

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6195911号  
(P6195911)

(45) 発行日 平成29年9月13日(2017.9.13)

(24) 登録日 平成29年8月25日(2017.8.25)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 45/00	(2006.01)
A 61 K 47/50	(2017.01)
A 61 K 47/00	(2006.01)
A 61 K 47/06	(2006.01)
A 61 K 47/34	(2017.01)
A 61 K	45/00
A 61 K	47/50
A 61 K	47/00
A 61 K	47/06
A 61 K	47/34

請求項の数 38 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-512647 (P2015-512647)
(86) (22) 出願日	平成25年3月14日 (2013.3.14)
(65) 公表番号	特表2015-518825 (P2015-518825A)
(43) 公表日	平成27年7月6日 (2015.7.6)
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/031788
(87) 國際公開番号	W02013/172967
(87) 國際公開日	平成25年11月21日 (2013.11.21)
審査請求日	平成28年3月1日 (2016.3.1)
(31) 優先権主張番号	61/648,516
(32) 優先日	平成24年5月17日 (2012.5.17)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/780,346
(32) 優先日	平成25年3月13日 (2013.3.13)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	514291842 エクステンド バイオサイエンシズ イン コーポレーテッド E X T E N D B I O S C I E N C E S, I N C アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 4 5 8 ニュートン ブリッジ ストリ ート 90 スイート 100
(74) 代理人	100147485 弁理士 杉村 慎司
(74) 代理人	100136858 弁理士 池田 浩
(74) 代理人	100193437 弁理士 高木 義和

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 向上した薬物送達のための担体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

炭素 1 位がヒドロキシル化されていないビタミン D を含み、治療ペプチド又は治療核酸に結合される、標的化基を含む、担体 - 薬物コンジュゲート。

## 【請求項 2】

前記標的化基が、ポリ(エチレンギリコール)、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ(プロピレンギリコール)、アミノ酸、核酸、グリカン、水溶性ポリマー、及び小型炭素鎖リンカーからなる群から選択されるスカフォールドを介して、前記治療ペプチド又は前記治療核酸に結合される、請求項 1 に記載の担体 - 薬物コンジュゲート。

## 【請求項 3】

前記スカフォールドが、約 100 Da. から 200,000 Da. である、請求項 2 に記載の担体 - 薬物コンジュゲート。

## 【請求項 4】

炭素 1 位がヒドロキシル化されていないビタミン D であり 300 Da. から 60,000 Da. のスカフォールドを介して治療化合物に結合される標的化基を含む担体 - 薬物コンジュゲートを含む医薬組成物。

## 【請求項 5】

前記担体が、循環中の前記治療化合物の吸収、バイオアベイラビリティ、又は半減期を増加させる、請求項 4 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

10

20

前記スカフォールドが、ポリ(エチレングリコール)、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ(プロピレングリコール)、アミノ酸、核酸、グリカン、水溶性ポリマー、及び小型炭素リンカーからなる群から選択される、請求項5に記載の医薬組成物。

**【請求項7】**

前記治療化合物が、小分子、化学物質、核酸、核酸誘導体、ペプチド、ペプチド誘導体、天然のタンパク質、非天然のタンパク質、ペプチド核酸(PNA)、ステープルドペプチド、モルホリノ、ホスホロジアミデートモルホリノ、アンチセンス薬、RNA系サイレンシング薬、アプタマー、糖タンパク質、酵素、ホルモン、サイトカイン、インターフェロン、成長因子、血液凝固因子、抗体、抗体断片、抗体誘導体、毒素結合抗体、代謝エフェクター、鎮痛剤、解熱剤、抗炎症剤、抗生物質、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、筋骨格の薬、心臓血管の薬、腎臓の薬、肺の薬、消化器疾患の薬、血液作用薬、泌尿器の薬、代謝作用薬、肝臓の薬、神経作用薬、抗糖尿病薬、抗癌剤、胃の病気を治療する薬、結腸の病気を治療する薬、皮膚病を治療する薬、及びリンパの病気を治療する薬からなる群から選択される、請求項4に記載の医薬組成物。10

**【請求項8】**

前記治療化合物が、配列番号2に少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むFGF21活性を有するタンパク質である、請求項7に記載の医薬組成物。

**【請求項9】**

前記治療化合物が、配列番号5に少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むグレリン活性を有するタンパク質である、請求項7に記載の医薬組成物。20

**【請求項10】**

前記スカフォールドが、ポリ(エチレングリコール)である、請求項8に記載の医薬組成物。

**【請求項11】**

前記治療化合物を必要とする患者を治療するために用いられる、請求項4に記載の医薬組成物。

**【請求項12】**

前記治療化合物が、小分子、化学物質、核酸、核酸誘導体、ペプチド、ペプチド誘導体、天然のタンパク質、非天然のタンパク質、ペプチド核酸(PNA)、ステープルドペプチド、モルホリノ、ホスホロジアミデートモルホリノ、アンチセンス薬、RNA系サイレンシング薬、アプタマー、糖タンパク質、酵素、ホルモン、サイトカイン、インターフェロン、成長因子、血液凝固因子、抗体、抗体断片、抗体誘導体、毒素結合抗体、代謝エフェクター、鎮痛剤、解熱剤、抗炎症剤、抗生物質、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、筋骨格の薬、心臓血管の薬、腎臓の薬、肺の薬、消化器疾患の薬、血液作用薬、泌尿器の薬、代謝作用薬、肝臓の薬、神経作用薬、抗糖尿病薬、抗癌剤、胃の病気を治療する薬、結腸の病気を治療する薬、皮膚病を治療する薬、及びリンパの病気を治療する薬からなる群から選択される、請求項11に記載の医薬組成物。30

**【請求項13】**

前記治療化合物が、配列番号2に少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むFGF21活性を有するタンパク質である、請求項12に記載の医薬組成物。40

**【請求項14】**

前記治療化合物が、配列番号5に少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むグレリン活性を有するタンパク質である、請求項12に記載の医薬組成物。

**【請求項15】**

前記スカフォールドが、ポリ(エチレングリコール)である、請求項11に記載の医薬組成物。

**【請求項16】**

前記医薬組成物が、薬学的に許容できる製剤中にある、請求項11に記載の医薬組成物。50

**【請求項17】**

前記医薬組成物が、経皮、経口、非経口、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、関節滑液囊内、胸骨内、髄腔内、病変内、頭蓋内注射、注入、吸入、眼、局所、直腸、鼻腔内、頸側、舌下、膣内、又は埋め込みリザーバー方式により前記患者に送達される、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項18】

前記標的化基及び前記治療化合物をコンジュゲートすることを含み、前記コンジュゲート工程が結合基を利用する、請求項5に記載の医薬組成物を製造する方法。

【請求項19】

前記結合基が、アミン反応性基、チオール反応性基、マレイミド基、チオール基、アルデヒド基、NHS-エステル基、ハロアセチル基、ヨードアセチル基、プロモアセチル基、SMCC基、スルホSMCC基、カルボジイミド基、二官能性架橋剤、NHS-マレイミド、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項18に記載の方法。 10

【請求項20】

前記組成物が、チオール結合、アミド結合、オキシム結合、ヒドラゾン結合、及びチアゾリジノン結合からなる群から選択される結合を含む担体-薬物化合物を含む、請求項18の方法から得られる医薬組成物。

【請求項21】

前記コンジュゲート工程が、環化付加反応により達成される、請求項18に記載の方法。 20

【請求項22】

前記スカフォールドが、ポリ(エチレングリコール)、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ(プロピレングリコール)、アミノ酸、核酸、グリカン、反応性リンカーを含む修飾基、水溶性ポリマー、小型炭素鎖リンカー、及び追加の治療化合物からなる群から選択される、請求項18に記載の方法。 20

【請求項23】

前記治療化合物が、抗体である、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項24】

前記抗体が、タンパク質に特異的に結合する抗TNF抗体であり、前記タンパク質が、配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項23に記載の医薬組成物。 30

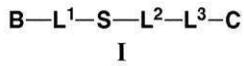
【請求項25】

前記抗TNF抗体が、タンパク質に特異的に結合し、前記タンパク質が、配列番号10のアミノ酸配列を含む、請求項24に記載の医薬組成物。

【請求項26】

式I:

【化1】



(式中、

Bは、炭素1位がヒドロキシル化されていないビタミンDである標的化基であり； Sは、ポリ(エチレングリコール)、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ(プロピレングリコール)、アミノ酸、核酸、グリカン、反応性リンカーを含む修飾基、ポリ乳酸、水溶性ポリマー、小型炭素鎖リンカー、又は追加の治療化合物を含むスカフォールドであり；

Cは、アミン反応性基、チオール反応性基、マレイミド基、チオール基、ジスルフィド基、アルデヒド基、NHS-エステル基、4-ニトロフェニルエステル、アシルイミダゾール、ハロアセチル基、ヨードアセチル基、プロモアセチル基、SMCC基、スルホSMCC基、カルボジイミド基、及びNHS-マレイミドなどの二官能性架橋剤、又はこれらの 50

組み合わせであり；

$L^1$  及び  $L^2$  は、 $- (C H_2)_n -$ 、 $- C (O) N H -$ 、 $- H N C (O) -$ 、 $- C (O) O -$ 、 $- O C (O) -$ 、 $- O -$ 、 $- S - S -$ 、 $- S -$ 、 $- S (O) -$ 、 $- S (O)_2 -$ 、及び $- N H -$ から独立に選択されるリンカーであり；

$L^3$  は $- (C H_2)_o -$ であり；

$n$ は、0～3の整数であり；且つ

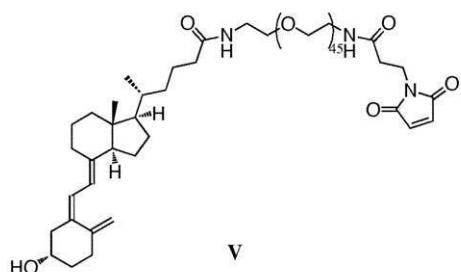
$o$ は、0～3の整数である）

を含む医薬担体。

【請求項 27】

式 V :

【化 2】



10

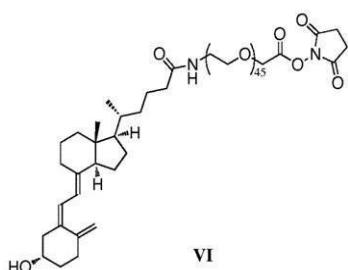
20

を含む請求項 26 に記載の医薬担体。

【請求項 28】

式 V I :

【化 3】



30

を含む請求項 26 に記載の医薬担体。

【請求項 29】

(a) 治療化合物、

(b) 安定に結合されたスカフォールド、

(c) 炭素 1 位がヒドロキシル化されていないビタミン D である標的化基、

を含む医薬組成物であって、

第 1 対象に投与した後に、複数の時点で得られる血液試料についての機能的アッセイによって測定される前記治療化合物の半減期が、治療化合物を前記結合されたスカフォールド及び標的化基がない状態で第 2 対象に投与したときの、複数の時点で得られる血液試料についての機能的アッセイによって測定される半減期よりも長い、医薬組成物。

【請求項 30】

前記第 1 対象及び第 2 対象への前記投与が、皮下投与により行われる、請求項 29 に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

前記スカフォールド及び標的化基に安定に結合した前記治療化合物が、前記スカフォールド及び標的化基に結合していない治療化合物と、前記機能的アッセイによる測定で、実

40

50

質的に同様の活性を有する、請求項2\_9に記載の医薬組成物。

【請求項32】

前記機能的アッセイが、E L I S A 分析である、請求項2\_9に記載の医薬組成物。

【請求項33】

治療ペプチド又は治療核酸に結合された非ホルモン性のビタミンDの標的化基を含む、担体-薬物コンジュゲート。

【請求項34】

前記標的化基が、ポリ(エチレングリコール)、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ(プロピレングリコール)、アミノ酸、核酸、グリカン、水溶性ポリマー、及び小型炭素鎖リンカーからなる群から選択されるスカフォールドを介して、前記治療ペプチド又は前記治療核酸に結合される、請求項3\_3に記載の担体-薬物コンジュゲート。10

【請求項35】

前記治療化合物がタンパク質である、請求項4に記載の医薬組成物。

【請求項36】

前記治療化合物がタンパク質である、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項37】

前記治療化合物がタンパク質である、請求項18に記載の製造する方法。

【請求項38】

前記治療化合物がタンパク質である、請求項29に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】20

【技術分野】

【0001】

本発明の分野は、インビオでの薬物動態的性質を向上させることにより治療化合物の効力、吸収、バイオアベイラビリティ、又は循環半減期を増加させるための化合物の担体、コンジュゲート、融合体、又は製剤の組成物及び全般的な使用を提供する。

【背景技術】

【0002】

本発明は、治療化合物の効力、吸収、又は薬物動態的性質を向上させることに関する。ポリ(エチレングリコール)すなわち(P E G)の添加は、腎クリアランスの低下、凝集の低下、及び潜在的に望ましくない免疫認識の減少により、いくつかの化合物の半減期を増加させる公知の方法である(Jain, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 25: 403 - 447 (2008))。P E Gは、典型的には、循環中の半減期を最大にするため、かなり大きいサイズで使用される(20 ~ 40 kDa)。これは、単一の大きいP E Gの使用でも、化合物に結合した複数のより小さなP E Gの使用でも達成できる(Clark et al. J. Biol. Chem. 271: 21969 - 21977 (1996); Fishburn, J. Pharm. Sci. 97: 4167 - 4183 (2008))。

【0003】

医薬の効果が起こる前に薬物は吸収されなければならないため、吸収は、薬物の開発及び医薬の化学において主な焦点である。薬物の薬物動態プロファイルは、多くの因子に影響され得る。さらに、治療化合物の吸収性は、化合物によって著しく異なる。経口又は経皮投与後にあまり吸収されない治療化合物がいくつかある。ほとんどのペプチド系及びタンパク質系治療薬などの他の治療化合物は、経口投与できない。静脈内、皮下、又は筋肉内注射などの代替投与経路が、いくつかの化合物に日常的に利用されている。しかし、これらの経路は、遅い吸収及び分解を起こし得る酵素への治療化合物の曝露を起こすことが多く、そのため有効性を得るためにより高い投与量を必要とする。40

【0004】

いくつかのペプチドが、治療上期待が持てるものと特定してきた。ペプチド及びタンパク質の化学的性質及び生物学的性質により、それらは、治療化合物として使用するための魅力的な候補である。ペプチド及びタンパク質は、アミノ酸でできた天然の分子であり50

、多くの生理学的プロセスに関与している。ペプチド及びタンパク質は、高度の選択性及び効力を示し、潜在的な有害薬物間相互作用も他の負の副作用も欠点として持たないことがある。そのため、ペプチド及びタンパク質は、多様性が高く、効き目が強く、選択性の高いクラスの低毒性の治療化合物として大いに有望なものである。しかし、ペプチド及びタンパク質は、短いインビオ半減期を有し得る。そのようなペプチドでは、これは数分になり得る。そのため、それらは、その天然の形態において治療的投与には一般的に非実用的である。さらに、ペプチドは、作用持続時間が短く、バイオアベイラビリティが低いことがある。

#### 【0005】

線維芽細胞増殖因子21（配列番号2）は、血清中を循環するタンパク質である。それは、FGF21遺伝子によりコードされており、FGF19及びFGF23を含む非定型の線維芽細胞増殖因子（FGF）のファミリーのメンバーである。それは、従来のFGFヘパリン結合ドメインを欠いている。FGFファミリーメンバーは、広い細胞分裂活性及び細胞生存活性を有し、胚発生、細胞成長、形態形成、組織修復、腫瘍の増殖及び侵入を含む種々の生物学的プロセスに関与している。FGF21は、HMGCS2活性により特異的に誘起される。FGF21は、脂肪細胞でのグルコース取り込みを刺激するが、他の細胞型ではそうではない。この作用は、インスリンの活性に追加的なものである。

#### 【0006】

インビトロ試験により、FGF21が、FGFR1c/b-Klotho受容体複合体への結合を、他のFGFRアイソタイプを含むものよりも好むことが示される（Kliewer and Mangelsdorf, Am. J. Clin. Nutr. 91: 254S-257S (2010)）。FGF21は、インビトロで脂肪細胞によるグルコース取り込みを促進する。FGF21を糖尿病性動物へ投与すると、循環グルコースレベルが低下する一方で、過剰なFGF21は、過剰なインスリンの投与でみられる低血糖を引き起こさない（Kharitonov and Shanafelt, Curr. Opin. Investig. Drugs 10: 359-364 (2009)）。したがって、FGF21は、糖尿病の治療のための期待が持てる治療用タンパク質である。しかし、動物モデルにおいて治療効果を見るためにFGF21は頻繁に投与された（Kharitonov et al., J. Clin. Invest. 115: 1627-1635 (2005)）。FGF21は、その天然の状態で、非常に短い血清中の半減期（1.1時間）を有するので、天然の状態のFGF21を体外から加えても、治療として臨床上実際的でない（国際公開第03/011213号パンフレット参照）。さらに、FGF21は、皮下注射される場合、低いバイオアベイラビリティを示す。比較薬物動態学試験において、1mg/kgのFGF21が静脈内（IV）と皮下（SC）のいずれかで注射され、FGF21の濃度が時間とともに分析された。その結果は、静脈内経路に比べて（Cmax 1890nM; Xu J et al., 2009. Am J Physiol Endocrinol Metab 297: E1105-E1114の表1参照）、皮下投与経路を使用する（Cmax 73nM）バイオアベイラビリティの著しい低下を示した。上記の引用文献は、引用によりその全体として本明細書に組み込まれる。

#### 【0007】

グレリンペプチド（配列番号5）は、哺乳動物の胃から循環に自然に分泌され、食欲及び成長ホルモンの放出を刺激する。グレリンは、細胞受容体GHS-Rを介して成長ホルモン（GH）の脳下垂体からの放出を刺激し、エネルギー恒常性に重要な役割を果たす。さらに、グレリンは中枢神経系に直接作用し、交感神経の活性を低下させる。グレリン受容体（GHS-R）は、視床下部-下垂体ユニットに集中している。GHS-Rは、心臓、肺、肝臓、腎臓、すい臓、胃、小腸及び大腸、脂肪、並びに免疫細胞を含む末梢組織に分布している。

#### 【0008】

グレリンは、カヘキシーや癌などの慢性病から起こる非自発的な体重減少を患っている患者の体重及び除脂肪体重を増やすために、治療的に使用してきた（Hiura e

10

20

30

40

50

t. al., Cancer Jan 26, 2012, http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.27430/abstract)。しかし、グレリンは、ヒトの中で11分という元々短い半減期を有し(Akamizu et al., Eur J Endocrinol 150: 447-55 (2004))、そのため治療効果を得るには頻繁に投薬しなければならない。

#### 【0009】

インフリキシマブ(Remicade(登録商標)、Janssen Biotech Inc.、米国特許第5,919,452号明細書及び米国特許出願公開第2002/0141996号明細書、引用によりその全体として本明細書に組み込まれる)は、自己免疫疾患の治療に使用される、腫瘍壊死因子(TNF-、配列番号10)に結合するモノクローナル抗体である。インフリキシマブは、米国食品医薬品局(FDA)により、乾癬、クローン病、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、関節リウマチ、及び潰瘍性大腸炎の治療用に認可された。TNF-は、化学的メッセンジャー(サイトカイン)及び自己免疫反応の重要な部分である。インフリキシマブは、医療従事者により静脈内投与され、皮下投薬には認可されていない。10

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

本発明は、治療化合物の吸収、安定性、半減期、作用持続期間、効力、又はバイオアベイラビリティを増加させる担体を提供する。担体は、ビタミンD結合タンパク質(DBP)に結合する標的化基(targeting groups)、標的化基を治療化合物に結合する連結基(conjugation groups)、及び任意選択のスカフォールド部分(scaffolding moieties)を含む。20

#### 【0011】

本発明の一実施形態において、標的化基は、ビタミンD、ビタミンDアナログ、ビタミンD関連代謝物、及びビタミンD関連代謝物のアナログ、DBPに結合するペプチド、抗DBP抗体、抗DBP抗体誘導体、DBPに結合するヌクレオチドアプタマー、又はDBPに結合する小型の炭素系分子である。

#### 【0012】

他の実施形態において、結合基(coupling group)は、アミン反応性基、チオール反応性基、マレイミド基、チオール基、アルデヒド基、NHS-エステル基、4-ニトロフェニルエステル、アシリイミダゾール、ハロアセチル基、ヨードアセチル基、プロモアセチル基、SMCC基、スルホSMCC基、カルボジイミド基、及びNHS-マレイミドなどの二官能性架橋剤、又はこれらの組み合わせである。本発明の結合基は、チオール結合、アミド結合、オキシム結合、ヒドラゾン結合、チアゾリジノン結合を促進することも、環化付加反応(例えば、クリックケミストリー)を利用して担体又は標的化基を治療化合物に結合することもできる。30

#### 【0013】

他の実施形態において、ポリ(エチレンギリコール)、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ(プロピレンギリコール)、ペプチド、血清アルブミン、チオレドキシン、免疫グロブリン、アミノ酸、核酸、グリカン、反応性リンカーを含む修飾基、水溶性ポリマー、小型炭素鎖リンカー、又は追加の治療部分を含む、スカフォールド部分をさらに含む医薬担体。40

#### 【0014】

他の実施形態において、スカフォールド部分は、約100Da.から200,000Da.である。好ましい実施形態において、スカフォールド部分は、約100Da.から20,000Da.、200Da.から15,000Da.、300Da.から10,000Da.、400Da.から9,000Da.、500Da.から5,000Da.、600Da.から2,000Da.、1000Da.から200,000Da.、5000Da.から100,000Da.、10,000Da.から80,000Da.、20,000Da.から100,000Da.、10,000Da.から80,000Da.、20,50

000Da. から 60,000Da.、又は 20,000Da. から 40,000Da. である。

**【0015】**

本発明は、担体にコンジュゲートされた、融合された、又は共に製剤された治療化合物を含む医薬組成物を与える。担体は、DBP に結合する標的化基を含み、循環中の治療化合物の吸収、バイオアベイラビリティ、又は半減期を増加させる。本発明の医薬組成物は、単一の担体にコンジュゲートされた 2 つ以上の治療化合物を含み得る。本発明の医薬組成物は、治療化合物にコンジュゲートされた 2 つ以上の担体を含み得る。

**【0016】**

一実施形態において、医薬組成物中の標的化基は、ビタミン D、ビタミン D アナログ、ビタミン D 関連代謝物、ビタミン D 関連代謝物のアナログ、DBP に結合するペプチド、抗 DBP 抗体、抗 DBP 抗体誘導体、DBP に結合するヌクレオチドアブタマー、又は DBP に結合する小型の炭素系分子である。

**【0017】**

他の実施形態において、医薬組成物はスカフォールド部分をさらに含む。好ましい実施形態において、スカフォールド部分は、ポリ(エチレングリコール)、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ(プロピレングリコール)、ペプチド、血清アルブミン、チオレドキシン、免疫グロブリン、アミノ酸、核酸、グリカン、反応性リンカーを含む修飾基、水溶性ポリマー、小型炭素鎖リンカー、又は追加の治療化合物である。

**【0018】**

本発明の医薬組成物は、小分子、化学物質 (chemical entities)、核酸、核酸誘導体、ペプチド、ペプチド誘導体、天然のタンパク質、非天然のタンパク質、ペプチド核酸 (PNA)、ステープルドペプチド、モルホリノ、ホスホジアミデートモルホリノ、アンチセンス薬、RNA 系サイレンシング薬、アブタマー、糖タンパク質、酵素、ホルモン、サイトカイン、インターフェロン、成長因子、血液凝固因子、抗体、抗体断片、抗体誘導体、毒素結合抗体 (toxin-conjugated antibodies)、代謝エフェクター、鎮痛剤、解熱剤、抗炎症剤、抗生物質、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、筋骨格の薬、心臓血管の薬、腎臓の薬、肺の薬、消化器疾患の薬、血液作用薬、泌尿器の薬、代謝作用薬、肝臓の薬、神経作用薬、抗糖尿病薬、抗癌剤、胃の病気を治療する薬、結腸の病気を治療する薬、皮膚病を治療する薬、又はリンパの病気を治療する薬を含み得る。

**【0019】**

好ましい実施形態において、医薬組成物は、配列番号 2 に少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む FGF21 活性を有するタンパク質を含む。他の好ましい実施形態において、標的化基はビタミン D である。他の好ましい実施形態において、スカフォールド部分はポリ(エチレングリコール)である。

**【0020】**

最も好ましい実施形態において、本発明は、配列番号 2 に少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む FGF21 活性を有するタンパク質、ポリ(エチレングリコール)であるスカフォールド部分、及びビタミン D である標的化基を含む医薬組成物を企図する。この実施形態において、標的化基は、循環中の治療化合物の吸収、バイオアベイラビリティ、又は半減期を増加させる。他の最も好ましい実施形態において、本発明は、FGF21 活性及び配列番号 2 のアミノ酸配列を有するタンパク質を含む医薬組成物を企図する。

**【0021】**

好ましい実施形態において、医薬組成物は、配列番号 5 に少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むグレリン活性を有するタンパク質を含む。他の好ましい実施形態において、標的化基はビタミン D である。他の好ましい実施形態において、スカフォールド部分はポリ(エチレングリコール)である。

**【0022】**

10

20

30

40

50

最も好ましい実施形態において、本発明は、配列番号5に少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むグレリン活性を有するタンパク質、ポリ(エチレングリコール)であるスカフォールド部分、及びビタミンDである標的化基を含む医薬組成物を企図する。この実施形態において、標的化基は、循環中の治療化合物の吸収、バイオアベイラビリティ、又は半減期を増加させる。他の最も好ましい実施形態において、本発明は、グレリン活性及び配列番号5のアミノ酸配列を有するタンパク質を含む医薬組成物を企図する。

#### 【0023】

一実施形態において、医薬組成物は抗体を含む。好ましい実施形態において、抗体は、配列番号10に対する少なくとも90%の配列同一性のアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗TNF抗体である。より好ましい実施形態において、抗TNF抗体は、配列番号10のアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する。他の好ましい実施形態において、標的化基はビタミンDである。他の好ましい実施形態において、スカフォールド部分はポリ(エチレングリコール)である。

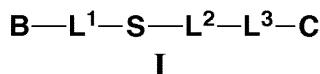
#### 【0024】

最も好ましい実施形態において、本発明は、配列番号10に少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗TNF抗体、ポリ(エチレングリコール)であるスカフォールド部分、及びビタミンDである標的化基を含む。この実施形態において、標的化基は、循環中の治療化合物の吸収、バイオアベイラビリティ、又は半減期を増加させる。

#### 【0025】

特定の実施形態において、本発明は、式Iのものを含む担体を与える：

#### 【化1】



式中、

Bは、ビタミンD、ビタミンDアナログ、ビタミンD関連代謝物、ビタミンD関連代謝物のアナログ、DBPに結合するペプチド、抗DBP抗体、抗DBP抗体誘導体、DBPに結合するスクレオチドアブタマー、又はDBPに結合する小型の炭素系分子から選択される標的化基であり；

Sは、ポリ(エチレングリコール)、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ(プロピレングリコール)、ペプチド、血清アルブミン、チオレドキシン、免疫グロブリン、アミノ酸、核酸、グリカン、反応性リンカーを含む修飾基、ポリ乳酸、水溶性ポリマー、小型炭素鎖リンカー、又は追加の治療部分を含むスカフォールド部分であり；

Cは、アミン反応性基、チオール反応性基、マレイミド基、チオール基、ジスルフィド基、アルデヒド基、NHS-エステル基、4-ニトロフェニルエステル、アシルイミダゾール、ハロアセチル基、ヨードアセチル基、プロモアセチル基、SMCC基、スルホSMCC基、カルボジイミド基、及びNHS-マレイミドなどの二官能性架橋剤、又はこれらの組み合わせであり；

L<sup>1</sup>及びL<sup>2</sup>は、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-、-C(O)NH-、-HNC(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-O-、-S-S-、-S-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、及び-NH-から独立に選択されるリンカーであり、

L<sup>3</sup>は、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0</sub>-であり；

nは、0~3の整数であり；且つ

oは、0~3の整数である。

#### 【0026】

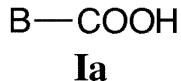
特定の実施形態において、本発明は、式Iの担体を製造する方法であって、

【化2】



式 I a の化合物：

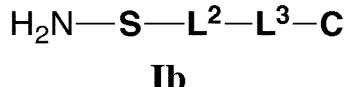
【化3】



10

を、式 I b の化合物：

【化4】



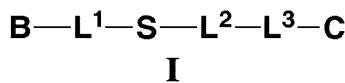
20

と、アミドカップリング剤の存在下で反応させる工程を含み、  
 式中、B、S、C、L<sup>2</sup>、及びL<sup>3</sup>が先に定義された通りであり、L<sup>1</sup>が-C(=O)NH-である方法を与える。

【0027】

特定の他の実施形態において、本発明は、式 I の担体を製造する方法であって、

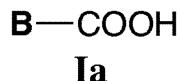
【化5】



30

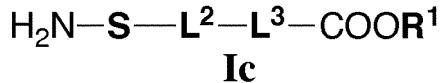
式 I a の化合物：

【化6】



を、式 I c の化合物：

【化7】



40

と、アミドカップリング剤の存在下で反応させる工程、  
 エステルをカルボン酸に加水分解する工程、及び  
 カルボン酸を活性エステルに変換する工程を含み、  
 式中、B、S、L<sup>2</sup>、L<sup>3</sup>、並びにn及びoが先に定義された通りであり、  
 L<sup>1</sup>が-C(=O)NH-であり、且つ  
 R<sup>1</sup>がC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルである方法を与える。

50

## 【0028】

本発明は、有効量の本明細書に記載される1種以上の医薬組成物を投与することを含む、治療化合物を必要とする患者を治療する方法を与える。例示的な治療化合物には、小分子、化学物質、核酸、核酸誘導体、ペプチド、ペプチド誘導体、天然のタンパク質、非天然のタンパク質、ペプチド核酸(PNA)、ステープルドペプチド、モルホリノ、ホスホロジアミデートモルホリノ、アンチセンス薬、RNA系サイレンシング薬、アプタマー、糖タンパク質、酵素、ホルモン、サイトカイン、インターフェロン、成長因子、血液凝固因子、抗体、抗体断片、抗体誘導体、毒素結合抗体、代謝エフェクター、鎮痛剤、解熱剤、抗炎症剤、抗生物質、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、筋骨格の薬、心臓血管の薬、腎臓の薬、肺の薬、消化器疾患の薬、血液作用薬、泌尿器の薬、代謝作用薬、肝臓の薬、神経作用薬、抗糖尿病薬、抗癌剤、胃の病気を治療する薬、結腸の病気を治療する薬、皮膚病を治療する薬、及びリンパの病気を治療する薬がある。

10

## 【0029】

好ましい方法において、治療化合物は、配列番号2に少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むFGF21活性を有するタンパク質である。他の好ましい方法において、治療化合物は、配列番号5に少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むグレリン活性を有するタンパク質である。他の好ましい方法において、治療化合物は、配列番号10に少なくとも90%の配列同一性を有するタンパク質に特異的に結合する抗TNF抗体である。他の好ましい方法において、標的化基はビタミンDであるか、又はスカフォールドはポリ(エチレングリコール)である。

20

## 【0030】

他の実施形態及び方法において、本発明の医薬組成物は、薬学的に許容できる製剤である。医薬組成物は、経皮、経口、非経口、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、関節滑液囊内、胸骨内、髄腔内、病変内、頭蓋内注射、注入、吸入、眼、局所、直腸、鼻腔内、頬側、舌下、膣内、又は埋め込みリザーバー方式により、患者に送達できる。

## 【0031】

本発明は、医薬を必要とする患者の治療のための医薬の製造のための、開示された医薬組成物の使用を与える。

## 【0032】

本発明は、本明細書に開示される医薬組成物を製造する方法であって、標的化基及び薬物を、結合基を利用してコンジュゲートし担体-薬物化合物にすることを含む方法を与える。結合基は、アミン反応性結合基、マレイミド結合基、システイン結合基、アルデヒド結合基、又はチオール反応性結合基でよい。マレイミドは、所望の位置で部位特異的にペプチド又はタンパク質を作り出され得る、遊離のシステイン残基上などのスルフヒドリル基に結合するのに使用される有用な結合基である。治療化合物のN末端に部位特異的に結合するのに使用できる、アミン基又はアルデヒドを標的とするNHSなどの他の結合基は、当業者に周知である。他のさらに特殊化された結合基が企図され、当業者により替えられ得る。

30

## 【0033】

いくつかの方法において、標的化基は、ビタミンD、ビタミンDアナログ、ビタミンD関連代謝物、ビタミンD関連代謝物のアナログ、DBPに結合するペプチド、抗DBP抗体、抗DBP抗体誘導体、DBPに結合するヌクレオチドアプタマー、又はDBPに結合する小型の炭素系分子である。

40

## 【0034】

他の実施形態において、医薬組成物を製造する方法は、スカフォールド部分を標的化基又は薬物にコンジュゲートすることをさらに含む。スカフォールド部分は、ポリ(エチレングリコール)、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ(プロピレングリコール)、ペプチド、血清アルブミン、チオレドキシン、免疫グロブリン、アミノ酸、核酸、グリカン、反応性リンカーを含む修飾基、水溶性ポリマー、小型炭素鎖リンカー、又は追加の治療化合物でよい。

50

**【図面の簡単な説明】**

**【0035】**

【図1】図1は、薬物に結合した担体の全般的構造を示す概略図である。担体は、標的化基、スカフォールド、及び任意選択的に結合基を含む。

【図2】図2は、担体、ビタミンD<sub>3</sub>-PEG-マレイミド付加物の生成に利用された化学構造及び合成を示す反応スキームである。担体は、1)ビタミンDアナログ(標的化基)、2)PEGスカフォールド、及び3)マレイミド結合基をコンジュゲートして生成された。

【図3】図3は、FGF21-担体コンジュゲートのバイオアベイラビリティ及び薬物動態である。FGF21のみ(配列番号3)又はビタミンD<sub>3</sub>-PEG-マレイミド担体にコンジュゲートされたFGF21を、Sprague Dawleyラットに0.1mg/kgで皮下注射した。血漿試料を、二連でELISAによりFGF21濃度に関して分析し、1時点あたり3~5匹の動物から得た平均を、片対数プロットグラフにプロットした。  
10

【図4】図4は、グレリン-担体コンジュゲートの薬物動態である。グレリン(配列番号6)のみ又はビタミンD<sub>3</sub>-PEG-マレイミド担体にコンジュゲートされたグレリンを、Sprague Dawleyラットに0.1mg/kgで静脈内注射した。血漿試料を、二連でELISAによりグレリン濃度に関して分析し、1時点あたり3~5匹の動物から得た平均を、片対数プロットグラフにプロットした。

【図5】図5は、他の担体、ビタミンD<sub>3</sub>-PEG-NHS付加物の生成に利用された化学構造及び合成を示す反応スキームである。担体は、1)ビタミンDアナログ(標的化基)、2)PEGスカフォールド、及び3)NHS結合基をコンジュゲートして生成された。  
20

【図6】図6は、インフリキシマブ-担体コンジュゲートのバイオアベイラビリティ及び薬物動態である。インフリキシマブのみ又はビタミンD<sub>3</sub>-PEG-NHS担体にコンジュゲートされたインフリキシマブを、Sprague Dawleyラットに1mg/kgで皮下注射した。血漿試料を、インフリキシマブ特異的ELISAによりインフリキシマブの濃度に関して分析し、1時点あたり3匹の動物から得た平均を線形プロットグラフにプロットした。

**【発明を実施するための形態】**

**【0036】**

本発明は、治療化合物の効力、吸収、バイオアベイラビリティ、循環半減期、又は薬物動態的性質を向上させるために、治療用タンパク質、ペプチド、核酸、又は小分子に共有結合された、融合された、又は共に製剤された担体分子を与える。特定の実施形態において、担体は、標的化基、スカフォールド、及び結合基を含む。他の実施形態において、担体はスカフォールドを欠くが、それは、とりわけ、標的化基と治療化合物の間の「スペーサー」として作用する。  
30

**【0037】**

担体は、ヒト及び動物における使用に好適であるように設計される。担体は、担体に結合された、コンジュゲートされた、融合された、又は共に製剤された生物学的実体(biological entity)又は化学物質の薬物動態的性質を向上させる目的を果たす。これは、標的化基とビタミンD結合タンパク質(DBP)との相互作用により起こり、そのため投与の部位から循環している血漿に速く効果的に分子を積極的に輸送でき、それにより分解酵素への薬物の曝露が低減する。担体は、DBPに結合することにより、薬物の循環半減期も向上させるが、それにより、腎臓の濾過を防ぐことにより薬物の効力及び治療有効性を増加させる。担体を本明細書に記載される治療化合物にコンジュゲートする方法は当技術分野に公知である。例としては、本発明の結合基を使用するコンジュゲーションは、それぞれ引用によりその全体として本明細書に組み込まれる国際公開第93/012145号パンフレット(Attassi et al.)及び第7,803,777号(Defrees et al.)に記載の組成物及び方法を使用して実施できる。  
40  
50

## 【0038】

本発明の1つ以上の実施形態を記載し特許請求するにあたり、以下の専門用語が、以下に記載の定義に従って使用されるだろう。

## 【0039】

用語「吸收」は、薬物の血流への動きである。薬物は、ある投与経路により（例えば、経口、局所、若しくは経皮）、又は錠剤、カプセル剤、若しくは液剤などの特定の剤形で導入される必要がある。輸液、筋肉内注射、及び経腸栄養では、吸收に変動が少なく、バイオアベイラビリティが100%に近いことが多い。最も速い吸收の経路は吸入である。

## 【0040】

用語「拮抗剤」は、リガンドの場合1つ以上の受容体に結合し、又は受容体の場合に1つ以上のリガンドに結合することを含む、特定又は指定されたタンパク質の活性を、中和し、遮断し、阻害し、無効にし、低減し、干渉できる分子を意味する。拮抗剤には、抗体及びその抗原結合断片、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖類、オリゴ糖、核酸、生物有機分子、ペプチドミメティクス、薬理的薬剤（pharmaceutical agents）及びその代謝物、転写及び翻訳制御配列などがある。拮抗剤には、タンパク質、ホルモン、又は他の生物活性分子の小分子阻害剤もある。拮抗剤は、融合タンパク質、受容体分子、アンチセンス分子、アプタマー、リボザイム、又はタンパク質、ホルモン、若しくは他の生物活性分子に特異的に結合して標的へのその結合を封鎖する誘導体でもよい。

## 【0041】

「抗体」（Ab）及び「免疫グロブリン」（Ig）は、類似の構造的特徴を有する糖タンパク質を意味する。抗体は特定の抗原に対して結合特異性を示すが、免疫グロブリンは、抗体と、全般的に抗原特異性を欠く他の抗体様分子の両方を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えば、リンパ系により低レベルで産生され、骨髄腫により増加したレベルで産生される。

## 【0042】

「アプタマー」は、特定の標的に結合するように選択された核酸系化合物である。アプタマー系治療化合物の例は、引用により本明細書にその全体として組み込まれる国際公開第07/035922号パンフレットに見ることができる。

## 【0043】

用語「バイオアベイラビリティ」は、全身循環に到達する未変化の薬物の投与された投与量の分率であり、薬物の主要な薬物動態的性質の1つである。医薬が静脈内に投与される場合、そのバイオアベイラビリティは100%である。医薬が他の経路により（経口など）投与される場合、そのバイオアベイラビリティは一般的に低下するか（不完全な吸収及び初回通過代謝により）、又は患者により様々になり得る。バイオアベイラビリティは、非静脈内投与経路の用量を計算する場合に考慮される、薬物動態において重要なパラメーターである。

## 【0044】

「担体」は、治療化合物にコンジュゲートされ、融合され、結合され、又は共に製剤されて、薬物の吸収、半減期、バイオアベイラビリティ、薬物動態的性質、又は薬力学的性質を向上させることができる化合物である。それらは、標的化基、結合基、及び任意選択的にスカフォールド部分を含む。

## 【0045】

「有効量」は、必要な用量及び期間で、所望の治療的又は予防的な結果を得るのに効果的な治療化合物の量を意味する。治療化合物の「治療上有効な量」は、個人の病態、年齢、性別、及び体重、並びに抗体が個人に所望の反応を惹起する能力などの因子により変わり得る。治療上有効な量は、例えば、向上した生存率、より迅速な回復若しくは寛解、症状の改善若しくは解消、又は他の許容できるバイオマーカー若しくは代用マーカーにより測定できる。治療上有効な量は、治療化合物の有毒又は有害な作用より、治療上利益のある効果が上回るものもある。「予防上有効な量」は、必要な用量及び期間で、所望の予

10

20

30

40

50

防的な結果を得るのに効果的な治療化合物の量を意味する。必ずではないが典型的には、予防的な投与量は対象において疾病の前又は初期に利用されるので、予防上有効な量は治療上有効な量より少ないだろう。

#### 【0046】

「半減期」は、被験分子の量の半分がもはや検出されない経過時間の量を意味する、当技術分野に公知である科学用語である。インビボ半減期は、被験分子の半分が、ヒト又は動物の循環している血清又は組織にもはや検出されない経過時間を意味する。

#### 【0047】

「ホルモン」は、ある細胞（又は細胞の群）からシグナル伝達能力を有する他の細胞への生物学的又は化学的メッセンジャーである。本明細書に記載される通り、本発明に使用するホルモンは、ペプチド、ステロイド、フェロモン、インターロイキン、リンフォカイン、サイトカイン、又は当技術分野に公知である他のホルモンクラスのメンバーであり得る。10

#### 【0048】

「ホモログ」は、ヌクレオチド配列レベル、ペプチド配列レベル、機能的レベル、又は構造的レベルで基準分子に類似である生物活性分子である。ホモログは、基準配列と特定のパーセントの同一性を共有する配列誘導体を含み得る。そのため、一実施形態において、ホモログ配列又は誘導配列は、少なくとも70パーセントの配列同一性を共有する。好みしい実施形態において、ホモログ配列又は誘導配列は、少なくとも80又は85パーセントの配列同一性を共有する。より好みしい実施形態において、ホモログ配列又は誘導配列は、少なくとも86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99パーセントの配列同一性を共有する。ホモログ核酸配列又は誘導核酸配列は、ハイストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で基準核酸配列に結合したまでいる能力によっても定義できる。基準分子に構造的又は機能的類似性を有するホモログは、基準分子の化学的誘導体であり得る。構造的又は機能的なホモログ並びに誘導体を検出、発生、及びスクリーニングする方法は、当技術分野に公知である。20

#### 【0049】

「ハイブリダイゼーション」は、一般的には、相補鎖が環境中にある場合、その融解温度未満で、変性したDNAがリアニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列の間の望まれる相同性の程度が高いほど、利用可能な相対温度は高くなる。結果として、より高い相対温度は反応条件をよりストリンジェントにする傾向となり、より低い温度は、ストリンジェンシーを低くする傾向になることになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーのさらなる詳細及び説明には、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照されたい。30

#### 【0050】

「個人」、「対象」、又は「患者」は、脊椎動物である。特定の実施形態において、脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物には、靈長類（ヒト及びヒト以外の靈長類を含む）及びげっ歯類（例えば、マウス、ハムスター、モルモット、及びラット）があるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、哺乳動物はヒトである。「対照対象」は、個人、対象、又は患者に確認された疾病、機能不全、又は病態があると診断されていない健康な対象を意味する。対照対象には、疾病、機能不全、又は病態に関連する徴候又は症状が全くない。40

#### 【0051】

「医薬品」は、疾病、障害、又は病態の治療のために製造された活性薬物である。

#### 【0052】

「モルホリノ」は、引用により本明細書にその全体として組み込まれる米国特許第8,076,476号明細書に記載されている、ホスホロジアミデート結合を利用する、天然の核酸の非天然バリアントである合成分子である。50

## 【0053】

「核酸」は、細胞機能を支配し得る遺伝情報を保持する高分子の群、D N A、R N A、又はそのバリエントのいずれかである。核酸は、酵素様活性を持つことがあり（例えばリボザイム）、又は対象の遺伝子発現の阻害に使用されることもある（例えばR N A i）。本明細書に記載される本発明に使用される核酸は、一本鎖でも、二本鎖でも、直鎖でも、環状でもよい。本発明は、アプタマー、P N A、モルホリノ、又は核酸の他の非天然バリエントを含むがこれらに限定されない核酸バリエントの使用をさらに組み込む。例としては、本発明に有用な核酸は、引用によりその全体として本明細書に組み込まれる米国特許第8,076,476号明細書に記載されている。

## 【0054】

10

「患者の反応」又は「反応」は、非限定的に下記を含む、患者にとっての利益を示す任意のエンドポイントを使用して評価できる、(1)緩徐化及び完全な停止を含む、疾病的進行のある程度の阻害；(2)疾病エピソード及び／又は症状の数の低減；(3)隣接周辺臓器及び／又は組織への疾病細胞の浸潤の阻害（すなわち、低減、緩徐化、又は完全な停止）；(4)疾病的広がりの阻害（すなわち、低減、緩徐化、又は完全な停止）；(5)自己免疫状態の低下；(6)疾病に関連するバイオマーカーの発現の有利な変化；(7)疾病に関連する1つ以上の症状のある程度の緩和；(8)治療後の無病表示（disease-free presentation）の長さの増加；又は(9)治療後のある時点での死亡率低下。

## 【0055】

20

本明細書では、用語「ペプチド」は、2つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドである。用語ペプチドは、短鎖ペプチドも（例えば、2～14個のアミノ酸を含むペプチド）、中鎖ペプチド（15～50）も、長鎖ペプチド（例えば、タンパク質）も含む。用語ペプチド、中鎖ペプチド、及びタンパク質は本明細書では互換的に使用できる。本明細書では、用語「ペプチド」は、アミノ酸残基から構成されたポリマー、関連する天然の構造的バリエント、及びペプチド結合で結合した合成の非天然アナログ、関連する天然の構造的バリエント、及びその合成の非天然アナログを意味すると解釈される。合成ペプチドは、例えば、自動ペプチド合成機を使用して合成できる。ペプチドは、細胞、細菌、酵母、又は他の生物などの他の手段によっても合成できる。ペプチドは、遺伝子がコードした20個のアミノ酸以外のアミノ酸を含むことがある。ペプチドは、プロセシング及び他の翻訳後修飾などの天然のプロセスにより修飾されたものも、化学修飾技術により修飾されたものも含む。そのような修飾は、基本的な教科書及びより詳述されたモノグラフに詳細に記載されており、当業者に周知である。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、及びアミノ又はカルボキシル末端を含む、ペプチド内のどこにでも起こる。

## 【0056】

30

本明細書では、「薬学的に許容できる担体」又は「治療上有効な担体」は、水性又は非水性（固体）、例えばアルコール性又は油性、又はこれらの混合物であり、界面活性剤、軟化薬、潤滑剤、安定剤、染料、香料、保存剤、p H調整用の酸若しくは塩基、溶媒、乳化剤、ゲル化剤、保湿剤、安定剤、湿潤剤、時間放出剤（time release agent）、保水剤、又は特定の形態の医薬組成物に通常含まれる他の成分を含み得る。薬学的に許容できる担体は当技術分野に周知であり、例えば、水又は生理学的に緩衝された塩水などの水溶液、又は他の溶媒若しくはビヒクリ、例えばグリコール、グリセロール、及びオリーブ油又は注射用有機エステルなどの油類がある。薬学的に許容できる担体は、例えば、特定の阻害剤の吸收を安定化又は増加させるように働く生理的に許容できる化合物、例えば、グルコース、スクロース又はデキストランなどの炭水化物、アスコルビン酸又はグルタチオンなどの酸化防止剤、キレート剤、低分子量タンパク質、又は他の安定剤若しくは賦形剤を含み得る。

## 【0057】

40

用語「薬物動態」は、治療化合物の吸収、分布、代謝、及び排泄の時間経過であると現在定義されている。向上した「薬物動態的性質」は、特定の治療化合物に望まれる1つ以

50

上の薬物動態的性質を向上させることと定義される。例には、代謝又は分泌による排出を低減すること、薬物吸収を増加させること、半減期を延ばすこと、及び／又はバイオアベイラビリティを増加させることがあるが、これらに限定されない。

#### 【0058】

「PNA」は、DNA又はRNAに類似の化学構造を持つペプチド核酸を意味する。ペプチド結合は、ヌクレオチド又はヌクレオシドを結合するために利用される。

#### 【0059】

「スカフォールド」は、他の分子が共有結合若しくは非共有結合で自身に結合するか、又は製剤される分子である。本発明のスカフォールドは、標的化基と薬物の間の「スペーサー」又は「リンカー」として作用し得る。スカフォールドは、反応性リンカーを含むこともあり、薬物に追加的に有益な治療性を有することもある。そのため、本発明のスカフォールドは、例えば、PEG、血清アルブミン、チオレドキシン、免疫グロブリン、反応性リンカーを含む修飾基、水溶性ポリマー、又は治療化合物のことがある。10

#### 【0060】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジエンシー」は、当業者により容易に決定可能であり、プローブの長さ、洗浄温度、及び塩の濃度に依存する経験的計算である。一般に、プローブが長いほど適切なアニーリングに高温が必要であり、プローブが短いほど低温が必要である。

#### 【0061】

本明細書に定義される「ストリンジエントな条件」又は「ハイストリンジエンシー条件」は、以下により定義され得る：(1)洗浄に、低イオン強度及び高温を利用するもの、例えば、0.015Mの塩化ナトリウム／0.0015Mのクエン酸ナトリウム／0.1%ドデシル硫酸ナトリウム；(2)ハイブリダイゼーションの間に、ホルムアミドなどの変性剤を利用するもの、例えば、42で、50%（v/v）ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン／0.1%Ficoll／0.1%ポリビニルピロリドン／50mMのリン酸ナトリウム緩衝剤（pH 6.5）と、750mMの塩化ナトリウム、75mMのクエン酸ナトリウム；又は(3)42での、50%ホルムアミド、5×SSC（0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH 6.8）、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト溶液、超音波処理されたサケ精子DNA（50μl/m1）、0.1%SDS、及び10%硫酸デキストランを利用する溶液中の一晩のハイブリダイゼーション、0.2×SSC（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）中42での10分間の洗浄、それに続いて、55のEDTAを含む0.1×SSCからなる10分間のハイ・ストリンジエンシー洗浄。2030

#### 【0062】

本明細書に開示される「治療化合物」は、対象に投与されて疾病若しくは機能不全を治療するか、又は他の方法で個人の健康に影響を与える小分子、化学物質、核酸、核酸誘導体、ペプチド、ペプチド誘導体、天然のタンパク質、非天然のタンパク質、糖タンパク質、及びステロイドを意味する。治療化合物の非限定的な例には、酵素、ホルモン、サイトカイン、抗体又は抗体断片、抗体誘導体などのポリペプチド、代謝機能に影響する薬物、並びに、鎮痛剤、解熱剤、抗炎症剤、抗生物質、抗ウイルス化合物、抗真菌化合物、心臓血管薬、腎機能、電解質代謝に影響する薬物、中枢神経系に作用する薬物、化学療法化合物、受容体作動剤、及び受容体拮抗剤などの有機化合物がある。治療化合物には、例えば、血清アルブミン、免疫グロブリン、アポリポタンパク質、若しくはトランスフェリンなどの血漿タンパク質、又は赤血球若しくはリンパ球の表面に存在するタンパク質があるがこれらに限定されない血清因子などの細胞外分子がある。そのため、例示的な治療化合物は、小分子、化学物質、核酸、核酸誘導体、ペプチド、ペプチド誘導体、天然のタンパク質、非天然のタンパク質、ペプチド核酸（PNA）、ステープルドペプチド、ホスホロジアミデートモルホリノ、アンチセンス薬、RNA系サイレンシング薬、アプタマー、糖タンパク質、酵素、ホルモン、サイトカイン、インターフェロン、成長因子、血液凝固因子、抗体、抗体断片、抗体誘導体、毒素結合抗体、代謝エフェクター、鎮痛剤、解熱剤、抗4050

炎症剤、抗生物質、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、筋骨格の薬、心臓血管の薬、腎臓の薬、肺の薬、消化器疾患の薬、血液作用薬、泌尿器の薬、代謝作用薬、肝臓の薬、神経作用薬、抗糖尿病薬、抗癌剤、胃の病気を治療する薬、結腸の病気を治療する薬、皮膚病を治療する薬、及びリンパの病気を治療する薬を含む。本明細書での用語「治療化合物」は、基本的に、用語「薬物」又は「治療剤」と同じ意味を有する。

#### 【0063】

本明細書では、「治療」は、治療される個人又は細胞の自然の経過を変えようとする臨床介入を意味し、臨床病理の過程の前又はその間に実施できる。治療の望ましい効果には、疾病又はその状態若しくは症状の発生又は再発の予防、疾病的状態又は症状の緩和、疾病的直接又は間接の病理的な結果の減少、疾病進行の速度の低減、疾病状態の寛解又は軽減、軽快又は改善された予後の達成がある。いくつかの実施形態において、本発明の方法及び組成物は、疾病又は疾患の発生を遅延する試みに有用である。10

#### 【0064】

「ビタミン」は、当技術分野における認識された用語であり、体の正常な成長及び活動のために微量で欠くことのできない脂溶性又は水溶性有機物質であると定義され、植物性又は動物性の食品又はサプリメントから自然に得られる。

#### 【0065】

「ビタミンD」は、一群の脂溶性セコステロイドである。いくつかの形態（ビタマー）のビタミンDが存在する。主要な2つの形態は、ビタミンD<sub>2</sub>すなわちエルゴカルシフェロール及びビタミンD<sub>3</sub>すなわちコレカルシフェロールである。下付き文字のないビタミンDは、D<sub>2</sub>とD<sub>3</sub>のいずれか又は両方を意味する。ヒトでは、ビタミンDは、コレカルシフェロール（ビタミンD<sub>3</sub>）又はエルゴカルシフェロール（ビタミンD<sub>2</sub>）として摂取される。さらに、ヒトは、日光の曝露が充分であると、コレステロールからビタミンDを合成できる。20

#### 【0066】

「ビタミンD結合タンパク質」又は「DBP」は、いろいろな活性の中でも、ビタミンD及びそのアナログに結合して、ビタミンがその活性型に修飾される肝臓及び腎臓中の部位に輸送できる、全哺乳動物に見られる自然に循環している血清タンパク質であり、それは、ビタミンDをその種々の形態で、ヒトで平均30日間循環した状態に保つ。DBPタンパク質配列は、配列番号7に開示されており、DBPタンパク質配列をコードする例示的な核酸配列は、配列番号8に開示されている。DBPは、複数の天然のアイソフォームを有する。例示的なアイソフォームは、公共の配列データベースで利用できる（例えば、受託番号NM\_001204306.1、NM\_001204307.1、NM\_000583.3、BC036003.1、M12654.1、X03178.1、AK223458、P\_001191235.1、NP\_000574.2、AAA61704.1、AAD13872.1、NP\_001191236.1、AAA19662.2、I54269、P02774.1、EAX05645.1、AAH57228.1、AAA52173.1、AAB29423.1、AAD14249.1、AAD14250.1、及びBAD97178.1）。30

#### 【0067】

本発明は、実質的にDBP活性を保持する保存的又は非保存的アミノ酸置換を含むDBPバリエント及びホモログの使用を企図する。DBP結合分子又は機能的DBPバリエントは、公知の技術を利用して特定でき、公知の方法を利用して特性化できる（Bouillon et al., J Bone Miner Res. 6(10):1051-7 (1991), Teegarden et al., Anal. Biochemistry 199(2):293-299 (1991), McLeod et al., J Biol Chem. 264(2):1260-7 (1989), Revelle et al., J. Steroid Biochem. 22:469-474 (1985)）。上記引用文献は、引用によりその全体として本明細書に組み込まれる。40

#### 【0068】

用語「水溶性」は、水にいくらかの検出可能な程度の溶解度を有する部分を意味する。水溶性を検出及び／又は定量化する方法は、当技術分野に周知である。例示的な水溶性ポリマーには、ペプチド、糖類、ポリ(エーテル)、ポリ(アミン)、ポリ(カルボン酸)などがある。

#### 【0069】

本発明は、タンパク質、ペプチド、他の生物製剤、核酸、及び小分子薬物の投与のための効果的な経路を与える。本発明は、経皮、経口、非経口、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、関節滑液囊内、胸骨内、髄腔内、病変内、頭蓋内注射、注入、吸入、眼、局所、直腸、鼻腔内、頸側、舌下、膣内、又は埋め込みリザーバー方式による、薬物投与の効果的な経路をさらに与える。

10

#### 【0070】

さらに、本明細書に記載される本発明は、治療化合物に、標的結合活性、すなわち薬力学(PD)を維持する組成物及び方法を与える。それは、本明細書に記載される治療化合物の薬物動態(PK)プロファイルを向上させる組成物及び方法もさらに与える。本発明は、同じ投与経路又は異なる投与経路を利用するが本明細書に記載される本発明のない薬物の薬物吸収プロファイルと比べて、向上した薬物吸収プロファイルのための組成物及び方法をさらに与える。本発明は、同じ投与経路又は異なる投与経路を利用するが本明細書に記載される本発明のない薬物の薬物バイオアベイラビリティプロファイルと比べて、向上した薬物バイオアベイラビリティプロファイルのための組成物及び方法をさらに与える。本発明は、同じ投与経路又は異なる投与経路を利用するが本明細書に記載される本発明のない薬物の薬物半減期プロファイルと比べて、向上した薬物半減期プロファイルのための組成物及び方法をさらに与える。

20

#### 【0071】

本発明は、本明細書に記載される本発明のない薬物と比べて、より経済的で患者に好都合な薬物投与の代替経路も与える。

#### 【0072】

本発明は、薬物の吸収、半減期、バイオアベイラビリティ、又は薬物動態的性質を向上させるために、活性な治療化合物にコンジュゲートされ、融合され、又は共に製剤され得る担体として作用する分子を使用するための組成物及び方法を提供する。担体は、体の天然のDBPに結合する性質を有する。本発明の一態様は、天然のDBPの使用により、担体-薬物複合体を、投与部位から循環する血清に輸送することを与える。本発明の他の態様は、天然のDBPの使用により、薬物を長時間循環中に保持することである。これにより、体からのその排泄を妨げ、体内の治療化合物の曝露を増加させて、より長く続く治療効果を得ることができる。本発明の他の態様において、コンジュゲートされず、融合されず、製剤されていない薬物と比べて、担体にコンジュゲートされ、融合され、又は共に製剤されている場合、要求される薬物の投与量がより低い。本発明の他の態様は、治療化合物に結合している場合、はるかに大きいPEG化合物の機能に代わって担体を使用することである。これにより、コンジュゲートされ、融合され、又は製剤された化合物の薬物動態プロファイル及び有効性を向上させることができる。

30

#### 【0073】

本発明は、好ましくは1つ以上の部分又は構成要素から構成される担体分子を与える。一実施形態において、担体は、標的化基及び、標的化基を治療化合物に結合するための結合基を含む。他の実施形態において、担体は、標的化基及び治療化合物に結合したスカフオールド部分を含む。標的化基は、ビタミンD、ビタミンDアナログ、ビタミンD関連代謝物、ビタミンD関連代謝物アナログ、又はビタミンD結合タンパク質(DBP)に結合でき、若しくは相互作用できる他の分子である。一実施形態において、標的化基は、抗体又は抗体誘導体、DBP又はその断片に結合するように設計されたペプチド、DBP又はその断片に対して選択されたファージディスプレイ又は他のペプチドライブラリーから誘導されたペプチド、DBPに結合するスクレオチドアプタマー、DBPに結合するように設計された、又はDBP若しくはその断片に対して選択された化合物ライブラリーから誘

40

50

導された小分子である。

【0074】

本発明の治療化合物担体コンジュゲートは、典型的には、個別に治療化合物に結合している約1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個の標的化基を有する。一実施形態において、本発明の担体コンジュゲートは、個別に治療化合物に結合している約4個の標的化基、又は個別に治療化合物に結合している約3個の標的化基、又は個別に治療化合物に結合している約2個の標的化基、又は治療化合物に結合している約1個の標的化基を含むだろう。治療化合物に結合している標的化基のそれぞれの構造は、同じでも異なっていてもよい。好ましい実施形態において、1つ以上の標的化基は、治療用タンパク質のN末端で治療化合物に安定に結合している。他の好ましい実施形態において、1つ以上の標的化基は、治療用タンパク質のC末端で治療用タンパク質に安定に結合している。他の好ましい実施形態において、1つ以上の標的化基は、治療用タンパク質の他の部位に安定に結合していることがある。例えば、治療化合物担体コンジュゲートは、N末端に結合した標的化基及び追加的にリジン残基に結合した標的化基を含み得る。他の実施形態において、治療化合物担体コンジュゲートは、グリコシリ化部位の一部としての糖残基などの修飾により、又はペプチドのアシル化部位上で治療用タンパク質に結合した標的化基、又はリン酸化部位若しくは当業者に周知の他の天然若しくは非天然の修飾に結合した標的化基を有する。上述の部位の組み合わせを利用する結合部位も企図される。本発明のある好ましい実施形態は、治療化合物のある特異的な部位で治療化合物に結合している標的化基を含む。他の好ましい実施形態において、タンパク質上の結合部位は、システインでも、リジンでも、N末端でも、C末端でもよい。10

【0075】

他の実施形態において、スカフォールドは、薬学的に許容できる担体である。好ましい実施形態において、スカフォールドは、ポリ(エチレングリコール)、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ(プロピレングリコール)、ペプチド、血清アルブミン、チオレドキシン、免疫グロブリン、アミノ酸、核酸、グリカン、反応性リンカーを含む修飾基、水溶性ポリマー、小型炭素鎖リンカー、又は追加の治療部分である。20

【0076】

一実施形態において、水溶性スカフォールド部分は、水に対していくらかの検出可能な程度の溶解度を有する。水溶性を検出及び/又は定量化する方法は、当技術分野に周知である。例示的な水溶性ポリマーには、ペプチド、糖類、ポリ(エーテル)、ポリ(アミン)、ポリ(カルボン酸)などがある。30

【0077】

ペプチドは、混合された配列を有しても、単一のアミノ酸、例えば、ポリ(リジン)で構成されていてもよい。例示的な多糖類はポリ(シアル酸)である。例示的なポリ(エーテル)はポリ(エチレングリコール)、例えば、m-P E Gである。ポリ(エチレンイミン)は例示的なポリアミンであり、ポリ(アクリル)酸は代表的なポリ(カルボン酸)である。水溶性ポリマーのポリマー骨格は、ポリ(エチレングリコール)(すなわちP E G)でよい。しかし、他の関連ポリマーも本発明の実施での使用に好適であり、用語P E G又はポリ(エチレングリコール)の使用がこの点で包括的であり、排他的でないものとすることを理解されたい。用語P E Gは、その形態のいずれにあるポリ(エチレングリコール)も含み、アルコキシP E G、二官能性P E G、マルチアームP E G、フォーク状P E G、分岐鎖P E G、ペンダントP E G(すなわち、1つ以上の官能基がポリマー骨格に懸垂しているP E G又は関連ポリマー)、又は中に分解性結合を有するP E Gを含む。ポリマー骨格は、直鎖でも分岐鎖でもよい。40

【0078】

分岐鎖ポリマー骨格は、一般的に当技術分野に公知である。典型的には、分岐鎖ポリマーは、中心の分岐コア部分及び中心分岐コアに結合した複数の直鎖ポリマー鎖を有する。P E Gは、通常、エチレンオキシドを種々のポリオールに、例えばグリセロール、ペンタエリスリトール、及びソルビトールに付加して調製できる分岐鎖形態で使用されている。50

中心の分岐部分は、リジンなどのいくつかのアミノ酸からも誘導できる。分岐鎖ポリ(エチレンギリコール)は、R(-PEG-OH)<sub>m</sub>として一般形態で表すことができるが、Rはグリセロール又はペントエリスリトールなどのコア部分を表し、mはアームの数を表す。引用により本明細書にその全体として組み込まれる米国特許第5,932,462号明細書に記載されるものなどのマルチアームPEG分子もポリマー骨格として使用できる。

#### 【0079】

多くの他のポリマーも本発明に好適である。非ペプチド性で水溶性であり、2から約300の末端を持つポリマー骨格は、本発明に特に有用である。好適なポリマーの例には、ポリ(プロピレングリコール)(「PPG」)などの他のポリ(アルキレングリコール)、エチレンギリコールとプロピレングリコールなどのコポリマー、ポリ(オキシエチル化ポリオール)、ポリ(オレフィン性アルコール)、ポリビニルピロリドン)、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ(ヒドロキシプロピルメタクリルアミド)、ポリ(-ヒドロキシ酸)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、引用により本明細書にその全体として組み込まれる米国特許第5,629,384号明細書に記載のものなどのポリ(N-アクリロイルモルホリン)、並びにこれらのコポリマー、ターポリマー、及び混合物があるが、これらに限定されない。ポリマー骨格の各鎖の分子量はさまざまになり得るが、典型的には約100Daから約100,000Daの範囲である。

#### 【0080】

他の実施形態において、スカフォールド部分は、ペプチド、血清アルブミン、チオレドキシン、免疫グロブリン、アミノ酸、核酸、グリカン、反応性リンカーを含む修飾基、水溶性ポリマー、小型炭素鎖リンカー、又は追加の治療化合物でよい。一実施形態において、スカフォールド部分はヒト及び動物にとって非毒性である。他の実施形態において、スカフォールドは内在性の血清タンパク質である。他の実施形態において、スカフォールド部分は水溶性ポリマーである。他の実施形態において、スカフォールドは非天然ポリマーである。他の実施形態において、スカフォールドは、追加の部分(例えば、PEG、ポリ(プロピレングリコール)、ポリ(アスパルテート)、生体分子、治療用部分、又は診断用部分)への共有結合により修飾されている天然の部分である。

#### 【0081】

PEGなどの親水性ポリマーのコンジュゲーションは当技術分野に公知である。その最も通常の形態では、PEGは、各末端がヒドロキシル基である直鎖ポリマーである: HO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O---(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH、式中、nは、典型的には、約3から約4000の範囲である。好ましい実施形態において、PEGは、基本的に単分散である分子量分布を有する。他の好ましい実施形態において、PEGは直鎖ポリマーである。他の好ましい実施形態において、PEGは分岐ポリマーである。

#### 【0082】

多くの末端官能化誘導体又は分岐誘導体並びに種々のサイズが当技術分野に公知であり、市販されている。例としては、PEG又はPEOのコンジュゲーションは、本明細書に記載並びにそれぞれ引用により本明細書にその全体として組み込まれる米国特許第7,803,777号明細書(Defrees et al.)及び同第4,179,337号明細書(Davis et al.)に記載の組成物及び方法を利用して実施できる。

#### 【0083】

いくつかの実施形態において、小さめの治療化合物は小さめのスカフォールド部分と組み合わされ、大きめの治療化合物は大きめのスカフォールド部分と組み合わされる。しかし、小さめの治療化合物を大きめのスカフォールド部分と組み合わせることができ、逆も同様であることが企図される。小さめの治療化合物は、1Daから10kDaの分子量を持つものと定義される。大きめの治療化合物は、10kDaから1000kDaの分子量を持つものと定義される。

#### 【0084】

10

20

30

40

50

本発明のスカフォールドは、例えば、100ダルトン(Da.)、500Da.、1000Da.、2000Da.、5000Da.、10,000Da.、15,000Da.、20,000Da.、30,000Da.、40,000Da.又は60,000Da.の分子量を有し得る。本発明の一実施形態において、「小さい」スカフォールド部分は、約100Da.から20,000Da.であり得る。他の実施形態において、「大きい」スカフォールド部分は、約20,000Da.を超える約200,000Da.になり得る。好ましい実施形態において、スカフォールド部分は、約100Da.から200,000Da.である。より好ましい実施形態において、スカフォールド部分は、約100Da.から20,000Da.、200Da.から15,000Da.、300Da.から10,000Da.、400Da.から9,000Da.、500Da.から5,000Da.、600Da.から2,000Da.、1000Da.から200,000Da.、20,000Da.から200,000Da.、5000Da.から100,000Da.、10,000Da.から80,000Da.、20,000Da.から60,000Da.、又は20,000Da.から40,000Da.である。

#### 【0085】

担体分子の他の構成要素は、好ましくは、スカフォールド又は担体に薬物を共有結合するのに使用される結合基を含む。本発明の結合基には、アミン反応性基、チオール反応性基、マレイミド基、チオール基、アルデヒド基、NHS-エステル基、ハロアセチル基、ヨードアセチル基、プロモアセチル基、SMCC基、スルホSMCC基、カルボジイミド基、及びNHS-マレイミドなどの二官能性架橋剤、これらの組み合わせ、又は当業者に周知である他の結合基がある。本発明の結合基は、チオール結合、アミド結合、オキシム結合、ヒドラゾン結合、チアゾリジノン結合を促進することができ、クリックケミストリーとも呼ばれる環化付加反応を利用して担体を治療化合物に結合することもできる。他の実施形態において、組成物は、好ましくは、スカフォールド分子の結合基に結合した1つ以上の治療化合物の組み合わせを含む。

#### 【0086】

NHS基は、結合の部位で操作する必要なく、天然のペプチド及びタンパク質にカップリングするのに有用であると、当業者に公知である。NHS基は、リジン残基などのアミン基を有するアミノ酸を含むほとんどのタンパク質及びペプチドへの結合を可能にする。タンパク質構造及び反応時間が、結合部位及び治療化合物にコンジュゲートされる担体分子の数に影響を与えるので、NHS基を利用すると担体コンジュゲーションの部位に柔軟性ができる。例としては、NHS-担体と治療化合物のモル比を制御することにより、当業者は、治療化合物に結合する担体分子の数をいくらか制御することができ、そのため、望まれる場合、2つ以上の担体が、ある治療化合物にコンジュゲートするのが可能となる。

#### 【0087】

治療化合物への担体のコンジュゲーションは、分子の溶液を、特定のモル比で、適合性のある溶液、緩衝液、又は溶媒を使用して混合することにより達成される。例えば、担体と治療化合物の1:1、2:1、4:1、5:1、10:1、20:1、25:1、50:1、100:1、1000:1、又は1:2、1:4、1:5、1:10、1:20、1:25、1:50、1:100、1:1000のモル比を利用できる。特定の実施形態において、担体と治療化合物の1:1、2:1、4:1、5:1、10:1、20:1、25:1又は1:2、1:4、1:5、1:10、1:20、1:25、1:50のモル比を利用できる。好ましい実施形態において、担体と治療化合物の1:1、2:1、4:1、5:1、10:1又は1:2、1:4、1:5、1:10のモル比を利用できる。比率を変えれば、治療化合物に結合する個別の担体の数を変えることができ、結合の特定の部位を選択するのを助けることができる。担体の結合は、pH、緩衝剤、塩、及び温度にも依存し、他のパラメーターの中でもこれらのパラメーターを変えると、結合部位、結合する担体の数、及び反応のスピードに影響を与えることができる。例えば、反応

に pH 6 以下の pH を選択すると、担体のアルデヒドバージョンが選択的に治療用タンパク質又はペプチドの N 末端にコンジュゲートするのを助けることができる。

#### 【0088】

特定の実施形態において、本発明は、

B が、ビタミン D、ビタミン D アナログ、ビタミン D 関連代謝物、ビタミン D 関連代謝物のアナログ、DBP に結合するペプチド、抗 DBP 抗体、抗 DBP 抗体誘導体、DBP に結合するスクレオチドアブタマー、又は DBP に結合する小型の炭素系分子から選択される標的化基であり；

S が、ポリ(エチレンギリコール)、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ(プロピレンギリコール)、ペプチド、血清アルブミン、チオレドキシン、免疫グロブリン、アミノ酸、核酸、グリカン、反応性リンカーを含む修飾基、ポリ乳酸、水溶性ポリマー、小型炭素鎖リンカー、又は追加の治療化合物を含むスカフォールド部分であり；  
10

C が、アミン反応性基、チオール反応性基、マレイミド基、チオール基、ジスルフィド基、アルデヒド基、NHS - エステル基、4 - ニトロフェニルエステル、アシルイミダゾール、ハロアセチル基、ヨードアセチル基、プロモアセチル基、SMCC 基、スルホ SMCC 基、カルボジイミド基、及び NHS - マレイミドなどの二官能性架橋剤、又はこれらの組み合わせであり；

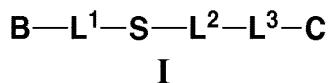
L<sup>1</sup> 及び L<sup>2</sup> が、- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> -、- C(O)NH -、- HNC(O) -、- C(O)  
O -、- OC(O) -、- O -、- S - S -、- S -、- S(O) -、- S(O)<sub>2</sub> -、  
及び - NH - から独立に選択されるリンカーであり；  
20

L<sup>3</sup> が - (CH<sub>2</sub>)<sub>0</sub> - であり；

n が 0 ~ 3 の整数であり；且つ

o が 0 ~ 3 の整数である、式 I のものを含む担体を与える。

#### 【化8】



#### 【0089】

好ましい実施形態において、本発明は、

B が、ビタミン D、ビタミン D アナログ、ビタミン D 関連代謝物、ビタミン D 関連代謝物のアナログ、又は DBP に結合する小型の炭素系分子から選択される標的化基であり；  
30

S が、ポリ(エチレンギリコール)、ポリリジン、ポリ(プロピレンギリコール)、ペプチド、血清アルブミン、アミノ酸、核酸、グリカン、ポリ乳酸、水溶性ポリマー、又は小型炭素鎖リンカーを含むスカフォールド部分であり；

C が、マレイミド基、チオール基、ジスルフィド基、アルデヒド基、NHS - エステル基、ヨードアセチル基、又はプロモアセチル基であり；

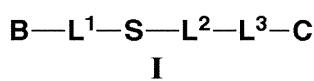
L<sup>1</sup> 及び L<sup>2</sup> が、- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> -、- C(O)NH -、- HNC(O) -、- C(O)  
O -、- OC(O) -、- O -、- S -、及び - NH - から独立に選択されるリンカーであり；

L<sup>3</sup> が - (CH<sub>2</sub>)<sub>0</sub> - であり；  
40

n が 0 ~ 3 の整数であり；且つ

o が 0 ~ 3 の整数である、式 I のものを含む担体を与える。

#### 【化9】



#### 【0090】

より好ましい実施形態において、本発明は、

B が、ビタミン D、ビタミン D アナログ、又はビタミン D 関連代謝物から選択される標的化基であり；  
50

Sが、ポリ(エチレングリコール)、ポリリジン、又はポリ(プロピレングリコール)を含むスカフォールド部分であり；

Cが、マレイミド基、ジスルフィド基、アルデヒド基、NHS-エステル基、又はヨードアセチル基であり；

L<sup>1</sup>及びL<sup>2</sup>が、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-、-C(O)NH-、-HNC(O)-、-C(O)O-、及び-OOC(O)-から独立に選択されるリンカーであり；

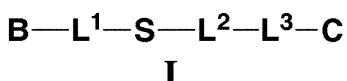
L<sup>3</sup>が-(CH<sub>2</sub>)<sub>0</sub>-であり；

nが0～3の整数であり；且つ

oが0～3の整数である、式Iのものを含む担体を与える。

【化10】

10



【0091】

最も好ましい実施形態において、本発明は、

Bが、ビタミンD、ビタミンDアナログ、又はビタミンD関連代謝物から選択される標的化基であり；

Sが、ポリ(エチレングリコール)、又はポリ(プロピレングリコール)を含むスカフォールド部分であり；且つ

20

Cが、マレイミド基、ジスルフィド基、アルデヒド基、NHS-エステル基、又はヨードアセチル基であり；

L<sup>2</sup>が-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-であり；

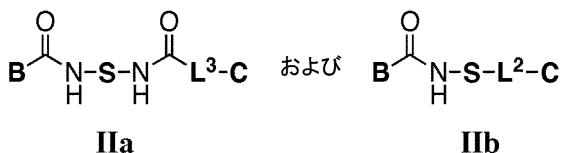
L<sup>3</sup>が-(CH<sub>2</sub>)<sub>0</sub>-であり；

nが1であり；且つ

oが2である、式IIa及びIIbのものを含む担体を与える。

【化11】

30

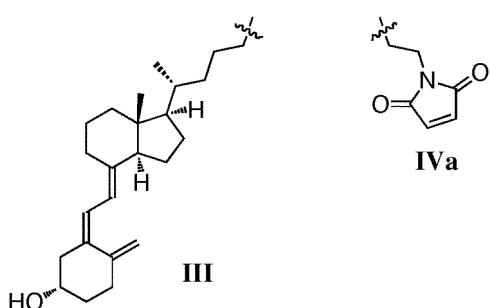


【0092】

式IIaの特定の最も好ましい実施形態において、Bは式IIIにより表され、Sはポリ(エチレングリコール)であり、L<sup>3</sup>-Cは式IVaにより表される。

【化12】

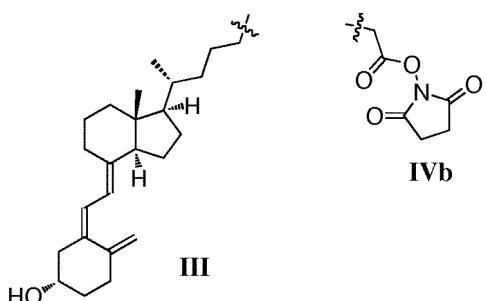
40



【0093】

式IIbの特定の最も好ましい実施形態において、Bは式IIIにより表され、Sはポリ(エチレングリコール)であり、L<sup>2</sup>-Cは式IVbにより表される。

## 【化13】



10

## 【0094】

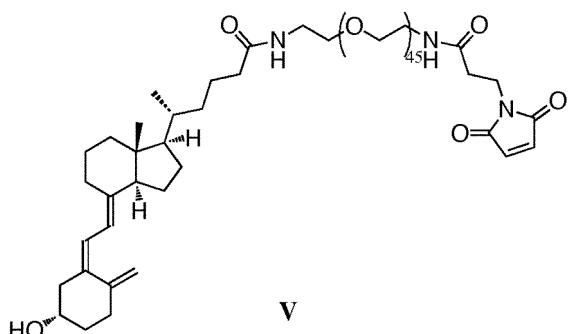
特定の最も好ましい実施形態において、Sは、約100Da.から200,000Da.である。他の最も好ましい実施形態において、スカフォールド部分は、約100Da.から20,000Da.、200Da.から15,000Da.、300Da.から10,000Da.、400Da.から9,000Da.、500Da.から5,000Da.、600Da.から2,000Da.、1000Da.から200,000Da.、5000Da.から100,000Da.、10,000Da.から80,000Da.、20,000Da.から60,000Da.、又は20,000Da.から40,000Da.である。

20

## 【0095】

具体的な実施形態において、本発明は、式Vにより表される担体を与える。

## 【化14】

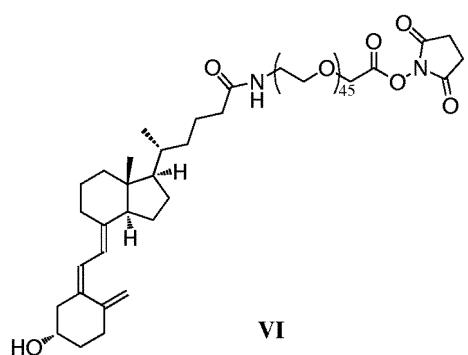


30

## 【0096】

他の具体的な実施形態において、本発明は、式VIにより表される担体を与える。

## 【化15】



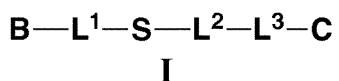
40

## 【0097】

特定の実施形態において、本発明は、式Iの担体を製造する方法であって、

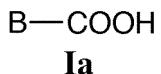
50

【化16】



式 I a の化合物：

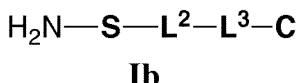
【化17】



10

を、式 I b の化合物：

【化18】



20

と、アミドカップリング剤の存在下で反応させる工程を含み、式中、B、S、C、及びL<sup>2</sup>が先に定義された通りであり、L<sup>1</sup>が-C(=O)NH-である方法を与える。

【0098】

当業者は、式 I b の化合物を、遊離塩基としても、好適な塩形態としても使用できることを認識するだろう。好適な塩形態には、TFA、HCl、HBr、MsOH、TfOH、及びAcOHがあるが、これらに限定されない。

【0099】

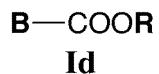
任意の好適なアミドカップリング剤を使用して、式 I の化合物を形成できる。好適なアミドカップリング剤には、2-クロロメチルピリジニウムヨージド、BOP、PyBOP、HBTU、HATU、DCC、EDCI、TBTU、及びT3Pがあるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は単独で使用される。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は、HOBT又はDMAPなどの共試薬 (co-reagent)と共に使用される。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は、HOBT又はDMAPなどの共試薬と、トリエチルアミン又はジイソプロピルエチルアミンなどの塩基と共に使用される。当業者は、HOBT又はDMAP以外の共試薬を使用できることを認識するだろう。さらに、当業者は、トリエチルアミン又はジイソプロピルエチルアミン以外の塩基を使用できることを認識するだろう。

30

【0100】

特定の実施形態において、式 I a のカルボン酸成分は、式 I d のエステルを、加水分解剤により処理して製造される：

【化19】



40

式中、Bは先に定義された通りであり、Rは、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>の分岐鎖又は非分岐鎖のアルキ

50

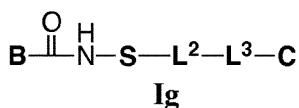
ル基である。

【0101】

任意の好適な加水分解剤を使用して、式Iaの化合物を式Idの化合物から調製できる。

【0102】

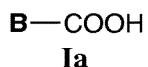
他の特定の実施形態において、本発明は、式Igの担体を製造する方法であって、  
【化20】



10

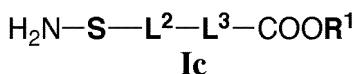
式Iaの化合物：

【化21】



を、式Icの化合物：

【化22】



20

と、アミドカップリング剤の存在下で反応させて式Ieの化合物を形成する工程；  
式Ieのエステルを加水分解して式Ifのカルボン酸にする工程；及び

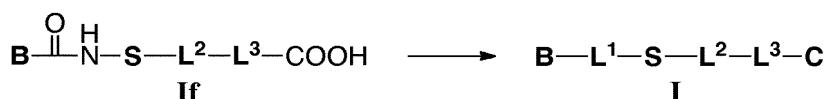
【化23】



30

式Ifのカルボン酸を式Iの活性なエステルに変換する工程；

【化24】



40

を含み、式中、B、S、C、R<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、L<sup>3</sup>、n、及びoが先に定義された通りであり、L<sup>1</sup>が-C(=O)NH-である方法を与える。

【0103】

当業者は、式Icの化合物が、遊離塩基としても、好適な塩の形態としても使用できることを認識するだろう。好適な塩の形態には、TFA、HCl、HBr、MsOH、TfOH、及びAcOHがあるが、これらに限定されない。

【0104】

任意の好適なアミドカップリング剤を使用して、式Ieの化合物を形成できる。好適なアミドカップリング剤には、2-クロロメチルピリジニウムヨージド、BOP、PyBO-P、HBTU、HATU、DCC、EDCI、TBTU、及びT3Pがあるが、これらに

50

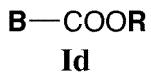
限定されない。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は単独で使用される。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は、HOB T又はD M A Pなどの共試薬と共に使用される。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は、トリエチルアミン又はジイソプロピルエチルアミンなどの塩基と共に使用される。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は、HOB T又はD M A Pなどの共試薬と、トリエチルアミン又はジイソプロピルエチルアミンなどの塩基の両方と共に使用される。当業者は、HOB T又はD M A P以外の共試薬を使用できることを認識するだろう。さらに、当業者は、トリエチルアミン又はジイソプロピルエチルアミン以外の塩基を使用できることを認識するだろう。

## 【0105】

10

特定の実施形態において、式Iaのカルボン酸成分は、式Idのエステルを加水分解剤により処理して製造される：

## 【化25】



式中、Bは先に定義された通りであり、Rは、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>の分岐鎖又は非分岐鎖のアルキル基である。

20

## 【0106】

任意の好適な加水分解剤を使用して、式Iaの化合物を式Idの化合物から調製できる。好適な加水分解剤には、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、及び水酸化カリウムがあるが、これらに限定されない。

## 【0107】

任意の好適な加水分解剤を使用して、式Ifの化合物を式Ieの化合物から調製できる。好適な加水分解剤には、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、及び水酸化カリウムがあるが、これらに限定されない。

## 【0108】

任意の好適な脱離基を、好適なカップリング試薬の存在下で式Ifのカルボン酸とカップリングして、式Iの活性エステルを形成できる。好適な脱離基には、イミダゾール、HOB T、NHS、及び4-ニトロフェノールがあるが、これらに限定されない。好適なカップリング試薬には、2-クロロメチルピリジニウムヨージド、BOP、PyBOP、HTU、HATU、DCC、EDCI、TBTU、及びT3Pがあるが、これらに限定されない。

30

## 【0109】

いくつかの実施形態において、式Iの活性エステルは、好適な脱離基とカップリング試薬の組み合わせを使用して、式Ifのカルボン酸から形成される。

## 【0110】

いくつかの実施形態において、式Iの活性エステルは、脱離基を生成しカップリング反応も起こす单一の試薬を使用して、式Ifのカルボン酸から形成される。そのような試薬には、1,1'-カルボニルジイミダゾール、炭酸N,N'-ジスクシンイミジル、トリフルオロ酢酸4-ニトロフェニル、及びHTUがあるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、单一の試薬が単独で使用される。他の実施形態において、单一の試薬は、アシル転移触媒と共に使用される。そのようなアシル転移触媒には、D M A P及びピリジンがあるが、これらに限定されない。当業者は、追加のアシル転移触媒を使用してよいことを認識するだろう。

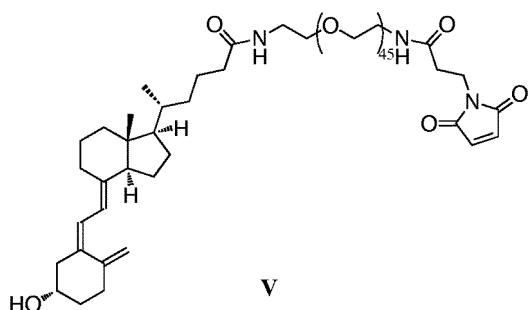
40

## 【0111】

具体的な実施形態において、本発明は、式Vにより表される担体を製造する方法であつて、

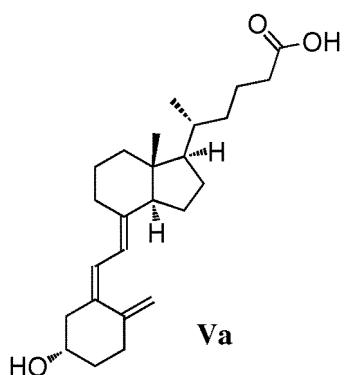
50

【化 2 6】



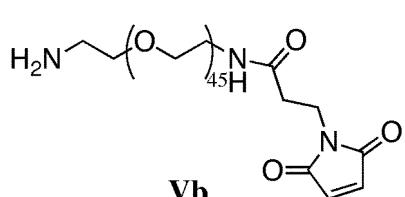
式 V a の化合物：

【化 2 7】



を、式 V b の化合物：

【化 2 8】



と、アミドカップリング剤の存在下で反応させる工程を含む方法を与える。当業者は、式 V b の化合物が、遊離塩基としても、好適な塩の形態としても使用できることを認識するだろう。好適な塩の形態には、T F A、H C l、H B r、M s O H、T f O H、及びA c O H があるが、これらに限定されない。

【0 1 1 2】

任意の好適なアミドカップリング剤を使用して、式 V の化合物を形成できる。好適なアミドカップリング剤には、2 - クロロメチルピリジニウムヨージド、B O P、P y B O P、H B T U、H A T U、D C C、E D C I、T B T U、及びT 3 P があるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は、単独で使用される。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は、H O B T 又はD M A Pなどの共試薬と共に使用される。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は、トリエチルアミン又はジイソプロピルエチルアミンなどの塩基と共に使用される。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は、H O B T 又はD M A Pなどの共試薬と、トリエチルアミン又はジイソプロピルエチルアミンなどの塩基の両方と共に使用される。当業者は、H O B T

40

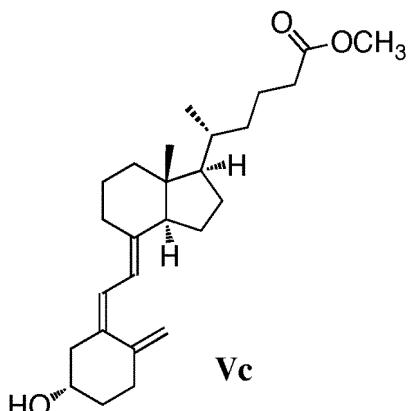
50

又はD M A P以外の共試薬を使用できることを認識するだろう。さらに、当業者は、トリエチルアミン又はジイソプロピルエチルアミン以外の塩基を使用できることを認識するだろう。

**【0113】**

具体的な実施形態において、式V aのカルボン酸成分は、式V cのメチルエステルを加水分解剤により処理して製造される。

**【化29】**



10

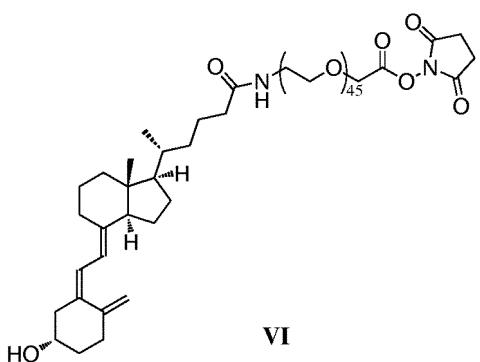
**【0114】**

任意の好適な加水分解剤を使用して、式V aの化合物を式V cの化合物から調製できる。好適な加水分解剤には、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、及び水酸化カリウムがあるが、これらに限定されない。

**【0115】**

他の具体的な実施形態において、本発明は、式V Iにより表される担体を製造する方法であって、

**【化30】**

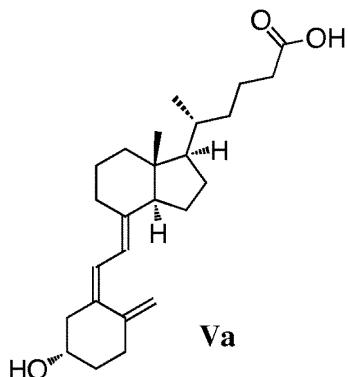


30

式V aの化合物：

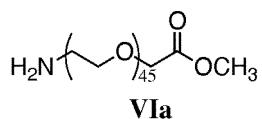
40

【化31】



を、式V I aの化合物：

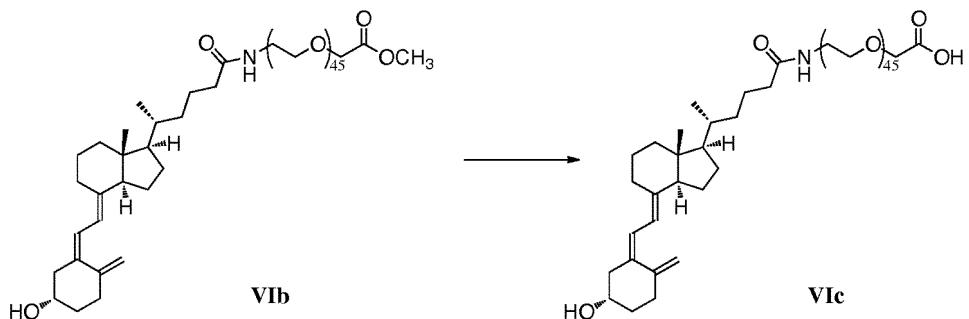
【化32】



20

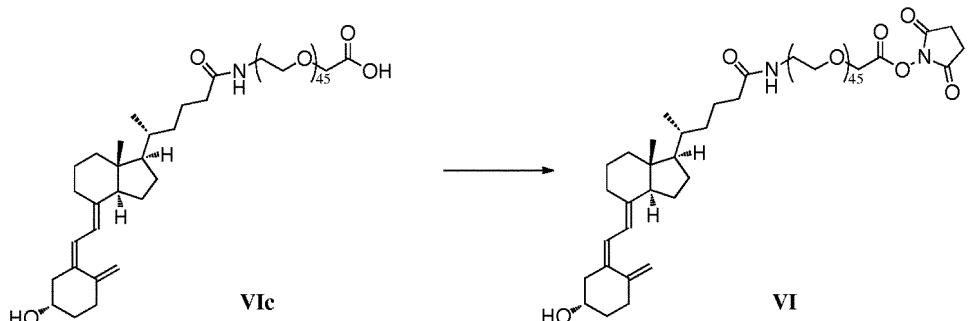
と、アミドカップリング剤の存在下で反応させて式V I bの化合物を形成する工程；  
式V I bのエステルを加水分解して式V I cのカルボン酸にする工程；及び

【化33】



式V I cのカルボン酸を式V I の活性エステルに変換する工程；

【化34】



を含む方法を与える。

【0116】

当業者は、式V I aの化合物を、遊離塩基としても、好適な塩の形態としても使用でき

50

ることを認識するだろう。好適な塩の形態には、TFA、HCl、HBr、MsOH、TfOH、及びAcOHがあるが、これらに限定されない。

【0117】

任意の好適なアミドカップリング剤を使用して、式V I bの化合物を形成できる。好適なアミドカップリング剤には、2-クロロメチルピリジニウムヨージド、BOP、PyBOP、HBTU、HATU、DCC、EDCI、TBTU、及びT3Pがあるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は、単独で使用される。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は、HOBT又はDMAPなどの共試薬と共に使用される。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は、トリエチルアミン又はジイソプロピルエチルアミンなどの塩基と共に使用される。特定の実施形態において、アミドカップリング剤は、HOBT又はDMAPなどの共試薬と、トリエチルアミン又はジイソプロピルエチルアミンなどの塩基の両方と共に使用される。当業者は、HOBT又はDMAP以外の共試薬を使用できることを認識するだろう。さらに、当業者は、トリエチルアミン又はジイソプロピルエチルアミン以外の塩基を使用できることを認識するだろう。  
10

【0118】

任意の好適な加水分解剤を使用して、式V I cの化合物を式V I bの化合物から調製できる。好適な加水分解剤には、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、及び水酸化カリウムがあるが、これらに限定されない。

【0119】  
20

NHSは、好適なカップリング試薬の存在下で式V I cのカルボン酸とカップリングして、式V Iの活性エステルを形成できる。好適なカップリング試薬には、2-クロロメチルピリジニウムヨージド、BOP、PyBOP、HBTU、HATU、DCC、EDCI、TBTU、及びT3Pがあるが、これらに限定されない。

【0120】

いくつかの実施形態において、式V Iの活性エステルは、NHSとカップリング試薬の組み合わせを使用して、式V I cのカルボン酸から形成される。

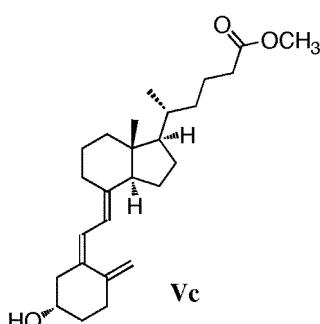
【0121】  
30

いくつかの実施形態において、式V Iの活性エステルは、脱離基を生成しカップリング反応も起こす单一の試薬を使用して、式V I cのカルボン酸から形成される。そのような試薬には、炭酸N,N'-ジスクシンイミジルがあるが、これに限定されない。いくつかの実施形態において、单一の試薬が単独で使用される。他の実施形態において、单一の試薬はアシル転移触媒と共に使用される。そのようなアシル転移触媒には、DMAP及びビリジンがあるが、これらに限定されない。当業者は、追加のアシル転移触媒を使用してよいことを認識するだろう。

【0122】

具体的な実施形態において、式V aのカルボン酸成分は、式V cのメチルエステルを加水分解剤により処理して製造される。

【化35】  
40



【0123】  
50

任意の好適な加水分解剤を使用して、式V aの化合物を式V cの化合物から調製できる。好適な加水分解剤には、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、及び水酸化カリウムがあるが、これらに限定されない。

