

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5690589号  
(P5690589)

(45) 発行日 平成27年3月25日 (2015. 3. 25)

(24) 登録日 平成27年2月6日 (2015. 2. 6)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 47/48 (2006. 01)

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 47/42 (2006. 01)

A 6 1 K 47/42

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 49/00 (2006. 01)

A 6 1 K 49/00

A

A 6 1 K 51/00 (2006. 01)

A 6 1 K 49/02

請求項の数 33 (全 131 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-515048 (P2010-515048)  
 (86) (22) 出願日 平成20年6月25日 (2008. 6. 25)  
 (65) 公表番号 特表2010-531363 (P2010-531363A)  
 (43) 公表日 平成22年9月24日 (2010. 9. 24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/068093  
 (87) 国際公開番号 W02009/002993  
 (87) 国際公開日 平成20年12月31日 (2008. 12. 31)  
 審査請求日 平成23年5月12日 (2011. 5. 12)  
 (31) 優先権主張番号 60/946, 092  
 (32) 優先日 平成19年6月25日 (2007. 6. 25)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/036, 186  
 (32) 優先日 平成20年3月13日 (2008. 3. 13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 508347801  
 エンドサイト・インコーポレイテッド  
 ENDOCYTE, INC.  
 アメリカ合衆国47906インディアナ州  
 ウェスト・ラファイエット、スウィート・エ  
 イ1-100、セント・アベニュー300  
 O番  
 (74) 代理人 110000176  
 一色国際特許業務法人  
 (72) 発明者 リーモン, クリストファー, ポール  
 アメリカ合衆国・インディアナ州 479  
 06・ウェスト ラファイエット・ファーム  
 リッジ ロード 5830

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 親水性スパーサーリンカーを含有する結合体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記式：



〔式中、Bは、標的細胞受容体に結合する1つ以上の葉酸受容体結合リガンドを表し、Lは、3つのポリヒドロキシル基を含む多価リンカーであり、そしてAは、望ましくは細胞に送達される、1つ以上の診断、治療又は画像化剤を表す〕

で示される化合物。

## 【請求項 2】

薬剤Aのうちの少なくとも1つが、治療剤、診断剤又は画像化剤である、請求項1に記載の化合物。

10

## 【請求項 3】

薬剤Aのうちの少なくとも1つが、癌を治療するための治療剤である、請求項1に記載の化合物。

## 【請求項 4】

Aが、癌を治療するための複数の治療剤を表す、請求項1に記載の化合物。

## 【請求項 5】

結合リガンドBが、葉酸である、請求項1に記載の化合物。

## 【請求項 6】

Lが、1つ以上のアスパラギン酸、1つ以上のグルタミン酸、1つ以上のアルギニン、

20

若しくは1つ以上のベータアミノアラニン、又はそれらの組み合わせをさらに含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項7】

Lが1つ以上のベータアミノアラニンをさらに含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項8】

Lが1つ以上の二価1,4-ピペラジンをさらに含み、1,4-ピペラジンの少なくとも一部が、結合リガンド(B)のうちの少なくとも1つと薬剤(A)のうちの少なくとも1つとを連結する原子の鎖に含まれている、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

10

【請求項9】

Lが少なくとも1つのアルギニンをさらに含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項10】

Lが1つ以上のトリアゾール結合ポリヒドロキシル基含有リンカーをさらに含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項11】

Lが1つ以上のアミド結合ポリヒドロキシル基含有リンカーをさらに含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項12】

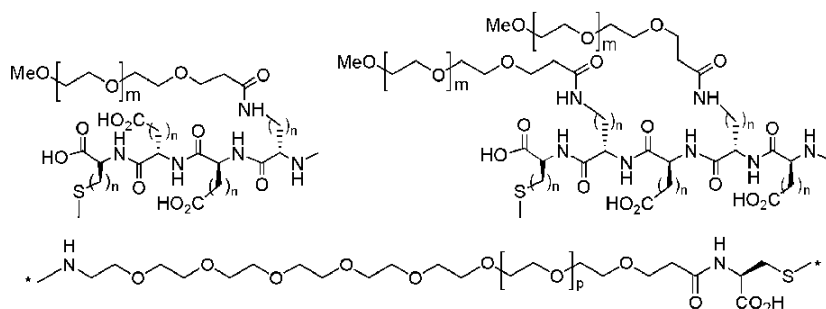
Lが1つ以上のEDTA誘導体をさらに含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

20

【請求項13】

Lが、下記からなる群より選択される式：

【化1】



30

〔式中、mは、それぞれの場合に1～8から独立して選択される整数であり、pは、それぞれの場合に1～10から選択される整数であり、そしてnは、それぞれの場合に1～3から独立して選択される整数である〕

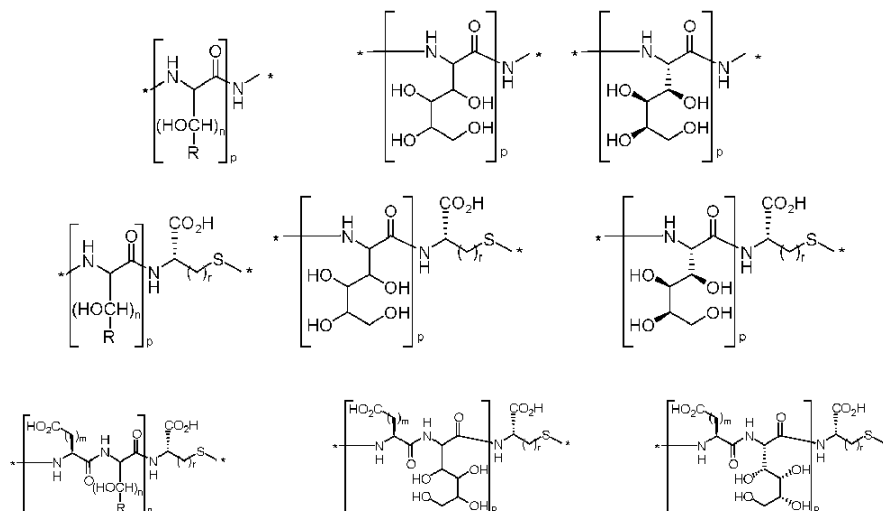
をさらに含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項14】

3つのポリヒドロキシル基が、下記からなる群：

40

## 【化 2】



10

〔式中、Rは、H、アルキル、シクロアルキル又はアリーラルキルであり、mは、それぞれの場合に1～3から独立して選択される整数であり、nは、1～5から選択される整数であり、pは、1～5から選択される整数であり、そしてrは、1～3から選択される整数である〕

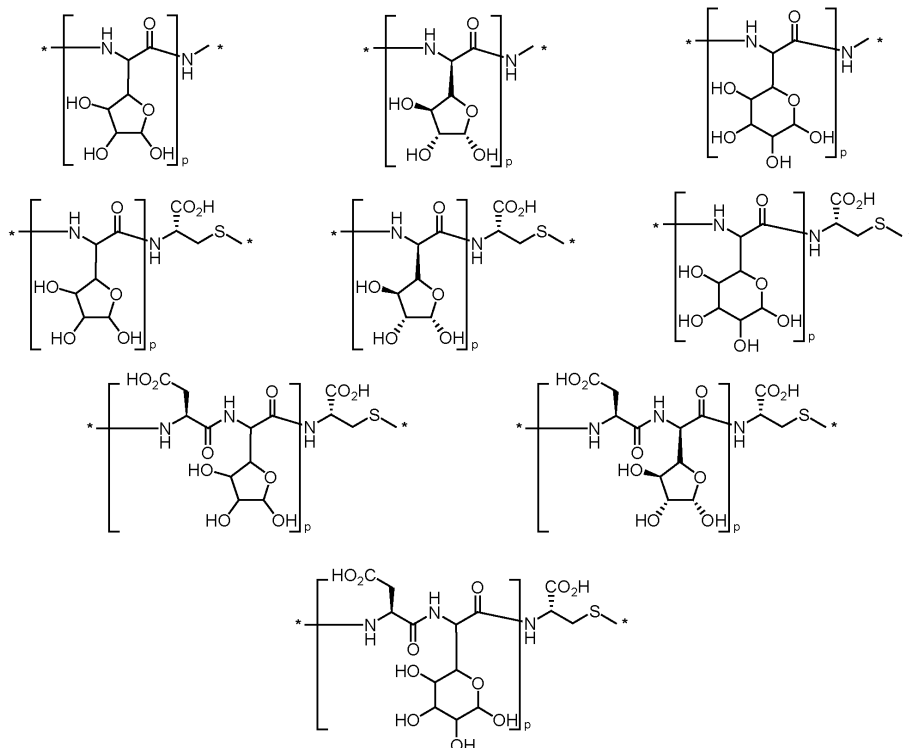
より選択される、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

20

## 【請求項 1 5】

3つのポリヒドロキシル基が、下記からなる群：

## 【化 3】



30

〔式中、pは1～5から選択される整数である〕

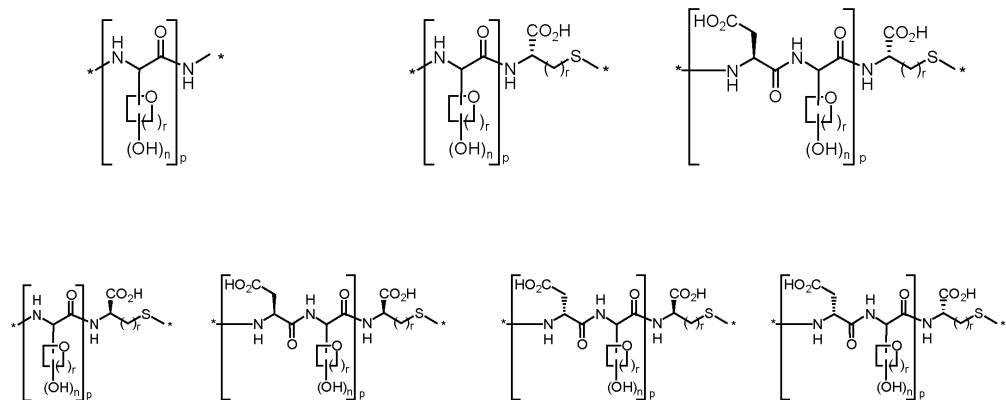
より選択される、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

## 【請求項 1 6】

3つのポリヒドロキシル基が、下記からなる群：

40

## 【化 4】



10

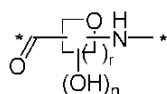
〔式中、 $n$ は、それぞれの場合に 2 ～ 5 から独立して選択される整数であり、 $p$ は、1 ～ 5 から選択される整数であり、そして $r$ は、それぞれの場合に 1 ～ 4 から独立して選択される整数であり、ただし、 $n$ は $r + 1$ 以下である〕

より選択される、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

## 【請求項 17】

3つのポリヒドロキシル基が、下記からなる群：

## 【化 5】



20

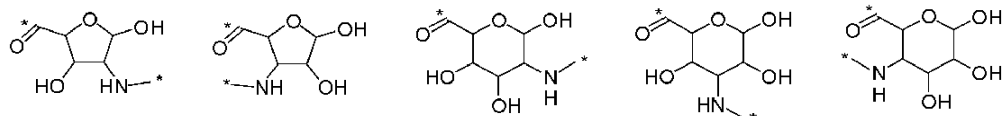
〔式中、 $n$ 及び $r$ は、それぞれ、1 ～ 3 から選択される整数であり、ただし、 $n$ は $r$ 以下である〕

より選択される、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

## 【請求項 18】

3つのポリヒドロキシル基が、下記からなる群：

## 【化 6】



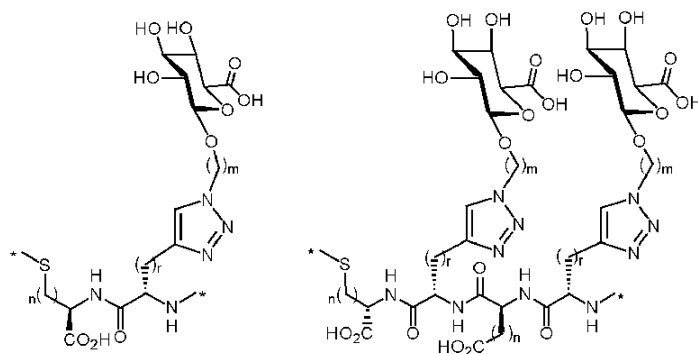
30

より選択される、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

## 【請求項 19】

3つのポリヒドロキシル基が、下記からなる群：

## 【化 7】



40

〔式中、 $n$ 、 $m$ 及び $r$ は、整数であり、それぞれ独立して、それぞれの場合に 1 ～ 5 から選択される〕

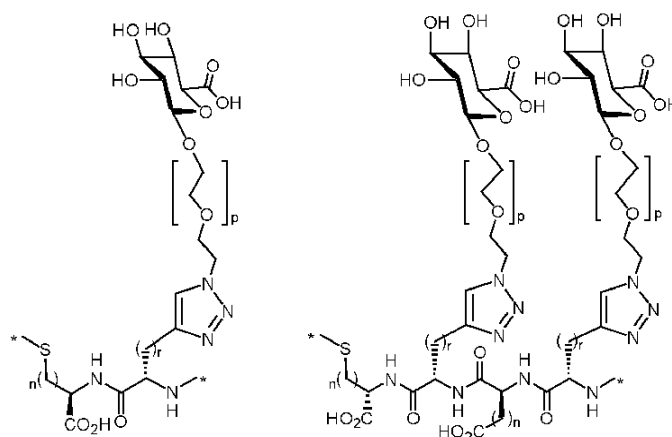
より選択される、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

## 【請求項 20】

50

3つのポリヒドロキシル基が、下記からなる群：

【化 8】



10

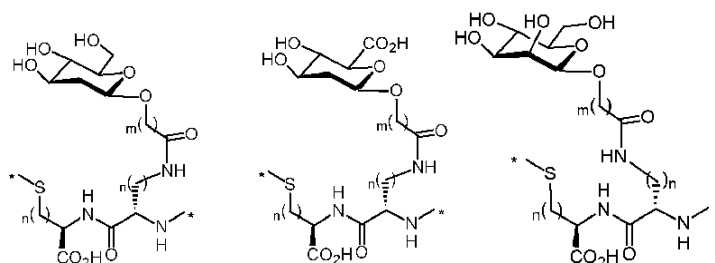
〔式中、 $n$  及び  $r$  は、整数であり、それぞれ独立して、それぞれの場合に 1 ~ 5 から選択され、そして  $p$  は、それぞれの場合に 1 ~ 4 から選択される整数である〕

より選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 2 1】

3つのポリヒドロキシル基が、下記からなる群：

【化 9】



20

〔式中、 $n$  は、それぞれの場合に 1 ~ 3 から選択される整数であり、そして  $m$  は、1 ~ 2 から選択される整数である〕

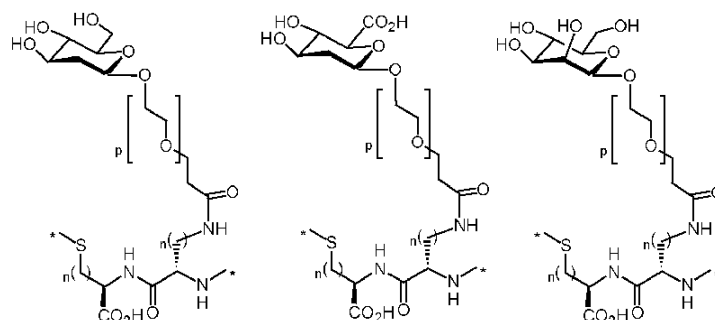
より選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

30

【請求項 2 2】

3つのポリヒドロキシル基が、下記からなる群：

【化 1 0】



40

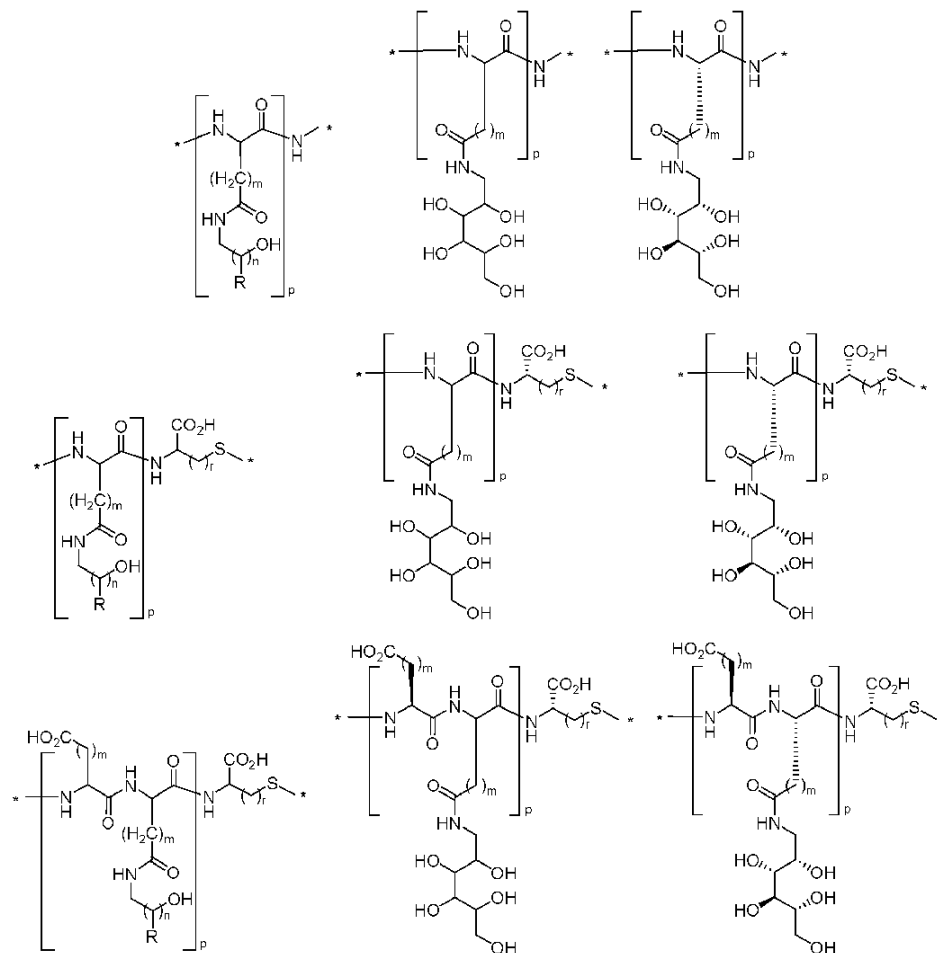
〔式中、 $n$  及び  $r$  は、整数であり、それぞれ独立して、それぞれの場合に 1 ~ 5 から選択され、そして  $p$  は、1 ~ 4 から選択される整数である〕

より選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 2 3】

3つのポリヒドロキシル基が、下記からなる群：

## 【化 1 1】



10

20

〔式中、Rは、H、アルキル、シクロアルキル又はアリールアルキルであり、mは、それぞれの場合に1～3から独立して選択される整数であり、nは、それぞれの場合に1～6から独立して選択される整数であり、pは、1～5から選択される整数であり、そしてrは、1～3から選択される整数である〕

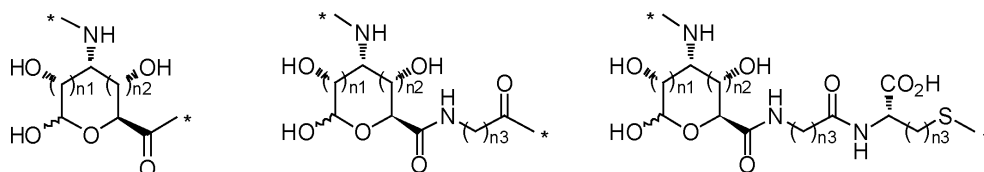
30

より選択される、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

## 【請求項 2 4】

3つのポリヒドロキシシル基が、下記からなる群：

## 【化 1 2】



〔式中、n1及びn2は、それぞれの場合に0～3から独立して選択される整数であって、ただし、n1及びn2が同時に0とはならず、n3は、それぞれの場合に0～3から独立して選択される整数である〕

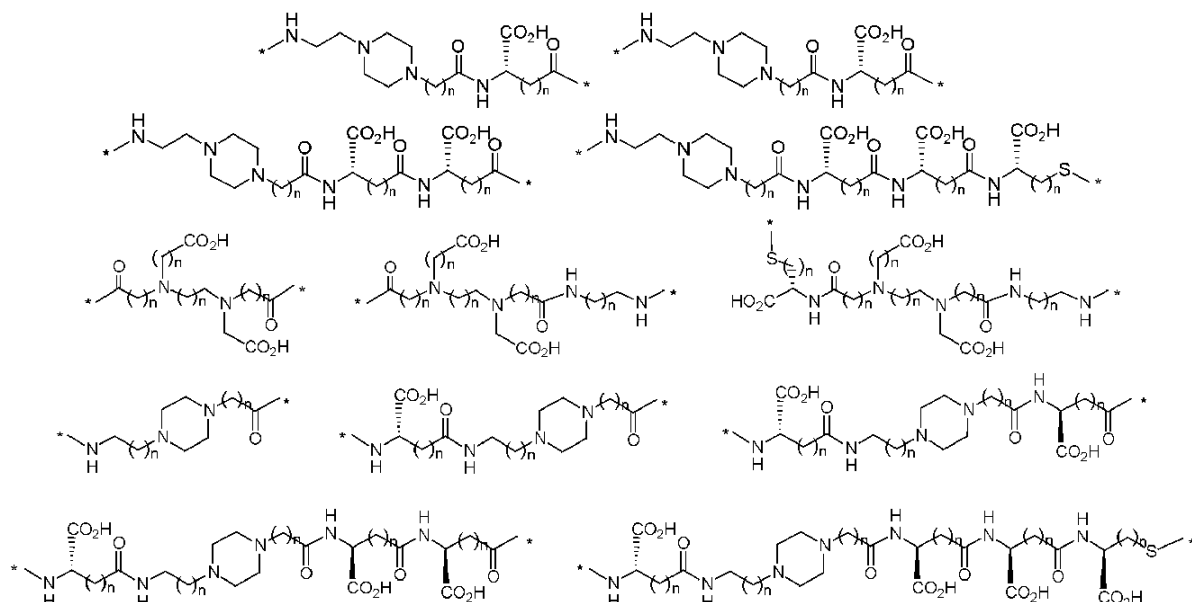
40

より選択される、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

## 【請求項 2 5】

Lが、下記からなる群より選択される式：

## 【化 1 3】



10

〔式中、 $n$ は、それぞれの場合に1～3から独立して選択される整数である〕

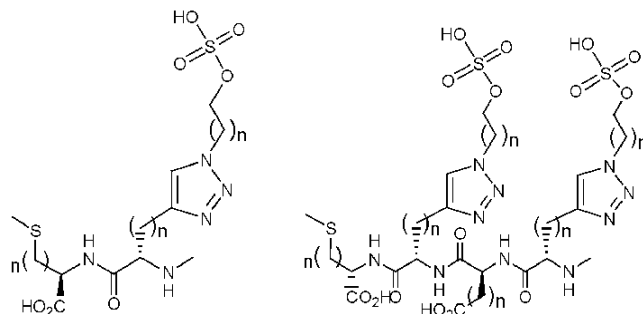
をさらに含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

## 【請求項 2 6】

20

Lが、下記からなる群より選択される式：

## 【化 1 4】



30

〔式中、 $n$ は、それぞれの場合に1～3から独立して選択される整数である〕

をさらに含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

## 【請求項 2 7】

リンカーLが、1つ以上の放出型リンカーを更に含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

## 【請求項 2 8】

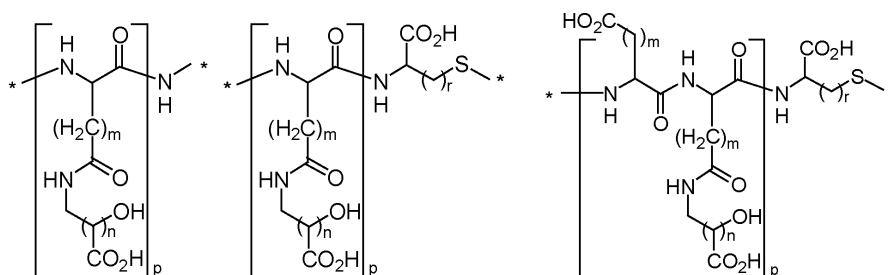
リンカーLが、1つ以上の放出型ジスルフィドリンカーを更に含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

## 【請求項 2 9】

40

3つのポリヒドロキシル基が、下記からなる群：

## 【化 1 5】



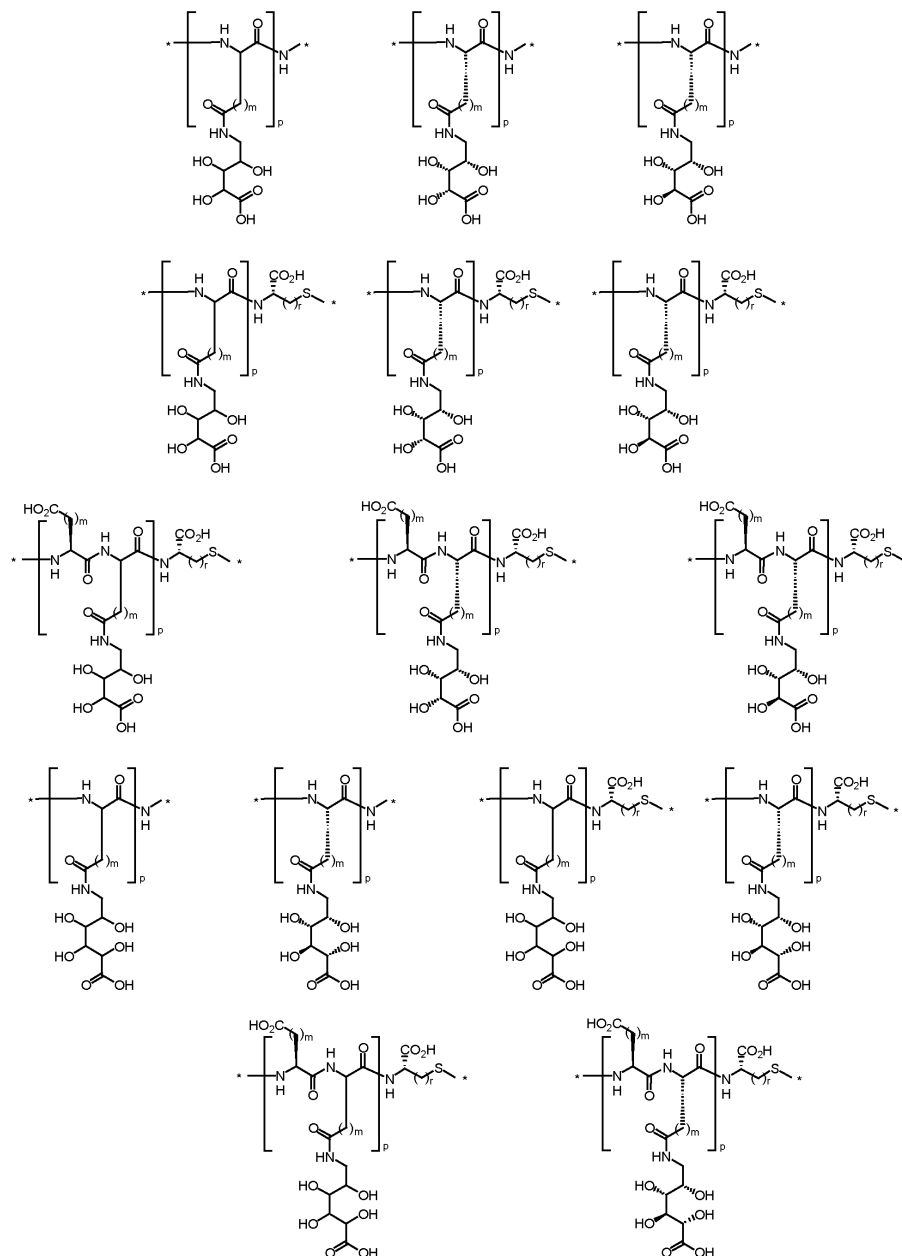
50

〔式中、mは、それぞれの場合に1～3から独立して選択される整数であり、nは、それぞれの場合に1～6から独立して選択される整数であり、pは、1～5から選択される整数であり、そしてrは、1～3から選択される整数である〕  
より選択される、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項30】

3つのポリヒドロキシル基が、下記からなる群：

【化16】



10

20

30

40

〔式中、mは、それぞれの場合に1～3から独立して選択される整数であり、pは、1～5から選択される整数であり、そしてrは、1～3から選択される整数である〕  
より選択される、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項31】

治療有効量の請求項1～5のいずれか1項に記載の1つ以上の化合物、及び、場合によりその担体、希釈剤及び/又は賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項32】

疾患又は状態を画像化する、治療する、診断する、又はそれらの組み合わせを行うための医薬の製造における、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物、又は請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物を含む医薬組成物を使用する方法であって、画像化、治療

50



、診断、又はそれらの組み合わせが、少なくとも1つの葉酸受容体結合リガンドBに結合することができる受容体を発現又は過剰発現している細胞を標的にすることを含む方法。

【請求項33】

疾患又は状態を画像化する、治療する、診断する、又はそれらの組み合わせを行うための医薬組成物であって、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物を含むか、又は、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物と、場合によりその担体、希釈剤及び/又は賦形剤のうちの1つ以上とを含み、画像化、治療、診断、又はそれらの組み合わせが、少なくとも1つの葉酸受容体結合リガンドBに結合することができる受容体を発現又は過剰発現している細胞を標的にすることを含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、標的薬剤送達に使用される組成物及び方法に関する。より詳細には、本発明は、病原性細胞集団により引き起こされる疾患状態を治療するのに使用される、親水性スパーサーリンカーを含有する薬剤送達結合体に結合する細胞表面受容体、並びにそのような結合体を使用する及び含む方法及び医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

哺乳類の免疫系は、腫瘍細胞、他の病原性細胞及び侵入外来性病原体の認識及び排除の手段を提供する。免疫系は、通常、強力な防衛線を提供するが、癌細胞、他の病原性細胞又は感染因子は、宿主免疫反応を避け、宿主の病原性を伴って繁殖するか又は存続する場合が多い。化学療法剤及び放射線療法は、例えば複製新生物を排除するために開発されてきた。しかし、現在利用可能な化学療法剤及び放射線療法レジメンの多くは、病原性細胞を破壊するばかりでなく、造血系の細胞のような正常な宿主細胞にも影響を与えるので、有害な副作用を有する。これらの抗癌剤の有害な副作用は、病原性細胞集団に対して選択的であって宿主毒性の低減した、新たな療法を開発する必要性を強調している。

20

【0003】

研究者らは、病原性細胞を破壊するために、そのような細胞を標的にする細胞毒性化合物の治療プロトコールを開発してきた。これらのプロトコールの多くは、毒素を正常細胞へ送達するのを最小限にする試みとして、病原性細胞に特有の又はそれらにより過剰発現された抗原に結合する抗体と結合させた毒素を利用する。この手法を使用して、病原性細胞の特定の抗原に対する抗体から構成され、この抗体がリシン、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素及び腫瘍壊死因子のような毒素に結合している、特定の免疫毒素が開発されてきた。これらの免疫毒素は、抗体により認識される特定の抗原を有する腫瘍細胞のような病原性細胞を標的にする (Olsnes, S., Immunol. Today, 10, pp. 291-295, 1989; Melby, E.L., Cancer Res., 53(8), pp. 1755-1760, 1993; Better, M.D., PCT公報番号WO91/07418、1991年5月30日公開)。

30

【0004】

宿主における癌細胞又は外来性病原体のような病原性細胞の集団を標的にする別の手法は、独立した宿主毒性も示す場合がある化合物を投与する必要性を回避するために、病原性細胞に対する宿主の免疫反応を増強することである。一つの報告されている免疫療法の戦略は、細胞表面に抗体の定常部領域を表すため、腫瘍細胞の表面に、抗体、例えば遺伝子操作された多量体抗体を結合させ、それによって、多様な免疫系仲介プロセスにより腫瘍細胞の死滅を誘導することである (De Vita, V.T., Biologic Therapy of Cancer, 2d ed. Philadelphia, Lippincott, 1995; Soullillou, J.P., U.S. Patent 5,672,486)。しかし、これらの手法は、腫瘍特異性抗原を限定する困難さによって複雑なものとなっている。したがって、追加の化合物及び方法が、病原性細胞集団を選択的に標的にするために必要となる。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

50

## 【0005】

治療剤、診断剤及び画像化剤を、他の化合物と結合して、それらのインビボにおける挙動、体内分布、代謝及び／又はクリアランスを制御又は変えうることが発見されている。本発明の一つの例示的な実施態様において、化合物の結合体は、親水性スパーサーリンカーを含むものとして記載される。一つの態様において、化合物の結合体は、親水性スパーサーリンカー及び標的リガンドの両方を含むものとして記載される。そのような結合体の例示は、以下の式：



〔式中、Bは、標的細胞受容体に結合する受容体結合リガンドであり、Lは、1つ以上の親水性スパーサーリンカーを含むリンカーであり、そしてAは、望ましくは細胞に送達される、診断、治療又は画像化剤である〕で示される、本明細書に記載される化合物である。

10

## 【0006】

別の実施態様において、以下の式：



〔式中、Lは、1つ以上の親水性スパーサーリンカーを含むリンカーであり、そしてAは、診断、治療又は画像化剤である〕で示される非受容体結合標的化合物が、本明細書において記載される。一つの変形態様において、リンカーLは、放出型リンカーを含まない。別の変形態様において、リンカーLは、放出型リンカーを含む。別の実施態様において、親水性スパーサーリンカーのうちの少なくとも1つは、少なくとも1つの炭水化物から形成されるか又はそれを含む。一つの変形態様において、炭水化物は、BとAを連結するリンカー鎖の一部を形成する。別の変形態様において、炭水化物は、BとAを連結するリンカー鎖に結合している側鎖の一部を形成する。

20

## 【0007】

上記の実施態様のそれぞれにおいて、2つ以上の受容体結合リガンドBが、本明細書に記載されるリンカーに結合できることが理解される。2つ以上の が、本明細書に記載されるリンカーに結合できることが更に理解される。そのような多リガンド及び／又は多剤結合体も本明細書に記載され、ここでリンカーは、親水性スパーサーリンカーを含む。

## 【0008】

別の実施態様において、肝臓への取り込みが低減され、肝臓により取り除かれる可能性が少ない化合物が、本明細書に記載される。一つの態様において、そのような化合物は、肝臓プロセスと比べて、腎臓プロセスにより優先的に取り除かれる。

30

## 【0009】

薬剤Aには、望ましくは又は有利に、細胞受容体を標的にすることにより細胞に送達される、治療薬、診断剤、画像化剤及び任意の他の化合物が含まれる。例示的な薬剤には、細胞毒性薬、抗炎症剤などが含まれる。例示的な診断剤及び画像化剤には、PET画像化剤、蛍光画像化剤、ラジオリガンド及びラジオリガンド複合体形成剤などが含まれる。

## 【0010】

本明細書に記載される化合物、組成物及び方法の実施態様において、治療、診断及び／又は画像化剤Aにより標的にされうる細胞には、癌細胞、細菌細胞、腫瘍細胞、単球、活性化マクロファージ、血管内皮前駆細胞のような前駆細胞、他の炎症性細胞、アテローム硬化プラーク、炎症などの、ただしこれらに限定されない多種多様なものが含まれる。細胞を標的化することは、細胞受容体結合リガンドBの適切な選択により達成される。インビボにおける細胞の選択的又は特異的標的化は、標的細胞により優先的に発現されているか又は過剰発現されている受容体を選択することによって達成できることが理解される。例示的には、標的細胞は、葉酸受容体のようなビタミン受容体を優先的に発現又は過剰発現する。

40

## 【0011】

別の実施態様において、本明細書に記載される結合体は、細胞の病原性集団と関連する

50

疾患又は疾患状態を治療する有効量で医薬組成物に含まれる。

【0012】

別の実施態様において、本明細書に記載される結合体及びそれを含有する医薬組成物は、細胞の病原性集団と関連する疾患又は疾患状態を治療する方法に使用される。

【0013】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2007年6月25日及び2008年3月13日にそれぞれ出願した、米国仮出願第60/946,092号及び同第61/036,186号(これらの開示の全体を参照により本明細書に組み込む)の米国特許法119条(e)に基づく優先権の利益を請求する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】EC234の相対的結合親和性、葉酸( )及びEC0234( )のDPMを示す。

【図2】EC258( )及びEC258+過剰葉酸( )における、KB細胞に対するEC0258の活性(パルス2時間/チェース72時間)を示す。

【図3A】マウスのM109腫瘍に対するEC0234及びEC0246の効果を、未処置対照( )、EC145標準(TIW 3 µmol/kg、3週間)( )、EC0234(TIW 3 µmol/kg、3週間)( )及びEC0246(TIW 3 µmol/kg、3週間)( )により示す。

【図3B】体重変化率に対するEC0234及びEC0246の効果を、未処置対照( )、EC145標準(TIW 3 µmol/kg、3週間)( )、EC0234(TIW 3 µmol/kg、3週間)( )及びEC0246(TIW 3 µmol/kg、3週間)( )で示し、総毒性は処置期間中には観察されなかったことを示唆している。

【図4A】2 µmol/kgをTIWで2週間投与した、EC0396( )、EC145( )及びPBS対照( )のマウスのKB腫瘍容量に対する効果を示す(縦線は最終投与日を示す)。

【図4B】2 µmol/kgをTIWで2週間投与した、EC0396( )、EC145( )及びPBS対照( )の体重変化率に対する効果を示し(縦線は最終投与日を示す)、総毒性は処置期間中には観察されなかったことを示唆している。

【図5A】2 µmol/kgをTIWで2週間投与した、EC0400( )、EC145( )及びPBS対照( )のKB腫瘍容量に対する効果を示す(縦線は最終投与日を示す)。

【図5B】2 µmol/kgをTIWで2週間投与した、EC0400( )、EC145( )及びPBS対照( )の体重変化率に対する効果を示し(縦線は最終投与日を示す)、総毒性は処置期間中には観察されなかったことを示唆している。

【図6A】Balb/cマウスのM109腫瘍において、未処置対照( )と比較した、2 µmol/kgをTIWで2週間投与したEC0429( )及びEC145( )の腫瘍容量に対する効果を示す(縦線は最終投与日を示す)。

【図6B】未処置対照( )と比較した、2 µmol/kgをTIWで2週間投与したEC0429( )及びEC145( )の体重変化率に対する効果を示し(縦線は最終投与日を示す)、総毒性は処置期間中には観察されなかったことを示唆している。

【図7A】Balb/cマウスの皮下M109腫瘍において、未処置対照( )と比較した、2 µmol/kgをTIWで2週間投与したEC0434( )及びEC145( )の腫瘍容量に対する効果を示す(縦線は最終投与日を示す)。

【図7B】未処置対照( )と比較した、2 µmol/kgをTIWで2週間投与したEC0434( )及びEC145( )の体重変化率に対する効果を示し(縦線は最終投与日を示す)、総毒性は処置期間中には観察されなかったことを示唆している。

【図8A】Balb/cマウスの皮下M109腫瘍において、2 µmol/kgをTIWで2週間投与したEC0305( )、EC0436( )及びPBS対照( )の腫瘍容量に対する

10

20

30

40

50

効果を示す（縦線は最終投与日を示す）。

【図8B】 $2\text{ }\mu\text{mol/kg}$ をTIWで2週間投与した、EC0305（ ）、EC0436（ ）及びPBS対照（ ）の体重変化率に対する効果を示し（縦線は最終投与日を示す）、総毒性は処置期間中には観察されなかったことを示唆している。

【図9】PBS（未処置対照）（ ）、EC0436（TIW  $2\text{ }\mu\text{mol/kg}$ ）（ ）、EC0436（TIW  $2.5\text{ }\mu\text{mol/kg}$ ）（ ）、EC0436（TIW  $3\text{ }\mu\text{mol/kg}$ ）（ ）、EC0305（TIW  $2\text{ }\mu\text{mol/kg}$ ）（ ）、EC0305（TIW  $2.5\text{ }\mu\text{mol/kg}$ ）（ ）及びEC0305（TIW  $3\text{ }\mu\text{mol/kg}$ ）（ ）により週に3回で1週間の静脈内投与により処置された、皮下M109腫瘍を有するBalb/cマウスの体重変化率を示す。

10

【図10A】PBS処置対照（ ）と比較した、EC0565の $3\text{ }\mu\text{mol/kg}$ （毎日×5回を2週間）（ ）によるnu/nuマウスの皮下KB腫瘍に対する効果を示す。データから、Log細胞死滅（LCK）値の1.2を決定することができる（約0.7を超える値は、抗癌活性を有する化合物であることを示唆している）。

【図10B】PBS処置対照（ ）と比較した、EC0565の $3\text{ }\mu\text{mol/kg}$ （毎日×5回を2週間）（ ）による体重変化率に対する効果を示し、総毒性は処置期間中には観察されなかったことを示唆している。

【図11】カニューレ挿入ラットの胆管アッセイの肝胆汁排泄における、 $2\text{ }\mu\text{mol/kg}$ 静脈内ボラス投与による多様なDAVLBH結合体からの総DAVLBH胆汁排泄を示す。胆汁の総用量の率を測定して、EC145 =  $8.7\%$ （ ）、EC0409 =  $7.9\%$ （ ）、EC0429 =  $8.6\%$ （ ）、EC0434 =  $2.8\%$ （ ）であった。加えて、EC145はAUC = 1092（ ）を示し、収集最終時点は139分であり、EC0434はAUC = 260（ ）を示し、120、135及び360分の時点では、定量化のレベルよりも全て低く、すなわち $<0.65\text{ }\mu\text{M}$ であった。

20

【図12】リボースに基づくスパーサーの胆汁クリアランスに対する効果及び長期誘導体化の影響を示す。棒線の上の数字は、リンカーにおける親水性スパーサーの数に相当する。

【図13】30分間のカメラ露出を使用して、EC0565が、KB細胞におけるRPS6及びp70S6Kの用量依存性阻害を誘発すること（パルス1時間/チェース4時間）を示し、ここで、C = 対照（未処置細胞）、FAC = 葉酸対照（ $100\text{ }\mu\text{M}$ ）である。

30

【図14】メチルチオールボルテゾミブ誘導体（EC0501）に対するボルテゾミブの細胞毒性を示す。IC<sub>50</sub> ボルテゾミブ20nM（ ）、EC0501 240nM（ ）。

【図15】親水性スパーサーリンカーが、RAW264.7細胞に対するモノ-及びビス-チオ-ベルケイド葉酸結合体の特異的活性を可能にすることを示す。パルス5時間、続いてチェース72時間の後の細胞生存率（MTT）：ボルテゾミブ（ ）、EC0501（ ）、EC0522（ ）、EC0522 + 過剰葉酸（ ）。

【図16】EC0595（13nM IC<sub>50</sub>）（ ）、EC0595 + 過剰葉酸（ ）、ボルテゾミブ（ ）、EC0525（46nM IC<sub>50</sub>）（ ）、EC0525 + 過剰葉酸（ ）による処置の後の細胞生存率（パルス5時間/チェース72時）（XTT）を示す。

40

【図17】ボルテゾミブ（ ）、EC0587（ ）、EC0587 + 過剰葉酸（ ）と共に24時間インキュベートした後の細胞生存率（XTT）を示す。

【図18】RAW264.7細胞におけるLPS100ng/mL、30分20秒のプロテオソーム/基質の反応時間でのLPS刺激プロテオソーム活性（パルス5時間/チェース24時間）の、ボルテゾミブ（ ）、EC0522（ ）、EC0522 + 過剰葉酸（ ）、EC0525（ ）、EC0525 + 過剰葉酸（ ）、EC0595（ ）、EC0595 + 過剰葉酸（ ）による阻害を示し、IC<sub>50</sub>は、EC0595及びEC0525では約30nMである。

【図19】 - アマニチン（ ）、EC0592（IC<sub>50</sub> 3.7nM）（ ）、EC0

50

592 + 過剰葉酸 ( ) による処理の後のRAW細胞に対する活性 (パルス5時間 / チェース72時間) を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

受容体結合リガンド (B)、1つ以上の親水性スペーサーリンカーを含む多価リンカー (L)、及び、望ましくは細胞に送達される、診断、治療又は画像化剤 (A)、から構成される薬剤送達結合体が、本明細書に記載される。結合リガンド (B) は、多価リンカー (L) に共有結合しており、診断、治療若しくは画像化剤 (A) 又はそれらの類似体若しくは誘導体も多価リンカー (L) に共有結合している。診断、治療又は画像化剤 (A) には、リンカー (L) に結合しているそれらの類似体及び誘導体が含まれることが理解されるべきである。多価リンカー (L) は、1つ以上のスペーサーリンカー及び / 又は放出型リンカー、並びにそれらの組み合わせを、任意の順番で含む。一つの変形態様において、放出型リンカー及び任意のスペーサーリンカーは、互いに共有結合してリンカーを形成する。別の変形態様において、放出型リンカーは、薬剤 (A) 又はその類似体若しくは誘導体に直接結合している。別の変形態様において、放出型リンカーは、結合リガンドに直接結合している。別の変形態様において、結合リガンド及び薬剤 (A) 又はその類似体若しくは誘導体は、そのいずれか又は両方が、1つ以上のスペーサーリンカーを介して放出型リンカーに結合している。別の変形態様において、結合リガンド及び薬剤 (A) 又はその類似体若しくは誘導体は、それぞれ放出型リンカーに結合しており、それぞれ互いに直接結合するか又は1つ以上のスペーサーリンカーを介して共有結合してもよい。

【0016】

前述から、結合リガンドと、薬剤 (A) 又はその類似体若しくは誘導体と、多様な放出型リンカー及び任意のスペーサーリンカーとの配置は、広範囲に変わりうるということが理解されるべきである。一つの態様において、結合リガンド及び薬剤 (A) 又はその類似体若しくは誘導体と多様な放出可能で任意のスペーサーリンカーとは、窒素、酸素、硫黄、リン、ケイ素などのヘテロ原子を介して互いに結合している。変形態様において、酸素を除くヘテロ原子は、N(OH)、S(O)、S(O)<sub>2</sub>、P(O)、P(O)<sub>2</sub>、P(O)<sub>3</sub> のように多様な酸化状態であってもよい。別の変形態様において、ヘテロ原子は、集まって、例えば式： - (NHR<sup>1</sup>NHR<sup>2</sup>) -、- SO -、- (SO<sub>2</sub>) - 及び - N(R<sup>3</sup>) O - [式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> 及び R<sup>3</sup> は、互いに独立して、水素、アルキル、アリール、アリールアルキル、置換アリール、置換アリールアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール及びアルコキシアルキルから選択される] のラジカルを含む、ヒドロキシルアミン、ヒドラジン、ヒドラゾン、スルホネート、ホスフィネート、ホスホネートなどのような、二価ラジカルを形成することができる。別の変形態様において、2つ以上の結合リガンドが多価リンカーに結合している。別の変形態様において、2つ以上の薬剤 (A) が多価リンカーに結合している。別の変形態様において、2つ以上の結合リガンド及び2つ以上の薬剤 (A) が多価リンカーに結合している。

【0017】

一つの実施態様において、受容体結合リガンドは、ビタミン受容体に結合することができるビタミン又はその類似体若しくは誘導体のような、ビタミン受容体結合リガンドである。別の実施態様において、結合リガンドは、1つ以上のスペーサーリンカー及び / 又は放出型リンカー及び / 又は親水性スペーサーリンカーから形成されるリンカーを介して薬剤に結合している放出型リンカーに結合している、ビタミン又はその類似体若しくは誘導体である。一つの変形態様において、薬剤及びビタミン又はその類似体若しくは誘導体は、両方とも、それぞれスペーサーリンカーに結合することができ、スペーサーリンカーは、1つ以上の放出型リンカーを介して互いに結合している。加えて、薬剤及びビタミン又はその類似体若しくは誘導体は、両方とも、それぞれ1つ以上の放出型リンカーに結合することができ、放出型リンカーは、スペーサーリンカーを介して互いに結合している。これらのラジカルは、それぞれ、既存の又は追加のヘテロ原子を介して、結合リガンド、薬剤 A 又は放出型親水性スペーサー若しくは追加のスペーサーリンカーに連結することがで

きる。

【0018】

結合リガンド(B)の結合部位は、受容体に特異的に結合することができるあらゆる結合リガンド(B)又はその誘導体若しくは類似体のための受容体を含んでもよく、ここで、受容体又は他のタンパク質は、病原性細胞の集団により独自に発現、過剰に発現又は優先的に発現している。病原性細胞の集団により独自に発現、過剰に発現又は優先的に発現している表面提示タンパク質は、典型的には、非病原性細胞には表れないか又は低い密度でしか表れない受容体であり、病原性細胞の選択的排除、標識化又は診断の手段を提供する。結合リガンド薬剤送達結合体は、癌細胞又は他の種類の病原性細胞の受容体に対して高い結合親和性で結合してもよい。高親和性の結合は結合リガンドにとって固有のものであってもよいし、あるいは、化学的に修飾したリガンド(例えば、ビタミンの類似体又は誘導体)の使用により結合親和性を増強することもできる。

10

【0019】

本明細書に記載されている結合リガンド薬剤送達結合体は、例えば、多種多様なビタミン又は受容体結合ビタミン類似体/誘導体、リンカー及び薬剤から形成することができる。本明細書に記載されている結合リガンド薬剤送達結合体は、リガンド結合に利用可能な、ビタミンのような結合リガンドに対する受容体の病原性細胞上での優先的な発現のおかげで、宿主動物において病原性細胞集団を選択的に標的にすることができる。結合リガンド(B)として使用することができる例示的なビタミン部分には、カルニチン、イノシトール、リボ酸、ピリドキサール、アスコルビン酸、ナイアシン、パントテン酸、葉酸、リボフラビン、チアミン、ビオチン、ビタミンB<sub>12</sub>、他の水溶性ビタミン、ビタミンB、並びに脂溶性ビタミンA、D、E及びKが含まれる。これらのビタミン、並びにその受容体結合類似体及び誘導体は、二価リンカー(L)により薬剤と結合して本明細書に記載されている結合リガンド(B)薬剤送達結合体を形成することができる、例示的な標的実体を構成する。ビタミンという用語には、特に別段の指示のない限りビタミン類似体及び/又は誘導体が含まれることが理解される。例示的には、葉酸の誘導体であるプテロイン酸、ビオシチン、ビオチンスルホキシド、オキシビオチン及び他のビオチン受容体結合化合物のようなビオチン類似体などが、ビタミン類、ビタミン類似体及びビタミン誘導体であると考慮される。本明細書に記載されているビタミン類似体又は誘導体は、それを介してビタミン類似体又は誘導体が二価リンカー(L)に共有結合しているヘテロ原子を組み込むビタミン類を意味することが、理解されるべきである。

20

30

【0020】

例示的なビタミン部分には、葉酸、ビオチン、リボフラビン、チアミン、ビタミンB<sub>12</sub>及びこれらのビタミン分子の受容体結合類似体及び誘導体、並びに他の関連するビタミン受容体結合分子が含まれる。

【0021】

別の実施態様において、細胞受容体は葉酸受容体であり、標的リガンドBは葉酸受容体結合リガンドである。別の実施態様において、Bは、葉酸、又は葉酸受容体に結合する葉酸の類似体若しくは誘導体のような、葉酸(folate、フォレート)である。本明細書に使用されるとき、葉酸(folate)という用語は、個別的及び集合的の両方において、葉酸それ自体を意味するため、並びに/又は、葉酸受容体に結合することができる葉酸の類似体及び誘導体を意味するために使用されることが、理解されるべきである。別の実施態様において、Bは、抗体のような、葉酸受容体に選択的又は特異的に結合することができる化合物である。

40

【0022】

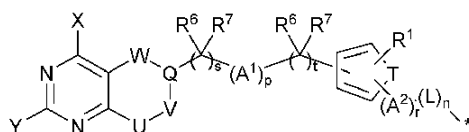
葉酸類似体及び/又は誘導体の例示的な実施態様には、フォリン酸、プテロポリグルタミン酸、及びテオラヒドロプテリン、ジヒドロ葉酸、テトラヒドロ葉酸のような葉酸受容体結合プテリジン、並びにこれらのデアザ及びジデアザ類似体が含まれる。用語「デアザ」及び「ジデアザ」類似体は、天然に生じる葉酸構造又はその類似体若しくは誘導体において炭素原子が1又は2個の窒素原子で置換されている、当該技術で確認されている類似体

50

10

葉酸受容体に結合する追加的な葉酸の類似体は、米国特許出願公開第2005/0227985号及び同第2004/0242582号に記載されており、これらの開示は参照として本明細書に組み込まれる。例示的に、そのような葉酸類似体は、一般式：

## 20



30

40

を有する。

## 50

本明細書に使用されるとき、葉酸 (folate) という用語は、独立して、結合体を形成するのに使用される葉酸、又は代替的に、葉酸受容体に結合することができるその葉酸類似体又は誘導体、の両方を意味することが理解される。

【 0 0 2 5 】

そのような葉酸類似体の一つの態様において、 $s$  が 1 である場合、 $t$  は 0 であり、 $s$  が 0 である場合、 $t$  は 1 である。そのような葉酸類似体の別の態様において、 $n$  と  $r$  は両方とも 1 であり、そしてリンカー  $L^a$  は、アミド結合を介してアルファ - アミノ基の  $A^2$  に共有結合している天然に生じるアミノ酸である。例示的なアミノ酸には、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、システインなどが含まれる。

【 0 0 2 6 】

ビタミンは、窒素を含む葉酸であってもよく、この実施態様において、スパーサーリンカーは、アルキレンカルボニル、シクロアルキレンカルボニル、カルボニルアルキルカルボニル、1 - アルキレンスクシンイミド - 3 - イル、1 - (カルボニルアルキル) スクシンイミド - 3 - イルであってもよく、ここで、スパーサーリンカーは、それぞれ場合により置換基  $X^1$  で置換されており、スパーサーリンカーは、葉酸窒素と結合してイミド又はアルキルアミドを形成する。この実施態様において、置換基  $X^1$  は、アルキル、ヒドロキシアルキル、アミノ、アミノアルキル、アルキルアミノアルキル、ジアルキルアミノアルキル、スルフヒドリルアルキル、アルキルチオアルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、グアニジノアルキル、 $R^4$  - カルボニル、 $R^5$  - カルボニルアルキル、 $R^6$  - アシルアミノ及び  $R^7$  - アシルアミノアルキルであってもよく、ここで、 $R^4$  及び  $R^5$  は、それぞれ独立して、アミノ酸、アミノ酸誘導体及びペプチドから選択され、そして  $R^6$  及び  $R^7$  は、それぞれ独立して、アミノ酸、アミノ酸誘導体及びペプチドから選択される。

【 0 0 2 7 】

ビタミン類似体及び/又は誘導体の例示的な実施態様には、ビオシチン、ビオチンスルホキシド、オキシビオチン及び他のビオチン受容体結合化合物などのようなビオチンの類似体及び誘導体も含まれる。本明細書に記載される他のビタミン類の類似体及び誘導体も、本明細書において考慮されることが理解される。一つの実施態様において、本明細書に記載されている薬剤送達結合体において結合リガンド (B) として使用することができるビタミン類には、葉酸又は本明細書に記載されているその類似体若しくは誘導体に結合する、葉酸受容体のような活性化マクロファージに特異的に発現するビタミン受容体に結合するものが含まれる。

【 0 0 2 8 】

本明細書に記載されているビタミン類に加えて、他の結合リガンドも、本明細書に記載され考慮されている薬剤及びリンカーに結合して、所望の標的への薬剤の送達を促進できる結合リガンドリンカー薬剤結合体を形成しうることが理解される。記載されているビタミン類、並びにその類似体及び誘導体に加えて、これらの他の結合リガンドを使用して、標的細胞に結合できる薬剤送達結合体を形成することができる。一般に、細胞表面受容体の任意の結合リガンド (B) を、リンカー薬剤結合体が結合できる標的リガンドとして有利に使用することができる。

【 0 0 2 9 】

本明細書に記載されている他の例示的なリガンドには、ライブラリースクリーンから同定されるペプチドリガンド、腫瘍細胞特異的ペプチド、腫瘍細胞特異的アプタマー、腫瘍細胞特異的炭水化物、腫瘍細胞特異的モノクローナル又はポリクローナル抗体、例えば転移性癌細胞に特異的に発現しているか又は独自に利用可能である Eph A 2 又は他のタンパク質に対する抗体の Fab フラグメントのような、抗体の Fab 又は scFv (すなわち、単鎖可変部) フラグメント、コンピナトリアルライブラリーから誘導される小型有機分子、EGF、FGF、インスリン及びインスリン様成長因子のような成長因子、相同性ポリペプチド、ソマトスタチン及びその類似体、トランスフェリン、リボタンパク質複合体、胆汁酸塩、セレクチン、ステロイドホルモン、Arg - Gly - Asp 含有ペプチド、

10

20

30

40

50



レチノイド、多様なガレクチン、 $\beta$ -オピオイド受容体リガンド、コレシストキニンA受容体リガンド、アンジオテンシンAT<sub>1</sub>又はAT<sub>2</sub>受容体に特異的なリガンド、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体リガンド、ペニシリンのような $\beta$ -ラクタム抗体、腫瘍細胞又は炎症性生物の表面に優先的に発現する受容体に特異的に結合する、抗菌薬を含む小型有機分子及び他の分子、受容体又は他の細胞表面タンパク質の結晶構造に基づいて特定の受容体の結合ポケットに適合するように設計された、抗菌薬及び他の薬剤、腫瘍抗原への又は腫瘍細胞の表面に優先的に発現した他の分子への結合リガンド、或いは以上の分子のいずれかのフラグメント、が含まれる。

#### 【0030】

結合リガンド薬剤送達結合体の結合部位として機能することができる腫瘍特異的抗原には、EphA2のようなエフリンファミリータンパク質のメンバーの細胞外エピトープが含まれる。正常な細胞においてはEphA2発現は細胞-細胞接合部に限定されているが、EphA2は、転移性腫瘍細胞の細胞表面全体にわたって分布している。したがって、転移性細胞のEphA2は、例えば薬剤と結合した抗体のFabフラグメントと結合することができる一方で、このタンパク質は、正常細胞上ではFabフラグメントと結合することができないので、転移性癌細胞に特異的な結合リガンド薬剤送達結合体をもたらす。

#### 【0031】

リンカーLは、1つ以上の親水性スペーサーリンカーを含む。加えて、他の任意のスペーサーリンカー及び/又は放出型リンカーをLに含めることができる。予め決定された長さを、薬剤Aから結合リガンドBを分離するために選択する場合、追加的なスペーサーリンカーが含まれうることが理解される。特定の形態において、放出型リンカーが含まれうることも、理解される。例えば、本明細書に記載されているように、一つの実施態様において、標的リガンド結合体を、病原性細胞が関わる癌又は他の疾患を治療する薬剤を送達するために使用できる。そのような実施態様において薬剤は、いったん送達されると、望ましくは結合体から放出されることが理解される。例えば、標的リガンドが葉酸又はその類似体若しくは誘導体である形態において、結合体は、葉酸受容体に結合することができる。結合体は、いったん結合すると、多くの場合にエンドサイトーシスのプロセスを受け、結合体は細胞の内部に送達される。細胞機構が結合体を生物学的に分解して、薬剤「積載物」を放出させ、葉酸化合物を放出させてもよい。

#### 【0032】

代替的な形態において、標的結合体を免疫療法に使用することができる。この形態では、放出型リンカーは一般に含まれない。例えば、葉酸又は他のビタミン受容体結合化合物と免疫原の結合体は、いったん送達されると、適切な受容体に結合し、抗原性積載物により細胞を装飾又はマークする。別の代替的な形態において、標的結合体を診断療法に使用することができる。この形態では、放出型リンカーを含んでも含まなくてもよい。例えば、画像化剤を含む結合体を、葉酸又は他のビタミン受容体結合化合物のような適切な細胞受容体結合リガンドを使用して、標的細胞に送達することができる。一つの態様において、結合体は、画像化のために細胞の表面に留まる。別の形態において、複合体はエンドサイトーシスを受けて細胞の内部に入ることができる。後者の場合では、放出型リンカーを含めることができる。

#### 【0033】

したがって、別の態様において、本明細書に記載されている結合体B-L-Aは、以下の一般式：



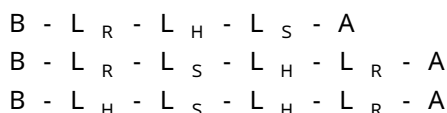
10

20

30

40

50

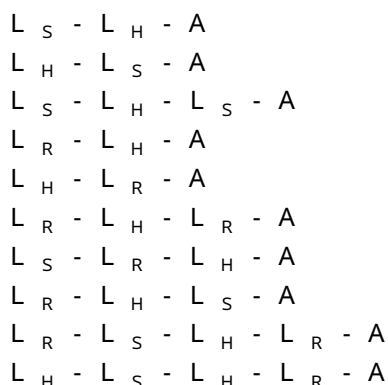


〔式中、B、L及びAは、本明細書に記載されたとおりであり、 $L_R$ は、リンカーLの放出型リンカー部分であり、 $L_S$ は、スペーサーリンカー部分であり、そして $L_H$ は、親水性リンカー部分である〕も含む。前述の式は単なる例示であり、親水性スペーサーリンカー部分、放出型リンカー部分及びスペーサーリンカー部分の他の配置も本明細書に含まれることが、理解されるべきである。加えて、複数の親水性スペーサーリンカー及び／又は複数の放出型リンカー及び／又は複数のスペーサーリンカーを含む追加の結合体が考慮されることが、理解されるべきである。

10

## 【0034】

同様に、別の態様において、本明細書に記載されている結合体L-Aは、以下の一般式：



20

〔式中、L及びAは、本明細書に記載されたとおりであり、 $L_R$ は、リンカーLの放出型リンカー部分であり、 $L_S$ は、スペーサーリンカー部分であり、そして $L_H$ は、親水性リンカー部分である〕も含む。前述の式は単なる例示であり、親水性スペーサーリンカー部分、放出型リンカー部分及びスペーサーリンカー部分の他の配置も本明細書に含まれることが、理解されるべきである。加えて、複数の親水性スペーサーリンカー及び／又は複数の放出型リンカー及び／又は複数のスペーサーリンカーを含む追加の結合体が考慮されることが、理解されるべきである。

30

## 【0035】

多様な親水性リンカーの配置及び／又は配向は、直鎖若しくは分岐鎖の様式であるか又はその両方であってもよい。例えば、親水性リンカーは、葉酸と薬剤、画像化剤又は診断剤との結合体を形成するリンカーの主鎖を、形成することができる。あるいは、リンカーの親水性部分は、結合リガンドBと薬剤Aとを連結している原子鎖の主鎖の側鎖であってもよいし又はそれに結合していてもよいことができる。この後者の配置において、親水性部分は、原子の主鎖から遠位であっても近位であってもよいあってもよい。

## 【0036】

別の実施態様において、リンカーは、おおよそ直鎖状であり、親水性基は、ほぼ直列に配置されて、結合体において鎖様リンカーを形成する。別の方法では、親水性基は、この直鎖状の実施態様においてリンカーの主鎖の幾つか又は全てを形成する。

40

## 【0037】

別の実施態様において、リンカーは親水性基により分岐している。この分岐鎖状の実施態様において、親水性基は、主鎖から遠位であってもよく、又は主鎖に近位であってもよいあってもよい。これらのそれぞれの配置において、リンカーは、より球状又は円筒状の形状である。一つの変形態様において、リンカーは瓶洗いブラシのような形状である。一つの態様において、リンカーの主鎖は、直鎖列のアミドにより形成され、リンカーの親水性部分は、例えば連結単糖、スルホン酸塩など、並びにそれらの誘導体及び類似体による、分岐側鎖の並列配置により形成される。

## 【0038】

50

リンカーは、インピボにおいて遭遇する生理学的条件のような特定の条件下で、中性又はイオン性であってもよい。イオン性リンカーでは、選択された条件下において、リンカーは脱プロトン化されて陰性イオンを形成しうるか又はあるいは脱プロトン化されて陽性イオンを形成しうる。2つ以上の脱プロトン化又はプロトン化事象が起こりうることが理解される。加えて、同じリンカーが脱プロトン化及びプロトン化されて、内塩又は双性イオン性化合物を形成しうるということが理解される。

#### 【0039】

別の実施態様において、親水性スペーサーリンカーは中性である、すなわち生理学的条件下において、リンカーは著しくプロトン化も脱プロトン化もされない。別の実施態様において、親水性スペーサーリンカーは、プロトン化されて1つ以上の正電荷を有することができる。プロトン化能力は条件依存性であることが理解される。一つの態様において、この条件とは生物学的条件であり、リンカーはインピボでプロトン化される。別の実施態様において、スペーサーは、中性の領域と、プロトン化されて1つ以上の正電荷を有する領域の両方を含む。別の実施態様において、スペーサーは、脱プロトン化されて1つ以上の負電荷を有する領域と、プロトン化されて1つ以上の正電荷を有する領域の両方を含む。この後者の実施態様において、双性イオン性又は内塩が形成されることが理解される。

#### 【0040】

一つの態様において、脱プロトン化されて負電荷を有するリンカーの領域には、アスパラギン酸、グルタミン酸のようなカルボン酸、より長鎖のカルボン酸基及び硫酸のアルキルエステルのような硫酸エステルが含まれる。別の態様において、プロトン化されて正電荷を有するリンカーの領域には、エチレンジアミン、プロピレンジアミン、ブチレンジアミンなどを含むポリアミノアルキレンのようなアミノ基、及び/又はピロリジン、ピペリジン、ピペラジンを含む複素環、並びに他のアミノ基が含まれ、これらはそれぞれ場合により置換されている。別の実施態様において、中性であるリンカーの領域には、糖、炭水化物、糖類、イノシトールなどのようなポリヒドロキシル基、及び/又はポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレンなどを含むポリオキシアルキレン基のようなポリエーテル基が含まれる。

#### 【0041】

一つの実施態様において、本明細書に記載されている親水性スペーサーリンカーは、主に炭素、水素及び酸素から形成され、約3:1以下又は約2:1以下の炭素/酸素比を有する。一つの態様において、本明細書に記載されている親水性リンカーは、複数のエーテル官能基を含む。別の態様において、本明細書に記載されている親水性リンカーは、複数のヒドロキシル官能基を含む。そのようなリンカーを形成するのに使用できる例示的なフラグメントには、炭水化物のようなポリヒドロキシル化合物、ポリエチレングリコール単位のようなポリエーテル化合物、並びにカルボン酸及びアルキル硫酸のような酸基が含まれる。一つの変形態様において、オリゴアミドスペーサーなどもリンカーに含まれる。

#### 【0042】

例示的な炭水化物スペーサーには、ペプチドの特徴と糖の特徴の両方を含む本明細書に記載されているサッカロペプチド；クリック化学としても知られている〔2+3〕ヒュスゲン（Huisgen）環化により組み込まれうるグルクロニド；例えば2-デオキシヘキサピラノース（2-デオキシグルコース、2-デオキシグルクロニドなど）の-アルキルグリコシド；及び-アルキルマンノピラノシド、が含まれる。例示的なPEG基には、約4~約20個のPEG基の範囲の特定の長さのものが含まれる。例示的なアルキル硫酸エステルをクリック化学により主鎖に直接導入することもできる。例示的なオリゴアミドスペーサーには、EDTA及びDTPAスペーサー、-アミノ酸などが含まれる。

#### 【0043】

別の実施態様において、本明細書に記載されている親水性スペーサーリンカーには、以下の式：

10

20

30

40

The image displays four chemical structures of poly(ether amide)s, labeled 1, 2, 3, and 4. Structures 1 and 2 are shown in the top row, while 3 and 4 are in the bottom row. Each structure features a repeating unit with a poly(ether amide) backbone. The structures are defined by the following parameters:

- Structure 1:**  $m = 1$ ,  $n = 1$ . The repeating unit consists of a methoxy-terminated poly(ether amide) chain with a terminal amide group.
- Structure 2:**  $m = 1$ ,  $n = 2$ . The repeating unit consists of a methoxy-terminated poly(ether amide) chain with a terminal amide group.
- Structure 3:**  $m = 1$ ,  $n = 1$ . The repeating unit consists of a methoxy-terminated poly(ether amide) chain with a terminal amide group.
- Structure 4:**  $m = 1$ ,  $n = 2$ . The repeating unit consists of a methoxy-terminated poly(ether amide) chain with a terminal amide group.

〔式中、 $m$ は、独立して、それぞれの場合に1～約8から選択される整数であり、 $p$ は、1～約10から選択される整数であり、そして $n$ は、独立して、それぞれの場合に1～約3から選択される整数である〕で示されるリンカーのようなポリエーテルが含まれる。一つの態様において、 $m$ は、独立して、それぞれの場合に1～約3である。別の態様において、 $n$ は、それぞれの場合に1である。別の態様において、 $p$ は、独立して、それぞれの場合に約4～約6である。例示的には、前述に対応して、対応するポリプロピレンポリエーテルが本明細書において考慮され、親水性スペーサーリンカーとして結合体に含まれうる。加えて、ポリエチレンポリエーテルとポリプロピレンポリエーテルの混合が親水性スペーサーリンカーとして結合体に含まれうるということが理解される。更に、前述のポリエーテル化合物の環状の変形態様、例えばテトラヒドロフラニル、1,3-ジオキサン、1,4-ジオキサンなどを含むものが、本明細書において考慮される。

別の例示的な実施態様において、本明細書に記載されている親水性スパーサーリンカーは、複数のヒドロキシル官能基を含み、例えば単糖、オリゴ糖、多糖などを組み込んだリンカーである。ポリヒドロキシル含有スパーサーリンカーは、複数の - ( C R O H ) - 基（ここで R は、水素又はアルキルである）を含むことが理解されるべきである。

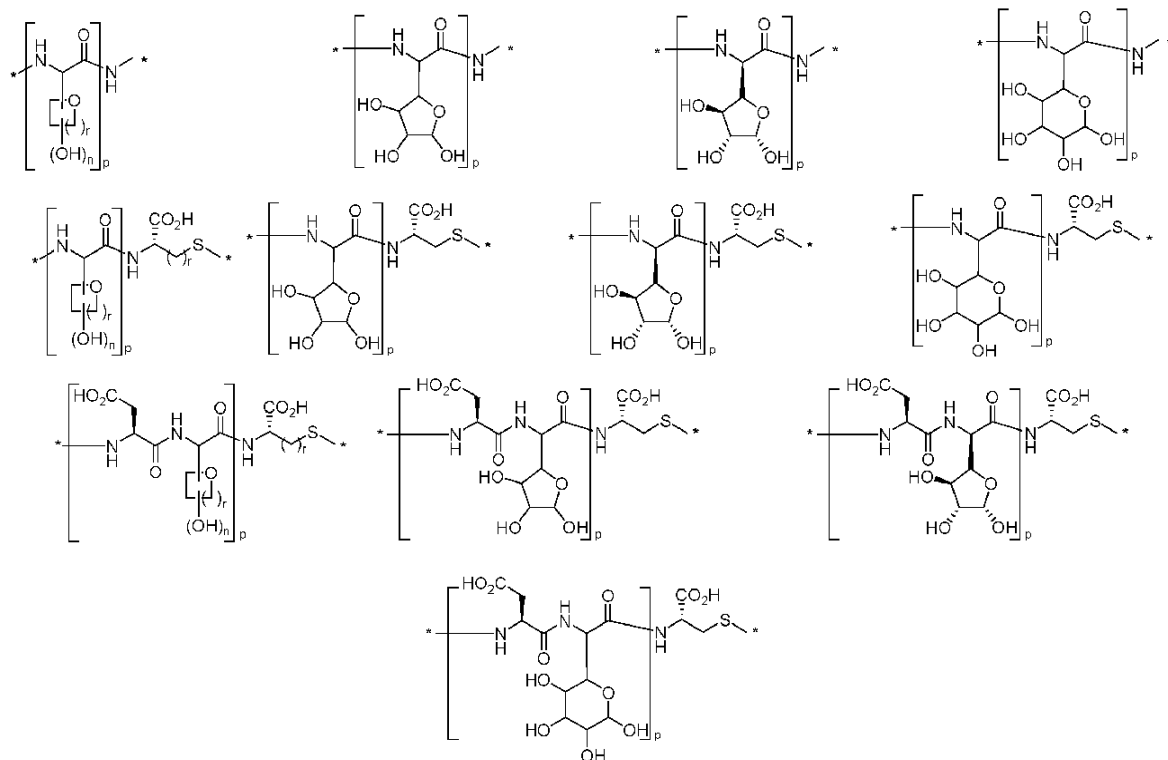
The image displays six chemical structures of poly(amic acid)s and their derivatives, arranged in two rows of three. Each structure is enclosed in brackets with a subscript 'p' and asterisks indicating the polymer chain continuation.

- Top Row, Left:** A poly(amic acid) with a pendant group  $R$  and a hydroxymethyl group  $(HOCH)_n$  attached to the amide nitrogen.
- Top Row, Middle:** A poly(amic acid) with a pendant group  $R$  and a hydroxymethyl group  $(HOCH)_n$  attached to the amide nitrogen, with a hydroxyl group  $HO$  on the adjacent carbon.
- Top Row, Right:** A poly(amic acid) with a pendant group  $R$  and a hydroxymethyl group  $(HOCH)_n$  attached to the amide nitrogen, with a hydroxyl group  $HO$  on the adjacent carbon.
- Bottom Row, Left:** A poly(amic acid) with a pendant group  $R$  and a hydroxymethyl group  $(HOCH)_n$  attached to the amide nitrogen, with a hydroxyl group  $HO$  on the adjacent carbon.
- Bottom Row, Middle:** A poly(amic acid) with a pendant group  $R$  and a hydroxymethyl group  $(HOCH)_n$  attached to the amide nitrogen, with a hydroxyl group  $HO$  on the adjacent carbon.
- Bottom Row, Right:** A poly(amic acid) with a pendant group  $R$  and a hydroxymethyl group  $(HOCH)_n$  attached to the amide nitrogen, with a hydroxyl group  $HO$  on the adjacent carbon.

〔ここで、Rは、H、アルキル、シクロアルキル又はアリールアルキルであり、mは、1～約3の整数であり、nは、1～約5の整数であり、pは、1～約5の整数であり、そしてrは、1～約3から選択される整数である〕のうちの1つ以上を含む。一つの態様において、整数nは、3又は4である。別の態様において、整数pは、3又は4である。別の態様において、整数rは1である。

50

## 【化 4】



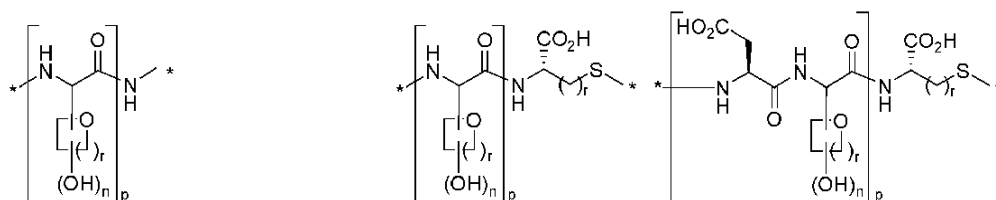
10

20

〔ここで、nは、2～約5の整数であり、pは1～約5の整数であり、そしてrは、1～約4の整数である〕のうちの1つ以上を含む。一つの態様において、整数nは、3又は4である。別の態様において、整数pは、3又は4である。別の態様において、整数rは、2又は3である。リンカーのそのような部分の全ての立体化学形態が、本明細書において考慮されることが理解される。例えば、上記の式において、この部分を、リボース、キシロース、グルコース、マンノース、ガラクトース又は他の糖から誘導することができ、これらの分子に存在する側鎖ヒドロキシル及びアルキル基の立体化学配置を保持することができる。加えて、前述の式において、多様なデオキシ化合物も考慮されることが理解されるべきである。例示的に、以下の式の化合物が考慮され：

30

## 【化 5】



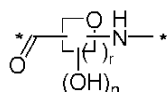
式中、nは、r以下であり、例えばrが2又は3である場合、nは、それぞれ、1若しくは2、又は1、2若しくは3である。

## 【0047】

40

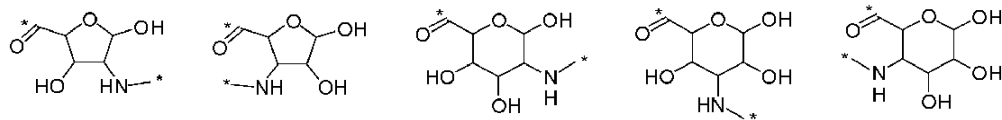
別の実施態様において、スペーサーリンカーは、以下の式：

## 【化 6】



〔式中、n及びrは、それぞれ、1～約3から選択される整数である〕で示されるポリヒドロキシル化合物を含む。一つの態様において、スペーサーリンカーは、以下の式のポリヒドロキシル化合物のうちの1つ以上を含む：

## 【化 7】

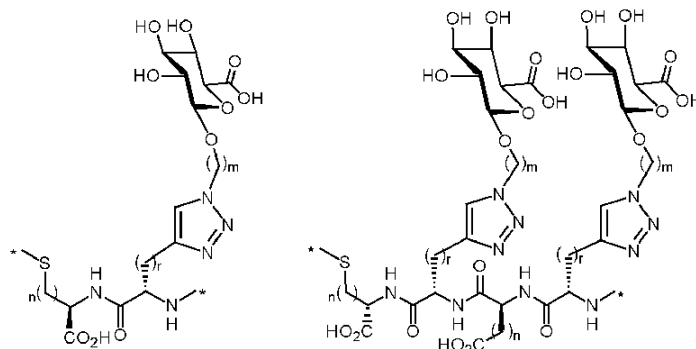


リンカーのそのような部分の全ての立体化学形態が、本明細書において考慮されることが理解される。例えば、上記の式において、この部分を、リボース、キシロース、グルコース、マンノース、ガラクトース又は他の糖から誘導することができ、これらの分子に存在する側鎖ヒドロキシル及びアルキル基の立体化学配置を保持することができる。

## 【0048】

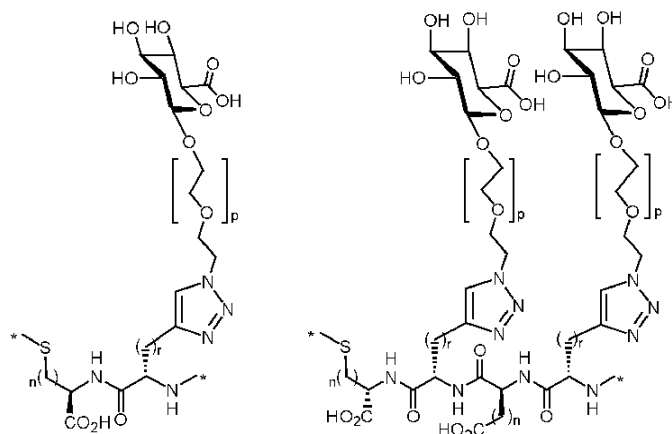
別の形態において、本明細書に記載されている親水性リンカーLは、リンカーの主鎖から離れているポリヒドロキシル基を含む。一つの実施態様において、そのような炭水化物基又はポリヒドロキシル基は、トリアゾール基により主鎖と連結しており、トリアゾール結合親水性スパーサーリンカーを形成する。例示的には、そのようなリンカーは、以下の式：

## 【化 8】



〔式中、 $n$ 、 $m$ 及び $r$ は、整数であり、それぞれ独立して、それぞれの場合に1～約5から選択される〕で示されるフラグメントを含む。一つの例示的な態様において、 $m$ は、独立して、それぞれの場合に2又は3である。別の態様において、 $r$ は、それぞれの場合に1である。別の態様において、 $n$ は、それぞれの場合に1である。一つの変形態様において、ポリヒドロキシル基をリンカーの主鎖に連結する基は、ピロール、ピラゾール、1, 2, 4-トリアゾール、フラン、オキサゾール、イソオキサゾール、チエニル、チアゾール、イソチアゾール、オキサジアゾールなどの、ただしこれらに限定されない異なるヘテロアリアル基である。同様に、二価6員環ヘテロアリアル基が考慮される。前述の例示的亲水性スパーサーリンカーの他の変形態様には、以下の式：

## 【化 9】



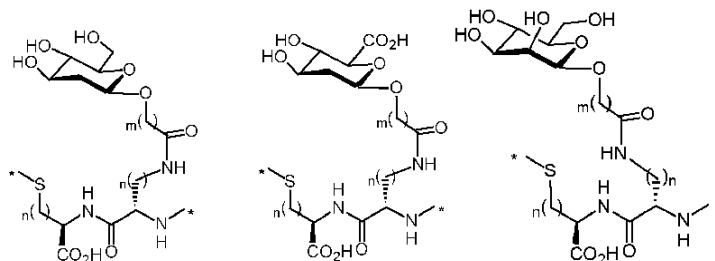
〔式中、 $n$ 及び $r$ は、整数であり、それぞれ独立して、それぞれの場合に1～約5から選択され、そして $p$ は、1～約4から選択される整数である〕で示されるようなオキシアル

キレン基が含まれる。

【0049】

別の実施態様において、そのような炭水化物基又はポリヒドロキシル基は、アミド基により主鎖と連結しており、アミド結合親水性スパーサーリンカーを形成する。例示的には、そのようなリンカーは、以下の式：

【化10】

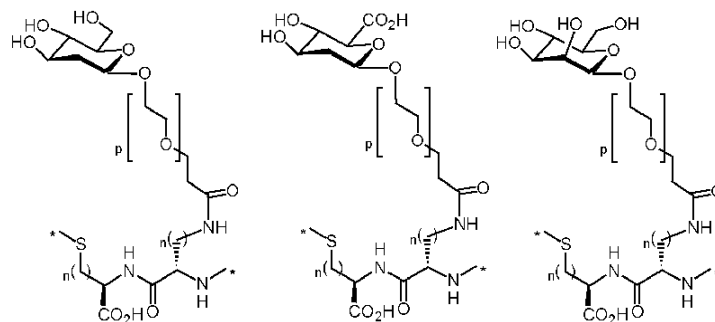


10

〔式中、 $n$ は、1～約3から選択される整数であり、そして $m$ は、1～約22から選択される整数である〕で示されるフラグメントを含む。一つの例示的な態様において、 $n$ は、1又は2である。別の例示的な態様において、 $m$ は、約6～約10から選択され、例示的には8である。一つの変形態様において、ポリヒドロキシル基をリンカーの主鎖に連結する基は、エステル、尿素、カルバメート、アシルヒドラゾンなどの、ただしこれらに限定されない異なる官能基である。同様に、環状の変形態様も考慮される。前述の例示的亲水性スパーサーリンカーの他の変形態様には、以下の式：

20

【化11】



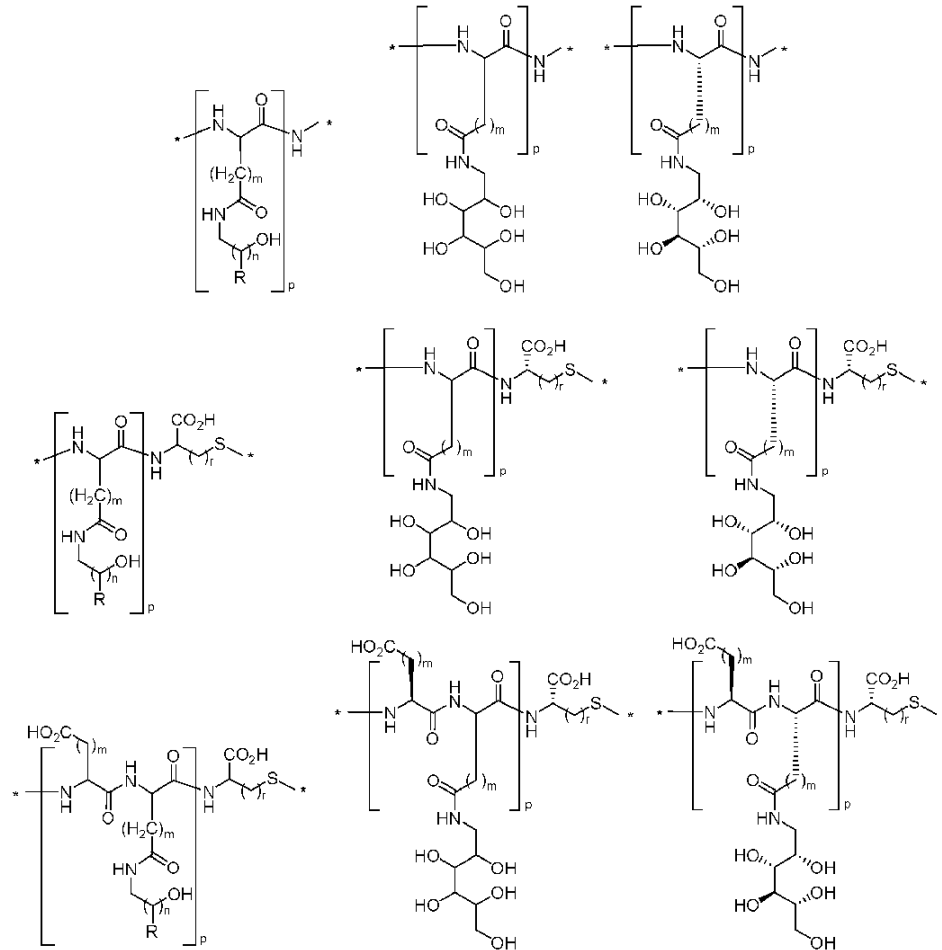
30

〔式中、 $n$ 及び $r$ は、整数であり、それぞれ独立して、それぞれの場合に1～約5から選択され、そして $p$ は、1～約4から選択される整数である〕で示されるようなオキシアルキレン基が含まれる。

【0050】

別の実施態様において、スパーサーリンカーは、以下のフラグメント：

## 【化 1 2】



10

20

〔ここで、Rは、H、アルキル、シクロアルキル又はアリールアルキルであり、mは、1～約3から独立して選択される整数であり、nは、1～約6の整数であり、pは、1～約5の整数であり、そしてrは、1～約3から選択される整数である〕のうちの1つ以上を含む。一つの変形態様において、整数nは、3又は4である。別の変形態様において、整数pは、3又は4である。別の変形態様において、整数rは1である。

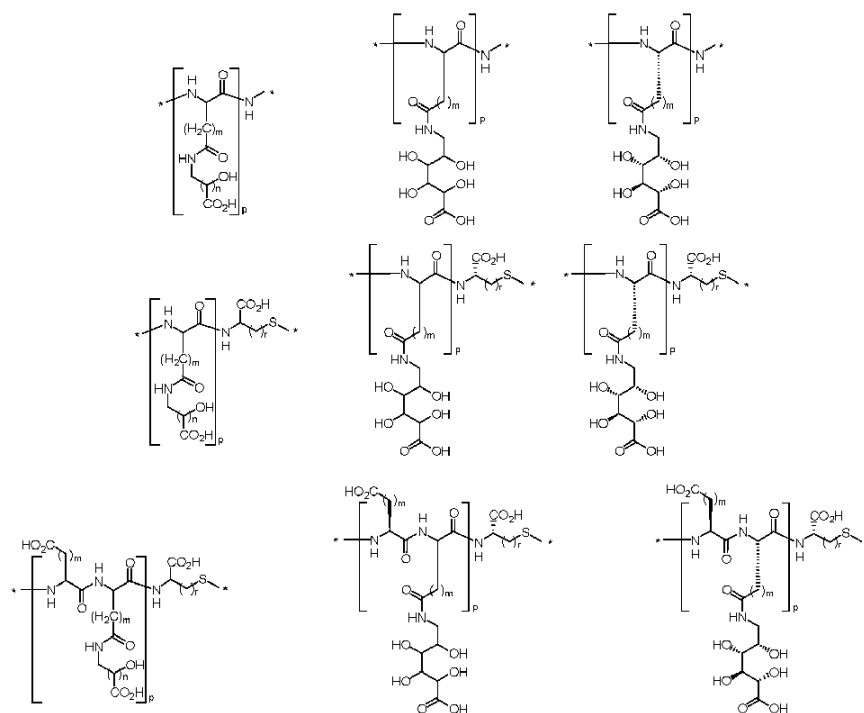
30

## 【0051】

別の実施態様において、スペーサーリンカーは、以下のフラグメント：



## 【化 1 3】



10

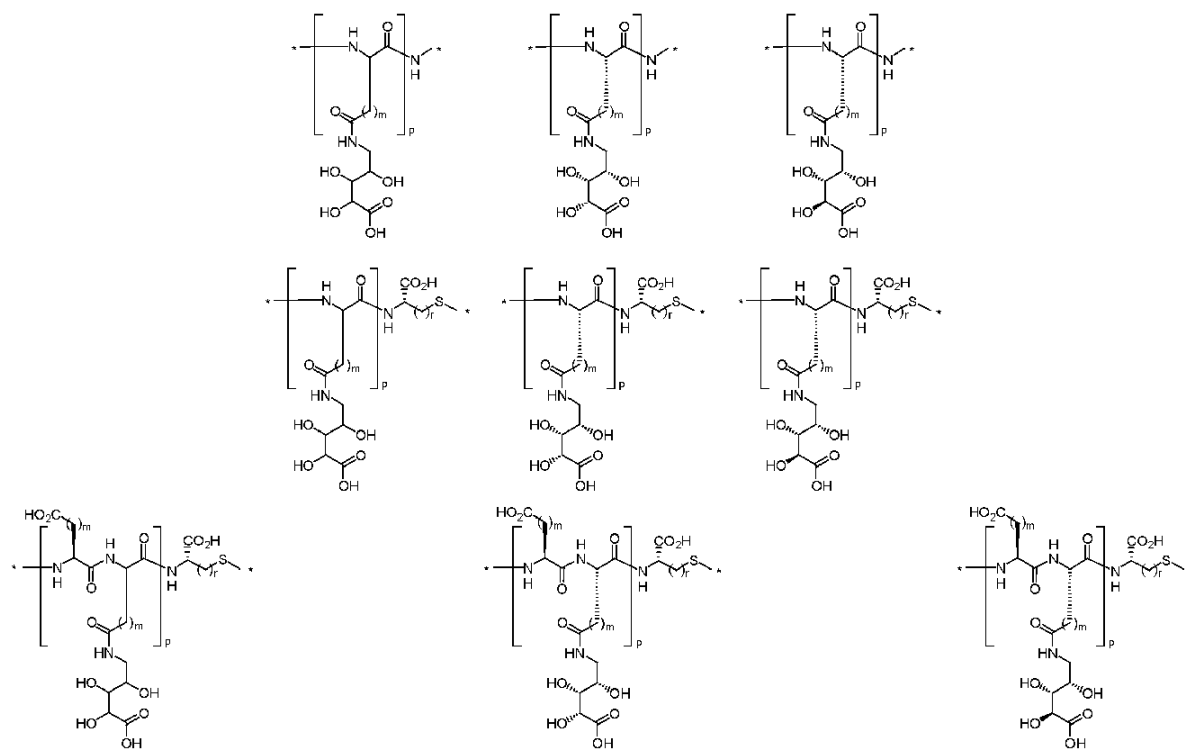
20

〔ここで、mは、1～約3から独立して選択される整数であり、nは、1～約6の整数であり、pは、1～約5の整数であり、そしてrは、1～約3から選択される整数である〕のうちの1つ以上を含む。一つの変形態様において、整数nは、3又は4である。別の変形態様において、整数pは、3又は4である。別の変形態様において、整数rは1である。

## 【0052】

別の実施態様において、スペーサーリンカーは、以下のフラグメント：

## 【化 1 4】



30

40

〔ここで、mは、1～約3から独立して選択される整数であり、nは、1～約6の整数であり、pは、1～約5の整数であり、そしてrは、1～約3から選択される整数である〕

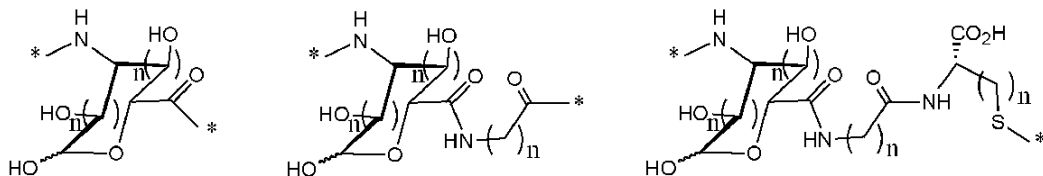
50

のうちの1つ以上を含む。一つの変形態様において、整数  $n$  は、3又は4である。別の変形態様において、整数  $p$  は、3又は4である。別の変形態様において、整数  $r$  は1である。

【0053】

別の実施態様において、親水性スパーサーリンカーは、主鎖と、以下の式：

【化15】



10

〔式中、 $n$ は、それぞれの場合に0～約3から独立して選択される整数である〕により例示されるような分岐側鎖モチーフとの組み合わせである。上記の式は、4員、5員、6員、さらに大きな員の環状糖を表すことが意図される。加えて、上記の式を修飾してデオキシ糖を表すことができ、ここで式に存在する1つ以上のヒドロキシ基は、水素、アルキル又はアミノで置換されていることが理解されるべきである。加えて、1つ以上のヒドロキシ基が酸化されて対応するカルボニルになっている対応するカルボニル化合物が、上記の式により考慮されることが理解されるべきである。加えて、この例示的な実施態様において、ピラノースは、カルボキシルとアミノの両方の官能基を含み、(a)主鎖に挿入することができ、(b)この実施態様の変形態様において分岐側鎖に合成ハンドルを提供することができ、側鎖ヒドロキシ基のいずれかを使用して、対応するオリゴ糖を調製する追加の糖を含む、他の化学フラグメントを結合することができる。ピラノース又は他の糖を単一炭素で主鎖に挿入すること、すなわちジェルミナル対の炭素でのスピロ配置及び同様の配置を含む、この実施態様の他の変形態様も考慮される。例えば、リンカー又は薬剤A又は結合リガンドBの1又は2つの末端を糖に連結して、1, 1, 1, 2, 1, 3, 1, 4, 2, 3又は他の配置で主鎖に挿入することができる。

20

【0054】

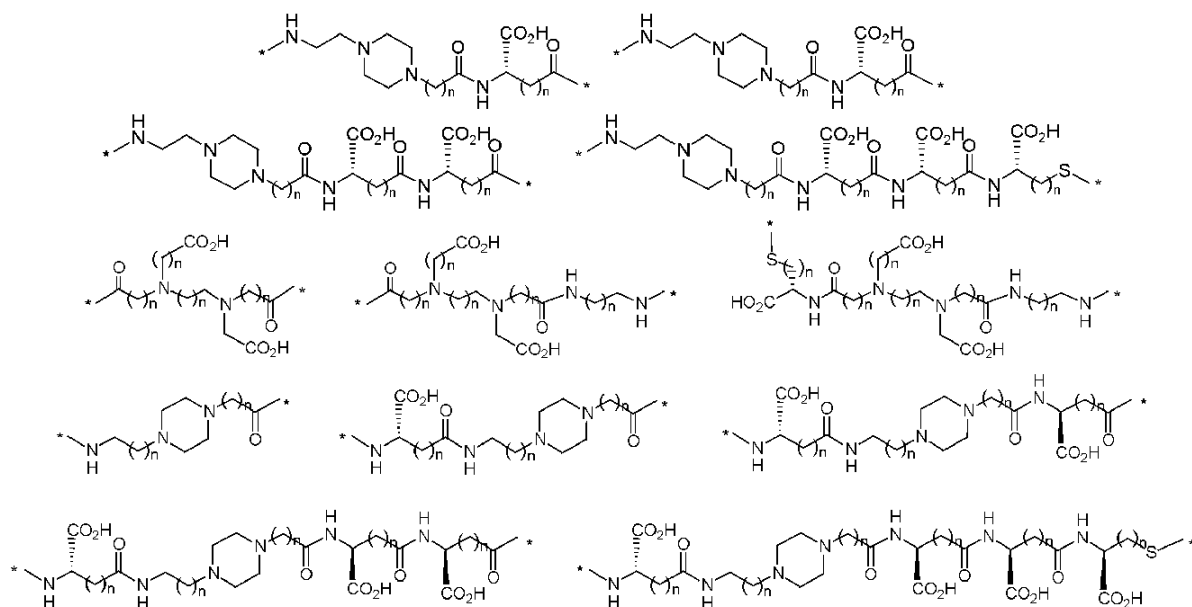
別の実施態様において、本明細書に記載されている親水性スパーサーリンカーは、主に炭素、水素及び窒素から形成され、炭素/窒素比の約3:1以下又は約2:1以下を有する。一つの態様において、本明細書に記載されている親水性リンカーは、複数のアミノ官能基を含む。

30

【0055】

別の実施態様において、スパーサーリンカーは、以下の式：

【化16】



40

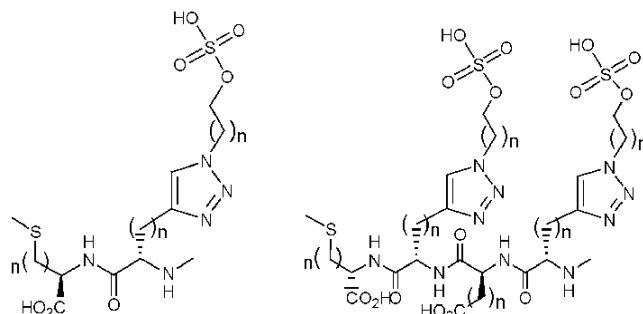
50

〔式中、 $n$ は、それぞれの場合に1～約3から独立して選択される整数である〕で示される1つ以上のアミノ基を含む。一つの態様において、整数 $n$ は、独立して、それぞれの場合に1又は2である。別の態様において、整数 $n$ は、それぞれの場合に1である。

【0056】

別の実施態様において、親水性スパーサーリンカーは、硫酸のアルキルエステルのような硫酸エステルである。例示的には、スパーサーリンカーは、以下の式：

【化17】



10

〔式中、 $n$ は、それぞれの場合に1～約3から独立して選択される整数である〕で示されるものである。例示的に、 $n$ は、独立して、それぞれの場合に1又は2である。

【0057】

ヘテロ原子に結合している遊離水素を含む、そのようなポリヒドロキシル、ポリアミノ、カルボン酸、硫酸などのリンカーにおいて、1つ以上の遊離水素原子を適切なヒドロキシル、アミノ又は酸保護基でそれぞれ保護してもよいし、あるいは対応するプロドラッグとしてブロックしてもよく、後者は、一般的な又は特定の生理学的条件下で母体薬剤を放出するプロドラッグのような、特定の使用のために選択される、ということが理解される。

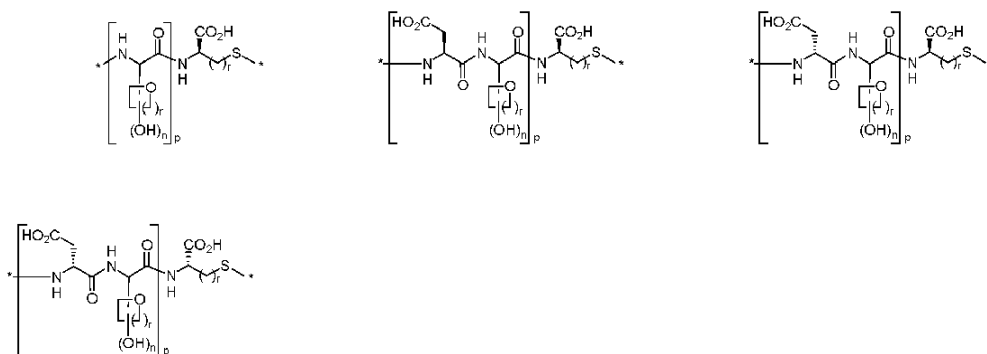
20

【0058】

前述のそれぞれの例示的なリンカーLの例において、幾つかの場合では、追加的なスパーサーリンカー $L_S$ 及び/又は追加的な放出型リンカー $L_R$ も含まれる。これらのスパーサーリンカー及び放出型リンカーも、不斉炭素原子を含むことができる。本明細書に示される立体化学配置は単なる例示であり、他の立体化学配置が考慮されることが、更に理解

30

【化18】



40

ここで、上記に記載されているように、 $n$ は、2～約5の整数であり、 $p$ は1～約5の整数であり、そして $r$ は、1～約4の整数である。

【0059】

前述の実施態様において、(\*)原子のような開放された部位は、結合リガンド(B)又は送達される薬剤(A)の結合する位置であることが、更に理解されるべきである。加えて、B及びAのいずれか又は両方の結合は、直接的であってもよいし又は介在リンカーを介するものであってもよいことが、理解されるべきである。介在リンカーには、他のス

50

ペーサーリンカー及び/又は放出型リンカーが含まれる。本明細書に記載されている結合体に含まれる例示的な追加のペーサーリンカー及び放出型リンカーは、米国特許出願第10/765,335号に記載されており、この開示は参照として本明細書に組み込まれる。

#### 【0060】

一つの実施態様において、親水性ペーサーリンカーは、1つ以上の炭水化物含有又はポリヒドロキシル基含有リンカーを含む。別の実施態様において、親水性ペーサーリンカーは、少なくとも3つの炭水化物含有又はポリヒドロキシル基含有リンカーを含む。別の実施態様において、親水性ペーサーリンカーは、1つ以上の炭水化物含有又はポリヒドロキシル基含有リンカー及び1つ以上のアスパラギン酸を含む。別の実施態様において、親水性ペーサーリンカーは、1つ以上の炭水化物含有又はポリヒドロキシル化合物基含有リンカー及び1つ以上のグルタミン酸を含む。別の実施態様において、親水性ペーサーリンカーは、1つ以上の炭水化物含有又はポリヒドロキシル基含有リンカー、1つ以上のグルタミン酸、1つ以上のアスパラギン酸及び1つ以上のベータアミノアラニンを含む。一連の変形態様において、前述のそれぞれの実施態様において、親水性ペーサーリンカーは、1つ以上のシステインも含む。別の一連の変形態様において、前述のそれぞれの実施態様において、親水性ペーサーリンカーは、少なくとも1つのアルギニンも含む。

10

#### 【0061】

別の実施態様において、親水性ペーサーリンカーは、少なくとも1つの結合リガンド(L)と少なくとも1つの薬剤(A)とを連結する原子の鎖に含まれている、1つ以上の二価1,4-ピペラジンを含む。一つの変形態様において、親水性ペーサーリンカーは、1つ以上の炭水化物含有又はポリヒドロキシル基含有リンカーを含む。別の変形態様において、親水性ペーサーリンカーは、1つ以上の炭水化物含有又はポリヒドロキシル基含有リンカー及び1つ以上のアスパラギン酸を含む。別の変形態様において、親水性ペーサーリンカーは、1つ以上の炭水化物含有又はポリヒドロキシル基含有リンカー及び1つ以上のグルタミン酸を含む。一連の変形態様において、前述のそれぞれの実施態様において、親水性ペーサーリンカーは、1つ以上のシステインも含む。前述のそれぞれの実施態様の他の一連の変形態様において、親水性ペーサーリンカーは、少なくとも1つのアルギニンも含む。

20

30

#### 【0062】

別の実施態様において、親水性ペーサーリンカーは、例えばアミノエチルピペラジニルアセトアミドなどの、ただしこれに限定されない1つ以上のオリゴアミド親水性ペーサーを含む。

#### 【0063】

別の実施態様において、親水性ペーサーリンカーは、1つ以上のトリアゾール結合炭水化物含有又はポリヒドロキシル基含有リンカーを含む。別の実施態様において、親水性ペーサーリンカーは、1つ以上のアミド結合炭水化物含有又はポリヒドロキシル基含有リンカーを含む。別の実施態様において、親水性ペーサーリンカーは、1つ以上のPEG基及び1つ以上のシステインを含む。別の実施態様において、親水性ペーサーリンカーは、1つ以上のEDTE誘導体を含む。

40

#### 【0064】

別の実施態様において、追加のペーサーリンカーは、場合により、下記に定義される置換基X<sup>1</sup>で置換されている1-アルキレンスクシンイミド-3-イルであってもよく、放出型リンカーは、メチレン、1-アルコキシアルキレン、1-アルコキシシクロアルキレン、1-アルオキシアルキレンカルボニル、1-アルコキシシクロアルキレンカルボニルであってもよく、ここで、放出型リンカーは、それぞれ場合により、下記に定義される置換基X<sup>2</sup>で置換されており、ペーサーリンカー及び放出型リンカーは、それぞれペーサーリンカーに結合して、スクシンイミド-1-イルアルキルアセタール又はケタールを形成する。

50

## 【 0 0 6 5 】

追加のスペーサーリンカーは、カルボニル、チオノカルボニル、アルキレン、シクロアルキレン、アルキレンシクロアルキル、アルキレンカルボニル、シクロアルキレンカルボニル、カルボニルアルキルカルボニル、1 - アルキレンスクシンイミド - 3 - イル、1 - (カルボニルアルキル) スクシンイミド - 3 - イル、アルキレンスルホキシル、スルホニルアルキル、アルキレンスルホキシルアルキル、アルキレンスルホニルアルキル、カルボニルテトラヒドロ - 2 H - ピラニル、カルボニルテトラヒドロフラニル、1 - (カルボニルテトラヒドロ - 2 H - ピラニル) スクシンイミド - 3 - イル及び1 - (カルボニルテトラヒドロフラニル) スクシンイミド - 3 - イルであってもよく、ここでスペーサーリンカーは、それぞれ場合により、下記に定義される置換基  $X^1$  で置換される。この実施態様において、スペーサーリンカーは、追加の窒素を含むことができ、スペーサーリンカーは、アルキレンカルボニル、シクロアルキレンカルボニル、カルボニルアルキルカルボニル、1 - (カルボニルアルキル) スクシンイミド - 3 - イルであってもよく、ここで、スペーサーリンカーは、それぞれ場合により、下記に定義される置換基  $X^1$  で置換されており、スペーサーリンカーは、窒素と結合してアミドを形成する。あるいは、スペーサーリンカーは、追加の硫黄を含むことができ、スペーサーリンカーは、アルキレン及びシクロアルキレンであってもよく、ここで、スペーサーリンカーは、場合によりカルボキシで置換されており、スペーサーリンカーは、硫黄と結合してチオールを形成する。別の実施態様において、スペーサーリンカーは、硫黄を含むことができ、スペーサーリンカーは、1 - アルキレンスクシンイミド - 3 - イル及び1 - (カルボニルアルキル) スクシンイミド - 3 - イルであってもよく、スペーサーリンカーは、硫黄と結合してスクシンイミド - 3 - イルチオールを形成する。

## 【 0 0 6 6 】

上記記載の実施態様の代替案として、追加のスペーサーリンカーは、窒素を含むことができ、放出型リンカーは、アルキレンアジリジン - 1 - イル、カルボニルアルキルアジリジン - 1 - イル、スルホキシルアルキルアジリジン - 1 - イル又はスルホニルアルキルアジリジン - 1 - イルを含む二価ラジカルであってもよく、ここで放出型リンカーは、それぞれ場合により、下記に定義される置換基  $X^2$  で置換されている。この代替的な実施態様において、スペーサーリンカーは、カルボニル、チオノカルボニル、アルキレンカルボニル、シクロアルキレンカルボニル、カルボニルアルキルカルボニル、1 - (カルボニルアルキル) スクシンイミド - 3 - イルであってもよく、ここで、スペーサーリンカーは、それぞれ場合により、下記に定義される置換基  $X^1$  で置換されており、スペーサーリンカーは、放出型リンカーと結合してアジリジンアミドを形成する。

## 【 0 0 6 7 】

置換基  $X^1$  は、アルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アミノ、アミノアルキル、アルキルアミノアルキル、ジアルキルアミノアルキル、ハロ、ハロアルキル、スルフヒドリルアルキル、アルキルチオアルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルキルカルボキシレート、アルキルアルカノエート、グアニジノアルキル、 $R^4$  - カルボニル、 $R^5$  - カルボニルアルキル、 $R^6$  - アシルアミノ及び $R^7$  - アシルアミノアルキルであってもよく、ここで、 $R^4$  及び $R^5$  は、それぞれ独立して、アミノ酸、アミノ酸誘導体及びペプチドから選択され、そして $R^6$  及び $R^7$  は、それぞれ独立して、アミノ酸、アミノ酸誘導体及びペプチドから選択される。この実施態様において、スペーサーリンカーは、窒素を含むことができ、置換基  $X^1$  及びスペーサーリンカーは、それに結合して複素環を形成する。

## 【 0 0 6 8 】

別の実施態様において、放出型リンカーは、アルキレンアジリジン - 1 - イル、アルキレンカルボニルアジリジン - 1 - イル、カルボニルアルキルアジリジン - 1 - イル、アルキレンスルホキシルアジリジン - 1 - イル、スルホキシルアルキルアジリジン - 1 - イル、スルホニルアルキルアジリジン - 1 - イル又はアルキレンスルホニルアジリジン - 1 -

イルを含む二価ラジカルであってもよく、ここで放出型リンカーは、それぞれ場合により、下記に定義されている置換基  $X^2$  で置換されている。

【 0 0 6 9 】

例示的な追加の放出型リンカーには、メチレン、1 - アルコキシアルキレン、1 - アルコキシシクロアルキレン、1 - アルコキシアルキレンカルボニル、1 - アルコキシシクロアルキレンカルボニル、カルボニルアリールカルボニル、カルボニル (カルボキシアリール) カルボニル、カルボニル (ビスカルボキシアリール) カルボニル、ハロアルキレンカルボニル、アルキレン (ジアルキルシリル)、アルキレン (アルキルアリールシリル)、アルキレン (ジアリールシリル)、(ジアルキルシリル) アリール、(アルキルアリールシリル) アリール、(ジアリールシリル) アリール、オキシカルボニルオキシ、オキシカルボニルオキシアルキル、スルホニルオキシ、オキシスルホニルアルキル、イミノアルキリデニル、カルボニルアルキリデンイミニル、イミノシクロアルキリデニル、カルボニルシクロアルキリデンイミニル、アルキレンチオ、アルキレンアリールチオ及びカルボニルアルキルチオが含まれ、放出型リンカーは、それぞれ場合により、下記に定義されている置換基  $X^2$  で置換されている。

10

【 0 0 7 0 】

前述の実施態様において、放出型リンカーは、酸素を含むことができ、放出型リンカーは、メチレン、1 - アルコキシアルキレン、1 - アルコキシシクロアルキレン、1 - アルコキシアルキレンカルボニル及び1 - アルコキシシクロアルキレンカルボニルであってもよく、ここで、放出型リンカーは、それぞれ場合により、下記に定義されている置換基  $X^2$  で置換されており、放出型リンカーは、酸素と結合してアセタール又はケタールを形成する。あるいは、放出型リンカーは、酸素を含むことができ、放出型リンカーは、メチレンであってもよく、ここで、メチレンは、場合により置換されているアリールで置換されており、放出型リンカーは、酸素と結合してアセタール又はケタールを形成する。更に、放出型リンカーは、酸素を含むことができ、放出型リンカーは、スルホニルアルキルであってもよく、放出型リンカーは、酸素と結合してアルキルスルホネートを形成する。

20

【 0 0 7 1 】

上記の放出型リンカーの実施態様の別の実施態様において、放出型リンカーは、窒素を含むことができ、放出型リンカーは、イミノアルキリデニル、カルボニルアルキリデンイミニル、イミノシクロアルキリデニル及びカルボニルシクロアルキリデンイミニルであってもよく、ここで、放出型リンカーは、それぞれ場合により、下記に定義されている置換基  $X^2$  で置換されており、放出型リンカーは、窒素と結合してヒドラゾン形成する。代替的な形態では、ヒドラゾンは、カルボン酸誘導体、オルトギ酸誘導体又はカルバモイル誘導体でアシル化されて、多様なアシルヒドラゾン放出可能リンカーを形成することができる。

30

【 0 0 7 2 】

あるいは、放出型リンカーは、酸素を含むことができ、放出型リンカーは、アルキレン (ジアルキルシリル)、アルキレン (アルキルアリールシリル)、アルキレン (ジアリールシリル)、(ジアルキルシリル) アリール、(アルキルアリールシリル) アリール及び(ジアリールシリル) アリールであってもよく、ここで、放出型リンカーは、それぞれ場合により、下記に定義されている置換基  $X^2$  で置換されており、放出型リンカーは、酸素と結合してシラノールを形成する。

40

【 0 0 7 3 】

上記の放出型リンカーの実施態様において、薬剤は、窒素原子を含むことができ、放出型リンカーは、窒素を含むことができ、放出型リンカーは、カルボニルアリールカルボニル、カルボニル (カルボキシアリール) カルボニル、カルボニル (ビスカルボキシアリール) カルボニルであってもよく、放出型リンカーは、ヘテロ原子の窒素と結合してアミドを形成することができ、また、薬剤の窒素と結合してアミドを形成することもできる。

【 0 0 7 4 】

上記の放出型リンカーの実施態様において、薬剤は、酸素原子を含むことができ、放出

50

型リンカーは、窒素を含むことができ、放出型リンカーは、カルボニルアリールカルボニル、カルボニル（カルボキシアリール）カルボニル、カルボニル（ビスカルボキシアリール）カルボニルであってもよく、放出型リンカーは、アミドを形成することができ、また、薬剤の窒素と結合してエステルを形成することもできる。

【0075】

置換基  $X^2$  は、アルキル、アルコキシ、アルコシアルキル、ヒドロキシ、ヒドロシアルキル、アミノ、アミノアルキル、アルキルアミノアルキル、ジアルキルアミノアルキル、ハロ、ハロアルキル、スルフヒドリルアルキル、アルキルチオアルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、カルボキシ、カルボシアルキル、アルキルカルボキシレート、アルキルアルカノエート、グアニジノアルキル、 $R^4$  - カルボニル、 $R^5$  - カルボニルアルキル、 $R^6$  - アシルアミノ及び  $R^7$  - アシルアミノアルキルであってもよく、ここで、 $R^4$  及び  $R^5$  は、それぞれ独立して、アミノ酸、アミノ酸誘導体及びペプチドから選択され、そして  $R^6$  及び  $R^7$  は、それぞれ独立して、アミノ酸、アミノ酸誘導体及びペプチドから選択される。この実施態様において、放出型リンカーは、窒素を含むことができ、置換基  $X^2$  及び放出型リンカーは、複素環を形成することができる。

10

【0076】

複素環は、ピロリジン、ピペリジン、オキサゾリジン、イソオキサゾリジン、チアゾリジン、イソチアゾリジン、ピロリジノン、ピペリジノン、オキサゾリジノン、イソオキサゾリジノン、チアゾリジノン、イソチアゾリジノン及びスクシンイミドであってもよい。

20

【0077】

薬剤 A は、窒素原子を含むことができ、放出型リンカーは、場合により、置換基  $X^2$  で置換されているハロアルキレンカルボニルであってもよく、放出型リンカーは、薬剤の窒素と結合してアミドを形成する。

【0078】

薬剤 A は、酸素原子を含むことができ、放出型リンカーは、場合により、置換基  $X^2$  で置換されているハロアルキレンカルボニルであってもよく、放出型リンカーは、薬剤の酸素と結合してエステルを形成する。

【0079】

薬剤 A は、二重結合窒素原子を含むことができ、この実施態様において、放出型リンカーは、アルキレンカルボニルアミノ及び 1 - (アルキレンカルボニルアミノ) スクシンイミド - 3 - イルであってもよく、放出型リンカーは、薬剤の窒素と結合してヒドラゾンを形成することができる。

30

【0080】

薬剤 A は、硫黄原子を含むことができ、この実施態様において、放出型リンカーは、アルキレンチオ及びカルボニルアルキルチオであってもよく、放出型リンカーは、薬剤の硫黄と結合してジスルフィドを形成することができる。

【0081】

薬剤 A は、マイトマイシン、マイトマイシン誘導体又はマイトマイシン類似体であってもよく、この実施態様において、放出型リンカーは、カルボニルアルキルチオ、カルボニルテトラヒドロ - 2 H - ピラニル、カルボニルテトラヒドロフラニル、1 - (カルボニルテトラヒドロ - 2 H - ピラニル) スクシンイミド - 3 - イル及び 1 - (カルボニルテトラヒドロフラニル) スクシンイミド - 3 - イルであってもよく、ここで、放出型リンカーは、それぞれ場合により、置換基  $X^2$  で置換されており、マイトマイシンのアジリジンは、放出型リンカーと結合してアシルアジリジンを形成する。

40

【0082】

結合リガンド B は、窒素を含む葉酸であってもよく、この実施態様において、スペーサーリンカーは、アルキレンカルボニル、シクロアルキレンカルボニル、カルボニルアルキルカルボニル、1 - アルキレンスクシンイミド - 3 - イル、1 - (カルボニルアルキル) スクシンイミド - 3 - イルであってもよく、ここで、スペーサーリンカーは、それぞれ場

50

合により、置換基  $X^1$  で置換されており、スパーサーリンカーは、葉酸窒素と結合してイミド又はアルキルアミドを形成する。この実施態様において、置換基  $X^1$  は、アルキル、ヒドロキシアルキル、アミノ、アミノアルキル、アルキルアミノアルキル、ジアルキルアミノアルキル、スルフヒドリルアルキル、アルキルチオアルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、グアニジノアルキル、 $R^4$  - カルボニル、 $R^5$  - カルボニルアルキル、 $R^6$  - アシルアミノ及び  $R^7$  - アシルアミノアルキルであってもよく、ここで、 $R^4$  及び  $R^5$  は、それぞれ独立して、アミノ酸、アミノ酸誘導体及びペプチドから選択され、そして  $R^6$  及び  $R^7$  は、それぞれ独立して、アミノ酸、アミノ酸誘導体及びペプチドから選択される。

#### 【0083】

10

本明細書で使用されるとき、シクロアルキレンという用語は、炭素原子の二価鎖を意味し、その一部は、シクロプロパ - 1, 1 - ジイル、シクロプロパ - 1, 2 - ジイル、シクロヘキサ - 1, 4 - ジイル、3 - エチルシクロペンタ - 1, 2 - ジイル、1 - メチレンシクロヘキサ - 4 - イルなどのような環を形成する。

#### 【0084】

本明細書で使用されるとき、複素環という用語は、炭素及びヘテロ原子の一価鎖を意味し、ここでヘテロ原子は、窒素、酸素及び硫黄から選択され、少なくとも1つのヘテロ原子を含むその一部は、アジリジン、ピロリジン、オキサゾリジン、3 - メトキシピロリジン、3 - メチルピペラジンなどのような環を形成する。

#### 【0085】

20

本明細書で使用されるとき、アリールという用語は、フェニル、ナフチルなどのような、炭素原子の芳香族単環式又は多環式の環を意味する。加えて、アリールにはヘテロアリールも含まれる。

#### 【0086】

本明細書で使用されるとき、ヘテロアリールという用語は、ピリジニル、ピリミジニル、インドリル、ベンゾオキサゾリルなどのような、炭素原子と、窒素、酸素、硫黄から選択される少なくとも1個のヘテロ原子とからなる芳香族単環式又は多環式の環を意味する。

#### 【0087】

本明細書で使用されるとき、場合により置換されているという用語は、一般に炭素上で、1つ以上の水素原子を、対応する数の、ハロ、ヒドロキシ、アミノ、アルキル又はジアルキルアミノ、アルコキシ、アルキルスルホニル、シアノ、ニトロなどのような置換基で置き換えることを意味する。加えて、同じ炭素上の、隣接する炭素上の、又は近接の炭素上の2個の水素を1個の二価置換基で置き換えて、対応する環状構造を形成することができる。

30

#### 【0088】

本明細書で使用されるとき、イミノアルキリデニルという用語は、本明細書に定義されているアルキレン及び窒素原子を含有する二価ラジカルを意味し、ここでアルキレンの末端炭素は、式： $-(CH)=N-$ 、 $-(CH_2)_2(CH)=N-$ 、 $-CH_2C(Me)=N-$  などのように、窒素原子に二重結合している。

40

#### 【0089】

本明細書で使用されるとき、アミノ酸という用語は、一般に、セリン、システイン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸などのような天然に生じるアミノ酸に対応する基を含むアミノアルキルカルボキシレートを意味し、ここでアルキルラジカルは、場合により、例えばアルキル、ヒドロキシアルキル、スルフヒドリルアルキル、アミノアルキル、カルボキシアルキルなどで置換されている。そのようなアミノ酸は、単一立体化学のものであるか又はラセミ混合物を含む立体化学の特定の混合物であってもよい。加えて、アミノ酸は、ベータ、ガンマ及びより長いアミノ酸、例えば下記の式：



〔式中、Rは、水素、アルキル、アシル又は適切な窒素保護基であり、 $R_1$  及び  $R_2$  は、

50



水素又は置換基であり、それぞれ現れるときに、それぞれ独立して選択され、そしてqは、1、2、3、4又は5のような整数である〕で示されるアミノ酸を意味する。例示的に、R及び/又はR'は、独立して、水素に対応するか、又は、メチル、ベンジル、ヒドロキシメチル、チオメチル、カルボキシル、カルボキシルメチル、グアニジノプロピルなどの、ただしこれらに限定されない天然に生じるアミノ酸に存在する側鎖、並びにその誘導体及び保護誘導体に対応する。上記に記載された式は、全ての立体化学的変形態様を含む。例えば、アミノ酸は、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、リシン、グルタミン、アルギニン、セリン、オルニチン、トレオニンなどから選択することができる。本明細書に記載されているビタミン受容体結合薬剤送達結合体の中間体の別の例示的態様において、薬剤又はその類似体若しくは誘導体は、アルキルチオール求核剤を含む。

10

#### 【0090】

上記記載の用語を組み合わせ、メチルオキシメチル、エチルオキシエチルなどを意味するアルコキシアルキル、トリフルオロメチルオキシエチル、1,2-ジフルオロ-2-クロロエタ-1-イルオキシプロピルなどを意味するハルアルコキシアルキル、ベンジル、フェネチル、-メチルベンジルなどを意味するアリールアルキルのような、化学的に関連する基を生じうることを理解するべきである。

#### 【0091】

本明細書で使用されるとき、アミノ酸誘導体という用語は、一般に、場合により置換されているアミノアルキルカルボキシレートの意味し、ここでアミノ基及び/又はカルボキシレート基は、それぞれ場合により、例えばアルキル、カルボキシアルキル、アルキルアミノなどで置換されているか、又は場合により保護されている。加えて、場合により置換されている介在二価アルキルフラグメントは、保護基などのような追加の基を含むことができる。

20

#### 【0092】

本明細書で使用されるとき、ペプチドという用語は、一般に、アミド結合により互いに共有結合している、一連のアミノ酸及び/又はアミノ酸類似体及び誘導体を意味する。

#### 【0093】

本明細書で使用されるとき、用語「放出型リンカー」は、生理学的条件下で分断される少なくとも1つの結合（例えば、pH不安定性、酸不安定性、酸化不安定性又は酵素不安定性の結合）を含むリンカーを意味する。結合分断をもたらすような生理学的条件には、例えば生理学的pHにおいて生じるか、又は細胞質のpHよりも低いpHを有するエンドソームのような細胞オルガネラへの区画化の結果により生じる標準的加水分解反応が含まれることが、理解されるべきである。

30

#### 【0094】

切断しうる結合は、切断しうるリンカーの内部及び/又は切断しうるリンカーの一端若しくは両端に存在することができる。切断しうる結合の不安定性は、そのような結合分断を補助する、又は促進することができる官能基又はフラグメントを多価リンカーLに含めることによって調整できることが理解され、これは隣接基補助とも呼ばれる。加えて、放出型リンカーの結合分断後に受容体結合リガンド剤結合体の追加的な断片化を補助する、又は促進することができる追加の官能基又はフラグメントを、多価リンカーLに含めうることが理解される。切断しうる結合の不安定性は、例えば、切断しうるジスルフィド結合に隣接してアルファ分岐を含むこと、加水分解しうるケイ素酸素結合を有する部分のケイ素の置換基の疎水性を増加すること、加水分解しうるケタール又はアセタールの一部を形成するアルコキシ基を同族体化することなどのような、切断しうる結合上の又はその近傍における置換変化により調整することができる。

40

#### 【0095】

切断しうる結合は、2つの隣接する原子を放出型リンカー内で連結できること、並びに/或いは、他のリンカー又は本明細書に記載されているV及び/若しくはDを、放出型リンカーのどちらか又は両方の末端で連結できること、が理解される。切断しうる結合が2

50

つの隣接する原子を放出型リンカー内で連結する場合、結合の分断の後、放出型リンカーは、2つ以上のフラグメントに分断される。あるいは、切断しうる結合が、放出型リンカーと、追加のヘテロ原子、追加のスペーサーリンカー、別の放出型リンカー、薬剤 A 又はその類似体若しくは誘導体、又は結合リガンド B 又はその類似体若しくは誘導体のような別の部分との間にある場合、結合の分断の後、放出型リンカーは、他の部分から分離される。

【0096】

追加のスペーサー及び放出型リンカーは、それぞれ二価であることが理解される。それぞれの多様な追加のスペーサー及び放出型リンカーそれ自体の間の連結、並びに多様な追加のスペーサー及び放出型リンカーと、本明細書で定義されている A 及び / 又は B との間の連結は、多様な追加のスペーサー又は放出型リンカーにおいて見出される任意の原子において生じることが、更に理解されるべきである。

10

【0097】

本明細書に記載されている多様な受容体結合薬剤送達結合体の一つの態様において、多価リンカーは、一緒になって 3 - チオスクシンイミド - 1 - イルアルキルオキシメチルオキシを形成する、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、ここでメチルは、場合により、アルキル又は置換アリールで置換されている。

【0098】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になって 3 - チオスクシンイミド - 1 - イルアルキルカルボニルを形成する、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、ここでカルボニルは、薬剤 A と共に、アシルアジリジン又はその類似体若しくは誘導体を形成する。

20

【0099】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になって 1 - アルコキシシクロアルキレンオキシを形成する、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含む。

【0100】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になってアルキレンアミノカルボニル（ジカルボキシルアリーレン）カルボキシレート形成する、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含む。

【0101】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になってジチオアルキルカルボニルヒドラジドを形成する、放出型リンカー、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、ここでヒドラジドは、薬剤 A と共に、ヒドラゾン又はその類似体若しくは誘導体を形成する。

30

【0102】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になって 3 - チオスクシンイミド - 1 - イルアルキルカルボニルヒドラジドを形成する、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、ここでヒドラジドは、薬剤 A と共に、ヒドラゾン又はその類似体若しくは誘導体を形成する。

【0103】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になって 3 - チオアルキルスルホニルアルキル（二置換シリル）オキシを形成する、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、ここで二置換シリルは、アルキル又は場合により置換されているアリールで置換されている。

40

【0104】

別の態様において、多価リンカーは、天然に生じるアミノ酸及びその立体異性体からなる群より選択される複数の追加のスペーサーリンカーを含む。

【0105】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になって 3 - ジチオアルキルオキシカルボニルを形成する、放出型リンカー、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、

50

ここでカルボニルは、薬剤 A と共に、カーボネート又はその類似体若しくは誘導体を形成する。

【 0 1 0 6 】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になって 3 - ジチオアリアルアルキルオキシカルボニルを形成する、放出型リンカー、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、ここでカルボニルは、薬剤 A と共に、カーボネート又はその類似体若しくは誘導体を形成し、そしてアリアルは場合により置換されている。

【 0 1 0 7 】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になって 3 - チオスクシンイミド - 1 - イルアルキルオキシアルキルオキシアルキリデンを形成する、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、ここでアルキリデンは、薬剤 A と共に、ヒドラゾン又はその類似体若しくは誘導体を形成し、アルキルは、それぞれ独立して選択され、そしてオキシアルキルオキシは、場合により、アルキル又は場合により置換されているアリアルで置換されている。

10

【 0 1 0 8 】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になって 3 - ジチオアルキルオキシカルボニルヒドラジドを形成する、放出型リンカー、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含む。

【 0 1 0 9 】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になって 3 - ジチオアルキルアミノを形成する、放出型リンカー、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、ここでアミノは、薬剤 A と共に、ビニル系アミド又はその類似体若しくは誘導体を形成する。

20

【 0 1 1 0 】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になって 3 - ジチオアルキルアミノを形成する、放出型リンカー、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、ここでアミノは、薬剤 A と共に、ビニル系アミド又はその類似体若しくは誘導体を形成し、そしてアルキルはエチルである。

【 0 1 1 1 】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になって 3 - ジチオアルキルアミノカルボニルを形成する、放出型リンカー、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、ここでカルボニルは、薬剤 A と共に、カルバメート又はその類似体若しくは誘導体を形成する。

30

【 0 1 1 2 】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になって 3 - ジチオアルキルアミノカルボニルを形成する、放出型リンカー、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、ここでカルボニルは、薬剤 A と共に、カルバメート又はその類似体若しくは誘導体を形成し、そしてアルキルはエチルである。

【 0 1 1 3 】

別の態様において、多価リンカーは、一緒になって 3 - ジチオアリアルアルキルオキシカルボニルを形成する、放出型リンカー、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、ここでカルボニルは、薬剤 A と共に、カルバメート又はカルバモイルアジリジン、又はその類似体若しくは誘導体を形成する。

40

【 0 1 1 4 】

別の実施態様において、多価リンカー ( L ) は、ジスルフィド放出可能リンカーを含む。別の実施態様において、多価リンカー ( L ) は、ジスルフィド放出可能リンカーではない少なくとも 1 つの放出型リンカーを含む。

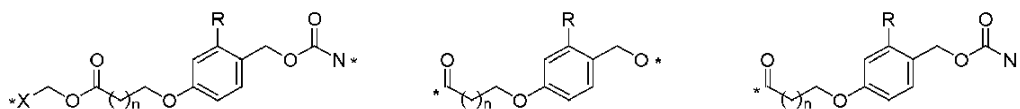
【 0 1 1 5 】

一つの態様において、放出型リンカー及びスペーサーリンカーを、多価リンカーの結合の切断の後、放出された官能基が追加の結合の分断又は切断を化学的に補助するように配置することができ、これは隣接基補助切断又は分断とも呼ばれる。そのような多価リンカ

50

ー又はその一部の例示的な実施態様には、以下の式：

【化 19】

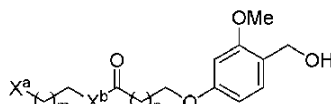


〔式中、X は、窒素、酸素若しくは硫黄のようなヘテロ原子、又はカルボニル基であり；n は、0 ～ 4 から選択される整数であり、例示的には 2 であり；R は、水素、又は正電荷を誘導的に又はメトキシを含むアルコキシのようなアリール環の共鳴により安定化することができる置換基を含む、置換基であり；そして符号（\*）は、追加のスペーサー、ヘテロ原子又は多価リンカーを形成する放出型リンカーの結合点、あるいは薬剤又はその類似体若しくは誘導体、又はビタミン又はその類似体若しくは誘導体の結合点を示す〕を有する化合物が含まれる。一つの実施態様において、n は 2 であり、そして R はメトキシである。ヒドロキシ、アルキル、アルコキシ、アルキルチオ、ハロなどの、ただしこれらに限定されない他の置換基が、アリール環、ベンジル炭素、アルカン酸又はメチレン架橋に存在できることが、理解される。補助切断は、ベンジリニウム中間体、ベンジン中間体、ラクトン環化、オキシニウム中間体、ベータ脱離などを伴う機構を含むことができる。放出型リンカーの切断の後の断片化に加えて、放出型リンカーの最初の切断を隣接基補助機構により促進できることが、更に理解される。

【0116】

そのようなリンカーを形成するのに有用な中間体の例示的な例には、下記が含まれ：

【化 20】

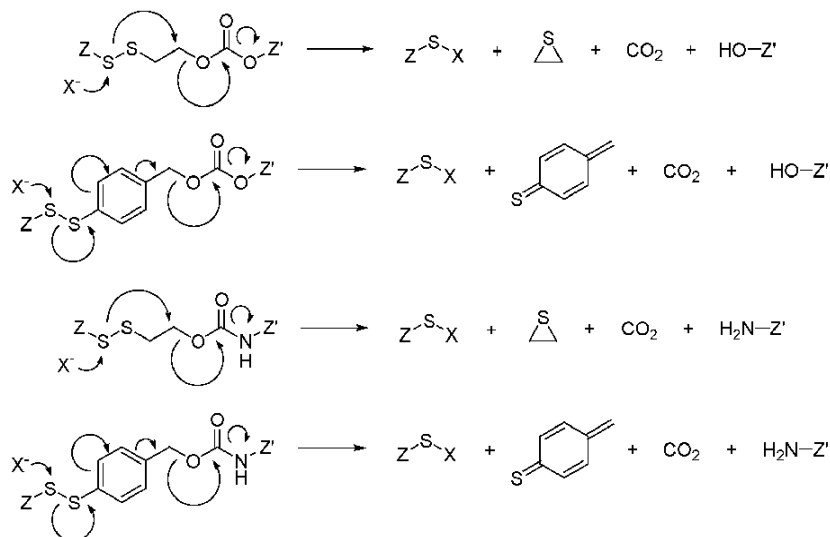


ここで、X<sup>a</sup> は、マレイミド、ビニルスルホン、活性化カルボン酸誘導体などのような求電子基であり、X<sup>b</sup> は、NH、O 又は S であり、そして m 及び n は、それぞれ、0 ～ 4 の整数から独立して選択される。一つの変形態様において、m 及び n は、それぞれ 0 ～ 2 の整数から独立して選択される。そのような中間体を、求電子基 X<sup>a</sup> への求核攻撃を介して又はのエステル若しくはカルボン酸誘導体を形成することによって、薬剤、結合リガンド又は他のリンカーに結合することができる。一つの実施態様において、ベンジルヒドロキシル基は、ホスゲン又はホスゲン同等物により、対応する活性化ベンジルオキシカルボニル化合物に変換される。この実施態様を、活性化カルボニル基への求核攻撃を介して、薬剤、結合リガンド又は他のリンカーに結合することができる。

【0117】

本明細書に記載されている二価リンカーの切断の例示的な機構には、以下の 1, 4 及び 1, 6 断片化機構が含まれ：

## 【化 2 1】



10

ここで、Xは、外来性又は内在性求核剤、グルタチオン又は生体内還元剤などであり、そしてZ又はZ'のいずれかは、ビタミン又はその類似体若しくは誘導体、又は薬剤又はその類似体若しくは誘導体、又は多価リンカーの他の部分と一緒にしたビタミン若しくは薬剤部分である。なお上記の断片化機構は協調的機構として描かれているが、任意の数の別個の工程が生じて、多価リンカーの、示されている最終生成物に至る最終的な断片化をもたらしてもよいことが、理解されるべきである。例えば、結合切断は、上記の例に例示されているベータ硫黄又はジスルフィドのいずれかのアリール基により提供される安定化によって隣接基補助されうる、カルバメート部分の酸触媒脱離によっても生じうることが理解される。本実施態様のこれらの変形態様において、放出型リンカーは、カルバメート部分である。あるいは、断片化は、ジスルフィド基への求核攻撃により開始され、切断を引き起こしてチオレートを形成することができる。チオレートは、炭酸又はカルバミン酸部分を分子間で置換して、対応するチアシクロプロパンを形成することができる。ベンジル含有多価リンカーの場合では、例示的なジスルフィド結合分断の後、得られたフェニルチオレートは、共鳴安定化中間体を形成することによって、更に断片化されて炭酸又はカルバミン酸部分を放出することができる。これらのいずれかの場合において、本明細書に記載されている例示的な多価リンカーの放出可能特性は、既存の化学的、代謝的、生理学的又は生物学的条件に関連しうるどのような機構によっても実現することができる。

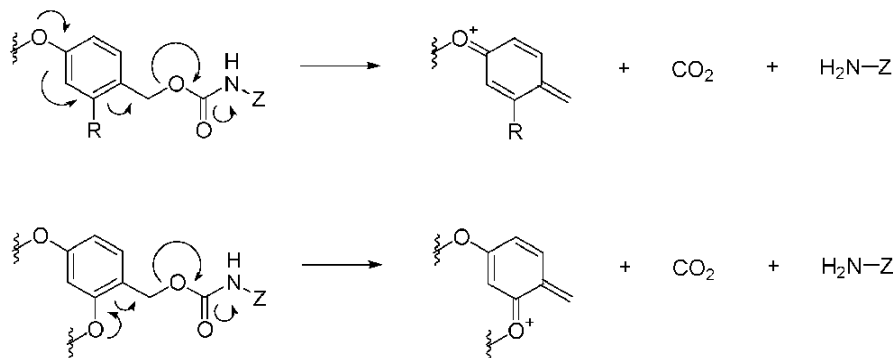
20

30

## 【0118】

放出型リンカーの結合切断の他の例示的な機構には、以下のようなオキソニウム補助切断を含み：

## 【化 2 2】



40

ここで、Zは、ビタミン又はその類似体若しくは誘導体、又は薬剤又はその類似体若しくは誘導体であるか、或いは、それぞれ、1つ以上のスペーサーリンカー及び/又は他の放出可能リンカーを含む薬剤又はビタミン部分のような、多価リンカーの他の部分と一緒に

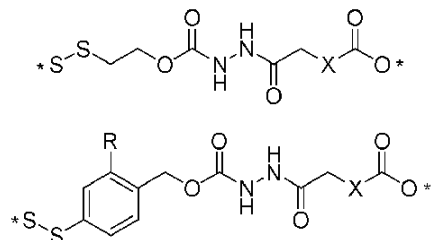
50

したビタミン若しくは薬剤部分である。理論に束縛されることなく、この実施態様において、例えばエンドソーム内にある酸触媒は、ウレタン基のプロトン化を介して切断を開始することができる。加えて、カルバメートの酸触媒脱離は、 $\text{CO}_2$  及び Z に結合している窒素含有部分の放出をもたらし、水又は他の任意のルイス酸により捕捉されうるベンジルカチオンの形成をもたらし。

#### 【0119】

他の例示的なリンカーには、下記の式：

#### 【化23】



10

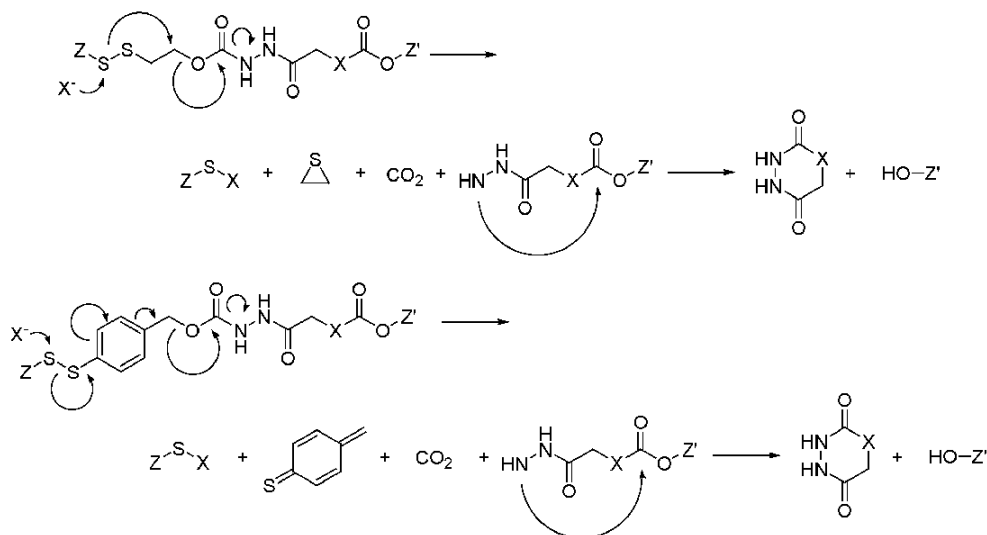
〔式中、Xは、NH、CH<sub>2</sub>又はOであり；Rは、水素、又は正電荷を誘導的に又はメトキシを含むアルコキシのようなアリール環の共鳴により安定化することができる置換基を含む、置換基であり；そして符号（\*）は、追加のスペーサー、ヘテロ原子又は多価リンカーを形成する放出型リンカーの結合点、あるいは薬剤又はその類似体若しくは誘導体、又はビタミン又はその類似体若しくは誘導体の結合点を示す〕で示される化合物が含まれる。

20

#### 【0120】

本明細書に記載されているそのような多価リンカーの切断の例示的な機構には、以下の1、4及び1、6断片化機構が含まれ、それらに続くのはヒドラジド基による環化を介したアシル化Zの隣接基補助切断である：

#### 【化24】



30

40

ここで、Xは、外来性又は内在性求核剤、グルタチオン又は生体内還元剤などであり、そしてZ又はZ'のいずれかは、ビタミン又はその類似体若しくは誘導体、又は薬剤又はその類似体若しくは誘導体、又は多価リンカーの他の部分と一緒にしたビタミン若しくは薬剤部分である。なお上記の断片化機構は協調的機構として描かれているが、任意の数の別個の工程が生じて、多価リンカーの、示されている最終生成物に至る最終的な断片化をもたらしてもよいことが、理解されるべきである。例えば、結合切断は、上記の例に例示されているベータ硫黄又はジスルフィドのいずれかのアリール基により提供される安定化によって隣接基補助されうる、カルバメート部分の酸触媒脱離によっても生じることが理解される。本実施態様のこれらの変形態様において、放出型リンカーは、カルバメート部

50

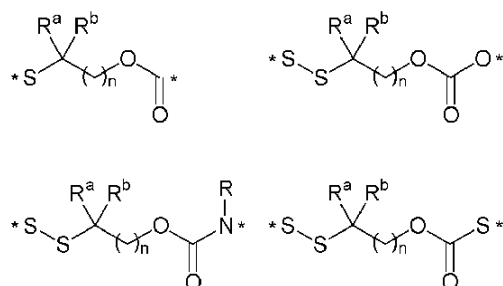
分である。あるいは、断片化は、ジスルフィド基への求核攻撃により開始され、切断を引き起こしてチオレートを形成することができる。チオレートは、炭酸又はカルバミン酸部分を分子間で置換して、対応するチアシクロプロパンを形成することができる。ベンジル含有多価リンカーの場合では、例示的なジスルフィド結合分断の後、得られたフェニルチオレートは、共鳴安定化中間体を形成することによって、更に断片化されて炭酸又はカルバミン酸部分を放出することができる。これらのいずれかの場合において、本明細書に記載されている例示的な多価リンカーの放出可能特性は、既存の化学的、代謝的、生理学的又は生物学的条件に関連しうるどのような機構によっても実現することができる。理論に束縛されることなく、この実施態様において、例えばエンドソーム内にある酸触媒は、ウレタン基のプロトン化を介して切断を開始することもできる。加えて、カルバメートの酸触媒脱離は、 $\text{CO}_2$  及び  $\text{Z}$  に結合している窒素含有部分の放出をもたらす、水又は他の任意のルイス酸により捕捉されうるベンジルカチオンの形成をもたらす、本明細書に同じように記載されている。

10

## 【0121】

一つの実施態様において、本明細書に記載されている多価リンカーは、以下の式：

## 【化25】



20

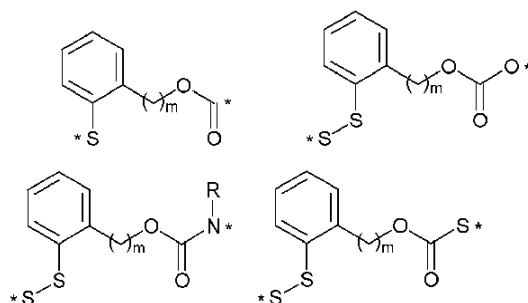
〔式中、 $n$  は、1 ~ 約 4 から選択される整数であり； $R^a$  及び  $R^b$  は、それぞれ独立して、水素及び場合により分岐鎖である  $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$  アルキルのような低級アルキルを含むアルキルからなる群より選択されるか、或いは  $R^a$  及び  $R^b$  は、結合している炭素原子と一緒に炭素環を形成し； $R$  は、場合により置換されているアルキル基、場合により置換されているアシル基又は適切に選択された窒素保護基であり；そして（\*）は、薬剤、ビタミン、画像化剤、診断剤、他の多価リンカー又は結合体の他の部分の結合点を示す〕で示される化合物である。

30

## 【0122】

別の実施態様において、本明細書に記載されている多価リンカーは、以下の式：

## 【化26】



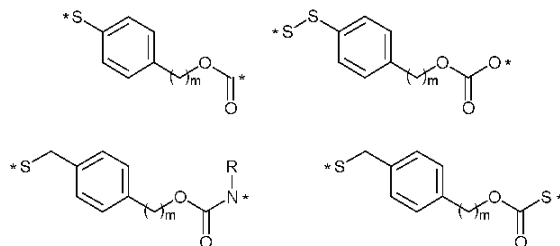
40

〔式中、 $m$  は、1 ~ 約 4 から選択される整数であり； $R$  は、場合により置換されているアルキル基、場合により置換されているアシル基又は適切に選択された窒素保護基であり；そして（\*）は、薬剤、ビタミン、画像化剤、診断剤、他の多価リンカー又は結合体の他の部分の結合点を示す〕で示される化合物を含む。

## 【0123】

別の実施態様において、本明細書に記載されている多価リンカーは、以下の式：

## 【化 2 7】



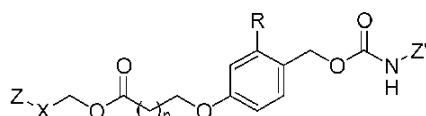
〔式中、mは、1～約4から選択される整数であり；Rは、場合により置換されているアルキル基、場合により置換されているアシル基又は適切に選択された窒素保護基であり；そして（\*）は、薬剤、ビタミン、画像化剤、診断剤、他の多価リンカー又は結合体の他の部分の結合点を示す〕で示される化合物を含む。

10

## 【0124】

別の例示的な機構は、放出型リンカー及びスペーサーリンカーを、多価リンカーの結合の切断の後、放出された官能基が追加の結合の分断又は切断を化学的に補助するように配置することを伴い、これは隣接基補助切断又は分断とも呼ばれる。そのような多価リンカー又はその一部の例示的な実施態様には、下記の式：

## 【化 2 8】



20

〔式中、Xは、窒素、酸素又は硫黄のようなヘテロ原子であり、nは、0、1、2及び3から選択される整数であり、Rは、水素、又は正電荷を誘導的に又はアルコキシなどのようなアリール環の共鳴により安定化することができる置換基を含む、置換基であり、Z又はZ'のいずれかは、ビタミン又はその類似体若しくは誘導體、又は薬剤又はその類似体又は誘導體、又は多価リンカーの他の部分と一緒にしたビタミン若しくは薬剤部分である〕を有する化合物が含まれる。ヒドロキシ、アルキル、アルコキシ、アルキルチオ、ハロなどの、ただしこれらに限定されない他の置換基が、アリール環、ベンジル炭素、カルバメート窒素、アルカン酸又はメチレン架橋に存在できることが、理解される。補助切断は、ベンジリニウム中間体、ベンジン中間体、ラクトン環化、オキソニウム中間体、ベータ脱離などを伴う機構を含むことができる。放出型リンカーの切断の後の断片化に加えて、放出型リンカーの最初の切断を隣接基補助機構により促進できることが、更に理解される。

30

## 【0125】

この実施態様において、環化されてもよいヒドロキシアルカン酸は、例えばオキソニウムイオンによりメチレン架橋の切断を促進し、結合切断を促進するか又は放出型リンカーの結合切断の後に続く断片化を促進する。あるいは、メチレン架橋の酸触媒オキソニウムイオン補助切断は、この例示的な多価リンカー又はそのフラグメントの断片化カスケードを開始することができる。あるいは、カルバメートの酸触媒加水分解は、環化してもよいヒドロキシアルカン酸のベータ脱離を促進することができ、例えばオキソニウムイオンによるメチレン架橋の切断を促進することができる。本明細書に記載されている代謝的、生理学的又は細胞条件下での結合分断又は切断の、その他の化学的機構が、そのような断片化のカスケードを開始してもよいことが理解される。本明細書に記載されている代謝的、生理学的又は細胞条件下での結合分断又は切断の、その他の化学的機構が、そのような断片化のカスケードを開始してもよいことが理解される。

40

## 【0126】

本明細書に記載されているリンカーの別の例示的な実施態様には、ベータ脱離を伴う化学的機構により本明細書に記載されている条件下で切断する放出型リンカーが含まれる。

50

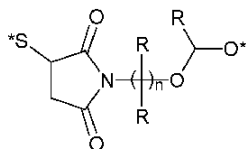


一つの態様において、そのような放出型リンカーには、ベータ - チオ、ベータ - ヒドロキシ及びベータ - アミノ置換カルボン酸、並びにエステル、アミド、カーボネート、カルバメート及び尿素のようなその誘導体が含まれる。別の態様において、そのような放出型リンカーには、2 - 及び 4 - チオアリールエステル、カルバメート及びカーボネートが含まれる。

【0127】

別の実施態様において、多価リンカーは、連結して多価 3 - チオスクシンイミド - 1 - イルアルキルオキシメチルオキシ基を形成する、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、以下の式により例示される：

【化29】

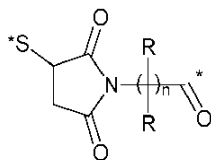


式中、n は、1 ~ 6 の整数であり、アルキル基は、場合により置換されており、メチルは、場合により、追加のアルキル又は場合により置換されているアリール基で置換されており、それぞれ、基 R から独立して選択されて表されている。符号 ( \* ) は、本明細書に記載されている結合体の他の部分への多価リンカーフラグメントの結合点を示す。

【0128】

別の実施態様において、多価リンカーは、連結して多価 3 - チオスクシンイミド - 1 - イルアルキルカルボニル基を形成する、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、以下の式により例示される：

【化30】

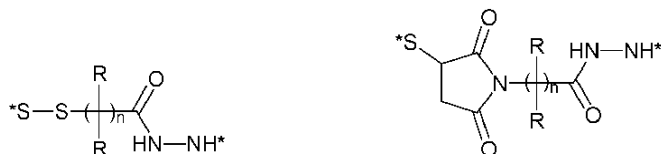


式中、n は、1 ~ 6 の整数であり、アルキル基は場合により置換されている。符号 ( \* ) は、本明細書に記載されている結合体の他の部分への多価リンカーフラグメントの結合点を示す。別の態様において、多価リンカーは、連結して多価 3 - チオアルキルスルホニルアルキル (二置換シリル) オキシ基を形成する、スペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、ここで二置換シリルは、アルキル及び / 又は場合により置換されているアリール基で置換されている。

【0129】

別の実施態様において、多価リンカーは、連結して多価ジチオアルキルカルボニルヒドラジド基又は多価 3 - チオスクシンイミド - 1 - イルアルキルカルボニルヒドラジドを形成する、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、以下の式により例示される：

【化31】

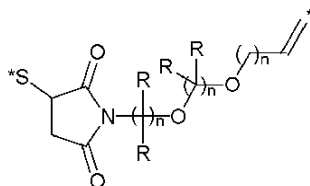


式中、n は 1 ~ 6 の整数であり、アルキル基は、場合により置換されており、ヒドラジドは、( B )、( D ) 又は多価リンカー ( L ) の別の部分と共にヒドラゾンを形成する。符号 ( \* ) は、本明細書に記載されている結合体の他の部分への多価リンカーフラグメントの結合点を示す。

## 【 0 1 3 0 】

別の実施態様において、多価リンカーは、連結して多価 3 - チオスクシンイミド - 1 - イルアルキルオキシアルキルオキシアルキリデン基を形成する、追加のスペーサーリンカー及び放出型リンカーを含み、以下の式により例示される：

## 【 化 3 2 】



10

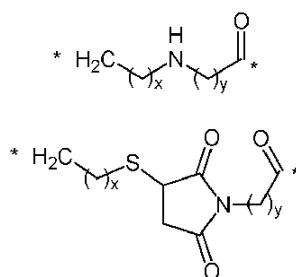
式中、n は、それぞれ、1 ~ 6 から独立して選択される整数であ、アルキル基は、それぞれ独立して選択され、場合により、例えばアルキル又は場合により置換されているアールで置換されており、アルキリデンは、( B )、( D ) 又は多価リンカー ( L ) の他の部分と共にヒドラゾンを形成する。符号 ( \* ) は、本明細書に記載されている結合体の他の部分への多価リンカーフラグメントの結合点を示す。

## 【 0 1 3 1 】

追加のスペーサーリンカーの追加的な例示には、アルキレン - アミノ - アルキレンカルボニル、アルキレン - チオ - カルボニルアルキルスクシンイミド - 3 - イルなどが含まれ、以下の式により更に例示されている：

20

## 【 化 3 3 】



式中、整数 x 及び y は、1、2、3、4 又は 5 である。

30

## 【 0 1 3 2 】

別の例示的な実施態様において、リンカーは 1 つ以上のアミノ酸を含む。一つの変形態様において、リンカーは、単一のアミノ酸を含む。別の変形態様において、リンカーは、2 ~ 約 50 個、2 ~ 約 30 個、又は 2 ~ 約 20 個のアミノ酸を有するペプチドを含む。別の変形態様においてリンカーは、約 4 ~ 約 8 個のアミノ酸を有するペプチドを含む。そのようなアミノ酸は、天然に生じるアミノ酸又はその立体異性体から例示的に選択される。アミノ酸は、他の任意のアミノ酸であってもよく、例えば、下記の一般式：



〔式中、R は、水素、アルキル、アシル又は適切な窒素保護基であり、R 及び R は、水素又は置換基であり、それぞれ現れるときに、それぞれ独立して選択され、そして q は、1、2、3、4 又は 5 のような整数である〕を有する任意のアミノ酸であってもよい。例示的に、R 及び R 又は R は、独立して、水素に対応するか又はメチル、ベンジル、ヒドロキシメチル、チオメチル、カルボキシル、カルボキシルメチル、グアニジノプロピルなどの、ただしこれらに限定されない天然に生じるアミノ酸に存在する側鎖、並びにその誘導体及び保護誘導体に対応する。上記に記載された式は、全ての立体化学的変形態様を含む。例えば、アミノ酸は、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、リシン、グルタミン、アルギニン、セリン、オルニチン、トレオニンなどから選択することができる。一つの変形態様において、放出型リンカーは、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、リシン、グルタミン、アルギニン、セリン、オルニチン及びトレオニンから選択される少なくとも 2 個のアミノ酸を含む。別の変形態様にお

40

50

いて、放出型リンカーは、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、リシン、グルタミン、アルギニン、セリン、オルチニン及びトレオニンから選択される2～約5個のアミノ酸を含む。別の変形態様において、放出型リンカーは、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、リシン、アルギニン及びオルニチン、並びにこれらの組み合わせから選択されるアミノ酸から構成される、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド又はヘキサペプチドを含む。

【0133】

本明細書に記載されているビタミン受容体結合薬剤送達結合体の中間体の別の例示的態様において、薬剤又はその類似体若しくは誘導体は、アルキルチオール求核剤を含む。

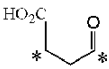
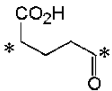
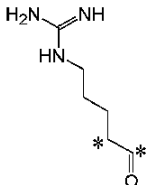
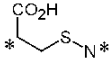
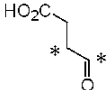
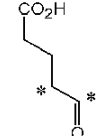
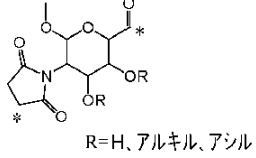
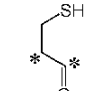
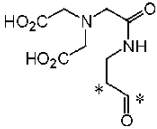
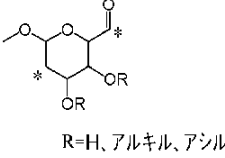
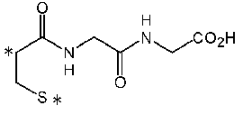
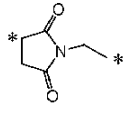
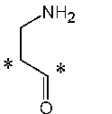
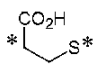
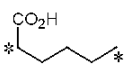
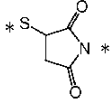
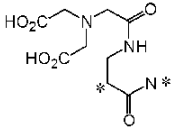
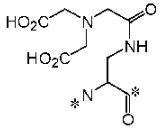
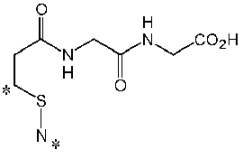
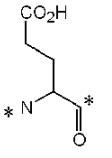
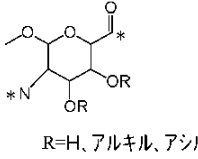
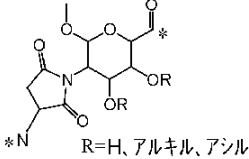
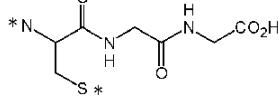
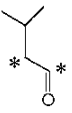
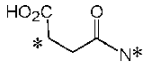
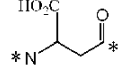
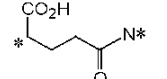
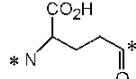
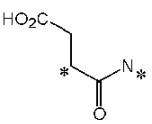
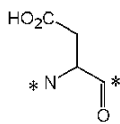
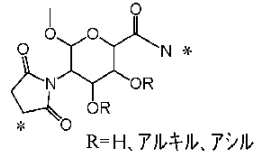
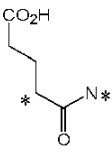
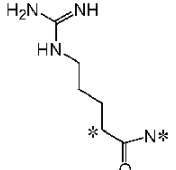
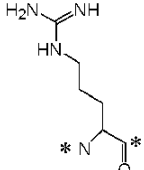
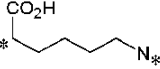
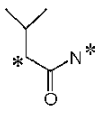
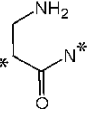
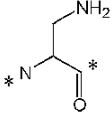
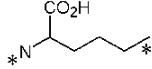
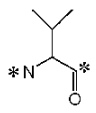
【0134】

追加のリンカーが以下の表に記載されており、( <sup>\*</sup> ) 原子は、追加のスペーサー若しくは放出型リンカー、薬剤及び/又は結合リガンドの結合点である。

【0135】

以下の例示的なスペーサーリンカーを記載する。

【表 1】

			
		 R=H、アルキル、アシル	
	 R=H、アルキル、アシル		
			
			
 R=H、アルキル、アシル	 R=H、アルキル、アシル		
			
		 R=H、アルキル、アシル	
			
			

10

20

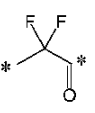
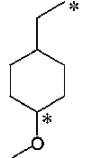
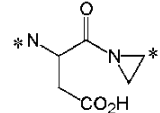
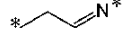
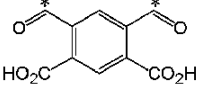
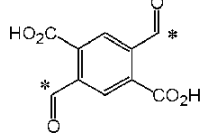
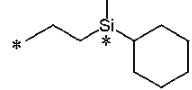

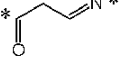
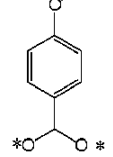
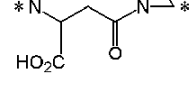
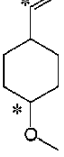
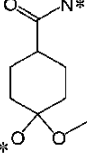
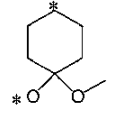
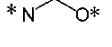
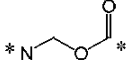
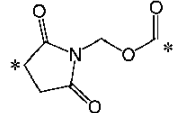
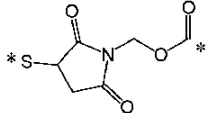
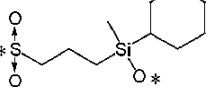
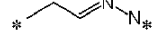
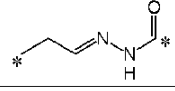
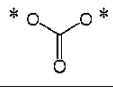
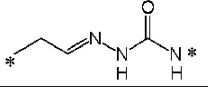
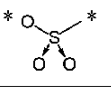
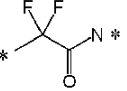
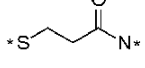
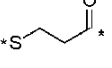
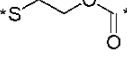
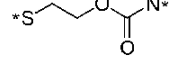
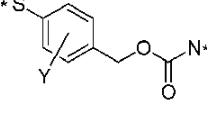
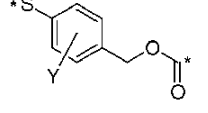
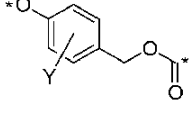
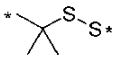
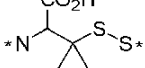
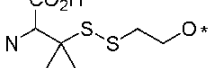

30

40

## 【 0 1 3 6 】

以下の例示的な放出型リンカーを記載する。

【表 2】

10

20

30

## 【0137】

そのような親水性リンカーは、特に米国特許出願第10/765,336号に記載されているペプチドに基づいた形態のような他の結合体の形態と比較すると、結合体の安定性、代謝性及び組織分布性を変えてもよいことが理解される。例えば、特定の条件下では、炭水化物タンパク質相互作用は、ペプチドタンパク質相互作用よりも弱いことが理解される。したがって、本明細書に記載されている多様な実施態様において、結合体は、血清タンパク質のより低い結合をもたらす。本明細書に記載されている結合体の、他の既に報告されているものと間のこれらのような違い及び他の物理化学的な違いには、標的細胞への増強された標的指向性、及び、改善された、すなわちより選択的又は差次的に選択的な体内分布プロフィールを含むことができる。細胞毒性の増加は、血清タンパク質結合の減少、又はより良好な若しくは差次的な体内分布（すなわち、非特異的区画において無駄になる薬剤が少ない）の当然の結果でありうる。このことは、親水性だが中性のスペーサーの使用に特に当てはまる。理論に束縛されることなく、本明細書に記載されている親水

40

50

性スパーサーリンカーは、少なくとも部分的に非特異的結合相互作用に起因しうる毒性を減少できることも示唆される。

【0138】

代替的实施態様において、薬剤を、親水性スパーサーリンカーに、直接的又は間接的に結合して、肝臓クリアランスを減少する目標を達成する。本明細書において、放出可能であってもなくても、親水性基、より詳細には親水性中性基の結合は、腎臓特異的送達を増加することが見出されている。

【0139】

ジスルフィドリンカー及びペプチドスパーサーを有する葉酸-薬剤結合体の肝臓クリアランスは、残留的な、時には著しく不都合な毒性プロフィールを保持することが、観察されている。本明細書に記載されている親水性スパーサーを含めることは、腎臓特異的送達のために、ベクターにも導入される。したがって、標的化薬剤結合体にそのようなリンカーを含めることは、全体的な肝臓取り込みを減少し、したがって全体的な毒性を減少することが理解される。理論に束縛されることなく、例えばピンカアルカノイド結合体によるMTDでの毒性は、非特異的肝臓クリアランスにより引き起こされ、代謝を引き起こし、DAVLBHのような遊離薬剤の胆汁への、次に腸への放出をもらしうることが理解される。局在性の毒性と同様に全身性の毒性（再吸収に起因する）が次に生じうる。本明細書に記載されている標的化及び非標的化結合体に親水性リンカーを含めることによって、腎臓からのクリアランスが優先的に生じ、したがって、同時に生じる肝臓代謝に基づく毒性を減少及び/又は回避することができると考えられる。したがって、一連の薬剤葉酸結合体からのDAVLBHのような薬剤成分の総胆汁クリアランスの測定を使用して、どの薬剤が最も毒性が少ないかを予測することができる。

【0140】

上記に記載したように、本明細書に記載されている結合体を使用して、標的薬剤Aを選択的又は特異的な方法で細胞に送達することができる。そのような送達の一つの態様において、望ましくないクリアランス機構を回避することもできる。本明細書に記載されている親水性スパーサーリンカーは、受容体リガンドBと薬剤Aの結合体を形成するのに使用されると、肝臓からのクリアランスの量を減少できることが、発見されている。これらの親水性スパーサーリンカーは、腎臓のような腎経路を通したクリアランスを好む傾向があることが、更に発見されている。本明細書に記載されている結合体は、同じ方法で投与されたとき、母体薬剤Aそれ自体よりも低い毒性を示すことが、更に発見されている。理論に束縛されることなく、より低い毒性は、腎臓クリアランス機構に対して肝臓クリアランス機構の減少が観察されたことから生じていることが示唆されている。

【0141】

別の実施態様において、肝臓への取り込みが低減され、肝臓により取り除かれる可能性が少ない化合物が、本明細書に記載される。一つの態様において、そのような化合物は、肝臓プロセスと比べて、腎臓プロセスにより優先的に取り除かれる。したがって、別の実施態様において、以下の式：



〔式中、Lは、親水性スパーサーリンカーであり、そしてAは、診断、治療又は画像化剤である〕で示される非標的化合物が、本明細書に記載されている。そのような非標的化合物は、受容体リガンドBを使用して標的化されていないが、そうであっても、同じ方法で送達されたとき、母体薬剤Aよりも減少した毒性を示しうることが理解される。非標的化合物は、本明細書に記載されている標的化結合体と同様に、親水性スパーサーLを含む。したがって、望ましく治療される細胞に到達しない薬剤は、通常の代謝及び生物学的経路により取り除かれる。しかし、親水性スパーサーリンカーLの存在は、クリアランスを、肝臓経路ではなく腎臓経路を通すように導くことが理解される。

【0142】

別の実施態様において、多剤結合体が本明細書に記載される。そのような多剤結合体の幾つかの例示的な形態が本明細書において考慮され、PCT国際公報WO 2007/0

10

20

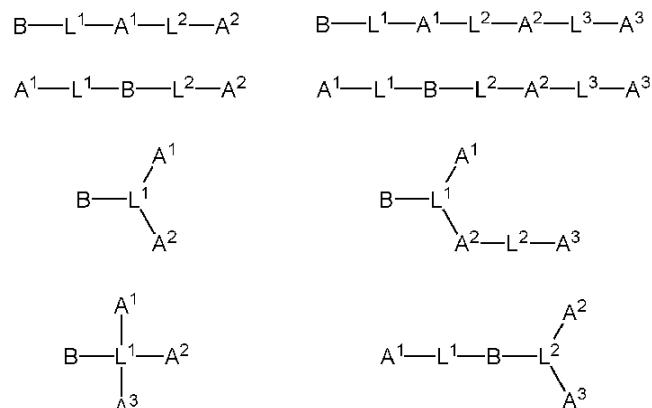
30

40

50

22494に記載されている化合物及び組成物が含まれ、この開示は参照として本明細書に組み込まれる。例示的には、多価リンカーは、受容体リガンドBと2つ以上の薬剤Aとを、多様な構造的形態で連結してもよく、その形態としては、以下の例示的な一般式：

【化34】



10

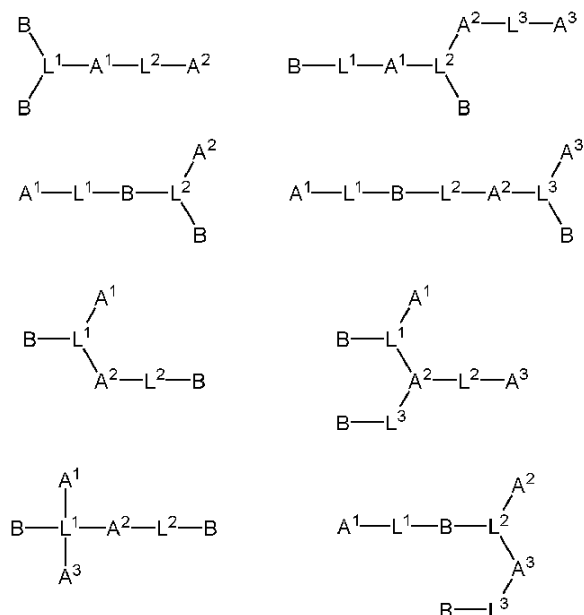
〔式中、Bは、受容体結合リガンドであり、(L<sup>1</sup>)、(L<sup>2</sup>)及び(L<sup>3</sup>)は、それぞれ、親水性スペーサーリンカーを含み、場合により1つ以上の放出型リンカー及び/又は追加のリンカーを含む、本明細書に記載されている多価リンカーであり、そして(A<sup>1</sup>)、(A<sup>2</sup>)及び(A<sup>3</sup>)は、それぞれ、薬剤A又はその類似体若しくは誘導体である〕が含まれるが、これらに限定されない。追加の薬剤A又はその類似体若しくは誘導体、追加のリンカー、及び(B)、(L)及び(A)それぞれの配置の追加の形態を含む他の変形態様も、本明細書において考慮される。

20

【0143】

一つの変形態様において、2つ以上の結合リガンドBが、本明細書に記載されている送達結合体に含まれ、その結合体としては、以下の例示的な一般式：

【化35】



30

40

〔式中、Bは、それぞれ受容体結合リガンドであり、(L<sup>1</sup>)、(L<sup>2</sup>)及び(L<sup>3</sup>)は、それぞれ、親水性スペーサーリンカーを含み、場合により1つ以上の放出型リンカー及び/又は追加のリンカーを含む、本明細書に記載されている多価リンカーであり、そして(A<sup>1</sup>)、(A<sup>2</sup>)及び(A<sup>3</sup>)は、それぞれ、薬剤A又はその類似体若しくは誘導体である〕が含まれるが、これらに限定されない。追加の薬剤A又はその類似体若しくは誘導体、追加のリンカー、及び(B)、(L)及び(A)それぞれの配置の追加の形態を含む他の変形態様も、本明細書において考慮される。一つの変形態様において、受容体結合リガンドBは、同じ受容体のリガンドであり、別の変形態様では、受容体結合リガンドBは

50

、異なる受容体のリガンドである。

【0144】

別の例示的な実施態様において、薬剤は、特定の作用機構を有する病原性細胞の1つ以上の集団に対する活性に基づいて選択される。例示的な作用機構には、アルキル化剤、ベータ-チューブリン剤を含む微小管形成を安定化及び/又は不安定化するものを含む微小管インヒビター、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)インヒビター、トポイソメラーゼインヒビター、タンパク質合成インヒビター、Ras、Raf、PKC、PI3Kなどのインヒビターを含むタンパク質キナーゼインヒビター、転写インヒビター、抗葉酸剤、熱ショックタンパク質ブロッカーなどが含まれる。

【0145】

例示的なアルキル化剤には、マイトマイシンCBIなどが含まれるが、これに限定されない。例示的なサイクリン依存性キナーゼ(CDK)インヒビターには、CYC202、セリクリブ、R-ロスコピチン、AGM-1470などが含まれるが、これらに限定されない。例示的なトポイソメラーゼインヒビターには、ドキソルビシン、他のアントラサイクリンなどが含まれるが、これらに限定されない。例示的なタンパク質合成インヒビターには、ブルセアンチンなどが含まれるが、これに限定されない。Ras、Raf、PKC、PI3Kなどのインヒビターを含む例示的なタンパク質キナーゼインヒビターには、L-779,450、R115777などが含まれるが、これらに限定されない。例示的な転写インヒビターには、アマナチン、アクチノマイシンなどが含まれるが、これらに限定されない。例示的な抗葉酸剤には、メトトレキセートなどが含まれるが、これに限定されない。例示的な熱ショックタンパク質ブロッカーには、ゲルダナマイシンなどが含まれるが、これに限定されない。

【0146】

微小管形成を安定化及び/又は不安定化するものを含む例示的な微小管インヒビターには、チューブリン剤、微小管毒などが含まれる。選択された受容体に結合する例示的な微小管毒には、アレナスタチン、ドラスタチン、ハリコンドリノB、マイタンシン、ホモプシンA、リゾキシシン、ウスチロキシシン、ピンブラスタチン、ピンクリスチンなどのようなピンカ結合部位に結合するインヒビター、ディスコデルモリド、エボチロン、タキソール、パクリタキソールなどのようなタキソール結合部位に結合する安定剤、コルヒチン、コンプレタスタチン、クラシンA、ポドフィロトキシシン、ステガナシンなどのようなコルヒチン結合部位に結合するインヒビター、及びクリプトフィシン、チューブリシンなどのような未確定部位に結合する他のものが含まれるが、これらに限定されない。

【0147】

一つの実施態様において、チューブリシンは、天然に生じるチューブリシンである。別の実施態様において、チューブリシンは、合成又は半合成チューブリシンである。本明細書に記載されている結合体に含めることができる追加的なチューブリシンは、PCT国際出願PCT/US2008/056824に記載されており、その開示は参照として本明細書に組み込まれる。

【0148】

本明細書に記載されている薬剤送達結合体の一つの実施態様において、少なくとも1つの薬剤は、微小管インヒビター又はその類似体若しくは誘導体である。別の実施態様において、少なくとも1つの薬剤は、DNAアルキル化剤である。別の実施態様において、少なくとも1つの薬剤はDNAアルキル化剤であり、少なくとも1つの他の薬剤は微小管インヒビターである。

【0149】

本明細書に記載されている薬剤送達結合体の別の実施態様において、薬剤のうちの少なくとも1つは、P-糖タンパク質(PGP)インヒビターである。別の実施態様において、本明細書に記載されている薬剤送達結合体に含まれる薬剤のうちの少なくとも1つはPGPインヒビターであり、薬剤送達結合体に含まれる薬剤のうちの他の少なくとも1つはPGP基質である。この後者の実施態様において、例示的には、PGP基質はDNAアル

10

20

30

40

50



キル化剤である。この実施態様を参照すると、マイトマイシンC、マイトマイシンAなどのような任意のマイトマイシンを含む、ただしこれらに限定されないDNAアルキル化剤のようなPGP基質と、PGPインヒビターとを対合すると、そうでなければPGP基質である薬剤の全体的な機能を改善できることが理解される。本明細書に記載されている放出型結合体において、PGPインヒビター薬剤及びPGP基質薬剤は、両方とも、エンドサイトーシスの後で細胞内に放出される。この方法によって、PGPインヒビター薬剤は、PGP基質薬剤の全体的な効能及び/又は効力を改善することができる。加えて、PGPインヒビターは、PGP発現を低減することができ、次に本明細書に記載されている多剤結合体に含まれている1つ以上の薬剤の、病原性細胞からの流出を減少する。マイトマイシン又はマイトマイシンCのようなその類似体若しくは誘導体は、PGPインヒビターとして又はPGPの下方制御剤として作用しうることが理解される。ピンカアルカロイド又はピンブラスチン類似体及び誘導体のようなその類似体若しくは誘導体は、PGPインヒビター又は下方制御剤による病原性細胞からの流出が防止されているPGP基質でありうることが、更に理解される。

#### 【0150】

本明細書に記載されている薬剤送達結合体の別の実施態様において、薬剤のうちの少なくとも1つは、ピンカアルカロイド又はその類似体若しくは誘導体である。本明細書に記載されているピンカアルカロイドには、ビンデシン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、カタランチン、ピンドリン、ロイロシン、ビノレルピン、イミドカルブ、シブトラミン、トルトラズリル、ピンブラスチン酸など、並びにこれらの類似体及び誘導体などの、ただしこれらに限定されない、アルカロイド類のインドール-ジヒドロインドールファミリーの全てのメンバーが含まれる。

#### 【0151】

別の実施態様において、病原性細胞の集団により引き起こされる又は証明される疾患を治療する方法が、本明細書に記載される。結合リガンド(B)薬剤送達結合体を使用して、宿主における病原性細胞集団の存在により特徴付けられる疾患状態を治療することができるが、この場合、病原性細胞集団のメンバーは、結合リガンド(B)又はその類似体若しくは誘導体により利用可能な結合部位を有し、結合部位は、病原性細胞により独自に発現、過剰に発現又は優先的に発現している。病原性細胞の選択的排除は、結合リガンド(B)又はその類似体若しくは誘導体に特異的に結合し、且つ病原性細胞により独自に発現、過剰に発現又は優先的に発現している、リガンド受容体、トランスポーター又は他の表面に現れるタンパク質に、結合リガンド(B)薬剤送達結合体のリガンド部分が結合することによって仲介される。病原性細胞の集団により独自に発現、過剰に発現又は優先的に発現している表面提示タンパク質は、非病原性細胞には表れないか又は低い密度でしか表れない受容体であり、病原性細胞の選択的排除の手段を提供する。

#### 【0152】

例えば、高親和性葉酸受容体のような表面発現ビタミン受容体は、癌細胞に過剰発現している。卵巣、乳腺、結腸、肺、鼻、喉及び脳の上皮癌では、全て、上昇したレベルの葉酸受容体の発現が報告されている。事実、全てのヒト卵巣腫瘍の90%超が、この受容体を大量に発現することが知られている。したがって、本明細書に記載されている結合リガンド(B)薬剤送達結合体を使用して、多様な種類の腫瘍細胞を、また、ビタミン受容体のようなリガンド受容体を優先的に発現し、したがってビタミン又はビタミン類似体若しくは誘導体のようなリガンドに利用可能な表面結合部位を有する感染因子のような他の種類の病原性細胞を治療することができる。一つの態様において、排除される病原性細胞への標的化を最大限にするための、結合リガンド-リンカー-薬剤結合体の標的化のための方法が本明細書に記載される。

#### 【0153】

本発明は、更に、排除される病原性細胞への標的化を最大限にするための、結合リガンド-リンカー-薬剤結合体の組み合わせの使用を考慮する。

#### 【0154】

本明細書に記載されている結合リガンド（Ｂ）薬剤送達結合体を、ヒト臨床医学及び獣医用途の両方に使用することができる。したがって、病原性細胞の集団を保有しており、結合リガンド（例えば、ビタミン）薬剤送達結合体で治療される宿主動物は、ヒトであってもよく、獣医用途の場合では、実験用、農業用、愛玩用又は野生の動物であってもよい。本明細書に記載されている方法を、ヒト、齧歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスターなど）、ウサギ、サル、チンパンジーのような実験用動物、イヌ、ネコ及びウサギのような愛玩動物、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギのような農業用動物、並びにクマ、パンダ、ライオン、トラ、レオパード、ゾウ、シマウマ、キリン、ゴリラ、イルカ及びクジラのような捕獲された野生動物などの、ただしこれらに限定されない宿主動物に適用することができる。

10

#### 【 0 1 5 5 】

本方法は、これらの宿主動物において多様な病理を引き起こす病原性細胞の集団に適用可能である。病原性細胞という用語は、例えば、癌細胞、細菌及びウイルスのような感染因子、細菌感染又はウイルス感染細胞、疾患状態を引き起こす可能性がある活性化マクロファージ、及び、ビタミン受容体又はビタミンの類似体若しくは誘導体が結合する受容体のような結合リガンド受容体を独自に発現、優先的に発現又は過剰発現している、他の任意の種類の病原性細胞を意味する。病原性細胞には、本明細書に記載される結合リガンド薬剤送達結合体の治療が疾患の症状の低減をもたらす疾患状態を引き起こす任意の細胞を含めることもできる。例えば、病原性細胞は、移植片対宿主疾患の原因であるが、他の条件下では病原性ではない免疫系の細胞のような、ある条件下で病原性である宿主細胞であってもよい。

20

#### 【 0 1 5 6 】

したがって、病原性細胞の集団は、良性腫瘍及び悪性腫瘍を含む腫瘍形成性の癌細胞集団であってもよく、非腫瘍形成性の癌細胞集団であってもよい。癌細胞集団は、自然に生じうる又は宿主動物の生殖細胞系に存在する突然変異若しくは体細胞突然変異のようなプロセスにより生じててもよいし、或いは化学的、ウイルス的又は放射線により誘発されてもよい。本方法を、癌腫、肉腫、リンパ腫、ホジキン病、黒色腫、中皮腫、バーキットリンパ腫、鼻咽腔癌、白血病及び骨髄腫のような癌の治療に利用することができる。癌細胞集団には、口腔癌、甲状腺癌、内分泌性癌、皮膚癌、胃癌、食道癌、咽頭癌、膀胱癌、結腸癌、膀胱癌、骨癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮癌、乳癌、精巣癌、前立腺癌、直腸癌、腎癌、肝癌及び肺癌を含めることができるが、これらに限定されない。

30

#### 【 0 1 5 7 】

病原性細胞集団が癌細胞集団である実施態様において、結合体投与の効果は、腫瘍体積の低減若しくは排除、又は腫瘍細胞繁殖の阻害により測定される治療反応である。腫瘍の場合では、排除は、原発性腫瘍の細胞若しくは転移した細胞の排除でありうるか、又は原発性腫瘍から解離させるプロセスである。腫瘍の外科的除去、放射線療法、化学療法又は生物学的療法を含む任意の治療手法により除去された後で腫瘍が戻るのを予防するための、結合リガンド（Ｂ）薬剤送達結合体（例えば、結合リガンドとして使用されるビタミン）による予防的治療も、記載される。予防的治療は、多回用量１日レジメンによる治療のような、結合リガンド（Ｂ）薬剤送達結合体による初期治療であってもよいし、及び／又は初期治療の後に数日若しくは数か月の間隔を置いた追加的な治療若しくは一連の治療であってもよい。したがって、記載されている方法を使用して治療される病原性細胞集団のいずれかの排除には、病原性細胞の数の低減、病原性細胞の繁殖の阻害、病原性細胞が戻るのを予防する予防的治療、又は疾患の症状の低減をもたらす病原性細胞の治療が含まれる。

40

#### 【 0 1 5 8 】

癌細胞が排除される場合、本方法を、腫瘍の外科的除去、放射線療法、化学療法、又はモノクローナル抗体療法、免疫調節剤による治療、免疫効果細胞の養子移入、造血成長因子による治療、サイトカイン及びワクチン接種などの、ただしこれらに限定されない他の免疫療法のような生物学的療法と組み合わせて使用することができる。

50

## 【 0 1 5 9 】

本方法は、多様な感染性疾患を引き起こす病原性細胞の集団にも適用可能である。例えば、本方法は、細菌、酵母菌を含む真菌、ウイルス、ウイルス感染細胞、マイコプラズマ及び寄生虫のような病原性細胞の集団に適用可能である。本明細書に記載されている結合リガンド（B）薬剤送達結合体により治療することができる感染性生物は、動物に病原を引き起こす当該技術で認められている任意の感染性生物であり、細菌としてそのような生物に含まれるものは、グラム陰性又はグラム陽性の球菌又は桿菌である。例えば、プロテウス種、クレブシエラ種、プロビデンシ種、エルシニア種、エルウィニア種、エンテロバクター種、サルモネラ種、セラチア種、アエロバクター種、エシェリキア種、シュドモナス種、シゲラ種、ビブリオ種、アエロモナス種、カンピロバクター種、レンサ球菌種、ブドウ球菌種、乳酸桿菌種、マイクロコッカス種、モラクセラ種、バチルス種、クロストリジウム種、コリネバクテリウム種、エベルセラ（Eberthella）種、マイクロコッカス種、マイコバクテリウム種、ナイセリア種、ヘモフィルス種、バクテロイデス種、リステリア種、エリジペロトリックス種、アシネトバクター種、ブルセラ種、パスツレラ種、ビブリオ種、フラボバクテリウム種、フソバクテリウム種、ストレプトバチルス種、カリマトバクテリウム種、レジオネラ種、トレポネーマ種、ボレリア種、レプトスピラ種、アクチノマイセス種、ノカルジア種、ケッチア種及び宿主に疾患を引き起こす他の任意の細菌は、本明細書に記載されている結合リガンド薬剤送達結合体により治療することができる。

10

## 【 0 1 6 0 】

特に興味深いものは、抗生物質耐性レンサ球菌種及びブドウ球菌種のような抗生物質に耐性を持つ細菌であるか、又は抗生物質に感受性はあるが、抗生物質により治療される再発性の感染を引き起こし、それにより最終的に耐性生物が生じる細菌である。抗生物質に感受性はあるが、抗生物質により治療される再発性の感染を引き起こし、それにより最終的に耐性生物が生じる細菌を、これらの抗生物質耐性細菌株の発生を回避するために、抗生物質の不在下で、又は患者に通常投与するよりも低い用量の抗生物質と組み合わせて、本明細書に記載されている結合リガンド（B）薬剤送達結合体本により治療することができる。

20

## 【 0 1 6 1 】

DNA及びRNAウイルスのようなウイルスも、記載されている方法により治療することができる。そのようなウイルスには、パピローマウイルス、パルボウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス及びワクチニアウイルスのようなDNAウイルス、並びにアレナウイルス、コロナウイルス、ライノウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザウイルス、ピコルナウイルス、パラミクソウイルス、レオウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス及びラブドウイルスのようなRNAウイルスが含まれるが、これらに限定されない。

30

## 【 0 1 6 2 】

本方法は、酵母菌を含むあらゆる真菌、マイコプラズマ種、寄生虫又は動物に疾患を引き起こす他の感染性生物にも適用可能である。本方法及び組成物で治療できる真菌の例には、例えば、白癬、ヒストプラズマ症、プラストミセス症、アスペルギルス症、クリプトコッカス症、スポロトリウム症、コクシジオイデス症、パラコクシジオイデス症、ムーコル症、黒色分芽菌症、皮膚糸状菌症、プロトテカ症、フサリウム症、秕糠疹、菌腫、パラコクシジオイデス症、黒色菌糸症、シュドアレシェリア症、スポロトリクス症、トリコスボロン、ニューモシスティス感染及びカンジダ症のような疾患を引き起こす真菌を含む、カビとして成長する真菌、又は酵母菌様の真菌が含まれる。

40

## 【 0 1 6 3 】

本方法は、テニア、ヒメノレピス、ジフィロボスリウム及びエキノコックス種のような条虫、ファシオロプシス、異形吸虫、メタゴニムス、肝吸虫、ファスキオラ、肺吸虫及びシトソーマ（Schistosoma）種のような吸虫、エンテロビウス、トリチュリス、アスカリス、アンキロストマ、ネカトール、ストロングロイデス、トリキネラ、ブケレリア、ブルギア、ロアオンコセルカ及びドラクンクルス種のような回虫、ネグレリア及びアカントアメ

50

ーバ種のようなアメーバ、並びにプラスモジウム、トリパノソーマ、リーシュマニア、トキソプラズマ、エントアメーバ、ジアルジア、イソスポーラ、クリプトスポリジウム及びエンテロシトゾーン種のような原生動物により引き起こされる炎症などの、ただしこれらに限定されない寄生虫炎症の治療に利用することもできる。

【0164】

本明細書に記載されている結合リガンド薬剤送達結合体が対象とする病原性細胞は、これらの細胞がビタミン受容体のようなリガンド受容体を優先的に発現する場合、ウイルス感染、マイコプラズマ感染、寄生虫感染又は細菌感染細胞のような内在性病原体を保持する細胞であることもできる。

【0165】

10

一つの実施態様において、リガンドに特異的に結合でき、且つ病原性細胞により優先的に発現している、受容体、トランスポーター又は他の表面提示タンパク質に、結合リガンド薬剤送達結合体の結合リガンド部分が結合すると、結合体は標的病原性細胞に内部移行することができる。そのような内部移行は、例えば、受容体仲介エンドサイトーシスによって生じることができる。結合リガンド(B)薬剤送達結合体が放出型リンカーを含有する場合、結合リガンド部分及び薬剤は、細胞内で解離することができ、薬剤は、細胞内標的に対して作用することができる。

【0166】

代替的な実施態様において、薬剤送達結合体の結合リガンド部分は、病原性細胞に結合して、薬剤を病原性細胞の表面と近接関係に置くことができる。次に薬剤を、放出型リンカーの切断により放出することができる。例えば、放出型リンカーがジスルフィド基である場合、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼにより、薬剤を放出することができる。次に薬剤は、結合リガンド(B)薬剤送達結合体が結合している病原性細胞により取り込まれることができるか、又は薬剤は、近接している別の病原性細胞により取り込まれることができる。あるいは、放出型リンカーがジスルフィド基である場合、細胞内のタンパク質ジスルフィドイソメラーゼにより、薬剤を放出することができる。特定のベータ脱離機構について上記に記載した酸触媒加水分解のような加水分解機構により、又はオキシニウムイオン若しくはラクトニウムイオン生成機構を介する隣接基補助切断により、薬剤を放出することもできる。放出型リンカーの選択は、薬剤が結合体から放出される機構を決定する。そのような選択は、薬剤結合体を使用される条件によって予め確定されることが理解される。あるいは、薬剤送達結合体は、結合すると標的細胞に内部移行することができ、結合リガンドと薬剤が細胞内で結合したまま、薬剤がビタミン部分から解離することなくその効果を示すことができる。

20

30

【0167】

結合リガンドがビタミンであるなお別の実施態様において、ビタミン薬剤送達結合体は、細胞ビタミン受容体と無関係の機構を介して作用することができる。例えば、薬剤送達結合体は、血清に存在する可溶性ビタミン受容体に又はアルブミンのような血清タンパク質に結合することができ、その結果、非結合薬剤の場合と比較して、より長時間の結合体の循環と、結合体の病原性細胞集団に対するより高い活性をもたらすことができる。

【0168】

40

リンカーが放出型リンカーを含まない別の実施態様において、薬剤送達結合体のビタミン部分は、病原性細胞に結合し、薬剤を病原性細胞の表面に設置して、病原性細胞を、薬剤に結合することができる他の分子による攻撃の標的にすることができる。あるいは、この実施態様において、薬剤送達結合体は、結合したときに標的細胞に内部移行することができ、ビタミン部分と薬剤は、細胞内で関連したままであることができ、薬剤は、ビタミン部分から解離することなくその効果を示すことができる。

【0169】

本発明の別の実施態様において、一般式：B-L-Aの細胞受容体結合送達結合体が提供され、式中、Lは、本明細書で定義されたとおりであり、そしてAは、免疫原のような薬剤である。免疫原は、ヘプテン、例えばフルオレセイン、ジニトロフェニルなどであっ

50

てもよい。この実施態様において、ビタミン受容体結合薬剤送達結合体は、病原性細胞の表面に結合し、免疫源により細胞を「標識」し、それによって標識化病原性細胞集団に対する免疫反応を誘発する。受動免疫法により宿主に投与された抗体、又は既存の先天的若しくは後天的免疫によって宿主系に存在する抗体は、免疫源に結合し、内因性免疫反応を誘発する。細胞結合ビタミン免疫原結合体に抗体が結合することによって、補体仲介細胞毒性、抗体依存性細胞仲介細胞毒性、抗体のオプソニン化及びファゴサイトーシス、細胞死若しくは静止をシグナル伝達する抗体誘導受容体クラスター化、又は細胞結合リガンド免疫原結合体に結合する抗体により刺激される他の任意のホルモン若しくは細胞免疫反応がもたらされる。免疫原が事前の抗体オプソニン化なしに免疫細胞により直接認識されうる場合、病原性細胞の直接的な死滅を生じることができる。この実施態様は、米国特許出願第09/822,379号により詳細に記載されており、参照として本明細書に組み込まれる。薬剤が免疫原であるこの実施態様の特定の変形態様において、多価リンカーは、Lが1つ以上の親水性スパーサーリンカー及び放出型リンカーを含むリンカーである一般式：B-L-Aのビタミン受容体結合薬剤送達結合体のような、上記に記載されている放出型リンカーを含むこともできることが理解される。

10

**【0170】**

本明細書に記載されている結合リガンド(B)薬剤送達結合体は、結合リガンド、多価リンカー(L)、薬剤、及び、場合により、結合リガンド及び薬剤を多価リンカー(L)に結合するヘテロ原子リンカーを含む。多価リンカー(L)は、スパーサーリンカー、放出型(すなわち、切断しうる)リンカー及びヘテロ原子リンカー又はこれらの組み合わせを含むことができる。

20

**【0171】**

薬剤は、細胞機能を調節、そうでなければ修飾することができる任意の分子であってもよく、薬学的に活性な化合物が含まれる。適切な分子には、ペプチド、オリゴペプチド、レトロ-インバースオリゴペプチド、タンパク質、ペプチド架橋が少なくとも1つの非ペプチド架橋に代わっているタンパク質類似体、アポタンパク質、糖タンパク質、酵素、補酵素、酵素インヒビター、アミノ酸及びそれらの誘導体、受容体及び他の膜タンパク質；抗原及びその抗体；ヘプテン及びその抗体；ホルモン、脂質、リン脂質；リポソーム；毒素；抗生物質；鎮静薬；気管支拡張剤；ベータ-ブロッカー；抗菌剤；抗高血圧剤；抗不整脈薬、強心配糖体、抗狭心症薬及び血管拡張薬を含む心血管剤；興奮薬、向精神薬、抗躁鬱薬及び抑制薬を含む中枢神経剤；抗ウイルス剤；抗ヒスタミン薬；化学療法剤を含む癌薬；精神安定薬；抗抑鬱薬；H-2アンタゴニスト；抗痙攣薬；制吐薬；プロスタグランジン及びプロスタグランジン類似体；筋弛緩薬；抗炎症性物質；刺激薬；充血除去薬；鎮吐薬；利尿薬；鎮痙薬；抗喘息薬；抗パーキンソン剤；去痰剤；鎮咳薬；粘液溶解薬；並びにミネラルおよび栄養添加物を含めることができるが、これらに限定されない。

30

**【0172】**

更に、薬剤は、細胞毒性があるか、腫瘍浸透性を増強するか、腫瘍細胞繁殖を阻害するか、アポトーシスを促進するか、標的細胞の抗アポトーシス活性を減少させるか、感染因子により引き起こされる疾患の治療に使用されるか、病原性細胞に対する内因性免疫反応を増強するか、又は、任意の種類の病原性細胞により引き起こされる疾患状態の治療に有用であるような、当該技術において既知の任意の薬剤であってもよい。本発明の使用に適切な薬剤には、アドレノコルチコイド及びコルチコステロイド、アルキル化剤、抗アンドロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン、アクラマイシン及びアクラマイシン誘導体、エストロゲン、抗代謝物、例えばシトシンアラビノサイド、プリン類似体、ピリミジン類似体及びメトトレキセート、ブスルファン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン及び他の白金化合物、タモキシフェン、タキソール、パクリタキセル、パクリタキセル誘導体、Taxotere(登録商標)、シクロホスファミド、ダウノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、リゾキシシン、T2毒素、植物アルカロイド、プレドニゾン、ヒドロキシ尿素、テニポシド、マイトマイシン、ディスコデルモリド、微小管インヒビター、エポチロン、ツブリシン、シクロプロピルベンズ[e]インドロン、セコ-シクロプロピル

40

50

ベンズ〔e〕インドロン、O-Ac-セコ-シクロプロピルベンズ〔e〕インドロン、ブレオマイシン及び他の任意の抗生物質、ナイトロジェンマスタード、ニトロソ尿素、ビンクリスチン、ビンブラスチン、それらの類似体及び誘導体、例えばデアセチルビンブラスチンモノヒドラジド、並びに、PCT国際公開WO2007/022493に記載されているものを含む他のピンカアルカロイド（その開示は参照として本明細書に組み込まれる）、コルヒチン、コルヒチン誘導体、アロコルヒチン、チオコルヒチン、トリチルシステイン、ハリコンドリンB、ドラスタチン、例えばドラスタチン10、アマニチン、例えばアマニチン、カンプトテシン、イリノテカン及び他のカンプトテシン誘導体、マイタンシン、ゲルダナマイシン及びゲルダナマイシン誘導体、エストラムスチン、ノコダゾール、MAP4、コルセミド、炎症剤及び炎症誘発剤、ペプチド及びペプチド模倣信号伝達インヒビター、並びに他の任意の当該技術で認められている薬剤又は毒素が含まれる。本発明に使用できる他の薬剤には、ペニシリン、セファロスポリン、バンコマイシン、エリスロマイシン、クリンダマイシン、リファンピン、クロラムフェニコール、アミノ配糖体抗生物質、ゲンタマイシ、アンフォテリシンB、アシクロビル、トリフルリジン、ガンシクロビル、ジドブジン、アマンタジン、リバビリン、及び、当該技術で認められている任意の他の抗菌化合物が含まれる。

#### 【0173】

別の実施態様において、薬剤（A）は、DAVLBHのようなピンカアルカロイド、クリプトフィシン、ボルテゾミブ、チオボルテゾミブ、チューブリシン、アミノプテリン、ラパマイシン、パクリタキセル、ドセタキセル、ドキソルピシン、ダウノルピシン、エベロリムス、アマナチン、ベルカリン、ジデムニンB、ゲルダナマイシン、プルバラノールA、エベロリムス、イスピネシブ、ブデソニド、ダサチニブ、エポチロン、マイタンシン、及び、チロシンキナーゼインヒビター（以上の類似体及び誘導体を含む）から選択される薬剤である。別の実施態様において、結合体は、DAVLBHのようなピンカアルカロイド、クリプトフィシン、ボルテゾミブ、チオボルテゾミブ、チューブリシン、アミノプテリン、ラパマイシン、パクリタキセル、ドセタキセル、ドキソルピシン、ダウノルピシン、エベロリムス、アマナチン、ベルカリン、ジデムニンB、ゲルダナマイシン、プルバラノールA、エベロリムス、イスピネシブ、ブデソニド、ダサチニブ、エポチロン、マイタンシン、及び、チロシンキナーゼインヒビター（以上の類似体及び誘導体を含む）から選択される、少なくとも2つの薬剤（A）を含む。一つの変形態様において、複数の薬剤（A）は同一である。別の変形態様において、複数の薬剤（A）は異なっている。

#### 【0174】

一つの実施態様において、本明細書に記載される方法に使用される薬剤は、血清中で少なくとも4時間安定した状態を保つ。別の実施態様において、薬剤はナノモル範囲のIC<sub>50</sub>を有し、別の態様では、薬剤は水溶性である。薬剤が水溶性ではない場合、多価リンカー（L）を誘導体化して水溶性を増強することができる。用語「薬剤」は、本明細書の上記に記載されている薬剤の任意の類似体又は誘導体も意味する。本発明によると、薬剤類似体又は誘導体とは、ヘテロ原子を組み込み、それを介して多価リンカー（L）と共有結合している薬剤を意味しうることが理解されるべきである。

#### 【0175】

結合リガンド薬剤送達結合体は、結合リガンド（B）、多価リンカー（L）、薬剤、及び、場合により、結合リガンド（B）受容体結合部分及び薬剤を二価リンカー（L）に結合するヘテロ原子リンカーを含むことができる。一つの例示的な実施態様において、ビタミン類似体又は誘導体とは、ヘテロ原子を組み込み、それを介して二価リンカー（L）と共有結合しているビタミンを意味しうることが理解されるべきである。したがって、この例示的な実施態様において、ビタミンは、ヘテロ原子リンカーを介して二価リンカー（L）と共有結合することができるか、又は、ビタミン類似体若しくは誘導体（すなわち、ヘテロ原子を組み込んでいる）は、二価リンカー（L）に直接結合することができる。同様の例示的な実施態様において、薬剤類似体又は誘導体は薬剤であり、薬剤類似体又は誘導

体とは、ヘテロ原子を組み込み、それを介して二価リンカー（L）と共有結合している薬剤を意味することができる。したがって、これらの例示的な態様において、薬剤は、ヘテロ原子リンカーを介して二価リンカー（L）と共有結合することができるか、又は、薬剤類似体若しくは誘導体（すなわち、ヘテロ原子を組み込んでいる薬剤）は、二価リンカー（L）に直接結合することができる。二価リンカー（L）は、スペーサーリンカー、放出型（すなわち、切断しうる）リンカー、及び、これらの種類のリンカーを両方とも含有する結合体においてスペーサーリンカーを放出型リンカーに結合するヘテロ原子リンカーを含んでもよい。

#### 【0176】

一般に、二価リンカー（L）と結合リガンド（B）、又はこれらの類似体若しくは誘導体、二価リンカー（L）と、薬剤又はその類似体若しくは誘導体との間の結合体（任意の介在ヘテロ原子リンカーを含む）を形成するために、あらゆる方法を利用することができる。また、スペーサーリンカーと、放出型リンカーと、二価リンカー（L）を形成するヘテロ原子リンカーとの間の結合体を形成するための当該技術で認められたあらゆる方法を使用することができる。結合体は、これらの分子のいずれかの直接結合、例えば複合体形成を介する結合、又は水素、イオン若しくは共有結合により形成することができる。共有結合は、例えば、酸、アルデヒド、ヒドロキシ、アミノ、スルフヒドリル又はヒドラゾ基の間のアミド、エステル、ジスルフィド又はイミノ結合の形成を介して生じることができる。

#### 【0177】

別の実施態様において、二価リンカー（L）は、結合リガンド（B）、親水性リンカー及び/又は薬剤（A）を共有結合する、C、N、O、S、Si及びPから選択される原子の鎖を含む。リンカーは、約2～約100個の原子の範囲のように、多種多様な長さを有することができる。リンカーを形成するのに使用される原子を、全ての化学的に関連する方法によって組み合わせることができ、その例としては、アルキレン、アルケニレン及びアルキニレン基などを形成する炭素原子の鎖；エーテル、ポリオキシアルキレン基を形成する、又はカルボニル基と組み合わせる場合はエステル及びカーボネートなどを形成する、炭素及び酸素原子の鎖；アミン、イミン、ポリアミン、ヒドラジン、ヒドラゾン形成する、又はカルボニル基と組み合わせる場合はアミド、尿素、セミカルバジド、カルバジドなどを形成する、炭素及び窒素原子の鎖；アルコキシアミン、アルコキシルアミン形成する、又はカルボニル基と組み合わせる場合はウレタン、アミノ酸、アシルオキシアミン、ヒドロキサム酸などを形成する、炭素、窒素及び酸素原子の鎖；などが挙げられる。加えて、前述の例示的な実施態様のそれぞれにおける鎖を形成する原子は、例えばアルカン、アルケン、アルキン、イミンなどがリンカーに含まれるラジカルでありうるように、飽和又は不飽和でありうるということが理解されるべきである。加えて、リンカーを形成する原子は、また、互いに環化して、リンカーにおいて、シクロアルカン、環状エーテル、環状アミン、アリーレン、ヘテロアリーレンなどを含む、リンカーを形成する二価環状構造を形成しうるということが理解されるべきである。

#### 【0178】

別の実施態様において、1回以上の用量が投与されたときに宿主動物において病原性細胞の集団を排除するのに有効な量の結合リガンド（B）薬剤送達結合体を含む、医薬組成物が記載される。結合リガンド薬剤送達結合体は、好ましくは、宿主動物に非経口投与、例えば皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内又は鞘内投与される。あるいは、結合リガンド薬剤送達結合体を、経口のような他の医学的に有用な方法により宿主動物に投与することができ、任意の有効用量、及び持続放出投与形態を含む適切な治療投与形態を使用することができる。

#### 【0179】

非経口投与形態の例には、等張食塩水、5%グルコース、又は液体アルコール、グリコール、エステル及びアミドのような周知の薬学的に許容される液体担体中の活性剤の水溶液が挙げられる。非経口投与形態は、薬剤送達結合体の用量を含む再構築可能な凍結乾燥

10

20

30

40

50

物の形態であってもよい。本発明の実施態様の一つの態様において、例えば米国特許第 4, 713, 249 号、同第 5, 266, 333 号及び同第 5, 417, 982 号（これらの開示は、参照として本明細書に組み込まれる）に記載されている生分解性炭水化物マトリックスのような、当該技術で既知の数多くの持続放出投与形態のうちのいずれかを投与してもよいし、あるいは低速ポンプ（浸透圧ポンプ）を使用してもよい。

#### 【0180】

一つの例示的な態様において、治療因子を含む少なくとも 1 つの追加の組成物を、上記に詳述した方法論と組み合わせる又はその佐剤として宿主に投与して、病原性細胞の集団の結合リガンド薬剤送達結合体仲介排除を増強してもよいし、又は 2 つ以上の追加の治療因子を投与してもよい。治療因子は、化学療法剤から、又は投与された結合リガンド薬剤送達結合体の効能を補うことができる他の治療因子から選択することができる。

10

#### 【0181】

一つの例示的な態様において、これらの要素の治療的に有効な組み合わせを使用することができる。一つの実施態様において、例えば、治療因子の治療有効量、例えば、多回用量 1 日レジメンにおける約 0.1 MIU/m<sup>2</sup> / 用量 / 日から約 15 MIU/m<sup>2</sup> / 用量 / 日の範囲の量、又は例えば、多回用量 1 日レジメンにおける約 0.1 MIU/m<sup>2</sup> / 用量 / 日から 7.5 MIU/m<sup>2</sup> / 用量 / 日の範囲の量を、結合リガンド薬剤送達結合体と共に使用して、病原性細胞を有する宿主動物において病原性細胞を排除、低減又は中和することができる（MIU = ミリ国際単位；m<sup>2</sup> = 平均的なヒトの体表面積の概算）。

#### 【0182】

20

別の実施態様において、例えばそれ自体は細胞毒性であるか又は腫瘍透過性を増強するように作用するような化学療法剤も、結合リガンド薬剤送達結合体と組み合わせる本明細書に記載されている方法において使用するのに適している。そのような化学療法剤には、アドレノコルチコイド及びコルチコステロイド、アルキル化剤、抗アンドロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン、アクラマイシン及びアクラマイシン誘導体、エストロゲン、代謝拮抗物質、例えばシトシンアラビノサイド、プリン類似体、ピリミジン類似体及びメトトレキセート、ブスルファン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン及び他の白金化合物、タモキシフェン、タキソール、パクリタキセル、パクリタキセル誘導体、Taxotere（登録商標）、シクロホスファミド、ダウノマイシン、ダウノルピシン、ドキソルピシン、リゾキシシン、T2 毒素、植物アルカロイド、プレドニゾン、ヒドロキシ尿素、

30

テニボシド、マイトマイシン、ディスコデルモリド、微小管インヒビター、エポチロン、ツブリシン、シクロプロピルベンゾ[e]インドロン、セコ-シクロプロピルベンゾ[e]インドロン、O-Ac-セコ-シクロプロピルベンゾ[e]インドロン、プレオマイシン及び他の任意の抗生物質、ナイトロジェンマスタード、ニトロソ尿素、ピンクリスチン、ピンブラスチン、それらの類似体及び誘導体、例えばデアセチルピンブラスチンモノヒドラジド、コルヒチン、コルヒチン誘導体、アロコルヒチン、チオコルヒチン、トリチルシステイン、ハリコンドリリン B、ドラスタチン、例えばドラスタチン 10、アマニチン、例えばアマニチン、カンプトテシン、イリノテカン及び他のカンプトテシン誘導体、マイタンシン、ゲルダナマイシン及びゲルダナマイシン誘導体、エストラムスチン、ノコダゾール、MAP4、コルセミド、炎症剤及び炎症誘発剤、ペプチド及びペプチド模倣信号伝達インヒビター、並びに、当該技術で認められている他の任意の薬剤又は毒素が含まれる。使用できる他の薬剤には、ペニシリン、セファロsporin、バンコマイシン、エリスロマイシン、クリンダマイシン、リファンピン、クロラムフェニコール、アミノ配糖体抗生物質、ゲンタマイシン、アンフォテリシン B、アシクロビル、トリフルリジン、ガンシクロビル、ジドブジン、アマンタジン、リバビリン、マイタンシン及びこの類似体及び誘導体、ゲムシタピン、並びに、当該技術で認められている他の任意の抗菌化合物が含まれる。

40

#### 【0183】

治療因子を、結合リガンド薬剤送達結合体の投与の前、後、又はそれと同時に、宿主動物に投与することができ、治療因子を、結合リガンド薬剤送達結合体を含む同じ組成

50



物の一部として、又は結合リガンド薬剤送達結合体と異なる組成物の一部として投与することができる。治療因子を治療的に有効な用量で含有する任意のそのような治療組成物を使用することができる。

#### 【0184】

加えて、2種類以上の結合リガンド薬剤送達結合体を使用することができる。例示的には、例えば、宿主動物を、ビタミンは異なるが同じ薬剤を有する複数の結合体の共投与プロトコールにより治療することができる。他の実施態様において、宿主動物を、異なる薬剤に結合している同じ結合リガンドを含む複数の結合体、又は多様な薬剤に結合している多様な結合リガンドを含む複数の結合体で治療することができる。別の例示的な実施態様において、同じ又は異なるビタミンを有する、並びに同じ薬剤送達結合体の一部として複数のビタミン及び複数の薬剤を含む、同じ又は異なる薬剤を有する結合リガンド薬剤送達結合体を使用することができる。

10

#### 【0185】

結合リガンド薬剤送達結合体の1日投与単位は、宿主の状態、治療される疾患の状態、結合体の分子量、その投与経路及び組織分布、並びに放射線治療のような他の治療処置の併用の可能性に依存して、著しく変わりうる。患者に投与される有効量は、体表面積、患者の体重及び患者の状態に関する医師の評価に基づいている。例示的な実施態様において、有効用量は、例えば、約1 ng/kg～約1 mg/kg、約1 µg/kg～約500 µg/kg、約1 µg/kg～約100 µg/kg、約1 µg/kg～約50 µg/kg及び約1 µg/kg～約10 µg/kgの範囲であってもよい。

20

#### 【0186】

別の例示的な態様において、結合リガンド薬剤送達結合体を投与するための任意の有効なレジメンを使用することができる。例えば、結合リガンド薬剤送達結合体を、単回用量として投与してもよいし、多回用量1日レジメンとして分割投与してもよい。別の実施態様において、時差レジメン、例えば1週間あたり1～3日を、連日治療の代替案として使用することができ、そのような断続的又は時差的な1日レジメンは、連日治療と同等であって、本明細書に記載されている方法の範囲内であると考慮される。一つの実施態様において、宿主を結合リガンド薬剤送達結合体の多回注射により治療して、病原性細胞の集団を排除する。別の実施態様において、宿主には、結合リガンド薬剤送達結合体を、例えば12～72時間間隔又は48～72時間間隔で複数回（好ましくは約2回から最大約50回まで）注射する。他の実施態様において、結合リガンド薬剤送達結合体の追加の注射を、最初の注射の後、数日間又は数か月の間隔で患者に投与することができ、追加の注射は、病原性細胞により引き起こされる疾患状態の再発を防止する。

30

#### 【0187】

一つの実施態様において、結合リガンド薬剤送達結合体を使用することができる、ビタミン又はその類似体若しくは誘導体には、葉酸又はその類似体若しくは誘導体に結合する葉酸受容体のような、活性化マクロファージに特異的に発現する受容体に結合するものが含まれる。例えば葉酸結合結合体を使用して、宿主に疾患を引き起こす活性化マクロファージを死滅させるか又はその活性を抑制することができる。そのようなマクロファージ標的結合体は、活性化マクロファージ仲介疾患状態に罹患している患者に投与されると、活性化マクロファージの集団の中で結合薬剤を濃縮し、会合させて、活性化マクロファージを死滅させる又はマクロファージの機能を抑制するように作用する。活性化マクロファージの集団の排除、低減又は不活性化は、治療される疾患状態の活性化マクロファージ仲介病因特性を停止又は低減するように作用する。活性化マクロファージにより仲介されることが知られている疾患の例には、リュウマチ様関節炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、乾癬、骨髄炎、多発性硬化症、アテローム動脈硬化症、肺線維症、サルコイドーシス、全身性硬化症、臓器移植拒否（GVHD）及び慢性炎症が挙げられる。薬剤送達結合体の投与は、典型的には、疾患状態の症状が低減又は排除されるまで続けられる。

40

#### 【0188】

例示的には、活性化マクロファージを死滅させるため又は活性化マクロファージの機能

50

を抑制するために投与される結合リガンド薬剤送達結合体を、薬学的に許容される担体と組み合わせて、疾患状態に罹患している動物又は患者に非経口投与することができ、例えば皮内、皮下、筋肉内、腹腔内又は静脈内投与することができる。別の実施態様において、結合リガンド薬剤送達結合体を、医学的に有用な他の手順により動物又は患者に投与することができ、有効用量を標準的又は持続放出投与形態で投与することができる。別の態様において、治療方法は、単独で、又は活性化マクロファージにより仲介される疾患状態の治療において認められている他の治療方法と組み合わせて、使用することができる。

#### 【0189】

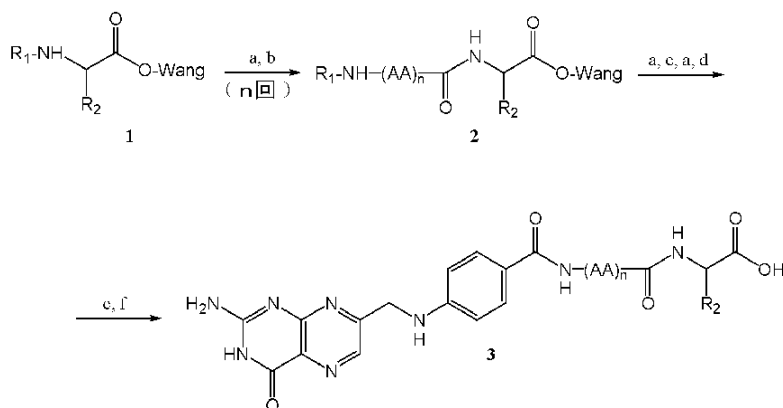
本明細書に記載されている薬剤送達結合体を、当該技術で認められている合成方法により調製することができる。合成方法は、場合により追加されるヘテロ原子又はスペーサーリンカーに既に存在しているヘテロ原子、放出型リンカー、薬剤及び/又は結合リガンドの選択に応じて選ばれる。一般に、関連する結合形成反応は、Richard C. Larock, "Comprehensive Organic Transformations, a guide to functional group preparations," VCH Publishers, Inc. New York (1989)及びTheodora E. Greene & Peter G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 2d edition, John Wiley & Sons, Inc. New York (1991)に記載されており、これらの開示は参照として本明細書に組み込まれる。放出型リンカーを含むリンカーに含有されるアミド、及びエステル、ケタール及びアセタール、スクシンイミド、シリルオキシ、ヒドラゾン、アシルヒドラジン、セミカルバゾン、ジスルフィド、カーボネート、スルホネートなどを含む官能基を調製するための追加的な詳細は、米国特許出願公開第2005/0002942A1号に記載されており、この全体が、参照として本明細書に組み込まれる。

#### 【0190】

葉酸ペプチドの一般的形成。葉酸含有ペプチジルフラグメントの  $Pte - Glu - (AA)_n - NH(CHR_2)CO_2H$  (3) は、下記のスキーム1に示されているように、酸感受性  $Fmoc - AA - Wang$  樹脂の  $Fmoc$  戦略のような標準的方法を使用するポリマー支持逐次的方法により調製される。

#### 【化36】

スキーム1



(a) 20% ピペリジン / DMF; (b)  $Fmoc - AA - OH$ 、PyBop、DIPEA、DMF; (c)  $Fmoc - Glu(O-t-Bu) - OH$ 、PyBop、DIPEA、DMF; (d) 1. N<sup>10</sup> (TFA) - Pte - OH; PyBop、DIPEA、DMF; (e) TFAA、 $(CH_2SH)_2$ 、i-Pr<sub>3</sub>SiH; (f)  $NH_4OH$ 、pH 10.3。

#### 【0191】

本明細書に記載される方法のこの例示的实施態様において、 $R_1$  は、 $Fmoc$  であり、 $R_2$  は、所望の適切に保護されたアミノ酸側鎖であり、そしてDIPEAは、ジイソプロピルエチルアミンである。標準的カップリング手順、例えばPyBOP及び本明細書に記載されている又は当該技術において既知である他の手順が使用され、ここで効果的なカップリングを確実にするために、例示的にはカップリング剤が活性化試薬として適用される

。Fmoc保護基を、ピペリジン、フッ化テトラブチルアンモニウム(TBAF)などによる処理のような標準的条件下でのそれぞれのカップリング工程の後で除去する。Fmoc-Glu-OtBu、N<sup>10</sup>-TFA-Pte-OHなどのような適切に保護されたアミノ酸構成単位を、スキーム1に記載されたように使用し、スキーム1の工程(b)においてはFmoc-AA-OHとして表されている。したがって、AAは、適切に保護されている任意のアミノ酸出発物質を意味する。本明細書で使用されるとき、アミノ酸という用語は、1つ以上の炭素で隔てられたアミンとカルボン酸官能基の両方を有する任意の試薬を意味することが意図され、天然に生じるアルファ及びベータアミノ酸、並びにこれらのアミノ酸の誘導体及び類似体を含むことを、理解するべきである。特に、保護セリン、トレオニン、システイン、アスパラギン酸などのような保護されている側鎖を有するアミノ酸を、本明細書に記載されている葉酸ペプチド合成に使用することもできる。更に、ガンマ、デルタ又はそれより長い同族アミノ酸を、本明細書に記載されている葉酸ペプチド合成に出発物質として含めることもできる。更に、ノルロイシン、イソバリン、 $\alpha$ -メチルトレオニン、 $\alpha$ -メチルシステイン、 $\beta$ -ジメチルシステインなどのような相対的側鎖又は交互分岐鎖構造を有するアミノ酸類似体を、本明細書に記載されている葉酸ペプチド合成に出発物質として含めることもできる。

10

#### 【0192】

Fmoc-AA-OHを伴うカップリングシーケンス(工程(a)及び(b))を、「n」回実施して、固体支持ペプチド2を調製するが、ここでnは、整数であり、0~約100であってもよい。最終カップリング工程に続いて、残留Fmoc基を除去し(工程(a))、次にペプチドをグルタミン酸誘導体に結合し(工程(c))、脱保護し、TFA-保護プテロイン酸に結合する(工程(d))。その後、ペプチドを、トリフルオロ酢酸、エタンジチール及びトリイソプロピルシランによる処理でポリマー支持体から切断する(工程(e))。これらの反応条件によって、適切に保護されているアミノ酸側鎖の一部を形成することができるt-Bu、t-Boc及びTrt保護基の同時の除去がもたらされる。TFA保護基を、塩基による処理で除去して(工程(f))、葉酸含有ペプチジルフラグメント3をもたらす。

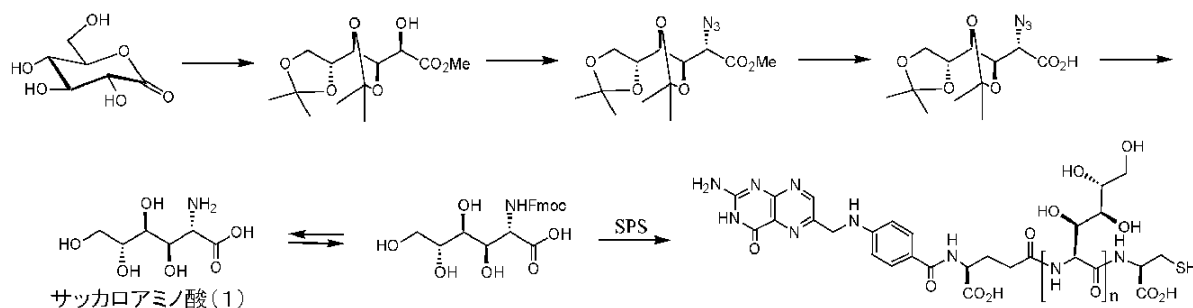
20

#### 【0193】

加えて、以下の例示的方法を使用して、本明細書に記載されている化合物を調製することができ、ここでnは1~約10の整数である。

30

#### 【化37】



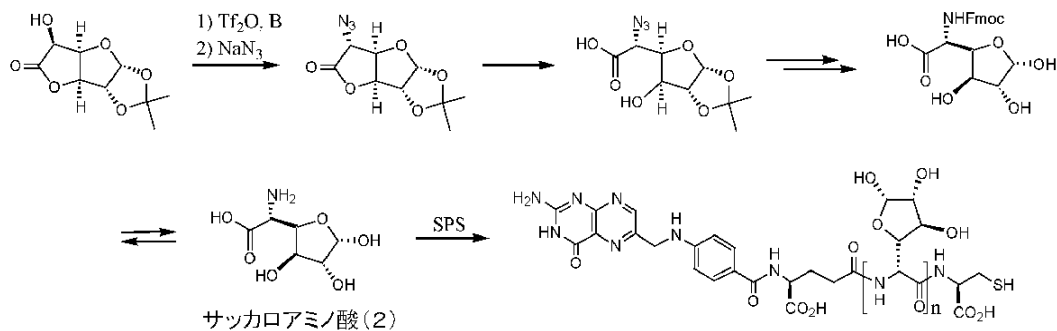
40

上記の合成方法は、示されている特定のサッカロペプチドのような選択された化合物により例示されているが、追加の類似化合物を、出発物質の慣用的な選択及び反応条件の慣用的な最適化により、同一又は同様の方法を使用して調製できることが、理解されるべきである。

#### 【0194】

本明細書に記載されている化合物は、従来の合成有機化学を使用して調製することができる。加えて、以下の例示的方法を使用して、本明細書に記載されている化合物を調製することができ、ここでnは1~約10の整数である。

## 【化 3 8】



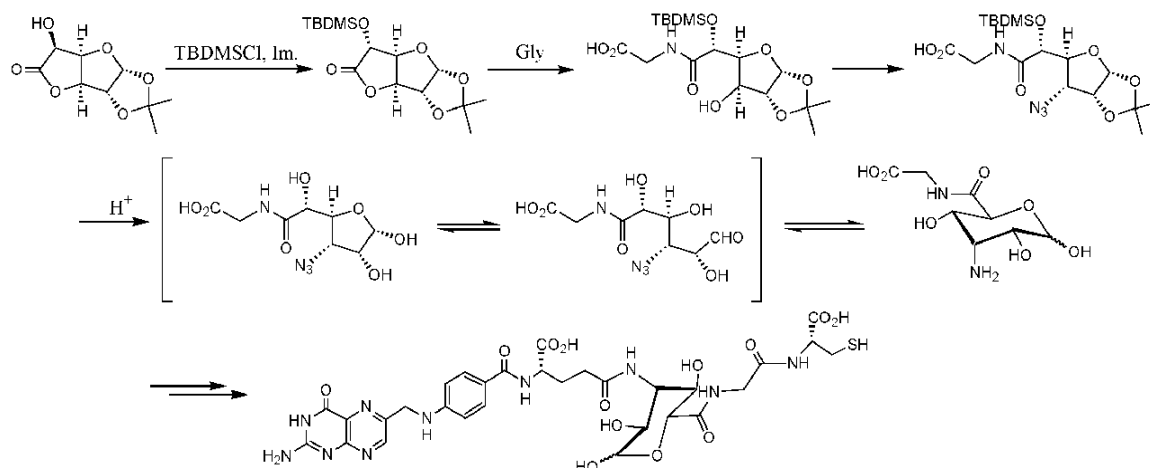
10

上記の合成方法は、示されている特定のサッカロペプチドのような選択された化合物により例示されているが、追加の類似化合物を、出発物質の慣用的な選択及び反応条件の慣用的な最適化により、同一又は同様の方法を使用して調製できることが、理解されるべきである。

## 【0195】

加えて、以下の例示的方法を使用して、本明細書に記載されている化合物を調製することができる。

## 【化 3 9】



20

30

上記の合成方法は、選択された化合物により例示されているが、追加の類似化合物を、出発物質の慣用的な選択及び反応条件の慣用的な最適化により同一又は同様の方法を使用して調製できることが、理解されるべきである。

## 【0196】

前述のそれぞれの合成方法において、中間体を、任意の追加の親水性スペーサーリンカー、他のスペーサーリンカー、放出型リンカー、又は薬剤 A に結合することができる。前述のそれぞれの合成方法の変形態様において、追加の親水性スペーサーリンカー、他のスペーサーリンカー、又は放出型リンカーを、結合リガンド B と指定の親水性スペーサーリンカーとの間に挿入することができる。加えて、二価親水性スペーサーリンカーの左から右への配置は限定的ではなく、したがって、薬剤 A、結合リガンド B、追加の親水性スペーサーリンカー、他のスペーサーリンカー、及び / 又は放出型リンカーを、本明細書に記載されている親水性スペーサーリンカーのいずれの末端にも結合できることが、理解されるべきである。

40

## 【0197】

## &lt; 方法例 &gt;

相対的親和性アッセイ。葉酸に対する葉酸受容体 (F R) の親和性を、以前に記載された方法 (Westerhof, G. R., J. H. Schornagel, et al. (1995) Mol. Pharm. 48: 459-471) を僅かに変更して決定した。簡潔には、F R 陽性 K B 細胞を、24 ウエル細胞培養プレートに大量に接種し、18 時間かけてプラスチックに接着させた。指定されたウエル中

50

の消費されたインキュベーション培地を、増加濃度の試験品又は葉酸の存在下又は不在下で、100 nMの<sup>3</sup>H-葉酸を補充した葉酸無含有RPMI (FFRPMI)で置換した。細胞を37で60分間インキュベートし、次にPBS、pH7.4で3回すすいだ。1ウエルあたり、500マイクロリットルのPBS、pH7.4中1%SDSを加えた。次に細胞溶解産物を収集し、5 mLのシンチレーションカクテルを含有する個々のバイアルに加え、次に放射能によって数えた。陰性対照のチューブは、FFRPMI中に<sup>3</sup>H葉酸のみを含有する(競合物質なし)。陽性対照のチューブは最終濃度1 mMの葉酸を含有しており、これらの試料で測定したCPM(標識の非特異的結合を表す)を、全ての試料から差し引いた。特に、相対的親和性を、KB細胞のFRに結合した<sup>3</sup>H-葉酸結合の50%を置き換えるのに必要な化合物の逆モル比として定義し、FRへの葉酸の相対的親和性を1

10

## 【0198】

細胞DNA合成の阻害。本明細書に記載されている化合物を、葉酸受容体陽性KB細胞の増殖を阻害する薬剤の能力を予測するインビトロ細胞毒性アッセイを使用して評価した。化合物を、本明細書に記載されているプロトコールに従って調製した、対応する化学療法薬に結合した葉酸から構成した。KB細胞を、指定した濃度の葉酸-薬剤結合体に、100倍の過剰葉酸の不在下又は存在下、37で最大7時間まで暴露した。次に細胞を新たな培地で1回すすぎ、新たな培地により37で72時間インキュベートした。細胞生存率を、<sup>3</sup>H-チミジン組み込みアッセイを使用して評価した。

## 【0199】

20

インビトロ濃度依存性細胞毒性活性。細胞を24ウエルFalconプレートに大量に接種し、一晚ではほぼコンフルレントな単層を形成させた。試験品を添加する30分前に、消費された培地を全てのウエルから吸引し、新たな葉酸無含有RPMI (FFRPMI)で置換した。過剰葉酸の存在下で生成される細胞毒性活性(FR結合との競合が可能)が、FR特異的送達と無関係であった総活性の一部を意味するので、100 μMの葉酸を含有する培地を入れた指示されたウエル及び後者のウエルの中の細胞を使用して、標的特異性を決定したことに留意すること。10%熱不活性化ウシ胎児血清を含有する新たなFFRPMIの1 mLで1回すすいだ後、各ウエルに、100 μMの遊離葉酸(結合部位競合物質)の存在下又は不在下で、試験品の増加濃度を含有する培地の1 mLを入れた(試料1つあたり4つのウエル)。処理細胞を37で2時間パルスし、0.5 mLの培地で4回すすぎ、次に1 mLの新たな培地で最大70時間までチェイスした。消費された培地を全てのウエルから吸引し、5 μCi/mLの<sup>3</sup>H-チミジンを含有する新たな培地で置換した。37で2時間の更なるインキュベーションの後、細胞を、0.5 mLのPBSで3回洗浄し、次に1ウエルあたり0.5 mLの氷冷5%トリクロロ酢酸で処理した。15分後、トリクロロ酢酸を吸引し、細胞物質を、0.5 mLの0.25 N水酸化ナトリウムの15分間の添加により可溶化した。450 μLの各可溶化試料を、3 mLのEcolumeシンチレーションカクテルを含有するシンチレーションバイアルに移し、次に液体シンチレーションカウンターで数えた。表に示した最終結果は、未処理対照に対する<sup>3</sup>H-チミジン組み込みの百分率として表した。

30

## 【0200】

40

本明細書の図に示されているように、用量依存性毒性を測定することができ、大部分の場合において、IC<sub>50</sub>値(新たに合成されたDNAへの<sup>3</sup>H-チミジン組み込みを50%低減するのに必要な薬剤結合体の濃度)は、低ナノモル範囲内であった。更に、これらの結合体の細胞毒性は、過剰遊離葉酸の存在下で低減され、観察された細胞の死滅は、葉酸受容体への結合により仲介されたことを示唆している。以下の表は、KB細胞に対する及びRAW264.7細胞に対する選択された化合物についてのデータを例示した。

## 【0201】

【表 3】

結合体 番号	基剤	K B細胞		RAW264. 7 細胞	
		IC <sub>50</sub> (nM)	過剰葉酸との 競合可能性	IC <sub>50</sub> (nM)	過剰葉酸との 競合可能性
EC0234	DAVLBH	56	あり		
EC0246	DAVLBH		あり		
EC0258	DAVLBH	8. 4	あり		
EC0262	クリプトフィシン	4	あり		
EC0263	DAVLBH	11	あり		
EC0409	DAVLBH	7	あり		
EC0525	チオボルテゾミブ			68	あり
EC0543	チューブリシンA	1. 6	あり		
EC0551	アミノプテリン			1	あり
EC0552	ラパマイシン			100	あり
EC0561	パクリタキセル	53	あり		
EC0563	チオボルテゾミブ+ ラパマイシン			387	あり
EC0582	チオボルテゾミブ+ エベロリムス			51	あり
EC0592	$\alpha$ アマナチン	~3	あり	5	あり
EC0595	ビスーチオボルテゾミブ			4	あり
EC0598	ベルカリン			33	あり
EC0605	ビスーベルカリン			14	あり
EC0610	ジデムニンB			4	あり
EC0647	ビスーアミノプテリン			0. 3	あり

## 【 0 2 0 2 】

多様な癌細胞株に対するインビトロ試験。細胞を24ウエルFalconプレートに大量に接種し、ほぼコンフルエントな単層を一晩形成させる。試験化合物を添加する30分前に、消費された培地を全てのウエルから吸引し、新たな葉酸欠乏RPMI (FFRPMI) 培地で置換する。ウエルのサブセットを、100  $\mu$ Mの葉酸を含有する培地を入れるように指定する。指定したウエルの中の細胞を使用して、標的特異性を決定する。理論に束縛されることなく、過剰葉酸の存在下で試験化合物により生成される細胞毒性活性(すなわち、FR結合への競合が存在する)は、FR特異的送達に無関係である総活性の一部に相当することが示唆される。10%熱不活性化ウシ胎児血清を含有する新たなFFRPMIの1mLで1回すすいだ後、各ウエルに、示されているように、100  $\mu$ Mの遊離葉酸の存在下又は不在下で、試験化合物の増加濃度を含有する培地の1mLを入れる(試料1つあたり4つのウエル)。処理細胞を37℃で2時間パルスし、0.5mLの培地で4回すすぎ、次に1mLの新たな培地で最大70時間までチェイスする。消費された培地を全てのウエルから吸引し、5  $\mu$ Ci/mLの<sup>3</sup>H-チミジンを含有する新たな培地で置換する。37℃で2時間の更なるインキュベーションの後、細胞を、0.5mLのPBSで3回洗浄し、次に1ウエルあたり0.5mLの氷冷5%トリクロロ酢酸で処理する。15分後、トリクロロ酢酸を吸引し、細胞物質を、0.5mLの0.25N水酸化ナトリウムの15分間の添加により可溶化する。各可溶化試料の450  $\mu$ Lのアリコートをし、3mLのEcolumeシンチレーションカ

クテルを含有するシンチレーションバイアルに移し、次に液体シンチレーションカウンターで数える。表に示した最終結果は、未処理対照に対する<sup>3</sup>H-チミジン組み込みの百分率として表す。

#### 【0203】

マウスにおける腫瘍増殖の阻害。4～7週齢のマウス（Balb/c又はnu/nu系）をHarlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, IN) から購入した。通常の齧歯類用固形飼料は高濃度の葉酸を含有する（6 mg/kg固形飼料）。そこで、正常なヒト血清の範囲に近い血清葉酸濃度を達成するため、使用するマウスは、腫瘍移植の前に、葉酸無含有食餌（Harlan diet #TD00434）により1週間維持した。腫瘍細胞の接種には、100 μL中の1×10<sup>6</sup>個のM109細胞（Balb/c系）又は1×10<sup>6</sup>個のKB細胞（nu/nu系）を、背中央領域に注射した。腫瘍の大きさを、カリパスを使用して2～3日毎に2つの垂直方向で測定し、その容量を、 $0.5 \times L \times W^2$ として算出したが、ここで、L = 最長軸の測定値（mm）であり、そしてW = Lに対して垂直な軸の測定値（mm）である。次に細胞死滅Log（LC<sub>50</sub>）及び処置対照（T/C）値を、発表されている手順に従って計算した（例えば、Lee et al., “BMS-247550: a novel epothilone analog with a mode of action similar to paclitaxel but possessing superior antitumor efficacy” Clin Cancer Res 7:1429-1437 (2001); Rose, “Taxol-based combination chemotherapy and other in vivo preclinical antitumor studies” J Natl Cancer Inst Monogr 47-53 (1993)を参照すること）。投与溶液は、PBSから毎日新たに調製し、マウスの尾側静脈を介して投与した。投与は、皮下腫瘍が50～100 mm<sup>3</sup>（t<sub>0</sub>）の平均容量を有したときに開始し、典型的には、KB腫瘍では、腫瘍接種後（PTI）から8日目であり、M109腫瘍ではPTIから11日目であった。

#### 【0204】

一般的KB腫瘍アッセイ。腫瘍を有する動物に静脈内（i.v.）投与したときの本明細書に記載されている化合物の抗腫瘍活性を、皮下KB腫瘍を有するnu/nuマウスにおいて評価した。マウス（5匹/群）において、1×10<sup>6</sup>個のKB細胞による右腋窩の皮下組織への腫瘍接種後からおおよそ8日目に（t<sub>0</sub>の平均腫瘍容量 = 50～100 mm<sup>3</sup>）、特に指示のない限り、5 μmol/kgの薬剤送達結合体又は同等な投与量のPBS（対照）を、週に3回（TIW）、3週間i.v.注射した。腫瘍増殖を、各処置群において2日又は3日間隔でカリパスを使用して測定した。腫瘍容量を、方程式： $V = a \times b^2 / 2$ を使用して計算し、ここで、「a」は腫瘍の長さであり、そして「b」は幅である（ミリメートルで表す）。

#### 【0205】

一般的M109腫瘍アッセイ。腫瘍を有する動物に静脈内（i.v.）投与したときの本明細書に記載されている化合物の抗腫瘍活性を、皮下M109腫瘍（同系肺癌）を有するBalb/cマウスにおいて評価した。マウス（5匹/群）において、1×10<sup>6</sup>個のM109細胞による右腋窩の皮下組織への腫瘍接種後からおおよそ11日目に（t<sub>0</sub>の平均腫瘍容量 = 60 mm<sup>3</sup>）、1500 nmol/kgの薬剤送達結合体又は同等な投与量のPBS（対照）を、週に3回（TIW）、3週間i.v.注射した。腫瘍増殖を、各処置群において2日又は3日間隔でカリパスを使用して測定した。腫瘍容量を、方程式： $V = a \times b^2 / 2$ を使用して計算し、ここで、「a」は腫瘍の長さであり、そして「b」は幅である（ミリメートルで表す）。

#### 【0206】

一般的4T-1腫瘍アッセイ。6～7週齢のマウス（雌Balb/c系）をHarlan, Inc., Indianapolis, INから得た。マウスを、Harlanの葉酸無含有固形飼料により、この実験を開始する前及びその期間中、合計三週間維持した。葉酸受容体陰性4T-1腫瘍細胞（動物1匹あたり1×10<sup>6</sup>個の細胞）を、右腋窩の皮下組織に接種した。4T-1腫瘍の平均容量が約100 mm<sup>3</sup>となる腫瘍接種後からおおよそ5日目に、特に指示のない限り、マウス（5匹/群）に、3 μmol/kgの薬剤送達結合体又は同等な投与量のPBS（対照）を、週に3回（TIW）、3週間i.v.注射した。腫瘍増殖を、各処置群において2日又は3日間隔

でカリパスを使用して測定した。腫瘍容量を、方程式： $V = a \times b^2 / 2$ を使用して計算し、ここで、「a」は腫瘍の長さであり、そして「b」は幅である（ミリメートルで表す）。

#### 【0207】

図3A、4A、5A、6A、7A、8A及び10Aに示されているデータは、本明細書に記載されている結合体が、対応する非結合化合物と比較して腫瘍の処置において優れた効能を示すことを指摘している。EC0396及びEC145による皮下M109腫瘍を有するBalb/cマウスの処置（図4A）は、全ての処置動物において完全寛解をもたらした（EC0396では3/3匹及びEC145では5/5匹）。加えて、ほぼ70日後には、疾患の再発は観察されなかった。同様に、EC0400（図5A）による処置は、完全寛解をもたらし、ほぼ70日後に疾患の再発はなかった。親水性スパーサーリンカーを含む本明細書に記載されている結合化合物（例えば、EC0436）による処置は、親水性スパーサーリンカーを欠いている比較結合体（例えば、EC0305）に対して優れており、優れた効能を示した（図8A）。EC0436は、5/5匹の動物において完全寛解を示し、90日後に疾患の再発がなかった。

#### 【0208】

薬剤毒性決定。心臓穿刺により血液を回収し、血清を、Ani-Lytics, Inc. (Gaithersburg, MD)における、血中尿素窒素（BUN）、クレアチニン、総タンパク質、AST-SGOT、AST-SGOT、および標準的な血液細胞パネルについての独立した分析にかけることにより、残留薬剤毒性を評価した。加えて、ホルマリン固定した心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、腸、骨格筋及び骨（脛骨/腓骨）の組織病理学的評価を、Animal Reference Pathology Laboratories (ARUP; Salt Lake City, Utah)において、委員会により認可を受けた病理学者により実施した。

#### 【0209】

体重減少により測定した毒性。体重の変化の率を、マウス（5匹のマウス/群）において腫瘍接種後（PTI）の選択した日に決定し、対照と比較し、グラフで表した。図3B、4B、5B、6B、7B、8B及び10Bに示されているように、本明細書に記載されている結合化合物は、非結合化合物と比較して、同等かそれ以下の毒性しか示さなかったことが、体重の減少率から分かった。

#### 【0210】

マウスに対する単回及び多回容量MTD<sub>app</sub>。本明細書に記載されている化合物は、結合体に含まれる親水性スパーサーリンカーの数と単回用量によるマウスへの最大耐量との間の正の相関を示すことができる。例えば、対照結合体と比較した、本明細書に記載されている以下のピンブラスチン結合体を、以下の表に示す。

#### 【0211】

【表4】

化合物	親水性リンカーの数	単回用量MTD <sub>app</sub> ( $\mu\text{mol/kg}$ )
EC145	0	15
EC0234	1	12*
EC0246	2	<20**
EC0263	3	>20

\* 溶解性により制限される用量；\*\* 1/3匹のマウスが20  $\mu\text{mol/kg}$ で死亡した。

#### 【0212】

EC0436及び比較例EC0305もBalb/cマウスにTIWで1週間i.v.投与した。多回用量で得られたMTDは、EC0305（6 mmol/kg）及びEC0436（9 mmol/kg）であった。データは、EC0436をEC0305よりも50%多いレベルで投与できる



ことを示している。

【 0 2 1 3 】

血清結合。親水性スパーサーリンカーを欠いた比較例 E C 1 4 5 と比較した、親水性スパーサーリンカーを含む葉酸 D A V L B H 結合体の、3 0 K N W W L 濾過した血清中の 5 0 μ M の化合物の血清結合及び H P L C - U V 検出 ( n = 3 ) による評価。

【表 5】

化合物	ヒト血清 (結合%)	SD	マウス血清 (結合%)	SD
EC145	54.3	1.6	67.3	2.6
EC0396	42.7	4.4	72.2	5.2
EC0400	61.1	1.9	75.5	1.4

10

【 0 2 1 4 】

胆汁クリアランス。非結合薬剤、親水性スパーサーリンカーを欠いている薬剤結合体及び本明細書に記載されている結合体の胆汁クリアランス ( I D % ) の比較。

【表 6】

化合物	スパーサー	胆汁クリアランス ( I D % )
DAVLBH	なし	58.0
EC145	親水性スパーサーなし	8.7
EC0234	モノーリボシル	10.6
EC0246	ビスーリボシル	4.7
EC0258	トリーリボシル	3.2
EC0434	テトラーリボシル	2.8
EC0400	モノーグルクロニド	6.3
EC0423	ビスーグルクロニド	3.9
EC0409	P E G <sub>12</sub>	7.9
EC0429	ピペラジン/A s p	8.6

20

30

【 0 2 1 5 】

図 1 1 及び 1 3 に示されている結果は、E C 1 4 5 標準と比較して、本明細書に記載されている親水性スパーサーリンカーを含む E C 0 4 3 4 の肝臓クリアランスが 7 6 % 減少したことを示している。理論に束縛されることなく、これらの結果は非特異的肝臓クリアランスに相当すると考えられ、したがって、本明細書に記載されている親水性スパーサーリンカーを含むこれらの結合体を、そのようなリンカーを含まない対応する結合体と比較して、有意に低い用量で投与できることが示唆される。更に、理論に束縛されることなく、肝臓クリアランスは、一部の結合体において観察される用量制限的 G I 関連毒性をもたらすことが示唆される。

40

【 0 2 1 6 】

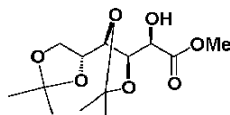
ウエスタンブロット分析。図 1 3 に示されているデータは、E C 0 5 6 5 ( 葉酸 - 糖 - エベロリムス ) が、m T O R の下流標的 ( エベロリムスの細胞内標的 ) の用量依存性的な特異的ノックダウンを引き起こしうることを示している。理論に束縛されることなく、葉酸は、細胞内部にエベロリムスを送達し、そこでエベロリムスは、ラパマイシン及び s e r / t h r キナーゼの哺乳類標的である m T O R を阻害するすると考えられる。ウエスタンブロットにより示されているように、m T O R の下流標的 ( P 7 0 S 6 - キナーゼ及びリボソーム S 6 ) の阻害がもたらされる。

50

## 【 0 2 1 7 】

&lt; 化合物例 &gt;

## 【 化 4 0 】

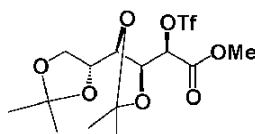


## 【 0 2 1 8 】

実施例。(3,4), (5,6) - ビスアセトニド - D - グルコン酸メチルエステル。乾燥した 250 mL の丸底フラスコの中で、アルゴン下、 $\alpha$  - D - グルコラクトン (4.14 g、23.24 mmol) をアセトン - メタノール (50 mL) に懸濁した。この懸濁液に、ジメトキシプロパン (17.15 mL、139.44 mmol)、続いて触媒量の p - トルエンスルホン酸 (200 mg) を加えた。この溶液を室温で 16 時間攪拌した。TLC (石油エーテル中 50% EtOAc) は、全ての出発物質が消費され、生成物が形成されたことを示した。アセトン - メタノールを減圧下で除去した。反応の残渣を EtOAc に溶解し、水で洗浄した。有機層をブラインで洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥し、濃縮乾固した。次にこの物質を  $\text{SiO}_2$  カラムに装填し、クロマトグラフィー (石油エーテル中 30% EtOAc) に付して、純粋な (3,4), (5,6) - ビスアセトニド - D - グルコン酸メチルエステル (3.8 g、56%) 及び位置異性体 (2,3), (5,6) - ビスアセトニド - D - グルコン酸メチルエステル (0.71 g、10%) を得た。 $^1\text{H}$  NMR データは、必要とされる生成物と一致した。 $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_7$ ; MW 290.31; 精密質量: 290.14。

## 【 0 2 1 9 】

## 【 化 4 1 】

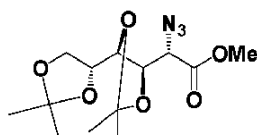


## 【 0 2 2 0 】

実施例。(3,4), (5,6) - ビスアセトニド - 2 - OTf - D - グルコン酸メチルエステル。乾燥した 100 mL の丸底フラスコの中で、アルゴン下、(3,4), (5,6) - ビスアセトニド - D - グルコン酸メチルエステル (3.9 g、13.43 mmol) を塩化メチレン (40 mL) に溶解し、 $-20 \sim -25^\circ\text{C}$  に冷却した。この溶液に、ピリジン (3.26 mL、40.29 mmol)、続いてトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (3.39 mL、20.15 mmol) を加えた。この白色の濁った溶液を  $-20^\circ\text{C}$  で 1 時間攪拌した。TLC (石油エーテル中 25% EtOAc) は、全ての出発物質が消費され、生成物が形成されたことを示した。反応混合物を碎氷中に注ぎ、ジエチルエーテルで抽出した。有機層を水、ブラインで洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥し、濃縮して、(3,4), (5,6) - ビスアセトニド - 2 - OTf - D - グルコン酸メチルエステル (5.5 g、97%) を得た。この物質を更に精製することなく次の反応に使用した。 $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{O}_9\text{S}$ ; MW 422.371; 精密質量: 422.09。

## 【 0 2 2 1 】

## 【 化 4 2 】



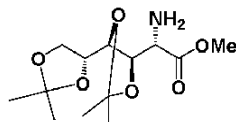
## 【 0 2 2 2 】

実施例。(3,4), (5,6) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - アジド - D - マannon酸メチルエステル。乾燥した 100 mL の丸底フラスコの中で、アルゴン下、(3

( 3 , 4 ) , ( 5 , 6 ) - ビスアセトニド - 2 - O T f - D - グルコン酸メチルエステル ( 5 . 5 g 、 1 3 . 0 2 mmol ) を D M F ( 2 0 mL ) に溶解した。この溶液に、N a N <sub>3</sub> ( 0 . 9 3 g 、 1 4 . 3 2 mmol ) を加えた。この溶液を室温で 1 時間撹拌した。T L C ( 石油エーテル中 8 % E t O A c 、 3 回実施 ) は、全ての出発物質が消費され、生成物が形成されたことを示した。D M F を減圧下で除去した。反応混合物をブラインで希釈し、E t O A c で抽出した。有機層を水、ブラインで洗浄し、N a <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> で乾燥し、濃縮乾固した。次にこの粗物質を S i O <sub>2</sub> カラムに装填し、クロマトグラフィー ( 石油エーテル中 2 0 % E t O A c ) に付して、純粋な ( 3 , 4 ) , ( 5 , 6 ) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - アジド - D - マンノン酸メチルエステル ( 3 . 8 g 、 9 3 % ) を得た。<sup>1</sup> H N M R データは、生成物と一致した。C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S ; M W 3 1 5 . 3 2 ; 精密質量 : 3 1 5 . 1 4 。

【 0 2 2 3 】

【 化 4 3 】

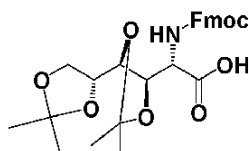


【 0 2 2 4 】

実施例。( 3 , 4 ) , ( 5 , 6 ) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - アミノ - D - マンノン酸メチルエステル。Parr 水素化フラスコの中で、( 3 , 4 ) , ( 5 , 6 ) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - アジド - D - マンノン酸メチルエステル ( 3 . 5 g 、 1 1 . 1 0 mmol ) をメタノール ( 1 7 0 mL ) に溶解した。この溶液に、1 0 % P d 担持炭 ( 8 0 0 mg 、 5 mol % ) を加えた。水素化を、Parr 水素化装置を 2 5 PSI で 1 時間使用して実施した。T L C ( 塩化メチレン中 1 0 % メタノール ) は、全ての出発物質が消費され、生成物が形成されたことを示した。反応混合物を、セライトパッドで濾過し、濃縮乾固した。次にこの粗物質を S i O <sub>2</sub> カラムに装填し、クロマトグラフィー ( 塩化メチレン中 2 % メタノール ) に付して、純粋な ( 3 , 4 ) , ( 5 , 6 ) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - アミノ - D - マンノン酸メチルエステル ( 2 . 6 1 g 、 8 1 % ) を得た。<sup>1</sup> H N M R データは、生成物と一致した。C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> N O <sub>6</sub> S ; M W 2 8 9 . 3 2 ; 精密質量 : 2 8 9 . 1 5 。

【 0 2 2 5 】

【 化 4 4 】



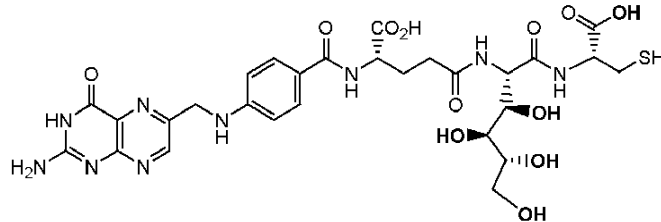
【 0 2 2 6 】

実施例。( 3 , 4 ) , ( 5 , 6 ) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - F m o c - アミノ - D - マンノン酸。乾燥した 1 0 0 mL の丸底フラスコの中で、( 3 , 4 ) , ( 5 , 6 ) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - アミノ - D - マンノン酸メチルエステル ( 1 . 2 4 g 、 4 . 2 9 mmol ) を T H F / M e O H ( 2 0 mL / 5 mL ) に溶解した。この溶液に、水 ( 5 mL ) 中の L i O H · H <sub>2</sub> O ( 2 1 5 . 8 mg 、 5 . 1 4 mmol ) を加えた。この明黄色の溶液を室温で 2 時間撹拌した。T L C ( 塩化メチレン中 1 0 % メタノール ) は、全ての出発物質が消費され、生成物が形成されたことを示した。T H F / M e O H を減圧下で除去した。水相を飽和 N a H C O <sub>3</sub> ( 1 0 mL ) に再懸濁した。この懸濁液に、1 , 4 - ジオキサン ( 1 0 mL ) 中の F m o c - O S u ( 1 . 7 4 g 、 5 . 1 4 mmol ) を加えた。この不均質溶液を室温で 1 8 時間撹拌した。T L C ( 塩化メチレン中 1 0 % メタノール ) は、大部分の出発物質が消費され、生成物が形成されたことを示した。ジオキサンを減圧下で除去した。水層をジエチルエーテルで抽出して、低極性の不純物を除去した。次に水層を、

0.2N HClを使用してpH6に酸性化し、EtOAcで再抽出した。EtOAc層をブラインで洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、濃縮して、(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸(1.6g、76%)を得た。この物質を更に精製することなく次の反応に使用した。<sup>1</sup>H NMRデータは、生成物と一致した。C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>8</sub>; MW 497.541; 精密質量: 497.20。

【0227】

【化45】



10

【0228】

実施例。EC0233を、H-Cys(4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂、及び下記のSPPS試薬から出発して、本明細書に記載されている一般的ペプチド合成手順に従って、3工程において、SPPSにより合成した：

【表7】

20

試薬	mmol	当量	MW	量
H-Cys(4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂 (装填0.56mmol/g)	0.56			1.0g
(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.7	1.25	497.54	0.348g
Fmoc-Glu-OtBu	1.12	2	425.5	0.477g
N <sup>10</sup> TFA-プテロイン酸 (10mlのDMSOに溶解)	0.70	1.25	408	0.286g
DIPEA	2.24	4	129.25 (d=0.742)	0.390mL
PyBOP	1.12	2	520	0.583g

30

【0229】

カップリング工程。ペプチド合成容器の中に、樹脂を加え、アミノ酸溶液、DIPEA及びPyBOPを加える。アルゴンを1時間泡立て、DMF及びIPAで3回洗浄する。それぞれのアミノ酸をカップリングする前、Fmocの脱保護に、DMF中20%ピペリジン(10分間)を使用する。3つのカップリング工程の全てが完了するまで続ける。終了時に、樹脂をDMF中2%ヒドラジンで3回(5分間)洗浄して、プテロイン酸のTFA保護基を切断する。

40

【0230】

切断工程。切断試薬: 92.5%(50ml)TFA、2.5%(1.34ml)H<sub>2</sub>O、2.5%(1.34ml)トリイソプロピルシラン、2.5%(1.34ml)エタンジチオール。25mlの切断試薬を加え、アルゴンを20分間泡立て、排水し、残りの試薬で3回洗浄する。5ml残留するまでRotavapに付し、エチルエーテルに沈殿させる。遠心分離し、乾燥する。

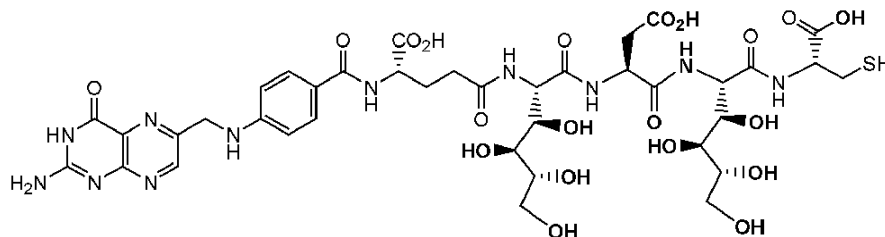
【0231】

50

H P L C 精製工程。カラム：Waters NovaPak C<sub>18</sub> 300 × 19 mm；緩衝液 A = 10 mM 酢酸アンモニウム、pH 5；B = A C N；方法：1 % B から 20 % B を 15 ml / 分で 40 分間；収量約 202 mg、50 %。C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>S；MW 721.70；精密質量：721.21。

【0232】

【化46】



10

【0233】

実施例。ビス - サッカロ - 葉酸リンカー E C 0 2 4 4。E C 0 2 4 4 を、H - C y s (4 - メトキシトリチル) - 2 - クロロトリチル樹脂、及び下記の S P P S 試薬から出発して、本明細書に記載されている一般的ペプチド合成手順に従って、5 工程において、S P P S により合成した：

【表 8】

試薬	mmol	当量	MW	量
H - C y s (4 - メトキシトリチル) - 2 - クロロトリチル樹脂 (装填 0.56mmol/g)	0.56			1.0g
(3, 4), (5, 6) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - F m o c - アミノ - D - マンノン酸	0.7	1.25	497.54	0.348g
F m o c - A s p (O t B u) - O H	1.12	2	411.5	0.461g
(3, 4), (5, 6) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - F m o c - アミノ - D - マンノン酸	0.7	1.25	497.54	0.348g
F m o c - G l u - O t B u	1.12	2	425.5	0.477g
N <sup>10</sup> T F A - プテロイン酸 (10ml の DMSO に溶解)	0.70	1.25	408	0.286g
D I P E A	2.24	4	129.25 (d=0.742)	0.390mL
P y B O P	1.12	2	520	0.583g

20

30

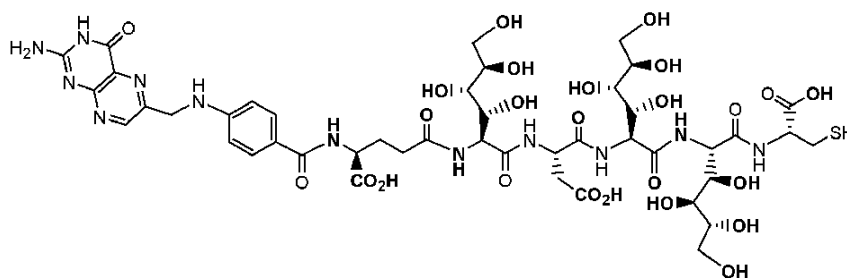
40

【0234】

カップリング工程、切断工程、切断試薬及び H P L C 精製工程は、上記に記載したものと同一である；収量約 284 mg、50 %。C<sub>38</sub>H<sub>51</sub>N<sub>11</sub>O<sub>20</sub>S；MW 1013.94；精密質量：1013.30。

【0235】

## 【化 4 7】



## 【 0 2 3 6】

10

実施例。E C 0 2 5 7 を、H - C y s ( 4 - メトキシトリチル ) - 2 - クロロトリチル樹脂、及び下記の S P P S 試薬から出発して、本明細書に記載されている一般的ペプチド合成手順に従って、6 工程において、S P P S により合成した：

## 【表 9】

試薬	mmol	当量	MW	量
H - C y s ( 4 - メトキシトリチル ) - 2 - クロロトリチル樹脂 ( 装填 0.56mmol/g )	0.2			0.333g
(3, 4), (5, 6) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - F m o c - アミノ - D - マンノン酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
(3, 4), (5, 6) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - F m o c - アミノ - D - マンノン酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
F m o c - A s p ( O t B u ) - O H	0.4	2	411.5	0.165g
(3, 4), (5, 6) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - F m o c - アミノ - D - マンノン酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
F m o c - G l u - O t B u	0.4	2	425.5	0.170g
N <sup>10</sup> T F A - プテロイン酸 (10ml の DMSO に溶解)	0.25	1.25	408	0.119g
D I P E A	0.8	4	129.25 (d=0.742)	0.139mL
P y B O P	0.4	2	520	0.208g

20

30

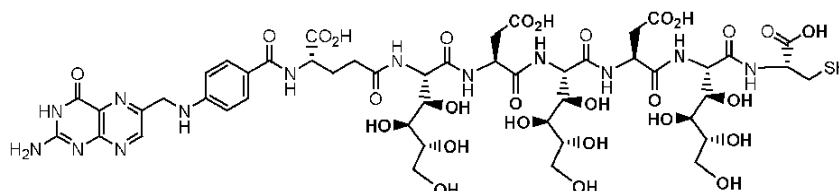
## 【 0 2 3 7】

カップリング工程、切断工程、切断試薬及び H P L C 精製工程は、上記に記載したものと同一である；収量約 1 7 0 mg、7 1 %。C<sub>44</sub>H<sub>62</sub>N<sub>12</sub>O<sub>25</sub>S；MW 1 1 9 1 . 0 9；精密質量：1 1 9 0 . 3 7。

40

## 【 0 2 3 8】

## 【化 4 8】



## 【 0 2 3 9】

50

実施例。EC0261を、H-Cys(4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂及び下記のSPPS試薬から出発して、本明細書に記載されている一般的ペプチド合成手順に従って、7工程において、下記のSPPS試薬により合成した：

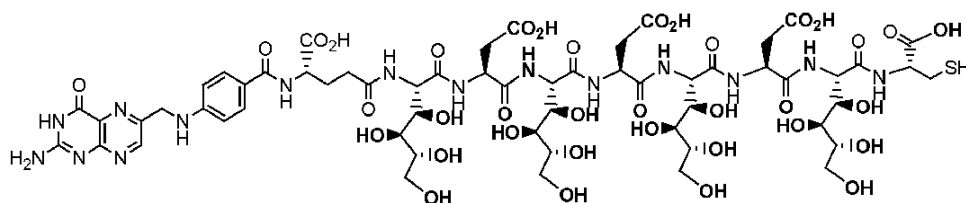
【表10】

試薬	mmol	当量	MW	量
H-Cys(4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂 (装填0.56mmol/g)	0.2			0.333g
(3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.4	2	411.5	0.165g
(3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.4	2	411.5	0.165g
(3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu-OtBu	0.4	2	425.5	0.170g
N <sup>10</sup> TFA-プテロイン酸 (10mlのDMSOに溶解)	0.25	1.25	408	0.119g
DIPEA	0.8	4	129.25 (d=0.742)	0.139mL
PyBOP	0.4	2	520	0.208g

カップリング工程、切断工程、切断試薬及びHPLC精製工程は、上記に記載したものと同一である；収量約170mg、65%。 $C_{48}H_{67}N_{13}O_{28}S$ ；MW 1306.18；精密質量：1305.39。

【0240】

【化49】



【0241】

実施例。テトラ-サッカロ-トリス-Asp-葉酸リンカーEC0268。EC0268を、H-Cys(4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂、及び下記のSPPS試薬から出発して、本明細書に記載されている一般的ペプチド合成手順に従って、9工程において、SPPSにより合成した：

10

20

30

40

【表 1 1】

試薬	mmol	当量	MW	量
H-Cys (4-メトキシトリチル)-2-クロ ロトリチル樹脂 (装填 0.56mmol/g)	0.1			0.167g
(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ- 2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
Fmoc-Asp (OtBu)-OH	0.2	2	411.5	0.082g
(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ- 2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
Fmoc-Asp (OtBu)-OH	0.2	2	411.5	0.082g
(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ- 2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
Fmoc-Asp (OtBu)-OH	0.2	2	411.5	0.082g
(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ- 2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
Fmoc-Glu-OtBu	0.2	2	425.5	0.085g
N <sup>10</sup> -TFA-プテロイン酸 (10ml の DMSO に溶解)	0.125	1.25	408	0.059g
DIPEA	0.4	4	129.25 (d=0.742)	0.070mL
PyBOP	0.2	2	520	0.104g

10

20

30

## 【0242】

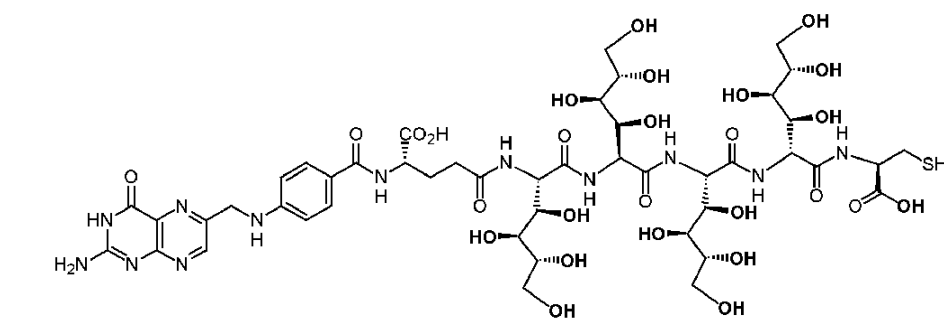
カップリング工程、切断工程、切断試薬及びHPLC精製工程は、上記に記載したものと同一である；収量約100mg、63%。C<sub>94</sub>H<sub>125</sub>N<sub>19</sub>O<sub>37</sub>S<sub>2</sub>；MW 2177.24；精密質量：2175.79。

## 【0243】

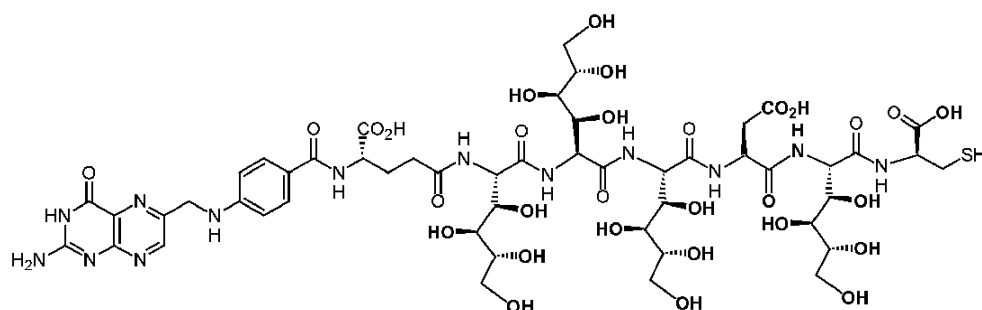
以下の例示的な実施例は、EC0268の手順に従って調製することができる：



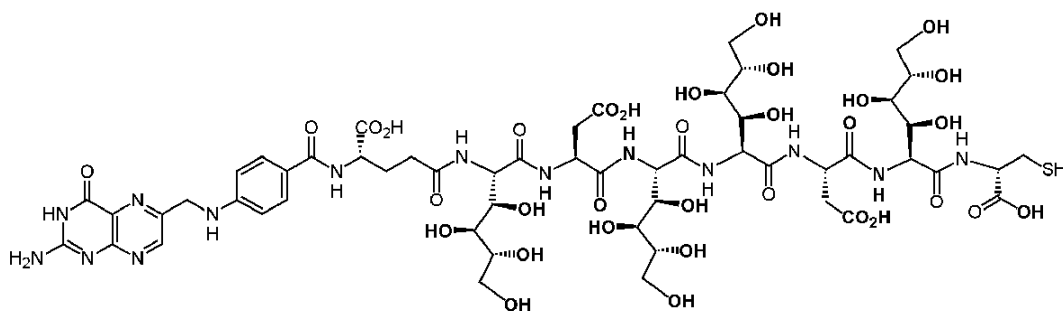
## 【化 5 0】



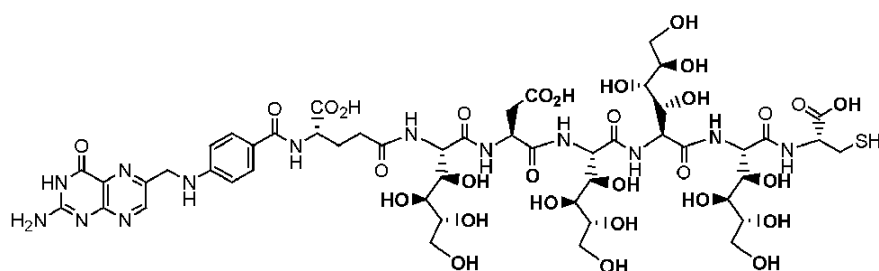
10



20



30



## 【 0 2 4 4 】

実施例。テトラ - サッカロ - A s p - 葉酸リンカー E C 0 4 6 3。E C 0 4 6 3を、H - C y s ( 4 - メトキシトリチル ) - 2 - クロロトリチル樹脂、及び下記の S P P S 試薬から出発して、本明細書に記載されている一般のペプチド合成手順に従って、7工程において、S P P S により合成した：

【表 1 2】

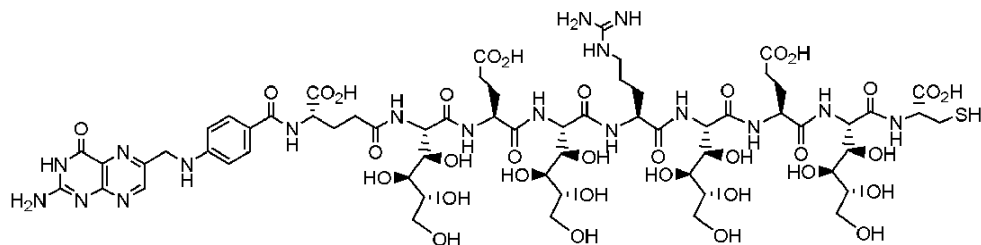
試薬	mmol	当量	MW	量
H-Cys (4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂 (装填 0.56mmol/g)	0.1			0.167g
(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
Fmoc-Asp (OtBu)-OH	0.2	2	411.5	0.082g
(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
Fmoc-Glu-OtBu	0.2	2	425.5	0.085g
N <sup>10</sup> TFA-プテロイン酸 (10ml のDMSOに溶解)	0.125	1.25	408	0.059g
DIPEA	0.4	4	129.25 (d=0.742)	0.070mL
PyBOP	0.2	2	520	0.104g

## 【0245】

カップリング工程、切断工程、切断試薬及びHPLC精製工程は、上記に記載したものと同一である；収量約63mg、46%。C<sub>50</sub>H<sub>73</sub>N<sub>13</sub>O<sub>30</sub>S；MW 1368.25；精密質量：1367.43。

## 【0246】

## 【化51】



## 【0247】

実施例。テトラ-サッカロ-ビス- -Glu-Arg-葉酸リンカーEC0480。EC0480を、H-Cys (4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂、及び下記のSPPS試薬から出発して、本明細書に記載されている一般的ペプチド合成手順に従って、9工程において、SPPSにより合成した：

10

20

30

40

【表 13】

試薬	mmol	当量	MW	量
H-Cys (4-メトキシトリチル)-2-クロ ロトリチル樹脂 (装填 0.56mmol/g)	0.2			0.333g
(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2 -Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.250	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu (OtBu)-OH	0.4	2	425.5	0.170g
(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2 -Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.250	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Arg (Pbf)-OH	0.4	2	648.78	0.260g
(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2 -Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.250	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu (OtBu)-OH	0.4	2	425.5	0.170g
(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2 -Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.250	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu-OtBu	0.4	2	425.5	0.170g
N <sup>10</sup> TFA-プテロイン酸 (10ml のDMSOに溶解)	0.250	1.25	408	0.119g
DIPEA	0.8	4	129.25 (d=0.742)	0.139mL
PyBOP	0.4	2	520	0.208g

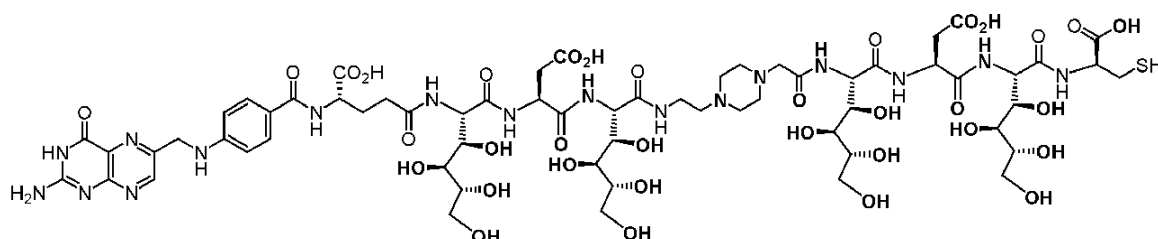
## 【0248】

カップリング工程、切断工程、切断試薬及びHPLC精製工程は、上記に記載したものと同一である；収量約100mg、33%。 $C_{62}H_{94}N_{18}O_{20}S$ ；MW 1667.58；精密質量：1666.59。

## 【0249】

実施例。テトラ-サッカロ-ビス-Asp-葉酸リンカーEC0452：

## 【化52】



## 【0250】

実施例。テトラ-サッカロ-ビス-Asp-葉酸リンカーEC0452。EC0452を、H-Cys (4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂、及び下記のSPPS試薬から出発して、本明細書に記載されている一般的ペプチド合成手順に従って、9工程において、SPPSにより合成した：

【表 1 4】

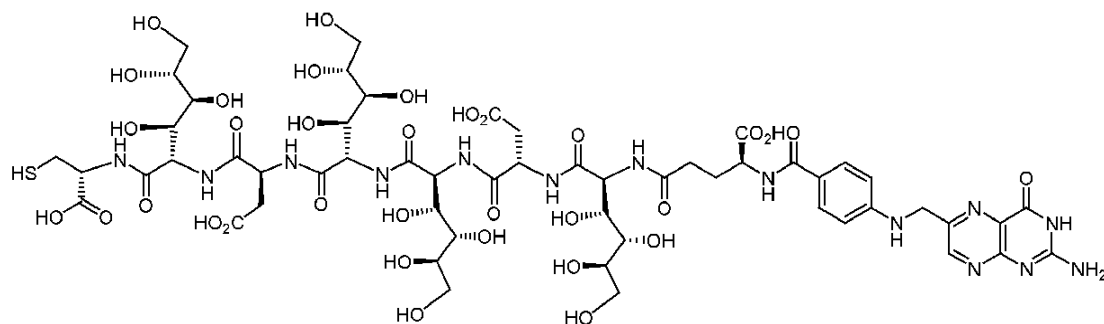
試薬	mmol	当量	MW	量
H-Cys (4-メトキシトリチル)-2-クロ ロトリチル樹脂 (装填 0.6mmol/g)	0.15			0.250g
(3, 4), (5, 6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2 -Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.188	1.25	497.54	0.094g
Fmoc-Asp (OtBu)-OH	0.3	2	411.5	0.123g
(3, 4), (5, 6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2 -Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.188	1.25	497.54	0.094g
Fmoc-4-(2-アミノエチル)-1-カルボ キシメチルピペラジンジヒドロクロリド	0.3	2	482.42	0.145g
(3, 4), (5, 6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2 -Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.188	1.25	497.54	0.094g
Fmoc-Asp (OtBu)-OH	0.3	2	411.5	0.123g
(3, 4), (5, 6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2 -Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.188	1.25	497.54	0.094g
Fmoc-Glu-OtBu	0.3	2	425.5	0.128g
N <sup>10</sup> -TFA-プテロイン酸 (10ml の DMSO に溶解)	0.188	1.25	408	0.077g
DIPEA	0.6	4	129.25 (d=0.742)	0.105mL
PyBOP	0.3	2	520	0.156g

## 【0251】

カップリング工程、切断工程及び切断試薬は、上記に記載したものと同一である。HPLC 精製工程。カラム：Waters NovaPak C<sub>18</sub> 300 × 19mm；緩衝液 A = 10mM 酢酸アンモニウム、pH 5；B = ACN；方法：1% B から 20% B を 25ml/分で 40 分間；収量約 98mg、40%。C<sub>62</sub>H<sub>93</sub>N<sub>17</sub>O<sub>34</sub>S；MW 1652.56；精密質量：1651.58。

## 【0252】

## 【化 53】



## 【0253】

実施例。テトラ-サッカロ-ビス-Asp-葉酸リンカー EC0457。EC0457

10

20

30

40

50

を、H-Cys(4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂及び下記のSPPS試薬から出発して、本明細書に記載されている一般的ペプチド合成手順に従って、8工程において、SPPSにより合成した：

【表15】

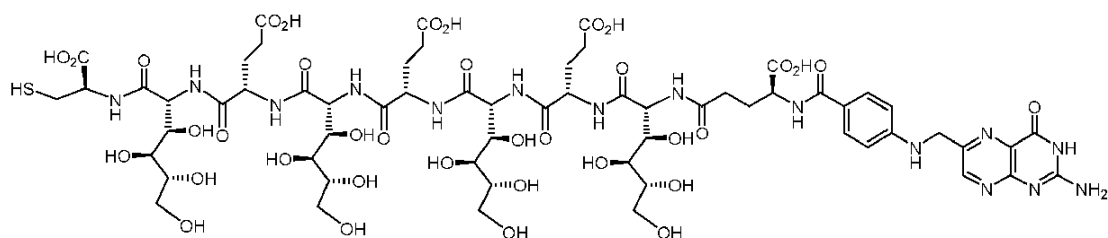
試薬	mmol	当量	MW	量
H-Cys(4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂 (装填 0.6mmol/g)	0.20			0.333g
(3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.30	1.5	411.5	0.123g
(3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
(3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.30	1.5	411.5	0.123g
(3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu-OtBu	0.30	1.5	425.5	0.128g
N <sup>10</sup> TFA-プテロイン酸 (10mlのDMSOに溶解)	0.25	1.25	408	0.102g
DIPEA		2当量の アミノ酸	129.25 (d=0.742)	87μL 又は 105μL
PyBOP		2当量の アミノ酸	520	260mg 又は 312mg

## 【0254】

カップリング工程、切断工程及び切断試薬は、上記に記載したものと同一である。HPLC精製工程。カラム：Waters NovaPak C<sub>18</sub> 300×19mm；緩衝液A=10mM酢酸アンモニウム、pH5；B=ACN；方法：0%Bから20%Bを25ml/分で40分間；収量約210mg、71%。C<sub>54</sub>H<sub>78</sub>N<sub>14</sub>O<sub>33</sub>S；MW 1483.34；精密質量：1482.46。

## 【0255】

## 【化54】



## 【0256】

実施例。テトラ-サッカロ-トリス-Glu-葉酸リンカーEC0477。EC047

10

20

30

40

50

7を、H-Cys(4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂、及び下記のSPPS試薬から出発して、本明細書に記載されている一般的ペプチド合成手順に従って、9工程において、SPPSにより合成した：

【表16】

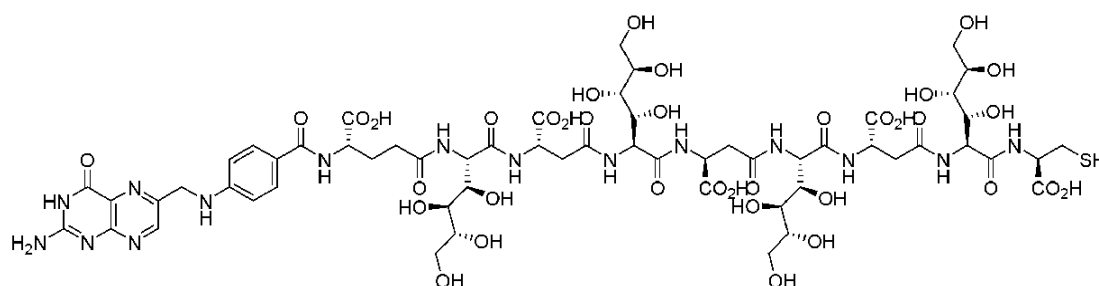
試薬	mmol	当量	MW	量
H-Cys(4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂 (装填0.6mmol/g)	0.20			0.333g
(3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.30	1.5	425.5	0.128g
(3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.30	1.5	425.5	0.128g
(3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.30	1.5	425.5	0.128g
(3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu-OtBu	0.30	1.5	425.5	0.128g
N <sup>1</sup> OTFA-プテロイン酸 (10mlのDMSOに溶解)	0.25	1.25	408	0.102g
DIPEA		2当量の アミノ酸	129.25 (d=0.742)	87μL 又は 105μL
PyBOP		1当量の アミノ酸	520	130mg 又は 156mg

## 【0257】

カップリング工程、切断工程及び切断試薬は、上記に記載したものと同一である。HPLC精製工程。カラム：Waters NovaPak C<sub>18</sub> 300×19mm；緩衝液A=10mM酢酸アンモニウム、pH5；B=ACN；方法：0%Bから20%Bを25ml/分で40分間；収量約220mg、67%。C<sub>61</sub>H<sub>89</sub>N<sub>15</sub>O<sub>36</sub>S；MW 1640.50；精密質量：1639.53。

## 【0258】

## 【化55】



## 【0259】

実施例。E C 0 4 5 3 を、H - C y s ( 4 - メトキシトリチル ) - 2 - クロロトリチル樹脂、及び下記の S P P S 試薬から出発して、本明細書に記載されている一般的ペプチド合成手順に従って、S P P S により合成した：

【表 1 7】

試薬	mmol	当量	MW	量
H - C y s ( 4 - メトキシトリチル ) - 2 - クロロトリチル樹脂 (装填 0.56mmol/g)	0.162			0.290 g
(3, 4), (5, 6) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - F m o c - アミノ - D - マンノン酸	0.203	1.25	497.54	0.101 g
F m o c - A s p ( O t B u ) - O H	0.324	2	411.5	0.133 g
(3, 4), (5, 6) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - F m o c - アミノ - D - マンノン酸	0.203	1.25	497.54	0.101 g
F m o c - A s p ( O t B u ) - O H	0.324	2	411.5	0.133 g
(3, 4), (5, 6) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - F m o c - アミノ - D - マンノン酸	0.203	1.25	497.54	0.101 g
F m o c - A s p ( O t B u ) - O H	0.324	2	411.5	0.133 g
(3, 4), (5, 6) - ビスアセトニド - 2 - デオキシ - 2 - F m o c - アミノ - D - マンノン酸	0.203	1.25	497.54	0.101 g
F m o c - G l u - O t B u	0.324	2	425.5	0.138 g
N <sup>10</sup> T F A - プテロイン酸 (10ml の DMSO に溶解)	0.203	1.25	408	0.083 g
D I P E A		2 当量の A A		71 μL 又は 85 μL
P y B O P		1 当量の A A		211mg 又は 253mg

## 【 0 2 6 0】

カップリング工程。ペプチド合成容器の中に、樹脂を加え、アミノ酸溶液、D I P E A 及び P y B O P を加える。アルゴンを 1 時間泡立て、D M F 及び I P A で 3 回洗浄する。それぞれのアミノ酸をカップリングする前、F m o c の脱保護に、D M F 中 2 0 % ピペリジンを 3 回 ( 1 0 分間 ) 使用する。9 つのカップリング工程の全てが完了するまで続ける。終了時に、樹脂を D M F 中 2 % ヒドラジンで 3 回 ( 5 分間 ) 洗浄して、プテロイン酸の T F A 保護基を切断し、樹脂を D M F ( 3 回 )、I P A ( 3 回 )、M e O H ( 3 回 ) で洗浄し、樹脂をアルゴンで 3 0 分間泡立てる。

## 【 0 2 6 1】

切断工程。切断試薬：9 2 . 5 % T F A、2 . 5 % H<sub>2</sub> O、2 , 5 % トリイソプロピルシラン、2 . 5 % エタンジチオール。樹脂を、アルゴンで泡立てながら、切断試薬で 3 回 ( 1 5 分間、5 分間、5 分間 ) 処理し、排水し、収集し、溶液をまとめる。5 ml 残留するまで Rotavap に付し、ジエチルエーテル ( 3 5 mL ) に沈殿させる。遠心分離し、ジエチルエーテルで洗浄し、乾燥する。粗固体を H P L C で精製した。

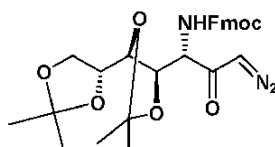
## 【 0 2 6 2】

H P L C 精製工程。カラム：Waters Xterra Prep MS C<sub>18</sub> 1 0 μm 1 9 × 2 5 0 mm、

溶媒 A : 10 mM 酢酸アンモニウム、pH 5 ; 溶媒 B : ACN ; 方法 : 25 mL/分により 0 % B で 5 分間から 20 % B で 40 分間 ; 生成物を含む画分を収集し、凍結乾燥して、約 60 mg の EC0453 を得た (収率 23 % )。<sup>1</sup>H NMR 及び LC/MS は、生成物と一致した。C<sub>58</sub>H<sub>83</sub>N<sub>15</sub>O<sub>36</sub>S ; MW 1598.43 ; 精密質量 : 1597.48。C 43.58 ; H 5.23 ; N 13.14 ; O 36.03 ; S 2.01。

【0263】

【化56】



10

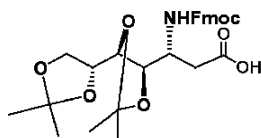
【0264】

実施例。(3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸-ジアゾ-ケトン。乾燥した 100 mL の丸底フラスコの中で、(3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸 (1.0 g、2.01 mmol) を、アルゴン雰囲気下、THF (10 mL) に溶解した (完全に溶解せず)。反応混合物を -25 °C に冷却した。この溶液に、NMM (0.23 mL、2.11 mmol) 及びクロロギ酸エチル (228.98 mg、2.11 mmol) を加えた。この溶液を -20 °C で 30 分間撹拌した。得られた白色の懸濁液を 0 °C に温め、エーテル中のジアゾメタンの溶液を、黄色になるまで加えた。撹拌を、混合物が室温に温まるまで続けた。2 時間撹拌し、過剰ジアゾメタンを、激しく撹拌しながら数滴の酢酸を添加することにより破壊した。混合物をエーテルで希釈し、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液、飽和 NH<sub>4</sub>Cl 水溶液、ブラインで洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥し、濃縮乾固した。次にこの粗物質を SiO<sub>2</sub> カラムに装填し、クロマトグラフィー (石油エーテル中 30 % EtOAc) に付して、純粋な (3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸-ジアゾ-ケトン (0.6 g、57 %) を得た。<sup>1</sup>H NMR データは、生成物と一致した。C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> ; MW 521.56 ; 精密質量 : 521.22。

20

【0265】

【化57】



30

【0266】

実施例。(3R,4R,5S,6R)-(4,5),(6,7)-ビスアセトニド-3-Fmoc-アミノ-ヘプタン酸。乾燥した 25 mL の丸底フラスコの中で、(3,4),(5,6)-ビスアセトニド-2-デオキシ-2-Fmoc-アミノ-D-マンノン酸-ジアゾ-ケトン (0.15 g、0.29 mmol) を、アルゴン雰囲気下、THF (1.6 mL) に溶解した。この溶液に、水 (0.4 mL) 中のトリフルオロ酢酸銀 (6.6 mg、0.03 mmol) を、暗黒中で加えた。得られた混合物を室温で 16 時間撹拌した。TLC (塩化メチレン中 10 % MeOH) は、全ての出発物質が消費され、生成物が形成されたことを示した。溶媒 (THF) を減圧下で除去し、残渣を水で希釈し (pH は 3.5 ~ 4.0 であった)、EtOAc で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥し、濃縮乾固した。次にこの粗物質を SiO<sub>2</sub> カラムに装填し、クロマトグラフィー (塩化メチレン中 1 % MeOH から塩化メチレン中 5 % MeOH の勾配溶離) に付して、純粋な (3R,4R,5S,6R)-(4,5),(6,7)-ビスアセトニド-3-Fmoc-アミノ-ヘプタン酸 (0.10 g、68 %) を得た。<sup>1</sup>H NMR データは、生成物と一致した。C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>8</sub> ; MW 511.56 ; 精密質量 : 511.22。

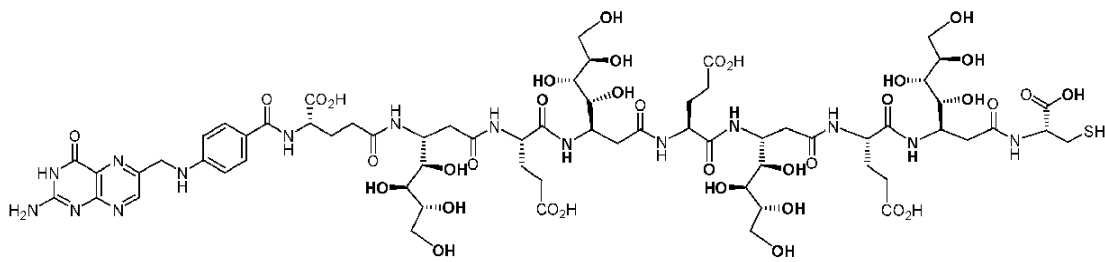
40

50



【 0 2 6 7 】

【 化 5 8 】



10

【 0 2 6 8 】

実施例。テトラ - ホモサッカロ - トリス - G l u - 葉酸スパーサー E C 0 4 7 8。E C 0 4 7 8 を、H - C y s ( 4 - メトキシトリチル ) - 2 - クロロトリチル樹脂、及び下記の S P P S 試薬から出発して、本明細書に記載されている一般的ペプチド合成手順に従って、9 工程において、S P P S により合成した：

【 表 1 8 】

試薬	mmol	当量	MW	量
H - C y s ( 4 - メトキシトリチル ) - 2 - クロロトリチル樹脂 ( 装填 0.56mmol/g )	0.1			0.167g
ホモ糖	0.12	1.2	511.56	0.061g
F m o c - G l u ( O t B u ) - O H	0.2	2	425.5	0.085g
ホモ糖	0.12	1.2	511.56	0.061g
F m o c - G l u ( O t B u ) - O H	0.2	2	425.5	0.085g
ホモ糖	0.12	1.2	511.56	0.061g
F m o c - G l u ( O t B u ) - O H	0.2	2	425.5	0.085g
ホモ糖	0.12	1.2	511.56	0.061g
F m o c - G l u - O t B u	0.2	2	425.5	0.085g
N <sup>10</sup> T F A - プテロイン酸・T F A ( 10ml の D M S O に溶解 )	0.12	1.2	408	0.049g
D I P E A	0.4	4	129.25 (d=0.742)	0.070mL
P y B O P	0.2	2	520	0.104g

20

30

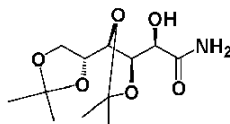
40

【 0 2 6 9 】

カップリング工程、切断工程及び切断試薬は、上記に記載したものと同一である。H P L C 精製工程。カラム：Waters NovaPak C<sub>18</sub> 300 × 1.9 mm；緩衝液 A = 10 mM 酢酸アンモニウム、pH 5；B = A C N；方法：2.6 ml/分で、100% A を 5 分間、次に 0% B から 20% B を 20 分間；収量約 8.8 mg、52%。C<sub>65</sub> H<sub>97</sub> N<sub>15</sub> O<sub>36</sub> S；MW 1696.61；精密質量：1695.59。

【 0 2 7 0 】

## 【化59】



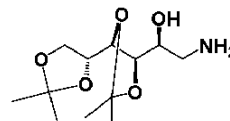
## 【0271】

実施例。(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-D-グルコン酸アミド。20gのメチルエスエルを100mLのメタノールに溶解し、高圧反応容器においてドライアイス/アセトンにより冷却し、100mLの液体アンモニアを投入し、室温まで温め、160 / 850 PSIで2時間加熱した。反応容器を室温に冷却し、圧力を放出した。溶媒の蒸発によって褐色を帯びたシロップを得て、最少量のイソプロピルアルコールを加えて、還流しながら均質の溶液にした。溶液を-20 に冷却し、得られた固体を濾過して、8.3gの固体を得た。母液を蒸発させ、得られた残渣に、エーテルを加え、均質溶液を得るまで環流した。次に溶液を-20 に冷却し、得られた固体を濾過して、4.0gの生成物を得た。固体をまとめて、イソプロピルアルコールで再結晶させて、11.2g (59%)の白色のアミド生成物を得た。 $C_{12}H_{21}NO_6$ ; MW 275.30; 精密質量: 275.14。

10

## 【0272】

## 【化60】



20

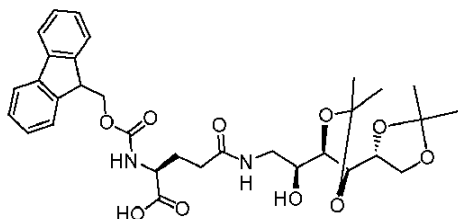
## 【0273】

実施例。(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-1-デオキシ-1-アミノ-D-グリシトール。乾燥した100mLの丸底フラスコの中で、アルゴン下、 $LiAlH_4$  (450mg, 11.86mmol)をTHF (10mL)に溶解し、0 に冷却した。この懸濁液に、THF (30mL)中の(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-D-グルコン酸アミド (1.09g, 3.96mmol)を、15分間かけて非常にゆっくりと加えた。この混合物を5時間還流した。TLC (塩化メチレン中10% MeOH)は、全ての出発物質が消費され、生成物が形成されたことを示した。反応混合物を室温に冷却し、次に氷浴温度に冷却し、ジエチルエーテル (40mL)で希釈し、0.5mLの水、0.5mLの15% NaOH水溶液をゆっくりと加え、次に1.5mLの水を加えた。反応混合物を室温に温め、30分間攪拌した。 $MgSO_4$ を加え、更に15分間攪拌し、濾過した。有機層を濃縮乾固して、(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-1-デオキシ-1-アミノ-D-グリシトールを得た。 $^1H$  NMRデータは、生成物と一致した。 $C_{12}H_{23}NO_5$ ; MW 261.31; 精密質量: 261.16。

30

## 【0274】

## 【化61】



40

## 【0275】

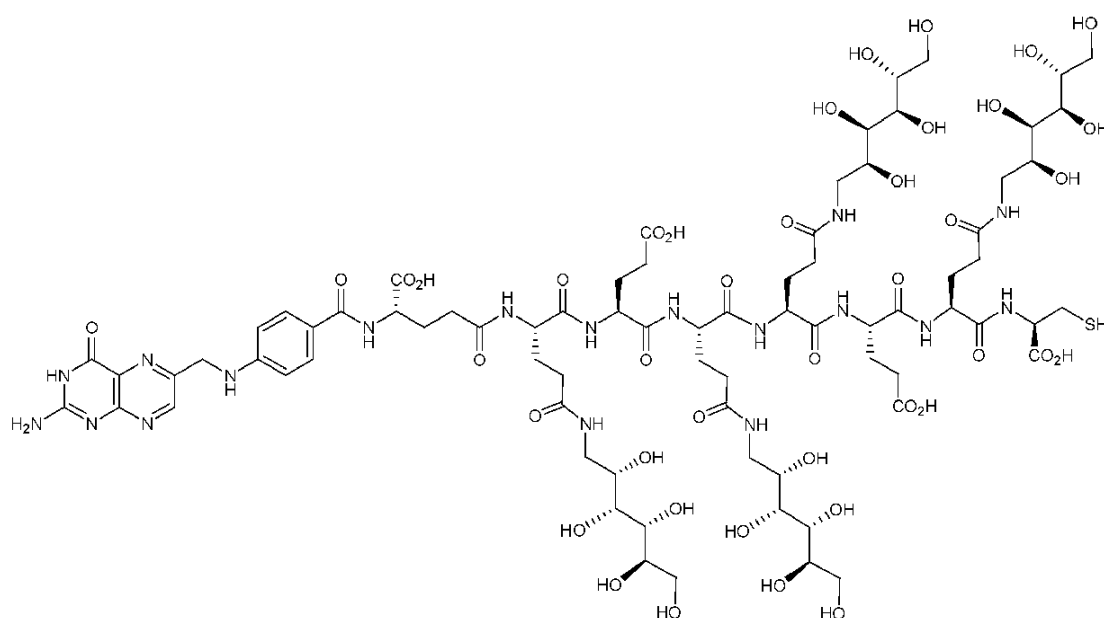
実施例。EC0475。O-アシル保護Fmoc-Glu (2.17g, 1当量)、PyBOP (2.88g, 1当量)及びDIPEA (1.83mL, 2当量)を、無水DMF (6mL)中の(3,4), (5,6)-ビスアセトニド-1-デオキシ-1-アミノ-D-グリシトール (1.4g, 5.3mmol)の溶液に加え、混合物をアルゴン下、室温で2

50

時間撹拌した。溶液をEtOAc (50 mL) で希釈し、ブライン (10 mL × 3) で洗浄し、有機層を分離し、乾燥し (MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、濃縮して、残渣を得て、それをフラッシュカラム (シリカゲル、60% EtOAc / 石油エーテル) により精製して、1.72 g (50%) のアリル保護EC0475を固体として得た。Pd (Ph<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (300 mg、0.1 当量) を、NMM / AcOH / CHCl<sub>3</sub> (2 mL / 4 mL / 74 mL) 中のアリル保護EC0475 (1.72 g、2.81 mmol) の溶液に加えた。得られた黄色の溶液を、アルゴン下、室温で1時間撹拌し、それに第2のPd (Ph<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (300 mg、0.1 当量) を加えた。更に1時間撹拌した後、混合物を1N HCl (50 mL × 3) 及びブライン (50 mL) で洗浄し、有機層を分離し、乾燥し (MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、濃縮して、黄色の泡状固体を得て、それをクロマトグラフィー (シリカゲル、1% MeOH / CHCl<sub>3</sub>、続いて3.5% MeOH / CHCl<sub>3</sub>) に付して、1.3 g (81%) のEC0475を固体物質として得た。MW 612.67; 精密質量: 612.27。

【0276】

【化62】



【0277】

実施例。テトラ - サッカログルタメート - ビス - Glu - 葉酸スペーサーEC0491。EC0491を、H-Cys (4 - メトキシトリチル) - 2 - クロロトリチル樹脂、及び下記のSPPS試薬から出発して、本明細書に記載されている一般的ペプチド合成手順に従って、8工程において、SPPSにより合成した：

【表 19】

試薬	Mmol	当量	MW	量
H-Cys (4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂 (装填 0.56mmol/g)	0.1			0.167g
EC0475	0.13	1.3	612.67	0.080g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.2	2	425.5	0.085g
EC0475	0.13	1.3	612.67	0.080g
EC0475	0.13	1.3	612.67	0.080g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.2	2	425.5	0.085g
EC0475	0.13	1.3	612.67	0.080g
Fmoc-Glu-OtBu	0.2	2	425.5	0.085g
N <sup>10</sup> TFA-プテロイン酸・TFA (10ml のDMSOに溶解)	0.2	2	408	0.105g
DIPEA	0.4	4	129.25 (d=0.742)	0.070mL
PyBOP	0.2	2	520	0.104g

10

20

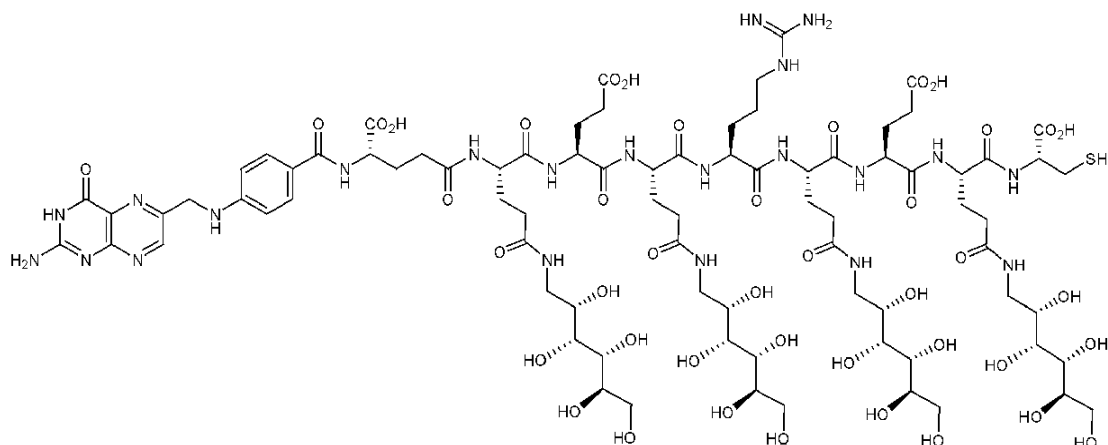
## 【0278】

カップリング工程、切断工程及び切断試薬は、上記に記載したものと同一である。HPLC精製工程。カラム：Waters NovaPak C<sub>18</sub> 300 × 19mm；緩衝液 A = 10mM酢酸アンモニウム、pH 5；B = ACN；方法：26ml/分で、100% Aを5分間、次に0% Bから20% Bを20分間；収量約100mg、51%。C<sub>76</sub>H<sub>118</sub>N<sub>18</sub>O<sub>41</sub>S；MW 1971.91；精密質量：1970.74。

30

## 【0279】

## 【化63】



40

## 【0280】

実施例。EC0479を、H-Cys (4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂、及び下記のSPPS試薬から出発して、本明細書に記載されている一般的ペプチド合成手順に従って、SPPSにより合成した：

【表 20】

試薬	mmol	当量	MW	量
H-Cys (4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂 (装填 0.6mmol/g)	0.094			0.16 g
EC0475	0.13	1.4	612.67	0.082 g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.19	2.0	425.47	0.080 g
EC0475	0.13	1.4	612.67	0.082 g
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0.19	2.0	648.77	0.12 g
EC0475	0.13	1.4	612.67	0.082 g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.19	2.0	425.47	0.080 g
EC0475	0.13	1.4	612.67	0.082 g
Fmoc-Glu-OtBu	0.19	2.0	425.47	0.080 g
N <sup>10</sup> TFA-プテロイン酸 (10mlのDMSOに溶解)	0.16	1.7	408.29	0.066 g
DIPEA		2.0 当量 のAA		41 $\mu$ L 又は 49 $\mu$ L
PyBOP		1.0 当量 のAA		122mg 又は 147mg

10

20

## 【0281】

カップリング工程。ペプチド合成容器の中に、樹脂を加え、アミノ酸溶液、DIPEA及びPyBOPを加える。アルゴンを1時間泡立て、DMF及びIPAで3回洗浄する。それぞれのアミノ酸をカップリングする前、Fmocの脱保護に、DMF中20%ピペリジン

30

ジンを3回(10分間)使用する。9つのカップリング工程の全てが完了するまで続ける。終了時に、樹脂をDMF中2%ヒドラジンで3回(5分間)洗浄して、プテロイン酸のTFA保護基を切断し、樹脂をDMF(3回)、IPA(3回)、MeOH(3回)で洗浄し、樹脂をアルゴンで30分間泡立てる。

## 【0282】

切断工程。試薬：92.5%TFA、2.5%H<sub>2</sub>O、2.5%トリイソプロピルシラン、2.5%エタンジチオール。樹脂を、アルゴンで泡立てながら、切断試薬で15分間処理し、排水し、樹脂を切断試薬で1回洗浄し、溶液をまとめる。5ml残留するまでRotavapに付し、ジエチルエーテル(35mL)に沈殿させる。遠心分離し、ジエチルエーテルで洗浄し、乾燥する。粗固体をHPLCで精製した。

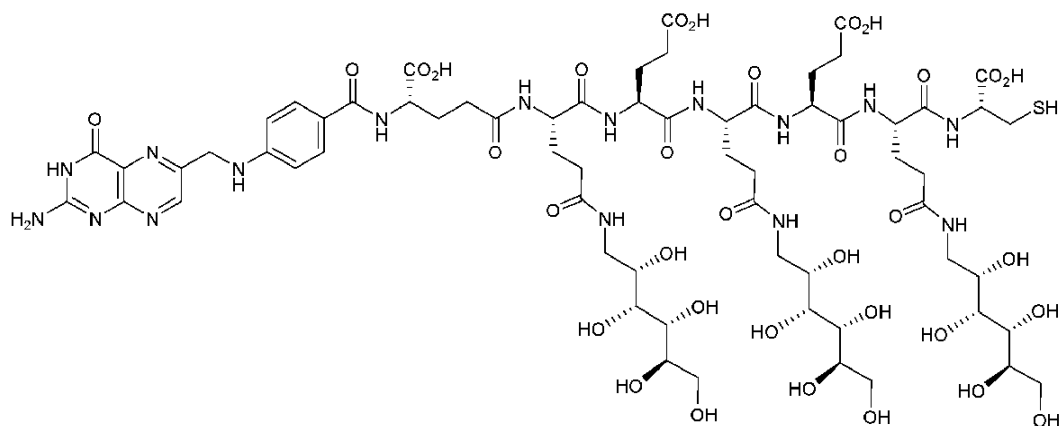
40

## 【0283】

HPLC精製工程。カラム：Waters Atlantis Prep T3 10 $\mu$ m OBD 19 $\times$ 250mm；溶媒A：10mM酢酸アンモニウム、pH5；溶媒B：ACN；方法：26mL/分で0%Bを5分間から20%Bを20分間。生成物を含有する画分を収集し、凍結乾燥して、約70mgのEC0479(収率35%)を得た。<sup>1</sup>H NMR及びLC/MSは、生成物と一致した。MW 2128.10；精密質量：2126.84。

## 【0284】

## 【化 6 4】



10

## 【 0 2 8 5】

EC0488. この化合物を、H-Cys(4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂、及び下記のSPPS試薬から出発して、本明細書に記載されている一般的ペプチド合成手順に従って、SPPSにより調製した：

## 【表 2 1】

試薬	mmol	当量	MW	量
H-Cys(4-メトキシトリチル)-2-クロロトリチル樹脂 (装填 0.6mmol/g)	0.10			0.17 g
EC0475	0.13	1.3	612.67	0.082 g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.19	1.9	425.47	0.080 g
EC0475	0.13	1.3	612.67	0.082 g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.19	1.9	425.47	0.080 g
EC0475	0.13	1.3	612.67	0.082 g
Fmoc-Glu-OtBu	0.19	1.9	425.47	0.080 g
N <sup>10</sup> TFA-プテロイン酸 (10ml のDMSOに溶解)	0.16	1.6	408.29	0.066 g
DIPEA		2.0 当量 のAA		
PyBOP		1.0 当量 のAA		

20

30

## 【 0 2 8 6】

カップリング工程。ペプチド合成容器の中に、樹脂を加え、アミノ酸溶液、DIPEA及びPyBOPを加える。アルゴンを1時間泡立て、DMF及びIPAで3回洗浄する。それぞれのアミノ酸をカップリングする前、Fmocの脱保護に、DMF中20%ピペリジンを3回(10分間)使用する。9つのカップリング工程の全てが完了するまで続ける。終了時に、樹脂をDMF中2%ヒドラジンで3回(5分間)洗浄して、プテロイン酸のTFA保護基を切断し、樹脂をDMF(3回)、IPA(3回)、MeOH(3回)で洗浄し、樹脂をアルゴンで30分間泡立てる。

40

## 【 0 2 8 7】

切断工程。試薬：92.5%TFA、2.5%H<sub>2</sub>O、2.5%トリイソプロピルシラン、2.5%エタンジチオール。樹脂を、アルゴンで泡立てながら、切断試薬で3回(10分間、5分間、5分間)処理し、排水し、樹脂を切断試薬で1回洗浄し、溶液をまとめ

50

る。5 ml 残留するまで Rotavap に付し、ジエチルエーテル (35 mL) に沈殿させる。遠心分離し、ジエチルエーテルで洗浄し、乾燥する。約半分の粗固体 (約 100 mg) を HPLC により精製した。

【0288】

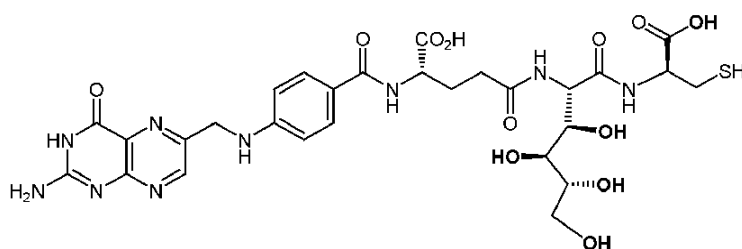
HPLC 精製工程。カラム: Waters Xterra Prep MS C18 10  $\mu$ m OBD 19  $\times$  250 mm; 溶媒 A: 10 mM 酢酸アンモニウム、pH 5; 溶媒 B: ACN; 方法: 26 mL/分で 0% B を 5 分間から 20% B を 25 分間。生成物を含む画分を収集し、凍結乾燥して、43 mg の EC0488 (収率 51%) を得た。 $^1\text{H}$  NMR 及び LC/MS (精密質量 1678.62) は、生成物と一致した。MW 1679.63; 精密質量: 1678.62。

10

【0289】

以下の結合リガンドリンカー中間体の実施例、EC0233、EC0244、EC0257 及び EC0261 を、本明細書に記載されたとおりに調製した。

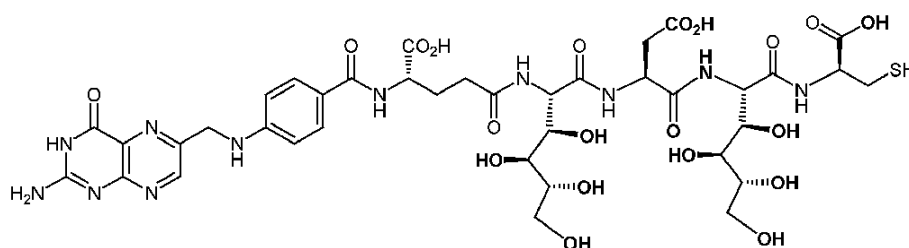
【化65】



20

EC0233:  $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}_{12}\text{S}$ ; MW 721.70; 精密質量: 721.21。

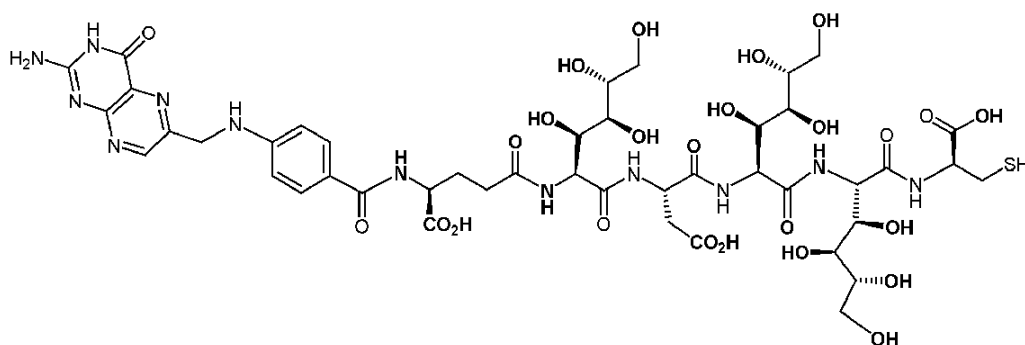
【化66】



30

EC0244:  $\text{C}_{38}\text{H}_{51}\text{N}_{11}\text{O}_{20}\text{S}$ ; MW 1013.94; 精密質量: 1013.30。

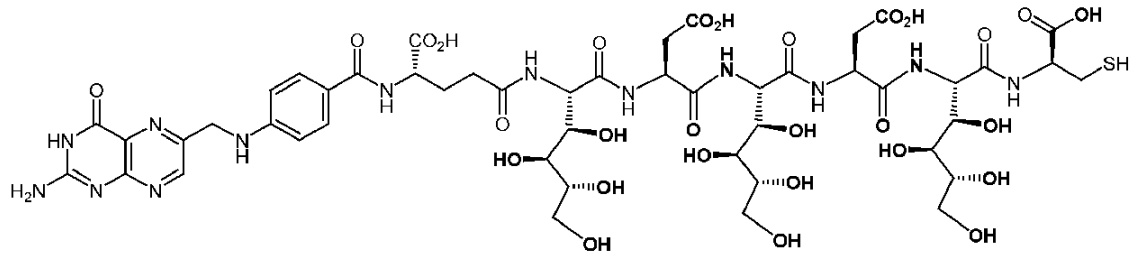
【化67】



40

EC0257:  $\text{C}_{44}\text{H}_{62}\text{N}_{12}\text{O}_{25}\text{S}$ ; MW 1191.09; 精密質量: 1190.37。

## 【化 6 8】



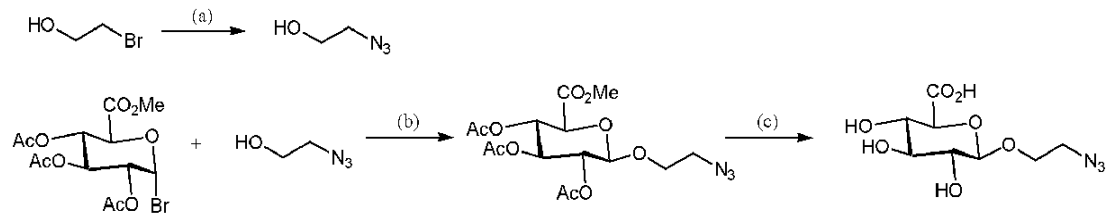
EC 0261 :  $C_{48}H_{67}N_{13}O_{28}S$  ; MW 1306.18 ; 精密質量 : 1305.39。

10

## 【 0 2 9 0】

以下の例示的な中間体の実施例を、本明細書に記載されたとおりに調製した。

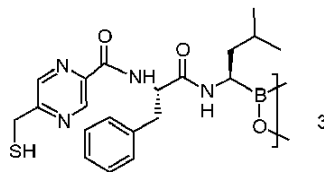
## 【化 6 9】



1, 2, 3 - トリアゾールを形成するHuisgenアジド ; ( a )  $NaN_3$  ; ( b )  $Ag_2CO_3$ 、DCM、モレキュラーシーブ ; ( c )  $LiOH$ 、 $MeOH$ 、 $H_2O$ 。

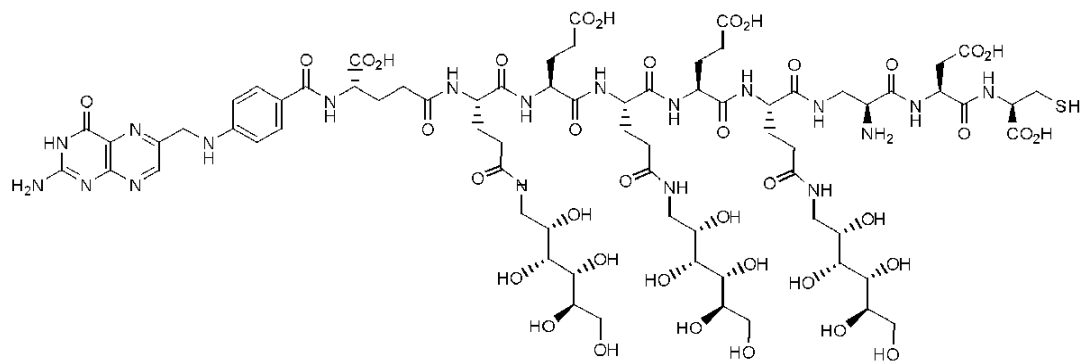
20

## 【化 7 0】



EC 0501 チオボルテゾミブ

## 【化 7 1】



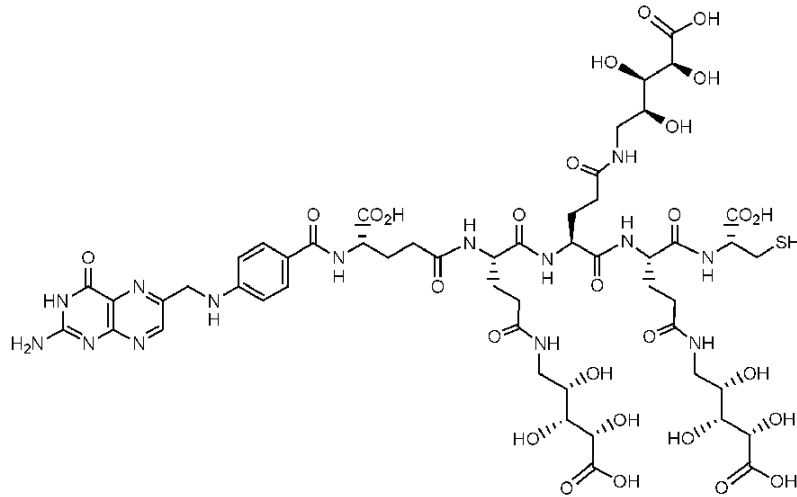
EC 0536 結合体中間体

30

40



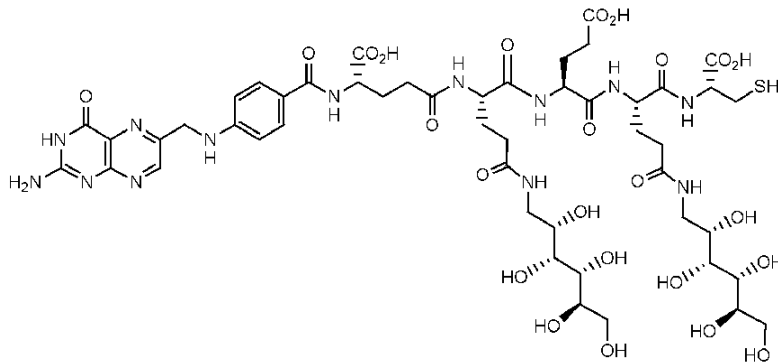
## 【化 7 2】



10

EC0632 結合体中間体。C<sub>52</sub>H<sub>72</sub>N<sub>14</sub>O<sub>28</sub>S、MW 1373.27、精密質量：1372.44、対応するtert-ブチル保護カルボキシレートから調製。

## 【化 7 3】



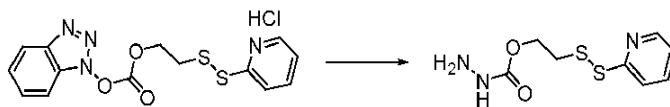
20

EC0669 結合体中間体。C<sub>49</sub>H<sub>71</sub>N<sub>13</sub>O<sub>24</sub>S、MW 1258.23、精密質量：1257.45。

## 【0291】

30

## 【化 7 4】



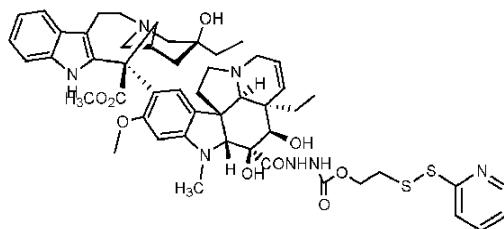
## 【0292】

実施例。カップリング試薬EC0311の合成。DIPEA(0.60mL)を、無水DCM(5.0mL)中のHOBT-OCO<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SS-2-ピリジンHCl(685mg、91%)の懸濁液に0 で加え、アルゴン下で2時間攪拌し、それに無水ヒドラジン(0.10mL)を加えた。反応混合物をアルゴン下、0 で10分間、室温で更に30分間攪拌し、濾過し、濾液をフラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、DCM中2%MeOH)により精製して、EC0311を明澄な濃油状物(371mg)として得て、放置して凝固させた。

40

## 【0293】

## 【化 7 5】

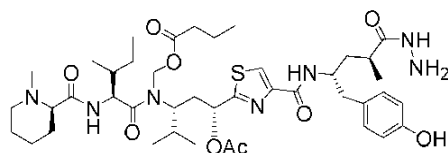


## 【 0 2 9 4 】

実施例。ピンブラスチンピリジニルジスルフィド。2 - [ ( ベンゾトリアゾール - 1 -  
 イル - ( オキシカルボニルオキシ ) - エチルジスルファニル ] - ピリジン H C 1 ( 6 0 1  
 mg ) 及び 3 7 8  $\mu$  L の D I P E A を、 5 ml の D C M 中のデスアセチルピンブラスチンヒド  
 ラジド ( 6 6 8 mg ) の溶液に、連続して加えた。反応を室温に温め、 3 時間攪拌した。T  
 L C ( D C M 中 1 5 % M e O H ) は、完全な変換を示した。混合物をシリカゲルクロマト  
 グラフィー ( 1 : 9 M e O H / D C M ) により精製した。まとめた画分を蒸発させ、D  
 C M に再溶解し、 1 0 % N a 2 C O 3 、ブラインで洗浄し、乾燥し ( M g S O 4 ) 、蒸発  
 させて、 5 5 0 mg ( 8 0 % ) にした ; H P L C - R T 1 2 . 6 5 1 分、純度 9 1 % 、 1  
 H H M R スペクトルは指定された構造と一致、M S ( E S I + ) : 9 8 4 . 3 、 9 8 3  
 . 3 、 9 8 2 . 4 、 4 9 2 . 4 、 4 9 1 . 9 、 1 4 1 . 8 。この手順の追加的な詳細は、  
 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 0 2 9 4 2 A 1 号に記載されている。

## 【 0 2 9 5 】

## 【化 7 6】

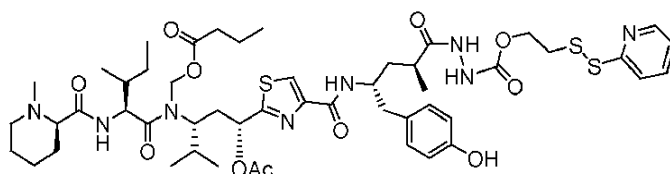


## 【 0 2 9 6 】

実施例。チューブリシンヒドラジドの調製。E C 0 3 4 7 の調製により説明する。N ,  
 N - ジイソプロピルエチルアミン ( D I P E A 、 6 . 1  $\mu$  L ) 及びクロロギ酸イソブチル  
 ( 3 . 0  $\mu$  L ) を、シリンジを介して、同時に、無水 E t O A c ( 2 . 0 mL ) 中のチュー  
 ブリシン B ( 0 . 1 5 mg ) の溶液に、 - 1 5 で加えた。アルゴン下、 - 1 5 で 4 5 分間  
 攪拌した後、反応混合物を - 2 0 に冷却し、それに無水ヒドラジン ( 5 . 0  $\mu$  L ) を加  
 えた。反応混合物をアルゴン下、 - 2 0 で 3 時間攪拌し、 1 . 0 mM リン酸ナトリウム緩  
 衝液 ( p H 7 . 0 、 1 . 0 mL ) で停止させ、精製のために分取 H P L C に注入した。カラ  
 ム : Waters XTerra Prep MS C18 1 0  $\mu$  m 、 1 9  $\times$  2 5 0 mm ; 移動相 A : 1 . 0 mM リン酸  
 ナトリウム緩衝液、 p H 7 . 0 ; 移動相 B : アセトニトリル ; 方法 : 2 0 分間かけて 1 0  
 % B から 8 0 % B 、流速 = 2 5 mL / 分。 1 5 . 1 4 ~ 1 5 . 5 4 分の画分を収集し、凍結  
 乾燥して、E C 0 3 4 7 を白色の固体 ( 2 . 7 mg ) として生成した。以上の方法は、チュー  
 ブリシン出発化合物の適切な選択によって、他のチューブリシンヒドラジドを調製する  
 ためにも同様に適用可能である。

## 【 0 2 9 7 】

## 【化 7 7】



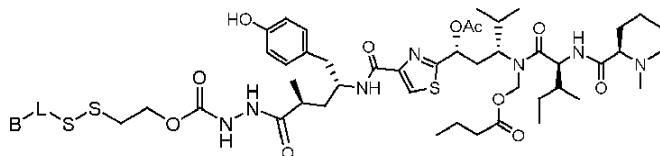
## 【 0 2 9 8 】

実施例。チューブリシンジスルフィドの調製 ( 段階的方法 ) 。 E C 0 3 1 2 により説明

する。D I P E A ( 3 6  $\mu$  L ) 及びクロロギ酸イソブチル ( 1 3  $\mu$  L ) を、シリンジの助けを借りて、同時に、無水 E t O A c ( 2 . 0 mL ) 中のチューブリシン B ( 8 2 mg ) の溶液に - 1 5 で加えた。アルゴン下、- 1 5 で 4 5 分間撹拌した後、反応混合物に、無水 E t O A c ( 1 . 0 mL ) 中の E C 0 3 1 1 の溶液を加えた。得られた溶液をアルゴン下、- 1 5 で 1 5 分間、室温で更に 4 5 分間撹拌し、濃縮し、残渣をフラッシュクロマトグラフィー ( シリカゲル、D C M 中 2 ~ 8 % M e O H ) により精製して、E C 0 3 1 2 を白色の固体 ( 9 8 mg ) として得た。以上の方法は、チューブリシン出発化合物の適切な選択によって、他のチューブリシン誘導体を調製するためにも同様に適用可能である。

【 0 2 9 9 】

【 化 7 8 】

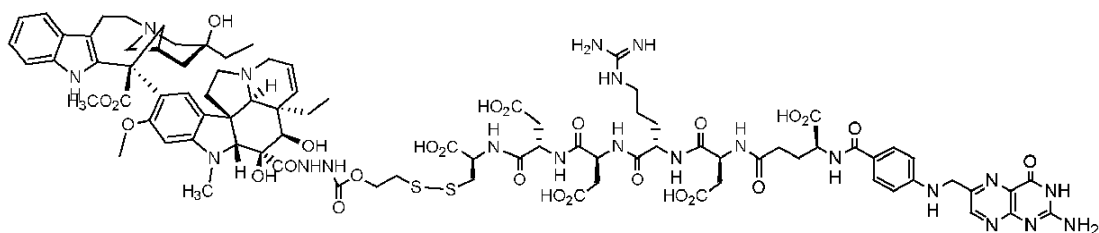


【 0 3 0 0 】

実施例。チューブリシン結合体を含有するジスルフィドの一般的合成。 E C 0 3 1 2 により説明する。チオール基を含有する結合リガンドリンカー中間体を、脱イオン水 ( 約 2 0 mg/mL、使用前にアルゴンで 1 0 分間泡立てた ) に取り、懸濁液の pH を飽和 N a H C O <sub>3</sub> ( 使用前にアルゴンで 1 0 分間泡立てた ) により約 6 . 9 に調製する ( 懸濁液は、p H が増加すると溶液になりうる ) 。必要であれば水溶液に追加の脱イオン水を加え ( 約 2 0 ~ 2 5 % ) 、その直後、水溶液に、T H F 中の E C 0 3 1 2 ( 約 2 0 mg/mL ) の溶液を加える。反応混合物は急速に均質になる。アルゴン下、例えば 4 5 分間撹拌した後、反応混合物を 2 . 0 mM リン酸ナトリウム緩衝液 ( p H 7 . 0 、約 1 5 0 容量 % ) で希釈し、T H F を蒸発により除去する。得られる懸濁液を濾過し、濾液を分取 H P L C により ( 本明細書に記載されているとおりに ) 精製することができる。画分を凍結乾燥して、結合体を単離する。以上の方法は、チューブリシン出発化合物の適切な選択によって、他のチューブリシン結合体を調製するためにも同様に適用可能である。

【 0 3 0 1 】

【 化 7 9 】



【 0 3 0 2 】

ピンブラスチン比較例。親水性スペーサーリンカーを欠いている E C 1 4 5 。 T H F 中のペプチジルフラグメント P t e - G l u - A s p - A r g - A s p - A s p - C y s - O H ( 配列番号 1 ) ( 実施例 1 3 ) を、チオスルホネート活性化ピンブラスチン又はピンブラスチンピリジニルジスルフィドのいずれかにより処理し、アルゴン下、p H > 6 . 5 で 0 . 1 M N a H C O <sub>3</sub> に溶解すると、黄色の溶液を得た。凍結乾燥及び H P L C により、7 0 % の収率を得た ; 選択 1 H N M R ( D 2 O ) 8 . 6 7 ( s , 1 H , F A H - 7 ) , 7 . 5 0 ( b r s , 1 H , V L B H - 1 1 ' ) , 7 . 3 0 - 7 . 4 0 ( b r s , 1 H , V L B H - 1 4 ) , 7 . 3 5 ( d , 2 H , J = 7 . 8 H z , F A H - 1 2 & 1 6 ) , 7 . 2 5 ( m , 1 H , V L B H - 1 3 ) , 7 . 0 5 ( b r s , 1 H , V L B H - 1 2 ) , 6 . 5 1 ( d , 2 H , J = 8 . 7 H z , F A H - 1 3 & 1 5 ) , 6 . 4 ( s , 2 H , V L B H - 1 4 & 1 7 ) , 5 . 7 ( m , 1 H , V L B オレフィン ) , 5 . 6 5 ( m , 1 H , V L B H - 7 ) , 5 . 5 ( d , 1 H , V L B オレフィ

10

20

30

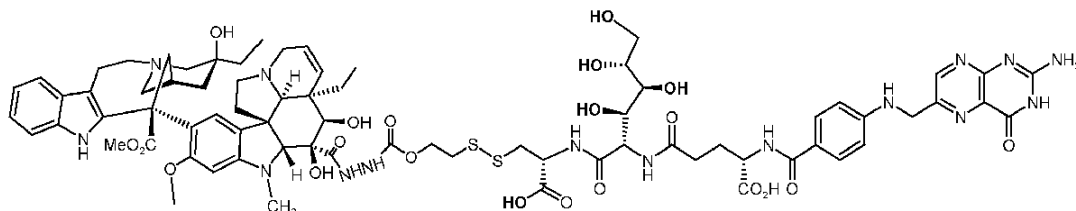
40

50

ン), 5.5 (m, 1H, VLB H-6), 4.15 (m, 1H, VLB H-8), 3.82 (s, 3H, VLB C18'-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.69 (s, 3H, VLB C16-OCH<sub>3</sub>), 2.8 (s, 3H, VLB N-CH<sub>3</sub>), 1.35 (br s, 1H, VLB H-3), 1.15 (m, 1H, VLB H-2), 0.9 (t, 3H, J = 7 Hz, VLB H-21), 0.55 (t, 3H, J = 6.9 Hz, VLB H-21); LCMS (ESI, m + H<sup>+</sup>) 1918.

【0303】

【化80】



10

【0304】

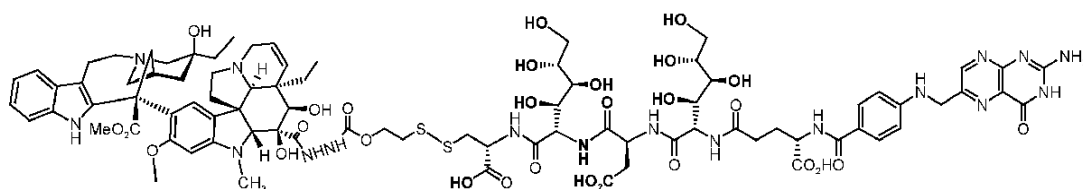
実施例。親水性スパーリンカーを含むEC0234 (モノ-サッカロ-葉酸ピンブラスチン結合体)。ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー (EC0233、22 mg、0.030 mmol) を2 mLの水に溶解し、アルゴンで10分間泡立てた。別のフラスコの中で、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液をアルゴンで10分間泡立てた。リンカー溶液のpHを、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液を使用して6.9に注意深く調整した。2 mLのテトラヒドロフラン (THF) 中のピンブラスチンピリジニルジスルフィド (27 mg、0.028 mmol) を、上記の溶液にゆっくりと加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で15分から1時間撹拌した。反応の進行を、分析HPLC (10 mM酢酸アンモニウム、pH = 7.0 及びアセトニトリル) によりモニタリングした。THFを減圧下で除去し、水溶液を濾過し、分取HPLCカラム (X-terra Column C18、19 × 300 mM) に注入した。1 mMのリン酸ナトリウム、pH = 7.0 及びアセトニトリルで溶離することによって、生成物を含有する純粋な画分を得た。48時間凍結乾燥した後、ピンブラスチン-サッカロ-葉酸結合体 (EC0234) を単離した (34 mg、76%)。<sup>1</sup>H NMRデータは、葉酸結合体と一致した。C<sub>74</sub>H<sub>93</sub>N<sub>15</sub>O<sub>21</sub>S<sub>2</sub>; MW 1592.75; 精密質量: 1591.61。

20

30

【0305】

【化81】



【0306】

実施例。EC0246 (ビス-サッカロ-葉酸ピンブラスチン結合体)。ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー (EC0244、30 mg、0.030 mmol) を5 mLの水に溶解し、アルゴンで10分間泡立てた。別のフラスコの中で、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液をアルゴンで10分間泡立てた。リンカー溶液のpHを、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液を使用して6.9に注意深く調整した。5 mLのテトラヒドロフラン (THF) 中のピンブラスチンピリジニルジスルフィド (27 mg、0.028 mmol) を、上記の溶液にゆっくりと加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で15分から1時間撹拌した。反応の進行を、分析HPLC (10 mM酢酸アンモニウム、pH = 7.0 及びアセトニトリル) によりモニタリングした。THFを減圧下で除去し、水溶液を濾過し、分取HPLCカラム (X-terra Column C<sub>18</sub>、19 × 300 mM) に注入した。1 mMのリン酸ナトリウム、pH = 7.0 及びアセトニトリルで溶離することによって、生成物を含有する純粋な画分を

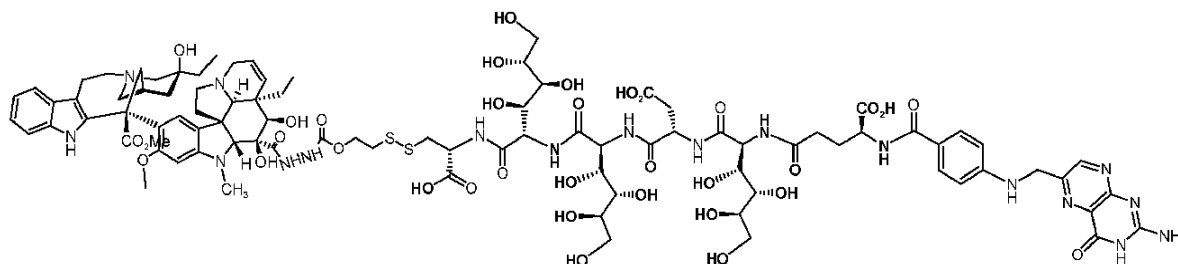
40

50

得た。48時間凍結乾燥した後、ピンブラスチン - ビス - サッカロ - 葉酸結合体 (EC0246) を単離した (34 mg、66%)。<sup>1</sup>H NMR データは、葉酸結合体と一致した。  
 $C_{84}H_{109}N_{17}O_{29}S_2$ ; MW 1884.99; 精密質量: 1883.70。

【0307】

【化82】



10

【0308】

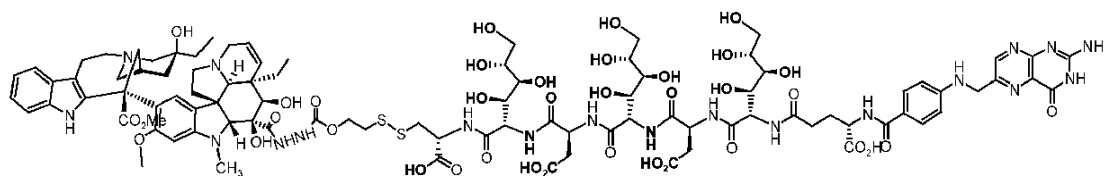
実施例。EC0258 (トリス - サッカロ - Asp - 葉酸ピンブラスチン結合体)。ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー (EC0257、37 mg、0.031 mmol) を 5 mL の水に溶解し、アルゴンで 10 分間泡立てた。別のフラスコの中で、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液をアルゴンで 10 分間泡立てた。リンカー溶液の pH を、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液を使用して 6.9 に注意深く調整した。5 mL のテトラヒドロフラン (THF) 中のピンブラスチンピリジニルジスルフィド (27.5 mg、0.028 mmol) を、上記の溶液にゆっくりと加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で 15 分から 1 時間攪拌した。反応の進行を、分析 HPLC (10 mM 酢酸アンモニウム、pH = 7.0 及びアセトニトリル) によりモニタリングした。THF を減圧下で除去し、水溶液を濾過し、分取 HPLC カラム (X-terra Column C<sub>18</sub>、19 × 300 mM) に注入した。1 mM のリン酸ナトリウム、pH = 7.0 及びアセトニトリルで溶離することによって、生成物を含有する純粋な画分を得た。48時間凍結乾燥した後、ピンブラスチン - トリス - サッカロ - Asp - 葉酸結合体 (EC0258) を単離した (36 mg、62%)。<sup>1</sup>H NMR データは、葉酸結合体と一致した。  
 $C_{90}H_{120}N_{18}O_{34}S_2$ ; MW 2062.15; 精密質量: 2060.77。

20

30

【0309】

【化83】



【0310】

実施例。EC0263 (トリス - サッカロ - ビス - Asp - 葉酸ピンブラスチン結合体)。ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー (EC0261、37 mg、0.029 mmol) を 5 mL の水に溶解し、アルゴンで 10 分間泡立てた。別のフラスコの中で、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液をアルゴンで 10 分間泡立てた。リンカー溶液の pH を、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液を使用して 6.9 に注意深く調整した。5 mL のテトラヒドロフラン (THF) 中のピンブラスチンピリジニルジスルフィド (25.5 mg、0.026 mmol) を、上記の溶液にゆっくりと加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で 15 分から 1 時間攪拌した。反応の進行を、分析 HPLC (10 mM 酢酸アンモニウム、pH = 7.0 及びアセトニトリル) によりモニタリングした。THF を減圧下で除去し、水溶液を濾過し、分取 HPLC カラム (X-terra Column C<sub>18</sub>、19 × 300 mM) に注入した。1 mM のリン酸ナトリウム、pH = 7.0 及びアセトニトリルで溶離することによって、生成物を含有する純粋な画分を得た。48時間凍結乾燥した後、ピンブラスチン - トリス - サッカ

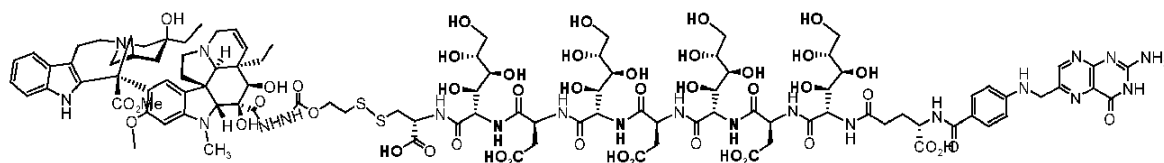
40

50

ロ - ビス - A s p - 葉酸結合体 ( E C 0 2 6 3 ) を単離した ( 3 6 mg、6 4 % ) 。  $^1\text{H}$  NMR データは、葉酸結合体と一致した。  $\text{C}_{94}\text{H}_{125}\text{N}_{19}\text{O}_{37}\text{S}_2$  ; MW 2177.24 ; 精密質量 : 2175.79。

【 0 3 1 1 】

【 化 8 4 】



10

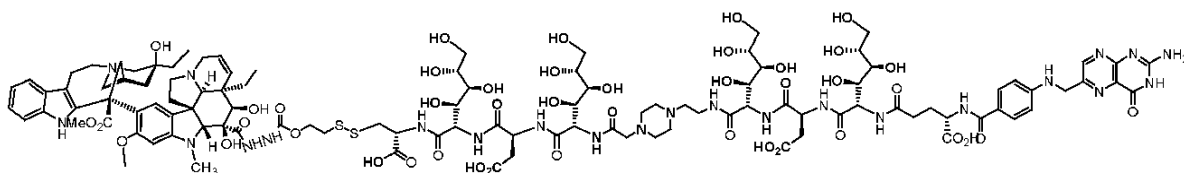
【 0 3 1 2 】

実施例。 E C 0 4 3 4 ( トリス - サッカロ - トリス - A s p - 葉酸ピンブラスチン結合体 ) 。 ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー ( E C 0 2 6 8、20mg、0.012mmol ) を 3 mL の水に溶解し、アルゴンで 10 分間泡立てた。別のフラスコの中で、0.1N  $\text{NaHCO}_3$  溶液をアルゴンで 10 分間泡立てた。リンカー溶液の pH を、0.1N  $\text{NaHCO}_3$  溶液を使用して 6.9 に注意深く調整した。3 mL のテトラヒドロフラン ( THF ) 中のピンブラスチンピリジニルジスルフィド ( 12 mg、0.012 mmol ) を、上記の溶液にゆっくりと加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で 15 分から 1 時間撹拌した。反応の進行を、分析 HPLC ( 10 mM 酢酸アンモニウム、pH = 7.0 及びアセトニトリル ) によりモニタリングした。THF を減圧下で除去し、水溶液を濾過し、分取 HPLC カラム ( X-terra Column  $\text{C}_{18}$ 、 $19 \times 300$  mm ) に注入した。1 mM のリン酸ナトリウム、pH = 7.0 及びアセトニトリルで溶離することによって、生成物を含有する純粋な画分を得た。48 時間凍結乾燥した後、ピンブラスチン - テトラ - サッカロ - トリス - A s p - 葉酸結合体 ( E C 0 4 3 4 ) を単離した ( 26 mg、62 % ) 。  $^1\text{H}$  NMR データは、葉酸結合体と一致した。  $\text{C}_{104}\text{H}_{141}\text{N}_{21}\text{O}_{45}\text{S}_2$  ; MW 2469.48 ; 精密質量 : 2467.88。

20

【 0 3 1 3 】

【 化 8 5 】



30

【 0 3 1 4 】

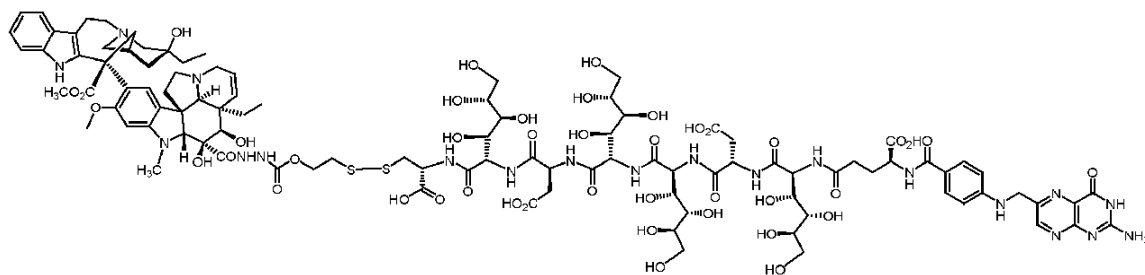
実施例。 E C 0 4 5 4 ( テトラ - サッカロ - ビス - A s p - 葉酸ピンブラスチン結合体 ) 。 ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー ( E C 0 4 5 2、34mg、0.02mmol ) を 3 mL の水に溶解し、アルゴンで 10 分間泡立てた。別のフラスコの中で、0.1N  $\text{NaHCO}_3$  溶液をアルゴンで 10 分間泡立てた。リンカー溶液の pH を、0.1N  $\text{NaHCO}_3$  溶液を使用して 6.9 に注意深く調整した。3 mL のテトラヒドロフラン ( THF ) 中のピンブラスチンピリジニルジスルフィド ( 20 mg、0.02 mmol ) を、上記の溶液にゆっくりと加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で 15 分から 1 時間撹拌した。反応の進行を、分析 HPLC ( 10 mM 酢酸アンモニウム、pH = 7.0 及びアセトニトリル ) によりモニタリングした。THF を減圧下で除去し、水溶液を濾過し、分取 HPLC カラム ( X-terra Column  $\text{C}_{18}$ 、 $19 \times 300$  mm ) に注入した。1 mM のリン酸ナトリウム、pH = 7.0 及びアセトニトリルで溶離することによって、生成物を含有する純粋な画分を得た。48 時間凍結乾燥した後、ピンブラスチン - テトラ - サッカロ - ビス - A s p - 葉酸結合体 ( E C 0 4 5 4 ) を単離した ( 35 mg、70 % ) 。  $^1\text{H}$  NMR データは、葉酸結合体と一致した。  $\text{C}_{108}\text{H}_{151}\text{N}_{33}\text{O}_{43}\text{S}_2$  ; MW 2523.62 ; 精密質量 : 2521.98。

40

【 0 3 1 5 】

50

## 【化 8 6】



## 【0316】

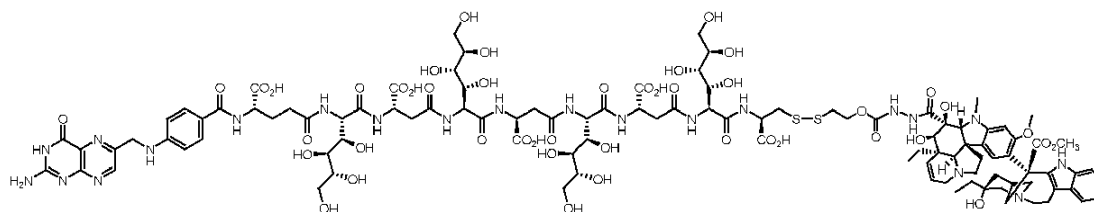
10

実施例。EC0455 (テトラ - サッカロ - ビス - Asp - 葉酸ピンブラスチン結合体)。ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー (EC0457、20mg、0.013mmol) を 1.5mL の水に溶解し、アルゴンで 10 分間泡立てた。別のフラスコの中で、0.1N NaHCO<sub>3</sub> 溶液をアルゴンで 10 分間泡立てた。リンカー溶液の pH を、0.1N NaHCO<sub>3</sub> 溶液を使用して 6.9 に注意深く調整した。1.5mL のテトラヒドロフラン (THF) 中のピンブラスチンピリジニルジスルフィド (18mg、0.018mmol) を、上記の溶液にゆっくりと加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で 30 分間撹拌した。反応の進行を、分析 HPLC (10mM 酢酸アンモニウム、pH = 7.0 及びアセトニトリル) によりモニタリングした。THF を減圧下で除去し、水溶液を濾過し、分取 HPLC カラム (X-terra Column C<sub>18</sub>、19 × 300mm) に注入した。1mM のリン酸ナトリウム、pH = 7.0 及びアセトニトリルで溶離することによって、生成物を含む純粋な画分を得た。48 時間凍結乾燥した後、ピンブラスチン - テトラ - サッカロ - ビス - Asp - 葉酸結合体 (EC0455) を単離した (19mg、62%)。<sup>1</sup>H NMR データは、葉酸結合体と一致した。C<sub>100</sub>H<sub>136</sub>N<sub>20</sub>O<sub>42</sub>S<sub>2</sub>; MW 2354.39。

20

## 【0317】

## 【化 8 7】



30

## 【0318】

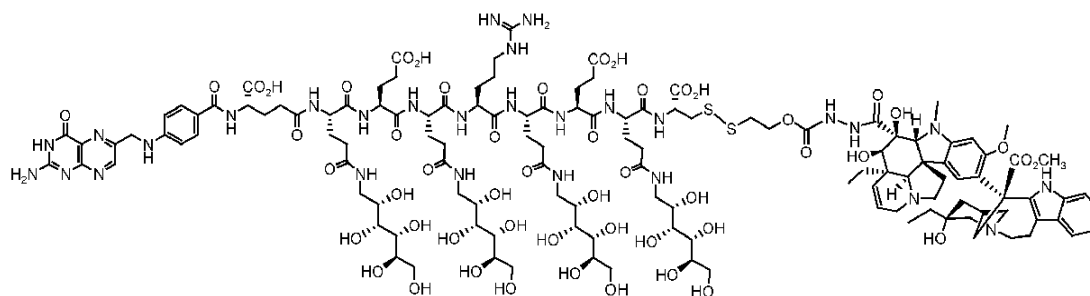
実施例。EC0456。ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー (EC0453、46mg、0.029mmol) を 3mL の水に溶解し、アルゴンで 10 分間泡立てた。別のフラスコの中で、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液をアルゴンで 10 分間泡立てた。リンカー溶液の pH を、アルゴンを泡立てながら、NaHCO<sub>3</sub> 溶液を使用して 6.9 に注意深く調整した。3mL のテトラヒドロフラン (THF) 中のピンブラスチンピリジニルジスルフィド (32mg、1.1 当量) を、上記の溶液に素早く加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で撹拌した。反応の進行を、分析 HPLC (2mM リン酸緩衝液、pH = 7.0 及びアセトニトリル) によりモニタリングした。30 分後、反応液に、12mL の 2mM リン酸緩衝液 (pH 7) を加え、得られた濁った溶液を濾過し、濾液を分取 HPLC に注入した：カラム：Waters Xterra Prep MS C<sub>18</sub> 10 μm 19 × 250mm、溶媒 A：2mM リン酸ナトリウム、pH 7；溶媒 B：ACN；方法：25mL / 分により 1% B で 5 分間から 80% B で 40 分間。EC0456 を含有する画分を収集し、凍結乾燥して、30mg の EC0456 (収率 42%) 及び 11.6mg のリン酸ナトリウム塩から構成される、41.6mg の綿毛状の黄色固体を得た。<sup>1</sup>H NMR 及び LC/MS は、生成物と一致した。C<sub>104</sub>H<sub>141</sub>N<sub>21</sub>O<sub>45</sub>S<sub>2</sub>; MW 2469.48；精密質量：2467.88。C 50.58；H 5.76；N 11.91；O 29.15；S 2.60。

40

50

【 0 3 1 9 】

【 化 8 8 】



10

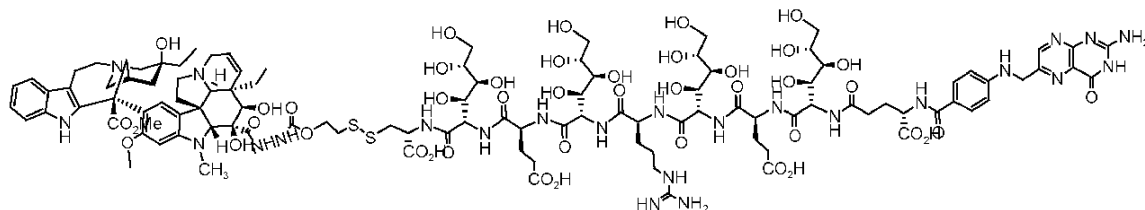
【 0 3 2 0 】

実施例。E C 0 4 8 1。ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー（E C 0 4 7 9、1.2 mg、0.0058 mmol）を2.5 mLの水に溶解し、アルゴンで10分間泡立てた。別のフラスコの中で、飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液をアルゴンで10分間泡立てた。リンカー溶液のpHを、アルゴンを泡立てながら、NaHCO<sub>3</sub>溶液を使用して6.9に注意深く調整した。2.5 mLのテトラヒドロフラン（THF）中のピンブラスチンピリジニルジスルフィド（5.7 mg、1.0 当量）を、上記の溶液に素速く加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で撹拌した。反応の進行を、分析HPLC（2 mMリン酸緩衝液、pH = 7.0 及びアセトニトリル）によりモニタリングした。20分後、反応液に、1.2 mLの2 mMリン酸緩衝液（pH 7）を加え、得られた濁った溶液を濾過し、濾液を分取HPLC

20

【 0 3 2 1 】

【 化 8 9 】



30

【 0 3 2 2 】

実施例。E C 0 4 8 4（テトラ - サッカロ - ビス - - G l u - A r g - 葉酸ピンブラスチン結合体）。ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー（E C 0 4 8 0、1.5 mg、0.009 mmol）を3 mLの水に溶解し、アルゴンで10分間泡立てた。別のフラスコの中で、0.1 N NaHCO<sub>3</sub>溶液をアルゴンで10分間泡立てた。リンカー溶液のpHを、0.1 N NaHCO<sub>3</sub>溶液を使用して6.9に注意深く調整した。3 mLのテトラヒドロフラン（THF）中のピンブラスチンピリジニルジスルフィド（8.8 mg、0.009 mmol）を、上記の溶液にゆっくりと加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で15分から1時間撹拌した。反応の進行を、分析HPLC（10 mM酢酸アンモニウム、pH = 7.0 及びアセトニトリル）によりモニタリングした。THFを減圧下で除去し、水溶液を濾過し、分取HPLCカラム（X-terra Column C18、19 × 300 mm）に注入した。1 mMのリン酸ナトリウム、pH = 7.0 及びアセトニトリルで溶離することによって、生成物を含有する純粋な画分を得た。48時間凍結乾燥した後、ピンブラスチン - テトラ - サッカロ - ビス - - G l u - A r g - 葉酸結合体（E C 0 4 8 4）を単離した（1.6 mg、70%）。<sup>1</sup>H NMRデータは、葉酸結合体と一致した。C 1 0 8 H 1 5 2 N 2

40

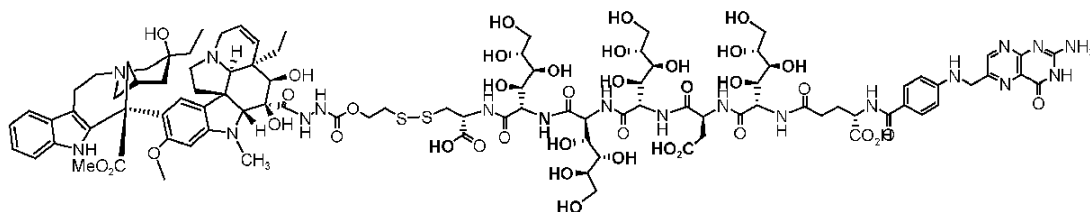
50



4043S2; MW 2538.63; 精密質量: 2536.99.

【0323】

【化90】

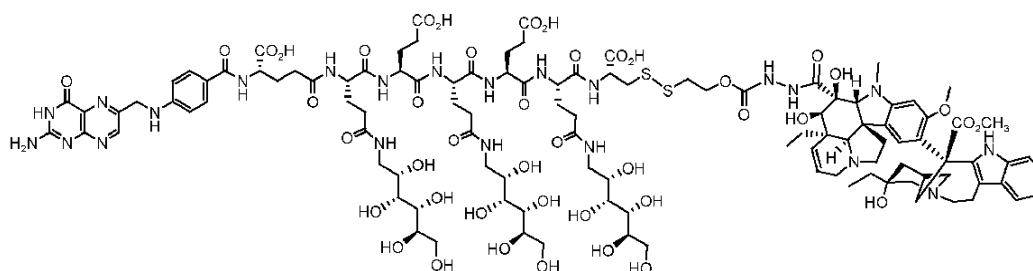


【0324】

実施例。EC0487 (テトラ - サッカロ - Asp - 葉酸ピンブラスチン結合体)。ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー (EC0463、21mg、0.015 mmol) を 3mL の水に溶解し、アルゴンで 10 分間泡立てた。別のフラスコの中で、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液をアルゴンで 10 分間泡立てた。リンカー溶液の pH を、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液を使用して 6.9 に注意深く調整した。3mL のテトラヒドロフラン (THF) 中のピンブラスチンピリジニルジスルフィド (15mg、0.015 mmol) を、上記の溶液にゆっくりと加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で 15 分から 1 時間撹拌した。反応の進行を、分析 HPLC (10mM 酢酸アンモニウム、pH = 7.0 及びアセトニトリル) によりモニタリングした。THF を減圧下で除去し、水溶液を濾過し、分取 HPLC カラム (Atlantis Column C<sub>18</sub>、19 × 300mm) に注入した。1mM のリン酸ナトリウム、pH = 7.0 及びアセトニトリルで溶離することによって、生成物を含む純粋な画分を得た。48 時間凍結乾燥した後、ピンブラスチン - テトラ - サッカロ - Asp - 葉酸結合体 (EC0487) を単離した (28mg、84%)。<sup>1</sup>H NMR データは、葉酸結合体と一致した。C<sub>96</sub>H<sub>131</sub>N<sub>19</sub>O<sub>39</sub>S<sub>2</sub>; MW 2239.30; 精密質量: 2237.83.

【0325】

【化91】



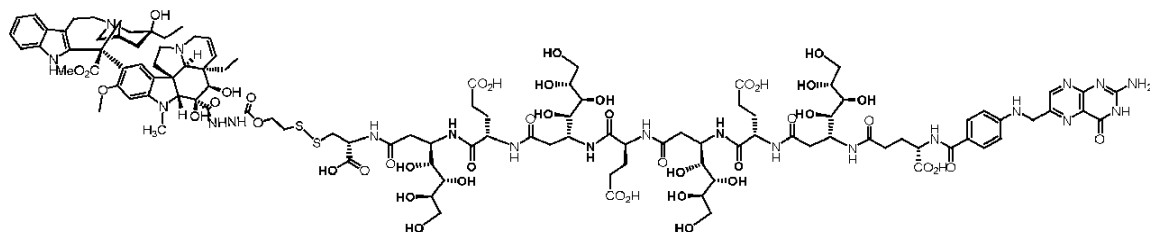
【0326】

実施例。EC0489。ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー (EC0488、26mg、0.015 mmol) を 2.5mL の水に溶解し、アルゴンで 10 分間泡立てた。別のフラスコの中で、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液をアルゴンで 10 分間泡立てた。リンカー溶液の pH を、アルゴンを泡立てながら、NaHCO<sub>3</sub> 溶液を使用して 6.9 に注意深く調整した。2.5mL のテトラヒドロフラン (THF) 中のピンブラスチンピリジニルジスルフィド (15mg、1.0 当量) を、上記の溶液に素早く加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で撹拌した。反応の進行を、分析 HPLC (2mM リン酸緩衝液、pH = 7.0 及びアセトニトリル) によりモニタリングした。20 分後、反応液に、1.2mL の 2mM リン酸緩衝液 (pH 7) を加え、得られた濁った溶液を濾過し、濾液を分取 HPLC に注入した: カラム: Waters Xterra Prep MS C<sub>18</sub> 10 μm 19 × 250mm、溶媒 A: 2mM リン酸ナトリウム、pH 7; 溶媒 B: ACN; 方法: 2.6mL/分により 1% B で 5 分間から 50% B で 25 分間)。EC0489 を含む画分を収集し、凍結乾燥して、27.5mg の EC0489 (収率 71%) 及び 7.5mg のリン酸ナトリウム塩から構成される、35mg の綿毛状の黄色固体を得た。<sup>1</sup>H NMR 及び LC/MS は、生成物と一致した。

MW 2550.68 ; 精密質量 : 2549.01。

【0327】

【化92】



10

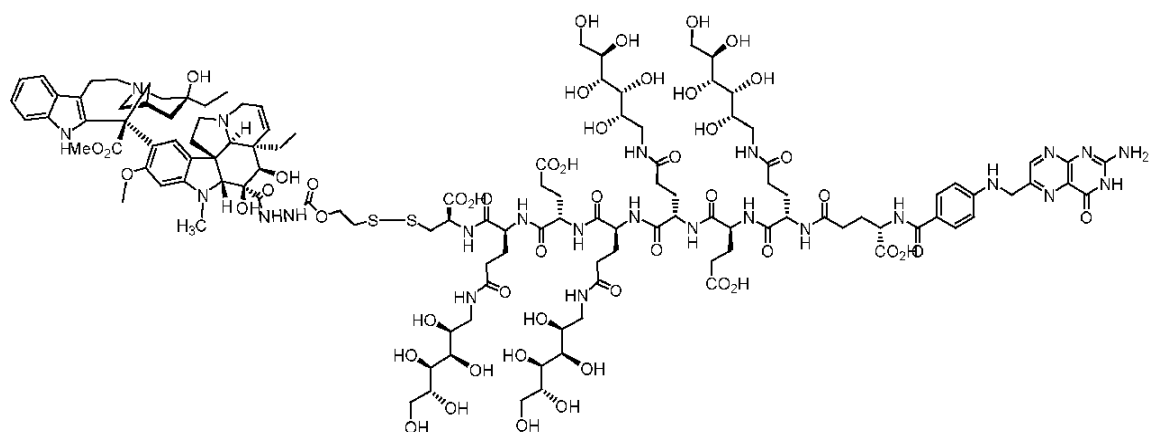
【0328】

実施例。EC0490 (テトラ - ホモサッカロ - トリス - Glu - 葉酸ピンプラスチン結合体)。ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー (EC0478、22 mg、0.013 mmol) を 3 mL の水に溶解し、アルゴンで 10 分間泡立てた。別のフラスコの中で、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液をアルゴンで 10 分間泡立てた。リンカー溶液の pH を、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液を使用して 6.9 に注意深く調整した。3 mL のテトラヒドロフラン (THF) 中のピンプラスチンピリジニルジスルフィド (mg、mmol) を、上記の溶液にゆっくりと加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で 15 分から 1 時間攪拌した。反応の進行を、分析 HPLC (10 mM 酢酸アンモニウム、pH = 7.0 及びアセトニトリル) によりモニタリングした。THF を減圧下で除去し、水溶液を濾過し、分取 HPLC カラム (X-terra Column C<sub>18</sub>、19 × 300 mM) に注入した。1 mM のリン酸ナトリウム、pH = 7.0 及びアセトニトリルで溶離することによって、生成物を含有する純粋な画分を得た。48 時間凍結乾燥した後、ピンプラスチン - テトラ - ホモサッカロ - トリス - Glu - 葉酸結合体 (EC0490) を、で単離した (15 mg、45%)。<sup>1</sup>H NMR データは、葉酸結合体と一致した。C<sub>111</sub>H<sub>155</sub>N<sub>21</sub>O<sub>45</sub>S<sub>2</sub>; MW 2567.66 ; 精密質量 : 2565.99。

20

【0329】

【化93】



30

40

【0330】

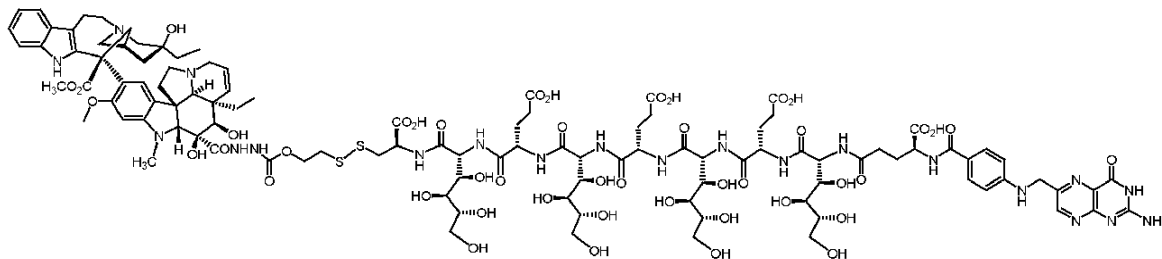
実施例。EC0492 (テトラ - ホモサッカロ - トリス - Glu - 葉酸ピンプラスチン結合体)。ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー (EC0491、26 mg、0.013 mmol) を 3 mL の水に溶解し、アルゴンで 10 分間泡立てた。別のフラスコの中で、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液をアルゴンで 10 分間泡立てた。リンカー溶液の pH を、0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液を使用して 6.9 に注意深く調整した。3 mL のテトラヒドロフラン (THF) 中のピンプラスチンピリジニルジスルフィド (13 mg、0.013 mmol) を、上記の溶液に加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で 15 分から 1 時間攪拌した。反応の進行を、分析 HPLC (10 mM 酢酸アンモニウム、pH = 7.0 及びアセトニトリル) によりモニタリングした。THF を減圧下で除去し、水溶液を濾過し、

50

分取HPLCカラム(X-terra Column C<sub>18</sub>、19×300mM)に注入した。1mMのリン酸ナトリウム、pH=7.0及びアセトニトリルで溶離することによって、生成物を含有する純粋な画分を得た。48時間凍結乾燥した後、ピンブラスチン-テトラ-ホモサッカロ-トリス-Glu-葉酸結合体(EC0492)を、で単離した(22mg、60%)。<sup>1</sup>H NMRデータは、葉酸結合体と一致した。C<sub>122</sub>H<sub>176</sub>N<sub>24</sub>O<sub>50</sub>S<sub>2</sub>; MW 2842.97; 精密質量: 2841.14。

【0331】

【化94】



10

【0332】

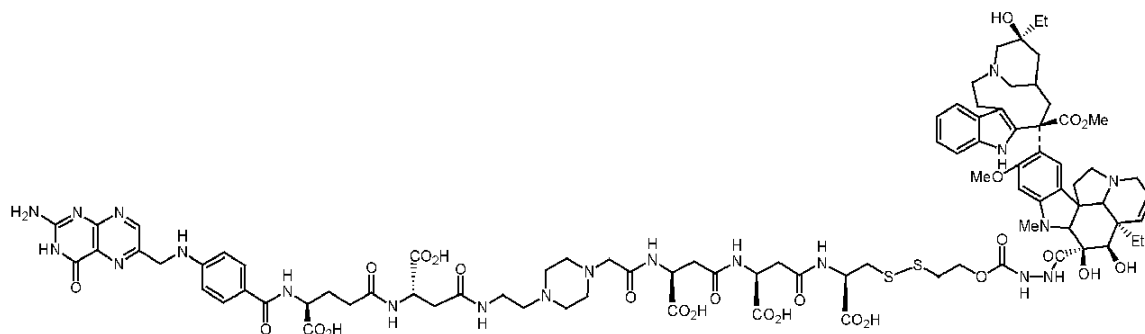
実施例。EC0493(テトラ-サッカロ-トリス-Glu-葉酸ピンブラスチン結合体)。ポリプロピレン遠心分離ボトルの中で、葉酸リンカー(EC0477、25mg、0.015mmol)を1.5mLの水に溶解し、アルゴンで10分間泡立てた。別のフラスコの中で、0.1N NaHCO<sub>3</sub>溶液をアルゴンで10分間泡立てた。リンカー溶液のpHを、0.1N NaHCO<sub>3</sub>溶液を使用して6.9に注意深く調整した。1.5mLのテトラヒドロフラン(THF)中のピンブラスチンピリジニルジスルフィド(20mg、0.020mmol)を、上記の溶液にゆっくりと加えた。得られた明澄な溶液を、アルゴン下で30分間攪拌した。反応の進行を、分析HPLC(10mM酢酸アンモニウム、pH=7.0及びアセトニトリル)によりモニタリングした。THFを減圧下で除去し、水溶液を濾過し、分取HPLCカラム(X-terra Column C<sub>18</sub>、19×300mM)に注入した。1mMのリン酸ナトリウム、pH=7.0及びアセトニトリルで溶離することによって、生成物を含有する純粋な画分を得た。48時間凍結乾燥した後、ピンブラスチン-テトラ-サッカロ-トリス-Glu-葉酸結合体(EC0493)を単離した(23mg、61%)。<sup>1</sup>H NMRデータは、葉酸結合体と一致した。C<sub>107</sub>H<sub>147</sub>N<sub>21</sub>O<sub>45</sub>S<sub>2</sub>; MW 2511.56; 精密質量: 2509.93。

20

30

【0333】

【化95】



40

【0334】

実施例。EC0429。Asp-Asp-Cysのアミノエチルピペラジニルアセトアミドにより表されるオリゴアミド親水性スパーサーを含むこの実施例は、本明細書に記載されている方法を使用して調製した。

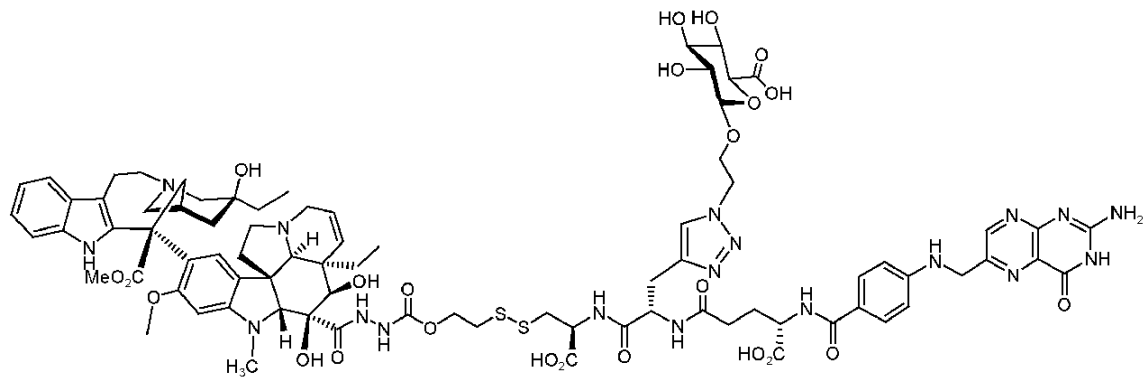
【0335】

糖類に基づいた基がクリック化学により例示的に導入されるグルクロニド化合物の例示的な実施例である以下のEC0400及びEC0423も、本明細書に記載されていると

50

おりに調製した。

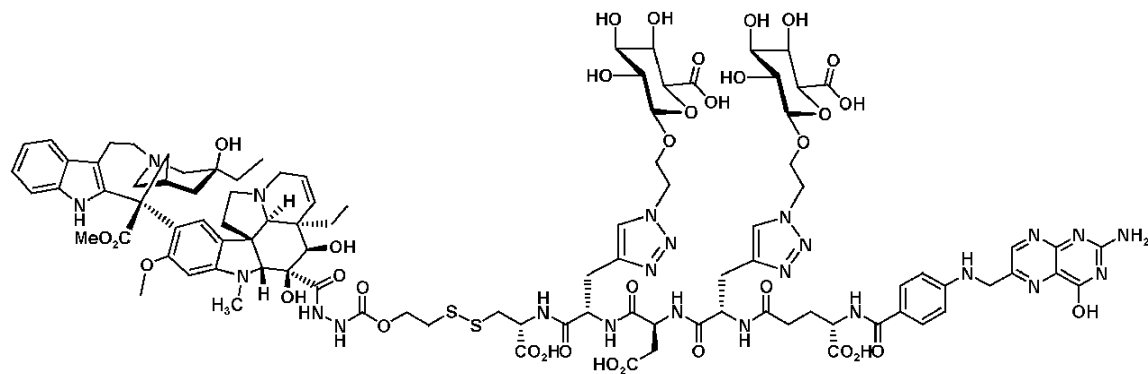
【化 9 6】



10

EC 0400

【化 9 7】



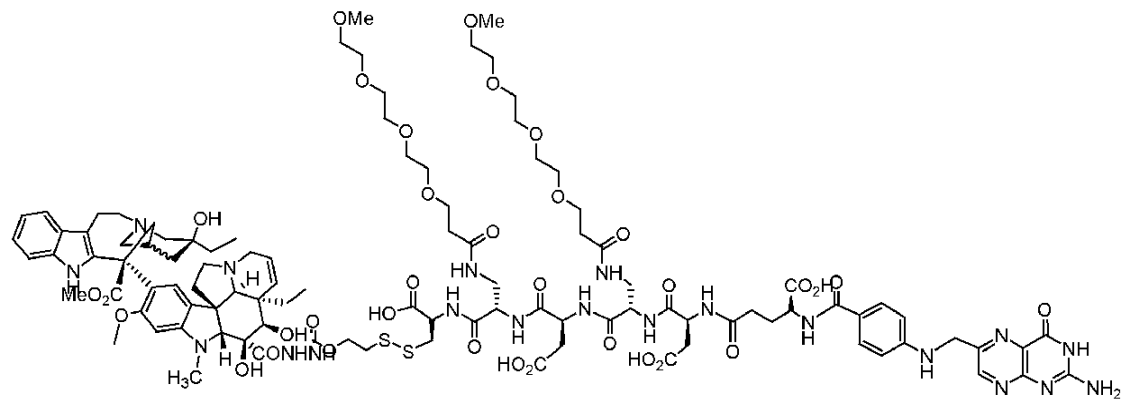
20

EC 0423

【0336】

PEGスパーサー化合物の例示的な実施例である以下のEC 0367及びEC 0409も、本明細書に記載されているとおりに調製した。

【化 9 8】

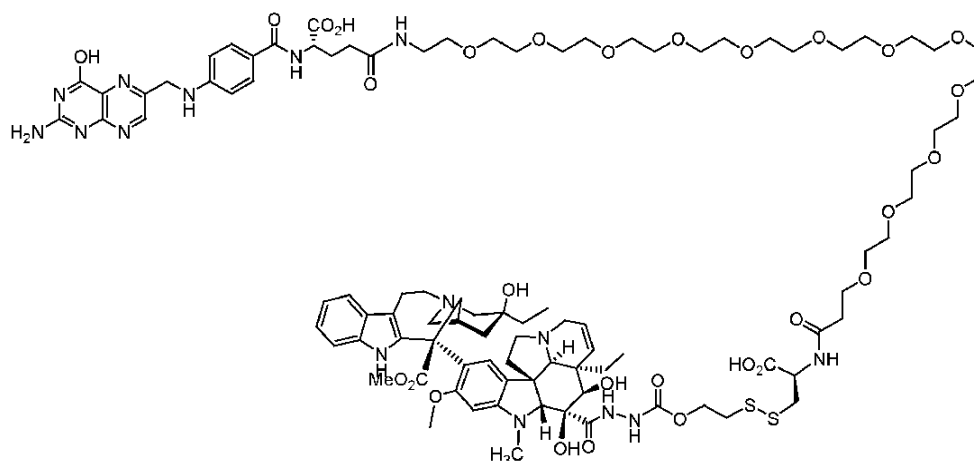


30

40

EC 0367

## 【化 9 9】



10

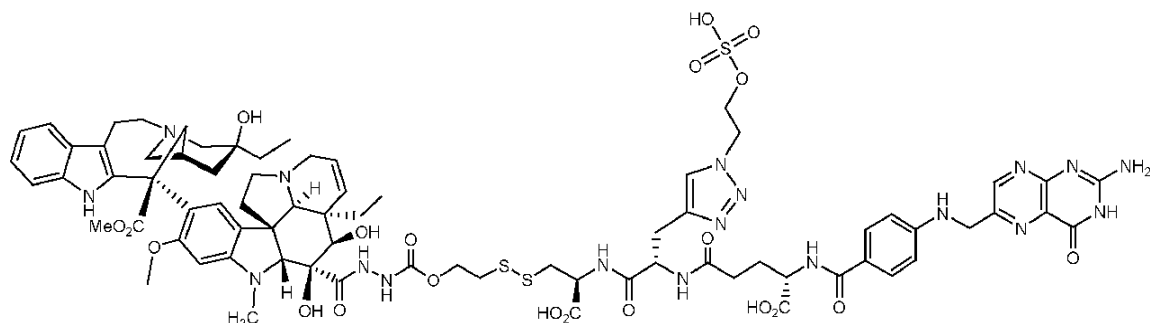
E C 0 4 0 9

## 【 0 3 3 7】

硫酸フラグメントがクリック化学を介して例示的に導入される硫酸アルキルエステル化合物の例示的な実施例である E C 0 4 1 8 及び E C 0 4 2 8 は、本明細書に記載されているとおりに調製した。

## 【化 1 0 0】

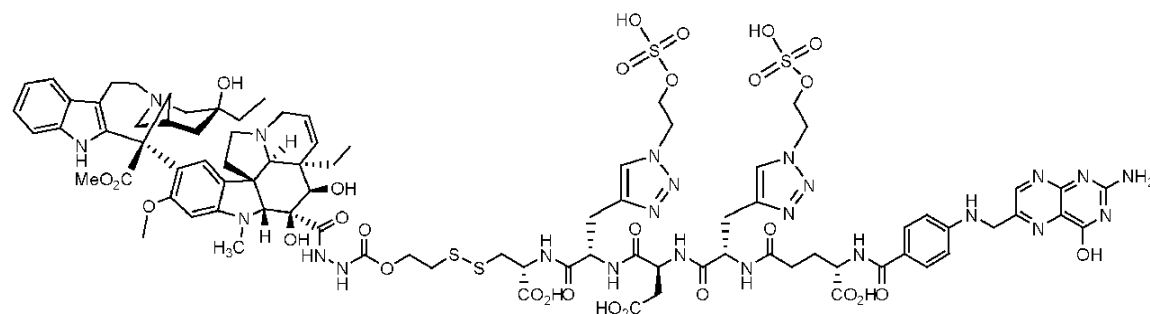
20



E C 0 4 1 8 D A V L B H の結合体

30

## 【化 1 0 1】



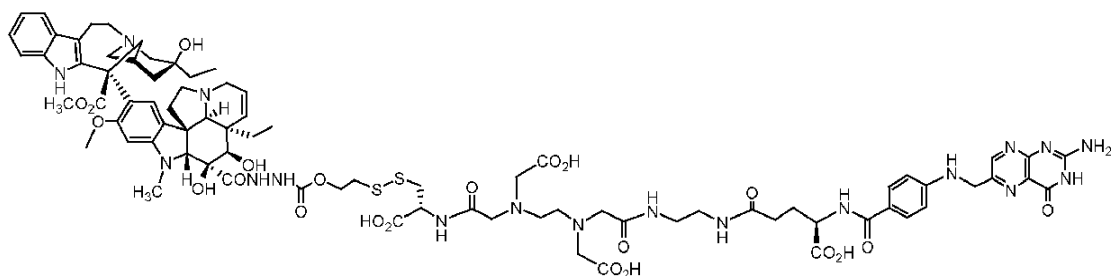
E C 0 4 2 8 D A V L B H の結合体

40

## 【 0 3 3 8】

オリゴアミドが E D T E 誘導体を含む追加のオリゴアミドスパーサー化合物の以下の例示的な実施例は、本明細書に記載されているとおりに調製した。

## 【化 102】



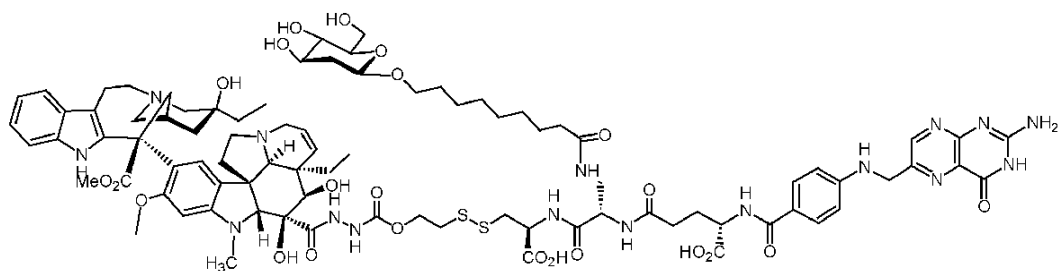
E C 0 3 9 6 D A V L B H の結合体

10

## 【 0 3 3 9 】

2 - デオキシヘキサピラノース化合物の - アルキルグルコシド及び P E G 結合化合物の以下の例示的な実施例は、親水性基をスペーサーリンカーに結合するクリック化学を使用して、本明細書に記載されているとおりに調製することができる。

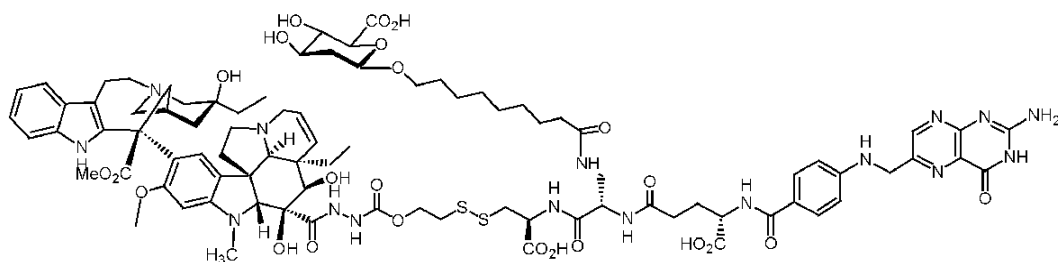
## 【化 103】



20

D A V L B H - アルキル 2 - デオキシグルコースを含む結合体

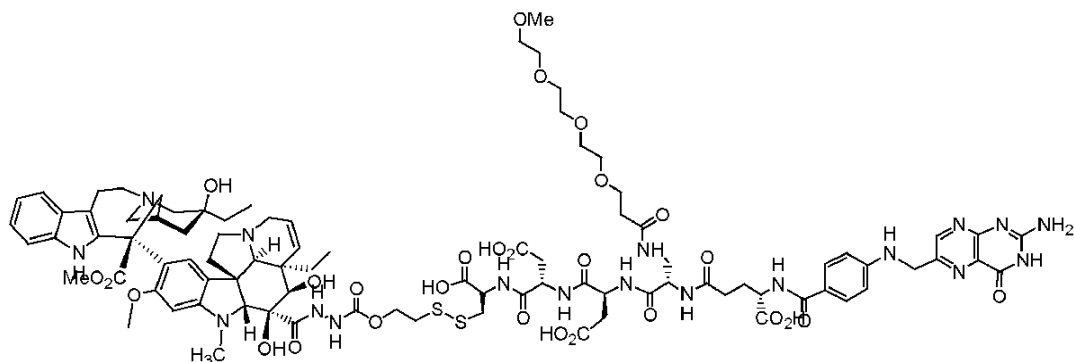
## 【化 104】



30

- アルキル 2 - デオキシグルクロニドを含む D A V L B H の結合体

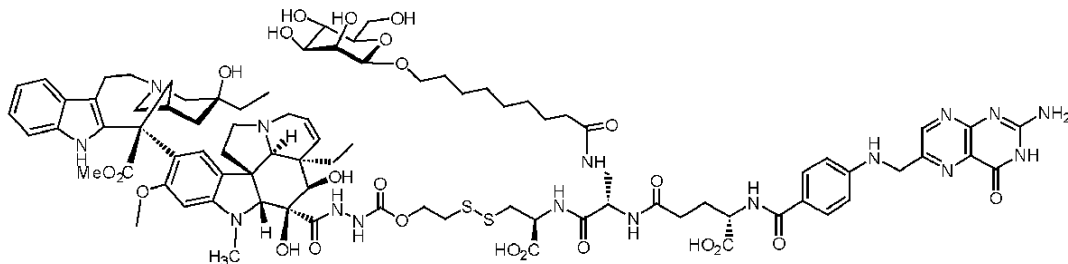
## 【化 105】



40

P E G を含む D A V L B H の結合体

## 【化 1 0 6】

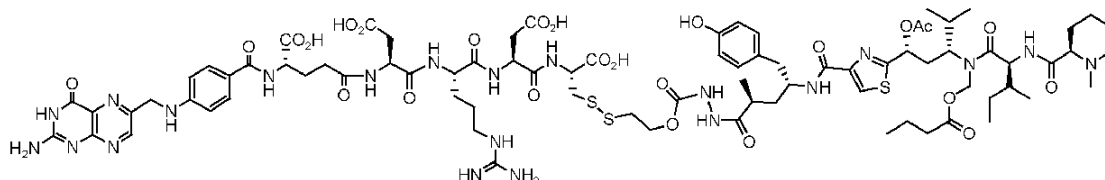


- アルキルマンノピラノシドを含む D A V L B H の結合体

10

## 【 0 3 4 0】

## 【化 1 0 7】



## 【 0 3 4 1】

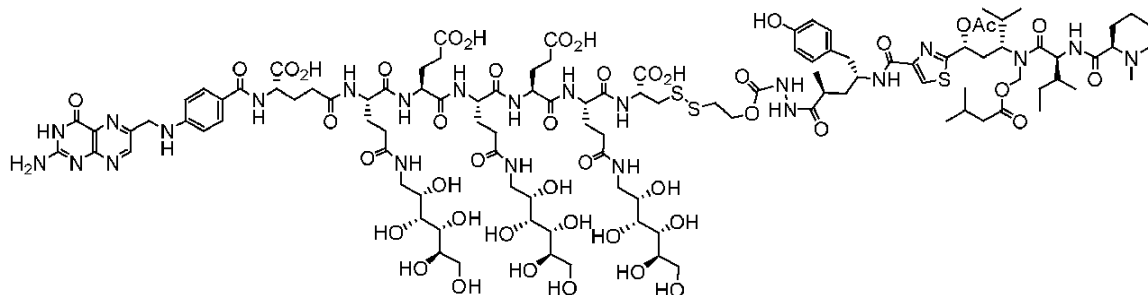
チューブリシン比較例。親水性スパーサーリンカーを欠いている E C 0 3 0 5。E C 8 9 ( 8 6 mg ) を、脱イオン水 ( 約 4 . 0 mg/mL、使用前にアルゴンで 1 0 分間泡立てた ) に取り、懸濁液の pH を飽和 N a H C O <sub>3</sub> ( 使用前にアルゴンで 1 0 分間泡立てた ) により約 6 . 9 に調整した ( 懸濁液は、pH が増加すると溶液になった )。追加の脱イオン水を水溶液に加えて総容量を 5 . 0 mL にし、その直後、水溶液に、T H F ( 5 . 0 mL ) 中の E C 0 3 1 2 ( 9 7 mg ) の溶液を加えた。反応混合物は急速に均質になった。アルゴン下で 4 5 分間撹拌した後、反応混合物を 2 . 0 mM リン酸ナトリウム緩衝液 ( pH 7 . 0、1 5 mL ) で希釈し、T H F を Rotavapor で除去した得られた懸濁液を濾過し、濾液を精製のために分取 H P L C ( カラム : Waters XTerra Prep MS C18 1 0 μm、1 9 × 2 5 0 mm ; 移動相 A : 2 . 0 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7 . 0 ; 移動相 B : アセトニトリル ; 方法 : 2 5 分間かけて 5 % B から 8 0 % B、流速 = 2 5 mL/分 ) に注入した。1 0 . 0 4 ~ 1 1 . 9 0 分の画分を収集し、凍結乾燥して、E C 0 3 0 5 を淡黄色の綿毛状固体 ( 1 1 7 mg ) として得た。

20

30

## 【 0 3 4 2】

## 【化 1 0 8】



40

## 【 0 3 4 3】

実施例。親水性スパーサーリンカーを有する結合体を調製する一般的方法 2 ( 1 ポット )。E C 0 5 4 3 の調製により説明する。D I P E A ( 7 . 8 μL ) 及びクロロギ酸イソブチル ( 3 . 1 μL ) を、シリンジの助けを借りて、同時に、無水 E t O A c ( 0 . 5 0 mL ) 中のチューブリシン A ( 1 8 mg ) の溶液に - 1 5 で加えた。アルゴン下、- 1 5 で 3 5 分間撹拌した後、反応混合物に、無水 E t O A c ( 0 . 5 0 mL ) 中の E C 0 3 1 1 ( 5 . 8 mg ) の溶液を加えた。冷却器を取り外し、反応混合物をアルゴン下で更に 4 5 分間撹拌し、濃縮し、真空に付し、残渣を T H F ( 2 . 0 mL ) に溶解した。一方、E C 0 4

50

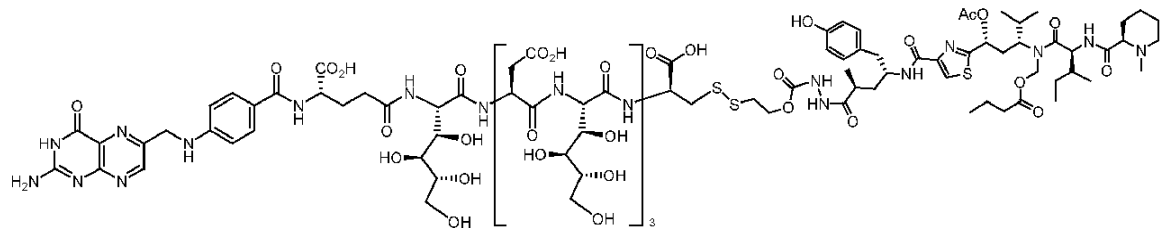
88 (40 mg) を脱イオン水 (使用前にアルゴンで 10 分間泡立てた) に溶解し、水溶液の pH を飽和  $\text{NaHCO}_3$  で 6.9 に調整した。追加の脱イオン水を EC0488 溶液に加えて、総容量を 2.0 mL にし、その直後、それに、活性化チューブリシンを含有する THF 溶液を加えた。急速に均質になった反応混合物を、アルゴン下で 50 分間攪拌し、2.0 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0、1.5 mL) で停止させた。得られた濁った溶液を濾過し、濾液を精製のために分取 HPLC に注入した。カラム: Waters XTerra Prep MS C18 10  $\mu\text{m}$ 、19  $\times$  250 mm; 移動相 A: 2.0 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0; 移動相 B: アセトニトリル; 方法: 1% B を 5 分間、次に 1% B から 60% B を次の 30 分間、流速 = 26 mL/分。20.75 ~ 24.50 分の画分を収集し、凍結乾燥して、EC0543 を淡黄色の綿毛状固体 (26 mg) として得た。以上の方法は、チューブリシン出発化合物の適切な選択によって、他のチューブリシン結合体を調製するためにも同様に適用可能である。

10

## 【0344】

親水性スパーサーリンカーを含むチューブリシン結合体の以下の追加の例示的な例は、チューブリシンについて本明細書に記載された方法及び合成を使用して調製した。

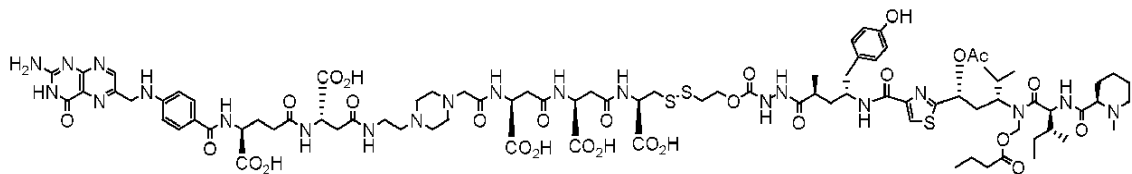
## 【化109】



20

EC0436 チューブリシンの結合体。

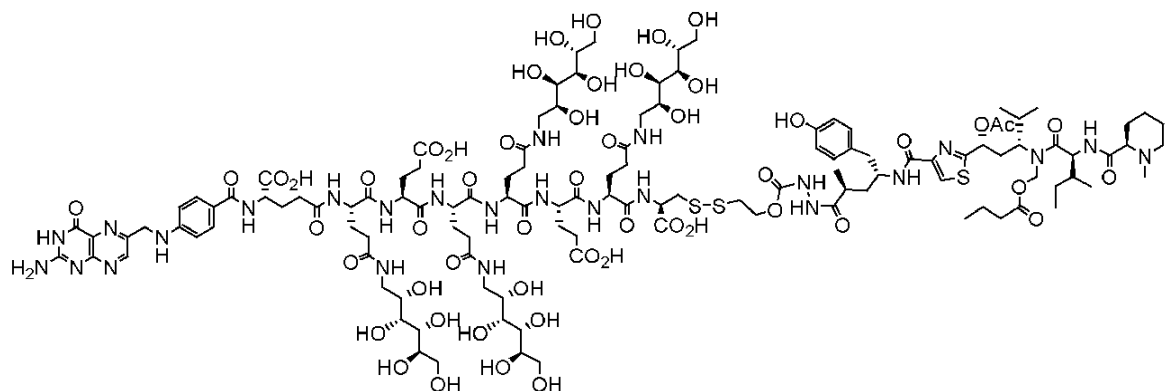
## 【化110】



30

EC0444 チューブリシンの結合体。

## 【化111】

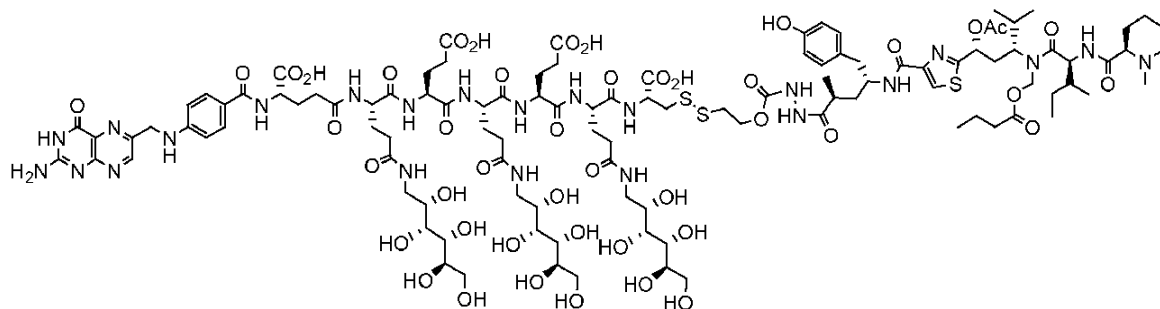


40

EC0530 チューブリシンの結合体。



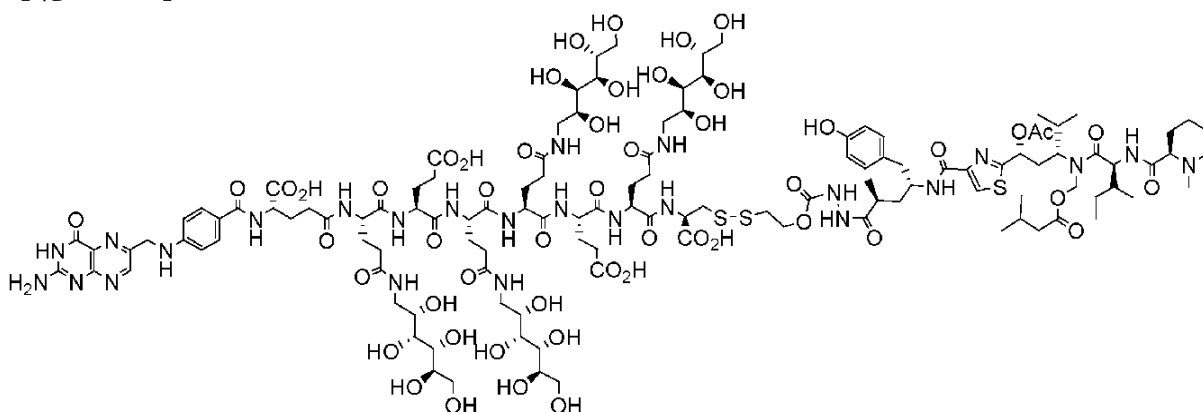
## 【化 1 1 2】



10

E C 0 5 3 1 チューブリシンの結合体。

## 【化 1 1 3】



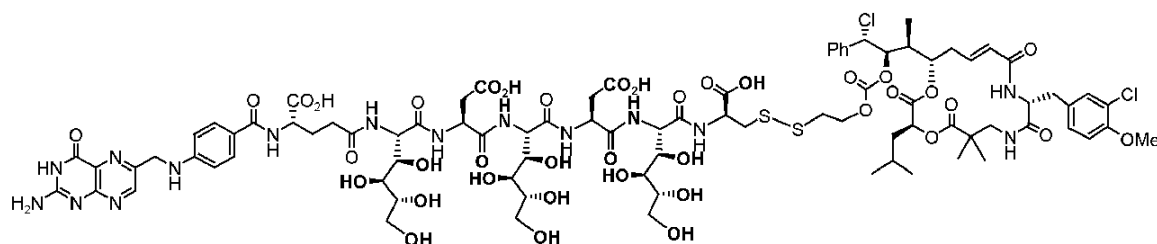
20

E C 0 5 3 3 チューブリシンの結合体。

## 【 0 3 4 5】

以下の例も本明細書に記載されているとおりに調製した。

## 【化 1 1 4】

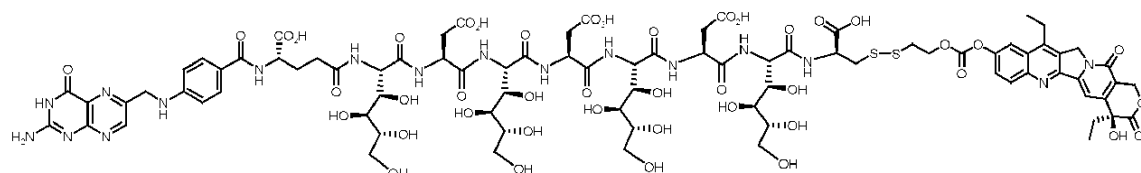


30

E C 0 2 6 2 クリプトフィシン - カーボネート -  $\text{CH}_2\text{CH}_2$  -  $\text{SS}$  - C y s - サッカロ  
 - A s p - サッカロ - A s p - サッカロ - 葉酸結合体。C 8 7 H 1 1 5 C 1 2 N 1 5 O 3  
 8 S 2 ; MW 2 1 1 3 . 9 6 ; 精密質量 : 2 1 1 1 . 6 3 。

## 【 0 3 4 6】

## 【化 1 1 5】



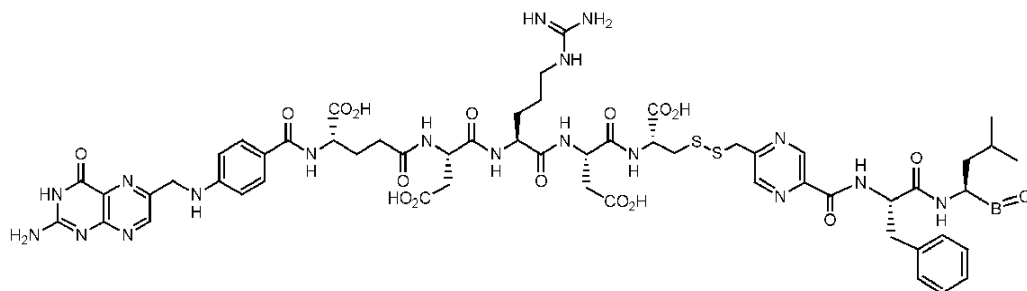
40

E C 0 2 7 8

## 【 0 3 4 7】

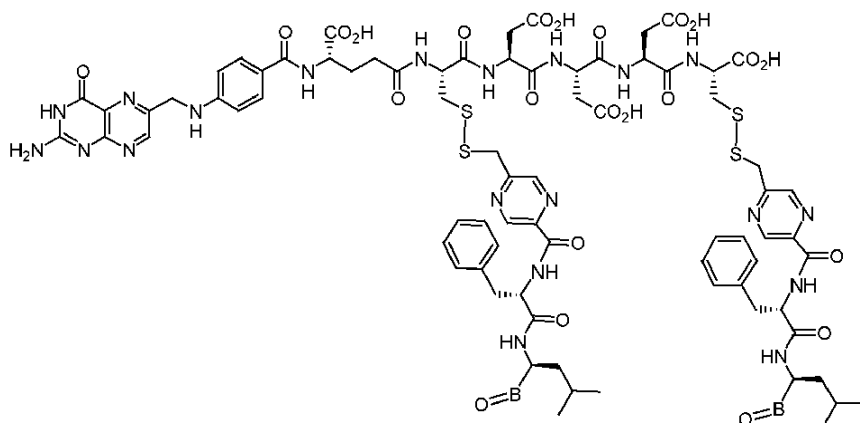
ボルテゾミブ比較例。親水性スパーリンカーを欠いているボルテゾミブ（ベルケイド）結合体（E C 0 5 2 2 及び E C 0 5 8 7）の以下の比較例も、本明細書及び米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 0 2 9 4 2 号に記載されているとおりに調製した。

## 【化 1 1 6】



EC0522 C56H69BN18O17S2、C 50.15; H 5.19; B 0.81; N 18.80; O 20.28; S 4.78、MW 1341.20、精密質量：1340.46。

## 【化 1 1 7】

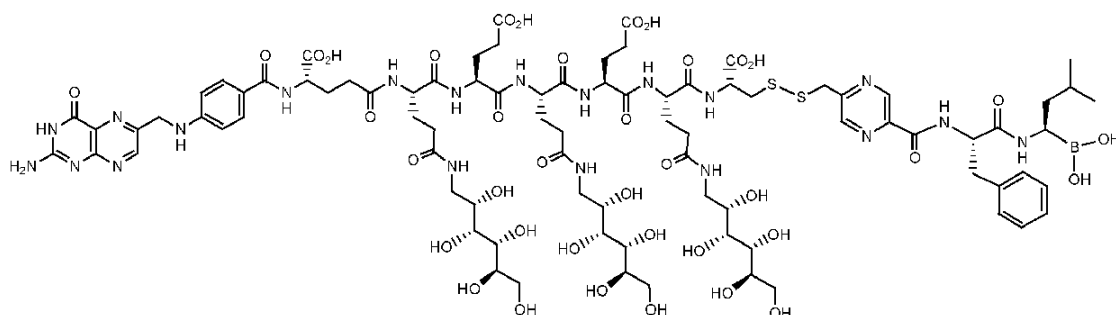


EC0587 C77H90B2N20O23S4、MW 1813.55、精密質量：1812.56。

## 【0348】

親水性スパーサーリンカーを含むボルテゾミブ結合体の以下の実施例も、本明細書に記載されているとおりに調製した。

## 【化 1 1 8】



EC0525 ボルテゾミブ（ベルケイド）の結合体。C85H119BN20O36S2、MW 2071.91、精密質量：2070.76。理論に束縛されることなく、ベルケイド結合体において、ボロン酸及びリンカーは炭水化物側鎖と分子間相互作用を形成してもよいことが理解される。例示的には、ボロン酸は1又は2つのヒドロキシル基とボロン酸エステル錯体を形成する。そのようなエステル錯体は、近接のヒドロキシルと、また1,3-ヒドロキシルと形成してもよい。ボロン酸エステル錯体を、炭水化物フラグメントの末端又は炭水化物フラグメントの内部に形成してもよいことが理解される。水溶液中では、ボロン酸エステル錯体はボロン酸と平衡であってもよいことが、更に理解される。

## 【0349】

10

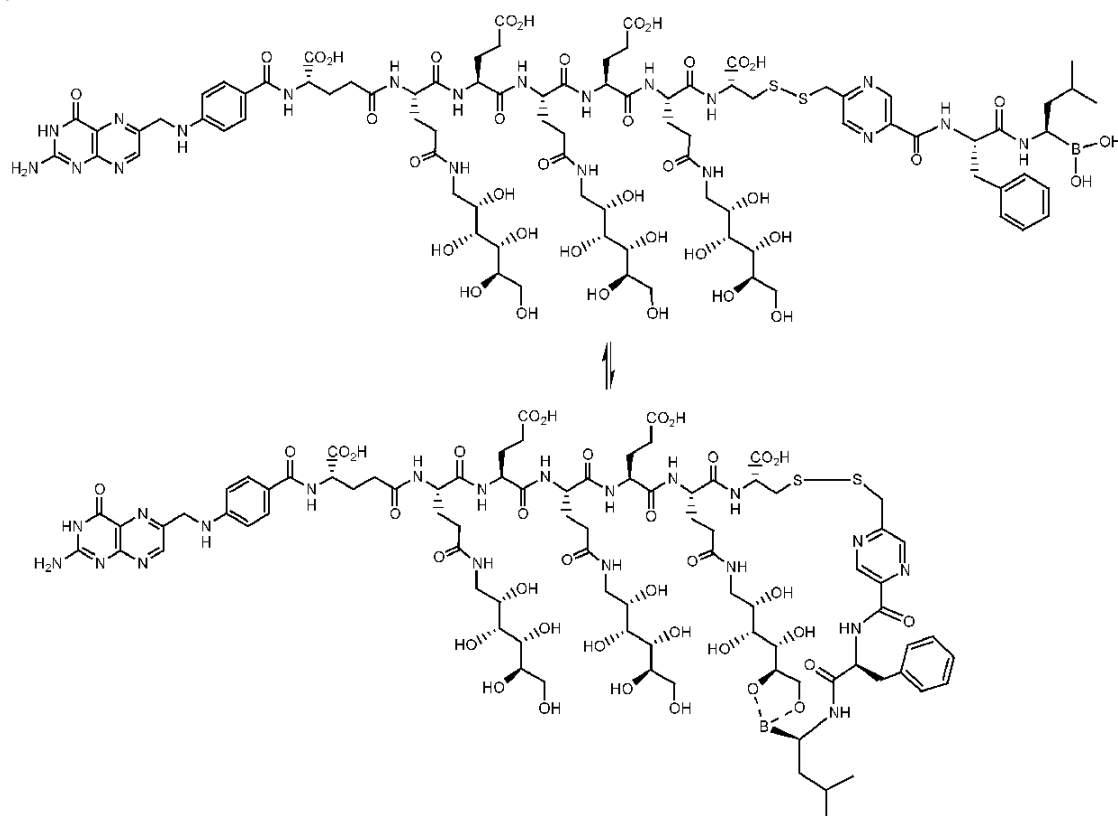
20

30

40

50

## 【化 1 1 9】



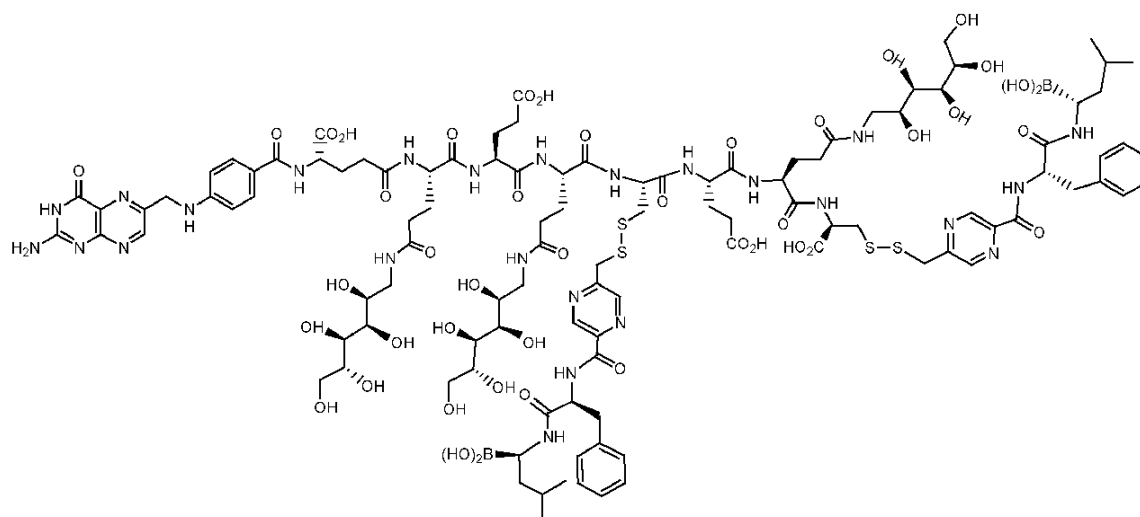
10

20

EC0525 (水和)。C<sub>85</sub>H<sub>119</sub>BN<sub>20</sub>O<sub>36</sub>S<sub>2</sub>、MW 2071.91、精密質量：2070.76；EC0525 (配位)。C<sub>85</sub>H<sub>123</sub>BN<sub>20</sub>O<sub>38</sub>S<sub>2</sub>、MW 2107.94、精密質量：2106.78。

## 【0350】

## 【化 1 2 0】



30

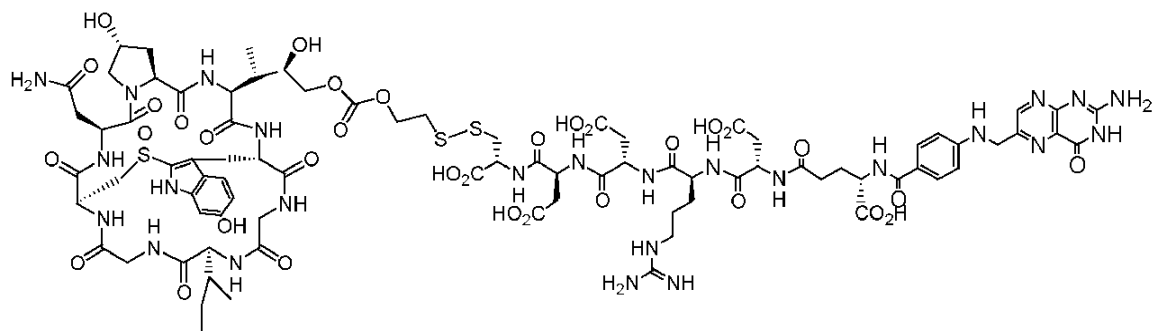
40

EC0595 ビス - ボルテゾミブ結合体。C<sub>108</sub>H<sub>145</sub>B<sub>2</sub>N<sub>25</sub>O<sub>39</sub>S<sub>4</sub>、MW 2567.34、精密質量：2565.92。

## 【0351】

アマニチン比較例。親水性スペーサーリンカーを欠いている アマニチン結合体の以下の比較例も、本明細書及び米国特許出願公開第 2005 / 0002942 号に記載されているとおりに調製した。

## 【化 1 2 1】



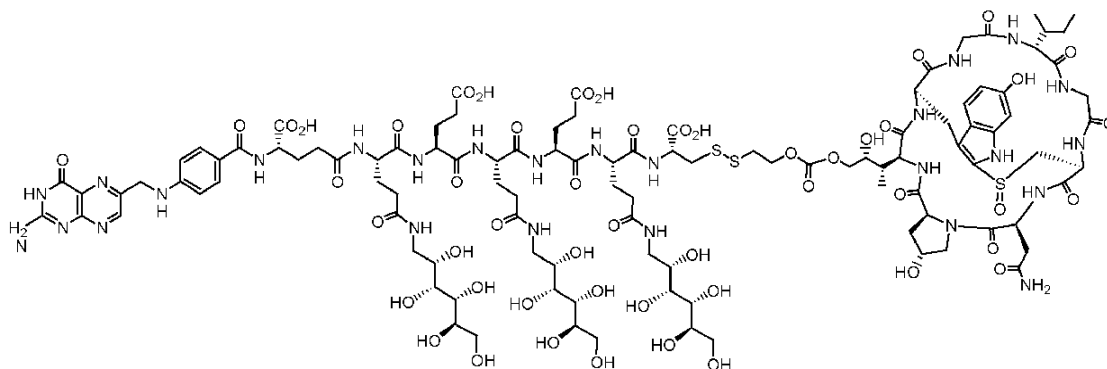
10

EC0323は、葉酸と競合せず、過剰葉酸の存在あり及びなしでも同じ $IC_{50}$ を示した。

## 【0352】

親水性スパーリンカーを含む アマニチン結合体の以下の実施例も、本明細書に記載されているとおりに調製した。

## 【化 1 2 2】



20

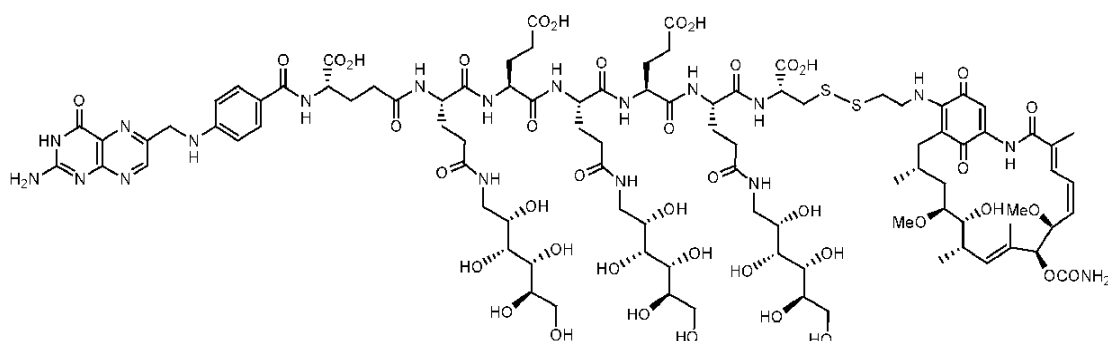
EC0592 アマニチンの結合体。 $C_{107}H_{154}N_{26}O_{50}S_3$ 、MW 2700.71、精密質量：2698.95。EC0592は、約3nMの $IC_{50}$ を示し、これは3H-チミジン組み込みアッセイにおいてKB細胞に対して過剰葉酸と競合しうる。

## 【0353】

以下の例示的な結合体の実施例を、本明細書に記載されたとおりに調製した。

30

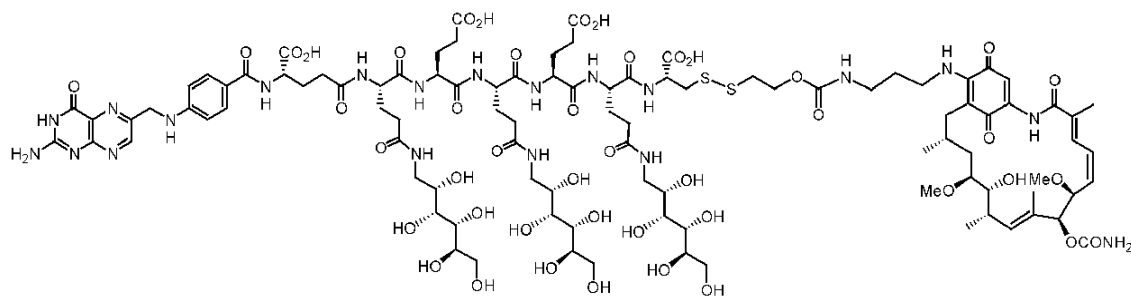
## 【化 1 2 3】



40

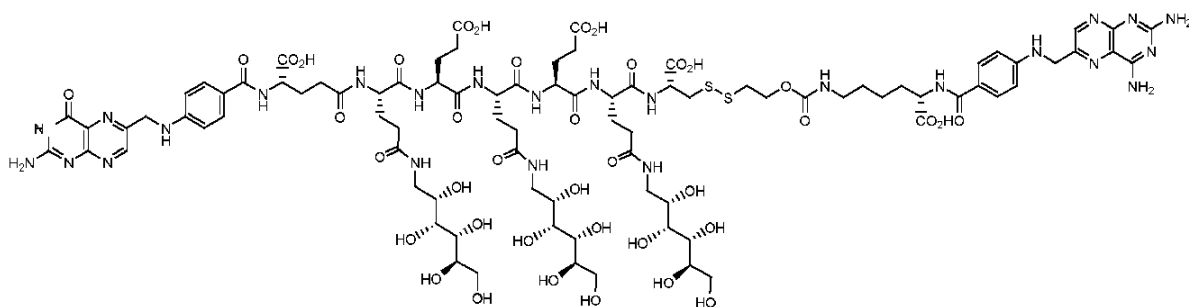
EC0535 ゲルダナマイシンの結合体。 $C_{95}H_{139}N_{19}O_{42}S_2$ 、MW 2283.35、精密質量：2281.88。

## 【化 1 2 4】



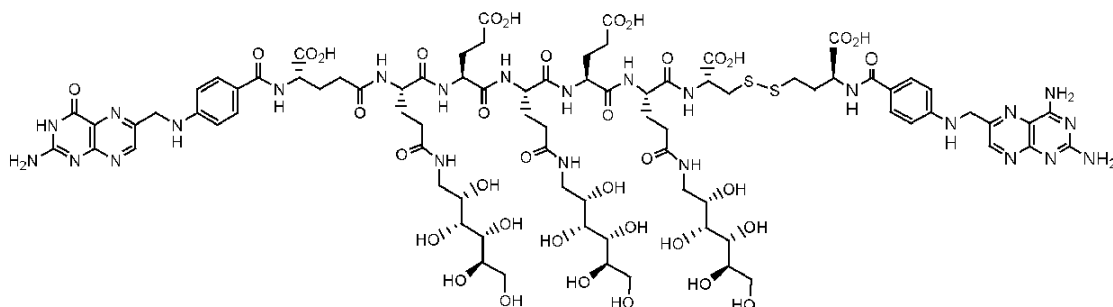
EC 0568 ゲルダナマイシンの結合体。C 99 H 146 N 20 O 44 S 2、MW 2 384 . 46、精密質量：2382 . 92。

## 【化 1 2 5】



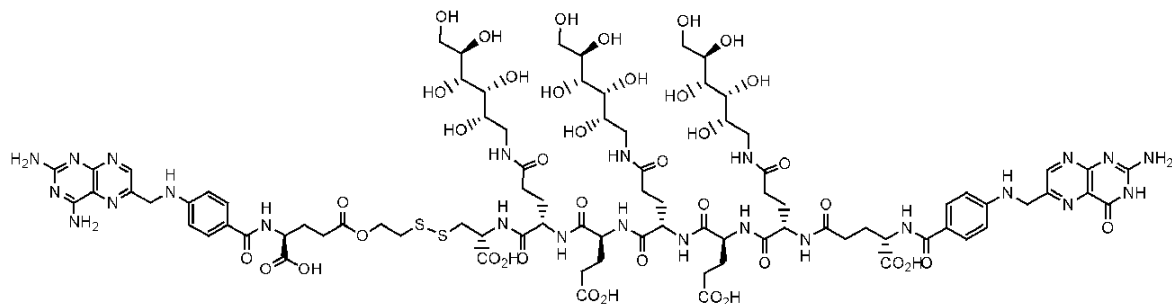
EC 0539 アミノプテリンのリシン類似体の結合体。

## 【化 1 2 6】



EC 0544 アミノプテリンのシステイン類似体の結合体。C 83 H 116 N 24 O 37 S 2、C 47 . 33 ; H 5 . 55 ; N 15 . 96 ; O 28 . 11 ; S 3 . 05、MW 2106 . 08、精密質量：2104 . 74。

## 【化 1 2 7】



EC 0551 アミノプテリンの結合体。C 86 H 120 N 24 O 39 S 2、C 47 . 42 ; H 5 . 55 ; N 15 . 43 ; O 28 . 65 ; S 2 . 94、MW 2178 . 14、精密質量：2176 . 76。

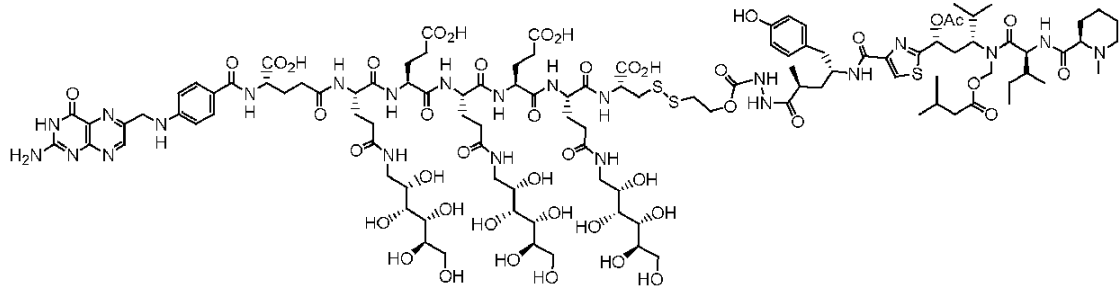
## 【0354】

20

30

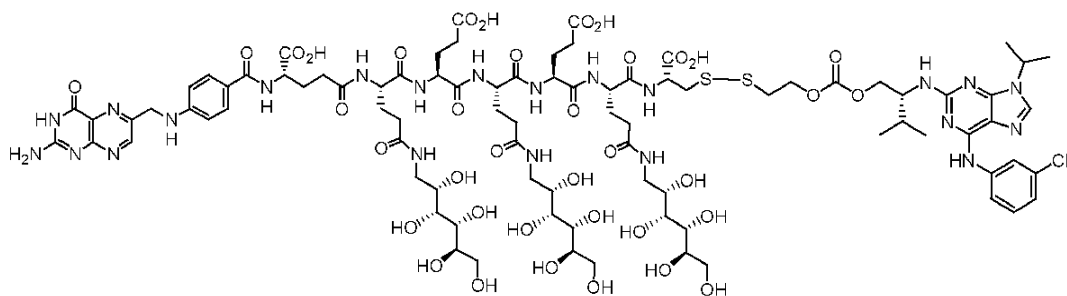
40

## 【化 1 2 8】



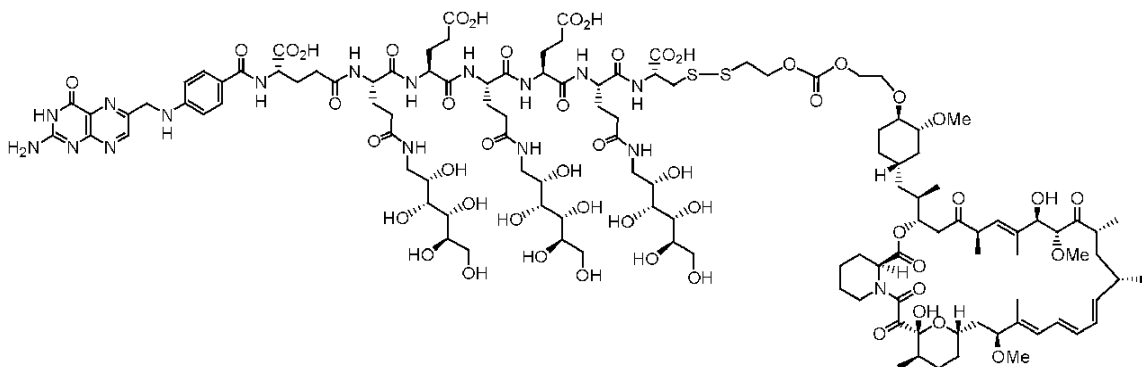
EC 0543 チュープリシン A の結合体。C 111 H 167 N 23 O 45 S 3、C 5 10  
0.50; H 6.38; N 12.20; O 27.27; S 3.64、MW 26  
39.84、 $m/z$ : 2639.07 (100.0%)、2638.06 (80.8%)  
、2640.07 (79.6%)。

## 【化 1 2 9】



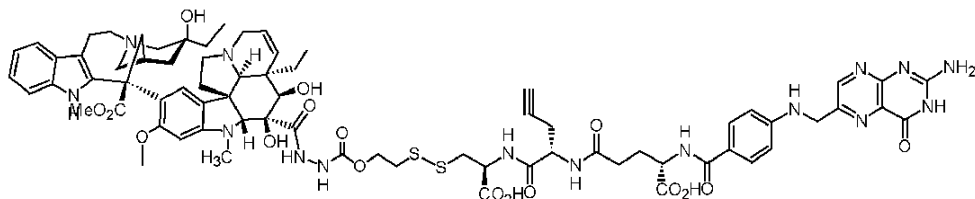
EC 0545 プルバラノール A の結合体。C 87 H 125 C 1 N 22 O 37 S 2、MW  
2170.636、精密質量: 2168.77。

## 【化 1 3 0】



EC 0565 エペロリムスの結合体。C 121 H 183 N 17 O 50 S 2、MW 27  
39.96; 精密質量: 2738.17。

## 【化 1 3 1】



DAVLBH の結合体。

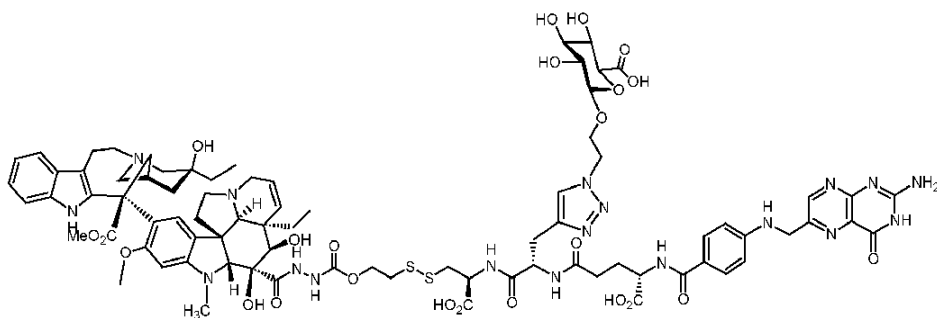
10

20

30

40

## 【化 1 3 2】

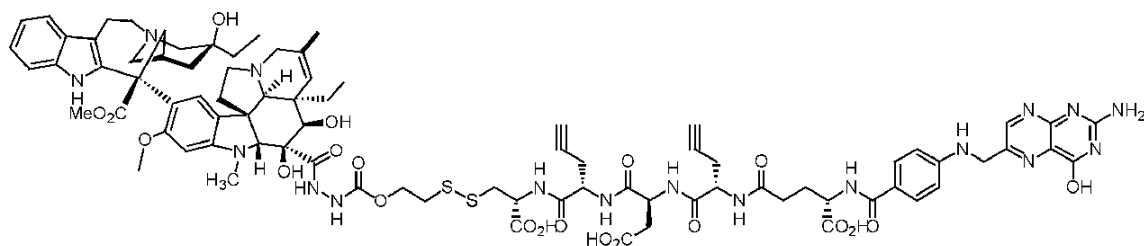


10

EC0400 DAVLBHの結合体。対応するアルキン及びアジドエチル炭水化物；2当量のアスコルビン酸ナトリウム、1当量の $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、THF / 水 (1 : 1)；5当量のアスコルビン酸ナトリウム、2.5当量の $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、THF / 水 (9 : 1)；(10mg)のHuisgen環化により調製。 $\text{C}_{81}\text{H}_{100}\text{N}_{18}\text{O}_{24}\text{S}_2$ 、 $\text{C} \ 54.84$ ； $\text{H} \ 5.68$ ； $\text{N} \ 14.21$ ； $\text{O} \ 21.65$ ； $\text{S} \ 3.62$ 、 $\text{MW} \ 1773.90$ 、精密質量：1772.66。

## 【0355】

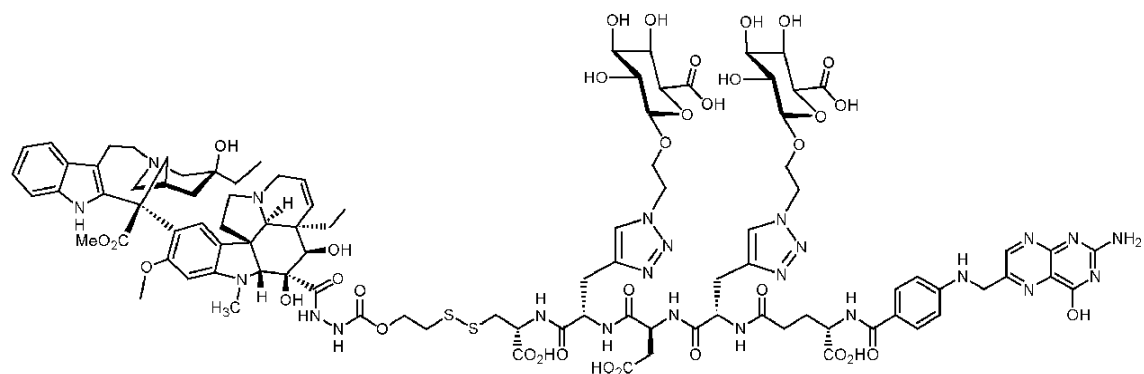
## 【化 1 3 3】



20

DAVLBHの結合体。EC0419から調製。 $\text{C}_{82}\text{H}_{97}\text{N}_{17}\text{O}_{21}\text{S}_2$ 、 $\text{MW} \ 1720.88$ 、精密質量：1719.65。(90mg)。

## 【化 1 3 4】

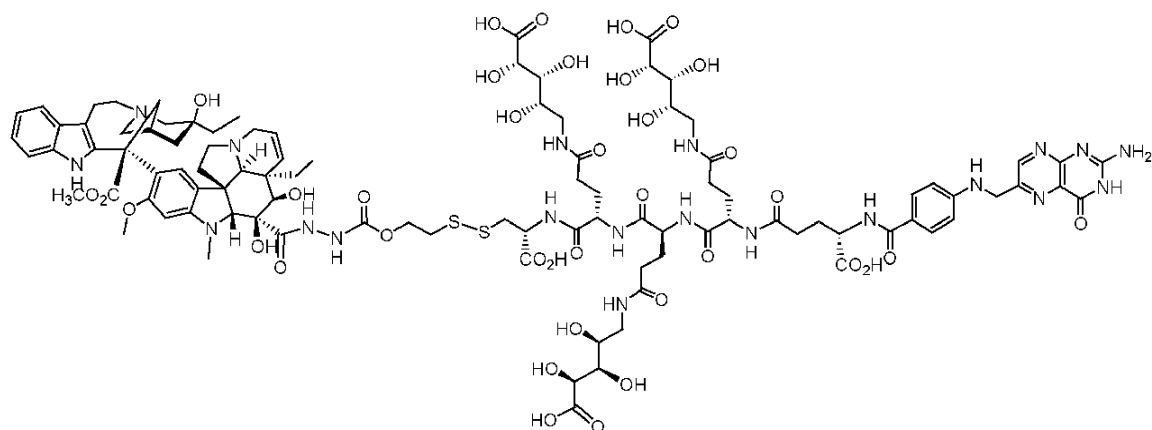


30

EC0423 DAVLBHの結合体。Huisgen環化により調製； $\text{C}_{98}\text{H}_{123}\text{N}_{23}\text{O}_{35}\text{S}_2$ 、 $\text{C} \ 52.38$ ； $\text{H} \ 5.52$ ； $\text{N} \ 14.34$ ； $\text{O} \ 24.92$ ； $\text{S} \ 2.85$ 、 $\text{MW} \ 2247.29$ 、精密質量：2245.80。

40

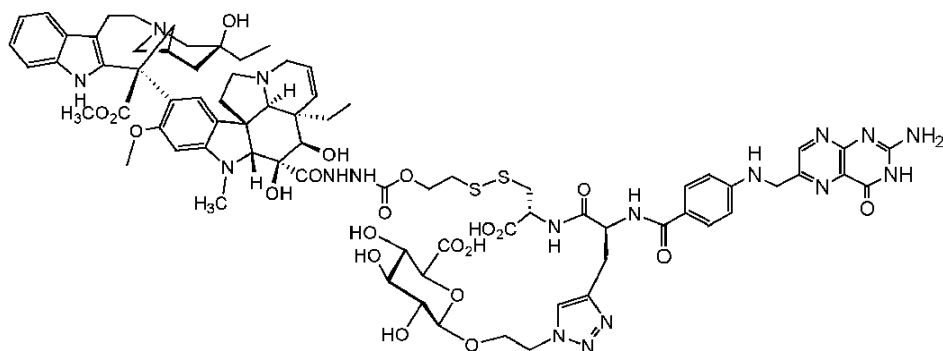
## 【化 1 3 5】



10

EC0637 DAVLBHの結合体。C<sub>98</sub>H<sub>130</sub>N<sub>20</sub>O<sub>37</sub>S<sub>2</sub>、MW 2244.32、精密質量：2242.83。

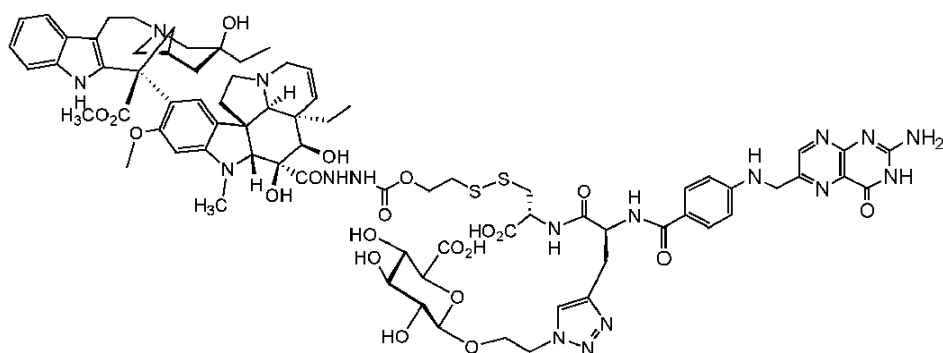
## 【化 1 3 6】



20

DAVLBHの結合体。

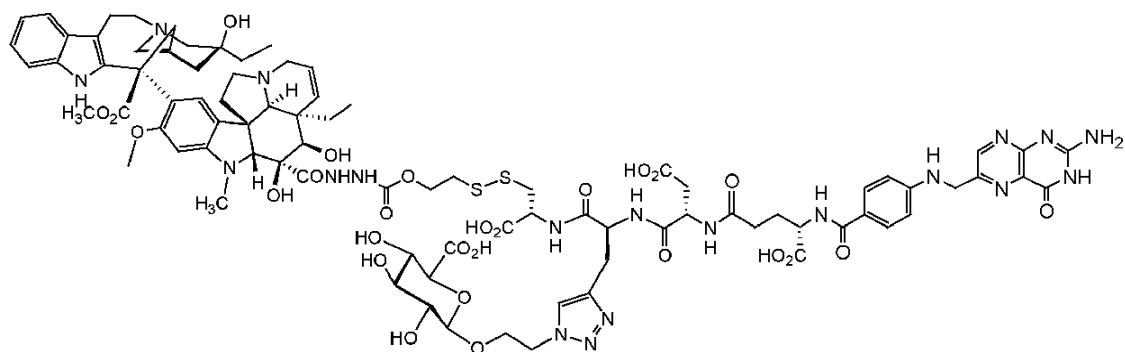
## 【化 1 3 7】



30

DAVLBHの結合体。

## 【化 1 3 8】



40

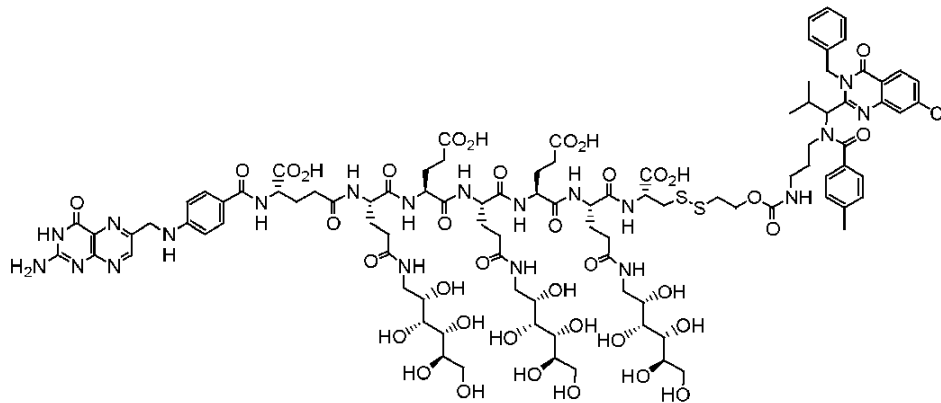
50



D A V L B H の結合体。

【 0 3 5 6 】

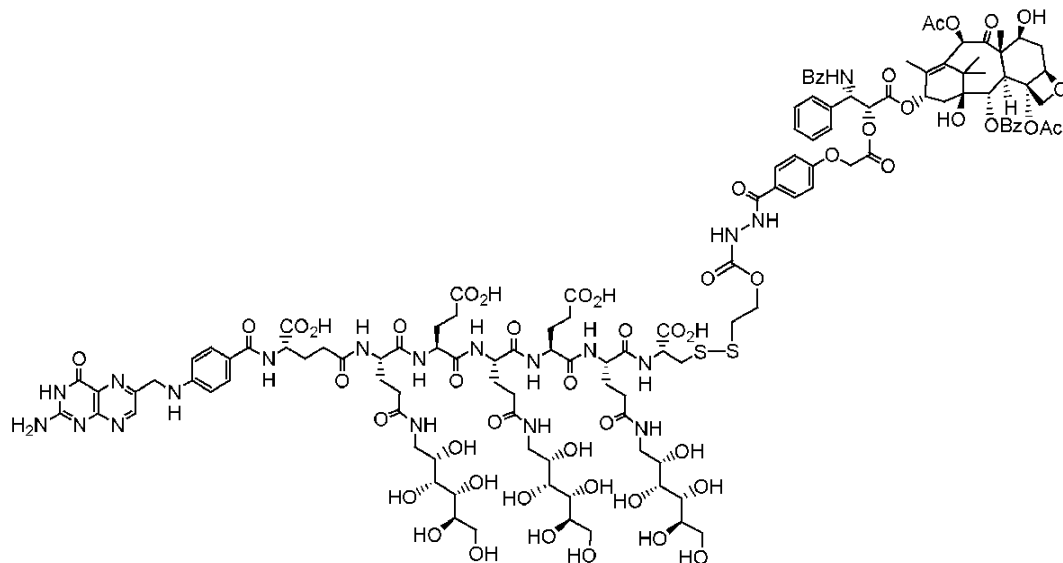
【 化 1 3 9 】



10

E C 0 5 8 1 イスピネシブの結合体。C 9 8 H 1 3 3 C 1 N 2 0 O 3 8 S 2、MW 2 2 9 8 . 8 0、精密質量：2 2 9 6 . 8 2。

【 化 1 4 0 】

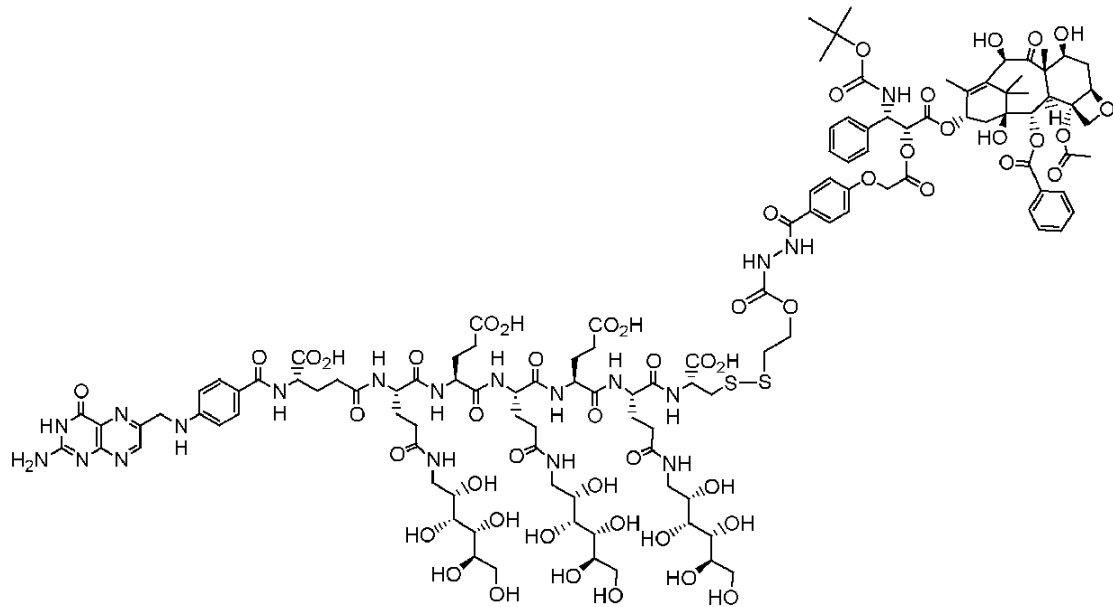


20

30

E C 0 5 6 1 パクリタセキルの結合体。C 1 2 4 H 1 5 9 N 1 9 O 5 3 S 2、MW 2 8 2 7 . 8 2 ; 精密質量：2 8 2 5 . 9 8。

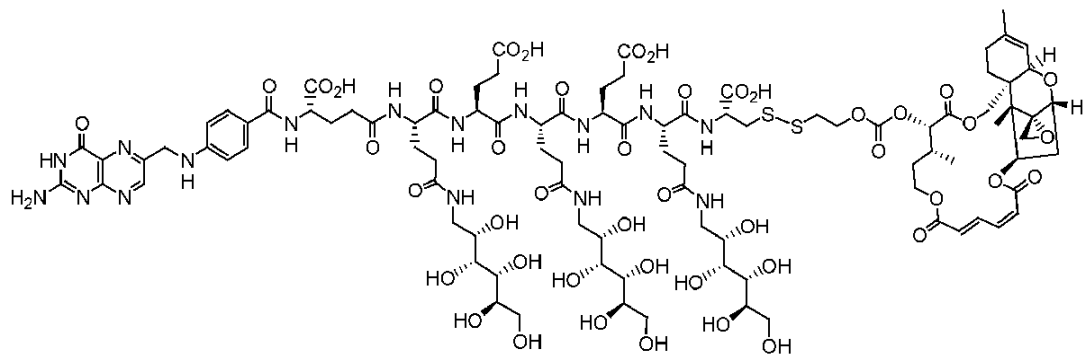
## 【化 1 4 1】



10

EC 0594 ドセタキセルンの結合体。C 120 H 161 N 19 O 53 S 2、MW 2781.79；精密質量：2779.99。

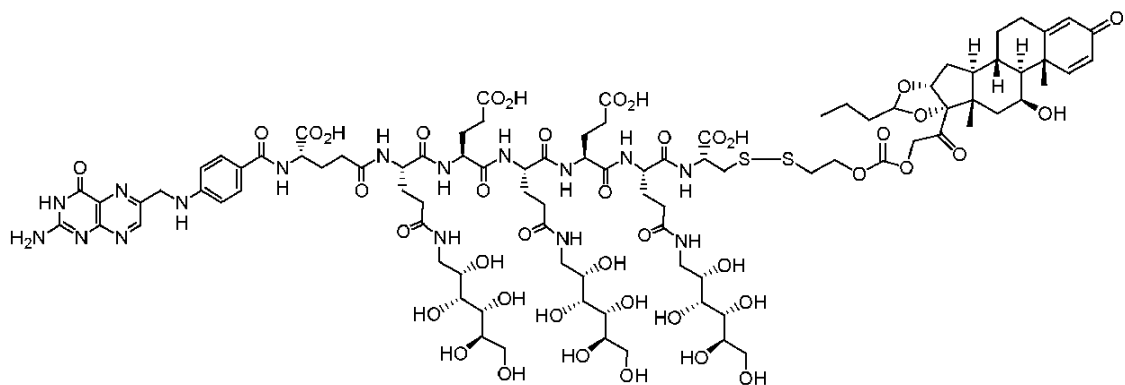
## 【化 1 4 2】



20

EC 0598 ベルカリンの結合体。C 95 H 134 N 16 O 45 S 2、MW 2284.29、精密質量：2282.81。

## 【化 1 4 3】

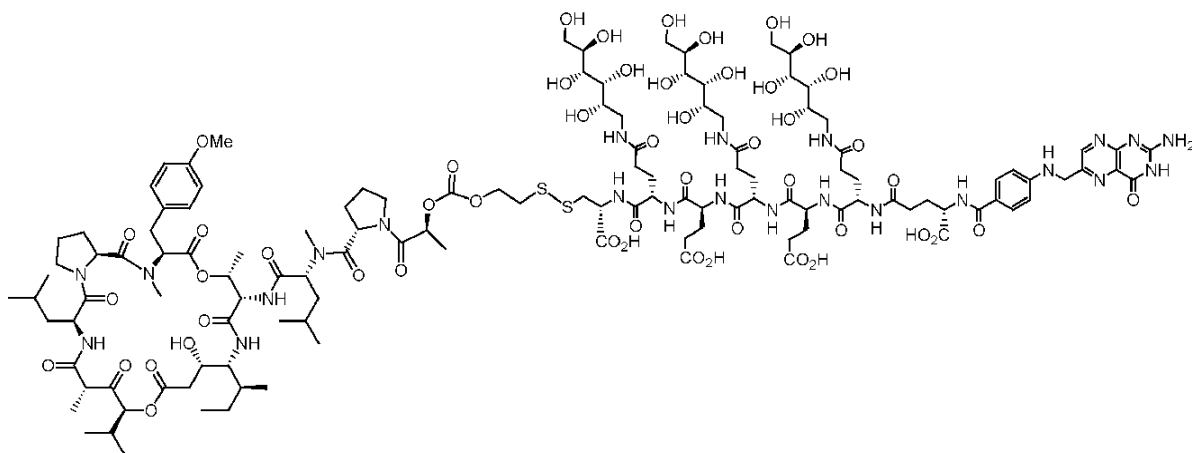


30

EC 0600 ブデソニドの結合体。C 93 H 134 N 16 O 42 S 2、C 50.49；H 6.11；N 10.13；O 30.37；S 2.90、MW 2212.27、精密質量：2210.83。

40

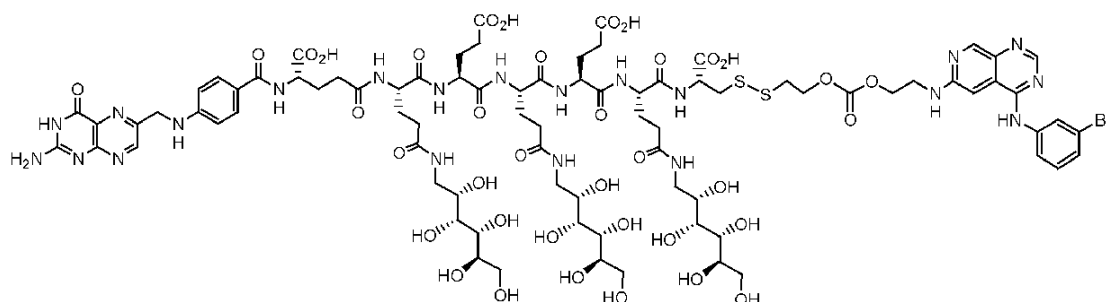
## 【化 1 4 4】



10

EC0610 ジデムニンBの結合体。C<sub>125</sub>H<sub>189</sub>N<sub>23</sub>O<sub>51</sub>S<sub>2</sub>、MW 2894.09；精密質量：2892.23。

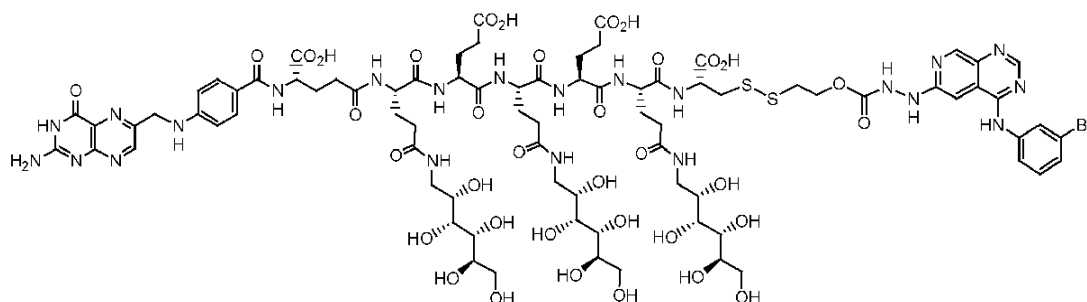
## 【化 1 4 5】



20

EC0631 チロシンキナーゼインヒビターである4-[(3-プロモフェニル)アミノ]-6-[(2-ヒドロキシエチル)-アミノ]-ピリド[3,4-d]ピリミジンの結合体、C<sub>83</sub>H<sub>114</sub>BrN<sub>21</sub>O<sub>37</sub>S<sub>2</sub>、MW 2141.95、精密質量：2139.63。

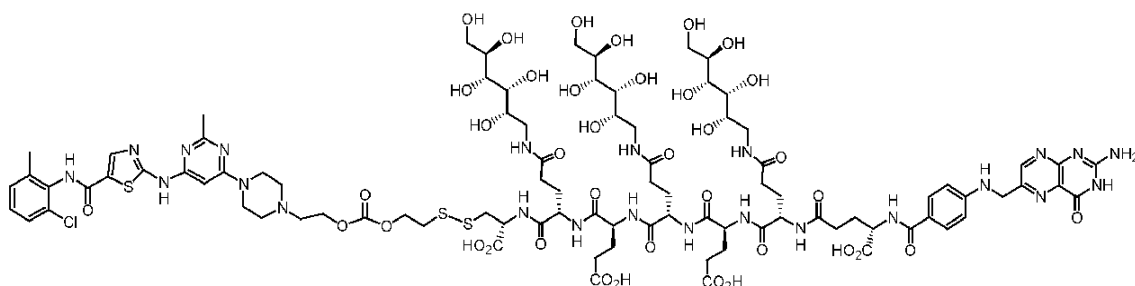
## 【化 1 4 6】



30

EC0640：4-[(3-プロモフェニル)アミノ]-6-ヒドラジノ-ピリド[3,4-d]ピリミジンの結合体。

## 【化 1 4 7】



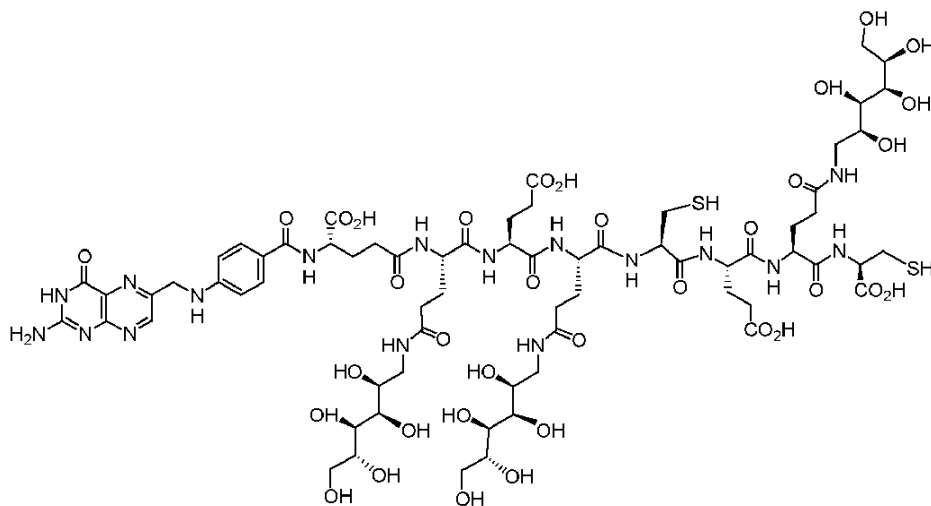
40

EC0663 ダサチニブの結合体。C<sub>90</sub>H<sub>126</sub>ClN<sub>23</sub>O<sub>38</sub>S<sub>3</sub>、MW 2269.74、精密質量：2267.75。

50

【 0 3 5 7 】

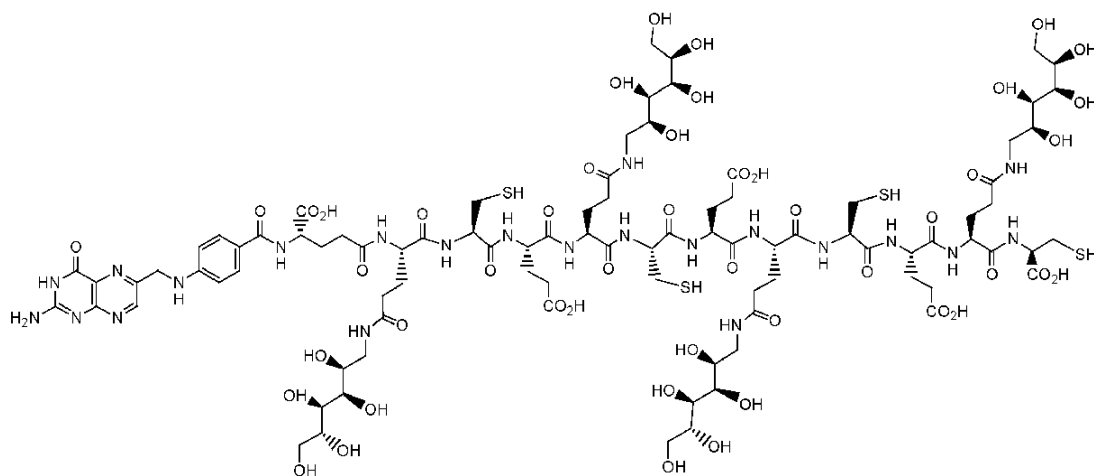
【 化 1 4 8 】



10

EC 0593 2つの薬剤のための多剤中間体。C<sub>68</sub>H<sub>103</sub>N<sub>17</sub>O<sub>35</sub>S<sub>2</sub>、MW 1782.77、精密質量：1781.62。

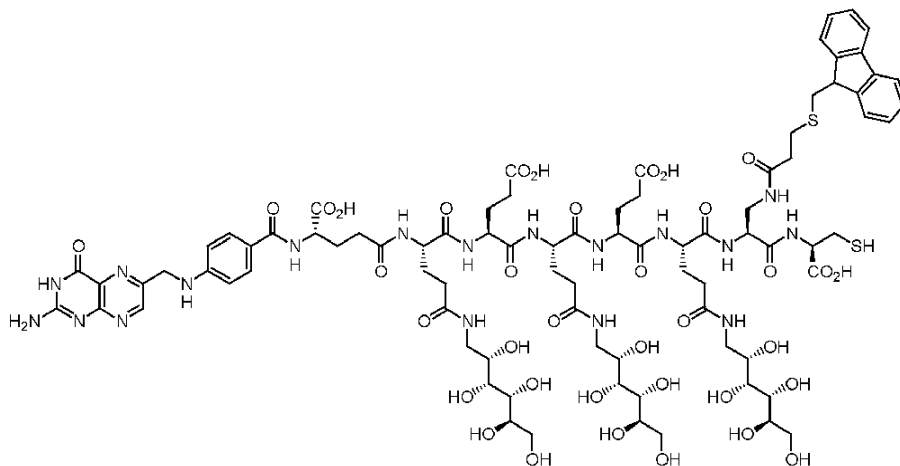
【 化 1 4 9 】



20

EC 0613 3つの薬剤のための多剤中間体。C<sub>90</sub>H<sub>140</sub>N<sub>22</sub>O<sub>47</sub>S<sub>2</sub>、MW 2410.45、精密質量：2408.81。

【 化 1 5 0 】



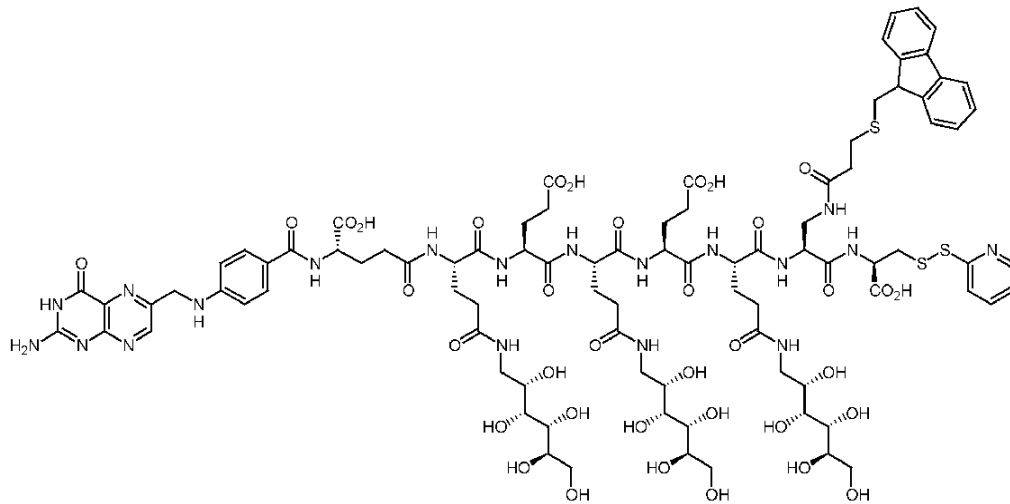
40

EC 0542 2つの薬剤のために任意に選択した多剤中間体。C<sub>85</sub>H<sub>118</sub>N<sub>18</sub>O<sub>36</sub>S<sub>2</sub>、C 50.24；H 5.85；N 12.41；O 28.34；S 3.50

50

16、MW 2032.08、精密質量：2030.74。

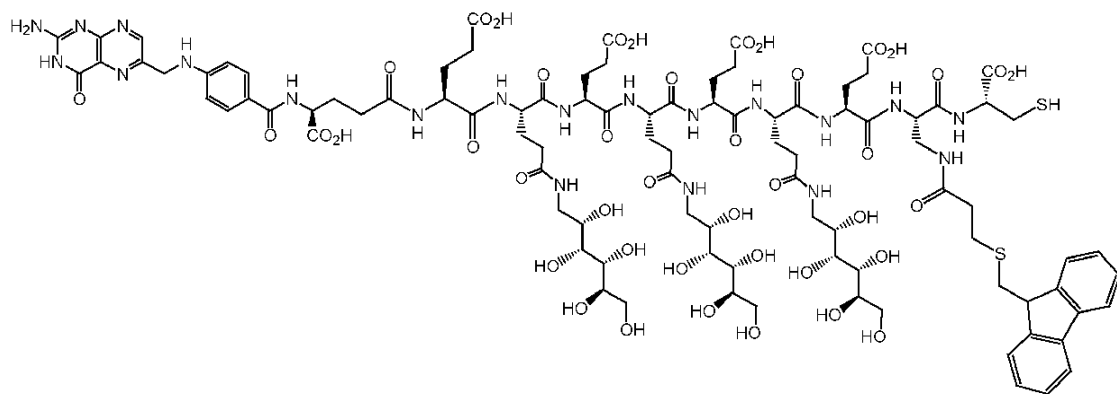
【化151】



10

EC0559 2つの薬剤のために任意に選択した多剤中間体。C<sub>90</sub>H<sub>121</sub>N<sub>19</sub>O<sub>36</sub>S<sub>3</sub>、MW 2141.22、精密質量：2139.74。

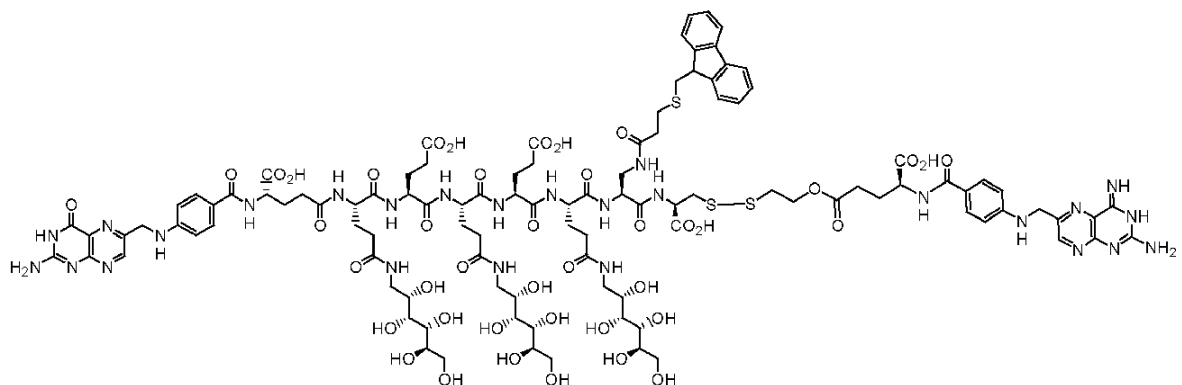
【化152】



20

EC0682 2つの薬剤のために任意に選択した多剤中間体。C<sub>95</sub>H<sub>132</sub>N<sub>20</sub>O<sub>42</sub>S<sub>2</sub>、MW 2290.30、精密質量：2288.82。

【化153】



30

EC0646 アミノプテリンと多剤結合体用の中間体との結合体。C<sub>106</sub>H<sub>140</sub>N<sub>26</sub>O<sub>41</sub>S<sub>3</sub>、MW 2530.59、精密質量：2528.88。

【0358】

40

[illegible]

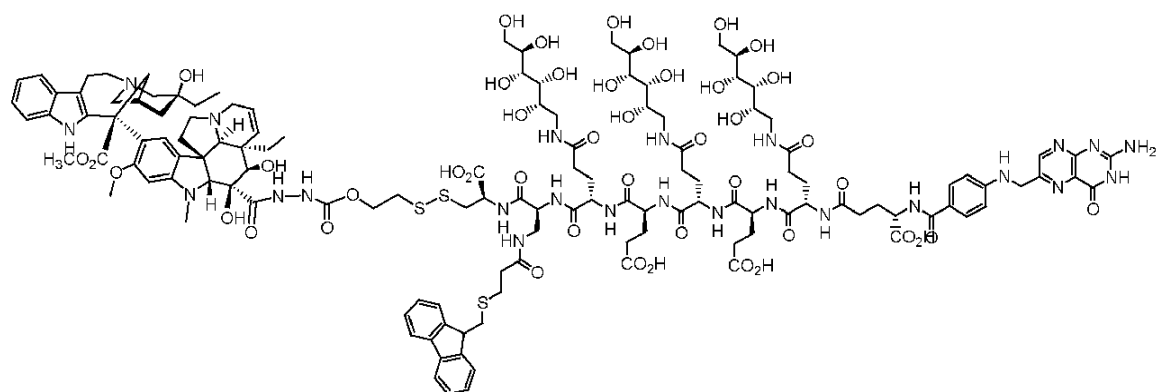
10

20

[illegible]

30

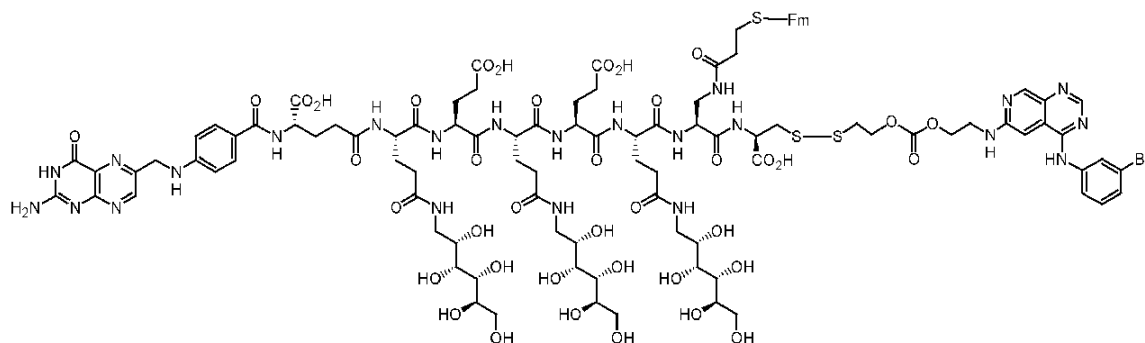
【化 1 5 6】



40

EC0633 DAVLBHと多剤結合体用の中間体との結合体。C131H176N24O45S3、MW 2903.13、精密質量：2901.14。

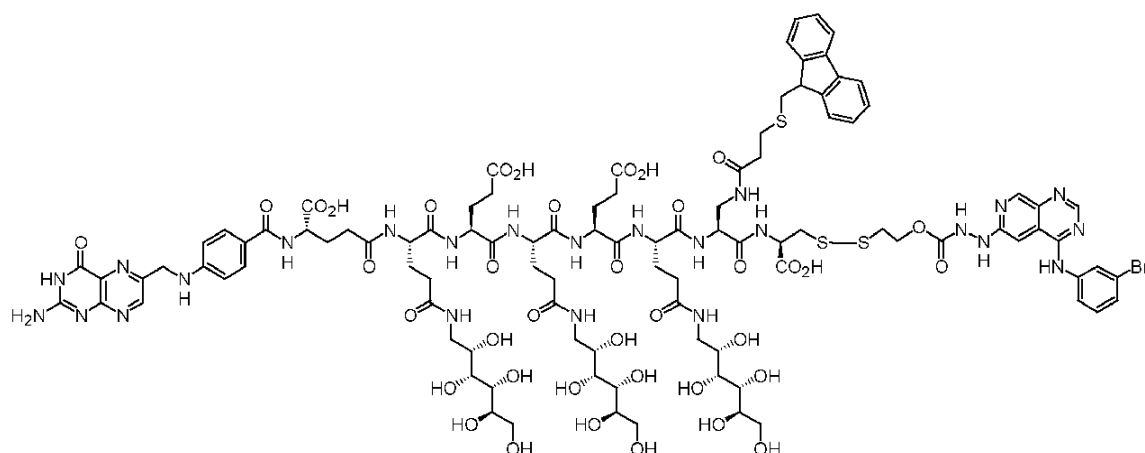
## 【化 1 5 7】



10

EC0661 4 - [ ( 3 - プロモフェニル ) アミノ ] - 6 - アミノ - ピリド [ 3 , 4 - d ] ピリミジンと多剤結合体用の中間体との結合体。C145H209BrN24O55S4、MW 3376.51、精密質量：3373.24。

## 【化 1 5 8】

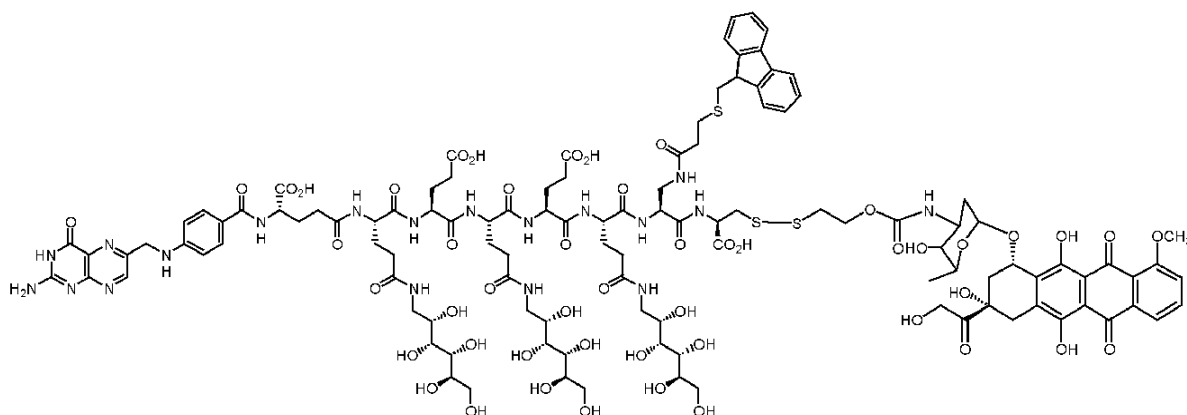


20

EC0679 4 - [ ( 3 - プロモフェニル ) アミノ ] - 6 - ヒドラジノ - ピリド [ 3 , 4 - d ] ピリミジンと多剤結合体用の中間体との結合体。C101H131BrN24O38S3、MW 2465.36、精密質量：2462.74。

30

## 【化 1 5 9】

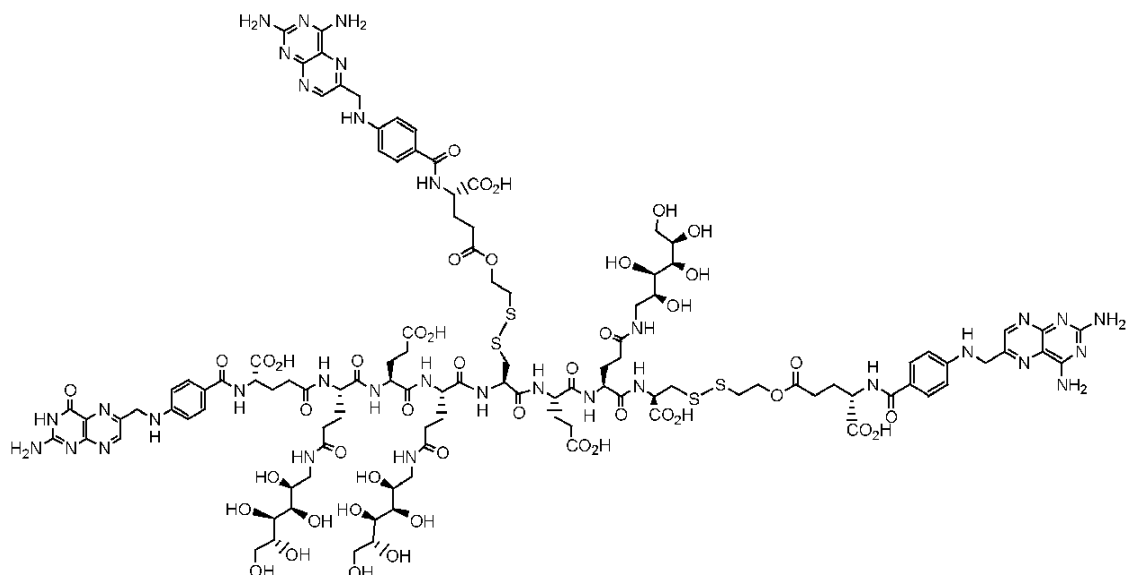


40

EC0693 ドキソルピシンと多剤結合体用の中間体との結合体。C115H149N19O49S3、MW 2677.71；精密質量：2675.89。

## 【 0 3 5 9】

## 【化 1 6 0】

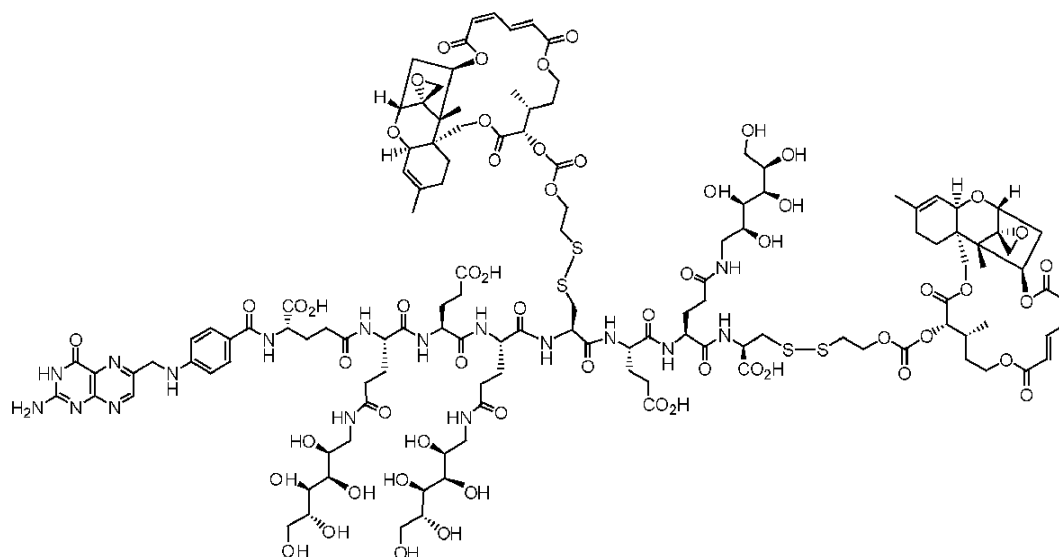


10

EC 0647 ビスアミノプテリン結合体。C 110 H 147 N 33 O 45 S 4、MW 2779.80、精密質量：2777.9112、 $m/z$ ：2778.91(100.0%)、2777.91(74.4%)、2779.92(62.2%)。

20

## 【化 1 6 1】

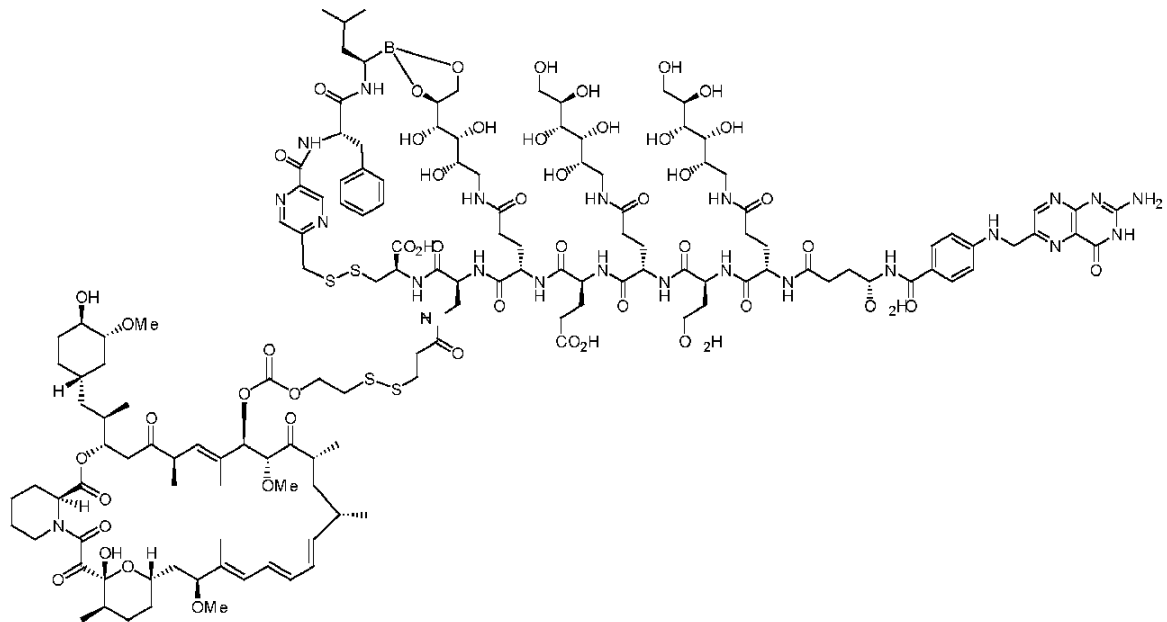


30

EC 0605 ビス - ペルカリン結合体。



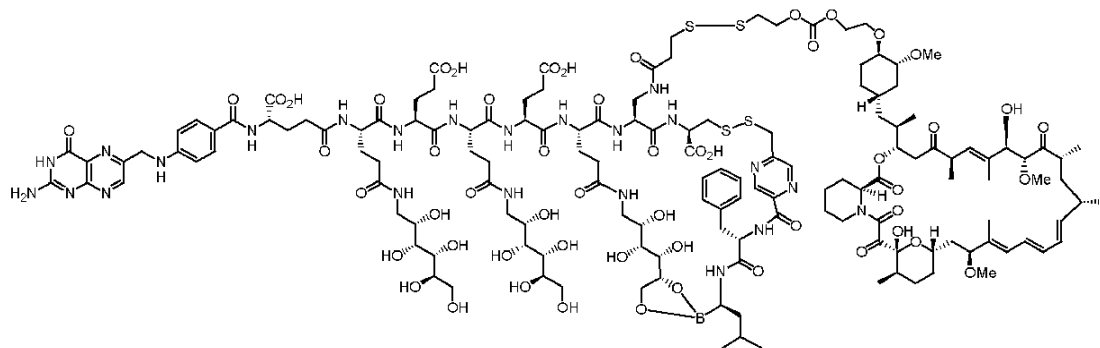
## 【化 1 6 2】



10

E C 0 5 6 3 ポルテゾミブ及びラパマイシンの結合体。

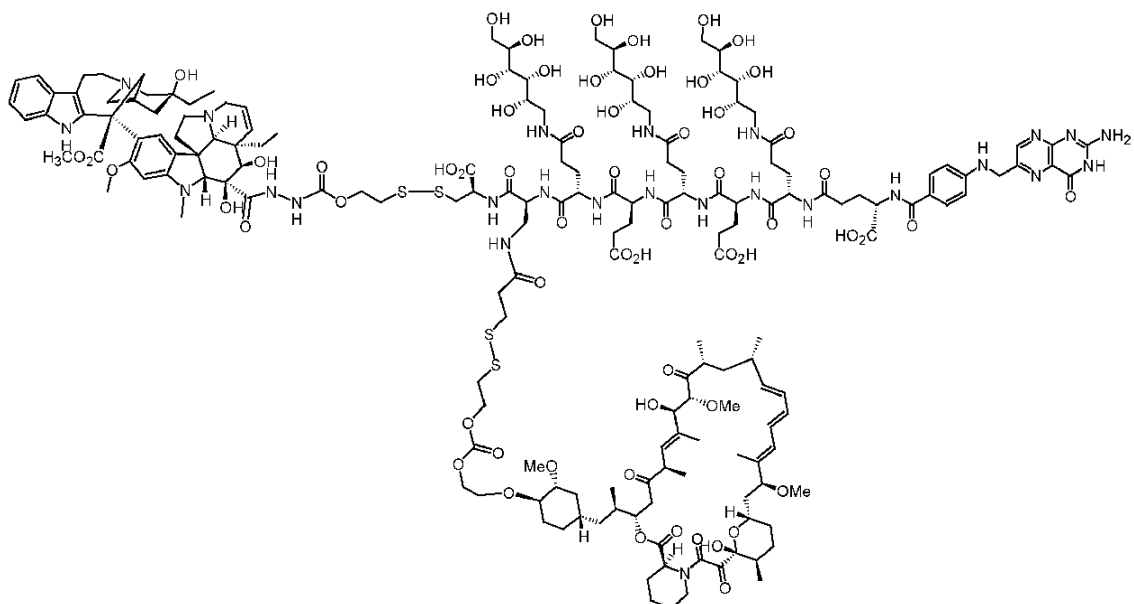
## 【化 1 6 3】



20

E C 0 5 8 2 ポルテゾミブ及びエベロリムスの結合体。C 1 4 7 H 2 1 4 B N 2 3 O 5  
4 S 4、C 5 3 . 4 0 ; H 6 . 5 2 ; B 0 . 3 3 ; N 9 . 7 4 ; O 2 6 . 1 3  
; S 3 . 8 8、MW 3 3 0 6 . 4 7、精密質量：3 3 0 4 . 3 7。

## 【化 1 6 4】

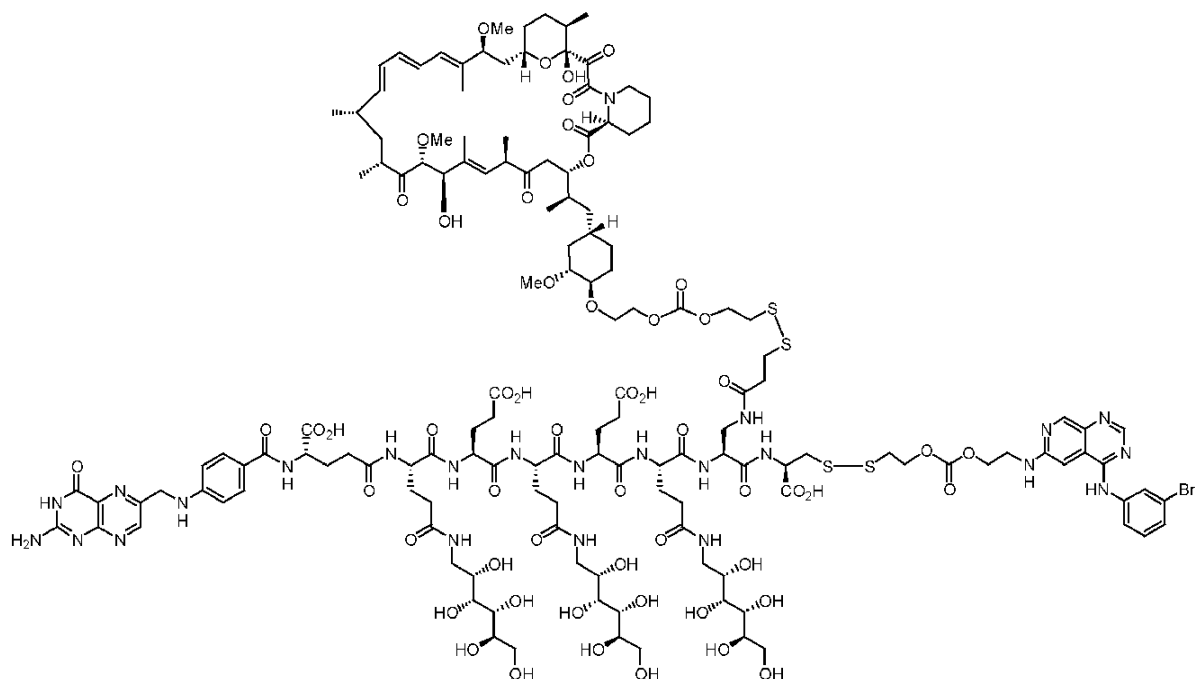


30

40

50

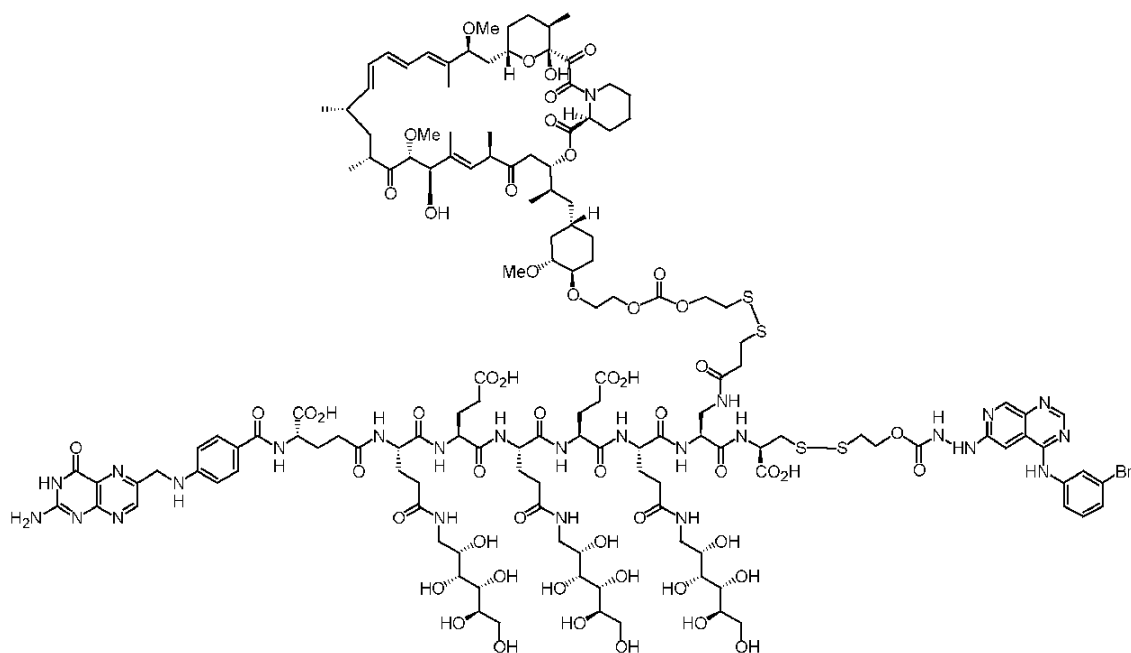
EC0636 DAVLBH及びエベロリムスの結合体。C<sub>173</sub>H<sub>251</sub>N<sub>25</sub>O<sub>61</sub>S<sub>4</sub>、MW 3785.23、精密質量：3782.62。  
【化165】



10

20

EC0664 エベロリムス及び4 - [ ( 3 - ブロモフェニル ) アミノ ] - 6 - アミノ - ピリド [ 3 , 4 - d ] ピリミジンの結合体。C<sub>145</sub>H<sub>209</sub>BrN<sub>24</sub>O<sub>55</sub>S<sub>4</sub>、MW 3376.51、精密質量：3373.24。  
【化166】

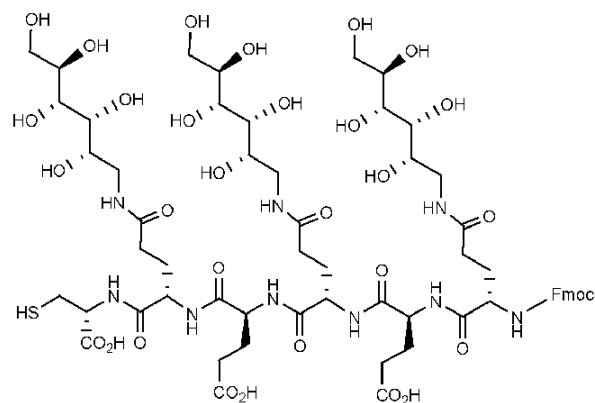


30

40

EC0680 エベロリムス及び4 - [ ( 3 - ブロモフェニル ) アミノ ] - 6 - ヒドラジノ - ピリド [ 3 , 4 - d ] ピリミジンの結合体。C<sub>143</sub>H<sub>206</sub>BrN<sub>25</sub>O<sub>54</sub>S<sub>4</sub>、MW 3347.47、精密質量：3344.22。  
【0360】

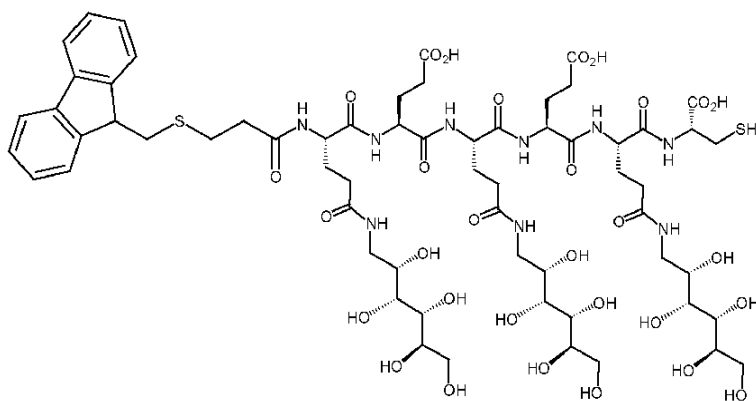
## 【化 1 6 7】



10

EC 0584 任意の非標的送達用の中間体。C<sub>61</sub>H<sub>91</sub>N<sub>9</sub>O<sub>31</sub>S、MW 1478.48、精密質量：1477.55。

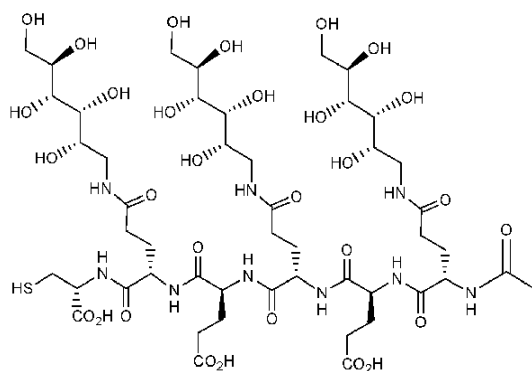
## 【化 1 6 8】



20

EC 0634 任意の非標的送達用の中間体。C<sub>63</sub>H<sub>95</sub>N<sub>9</sub>O<sub>30</sub>S<sub>2</sub>、MW 1522.60、精密質量：1521.56。

## 【化 1 6 9】

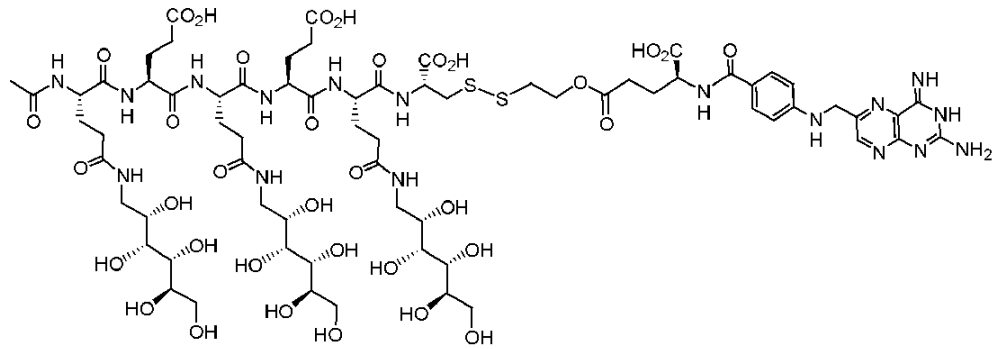


30

EC 0586 任意の非標的送達用の中間体。C<sub>48</sub>H<sub>83</sub>N<sub>9</sub>O<sub>30</sub>S、MW 1298.28、精密質量：1297.50。

40

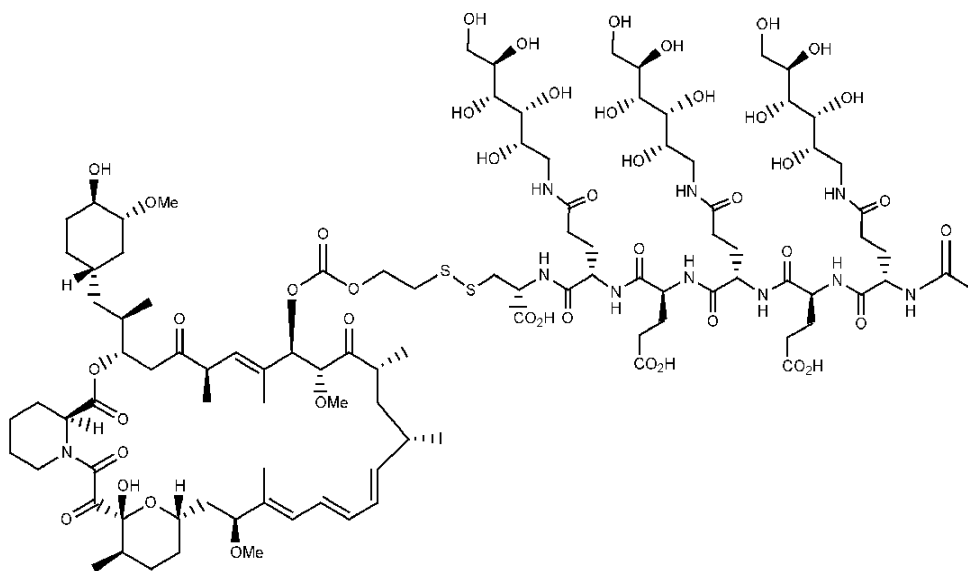
## 【化 170】



10

EC0588 任意の非標的送達用のアミノペプチン結合体の中間体。C<sub>69</sub>H<sub>105</sub>N<sub>17</sub>O<sub>35</sub>S<sub>2</sub>、MW 1796.79、精密質量：1795.64。

## 【化 171】

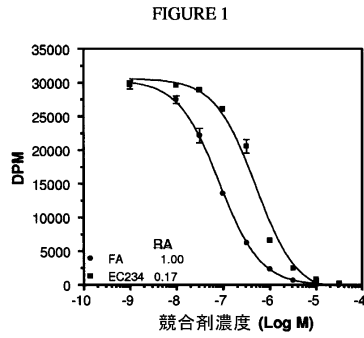


20

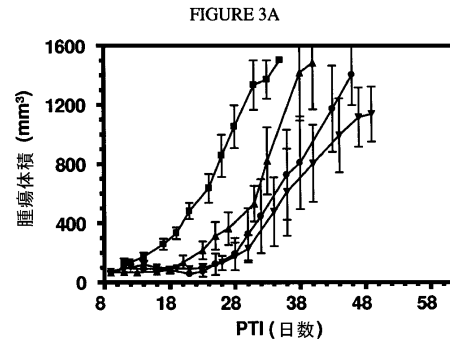
EC0591 任意の非標的送達用のラパマイン結合体の中間体。C<sub>102</sub>H<sub>164</sub>N<sub>10</sub>O<sub>45</sub>S<sub>2</sub>、C 52.93；H 7.14；N 6.05；O 31.11；S 2.77、MW 2314.57、精密質量：2313.03。

30

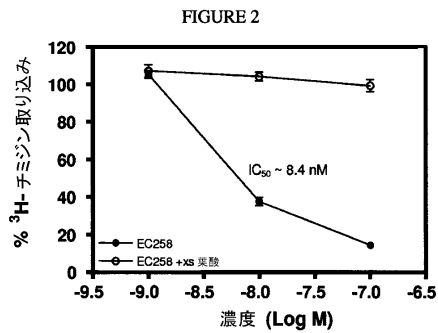
【図 1】



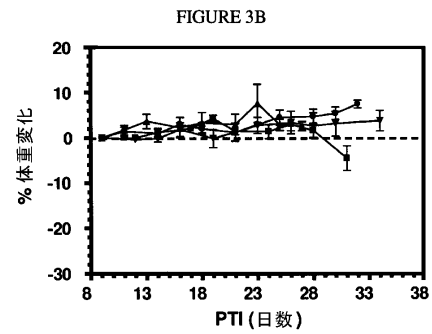
【図 3 A】



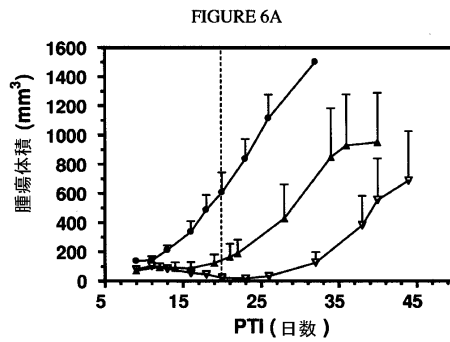
【図 2】



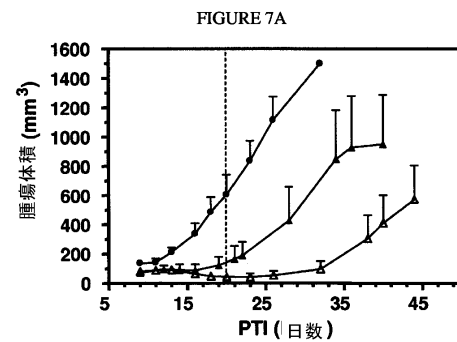
【図 3 B】



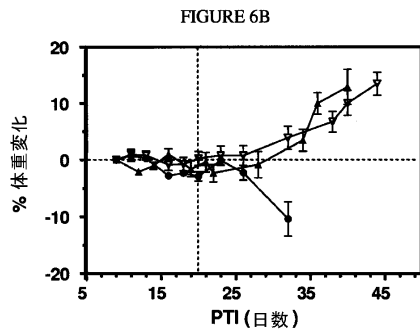
【図 6 A】



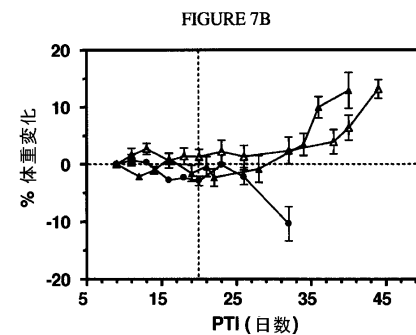
【図 7 A】



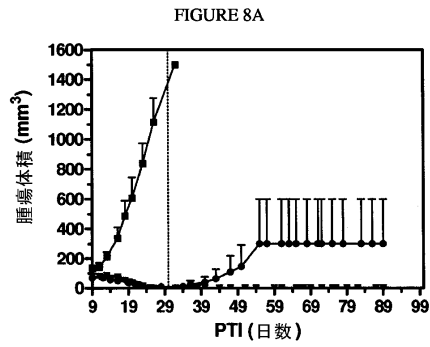
【図 6 B】



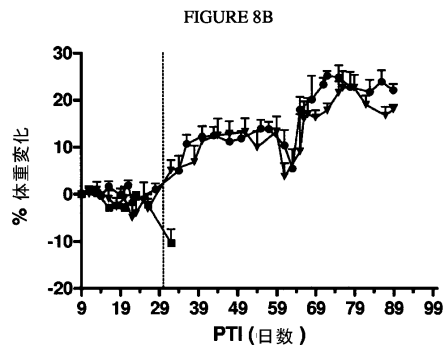
【図 7 B】



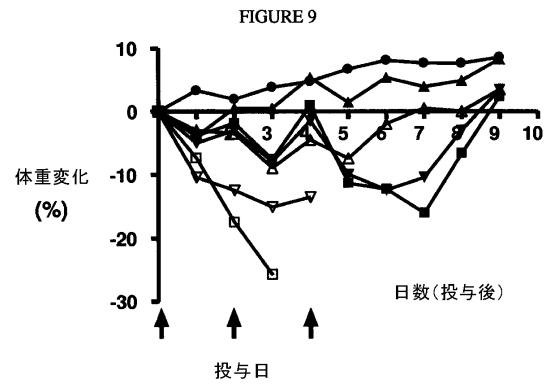
【図 8 A】



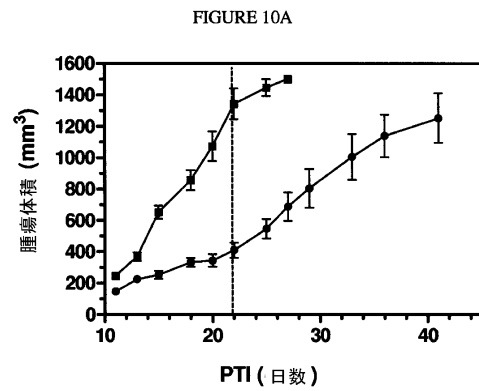
【図 8 B】



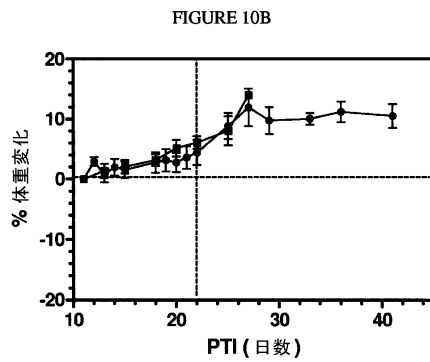
【図 9】



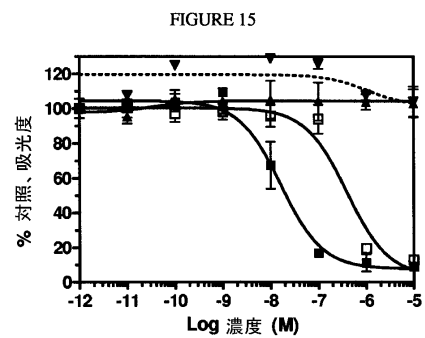
【図 10 A】



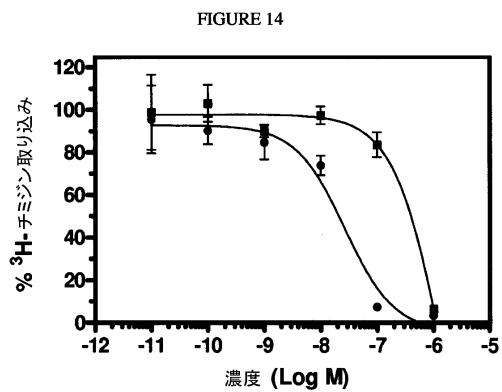
【図 10 B】



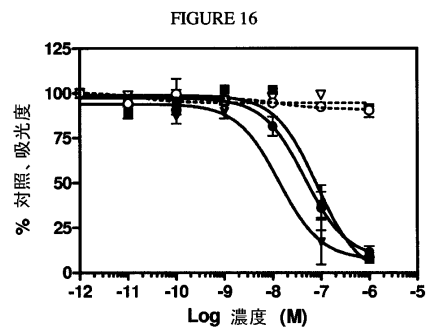
【図 15】



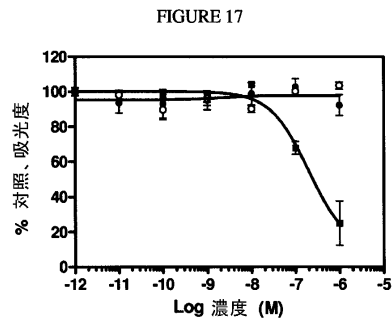
【図 14】



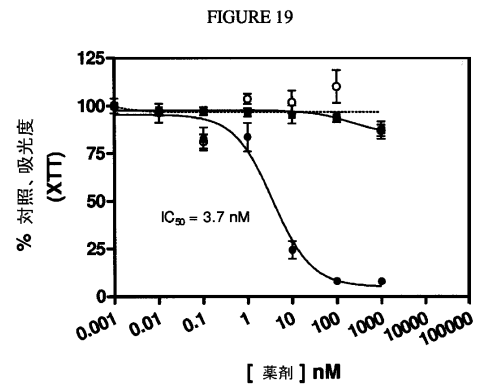
【図 16】



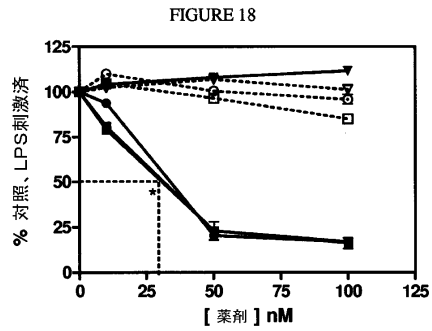
【図 17】



【図 19】

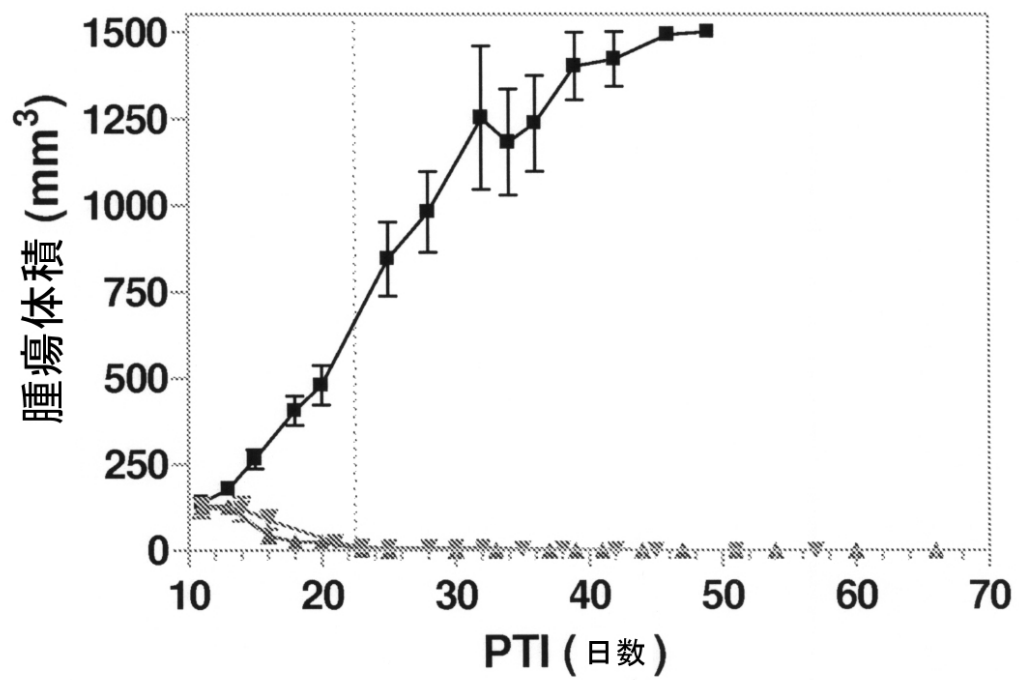


【図 18】



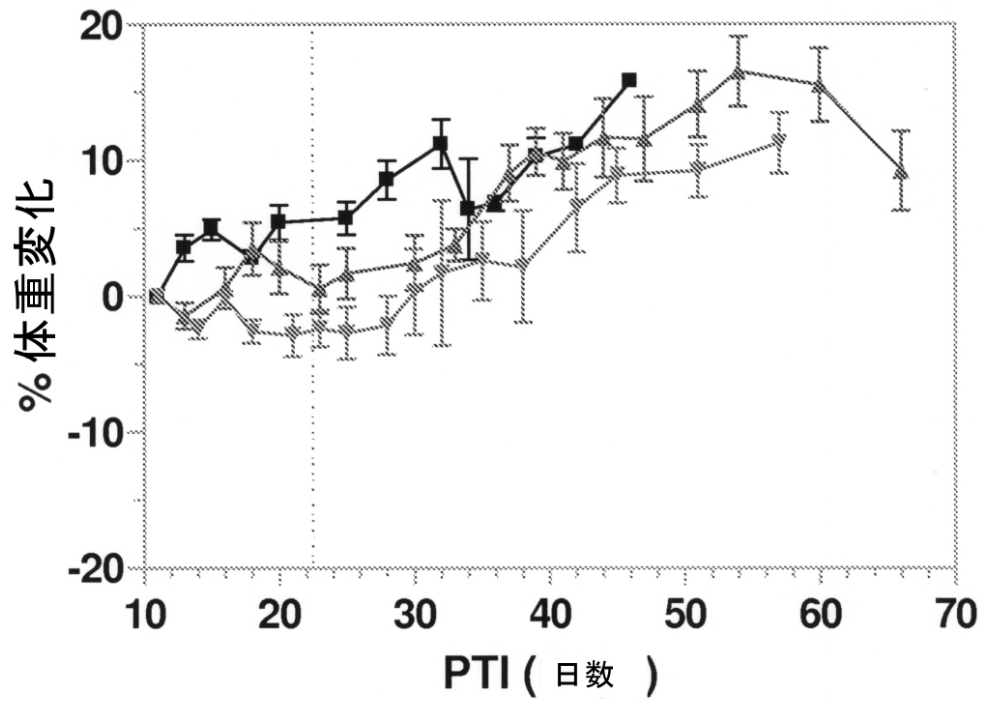
【図 4 A】

FIGURE 4A



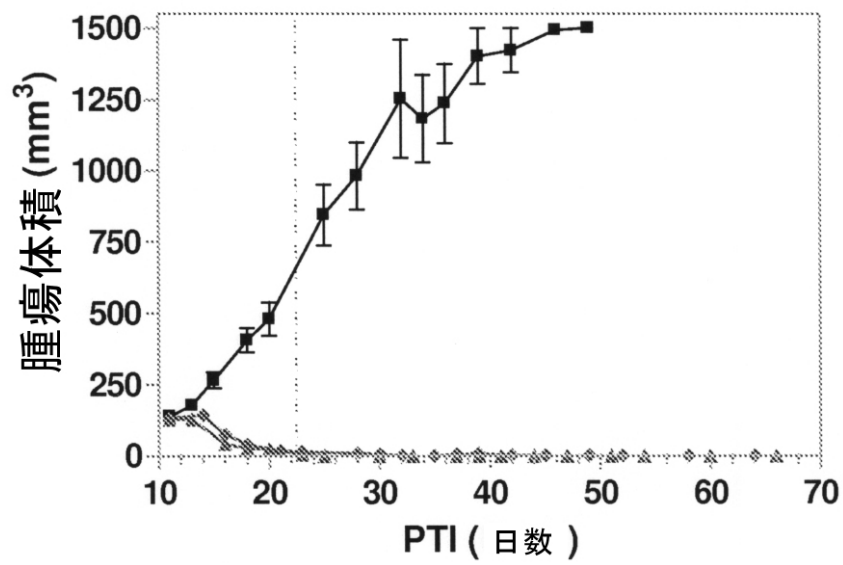
【 図 4 B 】

FIGURE 4B



【 図 5 A 】

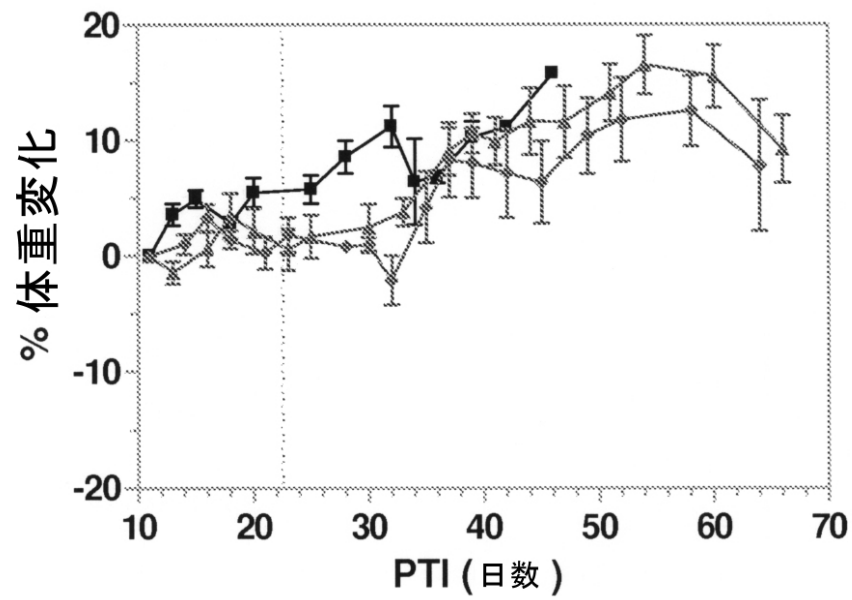
FIGURE 5A





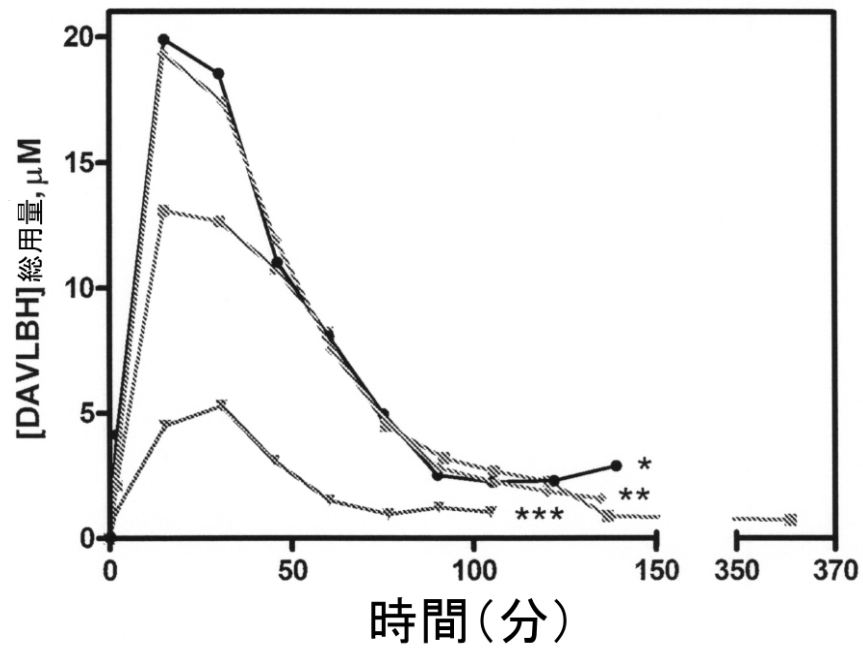
【図 5 B】

FIGURE 5B



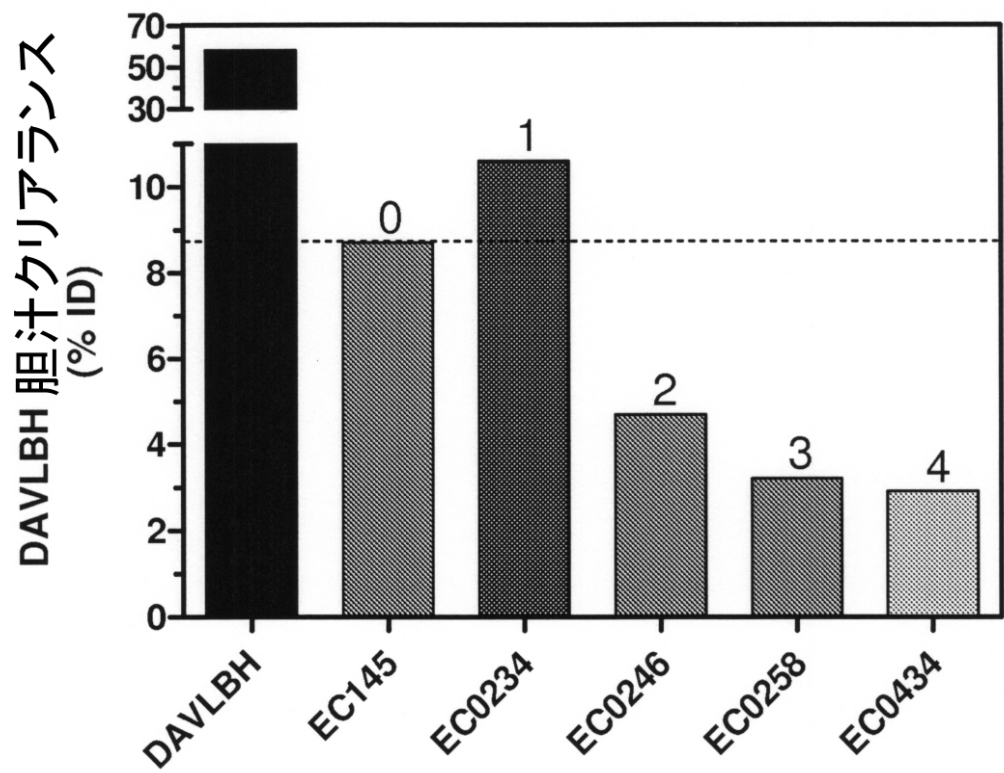
【図 1 1】

FIGURE 11



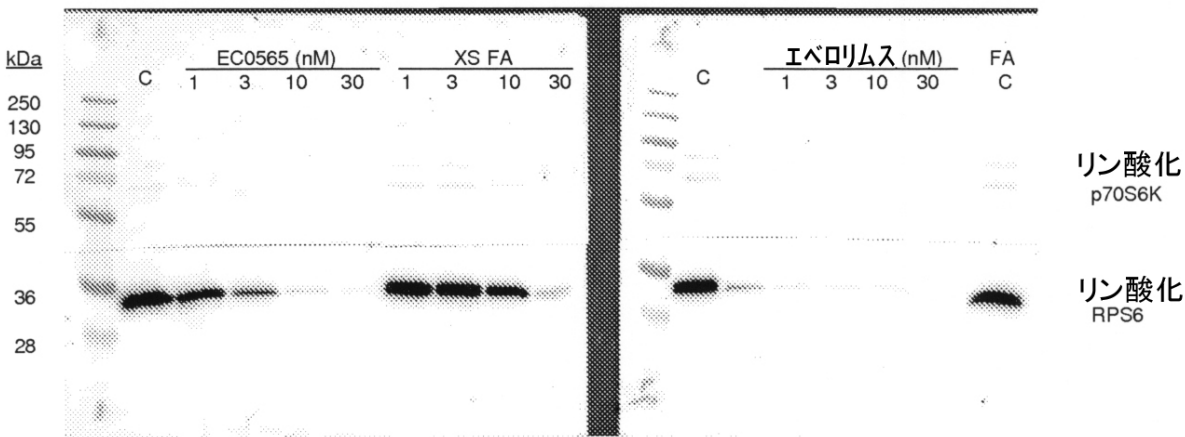
【 図 1 2 】

FIGURE 12



【 図 1 3 】

FIGURE 13



【 配 列 表 】

0005690589000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 C 0 7 K 7/02 (2006.01) C 0 7 K 7/02  
 C 0 7 K 5/11 (2006.01) C 0 7 K 5/11 Z N A  
 C 0 7 K 7/06 (2006.01) C 0 7 K 7/06

(72)発明者 ワン, ユ  
 アメリカ合衆国・インディアナ州 4 6 0 3 7・フィッシャーズ・シルベラード ドライブ 1 2  
 1 6 4  
 (72)発明者 グラホヴ, イオンチョ, ラドスラヴォヴ  
 アメリカ合衆国・インディアナ州 4 7 9 0 6・ウェスト ラファイエット・シューティングスタ  
 ー コート 1 0 4 1  
 (72)発明者 ユー, フェイ  
 アメリカ合衆国・インディアナ州 4 7 9 0 6・ウェスト ラファイエット・アパートメント 2  
 2・アンスロプ ドライブ 1 1 9 3  
 (72)発明者 クラインドル, ポール, ヨセフ  
 アメリカ合衆国・インディアナ州 4 6 0 5 2・レバノン・モンロー クレッセント 1 1 0  
 (72)発明者 サンサブラム, ハリ クリシュナ, アール.  
 アメリカ合衆国・インディアナ州 4 7 9 0 6・ウェスト ラファイエット・サンドパイパー ド  
 ライブ サウス 1 7 0 4

審査官 吉田 佳代子

(56)参考文献 特表2006-518712(JP, A)  
 国際公開第2007/022943(WO, A1)  
 特表2002-543111(JP, A)  
 Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002年, 10, pp.2397-2414  
 Organic Letters, 1999年, 1(2), 179-181

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2  
 A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0  
 A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 4 8  
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )