

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7239558号
(P7239558)

(45)発行日 令和5年3月14日(2023.3.14)

(24)登録日 令和5年3月6日(2023.3.6)

(51)国際特許分類	F I
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00

請求項の数 13 (全62頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2020-509440(P2020-509440)	(73)特許権者	520052547 ニューバイオ・セラピューティクス・インコーポレーテッド 中華人民共和国・201203・シャンハイ・プドン・ニュー・ディストリクト・ハレイ・ロード・1011・ビルディング・9・スイート・101
(86)(22)出願日	平成30年4月18日(2018.4.18)	(74)代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(65)公表番号	特表2020-530481(P2020-530481A)	(74)代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(43)公表日	令和2年10月22日(2020.10.22)	(74)代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(86)国際出願番号	PCT/CN2018/083515	(72)発明者	デキアン・アン 中華人民共和国・201203・シャン
(87)国際公開番号	WO2019/033773		
(87)国際公開日	平成31年2月21日(2019.2.21)		
審査請求日	令和3年1月20日(2021.1.20)		
(31)優先権主張番号	201710691056.X		
(32)優先日	平成29年8月14日(2017.8.14)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		

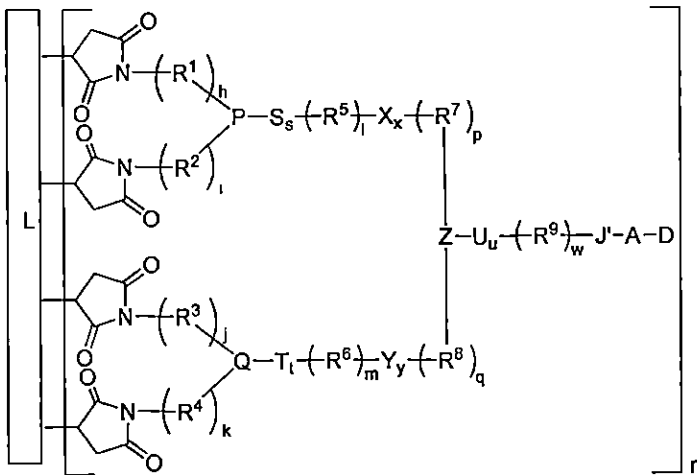
(54)【発明の名称】 テトラマレイミドリンカー及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式IVの抗体薬物コンジュゲート:

【化1】



IV

(式中、

Lは抗体又は抗体断片であり、

Aは、テトラマレイミドリンカーとは異なる切断可能又は非切断可能リンカーとして、存在してもしなくても良く、

Dは薬物分子であり、

4つのマレイミド基は、同じ抗体又は抗体断片に同時に連結しており、

P及びQは、それぞれ独立して、 CR^{10} から選択され、

S及びTは、それぞれ独立して、 $C=O$ 及び O から選択され、

X及びYは、それぞれ独立して、 $-C(O)N(R^{11})-$ 、 $-N(R^{12})C(O)-$ 及び $-O-$ から選択され、

Zは、 CR^{13} 、N及び $C_6 \sim C_{10}$ アリールから選択され、

Uは、 $C=O$ 及び O から選択され、

J'は、 $C=O$ 、 O 及び NR^{14} から選択され、

H及びjは0であり、

i及びkは1であり、

l、m、p、q、s、t、x、y、u及びwは、それぞれ独立して、0及び1から選択され、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は、それぞれ独立して、 $C_1 \sim C_6$ アルキレンから選択され、

R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 及び R^9 は、それぞれ独立して、 $C_1 \sim C_6$ アルキレン、及び骨格内にOを含有する $C_1 \sim C_6$ アルキレンから選択され、

R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 及び R^{14} は、それぞれ独立して、H及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択される)。

【請求項2】

X及びYが、それぞれ独立して、 $-C(O)N(R^{11})-$ から選択され、

x及びyが、それぞれ独立して、0及び1から選択され、

R^{11} がH及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択される、請求項1に記載の式IVの抗体薬物コンジュゲート。

【請求項3】

Zが、 CR^{13} 、N及びフェニルから選択され、

R^{13} が、H及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択される、請求項1に記載の式IVの抗体薬物コンジュゲート。

【請求項4】

S及びTが、それぞれ独立して、 $C=O$ 及び O から選択され、

R^5 及び R^6 が、それぞれ独立して、 $C_1 \sim C_6$ アルキレンから選択され、

l及びmが、それぞれ独立して、0及び1から選択され、

s及びtが、それぞれ独立して、0及び1から選択される、請求項1に記載の式IVの抗体薬物コンジュゲート。

【請求項5】

Uが、 $C=O$ 及び O から選択され、

R^9 が、 $C_1 \sim C_6$ アルキレンから選択され、

u及びwが、それぞれ独立して、0及び1から選択される、請求項1に記載の式IVの抗体薬物コンジュゲート。

【請求項6】

Aが、式C-E_e-F_f又はG_g：

(式中、

Cは切断可能リンカーであり、

E及びFは自己犠牲型リンカーであり、

e及びfは、それぞれ独立して、0～5の整数から選択され、

Gは非切断可能リンカーであり、

gは、0～5の整数である)を有する、請求項1に記載の式IVの抗体薬物コンジュゲート。

【請求項7】

前記抗体が、細胞表面受容体又は腫瘍関連抗原を標的とする、請求項1から6のいずれか

10

20

30

40

50

一項に記載の式IVの抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 8】

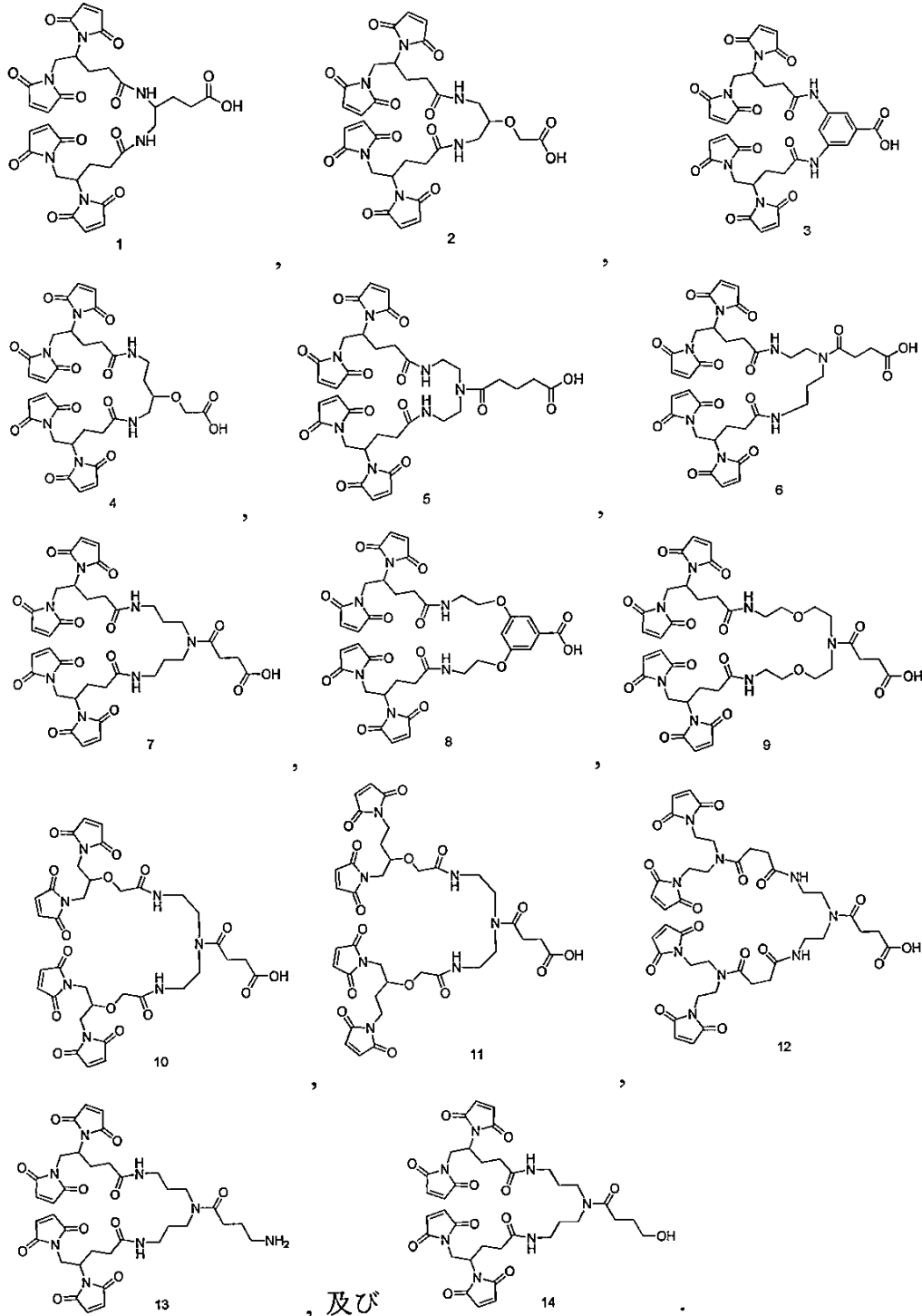
前記抗体がIgG1である、請求項1から6のいずれか一項に記載の式IVの抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 9】

前記薬物が、細胞障害性薬物、抗自己免疫疾患薬物、又は抗炎症薬物である、請求項1から6のいずれか一項に記載の式IVの抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 10】

【化 2】



10

20

30

40

から成る群から選択される化合物。

50

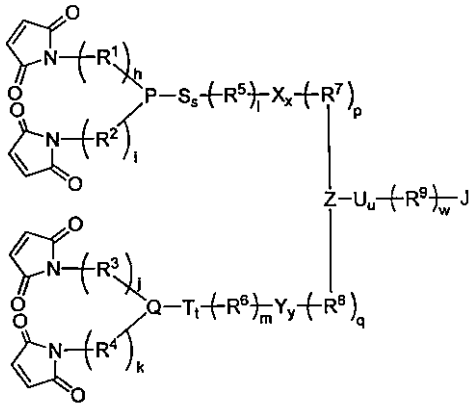
【請求項 1 1】

がん、自己免疫疾患又は炎症疾患の処置のための、請求項1から9のいずれか一項に記載の式IVの抗体薬物コンジュゲート及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 1 2】

抗体薬物コンジュゲートの調製におけるリンカーとしての式Iの化合物又はその薬学的に許容される塩の使用

【化 3】



10

I

20

(式中、

P及びQは、それぞれ独立して、N及びCR¹⁰から選択され、

S及びTは、それぞれ独立して、C=O及びOから選択され、

X及びYは、それぞれ独立して、-C(O)N(R¹¹)-、-N(R¹²)C(O)-及び-O-から選択され、

Zは、CR¹³、N及びC₆~C₁₀アリールから選択され、

Uは、C=O及びOから選択され、

Jは、-COOH、-OH及び-NHR¹⁴から選択され、

h及びjは0であり、

i及びkは1であり、

30

l、m、p、q、s、t、x、y、u及びwは、それぞれ独立して、0及び1から選択され、

R¹、R²、R³、R⁴は、それぞれ独立して、C₁~C₆アルキレンから選択され、

R⁵、R⁶、R⁷、R⁸及びR⁹は、それぞれ独立して、C₁~C₆アルキレン、及び骨格内にOを含有するC₁~C₆アルキレンから選択され、

R¹⁰、R¹¹、R¹²、R¹³及びR¹⁴は、それぞれ独立して、H及びC₁~C₆アルキルから選択される)。

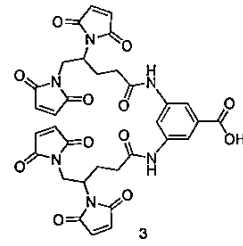
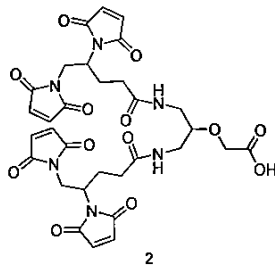
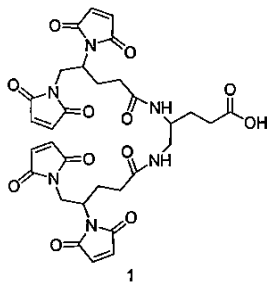
【請求項 1 3】

前記式Iの化合物が、

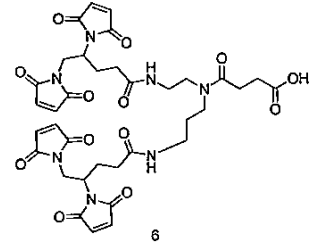
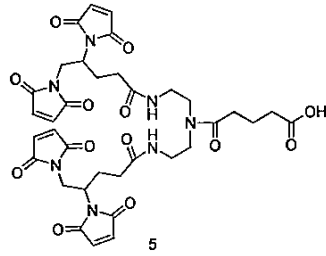
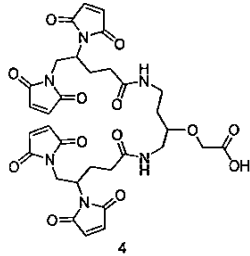
40

50

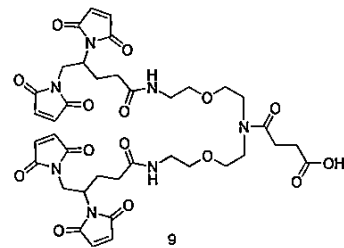
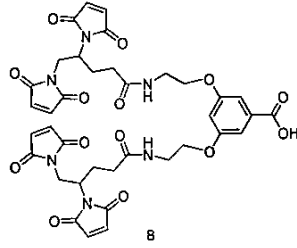
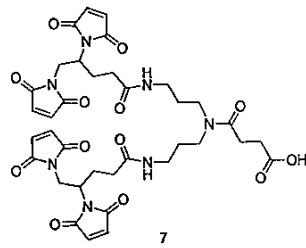
【化4】



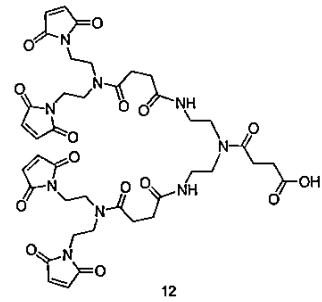
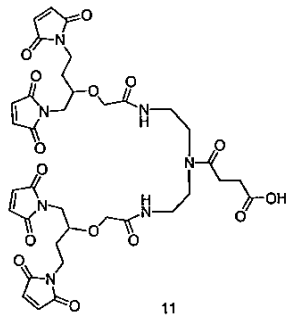
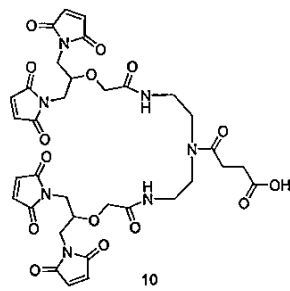
10



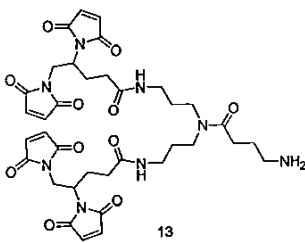
20



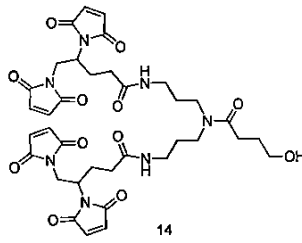
30



40



, 及び



から成る群から選択される、請求項12に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規テトラマレイミドリinker、これらのテトラマレイミドリinkerから調製される抗体薬物コンジュゲート、並びに腫瘍及び他の疾患の処置における抗体薬物コンジュゲートの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

50

抗体薬物コンジュゲート(ADC)とは、がん及び自己免疫疾患の処置のための新規の標的治療剤の一種である。基本的設計理念は、「魔法の弾丸」及び「薬物標的」、すなわち、特定の担体を介して標的領域に薬物を送達するという概念から生じ、これは1931年、Paul Ehrlichにより最初に提案された。しかし、抗体の技術及び高い作用強度の細胞障害性薬物により制限されて、急性骨髄性白血病(AML)処置のための最初のADC薬物、Mylotarg(商標)は、2000年までFDAで承認されなかった。最近、2つのADC薬物がFDAで承認され、これらは、Seattle Genetics社(2011年)により開発された、HL/ALCLの処置のためのAdcetris(商標)、及びGenentech社(2013年)により開発された、乳がんの処置のためのKadcyla(商標)である。これは、がん処置のためのADCの急速な開発段階が到来したことを示唆している。

10

【0003】

ADCは、3つの独立した部分、抗体又は抗体様リガンド、高い作用強度の細胞障害性薬物、及び薬物をリガンドにコンジュゲートしているリンカーで構成される。抗体薬物コンジュゲートの作用機序(MOA)は以下の通りである。抗体又は抗体様リガンドは細胞表面タンパク質受容体(抗原)を特異的に認識し、これに結合する。一度抗原に結合したら、結合複合体は内在化し、よって連結した薬物を細胞に送達する。抗体又は抗体様リガンドは酵素で分解されるか、又はリンカーは開裂し、よって、高い作用強度の細胞障害性薬物を活性形態で放出し、細胞を死滅させることができる。

【0004】

従来のADC構造では、高い作用強度の細胞障害性薬物は、二官能性リンカーを介した鎖間ジスルフィド結合の完全な/部分的還元後、リシン残基又はシステイン残基の-アミノ基に通常連結している。最適化されたDAR(薬物/抗体比)は2~4である。リシン受容体の多数の-アミノ基(約80/mAb)及び非選択的コンジュゲーションモードは、コンジュゲーション部位及びコンジュゲート薬物の数の不確実性をもたらし、よって高い異質性を有するADC生成物を生成する。例えば、平均DAR約3.5を有するKadcyla(商標)は0~8の範囲のDAR分布を有する(Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005、19、1806~1814頁)。同様に、システイン残基がコンジュゲーション部位として選択された場合、抗体内には4つの還元性鎖間ジスルフィド結合しか存在しないが、最適な平均DAR(2~4)を有するADCを得るためにこれらは部分的に還元されるべきである(Bioconjugate Chem. 2005、16、1282~1290頁)。現存する還元剤(DTT、TCEP等)は鎖間ジスルフィド結合を選択的に還元することができないので、こうして得たコンジュゲーション生成物は均質ではなく、0、2、4、6及び8のDARを有するマルチコンジュゲートを含有する。特定のDAR値を有する画分でさえ、それは異なる部位で薬物コンジュゲートを有する、コンジュゲートを含有する混合物である。ADC生成物の異質性は最終的には異なるPK、効力、及び毒性特性をもたらす。例えば、ある場合には、より急速に排除され、より激しい毒性の原因となる、より高いDARを有するコンジュゲートが報告されている(Bioconjugate Chem. 2011、22、1994~2004頁)。

20

30

【0005】

従来のリンカー技術の上述の弱点を克服するために、部位特異的なコンジュゲーション生成物を提供する新規リンカー技術が大いに必要とされる。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【文献】US5208020

WO2012/061590

US2012/0121615

US7498298

US2011/0021568

US2013/0224228

WO2011/130616

50

WO2014114207
 US2015/111864
 WO2006/20779
 WO2014/152127
 WO2013/173337
 WO2011/039721

【非特許文献】

【0007】

【文献】Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005、19、1806～1814頁
 Bioconjugate Chem. 2005、16、1282～1290頁
 Bioconjugate Chem. 2011、22、1994～2004頁
 Science、1975、189、1002～1005頁
 Biochemistry、2008、47、11818～11829頁
 Bioconjugate Chem. 2010、21、5～13頁
 Tetrahedron Asymmetry、1993、4、91～100頁
 European Journal of Medicinal Chemistry、2009、44、678～688頁
 Journal of Organic Chemistry、1995、60、6097～6102頁
 Clin. Cancer Res. 2004、10、7063～7070頁
 Anal. Chem. 2013、85、1699～1704頁

10

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、化学的カップリング法を介してADCを生成するために使用することができる新規のテトラマレイミドリンカー、及び前記リンカーを介して調製されるADC、並びに腫瘍を含む様々な疾患の処置におけるこれらの使用を提供することを意図する。

【0009】

大規模な研究に基づき、発明者は新規テトラマレイミドリンカーを開発した。この種のリンカーはその構造内に4つのマレイミド基を組み込み、これらは鎖間システイン又は抗体内の他のアミノ酸残基に同時に連結することができる。テトラマレイミドリンカー及び抗体から得たコンジュゲートは、約2の平均DAR(すなわち平均して抗体1つ当たり2つの薬物)を有することができ、DAR2(2つの薬物/抗体)画分が主成分(90%+)であった。この種のリンカーは、IgG1等の大部分の抗体とのコンジュゲーションに広く使用することができ、よって、多大な用途が見込まれる。

30

【0010】

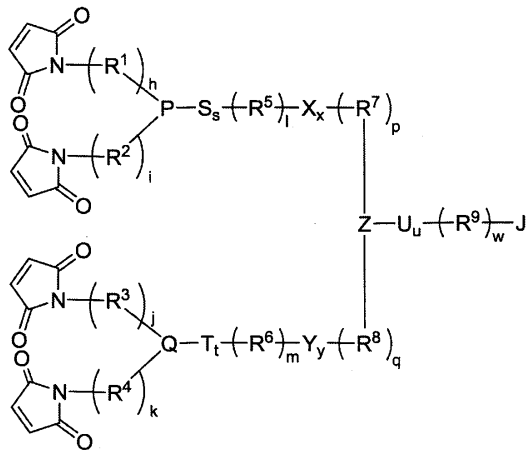
第1の態様では、本発明は、式Iの化合物、

【0011】

40

50

【化1】



I

【0012】

及び薬学的に許容されるその塩を提供する

(式中、

P及びQは、それぞれ独立して、CR¹⁰、N及びアリールから選択され、

S及びTは、それぞれ独立して、C=O及びOから選択され、

X及びYは、それぞれ独立して、-C(O)N(R¹¹)-、-N(R¹²)C(O)-及び-O-から選択され、

Zは、CR¹³、N及びアリールから選択され、

Uは、C=O及びOから選択され、

Jは、-COOH、-OH及び-NHR¹⁴から選択され、

h、i、j、k、l、m、p、q、s、t、x、y、u及びwは、それぞれ独立して、0及び1から選択され、

R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸及びR⁹は、それぞれ独立して、C₁~C₆アルキレン、及び骨格内にOを含有するC₁~C₆アルキレンから選択され、

R¹⁰、R¹¹、R¹²、R¹³及びR¹⁴は、それぞれ独立して、H及びC₁~C₆アルキルから選択される)。

【0013】

好ましい実施形態では、本発明は、式Iの化合物及びその薬学的許容される塩を提供する(式中、

P及びQは、それぞれ独立して、CR¹⁰、N及びアリールから選択され、

R¹⁰は、H及びC₁~C₆アルキルから選択される)。

【0014】

別の好ましい実施形態では、本発明は、式Iの化合物及びその薬学的許容される塩を提供する(式中、

X、及びYは、それぞれ独立して、-C(O)N(R¹¹)-から選択され、

X及びyは、それぞれ独立して、0及び1から選択され、

R¹¹は、H及びC₁~C₆アルキルから選択される)。

【0015】

別の好ましい実施形態では、本発明は、式Iの化合物及びその薬学的許容される塩を提供する(式中、

Zは、CR¹³、N及びC₆~C₁₀アリール、好ましくはフェニルから選択され、

R¹³はH及びC₁~C₆アルキルから選択される)。

【0016】

別の好ましい実施形態では、本発明は、式Iの化合物及びその薬学的許容される塩を提供

する(式中、
R¹、R²、R³及びR⁴は、それぞれ独立して、C₁～C₆アルキレンから選択され、
h、i、j及びkは、それぞれ独立して、0及び1から選択される)。

【0017】

別の好ましい実施形態では、本発明は、式Iの化合物及びその薬学的許容される塩を提供する(式中、

S及びTは、それぞれ独立して、C=O及びOから選択され、
R⁵及びR⁶は、それぞれ独立して、C₁～C₆アルキレンから選択され、
l及びmは、それぞれ独立して、0及び1から選択され
s及びtは、それぞれ独立して、0及び1から選択される)。

10

【0018】

別の好ましい実施形態では、本発明は、式Iの化合物及びその薬学的許容される塩を提供する(式中、

R⁷及びR⁸は、それぞれ独立して、C₁～C₆アルキレン、及び骨格内にOを含有するC₁～C₆アルキレンから選択される)
p及びqは、それぞれ独立して、0及び1から選択される)。

【0019】

別の好ましい実施形態では、本発明は、式Iの化合物及びその薬学的許容される塩を提供する(式中、

Uは、C=O及びOから選択され
R⁹は、C₁～C₆アルキレンから選択され
u及びwは、それぞれ独立して、0及び1から選択される)。

20

【0020】

別の好ましい実施形態では、本発明は、式Iの化合物及びその薬学的許容される塩を提供する(式中、

Jは、-COOH、OH及びNH₂から選択される)。

【0021】

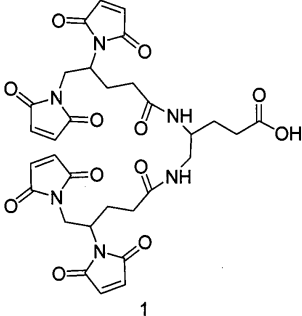
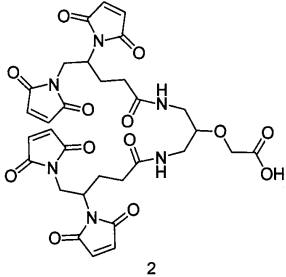
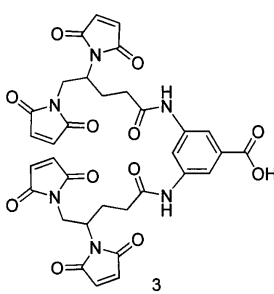
30

40

50

【表 1 A】

本発明の典型的な化合物は、

実施例番号	構造及び名称
1	<div style="text-align: center;">  <p>1</p> </div> <p>4,5-ビス(4,5-ビス(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンタンアミド)ペンタン酸</p>
2	<div style="text-align: center;">  <p>2</p> </div> <p>2-(1,3-ビス(4,5-ビス(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンタンアミド)プロパン-2-イルオキシ)酢酸</p>
3	<div style="text-align: center;">  <p>3</p> </div> <p>3,5-ビス(4,5-ビス(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンタンアミド)安息香酸</p>

10

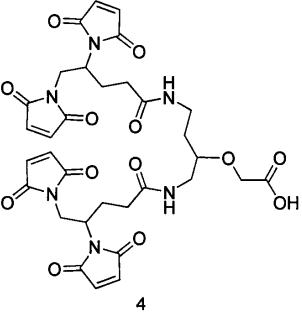
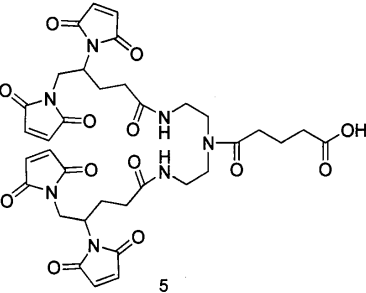
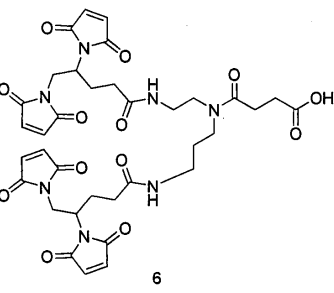
20

30

40

50

【表 1 B】

4	 <p style="text-align: center;">4</p>	10
5	 <p style="text-align: center;">5</p>	20
6	 <p style="text-align: center;">6</p>	30

10

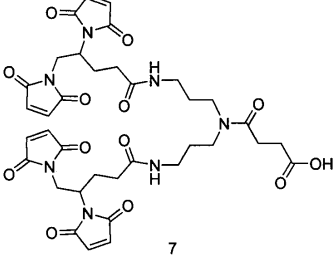
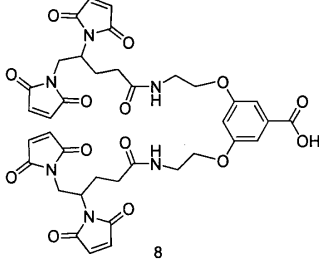
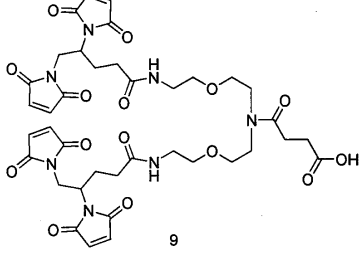
20

30

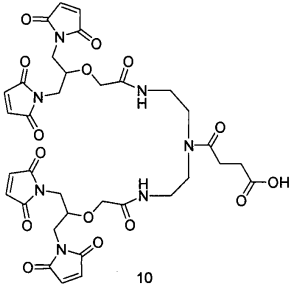
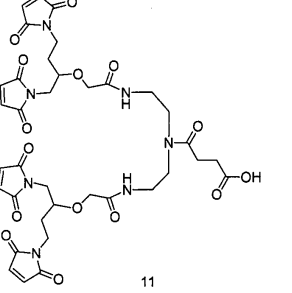
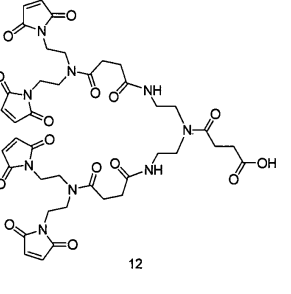
40

50

【表 1 C】

7		10
	4-(ビス(3-(4,5-ビス(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンタンアミド)プロピル)アミノ)-4-オキソブタン酸	
8		20
	3,5-ビス(2-(4,5-ビス(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンタンアミド)エトキシ)安息香酸	
9		30
	4-(ビス(2-(2-(4,5-ビス(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンタンアミド)エトキシ)エチル)アミノ)-4-オキソブタン酸	

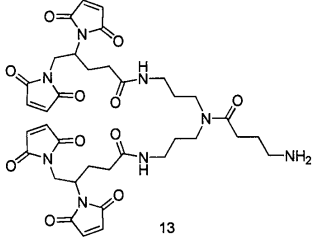
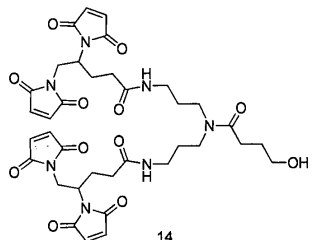
【表 1 D】

10	 <p style="text-align: center;">10</p>	10
	<p>4-(ビス(2-(2-(1,3-ビス(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)プロパン-2-イルオキシ)アセトアミド)エチル)アミノ)-4-オキソブタン酸</p>	
11	 <p style="text-align: center;">11</p>	20
	<p>4-(ビス(2-(2-(1,4-ビス(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ブタン-2-イルオキシ)アセトアミド)エチル)アミノ)-4-オキソブタン酸</p>	
12	 <p style="text-align: center;">12</p>	30
	<p>4-(ビス(2-(4-(ビス(2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル)アミノ)-4-オキソブタンアミド)エチル)アミノ)-4-オキソブタン酸</p>	

40

50

【表 1 E】

13		10
	4-(ビス(3-(4,5-ビス(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンタンアミド)プロピル)アミノ)-4-オキソブチルアミン	
14		20
	4-(ビス(3-(4,5-ビス(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンタンアミド)プロピル)アミノ)-4-オキソブタノール	

又はその薬学的に許容される塩を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 2 2 】

本発明は、式IIの化合物

V-A-D

II

を更に提供する(式中、

Vは本発明による式Iの化合物であり、

Aは場合による他のリンカーであり、

Dは薬物分子であり、

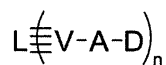
VはVの末端J基と、A又はDの末端基との間の反応によりA又はDに連結している)。

【 0 0 2 3 】

本発明は、式IIIの抗体薬物コンジュゲートを更に提供する

【 0 0 2 4 】

【化 2】



III

【 0 0 2 5 】

(式中、

Lは抗体又は抗体断片であり、

10

20

30

40

50

Vは本発明による式Iの化合物であり、

Aは場合による他のリンカーであり、

Dは薬物分子であり、

nは1～4の整数であり、

VはVの末端J基と、A又はDの末端基との間の反応によりA又はDに連結しており、Lのシステイン又は他のアミノ酸残基と4つのマレイミド基との間の反応によりLに連結している)。

【0026】

好ましい実施形態では、本発明は、本発明による式IIIの抗体薬物コンジュゲートを提供する(式中、Aは、切断可能リンカー及び非切断可能リンカーを含めた、テトラマレイミドリンカーとは別の場合によるリンカーである)。

10

【0027】

別の好ましい実施形態では、本発明は、AがC-E_e-F_f又はG_gの式:(式中、

Cは切断可能リンカーであり、

E及びFは自己犠牲型リンカーであり、

e及びfは、それぞれ独立して、0～5の整数から選択され、

Gは非切断可能リンカーであり、

gは0～5の整数である)を有する、本発明による式IIIの抗体薬物コンジュゲートを提供する。

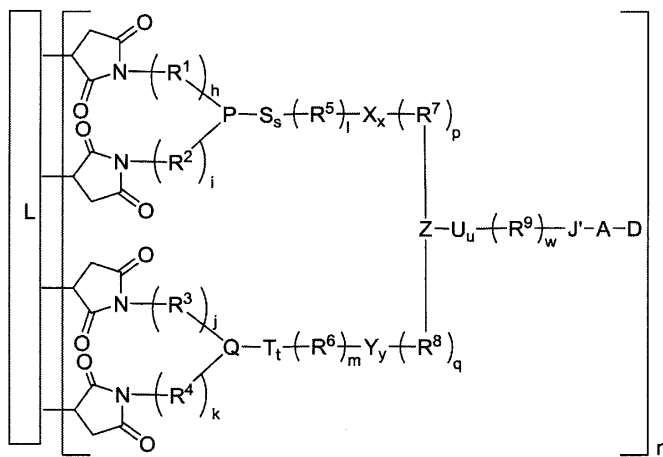
【0028】

別の好ましい実施形態では、本発明は、式IVの抗体薬物コンジュゲート:

20

【0029】

【化3】



IV

30

【0030】

(式中、

Lは抗体又は抗体断片であり、

Aは、切断可能リンカー及び非切断可能リンカーを含めた、テトラマレイミドリンカーとは別の場合によるリンカーであり、

Dは薬物分子であり、

4つのマレイミド基は、同じ抗体又は抗体断片に同時に連結しており、

P及びQは、それぞれ独立して、CR¹⁰、N及びアリアルから選択され、

S及びTは、それぞれ独立して、C=O及びOから選択され、

X及びYは、それぞれ独立して、-C(O)N(R¹¹)-、-N(R¹²)C(O)-及び-O-から選択され、

ZはCR¹³、N及びアリアルから選択され、

50

UはC=O及びOから選択され、

J'はC=O、O及びNR¹⁴から選択され、

h、i、j、k、l、m、p、q、s、t、x、y、u及びwは、それぞれ独立して、0及び1から選択され、

R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸及びR⁹は、それぞれ独立して、C₁~C₆アルキレン、及び骨格内にOを含有するC₁~C₆アルキレンから選択され、

R¹⁰、R¹¹、R¹²、R¹³及びR¹⁴は、それぞれ独立して、H及びC₁~C₆アルキルから選択される)である、本発明による式IIIの抗体薬物コンジュゲートを提供する。

【0031】

別の好ましい実施形態では、本発明は、抗体が細胞表面受容体又は腫瘍に関連する抗原を標的とする、本発明による式IIIの抗体薬物コンジュゲートを提供する。

10

【0032】

別の好ましい実施形態では、本発明は、抗体がIgG1である、本発明による式IIIの抗体薬物コンジュゲートを提供する。

【0033】

別の好ましい実施形態では、本発明は、薬物が細胞障害性薬物、抗自己免疫疾患薬物、又は抗炎症薬物である、本発明による式IIIの抗体薬物コンジュゲートを提供する。

【0034】

本発明は、本発明による式IIIの抗体薬物コンジュゲート及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を更に提供する。

20

【0035】

本発明は、抗体薬物コンジュゲートの調製におけるリンカーとしての本発明による式Iの化合物の使用を更に提供する。

【0036】

本発明は、がん、自己免疫疾患及び炎症疾患の処置のための薬物の調製における、本発明による式IIIの抗体薬物コンジュゲート、又はこれを含む医薬組成物の使用を更に提供する。

【0037】

本発明は、抗体薬物コンジュゲートの調製におけるリンカーとしての使用のための、本発明による式Iの化合物を更に提供する。

30

【0038】

本発明は、がん、自己免疫疾患又は炎症疾患の処置のために調製される薬物としての使用のための本発明による式IIIの抗体薬物コンジュゲートを更に提供する。

【0039】

本発明は、がん、自己免疫疾患又は炎症疾患の処置のための方法であって、治療有効量の本発明による式IIIの抗体薬物コンジュゲート、又はこれ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方法を更に提供する。

【課題を解決するための手段】

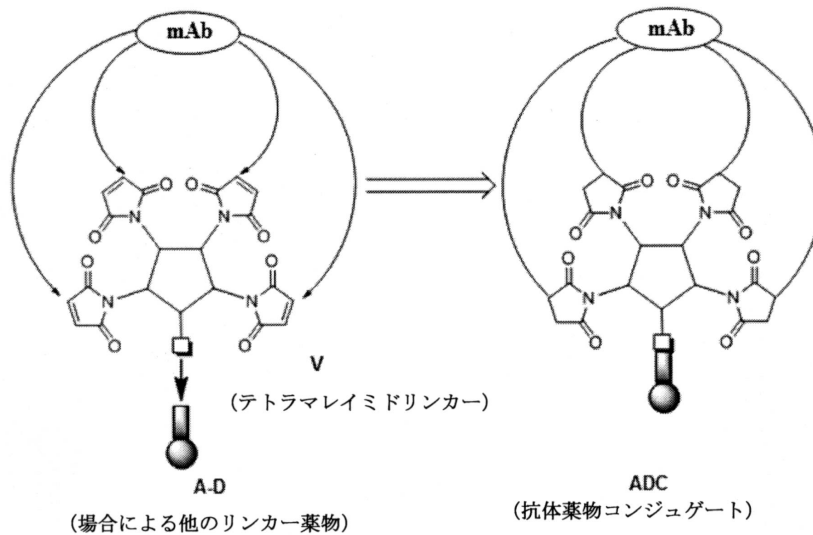
【0040】

本発明によるテトラマレイミドリンカーは、4つのマレイミド基及び5番目のカップリング基を含有する。4つのマレイミド基は、鎖間システイン(還元後)又は他のアミノ酸残基を架橋するために使用され、その一方で5番目のカップリング基は、スキーム1で示されている通り、小分子薬物又は薬物リンカー単位を連結するために使用される。

40

【0041】

【化4】



10

スキーム1

20

【0042】

こうして得たADCは、細胞障害性薬物を、標的細胞、例えば、腫瘍細胞に選択的に送達するために使用することができる。抗体薬物コンジュゲートは、細胞表面タンパク質に特異的に結合し、結合複合体は細胞により急速に内在化される。一度内在化すると、細胞障害性薬物はある特定の活性形態で放出され、効果を発揮する。

【0043】

本明細書で使用される場合、抗体は、キメラ、ヒト化、又はヒト抗体;抗原に結合できる抗体断片;又はFc縮合タンパク質;又はタンパク質を含む。

【0044】

本明細書で使用される場合、薬物は、これらに限定されないが、マイタンシノイド、アウリスタチン、カリケアミシン、ドキシソルピシン、CC-1065及びデュオカルマイシン誘導体、PBDダイマー、及びチューブリシン等を含む高い作用強度の細胞障害性薬物である。ある特定の条件下で、薬物でポリ(エチレングリコール)あることができる。

30

【0045】

薬物それ自体又は薬物リンカー単位は、テトラマレイミドリンカーを介して抗体にコンジュゲートし、鎖間架橋されたコンジュゲートを生成する。従来のもものと比較して、本発明に従い提供される抗体薬物コンジュゲートは、主成分としてDAR2画分を有するずっと狭いDAR分布を有し、よって、構造的及び薬理的均質性を大きく改善する。

【0046】

抗体

本明細書で使用される場合、「抗体」又は「抗体単位」という用語は、受容体、抗原、又は所与の標的細胞集団に関連する他の受容体単位に結合する、又は反応によりこれらと会合する、又は複合体形成する抗体の任意の断片をその範囲内に含む。抗体は、治療的、さもなければ生物学的に修飾されることになる細胞集団の部分に結合する、これらと複合体形成する、又は反応する任意のタンパク質又はタンパク質様分子であることができる。

40

【0047】

本発明のADCを作っている抗体は、これらの天然の、野生型同等物の抗原結合能力を好ましくは保持する。よって、本発明の抗体は、好ましくは特異的に抗原に結合することが可能である。このような抗原として、例えば、腫瘍関連抗原(TAA)、細胞表面受容体タンパク質及び他の細胞表面分子、細胞生存調節因子、細胞増殖調節因子、組織の発達又は分

50

化に関連する分子(例えば、機能に貢献することが知られているもの、又は貢献すると推測されるもの)、リンフォカイン、サイトカイン、細胞周期規制に關与する分子、脈管形成に關与する分子及び血管新生に關与する分子(例えば、機能に貢献することが知られているもの、又は貢献すると推測されるもの)が挙げられる。腫瘍関連抗原は、クラスター分化因子であってよい(すなわち、CDタンパク質)。本発明の抗体に結合する抗原は、上記カテゴリーの1つ又はサブセットであり、前記カテゴリーの他のサブセットは、異なる特徴を有する(目的の抗原に関して)他の分子/抗原を含む。

【0048】

ADCに使用されている抗体は、これらに限定されないが、細胞表面受容体及び腫瘍関連抗原(TAA)に対する抗体を含む。このような腫瘍関連抗原は当技術分野で周知であり、抗体の調製のための当技術分野で周知である方法又は情報に従い調製することができる。がんに対する診断及び処置に使用することができる有効な細胞標的を開発するために、研究者らは、他の1つ若しくは複数の正常な非がん細胞と比較して、1つ若しくは複数の特定の種類のがん細胞の表面上に特異的に発現される膜貫通、さもなければ腫瘍関連ポリペプチドを発見しようとしている。多くの場合、このような腫瘍関連ポリペプチドは、非がん細胞と比較して、がん細胞の表面により大量に発現する。このような腫瘍関連因子の識別は、抗体ベースのがん療法を大きく促進させることができる。

【0049】

TAAの例として、これらに限定されないが、以下に列挙した(1)~(36)の腫瘍関連抗原が挙げられる。便宜のため、これらの抗原に関する情報は、すべてが当技術分野で公知であるが、以下に列挙し、名称、代替の名称、Genbankアクセッション番号を含む。TAA(1)~(36)に対応する核酸及びタンパク質配列は、GenBank等の公共データベースで入手可能である。抗体の標的となる腫瘍関連抗原は、引用された参考文献に特定された配列に対して少なくとも約70%、80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を保有するすべてのアミノ酸配列変化形及びアイソフォームを含み、又は引用された参考文献に見出される配列を有するTAAと実質的に同じ生物学的特性又は特徴を示す。

【0050】

腫瘍関連抗原(1)~(36):

(1)BMPR1B(骨形成タンパク質受容体-IB型、Genbankアクセッション番号NM_001203);

(2)E16(LAT1、SLC7A5、Genbankアクセッション番号NM_003486);

(3)STEAP1(前立腺の6回膜貫通型上皮抗原、Genbankアクセッション番号NM_012449);

(4)0772P(CA125、MUC16、Genbankアクセッション番号AF361486);

(5)MPF(MPF、MSLN、SMR、巨核球増強因子、メソテリン、Genbankアクセッション番号NM_005823);

(6)Napi3b(NAPI-3B、NPTIIb、SLC34A2、溶質キャリアファミリー34(リン酸ナトリウム)メンバー2、II型ナトリウム依存性リン酸塩トランスポーター3b、Genbankアクセッション番号NM_006424);

(7)Sema 5b(FLJ10372、KIAA1445、Mm.42015、SEMA5B、SEMAG、Semaphorin 5b Hlog、セマドメイン、トロンボスポンジン7往復(1型及び1型様)、膜貫通ドメイン(TM)及び短い細胞質ドメイン、(セマフォリン)5B、Genbankアクセッション番号AB040878);

(8)PSCA hlg(2700050C12Rik、C530008016Rik、RIKEN cDNA2700050C12、RIKEN cDNA 2700050C12遺伝子、Genbankアクセッション番号AY358628);

(9)ETBR(エンドセリンB型受容体、Genbankアクセッション番号AY275463);

(10)MSG783(RNF124、仮想タンパク質FLJ20315、Genbankアクセッション番号NM_017763);

(11)STEAP2(HGNC_8639、IPCA-1、PCANAP1、STAMP1、STEAP2、STMP、前立腺がん関連性遺伝子1、前立腺がん関連性タンパク質1、前立腺2の6回膜貫通型上皮抗原、6回膜貫通前立腺タンパク質、Genbankアクセッション番号AF455138);

10

20

30

40

50

- (12) TrpM4(BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B、一過性受容体電位カチオンチャネル、サブファミリーM、メンバー4、Genbankアクセッション番号NM_017636);
- (13) CRIPTO(CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、奇形癌誘導性成長因子、Genbankアクセッション番号NP_003203又はNM_003212);
- (14) CD21(CR2(補体受容体2)又はC3DR(C3d/Epstein Barrウイルス受容体)又はHs。73792、Genbankアクセッション番号M26004);
- (15) CD79b(CD79B、CD79、IgG(イムノグロブリン関連性)、B29、Genbankアクセッション番号NM_000626);
- (16) FcRH2(IFGP4、IRTA4、SPAP1A(SH2ドメイン含有ホスファターゼアンカータンパク質1a)、SPAP1B、SPAP1C、Genbankアクセッション番号NM_030764); 10
- (17) HER2(ErbB2、Genbankアクセッション番号M11730);
- (18) NCA(CEACAM6、Genbankアクセッション番号M18728);
- (19) MDP(DPEP1、Genbankアクセッション番号BC017023);
- (20) IL20R(IL20Ra、ZCYTOR7、Genbankアクセッション番号AF184971);
- (21) Brevican(BCAN、BEHAB、Genbankアクセッション番号AF229053);
- (22) EphB2R(DRT、ERK、Hek5、EPHT3、Tyro5、Genbankアクセッション番号NM_004442);
- (23) ASLG659(B7h、Genbankアクセッション番号AX092328);
- (24) PSCA(前立腺幹細胞抗原前駆体、Genbankアクセッション番号AJ297436);
- (25) GEDA(Genbankアクセッション番号AY260763); 20
- (26) BAFF-R(B細胞活性化因子受容体、BLys受容体3、BR3、Genbankアクセッション番号AF116456);
- (27) CD22(B細胞受容体CD22-形態、Genbankアクセッション番号AK026467);
- (28) CD79a(CD79A、CD79、イムノグロブリン関連性アルファ、Ig(CD79B)と共有結合により相互作用し、IgM分子と共に表面上に複合体を形成するB細胞特異的タンパク質は、B細胞分化に関与しているシグナルを変換する、Genbankアクセッション番号NP-001774.1);
- (29) CXCR5(パーキットリンパ腫受容体1、CXCL13ケモカインにより活性化され、リンパ球遊走及び体液性防御においてある役割を果たし、HIV-2感染症並びにおそらくAIDS、リンパ腫、骨髄腫、及び白血病の発症にある役割を果たすGタンパク質共役受容体、Genbankアクセッション番号NP_001707.1); 30
- (30) HLA-DOB(ペプチドに結合し、CD4+Tリンパ球にそれらを提示するMHCクラスII分子(Ia抗原)のベータサブユニット、Genbankアクセッション番号NP_002111.1);
- (31) P2X5(プリン作動性受容体P2Xリガンド開口型イオンチャネル5、細胞外ATPでゲーティングされるイオンチャネルは、シナプス伝達及びニューロン新生に関与することができ、その欠陥は特発性不安定膀胱の病態生理の一因となり得る、Genbankアクセッション番号NP_002552.2);
- (32) CD72(B細胞分化抗原CD72、Lyb-2、Genbankアクセッション番号NP_001773.1);
- (33) LY64(リンパ球抗原64(RP105)、ロイシンリピート(LRR)が豊富なI型膜タンパク質ファミリーは、B細胞活性化及びアポトーシスを調節し、機能喪失は、全身性エリテマトーデスを有する患者における疾患活性の増加に関連する、Genbankアクセッション番号NP_005573.1); 40
- (34) FcRH1(Fc受容体様タンパク質1、Ig様C2型及びITAMドメインを含有するイムノグロブリンFcドメインに対する推定受容体は、Bリンパ球分化にある役割を果たし得る、Genbankアクセッション番号NP_443170.1);
- (35) IRTA2(転座に関連したイムノグロブリンスーパーファミリー受容体2、B細胞発生及びリンパ腫発症において役割を有し得る推定上免疫受容体;転座により引き起こされる遺伝子障害は、ある特定のB細胞悪性腫瘍を生じる、Genbankアクセッション番号NP_112571.1);
- (36) TENB2(EGF/成長因子及びフォリスタチンのヘレグリンファミリーに関係する、推定 50

上の膜貫通型プロテオグリカン、Genbankアクセッション番号AF179274)。

【0051】

薬物

本明細書で使用される場合、「薬物」又は「D」という用語は、所望の生物学的活性を保有し、薬物を本発明のコンジュゲートに組み込むために使用することができる反応性官能基を有する任意の化合物を指す。所望の生物学的活性は、ヒト又は他の動物における疾患の診断、治癒、軽減、処置、又は予防を含む。よって、薬物が必要な反応性官能基を有する限り、「薬物」という用語は、正式な米国薬局方(United States Pharmacopeia)、正式な米国ホメオパシー薬局方(Homeopathic Pharmacopeia of the United States)、正式な米国医薬品集(National Formulary)、又はこれらの任意の補足資料により認定された薬物を指す。例示的薬物は、医師用便覧(Physician's Desk Reference(PDR))及び米国食品医薬品局(FDA)が管理するOrange Bookに記載されている。新規薬物は、絶えず発見され、開発されており、本発明は、これらの新規薬物もまた本発明のプロドラッグに組み込むことができることを規定する。

10

【0052】

好ましくは、薬物はがん療法に有用な細胞障害性薬物;所望の生物学的活性、例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌外毒素、及びジフテリア毒素等の毒素を保有するタンパク質又はポリペプチド;腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来の成長因子、組織プラスミノゲン活性因子、及び生物学的応答調節物質、例えば、リンフォカイン、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-6(IL-6)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、又は他の成長因子を含む他の適切なタンパク質である。

20

【0053】

一態様では、薬物はマイタンシン又はマイタンシノイドである。マイタンシンは、ミクロチューブリンタンパク質の微小管の形成を阻害することにより細胞増殖を阻害する(Science、1975、189、1002~1005頁;US5208020)。マイタンシノイドはマイタンシンの誘導体である。マイタンシンもマイタンシノイドも極めて細胞傷害性であるが、がん療法におけるこれらの臨床使用は、腫瘍に対する選択性が弱いために大きく制限されてきた。しかし、その高い細胞傷害性作用強度により、これらはADCにおいて興味深い薬物部分となり得る。以下に示す構造は、マイタンシン、マイタンシノイド、及びADCに一般的に使用される3種の代表的マイタンシノイドである:

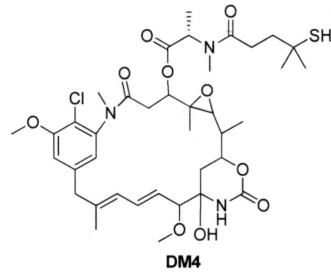
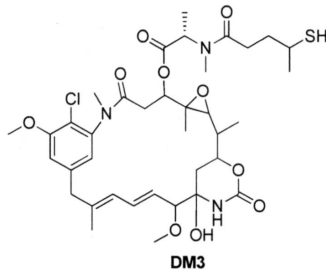
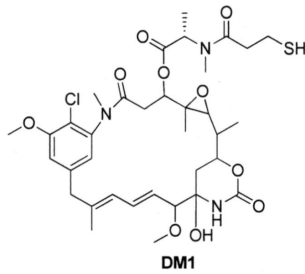
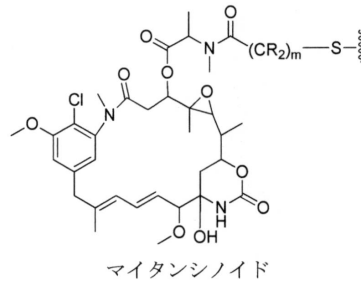
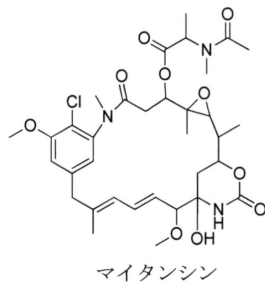
30

【0054】

40

50

【化5】

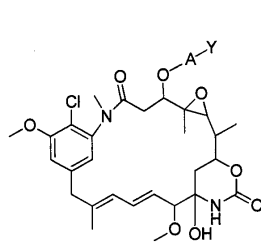


【0055】

マイタンシノイドを調製するための主要原料は、マイタンシノールであり、これはアンサマイトシン加水分解から主に得られる。アンサマイトシンは、発酵により利用しやすく生成することができる。アンサマイトシン誘導体(WO2012/061590)及びアラニルメイトシノール(US2012/0121615)もまたADCの「弾頭」として良好な候補であることが報告されている。

【0056】

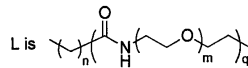
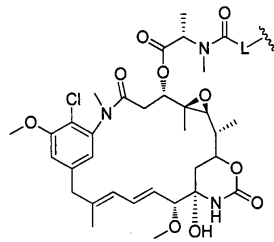
【化6】



AはC=O、(C=O)NR¹、及び(C=O)Oである。

Yは置換基である

アンサマイトシン誘導体



アラニルメイトシノール

【0057】

別の態様では、薬物はアウリスタチンである。アウリスタチンはドラスタチン10の合成類似体であり、これは海洋性軟体動物ツツナミガイ(Dolabella auricularia)から単離した生物活性のあるポリペプチドであった(US7498298)。ドラスタチン10は、抗がん性薬物ピンクリスチンとチューブリン上の同じドメインに結合することによりチューブリン重合を阻害する薬剤である。ドラスタチン10、アウリスタチンPE、及びアウリスタチンEはすべて、4つのアミノ酸(このうちの3つは、ドラスタチンに特有のものである)及びC末端アミドを有する直鎖ペプチドである。2つの代表的なアウリスタチン、モノメチルアウリスタチンE(MMAE)及びモノメチルアウリスタチンF(MMAF)は、ADCに対する好ましい薬物部分候補である。

10

20

30

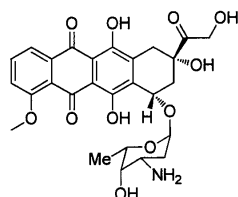
40

50

DNA二重ヘリックス構造が埋め込まれ、化学療法剤として使用されている挿入剤である。ドキシソルピシンの効力は相対的に低いため(ヒト癌系統に対して IC_{50} は $0.1 \sim 0.2 \mu M$ である一方で、現在ではサブナノモル活性がADC荷重に対して通常見られる)、ADC薬物部分としてのドキシソルピシンの適用は一般的ではない。

【0064】

【化10】



ドキシソルピシン

10

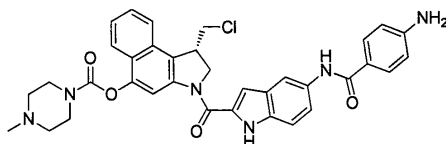
【0065】

別の態様では、薬物はデュオカルマイシン、CC-1065及び他のシクロプロパピロロインド-4-オン(CPI)誘導体であり、これらは強力な小溝結合DNAアルキル化剤である。シクロプロパベンズインドール-4-オン類似体(CBI)は、自然のCPIアルキル化サブユニットを含むこれらの親化合物よりも、化学的に安定しており、生物学的に強力であり、合成的により入手しやすい。1つの代表的なCBI誘導体はフェノール系ヒドロキシル基で保護されたCBI(以下の式を参照されたい)であり、これはプロドラッグ毒性の低減及び水溶性の改善を有する。

20

【0066】

【化11】



30

【0067】

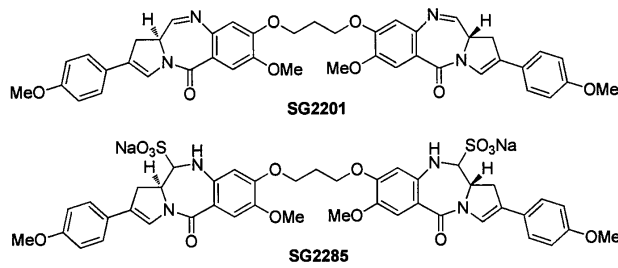
別の態様では、薬物はピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン(PBD)又はPBDダイマーである。ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン(PBD)は、特異的にプリン-グアニン-プリン配列において、DNAの副溝に非歪曲性共有結合の付加体を形成するという独特な特徴を有するストレプトマイセス種により生成される天然産物である。DNA配列を標的とするための小分子戦略の一部として、また新規の抗がん剤及び抗菌剤として、PBDを使用することについて関心が増大している(Biochemistry、2008、47、11818~11829頁)。これらの分子の生物学的活性は、柔軟性のあるアルキレンリンカーを介して、これらのC8/C8-ヒドロキシル基を介して2つのPBD単位を一緒に連結することにより増強させることができる(WO2011/130616)。PBDダイマーは、配列選択的DNA病変、例えば、回帰性5'-Pu-GATC-Py-3'鎖間架橋結合等を形成すると考えられ、これがこれらの生物学的活性の主な原因である。これらの化合物は、極めて有用な細胞毒性剤及びADC弾頭として良好な候補として示されている。

40

【0068】

50

【化12】



10

【0069】

別の態様では、薬物は、上述されたカテゴリーに限定されず、ADCに使用することができるすべての薬物も含む。

【0070】

リンカー

本明細書で使用される場合、「リンカー」又は「ADCリンカー」という用語は、タンパク質/抗体及び薬物とそれぞれ反応することができ、よってタンパク質/抗体を薬物に「架橋」として連結する二官能性又は多官能性分子を指す。細胞における薬物放出機序に従い、「リンカー」又は「ADCリンカー」は、2つのカテゴリー:非切断可能リンカー及び切断可能リンカーに分類することができる。

20

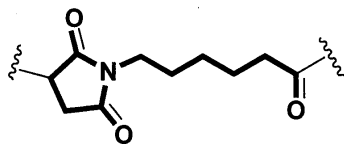
【0071】

非切断可能リンカーは、1種の比較的安定したリンカーであり、*in vivo*条件下で開裂するのが困難である。非切断可能リンカーを有するADCに対して、放出機序は、ADCの内在化、これに続くリソソーム内でのmAb構成成分の分解を介して生じ、リンカーを介して、抗体アミノ酸残基に依然として結合している小分子薬物の放出をもたらすと考えられている。薬物の化学修飾により、その細胞傷害性潜在能力が減退することはなかった。しかし、この形態の薬物は充填されており(アミノ酸残基)、恐らく隣接する細胞へと分散させることは困難である。したがって、標的抗原(抗原陰性細胞)を発現しない隣接する腫瘍細胞を死滅させる(バイスタンダー効果)ことはできない(Bioconjugate Chem. 2010、21、5~13頁)。一部の共通のリンカー、例えば、MCリンカー、MCCリンカー等が以下に示されている:

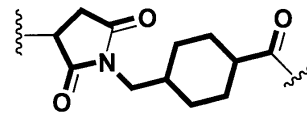
30

【0072】

【化13】



MCリンカー



MCCリンカー

40

【0073】

切断可能リンカーは、その名称が意味するように、標的細胞内で開裂して、活性薬物(小分子薬物それ自体)を放出することができる。切断可能リンカーは、2つの主要な群に分類することができる:化学的に不安定なリンカー及び酵素不安定なリンカー。

【0074】

化学的に不安定なリンカーは、血漿及び細胞形質の特性に従い選択的に開裂することができる。このような特性は、pH値、グルタチオン濃度等を含む。

【0075】

50

酸-切断可能リンカーと一般的に呼ばれているpH感受性リンカーについては、リンカーは血液の中性の環境(pH7.3~7.5)で比較的安定しているが、弱酸性エンドソーム(pH5.0~6.5)及びリソソーム(pH4.5~5.0)において加水分解が生じることになる。大部分のリンカー、例えば、ヒドロゾン、カーボネート、アセタール、ケタール等が第一世代のADCに使用された。しかし、酸で切断可能なリンカーの血漿安定性が限定されていることから、この種類のリンカーに基づくADCは比較的短い半減期(2~3日)を有する。半減期の短さは、新規世代のADCにおける、pH感受性リンカーの適用をある程度妨げている。

【0076】

ジスルフィドリンカーと一般的に呼ばれている、グルタチオン感受性リンカーについては、その放出は、細胞形質(ミリモル領域)における高い細胞内濃度と、血液中のグルタチオン(マイクロモル領域)の比較的低い濃度との対比に起因する。これは特に腫瘍細胞に当てはまり、腫瘍細胞では、低酸素状態は還元性酵素の活性の促進、よって更に高いグルタチオン濃度を結果として生じる。ジスルフィド結合は熱力学的に安定しており、よって血漿中の良好な安定性を提供する。

10

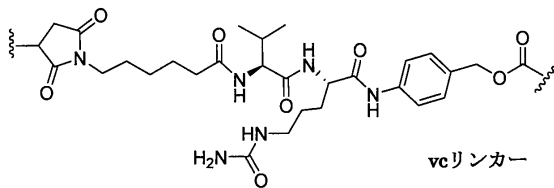
【0077】

酵素不安定なリンカー、例えば、ペプチドリンカー等は、薬物放出のより良い制御を達成するための代替の手法である。ペプチド連結は、リソソームプロテアーゼ、例えば、カテプシンB又はプラスミン等(ある特定の腫瘍組織におけるレベルの上昇)により効果的に開裂されることになる。細胞外の好ましくないpH及び血清プロテアーゼ阻害剤により、プロテアーゼは細胞外では普通活性がないので、このようなペプチド性連結は血漿循環において安定しているとみなされる。高い血漿安定性並びに良好な細胞内切断選択性及び効率を考慮して、酵素不安定なリンカーはADCにおける切断可能リンカー候補として幅広く選択される。典型的な酵素不安定リンカーとしてVal-Cit(vc)等が挙げられる。

20

【0078】

【化14】



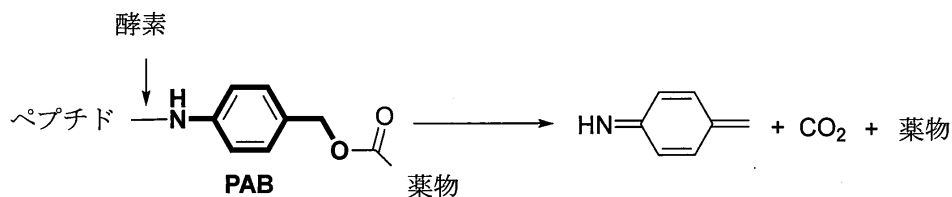
30

【0079】

自己犠牲型リンカーは、一般的に切断可能リンカーと細胞障害性薬物との間に位置するか、又は切断可能リンカーそれ自体の一部である。自己犠牲型リンカーの作動機序とは、自己犠牲型リンカーは、切断可能リンカーがプロテアーゼにより切り取られる際に、連結した活性薬物を放出するために自己構造的転位が起こり得るということである。典型的な自己犠牲型リンカーとして、p-アミノベンジルアルコール(PAB)等が挙げられる。

【0080】

【化15】



40

【0081】

50

抗体薬物コンジュゲート

本発明による抗体薬物コンジュゲートは、抗体、テトラマレイミドリンカー、場合による他のリンカー、及び薬物で構成される。場合による他のリンカーは、切断可能リンカー又は切断不可能リンカーと呼ばれる。

【0082】

抗体は球状タンパク質で構成され、これらは薬物リンカー単位をコンジュゲートするために使用することができる一連のアミノ酸連結部位を有する。これらの三次及び四次構造により、溶媒に接触可能なアミノ酸残基のみがコンジュゲートできる。実際に、高い生成率のコンジュゲーションは普通、リシン残基の ϵ -アミノ基又はシステイン残基のスルフヒドリル基上に生じる。

【0083】

抗体表面上のリシン側鎖の存在量は、コンジュゲーションのために複数の連結部位を提供し、これは、異なる荷重数(DAR)及びコンジュゲーション部位を有するADCの混合物をもたらす。

【0084】

慣習的に作製されたものと比較して、本発明に従い調製したADCは、最適化されたADCのDAR領域2~4の中に入る約2の平均DARを有するばかりでなく、DAR2画分が主成分(90%を超える)であるずっと狭いDAR分布も有する。加えて、コンジュゲーション生成物は、細胞死滅効果のない裸の抗体(DAR=0)を含有しない。また、コンジュゲーション生成物は、低いDAR数を有するものより急速に排除される、高度にコンジュゲートした抗体(例えばDAR 6)を含有しない。その結果、本発明に従い提供されるADC生成物は、大いに改善された均一性を示す。

【0085】

定義

特に述べられていない限り、明細書及び特許請求の範囲に使用されている用語は以下に記載されている意味を有する。

【0086】

「アルキル」とは、1~20個の炭素原子を含む飽和した直鎖又は分枝の脂肪族炭化水素基を指す。好ましくは、アルキル基は、1~12個の炭素原子を有するアルキル、より好ましくは1~10個の炭素原子、最も好ましくは1~6個の炭素原子を有するアルキルである。代表的な例として、これらに限定されないが、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル、*sec*-ブチル、*n*-ペンチル、1,1-ジメチルプロピル、1,2-ジメチルプロピル、2,2-ジメチルプロピル、1-エチルプロピル、2-メチルブチル、3-メチルブチル、*n*-ヘキシル、1-エチル-2-メチルプロピル、1,1,2-トリメチルプロピル、1,1-ジメチルブチル、1,2-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、1,3-ジメチルブチル、2-エチルブチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、2,3-ジメチルブチル、*n*-ヘプチル、2-メチルヘキシル、3-メチルヘキシル、4-メチルヘキシル、5-メチルヘキシル、2,3-ジメチルペンチル、2,4-ジメチルペンチル、2,2-ジメチルペンチル、3,3-ジメチルペンチル、2-エチルペンチル、3-エチルペンチル、*n*-オクチル、2,3-ジメチルヘキシル、2,4-ジメチルヘキシル、2,5-ジメチルヘキシル、2,2-ジメチルヘキシル、3,3-ジメチルヘキシル、4,4-ジメチルヘキシル、2-エチルヘキシル、3-エチルヘキシル、4-エチルヘキシル、2-メチル-2-エチルペンチル、2-メチル-3-エチルペンチル、*n*-ノニル、2-メチル-2-エチルヘキシル、2-メチル-3-エチルヘキシル、2,2-ジエチルペンチル、*n*-デシル、3,3-ジエチルヘキシル、2,2-ジエチルヘキシル、及びその分枝鎖の異性体が挙げられる。より好ましくは、アルキル基は、1~6個の炭素原子を有する低級アルキルである。代表的な例として、これらに限定されないが、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル、*sec*-ブチル、*n*-ペンチル、1,1-ジメチルプロピル、1,2-ジメチルプロピル、2,2-ジメチルプロピル、1-エチルプロピル、2-メチルブチル、3-メチルブチル、*n*-ヘキシル、1-エチル-2-メチルプロピル、1,1,2-トリメチルプロピル、1,1-ジメチルブチル、1,2-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、1,3-ジメチル

10

20

30

40

50

ブチル、2-エチルブチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、2,3-ジメチルブチル等が挙げられる。アルキル基は置換されているか、又は非置換であることができる。置換されている場合、置換基は任意の利用可能な接続ポイントで置換されることが可能で、好ましくは、置換基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキルオキシル、アルキルスルホ、アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、ヒドロキシ、ニトロ、シアノ、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルコキシ、ヘテロ環式アルコキシ、シクロアルキルチオ、ヘテロ環式アルキルチオ、オキソ基からなる群から独立して選択される1つ又は複数の基である。

【0087】

「アルキレン」とは、水素原子の1個が更に除去されて、二価の基を形成する、上で定義されたようなアルキル基を意味する。代表的な例として、これらに限定されないが、メチレン(-CH₂-)、エチレン(-(CH₂)₂-)、プロピレン((CH₂)₃-)、ブチレン(-(CH₂)₄-)等が挙げられる。

10

【0088】

「アルケニル」とは、少なくとも2個の炭素原子及び少なくとも1つの炭素-炭素二重結合からなる、上で定義されたようなアルキル基、例えば、ビニル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-、2-又は3-ブテニル等を指す。アルケニル基は置換されているか、又は非置換であってよく、置換されている場合、置換基は、任意の利用可能な接続ポイントで、好ましくは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルキルチオ、アルキルアミノ、ハロゲン、メルカプト、ヒドロキシ、ニトロ、シアノ、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルコキシ、ヘテロシクロアルコキシ、シクロアルキルチオ、ヘテロ環アルキルチオからなる群から独立して選択される1つ又は複数の基で置換されることが可能である。

20

【0089】

「アルキニル」とは、少なくとも2個の炭素原子及び少なくとも1つの炭素-炭素三重結合からなる、上で定義されたようなアルキル基、例えば、エチニル、プロピニル、ブチニル等を指す。アルキニル基は、置換されているか、又は非置換であってよく、置換されている場合、置換基は、任意の利用可能な接続ポイントで、好ましくは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルキルチオ、アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、ヒドロキシ、ニトロ、シアノ、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルコキシ、ヘテロシクロアルコキシ、シクロアルキルチオ、ヘテロ環アルキルチオからなる群から独立して選択される1つ又は複数の基で置換されることが可能である。

30

【0090】

「アルケニレン」とは、親アルケンの同じ又は2個の異なる炭素原子上の2個の水素原子の除去により、2つの一価基中心を含有する不飽和の直鎖、分枝又は炭素環炭化水素基である。代表的な例として、これらに限定されないが、ビニレン(-CH=CH-)、1,3-プロペニレン(-CH₂CH=CH-)等が挙げられる。

【0091】

「アルキニレン」とは、親アルキンの同じ又は2個の異なる炭素原子上の2個の水素原子の除去により、2つの一価基中心を含有する不飽和の直鎖、分枝又は炭素環炭化水素基である。代表的な例として、これらに限定されないが、エチニレン(-CH≡CH-)、1,3-プロピニル(-CH₂C≡CH-)等が挙げられる。

40

【0092】

「アリーレン」とは、親芳香族環系の2個の異なる炭素原子からの2個の水素原子の除去により、2つの一価基中心を含む、6~12個の炭素原子の芳香族炭化水素基を指す。代表的な例として、これらに限定されないが、1,2-フェニレン、1,3-フェニレン、1,4-フェニレン等が挙げられる。

【0093】

「シクロアルキル」とは、3~20個の炭素原子、好ましくは3~12個の炭素原子、より

50

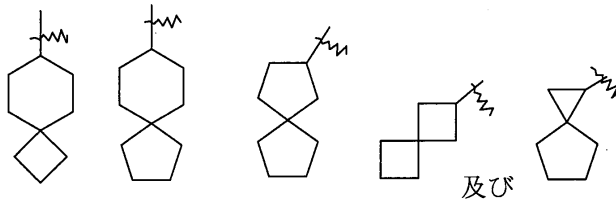
好ましくは3~10個の炭素原子、最も好ましくは3~8個の炭素原子を有する飽和した及び/又は部分的に不飽和の単環式又は多環式の炭化水素基を指す。単環式シクロアルキルの無制限の例として、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘキサジエニル、シクロヘプチル、シクロヘプタトリエニル、シクロオクチル等が挙げられる。多環式シクロアルキルとして、スピロ環、縮合環又は架橋環を有するシクロアルキルが挙げられる。

【0094】

「スピロシクロアルキル」とは、1個の共通の炭素原子(スピロ原子と呼ばれる)を介して連結された環を有する5~20員の多環式基であって、1つ又は複数の環が1つ又は複数の二重結合を含有してもよいが、環のいずれもが完全に共轭したpi-電子系を有さない、好ましくは6~14員のスピロシクロアルキル、より好ましくは7~10員のスピロシクロアルキルを指す。共通のスピロ原子の数に従い、スピロシクロアルキルは、モノスピロシクロアルキル、ジスピロシクロアルキル、又はポリスピロシクロアルキル、好ましくはモノスピロシクロアルキル又はジスピロシクロアルキル、より好ましくは4員/4員の、4員/5員の、4員/6員の、5員/5員の、又は5員/6員のモノスピロシクロアルキルへと分割されてもよい。スピロシクロアルキルの無制限の例として、これらに限定されないが:

【0095】

【化16】



【0096】

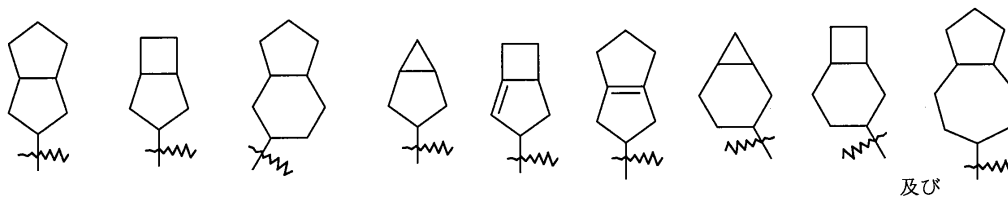
が挙げられる。

【0097】

「縮合シクロアルキル」とは、5~20員の全炭素多環式基であって、系内の各環が隣接する炭素原子対を別の環と共有し、1つ又は複数の環が1つ又は複数の二重結合を含有してもよいが、環のいずれもが完全に共轭したpi-電子系を有さない、好ましくは6~14員の縮合シクロアルキル、より好ましくは7~10員の縮合シクロアルキルを指す。員環の数に従い、縮合シクロアルキルは、二環式、三環式、四環式又は多環式の縮合シクロアルキル、好ましくは二環式又は三環式縮合シクロアルキル、より好ましくは5員/5員の、又は5員/6員の二環式縮合シクロアルキルへと分割されてもよい。縮合シクロアルキルの無制限の例として、これらに限定されないが:

【0098】

【化17】



【0099】

が挙げられる。

【0100】

10

20

30

40

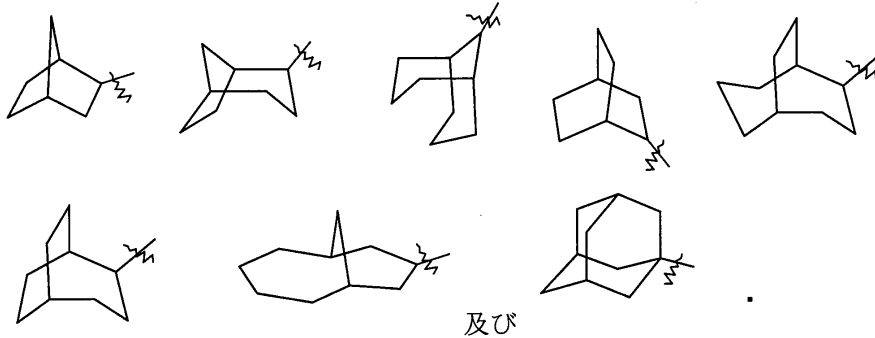
50

「架橋シクロアルキル」とは、5～20員の全炭素多環式基であって、系内の各2つの環が2個の切り離れた原子を共有し、環が1つ又は複数の二重結合を有してもよいが、環のいずれもが完全に共轭したpi-電子系を有さない、好ましくは6～14員の架橋シクロアルキル、より好ましくは7～10員の架橋シクロアルキルを指す。員環の数に従い、架橋シクロアルキルは、二環式、三環式、四環式又は多環式の架橋シクロアルキル、好ましくは二環式、三環式又は四環式の架橋シクロアルキル、より好ましくは二環式又は三環式の架橋シクロアルキルへと分割されてもよい。架橋シクロアルキルの無制限の例として、これらに限定されないが：

【0101】

【化18】

10



20

【0102】

が挙げられる。

【0103】

前記シクロアルキルは、アリアル、ヘテロアリアル又はヘテロシクリルに縮合することができ、親構造に結合している環はシクロアルキルである。無制限の例として、インダニル、テトラヒドロナフチル、ベンゾシクロヘプチル等が挙げられる。シクロアルキルは、場合によって置換されている場合、非置換であってもよい。置換されている場合、置換基は、好ましくは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルキルチオ、アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、ヒドロキシ、ニトロ、シアノ、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリアル、ヘテロアリアル、シクロアルコキシ、ヘテロ環式アルコキシ、シクロアルキルチオ、ヘテロシクリルチオ、オキソ、アミノ、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル、カルボキシル、カルボン酸エステルからなる群から独立して選択される1つ又は複数の基である。

30

【0104】

「ヘテロシクリル」とは、N、O、及びS(O)_m(式中、mは0～2から選択される整数である)からなる群から選択される1個又は複数のヘテロ原子を環原子として有し、ただし、環内の-O-O-、-O-S-又は-S-S-は除外するものとし、残留する環原子が炭素原子である、3～20員の飽和した及び/又は部分的に不飽和の単環式又は多環式の炭化水素基を指す。好ましくは、ヘテロシクリルは、1～4個のヘテロ原子を有する3～12個の原子、より好ましくは1～3個のヘテロ原子を有する3～10個の原子、最も好ましくは1～2個のヘテロ原子を有する5～6個の原子を有する。単環式ヘテロシクリルの無制限の例として、これらに限定されないが、ピロリジニル、ピペリジル、ピペラジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ホモピペラジニル、ピラニル、テトラヒドロフラニル等が挙げられる。多環式ヘテロシクリルとして、スピロ環、縮合環又は架橋環を有するヘテロシクリルが挙げられる。

40

【0105】

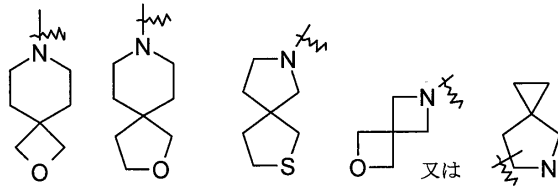
「スピロヘテロシクリル」とは、1個の共通の原子(スピロ原子と呼ばれる)を介して連結された環を有する5～20員の多環式ヘテロシクリルであって、前記環がN、O、及びS(O)_m(式中、mは0～2から選択される整数である)からなる群から選択される1個又は複数のヘ

50

テロ原子を環原子として有し、残留する環原子が炭素原子であり、1つ又は複数の環が1つ又は複数の二重結合を含有してもよいが、環のいずれもが完全に共轭したpi-電子系を有さない、好ましくは6~14員のスピロヘテロシクリル、より好ましくは7~10員のスピロヘテロシクリルを指す。共通のスピロ原子の数に従い、スピロヘテロシクリルは、モノスピロヘテロシクリル、ジスピロヘテロシクリル、又はポリスピロヘテロシクリル、好ましくはモノスピロヘテロシクリル又はジスピロヘテロシクリル、より好ましくは4員/4員の、4員/5員の、4員/6員の、5員/5員の、又は5員/6員のモノスピロヘテロシクリルへと分割されてもよい。スピロヘテロシクリルの無制限の例として、これらに限定されないが：

【0106】

【化19】



10

【0107】

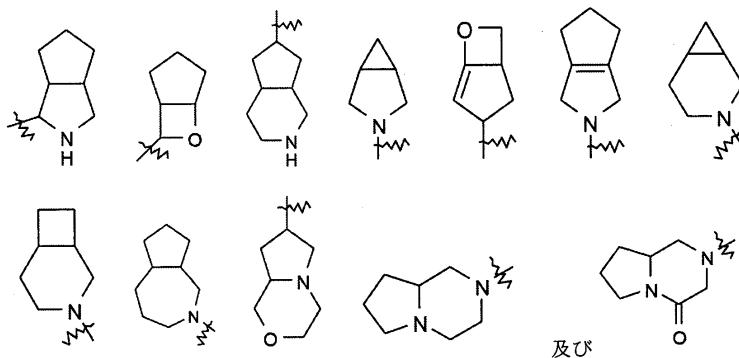
が挙げられる。

【0108】

「縮合ヘテロシクリル」とは、5~20員の多環式ヘテロシクリル基であって、系内の各環が別の環と隣接する原子対を共有し、1つ又は複数の環が1つ又は複数の二重結合を含有してもよいが、環のいずれもが完全に共轭したpi-電子系を有さない、前記環がN、O、及びS(O)_m(式中、mは0~2から選択される整数である)からなる群から選択される1個又は複数のヘテロ原子を環原子として有し、残留する環原子が炭素原子である、好ましくは6~14員の縮合ヘテロシクリル、より好ましくは7~10員の縮合ヘテロシクリルを指す。員環の数に従い、縮合ヘテロシクリルは、二環式、三環式、四環式又は多環式の縮合ヘテロシクリル、好ましくは二環式又は三環式の縮合ヘテロシクリル、より好ましくは5員/5員の、又は5員/6員の二環式の縮合ヘテロシクリルへと分割されてもよい。縮合ヘテロシクリルの無制限の例として、これらに限定されないが：

【0109】

【化20】



40

【0110】

が挙げられる。

【0111】

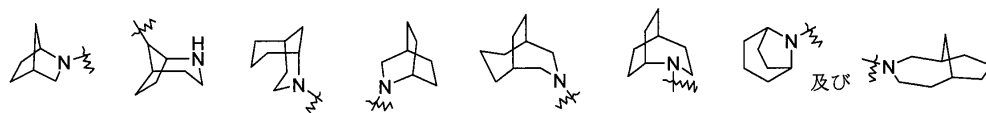
「架橋ヘテロシクリル」とは、5~14員の多環式ヘテロシクリル基であって、系内の各

50

2つの環が2個の切り離れた原子を共有し、環が1つ又は複数の二重結合を有してもよいが、環のいずれもが完全に共轭したpi-電子系を有さない、環がN、O、及びS(O)_m(式中、mは0~2から選択される整数である)からなる群から選択される1個又は複数のヘテロ原子を環原子として有し、残留する環原子が炭素原子である、好ましくは6~14員の架橋ヘテロシクリル、より好ましくは7~10員の架橋ヘテロシクリルを指す。員環の数に従い、架橋ヘテロシクリルは、二環式、三環式、四環式又は多環式の架橋ヘテロシクリル、好ましくは二環式、三環式又は四環式の架橋ヘテロシクリル、より好ましくは二環式又は三環式の架橋ヘテロシクリルへと分割されてもよい。架橋ヘテロシクリルの無制限の例として、これらに限定されないが:

【0112】

【化21】



10

【0113】

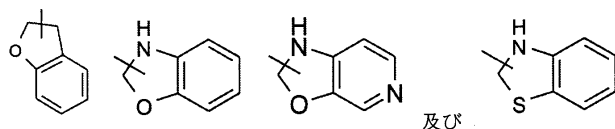
が挙げられる。

【0114】

前記ヘテロシクリルは、アリール、ヘテロアリール又はシクロアルキルに縮合することができ、親構造に結合している環はヘテロシクリルである。無制限の例として、これらに限定されないが:

【0115】

【化22】



20

30

【0116】

等が挙げられる。

【0117】

ヘテロシクリルは、場合によって置換されていても、非置換であってもよい。置換されている場合、置換基は、好ましくは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルキルチオ、アルキルアミノ、ハロゲン、チオール、ヒドロキシ、ニトロ、シアノ、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルコキシ、ヘテロ環式アルコキシ、シクロアルキルチオ、ヘテロシクリルチオ、オキソ、アミノ、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル、カルボキシル、カルボン酸エステルからなる群から独立して

40

【0118】

「アリール」は、6~14員の全炭素単環式環又は多環式の縮合環(すなわち系内の各環は、系内の別の環と、隣接する炭素原子対を共有する)であって、完全に共轭したpi-電子系を有する基である、好ましくは6~10員のアリール、より好ましくはフェニル及びナフチル、最も好ましくはフェニルを指す。アリールは、ヘテロアリール、ヘテロシクリル又はシクロアルキルに縮合でき、親構造に結合している環はアリールである。無制限の例として、これらに限定されないが:

【0119】

50

【0126】

「場合による」又は「場合によって」とは、その後に記載されている事象又は状況が生じる可能性があるが、必ずしも生じる必要はなく、このような説明が事象又は状況が生じて、生じなくてもよい状況を含むことを意味する。例えば、「アルキルで場合によって置換されているヘテロ環式基」は、アルキル基は存在することができるが、必ずしも存在する必要はなく、このような説明が、ヘテロ環式基がアルキルで置換されているという状況及びヘテロ環式基がアルキルで置換されていないという状況を含むことを意味する。

【0127】

「置換されている」とは、対応する数の置換基で独立して置換されている、基の中の1個又は複数の水素原子、好ましくは5個まで、より好ましくは1~3個の水素原子を指す。言うまでもなく、置換基は、これらの可能な化学的位置にのみ存在する。当業者は、過剰な努力を払うことなく実験又は理論により、置換が可能か不可能かを決定することができる。例えば、遊離水素を有するアミノ又はヒドロキシが炭素原子に結合している場合、不飽和結合を有すること(例えば、オレフィン等)は不安定となり得る。

10

【0128】

「医薬組成物」は、1種又は複数種の本発明による化合物又は生理学的/薬学的に許容されるその塩又はプロドラッグ及び他の化学成分、例えば、生理学的/薬学的に許容される担体及び賦形剤等の混合物を指す。医薬組成物の目的は、化合物の生物への投与及び活性成分の吸収を促進すること、よって生物学的活性を示すことである。

【0129】

「薬学的に許容される塩」とは、哺乳動物において安全で、有効であり、所望の生物学的活性を有する本発明の化合物の塩を指す。

20

【0130】

「薬物/抗体比(DAR)」という用語は、本明細書で使用される場合、各抗体分子にコンジュゲートする薬物の数を指す。抗体薬物コンジュゲート試料は異なるDAR値を有する複数の構成成分を含有するので、「平均DAR値」及び「DAR値分布」という概念が、抗体薬物コンジュゲートの組成物について記載するのにより適切である。平均DAR値は、試料中の薬物分子の総数の、抗体の総数に対する比であり、DAR値分布は、試料中の様々なDAR値を有する構成成分の含有量分布を指す。

【0131】

本発明による式Iの化合物の薬学的に許容される塩は、酸付加塩又は塩基付加塩であってよい。酸は、これらに限定されないが、塩酸、硫酸、リン酸、臭化水素酸を含む無機酸;又はこれらに限定されないが、クエン酸、マレイン酸、シュウ酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、安息香酸、フマル酸、トリフルオロ酢酸、コハク酸、酒石酸、乳酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、サリチル酸、ピルビン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸を含む有機酸であってよい。塩基は、これらに限定されないが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウムを含む無機塩基;又はこれらに限定されない、水酸化アンモニウム、トリエチルアミン、アルギニン、又はリシンを含む有機塩基であってよい。

30

【0132】

本発明の別の態様では、本発明による抗体薬物コンジュゲートは、臨床的に有用な医薬組成物として調製することができる。臨床的徴候、投与経路及び方法に従い、薬学的調製物として、これらに限定されないが、経口調製物、例えば、錠剤、ゲル剤、軟質/硬質カプセル剤、乳剤、分散性散剤、粒剤、水/油サスポエマルジョン剤;静脈内注射、筋肉注射、腹腔内注射、直腸投与坐剤、脳内注射(水溶液又は油溶液であってよい)を含む注射;クリーム剤、軟膏剤、ゲル剤、水/油溶液、及びパッケージを含む局所的製剤;微細粉末、液体エアゾール剤を含む吸入製剤、並びにin vivoインプランテーションに適切な様々な剤形が挙げられる。

40

【0133】

本発明の医薬組成物は、必要に応じて従来の医薬賦形剤を加えることができる。これら

50

の賦形剤は、薬学的調製物プロセス規定に従うべきであり、活性成分と適合すべきある。固体の経口調製賦形剤として、これらに限定されないが、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、セルロース、グルコース、スクロース、シクロデキストリン、及びビタミンE-PEG1000(腸の吸収を促進する)が挙げられる。経口製剤には、適切な着色剤、甘味剤、香味剤及び保存剤を加えることができる。

【0134】

投与される薬物の用量は、これらに限定されないが、利用する特定の化合物の活性、患者の年齢、患者の体重、患者の状態、食事、投与時間、投与モード、排出速度、薬物の組合せ等を含む様々な因子に依存することは当業者に周知である。加えて、最適な処置様式、例えば、処置のモード、一般式の化合物の1日投与量、又は薬学的に許容される塩の種類等は、従来の処置レジメンに従い検証することができる。

10

【0135】

テトラマレイミドリンカーに対して、任意の2つのマレイミド基(リンカーサイズ)間の距離は、テトラマレイミドリンカーと抗体との間の鎖間架橋に影響を与え得る。薬物を連結するために使用される側鎖の長さ及び構造はまた、ADC特性及び作用強度に影響を与え得る。したがって、発明者は、上述された影響因子を研究するために、異なるサイズの一連のテトラマレイミドリンカーを合成した。

【0136】

ADCに対する調製方法

本発明によるADCは、以下の方法を介して調製することができる。

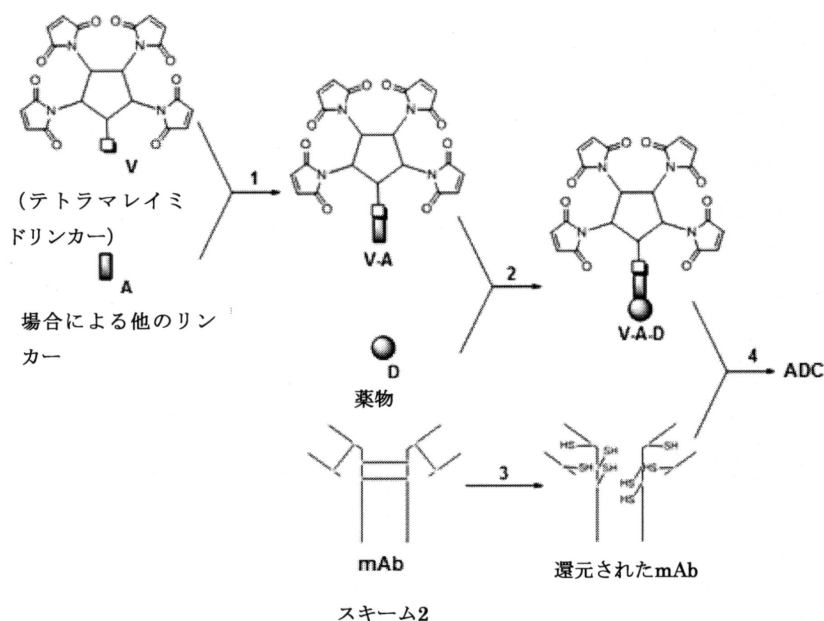
20

【0137】

方法1がスキーム2に示されている。

【0138】

【化25】



30

40

【0139】

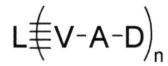
ステップ1: 場合による他のリンカー(A)及びテトラマレイミドリンカー(V)をコンジュゲートして、リンカー分子(V-A)を生成する;
 ステップ2: V-A及び薬物(D)をコンジュゲートして、テトラマレイミドリンカー-場合による他のリンカー-薬物(V-A-D)を得る;
 ステップ3: 抗体(L)の鎖間ジスルフィド結合を還元して、合計8つのスルフヒドリル基を生成する;

50

ステップ4:V-A-Dを、還元されたスルフヒドリル基又は抗体の他のアミノ酸残基で架橋して、式

【 0 1 4 0 】

【 化 2 6 】



【 0 1 4 1 】

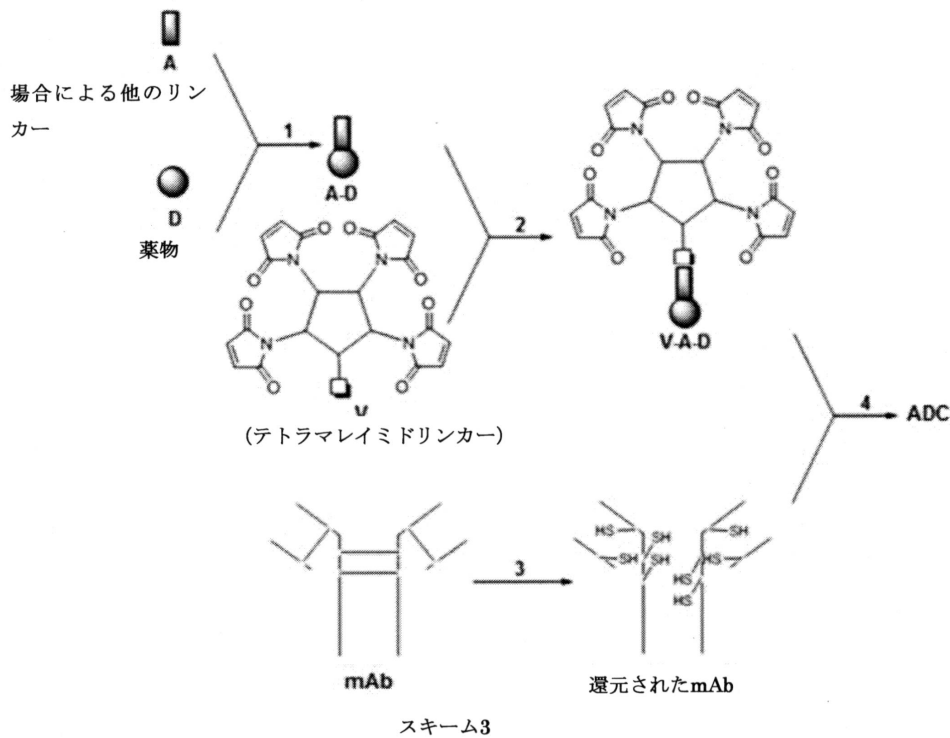
のADCを生成する。

【 0 1 4 2 】

方法2はスキーム3に示されている。

【 0 1 4 3 】

【 化 2 7 】



【 0 1 4 4 】

ステップ1:場合による他のリンカー(A)及び薬物(D)をコンジュゲートして、リンカー-薬物(A-D)を生成する;

ステップ2:テトラマレイミドリンカー(V)及びA-Dをコンジュゲートして、テトラマレイミドリンカー-場合による他のリンカー-薬物(V-A-D)を得る;

ステップ3:抗体(L)の鎖間ジスルフィド結合を還元して、合計8つのスルフヒドリル基を生成する;

ステップ4:V-A-Dを、スルフヒドリル基又は抗体の他のアミノ酸残基で架橋して、式

【 0 1 4 5 】

10

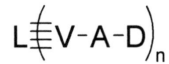
20

30

40

50

【化 2 8】



【0146】

のADCを生成する。

【0147】

使用

本発明による抗体薬物コンジュゲートは、特別な細胞集団を標的とし、特定の細胞表面タンパク質(抗原)に結合して、複合体を形成し、その後、複合体の細胞への内在化及び細胞内での薬物の活性形態での放出が続く。

10

【0148】

本発明による抗体薬物コンジュゲートは、特別な細胞集団を標的とし、特定の細胞表面タンパク質(抗原)に結合して効果を発揮する、又は薬物を細胞の外側に放出し、これに続いて薬物を細胞に浸透させて効果を発揮する。

【0149】

本発明は、動物の対象におけるがん又は他の腫瘍の処置のための方法であって、治療有効量の本発明による抗体薬物コンジュゲートを、がん又は他の腫瘍を患っている対象に投与することを含む方法を提供する。

20

【0150】

本発明は、自己免疫疾患又は感染症の処置のための方法であって、治療有効量の本発明による抗体薬物コンジュゲートを、自己免疫疾患又は感染症を患っている対象に投与することを含む方法を提供する。

【0151】

上記技術的特徴又は以下の実施例に記述されている特徴は、随意に組み合わせることができる。本発明で開示されたすべての特徴は、任意の組合せで一緒に適用することができ、各特徴は、任意の同一の、等しい、又は類似の特徴で置き換えることができる。他に特に述べられていない限り、すべての開示された特徴は等しい又は類似の特徴の一般的な例にすぎない。

30

【0152】

本発明は以下の主要な利点を有する：

- 1.本発明は、制御された平均DAR2と高い均一性の両方を持ち合わせたADC生成物を生成するためのコンジュゲーション技術を初めて提供する；
- 2.本発明による革新的なテトラマレイミドリンカーは、4つのマレイミド基を含み、これらは鎖間システイン及び/又は抗体内の他のアミノ酸残基を、単純な化学的手法により同時にコンジュゲートできる。従来のコンジュゲーション方法を介して得たものと比較して、本発明のテトラマレイミドリンカーを用いて得たコンジュゲートは、DAR2画分を主成分として(90%を超える)を有し、大いに狭いDAR分布を有する。その結果、生成物の均一性は大きく改善されている；
- 3.本発明によるコンジュゲーション技術は、IgG1等の大部分の抗体に適用可能であり、カップリングに対する特定の部位を導入するために使用される複雑な抗体エンジニアリングを回避することができる。したがって、コンジュゲーション技術は、非常に広範な応用が見込まれる。

40

【図面の簡単な説明】

【0153】

【図1】本発明のH-5-vcMMAEの天然MSスペクトルを例示している。

【図2a】テトラマレイミドリンカーに基づく抗体薬物コンジュゲートのSDS-PAGE結果を例示し、H-1-vcMMAE~H-6-vcMMAE(1~6にそれぞれ対応する)のSDS-PAGE結果を表している。

50

【図 2 b】テトラマレイミドリンカーに基づく抗体薬物コンジュゲートのSDS-PAGE結果を例示し、H-7-vcMMAE～H-12-vcMMAE(7～12にそれぞれ対応する)のSDS-PAGE結果を表している。

【図 3 a】抗体薬物コンジュゲートのHIC結果を例示し、H-1-vcMMAEに対応している。

【図 3 b】抗体薬物コンジュゲートのHIC結果を例示し、H-2-vcMMAEに対応している。

【図 3 c】抗体薬物コンジュゲートのHIC結果を例示し、H-3-vcMMAEに対応している。

【図 3 d】抗体薬物コンジュゲートのHIC結果を例示し、H-4-vcMMAEに対応している。

【図 3 e】抗体薬物コンジュゲートのHIC結果を例示し、H-5-vcMMAEに対応している。

【図 3 f】抗体薬物コンジュゲートのHIC結果を例示し、H-6-vcMMAEに対応している。

【図 3 g】抗体薬物コンジュゲートのHIC結果を例示し、H-7-vcMMAEに対応している。

10

【図 3 h】抗体薬物コンジュゲートのHIC結果を例示し、H-8-vcMMAEに対応している。

【図 3 i】抗体薬物コンジュゲートのHIC結果を例示し、H-9-vcMMAEに対応している。

【図 3 j】抗体薬物コンジュゲートのHIC結果を例示し、H-10-vcMMAEに対応している。

【図 3 k】抗体薬物コンジュゲートのHIC結果を例示し、H-11-vcMMAEに対応している。

【図 3 l】抗体薬物コンジュゲートのHIC結果を例示し、H-12-vcMMAEに対応している。

【図 3 m】P-7-vcMMAEに対応している。

【実施例】

20

【0154】

本発明は、以下の実施例を用いて詳細に更に記載される。しかし、これらの実施例は、本発明を例示するために使用されているが、本発明の範囲を限定すると考えられるべきではないことを理解されたい。述べられていない実験の条件は、所定の条件又は製造業者により提案された条件に一般的に従う。水素付加反応を除く、すべての反応は窒素大気下で行った。

【0155】

他に定義されない限り、本発明に使用されているすべての専門用語及び科学用語は、当技術分野の当業者が精通している意味と同じ意味を有する。更に、本発明で使用されているものと類似又は等しい任意の方法又は材料を本明細書で適用することができる。本発明で使用されている最適化された方法及び材料は、例示のためのみに使用されているもので、制限のためではない。

30

【0156】

略語

Ab 抗体

Ac アセチル

ACN アセトニトリル

ADC 抗体薬物コンジュゲート

BOC(Boc) tert-ブトキシカルボニル

Cbz ベンジルオキシカルボニル

40

t-Bu tert-ブチル

DCM ジクロロメタン

DIPEA ジイソプロピルエチルアミン

DMF N,N-ジメチルホルムアミド

ELISA 酵素結合免疫吸着法アッセイ

EtOAc 酢酸エチル

Eq(eq) 当量

g グラム

h 時間

HATU 2-(7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム

50

ヘキサフルオロホスフェート	
HOSu N-ヒドロキシスクシンイミド	
HIC 疎水性相互作用クロマトグラフィー	
HPLC 高速液体クロマトグラフィー	
LC-MS 液体クロマトグラフィー質量スペクトル	
mAb モノクローナル抗体	
min 分間	
mL ミリリットル	
MS 質量分析法	
nm ナノメートル	10
μg マイクログラム	
μL マイクロリットル	
PE 石油エーテル	
RP-HPLC 逆相高速液体クロマトグラフィー	
prep-RP-HPLC 分取逆相高速液体クロマトグラフィー	
rt 室温	
R _t 保持時間	
SDS-PAGE 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	
SEC サイズ排除クロマトグラフィー	
TEA トリエチルアミン	20
TFA トリフルオロ酢酸	
THF テトラヒドロフラン	
TLC 薄層クロマトグラフィー	
TsCl 塩化p-トリル	
【0157】	
特に述べられていない限り、すべての無水溶媒は、製造元から購入し、窒素大気下で保持する。購入したすべての他の試薬及び溶媒は高い純度のものであり、使用前に精製する必要はない。	
【0158】	
化合物の構造は、核磁気共鳴(NMR)及び/又は質量分析法(MS)により特定される。NMR化学シフト()は10 ⁻⁶ (ppm)で付与される。NMRは、Bruker AVANCE III 500で決定される。溶媒は、内部標準としてテトラメチルシラン(TMS)を有する、重水素化ジメチルスルホキシド(DMSO-d ₆)、重水素化クロロホルム(CDCl ₃)及び重水素化メタノール(CD ₃ OD)である。	30
【0159】	
液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC-MS)は、Hewlette-Packard Agilent 1200 HPLCに連結したAgilent 6110(酸の方法)又は6120B(塩基の方法)質量分析器で決定される。	
【0160】	
方法1:Waters Sunfire C18逆相カラム(4.60×50mm、3.5 μm)を、分離のために酸HPLC法で使用し、溶出勾配は、1.4minにわたり、A(0.01%TFAを含有する水)中の5%~95%のB(0.01%TFAを含有するアセトニトリル)である。流速は2.0mL/minであり、カラム温度は50 である。	40
【0161】	
方法2:Waters Sunfire C18逆相カラム(4.60×50mm、3.5 μm)は、分離のための酸HPLC法で使用され、溶出勾配は、1.4minにわたり、A(0.01%TFAを含有する水)中の5%~95%のB(0.01%TFAを含有するアセトニトリル)である。流速は2.3mL/minであり、カラム温度は50 である。	
【0162】	
方法3:Waters Sunfire C18逆相カラム(3.0×30mm、2.5 μm)は、分離のための酸H	50

PLC法に使用され、溶出勾配は、1.5minにわたり、A(0.01%TFAを含有する水)中の5%~95%のB(0.01%TFAを含有するアセトニトリル)である。流速は1.5mL/minであり、カラム温度は50 である。

【0163】

方法4:Waters Sunfire C18逆相カラム(4.6×50mm、3.5 μm)は、分離のための酸HPLC法に使用され、溶出勾配は、1.2minにわたり、A(0.01%TFAを含有する水)中の5%~95%のB(0.01%TFAを含有するアセトニトリル)である。流速は2.0mL/minであり、カラム温度は50 である。

【0164】

方法5:Waters Xbridge C18逆相カラム(4.60×50mm、3.5 μm)は、分離のための塩基HPLC法に使用され、溶出勾配は、1.5minにわたり、A(10mM炭酸水素アンモニウムを含有する水)中の5%~95%のB(アセトニトリル)である。流速は2.0mL/minであり、カラム温度は40 である。

【0165】

分取HPLCによる精製は、Gilson装置で行う。Waters Sunfire C18逆相カラム(250×19mm、10 μm)は分離のために使用する。

【0166】

方法6:酸性HPLC調製法。移動相:Aは0.1%TFAを含有する水溶液であり、BはACNである。流速は20mL/minである。

【0167】

SK-BR-3ヒト乳がん細胞はATCC社から購入する。Her2抗原はSino Biological社(Beijing)から購入する。抗体H(Herceptin Biosimilar、IgG1)はGenor Biopharma社(Shanghai)から購入する。抗体P(Perjeta Biosimilar、IgG1)はBiochempartner社(Shanghai)から購入する。酵素標識した抗-抗体はSigma社(Shanghai)から購入する。基質溶液はDecent Biotech社(Shanghai)から購入する。細胞カウティングキット(CCK-8)細胞増殖-細胞毒性アッセイキットはDojindo社(Shanghai)から購入する。

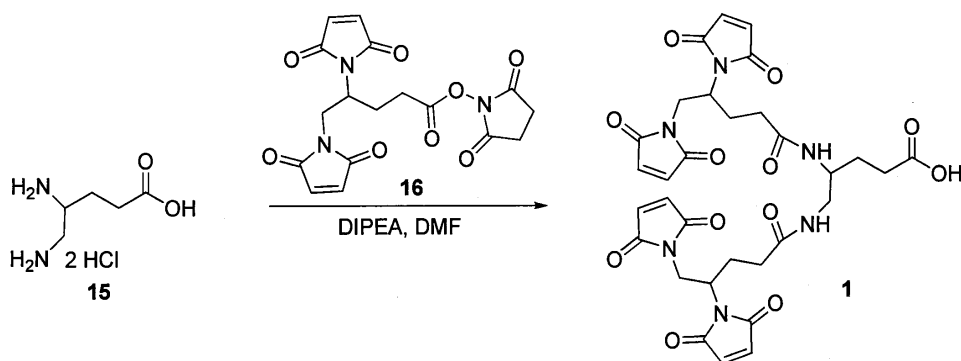
【0168】

(実施例1)

化合物1(リンカー1)の合成

【0169】

【化29】



【0170】

(S)-4,5-ジアミノペンタン酸ジヒドロクロリド(15)(10mg、49 μmol、Tetrahedron Asymmetry、1993、4、91~100頁に従い調製)及び化合物16(38mg、98 μmol、WO 2014114207に従い調製)をDMF(0.5mL)に溶解し、次いでこれにDIPEA(25mg、196 μmol)を加えた。反応混合物を室温で2h攪拌し、次いで、RP-HPLC(方法6:32%~40%B、8min 95%B、4min)で精製して、化合物1(12mg)を白色の固体として得た。

LC-MS (方法1): Rt = 1.39 min; m/z (ES+) 681.1 (M+H)⁺.

10

20

30

40

50

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) 6.80 (s, 4 H), 6.78 (s, 4 H), 4.20-4.12 (m, 2 H), 4.01-3.96 (m, 2 H), 3.92-3.87 (m, 1 H), 3.71-3.66 (m, 2 H), 3.37-3.32 (m, 1 H), 3.11-3.07 (m, 1 H), 2.42-2.30 (m, 4 H), 2.28-2.08 (m, 6 H), 1.83-1.76 (m, 1 H), 1.66-1.59 (m, 1 H).

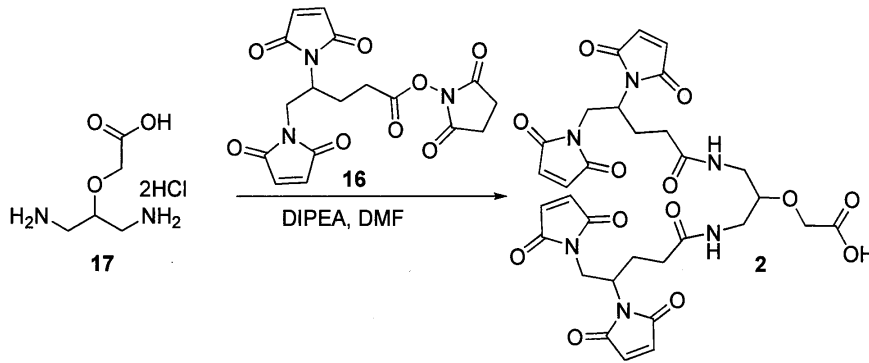
【 0 1 7 1 】

(実施例2)

化合物2(リンカー2)の合成

【 0 1 7 2 】

【 化 3 0 】



10

20

【 0 1 7 3 】

2-(1,3-ジアミノ-2-プロポキシ)酢酸ジヒドロクロリド(17)(10mg、45 μmol 、WO2014114207に従い調製)及び化合物16(35mg、90 μmol)をDMF(0.5mL)に溶解し、次いでこれにDIPEA(23mg、180 μmol)を加えた。反応混合物を室温で4h攪拌し、次いでRP-HPLC(方法6:30%~60%B、8min 95%B、4)で精製して、化合物2(9mg)を白色の固体として得た。

LC-MS (方法2): $R_t = 1.63$ min; m/z (ES+) 697.0 (M+H) $^+$.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) 6.79 (s, 4 H), 6.78-6.76 (m, 4 H), 4.22 (s, 2 H), 4.18-4.14 (m, 2 H), 4.00-3.95 (m, 2 H), 3.70-3.66 (m, 2 H), 3.50-3.45 (m, 1 H), 3.31-3.27 (m, 1 H), 3.24-3.23 (d, 2 H), 3.18-3.14 (m, 1 H), 2.46-2.38 (m, 2 H), 2.29-2.17 (m, 4 H), 2.14-2.08 (m, 2 H).

30

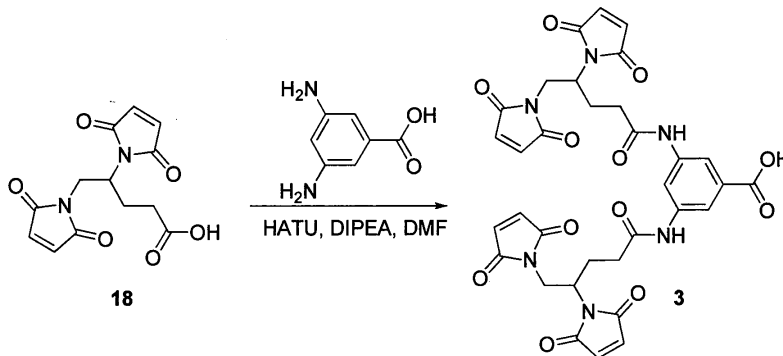
【 0 1 7 4 】

(実施例3)

化合物3(リンカー3)の合成

【 0 1 7 5 】

【 化 3 1 】



40

【 0 1 7 6 】

50

4,5-ビス(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンタン酸(18)(10mg、65 μ mol、WO2014114207に従い調製)及び3,5-ジアミノ安息香酸(38mg、130 μ mol)をDMF(0.6mL)に溶解し、次いでこれにHATU(62mg、160 μ mol)及びDIPEA(18mg、140 μ mol)を加えた。反応混合物を室温で18h攪拌し、次いでRP-HPLC(方法6:40%~70%B、8min 95%B、4)で精製して、化合物3(6mg)白色の固体として得た。

LC-MS (方法2): Rt = 1.74 min; m/z (ES+) 700.8 (M+H)⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 10.03 (s, 2 H), 8.02 (s, 1 H), 7.84 (s, 2 H), 7.01 (s, 4 H), 6.98 (s, 4 H), 4.09-4.02 (m, 2 H), 3.84-3.75 (m, 2 H), 3.65-3.61 (m, 2 H), 2.33-2.25 (m, 6 H), 2.06-1.95 (m, 2 H).

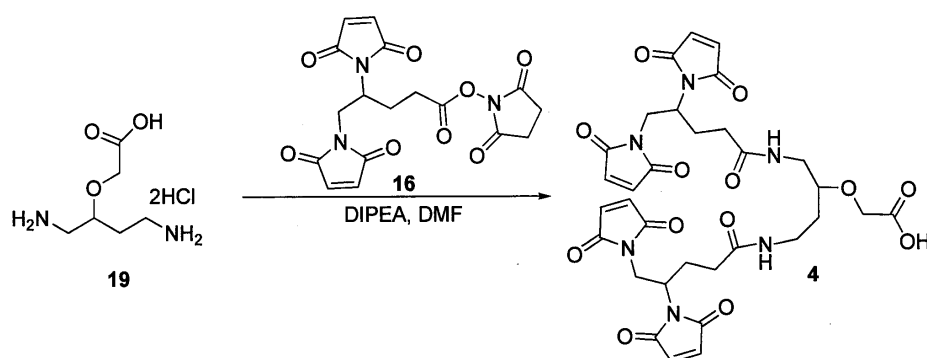
【0177】

(実施例4)

化合物4(リンカー4)の合成

【0178】

【化32】



【0179】

2-(1,4-ジアミノブタン-2-イルオキシ)酢酸(19)(20mg、85 μ mol、WO2014114207に従い調製)及び化合物16(66mg、170 μ mol)をDMF(0.4mL)に溶解し、次いでこれにDIPEA(44mg、340 μ mol)を加えた。反応混合物を室温で4h攪拌し、次いでRP-HPLC(方法6:35%~60%B、8min 95%B、4)で精製して、化合物4(9mg)を白色の固体として得た。

LC-MS (方法1): Rt = 1.41 min; m/z (ES+) 711.1 (M+H)⁺.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) 6.80 (s, 4 H), 6.77 (s, 4 H), 4.21 (s, 2 H), 4.18-4.12 (m, 2 H), 4.00-3.94 (m, 2 H), 3.70-3.65 (m, 2 H), 3.55-3.51 (m, 1 H), 3.49-3.35 (m, 1 H), 3.30-3.14 (m, 3 H), 2.46-2.38 (m, 2 H), 2.29-2.17 (m, 4 H), 2.15-2.08 (m, 2 H), 1.68-1.63 (m, 2 H).

【0180】

(実施例5)

化合物5(リンカー5)の合成

【0181】

10

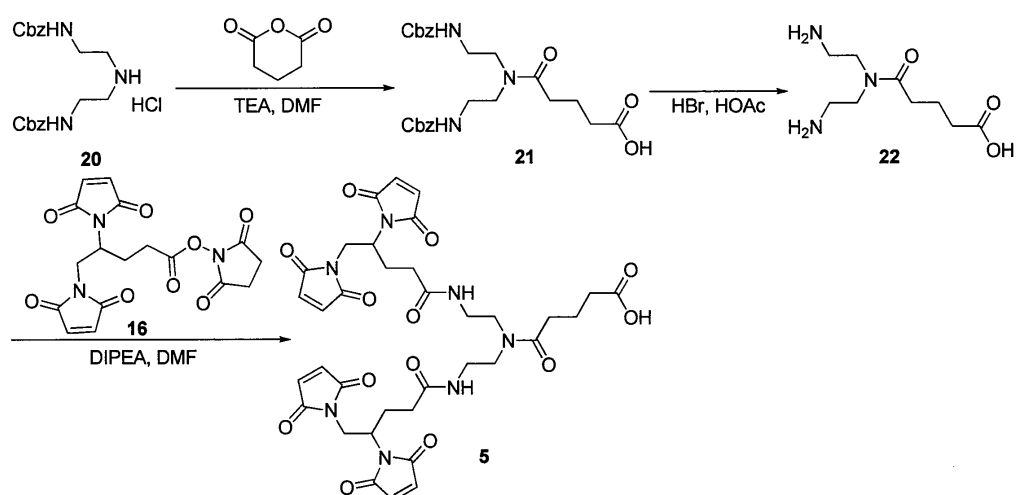
20

30

40

50

【化33】



10

【0182】

ステップ1:5-(ビス(2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)エチル)アミノ)-5-オキソペンタン酸(21)の合成

20

ビス(2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)エチル)アミン塩酸塩(20)(815mg、2mmol、European Journal of Medicinal Chemistry、2009、44、678~688頁に従い調製)及びTEA(0.70mL、5mmol)をDMF(5mL)に溶解し、次いでこれにグルタル酸無水物(1mLDMF中228mg、2mmol)を滴下添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌し、次いで水(20mL)を加えた。混合物をDCM(15mL×3)で抽出し、合わせた有機相を逐次的にブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:DCM/MeOH30:1)で精製して、化合物21(872mg)を薄黄色の固体として得た。

LC-MS(方法3):Rt=1.21min;m/z(ES+)486.3(M+H)⁺。

【0183】

ステップ2:5-(ビス(2-アミノエチル)アミノ)-5-オキソペンタン酸ジヒドロブromid(22)の合成

30

HBrの酢酸(33%、3mL)中溶液を化合物21(522mg、1.1mmol)に滴下添加し、次いで、反応混合物を室温で15min攪拌した。ジエチルエーテル(20mL)を混合物に加え、黄色の沈殿物を遠心分離で分離した。固体をジエチルエーテル(10mL)中に懸濁させ、次いで遠心分離で収集した。2ステップのプロセスを3回繰り返す、その後、得た固体を真空下で乾燥させて(60℃)、化合物22の臭化水素酸塩(350mg)を黄色の固体として得た。

LC-MS(方法4):Rt=0.28min;m/z(ES+)218.0(M+H)⁺。

【0184】

ステップ3:化合物5の合成

40

化合物22の臭化水素酸塩(45mg、119μmol)及び化合物16(50mg、128μmol)をDMF(5mL)に溶解し、次いでこれにDIPEA(37mg、287μmol)を加えた。反応混合物を室温で2h攪拌し、次いでRP-HPLC(方法6:30%~60%B、8min 95%B、4)で精製して、化合物5(30mg)を白色の固体として得た。

LC-MS(方法2):Rt=1.62min;m/z(ES+)765.9(M+H)⁺。

¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) 7.95(t,1H),7.84(t,1H),7.00(s,4H),6.97(d,4H),4.01-3.95(m,2H),3.80-3.75(m,2H),3.61-3.56(m,2H),3.25-3.16(m,4H),3.15-3.06(m,4H),2.27(t,2H),2.23-2.15(m,4H),2.04-1.98(m,4H),1.96-1.88(m,2H),1.72-1.66(m,2H)。

【0185】

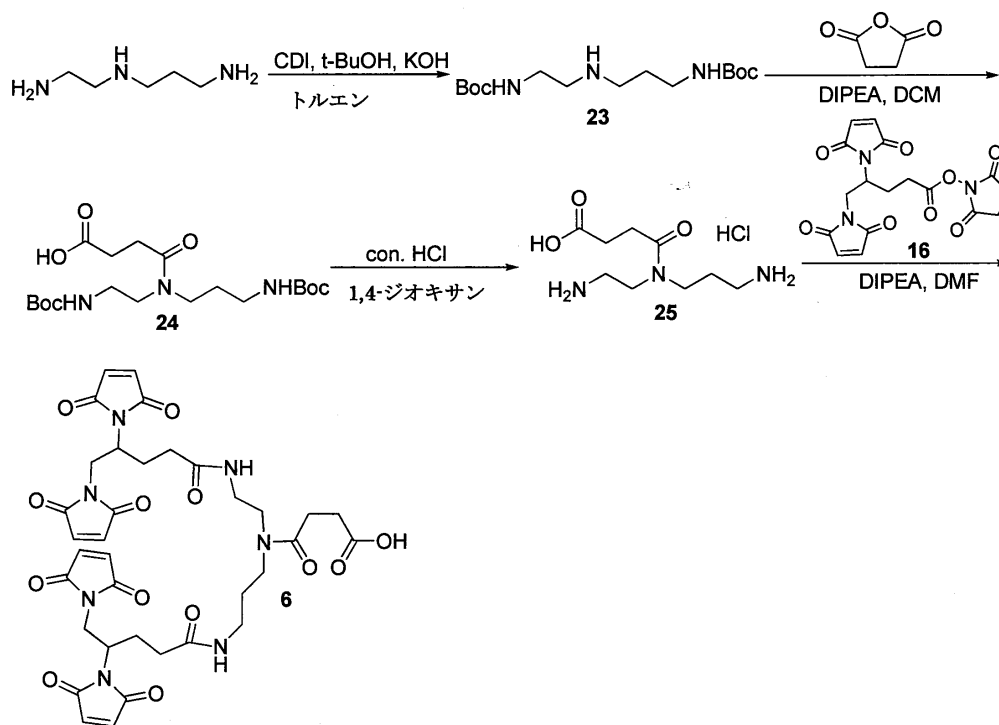
50

(実施例6)

化合物6(リンカー6)の合成

【0186】

【化34】



10

20

【0187】

ステップ1:(2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)エチル)(3-(tert-ブトキシカルボニル-アミノ)プロピル)アミン(23)の合成

CDI(2.9g、18.0mmol)、tert-ブチルアルコール(1.33g、18.0mmol)及び水酸化カリウム(24mg、0.43mmol)をトルエン(30mL)に逐次的に加え、反応混合物を60℃で3h撹拌した。N-(2-アミノエチル)プロパン-1,3-ジアミン(1.0g、8.55mmol)を混合物に加え、次いで反応混合物を60℃で3h撹拌した。反応混合物を室温に冷却し、減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。DCM(50mL)を残渣に加え、次いで混合物を水(30mL×3)で洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、化合物23(1.0g)を無色の油状物として得た。粗生成物は、精製することなく次のステップでそのまま使用した。

30

【0188】

ステップ2:4-((2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)エチル)(3-(tert-ブトキシカルボニル-アミノ)プロピル)アミノ)-4-オキソブタン酸(24)の合成

化合物23(1.0g)をDCM(15mL)に溶解し、次いでこれにコハク酸無水物(0.47g、4.73mmol)及びDIPEA(1.22g、9.46mmol)を逐次的に加えた。反応混合物を室温で18h撹拌し、次いで水(30mL×2)で洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、化合物24(1.2g)を無色の油状物として得た。粗生成物は、精製することなく次のステップに対してそのまま使用した。

40

LC-MS(方法5):Rt=1.68min;m/z(ES+)418.3(M+H)⁺。

【0189】

ステップ3:4-((2-アミノエチル)(3-アミノプロピル)アミノ)-4-オキソブタン酸(25)の合成
1,4-ジオキサン(6mL)及び濃塩酸(3mL)を化合物24(1.2g)に逐次的に加え、反応混合物を室温で2h撹拌した。混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。残渣をトルエンに溶

50

解し、次いで減圧下で濃縮して、溶媒を除去した(3回繰り返した)。残渣を真空下で乾燥させて、化合物25(520mg)を薄黄色の固体として得た。

LC-MS(方法5):Rt=0.32min;m/z(ES+)218.2(M+H)⁺。

【0190】

ステップ4:化合物6の合成

化合物25(24mg、83 μmol)及び化合物16(65mg、166 μmol)をDMF(0.4mL)に溶解し、次いでこれにDIPEA(43mg、332 μmol)を加えた。反応混合物を室温で4h攪拌し、次いでRP-HPLCで精製して(方法6:32%~60%B、8min 95%B、4)化合物6(8mg)を白色の固体として得た。

LC-MS(方法2):Rt=1.58min;m/z(ES+)766.2(M+H)⁺。

¹H NMR(500 MHz, CD₃OD) 6.80-6.78(m, 8 H), 4.19-4.13(m, 2 H), 4.01-3.95(m, 2 H), 3.70-3.67(m, 2 H), 3.48-3.36(m, 5 H), 3.30-3.06(m, 3 H), 2.68-2.62(m, 4 H), 2.44-2.38(m, 2 H), 2.25-2.06(m, 6 H), 1.82-1.70(m, 2 H)。

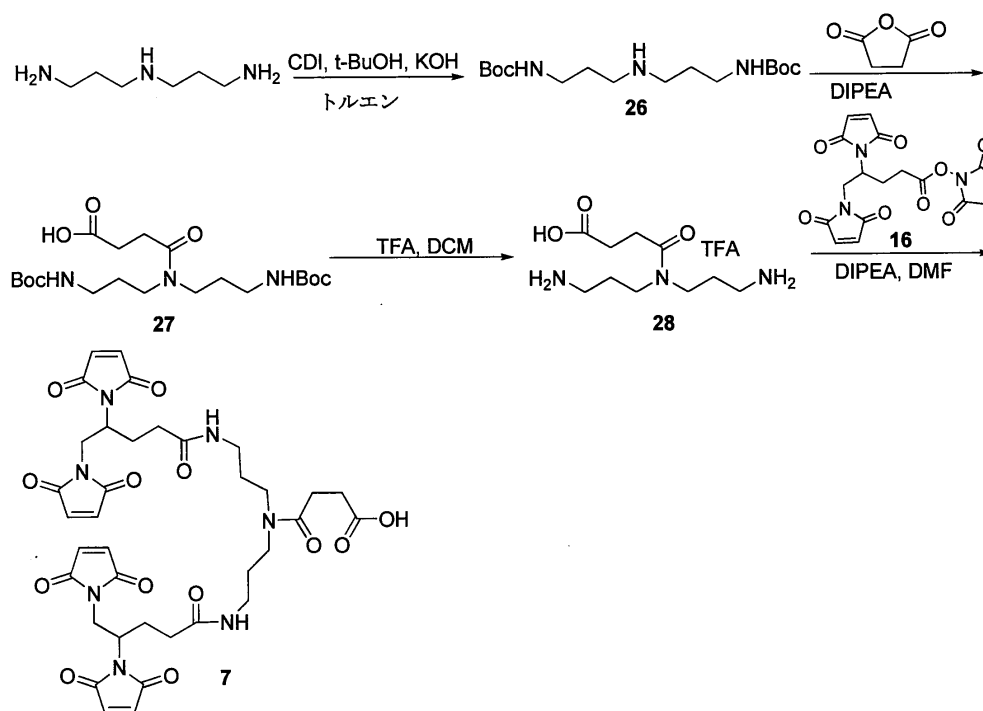
【0191】

(実施例7)

化合物7(リンカー7)の合成

【0192】

【化35】



【0193】

ステップ1:ビス(3-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロピル)アミン(26)の合成

CDI(3.4g、21mmol)、tert-ブチルアルコール(1.55g、21mmol)及び水酸化カリウム(28mg、0.50mmol)をトルエン(30mL)に逐次的に加え、反応混合物を60℃で3h攪拌した。N-(3-アミノプロピル)-1,3-プロピルジアミン(1.31g、10mmol)を混合物に加え、反応混合物を60℃で3h攪拌した。反応混合物を室温に冷却し、濃縮して、溶媒を除去した。残渣にDCM(50mL)を加え、次いで混合物を水(30mL×3)で洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、化合物26(1.0g)を白色の固体として得た。粗生成物は、精製することなく次のステップでそのまま使用した。

【0194】

ステップ2:4-(ビス(3-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロピル)アミノ)-4-オキソブタン

10

20

30

40

50

酸(27)の合成

化合物26(1.0g)をDCM(15mL)に溶解し、次いでこれにコハク酸無水物(0.36g、3.6mmol)及びDIPEA(0.78g、6.0mmol)を逐次的に加えた。反応混合物を室温で18h攪拌し、次いで減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:DCM/MeOH15:1)で精製して、化合物27(420mg)を無色の油状物として得た。

【0195】

ステップ3:4-(ビス(3-アミノプロピル)アミノ)-4-オキソブタン酸(28)の合成

化合物27(420mg)をDCM(900 μ L)に溶解し、溶液を0 $^{\circ}$ Cに冷却し、これにTFA(300 μ L)を加えた。反応混合物を室温で3h攪拌し、次いで減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。残渣をトルエンに溶解し、濃縮して、溶媒を除去した(3回繰り返した)。残渣を真空下で乾燥して、化合物28(480mg)を薄黄色の油状物として得た。

LC-MS(方法4):Rt=0.28、0.34min;m/z(ES+)232.2(M+H)⁺。

【0196】

ステップ4:化合物7の合成

化合物28(60mg、130 μ mol)及び化合物16(101mg、260 μ mol)をDMF(0.6mL)に溶解し、次いでこれにDIPEA(67mg、520 μ mol)を加えた。反応混合物を室温で2h攪拌し、次いでRP-HPLC(方法6:35%~58%B、8min 95%B、4)で精製して、化合物7(35mg)を白色の固体として得た。

LC-MS(方法2):Rt=1.47min;m/z(ES+)780.2(M+H)⁺。

¹H NMR(500MHz,CD₃OD) 6.80-6.78(m,8H),4.18-4.13(m,2H),4.00-3.95(m,2H),3.71-3.67(m,2H),3.42-3.35(m,4H),3.25-3.08(m,4H),2.68-2.67(m,4H),2.45-2.38(m,2H),2.25-2.08(m,6H),1.86-1.80(m,2H),1.73-1.68(m,2H)。

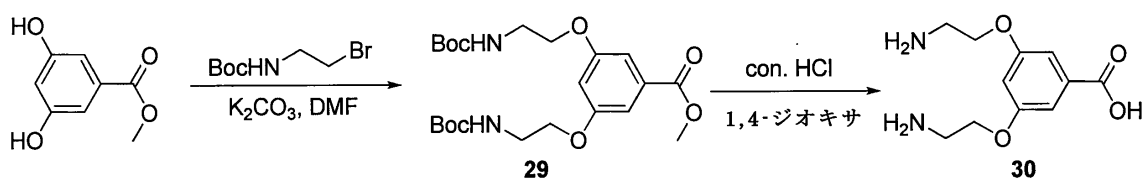
【0197】

(実施例8)

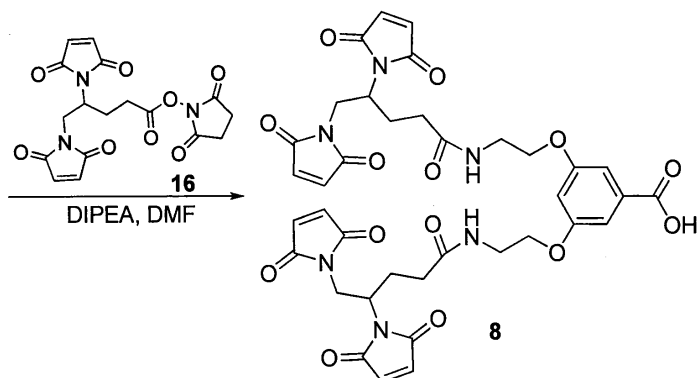
化合物8(リンカー8)の合成

【0198】

【化36】



30



40

【0199】

ステップ1:メチル3,5-ビス(2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)エトキシ)安息香酸塩(29)の合成

メチル3,5-ジヒドロキシベンゾエート(200mg、1.19mmol)及びtert-ブチル2-プロモ

50

エチルカルバメート(666mg、2.98mmol)をDMF(10mL)に溶解し、次いでこれに炭酸カリウム(411mg、2.98mmol)を加えた。反応混合物を50 で18h攪拌し、次いで濃縮して、溶媒を除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:PE/EA10:1)で精製して、化合物29(450mg)を無色の油状物として得た。

LC-MS(方法1):Rt=1.97min;m/z(ES+)477.0(M+Na)⁺。

【0200】

ステップ2:3,5-ビス(2-アミノエトキシ)安息香酸(30)の合成

化合物29(200mg)を1,4-ジオキサン(1mL)に溶解し、次いでこれに濃塩酸(1mL)を加えた。反応混合物を80 で2h攪拌し、次いで減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。残渣に、トルエン(3mL)を加え、次いで混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。固体が得られるまで、同じプロセスを数回繰り返した。固体を酢酸エチルに懸濁させ、次いで濾取した。固体を真空下で乾燥させて、化合物30(100mg)を褐色固体として得た。粗生成物は、精製することなく次のステップでそのまま使用した。

LC-MS(方法1):Rt=0.32min;m/z(ES+)241.0(M+H)⁺。

【0201】

ステップ3:化合物8の合成

化合物30(10mg、32 μmol)及び化合物16(25mg、64 μmol)をDMF(0.5mL)に溶解し、次いでこれにDIPEA(17mg、128 μmol)を加えた。反応混合物を室温で2h攪拌し、次いでRP-HPLC(方法6:35%~65%B、8min 95%B、4)で精製して、化合物8(6mg)を白色の固体として得た。

LC-MS(方法4):Rt=1.34min;m/z(ES+)789.2(M+H)⁺。

¹H NMR(500 MHz, DMSO-d₆) 8.05 (t, 2 H), 7.04 (d, 2 H), 7.00 (s, 4 H), 6.96 (s, 4 H), 6.72 (t, 1 H), 4.02-3.94 (m, 6 H), 3.80-3.74 (m, 2 H), 3.61-3.56 (m, 2 H), 3.37-3.33 (m, 4 H), 2.23-2.14 (m, 2 H), 2.06 (t, 4 H), 1.98-1.90 (m, 2 H)。

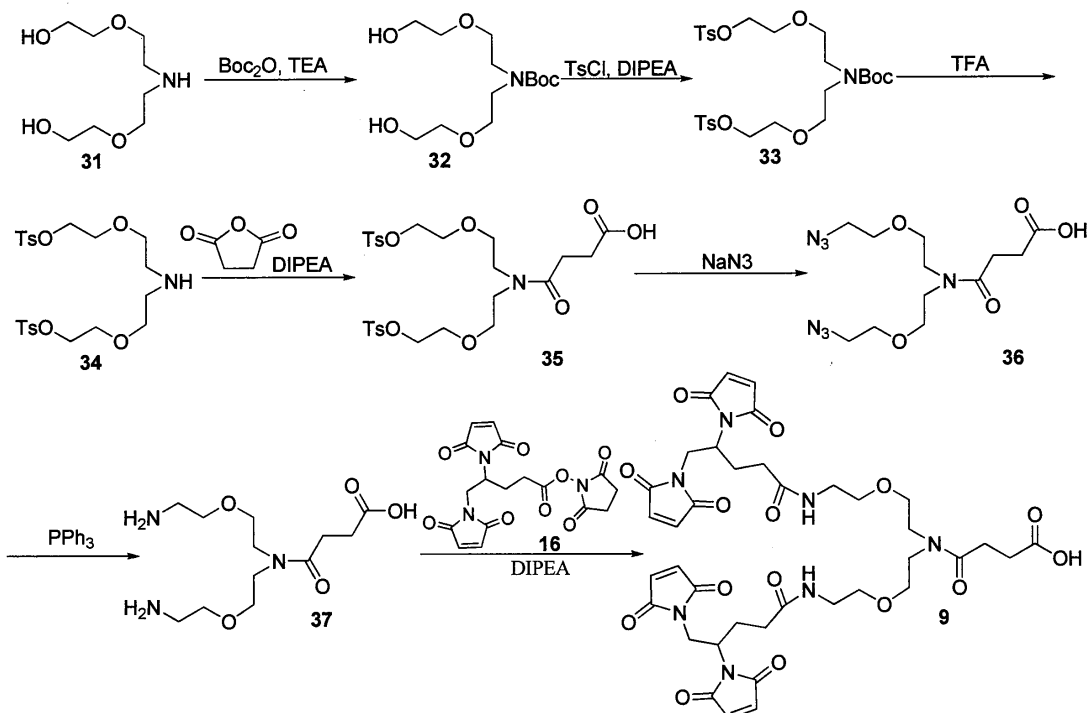
【0202】

(実施例9)

化合物9(リンカー9)の合成

【0203】

【化37】



10

20

30

40

50

【0204】

ステップ1:tert-ブチルビス(2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチル)カルバメート(32)の合成
ビス(2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチル)アミン(31)(4.2g、21.8mmol、Journal of Organic Chemistry、1995、60、6097~6102頁に従い調製)及びTEAをDCM(30mL)に溶解し、次いでこれに二炭酸ジ-tert-ブチル(5.69g、26.1mmol)を加えた。反応混合物を室温で18h攪拌し、次いで減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:DCM/MeOH30:1 15:1)で精製して、化合物32(2.3g)を薄黄色の油状物として得た。

LC-MS(方法1):Rt=1.41min;m/z(ES+)316.1(M+Na)⁺。

【0205】

ステップ2:tert-ブチルビス(2-(2-(トシルオキシ)エトキシ)エチル)カルバメート(33)の合成

化合物32(2.3g、7.85mmol)及びTEA(3.17g、31.4mmol)をDCM(40mL)に溶解し、次いでTsCl(4.49g、23.6mmol)をゆっくりと加えた。反応混合物を室温で18h攪拌し、次いで減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:PE/EA3:1)で精製して、化合物33(3.3g)を無色の油状物として得た。

LC-MS(方法4):Rt=1.88min;m/z(ES+)624.2(M+Na)⁺。

【0206】

ステップ3:ビス(2-(2-(トシルオキシ)エトキシ)エチル)アミン(34)の合成

化合物33(3.3g、5.49mmol)をDCM(9mL)に溶解し、反応混合物を0℃に冷却し、次いでこれにTFA(3mL)をゆっくりと加えた。反応混合物を室温で2h攪拌し、次いで減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。残渣をDCMに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウムで洗浄した。水相をDCM(10mL)で抽出し、合わせた有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、化合物34(2.5g)を無色の油状物として得た。粗生成物は、精製することなく次のステップでそのまま使用した。

【0207】

ステップ4:4-(ビス(2-(2-(トシルオキシ)エトキシ)エチル)アミノ)-4-オキソブタン酸(35)の合成

化合物34(2.5g、4.99mmol)をDCM(15mL)に溶解し、これにコハク酸無水物(0.75g、7.48mmol)及びDIPEA(1.93g、15.0mmol)を逐次的に加えた。反応混合物を室温で2h攪拌し、次いで水(20mL)で洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、無色の油状物を得た。さらなるシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製(溶出液:DCM/MeOH20:1)により化合物35(1.6g)を無色の油状物として得た。

LC-MS(方法4):Rt=1.64min;m/z(ES+)602.1(M+H)⁺。

【0208】

ステップ5:4-(ビス(2-(2-アジドエトキシ)エチル)アミノ)-4-オキソブタン酸(36)の合成

化合物35(1.6g、2.66mmol)をDMF(10mL)に溶解し、次いでこれにアジ化ナトリウム(0.52g、7.99mmol)を加えた。反応混合物を50℃で5h攪拌し、次いで減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:DCM/MeOH20:1)で精製して、化合物36(600mg)を無色の油状物として得た。

LC-MS(方法1):Rt=1.55min;m/z(ES+)344.1(M+H)⁺。

【0209】

ステップ6:4-(ビス(2-(2-アミノエトキシ)エチル)アミノ)-4-オキソブタン酸(37)の合成

化合物36(600mg、1.75mmol)をTHF(10mL)及び水(126μL)に溶解し、次いでこれにトリフェニルホスフィン(1.37g、5.25mmol)を加えた。反応混合物を室温で18h攪拌し、この間、フラスコの壁及び底に不溶性油状物が認められた。THFを慎重に除去し、無色の油状物をTHF(3mL×3)で洗浄し、次いで水(10mL)を加えた。溶液を凍結乾燥して、化合物37(500mg)を白色の固体として得た。

LC-MS(方法5):Rt=0.35、0.46min;m/z(ES+)292.1(M+H)⁺。

10

20

30

40

50

【0210】

ステップ7:化合物9の合成

化合物37(20mg、68 μ mol)及び化合物16(53mg、137 μ mol)をDMF(0.6mL)に溶解し、次いでこれにDIPEA(71mg、548 μ mol)を加えた。反応混合物を室温で2h攪拌し、次いでRP-HPLC(方法6:30%~60%B、8min 95%B、4)で精製して、化合物9(9mg)を白色の固体として得た。

LC-MS (方法2): Rt = 1.61 min; m/z (ES+) 840.0 (M+H)⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 7.83-7.79 (m, 2 H), 7.00 (s, 4 H), 6.97 (s, 4 H), 4.00-3.94 (m, 2 H), 3.79-3.74 (m, 2 H), 3.60-3.56 (m, 2 H), 3.50-3.47 (m, 4 H), 3.39 (s, 4 H), 3.36-3.29 (m, 4 H), 3.15-3.09 (m, 4 H), 2.55 (t, 2 H), 2.39 (t, 2 H), 2.21-2.14 (m, 2 H), 2.03-2.01 (m, 4 H), 1.95-1.88 (m, 2 H).

10

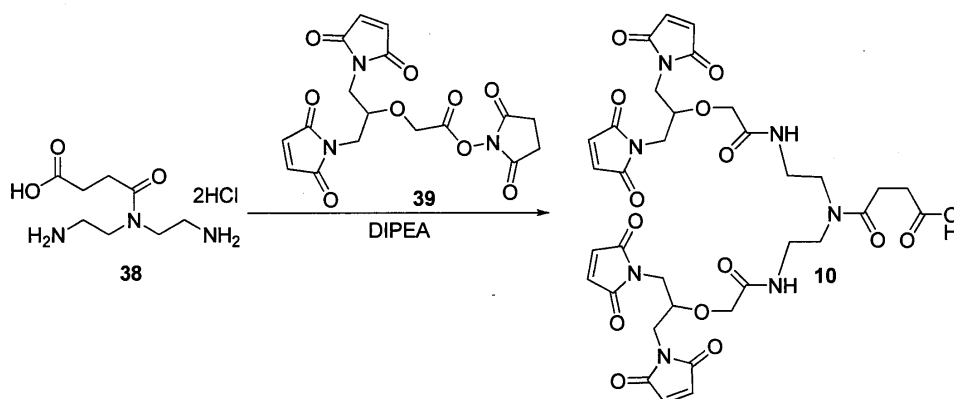
【0211】

(実施例10)

化合物10(リンカー10)の合成

【0212】

【化38】



20

【0213】

化合物38(15mg、54 μ mol、WO2014114207に従い調製)及び化合物39(44mg、108 μ mol、WO2014114207に従い調製)をDMF(0.6mL)に溶解し、次いでこれにDIPEA(28mg、216 μ mol)を加えた。反応混合物を室温で2h攪拌し、次いでRP-HPLC(方法6:37%~58%B、8min 95%B、4)で精製して、化合物10(15mg)を白色の固体として得た。

LC-MS (方法2): Rt = 1.63 min; m/z (ES+) 784.0 (M+H)⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 11.98 (br s, 1 H), 7.59 (t, 1 H), 7.44 (t, 1 H), 7.05 (s, 8 H), 3.88 (s, 2 H), 3.85 (s, 2 H), 3.82-3.77 (m, 2 H), 3.52-3.50 (m, 8 H), 3.29-3.19 (m, 6 H), 3.15-3.12 (m, 2 H), 2.49 (t, 2 H), 2.41 (t, 2 H).

30

【0214】

(実施例11)

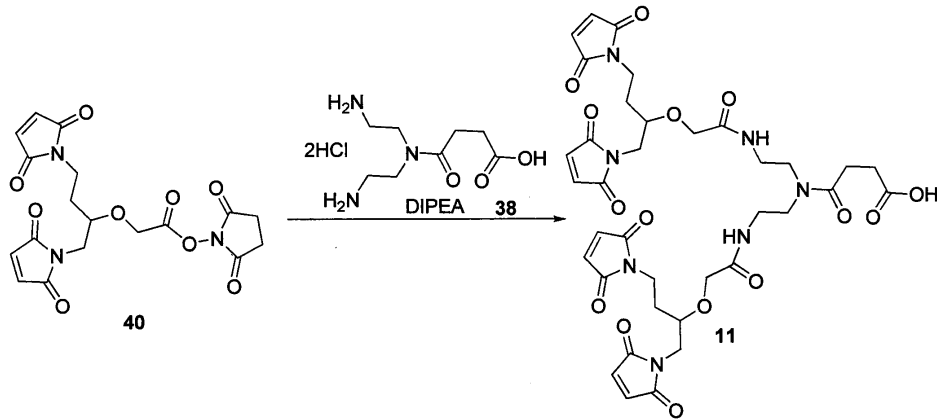
化合物11(リンカー11)の合成

【0215】

40

50

【化 3 9】



10

【 0 2 1 6】

化合物38(15mg、54 μ mol)及び化合物40(45mg、108 μ mol、WO2014114207に従い調製)をDMF(0.5mL)に溶解し、次いでこれにDIPEA(28mg、216 μ mol)を加えた。反応混合物を室温で2h攪拌し、次いで、RP-HPLC(方法6:38%~58%B、8min 95%B、4)で精製して化合物11(14mg)を白色の固体として得た。

20

LC-MS (方法2): Rt = 1.65 min; m/z (ES+) 812.0 (M+H)⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 12.01 (br s, 1 H), 7.75 (t, 1 H), 7.62 (t, 1 H), 7.04 (s, 4 H), 7.00 (s, 4 H), 4.02-3.95 (m, 2 H), 3.84-3.79 (m, 2 H), 3.58-3.45 (m, 10 H), 3.33-3.19 (m, 8 H), 2.53 (t, 2 H), 2.40 (t, 2 H), 1.66-1.56 (m, 4 H).

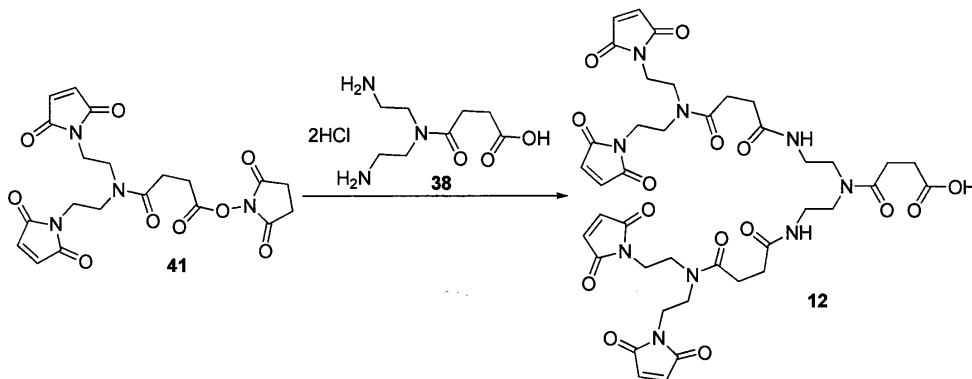
【 0 2 1 7】

(実施例12)

化合物12(リンカー12)の合成

【 0 2 1 8】

【化 4 0】



30

40

【 0 2 1 9】

化合物38(15mg、54 μ mol)及び化合物41(50mg、108 μ mol、WO2014114207に従い調製)をDMF(0.5mL)に溶解し、次いでこれにDIPEA(28mg、216 μ mol)を加えた。反応混合物を室温で2h攪拌し、次いでRP-HPLC(方法6:35%~60%B、8min 95%B、4 min)で精製して、化合物12(14mg)を白色の固体として得た。

LC-MS (方法2): Rt = 1.58 min; m/z (ES+) 894.0 (M+H)⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 7.97 (t, 1 H), 7.82 (t, 1 H), 7.04 (s, 4 H), 6.96 (s, 4 H), 3.58 (t, 4 H), 3.52 (t, 4 H), 3.39-3.38 (m, 8 H), 3.29 (t, 2 H), 3.23

50

(t, 2 H), 3.19-3.16 (m, 2 H), 3.12-3.08 (m, 2 H), 2.51-2.50 (m, 2 H), 2.41 (t, 2 H), 2.35-2.32 (m, 4 H), 2.23-2.18 (m, 4 H).

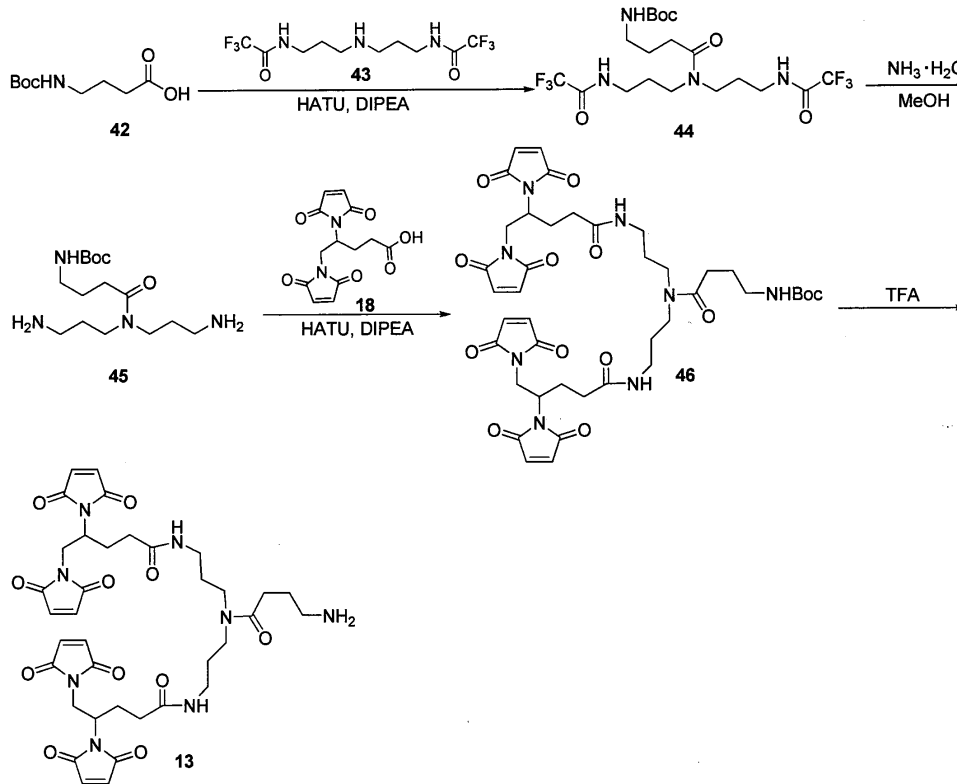
【 0 2 2 0 】

(実施例13)

化合物13(リンカー13)の合成

【 0 2 2 1 】

【 化 4 1 】



10

20

30

【 0 2 2 2 】

ステップ1:tert-ブチル4-(ビス(3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)プロピル)アミノ)-4-オキソブチルカルバメート(44)の合成

4-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)ブタン酸(42)(203mg、1.0mmol、US2015/111864に従い調製)及びビス(3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)プロピル)アミン(43)(388mg、1.2mmol、WO2006/20779に従い調製)をDMF(3mL)に溶解し、次いでこれにHATU(456mg、1.2mmol)及びDIPEA(258mg、2mmol)を加えた。反応混合物を室温で3h攪拌し、次いで濃縮した。残渣をRP-HPLC(方法6:45%~75%B、8min 95%B、4min)で精製して、化合物44(250mg)を無色のコロイド状固体として得た。

40

LC-MS (方法1): Rt = 1.81 min; m/z (ES+) 409.0 (M+H)⁺.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 8.34 (br s, 1 H), 7.949 (s, 1 H), 5.03 (br s, 1 H), 3.42-3.30 (m, 4 H), 3.30-3.17 (m, 4 H), 3.09 (s, 2 H), 2.39-2.27 (m, 2 H), 1.91-1.82 (m, 2 H), 1.82-1.73 (m, 2 H), 1.73-1.63 (m, 2 H), 1.37 (s, 9 H).

【 0 2 2 3 】

ステップ2及び3:tert-ブチル4-(ビス(3-(4,5-ビス(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンタンアミド)プロピル)アミノ)-4-オキソブチルカルバメート(46)の合成

化合物44(20mg、39μmol)をメタノール(1mL)に溶解し、次いでこれにアンモニア水(28%、1mL)を加えた。反応混合物を4h還流し、次いで濃縮して、溶媒を除去した。残渣を再度メタノールに溶解し、濃縮した(3回繰り返し)。

50

【0224】

こうして得た中間体45をDMF(1mL)及びDCM(1mL)に溶解し、次いでこれに化合物18(35mg、0.12mmol)、HATU(60mg、0.158mmol)及びDIPEA(30mg、0.23mmol)を逐次的に加えた。反応混合物を室温で2h攪拌し、次いで濃縮して、溶媒を除去した。残渣をRP-HPLC(方法6:50%~80%B、8min 95%B、4min)で精製して、化合物46(20mg)を白色の固体として得た。

LC-MS (方法3): Rt = 1.33 min; m/z (ES+) 865.5 (M+H)⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 7.81 (t, 1 H), 7.72 (t, 1 H), 7.00 (s, 4 H), 6.98 (s, 2 H), 6.97 (s, 2 H), 6.80 (t, 1 H), 4.02-3.94 (m, 2 H), 3.82-3.73 (m, 2 H), 3.64-3.54 (m, 2 H), 3.24-3.10 (m, 4 H), 3.05-2.85 (m, 6 H), 2.26-2.12 (m, 4 H), 2.08-1.86 (m, 6 H), 1.63-1.43 (m, 6 H), 1.37 (s, 9 H).

10

【0225】

ステップ4:化合物13の合成

化合物46(20mg、23 μmol)をDCM(3mL)に溶解し、次いでこれにTFA(1mL)を加えた。反応混合物を室温で1h攪拌し、次いで濃縮して、溶媒を除去した。残渣をRP-HPLC(方法6:30%~60%B、8min 95%B、4min)で精製して、化合物13をTFA塩形態(10mg)で白色の固体として得た。

LC-MS (方法2): Rt = 1.46 min; m/z (ES+) 765.0 (M+H)⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 7.83 (t, 1 H), 7.78-7.68 (m, 4 H), 7.01 (s, 4 H), 6.99 (s, 2 H), 6.98 (s, 2 H), 4.02-3.94 (m, 2 H), 3.82-3.74 (m, 2 H), 3.63-3.55 (m, 2 H), 3.19 (t, 4 H), 3.06-2.88 (m, 4 H), 2.86-2.77 (m, 2 H), 2.37 (t, 2 H), 2.26-2.12 (m, 2 H), 2.09-1.87 (m, 6 H), 1.80-1.71 (m, 2 H), 1.64-1.46 (m, 4 H).

20

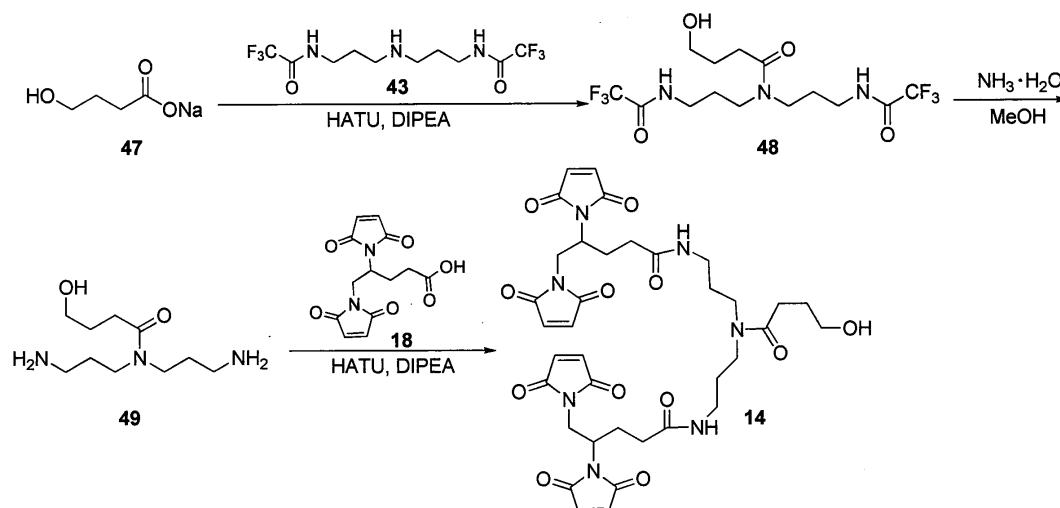
【0226】

(実施例14)

化合物14(リンカー14)の合成

【0227】

【化42】



30

40

【0228】

ステップ1:4-ヒドロキシ-N,N-ビス(3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)プロピル)ブタンアミド(48)の合成

ナトリウム4-ヒドロキシブタノエート(47)(126mg、1.0mmol、WO2014/152127に従い調製)及びビス(3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)プロピル)アミン43(388mg、1.2mmol)をDMF(3mL)に溶解し、次いでこれにHATU(456mg、1.2mmol)及びDIPEA(258mg、2mmol)を加えた。反応混合物を室温で3h攪拌し、次いで濃縮した。残渣をRP-HP

50

LC(方法6:40%~70%B、8min 95%B、4min)で精製して、化合物48(68mg)を無色のコロイド状固体として得た。

LC-MS (方法5): $R_t = 1.55$ min; m/z (ES+) 410.0 (M+H)⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 9.48 (t, 1 H), 9.37 (t, 1 H), 3.39 (t, 2 H), 3.31-3.05 (m, 8 H), 2.29 (t, 2 H), 1.81-1.70 (m, 2 H), 1.70-1.57 (m, 4 H).

【0229】

ステップ2,3:化合物14の合成

化合物48(20mg、49 μmol)をメタノール(1mL)に溶解し、次いでこれにアンモニア水(28%、1mL)を加えた。反応混合物を2h還流させ、次いで濃縮して、溶媒を除去した。残渣をメタノールに再度溶解し、濃縮し、このようなプロセスを3回繰り返した。

10

【0230】

こうして得た中間体49をDMF(1mL)及びDCM(1mL)に溶解し、次いでこれに化合物18(43mg、0.15mmol)、HATU(74mg、0.20mmol)及びDIPEA(38mg、0.29mmol)を逐次的に加えた。反応混合物を室温で2h攪拌し、次いで濃縮して、溶媒を除去した。残渣をRP-HPLC(方法6:35%~65%B、8min 95%B、4min)で精製して、化合物14(5mg)を白色の固体として得た。

LC-MS (方法2): $R_t = 1.62$ min; m/z (ES+) 765.9 (M+H)⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 7.82 (t, 1 H), 7.72 (t, 1 H), 7.00 (s, 4 H), 6.98 (s, 2 H), 6.97 (s, 2 H), 4.02-3.94 (m, 2 H), 3.82-3.73 (m, 2 H), 3.62-3.56 (m, 2 H), 3.37 (t, 2 H), 3.24-3.13 (m, 4 H), 3.03-2.87 (m, 4 H), 2.26 (t, 2 H), 2.23-2.13 (m, 2 H), 2.08-1.87 (m, 6 H), 1.68-1.43 (m, 6 H).

20

【0231】

(実施例15)

テトラマレイミドリンカー薬物(1-vcMMAE)の合成

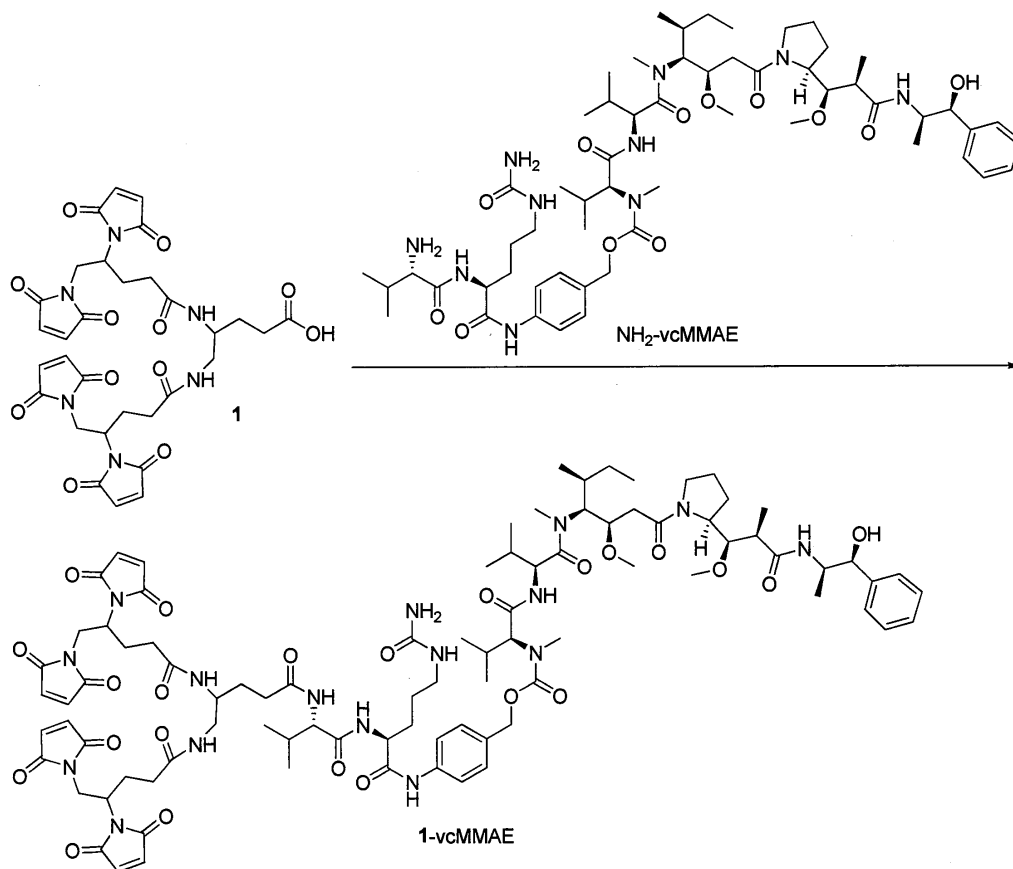
【0232】

30

40

50

【化43】



【0233】

化合物1(4.1mg、6 μ mol)及びNH₂-vcMMAE(TFA塩, 6.7mg、6 μ mol、WO2013/173337に従い調製)をDMF(300 μ L)に溶解し、次いでこれにDIPEA(2.3mg、9 μ mol)及びHATU(3.4mg、9 μ mol)を逐次的に加えた。反応混合物を室温で18h攪拌し、次いで

prep-RP-HPLC(方法6:45%~75%B、8min 95%B、4min)で精製して、化合物1-vcMMAE(4.8mg)を白色の粉末として得た。

LC-MS(方法2):R_t=1.84min;m/z(ES⁺)892.8[1/2(M+2H)]⁺。

【0234】

(実施例16)

他のテトラレイミドリンカー薬物の合成

化合物1をリンカー化合物2-12で置き換えたことを除いて、実施例15の1-vcMMAEに対する方法と類似の方法を介して、他のテトラレイミドリンカー薬物を合成した。リンカー薬物及びこれらの特徴付けデータをTable 1(表2)に列挙したが、この中でリンカー薬物2-vcMMAE~12-vcMMAEは、テトラレイミドリンカー化合物2~12に従い命名した

【0235】

【表 2】

表 1 本発明のリンカー薬物及びこれらの特徴付け

化合物	LC-MS 方法; R _t (min); m/z 1/2[M+2H] ⁺
2-vcMMAE	2; 1.90; 900.9
3-vcMMAE	2; 2.02; 903.5
4-vcMMAE	4; 1.56; 908.9
5-vcMMAE	2; 1.82; 935.3
6-vcMMAE	2; 1.95; 936.0
7-vcMMAE	2; 1.95; 943.1
8-vcMMAE	2; 1.87; 947.3
9-vcMMAE	4; 1.55; 973.0
10-vcMMAE	4; 1.56; 945.5
11-vcMMAE	4; 1.57; 959.0
12-vcMMAE	4; 1.53; 1000.5

10

20

【0236】

(実施例 17)

抗体薬物コンジュゲートの調製及び特徴付け

トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP、10当量、ストック溶液10mM)を抗体H(IgG1)溶液(2~10mg/mL、25mMホウ酸-ホウ酸ナトリウム緩衝液、25mM NaCl及び1mMジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)を含有、pH7.0~8.0)に加えた。振盪機内で、反応混合物を37℃で2hインキュベートし、次いで約10℃に冷却し、これに続いて、限外濾過法(Merck Millipore Amicon(登録商標)Ultra、50000 MWCO)又はゲル濾過を介して、PBS緩衝液(100 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄、100mM NaCl、1mM DTPA、pH7.0~8.0)との緩衝液交換を行った。溶液を10℃で冷却し、これに、DMSO及び実施例15で調製した化合物1-vcMMAE(DMSO中ストック溶液、3~6当量)を逐次的に加え、DMSOの容量パーセントを約15%に制御した。コンジュゲーション反応を10℃で0.5h行った。

30

【0237】

過剰のシステイン溶液を反応混合物に加えて、未反応の化合物1-vcMMAEをクエンチし、クエンチ反応を10℃で30min保持した。反応混合物を限外濾過(Merck Millipore Amicon(登録商標)Ultra、50000 MWCO)又はゲル濾過して、過剰の1-vcMMAE-システイン付加体及び過剰のシステインを除去した。0.22µmフィルター(Merck Millex-GVフィルター)を介して、濾液を無菌化濾過し、こうして得たコンジュゲートH-1-vcMMAEの溶液を4℃で保持した。

40

【0238】

化合物1-vcMMAEを化合物2-vcMMAE~12-vcMMAEで置き換えたことを除いて、上記と同法に従い、コンジュゲートH-2-vcMMAE~H-12-vcMMAEを抗体Hから調製した。化合物1-vcMMAEを化合物7-vcMMAEで置き換えたことを除いて、上記と同法に従い、コンジュゲートP-7-vcMMAEを抗体Pから調製した。

【0239】

1)平均DARの決定

平均DARをUV吸収方法で測定した(Clin. Cancer Res. 2004、10、7063~7070頁; WO2011/039721)。サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)カラム(TSKgel G3000SWX

50

L、7.8*300mm、Tosoh Bioscience Shanghai社)を有するAgilent 1100HPLCを使用した。

【0240】

$$\text{DAR} = (\text{Ab}_{248} \cdot R^*_{\text{Ab}_{280}}) / (R^*_{\text{D}_{280}} \cdot \text{D}_{248})$$

(式中、 Ab_{248} 及び Ab_{280} は、それぞれ248nm及び280nmにおける抗体に対するモル吸光係数である)。 D_{280} 及び D_{248} はatそれぞれ248nm及び280nmにおけるvcMMAEに対するモル吸光係数である。 $R = A_{248}/A_{280}$ (式中、 A_{248} 及び A_{280} は、それぞれ248nm及び280nmにおけるADCの吸光度である(SECスペクトル上のモノマーのピーク領域を使用して、本発明での吸光度を表した)。

【0241】

本発明のADCの平均DARをTable 2(表3)に列挙した。

【0242】

【表3】

表2 本発明のADCの平均DARの結果(リンカー薬物の抗体に対する当量比は3であった)

ADC	平均DAR	ADC	平均DAR
H-1-vcMMAE	1.99	H-7-vcMMAE	1.99
H-2-vcMMAE	1.99	H-8-vcMMAE	N/A
H-3-vcMMAE	N/A	H-9-vcMMAE	1.96*
H-4-vcMMAE	1.96	H-10-vcMMAE	2.46*
H-5-vcMMAE	2.05	H-11-vcMMAE	2.75
H-6-vcMMAE	1.88	H-12-vcMMAE	2.51
P-7-vcMMAE	2.20*&		

N/A:該当なし。

*:リンカー薬物の抗体に対する当量比は4であった。

&:DARはHIC方法から計算した、参考文献Anal. Chem. 2013、85、1699~1704頁を参照されたい。

【0243】

Table 2(表3)に示されている通り、本発明のADCの平均DARは、2の周辺でうまく制御することができたが、これは、本発明の部位特異的なリンカーによる正確な部位及び数の制御によるものである。

【0244】

2)天然MS

8µLのPNGase F(New England Biolabs社、USA)を400µgのコンジュゲートH-5-vcMMAEに加え、混合物を37℃で終夜(15h)インキュベートした。脱グリコシル化したADC試料を酢酸アンモニウム緩衝液(20mM、pH7.0)で緩衝液交換し、この緩衝液交換手順を5回繰り返した。

【0245】

使用した質量分析器は高分解能Orbitrap Exactive Plus EMR(Thermo Fisher Scientific社、Germany)であり、イオン源はTriVersa NanoMate(登録商標)(Advion社、USA)であった。試料濃度を2µg/µLに調節し、直接注入を採用した。質量データを陽性イオンモード下で収集し、タンパク質デコンボリューション4.0ソフトウェア(Thermo Fisher Scientific社、Germany)で天然質量データを分析した。

【0246】

コンジュゲートH-5-vcMMAEの天然MSスペクトルを図1に示した。これは、DAR=2が生成物の主成分であったことを示している。

【0247】

3)SDS-PAGE

XCell SureLock(登録商標)Mini-Cellタンパク質電気泳動装置(Thermal Fisher社)上でNuPAGE(商標)、4~12%、Bis-Tris Gel(Thermal Fisher社)を使用してSDS-PAGEを測定した。試料(10 μ g質量)をローディングバッファーと合わせ、混合物を水槽内で、70 $^{\circ}$ Cで10min加熱した。試料及び標準的なタンパク質(5 μ L/穴)をスパーサーゲルコームホールに逐次的に加え、電気泳動を220Vで50min行った。ゲルを除去し、脱イオン水ですすぎ、次いで、振盪機上で3h、SimplyBlue(商標)SafeStain(Thermal Fisher社)で着色した。着色したゲルを脱イオン水で3回すすぎ、振盪機上で4h脱染した。脱染したゲルを撮影装置に移し、ゲルの画像を記録した。

10

【0248】

SDS-PAGEの結果は図2a~2bに示されており、これは、試料H-1-vcMMAE~H-12-vcMMAE中の主成分が全抗体HLL(全ADC)及びハーフ抗体HL(全ADCが重鎖相互作用を失った)であったことを示している。結果は、本発明のテトラレイミドリンカーは、還元された抗体の鎖間を架橋することができ、よって抗体(DAR)1つ当たりの薬物の数を効果的に制御することができることを証明している。

【0249】

4)疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)分析

HICをAgilent 1100クロマトグラフで測定した。TSKgelブチル-NPRカラム(4.6 \times 35mm、2.5 μ m、Tosoh Bioscience Shanghai社)を固定相として適用した。本方法は、100%緩衝液A(50mMリン酸カリウム(pH7.0)+1.5M硫酸アンモニウム)から100%緩衝液B(80% v/v50mMリン酸ナトリウム(pH7.0)、20% v/vイソプロパノール)への25分間にわたる線型勾配からなつた。流速は0.8mL/minであり、カラム温度は30 $^{\circ}$ Cであり、検出波長は230及び280nmであった。

20

【0250】

HIC分析結果は図3a~3mに示されており、ADC試料(H-1-vcMMAE~H-12-vcMMAE、及びP-7-vcMMAE)の主成分はDAR=2構成成分であることを示している。結果は、本発明のテトラレイミドリンカーを使用して、ADC生成物のDAR及び分布を効果的に制御することができたことを証明している。

30

【0251】

試験実施例1

酵素結合免疫吸着法(ELISA)による本発明のADCの抗原結合能力の決定

間接的なELISAを使用して、対応する抗原に対する抗体又は抗体薬物コンジュゲートの結合能力を分析した。Her2抗原をコーティングで固相サポート(96ウェルマイクロプレート)上に固定化して、固相抗原を形成し、次いで未結合の抗原を洗浄により除去した。試験抗体又は抗体薬物コンジュゲートの段階希釈を加え、ここで、特定の抗体又は抗体薬物コンジュゲートが抗原に結合し、固相抗原-抗体複合体を形成した。固相抗原に未結合の抗体又は抗体薬物コンジュゲートを洗浄により除去した。酵素標識した抗-抗体を加えて、上記で形成された複合体に結合させた。洗浄後、基質溶液を加え、光学密度をマイクロプレートリーダーで、450nm/630nmで読み取り、これに基づいて、曲線を描き、EC₅₀を計算した。

40

【0252】

本発明のADCのHer2抗原への結合能力をTable 3(表4)に列挙した。

【0253】

50

【表 4】

表 3 本発明の ADC の Her2 抗原への結合能力

ADC	EC ₅₀ (ng/mL)	ADC	EC ₅₀ (ng/mL)
H	33.5		
H-1-vcMMAE	14.5	H-7-vcMMAE	34.0
H-2-vcMMAE	15.7	H-8-vcMMAE	28.9
H-3-vcMMAE	33.2	H-9-vcMMAE	25.8
H-4-vcMMAE	15.7	H-10-vcMMAE	36.6
H-5-vcMMAE	25.9	H-11-vcMMAE	38.1
H-6-vcMMAE	19.1	H-12-vcMMAE	33.8

【 0 2 5 4 】

Table 3(表4)に示されている通り、裸の抗体と比較して、テトラマレイミドリンカーから調製したADCの抗原への結合能力は著しい差異を示さない。

【 0 2 5 5 】

試験実施例 2

本発明のADCの細胞増殖阻害

細胞増殖アッセイ

抗体又はADCの細胞増殖阻害を以下の方法で測定する。腫瘍関連抗原又は受容体タンパク質(このアッセイでは乳がん細胞、SK-BR-3を発現するHer2を使用した)を発現する哺乳動物細胞を8000個の細胞/ウェルの濃度で96-ウェルプレートに播種し、細胞をDMEM(GIBCO)に懸濁させた。最初のADC濃度は2 µg/mLであり、これを、2%FBS(GIBCO)を含有するDMEMで3倍勾配希釈した。最初の細胞培養物培地を除去し、200 µLのADCを各ウェルに加えた。細胞を72hインキュベートし、培地を除去した。100 µLのCCK-8を加え、この後30minのインキュベーションを続けた。吸収を450nm/630nmで、マイクロプレートリーダーで読み取り、これに基づき、曲線を描き、IC₅₀を計算した。

【 0 2 5 6 】

本発明のADCの細胞増殖阻害結果をTable 4(表5)に列挙した。

【 0 2 5 7 】

【表 5】

表 4 本発明の ADC の細胞増殖阻害結果

ADC	IC ₅₀ (ng/mL)	ADC	IC ₅₀ (ng/mL)
H-1-vcMMAE	5.1	H-7-vcMMAE	8.8
H-2-vcMMAE	7.9	H-8-vcMMAE	9.1
H-3-vcMMAE	7.7	H-9-vcMMAE	5.1
H-4-vcMMAE	8.8	H-10-vcMMAE	6.3
H-5-vcMMAE	8.6	H-11-vcMMAE	6.1
H-6-vcMMAE	9.4	H-12-vcMMAE	7.4
P-7-vcMMAE	8.8		

10

20

30

40

50

【 0 2 5 8 】

Table 4(表5)は、本発明のADCが優れた細胞増殖阻害活性を有することを示している。

【 0 2 5 9 】

本出願に記述されているすべての参考文献は、それぞれ個々の参考文献が個々に参照により組み込まれていると同程度に、参照により本明細書に組み込まれている。加えて、本発明を読んだ後、当業者は本発明に対する様々な変更又は修正を行うことができ、これらの同等の形態もまた本出願の添付の特許請求の範囲で定義された範囲内に入ることを理解されたい。

10

20

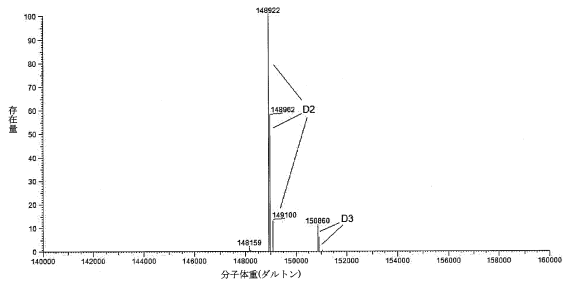
30

40

50

【図面】

【図 1】



【図 2 a】

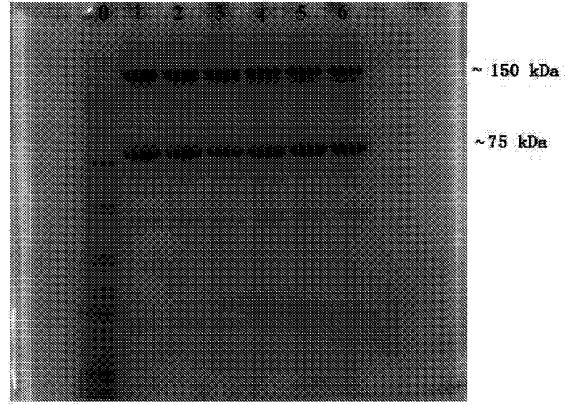


Figure 2a

10

【図 2 b】

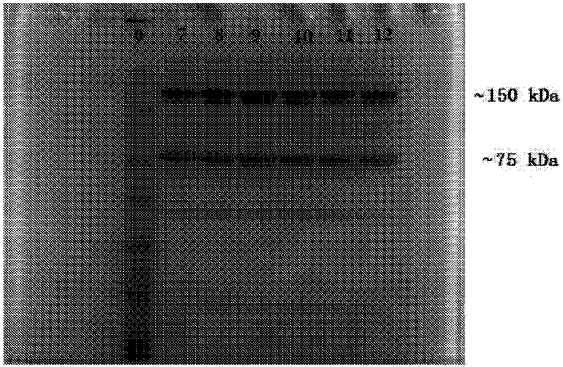
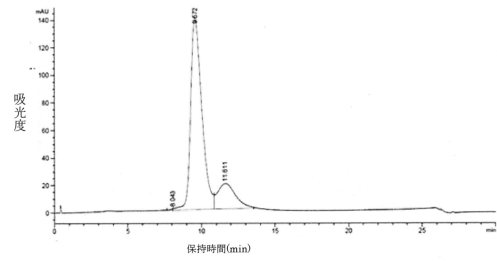


Figure 2b

【図 3 a】



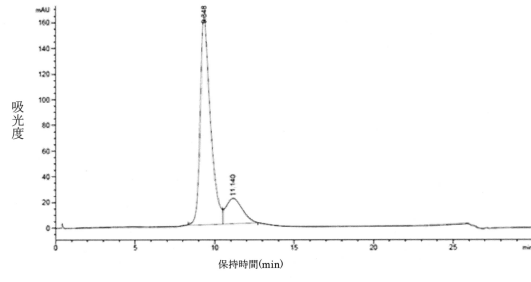
20

30

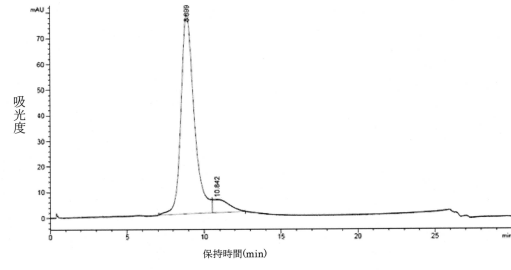
40

50

【図 3 b】

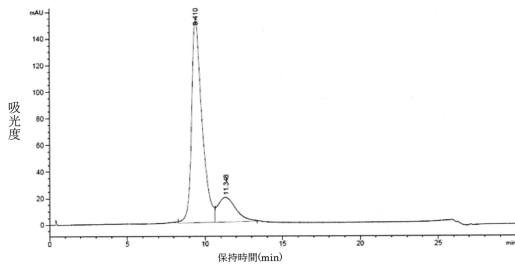


【図 3 c】

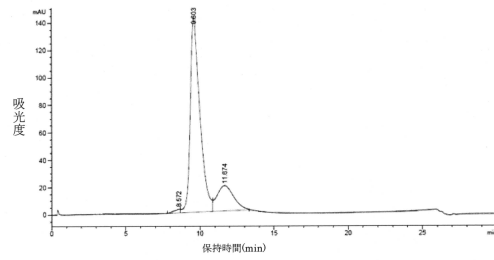


10

【図 3 d】

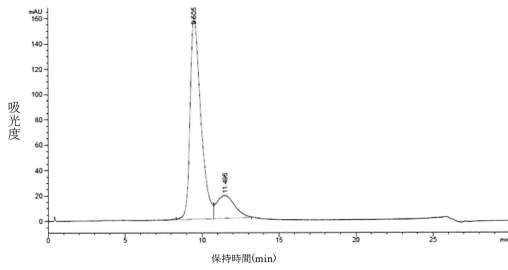


【図 3 e】

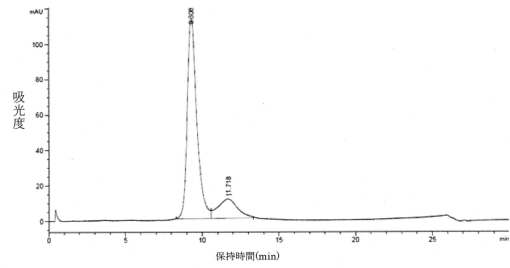


20

【図 3 f】



【図 3 g】

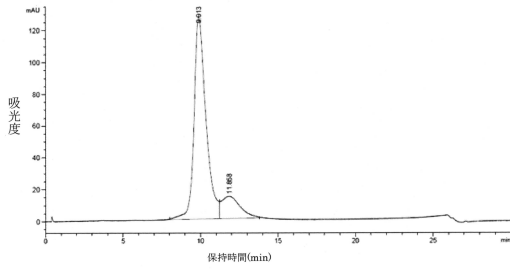


30

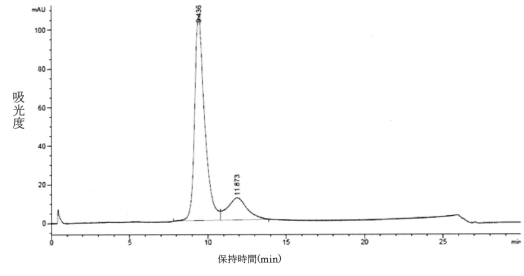
40

50

【 3 h 】

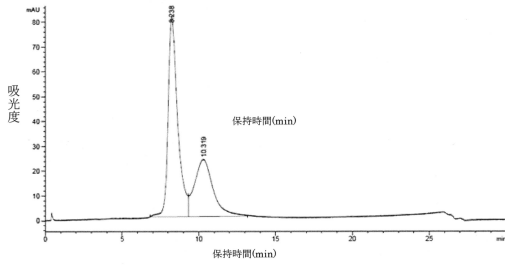


【 3 i 】

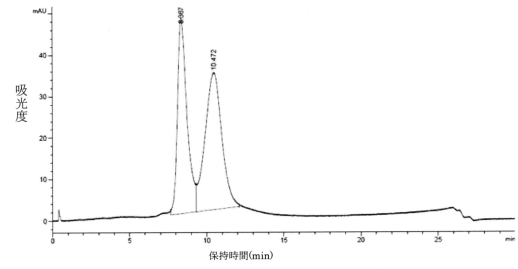


10

【 3 j 】

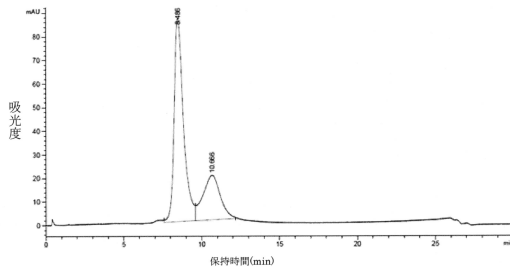


【 3 k 】

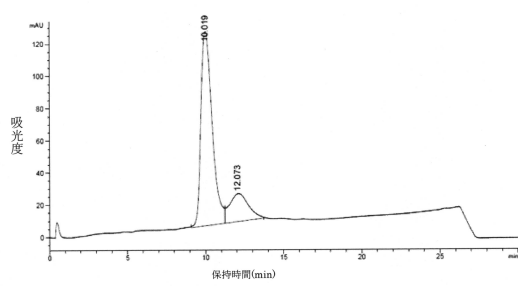


20

【 3 l 】



【 3 m 】



30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I			
C 0 7 D	207/452 (2006.01)	C 0 7 D	207/452	C S P	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y	

ハイ・ブドン・ニュー・ディストリクト・ハレイ・ロード・1011・ビルディング・9・スイート・101

(72)発明者

ニアンヘ・ハン

中華人民共和国・201203・シャンハイ・ブドン・ニュー・ディストリクト・ハレイ・ロード・1011・ビルディング・9・スイート・101

(72)発明者

ベン・ズ

中華人民共和国・201203・シャンハイ・ブドン・ニュー・ディストリクト・ハレイ・ロード・1011・ビルディング・9・スイート・101

(72)発明者

ディ・ゼン

中華人民共和国・201203・シャンハイ・ブドン・ニュー・ディストリクト・ハレイ・ロード・1011・ビルディング・9・スイート・101

(72)発明者

バオシャン・ワン

中華人民共和国・201203・シャンハイ・ブドン・ニュー・ディストリクト・ハレイ・ロード・1011・ビルディング・9・スイート・101

(72)発明者

フアリ・リ

中華人民共和国・201203・シャンハイ・ブドン・ニュー・ディストリクト・ハレイ・ロード・1011・ビルディング・9・スイート・101

(72)発明者

チュン・ヤン

中華人民共和国・201203・シャンハイ・ブドン・ニュー・ディストリクト・ハレイ・ロード・1011・ビルディング・9・スイート・101

審査官 伊佐地 公美

(56)参考文献

特開2006-321754(JP,A)
 米国特許出願公開第2016/0015832(US,A1)
 国際公開第2016/192528(WO,A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 D
 C 0 7 K
 A 6 1 P
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)