#### 【0124】

望まれる場合、異なる分子量を有する治療化合物担体コンジュゲートを、ゲル濾過クロマトグラフィー及び/又はイオン交換クロマトグラフィーを使用して単離できる。ゲル濾過クロマトグラフィーを利用して、異なる分子量に基づいて(差異は、基本的に標的化基の平均分子量に相当する)、異なる治療化合物担体コンジュゲートを分別することができる(例えば、1-マー、2-マー、3-マーなど、ここで、「1-マー」は、治療化合物あたり1つの標的化基分子を示し、「2-マー」は治療化合物に結合した2つの標的化基を示す、など)。10

#### 【0125】

この種の分離を実施するのに好適なゲル濾過カラムには、Amersham Biosciences(Piscataway, N.J.)から入手できるSuperdex及びSephadexカラムがある。特定のカラムの選択は、所望の分別範囲によるだろう。溶離は、一般的に、リン酸塩、酢酸塩などの好適な緩衝剤を使用して実施される。回収された分画は、いくつかの異なる方法、例えば、(i)タンパク質含量に関して280nmでの光学濃度(OD)、(ii)ウシ血清アルブミン(BSA)タンパク質分析、及び(iii)ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリラミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により分析することができる。20

#### 【0126】

治療化合物担体コンジュゲートの分離は、逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)C18カラム(Amersham Biosciences又はVydac)を利用して逆相クロマトグラフィーによっても、イオン交換カラム、例えば、Amersham Biosciencesから入手可能なDEAE-又はCM-Sephadexイオン交換カラムを利用してイオン交換クロマトグラフィーによっても実施できる。生じた精製された組成物は、好ましくは、標的化基にコンジュゲートされていない治療化合物を実質的に含まない。さらに、組成物は、好ましくは、他の非共有結合した標的化基の全てを実質的に含まない。30

#### 【0127】

本発明は、ビタミンD又は他のDBP結合分子を使用して薬物動態的性質を向上させることにより、薬物の効能を高める組成物及び方法を与える。紫外線への曝露時に皮膚でビタミンDを形成する自然の経路はDBPとの相互作用に依存しており、それによりUV活性化ビタミンDが循環にのり、細胞プロセスのために利用できる(Lips, Prog. Biophys. Molec. Biol. 92:4-8(2006); DeLuca, Nutr. Rev. 66(suppl. 2): S73-S78(2008))。DBPは、ビタミンDを、速く効果的に循環させる。DBPは、また、活性型ビタミンDを平均で30日間循環した状態に保つ(Cooke, N.E., and J.G. Haddad. 1989. Endocrinol. Rev. 10:294-307; Haddad, J.G. et al. 1993. J. Clin. Invest. 91:2552-2555; Haddad, J.G. 1995. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 53:579-582)。本発明は、DBPを利用して治療化合物をより効果的に体に送達することを初めて与える。一実施形態において、治療化合物は、担体に共有結合しているか、又は担体に融合している。他の実施形態において、治療化合物は、担体と共に製剤されているが、共有結合していない。一実施形態において、投与の部位から薬物を体内により効果的に運ぶために、担体はDBPと相互作用する。他の実施形態において、担体は、薬物を長期間循環したままに保つ。40

#### 【0128】

一実施形態において、担体は、標的化基及び標的化基を治療化合物に結合するための結合基を含む。他の実施形態において、担体は、標的化基及び治療化合物に結合したスカフ50

オールド部分を含む。標的化基は、ビタミンD、ビタミンDアナログ、ビタミンD関連代謝物、ビタミンD関連代謝物アナログ、又はビタミンD結合タンパク質(DBP)と結合若しくは相互作用できる他の分子である。一実施形態において、標的化基は、抗体若しくは抗体誘導体、DBP若しくはその断片に結合するように設計されたペプチド、DBP若しくはその断片に対して選択されたファージディスプレイ若しくは他のペプチドライブラーから誘導されたペプチド、DBPに結合するヌクレオチドアプタマー、DBPに結合するように設計された、若しくはDBP若しくはその断片に対して選択された化合物ライブラーから誘導された小分子、又は本明細書に開示されるDBPに結合できる部分である。他の実施形態において、担体は、DBP自体又はDBPの誘導体を含む。

## 【0129】

10

ビタミンDは一群の脂溶性セコステロイドである。いくつかの形態(ビタマー)のビタミンDが存在する。2つの主要な形態はビタミンD<sub>2</sub>すなわちエルゴカルシフェロール、及びビタミンD<sub>3</sub>すなわちコレカルシフェロールであり、下付き文字のないビタミンDは、D<sub>2</sub>とD<sub>3</sub>のいずれか又は両方を意味する。ヒトでは、ビタミンDは、コレカルシフェロール(ビタミンD<sub>3</sub>)又はエルゴカルシフェロール(ビタミンD<sub>2</sub>)として摂取され得る。さらに、ヒトは、日光の曝露が充分であると、コレステロールからビタミンDを合成できる。

## 【0130】

ビタミンDは、種々の臓器にある酵素によりさらに修飾されて、やはりDBPに結合可能な「ビタミンD代謝物」のファミリーになる。例えば、ビタミンDは、肝臓でカルシジオール(25OHヒドロキシ-ビタミンD)に変換される。カルシジオールの一部は、腎臓によりカルシトリオール(1,25(OH)<sub>2</sub>ジヒドロキシ-ビタミンD)に変換される。カルシジオールは、他の目的で、腎臓外でもカルシトリオールに変換される。24, 25(OH)<sub>2</sub>ジヒドロキシ-ビタミンDも体内にみられる。そのため、一実施形態において、標的化基はビタミンD代謝物である。

20

## 【0131】

他の実施形態において、標的化基は「ビタミンDアナログ」である。これらの化合物はビタミンD構造に基づき、ビタミンDの部分的機能を保持している。それらは、ビタミンDと同じタンパク質のいくつかと、親和性は様々であるが相互作用する(例えば、DBPとビタミンD受容体)。例示的なアナログには、OCT、側鎖の22位に酸素原子がある化学合成された1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>のアナログ(Abe et al., FEB S Lett. 226: 58-62 (1987))；ジェミニビタミンDアナログ、1,25-ジヒドロキシ-20R-21(3-ヒドロキシ-3-ジュウテロメチル-4,4,4-トリジュウテロブチル)-23-イン-26,27-ヘキサフルオロ-コレカルシフェロール(BXL0124)(So et al., Mol Pharmacol. 79(3): 360-7 (2011))；パリカルシトール、天然のビタミンD代謝物全てに見られる炭素-19メチレン基を欠く、ビタミンD<sub>2</sub>誘導ステロール(Slatopolsky et al., Am J. Kidney Dis. 26: 852 (1995))；アルファカルシドール(1-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>)のように、肝臓でヒドロキシル化されて1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>になるプロドラッグ、ドキセルカルシフェロール(1

30

-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>)がある。アルファカルシドールとは異なり、ドキセルカルシフェロールは、24-ヒドロキシル化されて、1,24(S)-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>も生じる(Knutson et al., Biochem Pharmacol 53: 829 (1997))；ジヒドロタキステロール<sub>2</sub>(DHT<sub>2</sub>)、インビボでヒドロキシル化されて25(OH)DHT<sub>2</sub>及び1,25(OH)<sub>2</sub>DHT<sub>2</sub>になる(McIntyre et al., Kidney Int. 55: 500 (1999))。Erben and Musculoskel, Neuron Interact. 2(1): 59-69 (2001)、及びSteddon et al. Nephrol. Dial. Transplant. 16(10): 1965-1967 (2001)も参照されたい。上記引用文献は、引用によりその全体として組み込まれる。

40

50

## 【0132】

他の実施形態において、担体は、標的化基及び治療化合物に共有結合した薬学的に許容できるスカフォールド部分をさらに含む。本発明の担体のスカフォールド部分は、治療化合物の機能に必ずしも関与しないが、機能に貢献することがあり、治療化合物の薬物動態的性質を向上させることがある。本発明のスカフォールドは、標的化基のDBPへの結合に実質的に干渉しない。同様に、本発明のスカフォールドは、治療化合物の構造又は機能に実質的に干渉しない。スカフォールド部分の長さは、標的化基及び治療化合物の性質による。当業者は、種々の結合間の公知の距離に基づいて、種々の原子の組み合わせが可変の長さの分子を与えることを認識するだろう（引用により本明細書に組み込まれるMorrison, and Boyd, Organic Chemistry, 3rd Ed., Allyn and Bacon, Inc., Boston, Mass. (1977)）<sup>10</sup>。本発明により企図される他のスカフォールドには、ペプチドリンカー、ヒト血清アルブミンなどのタンパク質リンカー、抗体又はその断片、核酸リンカー、小型炭素鎖リンカー、酸素又は窒素が挿入された炭素リンカーがあり、これらの例の組み合わせも企図される。

## 【0133】

他の実施形態において、DBPに結合する標的化基としてペプチドが選択された。ペプチド又はタンパク質ライブラリーを、DBP結合ペプチドを求めてスクリーニングする方法は当技術分野に公知である。好ましい実施形態において、DBP結合ペプチドを特定するツーハイブリッド法が利用される。他の好ましい実施形態において、DBP結合のインビトロスクリーンも利用される。次いで、この標的化ペプチドは、薬物と共に結合しても、薬物と共に製剤されてもよい。好ましい実施形態において、スカフォールド部分が使用される。他の実施形態において、標的化基は、DBPに結合する理由で選択されたアプタマーである。次いで、前記アプタマーは、スカフォールドにより、又は薬物に直接融合して、薬物に共有結合することも、薬物と共に製剤することもできる。<sup>20</sup>

## 【0134】

一実施形態において、薬物は、DNA分子、RNA分子、アプタマー（一本鎖又は二本鎖）、DNA又はRNAオリゴヌクレオチド、直鎖又は環状のより大きいDNA分子、RNA干渉(RNAi)に使用されるオリゴヌクレオチド、DNA/RNAハイブリッド分子の置換などのDNAのバリエーション、PNA又は他の核酸誘導体分子などの合成DNA様分子（引用により本明細書にその全体として組み込まれる国際公開第07/035922号パンフレット参照）である。他の実施形態において、治療化合物は、ヌクレアーゼ耐性DNA又はRNAオリゴヌクレオチドで構成されている。好ましい実施形態において、ヌクレアーゼ耐性DNAオリゴヌクレオチドはモルホリノである（すなわち、配列特異的に核酸に結合する核酸のホスホジアミデートアナログ、AVI Biopharma、Botheell、WA）<sup>30</sup>。

## 【0135】

他の実施形態において、薬物は小分子又は化学物質である。他の実施形態において、薬物は、ペプチド又はPNAなどペプチドの誘導体である。他の実施形態において、薬物は、全長だろうと、断片だろうと、切断されたバージョンであろうと、ペグ化されてしまうと、グリコシル化されてしまうと、他の方法で共有結合的に若しくは非共有結合的に修飾されてしまうと、未修飾のままであると、ポリペプチドの全て又は部分から構成されたタンパク質である。<sup>40</sup>

## 【0136】

治療化合物には、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖類、オリゴ糖、核酸などがある。例示的なポリペプチドには、成長因子、例えば、肝細胞成長因子(HGF)、神経成長因子(NGF)、上皮成長因子(EGF)、FGF21を含む線維芽細胞増殖因子、血液凝固因子、成長ホルモン、卵胞刺激ホルモン(FSH)などのホルモン、サイトカイン、インターフェロン、腫瘍壊死因子、酵素、骨形成タンパク質、ニューロトロフィン、及び増殖分化因子がある。本発明の組成物及び方法は、上述のタ<sup>50</sup>

ンパク質、糖タンパク質、小分子、ホルモン、成長因子、及び患者又は対象内に見られる他の分子のコンジュゲートされた作動剤、拮抗剤、又は他のエフェクターも含む。

### 【0137】

治療用ペプチドも本発明の範囲内にある。用語ペプチドは、ひとつなぎのアミノ酸を含むように意図される。本発明のペプチド中のアミノ酸は、天然でも、非天然でもよい。本発明のペプチドは、化学的に合成されても生物学的に合成されてもよく、システインリップチペプチド、環状ペプチド、ステープルドペプチド、D - 又はL - アミノ酸及びこれらの混合物を含むペプチド、ペプチドミメティクス、ペプチド核酸(PNA)、並びにこれらの組み合わせを含んでよい。例示的な実施形態には、AIDSワクチン、アレルギーワクチン、抗炎症ペプチド、抗インテグリンペプチド、抗TCRワクチン、抗アレルギーペプチド、抗癌ペプチド、抗真菌性ペプチド、抗菌性ペプチド、抗リウマチペプチド、抗トロンビンペプチド、抗ウイルスペプチド、Gタンパク質結合受容体(GPCR)リガンド及び関連ペプチド(例えば、セクレチンファミリー)、CGRPアナログ、GPCR拮抗剤、CMVペプチド、カルバイン阻害剤、コラゲナーゼ阻害剤、DAP阻害剤、ディフェンシン、透析性オリゴペプチド(dialytic oligopeptides)、エンハンシン、エンドルフィン、エンドセリン拮抗剤、フィブロネクチン阻害剤、ガストリン拮抗剤、グレリン、グルカゴン拮抗剤、ゴナドレリンアナログ、成長因子ペプチド、視床下部ホルモン、下垂体ホルモン、腸の機能及び食欲を制御するペプチド、炎症誘発性脂肪組織産生物、幹細胞増殖を刺激するペプチド、炎症性ペプチド、天然物、単純ヘルペスワクチン、ヘパリン結合ペプチド、B型肝炎ワクチン、免疫調節性ペプチド、インフルエンザワクチン、LHRH拮抗剤、オピオイドペプチド誘導体、MMP阻害剤、MUC-1ワクチン、マラリアワクチン、メラノーマワクチン、髄膜炎ワクチン、神経ペプチド、オピオイドペプチド、骨形成ペプチド、骨粗鬆症ペプチド(osteoporosis peptides)、パピローマウイルスワクチン、前立腺ガンワクチン、RGDペプチド、RSVワクチン、T細胞受容体ペプチドなどがある。本発明は、本明細書に記載される方法によるさらなる修飾により臨床製品として改良されるだろう、その合成アナログも企図する。当業者は、増加した半減期、作用持続時間、吸収、及び/又はバイオアベイラビリティを与える本明細書に記載される修飾を受ける余地がある多くの追加の商業的に重要なペプチドを認識するだろう。

### 【0138】

本明細書に記載される実施形態の範囲内にやはり企図されるのは、分岐鎖又は分岐があるか若しくは分岐がない環状のペプチドである。環状、分岐鎖、及び分岐のある環状ペプチドは、翻訳後の自然のプロセスから生じ、好適な合成法によっても作られる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される任意のペプチド生成物は、先に記載されたペプチドアナログを含み、それが次いでアルキル-グリコシド界面活性剤部分に共有結合する。

### 【0139】

本明細書に示される実施形態の範囲内にやはり企図されるのは、本明細書に特許請求されているアナログの修飾により好適な部位で置換されているペプチド鎖である。例えば、アシル化は、オクタン酸、デカン酸、ドデカン酸、テトラデカン酸、ヘキサデカン酸、オクタデカン酸、3 - フェニルプロパン酸などの脂肪酸又は飽和若しくは不飽和アルキル鎖により、例えば、リジンの位でリンカーアミノ酸上である(Zhang, L. and Bulaj, G. (2012) Curr Med Chem 19:1602-1618、引用により本明細書に全体として組み込まれる)。

### 【0140】

本明細書に示される実施形態の範囲内にやはり企図されるのは、天然及び非天然のアミノ酸又は天然のアミノ酸のアナログで構成されたペプチド鎖である。本明細書では、ペプチド及び/又はタンパク質の「アナログ」は、チロシン上の置換基が、アセチル基、ベンゾイル基、アミノ基、ヒドラジン、ヒドロキシアミン、チオール基、カルボキシ基、メチル基、イソブロピル基、C<sub>2</sub> ~ C<sub>20</sub>直鎖又は分岐鎖の炭化水素、飽和又は不飽和の炭化

10

20

30

40

50

水素、O - メチル基、ポリエーテル基、ハロゲン、ニトロ基などを含むパラ置換チロシン、オルト置換チロシン、及びメタ置換チロシンを含むチロシンアナログなど、天然のアミノ酸に基づく非天然のアミノ酸を含む。Tyrアナログの例には、2, 4 - ジメチル - チロシン(Dmt)、2, 4 - ジエチル - チロシン、O - 4 - アリル - チロシン、4 - プロピル - チロシン、Ca - メチル - チロシンなどがある。リジンアナログの例には、オルニチン(Orn)、ホモリジン、Ca - メチル - リジン(CMeLys)などがある。フェニルアラニンアナログの例には、置換基が、メトキシ基、C<sub>1</sub> ~ C<sub>20</sub>アルキル基、例えば、メチル基、アリル基、アセチル基などを含むメタ置換フェニルアラニンがあるが、これらに限定されない。具体例には、2, 4, 6 - トリメチル - L - フェニルアラニン(Tmp)、O - メチル - チロシン、3 - (2 - ナフチル)アラニン(Nal(2))、3 - (1 - ナフチル)アラニン(Nal(1))、3 - メチル - フェニルアラニン、1, 2, 3, 4 - テトラヒドロイソキノリン - 3 - カルボン酸(Tic)、フッ化フェニルアラニン、イソプロピル - フェニルアラニン、p - アジド - フェニルアラニン、p - アシル - フェニルアラニン、p - ベンゾイル - フェニルアラニン、p - ヨード - フェニルアラニン、p - ブロモフェニルアラニン、p - アミノ - フェニルアラニン、及びイソプロピル - フェニルアラニンなどがあるが、これらに限定されない。

## 【0141】

本明細書に示される実施形態の範囲内にやはり企図されるのは、当技術分野に公知である非標準的又は非天然のアミノ酸を含むペプチド鎖であり、例えば、AibなどのC - C置換アミノ酸、Ca - ジエチルグリシン(Deg)、アミノシクロペンタン - 1 - カルボン酸(Ac4c)、アミノシクロペンタン - 1 - カルボン酸(Ac5c)などである。そのようなアミノ酸は、しばしばアルファヘリックス構造に偏る制限された構造になることが多い(Kaul, R. and Balaram, P. (1999) *Bioorg Med Chem* 7: 105 - 117、引用により本明細書にその全体として組み込まれる)。アナログ設計に有用な、そのような非天然のアミノ酸の追加例は、ホモ - アルギニン(Har)などである。特定の例における還元アミド結合の置換は、酵素的破壊からの保護の向上につながるか、又は受容体結合を変える。例としては、還元アミド結合を持つTic - Pheジペプチドユニットの残基の間への組み込みは(Tic - F[CH2 - NH] ^ - Pheとして設計)、酵素分解を低減する。

## 【0142】

本明細書に示される実施形態の範囲内にやはり企図されるのは、アミノ末端又はカルボキシル末端での修飾が任意選択的に本ペプチド又はタンパク質に導入され得ることである(Nestor, J. J., Jr. (2009) *Current Medicinal Chemistry* 16: 4399 - 4418)。例えば、本ペプチド又はタンパク質を、N末端でトランケートすることも、アシル化することもできる(Gourlet, P. et al. (1998) *Eur J Pharmacol* 354: 105 - 111, Gozes, I. and Furman, S. (2003) *Curr Pharm Des* 9: 483 - 494)、その内容は引用により本明細書に組み込まれる)。D - PheなどのD - アミノ酸の欠失又は組み込みなどの、ペプチド又はタンパク質のN末端への他の修飾は、長鎖アルキルグリコシドなどの本明細書に記載される修飾により置換されると、強力で長時間作用型の作動剤又は拮抗剤を与えることもできる。そのような作動剤及び拮抗剤も商業的有用性があり、本明細書に記載される企図される実施形態の範囲内にある。上記引用文献は、その全体として本明細書に組み込まれる。

## 【0143】

本明細書に記載される実施形態の範囲内にやはり企図されるのは、治療化合物アナログに共有結合され、融合され、又は共に製剤されている担体であって、天然の治療化合物が、アセチル化、アシル化、ペグ化、ADP - リボシリ化、アミド化、脂質又は脂質誘導体の共有結合、ホスホジルイノシトール(phosphatidylinositol)の共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、システインの共有結合架橋形成の形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、カルボキシル化、グリコシリ化

10

20

30

40

50

、G P I アンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、グリコシル化、脂質結合、硫酸化、グルタミン酸残基のカルボキシル化、ヒドロキシル化及びA D P - リボシル化、セレノイル化 ( selenoylation ) 、硫酸化、アルギニル化などトランスファーRNAが媒介するアミノ酸のタンパク質への付加、並びにユビキチン化により修飾されているものである。例えば、( Nestor , J . J . , Jr . ( 2 0 0 7 ) Comprehensive Medicinal Chemistry II 2 : 5 7 3 - 6 0 1 , Nestor , J . J . , Jr . ( 2 0 0 9 ) Current Medicinal Chemistry 1 6 : 4 3 9 9 - 4 4 1 8 , Creighton , T . E . ( 1 9 9 3 , Wold , F . ( 1 9 8 3 ) Posttranslational Covalent Modification of Proteins 1 - 1 2 , Seifert , S . and Englard , S . ( 1 9 9 0 ) Methods Enzymol 1 8 2 : 6 2 6 - 6 4 6 , Rattan , S . I . , et al . ( 1 9 9 2 ) Ann NY Acad Sci 6 6 3 : 4 8 - 6 2 ) を参照されたい。上記の引用文献は、引用によりその全体として組み込まれる。

#### 【 0 1 4 4 】

グリコシル化された治療用ペプチドは、従来の F m o c 化学及び例えば樹脂上の固相ペプチド合成を利用して調製できるが、その場合、所望の保護された糖アミノ酸がペプチド合成の前に調製され、次いでペプチド合成の間に所望の部位でペプチド鎖に導入される。このように、治療用ペプチドポリマー・コンジュゲートはインビトロでコンジュゲートされ得る。グリコシル化は脱保護の前に起こり得る。アミノ酸グリコシドの調製は、引用により本明細書にその全体として組み込まれる米国特許第 5 , 7 6 7 , 2 5 4 号明細書、国際公開第 2 0 0 5 / 0 9 7 1 5 8 号パンフレット、及び Doores , K . , et al . , Chem . Commun . , 1 4 0 1 - 1 4 0 3 , 2 0 0 6 に記載されている。例えば、セリン及びスレオニン残基のアルファ及びベータ選択的グリコシル化は、ケーニッヒ・クノール反応及びシップ塩基中間体を伴う Lemieux のインサイチューアノマー化方法を利用して実施される。次いで、シップ塩基グリコシドの脱保護が、弱酸性条件又は加水素分解を利用して実施される。グリコシル化された治療用ペプチドコンジュゲートを含む組成物は、成長するペプチド鎖を、保護されたアミノ酸の少なくとも 1 つがグリコシル化されている保護されたアミノ酸と段階的に接触させ、それに続いて、水溶性ポリマーのコンジュゲーションを含む、段階的な固相ペプチド合成により作られる。そのような組成物は、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 7 % 、又は少なくとも 9 8 % のグリコシル化されコンジュゲートされた治療用ペプチドの単一の種の純度を有し得る。

#### 【 0 1 4 5 】

本明細書に定義及び / 又は開示される治療用ペプチドの 1 つ以上のアミノ酸残基の導入に使用できる单糖類には、グルコース ( デキストロース ) 、フルクトース、ガラクトース、及びリボースがある。使用に好適な追加の单糖類には、グリセルアルデヒド、ジヒドロキシアセトン、エリトロース、トレオース、エリトルロース、アラビノース、リキソース、キシロース、リブロース、キシリロース、アロース、アルトロース、マンノース、N - アセチルノイロマニン酸、フコース、N - アセチルガラクトサミン、及び N - アセチルグルコサミンなどがある。本明細書に定義及び / 又は開示される治療用ペプチド、治療用ペプチドの 1 つ以上のアミノ酸残基の修飾に使用される单糖類、二糖類、及び三糖類などのグリコシドには、とりわけ、スクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、メリビオース、及びセロビオースがある。三糖類には、アカルボース、ラフィノース、及びメレジトースがある。

#### 【 0 1 4 6 】

本発明のさらなる実施形態において、本明細書に定義及び / 又は開示される治療化合物は、ビオチンに化学的に結合していてもよい。次いで、ビオチン / 治療化合物がアビジンに結合できる。

#### 【 0 1 4 7 】

10

20

30

40

50

やはり本発明の範囲内にあるのは、抗体であるポリペプチドである。用語抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、毒素結合抗体、ヒト化抗体、抗体断片（例えば、F<sub>c</sub>ドメイン）、F<sub>a b</sub>断片、一本鎖抗体、二重特異性又は多重特異性抗体、ラマ抗体、ナノボディ、ダイアボディ、F<sub>v</sub>、F<sub>a b</sub>、F(a b')<sub>2</sub>、F<sub>a b'</sub>、sc F<sub>v</sub>、sc F<sub>v</sub>-F<sub>c</sub>などを含むように意図される。用語の中にやはり含まれるのは、Igキメラなどの抗体融合タンパク質である。好ましい抗体には、ヒト化若しくは完全ヒトモノクローナル抗体又はその断片がある。

#### 【0148】

用語「抗体」及び「免疫グロブリン」は最も広い意味で互換的に使用され、モノクローナル抗体（例えば、完全長又はインタクトモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、一価抗体、多価抗体、多重特異性抗体（例えば、所望の生物学的活性を示す限り二重特異性抗体）を含み、特定の抗体断片（本明細書により詳細に記載されるとおり）も含み得る。抗体は、キメラ、ヒト、ヒト化、及び／又は親和性成熟であり得る。10

#### 【0149】

用語「完全長抗体」、「インタクト抗体」及び「ホール抗体」は本明細書において互換的に使用され、以下に定義される抗体断片ではなく、実質的に無傷な形態にある抗体を意味する。その用語は、特に、F<sub>c</sub>領域を含む重鎖を持つ抗体を意味する。「抗体断片」は、好ましくは、抗原結合領域を含むインタクト抗体の一部を含む。抗体断片の例には、F<sub>a b</sub>、F<sub>a b'</sub>、F(a b')<sub>2</sub>、及びF<sub>v</sub>断片；ダイアボディ；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体がある。用語「モノクローナル抗体」は、本明細書では、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を意味し、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、少量存在する可能性のある突然変異、例えば、自然発生突然変異以外は同一である。そのため、修飾語「モノクローナル」は、別個の抗体の混合物でないとして、抗体の特性を示す。20

#### 【0150】

特定の実施形態において、そのようなモノクローナル抗体は、典型的には、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含むが、その場合、標的結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列からの単一の標的結合ポリペプチド配列の選択を含むプロセスにより得られた。例えば、選択プロセスは、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、又はリコンビナントDNAクローンのプールなどの複数のクローンからの独特的なクローンの選択であり得る。選択された標的結合配列が、さらに変化されて、例えば、標的への親和性が改善されたり、標的結合配列がヒト化されたり、細胞培養物中でのその產生が向上されたり、インビボでのその免疫原性が低下したり、多重特異性抗体が作り出されたりし得ることなど、及び変化された標的結合配列を含む抗体が、やはり本発明のモノクローナル抗体であることを理解されたい。典型的には異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、典型的には、他の免疫グロブリンにより汚染されていないという点で有利である。30

#### 【0151】

抗原に特異的に結合する抗体は、その抗原に高い親和性を有する。抗体親和性は解離定数（K<sub>d</sub>）により測定できる。特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、解離定数（K<sub>d</sub>）が、100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM、又は0.001nM（例えば、10<sup>-8</sup>M以下、例えば、10<sup>-8</sup>Mから10<sup>-13</sup>M、例えば、10<sup>-9</sup>Mから10<sup>-13</sup>M）である。40

#### 【0152】

一実施形態において、K<sub>d</sub>は、以下のアッセイにより記載されるとおり、対象としている抗体のF<sub>a b</sub>バージョン及びその抗原と共に、放射性標識抗原結合アッセイ（RIA）により測定される。抗原に対するF<sub>a b</sub>の溶液結合親和性は、未標識の抗原の漸増系列の存在下で、F<sub>a b</sub>を最低濃度の（125I）-標識抗原と共に平衡化させ、次いで、結合50

した抗原を、抗F<sub>a</sub>b抗体 - コートプレートにより捕捉して測定される（例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999) を参照されたい）。アッセイの条件を確立するために、MICROTITER（登録商標）マルチウェルプレート（Thermo Scientific）は、50 mM炭酸ナトリウム（pH 9.6）中5 µg/mlの抗F<sub>a</sub>b捕捉抗体（Cappel Labs）により一晩被覆され、その後PBS中2%（w/v）ウシ血清アルブミンにより、2から5時間室温（およそ23℃）でプロックされる。非吸着性プレート（Nunc 269620番）において、100 µM又は26 µM [125I]-抗原は、対象とするF<sub>a</sub>bの段階希釈物と混合される（例えば、Presta et al., Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997) 中の、抗VEGF抗体、F<sub>a</sub>b-12の評価と一致する）。次いで、対象とするF<sub>a</sub>bは一晩インキュベートされる。しかし、確実に平衡に達するように、インキュベーションをより長時間（例えば、約65時間）続けてもよい。その後、混合物は捕捉プレートに移され、室温でインキュベートされる（例えば、1時間）。次いで、溶液は除かれ、プレートは、PBS中0.1%ポリソルベート20（TWEEN-20（登録商標））で8回洗浄される。プレートが乾燥すると、150 µl / ウエルのシンチラント（MICROSCINT-20（商標）；Packard）が加えられ、プレートはTOPCOUNT（商標）ガンマカウンター（Packard）で10分間計測される。最大結合の20%以下を与える各F<sub>a</sub>bの濃度が、競合結合アッセイのために選択される。

## 【0153】

他の実施形態によると、K<sub>d</sub>は、例えば、固定化された抗原CM5チップと共に、約10の応答単位（RU）で、BIACORE（登録商標）-2000又はBIACORE（登録商標）-3000（BIACore, Inc., Piscataway, N.J.）を25℃で使用して、表面プラズモン共鳴アッセイにより測定される。簡単に述べると、製造業者の説明書に従って、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIACORE, Inc.）は、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）により活性化される。抗原は、pH 4.8の10 mM酢酸ナトリウムで5 µg/ml（約0.2 µM）に希釈されてから、流量5 µl / 分で注入されて、結合したタンパク質のおよそ10応答単位（RU）を得る。抗原の注入後、1 Mエタノールアミンが注入されて、未反応の基がプロックされる。反応速度測定のため、F<sub>a</sub>bの2倍の段階希釈物（0.78 nMから500 nM）が、25℃の0.05%ポリソルベート20（TWEEN-20（商標））界面活性剤を含むPBS（PBST）に、流量およそ25 µl / 分で注入される。会合速度（k<sub>on</sub>）及び解離速度（k<sub>off</sub>）が簡単な1対1ラングミュラーの結合モデル（BIACORE（登録商標）Evaluation Softwareバージョン3.2）を利用して、会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィッティングすることにより計算される。平衡解離定数（K<sub>d</sub>）はk<sub>off</sub> / k<sub>on</sub>の比として計算される。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999) を参照されたい。on速度が上記表面プラズモン共鳴アッセイにより10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>を超える場合、on速度は、トップフローを備えた分光光度計（spectrophotometer）（Aviv Instruments）又は8000-シリーズSLM-AMINCO（商標）分光光度計（Thermo Spectronic）などの分光計中で測定して増加する濃度の抗原の存在下、攪拌しているキュベットで、25℃で、pH 7.2のPBS中の20 nM抗抗原抗体（F<sub>a</sub>b形態）の蛍光発光強度の増加又は減少を測定する蛍光消光法（励起=295 nm；発光=340 nm、16 nmバンドパス）を利用して測定できる。チップ表面への標的抗原の他のカップリング化学作用（例えば、ストレプトアビシン / ビオチン、疎水性相互作用、又はジスルフィド化学作用）も、当業者により理解されるとおり、上述のアミンカップリング方法（CM5チップ）の代りに容易に利用可能である。

## 【0154】

10

20

30

40

50

修飾語「モノクローナル」は、抗体の特性を、抗体の実質的に均質な集団から得られたものとして示し、特別な方法による抗体の製造が必要であると解釈されないものとする。例えば、本発明により使用すべきモノクローナル抗体は、種々の技法、例えば、ハイブリドーマ法(例えば、Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981))、組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号明細書参照)、ファージディスプレイ技術(例えば、Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338 (2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340 (5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472 (2004); 及びLee et al., *J. Immunol. Methods* 284 (1-2): 119-132 (2004)参照)、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座又はヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の一部又は全てを有する動物中でヒト又はヒト様抗体を製造する技術(例えば、国際公開第98/24893号パンフレット; 同第96/34096号パンフレット; 同第96/33735号パンフレット; 同第91/10741号パンフレット; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7: 33 (1993); 米国特許第5,545,807号明細書; 同第5,545,806号明細書; 同第5,569,825号明細書; 同第5,625,126号明細書; 同第5,633,425号明細書; 同第5,661,016号明細書; Marks et al., *Bio. Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fischwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996)及びLonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)参照)により製造できる。上記特許、刊行物、及び引用文献は、引用によりその全体として組み込まれる。

#### 【0155】

「ヒト化」形態の非ヒト(例えば、ネズミ科の)抗体は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小限の配列を含むキメラ抗体である。一実施形態において、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性、及び/又は能力を有する、マウス、ラット、ウサギ、又は非ヒト靈長類などの非ヒト種の超可変領域(ドナー抗体)由来の残基により代えられたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基により代えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含むことがある。これらの修飾は、抗体の性能をさらに改良するために実施されることがある。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変領域の実質的に全てを含むだろうが、ここで、超可変ループの全て又は実質的に全てには非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRの全て又は実質的に全てはヒト免疫グロブリン配列に対応する。ヒト化抗体は、任意選択的に、典型的にはヒト免疫グロブリンのものである免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部も含むだろう。さらなる詳細については、Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1990) 参照)によりその全体として組み込まれる。

986) ; Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988) ; 及び Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992) を参照されたい。以下の総説記事及びそこに引用されている引用文献も参照されたい: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998) ; Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995) ; Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)。上記引用文献は、引用によりその全体として組み込まれる。

## 【0156】

「ヒト抗体」は、ヒトにより産生される抗体のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含むか、且つ／又は本明細書に開示されるヒト抗体を製造する技術のいずれかを利用して作られたものである。そのような技術には、ファージディスプレイライブラリーなどのヒトから誘導されたコンピナトリアルライブラリーのスクリーニング(例えば、Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) 及び Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19:4133-4137 (1991) 参照)；ヒトモノクローナル抗体の產生のためのヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞系の利用(例えば、Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984) ; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 55-93 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) ; 及び Boerner et al., *J. Immunol.*, 147:86 (1991) 参照)；及び内因性免疫グロブリン產生のない状態でヒト抗体の完全なレパートリーを產生できる遺伝子導入動物(例えばマウス)でのモノクローナル抗体の生成(例えば、Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993) ; Jakobovits et al., *Nature*, 362:255 (1993) ; Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993) 参照)がある。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト動物由来の抗原結合残基を含むヒト化抗体を明確に排除する。

## 【0157】

公知の全種類のそのような抗体は本発明の範囲内にある。例示的な抗体には、成長因子、サイトカイン、リンフォカイン、細胞表面受容体、酵素、血管内皮細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子に結合するもの及びそれらのそれぞれの受容体に対する抗体がある。他の例示的な抗体には、受容体-IgG Fc融合タンパク質、及び糖タンパク質に対するモノクローナル抗体がある。先に列記されたポリペプチドのいずれの修飾された(例えば、突然変異した)任意のバージョンも、本発明の範囲内にある。本発明に使用すべき治療化合物は当技術分野に公知であり、例としては、引用により本明細書にその全体として組み込まれる米国特許第7,608,681号明細書に開示されている。さらに、本発明は、自己免疫疾患又は望ましくない炎症状態を起こす、対象中の天然又は非天然の抗体の阻害剤又は拮抗剤のコンジュゲートを企図する。

## 【0158】

担体のアセンブリーのいくつかの態様は、当技術分野に周知である化学的方法を利用する。例えば、ビタミンE-PEGはEastman Chemicalにより製造され、ビオチン-PEGは、Enzon、Nektar、及びNOF Corporationなどの多くのPEG製造業者により製造されている。いくつかのビタミン及び他の治療化合物が連結しているPEG分子を製造する方法は、これらの方針及び当技術分野に公知である他の化学的方法に従う。例えば、5'アミン部分によりオリゴヌクレオチドに結合したPEG2-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルなど、オリゴヌクレオチド又は関連する分子へのPEGの結合が起こる。いくつかのカップリング法が企図され、例えば、ペ

10

20

30

40

50

プチド上のリジン残基などのアミン基へのNHSカップリング、システイン残基上などのスルフヒドリル基へのマレイミドカップリング、スルフヒドリル基へのヨードアセチルカップリング、スルフヒドリル基へのピリジルジチオールカップリング、炭水化物基へカップリングするためのヒドラジド、N末端にカップリングするためのアルデヒド、又は一級若しくは二級アミンと反応することが知られているテトラフルオロフェニルエステルカップリングがある。他の可能な化学的カップリング法は当業者に知られており、代えることができる。例としては、本発明の結合基を使用するコンジュゲーションは、引用により本明細書にその全体として組み込まれる国際公開第93/012145号パンフレット(A t a s s i e t a l.)に記載の組成物及び方法を利用して実施できるが、第7, 803, 777号明細書(Defrees et al.)も参照されたい。

10

## 【0159】

一実施形態において、担体化合物は、薬物に、共有結合で結合しても、非共有結合で結合してもよい。他の実施形態において、担体化合物は薬物と分離しているが、機能単位(functional units)に製剤されるように個別の濃度で混合されている。本発明の例示的な薬物製剤には、水性液剤、有機液剤、粉末製剤、固体製剤、及び混合相製剤(mixed phase formulations)がある。

## 【0160】

本発明の医薬組成物は、本発明の化合物のいずれか及びその薬学的に許容できる塩を、任意の薬学的に許容できる担体、アジュバント、又はビヒクルと共に含む。本発明の医薬組成物に使用できる薬学的に許容できる担体、アジュバント、及びビヒクルには、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質、リン酸塩などの緩衝物質、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩又は電解質、例えば、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩など、コロイダルシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリラート、蟻、ポリエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマー、ポリエチレングリコール、及び羊毛脂があるが、これらに限定されない。

20

## 【0161】

薬学的に許容できる塩は、毒性の副作用なしに治療用組成物の望ましい生物学的活性を保持する。そのような塩の例は、(a)無機酸、例えば、塩化水素酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸などにより形成される酸付加塩/及び有機酸、例えば、酢酸、トリフルオロ酢酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タニン酸(tanic acid)、バモ酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリガラクトン酸などにより形成される塩；(b)亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、カドミウムなどの多価金属カチオンにより形成される；又はN,N'-ジベンジルエチレンジアミン又はエスレンジアミン(ethylenediamine)から形成された有機カチオンにより形成される塩基付加塩若しくは錯体；又は(c)(a)と(b)の組み合わせ、例えば、亜鉛のタニン酸塩などである。

30

## 【0162】

本発明の医薬組成物は、経皮、経口、非経口、吸入、眼、局所、直腸、鼻腔内、頬側(舌下含む)、膣内、又は埋め込み式リザーバー方式により投与できる。本発明の医薬組成物は、従来の、非毒性で薬学的に許容できる担体、アジュバント、又はビヒクルを含み得る。本明細書での用語非経口は、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、関節滑液囊内、胸骨内、髄腔内、病変内、及び頭蓋内注射又は注入技術を含む。

40

## 【0163】

いくつかの実施形態において、薬学的に許容できる非毒性の成分との混合物中に有効成分として本明細書に記載される治療化合物又はその薬学的に許容できる塩を含む医薬組成

50

物も企図される。上述の通り、そのような組成物は、非経口投与用に、特に、液体溶液又は懸濁液の形態で；経口又は頬側投与用に、特に錠剤又はカプセルの形態で；鼻腔内投与用に、特に、散剤、点鼻剤、蒸発する溶液、又はエアロゾルの形態で；吸入用に、特に、液体溶液又は広く定義された賦形剤を含む乾燥粉末の形態で；経皮投与用に、特に皮膚パッチ又はマイクロニードルパッチの形態で；及び直腸又は腔内投与用に、特に坐剤の形態で調製することができる。

#### 【0164】

組成物は、簡便には単位剤形で投与でき、例えば、引用により本明細書にその全体として組み込まれる Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1985) に記載の通り、医薬分野に周知である方法のいずれによても調製できる。非経口投与用の製剤は、賦形剤として、滅菌水又はプロピレングリコールなどの含塩アルキレングリコール、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、糖類、植物由来の油、水素化ナフタレン(naphthalenes)、血清アルブミン、又は他のナノ粒子(Abraxane(商標))に使用されるとおり、American Pharmaceutical Partners, Inc. Schaumburg, IL)などを含んでよい。経口投与には、製剤は、胆汁酸塩又はアシルカルニチンの添加により強化され得る。鼻腔内投与用の製剤は、固体でも、ハイドロフルオロカーボンなどの蒸発する溶媒中の溶液でもよく、安定化のための賦形剤、例えば、糖類、界面活性剤、サブミクロン無水アルファ-ラクトース又はデキストランを含んでよく、点鼻剤又は定量スプレーの形態で使用するための水性又は油性の溶液でもよい。頬側投与には、典型的な賦形剤には、糖類、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、アルファ化デンプンなどがある。

#### 【0165】

本明細書に記載される修飾された治療化合物の、長時間にわたる、例えば1週間から1年にわたる対象への送達は、所望の放出期間のために充分な有効成分を含む制御放出系の单一投与により達成され得る。モノリシック又はリザーバータイプのマイクロカプセル、デポインプラント(depot implants)、ポリマー性ヒドロゲル、浸透圧ポンプ、ベシクル、ミセル、リポソーム、経皮パッチ、イオン導入装置、及び別な注射可能な剤形などの種々の制御放出系を、この目的に利用できる。有効成分の送達が望まれる部位での局在化は、いくつかの制御放出装置の追加の特徴であり、特定の疾患の治療において有益であると証明され得る。

#### 【0166】

経皮投与用の特定の実施形態において、皮膚のバリアを越えた送達が、電極(例えば、イオン導入)、電気穿孔、又は短い高電圧の電気パルスの皮膚への印加、無線周波数、超音波(例えば、超音波導入)、マイクロプロジェクション(例えば、マイクロニードル)、ジェットインジェクター、熱アブレーション、磁気泳動、レーザー、速度、又はフォトメカニカル波を利用すると増強され得る。薬物は、単層薬物含有粘着剤、複層薬物含有粘着剤、リザーバー、マトリックス、又は蒸気型パッチ(vapor style patch)に含まれてよく、パッチレス技術(patchless technology)を利用してできる。皮膚のバリアを越えた送達は、カプセル化、皮脂流動化剤(skin lipid fluidizer)、又は中空型若しくは中実型ミクロ構造経皮システム(microstructured transdermal system)(MTS、3Mにより製造されるものなど)、ジェットインジェクターを利用して増強できる。治療化合物が皮膚を通るのを助けるための製剤への添加剤には、プロドラッグ、化学物質、界面活性剤、細胞透過性ペプチド、透過促進剤、カプセル化技術、酵素、酵素阻害剤、ゲル、ナノ粒子、及びペプチド又はタンパク質シャペロンがある。

#### 【0167】

制御放出製剤の一形態は、引用により本明細書に組み込まれる Kent et al. , 米国特許第4,675,189号明細書の先駆的な研究に記載されている、コポリ(乳

10

20

30

40

50

酸 / グリコール酸)などのゆっくりと分解する非毒性で非抗原性ポリマーに分散されているか又はカプセル化されている治療化合物又はその塩を含む。化合物又はその塩は、コレステロール若しくは他の脂質マトリックスペレット、又はシラストマーマトリックスインプラント中に製剤されていてもよい。追加の徐放性デポインプラント又は注射用製剤は、当業者には明らかだろう。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, JR Robins on ed., Marcel Dekker Inc., New York, 1978; 及びControlled Release of Biologically Active Agents, RW Baker, John Wiley & Sons, New York, 1987を参照されたい。上記は引用によりその全体として組み込まれる。  
。

#### 【0168】

追加の形態の制御放出製剤は、生体許容性(bioacceptable)溶媒中のコポリ(乳酸 / グリコール酸)又は乳酸とPEGのブロックコポリマーなどの生分解性ポリマーの溶液を含み、それが皮下又は筋肉内に注射されて、デポ製剤が得られる。本明細書に記載される治療化合物をそのようなポリマー性製剤と混合すると、作用持続時間が非常に長い製剤を得るのに好適である。

#### 【0169】

鼻腔内投与用に製剤される場合、鼻腔内粘膜を越える吸収は、例えばグリココール酸、コール酸、タウロコール酸、エトコール酸(ethocholic acid)、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、デフドロコール酸(dehydrocholic acid)、グリコデオキシコール酸、シクレデキストリン(cyclohextrin)などの界面活性剤を、約0.1から1.5重量パーセント、約0.5から4重量パーセント、又は約2重量パーセントの量で使用してさらに増強され得る。刺激が少なくより高い有効性を示すことが報告されている追加のクラスの吸収促進剤は、テトラデシルマルトシドなどのアルキルマルトシドのクラスである(全て引用により本明細書に組み込まれているArnold, JJ et al., 2004, J Pharm Sci 93:2205-13; Ahsan, F et al., 2001, Pharm Res 18:1742046及びそこに引用されている引用文献)。

#### 【0170】

医薬組成物は、例えば、滅菌注射用の水性又は油性懸濁剤としての滅菌注射用調合物の形態でよい。この懸濁剤は、好適な分散剤又は湿潤剤(例えば、Tween 80など)及び懸濁化剤を使用して、当技術分野に公知である技術に従って製剤され得る。滅菌注射用調合物は、例えば1,3-ブタンジオール中の溶液として、非毒性の非経口的に許容できる希釈剤又は溶媒中の滅菌注射用液剤又は懸濁剤でもよい。利用され得る許容できるビヒクリル及び溶媒の中に、マンニトール、水、リンゲル液、及び等張性塩化ナトリウム溶液がある。さらに、滅菌の不揮発油は、従来、溶媒又は懸濁媒体として使用されている。この目的のために、合成モノグリセリド又はジグリセリドを含む任意の低刺激性不揮発油も利用できる。オレイン酸及びそのグリセリド誘導体などの脂肪酸は、特にポリオキシエチル化バージョンにおけるオリーブ油又はヒマシ油など、天然の薬学的に許容できる油であるので、注射剤の調製に有用である。これらの油液剤又は懸濁剤は、スイス薬局方又は類似のアルコールなどの長鎖アルコール希釈剤又は分散剤も含み得る。

#### 【0171】

本発明の医薬組成物は、カプセル剤、錠剤、並びに水性懸濁剤及び液剤を含むがこれらに限定されない経口的に許容できる任意の剤形で経口投与できる。経口使用のための錠剤の場合、通常使用される担体には、ラクトース及びコーンスターチがある。ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤も典型的には加えられる。カプセル形態での経口投与のためには、有用な希釈剤には、ラクトース及び乾燥コーンスターチがある。水性懸濁剤が経口投与される場合、有効成分は、乳化剤及び懸濁化剤と組み合わされる。所望の場合、特定の甘味剤及び / 又は着香剤及び / 又は着色剤を加えてよい。

## 【0172】

本発明の医薬組成物は、直腸投与用の坐剤の形態でも投与できる。これらの組成物は、本発明の化合物を、室温で固体であるが直腸の温度で液体であり、したがって直腸で融けて活性成分を放出する好適な非刺激性の賦形剤と混合して調製できる。そのような材料には、ココアバター、蜜蝋、及びポリエチレングリコールがあるが、これらに限定されない。

## 【0173】

本発明の医薬組成物の局所投与は、所望の治療が、局所適用により容易にアクセスできる部分又は臓器を含む場合に特に有用である。皮膚に局所的に適用するために、医薬組成物は、担体に懸濁又は溶解している活性成分を含む好適な軟膏により製剤されなくてはならない。本発明の化合物の局所投与用の担体には、鉛油、液化石油 (liquid petroleum)、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン化合物、乳化蝋、及び水があるが、これらに限定されない。或いは、医薬組成物は、担体に懸濁又は溶解している活性化合物を含む好適なローション又はクリームにより製剤できる。好適な担体には、鉛油、ソルビタンモノステアレート、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコール、及び水があるが、これらに限定されない。本発明の医薬組成物は、直腸坐剤製剤により、又は好適な浣腸製剤で、下部消化管に局所適用することもできる。局所経皮パッチも本発明に含まれる。

## 【0174】

本発明の医薬組成物は、鼻腔内エアゾールによても、吸入よっても投与できる。そのような組成物は、医薬製剤の分野に周知である技法により調製され、ベンジルアルコール又は他の好適な保存剤、バイオアベイラビリティを高める吸収促進剤、フルオロカーボン、及び／又は当技術分野に公知である他の可溶化剤若しくは分散剤を使用して、食塩水中的液剤として調製できる。

## 【0175】

吸入による送達用に製剤される場合、いくつかの製剤は利点を与える。ジケトピペラジン（例えば、Technosphere粒子 [Pfutzner, A and Forst, T, 2005, Expert Opin Drug Deliv 2:1097-1106]）などの容易に分散する固体又は類似の構造への治療化合物の吸着は、治療化合物の迅速な初期の取り込みをもたらす製剤を与える。治療化合物及び賦形剤を含む凍結乾燥された粉末、特にガラス質粒子は、良好なバイオアベイラビリティを持ち肺への送達に有用であり、例えば、Exubera（登録商標）（Pfizer及びAventis Pharmaceuticals Inc.による吸入式インスリン）を参照されたい。

## 【0176】

一日あたり体重kgあたり約0.01から約100mg、好ましくは一日あたり体重kgあたり0.5から約50mgの有効成分化合物の用量レベルが、疾病的予防及び治療に有用である。典型的には、本発明の医薬組成物は、一日あたり約1から約5回、或いは持続注入として投与されるだろう。そのような投与は、慢性の療法としても急性の療法としても利用できる。担体材料と組み合わせて単一剤形を製造できる有効成分の量は、治療される宿主及び特定の投与様式により変わるだろう。典型的な調合物は、約5%から約95%の活性化合物(w/w)を含むだろう。好ましくは、そのような調合物は、約20%から約80%の活性化合物を含む。

## 【0177】

患者の状態が改善されると、本発明の化合物、組成物、又は組み合わせの維持量が、必要な場合投与され得る。その後、投与の用量若しくは頻度、又はその両方を、症状に応じて、改善された状態が保持されるレベルに低減することができ、症状が望ましいレベルに緩和した時、治療をやめなければならない。しかし、患者は、疾病的症状の再発時に、長期間の間欠的な治療を必要とすることがある。

## 【0178】

10

20

30

40

50

当業者が認識する通り、先に列挙したものより低い投与量又は高い投与量も必要になり得る。特定の患者のための具体的な用量及び治療レジメンは、種々の因子、例えば、利用される具体的な化合物の活性、年齢、体重、全般的な健康状態、性別、食事、投与の時間、排泄率、薬物の組み合わせ、感染の重症度及び経過、患者の感染に対する傾向、並びに治療する医師の判断に依存するだろう。

#### 【0179】

担体 - 薬物コンジュゲート、融合体、又は製剤は、コンジュゲートされていない、融合されていない、又は製剤されていない薬物よりも薬物製造者及び患者に利点を与える。具体的には、担体 - 薬物コンジュゲート又は製剤は、コンジュゲートされていない、融合されていない、又は製剤されていない薬物と比べて、投薬がより小さく頻度が少なくて済む、より強力で長期間作用する薬物だろう。これは、患者にとって、ヘルスケアコストがより低く、薬物投与スケジュールがより簡便であるということになる。担体 - 薬物コンジュゲート又は製剤は、通常静脈内注射により注入される薬物の注射経路を、いまや皮下注射又は経皮送達系により投与されるように、影響し得る。皮下注射又は経皮送達による投与経路は、患者が自宅で自己投与できるので最も好都合である。これは、患者の服薬遵守を向上させることができる。

#### 【0180】

本発明のさらに他の態様において、D B P のレベルは、担体 - 薬物療法の一部として増加させることができる。エストロゲンがD B P レベルを増加させ得ることが報告されている (Speeckaert et al., Clinica Chimica Acta 371 : 33)。担体 - 薬物コンジュゲートのより効果的な送達のためのエストロゲンの投与により、D B P のレベルが増加し得ることが、ここで企図される。

#### 【0181】

本発明のさらに他の態様において、薬物を経皮送達するために担体が使用できることが企図される。D B P は、通常、皮膚の表面近くの位置でUVにより活性化されたビタミンDを輸送するので、担体を持つ経皮送達系を使用することが実現可能になる。

#### 【0182】

本明細書に記載される本発明がより完全に理解するために、以下の実施例が述べられる。これらの実施例が説明目的のみのものであり、本発明をどのようにも限定すると解釈されるものでないことを理解されたい。

#### 【実施例】

#### 【0183】

実施例1：マレイミド反応性基を有するビタミンD<sub>3</sub>-PEGで構成された例示的なチオール反応性担体の調製

この実施例の担体上のマレイミドを使用して、実施例2及び3でタンパク質又はペプチド上の遊離のシステインにコンジュゲートした。本発明のスカフォールド中のPEGのサイズが0.1kDaから100kDaであることが企図される。そのため、2kDaのPEGを、この実施例でスカフォールドとして選択した。この実施例で使用する出発物質は、商業的供給源から購入した：ビタミンDアナログ（化合物1、Toronto Research Chemicalsのカタログ番号B691610）、2kDaのmPEG-マレイミド（化合物4、Creative PEGworksカタログ番号PHB-940）。

#### 【0184】

図2によると、(R)-メチル5-(((1R,3aS,7aR,E)-4-((Z)-2-((S)-5-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)-2-メチレンシクロヘキシリデン)エチリデン)-7a-メチルオクタヒドロ-1H-インデン-1-イル)ヘキサノアート（化合物1、7.5mg、0.0145mmol、1当量、Toronto Research Chemicalsから購入）を無水テトラヒドロフラン(0.4mL)に溶解させ、窒素を流した。テトラブチルアンモニウムフルオリド(22.7mg、0.087mmol、6当量)を加え、薄層クロマトグラフィー(TLC、シリ

10

20

30

40

50

カゲル、ヘキサン中 30% 酢酸エチル、UV 検出、リンモリブデン酸染色) によりモニタリングしながら反応物を室温で 3 時間攪拌した。化合物 2 を含む生じた混合物に、水酸化リチウム一水和物 (4.2 mg、0.1015 mmol、7 当量)、テトラヒドロフラン (0.3 mL)、及び水 (0.15 mL) を加えた。反応物に窒素を流し、室温で 18 時間攪拌した。TLC 及び質量分析法 (MS) による評価により、期待される化合物 3 の存在と共に完全な反応が示された。反応混合物をエーテル ( $2 \times 15 \text{ mL}$ ) で希釈し、10% クエン酸水溶液 (30 mL)、水 (30 mL)、及びブライン (30 mL) で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、温度を 20 未満に保ちながら濃縮した。試料を窒素気流下でさらに乾燥させると、((R)-5-((1R,3aS,7aR,E)-4-((Z)-2-((S)-5-ヒドロキシ-2-メチレンシクロヘキシリデン)エチル-イデン)-7a-メチルオクタヒドロ-1H-インデン-1-イル)ヘキサン酸) (化合物 3、5.3 mg、収率 95%) を無色のゴムとして与えた。Rf 0.2 (シリカゲル、ヘキサン中 40% EtOAc)。NMR 分析により、約 1.14% の THF 及び約 0.14% のエーテルの存在が明らかになった。

#### 【0185】

化合物 3 (5.3 mg、0.0137 mmol、1 当量)、化合物 4 (MAL-P EG-アミン TFA 塩、21.9 mg、0.0109 mmol、0.8 当量、Creative Pegworks から購入)、及び 2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨージド (8.7 mg、0.0342 mmol、2.5 当量) を、無水ジクロロメタン (0.5 mL) に溶解させた。トリエチルアミン (7.6  $\mu\text{L}$ 、0.0548 mmol、4 当量) を加え、反応混合物を、窒素下、室温で 3 時間攪拌した。次いで、反応物をジクロロメタン (30 mL) で希釈し、10% クエン酸水溶液 (40 mL)、飽和重炭酸ナトリウム水溶液 (30 mL)、及びブライン (30 mL) で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、温度を 20 未満に保ちながら濃縮した。試料を、窒素気流下でさらに乾燥させると、目的化合物を茶色のゴムとして与えた。Rf 0.6 (シリカゲル、ジクロロメタン中 20% メタノール)。単離した生成物の TLC 分析 (ニンヒドリン染色) により、化合物 4 がないことが示された。単離された物質の  $^1\text{H}$  NMR 分析により、その正体及び純度が確認された。NMR 分析は、認識できる量の塩化メチレンも他の溶媒も示さなかった。

#### 【0186】

実施例 2：修飾された FGF 21 タンパク質 - 担体コンジュゲートの調製及び特性化：

修飾された FGF 21 を、実施例 1 に記載のビタミン D<sub>3</sub>-PEG-マレイミド担体にコンジュゲートした。以下に示す通り、FGF 21 - 担体組成物は、天然の FGF 21 と比べて著しく向上した薬物動態的性質を与え、それにより、担体コンジュゲート分子は、糖尿病の治療にとって重要な治療化合物となる。

#### 【0187】

FGF 21 を、以下の通り、エシェリキア・コリ (E. coli) 中に発現させ、精製し、担体にコンジュゲートした。修飾された FGF 21 を、タンパク質の担体への部位特異的カップリングを可能にする FGF 21 のアミノ末端付近の遊離システイン残基及び精製を容易にするために加えた His<sub>6</sub> タグを組み込むように設計した。修飾された FGF 21 コード配列 (配列番号 4) を、エシェリキア・コリ (E. coli) での発現のために計算により最適化し、遺伝子をコンストラクト研究組織 (DNA 2.0 Menlo Park, CA) に化学合成させ、T5 プロモーター及びカナマイシン耐性遺伝子を含む発現ベクター pJexpress 401 中にクローニングした。プラスミドを、エシェリキア・コリ (E. coli) Origami 2 細胞 (EMD Biosciences Inc.) 中に形質転換した。Origami 株での pJexpress 401 ベクターからの FGF 21 の発現は、以下の通り達成した。ルリア培地プラス 1% グルコースに、1:100 の希釈で一晩培養物を接種し、OD 600 が 0.6 である対数期まで増殖させた。次いで、培養温度を 37 から 18 に下げ、培養物を、0.2 mM の IPTG を使用して誘導し、180 rpm で振とうしながら 18 で一晩増殖させた。細胞を収集し、

10

20

30

40

50

溶解させ、上清を回収した。タンパク質を、固定化金属アフィニティクロマトグラフィー（IMAC）樹脂を使用して親和性精製し、イオン交換クロマトグラフィーにより仕上げた。

#### 【0188】

次いで、精製したFGF21タンパク質を、10 mMのトリスpH 8.0、50 mMのNaCl、1 mMのEDTA中で緩衝液交換した。ビタミンD<sub>3</sub>-PEG-マレイミド担体分子（実施例1）へのコンジュゲーションは、DMSOに10 mg/mLで溶解させたチオール反応性担体を、0.5 mg/mLの遊離のシステインを含むFGF21タンパク質（配列番号3）と、2:1の担体とタンパク質のモル比で混合して実施した。コンジュゲートしたタンパク質は、イオン交換クロマトグラフィーにより未反応成分から分離した。コンジュゲーション及び純度は、SDS-PAGEにより確認した。次いで、FGF21単体及びFGF21-担体コンジュゲートを、PBSに緩衝液交換して、0.22ミクロンフィルターを使って動物実験に使用するために滅菌した。  
10

#### 【0189】

FGF21（配列番号3）又はFGF21-担体コンジュゲートの薬物動態は、Sprague Dawleyラットで試験した。簡単に述べると、0.1 mg/kgの各分子を、SC注射によりラットに別々に注射した。血漿の試料を、30分、60分、120分、240分、360分、24時間、及び48時間で回収した。試料を、FGF21用に確認されている市販のELISAキット（Millipore、カタログ番号EZHFGF21-19K）を使用して分析した。結果は、FGF21とFGF21-担体コンジュゲートの間で、以下の時点（30、60、120、及び240分）、SC投与の後の吸収の著しい差を示し、その後FGF21レベルは低下し始めた（図3）。これらのデータは、担体のFGF21へのコンジュゲーションが、SC注射の後のFGF21のバイオアベイラビリティを著しく高めたことを示す（380倍の増加、FGF21の平均Cmax、376 pg/mLを、FGF21-担体コンジュゲートの平均Cmax、143526 pg/mLから分けることにより計算）。曲線下面積（AUC）は、FGF21-担体コンジュゲートでは1047980 h \* pg/mL及びFGF21単体では1551 h \* pg/mLと計算した。したがって、FGF21-担体コンジュゲートの平均AUCを、FGF21の平均AUCから分けると、675倍の薬物曝露の増加があった。合わせると、データは、バイオアベイラビリティの増加における担体分子の有用性を実証し、コンジュゲートされたFGF21が、天然のFGF21に優って著しい薬物動態の利点を持つことを示す。  
20

#### 【0190】

実施例3：グレリンペプチド-担体コンジュゲートの調製及び特性化：

この実施例では、実施例1で生成されたビタミンD<sub>3</sub>-PEG-マレイミド担体のグレリンへのコンジュゲーションが、著しく長い半減期をグレリンに与え、それにより、コンジュゲートされた分子が、力弱い、食欲不振、及び/又は高齢者の虚弱の治療のための潜在的に有用な治療薬となる。

#### 【0191】

C末端システインが加えられた合成ラットグレリンペプチドをInnovagen（Lund、Sweden、配列番号6）から購入した。コンジュゲーションが生物活性に著しい影響を与えないように、実施例1に記載のビタミンD<sub>3</sub>-PEG-マレイミド担体を、サイズで2~3 kDaペプチドに比例するように選択した。担体とのコンジュゲーションは、10 mg/mLでDMSOに溶解させたチオール反応性担体（実施例1）を、15 mMのMES（pH 6.0）、1 mMのEDTA中で1 mg/mLの濃度の遊離システインを含むグレリンペプチドと、2:1の担体とペプチドのモル比で混合させて実施した。コンジュゲートしたペプチドを、イオン交換クロマトグラフィーにより未反応成分から分離した。コンジュゲーション及び純度をSDS-PAGEにより確認した。次いで、ラットグレリン（rグレリン）ペプチド及びrグレリン-担体コンジュゲートを、PBSに緩衝液交換して、動物試験に使用するために0.22ミクロンのフィルターを使用して濾  
40  
50

過滅菌した。

**【0192】**

r グレリン（配列番号 6）又は r グレリン - 担体コンジュゲートの薬物動態を、 S p r a g u e D a w l e y ラットで試験した。簡単に述べると、 0 . 1 m g / k g の各分子を静脈内（ I V ）注射により別々にラットに注射した。血漿の試料を、 30 分、 60 分、 120 分、 240 分、 360 分、 24 時間、及び 48 時間で回収した。試料を、 ラット血漿からの r グレリンの分析用に確認されている市販の E L I S A キット（ M i l l i p o r e 、 カタログ番号 E Z R G R T - 91 K ）を使用して分析した。結果は、 r グレリンと r グレリン - 担体コンジュゲートの薬物動態プロファイルにおいて著しい差を示す（図 4 ）。 W i n N o n L i n を使用して半減期を計算すると、 r グレリンで 0 . 37 時間の半減期及び r グレリン - 担体コンジュゲートで 8 時間の半減期が明らかになり、 計算すると 10 2.2 倍の向上である。データは、半減期の増加における担体分子の有用性の第二の例を実証した。このように、コンジュゲートされた形態でのグレリンは、カヘキシー、食欲不振、及び高齢者の虚弱などのグレリン反応性の疾病的治療に有用な治療薬である。

**【0193】**

実施例 4 . グレリンペプチド - 担体の受容体結合活性の評価

グレリンペプチドの活性は、担体にコンジュゲートされている場合、スカフォールド及び標的化基の存在により悪影響を受けなかった。これを示すために、グレリン（配列番号 5 ）及び実施例 3 のビタミン D<sub>3</sub> - P E G - マレイミド担体 - コンジュゲートグレリンを、以下に記載する細胞ベースの受容体作動剤アッセイを利用して、受容体結合及びグレリン受容体の活性化（作動剤活性）に関して比較した。 20

**【0194】**

被験化合物を、 G H S - R - 発現 C H O - K 1 細胞培養物に加えた。グレリンは G H S - R 受容体に結合し、それを活性化し、細胞内カルシウム応答を作動剤活性の指標として評価した。 F L I P R （商標）（蛍光イメージングプレートリーダー）ハイスループット細胞スクリーニング装置用の G e n S c r i p t U S A I n c . により開発されたカルシウムフラックス系アッセイにより、活性を測定した。

**【0195】**

G H S - R を発現している C H O - K 1 細胞を、最適な細胞の健康を維持するために、 10 % ウシ胎児血清、 500 m g / m L の G 4 1 8 を補った H a m ' s F 1 2 培地で培養し、継代した。アッセイ 18 時間前に、 384 - ウェルブラックウォールクリアボトムプレートに、ウェルあたり 20,000 細胞の密度で、 20 μ L の増殖培地に細胞を播種し、 37 / 5 % C O<sub>2</sub> で保った。アッセイの最初に、 20 μ L のカルシウム - 4 ローディングバッファーをウェルに加えた。プレートを、暗所で、 37 で 60 分間、次いで室温で 15 分間インキュベートした。グレリン及びグレリン - コンジュゲート被験物は、 D M S O 中 1 m M の初期濃度であった。被験物を、 20 m M H E P E S 緩衝剤を含むハンクの緩衝食塩水（ H B S S ）（ p H 7.4 ）に、連続的に 10 倍希釈してから、試験プレートに加えた。各被験物の最終濃度は、細胞への添加前に 5 × 濃度であった。細胞中の細胞内カルシウムレベルを、被験物の添加前に F L I P R （商標）装置を使用して 20 秒間測定した。各希釈被験物の 10 μ L をプレートに加え、最終体積を 50 μ L にした。細胞内カルシウムレベルの変化を、さらに 100 秒間（ 21 から 120 秒）測定した。 30 40

**【0196】**

20 秒の読み（ 1 から 20 秒）の平均値をベースラインの読みとして計算し、相対蛍光単位（ R F U ）強度値を、ベースラインの読みの平均値を引いた最大蛍光単位（ 21 から 120 秒）により計算した。データ取得及び分析は S c r e e n W o r k s （登録商標）（バージョン 3.1 ）を利用して実施し、 E x c e l にエクスポートした。

**【0197】**

化合物の活性化 % は、以下の式を利用して計算した：

$$\text{活性化 \%} = \left( \frac{\text{R F U}_{\text{化合物}} - \text{R F U}_{\text{バックグラウンド}}}{\text{R F U}_{\text{作動剤対照}} - \text{R F U}_{\text{バックグラウンド}}} \right) \times 100 \% \text{, 次いで、活性化を、化合物の累積投与量の対数} \quad 50$$

の関数としてプロットした。データは、二連の測定の平均を表す。G e n S c r i p t により書かれたデータ分析ウィザードを利用して E C 5 0 を決定した。

#### 【 0 1 9 8 】

担体のないグレリンの E C 5 0 値は 8 8 . 5 n M であった。比較すると、担体コンジュゲートグレリンは、 E C 5 0 値が 8 5 n M であり、対照ペプチドにほぼ等しい。このように、ペプチドの作動剤活性は、グレリンペプチドへの担体のコンジュゲーションの後に保存された。D B P を含む 1 0 % 血清の存在下でアッセイを実施したことに留意されたい。担体コンジュゲートペプチドでは、受容体結合及び活性化に干渉は全く観察されなかった。

#### 【 0 1 9 9 】

実施例 5 . N H S 反応性基を有するビタミン D<sub>3</sub> - P E G で構成された例示的なアミン反応性担体の調製

担体上の N H S 反応性基を、タンパク質上のアミン基へのコンジュゲーションのために生成させた。2 k D a の P E G を、この実施例のスカフォールドとして選択した。この実施例に使用した出発物質は、ビタミン D アナログ（化合物 1 ）に関しては T o r o n t o R e s e a r c h C h e m i c a l s から、2 k D a の m P E G - アミノ酸（化合物 5 ）に関しては C r e a t i v e P e g w o r k s から購入した。

#### 【 0 2 0 0 】

図 5 ( 工程 1 及び 2 ) によると : ( R ) - メチル - 5 - ( ( 1 R , 3 a S , 7 a R , E ) - 4 - ( ( Z ) - 2 - ( ( S ) - 5 - ( ( t e r t - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) - 2 - メチレンシ - クロヘキシリデン ) エチリデン ) - 7 a - メチルオクタヒドロ - 1 H - インデン - 1 - イル ) ヘキノアート（化合物 1 、 8 . 2 m g 、 0 . 0 1 5 9 m m o l 、 1 当量）を無水テトラヒドロフラン（ T H F 、 0 . 4 m L ）に溶解させ、混合物に窒素を流した。テトラブチルアンモニウムフルオリド溶液（ 2 5 m g 、 0 . 0 9 6 m m o l 、 6 当量）を加え、薄層クロマトグラフィー（ T L C 、シリカゲル、ヘキサン中 3 0 % 酢酸エチル、 U V 検出、リンモリブデン酸染色）によりモニタリングしながら、反応混合物を室温で 3 時間攪拌した。化合物 2 を含む生じた混合物に、水酸化リチウム - 水和物（ 4 . 6 m g 、 0 . 1 0 9 m m o l 、 7 当量）、 T H F （ 0 . 3 m L ）、及び水（ 0 . 1 6 m L ）を加えた。反応混合物に窒素を流し、室温で 1 8 時間攪拌した。 T L C 及び質量分析法（ M S ）による評価により、期待される化合物 3 の存在と共に完全な反応が示された。反応混合物をエーテル（ 1 0 m L ）で希釈し、 1 0 % クエン酸水溶液（ 1 0 m L ）、水（ 1 0 m L ）、及びブライン（ 1 0 m L ）で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、温度を 2 0 未満に保ちながら濃縮した。窒素気流下で試料をさらに乾燥させると、( ( R ) - 5 - ( ( 1 R , 3 a S , 7 a R , E ) - 4 - ( ( Z ) - 2 - ( ( S ) - 5 - ヒドロキシ - 2 - メチレンシクロヘキシリデン ) エチル - インデン ) - 7 a - メチルオクタヒドロ - 1 H - インデン - 1 - イル ) ヘキサン酸（化合物 3 、 6 . 1 m g 、収率 9 9 % ）を無色ゴムとして与えた。 R f 0 . 2 ( シリカゲル、ヘキサン中 4 0 % 酢酸エチル ( E t O A c ) ) 。核磁気共鳴分光法（ N M R ）分析により、約 7 % のエーテルの存在が明らかになった。

#### 【 0 2 0 1 】

図 5 ( 工程 3 ) によると : P E G - アミノ酸 4 ( 1 8 . 5 m g 、 0 . 0 0 9 2 m m o l 、 C r e a t i v e P e g w o r k s から購入 ) の無水メタノール溶液に、ジオキサン中の H C 1 ( 4 M 、 1 . 5 m L ) を加え、反応混合物を密封した管の中で 7 0 で 2 0 時間加熱した。反応物を T L C ( ニンヒドリン染色 ) によりモニタリングし、反応が完了すると、ロータバップで濃縮させた。残渣をジクロロメタン（ 3 × 5 m L ）及びエーテル（ 3 × 5 m L ）と同時蒸発させて薄黄色の泡とし、それをエーテル（ 5 m L ）に懸濁させた。液体をデカンテーションし、得られた固体を乾燥して、所望の生成物 5 ( 1 4 m g 、 7 5 % ) を薄黄色の固体として単離した。 R f 0 . 2 ( シリカゲル、 2 0 % メタノール ( M e O H ) / D C M / 0 . 2 % N H<sub>4</sub> O H ) 。 N M R 分析により、認識できる量の塩化メチレンもエーテルも示されなかった。

10

20

30

40

50

## 【0202】

図5(工程4)によると:化合物3(3.4mg、0.009mmol、1当量)、化合物6(メチルエステルPEG-アミンHC1塩、14mg、0.007mmol、0.8当量)、及び2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨージド(5.6mg、0.022mmol、2.5当量)を、無水ジクロロメタン(0.6mL)に溶解させた。トリエチルアミン(5μL、0.0356mmol、4当量)を加え、反応混合物を窒素下で、3時間室温で攪拌した。反応はこの時点では不完全であったので、追加量の化合物3(1.7mg、0.0045mmol)を加え、反応をさらに3時間継続し、次いで、ジクロロメタン(10mL)で希釈し、10%クエン酸水溶液(10mL)、飽和重炭酸ナトリウム水溶液(10mL)、及びブライン(10mL)で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、温度を20℃未満に保ちながら濃縮した。試料をシリカゲル(2g)フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。カラムを、最初に酢酸エチルにより溶出して、未反応の化合物3を除き、次いで1~10%のMeOH/ジクロロメタン(各20mL)で溶出した。純粋な生成物を含む分画を合わせて、温度を20℃未満に保ちながらロータバップで蒸発させた。窒素気流下で試料を乾燥させると、化合物7を茶色のゴムとして与えた(10mg、60%)。R<sub>f</sub> 0.3(シリカゲル、ジクロロメタン中5%MeOH)。単離した生成物のTLC分析(ニンヒドリン染色)により、化合物6がないことが示された。単離した物質の<sup>1</sup>H NMR分析により、その正体及び純度が確認された。NMR分析により、1.1%の塩化メチレンの存在が明らかになった。

## 【0203】

図5(工程5)によると:化合物7(10mg、0.0042mmol)を、THF(0.2mL)と一滴のメタノールの混合物に溶解させた。この溶液に、水酸化リチウム-水和物溶液(0.9mg、0.021mmol、0.1mLの水中5当量)を加えた。反応混合物に窒素を流し、室温で18時間攪拌した。TLCにより評価すると、化合物8の存在と共に完全な反応が示された。反応混合物をジクロロメタン(10mL)で希釈し、10%クエン酸水溶液(10mL)及びブライン(10mL)で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、温度を20℃未満に保ちながら濃縮した。窒素気流下で、試料をさらに乾燥させると、所望のビタミン-D<sub>3</sub>-PEG-酸(化合物8、7mg、収率71%)を茶色のゴムとして与えた。R<sub>f</sub> 0.2(シリカゲル、10%MeOH/ジクロロメタン)。NMR分析により、約2%のジクロロメタンの存在が明らかになった。

## 【0204】

ストック溶液を調製した:1mLの無水ジメチルホルムアミド(DMF)中の34gのN-ヒドロキシスクシンイミド及び1mLの無水ジクロロメタン中の61mgのジシクロヘキシカルボジイミド(DCC)。

## 【0205】

図5(工程6)によると:化合物8(7mg、0.003mmol、1当量)のジクロロメタン(0.3mL)溶液に、N-ヒドロキシスクシンイミドのDMF溶液(10μL、0.34mg、0.003mmol)、それに続いてDCCのジクロロメタン溶液(10μL、0.61mg、0.003mmol)を加え、反応混合物に窒素を流し、20時間攪拌した。TLCにより示されるとおり反応がこの時点で不完全であったので、追加量のDMF中のN-ヒドロキシスクシンイミド(25μL、0.85mg、0.0075mmol)及びジクロロメタン中のDCC(25μL、1.53mg、0.0075mmol)を加え、反応をさらに20時間継続した。クロロホルム(10mL)を反応混合物に加え、水(10mL)で洗浄した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を除去すると、所望の目的化合物ビタミンD<sub>3</sub>-PEG-NHS(7.0mg、粗製)を与えた。この物質の<sup>1</sup>H NMR及びTLC(R<sub>f</sub>:0.3、10%MeOH/クロロホルム)により所望の物質の存在が示された。次いで、ビタミンD<sub>3</sub>-PEG-NHS担体を実施例6で使用した。

## 【0206】

実施例6.抗体-担体コンジュゲートの調製及び特性化

10

20

30

40

50

インフリキシマブ - 担体コンジュゲートは、インフリキシマブ単体と比べて、ラットで血清濃度及びバイオアベイラビリティの増加を示した。

#### 【0207】

インフリキシマブは、凍結乾燥粉末として適切な塩と共に販売されており (Hannah Pharmaceuticals)、それを、水で 10 mg / mL の濃度で再懸濁させた。ビタミン D<sub>3</sub> - PEG - NHS 担体を、DMSO に 10 mg / mL の濃度で再懸濁させた。次いで、ビタミン D<sub>3</sub> - PEG - NHS 担体とインフリキシマブを、担体とインフリキシマブのモル比 5 : 1 及び 10 : 1 で混合した。本発明の治療化合物担体コンジュゲートは、典型的には、治療化合物に個々に結合した担体分子を少なくとも 1 個有し、1 ~ 10 個の担体分子になり得る。担体の NHS バージョンを使用することにより、2 個以上の担体を治療用タンパク質に結合することができ、これは、実験的には、反応物中の担体と目的治療薬のモル比を変えることにより制御できる。この実施例において、2 ~ 4 担体の目標分布を、所望のパラメーターとして設定した。2 つの異なるモル比を試験し、得られたコンジュゲートを質量分析法により調べることにより、実際の比率を決定した。  
10

#### 【0208】

インフリキシマブ及びインフリキシマブNHS - 担体コンジュゲートを、コンジュゲートしていない担体から、40 kDa カットオフの脱塩カラム (Zeba Spin, Thermo Scientific) を使用して分離した。質量分析法を利用して、反応物中のインフリキシマブのインタクトマスを計算した。結果により、未修飾のインフリキシマブが圧倒的に 149 kDa の質量を有することが示された。担体にコンジュゲートされたインフリキシマブの質量は、抗体あたり 2 ~ 4 担体で 3 kDa 担体の平均結合と共に増加する割合の質量を有した。  
20

#### 【0209】

次いで、精製した 5 : 1 反応生成物を、皮下 (SC) 投与されたインフリキシマブをインフリキシマブ - 担体コンジュゲートと比較するラット薬物動態試験に使用した。投与量は全試験群で 1 mg / kg であり、一群には 3 匹のラットがいた。血清試料を、投薬前及び注射後 5 分から 48 時間の種々の時間で回収した。次いで、血清中のインフリキシマブのレベル決定に特異的な E L I S A キット (Promonitor (商標)、Progenika (商標)) を使用して、血清試料を E L I S A により分析した。薬物動態パラメーターを、WinNonLin を利用して決定した。図 6 に示す結果は、コンジュゲートしていない抗体に比べて抗体がビタミン D<sub>3</sub> - PEG - NHS 担体にコンジュゲートしている場合の、血清濃度及び曲線下面積 (AUC) の 1.5 倍の向上を表す。より具体的には、24 時間及び 48 時間の時点で、インフリキシマブでは、2100 ng / mL 及び 4800 ng / mL の濃度が観察される。対照的に、24 時間及び 48 時間の時点で、担体にコンジュゲートされたインフリキシマブでは、3200 ng / mL 及び 7000 ng / mL の濃度が観察される。これは、バイオアベイラビリティの 50 % 向上ということになる。AUC 計算により、50 % 向上が示された (図 6)。このように、この実施例は、コンジュゲートしていない抗体に比べて、インフリキシマブの血清濃度及びバイオアベイラビリティの向上における担体の有用性を示す。  
30

#### 【0210】

例示的な配列  
40

## 【化36】

配列番号1

ヒトFGF21タンパク質配列

MDSDETGFEHSGLWVSVLAGLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLTDDAQQTE  
 AHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDP  
 EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPNGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPP  
 GILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

10

## 【化37】

配列番号2

成熟ヒトFGF21タンパク質配列

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALK  
 PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP  
 GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYA  
 S

20

## 【化38】

配列番号3

修飾された成熟ヒトFGF21タンパク質配列(N末端6-hisタグ、tev切断部位、C末端に追加の182P、

及び成熟ヒトFGF21配列のナンバリングを利用して下記の残基への修飾:13C及びG170E)

MGSHHHHHHSSGENLYFQGHPCPDSSPLLQFGGQVRQRYLTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPNGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASP

30

## 【化39】

配列番号4

エシェリキア・コリ(E.Coli)中でのFGF21発現のための最適化されたコード配列(アミノ酸配列、配列番号3を参照)

ATGGGCTCACATCATCACCAACCACATCAGCAGCGGAGAGAACTTGTATTCAGGG  
 ACATCCGTGCCCTGACAGCAGCCCCCTGCTGCAGTTGGTGGTCAAGTCCGTAGCG  
 TTACCTGTACACTGACGACGCGAACAGACCGAGGCGCACCTGGAAATTGCGAAG  
 ATGGTACGGTGGGTGGCGCAGCGGACCAAAGCCCAGTCCCTGTTGCAGCTGAAG  
 GCCCTGAAGCCGGGTGTCACTCAAATCCTGGCGTTAAAACCAGCCGTTTCTGTGC  
 CAACGTCCGGATGGTGCCTGTACGGTCCCTGCACCTCGACCCAGAGGCATGTAGC  
 TTTCGTGAAGTGTGCTGGAAAGATGGCTATAATGTGTACCAAGTCTGAGGCGCACGGT  
 CTGCCGTTGCACCTGCCGGTAACAAAAGCCCAGCGACCCAGCACCGCGTGG  
 TCCGGCTCGCTTCCTGCCGCTGCCGGTCTGCCTCCGGCGCTGCCGGAGCCGCCAGG  
 CATTCTGGCTCCGCAACCGCCGGATGTTGGCAGCAGCGATCCGCTGAGCATGGTTGA  
 ACCGTCGCAGGGCCGCAGCCCGTCTTATGCCAGCCCGTAA

10

20

## 【化40】

配列番号5

ヒトグレリンタンパク質配列

GS(n-オクタノイル-S)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

## 【化41】

配列番号6

30

C末端cysが加えられたラットグレリン

GS(n-オクタノイル-S)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRC

## 【化42】

配列番号7

DBPタンパク質配列

MKRVLVLLAVAFGHALERGRDYEKNKVCKEFSHLGKEDFTSLSLVLYSRKFPSGTSEQ  
VSQVLKEVVSLTEACCAEGADPDCYDRTSALSAKSCENSPFPVHPGTAECCTKEGLE  
RKLCMAALKHQPEFPTYVEPTNDEICEAFRKDPKEYANQFMWEYSTNYGQAPLSLLV  
SYTKSYLSMVGSCCTSASPTVCFLKERLQLKHLSLLTLSNRVCSQYAAYGEEKSRLSN  
LIKLAQKVPTADLEDVLPLAEDITNILSKCCESASEDCMAKELPEHTVKLCDNLSTKNSK  
FEDCCQEKTAMDVFVCTYFMPAAQLPELPDVELPTNKDVCDPGNTKVMMDKYTFELSRR  
THLPEVFLSKVLEPTLKSLGECCDVDSTTCFNAKGPLLKKELSSFIDKGQELCADYSEN  
TFTYEYKKKLAERLKAKLPDATPTELAKLVNKHSDFASNCCSINSPPLYCDSEIDAELKNI  
L

10

## 【化43】

配列番号8

DBPヌセロチド配列

TTTAATAATAATTCTGTGTTGCTTCTGAGAGATTAATAATTGATTAATTCATAGTCAGGA  
 ATCTTGAAAAAGGAAACCAATTACTTTGGCTACCACTTTACATGGTCACCTAC  
 AGGAGAGAGGAGGTGCTGCAAGACTCTCTGGTAGAAAAATGAAGAGGGCCTGGT  
 ACTACTGCTTGCTGTGGCATTGGACATGCTTAGAGAGAGGCCGGATTATGAAAAA 10  
 GAATAAAAGTCTGCAAGGAATTCTCCATCTGGAAAGGAGGACTTCACATCTGTG  
 ACTAGTCCTGTACAGTAGAAAATTCCCAGTGGCACGTTGAACAGGTCAAGCCA  
 ACTTGTGAAGGAAGTTGTCTCCTTGACCGAACGCCTGCTGCGGAAGGGCTGACCCTG  
 ACTGCTATGACACCAGGACCTCAGCACTGTCTGCCAAGTCCTGTGAAAGTAATTCTC  
 CATTCCCCGTTCACCCAGGCACTGCTGAGTGCTGCACCAAAGAGGGCCTGGAACGA  
 AAGCTCTGCATGGCTGCTTGAAACACCAGGCCACAGGAATTCCCTACCTACGTGGA  
 ACCCACAAATGATGAAATCTGTGAGGCAGGAAAGATCCAAGGAATATGCTA  
 ATCAATTATGTGGAATTCCACTAATTACGGACAAGCTCCTCTGTCACTTTAGT 20  
 CAGTTACACCAAGAGTTATCTTCTATGGTAGGGCCTGCTGTACCTCTGCAAGCCC  
 AACTGTATGCTTTGAAAGAGAGACTCCAGCTAAACATTATCACTTCTCACCAC  
 TCTGTCAAATAGAGTCTGCTCACAAATATGCTGTTATGGGGAGAAGAAATCAAGGC  
 TCAGCAATCTCATAAAGTTAGCCCCAAAAGTGCCTACTGCTGATCTGGAGGATGTT  
 TGCCACTAGCTGAAGATATTACTAACATCCTCTCCAAATGCTGTGAGTCTGCCTCTG  
 AAGATTGCATGCCAAAGAGCTGCCGAACACACAGTAAAACACTCTGTGACAATTAA 30  
 TCCACAAAGAATTCTAAGTTGAAGACTGTTGTCAAGAAAAACAGCCATGGACGT  
 TTTGTGTGCACTTACTCATGCCAGCTGCCAACTCCCCGAGCTTCAGATGTAGA  
 GTTGCCCCACAAACAAAGATGTGTGATCCAGGAAACACCAAGTCATGGATAAGT  
 ATACATTGAACTAAGCAGAAGGACTCATCTCCGGAAAGTATTCCCTCAGTAAGGTAC  
 TTGAGCCAACCCTAAAAAGCCTGGTGAATGCTGTGATGTTGAAGACTCAACTACCT  
 GTTTAATGCTAAGGGCCCTCTACTAAAGAAGGAACATCTTCTTCATTGACAAGG  
 GACAAGAACTATGTGCAGATTATTCAAGAAAATACATTACTGAGTACAAGAAAAAA  
 CTGGCAGAGCGACTAAAAGCAAAATTGCCATGCCACACCCACGGAACTGGCAA 40  
 GCTGGTTAACAGCACTCAGACTTGCCTCCAAGTGTGTTCCATAAAACTCACCTCC  
 TCTTACTGTGATTGAGATTGATGCTGAATTGAAGAATATCCTGTAGTCCTGAAG  
 CATGTTTATTAACATTGACCAGAGTTGGAGCCACCCAGGGAAATGATCTGTGATGAC  
 CTAACCTAACGAAAACCACTGAGCTCTGGGAAGACAACTAGGATACTTTCTACTTT  
 TTCTAGCTACAATATCTCATACAATGACAAGTATGATGATTGCTATCAAAATAAA  
 TTGAAATATAATGCAAACCAAAAAAAAAAAAAAA

## 【化44】

配列番号9

腫瘍壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGCCAGGAGGCCTCCCCAA  
 GAAGACAGGGGGGCCAGGGCTCCAGGCAGGTGCTTGTCTCAGCCTCTCCTT  
 CCTGATCGTGGCAGGCCACCACGCTCTGCCTGCTGCACTTGGGTGATCGG 10  
 CCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCAGGGACCTCTCTAATCAGCCCTCTGCCAGGC  
 AGTCAGATCATCTCTCGAACCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCATGTTGTAGCAA  
 CCCTCAAGCTGAGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGCCAATGCCCTCTGG  
 CCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGTTGGTGGTGCCTCAGAGGCCCTGTAC  
 CTCATCTACTCCCAGGTCCCTCTCAAGGGCCAAGGCTGCCCTCACCCATGTGCTC  
 CTCACCCACACCATCAGCCGCATGCCGTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTC  
 TCTGCCATCAAGAGGCCCTGCCAGAGGGAGACCCAGAGGGGCTGAGGCCAGGCC  
 CTGGTATGAGCCATCTATCTGGGAGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTACCGAC 20  
 TCAGCGCTGAGATCAATCGGCCGACTATCTCGACTTT  
 GCCGAGTCTGGCAGGTCTACTTGGGATCATTGCCCTGTGA

## 【化45】

配列番号10

腫瘍壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQRE  
 EFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDKPVAVVVANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELR 30  
 DNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA VSYQTKVNLLSAIKSPCQRET  
 PEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI AL

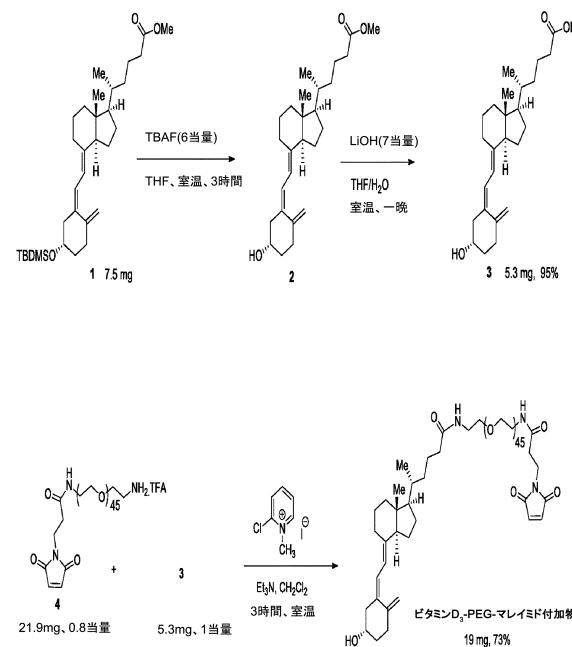
## 【0211】

本明細書に開示され言及された全ての刊行物及び特許は、引用によりその全体として組み込まれる。上記明細書は説明及び記載の目的のみに提示された。本明細書は、本発明を、開示された厳密な形態に限定しないものとする。本発明の範囲が、本明細書に添付される特許請求の範囲により定義されるものとする。

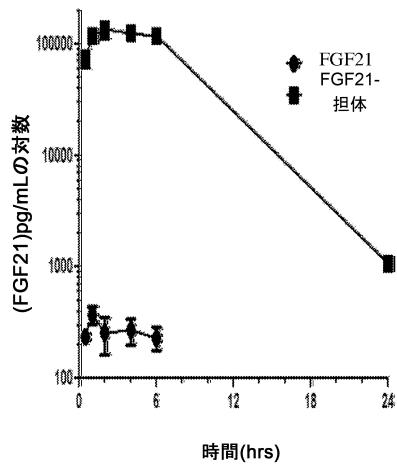
【図1】

標的化基  
スカフォード  
群合  
結合  
物

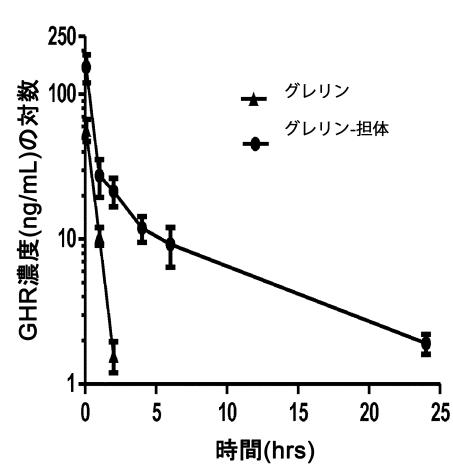
【図2】



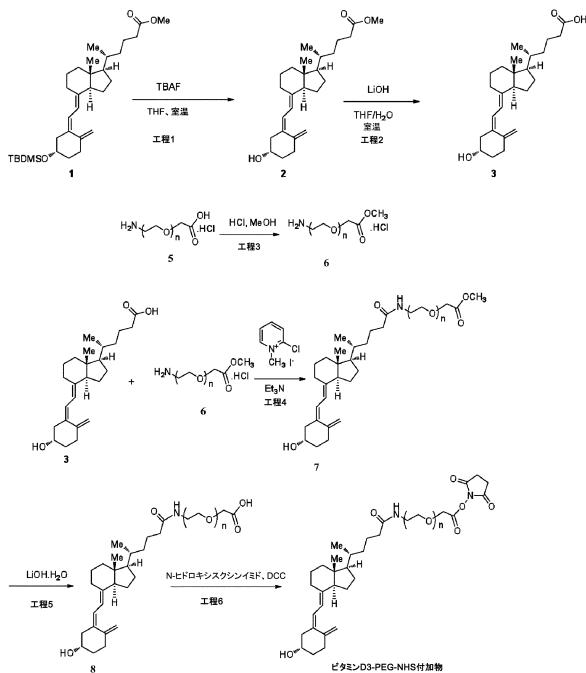
【図3】



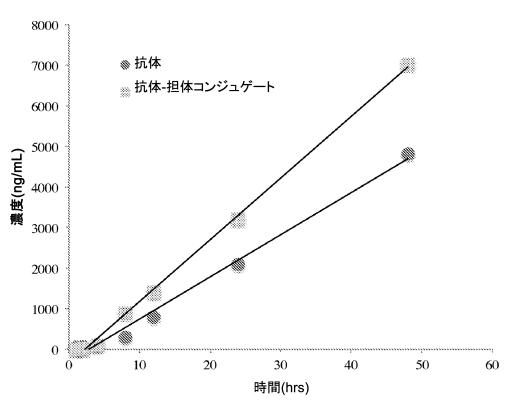
【図4】



【図5】



【図6】



【配列表】

0006195911000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K	47/42	(2017.01)
A 6 1 P	3/02	(2006.01)
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 K	38/18	(2006.01)
A 6 1 K	38/16	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)
A 6 1 P	31/04	(2006.01)
A 6 1 P	31/12	(2006.01)
A 6 1 P	31/10	(2006.01)
A 6 1 P	21/00	(2006.01)
A 6 1 P	9/00	(2006.01)
A 6 1 P	13/12	(2006.01)
A 6 1 P	11/00	(2006.01)
A 6 1 P	1/00	(2006.01)
A 6 1 P	7/00	(2006.01)
A 6 1 P	13/00	(2006.01)
A 6 1 P	3/00	(2006.01)
A 6 1 P	1/16	(2006.01)
A 6 1 P	25/00	(2006.01)
A 6 1 P	3/10	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	17/00	(2006.01)
C 0 7 K	14/575	(2006.01)
C 0 7 K	16/24	(2006.01)
		A 6 1 K    47/42
		A 6 1 P    3/02    1 0 2
		A 6 1 K    31/7088
		A 6 1 K    48/00
		A 6 1 K    39/395    D
		A 6 1 K    38/18
		A 6 1 K    38/16    1 0 0
		A 6 1 P    29/00
		A 6 1 P    31/04
		A 6 1 P    31/12
		A 6 1 P    31/10
		A 6 1 P    21/00
		A 6 1 P    9/00
		A 6 1 P    13/12
		A 6 1 P    11/00
		A 6 1 P    1/00
		A 6 1 P    7/00
		A 6 1 P    13/00
		A 6 1 P    3/00
		A 6 1 P    1/16
		A 6 1 P    25/00
		A 6 1 P    3/10
		A 6 1 P    35/00
		A 6 1 P    17/00
		C 0 7 K    14/575    Z N A
		C 0 7 K    16/24

(31)優先権主張番号 61/673,874

(32)優先日 平成24年7月20日(2012.7.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 タリク エム ソリマン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 0 ケンブリッジ ピーオーボックス 4 0 0 9  
2 7

(72)発明者 ラウラ エム ヘイルズ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 0 ケンブリッジ ピーオーボックス 4 0 0 9  
2 7

(72)発明者 ハワード ピー サード

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 8 0 1 ウォーバン セーラム ストリート 2 4 0

(72)発明者 ムカンティ アメール

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 8 0 1 ウォーバン セーラム ストリート 2 4 0

審査官 中尾 忍

(56)参考文献 米国特許出願公開第2 0 0 2 / 0 1 3 6 7 3 1 ( U S , A 1 )

米国特許出願公開第2 0 0 3 / 0 1 2 9 1 9 4 ( U S , A 1 )

特開平2 - 2 6 2 5 5 5 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61K 45 / 00  
A 61K 31 / 7088  
A 61K 38 / 16  
A 61K 38 / 18  
A 61K 39 / 395  
A 61K 47 / 00  
A 61K 47 / 06  
A 61K 47 / 34  
A 61K 47 / 42  
A 61K 47 / 50  
A 61K 48 / 00

C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )