

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7359449号  
(P7359449)

(45)発行日 令和5年10月11日(2023.10.11)

(24)登録日 令和5年10月2日(2023.10.2)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 5/02 (2006.01)  
A 6 1 P 35/00 (2006.01)  
A 6 1 P 31/12 (2006.01)  
A 6 1 P 37/02 (2006.01)  
A 6 1 P 29/00 (2006.01)

C 0 7 K 5/02  
A 6 1 P 35/00  
A 6 1 P 31/12  
A 6 1 P 37/02  
A 6 1 P 29/00

Z N A

請求項の数 26 (全78頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-529313(P2020-529313)  
(86)(22)出願日 平成30年11月30日(2018.11.30)  
(65)公表番号 特表2021-505541(P2021-505541 A)  
(43)公表日 令和3年2月18日(2021.2.18)  
(86)国際出願番号 PCT/US2018/063376  
(87)国際公開番号 WO2019/108974  
(87)国際公開日 令和1年6月6日(2019.6.6)  
審査請求日 令和3年11月30日(2021.11.30)  
(31)優先権主張番号 62/592,721  
(32)優先日 平成29年11月30日(2017.11.30)  
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)

(73)特許権者 519302556  
センチュリオン バイオファーマ コーポ  
レイション  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0  
4 9 , ロサンゼルス , サン ピセンテ  
ブルバード 1 1 7 2 6 , スイート  
6 5 0  
(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

最終頁に続く

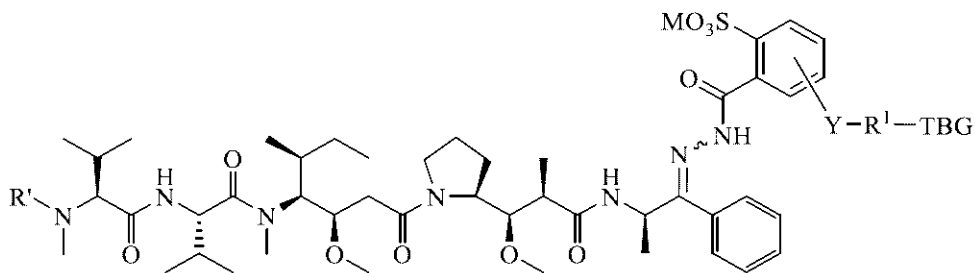
(54)【発明の名称】 オーリスタチンE誘導体のアルブミン結合プロドラッグ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

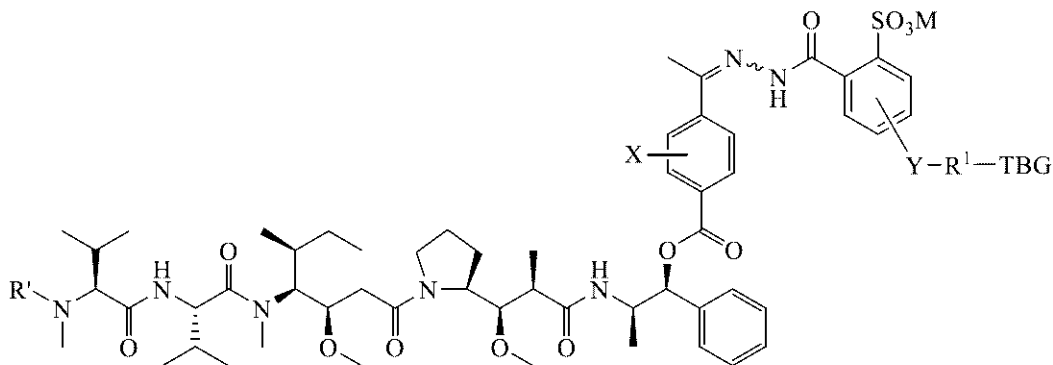
式IもしくはIIの構造を有する化合物、

## 【化 4 5】



式 I

10



式 II

20

またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体であって、  
式中、

R' は、Hまたは -CH<sub>3</sub>であり、

Mは、Hまたは薬学的に許容される対イオンであり、

Yは、不在であるか、または任意に置換されたC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル、-NH-C(O)-  
-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-O-、および-O-  
C(O)-から選択され、

30

R<sup>1</sup>は、不在であるか、または任意に置換されたC<sub>1</sub> - C<sub>18</sub>アルキルであり、前記C<sub>1</sub>  
- C<sub>18</sub>アルキルにおける任意に最大6個の炭素原子は、各々独立して、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>  
-で置換され、

Xは、Hであるか、またはハロゲン（例えば、-F、-Cl、-Br、もしくは-I）  
、-NO<sub>2</sub>、-NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>、-OR<sup>2</sup>、-NHCOR<sup>2</sup>、および-OCOR<sup>2</sup>から選択され、  
式中、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は、各々独立して、HおよびC<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>アルキルから選択され、

TBGは、任意に置換されたマレイミド基、任意に置換されたハロアセトアミド基、任  
意に置換されたハロアセテート基、任意に置換されたピリジルチオ基、任意に置換された  
イソチオシアネート基、任意に置換されたビニルカルボニル基、任意に置換されたアジリ  
ジン基、任意に置換されたジスルフィド基、および任意に置換されたアセチレン基から選  
択される、チオール結合基である、化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶  
媒和物、もしくは異性体。

40

## 【請求項 2】

R' が、-CH<sub>3</sub>である、請求項 1 に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、水  
和物、溶媒和物、もしくは異性体。

## 【請求項 3】

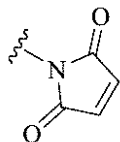
TBG が、任意に置換されたマレイミド基から選択される、請求項 1 または 2 に記載の  
化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体。

## 【請求項 4】

50

T B G が、下記式のマレイミド基である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体。

【化 4 6】



【請求項 5】

Y が、 $-NH-C(O)-$  である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体。

10

【請求項 6】

M が、 $H^+$  または  $Na^+$  である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体。

【請求項 7】

$R^1$  が、任意に置換された  $C_1 - C_5$  アルキルである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体。

【請求項 8】

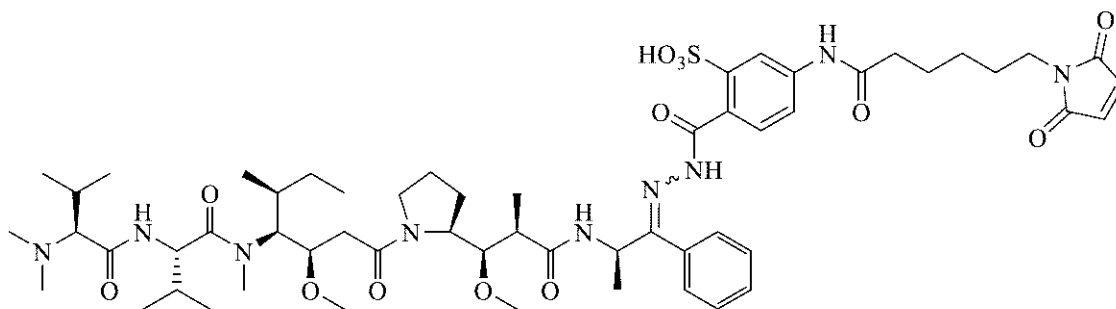
$R^1$  が、 $C_1 - C_5$  アルキルである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体。

20

【請求項 9】

式 I I I の構造を有する、請求項 1 に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体。

【化 4 7】



30

式 III

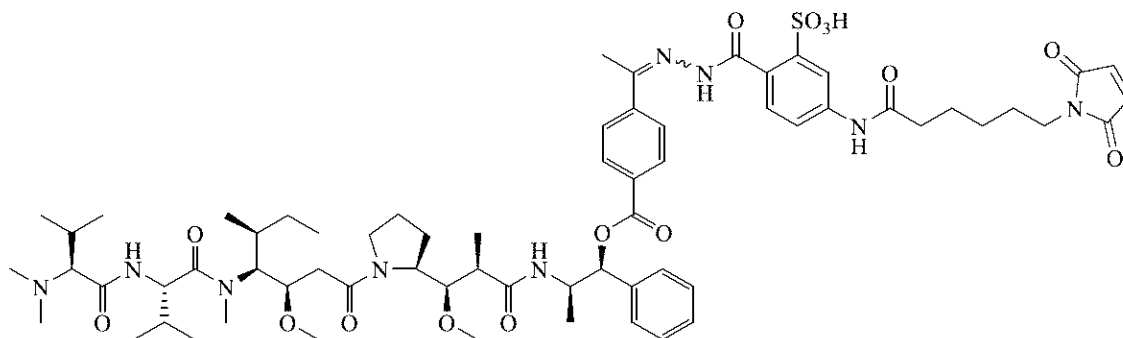
【請求項 10】

式 I V の構造を有する、請求項 1 に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体。

40

50

## 【化 4 8】



式IV

## 【請求項 1 1】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

## 【請求項 1 2】

前記薬学的に許容される担体が、可溶化剤、カプセル化剤、および溶解保護剤のうちの 1 つ以上から選択される、請求項 1 1 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 1 3】

前記薬学的に許容される担体が、ジメチル - シクロデキストリン、ヒドロキシエチル - シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル - シクロデキストリン、およびトリメチル - シクロデキストリンのうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 2 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 1 4】

前記薬学的組成物が、静脈内投与に好適である、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の薬学的組成物。

## 【請求項 1 5】

前記組成物が、患者に静脈内投与されるとき、血液循環において内因性アルブミンにインサイチュで選択的かつ急速に共有結合する、請求項 1 4 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 1 6】

前記組成物が、患者に静脈内投与されるとき、血液循環において内因性アルブミンのシステイン - 3 4 のチオール基にインサイチュで選択的かつ急速に共有結合する、請求項 1 5 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 1 7】

癌、ウイルス疾患、自己免疫疾患、急性または慢性炎症疾患、ならびに細菌、真菌、および他の微生物によって引き起こされる疾患から選択される疾患に罹患している患者の治療における使用のための、請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体を含む組成物、あるいは請求項 1 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の薬学的組成物。

## 【請求項 1 8】

前記疾患が、癌腫、肉腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、および黒色腫から選択される癌である、請求項 1 7 に記載の使用のための組成物または薬学的組成物。

## 【請求項 1 9】

前記癌が、腺癌、ブドウ膜黒色腫、急性白血病、聴神経腫、膨大部癌腫、肛門癌腫、星状細胞腫、基礎細胞腫、膵臓癌、結合組織腫瘍、膀胱癌、気管支癌腫、非小細胞気管支癌腫、乳癌、パーキットリンパ腫、子宮体癌腫、CUP 症候群、結腸癌、小腸の癌、卵巣癌、子宮内膜癌腫、胆嚢癌、胆嚢癌腫、子宮癌、子宮頸癌、頸部、鼻および耳腫瘍、血液学的新生物、有毛細胞白血病、尿道癌、皮膚癌、神経膠腫、精巣癌、カポジ肉腫、咽頭癌、骨癌、結腸直腸癌腫、頭頸部腫瘍、結腸癌腫、頭蓋咽頭腫、肝臓癌、白血病、肺癌、非小

10

20

30

40

50

細胞肺癌、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、胃癌、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、腎臓癌、腎細胞癌腫、乏突起神経膠腫、食道癌腫、溶骨性癌腫および骨形成性癌腫、骨肉腫、卵巣癌腫、膵臓癌腫、陰茎癌、前立腺癌、舌癌、卵巣癌腫から選択される、請求項 17 に記載の使用のための組成物または薬学的組成物。

【請求項 20】

前記投与が、静脈内投与である、請求項 17 ~ 19 に記載の使用のための組成物または薬学的組成物。

【請求項 21】

化合物の細胞毒性を低減するための、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体を含む組成物、あるいは請求項 11 ~ 16 のいずれかに記載の薬学的組成物であって、ここで、細胞毒性の低減が、等用量の未修飾活性剤と比較される、組成物または薬学的組成物。

10

【請求項 22】

腫瘍における化合物の代謝産物の濃度を増加させるための、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体を含む組成物、あるいは請求項 11 ~ 16 のいずれかに記載の薬学的組成物であって、ここで、前記増加が、等用量の未修飾活性剤と比較される、組成物または薬学的組成物。

【請求項 23】

医薬品としての使用のための、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体を含む薬学的組成物。

20

【請求項 24】

癌、ウイルス疾患、自己免疫疾患、急性または慢性炎症疾患、および細菌、真菌、または他の微生物によって引き起こされる疾患から選択される疾患または状態の治療のための医薬品の調製における、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体、あるいは請求項 11 ~ 16 に記載の組成物の使用。

【請求項 25】

前記疾患が、癌腫、肉腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、および黒色腫から選択される癌である、請求項 24 に記載の使用。

【請求項 26】

前記癌が、腺癌、ブドウ膜黒色腫、急性白血病、聴神経腫、膨大部癌腫、肛門癌腫、星状細胞腫、基礎細胞腫、膵臓癌、結合組織腫瘍、膀胱癌、気管支癌腫、非小細胞気管支癌腫、乳癌、パーキットリンパ腫、子宮体癌腫、CUP症候群、結腸癌、小腸の癌、卵巣癌、子宮内膜癌腫、胆嚢癌、胆嚢癌腫、子宮癌、子宮頸癌、頸部、鼻および耳腫瘍、血液学的新生物、有毛細胞白血病、尿道癌、皮膚癌、神経膠腫、精巣癌、カボジ肉腫、咽頭癌、骨癌、結腸直腸癌腫、頭頸部腫瘍、結腸癌腫、頭蓋咽頭腫、肝臓癌、白血病、肺癌、非小細胞肺癌、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、胃癌、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、腎臓癌、腎細胞癌腫、乏突起神経膠腫、食道癌腫、溶骨性癌腫および骨形成性癌腫、骨肉腫、卵巣癌腫、膵臓癌腫、陰茎癌、前立腺癌、舌癌、卵巣癌腫、ならびにリンパ腫癌から選択される、請求項 24 に記載の使用。

30

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2017年11月30日に出願された米国仮特許出願第62/592,721号の優先権を主張し、その開示は、その全体が本明細書に参照によって組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

低分子量抗癌薬はしばしば、それらの臨床有効性を限定する狭い治療濃度域を有する。これらの低分子量化合物は、拡散によって体組織に浸透する高い傾向を示し、均一な生体内分布をもたらす。したがって、少量のみの薬物が作用部位に到達し、健康な体組織にわ

50

たる分布によって、当該薬物は、問題のある副作用を生じさせる。

【0003】

これらの不利点は、高度に細胞毒性であり、非常に狭い治療濃度域を有する薬物にとって特に重要である。オーリスタチンは、チューブリン結合ペプチド系薬物であり、ドラスタチン10、ドラスタチン15、オーリスタチンPE、オーリスタチンE、またはオーリスタチンFなどの代表例は、高度細胞毒性効果を示す。臨床フェーズ1および2試験において、ドラスタチン10、ドラスタチン15、およびオーリスタチンPEは、許容されない全身毒性および抗腫瘍活性不足をもたらし、よって中止された(E. A. Perez et al., Invest. New Drugs, 23: 257 - 261 (2005); M. von Mehren et al., Sarcoma, 8: 107 - 111 (2004); R. S. Marks et al., Am. J. Clin. Oncol., 26: 336 - 337 (2003))。

10

【0004】

腫瘍学における薬物送達は、高度細胞毒性薬剤の狭い治療指数を増加させる潜在性を有するアプローチである。ほとんどの薬物送達システムにおいて、細胞毒性薬物は、結合した薬物が細胞標的部位で放出されることを可能にする所定の限界点を組み込むスパーサーを通して担体に結合している(F. Kratz et al., ChemMedChem, 3: 20 - 53 (2008))。

【0005】

アルブミンまたはその薬物コンジュゲートは、最大19日の全身循環における著しく長い半減期を示す。特に魅力的なアプローチは、投与後に高分子担体として機能する循環血清アルブミンに共有結合する高度細胞毒性薬剤のプロドラッグを開発することである。1.) インタクトなリンパ液排出システムと組み合わせられた悪性、感染または炎症組織の血管壁を通じた高分子の上昇した浸透性、ならびに2.) 腫瘍内皮上および腫瘍間質内のアルブミン結合タンパク質の発現のために、アルブミン薬物コンジュゲートは、治療有効物質を、高度細胞毒性薬剤が放出される標的部位(すなわち、腫瘍)に輸送する(US 7, 387, 771; F. Kratz, J. Control. Release, 132: 171 - 183 (2008); F. Kratz, U. Beyer, Drug Delivery, 5: 281 - 299 (1998))。

20

【0006】

しかしながら、高度細胞毒性薬剤での薬物送達システムを設計するとき、細胞毒性薬物の制御放出を可能にしながら薬物担体の標的化特性を保存することと、血液循環または全身におけるその早期放出を回避することとの間で重要なバランスがとられるべきである。酸感受性薬物送達システムは、血流において十分な安定性を有するべきだが、pH依存的に腫瘍部位での薬物の効果的な放出を可能にする(F. Kratz et al., ChemMedChem, 3: 20 - 53 (2008))。

30

【0007】

水不溶性および非常に狭い治療濃度域のために投与することができない、低分子量ペプチド系オーリスタチンのクラスなどの、ピコモル範囲の腫瘍細胞に対するIC<sub>50</sub>値を有する高度細胞毒性薬物について、そのような高度に強力な薬物のより有効な制御された送達および放出を達成するために効率的な薬物送達および放出システムの必要性がある。したがって、本開示は、悪性疾患の治療において使用することができるオーリスタチンE誘導体のアルブミン結合プロドラッグのより効率的なおよび/またはより忍容性の薬学的組成物を提供する。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【文献】米国特許第7, 387, 771号明細書

【非特許文献】

【0009】

50

【文献】E. A. Perez et al., Invest. New Drugs, 23: 257 - 261 (2005)  
 M. von Mehren et al., Sarcoma, 8: 107 - 111 (2004)  
 R. S. Marks et al., Am. J. Clin. Oncol., 26: 336 - 337 (2003)  
 F. Kratz et al., ChemMedChem, 3: 20 - 53 (2008)  
 F. Kratz, U. Beyer, Drug Delivery, 5: 281 - 299 (1998)

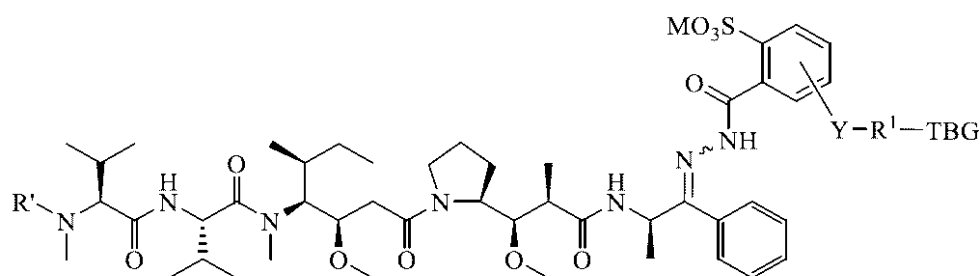
## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0010】

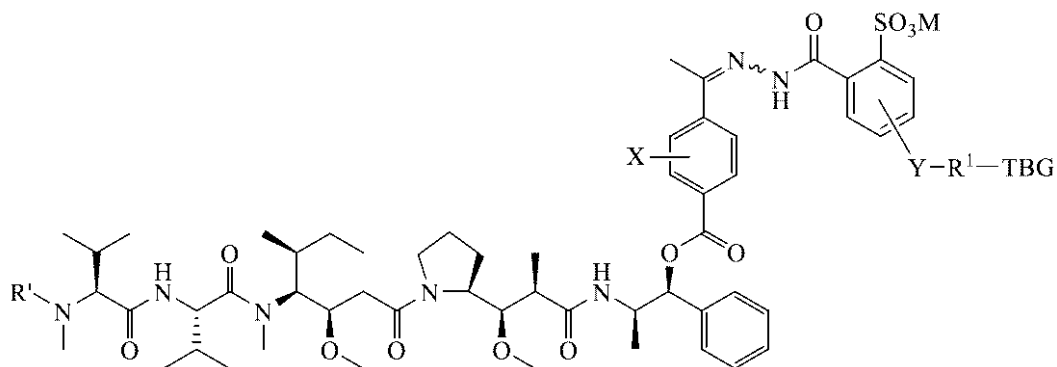
本開示は、式IもしくはIIの構造を有する化合物、

## 【化1】



式I

## 【化2】



式II

またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体を提供し、  
 式中、

R' は、Hまたは -CH<sub>3</sub>であり、

Mは、Hまたは薬学的に許容される対イオンであり、

Yは、不在であるか、または任意に置換されたC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル、-NH-C(O)-、  
 -C(O)-NH-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-O-、および-O-C(O)-から選択され、

R<sup>1</sup>は、不在であるか、または任意に置換されたC<sub>1</sub> - C<sub>18</sub>アルキルであり、当該C<sub>1</sub> - C<sub>18</sub>アルキルにおける任意に最大6個の炭素原子は、各々独立して、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-で置換され、

Xは、Hであるか、またはハロゲン(例えば、-F、-Cl、-Br、もしくは-I)、  
 -NO<sub>2</sub>、-NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>、-OR<sup>2</sup>、-NHCOR<sup>2</sup>、および-OCOR<sup>2</sup>から選択され

10

20

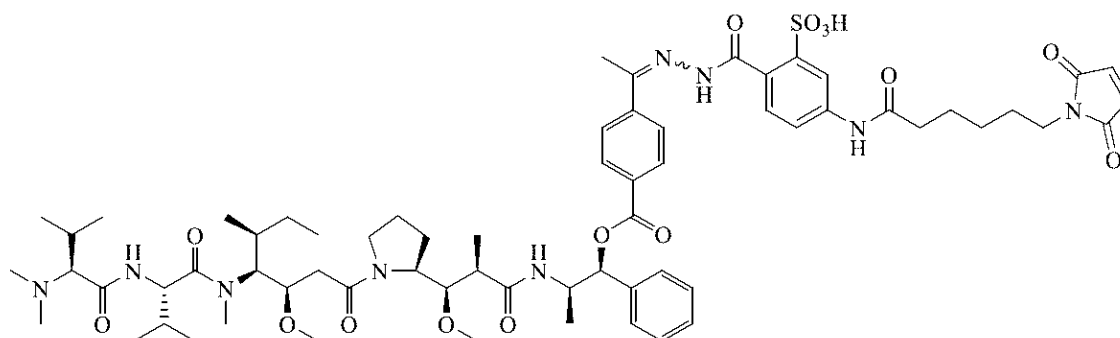
30

40

50



## 【化5】



式IV

10

## 【0019】

本開示はまた、本明細書に開示される化合物と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物を提供する。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される担体は、可溶化剤、カプセル化剤、および溶解保護剤のうちの一つ以上から選択される。他の実施形態では、薬学的に許容される担体は、ジメチル-β-シクロデキストリン、ヒドロキシエチル-β-シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、およびトリメチル-β-シクロデキストリンのうちの一つ以上を含む。

20

## 【0020】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、静脈内投与に好適である。いくつかの実施形態では、組成物は、患者に静脈内投与されるとき、血液循環において内因性アルブミンにインサイチュで選択的かつ急速に共有結合する。他の実施形態では、組成物は、患者に静脈内投与されるとき、血液循環において内因性アルブミンのシステイン-34のチオール基にインサイチュで選択的かつ急速に共有結合する。

## 【0021】

本開示はまた、癌、ウイルス疾患、自己免疫疾患、急性または慢性炎症疾患、ならびに細菌、真菌、および他の微生物によって引き起こされる疾患から選択される疾患に罹患している患者を治療するための方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の本明細書に記載される化合物または薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、疾患は、癌であり、癌腫、肉腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、および黒色腫から選択される。いくつかの実施形態では、投与は、静脈内投与である。

30

## 【0022】

本開示はまた、化合物の細胞毒性を低減する方法であって、本明細書に開示される化合物または薬学的組成物を、それを必要とする患者に投与することを含み、投与が、等用量の未修飾活性剤と比較されるとき、細胞毒性の低減をもたらす、方法を提供する。

## 【0023】

本開示は、腫瘍における化合物の代謝産物の濃度を増加させる方法であって、本明細書に開示される化合物または薬学的組成物を、それを必要とする患者に投与することを含み、増加が等用量の未修飾活性剤と比較される、方法をさらに提供する。

40

## 【0024】

本開示は、医薬品としての使用のための、本明細書に開示される化合物を提供する。

## 【0025】

本開示はまた、癌、ウイルス疾患、自己免疫疾患、急性または慢性炎症疾患、および細菌、真菌、または他の微生物によって引き起こされる疾患からなる群から選択される疾患または状態の治療における使用のための、本明細書に開示される化合物を提供する。

## 【0026】

本開示は、癌、ウイルス疾患、自己免疫疾患、急性または慢性炎症疾患、および細菌、真菌、または他の微生物によって引き起こされる疾患からなる群から選択される疾患また

50

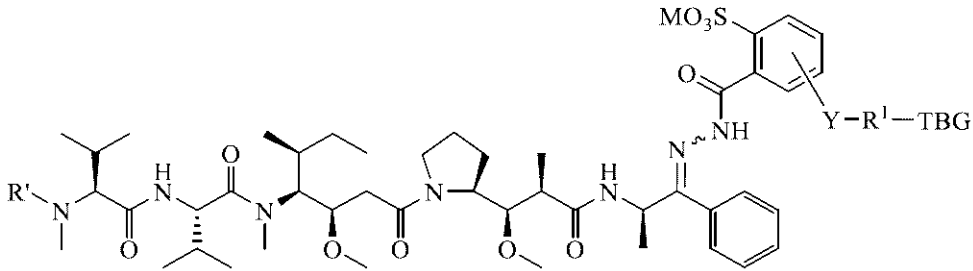
は状態の治療のための医薬品の調製における、本明細書に開示される化合物または組成物の使用をさらに提供する。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

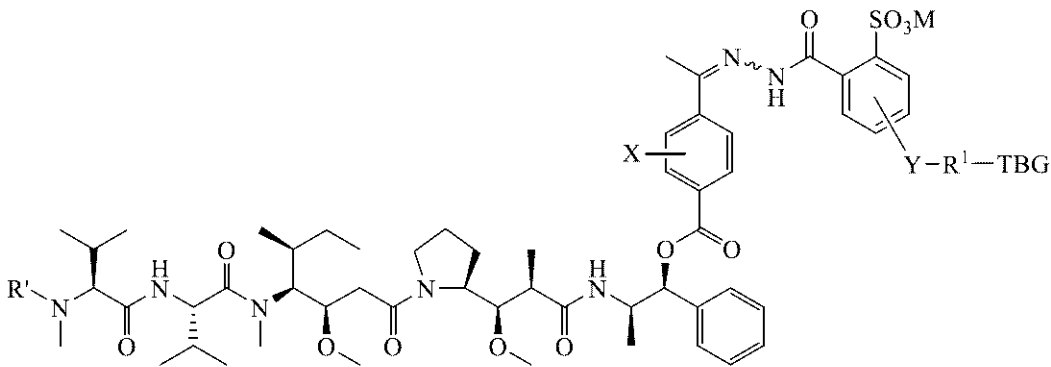
(項目1)

式IもしくはIIの構造を有する化合物、

【化45】



式I



式II

またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体であって、

式中、

R'は、Hまたは-CH<sub>3</sub>であり、

Mは、Hまたは薬学的に許容される対イオンであり、

Yは、不在であるか、または任意に置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、-NH-C(O)-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-O-、および-O-C(O)-から選択され、

R<sup>1</sup>は、不在であるか、または任意に置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>アルキルであり、前記C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>アルキルにおける任意に最大6個の炭素原子は、各々独立して、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-で置換され、

Xは、Hであるか、またはハロゲン(例えば、-F、-Cl、-Br、もしくは-I)、-NO<sub>2</sub>、-NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>、-OR<sup>2</sup>、-NHCO<sup>2</sup>R<sup>2</sup>、および-OCOR<sup>2</sup>から選択され、

式中、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は、各々独立して、HおよびC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルから選択され、

TBGは、任意に置換されたマレイミド基、任意に置換されたハロアセトアミド基、任意に置換されたハロアセテート基、任意に置換されたピリジルチオ基、任意に置換されたイソチオシアネート基、任意に置換されたビニルカルボニル基、任意に置換されたアジリジン基、任意に置換されたジスルフィド基、および任意に置換されたアセチレン基から選択される、チオール結合基である、化合物。

(項目2)

R'が、-CH<sub>3</sub>である、項目1に記載の化合物。

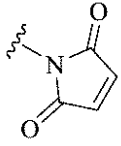
(項目3)

T B G が、任意に置換されたマレイミド基から選択される、項目 1 または 2 に記載の化合物。

(項目 4)

T B G が、下記式のマレイミド基である、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【化 4 6】



10

(項目 5)

Y が、- N H - C ( O ) - である、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 6)

M が、H<sup>+</sup> または N a<sup>+</sup> である、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 7)

R<sup>1</sup> が、任意に置換された C<sub>1</sub> - C<sub>5</sub> アルキルである、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 8)

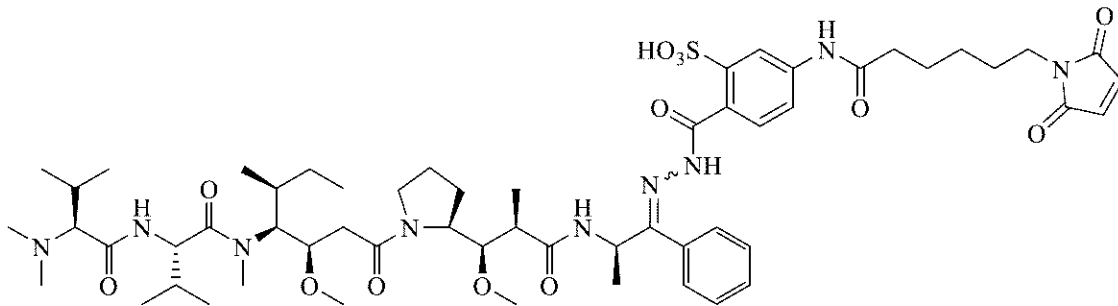
R<sup>1</sup> が、C<sub>1</sub> - C<sub>5</sub> アルキルである、項目 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 9)

式 I I I の構造を有する、項目 1 に記載の化合物。

20

【化 4 7】



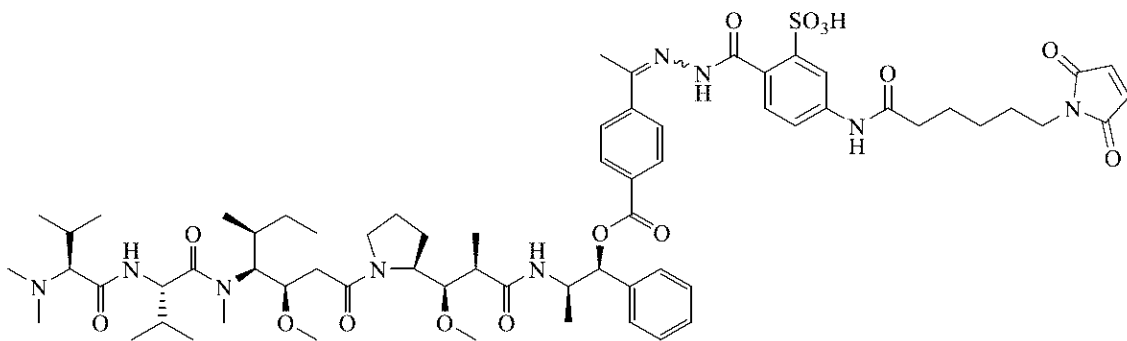
式III

30

(項目 1 0)

式 I V の構造を有する、項目 1 に記載の化合物。

【化 4 8】



式IV

40

(項目 1 1)

項目 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の化合物と、薬学的に許容される担体と、を含む、

50

薬学的組成物。

(項目12)

前記薬学的に許容される担体が、可溶化剤、カプセル化剤、および溶解保護剤のうちの1つ以上から選択される、項目11に記載の薬学的組成物。

(項目13)

前記薬学的に許容される担体が、ジメチル-β-シクロデキストリン、ヒドロキシエチル-β-シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、およびトリメチル-β-シクロデキストリンのうちの1つ以上を含む、項目12に記載の薬学的組成物。

(項目14)

前記薬学的組成物が、静脈内投与に好適である、項目11～13のいずれかに記載の薬学的組成物。

(項目15)

前記組成物が、患者に静脈内投与されるとき、血液循環において内因性アルブミンにインサイチュで選択的かつ急速に共有結合する、項目143に記載の薬学的組成物。

(項目16)

前記組成物が、患者に静脈内投与されるとき、血液循環において内因性アルブミンのシステイン-34のチオール基にインサイチュで選択的かつ急速に共有結合する、項目15に記載の薬学的組成物。

(項目17)

癌、ウイルス疾患、自己免疫疾患、急性または慢性炎症疾患、ならびに細菌、真菌、および他の微生物によって引き起こされる疾患から選択される疾患に罹患している患者を治療するための方法であって、それを必要とする前記患者に、治療有効量の、項目1～10のいずれかに記載の化合物または項目11～16のいずれかに記載の薬学的組成物を投与することを含む、方法。

(項目18)

前記疾患が、癌腫、肉腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、および黒色腫から選択される癌である、項目16に記載の方法。

(項目19)

前記投与が、静脈内投与である、項目17または18に記載の方法。

(項目20)

化合物の細胞毒性を低減する方法であって、項目1～10のいずれかに記載の化合物または項目11～16のいずれかに記載の薬学的組成物を、それを必要とする患者に投与することを含み、前記投与が、等用量の未修飾活性剤と比較されるとき、細胞毒性の低減をもたらす、方法。

(項目21)

腫瘍における化合物の代謝産物の濃度を増加させる方法であって、項目1～10のいずれかに記載の化合物または項目11～16のいずれかに記載の薬学的組成物を、それを必要とする患者に投与することを含み、前記増加が、等用量の未修飾活性剤と比較される、方法。

(項目22)

医薬品としての使用のための、項目1～10のいずれか一項に記載の化合物。

(項目23)

癌、ウイルス疾患、自己免疫疾患、急性または慢性炎症疾患、および細菌、真菌、または他の微生物によって引き起こされる疾患からなる群から選択される疾患または状態の治療における使用のための、項目1～10のいずれか一項に記載の化合物。

(項目24)

癌、ウイルス疾患、自己免疫疾患、急性または慢性炎症疾患、および細菌、真菌、または他の微生物によって引き起こされる疾患から選択される疾患または状態の治療のための医薬品の調製における、項目1～10のいずれか一項に記載の化合物または項目11～1

10

20

30

40

50

6に記載の組成物の使用。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1A】再構成緩衝剤（50mMリン酸ナトリウム緩衝剤pH7.65、5%スクロース（重量/体積）、および2%2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（2-HP-CD、（重量/体積））におけるAE-ケト-Sulf07（パネル（a））およびAE-ケト-EMCH（パネル（b））の安定性を比較する。

