

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-547434

(P2022-547434A)

(43)公表日 令和4年11月14日(2022.11.14)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	47/56 (2017.01)	A 6 1 K	47/56	Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68		4 C 0 8 4
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 C 0 8 5
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 K	47/60		4 H 0 4 5
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全127頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-513525(P2022-513525)	(71)出願人	522074383		
(86)(22)出願日	令和2年8月28日(2020.8.28)		スターファーマ プロプライエタリー リ		
(85)翻訳文提出日	令和4年4月13日(2022.4.13)		ミティド		
(86)国際出願番号	PCT/AU2020/050910		オーストラリア国, ビクトリア 3 0 7		
(87)国際公開番号	WO2021/035310		2, プレストン, ピーオー ボックス 2		
(87)国際公開日	令和3年3月4日(2021.3.4)		0 2 2		
(31)優先権主張番号	2019903152	(74)代理人	100092783		
(32)優先日	令和1年8月28日(2019.8.28)		弁理士 小林 浩		
(33)優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア(AU)	(74)代理人	100120134		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	弁理士 大森 規雄		
		(74)代理人	100153693		
			弁理士 岩田 耕一		
		(72)発明者	オーウェン, デイビッド		
			オーストラリア国, ビクトリア 3 0 7		
			2, プレストン, c/o ピーオー ボッ		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 標的化デンドリマー複合体

(57)【要約】

本明細書で提供されるのは、デンドリマーと、HER 2 標的化剤と、治療剤を含むデンドリマー標的化剤複合体であって、ここで、デンドリマーは、コアユニット、およびリジンまたはリジン類似体構成ユニットを含み、HER 2 標的化剤は、最大約80 kDaの分子量を有し、抗原結合部位を含むペプチド部分であり、スペーサー基によって共有結合により連結されており、治療剤は、デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結されている。また、本明細書では、複合体を含む組成物、および複合体を用いた治療法、特にがんの治療法を提供する。

【選択図】図1

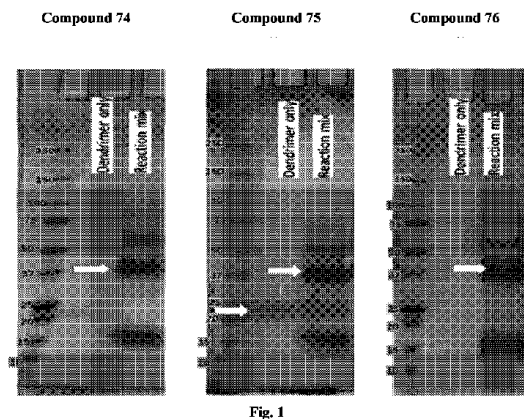


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

デンドリマー-標的化剤複合体であって、

a)

i) コアユニット (C)、および

ii) 構成ユニット (BU) を含むデンドリマーであって、各構成ユニットが、リジン残基またはその類似体であり、

前記コアユニットが、アミド連結を介して、少なくとも 2 つの構成ユニットに共有結合により付着しており、各アミド連結は、前記コアユニット内に存在する窒素原子と前記構成ユニット内に存在するアシル基の炭素原子との間で形成される、デンドリマーと；

b) 最大約 80 kDa の分子量を有し、かつ抗原結合部位を含むペプチド部分であり、スペーサー基によって前記デンドリマーに共有結合により連結しているペプチド部分である HER2 標的化剤と；

c) 前記デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している治療剤と；

d) 前記デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している親水性ポリマー基と

を含む、前記複合体。

【請求項 2】

前記ペプチド部分が、重鎖抗体、Fab、Fv、scFv、またはシングルドメイン抗体から選択される、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 3】

前記ペプチド部分が、重鎖可変 (V_H) ドメインを含むか、または重鎖可変 (V_H) ドメインからなる、請求項 1 または 2 に記載の複合体。

【請求項 4】

前記ペプチド部分が、軽鎖可変 (V_L) ドメインを含むか、または軽鎖可変 (V_L) ドメインからなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 5】

前記標的化剤が、約 5 kDa ～ 約 30 kDa の分子量を有する、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 6】

前記標的化剤が、約 5 kDa ～ 約 15 kDa の分子量を有する、請求項 5 に記載の複合体。

【請求項 7】

前記標的化剤が、約 10 kDa ～ 約 16 kDa の分子量を有する、請求項 6 に記載の複合体。

【請求項 8】

前記標的化剤が、120 未満のアミノ酸残基を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 9】

前記標的化剤が、本明細書に記載のアミノ酸配列のいずれかを含むか、またはそれらからなる、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 10】

1 つの標的化剤が、前記デンドリマーに共有結合により連結している、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 11】

2 つ以上の標的化剤が、前記デンドリマーに共有結合により連結している、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 12】

前記標的化剤と前記スペーサー基との間の前記共有結合による連結が、標的化剤前駆体およびスペーサー基前駆体上に存在する相補的反応性官能基間の反応によって形成される

10

20

30

40

50

【請求項 13】

【請求項 14】

また、

【請求項 15】

【請求項 16】

【請求項 17】

前記アルキン基が、ジベンゾシクロオクチン基である、請求項16に記載の複合体。

【請求項 18】

前記治療剤が、化学療法剤である、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 19】

前記治療剤が、細胞傷害剤である、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 20】

前記治療剤が、超細胞傷害剤である、請求項 1 ～ 19 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 21】

前記治療剤が、アウリスタチンまたはメイタンシノイドである、請求項 20 に記載の複合体。

【請求項 22】

前記治療剤が、モノメチルアウリスタチンEである、請求項21に記載の複合体。

【請求項 23】

前記治療剤が、モノメチルアウリスタチンFである、請求項21に記載の複合体。

【請求項 24】

前記治療剤が、リンカーを介して前記デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 25】

前記治療剤が、切断可能なリンカーを介して前記デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 26】

切断可能なリンカーが、Val-Cit-PAB基またはVal-Arg-PAB-Pトリガ基のいずれかを含む、請求項25に記載の複合体。

【請求項 27】

前記親水性高分子基が、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリエチルオキサゾリン（PEOX）、またはポリサルコシンからなる群から選択される、請求項1～26のいづ

れか一項に記載の複合体。

【請求項 28】

前記 dendrimer の表面構成ユニットに共有結合により連結している PEG 基を含む、請求項 1～27 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 29】

前記 PEG 基が、約 500～約 2500 g／モルの範囲の平均分子量を有する、請求項 28 に記載の複合体。

【請求項 30】

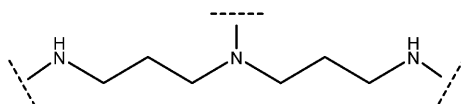
前記 spacer 基が、PEG 基を含む、請求項 1～29 のいずれか一項に記載の複合体。

10

【請求項 31】

前記 core ユニットが構造：

【化 2】



を含む、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 32】

前記 dendrimer が、1 世代～5 代の構成ユニットを有する、請求項 1～31 のいずれか一項に記載の複合体。

20

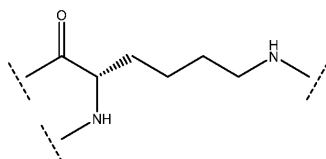
【請求項 33】

前記 dendrimer が、3 世代の構成ユニットを有する、請求項 32 に記載の複合体。

【請求項 34】

前記構成ユニットが、それぞれ、

【化 3】



30

である、請求項 1～33 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 35】

さらなる活性剤と組み合わせて投与するための、請求項 1～34 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 36】

前記複合体が、HER2 発現細胞内に内在化される、請求項 1～35 のいずれか一項に記載の複合体。

40

【請求項 37】

前記複合体の投与により、同等用量の遊離治療剤の投与と比較して、副作用の軽減がもたらされる、請求項 1～36 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 38】

前記複合体の投与により、同等用量の遊離治療剤の投与と比較して、放出された治療剤の最大血漿濃度の少なくとも 50% の減少がもたらされる、請求項 1～37 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 39】

請求項 1～38 のいずれか一項に記載の複数の複合体を含む組成物。

【請求項 40】

50

i) 請求項 1～39 のいずれか一項に記載の複合体と；
ii) 薬剂的に許容される賦形剤と
を含む、医薬組成物。

【請求項 41】

前記組成物が、非経口送達用に製剤化される、請求項 39 または 40 に記載の組成物。

【請求項 42】

がんの治療に使用するための、請求項 1～38 のいずれか一項に記載の複合体、または請求項 39～41 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 43】

治療有効量の請求項 1～38 のいずれか一項に記載の複合体または請求項 39～42 のいずれか一項に記載の組成物を、それを必要としている対象に投与することを含む、がんを治療する方法。

【請求項 44】

がんの治療のための医薬品の製造における、請求項 1～38 のいずれか一項に記載の複合体の使用、または請求項 39～43 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 45】

前記がんが、卵巣がん、乳がん、胃がん、子宮がん、または E R B B 2 遺伝子の異常発現を特徴とする別のがんである、請求項 42～44 のいずれか一項に記載の方法、使用、または使用のための複合体もしくは組成物。

【請求項 46】

H E R 2 発現細胞を死滅させる方法であって、
請求項 1～38 のいずれか一項に記載の複合体を、H E R 2 発現細胞と接触させて、これにより、前記複合体を前記細胞内に内在化させ、それによって前記治療剤が前記 H E R 2 発現細胞を死滅させることを含む、
前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、一般的に、H E R 2 が過剰発現しているがんを標的とするのに有用な治療法に関する。より具体的には、本開示は、H E R 2 抗体断片またはミメティック、および超細胞傷害剤の残基などの治療剤部分を含むデンドリマー-標的化部分複合体を用いた、治療剤部分の標的化送達に関する。

【背景技術】

【0002】

W H O によると、がんは世界の死因の第 2 位であり、2018 年には推定 960 万人の死亡原因となっている。最も多いがんの形態は、肺がん、乳がん、大腸がん、前立腺がん、皮膚がん、および胃がんである。

【0003】

効果的ながん治療法を開発するために、多くの努力がなされている。しかし、標的において十分な効力を有し、作用部位に送達させ得るような適切な薬物動態特性を有し、十分な作用時間を有し、良好な安全性プロファイルを有する新規治療法を見出す問題は、非常に困難であり、時間および費用を要する。

【0004】

トラスツズマブ (H e r c e p t i n (登録商標)) およびリツキシマブ (M a b t h e r a (登録商標)) などのモノクローナル抗体療法の開発は、注目すべき成功を収めた一種のアプローチである。例えば、H e r c e p t i n (登録商標) は、1998 年に承認され、H E R 2 過剰発現の乳がんおよび胃がんの治療のために使用される。この抗体は、一部のがんの形態において過剰発現している H E R 2 / E R B B 2 受容体に結合し、がん細胞の成長を刺激するシグナルを遮断することによって、作用する。しかし、H e r c e p t i n (登録商標) には欠点もある。例えば、既知の副作用としては、心筋損傷およ

10

20

30

40

50

び心不全が挙げられる。また、Herceptin（登録商標）は、がんがHER2陽性である一部の患者においても十分に効果的ではなく、いくつかの耐性メカニズムが提唱されている（Pohlmann, Mayer and Mernaugh, 2009年）。

【0005】

別の対照的な治療のためのアプローチは、急速に分裂している細胞に対して活性である細胞傷害剤を使用することを伴う。例えば、卵巣がん、膀胱がん、精巣がん、および扁平上皮癌など様々ながんの治療のために使用されるシスプラチンが長く確立されている例である。細胞傷害剤のもう一つの群は、モノメチルアウリスタチンE（MMAE）などのアウリスタチンなどの超細胞傷害剤であり、これらは、極めて強力な剤であるが、同時に一部の患者に重篤な毒性および有害な副作用を引き起こす可能性がある。その結果として、このような超細胞傷害剤は、それ自体が化学療法剤として患者に安全に投与することができない。このような超細胞傷害剤を利用する手段を特定するための研究が行われ、これにより、ブレンツキシマブドチン（Adcetris（商標登録））などの抗体薬物複合体が開発されることとなり、この複合体は、直鎖状リンカーを介してブレンツキシマブ（CD30抗体）にコンジュゲートしたMMAEを含み、かつホジキンリンパ腫および未分化大細胞リンパ腫の治療法として承認されている。

10

【0006】

多くの薬物候補は、治療指数（すなわち、治療効果対毒性の比）が低いために臨床試験において奏功しない。このように奏功しない根底原因のいくつかとしては、効力の欠如、特異性の欠如、薬物の吸収／生体利用率の低さ、生体内分布の制御不能、急速な代謝およびクリアランス、ならびに保存時の不安定性などが挙げられる。実際に、がん細胞を死滅させるために必要な、治療上の細胞傷害性の達成を妨げることと、有害な毒性および副作用を患者によって忍容され得るレベルまで軽減することとのバランスをとる必要がある。

20

【0007】

最適ではない特性を有する化合物の治療効果を試行し、改善するために、様々なアプローチが調査されている。例えば、急速に消失する化合物については、徐放性製剤が開発され得る。化学療法の分野でのこうした一例は、有効成分であるイリノテカンのリポソーム製剤である製品Onivyde（登録商標）であり、従来の製剤と比較して、血漿からの排泄率を大幅に低下させる（Messererら、2004年）。他の技術としては、デポ注射製剤（例えば、Lupron Depot（登録商標））の使用が挙げられる。デンドリマー技術は、医薬活性剤の特性を改善し、製剤上の問題を回避する目的でも研究されており、例えば国際公開第2012／167309号には、特に難溶性の薬学的活性剤であるドセタキセルを含む薬物-デンドリマー複合体の提供について記載されている。

30

【0008】

技術のこれらの進歩および他の進歩にもかかわらず、がんなどの疾患の治療時に、安全かつ効果的な治療法のさらなる開発が必要とされている。

【0009】

本明細書に記載されている文書、行為、材料、デバイス、記事などの考察はいずれも、これらの事項のいずれかまたはすべてが先行技術基盤の一部を形成していること、または本開示に関連する分野の共通の一般的な知識であったことを認めるものではない。

40

【発明の概要】

【0010】

第1の態様では、デンドリマー-標的化剤複合体が提供され、本複合体は、

a)

i) コアユニット（C）、および

ii) 構成ユニット（BU）を含むデンドリマーであって、各構成ユニットが、リジン残基またはその類似体であり、

コアユニットが、アミド連結を介して、少なくとも2つの構成ユニットに共有結合により付着しており、各アミド連結が、コアユニット内に存在する窒素原子と構成ユニット内に存在するアシル基の炭素原子との間で形成される、デンドリマーと；

50

b) 最大約 80 kDa の分子量を有し、かつ抗原結合部位を含むペプチド部分であり、スパーサー基によってデンドリマーに共有結合により連結している H E R 2 標的化剤と；
 c) デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している治療剤と；
 d) デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している親水性ポリマー基を含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、ペプチド部分は、重鎖抗体、F a b、F v、s c F v、またはシングルドメイン抗体から選択される。いくつかの実施形態では、ペプチド部分は、重鎖可変 (V_H) ドメインを含むか、または重鎖可変 (V_H) ドメインからなる。いくつかの実施形態では、ペプチド部分は、軽鎖可変 (V_L) ドメインからなるか、または軽鎖可変 (V_L) ドメインから構成される。

10

【0012】

いくつかの実施形態では、標的化剤は、約 5 kDa ~ 約 30 kDa の分子量を有する。いくつかの実施形態では、標的化剤は、約 5 kDa ~ 約 18 kDa の分子量を有する。いくつかの実施形態では、標的化剤は、約 5 kDa ~ 約 15 kDa の分子量を有する。いくつかの実施形態では、標的化剤は、約 10 kDa ~ 約 16 kDa の分子量を有する。いくつかの実施形態では、標的化剤は、約 14 kDa ~ 約 18 kDa の分子量を有する。

【0013】

いくつかの実施形態では、標的化剤は 120 未満のアミノ酸残基から構成される。

【0014】

いくつかの実施形態では、標的化剤は、本明細書で定義されているアミノ酸配列のいずれかを含むか、またはアミノ酸配列のいずれかからなる。

20

【0015】

いくつかの実施形態では、1つの標的化剤がデンドリマーに共有結合により連結している。いくつかの実施形態では、2つ以上の標的化剤がデンドリマーに共有結合により連結している。

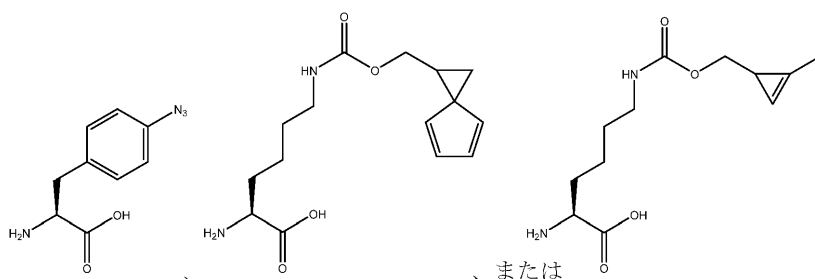
【0016】

いくつかの実施形態では、標的化剤前駆体は、非天然アミノ酸残基を含み、非天然アミノ酸残基は、反応性官能基を含む側鎖を有する。

【0017】

いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸残基は、
 【化1】

30



40

の残基である。

【0018】

いくつかの実施形態では、標的化剤は、標的化部分の C 末端を介して、スパーサー基に共有結合により連結される。

【0019】

いくつかの実施形態では、スパーサー基前駆体は、アルキン基である反応性官能基を含む。いくつかの実施形態では、アルキン基は、ジベンゾシクロオクチン基である。

【0020】

いくつかの実施形態では、スパーサー基は、デンドリマーの表面構成ユニットに共有結

50

合により付着している。いくつかの実施形態では、スペーサー基は、コアユニットに共有結合により付着している。

【0021】

いくつかの実施形態では、標的化剤とスペーサー基との間の共有結合による連結は、標的化剤前駆体上に存在する相補的反応性官能基とスペーサー基前駆体との反応によって形成される。いくつかの実施形態では、スペーサー基は、アルケン基からなる。

【0022】

いくつかの実施形態では、治療剤は、化学療法剤である。いくつかの実施形態では、治療剤は、細胞傷害剤である。いくつかの実施形態では、治療剤は、超細胞傷害剤である。いくつかの実施形態では、治療剤は、アウリスタチンまたはメイタンシノイドである。いくつかの実施形態では、治療剤は、モノメチルアウリスタチンEである。いくつかの実施形態では、治療剤は、モノメチルアウリスタチンFである。いくつかの実施形態では、治療剤は、SN-38である。いくつかの実施形態では、治療剤は、カバジタキセルである。

10

【0023】

いくつかの実施形態では、治療剤は、リンカーを介して、デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している。いくつかの実施形態では、治療剤は、切断可能なリンカーを介して、デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、Val-Cit-PAB基を含む。

20

【0024】

いくつかの実施形態では、複合体は、デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結した親水性ポリマー基を含む。いくつかの実施形態では、親水性ポリマー基は、PEG基であり、これはデンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している。いくつかの実施形態では、PEG基は、約500～約2500 g／モルの範囲の平均分子量を有する。

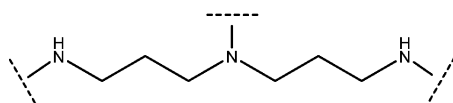
【0025】

いくつかの実施形態では、スペーサー基は、PEG基を含む。

【0026】

いくつかの実施形態では、コアユニットは、以下の構造：

【化2】



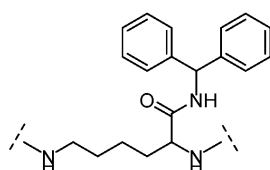
30

を含む。

【0027】

いくつかの実施形態では、コアユニットは、以下の構造：

【化3】



40

を含む。

【0028】

いくつかの実施形態では、コアユニットは、BHAl y sである。

【0029】

いくつかの実施形態では、デンドリマーは、1世代～5世代の構成ユニットを有する。

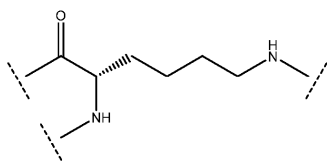
50

いくつかの実施形態では、デンドリマーは、3～5世代の構成ユニットを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマーは3世代の構成ユニットを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマーは4世代の構成ユニットを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマーは5世代の構成ユニットを有する。

【0030】

いくつかの実施形態では、構成ユニットはそれぞれ、

【化4】



10

を含む。

【0031】

いくつかの実施形態では、この複合体は、さらなる活性剤と組み合わせて投与するためのものである。

【0032】

いくつかの実施形態では、複合体は、HER2発現細胞内に内在化する。

【0033】

いくつかの実施形態では、複合体の投与により、同等用量の遊離治療剤を投与した場合と比較して、副作用の軽減がもたらされる。

20

【0034】

いくつかの実施形態では、複合体を投与することにより、同等用量の遊離治療剤を投与した場合と比較して、放出された治療剤の最大血漿濃度の少なくとも50%の減少となる。

【0035】

第2の態様では、本明細書で定義された複数の複合体を含む組成物が提供される。

【0036】

第3の態様では、

30

i) 本明細書に記載の複合体と；

ii) 薬剂的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物が提供される。

【0037】

いくつかの実施形態では、本組成物は、非経口送達用に製剤化されている。

【0038】

いくつかの実施形態では、複合体または組成物は、がんの治療に使用するためのものである。

【0039】

第4の態様では、それを必要とする対象に、治療的有效量の本明細書に記載の複合体または組成物を投与することを含む、がんを治療する方法が提供される。

40

【0040】

第5の態様では、がん治療用の医薬品の製造における、本明細書に記載の複合体または組成物の使用が提供される。

【0041】

いくつかの実施形態では、がんは、卵巣がん、乳がん、胃がん、子宮がん、またはERBB2遺伝子の異常発現を特徴とする別のがんである。

【0042】

第6の態様では、HER2発現細胞を死滅させる方法であって、本明細書で定義された複合体をHER2発現細胞と接触させて、これにより、複合体を細胞内に内在化させ、それによって、治療剤がHER2発現細胞を死滅させることを含む方

50

法が提供される。

【0043】

本明細書には、さらなる態様、実施形態、および例が記載されており、これらは、上述の実施形態または特徴のうちの1つ以上を含み得ることができることが理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】クーマシーブルーで染色した化合物74、75、76のSDSページ分析結果を示す図である。

【図2】化合物77および78のSDSページおよび蛍光イメージング分析を示す図である。

【図3】化合物41のSDSページおよび蛍光イメージング分析を示す図である（レーンA：粗混合物；レーンB：精製複合体）、42（レーンC：粗混合物；レーンD：精製複合体）、43（レーンE：粗混合物；レーンF：精製複合体）、44（レーンG：粗混合物；レーンH：精製複合体）および45（精製複合体）。

【図4】化合物36（対照）および化合物41（標的）とMDA-MB-231、MDA-MB-231/HER2およびSKOV-3細胞との24時間にわたる平均蛍光強度値を示す図である。測定ごとに少なくとも10,000個の細胞がカウントされた。値は、平均値±標準偏差（SD；n=3）である。

【図5-1】デンドリマーをHER2陽性細胞（MDA-MB-231/HER2）およびHER2陰性細胞（MDA-MB-231）に、3.33 nM、37℃で24時間インキュベートしたときのフローサイトメトリー解析結果を示す図である。1回の測定につき、少なくとも10,000個の細胞をカウントした。値は、平均値±標準偏差（SD；n=3）である。

【図5-2】（上記と同じ。）

【図6】a）化合物36（対照）またはb）化合物41（標的）を濃度3.33 nMで24時間処理したMDA-MB-231細胞の共焦点顕微鏡画像である。緑、青、赤の蛍光は、それぞれAF-488-WGAで染色した細胞膜、DAPIで染色した核、およびCy5で標識したデンドリマーを表す。スケールバー=50 μm。

【図7】a）化合物36（対照）またはb）化合物41（標的）を濃度3.33 nMで24時間処理したMDA-MB-231/HER2細胞の共焦点顕微鏡画像である。緑、青、赤の蛍光は、それぞれAF-488-WGAで染色した細胞膜、DAPIで染色した核、およびCy5で標識したデンドリマーを表す。スケールバー=50 μm。

【図8】a）化合物36（対照）またはb）化合物41（標的）を濃度3.33 nMで24時間処理したSKOV-3細胞の共焦点顕微鏡画像である。緑、青、赤の蛍光は、それぞれAF-488-WGAで染色した細胞膜、DAPIで染色した核、およびCy5で標識したデンドリマーを表す。スケールバー=50 μm。

【図9】3H標識した化合物40および化合物45のデンドリマーを48時間後に殺後の腫瘍および血液の分布データを示す図である。すべてのデータを組織量によって正規化した。すべてのデータは、平均±SEM（n=5）を表す；（NS=有意ではない；* = p値<0.05）。

【図10】48時間の時点で殺後の化合物36および41の代表的なex-vivo腫瘍分布を示す図である。データは、（a）非標的デンドリマー（化合物36）および（b）標的デンドリマー（化合物41）の典型的な視野を示している。

【図11】標的デンドリマー（化合物41）が腫瘍の中心領域および周辺領域に取り込まれ、対照化合物36は取り込まれなかったことを示す画像を示す図である。

【図12】SKOV3細胞を接種したマウスに、ビヒクル、対照化合物36、標的複合体41、Kadcyla（登録商標）またはHerceptin（登録商標）による治療後の経時的な平均腫瘍体積のプロットを示す図である。

【図13】SKOV3細胞を接種したマウスに、ビヒクル、対照化合物36、標的複合体

10

20

30

40

50

41、Kadcyla（登録商標）またはHerceptin（登録商標）による治療後の経時的な生存率を示す図である。

【図14】SKOV3細胞を接種したマウスに、ビヒクル、対照化合物36、標的複合体41、Kadcyla（登録商標）またはHerceptin（登録商標）を投与後の、経時的な平均体重変化率を示す図である。

【図15】第4世代のデンドリマーと、単一（化合物90、MFI 単一）または複数（化合物91、MFI 複数）コンジュゲート抗HER2ナノボディの内在化速度を示す図である。

【図16】化合物91（複数の2D3-デンドリマー複合体）を37℃で、a）1時間、b）3時間、c）6時間、またはd）24時間インキュベートした後のSKOV-3細胞を示す共焦点顕微鏡画像である。化合物91は、Cy5（マゼンタ）で、細胞膜はAF488-WGA（緑色）で、核はHoechst 33342（青色）でそれぞれ染色されている。スケールバー＝30 μm

【図17】化合物90（単一の2D3-デンドリマー複合体）を37℃で、a）1時間、b）3時間、c）6時間、またはd）24時間インキュベートした後のSKOV-3細胞を示す共焦点顕微鏡画像である。化合物91は、Cy5（マゼンタ）で、細胞膜はAF488-WGA（緑色）で、核はHoechst 33342（青色）でそれぞれ染色されている。スケールバー＝30 μm

【図18】 ^{89}Zr がデンドリマーに結合していることを示す、本開示の化合物の放射性TLC画像である。

【図19-1】化合物89、90、92の9日間にわたる（a）腎臓、（b）肝臓、（c）腫瘍における1gあたりのジルコニウム注入量の割合を示すグラフである。

【図19-2】（上記と同じ。）

【図20】4時間後から9日後までの動物の放射性同位元素複合体のPET画像の代表的な最大強度投影図を示す図である。データは、ベクレル／ボクセル（cm³）で表され、腫瘍の取り込みを強調するために閾値が設定されている。

【図21】2日目および9日目の本開示の化合物について、注入したジルコニウム（用量／グラム）のex vivoシグナルの腫瘍：器官比を示す表である。

【図22】2日目および9日目の本開示の化合物について、ex vivoの腫瘍および器官における注入したジルコニウム（用量／グラム）の割合を示す表である。

【図23】化合物70（対照）および化合物78（標的）とMDA-MB-231／HER2細胞との24時間にわたるフローサイトメトリー分析および平均蛍光強度値を示す図である。

【図24】化合物70（対照）および化合物78（標的）とMDA-MB-231細胞との24時間にわたるフローサイトメトリー分析および平均蛍光強度値を示す図である。

【図25】化合物70（対照）および化合物78（標的）とSKOV-3細胞との24時間にわたるフローサイトメトリー分析および平均蛍光強度値を示す図である。配列表を示す記号配列番号1：2D3ナノボディ。配列番号2：N末端タグ、TEV、C末端アジドを有する2D3ナノボディ。配列番号3：C末端タグ、TEV、アジドを有する2D3ナノボディ。

【発明を実施するための形態】

【0045】

一般的な定義

特に他のように定義されていない限り、本明細書で使用されているすべての技術的および科学的用語は、当業者（例えば、化学、生化学、医薬化学、高分子化学など）が一般的に理解しているものと同じ意味を有するものとする。

【0046】

本明細書中、「含む（comprise）」という単語、または「含む（comprises）」もしくは「含んでいる（comprising）」などの変形は、記載された要素、整数もしくはステップ、または要素群、整数もしくはステップを包含することを意

10

20

30

40

50

味し、任意の他の要素、整数もしくはステップ、または要素群、整数もしくはステップを除外することを意味するものではないと理解される。本明細書で使用されるとき、「および／または」という用語、例えば「Xおよび／またはY」は、「XおよびY」または「XまたはY」のいずれかを意味するものと理解され、両方の意味またはいずれかの意味を明示的にサポートを提供するものとみなされる。

【0047】

本明細書で使用されるとき、反対の記載がない限り、「約」という用語は、指定された値の±10%、より好ましくは±5%を指す。

【0048】

本明細書で使用されるとき、「a」、「an」、および「the」という用語は、文脈上明らかに他を示す場合を除き、単数および複数の面を含む。

【0049】

本明細書では、「対象」という用語は、HER2（ヒト上皮成長因子受容体2）に関連する疾患または状態に罹患しやすいあらゆる生物を指す。一実施形態では、対象は、動物であり得る。一例では、対象は、哺乳動物である。一実施形態では、対象は、ヒトである。一実施形態では、対象は、非ヒト動物である。一実施形態では、対象は、がんを有する。一実施形態では、対象は、HER2陽性がんを有する。

【0050】

本明細書では、「治療する（treating）」という用語は、特定の障害または状態に関連する症状を緩和することを含む。例えば、本明細書で使用するとき、「がんを治療する」という用語は、がんに関連する症状を緩和することを含む。一実施形態では、「がんを治療する」という用語は、癌性腫瘍のサイズを縮小させることを指す。一実施形態では、「がんを治療する」という用語は、がんの侵襲性を低下させることを指す。一実施形態では、「がんを治療する」という用語は、無増悪生存期間を延長することを指す。本明細書では、「無増悪生存期間」という用語は、がんの治療中および治療後に、患者が疾患、すなわちがんを有するが、疾患の再発または疾患の症状の増加を有せずに生存している期間の長さを指す。

【0051】

本明細書では、「予防」という用語は、特定の障害または状態を予防することを含む。例えば、本明細書では、「がんを予防する」という用語は、がんに関連する症状の発症または持続を防ぐことを指す。一実施形態では、「がんを予防する」という用語は、がんの進行を減速させるまたは停止させることを指す。一実施形態では、「がんを予防する」という用語は、転移を減速させるまたは予防することを指す。

【0052】

本明細書で使用するとき、「治療有効量」とは、治療剤を含む複合体を指し、これらは、治療される障害または状態の症状のうちの1つ以上を緩和するかまたはある程度予防するのに十分な量で投与される。その結果は、疾患または状態の兆候、症状もしくは原因の軽減および／もしくは緩和、または生物学的システムの任意の他の望ましい変化であり得る。一実施形態では、「治療的有效量」という用語は、癌性腫瘍のサイズの減少をもたらすのに十分な量で、複合体が投与されることを指す。一実施形態では、「治療的有效量」という用語は、無増悪生存期間の延長をもたらすのに十分な量で、複合体が投与されることを指す。本明細書で使用するとき、「有効量」とは、過度の副作用を伴わずに所望の薬理効果もしくは治療的改善を達成するために、または副作用プロファイルを減少させて、所望の薬理効果もしくは治療的改善を達成するために有効な複合体の量を指す。治療的有效量は、例えば、これに限定されないが、用量漸増臨床試験などの日常的な実験によって決定され得る。「治療的有效量」とは、例えば、予防的有效量を含む。一実施形態では、予防的有效量とは、転移の予防に十分な量である。「有効量」または「治療的有效量」は、化合物の代謝の変動、年齢、体重、対象の全身状態、治療される状態、治療される状態の重症度、および処方医師の判断のいずれかにより、対象によって変動し得ることは理解されている。あらゆる個体の場合における適切な「有効量」は、日常的な実験を用いて当

10

20

30

40

50

業者によって決定され得る。

【0053】

本明細書で使用されるとき、「付着させる (a t t a c h e d)」という用語は、共有結合による化学成分間の接続を指す。「共有結合」という用語は、「共有による付着」という用語と互換的に使用される。

【0054】

デンドリマー

第1の態様では、デンドリマー-標的化剤複合体が提供され、本複合体は、

a)

i) コアユニット (C)、および

ii) 構成ユニット (BU) を含むデンドリマーであって、各構成ユニットが、リジン残基またはその類似体であり、

コアユニットが、アミド連結を介して、少なくとも2つの構成ユニットに共有結合により付着しており、各アミド連結が、コアユニット内に存在する窒素原子と構成ユニット内に存在するアシル基の炭素原子との間で形成される、デンドリマーと；

b) 最大約80 kDaの分子量を有し、かつ抗原結合部位を含むペプチド部分であり、スパーサー基によってデンドリマーに共有結合により連結しているHER2標的化剤と；

c) デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している治療剤と；

d) デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している親水性ポリマー基を含む。

【0055】

デンドリマー複合体は、in vitroおよびin vivo試験で非常に有効な抗がん剤であることが実証されており、実験的試験では、Herceptin (登録商標) およびKadcycla (登録商標) (HER2-エムタンシン抗体-薬物複合体) に対して、効果が改善されることが実証されている。Herceptin (登録商標) 自体とは対照的に、この複合体は、HER2過剰発現がん細胞に迅速に内在化される。高速な内包化特性は、複合体を介して投与された治療剤が高い割合で所望の作用部位に送達される補助となることが期待される。治療部分を標的細胞に特異的に送達する能力は、迅速に内在化することにより、他の非がん性細胞の細胞傷害剤への曝露に関連する不要な副作用 (すなわち、毒性) を減少させる補助となる。このようなアプローチは、細胞傷害性治療部分 (例えば、超細胞傷害性治療部分) を送達する場合に特に有利であり、これらが血漿中で自由に循環することが、毒性の影響を有し得る。

【0056】

本明細書では、「デンドリマー」という用語は、コアおよびそのコアに付着したデンドロンを含む分子を指す。各デンドロンは、分岐した構成ユニットの世代から構成されており、構成ユニットの世代ごとに分岐数が増加する分岐構造になっている。「複合体」には、本明細書で定義されている薬学的に許容される塩または溶媒和物が含まれてもよい。

【0057】

本明細書で使用されるとき、「構成ユニット」という用語は、3つの官能基を有するリジン残基またはその類似体である分岐分子を指す。1つの官能基 (例えば、カルボン酸基に由来する) は、コアまたは前世代の構成ユニットに付着するためであり、少なくとも2つの官能基 (例えば、アミンに由来する) は、次世代の構成ユニットに付着するかまたはデンドリマー分子の表面を形成するためのものである。

【0058】

当業者であれば、複合体は、例えば、塩形態 (例えば、複合体中に存在するイオン化可能な基が存在する場合)、および異なる溶媒和物など、様々な形態で産生され得ることを理解するであろう。本開示は、デンドリマー-標的部分複合体のこのような形態のすべてにすることが理解されよう。

【0059】

複合体の好適な塩としては、有機または無機の酸または塩基と形成されるものが挙げら

10

20

30

40

50

れる。本明細書では、「薬学的に許容される塩」という表現は、薬学的に許容される有機または無機の塩を指す。例示的な酸付加塩としては、これらに限定されないが、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、ピタルト酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチシン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、サッカリン酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、パモ酸塩（すなわち、1, 1'-メチレン-ビス-(2-ヒドロキシ-3-ナフトエート)）の塩が挙げられる。例示的な塩基付加塩としては、これらに限定されないが、アンモニウム塩、アルカリ金属塩、例えば、カリウムおよびナトリウムの塩、アルカリ土類金属塩、例えば、カルシウムおよびマグネシウムの塩、有機塩基との塩、例えば、ジシクロヘキシルアミン、N-メチル-D-グルコミン、モルホリン、チオモルホリン、ピペリジン、ピロリジン、モノ、ジ、トリの低級アルキルアミン、例えばエチル、tert-ブチル、ジエチル、ジイソプロピル、トリエチル、トリブチル、またはジメチル-プロピルアミン、またはモノ、ジ、トリ-ヒドロキシ低級アルキルアミン、例えばモノ、ジ、トリエタノールアミンなどが挙げられる。薬学的に許容される塩には、酢酸イオン、コハク酸イオン、または別の対イオンなど、別の分子が含まれていてもよい。対イオンは、親化合物の電荷を安定化させる任意の有機または無機の部分であり得る。さらに、薬学的に許容される塩は、その構造中に2つ以上の荷電原子を有してもよい。複数の荷電原子が薬学的に許容される塩の一部である場合、複数の対イオンを有することができる。したがって、薬学的に許容される塩は、1つ以上の荷電原子および／または1つ以上の対イオンを有することができる。また、非薬学的に許容される塩も、薬学的に許容される塩を調製する際の間体として有用であり得るか、または保存もしくは輸送する間に有用であり得るため、本開示の範囲内であることが理解されるであろう。

10

20

30

40

50

【0060】

多くの有機化合物は、それらを反応させる、または沈殿させる、または結晶化させる溶媒と複合体を形成できることを、有機化学および医薬化学の当業者であれば、理解するであろう。このような複合体は、「溶媒和物」として公知である。例えば、水との複合体は、「水和物」として公知である。本明細書では、「薬学的に許容される溶媒和物」または「溶媒和物」という語句は、1つ以上の溶媒分子と本開示の化合物との会合を指す。薬学的に許容される溶媒和物を形成する溶媒の例としては、これらに限定されないが、水、イソプロパノール、エタノール、メタノール、DMSO、酢酸エチル、酢酸、およびエタノールアミンなどが挙げられる。

【0061】

コアユニット

デンドリマーのコアユニット(C)は、アミド連結を介して構成ユニットに共有結合により付着しており、各アミド連結は、コアユニット中に存在する窒素原子と構成ユニット中に存在するアシル基の炭素原子との間で形成される。したがって、コアユニットは、例えば、アミノ基を含むコアユニット前駆体から形成されてもよい。任意の好適なアミノ含有分子は、コアユニット前駆体として使用されてもよい。

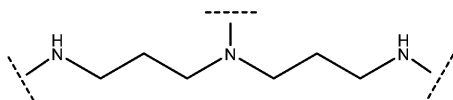
【0062】

典型的には、コアユニットは、構成ユニットの共有結合による付着に使用される窒素原子に追加の機能性を提供し、例えば、スペーサー基を介して標的化部分を付着させるために、官能基を含んでもよい。換言すれば、HER2標的化剤は、典型的には、スペーサー基によってデンドリマーのコアユニットに共有結合により連結される。いくつかの実施形態では、コアユニットは、3つの反応性窒素原子を有する前駆体から誘導可能であり、そのうちの2つは構成ユニットを付着させるために使用され得、そのうちの1つはスペーサー基を付着させるために使用され得る。

【0063】

いくつかの実施形態では、コアユニットは、以下の構造：

【化 5】



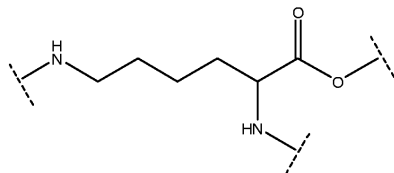
を有する。

【0064】

いくつかの実施形態では、コアユニットは、3つの付着点を有するリジン分子であり、構造：

10

【化 6】



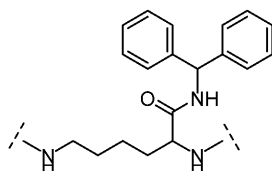
を有する。

【0065】

いくつかの実施形態では、コアユニットは、2つの反応性窒素原子を有する前駆体から誘導可能であり、これは、構成ユニットを付着させるために使用され得る。例えば、いくつかの実施形態では、コアユニットは、エチレンジアミン、1,4-ジアミノブタン、または1,6-ジアミノヘキサンから誘導可能であってもよい。いくつかの実施形態では、コアユニットは、以下の構造：

20

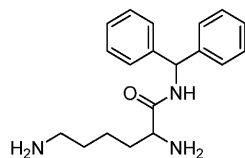
【化 7】



30

を有し、すなわち、これによって、コアユニットは、酸部分がベンズヒドリルアミンでキャップされて、対応するアミドを形成するリジン残基（BHA-Lys）を含み、例えば、2つの反応性（アミノ）ニトロゲンを有するコアユニット前駆体：

【化 8】



40

から形成され得る。

【0066】

BHA-Lysなどの2つの反応性窒素原子のみを有するコアユニット前駆体を使用する場合、2つのアミノ基は典型的には、構成ユニットで官能化され、スパーサー基（したがって標的化剤）は典型的には、表面構成ユニットを介して付着される。本発明のデンドリマー-標的化剤複合体では、複数の末端基を、制御された方法で、デンドリマー-標的化剤複合体の表面に提示できるようになる。特に、リジン構成ユニットが使用される場合、構成ユニットのアルファまたはイプシロン窒素原子上の標的化剤および／または親水性ポリマー基および／または治療剤の配置は、以下に記載されるとおりに予め決定され得る

50

10

構成ユニット

20

C(=O)NCCCNC(=O)、*C(=O)NCCCNC(=O)NCCCNC(=O)*、*C(=O)NCCCNC(=O)NCCCNC(=O)NCCCNC(=O)*、
C(=O)N1CCCNC1C(=O)、*C(=O)CC2NCCNC2C(=O)C(=O)*、および

30

いくつかの好ましい実施形態では、構成ユニットは、それぞれ

NC(=O)C(CCCCNC)C(=O)N

40

いくつかの好ましい実施形態では、構成ユニットは、それぞれ

C(=O)[C@H](CCCCN)N

50

結合による付着点を提供し、各窒素原子が、後世代の構成ユニット、または連結された治療剤などの末端基に共有結合により付着するための共有結合による付着点を提供する。

【0070】

最も外側の世代の構成ユニット（BU_{outer}）は、上述のとおり、リジンまたは他の世代の構成ユニット（BU）で使用されるもののリジン類似体構成ユニットによって形成されてもよい。最も外側の世代の構成ユニット（BU_{outer}）は、デンドリマーのコアユニットから最も外側にある世代の構成ユニットであり、すなわち、最も外側の世代の構成ユニット（BU_{outer}）には、それ以降の世代の構成ユニットは付着しない。

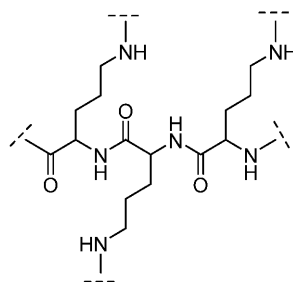
【0071】

デンドリマーのデンドロンは、例えば、構成ユニット（BU）を適宜付着させることにより、必要な世代数に合成され得ることが理解されるであろう。いくつかの実施形態では、各世代の構成ユニット（BU）が同じ構成ユニットで形成されてもよく、例えば、構成ユニットのすべての世代が、リジン構成ユニットであってもよい。他のいくつかの実施形態では、1つ以上の世代の構成ユニットは、他の世代の構成ユニットに対して、異なる構成ユニットで形成されてもよい。

【0072】

デンドリマー部分は、典型的には、1～5世代の構成ユニットを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマーは、1世代の構成ユニットデンドリマーである。いくつかの実施形態では、デンドリマーは、2世代の構成ユニットデンドリマーである。いくつかの実施形態では、デンドリマーは、3世代の構成ユニットデンドリマーである。いくつかの実施形態では、デンドリマーは、4世代の構成ユニットデンドリマーである。いくつかの実施形態では、デンドリマーは、5世代の構成ユニットデンドリマーである。例えば、3世代構成ユニットデンドリマーは、例えば構成ユニットがリジンである場合には、互いに共有結合により連結された3つの構成ユニットを含む構造を有するデンドリマーであり、これには、構造：

【化12】



を含んでもよい。

【0073】

いくつかの実施形態では、デンドリマーは、完全な世代の構成ユニットを有する。例えば、3世代デンドリマーは、3つの完全な世代の構成ユニットを有する。2つの反応性アミン基を有するコアの場合、このような3世代デンドリマーは、14の構成ユニット（すなわち、コアユニット+2BU+4BU+8BU）を含むであろう。しかし、デンドリマーを生成するための合成過程の性質上、デンドリマーを生成するために行われた1つ以上の反応が、完全には完了しない可能性があることは理解できるだろう。したがって、いくつかの実施形態では、デンドリマーは、不完全な世代の構成ユニットを含んでもよい。例えば、デンドリマーが、デンドリマーあたりの構成ユニットの数の分布を有する、デンドリマーの集団を得ることができる。いくつかの実施形態では、デンドリマーあたり、少なくとも8、または少なくとも9、または少なくとも10、または少なくとも11、または少なくとも12、または少なくとも13の平均構成ユニット数を有するデンドリマーの集団が得られる。いくつかの実施形態では、デンドリマーのうち、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%が、10

以上の構成ユニットを有するデンドリマーの集団が得られる。いくつかの実施形態では、デンドリマーのうち、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%が、12以上の構成ユニットを有するデンドリマーの集団が得られる。

【0074】

いくつかの実施形態では、各デンドロン(X)における構成ユニットの各世代は、式 $[BU]_2^{(b-1)}$ で表されてもよく、式中、bは、世代数である。3世代の完全な構成ユニットを有するデンドロン(X)は、 $[BU]_1 - [BU]_2 - [BU]_4$ と表される。

【0075】

標的化剤

本明細書に記載のデンドリマー-標的化剤複合体は、HER2標的化剤を含み、すなわち、標的化剤は、ヒト上皮成長因子受容体2(HER2、ERBB2としても公知である; Gene ID No. 2064, NCBI)と結合することができる本明細書に記載のHER2標的化剤は、開示されているデンドリマー複合体を腫瘍およびがん細胞に標的化するために有用である。

【0076】

標的化剤は、最大約80kDaの分子量を有するペプチド部分を含み、分子(すなわちHER2)と特異的に結合する、または標的分子(すなわちHER2)に対して親和性を有する抗原結合部位を含む。この相互作用は、例えば、共有結合、イオン結合、水素結合、ファンデルワールス力など、あらゆる種類の結合または会合によって生じ得る。

【0077】

一実施形態では、本明細書に記載のHER2標的化剤は、約3kDa~約80kDa、または約3kDa~約60kDa、または約3kDa~約50kDa、または約3kDa~約40kDa、または約3kDa~約30kDa、または約3kDa~約20kDa、または約3kDa~約15kDa、または約3kDa~約13kDa、または約5kDa~約15kDa、または約5kDa~約12kDa、または約5kDa~約10kDaの分子量を有する。

【0078】

一実施形態では、HER2標的化剤は、約3kDa~約80kDaの分子量を有する。一実施形態では、HER2標的化剤は、約3kDa~約60kDaの分子量を有する。一実施形態では、HER2標的化剤は、約3kDa~約50kDaの分子量を有する。一実施形態では、HER2標的化剤は、約3kDa~約40kDaの分子量を有する。一実施形態では、HER2標的化剤は、約3kDa~約30kDaの分子量を有する。一実施形態では、HER2標的化剤は、約3kDa~約20kDaの分子量を有する。一実施形態では、HER2標的化剤は、約3kDa~約15kDaの分子量を有する。一実施形態では、HER2標的化剤は、約3kDa~約13kDaの分子量を有する。一実施形態では、HER2標的化剤は、約5kDa~約15kDaの分子量を有する。一実施形態では、HER2標的化剤は、約5kDa~約12kDaの分子量を有する。一実施形態では、HER2標的化剤は、約5kDa~約10kDaの分子量を有する。

【0079】

本明細書では、「kDa」または「キロダルトン」とは、1000ダルトンからなる分子量の単位を指す。

【0080】

いくつかの実施形態では、標的化剤は、抗体断片である。本明細書で使用されるとき、「抗体断片」という用語は、抗原に特異的に結合することができる抗体の一部または断片を意味するものとし、例えば、本明細書で定義されているFv、VH、VLまたは可変領域が含まれる。この用語は、抗体から直接由来する断片、ならびに組換え手段を用いて産生されたタンパク質を包含するものと理解されよう。一実施形態では、抗体断片は、Fab、Fv、scFv、重鎖抗体、ドメイン抗体、重鎖抗体、ダイアボディまたはトリアポ

10

20

30

40

50

ディから選択される。

【0081】

本明細書で使用されるとき、「Fv」という用語は、複数のポリペプチドで構成されているか、単一のポリペプチド（scFv）であるかにかかわらず、V_LとV_Hが会合して、抗原結合ドメインを有する錯体を形成する、すなわち抗原に特異的に結合することができる任意のタンパク質を意味するものとする。抗原結合ドメインを形成するV_HおよびV_Lは、単一のポリペプチド鎖であっても、異なるポリペプチド鎖であってもよい。一実施形態では、本開示のFv（本開示の任意のタンパク質も同様）は、同じ抗原を結合してもしなくてもよい複数の抗原結合部位を有し得る。この用語は、抗体から直接由来する断片、ならびに組換え手段を用いて産生されたタンパク質を包含するものと理解されよう。いくつかの例では、V_Hは、重鎖定数ドメインC_{H1}に連結されておらず、および／またはV_Lは、軽鎖定数ドメイン（C_L）、例えば、ドメイン抗体に連結されていない。例示的なFv含有ポリペプチドまたはタンパク質には、Fab断片、Fab'断片、F(ab')断片、scFv、ダイアボディ、トリアボディなどがある。Fab断片は、免疫グロブリンの一価の抗原結合断片からなり、全抗体を酵素パパイニンで消化して、インタクトの軽鎖と重鎖の一部からなる断片を生成するか、または組換え手段を使用して、産生され得る。Fab断片は、一般的に、V_HおよびC_{H1}およびV_LおよびC_Lを含むか、これらから構成される。抗体の「Fab'断片は、全抗体をペプシンで処理した後、還元することで、インタクトの軽鎖と、V_Hおよび単一の定常ドメインを含む重鎖の一部からなる分子を生成することによって得ることができる。このようにして処理された抗体では、2つのFab'断片が得られる。Fab'断片は、組換え手段によっても産生することができる。「一本鎖Fv」または「scFv」は、軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域とが好適で柔軟なポリペプチドリンカーによって共有結合により連結されている抗体の可変領域断片（Fv）を含む組換え分子である。

10

20

【0082】

いくつかの実施形態では、抗体断片は、重鎖抗体、Fab、Fv、scFv、またはシングルドメイン抗体から選択される。

【0083】

本明細書で使用されるとき、「ドメイン抗体（dAb）」または「ナノボディ」とも呼ばれる「シングルドメイン抗体（sdAb）」は、単一の可変領域の重鎖V_Hまたは軽鎖V_Lからなる。一実施形態では、可変領域は、ラクダ科由来である。一実施形態では、可変領域は、サメ由来する。一実施形態では、V_Hは、ラクダ科由来のV_Hである。

30

【0084】

いくつかの実施形態では、標的化剤は、シングルドメイン抗体である。いくつかの実施形態では、標的化剤は、V_Hシングルドメイン抗体である。いくつかの実施形態では、標的化剤は、V_Lシングルドメイン抗体である。

【0085】

一実施形態では、シングルドメイン抗体は、例えば、欧州公開第2215125（A1）号、米国特許第20110028695号、Hussackら、（2018年）、またはArezumandra（2017年）に記載のシングルドメインのアミノ酸配列を含む。一実施形態では、シングルドメイン抗体は、米国特許第20110028695号に記載のシングルドメインのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、Vaneyskenらに記載のナノボディである（Vaneyskenら（2011年））。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、2Rs15dである（Vaneyskenら、（2011））。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、2Rb17cである（Vaneyskenら（2011年））。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、1R59bである（Vaneyskenら（2011年））。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、2R5aである（Vaneyskenら（2011年））。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、1R136dである（Vaneyskenら（2011年））。いくつかの実施形態では

40

50

、シングルドメイン抗体は、1 R 1 4 3 cである（V a n e y c k e nら（2011年））。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、C 3である（W uら（2018年））。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、5 F 7 G G Cである（P r u s z y n s k iら、（2013年））。一実施形態では、シングルドメイン抗体は、米国特許第20110028695号に示されているものと少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む5 F 7である。

【0086】

一実施形態では、シングルドメイン抗体は、実施例7に開示のシングルドメインのアミノ酸配列を含む。一実施形態では、シングルドメイン抗体は、米国特許第20110028695号の配列番号1986に示すアミノ酸配列を含む2 D 3である。

【0087】

一実施形態では、シングルドメイン抗体は、アミノ酸配列 E V Q L V E S G G S L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F D D Y A M S W V R Q V P G K G L E W V S S I N W S G T H T D Y A D S V K G R F T I S R N N A N N T L Y L Q M N S L K S E D T A V Y Y C A K N W R D A G T T W F E K S G S A G Q G T Q V T V S Sを含む。

【0088】

いくつかの実施形態では、標的化剤は、トラスツズマブおよび／またはペルツズマブとのH E R 2結合に競合しない。いくつかの実施形態では、標的化剤は、トラスツズマブおよび／またはペルツズマブとH E R 2の結合について競合する。一実施形態では、標的化剤は、2 D 3であり、標的化剤は、トラスツズマブおよび／またはペルツズマブとH E R 2の結合について競合する。いくつかの実施形態では、標的化剤は、H E R 2の細胞外ドメインに結合する。いくつかの実施形態では、標的化剤は、H E R 2の細胞外ドメインI、II、III、および／またはIVに結合する。一実施形態では、標的化剤は、H E R 2の細胞外ドメインIIIに結合する。いくつかの実施形態では、標的化剤は、E r b B 2の二量体化アームに結合する。標的化剤がE r b B 2の二量体化アームに結合する例では、標的化剤は、ペルツズマブとのH E R 2結合について競合し得る。いくつかの実施形態では、標的化剤は、S P R試験によって決定されたとおり、少なくとも1 n M、少なくとも2 n M、少なくとも5 n M、少なくとも10 n Mの結合親和性でH E R 2に結合する。

【0089】

いくつかの実施形態では、H E R 2標的化剤は、シングルドメイン抗体であり、約4 k D a～約80 k D a、または約5 k D a～約80 k D a、または約5 k D a～約60 k D a、または約5 k D a～約50 k D a、または約5 k D a～約40 k D a、または約5 k D a～約30 k D a、または約5 k D a～約20 k D a、または約5 k D a～約15 k D a、または約5 k D a～約12 k D a、または約10 k D a～約16 k D aの分子量を有する。

【0090】

いくつかの実施形態では、H E R 2標的化剤は、約500未満、約400未満、約300未満、約200未満、約150未満、約140未満、約130未満、約120未満、約110未満、約100未満のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、H E R 2標的化剤は、約50以上、約75以上、約100以上、または約120以上のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、H E R 2標的化剤は、120未満のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、H E R 2標的化剤は、約100～約120のアミノ酸残基を含む。

【0091】

いくつかの実施形態では、H E R 2標的化剤は、抗体または抗体断片のミメティックである。本明細書では、「ミメティック (m i m e t i c)」または「ミメティクス (m i m e t i c s)」という用語は、抗体または抗体断片のように、抗原を結合することができるが、抗体とは構造的に関連しない化合物を指す。この用語は、本明細書に記載の抗体

または抗体断片を包含しないと理解されるものとする。この用語は、合成（*in vitro*で産生された）ミメティクス、および組換え手段を用いて産生されたミメティクスを包含すると理解される。この用語は、タンパク質ミメティクスを包含するものと理解される。

【0092】

一実施形態では、ミメティックは、アフィボディ、アプタマー、アフィリン、アフィマー、アフィチン、アンチカリン、アビマー、アルファボディ、モノボディ、DARPin、Fyomer、フィブロネクチンIII型由来タンパク質スカフォールド、フィトシスタチン由来タンパク質スカフォールド、およびパラトープミメティックペプチドから選択される。抗体と同様に、ミメティックも標的化部分として使用され得る。

10

【0093】

一実施形態では、ミメティックは、以下のタンパク質スカフォールド：プロテインAのZドメイン、 γ -Bクリスタリン、ユビキチン、シスタチン、sac7d、三重らせん、コイルドコイル、リポカリン、シクロチド、膜受容体のAドメイン、アンキリンリピートモチーフ、Fymのsh3ドメイン、プロテアーゼ阻害剤のKunitzドミアン、フィブロネクチンのIII型ドメイン、ウェルシュ菌のIgG様、耐熱性炭水化物結合モジュールファミリー32（CBM32）のうちの1つに由来する。

【0094】

一実施形態では、ミメティックは、約3 kDa～約20 kDa、または約4 kDa～約18 kDa、または約6 kDa～約16 kDa、または約6 kDa～約14 kDa、または約6 kDa～約12 kDa、または約6 kDa～約10 kDa、または約6 kDa～約8 kDaである。一実施形態では、ミメティックは約3 kDa～約20 kDaである。一実施形態では、ミメティックは約3 kDa～約20 kDaである。一実施形態では、ミメティックは、約4 kDa～約18 kDaである。一実施形態では、ミメティックは、約6 kDa～約16 kDaである。一実施形態では、ミメティックは、約6 kDa～約14 kDaである。一実施形態では、ミメティックは、約6 kDa～約12 kDaである。一実施形態では、ミメティックは、約6 kDa～約10 kDaである。一実施形態では、ミメティックは、約6 kDa～約8 kDaである。

20

【0095】

いくつかの実施形態では、標的化剤は、アフィボディである。本明細書では、「アフィボディ」という用語は、「Zドメイン」として知られる長さ約58アミノ酸の3つの α ヘリックス束のドメインをベースにした、非常に小さい（約6 kDa）ポリペプチド抗体ミメティックのクラスの一つを指す。典型的には、アフィボディのスカフォールドは、プロテインAのBドメインの改変型をベースにしている。アフィボディは、非常に高い安定性（90℃の高温に耐性があり、ナノモルからピコモルの範囲の標的親和性を有する）を特徴としている。例えば、Nordら、（1995年）、Protein Eng. , 8: 601-608を参照のこと。既知のアフィボディの例としては、例えば、HER2に対するアフィボディ（例えば、抗体-HER2抗体（登録商標）、AFFIBODY AB, Bromma, Sweden；米国特許第7,993,650号）が挙げられる。

30

【0096】

いくつかの実施形態では、標的化剤は、アフィボディであり、約3 kDa～約10 kDa、または約3 kDa～約8 kDa、または約4 kDa～約8 kDa、または約4 kDa～約7 kDa、または約5 kDa～約7 kDa、または約6 kDaの範囲の分子量を有する。

40

【0097】

いくつかの実施形態では、標的化剤は、アフィボディであり、80未満のアミノ酸残基、または70未満のアミノ酸残基、または65未満のアミノ酸残基、または60未満のアミノ酸残基を有する。いくつかの実施形態では、標的化剤は、40～80のアミノ酸残基、または50～70のアミノ酸残基、または55～65のアミノ酸残基、または56～60のアミノ酸残基、または約58のアミノ酸残基で構成される。

50

【0098】

本開示の目的において、用語「抗体」は、Fvにより1つまたは少数の密接に関連する抗原に特異的に結合することができる組換え抗体または改変抗体（例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体、脱免疫抗体、およびハーフ抗体、二重特異性抗体）など、例えば2つの軽鎖および2つの重鎖を含む4つの鎖状タンパク質を含む。抗体は、一般に、定常ドメインを含み、これは、定常領域および定常断片、結晶化可能断片（Fc）に配置させ得る。例示的な形態の抗体は、四鎖構造を基本単位として含む。完全長抗体は、共有結合により連結した2つの重鎖（約50～70kDa）および2つの軽鎖（それぞれ約23kDa）を含む。軽鎖は、一般に、可変領域および定数ドメインを含み、哺乳動物では、κ軽鎖またはλ軽鎖のいずれかである。重鎖は、一般に、ヒンジ領域によって追加の定常ドメイン（複数可）に連結されている可変領域および1つまたは2つの定常ドメインを含む。哺乳動物の重鎖は、α型、δ型、ε型、γ型、μ型のうちのいずれか1つである。また、それぞれの軽鎖は、重鎖のうちの1つと共有結合により連結している。例えば、2つの重鎖、および重鎖と軽鎖は、鎖間ジスルフィド結合および非共有結合による相互作用によって一緒に保持される。鎖間ジスルフィド結合の数は、抗体の種類によって異なり得る。各鎖は、N-末端可変領域（VHまたはVL、それぞれ約110のアミノ酸長）、C-末端に1つ以上の定常ドメインを有する。軽鎖の定数ドメイン（CL：長さ約110アミノ酸）は、重鎖の第1定常ドメイン（CH：長さ約330～440アミノ酸）と整列し、ジスルフィド結合している。軽鎖の可変領域は、重鎖の可変領域と整列している。抗体重鎖は、2つ以上の追加のCHドメイン（例えば、CH2、CH3など）を含むことができ、CH1定常ドメインとCH2定常ドメインとの間のヒンジ領域を含むことができる。抗体は、任意の型（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）、またはサブクラスであり得る。一例では、抗体は、ヒト抗体、その脱免疫型、生殖細胞型、またはその親和性成熟型である。

10

20

【0099】

用語「完全長抗体」または「全抗体」は、抗体の抗原結合断片とは対照的に、その実質的にインタクトな形態の抗体を指すために同義的に使用される。具体的には、全抗体としては、定常領域などの重鎖および軽鎖を有する抗体が挙げられる。定常領域は、野生型配列定常領域（例えば、ヒトの野生型配列定常領域）またはそのアミノ酸配列バリエーションであってもよい。

30

【0100】

本明細書で使用されるとき、「可変領域」という用語は、本明細書で定義した抗体の軽鎖および／もしくは重鎖の部分、または抗原に特異的に結合できる重鎖のみの抗体（例えば、ラクダ科の抗体または軟骨魚類の免疫グロブリン新抗原受容体（IgNAR））の部分の指し、相補的決定領域「CDR」；すなわち、CDR1、CDR2、およびCDR3、ならびにフレームワーク領域「FR」のアミノ酸配列を含む。FRは、CDR残基以外の可変領域残基である。例えば、可変領域は、3つのCDRと共に、3つまたは4つのFR（例えば、FR1、FR2、FR3および任意によりFR4）を含む。VHは、重鎖の可変領域を指す。VLは、軽鎖の可変領域を指す。

40

【0101】

本明細書で使用されるとき、用語「相補性決定領域」（同義語CDR、すなわち、CDR1、CDR2、およびCDR3）は、抗体の可変領域のアミノ酸残基を指し、その存在は、特異的な抗原結合の主要な寄与因子である。各可変領域は、典型的には、CDR1、CDR2、およびCDR3と認定される3つのCDR領域を有する。各相補性決定領域は、Kabata（1987年および／または1991年）によって定義された「相補性決定領域」のアミノ酸残基を含んでもよい。例えば、重鎖可変領域では、CDRH1は、31～35残基、CDRH2は、50～65残基、CDRH3は、95～102残基にある。軽鎖では、CDRL1は、24～34残基、CDRL2は、50～56残基、CDRL3は、89～97残基である。これらのCDRは、例えばKabata（1987年および

50

／または1991年)に記載のとおり、多数の挿入物も含み得る。本開示は、Kabat付番システム、これらに限定されないが、カノニカル付番システム、またはChothia and Lesk (1987) ; Chothiaら (1989年) ; および／またはAl-Lazikaniら (1997年) ; Honnegerher and Plukthun (2001年) の付番システム ; Giudicelliら (1997年) で論じられているIMGTシステム ; またはEnhanced Chothia Numbering Scheme (<http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html>) など、すべての付番システムによって定義されるFRおよびCDRである。一例では、CDRおよび／またはFRは、例えば、図9A～9Dに太字で描写しているとおり、Kabatの付番システムに従って定義される。任意により、Kabat付番システムによる重鎖CDR2は、本明細書に記載の5つのC末端アミノ酸かを含まないか、またはそれらのアミノ酸のいずれか1つ以上が別の天然由来アミノ酸で置換されている。追加または代替として、任意では、軽鎖CDR1は、本明細書に記載の4つのN末端アミノ酸を含まないか、またはそれらのアミノ酸のいずれか1つ以上が別の天然由来のアミノ酸で置換されている。この点に関して、Padlanらは1995年に、重鎖CDR2の5つのC末端アミノ酸および／または軽鎖CDR1の4つのN末端アミノ酸は、一般に抗原結合に関与しないことを確立している。一例では、CDRおよび／またはFRは、例えば、図9A～9Dに下線付きテキストで描写しているとおり、Chothiaの付番システムに従って定義される。

10

【0102】

本明細書では、「Kabat付番システム」という用語は、Kabat (Kabatら、1987年および／または1991年) に記載されている、抗体の可変領域に番号を付け、CDR (超可変領域) を同定するためのスキームを指す。

20

【0103】

本明細書では、「Chothia付番システム」という用語は、Chothia and Lesk (Chothia and Lesk, 1987年) またはAl-Lazikani (Al-Lazikaniら、1997年) に記載されている、抗体の可変領域に番号を付け、CDR (構造ループ) を同定するためのスキームを指す。

【0104】

本明細書で使用されるとき、「抗原結合ドメイン」という用語は、抗原 (例えば、HER2) に特異的に結合することができる化合物の領域を意味するものとする。一実施形態では、化合物は、タンパク質である。一実施形態では、タンパク質は、抗体またはその断片である。一実施形態では、抗体断片は、本明細書に記載のF_V、V_H、またはV_Lのうちの1つ以上を含む。

30

【0105】

本明細書で使用されるとき、タンパク質またはその抗原結合ドメインと抗原との相互作用に関する「結合する (bind)」または「結合すること (binding)」という用語は、その相互作用が、抗原上の特定の構造 (例えば、抗原決定基またはエピトープ) の存在に依存することを意味する。例えば、抗体は、一般的なタンパク質ではなく、特定のタンパク質構造を認識して結合する。抗体がエピトープ「A」に結合している場合、標識された「A」を含む反応における、エピトープ「A」 (または遊離の非標識「A」) を含む分子および抗体が存在することにより、抗体に結合する標識された「A」の量が減少する。

40

【0106】

本明細書で使用されるとき、「特異的に結合する (specifically bind)」、「特異的に結合する (bind specifically)」、または類似の語句は、本開示のタンパク質が、特定の抗原 (HER2など) またはそれを発現する細胞と、代わりの抗原または細胞と比較して、より頻繁に、より迅速に、より持続的に、および／またはより高い親和性で、反応または会合することを意味するものとする。例えば、ある抗原に特異的に結合するタンパク質は、他の抗原に結合するよりも高い親和性 (例えば、20倍、40倍、60倍、80倍から100倍、150倍、200倍以上の親和性)

50

、アビディティ、容易さ、および／またはより長い持続性で、その抗原に結合する。また、この定義を読むことによって、例えば、第一の抗原に特異的に結合するタンパク質は、第二の抗原に特異的に結合し得るまたは結合し得ないことが理解される。このような「特異的な結合」は、必ずしも別の抗原との排他的な結合または検出不可能な結合を必要としないため、これは「選択的な結合」という用語によって意味される。

【0107】

いくつかの実施形態では、1つの標的化剤がデンドリマーに共有結合により連結している。いくつかの実施形態では、2つ以上の標的化剤がデンドリマーに共有結合により連結している。いくつかの実施形態では、2つの標的化剤が、デンドリマーに共有結合により連結している。いくつかの実施形態では、3つの標的化剤が、デンドリマーに共有結合により連結している。いくつかの実施形態では、4つの標的化剤が、デンドリマーに共有結合により連結している。

10

【0108】

標的化剤は、スペーサーを介して、複合体の残部に付着される。いくつかの実施形態では、標的化剤とスペーサー基との間の共有結合による付着または連結は、標的化剤前駆体上に存在する相補的反応性官能基とスペーサー基前駆体との間の反応によって形成されており、スペーサー基前駆体は、複合体を調製するために使用されるプロセスに応じて、HER2標的化部分前駆体と反応した時点で、複合体の残部に付着していても、付着してなくてもよい。

【0109】

いくつかの実施形態では、標的化剤は、標的化部分のC末端を介してスペーサー基に共有結合により連結している。

20

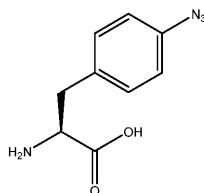
【0110】

標的化剤前駆体の共有結合による付着部位は、例えば、システイン、リジン、N-末端アミン、チロシン、炭水化物、非天然アミノ酸、またはトランスアミナーゼ（例えば、トランスグルタミナーゼまたはソルターゼA）または認識配列であり得る。タンパク質に共有結合により付着するための結合部位は、当技術分野において知られている（例えば、Milla P. ら、2012年）。In silicoの結晶構造予測は、コンジュゲートにとって構造的に適している、共有結合による付着部位を配置するために（例えば、パラトープ、CDR、正しい折り畳みおよびコンフォメーションにとって重要な機能、および／または高電荷、極性、または嵩高い側鎖基を有する残基から離れて）、標的化剤のポリペプチド配列中の位置を特定するために使用され得る。これらの候補となる位置から、経験的スクリーニングを行い、機能を最大限に保持する一方で、強固なコンジュゲートを可能にする置換部位を決定することができる。一実施形態では、2D3の位置は、13位、16位、42位、および126位（C-末端）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、標的化剤前駆体は、スペーサーに付着するための非天然アミノ酸残基を含む。非天然アミノ酸残基は、スペーサー基前駆体の反応性官能基と相補的な反応性官能基を有する側鎖を有してもよい。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸残基は、アジド基を含むものであり、例えば、4-アジドフェニルアラニン残基、例えば、

30

【化13】

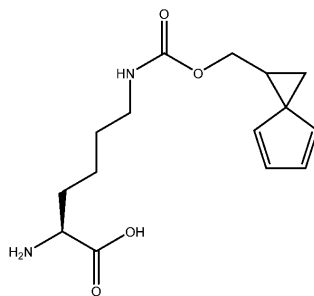
40



であってもよい。アジド基は、スペーサー前駆体基中に存在し得るアルキン基と環化付加反応を起こすことができる。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、ジエン含有アミノ酸、例えば、

50

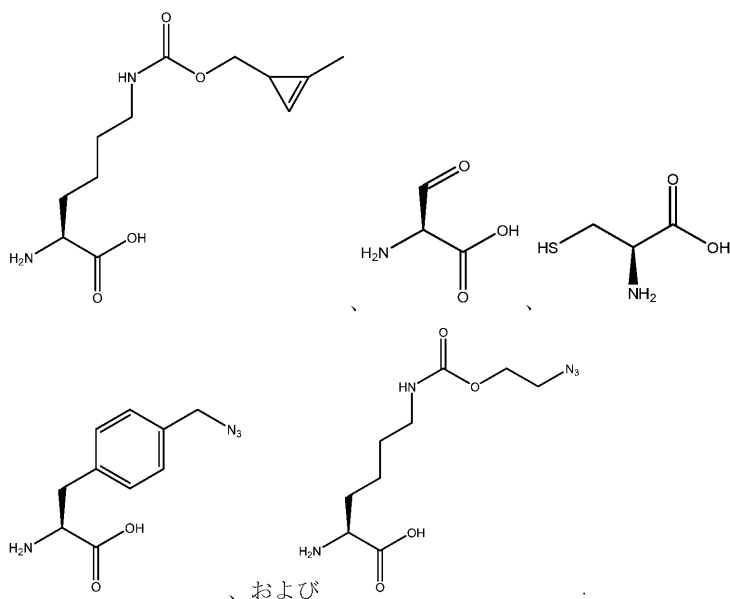
【化 1 4】



10

などのスピロシクロペンタジエン含有アミノ酸である。ジエン基は、マレイミドに存在するようなアルケン基との環化付加反応（例えば、ディールス・アルダー反応）を起こすことができる。スパーサーに付着させるために使用され得る非天然アミノ酸のさらなる例としては、ケトンなどのカルボニル基を含むもの、およびメチルシクロプロピレン基を含むものが挙げられる。非天然アミノ酸の追加例としては、

【化 1 5】



20

30

が挙げられる。

【0 1 1 1】

いくつかの実施形態では、標的化剤は、本明細書で定義されているアミノ酸配列のいずれかを含むか、またはアミノ酸配列のいずれかからなる。

【0 1 1 2】

スパーサー基

本明細書で使用されるとき、「スパーサー基」という用語は、標的化剤をデンドリマーに付着させる役割を果たす化学的実体を指す。すなわち、スパーサー基が標的化剤をデンドリマーにより（例えば、共有結合による付着を介して）結合させる。スパーサー基は、デンドリマーの他の構成要素からの過度の悪影響を受けることなく、HER2受容体に結合できるように、標的化剤を位置付けることを目的としている。

40

【0 1 1 3】

上述したとおり、標的化剤は、例えば、デンドリマーのコアを介してデンドリマーに共有結合により付着され得る。いくつかの実施形態では、スパーサー基は、コアユニットに共有結合により付着している。いくつかの実施形態では、標的化剤は、デンドリマーのコアを介してデンドリマーに共有結合により付着している。すなわち、抗体断片などの標的化剤は、スパーサー基によってデンドリマーのコアに共有結合により付着している。デン

50

ドリマーのコアに付着されているスペーサーを介して標的化剤をデンドリマーに共有結合により付着させることは、デンドリマーが立体的に密集している場合は、有益であり得、スペーサー基は、デンドリマーの表面を超えて突出するのに十分な長さであり得、それにより、*in vivo*において、標的化剤をその受容体などに結合させることができるようになる。

【0114】

いくつかの他の実施形態では、標的化剤は、デンドリマーの表面構成ユニットを介して、デンドリマーに共有結合により付着している。いくつかの実施形態では、スペーサー基は、表面構成ユニットに、共有結合により付着している。例えば、標的化剤は、リジン残基のアミン基と、標的化剤およびスペーサー基を含む中間体上に存在するカルボン酸基との間に形成されるアミド結合などにより、スペーサー基を介してリジン残基の表面窒素に連結されてもよい。一実施形態では、標的化剤は、スペーサー基を介して、リジン残基の表面窒素に共有結合により付着し、それにより、リジン残基のアミン基と、標的化剤およびスペーサー基を含む中間体上に存在するカルボン酸基との間にアミド結合が形成される。

10

【0115】

例示的なスペーサー基としては、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール、ポリアリル、ペプチド、アミノ酸、アルキル鎖、アルケニル鎖、およびサッカリド（モノ、オリゴ、ポリ）、またはそれらの残基が挙げられる。いくつかの実施形態では、スペーサー基は、2～60のエチレンオキシ繰り返し単位、例えば、2～20または20～48の繰り返し単位などのPEG鎖を含む。一実施形態では、PEGは、8～36の繰り返し単位である。さらなる実施形態では、PEGは、12、16、20、24または36の繰り返し単位である。

20

【0116】

いくつかの実施形態では、スペーサー基は、他の官能基に挟まれた複数のPEG基を含む。例えば、スペーサー基は、例えば、アミド基またはスペーサー基の部分を接続するために有用な他の官能基を介して連結されたPEG基を含んでいてもよい。

【0117】

スペーサー基を標的化剤および／またはデンドリマーに付着させるために、スペーサー基前駆体は、1つ以上の反応性官能基を含んでいてもよい。特定の実施形態では、反応性官能基は、ヒドロキシ、カルボキシ、NHSまたはペンタフルオロフェノールエステルなどの活性エステル、アミノ、アジド、マレイミド（スルホマレイミドなど）、ジエン（シクロペンタジエン、例えば、スピロ[2.4]ヘプタ-4,6-ジエン基）、テトラジン、シトラコンイミド、BCN（ビシクル[6.1.0]ノン-4-イン-9-イル）、DBCO（ジベンゾシクロシン-アミン）などのアルキン含有基、メチル-シクロプロピレン含有部位などの活性化アルケン、チオール、アルデヒドおよびケトンなどのカルボニル基、アルコキシアミン、ハロアセテート、ビオチン、テトラジン、TCO（トランス-シクロオクテン）などのアルケン含有基、メチル-シクロプロピレン基、およびPTADまたは他のチロシン反応性基などの基を含む。

30

【0118】

例えば、いくつかの実施形態では、スペーサー基中間体は、2つの反応性基（例えば、1つは、直交している各末端にある）含み得る。すなわち、反応性基のうちの少なくとも1つは、他の反応性基が安定しており、実質的に反応しない条件下で、標的化剤を含む中間体またはデンドリマーを含む中間体のいずれか上に存在する相補的な基と反応して、スペーサー基を複合体の構成要素に付着させることができる。これにより、スペーサーをデンドリマーまたは標的化剤のいずれかに付着（例えば、共有結合により付着）させ、その後、標的化剤をデンドリマーに連結させるために、残りの構成要素上に存在する相補的な基と他の反応基を反応させることができる。

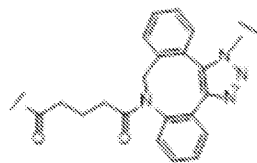
40

【0119】

いくつかの実施形態では、スペーサー基は、アルキン基およびアジド基をそれぞれ含む

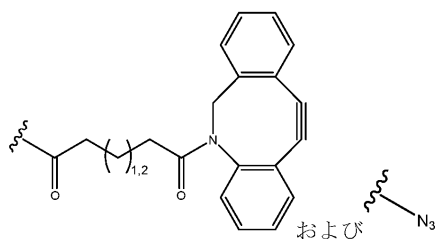
50

前駆体の反応により、標的化剤に付着（例えば、共有結合により付着）している（例えば、標的化基を含む中間体は、アジド基を含んでもよく、スペーサー基を含む中間体は、アルキン基を含んでもよい）。このような反応は、トリアゾール含有基、例えば、
【化 1 6】



10

の形成をもたらし、
以下の構造：
【化 1 7】

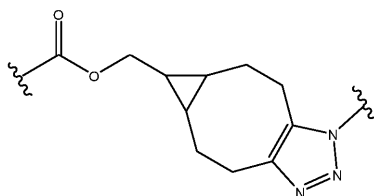


20

を有する前駆体を反応させることによって、形成され得る。

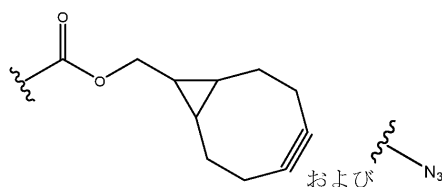
【0 1 2 0】

別の例として、スペーサー基は、トリアゾール含有基、例えば、
【化 1 8】



30

の形成を介して付着され得るか、または以下の構造：
【化 1 9】



40

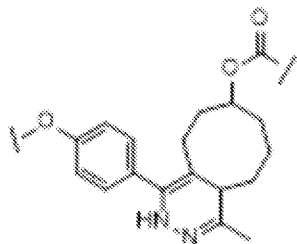
を有する前駆体を反応させることによって、形成され得る。

【0 1 2 1】

いくつかの実施形態では、スペーサー基は、アルケン（例えば、トランス-シクロオクテンなどの歪みアルケン）およびテトラジン基をそれぞれ含む前駆体の反応によって、標的化剤に付着（例えば、共有結合により付着）している。このような反応は、窒素の突出を有するピリダジン含有基、例えば、

50

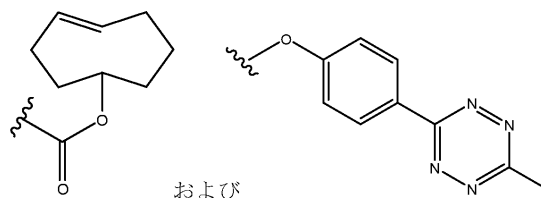
【化 2 0】



の形成をもたらし、また、以下の構造：

10

【化 2 1】



を有する前駆体の反応によって形成され得る。

20

【0 1 2 2】

いくつかの実施形態では、スペーサー基は、アルケン（例えば、メチルシクロプロペンなどの歪みアルケン）およびテトラジン基をそれぞれ含む前駆体の反応によって、標的化剤に付着（例えば、共有結合により付着）している。このような反応では、窒素の突出を有する、ピリダジン含有基の形成がもたらされる。

【0 1 2 3】

スペーサー基を dendrimer に付着（例えば、共有結合により付着）させるために、スペーサー基前駆体は、さらなる官能基を含んでもよい。例えば、スペーサー基前駆体は、コアユニット前駆体の一部を形成するアミノ基と反応する（例えば、アミド連結を形成する）ことができるカルボン酸基を含んでもよい。

【0 1 2 4】

30

いくつかの実施形態では、スペーサー基は、カルボン酸基およびアミン基を含む前駆体の反応によって、dendrimer に付着（例えば、共有結合によって付着）される。例えば、スペーサー基の中間体は、コアユニットの一部として存在するか、またはコアユニットから延びているアミン基と反応して、例えば、アミド連結を形成可能であるカルボン酸基を含み得、アルキン基およびアジド基をそれぞれ含む前駆体の反応によって標的化剤に付着する（例えば、標的基を含む中間体は、アジド基を含み得、スペーサー基を含む中間体は、アルキン基を含み得る）。

【0 1 2 5】

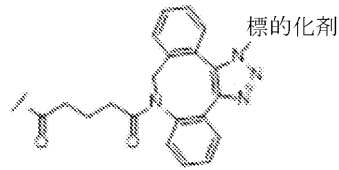
上述のとおり、標的化剤前駆体は、非天然アミノ酸残基を含んでもよい。いくつかの実施形態では、標的化剤は、非天然アミノ酸残基を含む。この非天然アミノ酸残基は、例えば、反応性側鎖を示すことができる任意の非天然アミノ酸であってもよく、反応性側鎖は、スペーサー基前駆体上に存在する官能基と相補的である官能基を保持している。このようにして、相補的官能基が反応し、その結果、標的化部分前駆体のスペーサー基前駆体への付着を生じさせることが可能になる。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸残基は、4-アジドフェニルアラニン残基である。いくつかの実施形態では、スペーサー基前駆体は、非天然アミノ酸残基を含む標的化部分前駆体にコンジュゲートするためのアルキン基を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー基前駆体は、4-アジドフェニルアラニン残基を含む標的化剤前駆体にコンジュゲートするためのアルキン基を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー基前駆体は、4-アジドフェニルアラニン残基を含む標的化部分前駆体にコンジュゲートするための、ジベンジルシクロオクタン基であるアルキン基を

40

50

含む。いくつかの実施形態では、スペーサー基の一端は、D B C O 基と標的化部分の一部を形成する（例えば、以下：

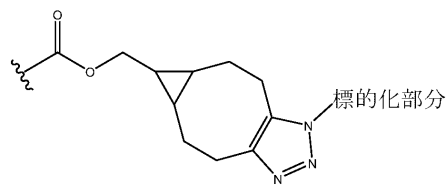
【化 2 2】



10

のようなトリアゾール含有基を形成する) 4-フェニルアラニン残基上のアジド部分との環化付加反応によって、または B C N ([ピシクル 6 . 1 . 0] ノン-4-イン-9-イル) 基と、標的化部分の一部を形成する（例えば、以下：

【化 2 3】



20

のようなトリアゾール含有基を形成する) 4-フェニルアラニン残基上のアジド部分との反応によって、標的化部分に付着される。

【0 1 2 6】

いくつかの実施形態では、スペーサー基の一端は、コア上に存在するまたは表面構成ユニット上に存在するアミノ基間、およびスペーサー基上に存在するカルボキシル基間のアミド化反応によって（例えば、活性化エステルの反応による）、デンドリマーに付着（例えば、共有結合により付着）される。いくつかの実施形態では、スペーサー基前駆体は、テトラジン基を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー基前駆体は、例えば、ジエン（シクロペンタジエン、例えばスピロ [2 . 4] ヘプター 4 , 6 -ジエン基など）にコンジュゲートするために、マレイミド基を含む。

30

【0 1 2 7】

いくつかの実施形態では、スペーサー基前駆体は、デンドリマーのコアでアミンに結合するための反応性カルボキシル基を有する P E G 鎖と、反応性アルキン部分を含む標的化剤前駆体にコンジュゲートするためのアジド基とを含む。いくつかの実施形態では、スペーサー基前駆体は、デンドリマーのコアでカルボキシル基に結合するための反応性アミン基を有する P E G 鎖と、反応性アルキン部分を含む標的化剤前駆体にコンジュゲートするためのアジド基と、からなる。いくつかの実施形態では、スペーサー基前駆体は、デンドリマーのコアでアミンに結合するための反応性カルボキシル基を有する P E G 鎖と、反応性チオール部分を含む標的化剤前駆体にコンジュゲートするためのマレイミド基と、からなる。いくつかの実施形態では、スペーサー基前駆体は、デンドリマーのコアでカルボキシル基に結合するための反応性アミン基を有する P E G 鎖と、反応性マレイミド部分を含む標的化剤前駆体にコンジュゲートするためのチオールまたはマスクされたチオール基と、からなる。いくつかの実施形態では、スペーサー基前駆体は、デンドリマーのコアでアミンに結合するための反応性カルボキシル基を有する P E G 鎖と、反応性アルケン部分を含む標的化剤前駆体にコンジュゲートするためのテトラジン基とを含む。いくつかの実施形態では、スペーサー基前駆体は、デンドリマーのコアでアミンに結合するための反応性カルボキシル基を有する P E G 鎖と、反応性ジエン（シクロペンタジエン、例えばスピロ [2 . 4] ヘプター 4 , 6 -ジエン基など）を含む標的化剤前駆体にコンジュゲートするためのマレイミド基とを含む。

40

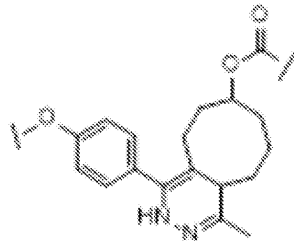
【0 1 2 8】

50

いくつかの実施形態では、標的化剤のデンドリマーへの連結は、第1のスペーサー基を標的化剤の中間体に、第2のスペーサー基をデンドリマーに（例えば、デンドリマーのコアに）付着させ（例えば、共有結合により付着させ）、次いで、標的化剤とデンドリマーを連結するために、第1および第2のスペーサー基上に存在する相補的官能基を一緒に反応させることによって達成され得る。このようなアプローチは、デンドリマーと標的化剤を容易に接続するために提供され得る。例えば、第1のスペーサー基中間体は、一端に標的化剤上の反応性基と相補的である第1の反応性基（例えば、アジド基と相補的であるアルキン基であり、一緒に反応してトリアゾール基を形成することができる）と、第2のスペーサー基上の反応性基と相補的である第2の反応性基（例えば、トランスシクロオクテン含有基との反応と相補的であるテトラジン含有基）とを含んでもよい。第2のスペーサー基中間体は、例えば、一端にデンドリマー上の反応性基との反応に相補的である第3の反応性基（例えば、アミン基との反応に相補的であるカルボン酸基）、他端に第1のスペーサー基中間体上の反応性基との反応に相補的である第4の反応性基（例えば、テトラジン基との反応に相補的であるトランスシクロオクテン含有基）を含んでもよい。例えば、トランスシクロオクテン基とテトラジン基とを反応させることによって産生された基を介して、第1の基およびスペーサー基が付着され得、構造：

10

【化24】



20

を含み得る。

【0129】

いくつかの実施形態では、標的化部分は、標的化剤上に存在するアジド部分とスペーサー基の一端にあるアルキン含有基（例えば、DBCO、BCN）との反応、およびデンドリマーに付着したテトラジン部分とスペーサー基（例えば、トランスシクロオクテン）の他端にある歪みアルケン基との反応によって形成されるスペーサー基を介して、デンドリマーに連結されてもよい。

30

【0130】

標的化剤前駆体をスペーサー基前駆体と反応させて、標的化剤のスペーサー基への付着を形成する。スペーサー基前駆体を標的化剤前駆体に付着させる手段は、当技術分野で知られている。例えば、標的化剤前駆体に共有結合により付着する部位としては、システイン残基、リジン残基、C末端アミノ酸残基、N末端アミン、チロシン残基、炭水化物、好適な非天然アミノ酸残基、またはトランスアミナーゼ、または認識配列などが挙げられるが、これらに限定されない。標的化剤前駆体などのタンパク質に共有結合により付着するための結合部位は、当技術分野において公知である（例えば、Milla Pら、2012年）。例えば、スペーサー基前駆体を標的化剤のC末端で標的化剤前駆体と反応させて、スペーサー基がC末端を介して標的化剤に付着するようにしてもよい。いくつかの実施形態では、標的化剤は、標的化剤のC末端を介してスペーサー基に付着している。一実施形態では、標的化剤は、標的化剤のC末端を介して、スペーサー基に共有結合により付着される、または連結される。

40

【0131】

治療剤

本明細書で使用されるとき、「治療剤」という用語は、例えばHER-2発現がん細胞に対して、*in vivo*で治療効果を発揮する剤を指す。治療剤の例としては、化学療

50

法剤とも呼ばれる抗がん剤、抗新生物剤、および細胞傷害剤などが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、治療剤は、化学療法剤である。いくつかの実施形態では、治療剤は、細胞傷害剤である。本明細書で使用されるとき、「細胞傷害剤」という用語は、化学療法的特性を呈する剤を指す。抗がん剤の例としては、これらに限定されないが、DNAアルキル化剤および架橋剤（例えば、シスプラチン、オキサリプラチンなどの白金含有剤）、DNA損傷剤、例えば、PARP（ポリADPリボースポリメラーゼ）阻害剤（例えば、オラパリブ、ルカパリブ、ニラパリブ、タラゾパリブ）、抗微小管剤（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、カバジタキセル）、トポイソメラーゼ阻害剤（例えば、イリノテカン、トポテカン、SN-38、ネモラビシンなど）、プロテアソーム阻害剤（例えば、ボルテゾミブ）、チロシンプロテインキナーゼ阻害剤（例えば、イマチニブ、ニロチニブ）、EGF受容体阻害剤（例えば、ゲフィチニブ、エルロチニブ）、細胞傷害抗生物質（例えば、アントラサイクリン、ブレオマイシン）、リボヌクレオチド還元酵素阻害剤（例えば、ゲムシタビン）、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、ペメトレキサートなど）、および抗分裂剤などが挙げられる。このような抗がん剤は、治癒（すなわち、がん罹患を取り除くこと）を目的として、またはがん患者の生活の質の向上および延命をもたらすような症状の軽減／緩和を目的として、がんの治療に使用され得る。抗がん剤は、がんの他の非化学療法的治療法（すなわち、放射線療法、手術／生検）と併用してもよい。

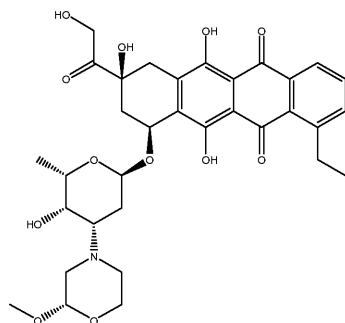
10

【0132】

一実施形態では、細胞傷害剤は、ネモルビシンである。ネモルビシンの構造は、以下のとおり：

20

【化25】



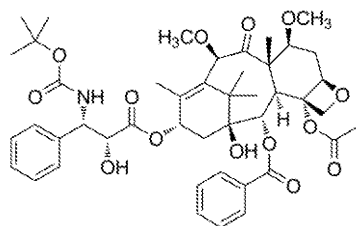
30

である。

【0133】

一実施形態では、細胞傷害剤は、カバジタキセルである。カバジタキセルの構造は、以下のとおり：

【化26】



40

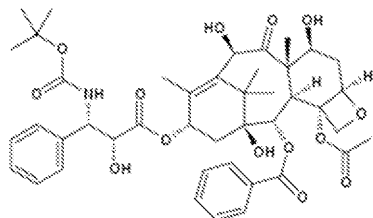
である。

【0134】

一実施形態では、細胞傷害剤は、ドセタキセルである。ドセタキセルの構造は、以下のとおり：

50

【化 2 7】



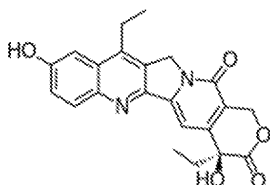
である。

【0 1 3 5】

10

一実施形態では、細胞傷害剤は、S N - 3 8 である。S N - 3 8 の構造は、

【化 2 8】



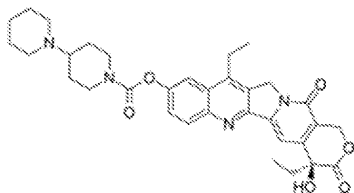
である。

【0 1 3 6】

20

一実施形態では、細胞傷害剤は、イリノテカンである。イリノテカンの構造は、

【化 2 9】



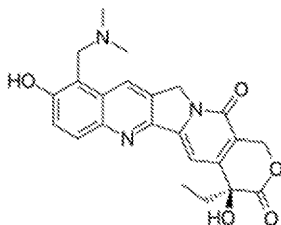
である。

【0 1 3 7】

30

ある実施形態では、細胞傷害剤は、トポテカンである。トポテカンの構造は、以下のとおり：

【化 3 0】



40

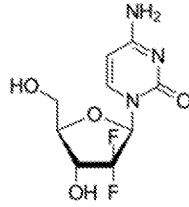
である。

【0 1 3 8】

一実施形態では、細胞傷害剤は、ゲムシタビンである。ゲムシタビンの構造は、以下のとおり：

50

【化 3 1】



である。

【0139】

いくつかの実施形態では、治療剤は、超細胞傷害剤である。本明細書で使用されるとき、「超細胞傷害剤」とは、非常に強力な化学療法特性を呈する剤を指すが、それ自体は、非常に毒性が強いため、抗がん剤として単独で投与できない剤を指す。すなわち、超細胞傷害剤は、化学療法特性を示すが、有害で毒性のある副作用が化学療法の有益性を上回るため、一般には対象に安全に投与することができない。

【0140】

超細胞傷害剤としては、例えば、ネモルピシン、ドラスタチン類（例えば、ドラスタチン-10、ドラスタチン-15）、アウリスタチン類（例えば、モノメチルアウリスタチン-E、モノメチルアウリスタチン-F）、メイタンシノイド類（例えば、メイタンシン、メルタンシン／エムタンシン（DM1、ラプタンシン（DM4））、カリキアミシン類（例えば、カリキアミシンγ1）、エスペラマイシン類（例えば、エスペラマイシンA1）、ピロロベンゾジアゼピン類（PDB）などが挙げられる。

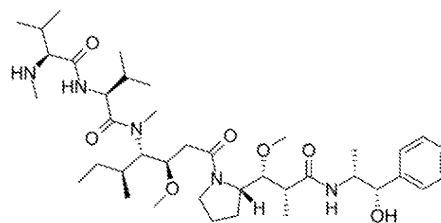
【0141】

いくつかの実施形態では、治療剤は、アウリスタチンである。いくつかの実施形態では、治療剤は、モノメチルアウリスタチンである。一実施形態では、治療剤は、モノメチルアウリスタチンE（MMAE）である。一実施形態では、治療剤は、モノメチルアウリスタチンF（MMAF）である。MMAEおよびMMAFは共に、チューブリンの重合を遮断することによって、細胞分裂を阻害すると理解されている。

【0142】

MMAEの化学構造は、以下のとおり：

【化 3 2】

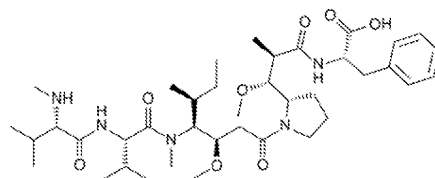


である。

【0143】

MMAFの化学構造は、以下のとおり：

【化 3 3】



である。

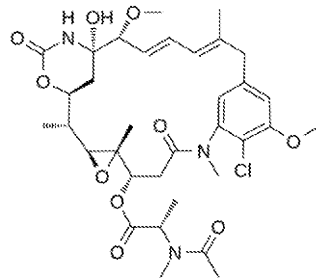
【0144】

いくつかの実施形態では、超細胞傷害剤は、メイタンシノイドである。一実施形態では、超細胞傷害剤は、メイタンシンである。一実施形態では、超細胞傷害剤は、アンサミトシンである。一実施形態では、超細胞傷害剤は、エムタンシン／メルタンシン（DM1）である。一実施形態では、超細胞傷害剤は、ラブタンシン（DM4）である。メイタンシノイドは、チューブリンに結合することによって、微小管の組み立てを阻害することが理解されている。

【0145】

メイタンシンの化学構造は、以下のとおり：

【化34】



10

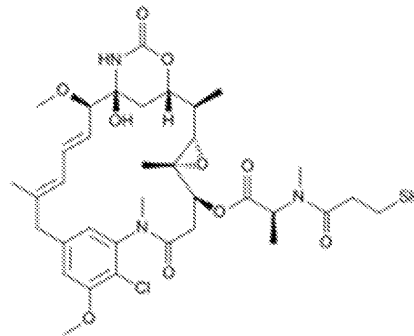
である。

20

【0146】

エムタンシン／メルタンシンの化学構造は、以下のとおり：

【化35】



30

である。

【0147】

いくつかの実施形態では、超細胞傷害剤は、がん細胞株（例えば、SKBR3細胞および／またはHEK293細胞および／またはMCF7細胞）に対する *in vitro* IC₅₀ が、100 nM未満、または10 nM未満、または5 nM未満、または3 nM未満、または2 nM未満、または1 nM未満、または0.5 nM未満である。MMAEおよびエムタンシンの *in vitro* の活性については、それぞれ、Abdollahpour-Alitappehら（2017年）、およびOroudjevら（2010年）で検討されている。

40

【0148】

デンドリマー標的化剤複合体は、標的化剤あたりの治療剤の分布を有し得ることが理解されるだろう。例えば、デンドリマー標的化剤複合体は、標的化剤ごとに最大で約8つ、またはそれ以上の治療剤を有し得ることも可能である。

【0149】

このことから、各デンドリマー標的化剤コンジュゲート種の治療剤対標的化剤の比率（DTR）は、集団によって異なり得ることが理解されるであろう。典型的には、高DTRを有するデンドリマー標的化剤複合体を産生することが望ましい。一般に、これは、

50

より効果的な治療法となる。しかし、D T Rが高すぎる場合には、例えば、治療剤が超細胞傷害剤である場合、望ましくない毒性となり得る。

【0150】

いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、2超のD T Rを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、4超のD T Rを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、8超のD T Rを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、14超のD T Rを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、26超のD T Rを有する。

【0151】

いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、約1～約32のD T Rを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、約7～約32のD T Rを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、G5デンドリマーであり、約26～約32のD T Rを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、G4デンドリマーであり、約14～約16のD T Rを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、G3デンドリマーであり、約6～約8のD T Rを有する。

10

【0152】

2超の標的化剤がデンドリマーにコンジュゲートされている場合、D T Rは、標的化剤のみのデンドリマー-標的化剤複合体に比べて低下する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、約2～約16のD T Rを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、約8～約16のD T Rを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、G5デンドリマーであり、約4～約16のD T Rを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、G5デンドリマーであり、約6～約16のD T Rを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、G4デンドリマーであり、約4～約8のD T Rを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、G4デンドリマーであり、約4～約8のD T Rを有する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、G3デンドリマーであり、約2～約4のD T Rを有する。

20

【0153】

デンドリマー治療剤の1つ超の治療剤を担持する能力により、超細胞傷害剤を不要にすることが可能であり得る。例えば、ドセタキセルなどの複数の細胞傷害剤の送達を単一のデンドリマー上で標的化する能力は、例えば、MMAEなどの単一の超細胞傷害剤の送達と比較したときに、同等であるかまたはそれ以上の治療効果であり得る。超細胞傷害剤を使用しないことは、利点でもあり得る。

30

【0154】

リンカー

いくつかの実施形態では、治療剤は、リンカーを介して、デンドリマーに付着している。リンカーは、治療剤の好ましい特性を保持し、全身循環において実質的に無傷で非毒性を維持することが好ましいものとする。リンカー基は、例えば、薬学的活性剤の利用可能な官能性が、構成ユニットへの直接的な付着にとって好適でない場合に、薬学的活性剤をデンドリマーに付着させるための好適な基を提供するために使用することができる。また、もしくはその代わりに、リンカー基は、デンドリマー足場からの薬学的活性剤の制御放出を容易にするために使用することもでき、これにより、好適な期間（例えば、長期間）、薬学的活性剤の治療有効濃度および望ましい薬物動態プロファイルが提供される。

40

【0155】

リンカーの一端は、治療剤に付着し、リンカーのもう一端は、デンドリマーに付着する。リンカーのデンドリマーへの付着点は、例えば、デンドリマーの表面構成ユニットであってもよい。

【0156】

当業者であれば、様々な好適なリンカーのいずれか1つが使用され得ることを理解でき

50

るであろう。リンカーは、全身循環中に十分な安定性を提供すると同時に、例えば、がん細胞に内在化されると、その作用部位において、活性形態の細胞傷害性薬物を迅速かつ効率的に放出することが可能であるものとする。

【0157】

リンカーは、非切断可能リンカーであっても切断可能リンカーであってもよい。一実施形態では、リンカーは、非切断可能リンカーである。一実施形態では、リンカーは、切断可能リンカーである。切断可能なリンカーは、それ自体または薬学的活性剤への連結と併せて、以下の切断可能な部分のうちの1つ以上を含む：エステル基、ヒドラゾン基、オキシム基、イミン基またはジスルフィド基。いくつかの実施形態では、リンカーは、腫瘍環境で切断可能であり、酸に不安定である、還元環境に不安定である、加水分解に不安定である、またはプロテアーゼに不安定である。

10

【0158】

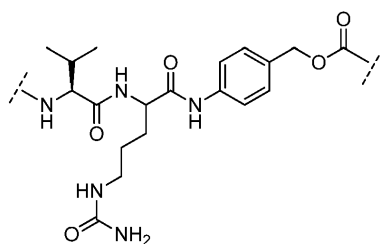
化学的に不安定なリンカーとしては、これらに限定されないが、酸不安定なリンカー（すなわち、ヒドラゾン）およびジスルフィドリンカーが挙げられる。酵素的に切断可能なリンカーとしては、これらに限定されないが、ペプチドリンカーおよびβ-グルクロニドリンカーが挙げられる。ペプチドリンカーの例としては、これらに限定されないが、Val-Ala、Val-Cit、Phe-Lys、Phe-Arg、Phe-Cit、Val-Arg、Val-Cit、Ala-Arg、およびAla-Citが挙げられる。リソソームのタンパク質分解酵素は血中において非常に低い活性を有するため、ペプチドリンカー、およびそのペプチド結合は、有利にも良好な血清安定性を有することが予想されている。Val-Ala、Val-Cit、Phe-Lys、Phe-Arg、Phe-Cit、Val-Arg、Val-Cit、Ala-Arg、およびAla-Citリンカーは、カテプシンBによって速やかに加水分解される。いくつかの実施形態では、リンカーは、酵素的に切断可能なリンカーである。例えば、いくつかの実施形態では、リンカーは、酵素による認識および切断が可能なアミノ酸残基を含む。

20

【0159】

いくつかの実施形態では、リンカーはペプチド基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、例えば、構造：

【化36】



30

を有するバリニン-シトルリン-パラアミノベンジルアルコール含有基（Val-Cit-PAB）を含む。

【0160】

例えば、PAB基は、カルボニル基を介して治療剤部分に存在するアミン基と共有結合により付着して、カルバメート連結を形成してもよく、また、バリニンアミノ基および外側の構成ユニットに存在するアミン基によりアミド結合を形成するジアシルリンカーを介して、外側の構成ユニットに存在するアミン基に付着してもよい。

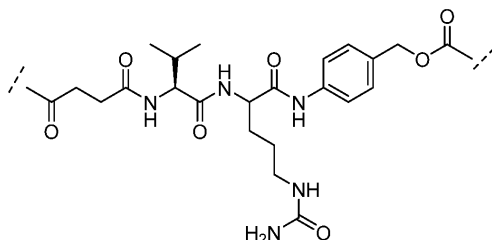
40

【0161】

いくつかの実施形態では、リンカーは、例えば、構造：

50

【化 3 7】



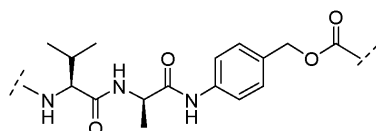
を有するグルタル酸－バリン－シトルリン－パラアミノベンジルアルコール基を含むか、またはそれからなる。

10

【0162】

いくつかの実施形態では、リンカーは、例えば、構造：

【化 3 8】



を有するバリン－アラニン－パラアミノベンジルアルコール基を含むか、またはそれからなる。

20

【0163】

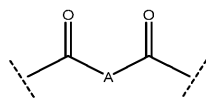
いくつかの実施形態では、薬学的活性剤は、ヒドロキシル基を含み、薬学的活性剤の残基は、ヒドロキシル基の酸素原子を介してリンカーに付着している。このアプローチでは、エステル基を介してリンカーに付着させることが可能であり、そのようなエステル基は、*in vivo*で切断可能であり、望ましい速度で薬学的活性剤を放出することが見出されている。

【0164】

いくつかの実施形態では、コアユニットは、アミノ基を含むコアユニット前駆体から形成され、構成ユニットは、リジン残基またはその類似体であり、薬学的活性剤は、ヒドロキシル基を含み、薬学的活性剤の残基は、ヒドロキシル基の酸素原子を介して付着しており、切断可能なリンカーは、ジアシルリンカーであり、これにより、薬剤活性剤の残基とリンカーとの間にエステル連結、およびリンカーと最外層の構成ユニット上に存在する窒素原子との間にアミド連結があるようになる。いくつかの実施形態では、薬学的活性剤は、ヒドロキシル基を含み、薬学的活性剤の残基は、ヒドロキシル基の酸素原子を介して付着しており、切断可能なリンカーは、式：

30

【化 3 9】



40

のジアシルリンカー基である。式中、Aは、O、S、S-S、NH、またはN(Me)により中断されたC₂～C₁₀アルキレン基であるか、またはAは、テトラヒドロフラン、テトラヒドロチオフェン、ピロリジン、およびN-メチルピロリジンからなる群から選択される複素環である。

【0165】

本明細書で使用されるとき、「アルキル」という用語は、一価の直鎖（すなわち線状）または分岐した飽和炭化水素基を指す。一例として、アルキル基は、1～10の炭素原子（すなわちC₁～C₁₀アルキル）を含む。一例として、アルキル基は1～6の炭素原子（すなわち、C₁～C₆アルキル）を含む。アルキル基の例としては、メチル基、エチル基、

50

プロピル基（例えば、*n*-プロピル、イソプロピル）、ブチル基（例えば、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル）、ペンチル基、およびヘキシル基などが挙げられる。

【0166】

本明細書で使用されるとき、「アルキレン」という用語は、2価の直鎖（すなわち線状）または分岐した飽和炭化水素基を指す。一例として、アルキレン基は、2～10の炭素原子（すなわち $C_{2\sim 10}$ アルキレン）を含む。一例として、アルキレン基は、2～6の炭素原子（すなわち、 $C_{2\sim 6}$ アルキレン）を含む。アルキレン基の例としては、例えば、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$ などが挙げられる。

10

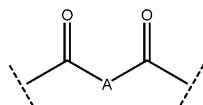
【0167】

このようなリンカーは、治療剤中に存在するヒドロキシル基を介して治療剤に連結するのに特に好適である。このような場合、複合体は、リンカーと治療剤部分との間にエステル連結を含み、リンカーとデンドリマー部分との間にアミド連結を含む。

【0168】

いくつかの実施形態では、薬学的活性剤は、ヒドロキシル基を含み、薬学的活性剤の残基は、ヒドロキシル基の酸素原子を介して付着しており、切断可能なリンカーは、式：

【化40】



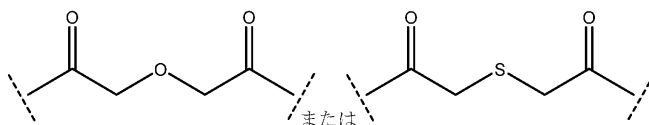
20

のジアシルリンカー基であり、Aは、O、S、NH、またはN(Me)によって中断された $C_{2\sim C_{10}}$ アルキレン基である。

【0169】

いくつかの実施形態では、薬学的活性剤が、ヒドロキシル基を有し、薬学的活性剤の残基が、ヒドロキシル基の酸素原子を介して付着しており、ジアシルリンカーが、

【化41】



30

である。

【0170】

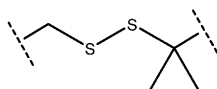
切断可能なリンカーの特定の型は、ジスルフィド部分を含むものである。このようなリンカーは、グルタチオンによる切断を受けやすい。例えば、この型のリンカーは、ジスルフィド部分によって中断されたアルキル鎖を介して連結された2つのアシル基を含み得る。

【0171】

いくつかの実施形態では、リンカーは、ジスルフィド部分によって中断されたアルキル鎖を含み、ここで、ジスルフィド基に隣接する炭素原子の1つまたは両方が、1つ以上のメチル基によって置換されている。例えば、ジスルフィド部分に隣接している炭素原子のうちの1つが、*gem*-ジメチル基で置換されてもよく、例えば、リンカーがその基：

40

【化42】



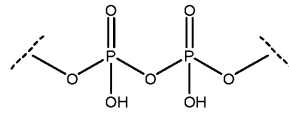
を含んでもよい。

50

【0172】

別の特定の型の切断可能なリンカーは、ニリン酸部分を含むものである。このようなリンカーは、リソソームの酸性ピロホスファターゼおよび酸性ホスファターゼの酵素による加水分解を受けやすい。いくつかの実施形態では、リンカーは、ピロリン酸部分：

【化43】



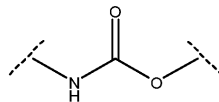
10

とも呼ばれるニリン酸部分によって中断されたアルキル鎖を含む。

【0173】

別の特定の型の切断可能なリンカーは、カルバメート部分を含むものである。このようなリンカーは、活性化する前に高い加水分解安定性を有し、かつ異なる分子内メカニズムによる効率的な切断を有する。いくつかの実施形態では、リンカーは、カルバメート部分：

【化44】



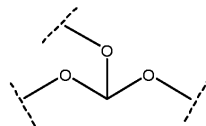
20

によって中断されたアルキル鎖を含む。

【0174】

別の特定の型の切断可能なリンカーは、オルトエステル部分：

【化45】



30

を含むものである。

【0175】

非切断可能リンカーは、必要な期間、*in vivo* 条件にさらされても、切断に対して不活性であるか、または切断に対して実質的に不活性である連結基である。非切断可能リンカーは、生物学的条件下では切断されない。

【0176】

例えば、アルキレン基またはシクロアルキレン基（例えば C_{1-10} アルキレン基または C_{3-10} シクロアルキレン基）によって架橋されたジアシルリンカーが挙げられる。非切断可能リンカーのさらなる例としては、チオエーテルリンカーが挙げられる。非切断可能リンカーの具体例としては、SMCC（サクシニミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート）を使用することによって形成されたものが挙げられる。SMCCは、マレイミド官能性を、治療剤部分に存在するかまたは治療剤部分に付着しているチオール基と反応させ、チオエーテル連結を形成するために使用できる。カルボン酸の官能性は、外側の構成ユニット上に存在するアミノ基との反応に使用できる。

40

【0177】

いくつかの実施形態では、リンカーは、Val-Cit-PAB基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、Val-Arg-PAB基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、Val-Arg-トリガ基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、Val-Ala-PAB-トリガ基である。いくつかの実施形態では、リンカーは

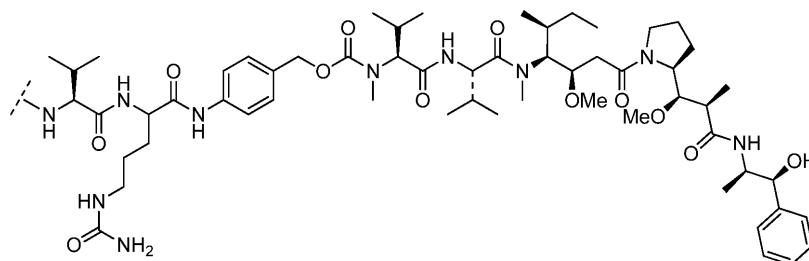
50

、Val-Ala-PNB-P基である。

【0178】

一実施形態では、リンカーは、Val-Cit-PAB基を含み、治療剤部分は、MMAEであり、Val-Cit-PAB基は、以下のように治療剤部分に付着している（すなわち、Val-Cit-PAB-MMAE）：

【化46】



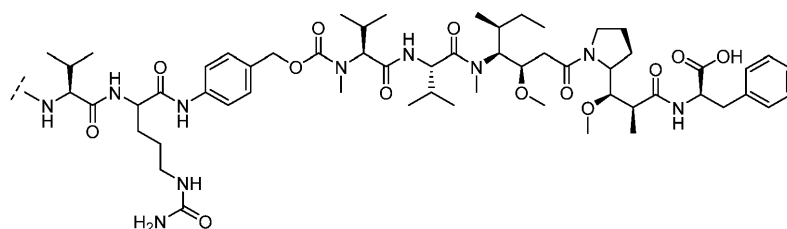
10

。

【0179】

一実施形態では、リンカーは、Val-Cit-PAB基であり、治療剤部分は、MMAFであり、Val-Cit-PAB基は、以下のように治療剤部分に付着している（すなわち、Val-Cit-PAB-MMAF）：

【化47】



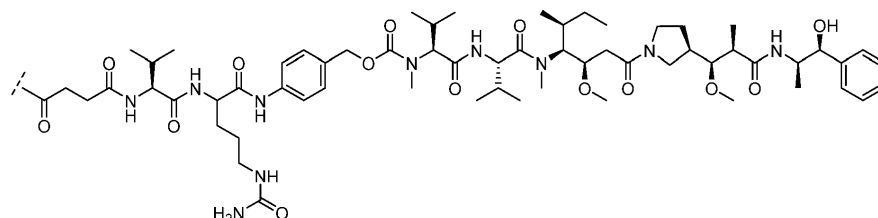
20

。

【0180】

一実施形態では、リンカーは、グルタル酸-Val-Cit-PAB基であり、治療剤部分は、MMAEであり、グルタル酸-Val-Cit-PAB基は、以下のように治療剤部分に付着している（すなわち、グルタル酸-Val-Cit-PAB-MMAE）：

【化48】



40

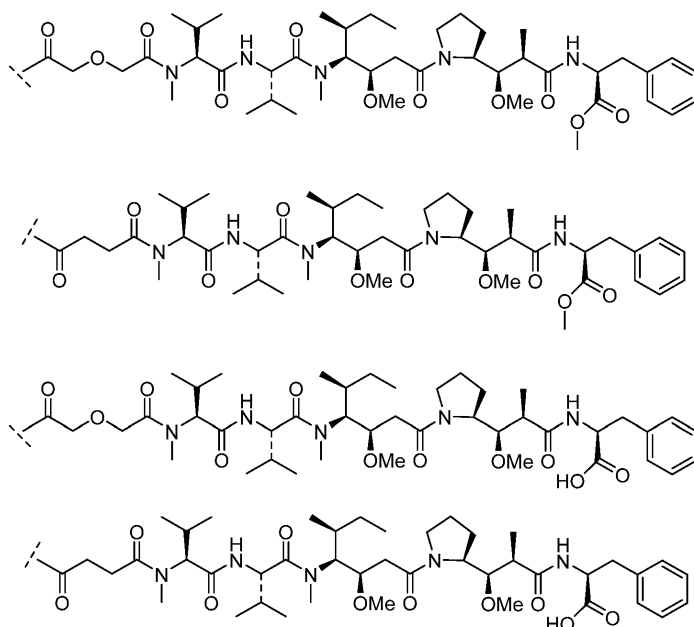
。

【0181】

一実施形態では、リンカーは、DGA（ジグリコール酸）またはグルタル酸基であり、治療剤部分は、MMAFまたはそのエステルであり、例えば：

50

【化 4 9】



10

20

である。

【0182】

いくつかの実施形態では、治療剤は、コネクター基を介してデンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結されている。例えば、治療剤は、リンカー基に加えて、コネクター基を介して、デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結されてもよい。コネクター基により、治療剤をデンドリマーの表面から異なる長さで繋ぎ止めることが可能になる。例えば、コネクター基は、デンドリマーの表面からの治療剤の距離を延長させるために利用されてもよい。これにより、切断可能リンカーへのアクセスを妨げ、かつ治療剤が標的と相互作用する能力を低下させる可能性のある、立体障害に関連するあらゆる潜在的な問題が回避され得る。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、リンカー基およびコネクター基を介して、デンドリマーの表面に共有結合により連結された治療剤を含む。いくつかの実施形態では、接続の順序は、デンドリマー-コネクター-リンカー-治療剤である。いくつかの実施形態では、接続の順序は、デンドリマー-リンカー-コネクター-治療剤である。

30

【0183】

コネクター基は、デンドリマーの表面からの治療剤の距離を延長させる役割を果たす任意の化学的部分を含み得る。いくつかの実施形態では、コネクター基は、1つ以上の親水性ポリマー基を含む。いくつかの実施形態では、コネクター基は、約1～約50個の親水性ポリマー基を含む。いくつかの実施形態では、コネクター基は、PEG基を含む。いくつかの実施形態では、コネクター基は、PEOX基を含む。いくつかの実施形態では、コネクター基は、ポリサルコシン基を含む。いくつかの実施形態では、コネクター基は、1以上、2以上、4以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上のPEG部分を含む。いくつかの実施形態では、コネクター基は、約1～約50のPEG部分を含む。いくつかの実施形態では、コネクター基は、4つのPEG部分を含む。いくつかの実施形態では、コネクター基は、12のPEG部分を含む。いくつかの実施形態では、コネクター基は、24のPEG部分を含む。いくつかの実施形態では、コネクター基は、48のPEG部分を含む。

40

【0184】

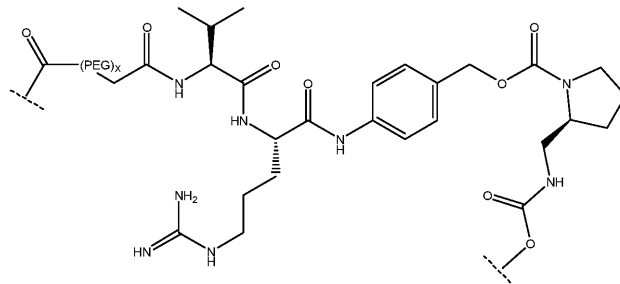
いくつかの実施形態では、リンカーは、コネクター基を含み、(PEG)_x-Val-Arg-PAB-トリガー部分である。Xは、上述のとおり、約1～約50の数であり得る。

50

【0185】

一実施形態では、リンカーは、コネクター基を含み、(PEG)₉-Val-Arg-PAB-トリガー-NHCO部分：

【化50】



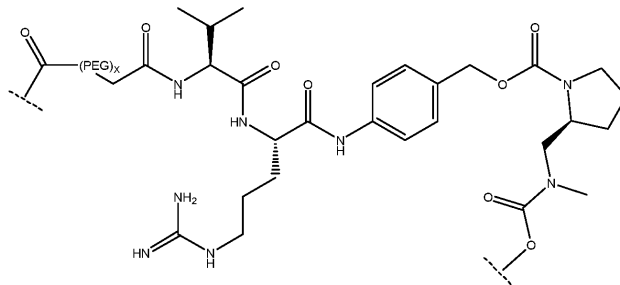
10

である。

【0186】

一実施形態では、リンカーは、コネクター基を含み、(PEG)₉-Val-Arg-PAB-トリガー-N(CH₃)CO部分：

【化51】



20

である。

【0187】

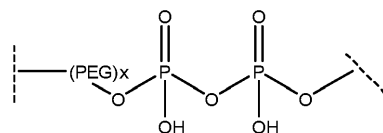
いくつかの実施形態では、リンカーは、コネクター基を含み、(PEG)_x-O-P(O)OH-O-P(O)OH-O部分である。ここでも、Xは、上述のとおり、約1～約50の数であり得る。

30

【0188】

一実施形態では、リンカーは、コネクター基を含み、(PEG)_x-O-P(O)OH-O-P(O)OH-O部分：

【化52】



40

である。

【0189】

いくつかの実施形態では、リンカーは、コネクター基を含み、(PEG)_x-Val-Ala-PAB-トリガー部分である。Xは、上述のとおり、約1～約50の数であり得る。一実施形態では、リンカーは、コネクター基を含み、(PEG)₉-Val-Ala-PAB-トリガー-NHCO部分である。

【0190】

例えば、(PEG)_x-Val-Arg-PAB-トリガーまたは(PEG)_x-O-P(O)OH-O-P(O)OH-Oなどの特定のリンカーを使用することにより

50

、治療剤の放出がもたらされ得る。

【0191】

(PEG)_x-Val-Arg-PAB-Pトリガー-NHCO、(PEG)_x-Val-Arg-PAB-Pトリガー-N(CH₃)COなどの例では、例えば、リンカーは、カテプシンBなどの細胞酵素によるジペプチド部分の切断によって最初に活性化され、自己崩壊型2-(アミノメチル)ピロリジンコネクターが現れる。分子内環状化後、ヒドロキシル含有治療剤の消失が生じる。例示的なヒドロキシル含有治療剤としては、カバジタキセル、ドセタキセル、およびSN-38が挙げられる。

【0192】

(PEG)_x-O-P(O)OH-O-P(O)OH-O-部分の例では、リンカーが特異的にきれいに切断し、カバジタキセル、ドセタキセル、およびSN-38などのヒドロキシル含有薬物をもたらすのみでなく、例えばゲムシタピンなど、ヌクレオチド阻害剤の活性種である薬物モノホスフェートを提供するという付加的な利点も有する。

10

【0193】

薬物動態の改変群

この複合体は、デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結されている複数の親水性ポリマー基を含み、これにより、複合体の薬物動態特性を改変することができる。親水性ポリマー基は、例えば、薬物動態特性の改善をもたらす。

【0194】

いくつかの実施形態では、デンドリマーは、デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している複数の親水性ポリマー基を含む。「親水性ポリマー基」という用語は、典型的には、25℃で、少なくとも25mg/ml、より好ましくは少なくとも50mg/ml、さらに好ましくは少なくとも100mg/mlの水への溶解度を有するポリマー基を指す。

20

【0195】

いくつかの実施形態では、親水性ポリマー基は、アミノ酸、アルキルオキシまたはアルキル(アシル)アミノ基の繰り返し単位を含むからなる。いくつかの実施形態では、親水性ポリマー基は、サルコシンなどのアミノ酸の繰り返し単位を含む。いくつかの実施形態では、親水性ポリマー基は、アルキルオキシ基の繰り返し単位を含む(例えば、親水性ポリマーは、PEG基である)。いくつかの実施形態では、親水性ポリマーは、アルキル(アシル)アミノ基の繰り返し単位を含む(例えば、親水性ポリマーは、PEOX基である)。

30

【0196】

いくつかの実施形態では、親水性ポリマー基は、少なくとも10のモノマー単位を含む。いくつかの実施形態では、親水性ポリマー基は、最大100のモノマー単位を含む。いくつかの実施形態では、親水性ポリマー基は、10~100、または10~50のモノマー単位を含む。

【0197】

いくつかの実施形態では、親水性ポリマー基は、PEG基である。PEG基は、ポリエチレングリコール基、すなわち、式-CH₂CH₂O-の繰り返し単位を含む基である。本開示のデンドリマーを産生するために使用されるPEG材料は、典型的には、分子量にある程度のばらつき(すなわち、±10%)を有するPEGの混合物を含み、したがって、分子量が指定される場合、それは、典型的には、PEG組成物の平均分子量の近似値である。例えば、「PEG~2100」という用語は、平均分子量約2100ダルトン、すなわち±約10%(PEG₁₈₉₀~PEG₂₃₁₀)を有するポリエチレングリコールを指す。「PEG~2300」とは、平均分子量約2300ダルトンすなわち±約10%(PEG₂₀₇₀~PEG₂₅₃₀)のポリエチレングリコールを有するポリエチレングリコールを指す。MW平均値の算出に一般的に用いられる3つの方法は、数平均、重量平均、Z平均分子量である。本明細書で使用されるとき、「分子量」という語句は、これらに限定されないが、NMR、質量分析、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間(M

40

50

A L D I - T O F)、ゲル浸透クロマトグラフィー、または他の液体クロマトグラフィー技術、光散乱技術、超遠心分離、および粘度測定など、当技術分野において周知である技術を用いて測定できる重量平均分子量を指すことを意図している。

【0198】

いくつかの実施形態では、PEG基は、500～2500ダルトンの範囲の平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、PEG基は、800～1200ダルトンの範囲の平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、PEG基は、900～1100ダルトンの範囲の平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、PEG基は、1500～2500ダルトンの範囲の平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、PEG基は、1900～2300ダルトンの範囲の平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、PEG基は、2100～2500ダルトンの範囲の平均分子量を有する。

10

【0199】

いくつかの実施形態では、PEG基は、約1100ダルトンの平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、PEG基は、約2000ダルトンの平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、PEG基は、約800、約900、約1000、約1100、約1200、約1300、約1400、約1500、約1600、約1700、約1800、約1900、約2000、約2100、約2200、約2300、約2400または約2500ダルトンの平均分子量を有する。

【0200】

いくつかの実施形態では、PEG基は、約1.00～約1.50、約1.00～約1.25、または約1.00～約1.10の多分散性指数(PDI)を有する。いくつかの実施形態では、PEG基は、約1.05の多分散性指数(PDI)を有する。用語「多分散性指数」とは、あるポリマー試料中の分子量の分布の指標である。多分散性指数(PDI)は、重量平均分子量(M_w)を数平均分子量(M_n)で割ったものであり、ポリマーのバッチ内での個々の分子量の分布を示す。多分散性指数(PDI)は、1以上の値を有するが、ポリマーが、均一な変化長および平均分子量に近づくと、多分散性指数(PDI)は1により近くなる。

20

【0201】

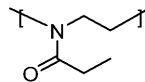
PEG基は、直鎖状であっても分岐状であってもよい。所望であれば、エンドキャップPEG基を使用し得る。いくつかの実施形態では、PEG基は、メトキシ末端PEGである。

30

【0202】

いくつかの実施形態では、親水性ポリマー基は、PEOX基である。いくつかの実施形態では、デンドリマーは、デンドリマー部分の表面構成ユニットに共有結合により連結している複数のPEOX基を含む。PEOX基とは、ポリエチルオキサゾリン基、すなわち、式：

【化53】



40

の繰り返し単位を含む基である。

【0203】

PEOX基は、エチルオキサゾリンの重合によって產生できるため、この名前が付けられた。本開示のデンドリマーを產生するために使用されるPEOX材料は、典型的には、分子量にある程度のばらつき(すなわち、±10%)を有するPEOXの混合物を含み、したがって、分子量が指定される場合、それは、典型的には、PEOX組成物の平均分子量の近似値である。いくつかの実施形態では、第2の末端基は、少なくとも750ダルトン、少なくとも1000ダルトン、または少なくとも1500ダルトンの平均分子量を有するPEOX基を含む。いくつかの実施形態では、第2の末端基は、750ダルトン～2

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50



50

50

50

50



50

50

50

50



の繰り返し単位を含む基を含む。

【0210】

いくつかの実施形態では、ポリサルコシン基は、構成ユニット中に存在する窒素原子とポリサルコシン基中に存在するアシル基の炭素原子との間に形成されるアミド連結を介して構成ユニットに付着している。いくつかの実施形態では、親水性ポリマー基は、少なくとも750ダルトン、少なくとも1000ダルトン、または少なくとも1500ダルトンの平均分子量を有するポリサルコシン基を含む。いくつかの実施形態では、第2の末端基は、750ダルトン～2500ダルトン、または1000ダルトン～2000ダルトンの範囲の平均分子量を有するポリサルコシン基を含む。

【0211】

多くの場合、デンドリマー表面で官能基化されているデンドリマーの集団は、官能基のランダムな化学量論およびトポロジーを含む。例えば、例えば64の反応性表面基を含むデンドリマー-標的化剤複合体の集団を、1つ以上の反応性官能基と反応させることにより、官能化されたデンドリマーの多様な集団となり、いくつかのデンドリマーは、他のものよりも多くの官能基を含むことになり得る。反応性官能基との反応に利用できる複数の異なる表面基がある場合には、異なる表面トポロジーを有するデンドリマーの幅広い分布も得ることができる。

【0212】

本発明のデンドリマー-標的化剤複合体、中間体、およびプロセスは、表面構成ユニットに共有結合により付着させることにより、治療剤の高負荷が可能になり得る。このようなデンドリマー-標的化剤複合体は、治療有効レベルの治療剤を投与後長時間にわたって放出することが容易になり、その結果、必要とされる投与頻度および／または投与数を減少させ得る。また、本発明のデンドリマー-標的化剤複合体は、治療剤をその作用部位に標的化して送達することを可能にし得る。その結果、そのようなデンドリマー-標的化部分剤は、細胞傷害性活性などのオフターゲット活性を低減することができる。

【0213】

デンドリマー-標的化剤複合体の内在化

デンドリマー-標的化剤複合体は、標的となる抗がん剤療法を提供する。複合体の有益な特性は、少なくとも部分的には、MMAE治療剤を含む例示の複合体が標的細胞に迅速に内在化することが観察されることと関連していると理解される。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、HER2発現細胞内に内在化する。

【0214】

本明細書で使用されるとき、「内在化」という用語は、デンドリマー-標的化剤複合体の細胞内へのエンドサイトーシスを指す。デンドリマー-標的化剤複合体が、標的HER2発現がん細胞上のHER2受容体の特異的に探し出して結合し、迅速に内在化させる能力は、減少した量の複合体が、血漿中で循環していることを意味する。このように、MMAEのような超細胞傷害性部分などの治療剤が、HER2が過剰に発現している部位（例えば、腫瘍細胞）以外で、デンドリマー-標的化剤複合体から望ましくない切断を受ける機会が減少し、かつ、対象において、治療剤の非特異的放出に関連する副作用または毒性の可能性が低下することになる。対照的に、超細胞傷害性部分などの治療剤を同等用量投与することにより、治療剤を単独で安全に投与できない点まで極端な毒性を引き起こす可能性がある。例えば、MMAEおよびMMAFは、毒性が強すぎるため、対象に単独で安全に投与することができないことが理解されている。したがって、デンドリマー-標的化剤複合体は、MMAEおよびMMAFなどの超細胞傷害剤などの治療剤を送達するための、より安全な手段を提供すると考えられる。

【0215】

いくつかの実施形態では、複合体の投与により、同等用量の遊離治療剤を投与した場合と比較して、副作用の軽減がもたらされる。いくつかの実施形態では、同等用量の遊離治療剤を投与した場合と比較して、複合体を投与することにより、治療剤の血漿中濃度（例えば、Cmax、または投与後の特定の時点（例えば、1時間、6時間、12時間、24

10

20

30

40

50

時間、48時間)での濃度)の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%の低下がもたらされる。

【0216】

いくつかの実施形態では、治療剤は、超細胞傷害性(例えばMMAE、MMAF)であり、デンドリマー-標的化剤複合体を投与することにより、同等用量の遊離治療剤の投与と比較して、治療剤の血漿中濃度(例えば、C_{max}、または投与後の特定の時点(例えば、1時間、6時間、12時間、24時間、48時間)での濃度)の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%の低下がもたらされる。

10

【0217】

したがって、HER2発現細胞を死滅させる方法が提供され、本方法は、本明細書で定義された複合体をHER2発現細胞と接触させて、これにより、複合体を細胞内に内在化させ、それによって、治療剤がHER2発現細胞を死滅させることを含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、超細胞傷害性(例えば、MMAE、MMAF)である。いくつかの実施形態では、複合体(例えば、超細胞傷害性含有複合体)は、エンドサイトーシスによって、細胞内に内在化される。

【0218】

本開示の複合体は、*in vivo*がん試験、すなわち異種移植試験において有効であることがわかっている。比較的小さいサイズ(例えば、全体としての低分子量の複合体)であることが、腫瘍組織への透過を支援し、本治療法の効果を支援すると考えられる。したがって、いくつかの実施形態では、複合体の分子量は、最大で約120kDa、最大で約100kDa、最大で約80kDa、最大で約60kDa、最大で約50kDa、最大で約45kDa、最大で約40kDaの範囲にある。

20

【0219】

組成物

いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、組成物、好ましくは医薬組成物として提示される。

【0220】

デンドリマーを産生するための合成プロセスの性質の結果として、所定の組成物中に存在するデンドリマー-標的化剤複合体間の分子組成に、若干のばらつきが存在し得ることが理解されるであろう。例えば、上記のとおり、デンドリマー-標的化剤複合体を産生するために使用される1つ以上の合成ステップが、完了するまで完全には進行しない場合があり、その結果、すべてが同数の治療剤部分、標的化剤を含まない、または不完全な世代の構成ユニットを含むデンドリマー-標的化剤複合体が存在することになり得る。

30

【0221】

一例では、組成物は、すべてが同数の治療剤部分を含まない複数のデンドリマーを含む。一例では、組成物は、すべてが同数の標的化剤を含まない複数のデンドリマーを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、デンドリマーに共有結合により連結した標的化剤の平均数が1である、複数のデンドリマー-標的化剤複合体を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、デンドリマーに共有結合により連結した標的化剤の平均数が1.2である、複数のデンドリマー-標的化剤複合体を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、デンドリマーに共有結合した標的化剤の平均数が1~1.5である、複数のデンドリマー-標的化剤複合体を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、デンドリマーに共有結合した標的化剤の平均数が0.5~5である、複数のデンドリマー-標的化剤複合体を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、デンドリマーに共有結合した標的化剤の平均数が1~4である、複数のデンドリマー-標的化剤複合体を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、デンドリマーに共有

40

50

結合した標的化剤の平均数が1～1.5である、複数のデンドリマー-標的化剤複合体を含む。したがって、複数のデンドリマー-標的化剤複合体またはその薬学的に許容される塩を含む組成物が提供され、デンドリマー-標的化剤複合体は、本明細書に定義されているとおりである。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体と、治療上許容される賦形剤とを含む治療用途の組成物が提供される。いくつかの実施形態では、本組成物は、非経口送達用に製剤化される。いくつかの実施形態では、本組成物は、静脈内送達用に製剤化される。いくつかの実施形態では、本組成物は、皮下送達用に製剤化される。いくつかの実施形態では、本組成物は、筋肉内注射用に製剤化される。

【0222】

本開示はまた、獣医用途およびヒト医療用途の両方用の医薬製剤または組成物を提供し、これらは、本開示の複合体またはその薬学的に許容される塩を、1つ以上の薬学的に許容される担体、および任意によりあらゆる他の治療成分、安定剤などと一緒に含む。

10

【0223】

したがって、i) 本明細書で定義された複合体、およびii) 薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬用途の組成物も提供される。

【0224】

賦形剤（複数可）は、製剤／組成物の他の成分と適合し、そのレシipientに過度に悪影響を与えないという意味で、薬学的に許容されるものでなければならない。

【0225】

いくつかの実施形態では、組成物は、注射用水および／または薬学的に許容される有機溶媒などの、薬学的に許容される溶媒を含む。

20

【0226】

本開示の組成物には、例えば、高分子賦形剤／添加剤または担体、例えば、ポリビニルピロリドン、誘導体化セルロース、例えば、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、およびヒドロキシプロピルメチルセルロース、フィコール（高分子糖類）、ヒドロキシエチルスターチ（HES）、デキストレート（例えば、シクロデキストリン（例えば、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、およびスルホブチルエーテル-β-シクロデキストリンなど）、ポリエチレングリコール、およびペクチンが含まれ得る。

【0227】

組成物としては、さらに、希釈剤、緩衝剤、クエン酸塩、トレハロース、結合剤、崩壊剤、増粘剤、滑剤、防腐剤（酸化防止剤など）、無機塩（例えば、塩化ナトリウム）、抗菌剤（例えば、塩化ベンザルコニウム）、甘味料、帯電防止剤、ソルビタンエステル、脂質（レシチンなどのリン脂質、および他のホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、脂肪酸、および脂肪酸エステル、ステロイド（例えば、コレステロールなど）、およびキレート剤（例えば、EDTA、亜鉛および他の好適なカチオンなど）を挙げることができる。本開示による組成物中での使用に好適である他の医薬賦形剤および／または添加剤は、「Remington: The Science & Practice of Pharmacy」19. sup. th ed., Williams & Williams, (1995年)、および「Physician's Desk Reference」52. sup. nd編、Medical Economics, Montvale, N. J. (1998年)、および「Handbook of Pharmaceutical Excipients」（第3版）、編、A. H. Kibbe, Pharmaceutical Press, 2000年に記載されている。

30

40

【0228】

本開示のデンドリマー-標的化剤複合体は、例えば、肺への吸入、エアロゾルによる投与、非経口（腹腔内、静脈内、皮下、筋肉内注射など）投与に好適であるものを含む組成物に製剤化させ得る。組成物は、簡便に単位剤形で提供されてもよく、また薬学の分野で周知の方法のいずれかによって調製されてもよい。すべての方法には、デンドリマー-標的化剤複合体を、1つ以上の付属成分を構成する担体と会合させるステップが含まれる。

50

一般に、組成物は、デンドリマー-標的化剤複合体を液体担体と会合させて溶液または懸濁液を形成するか、あるいは、デンドリマー-標的化剤複合体を固体、任意に粒子状生成物を形成するのに好適である製剤成分と会合させて、妥当である場合、生成物を所望の送達形態に成形することによって調製される。本開示の固形製剤は、微粒子化されている場合、典型的には、約1ナノメートル〜約500ミクロンの範囲のサイズの粒子を含む。一般に、静脈内投与を目的とした固形製剤の場合、粒子は、直径約1nm〜約10ミクロンの範囲である。組成物は、1000nm以下、例えば、5〜1000nm、特に5〜500nm、より特に5〜400nm、例えば5〜50nm、特に5〜20nmの粒子径を有するナノ粒子である本開示のデンドリマー-標的化部分複合体を含んでもよい。一例として、この組成物は、平均径5〜20nmのデンドリマー-標的化部分複合体を含む。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化部分複合体は、組成物中に多分散しており、PDIは、1.01〜1.8、特に1.01〜1.5、より特に1.01〜1.2である。一例では、デンドリマー-標的化部分複合体は、組成物中に単分散されている。

10

【0229】

いくつかの好ましい実施形態では、本組成物は、非経口送達用に製剤化される。例えば、一実施形態では、製剤は、注射前に水性ビヒクルで再構成するのに好適である滅菌凍結乾燥組成物であってもよい。

【0230】

いくつかの実施形態では、非経口投与に好適である製剤は、便利に、デンドリマー-標的化剤複合体の滅菌水性調製物を含み、これは、例えば、レシipientの血液と等張になるように製剤化させ得る。

20

【0231】

いくつかの実施形態では、本組成物は、化学療法レジメンの一部として非経口注入するために製剤化される。

【0232】

いくつかの実施形態では、本組成物は、腹腔内送達用に製剤化される。任意の好適な送達手段が使用されてもよい。例えば、いくつかの実施形態では、洗浄液またはエアロゾルによる送達であってもよい。一実施形態では、組成物は腹腔内送達用に製剤化され、悪性上皮性腫瘍（例えば、卵巣癌）、および腹膜癌腫症（例えば、胃腸、特に大腸がん、胃がん、婦人科がんおよび原発性腹膜新生物）など、腹腔内の癌がんの治療のためのものである。

30

【0233】

また、エアロゾルとして吸入により投与するために好適である医薬製剤も提供する。これらの製剤は、所望のデンドリマーまたはその塩の溶液または懸濁液を含む。所望の製剤を小チャンバーに入れ、ネブライズしてもよい。デンドリマーまたはその塩を含む複数の液滴または固形粒子を形成するために、圧縮空気または超音波エネルギーによってネブライジングを行うことができる。

【0234】

後述するとおり、本開示のデンドリマー-標的化剤複合体は、例えば、1つ以上の追加の薬学的活性剤と組み合わせて投与することができる。例えば、デンドリマー-標的化剤複合体は、さらなる薬学的活性剤と一緒に組成物中に含めて投与され得る。さらなる薬学的活性剤の例としては、化学療法剤、細胞傷害剤、低分子細胞傷害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、チェックポイント阻害剤、EGFR阻害剤、抗体療法、タキサン、およびアロマターゼ阻害剤などが挙げられる。

40

【0235】

本開示のデンドリマー-標的化剤複合体は、他の化学療法薬と一緒に投与できるのみでなく、適宜、他の医薬品と一緒に組成物中に含めて投与され得る。

【0236】

使用方法

また、本明細書では、治療有効量の本明細書で定義された複合体、または本明細書で定

50

義された複合体を含む医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、がんを治療する方法も提供する。

【0237】

また、本明細書では、がん治療用の医薬品の製造における、本明細書で定義された複合体、または本明細書で定義された複合体を含む組成物の使用を提供する。

【0238】

また、本明細書で提供されるのは、治療法に使用するための、本明細書で定義された複合体、または本明細書で定義された複合体を含む医薬組成物である。また、本明細書では、がんの治療に使用するための、本明細書で定義された複合体、または本明細書で定義された複合体を含む医薬組成物を提供する。

10

【0239】

いくつかの実施形態では、デンドリマー標的化剤複合体は、がんの治療または予防の方法、例えば腫瘍の成長を抑制するために使用される。いくつかの実施形態では、デンドリマー標的化剤複合体は、がんの治療に使用するためのものである。

【0240】

いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍である。がんは、原発性または転移性腫瘍であり得る。いくつかの実施形態では、がんは、原発性腫瘍である。いくつかの実施形態では、がんは、転移性腫瘍である。

【0241】

いくつかの実施形態では、がんは、HER2 (ERBB2とも呼ばれる) の異常または過剰発現を特徴とする。このようなHER2の異常発現または過剰発現は、例えば、乳がん、精巣がん、卵巣がん、胃がん (stomach cancer)、肺腺がん、胃がん (gastric cancer)、膵がん、唾液管がん、食道がん、および子宮がん (例えば、子宮体重症子宮内膜癌) などで生じることが知られている。いくつかの実施形態では、がんは、乳がん、精巣がん、卵巣がん、胃がん (stomach cancer)、肺腺がん、胃がん (gastric cancer)、膵がん、唾液管がん、食道がん、子宮がん (例えば、子宮体重症子宮内膜癌) からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、乳がんである。いくつかの実施形態では、がんは、精巣がんである。いくつかの実施形態では、がんは、卵巣がんである。いくつかの実施形態では、がんは、胃がんである。いくつかの実施形態では、がんは、肺腺癌である。いくつかの実施形態では、がんは、胃がんである。いくつかの実施形態では、がんは、膵がんである。いくつかの実施形態では、がんは、唾液管癌である。いくつかの実施形態では、がんは、食道がんである。いくつかの実施形態では、がんは、子宮体がんである。

20

30

【0242】

したがって、がんが、卵巣がん、乳がん、胃がん、子宮体がん、またはHER2 (すなわち、ERBB2) の異常発現または過剰発現を特徴とする別のがんからなる群から選択される、方法、使用、デンドリマー標的化剤複合体、または使用のための組成物も提供される。

【0243】

組み合わせ

薬物は、多くの場合、特に化学療法の際には、他の薬物と組み合わせて投与される。したがって、いくつかの実施形態では、デンドリマー標的化剤複合体は、1つ以上のさらなる薬学的活性剤、例えば1つ以上のさらなる抗がん剤／薬物と組み合わせて投与される。デンドリマー標的化剤複合体および1つ以上のさらなる薬学的活性剤は、同時に、続いて、または別々に投与することができる。例えば、同じ組成物の一部として、または別々の組成物を投与によって投与されてもよい。1つ以上のさらなる薬学的活性剤は、例えば、大腸がん、胃がん、膵がん、前立腺がん、または乳がんの治療法のための抗がん剤であってもよい。さらなる薬学的活性剤の例としては、化学療法剤、細胞傷害剤、低分子細胞傷害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、チェックポイント阻害剤、EGFR阻害剤、抗体療法、タキサン、およびアロマターゼ阻害剤などが挙げられる。

40

50

【0244】

用量

用語「治療有効量」とは、治療を受ける障害または状態のうちの1つ以上の症状をある程度まで緩和または予防するのに十分な量で投与されるデンドリマー-標的化剤複合体を指すことが理解されるであろう。治療有効量のデンドリマー-標的化剤複合体は、例えば、投与されたデンドリマー-標的化剤複合体の量に基づくように称され得る。あるいは、投与されたデンドリマー-標的化剤複合体を理論的に送達できる治療剤の量、例えば、デンドリマー-標的化剤複合体への治療剤の添加に基づいて決定され得る。

【0245】

デンドリマー-標的化剤複合体は、任意の好適な経路で投与されてもよく、例えば、デンドリマー-標的化剤複合体は、静脈内投与されてもよい。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、IVボラスとして送達される。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、0.5～60分の範囲、または0.5～15分の範囲、または0.5～5分の範囲の期間にわたってIV投与させる。別の例では、デンドリマー-標的化剤複合体は、腹腔内投与され得る。投与経路は、例えば、対象が有する疾患または障害を標的にしてもよい。例えば、いくつかの実施形態では、疾患または障害は、婦人科がんまたは胃腸がんなどの腹腔内悪性腫瘍であってもよく、デンドリマー-標的化剤複合体は、腹腔内投与されてもよい。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、悪性上皮性腫瘍（例えば、卵巣がん）または腹膜癌腫症（例えば、胃腸特に大腸がん、胃がん、婦人科がん、および原発性腹膜新生物）など、腹膜腔のがんの治療のためのものであってもよく、デンドリマー-標的化部分複合体は、腹腔内投与される。

【0246】

いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体の投与量は、2～100 mgの活性剤/m²、2～50 mgの活性剤/m²、2～40 mgの活性剤/m²、2～30 mgの活性剤/m²、2～25 mgの活性剤/m²、2～20 mgの活性剤/m²、5～50 mgの活性剤/m²、10～40 mgの活性剤/m²、15～35 mgの活性剤/m²、10～20 mg/m²、20～30 mg/m²、または25～35 mgの活性剤/m²を送達させるのに十分である。マウスの活性剤10 mg/kgの用量は、ヒトの30 mg/m²の用量にほぼ対応するものとする（FDA guidance 2005）。（ヒトのmg/kg用量をmg/m²に変換するには、37を乗じてよい（FDAガイダンス 2005））。

【0247】

いくつかの実施形態では、治療有効量のデンドリマー-標的化剤複合体を、それを必要とする対象に、所定の頻度で投与する。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、1～4週間に1回投与される投与レジメンに従って、それを必要とする対象に投与される。いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、3～4週間に1回投与される投与レジメンに従って、それを必要とする対象に投与される。

【0248】

本開示の標的化複合体は、制御された方法で治療剤を提供する。複合体からの治療剤の放出を制御することにより、循環する治療剤のレベル（例えば、超細胞傷害性）も制御することができる。例えば、治療剤の最大血漿濃度は、同等量の遊離治療剤の投与から得られた結果に比べて、かなり低くなり得る。いくつかの実施形態では、複合体の投与により、同等用量の遊離治療剤を投与した場合と比較して、放出された治療剤の最大血漿濃度が、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、または少なくとも80%低下する。

