

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-510080

(P2014-510080A)

(43) 公表日 平成26年4月24日(2014.4.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/30 (2006.01)	C07K 16/30 ZNA	4B024
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4C076
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4C084
A61K 47/48 (2006.01)	A61K 47/48	4C085
A61K 47/34 (2006.01)	A61K 47/34	4C086
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-557924 (P2013-557924)
 (86) (22) 出願日 平成24年3月9日 (2012.3.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年11月7日 (2013.11.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/028585
 (87) 国際公開番号 W02012/122514
 (87) 国際公開日 平成24年9月13日 (2012.9.13)
 (31) 優先権主張番号 61/450,795
 (32) 優先日 平成23年3月9日 (2011.3.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/500,756
 (32) 優先日 平成23年6月24日 (2011.6.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/507,882
 (32) 優先日 平成23年7月14日 (2011.7.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511028803
 セントローズ, エルエルシー
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537
 17-1917, マディソン, デミン
 グ ウェイ 802
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 ジャメス アール. プルデント
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53
 717-1917 マディソン デミング
 ウェイ 802 セントローズ エルエ
 ルシー シー/オー
 Fターム(参考) 4B024 AA01 BA54 CA02 CA20 DA02
 EA04 GA11 GA18

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞外標的化薬物複合体

(57) 【要約】

ヒト Na_vK-ATPアーゼシグナル伝達複合体のディスアドヘリン (dysadherin) サブユニットを標的とする抗体であり、この複合体のサブユニットに結合するステロイド剤に、安定なリンカーを介して共有結合するこの抗体は、癌の治療に有用である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞外標的化薬物複合体（EDC）であって、ジギトキシゲニン又はシラレニンのいずれかである薬剤に共有結合で結合するポリエチレングリコール（PEG）アミノ-グリコシドリンカーに共有結合されたNa, K-ATPアーゼシグナル伝達複合体のディスアドヘリンサブユニットに結合する抗体を含むEDCであり、前記リンカーの前記PEG部分が、2～36個のグリコール単位を含有し、前記アミノ-グリコシドが4-アミノ-リボシド又は4-アミノ-キシロシドであり、前記薬剤が、前記アミノ-グリコシドのC1ヒドロキシル基を介して前記リンカーに結合し、並びに前記複合体が2～8個の薬剤を含有する、EDC。

10

【請求項 2】

3個の薬剤を含有する、請求項1に記載のEDC。

【請求項 3】

7個の薬剤を含有する、請求項1に記載のEDC。

【請求項 4】

前記リンカーの前記PEG部分が、24個のグリコール単位を含有する、請求項1に記載のEDC。

【請求項 5】

前記抗体が、M53モノクローナル抗体である、請求項1に記載のEDC。

【請求項 6】

前記抗体が、M53の重鎖又は軽鎖可変領域とヒト不変領域とを含むキメラ又はヒト化抗体である、請求項1に記載のEDC。

20

【請求項 7】

前記抗体が、配列番号33～35からなる群から選択される1つまたは複数の重鎖CDRs、及び/又は配列番号36～38からなる群から選択される1つまたは複数の軽鎖CDRsを含む、請求項1に記載のEDC。

【請求項 8】

薬学的に許容可能なビヒクル、ベクター、希釈剤、及び/又は賦形剤を含む、静脈内投与に好適な、請求項1～7のいずれか一項に記載のEDCの医薬製剤。

【請求項 9】

約5mg～約5gの前記EDCを含有する、請求項7に記載の医薬製剤の単位投与形態。

30

【請求項 10】

請求項1に記載のEDCの治療的有効用量を、治療を必要とする患者に投与することを含む、癌を有する患者を治療する方法。

【請求項 11】

前記患者に第2の薬剤を投与することを更に含み、前記第2の薬剤が、ゲムシタピン、TRAIL（腫瘍壊死因子（TNF）関連アポトーシス誘導リガンド）、線維芽細胞成長因子受容体キナーゼ阻害剤からなる群から選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項 12】

前記患者が、肺癌患者である、請求項10又は11に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記患者が、膵臓癌患者である、請求項10又は11に記載の方法。

【請求項 14】

前記患者が、リンパ腫患者である、請求項10又は11に記載の方法。

【請求項 15】

前記患者に、TRAIL又は線維芽細胞成長因子受容体キナーゼ阻害剤のいずれかである第2の薬剤が投与される、請求項12に記載の方法。

【請求項 16】

前記患者に、前記EDCと併用してゲムシタピンが投与される、請求項13に記載の方

50

法。

【請求項 17】

前記患者に、患者の体重の kg 当たり (「mg/kg」) 0.1 mg ~ 10 mg/kg の前記範囲の用量で、前記 EDC が投与される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 18】

前記用量が、週に 1 回又は 3 週間毎に 1 回投与される、請求項 17 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体薬物複合体でガンを治療するための医薬製剤および方法を提供し、こ
 で、Na, K-ATPアーゼシグナル伝達複合体のディスアドヘリン (dysadherin) サブユニットの抗体は、Na, K-ATPアーゼシグナル伝達複合体のアルファサ
 ブユニットと結合する薬物に対して安定なリンカーによって連結される。本発明は、生物
 学、化学、医薬品化学、医学、分子生物学、および薬理学の分野に関する。

10

【背景技術】

【0002】

発生、免疫、および腫瘍形成をはじめとする全ての基本的な生物学的プロセスは、異な
 る組織および細胞型における遺伝子の選択的および差次的発現に関連する。例えば、多く
 の悪性腫瘍の形成は、ある特定の細胞表面シグナル伝達分子の産生および/または発現と
 関連することが示されている。現代の分子医学の目標の 1 つは、薬物を選択的に標的とし
 て、薬物の不適切な毒性効果を軽減または除去する方法を見出すことである。抗体、ペプ
 チドまたはアプタマーなどのターゲティング部分を用いて、病的細胞型に独特であるかま
 たは病的細胞型で高レベルにて発現される特定の標的に薬物を送達することが試みられて
 きた。これらのターゲティング部分を、リンカーを介して薬物に直接結合させるか、また
 はナノ粒子に結合させることも試みられてきた。

20

【0003】

そのような薬物ターゲティングシステムは、「抗体薬物複合体」または略して ADC と
 称され、1985 年から熱心に研究されている (例えば、参照することによって本明細書
 中に組み込まれる、米国特許公開第 2009/0220529 号を参照のこと)。このク
 ラスの標的治療学の構成要素は、抗原に対して特異的な抗体、細胞内で作用する薬物 (複
 数可)、および抗体を薬物 (複数可) に連結するリンカーから構成される。ADC を作製
 するために、ある細胞型を特異的に標的とし、結合および内面化に際してのみ活性薬物を
 放出する抗体を同定するための継続的に努力して、多様な抗体、リンカー、および薬物が
 組み合わせられ、試験されてきた。残念なことに、リンカーは循環構造で安定であるが、A
 DC がその標的と結合したら、または標的細胞中に内部移行したら「不安定」になる、抗
 体および薬物を連結するための手段を見出すのが困難であることをはじめとする多くの技
 術的問題点が ADC アプローチで起こる

30

【0004】

最近では、細胞外標的と特異的に結合する抗体などのターゲティング部分は、循環シス
 テムで安定なリンカーを介して近くの標的に作用する薬物に連結される、「細胞外標的化
 薬物複合体」または「EDC」の出現とともに当該技術分野では刺激的な新しい進展があ
 った。EDC は、薬物放出が有効性に必要でない点で ADC とは異なるが; その代わり、
 無傷な EDC がターゲティング部分の標的および薬物の標的の両方と結合する場合に最大
 の有効性が達成される。1 つの実例的 EDC は、ターゲティング部分がディスアドヘリン
 を標的とし、薬物が強心配糖体である EDC であり; この EDC では、ターゲティング部
 分および薬物は Na, K-ATPアーゼシグナル伝達複合体の異なるサブユニットを標的
 とする。参照することによって本明細書中に組み込まれる、PTC 公開第 2011/03
 1870 号を参照のこと。

40

【0005】

Na, K-ATPアーゼを標的とする新しい EDC、それらを含む新規処方、それらの

50

作製方法、およびそれらを単独またはガンを治療するための他の薬物と組み合わせて使用する方法が依然として必要とされている。本発明はこれらの必要性を満たす。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

様々な態様において、本発明は、Na, K-ATPアーゼシグナル伝達複合体のアルファサブユニットと結合する薬物とそれ自体が共有結合する循環システムで安定なリンカーと共有結合するNa, K-ATPアーゼシグナル伝達複合体のディスアドヘリンサブユニットと結合する抗体から構成されるEDCに関する。便宜上、このクラスのEDCは本明細書中では「クラス1EDC」と称する。

10

【0007】

第1の態様において、本発明は、ガンの患者を治療する方法であって、治療上有効用量のクラス1EDCを、治療を必要とする患者に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、クラス1EDCに加えて1以上の薬物を患者に投与してガンを治療する。様々な実施形態において、他の薬物は、ゲムシタピン、TRAIL（組織壊死因子（TNF）関連アポトーシス誘導リガンドおよびApoptosisとして知られる）、線維芽細胞成長因子受容体キナーゼ阻害剤、mTOR阻害剤および解糖阻害剤からなる群から選択される。

【0008】

第1の実施形態において、患者は肺ガン患者である。1つの実施形態において、肺ガンは非小細胞肺ガン（NSCLC）である。1つの実施形態において、肺ガンは扁平細胞ガンである。別の実施形態において、肺ガンは大細胞ガンである。1つの実施形態において、患者に、クラス1EDCと組み合わせて肺ガンの治療に関して認可された別の薬物を投与する。様々な実施形態において、他の薬物は、ペメトレキセド、ドセタキセル、ゲフィニチブ、ゲムシタピン、ピノレルピン、ポルフィマーナトリウム、エルロチニブ、エトポシド、トポテカン、メトトレキサート、ペバシズマブ、カルボプラチン、シスプラチン、およびクリゾチニブからなる群から選択される。

20

【0009】

第2の実施形態において、患者は膵臓ガン（PaCa）患者である。1つの実施形態において、患者に、クラス1EDCと組み合わせて肺がんの治療に認可された別の薬物を投与する。様々な実施形態において、他の薬物はゲムシタピンである。他の実施形態において、他の薬物は、フルオロウラシル、エルロチニブ、ゲムシタピン、スニチニブ、エベロリムスおよびマイトマイシンCからなる群から選択される。

30

【0010】

第3の実施形態において、患者はリンパ腫ガン患者である。1つの実施形態において、リンパ腫はB細胞リンパ腫である。1つの実施形態において、患者にクラス1EDCと組み合わせてリンパ腫の治療に認可された別の薬物を投与する。様々な実施形態において、他の薬物は、メトトレキサート、ドキシソルピシン、クロランブシル、ネララビン、ベンダムスチン、プレオマイシン、ボルテゾミブ、シクロホスファミド、イブリツモマブ・チウキセタン、プロカルバジン、プレリキサフォル、プラトトレキサート、デニロイキン・ジフチトクス、オファツムマブ、リツキシマブ、ロミデプシン、トシツモマブ、ピンブラスチン、ボルテゾミブ、ピンブラスチン、ポリノスタット、インターフェロン、ロミデプシン、ブレンツキシマブ・ベドチンおよびブリツモマブ（britumomab）・チウキセタンからなる群から選択される。

40

【0011】

本発明の治療法のこれらや他の実施形態において、治療有効用量は、約0.1mg/患者の体重kg（「mg/kg」）～約100mg/kgの範囲である。様々な実施形態において、治療有効用量は、約0.1mg/kg～約10mg/kgである。様々な実施形態において、治療有効用量は、0.25mg/kg～5mg/kgである。様々な実施形態において、治療有効用量を1週間に1回または3週間ごとに1回投与し、患者が治癒す

50

るまで、またはガンが進行するまで、その頻度で投薬を続ける。

【0012】

第2の態様において、本発明は新規クラス1EDCを提供する。PTC公開第2011/031870号で記載されているクラス1EDCは、本発明の方法および処方における使用に好適であるが、新規発明は、様々な新規クラス1EDCを提供する。一般的に、クラス1EDCは、(i)共有結合したディスプレインと結合する抗体；(ii)ポリエチレングリコール(PEG)-アミノグリコシドリンカー；および(iii)リンカー中のグリコシドと結合するステロイド薬物から構成される。

【0013】

様々な態様において、本発明のクラス1EDCの各抗体に結合した薬物の数(「薬物負荷」と称する)は、約2から約8までおよび。1つの実施形態において、薬物負荷は3である。別の実施形態において、薬物負荷は7である。

【0014】

様々な態様において、抗体に結合した薬物は、Na⁺, K⁺-ATPアーゼシグナル伝達複合体のアルファサブユニットに結合するステロイドである。様々な実施形態において、ステロイドはジギトキシゲンまたはシラレニンである。

【0015】

様々な態様において、薬物はグリコシドのC1ヒドロキシル基によりリンカーと結合し、グリコシドは、4-アミノ-リボシドおよび4-アミノ-キシロシドからなる群から選択され、リンカーのPEG部分はグリコシドのアミノ基と結合する。本発明のクラス1EDCの様々な実施形態において、ステロイドはジギトキシゲンまたはシラレニンであり、グリコシドは4-アミノ-リボシドまたは4-アミノ-キシロシドのいずれかである。

【0016】

様々な態様において、リンカーのPEG部分は、2~36のグリコール単位を含む。様々な実施形態において、リンカーのPEG部分は、24のグリコール単位を含む。

【0017】

様々な態様において、抗体はM53モノクローナル抗体である。様々な実施形態において、抗体は、M53抗体と同じエピトープと結合するモノクローナル抗体である。様々な実施形態において、抗体はM53抗体のヒト化形態である。

【0018】

第3の態様において、本発明は、静脈内投与を含むがこれに限定されない非経口投与に適したクラス1EDCの医薬製剤を提供する。1つの実施形態において、本発明は、薬理的に許容されるビヒクル、ベクター、希釈剤、および/または賦形剤と組み合わせたクラス1EDCを含む、非経口投与に適した医薬製剤を提供する。本発明はさらに、これらの医薬製剤の単位投与形態も提供する。1つの実施形態において、本発明は、約5mg~約5gのクラス1EDCを含む静脈内投与に適した本発明の医薬製剤を含む単位投与形態を提供する。様々な実施形態において、これらの単位投与形態は、0.5g、1g、2.5g、または5gのクラス1EDCを含む。

【0019】

本発明の医薬製剤は、疾患または障害細胞の過剰増殖の予防、改善、および/または治療目的のためにインビボで使用することができる。本発明による医薬製剤を使用することができる疾患または障害の非限定的例としては、ガン、転移、細胞アポトーシス障害、変性疾患、組織虚血、炎症障害、糖尿病および病的血管新生(pathological neo-angiogenesis)が挙げられる。様々な実施形態において、前述の様に、これらに限定されないが、肺ガン、リンパ腫ガン、および膵臓ガンをはじめとするガンを治療するために本発明の医薬製剤を使用する。したがって、本発明の方法にしたがって、対象を薬学的に有効な量の本発明による化合物または組成物で治療することができる。本発明の1つの実施形態では、対象はヒト対象である。

【図面の簡単な説明】

【0020】

10

20

30

40

50

【図1】実施例5で記載するような様々な薬物負荷での抗体M53およびクラス1EDCの薬物動態を示す。「EDC-ONE」は、様々な薬物負荷(2(「2x」)、5(「5x」)、または9(「9x」のいずれか)でのEDCを指す。

【図2】実施例6で記載される様に、様々な量のクラス1EDCの単回ボラス注射で投薬し、24日間の注射後期間で2回薬物負荷をしたマウスの体重測定値を示す。

【図3】実施例7で記載されるA549無胸腺ヌードマウス異種移植片モデルにおいてM53-PEG24-CEN09-106で得られた結果を示す。

【図4】実施例7で記載されるA549無胸腺ヌードマウス異種移植片モデルにおいてM53-PEG24-CEN09-106で得られた結果を示す。

【図5】実施例7で記載されるH460無胸腺ヌードマウス異種移植片モデルにおいてM53-PEG24-CEN09-106で治療されたマウスの平均腫瘍容積および平均体重を示す。

【図6】実施例8で記載されるPANC-1異種移植片モデルにおいてM53-PEG24-CEN09-106で得られた結果を示す。

【図7】実施例8で記載されるPANC-1異種移植片モデルにおいてM53-PEG24-CEN09-106で得られた結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明は、クラス1EDCの医薬製剤および単位投与形態ならびにガン、特に肺ガンおよび膵臓ガンの治療でそれらを単独または他の薬剤と組み合わせて使用するための方法に関する。読者の便宜のために、この本発明の詳細な説明をセクションに分ける。セクションIは本明細書中で用いられる用語の定義を提供する。セクションIIは、本発明の方法により提供され、本発明の方法で有用なクラス1EDCを説明する。セクションIIIは、ガンを治療するために、クラス1EDCを単独または他の薬物と組み合わせて使用するための本発明の方法を記載する。セクションIVは、本発明の医薬製剤および単位投与形態を記載する。本発明の詳細な説明に続いて本発明の様々な態様および実施形態を説明する一連の実施例を記載する。本明細書中で引用される全ての特許、特許出願、および科学参考文献はそれらの全体が参照することによって本明細書中に組み込まれる。

【0022】

I. 定義

「アミノ酸」という用語は、天然に存在するおよび非天然アミノ酸、ならびにアミノ酸アナログおよびアミノ酸模倣薬を指す。

【0023】

「抗体」という用語は、抗原のエピトープと特異的に結合し認識する、免疫グロブリン遺伝子またはそれらのフラグメントによってコード化される1以上のペプチド鎖を含むタンパク質またはタンパク質の混合物を指す。認識された免疫グロブリン遺伝子としては、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン、およびミュー定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかに分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンに分類され、これらは次に免疫グロブリンクラス、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEをそれぞれ規定する。典型的には、抗体の抗原結合領域は、結合の特異性および親和性において最も重要である。抗体は、IgG(IgG₁、IgG₂、IgG₃、およびIgG₄を含む)、IgA(IgA₁およびIgA₂を含む)、IgD、IgE、またはIgM、およびIgYを含む。本明細書中で用いられる場合、「抗体」という用語は、単鎖抗体を含む全抗体、およびそれらの抗原結合フラグメントを含むことを意味する。抗体は、抗原結合抗体フラグメントでもあり得、Fab、Fab'およびF(ab')₂、Fd、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド結合したFv(sdFv)、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、小型抗体(minibody)、およびF_LまたはV_Hドメインのいずれかを含むフラグメント、ならびにナノ抗体(Nanobody) PCT公開番号第WO94/04678号およびNature Med

icine、V9 (1) pp 129 - 134, 2003を参照のこと)を含むが、これらに限定されるものではない。抗体は、鳥類およびほ乳類をはじめとする任意の動物起源であり得る。典型的には、商業的または研究用途における抗体はヒト、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ科(例えば、ラクダ、ラマ)、ウマ、またはニワトリ抗体である。「抗体」は、本明細書中で用いられる場合、モノクローナル、キメラ、およびヒト化抗体、ならびにインタクト抗体および単離された抗体を包含する。抗体は、単一特異的、二重特異的、三重特異的またはさらに高次の多重特異的であり得る。

【0024】

「細胞外標的化薬物複合体」または「EDC」という用語は、細胞外標的を標的とする抗体または他のターゲティング部分が安定または非切断性リンカーを介して細胞外標的と結合する薬物と結合する薬物複合体を指す。

10

【0025】

「抗原」という用語は、抗体またはターゲティング部分が結合する物質または標的を指す。抗原は、抗体またはターゲティング部分によって「結合」される能力によって特徴づけられる。抗原はさらに、ターゲティング部分の産生、例えば、抗原で免疫化することによる抗原特異的抗体の産生を誘導するために用いられる物質を意味する可能性もある。

【0026】

「抗原結合部位」または「エピトープ」という用語は、抗体が結合する抗原の部分を目指す。

【0027】

「結合親和性」という用語は、その結合定数および解離定数の関数としての、抗体(あるいは他のターゲティング部分もしくは薬物または他の薬剤)とその抗原(または標的)との間の相互作用の強度を指す。高い親和性は、典型的には、ターゲティング部分が速いオン速度(結合)および遅いオフ速度(解離)を有することを意味する。結合親和性は、様々な生理学的条件下で変化することがあり、これらの条件下でおよび抗原または抗体/ターゲティング部分に起こる変化のもとで変化する。ターゲティング部分の結合親和性は、治療薬および/またはリンカーが結合している場合にも変化する可能性がある。結合親和性は、抗原に若干の変化、例えば、抗原のアミノ酸またはグリコシル化における変化が起こる場合にも、変化する可能性がある。

20

【0028】

「ガン」という用語は、細胞の制御できない異常な増殖、冒された細胞が局所的に、または血流およびリンパ系を通して身体他の部分へ広がる(即ち、転移する)能力、ならびに多くの特有の構造的および/または分子的特徴のいずれかによって特徴づけられる多くの疾患のいずれかを指す。「ガン性細胞」または「ガン細胞」は、分化が欠損し、浸潤および転移することができる、特定の構造的特性を有する細胞と理解される。ガンの例は、胸部、肺、脳、骨、肝臓、腎臓、結腸、および前立腺ガンである(あらゆる目的についてその全体が参照することによって本明細書中に組み込まれる、DeVita, V. et al. (eds.), 2005, Cancer Principles and Practice of Oncology, 6th. Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PAを参照のこと)。

30

40

【0029】

「キメラ抗体」という用語は、1つの種(典型的にはマウス)由来のモノクローナル抗体のFc定常領域が、組換えDNA技術を用いて、別の種(典型的にはヒト)の抗体由来のFc領域と置換されている抗体を指す。例えば、ネズミモノクローナル抗体をコード化するcDNAは、Fc定常領域をコード化する配列を除去するために特異的に選択された制限酵素で消化され、ヒトFc定常領域をコード化するcDNAの等価な部分は置換されている。CDRグラフト抗体は、いわゆる「アクセプター」抗体の少なくとも1つのCDRが、望ましい抗原特異性を有するいわゆる「ドナー」抗体からのCDR「グラフト」によって置換されている抗体である。一般的に、ドナーおよびアクセプター抗体は、異なる

50

種由来のモノクローナル抗体であり；典型的には、アクセプター抗体は、ヒト抗体（ヒトにおいてその抗原性を最小限に抑えるため）であり、この場合、結果として得られるCDRグラフト抗体は「ヒト化」抗体と称される。グラフトは、アクセプター抗体の単一の V_H または V_L 内の単一のCDR（またはさらには単一のCDRの一部）を有するものである可能性があるか、または V_H および V_L の一方または両方の複数のCDR（もしくははそれらの部分）を有するものである可能性がある。CDRグラフトおよびヒト化抗体を生成させるための方法は、参照することによって本明細書中に組み込まれる、Queen et al.、米国特許第5,585,089号、米国特許第5,693,761号および米国特許第5,693,762号；ならびにWinter、米国特許第5,225,539号によって教唆されている。

10

【0030】

「循環構造」という用語は、循環系の組織を含む、ほ乳類の体液、間質液、リンパ液および血液を指す。

【0031】

「ディスアドヘリン」、「ATPアーゼ7サブユニットガンマ5」、「FX Y D 5」、または「ガンマ5」という用語は、本明細書中では交換可能に使用され、Na, K - ATPアーゼシグナル伝達複合体のガンマサブユニット5を指す。

【0032】

「エピトープ」という用語は、通常、特定の3次元構造特性、ならびに特定の電荷特性を有し、モノクローナル抗体によって特異的に結合することができる抗原の表面のアミノ酸残基または糖側鎖などの分子の集団を指す。

20

【0033】

「細胞外」という用語は、細胞膜の外表面を指す。

【0034】

「インタクト抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互に連結された少なくとも2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書中ではHCVRまたは V_H と略記される）および重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、 CH_1 、 CH_2 および CH_3 から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書中ではLCVR^xまたは V_L と略記される）および軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン CL から構成される。 V_H および V_L 領域は、フレームワーク領域（FR）と称される更に保存された領域が散在した、相補性決定領域（CDR）と称される超可変性の領域にさらに細分することができる。各 V_H および V_L は、アミノ末端からカルボキシル末端まで次の順序で並んだ3つのCDRおよび4つのFRから構成される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的な補体系の第1成分（Clq）を含む宿主組織または因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介することができる。結合フラグメントの例としては、(i) V_L 、 V_H 、 CL および CH_1 ドメインからなる一価フラグメントである、Fabフラグメント；(ii) ヒンジ領域でジスルフィドブリッジによって連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメントである、 $F(ab')_2$ フラグメント；(iii) V_H および CH_1 ドメインからなるFdフラグメント；(iv) 抗体の単一アームの V_L および V_H ドメインからなるFvフラグメント、(v) V_H ドメインからなるdAbフラグメント（Ward et al, Nature 341 : 544 - 546, 1989）；および(vi) 単離された相補性決定領域（CDR）が挙げられる。

30

40

【0035】

「ヘテロ二機能性リンカー」という用語は、両側に異なる反応性基を有し、タンパク質および他の分子中の2つの異なる官能基間で連続結合を可能にするリンカーを指す。

【0036】

「細胞外標的」という用語は、細胞膜の外表面上に位置する、タンパク質、抗原、およ

50

びノまたはエピトープなどの標的を指す。

【0037】

「リンカー」という用語は、ターゲティング部分および薬物などの2以上の分子と共有結合する化学部分または結合を指す。

【0038】

「リンカースペーサー基」という用語は、リンカーによって結合した2つの分子間に空間を提供するリンカー中の原子を指す。

【0039】

「モノクローナル抗体」という用語は、単一分子組成物の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して1つの結合特異性および親和性を示す。「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来の可変および定常領域（存在する場合）を有する単一結合特異性を示す抗体を指す。ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合したヒト重鎖トランス遺伝子および軽鎖トランス遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えば、トランスジェニックマウスから得られるB細胞を含むハイブリドーマによって産生することができるが、「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術によって産生される抗体に限定されない。「モノクローナル抗体」という用語は、任意の真核、原核、またはファージクローンを含む単一クローンから誘導される抗体を指し、それが産生される方法ではない。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え体、およびファージディスプレイ技術の使用を含む当該技術分野で公知の多様な技術を用いて調製することができる。

10

20

【0040】

「修飾抗体」という用語は、抗体の部分を、例えば欠失、付加、または置換することによって修飾された、モノクローナル抗体、キメラ抗体、およびヒト化抗体などの抗体を指す。例えば、抗体は、定常領域を欠失させ、抗体の半減期、例えば血清半減期、安定性または親和性を増大させることを目的とする定常領域とそれを置換することによって修飾することができる。治療薬の複数の分子または複数の異なる薬剤を1つの抗体分子とカップリングさせることができる。例えば、異なる部分を同じリンカーによって抗体分子にカップリングさせることができるか、または複数の結合部位を提供する複数のリンカー（例えば、 dendrimer）を使用することができる。

【0041】

「非切断」および「未切断」という用語は、存在するEDC成分の大部分（例えば、>50%、>60%、>70%または>80%）が無傷である、すなわち薬剤をターゲティング部分に結合させるために使用するリンカーは切断されていない、任意の時点のEDC組成物を指す。

30

【0042】

「非切断性リンカー」という用語は、同じ生理学的条件下で治療またはターゲティング部分のいずれかよりもインピボで安定である特性を有する安定なリンカーを指す。非切断性リンカーの例としては、酸または塩基感受性でなく（例えば、ヒドラゾン含有リンカー）、還元剤または酸化剤に対して感受性でなく（例えば、ジスルフィド結合を含むもの）、そして細胞または循環システムで見出すことができる酵素に対して感受性でないポリエチレングリコール鎖またはポリエチレン鎖を含むリンカーが挙げられる。

40

【0043】

送達される薬物の量に関連した「薬剤的に有効な量」および「有効量」という用語は組織、系、動物、またはヒトにおいて所望の生物学的または医学的応答を誘発することができる薬物の量を指す。

【0044】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、ペプチド模倣薬および「タンパク質」という用語は、多少交換可能に用いられて、アミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、1以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的的化学模倣薬であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用する。これらの用語は、「抗体」と

50

いう用語も包含する。「ペプチド」は多くの場合、「ポリペプチド」または「タンパク質」よりも少ないアミノ酸残基のポリマーを指すために用いられる。タンパク質は、同一または互いに異なる可能性がある2以上のポリペプチドを含む可能性がある。

【0045】

「受容体」という用語は、細胞の原形質膜または細胞質のいずれかに埋め込まれ、1以上の特定の種類のシグナル伝達分子が結合することができる、細胞外標的タンパク質分子を指す。各細胞は、典型的には、多くの異なる種類の多くの受容体を有する。

【0046】

「実質的に同時に」という用語は、同時または比較的狭い時間枠内で起こる2以上の事象を指す。様々な実施形態において、実質的に同時とは、互いに約60、約40、約30、約20、約10、約5、約2または約1秒以内に起こる2以上の事象を指す。例えば、本発明のEDCは、ターゲティング部分結合および薬剤（薬物）作用が実質的に同時に起こるような特性を有する。

10

【0047】

「循環構造で安定な」という用語は、分解に抵抗するEDCなどの化合物の特性を指し、例えば、化合物の約50%未満、または約20%未満、または典型的には約2%未満が、約37の循環血液において少なくとも約2時間分解または切断されることを意味する。

【0048】

「安定なリンカー」という用語は、インビボまたはインビトロで生理学的条件（37およびpH7）においてEDCが標的（複数可）に到達し、標的（複数可）と結合するのを可能にするために十分な時間、複合体が標的部位に送達または輸送されるまで安定かつ無傷のままであるリンカー（それが結合する2つの分子に共有結合したままである安定なリンカー）を指す。したがって、安定なリンカーは、一般的に、循環構造内で安定である（一般的に、少なくとも2時間後、そしていくつかの実施形態では、少なくとも4、8、16、または24時間後で5%未満の分解を意味する）。

20

【0049】

「相乗的に」という用語は、2以上の薬剤を単独で使用する場合の効果の合計よりも高い、組み合わせて使用される場合の2以上の薬剤の効果の合計を指す。例えば、本発明のEDCでは、リンカーを介して連結された場合の抗体と薬剤（薬物）との相互作用の複合的治療効果は、単独で使用される場合のターゲティング部分および薬剤の個々の効果を合わせたものよりも高い。「効果」は、結合、治療効果、および/または特異性のいずれかを指す可能性がある。

30

【0050】

「標的」という用語は、ターゲティング部分が結合するタンパク質、糖タンパク質、抗原、炭水化物または核酸を指し、また治療薬（本明細書中では「薬物」とも称する場合がある）が結合するタンパク質、糖タンパク質、抗原、炭水化物または核酸も指す。薬剤およびターゲティング部分は、「標的複合体」において異なる標的と結合する可能性があり、この場合、「標的複合体」は、2以上の分子、例えば、多サブユニットタンパク質の異なるサブユニットまたは多タンパク質複合体中の2つの異なるタンパク質などであって、インビボで互いに物理的に近接したものを指す。

40

【0051】

「標的細胞」という用語は、病理に関与し、したがって治療活性の好ましい標的である細胞を指す。標的細胞は、例えば限定されないが、以下の群の1以上の細胞であり得る：一次または二次腫瘍細胞（転移）、一次または二次腫瘍の間質細胞、腫瘍または腫瘍転移の血管新生内皮細胞、マクロファージ、単球、多形核白血球およびリンパ球、ならびに腫瘍および腫瘍転移に浸潤する多核薬剤。

【0052】

「ターゲティング部分」および「ターゲティング薬剤」という交換可能な用語は、標的と特異的に結合する抗体を指す。

50

【0053】

「標的組織」という用語は、標的細胞（例えば、腫瘍細胞）および標的細胞の環境中の細胞を指す。

【0054】

「治療薬」および「薬物」および「薬剤」という用語は、本明細書中では交換可能に用いられ、治療有効量で存在する場合、作用部位に結合すると、治療効果をもたらす、その作用部位が標的細胞の表面上もしくは内部に位置するか、またはその効果が標的細胞の表面上もしくは内部で発揮される化合物を指す。

【0055】

「治療効果」という用語は、対象における疾患、疾患の症状または疾患の副作用の減少、除去、および/または予防を指す。

10

【0056】

「半減期を増大させる」という用語は、血液中の化合物、典型的には治療薬の平均滞留時間を増大させること、または参照化合物と比較して血液もしくは血漿クリアランスを減少させることを意味する。

【0057】

「治療 (treating および treat)」という用語は交換可能に用いられ、治療薬または組成物を、疾患もしくは障害（例えば、ガンもしくは転移ガン）、疾患もしくは障害の症状または疾患もしくは障害に対する素質を有する患者に、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患に対する素質を治療、治癒、軽減、緩和、変更、矯正、改善、向上または影響を及ぼす目的で投与することを指す。ガンまたは転移ガンの「治療 (treating または treat)」とは、任意の客観的もしくは主観的パラメータ、例えば症状の寛解；緩和；減退または疾患状態を患者にとってより許容されるようにすること；悪化もしくは減退の速度を遅らせること；または悪化の最終点をあまり減弱しないようにすることをはじめとする、ガンの治療または改善または予防を指す。症状の治療または改善は、医師による診察の結果をはじめとする、客観的または主観的パラメータに基づく可能性がある。したがって、「治療する」という用語は、新生物疾患を含むがこれに限定されない疾患に関連する症状または状態の発生を予防もしくは遅延するため、軽減するため、または停止もしくは阻害するために、治療薬を投与することを含む。

20

【0058】

「腫瘍特異的抗原」という用語は、腫瘍に特有であるか、または正常な細胞と比べて、腫瘍細胞上で少なくともより豊富にあるタンパク質または他の分子を指す。

30

【0059】

II. クラス 1 EDC

クラス 1 EDC は、安定または非切断性リンカー（このリンカーは、EDC がその最大治療効果を発揮する場合に無傷で切断されない）によって、Na, K - ATPアーゼシグナル伝達複合体のアルファサブユニットと結合するステロイド薬物に連結されたヒトディスプレイアドヘリン (human dysadherin) を標的とするかまたは結合する抗体を含む。したがって、全ての実施形態において、クラス 1 EDC は、細胞外標的と結合するターゲティング部分を含み、安定または非切断性リンカーを介してステロイドと結合しつつ、ヒト Na, K - ATPアーゼシグナル伝達複合体に対して作用することによって治療効果を発揮する。これらの成分のそれぞれを、Na, K - ATPアーゼシグナル伝達複合体の簡単な説明後に後述する。

40

【0060】

A. Na, K - ATPアーゼシグナル伝達複合体

ヒト Na, K - ATPアーゼシグナル伝達複合体は、その存在を決定し、存在する場合は細胞中または細胞上の位置を決定する複数のサブユニット、イソ型および/またはグリコシル化パターンを有する。提示は、細胞型、細胞上の位置、細胞の位置、ならびに/または生理学および病的状態に依存する可能性がある。例えば、Na / K - ATPアーゼシグナル伝達複合体およびそのグリコシル化パターン中に見出されるベータサブユニット

50

の種類(1対2)は、細胞型ごとに異なる(Proteomics 2008; 8(16): 3236-56、およびAm J Physiol 1997; 272(1 Pt 1): L85-94を参照のこと)。異常なグリコシル化はガンの顕著な特徴であり、糖タンパク質、糖脂質、およびグリコサミノグリカンの炭水化物含有量の変化を含む(Anticancer Agents Med Chem 2008; 8(1): 2-21およびBiochim Biophys Acta 1999; 1473(1): 21-34を参照のこと)。Na/K-ATPアーゼシグナル伝達複合体のガンマサブユニットイソ型5またはFX YD5遺伝子によってコード化されるので「FX YD5」とも称される「ディスアドヘリン」は、実験的ガン転移を促進することが示され、多くの異なる種類のヒトガンについて転移および生存の独立した予後指標である、グリコシル化膜タンパク質

10

【0061】

本発明のクラス1EDCは、ステロイド薬物、安定なまたは非切断性リンカー、およびNa, K-ATPアーゼシグナル伝達複合体のディスアドヘリンサブユニットの細胞表面露出エピトープを認識する抗体を含む。Na, K-ATPアーゼは、そのアルファ-、ベータ-およびガンマ-サブユニットの複数のイソ型の発現および差次的会合(differential association)から生じる複合分子多様性によって特徴付けられる(Am. J. Physiol. 275 (Renal Physiol. 44): F633-F650, 1998中の総説を参照のこと)。Na, K-ATPアーゼは、細胞膜を通過する様々なカチオンの能動輸送の原因となるP型ATPアーゼの広く分布するクラスに属する。現在のところ、4つもの異なるアルファ-イソ型3つの異なるベータ-イソ型、および9つの異なるガンマ-イソ型がほ乳類細胞で特定されている。発生中の複合体のイソ型の構造並びにそれらの組織特異的および発現の発生パターンに対する厳しい制約は、異なるNa, K-ATPアーゼ複合体が細胞要件に応じるために異なる特性を生じさせたことを示唆する。アルファ-サブユニットの異なるイソ型は、異なる細胞型に関して異なるレベルで発現され、異なって挙動する。アルファ-サブユニットは、カチオン、ATP、Srcキナーゼ、および分子の強心配糖体クラス中に含まれるステロイド薬物を含む様々な治療薬の結合部位を含有する。したがって、本発明の1つの実施形態において、アルファ-サブユニットは、本発明のEDCの薬剤の標的として作用する

20

30

【0062】

Na, K-ATPアーゼ複合体のベータ-サブユニットは、アルファ-サブユニットのシャペロンとしての機能を果たし、細胞膜上にその位置に向けると考えられ、ある異常細胞上で異常にグリコシル化される可能性がある。

【0063】

ガンマ-サブユニットの特異的役割はイオン輸送の活性を調節すると考えられ、複合体の電圧依存性を修飾することが示された。ガンマ-サブユニットはATPアーゼ活性に必要ではないと考えられる(Biochem Biophys Res Commun 1981 102: 250-251)。特に、ガンマサブユニットイソ型5は、あるガン細胞型に関して過剰発現され、転移の唯一の予言物質であるようである(Nam, J. et al. Cancer Lett. 255(2): 161-169)。ガンマ-サブユニットは、広範なFX YDペプチド範囲から構築される。複数のFX YDまたはガンマ-サブユニットイソ型があり、発現は細胞型や細胞環境によって異なる。このサブユニットはさらに、Na, K-ATPアーゼイオンポンプ以外に他のタンパク質と複合体形成することが示された。Na-K-ATPアーゼの調節性FX YDサブユニットの組織

40

50

ノ細胞特異的発現は静的ではなく、所定の生理学的または病的状態に適応するように変化
する可能性がある。FXYDサブユニットを含む複合体は、様々なイソ型の発現レベル、
および関連する複合体との競合に基づいてそうすると考えられる。したがって、FXYD
および特にFXYD5の発現は、Na⁺, K⁺-ATPアーゼイオンチャンネルと関連するで
あろうことを必ずしも示す訳ではない。本発明のクラス1EDCでは、ガンマ-サブユニ
ット5（ディスアドヘリンおよびFXYD5としても知られる）は、EDCの抗体の標的
である。特に、本発明のEDCは、Na⁺, K⁺-ATPアーゼシグナル伝達複合体のアルファ
サブユニットに対して作用するステロイド薬物、非切断性リンカー、およびガンマ5サ
ブユニットFXYD5に結合する抗体を含む。様々な実施形態において、抗体は、M53
あるいはM53またはM53と同じエピトープに結合する別の抗体の重鎖もしくは軽鎖可
変配列と同じ可変配列を有する別の抗体である（下記実施例2を参照）。本発明の様々な
実施形態において、EDCは、シラレニン、シラレニン-4-アミノ-4-デオキシ-L
-キシロピラノシド、およびPEG24-CEN-09-106を含む。

10

20

30

40

50

【0064】

B. クラス1EDCの抗体成分

抗体は、モノクローナル抗体NCC-M53（M53）を含むディスアドヘリンに対し
て生成し[Shimamura et al. J. Clinical Oncology 21(4) 659-667 (2003)]、これらの抗体は本発明のクラス1
EDCにおいて使用することができる。さらに、下記実施例2で記載されるように、M5
3抗体によって認識されるディスアドヘリン上のエピトープはマッピングされ、このエピ
トープと特異的に結合し、腫瘍細胞の表面上のディスアドヘリンと結合する任意の抗体を
本発明のクラス1EDCで抗体として使用することができる。

【0065】

したがって、クラス1EDC中の抗体は、ヒトディスアドヘリンの細胞外ドメインと特
異的に結合する。クラス1EDCの抗体は、M53の重鎖および/または軽鎖（CEN-
AB-010；それぞれ配列番号31および32）を含む可能性がある。1つの実施形態
において、クラス1EDCの抗体は、M53の重鎖からの1以上のCDR（例えば、配列
番号33~35）を含む可能性がある。1つの実施形態において、クラス1EDCの抗体
は、M53の軽鎖からの1以上のCDR（例えば、配列番号36~38）を含む可能性が
ある。1つの実施形態において、クラス1EDCの抗体は、M53の重鎖からの1以上の
CDR（例えば、配列番号33~35）およびM53の軽鎖からの1以上のCDR（例え
ば、配列番号36-38）を含む可能性がある。

【0066】

クラス1EDCの抗体は、モノクローナル抗体、例えばネズミモノクローナル抗体、キ
メラ抗体、ヒト抗体またはヒト化抗体である可能性がある。1つの実施形態において、抗
体はヒト化抗体、例えば、M53のヒト化形態である。1つの実施形態において、抗体は
、下記実施例4で記載されるM53のキメラ形態である。1つの実施形態において、抗体
は抗体フラグメント、例えばFabフラグメントである。1つの実施形態において、クラ
ス1EDCの抗体は、配列番号1で表されるポリペプチド内のエピトープと結合するか、
または選択的に結合する。1つの実施形態において、クラス1EDCの抗体は、M53抗
体によって認識されるFXYD5上のエピトープと結合する。

【0067】

モノクローナル抗体（MAb）を産生するために以前に用いられていた様々な方法は、
クラス1EDCで使用される抗体を産生するために使用することができる。単一種の抗体
を産生するクローンされた細胞系に適用するハイブリドーマ技術は、マウス（ネズミ）、
ハムスター、ラット、およびヒトをはじめとする様々な種の細胞を使用する。キメラおよ
びヒト化抗体を含むMAbを調製するための他の方法は、遺伝子工学、すなわち組換えD
NA技術を用いる。モノクローナル抗体は、実質的に均一な抗体の集団から得られる。ヒ
ト骨髄腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞系もヒトモノクローナル抗体の産生につ
いて記載されている（Kozbor, (1984) J. Immunol, 133

: 3001、および Brodeur et al, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。

【0068】

モノクローナル抗体をコード化するDNAは容易に単離され、配列決定される；ハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの供給源として機能する。一旦単離されたら、DNAを発現ベクター中に入れ、これを次いで大腸菌(E. coli)細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または他の方法では抗体タンパク質を産生しない骨髓腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトして、モノクローナル抗体の合成を得る(US2005/0048572；US2004/0229310；Skerra et al (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5 : 256-262；および Pluckthun (1992) Immunol. Revs. 130 : 151-188.を参照のこと。DNAは、例えば、ヒト重鎖および系鎖定常ドメインのコーディング配列をホモロガスなネズミ配列の代わりに置換することによって(米国特許第4,816,567号および Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 6851)、または免疫グロブリンコーディング配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコーディング配列の全部または一部を共有結合させることによって、修飾することができる。

10

20

【0069】

ヒト化の代替法として、ヒト抗体を生成させることができる。トランスジェニック動物(例えば、マウス)は、免疫化によって、内因性免疫グロブリン産生の非存在下で全種類のヒト抗体を産生することができる(Jakobovits et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 2551；Jakobovits et al (1993) Nature 362 : 255-258；Bruggemann et al (1993) Year in Immunol. 7 : 33；米国特許第5,591,669号；米国特許第5,589,369号；および米国特許第5,545,807号)。

【0070】

抗体フラグメントは、インタクト抗体のタンパク分解性消化によって得ることができる(Morimoto et al (1992) J. Biochem. Biophys. Meth. 24 : 107-117；および Brennan et al (1985) Science 229 : 81を参照のこと)または組換え宿主細胞によって直接産生することができる。Fab'-SHフラグメントは、大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させて、F(ab')₂フラグメントを形成することができる(Carter et al (1992) Bio/Technology 10 : 163-167)。F(ab')₂フラグメントを組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。単鎖Fvフラグメント(scFv)は、PTC公開第WO93/16185号；米国特許第5,571,894号；および米国特許第5,587,458号で記載されるようにして調製することができる。抗体フラグメントは、例えば、米国特許第5,641,870号で記載されているように、「線状抗体」でもあり得る。

30

40

【0071】

3以上の価数を有する抗体を本発明のEDCの様々な実施形態で用いることができる。3以上の抗原結合部位と2以上の可変ドメインとを有する多価「オクトパス(Octopus)」抗体は、抗体のポリペプチド鎖をコード化する核酸の組換え発現によって容易に産生することができる(US2002/0004586；WO01/77342)。例えば、三重特異的抗体を調製することができる(Tutt et al (1991) J. Immunol. 147 : 60)。

【0072】

50

本発明のEDCにおける抗体は、前述の説明の範囲内の様々な抗体を含み得る。したがって、クラス1EDC中の抗体は、完全ヒト化抗体、ヒトキメラまたは、抗原結合Fab、Fv、scFv、および小型抗体を含む抗体フラグメントである可能性があり、抗体を増強して、抗体の親和性、安定性、および発現レベルを増加させることができる(Nat Med. 2003 Jan; 9(1): 129-34を参照のこと)。

【0073】

典型的には、抗体は、クラス1EDCの形成で使用する前に、(例えば、Lowry法によって測定して)95重量%超まで、多くの場合は99重量%超まで精製される。通常、抗体は、少なくとも1つの精製ステップによって調製される。抗体が十分な純度で利用可能ならば、本明細書中で検討したように、それを様々なリンカーおよび結合化学のいずれかによって治療薬と連結することができる。

10

【0074】

C. クラス1EDCのリンカー成分

クラス1EDCを形成するために、ステロイド薬物をディスプレイ抗体に安定なリンカーによってカップリングさせる。リンカーは、クラス1EDCの一部としてではなく、別個のものとして概念化される場合、1以上の薬物を抗体と連結させてEDCを形成するために使用することができる二官能性または多官能性部分である。EDCは、薬物と、および抗体との結合のための反応性官能基を有するリンカーを使用して都合よく調製することができる。例えば、システインチオール、またはアミン、例えば抗体のN末端またはアミノ酸側鎖、例えばリジンは、リンカー試薬または薬物-リンカー試薬の官能基と結合を形成することができる。

20

【0075】

本発明の方法に好ましいクラス1EDCで使用するためのリンカーは、一般的に、ポリエチレングリコール(PEG)およびアミノグリコシドから構成される。様々な実施形態において、リンカーのPEG部分は、2~36個のグリコール単位を含む。様々な実施形態において、リンカーのPEG部分は24個のグリコール単位を含む。典型的には、本発明の製造方法にしたがったEDCの製造では、薬物-リンカー試薬が形成され、薬物-リンカー試薬を抗体と共役結合させて、クラス1EDCを形成する。典型的には、ステロイド薬物をアミノグリコシドのC1ヒドロキシル基によりリンカーと結合させ、グリコシドは、3-アミノ-リボシド、4-アミノ-リボシド、3-アミノ-キシロシド、および4-アミノ-キシロシドからなる群から選択され、そしてリンカーのPEG部分をグリコシドのアミノ基と結合させる。ステロイドがジゴキシゲニン、プロゲステロン、またはシラレニンである場合、グリコシドは4-アミノ-リボシドまたは4-アミノ-キシロシドのいずれかである。ステロイドがウアバインである場合、グリコシドは3-アミノ-リボシドまたは3-アミノ-キシロシドである。

30

【0076】

本発明のEDCで用いられるリンカーは安定である。投与後、EDCは安定であり、無傷なままである。即ち、ターゲティング部分はリンカーを介して薬剤と連結したままである。リンカーは標的細胞の外側で安定であり、有効性のために切断されていないままである。有効なリンカーは：(i)抗体の特異的結合特性を維持する；(ii)複合体または薬剤の送達を可能にする；(iii)安定かつ無傷なままである、即ち、抗体および/または薬剤が安定かつ無傷なままである限り切断されない；そして(iv)EDCが無傷なままで薬剤の細胞毒性、殺細胞効果または細胞増殖抑制効果を維持する。例として、安定なリンカーは、本発明のEDC中にある場合、最小(即ち、10%未満)の切断を示し、一方、循環構造中、標的組織の表面、標的細胞の表面、または細胞外マトリックス中に、少なくとも4~8時間以上、例えば8~24時間、または1~10日以上の間存在する場合；非切断性リンカーは、さらに長い期間、例えば20日以上もの長い期間、これらの条件で安定である(Durcy, L. et al. Bioconjugate Chem. 2010, 21, 5-13)。

40

【0077】

50

本発明のEDCで用いられるリンカーは2段階で都合よく産生することができる。第1段階で、遊離第1アミンなどの活性な求核試薬を含むグリコシドが結合される。第2段階で、二官能性PEGリンカーをグリコシドのアミンに結合させる。この方法は、グリコシドの様々な組み合わせおよび異なるリンカーの長さが連続して付け加えられることを可能にする点で有利である。加えて、グリコシドは、本発明のリンカー部分で用いられる場合にある利点を有することが示されている。

【0078】

安定なリンカーは、治療薬とターゲティング部分との間に共有結合を形成するので、結合する場合、薬剤およびターゲティング部分は、それらの各標的に対して結合し、作用することができる。安定なリンカーは単に、ターゲティング部分および薬剤上の反応性部位間で形成される共有結合である可能性があるが、本発明の安定なリンカーは、典型的には、リンカースペーサー基、すなわち繰り返す一連のエチレングリコール単位およびアミノグリコシドを含む。リンカーを介してターゲティング部分を薬剤に結合させるために、相補的反応性基を利用する。例えば、ターゲティング部分上のアクセス可能なスルフヒドリル基は、活性なマレイミド基と反応して、安定なチオエーテル結合を形成することができる。さらなる例は、薬剤上のアクセス可能なアミンであり、これはスクシンイミドエステルと反応して、安定なアミド結合を形成することができる。一端上にマレイミドを有し、他端上にスクシンイミドエステルを有する二官能性リンカーを、薬物を抗体と連結するために使用することができる。下記実施例で例示するように、クラス1EDCは、アミノグリコシドをステロイド薬物のヒドロキシル基と連結させ、O-グリコシド結合を形成することによって都合よく調製することができる。次いで、NHS-PEG-マレイミド試薬をアミノグリコシドのアミノ基と連結させて、「リンカー試薬」を形成する。最後に、リンカー試薬中のマレイミドを抗体中のシステイン部分と共有結合させる。

【0079】

したがって、異なる化学リンカー（単一の共有結合とは対照的に）は、典型的にはEDCで使用される。このタイプのリンカーは、典型的には、ターゲティング部分および/または治療薬をリンカーと共有結合させる連結試薬として機能することができる官能基を含む2つの「末端」を有する1以上の「リンカースペーサー基」からなる原子の直鎖またはポリマーである。好適なリンカーとしては、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、アルデヒド、酸、エステルおよび無水物、スルフィドリル(sulphydryl)またはカルボキシル基、例えば、マレイミド安息香酸誘導体、マレイミドカプロン酸誘導体、ならびにスクシンイミド誘導体など含むが、これらに限定されない多種多様の官能基および部分を挙げるができる、またはシアン化臭素もしくはシアン化塩素、スクシンイミジルエステルまたはスルホン酸ハロゲン化物などから誘導することができる。

【0080】

リンカーは、ターゲティング部分および薬物を物理的に連結することに加えて、有益な特性を本発明のEDCに付与することができる。リンカーは、薬剤に起因するEDCの薬剤自己会合または凝集を最小限に抑えるために使用することができる。リンカーはまた、EDCの治療効果を改善する可能性もある。リンカーはまた、EDCの薬物動態も改善する可能性がある。ターゲティング部分が治療薬と連結される場合、リンカー基は、本発明の化合物を、さらに生物学的耐性にする、さらに生物学的適合性にする、免疫原性を低くする、毒性を低くする、および/あるいは循環構造中でさらに安定にする、もしくは他の種類の破壊もしくは除去に対してさらに安定にする、または非切断性にするなどのいくつかの他の機能を有する可能性がある。したがって、ある実施形態では、安定または非切断性リンカーは、生理学的条件下でのターゲティング部分の治療薬に対する結合を維持するが、有益な治療効果も同様に有する可能性がある。

【0081】

安定な、非切断性リンカーの一例は、ポリアルキレングリコールリンカーである。安定な非切断性リンカーの別の例は、ポリアルキレングリコールリンカーに結合したグリコシ

10

20

30

40

50

ドである。ポリアルキレングリコールリンカーは、エーテル結合の形態で酸素によって一緒に結合した、少なくとも2、典型的には3以上のアルキレン部分を有する直鎖である。グリコシド結合ポリアルキレングリコールリンカーは、アミノグリコシドなどの糖が結合したポリアルキレングリコールの直鎖である。アルキレン基は置換されている可能性があるが、典型的には置換されていない可能性があり、任意の所望の数のアルキレン単位を含む可能性があるが、典型的には少なくとも2または100以下のそのような単位、例えばエチレン、プロピレン、ヘキシレンなどを含む可能性がある。1つの実施形態において、リンカーは24のエチレングリコール反復単位から構成され、PEG24型リンカーを作製する。このリンカーは、両端に結合した反応性基に応じて約90~100オングストロームの長さである。一般的に、リンカー長さは、約50~約500オングストロームまたは約50~約200オングストロームの範囲である。1つの実施形態において、リンカーは糖から構成される。様々な実施形態において、前述のように、リンカーはアミノ糖を含む。ポリアルキレングリコール残基は、全て同じであるか、または長さおよび/もしくは置換が異なるアルキレン反復単位を含む可能性がある。様々な実施形態において、本発明のEDCのリンカーは、(PEG)36二官能性リンカーを用いて構築される。特定の実施形態において、本発明のEDCのリンカーは、Thermo Scientificから得られるSM(PEG)24を用いて構築される。

10

20

30

40

50

【0082】

薬物に対してターゲティング部分を連結させるためにポリエチレングリコール(PEG)を使用する場合、EDCは免疫系による攻撃に抵抗することができる可能性がある。PEGをタンパク質または小分子に添加することは、あるタンパク質または小分子治療法の治療効果を改善することが示されている(参照することによって本明細書中に組み込まれる、PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications Series: Milestones in Drug Therapy Veronese, Francesco M. (Ed.) 2009およびAdvanced Drug Delivery Reviews Volume 55, Issue 10, 26 September 2003, Pages 1261-1277を参照のこと)。PEGは、したがって血清半減期を増大させ、抗原性を減少させる可能性がある。

【0083】

ポリアルキレングリコールを介して抗体を薬物に連結させるためにアミノグリコシドなどの糖を使用する場合、EDCは、そのような糖が欠損したEDCと比べて免疫系による攻撃に抵抗する能力が向上する可能性がある。糖をタンパク質または小分子に添加することは、抗体または小分子治療法の治療効果を改善することが示された(Nature Reviews Drug Discovery 8, 226-234 (March 2009)を参照のこと、そしてEssentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009を参照のこと)。糖はしたがって溶解度を増大させることができ、かくして凝集を減少させ、抗原性を減少させる。

【0084】

抗体、リンカー部分、および薬物の結合の順序はEDCの製造で変わる可能性があるが、典型的には、製造プロセスは、まず薬物を合成し、次いでリンカーの糖部分を結合し、次にリンカーのPEG部分を結合し、そして最後に抗体を結合することによって進行する。当業者が理解するように、抗体は、薬物-リンカー試薬(またはリンカー)の共有結合のために複数の部位を提示する可能性がある。カップリング条件の適切な修飾により、抗体あたりの薬物の平均数が用いられる条件にしたがって変化するEDCの製剤を作製することができる。本発明の様々な方法において、後述するように、この平均数は、EDCの最大の有益な治療効果を達成するのに重要である。

【0085】

D. クラス1 EDCのステロイド薬物

様々なステロイド薬物は、本発明によるクラス1EDCにおける使用に好適である。例えば限定されることなく、ステロイド薬物は、抗腫瘍、抗血管新生、または抗炎症治療活性を有する薬剤である可能性がある。様々な実施形態において、ステロイド薬物はシラレニンである。様々な実施形態において、ステロイド薬物はジギトキシゲンである。

【0086】

一般的に、任意の強心配糖体のステロイド成分は、本発明のクラス1EDCのステロイド薬物として用いることができる。ジギトキシシンおよびプロスシラリジンは、強力な抗腫瘍活性を有するが、高い心臓毒性も有する強心配糖体である(Arch Pharm Res 2007; 30: 10, 1216-1224を参照のこと)。強心配糖体は、ジギタリス属、ストロファンシス属などの植物由来の薬物の一種であり、これらは何世紀もの間、鬱血性心不全や不整脈を治療するために処方されてきた。これらの状態では、強心配糖体は、アルファサブユニットNa, K-ATPアーゼシグナル伝達複合体と結合し、そのポンピング活性を阻害する。最近の10年間にわたっておこなわれた研究によって強心配糖体が抗ガン薬剤として活性を有することが示された[Mijatovic et al. (2007) Biochim Biophys Acta 1776: 32-57およびPTC公開第2010/017480号]。

10

【0087】

本発明の医薬製剤で用いられるクラス1EDCの様々な実施形態において、ステロイドはシラレニンである。様々な実施形態において、ステロイドはジギトキシゲンである。様々な実施形態において、ステロイドは、PTC公開第WO2010/017480号(PTC/US2009/053159)で特定される化合物である。

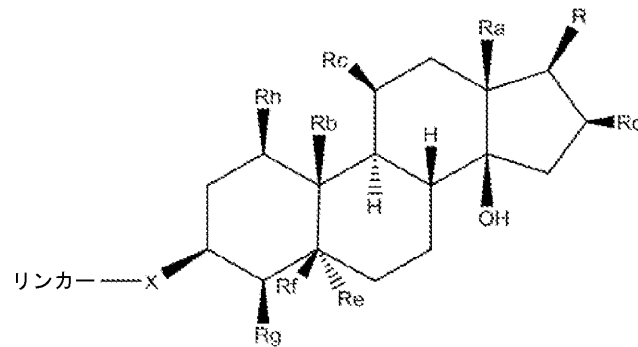
20

【0088】

好適なステロイド薬物の非限定的例には、下記式Iのもの、ならびにそれらの薬剂的に許容されるエステル、誘導體、複合体、水和物、溶媒和物、プロドラッグおよび塩、または前記のいずれかの混合物が含まれる：

【0089】

【化1】



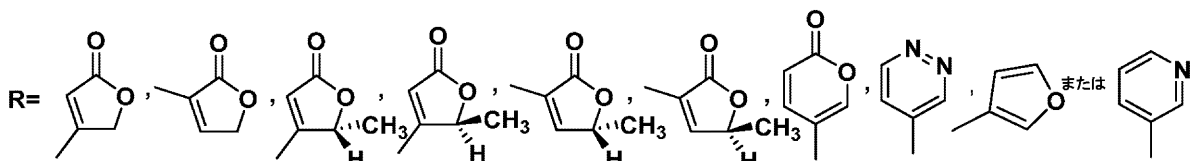
(I)

30

ここで、ステロイド環は、飽和、不飽和またはそれらの組み合わせのいずれかであり、

【0090】

【化2】



40

【0091】

R^aはCH₃である；R^bは、CH₃、CH₂OH、またはCHOである；R^cは、H、OHまたはCH₃COOである；R^dは、H、OHまたはCH₃COOである；R^eは、Hまたは基が存在しない；R^fは、H、OHまたは、R^eがHであるかもしくはR^e、R^fおよびR^gと結合した原子間にC=Cが存在する場合、R^fは基が存在しない；R^g

50

はHであるかまたは、 R_e がHであるかもしくは R_e 、 R_f および R_g に結合した原子間に $C=C$ が存在する場合、 R_g は基が存在しない； R_h はHまたはOHである；XはOまたはN(OR')である；そして R' はアルキルまたはアリアル基である。

【0092】

したがって、多種多様のステロイド薬物をクラス1EDCで用いることができる。

【0093】

E. 結合化学

EDCは、(1)抗体の求核基または求電子基を二価リンカー試薬と反応させて、共有結合により抗体-リンカー中間体を形成し、続いて活性化薬物と反応させること；および(2)薬物の求核基および求電子基とリンカー試薬(完全リンカーまたはその一部であってよく、一部だけの場合、残りの部分をその後共有結合させることができる)とを反応させて共有結合により薬物-リンカー中間体(「薬物-リンカー試薬」)を形成し、続いて抗体の求核基または求電子基と反応させることを含む、当業者に公知の有機化学反応、条件、および試薬を用いるいくつかの経路のいずれかによって調製することができる。結合方法(1)および(2)を様々な抗体、薬物、およびリンカーとともに用いて本発明のEDCを調製することができる。

10

【0094】

抗体上の求核基としては、例えば：(i)N末端アミン基、(ii)側鎖アミン基、例えばリジン、(iii)側鎖チオール基、例えばシステイン、および(iv)糖ヒドロキシルまたはアミノ基が挙げられるが、これらに限定されるものではなく、ここで、抗体はグリコシル化されている。アミン、チオール、およびヒドロキシル基は求核性であり：(i)NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート、および酸ハロゲン化物などの活性エステル；(ii)ハロゲン化アルキルおよびハロゲン化ベンジル、例えばハロアセトアミド；(iii)アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基を含むリンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基と反応して、共有結合を形成することができる。ある抗体は、還元性鎖間ジスルフィド、すなわちシステインブリッジを有する。抗体は、DTT(クレランド試薬、ジチオトレイトール)またはTCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩などの還元剤での処理によってリンカー試薬との結合について反応性にすることができる；Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80；Soltec Ventures, Beverly, Mass.)。各システインジスルフィドブリッジはしたがって、理論的に2つの反応性チオール求核試薬を形成するであろう。さらなる求核基は、リジンと2-イミノチオラン(トラウト試薬)との反応により抗体に導入することができ、結果としてアミンがチオールに変換される。

20

30

【0095】

抗体-薬物複合体は、リンカー試薬または薬物上の求核性置換基と反応することができる抗体を修飾して求電子部分を導入することによっても産生することができる。グリコシル化抗体の糖を、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤と反応させてアルデヒドまたはケトン基を形成することができ、これはリンカー試薬または薬物部分のアミン基と反応する可能性がある。結果として得られるイミンシッフ塩基は、安定な連結を形成することができるか、または、例えばボロヒドリド試薬によって還元して、安定なアミン結合を形成することができる。1つの実施形態において、グリコシル化抗体の炭水化物部分とガラクトースオキシダーゼまたはメタ過ヨウ素酸ナトリウムのいずれかとの反応によってカルボニル(アルデヒドおよびケトン)基がタンパク質中で得られる可能性があり、これは薬物上の適切な基と反応することができる(Hermanson, G. T. (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: New York, p234-242)。別の実施形態において、N末端セリンまたはトレオニン残基を含むタンパク質はメタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応することができ、第1アミノ酸の代わりにアルデヒドが生じる(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146；米国特許第5,

40

50

362, 852合)。そのようなアルデヒドを薬物部分またはリンカー-求核試薬と反応させることができる。

【0096】

同様に、薬物部分上の求核基としては：(i) 活性エステル、例えばNHSエステル、HOBTエステル、ハロホルメート、および酸ハロゲン化物；(ii) ハロゲン化アルキルおよびハロゲン化ベンジル、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基を含む、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基と反応して共有結合を形成することができる、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリーールヒドラジド基が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0097】

同様に、薬物部分上の求核基としては：(i) 活性エステル、例えばNHSエステル、HOBTエステル、ハロホルメート、および酸ハロゲン化物；(ii) ハロゲン化アルキルおよびハロゲン化ベンジル、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基を含むリンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基と反応して共有結合を形成することができる、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリーールヒドラジド基が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0098】

下記実施例で例示するように、クラス1EDCは、アミノグリコシドをステロイド薬物のヒドロキシル基と連結させて、O-グリコシド結合を形成することによって都合よく調製することができる。次いで、NHS-PEG-マレイミド試薬をアミノグリコシドのアミノ基と連結して、「リンカー-試薬」を形成する。最後に、リンカー試薬中のマレイミドを抗体中のシステイン部分と共有結合させる。

20

【0099】

F. 薬物負荷

薬物負荷とは、EDC製剤中の抗体あたりの薬物の平均数を指す。各リンカーが1つの薬剤に連結される場合、薬剤の平均数は、抗体上のリンカーの平均数と等しくなる。薬剤負荷は、典型的には抗体あたり1から8までの薬物に及ぶ、すなわち、1、2、3、4、5、6、7、または8の薬剤が抗体と共有結合する。リンカー（または薬物-リンカー試薬）が共有結合できる抗体上の複数の部位が存在するので、また潜在的な結合部位の1つのサブセットだけに結合の化学を向けることは困難であるので、ほとんどのEDC製剤は、異なる薬物負荷を有する抗体の混合物である。したがって、EDCの組成物は、典型的には、1～8の薬物範囲と結合した抗体の集まりを含む。

30

【0100】

典型的には、理論的 maximum よりも少ない薬物部分が結合反応中に抗体と結合する。抗体は、例えば、薬物-リンカー中間体(D-L)またはリンカー試薬と反応しないシステイン残基を多く含む可能性がある。さらに、最も反応性の高いシステインチオール基のみがチオール-反応性リンカー試薬と反応することができる。一般的に、抗体は、薬物部分と連結することができる遊離および反応性システインを、たとえあったとしても多くは含まない。化合物の抗体中のほとんどのシステインチオール残基はジスルフィドブリッジとして存在し、ジチオトレイトール(DTT)またはTCEPなどの還元剤で、部分または完全還元条件下で還元されるはずである。EDCの負荷(薬物/抗体比)は：(i) 薬物-リンカー(D-L；下記実施例では「リンカー対応(linker-ready)治療薬と称する)またはリンカー試薬の抗体に対するモル過剰を制限すること、(ii) 結合反応時間または温度を制限すること、および(iii) システインチオール修飾のための部分的または限定的還元条件をはじめとする、いくつかの異なる方法で制御することができる。

40

【0101】

薬物負荷は、EDCの薬力学、活性、毒性、および抗体安定性に影響を及ぼす可能性が

50

ある。したがって、当業者は、抗体あたりの薬物の数を最適化することが重要であることを理解する。EDC薬物負荷を最適化するために、あるEDC特性、例えば血清半減期および安定性、ならびにインビボ有効性対毒性を測定することができる。反応混合物から、準最適負荷を有する抗体から最適数の薬物をロードされた抗体薬物複合体を精製する方法を記載する文献では、複数の方法が記載されている（米国特許第7,811,572号を参照のこと）。

【0102】

本発明は、最適治療効果を得るための薬物負荷はガンの間で異なる可能性があるという発見に一部起因する。しかしながら一般的に、最適薬物負荷は3～6の範囲内である。1つの実施形態において、本発明の医薬製剤中のクラス1EDCは、EDCがモノクローナル抗体である場合、平均でEDCあたり3つの薬物を有する。別の実施形態では、本発明の医薬製剤中のクラス1EDCは、EDCがモノクローナル抗体である場合、平均でEDCあたり7つの薬物を有する。下記実施例で説明するように、薬物負荷が低いほど、EDCの半減期が長くなり、そしてEDCの細胞毒性が低くなる。したがって、例えば薬物負荷が3の本発明のEDCは、長い間隔（例えば、週1回、2もしくは3週間ごとに1回、または月1回）で投薬することができ、そしてさらに有利な副作用プロファイルを有する可能性がある。

【0103】

結合反応から得られるEDCの製剤中の抗体あたりの薬物の平均数は、分光光度分析、質量分析、ELISAアッセイ、電気泳動、およびHPLCなどの常法によって特徴づけることができる。場合によっては、薬剤の数が、他の薬物負荷を有するEDCに対してある値である、均一なEDCの分離、精製、および特性化は、逆相HPLCまたは電気泳動などの手段によって達成することができる。ポリマー逆相（PLRP）および疎水性相互作用（HIC）などの液体クロマトグラフィー法は、混合物中のEDCを薬物負荷値によって分ける。1つの薬剤負荷値を有するEDCの製剤を単離することができる。しかしながら、1つの薬剤ロードを有するこれらのEDCは依然として不均一な混合物である。なぜなら、薬物部分を、抗体上の異なる部位でリンカーにより結合させることができるからである。

【0104】

III. 治療方法

本発明のEDCは、一般的に、ガン患者の治療法で有用である。そのような方法は、治療上有効用量のクラス1EDCを、治療を必要とする患者に投与することを含んでもよい。いくつかの実施形態では、クラス1EDCに加えて1以上の薬物を患者に投与して、例えば、ディスアドヘリン陽性ガンを含むガンを治療する。様々な実施形態において、他の薬物は、ゲムシタピン、パクリタキセル、TRAIL（Apo2リガンドおよびApo2Lとしても知られる組織壊死因子（TNF）関連アポトーシス誘導リガンド）（例えば、izTrail）、および線維芽細胞成長因子（FGF）受容体キナーゼ阻害剤（例えば、PD173074）、mTOR阻害剤（例えば、エベロリムス）および解糖阻害剤（例えば、CEN10-128-cys）からなる群から選択される。驚くべきことに、本明細書中で開示されるクラス1EDCは、細胞死の促進において、TRAIL、線維芽細胞成長因子（FGF）受容体キナーゼ阻害剤、mTOR阻害剤、または解糖阻害剤のいずれかと相乗作用することが示されている。

【0105】

第1の態様において、患者は肺ガン患者である。1つの実施形態において、肺ガンは非小細胞肺ガン（NSCLC）である。1つの実施形態において、肺ガンは扁平細胞ガンである。別の実施形態において、肺ガンは大細胞ガンである。1つの実施形態において、患者に、クラス1EDCと組み合わせて肺ガンの治療について認可された第2の薬物を投与する。1つの実施形態において、第2の薬物はパクリタキセルまたはドセタキセルまたは別のタキサン薬物である。1つの実施形態において、第2の薬物は、これに限定されないがizTRAILを含むTRAILである。1つの実施形態において、第2の薬物はTR

10

20

30

40

50

A I L の受容体に対する抗体であり、ここで、抗体は T R A I L のようにアポトーシスのシグナルを送る働きをする。1つの実施形態において、第2の薬物は、これに限定されないが P D 1 7 3 0 7 4 を含む F G F 受容体キナーゼ阻害剤である。1つの実施形態において、第2の薬物は、これに限定されないが エベロリムスを含む m T O R 阻害剤である。1つの実施形態において、第2の薬物は、これに限定されないが C E N 1 0 - 1 2 8 - c y s を含む解糖阻害剤である。様々な実施形態において、他の薬物は、ペメトレキセド、ドセタキセル、ゲフィニチブ、ゲムシタピン、ビノレルピン、ボルフィマーナトリウム、エルロチニブ、エトポシド、トポテカン、メトトレキサート、ペバシズマブ、カルボプラチン、シスプラチン、およびクリゾチニブからなる群から選択される。

【0106】

第2の実施形態において、患者は膵臓ガン (P a C a) 患者である。1つの実施形態において、患者に、クラス1 E D C と組み合わせて膵臓癌の治療について認可された別の薬物を投与する。様々な実施形態において、他の薬物はゲムシタピンである。他の実施形態において、他の薬物は、フルオロウラシル、エルロチニブ、ゲムシタピン、スニチニブ、エベロリムスおよびマイトマイシンCからなる群から選択される。

【0107】

第3の実施形態において、患者はリンパ腫ガン患者である。1つの実施形態において、リンパ腫はB細胞リンパ腫である。1つの実施形態において、患者に、クラス1 E D C と組み合わせてリンパ腫の治療について認可された別の薬物を投与する。様々な実施形態において、他の薬物は、メトトレキサート、ドキシソルピシン、クロランブシル、ネララピン、ベンダムスチン、プレオマイシン、ボルテゾミブ、シクロホスファミド、イブリツモマブ・チウキセタン、プロカルバジン、プレリキサフォル、プララトレキサート、デニロイキン・ジフチトクス、オフアツムマブ、リツキシマブ、ロミデプシン、トシツモマブ、ピンブラスチン、ボルテゾミブ、ピンブラスチン、ポリノスタット、インターフェロン、ロミデプシン、ブレンツキシマブ・ベドチンおよびブリツモマブ (b r i t u m o m a b) ・チウキセタンからなる群から選択される。

【0108】

本発明の治療方法のこれらや他の実施形態において、治療有効用量は、約 0 . 1 m g / k g 患者体重 (「 m g / k g 」) から約 1 0 0 m g / k g の範囲内である。様々な実施形態において、治療有効用量は、約 0 . 1 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g である。様々な実施形態において、治療有効用量は 0 . 2 5 m g / k g ~ 5 m g / k g である。様々な実施形態において、治療有効用量は1週間に1回または3週間に1回投与され、患者が治癒するか、またはガンが進行するまで、投薬はその頻度で継続される。

【0109】

下記実施例で示すよう薬物負荷は、正常細胞およびガン細胞の両方に対して、そしてクラス1 E D C の半減期に対して、毒性に関して重大な影響を及ぼす可能性がある。特に、低い薬物負荷、即ち、抗体あたり2または3の薬物の薬物負荷は、高い薬物負荷、すなわち、抗体あたり8または9の薬物の薬物負荷と比べて、クラス1 E D C の血清半減期を増大させることができ、そして正常細胞毒性を減少させることができる。しかしながら、一部のガンについては、より高い薬物負荷がより良好な有効性を提供する。したがって、様々な実施形態において、本発明のクラス1 E D C の各抗体に結合する薬物の数 (「薬物負荷」と称する) は 2 ~ 9 である。1つの実施形態において、薬物負荷は2である。別の実施形態において、薬物負荷は3である。他の実施形態において、薬物負荷は5、7、または9である。

【0110】

様々な態様において、抗体に結合した薬物は、N a , K - A T P アーゼシグナル伝達複合体のアルファサブユニットに結合するステロイド薬物である。様々な実施形態において、ステロイドはジギトキシゲンまたはシラレニンである。様々な実施形態において、薬物は、グリコシドに対するアミド結合によってリンカーに結合し、そのグリコシド結合は、付加されたグリコシドの C 1 とステロイドアグリコンの C 3 との間で形成される。グリコ

10

20

30

40

50

シドは、例えば、4 - アミノ - リボシドおよび4 - アミノ - キシロシドからなる群から選択することができ、リンカーのPEG部分をグリコシドのアミノ基と結合させる。本発明のクラス1EDCの様々な実施形態において、ステロイドはジギトキシゲンまたはシラレニンであり、グリコシドは4 - アミノ - リボシドまたは4 - アミノ - キシロシドのいずれかである。

【0111】

様々な態様において、薬物をグリコシドのC1ヒドロキシル基によりリンカーと結合させ、グリコシドは4 - アミノ - リボシドまたは4 - アミノ - キシロシドであり、リンカーのPEG部分をリンカーのグリコシド部分のアミノ基と結合させる。様々な実施形態において、リンカーのPEG部分は2 ~ 36個のグリコール単位を含む。様々な実施形態において、リンカーのPEG部分は24個のグリコール単位を含む。

10

【0112】

様々な態様において、抗体はM53モノクローナル抗体である。様々な実施形態において、抗体は、M53抗体と同じエピトープに結合するモノクローナル抗体である。様々な実施形態において、抗体はM53抗体のキメラ形態である。様々な実施形態において、抗体はM53抗体のヒト化形態である。

【0113】

本発明による化合物の投与は、治療薬について承認され、当該技術分野で一般的に知られている任意の投与方法によっておこなうことができる。プロセスとしては、例えば、非経口、経口、鼻による全身投与、または局所投与が挙げられるが、これに限定されるものではない。非経口投与は、皮下、筋肉内もしくは静脈内注射によるか、または灌流によっておこなわれる。一般に、本発明のEDCなどの抗体ベースの治療法は、典型的には静脈内投与される。注射可能な組成物は、懸濁液もしくは液体溶液、または液体中に即座に溶解させるのに適した固体形態のいずれかの標準的な形態で調製することができる。1つの実施形態において、非経口投与は、一定の服用レベルの維持を保證する徐放または持続放出系の装置を使用する。

20

【0114】

疾患の治療に関して、EDCの適切な投薬量は、治療される疾患の種類、疾患の重篤度および経過、薬歴、患者の病歴および抗体に対する応答、ならびに担当医の判断によって変わるであろう。したがって、本発明による化合物の投与のための投薬量は、対象の種類、血統、年齢、体重、性別および医学的状態；治療される状態の重篤度；投与方法；対象の腎機能および肝機能の状態ならびに投与される特定のEDCの特質をはじめとする様々な因子にしたがって選択される。通常の実験豊富な医師は、治療される医学的状態を治療するための所望のEDCの有効量を容易に決定し、処方するであろう。例をあげれば、非経口投与する場合、本発明のクラス1EDCの有効レベルは、約0.1 ~ 約10mg/kg体重、例えば約0.25mg ~ 約2.5mg/kg体重の範囲内である。クラス1EDCは、静脈内投与する場合、一般的に、毎週または隔週または3週間ごとに投与される。

30

【0115】

本発明のEDCを用いて、ヒトまたは動物対象におけるガンおよび自己免疫状態などの様々な疾患または障害を治療することができる。1つの実施形態において、対象はヒトである。別の実施形態において、対象は非ヒト動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ、鳥など）である。例示的な状態また障害としては、良性または悪性腫瘍；白血病およびリンパ性悪性疾患；ニューロン、グリア、星状細胞（astrocytal）、視床下部、腺、マクロファージ、上皮、間質、胞胚腔、炎症、血管新生および免疫障害などの他の障害が挙げられる。

40

【0116】

本明細書中で治療されるガンの例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病またはリンパ性悪性疾患が挙げられるが、これらに限定されるものではない。そのようなガンの更に特定の例としては、扁平細胞ガン（例えば、上皮扁平細胞ガン）、小細胞肺ガン、非小細胞肺ガン、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌腫をはじめとする肺ガン、腹

50

膜ガン、肝細胞ガン、胃腸ガンを含む胃腸または胃ガン、胃腸間質性腫瘍（GIST）、膵臓ガン、グリア芽細胞腫、子宮頸がん、卵巣ガン、肝臓ガン、膀胱ガン、肝細胞ガン、乳ガン、結腸ガン、直腸ガン、結腸直腸ガン、子宮内膜ガンまたは子宮ガン、唾液腺癌、腎臓ガンまたは腎ガン、前立腺ガン、外陰ガン、甲状腺ガン、肝ガン、肛門癌、陰茎癌、ならびに頭頸部ガンが挙げられる。

【0117】

ガンに加えて、本発明のEDCを、抗炎症剤として、または他の疾患を治療するために用いることができる。研究により、嚢胞性線維症患者の肺におけるNa, K-ATPアーゼサブユニットイソ型/モジュレーター分布およびレベルは、正常な肺のものとは異なり、したがって嚢胞性線維症過剰炎症に対する治療薬の標的であることが示唆される。研究から、Na, K-ATPアーゼと結合する強心配糖体は、NF-カッパB阻害剤の特異的阻害リン酸化（specific inhibition phosphorylation）により、培養されたCF上皮細胞からのIL-8の過剰分泌を抑制することができることが明らかにされている（参照することによって本明細書中に組み込まれるSrivastava, M., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 7693-7698を参照のこと）。強心配糖体の潜在的な治療的使用の総説は、肥満、腎疾患、偏頭痛、てんかん、ジストニア、パーキンソン症候群を検討している（2007 Journal of Internal Medicine 261; 44-52）。

10

【0118】

本明細書中のクラス1 EDCを第2の薬物と同時に、連続して、もしくは交互に投与することができるか、または他の療法との非反応性によって投与することができる。したがって、第2の薬物の併用投与には、別々の処方または単一の医薬製剤を使用する同時投与、およびいずれかの順序での連続投与が含まれ、この場合、好ましくは両方の（または全ての）療法がそれらの生物学的活性を同時に発揮する時間がある。複数の第2の薬物を本発明のEDCと組み合わせることができる。したがって、本発明のEDCを、複合医薬製剤、または併用療法としての投薬レジメンにおいて、抗ガン特性を有する第2の化合物と組み合わせることができる。複合医薬製剤または投薬レジメンの第2の化合物は、好ましくは組み合わせのEDCに対する相補的活性を有するので、互いに悪影響を及ぼさない。

20

30

【0119】

第2の化合物は、化学治療薬、細胞毒性剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗ホルモン剤、アロマターゼ阻害剤、タンパク質キナーゼ阻害剤、脂質キナーゼ阻害剤、抗アンドロゲン、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、遺伝子治療ワクチン、抗血管新生剤および/または心臓保護剤（cardioprotectant）であってもよい。そのような分子は、好適には意図される目的に有効な量の組み合わせで存在する。EDCを含有する医薬組成物はさらに、治療有効量の、チュープリン形成阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、またはDNAバインダーなどの化学治療薬を有していてもよい。

【0120】

1つの実施形態において、併用治療薬は、TRAILまたは類似の活性を有するアゴニストmAB；ベパシズマブ；カルボプラチン；シスプラチン；シクロホスファミド；ドセタキセル注射；ドキシソルピシン；エトポシド；リン酸エトポシド；ジェムザール（ゲムシタピンHCL）；ハイカムチン（塩酸トポテカン）；イホスファミド；イレッサ（ゲフィニチブ）；イリノテカン注射；メトトレキサート注射；マイトマイシン；パクリタキセル；フォトフリン、QLT；プレメトレキセド（Premetrexed）；プロカルバジン；ストレプトゾシン；タルセバ（エルロチニブ）；ビンブラシン（Vinblastine）；ピンクリスチン；および酒石酸ビノレルピンから選択される。

40

【0121】

したがって、他の治療レジメンを本発明にしたがってクラス1 EDCの投与と組み合わせることができる。併用療法を同時または連続レジメンとして投与することができる。連

50

続して投与する場合、組み合わせは2回以上の投与で投与することができる。併用投与は、別の処方または単一医薬製剤使用する同時投与、ならびにいずれかの順序での連続投与を含み、この場合、両方の（または全ての）活性剤が同時にそれらの生物学的活性を發揮する期間がある。

【0122】

1つの実施形態において、本発明のEDCでの治療は、異なる化学治療薬のカクテルの同時投与を含む、本明細書中で特定される抗ガン剤、および1以上の化学治療薬または成長阻害剤の併用投与を含む。化学治療薬は、タキサン（例えば、パクリタキセルおよびドキシタキセル（doxetaxel））および/またはアントラサイクリン抗生物質を含む。そのような化学治療薬の調製および投薬スケジュールは、製造業者の指示にしたがって、または当業者によって経験的に決定できるように、使用することができる。そのような化学療法剤の調製および投薬スケジュールは、Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)でも記載されている。

10

【0123】

抗ガン剤は、抗ホルモン化合物；例えば、タモキシフェンなどの抗エストロゲン化合物；オナプリストンなどの抗プロゲステロン（EP616812）；またはフルタミドなどの抗アンドロゲンと、そのような分子について公知の投薬量で組み合わせてもよい。治療されるガンがホルモン非依存性ガンである場合、患者をあらかじめ抗ホルモン療法に付し、ガンがホルモン非依存性になった後、抗ErbB2抗体（および場合によって本明細書中で記載するような他の薬剤）を患者に投与することができる。心臓保護剤（療法に関連する心筋機能障害を予防もしくは軽減するため）または1以上のサイトカインを患者に同時投与することも有益である可能性がある。前記治療法に加えて、患者はガン細胞の外科的切除および/または放射線療法を受けてもよい。

20

【0124】

前記の同時投与される薬剤のいずれかの好適な投薬量は、現在使用されているものであり、新たに同定された薬剤および他の化学治療薬または治療の複合作用（相乗効果）のために少なくすることができる。

【0125】

併用療法は、一緒に使用される活性成分が、化合物を別々に使用することから得られる効果の合計よりも大きい場合に達成される効果を提供する可能性がある。効果は、活性成分が：（1）同時処方され、投与されるか、または複合単位投薬処方と同時に送達される場合；（2）別の処方として交互に、もしくは平行して送達される場合；または（3）ある他のレジメンによって、達成される可能性がある。交互療法で送達される場合、効果は、化合物が連続して、例えば別のシリンジ中で異なる注射により投与または送達される場合に達成される可能性がある。一般に、交互療法中、有効投薬量の各活性成分を連続して、すなわち順次投与し、一方、併用療法では、有効投薬量の2以上の活性成分を一緒に投与する。

30

【0126】

本発明の治療用EDCは、治療される状態に適切な任意の経路によって投与することができる。EDCは、典型的には、非経口的に、すなわち、注入、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、腹腔内、髄腔内、ポラス、腫瘍内注射または硬膜外投与される（Shire et al (2004) J. Pharm. Sciences 93(6): 1390-1402）。

40

【0127】

IV. 医薬製剤および単位投与形態

本発明は、静脈内投与を含むがこれに限定されない非経口投与に適したクラス1EDCの医薬製剤を提供する。1つの実施形態において、本発明は、クラス1EDCを薬剤的に許容されるビヒクル、ベクター、希釈剤、および/または賦形剤と組み合わせる含む、非経口投与に適した医薬製剤を提供する。本発明はまた、これらの医薬製剤の単位投与形態

50

も提供する。1つの実施形態において、本発明は、約2.5mg~約1.5gのクラス1 EDCを含む静脈内投与に適した本発明の医薬製剤を含有する単に投与形態を提供する。様々な実施形態において、これらの単位投与形態は、5mg、10g、25mg、0.5g、または1gのクラス1 EDCを含有する。

【0128】

EDCの医薬製剤は、典型的には、薬剂的に許容される非経口ビヒクルを用いて単位投薬注射可能な形態で非経口投与用に調製される。所望の程度の純度を有するEDCを、場合によって薬剂的に許容される希釈剤、担体、賦形剤または安定剤と、凍結乾燥処方または水溶液の形態で混合する(Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition, Osol, A. E d.)。

10

【0129】

許容される非経口ビヒクル、希釈剤、担体、賦形剤、および安定剤は、用いられる投薬量および濃度でレシピエントに対して無毒であり、緩衝液、例えばリン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸；アスコルビン酸およびメチオニンをはじめとする抗酸化剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、またはデキストリンをはじめとする他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；糖類、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；塩形成カウンターイオン、例えばナトリウム；金属複合体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；および/または非イオン性界面活性剤、例えばTween、PLURONICS（登録商標）、またはポリエチレングリコール（PEG）を含む。例えば、凍結乾燥抗ErB2抗体処方は、WO97/04801（参照することによって本明細書中に明らかに組み込まれる）に記載されている。EDCの例示的処方は、約100mg/mlのトレハロース（2-（ヒドロキシメチル）-6-[3, 4, 5-トリヒドロキシ-6-（ヒドロキシメチル）テトラヒドロピラン-2-yl]オキシ-テトラヒドロピラン-3, 4, 5-トリオール；C₁₂H₂₂O₁₁；CAS番号99-20-7）および約0.1%TWEEN（商標）20（ポリソルベート20；ドデカン酸2-[2-[3, 4-ビス（2-ヒドロキシエトキシ）テトラヒドロフラン-2-イル]-2-（2-ヒドロキシエトキシ）エトキシ]エチルエステル；C₂₆H₅₀O₁₀；CAS番号9005-64-5）を約pH6で含有する。

20

30

【0130】

治療用EDCの医薬製剤は、ある量の未反応薬物部分(D)、抗体（または他のターゲティング部分）-リンカー中間体(Ab-L)、および/または薬物-リンカー中間体(D-L)、EDCを作製するプロセス；あるいは時間/温度加水分解またはバルクEDCもしくは処方されたEDC組成物の貯蔵による分解における過剰の試薬の不完全な精製および分離の結果としての、不純物、および副生成物を含む可能性がある。例えば、検出可能な量の薬物-リンカーまたは様々な中間体を含む可能性がある。代替的にまたは付加的に、それは検出可能な量の連結していない遊離ターゲティング部分を含む可能性がある。例示の場合によっては薬物-リンカー複合体は遊離型薬物よりも殺細胞において有効でないことがインビトロ細胞増殖アッセイによって確認されたので、処方10%モル当量までの薬剤リンカーの薬剤を含む可能性がある。

40

【0131】

活性な医薬成分は、例えば、コアセルベーション技術によるか、または界面重合によって調製されるマイクロカプセル、例えばそれぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼ

50

ラチン - マイクロカプセルおよびポリ - (メチルメタクリレート) マイクロカプセル中、コロイド薬物送達系中 (例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル) 中またはマクロエマルジョン中にトラップすることもできる。そのような技術は Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) で開示されている。

【0132】

持続放出性製剤を調製することができる。持続放出製剤の好適な例としては、EDCを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスであって、例えばフィルム、またはマイクロカプセルなどの成形品の形態であるマトリックスが挙げられる。持続放出マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル (例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド (米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸およびガンマ-エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えば LUPRON DEPOT (商標) (乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なマイクロスフェア)、およびポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

10

【0133】

インビボ投与のために使用される処方は無菌でなければならず、これは、無菌ろ過膜を通したる過によって容易に達成される。

20

【0134】

処方は、前記投与経路に適したものを含む。処方は、単位投与形態で都合よく提供することができる、調剤分野で周知の方法のいずれかによって調製することができる。技術および処方は、概して、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.) で見出される。そのような方法は、活性成分を1以上の副成分を構成する担体と結合させるステップを含む。一般に、処方は、活性成分を液体担体または微粉末固体担体または両者と均一かつ密接に結合させ、次いで、必要ならば、生成物を成形することによって調製される。

【0135】

水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に適した賦形剤との混合物で活性物質 (EDC) を含む。そのような賦形剤は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、クロスカルメロース、ポビドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴムおよびアカシアゴムなどの懸濁剤、ならびに分散または湿潤剤、例えば天然に存在するホスファチド (例えば、レシチン)、アルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物 (例えば、ポリオキシエチレンステアレート)、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物 (例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール)、エチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトール無水物由来の部分エステルとの縮合生成物 (例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート) を含む。水性懸濁液はさらに、p-ヒドロキシ-安息香酸エチルまたはn-プロピルなどの1以上の防腐剤、1以上の着色剤、1以上の矯味矯臭剤およびスクロースまたはサッカリンなどの1以上の甘味料を含んでもよい。

30

40

【0136】

EDCの医薬組成物は、無菌注射用水性または油性懸濁液などの無菌注射用製剤の形態であってよい。この懸濁液は、公知技術にしたがって、前述の好適な分散または湿潤剤および懸濁剤を使用して処方することができる。無菌注射用製剤は、非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中無菌注射用溶液または懸濁液、例えば1,3-ブタン-ジオール中溶液であってもよいし、または凍結乾燥粉末として調製してもよい。用いることができる許容されるビヒクルおよび溶媒には、水、リンガー液および等張塩化ナトリウム溶液がある。加えて、無菌固定油は、溶媒または懸濁媒として通常用いることができる。こ

50

のために、合成モノグリセリドまたはジグリセリドをはじめとする、任意の無刺激性固定油を用いることができる。加えて、オレイン酸などの脂肪酸も同様に注射製剤で用いることができる。

【0137】

単一投与形態を製造するために担体物質と組み合わせることができる活性成分の量は、治療される宿主および特定の投与様式に応じて変わるであろう。約30 mL / hrの速度で好適な体積の注入が起こり得るために、例えば、静注を意図される水溶液は、溶液1ミリリットルあたり約3 ~ 500 μ gの活性成分を含んでもよい。皮下（ポラス）投与は、約1.5 mL以下の総容積および1 mLあたり約100 mgのEDCの濃度で実施することができる。頻回および慢性投与を必要とするEDCについて、例えばあらかじめ充填されたシリンジまたは自動注射装置技術によるなど、皮下経路を用いることができる。

10

【0138】

一般的問題として、1回につき投与されるEDCの薬剂的に有効な初回量は約0.1 ~ 10 mg / kgの範囲、即ち、約0.25 ~ 5 mg / kg患者体重/日の範囲であり、使用される化合物の典型的な初期範囲は0.25 ~ 5 mg / kg / 日である（多くの場合、週1回投薬またはそれほど頻繁でない投薬でさえも用いられる）。例えば、ヒト患者に、最初に患者の体重1 kgあたり約0.25 mgのEDCを投与することができる。用量は最大耐性量（MTD）まで増大させてもよい。投薬スケジュールは、ほぼ毎週1回または3週ごとに1回であってよいが、診断された状態または応答によって、スケジュールはさらに頻繁であっても、頻繁でなくてもよい。用量は、約4以上などの複数周期で安全に投与することができるMTD以下となるように治療の過程でさらに調節することができる。

20

【0139】

非経口投与に好適な処方には、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤および処方を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質を含んでもよい水性および非水性無菌注射溶液；ならびに懸濁剤および増粘剤を含んでもよい水性および非水性無菌懸濁液が含まれる。

【0140】

処方は、単位用量または複数回投与容器、例えば密封アンプルおよびバイアル中に包装することができる、また使用直前に注射用の無菌液体担体、例えば水を添加するだけでよいフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存することができる。即席注射溶液および懸濁液は、すでに記載した種類の無菌粉末、顆粒および錠剤から調製される。例示的単位投薬量処方では、活性成分の1日用量または単位1日分割用量、またはその適切なフラクションを含む。

30

【0141】

本発明は、少なくとも1つの前記定義の活性成分を獣医学的担体と一緒に含む獣医学的組成物をさらに提供する。獣医学的担体は、組成物を投与する目的に有用な物質であり、それ以外では獣医学分野で不活性または許容される固体、液体または気体状物質であり得、活性成分と適合性である。これらの獣医学的組成物を、非経口的、経口的または任意の他の所望の経路によって投与することができる。

【0142】

本発明による組成物は滅菌することができる、および/または：非毒性アジュバントおよび補助物質、例えば保存、安定化、湿潤または乳化のための薬剤；溶解を促進する薬剤；ならびに浸透圧を調節するための塩および/または緩衝液の1以上を含む可能性がある。加えて、それらは治療上の利点を提供する他の物質も含有する可能性がある。組成物は、それぞれ、当業者に周知の混合、増粒またはコーティングの標準的プロセスによって調製される。

40

【0143】

本発明の別の実施形態において、前述の障害の治療に有用な物質を含む製品が提供される。1つの態様において、製品は、（a）本明細書中の化合物を含む容器（好ましくは、容器は、EDCおよび薬剂的に許容される担体または希釈剤を容器内に含む）；ならびに（b）患者において障害を治療するための指示を記載した添付文書を含む。

50

【0144】

したがって、別の実施形態において、製品、またはEDCおよび前述の障害の治療のために有用な物質を含む「キット」が提供される。製品は、容器およびラベルまたは容器上に添付された添付文書を含む。好適な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、またはプリスターパックが含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成することができる。容器は、状態を治療するために有効なEDC組成物を保持し、無菌アクセスポートを有していてもよい（例えば、容器は静脈内溶液バッグまたは皮下注射針により穴を明けることができるストッパーを有するバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも1つの活性剤はEDCである。ラベルまたは添付文書は、ガンなどの選択される状態を治療するために組成物が使用されることを示す。例えば、ガンは、本発明のEDCの標的の1つを過剰発現するものである可能性がある。ラベルまたは添付文書はさらに、本発明のEDCの標的の1つの過剰発現によって特徴付けられないガンを治療するために組成物を使用することができることも示す可能性がある。他の実施形態において、添付文書は、ホルモン非依存性ガン、前立腺ガン、結腸ガンまたは結腸直腸ガンを治療するためにもEDC組成物を使用することができることを示す可能性がある。

10

【0145】

製品は、化合物がその中に含まれた容器を含んでもよく、その化合物は本発明のEDCを含む。この実施形態における製品は、ガンを治療するためにEDCを使用することができることを示す添付文書を更に含んでもよい。代替的に、または付加的に、製品は、注射用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝食塩水、リンガー液およびデキストロス溶液などの薬剂的に許容される緩衝液を含む第2（または第3）容器を更に含んでもよい。それは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジを含む、商業的および使用者の観点から望ましい他の物質を更に含んでもよい。

20

【実施例】

【0146】

本発明の更なる利点及び特性は、例示として提示された以下の実施例から明らかになるであろうし、この実施例は限定するものとみなされるべきではなく、この実施例では参照が添付の図面でなされるであろう。本発明は、前述の実施例で具体的に記載されたものとは別の方法で実施されてもよいことは、明白であろう。本発明の多くの修正及び変形が、上記の教示に照らして可能であり、したがって、多くの修正及び変形は、これら実施例に続く添付の特許請求の範囲の範囲内である。この実施例は、薬剤合成セクション、抗体セクション及びEDCセクションに分けられている。

30

【0147】

実施例1：リンカー動作可能治療薬の合成

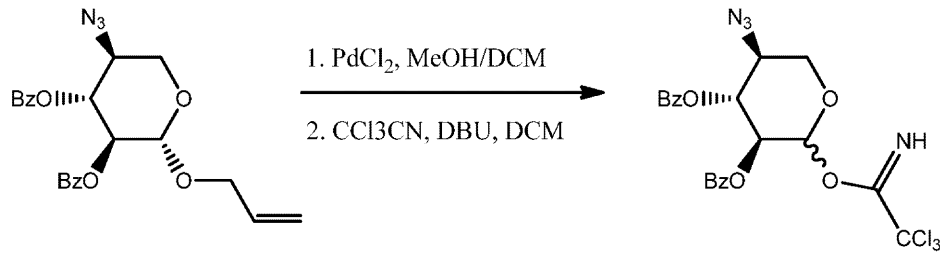
本実施例は、ステロイド剤をリンカーに結合させて、本明細書に記載されるような抗体に容易に結合し得る「リンカー動作可能」薬剤を生成するための合成プロトコルを記載する。このリンカー動作可能薬剤はまた、インピボにおけるプロテアーゼによるEDC分解によって生成され得るような、可能性のあるEDC分解生成物の活性を究明する試験において対照薬としても使用され得る。本実施例で記載されるこのリンカー動作可能試薬としては、PEG24-CEN09-106、PEG24-CEN09-107、PEG24-CEN10-110及びPEG24-CEN-319が挙げられる。

40

【0148】

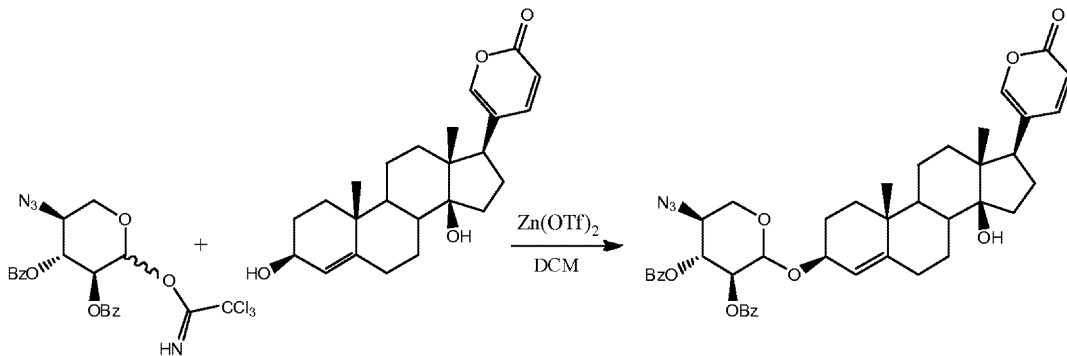
PEG24-CEN09-106は、ステロイド、リンカー及び活性マレイミド基を含むシラレニン系リンカー動作可能薬剤である。PEG24-CEN09-106の調製のための一般的合成工程は以下のとおりである。

【化3】



2, 3 - ジ - O - ベンゾイル - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - キシロピラノシド - 1 - トリクロロアセチミデート。1 - アリル - 2, 3 - ジ - O - ベンゾイル - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - リボピラノシド (11.9 g、28.1ミリモル) を、アルゴン下でジクロロメタン/メタノール (80 mL、90 : 10) 中に溶解し、PdCl₂ (0.5 g、2.8ミリモル) をこの溶液に加えた。混合物を室温で一晩攪拌し、セライトのパッドを通して濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルのパッド (ヘキサン/EtOAc、70 : 30) を通して濾過した。得られた化合物 (8.38 g、21.83ミリモル) を、アルゴン下で乾燥ジクロロメタン (170 mL) 中に溶解し、CCl₃CN (21.9 mL、218.3ミリモル) を加え、続いて0 でDBU (1.63 mL、10.91ミリモル) を滴加した。反応物を0 で1時間攪拌した。減圧下で溶媒を除去した。粗生成物をシリカゲルのパッド (ヘキサン/EtOAc、60 : 40 ~ 40 : 60) を通して濾過して、2, 3 - ジ - O - ベンゾイル - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - リボピラノシド - 1 - トリクロロアセチミデートを黄色油状物として得た (9.7 g、65%)。この化合物を更なる精製することなく、次に進めた。R_f 0.37 (シリカゲル、ヘキサン/EtOAc、80 : 20)。

【化4】

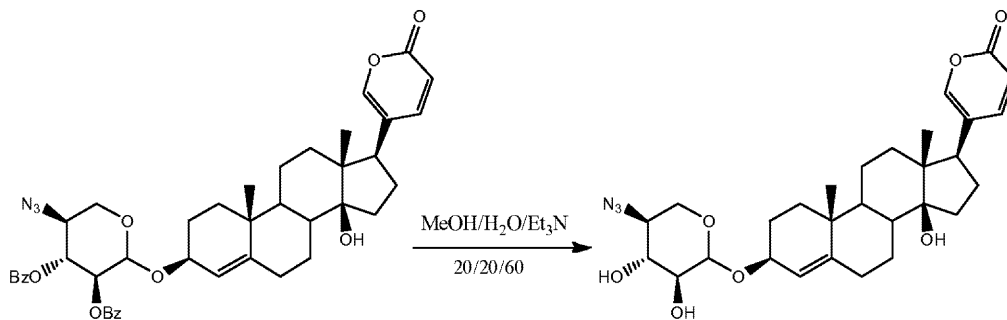


シラレニン - 2, 3 - ジ - O - ベンゾイル - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - キシロピラノシド。2, 3 - ジ - O - ベンゾイル - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - キシロピラノシド - 1 - トリクロロアセチミデート (0.483 g、0.915ミリモル) を、0 にてアルゴン下で、乾燥ジクロロメタン (15 mL) 中の活性化4分子篩 (90 mg) の懸濁液に加えた。次いで、シラレニン (0.182 g、0.474ミリモル) をこの混合物に加えた。5分後に、Zn(OTf)₂ (17 mg、0.047ミリモル) を加え、反応混合物を0 で更に30分間攪拌した。シラレニンの追加量 (0.182 g、0.474ミリモル) を加えた。反応混合物を0 で30分間攪拌した。Et₃Nの数滴で反応を停止させた。混合物を濾過し、減圧下で溶媒を除去した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン/EtOAc、75 : 25 ~ 50 : 50) によって精製し、シラレニン - 2, 3 - ジ - O - ベンゾイル - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - キシロピラノシドを白色粉末として得た (0.521 g、76%)。R_f 0.35 (シリカゲル、ヘキサン/EtOAc、50 : 50)。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)、0.68 (s, 3H), 0.90 - 2.17

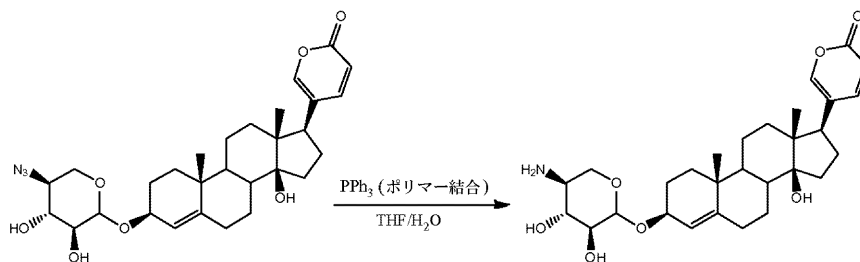
(m, 2 H), 2.39 - 2.44 (m, 1 H), 3.47 (dd, 1 H, J = 12.0, 9.5 Hz, H-5b), 3.79 - 3.87 (m, 1 H, H-4), 4.17 - 4.22 (m, 2 H, H-5a), 4.78 (d, 1 H, J = 6.8 Hz, H-1), 5.26 (dd, 1 H, J = 8.6, 6.8 Hz, H-2), 5.33 (s, 1 H), 5.49 (dd, 1 H, J = 8.7 Hz, H-3), 6.22 (dd, 1 H, J = 9.7, 0.6 Hz), 7.18 - 7.19 (m, 1 H), 7.33 - 7.39 (m, 4 H), 7.47 - 7.53 (m, 2 H), 7.80 (dd, 1 H, J = 9.7, 2.6 Hz), 7.92 - 7.97 (m, 4 H); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) 16.7, 19.0, 21.4, 25.8, 28.7, 28.8, 32.4, 32.8, 35.2, 37.6, 40.8, 42.9, 48.4, 50.2, 51.2, 59.2, 63.1, 71.6, 72.9, 76.1, 85.2, 100.0, 115.5, 121.7, 122.8, 128.5, 128.6, 129.1, 129.5, 129.9, 130.1, 133.4, 133.6, 146.9, 147.6, 148.7, 162.5, 165.3, 165.7.

【化5】



シラレニン-4-アジド-4-デオキシ-L-キシロピラノシド。シラレニン-2,3-ジ-O-ベンゾイル-4-アジド-4-デオキシ-L-キシロピラノシド (0.351 g、0.468 ミリモル) を、メタノール (21 mL) 中に溶解した。Et₃N (7 mL) 及び H₂O (7 mL) を加えた。反応混合物を室温で2日間攪拌した。混合物を濾過し、減圧下で溶媒を除去した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (CH₂Cl₂/MeOH、98:2~95:5) によって精製し、シラレニン-4-アジド-4-デオキシ-L-キシロピラノシドを黄色粉末として得た (40 mg、24%)。R_f 0.31 (CH₂Cl₂/MeOH、95:5); ^1H -NMR (300 MHz、CD₃OD), 0.74 (s, 3 H), 1.03 - 2.21 (m, 21 H), 2.52 - 2.57 (m, 1 H), 3.12 - 3.20 (m, 2 H), 3.40 - 3.44 (m, 2 H), 3.87 - 3.92 (m, 1 H), 4.17 - 4.23 (m, 1 H), 4.31 (d, 1 H, J = 7.7 Hz, H-1), 5.35 (s, 1 H), 6.28 (dd, 1 H, J = 9.7, 0.8 Hz), 7.43 (d, 1 H, J = 1.5 Hz), 7.99 (dd, 1 H, J = 9.7, 2.6 Hz)。

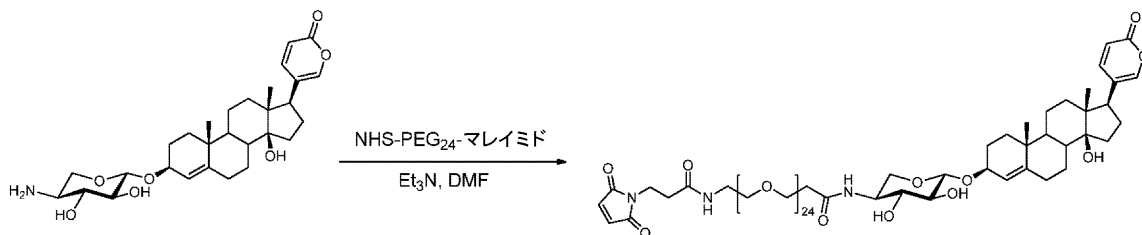
【化6】



シラレニン-4-アミノ-4-デオキシ-L-キシロピラノシド。シラレニン-4-アジド-4-デオキシ-L-キシロピラノシド (1.61 g、2.34 ミリモル) を THF/H₂O (2.8 mL、90:10) 中に溶解した。ポリマー結合型 PPh₃ (79 mg、

3ミリモル・ g^{-1})を加えた。反応混合物を40℃で2時間攪拌した。次いで混合物を濾過し、減圧下で溶媒を除去した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー($CH_2Cl_2/MeOH$ 、90:10~80:20)によって精製し、シラレニン-4-アミノ-4-デオキシ-L-キシロピラノシドを黄色粉末として得た(23mg、58%)。 R_f 0.2($CH_2Cl_2/MeOH$ 、80:20); ^1H-NMR (300MHz、 CD_3OD)、0.74(s, 3H), 1.06-2.19(m, 21H), 2.52-2.57(m, 1H), 2.75-2.86(m, 1H, H-4), 3.14-3.24(m, 2H, H-2, H-3), 3.64-3.72(m, 1H, H-5b), 3.87-3.91(m, 1H, H-5a), 4.19-4.24(m, 1H), 4.36(d, 1H, $J=7.1$ Hz, H-1), 5.38(s, 1H), 6.28(dd, 1H, $J=9.7$, 0.6Hz), 7.42(d, 1H, $J=1.6$ Hz), 7.99(dd, 1H, $J=9.7$, 2.5Hz); $^{13}C-NMR$ (75MHz、 CD_3OD) 17.4, 19.6, 22.5, 26.8, 29.9, 30.1, 33.3, 33.6, 36.6, 38.8, 41.8, 43.5, 49.4, 51.7, 52.2, 75.3, 76.5, 78.9, 79.3, 79.8, 85.8, 103.7, 115.6, 123.4, 125.1, 148.4, 149.4, 150.5, 164.9.

【化7】

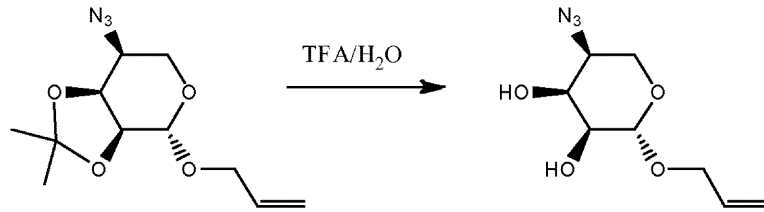


PEG24-CEN09-106.室温でDMF(1mL)中のシラレニン-4-アミノ-4-デオキシ-L-キシロピラノシド(18.5mg、0.0359ミリモル)の溶液に、NHS-PEG₂₄-マレイミド(50mg、0.0359ミリモル)を加えた。次いで Et_3N (0.025mL、0.18ミリモル)を加えた。反応物を室温で2時間攪拌した。減圧下で溶媒を除去した。粗物質をフラッシュクロマトグラフィー($CH_2Cl_2/MeOH$ 、95:5~80:20)によって精製し、PEG24-CEN09-106を黄色油状物として得た(48mg、75%)。 R_f 0.66($CH_2Cl_2/MeOH$ 、80:20)。HPLC分析[Luna C18、250×460mm、5 μ m、5%~95%のACNで32分間、1mL・分⁻¹]は、>95%の純度である生成物を示した。HRMS-ESI(m/z): $C_{87}H_{147}N_3O_{35}$ に関する[M+K]⁺計算値は1832.9452であり、実測値1832.9777であった。NHS-(PEG)_n-マレイミド(ここでnは整数)は、同様な反応条件を使用して、いずれのアミンを有する分子(下記参照)にも結合し得る。

【0149】

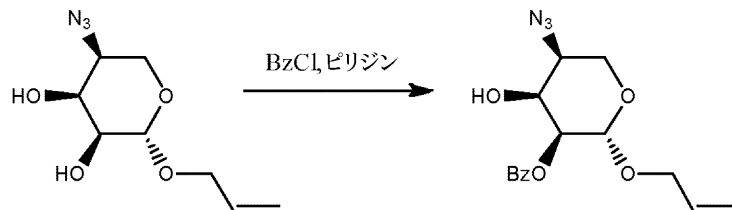
PEG24-CEN09-107は、ステロイド、リンカー及び活性マレイミド基を含むシラレニン系リンカー動作可能薬剤である。これは、リンカーが4-アミノ-キシロシド糖の代わりに4-アミノ-リボシドを含有することでPEG24-CEN09-106とは異なる。PEG24-CEN09-107の調製のための一般的合成工程は以下のとおりである。

【化 8】



1 - アリル - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - リボピラノシド . 1 - アリル - 2 , 3 - O - イソプロピリデン - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - リボピラノシド (8 . 5 3 g 、 3 3 . 6 ミリモル) を T F A / H ₂ O (8 0 : 2 0 、 4 0 m L) 中に溶解した。反応混合物を 0 で 3 0 分間攪拌した。減圧下で溶媒を除去し、得られた残渣をフラッシュクロマトグラフィー (C H ₂ C l ₂ / M e O H 、 9 5 : 5) によって精製し、1 - アリル - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - リボピラノシドを褐色油状物として得た (2 6 . 3 g 、 7 2 %) 。 R _f 0 . 5 (C H ₂ C l ₂ / M e O H 、 9 5 : 5) ; ¹ H - N M R (3 0 0 M H z 、 C D ₃ O D) , 3 . 4 9 (d d , 1 H , J = 5 . 1 , 3 . 5 H z , H - 2) , 3 . 5 8 (d d d , 1 H , J = 6 . 7 , 3 . 9 , 3 . 2 H z , H - 4) , 3 . 7 5 (d d , 1 H , J = 1 1 . 6 , 6 . 7 , H - 5 b) , 3 . 8 3 (d d , 1 H , J = 1 1 . 6 , 3 . 9 H z , H - 5 a) , 4 . 0 5 (d d t , 2 H , J = 1 . 4 , 6 . 0 , 1 3 . 0 H z , C H ₂ - C H = C H ₂) , 4 . 0 9 (d d , 1 H , J = 3 . 2 H z , H - 3) , 4 . 2 3 (d d t , 1 H , J = 1 . 5 , 5 . 2 , 1 3 . 0 H z , C H ₂ - C H = C H ₂) , 4 . 7 0 (d , 1 H , J = 5 . 1 H z , H - 1) , 5 . 1 7 (d d d , 1 H , J = 1 . 4 , 2 . 9 , 1 0 . 4 H z , C H ₂ = C H) , 5 . 3 0 (d d d , 1 H , J = 1 . 7 , 3 . 4 , 1 7 . 3 H z , C H ₂ = C H) , 6 . 0 0 - 5 . 8 7 (m , 1 H , C H ₂ = C H) .

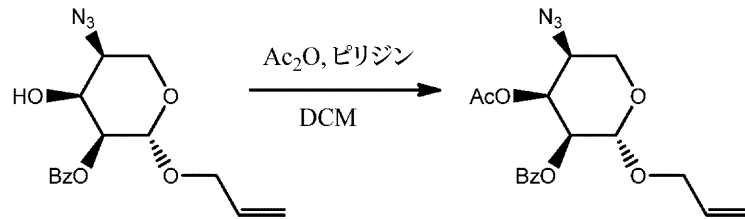
【化 9】



1 - アリル - 2 - O - ベンゾイル - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - リボピラノシド . 1 - アリル - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - リボピラノシド (4 . 0 g 、 1 8 . 6 ミリモル) を、アルゴン下で乾燥ジクロロメタン (1 2 0 m L) 中に溶解した。ピリジン (4 . 5 m L 、 5 5 . 7 6 ミリモル) を加え、混合物を 3 0 で 3 0 分間攪拌した。次いで B z C l (2 . 2 5 m L 、 1 9 . 5 1 ミリモル) を滴加した。次いでこれを室温にて一晩攪拌した。減圧下で溶媒を除去した。得られた残渣を E t O A c 中に溶解し、水、0 . 1 N の H C l 及び食塩水で洗浄した。有機層を N a ₂ S O ₄ 上で乾燥させて、濾過し、濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (トルエン / E t O A c 、 9 5 : 5 ~ 9 0 : 1 0) によって精製し、1 - アリル - 2 - O - ベンゾイル - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - リボピラノシドを褐色油状物として得た (4 . 4 6 g 、 7 5 %) 。 R _f 0 . 4 5 (トルエン / E t O A c 、 9 0 : 1 0) 。 ¹ H - N M R (3 0 0 M H z 、 C D ₃ O D) , 3 . 7 7 - 3 . 8 6 (m , 2 H , H - 4 , H - 5 b) , 3 . 9 6 (d d , 1 H , J = 2 . 8 , 1 1 . 7 H z , H - 5 a) , 4 . 0 2 - 4 . 1 0 (m , 1 H , C H ₂ - C H = C H ₂) , 4 . 2 0 - 4 . 2 7 (m , 1 H , C H ₂ - C H = C H ₂) , 4 . 3 6 (d d , 1 H , J = 3 . 4 H z , H - 3) , 4 . 9 5 (d , 1 H , J = 3 . 9 H z , H - 1) , 5 . 1 5 - 5 . 3 3 (m , 2 H , C H ₂ = C H) , 5 . 8 5 - 5 . 9 8 (m , 1 H , C H ₂ = C H) , 7 . 4 7 - 7 . 5 3 (m , 2 H , H - A r) , 7 . 5 9 - 7 . 6 5 (m , 1 H , H - A r) , 8 . 1 0 - 8 . 1 7 (m , 2 H , H - A r) ; ¹³ C - N M R (7 5 M H z , C D ₃

OD) 60.1 (C-4), 62.3 (C-5), 67.7 (C-3), 70.1 (CH₂-CH=CH₂), 73.1 (C-2), 98.7 (C-1), 117.7 (CH₂=CH), 129.65 (C-Ar), 131.1 (C-Ar), 134.6 (CH₂=CH), 135.6 (C-Ar), 167.7 (C=O).

【化10】



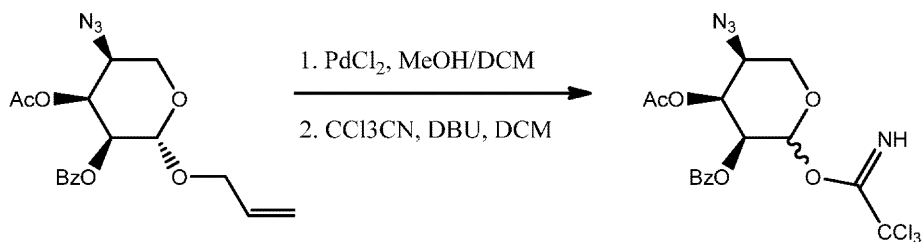
10

1-アリル-3-O-アセチル-2-O-ベンゾイル-4-アジド-4-デオキシ-L-リボピラノシド・1-アリル-2-O-ベンゾイル-4-アジド-4-デオキシ-L-リボピラノシド (4.45 g、13.93ミリモル) を、アルゴン下で0 にて無水ピリジン (5.6 mL、69.65ミリモル) 中に溶解し、Ac₂Oを滴加した。混合物を室温で一晩攪拌した。次いでジクロロメタンを加え、有機層を水、0.1 NのHCl及び食塩水で洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥させ、濾過し濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (トルエン/EtOAc、90:10) によって精製し、1-アリル-3-O-アセチル-2-O-ベンゾイル-4-アジド-4-デオキシ-L-リボピラノシドを黄色油状物として得た (5.03 g、100%)。R_f 0.50 (トルエン/EtOAc、90:10); ¹H-NMR (300 MHz、CDCl₃)、2.01 (s、3H)、3.8 (dd、1H、J = 12.4、3.1 Hz、H-5b)、3.92-3.95 (m、1H、H-4)、4.00-4.06 (m、2H、H-5a、CH₂-CH=CH₂)、4.21 (ddt、1H、J = 12.8、5.3、1.4 Hz、CH₂-CH=CH₂)、4.96 (d、1H、J = 2.6 Hz、H-1)、5.18-5.34 (m、2H、H-2、CH₂-CH=CH₂)、5.51 (dd、1H、J = 3.77 Hz、H-3)、5.82-5.95 (m、1H、CH=CH₂)、7.42-7.48 (m、2H)、7.55-7.60 (m、1H)、8.12-8.15 (m、2H); ¹³C-NMR (75 MHz、CDCl₃) 20.8 (CH₃)、56.8 (C-4)、61.2 (C-5)、68.6 (C-3)、68.7 (C-2)、69.0 (CH₂=CH-)、97.5 (C-1)、118.3 (CH₂-CH=CH₂)、128.7 (C-Ar)、129.7 (C-Ar)、130.2 (C-Ar)、133.4 (C-Ar)、133.6 (CH₂=CH)、166.0 (C=O)、169.9 (C=O)。

20

30

【化11】



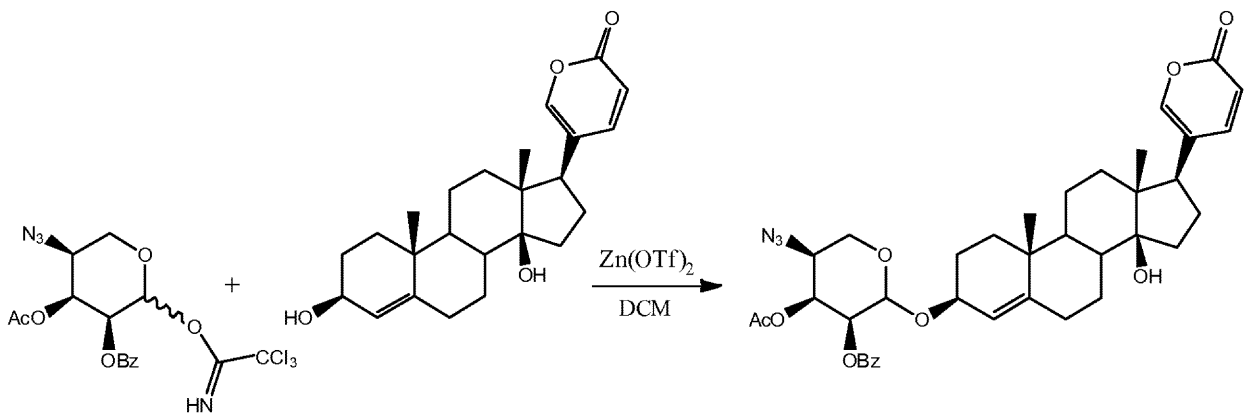
40

1-トリクロロアセチミド-3-O-アセチル-2-O-ベンゾイル-4-アジド-4-デオキシ-L-リボピラノシド・1-アリル-3-O-アセチル-2-O-ベンゾイル-4-アジド-4-デオキシ-L-リボピラノシド (5.03 g、13.93ミリモル) を、アルゴン下でジクロロメタン/メタノール (40 mL、90:10) 中で溶解し、PdCl₂ (0.5 g、2.6ミリモル) を加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌した。この混合物をセライトのパッドを通して濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルのパッド

50

(ヘキサン/EtOAc、80:20~50:50)を通して濾過した。得られた化合物(2g、6.22ミリモル)を、アルゴン下で乾燥DCM(50mL)中に溶解し、この溶液を0°に冷却した。CCl₃CN(6.24mL、62.2ミリモル)を加え、続いてDBU(0.46mL、3.11ミリモル)を滴加した。反応を0°で1時間攪拌した。減圧下で溶媒を除去した。粗生成物をヘキサン-EtOAc(60:40)中に取り上げ、シリカゲルのパッド(ヘキサン/EtOAc、60:40~40:60)を通して濾過して、1-トリクロロアセチミド-3-O-アセチル-2-O-ベンゾイル-4-アジド-4-デオキシ-L-リボピラノシドを白色粘性物として得た(1.7g、26%)。この化合物を更なる精製することなく、次に進めた。R_f 0.55(ヘキサン/EtOAc、50:50)。

【化12】



シラレニン-3-O-アセチル-2-O-ベンゾイル-4-アジド-4-デオキシ-L-リボピラノシド。アルゴン下、0°の乾燥ジクロロメタン(60mL)中の活性化4分子篩(160mg)の懸濁液に、最少量の乾燥ジクロロメタン中の1-トリクロロアセチミド-3-O-アセチル-2-O-ベンゾイル-4-アジド-4-デオキシ-L-リボピラノシド(5.03g、13.93ミリモル)を加えた。シラレニン(0.7g、1.825ミリモル)を加え、5分後、0°で、Zn(OTf)₂(0.133g、0.365ミリモル)を加えた。反応混合物を0°で30分間攪拌した。シラレニンの別の0.5当量(0.7g、1.825ミリモル)を加えた。反応混合物を0°で更に30分の時間にならって攪拌した。反応をEt₃Nの数滴で停止させた。混合物を濾過し、減圧下で溶媒を除去した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー(ヘキサン/EtOAc、60:40~40:60)によって精製し、シラレニン-3-O-アセチル-2-O-ベンゾイル-4-アジド-4-デオキシ-L-リボピラノシドを白色固体として得た(1.64g、65%)。R_f 0.39(ヘキサン/EtOAc、50:50)。¹H-NMR(300MHz、CDCl₃)、0.72(s、3H)、1.03-2.20(m、24H)、2.42-2.48(m、1H)、3.82(dd、1H、J=12.4、3.1Hz、H-5b)、3.94-3.97(m、1H)、4.12(dd、1H、J=12.4、2.4Hz、H-5a)4.17-4.22(m、1H)、5.10(d、1H、J=2.6Hz、H-1)、5.26(dd、1H、J=2.8Hz、H-2)、5.31(s、1H)、5.53(dd、1H、J=3.75Hz、H-3)、6.24-6.27(m、1H)、7.22(d、1H、J=1.6Hz)、7.44-7.49(m、2H)、7.56-7.61(m、1H)、7.82(dd、1H、J=9.7、2.6Hz)、8.13-8.16(m、2H)；¹³C-NMR(75MHz、CDCl₃)16.4、18.9、20.6、21.2、25.2、28.5、28.6、32.2、32.6、35.0、37.5、40.6、42.7、48.2、50.1、51.0、56.7(C-4)、60.9(C-5)、67.7(C-3)、69.1(C-2)、73.6、85.0、96.2(C-1)、115.3、121.2、121.6、128.5、129.5、129.9、133.3、146.7、147.5、148.5、162

10

20

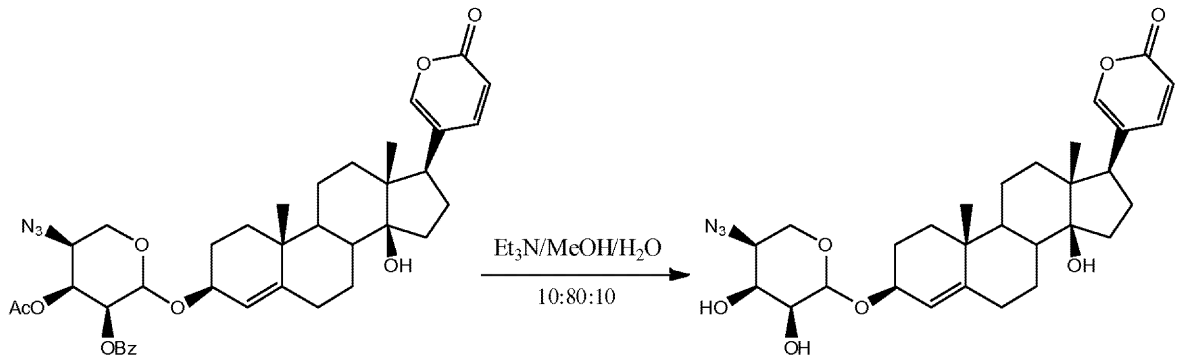
30

40

50

. 3 (C = O) , 165 . 9 (C = O) , 169 . 7 (C = O) .

【化13】



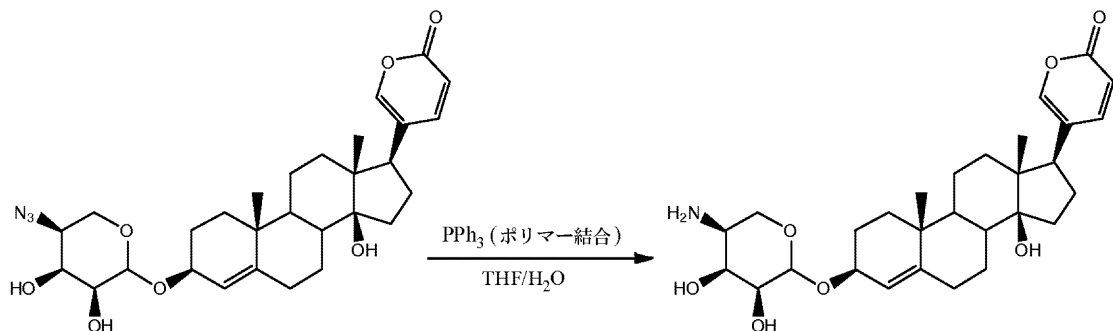
10

シラレニン - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - リボピラノシド . シラレニン - 3 - O - アセチル - 2 - O - ベンゾイル - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - リボピラノシド (1 . 61 g、2 . 34 ミリモル) をメタノール (20 mL) 中に溶解した。Et₃N (2 . 5 mL) 及び H₂O (2 . 5 mL) を加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で除去した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ / MeOH, 90 : 10) によって精製して、シラレニン - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - リボピラノシドを白色固体として得た (0 . 93 g、73%)。R_f 0 . 25 (CH₂Cl₂ / MeOH, 90 : 10) ; ¹H - NMR (300 MHz、CD₃OD) , 0 . 74 (s , 3 H) , 1 . 06 - 2 . 22 (m , 21 H) , 2 . 52 - 2 . 57 (m , 1 H) , 3 . 42 (dd , 1 H , J = 5 . 4 , 3 . 2 Hz , H - 2) , 3 . 54 - 3 . 59 (m , 1 H , H - 4) , 3 . 72 - 3 . 89 (m , 2 H , H - 5 a , H - 5 b) , 4 . 09 - 4 . 12 (m , 1 H , H - 3) 4 . 16 - 4 . 21 (m , 1 H) , 4 . 81 (d , 1 H , J = 5 . 4 Hz , H - 1) , 5 . 34 (s , 1 H) , 6 . 28 (dd , 1 H , J = 9 . 7 , 0 . 7 Hz) , 7 . 42 - 7 . 43 (m , 1 H) , 7 . 99 (dd , 1 H , J = 9 . 7 Hz、2 . 6 Hz) ; ¹³C - NMR (75 MHz、CD₃OD) 17 . 3 , 19 . 5 , 22 . 4 , 26 . 5 , 29 . 8 , 30 . 0 , 33 . 2 , 33 . 5 , 36 . 5 , 38 . 7 , 41 . 7 , 43 . 4 , 49 . 6 , 51 . 6 , 52 . 1 , 60 . 5 (C - 4) , 62 . 1 (C - 5) , 69 . 6 (C - 3) , 72 . 0 (C - 2) , 75 . 5 , 85 . 7 , 100 . 4 (C - 1) , 115 . 4 , 123 . 1 , 125 . 0 , 148 . 4 , 149 . 3 , 150 . 5 , 164 . 8 (C = O) .

20

30

【化14】



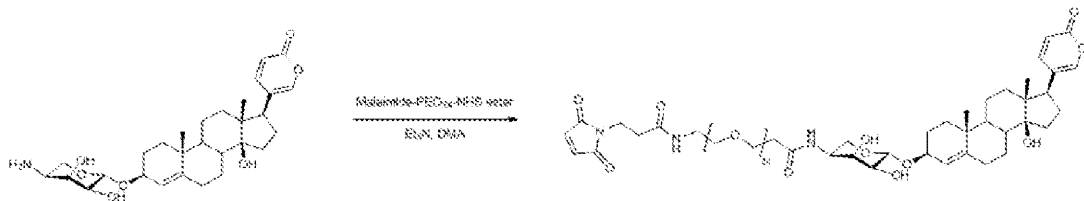
40

シラレニン - 4 - アミノ - 4 - デオキシ - L - リボピラノシド . シラレニン - 4 - アジド - 4 - デオキシ - L - リボピラノシド (1 . 61 g、2 . 34 ミリモル) を THF / H₂O (30 mL、90 : 10) 中に溶解した。ポリマー結合型 PPh₃ (2 . 34 g、3 ミリモル . g⁻¹) を加えた。混合物を 40 で 6 時間攪拌した。この混合物を濾過し、減圧下で溶媒を除去した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ / MeOH、90 : 10 ~ 80 : 20) によって精製し、シラレニン - 4 - アミノ - 4 - デオキ

50

シ - L - リポピラノシドを黄色粉末として得た (0 . 6 7 g 、 7 3 %) 。 R_f 0 . 1 ($C H_2 C l_2 / M e O H$ 、 8 0 : 2 0) ; $^1 H$ - NMR (3 0 0 M H z 、 $C D_3 O D$) , 0 . 6 3 (s , 3 H) , 0 . 9 6 - 2 . 1 0 (m , 2 1 H) , 2 . 4 3 - 2 . 4 6 (m , 1 H) , 2 . 9 0 - 2 . 9 2 (m , 1 H , H - 4) , 3 . 2 9 (d d , 1 H , $J = 3 . 3 H z$, H - 2) , 3 . 4 5 (d d , 1 H , $J = 1 1 . 4$, 5 . 4 H z , H - 5 b) , 3 . 6 3 - 3 . 6 8 (m , 2 H , H - 3 , H - 5 a) 4 . 0 2 - 4 . 0 8 (m , 1 H) , 4 . 6 9 (d , 1 H , $J = 4 . 2 H z$, H - 1) , 5 . 2 4 (s , 1 H) , 6 . 2 9 (d d , 1 H , $J = 9 . 7$, 0 . 7 H z) , 7 . 4 8 - 7 . 5 8 (m , 1 H) , 7 . 9 2 (d d , 1 H , $J = 9 . 7 H z$ 、 2 . 5 H z) ; $^{13} C$ - NMR (7 5 M H z , $(C D_3)_2 S O$) 1 6 . 6 , 1 8 . 6 , 2 0 . 9 , 2 5 . 2 , 2 8 . 4 , 2 8 . 5 , 3 1 . 8 , 3 1 . 9 , 3 4 . 8 , 3 7 . 0 , 3 9 . 7 , 4 1 . 5 , 4 7 . 8 , 4 9 . 6 , 4 9 . 9 , 5 0 . 8 (C - 4) , 6 3 . 7 (C - 5) , 6 7 . 1 , 7 1 . 2 (C - 3) , 7 2 . 3 (C - 3) , 8 3 . 1 , 9 9 . 1 (C - 1) , 1 1 4 . 2 , 1 2 2 . 2 , 1 2 2 . 6 , 1 4 6 . 1 , 1 4 7 . 3 , 1 4 9 . 2 , 1 6 1 . 3 (C = O) .

【化 1 5】

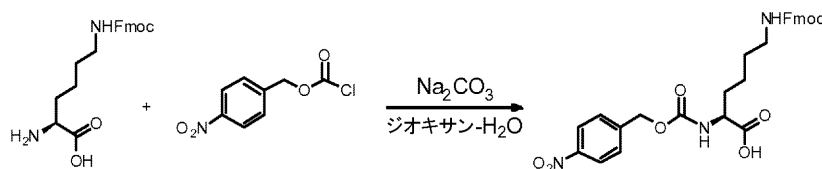


PEG 2 4 - CEN 0 9 - 1 0 7 . N , N - ジメチルアセトアミド (1 . 5 m L) 中のシラレニン - 4 - アミノ - 4 - デオキシ - L - リポピラノシド (2 0 m g 、 0 . 0 3 7 ミリモル) とマレイミド PEG 2 4 - NHS エステル (5 2 m g 、 0 . 0 3 7 ミリモル) の溶液に、 $E t_3 N$ (0 . 0 2 6 m L 、 0 . 1 8 6 ミリモル) を加えた。反応混合物を RT で 1 時間 にわたって 攪拌した。溶媒を真空中で除去した。粗物質を、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、 $C H_2 C l_2 - M e O H$ 、 9 5 : 5 ~ 8 0 : 2 0) によって精製し、CEN 1 0 - 1 2 9 を無色油状物として得た (3 0 m g 、 7 3 %) 。 R_t 1 5 . 6 5 分 (Gemini C 1 8 、 5 μm 、 4 . 6 m m \times 2 5 0 m m 、 1 8 分間にわたって 1 0 % ~ 9 0 % の ACN 、 0 . 1 % の TFA 、 1 m L . 分⁻¹) 。

【 0 1 5 0】

PEG 2 4 - CEN 1 0 - 1 1 0 は、ステロイド、リンカー及び活性マレイミド基を含むシラレニン系リンカー動作可能薬剤である。これは、リンカーが約 1 5 長いこと及び生理学的 pH 下でプラスに帯電していると予想される遊離アミンを含有することで、PEG 2 4 - CEN 0 9 - 1 0 6 とは異なる。PEG 2 4 - CEN 1 0 - 1 1 0 の調製のための一般的合成工程は以下のとおりである。

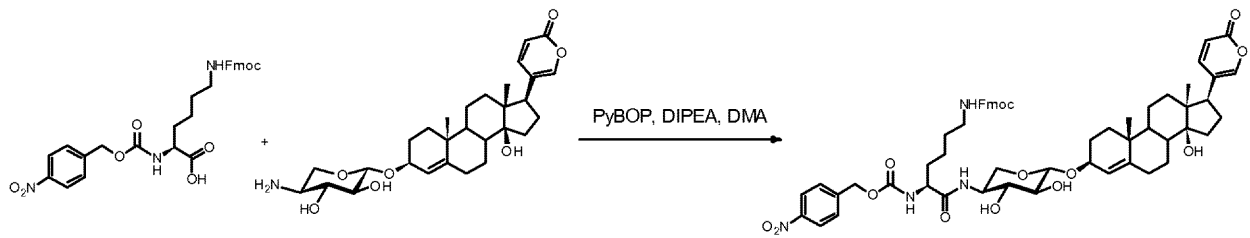
【化 1 6】



pNZ - Lys (Fmoc) - OH . $H_2 O$ (6 m L) 中の $N a_2 C O_3$ (1 8 0 m g 、 1 . 7 0 ミリモル) の激しく攪拌した溶液に、ジオキサン (3 m L) 中の H - Lys (Fmoc) - OH (2 5 0 m g 、 0 . 6 8 ミリモル) の溶液を加えた。ジオキサン (3 m L) 中の塩化 p - ニトロベンジルオキシカルボニル (1 6 1 m g 、 0 . 7 4 ミリモル) の溶液を、0 でゆっくりと加えた。反応混合物を 0 で 2 . 5 時間 にわたって攪拌し、次いで $E t O A c$ (2 0 m L) で希釈し、1 N の $H C l$ (2 0 m L) 、 $H_2 O$ (2 0 m L) 、食塩水 (1 0 m L) で洗浄し、乾燥し ($N a_2 S O_4$) 、濃縮した。粗物質を、フラッシ

ユクロマトグラフィー（シリカゲル、 CH_2Cl_2 - MeOH、98 : 2 ~ 90 : 10）によって精製し、pNZ-Lys(Fmoc)-OHを白色固体として得た（300 mg、82%）。 R_f 0.21 (CH_2Cl_2 - MeOH、90 : 10)。

