

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5175723号  
(P5175723)

(45) 発行日 平成25年4月3日(2013.4.3)

(24) 登録日 平成25年1月11日(2013.1.11)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519
A 6 1 K 31/573 (2006.01)	A 6 1 K 31/573
A 6 1 K 31/405 (2006.01)	A 6 1 K 31/405
A 6 1 K 31/196 (2006.01)	A 6 1 K 31/196
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48

請求項の数 14 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-519744 (P2008-519744)	(73) 特許権者	598063203
(86) (22) 出願日	平成18年7月5日(2006.7.5)		パーデュー・リサーチ・ファウンデーション
(65) 公表番号	特表2009-500613 (P2009-500613A)		PURDUE RESEARCH FOUNDATION
(43) 公表日	平成21年1月8日(2009.1.8)		アメリカ合衆国・インディアナ州 479
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/026484		06-4182・ウエスト ラファイエット
(87) 国際公開番号	W02007/006041		ト・ウィン ヘンチェル ブルーヴァード
(87) 国際公開日	平成19年1月11日(2007.1.11)		1281
審査請求日	平成21年7月3日(2009.7.3)	(74) 代理人	110000176
(31) 優先権主張番号	60/696,740		一色国際特許業務法人
(32) 優先日	平成17年7月5日(2005.7.5)	(72) 発明者	ロー, フィリップ, スチュワート
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国・インディアナ州 479
(31) 優先権主張番号	60/801,636		06・ウエスト ラファイエット・ファーム
(32) 優先日	平成18年5月18日(2006.5.18)		リッジ ロード 5850
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単球介在性疾患を治療するための組成物の調製

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

単球介在性疾患に罹患する患者を治療するための組成物の調製における一般式：

 $A_b-X$ 

の結合体または複合体の使用方法であって、

上式において、 $A_b$ 基は、葉酸、葉酸塩の5, 8 - ジデアザ類似体、 $N^{10}$ -メチルフォレート、2 - デアミノ - ヒドロキシフォレート、アミノプテリン、メトトレキセート、1 - デアザメトプテリン、3 - デアザメトプテリン、および、ジクロロメトトレキセートから成る群から選択される、末梢血単球に結合するリガンドを含み、

X基はグルココルチコイドを含み、前記組成物が、前記単球介在性病状を根絶し、

前記疾患は、変形性関節症、線維筋肉痛、シェーグレン症候群、糸球体腎炎からなる群から選択される、

ことを特徴とする使用方法。

【請求項2】

前記グルココルチコイドが、プレドニソロン、フルメタゾン、デキサメタゾン、および、ベータメタゾンから成る群から選択されることを特徴とする、請求項1に記載の使用方法。

【請求項3】

単球介在性疾患に罹患する患者を治療するための組成物の調製における一般式：

 $A_b-X$ 

10

20

の結合体または複合体の使用方法であって、

上式において、A<sub>6</sub>基は、葉酸、葉酸塩の5, 8 - ジデアザ類似体、N<sup>10</sup> - メチルフォレート、2 - デアミノ - ヒドロキシフォレート、アミノプテリン、メトトレキセート、1 - デアザメトプテリン、3 - デアザメトプテリン、および、ジクロロメトトレキセートから成る群から選択される、末梢血単球に結合するリガンドを含み、

X基はNSAIDを含み、前記組成物が、前記単球介在性病状を根絶し、

前記疾患は、変形性関節症、線維筋肉痛、シェーグレン症候群、糸球体腎炎からなる群から選択される、

ことを特徴とする使用方法。

【請求項4】

10

前記NSAIDがインドメタシンおよびジクロフェナックから成る群から選択されることを特徴とする、請求項3に記載の使用方法。

【請求項5】

X基が、リボソームをさらに含むことを特徴とする、請求項1~4のいずれかに記載の使用方法。

【請求項6】

前記組成物が製薬学的に適用可能な担体をさらに含み、該担体が、液性担体であることを特徴とする、請求項1~5のいずれかに記載の使用方法。

【請求項7】

前記液性担体が、生理食塩水、グルコース、アルコール類、グリコール類、エステル類、アミド類、および、これらいずれかの組み合わせから成る群より選択されることを特徴とする、請求項6に記載の使用方法。

20

【請求項8】

前記組成物が、非経口的投与のための形態をとっており、前記非経口的投与は、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与、静脈内投与、および、髄膜投与から成る群から選択されることを特徴とする、請求項1~7のいずれかに記載の使用方法。

【請求項9】

前記組成物が、復元可能な凍結乾燥品であることを特徴とする、請求項1~8のいずれかに記載の使用方法。

【請求項10】

30

前記疾患が、変形性関節症であることを特徴とする、請求項1~9のいずれかに記載の使用方法。

【請求項11】

前記疾患が、線維筋肉痛であることを特徴とする、請求項1~9のいずれかに記載の使用方法。

【請求項12】

前記疾患は、シェーグレン症候群であることを特徴とする、請求項1~9のいずれかに記載の使用方法。

【請求項13】

前記疾患は、糸球体腎炎であることを特徴とする、請求項1~9のいずれかに記載の使用方法。

40

【請求項14】

A<sub>6</sub>基は、葉酸であることを特徴とする、請求項1~13のいずれかに記載の使用方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

< 関連出願に対する相互参照 >

本出願は、米国特許法第119(e)条の下に、2005年7月5日出願の米国特許仮出願第60/696,740号、および2006年5月18日出願の米国特許仮出願第60/801,636号に対する優先権を主張する。なお、前記それぞれ、その全体を参照することにより本明細書に含める。

50

本発明は、単球によって介在される病状を治療および診断するための方法に関する。より具体的には、単球に結合するリガンドと診断に使用される画像形成剤との複合体を形成させるか、あるいは、単球介在性疾患の治療のために使用される、単球機能を改変する免疫原、細胞毒素、または薬剤と前述リガンドとの複合体を形成させる。

#### 【0002】

哺乳類免疫系は、外来病原体の認識および排除のための手段を提供する。免疫系は、通常、外来病原体に対し防衛線を提供する一方、免疫反応それ自身が、病気の進行に関わる場合が数多くある。宿主自身の免疫反応が誘発したり、あるいは悪化させる病気の例としては、自己免疫疾患および、免疫反応が病気発生に寄与する、その他の疾患がある。例えば、マクロファージは、一般に、外来病原体に遭遇する最初の細胞であるため、この細胞は、免疫反応において重要な役割を果たすが、活性化されたマクロファージは、ある場合には病気の病理・生理機構にも貢献する。

10

#### 【0003】

葉酸受容体は、ビタミンの葉酸に高い親和度 (<1 nM) をもって結合する、38KDのGPIアンカー型タンパク質である。受容体結合後、速やかなエンドサイトーシスによって該ビタミンは細胞内に輸送され、細胞内で、低pHのエンドソーム区画に落ち着く。重要なことは、葉酸と小型分子、タンパク質の共有結合、さらに、葉酸とリポソームの結合さえも、このビタミンの、葉酸受容体に対する結合能力を阻止しない。したがって、葉酸-薬剤複合体は、容易に細胞に輸送され、受容体介在エンドサイトーシスによって細胞内に進入することが可能である。

20

#### 【0004】

多くの細胞は、必要な葉酸を獲得するために、非特異的な還元型葉酸担体を用いるので、葉酸受容体の発現は数タイプの細胞に限られる。腎臓、脈絡叢、および胎盤を例外とすると、正常組織は、低レベルか、検出不能レベルの葉酸受容体しか発現しない。一方、多くの悪性組織、例えば、卵巣癌、乳癌、気管支癌、および脳の癌を含む悪性組織は、著しく高レベルの葉酸受容体を発現する。事実、全卵巣癌の95%は、葉酸受容体を過剰に発現すると推定されている。葉酸受容体の非上皮型異性形である葉酸受容体は、活性化(ただし、休止期のものはそうではない)滑液マクロファージにおいて発現されることが報告されている。したがって、葉酸受容体は、ある一部のマクロファージ(すなわち、活性化マクロファージ)において発現される。

30

#### 【発明の開示】

#### 【0005】

しかしながら、葉酸受容体が、マクロファージの前駆細胞である単球において発現されるかどうかは未知である。ここにおいて、本出願人は、葉酸受容体が、単球において発現されるかどうか、および、葉酸塩のようなリガンドを用いて、細胞毒性のある、またはその他の阻害性化合物を単球に輸送するために、単球標的照準が治療法として有用であるかどうかを定めることに取り組んだ。本出願人はまた、単球に結合が可能なりガンドに連結させた画像形成剤が、炎症性病態を診断するのに有用であるかどうかを定めることにも取り組んだ。

#### 【0006】

単球によって介在される病状を治療および診断するための方法が提供される。一つの実施態様では、単球は活性化単球である。また一つの実施態様では、単球によって介在される病状は、宿主の免疫反応を単球に向けるために、免疫原を単球へ輸送することによって、すなわち、単球に結合するリガンドに免疫原を連結することによって治療される。別の実施態様では、他の方法、例えば、細胞毒素、または、単球の機能を改変することが可能なその他の化合物を単球に輸送することによって、単球は不活性化されるか、殺される。

40

#### 【0007】

単球を不活性化する、または殺すために免疫原が単球に輸送される実施態様では、単球に結合するリガンドが免疫原に結合し、宿主の免疫反応を単球に向けるようにするか、あるいはリガンドが、単球を殺すための細胞毒素に結合する。本発明の複合体に使用される

50

リガンドとして、単球（例えば、活性化単球）で発現する、葉酸受容体に結合するような受容体に結合するリガンド、または、単球で発現する細胞表面マーカーに対するモノクロナール抗体のようなリガンド、または、活性化単球に結合するその他のリガンドが挙げられる。別の実施態様では、単球に結合するリガンドは、画像形成剤に結合し、この結合体は、単球によって介在される疾患の診断に使用される。

【0008】

別の実施態様では、単球によって介在される疾患を診断するための方法が提供される。この方法は、単球介在性疾患に罹患する患者から単球を単離する工程、一般式：



の結合体または複合体を含む組成物とこの単球を接触させる工程、上式において、 $A_b$ 基は、単球に結合するリガンドを含む、 $X$ 基は、画像形成剤を含む工程、および、前記リガンドに対する受容体を発現する単球の割合を定量する工程を含む。別の実施態様では、 $A_b$ は、葉酸受容体結合リガンドを構成する。さらに別の実施態様では、 $A_b$ は、活性化単球に結合する単球結合性抗体や抗体断片、または他のリガンドを含む。別の実施態様では、画像形成剤は、放射性核種である元素に結合する金属キレート成分を含む。さらに別の実施態様では、画像形成剤は、フルオレセイン、オレゴングリーン、ローダミン、フィコエリスリン、テキサスレッド、およびAlexaFluor 488から成るグループから選ばれる発色団を含む。

10

【0009】

別の実施態様では、単球によって介在される病状を診断するための方法が提供される。方法は、一般式：



の結合体または複合体を含む組成物を患者に対し非経口的に投与する工程で、 $A_b$ 基は単球に結合するリガンドを含み、 $X$ 基は画像形成剤を含む工程、および、リガンドに対する受容体を発現する単球の割合を定量する工程を含む。

20

【0010】

別の実施態様では、単球によって介在される病状を治療するための方法が提供される。この方法は、単球介在性疾患に罹患する患者に対し、一般式：



の結合体または複合体を含む組成物の有効量を投与する工程で、 $A_b$ 基は、単球に結合するリガンドを含み、 $X$ 基は、免疫原、細胞毒素、または、単球の機能を改変することが可能な化合物を含む工程、および、単球介在性疾患を根絶する工程を含む。

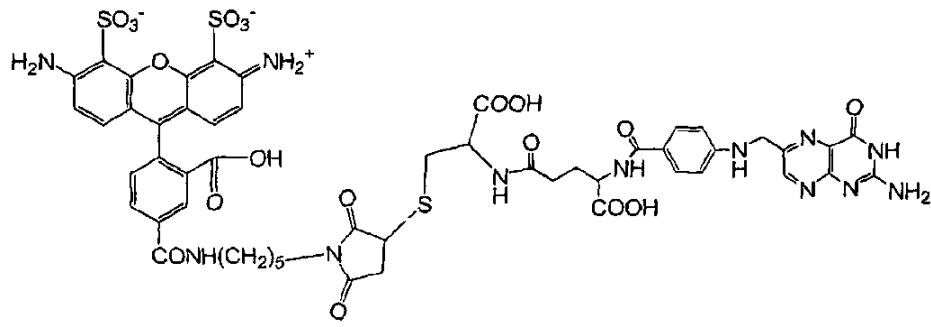
30

【0011】

さらに別の実施態様では、単球によって介在される病状を診断または治療するための化合物が提供される。この化合物は、下記の化合物から成るグループから選択される。

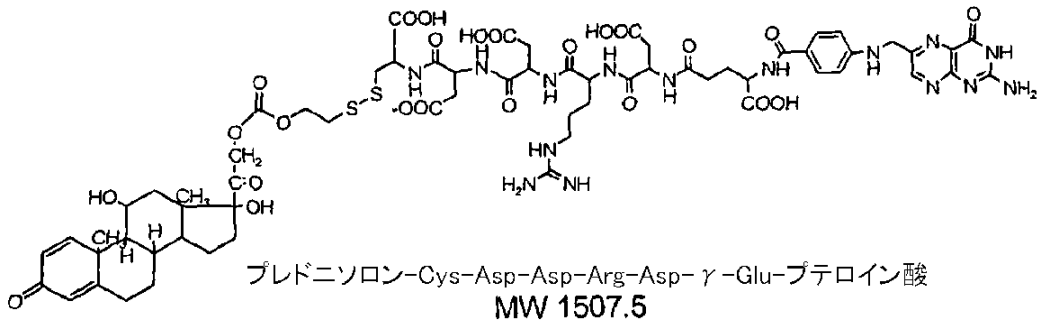
【0012】

【化1】



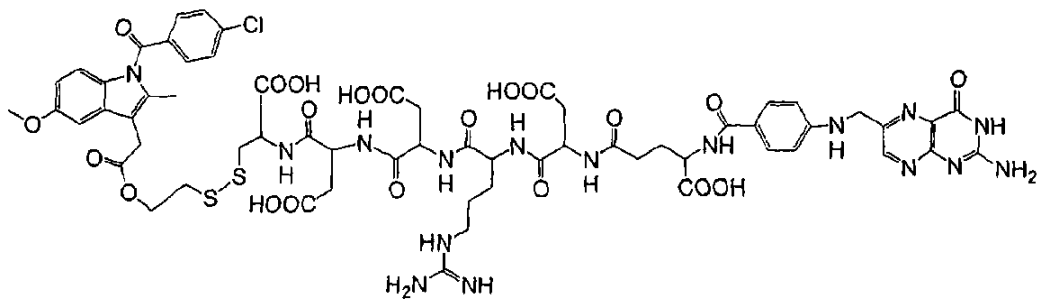
AlexaFluor 488-Cys- $\gamma$ -Glu-プテロイン酸  
MW 1242.21

10



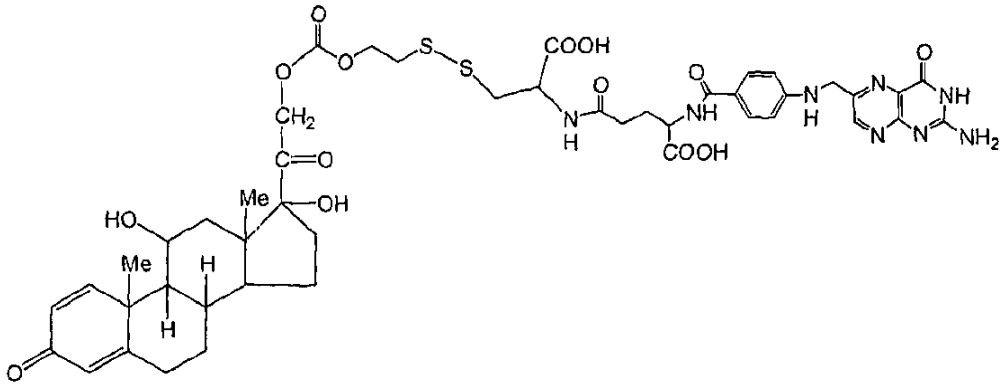
プレドニソロン-Cys-Asp-Asp-Arg-Asp- $\gamma$ -Glu-プテロイン酸  
MW 1507.5

20



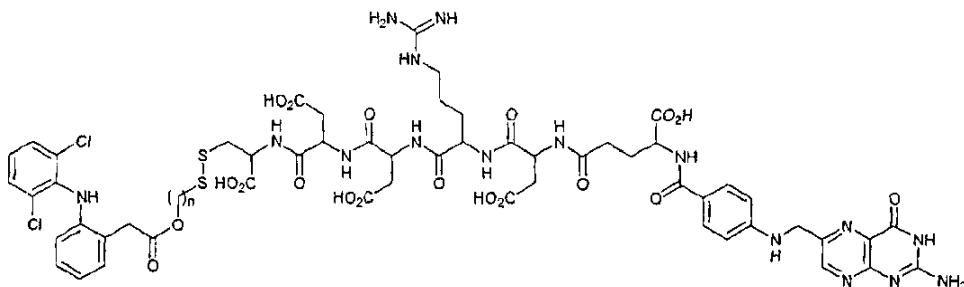
インドメタシン-Cys-Asp-Asp-Arg-Asp- $\gamma$ -Glu-プテロイン酸  
MW 1462

30



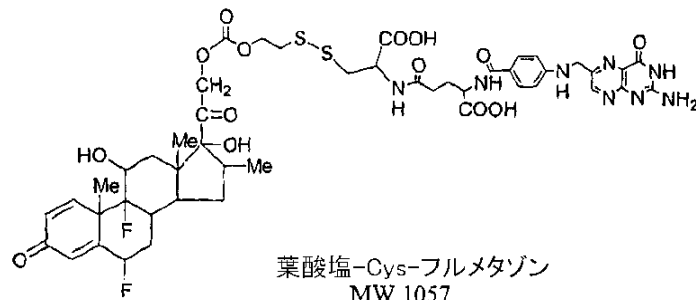
10

プレドニソロン-Cys-g-Glu-プテロイン酸  
MW 1007.10



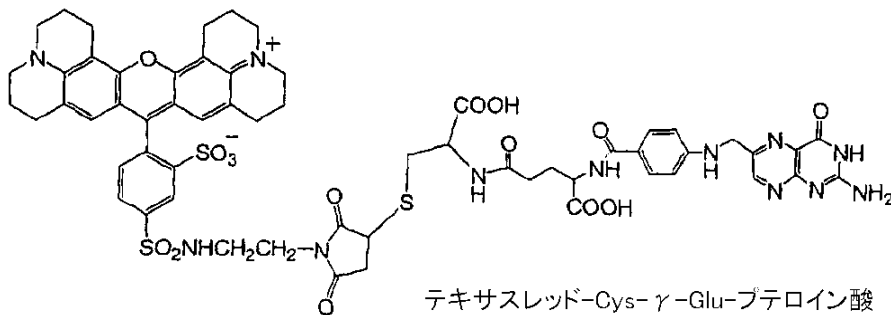
20

ジクロフェナック-Cys-Asp-Asp-Arg-Asp- $\gamma$ -Glu-プテロイン酸  
MW 1386



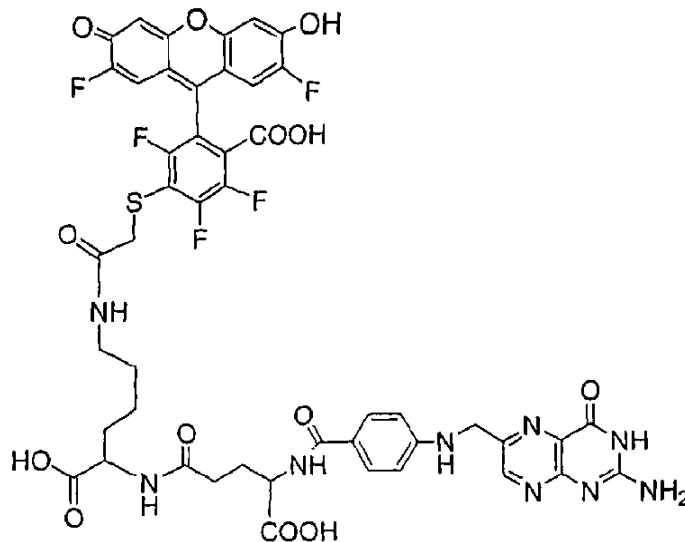
30

葉酸塩-Cys-フルメタゾン  
MW 1057



40

テキサスレッド-Cys- $\gamma$ -Glu-プテロイン酸  
MW 1273.37



10

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

単球によって介在される（例えば、誘発されるか、または増強される）病状を治療および診断するための方法が提供される。例示の病状としては、線維筋肉痛、関節リュウマチ、変形性関節症、潰瘍性大腸炎、クローン病、乾癬、骨髄炎、多発性硬化症、アテローム硬化症、肺線維症、類肉腫症、全身性硬化症、臓器移植拒絶反応（GVHD）、紅斑性狼瘡、シェーグレン症候群、糸球体腎炎、皮膚の炎症（例えば、乾癬）、および慢性炎症が挙げられる。以上のような病状は、そのような疾患に罹患する患者から単球（例えば、全血または抹消血単球）を単離し、 $A_b$ 基は単球に結合するリガンドを含み、X基は画像形成剤を含む一般式 $A_b-X$ で表される結合体を含む組成物にその単球を接触させること、および、そのリガンドに対する受容体を発現する単球の割合を定量することによって診断することが可能である。

20

【0014】

このような病状はまた、 $A_b$ 基は単球に結合するリガンドを含み、X基は画像形成剤を含む一般式 $A_b-X$ で表される結合体または複合体を含む組成物を、患者に非経口投与すること、および、そのリガンドに対する受容体を発現する単球の割合を定量することによって診断することが可能である。

30

【0015】

単球介在性疾患は、本明細書に開示される方法に従って、一般式 $A_b-X$ で、式中 $A_b$ 基は単球に結合するリガンドを含み、X基は免疫原、細胞毒素、または単球機能を改変することが可能な化合物を含む式の組成物の有効量を投与することによって治療することが可能である。このような単球標的性結合体は、単球介在性疾患に罹患する患者に投与されると、結合した細胞毒素、免疫原、または単球機能を改変することが可能な化合物を、単球集団に集中、結合させて単球を殺すか、または単球機能を改変するように作用する。この結合体は、通常、非経口的に投与されるが、任意の適当な投与方法（例えば、経口的）を用い、結合体および製薬学的に適用可能な該結合体の担体を含む組成物として、投与してもよい。結合体投与は、通常、病状の症状が緩和するか、根絶されるまで続けられる。あるいは、病気の進行または再発を阻止するために、投与は、その後も続けられることがある。

40

【0016】

病状に関連して本明細書で用いられる「根絶される」または「根絶する」という用語は、病状を緩和するか、または根絶すること、あるいは、病気の進行または再発を阻止することを意味する。

【0017】

リガンド受容体を発現する単球集団の「排除」および「不活性化」という用語は、この単球集団が殺されるか、あるいは部分的、または完全に不活性化されて、これが、治療の

50

対象である病状特有の、単球介在性病因を緩和することを意味する。

【0018】

単球の介在する疾患に関連して用いられる「介在」という用語は、単球によって誘発、または悪化されることを意味する。例えば、単球が、直接その病気を誘発してもよいし、あるいは、単球が、例えば、T細胞を刺激してTNF- $\alpha$ を分泌させるように、他の免疫細胞を刺激して病状に介在する因子を分泌させることによって病状が悪化してもよい。具体的に説明すると、単球自身が感染源を宿して病気を誘発してもよいし、かつ、感染した単球が、T細胞によってTNF- $\alpha$ を分泌させるように、他の免疫細胞に、病気を誘発する因子を分泌させてもよい。

【0019】

一つの実施態様では、単球介在性疾患は、その患者から単球を単離すること、およびA<sub>b</sub>は単球に結合するリガンドを含み、Xは画像形成剤を含むA<sub>b</sub>-Xで表される結合体に前記単離単球を接触させること、そして、そのリガンドに対する受容体を発現する単球の割合を定量することによって診断される。別の実施態様では、画像または診断結合体が、結合体と製薬学的に適用可能な担体を含む診断組成物として患者に投与される。その後、患者から単球が収集され、リガンドA<sub>b</sub>に対する受容体を発現する単球の割合が定量される。この実施態様では、通常、組成物は非経口投与用に処方され、単球の画像記録を可能とするのに有効な量が患者に投与される。別の実施態様では、病状はまた、A<sub>b</sub>は単球に結合するリガンドを含み、X基は画像形成剤を含む一般式A<sub>b</sub>-Xで表される、結合体または複合体を含む組成物を患者に非経口的に投与すること、および、そのリガンドに対する受容体を発現する単球の割合を定量することによって診断されてもよい。

【0020】

一つの実施態様では、例えば、画像形成剤（例えば、リポーター分子）は、放射性標識化合物、例えば、キレート成分および、放射性核種である元素、例えば、放射性核種である金属陽イオンを含む化合物であってもよい。別の実施態様では、この放射性核種は、テクネチウム、ガリウム、インジウム、および陽電子放射性核種（PET画像形成剤）から成るグループから選択される。また別の実施態様では、画像形成剤は、例えば、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、フィコエリスリン、オレゴングリーン、AlexaFluor 488（Molecular Probes, Eugene, オレゴン州）、Cy3、Cy5、Cy7等の発色団を含んでもよい。

【0021】

診断は、通常、治療の前に行われる。しかしながら、本明細書に記載される診断法では、「診断」という用語は、病状の進行を判断するために、治療の前、最中、またはその後に病状を監視することを意味することがある。監視は、治療の効力を定量するため、または、病気の将来の発展を予測するため、治療の前、最中、後、またはそれらの組み合わせにおいて行われてもよい。画像記録は、好適なものであれば、従来技術で既知の、どの方法によって行っても、例えば、生体内画像法によって実行してもよい。

【0022】

本明細書に開示される方法は、ヒトの臨床医学および獣医学的用途の両方に使用することが可能である。従って、単球介在性疾患に冒され、診断または治療を必要とする宿主動物は、ヒトであってもよく、あるいは、獣医学的用途の場合には、実験、農業、飼養、または野生動物であってもよい。結合体が、患者または動物に対して投与される実施態様では、結合体は、疾患に罹患する動物または患者に対し、非経口的に、例えば、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、または静脈内に投与されてもよい。それとは別に、結合体は、他の医学的に有効な手順によって動物または患者に投与されてもよく、有効用量の結合体は、標準的、または緩徐投与ポンプのような持続放出剤形を用いて投与されてもよい。本明細書に記載される治療法は、単独で使用されてもよいし、あるいは、炎症性病状の治療に有効と認められる他の治療法と組み合わせて使用されてもよい。

【0023】

一般式A<sub>b</sub>-Xのリガンド結合体では、この結合体が病状の診断または治療に使用される場



合、A<sub>b</sub>基は単球（例えば、活性化単球）に結合するリガンドである。単球結合リガンドは多数あるが、そのいずれも使用が可能である。適用可能なリガンドとしては、特に、葉酸受容体結合性リガンドとその類似体、および、単球の上に発現または存在する表面成分を認識し、それに結合することが可能な抗体または抗体断片が挙げられる。一つの実施態様では、単球結合性リガンドは、葉酸、葉酸類似体、または別の葉酸受容体結合性分子である。別の実施態様では、単球結合性リガンドは、単球に結合することが可能な特異的モノクロナールまたはポリクロナール抗体、または、そのような抗体のFabまたはscFv（すなわち、1本鎖可変域）断片である。

#### 【0024】

一つの実施態様では、単球結合性リガンドは、葉酸、葉酸類似体、または別の葉酸受容体結合性分子であってもよい。使用が可能な葉酸塩類似体としては、葉酸、プテロポリグルタミン酸、および、葉酸受容体結合性プテリジン類、例えば、テトラヒドロプテリン、ジヒドロフォレート、テトラヒドロフォレート、および、そのデアザ類似体およびジデアザ類似体が挙げられる。「デアザ」および「ジデアザ」類似体という用語は、天然の葉酸構造において、一つの炭素原子が、一つ以上の窒素原子に置換された、従来技術で周知の類似体を指す。例えば、デアザ類似体として、1-デアザ、3-デアザ、5-デアザ、8-デアザ、および10-デアザ類似体が挙げられる。ジデアザ類似体としては、例えば、1,5-ジデアザ、5,10-ジデアザ、8,10-ジデアザ、および5,8-ジデアザ類似体が挙げられる。前記の葉酸類似体は、それらの、葉酸受容体に結合する能力を反映して従来「葉酸塩」と呼ばれている。他の葉酸受容体結合性類似体としては、アミノプテリン、アメトプテリン（メトトレキセート）、N<sup>10</sup>-メチルフォレート、2-デアミノ-ヒドロキシフォレート、1-デアザメトプテリンまたは3-デアザメトプテリンなどのデアザ類縁体、および、3,5-ジクロロ-4-アミノ-4-デオキシ-N<sup>10</sup>-メチルプテロイルグルタミン酸（ジクロロメトトレキセート）が挙げられる。

#### 【0025】

別の実施態様では、他のビタミンを、単球結合性リガンドとして使用することが可能である。本明細書に記載される方法に従って使用が可能なビタミンとしては、ニアシン、パントテン酸、葉酸、リボフラビン、チアミン、ピオチン、ビタミンB<sub>12</sub>、ビタミンA、D、E、K、他の関連ビタミン分子、それらの類似体および誘導体、およびそれらの組み合わせが挙げられる。

#### 【0026】

別の実施態様では、単球結合性リガンドとして、活性化単球において発現または過剰発現する受容体に結合する任意のリガンド、例えば、CD40-、CD16-、CD14-、CD11b-、およびCD62-結合性リガンド、5-ヒドロキシトリプタミン、マクロファージ炎症タンパク質1-、MIP-2、核因子κBリガンド拮抗物質の受容体活性化因子、単球走化性タンパク質1結合リガンド、ケモカイン受容体5-結合性リガンド、RANTES-結合性リガンド、ケモカイン受容体結合性リガンド等の任意のリガンドが挙げられる。

#### 【0027】

単球が介在する病状を診断または治療するために使用される、単球（例えば、活性化単球）標的結合体は、式A<sub>b</sub>-Xで表され、式中、A<sub>b</sub>は単球に結合が可能なリガンドであり、Xは画像形成剤または免疫原、細胞毒素、または単球機能を改変することが可能な化合物を含む。A<sub>b</sub>基が、葉酸、葉酸類似体、または別の葉酸受容体結合性リガンドである結合体の場合、これらの結合体は、米国特許第5,688,488号に詳細に記載される。この明細書を、引用により本明細書に含める。この特許を始め、関連米国特許第5,416,016および5,108,921号、および関連の米国特許出願公開第2005/0002942A1号も、それぞれ引用により本明細書に含めるが、本明細書に記載される方法において有用な結合体を調製するための方法および実施例を記載する。本発明の、単球標的画像および治療剤は、これら先行特許および特許出願に記載される一般的プロトコル、および、本明細書に記載されるプロコールに従って調製および使用することが可能である。

#### 【0028】

別の実施態様によれば、単球が介在する疾患に罹患する患者に対し、一般式 $A_b-X$ で表わされ、式中、 $A_b$ は上述のように定義され、 $X$ 基は、細胞毒素、免疫原、または、単球機能を改変することが可能な化合物を含む式の結合体を含む組成物の有効量を投与することによって、そのような病状を治療する方法が提供される。これらの実施態様では、単球は、活性化単球であってもよく、 $A_b$ 基は、前述のリガンドのうち任意のものであってよい。本明細書に記載される方法に従って使用される結合体を形成するのに有用な細胞毒性成分の例としては、クロドロネート、炭疽、シュードモナス・エキソトキシンであるが、通常、これらの細胞毒性成分が正常細胞には結合しないように修飾されるもの、および、その他の毒素または細胞毒性のある、例えば、従来技術で周知の化学療法剤であるアドレノコルチコイド、アルキル化剤、抗アンドロゲン、抗エストロゲン、エストロゲン、抗代謝剤、例えば、シトシンアラビノシド、プリン類似体、ピリミジン類似体、およびメトレキセート、ブスルファン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチンおよびその他の白金化合物、タモキシフェン、タキソール、シクロフォスファミド、植物アルカロイド、プレドニソン、ヒドロキシ尿素、テニボシド、およびプレオマイシン、ナイトロジェンマスタード、ニトロソ尿素、ピンクリスチン、ピンプラスチン、MEKキナーゼ阻害剤、MAPキナーゼ経路阻害剤、PI-3-キナーゼ阻害剤、ミトコンドリアかく乱剤、NF B経路阻害剤、プロテオソーム阻害剤、プロアポトーシス促進剤、グルココルチコイド、例えば、プレドニソロン、フルメタゾン、デキサメタゾン、およびベータメタゾン、インドメタシン、ジクロフェナック、タンパク質類、例えば、ポークウィード、サポリン、モモルジン、およびゲロニン、非ステロイド抗炎症剤(NSAID)、タンパク質合成阻害剤、ジ

10

20

## 【0029】

同様に、 $X$ 基が、単球機能を改変することが可能な化合物、例えば、IL-10またはIL-11のようなサイトカインを含む場合、その化合物は、例えば、葉酸受容体結合性リガンド、または、単球結合性抗体や単球結合性抗体断片のような標的性リガンド $A_b$ に直接共有結合されてもよいし、あるいは、単球機能改変性化合物は、一つ以上のリポソーム成分と共有結合する単球標的性リガンド $A_b$ 側基を通じて、それ自体が単球を標的とするリポソームの中に封入されてもよい。

30

## 【0030】

別の実施態様では、 $A_b-X$ で表わされる結合体で、式中 $X$ は免疫原、または単球機能を改変することが可能な化合物である結合体を、細胞毒性をもつ化合物と組み合わせて投与してもよい。前述の細胞毒性化合物は、この目的のために特に好適である。

## 【0031】

もう一つの治療態様の方法では、単球標的結合体 $A_b-X$ の $X$ 基は免疫原を含み、このリガンド-免疫原結合体は、内因性免疫反応や同時投与される抗体によって病気を特異的根絶するために、その病気に罹患する患者においてその病気の原因となる単球集団を「標識」するのに有効である。本明細書に記載される治療法におけるリガンド-免疫原結合体の使用は、リガンド受容体を発現する単球集団の、免疫反応介在性排除を強化するように作用する。このような排除は、内因性免疫反応、または、同時投与される抗体によって生じる受動的免疫反応によって実現が可能である。

40

## 【0032】

リガンド-免疫原結合体の使用を含む治療法が、米国特許出願公開第2001/0031252A1、2002/0192157A1号、および国際公開第2004/100983号に記載される。なお、それぞれを、引用により本明細書に含める。

## 【0033】

内因性免疫反応としては、体液性反応、細胞性免疫反応、および、宿主動物における内

50

因性の、他の任意の免疫反応、例えば、補体介在性細胞分解、抗体依存性細胞介在性細胞毒性作用（ADCC）、食作用をもたらす抗体オプソニン作用、抗体結合による受容体のクラスター形成で、アポトーシス、抗増殖、または分化を導くシグナル伝達、および、輸送された免疫原（例えば、抗原、またはハプテン）の免疫細胞による直接的認識を含む反応が挙げられる。内因性免疫反応は、免疫細胞の増殖および移動のような過程を調節するサイトカインの分泌を用いていることも考えられる。内因性免疫反応は、B細胞、ヘルパーおよび細胞毒性T細胞を含むT細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、好中球、LAK細胞等のような免疫細胞タイプの関与を含んでもよい。

【 0 0 3 4 】

体液性反応は、正規に予定されるワクチン接種、または、天然の抗原、非天然抗原またはフルオレセインイソチオシアネート（FITC）のような不完全抗原による能動的免疫化によって誘発される反応であってもよい。その際、非天然抗原は新規免疫性を誘発する。新規免疫性を誘発するために、能動的免疫化は、正規のワクチン接種スケジュールの外に予定される非天然抗原または不完全抗原の複数回接種を含む。体液性免疫反応はまた、内在性免疫から生じることがある。その場合、宿主動物は、天然の生得的免疫、例えば、  
- ガラクトシル基に対する免疫を有する。

【 0 0 3 5 】

それとは別に、受動免疫は、抗体、例えば、血清から収集される天然の抗体、あるいは、ヒト化抗体のような遺伝子工学的に加工もしくは非加工のモノクローナル抗体を、宿主動物に投与することによって確立される。受動免疫を引き起こすためにある特定量の抗体試薬を利用すること、および、受動的に投与された抗体が免疫原を認識するリガンド-免疫原結合体を使用することは、可能な抗原に対する、患者の既存の抗体価が治療的に有効ではない場合に使用が可能な、標準試薬セットの利点を得られる可能性がある。受動的に投与される抗体は、このリガンド-免疫原結合体と「同時投与」されてもよく、同時投与とは、リガンド-免疫原結合体の投与時点の前の、その最中の、またはその後の、ある時点における抗体の投与と定義される。

【 0 0 3 6 】

既存抗体、誘発抗体、または受動的に投与される抗体は、リガンド-免疫原結合体が、単球細胞集団に対し優先的に結合することによって、改めて単球に向けられるので、これらの病原細胞は、補体介在性細胞分解、ADCC、抗体依存性食作用、または、受容体の抗体クラスター化によって殺される。この細胞毒性過程は、他のタイプの免疫反応、例えば、細胞性免疫を含んでもよい。

【 0 0 3 7 】

本明細書に記載される治療法に使用される結合体の調製に使用される適用可能な免疫原は、宿主動物において抗体産生を誘発することが可能な免疫原、または、以前に宿主動物において抗体産生を誘発し、既存免疫をもたらしたことのある免疫原、または、内在性免疫系の一部を構成する免疫原である。それとは別に、免疫原を認識する抗体は、受動免疫を確立するために宿主動物に対して投与されてもよい。本発明の使用方法に好適な免疫原としては、ポリオウィルス、破傷風、チフス、風疹、麻疹、おたふく風邪、百日咳、結核、およびインフルエンザ抗原、および   
- ガラクトシル基のような介在因子の正規に組み込まれたワクチン接種、あるいは、事前にそれらの因子に自然に暴露されることによって得られた既存の免疫が認識する抗原、または抗原ペプチドが挙げられる。このような場合、リガンド-免疫原結合体は、単球の排除のために、以前に獲得された体液性または細胞性免疫を、宿主動物の単球集団に対して改めて向けるために用いられる。

【 0 0 3 8 】

他の好適な免疫原としては、非天然抗原やフルオレセインイソチオシアネート（FITC）、またはジニトロフェニルのような不完全抗原の接種により、寄主動物中で産生された新規免疫が認識する抗原または抗原ペプチド、および、スーパー抗原およびムラミルジペプチドのような、内在性免疫が認識する抗原が挙げられる。

【 0 0 3 9 】

10

20

30

40

50

単球結合性リガンド、および、本明細書に記載される方法に従って使用される結合体を形成する際に使用される、免疫原、細胞傷害剤、単球機能改変性化合物、または画像形成剤は、複合体を形成するために、従来技術で既知の任意の方法を用いて結合されてよい。その方法として、免疫原に対するリガンドの、共有結合、イオン結合、または水素結合があり、直接的結合、または間接的結合、例えば、二価リンカーなどの結合基を介する結合が挙げられる。通常、結合体は、複合体のそれぞれの成分における酸性基、アルデヒド基、水酸基、アミノ基、またはヒドラゾ基の間にアミド、エステル、またはイミド結合を形成することによって、あるいは、例えばジスルフィド結合を形成することによって生じる、標的体に対するリガンドの、共有結合によって形成される。単球結合性リガンドを、免疫原、細胞毒素、単球機能改変性化合物、または画像形成剤に連結する方法は、米国特許出願公開第2005/0002942A1号、および国際公開第2006/012527号に記載される。それぞれを引用により本明細書に含める。

#### 【0040】

それとは別に、前述したように、リガンド複合体は、標的体（すなわち、画像形成剤、または免疫原、細胞傷害剤、または単球機能改変剤）が、リポソーム内に包含され、そのリポソーム自身が単球結合性リガンドに共有的に連結される、というリポソームを含むものであってもよい。他にも、単球介在性疾患の治療と診断に有用な治療剤または画像形成剤に連結することが可能なナノ粒子、デンドリマー、誘導体形成可能なポリマーまたはコポリマーも、標的照準結合体に使用できる。

#### 【0041】

本発明の一つの実施態様では、リガンドは、葉酸、葉酸の類似体、または、他の任意の葉酸塩受容体結合性分子であり、葉酸塩リガンドは、プテロイルアジド中間体を介して葉酸の  $\gamma$ -エステルを調製するために無水トリフルオロ酢酸を利用する工程によって、標的体に結合される。この工程によって、葉酸のグルタミン酸グループの  $\gamma$ -カルボキシル基を介してのみ標的体に結合する葉酸塩リガンドの合成が生じる。それとは別に、葉酸類似体を、グルタミン酸基の  $\gamma$ -カルボキシル成分、または、 $\alpha$  と  $\gamma$  カルボキシル酸の両実体を介して結合させてもよい。

#### 【0042】

本明細書に記載される治療法は、病気の進行を完全に、または部分的に遅滞させるために使用してもよい。それとは別に、本明細書に記載される治療法は、病状の再発を根絶、または阻止してもよい。

#### 【0043】

本明細書に記載される方法に従って用いられる、式A<sub>b</sub>-Xの結合体は、一局面では、患者に投与するための、治療または診断組成物を処方するために使用される。その場合、組成物は、有効量の組成物と、そのための適用可能な担体を含む。通常、このような組成物は、非経口的投与のために処方される。本明細書に記載される方法に従って使用するのに有効な結合体の量は、例えば、治療または診断される疾患の性質、結合体の分子量、その投与ルート、およびその組織分布、および、他の治療剤または診断剤の同時使用の可能性などを含む多くの要因に依存する。患者に対して投与される有効量は、通常、体表面積、患者の体重、および医師による患者の病状の評価に基づく。有効量は、約1 ng/kgから約1 mg/kgの範囲、より典型的には約1  $\mu$ g/kgから約500  $\mu$ g/kg、もっとも典型的には約1  $\mu$ g/kgから100  $\mu$ g/kgの範囲であってもよい。

#### 【0044】

このリガンド結合体を投与するためには、効果的であれば、いずれの投与スケジュールを採用してもよい。例えば、リガンド結合体は、単一用量として投与してもよいし、または分割して、一日当たり複数回用量処方として投与してもよい。さらに、毎日投与に代わるものとして、不規則処方、例えば、毎週1から3日の投与を使用してもよく、このような断続的、または不規則投与スケジュールも、毎日投薬と等価的と見なされ、本開示の範囲に含まれる。一実施態様では、患者は、病原性単球の集団を排除するために、リガンド結合体の複数回の注射によって治療される。その際、標的体は、免疫原、または細胞傷害剤

10

20

30

40

50

、または単球機能改変剤である。一実施態様では、患者は、例えば、リガンド結合体を複数回、例えば、12-72時間間隔または48-72時間間隔で注射されて治療される。初回の注射後、リガンド結合体の追加注射が、数日または数ヶ月の間隔において患者に接種してもよく、この追加注射は病気の再発を阻止する。それとは別に、リガンド結合体は、単球介在性疾患の発生に曝されたことが知られる患者に対して、病気の発生を予防するために投与されてもよい。一つの実施態様では、1種類を超えるリガンド結合体を使用されてもよい。例えば、宿主動物を、フルオレセインイソチオシアネートおよびジニトロフェニルであらかじめ免疫化し、その後、同時投与プロトコルにおいて、同じ、または異なる単球標的性リガンドと連結されたフルオレセインイソチオシアネートおよびジニトロフェニルで治療してもよい。

10

#### 【0045】

一局面では、リガンド結合体は、非経口的に、もっとも典型的には腹腔内注射、皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射、皮内注射、または、髄膜注射によって投与される。リガンド結合体はまた、浸透圧ポンプによって患者に投与されてもよい。非経口剤形の例としては、等張生理食塩水、5%グルコースのような、該結合体の水溶液、または他の周知の、アルコール類、グリコール類、エステル類、アミド類のような、製薬学的に適用可能な液性担体に溶解した溶液が挙げられる。本発明に従って使用される非経口組成物は、1回以上の用量を含むリガンド結合体の、復元可能な凍結乾燥品の形を取ってもよい。別の局面では、リガンド結合体は、従来技術で既知の、いくつかの徐放剤形の内の任意の一つとして、例えば、米国特許第4,713,249、5,266,333、および5,417,982号に記載される、生物分解性炭水化物基質として処方されてもよい。なお、これらの開示を、引用により本明細書に含める。リガンド結合体はまた、例えば、皮膚の炎症の治療のために、軟膏またはローションとして局所的に投与されてもよい。

20

#### 【0046】

前述の実施態様のいずれにおいても、単球は、活性化単球、または病状を誘発する、他の単球集団であってもよい。下記の実施例は、例示の実施態様を示すものであり、限定的であることを意図するものではない。

#### 【実施例】

#### 【0047】

##### 実施例1 材料

Fmoc-保護アミノ酸誘導体、トリチル-保護システイン2-クロロトリチルレジジン (H-Cys(Trt)-2-ClTrtレジジン #04-12-2811)、Fmoc-リシン(4-メチルトリチル)ワングレジン、2-(1H-ベンゾトリアゾル-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロフォスフェート(HBTU)、およびN-ヒドロキシベンゾトリアゾルを、Novabiochem(ラホヤ、カリフォルニア州)から購入した。N<sup>10</sup>-トリフルオロアセチルプテロイン酸を、Sigma、セントルイス、ミズーリ州から購入した。抗マウスおよび抗ヒト抗体は全て、Caltag Laboratories、Burlingame、カリフォルニア州から購入した。葉酸塩-R-フィコエリスリン、葉酸塩-Alexa-Fluor 488、葉酸塩-テキサスレッド、および葉酸塩-フルオレセイン、および葉酸塩-システインは、記載のように合成した。トリチウム(<sup>3</sup>H)-標識葉酸は、American Radiolabeled Chemicals(セントルイス、ミズーリ州)から入手した。

30

40

#### 【0048】

##### 実施例2 葉酸塩-システインの合成

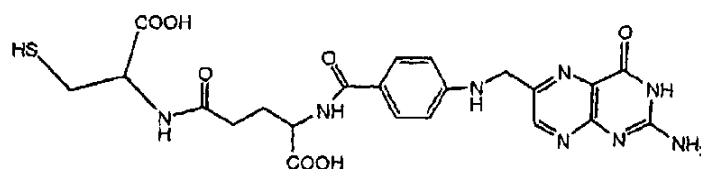
システインに葉酸の-COOHを付着させた葉酸塩-システインを合成するために、標準的Fmocペプチド化学を用いた。塩基として使用のジイソプロピルエチルアミン、および、Fmoc基の脱保護用として使用の、ジメチルフォルムアミド(DMF)に溶解した20%ピペリジンと共に、HBTUおよびN-ヒドロキシベンゾトリアゾルを活性剤として使用するFmoc化学によって、配列Cys-Glu-プテロイン酸(葉酸塩-Cys)を構築した。-t-Boc-保護N-<sup>10</sup>-Fmoc-L-グルタミン酸を、2-クロロトリチルレジジンに結合したトリチル保護Cysに結合した。次に、N<sup>10</sup>-トリフルオロアセチルプテロイン酸を、Gluの-COOHに付着させた。92.5%トリフルオロ酢酸-2.5%水-2.5%トリイソプロピルシラン-2.5%エタンジチオ溶液を用いて、この

50

樹脂から葉酸塩-Cysを切断分離した。ジエチルエーテルを用いてこの産物を沈殿し、この沈殿物を遠心によって収集した。この産物を、ジエチルエーテルで2回洗浄し、真空下で一晩乾燥した。N<sup>10</sup>-トリフルオロアセチル保護基を除去するために、産物を、10%水酸化アンモニウム溶液に溶解し、30分室温で攪拌した。システインがジスルフィドを形成するのを防ぐために、この間ずっとこの溶液を窒素流に維持した。30分後、塩酸を、溶液に、化合物が沈殿するまで加えた。この産物を遠心にて回収し、凍結乾燥した。産物を、質量分析によって分析し、確認した(分子量544、M<sup>+</sup> 545)。

【 0 0 4 9 】

【化 2】



Cys-g-Glu-プテロイン酸  
MW 544.54

10

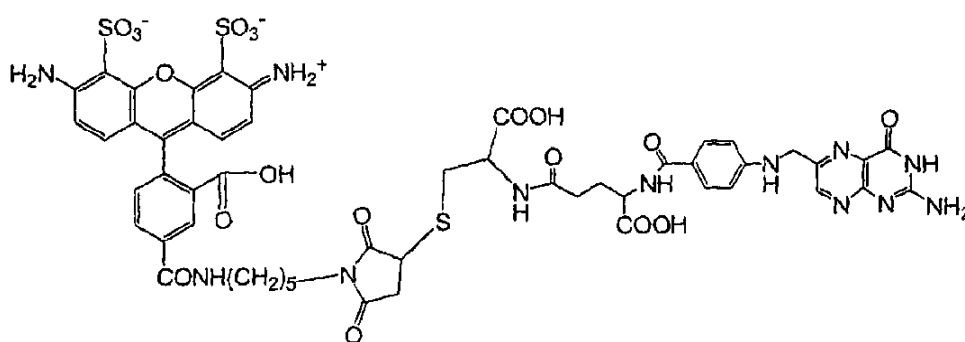
【 0 0 5 0 】

実施例 3 葉酸塩-Cys-Alexafluor 488の合成

AlexaFluor 488 C<sub>5</sub>-マレイミド (Molecular Probes, Eugene、オレゴン州) を、ジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した (0.5 mgを50 μlのDMSOに溶解)。1.5モル当量 (0.57 mg) の葉酸塩-Cysを、この溶液に加え、室温で4時間攪拌した。葉酸塩-Cys-AlexaFluor 488 (葉酸塩-AlexaFluor) を、C18カラムにおいて逆相HPLCによって1 ml/分の流速で精製した。移動相は、pH 7.0の10 mM NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>バッファー、(溶出液A)、およびアセトニトリル (溶出液B) から成っており、最初の1分は溶出液を99:1 A:Bの比に維持し、次の29分において直線勾配で1:99 A:Bに変更した。葉酸塩-Cys-AlexaFluor 488は、20分で溶出した。この産物を質量分析によって確認し、生物活性は、葉酸受容体陽性のM109培養細胞における細胞表面葉酸受容体への結合を蛍光法で測定することによって確認した。

【 0 0 5 1 】

【化 3】



Alexa Fluor 488-Cys-γ-Glu-プテロイン酸  
MW 1242.21

20

30

40

【 0 0 5 2 】

実施例 4 葉酸塩-Cys-テキサスレッドの合成

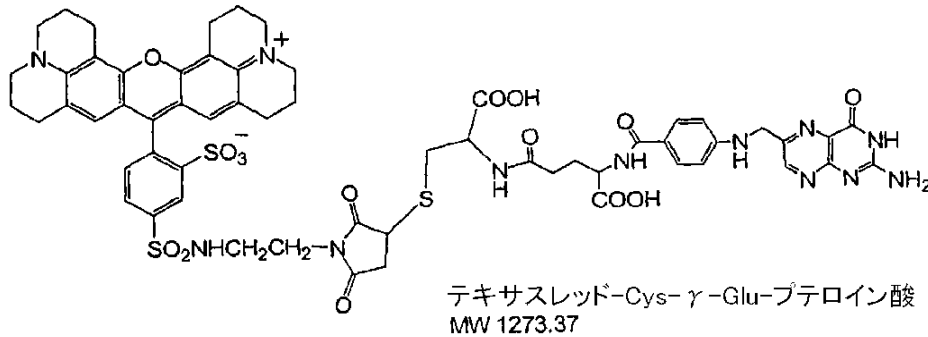
テキサスレッドC<sub>2</sub>-マレイミド (Molecular Probes, Eugene、オレゴン州) を、ジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した (1 mgを200 μlのDMSOに溶解)。1.4モル当量 (1 mg) の葉酸塩-Cysを、この溶液に加え、室温で4時間攪拌した。葉酸塩-Cys-テキサスレッド (葉酸塩-テキサスレッド) を、C18カラムにおいて逆相HPLCによって1 ml/分の流速で精製した。移動相は、pH 7.0の10 mM NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>バッファー、(溶出液A)、およびアセトニトリル

50

(溶出液B)から成るが、最初の5分は溶出液を99:1 A:Bの比に維持し、次の30分において直線勾配で70:30 A:Bに変更し、次いで最後の15分は1:99 A:B直線勾配とした。葉酸塩-Cys-テキサスレッドは、44.5と45.8分において二つの異性体ピークとして溶出した。この産物を質量分析によって確認し、生物活性は、葉酸受容体陽性のM109細胞培養体における細胞表面葉酸受容体へのその結合を蛍光法で測定することによって確認した。

【0053】

【化4】



10

【0054】

実施例5 葉酸塩オレゴングリーン514の合成

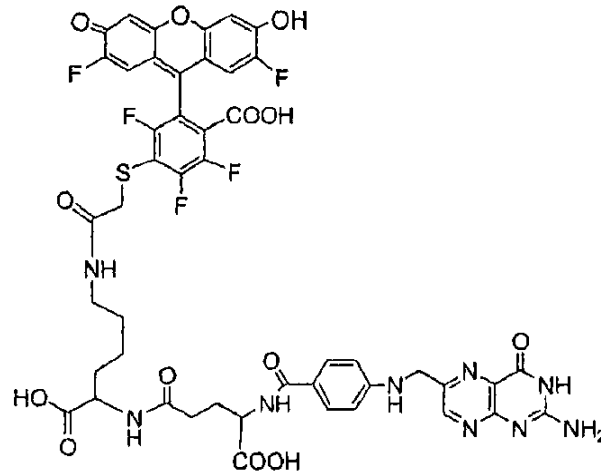
葉酸の-COOHに付着したオレゴングリーン(Molecular Probes, Eugene, オレゴン州)に結合した葉酸塩ペプチドを合成するために、標準的Fmocペプチド化学を用いた。塩基として使用のジイソプロピルエチルアミン、および、Fmoc基の脱保護用として使用の、ジメチルフォルムアミド(DMF)に溶解した20%ピペリジンと共に、HBTUおよびN-ヒドロキシベンゾトリアゾルを活性剤として使用するFmoc化学によって、配列Lys-Glu-プテロイン酸(葉酸塩-Cys)を構築した。-t-Boc-保護N- -Fmoc-L-グルタミン酸、次いで、N<sup>10</sup>-トリフルオロアセチルプテロイン酸を、-アミンにおいて4-メチルトリチル保護基を含むFmoc-保護リシンワングレジンに結合した。リシンの-アミンにおけるメトキシトリチル保護基を、ジクロロメタンに溶解した1%トリフルオロ酢酸によって除去し、オレゴングリーンを付着させた(葉酸塩-オレゴングリーン)。1.5モル当量のオレゴングリーンカルボン酸、スクシニミジルエステルを、このペプチドと一晩反応させ、次に、ペプチドレジン

30

ピースから徹底的に洗い流した。次に、95%トリフルオロ酢酸-2.5%水- 2.5%トリイソプロピルシラン溶液を用いて、この樹脂から、葉酸塩-オレゴングリーンを切断分離した。ジエチルエーテルを用いてこの産物を沈殿し、この沈殿物を遠心によって回収した。この産物を、ジエチルエーテルで2回洗浄し、真空下で一晩乾燥した。N<sup>10</sup>-トリフルオロアセチル保護基を除去するために、産物を、10%水酸化アンモニウム溶液に溶解し、30分室温で攪拌した。産物を、合わせたイソプロパノールおよびエーテルで沈殿させ、沈殿物を遠心にて回収した。

【0055】

【化5】



10

## 【 0 0 5 6 】

## 実施例 6 葉酸塩-R-フィコエリスリンの合成

葉酸塩-フィコエリスリンは、Kennedy M.D. et al., in *Pharmaceutical Research*, 20(5); 2003によって報告された手順に従って合成された。簡単に言うと、pH 7.4のリン酸バッファー生理食塩水 (PBS) に溶解したR-フィコエリスリンピリジルジスルフィド (Sigma, セントルイス、ミズーリ州)の溶液に、10倍過剰な葉酸塩-システインを加えた。この溶液を放置して4 で一晩反応させ、標識タンパク質 (Mr約260 kDa) を、G-15脱塩カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。葉酸塩標識は、100倍過剰な葉酸の存在下、および不在下に、葉酸塩-フィコエリスリンとインキュベートしたM109細胞を蛍光顕微鏡観察することによって確認した。1時間のインキュベーション、および、PBSによる3回の細胞洗浄後、処理細胞は強度の蛍光を発したが、一方、過剰な葉酸の存在下に置かれたサンプルでは、細胞の蛍光発光はほとんど見られなかった。

20

## 【 0 0 5 7 】

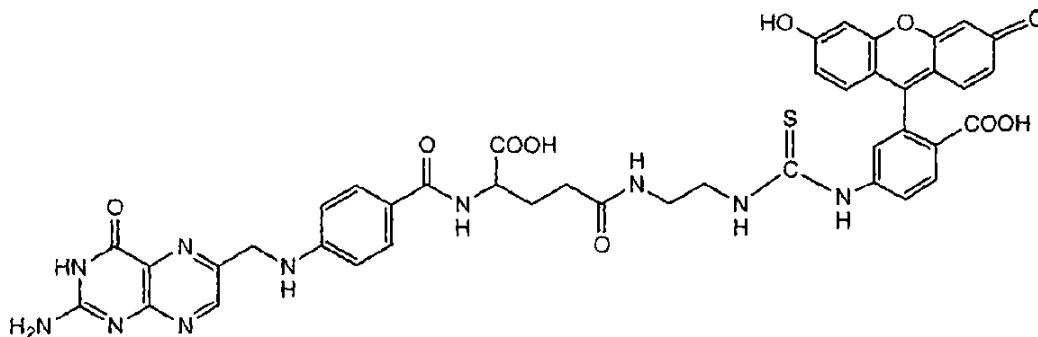
## 実施例 7 葉酸塩-フルオレセインの合成

葉酸塩-FITCは、Kennedy M.D. et al., in *Pharmaceutical Research*, 20(5); 2003によって記載される通りに合成された。

30

## 【 0 0 5 8 】

## 【 化 6 】



葉酸塩-EDA-FITC  
MW 888.90

40

## 【 0 0 5 9 】

## 実施例 8 葉酸塩-D-R-D-D-C--ブレドニソロンの合成

葉酸の -COOHにアミノ酸スペーサーを付着させた葉酸塩-アスパラギン酸-アルギニン-アスパラギン酸-アスパラギン酸-システイン (葉酸塩-Asp-Arg-Asp-Asp-Cys, 葉酸塩-D-R-D-D-C) を合成するために、標準的Fmocペプチド化学を用いた。塩基として使用のジイソプロピルエチルアミン、および、Fmoc基の脱保護用として使用の、ジメチルフォルムアミド (DMF) に溶解した20%ピペリジンと共に、HBTUおよびN-ヒドロキシベンゾトリアゾルを

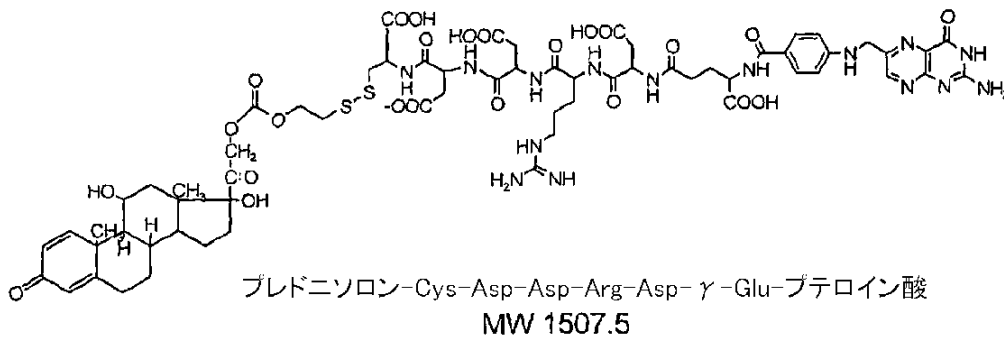
50



活性剤として使用するFmoc化学によって、配列Cys-Asp-Asp-Arg-Asp-Glu-プテロイン酸（葉酸塩-Asp-Arg-Asp-Asp-Cys）を構築した。Fmoc-D-Asp(OtBu)-OHを、2-クロロトリチルレジンに結合しているトリチル保護Cysに結合した。第2Fmoc-D-Asp(OtBu)-OH、次いでFmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-D-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Glu-OtBuと続けてこの樹脂に加えた。次いで、N<sup>10</sup>-トリフルオロアセチルプテロイン酸を、Gluの-COOHに付着させた。次に、92.5%トリフルオロ酢酸-2.5%水-2.5%トリイソプロピルシラン-2.5%エタンジチオ溶液を用いて、この樹脂から、葉酸塩-Asp-Arg-Asp-Asp-Cysを切断分離した。ジエチルエテルを用いてこの産物を沈殿し、この沈殿物を遠心によって回収した。この産物を、ジエチルエテルで2回洗浄し、真空下で一晩乾燥した。N<sup>10</sup>-トリフルオロアセチル保護基を除去するために、産物を、10%水酸化アンモニウム溶液に溶解し、30分室温で攪拌した。システインがジスルフィドを形成するのを防ぐために、この間ずっとこの溶液を窒素流に維持した。30分後、化合物が沈殿するまで、塩酸を溶液に加えた。この産物を遠心分離にて回収し、凍結乾燥した。この産物を、質量分析によって分析し、確認した（分子量1046）。

【 0 0 6 0 】

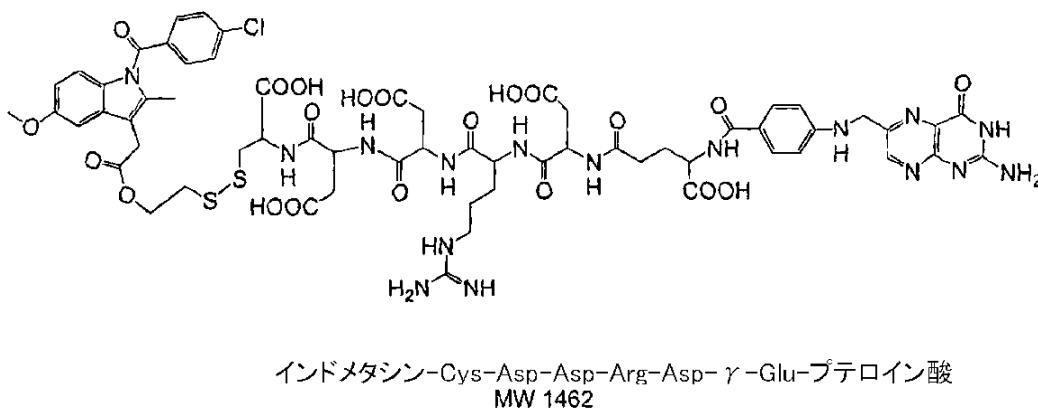
【 化 7 】



【 0 0 6 1 】

実施例 9 葉酸塩-インドメタシンの合成

【 化 8 】



【 0 0 6 2 】

2-(2-ピリジルジチオ)エタノールは、1.5当量のAldrithiol (Sigma、セントルイス、ミズーリ州)と、6当量の4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)を、ジクロロメタン(DCM)に溶解することによって合成した。この溶液の不純物を窒素で取り除き、このAldrithiol液に1当量のメルカプトエタノールを15分間に渡って滴下した。反応を室温で30分進行させたが、この時点で、メルカプトエタノールの匂いは全く残っていなかった。この反応系を、DCMで100倍に希釈し、Aldrithiol 1 g当たり5 gの活性炭素を加えた。反応混合物をろ過し、溶媒を除去した。混合物を、70:30(石油エーテル:酢酸エチル(EtOAc))に再懸濁し、60オンクストロームのシリカゲルカラムにおいてフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。産物は、薄層クロマトグラフィーによって監視し、収集した。

10

20

30

40

50

## 【0063】

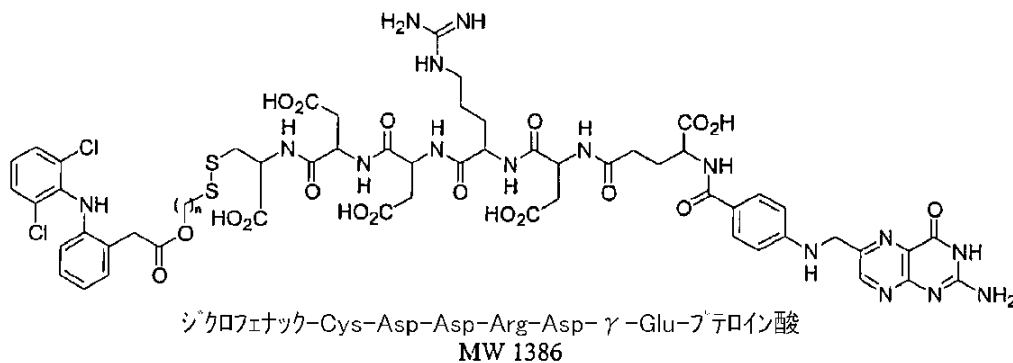
葉酸塩-インドメタシンは、Kalgutkar et al. Journal of Med. Chem. 2000, 43; 2860-2870によって報告された方法に変更を加えて合成された。この方法では、抗炎症剤（インドメタシン）が、エステル結合を通じて、2-(2-ピリジルジチオ)エタノールに結合された。簡単に言うと、1当量のインドメタシンが、0.08当量のDMAP、1.1当量の2-(2-ピリジルジチオ)エタノール、および1.1当量の1,3-ジシクロヘキシル-カルボジイミドと共にDCMに溶解された。この反応を室温で5時間進行させた。この反応系を、シリカゲル（EtOAc：ヘキサン、20:80）においてクロマトグラフィーによって精製した。1当量の精製化合物をDMSOに溶解し、それに、1.5当量の葉酸塩-Asp-Arg-Asp-Asp-Cysペプチドを加えた。得られた溶液を、室温で3時間反応させ、次いで、逆相のC18カラムにおいて1 ml/分の流速でHPLCによって精製した。移動相は、pH 7.0の10 mM NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>バッファー、（溶出液A）、およびアセトニトリル（溶出液B）から成るが、最初の5分は溶出液を99:1 A:Bの比に維持し、次の30分において直線勾配で70:30 A:Bに変更した。回収された最終産物を質量分析によって確認した。

10

## 【0064】

実施例10 葉酸-ジクロフェナックの合成

## 【化9】



20

## 【0065】

葉酸塩-ジクロフェナックは、インドメタシンの代わりにジクロフェナックを用いたことを除いては、実施例9に記載した方法によって合成した。各種の実施態様において、n=1、2、または3であるが、nは例示として2となる。

30

## 【0066】

実施例11 葉酸塩-Cys-プレドニソロンの合成

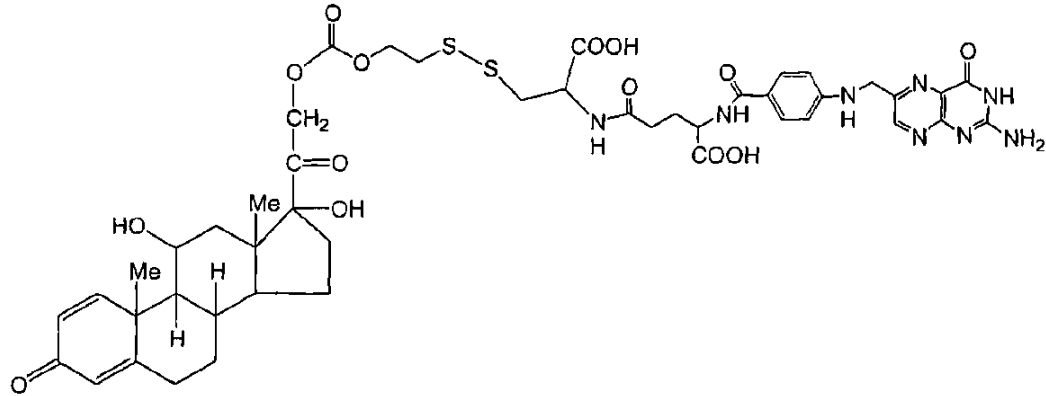
プレドニソロンの、葉酸塩グルココルチコイド結合体は下記のように調製した。1.1モル当量のプレドニソロンをテトラヒドロフラン(THF)に溶解した。別の瓶で、0.7モル当量のジメチルアミノピリジン、1モル当量のトリ（ヒドロキシエチル）アミン、および1モル当量のリンカー（合成法は、国際公開第2006/012527号に記載される、なお、引用により本明細書に含める）を、ジクロロメタンに溶解した。両方の液の、ほぼ等容量を合わせ、混合し、室温で4時間反応させた。反応は、40:10:1（ジクロロメタン：アセトニトリル：メタノール）を用いた薄層クロマトグラフィーによって監視した。産物は、R<sub>f</sub> = 0.52であった。この産物を、同じ割合の溶媒群を用いてシリカカラム（シリカ32-63、60オンクストローム）で精製した。回収産物を、葉酸-ペプチドへの結合の準備のため乾燥させた。誘導體形成したグルココルチコイドをDMSOに溶解し、これに、1.5モル当量の、葉酸-cysか、または葉酸塩-Asp-Arg-Asp-Asp-Cysペプチドを加えた。得られた溶液を室温で3時間反応させ、次いで、逆相のC18カラムにおいて1 ml/分の流速でHPLCによって精製した。移動相は、pH 7.0の10 mM NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>バッファー、（溶出液A）、およびアセトニトリル（溶出液B）から成るが、最初の1分は溶出液を99:1 A:Bの比に維持し、次の39分において直線勾配で1:99 A:Bに変更した。葉酸塩-グルココルチコイド結合体は、約26分で溶出した。回収された最終産物を質量分析によって確認した。

40

## 【0067】

50

## 【化10】



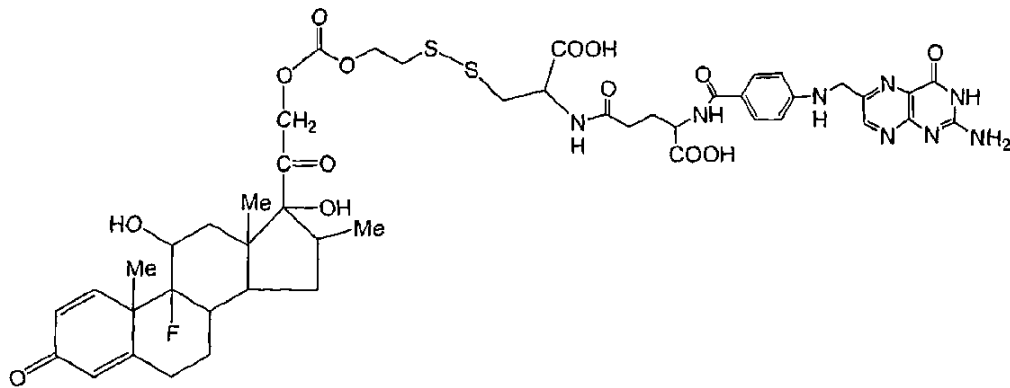
プレドニソロン-Cys-g-Glu-プテロイン酸  
MW 1007.10

10

## 【0068】

実施例12 葉酸塩-Cys-デキサメタゾンの合成

## 【化11】



デキサメタゾン-Cys-g-Glu-プテロイン酸  
MW 1039.11

20

30

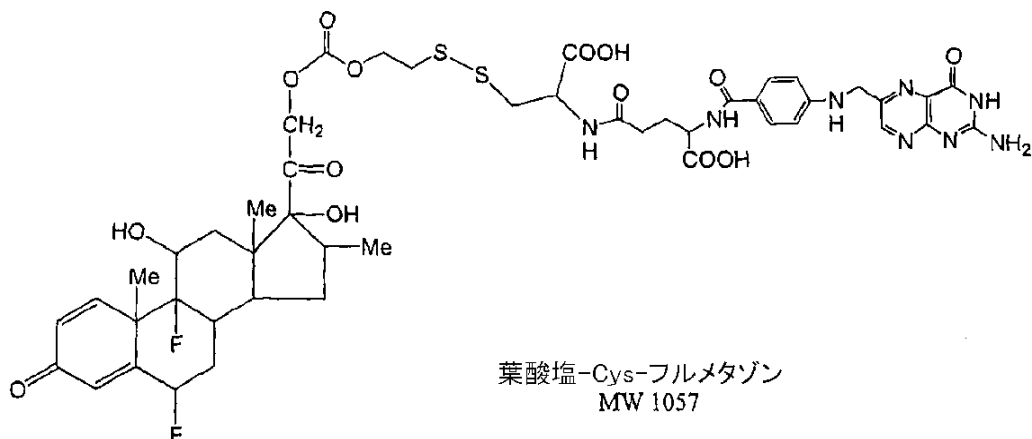
## 【0069】

葉酸塩-cys-デキサメタゾンは、グルココルチコイドの代わりにデキサメタゾンを使用したことを除いては、実施例11に記載したものと同様の手順によって合成した。

## 【0070】

実施例13 葉酸塩-Cys-フルメタゾンの合成

## 【化12】



葉酸塩-Cys-フルメタゾン  
MW 1057

40

50

## 【 0 0 7 1 】

葉酸塩-cys-フルメタゾンは、グルココルチコイドがの代わりにフルメタゾンを使用したことを除いては、実施例11に記載したものと同様の手順によって合成した。

## 【 0 0 7 2 】

## 実施例 1 4 抹消血単球 (pbmc) の単離

8-10 mlの全血サンプルを、EDTA抗凝固チューブに採取した。PBMCは、Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Piscataway、ニュージャージー州)を用い、かつ、メーカーからのプロトコルに従って血液サンプルから単離した。簡単に言うと、血液サンプルは、平衡塩溶液(後述)で50:50に希釈した。8 mLのFicoll-Paque Plusを、50 mlの円錐形遠心チューブに加えた。この希釈血液サンプル(約16-20 ml)を、Ficoll勾配の上に重層した。このサンプルを、室温で30分400 x gで遠心した。遠心後、血漿層(最上部の透明層)をピペットを用いて取り出し、リンパ球/単球層をかく乱せずに残した。血漿層直下の濁った細胞層を取り除いた。その際、細胞層界面全体を取り除くが、Ficoll層の除去は最小となるように注意した。単離された細胞は、滅菌された50 mlの円錐形遠心チューブに移し、平衡塩溶液で3倍(容量/容量)に希釈した。得られた細胞溶液を穏やかに攪拌し、室温で10分100 x gで遠心して細胞をペレットとした。上清は除去し、細胞は、10%熱不活性化FBS、ペニシリン(100 IU/ml)、およびストレプトマイシン(100 μg/ml)を添加した、葉酸塩無添加RPMI 1640培養液に再懸濁した。細胞は、実験の必要性に応じて微小遠心チューブ、または顕微鏡チェンバーに撒かれた。

## 【 0 0 7 3 】

## 実施例 1 5 平衡塩溶液

平衡塩溶液の調製 (Amersham Biosciencesの調製による)

溶液A		濃度(g/L)
無水D-グルコース	0.1パーセント	1.0
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	5.0 x 10 <sup>-5</sup> M	0.0074
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	9.8 x 10 <sup>-4</sup> M	0.1992
KCl	5.4 x 10 <sup>-3</sup> M	0.4026
TRIS	0.145 M	17.565

約950 mlの蒸留水に溶解し、容量を1 Lに調整する前に、10N HClをpH 7.になるまで加える。

溶液B		濃度(g/L)
NaCl	0.14 M	8.19

この平衡塩溶液を調製するためには、1容量の溶液Aを、9容量の溶液Bと混ぜる。

## 【 0 0 7 4 】

## 実施例 1 6 リガンド結合

全ての実験は、別様に指示しない限り、氷上、または4 °Cの冷却室で行った。葉酸塩結合体および<sup>3</sup>H-葉酸の結合実験は、細胞を、100 nM濃度の、表示の葉酸塩染料結合体と45分インキュベートすることによって行った。競合サンプルは、葉酸塩染料結合体を加える5分前に、100倍過剰濃度の葉酸(10 μM)と共に適切なサンプルをあらかじめインキュベートすることによって準備した。細胞表面に結合した葉酸塩結合体を剥離するために、酸性洗浄を、表示のサンプルに対して行った。洗浄は、酢酸でpH 3.5に調整した150 mM NaCl溶液で細胞サンプルを洗浄することによって行った。全ての抗体標識は、に抗体価測定によって最適化した。最適標識化は、多くの場合、メーカーのストック抗体溶液を1/1000から1/10,000倍に希釈することにより得られた。細胞を、葉酸塩染料結合体および/または抗体によって標識した後、サンプルをPBSで2回洗浄して非特異的結合を除去した。葉酸塩結合体結合および/または抗体結合は、共焦点顕微鏡法またはフローサイトメトリー(FCS Calibur, BD, Franklin Lakes、ニュージャージー州)によって分析した。<sup>3</sup>H-葉酸サンプルを洗浄して非特異的結合を除去した後、細胞を、0.25 M NaOHに溶解し、シンチレーションカウンターにて放射能をカウントした。

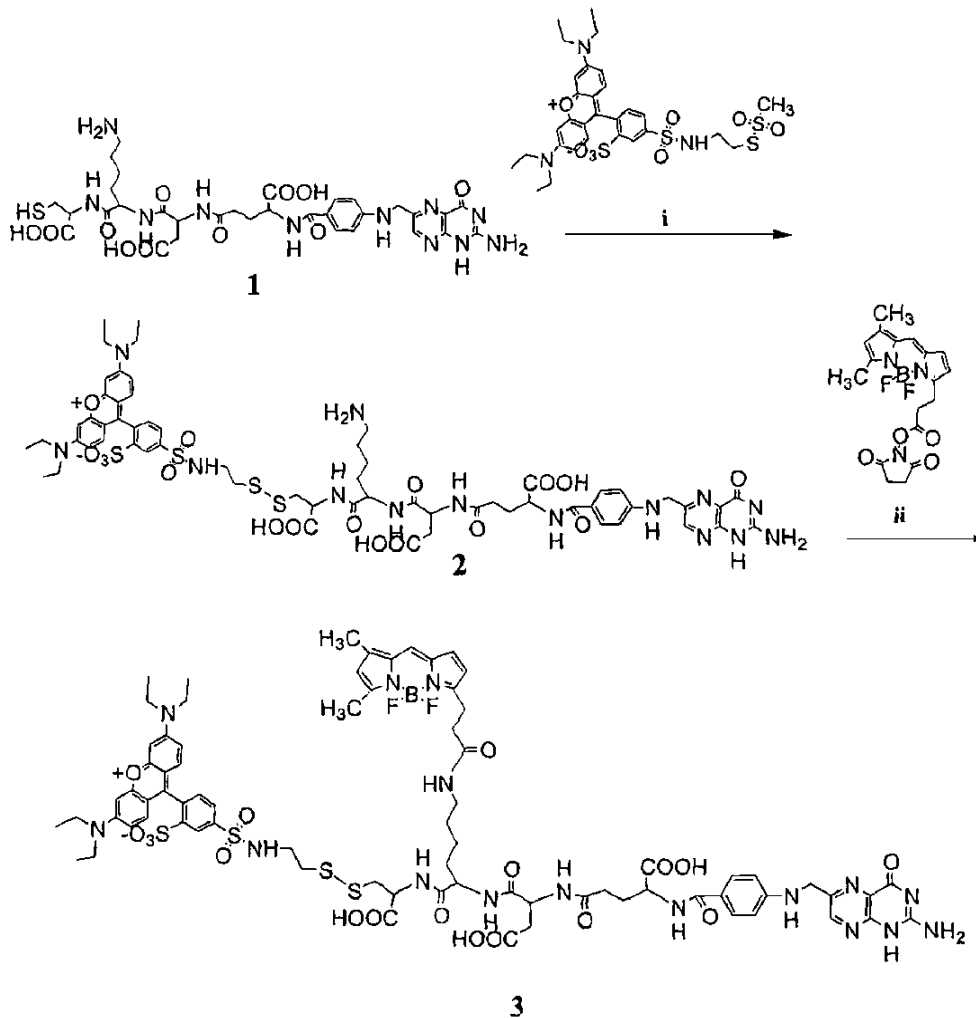
## 【 0 0 7 5 】

### 実施例 17 葉酸塩共鳴エネルギー転送リポーターの合成

化合物1は、既述のように（表示のペプチド配列に適合させて）、Fmoc-L-Cys(Trt)-OHを負荷した酸感受性トリチルレジンに関する標準的Fmoc化学に従って調製した。未精製化合物1を、VYDACタンパク質およびペプチドC18カラムを用いたHPLCによって精製した。次に、このHPLC精製した1を、ジイソプロピルエチルアミン（DIPEA）の存在下で、DMSOに溶解したテトラエチルローダミンメタンチオスルフォネート(Molecular Probes, Eugene、オレゴン州)と反応させて、化合物2を得た。この所望の化合物を、前述のように、準備したHPLCによって反応混合物から単離した。最終的結合は、過剰なDIPEAを、2（DMSOに溶解）と混ぜ合わせ、次いで、BODIPY FL NHSエステル(Molecular Probes, Eugene、オレゴン州)を加えて実行した。次に、化合物3を、準備したHPLCによってこの反応混合物から単離した。

【 0 0 7 6 】

【 化 1 3 】



【 0 0 7 7 】

### 実施例 18 レーザー画像法

葉酸塩連結画像形成剤の取り込みを定量するための、単球の蛍光共鳴エネルギー転送（FRET）画像記録は、共焦点顕微鏡観察によって得られる。Olympus FW300走査ボックスおよびOlympus 60X/1.2NA水浸対物レンズを備えた、Olympus IX-70倒立顕微鏡(Olympus、米国)を用いて細胞を画像記録する。各フッ素系色素について、別々の励起波長および吸収フィルターが使用される（BODIPY FL、488 nm（励起）および520/40 nm（吸収）；ローダミン、543 nm（励起）および600/70 nm（吸収））。543 nm(He-Ne)および488 nm(アルゴン)の波長を持つ、二つのレーザー光源を用いて、BODIPY FLおよびローダミンを別々に励起し、必要に応じ二つの波長の画像を得た。2.7秒の走査時間において512 x 512ピクセル

10

20

30

40

50

のサイズを持つ共焦点画像が得られる。画像は、Fluo View (Olympus) ソフトウェアを用いて処理した。

#### 【 0 0 7 8 】

##### 実施例 19 リポソーム調製

リポソームは、Leamon et al., Bioconjugate Chemistry 2003, 14, 738-747による方法に従って調製された。簡単に言うと、脂質とコレステロールを、Avanti Polar Lipids (Alabaster、アラバマ州) から購入した。葉酸塩標的性リポソームは、40モル%のコレステロール、4モル%か6モル%のポリエチレングリコール (Mr約2000) 由来フォスファチジルエタノールアミン(PEG2000-PE, Nekter、アラバマ州、Huntsville、アラバマ州)、0.03モル%か0.1モル%の葉酸塩-システイン-PEG3400-PEから成り、残りのモル%は、鶏卵フォスファチジルコリンから構成されていた。非標的性リポソームも、葉酸塩-システイン-PEG3400-PE無添加であることを除いて同様に調製した。クロロフォルムに溶解した脂質を、回転蒸発によって乾燥させて薄層とし、薬剤を含むPBSで再水和した。再水和は、高速でのボルテックスに続き、10サイクルの凍結と解凍で行った。次に、リポソームは、高圧押出機 (Lipex Biomembrane、バンクーバー、カナダ) を用いて、50 nm孔径のポリカーボネート膜を10回押し貫通させた。

10

#### 【 0 0 7 9 】

##### 実施例 20 葉酸塩-ヨウシュヤマゴボウの合成

ヨウシュヤマゴボウの抗ウィルスタンパク質は、Worthington Biochemical Corporation (Lakewood、ニュージャージー州) から購入した。N-スクシニミジル-3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート (SPDP、Pierce, Rockford、イリノイ州) は、ジメチルフォルムアミドに溶解した(9.6 mM)。氷上に置いたままで、5倍モル過剰なSPDP (約170 ナノモル) を、ヨウシュヤマゴボウ液に加えた(1 mg/ml PBS, MW 約29,000)。得られた溶液を静かに混ぜ合わせ、室温で30分反応させた。非結合SPDPは、遠心分子量濃縮機 (MWCO 10,000) (Millipore, Billerica、マサチューセッツ州) を用いて除去した。得られたタンパク質液を、10 mM EDTAを含むPBSに、最終容量が1 mLとなるように再懸濁した。このタンパク質液に、約60倍モル過剰な葉酸塩-Asp-Arg-Asp-Asp-Cysペプチド(2000ナノモル)を加え、1時間反応させた。未反応葉酸塩-Asp-Arg-Asp-Asp-Cysペプチドを、前述の遠心濃縮機を用いて除去した。このタンパク質を、PBSに再懸濁し、遠心によりタンパク質を濃縮する過程を繰り返して2回洗浄した。

20

30

#### 【 0 0 8 0 】

##### 実施例 21 葉酸塩-サポリンの合成

タンパク質のサポリンは、Sigma (セントルイス、ミズーリ州) から購入した。葉酸-サポリンは、Leamon and Low, Journal of Biological Chemistry 1992, 267(35); 24966-24971に報告されている、葉酸-タンパク質結合法に従って調製した。簡単に言うと、葉酸をDMSOに溶解し、5倍モル過剰な1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルバジイミドと室温で30分間インキュベートした。サポリンを、pH 8.5の100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、100 mMホウ酸、に溶解した。10倍モル過剰な、この「活性化」ビタミンを、前記タンパク質液に加え、放置して標識反応を4時間進行させた。未反応の材料を、pH 7.4のリン酸バッファー生理食塩水で平衡させたSephadex G-25カラムによって、標識タンパク質から分離した。

40

#### 【 0 0 8 1 】

##### 実施例 22 葉酸塩-モモルジンおよび葉酸塩-ゲロニンの合成

タンパク質、モモルジンおよびゲロニンは、Sigma (セントルイス、ミズーリ州) から購入した。葉酸塩-cysピリジルジスルフィドは、葉酸塩-cysをAldrithiol (Sigma、セントルイス、ミズーリ州) と反応させることによって調製した。両タンパク質を、pH 8.2の0.1 M HEPESバッファー、に溶解した。6倍モル過剰なTrouts試薬 (Aldrich、セントルイス、ミズーリ州) のDMSO溶液(16 mM)を、各タンパク質液に加えた。溶液を放置して室温で1時間反応させた。未反応の材料を、pH 7.0の0.1 Mリン酸バッファー生理食塩水で平衡させたSephadex G-25カラムによってタンパク質から分離した。遊離チオスの存在に関するEllmans試験は、両方のタンパク質について陽性であった。タンパク質液が氷上にある

50

間に、5倍モル過剰の、葉酸塩-cysピリジルジスルフィドのDMSO溶液を加えた。得られた溶液を室温に温め、30分反応させた。未反応の材料を、pH 7.4のリン酸バッファー生理食塩水で平衡させたSephadex G-25カラムによって標識タンパク質から分離した。

【 0 0 8 2 】

実施例 2 3 葉酸塩-標的性クロドロネートまたはプレドニソロンリン酸リポソームの調製

リポソームは、Leamon et al., Bioconjugate Chemistry 2003, 14, 738-747による方法に従って調製された。簡単に言うと、脂質とコレステロールを、Avanti Polar Lipids (Alabaster, アラバマ州) から購入した。葉酸塩標的性リポソームは、40モル%のコレステロール、5モル%のポリエチレングリコール (Mr約2000) 由来フォスファチジルエタノールアミン(PEG2000-PE, Nekter, アラバマ州, Huntsville, アラバマ州)、0.03モル%の葉酸塩-システイン-PEG3400-PE、および、54.97モル%の鶏卵フォスファチジルコリンから構成された。クロドロネートに溶解した脂質を、回転蒸発によって乾燥させて薄層とし、次にクロドロネート(250 mg/ml)、またはプレドニソロンフォスフェート(100 mg/ml)を含むPBSで再水和した。再水和は、高速でのボルテックスに続く、10サイクルの凍結と解凍で行った。次に、リポソームは、高圧押出機(Lipex Biomembrane, パンクーバー、カナダ)を用いて、50 nm孔径のポリカーボネート膜を10回押し貫通させた。これらのリポソームを、PBSで平衡させたCL4Bサイズ排除カラム (Sigma, セントルイス、ミズーリ州) を通過させて、未封入クロドロネートまたはプレドニソロンフォスフェートから分離した。平均粒径は、70から100 nmであった。

【 0 0 8 3 】

実施例 2 4 葉酸塩-FITCの、ヒト単球に対する結合

ヒトの単球、および、あらかじめ100倍過剰の未標識葉酸とインキュベートしたヒト単球に対する、葉酸塩-FITCの結合を測定した。抹消血単球は、実施例14および15の記載に従って分離し、葉酸塩-FITC結合およびフローサイトメトリーは、実施例16の記載に従って実行した。図1に示すように、葉酸塩-FITCは、未標識葉酸の不在下では、ヒトの抹消血単球に結合するが、100倍過剰な未標識葉酸の存在下では、結合は競合された。

【 0 0 8 4 】

実施例 2 5 葉酸-FITCの、CD11b<sup>+</sup>ヒト単球に対する結合

CD11b<sup>+</sup>ヒト単球、および、あらかじめ100倍過剰の未標識葉酸とインキュベートしたCD11b<sup>+</sup>ヒト単球に対する、葉酸塩-FITCの結合を定量した。抹消血単球は、実施例14および15の記載に従って分離し、葉酸塩-FITC結合およびフローサイトメトリーは、実施例16の記載に従って実行した。図2に示すように、葉酸塩-FITCは、未標識葉酸の不在下では、45.9%のヒトの抹消血単球に結合するが、100倍過剰な未標識葉酸の存在下では、2%のヒトの抹消血単球に結合するだけである。

【 0 0 8 5 】

実施例 2 6 葉酸塩-FITCのヒト単球に対する結合、および抗体のCDマーカーに対する結合

ヒト単球におけるCD11b、CD14、CD16、CD69、およびHLA-DRマーカーに対する、葉酸塩-FITCの結合、および抗体の結合を定量した。抹消血単球は、実施例14および15の記載に従って分離し、葉酸塩-FITC結合および抗体結合およびフローサイトメトリーは、実施例16の記載に従って実行した。図3に示すように、CD11b、CD14、CD16、CD69、およびHLA-DRマーカーは、ヒト抹消血単球において葉酸受容体と共発現した。CD14およびCD16発現単球は、炎症促進性単球集団であることが報告されている(Weber et al., J. Leuk. Biol., 67: 699-704(2000)、および、Ziegler-Heitbrock, J. Leuk. Biol., 67:603-606(2000))。これは、葉酸受容体を発現する単球 (全循環白血球の約2%) が炎症促進性単球であることを示唆する。

【 0 0 8 6 】

実施例 2 7 <sup>3</sup>H-葉酸の、白血球に対する結合

白血球に対する<sup>3</sup>H-葉酸の結合を、実施例16の記載に従って定量した。 " xs " と表示し

たサンプルでは、白血球を、100倍過剰な未標識葉酸とあらかじめインキュベートした。図4に示すように、葉酸受容体は、イヌとマウスから得られた白血球、およびKB細胞において検出可能である。

【 0 0 8 7 】

実施例 2 8 イヌおよびウマから得られた抹消血単球に対する葉酸塩-FITC結合

イヌおよびウマから得られた抹消血単球に対する葉酸塩-FITC結合を、あらかじめ100倍過剰の未標識葉酸とインキュベートした単球、およびインキュベートしなかった単球について定量した。抹消血単球は、実施例14および15の記載に従って分離し、葉酸塩-FITC結合およびフローサイトメトリーは、実施例16の記載に従って実行した。図5に示すように、葉酸受容体は、イヌとウマの両方の抹消血単球において検出可能であった。

10

【 0 0 8 8 】

実施例 2 9 イヌの抹消血単球に対する葉酸塩-FITCの結合、または葉酸塩-AlexaFluor 488の結合

イヌから得られた抹消血単球に対する葉酸塩-FITC結合または葉酸塩-AlexaFluor488を、あらかじめ100倍過剰の未標識葉酸とインキュベートした単球、およびインキュベートしなかった単球について定量した。抹消血単球は、実施例14および15の記載に従って分離し、葉酸塩-FITCおよび葉酸塩-AlexaFluor 488結合およびフローサイトメトリーは、実施例16の記載に従って実行した。図6に示すように、葉酸受容体は、葉酸塩-FITC、または葉酸塩-AlexaFluor 488のいずれを用いてもイヌの抹消血単球において検出可能であった。

20

【 0 0 8 9 】

実施例 3 0 葉酸塩-フィコエリスリンの、ヒト抹消血単球に対する結合

ヒトの抹消血単球に対する葉酸塩-フィコエリスリンの結合を、あらかじめ100倍過剰の未標識葉酸とインキュベートした単球、およびインキュベートしなかった単球について定量した。抹消血単球は、実施例14および15の記載に従って分離し、葉酸塩-フィコエリスリンの結合およびフローサイトメトリーは、実施例16の記載に従って実行した。図7に示すように、葉酸受容体は、葉酸塩-フィコエリスリンを用いることによってヒトの抹消血単球において検出可能であった。

【 0 0 9 0 】

実施例 3 1 健康なヒトおよび関節炎または線維筋肉痛の患者から得られた抹消血単球に対する、葉酸塩-FITCの結合

30

健康なヒト（四角）、および関節リュウマチ患者（ダイヤ）、変形性関節症（三角形上方グループ）、および線維筋肉痛（最低割合の三つの三角）から得られた抹消血単球に対する葉酸塩-FITC結合を定量した。抹消血単球は、実施例14および15の記載に従って分離し、葉酸塩-FITCの結合およびフローサイトメトリーは、実施例16の記載に従って実行した。図8に示すように、葉酸受容体は、葉酸塩-FITCを用いることによってヒトの抹消血単球において検出可能であった。このアッセイにおいて、線維筋肉痛患者では、健康な人よりも、葉酸受容体を発現する単球の割合が低いように見える。この差は、単球のマクロファージへの分化、および、活性化マクロファージの循環からの脱出、および活性化マクロファージの、炎症部位への局在のためと考えられる。この差の理由はどうであれ、図8の結果は、葉酸塩-画像形成剤結合体は、単球介在性疾患の診断に有用である可能性、および、そのような単球介在性疾患の一つが線維筋肉痛である可能性を示唆する。

40

【 0 0 9 1 】

実施例 3 2 関節炎の動物モデル

関節炎を、150-200 gの雌性Lewisラット(Harlan, Indianapolis、インディアナ州)において誘発した。この際、n=2-5/投与グループ。簡単に言うと、0.5 mgの、熱殺菌Mycoplasma butericumの鉍油懸濁液(5 mg/ml)を、0日目に、ラットの左後ろ足に注射し、次いでケタミンおよびキシラジンで麻酔した。処置動物は全て関節炎を発症した。これは、注射された足指における急激な腫脹、および関節炎の全身的進行によって生じた注射されない全ての四肢における漸進的腫脹、および患部四肢のX線分析によって裏付けられた。治療剤の投与前、全てのラットに、3週間葉酸塩欠乏食餌(DYET, Inc., Bethlehem, ペンシル

50



ベニア州)を与えた。これは、血清の葉酸塩レベルを、生理的に適合した濃度に下げたためである。対照群のラットにも、葉酸塩欠乏食餌を与えたが、関節炎は誘発されなかった。

#### 【0092】

##### 実施例33 アジュバント誘発性関節炎に対する治療剤の作用

実施例32に記載される、関節炎誘発のプロトコルに従った。ラットにおけるアジュバント誘発関節炎に対する、葉酸塩-フルメタゾン(50ナノモル/kg/日)および葉酸塩-インドメタシン(100または250ナノモル/kg/日)の効力を調べた。4日目に、ラットの腹腔に、生理食塩水(対照群ラット)、または葉酸塩-フルメタゾン(50ナノモル/kg/日)、または葉酸塩-インドメタシン(100または250ナノモル/kg/日)のいずれかを注射した。図9に示した日数において、測径器を用いて左足の大きさを測定した。アジュバント注射足の腫脹の急激な増加は、葉酸受容体を持たない好中球の流入によるものである。従って、本治療は、この段階の足腫脹に対しては影響を及ぼさない。しかしながら、図9のデータは、7日目くらいから、葉酸塩-フルメタゾンおよび葉酸塩-インドメタシンが単球に結合し、葉酸塩-フルメタゾンまたは葉酸塩-インドメタシンが単球内に取り込まれて単球を排除または不活性化し、それによって、このアジュバント誘発関節炎モデルにおいて強力な治療効果を発揮することを示す。

10

#### 【0093】

##### 実施例34 関節炎患者の抹消血単球に対する、葉酸塩-FITCの結合

関節炎患者の抹消血単球に対する、葉酸塩-FITCの結合を定量した。抹消血単球は、実施例14および15の記載に従って単離し、葉酸塩-FITCの結合およびフローサイトメトリーは、実施例16の記載に従って実行した。図10に示すように、葉酸受容体は、葉酸塩-FITCを用いると、ヒトの抹消血単球において検出可能であった。患者1番(x-軸は、患者番号を示す)はエンブレル/メトトレキセートで、患者2番はメトトレキセートで、患者3番はメドロールで、患者4番はメトトレキセート/アズルフィジン/プラケニルで、患者5番はメトトレキセート/アズルフィジン/プラケニル、セレブレックス、メドロールで、患者6番は、メトトレキセート/ズルフィジン/プラケニル、セレブレックス、プレドニソンで、および患者7番はプラケニル、アラバで処置された。このアッセイでは、関節炎患者の抹消血における葉酸受容体発現単球率は、関節炎治療の進行中に低下した。図10の結果は、葉酸受容体発現単球が関節炎の病因に関与することを示す。

20

30

#### 【0094】

前述の、実例による実施態様は、本明細書に記載される本発明を具体的に説明することを意図するものであって、限定的なものと考えてはならない。これらの実施態様についてはいくつかの変種が考えられるが、それらは、本発明に含まれることが意図されることを理解しなければならない。

#### 【0095】

具体的に言うと、実施例2から13までのそれぞれについて、葉酸塩リンカー結合体を形成するに当たって、多様な葉酸塩類似体および誘導体が、葉酸自身の代りに用いられてもよい。これらの類似体および誘導体、またはそれらの保護形を、本明細書に記載される合成プロトコルの中にも含めてもよい。さらに、結合体のリンカー部分の構造的修飾も本発明の範囲内にあるものと考えられる。例えば、結合体のリンカー部分に対して、いくつかのアミノ酸置換、例えば、天然のアミノ酸だけでなく、従来の合成法によって得られる合成アミノ酸による置換も実施が可能である。一局面では、一つ以上のアルファアミノ酸の代わりに、ベータ、ガンマ、およびさらに長い鎖のアミノ酸を使用してもよい。別の局面では、このような分子に認められるキラル中心の立体化学も、様々の光学的純度の混合物である全体分子を形成するように、あるいは、ある組のキラル中心のみから成る混合物を形成するように選択されてもよい。別の局面では、リンカーに含まれるペプチドの長さは、本発明に含まれるアミノ酸の数を変えることによって、または、より多い、またはより少ないベータ、ガンマ、または長鎖アミノ酸を含めることによって、短縮しても、または延長してもよい。別の局面では、特異的にリンカー部分の、または一般的に全体分子の、相

40

50

対的疎水性を増すか、または減らすように、ペプチド部分のアミノ酸側鎖の選択を行ってもよい。

【0096】

同様に、本明細書に記載されるリンカーの、他の化学的断片の長さおよび形も修飾してよい。一局面では、リンカーが、実施例3、4、および7において見られるように、アルキレン鎖を持っている場合、このアルキレンはより長くてもよいし、または短くてもよいし、あるいは、分枝鎖を含んでもよいし、あるいは、アルキレン鎖に対して直線または螺旋状となる環部分を含んでもよい。別の局面では、リンカーが、例えば、実施例8から13に示されるチオエチルオキシ二価断片のようなベータチオール放出可能な断片を含む場合、エチレン架橋の代わりに、限定はしないが、たとえば任意に置換されるベンジル基のような、チオール末端をヒドロキシまたは炭酸塩末端に接続する他の介在基を用いてもよいと理解される。この場合、ヒドロキシ末端は、ベンジルの炭素に結合し、チオール末端は、オルトまたはパラのフェニル位置を介して接続されるか、またはその逆となる。

【0097】

別の例示の実施態様では、米国特許出願公開第2005/0002942A1号に記載されているような、別の放出可能なリンカーを含めるために、リンカーに対し構造的な修飾を実行してもよい。

【図面の簡単な説明】

【0098】

【図1】図1は、抹消血から単離されたヒト単球であって、未反応のままに放置された単球、または、葉酸塩-フルオレセインと結合に関して競合させるために、あらかじめ100倍過剰な未標識葉酸とインキュベートした単球に対する葉酸塩-フルオレセインの結合を示す。

【図2】図2は、フローサイトメトリーによって定量した葉酸塩-フルオレセイン（葉酸塩-FITC、例えば、葉酸塩-フルオレセインイソチシアネート）結合を示す。結合は、CD11b<sup>+</sup>ヒト単球に対するもの（パネルA）、および、葉酸塩-FITCと結合に関して競合させるためにあらかじめ過剰な未標識葉酸とインキュベートしたCD11b<sup>+</sup>ヒト単球に対するもの（パネルB）である。

【図3】図3は、ヒトの単球において葉酸受容体と共発現されるCDマーカーの、CD11b(A)、CD14(B)、CD16(C)、CD69(D)、およびHLA-DR(E)抗体によるフローサイトメトリー分析を示す。

【図4】図4は、ヒト、イヌ、ウサギ、ラット、マウスから得られた白血球、またはKB細胞に対する<sup>3</sup>H-葉酸の結合を示す。上記細胞は、あらかじめ100倍過剰な未標識葉酸とインキュベートされた群と（"xs"と表示した斜線入り棒グラフ）、過剰な未標識葉酸とインキュベートされない群（黒塗りの棒グラフ）がある。

【図5】図5は、フローサイトメトリーによって分析した葉酸塩-FITC結合、および、未標識葉酸による結合の競合を示す。結合は、イヌ（パネルAおよびC）、および、ウマ（パネルBおよびD）の抹消血単球に対するものである。

【図6】図6は、フローサイトメトリーによって分析した、葉酸塩-FITC (A-C)、または葉酸塩-AlexaFluor 488 (D-F) の、イヌの抹消血単球に対する結合、および、未標識葉酸による結合の競合を示す。

【図7】図7は、フローサイトメトリーによって分析した、葉酸塩-フィコエリスリンの、ヒト抹消血単球に対する結合、および、未標識葉酸による競合を示す。

【図8】図8は、健康なヒト（四角）、および関節リュウマチ患者（ダイヤ）、変形性関節症（三角形上方グループ）、および線維筋肉痛（最低率の三つの三角）患者において葉酸受容体陽性である、ヒト抹消血単球の割合を示す。

【図9】図9は、ラットにおいて、関節炎誘発後の、足容量の経時的変化を示す。ラットは、葉酸塩-フルメタゾン（50ナノモル/kg/日、四角）、または葉酸塩-インドメタシン（100（三角）または250（ダイヤ）ナノモル/kg/日）で処置されるか、処置されなかった（円）。

10

20

30

40

50

【図10】図10は、治療進行中に見られる、関節リウマチ患者において葉酸受容体陽性である、ヒト抹消血単球の割合を示す。

【図1】

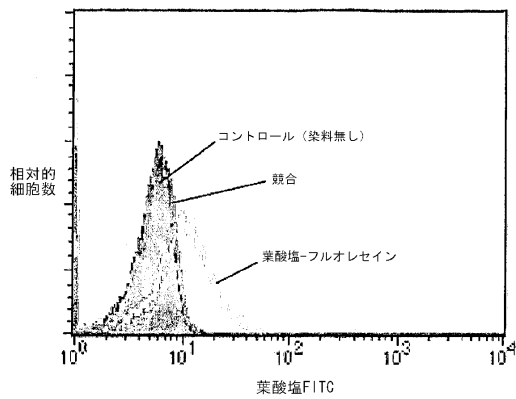


Fig. 1

【図2】

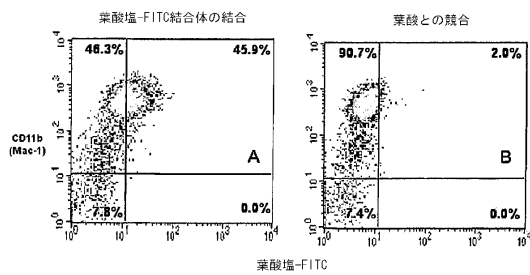


Fig. 2

【図3】

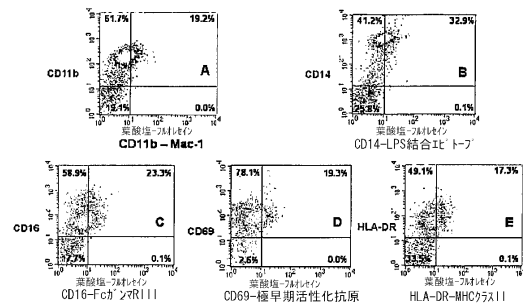


Fig. 3

【図4】

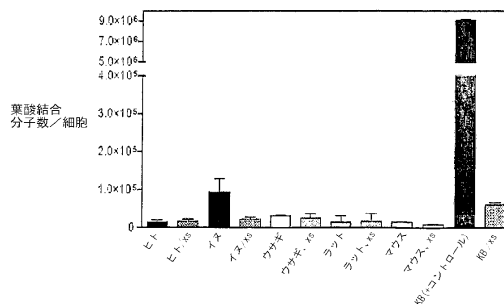


Fig. 4

【 図 5 】

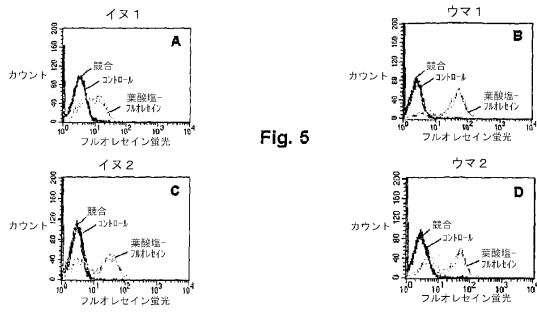


Fig. 5

【 図 7 】

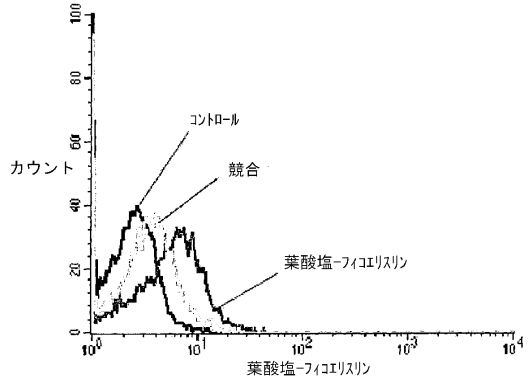


Fig. 7

【 図 6 】

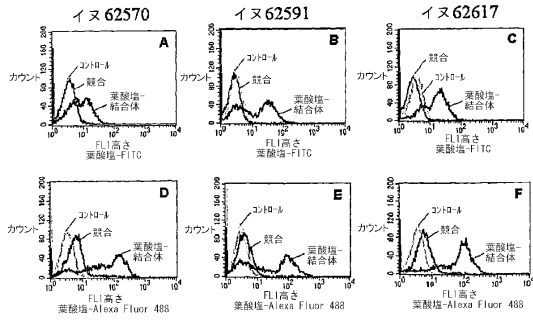


Fig. 6

【 図 8 】

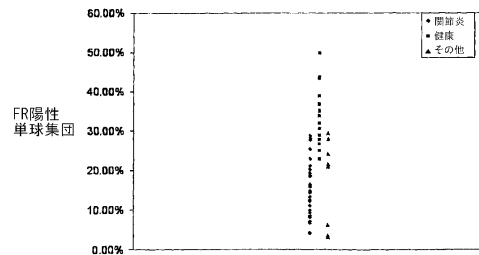


Fig. 8

【 図 9 】

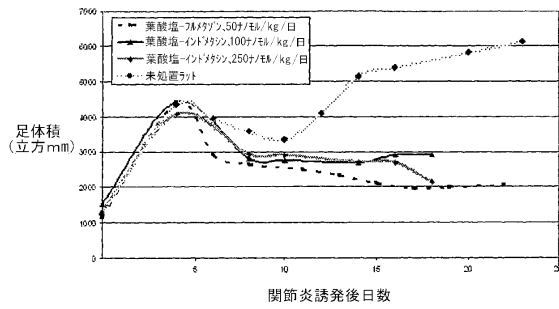


Fig. 9

【 図 10 】

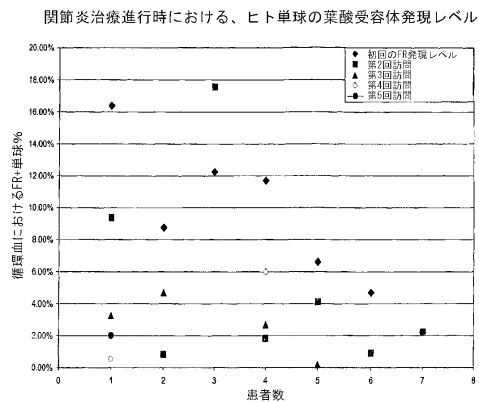


Fig. 10

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I
A 6 1 K	9/127	(2006.01)	A 6 1 K 9/127
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/00
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P 13/12

(72)発明者 ヒルジェンブリンク, アンドリュー, リチャード  
アメリカ合衆国・テネシー州 37215・ナッシュビル・ジェファーソン スクエア 136

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 国際公開第2004/100983(WO, A2)  
特表2004-530678(JP, A)  
Arthritis Rheum., 1999年, Vol.42, No.8, 1609-1616

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A61K 31/00  
A61K 47/48  
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)