

(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2018-525989
(P2018-525989A)

(43) 公表日 平成30年9月13日(2018.9.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-506150 (P2018-506150)
 (86) (22) 出願日 平成28年8月4日 (2016.8.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年4月4日 (2018.4.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/045655
 (87) 国際公開番号 W02017/024182
 (87) 国際公開日 平成29年2月9日 (2017.2.9)
 (31) 優先権主張番号 62/200,726
 (32) 優先日 平成27年8月4日 (2015.8.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507189666
 デューク ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2
 7705, ダラム, アーウィン ロード
 2812 스위트 306
 (74) 代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎
 (74) 代理人 100088694
 弁理士 弟子丸 健
 (74) 代理人 100103610
 弁理士 ▲吉▼田 和彦
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 稲田 篤
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子コードされた本質的に無秩序な送達用ステルスポリマーおよびその使用方法

(57) 【要約】

本明細書において、ポリペプチドおよび1つ以上の薬物分子を含むコンジュゲートが提供される。ポリペプチドは、1つ以上の荷電モチーフを含み、かつ1つ以上の非荷電モチーフをさらに含み得る。コンジュゲートは、薬物分子を対象に効率的に送達するために使用され得る。



FIG. 1A



FIG. 1B

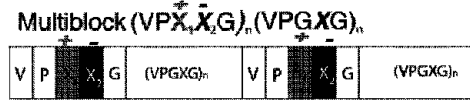


FIG. 1C

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 1つ以上の荷電モチーフを含むポリペプチドであって、それぞれの荷電モチーフが、独立して、配列番号 1 (VPX₁X₂G) (ここで、X₁が負または正荷電アミノ酸であり、X₂が負または正荷電アミノ酸の他方である) からなるアミノ酸配列を有する、ポリペプチド；および

(b) 前記ポリペプチドに付着している 1つ以上の薬物分子を含むコンジュゲート。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが複数の荷電モチーフを含む、請求項 1 に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 3】

前記複数の荷電モチーフがタンデムリピート型である、請求項 2 に記載のコンジュゲート。

【請求項 4】

前記ポリペプチドが 1つ以上の非荷電モチーフをさらに含み、それぞれの非荷電モチーフが、独立して、配列番号 3 (VPGXG) (ここで、X がプロリン以外の任意のアミノ酸である) からなるアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

前記ポリペプチドが複数の非荷電モチーフを含む、請求項 4 に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 6】

前記複数の非荷電モチーフがタンデムリピート型である、請求項 5 に記載のコンジュゲート。

【請求項 7】

1つ以上の非荷電モチーフが前記ポリペプチドの少なくとも 2つの隣接荷電モチーフ間に位置する、請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 8】

前記ポリペプチドが配列番号 2 (VPX₁X₂G)_n (ここで、X₁が負または正荷電アミノ酸であり、X₂が負または正荷電アミノ酸の他方であり、かつ n が 1 以上の整数である) のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 9】

前記ポリペプチドが配列番号 4 (VPGXG)_n (ここで、X がプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつ n が 1 以上の整数である) のアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載のコンジュゲート。

【請求項 10】

前記ポリペプチドが配列番号 5 (VPX₁X₂G)_n(VPGXG)_m (ここで、X₁が負または正荷電アミノ酸であり、X₂が負または正荷電アミノ酸の他方であり、X がプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつ n および m が独立して 1 以上の整数である) のアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載のコンジュゲート。

【請求項 11】

前記ポリペプチドが配列番号 6 (VPGXG)_m(VPX₁X₂G)_n (ここで、X₁が負または正荷電アミノ酸であり、X₂が負または正荷電アミノ酸の他方であり、X がプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつ n および m が独立して 1 以上の整数である) のアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載のコンジュゲート。

40

【請求項 12】

前記ポリペプチドが配列番号 7 {(VPX₁X₂G)(VPGXG)}_b (ここで、X₁が負または正荷電アミノ酸であり、X₂が負または正荷電アミノ酸の他方であり、X がプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつ b が 1 以上の整数である) のアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載のコンジュゲート。

【請求項 13】

50

X_1 が負荷電アミノ酸であり、 X_2 が正荷電アミノ酸である、請求項1～12のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項14】

X_1 が正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負荷電アミノ酸である、請求項1～12のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項15】

負荷電アミノ酸が独立してグルタミン酸およびアスパラギン酸から選択される、請求項1～14のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項16】

正荷電アミノ酸が独立してリジンおよびアルギニンから選択される、請求項1～15のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

10

【請求項17】

Xがプロリン以外の任意のアミノ酸である、請求項4～16のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項18】

Xがアルギニン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セレノシステイン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンから選択される、請求項17に記載のコンジュゲート。

【請求項19】

Xがグリシンおよびバリンから選択される、請求項18に記載のコンジュゲート。

20

【請求項20】

前記ポリペプチドがリンカーをさらに含む、請求項1～19のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項21】

前記リンカーが1つ以上のシステインを含む、請求項20に記載のコンジュゲート。

【請求項22】

前記リンカーが、配列番号(GGC)、配列番号((GGC)₈)、配列番号((G₄S)₃)、および配列番号((VPGXG)₁₆(ここで、Xが、1:1の比で存在するバリンまたはシステインである))から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項20または21に記載のコンジュゲート。

30

【請求項23】

前記リンカーが前記ポリペプチドのC末端、N末端、またはC末端およびN末端の両方に位置する、請求項20～22のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項24】

前記1つ以上の薬物分子が前記リンカーを介して前記ポリペプチドに付着している、請求項20～23のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項25】

前記薬物分子が前記リンカー中のチオール反応性基を介して前記ポリペプチドに付着している、請求項20～24のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

40

【請求項26】

前記1つ以上の薬物分子が小分子、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド、タンパク質、炭水化物、およびそれらの組合せから選択される、請求項1～25のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項27】

前記薬物分子が小分子を含む、請求項26に記載のコンジュゲート。

【請求項28】

前記薬物分子がタンパク質を含む、請求項26に記載のコンジュゲート。

【請求項29】

前記薬物分子が癌治療薬を含む、請求項1～25のいずれか一項に記載のコンジュゲート

50

ト。

【請求項 30】

前記薬物分子が抗体を含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 31】

前記薬物分子がパクリタキセルを含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 32】

前記薬物分子が T n 3 (T R A I L 超アゴニスト) を含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 33】

対象への投与のために調製される、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 34】

前記コンジュゲートの前記ポリペプチドが組換え発現される、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 35】

組換え発現される、請求項 28 に記載のコンジュゲート。

【請求項 36】

請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを含む組成物。

【請求項 37】

請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 38】

請求項 28 に記載のコンジュゲートをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 39】

請求項 37 または 38 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 40】

薬物分子を対象に送達する方法であって、請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを前記対象に投与することを含む方法。

【請求項 41】

疾患または障害を有する対象を治療する方法であって、請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを前記対象に投与することを含む方法。

【請求項 42】

試料中の標的の存在を判定する方法であって、前記試料を請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載のコンジュゲートと、前記薬物分子と前記試料中の前記標的との間で複合体が形成されることを可能にする条件下で接触させること；および前記複合体の存在を検出することであって、前記複合体の存在が前記試料中の前記標的を示す、検出することを含む方法。

【請求項 43】

前記試料が対象から得られ、および前記方法が、疾患を診断し、前記対象の治療の効力を予後予測するかまたは評価することをさらに含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記対象の治療の効力を評価することをさらに含む場合、必要に応じて前記対象の前記治療を改変して効力を改善することをさらに含む、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

対象における疾患を診断する方法であって、前記対象からの試料を請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載のコンジュゲートと、前記薬物分子と前記試料中の標的との間で複合体が形成されることを可能にする条件下で接触させること；

10

20

30

40

50

前記試料中の前記標的のレベルを判定することであって、前記複合体のレベルが前記試料中の前記標的の前記レベルを示す、判定すること；および

前記試料中の前記標的の前記レベルと前記標的の対照レベルとを比較することであって、前記対照レベルと異なる前記標的のレベルが前記対象における疾患を示す、比較することを含む方法。

【請求項 4 6】

前記対照レベルが、前記対象が治療を開始した期間の前またはその期間中の時点での前記対象におけるレベルに対応し、前記試料が後の時点で前記対象から採取される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記試料が、前記対象が治療を受けている期間中の時点で前記対象から採取され、前記対照レベルが、無疾患レベルまたは前記対象が治療を開始した期間の前の時点でのレベルに対応する、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

治療が前記疾患の治療において無効であると判定される場合、前記治療を改変するか、または異なる治療を前記対象に施与することをさらに含む、請求項 4 5 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記コンジュゲートがレポーターで標識されている、請求項 4 0 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記コンジュゲートが前記対象に静脈内、動脈内、腹腔内、または腫瘍内投与される、請求項 4 0 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記コンジュゲートが、ポリエチレングリコール (P E G) にコンジュゲートされている前記薬物分子に対して低減された抗原性を有する、請求項 4 0 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記コンジュゲートが、ポリエチレングリコール (P E G) にコンジュゲートされている前記薬物分子に対して低減された免疫原性を有する、請求項 4 0 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

疾患が癌、代謝疾患、自己免疫疾患、心血管疾患、および整形外科的障害から選択される、請求項 4 0 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記疾患が癌を含む、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記癌が乳癌、結腸直腸癌、結腸癌、肺癌、前立腺癌、精巣癌、脳癌、皮膚癌、直腸癌、胃癌、食道癌、非上皮性悪性腫瘍、気管癌、頭頸部癌、膵臓癌、肝臓癌、卵巣癌、リンパ癌、子宮頸癌、外陰癌、黒色腫、中皮腫、腎臓癌、膀胱癌、甲状腺癌、骨肉腫、上皮性悪性腫瘍、非上皮性悪性腫瘍、および軟部組織癌から選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記癌が乳癌を含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、参照により全体として本明細書に組み込まれる、2015年8月4日に出願された米国仮特許出願第62/200,726号明細書に対する優先権を主張する。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

連邦政府による資金提供を受けた研究に関する記述

本発明は、National Institutes of Healthにより授与された助成金5 R 0 1 E B 0 0 0 1 8 8 R 0 1のもとで政府支援を受けて作製された。政府は、本発明における一定の権利を有する。

【 0 0 0 3 】

本開示は、薬物送達の方法、より詳細には、治療薬にコンジュゲートされている双性イオン性ポリペプチドに関する。コンジュゲートは、改善された生体適合性および生体分解性を有する。一部の実施形態において、コンジュゲートは、組換え発現させることができ、およびそれにより正確に設計されかつ遺伝子レベルで操作され得る。

10

【 背景技術 】

【 0 0 0 4 】

薬物または治療薬、例えば、小分子、ペプチド、およびタンパク質のそれらの天然形態での送達は、それらの不十分な安定性、低い溶解度、および短いインビボ循環により制限される。薬物送達におけるこれらの課題は、治療効力の減少およびオフターゲット毒性のリスク増加をもたらす。薬物への巨大分子担体の付着は、それらの溶解度、血漿半減期、腫瘍特異的取り込み、およびそれらの全体的な治療上の潜在性を改善し得る。種々の材料、多くは合成ポリマーが薬物を送達するために既に設計されている。1つのこのような合成ポリマーは、ポリエチレングリコール(PEG)である。PEGは、薬物の周囲に「水のケージ」を形成し、次いで、それが血液成分からの立体反発を提供し、そのオプソニ化および酵素的分解の両方を防止する、親水性および吸湿性ポリマーである。PEGのこの「ステルス」特性は、薬物の溶解度および安定性を改善し、対象からのそれらの早期クリアランスを低減させ、それにより、PEG化(薬物をPEGに付着させるプロセス)は医薬産業における重要な方法となる。近年、新たなクラスの双性イオン性合成ポリマー、交互のカチオン性およびアニオン性基をそれらのモノマー中で有するポリマーが同様のステルス特性を実証した。しかしながら、薬物送達ビヒクルとしての合成ポリマーの信頼性を弱体化させる3つの大きい欠点が存在する。第1に、PEGへの反復曝露は、有害な免疫応答を誘発するPEG特異的抗体を産生し得ることが十分に報告されている。第2に、合成ポリマーは、非生体分解性であり、薬物送達後のそれらのインビボ効果が十分に理解されていない。第3に、合成ポリマーは、それぞれのバッチが異なる分子量を有する鎖から構成されるという点で多分散性である。この多分散性は、合成ポリマーに固有であり、特に半減期および免疫原性に関して異なる生物学的特性を有する薬物コンジュゲートの集団をもたらす。当技術分野において、改善された生体適合性、溶解度、安定性および半減期、ならびに低減された毒性を有する薬物の効率的な送達が必要とされている。

20

30

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 5 】

一態様では、本明細書において、(a) 1つ以上の荷電モチーフを含むポリペプチドであって、それぞれの荷電モチーフが、独立して、配列番号1(V P X₁ X₂ G)(ここで、X₁が負または正荷電アミノ酸であり、X₂が負または正荷電アミノ酸の他方である)からなるアミノ酸配列を有する、ポリペプチド;および(b)ポリペプチドに付着している1つ以上の薬物分子を含むコンジュゲートが提供される。

40

【 0 0 0 6 】

一部の実施形態において、ポリペプチドは、複数の荷電モチーフを含む。一部の実施形態において、複数の荷電モチーフは、タンデムリピート型である。一部の実施形態において、ポリペプチドは、1つ以上の非荷電モチーフをさらに含み、それぞれの非荷電モチーフは、独立して、配列番号3(V P G X G)(ここで、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸である)からなるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態において、ポリペプチドは、複数の非荷電モチーフを含む。一部の実施形態において、複数の非荷電モチーフは、タンデムリピート型である。一部の実施形態において、1つ以上の非荷電モチーフは、ポリペ

50

プチドの少なくとも2つの隣接荷電モチーフ間に位置する。

【0007】

一部の実施形態において、ポリペプチドは、配列番号2 (VPX_1X_2G)_n (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸の他方であり、かつnが1以上の整数である)のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ポリペプチドは、配列番号4 ($VPGXG$)_n (ここで、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつnが1以上の整数である)のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ポリペプチドは、配列番号5 (VPX_1X_2G)_n($VPGXG$)_m (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸配列の他方であり、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつnおよびmが独立して1以上の整数である)のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ポリペプチドは、配列番号6 ($VPGXG$)_m(VPX_1X_2G)_n (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸の他方であり、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつnおよびmが独立して1以上の整数である)のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ポリペプチドは、配列番号7 { (VPX_1X_2G) ($VPGXG$) }_b (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸の他方であり、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつbが1以上の整数である)のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、 X_1 は、負荷電アミノ酸であり、 X_2 は、正荷電アミノ酸である。一部の実施形態において、 X_1 は、正荷電アミノ酸であり、 X_2 は、負荷電アミノ酸である。一部の実施形態において、負荷電アミノ酸は、独立して、グルタミン酸およびアスパラギン酸から選択される。一部の実施形態において、正荷電アミノ酸は、独立して、リジンおよびアルギニンから選択される。一部の実施形態において、Xは、プロリン以外の任意のアミノ酸である。一部の実施形態において、Xは、アルギニン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セレノシステイン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンから選択される。一部の実施形態において、Xは、グリシンおよびバリンから選択される。

10

20

【0008】

一部の実施形態において、ポリペプチドは、リンカーをさらに含む。一部の実施形態において、リンカーは、1つ以上のシステインを含む。一部の実施形態において、リンカーは、配列番号(GGC)、配列番号($(GGC)_8$)、配列番号($(G_4S)_3$)、および配列番号($(VPGXG)_{16}$ (ここで、Xは、1:1の比で存在するバリンまたはシステインである))から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、リンカーは、ポリペプチドのC末端、N末端、またはC末端およびN末端の両方に位置する。一部の実施形態において、1つ以上の薬物分子は、リンカーを介してポリペプチドに付着している。一部の実施形態において、薬物分子は、リンカー中のチオール反応性基を介してポリペプチドに付着している。一部の実施形態において、1つ以上の薬物分子は、小分子、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド、タンパク質、炭水化物、およびそれらの組合せから選択される。一部の実施形態において、薬物分子は、小分子を含む。一部の実施形態において、薬物分子は、タンパク質を含む。一部の実施形態において、薬物分子は、癌治療薬を含む。一部の実施形態において、薬物分子は、抗体を含む。一部の実施形態において、薬物分子は、パクリタキセルを含む。一部の実施形態において、薬物分子は、 $Tn3$ (TRAIL超アゴニスト)を含む。一部の実施形態において、コンジュゲートは、対象への投与のために調製される。一部の実施形態において、コンジュゲートのポリペプチドは、組換え発現される。一部の実施形態において、コンジュゲートは、組換え発現される。

30

40

【0009】

別の態様では、本明細書において、本明細書に詳述されるコンジュゲートを含む組成物が提供される。

【0010】

50

別の態様では、本明細書において、本明細書に詳述されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。別の態様では、本明細書において、本明細書に詳述されるコンジュゲートをコードするポリヌクレオチドが提供される。別の態様では、本明細書において、ポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。

【0011】

別の態様では、本明細書において、薬物分子を対象に送達する方法であって、本明細書に詳述されるコンジュゲートを対象に投与することを含む方法が提供される。

【0012】

別の態様では、本明細書において、疾患または障害を有する対象を治療する方法であって、本明細書に詳述されるコンジュゲートを対象に投与することを含む方法が提供される。

10

【0013】

別の態様では、本明細書において、試料中の標的の存在を判定する方法であって、試料を本明細書に詳述されるコンジュゲートと、薬物分子と試料中の標的との間で複合体が形成されることを可能にする条件下で接触させること；および複合体の存在を検出することであって、複合体の存在が試料中の標的を示す、検出することを含む方法が提供される。

【0014】

一部の実施形態において、試料は対象から得られ、および方法は、疾患を診断し、対象の治療の効力を予後予測するかまたは評価することをさらに含む。一部の実施形態において、方法が対象の治療の効力を評価することをさらに含む場合、方法は、必要に応じて対象の治療を改変して効力を改善することをさらに含む。別の態様では、本明細書において、対象における疾患を診断する方法であって、対象からの試料を本明細書に詳述されるコンジュゲートと、薬物分子と試料中の標的との間で複合体が形成されることを可能にする条件下で接触させること；試料中の標的のレベルを判定することであって、複合体のレベルが試料中の標的のレベルを示す、判定すること；および試料中の標的のレベルと標的の対照レベルとを比較することであって、対照レベルと異なる標的のレベルが対象における疾患を示す、比較することを含む方法が提供される。一部の実施形態において、対照レベルは、対象が治療を開始した期間の前またはその期間中の時点での対象におけるレベルに対応し、試料は、後の時点で対象から採取される。一部の実施形態において、試料は、対象が治療を受けている期間中の時点で対象から採取され、対照レベルは、無疾患レベルまたは対象が治療を開始した期間の前の時点でのレベルに対応する。一部の実施形態において、方法は、治療が疾患の治療において無効であると判定される場合、治療を改変するか、または異なる治療を対象に施与することをさらに含む。一部の実施形態において、コンジュゲートは、レポーターで標識されている。一部の実施形態において、コンジュゲートは、対象に静脈内、動脈内、腹腔内、または腫瘍内投与される。一部の実施形態において、コンジュゲートは、ポリエチレングリコール(PEG)にコンジュゲートされている薬物分子に対して低減された抗原性を有する。一部の実施形態において、コンジュゲートは、ポリエチレングリコール(PEG)にコンジュゲートされている薬物分子に対して低減された免疫原性を有する。一部の実施形態において、疾患は、癌、代謝疾患、自己免疫疾患、心血管疾患、および整形外科的障害から選択される。一部の実施形態において、疾患は、癌を含む。一部の実施形態において、癌は、乳癌、結腸直腸癌、結腸癌、肺癌、前立腺癌、精巣癌、脳癌、皮膚癌、直腸癌、胃癌、食道癌、非上皮性悪性腫瘍、気管癌、頭頸部癌、膵臓癌、肝臓癌、卵巣癌、リンパ癌、子宮頸癌、外陰癌、黒色腫、中皮腫、腎臓癌、膀胱癌、甲状腺癌、骨肉腫、上皮性悪性腫瘍、非上皮性悪性腫瘍、および軟部組織癌から選択される。一部の実施形態において、癌は、乳癌を含む。

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A-C】ZIP Pの考えられるアーキテクチャーを示す。(A)ホモポリマー。(B)ジブロックポリマー。(C)マルチブロックポリマー。

【図1D】ZIP Pの考えられる配列を示す。(D)荷電モチーフの考えられる配列。

50

【図2A】ZiPPの特徴付けを示す。使用したZiPP構築物は、ペントペプチド双性イオン性モチーフの120個のリピートであった。(A)精製ZiPP構築物のSDS page分析。

【図2B】ZiPPの特徴付けを示す。使用したZiPP構築物は、ペントペプチド双性イオン性モチーフの120個のリピートであった。(B)(VPKDG)₁₂₀および(VPRDG)₁₂₀についての代表的なMALDIスペクトルにより、精製ZiPP構築物のMWが確認された(それぞれMW = 60.5 kDa、MW = 63.8 kDa)。

【図2C】ZiPPの特徴付けを示す。使用したZiPP構築物は、ペントペプチド双性イオン性モチーフの120個のリピートであった。(C)動的光散乱を使用して計測された流体力学的半径は、ELP対照と比較して十分に水和したZiPPを示した。

【図2D】ZiPPの特徴付けを示す。使用したZiPP構築物は、ペントペプチド双性イオン性モチーフの120個のリピートであった。(D)ZiPPのCD-スペクトルは、低波長で負の楕円率およびより高波長でわずかに正の楕円率を示し、それはELPのような無秩序構造の典型である。

【図2E】ZiPPの特徴付けを示す。使用したZiPP構築物は、ペントペプチド双性イオン性モチーフの120個のリピートであった。(E)ネイティブPAGEゲルは、ZiPPがアルブミンと相互作用しないことを示した。

【図3A】静脈内注射した場合のELP(VPGAG)およびZiPPの血漿薬物動態を示す。(A)実験設計。

【図3B】静脈内注射した場合のELP(VPGAG)およびZiPPの血漿薬物動態を示す。(B)注射後の時間に応じた血漿濃度。

【図3C】静脈内注射した場合のELP(VPGAG)およびZiPPの血漿薬物動態を示す。(C)それぞれのコンジュゲートについての曲線下面積(AUC)。

【図3D】静脈内注射した場合のELP(VPGAG)およびZiPPの血漿薬物動態を示す。(D)それぞれのコンジュゲートについての排出半減期。

【図4A】皮下注射した場合のELP(VPGAG)およびZiPPの血漿薬物動態を示す。(A)実験設計。

【図4B】皮下注射した場合のELP(VPGAG)およびZiPPの血漿薬物動態を示す。(B)注射後の時間に応じた血漿濃度。

【図4C】皮下注射した場合のELP(VPGAG)およびZiPPの血漿薬物動態を示す。(C)それぞれのコンジュゲートについてのAUC。

【図5A】ZiPP-PTXコンジュゲートの特徴付けを示す。(A)ZiPPパクリタキセル(PTX)ナノ粒子の設計概略図。パクリタキセルを、pH感受性リンカーを介して8つのC末端残基に化学的にコンジュゲートさせた。

【図5B】ZiPP-PTXコンジュゲートの特徴付けを示す。(B)PTXコンジュゲーション後の動的および静的光データは、ZiPPが58nm半径のミセルに自己集合し、1ミセル当たり26の凝集数であったことを示す。Rg/Rhとして計算された形状因子()は0.82であり、それは球状ミセルの形成を示す。ZiPPおよびZiPP+PTXコンジュゲートのMALDI-MSは、1ポリマー鎖当たり3.2~4つの薬物が存在することを示した。

【図5C】ZiPP-PTXコンジュゲートの特徴付けを示す。(C)72時間の処理後のMDA-MB-231三重陰性乳癌細胞系におけるZiPP-PTX、ELP-PTX、および遊離PTXについての細胞生存率。

【図6A】ZiPP化タンパク質を示す。(A)(Tn3)₆を有するZiPP融合タンパク質についての設計概要。

【図6B】ZiPP化タンパク質を示す。(B)大腸菌(E.coli)中で組換え発現させた種々の長さのZiPPを有する(Tn3)₆の親和性精製試料のSDS-PAGE分析。

【図6C】ZiPP化タンパク質を示す。(C)Colo205(結腸癌細胞)に対する細胞毒性アッセイおよび計算したIC₅₀値。

10

20

30

40

50

【図7A - B】Z i P Pの特徴付けを示す。使用したZ i P P構築物は、ペントペプチド双性イオン性モチーフの80個のリピートであった。(A)精製Z i P P構築物のSDS page分析。50kDおよび75kDラダーを参照分子量として標識するが、SDS - P A G Eで使用したラダーは球状タンパク質からのものであり、したがって非構造化Z I P Pと直接比較可能でない。(B)(V P R E G)₈₀および(V P K E G)₈₀についての代表的なM A L D Iスペクトルにより、精製Z I P P構築物の分子量(それぞれMW = 44.1kDa、MW = 41.8kDa)が確認された。

【図7C】Z i P Pの特徴付けを示す。使用したZ i P P構築物は、ペントペプチド双性イオン性モチーフの80個のリピートであった。(C)Z I P PのCDスペクトルは、低波長で負の楕円率およびより高波長でわずかに正の楕円率を示し、それはE L Pのような無秩序構造の典型である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本明細書において、薬物分子を対象に送達するための組成物および方法が提供される。組成物および方法は、ポリペプチドおよびそれに付着している薬物分子を含むコンジュゲートを含む。ポリペプチドは、正荷電アミノ酸および負荷電アミノ酸の両方を含む。本明細書に詳述される組成物および方法は、薬物送達における従来の課題、例として、生体適合性、溶解度、安定性および半減期、免疫原性、ならびに抗原性による制限を克服し得る。本明細書に詳述される構築物は、親水性原理を使用して「水のケージ」をコンジュゲートの周囲に提供して、コンジュゲートを分解から立体的に保護し得る。これにより、コンジュゲートは、コンジュゲート化治療薬の安定性および溶解度を増加させ、そのインビボ効力を改善する。コンジュゲートは、薬物を効率的に送達して疾患を治療することにより疾患の治療を可能にし得る。薬物が標的に結合する一部の実施形態において、コンジュゲートを使用して標的を検出し、疾患を検出もしくは診断し、および/または治療の効力を判定することもできる。本明細書に詳述されるコンジュゲートは、遺伝子操作により産生することもでき、それによりその設計および操作が容易になり、正確さ、より低い毒性、より良好な生体適合性、および改善された生体分解性を伴う。

【0017】

1. 定義

本明細書で使用される用語「含む」、「包含する」、「有している」、「有する」、「することができる」、「含有する」、およびそれらの変形語は、追加の作用または構造の可能性を除外しない制約のない移行句、用語、語であるものとする。単数形「1つの(a)」、「および」、および「その(the)」は、文脈が別途明確に示さない限り複数の参照対象を含む。本開示はまた、明示的に記載されているか否かにかかわらず、本明細書に提示される実施形態または要素を「含む」、「それらからなる」、および「本質的にそれらからなる」他の実施形態を企図する。

【0018】

本明細書における数値範囲の引用について、同程度の精度でそれらの間のそれぞれの介在する数字が明示的に企図される。例えば、6~9の範囲について、7および8の数字が6および9に加えて企図され、6.0~7.0の範囲について、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、および7.0の数字が明示的に企図される。

【0019】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術および科学用語は、当業者により一般に理解される意味と同一の意味を有する。矛盾する場合、定義を含め本明細書が優先する。好ましい方法および材料を以下に記載するが、本明細書に記載のものと同様のまたは均等な方法および材料を本発明の実施または試験で使用することができる。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許および他の参照文献は、参照により全体として本明細書に組み込まれる。本明細書に開示の材料、方法、および実施例は、説明目的にすぎず、限定的なものではない。

10

20

30

40

50

【0020】

1つ以上の目的の値に適用される本明細書で使用される用語「約」は、記述される参照値と類似する値を指す。ある態様において、用語「約」は、別途記述されない限りまたは別途内容から明らかでない限り、記述参照値のいずれかの方向（それよりも大きいまたは小さい）で20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%またはそれより小さい値内に収まる値の範囲を指す（このような数字が考えられる値の100%を超過する場合を除く）。

【0021】

本明細書で使用される「アミノ酸」は、天然存在および非天然合成アミノ酸、ならびに天然存在アミノ酸と類似する様式で機能するアミノ酸アナログおよびアミノ酸模倣体を指す。天然存在アミノ酸は、遺伝子コードによりコードされるものである。本明細書において、アミノ酸は、IUPAC-IUB生化学命名法委員会により推奨されるそれらの一般に公知の三文字記号または一文字記号のいずれかにより称することができる。アミノ酸は、側鎖およびポリペプチド骨格部分を含む。

10

【0022】

本明細書で使用される用語「バイオマーカー」は、疾患または病態の同定および/または分類において有用な変動濃度で対象中に存在する天然存在生物学的分子を指す。バイオマーカーとしては、疾患についての指標もしくはマーカーとして使用される遺伝子、タンパク質、ポリヌクレオチド、核酸、リボ核酸、ポリペプチド、または他の生物学的分子を挙げることができる。一部の実施形態において、バイオマーカーは、疾患マーカーを含む。例えば、バイオマーカーは、疾患を有する対象において上方調節または下方調節される遺伝子であり得る。別の例として、バイオマーカーは、疾患を有し、または疾患を発症するリスクを有する対象においてレベルが増加または減少するポリペプチドであり得る。一部の実施形態において、バイオマーカーは、小分子を含む。一部の実施形態において、バイオマーカーは、ポリペプチドを含む。

20

【0023】

用語「対照」、「参照レベル」および「参照」は、本明細書で互換的に使用される。参照レベルは、計測結果の比較評価対象となるベンチマークとして用いられる所定の値または範囲であり得る。本明細書で使用される「対照群」は、対照対象の群を指す。所定レベルは、対照群からのカットオフ値であり得る。所定レベルは、対照群からの平均であり得る。カットオフ値（または所定のカットオフ値）は、適応インデックスモデル（Adaptive Index Model）（AIM）法により決定することができる。カットオフ値（または所定のカットオフ値）は、患者群の生物学的試料から受信者動作特性（ROC）分析により決定することができる。生物学分野で一般に公知であるROC分析は、ある条件を別の条件から区別するための、例えば、CRCを有する患者の同定におけるそれぞれのマーカーの性能を決定するための試験の能力の決定法である。ROC分析の記載は、P. J. Heagerty et al. (Biometrics 2000, 56, 337-44)（その開示は参照により全体として本明細書に組み込まれる）に提供されている。あるいは、カットオフ値は、患者群の生物学的試料の四分位分析により決定することができる。例えば、カットオフ値は、25~75パーセントイル範囲の任意の値、好ましくは、25パーセントイル、50パーセントイルまたは75パーセントイル、より好ましくは、75パーセントイルに対応する値を選択することにより決定することができる。このような統計分析は、当技術分野における任意の方法を使用して実施することができる。多数の市販のソフトウェアパッケージ（例えば、Analyse-it Software Ltd., Leeds, UK; StataCorp LP, College Station, TX; SAS Institute Inc., Cary, NC.からのもの）を介して実行することができる。標的またはタンパク質活性についての健常または正常レベルまたは範囲は、標準的技法に従って定義することができる。対照は、疾患状態が既知である対象またはその対象からの試料であり得る。対象またはその対象からの試料

30

40

50

は、健常であるか、罹患しているか、治療前に罹患しているか、治療中に罹患しているか、または治療後に罹患しているか、またはそれらの組合せであり得る。

【0024】

用語「発現ベクター」は、所望のタンパク質をコードするための核酸配列を挿入または導入することができる、当技術分野で公知のプラスミド、ウイルスまたは別の媒体を示す。

【0025】

用語「宿主細胞」は、核酸構築物または発現ベクターによる形質転換、形質移入、形質導入、コンジュゲーションなどを受けやすい細胞である。宿主細胞は、植物、細菌、酵母、真菌、昆虫、動物などに由来し得る。一部の実施形態において、宿主細胞としては、大腸菌 (*Escherichia coli*) が挙げられる。

10

【0026】

「単分散する」または「単分散」は、それぞれがほぼ同一の分子量を有する複数のコンジュゲートまたはそれらのポリペプチドの特性を指す。コンジュゲートの遺伝子コード合成は、分子量の正確な制御を容易にし得る。分子量は、分子のインビボ循環時間またはその半減期に影響する因子である。

【0027】

「オプソニン化」は、分子、微生物、またはアポトーシス細胞が化学修飾されて、食細胞およびナチュラルキラー (NK) 細胞上の細胞表面受容体とのより強力な相互作用を有する分子機序を指す。分子、微生物、またはアポトーシス細胞上の抗原は、オプソニン中でコートされる。オプソニンは、免疫細胞、例えば、マクロファージおよび好中球への結合を向上させる。オプソニン化は、細胞表面受容体からのシグナルカスケードを介する食作用も媒介する。

20

【0028】

「合成ポリマー」は、化学プロセスにより少なくとも1つのモノマーから産生されるポリマーを指す。合成ポリマーは、生体によっては直接産生されない。合成ポリマーとしては、ホモポリマー、ヘテロポリマー、ブロックポリマー、コポリマー、ターポリマーなど、ならびにそれらのブレンド、組合せおよび混合物が挙げられる。合成ポリマーの例としては、限定されるものではないが、官能化ポリマー、例えば、5-ビニルテトラゾールモノマー単位を含み、2.0未満の分子量分布を有するポリマーが挙げられる。合成ポリマーは、星形ブロックコポリマー、直鎖ポリマー、分枝鎖ポリマー、超分枝鎖ポリマー、樹枝状ポリマー、櫛形ポリマー、グラフトポリマー、ブラシポリマー、ボトルブラシコポリマーおよび架橋構造、例えば、5-ビニルテトラゾールモノマー単位のブロックを含むブロックコポリマーの1つ以上であり得、またはそれを含有し得る。合成ポリマーとしては、限定されるものではないが、ポリエステル、ポリ(メタ)アクリルアミド、ポリ(メタ)アクリレート、ポリエーテル、ポリスチレン、ポリノルボルネンおよび不飽和結合を有するモノマーが挙げられる。例えば、両親媒性櫛形ポリマーが、Mayes et al. の米国特許出願公開第2007/0087114号明細書および米国特許第6,207,749号明細書(これらのそれぞれの開示は、参照により全体として本明細書に組み込まれる)に記載されている。両親媒性櫛型ポリマーは、疎水性非水溶性ポリマーから形成される骨格と、短鎖親水性非細胞結合ポリマーから形成される側鎖とを含有するコポリマーの形態で存在し得る。他の合成ポリマーの例としては、限定されるものではないが、ポリアルキレン、例えば、ポリエチレンおよびポリプロピレンおよびポリエチレングリコール(PEG); ポリクロロブレン; ポリビニルエーテル; 例えば、ポリ(酢酸ビニル); ハロゲン化ポリビニル、例えば、ポリ(塩化ビニル); ポリシロキサン; ポリスチレン; ポリウレタン; ポリアクリレート; 例えば、ポリ(メチル(メタ)アクリレート)、ポリ(エチル(メタ)アクリレート)、ポリ(n-ブチル(メタ)アクリレート)、ポリ(イソブチル(メタ)アクリレート)、ポリ(tert-ブチル(メタ)アクリレート)、ポリ(ヘキシル(メタ)アクリレート)、ポリ(イソデシル(メタ)アクリレート)、ポリ(ラウリル(メタ)アクリレート)、ポリ(フェニル(メタ)アクリレート)、ポリ(メ

30

40

50

チルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、およびポリ(オクタデシルアクリレート); ポリアクリルアミド、例えば、ポリ(アクリルアミド)、ポリ(メタクリルアミド)、ポリ(エチルアクリルアミド)、ポリ(エチルメタクリルアミド)、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリ(n、イソ、およびtert-ブチルアクリルアミド); ならびにそれらのコポリマーおよび混合物が挙げられる。これらの合成ポリマーとしては、有用な誘導体、例として、置換、化学基、例えば、アルキル基、アルキレン基の付加、ヒドロキシル化、酸化、および当業者により定型的に作製される他の修飾を有する合成ポリマーを挙げることができる。合成ポリマーとしては、双性イオン性ポリマー、例えば、ポリホスホリルコリン(polyphosphorycholine)、ポリカルボキシベタイン、およびポリスルホベタインなどを挙げることができる。合成ポリマーは、ベタイン、カルボキシベタイン、スルホベタイン、オリゴエチレングリコール(OEG)、サルコシンまたはポリエチレングリコール(PEG)の側鎖を有し得る。

10

20

30

40

50

【0029】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」は、一本鎖もしくは二本鎖であり得、または二本鎖配列および一本鎖配列の両方の部分を含有し得る。ポリヌクレオチドは、天然または合成核酸、DNA、ゲノムDNA、cDNA、RNA、またはハイブリッドであり得、ポリヌクレオチドは、デオキシリボおよびリボヌクレオチドの組合せ、ならびに塩基、例として、ウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシン、およびイソグアニンの組合せを含有し得る。ポリヌクレオチドは、化学合成法によりまたは組換え法により得ることができる。

【0030】

「ペプチド」または「ポリペプチド」は、ペプチド結合により結合している2つ以上のアミノ酸の結合配列である。ポリペプチドは、天然、合成、または改変または天然および合成の組合せであり得る。ペプチドおよびポリペプチドとしては、タンパク質、例えば、結合タンパク質、受容体および抗体が挙げられる。用語「ポリペプチド」、「タンパク質」、および「ペプチド」は、本明細書で互換的に使用される。「一次構造」は、特定のペプチドのアミノ酸配列を指す。「二次構造」は、ポリペプチド内の局所的に秩序化された三次元構造を指す。これらの構造は、ドメイン、例えば、酵素ドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細孔ドメイン、および細胞質尾部ドメインとして一般に公知である。ドメインは、ポリペプチドのコンパクトな単位を形成するポリペプチドの部分であり、典型的には、15~350アミノ酸長である。例示的なドメインとしては、酵素活性またはリガンド結合活性を有するドメインが挙げられる。典型的なドメインは、より小さい組織化のセクション、例えば、ベータ-シートおよびアルファ-ヘリックスのストレッチから構成される。「三次構造」は、ポリペプチドモノマーの完全な三次元構造を指す。「四次構造」は、独立した三次単位の非共有会合により形成される三次元構造を指す。「モチーフ」は、ポリペプチド配列の一部であり、少なくとも2つのアミノ酸を含む。モチーフは、2~20、2~15、または2~10アミノ酸長であり得る。一部の実施形態において、モチーフは、3、4、5、6、または7つの連続アミノ酸を含む。

【0031】

本明細書で使用される「薬物動態」は、体内の薬物の循環ならびにそのバイオアベイラビリティ、分布、および排泄を指す。

【0032】

「組換え体」は、例えば、細胞、または核酸、タンパク質、またはベクターに関して使用される場合、その細胞、核酸、タンパク質、またはベクターが、異種核酸もしくはタンパク質の導入または天然核酸もしくはタンパク質の変更により改変されたこと、またはその細胞がそのように改変された細胞に由来することを示す。したがって、例えば、組換え細胞は、細胞の天然(非組換え体)形態内で見出されない遺伝子を発現し、またはそうでなければ異常に発現され、過小発現され、もしくは全く発現されない天然遺伝子を発現する。

【0033】

「レポーター」、「レポーター基」、「標識」、および「検出可能標識」は、本明細書で互換的に使用される。レポーターは、検出可能シグナルを生成し得る。標識は、肉眼または機器による手段により検出可能なシグナルを産生し得る。レポーター基のシグナル伝達の物理的性質（例えば、蛍光、電気化学、核磁気共鳴（NMR）、および電子常磁性共鳴（EPR））および化学的性質が異なる種々のレポーター基を使用することができる。種々のレポーターとしては、シグナル産生物質、例えば、色原体、蛍光化合物、化学発光化合物、放射性化合物などが挙げられる。一部の実施形態において、レポーターは、放射性標識を含む。レポーターとしては、光を産生する部分、例えば、アクリジニウム化合物、および蛍光を産生する部分、例えば、フルオレセインを挙げることができる。一部の実施形態において、レポーターからのシグナルは、蛍光シグナルである。レポーターは、フルオロフォアを含み得る。フルオロフォアの例としては、限定されるものではないが、アクリロダン（6-アクリロイル-2-ジメチルアミノナフタレン）、バダン（6-プロモ-アセチル-2-ジメチルアミノ-ナフタレン）、ローダミン、ナフタレン、ダンシルアジリジン（danzylaziridine）、4-[N-[(2-ヨードアセトキシ)エチル]-N-メチルアミノ]-7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾールエステル（IANBDE）、4-[N-[(2-ヨードアセトキシ)エチル]-N-メチルアミノ-7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール（IANBDA）、フルオレセイン、ジピロメテンハウ素ジフルオリド（BODIPY）、4-ニトロベンゾ[c][1,2,5]オキサジアゾール（NBD）、Alexa蛍光色素、およびそれらの誘導体が挙げられる。フルオレセイン誘導体としては、例えば、5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3'6-カルボキシフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロフルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、フルオレセイン、およびイソチオシアネートを挙げることができる。

10

20

【0034】

本明細書で使用される「試料」または「試験試料」は、標的の存在および/またはレベルを検出または判定すべき任意の試料を意味し得る。試料としては、液体、溶液、エマルション、または懸濁液を挙げることができる。試料としては、医学的試料を挙げることができる。試料としては、任意の生物学的体液または組織、例えば、血液、全血、血液の分画、例えば、血漿および血清、筋肉、間質液、汗、唾液、尿、涙液、滑液、骨髄、脳脊髄液、鼻汁、痰、羊水、気管支肺胞洗浄液、胃洗浄液、嘔吐物、糞便物質、肺組織、末梢血単核細胞、全白血球、リンパ節細胞、脾細胞、扁桃腺細胞、癌細胞、腫瘍細胞、胆汁、消化液、皮膚、またはそれらの組合せを挙げることができる。一部の実施形態において、試料は、アリコートを含む。他の実施形態において、試料は、生体液を含む。試料は、当技術分野で公知の任意の手段により得ることができる。試料は、患者から得られたままで直接使用することができ、または例えば濾過、蒸留、抽出、濃縮、遠心分離、妨害成分の不活性化、試薬の添加などにより前処理して、本明細書で考察されるとおりまたはそうでなければ当技術分野で公知のとおり、何らかの様式で試料の特徴を改変することができる。

30

【0035】

本明細書で使用される用語「感度」は、真陽性の数を真陽性の数と偽陰性の数との合計により割ったものを指し、感度（「sens」）は、 $0 < sens < 1$ の範囲内であり得る。理想的には、本明細書における方法の実施形態は、対象が実際に疾患を有する場合に対象がその疾患を有しないと誤って識別されないように、0に等しいかまたはほぼ0に等しい偽陰性の数を有する。逆に、評価は、感度に対する補完的な計測である予測アルゴリズムが陰性を正確に分類する能力からなることが多い。

40

【0036】

本明細書で使用される用語「特異度」は、真陰性の数を真陰性の数と偽陽性の数との合計により割ったものを指し、特異度（「spec」）は、 $0 < spec < 1$ の範囲内であり得る。理想的には、本明細書に記載の方法は、対象が実際に疾患を有さない場合に対象がその疾患を有すると誤って識別されないように、0に等しいかまたはほぼ0に等しい偽

50

陽性の数を有する。したがって、1または100%に等しい感度および特異度の両方を有する方法が好ましい。

【0037】

「特異的に結合する」は、一般に、ポリペプチドがランダムな非関連標的に結合するよりも容易に標的に結合する場合、ポリペプチドがその標的に結合することを意味する。

【0038】

「ステルス」または「ステルスポリマー」は、長期間にわたり血流中で免疫細胞により検出されないままであり得るコンジュゲートまたはそのポリペプチドを指す。ステルスポリマーは、少なくとも部分的に、例えば、プロテアーゼによるコンジュゲートの酵素的分解またはそのポリペプチドへの分解、および外来粒子を認識するために免疫系により使用される一般的な方法であるオプソニン化に耐性である。したがって、ステルスポリマーは、他のポリマー、コンジュゲート、非ステルスポリマー、および/または非ステルスコンジュゲートに対して低減された抗原性、低減された免疫原性、増加した安定性、増加した半減期、および増加したバイオアベイラビリティの1つ以上を有し得る。オプソニン化、免疫系による認識、または体内からのコンジュゲート（またはそのポリペプチドもしくは薬物分子）のクリアランスを遅延、低減、または防止する能力は、本明細書でステルス特性と称され得る。

10

【0039】

本明細書で使用される「対象」は、本明細書に記載のコンジュゲートまたは融合タンパク質を所望するかまたはそれを必要とする哺乳動物を意味し得る。対象は、ヒトまたは非ヒト動物であり得る。対象は、哺乳動物であり得る。哺乳動物は、霊長類または非霊長類であり得る。哺乳動物は、霊長類、例えば、ヒト；非霊長類、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、マウス、ラット、ラクダ、ラマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、およびモルモットなど；または非ヒト霊長類、例えば、サル、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、およびテナガザルなどであり得る。対象は、任意の年齢または発生段階のもの、例えば、成人、青年、または幼児などであり得る。

20

【0040】

本明細書で使用される「標的」は、薬物分子が結合する実体を指し得る。標的としては、例えば、小分子、タンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、またはそれらの組合せを挙げることができる。

30

【0041】

「転移」または「相転移」は、熱応答性ポリペプチドの凝集を指す。相転移は、下限臨界溶液温度(LCST)または逆転移温度 T_i と呼ばれる規定の温度で急激に可逆的に生じる。転移温度未満では、熱応答性ポリペプチド（または熱応答性ポリペプチドを含むポリペプチド）は、高度に可溶性である。転移温度を超えた加熱時、熱応答性ポリペプチドは疎水的に崩壊し、凝集し、別個のゲル様相を形成する。「逆転移サイクリング(Inverse transition cycling)」は、熱応答性ポリペプチド（または熱応答性ポリペプチドを含むポリペプチド）のためのタンパク質精製法を指す。このタンパク質精製法は、可溶相および不溶相を介して溶液をサイクルさせ、それにより汚染物質を除去するための熱応答性ポリペプチドの可逆的相転移挙動の使用を含み得る。

40

【0042】

「治療」または「治療すること」は、疾患からの対象の保護を指す場合、その疾患を予防、抑制、抑止、改善、または完全に排除することを意味する。疾患の予防は、本発明の組成物を対象に疾患発症前に投与することを含む。疾患の抑制は、本発明の組成物を対象に疾患誘導後であるがその臨床的所見前に投与することを含む。疾患の抑止または改善は、本発明の組成物を対象に疾患の臨床的所見後に投与することを含む。

【0043】

「実質的に同一」は、第1および第2のアミノ酸配列が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、

50

75、80、85、90、95、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100アミノ酸の領域に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%であることを意味し得る。

【0044】

ポリヌクレオチドに関して本明細書で使用される「バリエーション」は、(i)参照ヌクレオチド配列の一部または断片；(ii)参照ヌクレオチド配列またはその一部の相補鎖；(iii)参照ポリヌクレオチドまたはその相補鎖と実質的に同一であるポリヌクレオチド；または(iv)ストリンジェントな条件下で参照ポリヌクレオチド、その相補鎖、またはそれと実質的に同一の配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドを意味する。

10

【0045】

「バリエーション」は、アミノ酸の挿入、欠失、または保存的置換によりアミノ酸配列が異なるが、少なくとも1つの生物学的活性を保持するペプチドまたはポリペプチドとしてさらに定義することができる。「生物学的活性」の代表例としては、特異的抗体もしくはポリペプチドにより結合される能力、または免疫応答を促進する能力が挙げられる。バリエーションは、実質的に同一の配列を意味し得る。バリエーションは、その機能的断片を意味し得る。バリエーションは、ポリペプチドの多重コピーも意味し得る。多重コピーは、タンデムであっても、リンカーにより離隔されていてもよい。バリエーションは、少なくとも1つの生物学的活性を保持するアミノ酸配列を有する参照ポリペプチドと実質的に同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドも意味し得る。アミノ酸の保存的置換、すなわち、あるアミノ酸の、類似特性（例えば、親水性、荷電領域の程度および分布）の異なるアミノ酸による置き換えは、典型的には、微小変化を伴うとして当技術分野で認識されている。これらの微小変化は、部分的には、アミノ酸のハイドロパシー指数を考慮することにより同定することができる。Kyte et al., J. Mol. Biol. 1982, 157, 105-132を参照されたい。アミノ酸のハイドロパシー指数は、その疎水性および電荷の考慮に基づく。類似のハイドロパシー指数のアミノ酸が置換され得、タンパク質機能を依然として保持することは当技術分野で公知である。一態様において、±2のハイドロパシー指数を有するアミノ酸が置換されている。アミノ酸の疎水性を使用して生物学的機能を保持するポリペプチドをもたらす置換を明らかにすることもできる。ポリペプチドに関するアミノ酸の親水性の考慮により、そのポリペプチドの最大局所平均親水性（参照により本明細書に完全に取り込まれる米国特許第4,554,101号明細書に考察される、抗原性および免疫原性と十分に相関することが報告された有用な尺度）の計算が可能となる。類似する親水性値を有するアミノ酸の置換は、当技術分野で理解されている生物学的活性、例えば、免疫原性を保持するポリペプチドをもたらすことができる。置換は、互いに±2内の親水性値を有するアミノ酸により実施することができる。アミノ酸の疎水性指数および親水性値の両方が、そのアミノ酸の特定の側鎖により影響を受ける。その観察と一致して、生物学的機能と適合性であるアミノ酸置換は、疎水性、親水性、電荷、サイズおよび他の特性により明らかにされるとおり、アミノ酸、特にそれらのアミノ酸の側鎖の相対類似性に依存することが理解される。

20

30

【0046】

バリエーションは、全遺伝子配列またはその断片の全長に対して実質的に同一であるポリヌクレオチド配列であり得る。ポリヌクレオチド配列は、遺伝子配列またはその断片の全長に対して80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であり得る。バリエーションは、アミノ酸配列またはその断片の全長に対して実質的に同一であるアミノ酸配列であり得る。アミノ酸配列は、アミノ酸配列またはその断片の全長に対して80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であり得る。

40

【0047】

50

「水のケージ」は、分子を包囲し、その分子とイオンの相互作用する水分子を指す。分子は、例えば、ポリペプチド、Z i P P、薬物分子、またはコンジュゲートであり得る。分子が溶液中に存在する場合、例えば、その分子は、包囲水分子とイオン性相互作用を形成し、その結果、その周囲に水のケージが形成される。例えば、ポリペプチドの正および負荷電アミノ酸は、溶液中でその周囲の水分子とのイオン性相互作用を形成し得る。溶液としては、例えば、対象の血漿または血液または他の体液を挙げることができる。イオン性相互作用は、水素結合または他の分子間引力よりも強力であり、摂動状態になるためにより多くのエネルギーを必要とする。一部の実施形態において、水のケージは、分子（例えば、ポリペプチド、Z i P P、薬物分子、またはコンジュゲート）を分解またはオゾン化から保護し得る。水のケージは、ステルス特性を分子に付与し得る。

10

【0048】

「双性イオン性」または「双性イオン」は、0の正味電荷を有するが、分子内の独立した個々の原子上の負および正電荷を含む分子を指す。荷電原子は、1つ以上の共有結合により結合している。ポリペプチドは、双性イオン性であり得る。

【0049】

2. コンジュゲート

コンジュゲートは、ポリペプチドおよびそのポリペプチドに付着している1つ以上の薬物分子を含む。コンジュゲートは、少なくとも1つのリンカーをさらに含み得る。コンジュゲートは、薬物送達のためのステルスポリマーとみなされる。

【0050】

20

a. ポリペプチド

ポリペプチドは、1つ以上の荷電モチーフを含む。荷電モチーフは、1つ以上の正荷電アミノ酸および1つ以上の負荷電アミノ酸を含み、正荷電アミノ酸および負荷電アミノ酸は1:1の比で存在する。一部の実施形態において、モチーフの正味電荷は、中性である。一部の実施形態において、荷電モチーフは、双性イオン性モチーフである。1つのモチーフ内の正荷電アミノ酸は、同一でも異なってもよい。1つのモチーフ内の負荷電アミノ酸は、同一でも異なってもよい。本明細書で使用されるアミノ酸の電荷（正および/または負）は、アミノ酸側鎖の電荷を指す。荷電アミノ酸は、中性pH、生理学的pH、またはタンパク質フォールド内の局所pH、またはそれらの組合せにおいて正および/または負荷電である。荷電モチーフは、1つ以上の非荷電アミノ酸をさらに含み得る。一部の実施形態において、荷電モチーフは、V P X₁X₂G（配列番号1）（ここで、X₁が負または正荷電アミノ酸であり、X₂が負または正荷電アミノ酸の他方である）のアミノ酸配列を有する。1つ以上の荷電モチーフを含むポリペプチドは、双性イオン性ポリペプチド（Z i P P）であり得る。Z i P Pは、負電荷を有するアミノ酸および正電荷を有するアミノ酸の両方を含む全体として中性のポリペプチドである。

30

【0051】

一部の実施形態において、ポリペプチドは、複数の荷電モチーフを含む。複数の荷電モチーフは、リピート型であり得る。一部の実施形態において、ポリペプチドは、(V P X₁X₂G)_n（配列番号2）（ここで、X₁が負または正荷電アミノ酸であり、X₂が負または正荷電アミノ酸の他方であり、かつnが1以上の整数である）のアミノ酸配列を含む。X₁は、隣接モチーフ間で同一でも異なってもよい。X₂は、隣接モチーフ間で同一でも異なってもよい。一部の実施形態において、nは、約100、200、300、400、または500以下の整数である。一部の実施形態において、nは、1、10、50、100、150、または200以上の整数である。一部の実施形態において、nは、約10~約500、約10~約200、約10~約100、約10~約50、約1~約500、約1~約200、約1~約100、または約1~約50の整数である。一部の実施形態において、nは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、16

40

50

5、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、または500に等しい整数である。一部の実施形態において、 $(VPX_1X_2G)_n$ (配列番号2) (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸の他方であり、かつ n が1以上の整数である)のアミノ酸配列を含むポリペプチドをホモポリマーと称することができる。

10

【0052】

一部の実施形態において、ポリペプチドは、1つ以上の荷電モチーフに加えて1つ以上の非荷電モチーフを含む。非荷電モチーフは、非荷電アミノ酸を含む。一部の実施形態において、非荷電モチーフは、いかなる荷電アミノ酸も含まない。一部の実施形態において、非荷電モチーフは、 $VPGXG$ (配列番号3) (ここで、 X がプロリン以外の任意のアミノ酸である) からなるアミノ酸配列を有する。

【0053】

複数の非荷電モチーフは、タンデムリピート型であり得る。一部の実施形態において、ポリペプチドは、1つ以上の荷電モチーフに加えて $(VPGXG)_n$ (配列番号4) (ここで、 X がプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつ n が1以上の整数である)のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、 n は、約100、200、300、400、または500未満の整数である。一部の実施形態において、 n は、約1、10、50、100、150、または200以上の整数である。一部の実施形態において、 n は、約10~約500、約10~約200、約10~約100、約10~約50、約1~約500、約1~約200、約1~約100、または約1~約50の整数である。一部の実施形態において、 n は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、または500に等しい整数である。一部の実施形態において、1つ以上の荷電モチーフに加えて $(VPGXG)_n$ (配列番号4) (ここで、 X がプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつ n が1以上の整数である) からなるアミノ酸配列を有する非荷電モチーフを含むポリペプチドをエラスチン様ポリペプチド(ELP)と称する。

20

30

40

【0054】

ポリペプチドのモチーフは、多数の考えられる手法で配置することができる。考えられる配置およびアーキテクチャーの例を図1に示す。図1では、灰色枠は正荷電アミノ酸を示す一方、黒色枠は負荷電アミノ酸を示す。図1Aは、ホモポリマーの一例を示し、それぞれの単位は、ペントペプチド配列 VPX_1X_2G (配列番号1) または荷電モチーフのリピートである。図1Dは、 VPX_1X_2G (配列番号1) の考えられる配列を示す。図1Bは、ジブロックポリマーの一例を示す。ジブロックアーキテクチャーでは、ポリマーの1つのブロックはリピート型の荷電モチーフから作製される一方、他の部分はリピート型の非荷電モチーフを含む。図1Cは、マルチブロックポリマーの一例を示し、荷電モチーフ

50

および非荷電モチーフは、そのポリマーの多様性を増加させるように異なる部位に置かれる。モチーフの特定の数、アイデンティティ、および配置は、溶媒和の最適レベルを達成し得るコンジュゲートを作出し、水のケージを作出し、および/またはその周囲の層を作出して治療薬または薬物分子の薬物動態の改善に役立つように設計することができる。一部の実施形態において、ポリペプチドは、ステルス特性をそのポリペプチドまたはコンジュゲートに付与するように配置される。一部の実施形態において、1つ以上の非荷電モチーフは、ポリペプチドの少なくとも2つの隣接荷電モチーフ間に位置する。一部の実施形態において、ポリペプチドは、タンデムリピート型の複数の荷電モチーフおよびタンデムリピート型の複数の非荷電モチーフを含む。一部の実施形態において、タンデムリピート型の複数の荷電モチーフは、タンデムリピート型の複数の非荷電モチーフに対してC末端に位置する。一部の実施形態において、タンデムリピート型の複数の荷電モチーフは、タンデムリピート型の複数の非荷電モチーフに対してN末端に位置する。

10

【0055】

一部の実施形態において、ポリペプチドは、 $(VPX_1X_2G)_n(VPGXG)_m$ (配列番号5) (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸の他方であり、 X がプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつ n および m が独立して1以上の整数である)のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、 n は、約100、200、300、400、または500以下の整数である。一部の実施形態において、 n は、約1、10、50、100、150、または200以上の整数である。一部の実施形態において、 n は、約10~約500、約10~約200、約10~約100、約10~約50、約1~約500、約1~約200、約1~約100、または約1~約50の整数である。一部の実施形態において、 n は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、または500に等しい整数である。一部の実施形態において、 m は、約100、200、300、400、または500以下の整数である。一部の実施形態において、 m は、約1、10、50、100、150、または200以上の整数である。一部の実施形態において、 m は、約10~約500、約10~約200、約10~約100、約10~約50、約1~約500、約1~約200、約1~約100、または約1~約50の整数である。一部の実施形態において、 m は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、または500に等しい整数である。一部の実施形態において、 $(VPX_1X_2G)_n(VPGXG)_m$ (配列番号5) (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸の他方であ

20

30

40

50

り、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつnおよびmが独立して1以上の整数である)のアミノ酸配列を含むポリペプチドをジブロックポリマーと称することができる。

【0056】

一部の実施形態において、ポリペプチドは、 $(VPGXG)_m(VPX_1X_2G)_n$ (配列番号6) (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸の他方であり、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつnおよびmが独立して1以上の整数である)のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、nは、約100、200、300、400、または500以下の整数である。一部の実施形態において、nは、約1、10、50、100、150、または200以上の整数である。一部の実施形態において、nは、約10~約500、約10~約200、約10~約100、約10~約50、約1~約500、約1~約200、約1~約100、または約1~約50の整数である。一部の実施形態において、nは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、または500に等しい整数である。一部の実施形態において、mは、約100、200、300、400、または500以下の整数である。一部の実施形態において、mは、約1、10、50、100、150、または200以上の整数である。一部の実施形態において、mは、約10~約500、約10~約200、約10~約100、約10~約50、約1~約500、約1~約200、約1~約100、または約1~約50の整数である。一部の実施形態において、mは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、または500に等しい整数である。一部の実施形態において、 $(VPGXG)_m(VPX_1X_2G)_n$ (配列番号6) (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸の他方であり、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつnおよびmが独立して1以上の整数である)のアミノ酸配列を含むポリペプチドをジブロックポリマーと称することができる。

10

20

30

40

【0057】

一部の実施形態において、ポリペプチドは、 $\{(VPX_1X_2G)(VPGXG)\}_b$ (配列番号7) (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸の他方であり、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつbが1以上の整数である)のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、bは、約100、200、または300以下の整数である。一部の実施形態において、bは、約1、10、50、100

50

、150、または200以上の整数である。一部の実施形態において、bは、約10～約300、約10～約200、約10～約100、約10～約50、約1～約300、約1～約200、約1～約100、または約1～約50の整数である。一部の実施形態において、bは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、または300に等しい整数である。一部の
10
実施形態において、 $\{(VPX_1X_2G)(VPGXG)\}_b$ (配列番号7) (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸の他方であり、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつbが1以上の整数である)のアミノ酸配列を含むポリペプチドをマルチブロックポリマーと称することができる。

【0058】

一部の実施形態において、 X_1 は、負荷電アミノ酸であり、 X_2 は、正荷電アミノ酸である。一部の実施形態において、 X_1 は、正荷電アミノ酸であり、 X_2 は、負荷電アミノ酸である。一部の実施形態において、負荷電アミノ酸は、独立して、グルタミン酸およびアスパラギン酸から選択される。一部の実施形態において、正荷電アミノ酸は、独立して、リジンおよびアルギニンから選択される。一部の実施形態において、Xは、アルギニン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セレノシステイン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンから
20
選択される。一部の実施形態において、Xは、グリシンおよびバリンから選択される。

【0059】

一部の実施形態において、ポリペプチドは温度感受性であり、熱応答性と称することもできる。熱応答性ポリペプチドは、相転移を有し得る。熱応答性ポリペプチドは、相転移特徴をポリペプチドおよび/またはコンジュゲートに付与し得る。相転移は、下限臨界溶液温度(LCST)または逆転移温度(T_i)と呼ばれる規定の温度で急激に可逆的に生じる。「相転移」または「転移」は、熱応答性ポリペプチドの凝集と称することもできる
30
。転移温度(LCSTまたは T_t)未満では、熱応答性ポリペプチド(または熱応答性ポリペプチドを含むポリペプチド)は、高度に可溶性であり得る。転移温度を超えた加熱時、熱応答性ポリペプチドは疎水的に崩壊および凝集し得、別個のゲル様相または不溶性疎水性凝集物を形成する。ポリペプチドの熱応答性特性は、「逆転移サイクリング」と称される方法に従ってポリペプチドおよび/またはコンジュゲートの精製において利用することができる。相転移は、コスモトロピック塩、例えば、硫酸アンモニウムなどを使用して誘発することもできる。例えば、塩化ナトリウムをコスモトロピック塩とともに使用することができる。コスモトロピック塩は、ポリペプチドおよび/またはコンジュゲートを含む溶液に添加することができ、コスモトロピック塩は、ポリペプチドおよび/またはコン
40
ジュゲートが凝集物を形成するまで、または溶液から沈殿するまで添加する。凝集物は、遠心分離によりペレット化し、第2の溶液または緩衝液中で再懸濁させることができる。ポリペプチドおよび/またはコンジュゲートの凝集物は、それらの T_t 未満に冷却されたら、またはコスモトロピック塩が溶液から除去された場合に溶液中に再可溶化し得る。一部の実施形態において、コンジュゲートを、いかなるクロマトグラフィー精製も用いずに精製する。一部の実施形態において、コンジュゲートを細菌培養物、例えば、大腸菌(E.coli)などから組換え生成し、精製する。

【0060】

b. 薬物分子

コンジュゲートは、1つ以上の薬物分子を含み得る。薬物分子は、治療薬であり得る。一部の実施形態において、薬物分子は、小分子、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、タン
50

パク質、ポリペプチド、炭水化物、およびそれらの組合せから選択される。一部の実施形態において、薬物分子は、小分子を含む。一部の実施形態において、薬物分子は、タンパク質を含む。一部の実施形態において、薬物分子は、癌治療薬を含む。一部の実施形態において、薬物分子は、抗体を含む。一部の実施形態において、薬物分子は、Tn3 (TRAIL超アゴニスト)を含む。一部の実施形態において、薬物分子は、コンジュゲートのポリペプチドのシステインに付着している。

【0061】

コンジュゲートは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の薬物分子を含み得る。コンジュゲートは、少なくとも約1つ、少なくとも約2つ、または少なくとも約3つの薬物分子を含み得る。コンジュゲートは、約10個未満、約8つ未満、または約5つ未満の薬物分子を含み得る。一部の実施形態において、コンジュゲートは、1つの薬物分子を含む。一部の実施形態において、コンジュゲートは、コンジュゲートの1ポリペプチド当たり1つの薬物分子を含む。一部の実施形態において、コンジュゲートは、1~10個の薬物分子を含む。一部の実施形態において、コンジュゲートは、2~5つの薬物分子を含む。

10

【0062】

c. リンカー

一部の実施形態において、コンジュゲートは、少なくとも1つのリンカーをさらに含む。一部の実施形態において、コンジュゲートは、2つ以上のリンカーを含む。このような実施形態において、リンカーは、互いに同一でも異なっていてもよい。コンジュゲートは、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、または少なくとも10個のリンカーを含み得る。コンジュゲートは、20個未満、15個未満、10個未満、または5つ未満のリンカーを含み得る。コンジュゲートは、1~20個、5~15個、または1~5つのリンカーを含み得る。リンカーは、ポリペプチドのC末端、ポリペプチドのN末端、またはポリペプチドのN末端およびC末端の両方に位置してよい。一部の実施形態において、リンカーは、ポリペプチド配列内のいずれの場所に位置してもよい。複数のリンカーは、互いに隣接して位置してよい。

20

【0063】

リンカーは、任意のアミノ酸配列および長さのポリペプチドであり得る。リンカーは、スペーサーペプチドとして作用し得る。一部の実施形態において、リンカーは、荷電アミノ酸を含む。一部の実施形態において、リンカーは、非荷電アミノ酸を含む。一部の実施形態において、リンカーは、フレキシブルである。一部の実施形態において、リンカーは、1つ以上のシステインを含む。一部の実施形態において、リンカーは、配列番号8 (GGC)、配列番号9 ((GGC)₈)、配列番号10 ((G₄S)₃)、および配列番号11 ((VPGXG)₁₆ (ここで、Xが、1:1の比で存在するバリンまたはシステインである))から選択されるアミノ酸配列を含む。

30

【0064】

リンカーは、ポリペプチドへの薬物分子のための付着部位として機能し得る。薬物分子は、当技術分野で公知の任意の好適な手段によりリンカーに付着し得る。薬物分子は、チオール反応性結合基を介してリンカーに付着し得る。一部の実施形態において、1つ以上の薬物分子は、リンカーを介してポリペプチドに付着している。一部の実施形態において、薬物分子は、リンカー中のチオール反応性基を介してポリペプチドに付着している。

40

【0065】

3. ポリヌクレオチド

本明細書に詳述されるコンジュゲートをコードするポリヌクレオチドがさらに提供される。ベクターは、本明細書に詳述されるコンジュゲートをコードするポリヌクレオチドを含み得る。ポリペプチドの発現を得るため、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、転写を指向するためのプロモーター、転写/翻訳ターミネーター、およびタンパク質をコードする核酸の場合、翻訳開始のためのリボソーム結合部位を含有する発現ベクター

50

中にサブクロニングすることができる。ベクターの一例は、pet 24である。好適な細菌プロモーターは、当技術分野で周知である。本明細書に詳述されるコンジュゲートをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターにより形質転換または形質移入された宿主細胞がさらに提供される。タンパク質発現のための細菌発現系は、例えば、大腸菌 (*E. coli*)、バシラス属種 (*Bacillus sp.*)、およびサルモネラ属 (*Salmonella*) (Paiva et al., Gene 1983, 22, 229-235; Mosbach et al., Nature 1983, 302, 543-545) で利用可能である。このような発現系のためのキットは市販されている。哺乳動物細胞、酵母、および昆虫細胞のための真核生物発現系は当技術分野で周知であり、同様に市販されている。本発明ではレトロウイルス発現系を使用することができる。一部の実施形態において、コンジュゲートは、配列番号12のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。一部の実施形態において、コンジュゲートは、配列番号13のポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドを含む。

10

20

30

40

50

【0066】

コンジュゲートは、当業者により宿主細胞中で組換え発現させることができる。コンジュゲートは、当業者に公知の任意の手段により精製することができる。例えば、コンジュゲートは、クロマトグラフィー、例えば、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、または親和性クロマトグラフィー、またはそれらの組合せを使用して精製することができる。一部の実施形態において、コンジュゲートは、クロマトグラフィーを用いずに精製する。一部の実施形態において、コンジュゲートは、逆転移サイクリングを使用して精製する。

【0067】

4. 投与

組成物は、コンジュゲートを含み得る。上記に詳述されるコンジュゲートは、医薬分野における当業者に周知の標準的技術に従って組成物中に配合することができる。組成物は、対象への投与のために調製することができる。コンジュゲートを含むこのような組成物は、年齢、性別、体重、および特定の対象の病態、ならびに投与経路などの因子を考慮して医学分野の当業者に周知の投与量およびその技術により投与され得る。

【0068】

コンジュゲートは、予防または治療的に投与され得る。予防的投与では、コンジュゲートは、応答を誘導するために十分な量で投与され得る。治療用途では、コンジュゲートは、治療効果を誘導するために十分な量でそれを必要とする対象に投与される。これを達成するために適切な量は、「治療有効用量」として定義される。この使用に有効な量は、例えば、投与されるコンジュゲートレジメンの特定の組成物、投与方式、疾患の段階および重症度、患者の一般健康状態、ならびに処方医師の判断に依存する。

【0069】

コンジュゲートは、Donnelly et al. (Ann. Rev. Immunol. 1997, 15, 617-648); Felgner et al. (米国特許第5, 580, 859号明細書、1996年12月3日発行); Felgner (米国特許第5, 703, 055号明細書、1997年12月30日発行); および Carson et al. (米国特許第5, 679, 647号明細書、1997年10月21日発行) (それらの全ての内容は、参照により全体として本明細書に組み込まれる)に記載のとおり、当技術分野で周知の方法により投与され得る。コンジュゲートは、例えば、ワクチン銃 (vaccine gun) を使用して個体に投与することができる粒子またはビーズに複合体化することができる。当業者は、薬学的に許容可能な担体、例として、生理学的に許容可能な化合物の選択が例えば投与経路に依存することを理解している。

【0070】

コンジュゲートは、種々の経路を介して送達することができる。典型的な送達経路としては、非経口投与、例えば、皮内、筋肉内または皮下送達が挙げられる。他の経路としては、経口投与、鼻腔内、膈内、経皮、静脈内、動脈内、腫瘍内、腹腔内、および表皮経路

が挙げられる。一部の実施形態において、コンジュゲートは、対象に静脈内、動脈内、または腹腔内投与される。

【0071】

コンジュゲートは、液体製剤、例えば、懸濁液、シロップ剤、またはエリキシル剤であり得る。コンジュゲートは、リポソーム、マイクロスフェア、または他のポリマーマトリックス中に取り込むことができる（例えば、Felgner et al.、米国特許第5,703,055号明細書；Gregoriadis, Liposome Technology, Vols. I to III (2nd ed. 1993)（それらの内容は、参照により全体として本明細書に組み込まれる）に記載の方法による）。リポソームは、リン脂質または他の脂質からなり得、作製および投与が比較的簡易な非毒性の生理学的に許容可能で代謝可能な担体であり得る。

10

【0072】

コンジュゲートは、ワクチンとして使用することができる。ワクチンは、エレクトロポレーションを介して、例えば、米国特許第7,664,545号明細書（その内容は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載の方法により投与され得る。エレクトロポレーションは、米国特許第6,302,874号明細書；同第5,676,646号明細書；同第6,241,701号明細書；同第6,233,482号明細書；同第6,216,034号明細書；同第6,208,893号明細書；同第6,192,270号明細書；同第6,181,964号明細書；同第6,150,148号明細書；同第6,120,493号明細書；同第6,096,020号明細書；同第6,068,650号明細書；および同第5,702,359号明細書（それらの内容は、参照により全体として本明細書に組み込まれる）に記載の方法および/または機器によるものであり得る。エレクトロポレーションは、最小侵襲装置を介して実施することができる。

20

【0073】

一部の実施形態において、コンジュゲートは、放出制御配合物中で投与される。コンジュゲートは、例えば、循環または腫瘍中に放出させることができる。一部の実施形態において、コンジュゲートは、少なくとも約1日、少なくとも約2日間、少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約1週間、少なくとも約1.5週間、少なくとも約2週間、少なくとも約2.5週間、少なくとも約3.5週間、少なくとも約4週間、または少なくとも約1カ月の期間にわたり放出させることができる。

30

【0074】

5. 検出

本明細書で使用される用語「検出する」または「～の存在を判定する」は、標的に結合している検出不可能、低濃度、通常濃度、または高濃度の1つ以上のコンジュゲートの定性的計測を指す。一部の実施形態において、標的は、バイオマーカーであり得る。検出としては、インピトロ、エクスピボ、またはインピボ検出を挙げることができる。検出としては、1つ以上のコンジュゲートまたは標的の存在と、1つ以上のコンジュゲートまたは標的の不存在との検出を挙げることができる。検出としては、1つ以上のコンジュゲートまたは標的のレベルの定量を挙げることでもできる。用語「定量する」または「定量」は、互換的に使用することができ、相対または絶対にかかわらず、物質（例えば、コンジュゲートまたは標的）の量または存在量を判定するプロセスを指し得る。任意の好適な検出方法は、本開示の一般的範囲内に収まる。一部の実施形態において、コンジュゲートは、検出のためのそれに付着しているレポーターを含む。一部の実施形態において、コンジュゲートは、レポーターで標識されている。一部の実施形態において、標的に結合しているコンジュゲートの検出は、限定されるものではないが、ウエスタンブロット上のバンド強度、フローサイトメトリー、放射性標識イメージング、細胞結合アッセイ、活性アッセイ、SPR、免疫アッセイが挙げられる方法により、または当技術分野で公知の種々の他の方法により判定することができる。

40

【0075】

50

一部の実施形態において、例として、コンジュゲートが標的への結合および/またはその検出のための抗体を含む実施形態では、任意の免疫アッセイを利用することができる。免疫アッセイは、例えば、酵素結合免疫アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、競合阻害アッセイ、例えば、順方向または逆方向競合阻害アッセイ、蛍光偏光アッセイ、または競合結合アッセイであり得る。ELISAは、サンドイッチELISAであり得る。標的へのコンジュゲートの特異的免疫学的結合は、コンジュゲートに付着している直接的標識を介して、または間接的標識、例えば、アルカリホスファターゼもしくはセイヨウワサビペルオキシダーゼを介して検出することができる。固定化コンジュゲートの使用を免疫アッセイに取り込むことができる。コンジュゲートは、種々の支持体、例えば、磁気またはクロマトグラフィーマトリックス粒子、アッセイプレート (例えば、マイクロタイターウェル) の表面、固体支持体材料片などの上に固定化することができる。コンジュゲートまたは複数のコンジュゲートを固体支持体上においてアレイでコートすることによりアッセイストリップを調製することができる。次いで、このストリップを試験生物学的試料中に浸漬させることができ、次いで、洗浄および検出ステップを介して迅速に処理して計測可能なシグナル、例えば、有色スポットを生成することができる。

10

【0076】

6. 方法

a. 薬物分子を送達する方法

本発明は、薬物分子を対象に送達する方法を対象とする。方法は、本明細書に記載のコンジュゲートを対象に投与することを含み得る。一部の実施形態において、コンジュゲートは、薬物分子単独または合成ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) にコンジュゲートされている薬物分子に対して改善された特性、例えば、ステルス、生体適合性、溶解度、安定性、半減期、血漿中滞留性、抗原性、免疫原性、単分散、またはそれらの組合せから選択される改善された特性を有する。一部の実施形態において、コンジュゲートは、容易に合成される。一部の実施形態において、コンジュゲートは、容易に精製される。一部の実施形態において、容易な合成および/または精製は、コンジュゲートの改善された費用有効性をもたらし得る。一部の実施形態において、コンジュゲートまたはそのポリペプチドは、遺伝子コードされ、それにより正確な分子量を有するコンジュゲートの設計が容易になる。一部の実施形態において、コンジュゲートの分子量は、そのインビボ半減期を決定し、および/またはそれに影響する。コンジュゲートの分子量を容易に正確に制御できることにより、インビボでのコンジュゲートの半減期の制御が容易になり得る。これと比較して、合成ポリマー、例えば、PEGの分子量を制御することは容易であり得ない。一部の実施形態において、コンジュゲートは、合成ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) にコンジュゲートされている薬物分子に対して低減された抗原性を有する。一部の実施形態において、コンジュゲートは、合成ポリマー、ポリエチレングリコール (PEG) にコンジュゲートされている薬物分子に対して低減された免疫原性を有する。

20

30

【0077】

b. 疾患を治療する方法

本発明は、疾患の治療を、それを必要とする対象において行う方法を対象とする。方法は、有効量の本明細書に記載のコンジュゲートを対象に投与することを含み得る。疾患は、例えば、癌、代謝疾患、自己免疫疾患、心血管疾患、または整形外科的障害であり得る。

40

【0078】

代謝疾患は、体内の異常な化学反応が正常な代謝プロセスを変動させる場合に生じ得る。代謝疾患としては、例えば、インスリン耐性、非アルコール性脂肪肝疾患、2型糖尿病、インスリン耐性疾患、心血管疾患、動脈硬化症、脂質関連代謝障害、高血糖症、高インスリン血症、高脂血症、およびグルコース代謝障害を挙げることができる。

【0079】

自己免疫疾患は、体内に通常存在する物質および組織に対する身体の異常な免疫応答か

50

ら生じる。自己免疫疾患としては、限定されるものではないが、ループス、関節リウマチ、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病、重症筋無力症、グレーブス病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、グッドパスチャー症候群、尋常性天疱瘡、急性リウマチ熱、連鎖球菌感染後糸球体腎炎、結節性多発動脈炎、心筋炎、乾癬、セリアック病、クローン病、潰瘍性大腸炎、および線維筋痛を挙げることができる。

【0080】

心血管疾患は、心臓または血管に関わる疾患のクラスである。心血管疾患としては、例えば、冠動脈疾患(CAD)、例えば、狭心症および心筋梗塞(心臓発作)、脳卒中、高血圧性心疾患、リウマチ性心疾患、心筋ミオパチー、心臓不整脈、先天性心疾患、心臓弁膜症、心臓炎、大動脈瘤、末梢動脈障害、および静脈血栓症を挙げることができる。

10

【0081】

整形外科的障害または筋骨格障害は、四肢、頸部、および背部を支持する体内の関節、靭帯、筋肉、神経、腱、および構造の傷害または疼痛である。整形外科的障害としては、疼痛を引き起こし、正常な活動を害する変性疾患および炎症病態を挙げることができる。整形外科的障害としては、例えば、毛根管症候群、上顎炎、および腱炎を挙げることができる。

【0082】

癌としては、限定されるものではないが、乳癌、結腸直腸癌、結腸癌、肺癌、前立腺癌、精巣癌、脳癌、皮膚癌、直腸癌、胃癌、食道癌、非上皮性悪性腫瘍、気管癌、頭頸部癌、膵臓癌、肝臓癌、卵巣癌、リンパ癌、子宮頸癌、外陰癌、黒色腫、中皮腫、腎臓癌、膀胱癌、甲状腺癌、骨肉腫、上皮性悪性腫瘍、非上皮性悪性腫瘍、および軟部組織癌を挙げることができる。一部の実施形態において、癌は、乳癌である。

20

【0083】

c. 疾患を診断する方法

本明細書において、疾患を診断する方法が提供される。方法は、本明細書に記載のコンジュゲートを対象に投与すること、および標的へのコンジュゲートの結合を検出して対象における標的の存在を判定することを含み得る。標的の存在または不存在は、対象における疾患を示し得る。他の実施形態において、方法は、対象からの試料を本明細書に記載のコンジュゲートと接触させること、試料中の標的のレベルを判定すること、および試料中の標的のレベルと標的の対照レベルとを比較することであって、対照レベルと異なる標的のレベルが対象における疾患を示す、比較することを含み得る。一部の実施形態において、対照未満の標的の検出レベルは、疾患を示し得る。一部の実施形態において、対照を上回る標的の検出レベルは、疾患を示し得る。一部の実施形態において、疾患は、上記で詳述される癌、代謝疾患、自己免疫疾患、心血管疾患、および整形外科的障害から選択される。一部の実施形態において、標的は、疾患マーカーまたはバイオマーカーを含む。

30

【0084】

d. 標的の存在を判定する方法

本明細書において、試料中の標的の存在を判定する方法が提供される。方法は、試料を本明細書に記載のコンジュゲートと、そのコンジュゲートと試料中の標的との間で複合体が形成されることを可能にする条件下で接触させること、および複合体の存在を検出することを含み得る。複合体の存在は、試料中の標的を示し得る。標的は、例えば、タンパク質または核酸であり得る。タンパク質は、例えば、受容体または抗原であり得る。抗原は、例えば、疾患に関連し得る。一部の実施形態において、標的は、バイオマーカーを含む。一部の実施形態において、コンジュゲートは、検出のためのレポーターで標識されている。

40

【0085】

一部の実施形態において、試料は対象から得られ、および方法は、対象の治療の効力を診断、予後予測または評価することをさらに含む。方法が対象の治療の効力を評価することを含む場合、方法は、必要に応じて対象の治療を改変して効力を改善することをさらに含む得る。

50

【0086】

e. 治療の有効性を判定する方法

本明細書において、疾患についての治療の有効性の判定を、それを必要とする対象において行う方法が提供される。方法は、対象からの試料を本明細書に詳述されるコンジュゲートと、そのコンジュゲートと試料中の標的との間で複合体が形成されることを可能にする条件下で接触させること、試料中の複合体のレベルを判定することによって、複合体のレベルが試料中の標的のレベルを示す、判定すること、および試料中の標的のレベルと標的の対照レベルとを比較することをさらに含み得、標的のレベルが対照レベルと異なる場合、治療は、その疾患の治療において有効または無効であると判定される。

【0087】

時点としては、疾患の発症前、治療法の施与前、治療法の施与中の種々の時点および治療法が完了した後、またはそれらの組合せを挙げることができる。対象へのコンジュゲートの投与時、コンジュゲートは標的に結合し得、標的の存在または不存在は、種々の時点における対象における疾患の存在を示す。一部の実施形態において、標的は、疾患マーカーまたはバイオマーカーを含む。種々の時点における標的へのコンジュゲートの結合の比較は、疾患が悪化したか否か、疾患が進行したか否か、治療法が疾患を治療または予防するように機能しているか否か、またはそれらの組合せを示し得る。

【0088】

一部の実施形態において、対照レベルは、対象が治療を開始した期間の前またはその期間中の種々の時点での対象におけるレベルに対応し、および試料は、後の時点で対象から採取される。一部の実施形態において、試料は、対象が治療を受けている期間中の時点で対象から採取し、および対照レベルは、無疾患レベルまたは対象が治療を開始した期間の前の時点でのレベルに対応する。一部の実施形態において、方法は、治療が疾患の治療において無効であると判定される場合、治療を改変するか、または異なる治療を対象に施すことをさらに含む。

【実施例】

【0089】

実施例 1

材料および方法

クローニング。ZiPPのための合成遺伝子を化学合成オリゴマー (IDT Inc. ; Coralville, IA) からアセンブルした。オリゴマーを、プラスミド再構築回帰的方向性ライゲーション (plasmid reconstruction recursive directional ligation) (Pre-RDL) 技術 (McDaniel, J. R., et al. Biomacromolecules, 2010, 11, 944-952) を使用して大腸菌 (E. coli) 中で pET 発現ベクター中にクローニングした。

【0090】

逆転移サイクリング (ITC) による ZiPP の発現および精製。ZiPP を大腸菌 (E. coli) 中で pET 発現ベクターから発現させた。水溶液中の全ての ZiPP は、可逆的な逆相転移を示す。これらは、それらの転移温度 (T_t) を超えて加熱された場合、可溶性タンパク質から不溶性疎水性凝集物に移行する。同一の現象 (相分離) は、コスモトピック塩を使用して誘発することもできる。ZiPP の凝集物は、その T_t 未満に冷却されると、または塩が溶液から除去された場合、溶液中に再可溶化し得る。ZiPP のこの熱応答特性により、タンパク質精製のための簡易な非クロマトグラフィー法が可能となる。この精製方法は、「逆転移サイクリング」(ITC) (Meyer, D. E. and A. Chilkoti. Nat. Biotech. 1999, 17, 1112-1115; MacEwan, S. R., et al. J. Vis. Exp. 2014, 88, e51583) と呼ばれる。

【0091】

ITC による ZiPP の典型的な精製において、1 L の培養物からの大腸菌 (E. coli

10

20

30

40

50

1 i) 細胞を遠心分離により回収し、低温PBS中で再懸濁させる。次いで、細胞を超音波破壊により4 で溶解させる。次いで、大腸菌(E. coli)溶解物を15,000 × gで遠心分離して細胞壁および他の細胞残屑を除去する。ZiPPは、細胞溶解物の可溶性分画(上清)中に存在する可溶性タンパク質である。ポリエチレンイミンを細胞溶解物の上清に添加し、14,000 × gで遠心分離してDNAおよび任意の残留細菌細胞壁をペレット化する。次いで、硫酸アンモニウムおよび塩化ナトリウムを使用して相分離を誘発し、次いで15,000 × gにおいて4 で15分間遠心分離することによりZiPPを上清から精製する。次いで、ペレットを低温PBS中で再懸濁させ、いかなる不溶性物質も4 における10分間の遠心分離ステップにより除去する。これらのステップを均一になるまで繰り返し、均一性はSDS-PAGEゲル中の単一バンドの出現により確認する。分子量(MW)もVoyager DE-Pro MALDI-TOF (Applied Biosystems; Foster City, CA) 機器により確認した。ZiPPの非構造化性質は、Circular Dichroism Instrument (Aviv 202) により確認した。動物実験のため、Detoxi-Gel (Thermo Scientific; Waltham, MA) を使用してエンドトキシンを除去する。

10

【0092】

インビボ薬物動態(PK)試験。この試験では、ZiPPを非荷電ポリマー(VPGA G)₁₂₀および(VPGA G)₁₆₀と比較した。ポリマーをN末端中でAlexa 488により蛍光標識し、尾静脈注射を使用してBalb/cマウス中に注射した。類似性質であるがいかなる電荷も有さない生体ポリマーのVPGA Gを対照として使用して、確認される薬物動態パラメータのいかなる変化も、VPX₁X₂Gモチーフ中で取り込まれる電荷の結果であることを示した。それぞれのマウスは、単一用量のZiPPまたは対照(150 mg/kg BW)を静脈内注射または皮下注射で受容した。血液試料を注射の40秒、15分、0.5、2、4、8、24、48、および72時間後に尾静脈から回収した(100 μLのヘパリンを有するチューブ中に10 μLを回収した)。Alexa 488の標準曲線を使用して血中の蛍光標識ポリマーの濃度を計算した。血液濃度時間経過データを、静脈内pkデータについての標準的な2つのコンパートメントPKモデルにより分析して薬物動態パラメータを確認した。

20

【0093】

パクリタキセル(PTX)コンジュゲーション。(VPGXG)₁₆(xは、1:1のVまたはCである)モチーフ中に配置された8つの周期的に間隔の空いたシステイン残基をZiPPのC末端にクローニングした。薬物コンジュゲーションセグメントは、PTXの多重コピーがコンジュゲートしている8つのシステインを含有した。PTXの最初の2' OHをレブリン酸により修飾した(Etrych, T.S., et al. Molecular Pharmaceutics 2010, 7, 1015-1026)。この修飾は、PTXの細胞毒性を保持する。次いで、ZiPP上のチオール基と反応して安定な炭素-硫黄結合を形成する末端マレイミドを有する酸不安定ヒドラジドリンカー(N-マレイミドカブロン酸ヒドラジド(EMCH)リンカー)を使用して活性化PTXを遊離チオールにコンジュゲートさせた(Andrew MacKay, J., et al. Nat. Mater. 2009, 8, 993-999)。

30

40

【0094】

ZiPP-PTX薬物コンジュゲーションの特徴付け。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を使用して薬物コンジュゲーションの純度を評価した。PTXの吸光度に対応する228 nmの吸光度におけるピーク下面積の積分を使用してHPLCデータを定量した。薬物とZiPPとのコンジュゲーション比を、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-MS)、窒素レーザー(337 nm)を備えるVoyager DE-Pro MALDI-MS (Applied Biosystems; Foster City, CA) 機器により測定した。動的光散乱(DLS)技術を実施してDynaproプレートリーダー(Wyatt Technology

50

; Santa Barbara, CA) を使用して 25 および 25 μ M 濃度における ZiPP-PTX ナノ粒子の流体力学的半径 (Rh) を測定した。データを自己相関関数の正規化フィットにより分析し、ラレー球体 (Rayleigh spheres) モデルを使用して割合強度を質量強度に変換した。次いで、正規化フィットを使用してランダムコイルについての質量パーセントにより秤量された流体力学的半径を測定した。PTX コンジュゲーション後に静的光散乱 (SLS) を使用して回転半径を計算した。形状因子 () を R_g / R_h として計算した。

【0095】

ZiPP-PTX コンジュゲートのインビトロ細胞毒性。インビトロ細胞毒性を MDA-MB-231 ヒト三重陰性乳癌細胞に対して行った。Falcon (商標) 96 ウェル細胞培養プレート (BD; Franklin Lakes, NJ) 中の 100 μ L の 1 培地当たり 3×10^3 個の細胞を播種した。細胞を 16 ~ 18 時間接着させてから、サブナノモル濃度から高マイクロモル濃度までの範囲に及ぶ濃度における遊離 PTX および ZiPP-PTX により処理した。薬物処理の 72 時間後、20 μ L の 3 - (4, 5, -ジメチル 2 - イル) - 5 - (3 - カルボキシメトキシフェニル) - 2 - (4 - スルホフェニル) - 2 H - テトラゾリウム (MTS) 試薬 (Cell Titer 96 Aqueous (商標) Promega; Madison, WI) をそれぞれのウェルに添加し、さらに 2 時間インキュベートした。Victor 3 マイクロプレートリーダー (Perkin Elmer; Waltham, MA) によって 490 nm におけるそれぞれのウェルの吸光度を計測することにより、遊離薬物および ZiPP-薬物コンジュゲートについての用量応答曲線を構築した。データを以下の式 (Andrew MacKay, J., et al. Nat. Mater. 2009, 8, 993 - 999) にフィットさせることにより、50% 阻害濃度 IC_{50} を決定した:

【数 1】

$$V_{50} = 100\% / \left[1 + \left(\frac{C_{\text{処理}}}{IC_{50}} \right)^p \right]$$

(ここで、V は、細胞の生存率であり、 $C_{\text{処理}}$ は、薬物濃度であり、p は、用量応答曲線の傾きである)。この IC_{50} 値を使用してコンジュゲートの効力を評価した。

【0096】

実施例 2

ZiPP の発現および精製

ZiPP の熱応答特性により、ITC を使用する簡易な非クロマトグラフィー精製が可能となった。銅染色 SDS-PAGE ゲル中の単一バンドの出現により、産物の純度が確認された (図 2A)。2 つの異なる ZiPP、(VPKEG)₈₀ (MW = 44 kDa) および (VPRDG)₈₀ (MW = 42 kDa) を精製産物の代表例として図 7A に示す。50 kDa ラダーをゲル中の参照 MW として標識するが、SDS ゲル中で使用されたラダーは、球状タンパク質からのものであり、したがって非構造化 ZiPP と直接比較可能でない。純度および MW を確認するため、精製産物を MALDI-TOF により分析した。MALDI スペクトルは、(VPKEG)₈₀ について 21 kDa および 42 kDa (ピーク 1 および 2) の m/z 値ならびに (VPRDG)₈₀ について 22 kDa および 44 kDa (ピーク 3 および 4) の m/z 値におけるイオンの存在を示した (図 7B)。MALDI スペクトルは、(VPKDG)₁₂₀ について 20 kDa、30 kDa、および 60.5 kDa の m/z 値および (VPRDG)₁₂₀ について 21 kDa および 32 kDa および 63.8 kDa の m/z 値におけるイオンの存在を示し (図 2B)、それにより精製 ZiPP 構築物の分子量 (それぞれ MW = 60.5 kDa、MW = 63.8 kDa) が確認された。本発明者らは、CD スペクトルを使用することにより ZiPP の固有の無秩序性質も確認した。図 2D および図 7C の CD スペクトルは、低波長で負の楕円率およびより高い

波長でわずかに正の楕円率を示し、それはELPのような無秩序構造の典型であるランダムコイルの特徴であり、それによりポリマーの非構造化性質が確認された。動的光散乱を使用して流体力学的半径を計測し、それはELP対照と比較して十分に水和したZiPPを示した(図2C)。ネイティブPAGEゲルは、ZiPPがアルブミンと相互作用しないことを示した(図2E)。

【0097】

実施例3

インビボ薬物動態試験

ZiPPの薬物動態パラメータを判定するため、尾静脈注射または皮下注射を介するマウスにおける全身投与後の72時間の期間にわたり血漿濃度を追跡した。合致するアミノ酸長を有する非荷電ポリマーを対照として使用した。実験設計を図3Aおよび図4Aに示す。ポリマーをAlexa488により蛍光標識し、マウスに注射した。血液試料を72時間までの種々の時点で回収した。ELP120(VPGAG)₁₂₀を長さ対照として使用した一方、ELP160(VPGAG)₁₆₀を分子量対照として使用した。図3Bおよび図4Bは、注射後の時間に応じた血漿ポリマー濃度を示し、それは、双性イオン性モチーフ(具体的には、例として、それぞれX₁およびX₂についてK、D、およびE)の取り込みがステルス特性を付与し、それが次いで非荷電ELPと比較してポリマーの循環時間を増加させることを示した。注射後の時間に応じた血漿濃度は、ZiPPがELPよりも良好に機能することを示した。これらのポリマーは、2つのコンパートメントモデルに従い、したがってこのモデルを使用して半減期および曲線下面積を計算した。2つのコンパートメントモデルを血漿ポリマー濃度にフィットさせ、薬物動態パラメータの曲線下面積(AUC)(図3Cおよび図4C)および排出半減期(図3D)を生じさせた。AUCを実験の時間経過にわたる全ポリマー曝露の尺度として計算した。AUCは、VPKEGおよびVPKDGが非荷電ELP長さ対照および分子量対照よりも有意に良好に機能することを示した。データは、図3Cについて平均±SE、n=5を表し、図4Cについて平均±SE、n=3~4を表す。ZiPPの最終半減期は、VPGAG構築物のものと比較して6時間だけ増加した(図3D)。さらに、最も記述的な薬物動態パラメータの、ZiPPについての血漿濃度曲線下面積(AUC)により計測されるポリマーの全累積血液曝露は、同一鎖長の非荷電ポリペプチドVPGAGのものよりも約3倍高かった(図3C)。結果は、ペプチドポリマー中への双性イオン性モチーフ、より具体的には荷電残基の取り込みが、ポリマーの薬物動態の改善において重要な役割を担うことを示した。

【0098】

実施例4

パクリタキセル-ZiPPコンジュゲートの特徴付け

パクリタキセル(PTX)を、(VPGXG)₁₆(ここで、Xが1:1の比のVまたはCである)にVPKEGペプチド単位の120個のリピートのC末端におけるトレーラーに化学的にコンジュゲートさせた。パクリタキセルを、pH感受性リンカーを介して8つのC末端残基に化学的にコンジュゲートさせた。この設計を図5Aに示す。Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units(MWCO:10kDa;Millipore;Billerica,MA)を使用してポリマー薬物コンジュゲートを精製し、精製産物をHPLC上でランして未反応遊離薬物の不在を確認した。HPLCクロマトグラムにより、無視可能な量の遊離薬物でのポリマー薬物コンジュゲートの純度が確認された。精製ZiPP-PTXコンジュゲートは、MALDI-TOFスペクトルを使用して親ZiPPポリマー鎖とZiPP-PTXコンジュゲートとの間で計算されたMWの差異により確認されるとおり、1ポリマー鎖当たり3.2~4つの薬物を有した(図5B)。さらに、動的光散乱計測は、PTXコンジュゲーション後、ZiPPが実際に58nmの流体力学的半径(Rh)のナノ粒子に自然に自己集合することを示した。これらは、58nm半径のミセルに自己集合し、1ミセル当たりの凝集数は26であった。Rg/Rhとして計算された形状因子()は0.82であり、それは球状ミセルの形成を示す。

【0099】

実施例 5

Z i P P - P T X コンジュゲートのインビトロ抗腫瘍効力

時間に応じた一連の濃度にわたる細胞生存率を検査することにより、Z i P P - P T X のインビトロ細胞毒性を計測した。ヒト三重陰性乳癌細胞系 M D A - M B - 2 3 1 をモデルとして使用した。薬物処理の 7 2 時間後、M D A - M B - 2 3 1 細胞の増殖は、対照（薬物なし）と比較して阻害された（図 5 C）。さらに、阻害は、遊離薬物のものと同等であった。遊離薬物についての I C₅₀ 値は約 2 n M であった一方、Z i P P - P T X のものは 1 2 . 4 n M（薬物に関する濃度）であった。Z i P P - P T X についての I C₅₀ 値は、遊離薬物のものよりも 6 倍高かったが、そのような結果は、遊離薬物が薬物トランスポーターを介して細胞内外に容易に拡散し得る一方、薬物 - ポリマーコンジュゲートからの P T X がエンドソーム内側に存在する場合にのみ放出されるインビトロ環境で予測される。このプロセスは緩慢である。なぜなら、ナノ粒子がエンドサイトーシスを介して取り込まれ、p H が低い後期エンドソームにナノ粒子が移動した後に薬物が放出されるためである。この低い p H は、Z i P P からの P T X の放出を誘発する。これらの結果は有望である。なぜなら、これらは、P T X - ポリマーコンジュゲートがインビボプラットフォームに順応するほど十分に安定であり、強力であることを示すためである。I C₅₀ 値は、細胞生存率を 5 0 % だけ低減させる薬物の濃度を表した。

10

【0100】

実施例 6

Z i P P - T n 3 コンジュゲート

多価足場タンパク質（T n 3）は、T N F 関連アポトーシス誘導リガンド受容体 2（T R A I L 2）の超アゴニストであり、Z i P P に付着させるためのタンパク質として選別した。融合タンパク質の設計の概要を図 6 A に示す。T R A I L 2 の超アゴニストを選別した。なぜなら、T R A I L 2 の活性化は種々のヒト癌でアポトーシスを誘導し得、したがって癌治療薬についての潜在性を有するためである。（T n 3）₆ は、M e d I m m u n e により高親和性で T R A I L 2 に結合するように遺伝子操作されたモノマー T n 3 単位の 6 つのタンデムリピートを表す。種々の長さの Z i P P を有する（T n 3）₆ を大腸菌（E . c o l i）中で組換え発現させた。親和性精製試料の S D S - P A G E 分析を図 6 B に示す。C o l o 2 0 5（結腸癌細胞）に対する細胞毒性アッセイは、図 6 C に示されるとおり、融合タンパク質が高度に細胞毒性であり、それらの効力は遊離タンパク質（付着 Z I P P を有さない（T n 3）₆）と同等であることを示した。I C₅₀ 値は、細胞生存率を 5 0 % だけ低減させる薬物の濃度を表した。

20

30

【0101】

具体的態様の上記の説明は、当技術分野の技能の範囲内の知識を適用することにより、そのような具体的態様を過度の実験なしで本開示の一般的概念から逸脱することなく他者が容易に改変および/または種々の用途に適合させ得る本発明の一般的性質を完全に明らかにする。したがって、このような適合形態および改変形態は、本明細書に提示される教示および指針に基づき、開示される態様の均等物の意味および範囲内にあるものとする。本明細書における語句または用語は、説明目的のためのものであり、限定を目的とするものではないことを理解すべきであり、その結果、本明細書の用語または語句は、その教示および指針に照らして当業者により解釈されるべきである。

40

【0102】

本開示の広さおよび範囲は、上記の例示的態様のいずれによっても限定されるべきでないが、以下の特許請求の範囲およびその均等物に従ってのみ定義されるべきである。

【0103】

本出願で引用される全ての刊行物、特許、特許出願、および/または他の文献は、それぞれの個々の刊行物、特許、特許出願、および/または他の文献が全ての目的のために参照により組み込まれることが個別的に示されるのと同程度に全ての目的のために全体として参照により組み込まれる。

50

【0104】

網羅性の理由で、本発明の種々の態様を以下の番号付与された条項に記載する。

【0105】

条項1。(a)1つ以上の荷電モチーフを含むポリペプチドであって、それぞれの荷電モチーフが、独立して、配列番号1(VPX₁X₂G)(ここで、X₁が負または正荷電アミノ酸であり、X₂が負または正荷電アミノ酸の他方である)からなるアミノ酸配列を有する、ポリペプチド、および(b)前記ポリペプチドに付着している1つ以上の薬物分子を含むコンジュゲート。

【0106】

条項2。前記ポリペプチドが複数の荷電モチーフを含む、条項1に記載のコンジュゲート。

10

【0107】

条項3。前記複数の荷電モチーフがタンデムリピート型である、条項2に記載のコンジュゲート。

【0108】

条項4。前記ポリペプチドが1つ以上の非荷電モチーフをさらに含み、それぞれの非荷電モチーフが、独立して、配列番号3(VPGXG)(ここで、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸である)からなるアミノ酸配列を有する、条項1~3のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【0109】

条項5。前記ポリペプチドが複数の非荷電モチーフを含む、項4に記載のコンジュゲート。

20

【0110】

条項6。前記複数の非荷電モチーフがタンデムリピート型である、項5に記載のコンジュゲート。

【0111】

条項7。1つ以上の非荷電モチーフが前記ポリペプチドの少なくとも2つの隣接荷電モチーフ間に位置する、条項4~6のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【0112】

条項8。前記ポリペプチドが配列番号2(VPX₁X₂G)_n(ここで、X₁が負または正荷電アミノ酸であり、X₂が負または正荷電アミノ酸の他方であり、かつnが1以上の整数である)のアミノ酸配列を含む、条項1に記載のコンジュゲート。

30

【0113】

条項9。前記ポリペプチドが配列番号4(VPGXG)_n(ここで、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつnが1以上の整数である)のアミノ酸配列を含む、条項4に記載のコンジュゲート。

【0114】

条項10。前記ポリペプチドが配列番号5(VPX₁X₂G)_n(VPGXG)_m(ここで、X₁が負または正荷電アミノ酸であり、X₂が負または正荷電アミノ酸の他方であり、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつnおよびmが独立して1以上の整数である)のアミノ酸配列を含む、条項4に記載のコンジュゲート。

40

【0115】

条項11。前記ポリペプチドが配列番号6(VPGXG)_m(VPX₁X₂G)_n(ここで、X₁が負または正荷電アミノ酸であり、X₂が負または正荷電アミノ酸の他方であり、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつnおよびmが独立して1以上の整数である)のアミノ酸配列を含む、条項4に記載のコンジュゲート。

【0116】

条項12。前記ポリペプチドが配列番号7{(VPX₁X₂G)(VPGXG)}_b(ここで、X₁が負または正荷電アミノ酸であり、X₂が負または正荷電アミノ酸の他方であり、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつbが1以上の整数である)のアミノ酸

50

配列を含む、条項 4 に記載のコンジュゲート。

【 0 1 1 7 】

条項 1 3。X₁ が負荷電アミノ酸であり、X₂ が正荷電アミノ酸である、条項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【 0 1 1 8 】

条項 1 4。X₁ が正荷電アミノ酸であり、X₂ が負荷電アミノ酸である、条項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【 0 1 1 9 】

条項 1 5。前記負荷電アミノ酸が独立してグルタミン酸およびアスパラギン酸から選択される、条項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

10

【 0 1 2 0 】

条項 1 6。前記正荷電アミノ酸が独立してリジンおよびアルギニンから選択される、条項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【 0 1 2 1 】

条項 1 7。X がプロリン以外の任意のアミノ酸である、条項 4 ~ 1 6 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【 0 1 2 2 】

条項 1 8。X がアルギニン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セレノシステイン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンから選択される、条項 1 7 に記載のコンジュゲート。

20

【 0 1 2 3 】

条項 1 9。X がグリシンおよびバリンから選択される、条項 1 8 に記載のコンジュゲート。

【 0 1 2 4 】

条項 2 0。前記ポリペプチドがリンカーをさらに含む、条項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【 0 1 2 5 】

条項 2 1。前記リンカーが 1 つ以上のシステインを含む、条項 2 0 に記載のコンジュゲート。

30

【 0 1 2 6 】

条項 2 2。前記リンカーが、配列番号 (G G C)、配列番号 ((G G C)₈)、配列番号 ((G₄ S)₃)、および配列番号 ((V P G X G)₁₆ (ここで、X が、1 : 1 の比で存在するバリンまたはシステインである)) から選択されるアミノ酸配列を含む、条項 2 0 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【 0 1 2 7 】

条項 2 3。前記リンカーが前記ポリペプチドの C 末端、N 末端、または C 末端および N 末端の両方に位置する、条項 2 0 ~ 2 2 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【 0 1 2 8 】

条項 2 4。前記 1 つ以上の薬物分子が前記リンカーを介して前記ポリペプチドに付着している、条項 2 0 ~ 2 3 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

40

【 0 1 2 9 】

条項 2 5。前記薬物分子が前記リンカー中のチオール反応性基を介して前記ポリペプチドに付着している、条項 2 0 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【 0 1 3 0 】

条項 2 6。前記 1 つ以上の薬物分子が小分子、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド、タンパク質、炭水化物、およびそれらの組合せから選択される、条項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【 0 1 3 1 】

条項 2 7。前記薬物分子が小分子を含む、条項 2 6 に記載のコンジュゲート。

50

- 【 0 1 3 2 】
条項 2 8。前記薬物分子がタンパク質を含む、条項 2 6 に記載のコンジュゲート。
- 【 0 1 3 3 】
条項 2 9。前記薬物分子が癌治療薬を含む、条項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
- 【 0 1 3 4 】
条項 3 0。前記薬物分子が抗体を含む、条項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
- 【 0 1 3 5 】
条項 3 1。前記薬物分子がパクリタキセルを含む、条項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。 10
- 【 0 1 3 6 】
条項 3 2。前記薬物分子が T n 3 (T R A I L 超アゴニスト) を含む、条項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
- 【 0 1 3 7 】
条項 3 3。対象への投与のために調製される、条項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
- 【 0 1 3 8 】
条項 3 4。前記コンジュゲートの前記ポリペプチドが組換え発現される、条項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。 20
- 【 0 1 3 9 】
条項 3 5。組換え発現される、条項 2 8 に記載のコンジュゲート。
- 【 0 1 4 0 】
条項 3 6。条項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを含む組成物。
- 【 0 1 4 1 】
条項 3 7。条項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- 【 0 1 4 2 】
条項 3 8。条項 2 8 に記載のコンジュゲートをコードするポリヌクレオチド。
- 【 0 1 4 3 】
条項 3 9。条項 3 7 または 3 8 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。 30
- 【 0 1 4 4 】
条項 4 0。薬物分子を対象に送達する方法であって、条項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを前記対象に投与することを含む方法。
- 【 0 1 4 5 】
条項 4 1。疾患または障害を有する対象を治療する方法であって、条項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを前記対象に投与することを含む方法。
- 【 0 1 4 6 】
条項 4 2。試料中の標的の存在を判定する方法であって、前記試料を条項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のコンジュゲートと、前記薬物分子と前記試料中の前記標的との間で複合体が形成されることを可能にする条件下で接触させること；および前記複合体の存在を検出することであって、前記複合体の存在が前記試料中の前記標的を示す、検出することを含む方法。 40
- 【 0 1 4 7 】
条項 4 3。前記試料が対象から得られ、および方法が、疾患を診断し、前記対象の治療の効力を予後予測するかまたは評価することをさらに含む、条項 4 2 に記載の方法。
- 【 0 1 4 8 】
条項 4 4。前記対象の治療の効力を評価することをさらに含む場合、必要に応じて前記対象の前記治療を改変して効力を改善することをさらに含む、条項 4 3 に記載の方法。
- 【 0 1 4 9 】 50

条項 4 5。対象における疾患を診断する方法であって、前記対象からの試料を条項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のコンジュゲートと、前記薬物分子と前記試料中の標的との間で複合体が形成されることを可能にする条件下で接触させること；前記試料中の前記標的のレベルを判定することであって、前記複合体のレベルが前記試料中の前記標的のレベルを示す、判定すること；および前記試料中の前記標的のレベルと前記標的の対照レベルとを比較することであって、前記対照レベルと異なる前記標的のレベルが前記対象における疾患を示す、比較することを含む方法。

【 0 1 5 0 】

条項 4 6。前記対照レベルが、前記対象が治療を開始した期間の前またはその期間中の時点での前記対象におけるレベルに対応し、前記試料が後の時点で前記対象から採取される、条項 4 5 に記載の方法。

10

【 0 1 5 1 】

条項 4 7。前記試料が、前記対象が治療を受けている期間中の時点で前記対象から採取され、前記対照レベルが、無疾患レベルまたは前記対象が治療を開始した期間の前の時点でのレベルに対応する、条項 4 5 に記載の方法。

【 0 1 5 2 】

条項 4 8。前記治療が前記疾患の治療において無効であると判定される場合、前記治療を改変するか、または異なる治療を前記対象に施与することをさらに含む、条項 4 5 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 5 3 】

条項 4 9。前記コンジュゲートがレポーターで標識されている、条項 4 0 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

【 0 1 5 4 】

条項 5 0。前記コンジュゲートが前記対象に静脈内、動脈内、腹腔内、または腫瘍内投与される、条項 4 0 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 5 5 】

条項 5 1。前記コンジュゲートが、ポリエチレングリコール (P E G) にコンジュゲートされている前記薬物分子に対して低減された抗原性を有する、条項 4 0 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 5 6 】

条項 5 2。前記コンジュゲートが、ポリエチレングリコール (P E G) にコンジュゲートされている前記薬物分子に対して低減された免疫原性を有する、条項 4 0 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

30

【 0 1 5 7 】

条項 5 3。前記疾患が癌、代謝疾患、自己免疫疾患、心血管疾患、および整形外科的障害から選択される、条項 4 0 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 5 8 】

条項 5 4。前記疾患が癌を含む、条項 5 3 に記載の方法。

【 0 1 5 9 】

条項 5 5。前記癌が乳癌、結腸直腸癌、結腸癌、肺癌、前立腺癌、精巣癌、脳癌、皮膚癌、直腸癌、胃癌、食道癌、非上皮性悪性腫瘍、気管癌、頭頸部癌、膵臓癌、肝臓癌、卵巣癌、リンパ癌、子宮頸癌、外陰癌、黒色腫、中皮腫、腎臓癌、膀胱癌、甲状腺癌、骨肉腫、上皮性悪性腫瘍、非上皮性悪性腫瘍、および軟部組織癌から選択される、条項 5 4 に記載の方法。

40

【 0 1 6 0 】

条項 5 6。前記癌が乳癌を含む、条項 5 5 に記載の方法。

【 0 1 6 1 】

配列

配列番号 1

V P X₁ X₂ G (ここで、X₁が負または正荷電アミノ酸であり、X₂が負または正荷電ア

50

ミノ酸の他方である)。

【0162】

配列番号2

$(VPX_1X_2G)_n$ (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸の他方であり、かつ n が1以上の整数である)。

【0163】

配列番号3

$VPGXG$ (ここで、 X がプロリン以外の任意のアミノ酸である)。

【0164】

配列番号4

$(VPGXG)_n$ (ここで、 X がプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつ n が1以上の整数である)。

10

【0165】

配列番号5

$(VPX_1X_2G)_n(VPGXG)_m$ (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸の他方であり、 X がプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつ n および m が独立して1以上の整数である)。

【0166】

配列番号6

$(VPGXG)_m(VPX_1X_2G)_n$ (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸の他方であり、 X がプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつ n および m が独立して1以上の整数である)。

20

【0167】

配列番号7

$\{(VPX_1X_2G)(VPGXG)\}_b$ (ここで、 X_1 が負または正荷電アミノ酸であり、 X_2 が負または正荷電アミノ酸の他方であり、 X がプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつ b が1以上の整数である)。

【0168】

配列番号8

GGC 。

30

【0169】

配列番号9

$(GGC)_8$ 。

【0170】

配列番号10

$(G_4S)_3$ 。

【0171】

配列番号11

$(VPGXG)_{16}$ (ここで、 X が、1:1の比で存在するバリンまたはシステインである)。

40

【0172】

配列番号12

ポリペプチドの例

V P K D G V P K D G V P K D G V P K D G
V P K D G。

【0173】

配列番号13

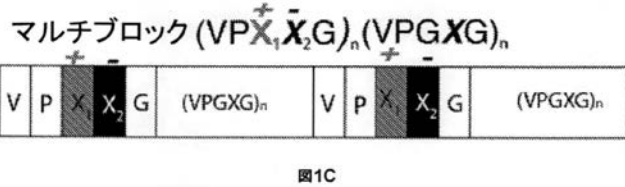
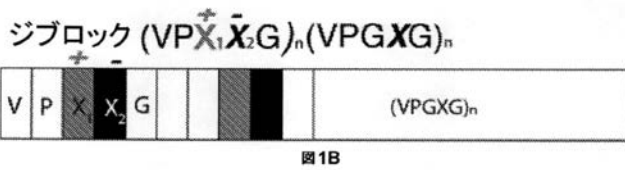
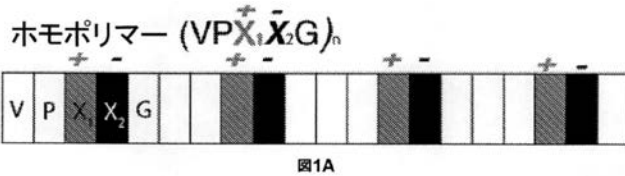
ポリペプチドの例をコードするポリヌクレオチド

GTC CCG a a a g a c GGT GTT CCG a a g g a c GGC
GTG CCT a a a g a t GGT GTT CCG a a g g a c GGG

50

G T G C C A a a a g a t G G G。

【 図 1 A - C 】



【 図 1 D 】

考えられる配列 $(VP\bar{X}_1\bar{X}_2G)_n$	
VPKEG	VPKDG
VPREG	VPRDG

図1D

【 図 2 A 】

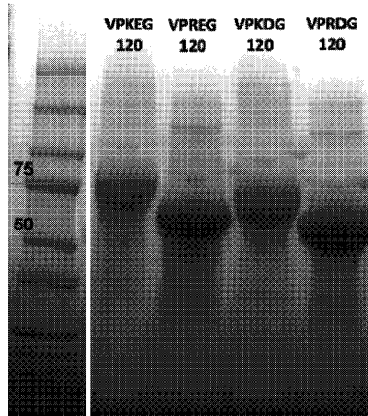


FIG. 2A

【 図 2 B 】

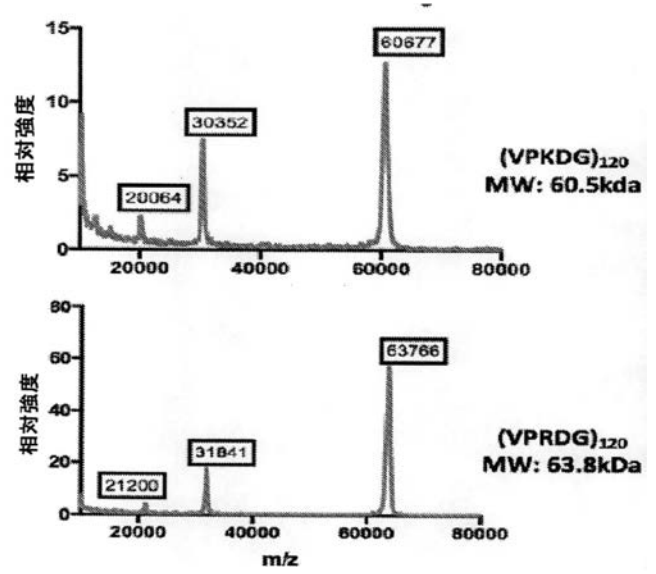


图2B

【 图 2 C 】

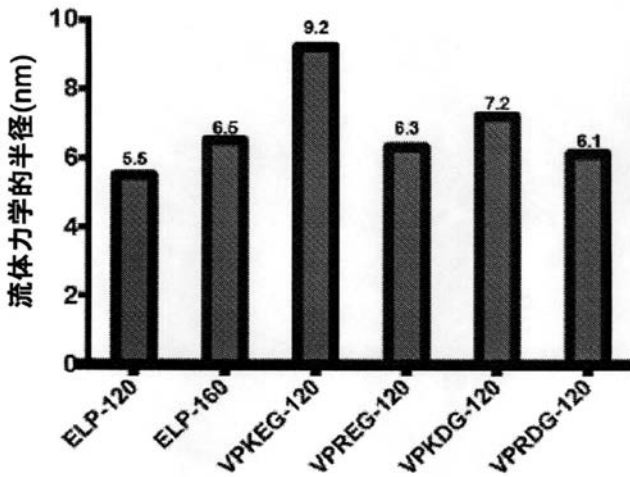


图2C

【 图 2 D 】

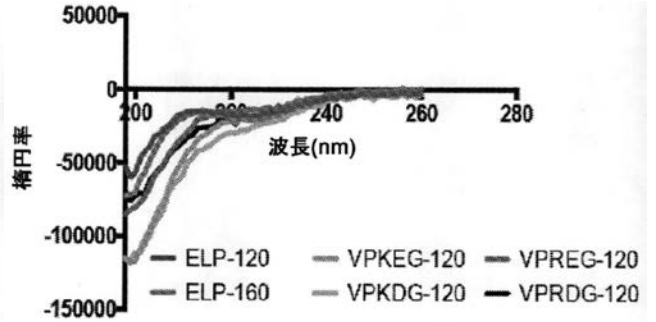
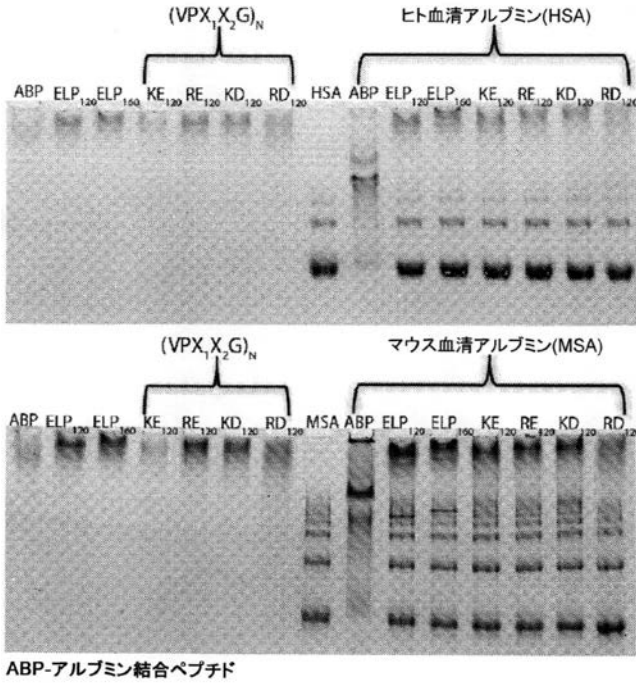


图2D

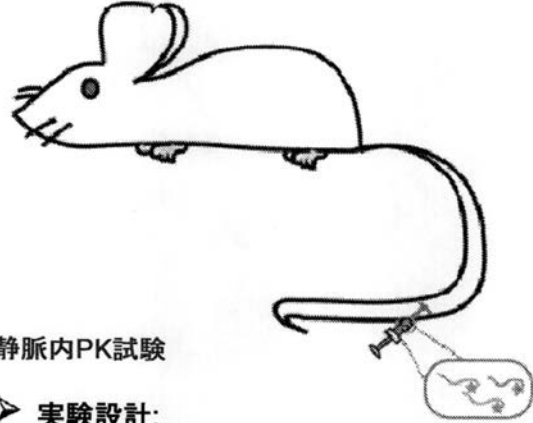
【 図 2 E 】



ABP-アルブミン結合ペプチド

図2E

【 図 3 A 】



静脈内PK試験

実験設計:

- VPGAG-120 (リピート数対照)] ELP
- VPGAG-160 (MW対照)] ELP
- VPKEG-120] ZIPP
- VPREG-120] ZIPP
- VPKDG-120] ZIPP
- VPRDG-120] ZIPP

図3A

【 図 3 B 】

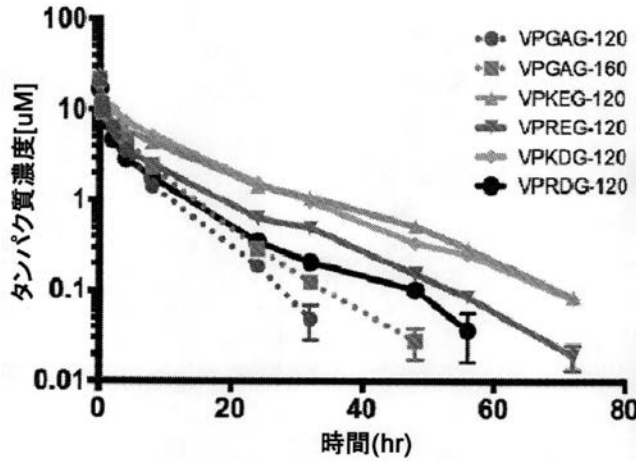


図3B

【 図 3 C 】

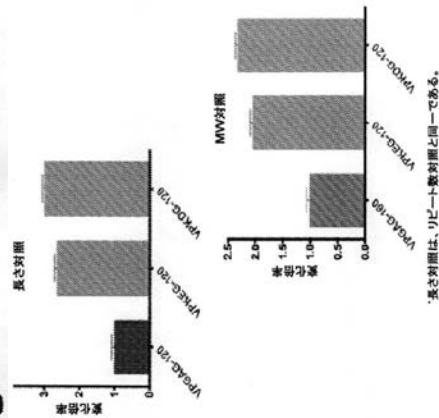


図3C

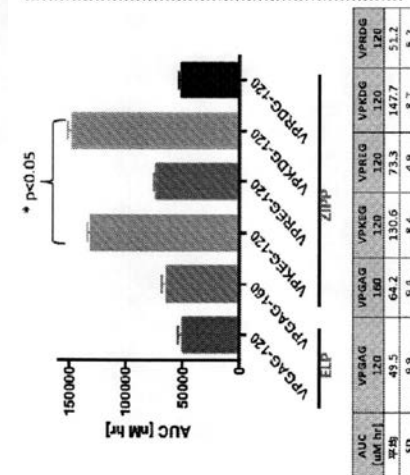


図3C

【 図 3 D 】

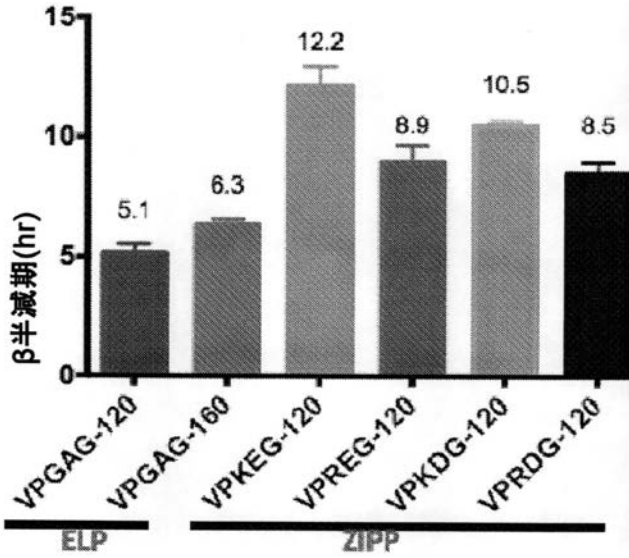
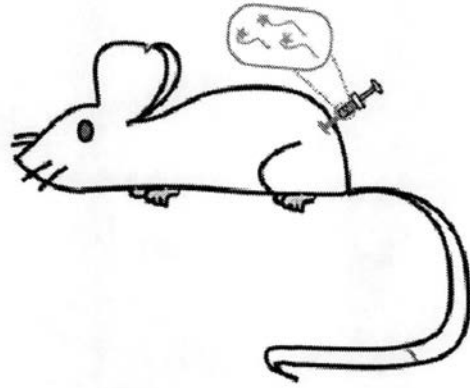


図3D

【 図 4 A 】



実験設計:

- VPGAG-120 (リポート数対照)
- VPGAG-160 (MW対照)
- VPKEG-120
- VPKDG-120

図4A

【 図 4 B 】

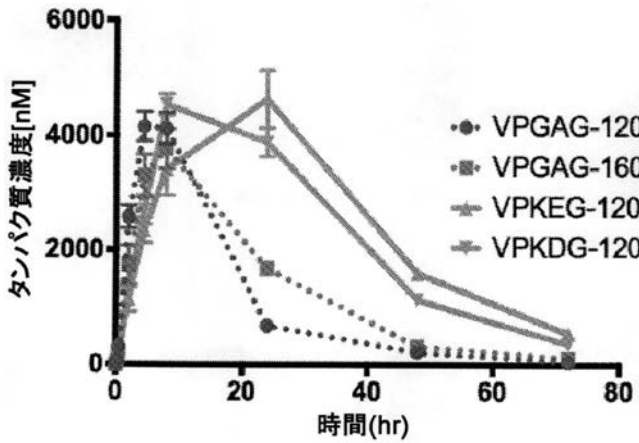
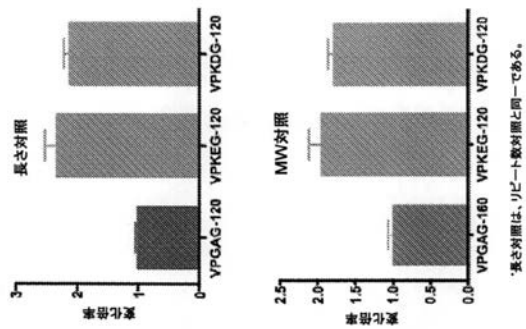


図4B

【 図 4 C 】



*報告対照は、レポート数対照と同一である。

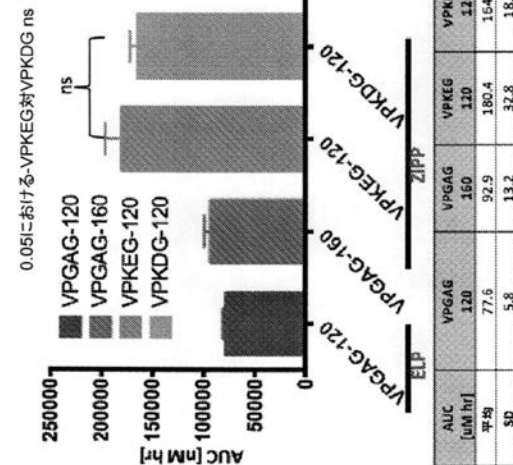


図4C

【 図 6 B 】

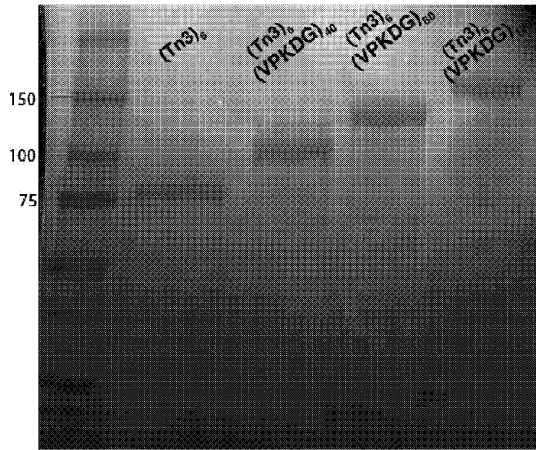


FIG. 6B

【 図 6 C 】

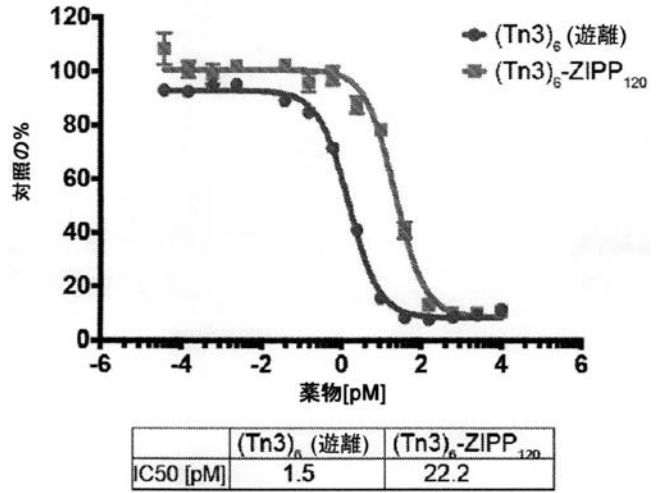


図6C

【 図 7 A - B 】

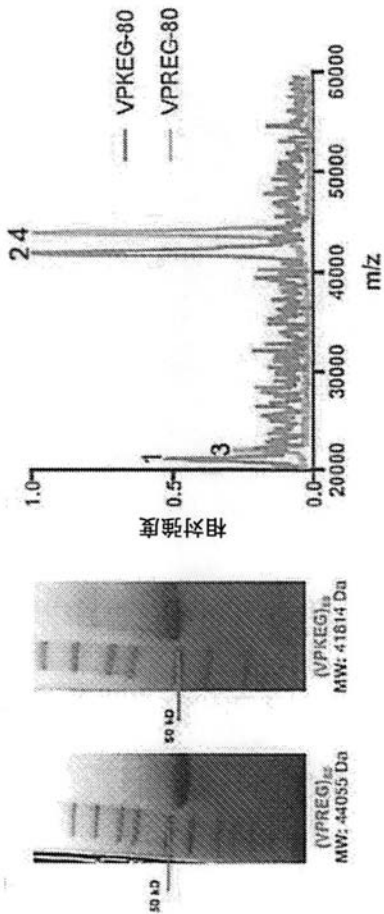


図7B

図7A

【 図 7 C 】

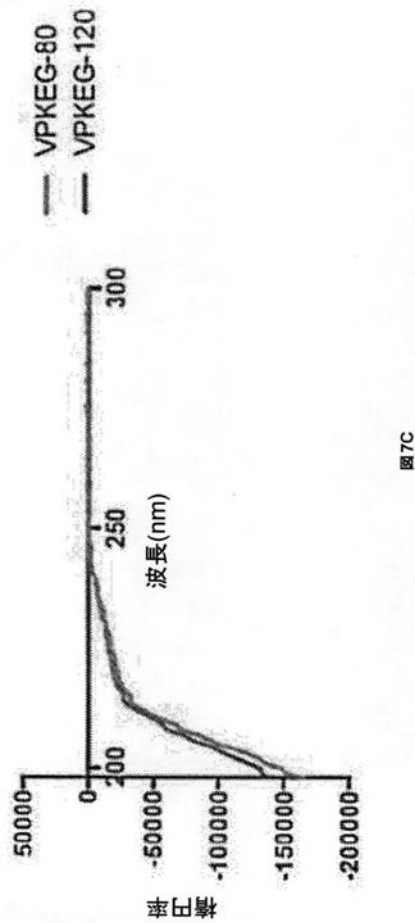


図7C

【配列表】

2018525989000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/45655

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/00, 39/395, 47/48 (2016.01) CPC - A61K 39/00, 39/395, 47/48 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 39/00, 39/395, 47/00, 47/48 (2016.01) CPC: A61K 39/00, 39/395, 47/00, 47/48; C07K 2319/01 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); EBSCO Discovery; PubMed; Google; Google Scholar; Google Patents; The Lens; ENA; NCBI Blast; KEYWORDS: conjugate, polypeptide, charge, motif, drug		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/123813 A2 (AMUNIX OPERATING INC.) October 6, 2011; abstract; paragraph [00158]	1-3, 4/1-3, 5/4/1-3, 6/5/4/1-3, 8, 9/4/1-3, 10/4/1-3, 11/4/1-3, 12/4/1-3
A	US 2011/0119778 A1 (LISS, M) May 19, 2011; paragraph [0053]	1-3, 4/1-3, 5/4/1-3, 6/5/4/1-3, 8, 9/4/1-3, 10/4/1-3, 11/4/1-3, 12/4/1-3
A	US 2013/0330335 A1 (BREMEL, R et al.) December 12, 2013; paragraph [0043]	1-3, 4/1-3, 5/4/1-3, 6/5/4/1-3, 8, 9/4/1-3, 10/4/1-3, 11/4/1-3, 12/4/1-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 01 November 2016 (01.11.2016)		Date of mailing of the international search report 02 DEC 2016
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. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/45655

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 7, 13-56
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
G 0 1 N 33/536 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
	G 0 1 N 33/536	

(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, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, US

(74) 代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74) 代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74) 代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74) 代理人 100137626

弁理士 田代 玄

(72) 発明者 チルコティ アシュトツシュ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27701 ダーラム グロリア アベニュー 1001

(72) 発明者 パンスコタ サマギヤ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27708-0281 ダーラム ピーオーボックス 9
0271 デューク ユニバーシティ内

(72) 発明者 ユーセフブール パリサ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27708-0281 ダーラム ピーオーボックス 9
0271 デューク ユニバーシティ内

(72) 発明者 バッタチャリア ジャヤンタ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27708-0281 ダーラム ピーオーボックス 9
0271 デューク ユニバーシティ内

F ターム(参考) 4C076 AA95 CC27 CC50 EE41 EE59

4C084 AA03 AA17 BA44 MA05 NA13 ZB261 ZC411

4C085 AA13 AA14 CC23 EE01 EE05

4C086 AA01 AA02 BA02 MA02 MA03 MA05 NA13 ZB26

4H045 AA11 AA30 BA50 BA53 BA54 BA57 BA72 CA40 DA76 EA20

EA50 FA74

专利名称(译)	用于递送的遗传编码的固有无序隐形聚合物及其使用方法		
公开(公告)号	JP2018525989A	公开(公告)日	2018-09-13
申请号	JP2018506150	申请日	2016-08-04
[标]申请(专利权)人(译)	杜克大学		
申请(专利权)人(译)	杜克大学		
[标]发明人	チルコティアシュトツシユ バンスコタサマギヤ ユーセフプールパリサ バツタチャリアジャヤンタ		
发明人	チルコティ アシュトツシユ バンスコタ サマギヤ ユーセフプール パリサ バツタチャリア ジャヤンタ		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/63 C07K16/18 A61K47/64 A61K45/00 A61K31/337 A61K38/16 A61K39/395 G01N33/536		
CPC分类号	A61K47/64 A61K31/337 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K47/10 A61K47/60 A61K2039/6031 A61P35/00 C07K7/06 C12N15/70		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C12N15/63 C07K16/18 A61K47/64 A61K45/00 A61K31/337 A61K38/16 A61K39/395. D A61K39/395.N G01N33/536		
F-TERM分类号	4C076/AA95 4C076/CC27 4C076/CC50 4C076/EE41 4C076/EE59 4C084/AA03 4C084/AA17 4C084 /BA44 4C084/MA05 4C084/NA13 4C084/ZB261 4C084/ZC411 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE05 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BA02 4C086/MA02 4C086/MA03 4C086 /MA05 4C086/NA13 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA50 4H045/BA53 4H045/BA54 4H045/BA57 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	田中真一郎 ▲▼吉尔场和彦 山崎 一夫 服部博信		
优先权	62/200726 2015-08-04 US		
其他公开文献	JP2018525989A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文提供了包括多肽和一种或多种药物分子的缀合物。多肽包括一个或多个带电荷的基序，并且可以进一步包括一个或多个不带电荷的基序。缀合物可用于有效地将药物分子递送至受试者。



FIG. 1A



FIG. 1B

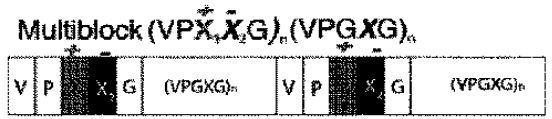


FIG. 1C