【化17】

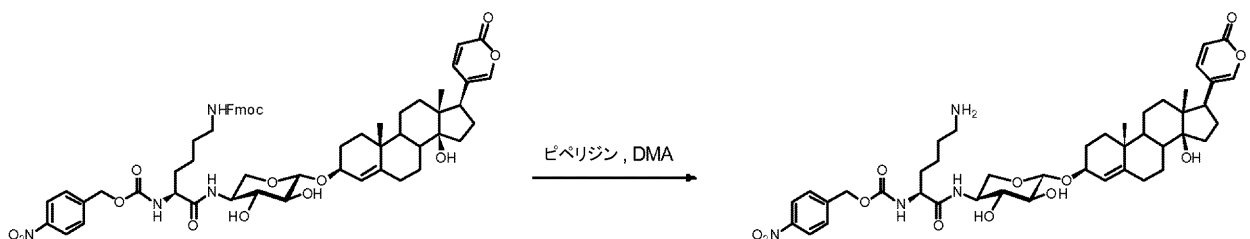


10

シラレニン-4-N-[pNZ-Lys(Fmoc)-イル]-4-デオキシ-4-アミノ-L-キシロピラノシド・シラレニン-4-アミノ-4-デオキシ-L-キシロピラノシド（150 mg、0.291ミリモル）、pNZ-Lys(Fmoc)-OH（160 mg、0.291ミリモル）及びPyBOP（182 mg、0.349ミリモル）を、DMA（3 mL）中に溶解した。ジイソプロピルエチルアミン（0.2 mL、1.164ミリモル）を加え、混合物を室温で1時間にわたって攪拌した。DMAを真空中で除去した。残渣をEtOAc（20 mL）中に溶解し、次いで H_2O （ 2×10 mL）、食塩水（10 mL）で洗浄し、乾燥し（ Na_2SO_4 ）、濃縮した。粗物質をフラッシュクロマトグラフィー（シリカゲル、 CH_2Cl_2 - MeOH、98 : 2 ~ 90 : 10）によって精製し、シラレニン-4-N-[pNZ-Lys(Fmoc)-イル]-4-デオキシ-4-アミノ-L-キシロピラノシドを灰白色固体として得た（288 mg、95%）。 R_f 0.21 (CH_2Cl_2 - MeOH、95 : 5)、 rt 21.82分（Gemini C18、5 μm 、4.6 mm \times 250 mm、10% ~ 95%のACN、0.1%のTFA）。

20

【化18】

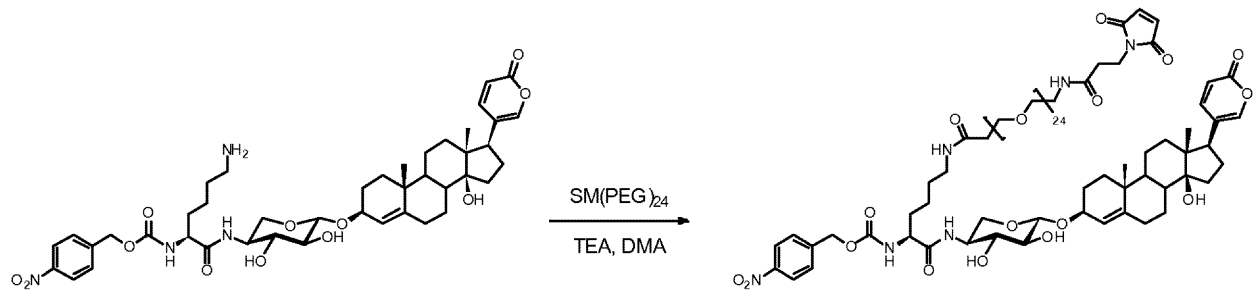


30

シラレニン-4-N-[pNZ-Lysイル]-4-デオキシ-4-アミノ-L-キシロピラノシド・シラレニン-4-N-[pNZ-Lys(Fmoc)-イル]-4-デオキシ-4-アミノ-L-キシロピラノシド（100 mg、0.096ミリモル）を、DMA（1 mL）中に溶解した。ピペリジン（94 μL 、0.957ミリモル）を加え、混合物を室温で10分間攪拌した。反応混合物を冷 Et_2O （50 mL）に滴加した。沈殿物を遠心分離により回収し、少量の冷 Et_2O で2回洗浄し、シラレニン-4-N-[pNZ-Lysイル]-4-デオキシ-4-アミノ-L-キシロピラノシドを灰白色固体として得た（61 mg、77%）。 rt 14.75分（Gemini C18、5 μm 、4.6 mm \times 250 mm、10% ~ 95%のACN、0.1%のTFA）。

40

【化19】

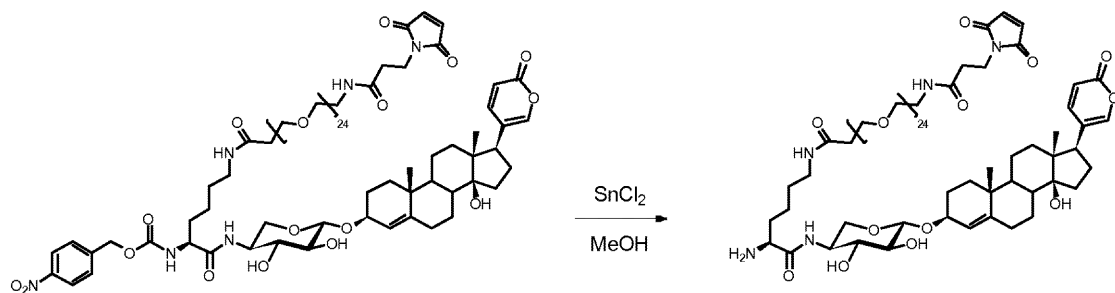


10

シラレニン-4-N-[pNZ-Lys (マレイミド-PEG₂₄)-イル]-4-デオキシ-4-アミノ-L-キシロピラノシド・シラレニン-4-N-[pNZ-Lysイル]-4-デオキシ-4-アミノ-L-キシロピラノシド (61 mg、0.074ミリモル) 及びマレイミド-PEG₂₄-NHS (103 mg、0.074ミリモル) を、DMA (1.5 mL) 中に溶解した。TEA (51 μ L、0.37ミリモル) を加え、反応混合物を室温で20分間攪拌した。溶媒を真空中で除去した。粗物質を、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、CHCl₃-MeOH-H₂O、85:15:1) によって精製し、シラレニン-4-N-[pNZ-Lys (マレイミド-PEG₂₄)-イル]-4-デオキシ-4-アミノ-L-キシロピラノシドを無色油状物として得た (86 mg、55%)。R_f 0.53 (CHCl₃-MeOH-H₂O、85:15:1)、rt 16.33分 (Gemini C18、5 μ m、4.6 mm x 250 mm、10%~95%のACN、0.1%のTFA)。Maldi (m/z); C₁₀₁H₁₆₄N₆O₄₀ に関する [M+Na]⁺ 計算値は2124.1であり実測値は2124.1であり、[M+K]⁺ 計算値は2140.1であり実測値2140.1であった。

20

【化20】



30

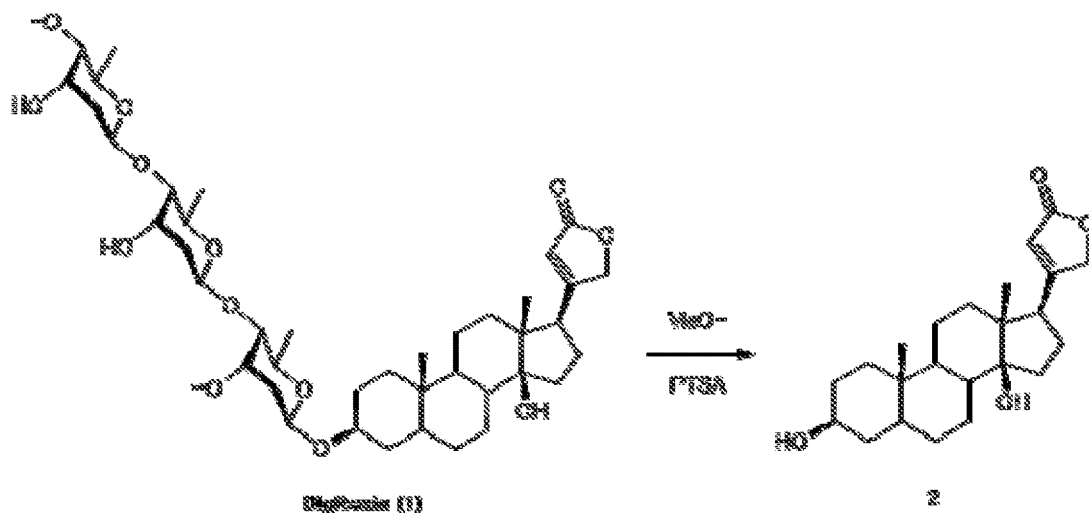
PEG₂₄-CEN10-110・シラレニン-4-N-[pNZ-Lys (マレイミド-PEG₂₄)-イル]-4-デオキシ-4-アミノ-L-キシロピラノシド (55 mg、0.026ミリモル) を、乾燥 MeOH (2 mL) 中に溶解した。SnCl₂ (49 mg、0.26ミリモル) 及び1.6 mMのHClの3滴を加えた。反応混合物を45で4時間にわたって攪拌した。溶媒を真空中で除去した。粗物質を、HPLC (rt 13.53分、Gemini C18、5 μ m、4.6 mm x 250 mm、10%~95%のACN、0.1%のTFA) によって精製して、CEN-301を得た (7.6 mg、13%)。Maldi (m/z); C₉₃H₁₅₉N₅O₃₆ に関する [M+H]⁺ 計算値は1923.1であり、実測値1923.1であり、[M+Na]⁺ 計算値は1945.1であり、実測値1945.0であった。

40

【0151】

PEG₂₄-CEN-319は、ステロイド、リンカー及び活性マレイミド基を含むジギトキシゲニン系リンカー動作可能薬剤である。PEG₂₄-CEN-319の調製のための一般的合成工程は以下のとおりである。

【化21】



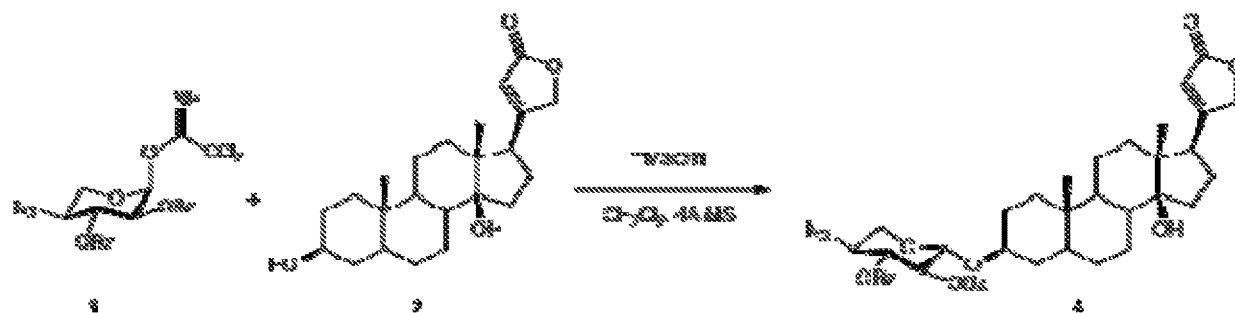
10

ジギトキシゲニン (2) . RTで、MeOH (270 ml) 中のジギトキシ (1、10 . 2 g、13.33ミリモル) の懸濁液に、PTSA (0.25 g、1.333ミリモル) を加えた。反応混合物をRTで2日間にわたって撹拌した。溶媒を真空中で除去した。粗物質を、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘキサン - EtOAc、4 : 6 ~ 3 . 7) によって精製し、2を白色固体として得た (3.44 g、68%)。¹H-NMR (300 MHz、DMSO - d₆) 5.90 (s, 1H, H-22), 4.97 (dd, J = 1.5, 18.4 Hz, 1H, H-21), 4.87 (dd, J = 18.2, 1.6 Hz, 1H, H-21), 4.17 (d, J = 3.0 Hz, OH), 4.05 (s, OH), 3.89 (m, 1H, H-3), 2.75 - 2.70 (m, 1H, H-17), 2.09 - 1.97 (m, 2H), 1.84 - 1.70 (m, 5H), 1.64 - 1.56 (m, 2H), 1.49 - 1.30 (m, 8H), 1.20 - 1.05 (m, 4H), 0.87 (s, 3H), 0.76 (s, 3H); ¹³C-NMR (75 MHz、DMSO - d₆) 176.3, 173.8, 116.2, 83.8, 73.1, 64.6, 50.2, 49.4, 40.9, 39.0, 35.7, 35.0, 34.7, 33.1, 32.2, 29.5, 27.5, 26.5, 26.4, 23.7, 21.1, 20.8, 15.7

20

30

【化22】



40

ジギトキシゲニン - 2,3 - ジ - O - ベンゾイル - 4 - デオキシ - 4 - アジド - L - キシロピラノシド (4) . 新しく蒸留した乾燥 CH₂Cl₂ (5 mL) 中の3 (1.40 g、2.67ミリモル) の溶液とジギトキシゲニン (2、1.00 g、2.67ミリモル) を、アルゴン下0 で、新しく蒸留した CH₂Cl₂ (5 mL) 中の活性化4 分子篩 (0.3 g) の懸濁液に加えた。10分間の撹拌後に、TMSOTf (24 μL、0.134ミリモル) を加えた。反応混合物を0 で2時間撹拌し、次いで Et₃N (40 μL、0.268ミリモル) で反応を止めた。溶媒を真空中で除去した。粗物質をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘキサン - EtOAc、7 : 3 ~ 1 : 1) によって精製し、4を白色粉末として得た (1.62 g、82%)。¹H-NMR (300 MHz、

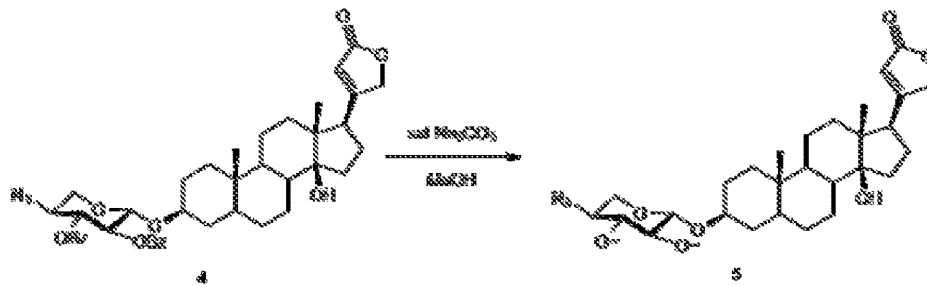
50

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 8.00 - 7.94 (m, 4H), 7.56 - 7.48 (m, 2H), 7.42 - 7.34 (m, 4H), 5.84 (br, s, 1H, H-22), 5.52 (dd, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H, H-3'), 5.32 (dd, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 6.8 Hz , 1H, H-2'), 4.97 (dd, $J = 18.2$, 1.9 Hz , 1H, H-21), 4.78 (dd, $J = 1.7$, 18.2 Hz , 1H, H-21), 4.70 (d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 1H, H-1'), 4.20 (dd, $J = 12.0$, 4.9 Hz , 1H, H-5'), 4.03 (m, 1H, H-3), 3.86 (dddd, $J = 9.2$, 9.1 , 4.9 Hz , 1H, H-4'), 3.47 (dd, $J = 12.0$, 9.6 Hz , 1H, H-5'), 2.76 - 2.71 (m, 1H, H-17), 2.18 - 2.02 (m, 2H), 1.89 - 1.63 (m, 6H), 1.55 - 1.25 (m, 10H), 1.20 - 1.01 (m, 4H), 0.81 (s, 3H), 0.57 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) 174.7, 174.6, 165.7, 165.2, 133.6, 133.4, 130.0, 129.9, 129.4, 129.0, 128.6, 128.5, 117.7, 98.9, 85.6, 73.7, 73.5, 72.9, 71.4, 63.1, 59.2, 51.0, 49.7, 41.9, 40.0, 36.3, 35.7, 35.0, 33.2, 33.1, 29.5, 27.0, 26.5, 23.9, 23.3, 21.4, 21.2, 15.8. ESI-MS (m/z); $\text{C}_{42}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_9$ に関する $[\text{M} + \text{H}]^+$ 計算値は 740.3 であり、実測値 740.3 であり、 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 計算値は 762.3 であり、実測値は 762.4 であった。

10

20

【化23】



ジギトキシゲニン-4-デオキシ-4-アジド-L-キシロピラノシド (5). MeOH (5 mL) 中の 4 (500 mg、0.676 ミリモル) の溶液に、 Na_2CO_3 (0.5 mL) の飽和水溶液を RT で加えた。反応混合物を RT で 3 日間にわたって攪拌した。pH を 1 N の HCl で 5 に調整した。 CH_2Cl_2 (15 mL) を加えた。有機層を水 (2 x 5 mL) 及び食塩水 (5 mL) で洗浄し、乾燥し (Na_2SO_4) 真空中で濃縮した。粗物質を、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘキサン-EtOAc、6:4 ~ 4:6) によって精製し、5 を白色泡状物として得た (262 mg、73%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$) 5.89 (br, s, 1H, H-22), 4.96 (dd, $J = 18.2$, 1.2 Hz , 1H, H-21), 4.86 (dd, $J = 18.5$, 1.4 Hz , 1H, H-21), 4.14 (d, $J = 7.7 \text{ Hz}$, 1H, H-1'), 3.86 (m, 1H, H-3), 3.74 (dd, $J = 11.3$, 5.2 Hz , 1H, H-5'), 3.39 (dd, $J = 10.2$, 4.9 Hz , 1H, H-4'), 3.27 (dd, $J = 9.1 \text{ Hz}$, 1H, H-3'), 3.08 - 2.97 (m, 2H, H-2', H-5'), 2.74 - 2.70 (m, 1H, H-17), 2.08 - 1.96 (m, 2H), 1.87 - 1.56 (m, 8H), 1.49 - 1.27 (m, 8H), 1.15 - 1.07 (m, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.75 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$) 176.3, 173.8, 116.2, 101.6, 83.8, 75.5, 73.6, 73.1, 72.9, 62.9, 61.4, 50.2, 49.4, 40.9, 39.0, 35.9, 34.8, 34.8, 32.2, 31.6, 29.5, 26.4, 23.7, 23.5, 21.0, 20.8, 15.7. ESI-MS (m/z); $\text{C}_{42}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_9$ に関する $[\text{M} + \text{H}]^+$ 計算

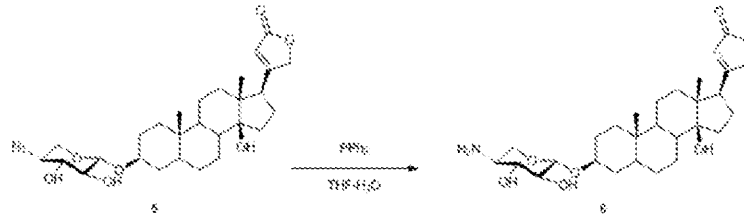
30

40

50

値は532.3であり実測値は532.2であり、 $[M + NH_4]^+$ 計算値は549.3であり実測値は549.3であり、 $[M + Na]^+$ 計算値は554.3であり実測値は554.2であった。

【化24】



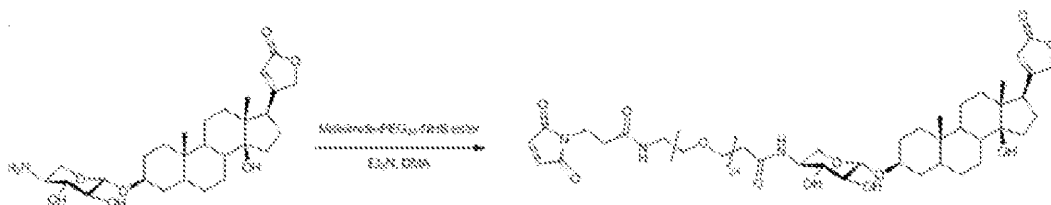
10

ジギトキシゲニン-4-デオキシ-4-アミノ-L-キシロピラノシド(6)。THF-H₂O(8mL、90:10)中の5(230mg、0.433ミリモル)の溶液に、PPh₃(567mg、2.16ミリモル)を加えた。反応混合物を40℃で一晩撹拌した。溶媒を真空中で除去した。粗物質をフラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、CHCl₃-MeOH-H₂O、85:15:1~75:25:2.5)によって精製し、6を白色粉末として得た(160mg、73%)。R_t12.67分(Gemini C18、5μm、4.6mm×250mm、18分間にわたって10%~90%のACN、0.1%のTFA、1mL・分⁻¹)。¹H-NMR(300MHz、DMSO-d₆/D₂O)5.89(br,s,1H,H-22),4.95(dd,J=18.5,1.5Hz,1H,H-21),4.86(dd,J=18.4,1.4Hz,1H,H-21),4.09(d,J=7.1Hz,1H,H-1'),3.86(m,1H,H-3),3.62(dd,J=11.4,5.0Hz,1H,H-5'),2.98-2.89(m,3H,H-2',H-3',H-5'),2.74-2.70(m,1H,H-17),2.54-2.46(m,1H,H-4'),2.08-1.96(m,2H),1.87-1.56(m,8H),1.49-1.27(m,8H),1.15-1.02(m,3H),0.85(s,3H),0.75(s,3H);¹³C-NMR(75MHz、DMSO-d₆/D₂O)176.4,173.8,116.2,109.3,101.9,83.8,77.4,73.6,73.1,72.5,66.6,53.1,50.2,49.4,41.0,39.0,36.0,34.9,34.8,32.2,31.7,29.6,26.4,23.7,23.5,21.0,20.8,15.7。ESI-MS(m/z);C₂₉H₄₁NO₇に関する、 $[M + H]^+$ 計算値は506.3であり、実測値は506.4であった。

20

30

【化25】



40

PEG24-CEN-319.N,N-ジメチルアセトアミド(0.4mL)中のジギトキシゲニン-4-デオキシ-4-アミノ-L-キシロピラノシド(22mg、0.043ミリモル)及びマレイミド-PEG₂₄-NHSエステル(60mg、0.043ミリモル)の溶液に、Et₃N(0.03mL、0.215ミリモル)を加えた。反応混合物をRTで2時間にわたって撹拌し、次いでHPLCによって精製し、7を無色油状物として得た(56mg、73%)。R_t19.32分(Gemini C18、5μm、4.6mm×250mm、18分間にわたって20%~50%、次いで2分間にわたって90%のACN、0.1%のTFA、1mL・分⁻¹)。ESI-MS(m/z);C₈₆H₁₄₉N₃O₃₅に関する、 $[M + Na]^+$ 計算値は1806.987であり、実測値

50

は1806.949であり、 $[M+K]^+$ 計算値は1822.961であり、実測値は1822.922であった。

【0152】

実施例2：M53抗体；エピトープマッピング；及びリンカー動作可能薬剤への複合体形成

M53抗体（Shimamuraら著、*J. Clinical Oncology* 21（4）659-667（2003）に記載される）及び対照の4F12抗体を、これら実施例では使用した。抗体M53は、ヒトディスアドヘリンを認識しかつこれに結合し（配列番号1にアミノ酸配列を示す）、対照の抗体4F12は配列番号1内で見出されるペプチドを認識しこれに結合するが、ヒト細胞の表面上で発現されるようなディスアドヘリンには結合しない。記載される両抗体は、マウス由来の及びIgG1のイソタイプ型のモノクローナルである。

10

【0153】

長さが15～17個のアミノ酸の重複ペプチド配列（配列番号2～配列番号16；それぞれCENP001、及びCENP004～CENP017と呼ばれる）を合成し、これはディスアドヘリンの細胞外ドメインの24～145位（配列番号1の残基22～145）に相当する。各ペプチドは、マレイミド活性化BSA（カタログ番号：77116、Pierce Biotechnology, Rockford, IL）への結合を容易にするC末端システインを含有した。ペプチド及びL-システイン（BSA-対照複合体として使用された）を製造業者のプロトコルによってBSAに結合させた。透明な96ウェルの培地結合ELISAプレート（カタログ番号：9017、Corning, Corning, NY）の各ウェルを、200mMの炭酸塩緩衝液（pH9.6）の100 μ L中の250ngのBSA-ペプチド又はBSA-対照複合体で、4で一晚、個々にコーティングした。コーティングしたELISAプレートを、PBS（pH7）で3回洗浄し、1%のNFDmを含有するPBS（pH7）（PBS+NFDm）で30分間ブロックし、次いでPBS（pH7）で3回洗浄した。PBS+NFDm中で1 μ g/mL（100 μ L）まで希釈したM53を、全てのBSA-ペプチド及びBSA-対照複合体でコーティングされたウェルに加え、RTで30分間インキュベートし、ウェルをPBS（pH7）で3回洗浄した。ヤギ抗-マウスIgGアルカリホスファターゼ（カタログ番号：A1418、Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を、PBS+NFDm中で1：15,000に希釈し、各ウェルに加え（100 μ L）、RTで30分間インキュベートし、ウェルをPBS（pH7）で3回洗浄した。50mMのMgCl₂を有する1MのDEA（pH9.8）中で1mg/mLのPNPPを加え（ウェル当たり100 μ L）、RTで30分間インキュベートし、Wallac Victor² Model 1420-041アッセイプレートリーダー（Perkin Elmer, Gaithersburg, MD）を使用して405nmにおける吸光度を決定した。

20

30

【0154】

M53が2つの重複するペプチド配列（配列番号4及び配列番号5に）結合したことを決定し、このことは、エピトープがヒトディスアドヘリン（配列番号1）の38位と59位の間に存在することを示している。このことによって、その配列が重複ペプチド（配列番号4及び配列番号5）のハイブリッド体であるペプチドCENP018（配列番号17）が生成された。本実施例の方法を使用して、M53がペプチド配列（配列番号17）に結合することが決定された。本発明のクラス1EDCsの様々な実施形態では、抗体はこのエピトープに結合する。

40

【0155】

複合体形成のための抗体の調製。スルフヒドリル残基を通しての抗体の選択的複合体形成は、先ず第1にジスルフィド還元を必要とする。これは、2つの方法のうちの1つを使用して実行される。BME法と呼ばれる1つの方法では、2-メルカプトエタノールが使用され、TCEP法と呼ばれる第2の方法については、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィンが使用された。各方法は以下に記載され、これら方法は、カップリングのため

50

に抗体を調製するよう様々な例で使用されたが、TCEP法がより一般的に使用されてきた。

【0156】

BME法を使用する抗体還元については、1mgの -MEを、1mgの抗体に添加し、0.1Mのリン酸ナトリウム、0.15MのNaCl、5mMのEDTAの500ul中で混合し、37で1.5時間インキュベートする。過剰な -MEを、Sephadex G-25又は同類物を使用するゲル濾過によって除去する。最終溶液をPBS中1mlに持っていく。

【0157】

TCEP法を使用する抗体還元については、20mMのリン酸ナトリウム(pH7)、150mMのNaCl、及び1mMのジエチレントリアミン5酢酸(DTPA)(MP Biomedical LLC)中の8モル当量のトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)(カタログ番号:HR2-651、Hampton Research)で、37で2時間処理した。反応を氷浴中に定置し、一旦冷却されたら、リンカー薬剤を加えた。

10

【0158】

抗体へのリンカー薬剤のカップリング。冷還元された抗体に、抗体の当量当たり9.6モル当量のリンカー動作可能薬剤を加えた。反応を氷上で30分間進めさせた。次いでL-システインを2倍過剰量で加え、いずれの未反応のマレイミド基を反応停止させた。薬剤結合体を濃縮しかつ抗体に結合しなかった過剰のリンカー動作可能薬剤を除去するために、複合体形成反応を濃縮し、次いでMicrocon Ultracel YM-30(Millipore)の30Kカットオフスピン濃縮装置を使用して、20mMのリン酸ナトリウム(pH7)及び150mMのNaClに3回にわたり緩衝液交換を行った。カップリングされたリンカー動作可能薬剤対照(抗体なし)については、抗体添加及び濃縮工程を省略した上記手順に従って実行された。

20

【0159】

薬物負荷の決定。ステロイドシラレニンを封じ込めた抗体薬剤複合体については、吸光度を使用して薬物負荷が算定された。まず初めに、遊離抗体の吸光度が280nm(A_{280Ab})及び299nm(A_{299Ab})の双方で測定され、抗体定数[Constant Ab]を決定した。次に、遊離薬剤の吸光度が280nm($A_{280drug}$)及び299nm($A_{299drug}$)の双方で測定され、薬剤定数[Constant Drug]を決定した。最後に、抗体薬剤複合体の吸光度が測定された[A_{280} 及び A_{299}]。濃度換算は、280nmにおける抗体のモル吸光係数($204,000M^{-1}cm^{-1}$)及び299nmにおける薬剤のモル吸光係数($5623M^{-1}cm^{-1}$)を基準とした。以下の計算は、薬物負荷を算定するために使用された: [Constant Ab] = A_{299Ab} / A_{280Ab} ; [Constant Drug] = $A_{299drug} / A_{280drug}$; $A_{280Ab} = A_{280} - (A_{299} - [Constant Ab]) \times A_{280}$; $A_{299drug} = A_{299} - [Constant Ab] \times A_{280Ab}$; 抗体濃度 = $A_{280Ab} / 204,000M^{-1}cm^{-1}$; 薬剤濃度 = $A_{299drug} / 5623M^{-1}cm^{-1}$; 薬物負荷 = 薬剤濃度 / 抗体濃度。ステロイドジギトキシゲニンを封じ込めた抗体薬剤複合体については、これが可視領域で光を吸収する発色団を含有しないために、薬物負荷は吸光度によって算定され得ず、そこで(シラレニン含有複合体の装填効率及び相対的活性)に基づいて算定された。典型的には、癌細胞に基づくインビトロアッセイでは、より高い薬物負荷は、より多くの細胞毒性複合体をもたらした。

30

40

【0160】

実施例3: インビトロ細胞毒性アッセイ

本実施例は、本発明の例示的化合物がインビトロにおいて腫瘍細胞を標的化しかつ死滅させることで有用であることを立証する。抗体M53(ヒト細胞系H460、A549、A375、PANC1、及びH929上で発現されるがH520上では発現されないディ

50

スアドヘリンに特異的)と抗体4F12(ディスアドヘリン細胞外部分内のペプチド配列に特異的であるが、ヒト細胞系上で発現されるディスアドヘリンを認識しない)を使用して、実施例2に記載されるような薬剤複合体を生成した。EDCsは、リンカー動作可能薬剤であるPEG24-CEN09-106、PEG24-CEN09-107、PEG24-CEN10-110及びPEG24-CEN-319を使用して構築された。実施例1に記載されるように、リンカー動作可能薬剤PEG24-CEN-319は、ジギトキシゲニンを含有し、一方他の薬剤はシラレニンを含有する。リンカー動作可能薬剤PEG24-CEN09-106、PEG24-CEN09-107、PEG24-CEN10-110は全て異なるリンカーを使用する。特に、PEG24-CEN09-106及びPEG24-CEN09-107はリンカー内に異なる糖を有するが、一方PEG24-CEN10-110は第一級アミンを有するより長いリンカーを含有する。M53及び4F12を伴うこれらリンカー動作可能薬剤は、活性EDCs M53-PEG24-CEN09-106、M53-PEG24-CEN09-107、M53-PEG24-CEN10-110及びM53-PEG24-CEN-319並びに非活性対照複合体4F12-PEG24-CEN09-106及び4F12-PEG24-CEN10-110を生成するよう使用された(リンカー動作可能薬剤は対照としても使用された)。

【0161】

インビトロにおける癌細胞の細胞毒性分析。全ての細胞系を完全培地[10%(重量/容量)のウシ胎児血清及びゲンタマイシン(50µg/ml)で補充されたRPMI培地1640]中で維持した。細胞を各384-ウェルの白色組織培養処理マイクロタイタープレートのウェル当たり1250個の細胞の密度で、20ulの完全培地中でプレート化し、次いで、試験化合物の添加前に、加湿されたインキュベーター内で7%のCO₂で37にて24時間培養した。別個の96-ウェルプレートにおいて、M53、キャップされたリンカー動作可能薬剤及び抗体複合体(PBS中)原液を、最終使用濃度の5倍で完全培地中で系列希釈し、アッセイで使用される細胞に5ulを添加した。細胞生存率試験の前に、細胞を薬剤/複合体と共に3日間インキュベートした。細胞生存率試験は、CellTiter-Glo発光細胞生存率アッセイ(Promega, Madison, WI)を使用した。各細胞系に対する薬剤のDE50値は、GraphPad Prism 5ソフトウェアを使用して決定した。

【0162】

結果を以下の表1に示し、これは、M53を含有する本発明の異なる複合体は、抗体及び薬剤の標的を近接して提示するこれら細胞系において、ピコモルから低いナノモル濃度で細胞毒性であることを立証している。H520を除いて、以下の細胞系の全ては、ディスアドヘリンサブユニットを有するNa、K-ATPアーゼを発現し、同様に抗体及び薬剤の標的も近接して提供する。H520細胞系は薬剤の標的を発現するが、異なるサブユニットイソタイプを含有するために、抗体の標的を提示しない。この結果はまた、キャップされたリンカー動作可能薬剤及び4F12複合体は、M53系クラス1EDCsと比較する場合、少なくとも100倍活性が少ないことも示している。この結果は更に、抗体53の単独は、試験された最高濃度で不活性であることも示し、したがって、抗体は細胞毒性を呈するステロイド剤を必要とすることを立証している。この結果は更に、M53-PEG24-CEN09-106がH520細胞上では活性ではないことも示し、このことは、M53抗体の標的であるディスアドヘリン(FXYD5)を発現しないことが免疫組織化学法によって示されている。

【表 1】

細胞系	H460	H520	A549	A375	PANC	H929
FXYD5細胞表面発現	++	--	++	++	++	++
M53			>5000	>2000	>5000	>200
M53-PEG24-CEN09-106	0.3	>50	0.2	0.4	0.3	0.1
M53-PEG24-CEN09-107			0.5	2.6		
M53-PEG24-CEN10-110	0.2		0.1	0.5		
M53-PEG24-CEN-319			1.6		>200	>200
4F12-PEG24-CEN09-106	142	162	85	280	78	266
4F12-PEG24-CEN10-110	65		100	184		
PEG24-CEN09-106	77	40	31	66	27	90
PEG24-CEN09-107			37	127		
PEG24-CEN10-110	40		31	>50	38	
PEG24-CEN-319			348		542	

10

上記表は、薬剤抗体リンカー複合体、M53抗体単独及びリンカー動作可能薬剤のナノモルにおけるEC50値を示す。

20

【0163】

M53-PEG24-CEN09-106薬剤併用を使用するインビトロの癌細胞の細胞毒性分析。FGFRキナーゼインヒビターPD 173074 (LC Laboratories, Woburn, MA)又は可溶性組換え体ヒトTRAIL (izTrail, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY)若しくはEverolimus又はCEN10-128-cys (Centyrose 特許出願第US 2011/0064752 A1号)と組み合わされたM53-PEG24-CEN09-106のNSCLC細胞系A549に対する細胞毒性効果を測定した。この試験は、濃度勾配全体の薬剤の固定比率(それぞれ単独のEC50値を基準とした)を使用した。単一薬剤のED50値を最初に決定し、これらの数値から、全ての化合物について8工程における3倍系列希釈法によって併用薬剤分析を調製した。併用薬剤は、固定濃度比率を使用して試験を行った。PD 173074及びM53-PEG24-CEN09-106については、比率勾配は、それぞれ0.12マイクロモル及び2ピコモルから251マイクロモル及び3600ピコモルまで及んだ。TRAIL及びM53-PEG24-CEN09-106については、比率勾配はそれぞれ0.25ng/mL~2ピコモルから540ng/mL~3600ピコモルまで及んだ。Everolimus及びM53-PEG24-CEN09-106については、比率勾配は、それぞれ0.01ナノモル及び0.4ピコモルから26.1ナノモル及び900ピコモルまで及んだ。CEN10-128-cys及びM53-PEG24-CEN09-106については、比率勾配は、それぞれ160ナノモル及び1ピコモルから330マイクロモル及び1.7ナノモルに及んだ。全ての化合物濃度及び薬剤併用は、二通りで試験された。細胞培養及び細胞生存率アッセイは記載の通りに実施された。

30

40

【表 2】

薬剤	EC50
M53-PEG24-CEN09-106	0.3nM
PD0173074	29uM
izTrail	82ng/mL
Everolimus	11nM
CEN10-128-cys	60uM
PD 0173074+M53-PEG24-CEN09-106	13uM+0.2nM
izTrail+M53-PEG24-CEN09-106	36ng/mL+0.2nM
Everolimus+M53-PEG24-CEN09-106	2nM+0.06nM
CEN10-128cys+M53-PEG24-CEN09-106	13uM+0.06nM

10

上記表は、培地中で増殖された A549 細胞上で試験される場合の薬剤（単独及び併用）の EC50 値を示す。

【0164】

上記表中のデータは、併用での薬剤についての EC50 値が、それ自体による薬剤の EC50 値未満であることを示し、したがってこれら併用は相乗的であることを示している。この結果は、TRAIL 及び線維芽細胞成長因子受容体キナーゼ阻害剤、mTOR 阻害剤及び解糖阻害剤が、クラス 1 EDCs と相乗的に働き、用量依存的方法で癌細胞死を促進することを立証している。これに加えて、併用される場合、M53-PEG24-CEN09-106 単独と比較する場合、生存する細胞の総数は減少することを試験は示すことが望ましい。更に、併用される場合、この試験は、M53-PEG24-CEN09-106 単独と比較する場合、生存する細胞の総数が減少することを示した。このことは、これら併用がインビボにおいて、腫瘍抑制及び/又は腫瘍退縮の増加にも導くべきことを示唆している。

20

【0165】

インビトロの正常細胞の細胞毒性。M53-PEG24-CEN09-106、PEG24-CEN09-106、M53-PEG24-CEN-319、PEG24-CEN-319、プロシラリジン及びジギトキシンのディスアドヘリン陽性一次正常ヒト細胞及びディスアドヘリン陽性ヒト非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞系に対するインビトロ細胞毒性活性を試験し比較した。使用された細胞は、一次ヒト腎上皮細胞 (HREpC)、一次ヒト臍静脈内皮細胞 (HUV EC)、一次ヒト臍動脈内皮細胞 (HUA EC)、及び A549 NSCLC 細胞であった。一次細胞は、PromoCell GmbH、Heidelberg, Germany から入手され、NSCLC 細胞系 A549 は、ATCC から入手された。一次腎上皮細胞は、腎上皮細胞成長培地 2 (PromoCell GmbH、Heidelberg, Germany) 中で増殖された。一次内皮細胞は、内皮細胞成長培地 2 (PromoCell GmbH、Heidelberg, Germany) 中で増殖された。NSCLC 細胞系は、10% のウシ胎児血清で補充された RPMI-1640 (HyClone、Thermo Scientific) 中で増殖された。HREpC、HUV EC、HUA EC、及び A549 細胞を、1250、1875、2500、及び 1250 細胞/ウェル (それぞれ) で 384 ウェルプレートにプレート化し、5% の CO₂、及び 100% の湿度で 37 °C にて 24 時間インキュベートさせた。様々な濃度の複合体 M53-PEG24-CEN-106 及び M53-PEG24-CEN-320 及び PEG24-CEN09-106 並びに PEG24-CEN-320 を、5 uL の総容量の培地で、ウェルに添加し、プレートを更に 72 時間インキュベートした。72 時間の薬剤への曝露の後に、Cell Titer-Glo 発光細胞生存率アッセイ (Promega、Madison, WI) を使用して、製造業者の使用説明書に従って、細

30

40

50

胞生存率を評価した。Wallac Victor² Model 1420-041アッセイプレートリーダー(Perkin Elmer, Gaithersburg, MD)を使用して、発光測定を実施した。GraphPad Prism 5ソフトウェアを使用して、各試験薬剤に関するEC₅₀値を決定した。化合物がそれぞれの細胞系の細胞生存率に及ぼす最大効果の半分を及ぼす場合の濃度を以下の表に示し、PEG24-CEN09-106及びPEG24-CEN-320について示されたEC₅₀濃度は、小薬剤分子それ自体の濃度であり、M53-PEG24-CEN09-106及びM53-PEG24-CEN-320について示されたEC₅₀濃度は、これら複合体の抗体部分の濃度である。これらデータは、M53-PEG24-CEN09-106が、FX Y D 5陽性NSCLC細胞系A549に比べてFX Y D 5陽性一次正常細胞に対して、170~>1180倍の著しく少ない細胞毒性であることを示している。

10

【表3】

細胞系	A549	HUVEC	HUAEC	HREpC
FX Y D 5細胞表面発現	++	+	+	+
M53-PEG24-CEN09-106	0.2	30	29	>200
PEG24-CEN09-106	32	37	32	
プロシラリジン	2.1	5.6	5.6	10
M53-PEG24-CEN-319	1.6	>200	>200	
PEG24-CEN-319	348	>200	>200	
ジギトキシン	17	39	47	135

20

【0166】

実施例4．M53配列決定及びヒトキメラ抗体の生成

M53を生成するハイブリドーマ細胞系から単離されたmRNAをクローンし、このマウスIgG1、免疫グロブリンの可変ドメインをコード化する核酸配列を決定するために配列決定した。5'-RACE(Smart RACEキット; Clontech)を使用して、M53のIgG重鎖及び軽鎖をコード化するmRNAの5'を増幅した。簡単に言うと、約1µgのmRNAを逆転写に使用して、cDNAプールを生成する。次に、cDNAを、RACEキットを備えるユニバーサルプライマーと遺伝子特異的プライマーでのPCRを介して増幅した。このユニバーサルプライマーは配列番号18であって、IgG1/IgG2A及びIgG2bに関する遺伝子特異的プライマーは、それぞれ配列番号19及び配列番号20であった。PCR生成物をゲル精製し、pSUPER-ブルントベクター(Alexon)中にクローンし、複数のコロニーを配列決定した。内因性異常軽鎖をスクリーニングによって除去し、非異常のコロニーを配列決定した。配列決定結果をNTIベクター上で分析した。全てのクローンの配列決定分析の結果は、ハイブリドーマが真のモノクローナル抗体を生成することを明らかにした。M53重鎖可変領域のコード化配列は、配列番号21の核酸(240~599)で示され、M53軽鎖可変領域のコード化配列は、配列番号22の核酸(221~559)で示される。

30

40

【0167】

キメラマウス-ヒトモノクローナル抗体(すなわち、キメラ抗体)は、当該技術分野で既知である組換えDNA技術によって生成される(Current Opinion in Biotechnology 12, no. 2, 2001年4月1日: 188-194)。例えば、ヒトIgGの不変領域に融合されたマウスIgG由来の可変領域を含む、組み立てられたIgG分子の重鎖(HC)及び軽鎖(LC)タンパク質をコード化する哺乳類発現ベクターの使用は、当該技術分野で周知である。配列番号21の不変領域コード化配列(ヌクレオチド243~245)がキメラ重鎖タンパク質(配列番号23)の2位でバリンの代わりにシステインをコード化するように変更されたことを除けば、M53生成

50

ハイブリドーマ系から単離されたHC及びLC可変領域をコード化するDNAを使用して、キメラM53(cM53)の生成のための哺乳類発現ベクターを構築した。標準組換えDNA技術(BMC Biotechnol. 2006年12月 22; 6: 49)を使用して、IgG1抗体M53に由来するその可変領域がヒトIgG1 HC及びLC不変領域に融合された、HC(配列番号23)及びLC(配列番号24)タンパク質配列の発現のために、キメラM53(cM53)哺乳類発現ベクターを生成した。キメラHCの発現のためのベクター挿入物のDNA配列(配列番号25)は、シグナルペプチド(ヌクレオチド1~90)、M53可変HCドメイン(ヌクレオチド91~450、ここではヌクレオチド94~96はパリンの代わりにシステインをコード化するように変更されている)、及びヒトIgG1不変HCドメイン(ヌクレオチド451~1443)をコード化する。キメラLCの発現のためのベクター挿入物のDNA配列(配列番号26)は、シグナルペプチド(ヌクレオチド1~60)、M53可変LCドメイン(ヌクレオチド61~399)、及びヒトIgG1不変LCドメイン(400~723)をコード化する。HEK293細胞におけるcM53の一過性発現に使用されるシグナルペプチド配列(配列番号27及び28)は開裂され、培養培地中のcM53の分泌を可能にし、同様に機能する他のシグナルペプチドは、当該技術分野で既知である(Trends in Cell & Molecular Biology (2007) 2, 1-17)。HC及びLC哺乳類発現ベクターは、HEK293F細胞(Invitrogen)において一過性で発現された。簡単に言うと、プラスミドDNA(HC及びLC哺乳類発現ベクターの1:1混合物)を、ポリエチレンイミンと1:4で組み合わせた(すなわち、1リットルのHEK293F細胞培養について、1mgのプラスミドDNA及び4mLのポリエチレンイミン(1mg/ml)を50mlのOptiMEM(Invitrogen)中で混合し、次いで細胞に添加する前に、10分間インキュベートした)。細胞を、37、8%のCO₂で、振蕩しながら(125rpm)5~7日間培養し、細胞生存度が50%に近づいた時点で、細胞培養培地を回収した。得られた細胞培養培地を遠心分離し、上澄み液を0.22µmのフィルターで濾過した。キメラマウス/ヒトIgGを、タンパク質G親和性クロマトグラフィーによって、濾過した細胞培養培地から単離した。

10

20

【0168】

精製したcM53及びM53抗体を、リンカー動作可能試薬PEG24-CEN09-106に結合した。簡単に言うと、抗体を10当量のジチオスレイトール(DTT)で、室温(RT)で1時間処理した。Microcon Ultracel YM-30(Millipore)30Kカットオフスピン濃縮装置を使用して、20mMのリン酸ナトリウム(pH7)及び150mMのNaClへの緩衝液交換によって、過剰なDTTを除去した。抗体を2当量のデヒドロアスコルビン酸で、RTにて3時間処理し、次いで5当量のPEG24-CEN09-106をそれぞれの反応に加え、RTで1時間インキュベートした。次いでL-システインを2倍の過剰量でPEG24-CEN09-106に加え、未反応のマレイミド基を反応停止させた。試料濃度及び抗体に結合しなかった過剰なリンカー剤の除去を達成するために、複合体形成反応を濃縮し、Microcon Ultracel YM-30(Millipore)30Kカットオフスピン濃縮装置を使用して、20mMのリン酸ナトリウム(pH7)及び150mMのNaClへの緩衝液交換を3回行った。

30

40

【0169】

得られた複合体を、上記のように、NSCLC細胞系A549に対するインビトロ活性について試験した。得られた複合体、cM53-PEG24-CEN09-106及びM53-PEG24-CEN09-106は、A549細胞に対して同様な活性を示した(それぞれ、2.0及び1.9のEC₅₀値)。

【0170】

単鎖可変断片構築。M53の重可変鎖及び軽可変鎖を含有するscFvをコード化するように合成遺伝子構築体を設計し、ここではシステインが、重可変鎖(配列番号29)のN末端において末位から二番目のアミノ酸位でパリンに置換された。このscFv遺伝子構

50

築体を含有する発現構築体 (p J e x p r e s s 4 1 1 : 5 8 8 6 6 - C E N s c F v 0 0 3 [重鎖状のシステイン] _ o p t E c _ V 2) を、DNA 2.0 (Menlo Park, CA) によって合成した。大腸菌 (E . c o l i) 中で発現される場合、この構築体は、PhoA (アルカリホスファターゼ) シグナル配列を含むタンパク質 (配列番号 30) を生成し、このシグナル配列は、発現されたタンパク質を周辺細胞質に向けるもので、この周辺細胞質では、発現されたタンパク質が、タンパク質の残部 (1 ~ 21 位)、M53 可変 HC ドメイン (22 ~ 141 位、ここでは 23 位がバリンに代わってシステインである)、グリシンリッチの可撓性リンカー (142 ~ 156 位)、及び M53 可変 LC ドメイン (157 ~ 269) から放出される。

【 0 1 7 1 】

s c F v 0 0 3 発現構築体を、大腸菌 EXPRESS BL21 (DE3) ケミカルコンピテント細胞 (Lucigen Corporation, Middleton, WI) に導入した。30 ug / mL のカナマイシンを含有する LB 培地の 6 リットルを、上記形質転換体と共にインキュベートし、IPTG を 200 uM で添加させる場合、17 で 0 . 8 0 . D . 6 0 0 まで増殖した。18 時間のインキュベーション後に、20 . 6 グラムの細胞ペーストを成長培地の 4000 rpm の遠心分離によって回収した。細胞を、超音波処理によって、90 mL の PBS (pH 7 . 4) + 1 mM - DTPA 中、氷上で細胞溶解した。細胞溶解物を、14,000 rpm にての 20 分間の遠心分離によって透明にして、次いで 0 . 8 uM のフィルター、その後 0 . 45 uM のフィルターを通して濾過した。抗 FX Y D 5 s c F v 0 0 3 を、免疫親和性クロマトグラフィーによって細胞溶解物から精製した。この免疫親和性樹脂は、製造業者のプロトコルに従って、CEN P 0 1 8 (P T R A P D A V Y T E L Q C) (配列番号 11) を SulfoLink Coupling Resin (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) に、1 mg のペプチド / 樹脂の mL の装填率で、複合体形成することによって調製された。2 mL のペプチド修飾樹脂を含有するカラムを調製し、細胞溶解物をこの樹脂全体に流した。次いでカラムを、100 カラム容量の PBS (pH 7 . 4) + 1 mM の DTPA で洗浄し、結合した s c F v を 0 . 1 M のクエン酸で溶出し、タンパク質を含有する溶出液を Tris 塩基で直ちに中和した。タンパク質含有溶出物を濃縮し、5 mL の 6 K M W C O ポリアクリルアミド脱塩カラム (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) を使用して、PBS (pH 7 . 4) + 1 mM の DTPA に緩衝液交換した。

【 0 1 7 2 】

上記で調製された s c F v タンパク質の不对システインを、システインジスルフィド還元のためなく、PEG₂₄ - CEN09 - 106 と反応させた。簡単に言うと、5 モル当量の PEG₂₄ - CEN09 - 106 を、PBS (pH 7 . 4) + 1 mM - DTPA 中 s c F v 0 0 3 の氷冷した 32 uM 溶液に加え、氷上で一晩反応させた。7 . 5 モル当量の L - システインを加えることによって、未反応のマレイミドを反応停止させて、室温で 30 分間反応させた。次いで、Amicon Ultra - 0 . 5 mL 10 K 遠心分離濃縮機 (Millipore, Billerica, MA) を使用して、緩衝液交換を繰り返すことによって、得られた複合体を過剰のリンカー薬剤から精製した。s c F v についての 280 nm におけるモル吸光係数値 51,590 M⁻¹ cm⁻¹ を使用して、実施例 2 に記載のように、この複合体に関する PEG₂₄ - CEN09 - 106 の装填率を決定した。

【 0 1 7 3 】

得られた複合体を、上記記載の通りに、NSCLC 細胞系 A549 に対するインビトロ活性について試験した。得られた複合体は、A549 細胞に対して活性を示した (EC50 = 1 . 6 nM)。s c F v - PEG_n - CEN09 - 016 (ここで n = 24) に関するこの結果に加えて、s c F v - PEG_n - CEN09 - 016 複合体 (ここで n = 12 及び 36) もまた生成し、A549 に対して試験した。s c F v - PEG₁₂ - CEN09 - 016 及び s c F v - PEG₃₆ - CEN09 - 016 は、s c F v 当たり 1 つの薬

10

20

30

40

50

剤を有し、並びにそれぞれ9.1及び1.1のEC50値を有することが決定された。追加的試験では、scFv-PEG₂₄-CEN09-106の細胞毒性活性は、M53抗体で中和又は競合され得ることを示し、このことは、scFvとM53が同一のエピトープと反応することを立証している。

【0174】

実施例5. M53及び異なる薬物負荷を有するM53-PEG24-CEN09-106の薬物動態

薬物負荷の薬物動態効果を評価するために、非複合体型抗体M53及び抗体当たり2、5、及び9の薬物の薬物負荷を有する抗体薬剤複合体M53PEG24-CEN09-106処方物を、SCIDベージュマウス(Harlan Laboratories、n = 2)に、尾静脈注射によって1mg/kgの試験物質(抗体成分に基づいて)を投与した。注射後1時間後、並びに1、2、3、6及び15日後に、後眼窩採血によって採取された血液試料から血清を単離した。血液をヘパリンでコーティングされた試験管に採取し、続いて遠心分離し(5,000×g、5分)、血漿を単離した。

【0175】

M53-PEG24-CEN09-106及び非複合体型M53の血漿濃度を、以下の方法で抗原結合ELISAによって測定した。96ウェルの透明底ELISAプレートのウェルを、200mMの炭酸緩衝液(pH9.6)100uL中、ウェル当たり400ngのBSA-ペプチド複合体で、BSAに結合されたCENP018(配列番号17)で4に一回晩コーティングすることによって、抗原補足用プレートを調製した。抗原コーティングされたELISAプレートを、PBS(pH7)で3回洗浄し、1%のNFDmを含むPBS(pH7)(PBS+NFDm)でブロックし、次いでPBS(pH7)で3回洗浄した。非複合体型M53及び各EDCの希釈された血清及び標準曲線を、上記ブロッキング緩衝液中で調製し、コーティングされたウェルに加え、RTで30分間インキュベートし、ウェルをPBS(pH7)で3回洗浄した。ヤギ抗マウスIgGアルカリホスファターゼ(カタログ番号:A1418;Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を、PBS+NFDm中で1:15,000に希釈し、各ウェルに加え(100uL)、RTで30分間インキュベートし、ウェルをPBS(pH7)で3回洗浄した。50mMのMgCl₂を有する1MのDEA(pH9.8)中の1mg/mLのPNPPを加え(ウェル当たり100uL)、Wallac Victor² Model 1420-041アッセイプレートリーダー(Perkin Elmer, Gait herburg, MD)を使用して、合計で6回の読み取りで5分毎に、405nmにおける吸光度を決定した。既知の抗体濃度標準からの吸光度値を使用して、血清試料中の抗体の濃度を決定した。これら血清濃度は、次いでプロットされ、図1に示すグラフを作成した。

【0176】

図1は、EDCの曝露(血清中半減期)(「EDC-ONE」、「2x」、「5x」、及び「9x」として示した)が、薬物負荷が減少するにつれて増加することを示す。図1はまた、2の薬物負荷が、遊離抗体と同様な又はそれよりも良好な血清中半減期をもたらすことも示す。非複合体型M53に関する検出可能な(抗原結合によって)抗体の血清中半減期は、約6日であると決定されたが、一方2、5、及び9の薬物負荷を有するM53-PEG24-CEN09-106に関する検出可能な抗体の血清中半減期は、それぞれ約7、4、及び2日であった。

【0177】

別の薬物動態試験では、非複合体型抗体M53と3の薬物負荷を有するEDC M53-PEG24-CEN09-106をマウスに投与し、抗体の薬物動態を、上記記載の方法及びELISAを使用して測定した。M53-PEG24-CEN09-106のステロイド剤の薬物動態を、以下に記載される薬剤特異的ELISAを使用して測定した。2つのELISA結果間の比較(抗体濃度-薬剤濃度)を使用して、薬剤分解の速度を決定し、これによって、M53-PEG24-CEN09-106の安定性を検討した。

【0178】

Balb/cマウス(3匹のマウス/群)に、M53及び3の薬物負荷を有するM53-PEG24-CEN09-106の1mg/kgを、尾静脈注射によって投与した。注射後1、2、4、8、16、26、及び40日に、後眼窩採血によって取得された血液試料から血清を単離した。M53-PEG24-CEN09-106及び非複合体型抗体M53の血漿濃度を、上記のように抗原結合ELISAによって測定した。M53-PEG24-CEN09-106中のステロイド剤の濃度を以下のように測定した。抗原コーティングされたELISAプレートを、PBS(pH7)で3回洗浄し、1%のNFDMを含有するPBS(pH7)(PBS+NFDM)でブロックし、次いでPBS(pH7)で3回洗浄した。M53-PEG24-CEN09-106の希釈された血清試料及び標準曲線を、上記ブロッキング緩衝液中で調製し、コーティングされたウェルに加え、RTで30分間インキュベートし、ウェルをPBS(pH7)で3回洗浄した。ピオチニル化25C2E3(PEG24-CEN09-106のステロイド部分に特異的なモノクローナルIgG1抗体であり、ピオチンに結合されたもの[Thermo Scientific, PN21911])を、PBS+NFDM中で100ng/mLに希釈し、各ウェルに加え(100 μ L)、RTで30分間インキュベートし、ウェルをPBS(pH7)で3回洗浄した。50mMのMgCl₂を有する1MのDEA(pH9.8)中の1mg/mLのPNPPを加え(ウェル当たり100 μ L)、Wallac Victor² Model 1420-041アッセイプレートリーダー(Perkin Elmer, Gaitheburg, MD)を使用して、5分毎で合計6回の読み取りで、405nmにおける吸光度を決定した。

10

20

【0179】

両ELISAsについて、既知の標準からの吸光度値を、吸光度として経時的にプロットし、各濃度について線形勾配を生じた。次いでこの生じた勾配を標準の対応の濃度に対してプロットし、第2の線形プロットを作成した。未知の血清試料に関する吸光度を経時的にプロットし、未知試料に関する勾配を確立した。次いで、勾配対濃度プロットからの線形推定を使用して、それぞれの未知試料に関する濃度をそれらの勾配に基づいて推定した。

【0180】

これら実験から、非複合体型M53の抗体部分の血清中半減期を、10mg/kg及び1mg/kgで投与されたそれぞれで10.3日及び11.9日であると決定した。M53-PEG24-CEN09-106の抗体部分の血清中半減期を、10mg/kg及び1mg/kgで投与されたそれぞれで9.2日及び11.9日であると決定した。M53-PEG24-CEN09-106のステロイド部分の血清中半減期を、10mg/kg及び1mg/kgで投与されたそれぞれで8日及び11日であると決定した。これら試料における無処置EDCの血清安定性(経時的に抗体から薬剤が放出する)を決定するために、抗体部分の血清減衰に対する薬剤部分の血清減衰の勾配の比を計算した。これら比から、10mg/kg及び1mg/kgで投与される場合のEDC血清安定性半減期を計算し、それぞれ39日及び45日であった。

30

【0181】

これら試験からの結論は以下のものである:(1)EDCの最大曝露を得るために、2又は3の薬物負荷が最適であるが、5までの薬物負荷は、非複合体型抗体よりもわずかに2日間短い血清中半減期に導くこと;(2)EDCの血清分解はEDCの血清中半減期に比較される場合に無視できること;(3)PEG24-アミノ-グリコシドリンカーは、非切断可能なリンカーであること;並びに(4)EDC血清中半減期は、投与レベルによって大きく影響されることはないこと。

40

【0182】

実施例6.M53-PEG24-CEN09-106の耐容用量

抗体当たり2、5又は9個の薬剤の薬物負荷を有するEDC M53-PEG24-CEN09-106調製物を、25、50、100及び200mg/kgの単回投与量で、

50

尾静脈を介してBALB/cマウス(Harlan Laboratories、n=1)に投与し、単回投与量MTDsを決定した。マウスを24日間毎日監視し体重及び臨床所見の双方を記録した(体重を週に少なくとも2回測定し、毒性の明白な徴候に関する評価を一日2回行った)。MTDは、いずれの動物においても重篤で明白な毒性を引き起こさない又は>20%の体重減少を引き起こさない最高投与量として定義される。

【0183】

抗体当たり2個の薬剤の薬物負荷を有するM53-PEG24-CEN09-106について、体重増加又は減少%を測定し、投与の日に対してプロットし、グラフに表し、これを図2に示した。MTDは>100mg/kgであると決定し、これは、いずれの動物においても>20%の体重減少、苦痛の重篤な徴候、又は明白な毒性を誘導しなかった最高投与量であった。200mg/kgの用量では、マウスは一日目に手足の虚弱を経験したが、3日目までに回復し、体重において25%の減少を経験した。

10

【0184】

抗体当たり5個の薬剤の薬物負荷を有するM53-PEG24-CEN09-106単回投与耐容量を、同一の基準を使用して>50mg/kgであると決定した。25及び50mg/kgでは、毒性の徴候及び体重減少は観察されなかった。100mg/kg用量では、マウスはその体重の27%を減少させ、わずかな弛緩及び閉じた前肢を経験したが、3日目までに回復した。200mg/kgの用量では、マウスは1日目及び2日目に弛緩及び閉じた前肢並びに虚弱を経験した。

20

【0185】

抗体当たり9個の薬剤の薬物負荷を有するM53-PEG24-CEN09-106単回投与耐容量を、同一の基準を使用して>25mg/kgであると決定した。25mg/kgでは、毒性の徴候及び体重減少は観察されなかった。50mg/kg用量では、マウスは5日目までにその体重の30%を減少させ、これは10日目までに正常に戻り、わずかな弛緩を2日目に経験したが3日目までに回復した。100及び200mg/kgの用量では、マウスは1日目までに弛緩、閉じた前肢並びに虚弱を経験し、これらは2日目まで続いた。

【0186】

別の実験において、雄BALB/cマウス(BALB/cAnNHsd、Harlan Laboratories)に、腹腔内注射によって、抗体当たり2個の薬剤の薬物負荷を有するM53-PEG24-CEN09-106の500mg/kgの単回及び即時投与を施した。動物の体重を22日間の期間にわたって記録し、目視観察を146日間にわたって実行し、ビヒクル対照を受容したマウスと比較した。体重測定値は、注射後最初の6日間にわたり30%の体重の平均的減少を示したが、目視観察は毒性の明らかな徴候を示さなかった。マウスは、15日目までに正常な対照体重に回復した。

30

【0187】

これらの結果は、腹腔内投与された、抗体当たり2個の薬剤の薬物負荷を有するM53-PEG24-CEN09-106の500mg/kgが、単回静脈内ボラス注射を投与された、抗体当たり2個の薬剤を有するM53-PEG24-CEN09-106の200mg/kgと同様に良好に耐容されたように、投与の経路は、最高耐容用量に影響を及ぼし得ることを示唆している。これはまた、腹腔内投与による血流へのより遅い放出にも起因し得る。

40

【0188】

実施例5及び6からの結論は、以下のものである：(1)薬物負荷はEDCの耐容用量に影響を及ぼし、抗体当たり2個の薬剤は、マウスにおいて500mg/kgまでの耐容用量を示し、抗体当たり9個の薬剤は、25と50mg/kgの間の耐容用量を示すこと；(2)2~4個の薬剤の抗体負荷が、最小毒性及び最大薬物動態を維持するために最適であること；(3)EDCsが血流内に入る投与の経路及び/又は速度が、MTDに影響を及ぼし得、より遅い血流投与がより耐容されること；並びに(4)体重減少及び明らかな毒性は、高レベルの投与量及び高レベルの薬物負荷によって影響されること。これらの

50

結果はまた、耐容されたヒト投与量は、 10 mg/kg よりも高いことが可能であることを立証している。

【0189】

実施例7．A549及びH460異種移植モデルにおけるM53-PEG24-CEN09-106の有効性

抗体当たり8個のステロイド剤の薬物負荷を有するM53-PEG24-CEN09-106の有効性を、A549異種移植モデルにおいて立証した。簡単に言うと、非小細胞肺癌疾患モデルを確立するために、 $200\ \mu\text{L}$ のRPMI1640+50%のMarigel HC (BD Biosciences, San Jose, CA)中の 6×10^6 個のA549細胞を、Hsd:無胸腺ヌード-Foxn1^{nu}マウス(Harlan, Indianapolis, IN)の左脇腹に移植した。次いで、5匹の動物の群における腫瘍体積が $\sim 300\text{ mm}^3$ の平均値になった場合に、抗体-薬剤複合体による処置を開始した。ビヒクル対照、 0.1 及び 1 mg/kg のM53-PEG24-CEN09-106、及び 10 mg/kg の対照M53-PEG24-CEN09-106(抗体当たり7個の薬剤の薬物負荷を有する対照複合体で、ここでは抗体の標的は細胞表面上にはないが、薬剤及びリンカー並びに抗体イソタイプはM53-PEG24-CEN09-106と同様である)を使用する処置を、7日毎に1回の注射で合計3回の注射用量($q7d \times 3$)の実施計画を使用して静脈内で全て施した。 $q2d \times 5$ で投与された 15 mg/kg のパクリタキセルは、陽性対照処置群として働いた。この実施計画を使用して、腫瘍体積を、校正済みノギスを用いて各群について測定し、移植後54日間及び最初の投与後40日間にわたって腫瘍移植の最初の日に対してプロットし、図3に示すグラフを作成した。この結果は、M53-PEG24-CEN09-106が 1 mg/kg で、ビヒクルと比較した場合、腫瘍の65%の増殖阻害を生じたことを示す。パクリタキセルはその最適投与量で、ビヒクルと比較した場合、腫瘍の45%の増殖阻害を生じた。同一の実施計画による 0.1 mg/kg では、M53-PEG24-CEN09-106は、ビヒクルと比較した場合、腫瘍の35%の増殖阻害を生じた。同一の実施計画による 10 mg/kg では、対照M53-PEG24-CEN09-106は、ビヒクルと比較した場合、腫瘍の35%の増殖阻害を生じた。

【0190】

第2番目のA549試験では、抗体当たり3個の薬剤の薬物負荷を有するM53-PEG24-CEN09-106の有効性が立証された。簡単に言うと、非小細胞肺癌疾患モデルを確立するために、皮下A549異種移植を、 8 mm^3 のA549腫瘍断片を左脇腹に皮下注射により移植することによって、雌HRLNM nu/nuマウスにおいて開始した。腫瘍増殖を監視し、 $60 \sim 180\text{ mm}^3$ の腫瘍を保持するマウスを試験のために選択した。約 110 mm^3 の群平均腫瘍体積を有する腫瘍保持マウス($n=7$ 匹のマウス/群)を、 5 mg/kg のM53-PEG24-CEN09-106($q3d \times 4$)、 20 mg/kg のシラレニン-4-アミノ-デオキシ-L-キシロピラノシド(M53-PEG24-CEN09-106の構築体中の中間体で、細胞毒素として知られる)($q2d \times 5$)、及び 15 mg/kg のパクリタキセル($q1d \times 5$)で腹腔内にて処置した。校正済みノギスを用いて、腫瘍体積を各群について測定し、100日間にわたって最初の投与の日に対してプロットし、図4に示すグラフを作成した。

【0191】

この実施計画を使用して、最初の投与から100日後に、M53-PEG24-CEN09-106は、 5 mg/kg で、ビヒクルと比較した場合、72%の腫瘍の増殖阻害を生じた。パクリタキセルは、その最適濃度で、ビヒクルと比較した場合、72%の腫瘍の増殖を阻害した。 20 mg/kg で、シラレニン-4-アミノ-デオキシ-L-キシロピラノシドは、ビヒクルと比較した場合、60%の腫瘍の増殖阻害を生じた(図4参照)。パクリタキセルを投与されたマウスは、11%の体重減少を示し、シラレニン-4-アミノ-デオキシ-L-キシロピラノシドでは8%の体重減少を示したが、一方他のマウスの全てはわずかな体重増加を示した。この試験は、抗体当たり3個の薬剤の薬物負荷を有す

るM53-PEG24-CEN09-106の5mg/kgが、その最適投与量でのパクリタキセルと同様な様式で腫瘍増殖を遅らせることで、有効性を示すことを表示している。この試験はまた、M53-PEG24-CEN09-106の有効性が、427倍低い総モルレベルで投与される場合、シラレニン-4-アミノ-デオキシ-L-キシロピラノシドと同様であることも立証した。加えて、M53-PEG24-CEN09-106は体重減少を生じず、このことは、これがパクリタキセル又はシラレニン-4-アミノ-デオキシ-L-キシロピラノシドよりも毒性が低いことを立証している。これら結果はまた、有効なヒト投与量は、5mg/kgを包含する範囲にあり得ることも立証する。

【0192】

別の試験で、抗体当たり8個の薬剤の薬物負荷を有するM53-PEG24-CEN09-106の有効性が、H460異種移植モデルにおいて立証された。簡単に言うと、非小細胞肺癌疾患モデルを確立するために、100 μ LのRPMI1640+30%のMareigel HC (BD Biosciences, San Jose, CA) 中の1 \times 10⁶個のH-460細胞を、Hsd:無胸腺ヌード-Foxn1^{nu}マウス (Harlan, Indianapolis, IN) の左脇腹に移植した。5匹の動物の群における腫瘍サイズが \sim 200mm³の平均値になった場合に、治療を開始した。ビヒクル対照、0.1及び1mg/kgのM53-PEG24-CEN09-106、及び10mg/kgの対照M53-PEG24-CEN09-106 (上記記載の通り) を使用する処置は、7日毎に1回の注射を合計2回注射する実施計画 (q7d \times 2) を使用する複数回の静脈注射からなる。パクリタキセルは、陽性対照処置群として働き、2日毎に1回の注射で合計5回注射する実施計画 (q2d \times 5) を使用して、15mg/kgで静脈投与した。この実施計画を使用して、腫瘍体積を、校正済みノギスを用いて各群について測定し、移植後24日間及び最初の投与後12日間にわたって腫瘍移植の日に対してプロットし、図5に示すグラフを作成した。この結果は、M53-PEG24-CEN09-106が1mg/kgで、ビヒクルと比較した場合、腫瘍の73%の増殖阻害を生じたことを示している。同一の実施計画による0.1mg/kgでは、M53-PEG24-CEN09-106は、ビヒクルと比較した場合、腫瘍の38%の増殖阻害を生じ、体重減少は生じなかった。パクリタキセルはその最適投与量で、ビヒクルと比較した場合、腫瘍の78%の増殖阻害を生じ、15%の平均体重減少を生じた。同一の実施計画による10mg/kgでは、対照M53-PEG24-CEN09-106は、ビヒクルと比較した場合、腫瘍の33%の増殖阻害を生じた。

【0193】

実施例8 . PANC-1異種移植モデルにおけるM53-PEG24-CEN09-106併用療法の有効性

別の試験において、抗体当たり8個の薬剤の薬物負荷を有するM53-PEG24-CEN09-106の有効性を、PANC-1異種移植モデルにおいてゲムシタピンと併用で立証した。100 μ LのDMEM中の5 \times 10⁶個のPANC-1細胞を、7週齢の雌C.B-17/IcrHsd-Prkdc^{scid}Lyst^{b8}マウスの左脇腹に移植することによって、膵臓癌の疾患モデルを確立した。次いで、3匹の動物の群における腫瘍サイズが \sim 500mm³の平均値になった場合に、マウスを、8個の薬物負荷を有するM53-PEG24-CEN09-106及び/又はゲムシタピンで処置した。処置は、ビヒクル対照、60mg/kgのゲムシタピンの有無で、0.2、1及び5mg/kgでのM53-PEG24-CEN09-106、又は60mg/kgのゲムシタピン単独からなり、並びに静脈内投与される7日毎に1回の注射で合計3回の注射 (q7d \times 3) のM53-PEG24-CEN09-106実施計画及び腹腔内投与される3日毎に1回の注射で合計3回の注射のゲムシタピン実施計画を使用する複数の注射からなる。腫瘍体積を、校正済みノギスを用いて各群について測定し、最初の投与後28日間にわたって腫瘍移植の最初の日に対してプロットし、グラフを作成し、図6に示した。最初の投与から28日目に、M53-PEG24-CEN09-106は、0.2、1、5mg/kgで、ビヒクルと比較する場合、それぞれ38%、48%及び76%の腫瘍の増殖阻害を生じた

。ゲムシタピン（3日毎に1回の注射で合計5回の注射）がM53-PEG24-CEN09-106の同一の実施計画及び投与量（0.2、1、5 mg/kg）と併用された場合、この投与量は、0.2 mg/kgについては、88%の増殖阻害を生じ、他の併用投与量については腫瘍退縮を生じた。ゲムシタピン単独は、ビヒクルと比較する場合、腫瘍の68%の増殖阻害を生じた。

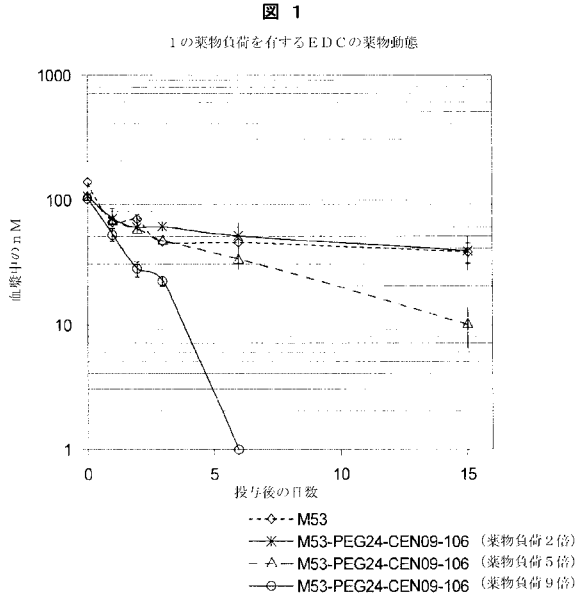
【0194】

別の試験では、Panc-1皮下異種移植モデルを使用して、抗体当たり7個の薬剤の薬物負荷を有するM53-PEG24-CEN09-106の抗腫瘍活性を評価した。1 mm³のPANC-1腫瘍断片を左脇腹に皮下注射により移植することによって、皮下Panc-1異種移植を雌HRLN nu/nuマウスにおいて開始し、腫瘍増殖を監視し、80~120 mm³の腫瘍を保持するマウスを試験用を選択した。腫瘍体積を、校正済みノギスを用いて各群について週に2回測定し、最初の投与の日に対してプロットし、図7に示すグラフを作成した。処置群の中では、毒性作用は観察されなかった（毒性は、試験期間中の>10%の体重減少として判定された）。この試験からの結論は、ヒト膵臓細胞系PANC1から発生した固形腫瘍を有するマウスへのM53-PEG24-CEN09-106投与は、ビヒクル群1と比較する場合、用量依存的方法で腫瘍縮小に導くことであった。

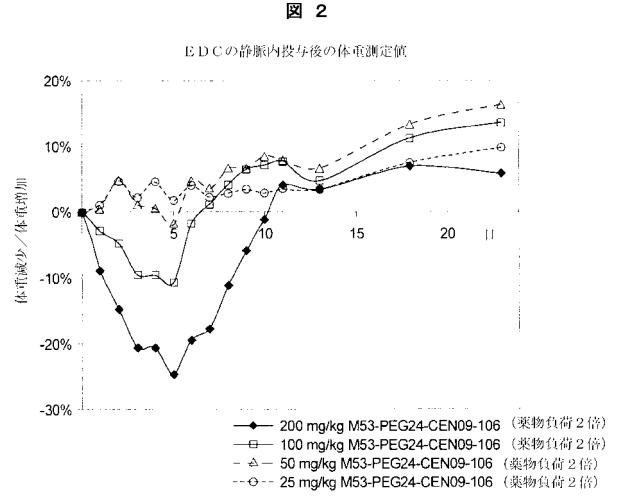
【表4】

群	N	薬剤又は試験薬剤；投与量；経路；及び実施計画			
		薬剤	mg/kg	経路	実施計画
1	10	ビヒクル	—	iv	Q3Dx7
1	10	ゲムシタピン	120	ip	Q3Dx7
3	10	M53-PEG24-CEN09-106	1	iv	Q3Dx7
4	10	M53-PEG24-CEN09-106	5	iv	Q3Dx7
5	10	M53-PEG24-CEN09-106	15	iv	Q3Dx7
6	10	M53-PEG24-CEN09-106	1	iv	Q7Dx3
7	10	M53-PEG24-CEN09-106	5	iv	Q7Dx3
8	10	M53-PEG24-CEN09-106	15	iv	Q7Dx3

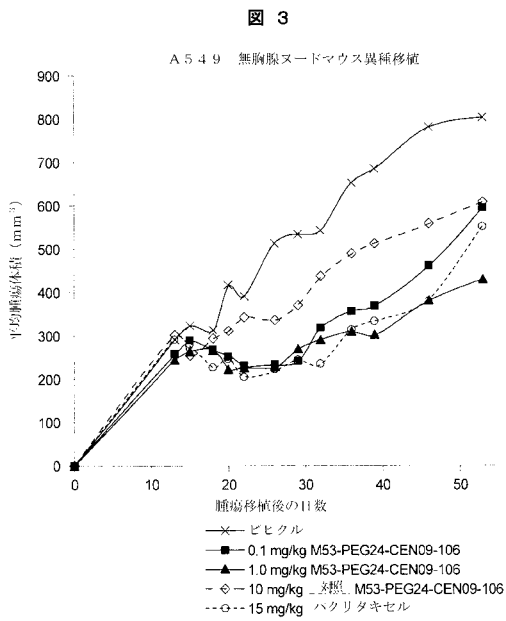
【 図 1 】



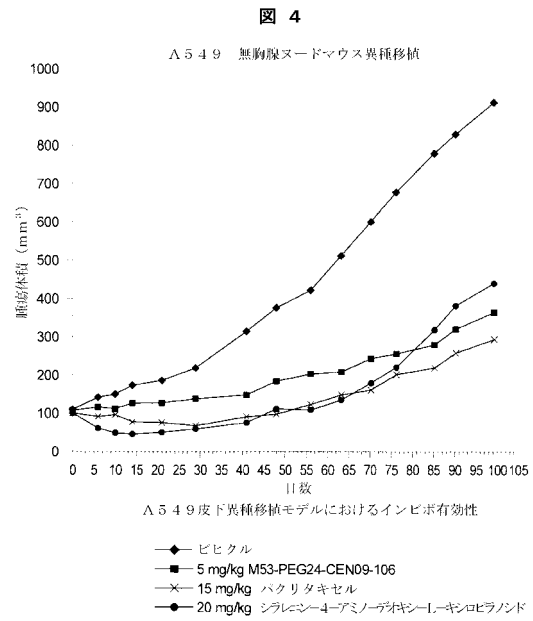
【 図 2 】



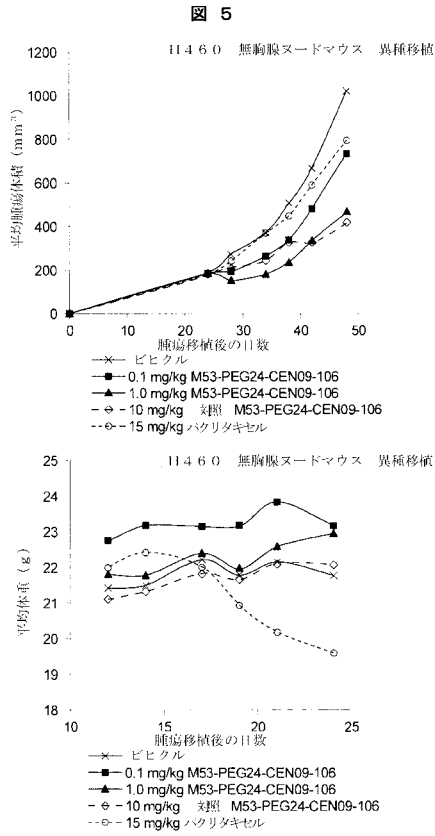
【 図 3 】



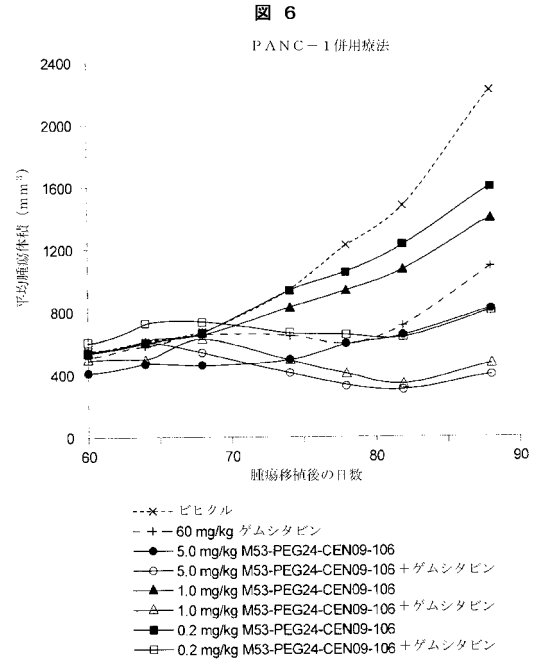
【 図 4 】



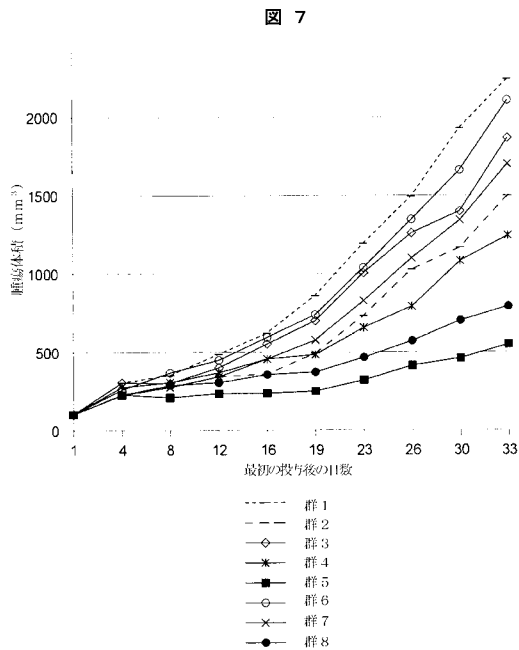
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【配列表】

2014510080000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成26年2月4日(2014.2.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2014510080000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/28585
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 16/00; A61K 39/395 (2012.01) USPC - 530/387.1; 424/133.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 530/387.1; 424/133.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 530/387.1; 424/133.1 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patents/Scholar Search Terms Used: Na K ATPase, dysadherin, cardio glycosides, PEG, digitoxigenin, scillarenin, antibody-drug conjugate, FGFR		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	US 2010/0154071 A1 (Fanidi et al.) 17 June 2010 (17.06.2010) para [0004], [0006], [0148], [0165], [0177], [0258]	1-6, 8-18 7
Y — A	US 2010/0173392 A1 (Boghaert et al.) 08 July 2010 (08.07.2010) para [0242], [0245], Table 3	1-6, 8-18 7
Y — A	WO 2010/017480 A1 (Hutchinson et al.) 11 February 2010 (11.02.2010) para [0024]-[0025], [0037], [0084], [0087]-[0088], [0090], [00103]	1-6, 8-18 7
Y	Smith et al. 'Studies on the localization of the cardiac glycoside receptor' J Clin Invest vol 51 pg 1777-1788; July 1972 (07.1972) abstract, pg 1787, col 2, para 1, pg 1787, col 2, para 2 to pg 1788, col 1, para 1, Fig. 6	4
Y	US 2006/0135441 A1 (Khodadoust et al.) 22 June 2006 (22.06.2006) para [0083], [0086]	15
A	MCCANN et al. GenBank Accession ACN41365.1; 04 March 2009 (04.03.2009); [online] [retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/224365733?report=genbank&log\$=protalign&blast_rank=1&RID=XD655WK9016 on 11 June 2012] whole doc	7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "J" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 June 2012 (11.06.2012)		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">25 JUN 2012</div>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US 12/28585
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/0110682 A1 (YANAGISAWA et al.) 30 April 2009 (30.04.2009) abstract; SEQ ID NO: 11	7
A	YANG et al. UniProt Accession C5BT28; 30 November 2010 (30.11.2010); [online]; downloaded from http://www.uniprot.org/uniprot/C5BT28.txt?version=9 on 11 June 2012	7
A	US 2002/0088978 A1 (VERHOEYEN et al.) 4 July 2002 (04.07.2002) abstract; SEQ ID NOs: 4, 5	7
A	WO 2010/022737 A1 (KLITGAARD et al.) 4 March 2010 (04.03.2010) abstract; SEQ ID NO: 173.	7

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T 4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/7068 (2006.01)	A 6 1 K 31/7068	
A 6 1 K 31/585 (2006.01)	A 6 1 K 31/585	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(31)優先権主張番号 61/551,287

(32)優先日 平成23年10月25日(2011.10.25)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

Fターム(参考) 4C076 BB13 CC27 CC41 DD67 EE23 EE59
 4C084 AA19 MA02 MA66 NA05 NA13 NA14 ZB261 ZC751
 4C085 AA14 AA21 AA24 AA26 BB01 DD51 EE03
 4C086 AA01 AA02 DA13 EA17 MA03 MA05 MA66 NA05 NA13 NA14
 ZB26 ZC75
 4H045 AA11 AA30 BA09 BA57 BA72 CA42 DA76 EA29 FA50 FA74