけるHerPBK10に等しい)で処置した。ウェルをGFP蛍光(相対MDA-MB-231数を決定する)およびクリスタルバイオレット染色(総細胞数を決定する)に対してアッセイした。

【図9B】さらに混合細胞培養におけるターゲティングを示す図である。細胞生存を、クリスタルバイオレット染色(総細胞)およびGFP蛍光(MDA-MB-231細胞)に基づき対照(control)細胞により正規化された、実験(experiment)細胞の相対倍加時間(DT)を計算することにより決定した。MDA-MB-435のDTを、MDA-MB-231のDTを総細胞DTから減算することにより決定した。相対生存は処置の第2日に対して示される。

【図9C】細胞培養において安定性が存在することを示す図である。HerDoxを含む培地のアリコート(示された時間の間、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした後)を2%アガロースゲル上で電気泳動させた。37 $^{\circ}$ CでHEPES-緩衝生理食塩水中、血清欠如にてインキュベートしたHerDoxを並行して処理した。Dox蛍光をUV励起により可視化した。遊離Dox(Dox単独)は、ゲル中に保持されないが、一方、HerDoxに組み込まれたDoxは保持される。蛍光バンドをHerPBK10と整列させ、ローディング/レーンを評価するために、ゲルをクーマシーブルーで染色した。これもまた、培地試料からの血清タンパク質を同定した。

【図10】GFP-HerのHER2+腫瘍への選択的なターゲティングを示す図である。腫瘍を有するマウスに、3nmolのGFP-Herを尾静脈を介して注射した。組織を、注射後3.5時間に採取し、Xenogen小動物撮像装置を用いて可視化した。GFP蛍光は疑似カラー赤色である(青色疑似カラーは、蛍光がないことを示し、GFP強度はカラーバーにおける赤色に向かう明度シフトにより反映される)。

【図11A】HerDoxのHER2+腫瘍への選択的なターゲティングを示す図である。腫瘍を有するマウスに、0.75nmolのHerDoxまたはDoxを尾静脈を介して注射し、カスタム小動物撮像装置を用いて画像化した。図11Aは、HerDoxのIV送達後の生存マウスのイメージングを示す。腫瘍は、矢印により示される。

【図11B】さらに、HerDoxのHER2+腫瘍への選択的なターゲティングを示す図である。腫瘍を有するマウスに、0.75nmolのHerDoxまたはDoxを尾静脈を介して注射し、カスタム小動物撮像装置を用いて画像化した。図11BはHerDoxまたはDoxの注射後3時間で採取した腫瘍および組織のイメージングを示す。Doxからの蛍光シグナルは、カラーバーにより疑似カラー化され、100に向かうシフトは高い蛍光強度を示す。図11Bは、Doxが単独投与されたものと比較した(右パネル)、本発明の一実施形態による送達系を用いた、他の器官および組織への最小送達を伴う、DoxのHER2+乳癌細胞への標的送達の比較(左パネル)を示す。

【図12A】腫瘍増殖に関するHerDoxおよびDoxの比較を示す図である。

【図12B】動物体重に関するHerDoxおよびDoxの比較を示す図である。

【図12C】心臓組織に関するHerDoxおよびDoxの比較を示す図である。

【図12D】心機能に関するHerDoxおよびDoxの比較を示す図である。

【図13】マウス全血中での安定性を示す図である。HerDoxまたはDoxとの37 $^{\circ}$ Cでの、1時間までのインキュベーション後、新たに収集した全血を限外濾過により10K MWカットオフ膜を通して、処理した。0.5mM EDTAを抗凝固薬として使用したので、EDTAのみ(-血液)中のHerDoxを並行して処理した。バーは保持された(残余分)または放出された(濾液)Doxの蛍光を、各試料の総蛍光のパーセンテージとして表す。Y軸のスケールは濾液試料の存在を示すように調整される。N=3/処置。

【図14A】生細胞におけるHerDoxおよびDox細胞内移行および標的の比較を示

す図である。MDA - MB - 435細胞を、Her Doxまたは遊離Dox (0.5 μ M) と共に37 でインキュベートした。生(非固定)細胞を、明視野および蛍光顕微鏡法により画像化した。

【図14B】生細胞におけるHer DoxおよびDox細胞内移行および標的の比較を示す図である。MDA - MB - 435細胞を、Her Doxまたは遊離Dox (0.5 μ M) と共に37 でインキュベートした。生(非固定)細胞を、DICおよび共焦点蛍光顕微鏡法により画像化した。

【図15】乳癌細胞におけるHer Dox輸送を示す図である。Her Doxと共に37 でインキュベートした細胞を示された時間点で固定し、免疫蛍光法のためにHer PBK 10に対する抗体を使用して処理した。画像を、共焦点顕微鏡法を使用して、蛍光および明視野下で獲得した。n、核;バー、約8ミクロン。

【図16】HER2+またはHER2-乳癌患者由来のヒト血清におけるMDA - MB - 435細胞へのHer PBK 10の結合を示す図である。細胞は、5人のHER2+乳癌患者または同年齢のHER2-対照(どちらも前化学療法処置を受けた)の各々由来のヒト血清を含む培地においてHer PBK 10 (1.2 μ g/ウェル)で処置した。細胞をELISAのためにHer PBK 10に対する抗体を使用して処理した。100xモル過剰競合的リガンド阻害剤を含まない、または含む(+Her)ウシ血清含有培地中のHer PBK 10を加えた対照(C)ウェルを、空白バーにより示す。患者血清はシーダーズ・サイナイ・メディカルセンターのWCRI組織バンクにより提供された。N = 3ウェル/処置。

【図17A】細胞型に関する相対細胞表面HERサブユニットレベルおよび細胞毒性を示す図である。細胞を、標準手順を使用して、抗HERサブユニット抗体と、続いて、HRP-コンジュゲート二次抗体と共にインキュベートした。相対細胞数をクリスタルバイオレット染色により測定し、590nmでクリスタルバイオレット吸光度を測定することにより定量した。相対サブユニットレベルは、相対細胞数により正規化された各細胞集団のELISAシグナル、またはAbs 450nm/590nmとして報告される。図17Aは、ELISAにより測定した相対細胞表面HERサブユニットレベルのグラフを示す。

【図17B】異なるHER2を呈する細胞への毒性を示す図である。ある範囲のHer Dox用量からの細胞毒性を、各細胞株上で代謝アッセイにより評価し、クリスタルバイオレット染色により確認した。対数スケールで示されるCD50値をHer Dox用量曲線の非線形回帰分析により、科学グラフプログラムを使用して決定し、計算機を使用して確認した。各細胞株の相対HER2レベルを各CD50値の隣に示す。

【図18】Her PBK 10の最適化を示す図である。修飾タンパク質、Her PBrg dK 10の送達能力を非ウイルス性遺伝子導入複合体との関連で試験し、送達効率をMDA - MB - 453ヒト乳癌細胞における導入遺伝子(ルシフェラーゼ)発現により評価した。* = P < 0.005 等しい濃度のHer PBK 10と比較、両側T検定により決定。図により、発明は、決して、Her PBK 10に制限されないことが証明される。というのも、タンパク質のターゲティング、受容体結合、細胞侵入および/または細胞内輸送を改善する様々な突然変異が導入され得るからである。

【図19】DS-オリゴ長は標的複合体中へのDox組み込みに影響しないことを証明するグラフを示す図である。グラフにより、30または48塩基対二本鎖のいずれかを使用するDox組み込みにおいて認識できる差はないことが証明される。

【図20A】Her Doxは、神経膠腫細胞に対して毒性であることを示す図である。図20AはU251ヒト神経膠腫細胞に関するHER免疫蛍光法を示す。画像を、レーザー走査型共焦点顕微鏡法を使用して獲得した。

【図20B】U251細胞に対するHer Dox対Dox毒性のグラフを示す図である。両側検定により有意な差が決定された。

【図21A】耐性はHer Dox毒性を増強させることを示す図である。AELISAにより膜透過処理なしで検出された、親およびトラスツズマブ耐性乳癌細胞株に関するHER3(およびHER2)の相対表面レベル。N = 3. * = p < 0.05 親と比較。

10

20

30

40

50

【図21B】トラスツズマブ単独、ペルツズマブ単独、およびトラスツズマブ - ペルツズマブ併用処置と比較した、HerDoxによる腫瘍細胞死滅を示す図である（処置後48～72時間まで）。N = 3。

【図22】HerDoxは、トラスツズマブ耐性腫瘍をインビボで死滅させることを示すグラフである。JIMT-1腫瘍を有する雌ヌードマウスは、腫瘍が約100mm³に到達した時に、示された試薬を示された用量でIV（尾静脈）注射により投与された（週2回注射を4～6週間）。腫瘍体積をノギスにより測定した。第0日は、処置の第1日に対応する。N = 10腫瘍/処置。

【図23】トラスツズマブ前処置は、HerDox毒性を増大させることを示すグラフである。親または非耐性細胞（A～C）およびトラスツズマブ耐性細胞（D～F）を、トラスツズマブにより、示された濃度で（X軸上部を参照されたい）、HerDox処置前4時間および24時間に処置し、処置後48～72時間に生存についてアッセイした。N = 3。

【図24A】非共有結合性、血清安定自己組織化により形成されたHerDoxを示す図であり、描出された機能ドメインを有するHerPBK10、ならびにDoxがインターカレートされたds-オリゴとの求電子性結合が示される。

【図24B】HerDox粒子のクライオEM画像を示す図である。

【図24C】HerDoxのHPLCクロマトグラムであり、Dox吸光度の溶離プロファイルを示す。図24Cは、さらにHPCIE収集画分のSDS-PAGEを示す。

【図24D】HerPBK10によるds-オリゴの血清ヌクレアーゼ消化からの保護を示す図である。ds-オリゴを20分間、100%マウス血清（Abcam、Cambridge, MA, USA）中でインキュベートし、その後、PAGEおよびEtBr染色し、DNAを可視化させた。

【図24E】HerDoxは血液中で安定なままであることを示す図である。DoxまたはHerDoxを1時間、マウス血液中、37℃でインキュベートし、続いて、限外濾過し、全ての放出されたDox（濾液）を複合体（残余分）から分離した。N = 3。*、p < 0.05、個々の残余分と比較。

【図25-A】HerDoxまたはDoxで処置した別々の培養物中のHER2+（MDA-MB-435）およびHER2-（MDA-MB-231）細胞に対する細胞毒性を比較する（0.5μM最終Dox濃度）。処置の第3日での相対細胞生存（未処置細胞の%として）。（+Her）、HerDox投与前にMDA-MB-435細胞の受容体-ブロッキングリガンド（組換えヘレグリン）とのプレインキュベーション。N = 3。

【図25-B】異なるHER2-3を発現する腫瘍を有するマウスにおけるHerDoxおよびDoxの体内分布を比較する。組織を注射後、示された時点で安楽死させた、注射したマウスから独立して採取し、蛍光強度/組織を多モード撮像装置を使用して獲得した。

【図25-C】MDA-MB-435細胞におけるHerDox取込後1時間でのHerPBK10およびDox位置を示す図である。n、核。バー、約4μm。

【図25-D】腫瘍増殖に関してHerDoxおよびDoxを比較した図である（N = 8～10腫瘍/処置）。第0日 = 尾静脈注射前3日（マウスは毎日、7日間注射を受けた）。対照（生理食塩水が注射された）マウスは、腫瘍潰瘍形成のために、IACUC方針を順守して早期に安楽死させた。

【図25-E】標的でない組織に対するHerDoxおよびDoxを比較した図である。第0日 = 尾静脈注射前3日（マウスは毎日、7日間注射を受けた）。対照（生理食塩水が注射された）マウスは、腫瘍潰瘍形成のために、IACUC方針を順守して早期に安楽死させた。図25-Eにおける顕微鏡写真（20×倍率）は処置マウス由来の、心筋の代表的なH&E染色標本および肝臓の免疫蛍光標本を示す。核中の緑色蛍光はアポトーシスを示す（陽性TUNEL染色）。上のグラフ、TUNEL染色の定量化；下のグラフ、注射後25日での心エコー測定。*、P < 0.05、生理食塩水との比較（モック）。

【図26-A】競合的阻害剤としての可溶性HER3ペプチドとの-/+プレインキュベ

10

20

30

40

50

ーション (HER3 ブロック) の、固定化 HER3 (ヒト ErbB3 細胞外ドメイン; Prospec) への HerPBK10 の結合の ELISA を示す図である。Un、HerPBK10 なし。

【図 26 - B】競合的阻害剤としての、1x および 10x モル比の可溶性 HER3 ペプチド、可溶性 HER4 ペプチド (ERBB4 ペプチド、Abnova)、ベータセルリン (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、またはペルツズマブ (Pz) との - / + プレインキュベーションの、HER2 + 細胞への HerPBK10 の結合の ELISA を示す図である。HER3 への HerPBK10 の結合は、患者血清により阻害されない。

【図 27 - A】耐性は HerDox 毒性を増強させることを示す図である。図 27 - A は、ELISA により、膜透過処理なしで検出される、親および Tz 耐性乳癌細胞株上の HER3 (および HER2) の相対表面レベルを示す。N = 3。*、 $p < 0.05$ 親と比較。

10

【図 27 - B】耐性は HerDox 毒性を増強させることを示す図である。図 27 - B は Tz、Pz、Tz + Pz、および Dox 単独と比較した、HerDox (処置後 48 ~ 72 時間) による腫瘍細胞死滅を示す。N = 3。

【図 27 - C】HER3 の標的毒性への寄与を示す図である。親および耐性細胞株を、HerDox - / + HER3 ブロッキングペプチド (ErbB3 ヒト; Prospec) により処置し、48 時間後の細胞生存に対して試験した。特定のには、HerDox は、HER3 ペプチドと、等モル比 HER3 : HerPBK10 で冷 PBS 中、1 時間の間吸着され、その後、細胞に 0.1 μM (JIMT-1、自然にトラスツズマブ処置に耐性)、0.125 μM (BT-474)、または 1 μM (SKBR3) の最終 HerDox 濃度で添加された。処置をモック (生理食塩水) 処置と比較した。N = 3。*、 $p < 0.05$ モックとの比較

20

【図 27 - D】ELISA により、膜透過処理なしで検出される、親および Tz 耐性乳癌細胞株上の HER3 (および HER2) の相対表面レベルを示す図である。N = 3。*、 $p < 0.05$ 親と比較。

【図 27 - E】Tz、Pz、Tz + Pz、および Dox 単独と比較した、HerDox (処置後 48 ~ 72 時間) による腫瘍細胞死滅を示す図である。N = 3。

【図 28】HerDox は、トラスツズマブ耐性腫瘍増殖をインビボで排除することを証明する。JIMT-1 腫瘍を有する雌ヌードマウスは、腫瘍が約 100 mm^3 に到達した時に、示された試薬を示された用量で静脈内 (尾静脈) 注射により投与された (週 2 回の注射を 4 週間)。腫瘍体積をノギスにより測定した。第 0 日は、処置の第 1 日に対応する。N = 10 腫瘍 / 処置。

30

【図 29 - A】トラスツズマブ前処置は、HerDox 毒性を増大させることを示す図である。図 29 - A は、Tz による HER3 の誘導された上昇および HerPBK10 による増強された結合を示す。親細胞株を 0.5 mg/mL Tz で 24 時間前処置し、その後、これらの細胞を表面 HER3 レベルに対して試験した。

【図 29 - B】トラスツズマブ前処置は、HerDox 毒性を増大させることを示す図である。図 29 - B は、Tz による HER3 の誘導された上昇および HerPBK10 による増強された結合を示す。親細胞株を 0.5 mg/mL Tz で 24 時間前処置し、その後、これらの細胞を HerPBK10 結合に対して試験した。

40

【図 29 - C】トラスツズマブ前処置は、HerDox 毒性を増大させることを示す図である。SKBR3 親細胞を示された濃度の Tz で (X 軸上部を参照されたい) HerDox 処置前 4 および 24 時間に処置し、処置後 48 ~ 72 時間に生存についてアッセイした。N = 3。

【図 29 - D】トラスツズマブ前処置は、HerDox 毒性を増大させることを示す図である。SK-474 親細胞を示された濃度の Tz で (X 軸上部を参照されたい) HerDox 処置前 4 および 24 時間に処置し、処置後 48 ~ 72 時間に生存についてアッセイした。N = 3。

【図 29 - E】トラスツズマブ前処置は、HerDox 毒性を増大させることを示す図で

50

ある。MDA - MB - 435 非耐性細胞を示された濃度の Tz で (X 軸上部を参照されたい) Her Dox 処置前 4 および 24 時間に処置し、処置後 48 ~ 72 時間に生存についてアッセイした。N = 3。

【図 29 - F】トラスツズマブ前処置は、Her Dox 毒性を増大させることを示す図である。Tz 耐性細胞を示された濃度の Tz で (X 軸上部を参照されたい) Her Dox 処置前 4 および 24 時間に処置し、処置後 48 ~ 72 時間に生存についてアッセイした。N = 3。

【図 29 - G】トラスツズマブ前処置は、Her Dox 毒性を増大させることを示す図である。Tz 耐性細胞を示された濃度の Tz で (X 軸上部を参照されたい) Her Dox 処置前 4 および 24 時間に処置し、処置後 48 ~ 72 時間に生存についてアッセイした。N = 3。

【図 29 - H】トラスツズマブ前処置は、Her Dox 毒性を増大させることを示す図である。Tz 耐性細胞を示された濃度の Tz で (X 軸上部を参照されたい) Her Dox 処置前 4 および 24 時間に処置し、処置後 48 ~ 72 時間に生存についてアッセイした。N = 3。

【図 30 - A】Her PBK 10 および Tz の体内分布および細胞内輸送の比較を示す図である。図 30 - A は標識された Her PBK 10、Tz、および BSA による体内分布のキセノゲンイメージングおよび蛍光定量化を示す。

【図 30 - B】Her PBK 10 (緑色) および Tz (緑色) による細胞表面結合後の異なる時間点での、MDA - MB - 435 細胞の蛍光共焦点顕微鏡写真を示す。グラフは、細胞表面 ELISA により定量され、細胞密度により正規化された、HER 2 (左バー) および HER 3 (右バー) の相対細胞表面レベルを示す。

【図 31 - A】ヒト原発腫瘍細胞への結合を示す図である。HER 2 + 患者の外科標本から取得した原発腫瘍細胞を、細胞表面受容体レベルについて調べた。

【図 31 - B】ヒト原発腫瘍細胞への結合を示す図である。HER 2 + 患者の外科標本から取得した原発腫瘍細胞を、Her PBK 10 結合について調べた。

【図 32 - A】ヒト (SEQ ID NO : 13) およびマウス HER 3 (SEQ ID NO : 14) のドメイン I - II (ヘレグリン - 結合ドメイン) のアミノ酸配列アライメントを示す図である。

【図 32 - B】ELISA (透過処理なし) により、ヒトおよびマウス HER 3 の両方と交差反応する抗 HER 3 抗体 (1B2E ; Cell Signaling Technologies) を使用して検出した、異なる細胞株上での相対 HER 3 レベルを比較する。

【図 32 - C】Her PBK 10 の 4T1 マウス乳房腫瘍細胞への結合を示す図である。N = 3。*、 $p < 0.05$ Her PBK 10 単独との比較。

【図 33 - A】メタル化された (S2Ga、S2MN)、およびメタル化されていない (S2FB) スルホン化コロールの化学構造、ならびに、それぞれ、Her FB、Her Ga、および Her Mn と指定される丸い粒子を形成する、Her PBK 10 との非共有結合性アセンブリの概略を示す図である。表は、3 つのコロールの際立った特徴の概要を示す。

【図 33 - B】Her Ga のクライオ EM 画像を示す。

【図 33 - C】溶液中の Her Mn の動的散乱測定を示す図である。挿入図は Her Mn 粒子の TEM を示す。

【図 34 - A】メタル化されたコロールではなく S2FB が SOD 1 を阻害することを示す図である。インビトロアッセイは XOD - / + SOD からのスーパーオキシド産生を測定する。S2FB (1 μ M) のみが SOD 活性に影響し、これを約 3 分の 1 だけ減少させる。

【図 34 - B】S2FB 吸光度ピークは SOD とのインキュベーションによりシフトする (矢印) ことを示す図である。

【図 34 - C】CuCl₂ は S2FB 蛍光を消光させることを示す図である。

10

20

30

40

50

【図35-A】ランダム変異誘発および変異ペントンベースライブラリのバイオパニングを要約するスキームを示す図である。

【図35-B】wt HerPBK10と整列させた、バイオパニングから単離した全長および切断型クローンの概略を示す図である。

【図35-C】N末端ヒスチジンタグに対する抗体を使用して検出された、細胞下画分の免疫プロット(20 µg/レーン)を示す図である。

【図35-D】示された組換えタンパク質の30分取込での、MDA-MB-435細胞の免疫蛍光を示す図である(10 µg/ウェル、12ウェル皿)。バー、約10 µm。

【図36-A】S2Gaは、TSPOと相互作用することを示す図である。図36-Aは、可溶性組換えTSPOタンパク質をS2Gaと、等モル濃度(1 µM)で約20分間室温でインキュベートし、続いて、限外濾過して、遊離、非結合S2Gaを除去したことを示す。残余分を、タンパク質結合コントロールの存在について、吸光度および蛍光スペクトルを測定することにより評価した。示されている場合、PK11195をTSPO上のポルフィリン結合部位に対する競合的阻害剤として使用した。

【図36-B】さらに、S2Gaは、TSPOと相互作用することを示す図である。図36-Bは、可溶性組換えTSPOタンパク質をS2Gaと等モル濃度(1 µM)で約20分間、室温にてインキュベートし、続いて、限外濾過して、遊離、非結合S2Gaを除去したことを示す。残余分を、タンパク質結合コントロールの存在について、吸光度および蛍光スペクトルを測定することにより評価した。示されている場合、PK11195を、TSPO上のポルフィリン結合部位に対する競合的阻害剤として使用した。

【図36-C】インサイチューでのTSPOとのHerGa相互作用の証拠を示す図である。MDA-MB-435細胞を、細胞をHerGaで処置する24時間前に、外因性TSPOを発現するプラスミドでトランスフェクトし、ミトコンドリアにおける赤色蛍光染料蓄積の低減および細胞質における緑色蛍光の蓄積により証明される、HerGa媒介ミトコンドリア破壊に対し調べた。

【図36-D】図36-Cにおいて見られる赤色蛍光の定量化を示す図である。*、 $p < 0.05$ 。

【図37】ヒトHER2+およびHER2-腫瘍細胞に対するHerMn毒性を示す図である。各細胞株は示された濃度のHerMnまたはS2Mnが投与され、クリスタルバイオレット(CV)染色により、24時間後の生存について評価された。N=3/濃度、3つの別の実験から。

【図38-A】HerMn細胞毒性のメカニズムを示す図である。共焦点蛍光画像は、HerMnのMDA-MB-435細胞に対する効果を示す。スケールバー=10 µm。図38-Aは、10 µM S2MnまたはHerMn、続いて、24時間後にTMRM(30 nM)を含むHBSSを投与された細胞におけるミトコンドリア膜電位の低減を示す。対照、PBS処置。

【図38-B】HerMn細胞毒性のメカニズムを示す図である。共焦点蛍光画像はHerMnのMDA-MB-435細胞に対する効果を示す。スケールバー=10 µm。図38-Bは、細胞上での24時間インキュベーション後、HerMn(5 µM)によるアクチン(赤色)およびチューブリン(緑色)のスーパーオキシド媒介崩壊を示す。S2Mn(5 µM)、HerPBK10(HerMnと等しいタンパク質濃度)およびPBSは、対照として機能した。追加の細胞はHerMn処置前1時間の間タイロン(5 mM)を投与された。

【図39】腫瘍を有するマウスにおける体内分布を示す図である。尾静脈注射後の、Alexa680標識HerMn、TzおよびBSA(各々12 nmol)のキセノゲンイメージングおよび定量化。グラフ、平均蛍光-/+SEM。

【図40-A】HerMnの治療効果を示す図である。図40-Aは、毎日、HerMnまたはS2Mn(5 nmol/注射)の静脈内注射(尾静脈を介する)を、1回/日、6連続日の間投与された雌ヌードマウスにおける、HER2+MDA-MB-435腫瘍増殖を示す。対照群は生理食塩水またはHerPBK10をHerMnと等しい濃

10

20

30

40

50

度で投与された。処置は、約 200 mm^3 平均腫瘍体積で開始された。腫瘍体積を試薬の注射前（第1日）、中（第3日）、および後（8、15、および22日）に測定した。N = 8 ~ 10 腫瘍 / 群。* $p < 0.05$ （一元配置ANOVA）。

【図40-B】HerMn、S2Mn、HerPBK10、またはドキシソルピシン（Dox）への48時間曝露後のヒトCDC生存率を示す図である。N = 3 / 濃度、3つの別の実験から。

【図41-A】HerMnはMRIコントラストを増強することを示す図である。図41-Aは溶液中でのT1緩和短縮を示す。

【図41-B】HerMnはインビボでMRIコントラストを増強することを示す図である。画像（左）は、HerMnまたはS2Mn（ $8 \text{ nmol} / \text{注射}$ ）の全身（IV）注射を8日間毎日受け、シグナルの蓄積を可能にした後、またはイメージング10分前の $0.1 \text{ mmol} / \text{kg}$ ガドリニウムの1回注射後の、腫瘍を有するマウスの断面を示す。腫瘍は囲み領域により描出され、拡大される（右）。

【図42-A】ELISAにより、膜透過処理なしで検出される、親およびTz耐性乳癌細胞株上のHER3およびHER2の相対表面レベルを示す図である。N = 3。*、 $p < 0.05$ 親と比較。

【図42-B】ELISAにより、膜透過処理なしで検出される、JIMT-1乳癌細胞株上のHER3およびHER2の相対表面レベルを示す図である。N = 3。*、 $p < 0.05$ 親と比較。

【図42-C】TzによるHER3の誘導された上昇およびHerPBK10による増強された結合を示す。親細胞株を $0.5 \text{ mg} / \text{mL}$ Tzで24時間前処置し、その後、細胞表面HER3レベルを測定した。

【図42-D】TzによるHER3の誘導された上昇およびHerPBK10による増強された結合を示す。親細胞株を $0.5 \text{ mg} / \text{mL}$ Tzで24時間前処置し、その後、これらの細胞をHerPBK10の結合に対して試験した。

【図42-E】HER2 + 患者の外科標本から取得した原発腫瘍細胞上の細胞表面受容体レベルを示す図である。

【図42-F】HER2 + 患者の外科標本から取得した原発腫瘍細胞上でのHerPBK10の結合を示す図である。

【図43】HerGaなどのコロールナノ生物学的粒子は、Tz耐性腫瘍細胞に対し、インビトロおよびインビボで増強された毒性を示すことを示す図である。

【図43-A】ELISAにより、膜透過処理なしで検出される、親およびトラスツマブ耐性乳癌細胞株上でのHER3の相対表面レベルを示す図である。N = 3。*、 $p < 0.05$ 親と比較。

【図43-B】Tzと比較した、HerGaによる腫瘍細胞死滅（処置後48 ~ 72時間まで）を示す図である。N = 3。

【図43-C】Tz + Pz併用治療と比較した、HerGaによる腫瘍細胞死滅（処置後48 ~ 72時間まで）を示す図である。N = 3。

【図43-D】インビボでの腫瘍増殖の消失を示す図である。BT474腫瘍を有する雌ヌードマウスは、腫瘍が約 100 mm^3 に到達した時に、示された試薬を示された用量で、静脈内注射（尾静脈）により投与された（週2回注射を4 ~ 6週間）。腫瘍体積をノギスにより測定した。第0日は、処置の第1日に対応する。N = 10 腫瘍 / 処置。

【図43-E】インビボでの腫瘍増殖の消失を示す図である。BT474腫瘍を有する雌ヌードマウスは、腫瘍が約 100 mm^3 に到達した時に、示された試薬を示された用量で、静脈内注射（尾静脈）により投与された（週2回注射を4 ~ 6週間）。腫瘍体積をノギスにより測定した。第0日は、処置の第1日に対応する。N = 10 腫瘍 / 処置。

【発明を実施するための形態】

【0010】

治療方法

1つの態様では、患者において癌を治療する方法が本明細書で開示され、方法は下記を

10

20

30

40

50

含む：

抗HER2療法による治療に耐性がある患者を同定すること；ならびに患者に治療的有効量の、ある型の細胞を標的にするように、かつ/またはこれに浸透するように適合されたポリペプチド分子；ポリペプチド配列に、静電相互作用により結合された核酸分子；ならびに核酸配列に非共有結合により連結された化学物質を含む、薬物送達分子を投与すること。

【0011】

本明細書で開示される方法において使用される薬物送達分子は、どこかで記載される。例えば、国際公開WO2009/009441号および米国特許出願公開US2010/0331273A1号は、詳細に、薬物送達分子の成分およびこれを調製する方法を記載する。これらの刊行物の両方の内容は、参照により、図面を含むその全体が本明細書に組み込まれる。特定的には、公開US2010/0331273A1号の段落[0055]～[0094]、図面およびそれらの説明、および配列表は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0012】

「治療的有効量」は、本明細書では、癌を有する患者において有益な結果を達成することができるその量を示す。治療的有効量は個々に決定することができ、少なくとも一部は、哺乳類の生理的特性、使用される送達系または治療技術の型および疾患の進行に対する投与時間の考慮に基づくであろう。下記の時に、有益な結果が得られる：1) 癌性腫瘍のサイズが縮む；2) 癌性腫瘍が増殖を中止する；または3) 癌性腫瘍の増殖速度が療法の投与前の期間と比べて減速される。

20

【0013】

いくつかの実施形態では、抗HER2療法は抗体療法を含む。これらの実施形態では、HER2に対して有効な抗体が患者に投与される。これらの抗体の例としては、トラスツズマブおよびペルツズマブ、またはそれらのバイオ後続品が挙げられる。他の実施形態では、抗HER2療法は小分子療法を含む。これらの実施形態では、小有機分子、すなわち、ポリペプチド、核酸、またはポリマーでない化合物（その化合物はHER2に対して有効である）が患者に投与される。小分子治療薬の一例はラパチニブである。

30

【0014】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子はターゲティングリガンドを含む。特定の実施形態では、ポリペプチド分子は、正電荷を持つドメインを含む。他の実施形態では、ポリペプチドは組換え融合タンパク質である。これらの実施形態のいくつかでは、組換え融合タンパク質は、Herセグメントを含む。特定の実施形態では、組換え融合タンパク質は、ペントンベースセグメントを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子は、受容体結合ドメインを含み、それは、いくつかの実施形態では、ヘレグリンである。特定の実施形態では、ポリペプチド分子は、エンドソーム溶解性ドメインを含む。これらの実施形態のいくつかでは、エンドソーム溶解性ドメインは、Arg-Gly-Aspモチーフを含み、一方、他の実施形態では、エンドソーム溶解性ドメインはGlu-Gly-Aspモチーフを含む。特定の実施形態では、ポリペプチド分子は、ポリリジンモチーフを含み、これは、いくつかの実施形態では、デカリジン(K10)である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、またはそれらの組み合わせである。特定の実施形態では、ポリペプチド配列はHerPBK10である。

40

【0015】

本明細書では、「PB」は、感染の初期段階中のアデノウイルス血清型5の細胞結合、侵入、およびサイトゾル浸透を正常に媒介するペントンベースセグメントを示す。ペントンベースタンパク質の一例は本明細書では、SEQ ID NO: 10として提供される。このペントンベースタンパク質は普通、RGDモチーフ(Arg-Gly-Asp)を

50

有する。本明細書では、「K10」は、デカリジンモチーフを示し、これは、求電子性相互作用により核酸に結合する能力を有し、本明細書では、SEQ ID NO: 11として提供される。HerPBK10をコードするヌクレオチド配列の一例は本明細書では、SEQ ID NO: 4として提供され、その相補鎖はSEQ ID NO: 5である。同様にRGDモチーフの点変異は、EGDモチーフ(Glu-Gly-Asp)を作製するのに使用することができ、HerPBr g d K10ポリペプチド分子(HerPBK10ではなく)が得られる。

【0016】

いくつかの実施形態では、核酸分子は二本鎖オリゴヌクレオチドである。これらの実施形態のいくつかでは、二本鎖オリゴヌクレオチドは組換え融合タンパク質に静電相互作用により結合される。

10

【0017】

いくつかの実施形態では、化学物質は毒素である。いくつかの実施形態では、化学物質は化学療法薬であり、これは、特定の実施形態ではドキソルビシン、またはその薬学的等価物である。特定の実施形態では、化学物質は核酸分子とインターカレートされる。本明細書では、「インターカレーティング」は、既存の構造、例えばポリヌクレオチド配列中に挿入する能力を示す。

【0018】

「化学療法薬」は、本明細書では、癌細胞または腫瘍を破壊し、死滅させ、またはその増殖を妨害する、かつ/または別様に、それに対して有害効果を有する能力を有する作用物質を示す。これらとしては、下記が挙げられるが、それらに決して限定されない：アルキル化剤（例えば、ブスルファン、シスプラチン、カルボプラチン、クロランブシル、シクロホスファミド、イホスファミド、ダカルバジン、メクロレタミン、メルファラン、およびテモゾロミド）、ニトロソウレア（例えば、ストレプトゾシン、カルムスチン、およびロムスチン）、アントラサイクリンおよび関連薬物（例えば、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、およびミトキサントロン）、トポイソメラーゼIおよびII阻害剤（例えば、トポテカン、イリノテカン、エトポシドおよびテニポシド）、および有糸分裂阻害剤（例えば、タキサン、例えばパクリタキセルおよびドセタキセル、およびビンカアルカロイド、例えばビンブラスチン、ピンクリスチン、およびビノレルビン）。他の化学療法薬は当業者により理解され、ルーチン作業の行使により、本明細書で開示される他の実施形態と組み合わせて使用することができる。

20

30

【0019】

いくつかの実施形態では、細胞の型は抗HER2療法耐性HER2+乳癌細胞である。通常、HER2+乳癌細胞は、例えば、抗HER2抗体、例えばトラスツズマブまたはペルツズマブによる、または小分子、例えばラパチニブによる療法に应答する。療法に「应答する」ということにより、抗体をインビボで全身的に癌患者に投与することにより、あるいは細胞をインビトロで抗体と接触させることにより、抗体が癌細胞に投与されるとすぐに、試料中のまたは患者における細胞の数のいずれかが、例えば誘導されたアポトーシスにより減少する、または試料中のまたは患者における細胞の増殖が減速または停止されることが意味される。患者において、これは、抗体の投与の前の期間と比べた場合の、癌性腫瘍の縮み、腫瘍の増殖の欠如、または腫瘍の増殖の減速として観察される。「抗HER2療法耐性HER2+乳癌細胞」は抗体または小分子による治療に应答しないそれらの細胞である。これらの細胞は治療薬が投与された後であっても増殖し続ける。いくつかの細胞はもともと治療に耐性がある。これらの細胞は、治療に決して应答しない。他の細胞は治療に対する耐性を獲得する。細胞は最初、治療に应答するが、一定期間後应答するのを止める。このように、患者は治療に不応性となる。

40

【0020】

いくつかの実施形態では、HER2+乳癌細胞は、非療法耐性HER2+乳癌細胞上の表面HER3レベルよりも高い表面HER3レベルを有する。「非療法耐性HER2+乳癌細胞」により、治療薬、例えば抗HER2抗体または小分子による治療に应答し、不応

50

性となっていないHER2+癌細胞が意味される。他の実施形態では、耐性乳癌細胞は、非療法耐性HER2+乳癌細胞上で見られるのと同じレベルの表面HER3発現を示す。特定の実施形態では、抗HER2抗体はトラスツズマブまたはベルツズマブである。いくつかの実施形態では、HER2+乳癌細胞は、抗HER2療法にもともと耐性であるが、一方、他の実施形態ではHER2+乳癌細胞は抗HER2療法に対する耐性を獲得している。

【0021】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法はさらに、抗HER2治療薬を薬物送達分子と共に共投与する工程を含む。これらの実施形態のいくつかでは、治療薬および薬物送達分子は同時に投与される。実施形態のいくつかでは、治療薬および薬物送達分子の両方は同じ投与可能な剤形中に存在する。他の実施形態では、治療薬および薬物送達分子は異なる時間に投与される。いくつかの実施形態では、患者は治療薬治療を受けていない。他の実施形態では、患者は治療薬による治療をしばらくの間受けてきており、その後、薬物送達分子治療が治療レジメンに加えらる。

10

【0022】

いくつかの実施形態では、患者はマウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、雌ウシ、サル、チンパンジー、類人猿、およびヒトからなる群より選択される哺乳類である。特定の実施形態では、患者はヒトである。

【0023】

別の態様では、抗HER2療法耐性HER2+乳癌細胞においてアポトーシスを誘導する方法が本明細書で開示され、方法は下記を含む：

20

抗HER2療法耐性HER2+乳癌細胞を、

ある型の細胞を標的にように、かつ/またはこれに浸透するように適合されたポリペプチド分子；

ポリペプチド配列に、静電相互作用により結合された核酸分子；ならびに

核酸配列に非共有結合により連結された化学物質

を含む、薬物送達分子と接触させること。

【0024】

この態様の実施形態では、薬物送達分子は、以上および本明細書の別の箇所で記載される通りである。

30

【0025】

いくつかの実施形態では、接触はインビトロである。例えば、これらの実施形態では、細胞は研究室で増殖され、接触は、研究室実験の一部として起こる。

【0026】

いくつかの実施形態では、接触はインビボである。これらの実施形態では、薬物送達分子、またはそのプロドラッグは患者に投与される。プロドラッグが投与される場合、そうすると、プロドラッグが薬物送達分子に変換され、接触が患者の体内で起こる。

【0027】

いくつかの実施形態では、抗HER2療法耐性HER2+乳癌細胞は哺乳類細胞であり、その哺乳類は任意で、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、雌ウシ、サル、チンパンジー、類人猿、およびヒトからなる群より選択される。

40

【0028】

第3の態様では、患者において癌を治療する方法が本明細書に記載され、方法は下記を含む：

抗HER2療法に耐性がある患者を同定すること；ならびに

患者に治療的有效量の、

ある型の細胞を標的にように、かつ/またはこれに浸透するように適合されたポリペプチド分子；ならびに

ポリペプチド配列に結合されたスルホン化コロール分子

を含む、薬物送達分子を投与すること。

50

【 0 0 2 9 】

この態様のいくつかの実施形態では、スルホン化コロール分子は、限定はされないが、マンガン (M n)、鉄 (F e)、および/またはガリウム (G a) などの金属を含む。いくつかの実施形態では、薬物送達分子は H e r M n、H e r F e、または H e r G a である。1つの実施形態では、抗 H E R 2 療法は抗体療法を含む。これらの実施形態のいくつかでは、抗体はトラスツズマブまたはペルツズマブである。別の実施形態では、抗 H E R 2 療法は小分子療法を含む。これらの実施形態のいくつかでは、小分子はラパチニブである。

【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子は、ターゲティングリガンドを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子は、正電荷を持つドメインを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは組換え融合タンパク質である。これらの実施形態のいくつかでは、組換え融合タンパク質は、H e r セグメントを含む。他の実施形態では、組換え融合タンパク質は、ペントンベースセグメントを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子は、受容体結合ドメインを含む。これらの実施形態のいくつかでは、受容体結合ドメインはヘレグリン - である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子は、エンドソーム溶解性ドメインを含む。これらの実施形態のいくつかでは、エンドソーム溶解性ドメインは、A r g - G l y - A s p モチーフを含む。他の実施形態では、エンドソーム溶解性ドメインは、G l u - G l y - A s p モチーフを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子は、ポリリジンモチーフを含む。これらの実施形態のいくつかでは、ポリリジンモチーフはデカリジンである。

【 0 0 3 1 】

1つの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は S E Q I D N O : 6、S E Q I D N O : 7、S E Q I D N O : 8、S E Q I D N O : 9、またはそれらの組み合わせである。1つの実施形態では、ポリペプチド配列は H e r P B K 1 0 である。H e r P B K 1 0 をコードするヌクレオチド配列の一例は本明細書では、S E Q I D N O : 4 として提供され、その相補鎖は S E Q I D N O : 5 である。

【 0 0 3 2 】

1つの実施形態では、細胞の型は、抗 H E R 2 療法耐性 H E R 2 + 乳癌細胞である。これらの実施形態のいくつかでは、H E R 2 + 乳癌細胞は、療法に应答する H E R 2 + 乳癌細胞上の表面 H E R 3 レベルより高い表面 H E R 3 レベルを有する。いくつかの実施形態では、H E R 2 + 乳癌細胞は、抗 H E R 2 療法にもともと耐性がある。他の実施形態では、H E R 2 + 乳癌細胞は抗 H E R 2 療法に対する耐性を獲得している。

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態では、患者は、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、雌ウシ、サル、チンパンジー、類人猿、およびヒトからなる群より選択される哺乳類である。

【 0 0 3 4 】

第4の態様では、抗 H E R 2 療法耐性 H E R 2 + 乳癌細胞においてアポトーシスを誘導する方法が本明細書に記載され、方法は下記を含む：

抗 H E R 2 療法耐性 H E R 2 + 乳癌細胞を、

ある型の細胞を標的にするように、かつ/またはこれに浸透するように適合されたポリペプチド分子；ならびに

ポリペプチド配列に結合されたスルホン化コロール分子を含む、薬物送達分子と接触させること。

【 0 0 3 5 】

この態様のいくつかの実施形態では、スルホン化コロール分子は、限定はされないが、マンガン (M n)、鉄 (F e)、および/またはガリウム (G a) などの金属を含む。いくつかの実施形態では、薬物送達分子は H e r M n、H e r F e、または H e r G a である。1つの実施形態では、抗 H E R 2 療法は抗体療法を含む。これらの実施形態のいくつ

10

20

30

40

50

かでは、抗体はトラスツズマブまたはペルツズマブである。別の実施形態では、抗HER2療法は小分子療法を含む。これらの実施形態のいくつかでは、小分子はラパチニブである。

【0036】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子は、ターゲティングリガンドを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子は、正電荷を持つドメインを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは組換え融合タンパク質である。これらの実施形態のいくつかでは、組換え融合タンパク質は、Herセグメントを含む。他の実施形態では、組換え融合タンパク質は、ペントンベースセグメントを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子は、受容体結合ドメインを含む。これらの実施形態のいくつかでは、受容体結合ドメインはヘレグリンである。いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子は、エンドソーム溶解性ドメインを含む。これらの実施形態のいくつかでは、エンドソーム溶解性ドメインは、Arg-Gly-Aspモチーフを含む。他の実施形態では、エンドソーム溶解性ドメインは、Glu-Gly-Aspモチーフを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子は、ポリリジンモチーフを含む。これらの実施形態のいくつかでは、ポリリジンモチーフはデカリジンである。

10

【0037】

1つの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、またはそれらの組み合わせである。1つの実施形態では、ポリペプチド配列はHerPBK10である。HerPBK10をコードするヌクレオチド配列の一例は本明細書では、SEQ ID NO: 4として提供され、その相補鎖はSEQ ID NO: 5である。

20

【0038】

1つの実施形態では、細胞の型は、抗HER2療法耐性HER2+乳癌細胞である。これらの実施形態のいくつかでは、HER2+乳癌細胞は、療法に応答するHER2+乳癌細胞上の表面HER3レベルより高い表面HER3レベルを有する。いくつかの実施形態では、HER2+乳癌細胞は、抗HER2療法にもともと耐性がある。他の実施形態では、HER2+乳癌細胞は抗HER2療法に対する耐性を獲得している。

【0039】

いくつかの実施形態では、患者は、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、雌ウシ、サル、チンパンジー、類人猿、およびヒトからなる群より選択される哺乳類である。

30

【0040】

いくつかの実施形態では、抗HER2療法耐性HER2+乳癌細胞を薬物送達分子と接触させることはインビトロである。他の実施形態では、接触はインビボである。

【0041】

いくつかの実施形態では、抗HER2療法耐性HER2+乳癌細胞は哺乳類細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳類は、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、雌ウシ、サル、チンパンジー、類人猿、およびヒトからなる群より選択される。

40

【0042】

薬物送達分子

化学物質を細胞にターゲティングさせるための自己組織化複合体を含む送達系が本明細書で開示される。送達系は、インビトロおよびインビボで罹患細胞を標的にすることができ、心臓組織を回避し(そうすることが望ましい場合)、標的細胞に結合し、それ中に浸透する。さらに、複合体は、非共有結合により(すなわち、例えば、化学療法薬の標的担体への化学的結合が必要ない)組織化され、これは小さな核酸担体を架橋として使用し、薬物を標的タンパク質担体ビヒクルと共に組織化する。

【0043】

任意の数のポリヌクレオチド配列または小さな二本鎖核酸が、本明細書に記載される様

50

々な実施形態により使用され得る。例えば、1つの実施形態では、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、またはそれらの組み合わせがポリヌクレオチド配列または二本鎖核酸として使用される。

【0044】

任意の数のターゲティングリガンドが本明細書に記載される様々な実施形態により使用され得る。例えば、v 3などのインテグリンを標的にする場合、PB自体がPBK10のターゲティングリガンドとして作用し得る。当業者により知られているように、インテグリンは、様々な型の転移性腫瘍において過度に発現される。そのため、本明細書に記載される様々な実施形態と併用して、PBK10は、転移性腫瘍およびインテグリンを高発現する細胞を標的にするために使用され得る。

10

【0045】

開示される送達系は、哺乳類に、様々な投与経路により投与することができる複合体を含み、すぐに、これは標的細胞（例えば、癌細胞）に焦点を合わせ、造影剤または治療薬などの分子を細胞中に送達する。1つの実施形態では、複合体は、正常で、健康な細胞を温存しながら、治療薬の癌細胞への送達を提供する。

【0046】

図1に示されるように、開示された送達系の一実施形態は、自己組織化して1つの標的コンジュゲートとなる3つの成分を含む。第1の成分（「ユニットA」）は特定の型の細胞（複数可）を標的にし、浸透する、特有の細胞透過性タンパク質である。それは、リガンド（受容体結合ドメイン）、膜透過ドメイン、およびDNA結合ドメインを含む。第2の成分（「ユニットB」）はユニットAに静電相互作用により結合する小さな核酸（例えば、二本鎖オリゴヌクレオチド）である。第3の成分（「ユニットC」）はユニットBにインターカレーション相互作用により結合する化学物質である。1つの実施形態では、化学物質は毒性分子である。1つの実施形態では、細胞の型は癌細胞であり、化学物質は化学療法薬である。別の実施形態では、細胞の型はHER2+乳癌細胞であり、化学物質はDox、またはその薬学的等価物である。

20

【0047】

1つの実施形態では、HerPBK10はインターカレートされたドキソルピシン（Dox）を含む小さな30塩基対二本鎖核酸（ds-オリゴ）と混合される。いくつかの実施形態では、これにより、クライオEMにより観察されるように、10~50nm直径の丸い粒子の非共有結合性アセンブリが得られ（図24B）、これは限外濾過中Doxを保持し、HPLC（図24C）、異なる温度で長期貯蔵され、血清（図24D）および血液（図24E）中での薬物放出に抵抗する。これらの実施形態のいくつかでは、ds-オリゴの配列は、Doxローディングに何の関係もなく、より長いds-オリゴ、例えば48bp断片は必ずしも改善されたローディング能力を示さない。いくつかの実施形態では、1つの30bpオリゴは50分子までのドキソルピシンに結合することができる。1つの実施形態では、タンパク質、DNA、およびDoxを含む組織化されたナノ粒子は、10分子までのタンパク質複合体HerPBK10に結合する。別の実施形態では、組織化された粒子のUV/Vis分光法により、各ds-オリゴ断片は約5、6、7、8またはそれ以上の分子のHerPBK10および約10~40分子のDoxに結合することが証明された。これは、DNAを中和し、それをインターカレートされたDoxで飽和するのに必要とされる、予想されるモル比に一致している。

30

40

【0048】

いくつかの実施形態では、HerDoxはHER2+細胞に対し、インビトロおよびインビボで、受容体依存性ターゲティングを示す。それらの実施形態の1つでは、図25-Aで示されるように、HerDox粒子は、別々（図25-A）および混合細胞培養（図9）の両方において、HER2-細胞ではなく、HER2+に対し選択的に毒性を示す。別の実施形態では、HerDox粒子は、HER2-細胞、例えばHER3を過剰発現する三種陰性乳癌（TNBC）細胞に対して毒性である。細胞毒性は、受容体-ブロックにより阻害される。図25-Bは、HerDoxが、インビボでのより低い受容体レベ

50

ルと比較して、より高い受容体レベルで、腫瘍細胞に対し、選択的な体内分布を示すことを示す。図25-Cに示される1つの実施形態では、腫瘍ターゲティングおよび細胞内輸送研究により、Doxは、細胞侵入後までHerDox粒子からの放出を示さず、その時点で、Doxは、核中に迅速に蓄積し、一方、HerPBK10は核周辺に残ったままであることが示される。図25-Dおよび25-Eは、インビボでの全身送達は、非常に低い薬理的用量(0.004mg/kgのDox)で、HER2+腫瘍細胞死を誘発し、一方、肝臓および心臓毒性を回避することを示す。これは非標的Doxと対照的であり、それは、同様の腫瘍毒性を誘発するのにより高い用量を必要とし、一方、肝臓組織および心筋ダメージを引き起こす。

【0049】

1つの実施形態では、HER2阻害への耐性により腫瘍はHerDox攻撃を受けやすくなる。それにもかかわらず、耐性は、HerDox効力のための必須条件ではなく、HerDoxはトラスツズマブ感応性および耐性腫瘍細胞の両方に有効であり、両方、とりわけ耐性細胞に対しシグナル阻害を超える利点を有する。

【0050】

様々な実施形態では、開示された送達系は医薬組成物中に組み入れられ、それは任意の投与経路を介する送達のために製剤化され得る。「投与経路」は当技術分野で知られている任意の投与経路を示すことができ、限定はされないが、エアロゾル、経鼻、経口、経粘膜的、経皮または非経口が挙げられる。「非経口」は、一般に、眼窩内、注入、動脈内、関節内、心臓内、皮内、筋肉内、腹腔内、肺内、脊髄内、胸骨内、くも膜下腔内、子宮内、静脈内、くも膜下、嚢下、皮下、経粘膜的、または経気管を含む注射と関連する投与経路を示す。非経口経路を介して、組成物は、注入または注射のための溶液または懸濁液の形態、または凍結乾燥粉末の形態とすることができる。

【0051】

いくつかの実施形態では、医薬組成物はまた、任意の薬学的に許容される担体を含む。「薬学的に許容される担体」は、本明細書では、対象となる化合物を1つの組織、器官、または身体の一部から別の組織、器官、または身体の一部に運搬または輸送することに関与する薬学的に許容される材料、組成物、またはビヒクルを示す。例えば、担体は、液体または固体フィラー、希釈剤、賦形剤、溶媒、またはカプセル化材料、またはそれらの組み合わせであってもよい。担体の各成分は、製剤の他の材料成分と適合可能でなければならないという点で、「薬学的に許容され」なければならない。それはまた、これと接触し得る任意の組織または器官との接触において使用するのに好適でなければならない、毒性、刺激作用、アレルギー応答、免疫原性、またはその治療効果を過度に上回る任意の他の合併症のリスクを伴ってはならないことが意味される。

【0052】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、経口投与のために、カプセル化され、錠剤化されあるいはエマルジョンまたはシロップで調製される。

【0053】

薬学的に許容される固体または液体担体は組成物を増強または安定化するために、または組成物の調製を促進するために添加され得る。液体担体としては、シロップ、ピーナッツ油、オリーブ油、グリセリン、生理食塩水、アルコールおよび水が挙げられる。固体担体としては、デンプン、ラクトース、硫酸カルシウム、二水和物、白土、ステアリン酸マグネシウムまたはステアリン酸、タルク、ベクチン、アラビアゴム、寒天またはゼラチンが挙げられる。担体はまた、徐放材料、例えばモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルを、単独またはワックスと共に含み得る。

【0054】

医薬調製物は、必要とあれば、錠剤形態に対してはミリング、混合、顆粒化、および圧縮；あるいはハードゼラチンカプセル形態を生成するためにはミリング、混合および充填を含む、薬学の従来技術に従い、調製される。液体担体が使用される場合、調製物は、シロップ、エリキシル剤、エマルジョンまたは水性または非水性懸濁液の形態とされるであ

10

20

30

40

50

ろう。そのような液体製剤は直接 p . o . で投与され得、またはソフトゼラチンカプセルに充填され得る。

【 0 0 5 5 】

本明細書で開示される医薬組成物は、治療的有効量で送達され得る。正確な治療的有効量は、ある被験体において、治療の効力の観点から最も有効な結果を得る組成物のその量である。この量は、様々な因子、例えば、限定はされないが、治療化合物の特性（活性、薬物動態、薬力学、およびバイオアベイラビリティを含む）、被験体の生理的条件（年齢、性別、疾患型および段階、全身的な身体状態、ある投与量に対する応答性、および薬物療法の型を含む）、製剤中の薬学的に許容される1つのまたは複数の担体の性質、ならびに投与経路によって変動するであろう。臨床および薬理学分野における当業者であれば、ルーチン実験により、例えば、化合物の投与に対する被験体の応答をモニターし、それにしたがって、投与量を調節することにより、治療的有効量を決定することができるであろう。さらなるガイダンスのために、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed. 20th edition, Williams & Wilkins PA, USA) (2000)を参照されたい。

10

【 0 0 5 6 】

開示された送達系、より特定的には、それにより送達される治療薬（例えば、化学療法薬）、特にDox、および/または造影剤の典型的な投与量は、公知の治療化合物または造影剤が使用される場合は製造者に推奨される範囲にあり、インビトロ応答または動物モデルにおける応答により当業者に示される通りである。実際の投与量は、医師の判断、患者の状態、および治療方法の有効性に依存するであろう。

20

【 0 0 5 7 】

治療に必要な哺乳類への、治療的有効量の、疾患を治療するのに適切な治療薬を含む開示された送達系の投与による疾患を治療する方法もまた開示される。1つの実施形態では、疾患は、癌であり、治療薬は化学療法薬である。別の実施形態では、疾患は乳癌および/またはHER2+乳癌であり、治療薬はDoxである。

【 0 0 5 8 】

薬物の送達

1つの実施形態では、本明細書で開示される薬物送達分子は、既存の化合物の腫瘍部位への送達を促進する。これらの実施形態のいくつかでは、本明細書で開示される薬物送達分子は、治療効果を示すことが知られている化合物の送達を改善するために使用される。いくつかの実施形態では、化合物は、疾患の治療のために、米国食品医薬品局（FDA）により認可されている。ある特定の実施形態では、FDAに認可された薬物は、適応外使用のために使用される。1つの実施形態では、薬物はドキシソルピシンである。いくつかの実施形態では、HerDox複合体内部での薬物の安定な捕捉は、薬物送達分子中の薬物の効力および安全性に寄与する。このアプローチは、拡散による漏れとなる傾向がある、薬物をカプセル中にローディングすること、または、その活性および効力に影響する傾向がある共有結合性コンジュゲーションにより薬物を化学的に修飾することよりも有利である。

30

40

【 0 0 5 9 】

HER2阻害剤との比較

HER2およびEGFR阻害に対する耐性と関連するHER3上昇は、HER3を介するシグナル伝達を抑制するための抗HER3抗体の開発に拍車を掛けた。HerDoxは、そのような阻害剤を超えるいくつかの利点を有する。1つの実施形態では、HerPBK10はその治療活性に対するシグナル減衰に依存しないが、代わりにHER3を、腫瘍細胞中に迅速に取り込ませる門として使用し、毒性分子の送達により、中から細胞を死滅させる。いくつかの実施形態では、HerPBK10とは異なり、抗体は取込を誘発しない。代わりに、抗体は受動的に、徐々に、および低レベルでインターナライズする。

【 0 0 6 0 】

50

1つの例として、HerDoxと、臨床使用のために最近承認されたトラスツズマブ-コンジュゲートエムタンシン(T-DM1)の間には重要な差がある。第1に、T-DM1はHER2を標的にし、よってHER2阻害耐性腫瘍に向かわない。第2に、T-DM1は有糸分裂阻害剤、エムタンシンの送達のためにインターナリゼーションを受けることを意図し、一方、それ自体の上のHER2は、取り込まず、代わりに、受容体ターンオーバーまたはHER3結合リガンドによる共取込による受動的細胞侵入に依存する。そのため、トラスツズマブ(Tz)コンジュゲートの取込は遅く(時間のオーダー)、HER-リガンド結合により誘発される強い侵入と対照的に比較的低い。この結果は、図30に示され、これは、HerPBK10取込をTz取込と比較する。第3に、T-DM1への耐性はHER3および薬剤排出トランスポーターの誘導により媒介される。他方、Doxは、細胞取込および核への輸送後まで、HerDox粒子内で保護されたままであり、そこで、薬物は核蓄積のために放出される。この粒子輸送は薬剤排出トランスポーターを逃れる。

10

【0061】

HerDoxと他の抗体の間の作用機序間のこれらの差は、治療効果のために必要とされる投与量に影響を与える。1つの例として、発明者らは、約0.004mg/kgのHerDoxは、マウスにおける心臓および肝臓などの正常組織を温存しながら、腫瘍増殖を標的にし、消失させるのに十分であることを示した。これはT-DM1で必要とされる治療量(約3.6mg/kg)、ならびに患者(約1~5mg/kg)およびマウス(0.04mg/kg超)における非標的Doxとは対照的であり、これは標的でない組織に対してよく知られた有害作用を誘発する。

20

【0062】

1つの実施形態では、本明細書で記載される癌を治療する方法は三種陰性乳癌(TNBC)の治療において使用される。TNBCはもともとHER2耐性である。これらの腫瘍上のエストロゲン、プロゲステロン、およびHER2受容体の欠如は、使用することができる標的療法の型を制限する。最近の研究により、TNBCはHER3を発現することが示されている。EGF-R阻害剤がこれらの腫瘍のために探索されてきたが、そのような阻害剤への耐性もまた、上昇したHER3により促進される。本明細書で記載される癌を治療する方法はそのような生得的なHER2耐性腫瘍に適用可能である。同様に本明細書で記載される方法はまた、乳房、胃、結腸、肺、および卵巣における腫瘍に適用可能であり、ここで、HER3上方制御はEGFR、HER2、およびPI3Kキナーゼ阻害剤に応じて同定される。

30

【0063】

HERDOX作用機序

いくつかの実施形態では、HER2阻害剤に対する獲得耐性を有するHER2+腫瘍は、下記のためにHerDoxに感受性がある：(i)HER3媒介ターゲティング、(ii)粒子エンドサイトーシスおよびエンドソーム溶解による受容体隔絶および下方制御、および/または(iii)ペイロード保護および薬剤排出の回避を可能にするエンドソームおよび粒子輸送。

【0064】

これらの実施形態のいくつかでは、HerDoxにより誘導されるHER3クラスター化、エンドサイトーシス、およびエンドソーム溶解はHER3をHER2活性化から隔絶し、シグナル伝達エンドソームを鈍らせる。1つの実施形態では、耐性細胞へのターゲティングを促進する上昇したHER3に加えて、多価のHerPBK10ナノ粒子はHER3ホモオリゴマー化およびHER2(および任意の他のチロシンキナーゼ)からの隔絶を誘導し、よってHER3リン酸化および活性化を防止する。別の実施形態では、HER3上昇はまた、リガンド誘導HER3ホモオリゴマーの形成を促進し、よって、そのような現象は、耐性細胞に特有である。その上、細胞質中への侵入を可能にするエンドソーム溶解による受容体隔絶小胞の破壊は、毒性の細胞内標的へのDoxの送達をサポートしながらエンドソームシグナル伝達を消滅させ、よって、全体の細胞毒性に寄与する。

40

50

【 0 0 6 5 】

いくつかの実施形態では、エンドソームおよび粒子輸送はペイロードを薬剤排出から保護する。エンドサイトーシス輸送、HerPBK10による薬物カプセル化、および核周辺へのHerDox移行の組み合わせは薬剤排出の回避に寄与する。いくつかの実施形態では、HerDoxは、併用療法に比べて、HER2阻害剤に対し獲得耐性を有するHER2+腫瘍への改善された標的毒性を与える。これらのHER2単独療法および併用治療としては、Tz、Tz-Pz、Tz-LpおよびT-DM1が挙げられるが、それらに限定されない。

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態では、HER2-阻害剤の効力は、ナイーブHER2+腫瘍に対するHerDox療法のアジュバントとして使用されると、増大される。これらの実施形態のいくつかでは、HER2-阻害剤はHER3を誘導し、ナイーブ腫瘍をHerDoxに対しインビボで感作させる。他の実施形態では、HerPBK10は、HER2+患者由来の腫瘍組織にHER3を介して結合する。1つの実施形態では、HER2-阻害はヒトCDCへのHerDox毒性を誘導しない。

10

【 0 0 6 7 】

本明細書で記載されるいくつかの実施形態では、TNBCを含むHER2-乳腺腫瘍は、HerDoxによりHER3を介して標的にすることができ、さらに、EGF-R阻害剤を用いるアジュバント治療により感作される。これらの実施形態のいくつかでは、EGF-R阻害剤はHER3上昇を誘導し、TNBC細胞をHerDoxに対してインビボで感作させる。いくつかの実施形態では、HerDoxは転移性および免疫適格性条件の両方において、TNBCモデルに関し治療的に有効である。

20

【 0 0 6 8 】

新規ペイロードとしてのコロール

コロールは、例えば、米国特許出願公開第US2014/03350251A1号(その全開示内容は、参照により、図面を含む本明細書に組み込まれる)で規定され、記載される。

【 0 0 6 9 】

患者において癌を治療する方法が本明細書で開示され、方法は、抗HER2療法に耐性がある患者を同定すること；ならびに患者に治療的有效量の、ある型の細胞を標的にするように、かつ/またはこれに浸透するように適合されたポリペプチド分子；ならびにポリペプチド配列に結合されたスルホン化コロール分子を含む薬物送達分子を投与することを含む。抗HER2療法耐性HER2+乳癌細胞においてアポトーシスを誘導する方法もまた、本明細書で開示され、方法は、抗HER2療法耐性HER2+乳癌細胞を、ある型の細胞を標的にように、かつ/またはこれに浸透するように適合されたポリペプチド分子；ならびにポリペプチド配列に結合されたスルホン化コロール分子を含む薬物送達分子と接触させることを含む。

30

【 0 0 7 0 】

コロールは、ポルフィリンに構造的に類似する。いくつかの実施形態では、コロールはスルホン化コロールである。いくつかの実施形態では、スルホン化コロールは両親媒性で、生理溶液中で可溶性であり、および/またはポリペプチドに非共有結合性相互作用を介して結合する。いくつかの実施形態では、非共有結合性相互作用は静電相互作用である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは組換えタンパク質である。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は組換え融合タンパク質である。アニオン性スルホン酸基は、負電荷を持つ細胞膜による反発のために非特異的細胞侵入を防止し、よって、担体タンパク質を介する標的細胞中へのコロール送達が生じる。

40

【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態では、コロールは金属化学元素を含む。これらの実施形態のいくつかでは、金属は遷移金属である。いくつかの実施形態では、金属は鉄(Fe)、マンガン(Mn)、またはガリウム(Ga)である。他の実施形態では、コロールはメタル化され

50

ていない。メタル化された、およびメタル化されていないコロールはタンパク質ポケットにおいて結合し、解離は無視できる。1つの例示的な例として、図33において記載されるHerGaはHerPBK10と組織化されたスルホン化ガリウム(III)コロール(S2Ga)から構成される。HerGaは、インピトロおよびインピボで、血清タンパク質へのコロール移行に抵抗する。HerPBK10とのコロールアセンブリにより25~35コロール/タンパク質が得られ、10~20nmの丸い粒子が得られ(図33-B)、これは、高速限外濾過に耐える。別の例示的な例として、HerMn、HerPBK10と組織化されたスルホン化マンガン(III)コロール(S2Mn)は約20nmの丸い粒子を形成する(図33-C)。

【0072】

1つの実施形態では、HerGaは、強く蛍光性であることに加えて、全身送達後、腫瘍選択的ターゲティングをインピボで示し、心臓を含むほとんどの正常組織を迂回し、非常に低い薬理的用量(0.008mg/kg)で腫瘍増殖消失を誘発する。別の実施形態では、HerMnは同様の腫瘍選択的ターゲティングおよび増殖消失をインピボで示し、蛍光性ではないが、磁気共鳴(MR)により、より臨床的に関連するイメージングを可能にする。これらの実施形態の両方において、HerGaおよびHerMnはROS媒介細胞骨格およびミトコンドリア破壊を引き起こす。コロール、例えば、限定はされないが、HerGAは、細胞ホメオスタシスおよび腫瘍維持において重要なミトコンドリアTSPOTタンパク質を標的にし、かつ/またはこれに結合する。同様に、スルホン化されたメタル化されていない遊離塩基コロール(S2FB)(図33-C)は、これもまた強く蛍光性であり、直接SOD1と相互作用し(図34-B)、SOD活性を阻害することができ(図34-A)、それは酵素由来の金属リガンドのキレート化による(図4C)。

【0073】

1つの実施形態では、本明細書に記載されるHerPBK10-コロール粒子はその蛍光寿命をpHに応じて変化させる。よって、コロール粒子は、そのすぐ近くにおける微小環境条件を知らせる診断プローブとして機能する。この特徴は、例えば輸送経路または細胞内位置を研究するために、細胞レベルで有用である。この特徴はまた、例えば腫瘍増殖部位を同定するために、組織レベルで有用である。1つの非限定的例として、HerGaの蛍光寿命は、エクスピボおよびインピボの両方で、腫瘍または肝臓組織に存在するかどうかによって異なり、よって、光学イメージングによる腫瘍と非腫瘍組織間の区別が可能になる。別の非限定的例として、HerMnは、腫瘍検出のために有用である。というのも、HerMn粒子は、溶液中での水分子とのコロール相互作用を防止するからである。一方、腫瘍侵入はT1緩和短縮およびコロール増強コントラストを改善し、組織取込後の粒子からのS2Mnコロール放出を示唆する。第3の非限定的例として、HerGaは、IT注射後、腫瘍において長期間保持され、検出可能である(30日まで)が、非腫瘍組織からは、皮下に注射した場合、より早く排除された。この特徴(一部HerPBK10により促進され得る)は、HerMnが有し得る、HerGd(Gd=ガドリニウム)を超える可能性のある利点に寄与する。というのも、HerGdは直ちに注射後排除されるからである。

【0074】

別の実施形態では、本明細書に記載されるHerPBK10-コロール粒子は、光増感剤として作用する。S2Gaの最大蛍光波長での光励起は一重項酸素を生成させ、これはHerGaを取り込んだ細胞に急速なダメージを誘導した。HerGaはすでに、照射なしで十分な腫瘍毒性を示したが、その一方、424nmでの光励起は実質的にHerGaのIC50を100~1000倍インピトロで低減させた。第2の吸光度ピーク(約620nm)での励起によりほぼ、有効な細胞死が得られ、よって照射のためにより長い波長を使用することができ、これはより深い組織中への浸透をサポートするであろう。

【0075】

別の実施形態では、本明細書に記載されるコロールナノ生物製剤は薬剤耐性癌細胞に立ち向かう。HER2阻害への耐性を促進するHER3上昇は、これらの腫瘍を、特に腫瘍

10

20

30

40

50

標的コロール治療を受けやすくする。そのため、HER2阻害剤、例えばTzは、アジュバントとして作用し、HER3上昇を引き起こすことにより腫瘍をコロールナノ療法に感作させる。

【0076】

いくつかの実施形態では、腫瘍標的コロールの治療効果は、HER3媒介受容体下方制御、粒子輸送、および複数の細胞内標的に対するコロール媒介毒性の組み合わせのために、阻害剤耐性腫瘍細胞上で増強される。

【0077】

1つの実施形態では、コロール粒子により誘導されるHER3クラスター化、エンドサイトーシス、およびエンドソーム溶解は、HER3をHER2活性化から隔絶させ、シグナル伝達エンドソームを鈍らせる。耐性細胞へのターゲティングを促進する上昇したHER3に加えて、多価のHerPBK10ナノ粒子はHER3ホモオリゴマー化を誘導し、HER2（および他のチロシンキナーゼ）から隔絶させ、よって、HER3リン酸化および活性化を防止する。HER3上昇はリガンド誘導HER3ホモオリゴマーの形成を促進し、そのような現象は耐性細胞に特有である。その上、細胞質中への侵入を可能にする、エンドソーム溶解による受容体隔絶小胞の破壊は、毒性の細胞内標的へのコロールの送達をサポートしながらエンドソームシグナル伝達を消失させ、よって、全体の細胞毒性に寄与する。これは、HerPBK10は単独では、その、シグナル刺激リガンドからの誘導にもかかわらず、腫瘍細胞増殖をインビトロまたはインビボで誘導しないという発明者らの観察結果と一致する。

【0078】

別の実施形態では、コロールは細胞質侵入後、細胞タンパク質への迅速移行により薬剤排出を逃れる。HerGa蛍光は小胞エスケープ後、生細胞内の細胞質全体に広がり、一方、HerPBK10は核周辺で蓄積する。その上、HerMn粒子ではなく遊離S2Mnは溶液中で著しいT1緩和短縮を示し、一方、HerMnは組織取込で改善されたT1短縮を示す。「T1緩和」という用語は、本明細書では、スピン-格子緩和を示す。その上、低いpHは、S2GaをHerPBK10から放出しない。これらの所見と一緒に、コロールはHerPBK10から、細胞質侵入後、pH非依存性メカニズムを介して放出されることを示す。さらに、細胞骨格およびミトコンドリアへの酸素ラジカル誘導ダメージの広範な効果（ROS生成の近接近を必要とする）は、コロールは、細胞小器官に付着し、全体的な様式でダメージを与えることを示す。そのため、コロールは、細胞取込後、細胞内タンパク質に迅速に移行し、これにより、コロールを薬剤排出トランスポーターから隔絶させたままにすることが助けられる。

【0079】

別の実施形態では、毒性およびイメージングは相補的コロール活性を組み合わせることにより増大される。S2FB媒介SOD阻害、S2GaまたはS2Mn媒介ROS上昇、およびS2Ga媒介TSPO阻害の組み合わせは、相補的活性を組み合わせることにより毒性を増大させる。そのようなアプローチはまた、異なる検出様式、例えば蛍光およびMRIを組み合わせる。

【0080】

いくつかの実施形態では、腫瘍ホーミングコロールは、HER2阻害にインビボで耐性であるHER2+腫瘍を標的にする。

【0081】

これらの実施形態の1つでは、耐性腫瘍へのインビボでの粒子分布は、HER3と相関する。HER2-阻害剤耐性腫瘍（例えば、BT-474RおよびJIMT-1）は、上昇したHER3のために、親腫瘍（例えば、BT-474）と比較してより高い粒子蓄積速度を示す。これらの実施形態のいくつかでは、インビボでの腫瘍ターゲティングは、HER3により媒介される。

【0082】

別の実施形態では、コロール粒子は、併用療法に比べて、HER2阻害剤に対する獲得

10

20

30

40

50

および先在耐性を有するHER2+腫瘍への改善された標的毒性を提供する。別の実施形態では、HER2シグナル-ブロックング阻害剤は、最適化Her-標的コロナノ粒子媒介療法のためのアジュバントとして作用する。

【0083】

いくつかの実施形態では、腫瘍ホーミングコロールは、播種性癌の免疫適格性条件において、HER3を介してTNBC腫瘍を標的にする。

【0084】

これらの実施形態のいくつかでは、EGF-R阻害剤は、インビトロで、HER3上昇を誘導し、TNBC細胞をコロナノ粒子に感作させる。1つの実施形態では、HerPBK10はマウス4T1細胞上のHER3に結合し、HER3レベルは、ヒトBT-549細胞上ではさらに高く、最適化されたHer-標的コロナノ粒子がこれらのTNBC細胞株への標的毒性を誘発することを示す。加えて、TNBC15上でのEGF-R阻害に対する耐性と関連するHER3の上昇は、そのような阻害剤は、これらの細胞への最適化されたHer-標的コロナノ粒子ターゲティングおよび毒性を増大させることを示す。

10

【0085】

別の実施形態では、コロナノ粒子はTNBCモデル上では、転移性および免疫適格性条件の両方において治療的に有効である。BALB/c-4T1モデルは、TNBCおよび播種性癌のモデルとして一般的に使用される。マウス乳腺中に移植されると、4T1細胞は肺および脳へ転移する腫瘍を形成し、ステージIV乳癌モデルを表す。この同系モデルは、播種性腫瘍への標的毒性を説明し、インタクテナ免疫環境の存在下での、最適化Her-標的コロナノ粒子の治療効果を評価する。

20

【0086】

実施例

下記実施例は特許請求される発明をよりよく説明するために提供され、その範囲を制限するものと解釈されるべきではない。特定の材料が言及される範囲内において、それは単に説明目的のものであり、特許請求される発明を制限することは意図されない。当業者は、発明の才能の訓練なしで、ならびに特許請求される発明の範囲から逸脱せずに、等価の手段または反応物を開発し得る。

30

【0087】

実施例1：化学療法薬のHER2+乳癌細胞への標的送達

開示された技術をHER2+乳癌細胞に対し、インビトロおよびインビボで試験した。図2で示されるように、HER2+乳癌を標的にする薬物送達分子を設計するために、ユニットAは、HerPBK10と呼ばれるタンパク質を含み、これはL. K. Medina-Kauwe et al. Gene Therapy, 8:1753-1761 (2001) (その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載される方法により作製される。HerPBK10は、カルボキシ(C)末端デカリジンにより修飾された細胞透過性アデノウイルスペントンベースタンパク質に融合されたヘレグリンの受容体結合ドメインを含む。HerPBK10の「Her」セグメントは、ヘレグリン-の受容体結合ドメインから得られ、それはHER2/HER3またはHER2/HER4サブユニットヘテロ二量体に特異的に結合する。ヘレグリンは直接、HER2ではなく、HER3またはHER4と相互作用するが、リガンド親和性は、HER2により著しく増強される。よって、HER2を過剰発現する腫瘍細胞(すなわち、HER2+腫瘍細胞)はヘレグリン指向性ターゲティングのための良好な候補となると考えられる。

40

【0088】

アデノウイルス血清型5(Ad5)ペントンベースタンパク質の膜透過活性はHerPBK10の「PB」セグメントに組み込まれ、標的細胞中への浸透を促進する。「K10」セグメントは10個のリジン残基を含み、その正電荷は、負電荷を持つ分子、例えば核酸の輸送を、求電子性相互作用により促進する。

【0089】

50

ユニットBは、共にアニールされた2つの相補的オリゴヌクレオチドを含み、小さな二本鎖核酸を形成する。ユニットCは化学療法薬、Doxを含む。3つの成分は室温でのインキュベーションにより2工程で共に組織化される。工程1では、ユニットB-DNAをユニットC-Doxとインキュベートし、DNA-Doxアセンブリ(すなわち、ユニットB+ユニットC)を形成させる。これは、DNA塩基対間でのDox分子のインターカレーションにより形成する。工程2では、DNA-Doxアセンブリを、HerPBK10とインキュベートし、HerDoxと呼ばれる最終複合体(すなわち、ユニットA+ユニットB+ユニットC)を形成させる。この相互作用は、負電荷を持つDNAリン酸塩骨格のHerPBK10の正電荷を持つポリリジン尾部への求電子性結合により形成される。

10

【0090】

図3は開示される送達系の、そのこの特定の実施形態における動作の概略図を示す。図11-Bは、従来のDox投与と比較した、その、インビボで成功した適用を示す。開示される送達系の使用により、Doxの送達は、癌性細胞を標的にし;従来の送達されるDoxに比べ、相対的に高い量の薬物が癌性細胞に送達され、比較的低い量の薬物が非標的健康組織に到達した。

【0091】

実施例2: HerDoxはアセンブリ中、非常に安定である

HerDoxは3つの成分から構成される: Dox; 小さな二本鎖核酸(Doxを運搬するのに直接関与する); ならびに標的タンパク質、HerPBK10。HerDoxは2工程で組織化される。最初に、DoxをDNAと混合し、DNAインターカレーションによりDNA-Dox対を形成させる。その後、DNA-Dox対をHerPBK10と混合し、HerDoxを求電子性相互作用により形成させる。DNA-Doxを遊離Doxから分離するために、混合物は限外濾過遠心分離を受けた。発明者らは、DNAに添加したDoxの>95%は、限外濾過スピニング中、DNAから放出されなかったことを見出し、高速スピニング中であっても薬物の高い保持が示される(図4-A)。このスピニングからの残余分および濾液の吸光度スペクトルにより、残余分の吸光度極大が濾過されていないDoxと一致し、一方、そのような吸光度は、濾液では検出できないことが確認される(図4-B)。残余分をその後、HerPBK10とインキュベートし、得られたHerDox複合体を遊離成分から高速液体クロマトグラフィー(HPLC)サイズ排除分離により分離した。ここで、発明者らは、Dox吸光度は、大部分はHerPBK10と共に共溶離されることを示し(図5)、これは、溶離画分のSDS-PAGEにより確認される(図5)。

20

30

【0092】

実施例3: HerDoxは貯蔵中および血清中で非常に安定である

発明者らは、HerDoxの安定性を12日にわたり、異なる貯蔵温度下で試験した: 4°C、室温、または37°C。毎日、試料は限外濾過を受け、その後、濾液および残余分を測定し、Doxが複合体から放出されたかどうかを決定した。4°Cでは、100%の生成物が12日までインタクトなままであったが、興味深いことに、室温および37°Cでは、薬物のHerDox生成物中への組み込みが増強されたようであった(図6-Aおよび6-B)。結局、これらの所見から、HerDoxは異なる温度下での長期貯蔵後安定なままであり、Doxを放出しないことが示唆される。発明者らはまた、血清含有培地において37°CでHerDox安定性を調べた。ニッケルセファロース上に固定されたHerDox(HerPBK10ヒスチジンタグを介して)を37°Cで完全(すなわち100%ウシ胎仔血清含有)培地において(組織培養条件を模倣するため)異なる期間インキュベートし、その後、ビーズをペレット化し、上清をDox放出に対して測定した。コンジュゲート中でのDox保持もまた、コンジュゲートをビーズから各時間点で溶離させることにより評価した。発明者らは、血清は、「(+)血清」試料中でのDox濾液吸光度の増加により検出されるであろう、コンジュゲートからのDoxの有意の放出を生成させず(図6-B、上パネル)、Doxはコンジュゲートにより各時間点で完全に保持された(図6

40

50

- B、下パネル) ことを観察した。

【0093】

実施例4: HerDoxは標的毒性を生成し、一方、Dox単独は生成しない
発明者らは、等しい投与量で(Dox濃度に関して $0.5\mu\text{M}$)、別々の皿中のHER2+およびHER2-乳癌細胞に対するHerDoxまたはDox単独の効果を比較した。3日までに、HerDoxはHER2+細胞数を75%超低減させたが、HER2-細胞生存は、影響されなかった(図7)。等しい濃度のDoxは単独でHER2+およびHER2-細胞の両方を同じオーダーの大きさ低減させた(図7)。これらの所見は、非標的薬物が標的外(すなわちHER2-)細胞に影響を与えることを示すことにより、ターゲティングの重要性を強調する。重要なことには、タンパク質担体、HerPBK10単独では、HerDox中の等しいタンパク質濃度($0.1\mu\text{M}$)で細胞株のいずれにも、増殖誘導の欠如を含む影響を有さなかった(図7)。受容体ターゲティングを試験するために、発明者らは遊離ヘレグリンリガンド(HerまたはeHRG)を競合的阻害剤として使用した。遊離リガンドは完全にHerDoxによる細胞死滅を阻害し(図8)、HerDoxはヘレグリン受容体を介して細胞に結合し、侵入したことを示した。最終インビトロ誘発として、発明者らは、HerDoxがHER2+およびHER2-乳癌細胞の混合培養物中で特異的にHER2+細胞に対して毒性を誘発するかどうかを試験した。これをするために、発明者らは混合培養物中での細胞同定のために、緑色蛍光タンパク質(GFP)でタグされたHER2-細胞株を生成させた(図9-A)。発明者らは、HerDoxは非GFP(HER2+)細胞増殖をほとんど完全に低減させ、一方、GFP(HER2-)細胞増殖は変化しなかったことを見出した(図9-B)。結局、これらの所見により、HerDoxは、選択的に毒性をHER2+細胞に標的させる能力を有することが示される。重要なことには、これらの実験は全て完全(すなわち血清含有)培地で実施され、よって、HerDoxは血清タンパク質の存在に関係なく、細胞を標的にすることが示された。その上、HER2+およびHER2-細胞の混合培養物中でのHER2+細胞の選択的細胞死滅は、標的細胞の死および溶解後、それらの細胞中に放出されたDoxは、HER2-細胞に対して毒性を誘導し続けることはできないことを意味する。細胞培養におけるHerDoxの安定性をさらに確認するために、HerDoxを培地から、別の実験において、示された時点で回収し、アガロースゲル上で電気泳動させ、これをその後、UV照射し、Doxを検出し、ならびにクーマシーブルーで染色し、HerPBK10タンパク質を検出した(図9-C)。ゲルは遊離Doxを保持しないので、時間に伴うDox蛍光の損失は、コンジュゲートがDoxを放出したことを示すであろう。血清含有培地において、HerDoxからのそのような損失は検出できない。血清を含まない条件では、Dox蛍光は1時間までに減少したようであるが、しかしながらクーマシーブルー染色は、減少した蛍光はゲルレーンにロードされた試料がより少ないことによることを示す。HerPBK10バンドの共泳動はさらに、細胞培地中でコンジュゲートはインタクテナままであったことを証明した。前に記載される血清-安定性アッセイと共に、これらの所見は、コンジュゲートは、細胞培養(これは常に少なくとも10%の血清を含む)における長期インキュベーション中インタクテナままであることを示す。

【0094】

実施例5: GFP-Herはインビボターゲティングの指標を提供する
リガンドのインビボでのターゲティング能力を検知し、インビボターゲティングの指標を確立するために、発明者らは緑色蛍光タンパク質(GFP)タグ付けリガンド(GFP-Her)を使用した。重要なことには、このリガンドはHerPBK10の「Her」ドメインと同一である。彼等は、6~8週雌ヌードマウスにおいて、MDA-MB-435細胞の両側側腹部注射を介してHER2+腫瘍を形成した。腫瘍が250~300mm³に到達した時(腫瘍細胞移植後-3~4週)、3nmolのGFP-Herを尾静脈を介して注射した。モック注射したマウスは生理食塩水のみを投与された。示された組織を、注射後3.5時間に採取し、GFPについてXenogen IVIS 3次元小動物インビボイメージングシステム(Xenogen, Alameda, CA)を使用して画像

10

20

30

40

50

化した。GFP蛍光の選択的な蓄積が、他の組織を超えて腫瘍において検出された(図10)。低～無視できるレベルの蛍光が肝臓および筋肉で検出され、GFP蛍光は心臓を含む他の組織では検出不能であった(図10)。モック処置動物由来の組織は蛍光を示さなかった。

【0095】

実施例6：HerDoxはHER2+乳癌細胞をインビボで標的にする

Doxは適切な波長励起で赤色蛍光を放出し、それは、HerDoxの全身送達後の体内分布を検出するために使用される。第4週の腫瘍(約700～800mm³)を有するマウスは、DoxまたはHerDoxの単回尾静脈注射を受け(Dox coneに関して0.008mg/mL)、リアルタイムで獲得した生存マウスの画像、または注射後3時間10分に採取した器官/組織の画像を、カスタマイズしたマクロ照明および検出システムを用いて獲得した。蛍光はHerDox注射後10分で、全身で明らかになり、その後、直ちに、腫瘍に20分までに蓄積し、注射後100分までは腫瘍中で検出可能なままであった(図11A)。HerDox注射後約3時間で採取した組織および腫瘍は、腫瘍中で強い蛍光を示したが、実質的に低いレベルの蛍光が肝臓で検出可能であった(図11B)。いくらかの蛍光が腎臓では辛うじて検出できたが、心臓、脾臓、肺、および骨格筋を含む他の組織は蛍光を示さなかった。対照的に、等しい用量のDoxを注射したマウスから採取した組織は、肝臓、腫瘍、および腎臓において検出可能な蛍光を示した。より低いレベルの蛍光もまた、肺および骨格筋において検出可能であった。

【0096】

インビボ腫瘍毒性を評価するために、3～4週両側側腹部腫瘍を有するマウスは毎日、DoxまたはHerDox(Dox coneに関して0.004mg/kg)、HerPBK10単独(HerDoxに等しいタンパク質濃度)または生理食塩水の尾静脈注射を7連続日の間、受け始めた。尾静脈注射2週前に開始して腫瘍増殖の間ずっと腫瘍を測定し、Doxは腫瘍増殖を減速させ、HerDoxは生得的に腫瘍増殖を防止したが、HerPBK10単独および生理食塩水は、効果を有さなかったことが示される(図12A)。時間に伴う認識できる体重減少は処置または対照マウスのいずれにおいても観察されなかった(図12B)。

【0097】

注射後25日に、腫瘍および器官を採取し、組織化学のために処理した。Doxは急性および長期心毒性を誘導することができることが確立されており、そのため、発明者らは、HerDoxまたはDoxで処置したマウスの心臓を調べた。Dox処置マウス由来の心臓は、HerDoxおよび生理食塩水処置マウス由来の心臓に比べてわずかに肥大し、拡張したようであり(図示せず)、Dox毒性と関連する拡張型心筋症が示唆される。生理食塩水処置マウス由来の心筋は、正常な心臓形態を示し、一方、Dox処置マウス由来のものは局所変性、筋原線維喪失、細胞質空胞化の増加、および核凝縮または溶解、典型的なDox誘導心毒性を示し、一方、HerDox処置マウス由来の心筋は生理食塩水処置マウスと同様の形態を示した(図12-C)。これらの所見に一致して、処置マウスにおける心機能を評価するために取得した心エコー図は、HerDox処置マウスにおいて検出可能でないDox誘導機能障害の徴候を示し：一方、Doxは、一回拍出量、心拍出量、および左心室内部寸法および体積の中程度～顕著な低減を誘導し、HerDoxはこれらの測定について効果を有さず、モック(生理食塩水)処置マウスと同様に見えた(図12-D)。

【0098】

インビボ安定性を測定する実現可能性を評価するために、発明者らはHerDox(0.12mg/mL最終Dox cone)または遊離Doxを等しい濃度でマウスから新たに収集した全血中でインキュベートし、混合物を37℃で1時間までインキュベートした。抗凝固薬として、0.5mMEDTAが採血物中に存在し、パラレル試料を37℃でEDTA単独中でインキュベートした。インプットHerDoxを表す試料(血液中でインキュベーション前)を37℃でHEPES-緩衝生理食塩水中でインキュベートし

た。全ての試料をその後、100 MWカットオフフィルタを通して遠心分離し、Dox蛍光を残余分および濾液中で測定した(Molecular Devices製のSpectraMax M2)。結果は、とりわけHBSまたはEDTA中でインキュベートしたHerDox、または遊離Doxと比較して、HerDoxの濾液蛍光の検出可能な増加が欠如していることから明らかなように、コンジュゲートからのDoxの検出可能な損失はないことを示す(図13)。同様に、生理食塩水またはEDTA単独中でインキュベートしたものに比べて、血液中でインキュベートした試料からのHerDox残余分からのDoxの認識できる損失はない(図13)。バイオイメージング結果と一緒にすると、これらの所見は、HerDoxは血液中でインタクトなままであり、インビボで、腫瘍標的への輸送中で安定性を保持することを示す。

10

【0099】

実施例7: HerDoxメカニズム: 細胞質中でのDox放出&核中での蓄積

HerPBK10単独では細胞死を誘導せず(図7)、そのため、HerDoxによる細胞死滅を促進するのは、細胞中へのDoxの送達である。HerDox媒介腫瘍細胞死のメカニズムを理解するために、発明者らは、HER2+細胞をHerDoxによる処置後、Dox蛍光を使用して顕微鏡的に調べ、細胞内位置を検出した。投与後早くに(取込の0分に)、HerDoxは大部分は細胞周辺に現れ、コンジュゲートが細胞表面に結合されたが、まだインターナライズされていないことが示される(図14-A)。対照的に、遊離Doxはすでに細胞内、核周辺で見出されている(図14-A)。60分で、ヘレグリン標的タンパク質の大部分が細胞に侵入すると、Doxは、遊離Doxと同様に、核内に蓄積した(図14-A)。これらの動力学は、前のターゲティング結果に加えて、受容体介在性HerDox侵入メカニズムを支持する。Doxの核内パターンでさえも、HerPBK10により送達されると、遊離Doxとは異なる。非標的Doxは細胞核内に蓄積するが、HerDoxは選択的に核小体構造内に蓄積し、いくつかの細胞質蛍光が依然として視認可能である(図14-B)。

20

【0100】

取込中、DoxがHerPBK10に付着されたままであるかどうかを決定するために、発明者らはHerPBK10に対する免疫蛍光を使用した。取込の15分で、HerPBK10は大部分、Doxと共存し、HerDoxの実質的な集団は依然としてインタクトなままであるが、Doxのいくつかの核蓄積がすでに視認可能であることが示唆される(図15)。30および60分で、増加するレベルのDoxが核内に蓄積するが、一方、HerPBK10の大部分は細胞質中に残ったままである(図15)。固定細胞では、核小体蓄積は生細胞のように検出可能でなかった(図14B)。結局、これらの所見は、HerPBK10はDoxを細胞中に送達し、Doxを細胞内に放出し、そこでは、これは核蓄積を受け、送達のメカニズムと一致することを示す(図11-B)。

30

【0101】

実施例8: ヒト血清は、細胞結合に対し顕著な効果を有さない

HerPBK10が、血清中に存在し得る循環リガンドと競合するかどうかを決定するために、発明者らは、HER2+患者から得られたヒト血清中で、HER2+乳癌細胞へのHerPBK10の結合を試験した。シーダーズ・サイナイの女性の癌研究所では時折、制限された量の患者血清が得られ、そのうち、HER2+患者由来の血清はさらに少ない小数部分を占める。特に、ここで使用されるヒト血清は、実際の血清画分であり、HER2+および同年齢HER2-患者の収集した全血から単離したタンパク質と関連する。初期の実験により、HerDoxは10%ウシ血清を含む完全培地中で細胞標的に結合すること、およびこの結合は過剰の遊離リガンドにより競合的に阻害されることが証明される。ここで、発明者らは、ルーチン培養培地中のウシ血清を、獲得した患者試料から得られたヒト血清に置き換え、とりわけ、HER2+患者由来のヒト血清が細胞結合を阻害するかどうかを評価した。発明者らは、処置前に、ヒト血清に対して確実に細胞をかなり曝露した(2時間、これは任意の循環リガンドの受容体結合に対し十分な時間を提供する)。HER2+患者、HER2-患者のいずれか由来の血清、またはウシ血清における細胞

40

50

結合の直接比較は有意の差を示さず(図16)、ここで試験したヒト血清は、標的細胞へのHerPBK10の結合を妨害しなかったことが示される。100xヘレグリンリガンド(+Her)による競合的阻害により、コントロール結合活性はヘレグリン受容体に特異的であることが確認される。

【0102】

実施例9:HERサブユニットレベルおよび提案した細胞型に対する細胞毒性

発明者らは、前に記載されるレベルが使用される入手可能な細胞における実際のレベルを反映しない可能性があるため、本明細書に記載される様々な細胞株および型上でのHERサブユニットの細胞表面レベルを測定した。発明者らは、ATCCおよびNIH/NCIから指された細胞株を獲得し、これらをHERサブユニットレベルに対してプロファイリングした(図17A)。HerDoxがHER2レベルに従い毒性を誘導するかどうかを評価するために、発明者らはかなり高い(SKBR3)、中程度(MDA-MB-435、MDA-MB-453、Hela)、および低~検出不能(MDA-MB-231)レベルでHER2を提示する株を選択し、細胞毒性用量曲線を実施した。発明者らは、HerDoxCD50は、これらの選択した株上の細胞表面HER2レベルと逆相関し:かなり高いHER2を提示する細胞株は、HerDoxに対してかなり高い感受性を示し、一方、低いHER2を提示する細胞株は低い感受性を示し、中間HER2レベルを提示する株は同様に中間感受性を示すことを観察した(図17B;CD50は対数スケールで示される)。

10

【0103】

実施例10

【表1】

表1-細胞株に対する細胞毒性

20

細胞株	HER2*	EC50** (uM HerDox)
MDA-MB-231	0.06 ± 0.006	7.2e5 ± 0.11
MDA-MB-435	0.52 ± 0.08	0.74 ± 0.07
T47D	1.03 ± 0.26	0.64 ± 0.04
SKOV3	1.79 ± 0.19	0.18 ± 0.03

30

* ELISAにより決定される相対細胞表面レベル(平均 ± 1SD)。N = 3つのウェル。

** HerDox用量曲線の非線形回帰分析により決定される、細胞生存において50%低減が得られる濃度(平均 ± ISD)。N = 3つの処置ウェル/用量。

【0104】

実施例11:HerPBK10の最適化

HerPBK10タンパク質はアデノウイルスペントンベースタンパク質に由来し、その自然結合標的は α -vインテグリンであるので、発明者らは、Arg-Gly-Asp(RGD)インテグリン結合モチーフの突然変異がタンパク質のカーゴを細胞内に送達する能力を改善するかどうかを評価した。前の研究により、ヘレグリン受容体結合リガンドのペントンベースへの付加がそれをほぼ排他的にヘレグリン受容体に再指向させる(競合的阻害アッセイにより証明される)ことが示されるが、HerPBK10は依然として、インテグリン受容体を利用することができ、それはタンパク質を異なる細胞内経路に再指向させる、またはタンパク質自体上の結合部位に対し競合することができる。点変異によりRGDモチーフをEGDにすることは、インテグリン結合を無効にする。そのため、この突然変異を有する変異タンパク質HerPBr g d K 1 0が生成された。これを、親HerPBK10と比較して、遺伝子送達に対して試験した。等しいタン

40

50

パク質濃度では、HerPBK10は中程度(約1.8倍)~劇的(約18倍)な遺伝子導入の増強を示した(図18)が、これは増強された受容体結合または結合後活性を反映する可能性がある。

【0105】

実施例12: DNAコンストラクト

発明者らは配列5'-ATCGAAGGATCCATGCGGCGCGCGGCGATGTAT-3'(SEQ ID NO:12)を含む一般的な5'オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、pJM17アデノウイルスゲノムテンプレート由来の野生型およびリジntag付けペントン配列の両方を増幅した。3'プライマーの配列はPB:5'-GCATCAGAAATTCCTCAAAAAGTGC GGCTCGATAG-3'(SEQ ID NO:1)およびPBK105'-CATGAATTC(A TTT)₁₀AAAAGTGC GGCTCGATAGGA-3'(SEQ ID NO:2)である。pRSET-A細菌発現プラスミド(Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)中への野生型およびリジntag付けペントンの両方のインフレーム挿入のために、BamHI制限部位を、5'プライマーに導入し、EcoRI制限部位を、3'プライマーに導入した。このプラスミドは組換えタンパク質を、ニッケルキレートアフィニティークロマトグラフィーによる親和性精製のためのN末端ヒスチンタグ付け融合物として発現する。

10

【0106】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅を使用して、短いポリグリシンリンカーをコードする配列をPBK10のアミノ(N)末端に付加した。リンカーをコードする配列は追加のクローニングのための50cII制限部位を含む。ヘレグリンターゲットングリガンドを、ヘレグリン遺伝子29の上皮成長因子(EGF)様ドメインのPCR増幅により、PBK10とインフレームでクローニングするために、BamHI部位を含む5'オリゴヌクレオチドプライマーおよびSacU部位を含む3'プライマーを使用して、生成させた。ターゲットングリガンドをリジntag付けコンストラクトに付加し、HerPBK10を、PCR産物をPBK10に対しちょうどN末端に連結させることにより、生成させた。HerおよびGFP-Herの構築は前に記載されている(Medina-Kauwe L.K., et al, BioTechniques 2000, 29: 602-609)。HerK10は、HerコンストラクトのPCR増幅により、5'Herプライマー(Medina-Kauwe L.K., et al, BioTechniques 2000, 29: 602-609)および配列5'-ATGAATTC(A TTT)₁₀AGATCTACTTCCACCACTTCCACC-3'(SEQ ID NO:3)を含む3'オリゴヌクレオチドプライマーを使用して作製した。

20

30

【0107】

実施例13: DS-オリゴ長は標的複合体中へのDox組み込みに影響しない

DS-オリゴ二本鎖を、相補的な30bp配列、LLAA-5(SEQ ID NO:6)およびLLAA-3(SEQ ID NO:7)または48bp配列、BglIIHis-5(SEQ ID NO:8)およびBglIIHis-3(SEQ ID NO:9)から形成させた。Doxをアニールされた二本鎖の各組に1:10、1:20、または1:40のいずれかのモル比の二本鎖:Doxで(20、40、または80μMのいずれかの最終Dox濃度)、10mM Tris/HCl緩衝液、pH8.0中、30分間室温で添加した。混合物をその後限外濾過膜を通して(Microcon Ultracel YML0; Millipore)、10,000xgで遠心分離し、遊離Doxを組み込まれたDoxから分離した。残余分および濾液を別々に収集し、各々の吸光度を480nmでSpectraMax M2プレートリーダー(Molecular Devices)を用いて測定した。結果(図19)は、30または48bp二本鎖のいずれかを用いるDox組み込みにおいて認識できる差はないことを示す。

40

【0108】

実施例14: HerDoxは、神経膠腫細胞に対して毒性である

50

U251ヒト神経膠腫細胞を、非透過処理免疫組織化学法により、HERサブユニットレベルについて評価し、かなり著しいレベルの細胞表面HER2、HER3、およびHER4を示すことを見出した(図20A)。

【0109】

皿内で増殖するU251細胞を、HerDoxまたはDoxのいずれかと共に(0.5 μMまたは1 μMのいずれか)培地中、4時間、37 °C、5%CO₂でインキュベートし、その後新鮮完全培地を添加し、最終培養体積をおよそ4倍増加させ、細胞を37 °C、5%CO₂で4日間維持した。細胞をトリプシン処理し、最終日にカウントした。

【0110】

発明者らの結果は、HerDoxはU251細胞に対し等しい濃度のDoxよりも8~10倍多い毒性を示し、同様に、10x少ないHerDoxがDoxと同じ毒性を誘発することを示す(図20B)。

【0111】

実施例15: HER2+腫瘍に対するインビボでのターゲティングおよび治療効果に対する、修飾カプシドタンパク質、ds-オリゴ、およびDNAインターカレーターから構成される最適化複合体の試験

耐性腫瘍細胞は上昇したHER3およびHerDoxへの増大した感受性を示す。トラスツズマブへの獲得耐性を有するHER2+乳癌細胞株は親株と比較すると、HER3の上昇した細胞表面レベルを示し(BT474およびSKBR3)(図21-A)、HER3上昇は薬物耐性と関連することを示す別の研究と一致する。HerDox処置を、培養下のBT474およびSKBR3親およびトラスツズマブ耐性株に対するトラスツズマブおよびトラスツズマブ+ペルツズマブ併用療法と比較した。各処置を、治療効果を誘発するために前に確立された濃度範囲で投与した。トラスツズマブ(Tz)は、親BT474細胞生存を、50%低減させ、ペルツズマブ(Pz)の追加は、有意に細胞死を増加させなかった(図21B)。どちらのレジメンも、BT474耐性細胞に対して無効であった。HerDoxは、TzおよびTz+Pzに比べ、BT474親細胞に対し、より高い細胞死を示し、BT474耐性細胞を完全に全滅させた。SKBR3に関する所見は同様であった。というのも、親および耐性細胞のどちらも、Tz単独または併用療法(Tz+Pz)のいずれにもほとんど応答を示さなかったからである(図21B)。対照的に、HerDoxは50%細胞死を親SKBR3に対して、SKBR3耐性細胞に関しては>80%細胞死を誘発した。

【0112】

HerDoxの効力をまた、先在耐性を有する細胞株に関して調べた。JIMT-1細胞株を、トラスツズマブ治療に決して応答しなかった腫瘍から誘導した。これらの細胞はTzおよびTz+Pzに対し、広い濃度範囲にわたって無応答性のままであった(図21-C)。対照的に、HerDoxは用量依存的細胞死をもたらし、90%までの細胞を死滅させた(図21-C)。加えて、HerDoxの、JIMT-1腫瘍を有するマウスへの全身送達は、TzおよびDox単独と対照的に腫瘍増殖を消失させた(図22)。

【0113】

トラスツズマブ前処置はHER2+細胞をHerDoxに感作させる。前の研究は、HER3は、ラパチニブまたは遺伝子サイレンシングのいずれかによるHER2阻害後4時間するとすぐに、転写的にかつ翻訳的に上昇したことを示した。親細胞を超える、Tz耐性細胞に対するHerDoxの増強された効力は、トラスツズマブはHerDoxのためのアジュバントとして作用する可能性があり、HER3上昇を誘導し、HerDoxの耐性細胞へのホーミングを増加させることを示唆する。これを試験するために、親および耐性株をHerDox処置前4または24時間トラスツズマブで前処置した。HerDoxはすでに、親SKBR3細胞に対しトラスツズマブと比べて、改善された細胞死滅を示し、一方、前処置は、試験した最高用量で、毒性を40~50%さらに増大させた(図23A)。親BT474細胞に対するHerDox毒性は、トラスツズマブよりも適度に改善されたが、トラスツズマブによる4時間前処置はHerDox毒性をさらに50%増強さ

10

20

30

40

50

せ、24時間前処置はほぼ75%の毒性の増強を可能にした(図23B)。HER2-3発現MDA-MB-435であっても(すでにHerDoxに感受性である)、トラスツズマブによる24時間前処置で、中程度の毒性の増強を示した(図23C)。他方、Tz耐性株はすでに、HerDoxに対する強力な感受性を示し、よって、前処置はほとんどの場合不要であった(図23D~F)。Tz耐性BT474細胞は特に、試験した全てのHerDox濃度で完全細胞死を呈した(図23E)。したがって、HerDox濃度を、トラスツズマブ前処置が効果を有するかどうかを評価するために低減させた。5倍低いHerDox濃度は依然として強力な効果を細胞生存に対して有し、トラスツズマブ前処置はさらに細胞毒性を増強させた(図23F)。結局、これらの所見から、トラスツズマブはHerDox処置のための有用なアジュバントとして作用し得ることが示唆される。

10

【0114】

実施例16: HerPBK10は、HER3に特異的である

図26は、HerPBK10は、HER3に特異的であることを示す。というのも、HerPBK10はヒトHER3の細胞外ドメインを含む固定化ペプチドに結合するからであり、これは、インビトロでの、遊離HER3ペプチドによるHerPBK10の前吸着により阻害された(図26-A)。同じ前吸着はまた、培養下のHER2+細胞へのHerPBK10の結合を阻害した(図26-B)。重要なことには、HER2のHER3との二量体化は、HerPBK10結合のために必要とされず、というのも、ヘテロ二量体-遮断抗体、ペルツズマブ(Pz)はHER2+細胞上のその受容体へのHerPBK10の結合を防止しなかった(図26-B)。結合はまた、HER4ペプチドまたはベータ

20

【0115】

実施例17: 受容体結合は、患者血清により阻害されない

5人のHER2+患者および同年齢対照由来の血清は培養下のHER2+細胞へのHerPBK10の結合を防止せず、互いの間で有意の差を示さなかった。そのため、受容体結合は、患者血清により阻害されない。免疫適格性マウスにおけるHerPBK10の治療的および10倍高いレベルでの繰り返し投与では、そのタンパク質に対する検出可能な中和抗体形成が得られなかった。

【0116】

実施例18: 耐性腫瘍細胞は上昇したHER3およびHerDoxへの増大した感受性を示す

30

図27Aは、トラスツズマブに対する獲得耐性を有するHER2+乳癌細胞株(HER2阻害剤の濃度を増加させる、長期培養の標準レジメンを使用する)は、親株と比較するとHER3の上昇した細胞表面レベルを示すことを示す図である(BT474およびSKBR3)。この結果は、HER3上昇は、薬物耐性と関連するという当技術分野で知られている知識と一致する。

【0117】

HerDoxの癌細胞への効果を、(i)トラスツズマブ、ならびに(ii)トラスツズマブ(Tz)およびペルツズマブ(Pz)の併用療法と比較した。実験をBT474およびSKBR3親細胞株およびトラスツズマブ耐性細胞株に対して培養下で実施した。各療法薬を、治療効果を誘発するために、前に確立したまたは当技術分野で知られている濃度範囲で投与した。Tzは親BT474細胞生存を50%だけ低減させ; Pzの追加は有意に細胞死を増加させなかった(図27-B)。どちらのレジメンもBT474耐性細胞に対して無効であった。他方、HerDoxは、TzおよびTz+Pzに比べ、BT474親細胞に対しより高い細胞死を示し、効果的にBT474耐性細胞を排除した。

40

【0118】

同様の結果がまた、SKBR3細胞株に対して得られた。親および耐性細胞はTz単独または併用療法(Tz+Pz)のいずれにもほとんど応答を示さなかった(図27-B)。対照的に、HerDoxは50%親SKBR3細胞死、およびSKBR3耐性細胞について>80%細胞死を誘発した。そのため、これらの結果は、耐性腫瘍細胞は、HerD

50

o xへの増大した感受性を示すことを示す。

【0119】

HER3のリガンド-結合ドメインを含むペプチドを用いたHerDoxの前吸着は細胞毒性をブロックしたかどうかを評価することにより、HER3の標的毒性への寄与を評価した。HerDoxは親および耐性株について著しい細胞死を誘発したが、一方、これは、HER3ペプチドにより阻害され(図27-C)、細胞死はDoxペイロードのリガンド指向性送達を介して起きたことが示される。図27Eは、先在耐性を有する細胞株に対するHerDoxの効力を示す。JIMT-1細胞株をトラスツズマブ治療に決して応答しなかったHER2+腫瘍から誘導した。これらの細胞はTzおよびTz+Pzに無応答性のままであり、広い濃度範囲にわたって、部分的にのみDoxに反応した。対照的に、HerDoxは用量依存的細胞死をもたらし、90%までの細胞を排除した(図27-E)。最後に、HerDoxのJIMT-1腫瘍を有するマウスへの全身送達は、HerDoxと同じ薬物用量でのTzおよびDox単独と対照的に、腫瘍増殖を消失させた(0.004mgDox/kg/注射)。実際、TzまたはDox単独の腫瘍増殖に対する影響は、モック生理食塩水処置と比べてわずかにすぎない(図28)。そのため、これらの結果は、HerDoxは耐性腫瘍細胞に対して著しい細胞死を誘発することを示す。

10

【0120】

実施例19:トラスツズマブはHER2+細胞をHerDoxに感作させる

図29Aは、インビトロでのTz前処置は、親細胞においてHER3を上昇させ(図29-A)、これらの細胞へのHerPBK10の結合を増大させ(図29-B)、これらの細胞へのHerDox毒性を増強させる(図29-C、29-D)ことを示す。親および耐性細胞株を、Tzで、HerDox処置前4または24時間の間前処置した。HerDoxはすでに親SKBR3細胞に対してTzと比べて、改善された細胞死滅を示したが、一方、前処置は、試験した最高用量で、毒性を40~50%さらに増大させた(図29-C)。親細胞を超える、Tz耐性細胞に対するHerDoxの増強された効力は、トラスツズマブは、HerDoxのためのアジュバントとして作用し、HER3上昇を誘導し、HerDoxの耐性細胞へのホーミングを増加させることを示す。

20

【0121】

親BT474細胞に対するHerDox毒性はTzよりも適度に改善されたが、トラスツズマブによる4時間前処置はHerDox毒性をさらに50%増強させ、24時間前処置はほぼ75%の毒性の増強を可能にした(図29-D)。HER2-3発現MDA-MB-435細胞であっても(すでにHerDoxに感受性である)、Tzによる24時間前処置で中程度の毒性の増強を示した(図29-E)。他方、Tz耐性株はすでに、HerDoxに対する強力な感受性を示し、よって、前処置はほとんどの場合不要であった(図29-F、29-G)。Tz耐性BT474細胞は特に、完全細胞死を試験した全てのHerDox濃度で受けた(図29-G)。したがって、HerDox濃度をトラスツズマブ前処置が効果を有するかどうかを評価するために低減させた。5倍低いHerDox濃度は依然として強力な効果を細胞生存に対して有し、Tz前処置はさらに細胞毒性を増強させた(図29-H)。結局、これらの所見から、Tzは、HerDox処置のための有用なアジュバントとして作用することが証明される。同様に、ペルツズマブ、ラパチニブ、T-DM1もまた、HerDox処置のためのアジュバントとして作用する。

30

40

【0122】

実施例20。HerPBK10取込はトラスツズマブと比べてより迅速で効率的である

蛍光標識されたHerPBK10を調製し、標識されたTzと比較して、その体内分布および細胞取込を評価した。等しい用量の各試薬をHER2+腫瘍を有するマウスの尾静脈に注射した。組織を、注射後4時間に、イメージングのために採取した。どちらの試薬も標識された非標的タンパク質のBSAと比べた。HerPBK10およびTzは、等しいレベルの腫瘍蓄積を示し(どちらもBSAより高かった)、心臓、脾臓、および筋肉への送達はほぼなかった(図30-A)。しかしながら、他の非腫瘍組織、例えば、肝臓、肺、および腎臓への送達はHerPBK10よりもTzで高かった。Tzと対照的に、H

50

HerPBK10は肺送達を示さなかった(図30-A)。

【0123】

HER2+MDA-MB-435細胞における取込もまた評価した。これらの細胞における細胞表面受容体レベルを図30-Bにおいてグラフにより示す。HerPBK10は、細胞取込後45分以内に、細胞表面クラスター化、続いて、著しいエンドサイトーシスを示した(図30-B)。対照的に、これらの細胞上のHER3と比較して上昇したHER2レベルに関係なく、Tzは細胞結合後2時間までに細胞上に低密度に点状領域で残った細胞表面上での低密度の結合を示した(図30-B)。

【0124】

これらの結果は、HerPBK10取込はTzと比べてより迅速で効率的であることを示す。

10

【0125】

実施例21: HerPBK10は、HER2よりも上昇したHER3を発現する患者腫瘍組織上で、トラスツズマブよりも高い結合を示す

本出願で記載されるナノ粒子はヒト組織上のHER3を認識することができるかどうかを決定するために、乳腺腫瘍組織をHER2+患者の外科標本から入手した。組織を調べ、HerPBK10がこの組織にHER3を介して結合するかどうかを決定した。図31は、HerPBK10およびTzはどちらもこの腫瘍試料由来の脱凝集された細胞への濃度依存性結合を示し、HerPBK10はTzよりも強い結合を示すことを示す(図31-B)。この結合曲線は、腫瘍細胞表面上で測定された上昇したHER3および非常に低いHER2と相関した(図31-A)。

20

【0126】

実施例22: HerPBK10はマウスHER3を認識する

BALB/cマウス乳房腫瘍から取得したマウス4T1細胞は三種陰性であり、BALB/cマウスにおける同系TNBCモデルとして使用されている。HER3は、4T1の細胞表面上で、著しいレベルで発現され(図32-B)、HerPBK10により認識され(図32-C)、かつヒトHER3ペプチドにより競合的に阻害される(図32-C)。HerPBK10のマウスHER3への受容体特異的結合はマウスとヒトHER3間の高レベルのアミノ酸配列同一性を反映する: 全タンパク質では91%同一性およびヘレグリン結合領域(細胞外ドメインIおよびII)における94%(図32-A)。これらの所見は、BALB/c-4T1モデルは、免疫適格性条件におけるターゲティングを試験するために使用することができることを示す。加えて、マウスHER3のHerPBK10による認識は異種移植片モデルにおける我々の既存の所見の臨床関連を増大させる: HerDoxはマウスにおける内在性HER3を認識する場合であっても選択的な腫瘍標的毒性を示す。重要なことには、ヒトBT-549細胞(これらもまた、TNBCから誘導される)は、細胞表面上で上昇したHER3を示し(図32-B)、追加のTNBC細胞株を標的に提供する。

30

【0127】

実施例23: ペントンベースドメインはサイトゾル中への浸透のために必要とされる

PBドメインが欠如している、HerPBK10の欠失変異体はS2Gaを細胞の細胞質中に送達することができなかった。これにより、HerPBK10のペントンベースドメインが、受容体介在性取込後にエンドソーム膜透過のために必要とされることが立証される。

40

【0128】

実施例24: 定向進化により生成された細胞内輸送変異体

定向進化およびファージディスプレイバイオパニングを潜在的に増大された細胞内輸送活性を有するペントンベースドメインのタンパク質バリエーションを単離するために適用した。この技術は、組換えペントンベース遺伝子のランダム変異誘発、T7バクテリオファージ上での得られた変異体ライブラリの発現、および培養下のHeLa細胞(ペントンベースを取り込む)上のファージライブラリのスクリーニングを必要とした。スクリーンに適

50

用された「選択圧」は、増大したサイトゾルおよび/または核分配を示す変異体を単離すること、タンパク質が細胞中への完全浸透を促進したことを示すこと、および所望の細胞内コンパートメントへ輸送することから構成された(図35-A)。HerPBK10にクローニングされ、ペントンベースドメインと置き換わった点変異を有する、いくつかの切断型および全長バリエーションを単離した(図35-B)。これらの全長変異体のうちの2つ(111Cおよび333F)は、親タンパク質(wt HerPBK10)と比較して、サイトゾル、細胞骨格、および核コンパートメントへの増強した分配を示し(図35-C)、一方、切断型バリエーション(すなわちTM)はエンドソームを免れることができなかった(図35-D)。

【0129】

実施例25: S2Gaは、TSP0と相互作用する

コロール毒性のメカニズムを探る研究は、HerGaが細胞骨格ならびにミトコンドリア膜透過性に対するスーパーオキシド媒介ダメージを引き起こし、アポトーシス死に導くことを明らかにした。図36-Aおよび36-Bは、S2Gaは、直接ミトコンドリア外膜タンパク質、TSP0に結合することを示す(図36A~B)。TSP0は、ポルフィリンおよび他の代謝産物を処理のためにミトコンドリア中に移動させ、ならびに、ミトコンドリア透過性移行膜孔複合体の成分と相互作用し、細胞ホメオスタシスにとって重要であり、というのも、TSP0のロックアウトはマウスにおいて胚性致死であるからである。S2Gaは特定のにはTSP0上のポルフィリン結合部位を認識し(図36A~B)、というのも、S2Ga結合は、PK11195により競合的に阻害されるからであり、これは、TSP0へのポルフィリン結合を阻害する。MDA-MB-435細胞における組換え可溶性TSP0の過剰発現は、ミトコンドリア膜電位のHerGa媒介破壊を防止し(図36C~D)、HerGaは、TSP0とインサイチューで相互作用することが証明される。

【0130】

実施例26: HerMnは標的毒性およびMR検出を可能にする

HerGaの蛍光特質はコロールの造影剤としての使用を確立したが、光学イメージングの臨床適用性は励起波長および再発光波長の限定された侵入深さにより制限される。したがって、HerPBK10と組み合わせられると、HerGaと同じくらい細胞毒性となるが、十分なコントラスト特性を有する別のメタル化コロールを使用し、臨床的に関連する様式、例えば磁気共鳴イメージング(MRI)を用いた検出が可能になった。HerMnは培養下のHER2-腫瘍細胞ではなく、HER2+への標的毒性を示し、一方、S2Mnは細胞生存に対して効果を有さない(図37)。HerMnはスーパーオキシド上昇により、ミトコンドリア膜電位(図38-A)および細胞骨格を崩壊させる(図38-B)。HerMnは全身送達後インビボで腫瘍にホーミングし、心臓を含むほとんどの正常組織を迂回し(図39)、非常に低い薬理的用量で腫瘍増殖を消失させ(0.008mg/kg)、遊離S2Mn、HerPBK10単独または生理食塩水処置と対照的である(図40-A)。溶液中では、HerMn粒子は、遊離S2Mnと比べて制限されたT1(スピン-格子)緩和短縮を示し(図41-A)、タンパク質粒子中でのカプセル化は水分子へのアクセスを防止することが示唆される。しかしながら、インビボでのHerMnの送達は、遊離S2MnおよびGdと比較して、腫瘍中で著しいT1緩和低減およびMRIコントラスト増強を与え(図40-B)、コロールは組織取込後粒子から放出されることが示唆される。腫瘍組織におけるコロールの長期保持は、HerMnがGdの迅速クリアランスと比べてより長寿命の造影剤として機能し得ることを示す。

【0131】

実施例27: HerGaおよびHerMnはヒト心筋球由来細胞(CDC)に対し無毒性である

翻訳可能性を評価するために、ヒト心筋球由来細胞(CDC)の生存率をHerGaおよび/またはHerMnの存在下で調べた。HerGa、HerMnおよび個々の成分(HerPBK10単独、S2Ga単独およびS2Mn単独)の濃度を増大させると、Do

10

20

30

40

50

x (図40 - B) (公知の心毒性を有する) と対照的に、CDC生存率に検出可能な効果を有さない。

【0132】

実施例28：耐性腫瘍細胞は上昇したHER3およびHerPBK10への増大した結合を示す

Tzに対する獲得耐性を有するHER2+乳癌細胞株(HER2阻害剤の濃度を増加させた長期培養の標準レジメンを用いる)は、親株と比較して、HER3の上昇した細胞表面レベルを示し(BT474およびSKBR3)(図42 - A、43 - A)、HER3上昇は、薬物耐性と関連するという当技術分野における知識と一致した。JIMT-1乳癌株(Tz処置に決して応答しなかったHER2+腫瘍から誘導した)もまた、HER2と比較して、上昇したHER3を示した(図42 - B)。HER3は、Lpまたは遺伝子サイレンシングのいずれかによる、HER2阻害後4時間するとすぐに、転写的にかつ翻訳的に上昇した。親株をTzに24時間曝露し、その後、非処置親細胞と比較して、細胞表面HER3レベルを測定した。Tz処置により、上昇したHER3レベルが得られただけでなく、これらの細胞へのHerPBK10の結合が比例して増加した(図42 - C、42 - D)。本明細書で記載されるナノ粒子がヒト組織上のHER3を認識することができるかどうかを評価する手段として、乳腺腫瘍組織をHER2+患者の外科標本から取得し、HerPBK10がこの組織にHER3を介して結合できるかどうかを調べた。HerPBK10およびTzはどちらもこの腫瘍試料由来の脱凝集された細胞に対し濃度依存性結合を示し、HerPBK10はTzよりも強い結合を示した(図42 - F)ことが見出された。この結合曲線は、腫瘍細胞表面で測定された上昇したHER3および非常に低いHER2と関連した(図42 - E)。

【0133】

実施例29：HerGaはインピトロおよびインピボにおいて、Tz耐性腫瘍細胞に対し増強された毒性を示す

HerGaのTzおよび併用療法(Tz+Pz)に対する有効性をBT474親およびTz耐性株について比較した。各治療薬を、治療効果を誘発するために当技術分野で知られている濃度範囲で投与した。Tzは親BT474細胞生存を50%だけ低減させ(図42 - B)、Pzの追加は有意に細胞死を増加させなかった(図43 - C)。HerGaは親細胞に対して同様の結果を示した(図43 - B、43 - C)。TzおよびTz+Pzは、BT474耐性細胞に対して無効であった(図43 - B、43 - C)。対照的に、HerGaは完全にBT474耐性細胞を排除した(図43 - B)。Tz+Lp耐性BT474細胞に対する所見は、Tzは効力を示さなかったが、一方、HerGaはほぼ完全な細胞死を誘発したという点で同様であった。

【0134】

HerGa(0.008mg/kg/注射)の、BT474Tz耐性腫瘍を有するマウスへの全身送達、S2GaおよびHerPBK10単独と対照的に、腫瘍増殖を消失させた(図43 - D)。これらのマウスには、耐性を維持するための、維持用量のTzが与えられなかったため、Tzに対する感受性はインピボで回復したように見えたが、これらの腫瘍は、最終的にはTz処置に耐性となり、治療量のTzにも関わらず、サイズが増大し始めた(図43 - E)。これらのマウスへのHerGaの静脈内送達はこれらの腫瘍サイズを低減させた(図43 - E)。

【0135】

発明を、特定の実施形態および実施例との関連で開示してきたが、発明の実施形態は特定的に開示された実施形態を超えて他の実施形態および/またはその使用および改変および等価物まで拡大することが当業者により理解されるであろう。

【0136】

多くの変更および別の要素が本発明の実施形態で開示されている。さらに、さらなる変更および別の要素は当業者に明らかになるであろう。これらの変更の1つは、限定はされないが、発明の組成物、ならびにこれを用いて診断され、予知され、治療され得る疾患お

10

20

30

40

50

よび他の臨床状態に対する構成モジュールの選択である。本発明の様々な実施形態は特定の、これらの変更または要素のいずれかを含むまたは排除することができる。

【0137】

いくつかの実施形態では、発明の特定の実施形態を記載し、特許請求するために使用される、材料成分の量、濃度などの特性、反応条件、などを表す数値は、場合によっては、「約」という用語により修飾されることが理解されるべきである。したがって、いくつかの実施形態では、書かれた説明および添付の特許請求の範囲において明記される数値パラメータは、特定の実施形態により得られるように求められた所望の特性に依存して変動し得る近似値である。いくつかの実施形態では、数値パラメータは、報告された有効桁の数を考慮して、通常四捨五入技術を適用することにより解釈されるべきである。発明のいくつかの実施形態の広い範囲を明記する数値範囲およびパラメータは近似値であるにもかかわらず、具体例で明記される数値は実用可能な限り正確に報告される。発明のいくつかの実施形態で提示された数値は、それらの個々の試験測定において見出される標準偏差から必然的に生じるある一定の誤差を含み得る。

10

【0138】

いくつかの実施形態では、発明の特定の実施形態の記載との関連で（とりわけ、特定の下記特許請求の範囲との関連で）使用される、「1つの（a、an）」および「その（the）」という用語および同様の言及は、単数形および複数形の両方を含むと解釈することができる。本明細書における値の範囲の列挙は、その範囲内にある各々別個の値に、個々に言及する省略方法として機能することを意図するにすぎない。本明細書で別記されない限り、各々々の値は、それが、本明細書で個々に列挙されるかのように、明細書に組み込まれる。本明細書で記載される全ての方法は、本明細書で別記されない限り、または、別に文脈により明確に反対されない限り、任意の好適な順序で実施することができる。本明細書における特定の実施形態に関して提供される、任意および全ての実施例、または例示的な言語（例として「例えば」）の使用は、発明をよりよく説明することを意図するにすぎず、別様に特許請求される発明の範囲を制限しない。明細書において言葉がないのは、発明の実施に必須の任意の特許請求されていない要素を示すと解釈されるべきである。

20

【0139】

本明細書で開示される発明の別の要素または実施形態のグループ分けは制限するものと解釈されるべきではない。各グループメンバーは個々に、またはそのグループの他のメンバーまたは本明細書で見出される他の要素との任意の組み合わせで言及および特許請求され得る。あるグループの1つ以上のメンバーは、利便性および/または特許性の理由のために、あるグループに包含され、またはそれから削除され得る。そのような包含または削除のいずれが起きても、明細書は、ここでは、添付の特許請求の範囲において使用される全てのマーカッシュ群の書かれた説明をこのように満たす、改変されたグループを含むと判断される。

30

【0140】

発明を実施するために発明者らに知られている最良の形態を含む、この発明の好ましい実施形態が本明細書で記載される。それらの好ましい実施形態に対する変更は、前記記載を読めば当業者に明らかになるであろう。熟練した技術者であれば、そのような変更を必要に応じて採用することができ、発明は、特定的に本明細書で記載される以外に実施することができることが企図される。したがって、この発明の多くの実施形態は、適用法により許容される、これに添付された特許請求の範囲に列挙された対象物の全ての改変および等価物を含む。その上、その全ての可能な変更における上記要素の全ての組み合わせは、本明細書で別記されない限り、または別に文脈により明確に反対されない限り、発明により包含される。

40

【0141】

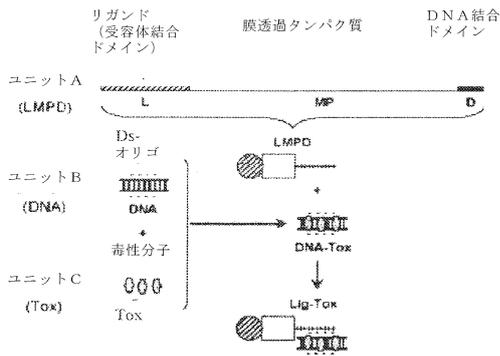
さらに、多くの特許および印刷された刊行物がこの明細書を通して参照されている。上記引用した参考文献および印刷された刊行物の各々は、その全体が、本明細書で、個々に、参照により組み込まれる。

50

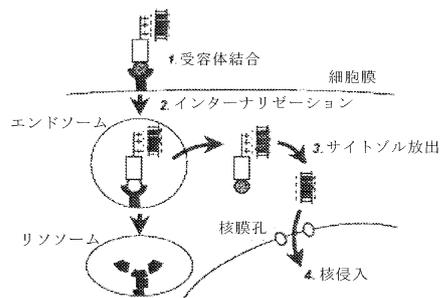
【 0 1 4 2 】

最後に、本明細書で開示される発明の実施形態は、本発明の原理の例示であることが理解されるべきである。使用することができる他の改変は発明の範囲内に含めることができる。よって、例として、制限はしないが、本発明の別の構成が本明細書の教示にしたがい使用され得る。したがって、本発明の実施形態は、厳密に、図示され、記載されるものに限定されない。

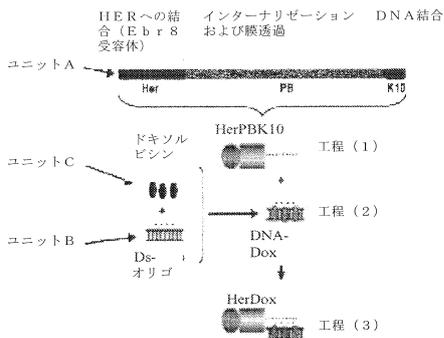
【 図 1 】



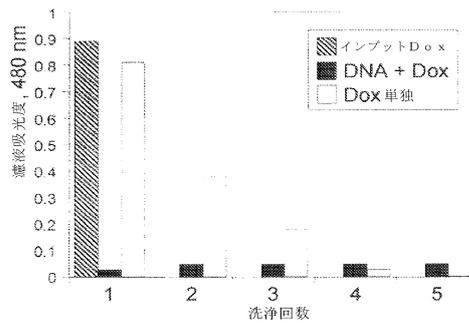
【 図 3 】



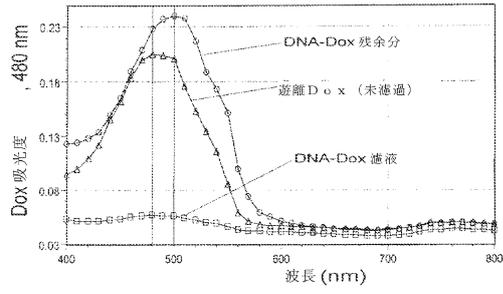
【 図 2 】



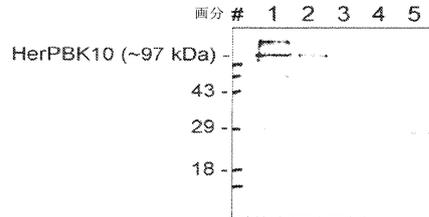
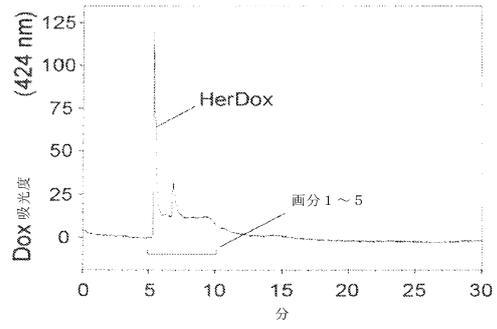
【 図 4 A 】



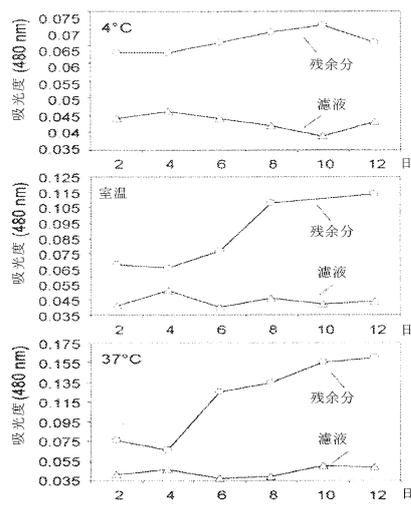
【 図 4 B 】



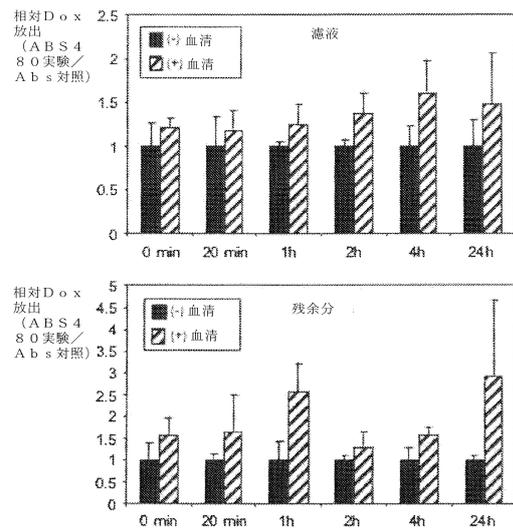
【 図 5 】



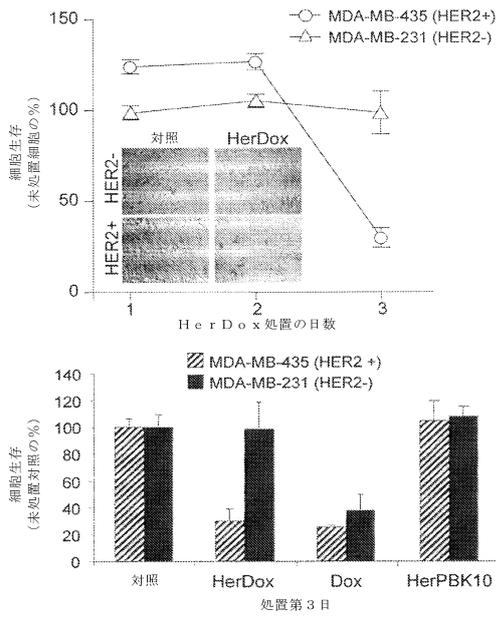
【 図 6 A 】



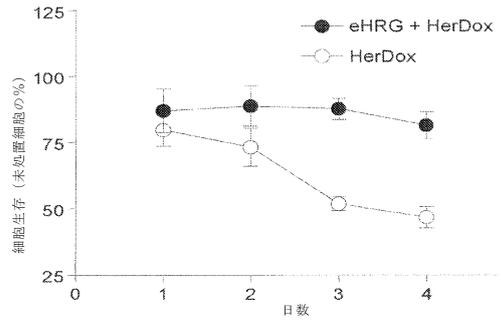
【 図 6 B 】



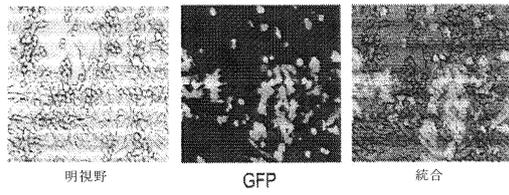
【 図 7 】



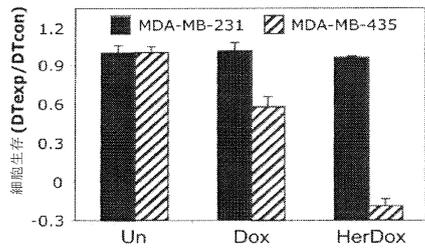
【 図 8 】



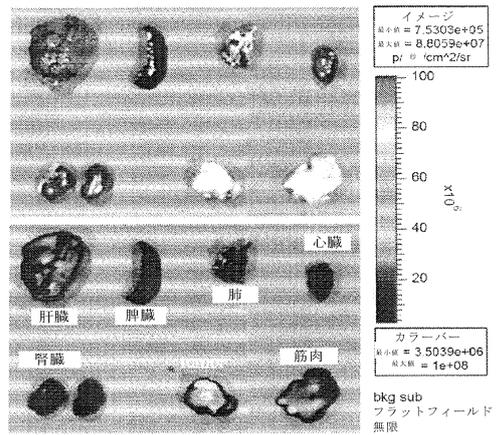
【 図 9 A 】



【 図 9 B 】



【 図 10 】



【 図 9 C 】

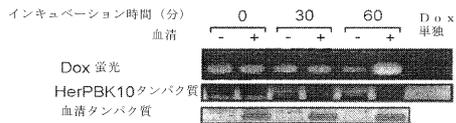
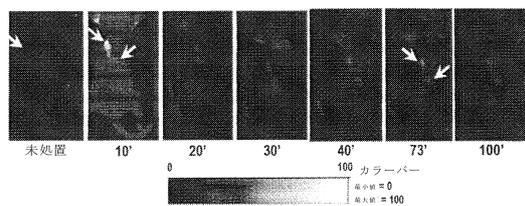
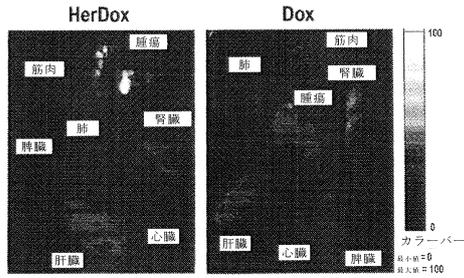


図 9 (c)

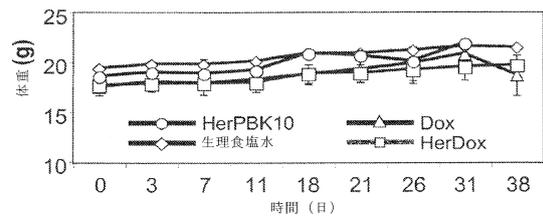
【 図 11 A 】



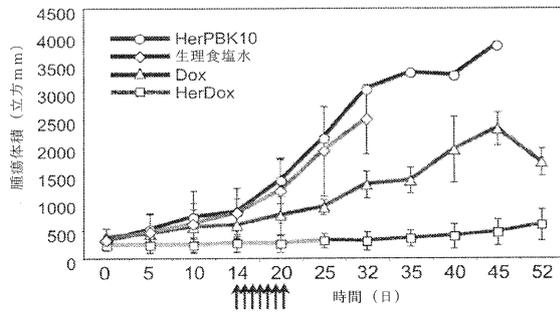
【図 1 1 B】



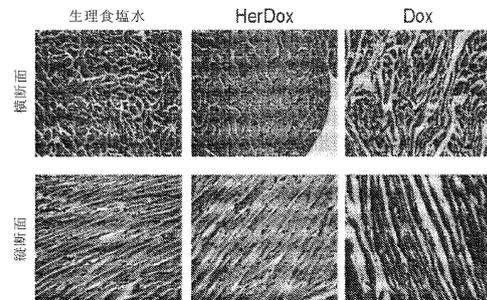
【図 1 2 B】



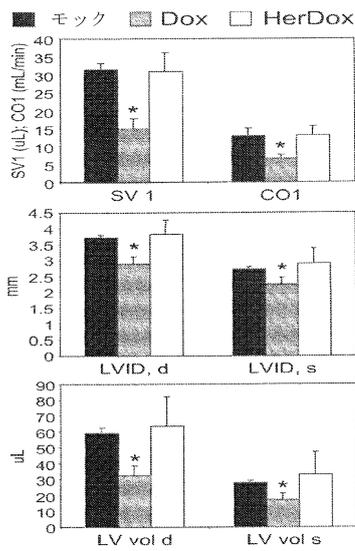
【図 1 2 A】



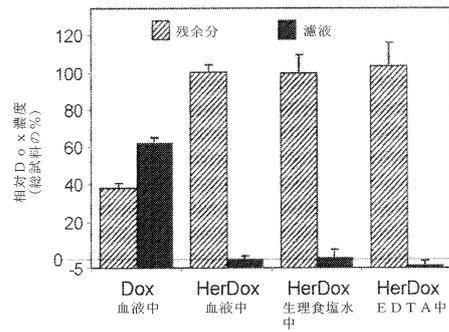
【図 1 2 C】



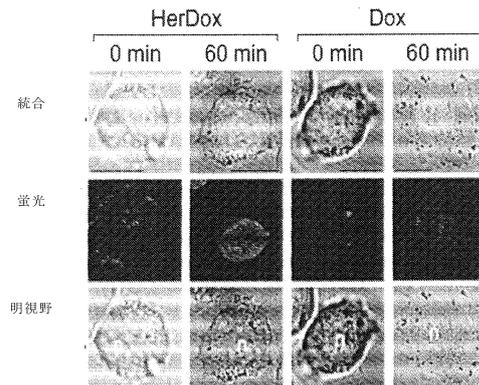
【図 1 2 D】



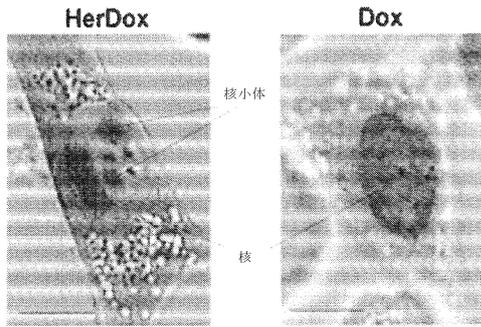
【図 1 3】



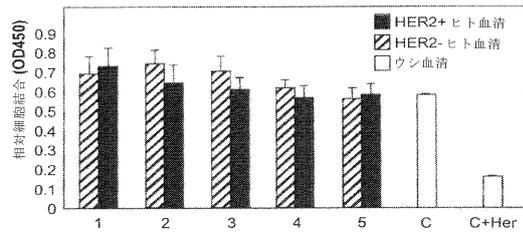
【図 1 4 A】



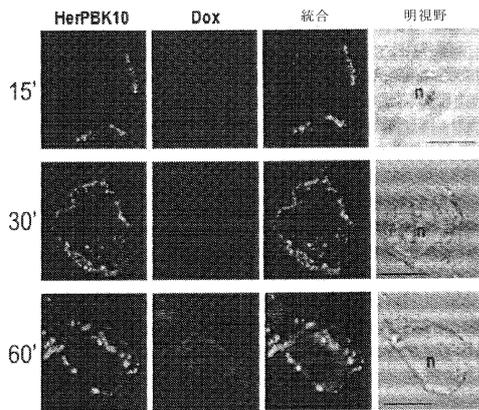
【図14B】



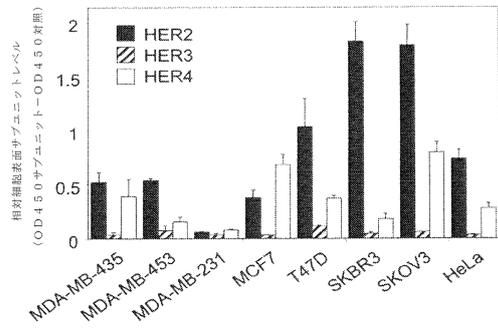
【図16】



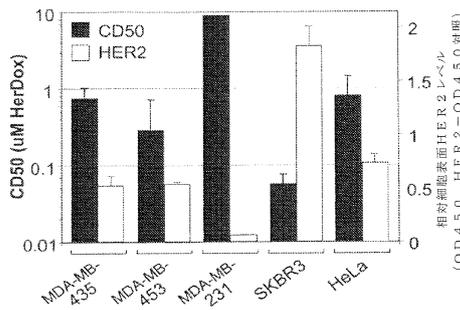
【図15】



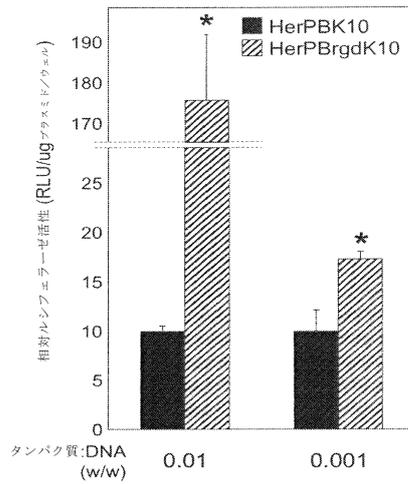
【図17A】



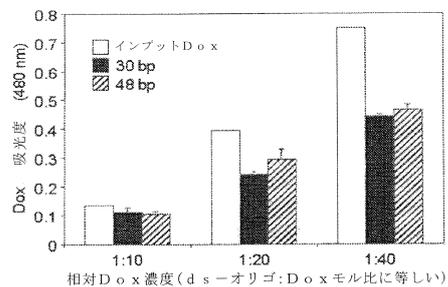
【図17B】



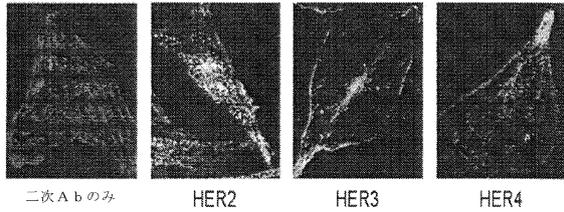
【図18】



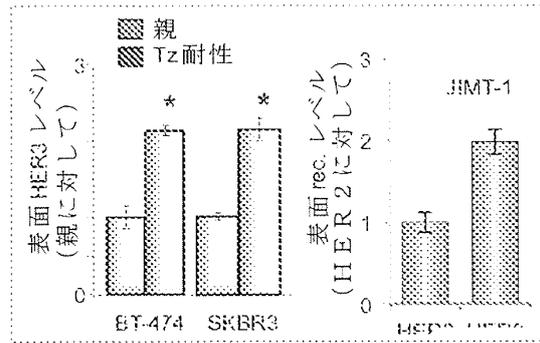
【図19】



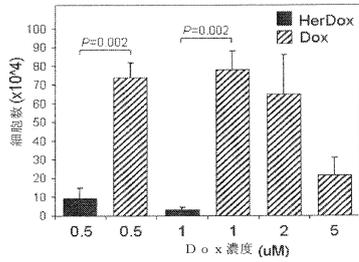
【図20A】



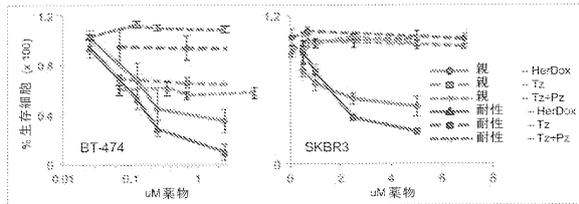
【図21A】



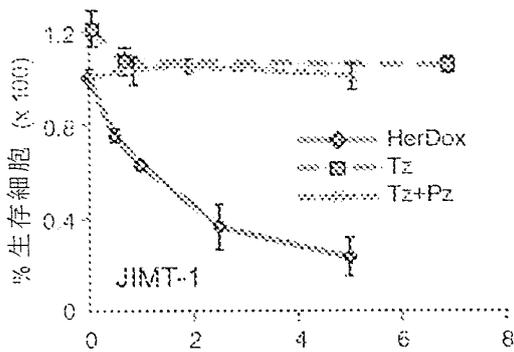
【図20B】



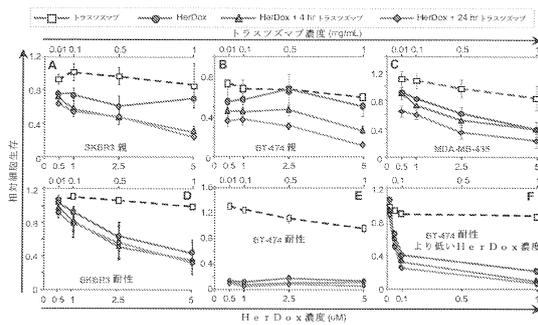
【図21B】



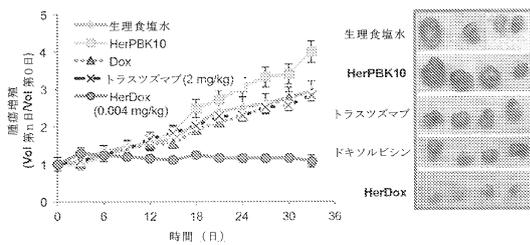
【図21C】



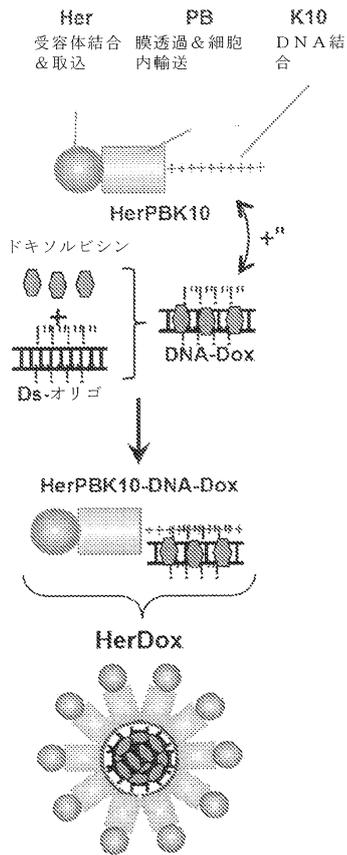
【図23】



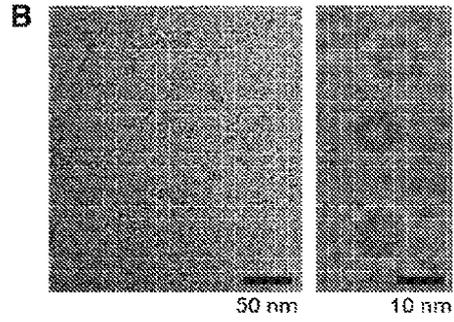
【図22】



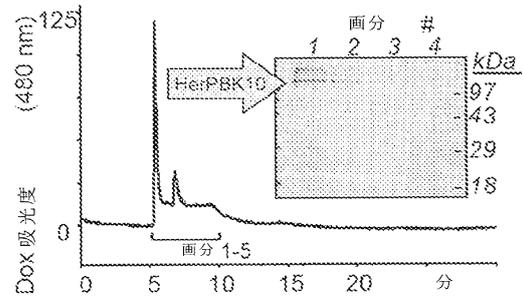
【図24A】



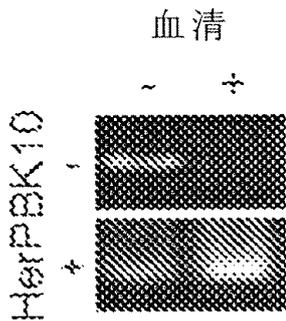
【図24B】



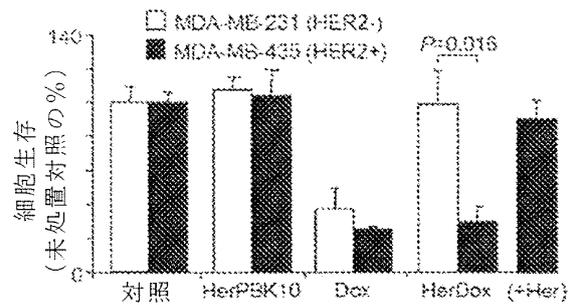
【図24C】



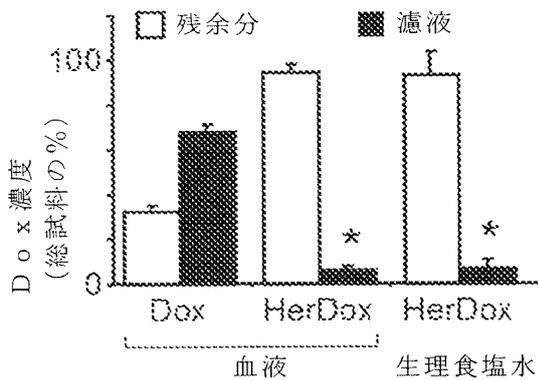
【図24D】



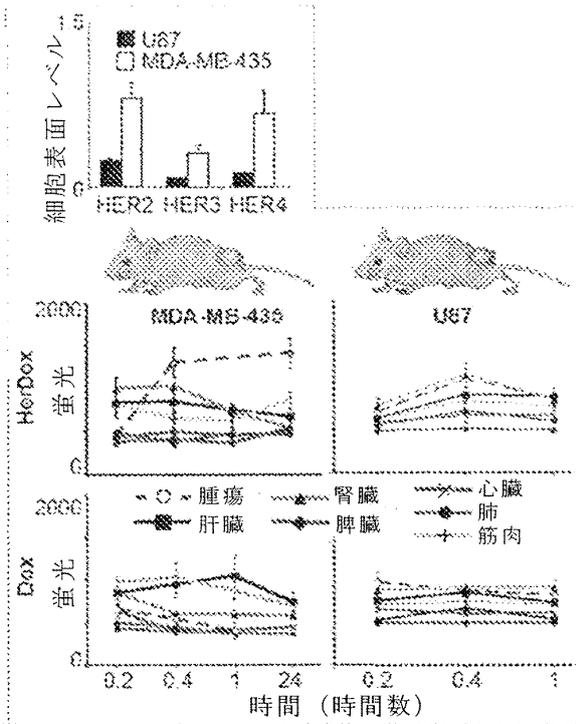
【図25-A】



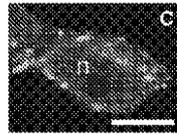
【図24E】



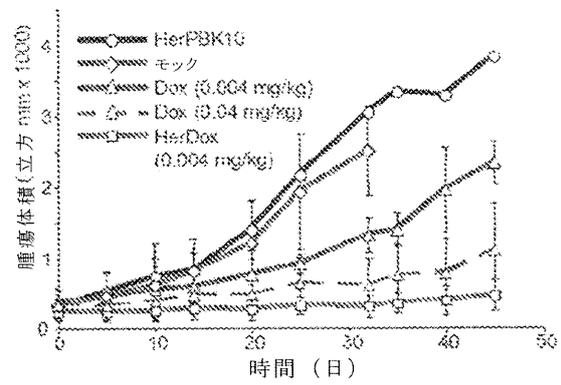
【図 25 - B】



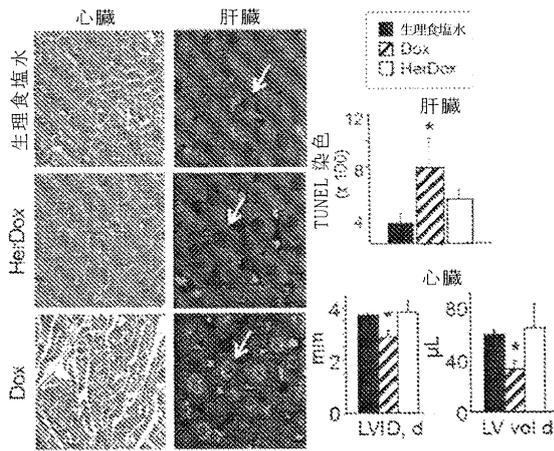
【図 25 - C】



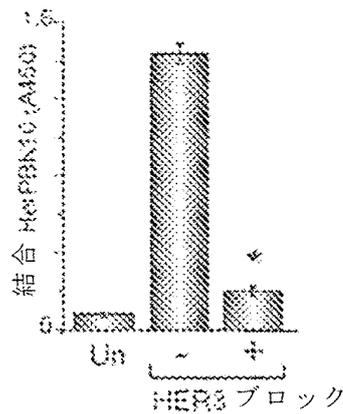
【図 25 - D】



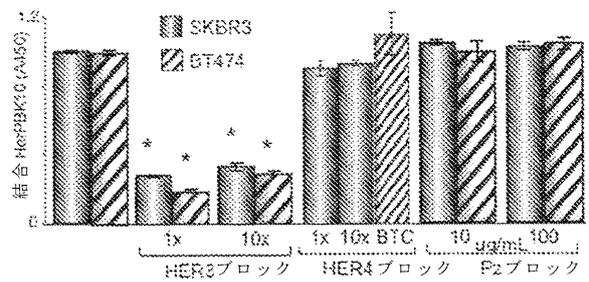
【図 25 - E】



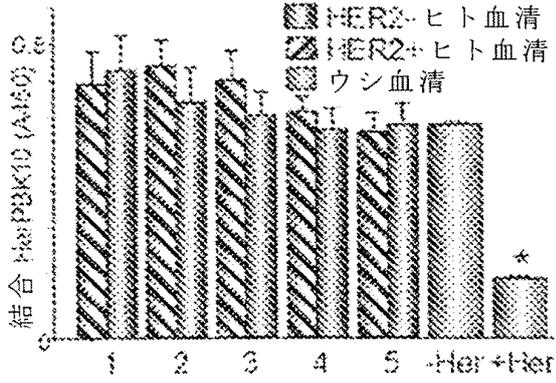
【図 26 - A】



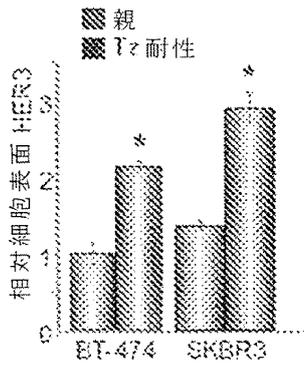
【図 26 - B】



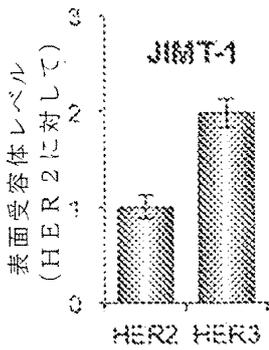
【図 26 - C】



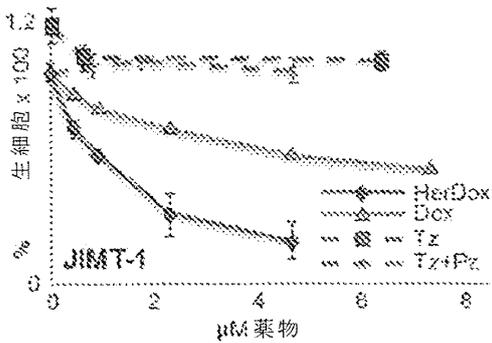
【図 27 - A】



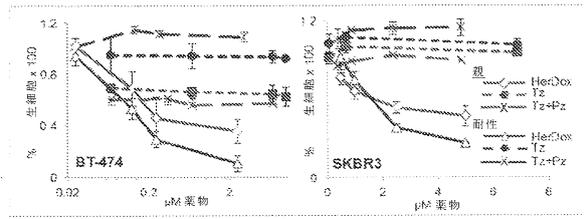
【図 27 - D】



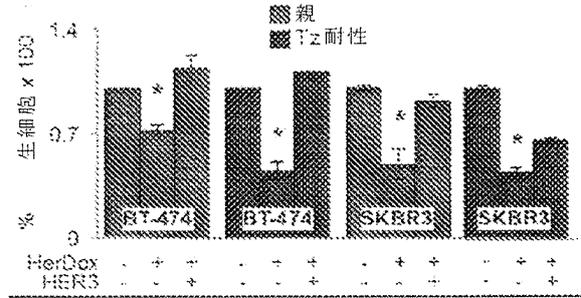
【図 27 - E】



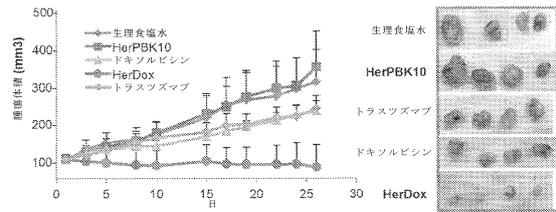
【図 27 - B】



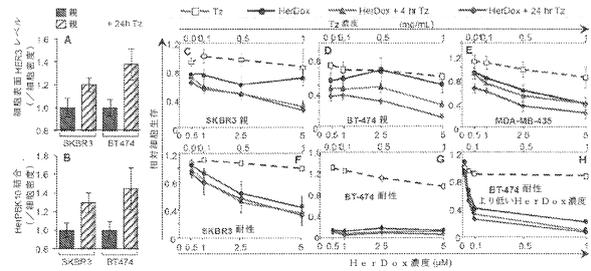
【図 27 - C】



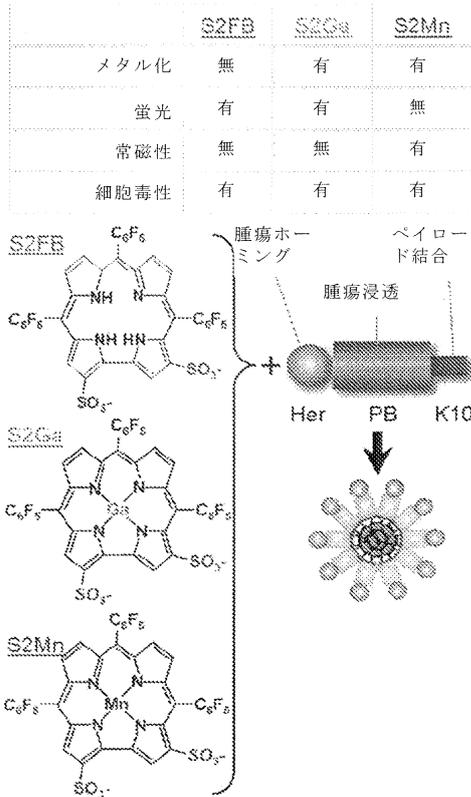
【図 28】



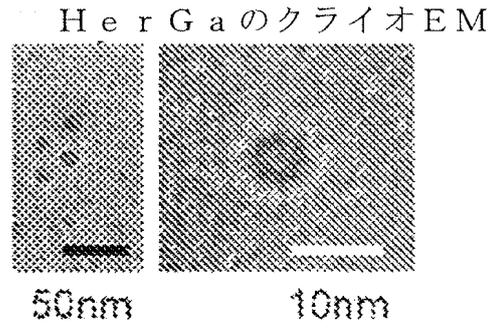
【図 29】



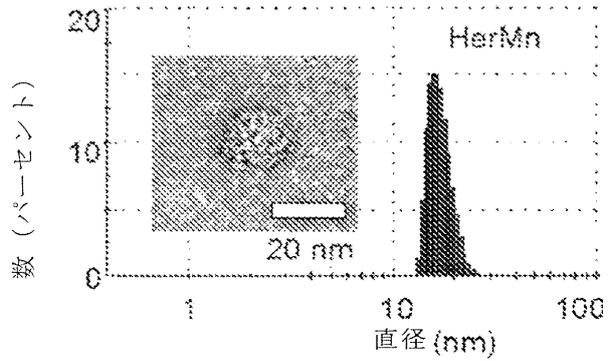
【図33-A】



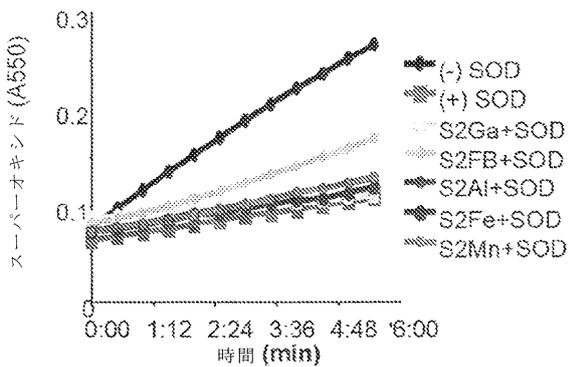
【図33-B】



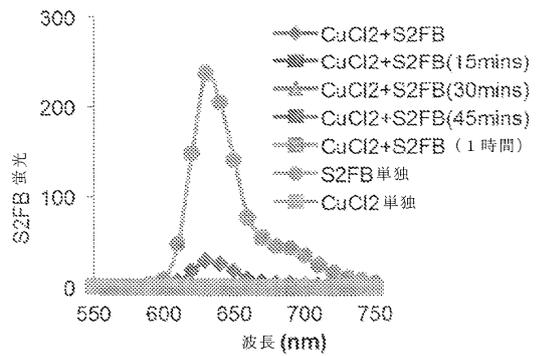
【図33-C】



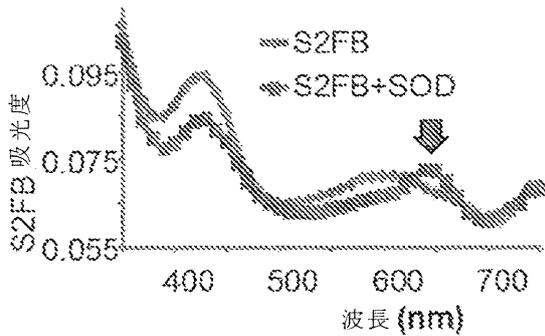
【図34-A】



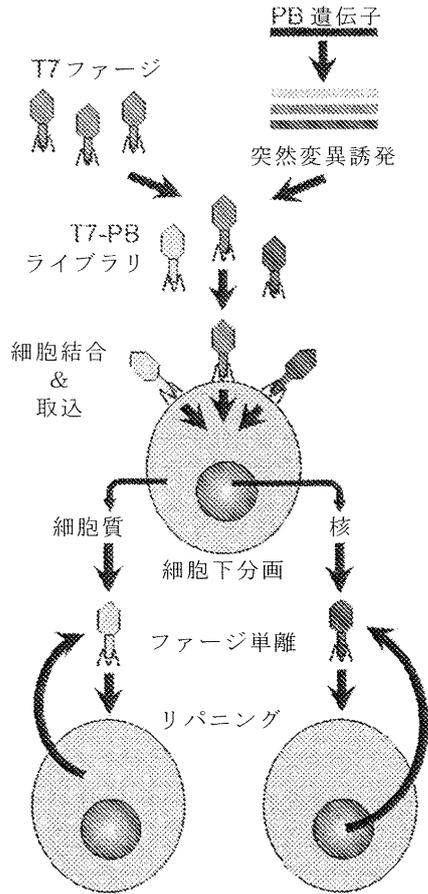
【図34-C】



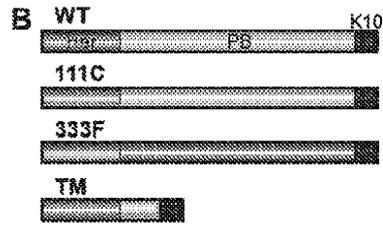
【図34-B】



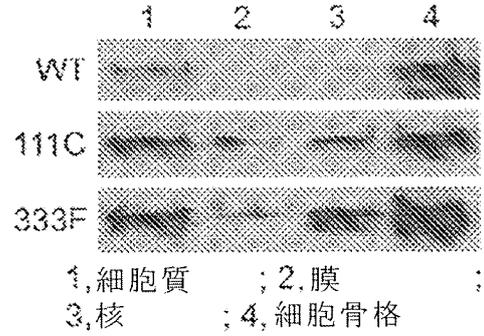
【図35-A】



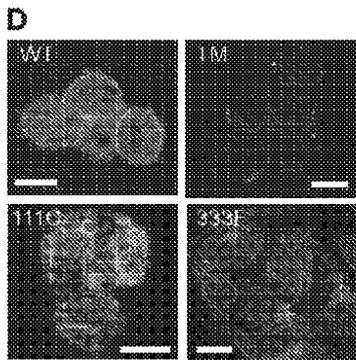
【図35-B】



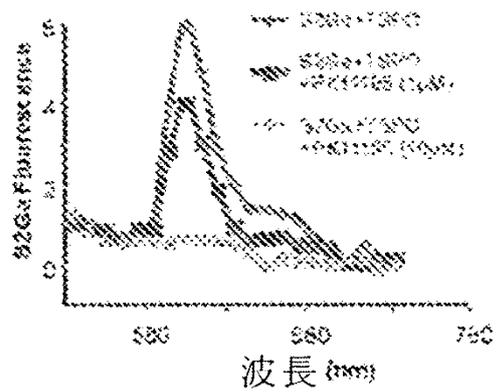
【図35-C】



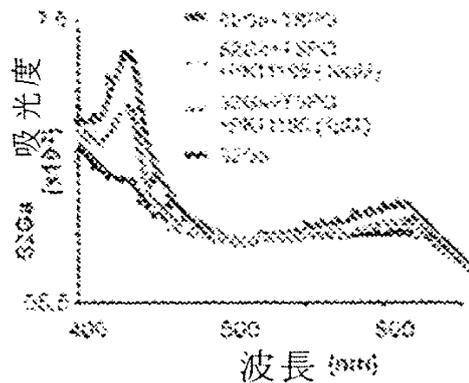
【図35-D】



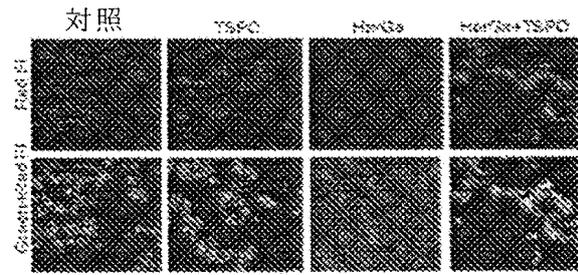
【図36-B】



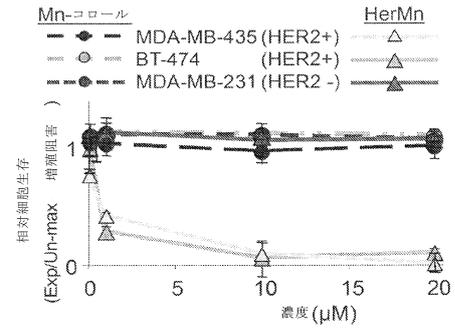
【図36-A】



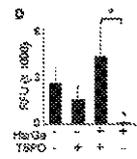
【図36-C】



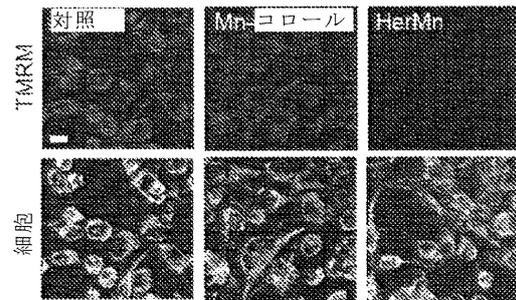
【図37】



【図36-D】



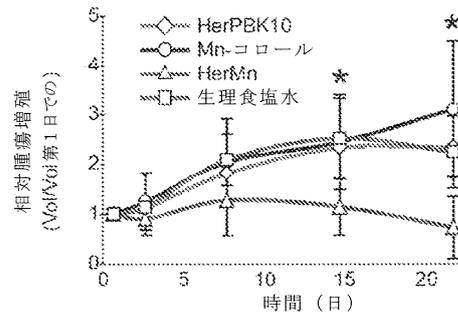
【図38-A】



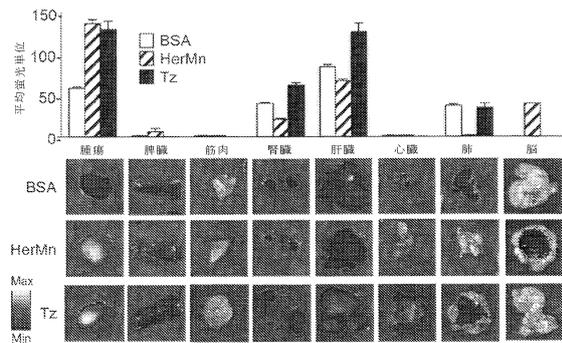
【図38-B】



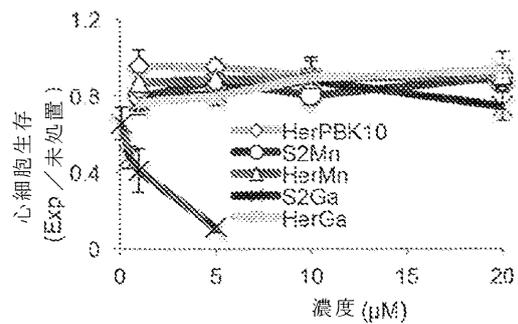
【図40-A】



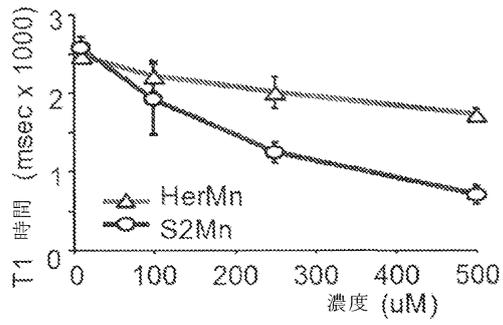
【図39】



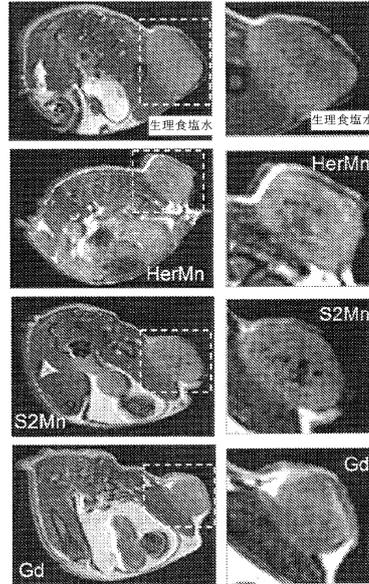
【図40-B】



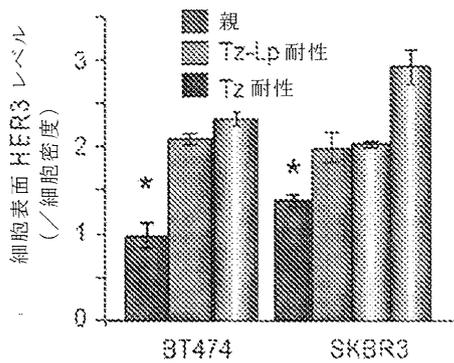
【図41-A】



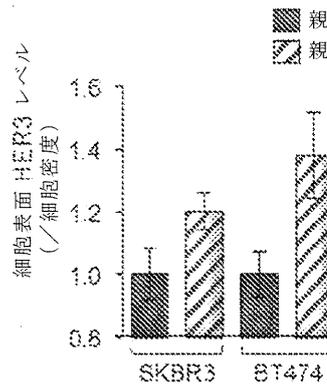
【図41-B】



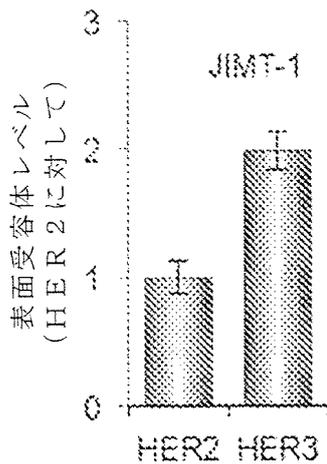
【図42-A】



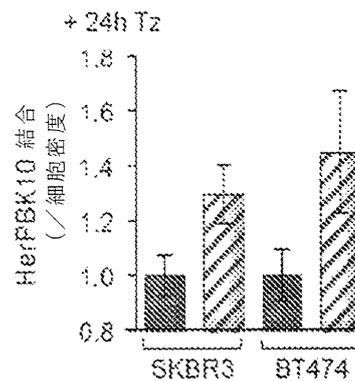
【図42-C】



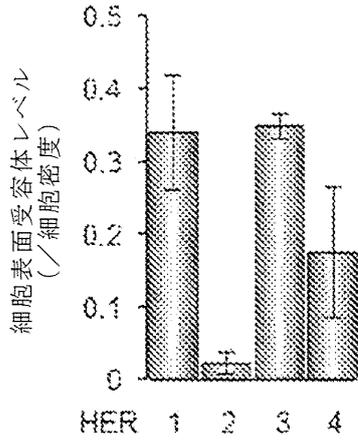
【図42-B】



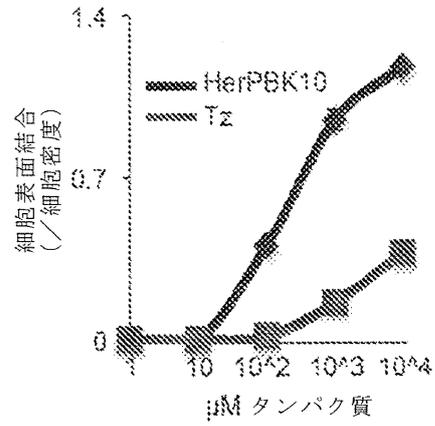
【図42-D】



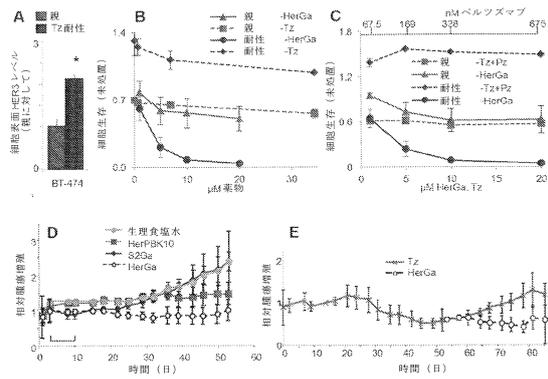
【図42-E】



【図42-F】



【図43】



フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 A 6 1 K 47/42 (2017.01) A 6 1 K 47/42
 A 6 1 K 47/30 (2006.01) A 6 1 K 47/30
- (72)発明者 メディナ - カウウェ, ラリ, ケイ .
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 0 4 8 , ロサンゼルス, 8 7 0 0 ベバリー ブールバ
 ード
- (72)発明者 シムズ, ジェシカ
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 0 4 8 , ロサンゼルス, 8 7 0 0 ベバリー ブールバ
 ード
- (72)発明者 タグタイム, マイケル
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 0 4 8 , ロサンゼルス, 8 7 0 0 ベバリー ブールバ
 ード
- (72)発明者 ハンソン, クリス
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 0 4 8 , ロサンゼルス, 8 7 0 0 ベバリー ブールバ
 ード
- (72)発明者 ツイ, シャオジャン
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 0 4 8 , ロサンゼルス, 8 7 0 0 ベバリー ブールバ
 ード

審査官 梅田 隆志

- (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 0 6 5 7 7 8 (U S , A 1)
 米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 3 3 1 2 7 3 (U S , A 1)
 LALI K MEDINA-KAUWE, DEVELOPMENT OF ADENOVIRUS CAPSID PROTEINS FOR TARGETED THERAPEUTI
 C DELIVERY, THER DELIV., 2 0 1 3 年 2 月, V4 N2, P267-277
 Drugs of Today, 1 9 9 9 年, Vol.35, No.12, pp.931-946
 Cancer Research, 2 0 1 4 年 1 0 月, Abstract 4487, DOI:10.1158/1538-7445.AM2014-4487
 J. Cancer Res Clin Oncol, 2 0 1 3 年, Vol.139, pp.1563-1568, DOI:10.1007/s00432-013-14
 79-0
 Nanomedicine, 2 0 1 2 年, Vol.7, No.3, pp.335-352
 Cancer Research, 2 0 1 3 年 1 2 月, Abstract P5-08-08, DOI:10.1158/0008-5472.SABCS13-P5
 -08-08
 BREAST CANCER RESEARCH, 2 0 1 1 年 1 1 月 2 8 日, V13:R121, P1-19
 Cancer Research, 2 0 1 3 年 2 月, Abstract A101, DOI:10.1158/1538-7445.TIM2013-A101
 PNAS, 2 0 0 9 年 4 月 1 4 日, Vol.106, No.15, pp.6105-6110
 Breast Cancer Res Treat., 2 0 1 3 年 6 月, Vol.139, No.3, pp.741-750, Abstract, DOI : 1
 0.1007/s10549-013-2570-6

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 4 0 9
 A 6 1 K 3 1 / 7 0 4
 A 6 1 K 4 5 / 0 0
 A 6 1 K 4 7 / 3 0
 A 6 1 K 4 7 / 4 2
 A 6 1 P 1 5 / 0 0
 A 6 1 P 3 5 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