【0249】

複合体の調製

デンドリマー-標的化剤は、実施例に記載されているものなど、任意の好適な合成経路を用いて、調製され得る。

【0250】

いくつかの実施形態では、デンドリマー-標的化剤複合体は、
HER2 標的化剤を含む第1の中間体と、デンドリマーである第2の中間体とを反応させることを含むプロセスによって製造され：

第1の中間体は、最大約80 kDaの分子量を有し、抗原結合部位を含むペプチド部分であって、標的化剤は、スパーサー前駆体基に共有結合により付着しており、スパーサー前駆体基が、第1の反応性基を含み、

第2の中間体は、

i) コアユニット (C)、および

ii) 構成ユニット (BU) を含み、各構成ユニットが、リジン残基またはその類似体であり、

コアユニットが、アミド連結を介して、少なくとも2つの構成ユニットに共有結合により付着しており、各アミド連結が、コアユニット内に存在する窒素原子と構成ユニット内に存在するアシル基の炭素原子との間で形成される、デンドリマーと；

デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している治療剤と；

デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している親水性ポリマー基とを含み、

第2の中間体は、第2の反応性基を含み、

第1および第2の反応性基は、HER2 標的化剤をデンドリマーに共有結合により連結させるために、互いに反応するのに好適であるように相補的である。

【0251】

また、本開示は、デンドリマー-標的化剤複合体の合成に有用な中間体を提供する。したがって、最大約80 kDaの分子量を有し、抗原結合部位を含むペプチド部分であるHER2 標的化剤を含むデンドリマー-標的化剤複合体を調製するための中間体も提供され、ここで、標的化剤は、スパーサー前駆体基に共有結合により付着しており、スパーサー前駆体基は、デンドリマー中間体上に存在する相補的な反応性基との反応に好適である反応性基を含む。

【0252】

いくつかの実施形態では、標的化剤は、非天然アミノ酸残基を介して、スパーサー前駆体基に共有結合により付着している。いくつかの実施形態では、標的化剤は、トリアゾール部分（例えば、アジドフェニルアラニンなどのアジド含有非天然アミノ酸と、DBCO [ジベンジルシクロオクテン] などのアルキン含有基との反応によって生成される）を介して、スパーサー前駆体基に共有結合により付着している。

【0253】

いくつかの実施形態では、スパーサー前駆体基は、PEG、PEOX、またはポリアミノ酸（例えば、ポリサルコシン）基などの1つ以上のオリゴマーまたはポリマー基を含む。例えば、2～100の-CH₂CH₂O-単位のPEG基を含んでもよい。

【0254】

いくつかの実施形態では、スパーサー前駆体基上に存在する反応性基は、アルケン基であり、例えば、テトラジン含有基との反応に好適である反応性アルケンである。いくつかの実施形態では、反応性基は、トランス-シクロオクテン基である。

【0255】

本開示は、以下の番号の付いた条項にも関する。

【0256】

1. デンドリマー-標的化剤複合体であって、

a)

i) コアユニット (C)、および

ii) 構成ユニット (BU) を含むデンドリマーであって、各構成ユニットが、リジン残基またはその類似体であり、

コアユニットが、アミド連結を介して、少なくとも2つの構成ユニットに共有結合により付着しており、各アミド連結は、コアユニット内に存在する窒素原子と構成ユニット内に

10

20

30

40

50

存在するアシル基の炭素原子との間で形成される、デンドリマーと；

b) 最大約 80 kDa の分子量を有し、かつ抗原結合部位を含むペプチド部分であり、スパーサー基によってデンドリマーに共有結合により連結している HER2 標的化剤と；

c) デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している治療剤と；

d) デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している PEG または PEO X 基とを含む。

2. ペプチド部分が、重鎖抗体、Fab、Fv、scFv、またはシングルドメイン抗体から選択される、条項 1 に記載の複合体。

3. ペプチド部分が、重鎖可変 (V_H) ドメインを含むか、または重鎖可変 (V_H) ドメインからなる、条項 1 または 2 に記載の複合体。

4. ペプチド部分が、軽鎖可変 (V_L) ドメインを含むか、または軽鎖可変 (V_L) ドメインからなる、条項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の複合体。

5. 標的化剤が、約 5 kDa ～ 約 30 kDa の分子量を有する、条項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の複合体。

6. 標的化剤が、約 5 kDa ～ 約 15 kDa の分子量を有する、条項 5 に記載の複合体。

7. 標的化剤が、約 10 kDa ～ 約 16 kDa の分子量を有する、条項 6 に記載の複合体。

8. 標的化剤が、120 未満のアミノ酸残基を含む、条項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の複合体。

9. 標的化剤が、本明細書で定義されているアミノ酸配列のいずれかを含むか、またはそれらからなる、条項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の複合体。

10. 標的化剤とスパーサー基との間の共有結合による連結が、標的化剤前駆体およびスパーサー基前駆体上に存在する相補的反応性官能基間の反応によって形成される、条項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の複合体。

11. 標的化剤前駆体が、非天然アミノ酸残基を含み、非天然アミノ酸残基が反応性官能基を含む側鎖を有する、条項 10 に記載の複合体。

12. 非天然アミノ酸残基が、4-アジドフェニルアラニン残基である、条項 11 に記載の複合体。

13. 標的化剤が、標的化剤の C 末端を介して、スパーサー基に共有結合により連結している、条項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の複合体。

14. スパーサー基前駆体が、アルキン基である反応性官能基を含む、条項 10 ～ 13 のいずれか一項に記載の複合体。

15. アルキン基が、ジベンゾシクロオクチン基である、条項 14 に記載の複合体。

16. 治療剤が、超細胞傷害剤である、条項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の複合体。

17. 治療剤が、アウリスタチンまたはメイタンシノイドである、条項 16 に記載の複合体。

18. 治療剤が、モノメチルアウリスタチン E である、条項 17 に記載の複合体。

19. 治療剤が、モノメチルアウリスタチン F である、条項 17 に記載の複合体。

20. 治療剤が、リンカーを介してデンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している、条項 1 ～ 19 のいずれか一項に記載の複合体。

21. 治療剤が、切断可能なリンカーを介してデンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している、条項 1 ～ 20 のいずれか一項に記載の複合体。

22. 切断可能なリンカーが、Val-Cit-PAB 基を含む、条項 21 に記載の複合体。

23. デンドリマーの表面構成ユニットに共有結合により連結している PEG 基を含む、条項 1 ～ 22 のいずれか一項に記載の複合体。

24. PEG 基が、約 500 ～ 約 2500 g/mol の範囲の平均分子量を有する、条項 23 に記載の複合体。

25. スパーサー基が、PEG 基を含む、条項 1 ～ 24 のいずれか一項に記載の複合体

10

20

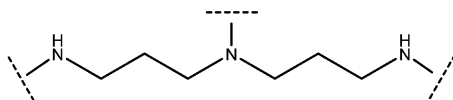
30

40

50

。

26. コアユニットが、構造
【化57】



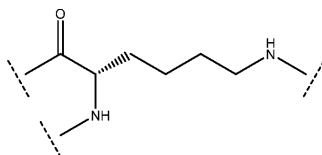
を含む、条項1～25のいずれか一項に記載の複合体。

27. デンドリマーが、1世代～5世代の構成ユニットを有する、条項1～26のいずれか一項に記載の複合体。

10

28. デンドリマーが3世代の構成ユニットを有する、条項27に記載の複合体。

29. 構成ユニットが、それぞれ、
【化58】



である、条項1～28のいずれか一項に記載の複合体。

20

30. さらなる活性剤と組み合わせて投与するための、条項1～29項のいずれか一項に記載の複合体。

31. 複合体が、HER2発現細胞内に内在化する、条項1～30のいずれか一項に記載の複合体。

32. 複合体の投与により、同等用量の遊離治療剤の投与と比較して、副作用の軽減がもたらされる、条項1～31のいずれか一項に記載の複合体。

33. 複合体の投与により、同等用量の遊離治療剤の投与と比較して、放出された治療剤の最大血漿濃度の少なくとも50%の減少がもたらされる、条項1～32のいずれか一項に記載の複合体。

34. 条項1～33のいずれか一項に記載の複数の複合体を含む組成物。

30

35.

i) 条項1～34のいずれか一項に記載の複合体と；

ii) 薬剂的に許容される賦形剤と、

を含む医薬組成物。

36. 組成物が、非経口送達用に製剤化される、条項34または35に記載の組成物。

37. がんの治療に使用するための、条項1～33のいずれか一項に記載の複合体、または条項34～36のいずれか一項に記載の組成物。

38. 治療有効量の条項1～33のいずれか一項に記載の複合体または条項34～37のいずれか一項に記載の組成物を、それを必要としている対象に投与することを含む、がんを治療する方法。

40

39. がんの治療のための医薬品の製造における、条項1～33のいずれか一項に記載の複合体の使用、または条項34～38のいずれか一項に記載の組成物の使用。

40. がんが、卵巣がん、乳がん、胃がん、子宮がん、またはERBB2遺伝子の異常発現を特徴とする別のがんである、条項37～39のいずれか一項に記載の方法、使用、または使用のための複合体もしくは組成物。

41. HER2発現細胞を死滅させる方法であって、

条項1～33のいずれか一項に記載の複合体を、HER2発現細胞と接触させて、これにより、複合体を細胞内に内在化させ、それによって治療剤がHER2発現細胞を死滅させることを含む、方法。

【0257】

50

本開示は、以下の実施例によってさらに説明される。以下の説明は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、上記の説明に関して限定することを意図するものではないことを理解されたい。

【0258】

実施例

本明細書では、デンドリマー複合体の合成に関連して、以下の命名法を使用している。

【表1-1】

略称	名前	構造 ¹
NEOEON	2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]-エチルアミン	
[Boc]NEOEON	t-ブトキシカルボニルアミノ-3,6-オキサ-8-アミノオクタン	
Su(NPN) ₂		
Lys	リジン	
DBL-oPNP	ジBocリジンのp-ニトロフェニル活性エステル	
NH ₂ , TFA	脱保護分子の表面のアミン基をTFA塩として表す	
Boc	t-ブチルオキシカルボニル	
(NPN) ₂ [Boc] ₂		
HO-Su(NPN) ₂ [Boc] ₂		
oPNPO-Su(NPN) ₂ [Boc] ₂		
MeOGly, HCl		
NHGluc-Val-Cit-PAB-MMAE または		

10

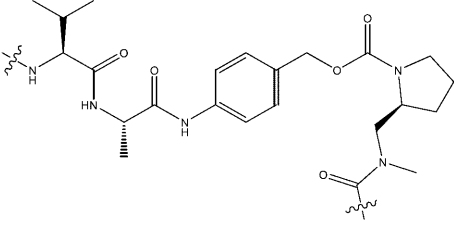
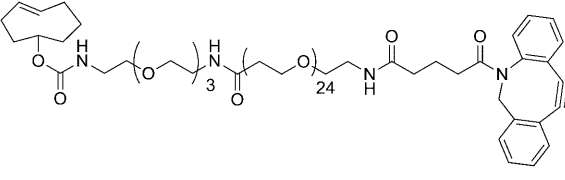
20

30

40

50

【表 1 - 2】

略称	名前	構造 ¹
NHGl u-vc- PAB-		
Val-Ala- PAB-P-トリガ -NMeCO		
DBCO-Glu- NHPEG ₂₄ CO- NHPEG ₃ -TCO / DBCO-PEG ₁₂ - TCO		

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

MeCN	アセトニトリル
LCMS	液体クロマトグラフィー質量分析法
ESI MS	エレクトロスプレー式質量分析法
UPA	固有の連結ポイント
Lys	リジン
Boc	ベンジルオキシカルボニル
PBS	リン酸塩緩衝生理食塩水
DIPEA	ジイソプロピルエチルアミン
PEG	ポリエチレングリコール
NH-PEG 別名：NH-COPEG-OMe	NH-COP ポリエチレングリコール-OMe
PyBop	ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリー ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホ スフェート
SEC	サイズ排除クロマトグラフィー
TFA	トリフルオロ酢酸
NMM	N-メチルモルホリン
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
DMF	ジメチルホルムアミド
DBL-oPNP	ジ-Boc-(L)-リジンパラ-ニトロフェニル エステル
NHFmoc	NH-フルオレニルメチルオキシカルボニル
NHBoc	NH-tert-ブチルオキシカルボニル
MMAE	モノメチルアウリスタチン
MMAF (OMe)	モノメチルアウリスタチン F (メチルエス テル)
N (PNBoc) ₂	ジB o cジプロピレントリアミン
TEA	トリエチルアミン
NMR	核磁気共鳴
N ₂	窒素
D ₂ O	酸化重水素
CD ₃ OD	重水素化メタノール
Glu	グルタミン酸誘導体
Val	バリン
Arg	アルギニン
Ala	アラニン
Cit	シトルリン
PAB	パラ-アミノベンジルカルバメート
DGA	ジグリコール酸
R _t	保持時間
DMAP	4- (ジメチルアミノ) ピリジン
NHS	N-ヒドロキシスクシンイミド
DCM	ジクロロメタン
EtOAc	酢酸エチル
THF	テトラヒドロフラン
N ₃	アジド
MAL	マレイミド
BCN	ビスクロノニーン含有リンカー
MAL-EDA-BCN	マレイミド-エチレンジアミン-ビスクロ ノニーン

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

DBC0	ジベンジルシクロオクチン含有リンカー
UPA	リンカーまたは標的化剤が付着しているか、または付着させ得る選択された連結点を有するデンドリマー
BCN トリアゾロ	ビスクロ [6, 1, 0] ノニン-[1, 2, 3] トリアゾール
DBC0 トリアゾロ	ジベンゾシクロオクチン-[1, 2, 3] トリアゾロ
MPED	N-(3-マレイミドプロピオン酸)-エチレンジアミン
DTX	ドセタキセル
t-BuOH	ターシャリーブタノール
TBTA	トリス[(1-ベンジル-1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル)メチル]アミン
DFO	デフェロキサミン
CTX	カバジタキセル
SN-38	7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン

10

20

【0259】

HPLC MS (質量分析計) および NMR の装置詳細:

HPLC-Waters 2795、2996 ダイオードアレイ検出器 (DAD)

MS-Waters ZQ4000 (ESIプローブ付き)、インレットフローは、MS に約 50 μ L / 分となるように分岐。

【0260】

質量分析データは、示されているとおり、ポジティブまたはネガティブ・エレクトロスプレー・イオン化モードで得た。生データは、Waters Corporation により提供された Mass Lynx ソフトウェア v 4.0 に実装されている Maximum Entropy アルゴリズム (MaxEnt) を用いてデコンボリューションを行った。実験の詳細で報告されているデータは、理論上のゼロ電荷状態にデコンボリューションした後の観測値に対応する。

30

NMR-300 MHz Bruker.

【0261】

カルボキシ反応性デンドリマースカフォールドの調製については、特に国際公開第 2007/082331 号、国際公開第 2008/017125 号、国際公開第 2012/167309 号、国際公開第 2015/184510 号に既述されている。当業者であれば、これらの方法を用いて、適合させ、本明細書に概説されている様々なデンドリマーを調製することができる。

【0262】

以下の例では、式中の [Lys] は、デンドリマーの表面層にあるリジン構成ユニットを指す。

40

【0263】

実施例 1

一般手順 A. Boc 脱保護

氷冷して攪拌した Boc 化合物 (1.0 当量) / 水懸濁液に、TFA (40 ~ 200 当量 / Boc 基) を加えた。5 分後、氷浴を取り除き、反応混合物を室温で一晩攪拌させた。揮発性物質を真空除去し、残った水溶液をさらに水で希釈して、凍結乾燥し、定量的な収率で脱保護された生成物を得た。

【0264】

50

一般手順 B. デンドリマー表面へのリジン層の付加。

窒素雰囲気下において TFA デンドリマー (1.0 当量) / DMF 攪拌溶液に、TEA (6.0 当量 / NH₂) を加え、次いで DBL-oPNP (2.0 当量 / NH₂) を加えた。続いて得られた反応混合物を、室温で一晩攪拌させて放置した。揮発性物質を真空除去し、得られた粗物質を標準方法を用いて精製した。

【0265】

一般手順 C. HO-Lys-(α-NHBoc) (ε-NHPEG1100) ウェッジを用いたデンドリマー表面の PEG 化。

窒素雰囲気下の TFA デンドリマー (1.0 当量) / DMF 攪拌溶液に、PyBOP (2.0 当量 / NH₂) および DIPEA (8.0 当量 / NH₂) を加えた。10 分後、HO-Lys-(α-NHBoc) (ε-NHPEG1100) (1.35 当量 / NH₂) / DMF 溶液を加え、次いで、得られた反応混合物を室温で一晩攪拌した。揮発性物質を真空除去し、得られた粗物質を標準方法を用いて精製した。

10

【0266】

一般手順 D. HO-Lys-(α-NHBoc) (ε-NHFmoc) ウェッジでデンドリマー表面をキャッピングし、その後、Fmoc 脱保護を行う。

ステップ 1: HO-Lys-(α-NHBoc) (ε-NHFmoc) (1.5 当量 / NH₂) および NMM (2.5 当量 / NH₂) / DMF 攪拌溶液に、PyBOP (1.4 当量 / NH₂) を加えた。その後、得られた反応混合物を室温で 15 分間攪拌し、TFA-デンドリマー (1.0 当量) および NMM (2.5 当量 / NH₂) / DMF 溶液を加えた。続いて得られた反応混合物を室温で 1 時間攪拌させて放置した後、氷冷 MeCN にゆっくりと加え、15 分間攪拌した。得られた固体を濾過により回収し、MeCN で洗浄 (3 回) 後、凍結乾燥した。

20

【0267】

ステップ 2: Fmoc/Boc デンドリマー (1.0 当量) を含む DMF 溶液に、ピペリジン (21 eq / Fmoc) を加えた。この溶液を室温で 90 分間攪拌後、氷冷 Et₂O にゆっくりと加えた。15 分後、析出固体を濾過により回収し、Et₂O で洗浄し、H₂O に溶解して凍結保存した。

【0268】

一般手順 E. DGA-ドキシソルビンまたは DGA-ネモルビンによるデンドリマー表面のキャッピング

30

DGA-3'-NH-ドキシソルビン

【0269】

ステップ 1: DMAP (2.5 当量) / DMF 溶液を、Dox.HCl (1.0 当量) / DMF の攪拌溶液に室温で加えた。5 分後、DGA (0.9 当量) / DMF 溶液を加えた。反応は、3 時間で完了した。

【0270】

ステップ 2: 上記の反応混合物に PyBOP (2.0 当量 / デンドリマー NH₂) を加え、次いで TFA-デンドリマー (アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂ [Lys]₄ [(α-NH₂. TFA) (ε-NHPEG1100)]₄ または アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂ [Lys]₈ [(α-NH₂. TFA) (ε-NHPEG1100)]₈) (1.0 当量) および DIPEA (6.0 当量 / デンドリマー NH₂) / DMF 溶液を加えた。続いて得られた反応混合物を、室温で一晩攪拌させて放置した。揮発性物質を真空除去し、得られた粗材料を SEC により精製した。

40

【0271】

DGA-14-O-ネモルビン

ステップ 1: DMAP (2.5 当量) / DMF 溶液を、ネモルビン (1.0 当量) / DMF の攪拌溶液に室温で加えた。5 分後、DGA (0.9 当量) / DMF 溶液を加えた。反応は、3 時間で完了した。

【0272】

50

ステップ2：上記反応混合物にPyBOP（2.0当量／デンドリマー-NH₂）を加え、次いでTFA-デンドリマー（アジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂ [Lys]₂ [Lys]₄ [(α-NH₂・TFA) (ε-NHPEG₁₁₀₀)]₄ またはアジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂ [Lys]₂ [Lys]₄ [Lys]₈ [(α-NH₂・TFA) (ε-NHPEG₁₁₀₀)]₈)（1.0当量）およびDIPEA（6.0当量／デンドリマー-NH₂）／DMF溶液を加えた。続いて得られた反応混合物を、室温で一晩攪拌した放置した。揮発性物質を真空除去し、得られた粗材料をSECにより精製した。

【0273】

一般手順F．Glu-vc-PAB-MMAEまたはDGA-MMAF (OMe) によりデンドリマー表面をカップリングする。 10

アジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂ [Lys]₈ [(α-NH₂・TFA) (ε-NHPEG₅₇₀／1100／2000)]₈（1.0当量）を、DMFおよびNMM（5.0当量／NH₂）の混合物に室温で溶解させた。この溶液をHO-Glu-vc-PAB-MMAEまたはDGA-MMAF (OMe)（1.2当量／NH₂）とPyBOP（2.0当量／NH₂）に加え、室温で放置した。得られた粗材料をSECにより精製した。

【0274】

一般手順G．Dox／Pt (IV) -アセテート／MMAE／MMAFデンドリマーへのアフィボディのコンジュゲート 20

ステップ1：アフィボディタンパク質（1.0mg／mL PBS）の溶液をTCEP（50mM，39.0当量）で処理し、反応混合物を650rpmで2時間、室温で振とうさせた。得られた溶液をSECより精製した。

【0275】

ステップ2：回収した透過液を、マレイミド-ビスクロ [6.1.0] ノニーン (Mal-BCN)（20.0当量）／DMSO溶液で処理した。続いて得られた反応混合物を650rpmで2時間、室温で振とうさせた。得られた溶液をSECで精製した。

【0276】

ステップ3：アフィボディ-BCN溶液は、アジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂ [Lys]₄ [(α-DGA-3' -NH-Dox) (ε-NHPEG₁₁₀₀)]₄／PBS（858μM）溶液またはアジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂ [Lys]₈ [(α-DGA-3' -NH-Dox) (ε-NHPEG₁₁₀₀)]₈（580μM／PBS）またはアジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂ [Lys]₈ [(α-Pt (IV) -アセテート) (ε-NHPEG₁₁₀₀)]₈（903μM／PBS）またはアジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂ [Lys]₈ [(α-Glu-vc-PAB-MMAE) (ε-NHPEG₅₇₀／1100／2000)]₈（240μM／PBS）またはアジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂ [Lys]₈ [(α-DGA-MMAF (OMe)) (ε-NHPEG₅₇₀／1100／2000)]₈（365μM／PBS）（1.3当量アフィボディ-BCN／デンドリマー）で処理した。続いて得られた混合物を、室温で一晩、650rpmで振とうさせた後、DBCOアガロース（5.0当量／デンドリマー）の9.38mM（30% EtOH／水）溶液で処理した。続いて得られた懸濁液を1200rpmで室温で一晩振とうした。この懸濁液をSECより精製した。

【0277】

一般手順H．MMAEデンドリマーへのナノボディのコンジュゲート

ステップ1：リンカー（1mg）を20：80（DMSO／10mM PBS、1mL）に溶解して、リンカー（BCN-PEG₂NH-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCOまたはDBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO）の溶液を調製した。

【0278】

ステップ2：TCO-リンカー溶液（1当量）を、テトラジン官能化デンドリマー（例 50

えば、Tz-MMAE-デンドリマーまたはBHA-Tz-MMAE-デンドリマー) (1.0当量、8mg/mL) / PBS (1) 溶液に加えた。反応混合物を室温で30分間放置した。反応の完了は、ピンクのテトラジン色の消失によって示された。この反応をHPLCによってモニターした。

【0279】

ステップ3：反応が完了したら、内容物をPBSで希釈した(最終的に0.5mLになるように)。BCN/DBCO-MMAE-デンドリマー(1.0当量)の一部を、ナノボディーアジド(1.0当量、9.2mg/mL)トリス緩衝液(20mM、1mL)の溶液に加えた。得られた溶液を、RTで7時間、その後4℃で一晩放置した。ナノボディーデンドリマー構築物の精製は、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびその後のSECによって行った。

10

【0280】

実施例1a 中間体の合成

1. 1 アジド-PEG₂₄-CO [N (PNBoc)₂] 化合物1

N₂雰囲気下、アジド-PEG₂₄-酸(2.00g、1.71mmol)およびPyBOP(1.33g、2.56mmol) / DMF(20mL) 攪拌溶液に、NMM(563μL、5.12mmol)を加えた。10分後、N (PNBoc)₂(622mg、1.88mmol)を含むDMF(5mL)溶液を加え、続いて得られた反応混合物を室温で一晩攪拌させて放置した。揮発分を真空除去し、得られた油をMeCNに溶解し、分取HPLC(27-50-70%MeCN、R_t47~50分)により精製して、淡黄色の油状固体(1.37g、54%)を得た。¹H-NMR(300MHz,CD₃OD) δ(ppm): 1.44(m,18H);1.65-1.84(m,4H);2.63(t,J6.3Hz,2H);3.05(dt,J6.9and14.7Hz,4H);3.36-3.41(m,6H);3.60-3.78(m,98H)。LCMS(親水法、ギ酸緩衝液) R_t=9.32分 ESI MS(+ve) 1486.3 [M]⁺; C₆₇H₁₃₂N₆O₂₉ [M]⁺のm/z計算値:1486.8

20

【0281】

1. 2 アジド-PEG₂₄-CO [N (PNH₂.TFA)₂]、化合物2

アジド-PEG₂₄-CO [N (PNBoc)₂](1.37g、922μmol)を用いて、一般手順Aに従って調製した。凍結乾燥産物は、淡黄色状油として得られた(1.67g、119%)。

30

¹H-NMR(300MHz,D₂O) δ(ppm): 1.88-2.06(m,4H);2.74(t,J6.0Hz,2H);2.96(t,J7.2Hz,2H);3.04(a見かけ上のt,J7.5Hz,2H);3.42-3.52(m,6H);3.67-3.95(m,93H)。LCMS(親水法、TFA緩衝液) R_t=8.47分、ESI MS(+ve) 1286.0 [M]⁺; C₅₇H₁₁₆N₆O₂₅ [M]⁺のm/z計算値=1286.6

【0282】

1. 3 アジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₂ [Boc]₄、G1、化合物3

アジド-PEG₂₄-CO [N (PNH₂.TFA)₂](186mg、145μmol)を用いて、一般手順Bに従って調製した。粗材料をMeCNに溶解し、分取HPLC(30~80%MeCN、R_t33.5~36分)で精製し、淡黄色状油を得た(224mg、80%)。

40

¹H-NMR(300MHz,CD₃OD) δ(ppm):1.22-1.87(m,56H);2.64(t,J6.0Hz,2H);3.03(t,J6.6Hz,4H);3.13-3.23(m,4H);3.36-3.45(m,6H);3.60-3.69(m,100H);3.77(t,J6.0Hz,2H);3.85-3.88(m,1H);3.92-4.02(m,2H)。LCMS(疎水法、ギ酸緩衝液) R_t=6.74分; ESI MS(+ve) 1942.4, [M]⁺; C₈₉H₁₇₂N₁₀O₃₅⁺ [M+H]⁺のm/z計算値=1942.4。

【0283】

1. 4 アジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₂ [NH₂.TFA]₄、G1、化合物4

50

アジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂ [Lys]₂ [Boc]₄ (220 mg, 1.13 μmol)] を用いて、一般手順 A に従って調製した。凍結乾燥産物は、淡黄色状油として得られた (251 mg, 111%)。LCMS (親水法、ギ酸緩衝液) R_t = 6.49 分, ESI MS (+ve) 1542.1 [M]⁺; C₆₉H₁₄₀N₁₀O₂₇ [M]⁺ の m/z 計算値 = 1541.90.

【0284】

1.5 アジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₄ [(α-Boc) (ε-NHPEG₁₁₀₀)]₄、G2、化合物 5

アジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂ [Lys]₂ [NH₂.TFA]₄ (120 mg, 60.1 μmol)] を用いて、一般手順 C に従って調製した。粗材料を MeCN/H₂O (1:1) に溶解し、分取 HPLC (20~70% MeCN, R_t 31~32.5 分) で精製して、本産物を淡黄色状油として得た (244 mg, 59%)。

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.24-1.91 (m, 74H); 2.42-2.47 (m, 8H); 2.62-2.66 (m, 2H); 3.13-3.25 (m, 12H); 3.36 (s, 12H); 3.52-3.78 (m, 490H); 3.85-3.88 (m, 4H); 3.94-4.11 (m, 4H); 4.25-4.31 (m, 2H)。LCMS (親水法, ギ酸緩衝液) R_t = 8.70 分; ESI MS (+ve) 1714.0 [M+4H]⁴⁺/4, 1371.7 [M+5H]⁵⁺/5; 1143.0 [M+6H]⁶⁺/6, 980.0 [M+7H]⁷⁺/7。6852 に変換する。

【0285】

1.6 アジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₄ [(α-NH₂.TFA) (ε-NHPEG₁₁₀₀)]₄、G2、化合物 6

アジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂ [Lys]₄ [(α-Boc) (ε-NHPEG₁₁₀₀)]₄ (244 mg, 35.6 μmol)] を用いて、一般手順 A に従って調製した。凍結乾燥粗産物を水に再溶解し、分取 HPLC (22~70% MeCN, 0.1% TFA, R_t 27 分) により精製し、本産物が淡黄色の粘性固体として得られた (173 mg, 67%)。

¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 1.31-1.98 (m, 40H); 2.51-2.56 (m, 8H); 2.72 (broad t, J6.0 Hz, 2H); 3.16-3.30 (m, 16H); 3.40 (s, 12H); 3.46-3.53 (m, 4H); 3.62-3.97 (m, 490H); 4.03 (t, J6.6 Hz, 2H); 4.24-4.29 (m, 2H)。LCMS (親水法, TFA 緩衝液) R_t = 9.85 分; ESI MS (+ve) 1614.1 [M+4H]⁴⁺/4, 1291.6 [M+5H]⁵⁺/5; 1076.5 [M+6H]⁶⁺/6。6452 に変換する。

【0286】

1.7 アジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₄ [Boc]₈、G2、化合物 7

アジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₂ [NH₂.TFA]₄ (117 mg, 58.6 μmol)] を用いて、一般手順 B に従って調製した。粗材料は、淡黄色状油として得られた (167 mg, 100%)。LCMS (疎水法 4.1a, ギ酸緩衝液) R_t = 8.35 分; ESI MS (+ve) 1328.6 [M+2H]²⁺/2-Boc; C₁₃₃H₂₅₂N₁₈O₄₇ [M]⁺ の m/z 計算値 = 2855.6。

【0287】

1.8 アジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₄ [NH₂.TFA]₈、G2、化合物 8

アジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₄ [Boc]₄ (167 mg, 58.6 μmol)] を用いて、一般手順 A に従って調製した。粗水溶液を分取 HPLC (10~60% MeCN, 0.1% TFA 緩衝液; R_t 27~29 分) によって精製し、本生成物を非常に淡黄色の粘性固体として得た (2 ステップにおいて 124 mg, 71%)。¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 1.30-1.96 (m, 42H); 2.71 (t, J6.0 Hz, 2H); 2.98-3.04 (m, 8H); 3.13-3.30 (m, 8H); 3.36-3.53 (m, 7H); 3.68-3.84 (m, 100H); 3.93 (t, J6.6 Hz, 2H); 4.04 (t, J6.6 Hz, 2H); 4.25 (t, J7.2 Hz, 2H)。LCMS (親水法

10

20

30

40

50

、TFA緩衝液) $R_t = 7.76$ 分, ESI MS (+ve) 1028.3 $[M+2H]^2+ / 2$, 685.9 $[M+3H]^3+ / 3$; $C_{93}H_{190}N_{18}O_{31}^{2+} [M+2H]^2+ / 2$ に対する m/z 計算値: 1028.3, $C_{93}H_{191}N_{18}O^{313+} [M+3H]^3+ / 3$ に対する m/z 計算値: 685.9.

【0288】

1.9 アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-Boc) (ε-NHPEG1100)]₈, G3, 化合物9

アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₄ [NH₂.TFA]₈ (123mg, 41.5 μmol) を用いて一般手順Cに従って調製し、粗材料を褐色の油として得た。LCMS(親水法、ギ酸緩衝液) $R_t = 11.52$ 分, ESI MS (+ve) 2113 $[M+6H]^6+ / 6$, 1812 $[M+7H]^7+ / 7$, 1585 $[M+8H]^8+ / 8$, 1409 $[M+9H]^9+ / 9$, 1268 $[M+10H]^{10+} / 10$, 1153 $[M+11H]^{11+} / 11$, 1057 $[M+12H]^{12+} / 12$. 12673に変換する。

10

【0289】

1.10 アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-TFA) (ε-NHPEG1100)]₈, G3, 化合物10

アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-Boc) (ε-NHPEG1100)]₈ (526mg, 41.5 μmol) を用いて、一般手順Aに従って調製した。粗水溶液を分取HPLC (3~60% MeCN, 0.1% TFA緩衝液; R_t 38~39分) によって精製し、本生成物を淡黄色の粘性固体として得た (2ステップにおいて359mg, 68%)。LCMS (親水法, TFA緩衝液) $R_t = 10.27$ 分、11880に変換される。

20

【0290】

1.11 アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-Boc) (ε-Fmoc)]₈, G3, 化合物11

アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₄ [NH₂.TFA]₈ (105mg, 35.4 μmol) を用いて、一般手順Dに従って調製した。生成物は、白色固体として得られた (166mg, 83%)。¹H-NMR (300MHz, d6-DMSO) δ (ppm): 1.23-1.49 (m, 160H); 2.73-2.95 (m, 36H); 3.44-3.60 (m, 94H); 3.83 (m, 8H); 4.05-4.28 (m, 29H); 6.33-6.90 (m, 8H, NH); 7.24-7.87 (m, 84H)。

30

【0291】

1.12 アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-Boc) (ε-NH₂)]₈, G3, 化合物12

アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-Boc) (ε-Fmoc)]₈ (169mg, 29.9 μmol) を用いて、一般手順Dに従って調製し、綿毛状の固体を得た (95mg, 82%)。

¹H-NMR (300MHz, d4-MeOH) δ (ppm): 1.46-1.49 (m, 160H); 2.69 (brs, 14H); 3.09-3.19 (m, 18H); 3.38-3.41 (m, 8H); 3.55-3.78 (m, 96H); 3.89-4.33 (m, 14H)。

【0292】

1.13 アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-Boc) (ε-NHPEG570)]₈, G3, 化合物13およびアジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-NH₂.TFA) (ε-NHPEG570)]₈, G3, 化合物14

40

mPEG₅₇₀-CO₂H (205mg, 348 μmol)、NMM (60 μL, 546 μmol) およびPyBOP (171mg, 329 μmol) DMF (1.5mL) / DMF溶液に、アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-Boc) (ε-NH₂)]₈ (0.5mL) / DMFを加えた。続いて得られた反応混合物を室温で一晩攪拌させ、その後、真空濃縮し、水に溶解させて、TFAで処理し、室温で一晩攪拌した。混合物が濃縮され、水に取り込まれた後、Millipore Centrifugation filtration unit (3K MWCO regenerated cellulose) を用いて精製し、凍結乾燥生成物 (2ステップで68%) を

50

オフホワイトの綿毛状材料として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, D_2O) δ (ppm): 1.33-1.90(m, 88H); 2.51-2.55(m, 16H); 2.67-2.75(m, 4H); 3.16-3.23(m, 32H); 3.40-3.53(m, 32H); 3.62-4.03(m, 470H); 4.21-4.39(m, 7H)。LCMS(親水法, ギ酸緩衝液) R_t =7.50分。

【0293】

1. 14 アジド-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -Boc)(ϵ -NHPEG₂₀₀₀)]₈、G3、化合物15

アジド-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -Boc)(ϵ -NH₂)]₈(95.0mg, 24.5 μ mol)/DMF(4mL) 攪拌溶液に、DIPEA(85 μ L, 488 μ mol)を加え、続いてmPEG2000-NHS(720mg, 313 μ mol)を加えた。続いて得られた反応混合物を室温で一晩攪拌した。粗残渣を水に溶解し、限外濾過(5K、Pall PES膜)により精製した。保持液を回収し、凍結乾燥させてオフホワイトの綿毛状材料を得た(76%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, D_2O) δ (ppm): 1.33-1.63(m, 160H); 3.05-3.15(m, 35H); 3.29(s, 24H); 3.35-3.96(m, 1370H); 4.13-4.19(m, 6H)。LCMS(親水法, ギ酸緩衝液) R_t =11.24分

10

【0294】

1. 15 アジド-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH₂.TFA)(ϵ -NHPEG₂₀₀₀)]₈、G3、化合物16

一般手順Aに従って、アジド-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -Boc)(ϵ -NHPEG₂₀₀₀)]₈(40.0mg, 1.87 μ mol)を用いて調製し、生成物をオフホワイトの綿毛状材料として得た(35mg, 88%)。

20

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, D_2O) δ (ppm): 1.28-1.79(m, 88H); 2.51-2.58(m, 4H); 3.04-3.18(m, 35H); 3.28(s, 24H); 3.35-3.97(m, 1348H); 4.14-4.25(m, 6H)。LCMS(親水法, ギ酸緩衝液) R_t =9.12分

【0295】

1. 16 (MeTzPh)-PEG₂₄-CO[N(PNBoc)₂] 化合物46

(MeTzPh)-PEG₂₄-CO₂H(0.402g, 0.305mmol)、PyBOP(0.205g, 0.394mmol)、およびNMM(130 μ L, 1.18mmol)/DMF(3mL) 攪拌溶液に、N₂雰囲気下でNH(PNBoc)₂(0.147g, 0.444mmol)を加えた。続いて得られた反応混合物を室温で一晩攪拌させて放置した。揮発分を真空除去し、得られた油をシリカクロマトグラフィー(5%~10% MeOH/DCM)で精製して、所望の生成物である化合物106を赤色の残渣として得た(0.474g, 95%)。

30

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1.43-1.44(m, 18H); 1.64-1.80(m, 4H); 2.63(t, J6.0Hz, 2H); 3.00(s, 3H); 3.02-3.09(m, 4H); 3.34-3.40(m, 4H); 3.58-3.77(m, 99H); 3.88-3.91(m, 2H); 4.25-4.28(m, 2H); 7.15-7.20(m, 2H); 8.46-8.51(m, 2H)。LCMS(疎水法, ギ酸緩衝液) R_T =6.20分。ESI MS(+ve) 1631.0[M+H]⁺; C₇₆H₁₄₀N₇O₃₀[M+H]⁺のm/z計算値: 1631.0。

【0296】

1. 17 (MeTzPh)-PEG₂₄-CO[N(PNH₂.HCl)₂] 化合物47

40

氷/水浴中の(MeTzPh)-PEG₂₄-CO[N(PNBoc)₂] 化合物1(0.420g, 0.258mmol)に、1.25M HCl/MeOH溶液(8mL, 10.0mmol)をゆっくりと加えた。5分後、氷浴を取り除き、続いて得られる反応混合物を室温で一晩攪拌させた。揮発分を真空除去し、生成物である化合物107を赤色の残渣として得た(0.388g, 100%)。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1.91-2.07(m, 4H); 2.68(t, J6.0Hz, 2H); 2.94-3.09(m, 7H); 3.53-3.80(m, 108H); 3.88-3.91(m, 2H); 4.25-4.28(m, 2H); 7.16-7.20(m, 2H); 8.47-8.51(m, 2H)。LCMS(親水法, ギ酸緩衝液) R_T =8.12分。ESI MS(+ve) 1430.9[M+H]⁺; C₆₆H₁₂₄N₇O₂₆[M+H]

50

⁺のm/z計算値:1430.8.

[0297]

1.18 (MeTzPh) - PEG₄CO - NH - PEG₂₄ - CO [N(PNH₂.HCl)]₂ 化合物48

H₂N - PEG₂₄ - CO [N(PNBoc)]₂ (0.418 g、0.286 mmol) / DMF (2.0 mL) 攪拌溶液に、(MeTzPh) - PEG₄ - CO₂H (0.15 g、0.344 mmol)、PyBOP (0.178 g、0.342 mmol) およびNMM (80 μL、0.727 mmol) を加えた。続いて得られた反応混合物を室温で一晩攪拌させて放置した。揮発分を真空除去し、得られた油を氷/水浴で冷却した後、1.25 M HCl / MeOH 溶液 (10.0 mL, 12.5 mmol) をゆっくりと加えた。5分後、氷浴を取り除き、続いて得られる反応混合物を室温で一晩攪拌させた。揮発分を真空除去し、得られた油をMeCN / H₂O (8 mL, 1:1) に溶解し、分取HPLC (10~50% MeCN, 0.1%ギ酸緩衝液, RT 35分) で精製して、赤色の固形化合物108 (1.37 g, 54%) を得た。

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.91-2.04 (m, 4H); 2.43 (t, J6.0 Hz, 2H); 2.68 (t, J6.0 Hz, 2H); 2.94-3.07 (m, 4H); 3.00 (s, 3H); 3.35 (t, J6.0 Hz, 2H); 3.51-3.80 (m, 119H); 3.88-3.91 (m, 2H); 4.25-4.28 (m, 2H); 7.16-7.20 (m, 2H); 8.46-8.51 (m, 2H)。LCMS (親水法, ギ酸緩衝液) RT = 8.15分。ESI MS (+ve) 1677.9 [M+H]⁺; C₇₇H₁₄₅N₈O₃₁ [M+H]⁺のm/z計算値:1678.0.

[0298]

1.19 (MeTzPh) - PEG₄CO - NH PEG₂₄ - CO [N(PN)₂ [Lys]]₂ [NH BOC] 4 G1 化合物49

N₂雰囲気下、(MeTzPh) - PEG₄CO - NH PEG₂₄ - CO [N(PNH₂.HCl)]₂ 化合物48 (0.195 g、0.111 mmol) とDBL-oPNP (0.146 g、0.312 mmol) / DMF (3.0 mL) 攪拌溶液に、NMM (125 μL、0.864 mmol) を加えた。続いて得られた反応混合物を、室温で一晩攪拌させて放置した。揮発分を真空除去し、得られた油状残渣をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (5% - 10% - 15% MeOH / DCM) で精製し、所望の生成物である化合物109を赤色の油として得た (0.186 g, 72%)。

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.28-1.87 (m, 56H); 2.43 (t, J6.0 Hz, 2H); 2.63 (t, J6.0 Hz, 4H); 3.00 (s, 3H); 3.02-3.06 (m, 4H); 3.10-3.21 (m, 4H); 3.35-3.41 (m, 6H); 3.51-3.78 (m, 110H); 3.84-3.99 (m, 4H); 4.25-4.28 (m, 4H); 7.15-7.20 (m, 2H); 8.47-8.51 (m, 2H)。LCMS (疎水法, ギ酸緩衝液) RT = 6.68分; ESI MS (+ve) 2335.3, [M+H]⁺; C₁₀₉H₂₀₁N₁₂O₄₁ + [M+H]⁺のm/z計算値 = 2335.4.

[0299]

1.20 (MeTzPh) - PEG₄CO - NH PEG₂₄ - CO [N(PN)₂ [Lys]]₂ [NH₂.HCl] 4 G1 化合物50

氷冷した (MeTzPh) - PEG₄CO - NH PEG₂₄ - CO [N(PN)₂ [Lys]]₂ [NH BOC] 4 化合物49 (0.215 g、0.0921 mmol) に、1.25 M HCl / MeOH (6.0 mL、7.50 mmol) の溶液をゆっくりと加えた。5分後、氷浴を取り除き、続いて得られる反応混合物を室温で一晩攪拌させた。揮発物を真空除去し、生成物である化合物110を赤い油として得た (0.208 g, 108%)。 ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.51-1.99 (m, 20H); 2.47 (t, J6.0 Hz, 2H); 2.67 (t, J6.0 Hz, 4H); 2.90-3.04 (m, 7H); 3.35-3.41 (m, 7H); 3.51-3.78 (m, 106H); 4.25-4.28 (m, 2H); 7.17-7.20 (m, 2H); 8.47-8.51 (m, 2H); LCMS (親水法, ギ酸緩衝液) RT = 7.28 min, ESI MS (+ve) 1934.9 [M+H]⁺; C₈₉H₁₆₉N₁₂O₃₃ [M]⁺のm/z計算値 = 1935.2.

[0300]

10

20

30

40

50

1. 21 (MeTzPh) - PEG₄CO - NHPEG₂₄ - CO [N(PN)₂]
[Lys]₄ [NHBOc]₈ G2 化合物 51

N₂ 雰囲気下、(MeTzPh) - PEG₄CO - NHPEG₂₄ - CO [N(PN)₂]
[Lys]₂ [NH₂·HCl]₄ 化合物 50 (0.192 g、0.0822 mmol)
) および DBL-oPNP (参考文献 1) (0.215 g、0.460 mmol) / DMF (3.0 mL) 攪拌溶液に、NMM (215 μL、0.196 mmol) を加えた。
続いて得られた反応混合物を、室温で一晩攪拌させて放置した。揮発分を真空除去し、得
られた油状残渣をシリカクロマトグラフィー (5% - 10% - 15% MeOH / DCM
) で精製して、所望の生成物である化合物 51 を赤色の油として得た (0.231 g, 8
7%)。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.28-1.87 (m, 140H); 2.44 (t, J 6.0 Hz, 2H); 2.63 (t, J 6.0 Hz, 2H); 3.00 (s, 3H); 3.02-3.06 (m, 10H); 3.10-3.21 (m, 16kH
); 3.33-3.40 (m, 8kH); 3.51-3.77 (m, 120H); 3.84-3.99 (m, 14H); 3.94-4.10 (m, 4H); 4.25-4.28 (m, 4H); 7.15-7.20 (m, 2H); 8.47-8.52 (m, 2H)。LCMS (疎水
法、ギ酸緩衝液) RT = 8.15 分; ESI MS (+ve) [M+2]⁺ = 1624.
5; [(M-3BOc)+3] = 1016.6; C₁₅₃H₂₈₁N₂₀O₅₃⁺ [M+H]
]⁺ の m/z 計算値 = 3247.99.

10

[0301]

1. 22 (MeTzPh) - PEG₄CO - NHPEG₂₄ - CO [N(PN)₂]
[Lys]₄ [NH₂·HCl]₈ G2 化合物 52

氷冷 (MeTzPh) - PEG₄CO - NHPEG₂₄ - CO [N(PN)₂] [Lys]
s]₄ [NHBOc]₈ 化合物 51 (0.231 g, 0.0711 mmol) に、1.2
5 M HCl / MeOH (9.0 mL, 11.3 mmol) の溶液をゆっくりと加えた。
5 分後、氷浴を取り除き、続いて得られる反応混合物を室温で一晩攪拌させた。揮発物を
真空除去し、生成物である化合物 51 を赤い油として得た (0.226 g, 100%)。
¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.51-1.96 (m, 40H); 2.53 (t, J 6.0 Hz, 2H); 2.
96-3.04 (m, 10H); 3.15-3.20 (m, 8H); 3.39-3.45 (m, 7H); 3.54-4.10 (m, 102H); 4.
25-4.28 (m, 2H); 7.17-7.20 (m, 2H); 8.48-8.51 (m, 2H); LCMS (親水法、ギ酸緩
衝液) RT = 6.38 分, ESI MS (+ve) 2447.6 [M+H]⁺; C₁₁₃
H₂₁₇N₂₀O₃₇ [M+H]⁺ の m/z 計算値 = 2447.6.

20

[0302]

1. 23 (MeTzPh) - PEG₄CO - NHPEG₂₄ - CO [N(PN)₂]
[Lys]₈ [(α-NH₂·HCl) (ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈ G3 化
合物 53

N₂ 雰囲気下、HO-Lys (α-NHBOc) (ε-NH-COPEG₁₁₀₀) (0.
541 g、0.402 mmol) および PyBOP (0.195 g、0.375 mm
ol) / DMF (2 mL) 攪拌溶液に、NMM (225 μL、2.96 mmol) を加え
た。10 分後、その溶液を (MeTzPh) - PEG₄CO - NHPEG₂₄ - CO [N
(PN)₂] [Lys]₄ [NH₂·HCl]₈ 化合物 52 (0.109 g, 0.039
8 mmol) / DMF (1 mL) に添加した。続いて得られた反応混合物を、室温で一晩
攪拌させて放置した。揮発分を真空除去し、得られた粗産物を氷 / 水浴で冷却した。冷却
した残渣に、1.25 M (8.0 mL、10 mmol) をゆっくりと加えた。10 分後、
冷水浴を除去し、反応物を室温で一晩攪拌させて放置した。揮発分を真空除去し、H₂O
(16 mL) に溶解した。この溶液を Millipore Amicon Ultra-
15 Centrifugal Filter Units (4 ユニット x 10 kDa
MWCO units) を用いた遠心分離*により精製した。保持液を一晩凍結乾燥し、
生成物である化合物 53 (0.327 g、65%) を赤色の固体として得た。¹H NMR (3
00 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.40-1.87 (m, 88H); 2.49-2.56 (m, 18H); 2.68-2.72 (m,
2H); 3.08 (s, 3H); 3.17-3.30 (m 30H); 3.37-3.51 (m, 10H); 3.41 (s, 24H); 3.59-4.0
1 (m, 816H); 4.25-4.40 (m, 8H); 7.29-7.33 (m, 2H); 8.44-8.49 (m, 2H); LCMS (親
水法, TFA 緩衝液) RT = 10.28 分

30

40

50

【0303】

* [ユニットをH₂O (5 mL) で事前にすすぎ洗し、4000 rpmで5分間回転させた。このプロセスを繰り返した。この粗液を0.45 μmのシリンジフィルタで濾過し、遠心分離装置に入れた。その後、ユニットを4000 rpmで15分間回転させた。その後、保持液をH₂O (4 mL) で希釈し、再び4000 rpmで15分間回転させた。このプロセスを8回繰り返した]。

【0304】

1. 24 MeTzPh) - PEG₄CO - NHPEG₂₄ - CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [NH₂·HCl]₁₆G3化合物54

N₂雰囲気下、(MeTzPh) - PEG₄CO - NHPEG₂₄ - CO [N(PN)₂] [Lys]₄ [NH₂·HCl]₈化合物52 (0.098 g, 0.0358 mmol) およびDBL-oPNP (0.207 g, 0.443 mmol) / DMF (2.0 mL) 攪拌溶液に、NMM (190 μL, 1.973 mmol) を加えた。続いて得られた反応混合物を、室温で一晩攪拌させて放置した。揮発分を真空除去し、得られた油状残渣をシリカクロマトグラフィー (5% - 10% - 15% MeOH / DCM) で精製し、Boc保護された生成物を赤い油として得た (0.128 g, 70%)。精製材料を氷 / 水浴で冷却した後、1.25 M HCl / MeOH (6.5 mL, 8.5 mmol) の溶液をゆっくりと加えた。5分後、氷浴を取り除き、続いて得られる反応混合物を室温で一晩攪拌させた。揮発物を真空除去し、生成物である化合物54を赤い油として得た (0.107 g, 100%)。LCMS (親水法, TFA緩衝液) RT = 7.48分, ESI MS (+ve) 3471 [M+H]⁺; [M+H]⁺のm/z計算値 = 3472。

10

20

【0305】

1. 25 (MeTzPh) - PEG₄CO - NHPEG₂₄ - CO [N(PN)₂] [Lys]₁₆ [(α-NH₂·HCl) (ε-NH-CO PEG₁₁₀₀)]₁₆G4化合物55

N₂雰囲気下、HO-Lys (α-NHBoc) (ε-NH-COPEG₁₁₀₀) (0.107 g, 0.132 mmol) およびPyBOP (0.065 g, 0.125 mmol) / DMF (1.5 mL) 攪拌溶液に、NMM (50 μL, 0.455 mmol) を加えた。10分後、その溶液を(MeTzPh) - PEG₄ - PEG₂₄ - CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [NH₂·HCl]₁₆化合物54 (0.0221 g, 0.00545 mmol) に加えた。続いて得られた反応混合物を、室温で一晩攪拌させて放置した。揮発分を真空除去し、得られた粗産物を氷 / 水浴で冷却した。冷却した残渣に、1.25 M HCl / MeOH (1.5 mL, 1.88 mmol) をゆっくりと加えた。10分後、冷水浴を除去し、反応物を室温で一晩攪拌させて放置した。揮発分を真空除去し、H₂O (5 mL) に溶解した。この溶液をMillipore Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (10 kDa MWCO) を用いた遠心分離により精製した。保持液を一晩凍結乾燥し、ギルソン (単一勾配60分, 10 > 60% ACN (0.1% TFA緩衝液, RT 36分) でさらに精製し、生成物である化合物55 (0.021 g, 25%) を赤色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.28-1.87 (m, 184H); 2.42-2.49 (m, 35H); 3.00 (s, 3H); 3.12-3.23 (m, 60H); 3.34-3.40 (m, 63H); 3.52-4.01 (m, 826H); 4.25-4.39 (m, 16H); 7.17-7.20 (m, 2H); 8.48-8.51 (m, 2H); LCMS (親水法, TFA緩衝液) RT = 8.96分。ESI MS (+ve) 2095 [M+7H]⁺; 1834 [M+8H]⁺; 1630 [M+9H]⁺。

30

40

【0306】

1. 26 MeTzPh) - PEG₄CO - NHPEG₂₄ - CO [N(PN)₂] [Lys]₁₆ [NH₂·TFA]₃₂G4化合物56

化合物54と同様に調製し、TFA / AcOHを用いて脱保護し、化合物56 (0.078 g, 78%) を赤色固体として得た。LCMS (親水法, TFA緩衝液) RT = 7.74分。ESI MS (+ve) 2095 [M+7H]⁺; 1834 [M+8H]⁺; 1

50

630 [M+9H]⁺。

【0307】

1.27 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₃₂[(α-NH₂.TFA)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₃₂G5 化合物57

N₂雰囲気下、HO-Lys(α-NHBoc)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)(0.476g, 0.354mmol)およびPyBOP(0.170g, 0.327mmol)/DMF(3.0mL)攪拌溶液に、NMM(180μL, 0.500mmol)を加えた。10分後、その溶液を(MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₁₆[NH₂.TFA]₃₂化合物56(0.078g, 0.00850mmol)に加えた。続いて得られた反応混合物を、室温で一晩攪拌させて放置した。揮発成分を真空除去し、得られた粗製品をH₂O(1.0mL)に溶解し、TFA(1.0mL)をゆっくりと加えた。この反応を室温で一晩攪拌した。反応物をH₂O(12mL)で希釈し、Millipore Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit(10kDa MWCO)を用いた遠心分離によって精製した。保持液を一晩凍結乾燥し、化合物57(0.374g、91%)をピンク色の固体として得た。¹HNMR(300MHz,D₂O)δ(ppm): 1.41-1.87(m,376H);2.52-2.56(m,64H);3.09(s,3H);3.17-3.24(m,126H);3.41(s,93H)3.48-3.98(m,2960H);4.27-4.39(m,32H);7.30-7.33(m,2H);8.46-8.49(m,2H);HPLC分析(親水法,緩衝液としてギ酸アンモニウム)RT=8.60分。

10

20

【0308】

1.28 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NHCy5)₁(α-NHAc)₇](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈, G3, 化合物37

Cy5-NHSエステルの溶液(1mg/mL DMF溶液1.0mL;1.0mg、1.59μmol)を、(MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH₂.HCl)₈](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈、化合物53(20mg, 1.59μmol)/DMF(0.5mL)の入ったバイアルに添加した。この溶液に、NMM(10μL, 91.0μmol)を加え、その後得られた反応混合物を光から保護して、RTで攪拌した。3.5時間後、無水酢酸(20μL, 212μmol)を加え、反応混合物を一晩攪拌して放置した。反応混合物を減圧濃縮後、MQ水(5mL)に取り込んで2つに分け、2つの(事前に平衡化させた)PD10カラムにより精製した。サンプルがカラム床に入ると、3.5mLのMQ水で溶出し、濾液を回収した。濾液を合わせて一晩凍結乾燥した。凍結乾燥により、表題生成物を鮮やかな青色の粉末として19.3mg(93%)得られた。HPLC(C8XBridge, 3x100mm)のグラジエント。5%ACN/H₂O(0~1分),5~80%ACN(1~7分),80%ACN(7~12分),80~5%ACN(12~13分),5%ACN(13~15分),214nm,0.4mL/分,Rt(分)=8.30。

30

【0309】

1.29 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₁₆[(α-NHCy5)₁(α-NHAc)₁₅](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₁₆, G4, 化合物38

Cy5-NHSエステルの溶液(520μLの1mg/mL DMF溶液;0.52mg、844nmol)を、(MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₁₆[(α-NH₂.HCl)₁₆](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₁₆、化合物55(20mg, 844nmol)/DMF(1.0mL)の入ったバイアルに添加した。この溶液に、NMM(10μL, 94.5μmol)を加え、その後得られた反応混合物を光から保護して、RTで攪拌した。3.5時間後、無水酢酸(20μL, 230μmol)を加え、反応混合物を一晩攪拌させて放置した。反応混合物を減圧濃縮後、MQ水(5mL)に取り込んで2つに分け、2つの(事前に平衡化させた)

40

50

PD10カラムにより精製した。サンプルがカラム床に入ると、3.5 mLのMQ水で溶出し、濾液を回収した。濾液を合わせて一晚凍結乾燥した。凍結乾燥により、表題生成物を鮮やかな青色の粉末として19.9 mg (98%) 得られた。HPLC (C8 X Bridge, 3 x 100 mm) のグラジエント。5% ACN/H₂O (0~1分), 5~80% ACN (1~7分), 80% ACN (7~12分), 80~5% ACN (12~13分), 5% ACN (13~15分), 214 nm, 0.4 mL/分, Rt(分)=8.40

【0310】

1.30 (MeTzPh) PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₃₂[(α-NHCy₅)₁(α-NHAc)₃₁](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₃₂、G5、化合物39

Cy₅-NHSエステルの溶液(300 μLの1 mg/mL DMF溶液; 0.30 mg、487 nmol)を、(MeTzPh) PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₃₂[(α-NH₂·HCl)₃₂](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₃₂、化合物57(20 mg, 435 nmol)/DMF(1.2 mL)の入ったバイアルに添加した。この溶液に、NMM(11 μL, 97.5 μmol)を加え、その後得られた反応混合物を光から保護して、RTで攪拌した。3.5時間後、無水酢酸(22 μL, 237 μmol)を加え、反応混合物を一晚攪拌させて放置した。反応混合物を減圧濃縮後、MQ水(5 mL)に取り込んで2つに分け、2つの(事前に平衡化させた)PD10カラムにより精製した。サンプルがカラム床に入ると、3.5 mLのMQ水で溶出し、濾液を回収した。濾液を合わせて一晚凍結乾燥した。凍結乾燥により、表題生成物を鮮やかな青色の粉末として18.7 mg (91%) が得られた。HPLC (C8 X Bridge, 3 x 100 mm) のグラジエント。5% ACN/H₂O (0~1分), 5~80% ACN (1~7分), 80% ACN (7~12分), 80~5% ACN (12~13分), 5% ACN (13~15分), 214 nm, 0.4 mL/分, Rt(分)=8.50.

【0311】

1.31 カバジタキセル(CTX)-2'-OCO-oPNPエステル、化合物58
カバジタキセル(CTX、111.0 mg、0.132 mmol)/DMF(3 mL)溶液に、トリエチルアミン(37.0 μL、0.264 mmol)、DMAP(1.64 mg、0.013 mmol)およびp-ニトロフェニルクロロホルメート(24.0 mg、0.12 mmol)を加えた。この混合物を室温で2時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーを使用して、0:100~50:50(酢酸エチル:ヘキサン)のグラジエントを用いて精製し、表題生成物を白色固体として得た(28 mg, 21%)。LCMS(親水法, TFA緩衝液) Rt=6.55分。ESI MS(+ve) 1001 [M]⁺; C₅₂H₆₀N₂O₁₈ [M]⁺のm/z計算値: 1001

【0312】

1.32 Fmoc-Val-Ala-PAB-Pトリガー(NMeBoc)、化合物59

この化合物は、Dal Corsoら、Angew. Chem Int. 編2020年, 59, 4176-4181に記載の方法で得られ得る。また、次のように調製されてもよい。Fmoc-Val-Ala-PAB-O-oPNPエステル(Iris Biotech, 127.0 mg、0.186 mmol)および(S)-tert-ブチルメチル(ピロリジン-2-イルメチル)カルバメート(Ascension Chemical, 42.0 mg、0.195 mmol)を丸底フラスコに入れ、続いてTHF(5 mL)を加えた。反応混合物を不活性雰囲気下で2時間、室温で攪拌した。反応混合物のLCMS分析では、表題化合物の形成が示された。溶媒を減圧除去し、得られた生成物は精製せずに次の反応に使用する。LCMS(親水法, TFA緩衝液), Rt=6.60分。ESI MS(+ve) 756 [M]⁺1; C₄₂H₅₃N₅O₈ [M]⁺1のm/z計算値: 756]

【0313】

1.33 TFA. NH₂-Val-Ala-PAB-Pトリガー (NMeBoc)、化合物60

化合物59 (141.0 mg, 0.186 mmol) / DMF (3 mL) 攪拌溶液に、0℃でピペリジン (0.6 mL, 6.07 mmol) を加え、反応混合物を1時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣をアセトニトリルに溶解し、分取HPLC (40~90% MeCN, 0.05% TFA緩衝液, RT約45分) を用いて精製し、凍結乾燥後に表題化合物を無色液体として得た (63.0 mg, 52%)。LCMS (親水法, TFA緩衝液) ESI MS (+ve) 556 [M] + Na; C₂₇H₄₃N₅O₆ [M] + Naのm/z計算値: 556; ¹H-NMR (300 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.62-7.51(m, 2H), 7.44-7.25(m, 2H), 5.18-4.98(bs, 2H), 4.56(q, J=9.0 Hz, 1H), 4.13(bs, 1H), 3.72(d, J=6.0 Hz, 1H), 3.51-3.36(m, 2H), 2.89(s, 1H), 2.73(bs, 1H), 2.35-2.13(m, 1H), 2.05-1.70(m, 4H), 1.59-1.36(m, 11H), 1.18-1.00(m, 6H)。

10

【0314】

1.34 COOH-PEG9-Val-Ala-PAB-Pトリガー (NMeBoc)、化合物61

化合物60 (52.0 mg, 0.081 mmol) / アセトニトリル (2 mL) 攪拌溶液に、DIPEA (87.2 μL, 0.50 mmol) を加え、反応混合物を0℃まで冷却した。COOH-PEG₉-NHSエステル (Iris Biotech; 86.0 mg, 0.139 mmol) を反応混合物に加え、反応混合物を室温で16時間攪拌した。反応混合物のLCMS分析により、生成物の形成が示された。LCMS (親水法, TFA緩衝液; 5~60%アセトニトリル15分以上), Rt=11.32分。ESI MS (+ve) 1048 [M] + H₂O; C₄₉H₈₃N₅O₁₈ [M] + H₂Oのm/z計算値: 1048。溶媒を減圧除去し、得られた生成物は精製せずに次の反応に使用する。

20

【0315】

1.35 COOH-PEG9-Val-Ala-PAB-Pトリガー (NMe. TFA)、化合物62

化合物61 (84.0 mg, 0.081 mmol) / ジクロロメタン (2 mL) の攪拌溶液に、0℃でTFA (0.5 mL, 6 mmol) を加え、反応混合物を室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣をアセトニトリルに溶解し、分取HPLC (5~70%アセトニトリル、0.05% TFA緩衝液、RT32~33分) を用いて精製し、凍結乾燥後に表題化合物を濃い無色の液体として得た (87.0 mg, 100%)。LCMS (親水法, FFA緩衝液) ESI MS (+ve) 930 [M] + 1; C₄₅H₇₇N₅O₁₅ [M] + 1のm/z計算値: 930; ¹H-NMR (300 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.64(d, J=9.0 Hz, 2H), 7.37(d, J=9.0 Hz, 2H), 5.13(d, J=9.0 Hz, 1H), 4.61-4.40(m, 2H), 4.19(d, J=6.0 Hz, 1H), 3.85(t, J=6.0 Hz, 1H), 3.79-3.69(m, 4H), 3.69-3.51(m, 35H), 3.17-3.05(m, 2H), 2.85(s, 1H), 2.76-2.68(m, 3H), 2.92(t, J=6.0 Hz, 1H), 2.62-2.45(m, 4H), 2.27-1.84(m, 4H), 1.46(d, J=9.0 Hz, 2H), 1.08-0.92(m, 6H)。

30

【0316】

1.36 COOH-PEG9-Val-Ala-PAB-Pトリガー-NMeCO-CTX、化合物63

化合物46 (28.0 mg, 0.027 mmol) / DMF (3 mL) 溶液に、DIPEA (9.40 μL, 0.54 mmol) および化合物51 (27.3 mg, 0.027 mmol) を加えた。この混合物を室温で16時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣をアセトニトリル (2 mL) に溶解した。この溶液を分取HPLC (5~60% ACN、Rt32.2~34.3分) により精製し、凍結乾燥後に表題生成物を白色固体 (26 mg, 56%) として得た。LCMS (親水法, TFA緩衝液) Rt=5.57分。ESI MS (+ve) 1792 [M] +; C₉₀H₁₃₀N₆O₃₁ [M] + のm/z計算値: 1792

40

【0317】

50

実施例 1 b B C N および D B C O リンカーの合成

1. 37 B C N - P E G 2 - G l u - C O - N H P E G 2 4 C O 2 H, 化合物 3 1
 N H 2 - P E G 2 4 - C O O H (93.7 mg, 0.082 mmol) を含む水 / T H
 F (1:1, 4 mL) の混合物の溶液に、炭酸水素ナトリウム (15.2 mg, 0.18
 1 mmol) を加えた。混合物を室温で 5 分間攪拌後、B C N - P E G 2 - N H S エステ
 ル (50 mg, 0.093 mmol) / T H F (2 mL) 溶液を加えた。得られた反応混
 合物を R T で 15 時間攪拌した。その後、揮発分を減圧除去し、得られた水性懸濁液に A
 C N (2.5 mL) を加えた。この溶液を分取 H P L C (5 ~ 60 % A C N、R f 32.
 2 ~ 34.3 分) で精製し、凍結乾燥後に表題物生成物を白色固体 (42 mg、33%)
 として得た。¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm)。0.85-0.92(m, 2H); 1.25-1.
 35(m, 1H); 1.43-1.57(m, 2H); 1.73-1.83(m, 2H); 2.09-2.25(m, 9H); 2.39(t, J=9.
 0 Hz, 2H); 3.21-3.31(m, 6H); 3.35-3.85(m, 106H); 4.10(d, J=9.0 Hz, 2H)。L C M
 S (親水法, ギ酸緩衝液) R t = 10.28 分; E S I M S (+ve) m/z 156
 6.7 [M] +。

10

【0318】

1. 38 B C N - P E G 2 - G l u - C O - N H P E G 2 4 C O - N H P E G 3 - T
 C O、化合物 3 2

B C N - P E G 2 - G l u - C O - N H P E G 2 4 - C O O H 化合物 3 1 (10.0 m
 g, 0.006 mmol) / D M F (3.0 mL) の攪拌溶液に、P y B O P (3.6 4
 mg, 0.007 mmol)、N M M (1.31 μL, 0.012 mmol)、その後 T
 C O - P E G 3 - N H 2 (2.41 mg, 0.007 mmol) を加えた。続いて得られ
 た反応混合物を室温で一晩攪拌した。その後、溶媒を減圧除去し、得られた残渣を A C N
 (2 mL) に溶解し、0.45 μm フィルタで濾過した。回収した濾液を分取 H P L C (30 ~ 50 %
 A C N R t 40 ~ 42 分) で精製し、生成物を含む分画を減圧濃縮し
 て、A C N を除去した。残った水溶液を一晩凍結乾燥し、表題生成物を白色固体として得
 た (4.7 mg, 39%)。¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 0.89-1.05(m, 2
 H), 1.26-1.48(m, 2H), 1.52-1.79(m, 5H), 1.83-2.06(m, 6H), 2.11-2.39(m, 12H)
 , 2.48(t, 2H, J=6.0 Hz), 3.35-3.44(m, 6H), 3.47-3.79(m, 102H), 3.83-3.92(m, 1
 H), 4.16(d, 2H, J=6.0 Hz), 4.26-4.41(m, 1H), 4.58(bs, 10H), 5.39-5.74(m, 3H)。
 L C M S (親水法, ギ酸緩衝液) R t = 11.0 分 E S I M S (+ve) 1894.0
 [M] +; C₉₀H₁₆₅N₅O₃₆ [M] + の m/z 計算値: 1894.2

20

30

【0319】

1. 39 D B C O - G l u - N H P E G 2 4 C O - N H P E G 3 - T C O、化合物 3 3
 D B C O - G l u - N H P E G 2 4 C O O P F P (50.0 mg, 0.031 mmol)
) / D M F (3 mL) の攪拌溶液に、T C O - P E G 3 - N H 2 (10.7 mg, 0.0
 31 mmol) を加え、その後 N M M (4.08 μL、0.037 mmol) を加えた。
 続いて得られた反応混合物を室温で 3 時間攪拌した後、減圧濃縮した。得られた残渣を A
 C N (2 mL) に溶解し、0.45 μm のフィルタで濾過し、濾液を分取 H P L C (40
 ~ 70 % A C N R t 27 ~ 29 分) により精製した。生成物を含む分画を減圧濃縮し
 て A C N を除去し、残った水溶液を一晩凍結乾燥し、表題生成物を無色粘性液体として得
 た (25.0 mg, 42%)。¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.31-1.62(m,
 4H), 1.60-1.83(m, 6H), 1.92-2.16(m, 4H), 2.25(t, 2H, J=6.0 Hz), 2.91-3.03(m, 4
 H), 3.12-3.58(m, 78H), 3.59-3.69(m, 1H), 4.01-4.18(m, 1H), 4.92(d, 2H, J=15H
), 5.15-5.49(m, 3H), 6.95-7.59(m, 8H)。L C M S (親水法, ギ酸緩衝液) R t = 7
 .0 分。E S I M S (+ve) 1775.0.0 [M] +; C₈₈H₁₄₈N₄O₃₂ [M]
] + の m/z 計算値: 1775.12

40

【0320】

1. 40 M e T z P h - P E G 4 P E G 2 4 - C O [N (P N) 2] [L y s] 8 [(α - C y 5) 1 (α - N H A c) 7 (ε - N H P E G 1100) 8]、G 3、化合物 3 7
 C y 5 - N H S エステルの溶液 (1 mg/mL D M F 溶液の 1.0 mL; 1.0 mg,

50

1. 59 μmol) を、MeTzPh-PEG₄PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₈ (α -NH₂)₈ (ϵ -NHPEG₁₁₀₀)₈]、(20 mg, 1. 59 μmol) / DMF (0. 5 mL) の入ったバイアルに加えた。この溶液に、NMM (10 μL , 91. 0 μmol) を加え、その後得られた反応混合物を光から保護して、RTで撹拌した。3. 5時間後、無水酢酸 (20 μL , 212 μmol) を加え、反応混合物を一晩撹拌させて放置した。反応混合物を減圧濃縮後、MQ水 (5 mL) に取り込んで2つに分け、2つの (事前に平衡化させた) PD10カラムにより精製した。サンプルがカラム床に入ると、3. 5 mLのMQ水で溶出し、濾液を回収した。濾液を合わせて一晩凍結乾燥した。凍結乾燥により、表題生成物を鮮やかな青色の粉末として19. 3 mg (93%) 得られた。HPLC (C8XBridge, 3 x 100 mm) のグラジエント。5% ACN/H₂O (0~1分), 5~80% ACN (1~7分), 80% ACN (7~12分), 80~5% ACN (12~13分), 5% ACN (13~15分), 214 nm, 0. 4 mL/分, Rt (分) = 8. 30.

10

【0321】

1. 41 MeTzPh-PEG₄PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₁₆ [(α -Cy5)₁ (α -NHAc)₁₅ (ϵ -NHPEG₁₁₀₀)₁₆]、G4、化合物38

Cy5-NHSエステルの溶液 (520 μL の1 mg/mL DMF 溶液; 0. 52 mg、844 nmol) を、MeTzPh-PEG₄PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₁₆ [(α -NH₂)₁₆ (ϵ -NHPEG₁₁₀₀)₁₆]、(20 mg, 844 nmol) / DMF (1. 0 mL) の入ったバイアルに入れた。この溶液に、NMM (10 μL , 94. 5 μmol) を加え、その後得られた反応混合物を光から保護して、RTで撹拌した。3. 5時間後、無水酢酸 (20 μL , 230 μmol) を加え、反応混合物を一晩撹拌させて放置した。反応混合物を減圧濃縮後、MQ水 (5 mL) に取り込んで2つに分け、2つの (事前に平衡化させた) PD10カラムにより精製した。サンプルがカラム床に入ると、3. 5 mLのMQ水で溶出し、濾液を回収した。濾液を合わせて一晩凍結乾燥した。凍結乾燥により、表題生成物を鮮やかな青色の粉末として19. 9 mg (98%) 得られた。HPLC (C8XBridge, 3 x 100 mm) のグラジエント。5% ACN/H₂O (0~1分), 5~80% ACN (1~7分), 80% ACN (7~12分), 80~5% ACN (12~13分), 5% ACN (13~15分), 214 nm, 0. 4 mL/分, Rt (分) = 8. 40.

20

【0322】

1. 42 MeTzPh-PEG₄PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₃₂ [(α -Cy5)₁ (α -NHAc)₃₁ (ϵ -NHPEG₁₁₀₀)₃₂]、G5、化合物39

Cy5-NHSエステルの溶液 (300 μL の1 mg/mL DMF 溶液; 0. 30 mg、487 nmol) を、MeTzPh-PEG₄PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₃₂ [(α -NH₂)₃₂ (ϵ -NHPEG₁₁₀₀)₃₂]、(20 mg, 435 nmol) / DMF (1. 2 mL) の入ったバイアルに入れた。この溶液に、NMM (11 μL , 97. 5 μmol) を加え、その後得られた反応混合物を光から保護して、RTで撹拌した。3. 5時間後、無水酢酸 (22 μL , 237 μmol) を加え、反応混合物を一晩撹拌させて放置した。反応混合物を減圧濃縮後、MQ水 (5 mL) に取り込んで2つに分け、2つの (事前に平衡化させた) PD10カラムにより精製した。サンプルがカラム床に入ると、3. 5 mLのMQ水で溶出し、濾液を回収した。濾液を合わせて一晩凍結乾燥した。凍結乾燥により、表題生成物を鮮やかな青色の粉末として18. 7 mg (91%) が得られた。HPLC (C8XBridge, 3 x 100 mm) のグラジエント。5% ACN/H₂O (0~1分), 5~80% ACN (1~7分), 80% ACN (7~12分), 80~5% ACN (12~13分), 5% ACN (13~15分), 214 nm, 0. 4 mL/分, Rt (分) = 8. 50.

30

40

【0323】

1. 43 BHA [Lys]₄ [((α -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄ (PhTzMe))₁₋₃ (α -Lys (α -NH-Cy5) (ϵ -NH-DFO))₁ (α -NH₂)₀₋₂) (ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₄] , G2, 化合物99

50

BHA [Lys]₄ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁₋₃(α-NH₂)₁₋₃](ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₄], G2, 化合物107 (3.0mg, 0.414μmol) およびHO-Lys [(α-Cy5)(ε-DFO)] 化合物108 (0.56mg, 0.414μmol) を使用した一般手順Cにより調製し、スピンカラム (10kDa MWカットオフ10x450μL MQ水で洗浄) により精製し、目的物の化合物99を得た (300μL MQ水に3.56mgの最終濃度)。

[0324]

1.44 BHA [Lys]₈ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁₋₄(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₃₋₆](ε-NH-COPEG₄₁₂)₈], G3, 化合物100

BHA [Lys]₈ [(α-NHCOPPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁₋₄(α-NH₂)₄₋₇](ε-NH-COPEG₄₁₂)₈], G3, 化合物109 (2.97mg, 0.452μmol) およびHO-Lys [(α-NHCy5)(ε-NHDFO)] 化合物40 (0.61mg, 0.452μmol) を使用して一般手順Cにより調製し、スピンカラム (10kDa MWカットオフ10x450μL MQ水で洗浄) で精製し、生成物である化合物100を得た (300μL MQ水に3.60mgの最終濃度)。

[0325]

1.45 BHA [Lys]₈ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₆](ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₈], G3, 化合物101

BHA [Lys]₈ [(α-NHCOPPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁(α-NH₂)₇](ε-NHCOPPEG₁₀₀₀)₈], G3, 化合物110 (3.14mg, 0.234μmol) およびHO-Lys (α-NHCy5)(ε-NHDFO) 化合物108 (0.32mg, 0.234μmol) を用いて、一般手順Cに従って調製し、スピンカラム (10kDa MWカットオフを10x450μLのMQ水で洗浄) で精製し、スピンカラム (10kDa MWカットオフを10x450μLのMQ水で洗浄) で精製し、生成物である化合物27 (300μLのMQ水、最終濃度3.45mg) を得た。

[0326]

1.46 BHA [Lys]₁₆ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₁₄](ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₁₆], G4, 化合物102

BHA [Lys]₁₆ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁(α-NH₂)₁₅](ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₁₆], G4, 化合物111 (11.8mg, 0.454μmol) およびHO-Lys (α-NHCy5)(ε-NHDFO) 化合物108 (0.62mg, 0.454μmol) を用いて一般手順Cに従って調製し、スピンカラム (10x450μL MQ水で10kDa MWカットオフを洗浄) で精製して、9.3mgの化合物28を青色の固体として得た (凍結乾燥後)。

[0327]

1.47 BHA [Lys]₃₂ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁₋₄(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₂₇₋₃₀](ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₃₂], G5, 化合物103

BHA [Lys]₁₆ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁₋₄(α-NH₂)₂₇₋₃₀](ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₃₂] を用いて、G4、化合物112 (12.9mg, 0.271μmol) およびHO-Lys (α-Cy5)(ε-DFO) 化合物108 (0.37mg, 0.271μmol) を、一般手順Cに従って調製し、スピンカラム (10x450μL MQ水で10kDa MWカ

10

20

30

40

50

ットオフを洗浄)で精製し、凍結乾燥後に8.4mgの生成物である化合物103を青色の固体として得た。

【0328】

1.48 BHA [Lys]₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(α-NHDFO))₁(α-NH₂)₃(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₄], G2, 化合物105

BHA [Lys]₄ [(α-NH₂·HCl)₄(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₄], G2、化合物113(11.0mg、0.0015mmol) / DMF(3mL) 攪拌溶液に、RTで、NMM(3.32μL、0.039mmol)、HO-Lys [(α-NHCy5)(ε-NHDFO)] 化合物108(2.06mg、0.0015mmol) およびPyBOP(1.18mg、0.0022mmol)を加えた。18時間後、揮発物を減圧除去し、青色の固体残渣をMQ水に溶解し、溶液を濾過した(0.45μmアクロディスクシリンジフィルタ)。濾液をスピンカラム(Amicon Ultra, 0.5mL, 3kDa MWカットオフ)によって濃縮し、保持液をMQ水(10x450μL)で繰り返し洗浄して、化合物24(MQ水での濃度10mg/mL; 1.3mL)を得た。LCMS(親水法,TFA緩衝液), グラジエント20~90、アセトニトリル、8分; Rt=5.64分; ¹HNMR(300MHz, D₂O) δ(ppm): 8.52(d, 8H, J=9.0Hz), 8.32(s, 1H), 8.29-8.17(m, 2H), 7.78-7.70(m, 2H), 7.69-7.62(m, 2H), 7.57-7.47(m, 2H), 7.48-7.25(m, 16H), 7.21(d, 8H, J=9.9Hz), 7.15-7.08(m, 1H), 7.06-7.00(m, 1H), 6.70-6.60(m, 2H), 6.21-6.12(m, 2H), 4.37-4.20(m, 14H), 4.18-4.06(m, 8H), 3.98-3.50(m, 480H), 3.48-3.34(m, 15H), 3.27-3.06(m, 18H), 3.06-2.97(m, 19H), 2.88(s, 8H), 2.54-2.40(m, 19H), 2.08-1.98(m, 28H), 1.93-1.12(m, 99H), 1.00-0.82(m, 8H)。

10

20

【0329】

1.49 BHA [Lys]₄ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁(α-NH₂)₃(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₄], G2, 化合物107

BHA [Lys]₄ [(α-NH₂·TFA)₄(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₄](50.0mg, 0.007mmol) およびHOOCPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe)(Click Chemistry Tools, 13.39mg, 0.010mmol)を用いて、反応容器をフویلで包んで光を遮断した以外は、メタノールを溶出液として使用して、残渣をSEC(Sephadex(商標)LH-20)により精製して、生成物である化合物107(44.00mg, 77%)を得た; ¹HNMR(300MHz, D₂O) δ(ppm)。8.42-8.26(m, 2H), 7.44-7.11(m, 12H), 6.04(bs, 1H), 4.44-4.07(m, 8H), 4.07-3.37(m, 556H), 3.33(s, 12H), 3.25-2.90(m, 17H), 2.62-2.43(m, 2H), 1.96-0.97(m, 48H); HPLC(C8XBridge, 3x100mm)グラジエント(ギ酸緩衝液): 5%ACN/H₂O(0-1分), 5-80%ACN(1-7分), 80%ACN(7-12分), 80-5%ACN(12-13分), 5%ACN(13-15分), 214nm, 0.4mL/分, Rt(分)=8.08-9.01。

30

【0330】

1.50 BHA [Lys]₈ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁(α-NH₂)₇(ε-NH-COPEG₄₁₂)₈], G3, 化合物109

BHA [Lys]₈ [(α-NH₂·TFA)₈(ε-NH-COPEG₄₁₂)₈](50.0mg, 0.008mmol) およびHOOC-PEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe)(Click Chemistry Tools; 11.2mg, 0.008mmol)を用いて、反応容器を箔で包んで遮光した以外は、一般手順Cに従って調製し、メタノールを溶出液として使用して、残渣をSEC(Sephadex(商標)LH-20)により精製して、生成物である化合物109(29mg, 55%)を得た; ¹HNMR(300MHz, D₂O) δ(ppm): 8.43-8.20(m, 2H), 7.50-7.09(m, 10H), 6.03(bs, 1H), 4.41-4.05(m, 10H), 4.01-3.41(m, 258H), 3.31(s, 16H), 3.24-2.83(m, 2

40

50

8H), 2.41(bs, 13H), 2.00-0.98(m, 75H); HPLC(C8XBridge, 3x100mm) グラジエント(ギ酸緩衝液): 5% ACN/H₂O(0-1分), 5-80% ACN(1-7分), 80% ACN(7-12分), 80-5% ACN(12-13分), 5% ACN(13-15分), 214nm, 0.4mL/分, Rt=8.16-8.93分。

【0331】

1. 51 BHA [Lys]₈ [((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁(α-NH₂)₇) (ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₈] , G3, 化合物110

BHA [Lys]₈ [(α-NH₂·TFA)₈(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₈] (100.0mg, 0.007mmol) およびHOOCPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe) (Click Chemistry Tools; 15.97mg, 0.010mmol) を用いて、反応容器を箔で包んで遮光した以外は、一般手順Cに従って調製し、メタノールを溶出液として使用して、残渣をSEC (Sephadex (商標) LH-20) により精製して、生成物である化合物19 (SPL-9248) (69mg, 66%) を得た。

¹HNMR(300MHz, D₂O) δ(ppm) 8.45-8.25(m, 2H), 7.47-7.07(m, 12H), 6.07(bs, 1H), 4.45-4.05(m, 12H), 4.04-3.37(m, 936H), 3.32(s, 25H), 3.23-2.88(m, 32H), 2.59-2.32(m, 6H), 1.90-0.98(m, 90H); HPLC(C8XBridge, 3x100mm) グラジエント(ギ酸緩衝液): 5% ACN/H₂O(0-1分), 5-80% ACN(1-7分), 80% ACN(7-12分), 80-5% ACN(12-13分), 5% ACN(13-15分), 214nm, 0.4mL/分, Rt=8.21-9.15分。

【0332】

1. 52 BHA [Lys]₁₆ [((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁(α-NH₂)₁₅) (ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₁₆] , G4, 化合物111

BHA Lys [Lys]₂ [Lys]₄ [Lys]₈ [Lys]₁₆ [(α-NH₂·TFA)₁₆ (ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₁₆] (参考文献1) (100.0mg, 0.004mmol) およびHOOCPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe) (Click Chemistry Tools; 6.74mg, 0.005mmol) を用いて、一般手順Cに従って調製し(反応容器を箔で包んで遮光することを除く)、メタノールを溶出液として使用して、残渣をSEC (Sephadex (商標) LH-20) により精製して、生成物である化合物111 (63mg, 65%) を得た。

¹HNMR(300MHz, D₂O) δ(ppm) 8.45-8.28(m, 2H), 7.47-7.07(m, 12H), 6.03(bs, 1H), 4.40-4.08(m, 23H), 4.06-3.38(m, 1906H), 3.33(s, 56H), 3.29-2.91(m, 78H), 2.63-2.45(m, 3H), 1.98-0.98(m, 200H); HPLC(C8XBridge, 3x100mm) グラジエント(ギ酸緩衝液): 5% ACN/H₂O(0-1分), 5-80% ACN(1-7分), 80% ACN(7-12分), 80-5% ACN(12-13分), 5% ACN(13-15分), 243nm, 0.4mL/分, Rt=8.51-9.02分。

【0333】

1. 53 BHA [Lys]₃₂ [((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁₋₄(α-NH₂)₂₈₋₃₁) (ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₃₂] , G5, 化合物112

BHA [Lys]₃₂ [(α-NH₂·TFA)₃₂(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₃₂] (100.0mg, 0.002mmol) およびHOOCPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe) (Click Chemistry Tools; 3.38mg, 0.005mmol) を用いて、反応容器を箔で包んで遮光した以外は、一般手順Cに従って調製し、メタノールを溶出液として使用して、残渣をSEC (Sephadex (商標) LH-20) により精製して、生成物である化合物21 (68mg, 72%) を得た;

¹HNMR(300MHz, D₂O) δ(ppm): 8.44-8.29(m, 2H), 7.44-7.09(m, 12H), 6.02(bs, 1H), 4.37-4.11(m, 31H), 4.08-3.37(m, 2937H), 3.32(s, 83H), 3.27-2.88(m, 116H), 2.59-2.42(m, 3H), 2.18-0.92(m, 313H); HPLC(C8XBridge, 3x100mm) グ

ラジエント(ギ酸緩衝液): 5% ACN/H₂O(0-1分), 5-80% ACN(1-7分), 80% ACN(7-12分), 80-5% ACN(12-13分), 5% ACN(13-15分), 214 nm, 0.4 mL/分, R_t=8.77分。

【0334】

1.54 BHA [Lys]₄ [(α-NHBoc)₄(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe)₄)] , G2, 化合物113

BHA [Lys]₄ [(α-NHBoc)₄(ε-NH₂)₄] (46.0 mg, 0.031 mmol) / DMF 攪拌溶液に、RTで、NMM (68.0 μL, 0.620 mmol)、HOOCPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe) (Click Chemistry Tools; 43.0 mg, 0.155 mmol)、PyBOP (81.0 mg, 0.155 mmol) を加えた。16時間後、反応混合物をACN:MQ水(3 mL, 1:1 v/v) に溶解し、溶液を濾過した(0.45 μm アクロディスクシリンジフィルター)。そのろ液を分取HPLCにより精製した。30-80% ACN、60分、移動相: MQ水およびアセトニトリル、R_t 33.0~36.0分、化合物22をピンク色の固体52 mg (22%) として得た。LCMS (親水法, TFA 緩衝液) R_t=5.66分; ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.52 (d, 8H, J=9.0 Hz), 7.40-7.26 (m, 10H), 7.20 (d, 8H, J=9.0 Hz), 6.23-6.17 (m, 1H), 4.36-4.21 (m, 10H), 3.99-3.83 (m, 13H), 3.82-3.46 (m, 487H), 3.46-3.32 (m, 22H), 3.27-3.02 (m, 15H), 3.02 (s, 12H), 2.54-2.38 (m, 17H), 1.92-1.14 (m, 89H)。

10

【0335】

1.55 BHA [Lys]₄ [(α-NH₂·HCl)₄(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe)₄)] , G2, 化合物114

BHA [Lys]₄ [(α-NHBoc)₄(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe)₄)] , G2, 化合物113 (48.0 mg) / メタノール (2 mL) の攪拌溶液に、3 M 塩酸 / メタノール (2 mL) 溶液を加え、反応混合物を室温で20時間攪拌した。揮発物を減圧除去して、BHALys [Lys]₂ [Lys]₄ [(α-NH₂·HCl)₄(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe)₄)] , G2, 化合物23をピンク色の固体41.0 mg (91%) として得た。LCMS (親水法, TFA 緩衝液), グラジエント: 20~90 アセトニトリル、8分; R_t=5.27分。

20

【0336】

1.56 HO-Lys [(α-NHCy5)(ε-NHDFO)] , 化合物108

化合物115 (20.0 mg, 0.032 mmol) / DMSO (5 mL) の攪拌溶液に、DIPEA (32 μL, 0.224 mmol) を加え、その後 p-SCN-デフェロキサミン (Macrocyclics, 24.0 mg, 0.032 mmol) を加えた。反応混合物を室温で4時間攪拌し、次いで、溶液に窒素ガス流を数時間吹き付けて濃縮した。その後、得られた残渣を分取HPLCによって精製した。30~60% ACN / MQ水 + 0.1% TFA (60分, R_t 39~42分) により、生成物である化合物108を青色固体15 mg (34%) として得た。LCMS (親水法, TFA 緩衝液) R_t=5.93分; ESI MS (+ve) 1364 [M]⁺; C₇₁H₁₀₃N₁₂O₁₁S₂ [M]⁺ の m/z 計算値 = 1364。 ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.25 (t, 2H, J=12.0 Hz), 7.56-7.18 (m, 9H), 6.65 (t, 1H, J=12.0 Hz), 6.37-6.15 (m, 2H), 4.43-4.32 (m, 1H), 4.11 (t, 2H, J=6.0 Hz), 3.70-3.46 (m, 8H), 3.22-3.10 (m, 3H), 2.86-2.69 (m, 3H), 2.56-2.38 (m, 3H), 2.31 (t, 2H, J=6.0 Hz), 2.11 (s, 2H), 1.96-1.18 (m, 32H)。

30

40

【0337】

1.57 HO-Lys [(α-NHCy5)(ε-NH₂)] , 化合物115

化合物116 (36 mg; 0.043 mmol) を含む DMF (4 mL) 攪拌溶液にピペリジン (1.5 mL) を加え、反応混合物を室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、残渣を分取HPLC; 20~90% ACN / MQ水 + 0.1% ギ酸 (60分, R_t 32.0~33.0分) によって精製し、生成物である化合物59を青色固体12 mg (44

50

%)として得た。LCMS (親水法, TFA緩衝液) $R_t = 7.65$ 分; ESI MS (+ve) 611 [M]⁺; C₃₈H₅₁N₄O₃ [M]⁺のm/z計算値=611。

【0338】

1.58 HO-Lys [(α-NHCy5)(ε-NHDFO)] ウェッジの合成、化合物116

HO-Lys [(α-NH₂·TFA)(ε-NHFmoc)] (57.0mg, 0.118mmol) / DMF (5mL) の攪拌溶液に、NMM (52μL, 0.472mmol) およびシアニン5 NHSエステル (Lumiprobesc, 40.0mg, 0.059mmol) を加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌した後、揮発分を真空除去した。残渣をACN:MQ水 (3mL 1:1 v/v) に溶解し、溶液を濾過した (0.45μmアクロディスクシリンジフィルタ)。ろ液を分取HPLC; 20~90% ACN/MQ水+0.1% ギ酸 (60分, R_t 39.0~42.0分) で精製し、青色固体として化合物58 33mg (67%) を得た。LCMS (親水法, TFA緩衝液) $R_t = 10.54$ 分; ESI MS (+ve) 833 [M]⁺; C₅₃H₆₁N₄O₅ [M]⁺のm/z計算値=833.46。¹H-NMR (300MHz, D₂O) δ (ppm): 8.21 (t, 2H, J=15.0Hz), 7.79 (d, 2H, J=6.0Hz), 7.63 (d, 2H, J=6.0Hz), 7.49-7.24 (m, 10H), 6.61 (t, 1H, J=12.0Hz), 6.29-6.22 (m, 2H), 4.49-4.26 (m, 2H), 1.18 (t, 1H, J=6.0Hz), 4.07 (t, 2H, J=6.0Hz), 3.68-3.60 (m, 2H), 3.60 (s, 3H), 3.12 (t, 2H, J=6.0Hz), 2.28 (t, 2H, J=6.0Hz), 1.94-1.61 (m, 6H), 1.71 (s, 12H), 1.62-1.19 (m, 6H)。

【0339】

実施例2 デンドリマー薬物複合体の合成

2.1 アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₄ [(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)(ε-NH-COPEG₁₀₀)]₄, G2、化合物17

アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₄ [(α-NH₂·TFA)(ε-NHPEG₁₁₀₀)]₄ (50.0mg, 7.24μmol) を用いて、一般手順Eに従って調製し、暗赤色の油状固体を得た (58mg, 89%)。

¹H-NMR (300MHz, CD₃OD) δ (ppm): 0.69-2.17 (m, 68H); 2.30-2.50 (m, 8H); 2.56-2.68 (m, 2H); 3.02-3.24 (m, 8H); 3.38-3.41 (m, 24H); 3.52-4.56 (m, 520H); 4.69-4.77 (m, 12H); 5.19-5.57 (m, 4H); 7.15-8.14 (m, 12H)。LCMS (親水法, ギ酸緩衝液) $R_t = 11.23$ 分。ESI MS (+ve) は、9016に変換される。

【0340】

2.2 アジド-PEG₂₄-CO- [N(PN)₂] [Lys]₄ [(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₄, G2, 化合物64

アジド-PEG₂₄-CO- [N(PN)₂] [Lys]₄ [(α-NH₂·TFA)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₄ (50.0mg, 7.24μmol) を用いて、一般手順Eに従って調製し、暗赤色の油状固体を得た (58mg, 89%)。

¹H-NMR (300MHz, CD₃OD) δ (ppm): 0.69-2.17 (m, 68H); 2.30-2.50 (m, 8H); 2.56-2.68 (m, 2H); 3.02-3.24 (m, 8H); 3.38-3.41 (m, 24H); 3.52-4.56 (m, 520H); 4.69-4.77 (m, 12H); 5.19-5.57 (m, 4H); 7.15-8.14 (m, 12H)。LCMS (親水法, ギ酸緩衝液) $R_t = 11.23$ 分。ESI MS (+ve) は、9016に変換される。

【0341】

2.3 アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)(ε-NH-COPEG₁₀₀)]₈, G3、化合物18

アジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-NH₂·TFA)(ε-NHPEG₁₁₀₀)]₈ (50.0mg, 3.91μmol) を用いて、一般手順Eに従って調製し、暗赤色の油状固体 (50mg, 75%) を得た。

¹H-NMR (300MHz, CD₃OD) δ (ppm): 0.88-1.93 (m, 120H); 2.33-2.51 (m, 16H); 2.58-2.72 (m, 2H); 3.04-3.24 (m, 8H); 3.35-3.41 (m, 76H); 3.52-4.61 (m, 964H); 5.27-5.45 (m, 8H); 7.13-8.13 (m, 24H)。LCMS (親水法, ギ酸緩衝液) $R_t = 11.30$ 分。

10

20

30

40

50

【0342】

2.4 アジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 化合物65

アジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH₂.TFA)₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈(50.0mg, 3.91μmol)を用いて、一般手順Eに従って調製し、暗赤色の油状固体を得た(50mg, 75%)。

¹H-NMR(300MHz,CD₃OD)δ(ppm): 0.88-1.93(m,120H);2.33-2.51(m,16H);2.58-2.72(m,2H);3.04-3.24(m,8H);3.35-3.41(m,76H);3.52-4.61(m,964H);5.27-5.45(m,8H);7.13-8.13(m,24H)。LCMS(親水法,ギ酸緩衝液)R_t=11.30分。

10

【0343】

2.5 アジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-Glu-VaL-Cit-PAB-MMAE)₈(ε-NH-COPEG₅₇₀)]₈, G3, 化合物19

アジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH₂.TFA)₈(ε-NH-COPEG₅₇₀)]₈(7.2mg, 842nmol)およびHO-Glu-Vc-PAB-MMAE(10.0mg, 8.08μmol)を用いて、一般手順Fに従って調製し、生成物濃度14.6mg/3.5mL(240μM)を得た。

【0344】

2.6 アジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-Glu-VaL-Cit-PAB-MMAE)₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 化合物20

アジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH₂.TFA)₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈(10.8mg, 842nmol)およびHO-Glu-Vc-PAB-MMAE(10.0mg, 8.08μmol)を用いて、一般手順Fに従って調製し、生成物濃度18mg/3.5mL(240μM)を得た。

20

【0345】

2.7 アジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-Glu-VaL-Cit-PAB-MMAE)₈(ε-NH-COPEG₂₀₀₀)]₈, G3, 化合物21

アジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₂[Lys]₄[Lys]₈[(α-NH₂.TFA)₈(ε-NH-COPEG₂₀₀₀)]₈(18.1mg, 842nmol)とHO-Glu-Vc-PAB-MMAE(10.0mg, 8.08μmol)を用いて、一般手順Fに従って調製し、生成物濃度25.5mg/3.5mL(240μM)を得た。

30

【0346】

2.8 アジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₂[Lys]₄[Lys]₈[(α-NH-DGA-MMAF(OMe))₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 化合物22

アジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₂[Lys]₄[Lys]₈[(α-NH₂.TFA)(ε-NH₀-COPEG₁₁₀₀)]₈(16.3mg, 1.28μmol)およびDGA-MMAF(OMe)(10.6mg, 12.3μmol)を用いて、一般手順Fに従って調製し、生成物濃度23.8mg/3.5mL(365μM)を得た。

40

【0347】

2.9 アジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-DGA-Pt(IV)アセテート)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 化合物23

アジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH₂.TFA)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈(SPL19およびSPL32)(22.4mg, 1.75μmol)/DMF(0.5mL)の攪拌溶液に、NMM(7.4μL, 67.3

50

μmol)を加えた。次に、得られた溶液を、酢酸ジグリコール酸-1R, 2R-シクロヘキサン-1, 2-ジアミン-オキサト白金(IV) (10.4mg, 17.7 μmol)およびPyBOP (8.74mg, 16.8 μmol) / DMF (0.5mL)の攪拌溶液に加えた。続いて得られた反応混合物を光から保護して、室温で一晩攪拌した後、SECにより精製して、生成物をオフホワイトの固体として得た (24mg, 86%)。¹H-NMR (300MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.28-1.89 (m, 128H), 2.07 (s, 23H), 2.24-3.01 (m, 57H), 3.12-3.26 (m, 22H), 3.37 (s, 25H), 3.39-3.90 (m, 768H), 4.04-4.69 (m, 80H)。LCMS (親水法, TFA緩衝液) R_t = 10.63分。ICP-OES決定されたPt% 9.0%は、巨大分子に7つのPt含有部分があることを示している。複合体の実際の分子量は、16.1kDaと決定される。

10

【0348】

2.10 BHA [Lys]₈ [((α -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁₋₄ (α -NH₂)₄₋₇) (ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₈], G3, 化合物34

BHA [Lys]₈ [(α NH₂.TFA)₈ (ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₈] (100mg, 0.00786mmol, 1.0eq) / DMF (300 μ L)の攪拌溶液を、RTで調製した。これに (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO₂H (Click Chemistry Tools; 16mg, 0.01mmol, 1.3当量)、PyBOP (8mg, 0.013mmol, 1.6当量)、DMF (200 μ L)を加えた。反応混合物を3分間攪拌後、NMM (40mg, 50 μ L, 0.38mmol, 48当量)を加えた。この内容物を光から保護して、RTで一晩攪拌した。反応混合物をMQ水で希釈し、一晩凍結保存した。凍結乾燥材料をMeOH (1mL)に取り込み、SECにより精製した (400滴 / チューブ、MeOH sephadex LH20、35滴 / 分)。生成物含有画分をHPLCにより確認し、2つの異なる画分に分けて回収した。各画分を減圧濃縮し、得られた残渣をMQ水に取り込み、濾過 (0.45 μ mアクロディスクフィルタ)し、凍結乾燥させて、表題生成物をピンク色の固体として得た (69mg, 66%)。

20

HPLC (C8 Xbridge, 3x100mm) グラジエント。5% ACN/H₂O (0-1分), 5-80% ACN (1-7分), 80% ACN (7-12分), 80-5% ACN (12-13分), 5% ACN (13-15分), 214nm, 0.4mL/分, R_f (分) = 8.4 (ブロード・ピーク)。¹H-NMR (300MHz, D₂O) δ (ppm): 1.00-2.00 (m, 90H), 2.51 (t, 3H), 2.60 (brs, 3H), 3.00-3.12 (m, 6H), 3.12-3.35 (brs, 27H), 3.35-3.45 (m, 26H), 3.45-4.15 (m, 937H), 4.15-4.45 (m, 12H), 6.12 (s, 1H), 7.15-7.50 (m, 12H), 8.40-8.50 (m, 2H)。

30

【0349】

2.11 BHA [Lys]₈ [((α -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₂-BCN)₁₋₄ (α -NH₂)₄₋₇) (ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₈], G3, 化合物35

BCN-PEG₂CO-NHPEG₂₄-CO₂H化合物31 (9.6mg, 0.006mmol, 1.3当量) / DMF (200 μ L)の攪拌溶液をRTで調製した。これにPyBOP (4mg, 0.008mmol, 1.6当量)およびNMM (23mg, 25 μ L, 0.226mmol, 48当量)を加え、5分後にBHA [Lys]₈ [(α -NH₂.TFA)₈ (ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₈] (60mg, 0.006mmol, 1.0当量)を加え、その後DMF (200 μ L)を加えた。内容物を光から保護して、RTで一晩攪拌した。反応混合物をACN (10mL)で希釈し、その後SEC (400滴 / チューブ、ACN sephadex LH20、35滴 / 分)により精製した。生成物含有画分をHPLCにより確認し、回収、濾過 (0.45 μ mアクロディスクフィルタ)し、減圧濃縮し、一晩凍結乾燥させて、表題化合物を淡黄色の固体として得た (58mg, 収率92%)。

40

HPLC (C8 Xbridge, 3x100mm) グラジエント。5% ACN/H₂O (0-1分), 5-80% ACN (1-7分), 80% ACN (7-12分), 80-5% ACN (12-13分), 5% ACN (

50

13-15分), 214nm, 0.4mL/分, Rt(分)=8.43(ブロード・ピーク)。¹H-NMR(300MHz, MeOD) δ(ppm): 0.75-1.12(m, 15H), 1.12-2.15(m, 95H), 2.15-2.35(m, 7H), 2.55(brs, 3H), 3.00-3.35(m, 90H), 3.35-3.38(s, 17H), 3.38-4.09(m, 592H), 4.13(d, 2H), 4.18-4.63(brs, 7H), 6.18(s, 0.9H), 7.12-7.48(m, 7H)。

【0350】

2.12 (MeTzPh) PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-Cy5)₁₋₄(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₄₋₇](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈], G3, 化合物36

Cy5-NHS(214μL 4.2mg/mL DMF溶液; 1.43μmol, 1.0当量)溶液を、ニート(MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH₂·HCl)₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈]化合物8(18mg, 1.43μmol)を得た。完全に溶解した後、NMM(10μL, 91.0μmol)を加え、得られた反応混合物を攪拌して、光から保護した。2時間後、NMM(10μL, 91.0μmol)およびPyBOP(7.3mg, 14.0μmol)をデンドリマー溶液、その後Glu-VC-PAB-MMAE/DMF溶液(290μL、60mg/mL溶液、14.0μmol, 9.8当量)に加えた。続いて得られた反応混合物を光から保護して、RTで一晩攪拌した。

10

【0351】

反応混合物をPBS(2.0mL)で希釈し、最終容量2.5mLとした。その後、希釈溶液をPD10脱塩カラム(PBSで事前に平衡化した)に通した。全溶液がカラム床に入った後、PBS(3.5mL)を加えて生成物を溶出させた(青色のバンドとして現れた)。構築物最終理論濃度=8.7mg/mL/PBS。材料は、-80℃で冷凍保存した。HPLC(C8 Xbridge, 3x100mm)グラジエント。5%ACN/H₂O(0-1分), 5-80%ACN(1-7分), 80%ACN(7-12分), 80-5%ACN(12-13分), 5%ACN(13-15分), 214nm, 0.4mL/分, Rt(分)=95~10分(ブロードピーク); 17%MMAE/MMAE-リンカーとの複合体関連ピーク83%。

20

【0352】

2.13 (MeTzPh) PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₂[³H-Lys]₄[Lys]₈[(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈], G3, 化合物40

30

(MeTzPh) PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₂[³H-Lys]₄[Lys]₈[(α-NH₂·HCl)₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈](化合物53の合成に用いた方法を使用して調製)(36.8mg, 2.93μmol)/NMM/DMF(7.8μL/0.5mL)に、固体PyBOP(24.7mg, 47.5μmol)を加えた。完全に溶解させた後、このデンドリマー溶液を、HO-Glu-VC-PAB-MMAE(40mg, 32.3μmol)/NMM/DMF(7.8μL/0.5mL)に加えた。続いて得られた反応混合物を光から保護して、RTで一晩攪拌した。

【0353】

反応混合物をPBS(4.0mL)で希釈し、最終容量を5mLにした。その後、希釈した溶液を2つのPD10脱塩カラム(PBSで事前に平衡化、各カラムに2.5mL)に通した。すべての溶液がカラム床に入ったときに、PBS(3.5mL)を各カラムに加えて生成物を溶出させた。得られた粗混合物は、再生セルロースAmicon Ultra-0.5mL遠心分離ユニット(10K MWCO)を用いてさらに精製した。構築物の最終理論濃度=29~30mg/mL/PBS。材料は、-20℃で冷凍保存した。HPLC(C8 Xbridge, 3x100mm)グラジエント。5%ACN/H₂O(0-1分), 5-80%ACN(1-7分), 80%ACN(7-12分), 80-5%ACN(12-13分), 5%ACN(13-15分), 214nm, 0.4mL/分, Rt(分)=9.5~12分(ブロードピーク); 複合体関連ピーク91.4%およびMMAE/MMAE-リンカー関連のピーク8.6%を有する。

40

【0354】

50

2.14 (MeTzPh) PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₆](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈]、G3化合物66

p-SCN-デフェロキサミン(2.1mg, 2.79μmol)/DMSO(100μL)の攪拌溶液をRTで調製した。これに、(MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH₂·HCl)₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈]化合物53(17.0mg, 1.35μmol)/DMF(200μL)を加えた。その後得られた反応混合物を3分間攪拌後、NMM(10μL, 91.0μmol)を加えた。得られた溶液を光から保護して、RTで4時間攪拌した。PyBOP(7.0mg, 13.5μmol)を加え、5分後に反応混合物をニートHO-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE(9.76mg, 7.89μmol)に加えた。続いて得られた反応混合物を一晩放置した。反応混合物をPBS緩衝液で希釈し(4.5mL)、4枚のAmicon Ultra遠心分離フィルタ(10K MWCO)に分け、フィルタを遠心分離(14K rcf、15分)した。保持液をPBSに対して透析濾過した(400μL、14K rcf、15分x10回)。保持液を混合してピンク色の溶液を得た。化合物67の濃度は、2mL中約16mgである。HPLC(C8XBridge, 3x100mm)のグラジエント。5%ACN/H₂O(0-1分), 5-80%ACN(1-7分), 80%ACN(7-12分), 80-5%ACN(12-13分), 5%ACN(13-15分), 214nm, 0.4mL/分, Rt(分)=8.7-9.8分(ブロードピーク)。

10

[0355]

20

2.15 BHA[Lys]₈[(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁(α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₅](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈]G3, 化合物67

p-SCN-デフェロキサミン(2.0mg, 2.66μmol)/DMSOの攪拌溶液(100μL)をRTで調製した。これに、BHALys[Lys]₈[(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁(α-NH₂)₇](ε-NH-PEG₁₁₀₀)₈]化合物34(17.0mg, 1.27μmol)/DMF(200μL)を加えた。その後得られた反応混合物を3分間攪拌後、NMM(10μL, 91.0μmol)を加えた。得られた溶液を光から保護して、RTで4時間攪拌した。PyBOP(7.0mg, 13.5μmol)を加え、5分後に反応混合物をニートHO-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE(9.17mg, 7.41μmol)に加えた。続いて得られた反応混合物を一晩放置した。反応混合物をPBS緩衝液で希釈し(4.5mL)、4枚のAmicon Ultra遠心分離フィルタ(10K MWCO)に分け、フィルタを遠心分離(14K rcf、15分)した。保持液をPBSに対して透析濾過した(400μL、14K rcf、15分x10回)。保持液を混合してピンク色の溶液を得た。化合物68の濃度は、2mL中約16mgである。HPLC(C8XBridge, 3x100mm)のグラジエント。5%ACN/H₂O(0-1分), 5-80%ACN(1-7分), 80%ACN(7-12分), 80-5%ACN(12-13分), 5%ACN(13-15分), 214nm, 0.4mL/分, Rt(分)=9.3-9.7分(ブロードピーク)。

30

[0356]

40

2.16 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-Cy5)₁(α-NH-Glu-SN₃₈)₇](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈]、G3 化合物68

(MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH₂·HCl)₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈]化合物53(10mg, 0.75μmol)/DMF(2mL)の攪拌溶液に、NMM(4.0μL, 36.0μmol)およびスルホCy5 NHSエステル(0.58mg, 0.75μmol)を加えた。反応混合物を室温で2時間攪拌した。SN38-Glu-COOH(WO2020/102852)(3.94mg, 7.8μmol)およびPyBOP(4.05mg, 7.8μmol)を反応混合物に加え、反応混合物を室温でさらに20時間攪拌し

50

た。溶媒を減圧除去し、移動相としてアセトニトリルを使用して、得られた残渣をサイズ排除クロマトグラフィー（Sephadex LH 20）により精製し、表題化合物を青色固体として得た（6.0 mg）。反応混合物のUPLC-TOF分析により、デンドリマー上にスルホCy5 NHSエステルおよびSN-38-Glu-COOHがランダムに付加していることが確認される。UPLC-TOF（親水法，TFA緩衝液）Rt = 84.80 - 5.80分。

【0357】

2.17 BHA [Lys]₃₂ [((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁₋₄ (α-NH₂)₂₈₋₃₁ (ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₃₂] , G5, 化合物69

BHA Lys [Lys]₃₂ [(α-NH₂·TFA)₃₂ (ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₃₂] (100.0 mg, 0.002 mmol) およびHOOCPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe) (Click Chemistry Tools; 3.38 mg, 0.005 mmol) を用いて、一般手順Cに従って調製し（反応容器を箔で包んで遮光断することを除く）、メタノールを溶出液として使用して、残渣をSEC (Sephadex (商標) LH-20) により精製し、生成物である化合物69 (68 mg, 72%) を得た；

¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.44-8.29 (m, 2H), 7.44-7.09 (m, 12H), 6.02 (bs, 1H), 4.37-4.11 (m, 31H), 4.08-3.37 (m, 2937H), 3.32 (s, 83H), 3.27-2.88 (m, 116H), 2.59-2.42 (m, 3H), 2.18-0.92 (m, 313H); HPLC (C8XBridge, 3x100 mm) グラジエント (ギ酸緩衝液): 5% ACN/H₂O (0-1分), 5-80% ACN (1-7分), 80% ACN (7-12分), 80-5% ACN (12-13分), 5% ACN (13-15分), 214 nm, 0.4 mL/分, Rt = 8.77分。

【0358】

2.18 BHA [Lys]₃₂ [((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁₋₄ (α-NHCy5)₁ (α-NH-COPEG₉-Val-Ala-PAB-トリガー-NMeCO-CTX)₂₂ (α-NH₂)₅₋₈ (ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₃₂] G5、化合物70

BHA [Lys]₃₂ [((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁₋₄ (α-NH₂)₂₈₋₃₁ (ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₃₂] 化合物69 (20.0 mg, 0.4 μmol) / DMFの攪拌溶液に、NMM (8.0 μL, 72 μmol)、その後Cy5-NHSエステル (0.26 mg, 0.4 μmol) を加え、反応混合物を室温で一晩攪拌した。化合物63 (25.7 mg, 14.4 μmol) およびPyBOPを反応混合物に加え、室温でさらに20時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、粗残渣をアセトニトリル (2 mL) に溶解し、得られた溶液を0.45 μm フィルタでろ過した。ろ液を回収し、アセトニトリルを溶媒として使用して、サイズ排除クロマトグラフィー (Sephadex LH 20) を用いて精製し、表題化合物を青色固体として得た (27 mg; 75%)。

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ (ppm): 8.52 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 8.25-7.05 (m, 329H), 6.39-5.89 (m, 23H), 5.73-4.94 (m, 141H), 4.64-4.05 (m, 161H), 4.05-3.36 (m, 4026H), 3.18-2.22 (m, 323H), 2.18-0.56 (m, 1362H); HPLC (C8XBridge, 3x100 mm) グラジエント (ギ酸緩衝液): 75% ACN/H₂O (0-1分), 75-90% ACN (1-7分), 90% ACN (7-12分), 90-75% ACN (12-13分), 75% ACN (13-15分), 214分, 0.4 mL/分, Rt (分) = 8.90-9.10。

【0359】

実施例3 標的デンドリマー複合体の合成

3.1 アフィボディー-MPED-BCN-トリアゾロ-PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₄ [(α-NH-DGA-3' NH-Dox)₁₋₄ (ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₄、G2、化合物24

アフィボディー-BCN (900 μL) およびアジド-PEG₂₄-CO [N (PN)₂] [Lys]₄ [(α-NH-DGA-3' -NH-Dox)₁₋₄ (ε-NH-COPE

G₁₁₀₀)]₄ (858 μM 溶液の300 μL) を用いて、一般手順 G に従って調製した (アフィボディー-BCN : DGA-Dox デンドリマーモル比 ; 1 : 3) 。SDS-PAGE 分析では、アフィボディー-デンドリマー複合体に対応するバンドが19 kDa (700 nm) 付近で示されていた。

【0360】

3.2 アフィボディー-BCN / N₃-PEG₂₄CO-[N(PN)₂] [Lys]₄ [(α-NH-DGA-14-O-Nemo) (ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₄, G2, 化合物71

アフィボディー-BCN (900 μL) およびアジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂] [Lys]₄ [(α-NH-14-O-DGA-Nemo) (ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₄ (858 μM 溶液の300 μL) を用いて、一般手順 G に従って調製した (アフィボディー-BCN : DGA-Nemo デンドリマーモル比 ; 1 : 3) 。SDS-PAGE 分析では、アフィボディー-デンドリマー複合体に対応するバンドが19 kDa (700 nm) 付近で示されていた。

10

【0361】

3.3 アフィボディー-MPED-BCN-トリアゾロ-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-NH-DGA-3'-NH-Dox) (ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 化合物25

アフィボディー-BCN (105 μL) およびアジド-PEG₂₄-CO [N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-NH-DGA-3'-NH-Dox) (ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈ (580 μM 溶液の35 μL) を用いて、一般手順 G に従って調製した (アフィボディー-BCN : DGA-Dox デンドリマーモル比 ; 1 : 1) 。SDS-PAGE 分析では、アフィボディー-デンドリマー複合体に対応するバンドが27 kDa (700 nm) 付近で示されていた。アジド IR Dye 800 CW を添加し、800 nm で蛍光を測定することによって、コンジュゲート収率は、80 % と推定した。

20

【0362】

3.4 アフィボディー-BCN / N₃-PEG₂₄CO-[N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-NH-DGA-14-O-Nemo) (ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 化合物72

アフィボディー-BCN (105 μL) およびアジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-NH-DGA-14-O-Nemo) (ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈ (580 μM 溶液の35 μL) を用いて、一般手順 G に従って調製した (アフィボディー-BCN : DGA-Nemo デンドリマーモル比 ; 1 : 1) 。SDS-PAGE 分析では、アフィボディー-デンドリマー複合体に対応するバンドが27 kDa (700 nm) 付近で示されていた。アジド IR Dye 800 CW を添加し、800 nm で蛍光を測定することによって、コンジュゲート収率は、80 % と推定した。

30

【0363】

3.5 アフィボディー-BCN / N₃-PEG₂₄CO-[N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₈ (ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 化合物26

アフィボディー-BCN (2.0 mg, 286 nmol, 1.0 mg/mL PBS) およびアジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE) (ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈ (1.0 mL の240 μM 溶液) を用いて、一般手順 G に従って調製した。精製した材料を凍結乾燥させて、白色の綿毛状粉末を得た (2.19 mg, 31 %) 。SDS-PAGE 分析では、アフィボディー-デンドリマー複合体に対応するバンドが30 kDa (700 nm) 付近で示されていた。

40

【0364】

3.6 アフィボディー-BCN / N₃-PEG₂₄CO-[N(PN)₂] [Lys]₈ [(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₈ (ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 化合物26

50

G2000)8], G3, 化合物27 (化合物78/SPL40)

アフィボディBCN (1.0mg、143nmol、1.0mg/mLのPBS) およ
びアジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-Glu-vc
-PAB-MMAE)(ε-NH-COPEG₂₀₀₀)]₈(250μLの233μM
溶液)を用いて、一般手順Gに従って調製した。SDS-PAGE分析では、アフィボデ
ィーデンドリマー複合体に対応するバンドが40kDa(700nm)付近で示されてい
た。

【0365】

3.7 アフィボディ-BCN/N₃-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]
8[(α-NH-DGA-Pt(IV)-アセテート)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀
)]₈, G3, 化合物28

10

アフィボディBCN (5.0mg, 715nmol、1.0mg/mL PBS) およ
びアジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-DGA-Pt
(IV)-アセテート)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈(903μM溶液の60
0μL)を用いて、一般手順Gに従って調製した。精製した材料を凍結乾燥させて、白色
の綿毛状粉末を得た(5.90mg, 47%)。SDS-PAGE分析では、アフィボデ
ィーデンドリマー複合体に対応するバンドが30kDa(700nm)付近で示されてい
た。

【0366】

3.8 Fab-トリアゾールDBCO-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]
4[(α-DGA-3'-NH-Dox)(ε-NHPEG₁₁₀₀)]₄G2-Dox/
PEG₁₁₀₀デンドリマー、化合物29

20

アジド-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[(α-NH-DGA-3'-N
H-Dox)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₄の溶液(500μMPBS溶液10
μL)を、Fab-DBCO*の溶液(13.4μM溶液/HEPES緩衝液40μL)
に加えた。続いて得られた反応混合物を室温で一晩振とう(650rpm)し、Fab-
アジド-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[(α-NH-DGA-3'NH-
Dox)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₄を生成した。SDS-PAGE分析を行い
、Odysseyスキャナを用いて700nmおよび800nmでスキャンした。700
nmでスキャンしたSDS-PAGEでは、50kDaに対応するDBCO-Fabのバ
ンドと、約65kDaにおいて予想されるFab-[デンドリマー-Dox/PEG₁₁
00]₂(化合物30)のバンドが見られた。

30

【0367】

3.9 Fab-DBCO/N₃-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₄[(
α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₄, 化合
物73

アジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₄[(α-NH-DGA-14-
O-Nemo)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₄の溶液(500μMPBS溶液の
10μL)を、Fab-DBCO*の溶液(13.4μM溶液/HEPES緩衝液40μ
L)に加えた。続いて得られた反応混合物を室温で一晩振とう(650rpm)し、Fa
b-DBCO/N₃-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₄[(α-NH-DG
A-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₄を生成した。SDS-
PAGE分析を行い、Odysseyスキャナを用いて700nmおよび800nmでス
キャンした。700nmでスキャンしたSDS-PAGEでは、50kDaに対応するD
BCO-Fabのバンドと、約65kDaにおいて予想されるFab-[デンドリマー-
Nemo/PEG₁₁₀₀]₂(化合物30)のバンドが見られた。

40

【0368】

3.10 アフィボディ-BCN/N₃-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]
2[Lys]₄[Lys]₈[(α-NH-DGA-MMAF(OMe)₈(ε-NH-
-COPEG₁₁₀₀)]₈、G3、化合物30

50

アフィボディBCN (2.0mg, 286nmol, 1.0mg/mL PBS) および
 アジド-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-DGA-MMA
 F(OMe))(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈(365μM溶液の600μL)
 を用いて、一般手順Gに従って調製した。精製した材料を凍結乾燥させて、白色の綿毛状
 粉末を得た(2.06mg, 33%)。SDS-PAGE分析では、アフィボディ-デ
 ンドリマー複合体に対応するバンドが30kDa(700nm)付近で示されていた。

【0369】

3.11 ナノボディ-PEG₁₂-TCO-MePhTz-PEG₄-PEG₂₄-C
 O[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-Cy5)₁(α-NH-Glu-VC-
 PAB-MMAE)₇(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈] , 化合物41

DBCO-PEG₁₂-TCOおよびナノボディ2D3 N-末端タグ、TEV、C-
 末端アジドを用いて、以下の実施例4に従って、ナノボディ構築物を調製した。

【0370】

3.12 ナノボディ-PEG₁₂-TCO-MePhTz-PEG₄-PEG₂₄-C
 O[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-Cy5)₁(α-NH-Glu-VC-
 PAB-MMAE)₇(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈] , 化合物42

DBCO-PEG₁₂-TCOおよびナノボディ2D3 N-末端タグ、TEV、C-
 末端アジドを用いて、以下の実施例4に従って、ナノボディ構築物を調製した。

【0371】

3.13 ナノボディ-PEG₁₂-TCO-MeTzPh-PEG₄-PEG₂₄-C
 O[N(PN)₂][Lys]₁₆[(α-NH-Cy5)₁(α-NHAc)₁₅(ε-
 NH-COPEG₁₁₀₀)₁₆] , 化合物43

DBCO-PEG₁₂-TCOおよびナノボディ2D3 N-末端タグ、TEV、C-
 末端アジドを用いて、以下の実施例4に従って、ナノボディ構築物を調製した

【0372】

3.14 ナノボディ-PEG₁₂-TCO-MeTzPh-PEG₄-PEG₂₄-C
 O[N(PN)₂][Lys]₃₂[(α-NH-Cy5)₁(α-NHAc)₃₁(ε-
 NH-COPEG₁₁₀₀)₃₂] , 化合物44

DBCO-PEG₁₂-TCOおよびナノボディ2D3 N-末端タグ、TEV、C-
 末端アジドを用いて、以下の実施例4に従って、ナノボディ構築物を調製した

【0373】

3.15 ナノボディ-PEG₁₂-TCO-MeTzPh-PEG₄-PEG₂₄-C
 O[N(PN)₂][3H-Lys]₄[Lys(α-NH-Glu-VC-PAB-M
 MAE)₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈] , 化合物45

DBCO-PEG₁₂-TCOおよびナノボディ2D3 N-末端タグ、TEV、C-
 末端アジドを用いて、以下の実施例4に従って、ナノボディ構築物を調製した

【0374】

3.16 ナノボディ-N₃/DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-
 TCO/(MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][L
 ys]₈[(α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-M
 MAE)₆(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈] , 化合物74

DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCOリンカー化合物33 (1
 当量)、テトラジンデンドリマー(MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO
 -[N(PN)₂][Lys]₄[Lys]₈[(α-NH-DFO)₂(α-NH-
 Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₆(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈
]、化合物66(1当量)、ナノボディ-N₃(「ナノボディ-N₃-C末端タグ」)(
 1当量)を用いて一般手順Hに従って調製した。SDS-PAGE分析では、ナノボディ
 -デンドリマー複合体約37kDaに相当するバンドが示された(図1)。

【0375】

3.17 ナノボディ-N₃/BCN-NHPEG₂-Glu-NHPEG₂₄CO-

NHPEG₃-TCO / (MeTzPh) PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₆](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈]、化合物75

BCN-NHPEG₂-Glu-NHPEG₂₄CONHPEG₃-TCOリンカー化合物32(1当量)、テトラジンデンドリマー(MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₄[Lys]₈[(α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₆](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈]、化合物66(1当量)、ナノボディーN₃(「ナノボディーN₃-C末端タグ」)(1当量)を用いて一般手順Hで調製した。SDS-PAGE分析では、ナノボディーデンドリマー複合体約37kDaに相当するバンドが示された(図1)。

10

[0376]

3.18 BHA[Lys]₈[(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz)/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-ナノボディー)1(α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₅](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈]、G3、化合物76

DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCOリンカー化合物33(1当量)、テトラジンデンドリマーBHA[Lys]₈[(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))1(α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₅](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈]、化合物67(1当量)、およびナノボディーN₃(「ナノボディーN₃-C末端タグ」)(1当量)を用いて一般手順Hで調製した。SDS-PAGE分析では、ナノボディーデンドリマー複合体約37kDaに相当するバンドが示された(図1)。

20

[0377]

3.19 ナノボディーN₃/DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO / (MeTzPh) PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-Cy5)₁(α-NH-Glu-10-O-SN38)₇](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈]、化合物77

DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCOリンカー化合物33(1当量)、テトラジンデンドリマー(MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-Cy5)₁(α-NH-Glu-10-O-SN38)₇](ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈]、化合物68(1当量)、ナノボディーN₃(「ナノボディーN₃-C末端タグ」)(1当量)を用いて一般手順Hで調製した。SDS-PAGE分析では、ナノボディーデンドリマー複合体約37kDaに相当するバンドが示された(図2)。

30

[0378]

3.20 BHA[Lys]₃₂[(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz)/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-ナノボディー)1-4(α-NHCy5)₁(α-NH-COPEG₉-Val-Ala-PAB-トリガー-NMeCO-CTX)₂₂](α-NH₂)₅₋₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₃₂]、G5、化合物78

40

DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCOリンカー化合物33(1当量)、テトラジンデンドリマーBHA[Lys]₂[Lys]₄[Lys]₈[Lys]₁₆[Lys]₃₂[(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))1-4(α-NHCy5)₁(α-NH-COPEG₉-Val-Ala-PAB-トリガー-NMeCO-CTX)₂₂(NH₂)₅₋₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₃₂]、化合物70(1当量)、ナノボディーN₃(「ナノボディーN₃-C末端タグ」)(1当量)を用いて一般手順Hで調製した。SDS-PAGE分析では、ナノボディーデンドリマー複合体約95kDaに相当するバンドが示された(図2)。

[0379]

3.21 BHA[Lys]₄[(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(

50

PhMeTz) / TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO / N₃-ナノボディ) 1 (α-Lys (α-NHCy5) (ε-NHDFO)) 1 (α-NH₂)₂) (ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₄] , G2, 化合物86およびBHA [Lys]₄ [((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄ (PhMeTz) / TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO / N₃-ナノボディ) 2-3 (α-Lys (α-NHCy5) (ε-NHDFO)) 1 (α-NH₂)) 0-1 (ε-NHC OPEG₁₀₀₀)₄]、G2、化合物87

BHA [Lys]₄ [((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄ (PhMeTz)) 1 (α-Lys (α-NHCy5) (ε-NHDFO)) 1 (α-NH₂)₁) (ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₄] , G2, 化合物99を用いて、以下を除き、一般手順Hに従って調製した。

10

【0380】

ステップ1: TCOリンカー溶液80は、ニートDMSOで調製した。

ステップ2: デンドリマーをpH8のトリス緩衝液に溶解し、TCOリンカーとデンドリマーが完全に反応したときに (UPLCまたはLCMS)、反応混合物をDMSOの最終濃度が5% (v/v) 以下になるようにトリス緩衝液で希釈し、遠心限外濾過 (Amicon、0.5mL再生セルロース膜、10kDa MWCO) により精製した。

【0381】

精製方法は、化合物74および76の精製に使用した方法と同じであり、ナノボディーデンドリマー複合体化合物86 (232 μg; 0.45 μg / μL / HEPE S緩衝液、pH8) およびナノボディーデンドリマー複合体化合物87 (60 μg; 0.30 μg / μL / HEPE S緩衝液、pH8) を得ることができる。

20

【0382】

3.22 BHA [Lys]₈ [((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄ (PhMeTz) / TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO / N₃-ナノボディ) 1 (α-Lys (α-NHCy5) (ε-NHDFO)) 1 (α-NH₂)₆) (ε-NH-COPEG₄₁₂)₈]、G3, 化合物88およびBHA [Lys]₈ [((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄ (PhMeTz) / TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO / N₃-ナノボディ) 2-4 (α-Lys (α-NHCy5) (ε-NHDFO)) 1 (α-NH₂)₃₋₅ (ε-NH-COP EG₄₁₂)₈]、G3, 化合物88a

30

BHA [Lys]₈ [((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄ (PhMeTz)) 1-4 (α-Lys (α-NHCy5) (ε-NHDFO)) 1 (α-NH₂)₃₋₆) (ε-NH-COPEG₄₁₂)₈] , G3, 化合物100を用いて、以下は除き、一般手順Hに従って調製した:

【0383】

ステップ1: TCOリンカー化合物80の溶液は、ニートDMSOで調製した。

ステップ2: デンドリマーをpH8のトリス緩衝液に溶解し、TCOリンカーとデンドリマーが完全に反応したときに (UPLCまたはLCMS)、反応混合物をDMSOの最終濃度が5% (v/v) 以下になるようにトリス緩衝液で希釈し、遠心限外濾過 (Amicon、0.5mL再生セルロース膜、10kDa MWCO) により精製した。

40

【0384】

精製方法は、化合物74および76の精製に使用した方法と同様にして、ナノボディーデンドリマー複合体化合物88 (140 μg; pH8のHEPE S緩衝液で1.48 μg / μL) および化合物88a (純粋ではない) を得た。

【0385】

3.23 BHA [Lys]₈ [((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄ (PhMeTz) / TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO / N₃-ナノボディ) 1 (α-Lys (α-NHCy5) (ε-NHDFO)) 1 (α-NH₂)₆) (ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₈] , G3, 化合物89およびBHA [Lys

50

] ₈ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz) / TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO / N₃-ナノボディ) ₂₋₄ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH₂) ₃₋₅ (ε-NH-COPEG₁₀₀₀) ₈]、G3、化合物89a

BHA[Lys]₈ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz)) ₁₋₄ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH₂) ₃₋₆ (ε-NH-COPEG₁₀₀₀) ₈] G3、化合物101を用いて、以下は除き、一般手順Hに従って調製した：

【0386】

ステップ1：TCOリンカー（化合物80）の溶液を、ニートDMSOで調製した

ステップ2：デンドリマーをpH8のトリス緩衝液に溶解し、TCOリンカーとデンドリマーが完全に反応したときに（UPLCまたはLCMS）、反応混合物をDMSOの最終濃度が5%（v/v）以下になるようにトリス緩衝液で希釈し、遠心限外濾過（Amicon、0.5mL再生セルロース膜、10kDa MWCO）により精製した。

【0387】

精製方法は、化合物74および76の精製に使用した方法と同様にして、ナノボディーデンドリマー複合体化合物89（249μg；pH8のHEPES緩衝液で2.68μg/μL）および化合物89a（純粋ではない）を得た。

【0388】

3.24 BHA[Lys]₁₆ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz) / TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO / N₃-ナノボディ) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH₂) ₁₄ (ε-NH-COPEG₁₀₀₀) ₁₆] G4、化合物90およびBHA[Lys]₁₆ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz) / TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO / N₃-ナノボディ) ₂₋₄ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH₂) ₁₁₋₁₃ (ε-NHCOP EG₁₀₀₀) ₁₆]、G4、化合物91

BHA[Lys]₁₆ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH₂) ₁₄ (ε-NH-COPEG₁₀₀₀) ₁₆]、G4、化合物102を用いて、以下は除き、一般手順Hに従って調製した：

【0389】

ステップ1：TCOリンカー（化合物80）の溶液を、ニートDMSOで調製した

ステップ2：デンドリマーをpH8のトリス緩衝液に溶解し、TCOリンカーとデンドリマーが完全に反応したときに（UPLCまたはLCMS）、反応混合物をDMSOの最終濃度が5%（v/v）以下になるようにトリス緩衝液で希釈し、遠心限外濾過（Amicon、0.5mL再生セルロース膜、10kDa MWCO）により精製した。

【0390】

精製方法は、化合物74および76の精製に使用した方法と同様にして、ナノボディーデンドリマー複合体化合物90（203μg；0.975μg/μLおよび0.556μg/μL/HEPES緩衝液、pH8）および化合物91（101μg；0.34μg/μL/HEPES緩衝液、pH8）を得た。

【0391】

3.25 BHA[Lys]₃₂ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz) / TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO / N₃-ナノボディ) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH₂) ₃₀ (ε-NH-COPEG₁₀₀₀) ₃₂]、G5、化合物92およびBHA[Lys]₃₂ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz) / TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO / N₃-ナノボディ) ₂₋₄ [α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)] ₁ (α-NH₂) ₂₇₋₂₉ (ε-NH-

10

20

30

40

50

COPEG₁₀₀₀)₃₂]、G5、化合物93

BHA [Lys]₃₂ [(α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁₋₄(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₂₇₋₃₀)(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₃₂] G5、化合物103を用いて、以下は除き、一般手順Hに従って調製した：

【0392】

ステップ1：TCOリンカー化合物80の溶液は、ニートDMSOで調製した。

ステップ2：デンドリマーをpH8のトリス緩衝液に溶解し、TCOリンカーとデンドリマーが完全に反応したときに(UPLCまたはLCMS)、反応混合物をDMSOの最終濃度が5%(v/v)以下になるようにトリス緩衝液で希釈し、遠心限外濾過(Amicon、0.5mL再生セルロース膜、10kDa MWCO)により精製した。

10

【0393】

精製方法は、化合物74および76の精製に使用した方法と同様にして、ナノボディーデンドリマー複合体化合物92(370μg; 3.66μg/μL/HEPES緩衝液、pH8)および生成物化合物93(177μg; 1.72μg/μL/HEPES緩衝液、pH8)を得た。

【0394】

3.26 BHA [Lys]₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₃)(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₂)(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-ナノボディ₂]、G2、化合物94a、BHA [Lys]₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₃)(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-Nanobody)₃]、G2、化合物94、およびBHA [Lys]₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₃)(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-ナノボディ₄]、G2、化合物95

20

BHA [Lys]₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₃)(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₄]、G2デンドリマー、化合物24を用いて、以下は除き、一般手順Hに従って調製した：

30

【0395】

ステップ1：TCOリンカー化合物51の溶液を水で調製した。

ステップ2：デンドリマーをMQ水に溶解した。

【0396】

精製方法は、化合物74および76の精製に使用した方法と同様にして、ナノボディーデンドリマー複合体化合物95および化合物94を分離不可能な混合物として得た(HEPES緩衝液、pH8の最終濃度は294μg)。

【0397】

40

また、DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO化合物80の溶液(10mg/mLの溶液/MQ水57μL、0.322μmol)をナノボディーN3(「ナノボディーN3-C末端タグ」)(2.5mg、0.161μmol)/900μLのトリス緩衝液の溶液にpH8で加えて調製した。この反応混合物をRTで2日間放置した後、反応混合物を、トリス緩衝液pH8を使用する遠心限外濾過(Amicon、0.5mL再生セルロース膜、10kDa MWCO; 10x450μL)によって精製した。この溶液に化合物105の溶液(230.0μg/MQ水500mμL; 0.026μmol)を加え、反応混合物をRTで一晩放置した。精製方法は、化合物74および76の精製に使用した方法と同様にして、ナノボディーデンドリマー化合物95、化合物94aおよび化合物94を分離不可能な混合物として得た(HEPES緩衝液、pH8の最

50

終濃度 124 μg)。

【0398】

3.27 BHA [Lys]₄ [((α -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄ (PhTzMe) / TCO-PEG₈-ナノボディ)₁ (α -Lys (α -NHCy5)₁ (ϵ -NHDFO)₁)₁ (α -NH₂)₂) (ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₄]、G2、化合物97

【0399】

2.0mgを1mL DMSO (1.0mL) に溶解することによって、ジブロモマレイミドリンカー化合物106の溶液を調製した。ナノボディ (「ナノボディ-N3-C-末端タグ」) (化合物79) (1.0mg, 0.058 μmol / トリス緩衝液715 μL 、pH8) の溶液に、TCEP (0.5M / PBS、pH7) の溶液 (2.3 μL , 1.174 μmol) を加えた。反応混合物を37℃で1時間加熱後、DMSOを加え (673 μL)、その後リンカー化合物57 (93.0 μg , 0.117 μmol) / DMSO溶液 (47.0 μL) を加えた。1.5時間後、反応混合物をRTまで冷却して遠心分離し、沈殿物に化合物99 (100 μg , 17 μL , 1.78mg / MQ水300 μL) の溶液を加え、溶液を4℃で一晩放置した。化合物74および76の精製に用いた方法と同様の方法で、化合物97 (29 μg) を、溶液 / トリス緩衝液、pH8 (最終濃度 = 1.78mg / mL) として得た。

10

【0400】

3.28 BHA [Lys]₄ [((α -NH-COPEG₂₄-NH-COPEG₄ (PhTzMe) / TCO-PEG₃-ナノボディ)₁₋₃ (α -Lys (α -NHCy5)₁ (ϵ -NHDFO)₁)₁ (α -NH₂)₀₋₂) (ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₄]、G2、化合物98

20

TCO-PEG₃-アルデヒド (コンジューブローブ) リンカー溶液 (0.7mg, 1.46 μmol) / DMSO (50 μL) 溶液を、ナノボディ (「ナノボディ-N3-C-」) (化合物79) の溶液 (1.07mg / mLストック溶液 / PBS緩衝液、pH6.5、931 μL) に加え、その後NaBH₃CN (0.09mg, 1.5 μmol) / 水 (19 μL) 溶液を加えた。反応混合物を4℃まで冷却し、UPLC分析により反応をモニターした。16時間後、反応混合物をPBS緩衝液 (pH6.5) で希釈して総量2.0mLとし、PBS緩衝液pH6.5を用いた遠心限外濾過 (Amicon, 0.5mL再生セルロース膜, 10kDa MWCO; 14x450 μL) により精製した。UPLC: 5-20-30ACN%, 15分, 0.01%TFA緩衝液を使用; ナノボディ (化合物79) Rt=8.46分、m/z13802; 生成物: 9.99分m/z14263。ナノボディ-PEG₃-TCO溶液 (500 μL PBS pH6.5) に、G2 dendrimer化合物107 (179 μg , 0.020 μmol) / MQ水 (15 μL) 溶液を加えた。4℃で一晩静置した後、反応混合物を、化合物74および76の精製に用いた方法と同じ方法で精製し、化合物99 (12 μg ; 図1i、レーン1に示す) を、溶液 / トリス緩衝液、pH8として得た (最終濃度 = 575 μg / mL)。

30

40

50

【表 3 - 1】

表 1 調製した化合物の表	
化合物番号	化合物の説明
1	アジド-PEG ₂₄ -CO [N(PNBoc) ₂]
2	アジド-PEG ₂₄ -CO [N(PNH ₂ . TFA) ₂]
3	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₂ [Boc] ₄
4	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₂ [NH ₂ . TFA] ₄
5	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α-Boc)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₄
6	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α-NH ₂ . TFA)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₄
7	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [Boc] ₈
8	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [NH ₂ . TFA] ₈
9	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Boc)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₈
10	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NH ₂ . TFA)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₈
11	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Boc)(ε-Fmoc)] ₈
12	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Boc)(ε-NH ₂)] ₈
13	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Boc)(ε-NHPEG ₅₇₀)] ₈
14	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NH ₂ . TFA)(ε-NHPEG ₅₇₀)] ₈
15	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Boc)(ε-NHPEG ₂₀₀₀)] ₈
16	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NH ₂ . TFA)(ε-NHPEG ₂₀₀₀)] ₈
17	アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₄ / アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α-DGA-Dox)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₄ G2
18	アジド-PEG ₂₄ -CO-[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₄ / アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-DGA-Nemo)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₈ G3
19	アジド-PEG ₂₄ -CO-[N(PN) ₂][Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [(α-NHGLu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₈ (ε-NH-COPEG ₅₇₀) ₈], G3 / アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Glu-vc-PAB-MMAE)(ε-NHPEG ₅₇₀)] ₈ G3
20	アジド-PEG ₂₄ -CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NHGLu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₈ (ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈] / アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Glu-vc-PAB-MMAE)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₈ G3
21	アジド-PEG ₂₄ -CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NHGLu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₈ (ε-NH-COPEG ₂₀₀₀) ₈] / アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Glu-vc-PAB-MMAE)(ε-NHPEG ₂₀₀₀)] ₈ G3
22	アジド-PEG ₂₄ -CO-[N(PN) ₂][Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [(α-NHDGA-MMAF(OMe)) ₈ (ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈] / アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-DGA-MMAF(OMe))(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₈ G3

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

2 3	アジド-PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -NHDGA-Pt(IV)アセテート)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈ , G3, / アジド-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -Pt(IV)-アセテート)(ϵ -NHPEG ₁₁₀₀) ₈ G3
2 4	アフィボディ-MPED-BCN-トリアゾロ-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α -DGA-3'-NH-Dox) ₁₋₄ (ϵ -NHPEG ₁₁₀₀) ₄ / アフィボディ-G2-DGA-Dox/PEG ₁₁₀₀ デンドリマー複合体
2 5	アフィボディ-MPED-BCN-トリアゾロ-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -DGA-3'-NH-Dox)(ϵ -NHPEG ₁₁₀₀) ₈ , G3 / アフィボディ-G3-DGA-Dox/PEG ₁₁₀₀ デンドリマー複合体
2 6	アフィボディ-BCN/N ₃ -PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₈ (ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈] / アフィボディ-G3-MMAE/PEG ₁₁₀₀ デンドリマー複合体
2 7	アフィボディ-BCN/N ₃ -PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₈ (ϵ -NH-COPEG ₂₀₀₀) ₈] / アフィボディ-G3-MMAE/PEG ₂₀₀₀ デンドリマー複合体
2 8	アフィボディ-BCN/N ₃ -PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -NH-DGA-Pt(IV)-アセテート)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈ , G3 / アフィボディ-G3-Pt(IV)-アセテート/PEG ₁₁₀₀ デンドリマー複合体
2 9	Fab-トリアゾロ-DBCO-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α -DGA-3'-NH-Dox)(ϵ -NHPEG ₁₁₀₀) ₄ G2-Dox/PEG ₁₁₀₀ デンドリマー / Fab-G2-ドキソルビシン/PEG ₁₁₀₀ デンドリマー複合体
3 0	アフィボディ-BCN/N ₃ -PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [(α -NHDGA-MMAF(OMe) ₈ (ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈] / アフィボディ-G3-MMAF/PEG ₁₁₀₀ デンドリマー複合体
3 1	BCN-PEG ₂ -Glu-CO-NHPEG ₂₄ CO ₂ H / BCN-PEG ₂ -Glu-PEG ₂₄ -CO ₂ H
3 2	BCN-PEG ₂ -Glu-CO-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO / BCN-PEG ₂ -Glu-PEG ₂₄ -PEG ₃ -TCO
3 3	DBCO-Glu-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO / DBCO-Glu-PEG ₂₄ -PEG ₃ -TCO
3 4	BHA[Lys] ₈ [(α -NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)) ₁₋₄ (α -NH ₂) ₄₋₇)(ϵ -NH-COPEG ₁₀₀₀) ₈], G3 / BHA-[Lys] ₈ [(α -(MeTzPh-PEG ₄ -PEG ₂₄) ₁ (α -NH ₂) ₇ (ϵ -NHPEG ₁₀₀₀) ₈]
3 5	BHA[Lys] ₈ [(α -NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₂ -BCN) ₁₋₄ (α -NH ₂) ₄₋₇)(ϵ -NH-COPEG ₁₀₀₀) ₈], G3 / BHA-[Lys] ₈ [(α -(BCN-PEG ₃ -Glu-PEG ₂₄) ₁ (α -NH ₂) ₇ (ϵ -NHPEG ₁₀₀₀) ₈]
3 6	(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -NH-Cy5) ₁₋₄ (α -NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₁₋₇)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈] /

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

	MePhTz-PEG ₄ -PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-(Cy5) ₁ (α-Glu-VC-PAB-MMAE) ₇ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₈]
3 7	MeTzPh-PEG ₄ -PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Cy5) ₁ (α-NHAc) ₇ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₈] / MeTzPh-PEG ₄ -PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Cy5) ₁ (α-NHAc) ₇ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₈]
3 8	(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₁₆ [(α-NHCy5) ₁ (α-NHAc) ₁₅ (ε-NH- COPEG ₁₁₀₀) ₁₆] / MeTzPh-PEG ₄ -PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₁₆ [(α-Cy5) ₁ (α-NHAc) ₁₅ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₁₆]
3 9	(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₃₂ [(α-NHCy5) ₁ (α-NHAc) ₃₁ (ε-NH- COPEG ₁₁₀₀) ₃₂] / MeTzPh-PEG ₄ -PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₃₂ [(α-Cy5) ₁ (α-NHAc) ₃₁ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₃₂]
4 0	(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₂ [³ H-Lys] ₄ [Lys] ₈ [(α-NH-Glu-Val- Cit-PAB-MMAE) ₈ (ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈] / MeTzPh-PEG ₄ -PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][³ H-Lys] ₄ [Lys(α-Glu-VC-PAB-MMAE) ₈ (ε- NHPEG ₁₁₀₀) ₈]
4 1	ナノボデイ-PEG ₁₂ -TCO-MePhTz-PEG ₄ -PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-(Cy5) ₁ (α- Glu-VC-PAB-MMAE) ₇ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₈]
4 2	ナノボデイ-PEG ₁₂ -TCO-MePhTz-PEG ₄ -PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-(Cy5) ₁ (α- Glu-VC-PAB-MMAE) ₇ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₈]
4 3	ナノボデイ-PEG ₁₂ -TCO-MeTzPh-PEG ₄ -PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₁₆ [(α-Cy5) ₁ (α- NHAc) ₁₅ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₁₆]
4 4	ナノボデイ-PEG ₁₂ -TCO-MeTzPh-PEG ₄ -PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₃₂ [(α-Cy5) ₁ (α- NHAc) ₃₁ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₃₂]
4 5	ナノボデイ-PEG ₁₂ -TCO-MeTzPh-PEG ₄ -PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][³ H-Lys] ₄ [Lys(α-Glu-VC- PAB-MMAE) ₈ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₈]
4 6	(MeTzPh)-PEG ₂₄ -CO[N(PNBoc) ₂]
4 7	(MeTzPh)-PEG ₂₄ -CO[N(PNH ₂ HC1) ₂]
4 8	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PNH ₂ HC1) ₂]
4 9	((MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₂ [NHBoc] ₄
5 0	((MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₂ [NH ₂ . HC1] ₄
5 1	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [NHBoc] ₈
5 2	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [NH ₂ . HC1] ₈
5 3	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NH ₂ . HC1)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈]
5 4	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [NH ₂ . HC1] ₁₆
5 5	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₁₆ [(α-NH ₂ . HC1)(ε-NH-CO PEG ₁₁₀₀) ₁₆]
5 6	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₁₆ [NH ₂ . TFA] ₃₂

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

5 7	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO-[N(PN) ₂][Lys] ₃₂ [(α -NH ₂ TFA)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₃₂
5 8	カバジタキセル (CTX) -2'-OCOO-oPNP エステル
5 9	Fmoc-Val-Ala-PAB-P-トリガー-(NMeBoc)
6 0	TFA, NH ₂ -Val-Ala-PAB-P-トリガー-(NMeBoc)
6 1	COOH-PEG ₉ -Val-Ala-PAB-P-トリガー-(NMeBoc)
6 2	COOH-PEG ₉ -Val-Ala-PAB-P-トリガー-(NMe, TFA)
6 3	COOH-PEG ₉ -Val-Arg-PAB-P-トリガー-NMeCO-CTX
4 6	アジド-PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α -NHDGA-14-O-Nemo)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₄
6 5	アジド-PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -NH-DGA-14-O-Nemo)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₈
6 6	(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₄ [Lys] ₈ [(α -NHDFO) ₂ (α -NHGlu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₆)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₈
6 7	BHA[Lys] ₈ [(α -NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)) ₁ (α -NHDFO) ₂ (α -NHGlu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₅)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₈
6 8	(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₄ [Lys] ₈ [(α -NHCy5) ₁ (α -NHGlu-SN38) ₇)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₈
6 9	BHA[Lys] ₃₂ [(α -NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)) ₁₋₄ (α -NH ₂) ₂₈₋₃₁ (ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₃₂
7 0	BHA[Lys] ₃₂ [(α -NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)) ₁₋₄ (α -NHCy5) ₁ (α -NH-COPEG ₉ -Val-Arg-PAB-P-トリガー-NHCO-CTX) ₂₂)(α -NH ₂) ₅₋₈ (ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₃₂
7 1	アフィボディ-BCN/N ₃ -PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α -NHDGA-14-O-Nemo)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₄
7 2	アフィボディ-BCN/N ₃ -PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -NH-DGA-14-O-Nemo)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₈
7 3	Fab-DBCO/N ₃ -PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α -NHDGA-14-O-Nemo)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] / G2-Nemo/PEG1100 デンドリマー
7 4	ナノボディ-N ₃ /DBCO-Glu-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO/(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -NHDFO) ₂ (α -NHGlu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₆)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₈
7 5	ナノボディ-N ₃ /BCN-NHPEG ₂ -Glu-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO/(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -NHDFO) ₂ (α -NHGlu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₆)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₈
7 6	BHA[Lys] ₈ [(α -NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -ナノボディ) ₁ (α -NHDFO) ₂ (α -NHGlu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₅)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₈
7 7	ナノボディ-N ₃ /DBCO-Glu-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO/(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -NHCy5) ₁ (α -NHGlu-SN38) ₇)(ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₈
7 8	BHA[Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [Lys] ₁₆ [Lys] ₃₂ [(α -NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -ナノボディ) ₁₋₄ (α -NHCy5) ₁ (α -NH-COPEG ₉ -Val-Arg-PAB-P-トリガー-NHCO-CTX) ₂₂)(α -NH ₂) ₅₋₈ (ϵ -NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₃₂

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

7	ナノボディ (ブレーション)
9	ggshhhhgmasmtggqmqmrdlyenlyfqqevqlvesveslvqpqgsrlrlscaasgftfddyamswvrq vpgkglewssinwsgthtdyadsvkgrftisrnnantlylqmnslkstedtavycaknwrdagttwfek sgsaggtqvtvss
8 0	DBCO-Glu-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO / DBCO-PEG ₁₂ -TCO
8 1	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)/TCO-PEG ₃ NH- COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₆ (ε-NH- COPEG ₄₁₂) ₈], G3
8 2	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH- Glu-DBCO)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₂ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₁], G2
8 3	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)/TCO-PEG ₃ NH- COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₆ (ε-NH- COPEG ₁₀₀₀) ₈], G3
8 4	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [Lys] ₁₆ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)/TCO- PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₁₄ (ε- NH-COPEG ₁₀₀₀) ₁₆], G4
8 5	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [Lys] ₁₆ [Lys] ₃₂ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH- COPEG ₄ (PhTzMe)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε- NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃₀ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₃₂], G5
8 6	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH- COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -ナノボディ) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α- NH ₂) ₂ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₄], G2 (ナノボディ-N3-C末端「タグ」を使用)
8 7	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH- COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -ナノボディ) ₂₋₃ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α- NH ₂) ₀₋₁ (ε-NHCOPEG ₁₀₀₀) ₄], G2 (ナノボディ-N3-C末端「タグ」を使用)
8 8	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH- COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -ナノボディ) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α- NH ₂) ₆ (ε-NH-COPEG ₄₁₂) ₈], G3 (ナノボディ-N3-C末端「タグ」を使用)
8 8 a	BHA[Lys] ₈ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu- DBCO/N ₃ -ナノボディ) ₂₋₄ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃₋₅ (ε-NH- COPEG ₄₁₂) ₈], G3
8 9	BHA[Lys] ₈ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu- DBCO/N ₃ -ナノボディ) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₆ (ε-NH- COPEG ₁₀₀₀) ₈], G3
8 9 a	BHA[Lys] ₈ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu- DBCO/N ₃ -ナノボディ) ₂₋₄ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃₋₅ (ε-NH- COPEG ₁₀₀₀) ₈], G3, 化合物 89a
9 0	BHA[Lys] ₁₆ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu- DBCO/N ₃ -ナノボディ) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₁₄ (ε-NH- COPEG ₁₀₀₀) ₁₆], G4
9 1	BHA[Lys] ₁₆ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu- DBCO/N ₃ -ナノボディ) ₂₋₄ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₁₁₋₁₃ (ε- NHCOPEG ₁₀₀₀) ₁₆], G4
9 2	BHA[Lys] ₃₂ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu- DBCO/N ₃ -ナノボディ) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃₀ (ε-NH- COPEG ₁₀₀₀) ₃₂], G5

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

9 3	BHA[Lys] ₃₂ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -ナノボデイ) ₂₋₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₂₇₋₂₉ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₃₂], G5
9 4	BHA[Lys] ₁₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃ (ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)) ₁ (ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -ナノボデイ) ₃], G2
9 4 a	BHA[Lys] ₁₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃ (ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)) ₂ (ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -ナノボデイ) ₂], G2,
9 5	BHA[Lys] ₁₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃ (ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -ナノボデイ) ₄], G2
9 6	DBCO-Glu-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO / DBCO-PEG ₁₂ -TCO
9 7	BHA[Lys] ₁₄ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)/TCO-PEG ₈ -ナノボデイ) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₂ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₄], G2
9 8	BHA[Lys] ₁₄ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)/TCO-PEG ₃ -ナノボデイ) ₁₋₃ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₀₋₂ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₄], G2
9 9	BHA[Lys] ₁₄ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁₋₃ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₀₋₂ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₄], G2
1 0 0	BHA[Lys] ₈ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁₋₄ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃₋₆ (ε-NH-COPEG ₄₁₂) ₈], G3
1 0 1	BHA[Lys] ₈ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₆ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₈], G3
1 0 2	BHA[Lys] ₁₆ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₁₄ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₁₆], G4
1 0 3	BHA[Lys] ₃₂ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁₋₄ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₂₇₋₃₀ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₃₂], G5
1 0 4	ナノボデイ-N3-C末端タグ/DBCO-DFO
1 0 5	BHA[Lys] ₁₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(α-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃ (ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₄], G2
1 0 6	BHA[Lys] ₁₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(α-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃ (ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₄], G2
1 0 7	BHA[Lys] ₁₄ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁ (α-NH ₂) ₃ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₄], G2
1 0 8	HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]
1 0 9	BHA[Lys] ₈ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁ (α-NH ₂) ₇ (ε-NH-COPEG ₄₁₂) ₈], G3

10

20

30

40

50

【表 3 - 7】

1 1 0	BHA[Lys] ₈ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁ (α-NH ₂) ₇](ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₈], G3
1 1 1	BHA[Lys] ₁₆ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁ (α-NH ₂) ₁₅](ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₁₆], G4
1 1 2	BHA[Lys] ₃₂ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁₋₄ (α-NH ₂) ₂₈₋₃₁](ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₃₂], G5
1 1 3	BHA[Lys] ₄ [(α-NHBoc) ₄ (ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₄], G2
1 1 4	BHA[Lys] ₄ [(α-NH ₂ ·HCl) ₄ (ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₄], G2
1 1 5	HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH ₂)]
1 1 6	HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)] ウエッジ

10

20

【0401】

実施例 4：HER2 標的デンドリマー複合体の合成

a) ナノボディの配列情報

ナノボディ 2D3 配列化合物 79

EVQLESGSLVQPAGSLLSCAASGFTFDDYAMSWVLVPGKLEWVSSINWSGTHTDYA
DSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSAGGTQTV
SS

ナノボディ 2D3 N 末端タグ，TEV，C 末端アジド（「N 末端タグーナノボディー N3」）

30

GGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYENLYFQGEVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCA
ASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTL
YLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS#

ナノボディ 2D3，C 末端タグ，TEV，アジド（「ナノボディー N3 - C 末端タグ」）

EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGT
HTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSG
SAGQGTQVTVSS#ENLYFQGHHHHHH

= 非天然アミノ酸。

40

【0402】

B) ナノボディー N3 発現プラスミド

抗 HER2 ナノボディー クローン 2D3 のコーディング配列（米国特許第 20110028695 号（A1）配列番号：1986）を、標準的な分子生物学的手法を用いて、発現プラスミド pET-His6-TEV-1B（Addgene plasmid 29653）に挿入した。大腸菌 K12 のコドン最適化 DNA 配列を合成し、プラスミド pET-His6-TEV-1B にクローン化した。

【0403】

組換えタンパク質に非天然アミノ酸を取り込むために、ナノボディのコーディング配列の最後の位置に amber の終止コドン（TAG）をインフレームで挿入し、その後、翻訳を終了させるために ochre（TAA）または opal（TGA）の終止コドン挿入

50

入した。C末端にhis6タグを使用する場合は、ナノボディコーディング配列の最後の位置にamber終止コドン(TAG)をインフレームで挿入し、TEVプロテアーゼ切断部位および6hisタグをコードし、翻訳終了のためのochre(TAA)またはopal(TGA)の終止コドンが続く配列を、この配列に付加した。

【0404】

c) ナノボディ-N3の発現および精製

抗HER2ナノボディ2D3の発現は、ナノボディ発現プラスミドおよび直交ペア発現プラスミドpEVOL-pAcFRS.2.t1(Amiramら、Nat. Biotechnol (2015年), 33(12)で形質転換した大腸菌株B95(DE3)(Mukaiら、Scientific Reports (2015年), 5, 9699)で行った。細胞は、バッフル付きシェイクフラスコに入れたTerrific broth (25g/Lトリプトン、30g/L酵母、および5g/Lグリセロール、0.017M KH₂PO₄、0.072M K₂HPO₄)で、37℃でOD₆₀₀ 0.7~1.0の細胞密度に達するまで培養した。組換えタンパク質の発現は、1.5mM IPTGおよび0.05%w/v L-(+)-アラビノースを加え、1.5mM p-アジドフェニルアラニンを加えることにより誘導し、25℃で20時間進行させた。菌体は遠心分離により採取し、高圧ホモジナイズ後、プロテアーゼインヒビターカクテル、リゾチムを加え、DNase処理を施して細胞溶解液を生成した。不溶物は、リフォールディング緩衝液(6M グアニジンHCl, 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM イミダゾール, pH8)に溶解することができる。高速遠心分離による清澄化と0.45μmの膜フィルタでのろ過後、ニッケル荷電ニトリロ三酢酸-アガロースを用いた固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)により、his6タグ付きナノボディを精製した。オンカラムリフォールディングは、最初に結合したタンパク質を3MグアニジンHCl、50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、20mM イミダゾール、pH8のカラムボリュームで洗浄し、続いて50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、20mM イミダゾール、pH8のカラムボリュームを2回行うことにより達成した。結合したタンパク質は、2カラムボリュームの50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、250mM イミダゾール、pH8で溶出した。IMAC後、ナノボディ-N3をHiTrap Q HPカラム(GE Healthcare, カタログ17115301)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製した。結合ステップおよび洗浄ステップは、トリス緩衝液(20mM、pH8)を用いて行い、溶出は1M NaCl緩衝液(1M NaCl、20mM トリス、pH8)の0%~50%のグラジエントを用いて行った。得られた関連するナノボディ画分は、Amicon 10k MWCOフィルターユニット(Merck, カタログUFC901008)を用いて、20mM トリス、pH8に緩衝交換した。

【0405】

d) デンドリマーへのナノボディ-N3-C末端タグのコンジュゲーション

リンカーDBCO-Glu-NHPEG24CO-NHPEG3-TCO(化合物51、Click Chemistry Tools)を使用した以外は、化合物74および76について説明した手順に従って、バイオ直交クリックケミストリーを用いて、ナノボディ-N3-C末端タグをデンドリマー化合物81~85にコンジュゲートさせ、化合物86~95を生成した。

【0406】

化合物41~45についてゲルを泳動させたところ、ナノボディ-デンドリマー複合体の適切なMWにバンドが見られた。各ナノボディ-デンドリマー複合体の純度は、非還元性ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いて確認した(図3)。4~15%ポリアクリルアミドゲル(Bio-rad, カタログ4561086)上で電気泳動分離させた後、Typhoon Biomolecular Imager(GE Healthcare)を用いて撮像したときに、ナノボディ-デンドリマー複合体は、デンドリマーのサイズにナノボディの追加質量を加えたサイズ

にはほぼ対応する蛍光バンドとして現れる。その後、C o o m a s s i e B r i l l i a n t B l u e (C B B) で染色して、同じ場所にナノボディが存在していることが判明した。C B Bにより他のバンドが検出されることはなく、これは、未反応のナノボディが存在せず、調製物の純度が高いことがわかった。

【0407】

実施例5 アフィボディー-MMAEデンドリマーおよびE r b B 2 E C DのS P R結合試験

E r b B 2 - E C Dの直接固定化

P r o t e O n X P R 3 6装置を用いて、E r b B 2 - E C Dは、H B S - P + 泳動緩衝液 (10mM H E P E S , p H 7 . 4 , 150mM N a C l , 0 . 05 % T w e e n 20) を用いて、25℃で、G L Cセンサーチップ表面 (B i o - R a d) に固定化した。この固定化には、アミンカップリングキット (B i o - R a d) に記載されている標準的なアミンカップリング方法を用いた。レーン1は、E D C (0 . 5mM) およびスルホ-N H S (0 . 125mM) の50 : 50の混合液により活性化した。E r b B 2 タンパク質を10mM酢酸ナトリウムで2mg / mL、p H 5 . 0に希釈し、活性化された表面チャンネル上に注入した。残った活性化部位は、1Mエタノールアミン-H C l (p H 8 . 5) で遮断した。平均応答レベル約590RU (1RU = 1pgタンパク質 / mm²) のタンパク質結合が観察された。

10

【0408】

S P R実験分析

すべてのS P R結合実験は、H B S - E P + / B S A (10mM H E P E S , p H 7 . 4 , 150mM N a C l , 3mM E D T A , 0 . 05 % T w e e n 20 , 0 . 1mg / mL B S A) を装置の泳動緩衝液 (R B) として使用し、25℃で行った。固定化手順後、様々な濃度の抗E r b B 2アフィボディおよびそのMMAE-デンドリマー複合体を、固定化されたE r b B 2タンパク質上に60μL / 分で注入し、その会合を90秒間モニターした。その後、泳動緩衝液を結合したA b - E r b B 2複合体に注入し、解離を最長60分観察した。H e r c e p t i nおよびアフィボディの対照は、泳動緩衝液中でチップ表面から適度な時間枠 (60分以内) で解離しなかった。すべての結合測定は3回行った。

20

【0409】

S P Rデータの処理および解析

収集した実験データは、S c r u b b e r - P r oソフトウェア (www.biologic.com.au) を用いて処理した。実験データの各セットをL a n g m u i r 1 : 1結合モデルに当てはめて、キネティックパラメータ (k_a = 会合および k_d = 解離速度定数) および平衡解離定数 ($K_D = k_d / k_a$) を導出した。すべての結合パラメータは、平均値 + / - 標準偏差として報告した。

30

【0410】

S P Rの結果

アフィボディー-MMAE-デンドリマー複合体は、あるプロセスにおいてE r b B 2タンパク質に特異的に結合し、古典的なキネティック結合プロファイルが得られた。その後、用量反応法を用いて、アフィボディー-MMAE-デンドリマー複合体のキネティック結合解析を行った。S P Rセンサーグラムから得られた速度論的パラメータおよび親和性パラメータを以下にまとめた。このアフィボディは二量体であるため、その結合定数は、デンドリマー複合体に使用される単量体のアフィボディで観察されるものよりも低いことに留意されたい。化合物20および21には、いかなる結合も観察されなかった。この結果は、ネイティブアフィボディに比べて少ない量にもかかわらず、アフィボディーデンドリマー標的に対するナノモルの特異的結合を明らかに示している。

40

50

【表 4】

表 2 S P R 結合試験

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$) $\times 10^4$	k_d (s^{-1}) $\times 10^{-4}$	K_D
H e r c e p t i n	230 $\pm$ 10	0.1 $\pm$ 0.0	4.3 $\pm$ 0.1 (pM)
アフイボディ	190 $\pm$ 30	5.1 $\pm$ 0.2	266 $\pm$ 46 (pM)
化合物 26 (アフイボディ-MMAE-PEG 1100)	2.5 $\pm$ 0.2	13.0 $\pm$ 0.1	50 $\pm$ 5 (nM)
化合物 27 (アフイボディ-MMAE-PEG 2000)	3.2 $\pm$ 0.2	11.4 $\pm$ 0.3	36 $\pm$ 3 (nM)
化合物 20 (G3-MMAE-PEG 1100)	—	—	—
化合物 21 (G3-MMAE-PEG 2000)	—	—	—

10

【0411】

20

実施例 6 アフイボディ-MMAE デンドリマーによる細胞成長阻害 (SRB アッセイ)
 H E R 2⁻ (E S 2) および H E R 2⁺ (S K O V 3) 細胞株の細胞成長阻害は、スル
 ホローダミン B (SRB) アッセイ [Voigt W. 「Sulforhodamine
 B assay and chemosensitivity」Methods Mol
 . Med. 2005 年, 110, 39-48.] を使用して、72 時間後に様々ながん細
 胞株に対して各実験を 2 回実施して測定した。G I 5 0 は、N C I の標準プロトコルに従
 って、全細胞の成長を 50 % 阻害するのに必要な濃度である。

【0412】

30

すべての化合物は、同等の薬物負荷に基づいて検査を行った。その結果は、P E G 1 1
 0 0 を標的化したデンドリマー複合体が、P E G 2 0 0 0 の表面を有するデンドリマーよ
 りも、細胞の成長阻害において有効であることを示している。アフイボディ単独では、H
 E R 2⁺ 細胞株、H E R 2⁻ 細胞株のいずれにおいても、このアッセイでは有効でなかつ
 た。

【表 5】

表 3 H E R 2⁻ (E S 2) 細胞および H E R 2⁺ (S K O V 3) 細胞における細胞成長
の阻害

検査対象化合物	使用した溶 媒	ES2 細胞株	SKOV3 細胞 株
		G I ₅₀ (nM)	G I ₅₀ (nM)
MMAE	DMSO	<5, 2	<5, 0.6
MMAE-Cit-Val-PAB	DMSO	320, >500	201, 330
アフイボディ	PBS	>500, >500	>500, >500
化合物 26	PBS	248, 250	4, 5
化合物 27	PBS	>100	>500

40

【0413】

実施例 7 デンドリマー-MMAE デンドリマーの i n v i v o での忍容性

50

デンドリマー（0.1～0.3 mlのPBS溶液）を週1回、3週間（1日目、8日目、15日目）にマウスに静脈内注射した。マウスの体重を毎日測定し、毒性の兆候を観察した。最終薬物投与後、最長10日間動物をモニターした。倫理的エンドポイントを超えたマウス（20%以上の体重減少、全身状態不良）はいずれも、直ちに殺し、観察結果を記録した。

【0414】

化合物26の1 mg/kgの投与は、ヌードSCIDマウスおよびb a l b/cマウスのいずれにおいても良好な忍容性を示し、健康状態不良のために殺する必要のある動物はいなかった。

【0415】

実施例8：複合体の*in vitro*効率

【表6】

使用した細胞株の詳細

細胞株	がんの種類	Her2 ステータス	報告された細胞あたりのHer2受容体密度	E G F R (Her1) 密度	Her3 ステータス
MDA-MB-231	乳房	1+		200,000	低/中
SKOV-3	卵巣	2+/3+	3-700,000	50,000	低い
SK-BR-3	乳房	3+	約1,500,000		中程度
NCI-N87	胃	3+	約1,300,000		低
OE19	食道	3+	>1,000,000		

【0416】

G I 5 0 結果

MDA-MB-231、SKOV-3、SK-BR-3、NCI-N87、およびOE19細胞に対するHerceptin（登録商標）、Kadcyla（登録商標）、Lapatinib、化合物36（対象）、および2D3ナノボディ標的デンドリマー（化合物41）の細胞傷害性をMTTアッセイを用いて評価した。96ウェルプレートに5 x 10³の密度で細胞を播種し、一晩インキュベートした。その後、細胞を試験組成物の1 log単位の連続希釈液で72時間（Herceptinの場合は6日間）処理した。最後の2時間のインキュベーション中に、10%培地量のMTT（チアゾリルブルーテトラゾリウムブロミド（Merck, Cat# M5655, 5 mg/ml滅菌溶液））を添加した。生細胞内でのMTTの還元により、紫色の不溶性ホルマゼン代謝物が生成される。2時間のインキュベーション後、アッセイプレートからすべての培地を取り除き、100 μlのDMSOを加え、直ちに570 nmの吸光度を読み取った。G I 5 0は、細胞の成長／増殖を50%阻害する濃度と定義されている。細胞生存率およびその後のG I 5 0値は、GraphPad Prism 7.02で4パラメータ非線形曲線フィットを用いてブランク補正した用量反応曲線から求めた。その結果、本開示の例示の複合体は、特にSK-BR-3、NCI-N87、およびOE19などのHER2を過剰に発現する細胞株に対して、強力な細胞傷害効果を有することが明らかになった。

10

20

30

40

50

【表 7】

I C 5 0 の結果

	H e r c e p t i n (n=3)	Kadcyla* (n=3)	Lapatinib (n=2)	化合物 41 (n=2)	化合物 36 (n=2)
	成 長 阻 害 率	GI ₅₀ nM	GI ₅₀ nM	GI ₅₀ nM	GI ₅₀ nM
MDA-MB- 231	1.7	22.9	112,000	172	12,470
SKOV-3	10	50.7	7,200	13.1	1600
SK-BR-3	51	0.04	138	0.83	948
NCI-N87	52	0.10	8.1	0.61	2040
OE19	62	0.06	200	1.67	6120

*推定重量のA D Cに基づく；#MMA E薬物等価量に基づく

【0417】

ペアとなるh i / l o H E R 2細胞株のためのH E R 2 + M D A - M B - 2 3 1乳がん細胞株の生成

M D A - M B - 2 3 1乳がん細胞は、製造業者の指示に従って、L i p o f e c t a m i n e 3 0 0 0を用いて、プラスミドH E R 2 W T (A d d g e n e , 1 6 2 5 7) でトランスフェクトした。5 0 0 μ g / m l G e n e t i c i n (T h e r m o F i s h e r , カタログ1 0 1 3 1 0 3 5) の存在下で継代後、M o F l o A s t r i o s (B e c k m a n C o u l t e r) を用いた蛍光活性化シングルセルソーティングにより、H E R 2 W Tを安定的に過剰発現させた細胞を単離した。この工程で単離されたクローン細胞集団について、G e n e t i c i nでさらに継代後、2回目のセルソーティングおよび導入遺伝子発現のスクリーニングを行った。その後、選択されたクローンをさらに増殖させ、M D A - M B - 2 3 1 / H E R 2と呼ばれるこの細胞株のストックを凍結保存して、安定的に導入された細胞のマスターストックを作成した。

【0418】

l o / h i 発現M D A - M B - 2 3 1モデルでのI C 5 0結果。

化合物36（対照）および化合物41（標的）のM D A - M B - 2 3 1およびM D A - M B - 2 3 1 / H E R 2トランスフェクション細胞に対する細胞傷害性をa l a m a r B l u eアッセイで評価した。96ウェルプレートに5 x 1 0 ³の密度で細胞を播種し、一晚インキュベートした。その後、細胞を指示された濃度の試験組成物で48時間処理した。最後の4時間のインキュベーション中にa l a m a r B l u e (T h e r m o F i s h e r , D A L 1 0 2 5) を添加した。生細胞内でa l a m a r B l u eが還元されることにより、赤い蛍光の代謝物が生成され、プレートリーダーで読み取ることができる（励起560nm／発光610nm）。細胞生存率およびその後のI C 5 0は、G r a p h P a d P r i s m 7 . 0 2で4パラメータ非線形曲線フィット、可変スロープ（4パラメータ）を用いて、ブランク補正した用量反応曲線から求めた。下表は、化合物36（対照）および化合物41（標的）とM D A - M B - 2 3 1細胞およびM D A - M B - 2 3 1 / H E R 2細胞とのI C 5 0値を示す。M D A - M B - 2 3 1 / H E R 2に対する化合物36（対照）および化合物41（標的）のI C 5 0値は、それぞれ2 . 8 4 2 μ Mおよび1 3 . 5 5 n Mであった。化合物41（標的）は、化合物36（対照）と比較して、M D A - M B - 2 3 1 / H E R 2細胞の成長阻害効果が約140倍になった。

【0419】

化合物36（対照）の異なるMMA E濃度でのM D A - M B - 2 3 1およびM D A - M B - 2 3 1 / H E R 2に対する用量反応曲線およびI C 5 0値を以下に示す。値は、平均±標準偏差（s d ; n = 4）。

【表 8】

MMA E の濃度 (M)	化合物 3 6 (細胞生存率)	
	MDA-MB-231	MDA-MB-231/HER2
5×10^{-5}	81.1 ± 5.4	49.9 ± 15.0
1×10^{-5}	94.2 ± 12.1	61.6 ± 3.1
1×10^{-6}	94.4 ± 8.2	78.2 ± 9.1
1×10^{-7}	94.2 ± 12.5	96.1 ± 3.6
1×10^{-8}	96.6 ± 11.7	95.4 ± 7.6
IC ₅₀	あいまい	$2.842 \mu\text{M}$

10

【0 4 2 0】

化合物 4 1 (標的) の異なる MMA E 濃度での MDA-MB-231 および MDA-MB-231/HER2 に対する用量反応曲線および IC₅₀ 値。値は、平均 ± 標準偏差 (s d ; n = 4) 。

【表 9】

MMA E の濃度 (M)	化合物 4 1 (細胞生存率%)	
	MDA-MB-231	MDA-MB-231/HER2
1×10^{-6}	—	5.25 ± 1.24
1×10^{-7}	—	10.9 ± 2.4
2.5×10^{-8}	49.7 ± 2.7	27.4 ± 1.3
1×10^{-8}	67.2 ± 3.0	57.8 ± 2.3
1×10^{-9}	81.0 ± 1.8	80.0 ± 3.3
1×10^{-10}	87.6 ± 4.2	91.1 ± 2.5
1×10^{-11}	96.1 ± 5.6	90.0 ± 3.0
IC ₅₀	曖昧	13.55nM

20

【0 4 2 1】

実施例 9 : 2 D 3 - デンドリマー複合体の HER 2 + 細胞への結合

シアニン 5 (Cy 5) で標識された異なるサイズのナノボディーデンドリマー複合体、化合物 4 2、4 3、および 4 4 を用いて、非標的化合物 3 7、3 8、および 3 9 (G 3、G 4、および G 5) に対する HER 2 + ヒト細胞株への結合を実証した。HER 2 発現ヒト転移性癌細胞株 MDA-MB-453 (ATCC HTB-131) および HER 2 陰性上皮性腺癌細胞株 MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) を、10% FBS およびペニシリン-ストربتマイシン (100 U/mL) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いて、5% CO₂ 加湿雰囲気下で 37℃ で維持し、トリプシンを使用して、コンフルエントになるまで継代培養した。ヒト腺癌卵巣細胞株 SKOV-3 (ATCC (登録商標) HTB-77) 細胞を、10% (v/v) FBS およびペニシリン-ストربتマイシン (100 U/mL) を加えた RPMI 培地を用いて、5% CO₂ 加湿雰囲気下で 37℃ で維持し、コンフルエントになるまで継代培養した。

30

【0 4 2 2】

蛍光顕微鏡による細胞会合の測定には、8 ウェルチャンバースライドに、 1×10^5 個 / ウェルの細胞を播種し、一晩かけて付着させた。翌日、非コンジュゲートデンドリマー化合物 3 7、3 8、および 3 9 (対照) またはナノボディーデンドリマー化合物 4 2、4 3、および 4 4 を最終濃度 $0.5 \mu\text{g/mL}$ になるまで培地に添加し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を染色し、細胞膜 (小麦胚芽凝集素 - alexa fluor 488) および核 (Hoechst 33342) を可視化した。細胞は、10% FBS を添加した 400 μL の冷 Fluorobrite 培地で 3 回洗浄した。40x0.9 NA の空気対物レンズが付属している Olympus IX83 顕微鏡を使用して、標準的な「Pinkel」DAPI/FITC/CY5 フィルタセットを用いて細胞を撮像した。

40

【0 4 2 3】

50

フローサイトメトリーによる細胞の会合の測定では、細胞を含む懸濁液を96ウェルアッセイプレートに 1×10^5 ／ウェル加えた。ナノボディーデンドリマーまたは非コンジュゲートデンドリマーと氷上で1時間インキュベートした後、細胞を10% FBSを含むDMEM 200 μ Lで3回洗浄し、結合していないデンドリマーを除去した。その後、10% FBSを添加した冷Fluorobrite培地に細胞を再懸濁し、642 nmの励起光および661～691 nmに集めた発光を用いてCy5蛍光を測定した。内在化速度を測定するために、37℃で24時間、4時間、1時間、0.5時間、0.1時間、ナノボディーデンドリマーを細胞とインキュベートした後、結合していないナノボディーデンドリマーを洗浄によって除去し、フローサイトメトリーによって分析した。

【0424】

In vitro 会合試験

MDA-MB-231、MDA-MB-231／HER2（HER2ノックイン）（上記のとおり）、またはSKOV-3細胞を、10%（v/v）ウシ胎児血清（FBS）を添加した500 μ Lの適切な成長培地で24ウェルプレート（ウェルあたり 1×10^5 細胞）に播種し、インキュベーション時間を1時間から24時間まで変化させて、化合物36または41を3.33 nM、37℃、5% CO₂加湿雰囲気下でインキュベートした。インキュベーション後、DPBSで穏やかに3回洗浄することにより、付着細胞から非結合粒子／非会合粒子を除去した（300 μ L／ウェル）。TrypLE（商標）Express Enzyme（1X）、no phenol red（150 μ L／ウェル）を用いて、室温で5～10分間処理することにより、プレートから細胞を除去した。その後、プレートを保氷上に置いた。その後、Cy5からのシグナルを取得することにより、フローサイトメトリーによりサンプルの細胞結合および会合を決定した。

【0425】

フローサイトメトリー：

これらの結果は、ナノボディーデンドリマー化合物42、43、および44は、HER2陽性MDA-MB-453細胞に結合することを示す。非コンジュゲートデンドリマー化合物37、38、および39は、MDA-MB-453細胞に結合しなかった。示されているデータは、3つのウェルで処理された細胞の平均MFIであり、標準偏差と共に示している。統計解析には、ダネット多重比較検定を用いたANOVAを使用した。

【表10】

デンドリマーとインキュベートした細胞の平均蛍光強度（Cy5）：

試験対象化合物	MFI	ANOVA
細胞のみ	3.047 $\pm$ 0.02	—
37	3.097 $\pm$ 0.01	NS
38	6.827 $\pm$ 0.07	NS
39	4.349 $\pm$ 0.08	NS
42	50.83 $\pm$ 14.98	<0.0001
43	158.4 $\pm$ 6.611	<0.0001
44	176.9 $\pm$ 4.041	<0.0001

【0426】

フローサイトメトリーの結果

これらの結果は、24時間にわたる3つの細胞株すべてに対する化合物36（対照）の最小限の結合を明確に示している。化合物41（標的）は、細胞株のHER2受容体の発現レベルに応じて、結合の増加を示した。フローサイトメトリーにより、24時間後までに、化合物41で処理したMDA-MB-231／HER2細胞（146.1 $\pm$ 9.6）

は、化合物 36 で処理した細胞 (16.05 ± 1.89) と比較して、約 9 倍強い蛍光を示したことが明らかになった。また、化合物 41 で処理した SKOV-3 細胞 (277.5 ± 5.9) は、化合物 36 で処理した細胞 (16.4 ± 6.86) と比較して、約 16 倍強い蛍光を示した。図 4 にその結果を示す。

【0427】

デンドリマーサイズ G3 ~ G5 :

追加のデンドリマー世代の試験を行った：化合物 37 および 42 (G3)、化合物 38 および 43 (G4)、化合物 39 および 44 (G5)、それぞれ 2D3 にコンジュゲートされていない、およびコンジュゲートされている。非コンジュゲート対照デンドリマー化合物 37、38、および 39 は、MDA-MB-231 (HER2 陰性) および MDA-MB-231 / HER2 (HER2 陽性) との会合が有意に少なかった。2D3-コンジュゲートデンドリマー 42、43 および 44 は、24 時間にわたって MDA-MB-231 / HER2 と有意に会合し、化合物 44 (G5) が、最も高い細胞会合率を有し ($73.47\% \pm 0.92$)、2 番目は化合物 42 (G3、 60.73 ± 0.21) および化合物 43 (G4、 56.27 ± 1.02) であった。デンドリマーの生成に関わらず、デンドリマーとコンジュゲートした 2D3 HER2-ナノボディは、HER2 受容体を過剰に発現している細胞に対する結合が大幅に改善する。

【0428】

化合物 42 (G3)、化合物 43 (G4) および化合物 44 (G5) と MDA-MB-231 および MDA-MB-231 / HER2 細胞との 24 時間にわたる細胞会合値の割合。値は平均 $\pm$ 標準偏差 (SD ; n = 3)。

【表 11】

MDA-MB-231/HER2							
時間 (h)	化合物 42	化合物 43	化合物 44	化合物 86	化合物 89	化合物 90	化合物 92
0.25	0.67 ± 0.12	0.57 ± 0.12	0.43 ± 0.40	—	—	—	—
0.5	0.60 ± 0.0	0.67 ± 0.15	0.70 ± 0.10	189.7 ± 9.074	218.3 ± 16.5	157.3 ± 7.02	165.3 ± 31.5
0.75	—	—	—	—	—	—	—
1	2.57 ± 0.64	0.77 ± 0.15	2.80 ± 0.61	—	—	—	—
2	17.43 ± 4.15	6.13 ± 2.60	17.97 ± 2.20	—	—	—	—
4	50.63 ± 0.15	36.03 ± 2.36	59.77 ± 4.13	—	—	—	—
24	60.73 ± 0.21	56.27 ± 1.02	73.47 ± 0.92	—	—	—	—

10

20

30

40

50

【表 1 2】

MDA-MB-231/HER2						
時間 (h)	化合物 97	化合物 98	化合物 82	化合物 83	化合物 84	化合物 185
0.2 5	—	—	—	—	—	—
0.5	—	—	14.83 ± 1.60	43.23 ± 3.48	16.7 ± 2.48	25.6 ± 0.43
0.7 5	14.97 ± 0.7	82.5	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—
24	—	—	—	—	—	—

10

【表 1 3】

MDA-MB-231							
時間 (h)	化合物 42	化合物 43	化合物 44	化合物 86	化合物 89	化合物 90	化合物 92
0.2 5	1.07 ± 0.38	0.87 ± 0.25	0.53 ± 0.50	—	—	—	—
0.5	0.87 ± 0.12	0.53 ± 0.15	1.03 ± 0.32	30.77 ± 0.50	25.07 ± 3.91	20.03 ± 2.73	17.47 ± 1.62
0.7 5	—	—	—	—	—	—	—
1	0.80 ± 0.20	1.00 ± 0.44	1.37 ± 0.59	—	—	—	—
2	1.13 ± 0.21	0.77 ± 0.31	0.73 ± 0.49	—	—	—	—
4	0.93 ± 0.45	0.83 ± 0.21	0.67 ± 0.25	—	—	—	—
24	0.83 ± 0.06	0.87 ± 0.06	0.80 ± 0.10	—	—	—	—

20

30

40

50

【表 1 4】

MDA-MB-231						
時間 (h)	化合物 97	化合物 98	化合物 82	化合物 83	化合物 84	化合物 85
0.2 5	—	—	—	—	—	—
0.5	—	—	23.3 ± 3.98	42.8 ± 2.78	20.23 ± 0.63	33.23 ± 2.2
0.7 5	13.36 ± 2.82	0.15 ± 0.07				
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—
24	—	—	—	—	—	—

10

【0 4 2 9】

化合物 3 7 (G 3) 、化合物 3 8 (G 4) および化合物 3 9 (G 5) と M D A - M B - 2 3 1 および M D A - M B - 2 3 1 / H E R 2 細胞との 2 4 時間にわたる細胞会合値の割合。値は平均 ± 標準偏差 (S D ; n = 3) 。

20

【表 1 5】

MDA-MB-231/HER2			
時間 (h)	化合物 37	化合物 38	化合物 39
1	2.47 ± 0.81	0.90 ± 0.35	1.07 ± 0.35
2	1.00 ± 0.26	0.50 ± 0.10	0.83 ± 0.31
4	1.07 ± 0.64	0.50 ± 0.35	0.47 ± 0.21
24	0.60 ± 0.17	0.37 ± 0.15	0.53 ± 0.49

30

【表 1 6】

MDA-MB-231			
時間 (h)	化合物 37	化合物 38	化合物 39
1	1.10 ± 0.35	0.80 ± 0.10	0.97 ± 0.12
2	1.23 ± 0.47	0.77 ± 0.06	1.07 ± 0.21
4	0.83 ± 0.15	0.60 ± 0.10	0.87 ± 0.15
24	0.73 ± 0.06	0.60 ± 0.17	0.57 ± 0.06

【0 4 3 0】

化合物 4 2 (G 3) 、化合物 4 3 (G 4) 、化合物 4 4 (G 5) と M D A - M B - 2 3 1 細胞および M D A - M B - 2 3 1 / H E R 2 細胞との 2 4 時間にわたる平均蛍光強度値。値は平均 ± 標準偏差 (S D ; n = 3) 。

40

【表 17】

	MDA-MB-231		
時間 (h)	2D3-化合物 42	2D3-化合物 43	2D3-化合物 44
0.25	245.7 ± 17.5	227.3 ± 14.0	194.7 ± 95.8
0.5	228.0 ± 4.6	222.7 ± 2.1	245.0 ± 4.0
1	237.0 ± 9.2	229.7 ± 6.4	253.7 ± 12.9
2	241.0 ± 18.2	235.7 ± 4.0	233.3 ± 9.7
4	250.0 ± 5.8	246.3 ± 5.5	247.0 ± 10.6
24	224.3 ± 5.1	219.0 ± 4.6	223.0 ± 4.4

10

【表 18】

	MDA-MB-231/HER2		
時間 (h)	2D3-化合物 42	2D3-化合物 43	2D3-化合物 44
0.25	235.0 ± 7.0	215.3 ± 14.0	207.0 ± 51.6
0.5	226.3 ± 8.7	224.3 ± 2.9	237.0 ± 9.5
1	294.3 ± 15.6	241.0 ± 11.5	295.0 ± 4.0
2	445.0 ± 33.2	342.3 ± 22.2	435.7 ± 16.3
4	799.7 ± 18.0	611.3 ± 35.2	1,038 ± 127.6
24	1,110 ± 27.8	1,012 ± 45.6	2,749 ± 88.1

20

化合物 37 (G3)、化合物 38 (G4)、化合物 39 (G5) と MDA-MB-231 細胞および MDA-MB-231/HER2 細胞との 24 時間にわたる平均蛍光強度値。値は平均 ± 標準偏差 (SD; n = 3)。

【表 19】

	MDA-MB-231/HER2		
時間 (h)	化合物 37	化合物 38	化合物 39
1	293.0 ± 8.5	269.0 ± 19.8	257.5 ± 12.0
2	268.0 ± 11.3	225.0 ± 5.7	249.0 ± 15.6
4	241.5 ± 17.7	198.0 ± 2.8	207.0 ± 2.8
24	206.0 ± 2.8	175.5 ± 0.7	207.5 ± 40.3

30

【表 20】

	MDA-MB-231		
時間 (h)	化合物 37	化合物 38	化合物 39
1	258.3 ± 19.6	239.3 ± 1.2	252.0 ± 6.0
2	256.7 ± 24.8	230.7 ± 2.3	249.0 ± 8.7
4	221.3 ± 3.5	217.3 ± 3.2	247.3 ± 7.2
24	215.3 ± 4.9	195.7 ± 0.6	196.3 ± 3.1

40

【0431】

これらの複合体のフローサイトメトリーの結果を図 5 に示す。

【0432】

実施例 10: HER2 過剰発現細胞への複合体の内在化を示す試験

共焦点細胞取り込み

MDA-MB-231、MDA-MB-231/HER2 および SKOV-3 細胞を μ -slide 8 well chambered coverslip (ibidi) に 1.0×10^4 細胞/ウェルでプレーティングし、37℃、5% CO₂ で一晩付着させた。その後、化合物 36 および 41 (3.33 nM) を添加し、1 時間、3 時間、6 時間

50

および24時間インキュベートさせた。細胞を洗浄後、1%パラホルムアルデヒドで20分間、室温で固定した。細胞膜は、Alexa Fluor 488-小麦胚芽凝集素 (AF488-WGA, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) / DPBSで、室温で10分間染色した。細胞核は、4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$) / DPBSを用いて、室温で10分間対比染色した。共焦点顕微鏡 (Leica SP8) を用いて、蛍光画像および光学的切片を収集した。画像は、Fiji (Image J 1.52n) で処理した。

【0433】

共焦点顕微鏡画像を、図6~8に示す。共焦点画像では、24時間インキュベート後も、図6a)の化合物36および図6b)の化合物41はいずれも、ほとんどMDA-MB-231と会合していない。一方、標的化合物41は、24時間インキュベート後に、MDA-MB-231/HER2およびSKOV-3細胞によって内在化され (図7aおよび図8a)、化合物36は、内在化されなかった (図7bおよび図8b)。

【0434】

実施例11トリチウム標識MMAEコンジュゲート dendリマー (化合物40および45)の腫瘍分布

MDA-MB-231/HER2細胞 ($50 \mu\text{L}$ のPBS:マトリゲルに 5×10^6 個)を、雌のNOD/SCIDマウス (5~7週齢)の第4乳腺脂肪パッドに皮下移植した。固形腫瘍は、 100 mm^3 まで成長させた (約3~4週間)。マウスを各群6匹の2つの異なる群に分け、化合物40 (対照群) または化合物45 (標的化群) ($100 \mu\text{L}$ 中 $0.5 \mu\text{Ci}$ 、PBS pH7)をイソフルラン鎮静下で尾静脈注射した。マウスは、48時間後にイソフルラン麻酔させ、頸椎脱臼直前に心臓穿刺により血液を採取した。その後、選択した器官 (腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、肺、心臓、および脳など)を摘出し、重量を測定して、トリチウム (^3H)の体内分布用に処理した。

【0435】

その結果を図9に示す。標的化 dendリマー化合物45は、HER2陽性腫瘍に蓄積され (3.53% 用量/ $\text{g} \pm 0.43$)、非コンジュゲート対照化合物40 (1.88% 用量/ $\text{g} \pm 0.28$)よりも広い範囲で、腫瘍への取り込みが約80%増加したことになる ($p < 0.05$)。血中濃度差は、標的 dendリマーと対照 dendリマーとは有意ではなく、それぞれ 4.52% 用量/ $\text{g} \pm 0.24$ 、および 3.69% 用量/ $\text{g} \pm 0.31$ であった。薬物動態の差が腫瘍の保持に影響を与える可能性はないため、2D3HER2-ナノボディ標的化により、dendリマーの保持が改善された。

【0436】

実施例12 SKOV3腫瘍モデルにおけるCy5標識-MMAEコンジュゲート dendリマー (化合物36および41)の腫瘍への取り込みの有効性および共焦点イメージング

雌のNOD/SCIDマウス (8週齢)の脇腹に、 3×10^6 個のSKOV3細胞/PBS:マトリゲル (1:1)を皮下接種した。固形腫瘍は、 200 mm^3 まで成長させた (約3週間)。マウスを5つの異なる群に分け、化合物36 (対照群) または化合物41 (標的群) ($250 \mu\text{L}$ のPBS、pH7中にMMAE換算で 0.5 mg/kg)、Kadcyla (登録商標) 40 mg/kg および Herceptin (登録商標) (40 mg/kg)を、イソフルラン鎮静下で尾静脈注射した。

【0437】

(a) 共焦点イメージング

マウスは、48時間後にイソフルラン麻酔させ、頸椎脱臼直前に心臓穿刺により血液を採取した ($n = 2$ /群)。その後、腫瘍を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで一晩固定した後、PBSで洗浄し、アガロースに包埋した。その後、腫瘍をビブラトームで $100 \mu\text{m}$ まで切開し、切片には核 (DAPI、同時、時間、サプライヤー) および血管 (CD31、同時、時間、サプライヤー)の染色を行った。共焦点顕微鏡 (Leica SP8) を用いて、蛍光画像および光学的切片を収集した。その結果は、図10および図11

に示す。標的化デンドリマー（化合物 41）は、腫瘍の中心部および周辺部に取り込みが示されたが、化合物 36 では示されなかった。

【0438】

（b）複合体の有効性

倫理的エンドポイントが満たされるまで、一定の間隔で腫瘍の測定を行った（ $n = 6$ / 群）。その結果を、図 12（経時的平均腫瘍体積のプロット）、図 13（経時的生存率のプロット）、および図 14（経時的平均体重変化のプロット）に示す。標的化デンドリマー化合物 41 は、化合物 36、Herceptin（登録商標）および Kadcyla（登録商標）と比較して、腫瘍の完全な退縮を示した。

【0439】

実施例 13 MDA-MB-231 / HER2 + 細胞株における第 4 世代複数ナノボディデンドリマー内在化のキネティクス

第 4 世代では、上述のように分離した 1 個（単一ナノボディ）または 2 ~ 4 個（複数ナノボディ）の抗 HER2 2D3 ナノボディ、化合物 90 および 91 のいずれかにコンジュゲートしたシデロフォ由来のキレーターであるデスフェリオキサミン（DFO）を有する Cy5 標識ナノボディデンドリマー複合体を用いて、デンドリマー 1 個あたりに対して異なる数のナノボディが付着している HER2 + ヒト細胞株への結合性を比較した。

【0440】

HER2 ノックイン上皮性腺癌細胞株 MDA-MB-231 / HER2（前述）を、10% FBS およびペニシリン-ストレプトマイシン（100 U mL⁻¹）を含むダルバッコ変法イーグル培地（DMEM）で、5% CO₂ 加湿雰囲気下、37℃で維持した。

【0441】

フローサイトメトリーによる細胞結合の測定では、10% FBS を添加した DMEM 培地で、96 ウェルの培養プレートに 20,000 個 / ウェルの細胞を一晩かけてプレATINGした。単一または複数のナノボディデンドリマーを 3 nM、6 nM、12 nM、および 30 nM で細胞に添加し、37℃で 0.5 時間、1 時間、2 時間、4 時間、および 6 時間インキュベートした。同様にして調製した対照細胞を事前冷却し、30 nM の単一および複数のナノボディデンドリマーと氷上で 6 時間インキュベートした。

【0442】

ナノボディコンジュゲートデンドリマーとのインキュベーション後、1% ウシ血清アルブミンを添加した氷冷 PBS で細胞を 3 回洗浄し、結合していないデンドリマーを除去し、TrypLE（商標）Express Enzyme（1X）、no phenol red（Gibco, 12604013）を用いてプレートから遊離させた。フローサイトメトリー（Stratedigm S1000EON, California）によって分析するために、細胞を冷 DPBS に再懸濁した。デンドリマーの存在を Cy5 からシグナルを得ることによって測定した。各濃度、各時点で内在化したデンドリマーの量を推定するために、氷上でデンドリマーとインキュベートした細胞の Cy5 シグナルを、内在化がないと仮定した場合の最大の表面結合デンドリマーとした。このシグナルを、37℃でインキュベートした細胞中で測定したシグナルから差し引き（これは、表面に結合し、内在化したデンドリマーを表す）、内在化したデンドリマーからのシグナルのみを単離した（図 15 を参照のこと）。

【0443】

複数（化合物 91）コンジュゲート抗 HER2 ナノボディデンドリマーは、単一（化合物 90）の場合と比べて、低濃度でより迅速に身体内に内在化される。高濃度の場合、化合物 90 は、約 2 時間後に化合物 91 よりも高いレベルの内在化を示す。

【0444】

実施例 14 HER2 Hi 細胞株における単一および複数のナノボディとの複合体の共焦点イメージング

HER2 hi, SKOV-3 細胞を μ -スライド 8 ウェルチェンバーカバースリップ（ibidi）に 1.0×10^4 細胞 / ウェルでプレATINGし、37℃、5% CO₂

10

20

30

40

50

で一晩付着させた。その後、化合物 91（複数の 2D3-デンドリマー複合体）および化合物 90（単一の 2D3-デンドリマー複合体）（3.33 nM）を加え、1、3 時間、6 時間、24 時間インキュベートさせた。細胞を DPBS で洗浄し、その後、1% パラホルムアルデヒドで 20 分間、室温で固定した。細胞膜は、小麦胚芽凝集素の Alexa Fluor 488（登録商標）複合体（AF488-WGA, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ）／DPBS で、室温で 10 分間染色した。細胞核は、Hoechst 33342（2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ）／PBS を用いて、室温で 10 分間対比染色した。共焦点顕微鏡（Leica SP8）を用いて、蛍光画像および光学的切片を収集した。画像は、Fiji（ImageJ 1.52p）で処理した。

【0445】

共焦点顕微鏡画像を図 16 および図 17 に示す。化合物 90 および 91 は両方とも、24 時間のインキュベーションの後、SKOV-3 細胞と結合し、内在化する。注目すべきことに、化合物 91 は、化合物 90 と比較して、3 時間および 6 時間の時点で、より大きい結合および内在化の程度を示す。

【0446】

複数（化合物 91）コンジュゲート抗 HER2 ナノボディ G4 デンドリマーは、この濃度では単一のナノボディ G4 デンドリマー（化合物 90）よりも迅速に内在化し、6 時間までは違いが見られるが、24 時間では、違いは現れなくなる。

【0447】

実施例 15 標的化された Zr 放射性核種含有デンドリマー-SKOV3 乳がん異種移植片を用いたイメージング試験

卵巣がんの SKOV3 マウス異種移植モデルにおける 89Zr-標識 HER2 標的デンドリマー構築物および非標的デンドリマー構築物の蓄積を調べた。注射後 9 日目までの体内分布を PET-CT によって測定し、2 日目および 9 日目に摘出した器官の ex vivo ガンマ・シンチレーション・イメージングによって検証した（可能な場合）。試験は、3 部構成で行った。

【0448】

腫瘍の発生および成長

5 x 10⁶ の SKOV3 細胞（50:50 のマトリゲル:PBS 50 μL ）を、健康な雌の NOD-SCID（約 20 g）8 週齢マウスの右脇腹に SC 注射した。イメージング化合物を注射する前に、腫瘍を 4 週間成長させた。

すべての腫瘍は撮像時に触知でき、撮影実験時のサイズは約 3~5 mm であった。

【0449】

試験化合物

下表の化合物は、以下のとおり標識した。

表 試験用化合物

【表 21】

化合物番号	非標的化	化合物番号	標的化
		104	DFO-NB
99	BHA-G2-PEG ₁₀₀₀	86	BHA-G2-PEG ₁₀₀₀ +NBS
		86	BHA-G3-PEG ₁₀₀₀ +NB+ リジンのプレロード対照
100	BHA-G3-PEG ₄₁₂	88	BHA-G3-PEG ₄₁₂ +NB
101	BHA-G3-PEG ₁₀₀₀	89	BHA-G3-PEG ₁₀₀₀ +NB
102	BHA-G4-PEG ₁₀₀₀	90	BHA-G4-PEG ₁₀₀₀ +NB
102	BHA-G4-PEG ₁₀₀₀	90	BHA-G4-PEG ₁₀₀₀ +NB
103	BHA-G5-PEG ₁₀₀₀	92	BHA-G5-PEG ₁₀₀₀ +NB

#=リピート

【0450】

Zr-89による試験用化合物の放射性標識およびRadio TLC分析

すべての構築物（必要に応じて鉄除去の前処理を施したもの：<http://jnm.snmjournals.org/content/44/8/1271.long>）を、0.1 M pH 7.4 HEPES緩衝液中でデンドリマーの過剰量（過剰量は表1参照）の ^{89}Zr と37℃で45分間インキュベートした。各溶液のサンプルを採取し、50 mM DTPAと1:1で混合した。各溶液の5 μL をTLC紙（シリカゲル含浸Agilent iTLC-SGガラスマイクロファイバークロマトグラフィー紙）にスポットし、50:50 H₂O:エタノールで実施した。その後、プレートをEckert & Ziegler Mini-Scan and Flow-Count iTLC Readerで画像化した。必要に応じて、7 K MWC O Zeba Spin Columns (Thermo Scientific) を用いて、製造業者のプロトコルに従って精製することによって、結合していないジルコニウムを除去した。すべてのサンプルが、95%を超える標識を示した。品質管理のために、遊離の ^{89}Zr およびDTPAに結合した ^{89}Zr の溶出挙動をモニターするための対照実験を行い、また、 ^{89}Zr で標識された任意の未結合のキレート剤を確認するために、各サンプルをDTPAを含めてまたはDTPAを含まずに実施した。代表的なRadio TLCの画像を図18に示し、これらは、 ^{89}Zr がすべてデンドリマーに結合しており、遊離 ^{89}Zr が、存在しなかったことを示す。Radio TLCは、以下に含まれる：

10

【表22】

識別子	領域	% ピーク	最大 mm	開始 mm	終了 mm	最大	%合計	Rf	セントロイド mm
化合物	55460	97.76	120	96	140	5815	33.5	0.61	118.44
Zr89	1272	2.24	156	148	168	318	77	0.81	156.1

20

【0451】

試験注射詳細

In vivo 撮像実験では、2匹のマウスに尾静脈から100 μL の試験化合物を注射し（29 G針、約1.5～3.5 MBq）、様々な時点での腫瘍の蓄積および生体内分布を観察した。注射後9日目の器官分布を決定するために、ガンマカウンタを用いてex vivoで定量化を行った。生体内分布実験では、2匹のマウスに構築物を注射して、注射後48時間の時点でのex vivoでの腫瘍の蓄積および生体内分布をガンマ線計数でモニターした。

30

【0452】

結果

PET-CTイメージング

注射後4時間、24時間、48時間、5日、7日、9日に、30～90分の静止画撮影を行った。PET画像は、サブセット化による期待値最大化法（order-subset expectation maximization）（OSEM2D）アルゴリズムを用いて再構成され、CTおよびPET画像の融合および関心領域（ROI）の定義が可能なInveon Research Workplaceソフトウェア（IRW 4.1）（Siemens）を用いて分析した。各動物のCTおよびPETデータセットは、IRWソフトウェア（Siemens）を用いてアライメントを行い、目的の器官が確実にオーバーラップするようにした。ボクセルあたりの活性量は、PETスキャナの効率を考慮して、既知の活性量の ^{89}Zr を充填した円筒形ファントムをスキャンすることによって得られた変換係数を用いて、nci/ccに変換した。活性濃度は、組織1 cm³あたりの減衰補正された注入活性のパーセンテージとして表され、注入用量/gパーセント（ID/g%）として近似させ得る。結果を、化合物89、90、92の9日間にわたる（a）腎臓、（b）肝臓、および（c）腫瘍における1 gあたりのジルコニウム注入用量率（パーセンテージ）を示すグラフとして、図19に示す。代表的なPET画像を図2

40

50

0に示す。放射性同位元素で標識された複合体の代表的な最大強度投影図。すべてのPETデータは、ベクレル／ボクセル（ cm^3 ）で表され、腫瘍の取り込みを強調するために閾値が設定されている。

【0453】

注入後2日目および9日目に器官を取り出し、*ex vivo*ガンマ解析によってシグナル強度を定量化し、画像化した。さらに、48時間後に各コホートにつき $n=2$ を集め、ガンマ解析により生体内分布を評価した。*Ex vivo*での生体内分布の結果は、図21の表に示し、2日目および9日目における注入用量／gの*ex vivo*シグナルの腫瘍：器官の比率を示す。

【0454】

その結果、特に化合物88（低分子G3デンドリマー）の2日目の結果から、非標的と比較して標的の腫瘍対血液の比率が高いことが示されている。9日目には、非標的と比較して、特に化合物90および92（より大きいG4およびG5のデンドリマー）では、標的の腫瘍対血液の比率がより良好である。

【0455】

また、図22の表には、*ex vivo*の腫瘍および器官に注入されたZr用量／グラムのパーセンテージも示されている。

【0456】

その結果は、特に化合物90および92（より大きいG4およびG5のデンドリマー）では2日目に、また化合物89（G3のデンドリマー）では9日目に、非標的と比較して、標的の腫瘍において高いシグナルを示す。

【0457】

結論

1. デンドリマーが大きいほど、腫瘍への蓄積がより良好である。2D3は、迅速なクリアランスおよび低い蓄積性を示した。
2. 標的化療法では、非標的化デンドリマーよりも、腫瘍への蓄積性が高くなる。
3. 化合物88（G3-1K-ナノボディ）は、他の低分子デンドリマーと比較して、腫瘍中でのシグナルが有意に増強することを示す。
4. 化合物90および92（G4およびG5ナノボディ）は、48時間の時点で腫瘍中で12%超のID/gを示し、9日の時点では、それぞれ4%超および8%超のID/gを示した。
5. デンドリマーを含む低分子ナノボディおよびナノボディのみは、腎臓の高い滞留性を有する。クリアランス器官での異常な蓄積は観察されず、肝臓および脾臓のシグナルは、同様のシステムで典型的に観察されるような予想濃度範囲を示した。

【0458】

実施例16：カバジタキセルとの併用、または併用しない場合のG5、PEG1000デンドリマーの*in vitro*会合試験

MDA-MB-231、MDA-MB-231/HER2（HER2ノックイン）、またはSKOV-3細胞を、10%（v/v）ウシ胎児血清（FBS）および1%（v/v）ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した500 μL の適切な成長培地の24ウェルプレートに播種し（1ウェルあたり 1×10^5 細胞）、インキュベーション時間を1時間から24時間まで変化させて、化合物70（G5，PEG1000，CTX）または78（2D3，G5，PEG1000，CTX）を3.33 nM、37℃、5% CO_2 加湿雰囲気下でインキュベートした。インキュベーション後、DPBSで穏やかに3回洗浄することにより、付着細胞から非結合／非会合粒子を除去した（300 μL ／ウェル）。TrypLE（商標）Express Enzyme（1X）、no phenol red（150 μL ／ウェル）を用いて、室温で5～10分間処理することにより、プレートから細胞を除去した。その後、プレートを氷上に置いた。その後、フローサイトメトリーによりCy5からのシグナルを取得することにより、サンプルの細胞結合および会合を決定した。

10

20

30

40

50

【0459】

フローサイトメトリーの結果

これらの結果は、24時間にわたる3つの細胞株すべてに対する化合物70（対照）の最小限の結合を明確に示している。化合物78（標的）は、細胞株のHER2受容体の発現レベルに応じて、結合の増加を示した。フローサイトメトリーにより、24時間後までに、化合物78（標的）で処理したMDA-MB-231/HER2細胞（ $4,269 \pm 322$ ）は、化合物70（対照）で処理した細胞（ 12.4 ± 0.64 ）と比較して、約340倍強い蛍光を示したことが明らかになった。また、化合物78（標的）で処理したSKOV-3細胞（ $1,817 \pm 60.8$ ）は、化合物70（対照）で処理した細胞（ 11.4 ± 0.42 ）と比較して、約160倍強い蛍光を示した。その結果は、図23～図25に示す。

10

【0460】

化合物70（対照）および化合物78（標的）とMDA-MB-231、MDA-MB-231/HER2およびSKOV-3細胞との24時間にわたる平均蛍光強度（MFI）値。値は、平均±標準偏差（SD；n=2）である。

【表23】

	MDA-MB-231	
時間(h)	化合物70（対照）	化合物78（標的）
1	1.00 ± 0.14	36.7 ± 0.85
3	4.10 ± 0.71	64.8 ± 31.5
6	5.65 ± 0.64	125 ± 2.12
24	13.4 ± 0.07	197 ± 0.71

20

【表24】

	MDA-MB-231/HER2 (HER2 ノックイン)	
時間(h)	化合物70（対照）	化合物78（標的）
1	0.77 ± 0.06	755.7 ± 3.54
3	7.72 ± 4.17	$2,460 \pm 17.7$
6	5.82 ± 0.07	$3,567 \pm 33.2$
24	12.4 ± 0.64	$4,269 \pm 322$

30

【表25】

	SKOV-3	
時間(h)	化合物70（対照）	化合物78（標的）
1	1.00 ± 0.29	625.8 ± 0.71
3	3.46 ± 0.69	$1,422 \pm 0.71$
6	3.90 ± 0.10	$1,621 \pm 1.41$
24	11.4 ± 0.42	$1,817 \pm 60.8$

40

【0461】

本開示の広範な一般的範囲から逸脱することなく、上述の実施形態に多数の変形および／または改変がなされ得ることが、当業者には理解されるであろう。したがって、本実施形態は、すべての点において例示的なものであり、限定するものではないと考えられる。

【0462】

参考文献

Abdollahpour-Alitappeh et al (2017) Novelty in Biomedicine 4: 145-151.
 Al-Lazikani et al. (1997) J Mol Biol 273: 927-948.
 Arezumand et al. (2017) Front Immunol 8:1746.

50

Bethesda, Md., 1987 and 1991.

Chetterjee et al. (2013) Biochemistry 52(10).

Chothia and Lesk (1987) J Mol Biol 196: 901 -917.

Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883.

Giudicelli et al. (1997) Nucleic Acids Res 25: 206-211.

Honnegher and Plukthun (2001) J Mol Biol 309: 657-670.

Hussack et al. (2018) BMC Res notes 11(1):866.

Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health,

Messerer et al. (2004) Clin. Cancer Res 10(19): 6638-6649.

Milla et al. (2012) Current Drug Metabolism 13(1): 105-119.

Mukai et al. (2015) Scientific Reports 5: 9699.

Nord et al. (1995) Protein Eng 8:601-608.

Oroudjev et al. (2010) Mol Can Thera 9:2700-2713.

Owen et al. (2011) WO2012167309.

Padlan et al. (1995) FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol 9: 133-9.

Pohlmann et al. (2009) Clin Cancer Research 15(24): 7479-7491.

Pruszyński et al. (2013) Nucl Med Biol 40(1): 52-59.

Reverts et al. (2011) US Application No. 20110028695

Vaneycken et al. (2011) FASEB J 25(7): 2433-2446.

Verel et al. (2003) J Nucl Med 44(8): 1271-1281.

Voigt (2015) Methods Mol Med 110: 39-48.

Wu et al. (2018) Translational Oncology 11(2): 366-373.

【図面】

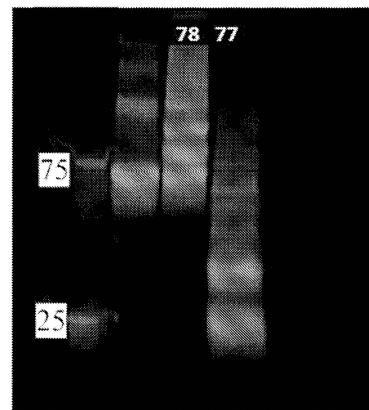
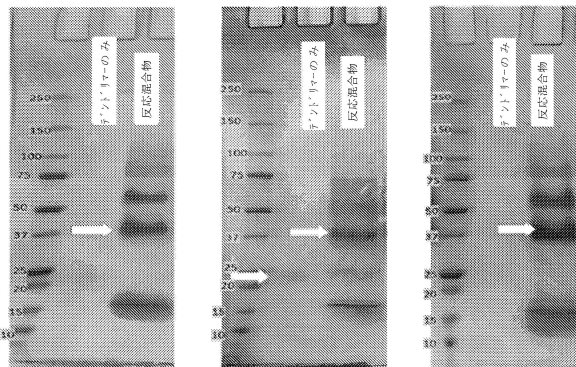
【図 1】

【図 2】

化合物 74

化合物 75

化合物 76



10

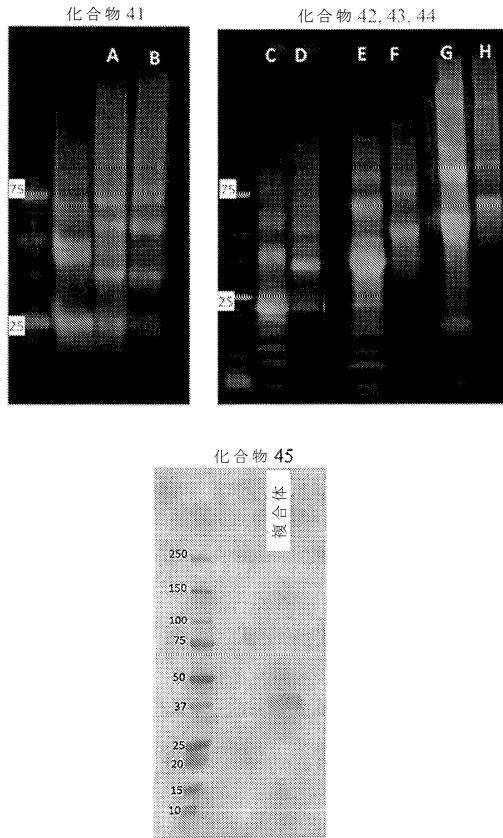
20

30

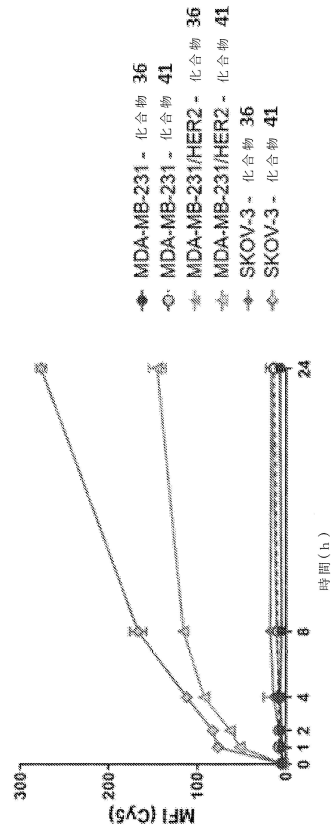
40

50

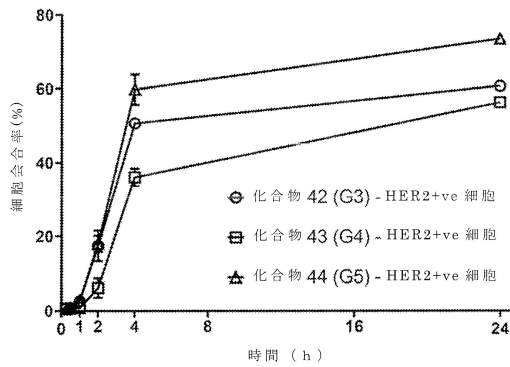
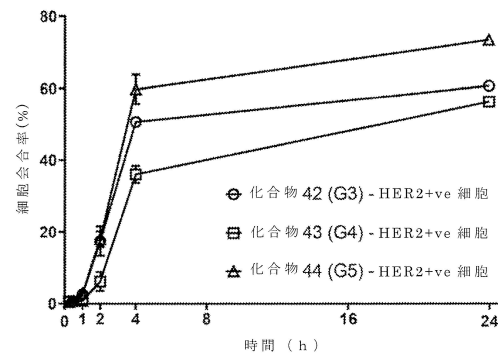
【図 3】



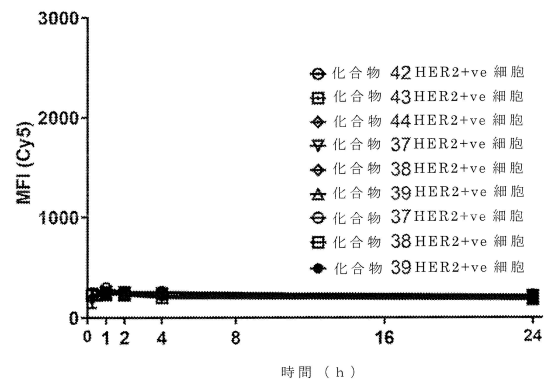
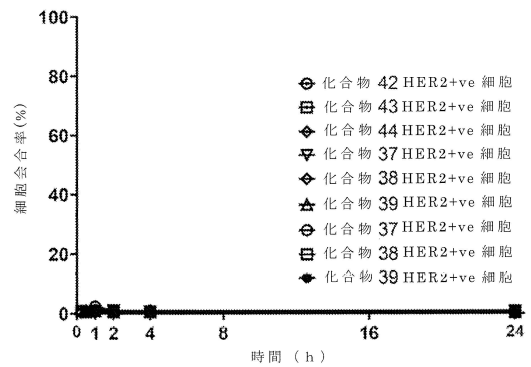
【図 4】



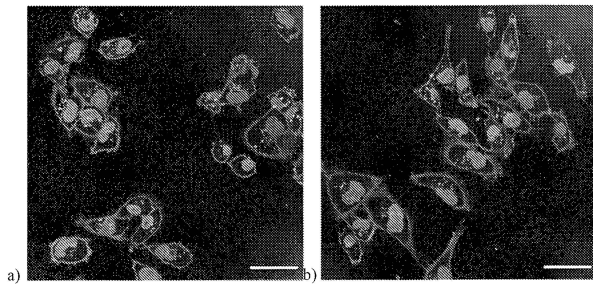
【図 5 - 1】



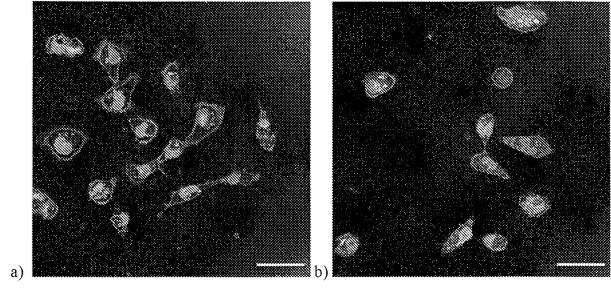
【図 5 - 2】



【図 6】

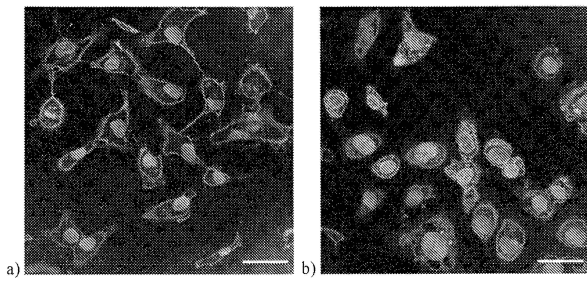


【図 7】

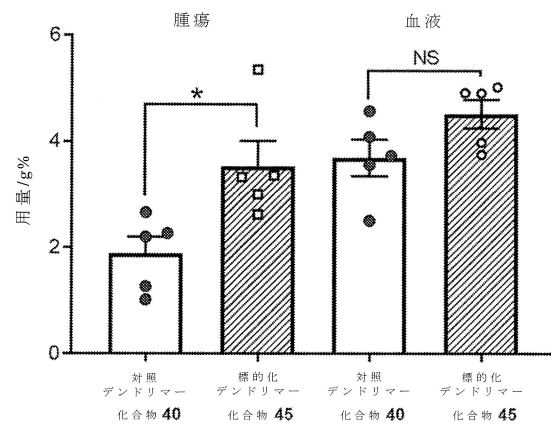


10

【図 8】



【図 9】



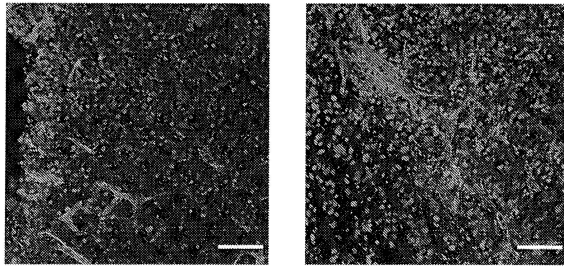
20

30

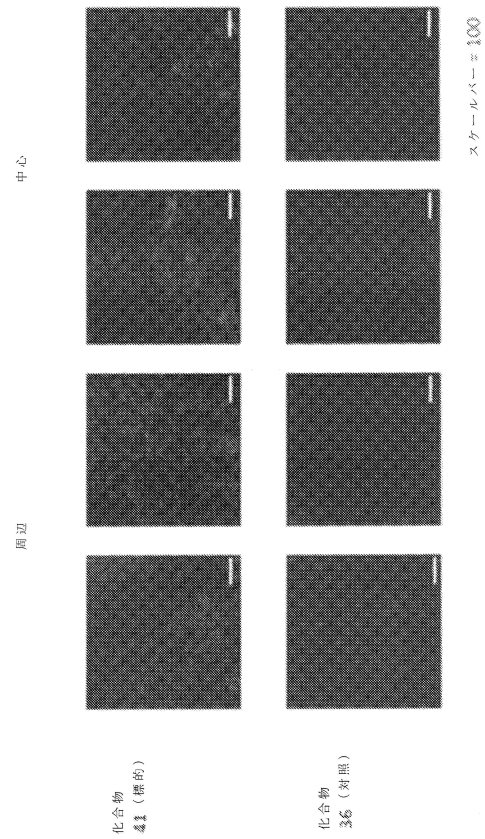
40

50

【図 10】



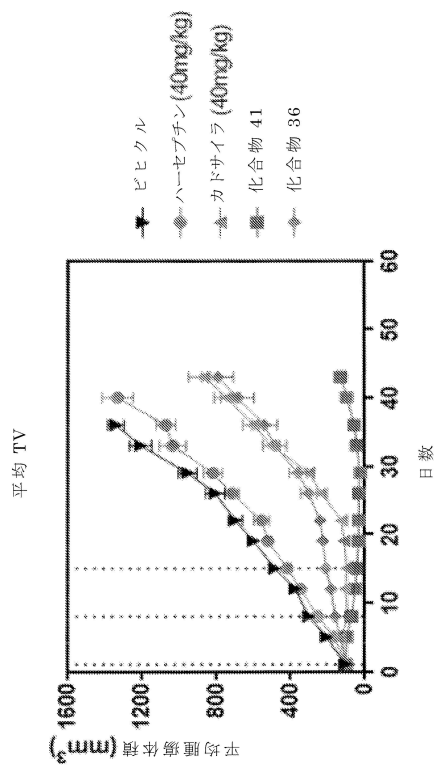
【図 11】



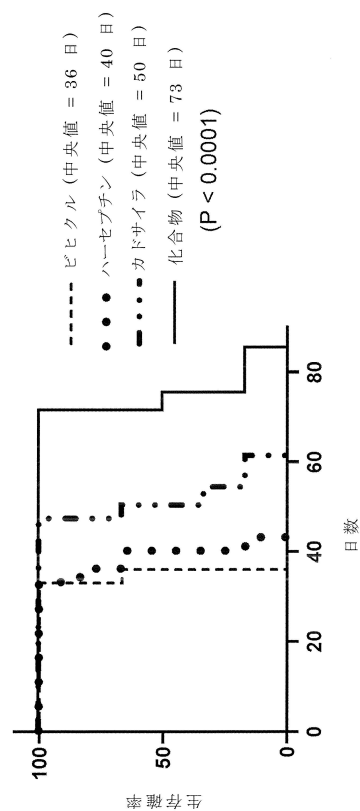
10

20

【図 12】



【図 13】

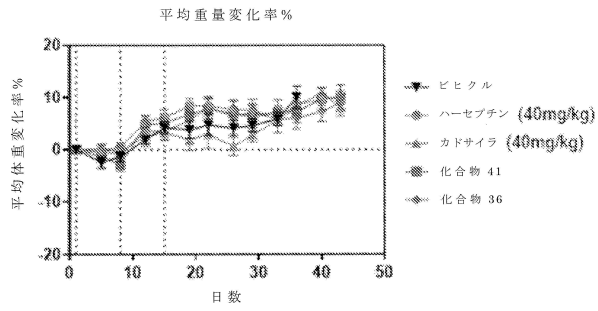


30

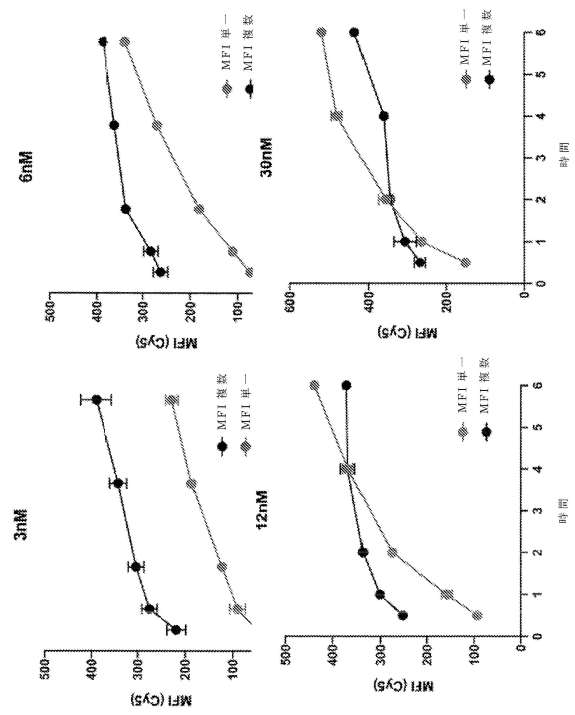
40

50

【図 14】



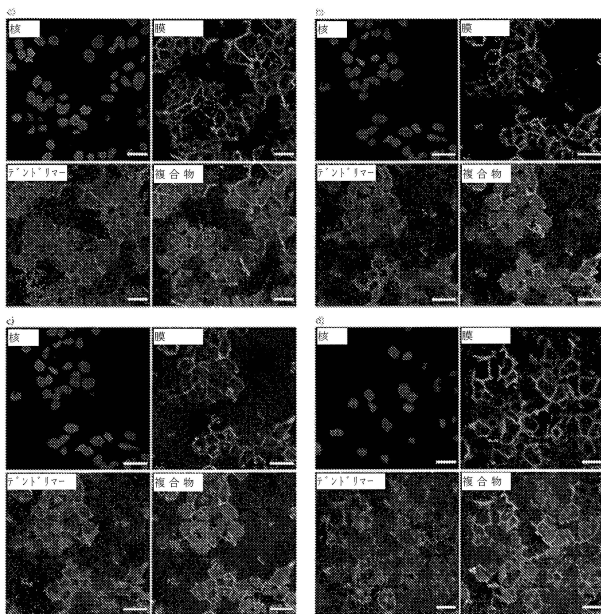
【図 15】



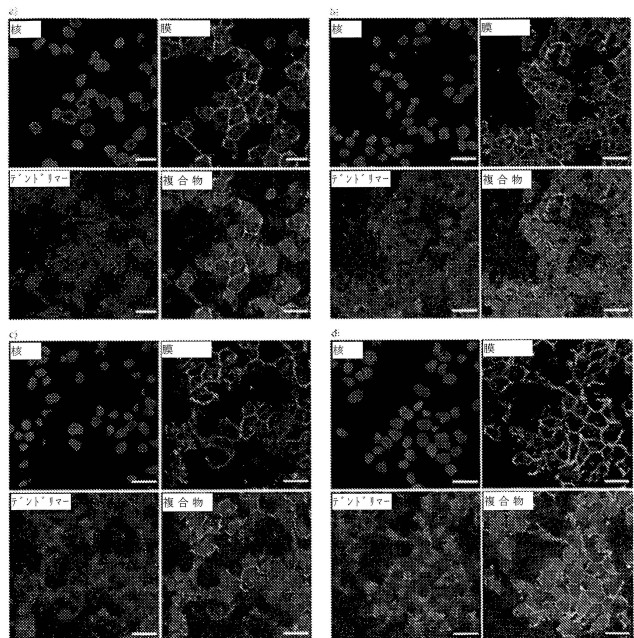
10

20

【図 16】



【図 17】

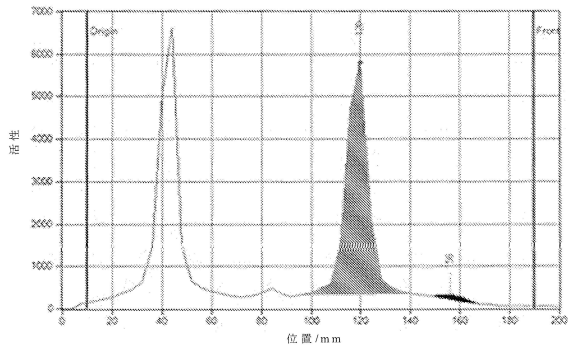


30

40

50

【図 18】



【図 19 - 1】

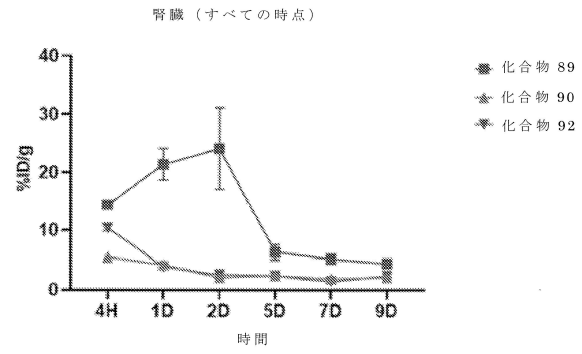


図 A

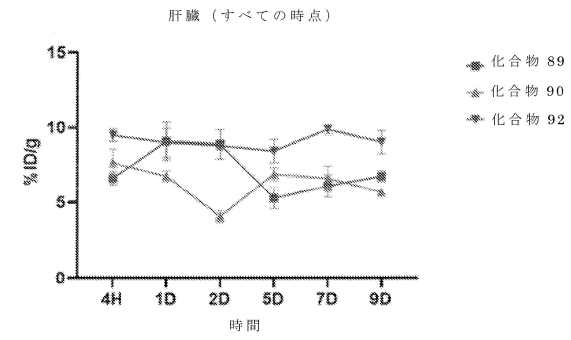


図 B

【図 19 - 2】

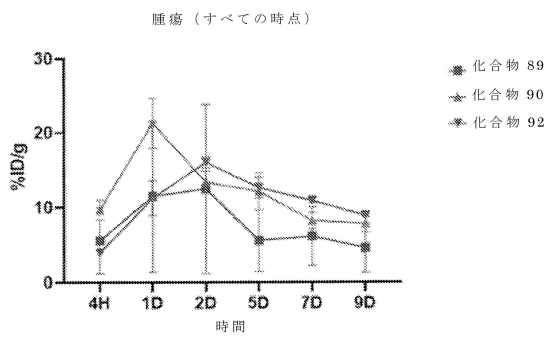
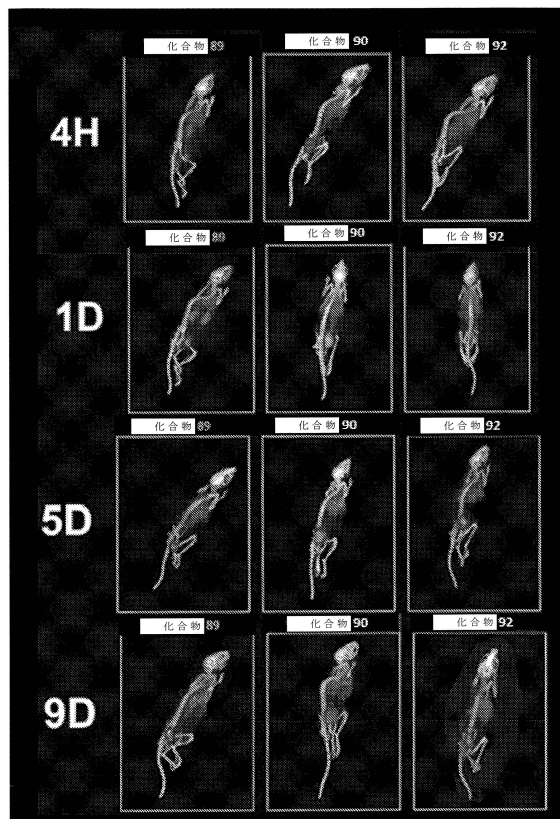


図 C

【図 20】



10

20

30

40

50

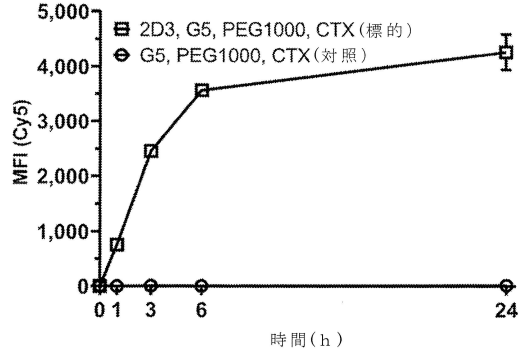
【図 2 1】

デンドリマー／臓器比率													
臓器	時間 ／ 日数	NB (10 kDa)	G2 (10.2 kDa)	G2 + NB (25.7 kDa)	G3-P412 (5.6 kDa)	G3-P412 + NB (25.1 kDa)	G3-P412 NB (31.9 kDa)	G3-P412 NB (31.9 kDa)	G4 (27.9 kDa)	G4 + NB (43.4 kDa)	G4 + NB NB (60.3 kDa)	G5 (51.4 kDa)	G5 + NB (66.8 kDa)
		104	99	86	100	88	101	87	102	90	91	103	92
臓器：血液	2	17.17	1.02	13.04	1.70	24.30	0.91	4.87	1.66	3.87	3.38	4.43	0.69
	9	1.24	6.57	10.58	0.74	1.67	7.76	25.86	21.92	56.95	32.30	12.62	13.68
臓器：肝臓	2	4.51	0.20	0.94	0.31	0.28	0.96	0.67	2.09	1.78	1.19	0.75	1.63
	9	1.36	0.11	0.28	0.01	0.05	0.15	0.71	0.29	0.66	0.52	0.27	0.37
臓器：脾臓	2	2.56	0.29	1.09	0.13	1.16	0.33	1.12	0.35	1.41	0.95	0.83	0.29
	9	0.10	0.11	0.23	0.01	0.05	0.04	0.25	0.05	0.21	0.16	0.07	0.09
臓器：腎臓	2	0.01	0.73	0.10	0.06	0.03	0.69	0.24	2.05	5.21	3.87	3.40	2.22
	9	0.00	0.82	0.06	0.05	0.01	0.51	1.15	2.03	2.99	3.07	1.43	2.29

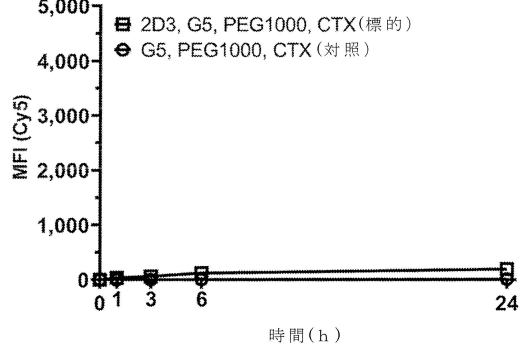
【図 2 2】

デンドリマー／注入用量比率													
臓器	時間 ／ 日数	NB (16 kDa)	G2 (10.2 kDa)	G2 + NB (25.7 kDa)	G3-P412 (5.6 kDa)	G3-P412 NB (25.1 kDa)	G3-P412 NB (31.9 kDa)	G3-P412 NB (31.9 kDa)	G4 (27.9 kDa)	G4 + NB (43.4 kDa)	G4 + NB NB (60.3 kDa)	G5 (51.4 kDa)	G5 + NB (66.8 kDa)
		104	99	86	100	88	101	87	102	90	91	103	92
臓器：化合物	2	1.05	1.74	2.70	0.71	2.28	2.67	4.78	3.96	12.53	12.64	7.85	4.04
	9	0.31	0.78	1.06	0.25	0.31	1.53	4.56	1.72	4.15	4.55	2.70	3.31
臓器：肝臓	2	0.23	8.70	3.06	18.25	7.82	9.62	5.22	5.85	6.05	7.34	6.73	5.48
	9	0.23	7.18	3.71	20.85	6.02	10.10	6.44	5.85	7.34	8.72	10.23	9.59
臓器：脾臓	2	0.53	5.83	2.96	5.51	2.14	8.12	4.27	11.13	8.98	13.06	9.46	16.45
	9	0.00	7.38	4.47	35.24	6.88	47.73	18.02	34.23	21.52	30.23	37.09	45.59
臓器：腎臓	2	109.01	2.36	28.56	11.23	79.08	4.05	20.07	1.93	2.47	3.29	2.33	1.87
	9	62.22	0.93	17.03	5.36	55.61	3.11	4.06	0.85	1.44	1.57	1.91	1.43
臓器：心臓	2	0.10	1.42	0.61	1.39	0.49	1.91	1.29	1.53	2.62	3.18	1.98	3.08
	9	0.00	0.64	0.52	0.92	0.28	1.23	0.81	1.11	1.36	1.35	1.72	1.83
臓器：肺	2	0.11	1.25	0.54	4.95	0.58	4.36	2.31	1.39	2.82	2.80	1.72	2.71
	9	0.00	0.44	0.38	2.78	0.55	3.55	1.33	1.06	1.32	1.24	1.38	1.12
臓器：脊	2	0.26	1.04	0.63	0.98	0.63	0.93	1.75	1.31	2.17	3.03	2.27	1.70
	9	0.00	0.28	0.34	0.58	-0.53	0.79	0.54	1.54	1.78	1.78	3.77	1.30
臓器：血液	2	0.08	1.67	0.22	0.42	0.09	3.05	1.03	2.37	3.40	3.51	1.81	5.97
	9	0.00	0.00	-0.26	-0.45	-0.29	-0.20	-0.18	0.08	-0.19	-0.21	-0.22	0.04
臓器：消化管	2	0.04	0.87	0.37	1.17	0.34	1.01	0.67	0.68	1.04	1.35	0.96	0.85
	9	0.11	0.31	0.32	0.80	0.29	0.77	0.52	0.37	0.46	0.57	0.64	0.63
臓器：尾	2	0.07	1.78	0.71	2.36	0.69	1.14	0.71	0.93	2.26	2.14	0.90	1.47
	9	0.03	2.56	1.76	0.58	1.50	0.99	1.32	2.53	1.12	1.29	1.03	1.14

【図 2 3】



【図 2 4】



10

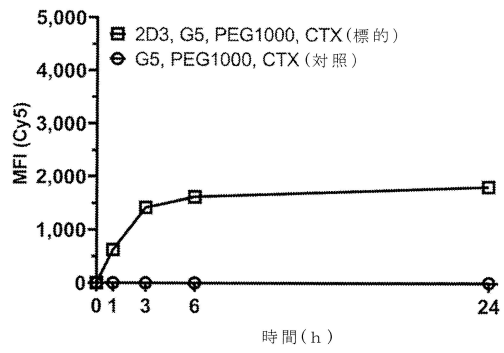
20

30

40

50

【図 25】



10

【配列表】

2022547434000001.app

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2020/050910
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 47/56 (2017.01) A61K 47/60 (2017.01) C07K 16/32 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/44 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
Databases: Patentscope; Google; EPOQUE: WPIAP, EPODOC; STN: CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CABA; Internal databases		
Search terms: dendrimers, cytotoxic, PEG, lysine, HER2 and similar terms; Starpharma Pty Ltd (applicant); TSEGAY, Sammi, SHENGULE, Sudhir, REITANO, Pauline, PORTER, Christopher, JOHNSTON, Angus, YUEN, Daniel (inventors); IPC/CPC marks: C08G83/003, A61K47/56, C08G83/002, A61K47/641, A61K47/6851		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C		☒ See patent family annex
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 9 November 2020	Date of mailing of the international search report 09 November 2020	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au	Authorised officer Ann Le AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262832745	

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2020/050910
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/167309 A1 (STARPHARMA PTY LTD) 13 December 2012 (see abstract, claims, pages 6, 12-13, 35, Example 2 on pages 54-55, Example 5 on pages 59-60, Example 6 on pages 60-61, Example 19 on page 83, Examples 30-31 on pages 92-93 of D1)	1-46
X	WO 2014/026286 A1 (ANGIOCHEM INC) 20 February 2014 (see abstract, claims, figures as explained on pages 8-9- specifically Figures 5(a)-5(c), and pages 19-26, 38-42 of D2)	1-46
X	Miyano, T. et al. : "Anionic Amino Acid Dendrimer-Trastuzumab Conjugates for Specific Internalization in HER2-Positive Cancer Cells" (2010), MOLECULAR PHARMACEUTICS VOL. 7, NO. 4, pages 1318-1327 (see whole document of D3, in particular: the abstract, "Introduction", "Materials and Methods")	1-46
X	Shukla, R. et al. : "HER2 Specific Tumor Targeting with Dendrimer Conjugated Anti-HER2 mAb" (2006), Bioconjugate Chem., Vol. 17, No. 5, pages 1109-1115 (see whole document of D4, in particular: the abstract, "EXPERIMENTAL PROCEDURES" and accompanying schemes)	1-46
X	Rostami, I. et al. : "Peptide-conjugated PEGylated PAMAM as a highly affinitive nanocarrier towards HER2-overexpressing cancer cells" (2016), RSC Adv, Vol.6, pages 107337-107343 (see whole document of D5, in particular: the abstract, "Experimental section" and scheme 1)	1-46
X	Ma, Pengkai. et al. : "Targeted delivery of polyamidoamine-paclitaxel conjugate functionalized with anti-human epidermal growth factor receptor 2 trastuzumab" (2015), International Journal of Nanomedicine Vol.10, pages 2173-2190 (see whole document of D6, in particular: the abstract, "Materials and methods", "Synthesis of TMAB-PEG-PAMAMPTX")	1-46
X	Mehra, D. et al. : "Reducing Dendrimer Generation and PEG Chain Length Increases Drug Release and Promotes Anticancer Activity of PEGylated Polylysine Dendrimers Conjugated with Doxorubicin via a Cathepsin-Cleavable Peptide Linker" (2018), Mol. Pharmaceutics, Vol. 15, pages 4568-4576 (see whole document of D7, in particular: the abstract and "EXPERIMENTAL SECTION")	1-46
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2020/050910	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2012/167309 A1	13 December 2012	WO 2012167309 A1	13 Dec 2012
		AU 2012267200 A1	09 May 2013
		AU 2012267200 B2	25 Feb 2016
		CA 2837979 A1	13 Dec 2012
		CN 103796684 A	14 May 2014
		CN 103796684 B	25 Jun 2019
		CN 110124051 A	16 Aug 2019
		EP 2729179 A1	14 May 2014
		EP 2729179 B1	23 Sep 2020
		HK 1198356 A1	10 Apr 2015
		IN 101DEN2014 A	15 May 2015
		JP 2014520105 A	21 Aug 2014
		JP 6158177 B2	05 Jul 2017
		KR 20140041678 A	04 Apr 2014
		KR 101941318 B1	22 Jan 2019
		US 2014171375 A1	19 Jun 2014
		US 9744246 B2	29 Aug 2017
		US 2017354739 A1	14 Dec 2017
		US 10265409 B2	23 Apr 2019
		US 2018326081 A1	15 Nov 2018
WO 2014/026286 A1	20 February 2014	WO 2014026286 A1	20 Feb 2014
		AU 2013302270 A1	26 Mar 2015
		AU 2013302273 A1	19 Feb 2015
		CA 2880342 A1	20 Feb 2014
		CA 2881602 A1	20 Feb 2014
		CN 104781276 A	15 Jul 2015
		CN 104781281 A	15 Jul 2015
		EP 2885318 A1	24 Jun 2015
		EP 2885321 A1	24 Jun 2015
		JP 2015526434 A	10 Sep 2015
		JP 2015526435 A	10 Sep 2015
		US 2016015823 A1	21 Jan 2016
		US 9687561 B2	27 Jun 2017
		US 2016106856 A1	21 Apr 2016
		US 2017281787 A1	05 Oct 2017

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2020/050910	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		WO 2014026283 A1	20 Feb 2014
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)			

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 38/07 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 38/08 (2019.01)	A 6 1 K 38/07	
A 6 1 K 38/12 (2006.01)	A 6 1 K 38/08	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	A 6 1 K 38/12	
	C 0 7 K 16/00	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

クス 2 0 2 2

- (72)発明者 ツェゲイ, サミ
オーストラリア国, ビクトリア 3 0 7 2, プレストン, c/o ピーオー ボックス 2 0 2 2
- (72)発明者 シェンガル, サドハー
オーストラリア国, ビクトリア 3 0 7 2, プレストン, c/o ピーオー ボックス 2 0 2 2
- (72)発明者 レイテノー, ポーライン
オーストラリア国, ビクトリア 3 0 7 2, プレストン, c/o ピーオー ボックス 2 0 2 2
- (72)発明者 ボーター, クリストファー
オーストラリア国, ビクトリア 3 0 7 2, プレストン, c/o ピーオー ボックス 2 0 2 2
- (72)発明者 ジョンストン, アンガス
オーストラリア国, ビクトリア 3 0 7 2, プレストン, c/o ピーオー ボックス 2 0 2 2
- (72)発明者 ユエン, ダニエル
オーストラリア国, ビクトリア 3 0 7 2, プレストン, c/o ピーオー ボックス 2 0 2 2

F ターム (参考) 4C076 AA95 BB11 CC27 CC41 FF67 FF70
4C084 AA02 AA03 AA07 AA19 BA01 BA08 BA09 BA16 BA17 BA23
BA28 BA31 NA05 NA06 NA13 ZB261 ZB262 ZC752
4C085 AA13 AA14 BB01 BB41 BB44
4H045 AA10 AA30 BA72 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74