

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6772199号
(P6772199)

(45) 発行日 令和2年10月21日(2020.10.21)

(24) 登録日 令和2年10月2日(2020.10.2)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 47/65 (2017.01)	A 6 1 K 47/65 Z N A
A 6 1 K 47/66 (2017.01)	A 6 1 K 47/66
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00

請求項の数 43 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-568345 (P2017-568345)	(73) 特許権者	517454088
(86) (22) 出願日	平成28年8月11日 (2016.8.11)		コヒレント バイオファーマ
(65) 公表番号	特表2018-529632 (P2018-529632A)		英国領ケイマン諸島 ケイワイー 1 1 1 2
(43) 公表日	平成30年10月11日 (2018.10.11)		グランド ケイマン, クリケット スク
(86) 国際出願番号	PCT/CN2016/094704		エア, ウィロウ ハウス, フロア 4, ピ
(87) 国際公開番号	W02017/025057		ー, オー, ボックス 2 8 0 4
(87) 国際公開日	平成29年2月16日 (2017.2.16)	(74) 代理人	100149076
審査請求日	平成30年2月21日 (2018.2.21)		弁理士 梅田 慎介
(31) 優先権主張番号	201510489556.6	(74) 代理人	100119183
(32) 優先日	平成27年8月11日 (2015.8.11)		弁理士 松任谷 優子
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)	(74) 代理人	100173185
(31) 優先権主張番号	201510489560.2		弁理士 森田 裕
(32) 優先日	平成27年8月11日 (2015.8.11)	(74) 代理人	100162503
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		弁理士 今野 智介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多リガンドー薬物複合体及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 種のペイロード及び 2 種以上の細胞相互作用分子を含み、前記ペイロードは前記細胞相互作用分子のうちの少なくとも 1 種に結合されている複合体化合物またはその医薬的に許容される塩：ここで、

前記 2 種以上の細胞相互作用分子は、

(a) 第一の細胞表面受容体に特異的に結合することができる第一のリガンド及び第二の細胞表面受容体に特異的に結合することができる第二のリガンドを含み、第一の細胞表面受容体及び第二の細胞表面受容体は互いに異なる、か、

(b) 第一の細胞表面受容体に特異的に結合することができる第一のリガンド及びエンドサイトーシスを仲介することができるエンドサイトーシス分子を含み、

前記第一の細胞表面受容体及び前記第二の細胞表面受容体は、ソマトスタチン - 1 4 (S S T - 1 4) 受容体、黄体形成ホルモン放出ホルモン (L H R H) 受容体、及び一過性受容体電位カチオンチャネルサブファミリー V メンバー 6 (T R P V 6) 受容体からなる群より選択され、

前記エンドサイトーシス分子は、葉酸塩及びそれらの類縁体、及び細胞貫通ペプチドからなる群より選択され、

前記ペイロードは、小分子化合物、ヌクレオチド、ペプチド、及びタンパク質からなる群より選択される。

【請求項 2】

10

20

前記ペイロードは前記細胞相互作用分子のうちの少なくとも１種にリンカーを介して結合されている、請求項１に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項３】

前記細胞相互作用分子のうちの少なくとも２種は、細胞表面受容体に特異的に結合することができるリガンドである、請求項１又は２に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項４】

前記ペイロードは前記第一のリガンドに結合され、前記第一のリガンドは前記第二のリガンドに結合されている、請求項１に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

10

【請求項５】

前記第一のリガンドは前記第二のリガンドにスペーサーを介して結合されている、請求項４に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項６】

前記スペーサーは、配列番号１～１４のアミノ酸配列、Arg-Arg、Ala-Ser-Asn、Ala-Ala-Ala、Ser-Ser-Arg、Pro-Arg、及びPro-Leu-Glyからなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項５に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項７】

前記ペイロードは前記第一のリガンド及び前記第二のリガンドのそれぞれと直接結合されている、請求項４に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

20

【請求項８】

前記ペイロードは前記第一のリガンドに第一のリンカーを介して結合され、前記第二のリガンドに第二のリンカーを介して結合されている、請求項４に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項９】

第三の細胞表面受容体に特異的に結合することができる第三のリガンドをさらに含む、請求項１～８の何れか一項に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項１０】

前記第一の細胞表面受容体、前記第二の細胞表面受容体、及び前記第三の細胞表面受容体は互いに異なる、請求項９に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

30

【請求項１１】

１種、２種、３種、または４種以上のペイロードを含む、請求項１～１０の何れか一項に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項１２】

前記ペイロードは小分子化合物である、請求項１～１１の何れかに記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項１３】

前記小分子化合物は、メイタンシン及びその任意の誘導体、タキシノール及びその任意の誘導体、オーリスタチン及びその任意の誘導体、エポチロン及びその任意の誘導体、プレオマイシン及びその任意の誘導体、ダクチノマイシン及びその任意の誘導体、プリカマイシン及びその任意の誘導体、及びマイトマイシンＣからなる群より選択される、請求項１２に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

40

【請求項１４】

前記小分子化合物はオーリスタチンまたはその任意の誘導体である、請求項１３に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項１５】

前記細胞貫通ペプチドは腫瘍吸収性ペプチド、ミトコンドリア貫通ペプチド、活性化可能な細胞貫通ペプチド、及び抗菌性ペプチドからなる群より選択される、請求項１に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

50

【請求項 16】

前記細胞貫通ペプチドは、配列番号 19 または配列番号 20 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項 17】

前記第一のリガンド、前記第二のリガンド、及び前記第三のリガンドは独立して、ペプチドである、請求項 9 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項 18】

前記ペプチドは、配列番号 15、及び配列番号 15 のアミノ酸配列と少なくとも 70% の相同性を有するアミノ酸配列を有する相同体ペプチドからなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、前記相同体ペプチドは配列番号 15 のペプチドの機能的均等物である、請求項 17 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

10

【請求項 19】

前記リンカーは、ペプチドリinker、ジスルフィドリinker、または pH 依存リンカーである、請求項 2 又は 8 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項 20】

前記ペプチドリinkerは、プロテアーゼによる切断または還元により特定の生理学的環境下で切断可能である、請求項 19 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項 21】

前記ペプチドリinkerは、バリン - シトルリン、フェニルアラニン - リシン、及びバリン - リシンからなる群より選択される、請求項 19 または 20 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

20

【請求項 22】

前記ジスルフィドリinkerは、DMDS、MDS、DSDM、及びNDMDS からなる群より選択される、請求項 19 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項 23】

前記 pH 依存リンカーはシス - アコニット酸無水物である、請求項 19 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項 24】

前記複合体化合物は以下の化合物：LDC10B、LDC10BR、LDC10BX、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013、LDC10H、LDC11H、LDC12H、及びLDC13H からなる群より選択される、請求項 1 ~ 23 の何れか一項に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

30

【請求項 25】

ペイロード、第一のエンドサイトーシス分子、及び第二のエンドサイトーシス分子を含み、前記第一のエンドサイトーシス分子は前記第二のエンドサイトーシス分子と同じである、請求項 1 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項 26】

ペイロード、第一のエンドサイトーシス分子、及び第二のエンドサイトーシス分子を含み、前記第一のエンドサイトーシス分子は前記第二のエンドサイトーシス分子と異なる、請求項 1 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

40

【請求項 27】

前記第一のエンドサイトーシス分子は細胞貫通分子である、請求項 26 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項 28】

ペイロード、細胞表面受容体に特異的に結合するリガンド、及びエンドサイトーシス分子を含む、請求項 1 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項 29】

第三の細胞相互作用分子をさらに含み、前記第三の細胞相互作用分子はエンドサイトーシス分子である、請求項 25 ~ 28 の何れか一項に記載の複合体化合物またはその医薬的

50

に許容される塩。

【請求項 3 0】

前記葉酸塩の類縁体は、5 - メチルテトラヒドロ葉酸塩、5 - ホルミルテトラヒドロ葉酸塩、スルファニルアミド、メトトレキサート、及び 5 , 1 0 - メチレンテトラヒドロ葉酸塩からなる群より選択される、請求項 1 ~ 2 9 の何れか一項に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩。

【請求項 3 1】

請求項 1 ~ 3 0 の何れか一項に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、及び医薬的に許容される担体を含む医薬品組成物。

【請求項 3 2】

静脈内投与、皮下投与、経口投与、筋肉内投与、または心室内投与される、請求項 3 1 に記載の医薬品組成物。

【請求項 3 3】

治療有効量を必要とする対象に投与することを含む、対象にペイロードを送達するために用いられる、請求項 1 ~ 3 0 の何れか一項に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは請求項 3 1 または 3 2 に記載の医薬品組成物。

【請求項 3 4】

治療有効量を対象に投与することを含む、対象の病気を治療するために用いられる、請求項 1 ~ 3 0 の何れか一項に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは請求項 3 1 または 3 2 に記載の医薬品組成物。

【請求項 3 5】

前記病気は、癌、免疫疾患、心臓血管疾患、代謝疾患、及び神経疾患からなる群より選択される、請求項 3 4 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは医薬品組成物。

【請求項 3 6】

前記癌は、乳癌、肺癌、前立腺癌、腎臓癌、白血病、卵巣癌、胃癌、子宮癌、子宮内膜上皮性悪性腫瘍、肝臓癌、大腸癌、甲状腺癌、脾臓癌、結腸直腸癌、食道癌、皮膚癌、リンパ腫、及び多発性骨髄腫からなる群より選択される、請求項 3 5 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは医薬品組成物。

【請求項 3 7】

前記免疫疾患は自己免疫疾患である、請求項 3 5 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは医薬品組成物。

【請求項 3 8】

前記自己免疫疾患は、結合組織疾患、全身性硬化、リウマチ性関節炎、及び全身性紅斑性狼瘡からなる群より選択される、請求項 3 7 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは医薬品組成物。

【請求項 3 9】

前記心臓血管疾患は、狭心症、心筋梗塞、脳卒中、心臓発作、高血圧性心疾患、リウマチ性心疾患、心筋症、心臓不整脈、及び先天性心疾患からなる群より選択される、請求項 3 5 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは医薬品組成物。

【請求項 4 0】

前記代謝疾患は、糖尿病、痛風、肥満、低血糖症、高血糖症、及び脂質異常からなる群より選択される、請求項 3 5 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは医薬品組成物。

【請求項 4 1】

前記神経疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、頭部外傷、多発性硬化症、めまい、昏睡、及びてんかんからなる群より選択される、請求項 3 5 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは医薬品組成物。

【請求項 4 2】

1 種以上の治療薬と組み合わせて投与される、請求項 3 4 ~ 4 1 の何れか一項に記載の

10

20

30

40

50

複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは医薬品組成物。

【請求項 4 3】

前記治療薬は、抗癌治療標的を標的とする、癌に対する免疫応答を誘発または促進する、あるいは化学療法薬である、請求項 4 2 に記載の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは医薬品組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連する出願の参照

本願は、2015年8月11日に「エンドサイトーシスを誘導することができる「リガンド - 薬物複合体」という名称で提出された中国特許出願第201510489556.6号、及び2015年8月11日に「エンドサイトーシスを誘導することができる多リガンド - 薬物複合体」という名称で提出された中国特許出願第201510489560.2号の優先権を主張するものであり、それぞれ、その全内容を参照により本明細書に組み込む。

10

【0002】

本願は、一般に、複合体化合物、医薬品組成物、及びその使用法に関する。より具体的には、本願は、多リガンド - 薬物複合体 (mLDC)、特にエンドサイトーシスを誘導することができる mLDC、その医薬品組成物、ペイロード (payload = 低分子薬剤のこと) を必要とする対象に送達するのに mLDC を用いる方法、及び病気の治療に mLDC を用いる方法に関する。

20

【背景技術】

【0003】

通常、病気の細胞と正常細胞の病理学的及び生理学的特性は大きく異なり、その違いの一つは、病気の細胞の表面には、特異的すなわち過剰発現した材料 (例えば、抗原、化学信号、受容体など) が存在することである。このような材料は正常細胞には存在しないか発現していても少ない。この原理に基づき、抗体 - 薬物複合体 (ADC) 及びポリペプチド - 薬物複合体 (PDC) が病気の治療のために開発された。現在、ADC 及び PDC 薬物は市場に出ているものや臨床実験中のものもあるが、これら薬物の設計原理のため、臨床では ADC 及び PDC には多くの限定がある。

30

【0004】

近年、ADC は、2011年のアドセトリス (Seattle Genetics社) 及び2013年のカドサイラ (Genentech社) の認可により大きな足がかりを掴み、臨床試験では30種を超える薬物について活発に研究開発が行われている分野である。にもかかわらず、ADC 開発は、好適な標的の欠如、製造上の障害、複雑な性質による低い薬物安定性、及びADCの分子量の大きさに渡る多くの困難に直面している。現在、ADC は主に癌の治療に用いられている。例えば、癌細胞表面の抗原に対する標的抗体の親和性は、 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ (Kd、モル/リットル) である。従って、ADC は標的細胞に高い特異性を有する一方で、標的細胞と同じ標的受容体を有する正常細胞に対しても高い特異性を有する。また、生体内でADCが代謝するのに長い時間 (1週間から3週間) がかかることがある。その間、ADC は正常細胞を殺し続け、これによりADCの毒性副作用が著しく大きくなる可能性がある。従って、ADC のより理想的な適応症は腫瘍細胞と正常細胞で細胞表面の抗原の量が大きく異なる病気である。しかしながら、当該分野で周知の病気でのこのような厳密な要件を満たす物はほとんど存在しない。

40

【0005】

薬物複合体化合物の別の群はリガンド - 薬物複合体 (LDC) (ここで、リガンドはペプチドまたは小分子の何れかである) である。しかしながら、LDC の応用には、生物学的利用能、安定性、有効性などに渡る毒性に対する様々な問題がある。例えば、多くのリガンドはその大きな分子量、親油性、あるいは他の属性により細胞内に入ることができず、その治療用途が限定される。また、その治療効果は、リガンドが従来の化学療法 (例えば

50

、ドキシソルピシン、パクリタキセルなど）と組み合わせる場合は一般に低く、有効性の高い薬物分子（例えば、MMAE、DM1など）と組み合わせる場合はその毒性が高く、腫瘍治療のための治療有効量に達する前に動物が中毒死してしまう。

【発明の概要】

【0006】

本願は、複合体化合物またはこれらの医薬的に許容される塩、これら複合体化合物の医薬品組成物、及びこれら複合体化合物を使用する方法に関する。本願は、より具体的には、多リガンド-薬物複合体(mLDC)、特にエンドサイトーシスを誘導することができるmLDC、これらの医薬品組成物、必要とする対象にペイロードを送達するのにこれらmLDCを用いる方法、及び病気の治療にこれらmLDCを用いる方法に関する。上記の病

10

【0007】

本願の一側面は、1種のペイロード及び2種以上の細胞相互作用分子を含む複合体化合物またはその医薬的に許容される塩を開示する。上記ペイロードは、前記細胞相互作用分子のうちの少なくとも1種と結合されている。

【0008】

態様によっては、前記ペイロードは、前記細胞相互作用分子のうちの少なくとも1種に直接結合されている。態様によっては、前記ペイロードは、前記細胞相互作用分子のうちの少なくとも1種に間接的に結合されている。態様によっては、前記ペイロードは、リンカーを介して前記細胞相互作用分子のうちの少なくとも1種に結合されている。態様によっ

20

【0009】

態様によっては、前記複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は、第一の細胞表面受容体に特異的に結合することができる第一のリガンド、及び第二の細胞表面受容体に特異的に結合することができる第二のリガンドを含む。態様によっては、前記複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は、第一の細胞表面受容体に特異的に結合することができる第一のリガンド、及び第二の細胞表面受容体に特異的に結合することができる第二のリガンドを含み、前記第一の細胞表面受容体及び前記第二の細胞表面受容体は互いに異なる。

30

【0010】

態様によっては、前記ペイロードは、第一のリガンドに結合し、前記第一のリガンドは前記第二のリガンドに結合されている。態様によっては、前記第一のリガンドは、前記第二のリガンドに直接結合されている。態様によっては、前記第一のリガンドは、前記第二のリガンドに間接的に結合されている。態様によっては、前記第一のリガンドは、スパーサーを介して前記第二のリガンドに結合されている。

【0011】

態様によっては、前記ペイロードは、リンカーなしで第一のリガンド及び第二のリガンドのそれぞれと直接結合されている。態様によっては、前記ペイロードは、第一のリンカーを介して第一のリガンドに結合され、第二のリンカーを介して第二のリガンドに結合されている。態様によっては、前記第一のリンカー及び前記第二のリンカーは同じである。他の態様によっては、前記第一のリンカー及び前記第二のリンカーは異なる。態様によっては、前記ペイロードは、リンカーなしで第一のリガンドに直接結合され、リンカーを介して第二のリガンドに結合されている。

40

【0012】

態様によっては、前記複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は、第三の細胞表面受容体に特異的に結合することができる第三のリガンドをさらに含む。態様によっては、前記第一の細胞表面受容体、前記第二の細胞表面受容体、及び前記第三の細胞表面受容体

50

は互いに異なる。態様によっては、前記第一の細胞表面受容体、前記第二の細胞表面受容体、及び前記第三の細胞表面受容体のうち、少なくとも2種は互いに異なる。態様によっては、前記第一のリガンド、前記第二のリガンド、及び前記第三のリガンドは同じである。

【0013】

態様によっては、本明細書で提供される第一、第二、及び第三の細胞表面受容体は、独立して、トランスフェリン受容体(TFR)、低密度リポタンパク質受容体(LDLR)、葉酸塩受容体(FR)、尿酸キナーゼ受容体、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)、インテグリン受容体LFA-1、ソマトスタチンSST-14受容体、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)受容体、TRPV6受容体、及びプロテアーゼ表面抗原受容体からなる群より選択される。

10

【0014】

態様によっては、前記第一のリガンド、前記第二のリガンド、及び前記第三のリガンドは、独立して、ペプチド、葉酸塩、及びこれらの類縁体からなる群より選択される。

【0015】

態様によっては、前記リガンドは、以下のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを含む：Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg(配列番号15、名称P10)、Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-Cys(配列番号16、名称P11)、Ala-Gly-[Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys](配列番号17、名称P12)、Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-Cys(配列番号18、名称P13)、Arg-Gly-Asp(名称RGD)、及び配列番号15~18のアミノ酸配列の何れかと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有するアミノ酸配列を有する相同体ペプチド。前記相同体ペプチドは、それぞれ、配列番号15~18のペプチドと機能的等価物である。

20

【0016】

態様によっては、本明細書で記載する細胞相互作用分子の少なくとも1種は、エンドサイトーシスを仲介することができるエンドサイトーシス分子である。態様によっては、前記エンドサイトーシス分子は、また、細胞表面受容体に特異的に結合することもできる。

30

【0017】

態様によっては、前記エンドサイトーシス分子は、葉酸塩及びそれらの類縁体、エンドサイトーシスを仲介することができるペプチド、及び細胞貫通ペプチドからなる群より選択される。

【0018】

態様によっては、本明細書で提供されるリンカーは、ペプチドリinker、ジスルフィドリinker、またはpH依存リンカーである。

【0019】

態様によっては、前記ペプチドリinkerは、プロテアーゼによる切断または還元により特定の生理学的環境下で切断可能である。態様によっては、前記ペプチドリinkerは、バリリン-シトルリン、フェニルアラニン-リシン、及びバリリン-リシンからなる群より選択される。

40

【0020】

態様によっては、前記ジスルフィドリinkerは、DMDS、MDS、DSDM、及びNDMSからなる群より選択される。

【0021】

態様によっては、前記pH依存リンカーは、シス-アコニット酸無水物である。

【0022】

態様によっては、前記複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は、少なくとも1種のペイロードを含む。態様によっては、前記複合体化合物またはその医薬的に許容される

50

塩は、1種、2種、3種、または4種以上のペイロードを含む。

【0023】

態様によっては、前記ペイロードは、小分子化合物、ヌクレオチド、ペプチド、タンパク質、及びナノ粒子からなる群より選択される。態様によっては、前記ペイロードは、小分子化合物である。態様によっては、前記ペイロードは、治療薬である。

【0024】

態様によっては、前記複合体化合物は、ペイロード、2種または3種以上のリガンド、及び任意でリンカーまたはスペーサーを含む、多リガンド複合体化合物である。態様によっては、前記複合体化合物は、ペイロード、2種のリガンド、及び任意でリンカーまたはスペーサーを含む、二リガンド複合体化合物である。態様によっては、前記複合体化合物は、ペイロード、3種のリガンド、及び任意でリンカーまたはスペーサーを含む、三リガンド複合体化合物である。態様によっては、前記複合体化合物は、本明細書の図1に示される以下の化合物からなる群より選択される：LDC10B、LDC10BR、LDC10BX、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013、LDC10H、LDC11H、及びLDC12H。

10

【0025】

本願の他の側面は、本明細書で提供される複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、及び医薬的に許容される担体を含む医薬品組成物を開示する。態様によっては、前記医薬品組成物は、静脈内投与、皮下投与、経口投与、筋肉内投与、非経口投与、または心室内投与される。

20

【0026】

本願の他の側面は、治療有効量の本明細書で提供される複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは本明細書で提供される医薬品組成物対象に投与することを含む、必要とする対象にペイロードを送達するための方法を開示する。

【0027】

本願の他の側面は、治療有効量の本明細書で提供される複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは本明細書で提供される医薬品組成物を対象に投与することを含む、対象の病気を治療するための方法を開示する。態様によっては、前記病気は癌、免疫疾患、心臓血管疾患、代謝疾患、及び神経疾患からなる群より選択される。

30

【0028】

態様によっては、前記癌は、乳癌、肺癌、前立腺癌、腎臓癌、卵巣癌、胃癌、子宮癌、子宮内膜上皮性悪性腫瘍、肝臓癌、甲状腺癌、脾臓癌、大腸癌、結腸直腸癌、食道癌、皮膚癌、リンパ腫、白血病、及び多発性骨髄腫からなる群より選択される。

【0029】

態様によっては、前記免疫疾患は自己免疫疾患である。態様によっては、前記自己免疫疾患は、結合組織疾患、全身性硬化、リウマチ性関節炎、及び全身性紅斑性狼瘡からなる群より選択される。

【0030】

態様によっては、前記心臓血管疾患は、狭心症、心筋梗塞、脳卒中、心臓発作、高血圧性心疾患、リウマチ性心疾患、心筋症、心臓不整脈、及び先天性心疾患からなる群より選択される。

40

【0031】

態様によっては、前記代謝疾患は、糖尿病、痛風、肥満、低血糖症、高血糖症、及び脂質異常からなる群より選択される。

【0032】

態様によっては、前記神経疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、頭部外傷、多発性硬化症、めまい、昏睡、及びてんかんからなる群より選択される。

【0033】

態様によっては、本明細書で提供される方法は、本明細書で提供される複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは本明細書で提供される医薬品組成物と組み合わせ

50

て1種以上の治療薬を投与することをさらに含む。態様によっては、前記治療薬は、抗癌治療標的を標的する、癌に対する免疫応答を誘導または促進する、あるいは化学療法薬である。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1は、LDC10B、LDC10BR、LDC10BX、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013、LDC10H、LDC11H、及びLDC12Hの構造を示す。

【図2】図2はLDC10Bのエンドサイトーシス試験の結果を示す。パネルA及びBは、葉酸塩-FITCがKB細胞（葉酸塩受容体陽性細胞）に入るが、A375細胞（葉酸塩受容体陰性細胞）には入らないことを示す。パネルC及びDは、10A-FITCがKB細胞にもA375細胞にも入ることができないことを示す。パネルE及びFは、ニリガンド複合体10B-FITCがKB細胞には入るが、A375細胞には入らないことを示す。

10

【図3】図3は、葉酸塩-FITC、10A-FITC、及び10B-FITCの構造を示す。

【図4】図4は、腫瘍部位に集中する蛍光標識LDC10B-Cy5を示す、生きたマウスの画像である。

【発明を実施するための形態】

【0035】

20

様々な側面及び態様が本明細書で開示されるが、当業者であれば自明の通り、本願の主題の精神及び範囲を逸脱することなく、これら側面及び態様に対して様々な等価の変形及び修正を行うことができる。本明細書で開示される様々な側面及び態様は、例示目的のみであり、添付の請求項に示される真の範囲を限定すると解釈されるべきではない。本明細書で引用したすべての文献、特許、または特許出願は、その全内容を参照により組み込む。特に定義しなければ、本明細書で用いられる技術用語及び科学用語は、本願が属する分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味を持つ。

【0036】

本明細書及び添付の請求項で用いられる単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が明らかにそうでないことを示していなければ、複数形を含む。本明細書では、用語「a」（または「an」）、「1つ以上」、及び「少なくとも1つ」は互いに言い換え可能である。また、用語「含む」、「備える」、及び「有する」も互いに言い換え可能である。

30

【0037】

本願の一側面は、1種のペイロード及び2種以上の細胞相互作用分子を含み、前記ペイロードは前記細胞相互作用分子のうちの少なくとも1種に結合されている、複合体化合物またはその医薬的に許容される塩を開示する。

【0038】

本明細書で用いられる用語「ペイロード」は標的細胞または組織に送達される分子または材料を指す。ペイロードは特に限定されず、対象の病気の診断、治療、または予防に用い

40

【0039】

態様によっては、前記ペイロードは、小分子化合物、ヌクレオチド（例えば、DNA、プラスミドDNA、RNA、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマーなど）、ペプチド、タンパク質（例えば、酵素）、またはナノ粒子である。態様によっては、前記ペイロードは、小分子化合物である。態様によっては、前記小分子化合物は、メイタンシン及びその任意の誘導体、タキシノール及びその任意の誘導体、オーリスタチン及びその任意の誘導体、エポチロン及びその任意の誘導体、ブレオマイシン及びその任意の誘導体、ダクチノマイシン及びその任意の誘導体、プリカマイシン及びその任意の誘導体、及びマイトマイシンCからなる群より選択される。態様によっては、前記ペイロードは

50

、オーリスチンまたはその任意の誘導体である。態様によっては、前記医薬品化合物は、癌を緩和または治療するのに用いられる化学療法薬である。

【0040】

態様によっては、本明細書で開示される前記複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は、1種のペイロードを含む。態様によっては、本明細書で開示される前記複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は、少なくとも1種のペイロードを含む。例えば、前記複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は、1種、2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、または20種以上のペイロードを含む。複数のペイロードを含む複合体分子では、これらペイロードはそれぞれ、同じであってもよく、互いに異なってもよい。態様によっては、前記ペイロードのうちの少なくとも2種は互いに異なる。

10

【0041】

本明細書で用いられる用語「細胞相互作用分子」は、標的細胞またはその標的細胞の細胞表面受容体と相互作用して、細胞相互作用分子を含む複合体分子の標的細胞への特異的結合、標的細胞による複合体分子のエンドサイトーシス、及び/またはそうでなければ複合体分子の標的細胞による特異的な会合及び保持を生じさせることを誘導するあるいは容易にすることができる任意の分子または部位を指す。

【0042】

細胞相互作用分子は小さな化学分子あるいは大きな生体分子であってもよい。態様によっては、細胞相互作用分子は、抗体、リガンド、またはエンドサイトーシス分子である。態様によっては、前記細胞相互作用分子のうちの少なくとも1種は、細胞表面受容体に結合することができるリガンドである。態様によっては、前記細胞相互作用分子のうちの少なくとも1種はエンドサイトーシスを仲介することができるエンドサイトーシス分子である。

20

【0043】

本明細書で開示されるリガンドは、選択された標的（例えば、細胞表面受容体、細胞、組織、器官など）に対する特異的結合親和性を有する可能性がある様々な化学的あるいは生物学的実体を含む。態様によっては、リガンドは標的細胞の表面に発現したタンパク質すなわちマーカーに特異的に結合してもよい。態様によっては、本願のリガンドは $10^{-6} \sim 10^{-9}$ (Kd値)の親和性を有する細胞表面受容体に結合する。態様によっては、リガンドは少なくとも 10^{-7} 、少なくとも 10^{-8} 、少なくとも 10^{-9} M (Kd値)の親和性を有する細胞表面受容体に結合する。態様によっては、本願のリガンドは標的細胞表面受容体に対する親和性が他の標的でない細胞表面タンパク質すなわちマーカーに対する親和性の少なくとも2倍、3倍、4倍以上である細胞表面受容体に結合する。

30

【0044】

態様によっては、本願の2種以上の細胞相互作用分子は、異なる細胞表面受容体に特異的に結合することができる2種以上のリガンドである。態様によっては、本願の複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は2種のリガンドを含み、第一のリガンドは第一の細胞表面受容体に特異的に結合することができ、第二のリガンドは第二の細胞表面受容体に特異的に結合することができる。態様によっては、前記複合体分子は2種のリガンドを含み、第一のリガンドは葉酸塩受容体に特異的に結合することができ、第二のリガンドは黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) 受容体に特異的に結合することができる。態様によっては、前記複合体分子は3種のリガンドを含み、第一のリガンドは葉酸塩受容体に特異的に結合することができ、第二のリガンドはLHRH受容体に特異的に結合することができ、第三のリガンドはSST-14受容体に特異的に結合することができる。

40

【0045】

態様によっては、本明細書で開示される複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は、2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、または20種以上の細胞相互作用分子を含む。一複合体分子では、各細胞相互作用分子は同じであってもよく、あるいは互

50

いに異なっている。態様によっては、前記細胞相互作用分子のうちの少なくとも2種は互いに異なる。態様によっては、前記細胞相互作用分子のそれぞれが互いに異なる。

【0046】

態様によっては、本明細書で提供される複合体分子は、複数の細胞相互作用分子に結合した単一のペイロードのみを含む。態様によっては、本明細書で提供される一複合体分子は、複数の細胞相互作用分子に結合した複数のペイロードを含む。

【0047】

本明細書で用いられる用語「結合する (conjugated)」は、2つの化学基の共有結合による結合を指し、それら2つの化学基は直接、共有結合しているか、あるいはリンカーを介して間接的に結合しているかの何れかである。

10

【0048】

態様によっては、前記複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は、1種のペイロード及び2種以上の細胞相互作用分子を含み、前記ペイロードは、前記細胞相互作用分子のうちの少なくとも1種と直接、共有結合する。態様によっては、前記ペイロードは、前記細胞相互作用分子のそれぞれと直接、共有結合している。

【0049】

態様によっては、前記複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は、1種のペイロード及び2種以上の細胞相互作用分子を含み、前記ペイロードは、リンカーを介して前記細胞相互作用分子のうちの少なくとも1種と共有結合している。態様によっては、前記ペイロードは、前記細胞相互作用分子のそれぞれとリンカーを介して共有結合している。

20

【0050】

本明細書で用いられる用語「リンカー」は、ペイロードを細胞相互作用分子に共有結合させる分子または部位を指す。リンカーは、ペイロードと細胞相互作用分子のうちの少なくとも1種と結合する官能基を含む。態様によっては、官能基は、2つの反応性部位、すなわち、ペイロードに結合する部位と細胞相互作用分子に結合する部位を含んでいてもよい。態様によっては、これら官能基は互いに異なっている。態様によっては、官能基は、チオール反応部位及びアミン反応部位を含む基を含む。態様によっては、これらの官能基は互いに同じである。態様によっては、これら官能基はマレイミド基である。

【0051】

態様によっては、本願のリンカーは、少なくとも1種 (例えば、1種、2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、または10種以上) のペイロードと少なくとも2種 (例えば、2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、または10種以上) の細胞相互作用分子に結合することができる多価リンカーである。多価リンカーに結合するペイロードは、同じであってもよく、あるいは異なっている。多価リンカーに結合する細胞相互作用分子は同じであってもよく、あるいは異なっている。

30

【0052】

一側面では、リンカーは、標的細胞または組織へのペイロードの有効量を高め、毒性を回避するため、血液循環時のペイロードの意図しない放出を回避するのに十分な程度安定でなければならない。他の側面では、リンカーは、効率的に標的細胞を殺す、あるいは標的細胞の機能を阻止するため、標的細胞付近あるいは標的細胞内でペイロードを放出することができなければならない。態様によっては、リンカーは少なくとも1種の切断可能な官能基を含む。好ましいのは、切断可能な官能基は、標的細胞外では十分に安定であるが、標的細胞内に入ると切断されてペイロードを放出する。態様によっては、この切断可能な官能基は、対象の血液または血清中に比べて標的細胞内で少なくとも10倍、20倍、30倍、50倍、または100倍以上効率的に切断される。

40

【0053】

切断可能なリンカーは、加水分解、酵素反応、または還元反応、あるいはpHの変化により切断されてもよい。態様によっては、リンカーは、特定の生理学的環境下、例えば、適切なpH環境下で切断可能である。態様によっては、リンカーは、pHが約6.5以下の酸性環境で、あるいは一般酸として作用することができる酵素などの薬剤により切断可能

50

である。態様によっては、リンカーは、切断剤、例えば、pH、酸化還元電位、または分解性分子の存在の影響を受けやすい。

【0054】

態様によっては、リンカーは切断不能である。本明細書で用いられる切断不能リンカーは、細胞内代謝時にそのまま残っているリンカーを言う。

【0055】

態様によっては、リンカーは、ペプチド結合で結合したアミノ酸の線状または分岐状の分子鎖からなるペプチドリンカーである。態様によっては、ペプチドリンカーは、標的細胞の周囲あるいは標的細胞中に多く、すなわち特異的に発現しているプロテアーゼ（例えば、リソソームまたはエンドソーム中のカテプシンB）により切断可能である。本明細書で用いられるペプチドリンカーは、様々な長さを有していてもよい。典型的には、本願のペプチドリンカーの長さは1～50アミノ酸である。態様によっては、ペプチドリンカーの長さは、アミノ酸が2～45個、2～40個、2～35個、2～30個、2～25個、2～20個、2～15個、2～10個、2～9個、2～8個、2～7個、2～6個、2～5個、2～4個、または2～3個である。本明細書で記載するペプチドリンカーのアミノ酸の数は、範囲の両端を含む上記数値範囲内の任意の整数値と同じであってもよい。態様によっては、ペプチドリンカーの長さは、アミノ酸2個、3個、4個、または5個であることが好ましい。態様によっては、ペプチドリンカーは、バリン-シトルリン（Val-Cit）、フェニルアラニン-リシン、またはバリン-リシンである。

【0056】

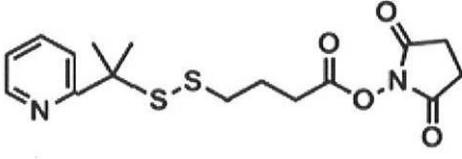
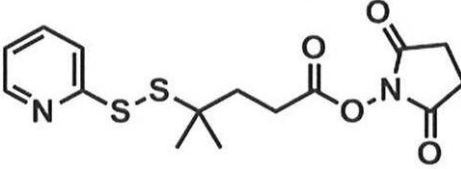
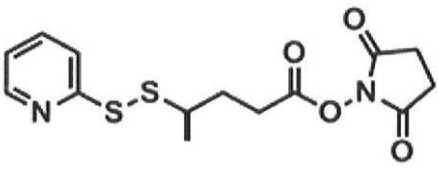
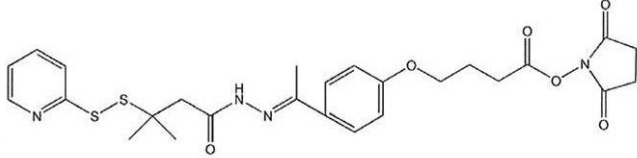
態様によっては、リンカーは、ジスルフィド結合を含むジスルフィドリンカーである。ジスルフィド結合は細胞内還元環境下で切断されてもよく、循環系では安定したままである。本願のジスルフィドリンカーは、DS DM、DM DS、M DS、またはND M DSであってもよい。これらジスルフィドリンカーの構造を以下の表1に示す。

10

20

【表 1】

表 1 : DSDM、DMDS、MDS、及びNDMD Sの構造

名称	構造
DSDM	
DMDS	
MDS	
NDMDS	

10

20

【 0 0 5 7 】

態様によっては、リンカーは pH 依存リンカーである。本明細書で記載する pH 依存リンカーは、特定の pH 環境で切断可能であってもよい。態様によっては、pH 依存リンカーは、アルカリ性条件で安定であってもよく、酸性条件、例えば、pH 値が 6.5 以下では切断可能である。態様によっては、pH 依存リンカーはシス - アコニット酸無水物である。

30

【 0 0 5 8 】

態様によっては、本願のリンカーは、上記のリンカーの何れか 1 種またはそれらの任意の組み合わせを含む。態様によっては、本願のリンカーは、リンカーの部分としてスペーサーを含んでもよい。

【 0 0 5 9 】

態様によっては、前記ペイロードは、第一の細胞相互作用分子に直接または間接的に結合され、第一の細胞相互作用分子は、第二の細胞相互作用分子に直接または間接的に結合されている。態様によっては、前記ペイロードは、第一の細胞相互作用分子及び第二の細胞相互作用分子のそれぞれに直接、結合されている。態様によっては、前記ペイロードは、第一の細胞相互作用分子及び第二の細胞相互作用分子のそれぞれに間接的に結合されている。態様によっては、前記ペイロードは、第一の細胞相互作用分子に間接的に（例えばリンカーを介して）結合され、第一の細胞相互作用分子は第二の細胞相互作用分子に直接または間接的に結合されている。態様によっては、前記ペイロードは、第一の細胞相互作用分子に第一のリンカーを介して結合され、第二の細胞相互作用分子に第二のリンカーを介して結合されている。態様によっては、前記リンカーは、少なくとも 1 種（例えば、1 種、2 種、3 種、4 種、5 種、6 種、7 種、8 種、9 種、または 10 種以上）のペイロード、及び少なくとも 2 種（例えば、2 種、3 種、4 種、5 種、6 種、7 種、8 種、9 種、ま

40

50

たは10種以上)のリガンドと結合する多価リンカーである。多価リンカーを、複数のペイロード及び複数の細胞相互作用分子を含む複合体分子を調製するのに用いてもよい。

【0060】

態様によっては、2種の細胞相互作用分子は、スペーサーを介して互いに結合してもよい。態様によっては、1種以上のスペーサーを用いて2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、または10種以上の細胞相互作用分子を結合させる。態様によっては、スペーサーは、標的細胞によって特異的に発現されている、あるいは標的細胞によって発現されるように誘導されるプロテアーゼにより切断可能である。このようなプロテアーゼとしては、例えば、以下の表2に示すプロテアーゼが挙げられる。態様によっては、スペーサーは、以下の表2に示すアミノ酸配列から選択される何れか1種のアミノ酸配列を含む。

【表 2】

表 2：酵素で切断可能な配列のリスト

プロテアーゼ	認識部位のアミノ酸配列	配列番号
カテプシンB	RR	－
レグマイン	ASN	－
マトリパーゼ	KSRAEDE	配列番号 1
MMP-2	PLGLAG	配列番号 2
前立腺特異抗原	SSLY	配列番号 3
ストロメリシン-3	AAA	－
TMPRSS2	LLRSLIG	配列番号 4
ウロキナーゼ型プラスミノ ーゲン活性化因子	SSR	－
活性化タンパク質C	LVKR	配列番号 5
因子 I x a	LVVR	配列番号 6
因子 V I I a	QLTR	配列番号 7
因子 X a	LEGR	配列番号 8
トロンビン	PR	－
カルパイン- a	PLFAEP	配列番号 9
カルパイン- 2	GLGSEP	配列番号 10
エンテロペプチダーゼ	DDDDK	配列番号 11
MMP-8	GPSG	配列番号 12

10

20

30

40

カテプシンL	PLG	—
プロプロテイン変換酵素5	RSKR	配列番号 13
カルパインー3	VGVF	配列番号 14

10

【0061】

本明細書で用いられる用語「切断可能」または「切断する」は、本明細書で提供される複合体化合物に対する代謝性過程または反応過程を指し、ペイロードと細胞相互作用分子のリンカー、または細胞相互作用分子間のスペーサーが分解されて、遊離ペイロードまたは細胞相互作用分子を放出する。リンカー及びスペーサーは、プロテアーゼにより切断される、あるいは特定の生理学的環境（例えば、pH環境）下で切断されるかの何れかである。

【0062】

態様によっては、本明細書で記載する複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は、3種のリガンドと結合されているペイロードを含み、第一のリガンドは、第一の細胞受容体に特異的に結合することができ、第二のリガンドは第二の細胞受容体に特異的に結合することができ、第三のリガンドは第三の細胞表面受容体に特異的に結合することができる。

20

【0063】

態様によっては、第三のリガンドは、第一のリガンドに直接または間接的に（例えば、スペーサーを介して）結合されている。態様によっては、第三のリガンドは、ペイロードに直接または間接的に（例えば、リンカーを介して）結合されている。態様によっては、第一のリガンドは、第二のリガンドに直接または間接的に（例えば、スペーサーを介して）結合され、第二のリガンドは第三のリガンドに直接または間接的に（例えば、スペーサーを介して）結合されている。

30

【0064】

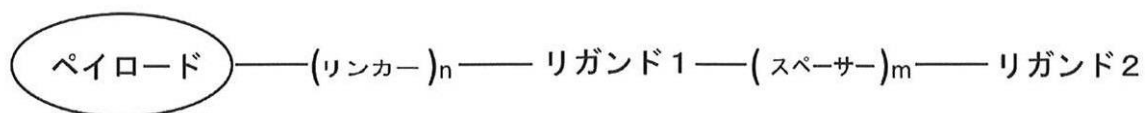
態様によっては、第一の細胞表面受容体、第二の細胞表面受容体、及び第三の細胞表面受容体は、構造または機能が互いに異なる。態様によっては、前記第一の細胞表面受容体、前記第二の細胞表面受容体、及び前記第三の細胞表面受容体のうち、少なくとも2種は構造または機能が互いに異なる。態様によっては、前記第一のリガンド、前記第二のリガンド、及び前記第三のリガンドは同じである。

【0065】

態様によっては、複合体分子は、以下に示される式I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、またはXの構造を有する（ここで、n、m、p、q、r、及びsは独立して0または1であり、リンカー及びスペーサーが独立して存在するか否かを表す）。

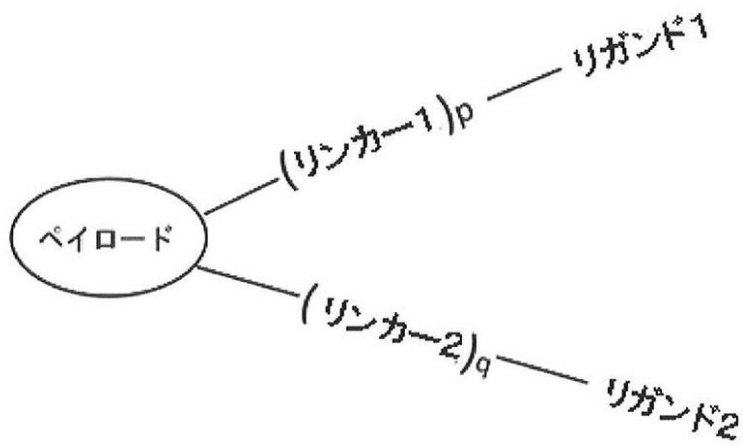
40

【化1】



(式 I)

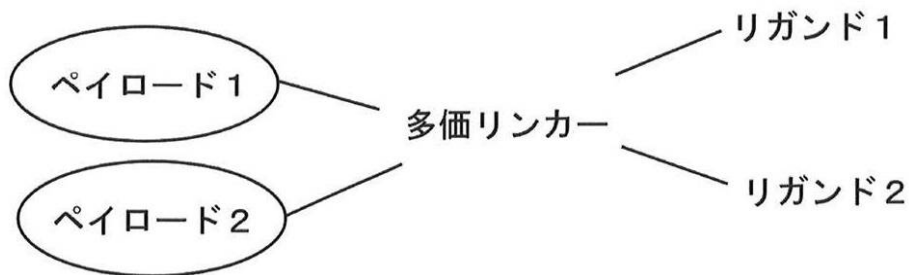
【化 2】



10

(式 II)

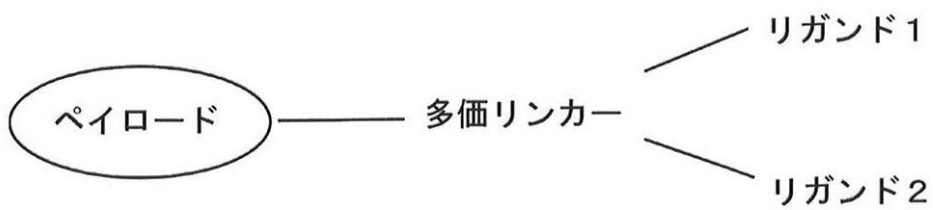
【化 3】



20

(式 III)

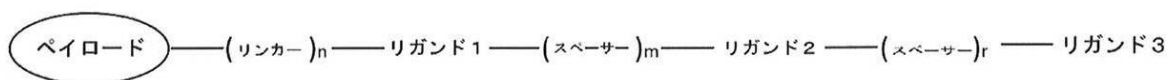
【化 4】



30

(式 IV)

【化 5】

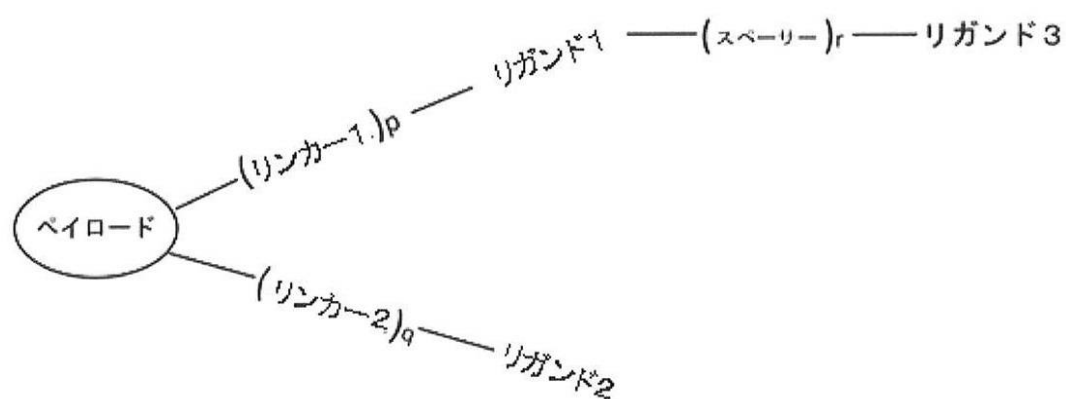


40

(式 V)

50

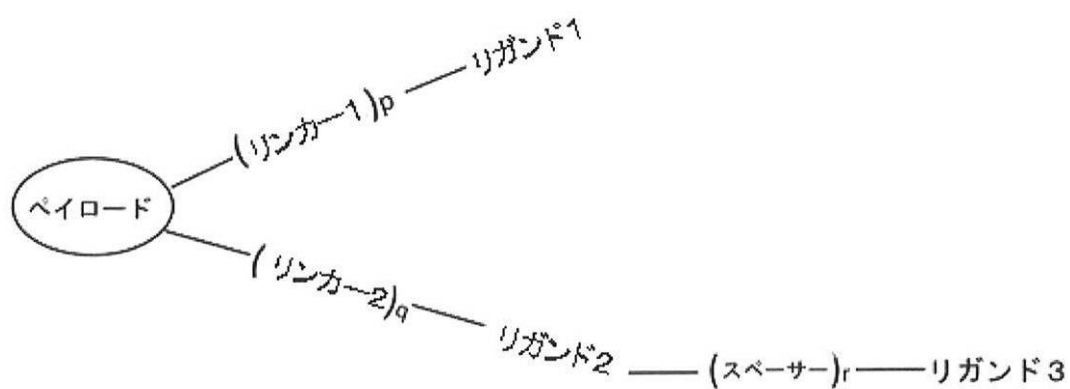
【化 6】



10

(式 VI)

【化 7】

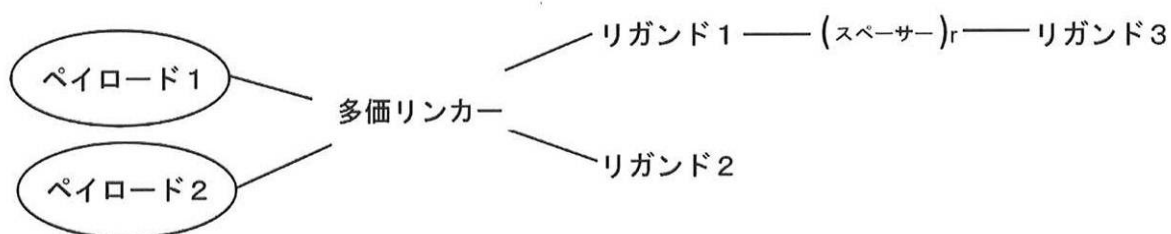


20

(式 VII)

30

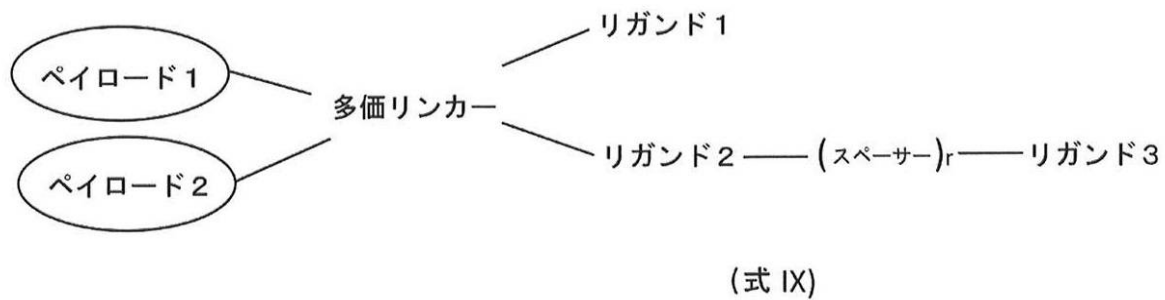
【化 8】



(式 VIII)

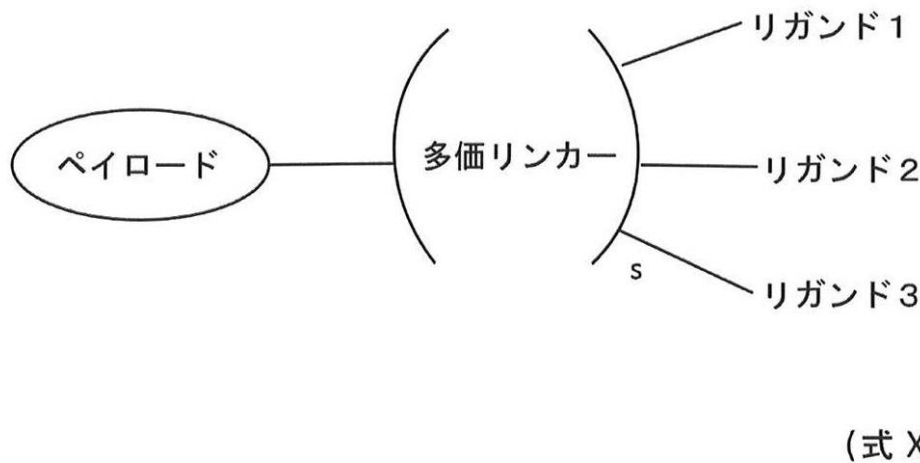
40

【化 9】



10

【化 10】



20

【0066】

好ましい態様では、細胞表面受容体の発現は、正常細胞よりも標的細胞（例えば、癌細胞）で有意に多い。本明細書で用いられる用語「有意に」は、統計的に有意な差、当業者が認識することができる有意な差を指す。

30

【0067】

態様によっては、細胞表面受容体の発現量は、正常細胞に比べて標的細胞（例えば、癌細胞）で2～1,000,000倍多く、例えば、正常細胞に比べて標的細胞（例えば、癌細胞）では2～10倍、2～100倍、2～1,000倍、2～10,000倍、2～100,000倍、2～1,000,000倍多い（範囲の両端を含む上記の数値範囲内の任意の値と同じであってもよい）。態様によっては、細胞表面受容体の発現量は、正常細胞に比べて標的細胞（例えば、癌細胞）では少なくとも10倍、100倍、1,000倍、10,000倍、または100,000倍多い。態様によっては、正常細胞上の細胞表面受容体の量は、標的細胞（例えば、癌細胞）上の細胞表面受容体の量に比べて少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%少ない。態様によっ

40

【0068】

態様によっては、第一、第二、及び第三の細胞表面受容体は、独立して、トランスフェリン受容体（TFR）、低密度リボタンパク質受容体（LDLR）、葉酸塩受容体（FR）、尿酸キナーゼ受容体、腫瘍壊死因子受容体（TNFR）、インテグリン受容体LFA-1、SST-14受容体、LHRH受容体、TRPV6受容体、及びプロテアーゼ表面抗原受容体からなる群より選択される。

【0069】

態様によっては、第一のリガンド、第二のリガンド、及び第三のリガンドは同じである。態様によっては、第一のリガンド、第二のリガンド、及び第三のリガンドのうち、少なく

50

とも2種は互いに異なる。態様によっては、第一のリガンド、第二のリガンド、及び第三のリガンドは、同じ細胞表面受容体に特異的に結合することができる。態様によっては、第一のリガンド、第二のリガンド、及び第三のリガンドは、異なる細胞表面受容体に特異的に結合することができる。態様によっては、第一のリガンド、第二のリガンド、及び第三のリガンドのそれぞれは、2種以上の異なる細胞表面受容体に結合することができる。

【0070】

態様によっては、第一のリガンド、第二のリガンド、及び第三のリガンドは独立して、葉酸塩及びそれらの類縁体、及びペプチドからなる群より選択される。態様によっては、第一のリガンド、第二のリガンド、及び第三のリガンドは独立して、葉酸塩及びそれらの類縁体であり、前記リガンドの少なくとも2種は互いに異なる。態様によっては、葉酸塩の類縁体は、5-メチルテトラヒドロ葉酸塩、5-ホルミルテトラヒドロ葉酸塩、スルファニルアミド、メトトレキサート、及び5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸塩からなる群より選択される。

10

【0071】

態様によっては、第一のリガンド、第二のリガンド、及び第三のリガンドは独立してペプチドである。態様によっては、前記ペプチドは、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、RGD、及び配列番号15~18のアミノ酸配列の何れかと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有するアミノ酸配列を有する相同体ペプチドからなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、前記相同体ペプチドは、配列番号15~18のペプチドと機能的均等物である。

20

【0072】

本明細書で用いられる用語「~とのパーセント(%)相同性」は、アミノ酸配列の場合は最大数の同一アミノ酸を達成するために候補と基準配列を並べ、任意でギャップを導入した後の2つのアミノ酸配列の同一性の百分率を指し、ヌクレオチド配列の場合は最大数の同一ヌクレオチドを達成するために候補と基準配列を並べ、任意でギャップを導入した後の2つのヌクレオチド配列間の同一性の百分率を指す。

【0073】

相同性の百分率は、当該分野でよく知られた様々な方法で決定してもよい。例えば、配列は、以下の公開ツールで比較してもよい：BLASTpソフトウェア(National Center for Biotechnology Information (NCBI)のウェブサイト<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>から入手可能。また、次を参照のこと。Altschul S.F. et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990); Stephen F. et al, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)), ClustalW2 (available from the website of European Bioinformatics Institute: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, また次を参照のこと：Higgins D.G. et al., Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al., Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007)), 及びTcoffee (Sweden Bioinformatics Instituteのウェブサイトから入手可能。また、次を参照のこと：Poirot O. et al., Nucleic Acids Res., 31(13): 3503-6 (2003); Notredame C. et al., J. Mol. Boil., 302(1): 205-17 (2000))。ソフトウェアを用いてこれらの配列のアライメントを行う場合、そのソフトウェアで利用可能な設定値のパラメータを用いてもよく、あるいはそれらパラメータをアライメントの目的に合うように変更してもよい。これらのすべては、当業者の知識の範囲内である。

30

40

【0074】

本明細書に用いられる用語「機能的均等物」は、誘導体ペプチドが由来する元のペプチド配列の生物学的活性と実質的に同じである生物学的活性を保持する誘導体ペプチドを指す。機能的均等物は天然の誘導体であってもよく、あるいは合成で調製される。機能的均等物としては、例えば、ペプチドの生物学的活性が保存されているという条件で1種以上のアミノ酸の置換、欠失、または付加を有するアミノ酸配列が挙げられる。置換するアミノ

50

酸は、置換されたアミノ酸の物理化学特性に類似した物理化学特性を有することが望ましい。望ましい類似した物理化学特性としては、電荷、嵩高さ、疎水性、親水性などの類似性が挙げられる。

【0075】

態様によっては、前記機能的均等物は、アミノ酸残基の保存的置換を含む。アミノ酸残基の保存的置換は、類似特性を有するアミノ酸同士の置換を指し、例えば、極性アミノ酸同士の置換（例えば、グルタミンとアスパラギンの置換）、疎水性アミノ酸同士の置換（例えば、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、及びバリン間の置換）、同じ電荷を有するアミノ酸同士の置換（例えば、アルギニン、リシン、及びヒスチジン間の置換あるいはグルタミン酸とアスパラギン酸の置換）が挙げられる。

10

【0076】

態様によっては、前記複合体化合物またはその医薬的に許容される塩の細胞相互作用分子のうちの少なくとも1種は、エンドサイトーシスを仲介することができるエンドサイトーシス分子である。

【0077】

本明細書で用いられる用語「エンドサイトーシス分子」は、標的細胞と相互作用した後に、本明細書で開示される複合体化合物またはその医薬的に許容される塩の標的細胞へのエンドサイトーシス、内部移行、すなわち取り込みを仲介することができる分子を指す。

【0078】

態様によっては、エンドサイトーシス分子は、葉酸塩及びそれらの類縁体、エンドサイトーシスを仲介することができるペプチド、及び細胞貫通ペプチドからなる群より選択される。

20

【0079】

態様によっては、エンドサイトーシス分子は、細胞表面受容体にも特異的に結合することができる。態様によっては、本明細書で提供されるエンドサイトーシス分子は、葉酸塩及びそれらの類縁体である。態様によっては、葉酸塩の類縁体は、5-メチルテトラヒドロ葉酸塩、5-ホルミルテトラヒドロ葉酸塩、スルファニルアミド、メトトレキサート、及び5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸塩からなる群より選択される。

【0080】

葉酸塩は、その小分子重量、免疫原性がないこと、及び高い安定性から、他の基と化学結合を形成するのに有用である。細胞の葉酸塩取り込みを仲介するために、葉酸塩は高い親和性を有する細胞表面で発現している葉酸塩受容体と会合してもよい。葉酸塩受容体は、大部分の正常細胞では非常に少ない量で発現するが、低葉酸塩条件で急速に細胞を分裂させるという葉酸塩の高い要求を満たすために多数の癌細胞では大量に発現している（Kelen LE, Int J Cancer, 2006; 119: 243-50; Kane MA, et al., J Clin Invest. 1988; 81: 1398-406; Matsue H, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89: 6006-9; Zhao R, et al., Annu Rev Nutr. 2011; 31: 177-201を参照のこと）。葉酸塩は、細胞表面上の葉酸塩受容体に特異的に結合することができ、また、前記複合体化合物またはその医薬的に許容される塩の標的細胞へのエンドサイトーシスを仲介することができるエンドサイトーシス分子でもある。

30

40

【0081】

態様によっては、エンドサイトーシス分子は、エンドサイトーシスを仲介することができるペプチドである。態様によっては、エンドサイトーシス分子は、さらに、細胞表面受容体にも特異的に結合することができる。態様によっては、エンドサイトーシスを仲介することができるペプチドは、配列番号16、配列番号17、配列番号18、RGD、及び配列番号16~18の何れかのアミノ酸配列と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有するアミノ酸配列を有する相同体ペプチドからなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、前記相同体ペプチドはそれぞれ、配列番

50

号 16 ~ 18 のペプチドの機能的均等物である。

【0082】

態様によっては、エンドサイトーシス分子は細胞貫通ペプチドである。細胞貫通ペプチド (CPP) は、タンパク質形質導入ドメイン (PTD) としても知られている、受容体から独立したやり方で細胞内部に入ることができる短いペプチド (一般に、40 個未満のアミノ酸) である。細胞貫通ペプチドがペイロードに結合されていると、ペイロードが膜を通る輸送を仲介することができ、タンパク質形質導入の活性を有する。態様によっては、本明細書に記載する細胞貫通ペプチドは、腫瘍吸収性ペプチド、ミトコンドリア貫通ペプチド、活性化可能な細胞貫通ペプチド、及び抗菌性ペプチドからなる群より選択される。態様によっては、細胞貫通ペプチドは、配列番号 19 (RRRRRRRRR、名称 R9) 及び配列番号 20 (GRKKRRQRRPPQ、Tat ペプチド、すなわち転写タンパク質の HIV 転写活性化因子の細胞貫通ペプチドである) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0083】

態様によっては、本明細書に記載するエンドサイトーシスを仲介することができるペプチドは、配列番号 16 ~ 20 の配列及び RGD に比べて 1 つのアミノ酸部位にのみアミノ酸の保存的置換を有する。態様によっては、本明細書に記載するエンドサイトーシスを仲介することができるペプチドは、配列番号 16 ~ 20 の配列と比べて、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、または 10 個のアミノ酸部位にアミノ酸の保存的置換を有する。

【0084】

本明細書に記載するエンドサイトーシスを仲介することができるペプチドは、その生物学的活性に影響を及ぼさないという前提条件で、人工のアミノ酸を含んでいてもよく、それらの例としては、-フルオロ-アラニン、1-メチル-ヒスチジン、-メチレン-グルタミン酸、-メチル-ロイシン、4,5-デヒドロ-リシン、ヒドロキシプロリン、3-フルオロ-フェニルアラニン、3-アミノ-チロシン、4-メチル-トリプトファンなどが挙げられる。

20

【0085】

態様によっては、本明細書で提供される複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は、本明細書で提供されるペイロードを少なくとも 1 種 (例えば、1 種、2 種、3 種、4 種、5 種、6 種、7 種、8 種、9 種、または 10 種以上)、本明細書で提供されるリガンドを少なくとも 1 種 (例えば、1 種、2 種、3 種、4 種、5 種、6 種、7 種、8 種、9 種、または 10 種以上)、本明細書で提供されるエンドサイトーシス分子を少なくとも 1 種 (例えば、1 種、2 種、3 種、4 種、5 種、6 種、7 種、8 種、9 種、または 10 種以上) 及び任意で本明細書で提供される 1 種のリンカーまたはスペーサーを含む。態様によっては、複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は、本明細書で提供される 1 種のペイロード、本明細書で提供される 1 種のリガンド、本明細書で提供される 1 種のエンドサイトーシス分子、及び任意で本明細書で提供される 1 種のリンカーまたはスペーサーを含む。

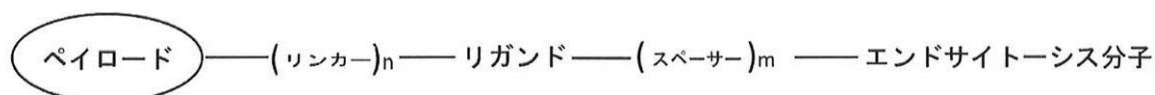
30

【0086】

態様によっては、前記複合体化合物は、以下で示す式 XI、XII、XIII、XIV、または XV の構造を有し、ここで、n、m、p、q、及び s は独立して 0 または 1 であり、リンカー、多価リンカー、及びスペーサーが独立して存在するか否かを示す。

40

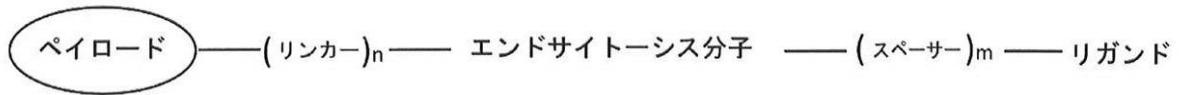
【化 11】



(式 XI)

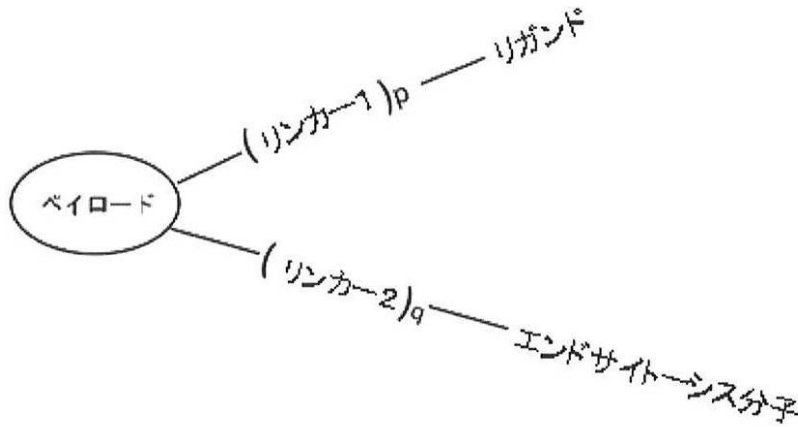
50

【化 1 2】



(式 XII)

【化 1 3】



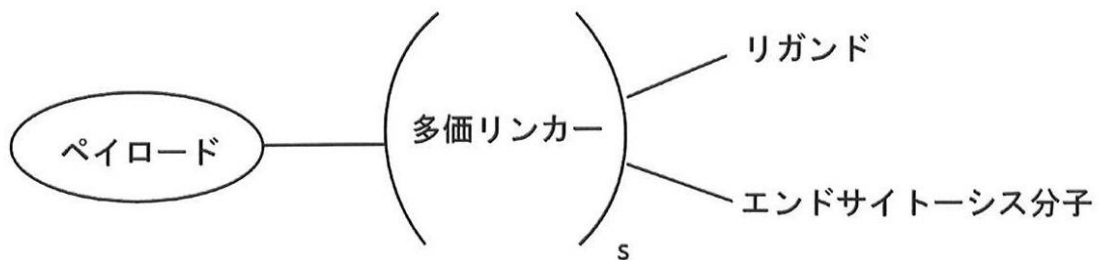
(式 XIII)

【化 1 4】



(式 XIII)

【化 1 5】



(式 XV)

【0087】

態様によっては、本願の複合体化合物は、化合物 LDC10B、LDC10BR、LDC

10

20

30

40

50

10BX、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013、LDC10H、LDC11H、LDC12H、及びLDC13Hからなる群より選択される。LDC10B、LDC10BR、LDC10BX、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013、LDC10H、LDC11H、及びLDC12Hの成分を以下の表3に示す。

【表3】

表3：複合体化合物の成分

複合体化合物の名前	細胞相互作用分子	リンカー	ペイロード
LDC10B	葉酸塩; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC10BR	葉酸塩; P10; RGD	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC10BX	葉酸塩; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC11B	葉酸塩; P11	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC12B	葉酸塩; P12	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC13B	葉酸塩; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC1013	P10; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC10H	R9; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC11H	R9; P11	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC12H	R9; P12	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC13H	R9; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE

10

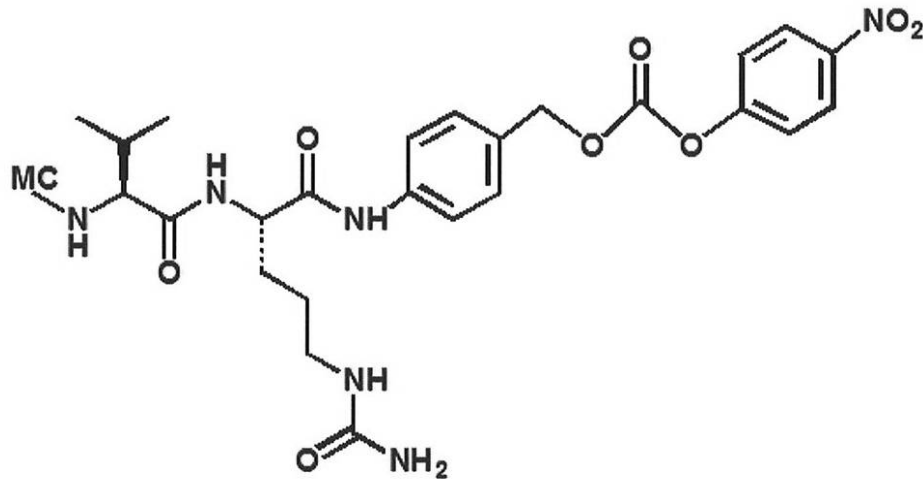
20

30

【0088】

MC-Val-Cit-PABの構造は以下の通りである。

【化 16】



10

【0089】

LDC10B、LDC10BR、LDC10BX、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013、LDC10H、LDC11H、及びLDC12Hの特定の構造を図1に示す。

【0090】

態様によっては、本明細書で提供される複合体化合物またはその医薬的に許容される塩は、1種のペイロード及び2種の細胞相互作用分子を含み、前記2種の細胞相互作用分子のうちの1つは細胞表面受容体に特異的に結合することができるリガンドであり、もう一方はエンドサイトーシス分子（例えば、LDC10H、LDC10B、LDC1013）である。態様によっては、エンドサイトーシス分子は、細胞表面受容体にも結合することができ、例えば、LDC10BまたはLDC1013である。態様によっては、エンドサイトーシス分子は、細胞貫通分子であり、例えば、LDC10Hなどである。

20

【0091】

態様によっては、本明細書で提供される複合体化合物またはその医薬的に許容可能塩は、1種のペイロード、及びいずれもエンドサイトーシス分子（例えば、LDC11B、LDC12B、LDC13B）である2種の細胞相互作用分子を含む。態様によっては、本明細書で提供される複合体化合物またはその医薬的に許容可能塩は、第一のエンドサイトーシス分子及び第二のエンドサイトーシス分子を含み、第一のエンドサイトーシス分子は第二のエンドサイトーシス分子と同じである。態様によっては、本明細書で提供される複合体化合物またはその医薬的に許容可能塩は、第一のエンドサイトーシス分子及び第二のエンドサイトーシス分子を含み、第一のエンドサイトーシス分子は第二のエンドサイトーシス分子（例えば、LDC11B、LDC12B、LDC13B）と異なる。態様によっては、本明細書で提供される複合体化合物またはその医薬的に許容可能塩は、1種のペイロード、及びいずれも細胞表面受容体の特異的に結合することができるエンドサイトーシス分子（例えば、LDC11B、LDC12B、LDC13B）である2種の細胞相互作用分子を含む。態様によっては、第一のエンドサイトーシス分子は細胞表面受容体にも特異的に結合することができ、第二のエンドサイトーシス分子は細胞貫通分子（例えば、LDC11H、LDC12H、LDC13H）である。

30

40

【0092】

態様によっては、本明細書で提供される複合体化合物またはその医薬的に許容可能塩は、1種のペイロード、及びいずれも細胞表面受容体の特異的に結合することができるリガンドである2種の細胞相互作用分子を含む。態様によっては、本明細書で提供される複合体化合物またはその医薬的に許容可能塩は、第一の細胞表面受容体に結合することができる第一の細胞相互作用分子、及び第二の細胞表面受容体に結合することができる第二の細胞相互作用分子を含み、第一の細胞相互作用分子は第二の細胞相互作用分子と同じである。

50

態様によっては、本明細書で提供される複合体化合物またはその医薬的に許容可能塩は、第一の細胞表面受容体に結合することができる第一の細胞相互作用分子と第二の細胞表面受容体に結合することができる第二の細胞相互作用分子を含み、第一の細胞相互作用分子は、第二の細胞相互作用分子（例えば、LDC10B、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013）と異なる。

【0093】

本願のmLDCを、標的組織環境の標的細胞に任意のペイロードを特異的に送達するのに用いてもよい。一般に、mLDC中に複数のリガンドがあることの利点は以下の3つである。まず、複数のリガンドは複数のモードでしばしば相乗的に作用して、その結果、副作用を低減しつつ治療効果を向上させることができる。次に、複数のリガンドの結合は、標的受容体または標的細胞に対するmLDCの親和性及び結合活性（avidity）を高めて、結合の特異性を高め、標的毒性を回避する。最後に、適切に設計されると、複数のリガンドの組み合わせは、しばしば薬物複合体に求められる多機能要件を満たすことができる。

【0094】

本願のmLDCは、以下に挙げる予期しなかった技術的效果を達成するが、これらに限定されない。（1）細胞表面受容体に結合することができるリガンドとエンドサイトーシス分子の組み合わせにより、複合体化合物は標的細胞内に特異的に侵入することができる。（2）mLDCは、非常に有効な化学療法薬（例えば、MMAE）を患者に送達するように薬物化合物の親和性及び標的特異性を高めて、そのような薬剤の治療可能域を広げ、副作用を回避する。（3）リンカーは、標的細胞の外（例えば、血液循環システム、細胞間物質など）へのペイロードの放出を防止することができ、これにより血液循環時の複合体化合物の安定性を確実にして薬物の毒性を低減する。標的細胞へ入った後、リンカーは切断されてペイロードを放出し、薬物の効果を発揮する。それと同時に、多剤耐性（MDR）を回避することが可能である。（4）様々な薬物を本願の複合体化合物の形態で送達することができるので、関連する薬物の用途範囲を広げることができる。従って、本願のmLDCは、目的の範囲及びLDC薬物の治療可能範囲を広げるだけでなく、薬物によってはその毒性及び副作用を低減する。

【0095】

例えば、複合体に2つのリガンドを用いてもよく、一方のリガンドは癌細胞表面受容体に特異的に結合し、もう一方のリガンドは癌に特異的なプロテアーゼにより充実性腫瘍内でのみ脱マスクングされ、エンドサイトーシスを誘導して複合体が薬物ペイロードを癌細胞のみに特異的に送達することを可能にし、受容体の何れかまたは両方を発現する正常細胞に対する毒性を回避する。

【0096】

例えば、2つのリガンド、すなわち、P10ペプチド及び葉酸塩を含むLDC10Bは、2つまたは3つのモードで機能することができる。P10ペプチドそのものは、相I臨床試験で有効な癌薬物であり、おそらくTRPV6拮抗薬として作用していることが示された。葉酸塩は、癌細胞を殺すためにエンドサイトーシスにより効率的に細胞毒素ペイロードを送達するのを助けることが示された。二リガンド-薬物複合体として、LDC10Bは、TRPV6受容体及び葉酸塩受容体の両方を発現している癌細胞を殺すため、次の3つの方法で相乗的に機能することができる。まず、P10ペプチド部位は、それ自体がTRPV6拮抗薬として機能する。次に、P10ペプチドは、あまり効率的ではないが、内部移行により結合した細胞毒素を送達することができる。また、葉酸塩は、葉酸塩受容体に結合してエンドサイトーシスにより効率的に細胞毒素を送達することができる。最後に、2つのリガンド、P10ペプチド及び葉酸塩は、それぞれの受容体に相乗的に結合して、両方の受容体を発現している標的細胞の内部に細胞毒素ペイロードを送達することができる。

【0097】

本明細書で用いられる「ポリペプチド」、「タンパク質」、及び「ペプチド」は互いに言い換え可能であり、アミノ酸の重合体を指す。本明細書で記載するポリペプチド、タンバ

10

20

30

40

50

ク質、またはペプチドは、天然に発生するアミノ酸、人工のアミノ酸、またはアミノ酸の類縁体及び模倣物を含んでいてもよい。ポリペプチド、タンパク質、またはペプチドは、当該分野でよく知られた任意の方法により得ることができる。例えば、天然の材料からの単離及び精製、組み換え発現、化学合成などが挙げられるが、それらに限定されない。

【0098】

本願の他の側面は、本明細書で提供される複合体化合物またはそれらの医薬的に許容される塩、及び医薬的に許容される担体を含む医薬品組成物を開示する。

【0099】

本明細書で用いられる用語「医薬的に許容される」は、妥当な医学的判断の範囲内で過度の毒性、刺激、アレルギー反応などがなく、ヒト及び他の動物の細胞と接触させて用いるのに好適であり、合理的な便益危険比と釣り合いが取れていることを意味する。

10

【0100】

本明細書で用いられる用語「医薬的に許容される塩」は、本願の複合体化合物の比較的非毒性である無機酸及び有機酸付加塩及び塩基付加塩を指す。代表的な酸付加塩としては、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、ホウ酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩、メシル酸塩、グルコヘプトン酸塩、ラクチオビオン酸塩 (lactiobionate)、スルファミン酸塩、マロン酸塩、サリチル酸塩、プロピオン酸塩、メチレン - ビス - b - ヒドロキシナフトエ酸塩、ゲンチシン酸塩、イセチオン酸塩、ジ - p - トルオイル酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩、シクロヘキシルスルファミン酸塩、及びキナテスラウリルスルホン酸塩などが挙げられる。塩基付加塩としては、医薬的に許容される金属及びアミン塩が挙げられる。好適な金属塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、バリウム塩、亜鉛塩、マグネシウム塩、及びアルミニウム塩などが挙げられる。態様によっては、ナトリウム塩及びカリウム塩が好ましい。好適な無機塩基付加塩は、金属塩基から調製され、例えば、水素化ナトリウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化アルミニウム、水酸化リチウム、水酸化マグネシウム、及び水酸化亜鉛などが挙げられる。好適なアミン塩基付加塩は、安定した塩を形成するのに十分な塩基性を有するアミンから調製され、好ましくは、その低い毒性と医学的な使用での許容性から医薬化学で頻繁に用いられる以下のアミンが挙げられる：アンモニア、エチレンジアミン、N - メチル - グルカミン、リシン、アルギニン、オルニチン、コリン、N, N' - ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、ジエタノールアミン、プロカイン、N - ベンジルフェネチルアミン、ジエチルアミン、ピペラジン、トリス (ヒドロキシメチル) - アミノメタン、水酸化四メチルアンモニウム、三エチルアミン、二ベンジルアミン、エフェナミン、デヒドロアピエチルアミン、N - エチルピペリジン、ベンジルアミン、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、エチルアミン、塩基性アミノ酸 (例えば、リシン及びアルギニン)、及びニシクロヘキシルアミンなど。

20

30

【0101】

本明細書に用いられる用語「医薬的に許容される担体」は、本明細書で提供される複合体化合物の構造及び特性と干渉しない、本明細書で提供される複合体化合物を対象に送達するための医薬的に許容される溶媒、懸濁剤、または任意の他の薬理的に不活性な媒体を指す。このような担体の特定のものにより、複合体化合物を例えば、対象が経口摂取するための錠剤、丸薬、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液、及びトローチとして処方することが可能になる。このような担体の特定のものにより、複合体化合物を注射、点滴、または局所投与として処方することが可能になる。

40

【0102】

本明細書で提供される医薬品組成物で用いられる医薬的に許容される担体は、これらに限定されないが、例えば、医薬的に許容される液体、ゲル、固体担体、水性媒体 (例えば、

50

塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、等張ブドウ糖注射液、殺菌水注射液、またはブドウ糖及び乳酸化リンゲル注射液）、非水性媒体（例えば、野菜由来の固定油、綿実油、トウモロコシ油、ごま油、またはピーナッツ油）、抗菌剤、等張剤（例えば、塩化ナトリウムまたはブドウ糖）、緩衝剤（例えば、リン酸塩またはクエン酸塩緩衝剤）、酸化防止剤（例えば、重硫酸ナトリウム）、麻酔薬（例えば、塩酸プロカイン）、懸濁／分散剤（例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ヒドロオキシプロピルメチルセルロース、またはポリビニルピロリドン）、キレート剤（例えば、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）またはEGTA（エチレングリコール四酢酸））、乳化剤（例えば、ポリソルベート80（Tween-80））、希釈剤、アジュバント、賦形剤、非毒性補助物質、当該分野で周知の他の成分、またはこれらの様々な組み合わせが挙げられる。好適な成分としては、例えば、賦形剤、結着剤、緩衝剤、保存料、潤滑剤、風味剤、増粘剤、着色剤、または乳化剤を含んでいてもよい。

10

【0103】

態様によっては、前記医薬品組成物は注射液製剤である。注射液製剤としては、例えば、水溶液または分散液、懸濁液、あるいは乳化液が挙げられる。すべての場合で、これら注射液製剤は殺菌されていなければならない、容易に注射することができるようになる。当然、流体である。製造及び保存条件で安定でなければならない、また微生物（例えば、バクテリア及び真菌類）の汚染作用から保護されなければならない。これら担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、これら及び／または植物油の好適な混合物を含む溶媒または分散媒であってもよい。これらの注射液製剤は適切な流動性を維持していなければならない。例えば、塗膜（例えば、レシチンなど）、界面活性剤などを用いて適切な流動性を維持してもよい。微生物の作用は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなど）により防止してもよい。

20

【0104】

態様によっては、前記医薬品組成物は経口投与製剤である。経口投与製剤は、例えば、カプセル、カシェー剤、丸薬、錠剤、トローチ剤（風味付けした基材、通常、スクロース及びアラビアゴムまたはトラガカントを用いる）、粉末、顆粒、水性または非水性液体の溶液または懸濁液、水中油型または油中水型液体乳化液、エリキシル剤、シロップ、トローチ（挿入基材、例えば、ゼラチン及びグリセリン、またはスクロース及びアラビアゴムを用いる）及び／または口内洗浄液などが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0105】

経口投与用の固体の投与形態（例えば、カプセル、錠剤、丸薬、糖衣錠、粉末、顆粒など）では、複合体化合物は1種以上の医薬的に許容される担体と混合される（例えば、クエン酸ナトリウムまたはリン酸水素カルシウム、及び／または以下の何れか：（1）賦形剤または増量剤（例えば、澱粉、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、及び／またはケイ酸）；（2）結着剤（例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース及び／またはアラビアゴム）；（3）保湿剤（例えば、グリセリン）；（4）崩壊剤（例えば、寒天 - 寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモ澱粉またはタピオカ澱粉、アルギン酸、特定のケイ酸塩、及び炭酸ナトリウム）；（5）溶解遅延剤（例えば、パラフィン）；（6）吸収促進剤（例えば、四級アンモニウム化合物）；（7）湿潤剤（例えば、アセチルアルコール及びモノステアリン酸グリセリン）；（8）吸収剤（例えば、カオリン及びベントナイト粘土）；（9）潤滑剤（例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、及びこれらの混合物）；及び（10）着色剤。

40

【0106】

経口投与用の液体の投与形態では、複合体化合物は医薬的に許容される乳化液、マイクロ乳化液、溶液、懸濁液、シロップ、及びエリキシル剤の何れかと混合される。この液体の投与形態は、複合体化合物に加えて、当該分野で一般に用いられる不活性希釈剤（例えば、水または他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤（例えば、エチルアルコール、イソプロピルア

50

ルコール、カルボン酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油（特に、綿種油、アメリカホドイモ油（groundnut）、トウモロコシ油、オリーブ油、ヒマシ油、及びごま油）、グリセリン、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール、ソルビタンの脂肪酸エステル、及びこれらの混合物）を含んでいてもよい。不活性希釈剤の他に、経口投与組成物は、アジュバント（例えば、湿潤剤）、乳化剤、懸濁剤、甘味料、風味料、着色剤、香料、及び防腐剤をも含んでいてもよい。

【0107】

態様によっては、上記医薬品組成物は、経口スプレー製剤または経鼻スプレー製剤である。スプレー製剤としては、水性エアロゾル、非水性懸濁液、リピドソーム製剤、または固体顆粒製剤などが挙げられるが、これらに限定されない。水性エアロゾルは、薬剤、従来の医薬的に許容される担体、及び安定化剤の混合水溶液または懸濁液により調製される。担体及び安定化剤は、特定の化合物の要件により変化するが、一般に、非イオン性界面活性剤（Tweens、すなわちポリエチレングリコール）、オレイン酸、レシチン、アミノ酸（例えば、グリシン）、緩衝溶液、塩、糖または糖アルコールが挙げられる。エアロゾルは、一般に、等張溶液により調製され、スプレーにより送達してもよい。

10

【0108】

態様によっては、前記医薬品組成物を、1種以上の他の薬物と混合して用いてもよい。態様によっては、前記医薬品組成物は、少なくとも1種の他の薬物を含む。態様によっては、これらの他の薬物は抗腫瘍薬物、心臓血管薬物、抗炎症性薬物、抗ウイルス薬物、消化器系薬物、神経系薬物、呼吸器系薬物、免疫系薬物、皮膚薬物、代謝性薬物などである。

20

【0109】

態様によっては、前記医薬品組成物は、適切な経路で必要とする対象に投与されてもよい。適切な経路としては、これらに限定されないが、経口投与、注射（例えば、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、皮内注射、心臓内注射、髄腔内注射、胸膜内注射、腹腔内注射など）、粘膜投与（例えば、経鼻投与、口内投与など）、舌下投与、直腸投与、経皮吸収投与、眼球内投与、及び肺投与が挙げられる。態様によっては、薬物組成物は静脈内投与、皮下投与、経口投与、筋肉内投与、または心室内投与してもよい。

【0110】

ペイロードのあるものの特性（例えば、高い毒性、高い親水性など）により、ペイロードを必要とする対象により特異的かつより効率的に送達することが望ましい。例えば、癌治療では、正常細胞に対しては毒性がなく、癌細胞に特異的に化学療法薬を送達することが望ましい。従って、本願の他の側面は、ペイロードを必要とする対象に送達する方法を開示する。この方法は、前記対象に本明細書で提供される複合体化合物またはそれらの医薬的に許容される塩、あるいは本明細書で提供される医薬品組成物の治療有効量を投与することを含む。本明細書で記載するペイロードは、病気の防止、阻害、改善、または治療において研究者、獣医、医者、またはその他の臨床医によって調べられている組織、系、動物、個体、またはヒトで生物学的または薬物反応を引き出す任意の医薬品であってもよい。

30

【0111】

本明細書で用いられる用語「対象」は、ヒト及び非ヒト動物を指す。非ヒト動物は、すべての脊椎動物、例えば、哺乳類及び非哺乳類を含む。対象はまた、ウシ、ブタ、ヒツジ、家禽、及びウマなどの家畜動物、あるいはイヌ及びネコなどのペット動物であってもよい。対象は、オスまたはメスであってもよく、高齢であってもよく、成人、青年、子供、あるいは幼児であってもよい。ヒトの対象は、白色人種、アフリカ系人種、アジア系人種、セム語系人種、その他の人種、あるいはこれら人種の混血であってもよい。

40

【0112】

本明細書で用いられる用語「治療有効量」は、対象の病気または障害の1つ以上の症状がある程度まで緩和する、病気または障害と関連づけられた、あるいは原因となる1つ以上の生理学的または生化学的パラメータを部分的あるいは完全に正常に戻す、及び/または

50

病気または障害の発症の尤度を低下させるような上記複合体化合物またはそれらの医薬的に許容される塩、あるいは医薬品組成物の量を指す。そのような量は、本明細書で提供される決定及び説明のための記載を前提として、一般に、当業者の権限内で多数の因子によって変動する。これらの因子としては、特定の対象、対象の年齢、重量、身長、一般的な体調、病歴、使用される特定の化合物、その化合物が処方される担体及びその化合物に選択された投与経路、及び治療される状態の性質及び重症度などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0113】

態様によっては、複合体化合物またはそれらの医薬的に許容される塩、あるいは医薬品組成物の量は、対象の病気または障害を阻害する、あるいは病気または障害の発症を予防的に阻害または防止するのに十分である。治療有効量は対象毎に異なってもよいが、一般に 0.01 ~ 100 mg / kg、例えば、0.01 ~ 90 mg / kg、0.01 ~ 80 mg / kg、0.01 ~ 70 mg / kg、0.01 ~ 60 mg / kg、0.01 ~ 50 mg / kg、0.01 ~ 40 mg / kg、0.01 ~ 30 mg / kg、0.01 ~ 20 mg / kg、0.01 ~ 10 mg / kg、0.01 ~ 5 mg / kg、0.01 ~ 4 mg / kg、0.01 ~ 3 mg / kg、0.01 ~ 2 mg / kg、0.01 ~ 1 mg / kg、0.01 ~ 0.1 mg / kg の範囲である。本明細書で記載する治療有効量は、(上記範囲の両端を含む)上記の数値範囲内の任意の値と同じであってもよい。

10

【0114】

本願の他の側面は、ペイロードを必要とする対象に送達するための方法を開示する。この方法は、前記対象に本明細書で提供される複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは本明細書で提供される医薬品組成物の治療有効量を投与することを含む。

20

【0115】

本願の他の側面は、対象の病気を治療するための方法を開示する。この方法は、前記対象に本明細書で提供される複合体化合物またはこれらの医薬的に許容される塩、あるいは本明細書で提供される医薬品組成物の治療有効量を投与することを含む。

【0116】

態様によっては、前記病気は癌であり、乳癌、肺癌、前立腺癌、腎臓癌、卵巣癌、胃癌、子宮癌、子宮内膜上皮性悪性腫瘍、肝臓癌、甲状腺癌、脾臓癌、大腸癌、結腸直腸癌、食道癌、皮膚癌、リンパ腫、白血病、及び多発性骨髄腫が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0117】

態様によっては、前記病気は免疫疾患、例えば、自己免疫疾患であり、結合組織疾患、全身性硬化、リウマチ性関節炎、及び全身性紅斑性狼瘡が挙げられるが、これらに限定されない。

【0118】

態様によっては、前記病気は心臓血管疾患であり、狭心症、心筋梗塞、脳卒中、高血圧性心疾患、狭心症、心筋梗塞、脳卒中、心臓発作、高血圧性心疾患、リウマチ性心疾患、心筋症、心臓不整脈、及び先天性心疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【0119】

態様によっては、前記病気は代謝疾患であり、糖尿病、痛風、肥満、低血糖症、高血糖症、及び脂質異常が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0120】

態様によっては、前記病気は神経疾患であり、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、頭部外傷、多発性硬化症、めまい、昏睡、及びてんかんが挙げられるが、これらに限定されない。

【0121】

態様によっては、本明細書で提供される方法は、複合体化合物またはその医薬的に許容される塩、あるいは医薬品組成物と1種以上の治療薬を組み合わせることをさらに含む。態様によっては、前記治療薬は、抗癌治療標的を標的とする、癌に対する免疫応答

50

を誘発または促進する、あるいは化学療法薬である。

【0122】

具体例により本願をさらに詳細に記載する。以下の例は、例示目的でのみ提供されており、いかなる方法でも本発明を限定することを意図しない。当業者には自明であるが、各種の重要ではないパラメータは変化または修正しても本質的に同じ結果が得られる。

【実施例】

【0123】

以下の実施例は本願をさらに例示することを意図している。本願の利点及び特徴は、以下の記載で明らかになる。しかしながら、これらの記載は単なる例示であって、本願の範囲の限定と解釈されるべきではない。

【0124】

実施例 I：複合体分子の調製

【0125】

ステップ I：葉酸塩 - NHS の合成

【0126】

葉酸塩 (44.1 g、100 mmol) を DMSO (2 L) に溶解して、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (24.8 g、120 mmol) 及び N-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) (23 g、200 mmol) と混合した。この混合物を暗所で 18 時間、常温で撹拌した。溶解しなかった物質を濾別して、真空乾燥し、コロイド状の固体を得た。コロイド状の固体を氷冷エーテルで 3 回洗浄し、乾燥して黄色の粉末 (53.8 g) を得た。この粉末は、さらに精製せずに次の反応に用いることができる。

【0127】

ステップ II：P10 保護ペプチド樹脂の合成

【0128】

Wang Resin (Sigma-Aldrich 社から購入、100 g、置換度：1.1 mmol/g) を秤取り、固相反応塔に加えた。次いで、DMF を加えて、30 分間、窒素ガスでバブリングしながら湿潤した。別の三角フラスコに Fmoc-Arg(pbf)-OH (142.7 g、220 mmol)、HOBt (35.6 g、264 mmol) 及び DMAP (2.7 g、22 mmol) を秤取り、DMF に溶解して、氷水槽で 0℃ まで冷却した。次いで、DIC (40.8 ml、264 mmol) を加えて、5 分間反応させた。この溶液を反応塔に加えて 3 時間反応させ、真空で乾燥させ、DMF で 3 回洗浄した。

【0129】

無水酢酸 (104 ml) 及びピリジン (88.5 ml) を DMF (500 ml) に溶解して、この混合物を上記の洗浄した樹脂に加えた。これら材料を密封して、室温で 5 時間静置した。DMF で 3 回洗浄し、メタノールで収縮した。樹脂を乾燥して Fmoc-Arg(pbf)-Wang Resin を得た。置換度を求めたところ、0.53 mmol/g であった。

【0130】

37.7 g (20 mmol) の Fmoc-Arg(pbf)-Wang Resin (置換度：0.53 mmol/g) を秤取り、反応塔に加えた。DMF で 3 回洗浄して、DMF で 30 分間湿潤した。Fmoc 保護基を DBLK で外して、DMF で 6 回洗浄した。Fmoc-Pro-OH (20.2 g、60 mmol) 及び HOBt (9.7 g、72 mmol) を秤取り、DMF に溶解して、氷水槽で 0℃ まで冷却した。次いで、DIC (11.1 ml、72 mmol) を加えて、5 分間反応させた。この溶液を反応塔に加えて、2 時間反応させ、DBLK を加えて Fmoc 保護基を外した。

【0131】

ペプチド配列の C-末端から N-末端まで各アミノ酸を付加するために上記の手順を繰り返した。Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、及び Fmoc-Cys(Trt)-OH をペプチド配列に従って 1 つずつ結合させ、DBLK を加えて Fmoc 保護基を外した。この溶液を DMF で 6 回洗浄して、メタ

10

20

30

40

50

ノールで2回収縮し、乾燥してP10保護ペプチド樹脂(85.8g)を得た。

【0132】

ステップIII：中間体である葉酸塩-P10(葉酸塩-Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg-OH)の合成

【0133】

葉酸塩-NHS(32.3g、60mmol)を秤取り、DMSOに溶解させた。ステップIIで得られたP10保護ペプチド樹脂(85.8g)を加えて、5分間反応させた。DIEA(21ml、120mmol)を滴下して、反応を室温で4時間継続した。反応生成物をDMFで3回洗浄して、メタノールで収縮し、真空乾燥して完全に保護されたペプチド樹脂(320.3g)を得た。

10

【0134】

上で得られた保護ペプチド樹脂(80g)を1000mlの一口フラスコに入れた。切断溶液(640ml、TFA：チオアニソール：EDT：アニソール=90：5：3：2(体積比))を調製して、フラスコに加え、室温で2.5時間反応させた。樹脂を濾過して、TFA(100ml)で洗浄した。濾液を合わせて無水エーテル(4500ml)に加えて黄色の固体を分離した。これらの固体を遠心分離して、無水エーテルで洗浄し、真空乾燥して黄色の固体(40.6g)を得た。粗ペプチドの収率は97.1%、HPLC純度は76.3%であった。得られた黄色の固体をHPLCで精製して、冷凍乾燥して葉酸塩-P10(28.25g、純度：98.6%)を得た。

【0135】

20

ステップIV：中間体R9-P10(Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg-OH)の合成

【0136】

ステップIIで得られたP10保護ペプチド樹脂の一部を秤取り、R9のペプチド配列に従って結合させ、中間体R9-P10を得た。

【0137】

ステップV：中間体Mc-Val-Cit-PAB-MMAEの合成

【0138】

MMAE(7.18g、10mmol)を秤取り、250mlの3つ口フラスコに入れ、無水DMFに溶解させた。N₂保護下、室温で透明になるまで攪拌した。Mc-Val-Cit-PAB-PNP(7.37g)及びHOAt(72mg、2mmol)を溶液に加えて、5分間反応させた。次いで、DIEA(3.5ml、20mmol)を滴下して、反応を室温で30分間継続した。温度を40~50℃まで上げて、20時間反応させた。その間、HPLCを用いて反応を監視した。真空乾燥してDMFを除去し、さらにHPLC精製を行って生成物Mc-Val-Cit-PAB-MMAE(10.7g、純度：99.3%)を得た。

30

【0139】

ステップVI：複合体LDC10B及びLDC10Hの合成

【0140】

ステップVで得られたMc-Val-Cit-PAB-MMAE(6.59g、5mmol)を秤取り、500mlの一口フラスコに入れた。3300mlのリン酸緩衝液を加えて、pH=7.2下で透明になるまで攪拌した。中間体である葉酸塩-P10またはR9-P10(10.5g、5.02mmol)を加えて、室温で2時間反応させた。この間、HPLCを用いて反応を監視した。反応が終了した後、溶液を濾過して、HPLC及び冷凍乾燥を行ってLDC10B(14.53g、純度：99.2%、収率：85.02%)及びLDC10H(12.37g、純度：98.7%、収率：81.34%)を得た。

40

【0141】

同様の手順で複合体LDC10BR、LDC10BX、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013、LDC11H、及びLDC12Hを得ることができる。

【0142】

ステップVII：葉酸塩-FITC(FITC-ACP-Lys(葉酸塩)-OH)の合

50

成

【0143】

Wang Resin (1 g、置換度：1.1 mmol/g) を秤取り、固相反応塔に加えた。次いで、DMFを加えて、30分間窒素ガスでバブリングしながら湿潤した。別の三角フラスコに2モル当量のFmoc-Lys(Dde)-OH、2.4モル当量のHOBt、及び0.2モル当量のDMAPをDMFに溶解させ、氷水槽で0℃まで冷却した。次いで、2.4モル当量のDICを加えて、5分間反応させた。溶液を反応塔に加えて、3時間反応させた。真空乾燥して、DMFで3回洗浄した。

【0144】

それぞれ10モル当量の無水酢酸及びピリジンをDMF(10 ml)に溶解して、上記の洗浄した樹脂に加えた。これらの材料を密封して、室温で5時間静置した。樹脂をDMFで3回洗浄して、メタノールで収縮し、乾燥してFmoc-LYS(Dde)-Wang Resinを得た。置換度を求めたところ、0.51 mmol/gであった。

10

【0145】

1.3 gのFmoc-LYS(Dde)-Wang Resin(置換度：0.51 mmol/g)を秤取り、反応塔に加えた。DMFで3回洗浄して、DMFで30分間湿潤した。DBLKでFmoc保護基を外して、DMFで6回洗浄した。2モル当量のFmoc-6-ACP-OH及び2.4モル当量のHOBtを秤取り、DMFに溶解して、氷水槽で0℃まで冷却した。次いで、2.4モル当量のDICを加えて、5分間反応させた。この溶液を反応塔に加えて、2時間反応させ、DBLKを加えてFmoc保護基を外した。

20

【0146】

FITCのDMF溶液(1.5モル当量)をこの樹脂に加えて、3モル当量のDIEAを滴下した。反応を2時間継続して、樹脂をDMFで3回洗浄した。

【0147】

2%のヒドラジン水和物のDMF溶液を上記樹脂に加えて、15分間反応させた。これを二回繰り返して、DMFで6回洗浄した。

【0148】

葉酸塩-NHS(2モル当量)を秤取り、DMSOに溶解して、樹脂に加えた。5分間反応させて、DIEA(21 ml、120 mmol)を滴下し、反応を室温で4時間継続した。反応生成物をDMSO及びDMFでそれぞれ3回洗浄して、メタノールで収縮し、真空乾燥して完全に保護されたペプチド樹脂を得た。

30

【0149】

樹脂から脱保護及び切断した後、HPLCで粗葉酸塩-FITCを精製して、純度が95%の黄色の固体の形態の生成物を得た。図3に葉酸塩-FITCの構造を示す。

【0150】

ステップVII：10A-FITCの合成

【0151】

ステップIで得られたP10保護ペプチド樹脂0.1 mmol(0.43 g)を秤取り、固相反応塔に加えた。次いで、DMFを加えて、30分間窒素ガスでバブリングしながら湿潤した。2モル当量のFmoc-e-ACP-OH、次いで2モル当量のDBLKを加えてFmoc保護基を外した。この溶液をDMFで6回洗浄した。

40

【0152】

FITCのDMF溶液(1.5モル当量)を樹脂に加えて、3モル当量のDIEAを滴下した。反応を2時間継続して、樹脂をDMFで3回洗浄した。

【0153】

樹脂から脱保護及び切断した後、HPLCで粗10A-FITCを精製して、黄色の固体の形態の生成物(純度：95%)を得た。図3に10A-FITCの構造を示す。

【0154】

ステップIX：10B-FITCの合成

【0155】

50

ステップ I I で得られた P 1 0 保護ペプチド樹脂 0 . 1 m m o l (0 . 4 3 g) を秤取り、固相反応塔に加えた。次いで、D M F を加えて、3 0 分間窒素ガスでバブリングしながら湿潤した。2 モル当量の Fmoc-Lys(Dde)-OH、Fmoc-e-ACP-OH、次いで 2 モル当量の D B L K を加えて F m o c 保護基を外した。溶液を D M F 6 回洗浄した。

【 0 1 5 6 】

F I T C の D M F 溶液 1 . 5 モル当量を樹脂に加えて、3 モル当量の D I E A を滴下した。反応を 2 時間継続して、樹脂を D M F で 3 回洗浄した。

【 0 1 5 7 】

2 % ヒドラジン水和物の D M F 溶液を上記の樹脂に加えて、1 5 分間反応させた。これを 2 回繰り返して、D M F で 6 回洗浄した。

【 0 1 5 8 】

葉酸塩 - N H S (2 モル当量) を秤取り、D M S O に溶解させ、樹脂に加えて 5 分間反応させた。D I E A (2 1 m l 、 1 2 0 m m o l) を滴下して、反応を室温で 4 時間継続した。反応生成物を D M S O 及び D M F でそれぞれ 3 回洗浄して、メタノールで収縮させ、真空乾燥して、完全に保護されたペプチド樹脂を得た。

【 0 1 5 9 】

樹脂から脱保護及び切断した後、H P L C で粗 1 0 B - F I T C を精製して黄色の固体の形態の生成物 (純度 : 9 5 %) を得た。図 3 に 1 0 B - F I T C の構造を示す。

【 0 1 6 0 】

ステップ X : L D C 1 0 B - C Y 5 の合成

【 0 1 6 1 】

ステップ I I で得られた P 1 0 保護ペプチド樹脂 0 . 1 m m o l (0 . 4 3 g) を秤取り、固相反応塔に加えた。次いで、D M F を加えて、3 0 分間窒素ガスでバブリングしながら湿潤した。2 モル当量の Fmoc-Lys(Dde)-OH、次いで 2 モル当量の D B L K を加えて F m o c 保護基を外した。溶液を D M F で 6 回洗浄した。

【 0 1 6 2 】

1 0 0 m g の蛍光色素 C y 5 、 1 . 5 モル当量の H A T U 、及び H O B T の D M F 溶液 (1 . 5 モル当量) を樹脂に加えて、3 モル当量の D I E A を滴下した。反応を 2 時間継続して、樹脂を D M F で 3 回洗浄した。

【 0 1 6 3 】

2 % ヒドラジン水和物の D M F 溶液を上記の樹脂に加えて、1 5 分間反応させた。これを 2 回繰り返して、D M F で 6 回洗浄した。

【 0 1 6 4 】

葉酸塩 - N H S (2 モル当量) を秤取り、D M S O に溶解して、樹脂に加えた。5 分間反応させて、D I E A (2 1 m l 、 1 2 0 m m o l) を滴下し、反応を室温で 4 時間継続した。反応生成物を D M S O 及び D M F でそれぞれ 3 回洗浄して、メタノールで収縮し、真空乾燥して完全に保護されたペプチド樹脂を得た。

【 0 1 6 5 】

樹脂から脱保護及び切断した後、H P L C で粗 L D C 1 0 B - C Y 5 を精製して、黄色の固体の形態の生成物 (純度 : 9 5 %) を得た。L D C 1 0 B - C Y 5 は、蛍光プローブ C Y 5 標識した L D C 1 0 B であり、二つのリガンド部位がリシンスパーサーを介して C Y 5 色素と結合している。

【 0 1 6 6 】

実施例 I I : 複合体の有効性アッセイ

【 0 1 6 7 】

以下の複合体が含まれる : L D C 1 0 B 、 L D C 1 0 B X 、 L D C 1 0 B R 、 L D C 1 1 B 、 L D C 1 2 B 、 L D C 1 3 B 、 L D C 1 0 1 3 、 L D C 1 0 H 、 L D C 1 1 H 、 L D C 1 3 H 、 L D C 1 、 L D C 1 0 A 、 L D C 1 1 A 、及び L D C 1 3 A 。実験によっては L D C 1 、 L D C 1 0 A 、 L D C 1 1 A 、及び L D C 1 3 A を対照として用いた。これらの構造は以下の通りである。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 8 】

L D C 1 : 葉酸塩 - (P E G)₃ - M C - V a l - C i t - P A B - M M A E

【 0 1 6 9 】

L D C 1 0 A : P10-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

【 0 1 7 0 】

L D C 1 1 A : P11-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

【 0 1 7 1 】

L D C 1 3 A : P13-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

【 0 1 7 2 】

1 . 複合体 L D C 1 0 B のエンドサイトーシス試験

10

【 0 1 7 3 】

以下の複合体が含まれる：葉酸塩 - F I T C (F I T C - A C P - L y s (葉酸塩) - O H)、1 0 B - F I T C、及び 1 0 A - F I T C。

【 0 1 7 4 】

培地：R P M I 1 6 4 0 培地、葉酸を含まない

【 0 1 7 5 】

実験方法：

【 0 1 7 6 】

1) ヒト鼻咽頭癌細胞株 K B、メラノーマ細胞株 A 3 7 5、ヒト肺癌細胞 H 4 6 0、卵巣癌細胞 S K O V 3、乳癌細胞株 H C C 1 9 5 4 を、1 0 % ウシ胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 培地で 3 7 、5 % C O₂ でインキュベートし、細胞を 2 ~ 3 日ごとに継代培養した。

20

【 0 1 7 7 】

2) ヒト鼻咽頭癌細胞株 K B、メラノーマ細胞株 A 3 7 5、ヒト肺癌細胞 H 4 6 0、卵巣癌細胞 S K O V 3、乳癌細胞株 H C C 1 9 5 4 を 1 ウェルにつき 1 × 1 0³ 細胞 (9 6 ウェルプレート) で蒔いて、3 7 、5 % C O₂ で 8 ~ 1 2 時間インキュベートした。

【 0 1 7 8 】

3) 1 μ M の F I T C 複合体または対照をプレートの細胞に加えて、3 7 で 1 0 ~ 1 5 分間インキュベートした。次いで、ウェルの培地を吸引して取り除き、細胞を P B S で 3 回洗浄した。

30

【 0 1 7 9 】

4) 次いで、細胞を共焦点顕微鏡 (ブランド) で撮像して、エンドサイトーシスを視覚化した。

【 0 1 8 0 】

結果及び分析：

【 0 1 8 1 】

葉酸塩リガンドを付加すると、ニリガンド L D C 1 0 B に葉酸塩受容体仲介エンドサイトーシスをもたらす可能性があることを示すため、K B (葉酸塩受容体陽性細胞) 及び A 3 7 5 (葉酸塩受容体陰性細胞) を 1 0 A - F I T C、葉酸塩 - F I T C、及び 1 0 B - F I T C で調べた。図 2 に示すように、葉酸塩受容体仲介エンドサイトーシスにより葉酸塩 - F I T C は K B (葉酸塩受容体陽性細胞) に入るが、A 3 7 5 (葉酸塩受容体陰性細胞) には入らない (パネル A 及び B)。一方、1 0 A - F I T C は、エンドサイトーシスがないために、いずれの細胞にも入ることができない (パネル C 及び D)。しかしながら、葉酸塩リガンドを付加して 1 0 A - F I T C をニリガンド複合体、すなわち 1 0 B - F I T C に転化すると、この複合体は葉酸塩受容体仲介エンドサイトーシスにより K B (パネル E) に入る能力が与えられるが、A 3 7 5 (パネル F) には入れない。さらに、5 0 m M (複合体の 5 0 倍過剰) の遊離葉酸塩を含むインキュベート前の K B 細胞は、葉酸塩 - F I T C 及び 1 0 B - F I T C の両方のエンドサイトーシスを完全に阻止して (データは不図示)、実際にエンドサイトーシスが葉酸塩受容体によって仲介されたことを確認した。

40

50

【 0 1 8 2 】

2 . 複合体 L D C 1 0 B の細胞毒性試験

【 0 1 8 3 】

検査試料 : L D C 1 0 B

【 0 1 8 4 】

対照試料 : M M A E 、 L D C 1 、 L D C 1 0 A

【 0 1 8 5 】

培地 : R P M I 1 6 4 0 培地、葉酸を含まない

【 0 1 8 6 】

実験方法 :

【 0 1 8 7 】

1) ヒト鼻咽頭癌細胞株 K B 、メラノーマ細胞株 A 3 7 5 、ヒト肺癌細胞 H 1 2 9 9 、慢性骨髄白血病細胞株 K 5 6 2 、ヒト肺癌細胞 H 4 6 0 、卵巣癌細胞 S K O V 3 、乳癌細胞株 H C C 1 9 5 4 、ヒト胃癌細胞 N 8 7 、及びヒト乳癌細胞 S K - B R - 3 を、1 0 % ウシ胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 培地で 3 7 、5 % C O ₂ でインキュベートし、細胞を 2 ~ 3 日ごとに継代培養した。

【 0 1 8 8 】

2) ヒト鼻咽頭癌細胞株 K B 、メラノーマ細胞株 A 3 7 5 、ヒト肺癌細胞 H 1 2 9 9 、慢性骨髄白血病細胞株 K 5 6 2 、ヒト肺癌細胞 H 4 6 0 、卵巣癌細胞 S K O V 3 、乳癌細胞株 H C C 1 9 5 4 、ヒト胃癌細胞 N 8 7 、及びヒト乳癌細胞 S K - B R - 3 を 1 ウェルあたり 1 × 1 0 ³ 細胞 (9 6 ウェルプレート) で蒔いて、3 7 、5 % C O ₂ で 8 ~ 1 2 時間インキュベートした。

【 0 1 8 9 】

3) L D C 複合体または対照の貯蔵溶液を P B S 溶液で調製した。1 0 0 μ L / ウェルの L D C 複合体または対照の連続希釈液をプレート内の試験細胞に加えて、3 7 、5 % C O ₂ で 1 5 ~ 3 0 分間インキュベートした。次いで、ウェルの培地を吸引して取り除き、試験細胞を、複合体を含まない新しい培地 (1 5 0 μ L / ウェル) で 3 7 、5 % C O ₂ で 2 ~ 3 日間インキュベートした。

【 0 1 9 0 】

4) CellTiter 96 (登録商標) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega 社) を各ウェルに加えて、死んだ細胞の量を測定し、各プレートをインキュベーター内で 3 7 、5 % C O ₂ で 1 時間インキュベートした。

【 0 1 9 1 】

5) 各プレートをマイクロプレートリーダーにて 4 9 0 n m で読み取り、L D C 複合体で処理した試験細胞と処理しなかった試験細胞の細胞生存数を比較した。5 0 % 細胞死 (I C ₅₀ 値) に必要な L D C 薬物濃度を決定した。

【 0 1 9 2 】

結果及び分析 :

【 0 1 9 3 】

L D C 1 0 B は、以下の癌細胞を非常に効率的に殺すことができる : ヒト鼻咽頭癌細胞株 K B 、ヒト肺癌細胞 H 4 6 0 、ヒト肺癌細胞 H 1 2 9 9 、慢性骨髄白血病細胞株 K 5 6 2 、卵巣癌細胞 S K O V 3 、乳癌細胞株 H C C 1 9 5 4 、ヒト胃癌細胞 N 8 7 、ヒト乳癌細胞 S K - B R - 3 。また、L D C 1 0 B の I C ₅₀ 値は L D C 1 及び L D C 1 0 A 対照よりも低かった (強かった) (表 4 を参照のこと) 。これらの細胞株は、葉酸塩受容体及び / または T R P V 6 受容体の発現があることが知られている。しかしながら、L D C 1 0 B の細胞毒性は、葉酸塩受容体の発現がないメラノーマ細胞株 A 3 7 5 に対して有意に低い (I C ₅₀ の読み取りが高い) 。

【 0 1 9 4 】

L D C 1 0 B は、葉酸塩受容体と T R P V 6 受容体の両方に結合することができるニリガン - 薬物複合体である。受容体陽性細胞株の場合、表 5 から分かるように、L D C 1 0

10

20

30

40

50

Bの細胞毒性は、単一リガンド - 薬物複合体 LDC1 または LDC10A に比べて 2 ~ 15 倍強かった (IC₅₀ 値は 2 ~ 15 倍低かった)。葉酸塩受容体がないメラノーマ細胞株 A375 では、LDC10B は、LDC1 及び LDC10A と同様に、毒性が約 15 倍少なく、優れた特異性を示す。従って、二リガンド - 薬物複合体 LDC10B は、相乗効果を示し、薬物の有効性に寄与している。

【表 4】

表 4：複合体 LDC10B と対照の細胞毒性試験の結果 (IC₅₀ 値)

(単位：モル / l、M)

表 4A：インキュベーション時間 30 分

細胞	H1299	K562	H460	SKOV3	HCC1954	N87	SK-BR-3
MMAE	0.86×10^{-9}	0.54×10^{-9}	0.77×10^{-9}	0.62×10^{-9}	0.45×10^{-9}	0.68×10^{-9}	0.52×10^{-9}
LDC1	2.62×10^{-7}	9.31×10^{-8}	1.92×10^{-7}	1.02×10^{-7}	9.44×10^{-8}	2.39×10^{-7}	9.82×10^{-8}
LDC10A	5.09×10^{-7}	1.11×10^{-7}	4.83×10^{-7}	1.25×10^{-7}	1.06×10^{-7}	5.17×10^{-7}	1.09×10^{-7}
LDC10B	5.88×10^{-8}	1.48×10^{-8}	5.04×10^{-8}	1.57×10^{-8}	1.41×10^{-8}	7.51×10^{-8}	1.59×10^{-8}

表 4B：インキュベーション時間 15 分

細胞	A375	KB
MMAE	1×10^{-7}	8.9×10^{-8}
LDC1	1×10^{-5}	1.5×10^{-5}
LDC10A	1×10^{-5}	8.5×10^{-6}
LDC10B	1×10^{-5}	7.6×10^{-7}

【0195】

3. 複合体 LDC11B の細胞毒性試験

【0196】

検査試料：LDC11B

【0197】

対照試料：MMAE、LDC1、LDC11A

【0198】

培地：RPMI 1640 培地、葉酸を含まない

【0199】

実験方法：

【0200】

1) ヒト肺癌細胞 H460、卵巣癌細胞 SKOV3、ヒト腎臓胚細胞 293A を、10% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地で 37℃、5% CO₂ でインキュベートし、細胞を 2 ~ 3 日ごとに継代培養した。

【0201】

2) ヒト肺癌細胞 H460、卵巣癌細胞 SKOV3、ヒト腎臓胚細胞 293A を 1 ウェルあたり 1×10^3 細胞 (96 ウェルプレート) で蒔いて、37℃、5% CO₂ で 8 ~ 12 時間インキュベートした。

【0202】

3) LDC 複合体または対照の貯蔵溶液を PBS 溶液で調製した。100 μL / ウェルの LDC 複合体または対照の連続希釈液をプレート内の細胞に加えて、37℃、5% CO₂ で 15 ~ 30 分間インキュベートした。次いで、ウェルの培地を吸引して取り除き、複合体を含まない新しい培地 (150 μL / ウェル) で細胞を 37℃、5% CO₂ で 2 ~ 3 日間インキュベートした。

【0203】

4) CellTiter 96 (登録商標) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega社) を各ウェルに加えて、死んだ細胞の量を測定し、プレートをインキュベーター内で 37℃、5% CO₂ で 1 時間インキュベートした。

【0204】

5) プレートをマイクロプレートリーダーにて 490 nm で読み取り、LDC 複合体で処理した細胞および処理しなかった細胞の生存数を比較した。50% 細胞死 (IC₅₀ 値) に必要な LDC 薬物濃度を決定した。

【0205】

結果及び分析：

【0206】

LDC 11B は以下の癌細胞を殺す、あるいはそれらの成長を阻害することができる：ヒト肺癌細胞 H460、卵巣癌細胞 SKOV3、ヒト腎臓胚細胞 293A。これらの細胞株は、葉酸塩受容体及び/または LHRH 受容体の発現量が多いことが知られている。LDC 11B の IC₅₀ 値は、LDC 1 及び LDC 11A 対照よりも低かった (表 5 を参照のこと)。

【0207】

LDC 11B は、葉酸塩受容体と LHRH 受容体の両方に結合することができるニリガンド-薬物複合体である。表 5 から分かるように、LDC 11B の細胞毒性は、単一リガンド複合体 LDC 1 または LDC 11A よりもほぼ 10 倍強かった (IC₅₀ 値がほぼ 10 倍低かった)。従って、ニリガンド-薬物複合体 LDC 11B は、相乗効果を示し、薬物の有効性に寄与している。

【表 5】

表 5：複合体 LDC 11B と対照の細胞毒性試験の結果 (IC₅₀ 値)

(単位：モル/1、M)

細胞	H460	SKOV3	293A
MMAE	0.58×10^{-9}	0.44×10^{-9}	0.86×10^{-9}
LDC1	5.26×10^{-7}	2.95×10^{-7}	7.15×10^{-7}
LDC11A	6.67×10^{-7}	3.41×10^{-7}	1.31×10^{-6}
LDC11B	8.13×10^{-8}	4.38×10^{-8}	5.24×10^{-7}

【0208】

4. 複合体 LDC 12B の細胞毒性試験

【0209】

検査試料：LDC 12B

【0210】

対照試料：MMAE

【0211】

培地：RPMI 1640 培地、葉酸を含まない

【0212】

実験方法：

【0213】

1) ヒト子宮内膜癌細胞 HEC-1A、ヒト胃癌細胞株 GTL-16、ヒト大腸上皮性悪性腫瘍 HCT-116、ヒト神経芽細胞腫細胞株 SH-SY5Y を、10% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地で 37℃、5% CO₂ でインキュベートし、細胞を 2~3 日ごとに継代培養した。

【0214】

2) ヒト子宮内膜癌細胞 HEC-1A、ヒト胃癌細胞株 GTL-16、ヒト大腸上皮性悪

10

20

30

40

50

性腫瘍 HCT - 116、ヒト神経芽細胞腫細胞株 SH - SY5Y を 1 ウェルあたり 1×10^3 細胞 (96 ウェルプレート) で蒔いて、37、5% CO₂ で 8 ~ 12 時間インキュベートした。

【0215】

3) LDC 複合体または対照の貯蔵溶液を PBS 溶液で調製した。100 μ L / ウェルの LDC 複合体または対照の連続希釈液をプレート内の細胞に加えて、37、5% CO₂ で 15 ~ 30 分間インキュベートした。次いで、ウェルの培地を吸引して取り除き、複合体を含まない新しい培地 (150 μ L / ウェル) で細胞を 37、5% CO₂ で 2 ~ 3 日間インキュベートした。

【0216】

4) CellTiter 96 (登録商標) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega 社) を各ウェルに加えて、死んだ細胞の量を測定し、プレートをインキュベーター内で 37、5% CO₂ で 1 時間インキュベートした。

【0217】

5) プレートをマイクロプレートリーダーにて 490 nm で読み取り、LDC 複合体で処理した細胞および処理しなかった細胞の生存数を比較した。50% 細胞死 (IC₅₀ 値) に必要な LDC 薬物濃度を決定した。

【0218】

結果及び分析：

【0219】

LDC 12B は以下の癌細胞を殺す、あるいはそれらの成長を阻害することができる：ヒト子宮内膜癌細胞 HEC - 1A、ヒト胃癌細胞株 GTL - 16、ヒト大腸上皮性悪性腫瘍 HCT - 116、ヒト神経芽細胞腫細胞株 SH - SY5Y。表 6 に IC₅₀ 値を示す。

【表 6】

表 6：複合体 LDC 12B と MMAE の細胞毒性試験の結果 (IC₅₀ 値)

(単位：モル / l、M)

細胞	HCT-116	GTL-16	HEC-1A	SH-SY5Y
MMAE	1.27×10^{-8}	6.38×10^{-9}	8.74×10^{-9}	2.4×10^{-8}
LDC12B	8.26×10^{-7}	6.12×10^{-7}	6.31×10^{-7}	3.96×10^{-7}

【0220】

5. 複合体 LDC 13B の細胞毒性試験

【0221】

検査試料：LDC 13B

【0222】

対照試料：MMAE、LDC 1、LDC 13A

【0223】

培地：RPMI 1640 培地、葉酸を含まない

【0224】

実験方法：

【0225】

1) ヒト鼻咽頭癌細胞株 KB、ヒト大腸上皮性悪性腫瘍 HCT - 116、ヒト前立腺癌細胞 PC - 3、ヒト胃癌細胞株 GTL - 16、ヒト子宮内膜癌細胞 HEC - 1A、及びヒト胃癌細胞 N87 を、10% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地で 37、5% CO₂ でインキュベートし、細胞を 2 ~ 3 日ごとに継代培養した。

【0226】

2) ヒト鼻咽頭癌細胞株 KB、ヒト大腸上皮性悪性腫瘍 HCT - 116、ヒト前立腺癌細胞 PC - 3、ヒト胃癌細胞株 GTL - 16、ヒト子宮内膜癌細胞 HEC - 1A、及びヒト

10

20

30

40

50

胃癌細胞 N 8 7 を 1 ウェルあたり 1×10^3 細胞 (9 6 ウェルプレート) で蒔いて、 3 7 、 5 % CO_2 で 8 ~ 1 2 時間インキュベートした。

【 0 2 2 7 】

3) L D C 複合体または対照の貯蔵溶液を P B S 溶液で調製した。 $100 \mu\text{L}$ / ウェルの L D C 複合体または対照の連続希釈液をプレート内の細胞に加えて、 3 7 、 5 % CO_2 で 1 5 ~ 3 0 分間インキュベートした。次いで、ウェルの培地を吸引して取り除き、複合体を含まない新しい培地 ($150 \mu\text{L}$ / ウェル) で細胞を 3 7 、 5 % CO_2 で 2 ~ 3 日間インキュベートした。

【 0 2 2 8 】

4) CellTiter 96 (登録商標) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega 社) を各ウェルに加えて、死んだ細胞の量を測定し、プレートをインキュベーター内で 3 7 、 5 % CO_2 で 1 時間インキュベートした。

【 0 2 2 9 】

5) プレートをマイクロプレートリーダーにて 490 nm で読み取り、 L D C 複合体で処理した細胞および処理しなかった細胞の生存数を比較した。 5 0 % 細胞死 (IC_{50} 値) に必要な L D C 薬物濃度を決定した。

【 0 2 3 0 】

結果及び分析：

【 0 2 3 1 】

L D C 1 3 B は、以下の癌細胞を殺す、あるいはそれらの成長を阻害することができる：ヒト鼻咽頭癌細胞株 K B、ヒト大腸癌細胞 H C T - 1 1 6、ヒト胃癌細胞株 G T L - 1 6、ヒト子宮内膜癌細胞 H E C - 1 A、ヒト前立腺癌細胞 P C - 3、ヒト胃癌 N 8 7。特に、 L D C 1 3 B は、葉酸塩受容体及び L H R H 受容体の両方を有する細胞株である K B に対して非常に効き目がある。さらに、ニリガンド L D C 1 3 B は、単一リガンド - 薬物複合体、すなわち L D C 1 及び L D C 1 3 A の何れかよりも 2 ~ 1 0 倍効き目があり、ニリガンド - 薬物複合体の有効性についての利点を確認された。表 7 に IC_{50} 値を示す。

【表 7】

表 7：複合体 L D C 1 3 B と対照の細胞毒性試験の結果 (IC_{50} 値)

(単位：モル / $1, \text{M}$)

細胞	KB	HCT-116	GTL-16	HEC-1A	PC-3	N87
MMAE	2.88×10^{-8}	1.27×10^{-8}	6.38×10^{-9}	8.74×10^{-9}	1.28×10^{-8}	3.83×10^{-9}
LDC1	6.5×10^{-8}	—	—	—	—	—
LDC13A	4.5×10^{-6}	—	—	—	—	—
LDC13B	2.57×10^{-8}	1.07×10^{-6}	7.55×10^{-7}	9.4×10^{-7}	1.18×10^{-6}	3.26×10^{-7}

【 0 2 3 2 】

6 . 複合体 L D C 1 0 H の細胞毒性試験

【 0 2 3 3 】

検査試料： L D C 1 0 H

【 0 2 3 4 】

対照試料： M M A E、 L D C 1、 L D C 1 0 A

【 0 2 3 5 】

培地： R P M I 1 6 4 0 培地、葉酸を含まない

【 0 2 3 6 】

実験方法：

【 0 2 3 7 】

1) ヒト肺癌細胞 H 1 2 9 9、卵巣癌細胞 S K O V 3、乳癌細胞株 H C C 1 9 5 4、及びヒト肺癌細胞 H 4 6 0 を、 1 0 % ウシ胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 培地で 3 7 、 5

10

20

30

40

50

%CO₂でインキュベートし、細胞を2～3日ごとに継代培養した。

【0238】

2) ヒト肺癌細胞H1299、卵巣癌細胞SKOV3、乳癌細胞株HCC1954、及びヒト肺癌細胞H460を1ウェルあたり 1×10^3 細胞(96ウェルプレート)で蒔いて、37℃、5%CO₂で8～12時間インキュベートした。

【0239】

3) LDC複合体または対照の貯蔵溶液をPBS溶液で調製した。100μL/ウェルのLDC複合体または対照の連続希釈液をプレート内の細胞に加えて、37℃、5%CO₂で15～30分間インキュベートした。次いで、ウェルの培地を吸引して取り除き、複合体を含まない新しい培地(150μL/ウェル)で細胞を37℃、5%CO₂で2～3日

10

【0240】

4) CellTiter 96(登録商標) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega社)を各ウェルに加えて、死んだ細胞の量を測定し、プレートをインキュベーター内で37℃、5%CO₂で1時間インキュベートした。

【0241】

5) プレートをマイクロプレートリーダーにて490nmで読み取り、LDC複合体で処理した細胞および処理しなかった細胞の生存数を比較した。50%細胞死(IC₅₀値)に必要なLDC薬物濃度を決定した。

【0242】

20

結果及び分析：

【0243】

LDC10Hは、以下の癌細胞を殺す、あるいはそれらの成長を阻害することができる：ヒト肺癌細胞H1299、卵巣癌細胞SKOV3、乳癌細胞株HCC1954、及びヒト肺癌細胞H460。このニリガンドLDC10Hは、一リガンド-薬物複合体LDC10Aよりも10倍以上効き目がある。この結果は、膜貫通ペプチド配列(H)がエンドサイトーシスによる薬物の細胞内への送達に役立つことができることを示している。さらに、LDC10Hはまた、単一リガンド複合体LDC1よりも効き目があり、有効性についてニリガンド-薬物複合体の利点を確認された。LDC10HのIC₅₀値は、LDC1及びLDC10A対照よりも低かった(表8を参照のこと)。

30

【表8】

表8：複合体LDC10Hと対照の細胞毒性試験の結果(IC₅₀値)

(単位：モル/1、M)

細胞	HCC1954	H1299	SKOV3	H460
MMAE	0.29×10^{-9}	0.71×10^{-9}	0.49×10^{-9}	0.56×10^{-9}
LDC1	7.79×10^{-8}	1.86×10^{-7}	2.01×10^{-7}	1.37×10^{-7}
LDC10A	4.18×10^{-7}	7.88×10^{-7}	6.41×10^{-7}	7.24×10^{-7}
LDC10H	3.6×10^{-8}	9.04×10^{-8}	7.38×10^{-8}	8.53×10^{-8}

40

【0244】

7. 複合体LDC1013の細胞毒性試験

【0245】

対照試料：MMAE、LDC1、LDC10A

【0246】

培地：RPMI1640培地、葉酸を含まない

【0247】

実験方法：

【0248】

50

1) ヒト鼻咽頭癌細胞株 KB、メラノーマ細胞株 A375、及びヒト肺癌細胞 H460 を、10%ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地で 37、5%CO₂ でインキュベートし、細胞を 2～3 日ごとに継代培養した。

【0249】

2) ヒト鼻咽頭癌細胞株 KB、メラノーマ細胞株 A375、及びヒト肺癌細胞 H460 を 1 ウェルあたり 1×10^3 細胞 (96 ウェルプレート) で蒔いて、37、5%CO₂ で 8～12 時間インキュベートした。

【0250】

3) LDC 複合体または対照の貯蔵溶液を PBS 溶液で調製した。100 μ L / ウェルの LDC 複合体または対照の連続希釈液をプレート内の細胞に加えて、37、5%CO₂ で 15～30 分間インキュベートした。次いで、ウェルの培地を吸引して取り除き、複合体を含まない新しい培地 (150 μ L / ウェル) で細胞を 37、5%CO₂ で 2～3 日間インキュベートした。

【0251】

4) CellTiter 96 (登録商標) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega 社) を各ウェルに加えて、死んだ細胞の量を測定し、プレートをインキュベーター内で 37、5%CO₂ で 1 時間インキュベートした。

【0252】

5) プレートをマイクロプレートリーダーにて 490 nm で読み取り、LDC 複合体で処理した細胞および処理しなかった細胞の生存数を比較した。50%細胞死 (IC₅₀ 値) に必要な LDC 薬物濃度を決定した。

【0253】

結果及び分析：

【0254】

LDC 1013 は、ヒト鼻咽頭癌細胞株 KB、ヒト肺癌細胞 H460 の細胞株を殺すのに有効であり、またメラノーマ細胞株 A375 の成長を阻害するのに有効である。LDC 1013 の IC₅₀ 値は、LDC 1 及び LDC 10A 対照よりも低かった (強かった) (表 9 を参照のこと)。しかしながら、LDC 1013 の細胞毒性は、対照細胞株メラノーマ細胞株 A375 に対しては有意に低い (IC₅₀ の読み取りが高い)。

【0255】

LDC 1013 は、LHRH 受容体及び TRPV6 受容体の両方に結合することができるニリガンド-薬物複合体である。受容体陽性細胞株の場合、表 9 から分かるように、LDC 1013 の細胞毒性は、単一リガンド-薬物複合体 LDC 1 または LDC 10A に比べて 2～15 倍強かった (IC₅₀ 値は 2～15 倍低かった) A375 の場合、LDC 1013 は H460 及び KB のそれぞれと比べて毒性が約 10～100 倍低く、優れた特異性を示した。従って、ニリガンド-薬物複合体 LDC 1013 は相乗効果を示し、薬物の有効性に寄与している。

【表 9】

表 9：複合体 LDC 1013 と対照の細胞毒性試験の結果 (IC₅₀ 値)

(単位：モル / l、M)

	MMAE	FA-MMAE	LDC10A	LDC1013
KB	2×10^{-8}	4×10^{-6}	$5.8 \times 10^{-6} \text{M}$	1.3×10^{-7}
H460	3.7×10^{-8}	9.4×10^{-6}	$1.39 \times 10^{-5} \text{M}$	2.2×10^{-6}
A375	8.5×10^{-8}	3.7×10^{-5}	$3.94 \times 10^{-5} \text{M}$	1.19×10^{-5}

【0256】

8. 複合体 LDC 10BR の細胞毒性試験

【0257】

対照試料：MMAE及びLDC10B

【0258】

培地：RPMI1640培地、葉酸を含まない

【0259】

実験方法：

【0260】

1) ヒト鼻咽頭癌細胞株KB、メラノーマ細胞株A375、及びヒト肺癌細胞H460を、10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地で37℃、5%CO₂でインキュベートし、細胞を2～3日ごとに継代培養した。

【0261】

2) ヒト鼻咽頭癌細胞株KB、メラノーマ細胞株A375、及びヒト肺癌細胞H460を1ウェルあたり1×10³細胞(96ウェルプレート)で蒔いて、37℃、5%CO₂で8～12時間インキュベートした。

【0262】

3) LDC複合体または対照の貯蔵溶液をPBS溶液で調製した。100μL/ウェルのLDC複合体または対照の連続希釈液をプレート内の細胞に加えて、37℃、5%CO₂で15～30分間インキュベートした。次いで、ウェルの培地を吸引して取り除き、複合体を含まない新しい培地(150μL/ウェル)で細胞を37℃、5%CO₂で2～3日間インキュベートした。

【0263】

4) CellTiter 96(登録商標)Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega社)を各ウェルに加えて、死んだ細胞の量を測定し、プレートをインキュベーター内で37℃、5%CO₂で1時間インキュベートした。

【0264】

5) プレートをマイクロプレートリーダーにて490nmで読み取り、LDC複合体で処理した細胞および処理しなかった細胞の生存数を比較した。50%細胞死(IC₅₀値)に必要なLDC薬物濃度を決定した。

【0265】

結果及び分析：

【0266】

LDC10BRは、ヒト鼻咽頭癌細胞株KB、ヒト肺癌細胞H460の細胞株を殺すのに有効であり、メラノーマ細胞株A375の成長を阻害するのに有効である。LDC10BRのIC₅₀値は、ニリガンド複合体LDC10Bと同等であった(表10を参照のこと)。

【0267】

LDC10BRは、RGD(インテグリン)受容体、葉酸塩受容体、及びTRPV6受容体に結合することができる三リガンド-薬物複合体である。受容体陽性細胞株の場合、表10から分かるように、LDC10BRの細胞毒性はニリガンド複合体LDC10Bと同等であった。従って、三リガンド-薬物複合体LDC10BRは、少なくともニリガンドLDC10Bと同じくらい有効である。さらに、三リガンドLDCは、上記の3種の受容体すべてを発現させている癌細胞に対して優れた細胞毒性及び選択性を有する可能性があり、3種のリガンドが相乗効果を示し、薬物の有効性に寄与している。

10

20

30

40

【表 10】

表 10：複合体LDC10BRとLDC10Bの細胞毒性試験の結果（ IC_{50} 値）(単位：モル／ $1、M$)

	MMAE	LDC10B	LDC10BR
KB	2×10^{-8}	2.2×10^{-6}	6.6×10^{-6}
H460	3.7×10^{-8}	6.8×10^{-6}	6.4×10^{-6}
A375	8.5×10^{-8}	5.13×10^{-5}	3.81×10^{-5}

10

【0268】

実施例ⅡⅡ：動物モデルでの複合体の有効性研究

【0269】

目的：癌治療のためのマウスモデルにおける複合体の抗腫瘍有効性を調べること

【0270】

1. 複合体LDC10B及びLDC10Hの異種移植腫瘍に対する阻害アッセイ

【0271】

治療に用いられた複合体：LDC10B、LDC10H

【0272】

動物：6～8週齢のメスのヌードマウス

20

【0273】

実験方法：

【0274】

1) ヒト大細胞肺癌細胞H460、ヒト肺癌細胞A549、卵巣癌細胞SKOV3、及び乳癌細胞株HCC1954を、10%ウシ胎児血清を含むIMDM培地で37℃、5%CO₂でインキュベートして、細胞を2～3日ごとに継代培養した。

【0275】

2) 腫瘍の発生：7×10⁶個の腫瘍細胞をヌードマウスの背中に皮下注射した。腫瘍寸法が100～200mm³程度になった後、マウスを治療のためにグループ分けした。

【0276】

3) 治療：3マウス/群をLDC10B、LDC10H、対照のMMAE及びPBSで治療した。5mg/kg及び10mg/kgの投与量で、5日ごとに3回注射した。

30

【0277】

4) 動物の物理的性能、体重、及び腫瘍寸法を監視した。実験中に動物の死亡数を記録した。

【0278】

結果及び分析：

【0279】

LDC10B及びLDC10Hは、ヒト大細胞肺癌細胞H460、卵巣癌細胞SKOV3、及び乳癌細胞株HCC1954の腫瘍の成長を阻害することができ、大部分の腫瘍は、5mg/kg及び10mg/kgの投与量で3回の注射を行った後に消失した。表11及び表12に詳細な結果を示す。

40

【表 1 1】

表 1 1 : 複合体LDC10Bの異種移植腫瘍に対する阻害有効性

時間	移植したH460腫瘍				移植したHCC1954腫瘍		移植したSKOV3腫瘍	
	5mg/kg		10mg/kg		10mg/kg		10mg/kg	
	マウスの体重(g)	腫瘍寸法(mm ³)	マウスの体重(g)	腫瘍寸法(mm ³)	マウスの体重(g)	腫瘍寸法(mm ³)	マウスの体重(g)	腫瘍寸法(mm ³)
注射前	23.13	89.25	22.51	97.38	21.85	225.32	22.96	178.68
注射1の5日後	22.53	78.63	22.53	45.74	22.2	108.73	22.44	163.05
注射2の5日後	22.26	49.11	23.37	6.32	22.55	0	23.23	120.51
注射3の5日後	21.65	52.5	23	0	22.38	0	23.53	68.31

10

【表 1 2】

表 1 2 : 複合体LDC10Hの異種移植腫瘍に対する阻害有効性

LDC10H	移植したH460腫瘍				移植したHCC1954腫瘍	
	5mg/kg		10mg/kg		10mg/kg	
	マウスの体重(g)	腫瘍寸法(mm ³)	マウスの体重(g)	腫瘍寸法(mm ³)	マウスの体重(g)	腫瘍寸法(mm ³)
注射前	23.29	136.49	23.37	126	22.05	88.6
注射1の5日後	24.26	71.51	24.39	108.15	23.32	16.77
注射2の5日後	23.14	65.73	22.12	37.5	22.87	0
注射3の5日後	23.22	11.64	23.61	2.34	22.51	0

20

【0280】

2. 複合体LDC11A、LDC11Bの異種移植腫瘍に対する阻害アッセイ

【0281】

治療に用いられた複合体：LDC11A及びLDC11B

30

【0282】

動物：6～8週齢のメスのヌードマウス

【0283】

実験方法：

【0284】

1) ヒト大細胞肺癌細胞H460、卵巣癌細胞SKOV3、乳癌細胞株HCC1954、及びヒト乳癌細胞SK-BR-3を、10%ウシ胎児血清を含むIMDM培地で37℃、5%CO₂でインキュベートし、細胞を2～3日ごとに継代培養した。

【0285】

2) 腫瘍の発生：7×10⁶個の腫瘍細胞をヌードマウスの背中に皮下注射した。腫瘍寸法が100～200mm³程度になった後、マウスを治療のためにグループ分けした。

40

【0286】

3) 治療：3マウス/群をLDC11A、LDC11B、対照のMMAE及びPBSで治療した。5mg/kg及び10mg/kgの投与量で、5日ごとに3回注射した。

【0287】

4) 動物の物理的性能、体重、及び腫瘍寸法を監視した。実験中に動物の死亡数を記録した。

【0288】

結果及び分析：

50

【 0 2 8 9 】

LDC11Bは、ヒト大細胞肺癌細胞H460、卵巣癌細胞SKOV3、及び乳癌細胞株HCC1954の腫瘍の成長を阻害することができ、10mg/kgの投与量で続けて3回注射した後にほとんどの腫瘍は消失した。LDC11Aに関しては、その強い毒性のために1回目の注射の後で動物は死亡した。表13及び表14に詳細な結果を示す。

【表13】

表13：複合体LDC11Bの異種移植腫瘍に対する阻害有効性

時間	移植したH460腫瘍		移植したSKOV3腫瘍		移植したHCC1954腫瘍	
	10mg/kg		10mg/kg		10mg/kg	
	マウスの体重 (g)	腫瘍寸法 (mm ³)	マウスの体重 (g)	腫瘍寸法 (mm ³)	マウスの体重 (g)	腫瘍寸法 (mm ³)
注射前	21.85	225.32	22.11	169.22	22.76	218.76
注射1の5日後	22.2	108.73	24.28	137.66	22.56	87.51
注射2の5日後	22.55	0	23.6	76.13	23.15	0
注射3の5日後	22.38	0	24.92	27.84	23.48	0

10

【表14】

表14：複合体LDC11Aの異種移植腫瘍に対する阻害有効性

LDC11A	移植したH460腫瘍	
	10mg/kg	
	マウスの体重 (g)	腫瘍寸法 (mm ³)
注射前	24.46	294
注射1の3日後	18.25	300
注射1の5日後	死亡	死亡

20

30

【 0 2 9 0 】

3. 複合体LDC13Bの異種移植腫瘍に対する阻害アッセイ

【 0 2 9 1 】

治療に用いられた複合体：LDC13B

【 0 2 9 2 】

動物：6～8週齢のメスのヌードマウス

【 0 2 9 3 】

実験方法：

【 0 2 9 4 】

1) ヒト大細胞肺癌細胞H460を、10%ウシ胎児血清を含むIMDM培地で37℃、5%CO₂でインキュベートし、細胞を2～3日ごとに継代培養した。

【 0 2 9 5 】

2) 腫瘍の発生：7×10⁶個の腫瘍細胞をヌードマウスの背中に皮下注射した。腫瘍寸法が200mm³程度になった後、マウスを治療のためにグループ分けした。

【 0 2 9 6 】

3) 治療：3マウス/群をLDC13B、対照のMMAE及びPBSで治療した。2.5mg/kg及び5mg/kgの投与量で3日ごとに4回注射した。

40

50

【 0 2 9 7 】

4) 動物の物理的性能、体重、及び腫瘍寸法を監視した。実験中に動物の死亡数を記録した。

【 0 2 9 8 】

結果及び分析：

【 0 2 9 9 】

LDC13Bは、ヒト大細胞肺癌細胞H460の腫瘍の成長を阻害することができる。ほとんどの腫瘍は2.5mg/kgで急速に縮小し、5mg/kgの投与量で4回の注射を行った後では完全に消滅した。表15に詳細な結果を示す。

【 表 1 5 】

表15：複合体LDC13Bの異種移植腫瘍に対する阻害有効性

時間	移植したH460腫瘍			
	2.5mg/kg		5 mg/kg	
	マウスの体重 (g)	腫瘍寸法 (mm ³)	マウスの体重 (g)	腫瘍寸法 (mm ³)
注射前	22.7	294	20.95	196
注射1の3日後	22.73	384	18.36	144
注射2の3日後	22.65	384	19.65	40
注射3の3日後	22.47	144	18.21	18
注射4の3日後	21.76	144	18.22	13.5

【 0 3 0 0 】

4. 複合体LDC1013の異種移植腫瘍に対する阻害アッセイ

【 0 3 0 1 】

治療に用いられた複合体：LDC1013

【 0 3 0 2 】

動物：6～8週齢のメスのヌードマウス

【 0 3 0 3 】

実験方法：

【 0 3 0 4 】

1) ヒト乳癌細胞HCC1954を、10%ウシ胎児血清を含むIMDM培地で37℃、5%CO₂でインキュベートし、細胞を2～3日ごとに継代培養した。

【 0 3 0 5 】

2) 腫瘍の発生：7×10⁶個の腫瘍細胞をヌードマウスの背中に皮下注射した。腫瘍寸法が180～320mm³程度になった後、マウスを治療のためにグループ分けした。

【 0 3 0 6 】

3) 治療：3マウス/群をLDC1013、対照のMMAE及びPBSで治療した。2.5mg/kg及び5mg/kgの投与量で3日ごとに4回注射した。

【 0 3 0 7 】

4) 動物の物理的性能、体重、及び腫瘍寸法を監視した。実験中に動物の死亡数を記録した。

【 0 3 0 8 】

結果及び分析：

【 0 3 0 9 】

LDC1013は、2.5mg/kgの投与量を7回、5mg/kgの投与量を7回、それぞれ3日ごとに注射した後、HCC1954異種移植腫瘍を完全に取り除くことができる。表16に詳細な結果を示す。

【表 16】

表 16：複合体LDC1013の異種移植腫瘍に対する阻害有効性

時間	移植したHCC1954腫瘍			
	2.5mg/kg		5 mg/kg	
	マウスの体重 (g)	腫瘍寸法 (mm ³)	マウスの体重 (g)	腫瘍寸法 (mm ³)
注射前	24.14	180	21.92	320
注射1の3日後	24.46	198	20.7	405
注射2の3日後	24.54	198	20.43	405
注射3の3日後	23.94	180	21.31	288
注射4の3日後	24.3	113	21.15	88
注射5の4日後	24.98	64	21.21	40
注射6の5日後	24.73	22	20.49	0
注射7の6日後	24.43	0	24.49	—

10

【0310】

5．複合体LDC10BXの異種移植腫瘍に対する阻害アッセイ

【0311】

20

治療に用いられた複合体：LDC10BX

【0312】

動物：6～8週齢のメスのヌードマウス

【0313】

実験方法：

【0314】

1) ヒト肺癌細胞H460を、10%ウシ胎児血清を含むIMDM培地で37℃、5%CO₂でインキュベートし、細胞を2～3日ごとに継代培養した。

【0315】

2) 腫瘍の発生：7×10⁶個の腫瘍細胞をヌードマウスの背中に皮下注射した。腫瘍寸法が180～320mm³程度になったら、マウスを治療のためにグループ分けした。

30

【0316】

3) 治療：3マウス/群をLDC10BXと対照LDC13Aで治療した。10mg/kgの投与量を3日ごとに3回注射した。

【0317】

4) 動物の物理的性能、体重、及び腫瘍寸法を監視した。実験中に動物の死亡数を記録した。

【0318】

結果及び分析：

【0319】

40

LDC10BXは、10mg/kgの投与量を3回、3日ごとに注射した後でH460異種移植腫瘍を取り除いた。

【0320】

6．異種移植腫瘍モデルでの複合体濃度の検出

【0321】

試料：LDC10B、LDC10H

【0322】

動物：6～8週齢のメスのヌードマウス

【0323】

実験方法：

50

【 0 3 2 4 】

1) ヒト卵巣癌細胞 S K O V 3 及び乳癌細胞株 H C C 1 9 5 4 を、1 0 % ウシ胎児血清を含む I M D M 培地で 3 7 、5 % C O₂ でインキュベートし、細胞を 2 ~ 3 日ごとに継代培養した。

【 0 3 2 5 】

2) 腫瘍の発生：7 × 1 0⁶ 個の腫瘍細胞をヌードマウスの背中に皮下注射した。腫瘍寸法が 1 0 0 ~ 2 0 0 m m³ 程度になった後、マウスを治療のためにグループ分けした。

【 0 3 2 6 】

3) 治療：3 マウス / 群、1 0 m g / k g、腹膜注射

【 0 3 2 7 】

4) 血液採取：治療前に血液を採取した時間を 0 とし、血液を治療の 2 0 分後、2 時間後、4 時間後、及び 2 4 時間後に採取した。血液を遠心分離して、血清を採取し、冷凍保存した。

【 0 3 2 8 】

5) 検出：血清中の M M A E、L D C 1 0 B、L D C 1 0 H と、L D C 1 0 B 及び L D C 1 0 H の M M A E 代謝物質の合計量をマウス抗 MMAE ELISA キットにより検出した。

【 0 3 2 9 】

結果及び分析：

【 0 3 3 0 】

治療の 2 4 時間後の血清中で微量の L D C 1 0 B が検出されたが、L D C 1 0 H 及びその M M A E 代謝物質は検出されなかった。このことは、遊離薬物は生体内で速く排泄 / 代謝されたことを示す。表 1 7 に詳細な結果を示す。

【 表 1 7 】

表 1 7：異種移植腫瘍を有する動物での複合体濃度

濃度 (ug/ml)	LDC10B	LDC10H
治療前	0	0
2 0 分後	10.8	0.77
2 時間後	5.035	0.58
4 時間後	0.53	0.196
2 4 時間後	0.1179	0

【 0 3 3 1 】

上記を考慮し、生体外及び生体内での研究から以下のことが判明した。

【 0 3 3 2 】

(a) 多リガンド - 薬物複合体 (m L D C) は、標的細胞に結合する、かつ / またはエンドサイトーシスにより標的細胞内に入って、細胞毒性ペイロードの効果により細胞を殺す。2 0 種を超える異なる癌細胞株を試験して、その結果、この結論が確認された。

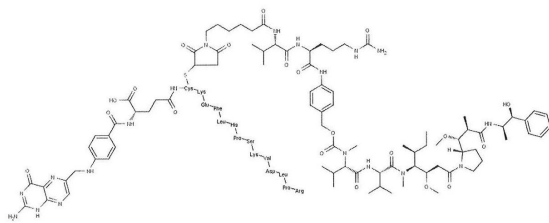
【 0 3 3 3 】

(b) 生きている動物の生体内撮像から、蛍光標識 L D C 1 0 B - C y 5 は、その場の腫瘍に集中し、2 4 時間以上継続することが示された (図 4 を参照のこと)。

【 0 3 3 4 】

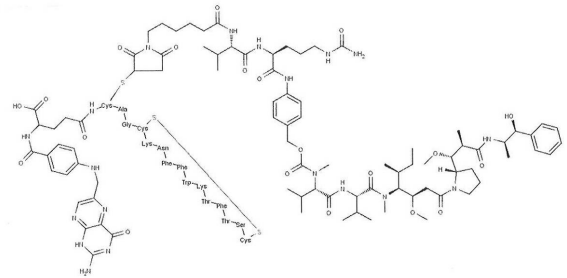
(c) m L D C は、マウスモデルの異種移植腫瘍を完全に取り除くことができる。大部分のリード化合物は、体重の低下や他の明らかな毒性を引き起こさず、投与量及び受容体発現に依存した形で異種移植腫瘍を制御または除去する優れた有効性を示した。腫瘍が完全に除去されると、マウスはその後の生涯に渡って (6 ヶ月超) 腫瘍が見られなかった。

【図 1 - 1】

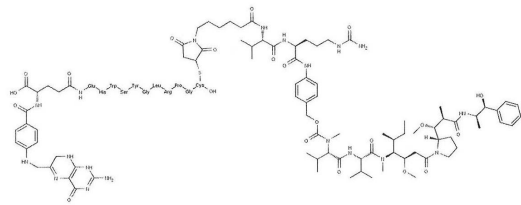


LDC10B

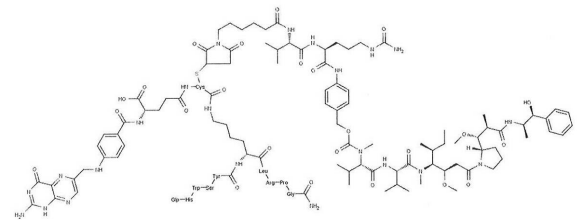
【図 1 - 2】



LDC12B

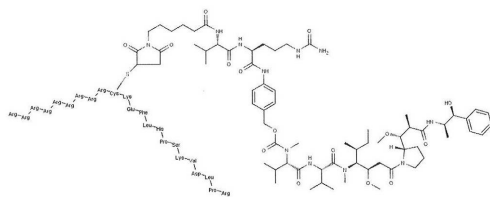


LDC11B

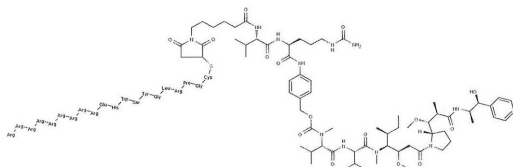


LDC13B

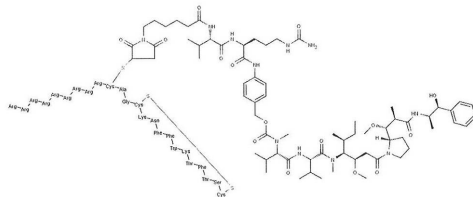
【図 1 - 3】



LDC10H

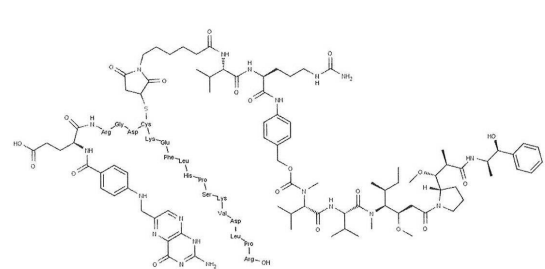


LDC11H

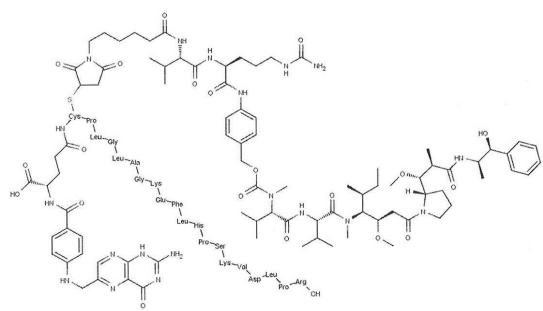


LDC12H

【図 1 - 4】

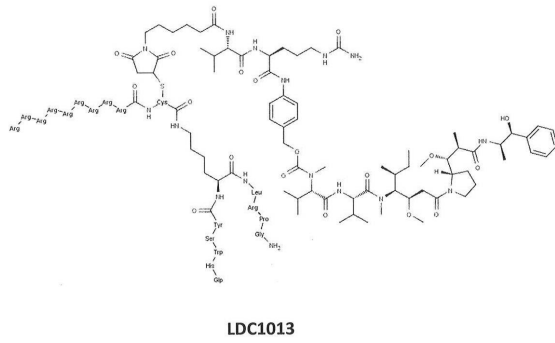


LDC10BR

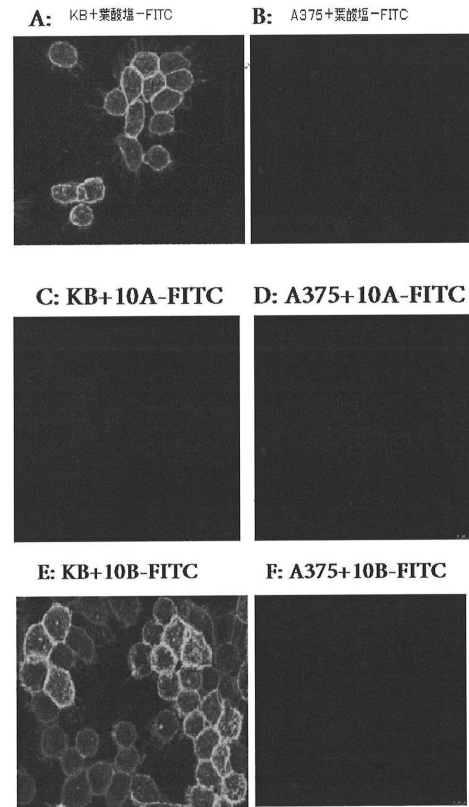


LDC10BX

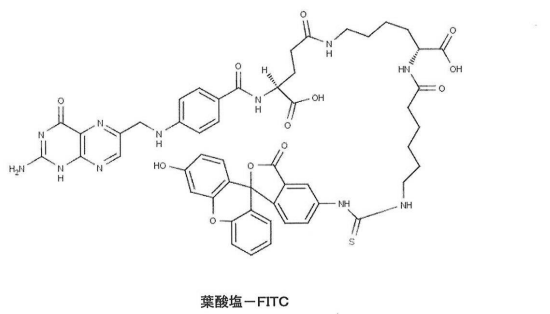
【図 1 - 5】



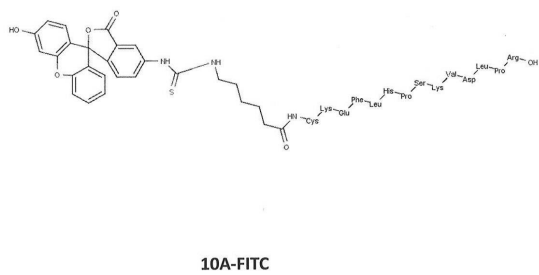
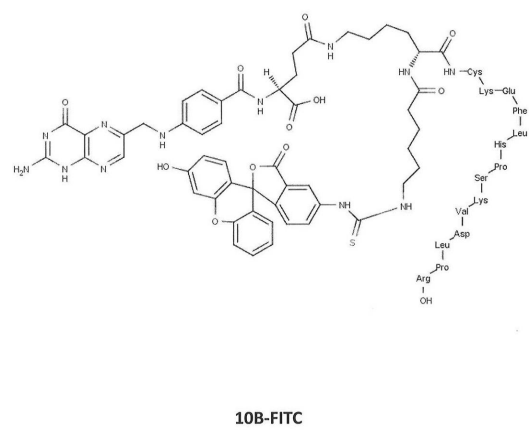
【図 2】



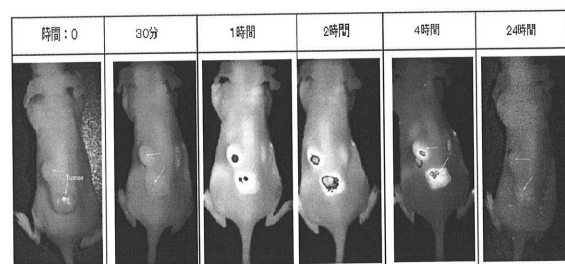
【図 3 - 1】



【図 3 - 2】



【図 4】



【配列表】

0006772199000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/18	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	19/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/06	
A 6 1 K	31/537	(2006.01)	A 6 1 K	31/537	
A 6 1 K	38/07	(2006.01)	A 6 1 K	38/07	
A 6 1 K	31/407	(2006.01)	A 6 1 K	31/407	
C 0 7 K	5/04	(2006.01)	C 0 7 K	5/04	
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C 0 7 K	7/06	

(74)代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(72)発明者 ファン, バオファ ロバート

中華人民共和国 2 1 5 2 0 0 ジャンスー, スーチョウ, ウージャン ディストリクト, パンヤ
ン ロード 8, チャンファ サイエнтиフィック ビルディング, サード フロアー, ゾーン
- ディー

(72)発明者 ダイ, ジャン

中華人民共和国 2 1 5 2 0 0 ジャンスー, スーチョウ, ウージャン ディストリクト, パンヤ
ン ロード 8, チャンファ サイエнтиフィック ビルディング, サード フロアー, ゾーン
- ディー

(72)発明者 ワン, ツォンボ

中華人民共和国 2 1 5 2 0 0 ジャンスー, スーチョウ, ウージャン ディストリクト, パンヤ
ン ロード 8, チャンファ サイエнтиフィック ビルディング, サード フロアー, ゾーン
- ディー

(72)発明者 シェ, シュエユアン

中華人民共和国 2 1 5 2 0 0 ジャンスー, スーチョウ, ウージャン ディストリクト, パンヤ
ン ロード 8, チャンファ サイエнтиフィック ビルディング, サード フロアー, ゾーン
- ディー

(72)発明者 リウ, シャオドン

中華人民共和国 2 1 5 2 0 0 ジャンスー, スーチョウ, ウージャン ディストリクト, パンヤ
ン ロード 8, チャンファ サイエнтиフィック ビルディング, サード フロアー, ゾーン

- ディー

(72)発明者 フー, シンリー

中華人民共和国 215200 ジャンスー, スーチョウ, ウージャン ディストリクト, パンヤ
ン ロード 8, チャンファ サイエントフィック ビルディング, サード フロアー, ゾーン
- ディー

審査官 岩下 直人

(56)参考文献 特表2005-532252(JP, A)

国際公開第2015/106599(WO, A1)

特表2010-503708(JP, A)

特表2015-519339(JP, A)

特表2012-509066(JP, A)

Journal of Controlled Release, 2010, Vol.146, p.388-399

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 47/65
A61K 31/407
A61K 31/537
A61K 31/7088
A61K 38/07
A61K 38/16
A61K 47/66
A61K 48/00
A61P 3/04
A61P 3/06
A61P 3/10
A61P 9/00
A61P 9/12
A61P 17/00
A61P 17/02
A61P 19/02
A61P 19/06
A61P 25/00
A61P 25/14
A61P 25/16
A61P 25/18
A61P 25/28
A61P 29/00
A61P 35/00
A61P 35/02
A61P 37/02
A61P 37/06
A61P 43/00
C07K 5/04
C07K 7/06
CAplus/REGISTRY(STN)