【図1B】再構成緩衝剤（50mMリン酸ナトリウム緩衝剤pH7.65、5%スクロース（重量/体積）、および2%2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（2-HP-CD、（重量/体積））におけるAE-ケト-Sulf07（パネル（a））およびAE-ケト-EMCH（パネル（b））の安定性を比較する。

10

【図2A】再構成緩衝剤（50mMリン酸ナトリウム緩衝剤pH7.65、5%スクロース（重量/体積）、および4%2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（2-HP-CD、（重量/体積））におけるAE-エステル-Sulf07（パネル（a））およびAE-エステル-EMCH（パネル（b））の安定性を比較する。

【図2B】再構成緩衝剤（50mMリン酸ナトリウム緩衝剤pH7.65、5%スクロース（重量/体積）、および4%2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（2-HP-CD、（重量/体積））におけるAE-エステル-Sulf07（パネル（a））およびAE-エステル-EMCH（パネル（b））の安定性を比較する。

【図3】ヒト血漿におけるアルブミンへのAE-ケト-Sulf07のコンジュゲーションを示す。

20

【図4】ヒト血漿におけるアルブミンへのAE-エステル-Sulf07のコンジュゲーションを示す。

【図5】ヒト血漿におけるアルブミンへのAE-ケト-Sulf07の結合キネティクスを示す。

【図6】マウス血漿におけるアルブミンへのAE-ケト-Sulf07の結合キネティクスを示す。

【図7】ラット血漿におけるアルブミンへのAE-ケト-Sulf07の結合キネティクスを示す。

【図8】ヒト血漿におけるアルブミンへのAE-エステル-Sulf07の結合キネティクスを示す。

30

【図9】薬物について定量限界（LOQ）が達成されるまでのマウス血漿におけるアルブミンへのAE-エステル-Sulf07の結合キネティクスを示す。

【図10】薬物についてLOQが達成されるまでのラット血漿におけるアルブミンへのAE-エステル-Sulf07の結合キネティクスを示す。

【図11A】ヒトアルブミン結合AE-ケト-Sulf07からのAE-ケト（pH7.4（パネル（a））およびpH4.1（パネル（b））のpH依存性放出を示す。

【図11B】ヒトアルブミン結合AE-ケト-Sulf07からのAE-ケト（pH7.4（パネル（a））およびpH4.1（パネル（b））のpH依存性放出を示す。

【図12A】ヒトアルブミン結合AE-エステル-Sulf07からのAE-エステル（pH7.4（パネル（a））およびpH4.1（パネル（b））のpH依存性放出を示す。

40

【図12B】ヒトアルブミン結合AE-エステル-Sulf07からのAE-エステル（pH7.4（パネル（a））およびpH4.1（パネル（b））のpH依存性放出を示す。

【図13】悪性黒色腫瘍モデルA375、開始時腫瘍体積平均中央値約134mm<sup>3</sup>における対照群との比較において、オーリスタチンEおよびAE-ケト-Sulf07の抗腫瘍効果を示す。

【図14】悪性黒色腫瘍モデルA375、開始時腫瘍体積平均中央値約332mm<sup>3</sup>における対照群との比較において、オーリスタチンEおよびAE-ケト-Sulf07の抗腫瘍効果を示す。

【図15】NSCLC異種移植モデルLXF A737、開始時腫瘍体積平均中央値約13

50

2 mm<sup>3</sup>における対照群との比較において、オーリスタチンEおよびAE-ケト-Sulf07の抗腫瘍効果を示す。

【図16】NSCLC異種移植モデルLXF A737、開始時腫瘍体積平均中央値約330 mm<sup>3</sup>における対照群との比較において、オーリスタチンEおよびAE-ケト-Sulf07の抗腫瘍効果を示す。

【図17】ヒト卵巣癌モデルA2780、開始時腫瘍体積平均中央値約148 mm<sup>3</sup>における対照群との比較において、オーリスタチンEおよびAE-ケト-Sulf07の抗腫瘍効果を示す。

【図18】ヒト卵巣癌モデルA2780、開始時腫瘍体積平均中央値約351 mm<sup>3</sup>における対照群との比較において、オーリスタチンEおよびAE-ケト-Sulf07の抗腫瘍効果を示す。

10

【図19】腎細胞癌モデルRXF631、開始時腫瘍体積約140 mm<sup>3</sup>における対照群との比較において、オーリスタチンEおよびAE-エステル-Sulf07の抗腫瘍効果を示す。

【図20】悪性黒色腫瘍モデルA375、開始時腫瘍体積平均中央値約332 mm<sup>3</sup>における対照群との比較において、オーリスタチンEおよびAE-エステル-Sulf07の抗腫瘍効果を示す。

【図21】NSCLC異種移植モデルLXF A737、開始時腫瘍体積平均中央値約132 mm<sup>3</sup>における対照群との比較において、オーリスタチンEおよびAE-エステル-Sulf07の抗腫瘍効果を示す。

20

【図22】ヒト卵巣癌モデルA2780、開始時腫瘍体積約351 mm<sup>3</sup>における対照群との比較において、オーリスタチンEおよびAE-エステル-Sulf07の抗腫瘍効果を示す。

【図23】ヒト卵巣癌モデルA2780、開始時腫瘍体積約148 mm<sup>3</sup>における対照群との比較において、AE-エステル-Sulf07の抗腫瘍効果を示す。

【図24】AE-ケト-Sulf07およびAE-ケト-EMCHの安定性の比較として凍結乾燥されたオーリスタチン製剤の加速された分解を示す。

【図25】AE-エステル-Sulf07およびAE-エステル-EMCHの安定性の比較として凍結乾燥されたオーリスタチン製剤の加速された分解を示す。

【発明を実施するための形態】

30

【0028】

本明細書において別段に定義されない限り、本出願で使用される科学および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。一般に、本明細書に記載される、化学、分子生物学、細胞および癌生物学、免疫学、微生物学、薬理学、ならびにタンパク質化学の技法に関する用語体系は、当該技術分野で周知であり、一般的に使用されるものである。

【0029】

本出願において参照される全ての刊行物、特許、および公開特許出願は、本明細書に参照によって特に組み込まれる。矛盾する場合、本明細書は、その特定の定義を含み、優先されるであろう。別段に特定されない限り、本明細書に開示される各実施形態は、単独でまたは本明細書に開示される任意の1つ以上の他の実施形態と組み合わせて使用され得ることが理解されるものである。

40

【0030】

定義

本明細書を通して、「含む(comprise)」という語または「含む(comprises)」もしくは「含む(comprising)」などの変形は、記載された整数(もしくは成分)または整数(もしくは成分)の群の包含を示すが、任意の他の整数(もしくは成分)または整数(もしくは成分)の群の除外を示さないことが理解されるであろう。

【0031】

50

本出願を通して、化合物または組成物が特定の成分を有する、含む (including)、または含む (comprising) として記載される場合、そのような化合物または組成物はまた、列挙された成分から本質的になるか、またはこれらからなり得ることが企図される。同様に、方法またはプロセスが、特定のプロセスステップを有する、含む (including)、または含む (comprising) として記載される場合、前記プロセスは、列挙されたプロセスステップから本質的になるか、またはこれらからなり得る。さらに、ステップの順序または特定のアクションを行うための順序は、本明細書に記載される化合物、組成物、および方法が実施可能なままである限り、重要でないことが理解されるべきである。また、2つ以上のステップまたはアクションを同時に行うことができる。

10

**【0032】**

単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈で別段に明示しない限り、複数形も含む。

**【0033】**

「含む」という用語は、「含むがこれらに限定されない」を意味するために使用される。「含む」および「含むがこれらに限定されない」は、交換可能に使用される。

**【0034】**

本明細書で使用される「または」という用語は、文脈で別段に明示しない限り、「および/または」を意味すると理解されるべきである。

**【0035】**

20

「薬物」、「薬剤」、「治療剤」、「治療活性剤」、「細胞毒性薬剤もしくは薬物」、「高度細胞毒性薬剤もしくは薬物」、または「治療有効物質」という用語は、問題の生物において自力でまたはその変換後のいずれかで薬理効果をもたらす、よってこれらの変換からの誘導体も含む、任意の化合物を意味するために使用される。本開示による組成物の薬物の薬理効果は、単一の効果のみ、例えば、細胞静止および/もしくは細胞毒性効果、または広域薬理スペクトルの作用、例えば、同時に免疫抑制および抗炎症効果であり得る。

**【0036】**

「患者」、「対象」、または「個体」という用語は、交換可能に使用され、ヒトまたは非ヒト動物のいずれかを指す。これらの用語は、ヒト、霊長類、家畜動物（例えば、ウシ、ブタ）、伴侶動物（例えば、イヌ、ネコ）、および齧歯類（例えば、マウスおよびラット）などの哺乳動物を含む。特定の実施形態では、患者または対象は、ヒト患者または対象、例えば、治療を必要とする状態を有するヒト患者である。

30

**【0037】**

「薬学的組成物」という用語は、例えば、1つ以上の薬学的に許容される担体、賦形剤、または溶媒と組み合わせられた、ヒトおよび哺乳動物を含む、対象動物における薬学的使用に好適な組成物を指す。そのような組成物はまた、希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤、保護剤、および当該技術分野で周知の他の材料を含有し得る。特定の実施形態では、薬学的組成物は、活性成分（複数可）と、賦形剤、担体、または希釈剤を構成する不活性成分（複数可）とを含む組成物、および直接または間接的に、成分のうちの任意の2つ以上の組み合わせ、錯体形成、もしくは凝集から、または成分のうちの1つ以上の解離から、または成分のうちの1つ以上の他のタイプの反応もしくは相互作用から、もたらされる任意の生成物を包含する。したがって、本開示の薬学的組成物は、本開示の化合物と、1つ以上の薬学的に許容される賦形剤（複数可）、担体（複数可）、および/または希釈剤（複数可）とを混合することによって作製される任意の組成物を包含する。

40

**【0038】**

「薬学的に許容される担体」という用語は、本明細書に開示される治療有効物質と共に、患者に投与され得、薬剤の薬理活性を破壊しない非毒性担体を指す。「賦形剤」という用語は、薬学的に活性な成分ではない製剤または組成物における添加剤を指す。特定の実施形態では、「薬学的に許容される」物質は、投与スケジュールによる剤形で使用される量で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、免疫原性、または他の有害反応なしに、動物

50

またはヒトの細胞、組織、または臓器との接触における使用に好適であり、合理的なベネフィット/リスク比に相応する。特定の実施形態では、薬学的組成物の成分である「薬学的に許容される」物質は、加えて、組成物の他の成分（複数可）と適合性である。特定の実施形態では、「薬学的に許容される賦形剤」、「薬学的に許容される担体」、および「薬学的に許容される希釈剤」という用語は、限定なく、薬学的に許容される不活性成分、材料、組成物、およびビヒクル、例えば、液体充填剤、固体充填剤、希釈剤、賦形剤、担体、溶媒、およびカプセル化材料を包含する。担体、希釈剤、および賦形剤はまた、全ての薬学的に許容される分散媒体、コーティング、緩衝剤、等張剤、安定化剤、吸収遅延剤、抗微生物剤、抗細菌剤、抗真菌剤、補助剤などを含む。任意の従来の賦形剤、担体、または希釈剤が活性成分と非適合性である限りを除いて、本開示は、薬学的組成物における従来の賦形剤、担体、および希釈剤の使用を包含する。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., Lippincott Williams & Wilkins (Philadelphia, Pennsylvania, 2005); Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th Ed., Rowe et al., Eds., The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association (2005); Handbook of Pharmaceutical Additives, 3rd Ed., Ash and Ash, Eds., Gower Publishing Co. (2007); および Pharmaceutical Preformulation and Formulation, Gibson, Ed., CRC Press LLC (Boca Raton, Florida, 2004) を参照されたい。

10

20

#### 【0039】

「薬学的に有効な量」、「治療有効量 (therapeutically effective amount)」、または「治療有効用量 (therapeutically effective dose)」という用語は、患者において疾患を治療するために有効な、例えば、疾患（例えば、癌）に罹患している患者の一般的な健康における有益なおよび/または所望の変化、治療、治癒、生理反応または状態の阻害または改善などを引き起こす量を指す。完全な治療効果は、1回の用量の投与によって必ずしも発生せず、一連の用量の投与後にはのみ発生し得る。よって、治療有効量は、1回以上の投与で投与され得る。対象に必要な正確な有効量は、例えば、対象のサイズ、健康および年齢、疾患の性質および程度、投与に選択される治療剤または治療剤の組み合わせ、ならびに投与方法に依存するであろう。当業者であれば、通常の実験によって所与の状況についての有効量を容易に決定することができる。当業者であれば、癌を治療することが、これらに限定されないが、癌細胞を殺滅すること、新たな癌細胞の成長を防止すること、腫瘍退縮（腫瘍サイズの減少）を引き起こすこと、転移の減少を引き起こすこと、患者の生活機能を改善すること、患者の幸福を改善すること、疼痛を減少させること、食欲を改善すること、患者の体重を改善すること、およびこれらに任意の組み合わせを含むことを認識するであろう。「薬学的に有効な量」、「治療有効量」、または「治療有効用量」という用語はまた、患者の臨床症状を改善するために必要な量を指す。本明細書に記載される治療的方法または癌を治療する方法は、癌を「治癒する」と解釈されるか、またはそうでなければこれに限定されるものではない。

30

40

#### 【0040】

本明細書で使用されるとき、「治療する」または「治療」という用語は、対象の状態を改善または安定化する方法で状態の症状、臨床徴候、および基礎病理を逆転、低減、または停止することを含む。本明細書で使用され、当該技術分野で十分に理解されるように、「治療」とは、臨床結果を含む、有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチである。有益なまたは所望の臨床結果は、検出可能か検出不能かにかかわらず、これらに限定されないが、状態、例えば、癌と関連した1つ以上の症状または状態の、軽減、改善、または進行の減速、疾患の程度の低下、疾患の安定化した（すなわち、悪化しない）状態、疾

50

患進行の遅延または減速、疾患状態の改善または緩和、ならびに寛解（部分または完全）を含むことができる。「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生存を延長することを意味することができる。例示的な有益な臨床結果は、本明細書に記載される。

#### 【0041】

物質、化合物、または薬剤を対象に「投与すること」または「その投与」は、当業者に知られている様々な方法のうちの1つを用いて行うことができる。例えば、化合物または薬剤は、静脈内、動脈内、皮内、筋肉内、腹腔内、皮下、眼内、舌下、経口（服用による）、鼻腔内（吸入による）、髄腔内、脳内、および経皮（例えば、皮膚管を通した、吸収による）投与することができる。化合物または薬剤は、再充填可能なまたは生分解可能なポリマーデバイスまたは他のデバイス、例えば、パッチおよびポンプ、または薬剤によって適切に導入することができ、これは、化合物または薬剤の持続性、緩効性、または制御放出を提供する。投与することはまた、例えば、1回、複数回、および/または1つ以上の長期間にわたって行うことができる。いくつかの態様では、投与は、自己投与を含む、直接投与、および薬物を処方する行為を含む、間接投与の両方を含む。例えば、本明細書で使用されるとき、患者に薬物を自己投与するように、もしくは薬物を別の者に投与してもらうように指示する、および/または患者に薬物の処方を提供する医師は、薬物を患者に投与している。方法が、2つ以上の薬剤または治療モダリティを含む治療レジメンの一部であるとき、本開示は、薬剤が、同じまたは異なる時間で、および同じまたは異なる投与経路で投与され得ることを企図する。物質、化合物、または薬剤を対象に投与する適切な方法はまた、例えば、対象の年齢、投与時に対象が活動的または非活動的であるか、投与時に対象に認知障害があるか、障害の程度、ならびに化合物または薬剤の化学および生物学的特性（例えば、可溶性、消化性、生物学的利用能、安定性、および毒性）に依存するであろう。

#### 【0042】

「置換された」という用語は、化学的化合物の骨格の1つ以上の炭素上の水素を置換する置換基を有する部分を指す。「置換」または「～で置換された」とは、そのような置換が、置換された原子および置換基の許容される原子価に従い、置換が、例えば、転位、環化、脱離などによるような変換を自発的に受けない、安定な化合物をもたらすという暗示的な条件を含むことが理解されるであろう。本明細書で使用されるとき、「置換された」という用語は、有機化合物の全ての許容される置換基を含むことが企図される。広範な態様では、許容される置換基は、有機化合物の非環式および環式、分岐および非分岐、炭素環式および複素環式、芳香族および非芳香族置換基を含む。許容される置換基は、1つ以上であり、適切な有機化合物について同じまたは異なり得る。本開示の目的のために、窒素などのヘテロ原子は、水素置換基、および/またはヘテロ原子の原子価を満たす本明細書に記載される有機化合物の任意の許容される置換基であり得る。置換基は、本明細書に記載される任意の置換基、例えば、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル（カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミル、またはアシルなど）、チオカルボニル（チオエステル、チオアセテート、またはチオホルメートなど）、アルコキシル、アルキルチオ、アシルオキシ、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、サルフェート、スルホネート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ヘテロシクリル、アラルキル、または芳香族（例えば、 $C_6-C_{12}$ アリール）もしくは複素芳香族（例えば、ヘテロアリール）部分を含むことができる。

#### 【0043】

「任意の」または「任意に」とは、その後に記載される状況が起こっても起こらなくてもよいことを意味するので、本出願は、状況が起こる場合および起こらない場合を含む。例えば、「任意に置換された」という句は、所与の原子上に非水素置換基が存在してもしなくてもよいことを意味し、よって、本出願は、非水素置換基が存在する構造および非水素置換基が存在しない構造を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 4 】

特に「非置換」として記載されない限り、本明細書における化学部分への参照は、置換バリエーションを含むことが理解される。例えば、「アルキル」基または部分への参照は、置換および非置換バリエーションの両方を暗示的に含む。化学部分上の置換基の例としては、これらに限定されないが、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル（例えば、カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミル、またはアシル）、チオカルボニル（例えば、チオエステル、チオアセテート、またはチオホルメート）、アルコキシル、アルキルチオ、アシルオキシ、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、スルフェート、スルホネート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ヘテロシクリル、アラールキル、またはアリールもしくはヘテロアリール部分が挙げられる。

10

## 【 0 0 4 5 】

「アリール」とは、環に、示された数の炭素原子、例えば、6 ~ 12個または6 ~ 10個の炭素原子を有する芳香族炭素環を示す。アリール基は、単環式または多環式（例えば、二環式、三環式）であり得る。いくつかの例では、多環式アリール基の両方の環は、芳香族（例えば、ナフチル）である。他の例では、多環式アリール基は、芳香族環に縮合した非芳香族環（例えば、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルケニル）を含み得るが、ただし、多環式アリール基は、芳香族環における原子を介して親構造に結合している。よって、1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフタレン-5-イル基（部分が芳香族炭素原子を介して親構造に結合している）は、アリール基とみなされるが、1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフタレン-1-イル（部分が非芳香族炭素原子を介して親構造に結合している）は、アリール基とみなされない。同様に、1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノリン-8-イル基（部分が芳香族炭素原子を介して親構造に結合している）は、アリール基とみなされるが、1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノリン-1-イル基（部分が非芳香族窒素原子を介して親構造に結合している）は、アリール基とみなされない。しかしながら、「アリール」という用語は、結合点にかかわらず、本明細書で定義される「ヘテロアリール」を包含しないか、またはこれとは重複しない（例えば、キノリン-5-イルおよびキノリン-2-イルの両方は、ヘテロアリール基である）。

20

## 【 0 0 4 6 】

「ヘテロアリール」とは、N、O、およびSから選択される1個以上のヘテロ原子（例えば、1, 2, 3、または4個のヘテロ原子）からなり、残りの環原子が炭素である、示された数の環原子を含有する芳香族環（例えば、5 ~ 12、または5 ~ 10員ヘテロアリール）を示す。5員ヘテロアリールは、5個の環原子を有するヘテロアリールである。6員ヘテロアリールは、6個の環原子を有するヘテロアリールである。ヘテロアリール基は、隣接するSおよびO原子を含有しない。いくつかの実施形態では、ヘテロアリール基におけるSおよびO原子の総数は、2以下である。いくつかの実施形態では、ヘテロアリール基におけるSおよびO原子の総数は、1以下である。別段に示されない限り、ヘテロアリール基は、原子価が許容するように、炭素または窒素原子によって親構造に結合され得る。例えば、「ピリジル」は、2-ピリジル、3-ピリジル、および4-ピリジル基を含み、「ピロリル」は、1-ピロリル、2-ピロリル、および3-ピロリル基を含む。窒素がヘテロアリール環に存在するとき、それは、隣接する原子および基の性質が許容する場合、酸化状態（すなわち、 $N^+ - O^-$ ）で存在する。加えて、硫黄がヘテロアリール環に存在するとき、それは、隣接する原子および基の性質が許容する場合、酸化状態（すなわち、 $S^+ - O^-$ または $SO_2$ ）で存在する。ヘテロアリール基は、単環式または多環式（例えば、二環式、三環式）であり得る。

30

40

## 【 0 0 4 7 】

いくつかの例では、ヘテロアリール基は、単環式である。例としては、ピロール、ピラゾール、イミダゾール、トリアゾール（例えば、1, 2, 3-トリアゾール、1, 2, 4-トリアゾール、1, 3, 4-トリアゾール）、テトラゾール、フラン、イソキサゾール、オキサゾール、オキサジアゾール（例えば、1, 2, 3-オキサジアゾール、1, 2

50

、4 - オキサジアゾール、1, 3, 4 - オキサジアゾール)、チオフェン、イソチアゾール、チアゾール、チアジアゾール(例えば、1, 2, 3 - チアジアゾール、1, 2, 4 - チアジアゾール、1, 3, 4 - チアジアゾール)、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、トリアジン(例えば、1, 2, 4 - トリアジン、1, 3, 5 - トリアジン)、およびテトラジンが挙げられる。

【0048】

「アシル」という用語は、当該技術分野で認識されており、一般式ヒドロカルビル - C(O) - によって表される基、例えば、アルキル - C(O) - を指す。

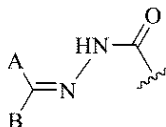
【0049】

「アルキル」という用語は、直鎖アルキル基、および分岐鎖アルキル基を含む、飽和脂肪族基のラジカルを指す。いくつかの実施形態では、直鎖または分岐鎖アルキルは、その骨格に30個以下の炭素原子(例えば、直鎖はC<sub>1</sub> - C<sub>30</sub>、分岐鎖はC<sub>4</sub> - C<sub>30</sub>)を有し、他の実施形態では、20個以下の炭素原子を有する。特定の実施形態では、アルキル基は、低級アルキル基、例えば、メチル、エチル、n - プロピル、i - プロピル、n - ブチル、およびn - ペンチルである。また、明細書、実施例、および特許請求の範囲を通して使用される「アルキル」という用語は、「非置換アルキル」および「置換アルキル」の両方を含むことが意図され、その後者は、炭化水素骨格の1つ以上の炭素上の水素を置換する置換基を有するアルキル部分を指す。特定の実施形態では、直鎖または分岐鎖アルキルは、その骨格に30個以下の炭素原子(例えば、直鎖はC<sub>1</sub> - C<sub>30</sub>、分岐鎖はC<sub>3</sub> - C<sub>30</sub>)を有する。いくつかの実施形態では、鎖は、その骨格に10個以下の炭素(C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub>)原子を有する。他の実施形態では、鎖は、その骨格に6個以下の炭素(C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>)原子を有する。

【0050】

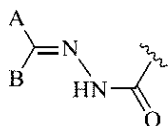
「ヒドラゾン部分」または「ヒドラゾン」という用語は、Eおよび/またはZヒドラゾン、例えば、

【化6】



または

【化7】



を指す。

ヒドラゾン部分の立体化学は、EまたはZであり得る。本明細書で使用されるヒドラゾンという用語は、EおよびZ異性体の両方を含む。本明細書に開示されるヒドラゾン部分は一般的には、一方の配置で描写されるが、本開示は、Eおよび/またはZの両方を含むことができることが理解される。

【0051】

本明細書における様々な場所で、本開示の化合物の置換基は、群または範囲において開示されている。本開示は、そのような群および範囲のメンバーの各々および全ての個別の部分組み合わせを含むことが特に意図される。例えば、「C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル」という用語は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n - ブチル、sec - ブチル、イソブチルなどを個別に開示することが特に意図される。

【0052】

10

20

30

40

50

「薬学的に許容される塩」とは、これらに限定されないが、金属塩（例えば、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなど）、酸付加塩（例えば、鉱酸、カルボン酸など）、および塩基付加塩（例えば、アンモニア、有機アミンなど）を含む、薬学的使用に好適な化合物の塩である。塩基としてその遊離形態で発生する化合物の酸付加塩形態は、当該遊離塩基形態を、無機酸、例えば、塩酸もしくは臭化水素酸などのハロゲン化水素鎖、硫酸、硝酸、リン酸など、または有機酸、例えば、酢酸、ヒドロキシ酢酸、プロパン酸、乳酸、ピルビン酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸、環状酸、サリチル酸、p - アミノサリチル酸、パモ酸などのような、適切な酸で処理することによって得ることができる（例えば、WO 01 / 062726を参照されたい。その全体が参照によって本明細書に組み込まれる、Berge et al., J . Pharm. Sci., 66 : 1 - 19 (1977) によって列挙されるいくつかの薬学的に許容される塩）。酸性プロトンを含む化合物は、適切な有機および無機塩基での処理によって、それらの治療活性、非毒性塩基付加塩形態、例えば、金属またはアミン塩に変換され得る。適切な塩基塩形態は、例えば、アンモニウム塩、アルカリおよび土類アルカリ金属塩またはイオン、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム塩など、有機塩基を有する塩、例えば、N - メチル - D - グルカミン、ヒドラバミン塩、ならびにアミノ酸を有する塩、例えば、アルギニン、リジンなどを含む。逆に、当該塩形態は、適切な塩基または酸での処理によって遊離形態に変換することができる。化合物およびそれらの塩は、本開示の範囲内に含まれる、溶媒和物の形態であり得る。そのような溶媒和物は、例えば、水和物、アルコラートなどを含む（例えば、WO 01 / 062726を参照されたい）。

10

20

**【0053】**

本開示は、薬学的に許容される担体または賦形剤と共に本開示の1つ以上の化合物を含む薬学的組成物をさらに提供する。本開示の化合物または薬学的組成物は、インビトロまたはインビボで使用され得る。

**【0054】**

本明細書で使用される「異性体」という用語は、これらに限定されないが、互変異性体、シスおよびトランス異性体（E (entgegen)、Z (zusammen)）、R - およびS - エナンチオマー（当該RおよびS表記は、Pure Appl. Chem. (1976), 45, 11 - 30に記載される規則に従って使用される）、ジアステレオマー、(D)異性体、(L)異性体、立体異性体、そのラセミ混合物、ならびにその他の混合物を含む。全てのそのような異性体、およびその混合物は、本開示に含まれることが意図される。互変異性体は、本明細書に記載される式において明示的には示されていないが、本開示の範囲内に含まれることが意図される。

30

**【0055】**

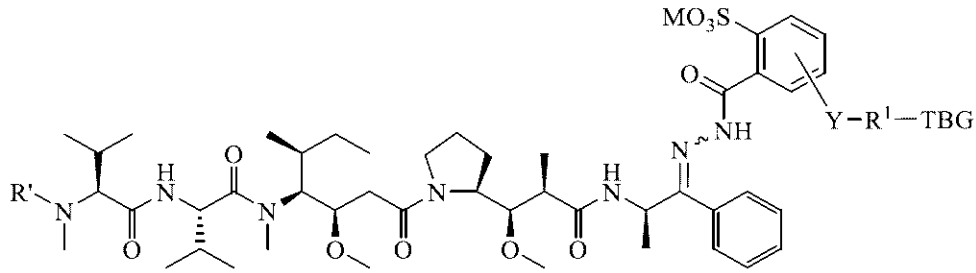
本開示の化合物

本開示の実施形態は、式 I もしくは式 I I によって表される構造を有する化合物、

40

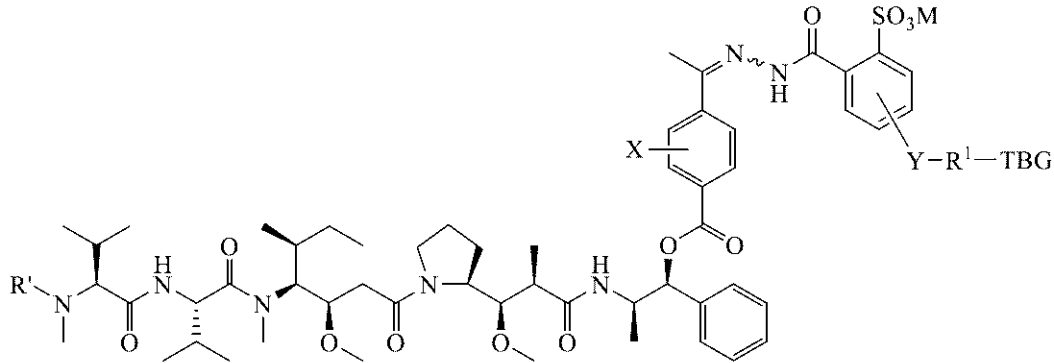
50

## 【化 8】



式 I

10



式 II

20

またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体を提供し、式中、  
R' は、Hまたは -CH<sub>3</sub>であり、

Mは、Hおよび薬学的に許容される対イオン、例えば、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、NR<sub>4</sub><sup>+</sup>、または  
NHR<sub>3</sub><sup>+</sup>から選択され、式中、Rは、HおよびC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルから選択され、

Yは、不在であるか、または任意に置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、-NH-C(O)-  
-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-O-、および-O-  
C(O)-から選択され、

30

R<sup>1</sup>は、不在であるか、または任意に置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>アルキルであり、当該C<sub>1</sub>-  
C<sub>18</sub>アルキルにおける任意に最大6個の炭素原子は、各々独立して、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-  
で置換され、

Xは、Hであるか、またはハロゲン（例えば、-F、-Cl、-Br、もしくは-I）  
、-NO<sub>2</sub>、-NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>、-OR<sup>2</sup>、-NHCOR<sup>2</sup>、および-OCOR<sup>2</sup>から選択され、  
式中、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は、各々独立して、HおよびC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルから選択され、

TBGは、任意に置換されたマレイミド基、任意に置換されたハロアセトアミド基、任  
意に置換されたハロアセテート基、任意に置換されたピリジルチオ基、任意に置換された  
イソチオシアネート基、任意に置換されたビニルカルボニル基、任意に置換されたアジリ  
ジン基、任意に置換されたジスルフィド基、および任意に置換されたアセチレン基から選  
択されるチオール結合基である。

40

## 【0056】

いくつかの実施形態では、式 I または II の構造の化合物は、任意に薬学的に許容され  
る担体を含む薬学的組成物として製剤化され、薬学的組成物は、生物に投与され、血  
液循環において内因性アルブミンのシステイン-34のチオール基にインサイチュで選択  
的かつ急速に共有結合する。

## 【0057】

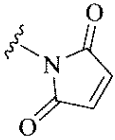
いくつかの実施形態では、R' は、-CH<sub>3</sub>である。他の実施形態では、R' は、Hである

50

## 【0058】

いくつかの実施形態では、チオール結合基、TBGは、マレイミド基である。

## 【化9】



## 【0059】

10

いくつかの実施形態では、高度細胞毒性ペプチド系薬物は、ヒドラジド部分を含有するマレイミド水溶性リンカーでの酸感受性ヒドラゾン結合の形成を可能にするカルボニル基を含有するような方法で誘導体化されるオーリスタチンEである。

## 【0060】

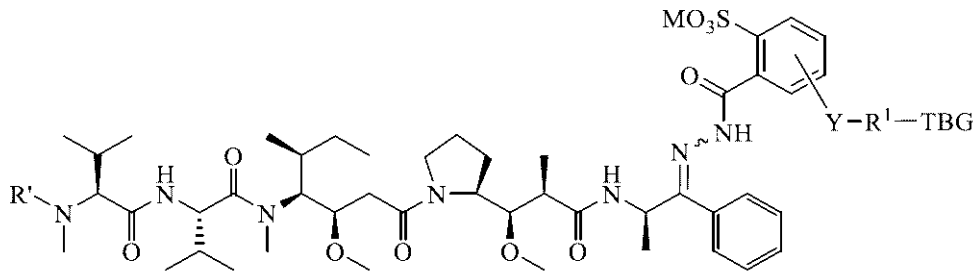
いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で開示される化合物と、任意に薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物を提供し、薬学的組成物は、静脈内投与され、血液循環において内因性アルブミンのシステイン - 34 のチオール基にインサイチュで選択的かつ急速に共有結合する。

## 【0061】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるアルブミン結合化合物において、高度細胞毒性薬物は、オーリスタチンEのペптаペプチド誘導体含有するカルボニルであり、アルブミン結合部分は、投与後アルブミンのシステイン - 34 に急速かつ選択的に結合する、チオール結合基(TBG)、例えば、マレイミド基であり、酸感受性結合は、一般式IおよびIIの誘導体化ベンゾイルヒドラゾン結合、

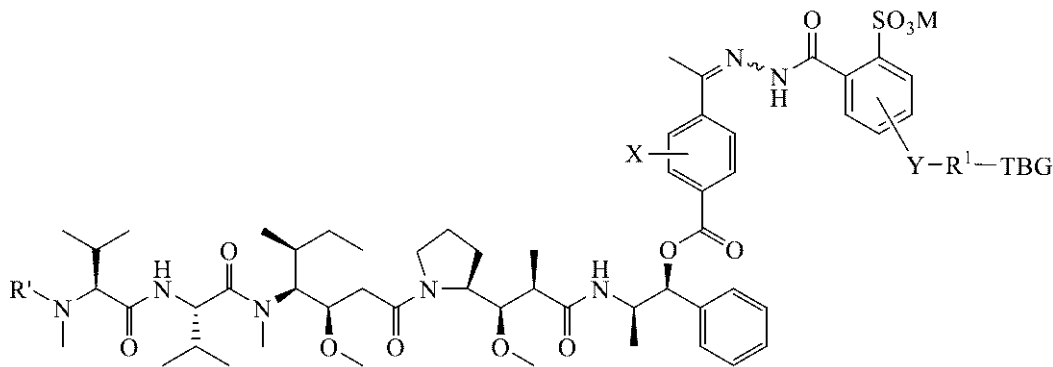
## 【化10】

20



式I

30



式II

40

またはその薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、もしくは異性体であり、式中、R'は、Hまたは-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>であり、

50

Mは、Hおよび薬学的に許容される対イオン、例えば、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{NR}_4^+$ 、または $\text{NHR}_3$ から選択され、式中、Rは、Hおよび $\text{C}_1 - \text{C}_4$ アルキルから選択され、

Yは、不在であるか、または任意に置換された $\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキル、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 、および $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ から選択され、

$\text{R}^1$ は、不在であるか、または任意に置換された $\text{C}_1 - \text{C}_{18}$ アルキルであり、当該 $\text{C}_1 - \text{C}_{18}$ アルキルにおける任意に最大6個の炭素原子は、各々独立して、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ で置換され、

Xは、Hであるか、またはハロゲン（例えば、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、もしくは $-\text{I}$ ）、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NR}^2\text{R}^3$ 、 $-\text{OR}^2$ 、 $-\text{NHCOR}^2$ 、および $-\text{OCOR}^2$ から選択され、式中、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ は、各々独立して、Hおよび $\text{C}_1 - \text{C}_4$ アルキルから選択され、

10

T B Gは、任意に置換されたマレイミド基、任意に置換されたハロアセトアミド基、任意に置換されたハロアセテート基、任意に置換されたピリジルチオ基、任意に置換されたイソチオシアネート基、任意に置換されたビニルカルボニル基、任意に置換されたアジリジン基、任意に置換されたジスルフィド基、および任意に置換されたアセチレン基から選択されるチオール結合基である。

#### 【0062】

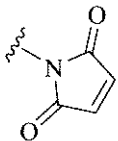
いくつかの実施形態では、T B Gは、 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキルまたはハロゲンで置換される。いくつかの実施形態では、T B Gは、メチル、 $-\text{Cl}$ 、または $-\text{Br}$ で置換される。

#### 【0063】

ジスルフィド基は、交換性基としてチオニトロ安息香酸（例えば、5'-チオ-2-ニトロ安息香酸）によって活性化され得る。マレイミドまたはピリジルチオ基は、適切な場合、アルキル基によって、または上記水溶性基によって置換することができる。一般に、チオール結合基は、タンパク質結合特性を有し、すなわち、それは、生理環境において、タンパク質の表面上の特定のアミノ酸に共有結合する（「共有タンパク質結合基」）。いくつかの実施形態では、マレイミド基、ハロアセトアミド基、ハロアセテート基、ピリジルチオ基、ジスルフィド基、ビニルカルボニル基、アジリジン基、および/またはアセチレン基は、システインのチオール（ $-\text{SH}$ ）基と反応する。いくつかの実施形態では、タンパク質結合基は、

20

#### 【化11】



30

アルブミンのシステイン-34に結合するマレイミド基である。

#### 【0064】

いくつかの実施形態では、薬物送達システムは、酸感受性で、開裂可能なヒドラゾン部分を含む。ヒドラゾン部分の開裂および薬物放出の半減期は、カルボニル誘導体の構造によって変動する。

40

#### 【0065】

いくつかの実施形態では、4.0~6.5のpH範囲におけるアルブミン結合薬物放出の放出の半減期は、約1.5時間から約80時間まで変動する。

#### 【0066】

理論によって縛られることなく、ヒドラゾン結合ヘオルト位に結合したスルホン酸（ $-\text{SO}_3\text{H}$ ）またはスルホネート基（ $-\text{SO}_3^-$ ）などの1つの電子吸引基を含むフェニル環は、ヒドラゾン部分を安定化し、酸性条件における薬物の緩効性および持効性放出をもたらす。

#### 【0067】

いくつかの実施形態では、 $\text{R}'$ は、 $-\text{CH}_3$ である。他の実施形態では、 $\text{R}'$ は、Hである

50

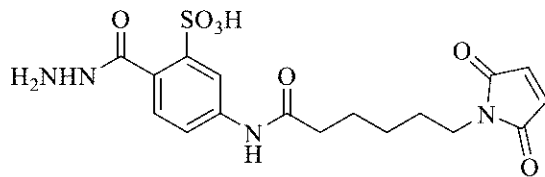


これらは、チオール含有抗体にコンジュゲートされた。両方の化合物は、上記に描写される式 A および式 B の 2 つの化合物に最小限の水溶性を与える脂肪族 6 - マレイミドカプロイルヒドラゾン部分を含有する。実際に、両方の前者の化合物と抗体とのコンジュゲーションは、有機溶媒、すなわち、アセトニトリル：DMSO の 9：1 混合物の補助のみでの化合物の溶解によって達成された。血流において循環するアルブミンのシステイン - 34 へのインサイチュ結合に適用可能な薬学的組成物の製剤における、単独での有機溶媒の使用、すなわち、本明細書に記載される薬物送達アプローチは、可能ではない。したがって、いくつかの実施形態では、本組成物は、有機溶媒を含まない。

【0073】

よって、静脈内投与のための薬学的組成物の製剤のためにアルブミン結合プロドラッグに十分な水溶性を与えるスルホン酸部分を含む芳香族マレイミドリンカーが発明された。1 つのそのようなリンカーは、Sulf07 と略され、以下に描写される化学構造を有する、5 - ( 6 - ( 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル ) ヘキサンアミド ) - 2 - ( ヒドラジンカルボニル ) - ベンゼンスルホン酸である。

【化13】



Sulf07の化学構造

【0074】

リンカー Sulf07、5 - ( 6 - ( 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル ) ヘキサンアミド ) - 2 - ( ヒドラジンカルボニル ) - ベンゼンスルホン酸を、下記合成スキームにおいて描写される経路 A および / または経路 B に従って調製した。

10

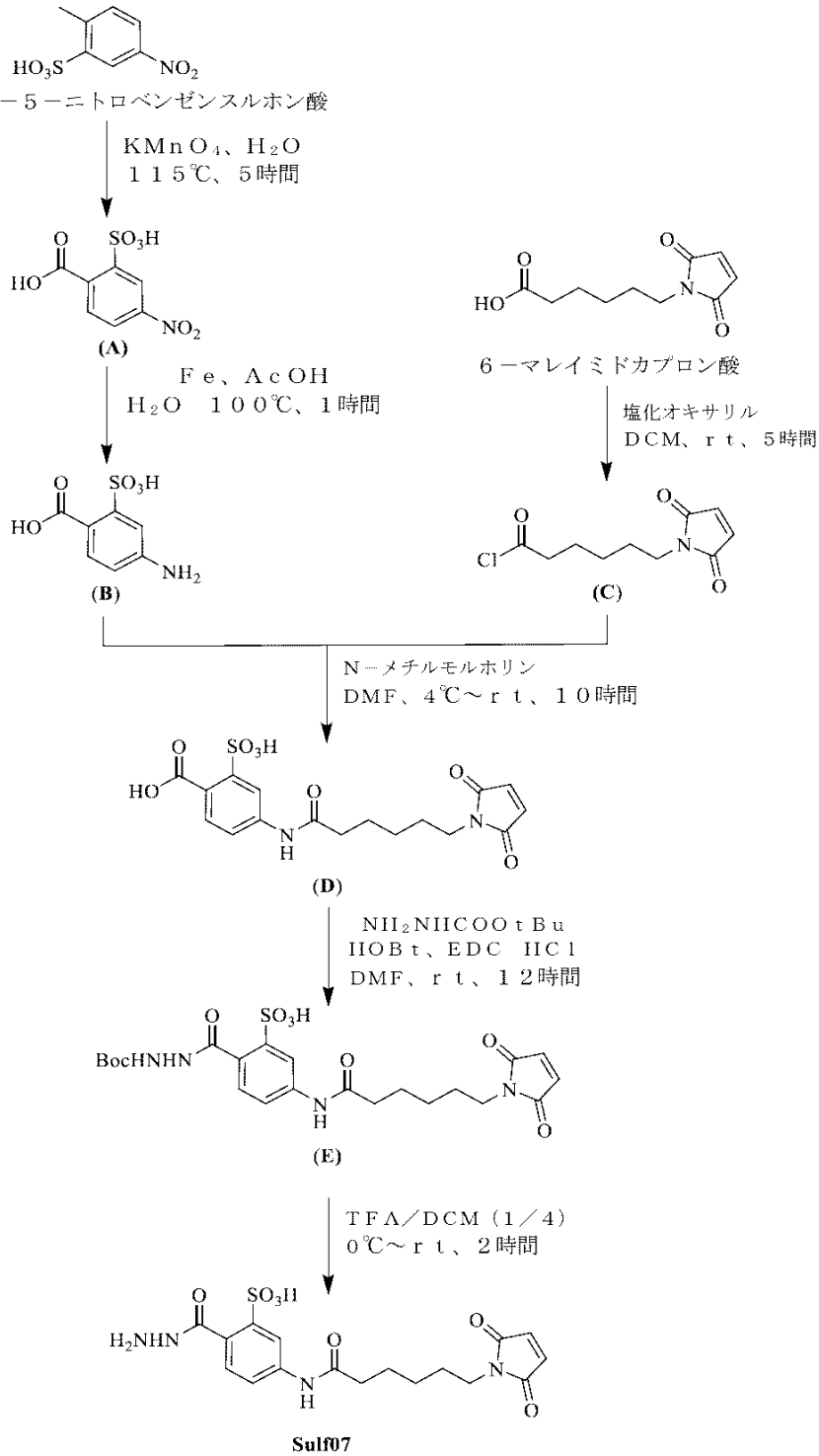
20

30

40

50

## 【化 1 4】



10

20

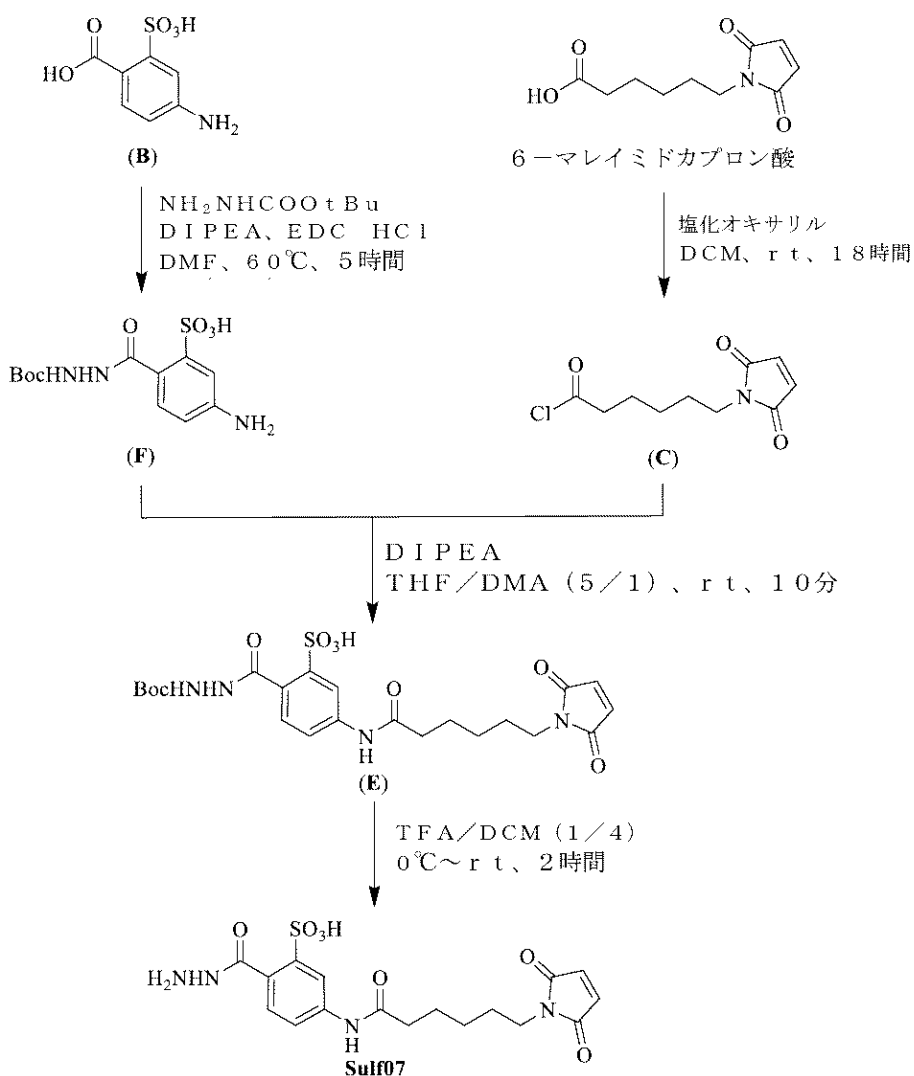
30

40

スキーム 1、経路 A

50

## 【化15】



10

20

30

## スキーム2、経路B

## 【0075】

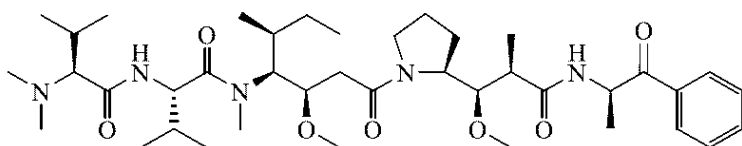
経路AおよびBに従って達成された、新規リンカーSulf07、5-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)-2-(ヒドラジンカルボニル)ベンゼンスルホン酸の新たな合成手順および特徴分析は、実施例1に記載される。

## 【0076】

リンカーSulf07は、それぞれ、式III(AE-ケト-Sulf07と略される)および式IV(AE-エステル-Sulf07と略される)の化合物を得るために、

40

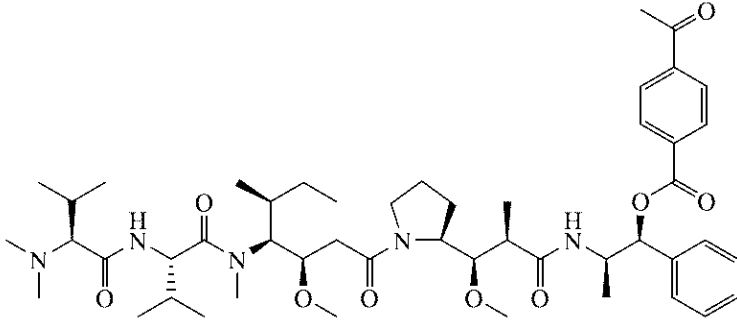
## 【化16】



AE-ケト  
または

50

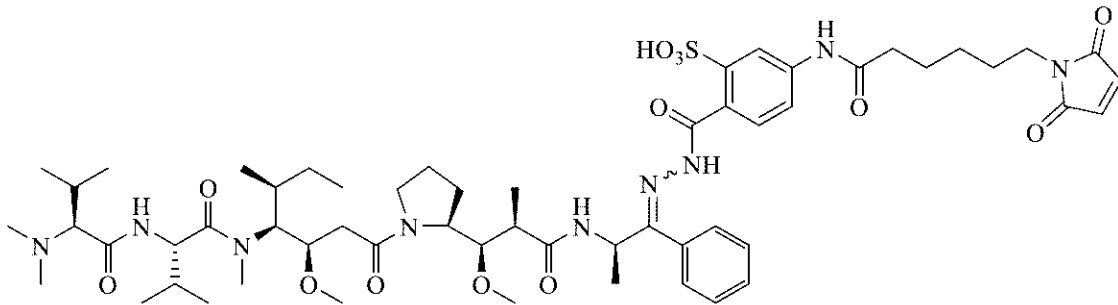
## 【化17】



10

AE - エステルと反応させた。

## 【化18】

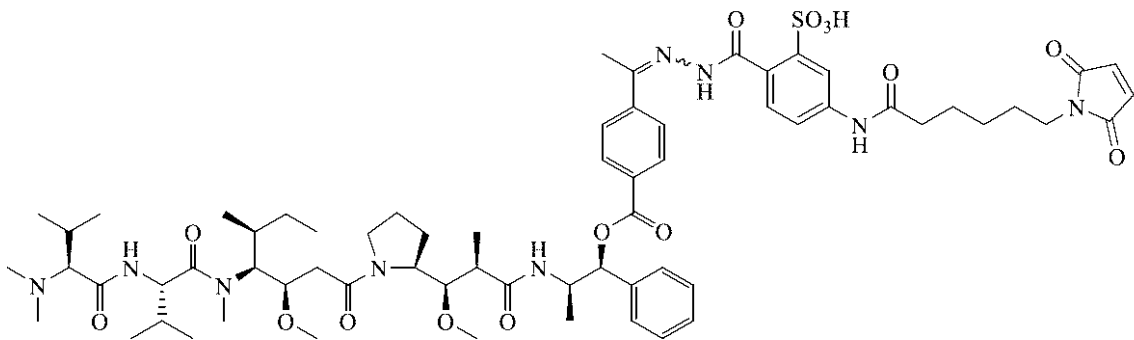


20

式III (AE-ケト-Sulf07)

式III (AE-ケト-Sulf07)

## 【化19】



30

式IV (AE-エステル-Sulf07)

式IV (AE-エステル-Sulf07)

## 【0077】

40

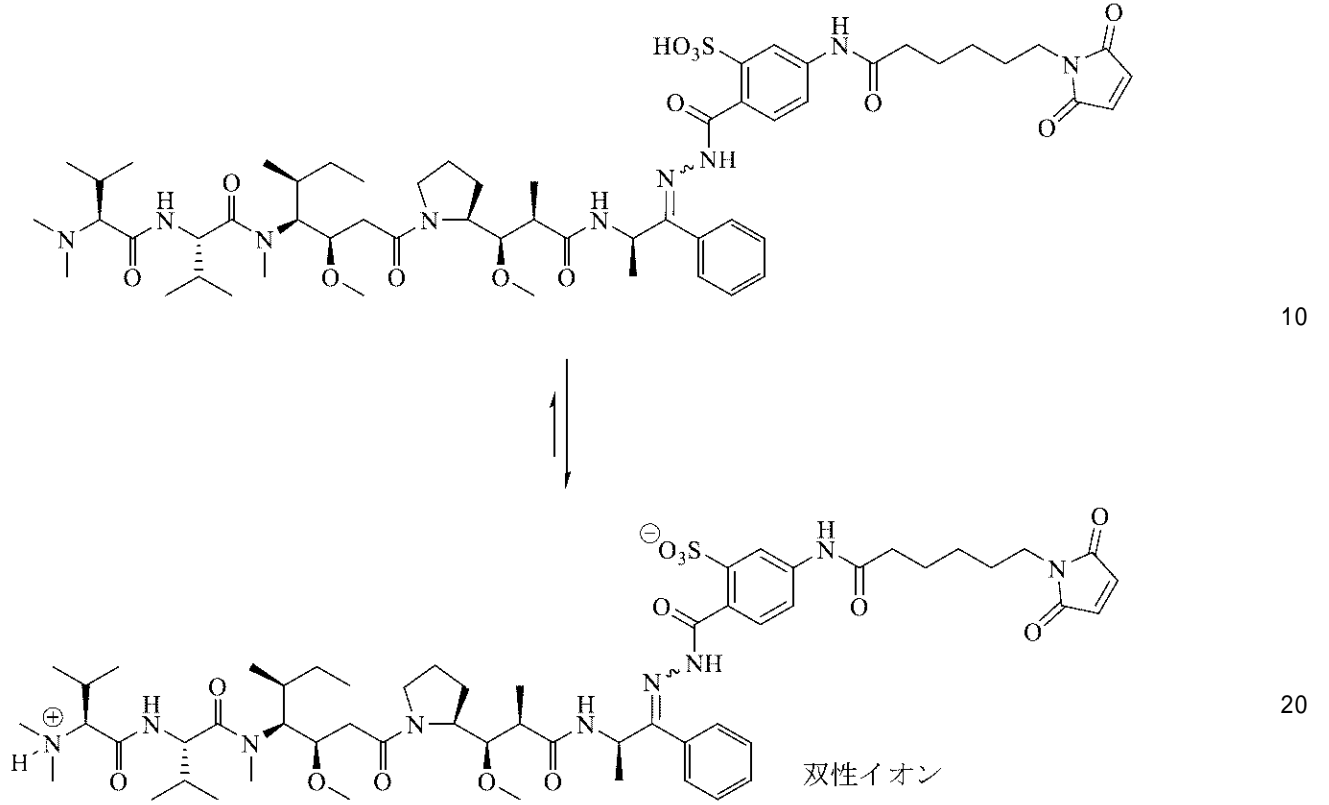
AE-ケト-Sulf07 (式III) およびAE-エステル-Sulf07 (式IV) の合成および特徴分析は、実施例2および3に記載される。

## 【0078】

AE-ケト-Sulf07およびAE-エステル-Sulf07の構造の分析は、両方の分子の2つの部分(-SO<sub>3</sub>Hおよび-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>基)が酸-塩基対として存在し、よってスキーム3およびスキーム4において描写される双性イオンを形成することを明らかにする。

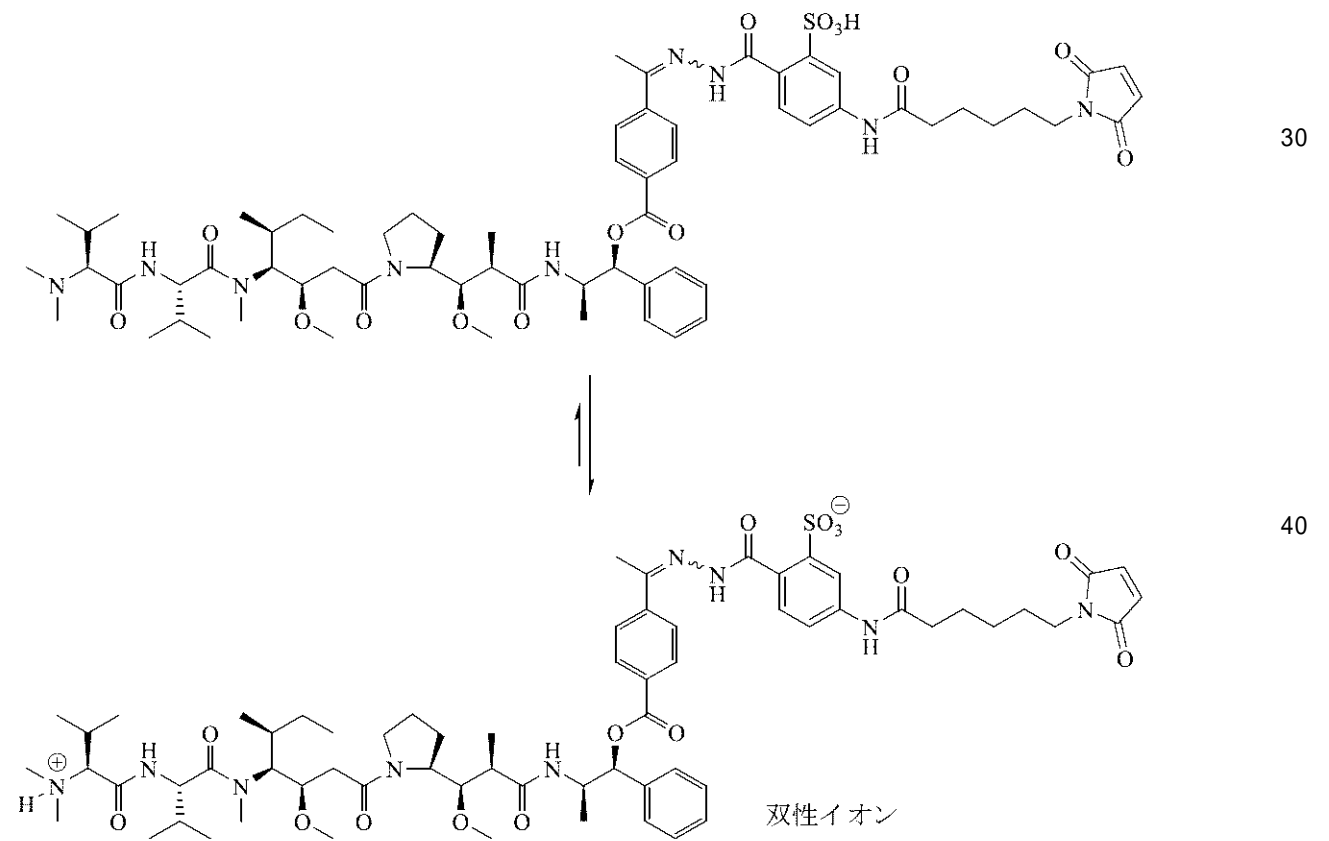
50

【化 2 0】



スキーム 3

【化 2 1】

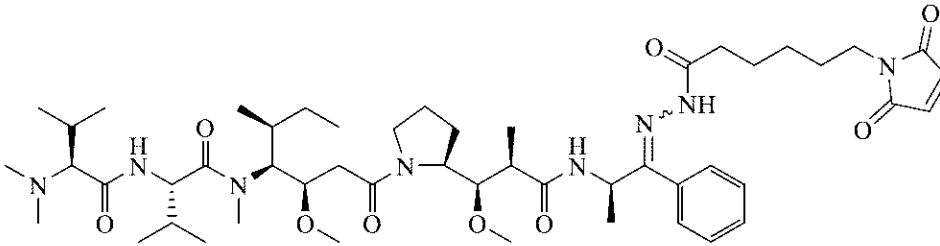


スキーム 4

## 【 0 0 7 9 】

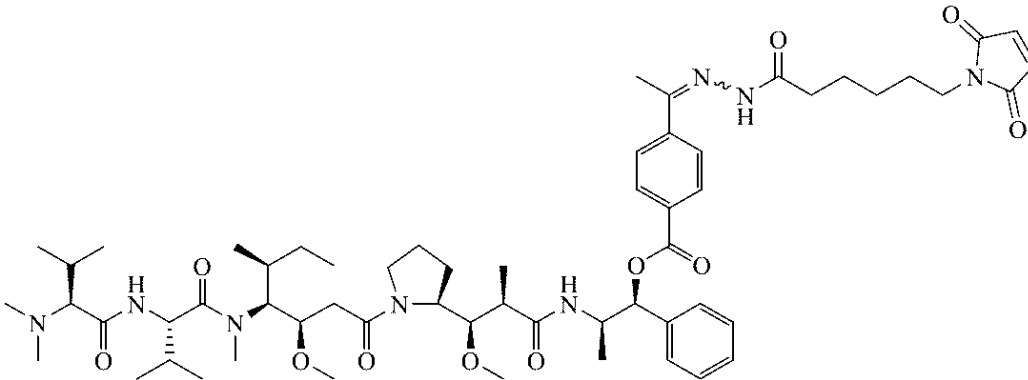
リンカー-S u l f 0 7において統合されるスルホン酸部分ならびに2つのオーリスタチンプロドラッグA E - ケト - S u l f 0 7およびA E - エステル - S u l f 0 7の双性イオン特性は、薬学的組成物を製剤化するために十分な水溶性を提供し、より重要なことにはマレイミド部分の高い安定性を提供し、これは式A ( A E - ケト - E M C H ) および式B ( A E - エステル - E M C H ) に対して有意に改善している。

## 【 化 2 2 】



式A

## 【 化 2 3 】



式B

U S 6 8 8 4 8 6 9 - B 2 ( 出 願 番 号 : 1 0 / 0 0 1 , 1 9 1 、 2 0 0 1 年 1 1 月 0 1 日 出 願 ) に 開 示 さ れ る 。

## 【 0 0 8 0 】

内因性アルブミンのシステイン - 3 4 へのインサイチュ結合について、7 . 4 ~ 7 . 6 のp H 範囲の生理的条件下でのマレイミド基の安定性は、静脈内投与および血流における循環アルブミンへの効率的な結合の基準である。

## 【 0 0 8 1 】

図1および図2に示されるように、A E - ケト - S u l f 0 7 および A E - エステル - S u l f 0 7 の両方についての加水分解に対するマレイミド部分の安定性は、U S 6 8 8 4 8 6 9 - B 2 に記載される2つの化合物、すなわち、A E - ケト - E M C H ( 式Aの化合物 ) および A E - エステル - E M C H ( 式Bの化合物 ) と比較してかなり改善している。再構成緩衝剤 ( 4 % H P C D および 5 % スクロースを含有する 5 0 m M リン酸ナトリウム p H 7 . 6 5 ) における室温で4時間のインキュベーション後、A E - ケト - E M C H の 5 . 4 % マレイミド加水分解と比較して、A E - ケト - S u l f 0 7 の 2 . 2 % マレイミドが加水分解され、同様に A E - エステル - E M C H の 1 1 . 0 % と比較して A E - エステル - S u l f 0 7 の 2 . 5 % マレイミドが加水分解された。加えて、S u l f 0 7 誘導体の活性薬学的成分 ( A P I ) 製剤は、加速分解条件 ( 例えば、最大 2 6 4 時間 5 5 ) 下で優れた安定性を示した ( 図 2 4 および 図 2 5 ) が、E M C H 誘導体のマレイミド部分は、急速に加水分解された。最小限のマレイミド加水分解は、定量的な内因性アルブ

10

20

30

40

50

ミン結合を確保するために、よって循環におけるいずれの早期遊離薬物放出も制限し、臨床効率を最大化するために、製品開発および製造に必須である。

【0082】

AE-ケト-Sulf07およびAE-エステル-Sulf07の水溶液のさらなる利点は、それらが6.8~7.5の範囲の生理的pH値を有することである。

【0083】

また、双性イオンAPIの可溶性および安定性は、Tween 80、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンなどの薬学的な承認された担体との組み合わせで使用されるとき増加し、これは薬学的組成物の製剤を促進し得る。

【0084】

AE-ケト-Sulf07およびAE-エステル-Sulf07の薬学的製剤は、血漿における非常に急速なアルブミン結合を達成した(ヒト、マウス、およびラット(図5~10))。両方の治療剤についてのアルブミンへの結合の特異性も、ヒト血漿において示された(図3~4)。

【0085】

薬学的組成物

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載される化合物を含む薬学的組成物を提供する。

【0086】

患者に投与される組成物における化合物の総量は、その患者に好適なものである。当業者であれば、異なる個体が、異なる総量の治療有効物質を必要とし得ることを理解するであろう。いくつかの実施形態では、化合物の量は、薬学的に有効な量である。当業者であれば、例えば、患者の年齢、体重、および健康状態などの因子に基づいて、患者を治療するために必要な組成物における化合物の量を決定することができるであろう。化合物の濃度は、静脈内投与溶液におけるその可溶性および投与することができる流体の体積に依存する。例えば、化合物の濃度は、注射可能な組成物における約0.1mg/mL~約50mg/mLであり得る。いくつかの実施形態では、化合物の濃度は、約0.1mg/mL~約40mg/mLの範囲であり得る。

【0087】

本開示の薬学的組成物およびキットはまた、希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤、保護剤、および当該技術分野で周知の他の材料を含有し得る。「薬学的に許容される」という用語は、活性成分(複数可)の生物学的活性の有効性に干渉しない非毒性材料を意味する。担体の特徴は、投与経路に依存するであろう。

【0088】

組成物は、様々な従来の方法で投与され得る。使用することができる例示的な投与経路は、経口、非経口、静脈内、動脈内、皮膚、皮下、筋肉内、局所、頭蓋内、眼窩内、眼内、硝子体内、心室内、嚢内、髄腔内、槽内、腹腔内、鼻腔内、エアロゾル、中枢神経系(CNS)投与、または坐剤による投与を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、非経口投与に好適である。これらの組成物は、例えば、腹腔内、静脈内、または髄腔内投与され得る。いくつかの実施形態では、組成物は、静脈内注射される。いくつかの実施形態では、再構成製剤は、例えば、アルコール、DMSO、および/またはポリエチレングリコールならびに水および/または塩緩衝剤を含む再構成液体において凍結乾燥化合物組成物を再構成することによって調製することができる。そのような再構成は、再構成液体を添加し、例えば、混合物をスワールまたはボルテックスすることによって混合することを含み得る。再構成製剤は次いで、例えば、乳酸リンゲル溶液、5%グルコース溶液、等張性食塩水、または好適な塩緩衝剤を製剤と混合して注射可能な組成物を作製することによって、注射に好適にすることができる。当業者であれば、治療有効物質製剤または組成物を投与する方法が、治療される患者の年齢、体重、および健康状態、ならびに治療される疾患または状態などの因子に依存するであろうことを理解するであろう。当業者であれば、よって、個別的に患者に最適な投与方法を選択することができるであろう。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される化合物および組成物は、癌、ウイルス疾患、自己免疫疾患、急性または慢性炎症疾患、および細菌、真菌、または他の微生物によって引き起こされる疾患の治療における使用のためのものである。

## 【 0 0 9 0 】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される化合物は、癌、ウイルス疾患、自己免疫疾患、急性または慢性炎症疾患、および細菌、真菌、または他の微生物によって引き起こされる疾患から選択される疾患を治療するための医薬品の製造において使用され得る。

## 【 0 0 9 1 】

いくつかの実施形態では、癌は、血液癌または固形腫瘍癌である。いくつかの実施形態では、癌は、癌腫、肉腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、および黒色腫から選択される。

10

## 【 0 0 9 2 】

いくつかの実施形態では、癌は、腺癌、ブドウ膜黒色腫、急性白血病、聴神経腫、膨大部癌腫、肛門癌腫、星状細胞腫、基礎細胞腫、膵臓癌、結合組織腫瘍、膀胱癌、気管支癌腫、非小細胞気管支癌腫、乳癌、パーキットリンパ腫、子宮体癌腫、CUP症候群、結腸癌、小腸の癌、卵巣癌、子宮内膜癌腫、胆嚢癌、胆嚢癌腫、子宮癌、子宮頸癌、頸部、鼻および耳腫瘍、血液学的新生物、有毛細胞白血病、尿道癌、皮膚癌、神経膠腫、精巣癌、カポジ肉腫、咽頭癌、骨癌、結腸直腸癌腫、頭頸部腫瘍、結腸癌腫、頭蓋咽頭腫、肝臓癌、白血病、肺癌、非小細胞肺癌、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、胃癌、結腸癌、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、腎臓癌、腎細胞癌腫、乏突起神経膠腫、食道癌腫、溶骨性癌腫および骨形成性癌腫、骨肉腫、卵巣癌腫、膵臓癌腫、陰茎癌、前立腺癌、舌癌、卵巣癌腫、またはリンパ腫癌である。

20

## 【 0 0 9 3 】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載される化合物と、薬学的に許容される賦形剤、担体、および/または希釈剤とを含む、キットを提供する。

## 【 0 0 9 4 】

いくつかの実施形態では、1つ以上の賦形剤が組成物に含まれ得る。当業者であれば、任意の1つの賦形剤の選択が、任意の他の賦形剤の選択に影響し得ることを理解するであろう。例えば、賦形剤の組み合わせは、望ましくない効果を生み出すので、賦形剤の選択は、1つ以上の追加の賦形剤の使用を除外し得る。当業者であれば、どの賦形剤を、もしあれば、組成物に含むべきか経験的に決定することができるであろう。賦形剤は、これらに限定されないが、共溶媒、可溶化剤、緩衝剤、pH調節剤、増量剤、界面活性剤、カプセル化剤、張性調節剤、安定化剤、保護剤、および粘度調整剤を含み得る。いくつかの実施形態では、組成物に薬学的に許容される担体を含むことが有益であり得る。

30

## 【 0 0 9 5 】

いくつかの実施形態では、可溶化剤が組成物に含まれ得る。可溶化剤は、化合物または賦形剤を含む、組成物の成分のいずれかの可溶性を増加させるために有用であり得る。本明細書に記載される可溶化剤は、完全なリストを構成することは意図されないが、単に組成物において使用され得る例示的な可溶化剤として提供される。特定の実施形態では、可溶化剤は、これらに限定されないが、エチルアルコール、tert-ブチルアルコール、ポリエチレングリコール、グリセロール、メチルパラベン、プロピルパラベン、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、シクロデキストリン、例えば、ジメチル-シクロデキストリン、ヒドロキシエチル-シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル-シクロデキストリン、およびトリメチル-シクロデキストリン、ならびにその組み合わせ、ならびにその任意の薬学的に許容される塩および/または組み合わせを含む。

40

## 【 0 0 9 6 】

組成物のpHは、製剤または組成物に所望の特性を提供する任意のpHであり得る。所望の特性は、例えば、化合物安定性、他のpH値の組成物と比較して増加した化合物保持、改善した濾過効率を含み得る。いくつかの実施形態では、組成物のpH値は、約3.0

50

～約 9.0、例えば、約 5.0～約 7.0 であり得る。特定の実施形態では、組成物の pH 値は、 $5.5 \pm 0.1$ 、 $5.6 \pm 0.1$ 、 $5.7 \pm 0.1$ 、 $5.8 \pm 0.1$ 、 $5.9 \pm 0.1$ 、 $6.0 \pm 0.1$ 、 $6.1 \pm 0.1$ 、 $6.2 \pm 0.1$ 、 $6.3 \pm 0.1$ 、 $6.4 \pm 0.1$ 、 $6.5 \pm 0.1$ 、 $6.6 \pm 0.1$ 、 $6.7 \pm 0.1$ 、 $6.8 \pm 0.1$ 、 $6.9 \pm 0.1$ 、 $7.0 \pm 0.1$ 、 $7.1 \pm 0.1$ 、および  $7.2 \pm 0.1$  であり得る。

【0097】

いくつかの実施形態では、組成物に 1 つ以上の緩衝剤を含むことによって pH を緩衝することが有益であり得る。特定の実施形態では、緩衝剤は、例えば、約 5.5、約 6.0、または約 6.5 の pKa を有し得る。当業者であれば、適切な緩衝剤が、その pKa および他の特性に基づいて組成物に含めるために選択され得ることを理解するであろう。緩衝剤は、当該技術分野において周知である。したがって、本明細書に記載される緩衝剤は、完全なリストを構成することは意図されないが、単に本開示の製剤または組成物において使用され得る例示的な緩衝剤として提供される。特定の実施形態では、緩衝剤は、これらに限定されないが、Tris、Tris-HCl、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムおよびカリウムの組み合わせ、Tris/Tris-HCl、重炭酸ナトリウム、リン酸アルギニン、塩酸アルギニン、塩酸ヒスチジン、カコジル酸塩、コハク酸塩、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、マレイン酸塩、ビス-トリス、リン酸塩、炭酸塩、ならびに任意の薬学的に許容される塩および/またはそれらの組み合わせを含む。

【0098】

いくつかの実施形態では、pH 調節剤が組成物に含まれ得る。組成物の pH を調整することは、例えば、化合物の安定性もしくは可溶性に対して有益な効果を有し得るか、または非経口投与に好適な組成物の作製において有用であり得る。pH 調節剤は、当該技術分野で周知である。したがって、本明細書に記載される pH 調節剤は、完全なリストを構成することは意図されないが、単に組成物において使用され得る例示的な pH 調節剤として提供される。pH 調節剤は、酸および塩基を含み得る。いくつかの実施形態では、pH 調節剤は、これらに限定されないが、酢酸、塩酸、リン酸、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、およびそれらの組み合わせを含む。

【0099】

いくつかの実施形態では、増量剤が組成物に含まれ得る。増量剤は、組成物に追加された体積を提供し、組成物の可視化を補助するために、特に凍結乾燥ペレットがそうでなければ見えにくい場合、凍結乾燥組成物において一般的に使用される。増量剤はまた、薬学的組成物の活性成分(複数可)の噴出防止および/または組成物の凍結保護の補助に役立ち得る。増量剤は、当該技術分野において周知である。したがって、本明細書に記載される増量剤は、完全なリストを構成することは意図されないが、単に組成物において使用され得る例示的な増量剤として提供される。

【0100】

例示的な増量剤は、炭水化物、単糖、二糖、多糖、糖アルコール、アミノ酸、および糖酸、ならびにそれらの組み合わせを含み得る。炭水化物増量剤は、これらに限定されないが、モノ-、ジ-、またはポリ-炭水化物、デンプン、アルドース、ケトース、アミノ糖、グリセルアルデヒド、アラビノース、リキソース、ペントース、リボース、キシロース、ガラクトース、グルコース、ヘキソース、イドース、マンノース、タロース、ヘプトース、グルコース、フルクトース、メチル-D-グルコピラノシド、マルトース、ラクトン、ソルボース、エリトロース、トレオース、アラビノース、アロース、アルトロース、グロース、イドース、タロース、エリトルロース、リブロース、キシルロース、プシコース、タガトース、グルコサミン、ガラクトサミン、アラビナン、フルクタン、フカン、ガラクタン、ガラクツロナン、グルカン、マンナン、キシラン、イヌリン、レバン、フコイダン、カラギーナン、ガラクトカロロース、ペクチン、アミロース、プルラン、グリコーゲン、アミロペクチン、セルロース、プスツラン、キチン、アガロース、ケラチン、コンドロイチン、デルマタン、ヒアルロン酸、キサンチンガム、スクロース、トレハロース、

10

20

30

40

50

デキストラン、およびラクトースを含む。糖アルコール増量剤は、これらに限定されないが、アルジトール、イノシトール、ソルビトール、およびマンニトールを含む。糖酸増量剤は、これらに限定されないが、アルドン酸、ウロン酸、アルダル酸、グルコン酸、イソアスコルビン酸、アスコルビン酸、グルカル酸、グルクロン酸、グルコン酸、グルカル酸、ガラクトuron酸、マンヌロン酸、ノイラミン酸、ペクチン酸、およびアルギン酸を含む。アミノ酸増量剤は、これらに限定されないが、グリシン、ヒスチジン、およびプロリンを含む。

#### 【0101】

いくつかの実施形態では、界面活性剤が組成物に含まれ得る。界面活性剤は、一般的には、液体組成物の表面張力を低減する。これは、改善した濾過しやすさなどの有益な特性を提供し得る。界面活性剤は、乳化剤および/または可溶化剤として作用し得る。界面活性剤は、当該技術分野において周知である。したがって、本明細書に記載される界面活性剤は、完全なリストを構成することは意図されないが、単に本開示の製剤または組成物において使用され得る例示的な界面活性剤として提供される。含まれ得る界面活性剤は、これらに限定されないが、ソルビタンエステル、例えば、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート20およびポリソルベート80）、リポ多糖、ポリエチレングリコール（例えば、PEG400およびPEG3000）、ポロキサマー（すなわち、ブルロニック（登録商標））、エチレンオキシドおよびポリエチレンオキシド（例えば、Triton X-100）、サポニン、リン脂質（例えば、レシチン）、およびそれらの組み合わせを含む。

#### 【0102】

いくつかの実施形態では、カプセル化剤が組成物に含まれ得る。カプセル化剤は、分子を隔離し、それらの安定化または可溶化を助けることができる。カプセル化剤は、当該技術分野において周知である。したがって、本明細書に記載されるカプセル化剤は、完全なリストを構成することは意図されないが、単に組成物において使用され得る例示的なカプセル化剤として提供される。組成物に含まれ得るカプセル化剤は、これらに限定されないが、 $\beta$ -シクロデキストリン、 $\beta$ -シクロデキストリン、 $\beta$ -シクロデキストリン、およびそれらの組み合わせ（例えば、 $\beta$ -シクロデキストリン、ジメチル- $\beta$ -シクロデキストリン、ヒドロキシエチル- $\beta$ -シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン、トリメチル- $\beta$ -シクロデキストリン、 $\beta$ -シクロデキストリン、ジメチル- $\beta$ -シクロデキストリン、ヒドロキシエチル- $\beta$ -シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン、トリメチル- $\beta$ -シクロデキストリン、 $\beta$ -シクロデキストリン、ジメチル- $\beta$ -シクロデキストリン、ヒドロキシエチル- $\beta$ -シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン、トリメチル- $\beta$ -シクロデキストリン、およびそれらの組み合わせを含む。

#### 【0103】

いくつかの実施形態では、張性調節剤が組成物に含まれ得る。液体組成物の張性は、例えば、非経口投与によって、組成物を患者に投与するとき、重要な考慮点である。張性調節剤は、よって、投与に好適な組成物の作製を助けるために使用され得る。張性調節剤は、当該技術分野において周知である。したがって、本明細書に記載される張性調節剤は、完全なリストを構成することは意図されないが、単に組成物において使用され得る例示的な張性調節剤として提供される。張性調節剤は、イオン性または非イオン性であり得、これらに限定されないが、無機塩、アミノ酸、炭水化物、糖、糖アルコール、および炭水化物を含む。例示的な無機塩は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸ナトリウム、および硫酸カリウムを含み得る。例示的なアミノ酸は、グリシンである。例示的な糖は、グリセロール、プロピレングリコール、グルコース、スクロース、ラクトース、デキストロース、およびマンニトールなどの糖アルコールを含み得る。

#### 【0104】

いくつかの実施形態では、安定化剤が組成物に含まれ得る。安定化剤は、組成物における化合物の安定性を増加させるのに役立つ。これは、例えば、化合物の分解を低減または凝集を防止することによって起こり得る。理論によって縛られることを望むことなく、安

10

20

30

40

50

定性を向上させるためのメカニズムは、溶媒からの化合物の隔離、または治療有効物質の遊離ラジカル酸化を阻害することを含み得る。安定化剤は、当該技術分野において周知である。したがって、本明細書に記載される安定化剤は、完全なリストを構成することは意図されないが、単に組成物において使用され得る例示的な安定化剤として提供される。安定化剤は、これらに限定されないが、乳化剤および界面活性剤を含み得る。

#### 【0105】

いくつかの実施形態では、保護剤が組成物に含まれ得る。保護剤は、薬学的に活性な成分（例えば、治療有効物質または化合物）を望ましくない条件（例えば、凍結もしくは凍結乾燥、または酸化によって引き起こされる不安定性）から保護する薬剤である。保護剤は、例えば、凍結保護剤、溶解保護剤、および抗酸化剤を含むことができる。凍結保護剤は、組成物とその凝固点未満の温度に曝露されるとき活性薬学的成分（例えば、アントラサイクリン化合物）の効力の喪失を防止するのに有用である。例えば、凍結保護剤は、再構成凍結乾燥製剤に含まれ得、製剤は、静脈内投与のために希釈前に凍結され得る。凍結保護剤は、当該技術分野において周知である。したがって、本明細書に記載される凍結保護剤は、完全なリストを構成することは意図されないが、単に組成物において使用され得る例示的な凍結保護剤として提供される。凍結保護剤は、これらに限定されないが、溶媒、界面活性剤、カプセル化剤、安定化剤、粘度調整剤、およびそれらの組み合わせを含む。凍結保護剤は、例えば、二糖（例えば、スクロース、ラクトース、マルトース、およびトレハロース）、ポリオール（例えば、グリセロール、マンニトール、ソルビトール、およびズルシトール）、グリコール（例えば、エチレングリコール、ポリエチレングリコール、およびプロピレングリコール）を含み得る。

10

20

#### 【0106】

溶解保護剤は、凍結乾燥に供された組成物の成分を安定化するのに有用である。例えば、治療有効物質は、再構成の前に溶解保護剤で凍結乾燥され得る。溶解保護剤は、当該技術分野において周知である。したがって、本明細書に記載される溶解保護剤は、完全なリストを構成することは意図されないが、単に組成物において使用され得る例示的な溶解保護剤として提供される。溶解保護剤は、これらに限定されないが、溶媒、界面活性剤、カプセル化剤、安定化剤、粘度調整剤、およびそれらの組み合わせを含む。例示的な溶解保護剤は、例えば、糖およびポリオールであり得る。トレハロース、スクロース、デキストラン、およびヒドロキシプロピル-ベータ-シクロデキストリンは、溶解保護剤の非限定的な例である。

30

#### 【0107】

抗酸化剤は、組成物の成分の酸化を防止するのに有用である。酸化は、薬物製品の凝集または薬物製品の純度もしくはその効力への他の有害効果をもたらし得る。抗酸化剤は、当該技術分野において周知である。したがって、本明細書に記載される抗酸化剤は、完全なリストを構成することは意図されないが、単に組成物において使用され得る例示的な抗酸化剤として提供される。抗酸化剤は、例えば、アスコルビン酸ナトリウム、クエン酸塩、チオール、メタ重亜硫酸塩、およびそれらの組み合わせであり得る。

#### 【0108】

いくつかの実施形態では、粘度調整剤が組成物に含まれ得る。粘度調整剤は、液体組成物の粘度を変化させる。これは、粘度が液体組成物の濾過しやすさにおいて重要な役割を果たすので、有益であり得る。組成物は、凍結乾燥および再構成前、または再構成後に濾過され得る。粘度調整剤は、当該技術分野において周知である。したがって、本明細書に記載される粘度調整剤は、完全なリストを構成することは意図されないが、単に組成物において使用され得る例示的な粘度調整剤として提供される。粘度調整剤は、溶媒、可溶性剤、界面活性剤、およびカプセル化剤を含む。組成物に含まれ得る例示的な粘度調整剤は、これらに限定されないが、N-アセチル-DL-トリプトファンおよびN-アセチル-システインを含む。

40

#### 【0109】

ヒト腫瘍異種移植マウスモデルにおける抗腫瘍活性

50

アルブミン結合プロドラッグAE-ケト-Sulf07およびAE-エステル-Sulf07は、腫瘍細胞株において例外的な抗腫瘍活性を示し、遊離薬物AE-ケトおよびAE-エステルのIC<sub>50</sub>は、ピコモル範囲（それぞれ、259および339 pM、親化合物AEの130 pMのIC<sub>50</sub>に相当、実施例4参照）であり、ヌードマウスにおけるいくつかのヒト腫瘍異種移植モデルにおいて、評価された全てのヒト腫瘍異種移植において部分および完全寛解を誘発した（図13～23の例を参照されたい）。これは、約130～170 mm<sup>3</sup>の範囲の出発体積を有する小腫瘍およびまた最大約380 mm<sup>3</sup>の出発体積を有する大腫瘍を含んだ。さらに、ほとんどの症例では、アルブミン結合プロドラッグAE-ケト-Sulf07およびAE-エステル-Sulf07での療方は、長期寛解および相対腫瘍体積（RTV）の減少を誘発した。親化合物オーリスタチンE（AE）は、試験されたモデルにおいて主に不活性であるか、または限界腫瘍阻害のみを示した。腫瘍担持マウスモデルにおける実験手順および結果は、実施例5および図13～23に詳細に記載される。

10

## 【0110】

## 治療方法

本明細書に記載される化合物および組成物は、様々な臨床応用に有用である。

## 【0111】

本明細書に記載される化合物および組成物は、腫瘍成長の延長または長期阻害を誘発することができる。特定の実施形態では、腫瘍成長の延長または長期阻害は、体重のいかなる減少もなく、骨髄毒性も全くないか、ほんのわずかである。

20

## 【0112】

いくつかの実施形態では、本開示は、悪性疾患を治療するための方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の本明細書に記載される化合物を含有する薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態は、癌、ウイルス疾患、自己免疫疾患、急性または慢性炎症疾患、ならびに細菌、真菌、および他の微生物によって引き起こされる疾患から選択される疾患に罹患している患者を治療するための方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の本開示による化合物を投与することを含む、方法を含む。

## 【0113】

本開示は、患者における状態または疾患を治療する方法であって、当該状態または疾患が、癌、ウイルス疾患、自己免疫疾患、急性または慢性炎症疾患、ならびに細菌、真菌、および他の微生物によって引き起こされる疾患から選択され、患者に、本明細書に記載される化合物または薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。

30

## 【0114】

いくつかの実施形態では、癌は、血液癌または固形腫瘍癌である。いくつかの実施形態では、癌は、癌腫、肉腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、または黒色腫から選択される。

## 【0115】

いくつかの実施形態では、癌は、腺癌、ブドウ膜黒色腫、急性白血病、聴神経腫、膨大部癌腫、肛門癌腫、星状細胞腫、基礎細胞腫、膵臓癌、結合組織腫瘍、膀胱癌、気管支癌腫、非小細胞気管支癌腫、乳癌、パーキットリンパ腫、子宮体癌腫、CUP症候群、結腸癌、小腸の癌、卵巣癌、子宮内膜癌腫、胆嚢癌、胆嚢癌腫、子宮癌、子宮頸癌、頸部、鼻および耳腫瘍、血液学的新生物、有毛細胞白血病、尿道癌、皮膚癌、神経膠腫、精巣癌、カボジ肉腫、咽頭癌、骨癌、結腸直腸癌腫、頭頸部腫瘍、結腸癌腫、頭蓋咽頭腫、肝臓癌、白血病、肺癌、非小細胞肺癌、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、胃癌、結腸癌、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、腎臓癌、腎細胞癌腫、乏突起神経膠腫、食道癌腫、溶骨性癌腫および骨形成性癌腫、骨肉腫、卵巣癌腫、膵臓癌腫、陰茎癌、前立腺癌、舌癌、卵巣癌腫、またはリンパ腫癌である。

40

## 【0116】

いくつかの実施形態は、本開示による化合物を投与することを含む、腫瘍における化合

50

物の代謝産物の濃度を増加させる方法を含む。

【0117】

変形および変更

本明細書に記載されるものの変形、変更、および他の実施は、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく、当業者に思いつくであろう。したがって、本開示は、先行する記載または以下の例に限定されない。

【0118】

例示

本開示の態様はここで一般的に記載され、これらは、単に本開示の特定の特徴および実施形態の例示の目的のために含まれ、限定することが意図されない、以下の例の参照によってより容易に理解されるであろう。

【0119】

等価物

当業者であれば、本明細書に記載される化合物、組成物、およびそれらの使用方法の多数の等価物を認識するか、または日常的にすぎない実験を用いて確認することができるであろう。そのような等価物は、本開示の範囲内であるとみなされる。

【実施例】

【0120】

化合物の調製および分析のための材料および方法

全ての反応は、別段に記載されない限り、窒素不活性雰囲気下で行った。市販の試薬は、別段に記載されない限り、さらなる精製なしで使用した。無水溶媒は、無水形態（ジクロロメタン、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフランなど）で購入し、全ての他の使用される溶媒は、試薬グレードまたはHPLCもしくはLCMSグレードであった。

【0121】

ガラス製品および攪拌棒は一般に、オープンにおいて110 で少なくとも12時間乾燥させ、次いで、適用可能な場合、使用前に窒素雰囲気下で冷却した。全ての他の反応は、ゴム隔膜で封止された丸底フラスコにおいて行った。液体試薬を移すために、プラスチックシリンジまたはガラスピペットを使用した。反応物は、テフロン（登録商標）コーティングされた磁気攪拌棒を用いて磁氣的に攪拌した。有機溶液は、減圧下、回転蒸発装置KNF RC 600およびHeidolph Hei-VAPを用いて濃縮した。

【0122】

フラッシュカラムクロマトグラフィーは、予め充填されたBiotage（登録商標）SNAP UltraおよびSNAP Ultra C18フラッシュシリカゲルカートリッジで、Biotage（登録商標）Isolera（商標）OneおよびBiotage（登録商標）Isolera（商標）SL（大規模）フラッシュ精製システムを用いて行った。

【0123】

溶液のpH値は、室温で、SenTix（登録商標）mic-D電極を備えたpHメーターWTW InoLab 7310を用いて測定した。

【0124】

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、SPD-M20Aフォトダイオードアレイ検出器を備えたShimadzu Nexera XR HPLCシステムを用いて行い、別段に記載されない限り、220nmで監視された。

【0125】

低分解能質量スペクトル（LRMS）は、Bruker Amazon SLまたはThermo Fisher LCQアドバンテージ分光計（エレクトロスプレーイオン化、ESI）で質量分析と組み合わせられた液体クロマトグラフィー（LCMS）を用いて収集した。高分解能質量スペクトル（HRMS）は、液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化および飛行時間質量分析計（ESI-TOF）を用いるBrukerからのm

10

20

30

40

50

i c r O T O F装置で記録した。元素分析は、C、H、およびSについてIR検出器を備え、Nについて熱伝導度検出器(TCD)を備えた、Leco TruSpec(登録商標)CHNS Macroで行った。

## 【0126】

凍結乾燥は、Martin Christ AlphaまたはEpsilon 2-4 LSCplus凍結乾燥機を用いて行った。

## 【0127】

遠心分離は、Rotor A-4-81、230V/50-60Hzを備え、冷蔵された、Eppendorf遠心分離機5810Rを用いて行った。

## 【0128】

トリフルオロ酢酸(TFA)含有量は、イオンクロマトグラフィーを用いて測定し、含水量は、Karl Fischer(KF)電量分析を用いて測定した。

## 【0129】

核磁気共鳴(NMR)スペクトルは、周囲温度で、400MHz分光計で記録した。Bruker Avance 400 Ultrashield(<sup>1</sup>Hにおいて400MHz、<sup>13</sup>Cにおいて100MHz)。プロトン化学シフトの全ての値は、百万分率( )で報告され、DMSO-d<sub>6</sub>(2.50)における重水素化プロトンが参照される。炭素化学シフトの全ての値は、百万分率( )で報告され、DMSO-d<sub>6</sub>(39.52)における炭素共鳴が参照される。NMRデータは、以下のように表される：化学シフト、多重特異性(s = 一重項、d = 二重項、t = 三重項、q = 四重項、p = 五重項、m = 多重項、br = ブロード、dd = 二重項の二重項、td = 二重項の三重項)、結合定数 = J (Hz = ヘルツ)、および統合。

## 【0130】

## HPLC方法

方法1：リンカー中間体および最終生成物Sulf07純度のためのHPLC方法。カラム：Phenomenex Kinetex Polar C18(150×4.6mm、2.6μm、100 )、勾配：移動相A：95：5酢酸アンモニウム10mM pH7.0：アセトニトリル、移動相B：95：5、アセトニトリル：酢酸アンモニウム10mM pH7.0。B相の溶出勾配：0～2.5分：0%、2.5～18分：0～45%、18～20分：45～75%、20～24分：75%、24～26分：75%～0%、26～30分：0%、30分：方法終了、流量 = 1.0mL/分。

## 【0131】

方法2：実施例2および実施例3のためのHPLC方法。カラム：Phenomenex Kinetex Polar C18(150×4.6mm、2.6μm、100 )、勾配：移動相A：95：5酢酸アンモニウム10mM pH7.0：アセトニトリル、移動相B：95：5、アセトニトリル：酢酸アンモニウム10mM pH7.0。B相の溶出勾配：0～0.5分：30%、0.5～9分：30～95%、9～11分：95%、11～12.5分：95～30%、12.5～15分：30%、15分：方法終了、流量 = 1.0mL/分。

## 【0132】

方法3：リンカー中間体および最終生成物Sulf07のためのLCMS方法。カラム：Phenomenex Kinetex Polar C18(150×2.1mm、2.6μm、100 )、勾配：移動相A：95：5酢酸アンモニウム10mM pH7.0：アセトニトリル、移動相B：95：5、アセトニトリル：酢酸アンモニウム10mM pH7.0。B相の溶出勾配：0～2.5分：0%、2.5～18分：0～45%、18～20分：45～75%、20～24分：75%、24～26分：75%～0%、26～30分：0%、30分：方法終了。流量 = 0.4mL/分。

## 【0133】

方法4：実施例2および実施例3のためのLCMS方法。カラム：Phenomenex Luna Omega Polar C18(50×2.1mm、1.6μm、100

10

20

30

40

50

)、勾配：移動相 A：99.9：0.1 水：ギ酸、移動相 B：99.9：0.1 アセトニトリル：ギ酸。B 相の溶出勾配：0～0.5 分：20%、0.5～3.5 分：20～100%、3.5～5.0 分：100%、5.0～5.5 分：100～20%、5.5～7.0 分：20%、7 分：方法終了。流量 = 0.4 mL / 分。

【0134】

方法 5：血漿結合実験のための LCMS 方法。カラム：Phenomenex Kinetex Polar C18 (50×2.1mm、2.6μm、100)、勾配：移動相 A：95：5 酢酸アンモニウム 10mM pH7.0：アセトニトリル、移動相 B：95：5、アセトニトリル：酢酸アンモニウム 10mM pH7.0。B 相の溶出勾配：0～1.0 分：0%、1.0～7.0 分：0～75%、7.0～7.5 分：75～90%、7.5～8.5 分：90～0%、8.5～10.0 分：0%、10 分：方法終了、流量 = 0.4 mL / 分。

10

【0135】

方法 6：血漿結合のための疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 方法。カラム：MabPac HIC-20 (250×4.6mm、5μm、100)、勾配：移動相 A：1.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH8.0、移動相 B：20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH8.0 および 20% イソプロパノール。B 相の溶出勾配：0～2.0 分：0%、2.0～10.0 分：0～50%、10.0～13.0 分：50～60%、13.0～17.0 分：60～100%、17.0～20.0 分：100%、20.0～25.0 分：100～0%、25.0～30.0 分：0%、30 分：方法終了、流量 = 1 mL / 分。

20

【0136】

方法 7：アルブミン薬物コンジュゲートの pH 安定性プロファイルのための HPLC 方法。カラム：Phenomenex Aeris WP C18 (250×4.6mm、3.6μm、ワイドポア)、勾配：移動相 A：20mM Tris 緩衝剤 pH8.0、移動相 B：90% アセトニトリル UHPLC および 10% 水。B 相の溶出勾配：0～0.5 分：25%、0.5～2.5 分：25～35%、2.5～16.0 分：35～85%、16.0～17.0 分：85～95%、17.0～20.0 分：95%、20.0～25.0 分：95～25%、25.0～30.0 分：25%、30 分：方法終了、流量 = 1.0 mL / 分。

30

【0137】

方法 8：API の製剤の加速分解のための HPLC 方法。カラム：Phenomenex Kinetex Polar C18 (150×4.6mm、2.6μm、100)、勾配：移動相 A：95：5 酢酸アンモニウム 10mM pH7.0：アセトニトリル、移動相 B：95：5、アセトニトリル：酢酸アンモニウム 10mM pH7.0。B 相の溶出勾配：0～2.5 分：20%、0.5～9 分：20～75%、9～11 分：75%、11～12.5 分：75～20%、12.5～15 分：20%、15 分：方法終了、流量 = 1.0 mL / 分。

【0138】

方法 9：経路 C によって調製されたリンカー中間体および最終生成物 Sulf07 純度のための HPLC 方法。カラム：Phenomenex Kinetex Polar C18 (150×4.6mm、2.6μm、100)、勾配：移動相 A：H<sub>2</sub>O 中の 0.1% トリフルオロ酢酸、移動相 B：アセトニトリル中の 0.1% トリフルオロ酢酸。B 相の溶出勾配：0～5.5 分：1%、5.5～20 分：1～40%、20～22 分：40～65%、22～24 分：65%、24～27 分：65%～1%、27～30 分：1%、30 分：方法終了、流量 = 1.0 mL / 分。

40

【0139】

方法 10：経路 C によって得られたリンカー Sulf07 から調製された AE-ケト-Sulf07 の純度のための HPLC 方法。Kinetex Polar C18 カラム (2.6μm、100、150mm×4.6mm)、勾配：移動相 A：95：5 酢酸アン

50

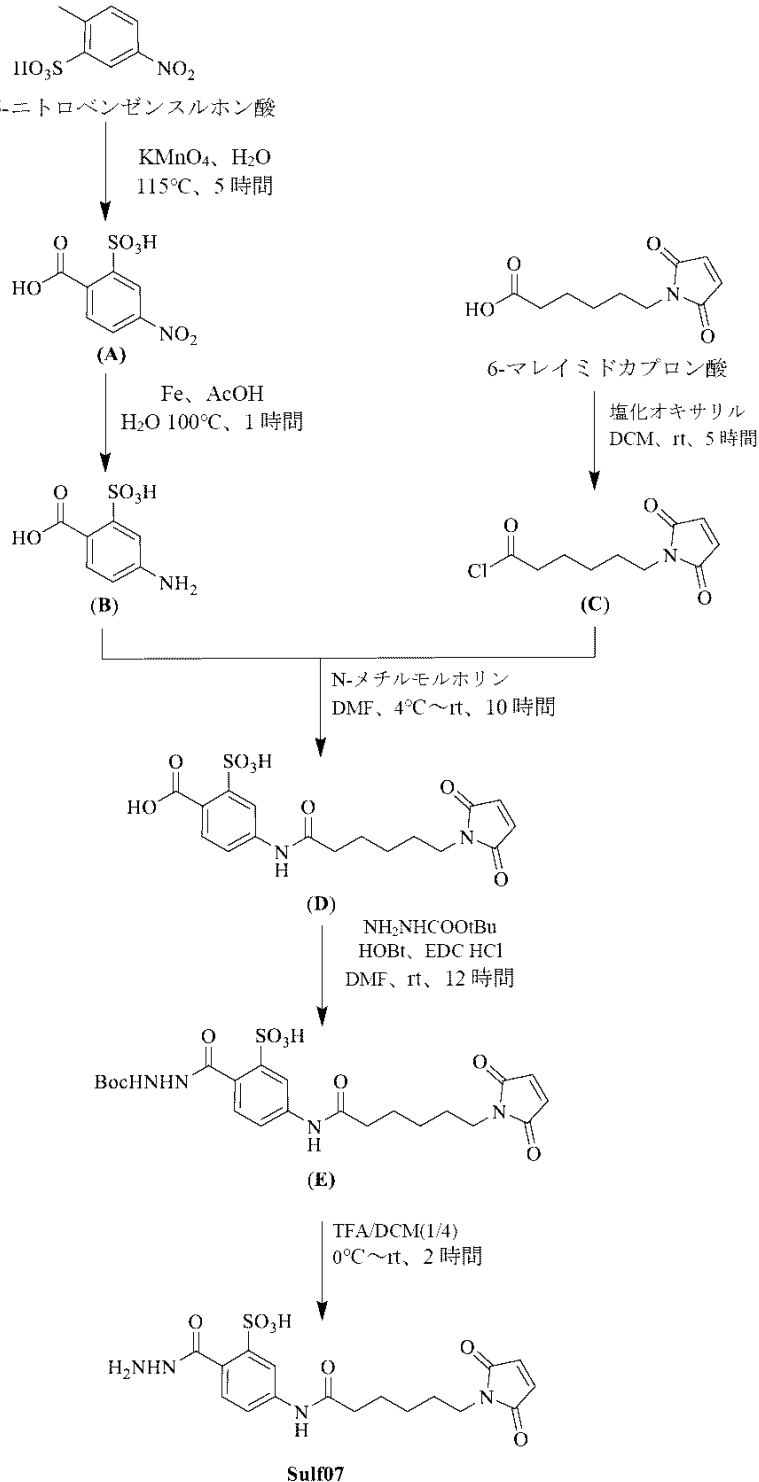
モニウム 5 mM pH 7.0 : メタノール、移動相 B : 95 : 5 メタノール : 酢酸アンモニウム 5 mM pH 7.0。B 相の溶出勾配 : 0 ~ 2.5 分 : 60%、2.5 ~ 18 分 : 60 ~ 80%、18 ~ 22 分 : 80 ~ 95%、22 ~ 26 分 : 95%、26 ~ 30 分 : 方法終了。流量 = 1.0 mL / 分。カラムオープン : 37。

【0140】

実施例 1

Sulf07、5-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサナムイド)-2-(ヒドラジン-カルボニル)-ベンゼンスルホン酸)を、経路 A に従って、以下に記載され、スキーム 1 に示されるように調製した。

【化 2 4】



10

20

30

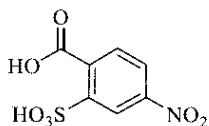
40

50

## スキーム 1、経路 A

## 4 - ニトロ - 2 - スルホ安息香酸の合成 (A)

## 【化 25】



## 【0141】

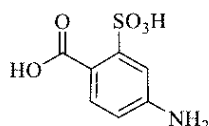
Millipore 水 (450 mL) 中の過マンガン酸カリウム (72 g、460 mmol、4.5 当量、Sigma Aldrich) の攪拌溶液に、10 秒以内に、Millipore 水 (100 mL) 中の 4 - ニトロ - 2 - スルホン酸水和物 (26 g、102 mmol、1.0 当量、Acr) の溶液を添加した。得られた紫色の混合物を、115 で 5 時間攪拌し、これは、この時間後に褐色に変わった。HPLC (方法 1、220 nm) は、反応が 5 時間後に完了したことを確認した。反応混合物を、室温まで冷却した。反応中に形成された褐色の固体を、Celite パッドでの吸引濾過を通して除去し、Millipore 水 (300 mL) で洗浄し、褐色 / 黄色の濾過溶液を 40 の減圧下で約 125 mL に濃縮し、白色の懸濁液が形成される (約 pH 1) まで 5 M の HCl 溶液でゆっくりと酸性化した。白色の懸濁液を次いで、透明な溶液が得られるまで 100 で加熱し、これを、白色の固体が形成されるまで、氷浴に 10 分間放置した。白色の固体を、フリットフィルター (ポアサイズ 4) を用いる吸引濾過によって得た。白色の固体を次いで、高真空下で 10 時間乾燥させ、A を得た。収率：18 g、72%。HPLC (方法 1、220 nm) による純度 > 95%。LRMS - ESI (m/z) C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>7</sub>S [M - H]<sup>-</sup> の計算：245.98。実測：245.83。

10

20

## 4 - アミノ - 2 - スルホ安息香酸の合成 (B)

## 【化 26】



## 【0142】

Millipore 水 (75 mL) 中の 4 - ニトロ - 2 - スルホ安息香酸 A (13 g、51 mmol、1.0 当量) の攪拌懸濁液を、完全溶解まで還流 (120) で加熱した。その温度で、酢酸 (7.2 mL、Sigma Aldrich) を添加し、続いて鉄粉 (9.5 g、180 mmol、3.5 当量、Sigma Aldrich) を少量ずつ (約 1 g / 1.0 分) 10 分かけて添加し、発熱反応を回避した。反応混合物を次いで、還流下で 1 時間攪拌しておいた。この時間中、形成された褐色の固体および HPLC 分析 (方法 1、220 nm) は、反応が完了したことを確認した。褐色の固体を、(熱いうちに) 直接 Celite パッド上での吸引濾過によって除去し、熱水 (3 x 50 mL) でさらに洗浄した。濾液を次いで、Whatman フィルターペーパー (11 μm) を通して濾過した。得られた濾液を、減圧下、50 で、約 100 mL の体積まで濃縮した。濃縮 HCl を、pH 1 が達成されるまで滴下 (約 1 mL / 2.0 分) し、白色 / 黄色の固体が沈殿した。懸濁液を、4 で 1 時間放置した。固体を、フリットフィルター (ポアサイズ 4) を用いる吸引濾過によって収集し、高真空下で 10 時間乾燥させ、B を白色の固体として得た。収率：9 g、81%。HPLC (方法 1、220 nm) による純度 > 95%。LRMS - ESI (m/z) C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>5</sub>S [M - H]<sup>-</sup> の計算：216.00。実測：216.16。

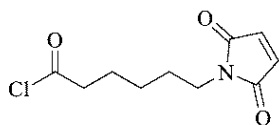
30

40

## 6 - (2,5 - ジオキソ - 2,5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) ヘキサニルクロリドまたは EMC - Cl の合成 (C)

50

## 【化27】



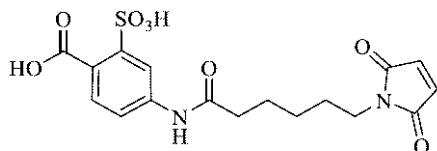
## 【0143】

室温で窒素雰囲気下の乾燥ジクロロメタン(150 mL)中の6-マレイミドカプロン酸(EMC)の攪拌溶液(33 g、156 mmol、1.0当量、Alfa Aesar)に、30分以内(約1 mL/2分)に、滴下漏斗を用いて塩化オキサリル(15 mL、171 mmol、1.1当量、Sigma Aldrich)を添加した。注意：添加プロセス中に気体発生が観察された。反応物を、室温で5時間攪拌した。反応溶液の色は、反応時間中に濃黄色に変化し、HPLC分析(方法1、220 nm)は、反応が5時間後に完了したことを確認した。溶媒を、減圧下40 で除去して、油を得、それを高真空下で乾燥させ、凝固化合物を得た。得られた淡褐色の固体を、スパチュラで粉砕し、高真空下でさらに20時間乾燥させて、Cを黄色の微結晶固体として得た。化合物を、さらなる精製なしで次の反応に使用した。収率：34 g、95%。HPLC(方法1、220 nm)による純度メチルエステルとして>95%。LRMS-ESI(m/z) C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>(メチルエステルとして)[M+H]<sup>+</sup>の計算：226.10。実測：225.97。4-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノンアミド)-2-スルホ安息香酸の合成(D)

10

20

## 【化28】



## 【0144】

B(18.5 g、85 mmol、1.0当量)を、窒素雰囲気下で無水N,N-ジメチルホルムアミド(300 mL)に溶解した。溶液を、氷浴で冷却し、10分間攪拌しておき、4 に達した。次いで、4-メチルモルホリン(18.69 mL、170 mmol、2.0当量、Sigma Aldrich)を、滴下漏斗を用いて1時間以内に冷却した溶液に滴下(約1 mL/3.5分)した。添加が完了したとき混合物は濃褐色となり、この濃褐色混合物に、1時間以内に滴下漏斗を用いて、無水N,N-ジメチルホルムアミド(200 mL)中のC(29.28 g、127 mmol、1.5当量)の溶液を滴下(約0.5 g/分)した。反応混合物を、一晚室温まで徐々に温め、次いで室温で10時間攪拌させた。HPLC(方法1、220 nm)によって示されるように反応の完全変換後、反応溶液を、8×50 mLのFalconチューブに分注し、20分間10 および4.000 rpmで遠心分離した。上清を除去し、固体を各チューブあたり10 mLのN,N-ジメチルホルムアミドに再懸濁させ、20分間10 および4.000 rpmで再度遠心分離した。全ての上清を組み合わせ、減圧下、50 で3時間濃縮して、淡橙色の固体(収率：34 g、HPLC(方法1、220 nm)による純度66%)を得た。この固体をメタノール(250 mL)に再懸濁させ、8×50 mLのFalconチューブに移し、20分間10 および4.000 rpmで遠心分離した。上清を除去し、固体を各チューブあたり5 mLのメタノールに再懸濁させ、20分間10 および4.000 rpmで再度遠心分離した。全ての固体を組み合わせ、高真空下で24時間乾燥させて、Dを結晶黄色固体として得た。収率：24 g、37%。HPLC(方法1、220 nm)による純度97%。LRMS-ESI(m/z) C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S[M-H]<sup>-</sup>の計算：409.08。実測：409.13。

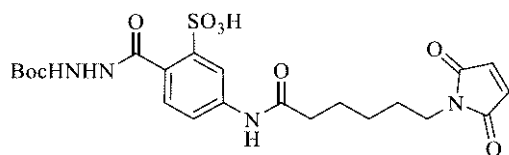
30

40

50

2 - ( 2 - ( tert - ブトキシカルボニル ) ヒドラジン - 1 - カルボニル ) - 5 - ( 6 - ( 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル ) ヘキサナムイド ) ベンゼンスルホン酸または B O C 保護リンカーの合成 ( E )

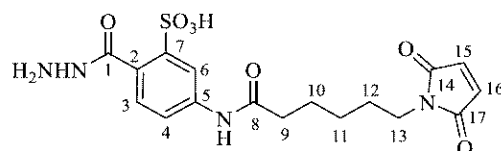
【化 2 9】



【 0 1 4 5】

窒素雰囲気下の無水 N - N - ジメチルホルムアミド ( 3 5 0 m L ) 中の D ( 1 7 g , 4 1 . 4 m m o l , 1 . 0 当量 ) の溶液に、N - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - N ' - エチルカルボジイミド - 塩酸塩 ( E D C - H C l ) ( 8 . 7 2 g , 4 5 . 5 m m o l , 1 . 1 当量、R o t h ) およびヒドロキシベンゾトリアゾール ( H O B t ) ( 6 . 1 5 g , 4 5 . 5 m m o l , 1 . 1 当量、S i g m a A l d r i c h ) を添加した。反応混合物を、3 0 分室温で撹拌しておき、次いで tert - ブチルカルバゼート ( 7 . 1 2 g , 5 3 . 9 m m o l , 1 . 3 当量、S i g m a A l d r i c h ) を添加し、溶液は、透明な黄色から赤っぽい色に変化した。反応混合物を、室温で一晩撹拌した。この時間後、反応の完全変換が H P L C ( 方法 1、2 2 0 n m ) によって確認された。溶媒を、減圧下 4 0 で、次いで高真空下、室温で 1 時間除去して、紫褐色の油を得、これを 2 つの予め充填された S N A P U l t r a 3 4 0 g カートリッジでのフラッシュ精製システムで精製した。精製を、6 0 カラム体積における 1 0 0 % ジクロロメタンから 9 0 % / 1 0 % ジクロロメタン / メタノールまでの、線形勾配システムを用いて行った。所望の生成物を含有するチューブを組み合わせ、減圧下 4 0 で 1 時間、および高真空下でさらに 6 時間乾燥させて、E を発泡性の黄色の固体として得た。収率：9 g、1 7 . 1 m m o l、4 2 %。H P L C ( 方法 1、2 2 0 n m ) > 9 5 %。L R M S - E S I ( m / z ) C 2 2 H 2 7 N 4 O 9 S [ M - H ] <sup>-</sup> の計算：5 2 3 . 1 6。実測：5 2 3 . 1 5。リンカー S u l f 0 7、5 - ( 6 - ( 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル ) ヘキサナムイド ) - 2 - ( ヒドラジンカルボニル ) ベンゼンスルホン酸の合成

【化 3 0】



【 0 1 4 6】

4 ~ 5 に冷却された、無水ジクロロメタン ( 3 0 m L ) 中の E ( 1 0 . 2 g、1 9 . 4 m m o l、1 . 0 当量 ) の黄色の溶液に、トリフルオロ酢酸 ( 1 5 m L、R o t h ) を、3 0 分以内に、滴下 ( 約 1 m L / 2 . 0 分 ) した。添加後、冷浴を除去し、反応混合物を室温で 3 時間撹拌しておいた。この時間後、反応の完了が H P L C ( 方法 1、2 2 0 n m ) によって確認された。反応混合物を、各々約 3 5 m L の冷たいジエチルエーテルを含有する、6 つの F a l c o n チューブに滴下した。白色の沈殿物が直ちに形成された。チューブを 4 で 3 時間放置した。2 0 分間 1 0 および 4 0 0 0 r p m での F a l c o n チューブの遠心分離後、上清を除去し、固体を各チューブあたり 5 m L のジエチルエーテルに再懸濁させ、再度遠心分離 ( 4 0 0 0 r p m、2 0 分、1 0 ) した。上清を再度除去し、固体を収集し、高真空下で 2 0 時間乾燥させて、リンカー S u l f 0 7 を白色の微結晶固体として得た。収率：1 0 g、2 3 . 6 m m o l、9 6 %。H P L C ( 方法 1、2 2 0 n m ) > 9 5 %。L R M S - E S I ( m / z ) C 1 7 H 2 1 N 4 O 7 S [ M + H ] <sup>+</sup> の計算：4 2 5 . 1 1。実測：4 2 5 . 0 7。L R M S - E S I ( m / z ) C 1 7 H 1 9 N 4

10

20

30

40

50

$O_7S[M-H]^-$  の計算：423.11。実測：423.12。HRMS-ESI ( $m/z$ )  $C_{17}H_{21}N_4O_7S[M+H]^+$  の計算：425.1125。実測：425.1125。LRMS-ESI ( $m/z$ )  $C_{17}H_{19}N_4O_7S[M-H]^-$  の計算：423.0978。実測：423.0980。

【0147】

5-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサ  
ンアミド)-2-(ヒドラジン-カルボニル)ベンゼンスルホン酸、Sulf07の構造  
を、 $^1H$  NMRによって確認した： $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ) 1  
1.94 (s, 1H, C1-NH)、10.27 (s, 1H, C8-NH)、8.01 (d,  $J=2.2$  Hz, 1H, C4-CH)、7.93 (dd,  $J=8.5, 2.2$  Hz, 1H, C6-CH)、7.68 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H, C7-CH)、7.00 (s, 2H, C15-CH, C16-CH)、3.40 (t,  $J=7.0$  Hz, 2H, C13-CH<sub>2</sub>)、2.32 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H, C9-CH<sub>2</sub>)、1.60 (p,  $J=7.5$  Hz, 2H, C10-CH<sub>2</sub>)、1.52 (p,  $J=7.2$  Hz, 2H, C12-CH<sub>2</sub>)、1.26 (q,  $J=8.8$  Hz, 2H, C11-CH<sub>2</sub>)、 $^{13}C$  NMR (101MHz, DMSO- $d_6$ ) 172.20 (C8)、171.54 (C14, C17)、167.59 (C1)、145.73 (C5)、142.09 (C3)、134.90 (C15, C16)、132.09 (C7)、123.79 (C2)、119.44 (C6)、117.47 (C4)、37.42 (C13)、36.65 (C9)、28.22 (C12)、26.21 (C11)、24.90 (C10)。元素分析  $C_{17}H_{21}N_4O_7S$  の計算、C、45.71、H、4.26、N、11.85、S、6.78。実測：C、46.2917、H、4.4836、N、12.8879、S、6.7886。TFA含有量 < 2% (重量/重量)。

【0148】

Sulf07、5-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサ  
ンアミド)-2-(ヒドラジン-カルボニル)ベンゼンスルホン酸を、  
経路Bに従って、以下に記載され、スキーム2に示されるように調製した。

10

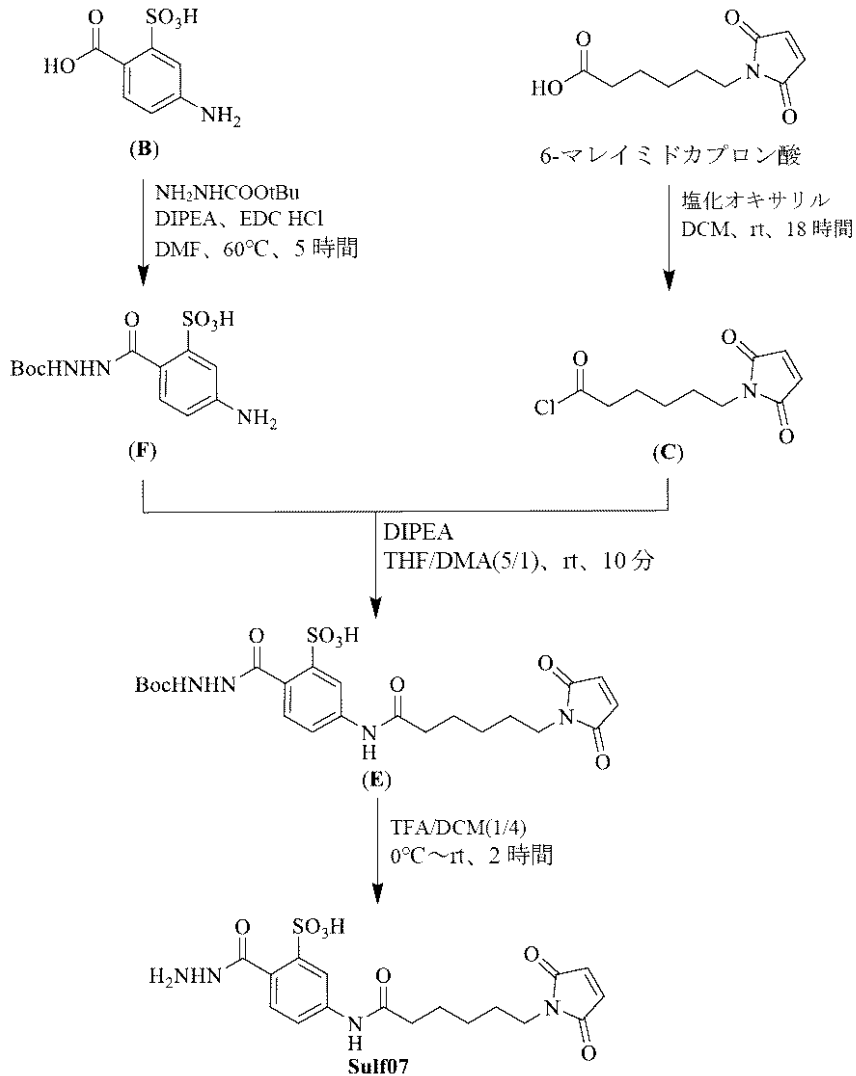
20

30

40

50

## 【化 3 1】



10

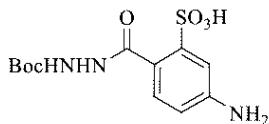
20

30

## スキーム 2、経路 B

5 - アミノ - 2 - ( 2 - ( tert - ブトキシカルボニル ) ヒドラジン - 1 - カルボニル )  
 ) ベンゼンスルホン酸の合成 ( F )

## 【化 3 2】



40

## 【 0 1 4 9 】

無水N, N - ジメチルホルムアミド ( DMF、1000 mL ) 中の4 - アミノ - 2 - スルホ安息香酸 B ( 50.00 g、230.20 mmol、1.00 当量 ) の懸濁液に、N, N - ジイソプロピルエチルアミン ( DIPEA、40.20 mL、29.75 g、230.20 mmol、1.00 当量 ) を5分かけて添加した。EDC - HCl ( 48.54 mg、253.21 mmol、1.10 当量 ) を次いで添加し、混合物を23 で30分間攪拌した。tert - ブチルカルバゼート ( 33.46 g、253.18 mmol、1.10 当量 ) を次いで添加し、混合物を70 まで加熱し、2時間攪拌した。EDC - HCl ( 24.31 g、126.68 mmol、0.55 当量 ) およびtert - ブチルカルバゼート ( 16.76 mg、126.68 mmol、0.55 当量 ) の第2の部分添

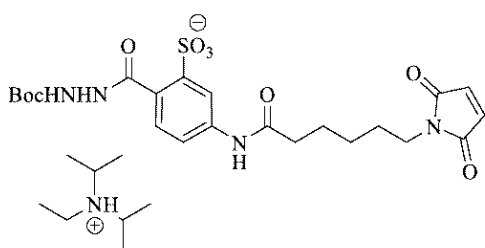
50

加し、反応混合物を70℃で14時間さらに撹拌した。反応物を、23℃まで冷却し、Celite（登録商標）545（100g）を通して濾過した。Celite（登録商標）545を700mLのメタノールでさらに洗浄した。濾液を減圧下で濃縮し、7つの予め充填されたSNAP Ultra 340gカートリッジを用いるフラッシュ精製システムによって精製した。精製を、100%ジクロロメタンから70%ジクロロメタン/30%メタノールまでの、線形勾配システムを用いて行って、表題化合物Fを白色の固体として得た。収率：32.50g、98.09mmol、42.6%、HPLC（方法1、220nm）>97%。LRMS-ESI（m/z） $C_{12}H_{16}N_3O_6S[M-H]^{-}$ の計算：330.08。実測：330.17。

N-エチル-N-イソプロピルプロパン-2-アミニウム2-(2-(tert-ブトキシ-カルボニル)ヒドラジン-1-カルボニル)-5-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)ベンゼンスルホン酸塩の合成(E)

10

## 【化33】



20

## 【0150】

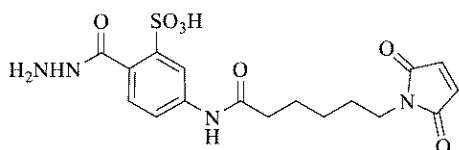
無水ジメチルアセトアミド（110mL）および無水テトラヒドロフラン（THF、275mL）の混合物中のF（26.97g、81.40mmol、1.00当量）の溶液に、無水テトラヒドロフラン（165mL）中の6-マレイミドカプロン酸塩化物C（26.60g、115.82mmol、1.42当量）の溶液を、一度に室温で添加した。透明な反応溶液を、室温で10分間撹拌した。反応混合物を次いで、各々ジイソプロピルエーテル（1100mL）およびDIPEA（10.15mL）を含有する、2つの2Lコニカルフラスコに撹拌しながら添加した。油が沈殿したら、上清を注意深く捨て、油をジイソプロピルエーテル（2×100mL）で洗浄し、メタノールに溶解し、組み合わせ、溶媒を高真空下で除去した。得られた油を、6つの予め充填されたSNAP Ultra 340gカートリッジを用いるフラッシュ精製システムによって精製した。精製を、100%ジクロロメタンから80%ジクロロメタン/20%メタノールまでの、線形勾配システムを用いて行って、表題化合物Eを白色の固体として得た。収率：24.00g、36.71mmol、45.1%、HPLC（方法1、220nm）>95%。LRMS-ESI（m/z） $C_{22}H_{27}N_4O_9S[M-H]^{-}$ の計算：523.15。実測：523.30。

30

5-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)-2-(ヒドラジン-カルボニル)ベンゼンスルホン酸(Sulf07)の合成

40

## 【化34】



## 【0151】

ジクロロメタン（150mL）中のE（21.00g、32.12mmol、1.00当量）の冷たい溶液（4℃）に、トリフルオロ酢酸（25.00mL、37.25g、3

50

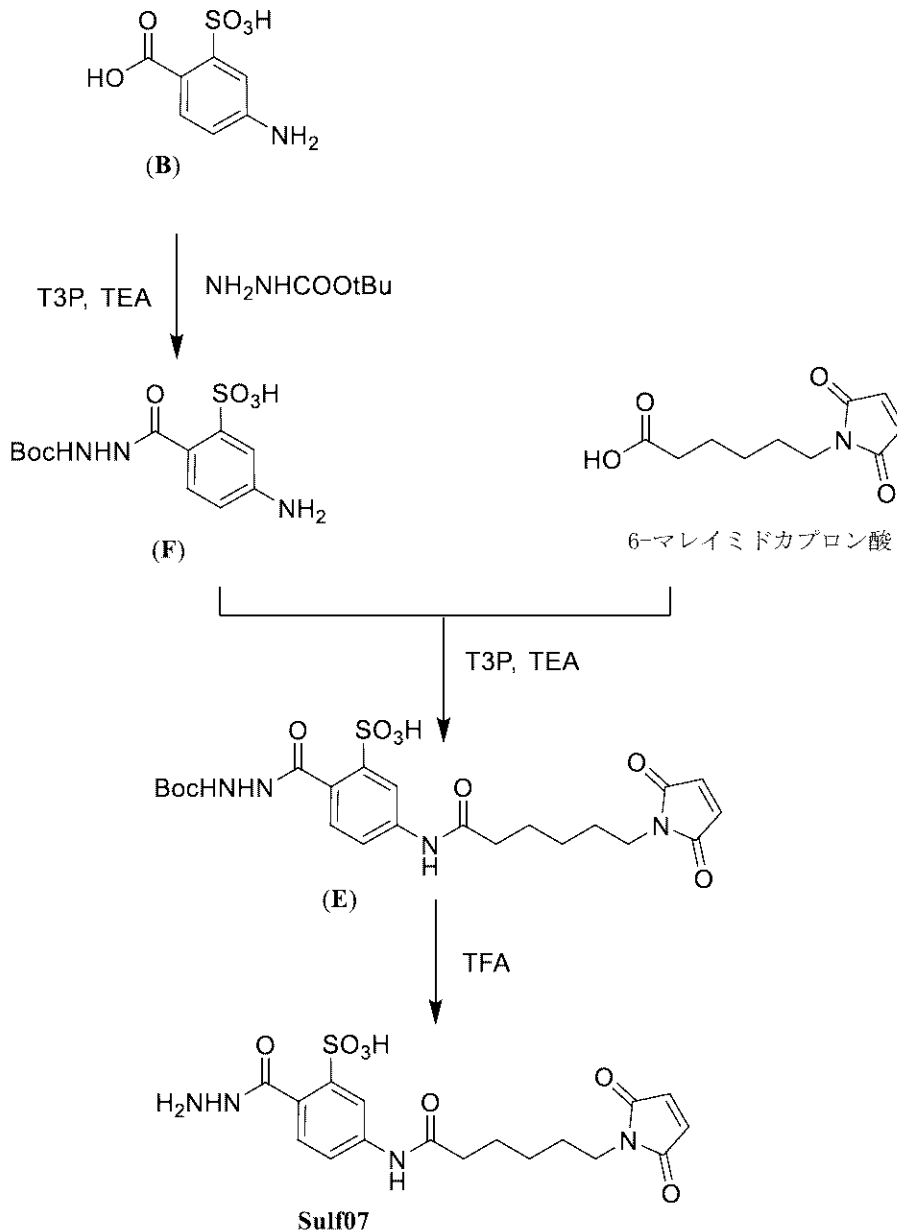
26.70 mmol、10.17 当量) を 1 時間かけて添加した。反応物を次いで、徐々に (30 分かけて) 室温まで温め、1 時間攪拌した。反応混合物を、分液漏斗を介して 1 時間かけて、0 のジイソプロピルエーテル (1.4 L) を含有する 2 L コニカルフラスコに滴下した。得られた白色の固体を、4 多孔性フリット漏斗を通して濾過し、ジクロロメタン (2 × 1000 mL) およびジイソプロピルエーテル (2 × 1000 mL) で連続して洗浄した。固体を、フリット漏斗で一晩室温で乾燥させておいた。さらなる乾燥を、高真空、25 で 2 時間行った。最終生成物 Sulf07 を、白色の固体として得た。収率: 13.58 g、32.00 mmol、99.6%、HPLC (方法 1、220 nm) > 96%。LRMS-ESI (m/z) C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S [M-H]<sup>-</sup> の計算: 423.10。実測: 423.21。

10

【0152】

Sulf07、5-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサナムイド)-2-(ヒドラジン-カルボニル)ベンゼンスルホン酸を、経路 C に従って、以下に記載され、スキーム 2 に示されるように調製した。

【化35】



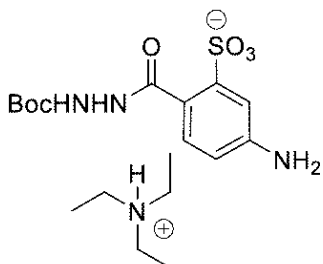
20

30

40

5 - アミノ - 2 - ( 2 - ( tert - ブトキシカルボニル ) ヒドラジン - 1 - カルボニル )  
ベンゼンスルホン酸の合成 ( F )

【化 3 6】



10

【 0 1 5 3 】

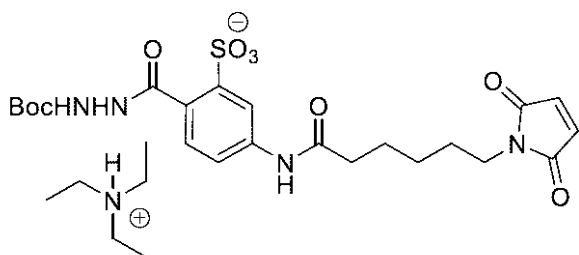
無水アセトニトリル ( 6 0 0 m L ) 中の B ( 3 0 . 0 0 g 、 1 3 8 . 1 2 m m o l 、 1 . 0 0 当量 ) の懸濁液に、トリエチルアミン ( 4 1 . 9 3 g 、 5 7 . 7 6 m L 、 4 1 4 . 3 7 m m o l 、 3 . 0 0 当量 ) を添加し、混合物を 1 0 分間攪拌した。その後、tert - ブチルカルバゼート ( 2 7 . 3 8 g 、 2 0 7 . 1 9 m m o l 、 1 . 5 0 当量 ) を添加し、混合物を - 3 5 °C まで冷却した。この温度で、プロピルホスホン酸無水物溶液、T 3 P ( 1 1 4 . 2 7 g 、 1 0 6 . 7 9 m L 、 1 7 9 . 5 6 m m o l 、 酢酸エチル中の 5 0 % s o l . 、 1 . 3 当量 ) を 1 時間かけて滴下した。反応物を、- 3 5 °C で 2 時間攪拌した。混合物を、室温まで温め、Celite (登録商標) 5 4 5 ( 1 0 0 g ) を通して濾過した。Celite (登録商標) を、アセトニトリル ( 5 0 0 m L ) でさらに洗浄した。両方の濾液を組み合わせ、2 5 0 m L に濃縮した。溶液を 6 つの部分に等しく分割し、溶媒を減圧下で除去した。各部分を、1 % Et<sub>3</sub>N を含有するジクロロメタン ( 5 0 m L ) に溶解し、Biotage Isolera (商標) One Flash Purification System で、予め充填された SNAP Ultra 3 4 0 g カラムでの、7 のカラム体積にかけて DCM ( 1 % NEt<sub>3</sub> 含有 ) 中の 2 % から 1 2 % までのメタノール ( 1 % NEt<sub>3</sub> 含有 ) の段階的な勾配を用いる、NP フラッシュクロマトグラフィーによって精製した。次いで、全ての部分からの精製画分を組み合わせ、溶媒を減圧下で除去し、固体を高真空下で乾燥させて、表題化合物 F をオフホワイト色の固体として得た。収率：5 3 . 2 5 g 、 1 0 8 . 0 m m o l 、 7 8 . 2 % ( DMSO - d<sub>6</sub> における NMR は 1 . 6 当量 トリエチルアミンの存在を示した ) 。HPLC (方法 9、2 2 0 n m ) > 9 9 % 。LRMS - ESI ( m / z ) C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S [ M - H ]<sup>-</sup> の計算：3 3 0 . 0 8 。実測：3 3 0 . 0 8 。

20

30

N - エチル - N - イソプロピルプロパン - 2 - アミノウム 2 - ( 2 - ( tert - ブトキシ - カルボニル ) ヒドラジン - 1 - カルボニル ) - 5 - ( 6 - ( 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - ) ヘキサナムイド ) ベンゼンスルホン酸塩の合成 ( E )

【化 3 7】



40

【 0 1 5 4 】

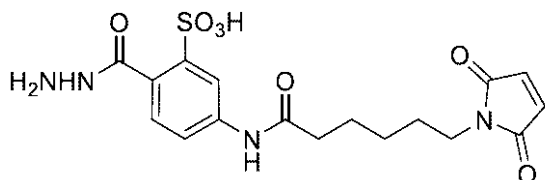
F ( 4 5 . 0 0 g 、 9 1 . 2 4 m m o l 、 1 . 0 0 当量 ) および 6 - マレイミドカプロン酸 ( 1 9 . 2 7 g 、 9 1 . 2 4 m m o l 、 1 . 0 0 当量 ) の混合物に、アセトニトリル

50

(450 mL)、トリエチルアミン(13.85 g、19.08 mL、136.86 mmol)およびT3P(43.55 g、40.70 mL、136.86 mmol、酢酸エチル中の50% sol.)を一度に室温で添加した。溶液を、室温で24時間撹拌した。溶媒を、減圧下で除去した。粗生成物を次いで、ジクロロメタン中の2%メタノールから15%メタノールまでの線形勾配を形成する7つの予め充填されたSNAP Ultra 340 gカートリッジを用いるフラッシュ精製システムによって精製して、表題化合物Eをオフホワイト色の固体として得た。収率：30.55 g、53.5% (DMSO-d<sub>6</sub>におけるNMRは1.1当量のトリエチルアミンの存在を示した)。HPLC(方法9、220 nm) > 99%。LRMS-ESI(m/z) C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S [M-H]<sup>-</sup>の計算：523.15。実測：523.26。

10

5-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)-2-(ヒドラジン-カルボニル)ベンゼンスルホン酸(Sulf07)の合成【化38】



## 【0155】

20

ジクロロメタン(50 mL)中のE(10.00 g、15.98 mmol、1.00当量)の冷たい懸濁液(4)に、トリフルオロ酢酸(18.22 g、12.31 mL、159.81 mmol、10.17当量)を15分かけて添加した。混合物を4で15分間さらに撹拌し、次いで室温まで徐々に温め、150分間撹拌した。反応混合物を、分液漏斗を介して、メチルtert-ブチルエーテル、MTBE、(400 mL)、およびジクロロメタン(200 mL)の撹拌溶液に滴下した。得られた白色の固体を、4A多孔性フリット漏斗を通して濾過し、ジクロロメタン(2×150 mL)およびMTBE(1×50 mL)、MeOH(1×50 mL)、ならびに再度MTBE(2×150 mL)で連続して洗浄した。固体を、フリット漏斗で一晩室温で10分間乾燥させておいた。さらなる乾燥を、高真空、25で18時間行った。最終生成物Sulf07を、黄色の固体として得た。収率：5.786 g、13.63 mmol、98.7%、HPLC(方法9、220 nm) > 96%。LRMS-ESI(m/z) C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S [M-H]<sup>-</sup>の計算：423.10。実測：422.95。

30

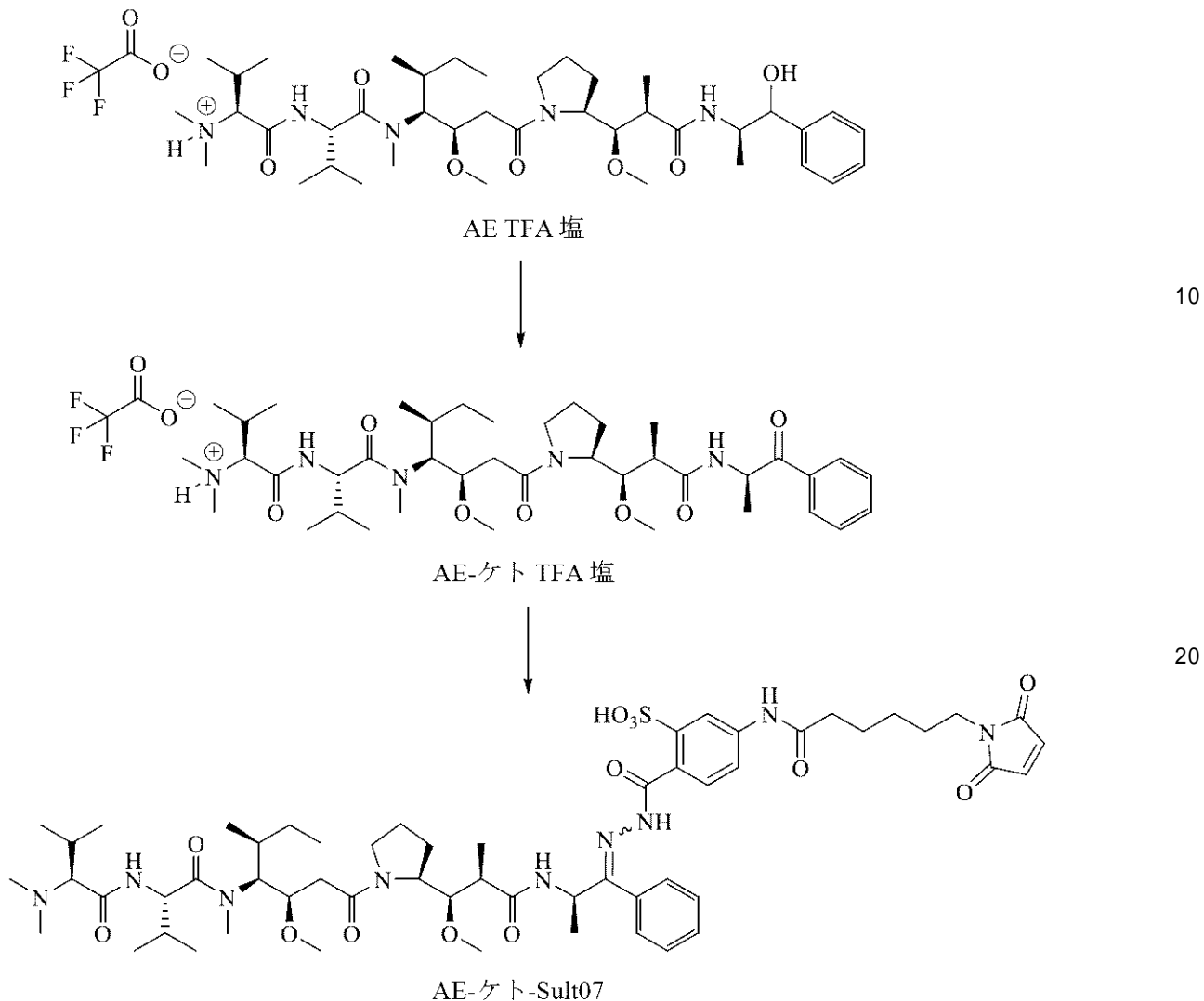
## 【0156】

## 実施例2

化合物AE-ケト-Sulf07、2-(2-((R)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(ジメチルアミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-1-フェニルプロピリデン)ヒドラジン-1-カルボニル)-5-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)ベンゼンスルホン酸を、以下に記載され、スキーム5に示されるように合成した。

40

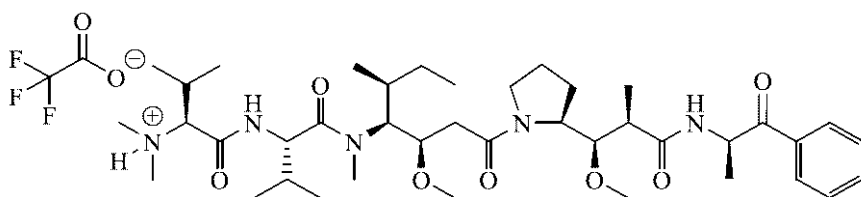
## 【化 3 9】



## スキーム 5

(S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-((S)-2-((1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキシ-3-((R)-1-オキシ-1-フェニルプロパン-2-イル)アミノ)プロピル)ピロリジン-1-イル)-5-メチル-1-オキシヘプタン-4-イル)(メチル)アミノ)-3-メチル-1-オキシブタン-2-イル)アミノ)-N,N,3-トリメチル-1-オキシブタン-2-アミニウム 2,2,2-トリフルオロ酢酸塩 (AE-ケトTFA塩) の合成

## 【化 4 0】



## 【0157】

経路 A：特許 US 6884869 - B2 の改善した手順による合成

クロロクロム酸ピリジニウム (PCC) (382 mg、1.772 mmol、1.5 当量

50

、Sigma Aldrich)を、無水ジクロロメタン(30 mL)中のオーリスタチンE TFA塩(1000 mg、1.183 mmol、Levena Biopharma)の溶液に窒素雰囲気下で添加した。反応混合物を、室温で17時間攪拌した。LC-MS(方法4、ポジティブモード)は、出発材料の完全変換を示した。反応混合物を、25 mLのジクロロメタンで希釈し、ブライン(3 x 20 mL)で洗浄した。水相を、1回ジクロロメタン(20 mL)で抽出した。組み合わせられた有機相を、減圧下40 °Cで蒸発させた。残留物を7.5 mLのアセトニトリルに溶解し、16のカラム体積にわたる水(+0.1% TFA)中の2%から40%までのアセトニトリル(+0.1% TFA)の段階的勾配を用いて、予め充填されたSNAP Ultra C18 30 gカートリッジでのRPフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。純粋の生成物画分をプールし、アセトニトリルを減圧下40 °Cで除去し、残留溶媒を凍結乾燥して、白色の固体を得た。収率：530 mg、53%。RP-HPLC(方法2、220 nm)：>95%。LRMS-E SI(m/z) C<sub>40</sub>H<sub>68</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>[M+H]<sup>+</sup>の計算：730.51。実測：730.34。

10

【0158】

経路B：ポリマー結合酸化剤を用いる合成

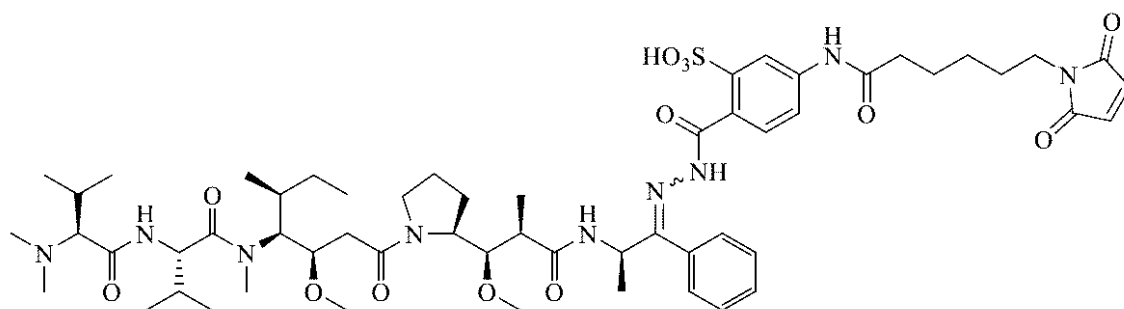
IBX-ポリスチレン(1.13 g、4.5 eq、1.34 mmol、装填1.18 mmol/g、Merck Novabiochem)を、無水ジクロロメタン(7.5 mL)に懸濁させ、15分間室温で穏やかに攪拌した。無水ジクロロメタン(5 mL)に溶解したAE TFA塩(250 mg、295.51 μmol、Sage Chemical Co.)を添加し、混合物を穏やかに室温で攪拌した。21時間後、出発材料の生成物への完全変換がHPLC(方法2、220 nm)によって観察された。樹脂を、折り畳んだフィルターペーパー(グレード3hw、Sartorius)での濾過によって除去し、ジクロロメタンで洗浄し、組み合わせられた濾液を減圧下40 °Cで乾燥状態まで蒸発させた。油性残留物をジエチルエーテルで滴定し、オフホワイト色の沈殿物を形成し、これを高真空下で乾燥させ、発泡性のオフホワイト色の固体を得た。収率：171 mg、69%、HPLC(方法2、220 nm)>99%。LRMS-E SI(m/z) C<sub>40</sub>H<sub>68</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>[M+H]<sup>+</sup>の計算：730.51。実測：730.69、C<sub>40</sub>H<sub>66</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>[M-H]<sup>-</sup>の計算：728.50。実測：728.79。

20

2-(2-(2-(R)-2-(2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(ジメチルアミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-1-フェニルプロピリデン)ヒドラジン-1-カルボニル)-5-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)ベンゼンスルホン酸(AE-ケト-Sulf07)の合成

30

【化41】



40

【0159】

合成1：窒素下で、AE-ケトTFA塩(200 mg、236.96 μmol)を、無水エタノール(6 mL)に溶解し、続いて分子篩(0.3 nmサイズ、3 )を添加した。無水ジメチルスルホキシド(1.5 mL)に溶解したSulf07(201 mg、47

50

3.92  $\mu\text{mol}$ 、2当量)を添加した。黄色の溶液を、室温で撹拌した。HPLC/LC-MS分析(方法2および4、220 nm)のための試料を、24および44時間後に採取した。変換(44時間後85%)後、混合物を、0.2  $\mu\text{m}$  PVDFシリンジフィルターを通して濾過し、エタノールのほとんどを減圧下で除去した。3 mLの200 mMリン酸ナトリウムpH 7.2を、溶液のpHが約6になるまで滴下した。溶液(約5 mL)を、16のカラム体積にわたる水中の2%から50%までのアセトニトリルの段階的勾配を用いて、予め充填されたSNAP Ultra C18 30 gカートリッジでのRPフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。生成物画分をHPLC(方法2、220 nm)によって分析し、純粋な画分を組み合わせ、アセトニトリルを減圧下で除去し、残留溶液を凍結乾燥させて、オフホワイト色の飛散性固体を得た。収率: 113 mg、42%、融点: >105。HPLC(方法2、220 nm) >95%。LRMS-ESI(m/z)  $\text{C}_{57}\text{H}_{86}\text{N}_9\text{O}_{13}[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算: 1136.61。実測: 1136.76、 $\text{C}_{57}\text{H}_{84}\text{N}_9\text{O}_{13}[\text{M}-\text{H}]^-$ の計算: 1134.59。実測: 1135.09。 $^1\text{H}$  NMR(400 MHz、DMSO- $d_6$ ) 11.21(2xs、1H)、10.09(2xs、1H)、8.66(d、J=8.3 Hz、1H)、8.20(2xd、J=8.4 Hz、1H)、7.84-7.69(m、2H)、7.50-7.41(m、1H)、7.35-7.21(m、5H)、6.98(s、2H)、4.96-4.84(m、1H)、4.77-4.60(m、1H)、4.56(td、J=8.6、2.2 Hz、1H)、4.03-3.92(m、1H)、3.61-3.52(m、1H)、3.51-3.41(m、2H)、3.38(t、J=7.0 Hz、2H)、3.35-3.32(m、1H)、3.20(m、7H)、3.02(2xs、3H)、2.61(2xs、6H)、2.47-2.37(m、1H)、2.26(t、J=7.4 Hz、2H)、2.22-2.04(m、3H)、2.04-1.91(m、1H)、1.88-1.63(m、3H)、1.62-1.43(m、7H)、1.37-1.27(m、4H)、1.27-1.19(m、2H)、1.06(d、J=6.6 Hz、2H)、0.98(d、J=6.6 Hz、1H)、0.96-0.88(m、8H)、0.87-0.81(m、5H)、0.80-0.73(m、5H)。 $^{13}\text{C}$  NMR(101 MHz、DMSO- $d_6$ ) 172.67、172.38、172.26、171.47、171.45、171.13、171.10、168.76、168.52、166.64、166.23、164.82、164.61、156.63、155.75、144.76、144.68、140.27、140.14、134.46、133.00、131.89、131.79、128.78、128.56、128.40、128.31、127.66、127.61、127.10、120.25、118.66、118.56、116.47、116.34、85.45、81.38、77.69、76.74、71.91、60.94、60.20、58.57、58.16、57.05、55.07、54.48、54.39、49.25、48.86、47.18、46.24、43.58、43.12、41.50、41.44、37.15、36.96、36.15、35.01、31.83、31.57、30.04、29.94、27.77、26.68、26.64、25.76、25.39、25.27、24.52、24.50、24.29、23.17、19.30、19.28、18.85、18.62、18.57、18.48、18.20、17.17、16.92、15.58、15.51、15.23、14.96、10.43、10.25。注記:いくつかの $^1\text{H}$ -NMRシグナルは、溶液における配座異性体の存在のために2つの異なるシグナルに分けられる。この理由で、 $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルにおけるピークの数、AE-ケト-Sulf07について予想される炭素の数よりも高い。

## 【0160】

合成2:窒素下の25 mL丸底フラスコにおいて、AE-ケト(150 mg、0.177 mmol、1.0当量)および経路Cから得られたSulf07(93 mg、0.213 mmol、1.2当量)を、無水EtOH(225  $\mu\text{L}$ )および無水DMSO(225  $\mu\text{L}$ )の混合物に溶解した。完全溶解は、室温での5分の超音波処理後に達成された。活

10

20

30

40

50

性化分子篩を添加し、得られた黄色の懸濁液を室温で攪拌し、進行をHPLC分析によって確認した。22時間後、反応混合物を2mLエッペンドルフチューブに移し、反応バイアルを2回600 $\mu$ LのDMSO-EtOH(1:1)で洗浄し、組み合わされた部分を遠心分離した。固体を上清から分離した。生成物を、45 $\mu$ LのMTBEの上清への添加によって沈殿させた。白色の懸濁液を遠心分離し、得られた上清を廃棄した。標的化合物の精製を、2%~50%水/アセトニトリルの勾配を形成するAQ C18球形20-35 $\mu$ m 100A 40grカートリッジを備えたIsolera One System (Biotage AB、Uppsala、Sweden)で行った。凍結乾燥後、表題化合物を、オフホワイト色の固体として得た。収率80mg、40%。HPLC(方法10、220nm)>97%。以前の報告に従ったNMRおよびLC-MS分析。

10

【0161】

## 実施例3

化合物AE-エステル-Sulf07、2-(2-(1-(4-(((1S,2R)-2-(((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4R,5S)-4-((S)-2-((R)-2-(ジメチルアミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-1-フェニルプロポキシ)カルボニル)フェニル)エチリデン)ヒドラジン-1-カルボニル)-5-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサナムド)ベンゼンスルホン酸を、以下に記載され、スキーム6に示されるように合成した。

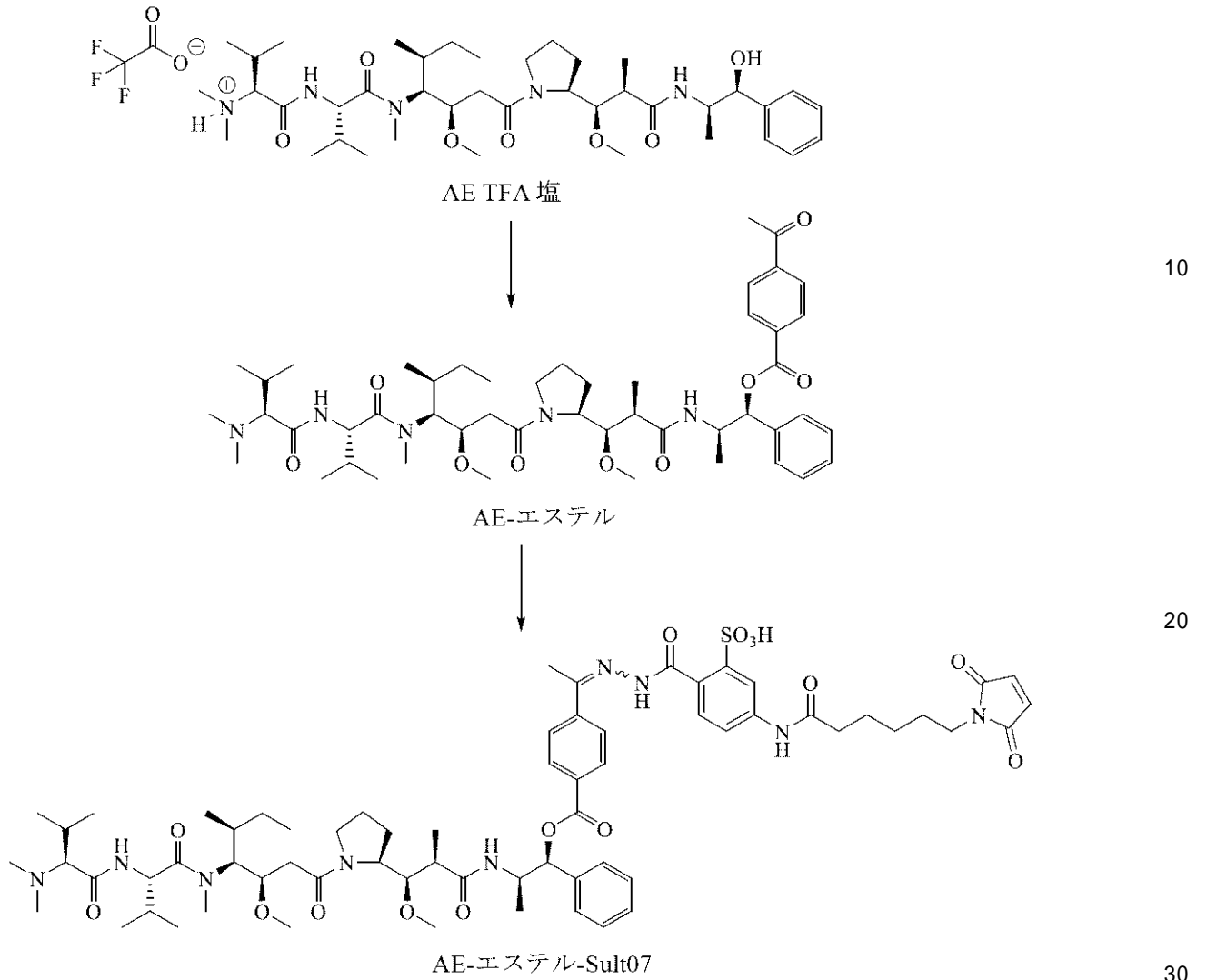
20

30

40

50

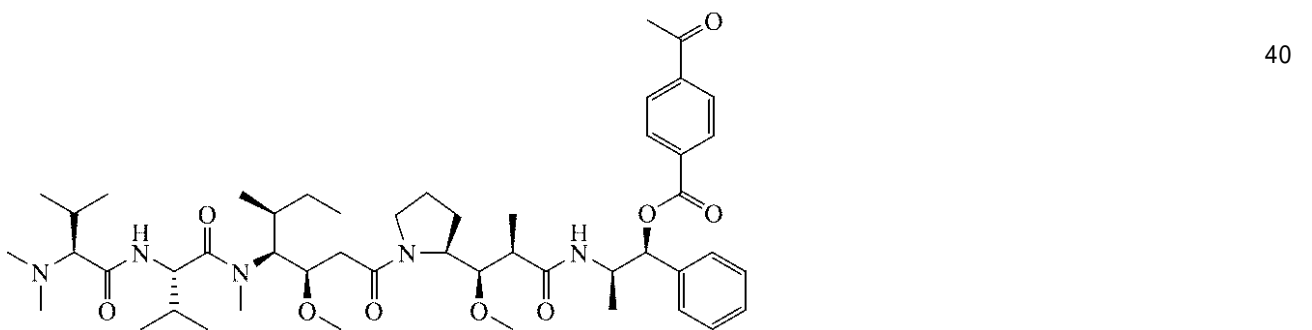
【化 4 2】



スキーム 6

(1S, 2R) - 2 - ((3R) - 3 - ((S) - 1 - ((3R, 4S, 5R) - 4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (ジメチルアミノ) - 3 - メチルブタンアミド) - N, 3 - ジメチルブタンアミド) - 3 - メトキシ - 5 - メチルヘプタノイル) ピロリジン - 2 - イル) - 3 - メトキシ - 2 - メチルプロパンアミド) - 1 - フェニルプロピル 4 - アセチル安息香酸塩 (AE - エステル) の合成

【化 4 3】



特許 US 6 8 8 4 8 6 9 - B 2 の改善した手順による合成

【0162】

分子篩（0.3 nmビーズ、3）の存在下での無水ジクロロメタン（18 mL）中のオーリスタチンE TFA塩（1.0 g、1.18 mmol、1.0当量、Levena Biopharma）および4-アセチル安息香酸（198 mg、1.42 mmol、1.2当量、Acros Organics）の溶液に、4-ジメチルアミノピリジン（DMAP、244 mg、2.36 mmol、2.0当量、Carbolution）およびN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド（DIC、186  $\mu$ L、1.42 mmol、1.2当量、Sigma Aldrich）を添加した。混合物を、室温で5時間撹拌した。反応の進行をHPLC（方法2、220 nm）によって監視し、81%の所望の生成物への変換を示した。DIC（155  $\mu$ L、1.18 mmol、1.0当量、Sigma Aldrich）をさらに添加し、混合物を室温で18時間撹拌しておき、この後HPLCは、所望の生成物への98%反応変換を示した。異なるバッチの化合物の合成中、新たに開けたボトルからの新鮮なDICが使用されるとき、第2の添加の必要性がないことが留意された。分子篩および微細に形成された沈殿物、DIC副生成物を、折り畳んだフィルターペーパー（グレード3 hw、Sartorius）を通して濾過し、得られた透明な黄色の溶液を1回HCl（0.1 M、15 mL）で洗浄した。水層を1回ジクロロメタン（15 mL）で逆抽出し、有機層を次いで組み合わせ、1回ブライン（15 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶液を減圧下で40で濃縮して、黄色の油を得、これを次いで最小限の量のジクロロメタン（5 mL）に溶解した。過剰なジエチルエーテル（50 mL）を添加して、白色の固体を生成した。混合物を、2~4で30分間放置し、次いで固体を遠心分離によって分離した。沈殿手順を3回繰り返し、白色の粉末を減圧下で乾燥させた。収率：706 mg、68%収率。HPLC（方法2、220 nm）による純度98%。LRMS-ESI（m/z）C<sub>49</sub>H<sub>75</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup>の計算：879.20。実測：878.70。

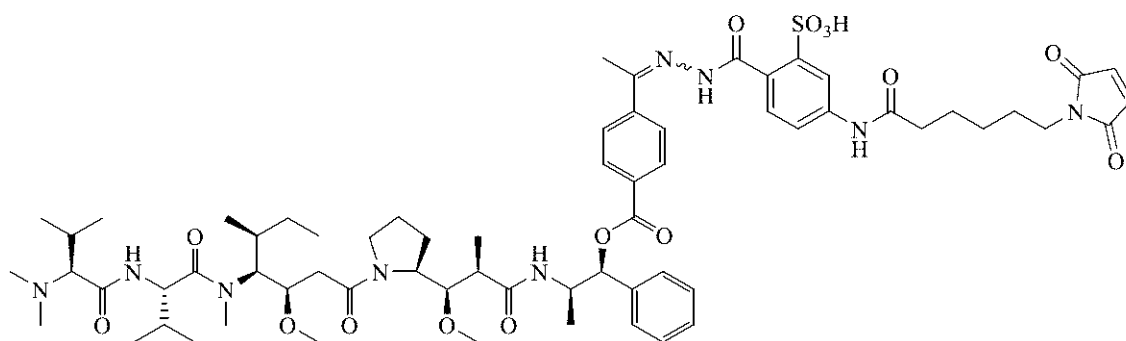
10

20

2 - ( 2 - ( 1 - ( 4 - ( ( ( 1 S , 2 R ) - 2 - ( ( 2 R , 3 R ) - 3 - ( ( S ) - 1 - ( ( 3 R , 4 R , 5 S ) - 4 - ( ( S ) - 2 - ( ( R ) - 2 - ( ジメチルアミノ ) - 3 - メチルブタンアミド ) - N , 3 - ジメチルブタンアミド ) - 3 - メトキシ - 5 - メチルヘプタノイル ) ピロリジン - 2 - イル ) - 3 - メトキシ - 2 - メチルプロパンアミド ) - 1 - フェニルプロポキシ ) カルボニル ) フェニル ) エチリデン ) ヒドラジン - 1 - カルボニル ) - 5 - ( 6 - ( 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル ) ヘキサンアミド ) ベンゼンスルホン酸 ( AE - エステル - S u l f o 7 ) の合成

30

【化44】



40

【0163】

無水ジメチルスルホキシド（2 mL）中のSulf07（164 mg、0.31 mmol、1.1当量）の溶液を、分子篩（0.3 nmビーズ、3）の存在下で無水エタノール（8 mL）中のAE-エステル（243 mg、0.28 mmol、1.0当量）の溶液に添加した。パラトルエンスルホン酸（10.5 mg、0.05 mmol、0.2当量）を添加して反応を触媒し、反応物を次いで室温で撹拌した。パラトルエンスルホン酸の代わりにTFAを使用することもできた。反応をHPLC（方法2、220 nm）によって監視し、15時間後に完全変換を示した。分子篩および形成された微細な沈殿物を、折り

50

畳んだフィルターペーパー（グレード3hw、Sartorius）を通した濾過によって反応溶液から除去した。溶液を過剰な量のメチルtert-ブチルエーテル（60mL）で沈殿させ、混合物を2~4で30分間放置した。沈殿物を次いで、遠心分離によって分離して、黄色の粘着性の固体を達成した。黄色の粘着性の固体をメタノール/ジクロロメタン3/7（10mL）に溶解し、溶液を、予め充填されたSNAP Ultra 25gカートリッジで、フラッシュ精製システムに注射した。精製を、17のカラム体積における100%ジクロロメタンから60%ジクロロメタン/40%メタノールまでの、段階的勾配を用いて、順相で行った。生成物を含有するチューブを組み合わせ、高真空下で乾燥させた。収率：162mg、45%収率。RP-HPLC（方法2、220nm）による純度96%。LRMS-ESI(m/z)  $C_{66}H_{93}N_9O_{15}S[M+H]^+$  の計算：1285.58。実測：1284.20。 $^1H$  NMR（400MHz、DMSO-d<sub>6</sub>） 12.24(d、J=5.3Hz、1H)、10.21(s、1H)、9.20(2xbr.s、1H)、8.32-7.90(m、8H)、7.74-7.71(dd、J=8.5、2.7Hz、1H)、7.41-7.27(m、5H)、7.00(s、2H)、6.13-6.02(2xd、J=5.0Hz、1H)、4.80-4.51(m、2H)、4.41-4.23(m、1H)、4.09-3.55(m、3H)、3.54-3.37(t、J=7.0Hz、3H)、3.27-3.17(m、8H)、3.00(s、2H)、2.88-2.63(m、5H)、2.37-2.30(m、6H)、2.22-1.80(m、4H)、1.75-1.48(m、7H)、1.42-1.22(m、6H)、1.18-1.11(m、3H)、1.10-1.04(m、3H)、1.00-0.74(m、20H)。 $^{13}C$  NMR（101MHz、DMSO） 172.93、172.65、171.44、170.94、168.61、168.49、164.59、164.52、164.24、164.16、149.20、144.83、143.05、142.96、140.71、137.97、137.78、134.30、132.25、129.43、129.38、129.31、129.21、128.39、128.31、126.49、126.44、126.35、125.72、118.77、116.77、85.20、81.26、77.65、77.04、76.84、60.82、60.12、58.59、58.03、57.01、48.35、47.76、47.15、46.03、43.60、42.99、36.89、36.11、31.64、29.89、29.73、27.70、26.56、25.70、25.33、25.04、24.42、24.04、23.03、19.16、18.63、18.44、18.37、15.50、15.47、15.29、15.14、13.88、13.84、10.19、10.04。注記：いくつかの $^1H$ -NMRシグナルは、溶液における配座異性体の存在のために2つの異なるシグナルに分けられる。この理由で、 $^{13}C$ -NMRスペクトルにおけるピークの数、AE-エステル-Sulf07について予想される炭素の数よりも高い。

10

20

30

pH7.4およびpH4.1でのAE-ケト-Sulf07およびAE-エステル-Sulf07のヒト血清アルブミンコンジュゲートのpH依存性放出（図11および図12）【0164】

アルブミン結合オーリスタチン-Sulf07誘導体を、無水DMSO中の2mMストック溶液として調製した。

40

【0165】

pH7.4での放出：1000μMの還元ヒト血清アルブミン（881μM遊離システイン-34）および727.6μLのPBS緩衝剤（4mMのリン酸ナトリウムpH7.4および150mMのNaCl）の442.4μLを、封止したHPLCバイアルに添加し、37で30分間インキュベートした。30分のインキュベーション後、130μLの適切なDMSO薬物ストック溶液を、プレインキュベートしたバイアルに添加して、オーリスタチン薬物の200μM溶液およびアルブミン（遊離システイン-34）の300μM溶液を生成した。混合物を10分間37で反応させ、次いでHPLC（方法7、20μL注射）によって分析した。注射を、1時間後、および次いで24時間まで毎時間繰

50

り返した。

【0166】

pH 4.1での放出：1000 μMの還元ヒト血清アルブミン（881 μM遊離システイン - 34）および539.4 μLの水の408.5 μLを、封止したHPLCバイアルに添加し、37で30分間インキュベートした。別個のバイアルにおいて、190 μLの酢酸ナトリウム緩衝剤50 mM pH 3.0および24.7 μLの1 M HClを、37で30分間インキュベートした。30分のインキュベーション後、120 μLの適切なDMSO薬物ストック溶液を、ブレインキュベートしたバイアルに添加して、アルブミン薬物コンジュゲートを生成した。10分のインキュベーション後、132 μLの酢酸ナトリウム緩衝剤溶液を添加して、オーリスタチン薬物誘導体の200 μM溶液およびアルブミン（遊離システイン - 34）の300 μM溶液を生成した。得られた溶液を、HPLC（方法7）によって直接分析した。バイアルからの注射を、1時間後、および次いで24時間まで毎時間繰り返した。

10

【0167】

放出された遊離薬物のパーセンテージを、HPLCによって、遊離薬物、すなわち、AE - ケト - Sulf 07のAE - ケトおよびAE - エステル - Sulf 07のAE - エステルの較正曲線（200 μM、100 μM、50 μM、25 μM、および12.5 μM）で決定した。HPLC分析前に、薬物ストック溶液を、溶媒としてDMSOを用いて調製し、リン酸緩衝剤（4 mMのリン酸ナトリウムpH 7.4および150 mMのNaCl）で10倍に希釈した。薬物放出計算は、AUC：254 nmのAE - ケトおよび310 nmのAE - エステル（局所UV最大値）に基づいた。放出されたAE - エステルのパーセントは、pHを7.4から4.1まで変化させた後放出されたAE - ケトのパーセントよりも高かった（図11および12を比較されたい）。

20

【0168】

再構成安定性AE - ケト - Sulf 07およびAE - ケト - EMCH（図1）

アルブミン結合AE - ケト薬物誘導体を、5%スクロース（重量/体積）および2%2 - ヒドロキシプロピル - β - シクロデキストリン（2 - HP CD）を含有した50 mMリン酸ナトリウム緩衝剤pH 7.6において再構成した。両方の薬物を1277 μM（4.5 mg/kgの Maus 異種移植用量に等しい）の濃度で再構成し、両方の薬物の溶解をHPLC（方法2、254 nm）によって確認した。再構成された薬物の安定性を、マレイミド加水分解およびAPIの喪失についてHPLCによって室温で15分毎に240分の期間をかけて監視した。AE - ケト - Sulf 07は、AE - ケト - EMCHよりも安定であった（図1参照）。

30

【0169】

再構成安定性AE - エステル - Sulf 07およびAE - エステル - EMCH（図2）

アルブミン結合AE - エステル誘導体を、5%スクロース（重量/体積）および4%2 - HP CDを含有した50 mMリン酸ナトリウム緩衝剤pH 7.6において再構成した。両方の薬物を655 μM（2.4 mg/kgの Maus 異種移植用量に等しい）の濃度で再構成し、両方の薬物の溶解をHPLC（方法2、310 nm）によって確認した。再構成された薬物の安定性を、マレイミド加水分解およびAPIの喪失についてHPLCによって室温で15分毎に240分の期間をかけて監視した。AE - エステル - Sulf 07は、AE - エステル - EMCHよりも安定であった（図2参照）。

40

【0170】

ヒト血漿、ラット血漿、およびCD1マウス血漿におけるオーリスタチン - Sulf 07誘導体の結合キネティクス（図5～10）。

CD1マウス血漿およびSprague Dawleyラット血漿を、-80保存から除去し、室温に到達させた。解凍された血漿を、13.6 kRPMで60秒間スピンドウンし、フィルターニードル（5 μm）およびその後0.45 μm CAメンブレンを通して濾過した。

【0171】

50

全血を健康なヒトボランティア（EDTA収集チューブ）から取得し、血漿を3分間3000RPMでスピンドアウンすることによって赤血球から分離した。血漿を次いで、血液供与の2時間以内に直接使用した。360 $\mu$ Lの適切な血漿を各結合実験に使用した。

【0172】

全ての結合実験を3通り行った。血漿を、Eppendorf Thermomixer Cを用いて37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。30分のインキュベーション後、40 $\mu$ Lの適切なアルブミン結合オーリスタチン-Sulf07誘導体をその再構成溶液に溶解し、血漿に添加した。試料（40 $\mu$ L）を、15秒、2分、4分、8分、および15分後に取得した（5試料）。

【0173】

試料を、160 $\mu$ Lのアセトニトリル（内部標準として4 $\mu$ g/mLの'MMAEを含有する）に直ちに添加し、1分間ボルテックスした。

【0174】

溶液を、Impact血漿沈殿プレート（60秒間振盪）にピペット化し、96ウェルプレートに真空によって濾過した。残った薬物を、MRM MS2ネガティブモード（多重反応モニタリング）を用いるLCMS定量化（方法5、30 $\mu$ L注射）によって決定した。親イオン：オーリスタチンF（質量-744.8）、AE-ケト-Sulf07（質量-1135.1）、およびAE-エステル-Sulf07（質量-1283.2）。結合のパーセンテージを、AE-ケト-Sulf07およびAE-エステル-Sulf07のAUCと、各化合物のLCMSによって生成された較正曲線とを比較することによって決定した。

【0175】

手順：ヒト血清アルブミンのシステイン-34へのオーリスタチン-Sulf07誘導体の結合特異性（図3~4）。

アルブミン結合オーリスタチン-Sulf07誘導体を、2-HP CDを含有した50mMリン酸ナトリウム緩衝剤pH7.6および5%スクロースにおいて再構成した。それぞれ、2%HP CD濃度を使用してAE-ケト-Sulf07、4%でAE-エステル-Sulf07を再構成した。両方の薬物を、1mg/mL（AE-エステル-Sulf07 780 $\mu$ M、AE-ケト-Sulf07 880 $\mu$ M）の濃度で再構成した。

【0176】

ヒト血漿を-80 $^{\circ}$ C保存から除去し、室温に到達させた。解凍された血漿を、13.6kRPMで60秒間スピンドアウンし、フィルターニードル（5 $\mu$ m）およびその後0.45 $\mu$ mCAメンブレンを通して濾過した。180 $\mu$ Lの適切な血漿を各結合実験に使用した。血漿を、Eppendorf Thermomixer Cを用いて37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。30分のインキュベーション後、20 $\mu$ Lの適切なアルブミン結合オーリスタチン-Sulf07誘導体を添加した。アルブミン結合薬物を、血漿において5分間37 $^{\circ}$ Cで反応させた。5分後、溶液をHPLC疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC、方法6、250nm）によって直接分析して、アルブミンへの部位特異的コンジュゲーションおよびアルブミン薬物コンジュゲートの形成を確認した。

【0177】

凍結乾燥オーリスタチン製剤の加速分解：EMCHおよびSulf07安定性（図24~25）

APIを、2-HP CD、10mMのクエン酸ナトリウムpH6.2、50%tert-ブチルアルコール（体積/体積）を含有した凍結乾燥緩衝剤に溶解した。AE-ケト誘導体について、2%（重量/体積）2-HP CDを使用して、AE-ケトAPIを1.27mM濃度で溶解し、AE-エステル誘導体について、4%（重量/体積）2-HP CDを使用して、APIを1.05mM濃度で溶解した。溶解したAPIを、Acrodisc Fluorodyne IIシリンジフィルター（0.2 $\mu$ m）を用いて滅菌濾過した。滅菌溶液を、凍結乾燥バイアルにピペット操作し、これを次いで、ゴム栓を用いて部分的に封止した。バイアルをその後、凍結乾燥のために凍結乾燥機に入れた。バイア

10

20

30

40

50

ルを - 40 で2時間凍結乾燥機で凍結し、2時間後、本乾燥を開始した。本乾燥を、26時間、パラメータ：貯蔵温度 - 20、真空0.0048mbarで行った。本乾燥後、最終乾燥を開始した。最終乾燥を、16時間、パラメータ：貯蔵温度20、真空0.0047mbarで行った。最終乾燥の完了後、バイアルを真空下で封止した。

【0178】

封止バイアルを、プレート挿入物 (Smart block) および蓋を備えた Eppendorf Thermomixer C を用いて 55 でインキュベートした。選択される時点 (t: 0、46、94、166、および264時間) で、試料を除去し、無水 DMSO に溶解した。API の安定性を、HPLC (方法8、AE-ケト誘導体は 254 nm、AE-エステル誘導体は 310 nm) によって決定した。各時点でのマレイミド加水分解のパーセンテージを、0 時点での各 API の AUC への比較によって決定した。AE-ケト-Sulf07 および AE-エステル-Sulf07 は、それぞれ EMCH 誘導体 AE-ケト-EMCH および AE-エステル-EMCH よりも安定であった (図 24 および図 25 参照)。

10

【0179】

#### 実施例 4

腫瘍細胞株のパネルに対するオーリスタチン E、AE-ケト、および AE-エステルの評価のための一般的な手順

##### IC<sub>50</sub> 決定

試料は、Charles River Discovery Research Services Germany GmbH に、薬学的グレード DMSO (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) 中の凍結ストック溶液として提供された。実験の各日に、ストック溶液の凍結されたアリコートを解凍した。その後の段階希釈は、中間体希釈プレートを用いて、完全な RPMI 1640 細胞培養培地で実現した。中間体希釈プレートから取得された 10 μL を次いで、140 μL / ウェルの細胞培養プレートに移した。細胞を、10 の濃度の試験化合物で 0.003 nM から 100 nM まで 96 時間の期間のハーフログステップにおいて 3 通りに処理した。

20

【0180】

化合物を、CellTiter-Blue (登録商標) Cell Viability アッセイ (Promega, Mannheim, Germany) を用いることによって 6 つの選択されたヒト癌細胞株のパネルにおいて試験した。IC 値は、試験された全ての細胞株にわたる IC<sub>50</sub> 値の幾何平均として試験化合物について得られた、絶対 IC<sub>50</sub> 値として報告される。

30

【0181】

使用された細胞株は、LXFL 1674L (Charles River Discovery Research Services Germany GmbH の患者由来異種移植から構築される)、SW-620 (NCI, Bethesda, MD, USA によって親切に提供される)、CAL-27 (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany から購入される)、RKO、MDA-MB-468、および SK-OV-3 (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA から) であった。全ての細胞株の信頼性は、DSMZ で STR (ショートタンデムリピート) 分析、PCR ベースの DNA-フィンガープリント方法によって証明された。細胞株を、週に 1 回または 2 回通常通りに継代し、最大 20 回の継代にわたって培養に維持した。細胞を、37 で、5% CO<sub>2</sub> を有する加湿雰囲気において、10% (体積/体積) ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) および 0.1 mg/mL のゲンタマイシン (Life Technologies, Karlsruhe, Germany) が補足された RPMI 1640 培地 (L-グルタミンを有する、25 mM の HEPES, Biochrom, Berlin, Germany) で成長させた。CellTiter

40

50

- Blue (登録商標) Cell Viability Assay を、製造業者の指示に従って使用した。簡潔に、細胞を、対数期培養物から採取し、カウントし、96 ウェル平底マイクロタイタープレートに、細胞株の成長速度に応じて4,000~10,000細胞/ウェルの細胞密度で播種した。細胞が対数成長を再開することを可能にする24時間の回復期後、10  $\mu$ L の培養培地 (6つの対照ウェル/プレート) または試験化合物を有する培養培地を添加した。化合物を、10の濃度で3通りに最大100 nMのハーフログ増分で適用し、細胞を96時間継続して処理した。4日の細胞処理後、20  $\mu$ L /ウェルのCell Titer - Blue (登録商標) 試薬を添加した。4時間までのインキュベーション期間後、蛍光 (FU) を、Enspire Multimode Plate Reader (励起 = 531 nm、放出 = 615 nm) を用いることによって測定した。IC<sub>50</sub> 値を、GraphPad Prism 生体分析ソフトウェア (San Diego, CA, USA) で決定した。

10

## 【0182】

S字状濃度 - 効果曲線での濃度依存性活性が、試験された6つの腫瘍細胞株において観察された。幾何平均IC<sub>50</sub> 値は、AE - ケトについて259  $\pm$  0.11 pM、AE - エステルについて399  $\pm$  0.19 pMであった。極めて強力な薬物MMAE (171  $\pm$  0.10 pM) およびAE (130  $\pm$  0.05 pM) と比較して、AE - ケトおよびAE - エステル誘導体は、ピコモル範囲の同様の細胞毒性を有する。

## 【0183】

## 実施例 5

20

患者由来の腫瘍異種移植モデルにおけるオーリスタチンEおよびアルブミン結合オーリスタチンE誘導体の評価の一般的な手順。

Charles River Discovery Research Services Germany GmbHからの雌免疫欠損NMR1ヌードマウスの左脇腹に、ヒト由来腫瘍での片側腫瘍インプラントを、イソフルラン麻酔下で、腫瘍が触診可能になり、所望の体積に到達するまで皮下投与した。

## 【0184】

動物をケージに保持し、ケージ内の温度を25  $\pm$  1、45~65%の相対湿度、および1時間あたり60倍の空気変化率で維持した。マウスを、14時間の明/10時間の暗の人工光サイクル下に保持した。動物は、Envigo RMS SARLからのTeklad Global 19% Protein Extruded Diet (T.2019 S.12) が給餌され、週に2回交換された滅菌濾過および酸性化 (pH 2.5) 水道水へのアクセスを有した。飼料および水は、自由に提供した。療法の前に、動物は、群腫瘍体積の同程度の中央値および平均値を考慮してランダム化した (1群あたり7~8匹)。動物は、営業日は1日2回、土曜日および日曜日は1日1回、日常的に監視した。0日目に開始して、動物は、1週間に2回計量した。個別の動物の相対体重 (RBW) は、X日目の個別の絶対体重 (BW<sub>x</sub>) を、ランダム化の日の個別の体重によって割り、100%をかけることによって計算した。腫瘍体積は、ランダム化の日 (0日目) および次いで週に2回のキャリパーでの2次元測定によって決定した。腫瘍体積は、以下の式：

30

腫瘍体積 [mm<sup>3</sup>] = l [mm]  $\times$  w<sup>2</sup> [mm<sup>2</sup>]  $\times$  0.5に従って計算され、式中、「l」は、腫瘍の長さであり、「w」は、腫瘍の幅である。X日目の個別の腫瘍の相対体積 (RTV<sub>x</sub>) は、X日目のそれぞれの腫瘍 (T<sub>x</sub>) の絶対個別腫瘍体積 [mm<sup>3</sup>] を、ランダム化の日の同じ腫瘍の絶対個別腫瘍体積によって割り、100%をかけることによって計算した。スケジュールは、動物福祉政策が許容する程度に適用した。個別のマウスの殺は、腫瘍体積 > 2000 mm<sup>3</sup> (片側) で行った。抗腫瘍有効性の統計的有意性の評価のために、ノンパラメトリックKruskal - Wallis検定、続いてペアワイズ比較のためのDunnの方法を行い、これによって試験および対照群の個別のRTVを、試験群において最小T/C値が達成された日に比較し、T/C [%] = (RTV<sub>x</sub> 治療群中央値 / RTV<sub>x</sub> 対照群中央値)  $\times$  100であった。統計的分析は、相対群における初期ランダム化動物の少なくとも50%が依然として生存した場合のみ行った。試験群間の比較

40

50

を、同じ日数で行った。慣例により、 $p$ 値 0.05 は、腫瘍阻害の有意性を示す。統計的計算は、GraphPad Prism 生体分析ソフトウェア (San Diego California USA、www.graphpad.com) を用いて行った。

#### 【0185】

用量設定研究および細胞株由来腫瘍異種移植モデルにおけるオーリスタチンEおよびアルブミン結合オーリスタチンE誘導体の評価の一般的な手順。

Janvier、Franceからの雌免疫欠損NMR1ヌードマウスに、腫瘍が触診可能であり、(異種移植研究について)所望の体積に達するまで、皮下接種させる緩衝剤/Matrigel(1:1)における $5 \times 10^6 - 10^7$ 培養癌細胞を投与した。

#### 【0186】

動物をケージ(Macrolon Type-IIワイヤーメッシュ)に保持し、温度を $22 \pm 1$ 、 $50 \pm 10\%$ の相対湿度、および1時間あたり60倍の空気変化率で維持した。マウスを、12時間の明/12時間の暗の人工光サイクル下に保持した。動物は、オートクレーブされたSsniff NM(Soest、Germany)が給餌され、週に2回交換された滅菌濾過および酸性化( $pH 4.0$ )水道水へのアクセスを有した。飼料および水は、自由に提供した。療法の前に、動物は、群腫瘍体積の同程度の中央値および平均値を考慮して、ランダム化した(用量設定研究において1群あたり3~4匹および異種移植研究において1群あたり7~8匹)。動物の健康は、実験の開始時および実験中に1日2回調査した。使用される識別:耳標およびケージラベル。0日目を開始して、動物は、週に2回または3回計量され、1群あたりの平均体重は、体重変化(BWC)を計算するために初期値パーセントに關した。腫瘍直径は、ランダム化の日(0日目)および次いで週に2回または3回のキャリパーでの2次元測定によって決定した。腫瘍体積は、以下の式:

腫瘍体積 [ $mm^3$ ] =  $l [mm] \times w^2 [mm^2] \times 0.5$  に従って計算され、式中、「 $l$ 」は、腫瘍の長さであり、「 $w$ 」は、腫瘍の幅である。 $X$ 日目の個別の腫瘍の相対体積( $RTV_x$ )は、 $X$ 日目のそれぞれの腫瘍( $T_x$ )の絶対個別腫瘍体積 [ $mm^3$ ] を、ランダム化の日の同じ腫瘍の絶対個別腫瘍体積によって割り、100%をかけることによって計算した。スケジュールは、動物福祉政策が許容する程度に適用した。個別のマウスの殺は、腫瘍体積  $> 1500 mm^3$  (片側)で、または潰瘍が観察されたとき行った。統計的比較は、Mann-Whitney U検定で行った。

#### 【0187】

オーリスタチンEならびにアルブミン結合オーリスタチンE誘導体AE-ケト-Sulf07およびAE-エステル-Sulf07の用量設定研究

ストック溶液を次のように調製した。

1) 1群あたり3匹のマウス、ランダム化の日に26gの平均体重:0.3、0.6、または1.2mg/kgの用量のオーリスタチンE TFA塩(AE当量)を、4週間にわたって週に1回、0、6、13、20日目に0.35~1.41mg/kg 7.1~28.3 $\mu g$ /20gマウスで投与した。試料調製:8.5mgを50mLバイアルに計量し、30.0mLの25/75tert-ブタノール/10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH7.0に溶解し、最終的な所望の最終用量に応じて0.2~0.8mLを2mLバイアルにアリコートした。バイアルを1時間-40で凍結し、-20で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、0.8mLの10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、20%プロピレングリコール-pH7.0で再構成した。

2) 1群あたり3匹のマウス、ランダム化の日に26gの平均体重:1.2および2.4mg/kgのAE-ケト-Sulf07(AE当量)を、4週間にわたって週に2回1.94~3.87mg/kg 38.7および77.4 $\mu g$ /20gマウスで投与した。試料調製:11.0mgを30mLバイアルに計量し、14.2mLの50/50tert-ブタノール/10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH7.0に溶解し、最終的な所望の最終用量に応じて0.4~0.8mLを2mLバイアルにアリコー

10

20

30

40

50

トした。バイアルを1時間 - 40 で凍結し、- 20 で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、0.8 mLの10 mMリン酸ナトリウム緩衝剤、20%プロピレングリコール - pH 7.0で再構成した。

3) 1群あたり3匹のマウス、ランダム化の日に26 gの平均体重: 1.2、1.6、または2.0 mg/kgのAE - エステル - Sulf 07 (AE当量)を、4週間にわたって週に2回1日 2.18 ~ 3.64 mg/kg 43.7 ~ 72.8 µg/20 gマウスで投与した。試料調製: 19.2 mgを30 mLバイアルに計量し、26.3 mLの50/50 tert - ブタノール/10 mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース - pH 7.0に溶解し、最終的な所望の最終用量に応じて0.48 ~ 0.8 mLを2 mLバイアルにアリコートした。バイアルを1時間 - 40 で凍結し、- 20 で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、0.8 mLの50 mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5% Tween 80 - pH 7.6で再構成した。

10

4) 1群あたり4匹のマウス、ランダム化の日に23 gの平均体重: 2.0、2.2、および2.4 mg/kgのAE - エステル - Sulf 07 (AE当量)を、4週間にわたって週に2回1日に 3.64 ~ 4.37 mg/kg 72.8 ~ 87.3 µg/20 gマウスで投与し、4.0、4.4、および4.8 mg/kgのAE - エステル - Sulf 07 (AE当量)を、4週間にわたって週に1回0、7、14、21日目に 7.28 ~ 8.73 mg/kg 145.6 ~ 174.7 µg/20 gマウスで投与した。試料調製: 56.0 mgを50 mLバイアルに計量し、32.0 mLの50/50 tert - ブタノール/10 mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース - pH 7.0に溶解し、最終的な所望の最終用量に応じて0.33 ~ 0.8 mLを2 mLバイアルにアリコートした。バイアルを1時間 - 40 で凍結し、- 20 で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、0.8 mLの50 mMリン酸ナトリウム緩衝剤、2% Tween 80 - pH 7.6で再構成した。

20

#### 【0188】

1.2および0.6 mg/kg用量のオーリスタチンEは、それぞれ第1および第2の注射後に、高い毒性を示し、動物が生存しなかった。0.3 mg/kg用量は十分に忍容された。その後の研究において、AEは、4週間にわたって週に2回注射された0.3 mg/kg (合計8回の注射)で忍容されたことが見出され、この用量は、したがって、最大耐量(MTD)として異種移植研究に使用された。

30

#### 【0189】

週に2回のスケジュールで8回注射されたAE - ケト - Sulf 07について試験された全ての用量は、十分に忍容された。その後の異種移植研究では、この薬物の用量は、同じ投与レジメンで6.5 mg/kgまで増加させ、この最も高い用量で、1匹のマウスにおいて体重減少および第2のマウスにおいて悪い全身状態を引き起こし、治療は、計画された8回ではなく、5回の注射後に停止しなければならなかった。そのような用量は、したがって、MTDを超えるとみなされ、4.5 mg/kgが安全な用量として選択された。

AE - エステル - Sulf 07は、4週間にわたって週に2回投与された最大2.0 mg/kgで初期試験され、毒性の明らかな兆候を有さなかった。皮膚刺激がその後異種移植研究において観察されたので、第2の用量設定研究は、4週間かけて週に2回投与された2.0、2.2、および2.4 mg/kgで繰り返され、週に1回のみ注射された4.0、4.4、および4.8 mg/kgの対応する二倍用量と比較した。体重変化は観察されなかったが、皮膚刺激は、全ての群において9 ~ 14日後に出現した。より早期およびより頻繁な皮膚刺激は、より高用量について観察された。刺激が治療終了後に治癒し始めたように、副作用は可逆的であると考えられた。週に1回4.0 mg/kgで治療された群は、最も低い副作用を示したが、他の群の間で有意な差が観察されなかった。

40

#### 【0190】

腫瘍異種移植モデルにおけるオーリスタチンEおよびアルブミン結合オーリスタチンE誘導体の評価基準

各薬物の有効性は、腫瘍体積低減(0日目と比較した選択される日の腫瘍体積の%)に

50

基づいて決定した：初期腫瘍体積と比較して、完全寛解 < 10%、部分寛解 > 10 ~ 50%、小寛解 > 50 ~ 75%、安定性疾患 > 75 ~ 125%、進行性疾患 > 125%。

【0191】

ヒト悪性黒色腫瘍モデル A375 - 小腫瘍におけるオーリスタチン E およびアルブミン結合オーリスタチン E 誘導体 AE - ケト - S u l f 0 7 の評価 (図 13)

ヒト悪性黒色腫瘍モデル A375 におけるオーリスタチン E およびアルブミン結合オーリスタチン E 誘導体 AE - ケト - S u l f 0 7 の評価を、細胞株由来異種移植モデルについての一般的な手順に記載されるように行った。

【0192】

ストック溶液を次のように調製した。

1) 7匹のマウス、ランダム化の日に 29 g の平均体重、 $135 \text{ mm}^3$  の平均腫瘍体積中央値： $0.3 \text{ mg / kg}$  のオーリスタチン E TFA 塩 (AE 当量) を、3週間にわたって週に2回、0、6、9、13、16、19日目に  $0.35 \text{ mg / kg}$   $7.1 \mu\text{g} / 20 \text{ g}$  マウスで投与した。試料調製：2 mg を 30 mL バイアルに計量し、28.3 mL の 50 / 50 tert - ブタノール / 10 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、5% スクロース - pH 7.0 に溶解し、1.2 mL を 4 mL バイアルにアリコートした。バイアルを1時間 - 40 で凍結し、- 20 で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2 mL の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、20% プロピレングリコール - pH 7.0 で再構成した。

2) 7匹のマウス、ランダム化の日に 28 g の平均体重、 $137 \text{ mm}^3$  の平均腫瘍体積中央値： $3.0 \text{ mg / kg}$  の AE - ケト - S u l f 0 7 (AE 当量) を、3週間にわたって週に2回、0、6、9、13、16、19日目に  $5.32 \text{ mg / kg}$   $106.3 \mu\text{g} / 20 \text{ g}$  マウスで投与した。試料調製：19.2 mg を 30 mL バイアルに計量し、19.0 mL の 50 / 50 tert - ブタノール / 10 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、5% スクロース - pH 7.0 に溶解し、1.2 mL を 4 mL バイアルにアリコートした。バイアルを1時間 - 40 で凍結し、- 20 で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2 mL の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、20% プロピレングリコール - pH 7.0 で再構成した。

【0193】

黒色腫異種移植モデル A375 における腫瘍成長進行は、両方とも6回、週に2回注射された、オーリスタチン E の  $0.3 \text{ mg / kg}$  用量に対する、 $3.0 \text{ mg / kg}$  の化合物 AE - ケト - S u l f 0 7 の統計的に有意な優れた抗腫瘍有効性を示した (27日目から37日目まで  $p < 0.01$ )。オーリスタチン E で治療されたマウスは、21日目まで安定性疾患状態を達成し、その後腫瘍は再度成長し始めた。対照的に、AE - ケト - S u l f 0 7 治療群におけるマウスは、長期腫瘍退縮を達成し、19日目から37日目の研究終了まで完全寛解 ( $1 \text{ mm}^3$  最終腫瘍体積) を示した。

【0194】

AE - ケト - S u l f 0 7 で治療された群におけるマウスは、対照と比較して体重増加のわずかな低減のみを有したが、検出可能な副作用は観察されなかった。

【0195】

ヒト悪性黒色腫瘍モデル A375 - 大腫瘍におけるオーリスタチン E およびアルブミン結合オーリスタチン E 誘導体 AE - ケト - S u l f 0 7 の評価 (図 14)。

ヒト悪性黒色腫瘍モデル A375 におけるオーリスタチン E およびアルブミン結合オーリスタチン E 誘導体 AE - ケト - S u l f 0 7 の評価を、細胞株由来異種移植モデルについての一般的な手順に記載されるように行った。

【0196】

ストック溶液を次のように調製した。

1) 7匹のマウス、ランダム化の日に 28 g の平均体重、 $310 \text{ mm}^3$  の平均腫瘍体積中央値： $0.3 \text{ mg / kg}$  のオーリスタチン E TFA 塩 (AE 当量) を、3週間にわたって週に2回、1、6、9、13、16日目に  $0.35 \text{ mg / kg}$   $7.1 \mu\text{g} / 20$

10

20

30

40

50

g マウスで投与した。試料調製：2 mg を 30 mL バイアルに計量し、28.3 mL の 50/50 tert-ブタノール/10 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、5% スクロース - pH 7.0 に溶解し、1.2 mL を 4 mL バイアルにアリコートした。バイアルを 1 時間 - 40 で凍結し、-20 で約 36 時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2 mL の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、20% プロピレングリコール - pH 7.0 で再構成した。

2) 7 匹のマウス、ランダム化の日に 27 g の平均体重、331 mm<sup>3</sup> の平均腫瘍体積中央値：6.5 mg/kg の AE-ケト-Sulf07 (AE 当量) を、3 週間にわたって週に 2 回、1、6、9、13、16 日目に 11.52 mg/kg 230.4 μg/20 g マウスで投与した。試料調製：28.0 mg を 30 mL バイアルに計量し、12.2 mL の 50/50 tert-ブタノール/10 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、5% スクロース - pH 7.0 に溶解し、1.2 mL を 4 mL バイアルにアリコートした。バイアルを 1 時間 - 40 で凍結し、-20 で約 36 時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2 mL の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、2% Tween 80 - pH 7.6 で再構成した。

#### 【0197】

化合物 AE-ケト-Sulf07 の抗腫瘍有効性も、より大きな悪性黒色腫 A375 腫瘍 (約 320 mm<sup>3</sup>) を有するマウスにおいて試験されて、薬物有効性が小さな腫瘍に限定されないことを証明した。6.5 mg/kg の AE-ケト-Sulf07 で治療されたマウスは、同様に 5 回、週に 2 回注射された、0.3 mg/kg 用量のオーリスタチン E で治療された群と比較して、抗腫瘍効果の統計的に有意な改善を示した (9 日目から 33 日目まで  $p < 0.01$ )。オーリスタチン E は、14 日目まで初期安定性疾患を示した後、着実に成長したが、AE-ケト-Sulf07 治療群におけるマウスは、19 日目から 37 日目の研究終了時まで完全寛解を記録し、28 日目 (最終治療後 12 日目) に 1 mm<sup>3</sup> および研究終了時に約 14 mm<sup>3</sup> の腫瘍体積の最小値に達し、相対的に大きな開始時腫瘍体積中央値にかかわらず、長期効果をもたらした。

#### 【0198】

AE-ケト-Sulf07 は、一時的な体重減少を引き起こし (21 日目に 13% が到達され)、2 匹のマウスは、悪い全身状態のために犠死させなければならなかった。

#### 【0199】

ヒト非小細胞肺癌モデル LXF A737 - 小腫瘍におけるオーリスタチン E およびアルブミン結合オーリスタチン E 誘導体 AE-ケト-Sulf07 の評価 (図 15)

ヒト非小細胞肺癌モデル LXF A737 におけるオーリスタチン E およびアルブミン結合オーリスタチン E 誘導体 AE-ケト-Sulf07 の評価を、患者由来異種移植モデルについての一般的な手順に記載されるように行った。

#### 【0200】

ストック溶液を次のように調製した。

1) 7 匹のマウス、ランダム化の日に 27 g の平均体重、137 mm<sup>3</sup> の平均腫瘍体積中央値：0.3 mg/kg のオーリスタチン E TFA 塩 (AE 当量) を、4 週間にわたって週に 2 回、0、4、7、11、14、18、21、25 日目に 0.35 mg/kg 7.1 μg/20 g マウスで投与した。試料調製：2 mg を 30 mL バイアルに計量し、28.3 mL の 50/50 tert-ブタノール/10 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、5% スクロース - pH 7.0 に溶解し、1.2 mL を 4 mL バイアルにアリコートした。バイアルを 1 時間 - 40 で凍結し、-20 で約 36 時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2 mL の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、20% プロピレングリコール - pH 7.0 で再構成した。

2) 7 匹のマウス、ランダム化の日に 26 g の平均体重、128 mm<sup>3</sup> の平均腫瘍体積中央値：4.5 mg/kg の AE-ケト-Sulf07 (AE 当量) を、4 週間にわたって週に 2 回、0、4、7、11、14、18、21、25 日目に 7.98 mg/kg 159.5 μg/20 g マウスで投与した。試料調製：38 mg を 30 mL バイアルに計

10

20

30

40

50

量し、23.8 mLの50/50 tert-ブタノール/10 mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH 7.0に溶解し、1.2 mLを4 mLバイアルにアリコートした。バイアルを1時間-40 で凍結し、-20 で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2 mLの50 mMリン酸ナトリウム緩衝剤、2%2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン2-HP CD-pH 7.6で再構成した。

3) 7匹のマウス、ランダム化の日に27 gの平均体重、130 mm<sup>3</sup>の平均腫瘍体積中央値: 4.5 mg/kgのAE-ケト-Sulfate (AE当量)を、4週間にわたって週に2回、0、4、7、11、14、18、21、25日目に7.98 mg/kg 159.5 μg/20 gマウスで投与した。試料調製: 38 mgを30 mLバイアルに計量し、23.8 mLの50/50 tert-ブタノール/10 mMクエン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH 6に溶解し、1.2 mLを4 mLバイアルにアリコートした。バイアルを1時間-40 で凍結し、-20 で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2 mLの50 mMリン酸ナトリウム緩衝剤、2% Tween 80-pH 7.6で再構成した。

#### 【0201】

NSCLC異種移植モデルLXF E737における腫瘍成長進行は、8回、週に2回投与された0.3 mg/kgのオーリスタチンEに対する(Tween 80および2-HP CDの両方の緩衝剤中の)4.5 mg/kgの化合物AE-ケト-Sulfateの優れた抗腫瘍有効性を、統計的有意性と共に示した(56および63日目にp < 0.01)。オーリスタチンE治療群における腫瘍は、(21日目から42日目まで)一時的にのみ安定性疾患状態を保ち、療法の終了後に有意に成長した。対照的に、AE-ケト-Sulfateで治療されたマウスは、療法終了の3日後、28日目に完全腫瘍寛解に達し、(使用される緩衝剤から独立して)74日目の研究終了まで腫瘍体積を測定不能レベルに下げ、長期抗腫瘍効果をもたらした。

#### 【0202】

対照に対する体重変化は、AE-ケト-Sulfateで治療された群における毒性の部分的な増加を示した。32日目に、2-HP CDの症例において毒性の他の兆候なく、体重減少の最大値(-7%)が記録されたが、2匹のマウスは、薬物がTween 80で投与されたとき、悪い全身状態のために犠牲させなければならなかった。

#### 【0203】

ヒト非小細胞肺癌モデルLXF A737-大腫瘍におけるオーリスタチンEおよびアルブミン結合オーリスタチンE誘導体AE-ケト-Sulfateの評価(図16)

ヒト非小細胞肺癌モデルLXF A737におけるオーリスタチンEおよびアルブミン結合オーリスタチンE誘導体AE-ケト-Sulfateの評価を、患者由来異種移植モデルについての一般的な手順に記載されるように行った。

#### 【0204】

ストック溶液を次のように調製した。

1) 8匹のマウス、ランダム化の日に26 gの平均体重、324 mm<sup>3</sup>の平均腫瘍体積中央値: 0.3 mg/kgのオーリスタチンE TFA塩(AE当量)を、4週間にわたって週に2回、1、5、8、12、15、19、22、26日目に0.35 mg/kg 7.1 μg/20 gマウスで投与した。試料調製: 3 mgを100 mLバイアルに計量し、43.3 mLの50/50 tert-ブタノール/10 mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH 7.0に溶解し、2.4 mLを4 mLバイアルにアリコートした。バイアルを1時間-40 で凍結し、-20 で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、2.4 mLの10 mMリン酸ナトリウム緩衝剤、20%プロピレングリコール-pH 7.0で再構成した。

2) 8匹のマウス、ランダム化の日に28 gの平均体重、342 mm<sup>3</sup>の平均腫瘍体積中央値: 4.5 mg/kgのAE-ケト-Sulfate (AE当量)を、4週間にわたって週に2回、1、5、8、12、15、19、22、26日目に6.99 mg/kg

139.7  $\mu\text{g}$  / 20 g マウスで投与した。試料調製：51 mg を 100 mL バイアルに計量し、36.5 mL の 50 / 50 tert - ブタノール / 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝剤、3% 2 - H P C D - pH 6.2 に溶解し、2.4 mL を 4 mL バイアルにアリコートした。バイアルを 1 時間 - 40 で凍結し、-20 で約 36 時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、2.4 mL の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、5% スクロース - pH 7.6 で再構成した。

【0205】

NSCLC 異種移植モデル L X F E 7 3 7 における腫瘍成長進行は、両方とも 8 回、週に 2 回投与された、0.3 mg / kg のオーリスタチン E に対する 4.5 mg / kg の化合物 AE - ケト - S u l f 0 7 の優れた抗腫瘍有効性を、統計的有意性と共に示した (28 日目に  $p < 0.01$ )。オーリスタチン E 治療群における腫瘍は、いかなる活性も示さなかったが、AE - ケト - S u l f 0 7 で治療されたマウスは、15 日目から 59 日目の研究終了まで部分腫瘍寛解を達成し、長期抗腫瘍効果をもたらした。

10

【0206】

副作用は記録されなかった。

【0207】

ヒト卵巣癌腫モデル A 2 7 8 0 - 小腫瘍におけるオーリスタチン E およびアルブミン結合オーリスタチン E 誘導体 AE - ケト - S u l f 0 7 の評価 (図 17)

ヒト卵巣癌腫モデル A 2 7 8 0 におけるオーリスタチン E およびアルブミン結合オーリスタチン E 誘導体 AE - ケト - S u l f 0 7 の評価を、細胞株由来異種移植モデルについて一般的な手順に記載されるように行った。

20

【0208】

ストック溶液を次のように調製した。

1) 7 匹のマウス、ランダム化の日に 27 g の平均体重、147 mm<sup>3</sup> の平均腫瘍体積中央値：0.3 mg / kg のオーリスタチン E T F A 塩 (AE 当量) を、4 週間にわたって週に 2 回、1、4、8、11、15、18、22、25 日目に 0.35 mg / kg 7.1  $\mu\text{g}$  / 20 g マウスで投与した。試料調製：2 mg を 30 mL バイアルに計量し、28.3 mL の 50 / 50 tert - ブタノール / 10 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、5% スクロース - pH 7.0 に溶解し、1.2 mL を 4 mL バイアルにアリコートした。バイアルを 1 時間 - 40 で凍結し、-20 で約 36 時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2 mL の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、20% プロピレングリコール - pH 7.0 で再構成した。

30

2) 7 匹のマウス、ランダム化の日に 27 g の平均体重、153 mm<sup>3</sup> の平均腫瘍体積中央値：3.0 mg / kg の AE - ケト - S u l f 0 7 (AE 当量) を、4 週間にわたって週に 2 回、1、4、8、11、15、18、22、25 日目に 5.32 mg / kg 106.3  $\mu\text{g}$  / 20 g マウスで投与した。試料調製：51.0 mg を 30 mL バイアルに計量し、28.8 mL の 50 / 50 tert - ブタノール / 10 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、5% スクロース - pH 7.0 に溶解し、0.72 mL を 4 mL バイアルにアリコートした。バイアルを 1 時間 - 40 で凍結し、-20 で約 36 時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2 mL の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、2% Tween 80 - pH 7.6 で再構成した。

40

3) 7 匹のマウス、ランダム化の日に 25 g の平均体重、141 mm<sup>3</sup> の平均腫瘍体積中央値：5.0 mg / kg の AE - ケト - S u l f 0 7 (AE 当量) を、4 週間にわたって週に 2 回、1、4、8、11、15、18、22、25 日目に 8.86 mg / kg 177.2  $\mu\text{g}$  / 20 g マウスで投与した。試料調製：51.0 mg を 30 mL バイアルに計量し、28.8 mL の 50 / 50 tert - ブタノール / 10 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、5% スクロース - pH 7.0 に溶解し、1.2 mL を 4 mL バイアルにアリコートした。バイアルを 1 時間 - 40 で凍結し、-20 で約 36 時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2 mL の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝剤、2% Tween 80 - pH 7.6 で再構成した。

50

## 【 0 2 0 9 】

卵巣癌腫モデル A 2 7 8 0 における腫瘍成長進行は、8 回、週に 2 回注射された、0 . 3 m g / k g 用量で投与されたオーリスタチン E に対する、3 . 0 および 5 . 0 m g / k g の化合物 A E - ケト - S u l f 0 7 の統計的に有意な優れた抗腫瘍有効性を示した ( 7 日目から 2 9 日目まで  $p < 0 . 0 1$  )。オーリスタチン E で治療されたマウスは、いかなる抗腫瘍効果も達成せず、腫瘍は、対照群で治療されたものと同等に成長した。A E - ケト - S u l f 0 7 での療法は、しかしながら、9 日目から 6 0 日目の研究終了まで部分寛解、低用量について 2 3 日目から 3 5 日目までおよび高用量について 2 5 日目から 5 1 日目まで一時的な完全寛解を誘発し、用量から独立して、長期腫瘍退縮をもたらした。

## 【 0 2 1 0 】

A E - ケト - S u l f 0 7 治療群は、第 1 の治療後に約 2 % の一時的な体重減少を引き起こした。高用量群からの 1 匹のマウスは、3 5 日目に死亡が確認され、低用量群からの 1 匹は、4 2 日目に悪い全身状態のために犠死させなければならなかった。

## 【 0 2 1 1 】

ヒト卵巣癌腫モデル A 2 7 8 0 - 大腫瘍におけるオーリスタチン E およびアルブミン結合オーリスタチン E 誘導体 A E - ケト - S u l f 0 7 の評価 ( 図 1 8 )

ヒト卵巣癌腫モデル A 2 7 8 0 におけるオーリスタチン E およびアルブミン結合オーリスタチン E 誘導体 A E - ケト - S u l f 0 7 の評価を、細胞株由来異種移植モデルについての一般的な手順に記載されるように行った。

## 【 0 2 1 2 】

ストック溶液を次のように調製した。

1 ) 8 匹のマウス、ランダム化の日に 2 8 g の平均体重、3 4 1 m m <sup>3</sup> の平均腫瘍体積中央値 : 0 . 3 m g / k g のオーリスタチン E T F A 塩 ( A E 当量 ) を、4 週間にわたって週に 2 回、1、4、8、1 1、1 5、1 8、2 2、2 5 日目に 0 . 3 5 m g / k g 7 . 1 μ g / 2 0 g マウスで投与した。試料調製 : 3 . 7 m g を 1 0 0 m L バイアルに計量し、5 2 . 3 m L の 5 0 / 5 0 t e r t - ブタノール / 1 0 m M リン酸ナトリウム緩衝剤、5 % スクロース - p H 7 . 0 に溶解し、1 . 5 m L を 4 m L バイアルにアリコートした。バイアルを 1 時間 - 4 0 ° で凍結し、- 2 0 ° で約 3 6 時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1 . 5 m L の 1 0 m M リン酸ナトリウム緩衝剤、2 0 % プロピレングリコール - p H 7 . 0 で再構成した。

2 ) 8 匹のマウス、ランダム化の日に 2 8 g の平均体重、3 7 8 m m <sup>3</sup> の平均腫瘍体積中央値 : 4 . 5 m g / k g の A E - ケト - S u l f 0 7 ( A E 当量 ) を、4 週間にわたって週に 2 回、1、4、8、1 1、1 5、1 8、2 2、2 5 日目に 6 . 9 9 m g / k g 1 3 9 . 7 μ g / 2 0 g マウスで投与した。試料調製 : 4 0 . 0 m g を 3 0 m L バイアルに計量し、2 8 . 6 m L の 5 0 / 5 0 t e r t - ブタノール / 1 0 m M リン酸ナトリウム緩衝剤、5 % スクロース - p H 7 . 0 に溶解し、1 . 5 m L を 4 m L バイアルにアリコートした。バイアルを 1 時間 - 4 0 ° で凍結し、- 2 0 ° で約 3 6 時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1 . 5 m L の 5 0 m M リン酸ナトリウム緩衝剤、2 % 2 - H P C D - p H 7 . 6 で再構成した。

## 【 0 2 1 3 】

化合物 A E - ケト - S u l f 0 7 の抗腫瘍有効性はまた、ヒト卵巣癌腫モデル A 2 7 8 0 のより大きな腫瘍 ( 約 3 6 0 m m <sup>3</sup> ) を有するマウスに対して試験された。薬物は、両方とも 8 回、週に 2 回注射された、0 . 3 m g / k g で投与されたオーリスタチン E に対する、4 . 5 m g / k g で投与された統計的に有意な優れた抗腫瘍効果を示した ( 2 2 日目から 4 0 日目まで  $p < 0 . 0 0 1$  )。オーリスタチン E で治療されたマウスは、いかなる抗腫瘍効果も達成せず、対照的に、A E - ケト - S u l f 0 7 で治療されたマウスは、2 6 日目から 1 0 3 日目の研究終了まで完全寛解を示し、より小さな腫瘍で既に観察されているように、長期腫瘍退縮を達成した。

## 【 0 2 1 4 】

A E - ケト - S u l f 0 7 治療マウスは、対照と比較してわずかに低減した体重増加の

10

20

30

40

50

みを有した。

【0215】

ヒト腎細胞癌モデルR X F 6 3 1 - 小腫瘍におけるオーリスタチンEおよびアルブミン結合オーリスタチンE誘導体AE - エステル - S u l f 0 7の初期評価(図19)

ヒト腎細胞癌モデルR X F 6 3 1におけるオーリスタチンEおよびアルブミン結合オーリスタチンE誘導体AE - エステル - S u l f 0 7の初期評価を、患者由来異種移植モデルについての一般的な手順に記載されるように行った。

【0216】

このインビボ実験のために、ストック溶液を次のように調製した。

1) 7匹のマウス、ランダム化の日に25gの平均体重、138mm<sup>3</sup>の平均腫瘍体積 : 0.3mg/kgのオーリスタチンE T F A塩(AE当量)を、4週間にわたって週に2回、1、5、8、12、15、19、22、26日目に0.35mg/kg 7.1μg/20gマウスで投与した。試料調製: 2mgを30mLバイアルに計量し、28.3mLの50/50tert-ブタノール/10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH7.0に溶解し、1.2mLを4mLバイアルにアリコートした。1時間-40で凍結し、-20で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2mLの10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、20%プロピレングリコール-pH7.0で再構成した。

10

2) 7匹のマウス、ランダム化の日に26gの平均体重、141mm<sup>3</sup>の平均腫瘍体積 : 2.2~3.0mg/kgのAE - エステル - S u l f 0 7(AE当量)を、4週間にわたって週に2回、1、5、8、12、15、19、26日目に4.00mg/kg 80.1μg/20gマウスで投与した。試料調製: 15.7mgを30mLバイアルに計量し、19.6mLの50/50tert-ブタノール/10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH7.0に溶解し、1.2mLを4mLバイアルにアリコートした。1時間-40で凍結し、-20で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2mLの50mMリン酸ナトリウム緩衝剤、2% tween 80-pH7.6で再構成した。

20

【0217】

腎細胞癌モデルR X F 6 3 1における腫瘍成長進行は、それぞれ8回および7回、週に2回注射された、0.3mg/kgで投与されたオーリスタチンEに対する、2.2mg/kg(用量は15日目および19日目の注射で一時的に3.0mg/kgに増加した)で投与された化合物AE - エステル - S u l f 0 7の統計的に有意な優れた抗腫瘍有効性を示した(p<0.05)。オーリスタチンEは、約40日目まで安定性疾患状態を達成した後、研究終了まで着実に成長した。対照的に、AE - エステル - S u l f 0 7療法は、24日目から53日目まで完全寛解をもたらし、1mm<sup>3</sup>の腫瘍体積の最小値および長期効果を達成した。

30

【0218】

AE - エステル - S u l f 0 7は、一時的な体重減少を引き起こし、9%の最小値が31日目に到達された。17日目から開始した噛みつきおよび引っ掻きによる創傷も観察された。2匹のマウスが死亡し、1匹は悪い全身状態のために犠牲させなければならなかった(20、43、および66日目)。

40

【0219】

ヒト悪性黒色腫瘍モデルA 3 7 5 - 大腫瘍におけるオーリスタチンEおよびアルブミン結合オーリスタチンE誘導体AE - エステル - S u l f 0 7の評価(図20)

ヒト悪性黒色腫瘍モデルA 3 7 5におけるオーリスタチンEおよびアルブミン結合オーリスタチンE誘導体AE - エステル - S u l f 0 7の評価を、細胞株由来異種移植モデルについての一般的な手順に記載されるように行った。

【0220】

R X F 6 3 1異種移植モデルにおける投与経験に基づいて、ストック溶液を次のように調製した。

50

1) 7匹のマウス、ランダム化の日に28gの平均体重、310mm<sup>3</sup>の平均腫瘍体積中央値: 0.3mg/kgのオーリスチンE TFA塩(AE当量)を、3週間にわたって週に2回、1、6、9、13、16日目に0.35mg/kg 7.1μg/20gマウスで投与した。試料調製: 2mgを30mLバイアルに計量し、28.3mLの50/50tert-ブタノール/10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH7.0に溶解し、1.2mLを4mLバイアルにアリコートした。バイアルを1時間-40で凍結し、-20で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2mLの10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、20%プロピレングリコール-pH7.0で再構成した。

2) 7匹のマウス、ランダム化の日に29gの平均体重、371mm<sup>3</sup>の平均腫瘍体積中央値: 2.4mg/kgのAE-エステル-Sulf07(AE当量)を、3週間にわたって週に2回、1、6、9、13、16日目に4.37mg/kg 87.3μg/20gマウスで投与した。試料調製: 12.6mgを30mLバイアルに計量し、14.4mLの50/50tert-ブタノール/10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH7.0に溶解し、1.2mLを4mLバイアルにアリコートした。バイアルを1時間-40で凍結し、-20で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2mLの50mMリン酸ナトリウム緩衝剤、2%Tween 80-pH7.6で再構成した。

3) 7匹のマウス、ランダム化の日に31gの平均体重、355mm<sup>3</sup>の平均腫瘍体積中央値: 2.4mg/kgのAE-エステル-Sulf07(AE当量)を、3週間にわたって週に2回、1、6、9、13、16日目に4.37mg/kg 87.3μg/20gマウスで投与した。試料調製: 12.6mgを30mLバイアルに計量し、14.4mLの50/50tert-ブタノール/10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH7.0に溶解し、1.2mLを4mLバイアルにアリコートした。バイアルを1時間-40で凍結し、-20で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2mLの50mMリン酸ナトリウム緩衝剤、4%2-HP CD-pH7.6で再構成した。

#### 【0221】

黒色腫異種移植モデルA375における腫瘍成長進行は、5回、週に2回注射された、0.3mg/kgで投与されたオーリスチンEと比較して、(再構成緩衝剤、2%Tween 80または4%2-HP CDから独立して)2.4mg/kgで投与された化合物AE-エステル-Sulf07の統計的に有意な抗腫瘍改善を示す(9~33日目にp<0.01)。オーリスチンEでの治療は、14日目まで初期安定性疾患を示し、その後腫瘍は着実に成長した。AE-エステル-Sulf07で治療されたマウスは、しかしながら、16日目から37日目の研究終了までほぼ完全寛解を達成し、実験の開始時の大きな腫瘍体積中央値にかかわらず、それぞれ2%Tween 80および4%2-HP CDで再構成されたAE-エステル-Sulf07について23日目に4mm<sup>3</sup>および26日目に1mm<sup>3</sup>の最小値に到達した。

#### 【0222】

対照と比較して有意な体重変化は記録されなかったが、9日目から開始した嘔みつきおよび引っ掻きによる創傷が観察された。Bepanthen治療は、負傷したマウスの健康を改善した。AE-エステル-Sulf07 2%Tween 80治療群における1匹のみのマウスを、悪い全身状態のために犠牲させなければならなかった。

#### 【0223】

ヒト非小細胞肺癌モデルLXF A737-小腫瘍におけるオーリスチンEおよびアルブミン結合オーリスチンE誘導体AE-エステル-Sulf07の評価(図21)

ヒト非小細胞肺癌モデルLXF A737におけるオーリスチンEおよびアルブミン結合オーリスチンE誘導体AE-エステル-Sulf07の評価を、患者由来異種移植モデルについての一般的な手順に記載されるように行った。

#### 【0224】

10

20

30

40

50

ストック溶液を次のように調製した。

1) 7匹のマウス、ランダム化の日に27gの平均体重、137mm<sup>3</sup>の平均腫瘍体積中央値: 0.3mg/kgのオーリスタチンE TFA塩(AE当量)を、4週間にわたって週に2回、0、4、7、11、14、18、21、25日目に0.35mg/kg 7.1μg/20gマウスで投与した。試料調製: 2mgを30mLバイアルに計量し、28.3mLの50/50tert-ブタノール/10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH7.0に溶解し、1.2mLを4mLバイアルにアリコートした。バイアルを1時間-40で凍結し、-20で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2mLの10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、20%プロピレングリコール-pH7.0で再構成した。

10

2) 7匹のマウス、ランダム化の日に27gの平均体重、126mm<sup>3</sup>の平均腫瘍体積中央値: 2.4mg/kgのAE-エステル-Sulf07(AE当量)を、4週間にわたって週に2回、0、4、7、11、14、18、21、25日目に4.37mg/kg 87.3μg/20gマウスで投与した。試料調製: 31mgを30mLバイアルに計量し、28.5mLの50/50tert-ブタノール/10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH7.0に溶解し、0.96mLを4mLバイアルにアリコートした。バイアルを1時間-40で凍結し、-20で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.2mLの50mMリン酸ナトリウム緩衝剤、4%2-HP CD-pH7.6で再構成した。

【0225】

20

NSCLC異種移植モデルLXF E737における腫瘍成長進行は、両方とも8回週に2回投与された、0.3mg/kgのオーリスタチンEに対する2.4mg/kgの化合物AE-エステル-Sulf07の優れた抗腫瘍有効性を、統計的有意性と共に示した(56および63日目にp<0.05)。オーリスタチンE治療群における腫瘍は、21日目から42日目まで一時的にのみ安定性疾患状態を保ち、療法の終了後に有意に成長した。対照的に、AE-エステル-Sulf07で治療されたマウスは、21日目に完全腫瘍寛解に達し、74日目の研究終了まで腫瘍体積を測定不能レベルに下げ、長期抗腫瘍効果をもたらした。

【0226】

研究の経過中、5匹のマウスを、体重減少および皮膚病変の組み合わせのために安楽死させなければならなかった。

30

【0227】

ヒト卵巣癌腫モデルA2780-大腫瘍におけるオーリスタチンEおよびアルブミン結合オーリスタチンE誘導体AE-エステル-Sulf07の評価(図22)

ヒト卵巣癌腫モデルA2780におけるオーリスタチンEおよびアルブミン結合オーリスタチンE誘導体AE-エステル-Sulf07の評価を、細胞株由来異種移植モデルについての一般的な手順に記載されるように行った。

【0228】

ストック溶液を次のように調製した。

1) 8匹のマウス、ランダム化の日に28gの平均体重、341mm<sup>3</sup>の平均腫瘍体積中央値: 0.3mg/kgのオーリスタチンE TFA塩(AE当量)を、4週間にわたって週に2回、1、4、8、11、15、18、22、25日目に0.35mg/kg 7.1μg/20gマウスで投与した。試料調製: 3.7mgを100mLバイアルに計量し、52.3mLの50/50tert-ブタノール/10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH7.0に溶解し、1.5mLを4mLバイアルにアリコートした。バイアルを1時間-40で凍結し、-20で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.5mLの10mMリン酸ナトリウム緩衝剤、20%プロピレングリコール-pH7.0で再構成した。

40

2) 8匹のマウス、ランダム化の日に27gの平均体重、403mm<sup>3</sup>の平均腫瘍体積中央値: 1.9mg/kgのAE-エステル-Sulf07(AE当量)を、4週間にわ

50

たって週に1回、1、4、8、11、15、18、22、25日目に 3.46 mg/kg 69.2 µg/20g マウスで投与した。試料調製：36.5 mgを30 mLバイアルに計量し、26.4 mLの50/50 tert-ブタノール/10 mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH 7.0に溶解し、0.75 mLを4 mLバイアルにアリコートした。バイアルを1時間-40 で凍結し、-20 で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.5 mLの50 mMリン酸ナトリウム緩衝剤、2% 2-H P C D - pH 7.6で再構成した。

【0229】

1.9 mg/kgの用量で投与されたAE-エステル-Sulfateは、卵巣癌腫モデルA2780において、同様に8回週に2回注射された、0.3 mg/kgで投与されたオーリスタチンEと比較して、優れた抗腫瘍有効性を示す(37日目から40日目までp < 0.001)。オーリスタチンEで治療されたマウスは、いずれの抗腫瘍効果も達成しなかった。AE-エステル-Sulfateで治療されたマウスは、しかしながら、19日目から51日目までに部分寛解、および54日目から103日目の研究の終了までに完全寛解を示し、長期腫瘍退縮をもたらした。

10

【0230】

AE-エステル-Sulfate治療マウスは、対照と比較して体重減少の兆候を有さなかったが、4匹の動物は、腫瘍壊死のために研究から除外されなければならなかった。

【0231】

ヒト卵巣癌腫モデルA2780-小腫瘍におけるアルブミン結合オーリスタチンE誘導体化合物AE-エステル-Sulfateの評価(図23)

20

ヒト卵巣癌腫モデルA2780におけるアルブミン結合オーリスタチンE誘導体AE-エステル-Sulfateの評価を、細胞株由来異種移植モデルについての一般的な手順に記載されるように行った。

【0232】

ストック溶液を次のように調製した。

1) 8匹のマウス、ランダム化の日に27gの平均体重、174 mm<sup>3</sup>の平均腫瘍体積中央値：3.8 mg/kgのAE-エステル-Sulfate(AE当量)を、4週間にわたって週に1回、1、8、15、22日目に 6.67 mg/kg 133.4 µg/20g マウスで投与した。試料調製：25.6 mgを30 mLバイアルに計量し、19.2 mLの50/50 tert-ブタノール/10 mMリン酸ナトリウム緩衝剤、5%スクロース-pH 7.0に溶解し、1.5 mLを4 mLバイアルにアリコートした。バイアルを1時間-40 で凍結し、-20 で約36時間かけて凍結乾燥し、次いで栓をした。注射の日に、凍結乾燥試料を、1.5 mLの50 mMリン酸ナトリウム緩衝剤、6% 2-H P C D - pH 7.6で再構成した。

30

【0233】

AE-エステル-Sulfateはまた、同じ卵巣癌腫モデルA2780において、より小さな腫瘍、およびマウスの皮膚に対する薬物の副作用を減少させる異なる投与スキームで試験された。AE-エステル-Sulfateは、3.8 mg/kgで4回、週に1回投与され、対照と比較して統計的に有意な改善した抗腫瘍効果を再度示した(7日目から14日目までp < 0.01)。新たな投与レジメンにおいてAE-エステル-Sulfateで治療されたマウスは、12日目から35日目までに部分寛解、39日目から70日目の研究の終了までに完全寛解を達成した。3匹のAE-エステル-Sulfate治療マウスは、体重減少を示し、59日目に犠死させなければならなかった。

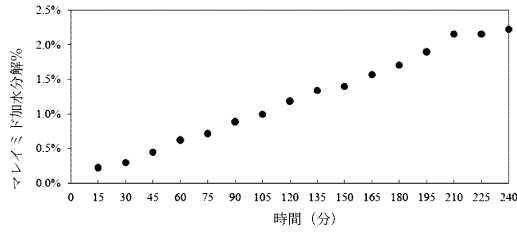
40

【図面】

【図 1 A】

【図 1 A】

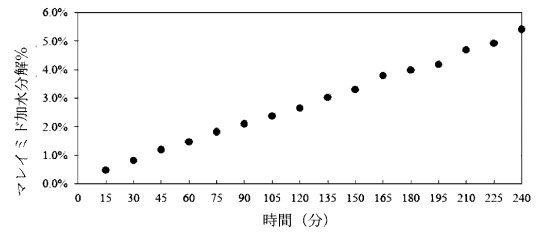
(a) 2%HPCβDを含有する50mMリン酸ナトリウムpH7.65緩衝剤におけるAE-ケト-Su1f07(1277μM)の再構成安定性



【図 1 B】

【図 1 B】

(b) 2%HPCβDを含有する50mMリン酸ナトリウムpH7.65緩衝剤におけるAE-ケト-EMCH(1277μM)の再構成安定性

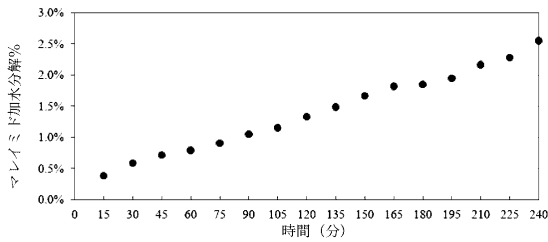


10

【図 2 A】

【図 2 A】

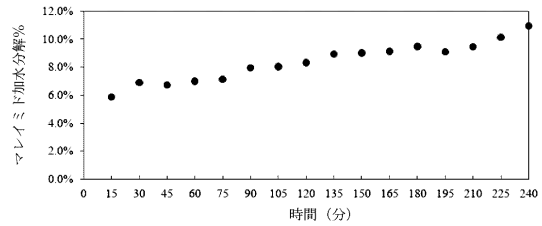
(a) 4%HPCβDを含有する50mMリン酸ナトリウムpH7.65緩衝剤におけるAE-エステル-Su1f07(655μM)の再構成安定性



【図 2 B】

【図 2 B】

(b) 4%HPCβDを含有する50mMリン酸ナトリウムpH7.65緩衝剤におけるAE-エステル-EMCH(655μM)の再構成安定性



20

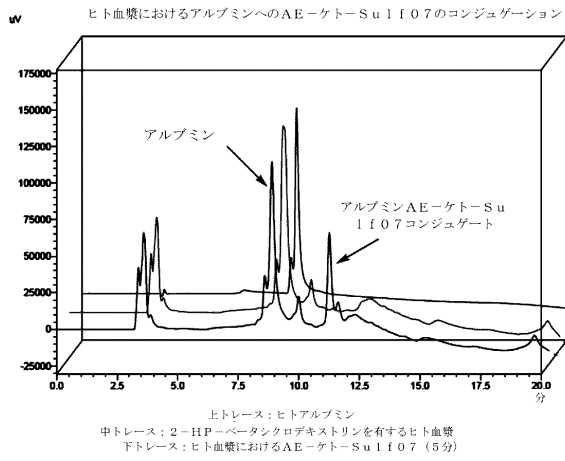
30

40

50

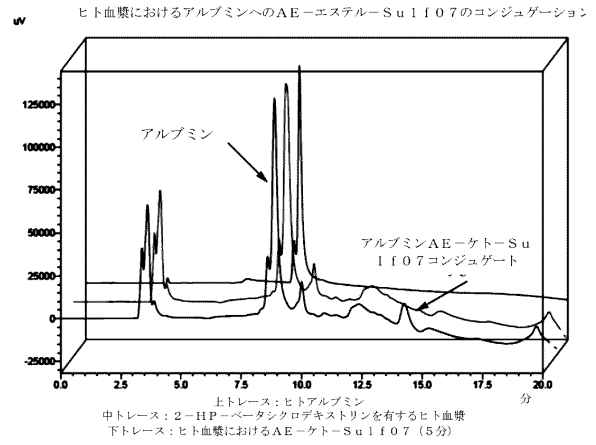
【 図 3 】

【図3】



【 図 4 】

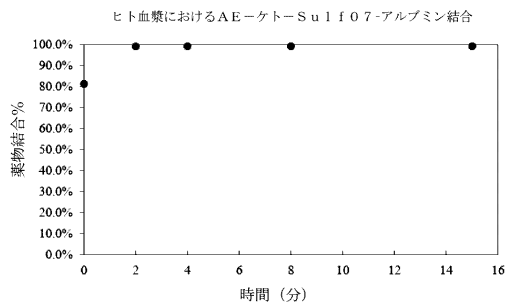
【図4】



10

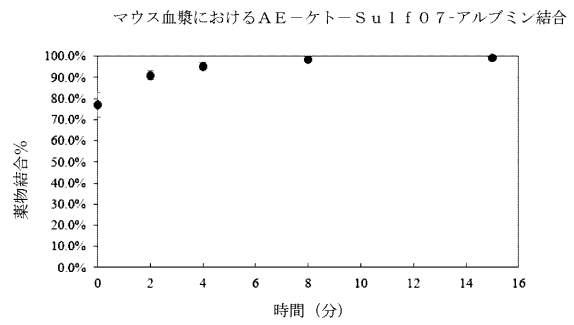
【 図 5 】

【図5】



【 図 6 】

【図6】



20

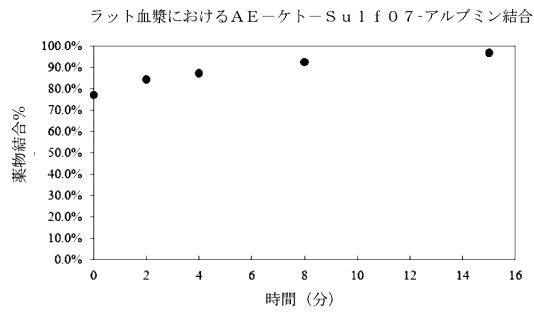
30

40

50

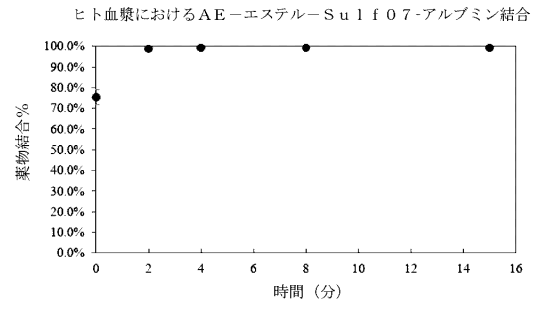
【図7】

【図7】



【図8】

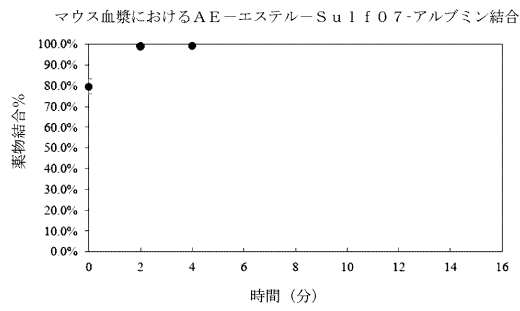
【図8】



10

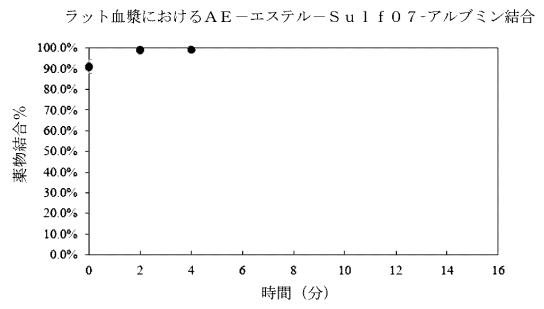
【図9】

【図9】



【図10】

【図10】

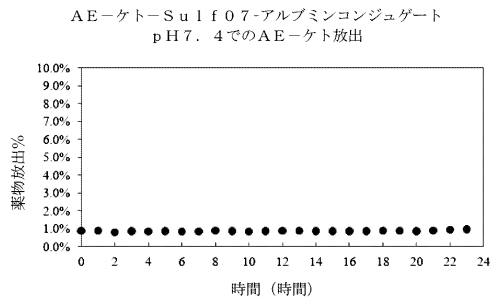


20

【図11A】

【図11A】

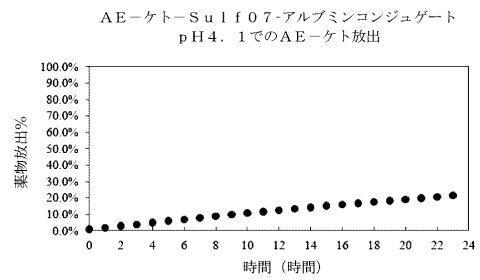
(a)



【図11B】

【図11B】

(b)



30

40

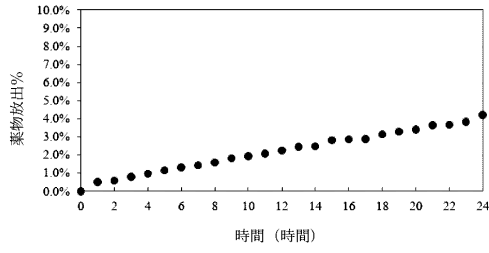
50

【 図 1 2 A 】

【 図 1 2 A 】

(a)

AE-エステル-Sulf07-アルブミンコンジュゲート  
pH7.4でのAE-エステル放出

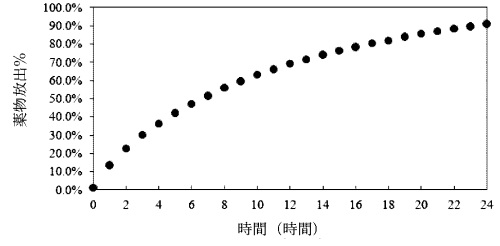


【 図 1 2 B 】

【 図 1 2 B 】

(b)

AE-エステル-Sulf07-アルブミンコンジュゲート  
pH4.1でのAE-エステル放出

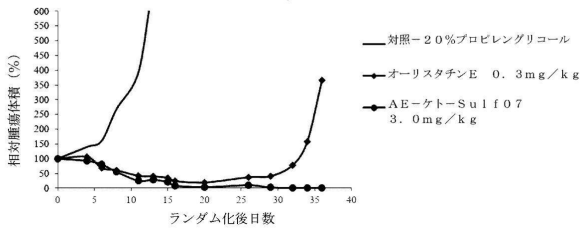


10

【 図 1 3 】

【 図 1 3 】

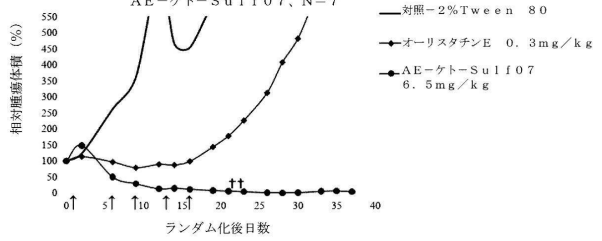
経時的な群RTV中央値  
A375-小腫瘍、Ind. 時間8日  
AE-ケート-Sulf07、N=7



【 図 1 4 】

【 図 1 4 】

経時的な群RTV中央値  
A375-大腫瘍、Ind. 時間15日  
AE-ケート-Sulf07、N=7

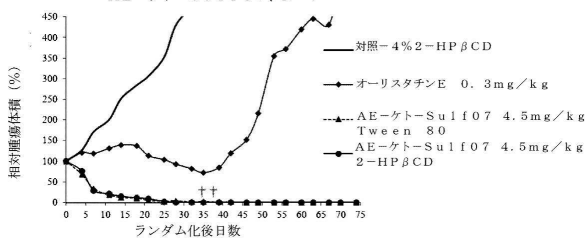


20

【 図 1 5 】

【 図 1 5 】

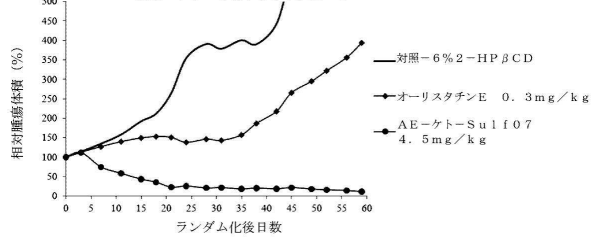
経時的な群RTV中央値  
LXFA737-小腫瘍、Ind. 時間29日  
AE-ケート-Sulf07、N=7



【 図 1 6 】

【 図 1 6 】

経時的な群RTV中央値  
LXFA737-大腫瘍、Ind. 時間89日  
AE-ケート-Sulf07、N=8



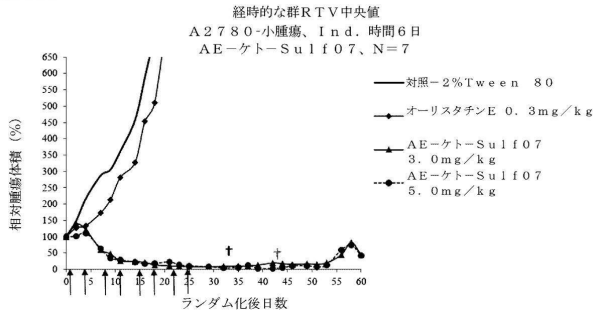
30

40

50

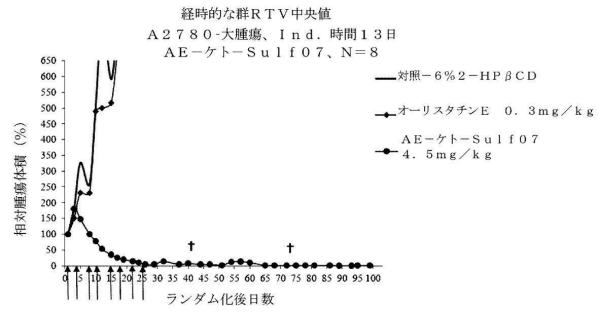
【図17】

【図17】



【図18】

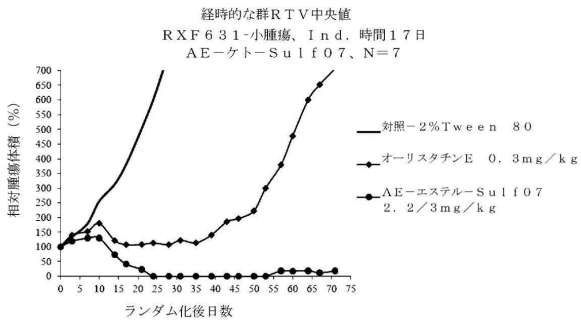
【図18】



10

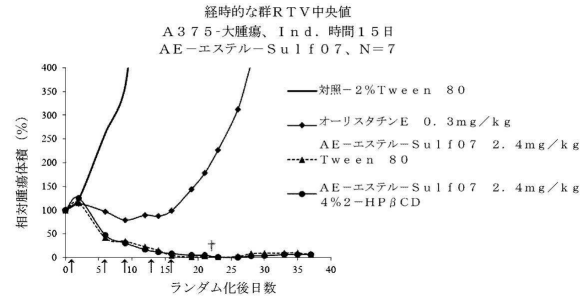
【図19】

【図19】



【図20】

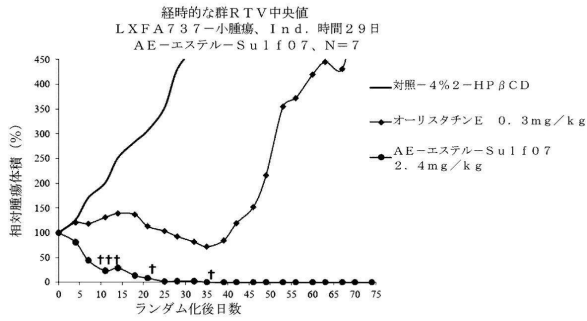
【図20】



20

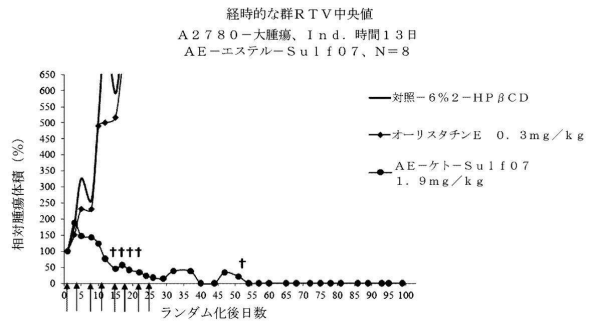
【図21】

【図21】



【図22】

【図22】



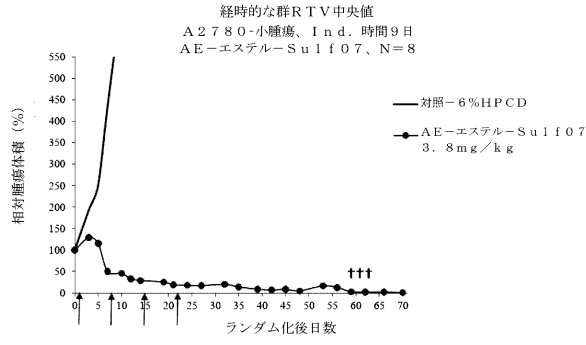
30

40

50

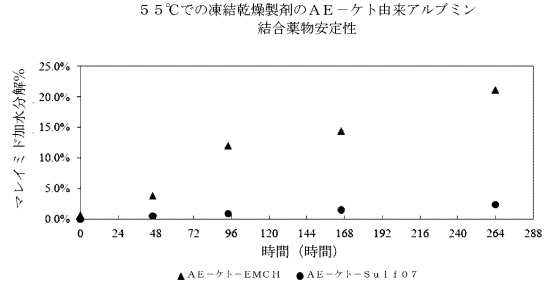
【 図 2 3 】

【図 2 3】



【 図 2 4 】

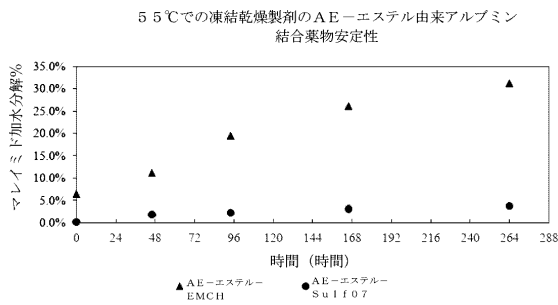
【図 2 4】



10

【 図 2 5 】

【図 2 5】



20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	31/10
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 P	39/02	(2006.01)	A 6 1 P	39/02
A 6 1 K	38/07	(2006.01)	A 6 1 K	38/07

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 クラッツ, フェリクス

ドイツ国 7 9 2 3 8 エーレンキルヒェン, ティールガルテンシュトラッセ 9

(72)発明者 アブ アジャアジャ, ハーリド

ドイツ国 1 3 1 8 7 ベルリン, ミューレンシュトラッセ 6 8

(72)発明者 ワルネッケ, アナ

ドイツ国 7 9 1 1 7 フライブルク, ジーゲルスバッハシュトラッセ 1 0

(72)発明者 ノルマン, フリーデリーケ イー.

ドイツ国 7 9 1 0 0 フライブルク, マリー-キュリー-シュトラッセ 4 0

(72)発明者 ケスター, シュテファン ダーヴィト

ドイツ国 7 9 1 9 4 ゲンデルフィンゲン, ドルフシュトラッセ 1

(72)発明者 ガルシア フェルナンデス, ハビエル

ドイツ国 7 9 1 1 7 フライブルク, カプラー シュトラッセ 9

(72)発明者 ペス, ララ

ドイツ国 7 9 1 0 0 フライブルク, メルツハウザー シュトラッセ 6

(72)発明者 ヴァルター, ハイディ-クリスティン

ドイツ国 7 9 1 1 4 フライブルク, ラウフェナー シュトラッセ 1 5

(72)発明者 マグヌソン, ヨハネス パル

ドイツ国 7 9 1 0 8 フライブルク, イェーガーシュトラッセ 8

(72)発明者 チェルヘジャ, セルゲイ

ドイツ国 7 9 1 0 8 フライブルク, オッフエンブルガー シュトラッセ 5 2

(72)発明者 ペレス ガラン, パトリシア

ドイツ国 7 9 1 1 0 フライブルク, ドゥナントシュトラッセ 1アー

(72)発明者 メダ, フェデリコ

ドイツ国 7 9 1 1 0 フライブルク, ドゥナントシュトラッセ 1アー

(72)発明者 ダウム, シュテフェン ヨゼフ

ドイツ国 7 9 3 1 2 エメンディングゲン, メッツガー-グヤール-シュトラッセ 4

審査官 吉門 沙央里

(56)参考文献 国際公開第2016/205738(WO, A2)

特表2004-531544(JP, A)

特表2017-506628(JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )