

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2016-538286**

**(P2016-538286A)**

(43) 公表日 **平成28年12月8日(2016.12.8)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C 0 5 0
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 5 7
<b>A 6 1 P 1/18 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/18	4 C 0 7 1
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 7 2
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-530831 (P2016-530831)  
 (86) (22) 出願日 平成25年11月15日 (2013.11.15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年7月12日 (2016.7.12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/002727  
 (87) 国際公開番号 W02015/071701  
 (87) 国際公開日 平成27年5月21日 (2015.5.21)

(71) 出願人 591100596  
 アンスティチュ ナショナル ドウ ラ  
 サンテ エ ドウ ラ ルシエルシュ メ  
 ディカル  
 フランス国、エフ-75013 パリ、リ  
 ユ・ドウ・トルビアック 101  
 (71) 出願人 508266546  
 ユニベルシテ パリ ディドロ-パリ 7  
 UNIVERSITE PARIS DI  
 DEROT-PARIS 7  
 フランス国 エフ-75205 パリ セ  
 デックス 13 リュ トマ マン 5  
 5, rue Thomas Mann  
 F-75205 Paris Cedex  
 13 FRANCE

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵臓癌を処置するための方法及び医薬組成物

(57) 【要約】

本発明は、膵臓癌を処置するための方法及び医薬組成物に関する。特に、本発明は、それを必要とする被験体における膵臓癌の処置に用いるためのOX1Rアゴニストに関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

該被験体に、治療有効量の O X 1 R アゴニストを投与することを含む、それを必要とする被験体における膵臓癌の処置のための方法。

## 【請求項 2】

前記 O X 1 R アゴニストが、小有機分子である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

前記 O X 1 R アゴニストが、抗体である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 4】

前記 O X 1 R アゴニストが、キメラ抗体、ヒト化抗体又は全ヒトモノクローナル抗体からなる群より選択される、請求項 1 記載の方法。

10

## 【請求項 5】

前記 O X 1 R アゴニストが、ポリペプチドである、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 6】

前記 O X 1 R アゴニストが、オレキシン - A 又はオレキシン - B の機能的等価物である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 7】

前記 O X 1 R アゴニストが、配列番号 2 又は 3 と 80% 以上の同一性を有するポリペプチドである、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 8】

前記 O X 1 R アゴニストが、イムノアドヘシンである、請求項 1 記載の方法。

20

## 【請求項 9】

前記 O X 1 R アゴニストが、アプタマーである、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 10】

前記膵臓癌が、膵管癌等の膵臓腺癌、漿液性嚢胞腺腫、腺房細胞癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) 等の、膵外分泌の他の腫瘍、及びインスリノーマ等の膵臓神経内分泌腫瘍からなる群より選択される、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 11】

前記被験体が、化学療法剤も投与される、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 12】

膵臓癌の処置を、それを必要とする被験体において行う方法であって、i) 該被験体から得られた腫瘍組織試料における O X 1 R の発現レベルを測定する工程；ii) 工程 i) で測定された該発現レベルを、基準値と比較する工程；及びiii) 工程 i) で測定された該レベルが該基準値より高い場合、該被験体に、治療有効量の O X 1 R アゴニストを投与する工程を含む方法。

30

## 【請求項 13】

膵臓癌を処置するための薬物をスクリーニングする方法であって、i) 複数の試験物質を提供する工程；ii) 該試験物質が O X 1 R アゴニストであるかを決定する工程；及びiii) O X 1 R アゴニストである該試験物質をポジティブに選択する工程を含む方法。

## 【発明の詳細な説明】

40

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、膵臓癌を処置するための方法及び医薬組成物に関する。

## 【0002】

## 発明の背景

膵臓癌は、極めて予後不良の侵襲性疾患である。これは最も悪性である癌の 1 つであって、潜行性の発症を特徴とし、通常、診断が遅れ、診断後の生存率が低い。例えば、膵管腺癌 (PDAC) は、米国における癌による死因の第 4 位である。近年の治療の進歩にもかかわらず、PDAC における長期の生存は、疾患の初期段階で手術を受けた患者に限られる場合が多い。PDAC の生物学的侵襲性は、部分的には、この腫瘍の化学療法に対す

50

る抵抗性によるものである。現在、処置の基準は、ゲムシタピンによる全身的化学療法にとどまっております、これは緩和を目的とするもので、不本意な最低限の延命効果しかない。ごく最近、5 - フルオロウラシル、ロイコボリン、イリノテカン及びオキサリプラチン（フォルフィリノックス）投与計画による、単剤ゲムシタピンに対しての、臨床的にも統計的にも意味のある延命効果の実証（Conroy et al., *N. Engl. J. Med.*, 364: 1817- 1825 (2011)）、及び膵管腺癌（P D A C）に特徴的な繊維形成性間質（desmoplastic stroma）を標的とするときみられる、アルブミン結合パクリタキセルのナノ粒子（n a d - パクリタキセル）の導入（Garber, K., *J. Natl. Cancer Inst.*, 102: 448-450 (2010)）が、古典的な細胞毒の革新的な組み合わせ及び改善された送達、実際、進行したP D A Cにおける化学療法の有効性に、実質的な影響を及ぼしうると期待を高めた。従って、膵臓癌処置におけるわずかな進歩はあるものの、膵臓癌の有効な治療を開発・提供する、改善された治療及びより創造的なアプローチが依然として必要とされている。

10

#### 【0003】

オレキシン（ヒポクレチン）には、視床下部で産生される2種の神経ペプチド、オレキシンA（O X - A）（33アミノ酸のペプチド）及びオレキシンB（O X - B）（28アミノ酸のペプチド）（Sakurai T. et al., *Cell*, 1998, 92, 573-585）が含まれる。オレキシンは、マウスにおける食餌消費を促進することが見出されており、このことは、食餌行動を制御する中枢フィードバック機構におけるメディエーターとしての、これらのペプチドの生理的な役割を示唆している。オレキシンは、睡眠及び覚醒の状態を制御しており、このことは、ナルコレプシー又は不眠症患者にとって、治療上の風穴を開ける（opening potentially novel therapeutic approaches）ものである。オレキシンはまた、覚醒、報酬、学習及び記憶において役割を果たしていることが示されている。2種のオレキシンレセプターが、哺乳類においてクローニング及び特徴付けされている。それらはGタンパク質共役レセプター（7回膜貫通レセプター）のスーパーファミリーに属し（Sakurai T. et al., *Cell*, 1998, 92, 573-585）：オレキシン - 1レセプター（O X 1 R又はH C T R 1）はO X - Aに選択的であり、オレキシン - 2レセプター（O X 2 R又はH C T R 2）は、O X - AともO X - Bとも結合しうる。近年の研究により、オレキシンによるO X 1 Rの活性化が、結腸癌細胞において、それらが結腸癌化学療法において最も一般的に用いられる薬物に対し抵抗性であっても、活発な（robust）インビトロ及びインビボのアポトーシスを促進しうることを示された（Voisin T, El Firar A, Fasseu M, Rouyer-Fessard C, Descatoire V, Walker F, Paradis V, Bedossa P, Henin D, Lehy T, Laburthe M. Aberrant expression of OX1 receptors for orexins in colon cancers and liver metastases: an openable gate to apoptosis. *Cancer Res.* 2011 May 1;71(9):3341-51）。注目すべきことに、全ての原発性結腸直腸腫瘍は、その部位やデュークステージに関わりなくO X 1 Rを発現していたが、隣接する正常結腸細胞や、対照の正常組織は陰性であった。よって、この研究は、O X 1 Rが結腸癌（化学療法耐性のものであっても）の急所（Achilles's heel）であることを支持し、かつO X 1 Rアゴニストが結腸癌治療についての新規な候補となりうることを示唆するものである。

20

30

#### 【0004】

##### 発明の概要

本発明は、膵臓癌を処置するための方法及び医薬組成物に関する。特に、本発明は、それを必要とする被験体における膵臓癌の処置に用いるためのO X 1 Rアゴニストに関する。

40

#### 【0005】

##### 発明の詳細な説明

本発明は、それを必要とする被験体における膵臓癌の処置に用いるためのO X 1 Rアゴニストに関する。

#### 【0006】

本明細書で使用する用語（tem）「O X 1 R」は、当技術分野における一般的な意味を有し、オレキシンの7回膜貫通レセプターO X 1 Rを指す。本発明によれば、O X 1 Rは

50

、Gq介在型ホスホリパーゼC活性化や細胞カルシウム一過性変化(transients)とは関連していない機構を通じて、ヒト膵臓癌細胞株におけるアポトーシスを促進する。オレキシンは実際、OX1R、ITIM及びITSMにおける、チロシンを基盤とする(tyrosine-based)モチーフ2つのチロシンリン酸化を誘発し、これはホスホチロシンホスファターゼSHP-2の動員(recruitment)をもたらすが、このものの活性化は、ミトコンドリア性アポトーシスに参与している(Voisin T, El Firar A, Rouyer-Fessard C, Gratio V, Laburthe M. A hallmark of immunoreceptor, the tyrosine-based inhibitory motif ITIM, is present in the G protein-coupled receptor OX1R for orexins and drives apoptosis: a novel mechanism. FASEB J. 2008 Jun;22(6):1993-2002.; El Firar A, Voisin T, Rouyer-Fessard C, Ostuni MA, Couvineau A, Laburthe M. Discovery of a functional immunoreceptor tyrosine-based switch motif in a 7-transmembrane-spanning receptor: role in the orexin receptor OX1R-driven apoptosis. FASEB J. 2009 Dec;23(12):4069-80. doi: 10.1096/fj.09-131367. Epub 2009 Aug 6.)。OX1Rの例示的なアミノ酸配列を配列番号1として示す。

10

20

30

40

50

## 【0007】

オレキシンレセプター - 1 OX1R (配列番号1)

```
1 mepsatpqaq mgvppgsrep spvppdyede flrylwrdbl ypkqyewvli aayvavfvva
61 lvgntlvlcla vwrnhhmrtv tnyfivnlsl advlvtaicl pasllvdite swlfghalck
121 vipylqavsv svavltlsfi aldrwyaich pllfkstarr argsilgiwa vsclaimvpqa
181 avmecssvlp elanrtrlfs vderwaddl ypkihscff ivtylaplgl mamayfqifr
241 klwgrqipgt tsalvrnwkr psdqlgdeq glsgepprg raflaevkqm rarrktakml
301 mvvllvfalc ylpisvlvnl krvmgmrqa sdreavyacf tfshwlvyan saanpiiynf
361 lsgkfreqfk aafscclppl gpcgslkaps prssashksl slqsracsisk isehvvltsv
421 ttvlp
```

## 【0008】

従って、本明細書で使用する用語「OX1Rアゴニスト」は、天然のものであれ、そうでないものであれ、OX1Rと結合することができ、一過性のカルシウム放出とは独立したシグナル伝達経路の活性化(SHP-2の動員及び細胞のアポトーシスの誘発に参与)からなるOX1R活性を促進するあらゆる化合物を指す。

## 【0009】

いくつかの実施態様においては、OX1Rアゴニストは小有機分子である。用語「小有機分子」は、医薬品において一般的に用いられる有機分子に匹敵するサイズの分子を指す。この用語は、生体高分子(例えば、タンパク質、核酸等)を排除している。好ましい小有機分子は、サイズにおいて、約5000Daまで、より具体的には2000Daまで、最も具体的には約1000Daまでの範囲である。

## 【0010】

ある実施態様においては、OX1Rアゴニストは抗体又はその一部である。

## 【0011】

本明細書で使用する「抗体」には、天然及び非天然の両抗体が含まれる。具体的には、「抗体」には、ポリクローナル及びモノクローナル抗体、並びにその一価及び二価フラグメントが含まれる。更に、「抗体」には、キメラ抗体、全合成抗体、一本鎖抗体及びそのフラグメントが含まれる。抗体は、ヒト抗体又は非ヒト抗体でありうる。非ヒト抗体は、人における免疫原性低下のために、組換え法によりヒト化されていてもよい。

## 【0012】

本明細書に記載の抗体又はその一部の一つの実施態様において、抗体はモノクローナル抗体である。本明細書に記載の抗体又はその一部の一つの実施態様において、抗体はポリクローナル抗体である。本明細書に記載の抗体又はその一部の一つの実施態様において、抗体はヒト化抗体である。本明細書に記載の抗体又はその一部の一つの実施態様において、抗体はキメラ抗体である。本明細書に記載の抗体又はその一部の一つの実施態様において、抗体の一部は、抗体の軽鎖を含む。本明細書に記載の抗体又はその一部の一つの実施

態様において、抗体の一部は、抗体の重鎖を含む。本明細書に記載の抗体又はその一部の  
 一つの実施態様において、抗体の一部は、抗体の F a b 部を含む。本明細書に記載の抗体  
 又はその一部の一つの実施態様において、抗体の一部は、抗体の F ( a b ' ) 2 部を含む  
 。本明細書に記載の抗体又はその一部の一つの実施態様において、抗体の一部は、抗体の  
 F c 部を含む。本明細書に記載の抗体又はその一部の一つの実施態様において、抗体の一  
 部は、抗体の F v 部を含む。本明細書に記載の抗体又はその一部の一つの実施態様におい  
 て、抗体の一部は、抗体の可変ドメインを含む。本明細書に記載の抗体又はその一部の  
 一つの実施態様において、抗体の一部は、抗体の C D R ドメインを含む。

#### 【 0 0 1 3 】

抗体は、従来の方法論に従って調製される。モノクローナル抗体は、K o h l l e r 及び  
 M i l l s t e i n の方法 (Nature, 256:495, 1975) を用いて作成しうる。本発明におい  
 て有用なモノクローナル抗体を調製するためには、マウスその他の適切な宿主動物を、抗  
 原の形態の O X 1 R により、適切な間隔 (例えば、2 週間ごと、1 週間ごと、2 か月ごと  
 又は 1 か月ごと) で免疫する。サクリファイス (sacrifice) から 1 週間以内に、動物に  
 最終の抗原の「ブースト」を投与してもよい。免疫する間に、免疫学的アジュバントを用  
 いることが好ましい場合が多い。適切な免疫学的アジュバントには、フロイント完全アジ  
 ュバント、フロイント不完全アジュバント、ミョウバン、R i b i アジュバント、ハンタ  
 ーのタイターマックス、Q S 2 1 又は Q u i l A といったサポニンアジュバント又は C p  
 G 含有免疫賦活オリゴヌクレオチドが含まれる。他の適切なアジュバントは、当該分野に  
 おいて周知である。動物の免疫は、皮下、腹腔内、筋肉内、静脈内、鼻腔内その他の経路  
 で行ってよい。所与の動物を、複数の形態の抗原により、複数の経路で免疫してよい。簡  
 潔に言えば、組換え O X 1 R を、組換え細胞株を用いて提供してもよい。具体的には、O  
 X 1 R を、表面に O X 1 R が発現しているヒト細胞の形態で提供してもよい。免疫の投与  
 計画に続いて、動物の脾臓、リンパ節その他の組織からリンパ球を分離し、ポリエチレン  
 グリコール等の試薬を用いて適切な骨髓腫細胞株と融合させて、ハイブリドーマを形成す  
 る。融合に続いて、文献記載の通りに (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles an  
 d Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology,  
 Biochemistry and Immunology, 3rd edition, Academic Press, New York, 1996)、標  
 準的方法を用いて、細胞を、ハイブリドーマについては増殖を許容するが、融合のパート  
 ナーについてはそうでない培地に入れる。ハイブリドーマの培養に続いて、所望の特異性  
 を有する、即ち抗体に選択的に結合する抗体の存在について、細胞上清を分析する。適切  
 な分析技術には、E L I S A、フローサイトメトリー、免疫沈降法及びウェスタンブロッ  
 ティングが含まれる。他のスクリーニング技術は、当該分野において周知である。好まし  
 い技術は、非変性 E L I S A、フローサイトメトリー及び免疫沈降法といった、コンホメ  
 ーションが正常で、本来の形に折りたたまれた抗原に対しての、抗体の結合を確認するも  
 のである。

#### 【 0 0 1 4 】

当技術分野において周知のことであるが、意義深いことに、抗体分子の小さな一部であ  
 るパラトープのみが、その抗体のエピトープへの結合に関与している (一般に、Clark, W  
 . R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology Wiley & Sons, Inc.  
 , New York; Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7th Ed., Blackwell Scientific  
 Publications, Oxfordを参照)。例えば、F c ' 及び F c 領域は、補体カスケードのエ  
 フェクターであるが、抗原結合には関与していない。F ( a b ' ) 2 フラグメントと呼ば  
 れる、p F c ' 領域が酵素的に開裂した抗体、又は p F c ' 領域なしで産生された抗体は  
 、正常な抗体の両方の抗体結合部位を保持している。同様に、F a b フラグメントと呼ば  
 れる、F c 領域が酵素的に開裂した抗体、又は F c 領域なしで産生された抗体は、正常な  
 抗体分子の一方の抗体結合部位を保持している。更に進めると、F a b フラグメントは、  
 抗体軽鎖と、抗体重鎖の一部 ( F d と示される ) が、共有結合したもものからなる。F d フ  
 ラグメントは、抗体の特異性の主要な決定因子であり (抗体の特異性は変わっていないの  
 に、単一の F d フラグメントが、10 種類までの異なる軽鎖を伴っている場合がある)、

10

20

30

40

50

また F d フラグメントは、単離されてもエピトープ結合能を保持している。

【 0 0 1 5 】

当技術分野において周知のことであるが、抗体の抗体結合部には、抗原のエピトープと直接に相互作用する相補性決定領域 ( C D R ) と、パラトープの第三級構造を維持するフレームワーク領域 ( F R ) が存在する ( 一般に、Clark, 1986; Roitt, 1991 を参照 )。I g G 免疫グロブリンの重鎖 F d フラグメント及び軽鎖の両者には、それぞれが 3 つの相補性決定領域 ( C D R 1 ~ C D R 5 ) で分離されている、4 つのフレームワーク領域 ( F R 1 ~ F R 4 ) が存在する。C D R、具体的には C D R 5 領域、より具体的には重鎖の C D R 5 が、抗体の特異性に大きく関与している。

【 0 0 1 6 】

哺乳類抗体の非 C D R 領域を、元の抗体のエピトープ特異性を維持したままで、同種又は異種の抗体における同様の領域で置き換えることが、現在、当技術分野において十分に確立されている。このことは、非ヒト C D R を、ヒト F R 及び / 又は F c / p F c ' 領域と共有結合で接続して機能的抗体を製造する「ヒト化」抗体の開発及び使用において最も明確に示される。

【 0 0 1 7 】

特定の実施態様において、本発明は、ヒト化された形態の抗体を含む組成物及び方法を提供する。本明細書で使用する「ヒト化」は、C D R 領域外のいくらか、大半又は全てのアミノ酸が、ヒト免疫グロブリン分子由来の対応するアミノ酸で置換されている抗体を記載するものである。ヒト化の方法には、米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号、米国特許第 5 2 2 5 5 3 9 号、米国特許第 5 5 8 5 0 8 9 号、米国特許第 5 6 9 3 7 6 1 号、米国特許第 5 6 9 3 7 6 2 号及び米国特許第 5 8 5 9 2 0 5 号 ( これらは参照により本明細書に組み入れられる ) に記載のものが含まれるが、これらに限定されない。前記米国特許第 5 5 8 5 0 8 9 号及び米国特許第 5 6 9 3 7 6 1 号、並びに国際公開公報第 9 0 / 0 7 8 6 1 号はまた、ヒト化抗体の設計に使用し得る、考えられる 4 つの基準を提案している。初めの提案は、アクセプターには、ヒト化されるべきドナーの免疫グロブリンと著しく相動的な、特定のヒト免疫グロブリンからのフレームワークを用いる、又は、多数のヒト抗体からのコンセンサスフレームワークを用いる、というものであった。第 2 の提案は、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク内のあるアミノ酸が異常であり、その位置のドナーのアミノ酸が、ヒトの配列において典型的なものであるならば、アクセプターよりもドナーのアミノ酸を選択するというものであった。第 3 の提案は、ヒト化免疫グロブリン鎖中の 3 つの C D R にすぐ隣接する位置では、アクセプターのアミノ酸よりもドナーのアミノ酸を選択するというものであった。第 4 の提案は、抗体の 3 次元モデルにおいて、アミノ酸が、C D R から 3 以内に側鎖の原子を有すると予測され、かつその C D R と相互作用しうると予測されるフレームワークの位置にあるドナーのアミノ酸を用いるというものであった。前記の方法は、当業者がヒト化抗体を作成するために採用しういくつかの方法の単なる例示である。当業者は、抗体をヒト化するための他の方法を熟知しているであろう。

【 0 0 1 8 】

ヒト化された形態の抗体の一つの実施態様では、C D R 領域外のいくらか、大半又は全てのアミノ酸が、ヒト免疫グロブリン分子由来の対応するアミノ酸で置換されているが、1 つ以上の C D R 領域内のいくらか、大半又は全てのアミノ酸は不変である。抗体が所与の抗体と結合する能力を阻害しない限り、アミノ酸のわずかな付加、削除、挿入又は修飾は許容される。適切なヒト免疫グロブリン分子には、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 及び I g M 分子が含まれるであろう。「ヒト化」抗体は、元の抗体と類似の抗原特異性を保持している。しかし、あるヒト化の方法を用い、Wu et al. ( Mol. Biol. 294:151, 1999 ( その内容は、参照により本明細書に組み入れられる ) ) により記載された「指向進化」の方法を用いて、抗体結合の親和性及び / 又は特異性を増加しう。

【 0 0 1 9 】

全長 ( Fully ) ヒトモノクローナル抗体もまた、ヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子座の大部分についてトランスジェニックなマウスを免疫することによって、調製するこ

10

20

30

40

50

とができる。米国特許第5591669号、米国特許第5598369号、米国特許第5545806号、米国特許第5545807号および米国特許第6150584号、並びにそれらにおける引用文献（これらの内容は、参照により本明細書に組み入れられる）を参照されたい。これらの動物は、内因性（例えばマウスの）抗体の産生において機能的な欠損が存在するように、遺伝的な修飾を受けている。これらの動物は更に修飾されて、これらの動物を免疫することにより、関心ある抗原に対する全長ヒト抗体の産生がもたらされるように、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子座の全体または一部を含む。これらのマウス（例えば、XenoMouse(Abgenix)、HuMAb mice(Medarex/GenPharm)）の免疫に続き、標準的なハイブリドーマ技術に従って、モノクローナル抗体を調製することができる。これらのモノクローナル抗体はヒト免疫グロブリンアミノ酸配列を有し、従って、ヒトに投与した時、ヒト抗マウス抗体（KAMA）応答を惹起しないであろう。

10

## 【0020】

ヒト抗体製造のためのインビトロ方法も存在する。これらには、ファージ提示技術（米国特許第5565332号及び米国特許第5573905号）及びヒトB細胞のインビトロ刺激（米国特許第5229275号及び米国特許第5567610号）が含まれる。これらの特許の内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

## 【0021】

よって、当業者にとっては明らかであろうが、本発明はまた、F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fv及びFdフラグメント；Fc及び/又はFR及び/又はCDR1及び/又はCDR2及び/又は軽鎖CDR3領域が、相同的なヒト又は非ヒト配列で置き換えられているキメラ抗体；FR及び/又はCDR1及び/又はCDR2及び/又は軽鎖CDR3領域が、相同的なヒト又は非ヒト配列で置き換えられているキメラF(ab')<sub>2</sub>フラグメント抗体；FR及び/又はCDR1及び/又はCDR2及び/又は軽鎖CDR3領域が、相同的なヒト又は非ヒト配列で置き換えられているキメラFabフラグメント抗体；及びFR及び/又はCDR1及び/又はCDR2領域が、相同的なヒト又は非ヒト配列で置き換えられているキメラFdフラグメント抗体を提供する。本発明はまた、いわゆる一本鎖抗体をも包含する。

20

## 【0022】

種々の抗体分子及びフラグメントは、一般に知られている免疫グロブリンクラス（IgA、分泌型IgA、IgE、IgG及びIgMが含まれるが、これらに限定されない）のいずれに由来するものであってもよい。IgGサブクラスは当業者にとって周知であり、ヒトIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4が含まれるが、これらに限定されない。

30

## 【0023】

他の一つの実施態様において、本発明による抗体は、シングルドメイン抗体である。用語「シングルドメイン抗体」(sdAb)又は「VHH」は、ラクダ科哺乳動物に見出されうるタイプの、元々軽鎖を欠いている、抗体の単一の重鎖可変ドメインを指す。そのようなVHHは、「nanobody(登録商標)」とも呼ばれている。本発明によれば、sdAbは特に、ラマのsdAbでありうる。

## 【0024】

本明細書に記載の試薬の一つの実施態様では、試薬はポリペプチドである。特定の実施態様において、前記ポリペプチドは、オレキシン-A又はオレキシン-Bの機能的等価物である。

40

## 【0025】

本明細書で使用する用語「オレキシン-A」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、配列番号2で示されるアミノ酸配列を指す。

## 【0026】

オレキシン-A(配列番号2)：<sub>p</sub>epIpdccrqq tcscriyell hgagnhaagi ltlx

## 【0027】

本明細書で使用する用語「オレキシン-B」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、配列番号3で示されるアミノ酸配列を指す。

50

## 【0028】

オレキシン - B (配列番号3) : 1 fsgppglqgr lqrlilqasgn haagiltm

## 【0029】

本明細書で使用する「オレキシンの機能的等価物」は、OX1Rと結合することができ、そのことにより、本発明によるOX1R活性を促進するポリペプチドである。用語「機能的等価物」には、オレキシン - A及びオレキシン - Bのフラグメント、変異体及び突然変異タンパク質が含まれる。よって、用語「機能的等価物」には、OX1Rと結合し、本発明によるOX1R活性(例えば、癌細胞のアポトーシス(apoptosis))を促進する能力を、タンパク質類似体が保持するように、アミノ酸配列を変えること、例えば、1個以上のアミノ酸の削除、置換又は付加によって得られる、オレキシン(即ち、オレキシン - A又はオレキシン - B)のあらゆる等価物が含まれる。アミノ酸置換は、例えば、アミノ酸配列をコードするDNAの点突然変異によって行ってもよい。

10

## 【0030】

いくつかの実施態様において、前記機能的等価物は、対応するタンパク質と80%以上相同である。好ましい実施態様では、前記機能的等価物は、例えば、Pileup配列分析ソフトウェア(Program Manual for the Wisconsin Package, 1996)といった、何らかの従来の分析アルゴリズムにより評価するとき、90%以上相同である。本明細書で使用する用語「機能的等価フラグメント」はまた、OX1Rと結合し、本発明によるOX1R活性を促進する、オレキシンの何らかのフラグメント又はフラグメントの集合物を意味する場合がある。従って、本発明は、オレキシン - A又はオレキシン - Bの、OX1Rと結合し、本発明によるOX1R活性を促進する少なくとも一部の配列に対応する配列を有する、連続するアミノ酸を含むポリペプチドを提供する。

20

## 【0031】

機能的等価フラグメントは、本明細書において同定されているヒトオレキシンと同一のタンパク質ファミリーに属しうる。「タンパク質ファミリー」とは、共通の機能を共有し、共通の配列相同率を示す一群のタンパク質を意味する。相同タンパク質は、ヒト以外の種に由来するものであってよい。具体的には、完全タンパク質の全アミノ酸配列にわたる、機能的に等価なタンパク質配列間の相同率は、25%以上である。より具体的には、タンパク質又はタンパク質フラグメントの全アミノ酸配列にわたる相同率は50%以上であり、更に具体的には、相同率は75%以上である。より具体的には、全配列にわたる相同率は80%超である。より具体的には、全配列にわたる相同率は90%超である。より具体的には、全配列にわたる相同率は95%超である。

30

## 【0032】

当業者にとっては明らかなことであろうが、本発明のポリペプチドは、あらゆる適切な手段により製造しうる。本発明に従って使用するのに十分な量のポリペプチド又はその機能的等価物を製造するためには、簡便には、本発明のポリペプチドを含む組換え宿主細胞を、適切な条件下で培養することにより、発現を達成しうる。具体的には、ポリペプチドは、組換え手段により、コードしている核酸分子からの発現により製造する。種々異なる宿主細胞における、ポリペプチドのクローニング及び発現のための系は周知である。組換え型で発現させる場合、ポリペプチドは、具体的には、宿主細胞における、コードしている核酸からの発現により生成する。具体的な系における個々の要件に応じて、あらゆる宿主細胞を使用しうる。適切な宿主細胞には、細菌、哺乳類細胞、植物細胞、酵母及びバキユロウィルス系が含まれる。異種ポリペプチドの発現のための、当技術分野において入手可能な哺乳類細胞株には、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓細胞その他多くのものが含まれる。細菌もまた、どの細菌を操作し、増殖させるかについての容易さ故に、組換えタンパク質製造のための好ましい宿主である。一般には、好ましい細菌宿主は大腸菌である。

40

## 【0033】

いくつかの実施態様においては、本発明のポリペプチドはイムノアドヘシンである。

## 【0034】

50



本明細書で使用する用語「イムノアドヘシン」は、異種タンパク質の結合特異性（O X 1 Rと結合することができる「アドヘシン」と、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能が組み合わされた抗体様分子をいう。構造的には、イムノアドヘシンは、O X 1 Rへの所望の結合特異性を有する（即ち「異種」である）アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列の融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部は、典型的には、O X 1 Rについての結合部位を少なくとも含む、連続するアミノ酸配列である。一つの実施態様では、アドヘシンは、配列番号2又は配列番号3により特徴付けられるポリペプチドを含む。イムノアドヘシン中の免疫グロブリン定常ドメイン配列は、I g G - 1、I g G - 2、I g G - 3又はI g G - 4サブタイプ、I g A（I g A - 1及びI g A - 2を含む）、I g E、I g D又はI g Mといった、あらゆる免疫グロブリンから得られるものであってよい。

10

**【0035】**

免疫グロブリン配列は、典型的には（ただし必然的ではない）、免疫グロブリン定常ドメイン（F c領域）である。イムノアドヘシンは、ヒト抗体の価値ある化学的及び生物学的特性のうち多くを有しうる。イムノアドヘシンは、適切なヒト免疫グロブリンヒンジ及び定常ドメイン（F c）配列と連結した、所望の特異性を有するヒトタンパク質の配列から構成しうるので、関心ある結合特異性を、ヒト成分全てを用いて達成することができる。そのようなイムノアドヘシンは、患者にとっての免疫原性が最低限のものであり、慢性的又は反復使用においても安全である。

**【0036】**

一つの実施態様において、F c領域は、本来の配列のF c領域である。一つの実施態様において、F c領域は、変異型のF c領域である。更に他の一つの実施態様において、F c領域は、機能的F c領域である。本明細書で使用する用語「F c領域」は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するのに用いられ、本来の配列のF c領域及び変異型のF c領域を含む。免疫グロブリン重鎖のF c領域の境界は変動しうるが、ヒトI g G重鎖のF c領域は通常、C y s 2 2 6の位置のアミノ酸残基から、又はP r o 2 3 0から、そのカルボキシル末端までにわたる、と定義される。イムノアドヘシンの付着部（adhesion portion）と免疫グロブリン配列部は、最小限のリンカーにより連結されていてよい。免疫グロブリン配列は、典型的には（ただし必然的ではない）、免疫グロブリン定常ドメインである。本発明のキメラにおける免疫グロブリン部は、I g G 1、I g G 2、I g G 3又はI g G 4サブタイプ、I g A、I g E、I g D又はI g Mから得られるものであってよいが、I g G 1又はI g G 3である。

20

30

**【0037】**

本発明のポリペプチド、本発明によるそのフラグメントおよび融合タンパク質（例えばイムノアドヘシン）は、グリコシル化（例えば、N結合又はO結合グリコシル化）、ミリスチル化、パルミチル化、アセチル化及びリン酸化（例えば、セリン/スレオニン又はチロシン）をはじめとする（ただしそれらに限定されない）翻訳語修飾を示すものでありうる。

**【0038】**

特定の実施態様においては、本発明の治療方法において用いられるポリペプチドは、その治療有効性を改善するために修飾されていてもよいことが意図されている。治療化合物のそのような修飾は、毒性を低減し、循環時間を増し、又は生体内分布を変えるために用いてよい。例えば、生体内分布を変える種々の薬物担体媒体（drug carrier vehicles）と組み合わせることにより、潜在的な重要治療化合物の毒性を有意に低減することができる。例えば（In example）、ジペプチドを付加することは、内因性トランスポーターを用いる、循環する薬物の血液-網膜関門を通じての目への浸透を改善することができる。

40

**【0039】**

薬物生存率を向上するための戦略は、水溶性ポリマーの利用である。種々の水溶性ポリマーが、生体内分布を変え、細胞取り込みの様式を向上し、生理的関門を通じての浸透性を変え、生体からのクリアランス速度を変えることが示されている。ターゲティング及

50

び徐放効果を達成するために、薬物部分を、ポリマー鎖上の末端基として、主鎖の一部として、又はペンダント基として含有する水溶性ポリマーが合成されてきた。

【0040】

ポリエチレングリコール(PEG)が、その高度の生体適合性と修飾の容易さから、薬物担体として広く用いられてきた。種々の薬物、タンパク質及びリボソームへの取り付けが、滞留時間を向上し、毒性を低減することが示されている。PEGは、その鎖末端のヒドロキシル基を介して、またその他の化学的方法を通じて、活性剤と結合しうるが、PEG自体は、1分子あたり、最大で2個の活性剤に限られている。別のアプローチでは、PEGとアミノ酸の共重合体が、PEGの生体適合特性を保持しているが、1分子あたりの多数の結合点(より大きな薬物負荷をもたらす)という付加された利点を有し、また合成上の設計で種々の用途に適合させうる、新規な生体適合材料として検討された。

10

【0041】

当業者は、薬物の有効な修飾のためのPEG化技術を承知している。例えば、PEGと、リジンのような三官能性モノマーの交互重合体からなる薬物送達ポリマーが、VectraMed (Plainsboro, N.J.)により用いられている。PEG鎖(典型的には2000ダルトン以下)が、安定なウレタン結合を介してリジンの - 及び - アミノ基(a- and e-amino groups)に結合している。そのような共重合体は、ポリマー鎖に沿った、厳密に制御された所定の間隔で、反応性ペンダント基(リジンのカルボン酸基)を提供しつつ、PEGの望ましい特性を保持している。反応性ペンダント基は、誘導体化、架橋又は他分子との結合に用いることができる。これらのポリマーは、ポリマーの分子量、PEGセグメントの分子量及び薬物とポリマーの間の開裂可能な結合を変えることにより、安定で、長時間循環するプロドラッグの製造において有用である。PEGセグメントの分子量は、薬物/結合基複合体の間隔と、結合物の分子量あたりの薬物の量(より小さいPEGセグメントは、より大きな薬物負荷をもたらす)に影響する。一般に、ブロック共重合体結合物の分子量を増加させることは、結合物の循環半減期を増加させるであろう。それでも、結合物は、容易に分解されうるか、又は、限界糸球体濾過(threshold-limiting glomerular filtration)を下回る分子量(例えば60kDa未満)を有していなければならない。

20

【0042】

加えて、循環半減期の維持及び生体内分布に重要なポリマー主鎖に対し、標的組織において特定のトリガー(典型的には酵素活性)によりポリマー主鎖から放出されるまで、治療剤をプロドラッグの形態に維持するためのリンカーを用いてもよい。例えば、この様式の組織活性化薬物送達は、生体内分布における特定の部位への送達が必要である場合に特に有用であり、治療剤は病変の部位又はその近傍で放出される。活性化薬物送達に用いる結合基のライブラリーは当業者に公知であり、酵素の速度論、活性酵素の存在量(prevalence)及び選択された疾患に特異的な酵素の開裂特異性に基づくものでありうる。そのようなリンカーを、治療送達のための、本明細書に記載のタンパク質又はタンパク質のフラグメントの修飾に用いてもよい。

30

【0043】

一つの実施態様において、OX1Rアゴニストはアプタマーである。アプタマーは、分子認識の観点からは、抗体の代替物に相当する(represents)分子のクラスである。アプタマーは、高度の親和性及び特異性をもって、実質的にあらゆるクラスの標的分子を認識する能力を有するオリゴヌクレオチド又はオリゴペプチド配列である。そのようなリガンドは、ランダム配列ライブラリーのSystematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX)を通じて単離しうる。このランダム配列ライブラリーは、DNAのコンビナトリアル化学合成により得ることができる。このライブラリーにおいて、各メンバーは、固有の配列を有する直鎖状オリゴマー(最終的には化学修飾される)である。ペプチドアプタマーは、プラットフォームタンパク質(大腸菌チオレドキシニンAのような)により提示される、コンホメーションが拘束された抗体可変領域からなり、2ハイブリッド法によるコンビナトリアルライブラリーより選択される。

40

【0044】

50

本明細書で使用する用語「膵臓癌」又は「膵癌」は、膵臓細胞由来の癌に関する。具体的には、膵臓癌は、膵臓腺癌（例えば膵管腺癌）に加え、膵外分泌部の他の癌（例えば漿液性嚢胞腺腫）、腺房細胞癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）及び膵臓神経内分泌腫瘍（例えばインスリノーマ）を含んだ。

【0045】

いくつかの実施態様においては、治療有効量の本発明のOX1Rアゴニストを、被験体に投与する。

【0046】

「治療有効量」は、何らかの医療処置に適用しうる合理的なリスク対効果比において、膵臓癌を処置するのに十分な量のOX1Rを意味する。本発明の化合物及び組成物の一日あたりの総使用量は、妥当な医学的判断の範囲内で、担当医により決定されるであろうことが理解されよう。いずれかの具体的な被験体についての特定の治療有効投与量レベルは、処置される障害およびその障害の重症度；使用する特定の化合物の活性；使用する特定の組成物、被験体の年齢、体重、一般的健康状態、性別及び食餌；使用する特定の化合物の投与時間、投与系路及び排泄速度；処置の期間；使用する特定のポリペプチドと組み合わせ、又は同時に用いる薬物；及び医療分野において周知の類似の因子をはじめとする、種々の因子に応じて変動するであろう。例えば、化合物の投与量を、所望の治療効果を達成するのに必要なレベルよりも低いレベルで開始し、所望の効果が達成されるまで投与量を徐々に増加させることは、十分に当該分野の技術の範囲内である。しかし、製品の日あたりの投与量は、0.01～1,000mg（成人1人に対して一日あたり）に及び広い範囲で変動しうる。具体的には、処置すべき被験体に対する投与量の、症状に対する調節のため、組成物は、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、250及び500mgの有効成分を含有する。薬剤は、典型的には約0.01mg～約500mg、具体的には1mg～約100mgの有効成分を含有する。有効量の薬物を、通常は、一日あたり0.0002mg/体重kg～約20mg/体重kg、特に、一日あたり約0.001mg/体重kg～7mg/体重kgの投与量レベルで供給する。

【0047】

本発明のOX1Rアゴニストは、その薬学的に許容され得る賦形剤、及び場合により、生分解性ポリマーのような徐放マトリックスと組み合わせ、治療組成物を形成してもよい。

【0048】

「薬学的に」又は「薬学的に許容され得る」とは、必要に応じて哺乳類、特にヒトに投与するとき、副作用、アレルギー反応その他の有害な反応を生じない、分子の実体及び組成物を指す。薬学的に許容され得る担体又は賦形剤とは、無毒な固体、半固体又は液体である、あらゆる様式の充填剤、希釈剤、カプセル化材料又は製剤助剤を指す。

【0049】

本発明の、経口、舌下、筋肉内、静脈内、経皮、局所又は直腸投与用の医薬組成物においては、活性成分を単独で、又は他の活性成分と組み合わせ、単位剤形で、従来の医薬用担体（pharmaceutical supports）との混合物として、動物及び人間に投与することができる。適切な単位剤形には、錠剤、ゲルカプセル、散剤、顆粒剤及び経口用懸濁液又は溶液といった経口経路の剤形、舌下及びパッカル投与剤形、エアゾール、埋め込み、皮下、経皮、局所、腹腔内、筋肉内、静脈内、皮下、経皮、くも膜下及び経鼻投与剤形並びに直腸投与剤形が含まれる。

【0050】

具体的には、医薬組成物は、注射しうる製剤のための、薬学的に許容され得る媒体を含有する。これらは具体的には、等張滅菌塩溶液（リン酸一ナトリウム又は二ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウム又はマグネシウム等、又はそのような塩の混合物）、又は、場合により滅菌水又は生理食塩水を添加すると、注射用液剤の構成が可能になる乾燥（特に凍結乾燥）組成物であってよい。

10

20

30

40

50

## 【0051】

注射用の使用に適した剤形には、滅菌水溶液又は水性分散液；ゴマ油、ラッカセイ油又は水性プロピレングリコールを含む製剤；及び滅菌注射用溶液又は分散液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。いずれの場合も、この剤形は滅菌されていなければならない、また容易に注射できる（easy syringability exists）程度に流動性があらねばならない。製造及び保管の条件下において安定であらねばならず、また細菌、真菌といった微生物の汚染作用に対して保存されていなければならない。

## 【0052】

本発明の化合物を遊離塩基又は薬理的に許容し得る塩として含む溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤と適切に混合された水の中に調製することができる。分散液は、グリセリン、液体ポリエチレングリコール及びそれらの混合物、並びに油中でも調製することができる。通常の保管及び使用の条件下において、これらの製剤は、微生物の増殖を防ぐための保存剤を含有する。

10

## 【0053】

本発明のOX1Rアゴニストは、中性又は塩の形態で組成物に処方することができる。薬学的に許容し得る塩には、例えば塩酸又はリン酸といった無機酸、又は、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等といった有機酸と形成される酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基と形成される）が含まれる。遊離カルボキシル基と形成される塩もまた、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム又は水酸化鉄（III）といった無機塩基、及び、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等といった有機塩基から導出する。

20

## 【0054】

担体はまた、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコール等）、それらの適切な混合物及び植物油を含有する溶媒又は分散媒でありうる。例えば、レシチンのようなコーティングの使用により、必要な粒子径の維持（分散液の場合）により、また界面活性剤の使用により、適切な流動性を維持することができる。例えばパラベン類、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等の種々の抗菌及び抗真菌剤（antibacterial and antifungal agents）により、微生物の作用の防止をもたらすことができる。多くの場合、等張化剤、例えば糖類又は塩化ナトリウムを含有することが好ましいであろう。注射用組成物における吸収の延長は、同組成物における吸収遅延剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの使用によりもたらすことができる。

30

## 【0055】

滅菌注射液は、必要量の活性ポリペプチドを、必要に応じて、先に列挙した種々の他の成分と共に、適切な溶媒に加え、次いで濾過滅菌（filtered sterilization）することにより調製される。一般に、分散液は、種々の滅菌した有効成分を、基本の分散媒及び先に列挙したもののからの必要な他の成分を含有する滅菌した媒体に加えることにより調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、減圧乾燥及び凍結乾燥技術であり、これは、有効成分の粉末と、追加の所望の成分（あれば）を合わせたものを、予め滅菌濾過したそれらの溶液から生成する。

40

## 【0056】

溶液は、製剤されると、投与製剤と適合する様式で、また治療に有効であるような量で投与されるであろう。製剤は、前記注射用溶液の様式のような、種々の投与形態で容易に投与することができるが、薬物放出カプセルなどもまた使用することができる。

## 【0057】

水溶液で非経口投与するためには、例えば、必要であれば溶液を緩衝化すべきであり、また液体希釈剤をまず十分な食塩又はグルコースで等張にすべきである。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下及び腹腔内投与に特に適している。このことに関連して、使用しうる滅菌水性媒体は、本開示に照らして、当業者には公知であろう。例えば、1回分の投与量を、等張NaCl溶液1mLに溶解することもでき、皮下注入流体1000mL

50

に添加することもでき、また提案された注入部位に注射することもできるであろう。処置される被験体の状態に応じて、いくらかの投与量の変動が必然的に生じるであろう。いずれにしても、投与についての責任者が、個々の被験体についての適切な投与量を決定するであろう。

【0058】

本発明のOX1Rアゴニストは、投与1回分に、約0.0001~1.0ミリグラム、又は約0.001~0.1ミリグラム、又は約0.1~1.0ミリグラム(約10ミリグラムさえも)を含むように、治療混合物に処方しうる。投与複数回分の投与も可能である。

【0059】

静脈内又は筋肉内注射のような、非経口投与用に処方された本発明の化合物に加えての、他の薬学的に許容され得る形態には、例えば、錠剤その他の経口投与用固体；リボソーム製剤；徐放性カプセル；及びその他の現在用いられている形態が含まれる。

【0060】

いくつかの実施態様において、本発明のOX1Rアゴニストは、化学療法剤と組み合わせて用いられる。化学療法剤には、チオテパ及びシクロホスファミドのようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなアルキルスルホナート類；ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド(triethylenephosphoramidate)、トリエチレンチオホスホルアミド(triethyl enethiophosphoramidate)及びトリメチロロメラミン(trimethylolomelamine)をはじめとするエチレンイミン類及びメチラメラミン類(methylamelamines)；アセトゲニン類(特に、プラタシン及びプラタシノン)；カンプトテシン(合成類似体のトポテカンを含む)；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成類似体を含む)；クリプトフィシン類(特に、クリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン；デュオカルマイシン(合成類似体のKW-2189及びCB1-TM1を含む)；エリュテロピン；パンクラチスタチン；サルコディクチン；スポンギスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エスタムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピシン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードのような窒素マスタード類；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン及びラニムスチンのようなニトロソウレア類；エンジン抗生物質のような抗生物質(例えば、カリケアミシン、特にカリケアミシガンマII及びカリケアミシンオメガII；ダイネミシンAをはじめとするダイネミシン；クロドロナーのようなビスホスホナート；エスペラミシン；また、ネオカルジノスタチンクロモフォア及び関連する色素タンパク質エンジン抗生物質クロモフォア)、アクラシノマイシン類、アクチノマイシン、アントラマイシン(authrarnycin)、アザセリン、プレオマイシン類、カクチノマイシン、カラピシン(carabycin)、カミノマイシン(caminomycin)、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン(モルホリノドキシソルピシン、シアノモルホリノドキシソルピシン、2-ピロリノドキシソルピシン及びデオキシドキシソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシンCのようなマイトマイシン類、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン類、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルピシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン；メトトレキサート及び5-フルオロウラシル(5-FU)のような代謝拮抗剤；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートのような葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリン類似体；アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウ

10

20

30

40

50

リジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロキシウリジンのようなピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタノール、テストラクトンのようなアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎薬；フロリン酸 (frolinic acid) のような葉酸補充薬；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド (aldophosphamide glycoside)；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート (ed atraxate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルシン；ジアジコン；エフロルニチン (elformithine)；酢酸エリプチニウム；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；エポチロン；エトグルシド；レンチナン；ロニダミン (lonidainine)；メイタンシン及びアンサミトシンのようなメイタンシノイド類；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール (mopidanmol)；ニトラエリン (nitraerine)；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K 多糖複合体；ラゾキサシン；リゾキシニン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2 , 2 ' , 2 " - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類 (特に T - 2 トキシニン、ベラクリン A (verracurin A)、ロリジン A 及びアングイジン)；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド (「A r a - C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド類、例えばパクリタキセル及びドキシタキセル；クロラムブシル；ゲムシタピン；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチン、オキサリプラチン及びカルボプラチンのような白金配位錯体；ピンブラスチン；白金；エトポシド (V P - 1 6)；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ノバントロン；テニボシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロナート；イリノテカン (例えば C P T - 1 1)；トポイソメラーゼインヒビター R F S 2 0 0 0；ジフルオロメチルオミチン (difluoromethylomithine) (D M F O)、レチノイン酸のようなレチノイド類；カペシタピン；および前記のあらゆるものの薬学的に許容し得る塩、酸又は誘導体が含まれるが、それらに限定されない。

#### 【0061】

本発明の更なる目的は、膵臓癌の処置を、それを必要とする (in thereof) 被験体において行う方法であって、i) 前記被験体から得られた腫瘍組織試料における O X 1 R の発現レベルを測定する工程；ii) 工程 i) で測定された前記発現レベルを、基準値と比較する工程；及び iii) 工程 i) で測定された前記レベルが前記基準値より高い場合、前記被験体に、治療有効量の O X 1 R アゴニストを投与する工程を含む方法に関する。

#### 【0062】

O X 1 R の発現レベルは、当技術分野において周知のいかなる方法で測定してもよい。例えば、m R N A の量を測定する方法は、当技術分野において周知である。典型的には、まず試料 (例えば、患者から調製した細胞又は組織) に含まれる核酸を、標準的方法に従って、例えば、溶解酵素又は化学物質溶液を用いて抽出するか、又は、製造元の説明書に従い、核酸結合樹脂を用いて抽出する。次に、抽出した m R N A をハイブリダイゼーション (例えばノーザンブロット分析) 及び / 又は増幅 (例えば R T - P C R) により検出する。好ましくは、定量的又は半定量的 R T - P C R が好ましい。リアルタイムの定量的又は半定量的 R T - P C R が特に有利である。或いは、免疫組織化学 (I H C) 法を用いてもよい。I H C は、試料又は組織標本中のターゲットをインサイチューで検出する方法を特異的に提供する。I H C では、試料の全体的な細胞の完全性が維持され、よって、関心あるターゲット (即ち O X 1 R) の存在及び位置の両方の検出が可能になる。典型的には、試料をホルマリンで固定し、パラフィンに埋め込み、染色及びそれに次ぐ光学顕微鏡での観察のため、切って切片とする。現行の I H C 法は、直接ラベリング、或いは二次抗体に基づく、又はハプテンに基づくラベリングのいずれかを用いる。公知の I H C システムの例には、例えば、EnVision (商標) (DakoCytomation)、Powervision (登録商標) (Immunovision, Springdale, AZ)、NBA (商標) キット (Zymed Laboratories Inc., South

San Francisco, CA)、HistoFine(登録商標)(Nichirei Corp, Tokyo, Japan)が含まれる。特定の実施態様においては、腫瘍組織切片を、OX1Rに対する抗体と共にインキュベーションした後、スライドその他の支持体に据え付けてもよい。次いで、適切な固体支持体に据え付けた試料において、顕微鏡観察を行ってよい。顕微鏡写真作成のため、試料を含む切片を、スライドガラスその他平面状の支持体に据え付け、選択的染色により関心あるタンパク質の存在を強調してもよい。

#### 【0063】

「基準値」は、「閾値」又は「カットオフ値」でありうる。典型的には、「閾値」又は「カットオフ値」は、実験的に、経験的に又は理論的に決定することができる。当業者には認識されていることであろうが、閾値はまた、実験上及び/又は臨床上的現状に基づき、恣意的に選択することもできる。閾値は、試験の機能と、リスク対効果のバランス(偽陽性及び偽陰性の臨床上的重要性)に照らして、最適化された感度及び特異性が得られるように決定されなければならない。典型的には、最適化された感度及び特異性(閾値もそうであるが)は、実験データに基づく受信者動作特性(ROC)曲線を用いて決定することができる。典型的には、閾値は、OX1Rアゴニストによる処置を受けるのに十分な量のOX1Rレベルを有する、1以上の被験体に由来する腫瘍組織試料において測定されたOX1R発現レベル(又は比、又はスコア)から導出される。更に、これらの閾値の確立には、適切に保存された過去の(historical)被験体試料における、OX1R発現レベル(又は比、又はスコア)の遡及的な測定を用いてもよい。

10

#### 【0064】

本発明の更なる目的は、膵臓癌を処置するための薬物をスクリーニングする方法であって、i)複数の試験物質を提供する工程；ii)前記試験物質がOX1Rアゴニストであるかを決定する工程；及びiii)OX1Rアゴニストである前記試験物質を肯定的に選択する工程を含む方法に関する。

20

#### 【0065】

典型的には、本発明のスクリーニング方法は、表面にオレキシン-1レセプターが発現している適切な細胞を提供する工程を含む。そのような細胞には、哺乳類、酵母、ショウジョウバエ又は大腸菌からの細胞が含まれる。具体的には、オレキシン-1レセプターをコードするポリヌクレオチドを用いて細胞をトランスフェクションし、レセプターを発現させる。次いで、発現させたレセプターを、試験物質及び必要に応じてオレキシン-1レセプターのリガンド(例えばオレキシン類)と接触させて、SHP-2の動員及び細胞の細胞アポトーシスの誘発といった、機能的反応の活性化を観測する。機能的アッセイは、El Firar A, Voisin T, Rouyer-Fessard C, Ostuni MA, Couvineau A, Laburthe M. Discovery of a functional immunoreceptor tyrosine-based switch motif in a 7-transmembrane-spanning receptor: role in the orexin receptor OX1R-driven apoptosis. FASEB J. 2009 Dec;23(12):4069-80. doi: 10.1096/fj.09-131367. Epub 2009 Aug 6に記載されているように行いうる。具体的には、比較工程は、試験物質により誘発された活性と、オレキシンのような周知のOX1Rアゴニストにより誘発された活性を比較することを含む。具体的には、周知のOX1Rアゴニストと類似の、又はそれよりもよりよい活性を有しうる物質を、ポジティブに選択する。

30

40

#### 【0066】

典型的には、本発明のスクリーニング方法はまた、細胞表面に存在するオレキシン-1レセプターに結合しうる試験物質のスクリーニングをも含む。典型的には、試験物質を標識(例えば放射性標識で)し、結合をオレキシンのような周知のOX1Rアゴニストと比較する。調製物を標識OX1Rと共にインキュベーションし、NGALと結合した試験物質の複合体を単離して、当技術分野において公知の日常的な方法に従い特徴付けを行う。或いは、OX1Rを固相支持体に結合させて、細胞から可溶化させた結合性分子がカラムに結合し、次いで溶出して日常的な方法に従い特徴付けされるようにしてもよい。もう一つの実施態様では、NGALにより調節されるシグナル伝達又は制御経路の分子のような、NGALと結合する分子を発現する細胞から、細胞内コンパートメントを調製して

50

もよい。調製物を、候補化合物の存在下又は不在下に標識 N G A L と共にインキュベーションする。候補化合物の結合性分子と結合する能力は、標識リガンドとの結合の減少に反映される。

【0067】

典型的には、候補化合物は、小有機分子、ペプチド、ポリペプチド又はオリゴヌクレオチドからなる群より選択される。

【0068】

肯定的に選択された試験物質を、膵臓癌の処置のためのその特性を更にアッセイするという観点から、更なる選択工程に付してもよい。例えば、肯定的に選択された候補化合物を、膵臓癌の動物モデルにおけるその特性を更にアッセイするという観点から、更なる選択工程に付してもよい。

10

【0069】

膵臓癌の処置に有用でありうる薬物を開発するために、前記アッセイは、試験物質を同定するための高スループットのスクリーニング技術を用いて行ってよい。高スループットのスクリーニング技術は、自動化されたロボットシステムを用いて複数のアッセイを行うため、多穴プレート（例えば、96、384又は1536穴プレート）を用いて行ってよい。よって、試験物質の大きなライブラリーを、高効率な様式でアッセイしうる。より具体的には、マイクロタイタープレート（96穴又は384穴）のウェルで増殖する、安定的にトランスフェクションした細胞を、化合物のライブラリーの高スループットのスクリーニングに適合させることができる。ライブラリー中の化合物は、前記のトランスジェニック細胞を含有するマイクロタイター皿のウェルに、自動化された様式で1種ずつ適用されよう。アポトーシス性シグナルを活性化する試験物質が同定されたら、更なる特徴付けのためにそれらを肯定的に選択する（selected from）ことができる。これらのアッセイは、いくつかの利点を提供する。試験物質を丸ごとの細胞に曝露することは、その活性を、その試験物質が作用しうる自然な状況において評価することを可能にする。このアッセイは、マイクロタイタープレートのフォーマットにおいて容易に行えるので、記載されたアッセイを自動化されたロボットシステムによって行うことができ、このことが、多数の試料を、合理的に短い期間内に試験することを可能にする。本発明のアッセイは、これまで試験されていない化合物又は抽出物の活性を評価するためのスクリーンに用いることができ、この場合には、単一の濃度を試験して対照と比較する。本発明のアッセイはまた、ある範囲、例えば100  $\mu$ M ~ 1  $\mu$ Mの範囲を試験し、アポトーシスが最大になる濃度を計算することにより、化合物の相対的効力を評価するのにも用いることができる。

20

30

【0070】

以下の図面及び実施例により、本発明を更に説明する。ただし、これらの実施例及び図面は、いかなる様式であれ本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】図1は、AsPC-1細胞を異種移植したヌードマウスへのオレキシン-A注射により誘発された、腫瘍の縮小を示す。

【0072】

40

実施例

オレキシンは、睡眠/覚醒の制御に關与する視床下部ペプチドである。本発明者らは、オレキシンが、結腸直腸癌細胞における活発なアポトーシスを促進することを示した。細胞死は、OX1R配列中の2個のITIM（免疫受容体チロシン抑制性モチーフ）の存在並びにチロシンホスファターゼSHP-2の動員及び活性化が關与するオリジナルの機構を通じて、オレキシン1レセプター（OX1R）により媒介される。クラスI GPCRであるOX1Rは、原発結腸直腸腫瘍及び肝転移において異常に発現する。膵管腺癌（PAC）は、予後不良の極めて悪性の腫瘍である。化学療法処置は、不十分な奏効率を示す。本発明者らは、免疫組織化学により、大半の膵管腺癌におけるOX1Rの発現を示したが、このことは、試験したPACの98%におけるOX1Rの異所性発現を示唆するもので

50



ある。

【0073】

この研究の目的は、1ノヒトPAC細胞株におけるOX1Rの存在を調査し、アポトーシスに関連するオレキシン-Aの効果を解析すること；2ノオレキシン-Aに応答した腫瘍増殖の検討のため、OX1Rを発現する細胞株から、インビボ異所性異種移植モデルを開発することであった。3つのPAC細胞株（AsPC-1、HPAF-II及びSW1990）において、mRNA（RT-PCR）、タンパク質（免疫細胞化学）及び機能のレベルで、OX1Rの発現を検討した。OX1Rを発現する細胞株からの動物モデル（異所性異種移植）の開発は、腫瘍増殖におけるオレキシン-Aの効果を検討することを可能にした。切除した腫瘍を、免疫組織化学により解析した。AsPC-1細胞のみが、OX1Rを発現する。

10

【0074】

オレキシン-Aによる処置は、ミトコンドリア性アポトーシスを促進することにより、細胞増殖阻害を32%促進した。本発明者らは、SHP阻害剤NSC-87877を用いて、同阻害剤の、AsPC-1細胞におけるオレキシン誘発アポトーシスを逆転する能力を示した。AsPC-1細胞を異種移植したヌードマウスへのオレキシン-A注射は、処置した場合において、腫瘍の進行を49%減少させた。全ての腫瘍は、サイトケラチン7、CA9（低酸素症のマーカー）及びOX1Rを発現する低分化腺癌に相当するものであった。オレキシン-Aで処置した（カスパーゼ-3が活性化された）腫瘍では、アポトーシスの誘発が観測された。

20

【0075】

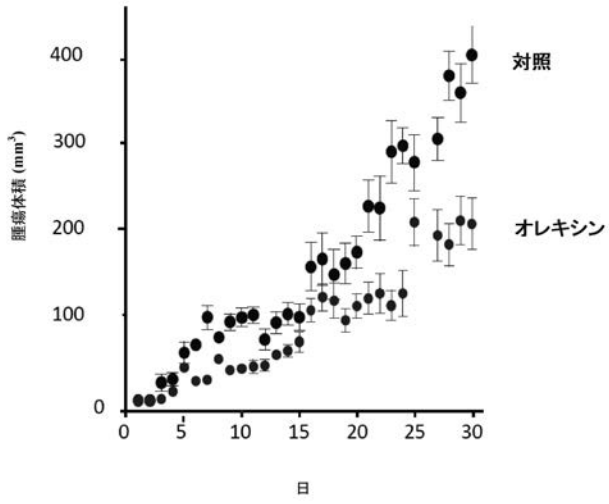
結論として、この研究は、PACにおけるオレキシンの抗腫瘍及びアポトーシス促進効果を示した。このことに関連して、オレキシンレセプターは、膵臓の抗腫瘍治療及び/又は前臨床診断における新しい有望な標的に相当する。

【0076】

参考文献

本願全体にわたり、本発明が関連する分野の状態を、種々の参考文献が記載している。これらの参考文献の開示は、参照により本開示に組み入れられる。

【 図 1 】



【 配列表 】

2016538286000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2013/002727
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K38/17 A61P35/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
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) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PALAZZO MAXIME ET AL: "Orexins Exert a PRO-Apoptotic Effect on Digestive Human Neuroendocrine Tumors (NET) in an Ex-Vivo Culture Model of Tissue Slices", GASTROENTEROLOGY, vol. 142, no. 5, Suppl. 1, May 2012 (2012-05), page S857, XP002724017, & DIGESTIVE DISEASE WEEK (DDW); SAN DIEGO, CA, USA; MAY 19 -22, 2012 abstract	1-13
X	LABURTHE M ET AL: "Orexins/hypocretins and orexin receptors in apoptosis: a mini-review", ACTA PHYSIOLOGICA, vol. 198, no. 3, March 2010 (2010-03), pages 393-402, XP002724018, abstract	1-11,13
<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  7 May 2014		Date of mailing of the international search report  23/06/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Vandenbergarde, Ann

## 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 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/675 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/255 (2006.01)	A 6 1 K 31/675	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/53 (2006.01)	A 6 1 K 31/255	
A 6 1 K 31/4745 (2006.01)	A 6 1 K 31/53	
A 6 1 K 31/365 (2006.01)	A 6 1 K 31/4745	
A 6 1 K 31/407 (2006.01)	A 6 1 K 31/365	
A 6 1 K 31/513 (2006.01)	A 6 1 K 31/407	
A 6 1 K 31/7076 (2006.01)	A 6 1 K 31/513	
A 6 1 K 31/7068 (2006.01)	A 6 1 K 31/7076	
A 6 1 K 31/03 (2006.01)	A 6 1 K 31/7068	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/03	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 0 7 D 251/70 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 D 491/22 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	Z N A
C 0 7 D 493/22 (2006.01)	C 0 7 D 251/70	A
C 0 7 D 519/00 (2006.01)	C 0 7 D 491/22	
C 0 7 D 487/04 (2006.01)	C 0 7 D 493/22	
C 0 7 D 239/553 (2006.01)	C 0 7 D 519/00	3 1 1
C 0 7 H 19/19 (2006.01)	C 0 7 D 487/04	1 3 7
C 0 7 H 19/09 (2006.01)	C 0 7 D 239/54	C
	C 0 7 H 19/19	
	C 0 7 H 19/09	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), 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, R S, 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, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 591140123

アシスタンス ピュブリク - オピトー ドゥ パリ  
ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS  
フランス国, 75004 パリ, アベニュー ビクトリア 3番地

(71)出願人 511133761

ユニヴェルシテ・ドゥ・ヴェルサイユ・サン - クァンタン - アン - イヴェリーヌ  
UNIVERSITE DE VERSAILLES SAINT - QUENTIN - EN - YV  
ELINES  
フランス国、ヴェルサイユ 78000、アヴェニュー ドゥ パリ 55  
55 avenue de Paris, 78000 Versailles, France

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72)発明者 ヴォワザン, ティエリー

フランス国、エフ - 75018 パリ、リュ・アンリ・ユシャール 16、ファキュルテ・ドゥ・  
メドシーヌ・クサヴィエ・ピシャ、サントル・ドゥ・ルシエルシュ・ピオメディカル・ピシャ・ボ

ージョン(セエールベ3)/アンセルム・ユ773、エキップ“レセプトゥール・マンブラネール  
:ストリクテュール、フォンクシオン アンド フィシオパソロジ”

(72)発明者 クーヴラール, アンヌ

フランス国、エフ-75018 パリ、リュ・アンリ・ユシャール 16、ファキュルテ・ドゥ・  
メドシーヌ・シテ・クサヴィエ・ピシャ、アンセルム・ユ1149

(72)発明者 クーヴィノー, アラン

フランス国、エフ-75018 パリ、リュ・ユシャール 16、ファキュルテ・ドゥ・メドシー  
ヌ・シテ・クサヴィエ・ピシャ、アンセルム・ユ1149

F ターム(参考) 4C050 AA02 AA07 BB04 CC07 DD02 EE02 FF01 GG03 HH01  
4C057 CC03 DD01 LL17 LL20 LL34 LL43  
4C071 AA03 BB03 BB06 CC14 DD40 EE07 FF17 GG01 GG03 GG06  
HH05 HH08 LL01  
4C072 MM01 UU01  
4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 BA01 BA02 BA08 BA19 BA22 BA23  
BA44 NA14 ZA66 ZB26 ZC41  
4C085 AA13 AA14 AA16 EE01  
4C086 AA01 AA02 BC43 BC64 CA03 CB03 CB22 DA35 DA38 EA16  
EA17 EA18 GA07 MA01 MA04 NA14 ZA66 ZB26 ZC41  
4C206 AA01 AA02 BA10 JA06 MA02 MA04 MA28 NA05 NA14 ZA66  
ZB26 ZC41