

(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2017-506640
(P2017-506640A)

(43) 公表日 平成29年3月9日(2017.3.9)

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

F 1

A 61 K 39/395
A 61 K 39/395
A 61 K 39/395
A 61 K 39/395
A 61 K 47/48

テーマコード (参考)

L 4 C 076
N 4 C 085
C 4 C 086
D 4 H 045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-551824 (P2016-551824)
(86) (22) 出願日 平成27年2月17日 (2015.2.17)
(85) 翻訳文提出日 平成28年9月14日 (2016.9.14)
(86) 國際出願番号 PCT/US2015/016212
(87) 國際公開番号 WO2015/123687
(87) 國際公開日 平成27年8月20日 (2015.8.20)
(31) 優先権主張番号 61/946,314
(32) 優先日 平成26年2月28日 (2014.2.28)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 61/940,219
(32) 優先日 平成26年2月14日 (2014.2.14)
(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, マディソン, デミング ウェイ
918
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
(74) 代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
(74) 代理人 230113332
弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞外標的化薬物共役体

(57) 【要約】

C D 3 8 を標的とする細胞外薬物共役体 (E D C) は、癌、及び喘息を含む免疫障害等の疾患の治療において有用である。本開示は、薬剤部分 (薬物、診断薬剤、もしくはその誘導体等の治療薬剤であり得る) 、及び標的化部分 (抗 C D 3 8 抗体もしくはその結合断片等の抗体標的化部分であり得る) が、 N a , K - A T P a s e (例えば、 A T P 1 A 1 、 A T P 1 A 2 、 A T P 1 A 3 、及び A T P 1 A 4 遺伝子を含む、 A T P 1 遺伝子ファミリーによってコードされる) を含有する錯体に結合するか、またはその上で作用する、細胞外標的化薬物共役体または E D C を提供する。

【選択図】図 1

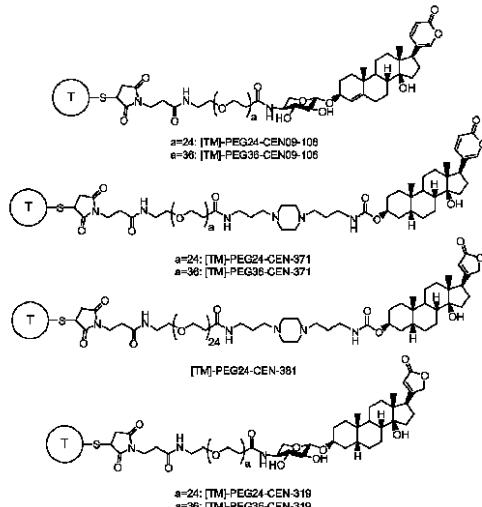


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

安定したまたは開裂不可能なリンカーによって薬剤に結合される標的化部分を含む、細胞外標的化薬物共役体（E D C）であって、前記標的化部分が、C D 3 8に結合し、前記薬剤が、N a , K - A T P a s e に結合するか、またはその活性を修飾する、細胞外標的化薬物共役体（E D C）。

【請求項 2】

前記標的化部分が、S U N 4 B 7 、H B 7 、O K T 1 0 、I B 4 、A T 1 、S A R 6 5 0 9 8 4 、3 8 S B 1 9 、ダラツムマブ、M O R 2 0 2 抗体、及び任意のそれらの結合断片から成る群から選択されるC D 3 8エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む、請求項1に記載のE D C。

10

【請求項 3】

前記標的化部分が、S U N 4 B 7 抗体もしくはその結合断片、またはS U N B 4 7 と同じもしくは実質的に同様のC D 3 8エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である、請求項1に記載のE D C。

【請求項 4】

前記標的化部分が、A T 1 抗体もしくはその結合断片、またはA T 1 と同じもしくは実質的に同様のC D 3 8エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である、請求項1に記載のE D C。

20

【請求項 5】

前記リンカーが、少なくとも1つの窒素ヘテロ原子を含む、いずれかの先行請求項に記載のE D C。

【請求項 6】

前記少なくとも1つの窒素原子が、第3級窒素原子である、請求項5に記載のE D C。

【請求項 7】

前記リンカーが、少なくとも1つのエチレングリコール部分を含む、いずれかの先行請求項に記載のE D C。

【請求項 8】

前記ポリエチレングリコールが、P E G 2 4 またはP E G 3 6 である、請求項7に記載のE D C。

30

【請求項 9】

前記薬剤が、カルデノライドまたは強心ステロイドである、いずれかの先行請求項に記載のE D C。

【請求項 10】

前記強心ステロイドが、ブファリン、ジギトキシゲニン、シラレニン、または前述のうちのいずれかの誘導体である、請求項9に記載のE D C。

【請求項 11】

式(I)の細胞外標的化薬物共役体（E D C）であって、

[標的化部分] - [リンカー] - [薬剤] 式(I)

40

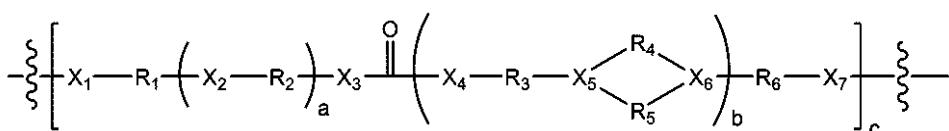
式中、

[標的化部分]が、C D 3 8に結合する抗体であり、

[薬剤]が、強心ステロイドまたはカルデノライドであり、

[リンカー]が、式(II)の式を有し、

【化34】

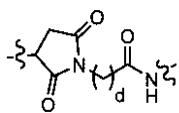


式(II)

式中、X₁が、任意に存在し、存在するとき、

50

【化35】



であり、dが、0～6であり、

X₂、X₃、及びX₄が、各々任意に存在し、存在するとき、アルキル、ケトン、-C(O)NH-、-C(O)NR₈-、-O-、-S-、-NH-、-NR₉-から個々に選択され、R₈及びR₉が、アルキル（例えば、メチル）、ヘテロアルキル、アリール、及びヘテロアリールから個々に選択され、

X₅及びX₆が、CR₁₀及びNから各々個々に選択され、R₁₀が、H、分岐アルキル、非分岐アルキル、飽和アルキル、または不飽和アルキルであり、

X₇が、任意に存在し、存在するとき、-C(O)-、-OC(O)-、-NHCO-、-NR₁₁C(O)-から選択され、R₁₁が、H、分岐アルキル、非分岐アルキル、飽和アルキル、または不飽和アルキルであり、

R₁が、任意に存在し、存在するとき、分岐アルキル、非分岐アルキル、飽和アルキル、または不飽和アルキルから選択され、

R₂、R₃、及びR₆の各々が、任意に存在し、存在するとき、各々が、分岐アルキル、非分岐アルキル、飽和アルキル、及び不飽和アルキルから個々に選択され、

R₄及びR₅の各々が、任意に存在し、存在するとき、分岐アルキル、非分岐アルキル、飽和アルキル、または不飽和アルキルから個々に選択されるが、但し、R₄及びR₅のうちの少なくとも1つが存在しなければならないことを条件とし、

aが0～99であり、

bが0～99であり、

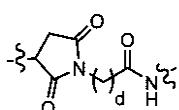
cが0～99である、細胞外標的化薬物共役体（EDC）。

【請求項12】

式中、

X₁が

【化36】



であり、dが2であり、

X₂が-O-であり、

X₃がヌルであり、

X₄が-NH-であり、

X₅及びX₆が、各々Nであり、

R₁、R₂、R₄、及びR₅が、各々-CH₂CH₂-であり、

X₇が-NHCO-であり、

R₃及びR₆が、各々-CH₂CH₂CH₂-であり、

aが24であり、

bが1であり、

cが1である、請求項11に記載のEDC。

【請求項13】

前記標的化部分が、SUN4B7と同じまたは実質的に同じCD38のエピトープに結合する、請求項11または12に記載のEDC。

【請求項14】

前記薬剤がブファリンである、請求項11～13のいずれか1項に記載のEDC。

【請求項15】

10

20

30

40

50

疾患を治療するための方法であって、前記疾患のための治療を必要とする対象に、治療有効量の請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の E D C を投与することを含み、前記疾患が任意に喘息等の免疫疾患である、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

本出願は、2014年2月14日に出願された米国仮特許出願第61/940,219号、及び2014年2月28日に出願された米国仮特許出願第61/946,314号の優先権を主張するものであり、これらの各々の内容全体が、参照により本明細書に組み込まれ、かつそれに依存する。

10

【0002】

本開示は、疾患の治療において、また生体系の評価のためのツールとしても有用な細胞外薬物共役体を提供する。本開示は、生物学、化学、医薬化学、医学、分子生物学、及び薬理学の分野に関する。

【背景技術】

【0003】

発達、免疫、及び腫瘍形成を含む、全ての基本的な生物学的プロセスは、異なる組織及び細胞型における遺伝子の選択的及び差次的発現に関する。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及び／もしくは発現、または増加した産生及び／もしくは発現と関連付けられることが示されている。現代の分子医学の目標のうちの1つは、薬物の非標的毒性効果を低減または排除するように、選択的に薬物を標的化するための方法を見出すことである。抗体、ペプチド、またはアプタマー等の標的化部分を使用して、罹患した細胞型に特有の、またはそれにおいて高いレベルで発現する特定の標的に薬物を送達することが、調査されている。これらの標的化部分を直接、リンカーを通じて薬物に、またはナノ粒子に結合させることが、調査されている。

20

【0004】

疾患の治療のための新たな細胞外標的化薬物共役体（E D C）に対する必要性が存在する。本開示は、この必要性を満たす。Na, K-ATPase と細胞表面上の細胞シグナル伝達経路タンパク質との間のタンパク質・タンパク質相互作用を識別及び評価するための方法及び試薬に対する必要性もまた依然として存在する。本開示はまた、この必要性も満たす。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示は、概して、式（I）と一致し、かつ3つの部分：標的化部分の部分（例えば、式（I）中の「標的化部分」）、開裂不可能なリンカー部分（例えば、式（I）中の「リンカー」）、及び治療または診断薬剤部分（例えば、式（I）中の「薬剤」）を含む、細胞外標的化薬物共役体（E D C）に関し、3つの部分は、概して、以下のとおりに関連付けられる。

40

【化1】

〔標的化部分〕 - 〔リンカー〕 - 〔薬剤〕

式（I）

【0006】

別の態様において、本開示は、薬学的製剤含む組成物、ならびに疾患の治療において有用である、本明細書に開示されるような式（I）と一致する E D C を含む単位用量形態及び薬物送達系を提供する。

【0007】

本開示のこれらの及び他の態様ならびに実施形態を、以下で詳細に説明する。

50

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】本開示の種々のEDCに対する構造を示す。

【図2】SU-DHL-8細胞における本開示の抗CD38標的EDCの比較である。

【図3】SU-DHL-8細胞における本開示の抗CD38標的EDCの比較である。

【図4】Ramos細胞における本開示の抗CD38標的EDCの比較である。

【図5】本開示に従う1つのEDC(SUN4B7-P EG24-CEN09-106)に関する薬物動態プロットである。

【図6】本開示に従う1つのEDC(SUN4B7-P EG24-CEN371)に関する薬物動態プロットである。

【図7】本開示の種々のEDCに対する腫瘍移植後の日数の関数としての2,000mm³未満のサイズの腫瘍を有する腫瘍誘導動物の数のプロットである。

【図8】本開示の種々のEDCに対する腫瘍移植後の日数の関数としての平均腫瘍体積のプロットである。

【図9】ATRAの添加を伴わない、ヒト急性骨髓性白血病細胞株MV4-11における本開示の抗CD38標的EDCに関する、インビトロ活性の比較である。

【図10】ATRAの添加を伴わない、細胞株MV4-11における本開示の抗CD38標的EDCに関するインビトロ活性の比較である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本開示は、薬剤部分(薬物、診断薬剤、もしくはその誘導体等の治療薬剤であり得る)及び標的化部分(抗CD38抗体もしくはその結合断片等の抗体標的化部分であり得る)が、Na₊K-ATPase(例えば、ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、及びATP1A4遺伝子を含む、ATP1遺伝子ファミリーによってコードされる)を含有する錯体に結合するか、またはその上で作用する、細胞外標的化薬物共役体またはEDCを提供する。EDCは、様々な用途、特に、癌、ならびに喘息及び肺の炎症を伴う他の疾患を含む肺疾患、ならびに他の医学的状態等のヒト疾患の治療において有用である。

【0010】

本開示は、安定した、または開裂不可能なリンカー(例えば、その最大の治療効果を与えるように、EDCに対して、無傷であるか、もしくは開裂していないリンカー)を介して薬剤に結合される標的化部分を含むEDCを提供する。種々の実施形態において、標的化部分は、CD38を標的とし、抗体、即ち、抗CD38抗体またはその結合断片である。これらのEDCは、Na₊K-ATPase及びCD38の錯体上で作用する。本開示のEDCは、薬剤を、単独で投与される薬剤よりも、選択に標的細胞及び組織に送達する。多くの実施形態において、EDCは、細胞シグナル伝達経路を調節する際にNa₊K-ATPaseと会合するとき、CD38に結合する(例えば、特異的に結合する)標的化部分を含有し、かつ安定した、もしくは開裂不可能なリンカーを介して標的化部分に結合される、Na₊K-ATPaseに(もしくはNa₊K-ATPaseとの相互作用をブロックするタンパク質結合部位に)結合する、強心ステロイドまたは強心グリコシド等の薬剤を含有する。種々の実施形態において、リンカーは、1つ以上の窒素等のヘテロ原子、またはアミノグリコシド等のグリコシドを含む。

【0011】

このため、本開示のEDCの3つの部分は、(1)CD38を含むが、これに限定されない、Na₊K-ATPaseではなく、かつ関心対象の疾患もしくは他の状態においてNa₊K-ATPaseと会合し、それにごく近接する、細胞外標的に結合する、標的化部分と、(2)EDCがその標的に結合するために必要とされる時間中、標的化部分を治療薬に接続し、無傷の(開裂していない)ままである、安定した、もしくは開裂不可能なリンカーと、(3)強心ステロイドもしくは強心グリコシド等のNa₊K-ATPase(Na₊K-ATPaseとの会合を制御する関連タンパク質上の部位)上で作用するか、またはそれに結合する、治療(もしくは診断)薬剤と、を含み得るか、本質的にそれら

10

20

30

40

50

から成り得るか、またはそれらから成り得る。

【0012】

第PCT公開第2010/017480号、第2011/031870号、第2012/122514号、及び第2012/178173号、ならびに本明細書に引用される全ての他の特許、特許出願、及び科学文献からの参考文献は、それらの全体として、参照により本明細書に組み込まれる。

【0013】

I. 定義

「抗体」という用語は、抗原のエピトープに特異的に結合し、それを認識する、免疫グロブリン遺伝子またはその断片（遺伝子工学によって產生されるその非自然発生形態を含む）によってコードされる、1つ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は、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン、及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を含む。軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかとして分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンとして分類され、これは、同様に、免疫グロブリンクラスである、IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEをそれぞれ定義する。典型的に、抗体の抗原結合領域は、結合の特異性及び親和性において最も重要である。抗体は、IgG（IgG₁、IgG₂、IgG₃、及びIgG₄を含む）、IgA（IgA₁及びIgA₂を含む）、IgD、IgE、またはIgM、ならびにIgYを含む。本明細書で使用される際、「抗体」という用語は、単鎖抗体を含む全抗体、及びその抗原結合断片を含むことを意味する。抗体はまた、抗原結合抗体断片であり得、Fab、Fab'、及びF(ab')₂、Fd、単鎖Fvs(scfv)、単鎖抗体、ジスルフィド結合Fvs(sdfv)、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、及びV_LまたはV_Hドメインのいずれかを含む断片、ならびにナノボディを含むが、これらに限定されない（PCT公開第WO 94/04678号及びNature Medicine, V9(1) pp 129-134, 2003を参照されたい）。抗体は、鳥類及び哺乳類を含む、任意の動物起源からであり得る。典型的に、商業的または研究使用における抗体は、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、本明細書で使用される際、モノクローナル、免疫吸着ポリクローナル、キメラ、及びヒト化抗体、ならびに無傷抗体及び単離抗体を含む。抗体は、单一特異性、二重特異性、三重特異性、またはそれ以上の多特異性であり得る。

【0014】

「抗原」という用語は、抗体または標的化部分が結合する物質または標的を指す。抗原は、抗体または標的化部分によって結合されるその能力によって特徴付けられる。抗原はまた、抗原での免疫化を通じた抗原特異的抗体の產生等の標的化部分の產生を惹起するために使用される物質を意味し得る。抗原は、多くの実施形態において、受容体を含むが、これに限定されないタンパク質である。

【0015】

「抗原結合部位」または「エピトープ」という用語は、抗体等の標的化部分が結合する抗原の部分を指す。

【0016】

「結合する（bind）」、「結合する（binds）」、及び「特異的に結合する（specifically binds）」という用語は、それが非標的に結合するよりも大きい親和性で細胞外標的に結合する標的化部分の能力を指す。ある実施形態において、特異的結合は、非標的にに対する親和性よりも少なくとも10、50、100、250、500、または1000倍大きい親和性での細胞外標的にに対する結合を指す。

【0017】

「結合親和性」という用語は、その会合及び解離定数の関数としての抗体（または他の標的化部分もしくは薬物もしくは他の薬剤）と、その抗原（または標的）との間の相互作

10

20

30

40

50

用の強度を指す。より高い親和性は、典型的に、標的化部分が、速いオンレート（会合）及び遅いオフレート（解離）を有することを意味する。結合親和性は、それらの条件下で抗原または抗体／標的化部分に生じる変化による種々の生理学的条件下で変化し得る。標的化部分の結合親和性はまた、治療薬剤及び／またはリンカーが結合されるときにも変化し得る。結合親和性はまた、アミノ酸配列の変化または抗原のグリコシル化等の若干の変化が抗原に生じるときにも変化し得る。一般的に、本開示のE D Cの標的化部分及び薬剤は、それらのそれぞれの標的にに対する高い結合親和性を有する。

【0018】

「癌」という用語は、細胞の制御されていない異常な増殖、罹患細胞が局所的に、または血流及びリンパ系を通じて身体の他の部分に広がる（例えば、転移する）能力によって特徴付けられるいくつかの疾患のうちのいずれか、ならびにいくつかの特徴的な構造的及び／または分子特性のうちのいずれかを指す。「癌性細胞」または「癌細胞」は、特異的な構造的特性を有する細胞として理解され、これは、分化を欠き、かつ浸潤及び転移が可能であり得る。癌の例は、乳、肺、脳、骨、肝臓、腎臓、結腸、及び前立腺癌である（全ての目的で、その全体として参照により本明細書に組み込まれる、DeVita, V. et al. (eds.), 2005, *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 6th. Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PAを参照されたい）。

10

【0019】

「キメラ抗体」という用語は、1つの種（典型的にマウス）からのモノクローナル抗体のFc定常領域が、組み換えDNA技術を使用して、別の種（典型的にヒト）の抗体からのFc領域で置き換えられている抗体を指す。例えば、マウスモノクローナル抗体をコードするcDNAは、Fc定常領域をコードする配列を除去するように特異的に選択される制限酵素で消化され、ヒトFc定常領域をコードするcDNAの同等の部分は、置換される。CDRグラフト抗体は、いわゆる「アクセプタ」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、CDR「グラフト」によって置き換えられている抗体である。一般的に、ドナー及びアクセプタ抗体は、異なる種からのモノクローナル抗体であり、典型的に、アクセプタ抗体は、ヒト抗体であり（ヒトにおいてその抗原を最小化するように）、この場合、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、アクセプタ抗体の单一のV_HもしくはV_L内の单一のCDR（もしくは更には単一のCDRの一部分）であり得るか、またはV_H及びV_Lの一方もしくは双方内の複数のCDR（またはその部分）であり得る。CDRグラフト及びヒト化抗体を生成するための方法は、参照により本明細書に組み込まれる、Queen et al.の米国特許第5,585,089号、米国特許第5,693,761号、及び米国特許第5,693,762号、ならびにWinterの米国特許第5,225,539によって教示されている。「抗体」へのいずれも言及も、キメラ抗体への言及を示唆する。

20

30

【0020】

「ごく近接」という用語は、例えば、標的化部分（X）及び治療薬剤（Y）がリンカーを通じて共役される、ならびにX及びYの双方が、それらのそれぞれの標的に結合されるとき、共役体が、XまたはYのいずれか単独によって誘導されるものとは異なる、及びそれよりも優れた、所望の生物学的または医学的応答を誘導するように、物理的に近接している2つの標的X及びYを指す。一実施形態において、達成される生物学的または医学的応答は、標的化部分または治療薬剤のいずれか単独によって観察されるものよりも大きい。別の実施形態において、達成される生物学的または医学的応答は、標的化部分及び治療薬剤の相加効果によって観察されるものよりも大きい。例えば、X及びYが異なる分子上に位置するが、分子が同じ多分子錯体内に存在するとき、標的は、本明細書で定義されるように、「ごく近接」している。別の実施例において、X及びYが、互いから200以下のオングストローム以内で同じ細胞上にあり、かつシグナルを伝送する、またはそうでな

40

50

ければ生化学的応答を生成するように共に作用するとき、標的は、本明細書で定義されるように、互いに「ごく近接」している。X及びYが、異なる細胞上にある（及び／または互いと相互作用しない）とき、それらは、本明細書で定義されるようには「ごく近接」していない。

【0021】

「有効量」という用語は、対象に投与されたときの疾患段階または状態のいずれかの症状、態様、パラメータ、または特徴において、いずれかの検出可能な、プラスの治療効果を有することが可能である、単独での、または薬学的組成物の一部としてのいずれかのEDCの量を指す。かかる効果は、有益であるために絶対的である必要はない。

【0022】

「エピトープ」という用語は、通常、特異的な3次元構造特徴、ならびに特異的な電荷特徴を有し、かつモノクローナル抗体によって特異的に結合することが可能である、抗原の表面におけるアミノ酸残基または糖側鎖等の分子の基を指す。

【0023】

「細胞外」と「細胞表面」という用語は、細胞膜の外側部分上、または循環構造の流体中に位置する、タンパク質、抗原、もしくはエピトープを指す（例えば、アンジオテンシン変換酵素は、細胞外タンパク質である）。

【0024】

「細胞外標的」という用語は、細胞膜上、または循環構造の流体中に位置する、タンパク質、ガングリオシド、抗原、及び／またはエピトープ等のNa_xK₋ATPaseではない標的を指す。例えば、かつ限定することなく、以下は、細胞外標的である：細胞表面受容体、細胞表面イオンチャネル、CD（分化抗原類（cluster of differentiationまたはdesignation））略称タンパク質。より具体的に、かつ再度限定することなく、CD38は、細胞外標的である。

【0025】

「細胞外標的化薬物共役体」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標的化部分が、安定した、または開裂不可能なリンカーを介して、細胞外標的に結合する薬物または他の薬剤に結合される、本開示の薬物共役体を指す。本開示の種々の実施形態において、EDCは、CD38抗体またはその結合断片である標的化部分を介してCD38を標的とし、かつ強心ステロイド（cardiotonic steroid）である薬剤を介して、Na_xK₋ATPaseを標的とする。

【0026】

「免疫障害」は、任意の炎症性疾患もしくは他の疾患、または免疫系が不適切に機能している望ましくない状態を指す。本開示のEDCは、概して、免疫障害を治療する際に有用である。多くの癌は、免疫障害を伴う。他の免疫障害は、炎症が原因要素である肺の疾患、または望ましくない症状を含む。本開示の種々のEDCは、喘息を含む、肺の免疫障害を治療する際に有用である。

【0027】

「無傷抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重（H）鎖及び2つの軽（L）鎖を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書においてHCVRまたはV_Hとして略称される）及び重鎖定常領域から成る。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH₁、CH₂、及びCH₃から成る。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書においてLCVR^XまたはV_Lとして略称される）及び軽鎖定常領域から成る。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、C_Lから成る。V_H及びV_L領域は、より保存された、フレームワーク領域（FR）と称される領域が散在した、相補性決定領域（CDR）と称される超可変性の領域に更に細分され得る。各V_H及びV_Lは、アミノ末端からカルボキシル末端に以下の順序で構成される3つのCDR及び4つのFRから成る：FR1、CDR₁、FR₂、CDR₂、FR₃、CDR₃、FR₄。重鎖及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有する。抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクタ細胞）及び古典的な補体系の第1成分（C1q）を含む、免疫グロブリンの宿

主組織または因子への結合を媒介し得る。結合断片の例としては、(i) F_ab断片である、V_L、V_H、C_L、及びC_H1ドメインから成る一価断片、(ii) F(ab')₂断片である、ヒンジ領域でジスルフィドブリッジによって結合される2つのF_ab断片から成る二価断片、(iii) V_H及びC_H1ドメインから成るF_d断片、(iv) 抗体の単一のアームのV_L及びV_Hドメインから成るF_v断片、(v) V_Hドメインから成るd_Ab断片(Ward et al., Nature 341: 544-546, 1989)、ならびに(vi) 単離された相補性決定(complementarily determining)領域(CDR)が挙げられるが、これに限定されない。本明細書で使用される際、抗体へのいずれの一般的な言及も、いずれの型の無傷抗体(自然発生、組み換え、キメラ、またはヒト化)ならびに結合断片を指す。

10

【0028】

「修飾された抗体」という用語は、例えば、抗体の一部分を欠失、付加、または置換することによって修飾されている、モノクローナル抗体、キメラ抗体、及びヒト化抗体等の抗体を指す。例えば、抗体は、定常領域を欠失させ、かつそれを、抗体の半減期、例えば、血清半減期、安定性、または親和性を増加させることができることが意図される定常領域で置き換えることによって、修飾することができる。治療薬剤の複数の分子または複数の異なる薬剤は、1つの抗体分子に結合させることができる。例えば、異なる部分を、同じリンカーを介して抗体分子に結合させることができるか、または結合のための複数の部位を提供する複数のリンカー(例えば、デンドリマー)を使用することができる。「抗体」へのいずれも一般的な言及も、「修飾された抗体」への言及を示唆する。

20

【0029】

「調節する」という用語は、例えば、細胞シグナル伝達経路の活性を限定もしくは低減する(例えば、阻害する)、または増加させることを含む、直接的にまたは間接的に、細胞シグナル伝達経路を改変するためのEDCと細胞外標的及びNa₊、K-ATPaseとの相互作用を指す。

【0030】

「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単一の結合特異性及び親和性を提示する。「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、ヒト生殖細胞免疫グロブリン配列に由来する可変及び定常領域(存在する場合)を有する、単一の結合特異性を提示する、抗体を指す。ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合されたヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入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たB細胞を含む、ハイブリドーマによって产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を通じて产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、いずれの真核、原核も含む單一クローン、またはファージクローンに由来する抗体を指し、それが产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、組み換え、及びファージ提示技術の使用を含む、当該技術分野において既知の多種多様な技術を使用して調製することができる。「抗体」へのいずれも言及も、「モノクローナル抗体」への言及を示唆する。

30

【0031】

「非内在化標的化部分」または「非内在化抗体」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及びpH7で)下において、細胞の外側の抗原に、循環構造内で、または細胞表面上で、反応する(結合する)特性を有する、かつ、その標的抗原に結合されるとき、細胞に進入せず、リソソームで分解しない、標的化部分または抗体をそれぞれ指す(Cancer Res 2009; 69(6): 2358-64を参照されたい)。この文脈において、「内在化する」と「内在化」は、材料が細胞に進入し、分解し、非共役薬剤を放出するプロセスを指す。一実施形態において、標的化部分または抗体は、その標的抗原に結合されるとき、細胞に进入せず、エンドソームに内在化されない。「非内在化標的化部分」または「非内在化抗体」の標的は、本明細書において「非内在化標的」と称され、これは、標的化部分または抗体への結合の結果として、リソソームの中

40

50

へ内在化されない標的である。しかしながら、非内在化標的は、他の生物学的プロセスにおいて、細胞の中へ内在化され得る。非内在化標的の例としては、CD38が挙げられるが、これに限定されない。

【0032】

「非内在化薬剤」という用語は、細胞の中へ内在化されることなく、インビボまたはインビトロで生理学的条件(37及びpH7で)下において、その標的と反応する(典型的に、その受容体への結合を介して)特性を有する、薬剤(例えば、薬物等の治療薬剤)を指す。

【0033】

送達される薬物の量の文脈における「薬学的有効量」及び「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導することができる、薬物の量を指す。

10

【0034】

「ポリクローナル抗体」という用語は、抗原に対して1つを超える(2つ以上の)異なる抗体の調製物を指す。かかる調製物は、様々な異なる抗原結合部位に結合する抗体を含む。

【0035】

「受容体」という用語は、1つ以上の特定の種類のシグナル伝達分子が結合し得る、血漿膜または細胞の細胞質のいずれかに埋め込まれる、細胞外標的タンパク質分子を指す。各細胞は、典型的に、多くの異なる種類の多くの受容体を有する。

20

【0036】

「循環構造において安定した」という用語は、分解に抵抗するためのEDC等の化合物の特性を指し、かつ、例えば、化合物の約50%未満、または約20%未満、または典型的に約2%未満が、約37で少なくとも約2時間、循環血液中で分解または開裂することを意味する。

【0037】

「実質的に同時に」という用語は、同じ時間に、または比較的狭い時間フレーム内に生じる2つ以上の事象を指す。種々の実施形態において、実質的に同時にとは、互いの約60、約40、約30、約20、約10、約5、約2、もしくは約1秒、または約1秒未満以内に生じる2つ以上の事象を指す。例えば、本開示のEDCは、標的化部分結合及び薬剤(薬物)作用が実質的に同時に発生するような特性を有する。

30

【0038】

「相乗的に」という用語は、単独で使用されるときの双方の薬剤の効果の合計よりも大きい、組み合わされて使用されるときの2つ以上の薬剤の効果を指す。例えば、本開示のEDCにおいて、リンカーを通じて結合されるときの標的化部分及び薬剤(薬物)の相互作用の組み合わされた治療効果は、単独で使用されるときの標的化部分及び薬剤の組み合わされた個々の効果よりも大きい。「効果」は、結合、治療効果、及び/または特異性のいずれも指し得る。

【0039】

「標的」という用語は、標的化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、治療薬剤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。薬剤及び標的化部分は、「標的錯体」において異なる標的に結合し、「標的錯体」は、インビボで互いと物理的にごく近接している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錯体中の2つの異なるタンパク質等の2つ以上の分子を指す。

40

【0040】

「標的細胞」という用語は、病理に関与し、かつそのため、治療活性に対する好ましい標的である、細胞を指す。標的細胞は、例えば、かつ限定することなく、以下の群の細胞のうちの1つ以上であり得る:原発性もしくは続発性腫瘍細胞(転移)、原発性もしくは続発性腫瘍の間質細胞、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

50

、多形核白血球、及びリンパ球、ならびに腫瘍及び腫瘍転移に浸潤する多核薬剤。

【0041】

「標的化部分」及び「標的薬剤」という同義的な用語は、抗体、アブタマー、ペプチド、または標的に特異的に結合する他の物質を指す。標的化部分は、標的（即ち、その結合断片）または非抗体標的化部分（例えば、アブタマー、ペプチド、もしくは標的に特異的に結合する他の物質）に特異的に結合する、抗体標的化部分（例えば、抗体またはその断片であり得る。

【0042】

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

10

【0043】

「治療薬剤」及び「薬物」及び「薬剤」という用語は、治療有効量で存在するとき、作用部位に結合すると、治療効果をもたらし、その作用部位が、標的細胞の表面または内側に位置するか、またはその効果が、そこに与えられる化合物を指すように、本明細書において同義的に使用される。例として、治療薬剤は、化学的薬剤、例えば、抗生物質もしくは抗癌剤、ポリペプチド、タンパク質、または核酸であり得る。

【0044】

「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低減、排除、及び／または予防を指す。

20

【0045】

「半減期時間を増加させる」という用語は、参照化合物と比較して、血液中の化合物、典型的に治療薬剤の平均滞留時間を増加させること、または血液もしくは血漿クリアランスを低減することを意味する。

【0046】

「治療する」及び「治療」という用語は、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患への素因を治癒する、回復させる、軽減する、緩和する、改善する、修復する、改善する、向上させる、またはそれに影響を及ぼす目的での、疾患もしくは障害（例えば、癌もしくは転移性癌）、疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは障害への素因を有する患者への治療薬剤もしくは組成物の投与を指すように、同義的に使用される。癌もしくは転移性癌を「治療する」または「治療」は、症状の除去、寛解、縮小等のいずれの客観的もしくは主観的パラメータを含む、癌の治療もしくは改善もしくは、または疾患状態を患者にとってより許容可能にすること、悪化もしくは衰退の速度の減速、または悪化の最終点をより弱体化させることを指す。症状の治療または改善は、医師による検査の結果を含む、客観的もしくは主観的パラメータに基づき得る。したがって、「治療する」という用語は、腫瘍性疾患を含むが、これに限定されない、疾患に関連する症状もしくは状態の発症をもしくは遅延、軽減、または阻止もしくは阻害するための治療薬剤の投与を含む。

30

【0047】

「腫瘍特異的抗原」という用語は、腫瘍に特有であるか、または正常細胞に対して、腫瘍細胞上で少なくともより豊富である、タンパク質または他の分子を指す。

40

【0048】

I I . N a , K - A T P a s e 及び細胞シグナル伝達経路

N a , K - A T P a s e は、イオンチャネル及びシグナル伝達物質として機能する。N a , K - A T P a s e は、最初は、濃度勾配に対して、カリウムイオンを取り込み、ナトリウムイオンを排出するだけであると考えられていたが、最近では、細胞膜にわたってシグナルを伝送することも示されている、内在性膜貫通タンパク質酵素である。酵素は、3つのサブユニット：触媒コア、及びステロイド化合物に対する主要な標的であるアルファ；アルファサブユニットを特定の細胞表面位置に輸送すると考えられ、かつアルファサブユニット活性に必要とされる、ベータサブユニット；ならびに補足的サブユニットであり、かつ様々な細胞型特異的アイソタイプで存在する、ガンマサブユニットから成る。強心

50

(心臓作用性) グリコシドの Na₊ , K - ATPaseへの主要な結合部位は、膜貫通ヘリックスM1、M2、M4、M5、及びM6によって形成されるくぼみに位置する [Proc. Natl. Acad. Sci. , 2009 , 106 , 13742 - 13747] 。強心グリコシドは、Na₊ , K - ATPaseを標的とする。しかしながら、強心グリコシドの治療ウインドウは、小さい。実際、認可された強心グリコシド(例えば、ジゴキシンまたはプロスシラリジン)は、投与に対して認可されたレベルの2~3倍のみで、患者の死亡を引き起こし得る。Anesth Prog. 2007 Spring ; 54 (1) : 19 - 24 。

【0049】

本開示は、Na₊ , K - ATPaseが、CD38と密接に会合(錯化)し、かつそれと共に作用して、細胞シグナル伝達経路を調節する、ならびにかかる錯体を標的とするEDCが、特に、癌、及び喘息等の免疫障害の治療において、顕著な治療活性を有するという発見に、部分的に起因する。本開示のEDCにおいて有用な標的化部分を、以下の項で説明する。

10

【0050】

I I I . 標的化部分

本開示のEDCの多くの実施形態において、標的化部分は、限定することなく、標的結合時に内在化を誘導せず、かつこのため、一度その細胞外標的に結合されると、リソソームに内在化されない、ヒト、マウス、ヒト化、もしくはキメラ抗体であり得る。

20

【0051】

本開示のEDCは、それらが含有する薬物よりも選択的である、及び/または特性が少ない。本開示のEDCにおいて、標的化部分及び/またはリンカーは、標的化部分がその標的に結合するまで、薬物の治療(かつそのため毒性の非標的を低減する)効果を効果的に防止または劇的に低減し得る。これは、Na₊ , K - ATPaseが、無数の他のシグナル伝達タンパク質と相互作用し、著しい望ましくない「非標的」効果に対する潜在性を創出するという発見を考慮すると、本開示の特に重要な態様である。このため、本開示のEDCは、標的化部分がその標的に結合され、治療薬剤の標的にごく近接しているとき、及びEDCが無傷であるときのみに、主に活性である。総合すれば、Na₊ , K - ATPaseに作用する潜在性は、抗体がその標的に結合するときに、著しく高いに過ぎないため、これらの特徴は、より特異的かつより毒性が低いEDCを可能にする。本開示のEDCは、薬剤及び抗体標的部位の双方が存在し、かつEDCが治療効果を与えるために、互いにごく近接している必要があるため、より選択的である。本開示のEDCは、薬剤が、安定したリンカーを通じて、選択的にその標的に結合する標的化部分に結合され、薬剤をごく近接した状態に保ち、このため、そのごく近接したNa₊ , K - ATPasesのみに作用することができるため、より毒性が低い。

30

【0052】

EDCの標的化部分は、細胞シグナル伝達経路を調節するようにNa₊ , K - ATPaseと会合する、CD38等の抗原を標的とする。

【0053】

CD38(環状ADPリボースヒドロラーゼとしても既知である)は、多くの免疫細胞の表面で見出される300アミノ酸(45kD)糖タンパク質であり、CD38遺伝子によってコードされる。CD38は、外酵素として作用する細胞外ドメインであり、ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドのニコチニアミド、アデノシン二リン酸リボース、及び環状アデノシン二リン酸リボースへの変換を触媒する、I I型膜貫通糖タンパク質である。慢性リンパ球白血病(CLL)において、CD38発現は、不良な予後を表す。CLLは、より効果的な治療が必要とされる致死的な疾患である。本開示は、この必要性を満たす。CD38は、多くの造血器悪性(hematopoietic)腫瘍において、かつ非ホジキンリンパ腫(NHL)、バーキットリンパ腫(BL)、多発性骨髄腫(MM)、B慢性リンパ球白血病(B-CLL)、B及びT急性リンパ球白血病(ALL)、T細胞リンパ腫(TCL)、急性骨髄性白血病(AML)、有毛細胞白血病(HCL)、ホジキン

40

50

ンリンパ腫(H L)、ならびに慢性骨髓性白血病(C M L)を含む、種々の造血器悪性腫瘍に由来する細胞株において上方制御される。一方、造血系のほとんどの原始的な多能性幹細胞は、 C D 3 8 陰性である。造血器悪性腫瘍における C D 3 8 発現及びその疾患の進行との相関は、 C D 3 8 を、抗体療法に対するより魅力的な標的にする(*J . B i o l . C h e m . 2 0 1 1 , 2 8 6 : 2 2 1 7 0 - 2 2 1 7 7*)。

【 0 0 5 4 】

CD 3 8 は、 C a ^{2 +} 移動(*M . Morra et al . , 1 9 9 8 , F A S E B J . , 1 2 : 5 8 1 - 5 9 2 ; M . T . Z i l b e r et al . , 2 0 0 0 , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 9 7 : 2 8 4 0 - 2 8 4 5*)、ならびにリンパ性及び骨髓性細胞もしくは細胞株におけるホスホリパーゼ C - 、 Z A P - 7 0 、 s y k 、及び c - c b 1 を含む、多数のシグナル伝達分子のチロシンリン酸化を通じたシグナル伝達(*A . F u n a r o et al . , 1 9 9 3 , E u r J I m m u n o l , 2 3 : 2 4 0 7 - 2 4 1 1 ; M . M o r r a et al . , 1 9 9 8 , F A S E B J . , 1 2 : 5 8 1 - 5 9 2 ; A . F u n a r o et al . , 1 9 9 0 , J I m m u n o l , 1 4 5 : 2 3 9 0 - 2 3 9 6 ; M . Z u b i a u r et al . , 1 9 9 7 , J I m m u n o l , 1 5 9 : 1 9 3 - 2 0 5 ; S . D e a g l i o et al . , 2 0 0 3 , B l o o d 1 0 2 : 2 1 4 6 - 2 1 5 5 ; E . T o d i s c o et al . , 2 0 0 0 , B l o o d , 9 5 : 5 3 5 - 5 4 2 ; M . K o n o p l e v a et al . , 1 9 9 8 , J I m m u n o l , 1 6 1 : 4 7 0 2 - 4 7 0 8 ; M . T . Z i l b e r et al . , 2 0 0 0 , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 9 7 : 2 8 4 0 - 2 8 4 5 ; A . K i t a n a k a et al . , 1 9 9 7 , J I m m u n o l , 1 5 9 : 1 8 4 - 1 9 2 ; A . K i t a n a k a et al . , 1 9 9 9 , J I m m u n o l , 1 6 2 : 1 9 5 2 - 1 9 5 8 ; R . M a l l o n e et al . , 2 0 0 1 , I n t I m m u n o l , 1 3 : 3 9 7 - 4 0 9*)に関与することが報告されている。これらの観察に基づき、 CD 3 8 は、それらの正常な発達中のリンパ性及び骨髓性細胞の成熟及び活性化における重要なシグナル伝達分子であると提唱された。

【 0 0 5 5 】

シグナル伝達及び造血における CD 3 8 の正確な役割は、特に、これらのシグナル伝達研究のほとんどが、非生理学的リガンドである、 CD 3 8 及び抗 CD 3 8 モノクローナル抗体を異所的に過剰発現する細胞株を使用していたため、文献では依然として明確ではない。 CD 3 8 タンパク質は、 C a ^{2 +} 移動を誘導し得る分子である c A D P R を産生する酵素活性を有するため(*H . C . L e e et al . , 1 9 8 9 , J B i o l C h e m , 2 6 4 : 1 6 0 8 - 1 6 1 5 ; H . C . L e e and R . A a r h u s , 1 9 9 1 , C e l l R e g u l , 2 : 2 0 3 - 2 0 9*)、モノクローナル抗体による CD 3 8 結紮が、 c A D P R の産生を増加させることによって、リンパ球における C a ^{2 +} 移動及びシグナル伝達を引き起こすことが提唱されている(*H . C . L e e et al . , 1 9 9 7 , A d v E x p M e d B i o l , 4 1 9 : 4 1 1 - 4 1 9*)。この仮説とは対照的に、 CD 3 8 タンパク質の切断及び点突然変異分析は、その細胞質尾部もその酵素活性も、抗 CD 3 8 抗体によって媒介されるシグナル伝達には必要ではないことを示した(*A . K i t a n a k a et al . , 1 9 9 9 , J I m m u n o l , 1 6 2 : 1 9 5 2 - 1 9 5 8 ; F . E . L u n d et al . , 1 9 9 9 , J I m m u n o l , 1 6 2 : 2 6 9 3 - 2 7 0 2 ; S . H o s h i n o et al . , 1 9 9 7 , J I m m u n o l , 1 5 8 , 7 4 1 - 7 4 7*)。

【 0 0 5 6 】

CD 3 8 ノックアウトマウスを生成した。これらの動物は、組織関連 N A D a s e 活性のほぼ完全な喪失を示す。それにもかかわらず、これらの動物は生存可能であり、 CD 3 8 及びその活性が、生存に必要ではないという結論を導き出す。しかしながら、これらのマウスは、樹状細胞遊走の欠損により、それらの先天性免疫の欠損、及び低減された T 細胞依存性液性応答を呈する(*S . P a r t i d a - S a n c h e z et al . , 2 0 0 4 , I m m u n i t y , 2 0 : 2 7 9 - 2 9 1 ; S . P a r t i d a - S a n c h e z* 50

et al. , 2001 , Nat Med , 7 : 1209 - 1216) 。

【 0057 】

抗癌剤の発見及び開発における最近の進歩にもかかわらず、CD38発現腫瘍を含む多くの形態の癌は、依然として、不良な予後を有する。CD38は、骨髄腫のほとんどの症例、AIDS関連のリンパ腫の一部の症例、及び移植後のリンパ増殖の多くの症例を含む、様々なリンパ性腫瘍によって、高いエピトープ密度で発現する。正常細胞とそれらの白血病対応物との間の細胞表面発現における際立った量的差異は、CD38を、免疫療法治療のための魅力的な標的とした。

【 0058 】

CD38はまた、機関紙過敏症及び気道炎症等の喘息の主な特性に関与し、かつ喘息に対する新たな潜在的な治療標的を表し得る。異常なCD38活性及び/または発現は、喘息を有する患者において観察される気道狭窄を強調し得る。CD38は、喘息の病因において重要である、IL-6及びRANTES等の異なる炎症性遺伝子の制御における役割を有し得る。TNF 及びIFN等の前端息サイトカインは、NF- κ B活性化によって、CD38タンパク質及びmRNAレベルの双方を相乗的に増加させる。一方、CD38発現は、NF- κ Bの阻害を介して、抗炎症性グルココルチコイドによって減少する。CD38発現はまた、炎症関連のステロイド耐性に関与する。CD38制御、ならびにその喘息及び他の炎症性疾患との相関は、CD38を、慢性閉塞性肺疾患及び肺線維症のような喘息を超える疾患の病態生理に影響を及ぼし得る、新規のCD38療法の開発のための魅力的な標的にする。現時点での喘息に対するCD38特異的薬物は、現在存在しない。

10

20

30

【 0059 】

ある実施形態において、本開示のEDCは、CD38を標的とし、かつ炎症を減少させる及び/またはCD38を発現する細胞を殺滅するように作用する薬剤に結合させることができるために、本開示のEDCは、それらの表面上でCD38を上方制御する、悪化した喘息を含む種々の型の喘息 (asthma) を有する患者を治療する際に有用であろう。ある実施形態において、本開示のEDCの薬剤はまた、NF- κ B (活性化したB細胞の核因子カッパ軽鎖エンハンサ) の活性化を遮断するため、本開示のEDCは、炎症性及び自己免疫疾患、敗血性ショック、ウイルス感染、ならびに不適切な免疫発達に関連するもの等の疾患を治療する際の使用を有し得る (2000 Cancer Res. 60 , pp 3838-3847 及び (2003 Biochem. Pharmacol. 66 p p 2223-2239))。

ある実施形態において、本開示のEDCの薬剤はまた、インターフェロンベータ、IL-1、及びIL-8等のサイトカイン産生を低減するため、本開示のEDCは、上昇したレベルのかかるサイトカインによって特徴付けられるいくつかの障害の治療、または改善につながり得る (Circulation. 1997 ; 96 : 1501 - 1506) 。

30

【 0060 】

ある実施形態によると、本開示のEDCの薬剤はまた、炎症を低減し得るため、炎症関連障害または疾患もまた、本明細書で説明されるEDCを使用して治療され得る (PNA S 2005 vol. 102 no. 27 , 9631-9636、第US20140088056 A1号)。炎症によって特徴付けられるかかる障害または疾患は、喘息、自己免疫疾患、慢性前立腺炎、糸球体腎炎、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease) 、骨盤炎症性疾患、再かん流傷害、関節炎、珪肺症、血管炎、炎症性ミオパチー、過敏症、片頭痛、乾癬、痛風、アテローム性動脈硬化 (atherosclerosis) 、及び任意のこれらの組み合わせを含み得るが、これらに限定されない。

40

【 0061 】

例示的な炎症性疾患としては、関節リウマチ、炎症性腸疾患、骨盤炎症性疾患、潰瘍性結腸炎、乾癬、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、1型糖尿病、多発性硬化症、乾癬、脈管炎 (vasculitis) 、ならびにアレルギー性喘息、アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis) 、及び接触過敏症等のアレルギー性炎症が挙げら

50

れるが、これらに限定されない。自己免疫関連疾患または障害の他の例としては、関節リウマチ、多発性硬化症（MS）、全身性エリテマトーデス、グレーブス病（甲状腺機能亢進）、橋本甲状腺炎（甲状腺機能不全）、1型糖尿病、セリアック病、クローン病及び潰瘍性結腸炎、ギラン・バレー症候群、原発性胆汁性硬化症／肝硬変、硬化性胆管炎、自己免疫肝炎、レイノー現象、強皮症、シェーグレン症候群、グッドパスチャーリー症候群、ウェゲナー肉芽腫症、リウマチ性多発筋痛、側頭動脈炎／巨細胞性動脈炎、慢性疲労症候群（CFS）、乾癬、自己免疫アジソン病、強直性脊椎炎、急性播種性脳脊髄炎、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症、オブソクローヌス・ミオクローヌス症候群、視神経炎、オード甲状腺炎、天疱瘡、悪性貧血（pernicious anaemia）、イヌにおける多発性関節炎、ライター症候群、高安動脈炎、温式自己免疫性溶血性貧血、ウェゲナー肉芽腫症、線維筋痛（FM）、自己炎症性PAPA症候群、家族性地中海熱（Familial Mediiterranean Fever）、家族性感冒自己炎症性症候群、マックル ウエルズ症候群、及び新生児期発症多臓器性炎症性疾患が挙げられるが、これらに限定されると解釈されべきではない。

【0062】

本明細書で使用される際、抗炎症治療は、炎症の発症または進行等の望ましくない生理学的变化または障害を、または減速（低下）させることを目指す。有益なまたは所望の臨床結果としては、検出可能または検出不可能にかかわらず、症状の軽減、疾患の程度の縮小、疾患の安定化した（即ち、悪化しない）状態、炎症疾患進行の遅延もしくは減速、疾患状態の改善もしくは緩和、及び寛解（部分的もしくは完全にかかわらず）が挙げられるが、これらに限定されない。抗炎症治療はまた、治療を受けない場合に予想される生存と比較して、延長された生存を意味し得る。抗炎症治療はまた、炎症応答を完全に抑制し得る。

【0063】

癌を治療するための抗体（モノクローナル及び二重特異性）ならびに抗体薬物共役体を作製及び使用するための多くの試みが行われており、ある型のヒト癌細胞を殺滅する際に活性であることが示されている（特許第U.S.8153765号）。抗CD38抗体のうちの一部は、CD38陽性細胞において、しかしながら、間質細胞または間質由来サイトカインの存在下でのみ、アポトーシスを引き起こすことが示されている。アゴニスト抗CD38抗体（IB4）は、ヒト胚中心（GC）B細胞のアポトーシスを防止すること（S. Zupone et al. 1994, Eur J Immunol, 24: 1218-1222）、ならびにKG-1及びHL-60 AML細胞の増殖を誘導する（M. Kono et al. 1998, J Immunol, 161: 4702-4708）が、Jurkat Tリンパ芽球細胞においてはアポトーシスを誘導しないこと（M. Morra et al. 1998, FASEB J, 12: 581-592）が報告されている。別の抗CD38抗体T16は、ALL患者からの未熟リンパ性細胞及び白血病リンパ芽球細胞（M. Kumagai et al. 1995, J Exp Med, 181: 1101-1110）、ならびにAML患者からの白血病性骨髄芽球細胞（E. Todisco et al. 2000, Blood, 95: 535-542）のアポトーシスを誘導したが、T16は、間質細胞または間質由来サイトカイン（IL-7、IL-3、幹細胞因子）の存在下でのみアポトーシスを誘導した。一方、一部のCD38特異的抗体は、架橋後にアポトーシスを誘導するが、単独でインキュベートされるとき、いずれのアポトーシス活性も完全に欠いている（第WO 2006/099875号）。SAR650984様抗体は、3つの異なる細胞毒性機構：アポトーシス、ADC、及びCDCの誘導によって、CD38陽性細胞を殺滅することが可能である（第U.S.20120156218号）。

【0064】

一部の有望な結果にもかかわらず、これらの調査は、いまだに臨床的応用につながっていない。これは、主に、抗体薬物がヒトに投与されたときの負の治療指標に起因する。これらの効果は、リンパ、骨髄、及び上皮細胞、ならびに特殊組織、及び眼を含む臓器にお

10

20

30

40

50

ける、CD38の広範な分布に関連し得る。組み合わせ療法は、治療ウィンドウ（即ち、CD38を上方制御するレチノイン酸）を増加させるために試みられているが、患者における著しい副作用が観察された。このため、CD38が、癌を治療するための標的として使用される場合、薬物が、CD38を発現する特定の罹患細胞を標的とするように、どのようにそれが機能するか、及び薬物をそれに送達するより正確な方法の発見のより良好な理解が必要である。標的化部分がCD38への抗体であり、かつ薬物がステロイドである、本明細書で説明されるEDCは、CD38を発現するある細胞が、EDCに対して耐性を有する一方、同様にCD38を発現する他の細胞は、かなり感受性であることを示し、このため、EDCが、EDCの2つの標的間で錯体を発現する細胞に正確に作用する能力を有するという証拠を示す。

10

【0065】

ヒトCD38の複数の機能、及び裸CD38抗体単独では、CD38上の種々のエピトープの結合を上回る特異性を提供しないという事実を考慮すると、罹患細胞上のCD38の特定の機能をより特異的に調節する新たな治療に対する必要性が存在する。

【0066】

CD38に結合するいくつかの抗体が存在し、これらのうちの一部は、臨床試験で現在調査されている。表1は、CD38を標的とする抗体のリスト（これらに限定されない）を提供し、これらの抗体、またはその断片もしくは誘導体は、本開示の種々の実施形態において有用であり得る。本開示の種々のEDCの標的化部分を標的とするCD38として機能することができる更に多くの抗体は、[http://www99.mh-hannover.de/aktuelles/projekte/hilda7/hildabase/select.htm]及び[http://www.imgt.org/mAb-DB/index]の臨床抗体のリストで見出すことができる。

20

【表1】

表1.

抗体名	標的タンパク質	潜在的な適応	参照
HB7、OKT10、ダラツムマブ、SAR650984、IB4、SUN4B7、IB6、AT1、AT2、UM16、5D2、BB51、GR7A4、HI157、HIT2、HIT3、MOR202、KKIB5、KK9H4	CD38	癌、自己免疫及び（慢性）炎症性疾患、例えは、1及び2型糖尿病、甲状腺炎、グレーブス病、関節炎、神経炎症、ならびに喘息。	The Journal of Immunology, 2011, 186:1840-1848., Blood, 2004; 104 (13) 4269-78、米国特許出願第US20130209355号、第US20120156218号、第WO2006099875号、第EP20000202597号BMC Immunology 2004, 5: 21

30

【0067】

CD38に特異的に結合する抗体の他の例としては、限定することなく、表1に上で列記される抗体、例えは、SUN4B7、OKT10、HB7、IB4、AT1、SAR650984（または38SB19）、ダラツムマブ、IB6、AT2、UM16、5D2、BB51、GR7A4、HI157、HIT2、HIT3、及びMOR202が挙げられる。以下の表2は、それらのCD38エピトープ（結合部位）、及びマカクCD38との交差反応を含む、表1に列記される種々の抗CD38抗体に関する追加の情報を提供する。

40

【表2】

表2.

名称	型	CD38エピトープ (アミノ酸)	マカクCD38 との交差反応?	Ref s*
SUN4B7	IgG1	254~275	あり	1
OKT10	IgG1	280~298	あり	1
HB7	IgG1	254~275	なし	1, 2
IB4	IgG2a	220~241及び273~ 285	なし	1
IB6	IgG2b	ND*	なし	1
AT1	IgG1	254~275	あり	1
SAR650 984 または38S B19	IgG1 (ヒ ト)	107~120、125、1 46、155、189、19 3、194、及び226	ND*	3
ダラツムマブ	IgG1 (ヒ ト)	233~246及び267~ 280	ND*	4
MOR202	IgG1 (ヒ ト)	ND*	ND*	5

Ref s* = 参照; ND* = 判定せず; 1) Tissue Antigens 2000; 56: 539-547 及び BMC Immunology 2004, 5: 21; 2) J. Biol. Chem. 2011, 286: 22170-22177; 3) 米国特許第8, 153, 765号、及び Clin Cancer Res 2014; 20 (17); 4574-83; 4) J Immunol 2011; 186: 1840-1848; 5) 米国特許第8, 877, 899号。

10

20

30

【0068】

ヒトCD38は、短い細胞質内尾部(21アミノ酸)、膜貫通ドメイン(23アミノ酸)、及び主要細胞外ドメイン(256アミノ酸)から成る。受容体及び酵素活性の双方が存在するCD38細胞外ドメインは、このファミリーのメンバに共通の12個のシステイン/6個のジスルフィドシグネチャを有し、これは、タンパク質の全体的な構造を安定化させるのに役立つ(BMC Immunol. 2004; 5: 21を参照されたい)。CD38の6個のシステインジスルフィドは、その触媒活性に重要であることが以前に示されている。ヒトCD38のエピトープマップは、6つの特異的抗CD38モノクローナル抗体、IB4、IB6、SUN4B7、OKT10、AT1、及びAT2のパネルを使用して以前に生成された(その全体として参照により本明細書に組み込まれる、Tissue Antigens 2000; 56 (6): 539-47を参照されたい)。結果は、モノクローナル抗体が、大きく2つのグループに分離され得、これは、完全にまたは部分的に重複するエピトープを認識することを示した。IB4、AT2、及びIB6抗体は、CD38の一方の側に結合したが、OKT10、SUN4B7、及びAT1は、CD38の他方の側に結合した。

【0069】

モノクローナル抗体を使用したヒトCD38及びシノムルガス・マカクCD38の特性評価は、CD38の追加の構造的・機能的特徴を識別した(その全体として参照により本明細書に組み込まれる、BMC Immunol. 2004; 5: 21を参照されたい)。IB4、IB6、OKT10、SUN4B7、AT1、及びHB7を含むヒトCD38に対して作製されたモノクローナル抗体のパネルを、ヒトCD38への結合に関して、ならびにヒトCD38との92%のアミノ酸配列同一性及び94%の類似性を有する、シノムルガス・マカクCD38(カニクイザル)への交差反応に関して評価した。結果は、IB4、IB6、OKT10、SUN4B7、AT1、及びHB7抗体が全て、ヒトCD38に結合したことを示した。しかしながら、OKT10、SUN4B7、及びAT1抗体のみは、シノムルガスCD38に結合したが、IB4、IB6、及びHB7抗体は、シノムルガスCD38に結合しなかった。研究は、2つのC末端ジスルフィドループに位置するヒトCD38上の2つの異なるエピトープを識別した。OKT10 CD38エピトープ結合部位は、CD38の残基Cys²⁸⁷~Cys²⁹⁶を含むヒトCD38の最後の

40

50

(6番目の)ジスルフィドループにマップされた。しかしながら、SUN4B7及びAT1 CD38エピトープ結合部位は、ヒトCD38の残基Cys²⁵⁴~Cys²⁷⁵を含む最後から2番目の(5番目の)C末端ジスルフィドループにマップされた。2つのC末端ジスルフィドループの近傍の抗体のフットプリントを例解する、Apolyusia ADPRシクラーゼに由来するヒトCD38のホモロジーモデルが生成された。他の研究は、異なるモノクローナル抗体によって認識される追加のCD38エピトープを識別した。

【0070】

ある実施形態によると、EDC中の標的化部分の例は、CD38に特異的に結合する抗体標的化部分であり得る。ヒトCD38のポリヌクレオチド配列は、配列番号1において提供され、これは、配列番号2において提供されるCD38アミノ酸配列をコードする。ある実施形態において、EDC中の標的化部分は、配列番号1を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る、ポリヌクレオチド配列によってコードされる、CD38に特異的に結合する抗体標的化部分であり得る。ある実施形態において、EDC中の標的化部分は、配列番号2を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る、CD38に特異的に結合する抗体標的化部分であり得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、CD38(即ち、配列番号2)の細胞外ドメインに位置するエピトープに特異的に結合し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、表1または2に列記される抗体のうちのいずれかと同じCD38(即ち、配列番号2)に対する結合特異性を有し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、表1または2に列記される抗体のうちのいずれかと、同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合し得る。当業者は、表1または2に列記される抗体のうちのいずれかと、同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する、本明細書で説明されるEDCにおいて使用されるべき抗体を生成することができることを認識するであろう。種々の実施形態において、EDC中の抗体標的化部分は、例えば、モノクローナル抗体であり得る抗体である。ある実施形態において、抗体標的化部分は、限定することなく、上の表1または2に見出される抗体のうちの1つのマウス抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体であり得る。一実施形態において、ヒト化抗体は、例えば、任意の非ヒト源、例えば、マウスからのヒト化形態の抗CD38抗体であり得る。一実施形態において、ヒト化抗体は、例えば、上の表1または2に見出される抗体のうちの1つのヒト化形態であり得る。一実施形態において、ヒト化抗体は、細胞表面上のCD38を認識する重鎖及び軽鎖可変配列から構築され得る。一実施形態において、抗体は、抗体断片、例えば、Fab断片であり得る。種々の実施形態において、EDCの抗体は、CD38等のヌクレオチド代謝(外)酵素ファミリーメンバタンパク質の細胞外部分に特異的に結合する。

【0071】

種々の実施形態において、本明細書で説明されるEDCは、CD38を標的とする標的化部分を含む。種々の実施形態において、本明細書で説明されるEDCは、CD38に特異的に結合する抗体標的化部分である標的化部分を含む。種々の実施形態において、EDC中の抗体標的化部分は、抗CD38マウスモノクローナル抗体SUN4B7(IgG1)である(BMC Immunol. 2004; 5:21; Tissue Antigens 2000; 56(6):539-47を参照されたい)。以下の実施例において示されるように、標的化部分を比較するとき、SUN4B7を使用して構築されたEDCは、この標的化部分が、PK活性試験によって判定される際、最も低い同等の最大半量有効濃度(EC₅₀)値及び最も長いインビオ半減期を有するEDCを產生したため、好みしい活性を提示した。実施例5に提供される研究は、SUN4B7で產生されるEDCが、CD38を発現する細胞株において特異的にアポトーシスを誘導する際に最も効力が高かったため、SUN4B7は、本明細書に提供されるEDCに対する例示的な標的化部分であることを実証する。ヒトCD38上のSUNB47エピトープ結合部位は、CD38(即ち、配列番号2)の細胞外ドメインのCys²⁵⁴~Cys²⁷⁵を伴うヒトCD38の5番目のC末端ジスルフィドループ(即ち、ジスルフィドループは、アミノ酸25

10

20

30

40

50

4～275を含む)にマッピングするとして、一研究において以前に特徴付けられた(BMC Immuno 1. 2004; 5: 21を参照されたい)。更に、この研究は、SUN4B7もまた、シノムルガス・マカクCD38に結合することを示した。ある実施形態において、CD38に特異的に(specfic ally)結合するEDC中の抗体標的化部分は、CD38(即ち、配列番号2)のアミノ酸254(即ち、Cys²⁵⁴)及び275(即ち、Cys²⁷⁵)によって形成されるCD38のジスルフィド結合を含むエピトープに特異的に結合し得る。ある実施形態において、エピトープは、CD38(即ち、配列番号2)のアミノ酸254～275を含むCD38の5番目のC末端ジスルフィドループを含み得る。ある実施形態において、エピトープは、CD38(即ち、配列番号2)のアミノ酸254～275のうちの1つ以上を含み得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、SUN4B7モノクローナル抗体と同じCD38(即ち、配列番号2)に対する結合特異性を有し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、SUN4B7と、同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトCD38(即ち、配列番号2)及びシノムルガス・マカクCD38(即ち、配列番号3)の双方に特異的に結合する。本明細書で説明される実施形態の全てにおいて、抗体標的化部分は、限定することなく、マウス、ヒト、キメラ、ヒト化抗体またはその結合断片から選択され得る。

10

20

30

【0072】

ある実施形態において、CD38に特異的に結合するEDC中の抗体は、アイソタイプサブクラスIgG1のモノクローナル抗体である、AT1であり得る。AT1によって認識されるCD38エピトープは、CD38(即ち、配列番号2)の細胞外ドメインのCys²⁵⁴～Cys²⁷⁵を伴うヒトCD38の5番目のC末端ジスルフィドループ(即ち、ジスルフィドループは、アミノ酸254～275を含む)にマッピングするCD38のカルボキシル末端の近くに位置する、SUN4B7によって認識される同じエピトープである(BMC Immuno 1. 2004; 5: 21を参照されたい)。AT1もまた、シノムルガスCD38に結合することが以前に示された。同文献。ある実施形態において、CD38に特異的に結合する抗体標的化部分は、CD38(即ち、配列番号2)のアミノ酸254(即ち、Cys²⁵⁴)及び275(即ち、Cys²⁷⁵)によって形成されるCD38のジスルフィド結合を含むエピトープに特異的に結合し得る。ある実施形態において、エピトープは、CD38(即ち、配列番号2)のアミノ酸254～275を含むCD38の5番目のC末端ジスルフィドループを含み得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、AT1モノクローナル抗体と同じCD38(即ち、配列番号2)に対する結合特異性を有し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、AT1モノクローナル抗体と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトCD38(即ち、配列番号2)及びシノムルガス・マカクCD38(即ち、配列番号3)の双方に特異的に結合する。本明細書で説明される実施形態の全てにおいて、抗体標的化部分は、限定することなく、マウス、ヒト、キメラ、ヒト化抗体またはその結合断片から選択され得る。

30

40

【0073】

以下の実施例において示されるように、抗体標的化部分としてSUN4B7を有するEDCは、最適な結果を提供した。当業者は、SUN4B7と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープ(即ち、CD38(即ち、配列番号2)の細胞外ドメインのアミノ酸254～275を含む、Cys²⁵⁴～Cys²⁷⁵を伴うCD38の5番目のC末端ジスルフィドループ)に結合する抗体を生成することができることを認識するであろう。更に、ある実施形態において、SUN4B7と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合し、かつ、シノムルガス・マカクCD38(即ち、配列番号3)にも特異的に結合する、EDCで使用するための抗体が生成され得る。本明細書で説明される実施形態の全てにおいて、EDCで使用するための抗体は、限定することなく、マウス、ヒト、キメラ、ヒト化抗体またはその結合断片から選択され得る。

50

【0074】

本開示において同様に有用である他の抗体は、SUN4B7と同じCD38エピトープ結合部位（即ち、Cys²⁵⁴～Cys²⁷⁵を伴うヒトCD38の5番目のC末端ジスルフィドループ）を有することが報告されているが、シノムルガス・マカクCD38（即ち、配列番号3）には結合しない。例えば、CD38に対するHB7の特異性は、HB7が、SUN4B7に関して報告された同じエピトープ結合部位である、CD38の残基Cys²⁵⁴及びCys²⁷⁵によって形成される、特異的なジスルフィドにマッピングするヒトCD38上のエピトープに直接結合することを示す×線結晶学及び部位特異的突然変異誘発法研究によって以前に確立された（その全体として参照により本明細書に組み込まれる、J. Bio. Chem. 2011; 286 (25): 22170-7を参照されたい）。追加の研究は、HB7がシノムルガスCD38に結合しないことを示した（BMC Immunol. 2004; 5: 21を参照されたい）。HB7（マウスIgG1、¹⁰）は、寄託番号HB-136でAmerican Type Culture Collection (ATCC)に寄託されているハイブリドーマ細胞株を使用して產生される（Tissue Antigens. 1984; 24 (3): 140-9を参照されたい）。ある実施形態において、抗体標的化部分は、HB7モノクローナル抗体と同じCD38（即ち、配列番号2）に対する結合特異性を有し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、HB7モノクローナル抗体と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトCD38（即ち、配列番号2）に特異的に結合するが、シノムルガス・マカクCD38（即ち、配列番号3）には特異的に結合しない。²⁰

【0075】

本明細書で提供されるEDCにおいて有用な抗体はまた、表1及び2に列記されるいづれかの抗体もしくはその結合断片、または表1及び2に列記される抗体のうちのいづれかと同じもしくは実質的に類似のCD38エピトープに結合する、いづれかの抗体もしくはその結合断片を含み得る。本明細書で説明される実施形態の全てにおいて、抗体標的化部分は、限定することなく、マウス、ヒト、キメラ、ヒト化抗体またはその結合断片から選択され得る。

【0076】

ある実施形態において、CD38に特異的に結合するEDC中の抗体は、寄託番号CRL-8022でATCCに1979年11月21日に寄託されたハイブリドーマ細胞株を使用して產生されるCD38に対するモノクローナル抗体である、OKT10であり得る（OKT10及びOKT10を產生する方法の説明については、その全体として参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,364,935号を参照されたい）。以下の実施例5に示されるように、ATRAは、OKT10で構築されたEDCで試験された、CD38を発現する全ての細胞の細胞感受性を増強した。以前の研究は、OKT10によって認識されるCD38エピトープが、CD38のカルボキシル末端の近くに位置し、CD38の残基287～296を伴うヒトCD38の最後の（6番目の）ジスルフィドループにマップされたことを示した（Tissue Antigens 2000; 56 (6): 539-47; BMC Immunol. 2004; 5: 21を参照されたい）。更に、OKT10もまた、シノムルガスCD38に結合することが示された。ある実施形態において、抗体標的化部分は、CD38（即ち、配列番号2）のアミノ酸287（即ち、Cys²⁸⁷）及び296（即ち、Cys²⁹⁶）によって形成されるCD38（即ち、配列番号2）のジスルフィド結合を含むエピトープに、特異的に結合し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、CD38（即ち、配列番号2）のアミノ酸287～296を含む6番目のC末端ジスルフィドループを含むエピトープに、特異的に結合し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、OKT10モノクローナル抗体と同じCD38（即ち、配列番号2）に対する結合特異性を有し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、OKT10モノクローナル抗体と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合し得る。³⁰

【0077】

10

20

30

40

50

ある実施形態において、CD38に特異的に結合するEDC中の抗体は、寄託番号HB-10164でATCCに寄託されているハイブリドーマ細胞株を使用して產生される、抗CD38抗体IB4であり得る(*J. Immunol.* 1997; 158(2): 741-7を参照されたい)。IB4が、ヒトCD38のアミノ酸273~285(参照により本明細書に組み込まれる、 *J. Immunol.* 1997; 158(2): 741-7を参照されたい)、及び同様にヒトCD38のアミノ酸220~241(*Tissue Antigens* 2000; 56(6): 539-47、表1を参照されたい)にまたがるCD38のカルボキシル末端の近くに位置するエピトープに結合することが以前に確立された。追加の研究は、IB4がシノムルガスCD38に結合しないことを示した(*BMC Immunol.* 2004; 5: 21を参照されたい)。ある実施形態において、抗体標的化部分は、CD38(即ち、配列番号2)のアミノ酸220~241を含むエピトープに特異的に結合し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、CD38(即ち、配列番号2)のアミノ酸273~285を含むエピトープに特異的に結合し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、CD38(即ち、配列番号2)のアミノ酸220~241及び273~285を含むエピトープに特異的に結合し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、IB4モノクローナル抗体と同じCD38(即ち、配列番号2)に対する結合特異性を有し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、 *Tissue Antigens* 2000; 56(6): 539-47に説明されるように、IB4モノクローナル抗体と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合し得る。

10

20

30

40

50

【0078】

ある実施形態において、CD38に特異的に結合するEDC中の抗体は、アイソタイプサブクラス、IgG2bである、抗CD38抗体IB6であり得る(*Tissue Antigens* 2000; 56(6): 539-47を参照されたい)。以前の研究は、IB6がシノムルガスCD38に結合しないことを示した(*BMC Immunol.* 2004; 5: 21を参照されたい)。ある実施形態において、抗体標的化部分は、IB6モノクローナル抗体と同じCD38(即ち、配列番号2)に対する結合特異性を有し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、IB6モノクローナル抗体と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合し得る。

【0079】

ある実施形態において、CD38に特異的に結合するEDC中の抗体は、現在、臨床開発中である、CD38に対するヒト化モノクローナル抗体である、SAR650984(38SB19としても既知である)であり得る。SAR650984は、寄託番号PTA-7670でATCCに寄託されているハイブリドーマ細胞株を使用して產生される(その全体として参照により本明細書に組み込まれる、 *Clin Cancer Res* 2014; 20(17): 4574-83)(38SB19抗体及び他の抗CD38抗体、ならびに重鎖、軽鎖、及びCDR配列を含むそれらの配列、ならびに該抗体を產生する方法の説明については、その全体として参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第8,153,765号も参照されたい)。SAR650984は、CD38のアミノ酸107~120、125、146、155、189、193、194、及び226を含む、CD38上のエピトープを認識する(その全体として参照により本明細書に組み込まれる、 *Clin Cancer Res* 2014; 20(17): 4574-83を参照されたい)。ある実施形態において、抗体標的化部分は、CD38(即ち、配列番号2)のアミノ酸107~120、125、146、155、189、193、194、及び226を含むエピトープに結合し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、CD38(即ち、配列番号2)のアミノ酸107~120、125、146、155、189、193、194、及び226のうちの1つ以上を含むエピトープに結合し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、SAR650984モノクローナル抗体と同じCD38(即ち、配列番号2)に対する結合特異性を有し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、SAR650984モノクローナル抗体と同じまたは実質的に類似のCD38

8エピトープに結合し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、米国特許第8,153,765号に記載される抗CD38抗体のうちのいずれかと同じCD38(即ち、配列番号2)に対する結合特異性を有し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、米国特許第8,153,765号に記載される抗CD38抗体のうちのいずれかの重鎖、軽鎖、及びCDRのうちの1つ以上を含み得る。

【0080】

ある実施形態において、CD38に特異的に結合するEDC中の抗体は、現在、臨床開発中である。CD38に対するヒトモノクローナル抗体である、ダラツムマブであり得る(その全体として参照により本明細書に組み込まれる、J Immunol 2011;186(3):1840-8を参照されたい)。ダラツムマブは、アミノ酸233~246及び267~280を含むCD38の細胞外ドメイン内の2つのベータ鎖に限局するCD38上のエピトープを認識する(J Immunol 2011;186(3):1840-8を参照されたい)。ある実施形態において、抗体標的化部分は、CD38(即ち、配列番号2)のアミノ酸233~246及び267~280のうちの1つ以上を含むエピトープに結合し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、ダラツムマブモノクローナル抗体と同じCD38(即ち、配列番号2)に対する結合特異性を有し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、ダラツムマブモノクローナル抗体と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合し得る。

10

【0081】

ある実施形態において、CD38に特異的に結合するEDC中の抗体は、CD38に対する完全ヒトモノクローナル抗体である、MOR202であり得る(MOR202抗体及び他の抗CD38抗体、ならびに重鎖、軽鎖、及びCDR配列を含むそれらの配列、ならびに該抗体を産生する方法に関する情報については、その全体として参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第8,877,899号を参照されたい)。ある実施形態において、抗体標的化部分は、MOR202モノクローナル抗体と同じCD38(即ち、配列番号2)に対する結合特異性を有し得る。ある実施形態において、抗体標的化部分は、MOR202モノクローナル抗体と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合し得る。ある実施形態において、CD38に特異的に結合するEDC中の抗体標的化部分は、米国特許第8,877,899号で提供されるようなMOR202抗体または他の抗CD38抗体の重鎖、軽鎖、及びCDRのうちの1つ以上を含み得る。

20

【0082】

本開示のEDC中の抗体標的化部分は、典型的に、それらのネイティブ非共役対応物の抗原結合能力を保持する。このため、本開示のEDCにおいて有用な抗体は、安定した(かつ、一部の実施形態において、開裂不可能な)リンカーを通じて、Na, K-ATPase(例えば、シラレニン)上で作用する薬剤に共有結合されつつ、抗原に特異的に結合することが可能である。かかる抗原は、治療的介入(または診断)のために標的とされている細胞または組織中のNa, K-ATPaseと会合され、かつそれにごく近接する、タンパク質または標的を含む。

30

【0083】

モノクローナル抗体(MAb)を産生するために種々の方法が採用されており、これらの方法は、本開示のEDCにおける使用のための抗体の産生に適用可能であり、そのため、以下では簡潔に概説する。単一の型の抗体を産生するクローン化細胞株を意味するハイブリドーマ技術は、マウス(mice)(マウス(murine))、ハムスター、ラット、及びヒトを含む、種々の種の細胞を使用する。キメラ及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、例えば、組み換えDNA技術を採用する。

40

【0084】

ポリクローナル抗体は、関連抗原及びアジュバントの頻回皮下(sc)または腹腔内(ip)注射によって動物において作製され得る。モノクローナル抗体は、実質的に均質な抗体の個体群から得られ、例えば、該個体群を含む個々の抗体は、少量で存在し得る可能な自然発生突然変異を除き、同一である。

50

【0085】

ヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の產生に関して説明されている(Kozbor, (1984) *J. Immunol.*, 133: 3001、及びBrodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。ハイブリドーマ細胞が成長している培養培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の產生に関してアッセイする。ハイブリドーマ細胞によって產生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって、またはラジオイムノアッセイ(RIA)もしくは酵素結合免疫吸着アッセイ(enzyme-linked immunoabsorbent assay)(ELISA)等のインビトロ結合アッセイによって、判定され得る。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson et al(1980) *Analyt. Biochem.* 107: 220のScatchard解析によって判定することができる。10

【0086】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能である、オリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)、容易に単離及び配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、かかるDNAの源として機能する。一度単離されると、DNAは、発現ベクターに入れられ得、これは、次いで、大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、またはそうでなければ抗体タンパク質を產生しない骨髄腫細胞等の宿主細胞に形質転換されて、組み換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を得る(米国特許出願公開第US20050048572号及び第US20040229310号を参照されたい)。抗体をコードするDNAの細菌における組み換え発現に関する概説記事としては、Skerra et al(1993) *Curr. Opinion in Immunol.* 5: 256-262及びPluckthun(1992) *Immunol. Revs.* 130: 151-188が挙げられる。20

【0087】

更なる実施形態において、モノクローナル抗体または抗体断片は、それぞれ、ファージライブラリを使用したマウス及びヒト抗体の単離を説明する、McCafertry et al(1990) *Nature* 348: 552-554; Jackson et al(1991) *Nature* 352: 624-628; 及びMarks et al(1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597において説明される技術を使用して生成された抗体ファージライブラリから単離することができる。その後の公開物は、非常に大きいファージライブラリを構築するための戦略としての、鎖シャッフリング(Marks et al (1992) *Bio/Technology* 10: 779-783)、ならびに組み合わせ感染及びインビオ組み換えによる、高親和性(nM範囲)ヒト抗体の產生を説明する(Waterhouse et al (1993) *Nuc. Acids. Res.* 21: 2265-2266)。このため、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に対する実行可能な代替策である。30

【0088】

DNAはまた、例えば、同種マウス配列の代わりに、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインに対するコード配列を置換することによって(米国特許第4,816,567)；及びMorrison et al(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851)、または非免疫グロブリンポリペプチドに対するコード配列の免疫グロブリンコード配列全てまたは一部に共有結合させることによって、修飾され得る。40

【0089】

典型的に、かかる非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインに対して置換されるか、またはそれらは、抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインに対して置換され50

て、ある抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位と、異なる抗原に対する特異性を有する別の抗原結合部位とを含む、キメラ二価抗体を作製する。

【0090】

ヒト化の代替としては、ヒト抗体を生成することができる。例えば、免疫化されると、内因性免疫グロブリン産生の不在下で、フルレパートリのヒト抗体を産生することが可能である、トランスジェニック動物（例えば、マウス）を産生することが現在可能である（Jakobovits et al. , (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 2551; Jakobovits et al. , (1993) Nature 362: 255-258; Bruggermann et al. , (1993) Year in Immuno. 7: 33; ならびに米国特許第5,591,669号；第5,589,369号；及び第5,545,807号）。 10

【0091】

代替的に、ファージ提示技術（McCafferty et al. , (1990) Nature 348: 552-553）を使用して、免疫化されていないドナーからの免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産生することができる（Johnson et al. , (1993) Curr. Opin. Structural Biol. 3: 564-571）。免疫化されていないヒトドナーからのV遺伝子のレパートリを構築することができ、多種多様な抗原（自己抗原を含む）に対する抗体を、本質的に単離することができる（Marks et al. , (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597; Griffith et al. , (1993) EMBO J. 12: 725-734；米国特許第5,565,332号及び第5,573,905号）。ヒト抗体はまた、インビトロ活性化B細胞によって生成することができる（米国特許第5,567,610号及び第5,229,275号）。ヒト抗Erbb2抗体が、説明されている（米国特許第5,772,997号及びPCT公開第WO 97/00271号）。 20

【0092】

種々の技術が、抗体断片の産生のために開発されている。従来、これらの断片は、無傷抗体のタンパク質分解消化を介して得られた（Morimoto et al. , (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 24: 107-117；及びBrennan et al. , (1985) Science 229: 81を参照されたい）。抗体断片はまた、上で述べられる組み換え宿主細胞及び抗体ファージライプラリによって直接産生することができる。Fab'-SH断片は、直接大腸菌から回収され、結合されて、Fab'(ab')₂断片を形成することができる（Carter et al. (1992) Bio/Technology 10: 163-167）。別の手法によると、Fab(ab')₂断片は、組み換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。抗体断片の産生のための他の技術は、当業者には明らかであろう。他の実施形態において、選択される抗体は、単鎖Fv断片（V(sFv)二量体である（Gruber et al. , (1994) J. Immunol. 152: 5368）。例えば、化学結合を使用して、抗体断片から二重特異性抗体を生成するための技術もまた、説明されており、ここでは、無傷抗体は、タンパク質分解的に開裂されて、Fab(ab')₂断片を生成する（Brennan et al. , (1985) Science 229: 81）。Fab'-SH断片は、大腸菌から回収され、結合されて、二重特異性抗体を形成することができる（Shalaby et al. , (1992) J. Exp. Med. 175: 217-225。「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片を作製するための代替的な方法を提供する（Hollinger et al. , (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-6448）。 30 40

【0093】

2よりも多い原子価を有する抗体を、本開示のEDCの種々の実施形態において採用することができる。3つ以上の抗原結合部位及び2つ以上の可変ドメインを有する多価「オクトパス」抗体は、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組み換え発現によって容易

に產生することができる（米国特許出願公開第 U S 2 0 0 2 / 0 0 0 4 5 8 6 号及び P C T 公開第 W O 0 1 / 7 7 3 4 2 号）。例えば、三重特異性抗体を調製することができる（T u t t e t a l . , (1 9 9 1) J . I m m u n o l . 1 4 7 : 6 0 ）。

【 0 0 9 4 】

抗体のアミノ酸配列修飾（複数を含む）が、本開示によって企図される。例えば、腫瘍関連または他の抗原に結合する抗体の突然変異体及び種々のイソフォームは、抗体の結合親和性及び／もしくは他の生物学的特性を向上させる、ならびに／または抗体へのリンカー及び／もしくは治療薬剤の部位特異的共役を可能にするように企図される。抗体のアミノ酸配列変異は、抗体をコードする核酸に、適切なヌクレオチド変化を導入することによって、またはペプチド合成によって、調製される。かかる修飾としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び／またはそれへの挿入、及び／またはその置換が挙げられる。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせが、最終構築物に達するように行われるが、ただし、最終構築物が所望の特徴を有することを条件とする。アミノ酸変化はまた、グリコシル化部位の数または位置の変化等の抗体の翻訳後プロセスを改変し得る。

10

【 0 0 9 5 】

突然変異誘発のための好ましい位置にある抗体のある残基または領域の識別のための有用な方法は、「アラニンスキャニング突然変異誘発」であり（C u n n i n g h a m a n d W e l l s (1 9 8 9) S c i e n c e 2 4 4 : 1 0 8 1 - 1 0 8 5 ）、ここでは、アミノ酸残基、または標的残基群が識別され（例えば、a r g 、a s p 、h i s 、l y s 、及びg l u 等の荷電残基）、アラニンもしくはポリアラニン等の中性もしくは負に荷電されたアミノ酸によって置き換えられて、アミノ酸と抗原との相互作用を最適化する。アミノ酸配列挿入は、1つの残基から1 0 0 以上の残基を含有するポリペプチドまでの長さに及ぶ、アミノ及び／またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。

20

【 0 0 9 6 】

抗体のアミノ酸配列は、通常、基本的な核酸配列を改変することによって、改変される。抗体のアミノ酸配列変異をコードする核酸分子は、当該技術分野において既知の様々な方法によって調製される。これらの方針としては、天然源からの単離（自然発生アミノ酸配列変異の場合）、または抗体の先に調製された変異もしくは非変異型のオリゴヌクレオチド媒介（もしくは部位特異的）突然変異誘発、P C R 突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製が挙げられるが、これらに限定されない。置換突然変異誘発のための最も関心の高い部位は、超可変領域を含むが、F R 改変もまた、企図される。

30

【 0 0 9 7 】

抗体の生物学的特性における実質的な修飾は、（a）例えば、シートもしくはらせん構造としての、置換の領域におけるポリペプチド骨格の構造、（b）標的部位において分子の荷電もしくは疎水性、または（c）側鎖の嵩を維持することに対するそれらの効果が著しく異なる置換を選択することによって達成される。自然発生残基は、共通の側鎖特性：（1）疎水性：ノルロイシン、m e t 、a l a 、v a l 、l e u 、i l e ；（2）中性親水性：c y s 、s e r 、t h r ；（3）酸性：a s p 、g l u ；（4）塩基性：a s n 、g l n 、h i s 、l y s 、a r g ；（5）鎖配向に影響する残基：g l y 、p r o ；及び（6）芳香族：t r p 、t y r 、p h e に基づいて、グループに分割される。非保存置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバを別のクラスと交換することを必要とするであろう。

40

【 0 0 9 8 】

抗体の適切な構造を維持することに関与しないいずれのシステイン残基もまた、分子の酸化安定性を向上させ、異常な架橋を防止するように、一般的にはセリンで置換され得る。逆に、システイン結合（複数を含む）は、その安定性（特に、抗体がF v 断片等の抗体断片である場合）を向上させるように、抗体に付加され得る。

【 0 0 9 9 】

抗体の血清半減期を増加させるために、例えば、米国特許第5,739,277号で説

50

明されるように、抗体（特に、抗体断片）にサルベージ受容体結合エピトープを組み込み得る。本明細書で使用される際、「サルベージ受容体結合エピトープ」という用語は、Ig G分子のインビボ血清半減期を増加させることに関与するIg G分子（例えば、Ig G₁、Ig G₂、Ig G₃、またはIg G₄）のFc領域のエピトープを指す（米国特許出願公開第US20030190311号、ならびに米国特許第6,821,505号；第6,165,745号；第5,834,597号；第5,648,260号；及び第5,624,821号を参照されたい）。PEG化もまた、本開示のEDCの半減期を増加させるために使用することができる。

【0100】

抗体のグリコシリ化変異は、抗体のグリコシリ化パターンが改変されている変異である。改変するとは、抗体で見出される1つ以上の炭水化物部分を欠失させる、1つ以上の炭水化物部分を抗体に付加する、グリコシリ化（グリコシリ化パターン）の組成またはグリコシリ化の程度を変化させることを意味する。抗体は、それらの定常領域の保存位置（N結合またはO結合された）でグリコシリ化され得る（Hse et al.，（1997）J. Biol. Chem. 272:9062-9070；Jeffreys and Lund，（1997）Chem. Immunol. 65:111-128；Wright and Morrison，（1997）TibTECH 15:26-32）。免疫グロブリンのオリゴ糖側鎖は、タンパク質の機能（Boyd et al.，（1996）Mol. Immunol. 32:1311-1318；Wittwe and Howard，（1990）Biochem. 29:4175-4180）、ならびに糖タンパク質の構造及び提示された3次元表面に影響を及ぼし得る糖タンパク質の部分間の分子内相互作用（Hefferis and Lund、上記を参照；Wyss and Wagner（1996）Current Opin. Biotech. 7:409-416）に影響を及ぼす。オリゴ糖はまた、特定の認識構造に基づいて、所与の糖タンパク質を有する分子に対する標的とする機能を果たし得る（Malhotra et al.，（1995）Nature Med. 1:237-243；Umana et al.，（1999）Nature Biotech. 17:176-180）。オリゴ糖の除去は、抗体の抗原結合及び他の特性を最適化し得る（Boyd et al.，（1996）Mol. Immunol. 32:1311-1318）。

【0101】

抗体の組み換え產生中のグリコシリ化に影響を及ぼす要因としては、成長モード、培地配合、培養密度、酸素化、pH、精製スキームなどが挙げられる（米国特許第5,047,335号；第5,278,299号；及び第5,510,261号）。グリコシリ化、またはある型のグリコシリ化は、例えば、エンドグリコシダーゼH（Endo H）を使用して、糖タンパク質から酵素的に除去することができる。加えて、組み換え宿主細胞は、遺伝子操作され、例えば、ある型の多糖を処理する際に不良なものにし得る。これらの及び類似の技術は、当該技術分野において公知である。

【0102】

抗体のグリコシリ化構造は、レクチンクロマトグラフィ、NMR、質量分光分析、HPLC、GPC、単糖組成分析、連続酵素消化、及びHPAEC-PAD（高pHアニオン交換クロマトグラフィを使用して、荷電に基づいてオリゴ糖を分離する）を含む、炭水化物分析の従来の技術によって容易に分析することができる。分析目的でオリゴ糖を放出するための方法は、既知であり、それらとしては、限定することなく、酵素処理（一般的に、ペプチド-N-グリコシダーゼF/エンド-β-ガラクトシダーゼを使用して実施される）、主にO結合構造を放出するように厳しいアルカリ性環境を使用した排除、ならびにN及びO結合オリゴ糖の双方を放出するように無水ヒドラジンを使用した化学的方法が挙げられる。

【0103】

本開示のEDC中の抗体は、例えば、かつ限定することなく、上で提供される定義において説明されるようなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、修飾された抗体、キメ

10

20

30

40

50

ラ抗体、または向上された抗体であり得る。例えば、現代の代替的な戦略は、現在、抗体の免疫原性を低減するように、完全ヒト化抗体の産生を可能にする。加えて、抗原結合F_{ab}、F_v、s_cF_v、及びミニボディを含む、より小さい抗体断片を操作することができ、抗体はまた、抗体の親和性、安定性、及び発現レベルを増加するように、増強することができる(Nat Med. 2003 Jan; 9 (1) : 129 - 34を参照されたい)。

【0104】

本開示の代替的な実施形態において、本開示のEDCの標的化部分は、抗体ではないが、代わりに、抗体のペプチドもしくはタンパク質、または標的とすることに関して、機能的な同等物であるペプチド模倣薬である。例えば、かつ限定することなく、抗体は、コンビナトリアルタンパク質設計の方法を使用して、所定の結合機能を備え得る、いくつかの小さいかつ堅牢な非免疫グロブリン「足場」のうちのいずれかによって置き換えることができる。かかる足場は、種々の概説で説明されている(例えば、“Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics” in Curr Opin Chem Biol. 2009 Jun; 13 (3) : 245 - 55及び“Engineered affinity proteins for tumour-targeting applications” in Biotechnol Appl Biochem. 2009 May; 53 (Pt 1) : 1 - 29を参照されたい)。

【0105】

本開示の別の代替的な実施形態において、本開示のEDCの標的化部分は、抗体ではないが、代わりに、抗体のDNA、RNA、または標的とすることに関して、機能的な同等物であるオリゴヌクレオチドである。例えば、SELEX方法を使用して、所定の結合機能を有するDNAまたはRNAまたはその修飾を識別することができる。アプタマーは、指數関数的富化SELEXプロセスのようなリガンドの系統的進化によって単離されるRNAまたはDNAオリゴヌクレオチドまたはその修飾のポリマーである(Hickey and Stephens, 2000, “Escort Aptamers: A Delivery Service for Diagnosis and Therapy,” J. Clin. Invest., 106 (8), pp. 923 - 928を参照されたい)。

。

【0106】

典型的に、標的化部分(抗CD38抗体もしくはその結合断片、または他の標的化部分)は、本開示のEDCを形成する上で使用する前に、しばしば95重量%を上回って(例えば、Lowry法によって判定される際)、かつしばしば99重量%超まで精製される。一度、標的化部分、または関心対象のEDCに対する所望の合成経路における使用のためのその好適な部分が利用可能になると、以下の項で述べられるように、様々なリンカー及び結合技術のうちのいずれかによって、例えば、かつ限定することなく、強心ステロイドであり得る治療薬剤に結合させることができる。

【0107】

I V . リンカー部分

本開示のEDCにおいて、薬剤は、安定したリンカーを介して標的化部分の部分に結合される。リンカーは、長く(一般的に少なくとも約50オングストローム(Angstrom)の長さ、及びより典型的に100オングストロームの長さ、または約200オングストロームもしくは更には300オングストローム程度の長さ以上)、可撓性かつ延長可能であり、一部の実施形態においては、正に荷電されている(リンカー部分の全てもしくは一部を形成し、薬剤に結合される、アルキル鎖中の1つ以上のヘテロ原子(例えば、窒素)の存在によるものを含む)。1つの重要な態様において、本開示は、抗CD38抗体または他の標的化部分を、強心(cardiotonic)ステロイド、強心グリコシド、及びNa₊、K⁺-ATPaseを標的とする他の薬剤、及び他の薬剤全般に結合させるための新たなリンカー、ならびにそれらの合成において有用な精製された形態の組成物及び

10

20

30

40

50

化合物を開示し、そのための方法もまた、本開示によって提供される。リンカー（例えば、完全なリンカー部分として）の結合、または、例えば、リンカーの第1の部分に結合された標的化部分、及び次いで、リンカーの更なる部分、または任意に、薬剤がリンカーの第2の部分に結合される合成中間体にあり得る薬剤部分に直接結合させることによって、段階的に形成される。

【0108】

本開示 (disclosure) のEDCにおいて採用されるリンカーは、安定している。例えば、投与後、EDCは、安定しており、かつ無傷のままであり、例えば、標的化部分は、リンカーを介して薬剤に結合されたままである。リンカーは、標的細胞の外側で安定しており、かつ有効性のために未開裂のままである。効果的なリンカーは、(i) 抗体の特異的結合特性を維持し、(ii) 共役体もしくは薬剤の送達を可能にし、(iii) 安定かつ無傷のままであり、例えば、抗体及び／もしくは薬剤が安定かつ無傷のままである限り、開裂しておらず、(iv) EDCが無傷である間、薬剤の細胞毒性、細胞殺滅効果、または細胞増殖抑制効果を維持する。例として、安定したリンカーは、本開示のEDC内にあるとき、循環構造、標的組織の表面、標的細胞の表面、または細胞外マトリクスに少なくとも4～8時間以上の期間、例えば、8～24時間、または1～10日以上存在する間、最小の（例えば、10%未満）開裂を示すものであり、開裂不可能なリンカーは、20日以上程度の期間を含む、より長い期間、これらの条件において安定している (Durcy, L. et al. Bioconjugate Chem. 2010, 21, 5-13)。

10

20

30

【0109】

好適なリンカーの長さは、実験的測定によって、例えば、得られる本開示のEDCの活性を判定するために使用されるアッセイにおいて複数のリンカーの長さを試験することによって、判定され得る。例えば、リンカーの長さが短すぎる（薬物及び標的化部分が同時にそれらの結合部位に到達することを可能にしない）場合、問題を容易に識別及び解決して、本開示のEDCを提供することができる。典型的に、リンカーの長さは、約50～約300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ろう。リンカーの長さ及び組成物は、EDCが、酵素及び他の環境的物質が、そうでなければ崩壊し得る、循環構造において、安定していることを確実とするように、かつ標的化部分がその抗原に結合する場所から、薬剤がその標的上で作用する場所までの距離を反映するように、選択される。これらの要件に適合する多種多様なリンカーは、入手可能であるか、または合成することができ、これは、特に、本開示のEDCにおいて採用することができる多種多様なリンカー、治療薬剤、及び標的化部分を考慮するとき、非常に大きいクラスの本開示によって提供されるEDCを作製する。

【0110】

リンカーは、EDCの一部の代わりに、個別のエンティティとして概念化される場合、1つ以上の薬物を抗体に結合させてEDCを形成するために使用することができる、単官能性または多官能性部分である。EDCは、薬物及び抗体に結合するための反応性官能基を有するリンカーを使用して、好都合に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、抗体の還元ジスルフィド結合の硫黄原子、またはリジンもしくはヒスチジン等のN末端もしくはアミノ酸側鎖は、リンカー試薬または薬物-リンカー試薬（薬剤及びリンカーから成る）の官能基との結合を形成することができる。

40

【0111】

一部の実施形態において、リンカーは、1つ以上のエチレングリコール単位（例えば、ポリエチレングリコール）を含む。理論によって束縛されることを望むことなく、リンカーにおけるエチレングリコール単位の存在は、可撓性、薬剤と標的化部分との間の調節可能な空間、及びEDCに対する望ましい可溶特性を付与すると考えられる。一部の実施形態において、リンカーは、標的化部分にごく近接した、例えば、標的化部分に直接結合された、または短いアルキル鎖（例えば、2～約20個の原子を有する官能化アルキル鎖）によって標的化部分に結合された、エチレングリコール単位（複数を含む）を含む。一部

50

の実施形態において、リンカーは、約 6 ~ 約 60 個のエチレングリコール繰り返し単位、例えば、約 6、約 12、約 24、約 36、約 48、または約 60 個のエチレングリコール繰り返し単位を有する、ポリエチレングリコールサブユニットを含む。一部の好ましい実施形態において、リンカーは、24 個のエチレングリコール繰り返し単位（本明細書において、「PEG 24」とも称される）を含む。他の好ましい実施形態において、リンカーは、36 個のエチレングリコール単位（「PEG 36」）を含む。

【0112】

一部の実施形態において、リンカーは、少なくとも 1 個のヘテロ原子（例えば、窒素）を含む、第 2 の部分を含む。理論によって束縛されることを望むことなく、リンカーにおける窒素等のヘテロ原子（複数を含む）の存在は、生理学的 pH での EDC の可溶特性を増強させると考えられる。したがって、その中に含まれる最適な数のヘテロ原子を含む、最適なリンカーは、薬剤部分及び標的化部分の部分の異なる組み合わせによって異なり得る。

10

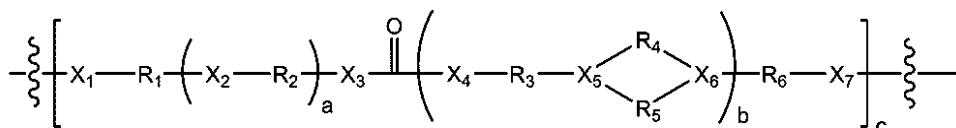
【0113】

一部の実施形態において、ヘテロ原子（複数を含む）は、アルキル鎖（例えば、官能化ヘテロアルキル鎖）に含まれる。ヘテロアルキル鎖は、薬剤の活性が実質的に縮小されないように（例えば、薬剤が強心剤であるとき、C3 炭素を通じて）、任意の好適な場所で薬剤に結合され得る。一部の実施形態において、ヘテロアルキル鎖は、標的化部分に直接結合されるが、好ましい実施形態において、ヘテロアルキル鎖は、1 つ以上のエチレングリコール単位（例えば、PEG 24 等のポリエチレングリコール）によって、標的化部分に結合される。一部の実施形態において、リンカーは、少なくとも（at least）1 つのグリコシド残基（例えば、アミノグリコシド）を含み、これは、典型的に、EDC の薬剤に結合される。

20

【0114】

一部の実施形態において、本開示のリンカーは、式 (II) と一致する式を有し、
【化 2】



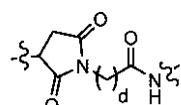
式 (II)

30

式中、

X_1 が、任意に存在し、存在するとき、（標的化部分との結合前に）標的化部分の一部分と反応性の基を含む。例えば、かつ限定することなく、標的化部分が抗体、抗体断片、タンパク質、またはペプチドであるとき、リンカーは（標的化部分との結合前に）、還元ジスルフィド結合からの硫黄原子、またはリジンまたはヒスチジン残基からの窒素原子等の求核原子を通じて、標的化部分との結合を可能にするように、マレイミド等の求電子基を含み得る。このため、一部の実施形態において、式 (II) の X_1 は、

【化 3】



40

であり得、式中、d が 0 ~ 6 であり、

X_2 、 X_3 、及び X_4 の各々が、任意に存在し得、かつアルキル、ケトン、-C(O)NH-、-C(O)NR₈-、-O-、-S-、-NH-、-NR₉-から個々に選択され得、 R_8 及び R_9 が、アルキル（例えば、メチル）、ヘテロアルキル、アリール、及びヘテロアリールから個々に選択され、

X_5 及び X_6 が、CR₁₀ 及び N から各々個々に選択され、 R_{10} が、H、分岐アルキル、非分岐アルキル、飽和アルキル、または不飽和アルキルであり、

50

X_7 が、任意に存在し、かつ - C(=O) - 、 - O C(=O) - 、 - N H C(=O) - 、 - N R₁₁ C(=O) - から選択され得、R₁₁ が、H、分岐アルキル、非分岐アルキル、飽和アルキル、または不飽和アルキルであり、

R₁ が、任意に存在し、かつ分岐アルキル、非分岐アルキル、飽和アルキル、または不飽和アルキルから選択され得、

R₂、R₃、及びR₆ の各々が、任意に存在し得、かつ分岐アルキル、非分岐アルキル、飽和アルキル、及び不飽和アルキルから個々に選択され得、

R₄ 及びR₅ の各々が、任意に存在し、かつ分岐アルキル、非分岐アルキル、飽和アルキル、または不飽和アルキルから個々に選択され得るが、但し、R₄ 及びR₅ のうちの少なくとも1つが存在しなければならないことを条件とし、

a が 0 ~ 9 9 であり、

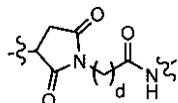
b が 0 ~ 9 9 であり、

c が 0 ~ 9 9 である。

【0115】

一部の好ましい実施形態において、リンカーは、式(II)の式を有し、式中、X₁ が

【化4】

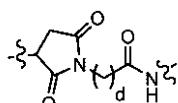


20 であり、d が 2 であり；X₂ が - O - であり；X₃ が ヌルであり；X₄ が - NH - であり；X₅ 及びX₆ が 各々 N であり；X₇ が - N H C(=O) - であり；R₁ が - C H₂ C H₂ - であり；R₂ が - C H₂ C H₂ - であり；R₃ 及びR₆ が 各々 - C H₂ C H₂ C H₂ - であり；R₄ 及びR₅ が 各々 - C H₂ C H₂ - であり；a が 1 ~ 5 0 であり；b が 1 ~ 1 0 であり；c が 1 ~ 1 0 である。

【0116】

1つの特に好ましい実施形態において、リンカーは、式(II)の式を有し、式中、X₁ が

【化5】

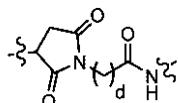


30 であり、d が 2 であり；X₂ が - O - であり；X₃ が ヌルであり；X₄ が - NH - であり；X₅ 及びX₆ が 各々 N であり；X₇ が - N H C(=O) - であり；R₁ が - C H₂ C H₂ - であり；R₂ が - C H₂ C H₂ - であり；R₃ 及びR₆ が 各々 - C H₂ C H₂ C H₂ - であり；R₄ 及びR₅ が 各々 - C H₂ C H₂ - であり；a が 2 4 または 3 6 であり；b が 1 であり；c が 1 である。

【0117】

別の特に好ましい実施形態において、リンカーは、式(II)の式を有し、式中、X₁ が

【化6】



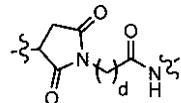
40 であり、d が 2 であり；X₂ が - O - であり；X₃ が ヌルであり；X₄ が - NH - であり；X₅ が - N (C H₃) - であり；X₆ が ヌルであり；X₇ が - N H C(=O) - であり；R₁ が - C H₂ C H₂ - であり；R₂ が - C H₂ C H₂ - であり；R₃ が - C H₂ C H₂ C H₂ - であり；R₄ が ヌルであり；R₅ 及びR₆ が 共に、 - C H₂ C H₂ C H₂ - であ

り； a が 24 または 36 であり； b が 1；であり c が 1 である。

〔 0 1 1 8 〕

別の特に好みしい実施形態において、リンカーは、式(II)の式を有し、式中、 X_1 が

【化 7】



であり、d が 2 であり；X₂ が -O- であり；X₃ がヌルであり；X₄ 及びX₅ が各々 -NH- であり；X₆ がヌルであり；N₇ が -NHCO(O)- であり；R₁ が -CH₂CH₂- であり；R₂ が -CH₂CH₂- であり；R₃ が -CH₂CH₂CH₂- であり；R₄ がヌルであり；R₅ 及びR₆ が共に、-CH₂CH₂CH₂- であり；a が 2 4 または 3 6；b が 1 であり；c が 1 である。

〔 0 1 1 9 〕

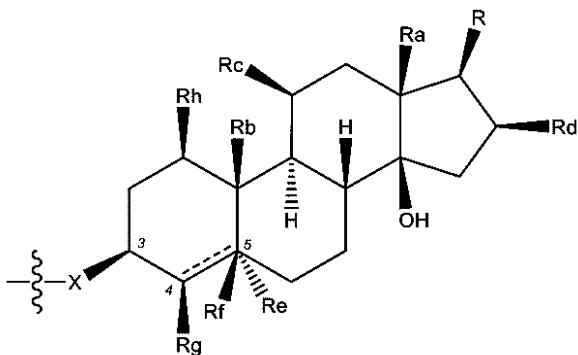
Ⅴ. 藥剤部分

多種多様な薬剤が、本開示のE D Cにおける使用に好適である。一般的に、薬剤は、Na₊、K-ATPaseに結合するか、またはそうでなければ、ポンプ活性に影響を及ぼす（例えば、ポンプ活性を低減するか、またはポンプ活性を停止する）ことが可能である。典型的に、薬剤は、Na₊、K-ATPase上、例えば、アルファサブユニットで直接作用する「非内在化治療薬剤」である。本開示の他の実施形態において、薬剤は、Na₊、K-ATPaseと、それと会合する細胞表面経路シグナル伝達タンパク質との相互作用を阻害するように作用する。本開示の種々の実施形態において、薬剤は、ステロイド、修飾ステロイド、ステロイド誘導体（例えば、官能化ステロイド）、強心ステロイド、強心グリコシド、またはカルデノライドであり得る。一部の実施形態において、薬剤は、ブファリン、シラレニン、またはジギトキシゲニンである。他の実施形態において、薬剤は、強心グリコシド、または強心グリコシドのアグリコン、例えば、ジギトキシン、ジゴキシン、ウアベイン、もしくはプロスシラリジンである。

【 0 1 2 0 】

本開示の好ましい実施形態において、薬剤は、カルデノライド、強心ステロイド、または以下の式(I II I)の強心グリコシドであり、

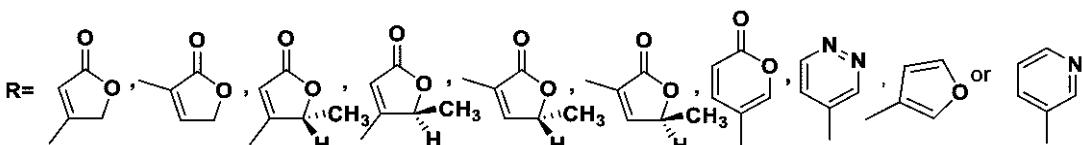
【化 8】



式 (I I I)

式中、ステロイド環が、飽和、不飽和、またはこれらの組み合わせのいずれかであり、

【化 9】



であるか、またはRが、 CH_2OCH_3 、O、OH、または分岐アルカン等の種々のコルチコステロイド上で見出される側鎖であり、 R_a が CH_3 であり； R_b が CH_3 、 CH_2O H、もしくはCHOであり； R_c がH、OH、もしくは CH_3COO であり； R_d がH、OH、もしくは CH_3COO であり； R_e がHであるか、あるいは R_f がHもしくはOHであるとき、または炭素C4及びC5間に二重結合が存在するとき、 R_e が基ではなく； R_f がHもしくはOHであるか、または R_e がHであるか、もしくは炭素C4及びC5間に二重結合が存在するとき、 R_f が基ではなく； R_g がHであるか、または R_e がHであるか、もしくは炭素C4及びC5間に二重結合が存在するとき、 R_g が基ではなく； R_h がHもしくはOHであり；Xが「-Y-Z-」の一般式を有し、式中、Yが炭素C3に共有結合され、かつO、S、N(OR')、N(SR')、及びN(NR')から選択され、Zがヌルであるか、またはグリコシド、例えば、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、及び/もしくは4-アミノ-キシロシドであり；R'がアルキルもしくはアリール基である。

10

【0121】

一部の実施形態において、薬剤は、式(III)のカルデノライド、強心ステロイド、または強心グリコシドの薬学的に許容可能なエステル、誘導体、共役体、水和物、溶媒和物、プロドラッグ、もしくは塩、または前述のうちのいずれかの混合物である。

20

【0122】

一部の実施形態において、EDCの薬剤部分は、ブファリンである。他の実施形態において、EDCの薬剤部分は、シラレニンである。更に他の実施形態において、EDCの薬剤部分は、ジギトキシゲニンである。

20

【0123】

VI. EDC構築、スクリーニング、及び具体的な実施形態

本開示は、安定した(かつ、一部の実施形態において、開裂不可能な)リンカーを介して、強心ステロイド等の薬剤部分に結合される、抗CD38抗体等の標的化部分を概して含むEDCを提供する。

30

【0124】

概して、本開示のEDCにおいて、薬剤部分がリンカーに結合される部位は、リンカー結合が、EDCにおける薬剤の所望の活性、例えば、Na, K-ATPaseへの結合を最小限に干渉するのみであるか、または全く干渉しない位置である。本開示の実施形態は、これらの強心ステロイドのC3を通じて結合されるリンカーを例解するが、他の結合点が可能であり、かつ本開示の範囲内である。

【0125】

概して、リンカー部分は、チオール(例えば、最初にジスルフィド結合を還元することによって得られる)またはアミン(例えば、リジンもしくはヒスチジン残基から)等のペプチドの反応基を通じて、標的化部分に結合される。一部の好ましい実施形態において、標的化部分の反応基または原子は、抗体(例えば、抗CD38抗体)のヒンジ領域における硫黄原子である。

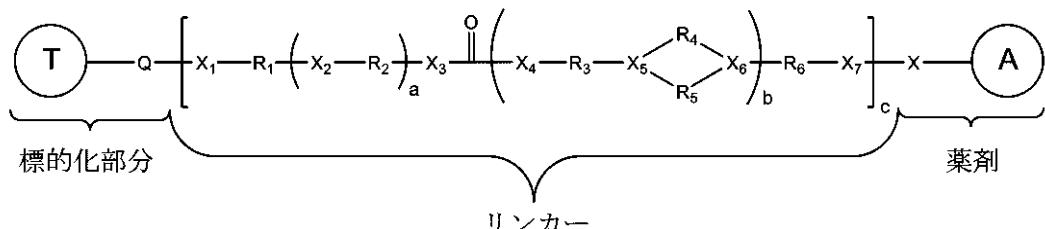
30

【0126】

したがって、一部の実施形態において、本開示のEDCは、以下の式(IV)に示されるような構造を有し、

40

【化10】



式 (IV)

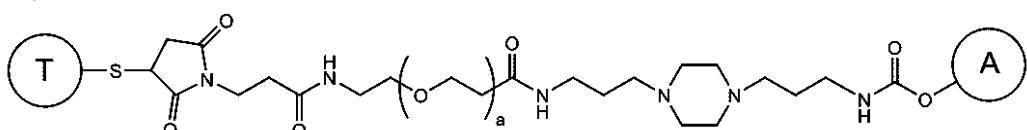
10

式中、Qが、硫黄または窒素原子等の標的化部分の反応性原子であり、リンカー及び薬剤(薬剤の置換基Xを含む)が、上で説明されるとおりである。

【0127】

一部の実施形態において、EDCは、式(IVa)に示されるような構造を有し、

【化11】

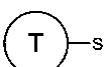


式 (IVa)

20

式中、

【化12】



が、上で説明されるような標的化部分の部分であり、

【化13】

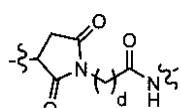


が、上で説明されるような薬剤部分であり、aがリンカー部分に関して上で定義されるとおりである。

【0128】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がブファリンであり；リンカーが、式(II)の構造を有し、式中、X1が

【化14】



であり、dが2であり；X2が-O-であり；X3がヌルであり；X4が-NH-であり；X5及びX6が各々Nであり；X7が-NHC(O)-であり；R1、R2、R4及びR5が、各々-CH2-CH2-であり；R3及びR6が各々-CH2-CH2-CH2-であり；aが24であり；bが1であり；cが1であり；標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラSUN4B7抗体もしくはその結合断片、あるいはSUNB47と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1抗体もしくはその結合断片、またはAT1と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合

30

40

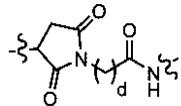
50

断片である。

【0129】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がブファリンであり；リンカーが、式(I)の構造を有し、式中、X₁が

【化15】

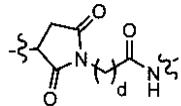


であり、dが2であり；X₂が-O-であり；X₃がヌルであり；X₄が-NH-であり；X₅及びX₆が各々Nであり；X₇が-NHC(O)-であり；R₁、R₂、R₄、及びR₅が、各々-CH₂CH₂であり；R₃及びR₆が各々-CH₂CH₂CH₂-であり；aが36であり；bが1であり；cが1であり；標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラSUN4B7抗体もしくはその結合断片、あるいはSUNB47と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1抗体もしくはその結合断片、またはAT1と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

【0130】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がブファリンであり；リンカーが、式(I)の構造を有し、式中、X₁が

【化16】

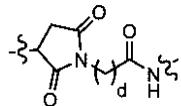


であり、dが2であり；X₂が-O-であり；X₃がヌルであり；X₄が-NH-であり；X₅及びX₆が各々Nであり；X₇が-NHC(O)-であり；R₁、R₂、R₄、及びR₅が、各々-CH₂CH₂であり；R₃及びR₆が各々-CH₂CH₂CH₂-であり；aが24であり；bが1であり；cが1であり；標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラSUN4B7抗体もしくはその結合断片、あるいはSUNB47と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1抗体もしくはその結合断片、またはAT1と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

【0131】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がジギトキシゲニンであり；リンカーが、式(I)の構造を有し、式中、X₁が

【化17】



であり、dが2であり；X₂が-O-であり；X₃がヌルであり；X₄が-NH-であり；X₅及びX₆が各々Nであり；X₇が-NHC(O)-であり；R₁、R₂、R₄、及びR₅が、各々-CH₂CH₂であり；R₃及びR₆が各々-CH₂CH₂CH₂-であり；aが36であり；bが1であり；cが1であり；標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラSUN4B7抗体もしくはその結合断片、あるいはSUNB47と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1抗体もしくはその結合断片、またはAT1と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

10

10

20

20

30

40

50

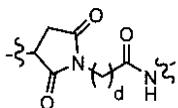
; X₅ 及び X₆ が各々 N であり ; X₇ が - N H C (O) - であり ; R₁、R₂、R₄、及び R₅ が、各々 - C H₂ C H₂ であり ; R₃ 及び R₆ が各々 - C H₂ C H₂ C H₂ - であり ; a が 36 であり ; b が 1 であり ; c が 1 であり ; 標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202 抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38 エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラ SUN4B7 抗体もしくはその結合断片、あるいは SUNB47 と同じまたは実質的に類似の CD38 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1 抗体もしくはその結合断片、または AT1 と同じまたは実質的に類似の CD38 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

10

【0132】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がジギトキシゲニンであり；リンカーが、式(I)の構造を有し、式中、X₁ が

【化18】



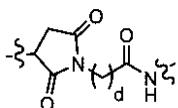
であり、d が 2 であり ; X₂ が - O - であり ; X₃ が ヌルであり ; X₄ が - NH - であり ; X₅ 及び X₆ が各々 N であり ; X₇ が - N H C (O) - であり ; R₁、R₂、R₄、及び R₅ が、各々 - C H₂ C H₂ R₃ であり、R₆ が各々 - C H₂ C H₂ C H₂ - であり ; a が 24 であり ; b が 1 であり ; c が 1 であり ; 標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202 抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38 エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラ SUN4B7 抗体もしくはその結合断片、あるいは SUNB47 と同じまたは実質的に類似の CD38 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1 抗体もしくはその結合断片、または AT1 と同じまたは実質的に類似の CD38 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

20

【0133】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がシラレニンであり；リンカーが、式(I)の構造を有し、式中、X₁ が

【化19】



であり、d が 2 であり ; X₂ が - O - であり ; X₃ が ヌルであり ; X₄ が - NH - であり ; X₅ 及び X₆ が各々 N であり ; X₇ が - N H C (O) - であり ; R₁、R₂、R₄、及び R₅ が、各々 - C H₂ C H₂ - であり ; R₃ 及び R₆ が各々 - C H₂ C H₂ C H₂ - であり ; a が 36 ; b が 1 であり ; c が 1 であり ; 標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202 抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38 エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラ SUN4B7 抗体もしくはその結合断片、あるいは SUNB47 と同じまたは実質的に類似の CD38 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1 抗体もしくはその結合断片、または AT1 と同じまたは実質的に類似の CD38 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片

40

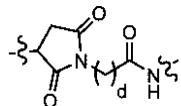
50

である。

【0134】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がシラレニンであり；リンカーが、式(I)の構造を有し、式中、X₁が

【化20】

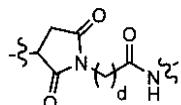


であり、dが2であり；X₂が-O-であり；X₃がヌルであり；X₄が-NH-であり；X₅及びX₆が各々Nであり；X₇が-NHC(O)-であり；R₁、R₂、R₄、及びR₅が、各々-CH₂CH₂であり；R₃及びR₆が各々-CH₂CH₂CH₂-であり；aが24；bが1であり；cが1であり；標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラSUN4B7抗体もしくはその結合断片、あるいはSUNB47と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1抗体もしくはその結合断片、またはAT1と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

【0135】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がシラレニンであり；リンカーが、式(I)の構造を有し、式中、X₁が

【化21】

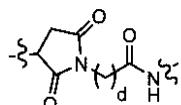


であり、dが2であり；X₂が-O-であり；X₃がヌルであり；X₄が-NH-であり；X₅及びX₆が各々Nであり；X₇が-NHC(O)-であり；R₁、R₂、R₄、及びR₅が、各々-CH₂CH₂であり；R₃及びR₆が各々-CH₂CH₂CH₂-であり；aが24；bが1であり；cが1であり；標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラSUN4B7抗体もしくはその結合断片、あるいはSUNB47と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1抗体もしくはその結合断片、またはAT1と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

【0136】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がブファリンであり；リンカーが、式(I)の構造を有し、式中、X₁が

【化22】



であり、dが2であり；X₂が-O-であり；X₃がヌルであり；X₄が-NH-であり；X₅及びX₆が各々Nであり；X₇が-NHC(O)-であり；R₁、R₂、R₄、及びR₅が、各々-CH₂CH₂であり；R₃及びR₆が各々-CH₂CH₂CH₂-であり；aが24；bが1であり；cが1であり；標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラSUN4B7抗体もしくはその結合断片、あるいはSUNB47と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1抗体もしくはその結合断片、またはAT1と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

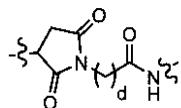
JP 2017-506640 A 2017.3.9

; X₅ が - N (C H₃) - であり ; X₆ が ヌルであり ; X₇ が - N H C (O) - であり ; R₁ が - C H₂ C H₂ - であり ; R₂ が - C H₂ C H₂ - であり ; R₃ が - C H₂ C H₂ C H₂ - であり ; R₄ が ヌルであり ; R₅ 及び R₆ が 共に、 - C H₂ C H₂ C H₂ - であり ; a が 24 ; b が 1 であり ; c が 1 であり ; 標的化部分が、 S U N 4 B 7 、 H B 7 、 O K T 1 0 、 I B 4 、 A T 1 、 S A R 6 5 0 9 8 4 、 3 8 S B 1 9 、 ダラツムマブ、 M O R 2 0 2 抗体、 及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、 C D 3 8 エピトープに結合する、 抗体標的化部分を含む。 一部の実施形態において、 抗体標的化部分は、 ヒトまたはキメラ S U N 4 B 7 抗体もしくはその結合断片、 あるいは S U N B 4 7 と同じまたは実質的に類似の C D 3 8 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。 一部の実施形態において、 標的化部分は、 A T 1 抗体もしくはその結合断片、 または A T 1 と同じまたは実質的に類似の C D 3 8 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。
10

【 0 1 3 7 】

一部の実施形態において、 本開示は、 式 (I V) の E D C を提供し、 式中、 薬剤がブファリンであり； リンカーが、 式 (I I) の構造を有し、 式中、 X₁ が

【 化 2 3 】



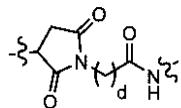
20

であり、 d が 2 であり ; X₂ が - O - であり ; X₃ が ヌルであり ; X₄ が - N H - であり ; X₅ が - N (C H₃) - であり ; X₆ が ヌルであり ; X₇ が - N H C (O) - であり ; R₁ が - C H₂ C H₂ - であり ; R₂ が - C H₂ C H₂ - であり ; R₃ が - C H₂ C H₂ C H₂ - であり ; R₄ が ヌルであり ; R₅ 及び R₆ が 共に、 - C H₂ C H₂ C H₂ - であり ; a が 36 ; b が 1 であり ; c が 1 であり ; 標的化部分が、 S U N 4 B 7 、 H B 7 、 O K T 1 0 、 I B 4 、 A T 1 、 S A R 6 5 0 9 8 4 、 3 8 S B 1 9 、 ダラツムマブ、 M O R 2 0 2 抗体、 及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、 C D 3 8 エピトープに結合する、 抗体標的化部分を含む。 一部の実施形態において、 抗体標的化部分は、 ヒトまたはキメラ S U N 4 B 7 抗体もしくはその結合断片、 あるいは S U N B 4 7 と同じまたは実質的に類似の C D 3 8 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。 一部の実施形態において、 標的化部分は、 A T 1 抗体もしくはその結合断片、 または A T 1 と同じまたは実質的に類似の C D 3 8 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。
30

【 0 1 3 8 】

一部の実施形態において、 本開示は、 式 (I V) の E D C を提供し、 式中、 薬剤がシラレニンであり； リンカーが、 式 (I I) の構造を有し、 式中、 X₁ が

【 化 2 4 】



40

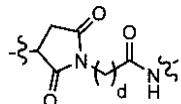
であり、 d が 2 であり ; X₂ が - O - であり ; X₃ が ヌルであり ; X₄ が - N H - であり ; X₅ が - N (C H₃) - であり ; X₆ が ヌルであり ; X₇ が - N H C (O) - であり ; R₁ が - C H₂ C H₂ - であり ; R₂ が - C H₂ C H₂ - であり ; R₃ が - C H₂ C H₂ C H₂ - であり ; R₄ が ヌルであり ; R₅ 及び R₆ が 共に、 - C H₂ C H₂ C H₂ - であり ; a が 24 ; b が 1 であり ; c が 1 であり ; 標的化部分が、 S U N 4 B 7 、 H B 7 、 O K T 1 0 、 I B 4 、 A T 1 、 S A R 6 5 0 9 8 4 、 3 8 S B 1 9 、 ダラツムマブ、 M O R 2 0 2 抗体、 及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、 C D 3 8 エピトープに結合する、 抗体標的化部分を含む。 一部の実施形態において、 抗体標的化部分は、 ヒトまたはキメラ S U N 4 B 7 抗体もしくはその結合断片、 あるいは S U N B 4 7 と同じま
50

たは実質的に類似の CD38 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1 抗体もしくはその結合断片、または AT1 と同じまたは実質的に類似の CD38 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

【0139】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がシラレニンであり；リンカーが、式(II)の構造を有し、式中、X₁が

【化25】



10

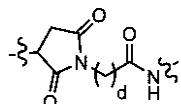
であり、dが2であり；X₂が-O-であり；X₃がヌルであり；X₄が-NH-であり；X₅が-N(CH₃)-であり；X₆がヌルであり；X₇が-NHC(O)-であり；R₁が-CH₂CH₂-であり；R₂が-CH₂CH₂-であり；R₃が-CH₂CH₂CH₂-であり；R₄がヌルであり；R₅及びR₆が共に、-CH₂CH₂CH₂-であり；aが36；bが1であり；cが1であり；標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38 エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラSUN4B7抗体もしくはその結合断片、あるいはSUNB47と同じまたは実質的に類似のCD38 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1 抗体もしくはその結合断片、または AT1 と同じまたは実質的に類似の CD38 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

20

【0140】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がジギトキシゲニンであり；リンカーが、式(II)の構造を有し、式中、X₁が

【化26】



30

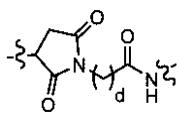
であり、dが2であり；X₂が-O-であり；X₃がヌルであり；X₄が-NH-であり；X₅が-N(CH₃)-であり；X₆がヌルであり；X₇が-NHC(O)-であり；R₁が-CH₂CH₂-であり；R₂が-CH₂CH₂-であり；R₃が-CH₂CH₂CH₂-であり；R₄がヌルであり；R₅及びR₆が共に、-CH₂CH₂CH₂-であり；aが24；bが1であり；cが1であり；標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38 エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラSUN4B7抗体もしくはその結合断片、あるいはSUNB47と同じまたは実質的に類似のCD38 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1 抗体もしくはその結合断片、または AT1 と同じまたは実質的に類似の CD38 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

40

【0141】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がジギトキシゲニンであり；リンカーが、式(II)の構造を有し、式中、X₁が

【化27】

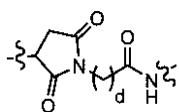


であり、dが2であり；X₂が-O-であり；X₃がヌルであり；X₄が-NH-であり；X₅が-N(CH₃)-であり；X₆がヌルであり；X₇が-NHC(O)-であり；R₁が-CH₂CH₂-であり；R₂が-CH₂CH₂-であり；R₃が-CH₂CH₂CH₂-であり；R₄がヌルであり；R₅及びR₆が共に、-CH₂CH₂CH₂-であり；aが36；bが1であり；cが1であり；標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラSUN4B7抗体もしくはその結合断片、あるいはSUNB47と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1抗体もしくはその結合断片、またはAT1と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。10

【0142】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がブファリンであり；リンカーが、式(II)の構造を有し、式中、X₁が20

【化28】

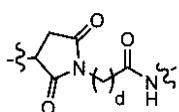


であり、dが2であり；X₂が-O-であり；X₃がヌルであり；X₄が-NH-であり；X₅が-N(CH₃)-であり；X₆がヌルであり；X₇が-NHC(O)-であり；R₁が-CH₂CH₂-であり；R₂が-CH₂CH₂-であり；R₃が-CH₂CH₂CH₂-であり；R₄がヌルであり；R₅及びR₆が共に、-CH₂CH₂CH₂-であり；aが24；bが1であり；cが1であり；標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラSUN4B7抗体もしくはその結合断片、あるいはSUNB47と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1抗体もしくはその結合断片、またはAT1と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。30

【0143】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がブファリンであり；リンカーが、式(II)の構造を有し、式中、X₁が40

【化29】



であり、dが2であり；X₂が-O-であり；X₃がヌルであり；X₄が-NH-であり；X₅が-N(CH₃)-であり；X₆がヌルであり；X₇が-NHC(O)-であり；R₁が-CH₂CH₂-であり；R₂が-CH₂CH₂-であり；R₃が-CH₂CH₂-50

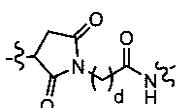
C H₂ - であり； R₄ がヌルであり； R₅ 及び R₆ が共に、 - C H₂ C H₂ C H₂ - であり； a が 24； b が 1 であり； c が 1 であり； 標的化部分が、 S U N 4 B 7、 H B 7、 O K T 1 0、 I B 4、 A T 1、 S A R 6 5 0 9 8 4、 3 8 S B 1 9、 ダラツムマブ、 M O R 2 0 2 抗体、 及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、 C D 3 8 エピトープに結合する、 抗体標的化部分を含む。 一部の実施形態において、 抗体標的化部分は、 ヒトまたはキメラ S U N 4 B 7 抗体もしくはその結合断片、 あるいは S U N B 4 7 と同じまたは実質的に類似の C D 3 8 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。 一部の実施形態において、 標的化部分は、 A T 1 抗体もしくはその結合断片、 または A T 1 と同じまたは実質的に類似の C D 3 8 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

10

【 0 1 4 4 】

一部の実施形態において、 本開示は、 式 (I V) の E D C を提供し、 式中、 薬剤がシラレニンであり； リンカーが、 式 (I I) の構造を有し、 式中、 X₁ が

【 化 3 0 】



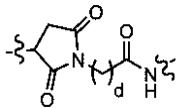
であり、 d が 2 であり； X₂ が - O - であり； X₃ がヌルであり； X₄ が - N H - であり； X₅ が - N (C H₃) - であり； X₆ がヌルであり； X₇ が - N H C (O) - であり； R₁ が - C H₂ C H₂ - であり； R₂ が - C H₂ C H₂ - であり； R₃ が - C H₂ C H₂ C H₂ - であり； R₄ がヌルであり； R₅ 及び R₆ が共に、 - C H₂ C H₂ C H₂ - であり； a が 24； b が 1 であり； c が 1 であり； 標的化部分が、 S U N 4 B 7、 H B 7、 O K T 1 0、 I B 4、 A T 1、 S A R 6 5 0 9 8 4、 3 8 S B 1 9、 ダラツムマブ、 M O R 2 0 2 抗体、 及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、 C D 3 8 エピトープに結合する、 抗体標的化部分を含む。 一部の実施形態において、 抗体標的化部分は、 ヒトまたはキメラ S U N 4 B 7 抗体もしくはその結合断片、 あるいは S U N B 4 7 と同じまたは実質的に類似の C D 3 8 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。 一部の実施形態において、 標的化部分は、 A T 1 抗体もしくはその結合断片、 または A T 1 と同じまたは実質的に類似の C D 3 8 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

20

【 0 1 4 5 】

一部の実施形態において、 本開示は、 式 (I V) の E D C を提供し、 式中、 薬剤がシラレニンであり； リンカーが、 式 (I I) の構造を有し、 式中、 X₁ が

【 化 3 1 】



であり、 d が 2 であり； X₂ が - O - であり； X₃ がヌルであり； X₄ が - N H - であり； X₅ が - N (C H₃) - であり； X₆ がヌルであり； X₇ が - N H C (O) - であり； R₁ が - C H₂ C H₂ - であり； R₂ が - C H₂ C H₂ - であり； R₃ が - C H₂ C H₂ C H₂ - であり； R₄ がヌルであり； R₅ 及び R₆ が共に、 - C H₂ C H₂ C H₂ - であり； a が 24； b が 1 であり； c が 1 であり； 標的化部分が、 S U N 4 B 7、 H B 7、 O K T 1 0、 I B 4、 A T 1、 S A R 6 5 0 9 8 4、 3 8 S B 1 9、 ダラツムマブ、 M O R 2 0 2 抗体、 及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、 C D 3 8 エピトープに結合する、 抗体標的化部分を含む。 一部の実施形態において、 抗体標的化部分は、 ヒトまたはキメラ S U N 4 B 7 抗体もしくはその結合断片、 あるいは S U N B 4 7 と同じまたは実質的に類似の C D 3 8 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。 一部の実施形態において、 標的化部分は、 A T 1 抗体もしくはその結合断片、 または A T 1

40

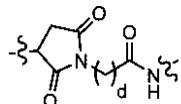
50

と同じまたは実質的に類似の CD38 エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

【 0146 】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がジギトキシゲニンであり；リンカーが、式(II)の構造を有し、式中、X₁が

【 化 32 】



10

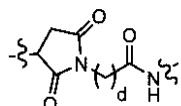
であり、dが2であり；X₂が-O-であり；X₃がヌルであり；X₄が-NH-であり；X₅が-N(CH₃)-であり；X₆がヌルであり；X₇が-NHC(O)-であり；R₁が-CH₂CH₂-であり；R₂が-CH₂CH₂-であり；R₃が-CH₂CH₂CH₂-であり；R₄がヌルであり；R₅及びR₆が共に、-CH₂CH₂CH₂-であり；aが24；bが1であり；cが1であり；標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラSUN4B7抗体もしくはその結合断片、あるいはSUNB47と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1抗体もしくはその結合断片、またはAT1と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

20

【 0147 】

一部の実施形態において、本開示は、式(IV)のEDCを提供し、式中、薬剤がジギトキシゲニンであり；リンカーが、式(II)の構造を有し、式中、X₁が

【 化 33 】



30

であり、dが2であり；X₂が-O-であり；X₃がヌルであり；X₄が-NH-であり；X₅が-N(CH₃)-であり；X₆がヌルであり；X₇が-NHC(O)-であり；R₁が-CH₂CH₂-であり；R₂が-CH₂CH₂-であり；R₃が-CH₂CH₂CH₂-であり；R₄がヌルであり；R₅及びR₆が共に、-CH₂CH₂CH₂-であり；aが24；bが1であり；cが1であり；標的化部分が、SUN4B7、HB7、OKT10、IB4、AT1、SAR650984、38SB19、ダラツムマブ、MOR202抗体、及びこれらの任意の結合断片から成る群から選択される、CD38エピトープに結合する、抗体標的化部分を含む。一部の実施形態において、抗体標的化部分は、ヒトまたはキメラSUN4B7抗体もしくはその結合断片、あるいはSUNB47と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。一部の実施形態において、標的化部分は、AT1抗体もしくはその結合断片、またはAT1と同じまたは実質的に類似のCD38エピトープに結合する抗体もしくはその結合断片である。

40

【 0148 】

本開示のEDCは、(1)窒素等のヘテロ原子(複数を含む)を含むリンカーのサブユニットに対する薬剤部分の反応、続いて、リンカー部分の残りに対する(例えば、ポリエチレンギリコールに対する)、リンカーサブユニットの末端部分の反応、及び最後に、標的化部分をリンカーの末端部に反応させて、EDVを形成すること；(2)窒素等のヘテロ原子(複数を含む)を含むリンカーのサブユニットに対する薬剤部分の反応、リンカー

50

部分の残りの部分に対する標的化部分の反応、及び最後にリンカーサブユニットの末端部を結合させて、EDCを形成すること；(3)標的化部分と、リンカー部分のサブユニット(例えば、PEGポリマー)との反応、続いて、リンカーサブユニットの末端部と、リンカー部分の残りのサブユニットとの反応、及び最後に薬剤部分との反応で、EDCを形成すること；(4)ヘテロ原子(複数を含む)(例えば、窒素)を含むリンカーのサブユニットと、PEGサブユニットとの反応で、完全なリンカー部分を形成し、続いて、完成したリンカー部分と薬剤部分との反応で、薬剤-リンカーサブユニットを形成し、最後に、薬剤-リンカーサブユニットと標的化部分との反応で、EDCを形成すること；ならびに/または(5)ヘテロ原子(複数を含む)(例えば、窒素)を含むリンカーのサブユニットと、PEGサブユニットとの反応で、完全なリンカー部分を形成し、続いて、完成したリンカー部分と、標的化部分の部分との反応で、標的化部分-リンカーサブユニットを形成し、最後に、標的化部分-リンカーサブユニットと薬剤部分との反応で、EDCを形成すること、を含む、当業者には既知の有機化学反応、条件、及び試薬を採用して、いくつかの経路のうちのいずれかによって段階的に調製され得る。

10

【0149】

標的化部分の部分(例えば、抗体)をPEG型リンカーサブユニットに結合させる方法は、当業者には既知であり、例えば、以下の実施例、及び第WO2012/178173号(この内容は、それらの全体として参照により本明細書に組み込まれる)において見出すことができる。

20

【0150】

一実施形態において、本開示のEDCは、活性化された形態の薬剤部分(例えば、3-ヒドロキシル酸素原子に結合される4-ニトロフェニルカルバメート基を有する、ステロイド型薬剤)を、リンカーのアルキルアミンサブユニットと反応させ、続いて、保護されたPEGポリマー(例えば、MAL-PEG24-TFPエステル、製品番号10554、Quanta Biodesign Ltd, Plain City, Ohio, USA)と結合させて、薬剤-(保護)リンカー(例えば、MAL-PEG24-アルキルアミン-薬剤)を形成することによって、形成される。次いで、薬剤-(保護)リンカーを、標的化部分と(例えば、任意にトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン等の還元剤との反応により還元された、SUN4B7等の、マウス、ヒト、キメラ、またはヒト化抗CD38抗体、もしくはその結合断片等の抗体と)共役させて、薬剤-(保護)リンカーのマレイミド部分への求核付加を通じてEDCを形成する。

30

【0151】

抗体及び他の標的化部分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、及び(iv)糖ヒドロキシルまたはアミノ基(抗体がグリコシル化されている)が挙げられるが、これらに限定されない。アミン、チオール、及びヒドロキシル基は、求核であり、(i)NHSエステル、HOBTエステル、ハロホルメート、及び酸ハロゲン化物等の活性エステル；(ii)ハロアセトアミド等のハロゲン化アルキル及びベンジル；(iii)アルデヒド、ケトン、カルボキシル、及びマレイミド基を含む、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基との共有結合を形成するように反応することができる。ある抗体は、還元性鎖間ジスルフィド、即ち、システインブリッジを有する。抗体は、DTT(Cleland試薬、ジチオスレイトール)またはTCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩等の還元剤による処理によって、リンカー試薬との共役のために反応性にされ得る；Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80；Soltac Ventures, Beverly, Mass.。このように、各システインジスルフィドブリッジは、理論上は、2つの反応性チオール求核試薬を形成する。加えて、ジスルフィドブリッジは、リンカー-薬剤が、抗体に共有結合されつつ、2つのシステイン間の閉結合を維持し、このため、抗体を安定化せんように、本開示のEDCのリンカー部分によって架橋することができる(第WO 2013/085925 A1号、及びBioconjugate Chem., Vol. 1,

40

50

No. 1, 1990 pp 36-50)。追加の求核基は、アミンのチオールへの変換をもたらす、2-イミノチオラン (Traut試薬)とのリジンの反応を通じて、抗体に導入することができる。

【0152】

EDCはまた、リンカー試薬または薬物上の求核置換基と反応することができる求電子部分を導入するための抗体の修飾によって產生され得る。グリコシリ化された抗体の糖は、例えば、過ヨウ素酸塩酸化試薬で参加されて、リンカー試薬または薬物部分のアミン基と反応し得るアルデヒドまたはケトン基を形成し得る。得られたイミン Schiff塩基は、安定した結合を形成し得るか、または、例えば、ホウ化水素試薬によって還元されて、安定したアミン結合を形成し得る。一実施形態において、グリコシリ化された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り、薬物上の適切な基と反応することができるタンパク質中のカルボニル(アルデヒド及びケトン)基を得ることができる (Hermanson, G. T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: New York, p 234-242)。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有するタンパク質は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応することができ、第1のアミノ酸の代わりにアルデヒドの產生をもたらす (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3: 138-146; 米国特許第5,362,852号)。かかるアルデヒドは、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。

10

20

30

40

【0153】

同様に、薬物部分上の求核基としては、(i) NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート、及び酸ハロゲン化物等の活性エステル；(ii) ハロアセトアミド等のハロゲン化アルキル及びベンジル；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、及びマレイミド基を含む、反応して、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と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、ヒドラジンカルボン酸、及びアリールヒドラジド基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0154】

抗体等のある標的化部分は、薬剤-リンカーサブユニットのリンカー部分に反応性の1つを超える部位を含み得る。かかる実施形態において、1つを超える薬剤は、単一の標的化部分に結合され得る。薬剤負荷は、EDC中の1つの標的化部分(例えば、抗体)あたりの薬剤の平均数を指す。各リンカーが1つの薬剤に結合される場合、薬剤の平均数は、標的化部分上のリンカーの平均数に等しくなる。本開示のEDCに対する薬剤負荷は、標的化部分が抗体(Ab)である場合、典型的に、1つの標的化部分あたり1~8つの薬剤の範囲であり、例えば、ここでは、1、2、3、4、5、6、7、または8つの治療薬剤が、抗体に共有結合される。このため、EDCの組成物は、1~8のある範囲の薬物と共にされた抗体の集合体を含む。共役反応物からのEDCの調製物における1つの抗体あたりの薬物の平均数は、質量スペクトル分析、ELISAアッセイ、電気泳動、及びHPLC等の従来の手段によって特徴付けられ得る。ELISAにより、EDCの特定の調製物における治療薬剤の平均化値が判定され得る (Hamblett et al (2004) *Clinical Cancer Res.* 10: 7063-7070; Sanderson et al (2005) *Clinical Cancer Res.* 11: 843-852)。しかしながら、ELISAに基づく方法によって、抗体に共役された治療薬剤及び/またはリンカーの位置を識別することは可能ではない。一部の例において、均質なEDC(治療薬剤の数は同じであるが、抗体上の位置は異なり得る場合)の分離、精製、及び特性評価は、逆相HPLCまたは電気泳動等の手段によって達成され得る。

【0155】

一部の実施形態において、薬剤部分、リンカー部分、及び標的化部分の部分から成るEDCは、標準的な親和性、サイズ排除、濾過、または当業者に既知の他の方法を使用して

50

、結合されていない薬剤、リンカー、及び／または標的化部分から精製される。

【0156】

種々の実施形態において、本開示のE D Cは、概して、癌、免疫障害（例えば、喘息）、及び他の疾患の治療に有用である。癌治療のための疾患の例としては、乳癌、大腸癌、肝臓癌、肺癌、前立腺癌、卵巣癌、脳癌、及び脾臓癌が挙げられる。具体的に、以下の腫瘍型のうちの1つのための治療が効果的であり得る：B細胞リンパ芽球白血病、T細胞リンパ芽球白血病、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、濾胞性リンパ腫、バーキットリンパ腫、メラノーマ、眼メラノーマ、皮膚メラノーマ、結腸腺癌、肝細胞癌、腎細胞癌、卵巣癌、前立腺腺癌、肝臓癌、移行上皮癌、脾臓腺癌、肺癌、乳癌、及び結腸癌。

10

【0157】

V I I . 薬学的製剤

本開示に従う化合物または製剤（例えば、開示されるE D Cを含む化合物または製剤）の投与は、治療薬剤に対して受け入れられている、及び当該技術分野において一般的に既知の投与方法のうちのいずれかによって行うことができる。これらのプロセスとしては、例えば、非経口、経口、経鼻、または局所投与（例えば、パッチによる）による、全身投与が挙げられるが、これに限定されない。非経口投与は、一般的に、皮下、筋肉内、もしくは静脈内注射によって、または灌流によって、行われる。一般的に、抗体に基づく治療は、典型的に、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、または液体中での用時溶解に好適である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。一実施形態において、非経口投与は、一定の用量レベルの維持を確実とする緩速放出または延長放出を有するシステムの設定を使用する。鼻腔内投与に関しては、当業者に公知である好適な鼻腔内ビヒクルを使用することが可能である。経口投与は、錠剤、カプセル、ソフトカプセル（遅延放出または延長放出を有する製剤を含む）、ピル、粉末、顆粒、エリキシル、染料、懸濁液、シロップ、及びエマルションによって行うことができる。この形態の提示は、腸管バリアの通過のためにより特に適している。

20

【0158】

本開示による化合物または製剤の投与のための用量は、対象の型、血統、年齢、体重、性別、及び医学的状態；治療されるべき状態の重篤性；投与方法；対象の腎臓及び肝臓機能の状態、ならびに既知の試験プロトコルを使用して、あるいはインビボもしくはインビトロ試験または診断データからの外挿によって、使用され、かつ経験的に判定され得る、特定の化合物もしくは塩の性質を含む、様々な要素に従って選択される。任意の特定の個人に関して、具体的な用量レジメンが、個々の必要性、及び製剤を投与する、または製剤の投与を管理する人物の専門的な判断に従って、経時的に調節されるべきであることが更に理解される。例えば、通常の経験のある医者は、治療されることになる医学的状態の進行を、中断、または停止するための所望の化合物の有効量を容易に判定及び処方するであろう。例として、非経口的に投与されるとき、本開示に従う化合物の有効レベルは、体重1 kgあたり約0.002～約500 mg、より具体的には、体重1 kgあたり約0.02 mg～約50 mgの範囲内であり、毎日、毎週、または隔週投与される。

30

【0159】

本開示に従う化合物または製剤は、1日1回の用量の形態で投与することができるか、または、1日の総用量を、1日あたり2、3、4回以上の用量の用量（例えば、分割用量）で投与することができる。かかる容量（複数を含む）は、断続的に、例えば、毎週、または3週毎（例えば、患者が、組成物または製剤の約2～約20、例えば、約6回の用量を受けるように）投与されてもよい。初期のより高い負荷用量、続いて、1回以上のより低い用量が投与されてもよい。例示的な投薬レジメンは、初期負荷用量、続いて、毎週の維持用量を投与することを含む。しかしながら、他の用量レジメンは、有用であり得る。より具体的には、用量は、一部の実施形態において、1～20 mg s / 平方メートル (mg s / m²) 体表面積 (b s a) の範囲で類似であってもよく、用量は、毎週、または2週毎に投与することができる。固体腫瘍に関しては、用量は、一部の実施形態において、

40

50

より高い、例えば、200～600mg s / m² b s a または約0.01～20mg s / kg (例えば、120分の静脈内点滴を通じて投与) 、及び150～350mg s / m² または1～10mg s / kg (60分の静脈内点滴を通じて投与) の範囲の初期用量であってもよい。したがって、本開示に従う化合物の投薬範囲は、毎日～毎週の1mg s / m² ～500mg s / m² b s a の用量とすることができます。

【 0160 】

本開示に従う組成物または製剤は、殺菌することができる、かつ / または以下のうちの1つ以上を含有することができる：保存、安定化、湿潤、もしくは乳化のための薬剤等の非毒性アジュvant及び補助物質；溶解を促進する薬剤；ならびに浸透圧を制御するための塩及び / もしくは緩衝剤。加えて、それらはまた、治療利点を提供する他の物質を含有することができる。組成物は、当業者には公知の混合、造粒、またはコーティングの標準的なプロセスによって、それぞれ調製される。

本明細書における本開示の化合物または製剤は、第2の薬物と同時に、連続的に、もしくは交互に、または他の療法で反応がなければ、投与することができる。このため、第2の薬物の組み合わせ投与は、別個の製剤または単一の薬学的製剤を使用する同時投与、及びいずれかの順序の連続投与を含み、好ましくは、双方の (または全ての) 療法が、それらの生物学的活性を同時に与える期間が存在する。複数の第2の薬物が、本開示の化合物と組み合わせて使用されてもよい。

【 0161 】

本開示の別の実施形態において、上で説明される障害の治療に有用な材料を含有する製造物品が提供される。一態様において、製造物品は、(a) 本明細書における化合物または製剤を含む容器 (好ましくは、容器は、容器内に E D C 及び薬学的に許容可能な担体または希釈剤を含む) ；ならびに (b) 患者における障害を治療するための説明を有するパッケージ挿入物を含む。

【 0162 】

本開示の治療 E D C は、治療されるべき状態に適切ないずれの経路によっても投与されてよい。 E D C は、典型的に、非経口的投与され、例えば、点滴、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、髄腔内、ボーラス、腫瘍内注射、または硬膜外注射である (Shire et al (2004) J. Pharm. Sciences 93 (6) : 1390 - 1402) 。 E D C の薬学的製剤は、典型的に、薬学的に許容可能な非経口ビヒクルと共に、非経口投与のために、かつ単位用量の注射可能な形態で調製される。所望の純度を有する E D C は、任意に、凍結乾燥製剤または水溶液の形態の薬学的に許容可能な希釈剤、担体、賦形剤、または安定剤と混合される (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition , Osol , A. Ed.) 。

【 0163 】

許容可能な非経口ビヒクル、希釈剤、担体、賦形剤、及び安定剤は、採用される用量及び濃度において、レシピエントに対して非毒性であり、かつリン酸、クエン酸、及び他の有機酸等の緩衝剤；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤 (オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベン等のアルキルパラベン；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；及び m - クレゾール等) ；低分子量 (約 10 残基未満) ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；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、もしくはリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む、単糖、二糖、及び他の炭水化物； E D T A 等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体 (例えば、Zn - タンパク質錯体) ；ならびに / または T W E E N (商標) 、 P L U R O N I C S (商標) 、もしくはポリエチレングリコール (P E G) 等

10

20

30

40

50

の非イオン界面活性剤を含む。例えば、凍結乾燥された抗 E r b B 2 抗体製剤は、明示的に参照により本明細書に組み込まれる第 WO 97 / 04801 号で説明されている。E D C の例示的な製剤は、適切に pH 6 の約 100 mg / 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 - イル] オキシ - テトラヒドロピラン - 3, 4, 5 - トリオール; C₂H₂₂O₁₁; C A S 番号 99 - 20 - 7)、及び約 0.1% の T W E E N (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; C A S 番号 9005 - 64 - 5) を含有する。

【0164】

治療 E D C の薬学的製剤は、E D C を作製するプロセスにおける、不完全な精製、ならびに過剰な試薬、不純物、及び副生成物の分離；あるいは時間 / 温度加水分解、またはバルク E D C もしくは製剤化された E D C 組成物の保存後の分解の結果として、ある量の未反応薬剤部分、標的化部分 - リンカー中間体、及び / または薬剤 - リンカー中間体を含有し得る。例えば、それは、検出可能な量の薬剤 - リンカーまたは種々の中間体を含有し得る。代替的に、または加えて、それは、検出可能な量の結合されていない遊離標的化部分を含有し得る。例示的な製剤は、インビトロ細胞増殖アッセイによって、一部の場合において、薬剤 - リンカー共役体が、遊離薬剤よりも細胞殺滅において効力が低いことが示されたため、最大 10% モル当量の薬剤 - リンカーの薬剤を含有し得る。

【0165】

活性薬学的成分はまた、コロイド状薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子、及びナノカプセル）において、またはマクロエマルションにおいて、それぞれ、例えば、コアセルベーション技術によって、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、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセル及びポリ - (メタクリル酸メチル (methyl methacrylate)) マイクロカプセルに封入されてもよい。かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示されている。

【0166】

持続放出調製物が調製され得る。持続放出調製物の好適な例は、E D C を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスを含み、このマトリクスは、成形された物品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリクスの例としては、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)、もしくはポリ (ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第 3,773,919 号）、L - グルタミン酸及びガンマ - エチル - L - グルタミン酸塩のコポリマー、分解不可能なエチレン酢酸ビニル、LUPRON DEPOT (商標)（乳酸 - グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから成る注射可能なマイクロスフェア）等の分解可能な乳酸 - グリコール酸コポリマー、ならびにポリ - D - (-) - 3 - ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

【0167】

インビボ投与のために使用されるべき製剤は、無菌でなければならず、これは、無菌濾過膜を通じた濾過によって、容易に達成される。

【0168】

製剤は、前述の投与経路に好適なものを含む。製剤は、単位用量形態で好都合に提示され得、かつ薬学の技術分野において公知の方法のうちのいずれかによって調製され得る。技術及び製剤は、概して、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.) において見出される。かかる方法は、活性成分を、1 つ以上の副成分を構成する担体と会合させるステップを含む。一般的に、製剤は、活性成分を、液体担体、または微細に分割された固体担体、または双方と均一かつ緊密に会合させ、次いで、必要な場合、製品を成形

10

20

30

40

50

することによって、調製される。

【0169】

水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に好適な賦形剤との混合物中に活性材料（E D C）を含有する。かかる賦形剤としては、懸濁剤、例えば、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、及びアカシアゴム、ならびに分散もしくは湿潤剤、例えば、自然発生フォスファチド（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、ステアリン酸ポリオキシエチレン）、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及び無水ヘキシトールから誘導される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アート）が挙げられる。水性懸濁液はまた、エチルまたはn-プロピルp-ヒドロキシ-ベンゾエート等の1つ以上の防腐剤、1つ以上の着色剤、1つ以上の矯味剤、及びスクロースまたはサッカリン等の1つ以上の甘味剤を含有し得る。

10

【0170】

E D Cの薬学的組成物は、無菌の注射可能な水性または油性懸濁液等の無菌の注射可能な調製物の形態であり得る。この懸濁液は、上で言及されているそれらの好適な分散または湿潤剤、及び懸濁剤を使用して、既知の技術に従って製剤化され得る。無菌の注射可能な調製物はまた、1,3-ブタン-ジオール中の溶液等の非毒性の非経口的に許容可能な希釈剤もしくは溶媒中の無菌の注射可能な溶液もしくは懸濁液であり得るか、または凍結乾燥粉末として調製され得る。採用され得る許容可能なビヒクル及び溶媒は、R i n g e r溶液及び生理食塩液である。加えて、無菌固定油が、溶媒または懸濁媒体として従来に採用されてもよい。この目的のために、合成モノまたはジグリセリドを含む、任意の無菌性固定油が採用されてもよい。加えて、オレイン酸等の脂肪酸が、注射剤の調製物において同様に使用されてもよい。

20

【0171】

单一用量形態をもたらすように担体材料と組み合わされ得る活性成分の量は、治療される宿主及び特定の投与形態に依存して変化する。例えば、静脈内点滴が意図される水性溶液は、約30mL/時の速度の好適な体積の点滴を行うことができるようになるために、溶液1ミリリットルあたり約3~500μgの活性成分を含有し得る。皮下（ボーラス）投与は、約1.5mL以下の総体積、及び1mLあたり約100mgのE D Cの濃度で達成され得る。頻回及び長期投与を必要とするE D Cに関して、事前充填された注射器または自動注射デバイス技術等による、皮下経路が採用されてもよい。

30

【0172】

一般的な提案として、1用量あたりに投与されるE D Cの初期の薬学的有効量は、約0.01~100mg/kg、即ち、1日あたり約0.1~20mg/患者の体重1kgの範囲内であり、使用される化合物の典型的な初期範囲は、0.3~15mg/kg/日である。例えば、ヒト患者は、患者の体重1kgあたり約1.0mgのE D Cで初期に投薬されてもよい。用量は、最大耐性量（M T D）まで上昇されてもよい。投薬スケジュールは、約3週毎であってもよいが、診断された状態または応答に従って、スケジュールは、より多いまたはより少ない頻度であってもよい。用量は、約4サイクル以上等の複数のサイクルで安全に投与することができるM T D以下となるように、治療過程の間に更に調節されてもよい。

40

【0173】

非経口投与に好適な製剤は、意図されるレシピエントの血液で製剤を等張にする抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、及び溶質を含有し得る、水性及び非水性無菌注射溶液；ならびに懸濁剤及び増粘剤を含み得る、水性及び非水性無菌懸濁液を含む。

【0174】

タンパク質治療の経口投与は、一般的に、胃腸における限られた吸収、加水分解、または変性による乏しいバイオアベイラビリティにより、不利であるが、経口投与に好適なE

50

D C の製剤は、既定量の E D C を各々含有するカプセル、カシェー、または錠剤等の個別の単位として調製され得る。

【 0 1 7 5 】

製剤は、単位用量または複数回用量容器、例えば、封止されたアンプル及びバイアルにパッケージ化されてもよく、かつ、使用の直前に、注射するために、無菌液体担体、例えば、水の添加のみを必要とするフリーズドライ（凍結乾燥）状態で、保存されてもよい。用時注射溶液及び懸濁液は、先で説明される種類の無菌粉末、顆粒、及び錠剤から調製される。例示的な単位用量製剤は、1日用量もしくは単位1日サブ用量、またはその適切な一部分の活性成分を含有する。

【 0 1 7 6 】

本開示は、上で定義されるような少なくとも1つの活性成分と共に、そのための獣医学的担体を含む、獣医学的組成物を更に提供する。獣医学的担体は、組成物を投与する目的上有用な材料であり、本来不活性であるか、または獣医学的技術分野において許容可能であり、かつ活性成分と適合性がある、固体、液体、または気体状材料であり得る。これらの獣医学的組成物は、非経口的に、経口的に、または任意の他の所望の経路によって投与され得る。

【 0 1 7 7 】

本開示の E D C は、ヒトもしくは動物対象において、癌及び自己免疫状態または他の免疫障害等の種々の疾患または障害を治療するために使用され得る。一実施形態において、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、トリなど）である。例示的な状態または障害としては、良性もしくは悪性腫瘍；白血病及びリンパ性悪性腫瘍；ニューロン、グリア、アストロサイト、視床下部、腺、マクロファージ、上皮、間質、胞胚腔の、炎症性、血管形成、及び免疫学的障害（喘息を含むが、これに限定されない）等の他の障害が挙げられる。

【 0 1 7 8 】

動物モデル及び細胞ベースのアッセイにおいて識別される E D C 化合物は、腫瘍を有する高等霊長類及びヒト臨床試験において更に試験することができる。ヒト臨床試験は、有効性を試験する臨床試験と同様に設計することができる。臨床試験は、既知の化学療法及び/または細胞毒性薬剤を含む、放射線及び/または化学療法等の既知の治療レジメンと組み合わせて、E D C の有効性を評価するために設計されてもよい（P e g r a m e t a l (1 9 9 9) O n c o g e n e 1 8 : 2 2 4 1 - 2 2 5 1 ）。一実施形態において、組み合わせ治療薬剤は、A T R A 、ベルケイド、三酸化ヒ素、サリドマイド、ブクラシン（B u c l a s i n e ）、A B T - 1 9 9 、ゲルダナマイシン、m T O R 阻害剤、酪酸塩、（M G 1 3 2 、ベルケイド、他の（プロテアソーム阻害剤s）、アニソマイシン、D - c A M P 、ベルベリン、カルシフェロール、もしくは他のビタミンD誘導体、バフィロマイシンA 1 、（ロカグラミドもしくは他のフラバグリン）、ベバシズマブ；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；ドキソルビシン；エトポシド；リン酸エトポシド；ジェムザール（ゲムシタビンH C L ）；ハイカムチン（塩酸トポテカン）；イホスファミド；イレッサ（ゲフィチニブ）；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、Q L T ；プレメトレキセド（P r e m e t r e x e d ）；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（V i n b l a s i n e ）；ビンクリスチン；ならびに酒石酸ビノレルビンから選択される。

【 0 1 7 9 】

本開示の E D C を使用して治療される癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病、またはリンパ性悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。かかる癌のより具体的な例としては、扁平上皮細胞癌（s q u a m o u s c e l l c a n c e r ）（例えば、扁平上皮細胞癌（e p i t h e l i a l s q u a m o u s c e l l c a n c e r ））、小細胞肺癌、非小細胞肺癌を含む肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞癌、消化管癌を含む胃（（g a s t r i c ）もしくは（s t o

10

20

30

40

50

m a c h)) 癌、消化管間質腫瘍 (G I S T) 、脾臓癌、グリア芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーマ、乳癌、結腸癌、直腸癌、大腸癌、子宮内膜もしくは子宮癌、唾液腺癌、腎臓 ((k i d n e y) もしくは (r e n a l)) 癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、ならびに頭部及び頸部癌が挙げられる。

【 0 1 8 0 】

疾患の防止または治療のために、E D C の適切な用量は、上で定義されるような治療されるべき疾患の型、疾患の重篤性及び過程、分子が予防または治療目的で投与されるかどうか、以前の治療、患者の病歴及び抗体への応答、ならびに主治医の判断に依存する。分子は、1度に、または一連の治療にわたって、患者に好適に投与される。疾患の型及び重篤性に依存して、例えば、1つ以上の別個の投与によるか、または連続的な点滴によるかにかかわらず、約 $1 \mu \text{g} / \text{kg} \sim 15 \text{mg} / \text{kg}$ (例えば、 $1 \text{mg} / \text{kg} \sim 15 \text{mg} / \text{kg}$) を含む、例えば、 $0.1 \sim 20 \text{mg} / \text{kg}$ の分子が、患者への投与に対する初期候補用量である。典型的な1日用量は、上で言及される要因に依存して、約 $1 \mu \text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ (例えば、 $1 \text{mg} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$) 以上の範囲であり得る。患者に投与されるべき E D C の例示的な用量は、約 $0.1 \sim 10 \text{mg}$ / 患者の体重の 1kg の範囲内である。

10

【 0 1 8 1 】

本開示の E D C は、抗癌特性を有する第2の化合物と、薬学的組み合わせ製剤、または組み合わせ療法としての投薬レジメンにおいて組み合わされ得る。薬学的組み合わせ製剤または投薬レジメンの第2の化合物は、好ましくは、それらが互いに悪影響を及ぼさないように、組み合わせの E D C に対する補足的活性を有する。

20

【 0 1 8 2 】

第2の化合物は、化学療法剤、細胞毒性薬、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、抗血管形成剤、及び / または心筋保護剤であり得る。かかる分子は、意図される目的上、効果的である量において、組み合わせで好適に存在する。E D C を含有する薬学的組成物はまた、チューブリン形成阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、またはDNA結合剤等の治療有効量の化学療法剤を有し得る。

30

【 0 1 8 3 】

他の治療レジメンが、本開示に従って識別される抗癌剤の投与と組み合わされてもよい。組み合わせ療法が、同時または連続的レジメンとして投与されてもよい。連続的に投与されるとき、組み合わせは、2回以上の投与で投与されてもよい。組み合わされた投与は、別個の製剤または単一の薬学的製剤を使用した同時投与、及びいずれかの順序における連続投与を含み、双方の (または全ての) 活性薬剤が、それらの生物学的活性を同時に与える期間が存在する。

【 0 1 8 4 】

一実施形態において、本開示の E D C での治療は、本明細書で識別される抗癌剤と、異なる化学療法剤のカクテルの同時投与を含む、1つ以上の化学療法剤または成長阻害剤との組み合わせ投与を含む。化学療法剤は、タキサン (パクリタキセル及びドキセタキセル等) 、ならびに / またはアントラサイクリン系抗生物質を含む。かかる化学療法剤に関する調製及び投薬スケジュールは、製造元の説明書に従って、または技能を有する実践者によって経験的に判定されるとおりに、使用され得る。かかる化学療法の調製及び投薬スケジュールもまた、Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992) に説明されている。

40

【 0 1 8 5 】

抗癌剤は、抗ホルモン化合物 ; 例えば、タモキシフェン等の抗エストロゲン化合物 ; オナプリストン等の抗プロゲステロン (第 E P 616812 号) ; またはフルタミド等の抗アンドロゲンと、かかる分子に対して既知の用量で組み合わされてもよい。治療される

50

べき癌がホルモン非依存性癌である場合、患者は、以前に、抗ホルモン療法に供された可能性があり、癌がホルモン非依存性になった後で、抗 E r b B 2 抗体（及び任意に本明細書で説明されるような他の薬剤）が患者に投与されてもよい。心筋保護剤（療法と関連付けられる心筋機能障害を予防もしくは低減するように）、または 1 つ以上のサイトカインを、患者に同時投与することもまた有益であり得る。上の治療レジメン（r e g i m e s）に加えて、患者は、癌細胞の外科的除去及び／または放射線療法に供され得る。

【 0 1 8 6 】

上の同時投与される薬剤のうちのいずれかに対する好適な用量は、現在使用されているものであり、新たに識別された薬剤及び他の化学療法剤または治療の組み合わせ作用（相乗効果）により、低下され得る。

10

【 0 1 8 7 】

組み合わせ療法は、共に使用される活性成分が、別個に化合物を使用することに起因する効果の合計を上回るときに達成される効果を提供し得る。効果は、活性成分が、（1）同時製剤化され、組み合わされた単位用量製剤で同時に投与もしくは送達されるとき；（2）別個の製剤として、交替で、もしくは並行して送達されるとき；または（3）何らかの他のレジメンによって、実現され得る。交替療法で送達されるとき、効果は、化合物が、連続的に、例えば、別個の注射器の異なる注射によって投与または送達されるときに実現され得る。一般的に、交替療法中、有効用量の各活性成分は、連続的に、例えば、順次に投与されるが、組み合わせ療法においては、有効用量の 2 つ以上の活性成分は、共に投与される。

20

【 0 1 8 8 】

本明細書で説明される E D C 化合物のインビボ代謝産物もまた、かかる産物が、先行技術に対して新規かつ非自明である限り、本開示の範囲内である。かかる産物は、例えば、投与された化合物の酸化、還元、加水分解、アミド化、エステル化、酵素的開裂などに起因し得る。したがって、本開示は、その代謝産物を得るために十分な期間、本開示の化合物を哺乳類と接触させることを含むプロセスによって產生される、新規かつ非自明の化合物を含む。

【 0 1 8 9 】

代謝産物は、放射標識された E D C を調製し、それを非経口的に、検出可能な用量（例えば、約 0 . 5 m g / k g 超）で、ラット、マウス、モルモット、サル等の動物に、または人間に投与し、十分な時間、代謝を生じさせ（典型的に約 3 0 秒～3 0 時間）、その変換産物を尿、血液、または他の生物学的試料から単離することによって、識別され得る。これらの産物は、それらが標識されているため、容易に単離される（他は、代謝産物中で生存するエピトープに結合することが可能な抗体の使用によって単離される）。代謝産物構造は、例えば、M S 、L C / M S 、またはN M R 分析によって、従来的に判定される。一般的に、代謝産物の分析は、当業者に公知の従来の薬物代謝研究と同じように行われる。変換産物は、それらがインビボで見出されない限り、E D C 化合物の治療的投薬のための診断アッセイにおいて有用である。

30

【 0 1 9 0 】

代謝産物は、薬物部分を抗体に結合させる、任意の結合の開裂が生じる、E D C のインビボ開裂の産物を含む。このため、代謝開裂は、裸抗体、または抗体断片をもたらし得る。抗体代謝産物は、リンカーの一部または全てに結合され得る。代謝開裂はまた、薬物部分またはその一部の產生をもたらし得る。薬物部分代謝産物は、リンカーの一部または全てに結合され得る。

40

【 0 1 9 1 】

別の実施形態において、E D C 、及び上で説明される障害の治療に有用な材料を含有する、製造物品、または「キット」が提供される。製造物品は、容器と、容器上に、またはそれと関連付けられる、ラベルまたはパッケージ挿入物と、を含む。好適な容器としては、例えば、瓶、バイアル、注射器、またはプリスタパックが挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチック等の様々な材料から形成されてもよい。容器は、状態を治療するため

50

に効果的である E D C 組成物を保持し、無菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は、皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する、静脈注射用溶液のバッグまたはバイアルであってもよい）。組成物中の少なくとも 1 つの活性薬剤は、E D C である。ラベルまたはパッケージ挿入物は、組成物が、癌等の選択される状態を治療するために使用されることを示す。例えば、癌は、本開示の E D C の標的のうちの 1 つを過剰発現するものである。ラベルまたはパッケージ挿入物はまた、組成物が、癌を治療するために使用され得、癌が、本開示の E D C の標的のうちの 1 つの過剰発現によって特徴付けられないことを示し得る。他の実施形態において、パッケージ挿入物は、E D C 組成物が、ホルモン非依存性癌、前立腺癌、結腸癌、または大腸癌を治療するためにも使用され得ることを示し得る。

10

【 0 1 9 2 】

製造物品は、その中に化合物が含有される容器を含んでもよく、化合物は、本開示の E D C を含む。この実施形態における製造物品は、E D C が癌を治療するために使用され得ることを示すパッケージ挿入物を更に含んでもよい。代替的に、または更に、製造物品は、注射用静菌水（B W F I ）、リン酸緩衝生理食塩水、R i n g e r 溶液、及びデキストロース溶液等の薬学的に許容可能な緩衝剤を含む、第 2 の（または第 3 の）容器を更に含んでもよい。それは、他の緩衝剤、希釈剤、フィルタ、針、及び注射器を含む、商業的及びユーザの観点から望ましい他の材料を更に含んでもよい。

【 実施例 】

【 0 1 9 3 】

実施例 1：リンカーの準備が整った治療薬剤の合成、E D C の調製、及び生物学的活性の評価。

20

この実施例は、そのチオール反応性形態における「リンカーの準備が整った」薬剤 C E N 0 1 0 - 1 0 5 の合成（パート A）、及び本開示の種々の E D C を形成するための抗体へのステロイドシラレニンの共役（パート B）を説明する。この実施例はまた、E D C 活性を評価するために使用することができる種々の方法を説明する（パート C）。

【 0 1 9 4 】

パート A 「リンカーの準備が整った」薬剤の合成

【 0 1 9 5 】

この実施例は、本明細書で説明されるように、ステロイド薬物をリンカーに結合させて、抗体に容易に結合させることができる「リンカーの準備が整った」薬剤を產生するための合成プロトコルを説明する。アミノ酸システインをチオール反応性形態の「リンカーの準備が整った」薬剤に結合させることによって、キャップされた「リンカーの準備が整った」薬剤もまた、インビボのプロテアーゼによる E D C 分解によって生成され得るような、潜在的な E D C 分解産物の活性を調査するために使用することができる。

30

【 0 1 9 6 】

C E N 0 1 0 - 1 0 5 は、シラレニンと、リンカーと、及び抗体への安定した共有結合を形成するために使用される活性基とを含む、「リンカーの準備が整った」シラレニンである。C E N 0 1 0 - 1 0 5 の調製のための一般的な合成ステップは、以下のとおりである。

40

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 - トリクロロアセトイミダート。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（1 1 . 9 g、2 8 . 1 m m o l ）を、アルゴン下で、ジクロロメタン / メタノール（8 0 m L、9 0 : 1 0 ）に溶解し、P d C l ₂（0 . 5 g、2 . 8 m m o l ）をその溶液に添加した。混合物を終夜室温で攪拌し、C e l i t e のパッドを通じて濾過し、減圧下で濃縮した。残渣を、シリカゲル（ヘキサン / E t O A c、7 0 : 3 0 ）のパッドを通じて濾過した。得られた化合物（8 . 3 8 g、2 1 . 8 3 m m o l ）をアルゴン下で無水ジクロロメタン（1 7 0 m L ）に溶解した。C C l ₃ C N（2 1 . 9 m L、2 1 8 . 3 m m o l ）を添加し、続いて、0 の D B U（1 . 6 3 m L、1 0 . 9 1 m m o l ）を滴下添加した。反応物を 0 で 1 時間攪拌した。溶媒を減圧下

50

で除去した。粗生成物をシリカゲル(ヘキサン/EtOAc、60:40~40:60)のパッドを通じて濾過して、黄色油として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-トリクロロアセトイミダートを得た(9.7g、65%)。化合物は、更に精製することなく次で用いた。R_f 0.37(シリカゲル、ヘキサン/EtOAc、80:20)。

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-トリクロロアセトイミダート(0.483g、0.915mmol)を、0のアルゴン下で、無水ジクロロメタン(15mL)中の活性化4分子篩(90mg)の懸濁液に添加した。次いで、シラレニン(0.182g、0.474mmol)を混合物に添加した。5分後、Zn(O Tf)₂(17mg、0.047mmol)を添加し、反応混合物を0で更に30分間攪拌した。追加量のシラレニン(0.182g、0.474mmol)を添加した。反応混合物を0で30分間攪拌した。反応を数滴のEt₃Nで停止させた。混合物を濾過し、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(ヘキサン/EtOAc、75:25~50:50)によって精製して、白色粉末としてシラレニン-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得た(0.521g、76%)R_f 0.35(シリカゲル、ヘキサン/EtOAc、50:50)。¹H-NMR(300MHz、CDCl₃)、0.68(s、3H)、0.90-2.17(m、21H)、2.39-2.44(m、1H)、3.47(dd、1H、J=12.0、9.5Hz、H-5b)、3.79-3.87(m, 1H、H-4)、4.17-4.22(m、2H、H-5a)、4.78(d、1H、J=6.8Hz、H-1)、5.26(dd、1H、J=8.6、6.8Hz、H-2)、5.33(s、1H)、5.49(dd、1H、J=8.7Hz、H-3)、6.22(dd、1H、J=9.7、0.6Hz)、7.18-7.19(m、1H)、7.33-7.39(m、4H)、7.47-7.53(m、2H)、7.80(dd、1H、J=9.7、2.6Hz)、7.92-7.97(m、4H)；¹³C-NMR(75MHz、CDCl₃) 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。

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(0.351g、0.468mmol)をメタノール(21mL)に溶解した。Et₃N(7mL)及びH₂O(7mL)を添加した。反応混合物を室温で2日間攪拌した。混合物を濾過し、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(CH₂Cl₂/MeOH、98:2~95:5)によって精製して、黄色粉末としてシラレニン-4-アジド-4-デオキシ-L-キシロピラノシドを得た(40mg、24%)R_f 0.31(CH₂Cl₂/MeOH、95:5)；¹H-NMR(300MHz、CD₃OD)、0.74(s、3H)、1.03-2.21(m、21H)、2.52-2.57(m、1H)、3.12-3.20(m、2H)、3.40-3.44(m、2H)、3.87-3.92(m、1H)、4.17-4.23(m、1H)、4.31(d、1H、J=7.7Hz、H-1)、5.35(s、1H)、6.28(dd、1H、J=9.7、0.8Hz)、7.43(d、1H、J=1.5Hz)、7.99(dd、1H、J=9.7、2.6Hz)。

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(1.61g、2.34mmol)をTHF/H₂O(2.8mL、90:10)に溶解した。PPh₃ポリマー結合(79mg、3mmol·g⁻¹)を添加した。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、溶媒を減圧下で除去した。粗生成物をフラッショクロマトグラフィ (CH_2Cl_2 / MeOH 、90 : 10 ~ 80 : 20) によって精製して、黄色粉末としてシラレニン-4-アミノ-4-デオキシ-L-キシロピラノシドを得た (23 mg, 58%) R_f 0.2 (CH_2Cl_2 / MeOH 、80 : 20); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 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, 0.6 Hz)、7.42 (d, 1H, J = 1.6 Hz)、7.99 (dd, 1H, J = 9.7, 2.5 Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, 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。
 CEN010-105。室温のDMF (1 mL) 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 (18.5 mg, 0.0359 mmol) の溶液に、NHS-PEG₂₄-マレイミド (50 mg, 0.0359 mmol) を添加した。次いで、Et₃N (0.025 mL, 0.18 mmol) を添加した。反応物を室温で2時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去した。粗材料をフラッショクロマトグラフィ (CH_2Cl_2 / MeOH 、95 : 5 ~ 80 : 20) によって精製して、黄色油としてCEN010-105を得た (48 mg, 75%) R_f 0.66 (CH_2Cl_2 / MeOH 、80 : 20)。HPLC分析 [Luna C18、250 × 4, 60 mm, 5 μm, 32分にわたり5%~95%ACN、1 mL·分⁻¹] は、>95%純粋であった生成物を示した。HRMS-ESI (m/z) : C₈H₁₄N₃O₃ [M + K⁺]⁺に対する計算値: 1832.9452、実測値 1832.9777。

【0197】

パートB 免疫共役体 (EDC 及び対照) の調製

【0198】

実施例2~10に説明されるEDC、及び対照共役体（抗体4F12、マウスIgGカッパを含有し、これは細胞ヒト細胞に結合しない）は、抗体鎖間ジスルフィドの還元を含む、以下の方法によって調製した。簡潔に述べると、PBS (20 mM リン酸ナトリウム pH 7 及び 150 mM のNaCl) 中の 1~10 mg / mL の濃度の抗体を、37度2時間、1 mM のジエチレントリアミン5酢酸 (DTPA) (MP Biomedical LLC) 及び 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) の存在下で還元し、次いで、湿潤氷に移した。次いで、9.6 当量のCEN010-105（「リンカーの準備が整った」薬剤）を添加し、30分間氷上で反応させた。CEN010-105への1.5 当量のL-システインの添加によって反応を停止させ、室温で30分間反応させた。次いで、Amicon Ultra 30,000 MWCO (Millipore, Billerica, MA) を使用した繰り返し遠心濃縮、及びDPBS緩衝液交換によって、抗体共役体を非共役CEN010-105から分離した。共役体を、1~10 mg / mL の範囲の濃度のPBS中に2~8で保存した。

【0199】

薬剤としてのシラレニンを含むEDCに対する薬剤負荷（1つの抗体あたりの薬剤の数）は、以下の方法によって判定される。一度、薬剤の減衰係数が280 nm の ± 10 nm の外側の波長で判定されると、この方法は、ステロイド薬物を含むいずれのEDCに対しても使用することができる。該方法は、280 nm、及び、シラレニンの場合には、299 nm の双方で共役体、抗体 (Ab)、及びシラレニン（薬物）の吸光度を測定することを必要とする。まず、遊離抗体の吸光度を、280 nm (A₂₈₀Ab) 及び 299 nm

(A₂₉₉Ab)の双方で測定して、抗体定数[Constant Ab]を判定する。次に、遊離薬物の吸光度を、280nm(A₂₈₀薬物)及び299nm(A₂₉₉薬物)の双方で測定して、薬物定数[Constant Drug]を判定する。最後に、抗体薬物共役体の吸光度を測定する[A₂₈₀Conj及びA₂₉₉Conj]。280nmの抗体モル減衰係数=204,000M⁻¹cm⁻¹。

【0200】

パートC 細胞毒性活性評価

【0201】

細胞及び培養条件：細胞株H460、HT29、A549、PANC-1、MB231、FaDu、H69、及びH929は、American Type Culture Collection(ATCC), Manassas, VAから得た。悪性メラノーマ細胞株LOX IMVIは、DCTD Tumor Repository, National Cancer Institute, Frederick, Marylandから得た。細胞株を、推奨される培地製剤中に維持し、3~4日毎に継代培養した。薬物部分が結合するある標的の発現を達成するため、及び/またはあるタンパク質とのNa, K-ATPase錯体を形成するため、細胞は、推奨される培地+ホルボールエステル等の添加剤、VEGF、線維芽細胞成長因子、ヒト成長因子、インターロイキン、及び腫瘍壊死因子等の種々の成長因子及びサイトカインにおいて培養することができる。加えて、細胞は、ヒト線維芽細胞のような他の細胞と共に培養することができる。更に、マイクロタイタープレートは、フィブリノゲンのような種々のタンパク質でコーティングすることができる。

10

20

30

30

【0202】

インビトロ細胞毒性評価：細胞を、20u1完全培地中の384-ウェル白色組織培養処理マイクロタイタープレートの1ウェルあたり1250~3333の密度でプレートし、次いで、共役体または小分子薬剤添加の前に、加湿されたインキュベータにおいて、7%のCO₂で、37で24時間成長させた。細胞を、細胞生存試験の前に、72時間、試験化合物の存在下でインキュベートした。細胞生存試験は、CellTiter-Glo発光細胞生存アッセイ(Promega, Madison, WI)を使用して実施した。各細胞株に対する試験化合物のEC50値は、GraphPad Prism 5ソフトウェアを使用して判定した。

【0203】

実施例2：種々の薬剤及び薬剤-リンカー中間体の合成

i. 4-ニトロフェニルカルバメート-3-O-ブファリン合成
 36.08(93.3μmol)のブファリンを計量し、2mLのDCEに溶解した。38μL(467μmol)のピリジン及び57.5mg s(285.3μmol)の4-ニトロフェニルクロロホルマートをブファリンに添加し、終夜(約16時間)攪拌した。TLCは、反応が約50%完全であったことを示した。追加の38μL(467μmol)のピリジン及び68.5mg s(340μmol)の4-ニトロフェニルクロロホルマートを、4分子篩と共に添加した。反応物を室温で30分間攪拌した。2mLの冰酢酸を198mLのナノ純水に添加して、1%酢酸溶液を作製した。60~70mLのDCMを反応物に添加して、分液漏斗に注入した。抽出は、50mLの1%酢酸溶液を分液漏斗に添加することによって、実施した。これを、更に3回繰り返した。次いで、水層を廃棄した。1.4g(11.63mmol)のMgSO₄を有機層に添加した。混合物を20分間攪拌し、重力濾過し、続いて、溶媒を回転蒸発させた。材料を最小量のDCMに溶解し、シリカゲル(孔径=0.015~0.040μm)を使用して、フラッシュカラムを行った。適切な画分を収集し、溶媒を蒸発させた。41.34mg s(74.67μmol)の生成物を得、80.03%の収率に相当した。TLC: 75:25 DCM: EtOAc; Rf 2=0.46; ¹H-NMR(400MHz, DMSO-d6): δ 8.3(d, 2H, H23, 24)、7.92(s, 1H, H21)、7.56(d, 2H, H22, 25)、7.51(s, 1H, H14)、6.28(d, 1H, H20)、4.50

17 (s、1H、H10)、4.13 (s、1H、H13)、3.87 (s、1H、H3)、2.1-1.1 (複数ピーク、22H、H1、2、4、5、6、7、8、9、11、1215、16、17)、0.89 (s、3H、H18)、0.59 (s、3H、H19)。IUPAC名：不明

【0204】

i i . 4 - ニトロフェニルカルバメート - 3 - O - ジギトキシゲニン合成

2.914gの4分子篩を含有する695.5mg s (3.45mmol) の4 - ニトロフェニルクロロホルマートを、12mLのDCEに溶解した。2.914gの4分子篩及び461.2μL (5.702mmol) のピリジンを、反応物に添加した。次いで、211.85mg s (570.2umol) のジギトキシゲニン (3) を反応物に添加し、終夜 (約16時間) 搅拌した。溶媒を傾瀉し、丸底フラスコに入れ、回転蒸発させた。残りの固体をDCM (12mL) に再懸濁し、フラッシュカラム (75:25 DCM : EtOAc ; 孔径 = 0.015 ~ 0.040 μm) 上に静置した。精製された画分を組み合わせ、溶媒を回転蒸発させた。272mg s (505μmol) の4 - ニトロフェニルカルバメート - 3 - O - ジギトキシゲニンを88.56 %の収率 %で得た。TLC : 75:25 DCM : EtOAc ; Rf 4 = 0.57。HPLC分析 : C18カラム : Atlan t i s (登録商標) T3 ; 3um ; 4.6 × 150mm ; 勾配 : 0 ~ 2分 = 90 : 20 (A : B) ; 1 ~ 16分 = 0 : 100 (A : B) ; 16 ~ 25分 = 0 : 100 (A : B) ; 流速 : 1mL / 分 ; Rt 4 = 21.22分 (max = 271nm)。IUPAC名：不明

10

20

30

40

【0205】

i i i . C E N - 371 合成

10mg s (18.1μmol) の4 - ニトロフェニルカルバメート - 3 - O - ブファリンを、200μL (971.5μmol) の1,4 - ビス (3 - アミノプロピル) ピペラジンと、室温で35分間搅拌することによって、反応させた。材料を、逆相HPLCによって精製した (緩衝液A = H₂O中1%酢酸 ; 緩衝液B = ACN中1%酢酸)。収集した材料の溶媒を回転蒸発させた。材料を凍結し、終夜凍結乾燥させた。4.87mg s (7.95μmol) のCEN-371を、43.9 %の収率 %で得た。TLC : 75:25 DCM : EtOAc ; Rf CEN-371 = 0.0 ; ニンヒドリン陽性 ; HPLC分析 : C18カラム : Atlan t i s (登録商標) T3 ; 3um ; 4.6 × 150mm ; 勾配 : 0 ~ 1分 = 80 : 20 (A : B) ; 1 ~ 19分 = 10 : 90 (A : B) ; 流速 : 1mL / 分 ; Rt CEN-371 = 9.27分 (max = 300nm)。¹H-NMR (400MHz, DMSO-d6) : 7.92 (d、1H、H21)、7.52 (s、1H、H14)、7.03 (s、1H、H26)、6.28 (d、1H、H20)、4.78 (s、1H、H3)、4.13 (s、1H、H13)、3-1.1 (複数ピーク、44H、H1、2、4-9、11、12、15-17、27-37)、0.89 (s、3H、H18)、0.59 (s、3H、H19)。¹³C-NMR (500MHz, CDCl₃) : 177.02、162.37、156.28、148.51、146.8、122.67、115.25、85.26、70.11、57.46、56.43、52.8、52.59、51.20、48.32、42.29、40.82、40.40、35.78、35.15、32.75、30.73、30.54、28.70、26.43、25.81、25.34、23.83、23.28、22.93、21.39、21.29、16.52。TOF-MS (ESI) : MWobs = 613.44g/mol ; MWcalc. = 613.84g/mol。IUPAC名 : 4 - (3 - { (1S, 2S, 5S, 7R, 10R, 11S, 14S, 15R) - 11 - ヒドロキシ - 2, 5, 14, 15 - テトラメチル - 14 - (6 - オキソ - 3 - ピラニル) テトラシクロ [8.7.0.0_{2,7}.0_{11,15}] ヘプタデカ - 5 - イルオキシカルボニルアミノ } プロピル) - 1 - (3 - アミノプロピル) ピペラジン。

【0206】

i v . C E N - 372 合成

50

31.8 mg s (57.44 μ mol) の 4 - ニトロフェニルカルバメート - 3 - O - ブファリンを、1 mL の DCM 及び 1 mL の MTBE に溶解した。46.3 μ L (287.2 μ mol) の 3,3' - ディアミノ - N - メチルジプロピルアミンを添加し、室温で攪拌した。90 分後、4 mL の MTBE を添加し、更に 30 分間攪拌した。溶媒を傾瀉し、黄色沈殿物が残った。沈殿物を最小量の MTBE で洗浄した。MTBE を傾瀉し、先に傾瀉した材料と共に静置した。傾瀉した溶媒を回転蒸発させた。材料を 10 mL のヘキサンで 4 回洗浄した。5 mL の H₂O を添加し、沈殿物を吸引濾過した。沈殿物を 10 ~ 15 mL の H₂O で 3 回洗浄した。沈殿物 (16.5 mg s) に、1 mL の MeOH を添加した。溶媒を傾瀉した状態で、材料を遠心分離した。傾瀉した材料を回転蒸発させた。14.21 mg s (25.48 umol) の CEN - 372 を 44.4 % の収率 % で得た。TLC : 75 : 25 DCM : EtOAc ; R_f CEN - 372 = 0.0 ; ニンヒドリン陽性 ; HPLC 分析 : C18 カラム : Atlantis (登録商標) T3 ; 3 um ; 4.6 × 150 mm ; 勾配 : 0 ~ 2 分 = 90 : 10 (A : B) ; 2 ~ 15 分 = 0 : 100 (A : B) ; 流速 : 1 mL / 分 ; R_t CEN - 372 = 11.60 分 (max = 300 nm)。
¹H - NMR (400 MHz, DMSO - d₆) : 7.92 (d, 1H, H21)、7.51 (s, 1H, H14)、6.95 (s, 1H, H26)、6.27 (d, 1H, H20)、4.78 (s, 1H, H3)、4.15 (s, 1H, H13)、3-1.1 (複数ピーク、39H, H1, 2, 4-9, 11, 12, 15-17, 27-34)、0.87 (s, 3H, H18)、0.59 (s, 3H, H19)。TOF - MS (ESI) : MW_{obs} = 558.39 g / mol ; MW_{calc} = 558.84 g / mol。IUPAC 名 : 5 - [(1S, 2S, 5S, 7R, 10R, 11S, 14S, 15R) - 5 - { 3 - [N - メチル (3 - アミノプロピル) アミノ] プロピルアミノカルボニルオキシ } - 11 - ヒドロキシ - 2, 15 - ジメチルテトラシクロ [8.7.0.02, 7.011, 15] ヘプタデカ - 14 - イル] - 2 - ピラノン

【0207】

v. CEN - 373 合成

21 mg s (37.93 μ mol) の 4 - ニトロフェニルカルバメート - 3 - O - ブファリンを、2 mL の DCM 及び 1.4 mL の MTBE に溶解した。26.6 μ L (190 μ mol) のビス (3 - アミノプロピル) アミンを添加し、室温で攪拌した。25 分後、5 mL の MTBE を添加し、更に 30 分間攪拌した。沈殿物を吸引濾過し、10 mL の MTBE で洗浄した。沈殿物を 20 mL の DCM で洗浄した。濾液を回転蒸発させた。5 mL の H₂O を添加し、吸引濾過した。沈殿物を 30 mL の H₂O で洗浄した。沈殿物を 1 : 1 DCM : MeOH 混合物 (約 5 mL) に溶解し、溶媒を蒸発させた。100 μ L の H₂O を材料に添加し、これを凍結させ、終夜、凍結乾燥機上に静置した。9.57 mg s (17.6 μ mol) の CEN - 373 を 46.4 % の収率 % で得た。TLC : 75 : 25 DCM : EtOAc ; R_f CEN - 373 = 0.0 ; ニンヒドリン陽性 ; HPLC 分析 : C18 カラム : Atlantis (登録商標) T3 ; 3 um ; 4.6 × 150 mm ; 勾配 : 0 ~ 2 分 = 90 : 10 (A : B) ; 2 ~ 15 分 = 0 : 100 (A : B) ; 流速 : 1 mL / 分 ; R_t CEN - 373 = 11.70 分 (max = 300 nm)。
¹H - NMR (400 MHz, DMSO - d₆) : 7.92 (d, 1H, H21)、7.51 (s, 1H, H14)、6.99 (s, 1H, H26)、6.28 (d, 1H, H20)、4.79 (s, 1H, H3)、4.15 (s, 1H, H13)、3-1.1 (複数ピーク、37H, H1, 2, 4-9, 11, 12, 15-17, 27-34)、0.85 (s, 3H, H18)、0.59 (s, 3H, H19)。TOF - MS (ESI) : MW_{obs} = 544.38 g / mol ; MW_{calc} = 544.82 g / mol。IUPAC 名 : 5 - { (1S, 2S, 5S, 7R, 10R, 11S, 14S, 15R) - 5 - [3 - (3 - アミノプロピルアミノ) プロピルアミノカルボニルオキシ] - 11 - ヒドロキシ - 2, 15 - ジメチルテトラシクロ [8.7.0.02, 7.011, 15] ヘプタデカ - 14 - イル } - 2 - ピラノン。

【0208】

10

20

30

40

50

v i . C E N - 3 7 5 合成 (活性化 P E G 2 4 - C E N - 3 7 1)

170 μ L の D M S O 中の 4 . 0 5 m g s (6 . 6 2 μ m o l) の C E N - 3 7 1 を、 100 μ L の D M S O 中の 10 . 6 5 m g s (7 . 2 8 μ m o l) の M A L - P E G 2 4 - T F P エステル (例えは、 M A L - d P E G ₂ ₄ - T F P エステル、 2 , 3 , 5 , 6 - テトラフルオロフェニル 1 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) - 3 - オキソ - 7 , 10 , 13 , 16 , 19 , 22 , 25 , 28 , 31 , 34 , 37 , 40 , 43 , 46 , 49 , 52 , 55 , 58 , 61 , 64 , 67 , 70 , 73 , 76 - テトラコサオキサ (t e t r a c o s a o x a) - 4 - アザノナヘプタコンタン (a z a n o n a h e p t a c o n t a n) - 7 9 - オアート (o a t e) 、 C ₆ ₄ H ₁ ₀ ₈ F ₄ N ₂ O ₂ ₉ 、 製品番号 10554 、 Quanta Biodesign Ltd , Plain City , Ohio , U S A) に添加した。反応物を室温で 90 分間攪拌した。90 分後、追加の 5 m g s (3 . 4 2 μ m o l) の M A L - P E G 2 4 - T F P エステルを添加し、終夜反応させた。15 mL のエーテル及び 2 mL の D C M を反応物に添加し、続いて、 25 mL のヘキサンを添加した。反応物を - 20 $^{\circ}$ C で 1 時間静置した。材料は沈殿せず、そのため、溶媒を回転蒸発させた。反応物を D M S O に再懸濁し、逆相 H P L C によって精製した (緩衝液 A = H ₂ O 中 1 % 酢酸 ; 緩衝液 B = A C N 中 1 % 酢酸) 。収集した材料の溶媒を回転蒸発させた。材料を凍結し、終夜凍結乾燥させた。6 . 2 1 m g s (3 . 2 8 μ m o l) の C E N - 3 7 5 を、 49 . 6 % の収率 % で得た。H P L C 分析 : C 1 8 カラム : A t l a n t i s (登録商標) T 3 ; 3 u m ; 4 . 6 \times 1 5 0 m m ; 勾配 : 0 ~ 1 分 = 8 0 : 2 0 (A : B) ; 1 ~ 1 9 分 = 1 0 : 9 0 (A : B) ; 流速 : 1 m L / 分 ; R t C E N - 3 7 5 = 1 2 . 8 7 分 (m a x = 3 0 1 n m) 。 ¹ H - N M R (4 0 0 M H z 、 D M S O - d 6) : 8 . 0 5 (s 、 1 H 、 H 4 2) 、 7 . 9 2 (d 、 1 H 、 H 2 1) 、 7 . 8 (s 、 1 H 、 H 3 7) 、 7 . 5 2 (s 、 1 H 、 H 1 4) 、 7 . 0 3 (s 、 1 H 、 H 2 6) 、 6 . 7 (d 、 2 H 、 H 4 5 , 4 6) 、 6 . 2 8 (d 、 1 H 、 H 2 0) 、 4 . 7 8 (s 、 1 H 、 H 3) 、 4 . 1 3 (s 、 1 H 、 H 1 3) 、 3 . 7 - 3 . 2 (m 、 P E G ピーク) 、 3 - 1 . 1 (複数ピーク、 4 4 H 、 H 1 、 2 、 4 - 9 、 1 1 、 1 2 、 1 5 - 1 7 、 2 7 - 3 7) 、 0 . 8 9 (s 、 3 H 、 H 1 8) 、 0 . 5 9 (s 、 3 H 、 H 1 9) 。 ¹ ³ C N M R (5 0 0 M H z 、 C D C 1 3) : 1 7 4 . 4 3 、 1 7 3 . 2 8 、 1 7 1 . 0 6 、 1 7 0 . 7 3 、 1 7 0 . 4 4 、 1 6 9 . 5 9 、 1 6 9 . 1 3 、 1 6 2 . 2 9 、 1 6 0 . 9 4 、 1 5 6 . 2 4 、 1 4 9 . 6 1 、 1 4 8 . 4 9 、 1 4 6 . 7 1 、 1 3 4 . 1 7 、 1 2 2 . 8 7 、 1 2 2 . 6 0 、 1 1 5 . 2 8 、 8 6 . 0 7 、 8 5 . 2 8 、 7 8 . 6 3 、 7 7 . 5 7 、 7 0 . 6 、 7 0 . 5 2 、 7 0 . 4 7 、 7 0 . 4 5 、 7 0 . 3 4 、 7 0 . 2 2 、 7 0 . 1 9 、 7 0 . 1 2 、 6 9 . 6 1 、 6 9 . 5 5 、 6 8 . 8 1 、 6 7 . 3 0 、 6 4 . 3 2 、 6 3 . 0 0 、 5 6 . 9 5 、 5 6 . 7 8 、 5 3 . 4 0 、 5 3 . 2 3 、 5 3 . 0 6 、 5 1 . 1 9 、 4 9 . 7 1 、 4 8 . 2 9 、 4 4 . 8 3 、 4 2 . 3 3 、 4 2 . 0 1 、 4 1 . 7 7 、 4 0 . 8 2 、 4 0 . 6 5 、 4 0 . 5 0 、 3 9 . 2 1 、 3 8 . 6 0 、 3 8 . 5 8 、 3 8 . 3 7 、 3 7 . 1 1 、 3 6 . 9 2 、 3 5 . 7 8 、 3 5 . 6 7 、 3 5 . 4 0 、 3 5 . 1 5 、 3 4 . 4 9 、 3 4 . 2 6 、 3 3 . 3 2 、 3 2 . 7 5 、 3 2 . 2 2 、 3 0 . 7 5 、 3 0 . 5 4 、 2 8 . 6 8 、 2 7 . 2 7 、 2 6 . 4 1 、 2 5 . 8 4 、 2 5 . 8 1 、 2 5 . 3 6 、 2 5 . 3 2 、 2 3 . 8 4 、 2 1 . 3 9 、 2 1 . 2 8 、 2 1 . 2 3 、 2 1 . 0 8 。 1 6 . 5 0 、 1 6 . 4 6 。 I U P A C 名 : N / A 。

【 0 2 0 9 】

v i i . C E N - 3 7 6 合成 (活性化 P E G 2 4 - C E N - 3 7 2)

8 . 2 m g s (1 4 . 7 μ m o l) の C E N - 3 7 2 を、 3 0 0 μ L の D M S O に溶解した。26 . 7 7 m g s (1 8 . 2 9 μ m o l) の M A L - P E G 2 4 - T F P エステルを反応物に添加し、これを、室温で 80 分間攪拌した。7 . 5 m L の M T B E を、 1 m L の D C M と共に反応物に添加した。反応物を - 20 $^{\circ}$ C で静置した。1 時間後、溶液を除去し、溶媒を丸底フラスコに傾瀉し、回転蒸発を通じて除去した。450 μ L のナノ純水を、未精製の生成物を含有した材料に添加した。この材料を凍結し、終夜凍結乾燥機上に静置した。材料をアセトニトリルに再懸濁し、逆相 H P L C によって精製した (緩衝液 A = H

10

20

30

40

50

H_2O 中 1 % 酢酸；緩衝液 B = ACN 中 1 % 酢酸）。収集した材料の溶媒を回転蒸発させた。材料を凍結し、終夜凍結乾燥させた。0.89 mg s (0.484 μmol) の CEN-376 を 3.3 % の収率 % で得た。HPLC 分析：C18 カラム：Atlantis (登録商標) T3；3 um；4.6 × 150 mm；勾配：0 ~ 2 分 = 90 : 10 (A : B)；2 ~ 15 分 = 0 : 100 (A : B)；流速：1 mL / 分；Rt CEN-376 = 12.65 分 (max = 300 nm)。IUPAC 名：N / A。

【0210】

viii. CEN-377 合成 (活性化 PEG24-CEN-373)

200 μL の DMSO 中の 4.0 mg s (7.36 μmol) の CEN-373 を、12.0 mg s (8.26 μmol) の MAL-PEG24-TFP エステルに添加した。反応物を室温で 90 分間攪拌した。7.5 mL の MTBE を反応物に添加し、次いで、これを、-20 で 2 時間静置した。液体を傾瀉し、沈殿物を 10 mL の MTBE で 4 回洗浄した。溶媒を回転蒸発させ、120 μL の DMSO に再懸濁した。材料を HPLC によって精製した。収集された画分の溶媒を、回転蒸発を通じて除去した。400 μL の H_2O を添加した。溶液を凍結し、終夜凍結乾燥機上に静置した。0.6 mg s (0.329 μmol) の CEN-377 を 4.47 % の収率 % で得た。HPLC 分析 C18 カラム：Atlantis (登録商標) T3；3 um；4.6 × 150 mm；勾配：0 ~ 2 分 = 90 : 10 (A : B)；2 ~ 15 分 = 0 : 100 (A : B)；流速：1 mL / 分；Rt CEN-377 = 12.47 分 (max = 300 nm)。IUPAC 名：N / A。

【0211】

ix. CEN-381 合成

室温で 2 時間、20.77 mL の DCE、14.23 mL の DCM、及び 35 mL のヘキサン中で攪拌することにより、161.35 mg s (300 μmol) の 4 - ニトロフェニルカルバメート - 3 - O - ジギトキシゲニンを、88.94 μL (432 μmol) の 1,4 - ピス (3 - アミノプロピル) ピペラジンと反応させた。反応物を 4 で 2 日間静置した。沈殿物を、吸引濾過を通じて除去し、約 20 mL のヘキサンで洗浄した。濾液に、24.94 μL (432 μmol) の氷酢酸を添加した。溶媒を回転蒸発させ、MeOH に再懸濁した。材料を、逆相 HPLC によって精製した (緩衝液 A = H_2O 中 1 % 酢酸；緩衝液 B = ACN 中 1 % 酢酸)。収集した材料の溶媒を回転蒸発させた。材料を凍結し、終夜凍結乾燥させた。109.43 mg s (182.13 μmol) の CEN-381 を 60.71 % の収率 % で得た。TLC : 75 : 25 DCM : EtOAc；Rf CEN-381 = 0.0；ニンヒドリン陽性；HPLC 分析：C18 カラム：Atlantis (登録商標) T3；3 um；4.6 × 150 mm；勾配：0 ~ 2 分 = 90 : 10 (A : B)；2 ~ 14 分 = 0 : 100 (A : B)；流速：1 mL / 分；Rt CEN-381 = 11.53 分 (max = 220 nm)。IUPAC 名：4 - (3 - { (1S, 2S, 5S, 7R, 10R, 11S, 14R, 15R) - 11 - ヒドロキシ - 2, 5, 14, 15 - テトラ

メチル - 14 - (5 - オキソ - 2H - フル - 3 - イル) テトラシクロ [8.7.0.02, 7.011, 15] ヘプタデカ - 5 - イルオキシカルボニルアミノ} プロピル) - 1 - (3 - アミノプロピル) ピペラジン。

【0212】

x. CEN-382 合成 (活性化 PEG24-CEN-381)

15 mg s (24.97 μmol) の CEN-381 を 1.6 mL の DCM に溶解した。42.46 mg s (29.01 μmol) の MAL-PEG24-TFP エステルを反応物に添加した。反応物を室温で 3 時間攪拌した。追加の 2 mg s (1.37 μmol) の MAL-PEG24-TFP エステルを添加し、30 分間反応させた。反応物を約 40 ~ 50 に加熱し、キャップを取り外して、DCM の蒸発を促進しやすくした。材料を 30 0 μL の MeOH に再懸濁し、逆相 HPLC によって精製した (緩衝液 A = H_2O 中 1 % 酢酸；緩衝液 B = ACN 中 1 % 酢酸)。収集した材料の溶媒を回転蒸発させた。材料を凍結し、終夜凍結乾燥させた。39.38 mg s (20.94 μmol) の CEN-382

10

20

30

40

50

を 83.86% の収率 % で得た。HPLC 分析 : C18 カラム : Atlantis (登録商標) T3 ; 3 μm ; 4.6 × 150 mm ; 勾配 : 0 ~ 2 分 = 90 : 10 (A : B) ; 2 ~ 16 分 = 0 : 100 (A : B) ; 流速 : 1 mL / 分 ; Rt CEN-382 = 13.20 分 (max = 218 nm)。IUPAC 名 : N / A。

【0213】

x i . S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N - 3 7 1 の合成

SUN4B7 緩衝液交換 : PBS 緩衝液中の約 0.8 mL (1.2 mg/s) の SUN4B7 を、30k MWCO 遠心分離フィルタに添加し、約 35 ~ 45 μL に沈降させた。濾液を廃棄し、0.4 mL の 150 mM の酢酸ナトリウム (pH = 6.5) を SUN4B7 に添加した。遠心分離プロセスを更に 2 回繰り返し、濾液はその都度廃棄した。SUN4B7 を除去し、フィルタを、150 mM の酢酸ナトリウム (pH = 6.5) で 2 回 (各回約 60 ~ 70 μL で) 洗浄した。総作用体積は、約 140 μL である。UV-VIS 判定は、8.80 mg / mL (約 1.2 mg/s) の濃度を示した。0.67 μL の DTPA を SUN4B7 に添加し、続いて、140 μL の 150 mM の酢酸ナトリウム / 1.2 M のクエン酸ナトリウム (pH = 7.8) を添加した。SUN4B7 の最終濃度は、150 mM の酢酸ナトリウム / 600 mM のクエン酸ナトリウム (pH = 7.5) の最終緩衝液で、4.40 mg / mL であった。

10

【0214】

SUN4B7 還元 : SUN4B7 (4.40 mg / mL ; 8.21 nmol) を、0 ~ 8 で約 5 分間静置した。ナノ純水中の 10 mM の TCEP 溶液の 4.11 μL (41.1 nmol ; SUN4B7 に対して 5 当量) を添加し、続いて、5 ~ 10 秒間わずかに攪拌した。溶液を 30 分にわたって 37 に加熱した。溶液が 37 に到達したとき、反応物を更に 2 時間反応させた。還元された SUN4B7 を 37 から取り出し、室温で静置した。

20

【0215】

SUN4B7 への CEN-375 共役 : 25 mM の酢酸ナトリウムを含有する IPA : H₂O (1 : 1) の溶液 (pH = 5.5) 中の CEN-375 の 4 mM の溶液の 21 μL (84 nmol ; SUN4B7 に対して 10.2 当量) を還元された SUN4B7 に添加した。反応物を 5 ~ 10 秒間わずかに攪拌し、室温で 2 時間放置した。360 μL の 150 mM の酢酸ナトリウム (pH = 6.5) を反応物に添加し、更に 20 分間放置した。反応物を 30k MWCO 遠心分離フィルタに配置し、そこで、それを約 35 ~ 40 μL に沈降させた。0.4 mL の DPBS を添加し、35 ~ 40 μL に遠心分離した。これを更に 4 回繰り返した。最終生成物をバイアルに配置し、遠心分離フィルタを約 340 μL の DPBS 緩衝液で洗浄した。DPBS 中の SUN4B7 (CEN-375) の最終体積は、360 μL であった。UV-VIS 分析は、3.33 mg / mL (22.18 μM) の濃度で 5.02 の薬物対抗体比 (DAR) を示した。疎水性相互作用クロマトグラフィ (HIC) 分析は、5.36 の DAR 値を示し、4.86% は未標識 SUN4B7 から成った。UV-VIS (299 / 280) は、3.33 mg / mL (22.18 μM) の濃度で 5.02 の DAR 値を示した。

30

【0216】

SUN4B7 への CEN-382 共役 : 直上で説明される「SUN4B7 への CEN-375 共役」に類似の手順を、類似の結果で実施した。

40

【0217】

実施例 3 : インピトロモデルにおける薬剤及び薬剤 - リンカー中間体の細胞毒性

選択薬剤及び薬剤 - リンカー中間体の細胞毒性は、インピトロ癌細胞細胞毒性分析を使用して評価した。細胞を、以下の密度 : 1 ウェルあたり 2000 (Ramos, SU-DH-8, HL60) 細胞、1 ウェルあたり 1500 (Hut78) 細胞、及び 1 ウェルあたり 1333 (H929) 細胞で、250 nM の全トランス型レチノイン酸 (ATRA) を含む、または含まない、20 μL の完全培地中の 384 - ウェル白色組織培養処理マイクロタイタープレートにプレートした。これらの細胞を、試験絵化合物の添加の前に、加

50

湿されたインキュベータにおいて、5 %のCO₂で、37 °Cで24時間平衡化した。化合物及び/またはマウス血漿試料を5×最終作用濃度で完全培地において順次希釈し、各々の5 μLをアッセイに使用される細胞に添加した。処理した細胞を、細胞生存試験の前に、3日間インキュベートした。細胞生存試験は、CellTiter-Glo luminescent細胞生存アッセイ(Promega, Madison, WI)を使用した。各細胞株への薬剤のEC50値は、GraphPad Prism 5ソフトウェアを使用して判定し、表3に示される。

【表3-1】

表3. 選択薬剤及び薬剤-リンカー中間体の細胞毒性

薬剤/薬剤-リンカー中間体	構造	piGOMでのEC50(生存%)	
		Ramos	SUDHL8
CEN09-106		1,900 (0)	2,070 (0)
CEN-319		5,800 (0)	8,400 (ND)
CEN-371		7,805 (0)	11,000 (0)
CEN-372		3,600	4,400
CEN-373		4,000	5,900
CEN-381		>50,000	>50,000
ブファリン		7,300	16,000
シラレニン		17,000	18,000

10

20

30

40

【表3-2】

薬剤/薬剤 ーリンカ ー中間体	構造	p i c o MでのEC50 (生存%)	
		Ramos	SUDHL8
ジギトキシ ゲニン		> 50, 000	> 50, 000

10

【0218】

実施例4：選択EDCの細胞毒性

式(I)の選択EDCの細胞毒性は、インビトロ癌細胞細胞毒性分析を使用して評価した。表4に列記されるEDCの各々に関する構造は、図1に示される。薬剤負荷は、約4であると判定された。細胞を、以下の密度：1ウェルあたり2000(Ramos、SUDHL8、HL60)細胞、1ウェルあたり1500(Hut78)細胞、1ウェルあたり1333(H929)及び1500(MV-4-11)細胞で、250nMの全トランスクレチノイン酸(ATRA)を含む、または含まない、20μLの完全培地中の384-ウェル白色組織培養処理マイクロタイプレートにプレートした。これらの細胞を、試験化合物の添加の前に、加湿されたインキュベータにおいて、5%のCO₂で、37で24時間平衡化した。化合物及び/またはマウス血漿試料を5×最終作用濃度で完全培地において順次希釈し、各々の5μLをアッセイに使用される細胞に添加した。処理した細胞を、細胞生存試験の前に、3日間インキュベートした。細胞生存試験は、CellTiter-Glo luminescent細胞生存アッセイ(GraphPad Prism 5ソフトウェアを使用して判定し、表4に示される。非共役SUN4B7、非共役治療薬剤、非共役ブファリン、及び/または抗体4F12で製造される対照EDCと比較した、一部の例における、選択データもまた、図2、3、4、9、及び10において、グラフで(対数変換)示される。

20

30

【表4】

表4. 選択EDCの細胞毒性

標的化部分	以下のものを含むリ ンカーー薬剤：	p i c o MでのEC50 (生 存%)	
		Ramos	SUDHL8
SUN4B7	PEG24、CEN 09-106	120(0)	38(0)
SUN4B7	PEG36、CEN 09-106	43(0)	14(0)
SUN4B7	PEG24、CEN -319	1,400 (17)	280(50)
SUN4B7	PEG36、CEN -319	160(3)	45(15)
SUN4B7	PEG24、CEN -371	90(0)	139(0)
SUN4B7	PEG24、CEN -381	3,300 (50)	6,200(50)

40

【0219】

実施例5：CD38を発現する細胞に対する選択EDCの細胞毒性

標的化部分に対するエピトープが本開示のEDCに重要であるかどうかを判定するため

50

に、及び全トランス型レチノイン酸 (A T R A) が本発明の E D C の活性を増強させることができるとどうかを判定するために、以下の研究を行った。異なる C D 3 8 エピトープに特異的な 4 つの異なる抗 C D 3 8 抗体を、 P E G 3 6 含有リンカーを介して C E N 0 9 - 1 0 6 に共役させた。得られた E D C に対する一般構造は、図 1 に示される。薬剤負荷は、約 4 であると判定された。各 E D C を、 6 つのヒト血液癌細胞型 (H L 6 0 、 U 9 3 7 、 M V 4 1 1 、 H u t 7 8 、 H 9 2 9 、 及び R A M O S) において試験した。全トランス型レチノイン酸 (A T R A) は、 C D 3 8 の既知の誘導因子である (Ferrero E , Malavasi F . (2 0 0 2) A N a t u r a l H i s t o r y o f t h e H u m a n C D 3 8 G e n e . Kluwer Academic Publishers , Norwell , MA , p p . 8 1 - 9 9) 。したがって、これらの E D C は、 A T R A 誘導を伴う、及び伴わない、様々な細胞型におけるインビトロ細胞毒性活性に関して試験され、 E D C 曝露の 7 2 時間後のピコモルでの E C 5 0 及び生存細胞率 (%) が示される (表 5 を参照されたい) 。

【表 5 】

表 5. 選択 [TM] - P E G 3 6 - C E N 0 9 - 1 0 6 E D C の E C 5 0 細胞毒性 (C y c l o t o x i c i t i e s)

細胞株	[TM] 標的化部分							
	S U N 4 B 7		O K T 1 0		I B 4		H B 7	
	ATR	ATR Aなし	ATR	ATR Aなし	ATR	ATR Aなし	ATR	ATR Aなし
H L 6 0 (A M L)	N/A	8 0 (1 5)	N/A	8 0 0 (2 0)	N/A	N/A	N/A	N/A
U 9 3 7 (A M L)	N/A	1 4 0 (5)	N/A	1 0 9 0 (1 0)	N/A	N/A	N/A	N/A
M V 4 1 1 (A M L)	N/A	1 0 0 (0)	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
H u t 7 8 (C T C L)	N/A	1 2 0 (5)	N/A	3 1 0 (5)	N/A	2 1 0 (1 0)	N/A	2 9 0 (1 0)
H 9 2 9 (M M)	1 4 0 (1 0)	8 0 (0)	1 9 0 0 (2 0)	4 4 0 (0)	1 3 0 0 (3 0)	1 8 0 (2 0)	4 9 0 (5 0)	3 3 0 (3 0)
R A M O S	4 0 (0)	4 0 (0)	1 4 0 (0)	1 2 0 (0)	1 4 0 (0)	1 2 0 (0)	2 0 0 (0)	1 6 0 (0)

N/A = 活性は観察されず。 ND* = 判定されず。 () = 曝露後の生存細胞率 (%) 。

【 0 2 2 0 】

この研究において、全ての条件下の全ての裸抗体は、全ての条件下で不活性であることが見出された。この研究において、 A T R A 単独は、 R A M O S を除く、試験された全ての細胞株において細胞成長を減速させ、 R A M O S 細胞に A T R A を添加することは、試験された E D C に対するそれらの感受性を増加させなかった。この研究において、及び抗体細胞染色によって判定されるように、かつ H L - 6 0 細胞を除いて、全ての細胞は、 A T R A 添加の前に、種々のレベルの細胞表面 C D 3 8 を発現した。 R A M O S を除いて、この研究において試験された全ての細胞株は、 C D 3 8 発現を増加させ、このため、 E D C に対する増強された活性を提示した (より低い E C 5 0 値及びより少ない残留生存細胞) 。

これらのデータは、 S U N 4 B 7 で産生された E D C が、細胞表面上で C D 3 8 を発現する細胞株において、アポトーシスを誘導する際に最も効力が高かったことを実証する。これらのデータはまた、 A T R A が E D C に対する細胞感受性を増強させることができることを実証する。

【 0 2 2 1 】

10

20

30

40

50

実施例 6：選択 E D C のインビボ薬物動態

本開示の種々の E D C の薬物動態を検査するために、3 つの E D C を研究室マウスに投与し、投与後の種々の時点における活性 E D C の存在について、血液を検査した。 E D C である S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N - 3 1 9 、 S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N 0 9 - 1 0 6 、及び S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N - 3 1 7 (薬剤負荷：各 E D C に 10
関して約 4) を、2 匹のマウスにそれぞれに、6 m g / k g の単回 I P 用量で、別個に投与し、種々の時点で血液を採取し、インビトロ試験によって、活性 E D C の存在について試験した。この研究の結果は、図 5 ~ 6 にグラフで示される。 S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N - 3 1 9 、 S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N 0 9 - 1 0 6 、及び S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N - 3 1 7 のインビボ半減期は、それぞれ 3 7 時間または 6 9 時間で計算することができなかった。加えて、結果は、 S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N 0 9 - 1 0 6 及び S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N - 3 1 7 が、試験された時点の間にそれらの完全活性 (細胞の > 9 9 % を殺滅する能力) を維持した一方、 S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N - 3 1 9 が、2 4 時間後にその活性を喪失した (即ち、細胞の 3 0 % 超が生存したままであった) ことを示した。これらのデータは、 S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N - 3 1 7 が好ましい E D C であることを示す。これは、 E D C が 0 . 1 ~ 1 0 m g s / k g で、かつ 2 週に 1 度の低頻度で投与され得ることを意味する。

【 0 2 2 2 】

実施例 7：選択 E D C のインビボ有効性

本明細書に開示される種々の E D C のインビボ有効性を検査するために、標的化部分として S U N 4 B 7 を使用して構築された 2 つの E D C (S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N - 3 1 9 及び S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N 0 9 - 1 0 6 ； 薬剤負荷：各 E D C に 20
関して約 4) を、非共役 S U N 4 B 7 、 C H O P (シクロホスファミド、ドキソルビシン、ピンクリスチン、及びプレドニゾンの混合物から成る、リンパ腫のための標準治療) 、ならびにビヒクル群と比較した。

【 0 2 2 3 】

研究室マウスに R a m o s 腫瘍細胞を移植し、約 2 5 0 m m ³ の平均サイズの腫瘍の担持を監視した。腫瘍が 2 5 0 m m ³ の平均サイズに到達した後、各群の 5 匹のマウスに、各々、 E D C (P B S に希釈し、 1 0 m g / k g で 5 週毎に 4 回投与) 、非共役 S U N 4 B 7 (P B S に希釈し、 1 0 m g / k g で 5 週毎に 4 回投与) 、ビヒクル (P B S を 1 0 30
m g / k g で 5 週毎に 4 回投与) 、または C H O P は 1 回、 3 0 m g / k g のシクロホスファミド、 2 . 4 7 5 m g / k g のドキソルビシン、 0 . 3 7 5 m g / k g のピンクリスチンで、及び P は毎日 5 回、 0 . 1 5 m g / k g のプレドニゾンで投与した。

【 0 2 2 4 】

図 7 に示されるように、 5 つの群の動物を比較したとき、 E D C を受けた群は、 C H O P 、非共役 S U N 4 B 7 、またはビヒクルを受けた群よりも、 4 5 日後に 2 , 0 0 0 m m ³ よりも小さい腫瘍を担持した。同様に、図 8 に示されるように、腫瘍は、 C H O P 、非共役 S U N 4 B 7 、またはビヒクルを投与された群と比較して、 E D C を投与された群においては、はるかにずっと遅く成長した。

【 0 2 2 5 】

これらのデータは、双方の E D C が、標準治療である C H O P と比較して、かつマウスに安全な用量で投与されるとき、優れた様態で腫瘍成長を低減させることを示す。

【 0 2 2 6 】

細胞株及び細胞培養：細胞株 R a m o s (A T C C 番号 - C R L - 1 5 9 6) 、 S U - D H L - 8 (A T C C 番号 - C R L - 2 9 6 1) 、 U 9 3 7 (A T C C 番号 - C R L - 1 5 9 6 . 2) 、 H u t 7 8 (A T C C 番号 - T I B - 1 6 1) 、 H 9 2 9 (A T C C 番号 - C R L - 9 0 7 8) 、 H L 6 0 (A T C C 番号 - C C L - 2 4 0) 、及び M V - 4 - 1 1 (A T C C 番号 C R L - 9 5 9 1) を、加湿されたインキュベータにおいて、 3 7 、 5 % の C O ₂ で、 1 m L あたり 1 × 1 0 ⁵ ~ 1 × 1 0 ⁶ 細胞の密度で、完全培地 [1 0 % (w t / v o l) ウシ胎仔血清及びゲンタマイシン (3 0 μ g / m l) で補充した R P M I 50

培地 1 6 4 0] に維持した。

【 0 2 2 7 】

インビトロ癌細胞細胞毒性分析：細胞を、以下の密度：1 ウェルあたり 2 0 0 0 (R a m o s 、 S U - D H - 8 、 H L 6 0) 、 1 5 0 0 (H u t 7 8) 、 1 3 3 3 (H 9 2 9) 、 及び 1 5 0 0 (M V - 4 - 1 1) 細胞で、 2 5 0 n M の全トランス型レチノイン酸 (A T R A) を含む、または含まない、 2 0 u l の完全培地中の 3 8 4 - ウェル白色組織培養処理マイクロタイタープレートにプレートした。これらの細胞を、試験絵化合物の添加の前に、加湿されたインキュベータにおいて、 5 % の C O ₂ で、 3 7 で 2 4 時間平衡化した。化合物及び / またはマウス血漿試料を 5 X 最終作用濃度で完全培地において順次希釈し、 5 μ l をアッセイに使用される細胞に添加した。処理した細胞を、細胞生存試験の前に、 3 日間インキュベートした。細胞生存試験は、 C e l l T i t e r - G l o 1 u m i n e s c e n t 細胞生存アッセイ (P r o m e g a , M a d i s o n , W I) を使用した。各細胞株に対する薬剤の E C 5 0 値は、 G r a p h P a d P r i s m 5 ソフトウェアを使用して判定した。

10

【 0 2 2 8 】

薬物動態。 S U N 4 B 7 - P E G - 2 4 - C E N - 3 1 9 、 S U N 4 B 7 - P E G - 2 4 - C E N 0 9 - 1 0 6 、 及び S U N 4 B 7 - P E G - 2 4 - C E N - 3 7 1 (薬剤負荷 : 各 E D C に関して約 4) の薬物動態を、 B a l b / c マウスにおいて評価した。 B a l b / c マウス (n = 2) に、腹腔内 (I P) 注射によって、 1 0 m g / k g の試験材料 (S U N 4 B 7 - P E G - 2 4 - C E N - 3 1 9) または 6 m g / k g (S U N 4 B 7 - P E G - 2 4 - C E N 0 9 - 1 0 6 及び S U N 4 B 7 - P E G - 2 4 - C E N - 3 7 1) を投与した。血液試料を、注射の 2 4 時間、 7 2 時間、 1 2 0 時間、及び 1 6 8 時間後に、ヘパリン化ヘマトクリット管を使用した眼窩後方からの採血を介して、各マウスから収集した。血液を遠心分離して (5 , 0 0 0 X g 、 5 分) 、血漿を単離した。 B 細胞リンパ腫細胞株 R a m o s の細胞毒性アッセイにおける E C 5 0 をもたらした血漿希釈係数 (各採血に対する) を確立することによって、マウス血液中の活性共役体の持続性をアッセイし、次いで、マウス血液中に存在する化合物の細胞毒性活性が半分に減少するために必要とされる時間として、半減期を計算した。

20

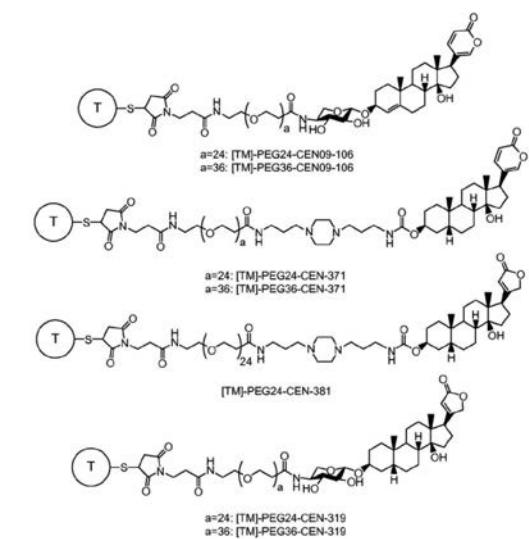
【 0 2 2 9 】

有効性 : リン酸緩衝生理食塩水中の R a m o s リンパ腫細胞 (1 0 ⁷) を、 5 ~ 7 週齢のメス C r l : S H O - P r k d c s c i d H r h r マウス (C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s , W i l m i n g t o n , M A) の脇腹に、 0 . 1 m L / マウスの体積で、皮下注射した。処理は、 5 匹の動物の群の腫瘍体積が、平均で約 2 5 0 m m ³ になったとき (腫瘍移植の 1 8 日後) に開始した。 S U N 4 B 7 、 S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N - 3 1 9 、 及び S U N 4 B 7 - P E G 2 4 - C E N 0 9 - 1 0 6 は、 1 0 m g / k g q 5 d x 4 (5 日毎に 4 回) で投薬した。 C H O P 処理は、 3 0 m g / k g のシクロホスファミド、 2 . 4 7 5 m g / k g のドキソルビシン、 0 . 3 7 5 m g / k g のビンクリスチンの単回腹腔内注射、及び 5 日間の 0 . 1 5 m g / k g でのプレドニゾンの毎日の投薬から成了た。腫瘍体積は、ノギスを使用して各群について毎週 2 回測定し、かつ腫瘍体積は、式 $V = (W^2 \times L) / 2$ (式中、 V は腫瘍体積であり、 W は腫瘍幅であり、 L は腫瘍長さである) を使用して計算した。

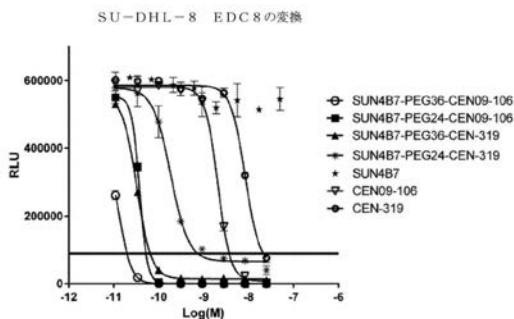
30

40

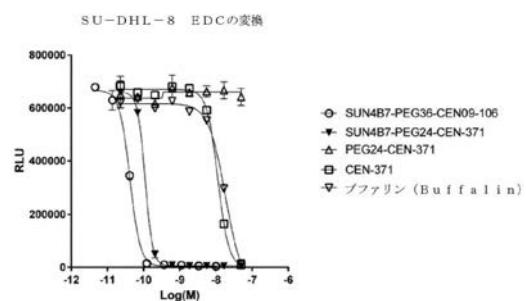
【図1】



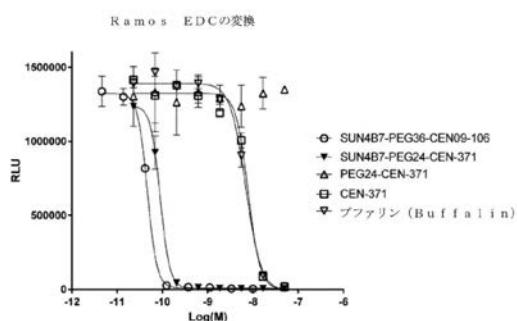
【図2】



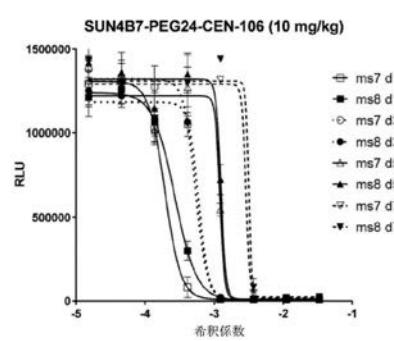
【図3】



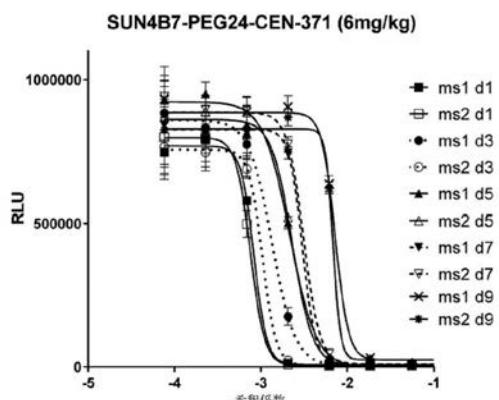
【図4】



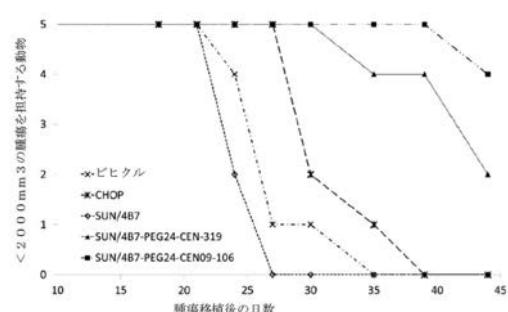
【図5】



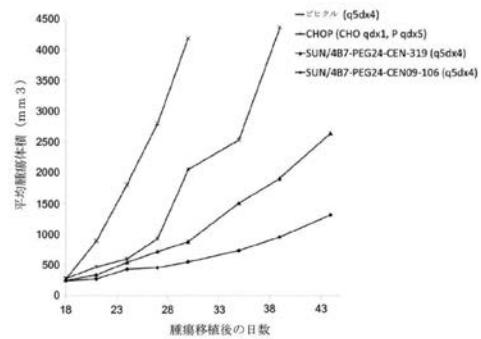
【図6】



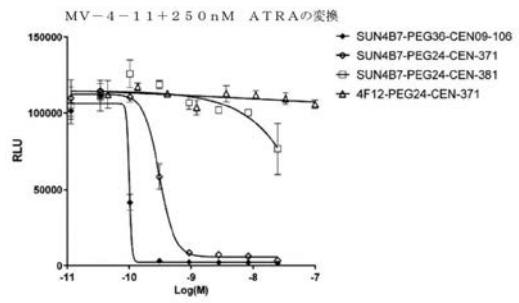
【図7】



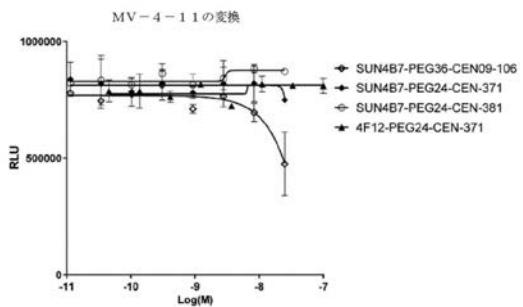
【図8】



【図10】



【図9】



【配列表】

2017506640000001.app

【国際調査報告】

PCT/US2015/016212 24.07.2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/16212
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/00, C07K 16/00 (2015.01) CPC - A61K 38/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8)- A61K 39/00, C07K 16/00 (2015.01) CPC- A61K 38/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- USPC- 424/178.1, 530/391.7 (keyword search, terms limited)		
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: Anti-CD38 conjugate, Na,K-ATPase, stable linker, non-cleavable linker, tertiary nitrogen, extracellular conjugate, lipid raft, caveolin		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/178173 A1 (Prudent) 27 December 2012 (27.12.2012) pg 2, para 3, pg 3, para 3, pg 4, para 2, pg 24, para 2	1-6
Y	Tian et al. "The Na-K-ATPase and Calcium-Signaling Microdomains" Physiology 23: 205-211, 2008; pg 206, fig. 1, pg 208, col 1, para 2, pg 209, col 1, para 2	1-6
Y	Deaglio et al. "CD38/CD19: a lipid raft - dependent signalling complex in human B cells" Blood, 15 June 2007, 109:5380-5398; abstract, Fig 1B, 2A, legend	1-6
Y	US 2009/0285780 A1 (Lee) 19 November 2009 (19.11.2009) abstract, claims 13, 15	5-6
A	Jia et al. "Formation and function of ceramide-enriched membrane platforms with CD38 during M1-receptor stimulation in bovine coronary arterial myocytes". Am J Physiol Heart Circ Physiol 295: H1743?H1752, 2008; abstract	1
<input 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		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 June 2015 (30.06.2015)	Date of mailing of the international search report 24 JUL 2015	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

PCT/US2015/016212 24.07.2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
PCT/US 15/16212		
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input checked="" type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments:</p>		

PCT/US2015/016212 24.07.2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/16212						
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)								
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 7-10, 14, 15 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 								
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)								
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.</p> <p>Group I: Claims 1-6, directed to an extracellular-targeted drug conjugate (EDC) comprising a targeting moiety linked by a stable or non-cleavable linker to an agent, wherein the targeting moiety binds to CD36, wherein the agent binds to or modifies the activity of a Na,K-ATPase.</p> <p>Group II: claim 11-13, drawn to an extracellular-targeted drug conjugate (EDC) of Formula I, [TARGETING MOIETY]-[LINKER]-[AGENT] wherein [Linker] has formula II.</p> <p>- Please see extra sheet for continuation -</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-6 								
<p>Remark on Protest</p> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.							
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.							
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.							

PCT/US2015/016212 24.07.2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/16212

Continuation of:

Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I includes the special technical feature of a stable or non-cleavable linker, not required by Group II.

Group II includes the special technical feature of a [Linker] of formula II, not required by Group I.

Common Technical Features

Groups I and II share the technical feature of an extracellular-targeted drug conjugate (EDC) comprising a targeting moiety linked via a linker to an agent, wherein the targeting moiety binds to CD38, wherein the agent binds to or modifies the activity of a Na,K-ATPase.

However, these shared technical feature do not represent a contribution over prior art in view of WO 2012/178173 A1 (Prudent), the article entitled "The Na-K-ATPase and Calcium-Signaling Microdomains" by Tian et al. (hereinafter 'Tian') (Physiology 23: 205-211, 2008) and the article entitled "Formation and function of ceramide-enriched membrane platforms with CD38 during M1-receptor stimulation in bovine coronary arterial myocytes" by Jia et al. (hereinafter 'Jia') (Am J Physiol Heart Circ Physiol 295: H1743?H1762, 2008).

Prudent teaches an extracellular-targeted drug conjugate (EDC) comprising a targeting moiety linked via a linker to an agent, wherein the targeting moiety binds to an extracellular target that is not a Na,K-ATPase, wherein the agent binds to or modifies the activity of a Na,K-ATPase (pg 2, para 3). Prudent further teaches that the targeting moiety's target is distinct from the target of the therapeutic (or diagnostic) agent, but the two targets exist within close proximity such that the targeting moiety and agent act in concert or even synergistically with one another. Thus, the EDC of the invention is generally only therapeutically effective when both the targeting moiety's and agent's targets are in close proximity to one another on the cell, tissue, or organ to which the therapy is targeted (pg 3, para 3). In one specific embodiment, Prudent listed caveolin as the target for the targeting moiety (pg 24, para 2). Tian teaches that caveolin is a structural protein of caveolae and plays a role in targeting the Na,K-ATPase into caveolae (pg 209, col 1, para 2) wherein Na,K-ATPase represents a highly abundant caveolar membrane protein (pg 208, col 1, para 2, pg 206, Fig.1). Jia teaches that CD38 contains an ADP ribosylcyclase domain and the localization of CD38 in a special lipid raft form contributes to CD38 activation to produce cADPR in response to muscarinic type1 receptor stimulation (abstract)[NOTE, caveolae is one type of lipid raft]. One of ordinary skill in the art would have been motivated to prepare an EDC construct comprising a targeting moiety linked via a linker to an agent, wherein the targeting moiety binds to CD38; and wherein the agent binds to or modifies the activity of a Na,K-ATPase, since Tian, in view of Jia, teaches that CD38 may be brought to the close proximity of Na,K-ATPase, in a lipid raft/caveolae microdomain. Consequently, one of ordinary skill in the art would have substituted the antibody to caveolin with the antibody to CD38, as the targeting moiety in an EDC construct. As said technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 K 31/585 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 K 31/704	
	A 6 1 K 31/585	
	C 0 7 K 16/28 Z N A	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, 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 0, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US)

(72) 発明者 プルデント, ジェイムズ アール.

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 7 - 1 9 4 4 , マディソン, デミング ウェイ
9 1 8

F ターム(参考) 4C076 BB01 BB13 BB15 BB16 CC04 CC07 CC15 CC27 DD60 EE23
EE59
4C085 AA13 AA14 AA16 AA22 AA25 CC23 EE01 GG02 GG03 GG04
GG08
4C086 AA01 AA02 DA13 EA19 MA01 MA04 NA13 ZA59 ZB08 ZB11
ZB26 ZC41
4H045 AA30 BA72 CA40 DA76 EA20 FA74