

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7458997号
(P7458997)

(45)発行日 令和6年4月1日(2024.4.1)

(24)登録日 令和6年3月22日(2024.3.22)

(51)国際特許分類	F I
C 0 7 K 5/06 (2006.01)	C 0 7 K 5/06
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L
A 6 1 K 47/65 (2017.01)	A 6 1 K 47/65
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 3
請求項の数 21 (全53頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号	特願2020-566576(P2020-566576)	(73)特許権者	391015708
(86)(22)出願日	令和1年5月28日(2019.5.28)		ブリistol - マイヤーズ スクイブ カン
(65)公表番号	特表2021-525724(P2021-525724		パニー
	A)		BRISTOL - MYERS SQUI
(43)公表日	令和3年9月27日(2021.9.27)		BB COMPANY
(86)国際出願番号	PCT/US2019/034114		アメリカ合衆国08543ニュージャー
(87)国際公開番号	WO2019/231879		ジー州 プリンストン、ルート206ア
(87)国際公開日	令和1年12月5日(2019.12.5)		ンド・プロビンス・ライン・ロード
審査請求日	令和4年5月17日(2022.5.17)	(74)代理人	100145403
(31)優先権主張番号	62/677,307		弁理士 山尾 憲人
(32)優先日	平成30年5月29日(2018.5.29)	(74)代理人	100126778
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 品川 永敏
前置審査		(74)代理人	100162695
			弁理士 釜平 双美
		(74)代理人	100156155
			最終頁に続く

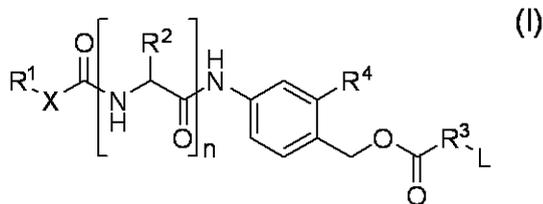
(54)【発明の名称】 プロドラッグおよび複合体に使用する修飾自己切断部分ならびにその使用方法および製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(I)

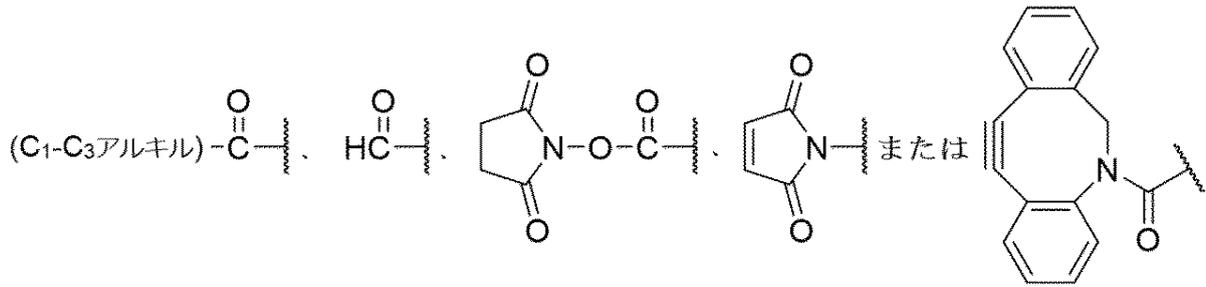
【化1】



[式中、

R¹は、 N_3 、OH、SH、ONH₂、NH₂、CO₂H、

【化2】



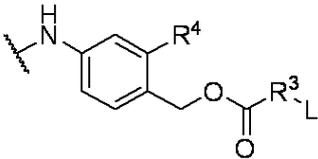
10

であり；

各R²は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、 γ -カルボキシグルタミン酸、シトルリン、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、ノルロイシン、ノルバリン、オルニチン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンからなる群からそれぞれ独立して選択されるアミノ酸残基の側鎖であり；

nは、2、3、4、または5であり；

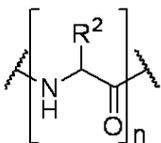
【化3】



20

に結合するポリペプチドを有する

【化4】

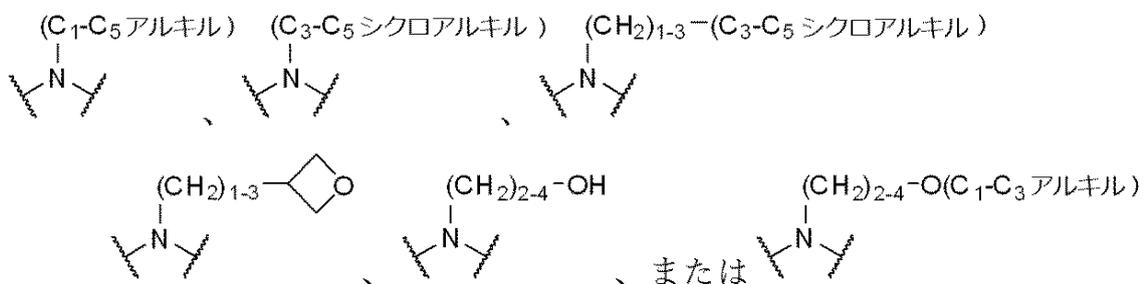


30

は、カテプシンBで切断可能であり；

R³は、O、NH、

【化5】



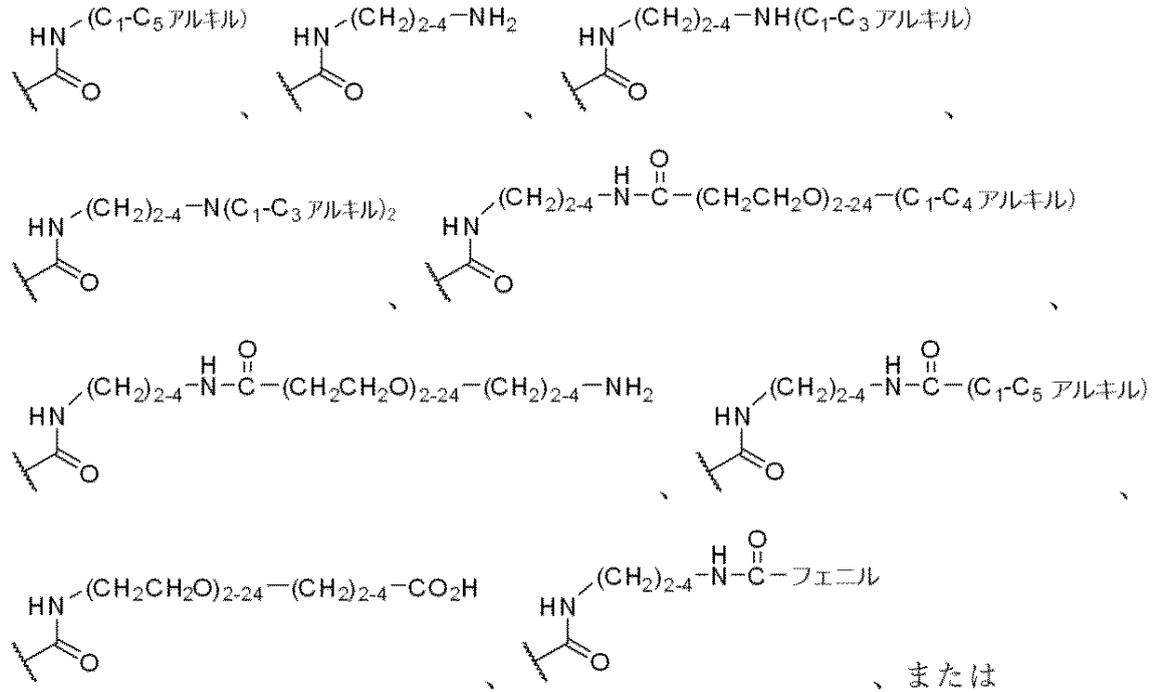
40

であり；

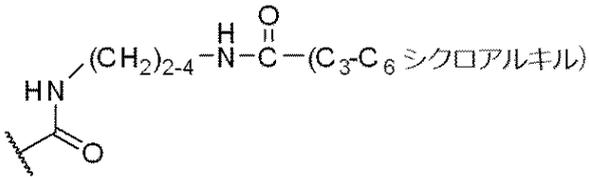
R⁴は、

50

【化6】



【化7】



であり；

フェニルまたはC₃-C₆シクロアルキル基は、F、Cl、CN、NO₂、またはC₁-C₃アルキルで適宜置換され；

Lは、式L-R³Hの生物活性分子の残渣であり；および

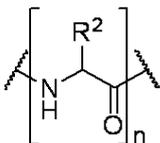
Xは、スペーサー基である]

で示される化合物。

【請求項2】

式

【化8】



が、Val-Cit、Glu-Val-Cit、Phe-Lys、Phe-Arg、Val-Lys、Ala-Lys、Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Val-Ala、Ala-Val-Cit、またはVal-Glyである、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

R⁴が、

10

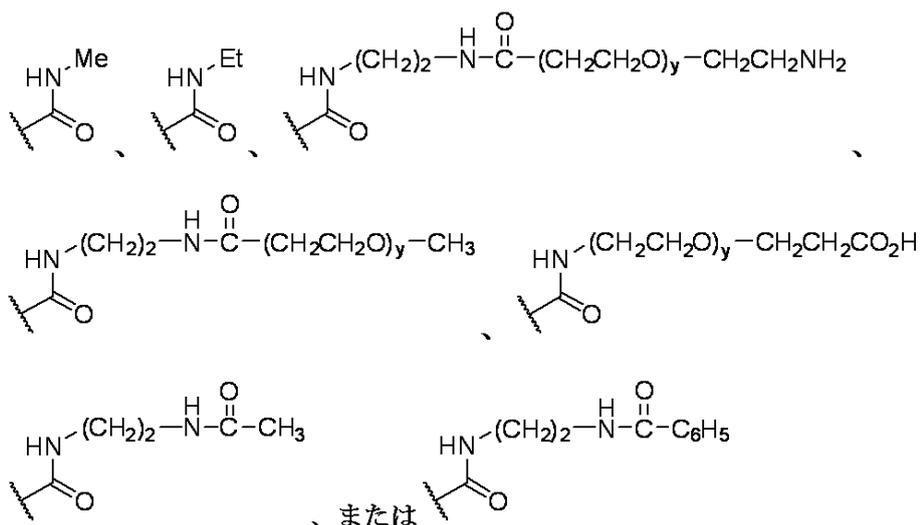
20

30

40

50

【化 9】



10

であり；

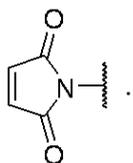
yが、4、8、12、または24である、請求項1に記載の化合物。

20

【請求項 4】

R¹が、NH₂または

【化 1 0】

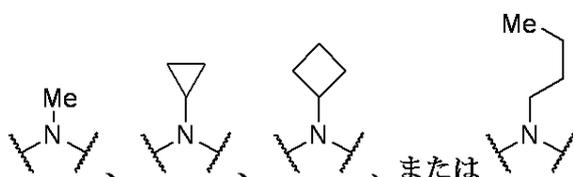


である、請求項1に記載の化合物。

【請求項 5】

R³が、NH、

【化 1 1】



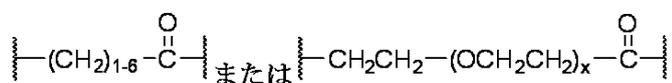
である、請求項1に記載の化合物。

40

【請求項 6】

Xが、

【化 1 2】



であり；

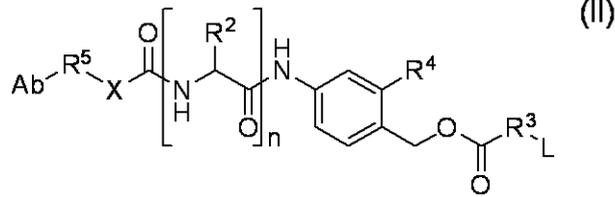
xが、2～24の整数である、請求項1に記載の化合物。

【請求項 7】

式(II)

50

【化13】



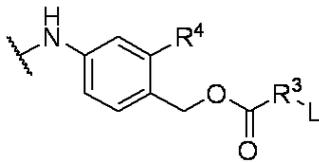
[式中、

Abは、抗体であり；

各R²は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、 γ -カルボキシグルタミン酸、シトルリン、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、ノルロイシン、ノルバリン、オルニチン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンからなる群からそれぞれ独立して選択されるアミノ酸残基の側鎖であり；

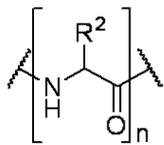
nは、2、3、4、または5であり；

【化14】



に結合するポリペプチドを有する

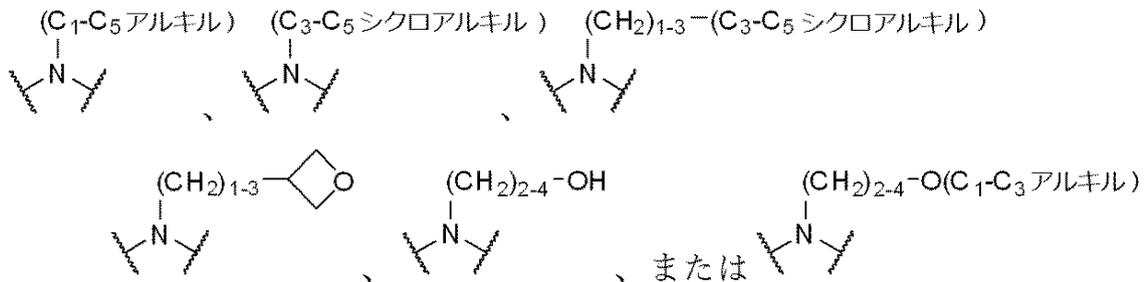
【化15】



は、カテプシンBで切断可能であり；

R³は、O、NH、

【化16】



であり；

R⁴は、

10

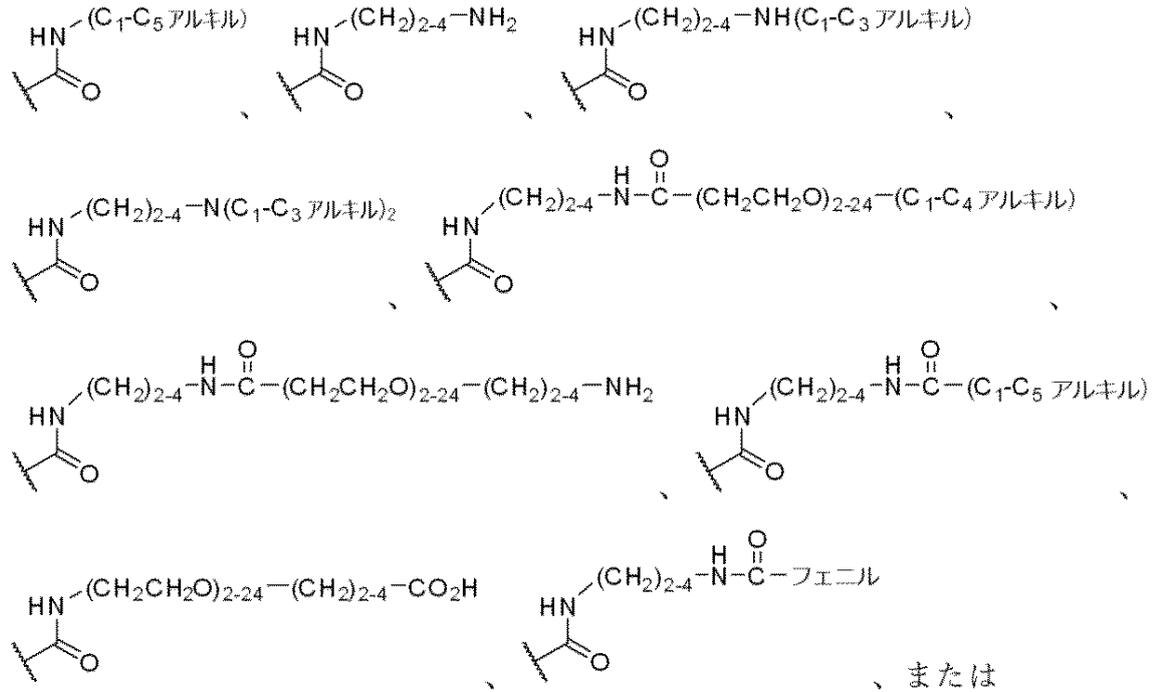
20

30

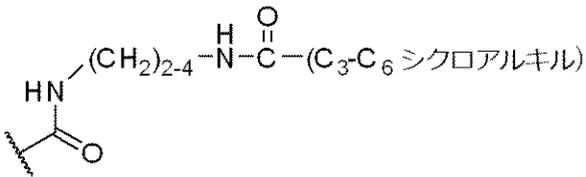
40

50

【化 1 7】



【化 1 8】



であり；

フェニルまたはC₃-C₆シクロアルキル基が、F、Cl、CN、NO₂、またはC₁-C₃アルキル
で適宜置換され；

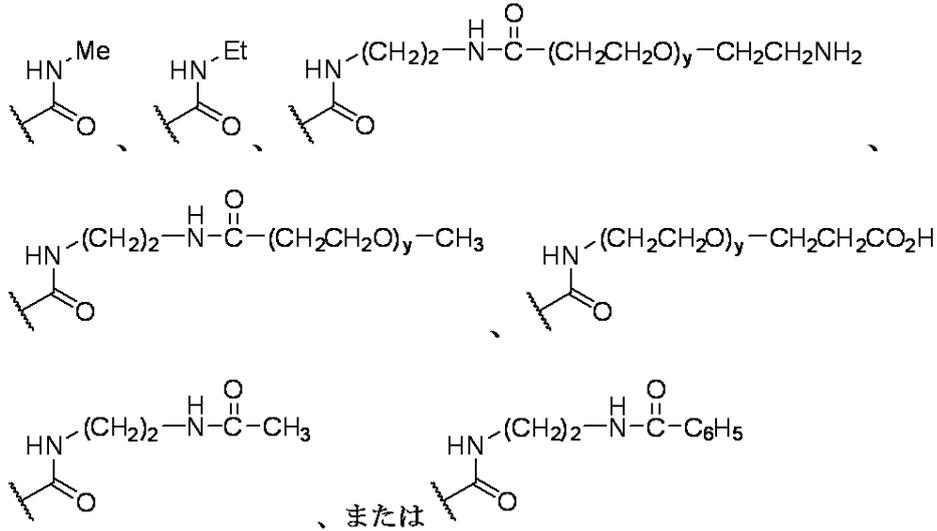
R⁵は、

30

40

50

【化 2 1】



10

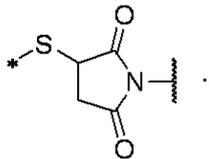
であり；

yが、4、8、12、または24である、請求項8に記載の複合体。

【請求項 1 0】

R⁵が、

【化 2 2】

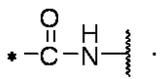


である、請求項7に記載の複合体。

【請求項 1 1】

R⁵が、

【化 2 3】

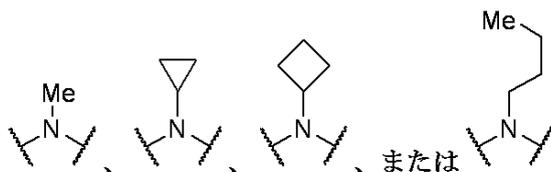


である、請求項9に記載の複合体。

【請求項 1 2】

R³が、NH、

【化 2 4】



40

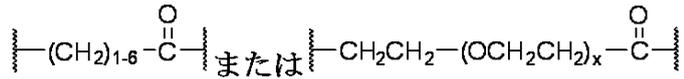
である、請求項7に記載の複合体。

【請求項 1 3】

Xが、

50

【化25】



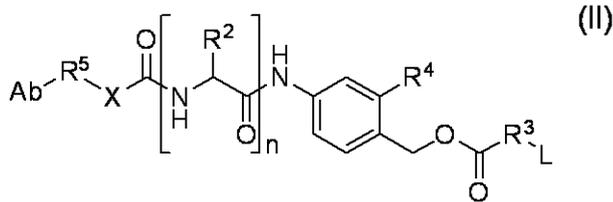
であり；

xが、2～24の整数である、請求項7に記載の複合体。

【請求項14】

式(II)

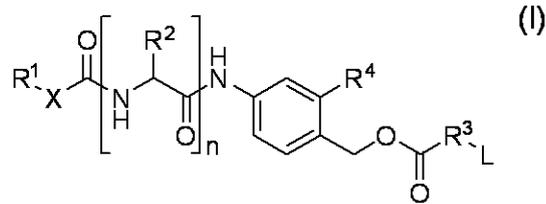
【化26】



10

に示される複合体を製造する方法であって、抗体Abを式(I)

【化27】



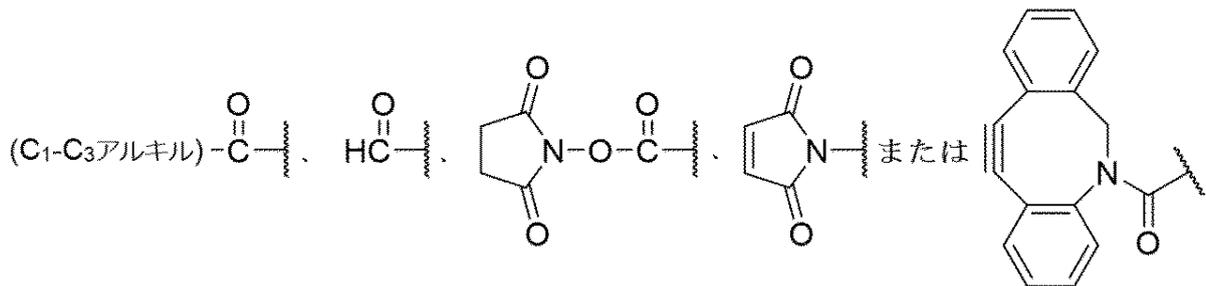
20

[ここで、

Abは、抗体であり；

R¹は、N₃、OH、SH、ONH₂、NH₂、CO₂H、

【化28】



30

であり；

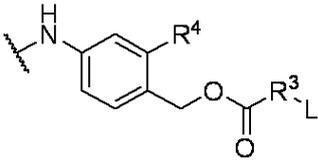
各R²は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、 γ -カルボキシグルタミン酸、シトルリン、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、ノルロイシン、ノルバリン、オルニチン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンからなる群からそれぞれ独立して選択されるアミノ酸残基の側鎖であり；

40

nは、2、3、4、または5であり；

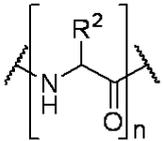
50

【化 2 9】



に結合するポリペプチドを有する

【化 3 0】

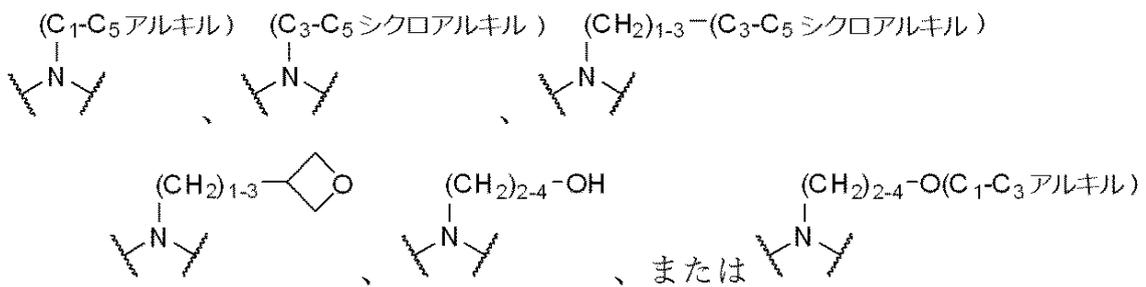


10

は、カテプシンBで切断可能であり；

R³は、O、NH、

【化 3 1】

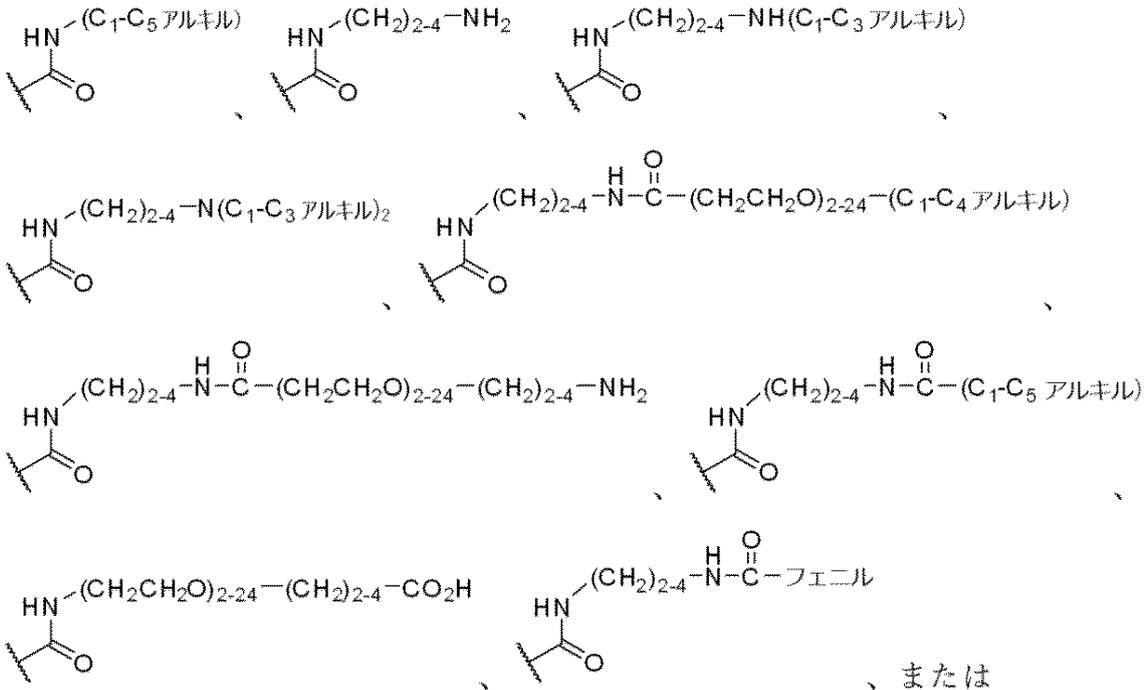


20

であり；

R⁴は、

【化 3 2】

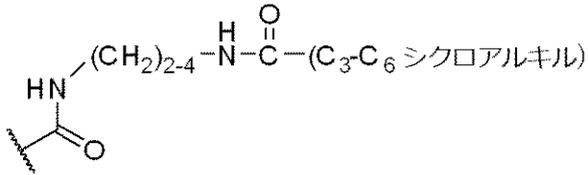


30

40

50

【化 3 3】

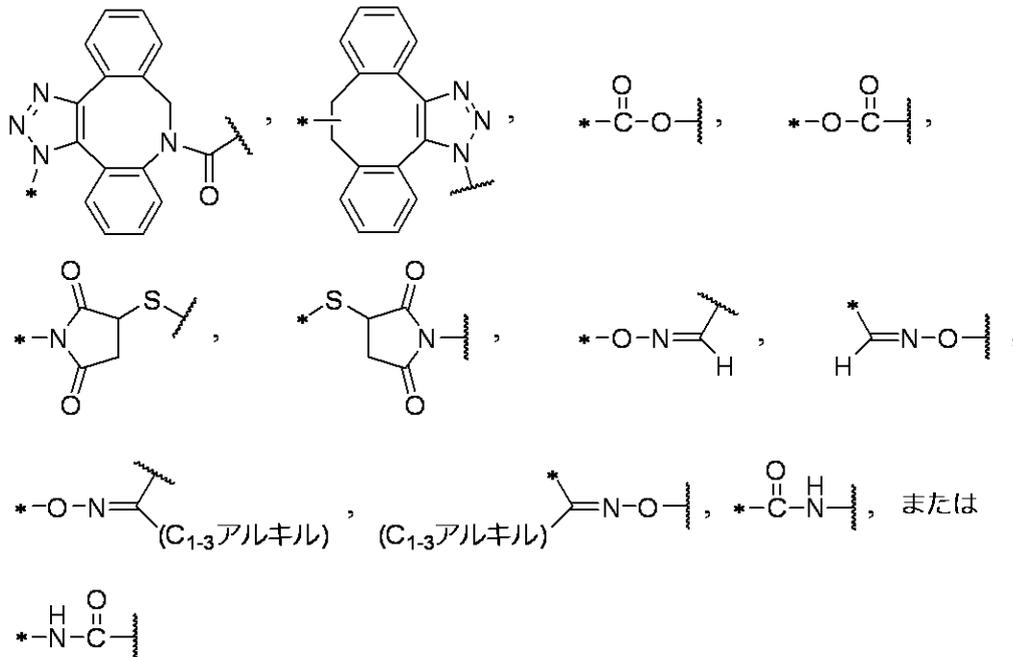


であり；

フェニルまたは C_3-C_6 シクロアルキル基が、F、Cl、CN、 NO_2 、または C_1-C_3 アルキルで適宜置換され；

R^5 は、

【化 3 4】



であり、式中、Abに結合する価電子の位置はアスタリスクで表され、Xに結合する価電子の位置は波線で表され；

Lは、式 $\text{L-R}^3\text{H}$ の生物活性分子の残渣であり；および

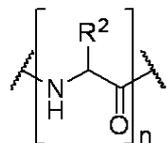
Xは、スペーサー基である]

の化合物と結合することを含む、方法。

【請求項 1 5】

式

【化 3 5】



が、Val-Cit、Glu-Val-Cit、Phe-Lys、Phe-Arg、Val-Lys、Ala-Lys、Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Val-Ala、Ala-Val-Cit、またはVal-Glyである、請求項14に記載の方法。

【請求項 1 6】

R^1 が、 NH_2 である、請求項14に記載の方法。

【請求項 1 7】

10

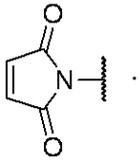
20

30

40

50

R¹が、
【化36】



である、請求項14に記載の方法。

【請求項18】

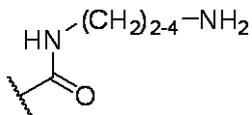
R³が、NH、
【化37】



10

であり；

R⁴が、
【化38】

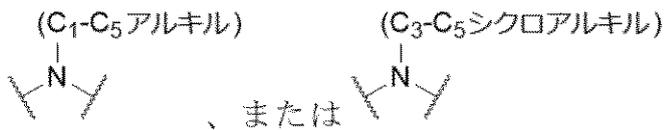


20

である、請求項4に記載の化合物。

【請求項19】

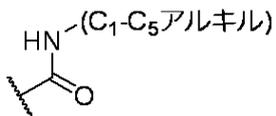
R³が、NH、
【化39】



30

であり；

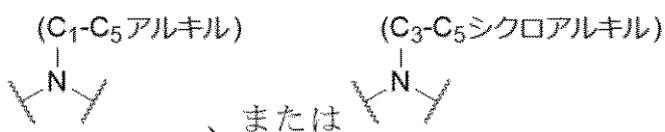
R⁴が、
【化40】



である、請求項4に記載の化合物。

【請求項20】

R³が、NH、
【化41】



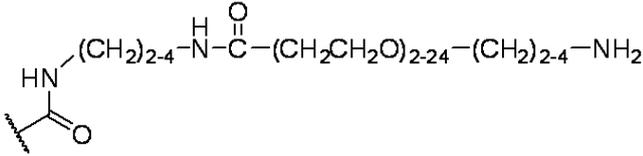
40

であり；

R⁴が、

50

【化42】



である、請求項4に記載の化合物。

【請求項21】

R³が、NH、

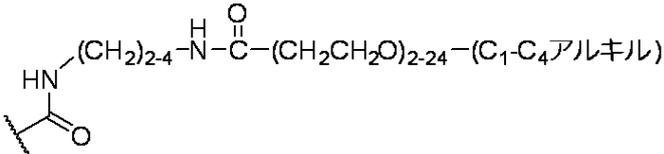
【化43】



であり；

R⁴が、

【化44】



である、請求項4に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2018年5月29日出願の米国仮出願番号第62/677307号に対する優先権を米国特許法第119条(e)の下に主張するものであって、該開示は引用により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

本開示は、酵素活性化自己切断部分に関するものであり、その部分は、プロドラッグおよび複合体に使用するために修飾され、酵素活性化を調節している。

【0003】

プロテアーゼ酵素に曝してペプチド結合が切断され、障害が無い活性形態に解放されるまでの間、ペプチドを生物学的活性分子に結合させて、一時的に生物学的活性分子の活性を遮断することが望まれることもある。生物学的活性分子は、低分子薬または生物分子(例えば抗体)であり得る。

【0004】

ペプチドが直接生物学的活性分子に接続する場合、立体障害またはその他の理由により、生物学的活性分子が、ペプチド結合を切断するプロテアーゼの機能を妨げ得る。その場合、自己切断(SI)部分がペプチドおよび生物学的活性分子の間に挿入され得る。一般に使用されるSI部分は、作用機構が下記で示されているp-アミノベンジルオキシカルボニル(PABC)基であり、式中、生物学的活性分子は、アミン含有の一般式の1つであるD-NH₂であり、Pは、プロテアーゼにより点線(a)で切断可能なペプチド、およびYは、下記で説明する様々な機能として働く部分を適宜発現する。

10

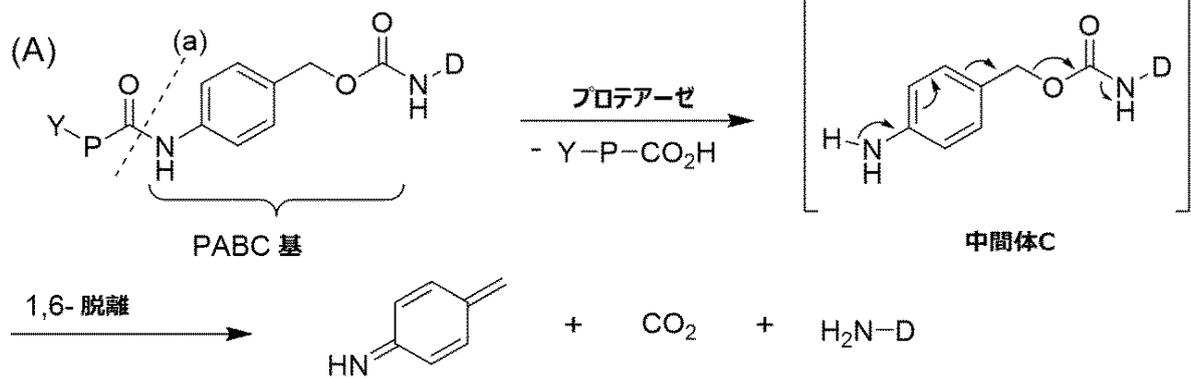
20

30

40

50

【化1】



10

【0005】

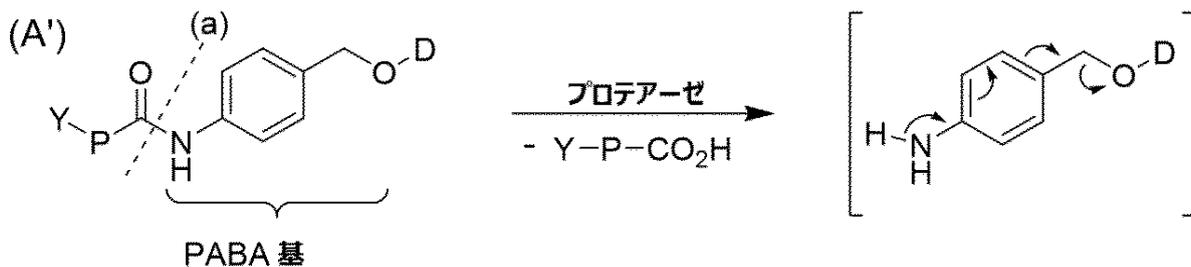
点線(a)でのペプチドPのプロテアーゼ切断により不安定な中間体Cが生成され、自然に自己切断反応(機構的には1,6-脱離)および脱炭酸が起り、D-NH₂が放出される。PABC基は、DおよびPの間に空間的隔離を与え、プロテアーゼ活性の干渉から前者を防ぐが、それでもやはりそれ自体が干渉しないような構造を取る。スペーサーとしてのSI部分の使用における一般的な議論に関してはCarl et al. 1981aおよびDoronina et al. 2008.、またAlouane et al.も参照のこと。

20

【0006】

変形として、生物学的活性分子は、アミンの代わりにアルコールであるD-OH-であり得て、類似の機構により放出される。D-OHが十分に良い脱離基である場合、SI部分は、脱炭酸が無い他は同じ1,6-脱離反応を介して自己切断する、p-アミノベンジルアルコール(PABA)基に集約され得る。

【化2】



30

【0007】

式(A)のある実施態様は、意図した部位(例えば腫瘍)にD-NH₂を目的通り送達するための抗体-薬物複合体(「ADC」、免疫抱合体とも称される)である。その場合、Yは抗体を示し、D-NH₂は、治療剤、ウォーヘッド(warhead)、またはペイロードと同義的に称される。抗がん治療において、抗体Yは、その抗原が腫瘍に関連する抗原であるように選択される。すなわち、抗体Yは、ADCをがん部位に導く標的薬として機能するような、がん細胞により特異的または選択的に発現するものである。

40

【0008】

抗原が、がん細胞の表面に位置している場合、ADCによってそこに結合することは、しばしばエンドサイトーシスによる抗原-ADC複合体の標的細胞への内在化に繋がる。ADCは、最終的に細胞小器官(例えばリソソーム)に入り込む。ペプチドPの配列は、リソソームプロテアーゼに選択的な基質である。プロテアーゼによる切断は、D-NH₂を放出する。ADCが血流中で循環する間、D-NH₂は抗体に接続したままであり、ペプチドPは血液に見られるプロテアーゼの基質ではないため、D-NH₂は不活性である。ADCのレビューとしては、Gerber et al. 2013を参照のこと。

50

【0009】

別の実施態様において、(A)は、PABC基に結合しているため、D-NH₂が不活性なままのプロドラッグであり得る。PABC基およびペプチドPが、それ自体でD-NH₂の活性を十分に阻害する場合、Yは存在しなくてもよい。他方、Yが存在し得て、さらなる阻害効果を与える場合、Yは阻害部位と称される。Yはターゲティング機能を行わないため、意図した作用部位でのD-NH₂の選択的放出はペプチドPの設計に依拠し、そのペプチドPは、各組織または血液中と比較してその部位で主に見られる酵素により選択的に切断されるように設計されている。

【0010】

一般に、PABCまたはPABA部分の芳香環は、上記の非置換1,4-フェニレン環である。しかしながら、置換された環の開示も存在する。電子求引基は、1,6-脱離反応を加速させると言われている。例えば、Boyd et al. 2010, Burke et al. 2017, Carl et al. 1981b, McDonagh et al. 2007, Senter et al. 2006およびSzczeapanik et al. 2014を参照のこと。

10

【0011】

該芳香環が、適宜置換されていてもよい5または6員ヘテロ環であり、1,6-脱離反応を行うことも可能なSI部分もまた開示されている。例えば、Feng 2008および2011である。

【0012】

ペプチド結合切断以外の反応により1,6-脱離反応が引き起こされるSI部分もまた公知である。他に引き起こされる反応とは、グルクロニド部分の切断、ホウ酸エステルの加水分解、ホスフェートの加水分解、ニトロ基のアミンへの還元、およびアジド基のアミンへの還元であり得て、しばしば酵素が介在するものである。多様なSI部分およびそれらの性質のレビューとしては、Alouane et al. 2015を参照のこと。非PABCまたは非PABAのSI部分の特定の開示については、例えば、Jeffrey 2011、Jeffrey et al. 2006、Kim et al. 2016、Machida et al. 2016、Major et al. 2011およびZhang et al. 2015を参照のこと。

20

【0013】

溶解度を向上させるために、親水性基はPABC基のベンジル位に結合している(Lin et al. 2016)。

【0014】

第一著者または発明者および年号によって本明細書に引用される文献の完全な引用は、本明細書の最後に列記されている。

30

【本発明の概要】

【0015】

意図した活性化プロテアーゼ以外のプロテアーゼによる切断を予防、または活性化プロテアーゼによる生物学的活性分子の放出率の調節のいずれかを行うために、ペプチド-PABC結合のタンパク質分解感受性を調節することが望ましい場合がある。

【0016】

有効なADCまたはプロドラッグは、例えばADCまたはプロドラッグが血液系を循環している間などに、ペプチドPの切断を早期に起こすべきではない。内在化ADCにとって、ペプチドPは、リソソーム酵素および好ましいカテプシンBで特異的に切断するように設計され得る。Dubowchik et al. 1998a、1998bおよび2002ならびにFirestone et al. 2001を参照のこと。

40

【0017】

プロドラッグの酵素は、例えばマトリプターゼまたはマトリックスメタロプロテアーゼなど、健常組織に比べて疾患組織の細胞外環境でより多く見られるものであり得る。血液は、Pが基質になり得るプロテアーゼの補体自体を含有するため、絶対選択性を達成することは困難である。

【0018】

ADCまたはプロドラッグの候補の前臨床評価において、ヒト血清中の安定性が最初に評

50

価される。それが必要な安定性を示した場合、さらに動物モデル；通常マウスモデル(霊長類、またはより大きな齧歯類を用いたモデルと比較して、より少ない量の候補物質、およびより安価に行えるという便宜上の理由から)における前臨床評価で有望な候補になる。また、マウス血清のエステラーゼ活性は、一般にヒト血清のそれより高いため、マウス血清中で安定なADCは、ヒト血清中で安定であると期待され得る。

【0019】

マウス血清中のプロテアーゼの補体はヒト血清中のそれとは異なる。つまりヒト血清中で安定なADCまたはプロドラッグが、マウス血清中で安定であると仮定され得ないことを意味する。これ故、ADCまたはプロドラッグの候補の安定性をマウス血清中でも試験することが重要である。そこで不安定な場合、マウスモデルから情報を得られず、有効性の欠如または有毒な副作用の発生が、血流中の薬剤の早期放出に起因するのかADC自体の不安定性に起因するのかが分からない。

【0020】

カテプシン、特にカテプシンBは、その基質であるペプチド配列がヒト血清中に見られるプロテアーゼの基質ではないため、ADCにおける好ましいリソソームの活性化酵素として存在している。しかしながら、カテプシンBにより切断される設計のいくつかのADCは、ヒト血清中で安定であるが、マウス血清でそこに含まれるカルボキシエステラーゼC1の活性により不安定となることが観測されている(Dorywalska et al.2016)。そのような不安定さはマウスモデルの使用が不可能となり、薬剤の候補化合物を動物モデルで評価することが困難になる。

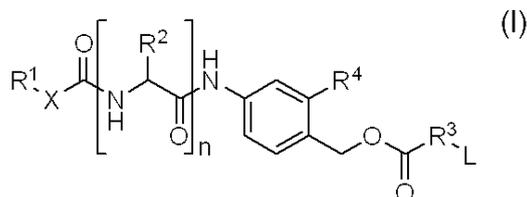
【0021】

我々は、PABC基の特定の置換基；ベンジルオキシカルボニル基に対してオルト位の置換基が、意図した活性化プロテアーゼではないプロテアーゼによる切断を阻止するか、または意図した活性化プロテアーゼによる切断率を徐々に減少させるかのいずれかを行い、そこに結合するペプチド部分のプロテアーゼ切断の感受性を調節し得ることを発見した。特に、オルト置換基を有するSI部分は、ヒト血清中の安定性を保持し、マウス血清中の安定性の向上を示すうえに、カテプシンBにより即座に切断される。

【0022】

ある実施態様において、式(I)

【化3】



[式中、

R¹は、C₁-C₅アルキル、N₃、OH、SH、ONH₂、NH₂、CO₂H

10

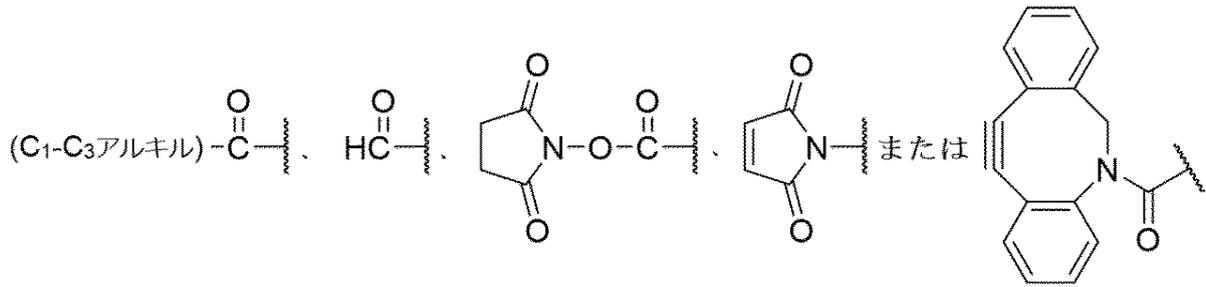
20

30

40

50

【化4】



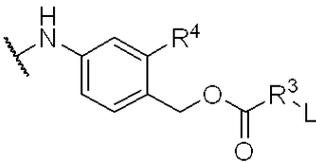
10

であり；

R^2 は、アラニン、 β -アラニン、 α -アミノ酪酸、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、 γ -カルボキシグルタミン酸、シトルリン、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、ノルロイシン、ノルバリン、オルニチン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンからなる群から選択される側鎖のアミノ酸残基であり；

n は、2、3、4、または5であり；

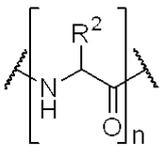
【化5】



20

に結合するポリペプチドを有する

【化6】

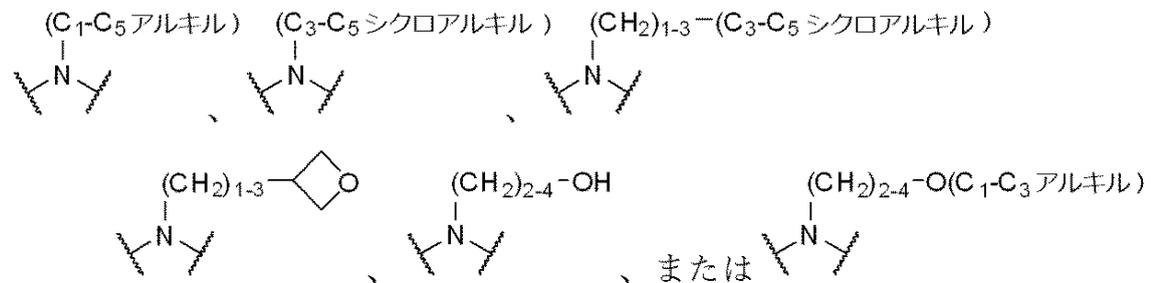


30

は、カテプシンBで切断可能であり；

R^3 は、O、NH、

【化7】



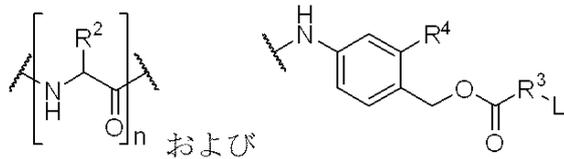
40

であり；

R^4 は、マウス血清中の

50

【化 8】



の間の結合の切断を実質的に抑止する部分であるが、カテプシンBによる同結合の切断は実質的に抑止せず；

Lは、式L-R³Hの生物活性分子の残渣であり；および

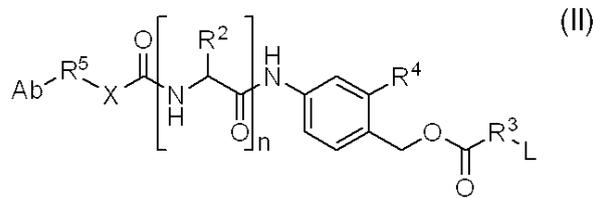
Xは、スペーサー基である]

で示される化合物を提供する。

【0023】

式(I)の化合物は、抗体に結合するための反応性R¹基、例えば、以下に限らないが、NH₂を用いて、ADCを製造するために用いられ得る。それ故、別の実施態様において、式(II)：

【化 9】



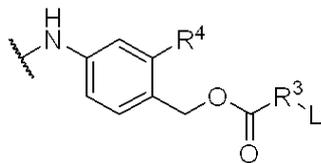
[式中、

Abは、抗体であり；

R²は、アラニン、 α -アラニン、 β -アミノ酪酸、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、 γ -カルボキシグルタミン酸、シトルリン、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、ノルロイシン、ノルバリン、オルニチン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンからなる群から選択される側鎖のアミノ酸残基であり；

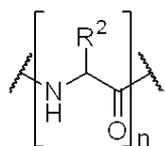
nは、2、3、4、または5であり；

【化 10】



に結合するポリペプチドを有する

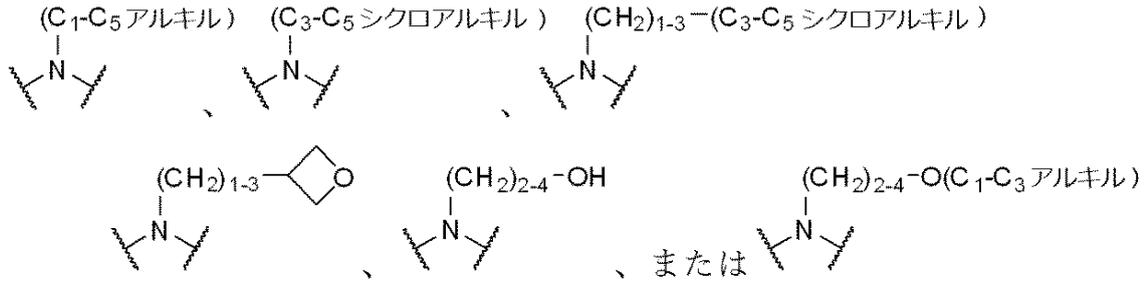
【化 11】



は、カテプシンBで切断可能であり；

R³は、O、NH、

【化 1 2】

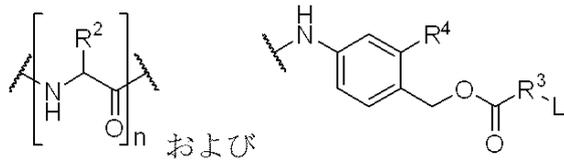


10

であり；

R⁴は、マウス血清中の

【化 1 3】

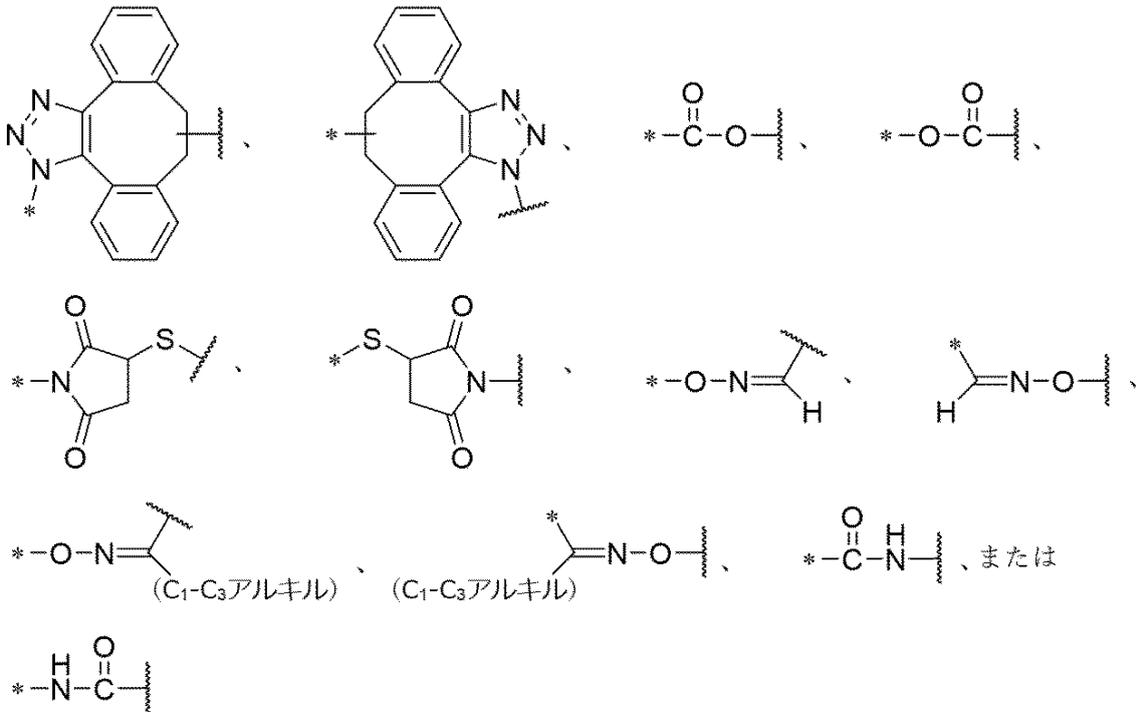


の間の結合の切断を実質的に抑止する部分であるが、カテプシンBによる同結合の切断は実質的に抑止せず；

20

R⁵は、

【化 1 4】



30

40

であり、式中、Abに結合する価電子の位置はアスタリスクで表され、Xに結合する価電子の位置は波線で表され；

Lは、式L-R³Hの生物活性分子の残渣であり；および

Xは、スペーサー基である]

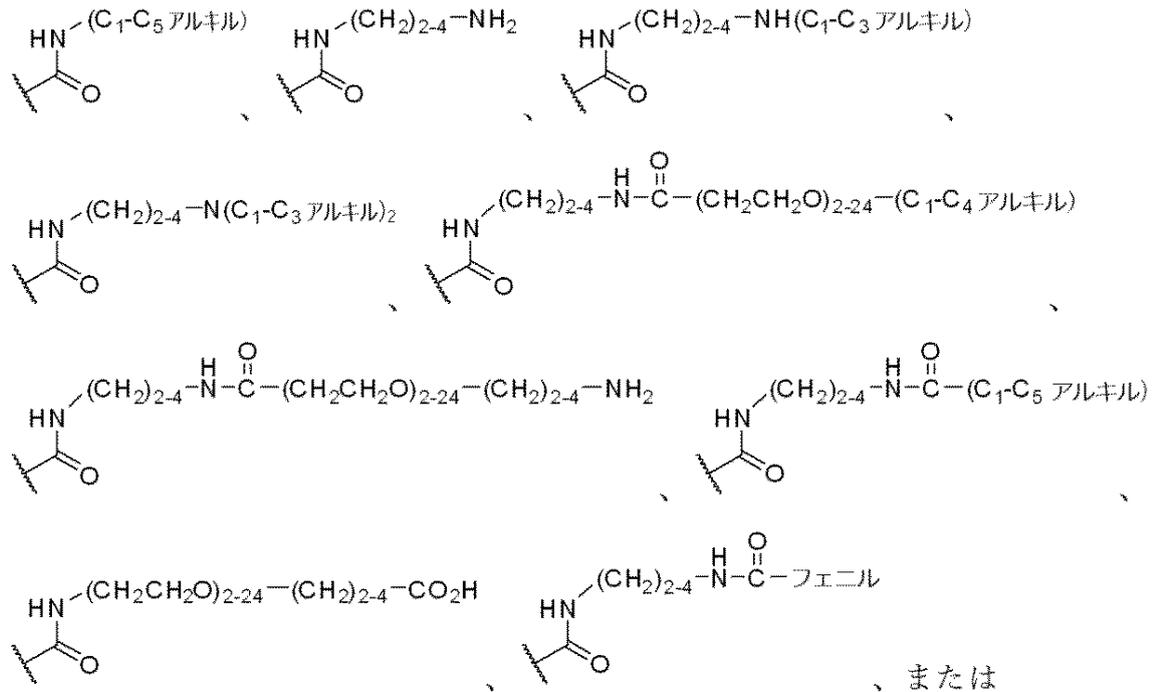
で示される複合体を提供する。

【0024】

好ましくは、式(I)または(II)におけるR⁴は、

50

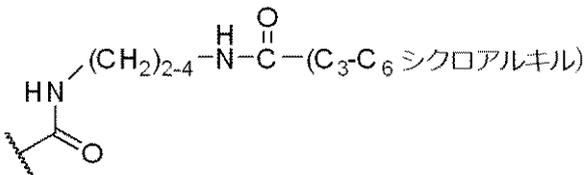
【化 1 5】



10

20

【化 1 6】



であり；

フェニルまたはC₃-C₆シクロアルキル基は、F、Cl、CN、NO₂、またはC₁-C₃アルキルで適宜置換されている。

30

【0025】

別の実施態様において、抗体Abを式(I)の化合物と結合することを含む、式(II)で示される複合体を製造する方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は、本発明の化合物を用いて製造したADCの、動物モデルにおける中皮腫に対する有効性を示す。

【図2A】図2Aは、図2Bと組み合わせて、本明細書に開示の化合物の合成におけるスキームAを示す。

40

【図2B】図2Bは、図2Aと組み合わせて、本明細書に開示の化合物の合成におけるスキームAを示す。

【図3A】図3Aは、図3Bおよび図3Cと組み合わせて、本明細書に開示の化合物の合成におけるスキームBを示す。

【図3B】図3Bは、図3Aおよび図3Cと組み合わせて、本明細書に開示の化合物の合成におけるスキームBを示す。

【図3C】図3Cは、図3Aおよび図3Bと組み合わせて、本明細書に開示の化合物の合成におけるスキームBを示す。

【図4】図4は、本明細書に開示の化合物の合成におけるスキームCを示す。

【図5】図5は、本明細書に開示の化合物の合成におけるスキームDを示す。

50

【本発明の詳細な説明】

【0027】

(定義)

「抗体」は、全抗体およびいずれかの抗原結合フラグメント(すなわち「抗原結合部位」)またはその一本鎖バリエーションを意味する。全抗体は、少なくとも2つの重鎖(H)および2つの軽鎖(L)がジスルフィド結合で相互接続したタンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域(V_H)および3つのドメイン、C_{H1}、C_{H2}およびC_{H3}を有する重鎖定常領域を包含する。各軽鎖は、軽鎖可変領域(V_LまたはV_K)および単一のドメイン、C_Lを有する軽鎖定常領域を包含する。V_HおよびV_L領域は、より変異の少ないフレームワーク領域(FR)が散在している、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変領域にさらに細分割され得る。各V_HおよびV_Lは、3つのCDRおよび4つのFRを包含し、アミノ末端からカルボキシ末端が次の順序で配列されている: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4。可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを有する。定常領域は、ホスト組織または因子(免疫系の様々な細胞(例えばエフェクター細胞)および古典的補体システムの最初の成分(C1q)など)への抗体の結合を仲介し得る。抗体が、K_Dが5 × 10⁻⁸M以下、より好ましくは1 × 10⁻⁸M以下、より好ましくは6 × 10⁻⁹M以下、より好ましくは3 × 10⁻⁹M以下、さらにより好ましくは2 × 10⁻⁹M以下で抗原Xに結合する場合、その抗体は抗原Xに「特異的に結合する」と言われる。該抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、または好ましくはヒト抗体であり得る。重鎖定常領域は、グリコシル化のタイプまたは度合に作用するように、抗体半減期を延長するように、エフェクター細胞または補体システムとの相互作用を強める、または弱めるように、もしくはいくつかの他の性質を調節するように改変され得る。この改変は、1つ以上のアミノ酸を置換、付加、ならびに欠失すること、またはドメインを別の免疫グロブリン型のドメインと置換すること、もしくは前述の組み合わせにより行われ得る。

【0028】

抗体の「抗原結合フラグメント」および「抗原結合部位」(または単純に「抗体部位」または「抗体フラグメント」)は、抗原への特異的結合能を有する、1つ以上の抗体のフラグメントを意味する。抗体の抗原結合機能は、完全な抗体のフラグメント、例えば(i) Fabフラグメント: V_L、V_H、C_LおよびC_{H1}ドメインを有する一価フラグメント、(ii) F(ab')₂フラグメント: ヒンジ領域でジスルフィド結合により繋がった2つのFabフラグメントを有する二価フラグメント、(iii) Fab'フラグメント: 本質的にはFabでありヒンジ領域の一部を有するフラグメント(例えば、Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 6th ed., Saunders Elsevier 2007を参照)、(iv) Fdフラグメント: V_HおよびC_{H1}ドメインを有するフラグメント、(v) Fvフラグメント: 抗体の片腕のV_LおよびV_Hドメインを有するフラグメント、(vi) dAbフラグメント: V_Hドメインを有するフラグメント(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)、(vii) 単離された相補性決定領域(CDR)、および(viii) ナノボディ: 1つの可変ドメインおよび2つの定常ドメインを有する重鎖可変領域などにより行われ得ることが示されている。好ましい抗原結合フラグメントは、Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv、およびFdフラグメントである。さらに、Fvフラグメントの2つのドメイン、V_LおよびV_Hは、別個の遺伝子によりコードされているが、組み換えの方法を用いて、合成リンカーにより接合され得る。該合成リンカーは、V_LおよびV_H領域を組み合わせて(一本鎖Fv、またはscFvとして知られる)一価分子を形成する、一本鎖タンパク質として合成することが可能である。例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426; およびHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)を参照のこと。そのような一本鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合部位」の用語の範囲である。

【0029】

特に断りが無い限り(例えばSEQ ID NO内の直鎖ナンバリング一覧を参照する場合など)、重鎖または軽鎖可変領域(V_HまたはV_L)における抗体中のアミノ酸位置のナンバリングは、Kabatシステム(Kabat et al., "Sequences of proteins of immunological interest", 5th ed., Pub. No. 91-3242, U.S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, Md., 1991、以下「Kabat」という)を参照し、重鎖または軽鎖定常領域(C_{H1}、C_H

2、C_{H3}、またはC_L)における抗体中のアミノ酸位置のナンバリングは、Kabatに記載のEUインデックスを参照する。その使用の例として、開示の内容が引用として本明細書に組み込まれるLazar et al.、US 2008/0248028 A1を参照のこと。さらに、ImMunoGeneTics情報システム(IMG T)のウェブサイトでは、「IMG T Scientific Chart: Correspondence between C Numberings」と題する表が提供されており、その採番システム間の対応、重鎖定常領域のEUナンバリングおよびKabatナンバリングを示している。

【0030】

「単離抗体」は、異なる抗原特異性をもつ他の抗体が実質的に無い(例えば、抗原Xに特異的に結合する単離抗体は、抗原X以外の抗原に特異的に結合する抗体が実質的に無い)抗体を意味する。しかしながら、抗原Xに特異的に結合する単離抗体は、他の抗原(例えば他の種由来の抗原X分子)に対して交差反応性があってもよい。ある実施態様において、単離抗体は特異的にヒト抗原Xに結合し、他の(非ヒト)抗原Xと交差反応しない。さらに、単離抗体は、実質的に他の細胞物質および/または化学物質が含まれ得ない。

10

【0031】

「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、特定の抗原決定基に対して単一の結合特異性および親和性を示す、単一分子組成物の抗体分子の調製を意味する。

【0032】

「ヒト抗体」は、フレームワークおよびCDR領域の両方(および存在する場合は定常領域)が、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来である可変領域を有する抗体を意味する。ヒト抗体は、天然または合成修飾を含む、後の修飾を包含する。ヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によりコードされていないアミノ酸残基(例えば、無作為または部位特異的なインビトロ突然変異、ならびにインビボ体細胞変異により導入される変異)を包含してもよい。しかしながら、「ヒト抗体」は、別の哺乳類種(例えばマウス)の生殖細胞系由来のCDR配列がヒトフレームワーク配列に接合されている抗体を含まない。

20

【0033】

「ヒトモノクローナル抗体」は、単一の結合特異性を示し、フレームワークおよびCDR領域の両方が、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を意味する。ある実施態様において、ヒトモノクローナル抗体は、遺伝子組み換え非ヒト動物(例えば、不死化細胞と融合したヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する遺伝子組み換えマウス)から得たB細胞を含むハイブリドーマにより生産される。

30

【0034】

「脂肪族」は、特定の炭素原子数(例えば、「C₃脂肪族」、「C₁₋₅脂肪族」、「C₁-C₅脂肪族」、または「C₁~C₅脂肪族」；後者3つは1~5個の炭素原子を有する脂肪族部分と同義のフレーズ)か、または炭素原子の数が明確に特定されていない場合、1~4個の炭素原子(不飽和脂肪族部分の例では2~4個の炭素)を有する直鎖または分岐鎖、飽和または不飽和の非芳香族炭化水素部分を意味する。同様の理解が、他のタイプの炭素数にも適用される(C₂₋₄アルケン、C₄-C₇シクロ脂肪族など)。同様に、例えば用語「(CH₂)₁₋₃」の下付き文字の1、2、または3は、該用語がCH₂、CH₂CH₂、およびCH₂CH₂CH₂を表すための略記であると理解される。

40

【0035】

「アルキル」は、飽和脂肪族部分を意味し、適用される炭素原子の数を指定する上記と同様の方法を用いる。実例として、C₁-C₄アルキル部分には、以下に限らないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、イソブチル、t-ブチル、1-ブチル、2-ブチルなどが挙げられる。「アルキレン」は、アルキル基に対応する二置換基、例えばCH₂CH₂、CH₂CH₂CH₂、およびCH₂CH₂CH₂CH₂を意味する。

【0036】

「アルケニル」は、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を有する脂肪族部分を意味し、適用される炭素原子の数を指定する上記と同様の方法を用いる。実例として、C₂-C₄アルケニル部分には、以下に限らないが、エテニル(ビニル)、2-プロペニル(アリルまたはプロ

50

パ-2-エニル)、シス-1-プロペニル、トランス-1-プロペニル、E(またはZ)-2-ブテニル、3-ブテニル、1,3-ブタジエニル(ブタ-1,3-ジエニル)などが挙げられる。

【0037】

「アルキニル」は、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を有する脂肪族部分を意味し、適用される炭素原子の数を指定する上記と同様の方法を用いる。実例として、C₂-C₄アルキニル基には、エチニル(アセチレニル)、プロパルギル(プロパ-2-イニル)、1-プロピニル、ブタ-2-イニルなどが挙げられる。

【0038】

「シクロ脂肪族」は、各環が3~8個(好ましくは3~6個)の炭素原子を有する、1~3環の飽和または不飽和の非芳香族炭化水素部分を意味する。「シクロアルキル」は、各環が飽和しているシクロ脂肪族部分を意味する。「シクロアルケニル」は、少なくとも1つの環が少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を有する、シクロ脂肪族部分を意味する。「シクロアルキニル」は、少なくとも1つの環が少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を有する、シクロ脂肪族部分を意味する。実例として、シクロ脂肪族部分には、以下に限らないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチル、シクロオクチル、およびアダマンチルが挙げられる。好ましいシクロ脂肪族部分は、シクロアルキル部分、特にシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、およびシクロヘキシルである。「シクロアルキレン」は、シクロアルキル基に対応する二置換基を意味する。

【0039】

「ヘテロシクロ脂肪族」は、シクロ脂肪族部分を意味し、少なくとも1つのその環のうち、3個まで(好ましくは1~2個)の炭素がN、O、またはSから独立して選択されたヘテロ原子で置換され、NおよびSの場合は適宜酸化されていてもよく、Nの場合は適宜四級化されていてもよい。好ましいシクロ脂肪族部分は、5~6員の大きさの単環である。同様に、「ヘテロシクロアルキル」、「ヘテロシクロアルケニル」、および「ヘテロシクロアルキニル」は、それぞれ、少なくとも1つのその環が上記のように修飾されている、シクロアルキル、シクロアルケニル、またはシクロアルキニル部分を意味する。ヘテロシクロ脂肪族部分の例として、アジリジニル、アゼチジニル、1,3-ジオキサニル、オキセタニル、テトラヒドロフリル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロチオピラニルスルホン、モルホリニル、チオモルホリニル、チオモルホリニルスルホキシド、チオモルホリニルスルホン、1,3-ジオキサソラニル、テトラヒドロ-1,1-ジオキソチエニル、1,4-ジオキサニル、チエタニルなどが挙げられる。「ヘテロシクロアルキレン」は、ヘテロシクロアルキル基に対応する二置換基を意味する。

【0040】

「アルコキシ」、「アリーロキシ」、「アルキルチオ」、および「アリーロチオ」は、それぞれ-O(アルキル)、-O(アリール)、-S(アルキル)、および-S(アリール)を意味する。例として、それぞれメトキシ、フェノキシ、メチルチオ、およびフェニルチオが挙げられる。

【0041】

「ハロゲン」または「ハロ」は、狭義が示されていない限り、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素を意味する。

【0042】

「アリール」は、各環が、3~7個の炭素原子および少なくとも1つの芳香族環を有する、単環、二環または三環システム(好ましくは単環)の炭化水素部分を意味する。環システムの環は、互いに縮合してもよい(例えばナフチル)、または互いに結合してもよく(例えばビフェニル)、非芳香環に縮合または結合してもよい(例えばインダニルまたはシクロヘキシルフェニル)。さらなる実例として、アリール部分には、以下に限らないが、フェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、インダニル、ビフェニル、フェナントリル、アントラセニル、およびアセナフチルが挙げられる。「アリーレン」は、アリール基に対応する

二置換基、例えば1,2-フェニレン、1,3-フェニレン、または1,4-フェニレンを意味する。

【0043】

「ヘテロアリアル」は、各環が、3～7個の炭素原子および少なくとも1つの芳香族環(この芳香族環は、N、O、またはSから独立して選択される1～4個のヘテロ原子を含み、NおよびSの場合は適宜酸化されていてもよく、Nの場合は適宜四級化されていてもよい)を有する、単環、二環、または三環システム(好ましくは5～7員の単環)の部分の意味する。このような少なくとも1個のヘテロ原子を含む芳香環は、他のタイプの環に縮合してもよい(例えばベンゾフラニルまたはテトラヒドロイソキノリル)、または他のタイプの環に直接結合してもよい(例えばフェニルピリジルまたは2-シクロペンチルピリジル)。さらに実例として、ヘテロアリアル部分には、ピロリル、フラニル、チオフェニル(チエニル)、イミダゾリル、ピラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ピリジル、N-オキソピリジル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、キノリニル、イソキノリニル、キナゾリニル、シンノリニル、キノサリニル、ナフチリジニル、ベンゾフラニル、インドリル、ベンゾチオフェニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、フェノチアゾリル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾトリアゾリル、ジベンゾフラニル、カルバゾリル、ジベンゾチオフェニル、アクリジニルなどが挙げられる。「ヘテロアリーレン」は、ヘテロアリアル基に対応する二置換基を意味する。

【0044】

ある部分が、例えば「非置換または置換」または「適宜置換」(例えば「非置換または置換C₁-C₅アルキル」または「適宜置換されたヘテロアリアル」などのフレーズ)の使用により置換され得ることが意図される場合、その部分は、独立して選択された1個以上の置換基を、好ましくは合計1～5個、より好ましくは合計1～2個有し得る。置換基および置換パターンは、当業者により、置換基が結合する部分を考慮して、化学的に安定であり、当該分野に公知の技法ならびに本明細書に記載の方法により合成され得る化合物を与えるように選択され得る。ある部分が「非置換または置換」または「適宜置換」されると見なされる場合、好ましい実施態様において、該部分は非置換である。

【0045】

「アリアルアルキル」「(ヘテロシクロ脂肪族)アルキル」「アリアルアルケニル」「アリアルアルキニル」「ピアリアルアルキル」などは、場合によっては、アリアル、ヘテロシクロ脂肪族、ピアリアルなどの部分により置換されたアルキル、アルケニル、またはアルキニル部分であることを意味し、場合によっては、例えばベンジル、フェネチル、N-イミダゾイルエチル、N-モルホリノエチルなどのような、アルキル、アルケニル、またはアルキニル部分で開放(不飽和)原子価を伴うものであることを意味する。逆に、「アルキルアリアル」「アルケニルシクロアルキル」などは、場合によってはアルキル、アルケニルなどで置換されてもよいアリアル、シクロアルキル部分など(例えば場合によってはメチルフェニル(トリル)またはアリルシクロヘキシル部分)を意味する。「ヒドロキシアルキル」「ハロアルキル」「アルキルアリアル」「シアノアリアル」などは、場合によっては、1つ以上の特定の置換基(場合によってはヒドロキシル、ハロゲンなど)で置換されるアルキル、アリアル部分などを意味する。

【0046】

例えば、許容される置換基として、以下に限らないが、アルキル(特にメチルまたはエチル)、アルケニル(特にアリル)、アルキニル、アリアル、ヘテロアリアル、シクロ脂肪族、ヘテロシクロ脂肪族、ハロゲン(特にフルオロ)、ハロアルキル(特にトリフルオロメチル)、ヒドロキシル、ヒドロキシアルキル(特にヒドロキシエチル)、シアノ、ニトロ、アルコキシ、-O(ヒドロキシアルキル)、-O(ハロアルキル)(特に-OCF₃)、-O(シクロアルキル)、-O(ヘテロシクロアルキル)、-O(アリアル)、アルキルチオ、アリアルチオ、=O、=NH、=N(アルキル)、=NOH、=NO(アルキル)、-C(=O)(アルキル)、-C(=O)H、-CO₂H、-C(=O)NHOH、-C(=O)O(アルキル)、-C(=O)O(ヒドロキシアルキル)、-C(=O)NH₂、-C(=O)NH(アルキル)、-C(=O)N(アルキル)₂、-OC(=O)(アルキル)、-OC(=O)(ヒドロキシアルキル)、-OC(=O)O(アルキル)、-OC(=O)O(ヒドロキシアルキル)、-OC(=O)NH₂、-OC(=O)NH(ア

10

20

30

40

50

ルキル)、 $-OC(=O)N(\text{アルキル})_2$ 、アジド、 $-NH_2$ 、 $-NH(\text{アリール})$ 、 $-N(\text{アルキル})_2$ 、 $-NH(\text{アリール})$ 、 $-NH(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-NHC(=O)(\text{アルキル})$ 、 $-NHC(=O)H$ 、 $-NHC(=O)NH_2$ 、 $-NHC(=O)NH(\text{アルキル})$ 、 $-NHC(=O)N(\text{アルキル})_2$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-OSO_2(\text{アルキル})$ 、 $-SH$ 、 $-S(\text{アルキル})$ 、 $-S(\text{アリール})$ 、 $-S(\text{シクロアルキル})$ 、 $-S(=O)\text{アルキル}$ 、 $-SO_2(\text{アルキル})$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(\text{アルキル})$ 、 $-SO_2N(\text{アルキル})_2$ などが挙げられる。

【 0 0 4 7 】

置換されている部分が脂肪族部分である場合、好ましい置換基は、アリール、ヘテロアリール、シクロ脂肪族、ヘテロシクロ脂肪族、ハロ、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、アルコキシ、 $-O(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-O(\text{ハロアルキル})$ 、 $-O(\text{シクロアルキル})$ 、 $-O(\text{ヘテロシクロアルキル})$ 、 $-O(\text{アリール})$ 、アルキルチオ、アリールチオ、 $=O$ 、 $=NH$ 、 $=N(\text{アルキル})$ 、 $=NOH$ 、 $=NO(\text{アルキル})$ 、 $-CO_2H$ 、 $-C(=O)NHOH$ 、 $-C(=O)O(\text{アルキル})$ 、 $-C(=O)O(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-C(=O)NH(\text{アルキル})$ 、 $-C(=O)N(\text{アルキル})_2$ 、 $-OC(=O)(\text{アルキル})$ 、 $-OC(=O)(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-OC(=O)O(\text{アルキル})$ 、 $-OC(=O)O(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-OC(=O)NH_2$ 、 $-OC(=O)NH(\text{アルキル})$ 、 $-OC(=O)N(\text{アルキル})_2$ 、アジド、 $-NH_2$ 、 $-NH(\text{アルキル})$ 、 $-N(\text{アルキル})_2$ 、 $-NH(\text{アリール})$ 、 $-NH(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-NHC(=O)(\text{アルキル})$ 、 $-NHC(=O)H$ 、 $-NHC(=O)NH_2$ 、 $-NHC(=O)NH(\text{アルキル})$ 、 $-NHC(=O)N(\text{アルキル})_2$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-OSO_2(\text{アルキル})$ 、 $-SH$ 、 $-S(\text{アルキル})$ 、 $-S(\text{アリール})$ 、 $-S(=O)\text{アルキル}$ 、 $-S(\text{シクロアルキル})$ 、 $-SO_2(\text{アルキル})$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(\text{アルキル})$ 、および $-SO_2N(\text{アルキル})_2$ である。より好ましい置換基は、ハロゲン、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、アルコキシ、 $-O(\text{アリール})$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=NO(\text{アルキル})$ 、 $-OC(=O)(\text{アルキル})$ 、 $-OC(=O)O(\text{アルキル})$ 、 $-OC(=O)NH_2$ 、 $-OC(=O)NH(\text{アルキル})$ 、 $-OC(=O)N(\text{アルキル})_2$ 、アジド、 $-NH_2$ 、 $-NH(\text{アルキル})$ 、 $-N(\text{アルキル})_2$ 、 $-NH(\text{アリール})$ 、 $-NHC(=O)(\text{アルキル})$ 、 $-NHC(=O)H$ 、 $-NHC(=O)NH_2$ 、 $-NHC(=O)NH(\text{アルキル})$ 、 $-NHC(=O)N(\text{アルキル})_2$ 、および $-NHC(=NH)NH_2$ である。特に好ましい置換基は、フェニル、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、ニトロ、 C_1 - C_4 アルキルオキシ、 $O(C_2$ - C_4 アルキレン) O H、および $O(C_2$ - C_4 アルキレン)ハロである。

【 0 0 4 8 】

置換されている部分がシクロ脂肪族、ヘテロシクロ脂肪族、アリール、またはヘテロアリール部分である場合、好ましい置換基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ハロアルキル、ヒドロキシル、ヒドロキシアルキル、シアノ、ニトロ、アルコキシ、 $-O(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-O(\text{ハロアルキル})$ 、 $-O(\text{アリール})$ 、 $-O(\text{シクロアルキル})$ 、 $-O(\text{ヘテロシクロアルキル})$ 、アルキルチオ、アリールチオ、 $-C(=O)(\text{アルキル})$ 、 $-C(=O)H$ 、 $-CO_2H$ 、 $-C(=O)NHOH$ 、 $-C(=O)O(\text{アルキル})$ 、 $-C(=O)O(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-C(=O)NH(\text{アルキル})$ 、 $-C(=O)N(\text{アルキル})_2$ 、 $-OC(=O)(\text{アルキル})$ 、 $-OC(=O)(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-OC(=O)O(\text{アルキル})$ 、 $-OC(=O)O(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-OC(=O)NH_2$ 、 $-OC(=O)NH(\text{アルキル})$ 、 $-OC(=O)N(\text{アルキル})_2$ 、アジド、 $-NH_2$ 、 $-NH(\text{アルキル})$ 、 $-N(\text{アルキル})_2$ 、 $-NH(\text{アリール})$ 、 $-NH(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-NHC(=O)(\text{アルキル})$ 、 $-NHC(=O)H$ 、 $-NHC(=O)NH_2$ 、 $-NHC(=O)NH(\text{アルキル})$ 、 $-NHC(=O)N(\text{アルキル})_2$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-OSO_2(\text{アルキル})$ 、 $-SH$ 、 $-S(\text{アルキル})$ 、 $-S(\text{アリール})$ 、 $-S(\text{シクロアルキル})$ 、 $-S(=O)\text{アルキル}$ 、 $-SO_2(\text{アルキル})$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(\text{アルキル})$ 、および $-SO_2N(\text{アルキル})_2$ である。より好ましい置換基は、アルキル、アルケニル、ハロゲン、ハロアルキル、ヒドロキシル、ヒドロキシアルキル、シアノ、ニトロ、アルコキシ、 $-O(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-C(=O)(\text{アルキル})$ 、 $-C(=O)H$ 、 $-CO_2H$ 、 $-C(=O)NHOH$ 、 $-C(=O)O(\text{アルキル})$ 、 $-C(=O)O(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-C(=O)NH(\text{アルキル})$ 、 $-C(=O)N(\text{アルキル})_2$ 、 $-OC(=O)(\text{アルキル})$ 、 $-OC(=O)(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-OC(=O)O(\text{アルキル})$ 、 $-OC(=O)O(\text{ヒドロキシアルキル})$ 、 $-OC(=O)NH_2$ 、 $-OC(=O)NH(\text{アルキル})$ 、 $-OC(=O)N(\text{アルキル})_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(\text{アルキル})$ 、 $-N(\text{アルキル})_2$ 、 $-NH(\text{アリール})$ 、 $-NHC(=O)(\text{アルキル})$ 、 $-NHC(=O)H$ 、 $-NHC(=O)NH_2$ 、 $-NHC(=O)NH(\text{アルキル})$ 、 $-NHC(=O)N(\text{アルキル})_2$ 、および $-NHC(=NH)NH_2$ である。特に好ましい置換基は、 C_1 - C_4 アルキル、シアノ、ニトロ、ハロゲン、および C_1 - C_4 アルコキシである。

10

20

30

40

50

【0049】

範囲が「C₁-C₅アルキル」または「5~10%」のように示される場合、その範囲には範囲の端点(第1の例におけるC₁およびC₅、ならびに第2の例における5%および10%)を含む。

【0050】

特定の立体異性体が特に示されない限り(例えば、構造式中の重要な立体中心において太線または破線で結ぶ、構造式においてEまたはZ配置を有する二重結合を図示する、または立体化学が示されている命名を用いるなど)、全ての立体異性体は、純粋な化合物ならびにその混合物として本発明の範囲内に含まれる。特に断りが無い限り、個々のエナンチオマー、ジアステレオマー、幾何異性体、およびその組み合わせおよび混合物は全て本発明に

10

【0051】

当業者は、化合物が、本明細書に用いる構造式に図示された化合物と等価の互変異性体(例えばケトおよびエノール体)、共鳴混成体、および双性イオン形体を有し得ること、およびその構造式が互変異性体、共鳴混成体、または双性イオン形体を包含することを理解する。

【0052】

「医薬的に許容されるエステル」は、インビボ(例えばヒト体内)で加水分解し、親化合物またはその塩を形成するか、またはそれ自体で親化合物の活性に類似の活性を有するエステルを意味する。適切なエステルには、C₁-C₅アルキル、C₂-C₅アルケニルまたはC₂-C₅アルキニルエステル、特にメチル、エチルまたはn-プロピルが挙げられる。

20

【0053】

「医薬的に許容される塩」は、医薬製剤に適切な化合物の塩を意味する。化合物が1つ以上の塩基性基を有する場合、塩は、酸添加塩(例えば硫酸塩、臭化水素酸塩、酒石酸塩、メシル酸塩、マレイン酸塩、クエン酸塩、ホスフェート、アセテート、パモ酸塩(エンボン酸塩)、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、塩酸塩、乳酸塩、メチル硫酸塩、フマル酸塩、安息香酸塩、コハク酸塩、メシル酸塩、ラクトビオン酸塩、スベリン酸塩、トシル酸塩など)であり得る。化合物が1つ以上の酸性基を有する場合、塩は、例えばカルシウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、メグルミン塩、アンモニウム塩、亜鉛塩、ピペラジン塩、トロメタミン塩、リチウム塩、コリン塩、ジエチルアミン塩、4-フェニルシクロヘキシルアミン塩、ベンザチン塩、ナトリウム塩、テトラメチルアンモニウム塩などの塩であり得る。結晶多形形態および溶媒和物もまた本発明の範囲に包含される。

30

【0054】

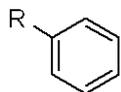
本明細書の式において、結合の終点で、結合またはアスタリスク(*)に対して横断する波線

【化17】



は、共有結合部分を表す。例えば、式：

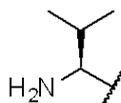
【化18】



40

中のRが、

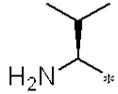
【化19】



であるか、またはRが、

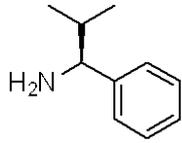
50

【化 2 0】



であるという記載は、

【化 2 1】



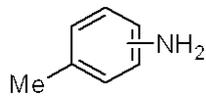
10

であることを意味する。

【0 0 5 5】

本明細書の式において、芳香族またはヘテロ芳香環中の2個の炭素間を横断する結合は、結合する基が、非明示的な水素の除去により芳香族またはヘテロ芳香環のいずれかの位置に存在し得ることを意味する。実例として、式：

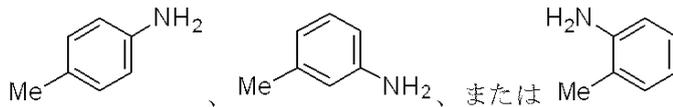
【化 2 2】



20

は、

【化 2 3】



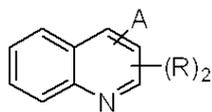
30

を表す。

【0 0 5 6】

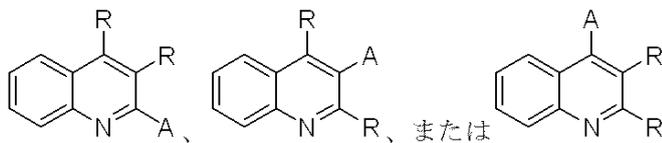
他の例において、

【化 2 4】



は、

【化 2 5】

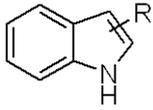


40

を表し、

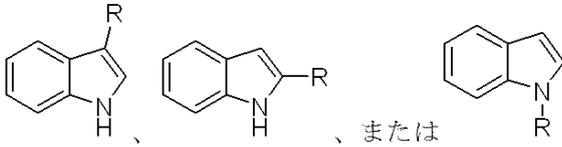
50

【化26】



は、

【化27】



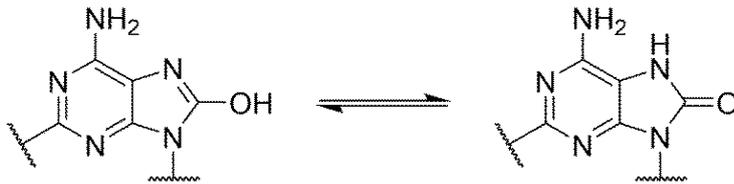
10

を表す。

【0057】

ほとんどの場合、本明細書における互変異性体構造は、一貫性および利便性を考慮してエノール体の状態である。

【化28】



20

エノール互変異性体

ケト互変異性体

また、当業者はこれらが等価のケト型の状態で存在し得て、2つの互変異性体が等価であることも理解する。

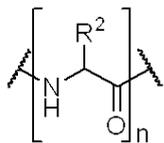
【0058】

(化合物)

我々は、PABC部分のベンジルオキシカルボニル基に対してオルト位に置換基 R^4 を配置することで、マウス血清中のペプチド

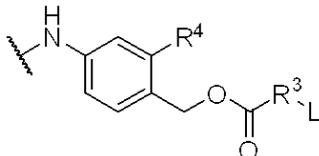
30

【化29】



および置換PABC基

【化30】



40

の間の結合の切断を実質的に阻害するが、以下に示すデータに証明されるようにカテプシンBによる同結合の切断は実質的に阻害しないことを発見した。従って、本明細書に記載の化合物は、マウスモデルでの評価に適する抗体に結合し得る。

【0059】

マウス血清による前述の結合の切断を実質的に阻害することにより、以下の実施例のセ

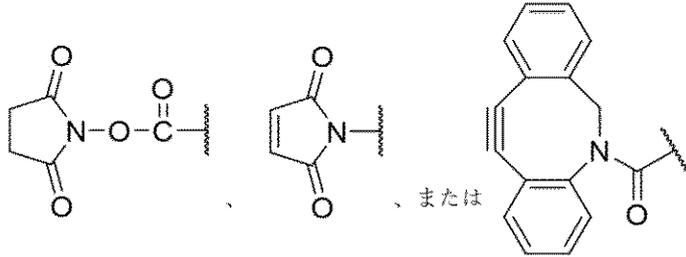
50

クションに記載の条件下で、24時間後に10%以下の切断しか起こさず、好ましくは6%以下の切断しか起こさないことを意図する。逆に、カテプシンBによる前述の結合の切断は実質的に阻害しないことにより、以下の実施例のセクションに記載の条件下で、24時間後に90%以上の切断が起こることを意図する。

【0060】

式(I)において、 R^1 は、好ましくはH、 CH_3 、 NH_2 、 N_3 、

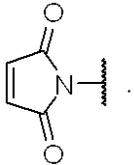
【化31】



10

であり、特に好ましい R^1 は、 NH_2 および

【化32】



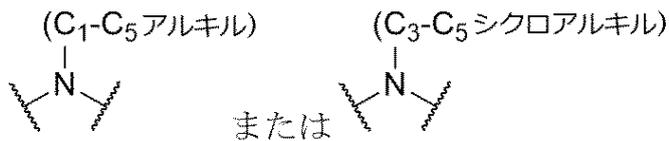
20

である。

【0061】

式(I)および(II)において、 R^3 は、好ましくは NH 、

【化33】



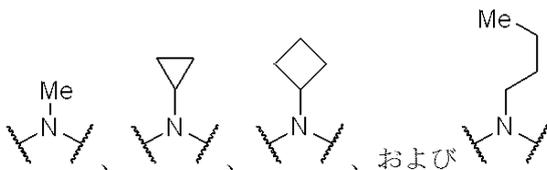
30

である。

【0062】

特に好ましい R^3 は、 NH 、

【化34】



40

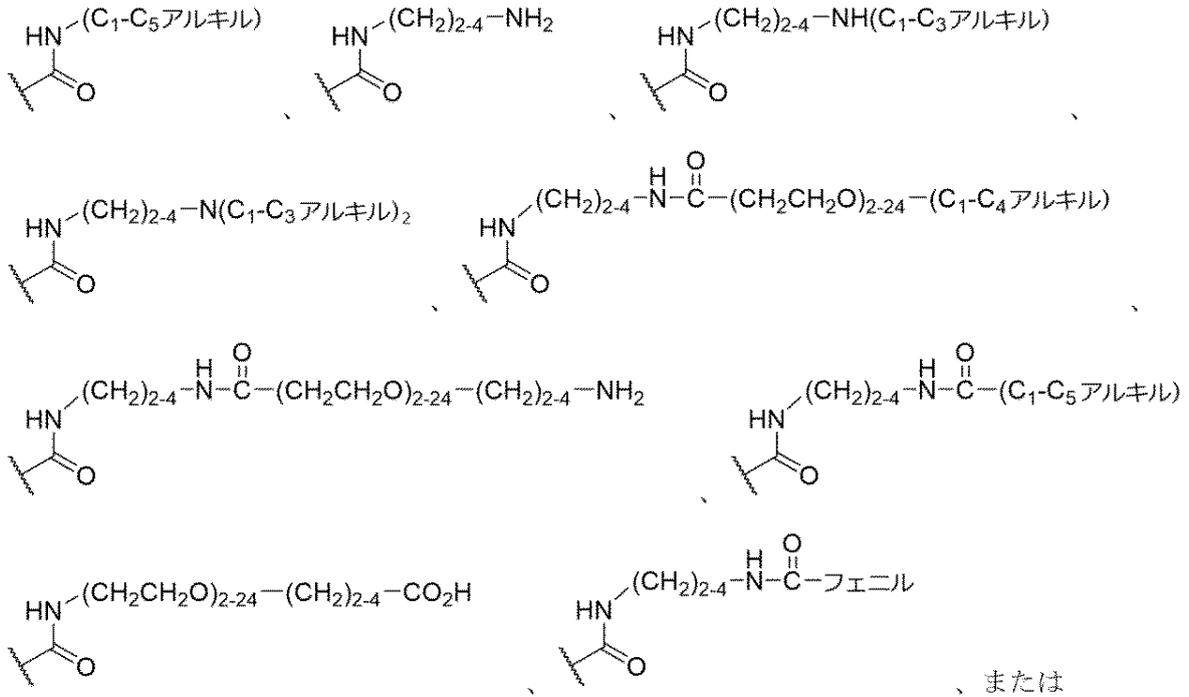
である。

【0063】

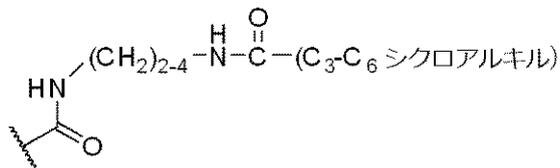
式(I)および(II)において、 R^4 は、好ましくは

50

【化35】



【化36】



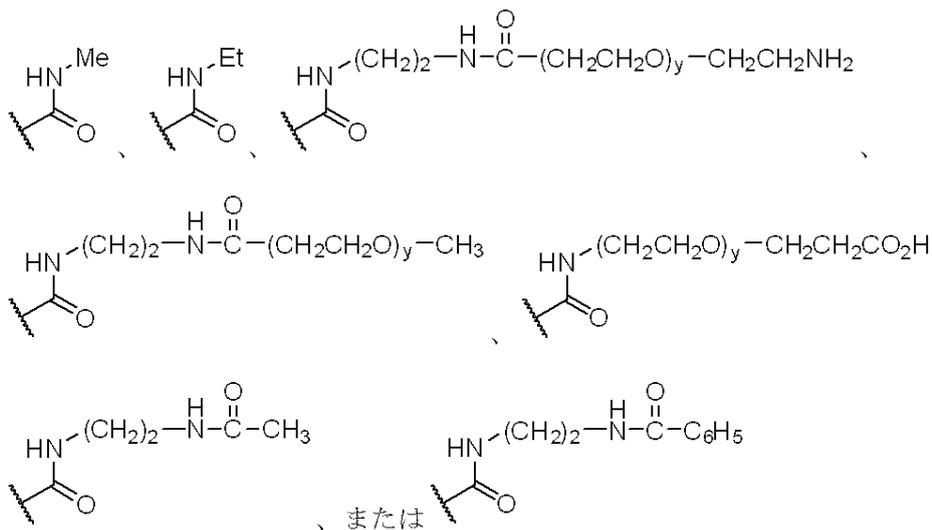
であり；

フェニルまたはC₃-C₆シクロアルキル基は、F、Cl、CN、NO₂、またはC₁-C₃アルキルで適宜置換されていてもよい。

【0064】

R⁴は、より好ましくは

【化37】



であり；

yは、4、8、12、または24である。

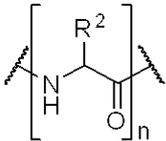
【0065】

式(I)および(II)において、R²は、好ましくは側鎖のアミノ酸残基であり、バリン(Val)、グルタミン酸(Glu)、シトルリン(Cit)、リシン(Lys)、アラニン(Ala)、フェニルアラニン(Phe)、アルギニン(Arg)、およびグリシン(Gly)から選択される。

【0066】

式(I)および(II)において、ペプチド基

【化38】



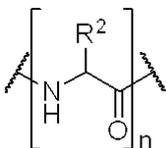
10

は、好ましくはカテプシンBで切断可能、およびヒト血清中で安定なものである。そのようなペプチド基の例(NからCの方向に記載)として、Val-Cit、Glu-Val-Cit、Phe-Lys、Phe-Arg、Val-Lys、Ala-Lys、Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Val-Ala、Ala-Val-Cit、およびVal-Glyが挙げられる。

【0067】

ペプチド

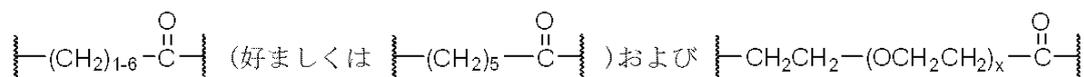
【化39】



20

は、NからC(アミノからカルボキシル)の方向に記載するため、スペーサー基Xは、ペプチドのN末端をR¹に結合させる。一般に、Xは、ペプチドのN末端と共にアミド結合を形成するカルボニル基を包含するが、Xは、終点アミノ酸の側鎖の官能基(例えばGluまたはAspのカルボキシル基)の代わりに結合し得る。R¹がアルキルである場合、Xは単純なカルボニル(C=O)であり得る。Xの他の実施態様は、

【化40】



30

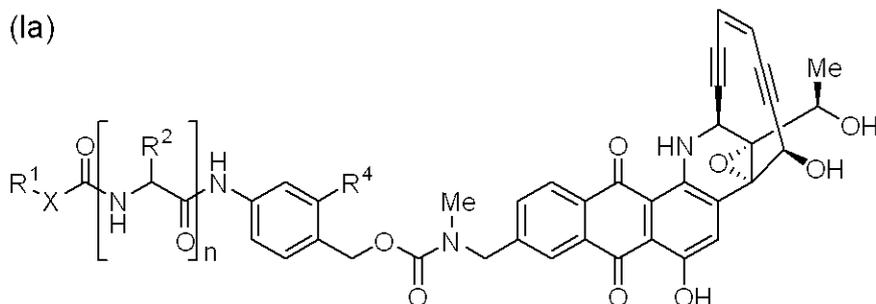
であり、xは、好ましくは2、4、または8を含む、2~24の整数である。

【0068】

ある実施態様において、式(I)の化合物は、式(1a)：

【化41】

(1a)



40

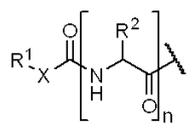
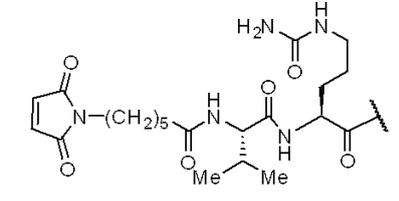
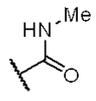
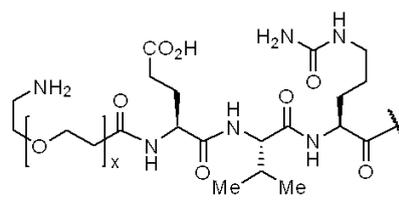
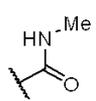
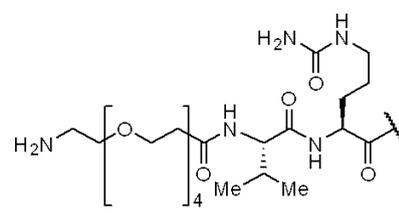
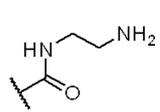
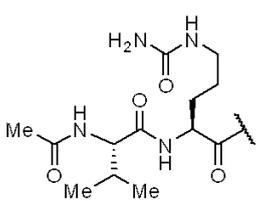
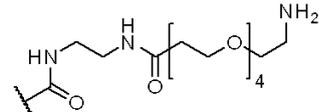
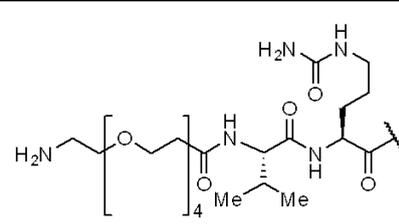
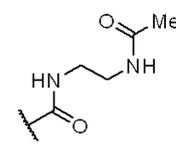
(上記の式(I)中のR¹、X、R²、およびR⁴の好適例が式(1a)にも適用される)で表される。

【0069】

式(1a)において、L-R³Hに対応する生物活性分子は、天然生成物ウンシアラマイシンの

50

【表 1】

表A-式(Ia)に記載の化合物			
化合物			
(Ia-01)			10
(Ia-02) (x=8) (Ia-03) (x=4) (Ia-04) (x=2)			20
(Ia-05)			
(Ia-06)			30
(Ia-07)			40

10

20

30

40

50

【表 2】

(Ia-08)		
(Ia-09) (y=8) (Ia-10) (y=12) (Ia-11) (y=24)		

10

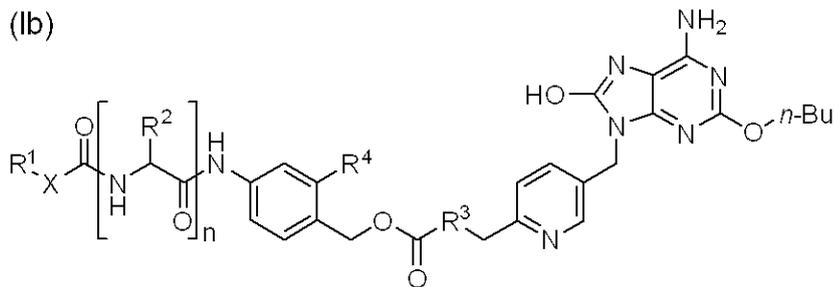
【0071】

別の実施態様において、式(I)に記載の化合物は、式(Ib)：

20

【化 4 3】

(Ib)



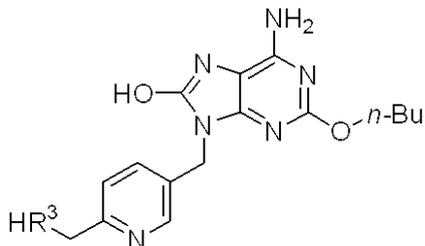
30

(上記の式(I)中のR¹、X、R²、R³、およびR⁴の好適例が式(Ib)にも適用される)に表される。

【0072】

式(Ib)において、L-R³Hに対応する生物学的活性分子は、

【化 4 4】



40

である。

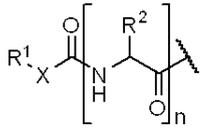
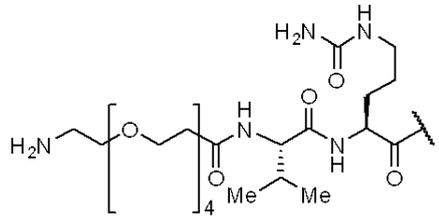
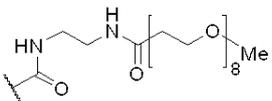
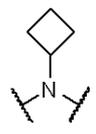
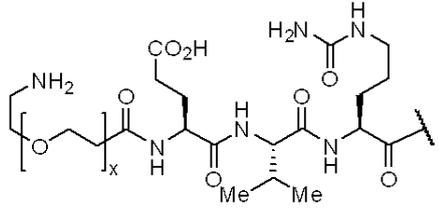
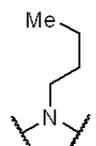
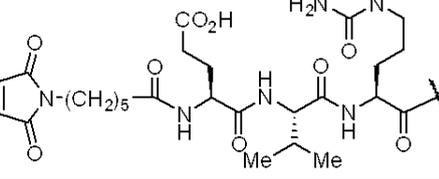
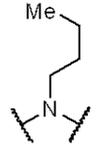
このタイプの分子は、Toll様受容体7(TLR7)のアゴニストである。それらによるTLR7の活性化は、ワクチンおよび免疫療法剤に対するアジュバント効果を発揮し得る。

【0073】

式(Ib)に記載の化合物の実施例は、表Bに示される。

50

【表3】

表B-式(Ib)に記載の化合物			
化合物			
(Ib-01)			
(Ib-02) x=2 (Ib-03) x=4 (Ib-04) x=8			
(Ib-05)			

10

20

30

【0074】

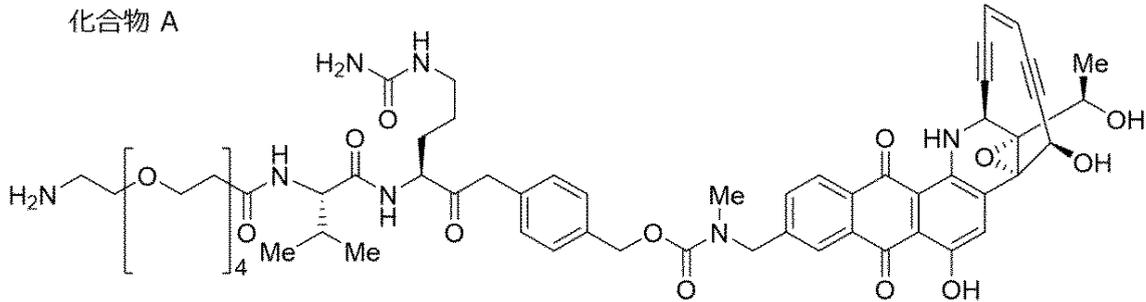
表Cは、PABC基中のベンジルオキシカルボニル基に対してオルト位に置換基を有する本明細書に開示の化合物が、ヒトおよびマウス血清中の両方でいかに安定(またはマウス血清中での安定性が向上)し、それでもやはりカテプシンBでは切断されるかを示す。対照的に、2つの非置換PABC基コントロール化合物；8-アミノメチルウンシアラマイシンペイロード(化合物A)およびTLR7アゴニストペイロード(化合物B)は、どちらもマウス血清中で不安定である。

40

50

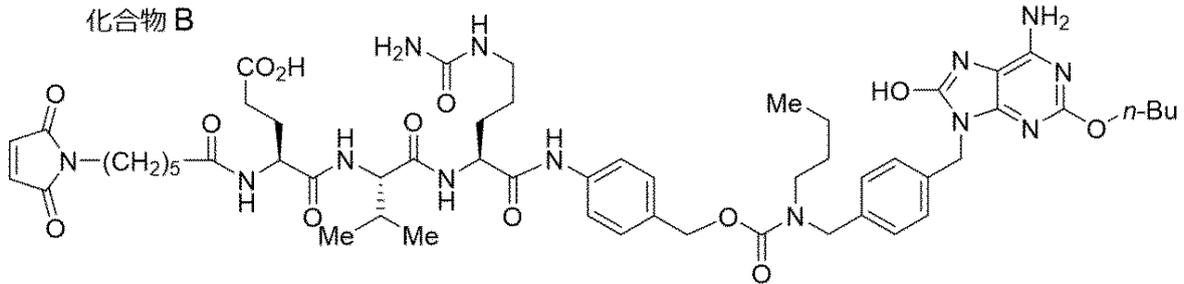
【化 4 5】

化合物 A



10

化合物 B



【表 4】

表C-ヒトおよびマウス血清中の化合物の安定性およびカテプシンBによる開裂			
化合物	ヒト血清中の安定性 (24時間後の開裂%)	マウス血清中の安定性 (24時間後の開裂%)	カテプシンB開裂 (24時間後の開裂%)
化合物A	0	100	100
化合物B	0	50	100
(Ia-01)	0	50	100
(Ia-03)	0	7	100
(Ia-05)	0	3	100
(Ia-06)	0	6	100
(Ib-01)	0	3	100
(Ib-05)	0	2	100

20

30

【0075】

(複合体)

式(II)の複合体は、R¹基の特性により、抗体および式(I)の化合物から多数の方法で製造され得る。

【0076】

R¹がOH基である場合、抗体のカルボキシ基(例えばアスパラギンまたはグルタミン酸側鎖または抗体の重鎖または軽鎖のC末端)をエステル化させ得る。

【0077】

R¹がCO₂H基である場合、抗体のOH基(例えばセリン残基の側鎖)をエステル化させ得るか、または抗体のアミノ基(例えばリシン側鎖)をアミド化させ得る。

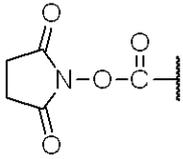
【0078】

40

50

R¹がN-ヒドロキシスクシンイミドエステル

【化46】

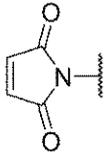


の場合、機能的には活性化カルボキシル基であり、抗体のアミノ基(例えばリシン由来)と反応し、アミド化し得る。

【0079】

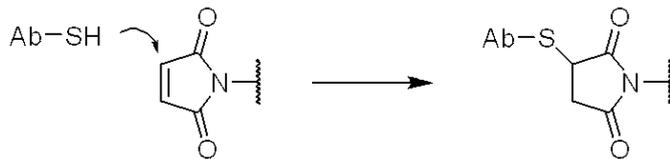
好ましい実施態様において、R¹は、マレイミド基

【化47】



であり、抗体のSH基(例えばシステインまたは化学修飾抗体に導入されたスルフヒドリル官能基由来)とマイケル付加反応で結合し得る。

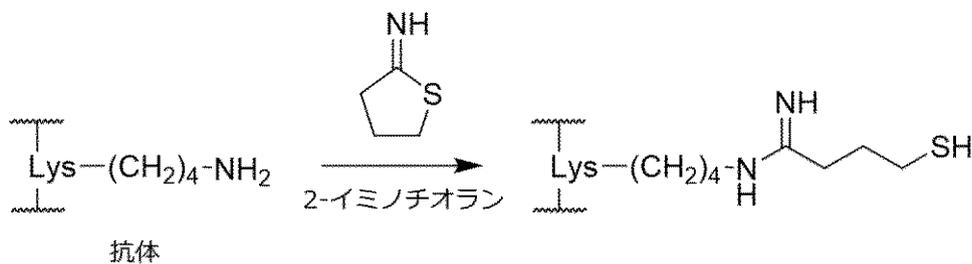
【化48】



【0080】

抗体が結合可能なシステインSHを有さない場合(多くの抗体のシステインSHはジスルフィド結合で塞がれる)、リシン残基の側鎖のε-アミノ基が2-イミノチオランまたはN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオネート(「SPDP」)と反応して、言わば代理システインを形成し、結合可能な遊離チオール(-SH)基を導入し得る。

【化49】



【0081】

一般にチオール化は、抗体あたり2~3個のチオールが導入される程度に達する。代表的な工程として、開示の内容が引用として本明細書に組み込まれるCong et al., US 8,980,824 B2(2015)を参照のこと。

【0082】

逆の合成として、抗体がN-スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)-シクロヘキサンカルボキシレート(「SMCC」)またはそのスルホン酸化バリエーションであるスルホSMCC(共に市販で入手可能)で修飾され、マレイミド基が導入され得る。次いで、R¹がSHである式(I)の化合物により複合体がもたらされ得る。

【0083】

10

20

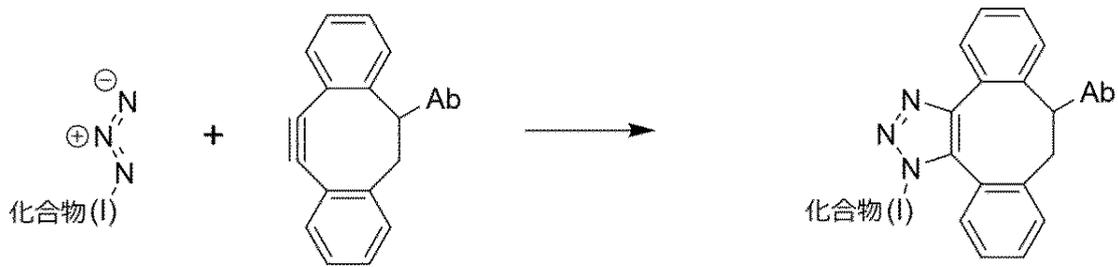
30

40

50

別の結合方法では、銅不要の「クリックケミストリー」を用い、アジド基を歪みのあるシクロオクチンに添加することで、1,2,3-トリアゾール環が形成される。例えば開示の内容が引用として本明細書に組み込まれる、Agard et al., J. Amer. Chem. Soc. 2004, 126, 15046; Best, Biochemistry 2009, 48, 6571を参照のこと。アジドは抗体中、シクロオクチンは式(I)の化合物中に位置し得るか、またはその逆である。好ましいシクロオクチン基は、ジベンゾシクロオクチン(DIBO)である。DIBO基を有する様々な試薬は、Invitrogen/Molecular Probes(Eugene, Oregon)から入手可能である。下記の反応は、DIBO基が抗体(Ab)に結合するクリックケミストリー複合体の例を説明している。

【化50】



10

【0084】

さらに、別の結合技法は、非天然アミノ酸を抗体に導入することに関与する。この導入により非天然アミノ酸は、複合体の官能性のために、ドラッグ部分の反応性官能基を与える。例えばTian et al., WO 2008/030612 A2(2008)に記載のように、非天然アミノ酸のp-アセチルフェニルアラニンが、抗体または他のポリペプチドに組み込まれ得る。p-アセチルフェニルアラニンのケトン基は、リンカー-ドラッグ部分のヒドロキシルアミノ基とオキシムを形成することで結合部位となり得る。あるいは、非天然アミノ酸のp-アジドフェニルアラニンは、抗体に組み込まれ、上記で説明したクリックケミストリーを用いて複合体のためのアジド官能基を提供し得る。また、非天然アミノ酸は、Goerke et al., US 2010/0093024 A1(2010)およびGoerke et al., Biotechnol. Bioeng. 2009, 102 (2), 400-416に記載のような無細胞の方法を用いて、抗体または他のポリペプチドに組み込まれ得る。

20

【0085】

好ましい実施態様において、R¹はNH₂であり、酵素トランスグルタミナーゼを用いて複合化される。

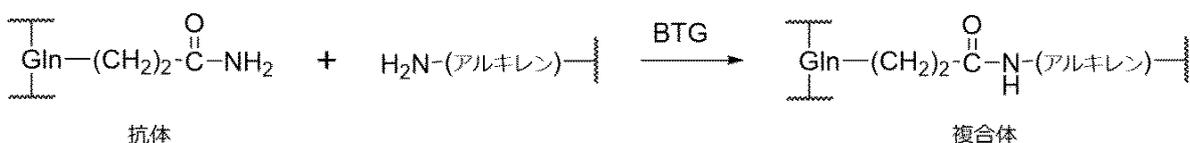
【0086】

トランスグルタミナーゼ(好ましくはストレプトマイセス・モバラエンシスまたはBTG由来の細菌トランスグルタミナーゼ)は、グルタミンの側鎖カルボキサミド(アミンアクセプター)およびアルキレンアミノ基(アミンドナー、例えばリシンのε-アミノ基または5-アミノ-n-ペンチル基(Jeger et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 9995)が該当し得る)の間でアミド結合を形成する。アルキレンアミノ基は、R¹がNH₂である式(I)の化合物に存在し得る。

30

40

【化51】



【0087】

ポリペプチド鎖におけるグルタミン残基の位置は、BTG媒介のトランスアミド化に対するその感受性に大きな影響を与える。通常、抗体のグルタミン残基は全てBTG基質ではない。しかしながら、抗体が脱グリコシル化されている場合、つまり重鎖のグリコシル化部

50

位がアスパラギン297(N297; Kabat et al., "Sequences of proteins of immunological interest," 5th ed., Pub. No. 91-3242, U.S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, Md., 1991に記載のEUインデックスに対応するナンバリング; 以下「Kabat」という)である場合、隣接するグルタミン295(Q295)がBTG感受性となる。抗体は、PNGase F(ペプチド-N-グリコシダーゼF)で処理されることにより、酵素的に脱グリコシル化され得る。あるいは、抗体は、定常領域のN297A変異を導入することで、グリコシドフリーで合成され、N297グリコシル化部位を除去し得る。さらに、N297Q置換は、グリコシル化を排除するだけでなく、アミンアクセプターである第2グルタミン残基を(297の位置に)導入することが知られている。それ故、ある実施態様において、抗体は脱グリコシル化される。別の実施態様において、抗体はN297Q置換を有する。当業者は、合成後の修飾またはN297A変異の導入による脱グリコシル化は、抗体あたり2個のBTG反応性グルタミン残基(295の位置に重鎖あたり1個)を生じ、さらにN297Q置換された抗体は4個のBTG反応性グルタミン残基(295および297の位置で重鎖あたり2個)を有することを理解する。

10

【0088】

抗体は、例えばPons et al., US 2013/0230543 A1(2013)およびRao-Naik et al., WO 2016/144608 A1に記載のようなグルタミン含有ペプチドまたは「タグ」を抗体に導入することで、BTG介在複合体に対する感受性もまた有し得る。

【0089】

補足の方法として、BTGの基質特異性は、Rao-Naik et al., WO 2017/059158 A1(2017)に記載のように、そのアミノ酸配列を変化させることで、非修飾抗体のグルタミン295と反応可能になるように変化し得る。

20

【0090】

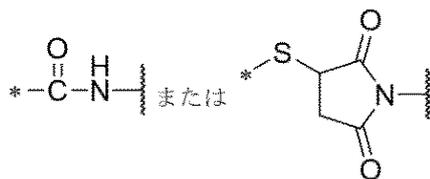
最も一般に入手可能な細菌トランスグルタミナーゼは、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来のものである一方、他の細菌由来の、多少異なる基質特異性を有するトランスグルタミナーゼには、例えばストレプトベルティシリウム・ラダカヌム由来のトランスグルタミナーゼ(Hu et al., US 2009/0318349 A1(2009)、US 2010/0099610 A1(2010)、およびUS 2010/0087371 A1(2010))が挙げられ得る。

【0091】

式(II)の複合体において、R⁵は、好ましくは

30

【化52】



である。

【0092】

多くの異なる抗体が、式(I)の化合物に結合し得る。抗体は、腫瘍に関連する抗原に対する抗体であり、がん細胞を選択的に標的とするものが好ましい。そのような抗原の例として、メソテリン、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、CD19、CD22、CD30、CD70、B7H3、B7H4(O8Eとしても知られる)、タンパク質チロシンキナーゼ7(PTK7)、グリピカン3、RG1、フコシルGM1、CTLA-4、およびCD44が挙げられる。抗体は、動物(例えばマウス)、キメラ、ヒト化、または好ましくは、ヒトの抗体であり得る。抗体は、好ましくはモノクローナルであり、特にモノクローナルヒト抗体である。前述の抗原の一部に対するヒトモノクローナル抗体の製造は、Korman et al., US 8,609,816 B2(2013; B7H4(O8E)としても知られる); 特に抗体2A7、1G11、および2F9)、Rao-Naik et al., 8,097,703 B2(2012; CD19; 特に抗体5G7、13F1、46E8、21D4、21D4a、47G4、27F3、および3C10)、King et al., US 8,481,683 B2(2013; CD22; 特に抗体12C5、19A3、16F7

40

50

、および23C6)、Keler et al., US 7,387,776 B2(2008; CD30; 特に抗体5F11、2H9、および17G1)、Terrett et al., US 8,124,738 B2(2012; CD70; 特に抗体2H5、10B4、8B5、18E7、および69A7)、Korman et al., US 6,984,720 B1(2006; CTLA-4; 特に抗体10D1、4B6、および1E2)、Vistica et al., US 8,383,118 B2(2013、フコシルGM1、特に抗体5B1、5B1a、7D4、7E4、13B8、および18D5)、Korman et al., US 8,008,449 B2(2011; PD-1; 特に抗体17D8、2D3、4H1、5C4、4A11、7D3、および5F4)、Huang et al., US 2009/0297438 A1(2009; PSMA; 特に抗体1C3、2A10、2F5、2C6)、Cardarelli et al., US 7,875,278 B2(2011; PSMA; 特に抗体4A3、7F12、8C12、8A11、16F9、2A10、2C6、2F5、および1C3)、Terrett et al., US 8,222,375 B2(2012; PTK7; 特に抗体3G8、4D5、12C6、12C6a、および7C8)、Terrett et al., US 8,680,247 B2(2014; グリピカン3; 特に抗体4A6、11E7、および16D10)、Harkins et al., US 7,335,748 B2(2008; RG1; 特に抗体A、B、C、およびD)、Terrett et al., US 8,268,970 B2(2012; メソテリン; 特に抗体3C10、6A4、および7B1)、Xu et al., US 2010/0092484 A1(2010; CD44; 特に抗体14G9.B8.B4、2D1.A3.D12、および1A9.A6.B9)、Deshpande et al., US 8,258,266 B2(2012; IP10; 特に抗体1D4、1E1、2G1、3C4、6A5、6A8、7C10、8F6、10A12、10A12S、および13C4)、Kuhne et al., US 8,450,464 B2(2013; CXCR4; 特に抗体F7、F9、D1、およびE2)、およびKorman et al., US 7,943,743 B2(2011; PD-L1; 特に抗体3G10、12A4、10A5、5F8、10H10、1B12、7H1、11E6、12B7、および13G4)に開示され、これらの内容は引用として本明細書に組み込まれる。

10

20

【0093】

(実施例)

本発明の実践は、次の実施例を参照することによりさらに理解され得る。該実施例は、説明の手段として提供するものであり、限定を意図するものではない。

【0094】

実施例の後の表は、本明細書で用いる頭文字ならびに略語およびその意味を列記している。

【0095】

実施例1-血清安定性

次の工程は、マウス、ラット、またはヒト血清においてリンカーの血清安定性を試験するために用いられた。

30

【0096】

5 μ Lの試験化合物(DMSO中0.5mM)を、120 μ Lの1倍リン酸緩衝化食塩水、マウス、ラットまたはヒト血清を含む各試験管にそれぞれ移した。サンプルを37 $^{\circ}$ Cで0、1、2、4、および24時間インキュベートした。各時間が経過後、サンプルから一部(20 μ L)を採取し、75:25:0.1のMeOH:アセトニトリル:ギ酸溶液(60 μ L)でクエンチした。クエンチ後、全てのサンプルを-20 $^{\circ}$ Cで1時間置き、さらに14,000rpmで15分間遠心分離した。上清を新しいバイアルに移し、分析するまで-20 $^{\circ}$ Cで保管した。

【0097】

サンプルは、LC-MS/(MS: Agilent 6530 Q-TOFマスマスペクトロメーターをAgilent 1290 UPLCに接続)を用いて分析した。3 μ Lのサンプルを60 $^{\circ}$ Cに保ったWaters BEH C18カラム(2.1 x 50mm、1.7 μ m)に注入した。該化合物は、0.4mL/分の流速で、0.1%ギ酸水溶液および0.1%ギ酸含有アセトニトリルのグラジエントを用い、カラムから溶出させた。実行時間は、計9.5分である。

40

【0098】

実施例2-カテプシンB切断

次の工程は、リンカーのカテプシンB切断を試験するために用いられた。

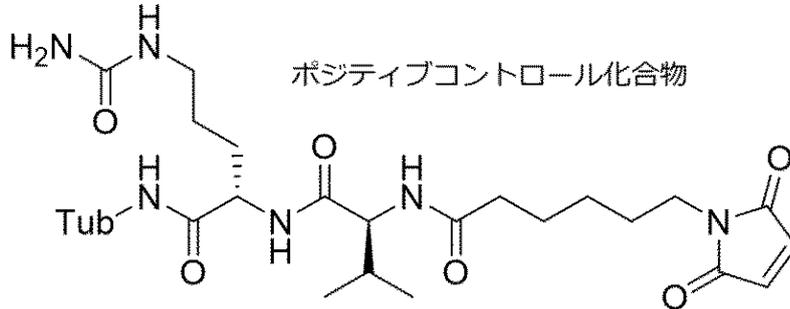
【0099】

7.5 μ Lの試験化合物(DMSO中0.5mM)を、135 μ LのカテプシンB緩衝液(25mM酢酸ナトリウム、1mM EDTA、1mM DTT、pH = 5.5)を含む各試験管に移し、7.5 μ Lの希釈カ

50

テブシンB酵素(活性化、1.45 μ M、0.1ユニット)を添加して消化を開始した。該サンプルを37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした。24時間後、一部(20 μ L)を採取し、75:25:0.1のMeOH:アセトニトリル:ギ酸溶液(80 μ L)でクエンチした。カテブシンBを添加していないネガティブコントロールもインキュベートした。コントロール化合物(構造は下記)を同様に消化し、ポジティブコントロールとして含んだ。クエンチ後、全てのサンプルを-20 $^{\circ}$ Cで1時間置き、さらに14,000rpmで5分間遠心分離した。前述の実施例の工程ごとに上清を新しいバイアルに移し、分析UPLCオートサンプラーに入れた。

【化53】



10

【0100】

上記の構造において、「Tub」は、チューブリシン類似体を表す(Cheng et al., US 8, 394,922 B2(2013))。バリン-シトルリン(Val-Cit)ジペプチドは、カテブシンBの基質として知られる。

20

【0101】

実施例3-トランスグルタミナーゼを用いた複合体の製造

次の工程は、アミドナーとして機能し得るアミノ基を有するリンカーである、リンカー化合物(例えば、化合物1a-02から1a-12および1b-01から1b-04)のトランスグルタミナーゼ媒介複合体に用いられ得る。該抗体は、トランスグルタミナーゼ反応性グルタミンを有する抗体(例えばN297AまたはN297Q置換のもの)であり得る。複合化は、抗体:酵素のモル比率が5:1で、組み換え細菌トランスグルタミナーゼにより行われる。その複合化は、50mMトリス緩衝液(pH=8.0)中で標準プロトコルを用いて行われ、37 $^{\circ}$ Cで一夜インキュベートした。得られた複合体は、50mMトリス(pH=8.0)で予め平衡化したタンパク質Aカラムで精製される。複合体を0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液(pH=3.5)で溶出する。溶出したフラクションを1Mトリス(pH=9.0)で中和する。該複合体は、20mg/mLソルビトール、10mg/mLグリシン(pH=5.0)中で製剤化され得る。

30

図1より、CD70ではなくメソテリンを発現するH226がん細胞(中皮腫)を用いるマウスモデルにおいて、本明細書に開示の修飾したSI部分と共に製造したADCが抗がん治療に有効であることが確認される。このグラフは、コントロール(製剤緩衝液、または化合物(1a-03)と共に製造したADCおよび抗CD70モノクローナル抗体(Terrett et al., US 8,124,738 B2(2012))のいずれかを含むもの)と比較して、化合物(1a-03)と共に製造したADCおよび抗メソテリンモノクローナル抗体(Terrett et al., US 8,268,970 B2(2012))が、35日後の腫瘍体積を減少させたことを示す。抗CD70 ADCのコントロールにおいて、H226細胞によるCD70抗原の発現の欠損は、抗CD70抗体がADCに対して有効な標的薬剤となることを防いでいる。(抗メソテリンおよび抗CD70の両抗体は、それらがトランスグルタミナーゼ介在複合体に対して適切なアミンアクセプターとなるようにN297A置換で修飾されている)

40

【0102】

実施例4-マレイミドマイケル付加による複合体の製造

この基本的な工程は、リシン-アミノ基と2-イミノチオランとの反応、続いてマレイミドを含むリンカー部分との反応による、抗体への遊離チオール基の導入に基づいている(例えば化合物1a-01および1b-05)。初めに、抗体の緩衝液を、50mM NaClおよび2mM DT

50

PAを含む0.1Mホスフェート緩衝液(pH = 8.0)に交換し、5 ~ 10mg/mLに濃縮する。抗体に2-イミノ-チオランを加えることでチオール化を行う。加える2-イミノチオランの量は予備実験により決定され得て、それは抗体によって異なる。予備実験において、2-イミノチオランを滴定して抗体に加え、続いて1時間室温で抗体と共にインキュベートした。抗体をSEPHADEX^T MG-25カラムを用いて脱塩し、50mM HEPES、5mMグリシン、2mM DTPA、pH = 5.5中に加え、導入されたチオール基の数をDTDPとの反応により速やかに決定した。チオール基とDTDPとの反応により、324nmのスペクトルでモニターされ得る、チオピリジンの遊離を生じた。タンパク質濃度0.5 ~ 1.0mg/mLのサンプルが一般に用いられる。280nmでの吸光度は、サンプル中のタンパク質濃度を正確に決定するために用いられ得り、次いで各サンプルの一部(0.9mL)を0.1mLのDTDP(エタノールのストック溶液(5mM))と共に10分間室温でインキュベートする。緩衝液とDTDPのみのブランクサンプルも並行してインキュベートする。10分後、324nmの吸光度を測定し、チオピリジン $19,800\text{M}^{-1}$ の吸光係数を用いてチオール基の数を定量する。

10

一般にチオール化は、抗体あたり約2 ~ 3個のチオール基が導入される程度に達する。これは例えば、いくつかの抗体において、15倍モル過剰の2-イミノチオランを加え、続いて室温で1時間インキュベートすることにより達成され得る。次いで抗体を2-イミノチオランと共に所望のモル率でインキュベートし、次いで脱塩し、コンジュゲーション緩衝液(50mM HEPES、5mMグリシン、2mM DTPA、pH = 5.5)に加える。導入したチオール数を上記に記載の通りに定量化する間、チオール化した物質を氷上に静置する。

導入されたチオール数を検証後、ドラッグ-リンカー部分がチオールに対して2.5倍モル過剰で加えられる。複合化反応は、コンジュゲーション緩衝液(最終濃度25%プロピレングリコールおよび5%トレハロース含有)中で進められる。一般に、リンカーストック溶液を100%DMSOに溶解する。ストック溶液を直接チオール化抗体に加える。

20

この複合化反応混合物を、ゆっくり攪拌しながら室温で2時間インキュベートする。10倍モル過剰のN-エチルマレイミド(DMSO中100mMでストック)を次いで複合体混合物に加え、さらに1時間攪拌し、未反応のチオールをいずれも阻害する。次いでこのサンプルを0.2 μ フィルターで濾過し、緩衝液をTFF VivaFlow 50 Sartorius 30 MWCO PES膜を用いて10mg/mLグリシン、20mg/mLソルビトール、15%アセトニトリル、pH = 5.0(5X TFF緩衝液交換体積)に交換し、あらゆる未反応の薬剤を除去する。最終の製剤は、TFFにより20mg/mLソルビトール、10mg/mLグリシン、pH = 5.0中で行う。

30

【0103】

実施例5-マウスモデル試験

次の工程は、図1で説明したタイプのマウスモデル試験に用いられ得る。

【0104】

リン酸緩衝化食塩水(「PBS」、0.1mL)およびマトリゲル(0.1mL)に再懸濁したがん細胞(図1の例では、H226中皮腫)を、SCIDマウスの脇腹部皮下に移植する。腫瘍の測定を28日後に開始し、それぞれおよそ同じ腫瘍サイズ(腫瘍のLWH/2から推定(mm^3); 図1の例では約 135mm^3)の7匹のマウスのグループに無作為に分ける。腫瘍移植から29日後、マウスに試験複合体を単体で腹腔内に投与する。

【0105】

40

実施例6-スキームAでの化合物の合成

本実施例および図1A-1Bは、本明細書に開示の化合物の合成、特に化合物Ia-03に言及する、スキームAに関する。

【0106】

化合物2

6-アミノイソベンゾフラン-1(3H)-オン1(1.0g、6.70mmol)およびメタンアミン(MeOH中2M、16.76mL、33.5mmol)/DCM(5mL)の混合物を3日間攪拌した。LCMSで開環生成物の存在が示された($M+H-H_2O=163.0$)。溶媒を濃縮し、化合物2を無色のペーストとして得た(定量的収量)。

【0107】

50

化合物3

(S)-2-(((S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)-アミノ)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタン酸(Fmoc-Val-Cit、1.681g、3.39mmol)および化合物2(1.22g、6.77mmol)のTHF(5mL)溶液に、EEDQ(1.674g、6.77mmol)を加えた。反応混合物を室温で一晩撹拌した。LCMSで生成物の形成が示された(M+H-H₂O=659.3)。反応液はシリカゲル(40g)を用いてCOMBIFLASHTMカラムで直接精製し、0~100%のMeOH/DCMで溶出し、化合物3を得た(53%収率)。

【0108】

化合物4

化合物3(206mg、0.313mmol)/DMF(1mL)の溶液に、ビス(4-ニトロフェニル)カルボネート(190mg、0.625mmol)、続いてDIEA(0.164mL、0.938mmol)を加えた。反応液を室温で3時間撹拌後、LCMSで生成物の形成が示された(M+H=824.3)。これをCOMBIFLASHTMカラム(シリカゲル40g)に直接注入し、0~100%のMeOH/DCMで溶出し、化合物4を白色固体として得た(50%収率)。

【0109】

化合物6

化合物5(26mg、0.054mmol)/DMF(0.5mL)の溶液に、化合物4(66.6mg、0.081mmol)、続いて2,6-ルチジン(0.013mL、0.108mmol)を加えた。反応液を室温で3時間撹拌後、LCMSで中間体付加化合物が形成し、反応の完了が示された(M+H=1167.3)。反応液を飽和NaHCO₃水溶液/EtOAcでワークアップし、付加物を精製せずに次のステップに用いた。

付加物(63.0mg、0.054mmol)/DMF(0.5mL)の溶液に、DEA(0.056mL、0.540mmol)を加えた。30分後、LCMSで反応の完了が示された(M+H=945.4)。反応混合物をDMSO(0.5mL)で希釈し、XBridge Prep C18カラム(5μm、OBD、10 x 150mm)を取り付けたLC-20AP分取HPLC(Shimadzu)で精製し、0~95%のH₂O/アセトニトリル(0.05%ギ酸含有)で溶出した。得られた生成物を含む11分でのフラクションを凍結乾燥し、化合物6を紫色固体として得た。

【0110】

化合物7

(S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-5-(アリルオキシ)-5-オキソペンタン酸(FmocNH-O-alloc-Glu、38.1mg、0.093mmol)および化合物6(88mg、0.093mmol)の混合物を2,6-ルチジン(0.033mL、0.279mmol)およびHATU(70.8mg、0.186mmol)で処理し、1時間撹拌した。LCMSで付加化合物の形成が示された(M+H=1279.6)。反応液をEtOAc/飽和NaHCO₃水溶液でワークアップし、付加物を精製せずに次のステップに用いた。

上記のステップから得た付加物に、モルホリン(0.016mL、0.186mmol)、続いてテトラキスパラジウム(10.76mg、9.31μmol)を加え、30分間撹拌した。LCMSでalloc基の除去が示された(M+H=1240.0)。この混合物に、DEA(0.049mL、0.466mmol)を加えて30分間撹拌後、LCMSで反応の完了が示された(M+H=1017.6)。反応液を逆相COMBIFLASHTMカラム(40g、c-18)で精製し、0~100%の水/アセトニトリル(0.05%ギ酸含有)で溶出し、化合物7を紫色固体として得た。

【0111】

化合物1a-03

化合物7(10.2mg、9.50μmol)および2,5-ジオキソピロリジン-1-イル1-(9H-フルオレン-9-イル)-3-オキソ-2,7,10,13,16-ペンタオキサ-4-アザノナデカン-19-オエート(FmocNH-PEG4-OSuc、5.55mg、9.50μmol)/DMF(0.5mL)の溶液を2,6-ルチジン(3.32μL、0.028mmol)で処理し、3時間撹拌した。LCMSで反応の完了が示された(M+H=1357.5)。この反応液に、DEA(0.020mL、0.190mmol)を加え、続いて30分間撹拌後、LCMSで反応の完了が示された(M+H=1135.4)。反応混合物をDMSO(0.5mL)で希釈し、XBridge Prep C18カラム(5mm、OBD、10 x 150mm)を取り付けたLC-20AP分取HPLC(Shi

10

20

30

40

50

madzu)で精製し、0~95%のH₂O/アセトニトリル(0.05%ギ酸含有)で溶出した。得られた生成物を含む11.5分でのフラクションを凍結乾燥し、化合物Ia-03を紫色固体として得た。

【0112】

スキームAを準用して、表Dの化合物を製造した。

【表5】

表D-スキームAで製造した化合物		
化合物	期待質量 (M+H)	観測質量 (M+H)
化合物A	1134.4	1135.4
(Ia-01)	1137.4	1138.4
(Ia-02)	1497.5	1498.9
(Ia-03)	1320.5	1321.3
(Ia-04)	1232.5	1233.3

10

【0113】

実施例7-スキームBでの化合物の合成

本実施例および図3A-3Cは、本明細書に開示の化合物の合成、特に化合物Ia-06およびIa-09に言及する、スキームBに関する。

【0114】

化合物8

6-アミノイソベンゾフラン-1(3H)-オン(1g、6.70mmol)/メタノール(1mL)の溶液に、エタン-1,2-ジアミン(2.246mL、33.5mmol)を加えた。反応混合物を室温で3時間撹拌した。LCMSで出発物質が消失し、生成物の出現が示された(M+H-H₂O=192.2)。溶媒および過剰な試薬を蒸発により除去し、得られた粗製物質8を次のステップに用いた。

30

【0115】

化合物9

化合物8(1402mg、6.70mmol)のDMF(5mL)溶液に、0 でアリルクロロホルメート(0.715mL、6.70mmol)のTHF(1mL)溶液を加えた。反応液を1時間撹拌後、LCMSで生成物の形成が示された(M+H-H₂O=276.2)。反応液に飽和NaHCO₃水溶液を添加してクエンチし、EtOAcで抽出した。得られた粗製生成物を、シリカゲルカラム(40g)で精製し、0~100%のMeOH/DCMで溶出し、化合物9を白色固体として得た。

【0116】

化合物10

(S)-2-(((S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタン酸(Fmoc-Val-Cit、242mg、0.488mmol)および化合物9(286mg、0.975mmol)のMeOH(2mL)溶液に、EEDQ(241mg、0.975mmol)を加えた。反応混合物を室温で一夜撹拌した。LCMSで新たなピークが示された(M+H=772.5)。反応液は、シリカゲル(40g)を用いて直接COMBIFLASHTMカラムで精製し、0~100%のMeOH/DCMで溶出し、化合物10を得た。

40

【0117】

化合物11

化合物10(102mg、0.132mmol)のDMF(1mL)溶液に、ビス(4-ニトロフェニル)カルボネート(121mg、0.396mmol)およびDIPEA(0.046mL、0.264mmol)を加えた。反応液を室温で3時間撹拌後、LCMSで反応の完了が示された(M+H=937.3)。シリカゲルカラム

50

(40g)を用いて直接COMBIFLASHTMユニットで精製し、0~50%のMeOH/DCMで溶出し、化合物11を白色固体として得た。

【0118】

化合物12

化合物11および化合物5(53.0mg、0.110mmol)の混合物を一夜攪拌した。LCMSで反応の完了が示され(M+H=1110.4)、これを飽和水溶液NaHCO₃/EtOAcでワークアップし、乾燥させた。この粗製混合物/DMF(5mL)に、DEA(0.057mL、0.550mmol)を加え、続いて30分間攪拌した。LCMSで反応の完了が示された(M+H=888.1)。得られた生成物を、逆相COMBIFLASHTMカラム(150g C-18)に直接注入し、0~50%の水/アセトニトリル(0.05%ギ酸含有)で溶出し、化合物12を紫色固体として得た。

10

【0119】

化合物13

化合物12(150mg、0.142mmol)および2,5-ジオキソピロリジン-1-イル1-(9H-フルオレン-9-イル)-3-オキソ-2,7,10,13,16-ペンタオキサ-4-アザノナデカン-19-オエート(FmocNH-PEG₄-OSu、83mg、0.142mmol)のDMF(0.5mL)溶液に、2,6-ルチジン(0.050mL、0.425mmol)を加えた。反応混合物を2時間攪拌し、LCMSで新たなピークが示された(M+H=1528.7)。得られた粗製生成物を、逆相COMBIFLASHで精製し、0~100%のアセトニトリル/水(0.05%ギ酸含有)で溶出し、所望の生成物を紫色固体として得た。

前述のステップから得られた生成物(5mg、0.037μmol)をDMF(0.5mL)に溶解し、フェニルシラン(0.775μL、6.28μmol)、続いてテトラキスパラジウム(1.815mg、1.571μmol)で処理した。LCMSでalloc基の除去が示された(M+H=1444.4)。反応液はシリンジフィルターを介して濾過し、溶媒を濃縮し、化合物13を得た。

20

【0120】

化合物1a-09

8(4.8mg、3.14μmol)の溶液をDMF(0.5mL)に溶解し、2,5,8,11,14,17,20,23-オクタオキサヘキサコサン-26-酸(6.75mg、0.016mmol)、HATU(6.22mg、0.016mmol)および2,6-ルチジン(4μL、0.033mmol)で処理し、1時間攪拌後、アミンがアシル化した。粗製反応液を次いでDEA(3.28μL、0.031mmol)で処理した。LCMSでFmoc基の脱保護が示された(M+H=1616.5)。得られた粗製生成物を、XBridge Prep C18カラム(5μm、19 x 150mm)を取り付けた分取HPLC(Shimadzu)に直接注入し、0~95%のMeCN/H₂O(0.1%FA含有)で溶出し、生成物を含むフラクションを凍結乾燥し、化合物1a-09(1.3mg、0.833μmol、26.5%収率)を紫色固体として得た。

30

【0121】

化合物14

化合物12/DMF(0.5mL)の溶液を2,6-ルチジン(10.24μL、0.088mmol)、続いて無水酢酸(2.76μL、0.029mmol)で処理した。5分後、LCMSでアセチル化の完了が示された(M+H=1100.3)。この混合物に、モルホリン(5.10μL、0.059mmol)、続いてテトラキスパラジウム(6.77mg、5.86μmol)を加え、1時間攪拌した。LCMSで反応の完了が示された(M+H=1016.3)。反応液は、C18カラム(50g)を用いて逆相COMBIFLASHTMユニットで直接精製し、0~50%の水/アセトニトリル(0.05%ギ酸含有)で溶出し、化合物14を紫色固体として得た。

40

【0122】

化合物1a-06

化合物14(22mg、0.022mmol)/DMF(0.5mL)の溶液に、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル1-(9H-フルオレン-9-イル)-3-オキソ-2,7,10,13,16-ペンタオキサ-4-アザノナデカン-19-オエート(12.66mg、0.022mmol)および2,6-ルチジン(7.57μL、0.065mmol)を加えた。反応液を1時間攪拌後、LCMSで反応の完了が示された。ジエチルアミン(0.011mL、0.108mmol)を加え、反応混合物を30分間攪拌後、LCMSで生成物の形成が示された(M+H=1363.3)。反応液をDMSO(0.5mL)で希釈し、XBridge Prep C18カラム(5μm、OBD、10 x 150mm)を取り付けたLC-20AP分取HPLC(Shimadzu)で精製し、0~95%

50

のH₂O/アセトニトリル(0.05%ギ酸含有)で溶出した。得られた生成物を含むフラクションを凍結乾燥し、化合物Ia-06を紫色固体として得た。

【 0 1 2 3 】

スキームBを準用して、表Eの化合物を製造した。

【表 6】

表E-スキームBで製造した化合物		
化合物	期待質量 (M+H)	観測質量 (M+H)
(Ia-05)	1220.5	1221.2
(Ia-06)	1262.5	1263.3
(Ia-07)	1262.5	1264.5
(Ia-08)	1324.5	1326.2
(Ia-09)	1614.7	1616.5
(Ia-10)	1790.8	896.6 (M+H)/2
(Ia-11)	2319.1	1161.3 (M+H)/2

10

20

【 0 1 2 4 】

実施例8-スキームCでの化合物の合成

本実施例および図4は、本明細書に開示の化合物の合成、特に化合物Ib-05に言及する、スキームCに関する。

【 0 1 2 5 】

化合物17

化合物15(124mg、0.312mmol)および化合物16(310mg、0.312mmol)/DMF(2mL)およびDMSO(2mL)の混合物に、DIPEA(0.164mL、0.937mmol)を加えた。反応混合物を50℃で2時間加熱し、LCMSで反応の完了が示された(M+H=1251.2)。塩基を蒸発させ、得られた粗製生成物を、COMBIFLASHTMカラム(80gシリカゲル)で精製し、0~50%のMeOH/DCMで溶出し、化合物17を白色固体として得た。

30

【 0 1 2 6 】

化合物18

化合物17(52mg、0.042mmol)/DMF(0.5mL)の溶液をモルホリン(7.23μL、0.083mmol)、続いてテトラキスパラジウム(9.60mg、8.30μmol)で処理した。1時間後、LCMSでalloc基の除去が示された。この溶液をDEA(0.043mL、0.415mmol)で処理した。30分後、LCMSで反応の完了が示された(M+H/2=495.9)。得られた粗製生成物を、XBridge Prep C18カラム(5mm、19 x 150mm)を取り付けた分取HPLC(Shimadzu)に直接注入し、0~95%のアセトニトリル/H₂O(0.1%ギ酸含有)で溶出した。得られた生成物を含むフラクションを凍結乾燥し、化合物18を白色固体として得た。

40

【 0 1 2 7 】

化合物Ib-05

化合物18(17mg、0.017mmol)および2,5-ジオキソピロリジン-1-イル6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノエート(MC-OSuc、5.29mg、0.017mmol)/DMF(0.5mL)およびDMSO(0.5mL)の溶液を2,6-ルチジン(6.00μL、0.052mmol)で処理し、40℃で1時間加熱した。LCMSで反応の完了が示された(M+H=1183.3)。得ら

50

れた粗製生成物を、XBridge Prep C18カラム(5mm、19 x 150mm)を取り付けた分取HPLC(Shimadzu)に直接注入し、0~95%のアセトニトリル/H₂O(0.1%ギ酸含有)で溶出した。得られた生成物を含むフラクションを凍結乾燥し、化合物Ib-05を白色固体として得た(15mg)。

【0128】

化合物BもまたスキームCを準用して合成した(質量分析計(M+H)理論値:1182.5、観測値:1183.3)。

【0129】

実施例9-スキームDでの化合物の合成

本実施例および図5は、本明細書に開示の化合物の合成、特に化合物Ib-01に言及する、スキームDに関する。

10

【0130】

化合物21

化合物20(575mg、0.604mmol)および化合物19(240mg、0.604mmol)のDMF(1mL)溶液を、DIPEA(0.316mL、1.811mmol)で処理した。室温で3時間攪拌後、LCMSで反応の完了が示された(M+H=1211.0)。塩基を濃縮し、得られた粗製生成物を、シリカゲル(80g)を用いてCOMBIFLASHTMカラムで精製し、0~50%のMeOH/DCMで溶出し、化合物21を淡黄色固体として得た。

【0131】

化合物22

20

化合物21(0.206g、0.170mmol)/DMF(1mL)溶液をDEA(1mL)で処理し、1時間攪拌した。過剰の塩基を蒸発させ、溶液をHATU(0.071g、0.187mmol)および1-(9H-フルoren-9-イル)-3-オキソ-2,7,10,13,16-ペンタオキサ-4-アザノデカン-19-酸(0.083g、0.170mmol)、および2,6-ルチジン(0.059mL、0.510mmol)の溶液で処理した。30分間攪拌後、LCMSで反応の完了が示された(M+H=1458.4)。反応液は、カラム(50g)を用いて逆相COMBIFLASHTMユニットで精製し、0~100%のアセトニトリル/H₂O(0.05%ギ酸含有)で溶出し、化合物22を得た。

【0132】

化合物Ib-01

化合物22(0.249g)の溶液をTFA(1mL)で処理し、1時間攪拌後、LCMSでBoc保護基の除去が示された(M+H=1358.1)。TFAをV-10エバポレーターで濃縮した。

30

【0133】

バイアル中、2,5,8,11,14,17,20,23-オクタオキサヘキサコサン-26-酸(0.070g、0.171mmol)をDMF(0.5mL)に溶解し、HATU(0.078g、0.205mmol)およびDIPEA(0.149mL、0.854mmol)で処理し、20分間攪拌した。この溶液を脱保護した化合物22で処理し、30分間攪拌し、LCMSで所望の生成物が形成されたことが示された(M+H=1752.4)。

この溶液をDEA(0.357mL、3.41mmol)で処理した。30分後、LCMSで化合物Ib-01の形成が示された(M+H=1529.3)。塩基をV-10エバポレーターで蒸発させ、得られた粗製生成物を、C-18カラム(50g)を用いて逆相COMBIFLASHTMユニットで精製し、0~95%のアセトニトリル/H₂O(0.1%ギ酸含有)で溶出し、生成物を含むフラクションを凍結乾燥し、化合物Ib-01を得た(122mg、0.073mmol、43.0%収率)。

40

【0134】

スキームDを準用して、表Fの化合物を製造した。

【表 7】

表F-スキームDで製造した化合物		
化合物	期待質量 (M+H)	観測質量 (M+H)
(Ib-01)	1528.8	1529.3
(Ib-02)	1148.5	575.5 (M+H)/2
(Ib-03)	1237.5	1237.4
(Ib-04)	1412.7	1413.5

10

【0135】

前述の本発明の詳細な説明には、本発明の特定の部分または態様に、全体的または限定的に関係している一節を含む。これは明確化および便宜を図るためであり、特定の特徴は、単に開示された一節のみではなく、それ以外にも関係し得り、本開示は、様々な一節に見られる情報の適当な組み合わせを全て含むと理解される。同様に、本明細書の様々な図および説明が本発明の特定の実施態様に関連しているが、ある特徴が特定の図または実施態様中に開示されている場合、その特徴は、別の図または実施態様中、別の特徴との組み合わせ、または本発明一般において、適切な範囲で用いられ得ると理解される。

20

【0136】

さらに本発明は、特定の好ましい実施態様に関して特に説明されている一方、本発明はそのような好ましい実施態様に制限されない。本発明の範囲は添付の請求項により定義される。

【0137】

(頭文字および略語)

次の表は、本明細書で用いられる頭文字および略語の一覧、およびそれらの意味である。

30

40

50

【表 8】

頭文字または略語	意味または定義
Alloc	アリルオキシカルボニル
Boc	t-ブチルオキシカルボニル
DCM	ジクロロメタン
DEA	ジエチルアミン
DIPEA、DIEA	N,N-ジイソプロピルエチルアミン (ヒューニツヒ塩基としても知られる)
DMF	N,N-ジメチルホルムアミド
DMSO	ジメチルスルホキシド
DTDP	2,2'-ジチオジピリジン
DTPA	ジエチレントリアミンペンタ酢酸
EEDQ	エチル2-エトキシキノリン-1(2H)-カルボキシレート
Fmoc	フルオレニルメチルオキシカルボニル
HATU	ヘキサフルオロホスフェートアザベンゾ トリアゾールテトラメチルウロニウム； 1-[ビス(ジメチルアミノ)-メチレン]-1H- 1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3- オキシドヘキサフルオロホスフェート
HEPES	4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-エ タンスルホン酸、N-(2-ヒドロキシエチ ル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)
PEG	ポリエチレングリコール
RT	室温、約25°C
TFA	トリフルオロ酢酸
THF	テトラヒドロフラン

10

20

30

【0138】

参考文献

本明細書において、第一著者(または発明者)および先の日付により省略形で示した次の文献の完全な引用を下記に示す。各引用文献は参照により本明細書に援用される。

Alouane et al., Ang. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 7492, "Self-Immolative spacers: Kinetic Aspects, Structure-Property Relationships, and Application."

Boyd et al., US 7,691,962 B2 (2010).

Burke et al., US 2017/0247412 A1 (2017).

Carl et al., J. Med. Chem. 1981, 24(5), 479, "A Novel Connector Linkage Applicable in Prodrug Design." [1981a]

Carl et al., WO 81/01145 A1 (1981). [1981b]

Doronina et al., Bioconjugate Chem. 2008, 19, 1960, "Novel Peptide Link

40

50

ers for Highly Potent Antibody-Auristatin Conjugate."

Dorywalska et al., *Mol. Cancer Ther.* 2016, 15(5), 958, "Molecular Basis of Valine-citrulline-PABC Linker Instability in Site-specific ADCs and its Mitigation by Linker Design."

Dubowchik et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 3341, "Cathepsin B-Sensitive Dipeptide Prodrugs. 1. A Model Study of Structural Requirements for Efficient Release of Doxorubicin." [1998a].

Dubowchik et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 3347, "Cathepsin B-Sensitive Dipeptide Prodrugs. 2. Models of Anticancer Drugs Paclitaxel (Taxol(登録商標)), Mitomycin C and Doxorubicin." [1998b].

Dubowchik et al., *Bioconjugate Chem.* 2002, 13, 855, "Cathepsin B-Labile Dipeptide Linkers for Lysosomal Release of Doxorubicin from Internalizing Immunoconjugates: Model Studies of Enzymatic Drug Release and Antigen-Specific In Vitro Anticancer Activity."

Feng, US 7,375,078 B2 (2008).

Feng, US 7,989,434 B2 (2011).

Firestone et al., US 6,214,345 B1 (2001).

Gerber et al., *Nat. Prod. Rep.* 2013, 30, 625, "The antibody-drug conjugate: an enabling modality for natural product based cancer therapies."

Jeffrey, US 8,039,273 (2011).

Jeffrey et al., *Bioconjugate Chem.* 2006, 17, 831, "Development and Properties of β -Glucuronide Linkers for Monoclonal Antibody-Drug Conjugates."

Lin et al., US 9,089,614 B2 (2015).

Kim et al., US 2016/0184451 A1 (2016).

Kim et al., US 2017/0095576 A1 (2017).

Machida et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 8595, "Allosterically Regulated Phosphatase Activity from Peptide-PNA Conjugates Folded Through Hybridization."

Major et al., *Chem. Commun.* 2011, 47, 7968, "Investigation of Self-Immolative Linkers in the Design of Hydrogen Peroxide Activated Metalloprotein Inhibitors."

McDonagh et al., WO 2007/103288 A2 (2007).

Senter et al., US 7,091,186 B2 (2006).

Szczepanik et al., US 8,828,678 B2 (2014).

Zhang et al., *Chem. Commun.* 2015, 51, 7031, "An Enzyme Activatable Probe with a Self-immolative Linker for Rapid and Sensitive Alkaline Phosphatase Detection and Cell Imaging through a Cascade Reaction."

10

20

30

40

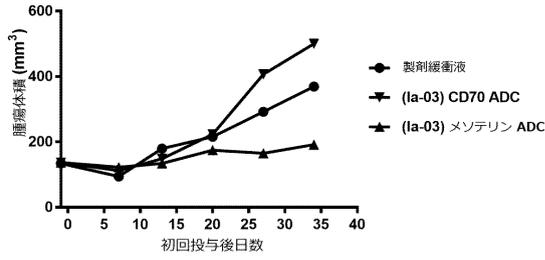
50

【図面】

【図 1】

図 1

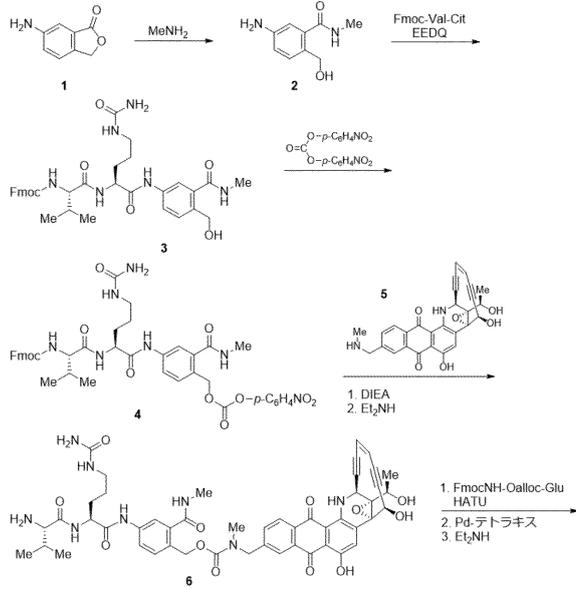
H226腫瘍(中皮腫)に対する有効性



【図 2 A】

図 2A

スキーム A



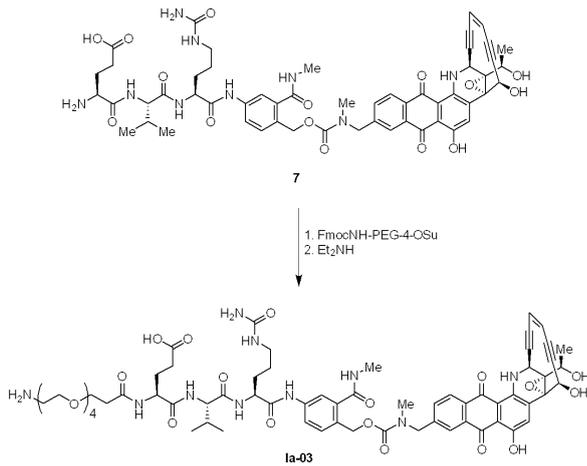
10

20

【図 2 B】

図 2B

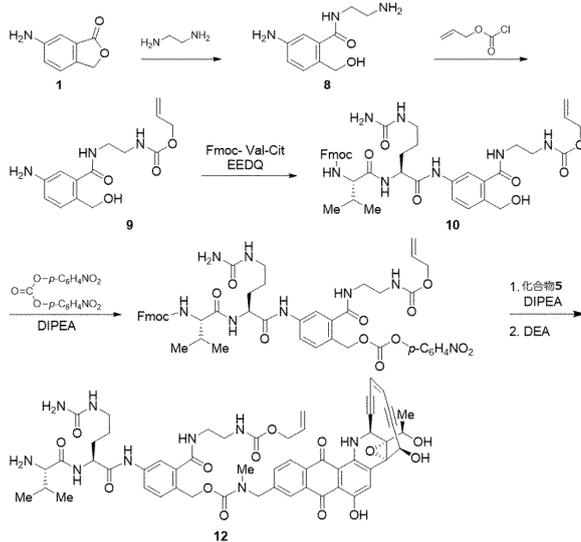
スキーム A(続き)



【図 3 A】

図 3A

スキーム B



30

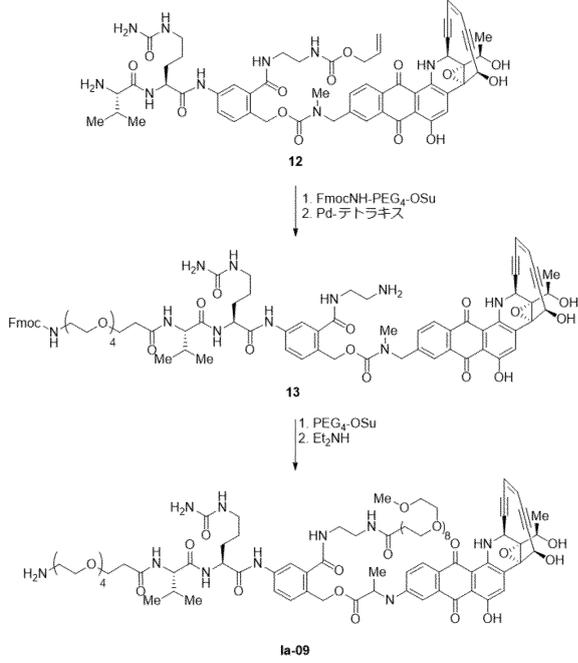
40

50

【 図 3 B 】

図 3B

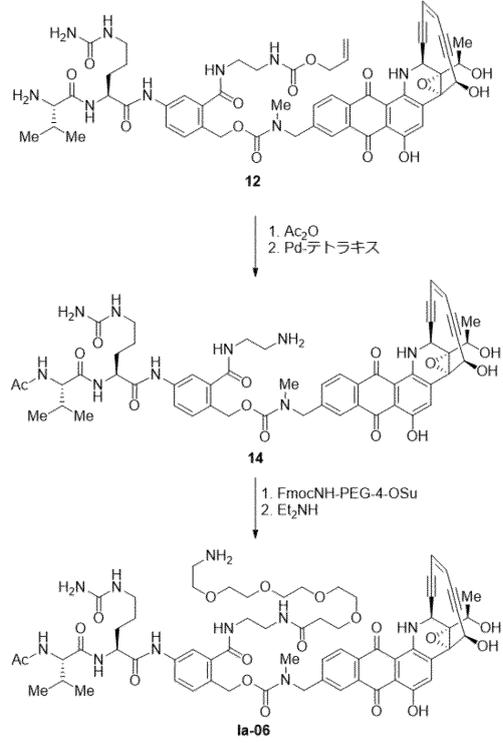
スキーム B(続き)



【 図 3 C 】

図 3C

スキーム B(続き)



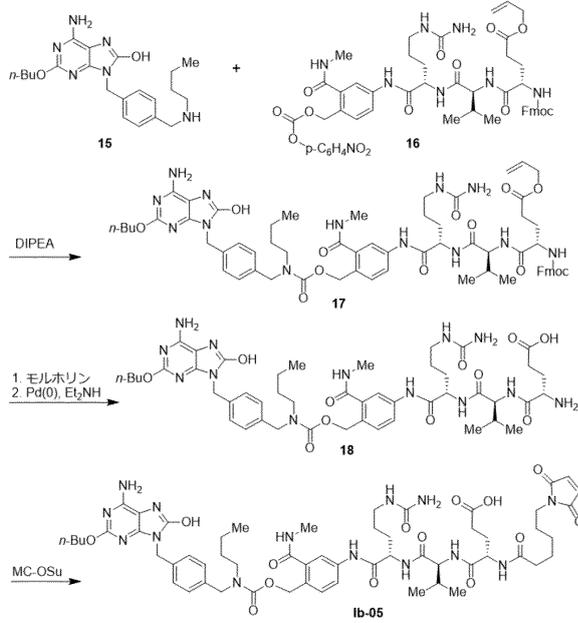
10

20

【 図 4 】

図 4

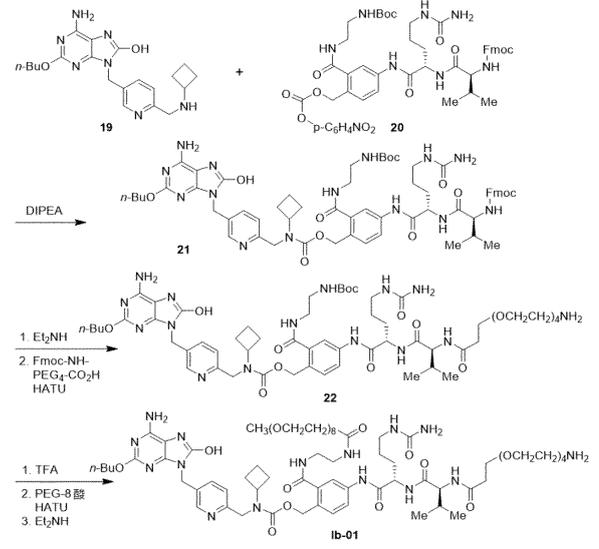
スキーム C



【 図 5 】

図 5

スキーム D



30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I	
C 0 7 K	5/08 (2006.01)	C 0 7 K	5/08
C 0 7 K	5/10 (2006.01)	C 0 7 K	5/10
C 0 7 K	7/06 (2006.01)	C 0 7 K	7/06
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00

弁理士 水原 正弘

(74)代理人 100162684

弁理士 呉 英燦

(72)発明者 ヤム・ビー・ポウデル

アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0 番、プリ
ストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 サンジーブ・ギャングウォー

アメリカ合衆国 9 4 4 0 4 カリフォルニア州フォスター・シティ、ポンパノ・サークル 3 1 2 番

審査官 山 崎 真奈

(56)参考文献

中国特許出願公開第 1 0 4 5 8 7 4 8 7 (C N , A)

国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 4 4 6 2 (W O , A 2)

国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 4 4 5 8 (W O , A 2)

国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 4 3 3 5 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 4 3 3 9 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 0 7 / 1 0 3 2 8 8 (W O , A 2)

特開 2 0 1 4 - 1 6 9 2 9 8 (J P , A)

国際公開第 2 0 0 8 / 0 6 7 4 9 5 (W O , A 2)

特表 2 0 1 4 - 5 0 7 4 3 9 (J P , A)

Xuan Zhang et al. , Bioconjugate Chem , 2016年 , Vol.27 , pp.1267-1275

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K

C 1 2 N

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)