

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6258523号
(P6258523)

(45) 発行日 平成30年1月10日(2018.1.10)

(24) 登録日 平成29年12月15日(2017.12.15)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 K 38/07	(2006.01)	A 6 1 K 38/07	
C 07 K 16/28	(2006.01)	C 07 K 16/28	Z N A
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	

請求項の数 24 (全 175 頁)

(21) 出願番号	特願2016-564149 (P2016-564149)
(86) (22) 出願日	平成27年4月27日 (2015.4.27)
(65) 公表番号	特表2017-513900 (P2017-513900A)
(43) 公表日	平成29年6月1日 (2017.6.1)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2015/059045
(87) 國際公開番号	W02015/162291
(87) 國際公開日	平成27年10月29日 (2015.10.29)
審査請求日	平成29年6月30日 (2017.6.30)
(31) 優先権主張番号	14305620.8
(32) 優先日	平成26年4月25日 (2014.4.25)
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者	500033483 ピエール、ファーブル、メディカマン フランス国ブローニュ、ビヤンクール、プ ラス、アペル、ガヌス、45
(74) 代理人	100091982 弁理士 永井 浩之
(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
(74) 代理人	100082991 弁理士 佐藤 泰和
(74) 代理人	100105153 弁理士 朝倉 悟
(74) 代理人	100126099 弁理士 反町 洋

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IGF-1R抗体-薬物複合体および癌の処置のためのその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下式 (I) の抗体 - 薬物複合体またはその薬学上許容可能な塩 :

A b - (L - D)_n (I)

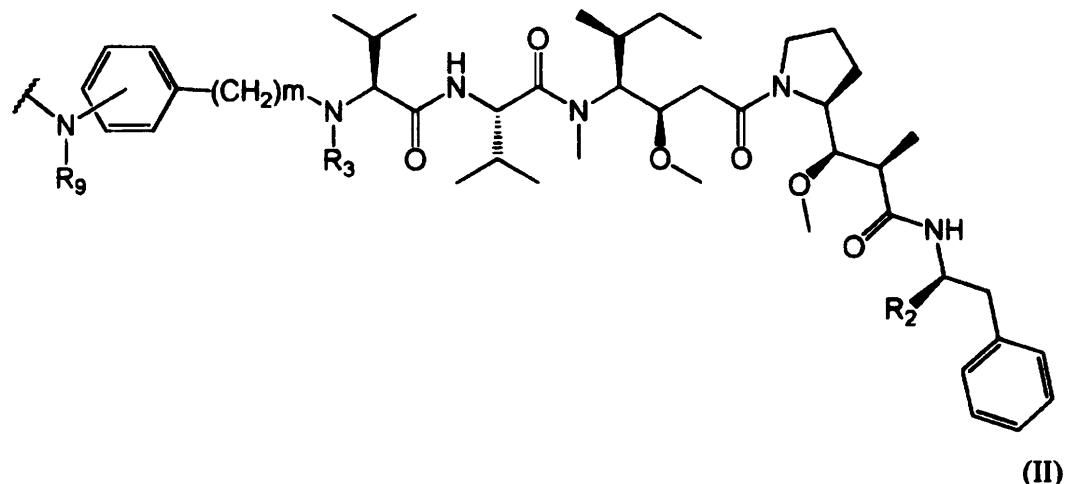
[式中、

A b は、配列番号 1、2 および 3 の配列の 3 つの重鎖 CDR と、配列番号 4、5 および 6 の配列の 3 つの軽鎖 CDR とを含んでなる、ヒト IGF-1R と結合し得る抗体、またはその抗原結合フラグメントであり；

L は、リンカーであり；

D は、下式 (II) の薬物成分である：

【化1】



10

(式中、

R₂は、COOH、COOCH₃またはチアゾリルであり；R₃は、Hまたは(C₁-C₆)アルキルであり；R₉は、Hまたは(C₁-C₆)アルキルであり；

mは、1~8の間に含まれる整数であり；

波線は、Lとの結合点を示し；かつ

nは、1~12である)]。

20

【請求項2】

A bが、

a)配列番号7、2および3の配列の3つの重鎖CDRと、配列番号9、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；

b)配列番号7、2および3の配列の3つの重鎖CDRと、配列番号10、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；

c)配列番号7、2および3の配列の3つの重鎖CDRと、配列番号9、5および12の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；ならびに

d)配列番号8、2および3の配列の3つの重鎖CDRと、配列番号9、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体

から選択される、請求項1に記載の抗体-薬物複合体。

30

【請求項3】

A bが、

a)配列番号13の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号9、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；

b)配列番号14の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号10、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；

c)配列番号15の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号9、5および12の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；

40

d)配列番号16の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号9、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；ならびに

e)配列番号17の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号9、5および12の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体

から選択される、請求項1または2の抗体-薬物複合体。

【請求項4】

A bが、

a)配列番号18の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号7、2および3の配列の3つの重鎖CDRとを含んでなる抗体；

b)配列番号19の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号7、2および3の配列の3つ

50

の重鎖 C D R とを含んでなる抗体；

c) 配列番号 2 0 の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号 7 、 2 および 3 の配列の 3 つ
の重鎖 C D R とを含んでなる抗体；

d) 配列番号 2 1 の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号 8 、 2 および 3 の配列の 3 つ
の重鎖 C D R とを含んでなる抗体；ならびに

e) 配列番号 2 2 の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号 7 、 2 および 3 の配列の 3 つ
の重鎖 C D R とを含んでなる抗体

から選択される、請求項 1 または 2 に記載の抗体 - 薬物複合体。

【請求項 5】

A b が、抗体 2 0 8 F 2 、 2 1 2 A 1 1 、 2 1 4 F 8 、 2 1 9 D 6 および 2 1 3 B 1 0 10
から選択される、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体。

【請求項 6】

A b が、

a) 配列番号 3 3 の配列の重鎖可変ドメイン (V H) であって、前記配列番号 3 3 の配
列は、残基 2 0 、 3 4 、 3 5 、 3 8 、 4 8 、 5 0 、 5 9 、 6 1 、 6 2 、 7 0 、 7 2 、 7 4
、 7 6 、 7 7 、 7 9 、 8 2 および 9 5 から選択される少なくとも 1 つの復帰突然変異を含
んでなる重鎖可変ドメイン；ならびに

b) 配列番号 3 5 の配列の軽鎖可変ドメイン (V L) であって、前記配列番号 3 5 の配
列は、残基 2 2 、 5 3 、 5 5 、 6 5 、 7 1 、 7 2 、 7 7 または 8 7 から選択される少なく
とも 1 つの復帰突然変異を含んでなる軽鎖可変ドメイン 20

を含んでなる、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体。

【請求項 7】

A b が、

a) 配列番号 5 6 、 6 2 、 6 4 、 6 6 、 6 8 、 7 0 、 7 2 、 7 4 、 7 6 、 7 8 および 8
0 から選択される配列または配列番号 5 6 、 6 2 、 6 4 、 6 6 、 6 8 、 7 0 、 7 2 、 7 4
、 7 6 、 7 8 もしくは 8 0 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する任意の配列の重鎖可変ド
メインと、配列番号 9 、 5 および 1 1 の配列の 3 つの軽鎖 C D R とを含んでなる抗体；

b) 配列番号 5 7 もしくは 6 0 から選択される配列または配列番号 5 7 もしくは 6 0 と
少なくとも 8 0 % の同一性を有する任意の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号 7 、 2 お
よび 3 の配列の 3 つの重鎖 C D R とを含んでなる抗体；ならびに 30

c) 配列番号 5 6 、 6 2 、 6 4 、 6 6 、 6 8 、 7 0 、 7 2 、 7 4 、 7 6 、 7 8 および 8
0 から選択される配列または配列番号 5 6 、 6 2 、 6 4 、 6 6 、 6 8 、 7 0 、 7 2 、 7 4
、 7 6 、 7 8 もしくは 8 0 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する任意の配列の重鎖可変ド
メインと、配列番号 5 7 もしくは 6 0 から選択される配列または配列番号 5 7 もしくは 6
0 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する任意の配列の軽鎖可変ドメインとを含んでなる抗
体

から選択される、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体。

【請求項 8】

A b が、

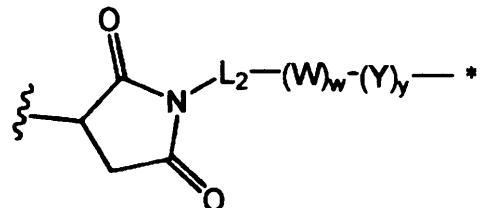
a) 配列番号 5 8 、 6 3 、 6 5 、 6 7 、 6 9 、 7 1 、 7 3 、 7 5 、 7 7 、 7 9 および 8
1 から選択される配列または配列番号 5 8 、 6 3 、 6 5 、 6 7 、 6 9 、 7 1 、 7 3 、 7 5
、 7 7 、 7 9 もしくは 8 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する任意の配列の重鎖；なら
びに 40

b) 配列番号 5 9 および 6 1 から選択される配列または配列番号 5 9 もしくは 6 1 と少
なくとも 8 0 % の同一性を有する任意の配列の軽鎖
を含んでなる、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体。

【請求項 9】

L が下式 (I I I) :

【化2】



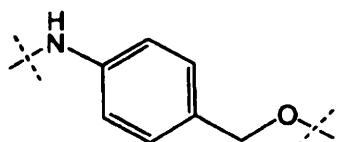
(III)

のリンカーであり、式中、

L_2 は、(C₄ - C₁₀) シクロアルキル - カルボニル、(C₂ - C₆) アルキル、または(C₂ - C₆) アルキル - カルボニルであり、Wは、アミノ酸単位であり；wは、0 ~ 5 の間に含まれる整数であり；

Yは、PAB - カルボニルであり、ここで、PABは、

【化3】



10

であり；yは、0または1であり；

アスタリスクは、Dとの結合点を示し；かつ

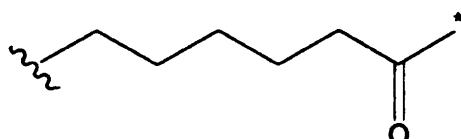
波線は、Abとの結合点を示す、

請求項1~8のいずれか一項に記載の抗体 - 薬物複合体。

【請求項10】

 L_2 が下式：

【化4】



20

のものであり、式中、

アスタリスクは、(W)_wとの結合点を示し；かつ

波線は、マレイミド部分の窒素原子との結合点を示す、

請求項9に記載の抗体 - 薬物複合体。

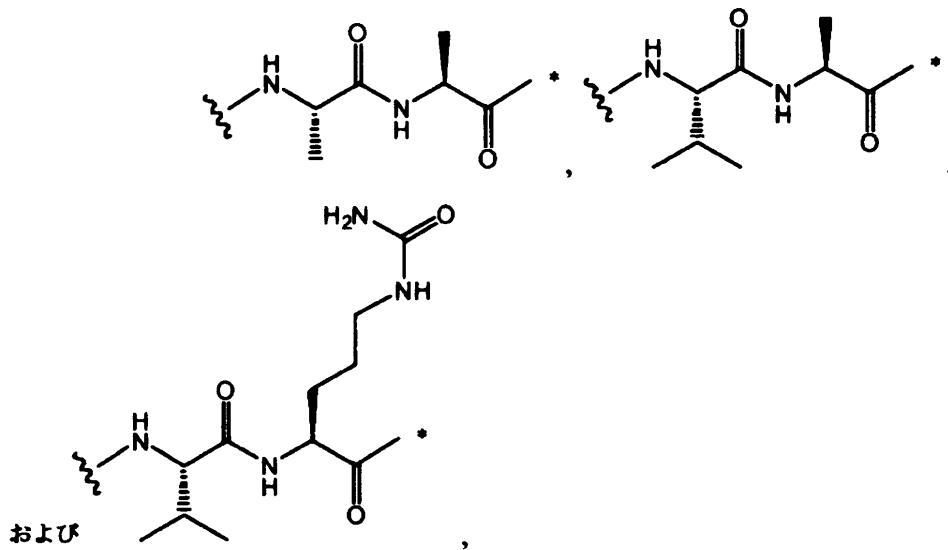
【請求項11】

(W)_w が、

一重結合、

30

【化 5】



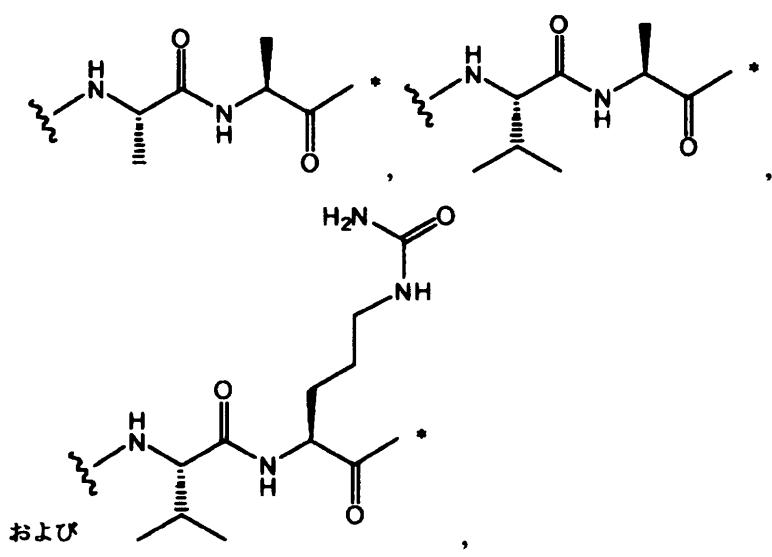
から選択され、

アスタリスクは (Y)_y との結合点を示し；かつ
波線は L_2 との結合点を示す、請求項 9 に記載の抗体 - 薬物複合体。

【請求項 12】

$w = 0$; または $w = 2$ であり、かつ、 (W)_w が、

【化 6】



から選択され、

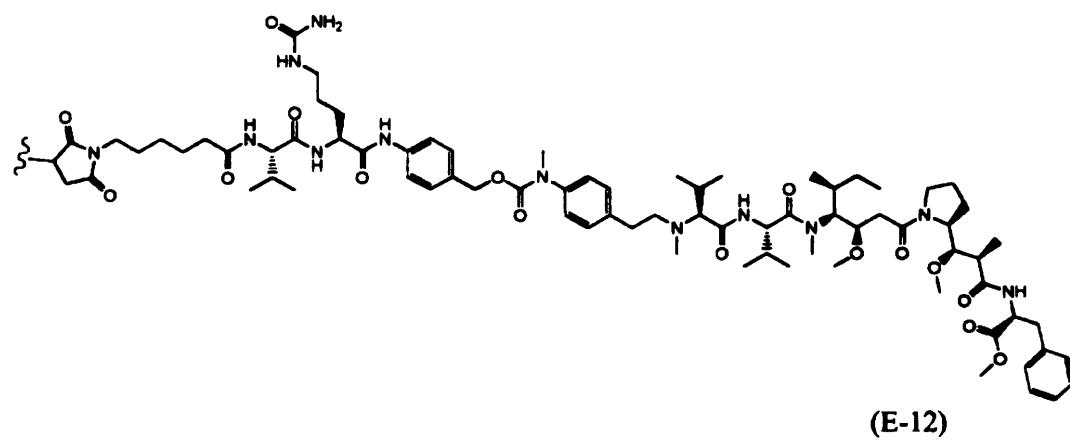
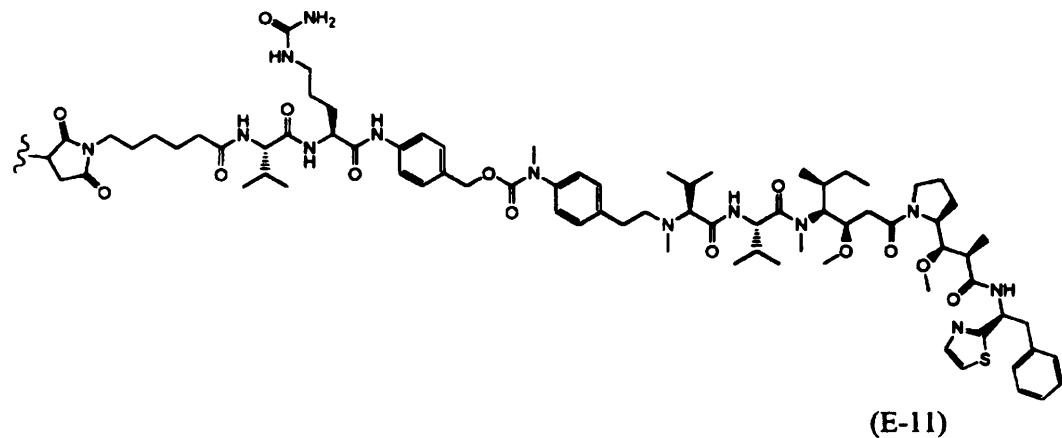
アスタリスクは、 (Y)_y との結合点を示し；かつ
波線は、 L_2 との結合点を示す、請求項 9 に記載の抗体 - 薬物複合体。

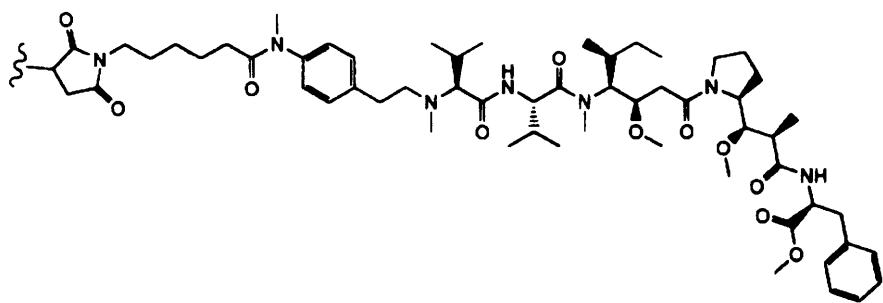
【請求項 13】

($L - D$) が、

40

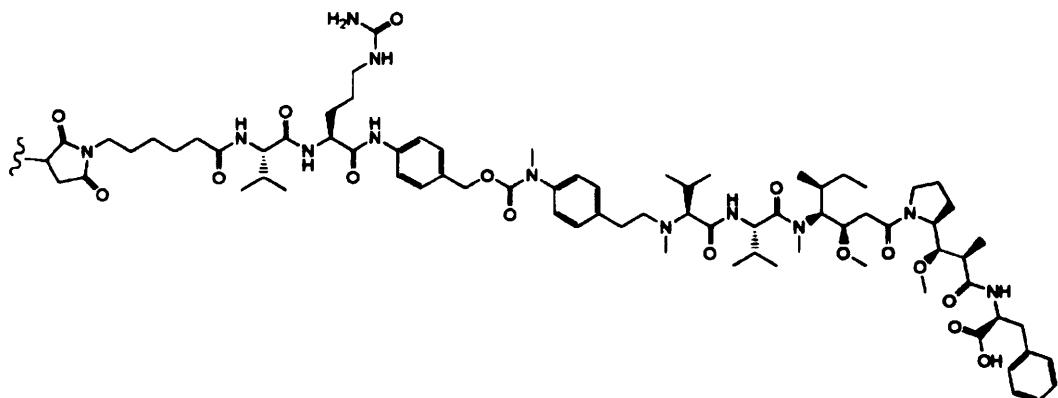
【化7】





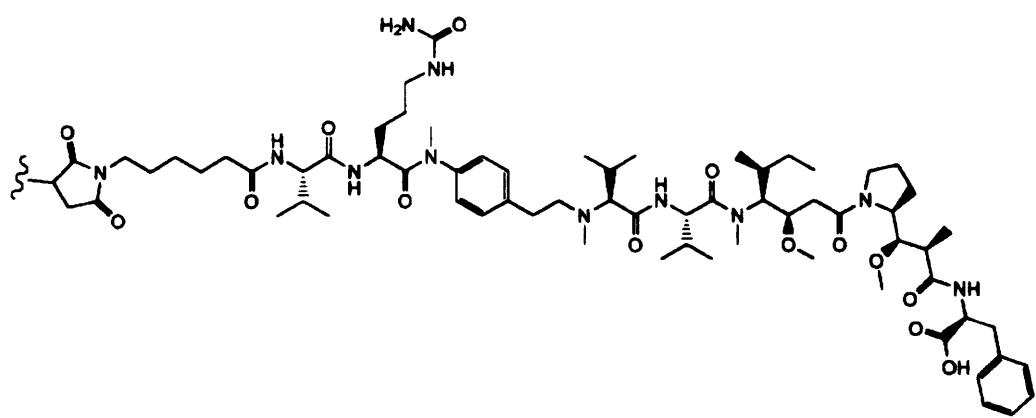
(G-12)

10



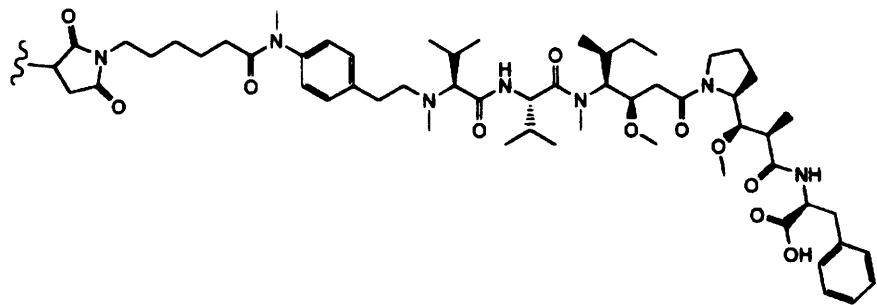
(E-13)

20



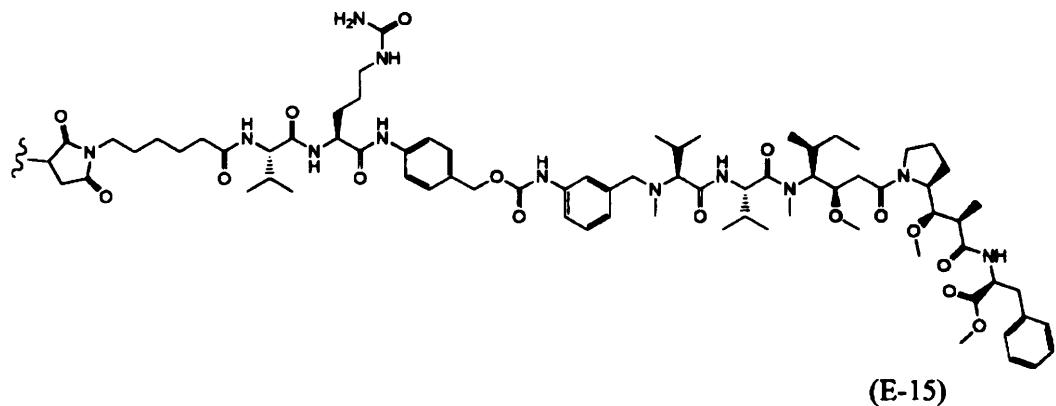
(F-13)

30



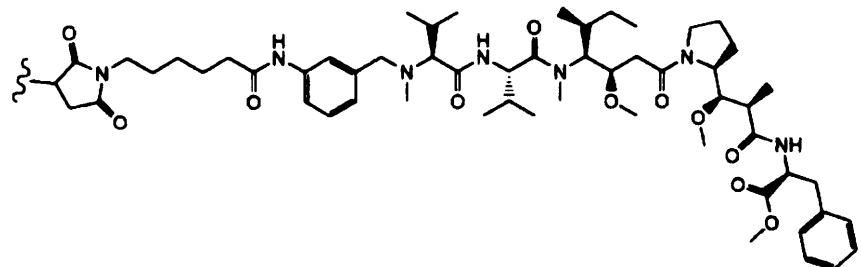
(G-13)

40



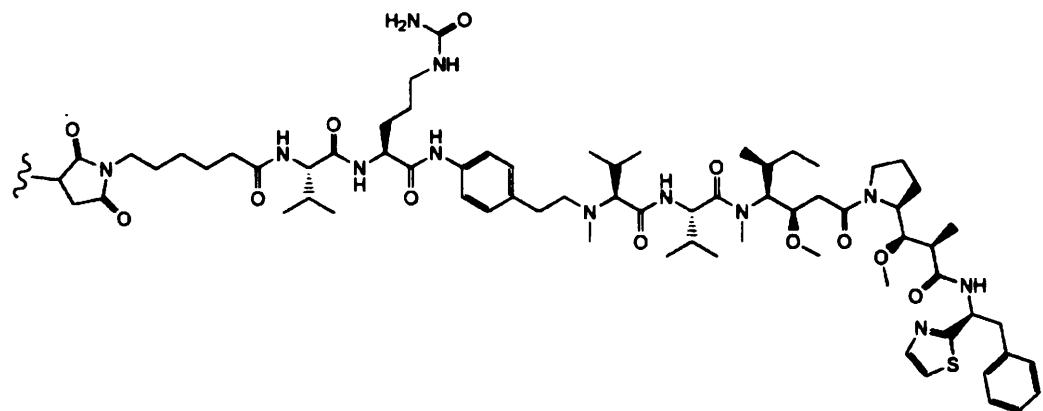
10

(E-15)



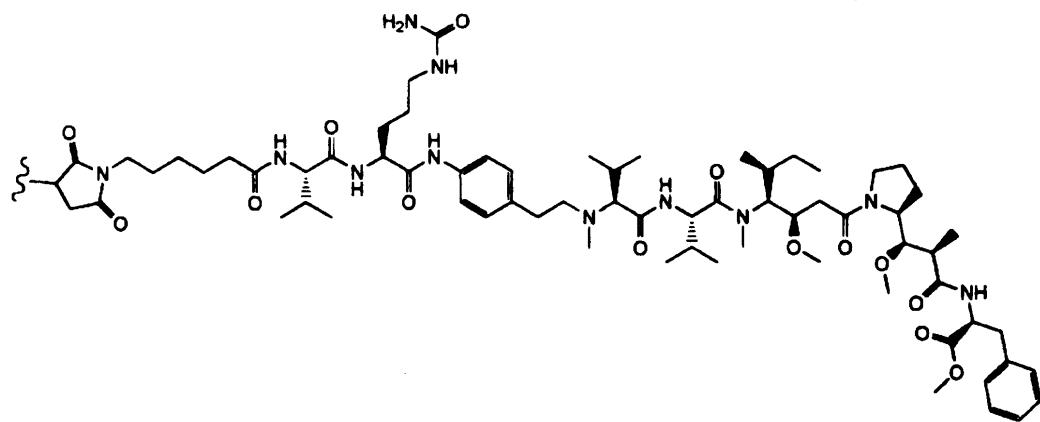
20

(G-15)

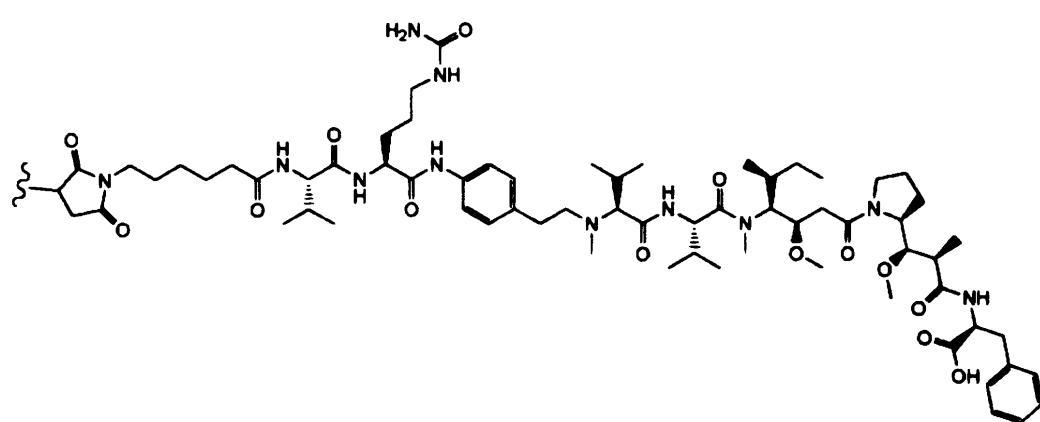


30

(F-61)



および



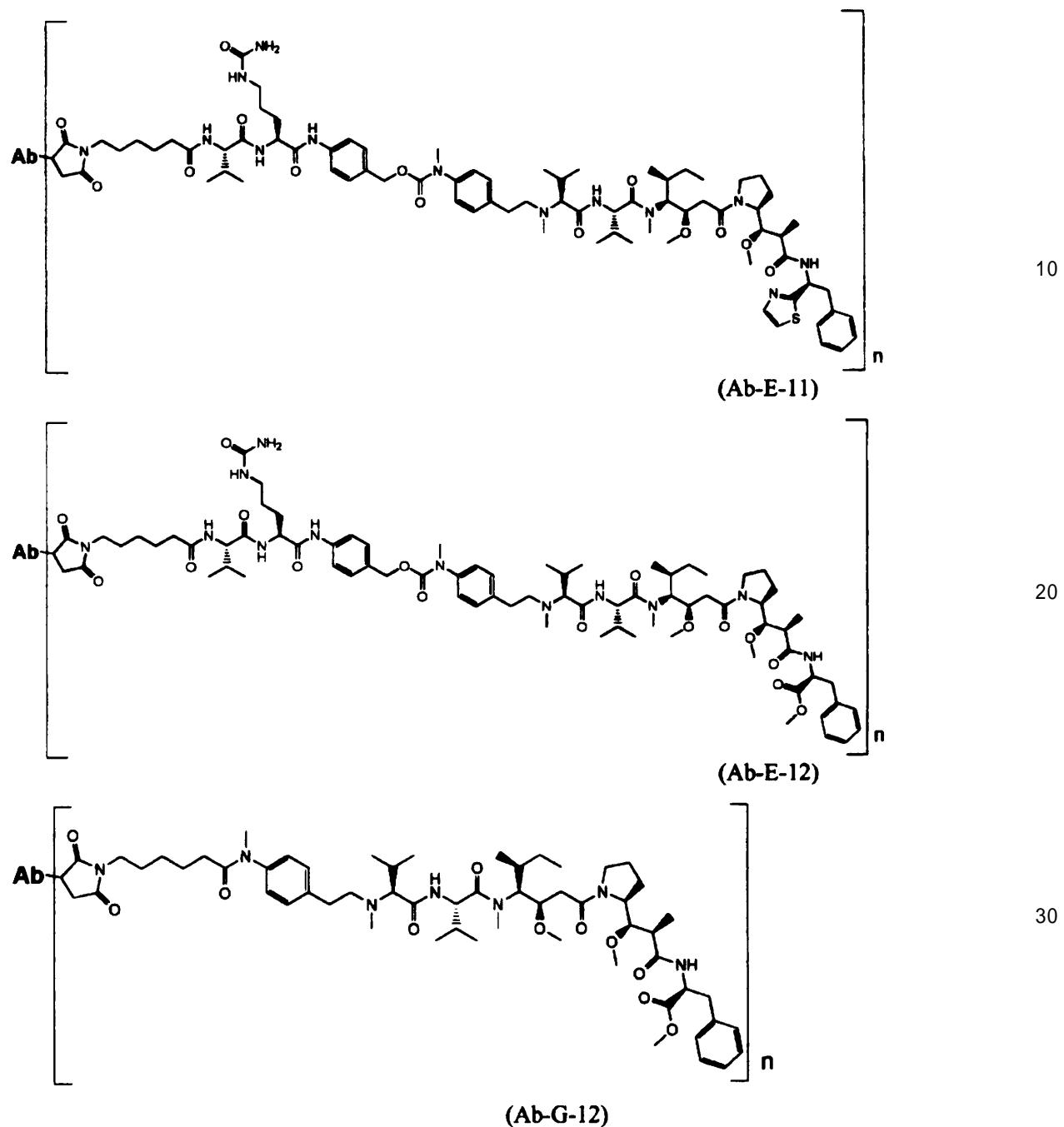
から選択され、

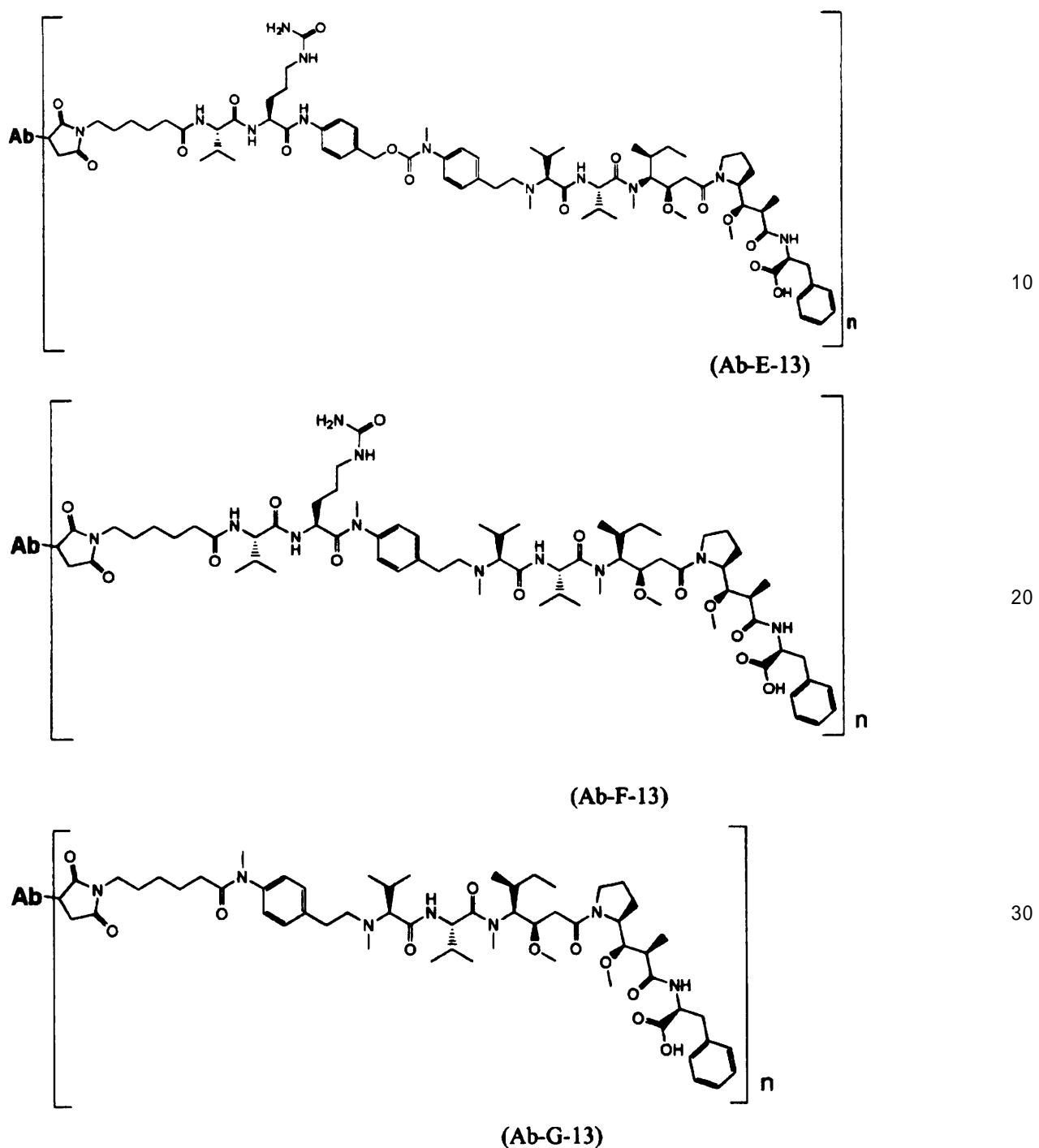
波線は、A bとの結合点を示す、請求項1～12のいずれか一項に記載の抗体・薬物複合体。

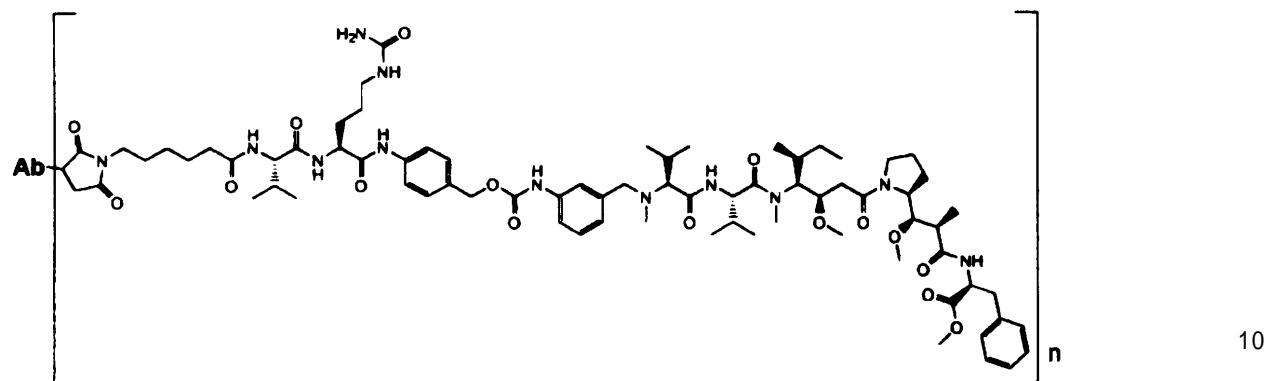
【請求項14】

30

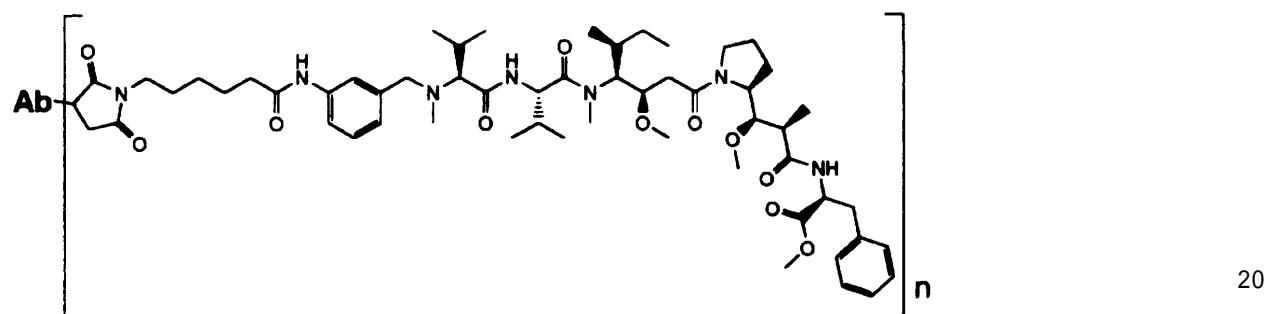
【化 8】



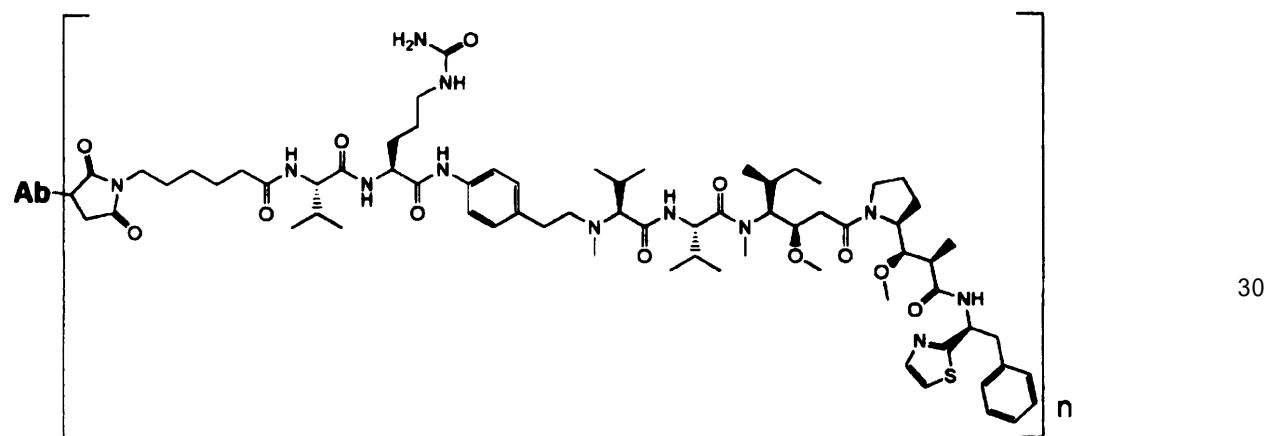




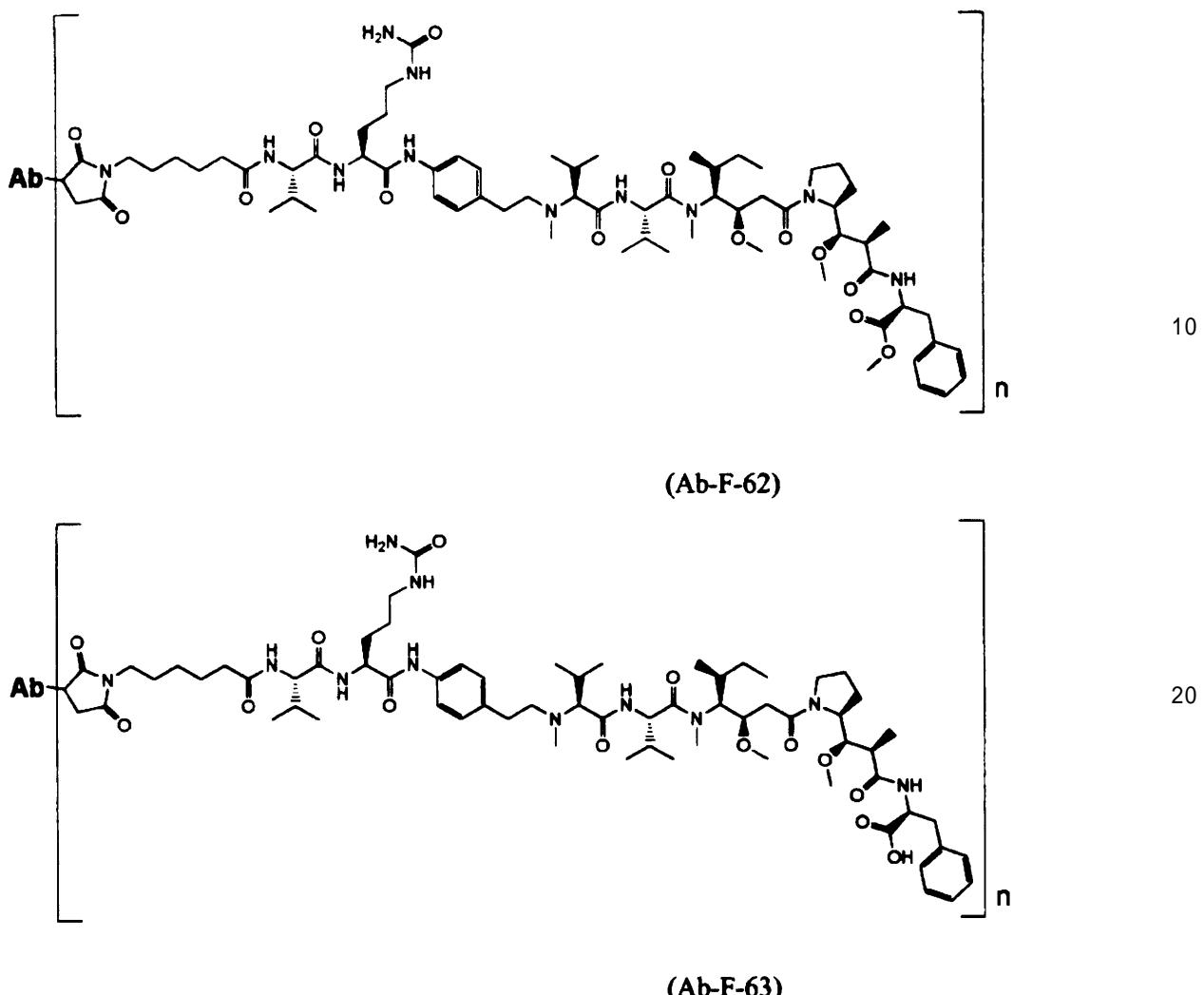
(Ab-E-15)



(Ab-G-15)



(Ab-F-61)



から選択される式を有する、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体、およびその薬学上許容可能な塩であって、

A b が、抗体 2 0 8 F 2 、 2 1 2 A 1 1 、 2 1 4 F 8 、 2 1 9 D 6 および 2 1 3 B 1 0 からなる群において選択される、抗体 - 薬物複合体、およびその薬学上許容可能な塩。

【請求項 15】

A b が、

配列番号 5 6 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 5 7 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体；

配列番号 5 6 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 6 0 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体；

配列番号 6 2 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 5 7 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体；

配列番号 6 4 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 5 7 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体；

配列番号 6 4 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 6 0 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体；

配列番号 6 6 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 5 7 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体；

配列番号 6 8 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 5 7 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体；

配列番号 6 8 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 6 0 の配列の軽鎖可変ドメイン

10

20

40

50

を有する抗体；

配列番号 7 0 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 5 7 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体；

配列番号 7 2 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 5 7 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体；

配列番号 7 4 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 5 7 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体；

配列番号 7 6 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 5 7 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体；

配列番号 7 8 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 5 7 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体；

配列番号 7 8 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 6 0 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体；並びに

配列番号 8 0 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 5 7 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体からなる群から選択される、請求項 1 4 に記載の抗体 - 薬物複合体。

【請求項 1 6】

A b が、

配列番号 5 8 の配列の重鎖および配列番号 5 9 の配列の軽鎖を有する抗体；

配列番号 5 8 の配列の重鎖および配列番号 6 1 の配列の軽鎖を有する抗体；

配列番号 6 3 の配列の重鎖および配列番号 5 9 の配列の軽鎖を有する抗体；

20

配列番号 6 5 の配列の重鎖および配列番号 5 9 の配列の軽鎖を有する抗体；

配列番号 6 5 の配列の重鎖および配列番号 6 1 の配列の軽鎖を有する抗体；

配列番号 6 7 の配列の重鎖および配列番号 5 9 の配列の軽鎖を有する抗体；

配列番号 6 9 の配列の重鎖および配列番号 5 9 の配列の軽鎖を有する抗体；

配列番号 6 9 の配列の重鎖および配列番号 6 1 の配列の軽鎖を有する抗体；

配列番号 7 1 の配列の重鎖および配列番号 5 9 の配列の軽鎖を有する抗体；

配列番号 7 3 の配列の重鎖および配列番号 5 9 の配列の軽鎖を有する抗体；

配列番号 7 5 の配列の重鎖および配列番号 5 9 の配列の軽鎖を有する抗体；

配列番号 7 7 の配列の重鎖および配列番号 5 9 の配列の軽鎖を有する抗体；

配列番号 7 9 の配列の重鎖および配列番号 5 9 の配列の軽鎖を有する抗体；

30

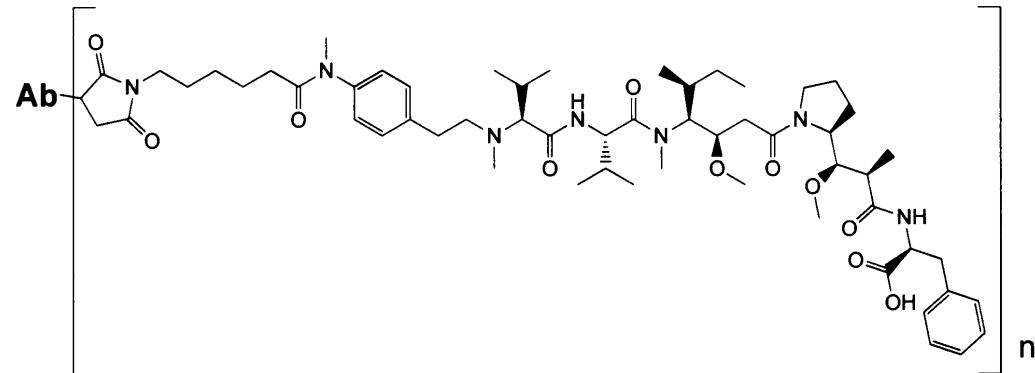
配列番号 7 9 の配列の重鎖および配列番号 6 1 の配列の軽鎖を有する抗体；並びに

配列番号 8 1 の配列の重鎖および配列番号 5 9 の配列の軽鎖を有する抗体からなる群から選択される、請求項 1 5 に記載の抗体 - 薬物複合体。

【請求項 1 7】

以下の式：

【化 9】



(Ab-G-13)

を有する、請求項 1 4 に記載の抗体 - 薬物複合体、またはその薬学上許容可能な塩であつ

50

て、

A b が、配列番号 8 0 の配列の重鎖可変ドメインおよび配列番号 5 7 の配列の軽鎖可変ドメインを有する抗体である、抗体 - 薬物複合体、またはその薬学上許容可能な塩。

【請求項 1 8】

A b が、配列番号 8 1 の配列の重鎖および配列番号 5 9 の配列の軽鎖を有する抗体である、請求項 1 7 に記載の抗体 - 薬物複合体。

【請求項 1 9】

n が 2 である、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体。

【請求項 2 0】

n が 4 である、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体。

10

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種類の抗体 - 薬物複合体を含んでなる組成物。

【請求項 2 2】

薬学上許容可能なビヒクルをさらに含んでなる、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

I G F - 1 R 発現癌の処置に使用するための、請求項 2 1 または 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

I G F - 1 R 発現癌が、乳癌、結腸癌、食道癌、肝細胞癌、胃癌、神経膠腫、肺癌、黒色腫、骨肉腫、卵巣癌、前立腺癌、横紋筋肉腫、腎臓癌、甲状腺癌、子宮内膜癌、中皮腫、口腔扁平上皮癌および任意の薬剤耐性癌から選択される癌である、請求項 2 3 に記載の組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、I G F - 1 R と結合し得る抗体 - 薬物複合体に関する。1 つの態様から、本発明は、I G F - 1 R と結合し得る抗体を含んでなる抗体 - 薬物複合体に関し、前記抗体は、ドラスタチン 1 0 の誘導体およびアウリスタチンから選択される少なくとも 1 種類の薬物とコンジュゲートされている。本発明はまた、癌の処置のための処置方法および前記抗体 - 薬物複合体の使用も含んでなる。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

I G F - I R (または時には I G F 1 R もしくは I G F - I R) と呼ばれるインスリン様成長因子 I 受容体は、チロシンキナーゼ活性を有し、インスリン受容体 I R と 70 % の相同性を有する受容体である。I G F - I R は、分子量が約 350,000 の糖タンパク質である。これは、ヘテロ四量体の受容体であり、その半分はそれぞれジスルフィド架橋によって連結しており、細胞外 - サブユニットおよび膜貫通 - サブユニットからなる。I G F - I R は、極めて高い親和性 (K d # 1 n M) で I G F 1 および I G F 2 と結合するが、同様にインスリンとも 100 分の 1 ~ 1000 分の 1 の親和性で結合し得る。逆に、I G F は 100 分の 1 の親和性でしかインスリン受容体と結合しないが、I R は極めて高い親和性でインスリンと結合する。 - サブユニット上に存在するシステインに富む領域と - サブユニットの C 末端部分にそれぞれ相同性の低い区域があるが、I G F - I R のチロシンキナーゼドメインと I R のチロシンキナーゼドメインとは極めて高い配列相同性を有している。 - サブユニットに見られる配列の差異はリガンドの結合区域に存在するため、それは I G F とインスリンのそれぞれに対する I G F - I R と I R の相対的親和性の基となっている。 - サブユニットの C 末端部分における差異は、2 つの受容体のシグナル伝達経路における相違をもたらし、I G F - I R は細胞分裂促進特性、分化作用および抗アポトーシス作用を媒介し、一方、I R の活性化は主として代謝経路のレベルでの作用に関与する。

40

【0 0 0 3】

50

細胞質チロシンキナーゼタンパク質は、リガンドが受容体の細胞外ドメインに結合することによって活性化される。キナーゼの活性化は、次に、IRS-1、IRS-2、ShcおよびGrb10を含む種々の細胞内基質の刺激に関与する。IGF-IRの2つの主要な基質はIRSおよびShcであり、これらは下流で多くのエフェクターの活性化によって、IGFのこの受容体への結合に関連した成長および分化作用の大部分を媒介する。従って、基質の利用度がIGF-IRの活性化に関連した最終的な生物学的作用を決定し得る。IRS-1が優勢である場合には、細胞は増殖し形質転換する傾向にある。Shcが優勢である場合には、細胞は分化する傾向にある。アポトーシスに対する保護作用に主として関与する経路は、ホスファチジル-イノシトール3-キナーゼ(PI3-キナーゼ)経路であると思われる。

10

【0004】

発癌におけるIGF系の役割は、ここ10年で集中的な研究の対象となってきている。この関心は、IGF-IRが、その細胞分裂促進性および抗アポトーシス性に加えて、形質転換された表現型の確立と維持に必要であると思われるという事実の発見に従ったものである。実際に、IGF-IRの過剰発現または構成的活性化が、多様な細胞において、ウシ胎仔血清を含まない培地で補助に依存することなく細胞を成長させ、ヌードマウスにおいて腫瘍を形成させるということが十分に確認されている。成長因子の多数の受容体を含む、過剰発現した遺伝子の多様な産物が細胞を形質転換し得ることから、このこと自体は固有の特性ではない。しかしながら、IGF-IRが形質転換において果たす主要な役割を明らかに立証した重要な発見は、IGF-IRをコードする遺伝子が不活性化されたIGR-IR⁻細胞が、ウシパピローマウイルスのE5タンパク質などの、通常は細胞を形質転換することができる様々な物質、EGFRまたはPDGFRの過剰発現、SV40のT抗原、活性化したras、又はこれら最後の2つの因子の組合せなどによる形質転換に全く不応であるということを立証している。

20

【0005】

IGF-IRは、多様な腫瘍および腫瘍株において発現し、IGFは、IGF-IRへの結合を介して腫瘍成長を增幅する。IGF-IRの発癌における役割を支持するその他の論拠は、受容体に対するマウスモノクローナル抗体を用いた、またはIGF-IRのドミナントネガティブを用いた研究から得られる。実際には、IGF-IRに対するマウスマonoクローナル抗体は、多くの細胞株の培養増殖およびin vivoにおける腫瘍細胞の成長を阻害する。同様に、IGF-IRのドミナントネガティブが腫瘍増殖を阻害することができるということが示されている。

30

【0006】

多くのプロジェクトが、癌の処置のための裸のIGF-1R抗体の開発に着手している。しかしながら、現時点でこれらのプロジェクトに成功したものは無く、上市している抗IGF-1R抗体は無い。

【0007】

さらに、これらの抗体にKras突然変異患者を治療できたものは無かったのでEGFRとIGF-1Rの両方を標的とするために抗EGFR抗体と組み合わせた抗IGF-1R抗体に関する一連の臨床試験は成功を見ていない。

40

【0008】

結果として、IGF-1Rは今や主要な標的とは見なされず、潜在的治療抗体の研究では、IGF-1Rはもはや特に注目されるものとは考えられていない。

【0009】

しかしながらやはり、IGF-1R抗体を作製するための努力は、裸の抗体、すなわち、それらの固有の特性により有用な抗体に焦点が当てられたことにも留意しなければならない。この意味で、IGF-1Rは、IGF-1Rは血管を含む正常な細胞によっても広く発現される標的として記載されているので、抗体-薬物複合体(「ADC」と呼称)などのADCの作出には好適とは言えない標的と考えられる。この意味で、より最近のIGF-1R抗体、すなわち、AVE1642は、薬物の腕を持たない裸の抗体として開発さ

50

れでいることに着目できる。それは現在開発中の他の IGF - 1R 抗体と、また、臨床試験で成功しなかった総てのものと同じである。

【0010】

この文脈で、本発明は、癌、より詳しくは、IGF - 1R 発現癌の処置のための ADC または複合体およびその使用に関する。

【0011】

ADC は、抗体の結合特異性と例えば細胞傷害性薬剤などの薬物の効力を組み合わせたものである。モノクローナル抗体の開発、より有効な薬物の使用およびこれらの成分と共に結合する化学リンカーの設計に関連する技術が、近年、急速に進んできた。

【0012】

ADC の使用は、複合体を形成しない薬物として投与された際に、正常な細胞に許容されないレベルの毒性をもたらし得る薬物の局所送達を可能とする。

【0013】

言い換えれば、それにより最小の毒性で最大の有効性が求められる。ADC を設計および精密化するための努力は、抗体の選択性ならびに薬物の作用機序、薬物の架橋、薬物 / 抗体比（負荷量または DAR）、および薬物放出特性に焦点が当てられてきた。薬物部分は、チューブリン結合、DNA 結合、プロテアソーム、リボソーム機能の障害、タンパク質合成および / またはトポイソメラーゼ阻害を含む機構によってこれらの細胞傷害性および細胞増殖抑制作用を付与し得る。いくつかの細胞傷害性薬物は、大きな抗体とコンジュゲートされると不活性または低活性となる傾向がある。

【0014】

各抗体は個別に特性決定されなければならず、適当なリンカーが設計されなければならず、また、腫瘍細胞へ送達された際にその効力を保持する好適な細胞傷害性薬剤が同定されなければならない。癌標的上の抗原の濃度および正常組織がその標的抗原を発現するかどうかを考慮しなければならない。他の考慮すべき点としては、標的と結合した際に ADC 全体が内部移行されるかどうか；正常組織暴露の可能性ならびに / または処置される癌のタイプおよびステージを考慮する場合に細胞増殖抑制薬剤または細胞傷害性薬剤が好ましいかどうか；ならびに抗体と薬物弾頭を接続するリンカーが切断可能な結合か切断不能な結合かが含まれる。さらに、抗体と薬物成分のコンジュゲーション比は、抗体の結合活性および / または薬物の効力を損なわず、かつ、ADC の物理化学的特性を変化させて凝集またはその化合物の以降の開発工程に関して有害な特性を生じることのない十分なものでなければならない。

【0015】

ADC は複雑な生体分子であり、有効な ADC を開発する挑戦には大きな問題が残っている。

【発明の概要】

【0016】

本発明はこの問題に取り組もうとするものであり、下式 (I) :

$A_b - (L - D)_n \quad (I)$

の ADC またはその薬学上許容可能な塩に關し、

式中、

A_b は、 i) 配列番号 1、2 および 3 の配列の 3 つの重鎖 CDR と、配列番号 4、5 および 6 の配列の 3 つの軽鎖 CDR とを含んでなる抗体； i i) IGF - 1R との結合に関して i) の抗体と競合する抗体；および i i i) i) の抗体と同じ IGF - 1R のエピトープと結合する抗体から選択されるヒト IGF - 1R と結合し得る抗体、またはその抗原結合フラグメントであり；

L は、リンカーであり；

D は、下式 (II) :

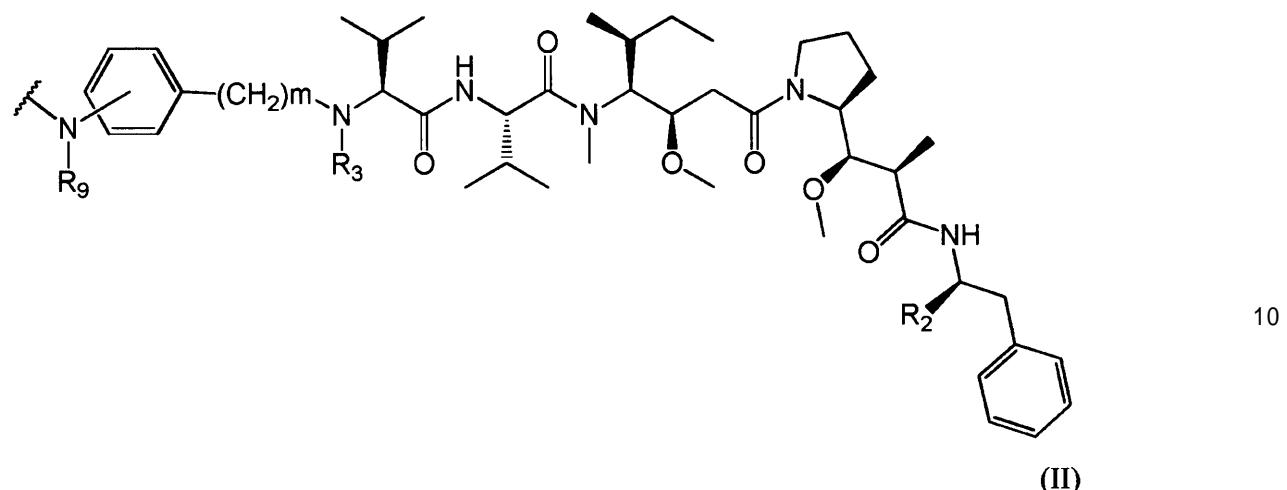
10

20

30

40

【化1】



(式中、

R₂は、C₂O₄H、C₂OOC₂H₅またはチアゾリルであり；

R₃は、Hまたは(C₁-C₆)アルキルであり；

R₉は、Hまたは(C₁-C₆)アルキルであり；

mは、1~8の間に含まれる整数であり；

波線は、Lとの結合点を示し；かつ

nは、1~12である)

の薬物成分である。

【0017】

本発明の1つの実施形態は、A bが

a) 配列番号7、2および3の配列の3つの重鎖CDRと、配列番号9、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；

b) 配列番号7、2および3の配列の3つの重鎖CDRと、配列番号10、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；

c) 配列番号7、2および3の配列の3つの重鎖CDRと、配列番号9、5および12の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；ならびに

d) 配列番号8、2および3の配列の3つの重鎖CDRと、配列番号9、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体

から選択されるADCに関する。

【0018】

本発明の1つの実施形態は、A bが

a) 配列番号13の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号9、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；

b) 配列番号14の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号10、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；

c) 配列番号15の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号9、5および12の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；

d) 配列番号16の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号9、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；ならびに

e) 配列番号17の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号9、5および12の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体

から選択されるADCに関する。

【0019】

本発明の1つの実施形態は、A bが

a) 配列番号18の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号7、2および3の配列の3つ

20

30

40

50

の重鎖 C D R とを含んでなる抗体；

b) 配列番号 1 9 の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号 7、 2 および 3 の配列の 3 つ
の重鎖 C D R とを含んでなる抗体；

c) 配列番号 2 0 の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号 7、 2 および 3 の配列の 3 つ
の重鎖 C D R とを含んでなる抗体；

d) 配列番号 2 1 の配列の軽鎖可変ドメインとの配列番号 8、 2 および 3 の配列 3 つの
重鎖 C D R とを含んでなる抗体；ならびに

e) 配列番号 2 2 の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号 7、 2 および 3 の配列の 3 つ
の重鎖 C D R とを含んでなる抗体

から選択される A D C に関する。

10

【 0 0 2 0 】

1 つの実施形態では、本発明は、A b が

i) 抗体 2 0 8 F 2 、 2 1 2 A 1 1 、 2 1 4 F 8 、 2 1 9 D 6 および 2 1 3 B 1 0 ；

i i) I G F - 1 R との結合に関して i) の抗体と競合する抗体；ならびに

i i i) i) の抗体と同じ I G F - 1 R のエピトープと結合する抗体

から選択される A D C に関する。

【 0 0 2 1 】

本発明の 1 つの実施形態は、A b がヒト化抗体である A D C に関する。

【 0 0 2 2 】

本発明の 1 つの実施形態は、A b が

20

a) それぞれ配列番号 7、 2 および 3 の配列の C D R - H 1 、 C D R - H 2 および C D
R - H 3 と、ヒト生殖細胞系 I G H V 1 - 4 6 * 0 1 (配列番号 4 6) に由来する F R 1
、 F R 2 および F R 3 、ならびにヒト生殖細胞系 I G H J 4 * 0 1 (配列番号 4 8) に由
来する F R 4 とを有する重鎖と、

b) それぞれ配列番号 9、 5 および 1 1 の配列の C D R - L 1 、 C D R - L 2 および C
D R - L 3 と、ヒト生殖細胞系 I G K V 1 - 3 9 * 0 1 (配列番号 4 7) に由来する F R 1
、 F R 2 および F R 3 、ならびにヒト生殖細胞系 I G K J 4 * 0 1 (配列番号 4 9) に由
来する F R 4 とを有する軽鎖

を含んでなる抗体から選択される A D C に関する。

【 0 0 2 3 】

30

本発明の 1 つの実施形態では、A b は、

a) 配列番号 3 3 の配列の重鎖可変ドメインまたは配列番号 3 3 と少なくとも 8 0 % の
同一性を示す任意の配列と、配列番号 9、 5 および 1 1 の配列の 3 つの軽鎖 C D R とを含
んでなる抗体；ならびに

b) 配列番号 3 4 の配列の重鎖可変ドメインまたは配列番号 3 4 と少なくとも 8 0 % の
同一性を示す任意の配列と、配列番号 9、 5 および 1 1 の配列の 3 つの軽鎖 C D R とを含
んでなる抗体

から選択される。

【 0 0 2 4 】

本発明の 1 つの実施形態では、A b は、

40

a) 配列番号 3 5 の配列の軽鎖可変ドメインまたは配列番号 3 5 と少なくとも 8 0 % の
同一性を示す任意の配列と、配列番号 7、 2 および 3 の配列の 3 つの重鎖 C D R とを含
んでなる抗体；ならびに

b) 配列番号 3 6 の配列の重鎖可変ドメインまたは配列番号 3 6 と少なくとも 8 0 % の
同一性を示す任意の配列と、配列番号 7、 2 および 3 の配列の 3 つの重鎖 C D R とを含
んでなる抗体

から選択される。

【 0 0 2 5 】

本発明の 1 つの実施形態では、A b は、

a) 配列番号 3 7 の配列または配列番号 3 7 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の

50

配列の重鎖と、配列番号 3 9 の配列または配列番号 3 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；ならびに

b) 配列番号 3 8 の配列または配列番号 3 8 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 4 0 の配列または配列番号 4 0 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体
から選択される。

【 0 0 2 6 】

本発明の 1 つの実施形態では、A b は、

a) 配列番号 5 6 、 6 2 、 6 4 、 6 6 、 6 8 、 7 0 、 7 2 、 7 4 、 7 6 、 7 8 および 8 0 から選択される配列または配列番号 5 6 、 6 2 、 6 4 、 6 6 、 6 8 、 7 0 、 7 2 、 7 4 10 、 7 6 、 7 8 もしくは 8 0 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号 9 、 5 および 1 1 の配列の 3 つの軽鎖 C D R とを含んでなる抗体；ならびに

b) 配列番号 5 7 および 6 0 から選択される配列または配列番号 5 7 もしくは 6 0 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する任意の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号 7 、 2 および 3 の配列の 3 つの重鎖 C D R とを含んでなる抗体；ならびに

c) 配列番号 5 6 、 6 2 、 6 4 、 6 6 、 6 8 、 7 0 、 7 2 、 7 4 、 7 6 、 7 8 および 8 0 から選択される配列または配列番号 5 6 、 6 2 、 6 4 、 6 6 、 6 8 、 7 0 、 7 2 、 7 4 20 、 7 6 、 7 8 もしくは 8 0 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号 5 7 もしくは 6 0 から選択される配列または配列番号 5 7 もしくは 6 0 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する任意の配列の軽鎖可変ドメインとを含んでなる抗体

から選択される。

【 0 0 2 7 】

本発明の 1 つの実施形態では、A b は、

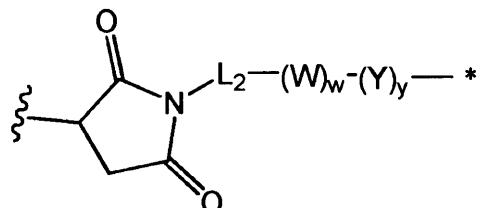
a) 配列番号 5 8 、 6 3 、 6 5 、 6 7 、 6 9 、 7 1 、 7 3 、 7 5 、 7 7 、 7 9 および 8 1 から選択される配列または配列番号 5 8 、 6 3 、 6 5 、 6 7 、 6 9 、 7 1 、 7 3 、 7 5 、 7 7 、 7 9 もしくは 8 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する任意の配列の重鎖；ならびに

b) 配列番号 5 9 および 6 1 から選択される配列または配列番号 5 9 もしくは 6 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する任意の配列の軽鎖
から選択される。

【 0 0 2 8 】

本発明の 1 つの実施形態では、L が下式 (III) :

【 化 2 】



(III)

のリンカーであり、

式中、

L₂ は、(C₄ - C₁₀) シクロアルキル - カルボニル、(C₂ - C₆) アルキルまたは(C₂ - C₆) アルキル - カルボニルであり；

W は、アミノ酸単位であり；w は、0 ~ 5 の間に含まれる整数であり；

Y は、PAB - カルボニルであり、ここで、PAB は

10

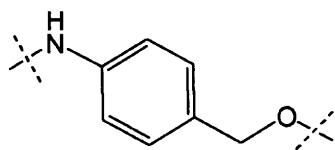
20

30

40

50

【化3】



であり；yは、0または1であり；

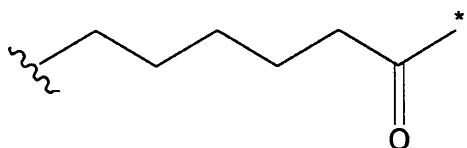
アスタリスクは、Dとの結合点を示し；かつ
波線は、Abとの結合点を示す、ADCに関する。

10

【0029】

本発明の1つの実施形態は、L₂が下式：

【化4】

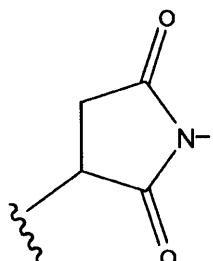


のものであり、式中、

アスタリスクは、(W)_wとの結合点を示し；かつ
波線は、式：

20

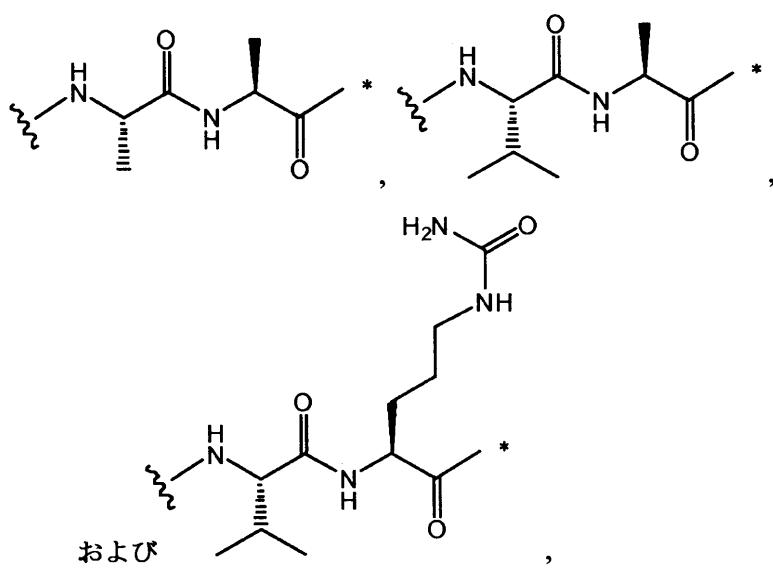
【化5】



30

のマレイミド部分の窒素原子との結合点を示す、ADCに関する。

【0030】

本発明の1つの実施形態では、w=0、またはw=2であれば、(W)_wは、
【化6】

40

50

から選択され、

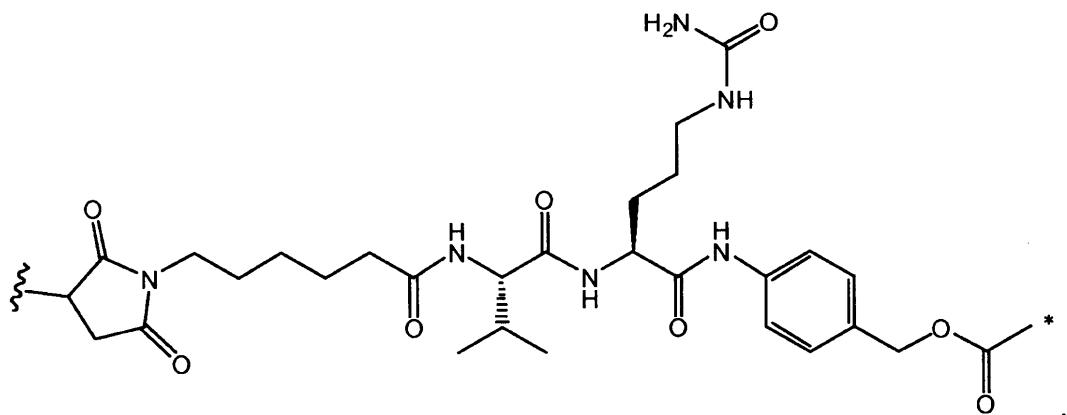
式中、

アスタリスクは、(Y)_yとの結合点を示し；かつ
波線は、L₂との結合点を示す。

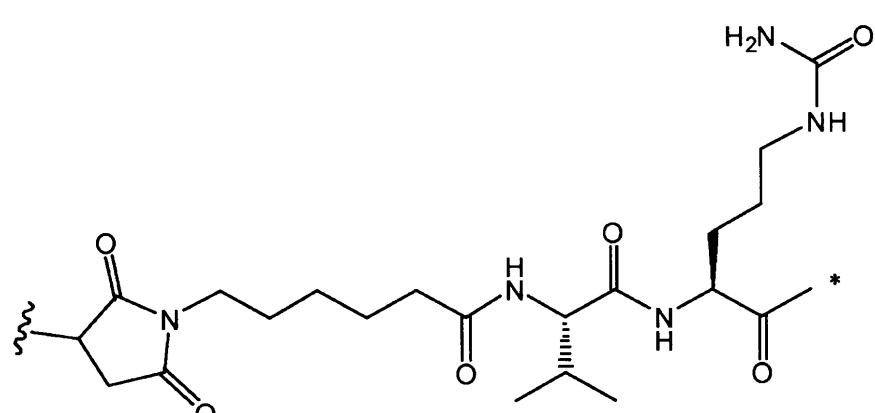
【0031】

本発明の1つの実施形態は、Lが

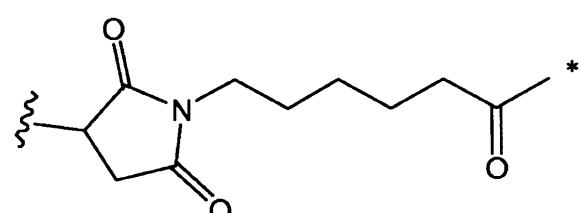
【化7】



10



20



30

, および

から選択され、

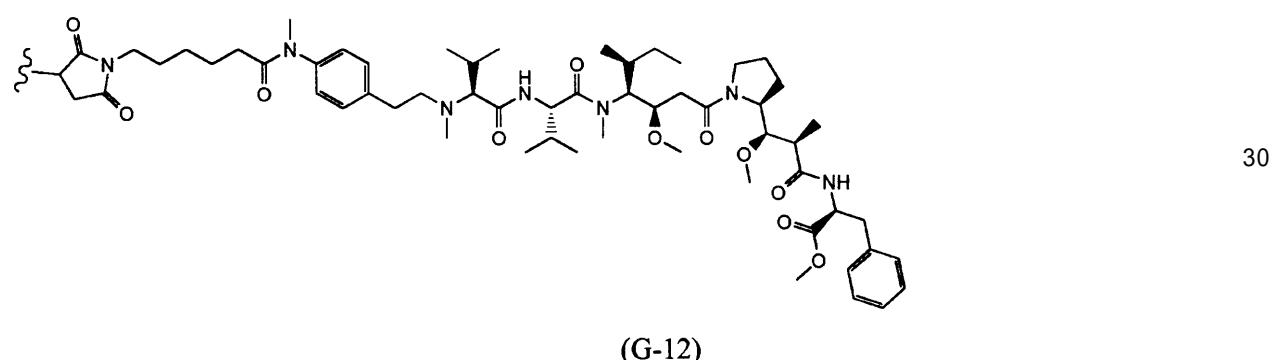
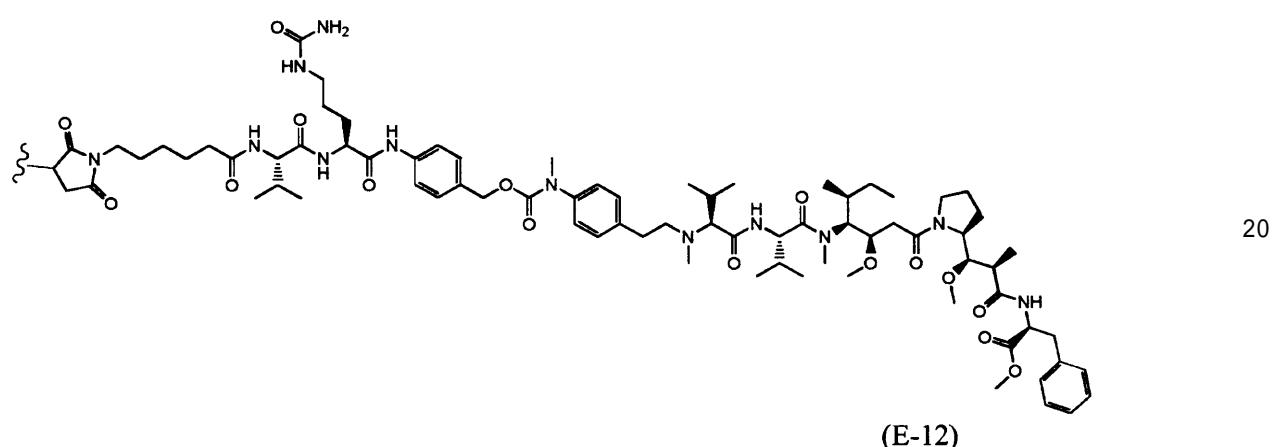
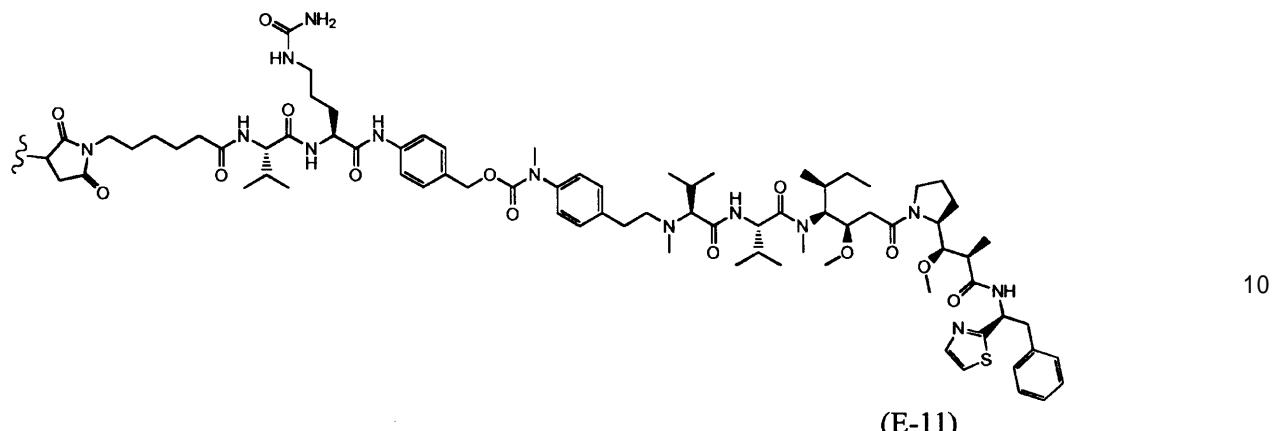
アスタリスクはDとの結合点を示し、かつ、波線はA bとの結合点を示すADCに関する。

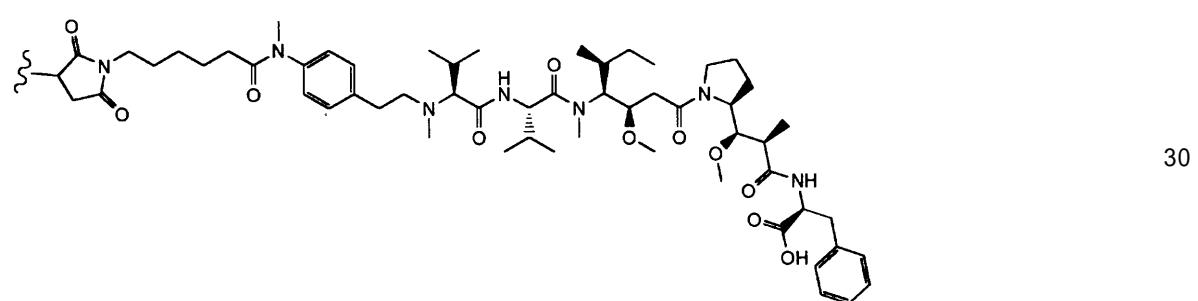
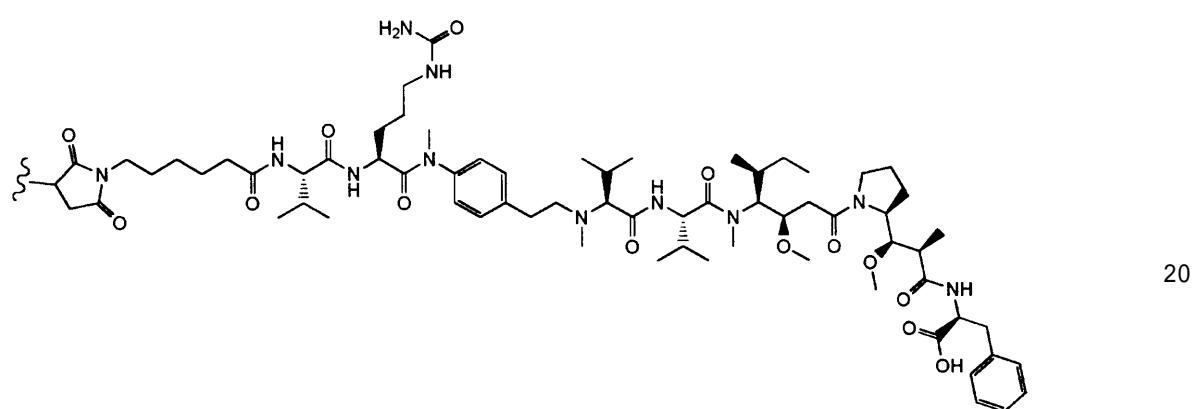
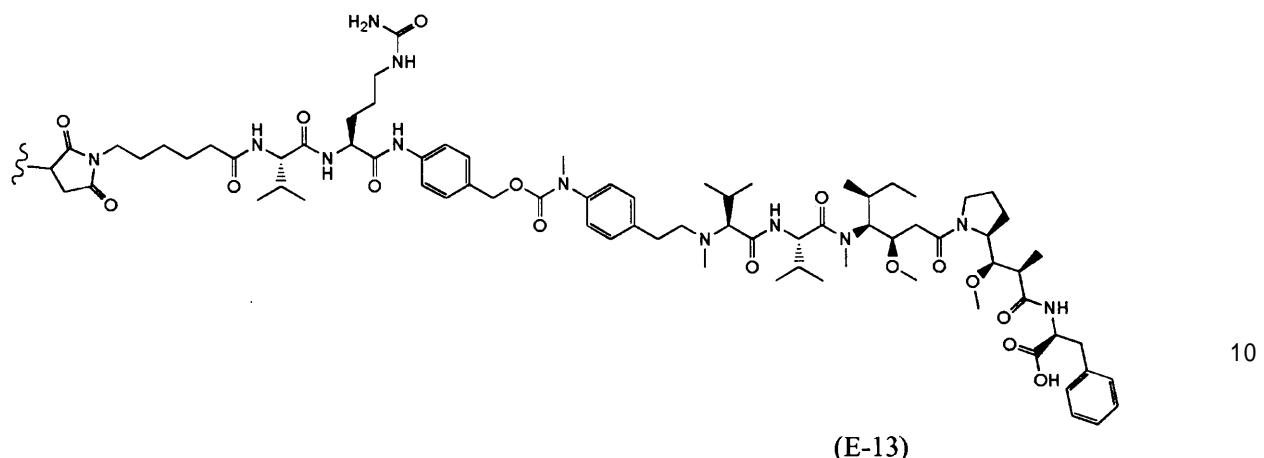
【0032】

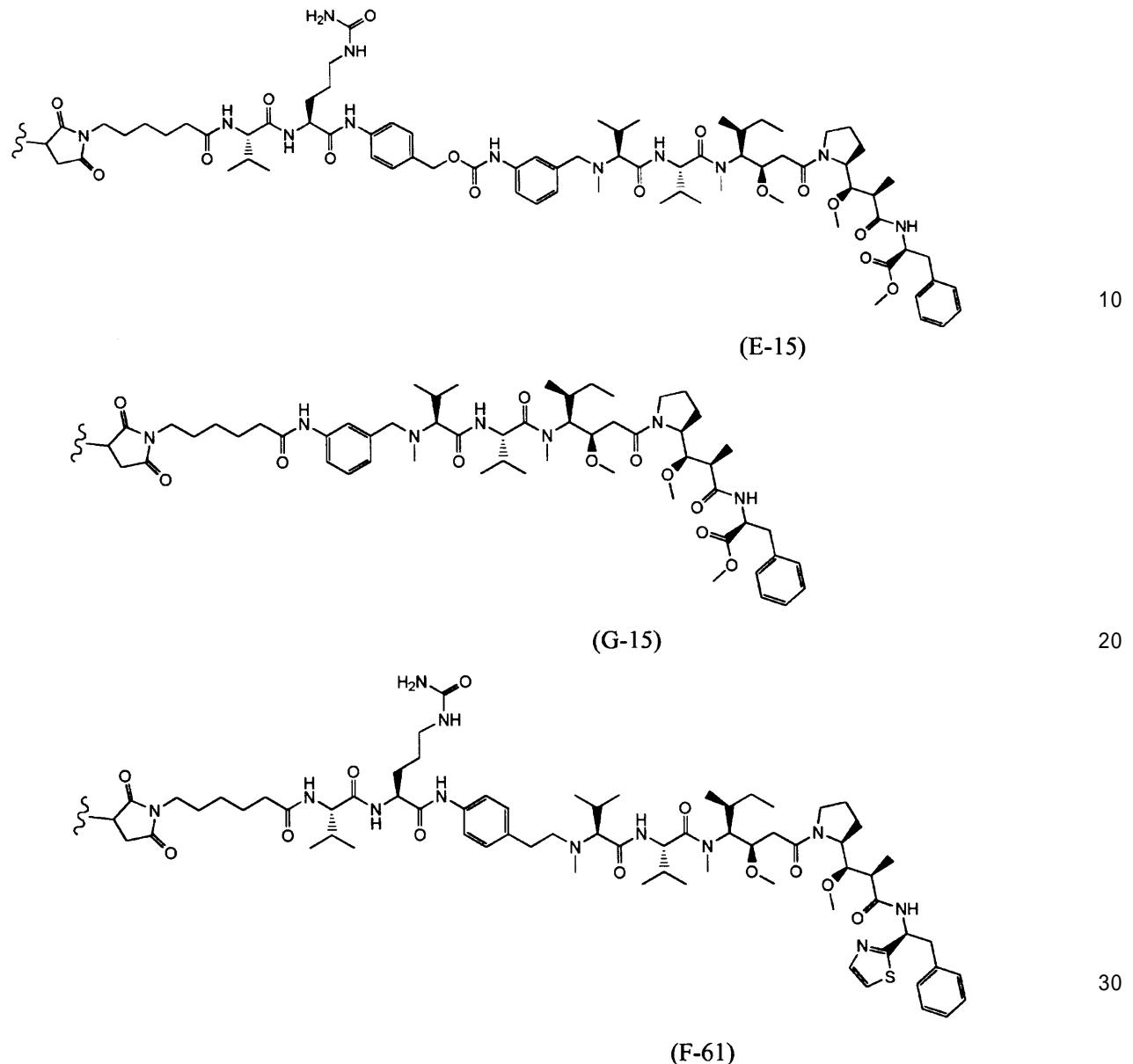
本発明の1つの実施形態は、(L-D)が

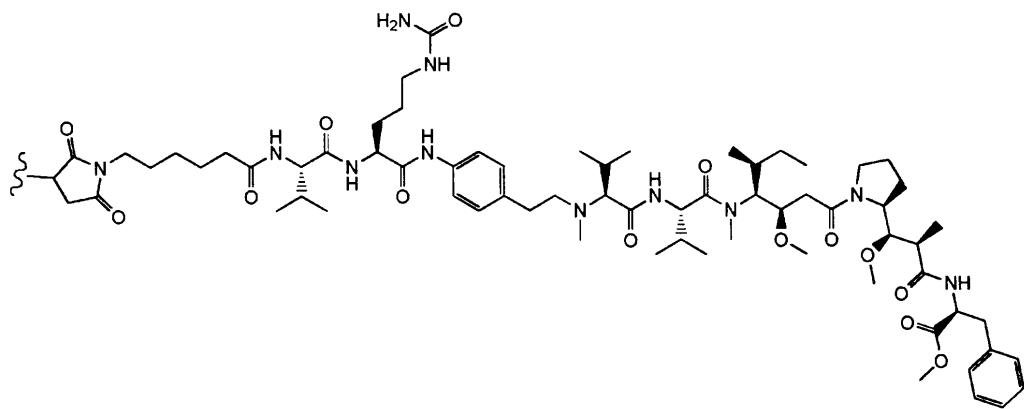
40

【化 8】



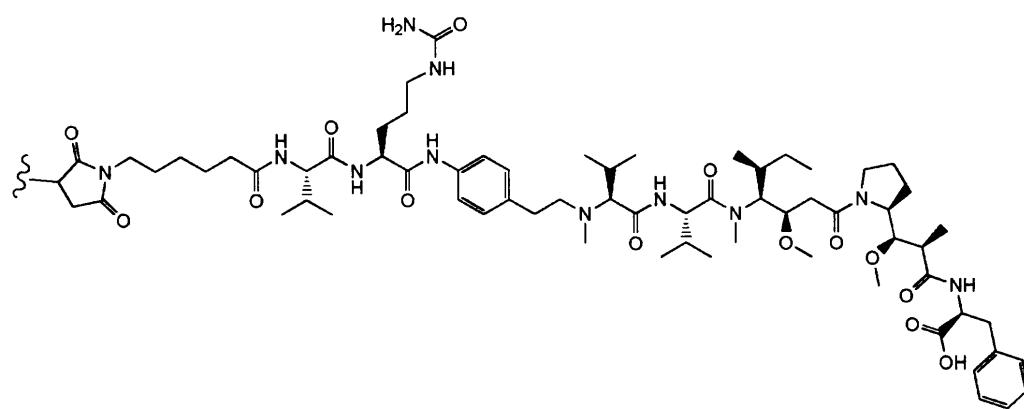






(F-62)

および



(F-63)

から選択され、式中、波線は A b との結合点を示す A D C に関する。

【 0 0 3 3 】

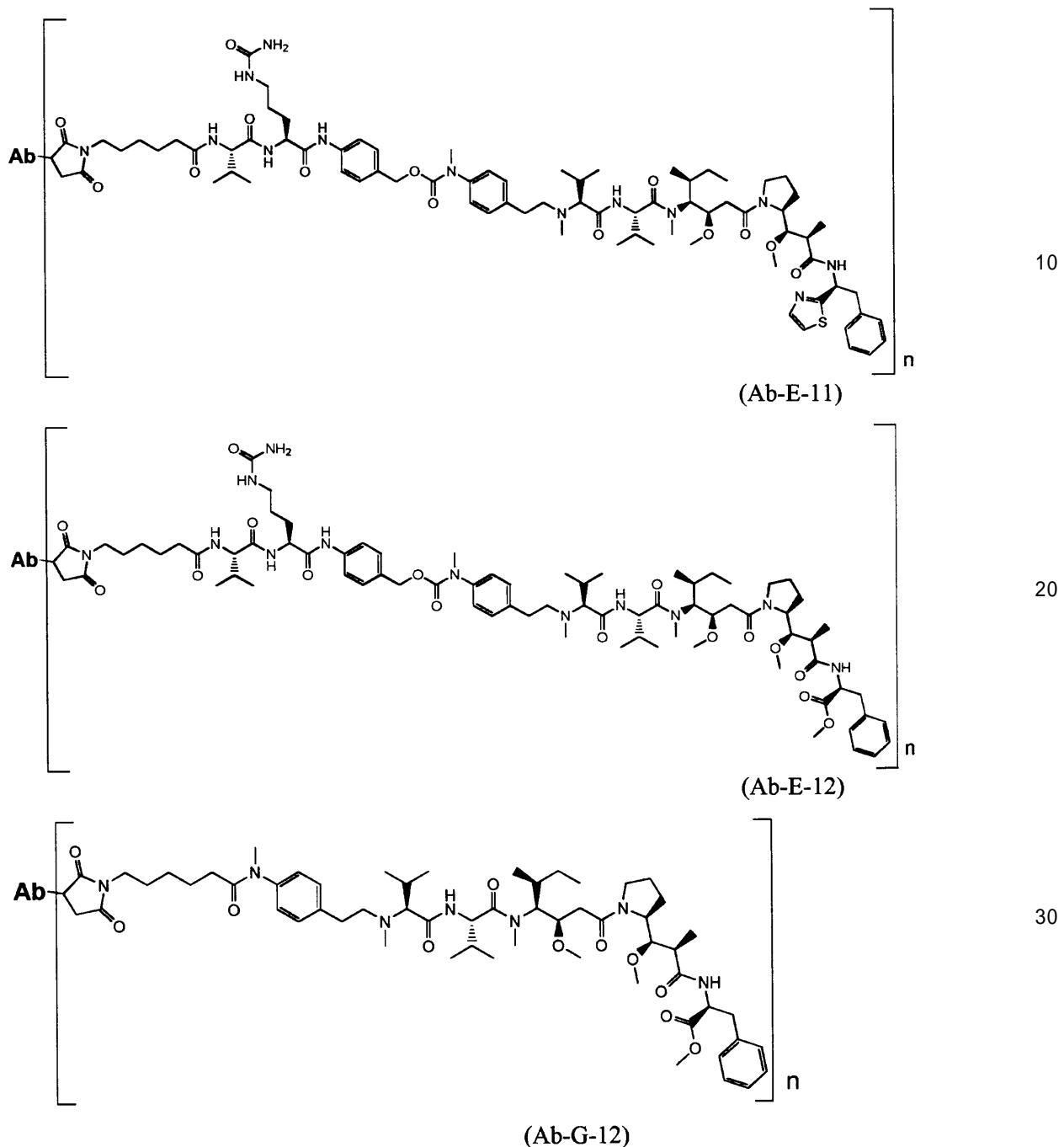
本発明の 1 つの実施形態は、

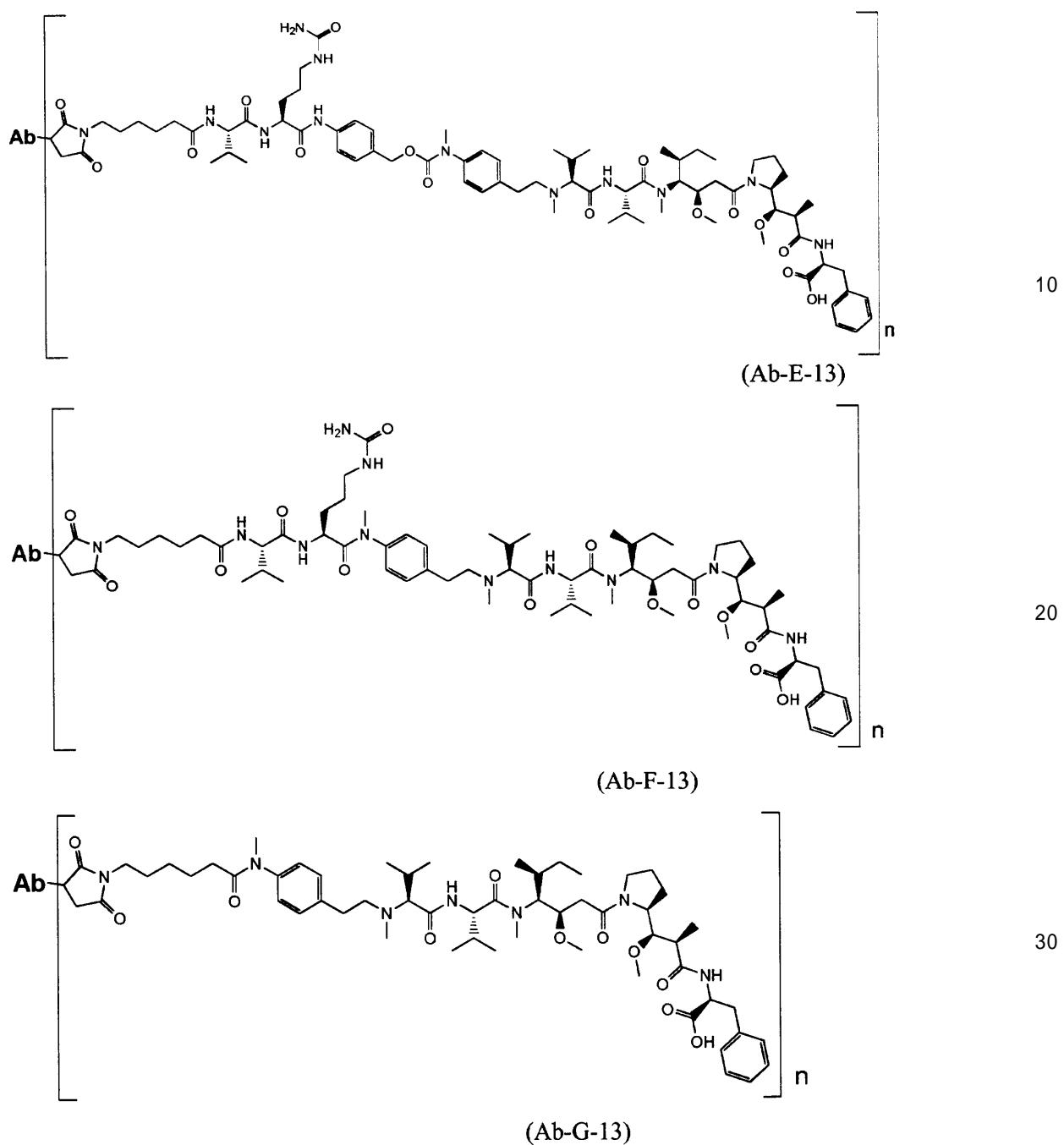
10

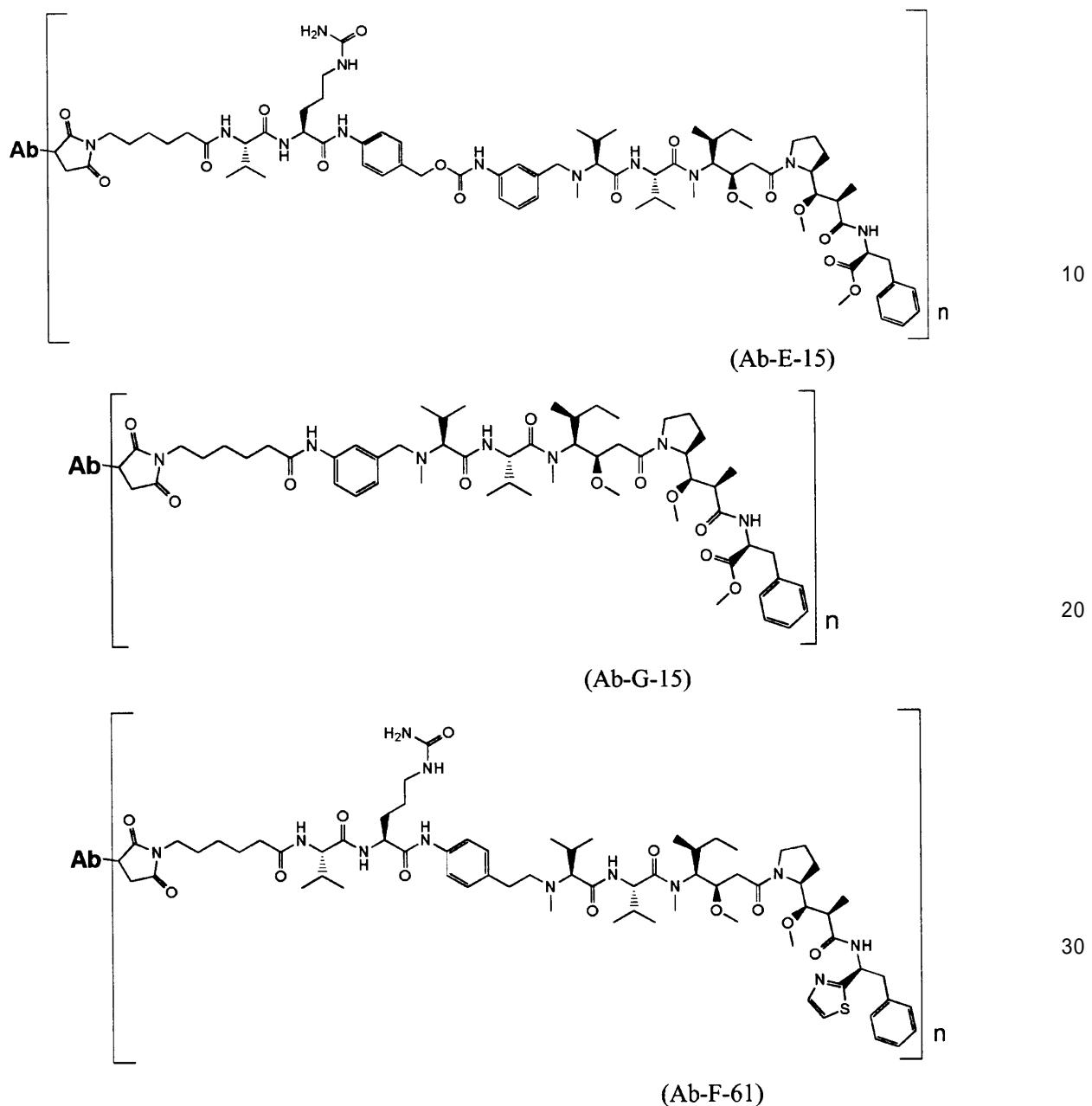
20

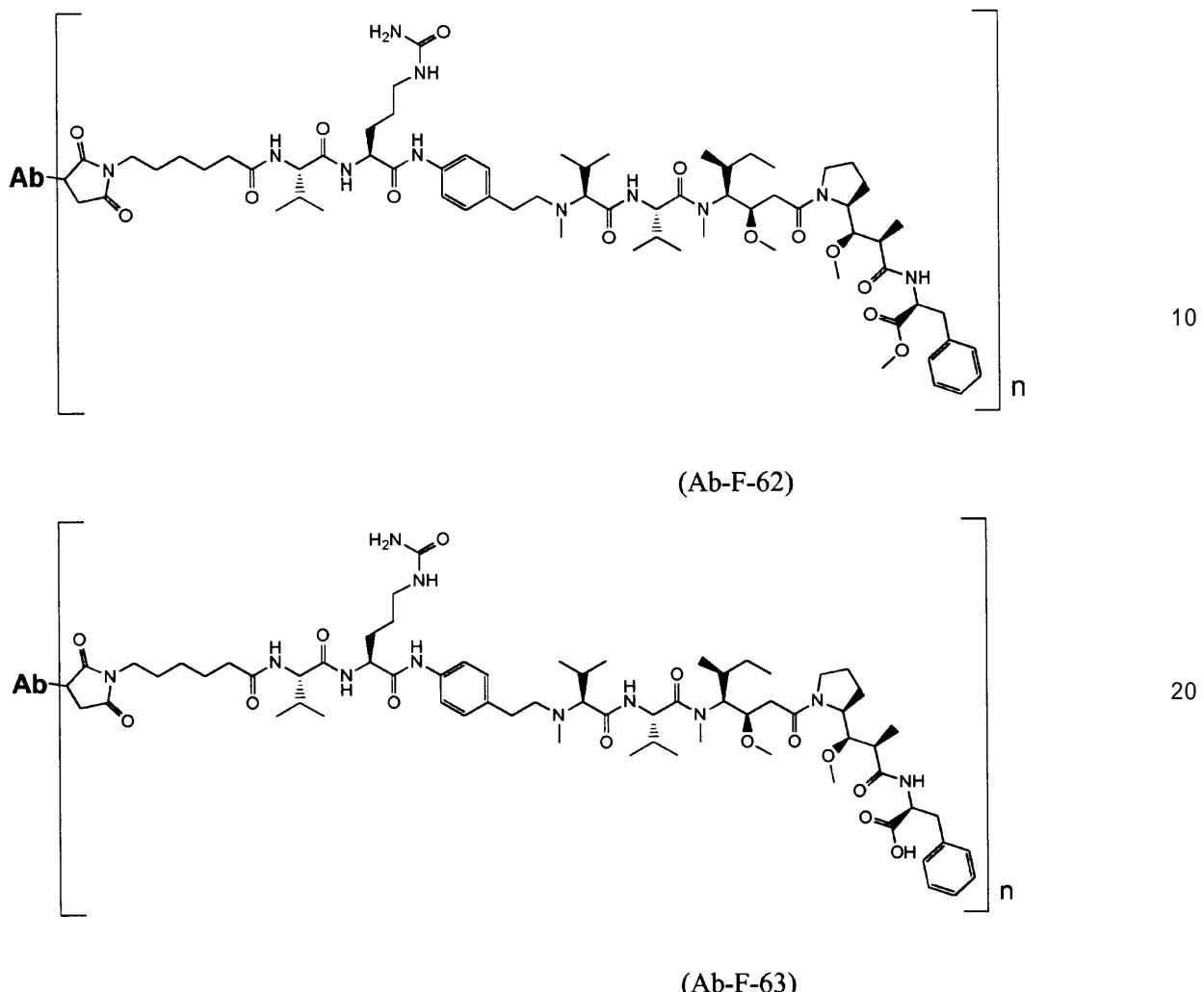
30

【化9】









から選択される式を有する A D C およびその薬学上許容可能な塩に関し、ここで、 A b は 30

、
 i) 抗体 208F2、212A11、214F8、219D6 および 213B10；
 ii) IGF-1R との結合に関して i) の抗体と競合する抗体；および
 iii) i) の抗体と同じ IGF-1R のエピトープと結合する抗体
 からなる群において選択される。

【 0 0 3 4 】

本発明の 1 つの実施形態は、 n が 2 である A D C に関する。

【 0 0 3 5 】

本発明の 1 つの実施形態は、 n が 4 である A D C に関する。

【 0 0 3 6 】

本発明の 1 つの実施形態は、 薬剤として使用するための A D C に関する。 40

【 0 0 3 7 】

本発明の 1 つの実施形態は、 上記のような A D C を含んでなる組成物に関する。

【 0 0 3 8 】

本発明の 1 つの実施形態は、 薬学上許容可能なビヒクルをさらに含んでなる組成物に関する。

【 0 0 3 9 】

本発明の 1 つの実施形態は、 IGF-1R 発現癌、または IGF-1R 関連癌の処置において使用するための組成物に関する。

【 0 0 4 0 】

50

I G F - 1 R 発現癌または I G F - 1 R 関連癌は、それらの表面で I G F - 1 R の全部または一部を発現または過剰発現する腫瘍細胞を含む。

【 0 0 4 1 】

本発明の 1 つの実施形態は、前記 I G F - 1 R 発現癌が、乳癌、結腸癌、食道癌、肝細胞癌、胃癌、神経膠腫、肺癌、黒色腫、骨肉腫、卵巣癌、前立腺癌、横紋筋肉腫、腎臓癌、甲状腺癌、子宮内膜癌、中皮腫、口腔扁平上皮癌および任意の薬剤耐性癌から選択される癌である組成物に関する。

【 0 0 4 2 】

本発明の 1 つの実施形態は、必要とする対象における I G F - 1 R 発現癌の処置のための方法であって、前記対象に有効量の本発明による少なくとも 1 種類の抗体 - 薬物複合体または組成物を投与することを含んでなる方法に関する。 10

【 0 0 4 3 】

本発明の 1 つの実施形態は、少なくとも i) 上記のような抗体 - 薬物複合体および / または組成物と、 ii) 前記抗体 - 薬物複合体および / または組成物が配分されているシリングジまたはバイアルまたはアンプルとを含んでなるキットに関する。

【 発明の具体的説明 】

【 0 0 4 4 】

I - 抗体 (A b)

用語「抗体」、「抗体(複数)」、「a b」、「A b」、「M A b」または「免疫グロブリン」は、最も広義で互換的に使用され、それらが所望の生物活性を示す限り、モノクローナル抗体、単離された、操作された、または組換え型の抗体(例えば、全長または完全モノクローナル抗体)、ポリクローナル抗体、多価抗体または多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)およびまたその抗体フラグメントが含まれる。 20

【 0 0 4 5 】

1 つの実施形態では、本発明の A D C の抗体は組換え抗体からなる。用語「組換え抗体」は、生細胞内での組換え D N A の発現から生じる抗体を意味する。本発明の A D C の組換え抗体は、生物学的有機体では見られない D N A 配列を作り出す、当業者に周知の遺伝子組換えの実験法を使用することにより得られる。

【 0 0 4 6 】

別の実施形態では、本発明の A D C の抗体は、化学的に合成された抗体からなる。 30

【 0 0 4 7 】

より詳しくは、このような分子は、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも 2 本の重(H)鎖と 2 本の軽(L)鎖とを含んでなる糖タンパク質からなる。各重鎖は、重鎖可変領域(またはドメイン)(本発明では H C V R または V H と略される)と重鎖定常領域とを含んでなる。重鎖定常領域は、3 つのドメイン、C H 1、C H 2 および C H 3 を含んでなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本発明では L C V R または V L と略される)と軽鎖定常領域とを含んでなる。軽鎖定常領域は、1 つのドメイン C L を含んでなる。V H および V L 領域は、フレームワーク領域(F R)と呼ばれるより保存された領域が散在した相補性決定領域(C D R)と呼ばれる超可変領域にさらに細分できる。各 V H および V L は、3 つの C D R と 4 つの F R から構成され、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4 に配置されている。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第 1 成分(C 1 q)を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。 40

【 0 0 4 8 】

本発明による A D C の抗体の「抗原結合フラグメント」または「I G F - I R 結合フラグメント」とは、抗体の標的(一般には抗原とも呼ばれる)と結合する能力を保持するいずれのペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質も示すものとする。

【 0 0 4 9 】

1 つの実施形態では、このような「抗原結合フラグメント」は、F v、s c F v (s c 50

は一本鎖)、F a b、F(a b')₂、F a b'、s c F v - F c フラグメントもしくはダイアボディ、またはポリ(エチレン)グリコール(「ペグ化」)(F v - P E G、s c F v - P E G、F a b - P E G、F(a b')₂ - P E G または F a b' - P E G と呼ばれるペグ化フラグメント)(「P E G」はポリ(エチレン)グリコール)などのポリ(アルキレン)グリコールの添加などの化学修飾により、または本発明による抗体の特徴的 C D R のうち少なくとも 1 つを有する前記フラグメントをリポソーム内に組み込むことによりその半減期が延長されている任意のフラグメントからなる群において選択される。好ましくは、前記「抗原結合フラグメント」は、それらが由来する抗体の可変重鎖または軽鎖の部分配列から構成されるか、または含んでなり、前記部分配列は、それが由来する抗体と同じ結合特異性、および標的に対して十分な、好ましくは、それが由来する抗体の親和性の少なくとも 1 / 1 0 0 、より好ましい様式では少なくとも 1 / 1 0 に相当する親和性を保持するのに十分なものである。より好ましくは、前記「抗原結合フラグメント」は、それらが由来する抗体の可変重鎖の 3 つの C D R C D R - H 1 、 C D R - H 2 および C D R - H 3 と可変軽鎖の 3 つの C D R C D R - L 1 、 C D R - L 2 および C D R - L 3 から少なくとも構成されるか、または含んでなる。

【 0 0 5 0 】

「結合」または「結合する」などとは、抗体、またはその任意の抗原結合フラグメントが、生理学的条件下で比較的安定な、抗原との複合体を形成することが意図される。特異的結合は、少なくとも約 $1 \times 1 0 ^{-6}$ M の平衡解離定数を特徴とし得る。2 分子が結合するかどうかを決定するための方法は当技術分野で周知であり、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴、および放射性標識アッセイなどが挙げられる。疑念を避けるため、それは前記抗体が別の抗原と、低レベルで結合または干渉できないことを意味するものではない。しかしながら、1 つの実施形態として、前記抗体は前記抗原のみと結合する。

【 0 0 5 1 】

本明細書において使用する場合、「I G F - 1 R 抗体」という表現は、「抗 I G F - 1 R 抗体」と同様に解釈されるべきであり、I G F - 1 R と結合し得る抗体を意味する。

【 0 0 5 2 】

本出願の1つの実施形態では、抗体のエピトープは、優先的にはヒト I G F - 1 R の細胞外ドメイン(I G F - 1 R E C D とも呼ばれる)に位置する。

【 0 0 5 3 】

特定の実施形態では、抗体、またはその任意の抗原結合フラグメントは、 $1 0 \times 1 0 ^{-1 0} \sim 1 \times 1 0 ^{-1 0}$ の間、より優先的には $8 \times 1 0 ^{-1 0} \sim 2 \times 1 0 ^{-1 0}$ の間に含まれる E C₅₀ で I G F - 1 R と結合し得る。

【 0 0 5 4 】

用語 50 % 有効濃度(E C₅₀)は、ベースラインと明示されたある暴露時間後の最大値の半分の応答を誘導する薬物、抗体または毒物の濃度に相当する。それは薬物の効力の尺度として慣用されている。従って、漸増用量反応曲線の E C₅₀ は、その最大効果の 50 % が見られる化合物の濃度を表す。素量的用量反応曲線の E C₅₀ は、明示された暴露期間の後に集団の 50 % が応答を示す化合物の濃度を表す。濃度尺度は一般に、比較的小さな濃度変化で急激に増加するシグモイド曲線を描く。これはベストフィットラインの導出により数学的に決定できる。

【 0 0 5 5 】

好ましい実施形態として、本発明で決定された E C₅₀ は、ヒト腫瘍細胞上に露出している I G F - 1 R E C D に結合する抗体の効力を特徴付ける。E C₅₀ パラメーターは、F A C S 分析を用いて決定される。E C₅₀ パラメーターは、ヒト腫瘍細胞上で発現されるヒト I G F - 1 R 上で最大結合の 50 % が得られる抗体濃度を表す。各 E C₅₀ 値は、4 パラメーター回帰曲線フィッティングプログラム(Prism Software)を用いて用量反応曲線の中点として計算された。このパラメーターは生理学的 / 病理学的状態を代表するように選択された。

【 0 0 5 6 】

10

20

30

40

50

用語「エピトープ」は、抗体により結合される抗原の領域である。エピトープは、構造的または機能的として定義され得る。機能的エピトープは一般に構造的エピトープのサブセットであり、相互作用の親和性に直接寄与する残基を有する。エピトープはまたコンフォメーション的でもあり得、すなわち、非直鎖アミノ酸から構成される。特定の実施形態では、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、またはスルホニル基などの化学的に活性な表面分子群である決定基を含み得、特定の実施形態では、特定の三次元構造特徴、および／または特定の変化特徴を有し得る。

【0057】

I G F - 1 Rとの結合に関する競合は、限定されるものではないが、放射能、B i a c o r e、E L I S A、フローサイトメトリーなどの当業者に公知のいずれの方法または技術によっても決定可能である。「I G F - 1 Rとの結合に関して競合する」とは、少なくとも20%、優先的には少なくとも50%、より優先的には少なくとも70%の競合を意味する。

【0058】

同じエピトープへの結合の決定は、限定されるものではないが、放射能、B i a c o r e、E L I S A、フローサイトメトリーなどの当業者に公知のいずれの方法または技術によっても決定可能である。「I G F - 1 Rの同じエピトープに結合する」とは、少なくとも20%、優先的には少なくとも50%、より優先的には少なくとも70%に競合を意味する。

【0059】

上述のように、一般的知識に反して、本発明は、I G F - 1 R 結合後に高い内部移行能を示す特定のI G F - 1 R 抗体に着目する。本明細書で使用される場合、「内部移行される」または「内部移行された」抗体（これらの2つの表現は同様である）は、哺乳動物細胞上のI G F - 1 R に結合した際に細胞により取り込まれる（それが入ることを意味する）ものである。このような抗体はA D C の一部として着目され、従って、それは連結された細胞傷害剤を標的癌細胞にアドレスする、または向ける。ひと度、内部移行されると、細胞傷害剤は癌細胞死を誘導する。

【0060】

驚くべきことに、本発明による抗体は総てC D R - H 2、C D R - H 3 およびC D R - L 2 に関しては同じ配列を示し、他の3つのC D R は異なる。この所見は、抗体の結合特異性に関して、C D R - H 3 が最も重要であり、エピトープの認識に最も関連があると記載されている一般的知識の一部であるので、一貫性があると思われる。

【0061】

A D C療法で成功するための重要な鍵は、標的抗原の特異性と抗原 - 抗体複合体の癌細胞への内部移行であると思われる。明らかに内部移行しない抗原は内部移行する抗原よりも細胞傷害性薬剤送達効果が低い。内部移行プロセスは抗原によって異なり、抗体により影響を受け得る複数のパラメーターに依存する。

【0062】

A D Cでは、細胞傷害剤が細胞傷害活性を付与し、使用する抗体が癌細胞に対する特異性、ならびに細胞傷害剤を適正にアドレスするよう細胞内に入れるためのベクターを担う。従って、A D Cを改善するために、抗体は標的癌細胞への高い内部移行能を示し得る。抗体により媒介される内部移行の効率は、標的とされるエピトープによって有意に異なる。強力な内部移行性I G F - 1 R 抗体の選択には、I G F - 1 R のダウンレギュレーションだけではなく、I G F - 1 R 抗体の細胞への内部移行後を研究する様々な実験データが必要である。

【0063】

1つの実施形態では、本発明によるA D Cの抗体の内部移行は、免疫蛍光もしくはF A C S（フローサイトメトリー）（本出願の下記に例示される通り）または内部移行機構に特異的な当業者に知られている任意の方法もしくはプロセスによって評価することができる。好みの実施形態では、本発明によるA D Cの抗体は、I G F - 1 Rとの結合後に少

10

20

30

40

50

なくとも 30%、優先的には 50% およびより優先的には 80% の内部移行を誘導し得る。

【0064】

複合体 IGF - 1R / 抗体は、前記 IGF - 1R の ECDへの抗体の結合の後に内部移行され、細胞表面の IGF - 1R 量の減少が誘導される。この減少は、限定されるものではないが、ウエスタンプロット、FACS、および免疫蛍光などの当業者に公知のいずれかの方法によって定量することができる。

【0065】

1つの実施形態では、このように内部移行を反映するこの減少は、好ましくは FACS により測定可能され、4¹⁰で測定された平均蛍光強度 (MFI) と抗体との4時間のインキュベーション後に37¹⁰で測定されたMFIの間の差またはとして表すことができる。

【0066】

非限定例として、この は、i) 本明細書に記載の抗体との4時間のインキュベーション後の乳癌細胞 MCF7 と、ii) Alexa 488 で標識された二次抗体を用い、非処理細胞および抗体で処理した細胞で得られたMFIに基づいて決定される。このパラメーターは、下式：(MFI₄ - MFI₃₇) で算出される通りに定義される。

【0067】

MFI は細胞表面で発現される IGF - 1R に比例するので、この MFI 間の差異は、GFR - 1R のダウンレギュレーションを反映する。²⁰

【0068】

有利な態様において、本抗体は、MCF - 7 上で (MFI₄ - MFI₃₇) を惹起する少なくとも 280、好ましくは少なくとも 400 の抗体からなる。

【0069】

より詳細には、上述の は下記の過程に従って測定することができ、それは例示的な非限定例と見なされるべきである：

a) 対象とする腫瘍細胞を低温 (4²⁰) または温かい (37²⁰) 完全培養培地中、本発明の抗体で処理し、インキュベートすること；

b) 工程 a) の処理細胞および並行して非処理細胞を二次抗体で処理すること；

c) 本発明の抗体と結合し得る二次標的抗体で処理した細胞および非処理の細胞の MFI を測定すること（表面に存在する IGF - 1R の量を代表する）；および

d) を非処理細胞で得られたMFIから処理細胞で得られたMFIの減算として計算すること。

【0070】

この MFI から、内部移行パーセンテージ：

$$100 \times (MFI_4 - MFI_{37}) / MFI_4$$

を求めることができる。

【0071】

本発明による ADC の抗体は、好ましくは、MCF7 上に 50% ~ 99%、70% ~ 90%、優先的には 75% ~ 87% の間で含まれる内部移行パーセンテージで存在する。⁴⁰

【0072】

本明細書に記載の抗体の特定の利点は、それらの内部移行速度に依存する。

【0073】

ADC の場合、使用する抗体は急速な、好ましくは、抗体の投与から 24 時間以内、より好ましくは 12 時間以内、いっそうより好ましくは 6 時間以内の内部移行速度を示すことが望ましいことが一般に知られている。

【0074】

本発明では、細胞表面結合抗体減少または細胞表面抗体減衰とも呼ばれる内部移行率は、t_{1/2} (半減期) として表され、MFI の 50% の低下を得るために必要な時間に相当する (この態様は、下記の例に関して明確に理解される)。⁵⁰

【0075】

特定の利点は、本発明のADCの抗体は、5～25分の間、優先的には10～20分の間に含まれるt_{1/2}を有する。

【0076】

本発明の特定の実施形態は、抗体Abが配列番号2の配列のCDR-H2および配列番号3の配列のCDR-H3を有する3つの重鎖CDRと、配列番号5の配列のCDR-L2を有する3つの軽鎖CDRとを含んでなるADCに関する。

【0077】

本発明の特定の実施形態は、抗体Abが配列番号1、2および3の配列の3つの重鎖CDRと、配列番号4、5および6の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなるADCに関する。 10

【0078】

ADCの実施形態は、配列番号1、2および3の配列、または配列番号1、2もしくは3と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を示す任意の配列とを含んでなるまたはからなる3つの重鎖CDR；ならびに配列番号4、5および6の配列、または配列番号4、5もしくは6と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する任意の配列を含んでなるまたはからなる3つの軽鎖CDRを含んでなる抗体を含んでなる。

【0079】

別の実施形態では、抗体、またはその任意の抗原結合フラグメントは、配列番号1、2および3の配列を含んでなる3つの重鎖CDR；ならびに配列番号4、5および6の配列を含んでなる3つの軽鎖CDRを含んでなる。 20

【0080】

IMGT独自ナンバリングは、抗原受容体であれ、鎖型であれ、または種であれ、可変ドメインを比較するために定義されている[Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pomme, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]。IMGT独自ナンバリングでは、保存されているアミノ酸は、常に同じ位置を持ち、例えば、システイン23(1st-CYS)、トリプトファン41(CONSERVED-TRP)、疎水性アミノ酸89、システイン104(2nd-CYS)、フェニルアラニンまたはトリプトファン118(J-PHEまたはJ-TRP)などである。IMGT独自ナンバリングは、フレームワーク領域の標準的な画定(FR1-IMGT: 1～26番、FR2-IMGT: 39～55番、FR3-IMGT: 66～104番およびFR4-IMGT: 118～128番)および相補性決定領域の標準的な画定：CDR1-IMGT: 27～38番、CDR2-IMGT: 56～65番およびCDR3-IMGT: 105～117番を提供する。ギャップは占有されていない位置を表すので、CDR-IMGT長(括弧内に示され、ドットで仕切られる、例えば[8.8.13])は重要な情報となる。IMGT独自ナンバリングは、IMGT Collie's de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)]と呼ばれる2Dグラフ、およびIMGT/3D structure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)]における3D構造において使用される。 30

【0081】

本明細書に相反する記載がなければ、相補性決定領域またはCDRは、IMGTナンバリングシステムに従って定義される免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の超可変領域を意味する。

【0082】

CDRもやはりKabatナンバリングシステム(Kabat et al., Sequences of protein 50

ns of immunological interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, および後続版)に従って定義することができる。3つの重鎖 CDR と 3つの軽鎖 CDR が存在する。本明細書では、用語 CDR (単数または複数) は、場合に応じて、抗体が認識する抗原またはエピトープに対するその抗体の親和性を担うアミノ酸残基の大多数を含むこれらの領域の 1 以上もしくはさらには全体を示すために使用される。本出願の通説を簡単にするために、Kabat による CDR は定義しない。しかしながら、IMGT による CDR の定義を用いて Kabat による CDR を定義することは当業者には自明であろう。

【 0 0 8 3 】

本発明の意味において、核酸またはアミノ酸の 2 配列間の「同一性」または「同一性パーセンテージ」は、最適なアラインメントの後に得られる、比較する 2 配列間の同一の又クレオチドまたはアミノ酸残基のパーセンテージを意味し、このパーセンテージは、純粹に統計学的なものであり、2 配列間の差異はそれらの長さに沿ってランダムに分布している。2 つの核酸配列またはアミノ酸配列間の比較は、それらを最適にアラインした後に配列を比較することによって慣例的に行われ、前記比較はセグメントにより、または「アラインメントウインドウ」を使用することによって行うことができる。比較のための配列の最適なアラインメントは、手による比較の他、Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482] のローカルホモロジーアルゴリズムの手段によるか、Needleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443] のローカルホモロジーアルゴリズムの手段によるか、Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] の類似性検索法の手段によるか、またはこれらのアルゴリズムを用いるコンピューターソフトウェア (the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI の G A P、B E S T F I T、F A S T A および T F A S T A、または比較ソフトウェア B L A S T N R もしくは B L A S T P による) の手段によって行うことができる。

【 0 0 8 4 】

同一性パーセンテージは、2 配列間、好ましくは 2 つの全配列の間でアミノ酸又クレオチドまたは残基が同一である位置の数を決定し、その同一の位置の数をアラインメントウインドウ内の位置の総数で割り、その商に 100 を掛けて 2 配列間の同一性パーセンテージを得ることによって計算される。

【 0 0 8 5 】

例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html> のサイトで利用可能な B L A S T プログラム、「 B L A S T 2 sequences」(Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol, 1999, Lett. 174:247-250) をデフォルトパラメーター (特に、パラメーター「オープンギャップペナルティー」: 5、および「エクステンションギャップペナルティー」: 2 に関して ; 選択されるマトリックスは、このプログラムによって提案される例えは「 B L O S U M 62 」マトリックスである) とともに使用でき、比較する 2 配列間の同一性パーセンテージはこのプログラムによって直接計算される。

【 0 0 8 6 】

参照アミノ酸配列と少なくとも 80 %、好ましくは 85 %、90 %、95 % および 98 % の同一性を示すアミノ酸配列に関して、好ましい例としては、参照配列、特定の改変、特に、少なくとも 1 つのアミノ酸の欠失、付加もしくは置換、末端切断または延長を含有するものが含まれる。1 以上の連続または非連続アミノ酸の置換の場合、置換アミノ酸が「等価な」アミノ酸により置換される置換が好ましい。ここで、「等価なアミノ酸」は、構造アミノ酸の 1 つに関しておそらく置換されるが、対応する抗体の、また、以下に定義される具体例の、生物活性を変更しないいずれのアミノ酸も示すものとする。

【 0 0 8 7 】

等価なアミノ酸は、それらが置換されるアミノ酸との構造的相同性か、または生成される可能性のある種々の抗体間の生物活性の比較試験の結果かのいずれかに基づいて決定され得る。

10

20

30

40

50

【0088】

限定されない例として、下表1は、対応する改変抗体の生物活性に有意な改変をもたらさずに行えると思われる潜在的置換をまとめたものであり、同じ条件下で逆の置換も当然可能である。

【0089】

【表1】

表1

元の残基	置換
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

10

20

30

【0090】

本発明の特定の態様は、ADCの抗体がインスリン受容体(IRR)に結合しないというものである。この態様は、本明細書に記載の抗体はIRR、すなわち、インスリン代謝に悪影響を持たないので注目される。

【0091】

別の実施形態では、本発明のADCの抗体のさらに別の有利な態様は、ヒトIGF-1Rにだけでなく、サルIGF-1Rにも、より詳しくはカニクイザルIGF-1Rにも結合できるということである。この態様もまた、それが臨床試験に要される毒性評価を助けるので注目される。

40

【0092】

さらに別の実施形態では、本発明のADCの抗体は、モノクローナル抗体からなる。

【0093】

用語「モノクローナル抗体」または「Mab」は、本明細書で使用される場合、実質的に均質の抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、その集団の個々の抗体は、わずかな量で見られ得る潜在的な自然突然変異以外は同一である。モノクローナル抗体は特異性が高く、単一のエピトープに向けられている。このようなモノクローナル抗体は、B細胞の単一のクローニングまたはハイブリドーマにより生産され得る。モノクローナル抗体はまた、組換え型であってもよく、すなわち、タンパク質工学または化学合成によっても生産され得る。モノクローナル抗体はまた、ファージ抗体ライブラリーから単離することも

50

できる。加えて、一般に種々の決定基またはエピトープに対する種々の抗体を含むポリクローナル抗体の作製とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原の単一のエピトープに対するものである。

【0094】

モノクローナル抗体は、本明細書において、以降に記載されるようなマウス、キメラおよびヒト化抗体を含む。

【0095】

抗体は好ましくは、微生物培養物の仏国コレクション（C N C M、パストール研究所、
25 Rue du Docteur Roux、75724 Paris Cedex
15、フランス）に提出されたマウス起源のハイブリドーマに由来し、前記ハイブリド
ーマは、Balb/C免疫マウス脾細胞／リンパ球と骨髄腫Sp 2/O-Ag 14細胞株の細胞の融合により得られたものである。
10

【0096】

1つの実施形態では、本発明のADCのIGF-1R抗体はマウス抗体からなり、従って、m [抗体の名称]と呼ばれる。

【0097】

1つの実施形態では、IGF-1R抗体はキメラ抗体からなり、従って、c [抗体の名称]と呼ばれる。

【0098】

1つの実施形態では、IGF-1R抗体はヒト化抗体からなり、従って、h z [抗体の名称]と呼ばれる。
20

【0099】

疑念を避けるため、以下の明細書において、「IGF-1R抗体」および「[抗体の名称]」という表現は同等であり、前記IGF-1R抗体または前記「[抗体の名称]」のマウス型、キメラ型およびヒト化型を含む（相反する記載がない限り）。必要であれば、接頭辞m-（マウス）、c-（キメラ）またはh z-（ヒト化）が使用される。

【0100】

より明確にするために、下表2に好ましい抗体に関してIMGTに従って定義されるCDR配列を示す。

【0101】

【表2】

表2

	重鎖	軽鎖	配列番号
コンセンサス	CDR-H1		1
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	4
		CDR-L2	5
		CDR-L3	6
208F2	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11
212A11	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	10
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11
214F8 および 213B10	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	12
219D6	CDR-H1		8
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11

【0102】

上記のような6つのCDRのいずれの組合せも本発明の一部と見なされるべきであることは当業者には自明であろう。

【0103】

この表2から見て取ることができるよう、本明細書に記載の抗体は総て、CDR-H2、CDR-H3およびCDR-L2に関して同じ配列を有し、この特性は上記のように特に注目される。

【0104】

特定の態様は、抗体がマウス抗体であり、前記抗体はまたマウスとは異種の、特にヒトの抗体に由来する軽鎖および重鎖定常領域も含んでなることを特徴とするADCに関する。

【0105】

別の特定の態様は、抗体がキメラ(c)抗体であり、前記抗体はまたマウスとは異種の、特にヒトの抗体に由来する軽鎖および重鎖定常領域も含んでなることを特徴とするADCに関する。

【0106】

キメラ抗体は、所与の種の抗体に由来する天然可変領域(軽鎖および重鎖)を前記の所与の種とは異種の抗体の軽鎖および重鎖の定常領域と組み合わせて含有するものである。

10

20

30

40

50

【0107】

キメラ抗体は、組換え遺伝子の技術を使用することにより製造され得る。例えば、キメラ抗体は、プロモーターおよび非ヒト、特にマウスのモノクローナル抗体の可変領域をコードする配列および異種、好ましくは、ヒトの抗体定常領域をコードする配列を含む組換えDNAをクローニングすることにより製造することができる。1つのこのような組換え遺伝子によりコードされている本発明によるADCのキメラ抗体は、例えば、マウス-ヒトキメラであり得、この抗体の特異性はマウスDNAに由来する可変領域により決定され、そのアイソタイプは、ヒトDNAに由来する定常領域により決定される。

【0108】

限定されるものではないが、好ましい実施形態では、本発明のADCの抗体は、 10

a) 配列番号13の配列または配列番号13と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号9、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；

b) 配列番号14の配列または配列番号14と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号10、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；

c) 配列番号15の配列または配列番号15と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号9、5および12の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；

d) 配列番号16の配列または配列番号16と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号9、5および11の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；ならびに 20

e) 配列番号17の配列または配列番号17と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号9、5および12の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体

から選択される。

【0109】

「配列番号13～17と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を示す任意の配列」とは、配列番号1、2および3の3つの重鎖CDRを示し、加えて、CDRに相当する配列（すなわち、配列番号1、2および3）外の配列番号13～17の全長配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を示す配列を表すものとする。 30

【0110】

限定されるものではないが、別的好ましい実施形態では、本発明のADCの抗体は、

a) 配列番号18の配列または配列番号18と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号7、2および3の配列の3つの重鎖CDRとを含んでなる抗体；

b) 配列番号19の配列または配列番号19と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号7、2および3の配列の3つの重鎖CDRとを含んでなる抗体； 40

c) 配列番号20の配列または配列番号20と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号7、2および3の配列の3つの重鎖CDRとを含んでなる抗体；

d) 配列番号21の配列または配列番号21と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号8、2および3の配列の3つの重鎖CDRとを含んでなる抗体；ならびに

e) 配列番号22の配列または配列番号22と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号7、2および3の配列の3つの重鎖CDRとを含んでなる抗体

から選択される。

50

【0111】

「配列番号18～22と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を示す任意の配列」とは、配列番号4、5および6の3つの軽鎖CDRを示す、および加えて、CDRに相当する配列（すなわち、配列番号4、5および6）外の配列番号18～22の全長配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を示す配列をそれぞれ表すものとする。

【0112】

本発明の実施形態は、Abが、

a) 配列番号13の配列または配列番号13と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号18の配列または配列番号18と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインとを含んでなる抗体；
10

b) 配列番号14の配列または配列番号14と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号19の配列または配列番号19と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインとを含んでなる抗体；

c) 配列番号15の配列または配列番号15と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号20の配列または配列番号20と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインとを含んでなる抗体；

d) 配列番号16の配列または配列番号16と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号21の配列または配列番号21と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインとを含んでなる抗体；ならびに
20

e) 配列番号17の配列または配列番号17と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号22の配列または配列番号22と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインとを含んでなる抗体
から選択される抗体であるADCに関する。

【0113】

本明細書に記載のキメラ抗体はまた定常ドメインによっても特徴付けることができ、より詳しくは、限定されるものではないが、IgG1、IgG2、IgG3、IgM、IgA、IgDまたはIgEなどの前記キメラ抗体が選択または設計され得る。より好ましくは、本発明に関して、前記キメラ抗体はIgG1またはIgG4である。

【0114】

本発明の実施形態は、Abが、形式IgG1において上記されているような可変ドメインVHおよびVLを含んでなるキメラ抗体であるADCに関する。より好ましくは、前記キメラ抗体は、配列番号43の配列のVHの定常ドメインと、配列番号45の配列のVLのKappaドメインとを含んでなる。

【0115】

本発明の実施形態は、Abが、形式IgG4において上記されているような可変ドメインVHおよびVLを含んでなるキメラ抗体であるADCに関する。より好ましくは、前記キメラ抗体は、配列番号44の配列のVHの定常ドメインと、配列番号45の配列のVLのKappaドメインとを含んでなる。

【0116】

限定されるものではないが、別の好ましい実施形態では、本発明のADCの抗体は、

a) 配列番号23の配列または配列番号23と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号28の配列または配列番号28と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

b) 配列番号24の配列または配列番号24と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号29の配列または配列番号29と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

c) 配列番号25の配列または配列番号25と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号30の配列または配列番号30と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；
40
50

d) 配列番号 2 6 の配列または配列番号 2 6 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 3 1 の配列または配列番号 3 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；ならびに

e) 配列番号 2 7 の配列または配列番号 2 7 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 3 2 の配列または配列番号 3 2 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体
から選択される。

【 0 1 1 7 】

より明確にするために、下表 3 に好ましいキメラ抗体に関してそれぞれ V H および V L の配列を示す。

【 0 1 1 8 】

【 表 3 】

表 3

	重鎖	軽鎖	配列番号
c208F2	可変ドメイン(VH)		13
		可変ドメイン(VL)	18
	全長		23
		全長	28
c212A11	可変ドメイン(VH)		14
		可変ドメイン(VL)	19
	全長		24
		全長	29
c214F8	可変ドメイン(VH)		15
		可変ドメイン(VL)	20
	全長		25
		全長	30
c219D6	可変ドメイン(VH)		16
		可変ドメイン(VL)	21
	全長		26
		全長	31
c213B10	可変ドメイン(VH)		17
		可変ドメイン(VL)	22
	全長		27
		全長	32

【 0 1 1 9 】

本発明のさらに別の特定の態様は、「 A b 」が、ヒト抗体に由来する軽鎖および重鎖の

10

20

30

40

50

定常領域がそれぞれ または 領域および - 1、 - 2 または - 4 領域であることを特徴とするヒト化抗体である、 A D C に関する。

【 0 1 2 0 】

「ヒト化抗体」は、非ヒト起源の抗体に由来する C D R 領域を含み、抗体分子の他の部分は 1 つの（またはいくつかの）ヒト抗体に由来する抗体を意味する。加えて、骨格セグメント残基（ F R と呼ばれる）の一部を、結合親和性を保持するように改変することができる。

【 0 1 2 1 】

ヒト化抗体またはそのフラグメントは、当業者に公知の技術によって作製することができる。このようなヒト化抗体は、 in vitro 診断または in vivo における予防的および／または治療的処置を含む方法におけるそれらの使用に好ましい。 P D L により特許 E P 0 4 5 1 2 1 6 、 E P 0 6 8 2 0 4 0 、 E P 0 9 3 9 1 2 7 、 E P 0 5 6 6 6 4 7 または U S 5 , 5 3 0 , 1 0 1 、 U S 6 , 1 8 0 , 3 7 0 、 U S 5 , 5 8 5 , 0 8 9 および U S 5 , 6 9 3 , 7 6 1 に記載されている例え、「 C D R グラフト」技術などの他のヒト化技術もまた当業者に公知である。米国特許第 5 , 6 3 9 , 6 4 1 号または同第 6 , 0 5 4 , 2 9 7 号、同第 5 , 8 8 6 , 1 5 2 号および同第 5 , 8 7 7 , 2 9 3 号も引用することができる。

【 0 1 2 2 】

本発明の特定の実施形態として、以下の実施例においてより詳しく解説されるように、本明細書では h z 2 0 8 F 2 からなる抗体が記載される。このようなヒト化は、本発明の他の抗体部分にも当てはまり得る。

【 0 1 2 3 】

好ましい実施形態では、本発明による A D C の抗体は、

- i) それぞれ配列番号 7 、 2 および 3 の配列の C D R - H 1 、 C D R - H 2 および C D R - H 3 と、
- ii) ヒト生殖細胞系 I G H V 1 - 4 6 * 0 1 （配列番号 4 6 ）に由来する F R 1 、 F R 2 および F R 3 と、
- iii) ヒト生殖細胞系 I G H J 4 * 0 1 （配列番号 4 8 ）に由来する F R 4 を有する重鎖可変ドメイン（ V H ）を含んでなる。

【 0 1 2 4 】

好ましい実施形態では、本発明による A D C の抗体は、

- i) それぞれ配列番号 9 、 5 および 1 1 の配列の C D R - L 1 、 C D R - L 2 および C D R - L 3 と、
- ii) ヒト生殖細胞系 I G K V 1 - 3 9 * 0 1 （配列番号 4 7 ）に由来する F R 1 、 F R 2 および F R 3 と、
- iii) ヒト生殖細胞系 I G K J 4 * 0 1 （配列番号 4 9 ）に由来する F R 4 を有する軽鎖可変ドメイン（ V L ）を含んでなる。

【 0 1 2 5 】

限定されるものではないが、本発明の好ましい実施形態では、抗体は、

- a) それぞれ配列番号 7 、 2 および 3 の配列の C D R - H 1 、 C D R - H 2 および C D R - H 3 と、ヒト生殖細胞系 I G H V 1 - 4 6 * 0 1 （配列番号 4 6 ）に由来する F R 1 、 F R 2 および F R 3 、ならびにヒト生殖細胞系 I G H J 4 * 0 1 （配列番号 4 8 ）に由来する F R 4 とを有する重鎖と、
- b) それぞれ配列番号 9 、 5 および 1 1 の配列の C D R - L 1 、 C D R - L 2 および C D R - L 3 と、ヒト生殖細胞系 I G K V 1 - 3 9 * 0 1 （配列番号 4 7 ）に由来する F R 1 、 F R 2 および F R 3 、ならびにヒト生殖細胞系 I G K J 4 * 0 1 （配列番号 4 9 ）に由来する F R 4 とを有する軽鎖を含んでなる。

【 0 1 2 6 】

1 つの実施形態では、本発明による A D C の抗体は、配列番号 3 3 の配列の重鎖可変ド

10

20

30

40

50

メイン(V H)と、配列番号 3 5 の配列の軽鎖可変ドメイン(V L)とを含んでなる。前記ヒト化抗体は、以下、 h z 2 0 8 F 2 (「変異体 1 」 または 「 V a r . 1 」)と呼ぶ。

【 0 1 2 7 】

別の実施形態では、本発明による A D C の抗体は、配列番号 3 3 の配列の重鎖可変ドメイン(V H)を含んでなり、前記配列番号 3 3 の配列は、残基 2 0 、 3 4 、 3 5 、 3 8 、 4 8 、 5 0 、 5 9 、 6 1 、 6 2 、 7 0 、 7 2 、 7 4 、 7 6 、 7 7 、 7 9 、 8 2 および 9 5 から選択される少なくとも 1 つの復帰突然変異を含んでなる。

【 0 1 2 8 】

「復帰突然変異 (back-mutation or back mutation) 」という表現は、生殖細胞系中に存在するヒト残基の突然変異またはマウス配列に元々存在する対応する残基による置換を意味する。

10

【 0 1 2 9 】

別の実施形態では、本発明による A D C の抗体は、配列番号 3 3 の配列の重鎖可変ドメイン(V H)を含んでなり、前記配列番号 3 3 の配列は、残基 2 0 、 3 4 、 3 5 、 3 8 、 4 8 、 5 0 、 5 9 、 6 1 、 6 2 、 7 0 、 7 2 、 7 4 、 7 6 、 7 7 、 7 9 、 8 2 および 9 5 から選択される 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 または 1 7 の復帰突然変異を含んでなる。

【 0 1 3 0 】

より明確にするために、下表 4 に好ましい復帰突然変異を示す。

【 0 1 3 1 】

【 表 4 】

20

表 4

残基番号	20	34	35	38	48	50	59	61
マウス	M	I	Y	K	L	W	K	N
ヒト	V	M	H	R	M	I	S	A

残基番号	62	70	72	74	76	77	79	82	95
マウス	E	L	A	K	S	N	A	F	F
ヒト	Q	M	R	T	T	S	V	E	Y

30

【 0 1 3 2 】

1 つの実施形態では、本発明による A D C の抗体は、配列番号 3 5 の配列の軽鎖可変ドメイン(V L)を含んでなり、前記配列番号 3 5 の配列は、残基 2 2 、 5 3 、 5 5 、 6 5 、 7 1 、 7 2 、 7 7 および 8 7 から選択される少なくとも 1 つの復帰突然変異を含んでなる。

【 0 1 3 3 】

1 つの実施形態では、本発明による A D C の抗体は、配列番号 3 5 の配列の軽鎖可変ドメイン(V L)を含んでなり、前記配列番号 3 5 の配列は、残基 2 2 、 5 3 、 5 5 、 6 5 、 7 1 、 7 2 、 7 7 または 8 7 から選択される 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 または 8 の復帰突然変異を含んでなる。

40

【 0 1 3 4 】

別の実施形態では、本発明による A D C の抗体は、

a) 配列番号 3 3 の配列の重鎖可変ドメイン(V H)、ここで前記配列番号 3 3 の配列は、残基 2 0 、 3 4 、 3 5 、 3 8 、 4 8 、 5 0 、 5 9 、 6 1 、 6 2 、 7 0 、 7 2 、 7 4 、 7 6 、 7 7 、 7 9 、 8 2 および 9 5 から選択される少なくとも 1 つの復帰突然変異を含んでなる；と、

b) 配列番号 3 5 の配列の軽鎖可変ドメイン(V L)、ここで前記配列番号 3 5 の配列は、残基 2 2 、 5 3 、 5 5 、 6 5 、 7 1 、 7 2 、 7 7 および 8 7 から選択される少なくと

50

も 1 つの復帰突然変異を含んでなる
とを含んでなる。

【 0 1 3 5 】

より明確にするために、下表 5 に好ましい復帰突然変異を示す。

【 0 1 3 6 】

【 表 5 】

表 5

残基番号	22	53	55	65	71	72	77	87
マウス	S	R	H	R	Y	S	N	F
ヒト	T	S	Q	S	F	T	S	Y

【 0 1 3 7 】

このような実施形態では、本発明による A D C の抗体は、上述の復帰突然変異の総てを含んでなり、配列番号 3 4 の配列の重鎖可変ドメイン (V H) と、配列番号 3 6 の配列の軽鎖可変ドメイン (V L) とを含んでなる抗体に相当する。前記ヒト化抗体を以下、 h z 2 0 8 F 2 (「変異体 3 」 または 「 V a r . 3 」) と呼ぶ。

【 0 1 3 8 】

別の実施形態では、変異体 1 ~ 変異体 3 の間を含むヒト化型もまた本発明により包含される。言い換えれば、本発明による抗体は、配列番号 4 1 の「コンセンサス」配列の重鎖可変ドメイン (V H) と、配列番号 4 2 の「コンセンサス」配列の軽鎖可変ドメイン (V L) とを含んでなる抗体に相当する。前記ヒト化抗体を以下、 h z 2 0 8 F 2 (「変異体 2 」 または 「 V a r . 2 」) と呼ぶ。

【 0 1 3 9 】

限定されるものではないが、好ましい実施形態では、本発明の A D C の抗体は、

a) 配列番号 3 3 の配列または配列番号 3 3 と少なくとも 8 0 % 、好ましくは 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % および 9 8 % の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号 9 、 5 および 1 1 の配列の 3 つの軽鎖 C D R とを含んでなる抗体 ; ならびに

b) 配列番号 3 4 の配列または配列番号 3 4 と少なくとも 8 0 % 、好ましくは 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % および 9 8 % の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号 9 、 5 および 1 1 の配列の 3 つの軽鎖 C D R とを含んでなる抗体
から選択される。

【 0 1 4 0 】

「配列番号 3 3 または 3 4 と少なくとも 8 0 % 、好ましくは 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % および 9 8 % の同一性を示す任意の配列」とは、配列番号 1 、 2 および 3 の 3 つの重鎖 C D R を示し、加えて、 C D R に相当する配列 (すなわち、配列番号 1 、 2 および 3) 外の配列番号 3 3 または 3 4 の全長配列と少なくとも 8 0 % 、好ましくは 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % および 9 8 % の同一性を示す配列を表すものとする。

【 0 1 4 1 】

本明細書の関連段落に任意の配列によりまたは特定の配列と少なくとも 8 0 % を示す配列により示されていなければ、前記配列は参照配列と少なくとも 8 0 % および好ましくは 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % および 9 8 % の同一性を示すと理解されるべきである。これらの配列が C D R 配列を含むかどうかは、これらの配列が参照配列 C D R と同様に少なくともこれらの C D R において、これらの C D R に相当する配列の外に位置する残りの配列に関して算出されなければならない全長配列と 8 0 % 、好ましくは 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % および 9 8 % の同一性を示すことを表すものとする。

【 0 1 4 2 】

限定されるものではないが、好ましい実施形態では、本発明の抗体は、

10

20

30

40

50

a) 配列番号 3 5 の配列または配列番号 3 5 と少なくとも 8 0 %、好ましくは 8 5 %、9 0 %、9 5 %および 9 8 %の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号 7、2 および 3 の配列の 3 つの重鎖 C D R とを含んでなる抗体；ならびに

b) 配列番号 3 6 の配列または配列番号 3 6 と少なくとも 8 0 %、好ましくは 8 5 %、9 0 %、9 5 %および 9 8 %の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号 7、2 および 3 の配列の 3 つの重鎖 C D R とを含んでなる抗体
から選択される。

【 0 1 4 3 】

「配列番号 3 5 または 3 6 と少なくとも 8 0 %、好ましくは 8 5 %、9 0 %、9 5 %および 9 8 %の同一性を示す任意の配列」とは、配列番号 4、5 および 6 の 3 つの軽鎖 C D R を示し、加えて、C D R に相当する配列（すなわち、配列番号 4、5 および 6）外の全長配列番号 3 5 の配列または 3 6 と少なくとも 8 0 %、好ましくは 8 5 %、9 0 %、9 5 %および 9 8 %の同一性を示す配列を表すものとする。 10

【 0 1 4 4 】

本明細書に記載のヒト化抗体はまた定常ドメインによっても特徴付けることができ、より詳しくは、限定されるものではないが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g M、I g A、I g D または I g E などの前記ヒト化抗体が選択または設計され得る。より好ましくは、本発明に関して、前記ヒト化抗体は I g G 1 または I g G 4 である。

【 0 1 4 5 】

本発明の実施形態は、「A b」が、形式 I g G 1 において上記されているような可変ドメイン V H および V L を含んでなるヒト化抗体である A D C に関する。より好ましくは、前記ヒト化抗体は、配列番号 4 3 の配列の V H の定常ドメインと、配列番号 4 5 の配列の V L の Kappa ドメインとを含んでなる。 20

【 0 1 4 6 】

本発明の実施形態は、「A b」が、形式 I g G 4 において上記されているような可変ドメイン V H および V L を含んでなるヒト化抗体である A D C に関する。より好ましくは、前記ヒト化抗体は、配列番号 4 4 の配列の V H の定常ドメインと、配列番号 4 5 の配列の V L の Kappa ドメインとを含んでなる。

【 0 1 4 7 】

本発明のさらに別の実施形態は、「A b」が、

30

a) 配列番号 3 7 の配列または配列番号 3 7 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 3 9 の配列または配列番号 3 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；ならびに

b) 配列番号 3 8 の配列または配列番号 3 8 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 4 0 の配列または配列番号 4 0 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体

から選択される抗体である A D C に関する。

【 0 1 4 8 】

より明確にするために、下表 6 a にヒト化抗体 h z 2 0 8 F 2 の変異体 1 (V a r . 1) および変異体 3 (V a r . 3) に関する V H および V L の配列の非限定例を示す。それはまた、変異体 2 (V a r . 2) のコンセンサス配列も含んでなる。 40

【 0 1 4 9 】

【表6】

表6a

	重鎖	軽鎖	配列番号
hz208F2 (var. 1)	可変ドメイン(VH)		33
		可変ドメイン(VL)	35
	全長		37
		全長	39
hz208F2 (Var. 3)	可変ドメイン(VH)		34
		可変ドメイン(VL)	36
	全長		38
		全長	40
hz208F2 (Var. 2)	可変ドメイン(VH)		41
		可変ドメイン(VL)	42

10

20

【0150】

限定されるものではないが、別の好ましい実施形態では、本発明のADCの抗体は、

a) 配列番号56、62、64、66、68、70、72、74、76、78および80から選択される配列または配列番号56、62、64、66、68、70、72、74、76、78および80と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号9、5および1の配列の3つの軽鎖CDRとを含んでなる抗体；ならびに

b) 配列番号57もしくは60から選択される配列または配列番号57もしくまたは60と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する任意の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号7、2および3の配列の3つの重鎖CDRとを含んでなる抗体；ならびに

c) 配列番号56、62、64、66、68、70、72、74、76、78および80から選択される配列または配列番号56、62、64、66、68、70、72、74、76、78および80と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する任意の配列の重鎖可変ドメインと、配列番号57もしくは60から選択される配列または配列番号57もしくは60と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する任意の配列の軽鎖可変ドメインとを含んでなる抗体

から選択される。

30

40

【0151】

本発明のさらに別の実施形態は、「Ab」抗体が

a) 配列番号56、62、64、66、68、70、72、74、76、78および80の配列または配列番号56、62、64、66、68、70、72、74、76、78もしくは80と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号57の配列または配列番号57と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなる抗体；ならびに

b) 配列番号56、64、68および78の配列または配列番号56、64、68もしくは78と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号60の配列または配列番号60と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなる抗

50

体

から選択される A D C に関する。

【 0 1 5 2 】

本発明のさらに別の実施形態は、 A b が

a) 配列番号 5 8 の配列または配列番号 5 8 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 5 9 の配列または配列番号 5 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

b) 配列番号 5 8 の配列または配列番号 5 8 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 6 1 の配列または配列番号 6 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

10

c) 配列番号 6 3 の配列または配列番号 6 3 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 5 9 の配列または配列番号 5 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

d) 配列番号 6 5 の配列または配列番号 6 5 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 5 9 の配列または配列番号 5 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

e) 配列番号 6 5 の配列または配列番号 6 5 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 6 1 の配列または配列番号 6 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

f) 配列番号 6 7 の配列または配列番号 6 7 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 5 9 の配列または配列番号 5 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

20

g) 配列番号 6 9 の配列または配列番号 6 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 5 9 の配列または配列番号 5 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

h) 配列番号 6 9 の配列または配列番号 6 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 6 1 の配列または配列番号 6 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

i) 配列番号 7 1 の配列または配列番号 7 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 5 9 の配列または配列番号 5 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

30

j) 配列番号 7 3 の配列または配列番号 7 3 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 5 9 の配列または配列番号 5 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

k) 配列番号 7 5 の配列または配列番号 7 5 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 5 9 の配列または配列番号 5 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

l) 配列番号 7 7 の配列または配列番号 7 7 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 5 9 の配列または配列番号 5 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

40

m) 配列番号 7 9 の配列または配列番号 7 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 5 9 の配列または配列番号 5 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；

n) 配列番号 7 9 の配列または配列番号 7 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 6 1 の配列または配列番号 6 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体；ならびに

o) 配列番号 8 1 の配列または配列番号 8 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の重鎖と、配列番号 5 9 の配列または配列番号 5 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖とを含んでなるまたはからなる抗体

から選択される抗体である A D C に関する。

50

【 0 1 5 3 】

言い換えれば、本発明は、A b が

a) 配列番号 5 8、6 3、6 5、6 7、6 9、7 1、7 3、7 5、7 7、7 9 および 8
1 から選択される配列または配列番号 5 8、6 3、6 5、6 7、6 9、7 1、7 3、7 5
、7 7、7 9 および 8 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する任意の配列の重鎖と、

b) 配列番号 5 9 および 6 1 から選択される配列または配列番号 5 9 および 6 1 と少な
くとも 8 0 % の同一性を有する任意の配列の軽鎖
とを含んでなる抗体 A D C に関する。

【 0 1 5 4 】

より明確にするために、下表 6 b にヒト化抗体 h z 2 0 8 F 2 の種々の変異体に関する 10
V H および V L (可変ドメインおよび全長) の配列の非限定例を示す。

【 0 1 5 5 】

【表 7】

表 6b

	重鎖	軽鎖	配列番号
Hz208F2 H037/L018	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	56
			57
	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	58
			59
Hz208F2 H037/L021	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	56
			60
	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	58
			61
Hz208F2 H047/L018	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	62
			57
	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	63
			59
Hz208F2 H049/L018	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	64
			57
	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	65
			59
Hz208F2 H049/L021	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	64
			60
	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	65
			61
Hz208F2 H051/L018	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	66
			57
	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	67
			59
Hz208F2 H052/L018	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	68
			57
	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	69
			59
Hz208F2 H052/L021	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	68
			60
	可変ドメイン(VH) 全長	可変ドメイン VL 全長	69
			61
	可変ドメイン(VH)		70

Hz208F2 H057/L018	全長	可変ドメイン(VL)	57
		全長	71 59
Hz208F2 H068/L018	全長	可変ドメイン(VH)	72
		可変ドメイン(VL)	57 73 59
Hz208F2 H070/L018	全長	可変ドメイン(VH)	74
		可変ドメイン(VL)	57 75 59
Hz208F2 H071/L018	全長	可変ドメイン(VH)	76
		可変ドメイン(VL)	57 77 59
Hz208F2 H076/L018	全長	可変ドメイン(VH)	78
		可変ドメイン(VL)	57 79 59
Hz208F2 H076/L021	全長	可変ドメイン(VH)	78
		可変ドメイン(VL)	60 79 61
Hz208F2 H077/L018	全長	可変ドメイン(VH)	80
		可変ドメイン(VL)	57 81 59

【0156】

本発明の別の態様は、A b が、i) それぞれ2013年5月30日、2013年6月26日、2013年6月26日、2013年4月24日および2013年6月26日にCNCM、パストール研究所、フランスに寄託されたハイブリドーマI - 4757、I - 4773、I - 4775、I - 4736もしくはI - 4774により產生された抗体、またはi i) IGF - 1Rとの結合に関してi) の抗体と競合する抗体；またはi i i) i) の抗体と同じIGF - 1Rエピトープと結合する抗体から選択される抗体であるADCである。

【0157】

実際に、それぞれ2013年5月30日、2013年6月26日、2013年6月26日、2013年4月24日および2013年6月26日にCNCM、パストール研究所、フランスに寄託されたハイブリドーマI - 4757、I - 4773、I - 4775、I - 4736およびI - 4774から選択されるマウスハイブリドーマが本明細書に記載される。

10

20

30

40

50

【0158】

また、本発明による、抗体をコードする単離された核酸、またはその抗原結合フラグメントも記載される。

【0159】

本明細書において互換的に使用される用語「核酸」、「核配列」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」は、非天然ヌクレオチドを含有するまたは含有しない核酸のフラグメントまたは領域を定義し、二本鎖DNA、一本鎖DNAまたは前記DNAの転写産物のいずれかである、修飾されたまたは修飾されていないヌクレオチドの厳密な配列を意味する。

【0160】

10

これらの配列は単離および／または精製されており、すなわち、それらは例えば複製により直接的または間接的にサンプリングされたものであり、それらの環境は少なくとも部分的に改変されている。組換え遺伝学により、例えば宿主細胞の手段により得られた、または化学合成により得られた単離された核酸もまた本明細書に記載されるべきである。

【0161】

また、本発明によるADCの抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする核酸を含んでなるベクター、特に、このようなヌクレオチド配列を得るクローニングおよび／または発現ベクターも記載される。

【0162】

20

ベクターは好ましくは、所与の宿主細胞においてヌクレオチド配列の発現および／または分泌を可能とするエレメントを含む。従って、ベクターは、プロモーター、翻訳開始および終結シグナル、ならびに好適な転写調節領域を含み得る。ベクターは宿主細胞内で安定に維持可能でなければならず、場合により、翻訳されたタンパク質の分泌を指定する特異的シグナルを有してよい。これらの種々のエレメントは使用する宿主細胞に応じて当業者により選択および最適化される。この目的で、ヌクレオチド配列は、選択された宿主内でまたは自己複製するベクターに挿入できるか、または選択された宿主の組み込みベクターであり得る。

【0163】

30

ベクターは、例えば、プラスミドまたはウイルス起源のベクターである。ベクターは本発明のヌクレオチド配列をクローニングまたは発現するように、宿主細胞を形質転換させるために使用される。

【0164】

このようなベクターは当業者により一般に使用される方法によって作製され、得られたクローランは、リポフェクション、エレクトロポレーション、コンジュゲーション、熱ショックまたは化学法などの標準的方法により好適な宿主に導入することができる。

【0165】

これらの単離された宿主細胞は、上記のベクターにより形質転換されるか、または上記のベクターを含んでなる。

【0166】

40

宿主細胞は、細菌細胞などの原核生物系または真核生物系、例えば、また、酵母細胞または動物細胞、特に哺乳動物細胞（ヒトを除く）などの中から選択され得る。昆虫または植物細胞も使用可能である。

【0167】

また、本発明によるADCの抗体またはその抗原結合フラグメントの製造のための方法も開示され、前記方法は、以下の工程：

a) 培地中、上記に開示されるような宿主細胞に好適な培養条件での培養；および

b) このようにして產生された抗体の、培養培地からまたは前記培養細胞からの回収を含んでなる。

【0168】

形質転換細胞は、本発明によるADCの組換え抗体の生産方法で使用される。上記に開

50

示されるようなベクターおよび／またはベクターにより形質転換された細胞を用いて組換え型の抗体を生産するための方法もまた本明細書に含まれる。好ましくは、上記のようなベクターにより形質転換された細胞は、前記抗体の発現および前記抗体の回収を可能とする条件下で培養される。

【0169】

既述のように、宿主細胞は、原核生物系または真核生物系の中から選択することができる。特に、このような原核生物系または真核生物系において分泌を促進するヌクレオチド配列を特定することができる。よって、このような配列を有する上記に開示されるベクターは、分泌される組換えタンパク質の製造に遊離に使用できる。実際に、対象とするこれらの組換えタンパク質の精製は、それらのタンパク質が宿主細胞内部ではなく細胞培養の上清中に存在するという事実により容易となる。10

【0170】

本発明のADCの抗体はまた、化学合成によって作製することもできる。このような1つの作製方法もまた、本発明の目的である。当業者は、固相技術または部分的固相技術、フラグメントの縮合による、または溶液中の従来合成によるなどの化学合成のための方法を知っている。化学合成により得られた、また対応する非天然アミノ酸を含有し得るポリペプチドも引用することができる。

【0171】

上記の方法により得られる可能性のある抗体もまた、本発明に含まれる。

【0172】

特定の態様によれば、本発明は、ABが宿主標的部位に細胞傷害性薬剤を送達するためのアドレッシングビヒクルとして使用するための上記の抗体またはその抗原結合フラグメントである、ADCに関し、前記宿主標的部位は、IGF-1R、好ましくは、IGF-1R細胞外ドメイン、より好ましくは、ヒトIGF-1R（配列番号50）、いっそうより好ましくは、ヒトIGF-1R細胞外ドメイン（配列番号51）に、いっそうより好ましくは、ヒトIGF-1R細胞外ドメインのN末端（配列番号52）、またはその任意の天然変異体配列に局在するエピトープからなる。20

【0173】

好ましい実施形態では、前記宿主標的部位は、哺乳動物細胞、より好ましくは、ヒト細胞、より好ましくは、天然にまたは遺伝子組換えの方法によりIGF-1Rを発現する細胞の標的部位である。30

【0174】

さらなる実施形態において、前記宿主標的部位は、癌、好ましくは、IGF-1R発現癌、またはIGF-1R関連癌を有する患者、好ましくは、ヒトの細胞の標的部位である。

【0175】

IGF-1R発現癌またはIGF-1R関連癌としては、特に、腫瘍細胞がそれらの表面でIGF-1Rの全部または一部を発現または過剰発現する癌である。

【0176】

I I - 薬物 (D)

本発明による薬物成分は下式(I I)

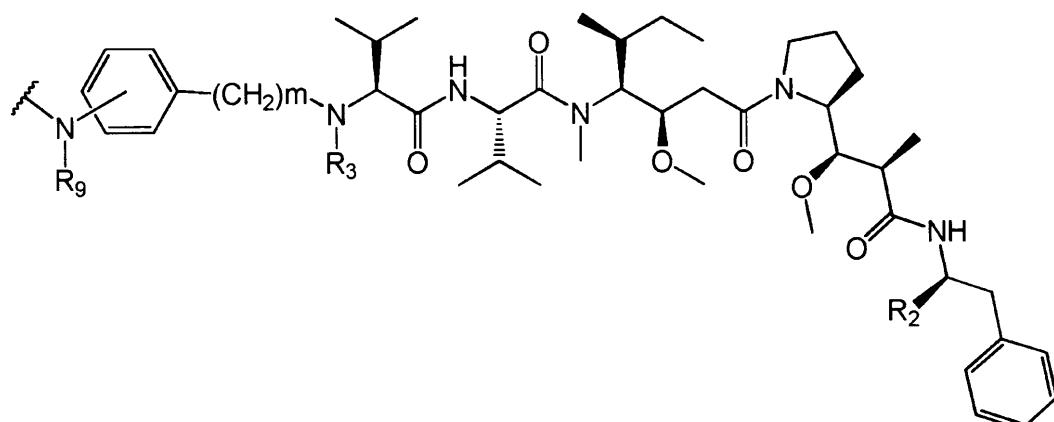
10

20

30

40

【化10】



10

を有し、式中、

R₂ は、COOH、COOCH₃ またはチアゾリル（例えば、チアゾール-2-イル）であり、

R₃ は、H または (C₁-C₆) アルキル（例えば、メチル）、特に、(C₁-C₆) アルキル基であり、

R₉ は、H または (C₁-C₆) アルキル（例えば、メチル）であり、

m は、1~8 の間に含まれる整数であり、かつ

波線は、Lとの結合点を示す。

20

【0177】

「アルキル」とは、本発明において、直鎖または分岐型の飽和炭化水素鎖を意味する。例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチルまたはヘキシル基が挙げられる。

【0178】

「(C_x-C_y) アルキル」とは、本発明において、x~y 個の炭素原子を含んでなる上記で定義されるものなどのアルキル鎖を意味する。従って、(C₁-C₆) アルキル基は、1~6 個の炭素原子を有するアルキル鎖である。

30

【0179】

(C₁-C₆) アルキルは有利には(C₁-C₄) アルキル、好ましくは、(C₁-C₂) アルキルである。

【0180】

本発明の化合物の中で、薬物部分の特に有価な1つのクラスは、R₂ がCOOH基を表す式(I)の薬物部分に相当する。

【0181】

薬物部分の別の特に有価なクラスは、R₂ がチアゾール（特に、チアゾール-2-イル基）である式(I)の部分に相当する。

【0182】

40

特に有価な部分の別のクラスは、R₂ がCOOMeである式(I)の部分に相当する。

【0183】

本発明の1つの特定の実施形態によれば、R₂ はより詳しくはCOOH、COOMe またはチアゾール-2-イル基である。

【0184】

第1の好ましい実施形態によれば、R₂ はCOOHである。

【0185】

第2の好ましい実施形態によれば、R₂ はCOOMeである。

【0186】

50

R_3 は、特に ($C_1 - C_6$) アルキル、有利にはメチル基を表す。

【0187】

m は、1 ~ 8 の間、特に 1 ~ 6 の間、有利には 1 ~ 4 の間に含まれる整数であり、好ましくは、1 または 2 である。

【0188】

好ましい実施形態では、 R_2 は COOH であり、 R_3 はメチル基であり、かつ、 m は 1 または 2 である。

【0189】

本発明の薬物部分の中で、薬物部分の特に有価な 1 つのクラスは、 R_9 がメチル基または水素である式 (II) の薬物部分に相当する。

10

【0190】

好ましい実施形態では、

R_2 は COOH であり、 R_3 はメチル基であり、 R_9 はメチル基であり、かつ、 m は 1 または 2 であるか、または

R_2 は COOH であり、 R_3 はメチル基であり、 R_9 は水素であり、かつ、 m は 1 または 2 である。

【0191】

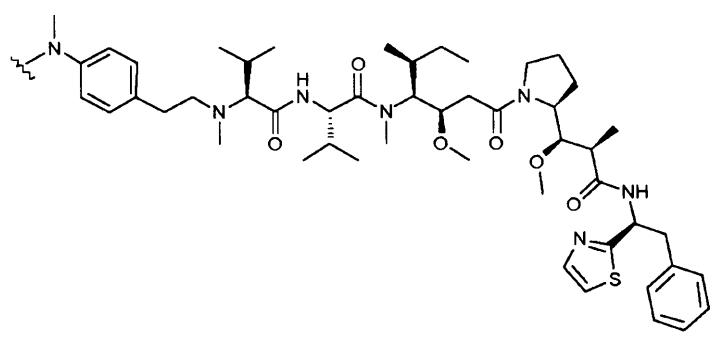
好ましい実施形態によれば、 NR_9 基は、フェニル環上で $(\text{CH}_2)_m$ 基に対してパラ位に位置する。

【0192】

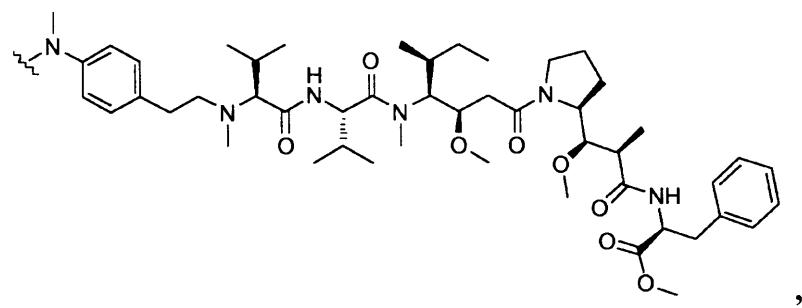
20

有利には、薬物成分は下記の部分の中から選択される：

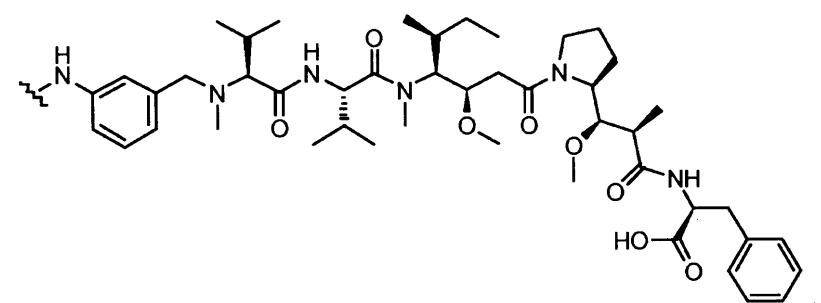
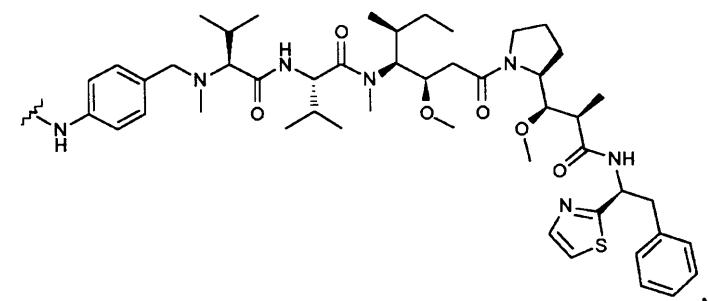
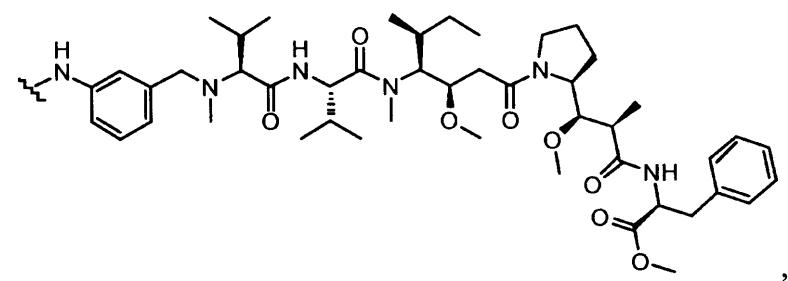
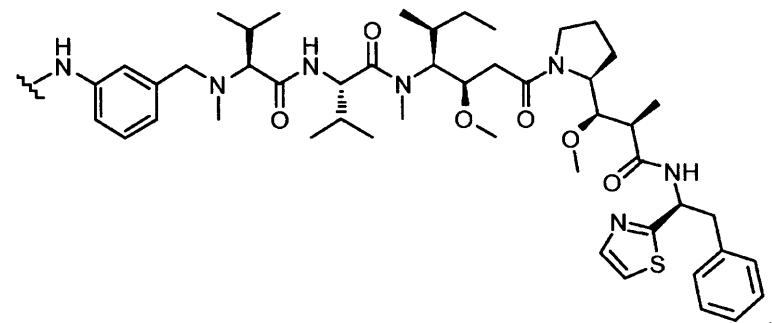
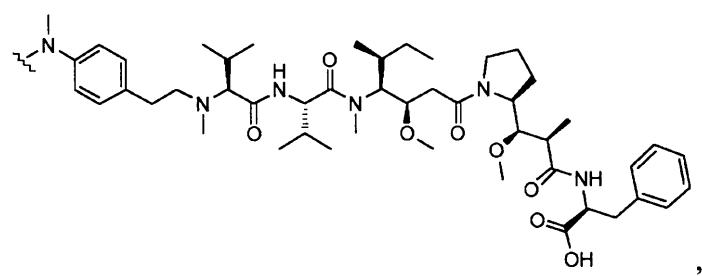
【化11】

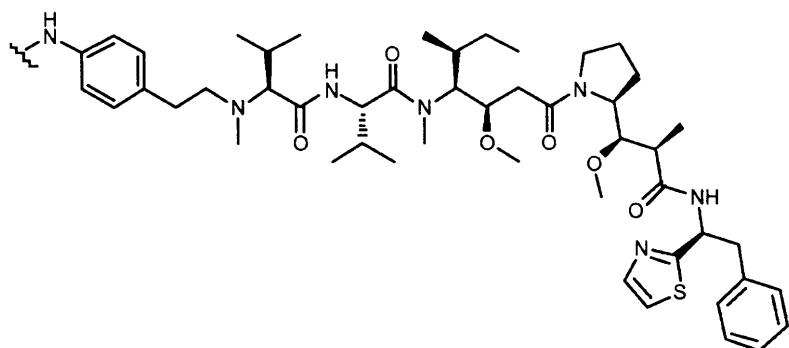


30

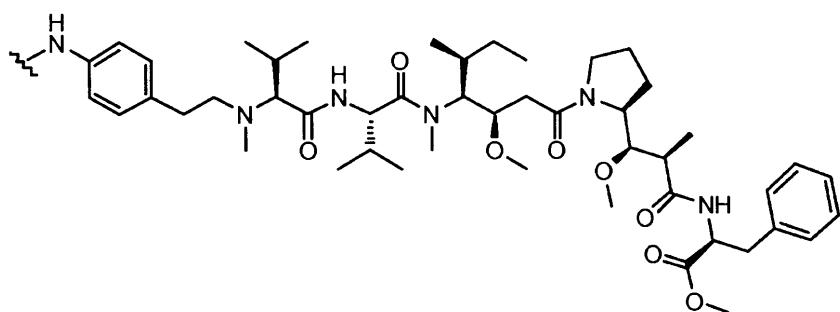


40

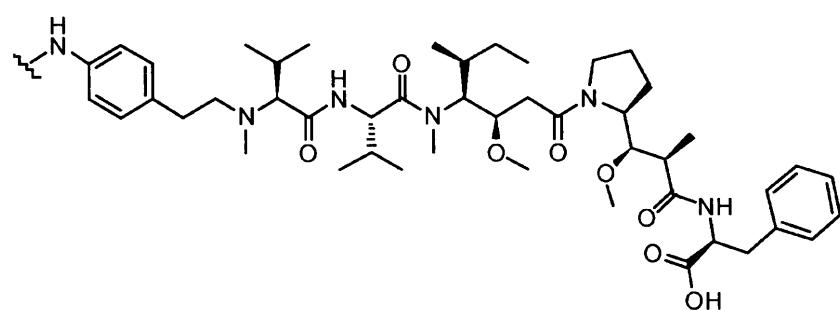




10



20



30

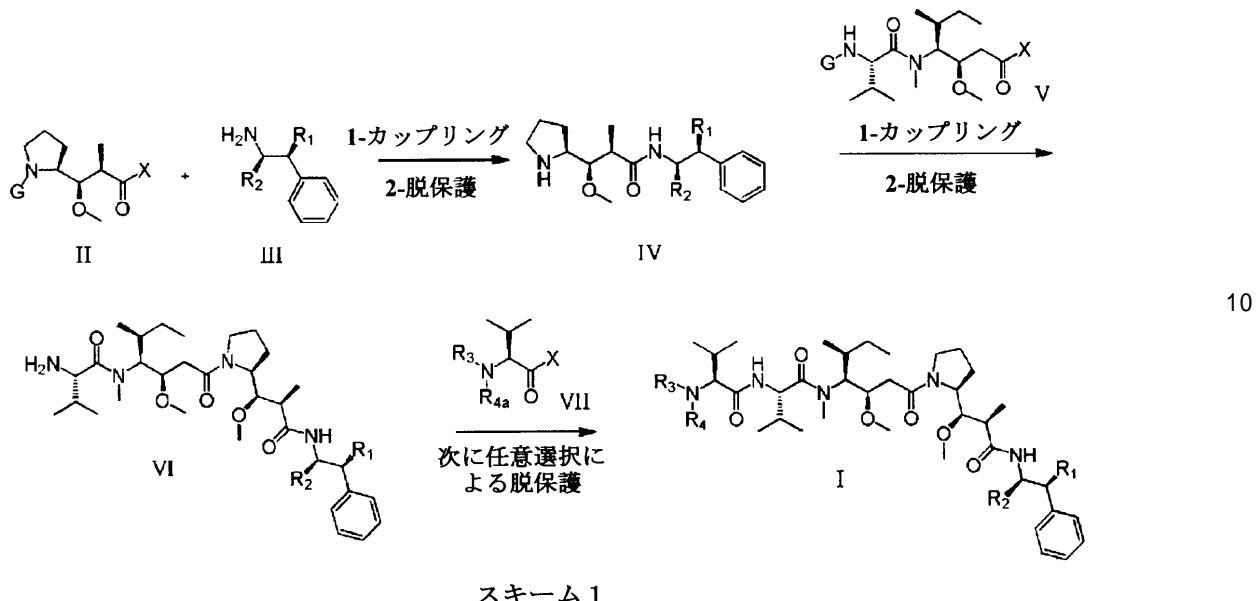
【0193】

(式D Hの)薬物の製造:

薬物は、必要であれば、場合により、文献に記載のまたは当業者に周知の、または本明細書の実験の部の例に記載される任意の標準的操作を補って、下記の合成スキームに記載の一般法を用いて製造することができる。

【0194】

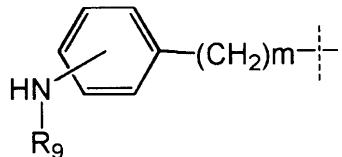
【化12】



【0195】

スキーム 1 は、薬物を製造するために使用可能な第 1 の一般法を示す。上記一般式において、 $R_1 = H$ 、 R_2 および R_3 は従前に式 II に関して定義されたものなどであり、 R_4 は

【化13】



を表し、 R_{4a} は、場合により保護型の、従前に定義されたような R_4 基を表し、かつ、G は保護基である。

【0196】

第 1 の工程は、そのアミン官能基上で保護基 G により保護された化合物 (II) と化合物 (III) の縮合からなる。X は、塩素などの脱離基を表し得る。この場合、この第 1 の工程は、酸塩化物とアミンの間の反応からなる。この反応は、当業者に周知の方法および技術を用いて行うことができる。1 つの特に有価な方法では、これら 2 つの実体を、特に -20 ~ 100 の間の温度で、THF、ジクロロメタン、DMF、DMSO などの溶媒中、有機または無機塩基、例えば、Et₃N、iPr₂NEt、ピリジン、NaH、Cs₂CO₃、K₂CO₃ の存在下で反応させる。X はまたヒドロキシル (OH) であつてもよい。この場合、第 1 の工程は、カルボン酸 (II) とアミン (III) の間の縮合反応である。この反応は、当業者に周知の方法および技術に従って行うことができる。1 つの特に有価な方法では、これら 2 つの実体を、特に -15 ~ 40 の間の温度で、ジクロロメタンまたは DMF などの極性非プロトン性溶媒中、1-(3-ジメチルアミノブロピル)-3-エチル-カルボジイミド (EDC)、3-ヒドロキシ-1,2,3-ベンゾトリアジン-4(3H)-オンなどのカップリング剤、ジイソプロピルエチルアミンなどの第 3 級アミンの存在下で反応させる。別の特に有価な方法では、これら 2 つの実体を -15 ~ 40 の間の温度で、ジクロロメタンまたは DMF などの極性非プロトン性溶媒中、ジエチルホスホシアニデート (DEPC)、トリエチルアミンなどの第 3 級アミンの存在下で反応させる。別の特に有価な方法は、-15 ~ 100 の間の温度で、ジ

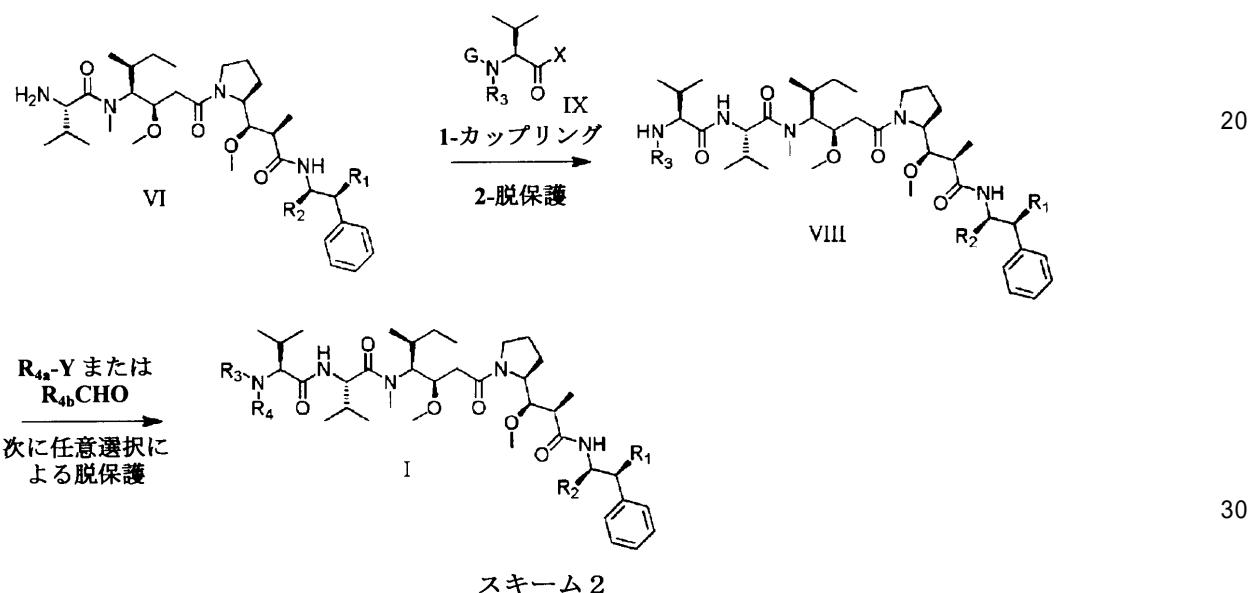
クロロメタンまたはD M Fなどの極性非プロトン性溶媒中、O - (7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチル - ウロニウムヘキサフルオロホスフェート (H A T U) 、第3級アミン、例えばジイソプロピルエチルアミンの存在下でこれら2つの実体を反応させることからなる。

【0197】

当業者に周知の技術(<< Protective Groups in Organic Synthesis >>, T.W. Greene, John Wiley & Sons, 2006 and << Protecting Groups >>, P.J. Kocienski, Thieme Verlag, 1994)を用いた中間体の脱保護後に、化合物(IV)を上記の方法および技術に従つて化合物(V)と縮合させると、脱保護工程後に化合物(VI)が得られる。この化合物を次に、中間体(VII)と縮合させ、任意選択の脱保護の後に薬物の形成に至り得る。化合物(VI)はまた、R'3がR3の前駆体、特に、保護基により保護されたR3基である化合物(VII')とカップリングさせることもできる。カップリングおよびその後のR3を得るための基R'3の脱保護は従前に記載されたものと同じ手順に従つて行うことができる。

【0198】

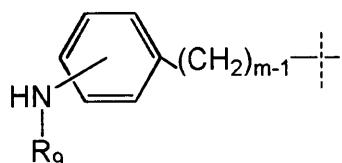
【化14】



【0199】

スキーム2は、薬物を製造するために使用可能な第2の一般法を示す。上記一般式において、Gは保護基であり、R₁=H、R₂、R₃およびR_{4a}は従前に定義されたようなものであり、かつ、R_{4b}は

【化15】



を表す。

【0200】

第1の工程において、そのアミン官能基上で保護基Gにより保護された化合物(IX)を化合物(VI)と縮合させる。Xは、脱離基、例えば、塩素を表し得る。この場合、第1の工程は、酸塩化物とアミンの間の反応からなる。この反応は、当業者に周知の方法および技術を用いて行うことができる。1つの特に有価な方法では、これら2つの実体を、

50

特に - 20 ~ 100 の間の温度で、 THF、ジクロロメタン、 DMF、DMSOなどの溶媒中、 Et₃N、iPr₂NEt、ピリジン、 NaH、Cs₂CO₃、K₂CO₃などの有機または無機塩基の存在下で反応させる。Xはまたヒドロキシルを表してもよい。この場合、第1の工程は、カルボン酸(IX)とアミン(VI)の間の縮合反応である。この反応は当業者に周知の方法および技術に従って行うことができる。1つの特に有価な方法では、これら2つの実体を、特に - 15 ~ 40 の間の温度で、ジクロロメタンまたはDMFなどの極性非プロトン性溶媒中、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチル-カルボジイミド(EDC)、3-ヒドロキシ-1,2,3-ベンゾトリアジン-4(3H)-オン、第3級アミン、例えばジイソプロピルエチルアミンの存在下で反応させる。別の特に有価な方法では、これら2つの実体を、特に - 15 ~ 40 の間の温度で、ジクロロメタンまたはDMFなどの極性非プロトン性溶媒中、ジエチルホスホロシアニデート(DEPC)、第3級アミン、例えばトリエチルアミンの存在下で反応させる。

【0201】

当業者に周知の技術を用いた中間体の脱保護の後、得られた化合物(VIII)はR₄Yとの反応の後に薬物となり得る。この場合、Yは、Cl、Br、I、OSO₂CH₃、OSO₂CF₃またはO-トシリルなどの脱離基である。この反応は、特に - 20 ~ 100 の間の温度で、ジクロロメタン、THF、DMF、DMSOなどの極性無水溶媒中、Et₃N、iPr₂NEt、NaH、Cs₂CO₃、K₂CO₃などの有機または無機塩基の存在下で行われる。別の特に有価な方法では、化合物(VIII)を、R_{4b}がR₄の前駆体に相当する式R_{4b}-CHOのアルデヒドと反応させる。この場合、この反応は、特に - 20 ~ 100 の間の温度で、酢酸などの酸の添加により制御可能なpHにて、任意選択のチタンイソプロポキシド(IV)の存在下、1,2-ジクロロエタン、ジクロロメタン、THF、DMF、MeOHなどの極性溶媒中、NaBH₄、NaBH₃CN、NaBH(OAc)₃などの還元剤の存在下での還元的アミノ化である。

【0202】

以上の合成スキームでは、薬物は、例えば、当業者に周知の方法を用いた鹼化などの附加的反応工程後に別の薬物となり得、それにより、エステル(COOMe)を表すR₂基がカルボン酸(COOH)を表すR₂基に変化する。

【0203】

少なくとも1つの塩基官能基を含有する薬物を酸付加塩の状態で単離することが望まれる場合には、これは薬物の遊離塩基(少なくとも1つの塩基官能基を含有する)を好ましくは等量の好適な酸で処理することにより可能となる。好適な酸は特にトリフルオロ酢酸であり得る。

【0204】

I I I - リンカー(L)

「リンカー」、「リンカー単位」、「L」または「連結」は、本発明において、共有結合を含んでなる化学部分または抗体を少なくとも1つの薬物に共有結合させる原子の鎖を意味する。

【0205】

リンカーは、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPPD)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、イミノチオラン(ITT)、イミドエステルの二官能性誘導体(例えば、ジメチルアジビミデートHCl)、活性エステル(例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、2,6-ジイソシアヌ酸トルエン)、およびビス活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)などの種々の二官能性タンパク質カップリング剤を用いて作製され得る。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)が、細胞傷害性薬剤とアドレス

10

20

30

40

50

指定系のコンジュゲーションのための例示的キレート剤である。他の架橋試薬は、B M P S、E M C S、G M B S、H B V S、L C - S M C C、M B S、M P B H、S B A P、S I A、S I A B、S M C C、S M P B、S M P H、スルホ - E M C S、スルホ - G M B S、スルホ - K M U S、スルホ - M B S、スルホ - S I A B、スルホ - S M C C、およびスルホ - S M P B、ならびに(例えば、P i e r c e B i o t e c h n o l o g y , I n c .、ロックフォード、I l l .、U . S . Aから)市販されているS V S B(スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾエート)であり得る。

【0206】

リンカーは、「切斷不能」であってもまたは「切斷可能」であってもよい。

【0207】

好ましい実施形態では、リンカーは、細胞内での薬物の放出を助ける「切斷なリンカー」からなる。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光解離性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカーが使用可能である。リンカーは、好ましい実施形態では、リンカーの切斷が細胞内環境において抗体から薬物を放出するように、細胞内条件下で切斷可能である。

【0208】

例えば、いくつかの実施形態では、リンカーは、細胞内環境(例えば、リソソームまたはエンドソームまたはカベオラ内)に存在する切斷因子により切斷可能である。リンカーは、例えば、細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素(限定されるものではないが、リソソームまたはエンドソームプロテアーゼを含む)により切斷されるペプチジルリンカーであり得る。一般に、ペプチジルリンカーは、少なくとも2つの連続するアミノ酸もしくは少なくとも3つの連続するアミノ酸を含んでなるか、または少なくとも2アミノ酸長または少なくとも3アミノ酸長である。切斷因子はカテプシンBおよびDおよびプラスミンを含むことができ、これらは総て、ジペプチド薬誘導体を加水分解して標的細胞内で活性薬物の放出をもたらすことが知られている。例えば、癌組織で発現の高いチオール依存性プロテアーゼカテプシン-Bにより切斷可能なペプチジルリンカーが使用可能である(例えば、P h e - L e uまたはG l y - P h e - L e u - G l yを含んでなる、またはそのものであるリンカー)。特定の実施形態では、細胞内プロテアーゼにより切斷可能なペプチジルリンカーは、V a l - C i tまたはP h e - L y sを含んでなる、またはそのものである。薬物の細胞内タンパク質分解性放出を使用することの1つの利点は、薬物がコンジュゲートされた場合には一般に減弱され、かつ、その複合体の血清安定性が一般に高いことである。

【0209】

他の実施形態では、切斷可能なリンカーはp H感受性、すなわち、特定のp H値での加水分解に対して感受性である。一般に、p H感受性リンカーは酸性条件下で加水分解可能である。例えば、リソソーム中で加水分解可能な酸不安定性リンカー(例えば、ヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、シス-アコニットアミド、オルトエステル、アセタール、またはケタールなど)が使用できる。このようなリンカーは、血中などの中性p H条件下で比較的安定であるが、リソソームのおよそのp Hであるp H5.5または5.0以下では不安定である。特定の実施形態では、加水分解可能なリンカーは、チオエーテルリンカー(例えば、アシルヒドラゾン結合を介して薬物と結合されているチオエーテル)である。

【0210】

さらに他の実施形態では、リンカーは、還元条件下で切斷可能である(例えば、ジスルフィドリンカー)。種々のジスルフィドリンカーが当技術分野で公知であり、例えば、S A T A(N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート)、S P D P(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート)、S P D B(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)ブチレート)およびS M P T(N-スクシンイミジル-オキシカルボニル- - -メチル- - -(2-ピリジル-ジチオ)トルエン)を用いて形成可能なものが含まれる。

10

20

30

40

50

【0211】

特定の好ましい実施形態では、リンクー単位は、下記一般式：

- (T)_a - (W)_w - (Y)_y -

を有してよく、式中、

Tは、延伸単位であり；

aは、0または1であり；

Wは、アミノ酸単位であり；

wは、0～12の範囲の整数であり；

Yは、スペーサー単位であり；

yは、0、1または2である。

10

【0212】

延伸単位(T)は、存在する場合、抗体を、存在する場合にアミノ酸単位(W)と、または存在する場合にスペーサー単位と、または直接的に薬物と連結する。天然にまたは化学的操作を介して抗体上に存在し得る有用な官能基としては、スルフヒドリル、アミノ、ヒドロキシル、炭水化物のアノマーヒドロキシル基、およびカルボキシルが含まれる。好適な官能基はスルフヒドリルおよびアミノである。スルフヒドリル基は、存在する場合、抗体の分子内ジスルフィド結合の還元により作製することができる。あるいは、スルフヒドリル基は、抗体のリシン部分のアミノ基と2-イミノチオランまたは他のスルフヒドリル生成試薬との反応により生成することもできる。特定の実施形態では、抗体は、1以上のリシンを有するように操作される。より好ましくは、抗体は、1以上のシステインを有するように操作することができる(Thiomab's参照)。

20

【0213】

ある特定の実施形態では、延伸単位は、抗体の硫黄原子と結合を形成する。硫黄原子は、還元型の抗体のスルフヒドリル(-SH)基に由来し得る。

【0214】

他のある特定の実施形態では、延伸単位は、抗体の硫黄原子と延伸単位の硫黄原子とのジスルフィド結合を介して抗体に連結される。

【0215】

他の特定の実施形態では、延伸部の反応性基は、抗体のアミノ基に反応し得る反応性部位を含む。このアミノ基は、アルギニンまたはリシンのものであり得る。好適なアミン反応性部位としては、限定されるものではないが、活性化エステル(例えば、スクシンイミドエステル、4-ニトロフェニルエステル、ペニタフルオロフェニルエステル)、無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアネートおよびイソチオシアネートが挙げられる。

30

【0216】

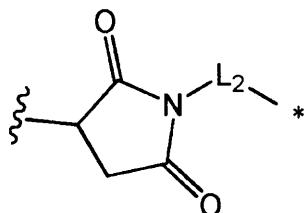
さらに別の態様では、延伸部の反応性官能基は、抗体上に存在し得る修飾炭水化物基に反応性のある反応性部位を含む。特定の実施形態では、抗体は、炭水化物部分を提供するように酵素的にグリコシル化されているか、または天然にグリコシル化されている。炭水化物は過ヨウ素酸ナトリウムなどの試薬で穏やかに酸化されてもよく、結果として得られる酸化炭水化物のカルボニル単位は、ヒドラジド、オキシム、反応性アミン、ヒドラジン、チオセミカルバジド、カルボン酸ヒドラジン、またはアリールヒドラジドなどの官能基を含む延伸部と縮合させることができる。

40

【0217】

特定の実施形態によれば、延伸単位は下式：

【化16】



を有し、式中、

L_2 は、($C_4 - C_{10}$) シクロアルキル - カルボニル、($C_2 - C_6$) アルキルまたは($C_2 - C_6$) アルキル - カルボニル（前記シクロアルキルまたはアルキル部分は、マレイミド部分の窒素原子に結合される）であり、10

アスタリスクは、存在する場合にアミノ酸単位との、存在する場合にスペーサー単位との、または薬物 D との結合点を示し、かつ

波線は、抗体 A b との結合点を示す。

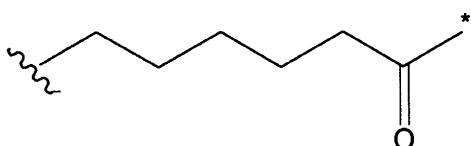
【0218】

「($C_4 - C_{10}$) シクロアルキル」は、本発明において、4 ~ 10 個の炭素原子を有する炭化水素環を意味し、限定されるものではないが、シクロペンチル、およびシクロヘキシリなどが含まれる。20

【0219】

L_2 は、有利には($C_2 - C_6$) アルキル - カルボニル、例えば、下式：

【化17】



のペンチル - カルボニルであり得、式中、

アスタリスクは、存在する場合にアミノ酸単位、存在する場合にスペーサー単位、または薬物 D との結合点を示し；かつ30

波線は、マレイミド部分の窒素原子との結合点を示す。

【0220】

アミノ酸単位 (W) は、存在する場合、存在する場合に延伸単位 (T) を連結し、またはそうでなければ、抗体を、スペーサー単位が存在する場合にスペーサー単位 (Y) に、もしくはスペーサー単位が存在しない場合には薬物に連結する。

【0221】

上述のように、(W)_w は存在しないか (w = 0) 、またはジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペントapeptid、ヘキサapeptid、ヘプタapeptid、オクタapeptid、ノナapeptid、デカapeptid、ウンデカapeptidもしくはドデカapeptid単位であり得、ここで、ペプチドを形成するアミノ酸は互いに異なり得。40

【0222】

よって、(W)_w は、下式：(W1)_{w1} (W2)_{w2} (W3)_{w3} (W4)_{w4} (W5)_{w5} により表すことができ、式中、各 W1 ~ W5 は互いに独立にアミノ酸単位を表し、各 w1 ~ w5 は、0 または 1 である。

【0223】

いくつかの実施形態では、アミノ酸単位 (W)_w は、天然に存在するものなどのアミノ酸残基、ならびにシトルリンなどの希少アミノ酸および非天然アミノ酸類似体を含んでなり得る。

【0224】

10

20

30

40

50

アミノ酸単位 (W_w) のアミノ酸残基としては、限定されるものではないが、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、アセチルまたはホルミルで保護されたまたは保護されていないリシン、アルギニン、トリルまたはニトロ基で保護されたまたは保護されていないアルギニン、ヒスチジン、オルニチン、アセチルまたはホルミルで保護されたオルニチン、およびシトルリンが挙げられる。例示的アミノ酸リンカー成分としては、好ましくは、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペントペプチド、特に、ジペプチドまたはトリペプチドが挙げられる。

【0225】

例示的ジペプチドとしては、Val-Cit、Ala-Val、Ala-Ala、Val 10
- Ala、Lys-Lys、Cit-Cit、Val-Lys、Ala-Phe、Phe-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-トリル-Arg、Phe-N⁹-ニトロ-Argが挙げられる。

【0226】

例示的トリペプチドとしては、Val-Ala-Val、Ala-Asn-Val、Val 20
- Leu-Lys、Ala-Ala-Asn、Phe-Phe-Lys、Gly-Gly-Gly、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lysが挙げられる。

【0227】

例示的テトラペプチドとしては、Gly-Phe-Leu-Gly（配列番号53）、Ala-Leu-Ala-Leu（配列番号54）が挙げられる。

【0228】

例示的ペントペプチドとしては、Pro-Val-Gly-Val-Val（配列番号55）が挙げられる。

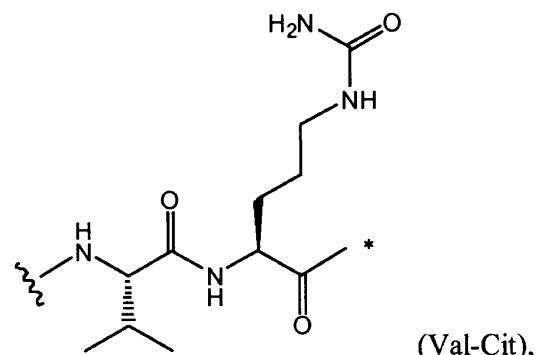
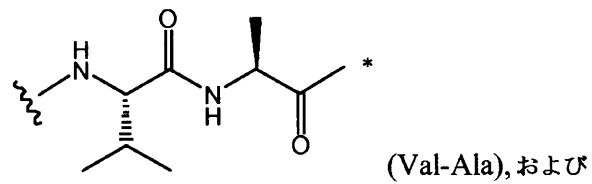
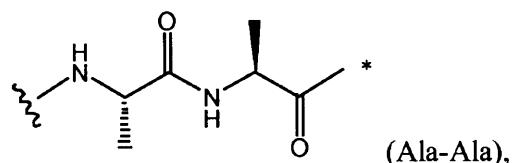
【0229】

特定の実施形態によれば、(W_w)は、Val-Citなどのジペプチド（すなわち、 $w = 2$ ）であり得、またはリンカーはアミノ酸単位を欠いている（ $w = 0$ ）。リンカーがアミノ酸単位を欠く場合、好ましくは、それはスペーサー単位も欠く。

【0230】

好ましい実施形態によれば、 $w = 0$ （すなわち、(W_w)は一重結合である）または $w = 2$ （すなわち、(W_w)はジペプチドである）および従って、(W_w)は

【化18】



10

20

から選択することができ、特に、Val-Cit であり、式中、

アスタリスクは、存在する場合にスペーサー単位との、または薬物 D との結合点を示すかつ

波線は、L₂ との結合点を示す。

【0231】

アミノ酸リンカー成分は、特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシン B、C および D、またはプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断に関するそれらの選択性において設計および最適化することができる。

30

【0232】

リンカーのアミノ酸単位は、限定されるものではないが、腫瘍関連プロテアーゼを含む酵素により酵素的に切断されて薬物を遊離し得る。

【0233】

アミノ酸単位は、特定の腫瘍関連プロテアーゼによる酵素的切断に関するそれらの選択性において設計および最適化することができる。好適な単位は、その切断がプロテアーゼ、カテプシン B、C および D、ならびにプラスミンにより触媒されるものである。

【0234】

スペーサー単位 (Y) は、存在する場合、存在する場合にアミノ酸単位を、または存在する場合に延伸単位を、またはそうでなければ、抗体を薬物に連結する。スペーサー単位は、自壊的および非自壊的の 2 つの一般的タイプのものである。非自壊的スペーサー単位は、抗体 - 薬物複合体からのアミノ酸単位の酵素的切断後にそのスペーサー単位の一部または全部が薬物に結合して残るものである。非自壊的スペーサー単位の例としては、限定されるものではないが、(グリシン - グリシン) スペーサー単位およびグリシンスペーサー単位が挙げられる。薬物を遊離させるためには、非依存的加水分解反応がグリシン - 薬物単位の結合を切断するように標的細胞内で起こるべきである。

40

【0235】

特定の実施形態では、非自壊的スペーサー単位 (Y) は Gly である。

【0236】

あるいは、自壊的スペーサー単位を含有する抗体 - 薬物複合体は、独立した加水分解工

50

程の必要なく薬物を放出することができる。これらの実施形態では、(Y)は、PAB基の窒素原子を介して(W)_wに連結され、かつ、エステル基、炭酸基、カルバミン酸基またはエーテル基を介して薬物に直接接続されたp-アミノベンジルアルコール(PAB)単位の残基である。

【0237】

自壊的スペーサーの他の例としては、限定されるものではないが、PAB基と電気的に等価な芳香族化合物、例えば、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体およびオルトまたはパラ-アミノベンジルアセタールの残基が挙げられる。スペーサーは、アミド結合の加水分解時に容易に環化を受けるもの、例えば、置換および非置換4-アミノ酪酸アミド、適宜置換されたビシクロ[2.2.1]およびビシクロ[2.2.2]環系ならびに2-アミノフェニルプロピオン酸アミドが使用可能である。

10

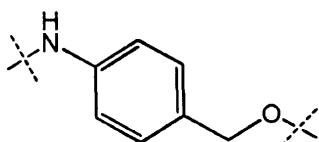
【0238】

別の実施形態では、スペーサー単位は、分岐型のビス(ヒドロキシメチル)スチレン(BHMS)単位であり、これは付加的薬物を組み込むために使用可能である。

【0239】

特定の実施形態では、スペーサー単位(Y)はPAB-カルボニルであり、ここで、PABは

【化19】



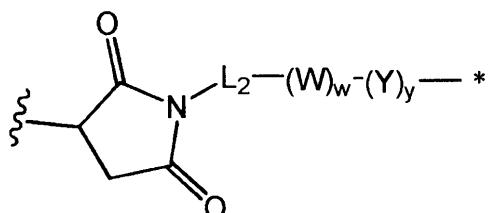
20

(PAB単位の酸素は、カルボニルに連結されている)であり、かつ、y=1またはリンカーハイドリドはスペーサー単位を欠いている(y=0)。

【0240】

特定の実施形態では、リンカーハイドリドは下式(III)：

【化20】



30

(III)

を有し、式中、

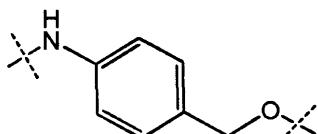
L₂は、(C₄-C₁₀)シクロアルキル-カルボニル、(C₂-C₆)アルキルまたは(C₂-C₆)アルキル-カルボニル(これらの部分のカルボニルは、存在する場合、(W)_wに連結されている)であり、

40

Wは、アミノ酸単位を表し、ここで、wは、0~5の間に含まれる整数を表し、

Yは、PAB-カルボニルであり、ここで、PABは、

【化21】



50

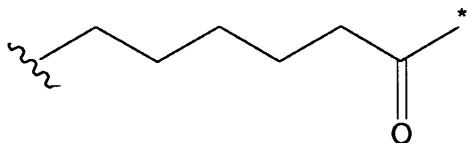
(PAB単位の酸素は、カルボニルに連結されている)であり、かつ、yは0または1であり(好ましくは、wが0である場合、yは0であり、wが1~5の間に含まれる場合、yは0または1である)、

アスタリスクは、薬物Dとの結合点を示し、かつ
波線は、抗体Abとの結合点を示す。

【0241】

有利には、L₂は、(C₂-C₆)アルキル-カルボニル、例えば、下式:

【化22】



10

のペンチル-カルボニルであり、式中、

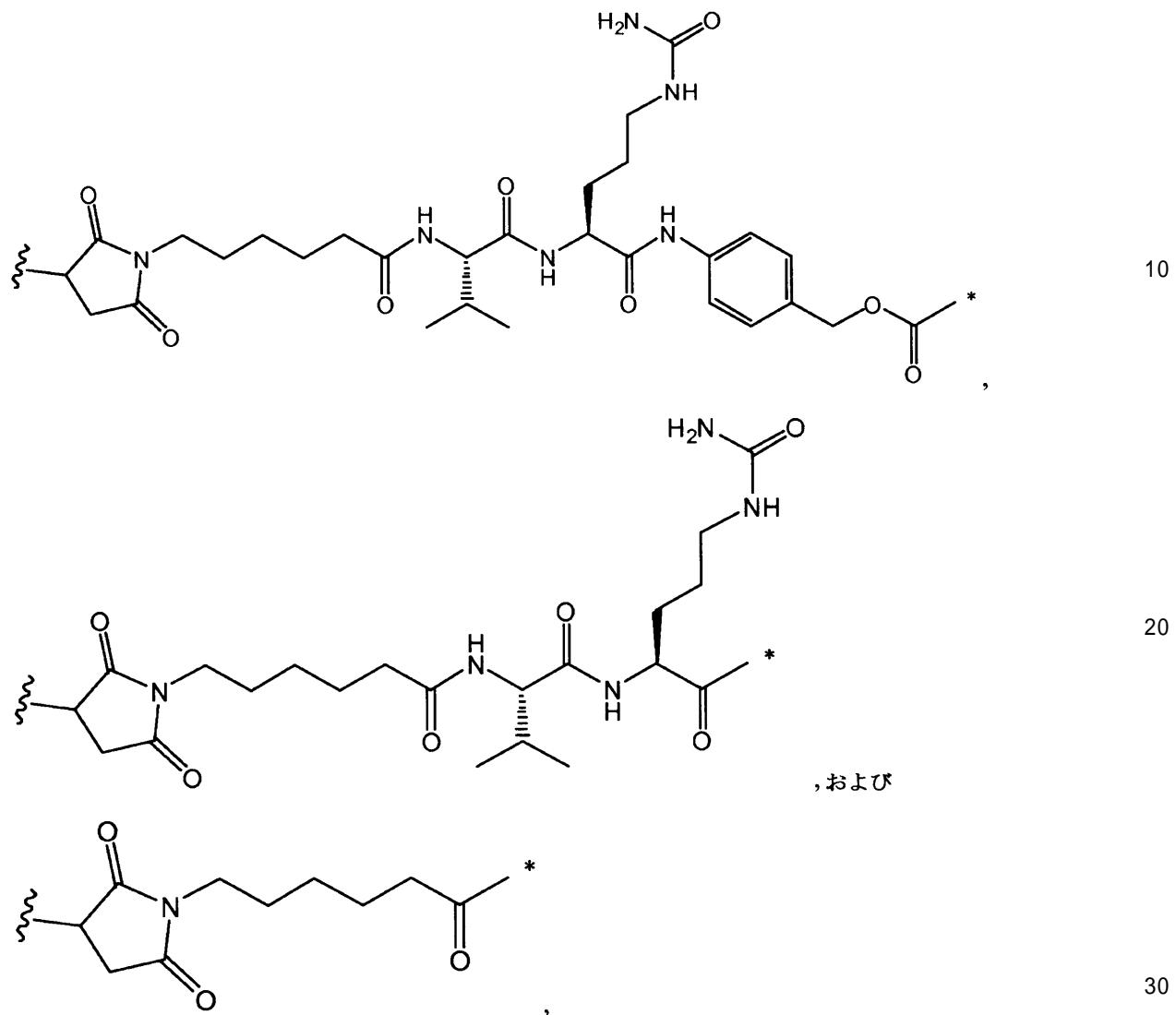
アスタリスクは、(W)_wとの結合点を示し;かつ
波線は、マレイミド部分の窒素原子との結合点を示す。

【0242】

好ましい実施形態によれば、リンカーLは、

20

【化 2 3】



から選択され、式中、

アスタリスクは、薬物Dとの結合点を示し、かつ、波線は、抗体Abとの結合点を示す。

【0243】

I V - 抗体 - 薬物複合体 (ADC)

好ましい実施形態では、本発明の抗体 - 薬物複合体は、例えば、限定されるものではないが、i) 抗体の求核基と二価リンカー試薬との反応およびその後の薬物の求核基との反応、またはii) 薬物の求核基と二価リンカー試薬との反応およびその後の抗体の求核基との反応など、当業者に公知のいずれの方法によって作製されてもよい。

【0244】

抗体上の求核基としては、限定されるものではないが、N末端アミン基、側鎖アミン基（例えば、リシン）、側鎖チオール基、および抗体がグリコシル化されている場合には糖のヒドロキシル基またはアミノ基が挙げられる。

【0245】

薬物上の求核基としては、限定されるものではないが、アミン、チオール、およびヒドロキシル基、好ましくは、アミン基が挙げられる。

【0246】

アミン、チオール、およびヒドロキシル基は求核性であり、リンカー部分およびリンカ

40

50

—試薬上の求電子基と反応して共有結合を形成することができ、限定されるものではないが、活性エステル、例えば、NHSエステル、HOBTエステル、ハロホルメート、および酸ハリド；アルキルおよびベンジルハリド、例えば、ハロアセトアミド；アルデヒド；ケトン；カルボキシル；およびマレイミド基が挙げられる。抗体は、還元可能な鎖内ジスルフィド、すなわち、システイン架橋を有してもよい。抗体は、DTT(ジチオトレイトル)などの還元剤での処理により、リンカー試薬とのコンジュゲーションに反応性とすることができる。従って、各システイン架橋は理論上2つの反応性チオール求核部分を形成する。当業者に公知の任意の反応を介して抗体に付加的求核基を導入することができる。非限定例として、反応性チオール基は、1以上のシステイン残基を導入することにより抗体に導入され得る。

10

【0247】

抗体-薬物複合体はまた、リンカー試薬上の求核置換基と反応し得る求電子部分を導入するための抗体の修飾によっても作製され得る。グリコシリ化抗体の糖を酸化してアルデヒドまたはケトン基を形成させてもよく、これはリンカー試薬または薬物のアミン基と反応し得る。生じたイミンシップ塩基群は安定な結合を形成し得るか、または還元して安定なアミン結合を形成させてもよい。一実施形態では、グリコシリ化抗体の炭水化物部分とガラクトースオキシダーゼまたはメタ過ヨウ素酸ナトリウムのいずれかとの反応はタンパク質中に、薬物上の適当な基と反応し得るカルボニル(アルデヒドおよびケトン)基を生じ得る。別の実施形態では、N末端セリンまたはトレオニン残基を含有するタンパク質はメタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応して、その結果、最初のアミノ酸に代わってアルデヒドの生成をもたらし得る。

20

【0248】

好ましい実施形態では、本発明の抗体-薬物複合体は、薬物-リンカー部分の形成とその後の抗体の求核基(例えば、システイン部分のSH基)と薬物-リンカー部分の求電子基(例えば、マレイミド)との間のカップリングにより作製される。

【0249】

1. 薬物-リンカー

薬物-リンカー部分は、

リンカーと薬物、

リンカーの合成が完了する前のリンカーの一部と薬物、

30

薬物の合成が完了する前のリンカーと薬物の一部または前駆体、または

リンカーおよび薬物の合成が完了する前のリンカーの一部と薬物の一部または前駆体をカップリングすることにより作製され得る。

【0250】

カップリング反応は、求核基と求電子基の間の当業者に周知の反応である。

【0251】

求核基は特に、アミン、チオールまたはヒドロキシル基であり得る。好ましい実施形態では、求核基は第1級または第2級アミン基である。

【0252】

求電子基は、場合により活性化形態のカルボン酸基(COOH)、または活性化された炭酸エステル部分であり得る。

40

【0253】

カルボン酸の「活性化形態」とは、COOH官能基のOH部分が、アミド結合を形成して化合物LG-Hを放出するために活性化カルボン酸基とアミノ基のカップリングを可能とする活性化脱離基(LG)で置換されている、カルボン酸を意味する。活性化形態は、活性化エステル、活性化アミド、無水物またはアシルハリド、例えば、塩化アシルであり得る。活性化エステルとしては、カルボン酸基とN-ヒドロキシベンゾトリアゾールまたはN-ヒドロキシスクシンイミドの反応により形成される誘導体が含まれる。

【0254】

「活性化炭酸エステル」は、-OC(O)OR部分を含んでなる炭酸エステルを意味し

50

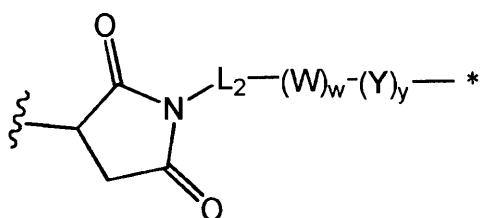
、ここで、ORは、カルバミン酸部分を形成して化合物ROHを放出するため活性化炭酸エステルとアミノ基のカップリングを可能とする良好な脱離基を表す。活性化炭酸エステルのR基としては、限定されるものではないが、p-ニトロ-フェニル、ペンタフルオロフェニル、2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イルおよびベンジル基、好ましくはp-ニトロ-フェニルおよびペンタフルオロフェニル基が挙げられる。

【0255】

リンカーが下式(III)：

【化24】

10

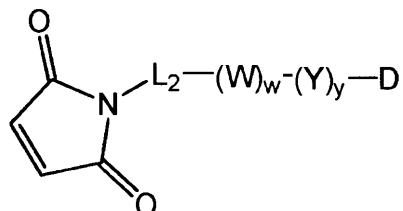


(III)

を有する場合、薬物-リンカー部分は下式(IV)：

【化25】

20

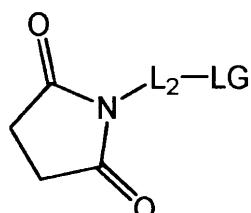


(IV)

を有し、薬物-リンカー部分の合成の最終工程は一般に、下式(V)：

【化26】

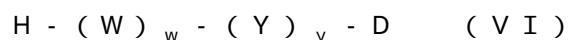
30



(V)

(式中、L₂は従前に定義された通りであり、LGは、脱離基、特に、ハリド、例えば、クロリドまたはN-ヒドロキシスクシンイミドに由来する基を表す)

の化合物と下式(VI)：



(式中、y = 1 および Y = PAB - カルボニル)

の化合物の間のカップリングであり、式(VI)の化合物は、薬物(DH)と下式(VII)の化合物、好ましくは、その保護形態：



(式中、Wおよびwは従前に定義された通りであり、Rは、「活性化炭酸エステル」の定義に定義された通りであり、GはHまたは保護基である)

の間のカップリングにより作製され得る。

40

50

【0256】

式(VII)の化合物が保護形態である場合、脱保護の最終工程が必要である。

【0257】

$y = 0$ である場合、化合物(VI)は式H-(W)_w-Dを有し、式中、(W)_wおよび好ましくは、Dはアミノ酸単位から構成される。結果として、化合物(VI)はこの場合、当業者に周知の従来のペプチド合成方法により作製され得る。

【0258】

2. A b - リンカー - 薬物

本発明による好ましい実施形態は、抗体上に存在するシステインと薬物-リンカー部分の求電子基、好ましくは、薬物-リンカー部分上に存在するマレイミド部分との間のカップリングからなる。10

【0259】

マレイミド-システインのカップリングは、当業者に周知の方法により行うことができる。

【0260】

一般に、抗体は、たとえあるとしても、薬物成分に連結可能な多くの遊離の反応性システインチオール基を含まない。抗体中のほとんどのシステインチオール残基はジスルフィド架橋として存在し、部分的または完全な還元条件下でジチオトレイトル(DTT)またはTCEPなどの還元剤を用いて還元しなければならない。ADCの負荷量(薬物/抗体比)は、薬物-リンカー中間体(D-L)または抗体に対するリンカー試薬のモル過剰率の制限、(ii)コンジュゲーション反応時間または温度の制限、および(iii)システインチオール修飾に対する部分的還元条件または還元条件の制限を含む、いくつかの異なる方法で制御可能である。20

【0261】

ヒトIgGのジスルフィド結合構造は、今日、よく確立されている(Liu and May, mAbs 4 (2012): 17-23に総説)。実際に、4つのヒトIgGサブクラス、すなわち、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4のジスルフィド結合構造に関して、多くの類似性といつつかの相違がある。総てのIgGサブクラスが常に12の鎖内ジスルフィド架橋と、重鎖と軽鎖の間で形成されるそれらの鎖内ジスルフィド結合内に存在する相違を含む。各鎖内ジスルフィド結合は、個々のIgGドメイン、すなわち、可変(VLおよびVH)および定常(CL、CH1、CH2およびCH3)ドメインに関連する。2本の重鎖はそれらのヒンジ領域で様々な数:IgG1およびIgG4では2つ、IgG2では4つ、IgG3では11のジスルフィド架橋により連結されている。IgG1の重鎖と軽鎖は軽鎖の最後のシステイン残基と重鎖の5番目の残基の間のジスルフィド結合により接続されているが、他のサブクラスIgG2、IgG3およびIgG4では、軽鎖は、軽鎖の最後のシステイン残基とVHドメインとCH1ドメインの境界に存在する、重鎖の3番目のシステイン残基の間のジスルフィド結合により重鎖に連結されている。IgG2およびIgG4では、これらの古典的構造以外のジスルフィド結合構造が記載されている(Liu and May, mAbs 4 (2012): 17-23に総説)。鎖内ジスルフィド結合は溶媒露出性が高く、結果として、各ドメイン内で逆平行-シート構造に埋もれて溶媒に曝されていない鎖内ジスルフィド結合よりもはるかに反応性が高い。これらの理由で、抗体のアイソタイプによらず、カップリングは、軽い還元の後に露出した鎖内システイン残基で起こる。従って、各鎖内ジスルフィド架橋は、理論上、2つのコンジュゲーション部位を形成し得る。30

【0262】

付加的な求核基は、リシンと2-イミノチオラン(トロート試薬)との反応によるアミンのチオールへの変換を介して抗体に導入することができる。反応性チオール基はまた、1、2、3、4、またはそれを越えるシステイン残基を操作すること(例えば、1以上の非天然システインアミノ酸残基を含んでなる変異型抗体を作製すること)によって抗体(またはそのフラグメント)に導入してもよい。米国特許第7521541号は、反応性システインアミノ酸の導入による抗体の操作を教示している。40

【0263】

システインアミノ酸は、抗体中の、鎖内または分子間ジスルフィド結合を形成しない反応性部位で操作し得る (Junutula, et al., 2008b *Nature Biotech.*, 26(8):925-932; Do rnan et al (2009) *Blood* 114(13):2721-2729; 米国特許第7521541号; 米国特許第7723485号; WO 2009 / 052249)。操作されたシステインチオールは、マレイミドまたは - ハロアミドなどのチオール反応性求電子基を有する本発明のリンカー試薬または薬物 - リンカー試薬と反応させて、システイン操作抗体と薬物部分を有するADCを形成することができる。従って、薬物成分の位置は設計、制御可能であり、既知である。操作されたシステインチオール基は一般に高収率でチオール反応性リンカー試薬または薬物 - リンカー試薬と反応するので、薬物負荷量は制御可能である。重鎖または軽鎖上の単一部位における置換によるシステインアミノ酸の導入のためのIgG抗体の操作から、対称抗体上に2つの新たなシステインが得られる。ほぼ均質なコンジュゲーション産物ADCで、2に近い薬物負荷量が達成できる。10

【0264】

抗体の2以上の求核基または求電子基が薬物 - リンカー中間体、またはリンカー試薬次いで薬物成分試薬と反応する場合、得られる産物は、抗体と結合した一定の分布、例えば、1、2、3などの薬物部分を持ったADC化合物の混合物である。ポリマー逆相 (PLRP) および疎水性相互作用 (HIC) などの液体クロマトグラフィー法で、混合物中の化合物を薬物負荷値によって分離することができる。単一薬物負荷値 (p) を有するADCの調製物は単離可能であるが、薬物部分はリンカーを介して抗体の異なる部位に結合されている可能性があるので、これらの単一薬物負荷値のADCはなお異質な混合物であり得る。20

【0265】

一部の抗体 - 薬物複合体では、薬物比は抗体上の結合部位の数によって制限を受け得る。高い薬物負荷、例えば、薬物比 > 5 は、特定の抗体 - 薬物複合体の凝集、不溶性、毒性、または細胞透過性の低下を招く場合がある。一般には、コンジュゲーション反応では、理論的最大値より少ない薬物部分が抗体にコンジュゲートされる。

【0266】

薬物負荷量はまた薬物 - 抗体比 (DAR) とも呼ばれ、細胞結合剤当たりの薬物の平均数である。30

【0267】

抗体 IgG1 および IgG4 アイソタイプの場合、部分的抗体還元の後に薬物がシステインに結合される場合、薬物負荷量は抗体当たり 1 ~ 8 薬物 (D) の範囲であり得、すなわち、1、2、3、4、5、6、7、および 8 つの薬物部分が抗体と共有結合される。

【0268】

抗体 IgG2 アイソタイプの場合、部分的抗体還元の後に薬物がシステインに結合される場合、薬物負荷量は抗体当たり 1 ~ 12 薬物 (D) の範囲であり得、すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 および 12 の薬物部分が抗体と共有結合される。

【0269】

ADCの組成物は、一定範囲の、1 ~ 8 または 1 ~ 12 の薬物とコンジュゲートされた細胞結合剤、例えば抗体の集合体を含む。

【0270】

コンジュゲーション反応からのADCの調製における抗体当たりの薬物の平均数は、UV、逆相HPLC、HIC、質量分析、ELISA アッセイ、および電気泳動などの従来の手段によって特徴付けることができる。

【0271】

非限定実施形態として、本明細書では、抗体 c208F2とのコンジュゲーションが提供される。この場合、薬物は、i) 配列番号28の配列の軽鎖では214番の残基Cys、およびii) 配列番号23の配列の重鎖では223、229および232番の残基Cys

50

s から選択される少なくとも 1 つのシステインとカップリングされる。

【 0 2 7 2 】

非限定実施形態として、本明細書では、抗体 c 2 0 8 F 2 とのコンジュゲーションが提供される。この場合、薬物は、 i) 配列番号 2 8 の配列の軽鎖では 2 1 4 番の残基 C y s 、および i i) 配列番号 2 3 の配列の重鎖では、 2 2 3 、 2 2 9 および 2 3 2 番の残基 C y s から選択される 2 、 3 または 4 つのシステインとカップリングされる。

【 0 2 7 3 】

非限定実施形態として、本明細書では、抗体 h z 2 0 8 F 2 (a r . 1) とのコンジュゲーションが提供される。この場合、薬物は、 i) 配列番号 3 9 の配列の軽鎖では 2 1 4 番の残基 C y s 、および i i) 配列番号 3 7 の配列の重鎖では 2 2 3 、 2 2 9 および 2 3 2 番の残基 C y s から選択される少なくとも 1 つのシステインとカップリングされる。
10

【 0 2 7 4 】

非限定実施形態として、本明細書では、抗体 h z 2 0 8 F 2 (v a r . 3) とのコンジュゲーションが提供される。この場合、薬物は、 i) 配列番号 4 0 の配列の軽鎖では 2 1 4 番の残基 C y s 、および i i) 配列番号 3 8 の配列の重鎖では 2 2 3 、 2 2 9 および 2 3 2 番の残基 C y s から選択される 2 、 3 または 4 つのシステインとカップリングされる。
。

【 0 2 7 5 】

別の例はリシンカップリングからなる。抗体は、薬物 - リンカー中間体 (D - L) またはリンカー試薬と反応しない、例えば、多数のリシン残基を含み得る。最も反応性の高いリシン基だけがアミン反応性リンカー試薬と反応し得る。また、最も反応性の高いシステインチオール基だけがチオール反応性リンカー試薬と反応し得る。
20

【 0 2 7 6 】

本発明の化合物がリシンと結合される場合、薬物負荷量は細胞抗体当たり 1 ~ 8 0 薬物 (D) の範囲であり得るが、上限は 4 0 、 2 0 、 1 0 または 8 が好ましいものであり得る。ADC の組成物は、一定範囲の、 1 ~ 8 0 、 1 ~ 4 0 、 1 ~ 2 0 、 1 ~ 1 0 または 1 ~ の薬物とコンジュゲートされた細胞結合剤、例えば抗体の集合体を含む。

【 0 2 7 7 】

本発明による式 (I) の ADC は、薬学上許容可能な塩の形態であり得る。

【 0 2 7 8 】

本発明において、「薬学上許容可能な」とは、一般に、安全、無毒で、生物学的もその他の点でも望ましくないものではなく、かつ、獣医学的使用ならびにヒト医薬的使用に許容可能な医薬組成物の作製に使用できるものを意味する。
30

【 0 2 7 9 】

化合物の「薬学上許容可能な塩」とは、本明細書で定義されるように薬学上許容可能であり、かつ、親化合物の所望の薬理活性を有する塩を意味する。

【 0 2 8 0 】

薬学上許容可能な塩は特に、

(1) 塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸および類似の酸などの薬学上許容可能な無機酸を伴って形成される、または酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、マレイン酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、ステアリン酸、乳酸および類似の酸などの薬学上許容可能な有機酸を伴って形成される、薬学上許容可能な酸の付加塩；ならびに
40

(2) 親化合物中に存在する酸プロトンが、金属イオン、例えば、アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオンまたはアルミニウムイオンのいずれかにより置換されている；またはリシン、アルギニンおよび類似のものなどの薬学上許容可能な有機塩基；もしくは水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウムおよび類似のものなどの薬学上許容可能な無機塩基とともに配位している場合に形成される薬学上許容可能な塩基の付加塩を含んでなる。
50

【0281】

これらの塩は、塩基または酸官能基を含有する本発明の化合物および対応する酸または塩基から、従来の化学法を用いて作製することができる。

【0282】**V - 処置**

最後に、本発明は、特に、癌の処置における薬物として使用するための上記のADCに関する。

【0283】

本発明のさらなる主題は、特に、癌の処置のために医薬品として使用するための、上記で定義されるものなどの式(I)の化合物である。

10

【0284】

本発明はまた、特に癌の処置のために意図される医薬品を製造するための、上記で定義されるものなどの式(I)の化合物の使用に関する。

【0285】

本発明はまた、癌を処置するための方法であって、それを必要とする人に有効量の上記で定義されるものなどの式(I)の化合物を投与することを含んでなる方法に関する。

【0286】

癌は好ましくは、それらの表面でタンパク質IGF-1Rの全部または一部を発現または過剰発現する腫瘍細胞を含むIGF-1R関連癌から選択することができる。

【0287】

より詳しくは、前記癌は、乳癌、結腸癌、食道癌、肝細胞癌、胃癌、神経膠腫、肺癌、黒色腫、骨肉腫、卵巣癌、前立腺癌、横紋筋肉腫、腎臓癌、甲状腺癌、子宮内膜癌、神経鞘腫、神経芽腫、口腔扁平上皮癌、中皮腫、平滑筋肉腫および任意の薬物耐性現象または癌である。

20

【0288】

疑念を避けるため、薬物耐性IGF-1R発現癌とは、元々IGF-1Rを発現する耐性癌だけなく、元々はIGF-1Rを発現または過剰発現しないが、それらがひと度従前の処置に対して耐性となった場合にIGF-1Rを発現する癌もそうであると理解されるべきである。

【0289】

本発明のもう1つの目的は、本明細書に記載のようなADCを含んでなる医薬組成物である。

30

【0290】

より詳しくは、本発明は、本発明のADCを少なくとも賦形剤および/または薬学上許容可能なビヒクリルを含んでなる医薬組成物に関する。

【0291】

本明細書において、「薬学上許容可能なビヒクリル」または「賦形剤」は、二次反応を誘発せずに医薬組成物中に入り、かつ、1または複数の有効化合物の投与の助長、内体でのその寿命および/またはその有効性の増強、溶液中のその溶解度の増大またはその保存の改善を可能とする化合物または化合物の組合せを表すものとする。これらの薬学上許容可能なビヒクリルおよび賦形剤は周知であり、選択された1または複数の化合物の性質および投与様式の関数として当業者により適合される。

40

【0292】

有効成分は、従来の医薬担体との混合物として単位投与形で動物またはヒトに投与することができる。好適な単位投与形は、経口経路を介する形態および非経口経路(皮下、皮内の、筋肉内または静脈内)を介する投与形態を含んでなる。

【0293】

経口投与用の固体組成物として、錠剤、丸剤、散剤(ゼラチン硬または軟カプセル)または顆粒の使用が可能である。これらの組成物では、本発明の有効成分は、アルゴン流中でデンプン、セルロース、スクロース、ラクトースまたはシリカなどの1以上の不活性希

50

釀剤と混合する。これらの組成物はまた、希釀剤以外の物質、例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはタルクなどの1以上の滑沢剤、着色剤、コーティング剤(コーティング錠)またはワニスも含んでなり得る。

【0294】

非経口投与用の無菌組成物は、好ましくは、水性または非水性溶液、懸濁液またはエマルジョンであり得る。溶媒またはビヒクリとして、水、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、特に、オリーブ油、注射用有機エステル、例えば、オレイン酸エチルまたは他の好適な有機溶媒の使用が可能である。これらの組成物は、アジュバント、特に、湿潤剤、等張剤、乳化剤、分散剤および安定剤も含有してよい。滅菌は、例えば、除菌濾過、組成物への滅菌剤の配合、照射または加熱によるなどのいくつかの方法で行うことができる。それらはまた、使用時に無菌水または他の任意の注射用無菌媒体に溶かすことができる固体無菌組成物の形態で調製することもできる。10

【0295】

好ましくは、これらのADCは、全身経路により、特に、静脈内経路により、筋肉内、皮内、腹腔内または皮下経路により、または経口経路により投与される。より好ましい様式では、本発明によるADCを含んでなる組成物は、連続的に数回投与される。

【0296】

本発明は、従って、また、少なくともi)本発明による抗体-薬物複合体、および/または本発明による医薬組成物と、ii)前記抗体-薬物複合体および/または医薬組成物が配分されているシリンジまたはバイアルまたはアンプルとを含んでなるキットにも関する。20

【0297】

それらの投与様式、用量および最適な剤形は、例えば、患者の年齢または体重、患者の健康状態の重篤度、処置に対する忍容性および示される二次的影響など、患者に適合された処置の確立において一般に考慮される基準に従って決定することができる。

【0298】

本発明の他の特徴および利点は、実施例および判例が以下に表される図面とともに本明細書の続きで明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0299】

【図1】図1A～1C：FACS分析によるヒト天然IGF-1Rへの抗体結合。図1Aは、MCF-7細胞株での力価測定曲線を表す。MF1は、蛍光強度の平均を表す。図1Bは、MCF-7細胞株でのマウスおよびキメラ両方の抗IGF-1R抗体のEC₅₀を表す。図1Cは、MCF-7細胞株でのキメラ抗IGF-1R抗体のB_{m a x}を表す。30

【図2】図2A～2B：トランスフェクト細胞と非トランスフェクト細胞を用いたhIGF-1R認識の評価。図2A)は、IGF-1R⁺細胞株での1つのキメラ抗IGF-1R Abの力価測定曲線を表す。MF1は、蛍光強度の平均を表す。図2Bは、ヒトIGF-1R⁻細胞株でのキメラ抗IGF-1R Abの結合を表す。

【図3】図3A～3B：トランスフェクト細胞を用いたIGF-1RとhIRのAbの特異性の評価。図3Aは、hIR⁺トランスフェクト細胞株でのマウス抗IGF-1R Abの結合を表す。図3Bは、IR⁺細胞株でのキメラ抗IGF-1R Abの結合を表す。MF1は、蛍光強度の平均を表す。GRO5抗hIR Mab(Calbiochem)は陽性対照として導入された。40

【図4】図4：IM-9細胞株でのマウス抗IGF-1R Abの結合。MF1は、蛍光強度の平均を表す。GRO5抗hIR Mabは陽性対照として導入された。

【図5】図5A～5C：サルIGF-1Rの認識の評価。図5Aは、COS-7細胞株でのキメラ抗IGF-1R Abの力価測定曲線を表す。MF1は、蛍光強度の平均を表す。図5Bは、COS-7細胞株でのマウスおよびキメラ両抗IGF-1R抗体のEC₅₀を表す。図5Cは、NIH 3T3トランスフェクト細胞hIGF-1R⁺およびCOS-7の両細胞株でのキメラ抗IGF-1R抗体のEC₅₀を表す。50

【図6】図6：カルボキシメチルデキストランマトリックスに化学的にグラフトされたマウス抗Tag His抗体11000RU超で活性化したCM5センサーチップを用いたSPR技術に基づくBiacore X100で得られたセンサーグラム。実験は、ランニングおよびサンプル希釈バッファーとしてHBS-EP+を用い、25にて $30\mu l$ /分の流速で行った。図は、分析の最初の注入の開始時にx軸上に、また、この最初の注入直前に定義されたベースラインによりy軸上に並べた4つの独立したセンサーグラムの重畠を示した。組換え可溶性IGF1Rのヒトに基づく配列のキャプチャーで得られたセンサーグラムを菱形で示す。組換え可溶性IGF-1Rのカニクイザルに基づく配列のキャプチャーで得られたセンサーグラムを三角で示す。白い記号はブランクサイクル(ランニングバッファーの5回の注入)に相当し、黒い記号は漸増濃度範囲のc208F2(5、10、20、40および80nM)の注入に相当する。

【図7】図7：IGF1と比較した場合の受容体リン酸化に対する抗hIGF-1R抗体の固有の効果の評価。

【図8】図8：マウス抗hIGF-1RによるIGF-1に応答したIGF-1Rリン酸化の阻害。

【図9】図9：抗IGF-1R抗体の細胞表面シグナル強度は、37での細胞インキュベーション後にダウンレギュレートされる。MCF-7細胞を4または37で4時間、 $10\mu g/ml$ のAbとともにインキュベートした。図は、MFIを表す。

【図10】図10A～10B：抗体表面減衰。細胞表面結合抗体を37で10、20、30、60および120分後に評価した。図10Aは、4で測定したシグナル強度と比較した残留IGF-1R%を表す。図10Bは、Prisms Softwareを用い、指數減衰フィッティングを用いた半減期計算を表す。

【図11】図11：抗hIGF-1R Abは内部移行される。細胞を $10\mu g/ml$ のマウスAbとともに37で0、30または60分間インキュベートした。細胞に透過処理を施し、または施さず、二次抗マウスIgG-Alexa488とともにインキュベートした。膜は、シグナル強度w/o透過処理に相当する。全体は、細胞透過処理後のシグナル強度に相当し、細胞質は、内部移行したAbに相当する。各評価抗体の名称を各グラフの上に示す。

【図12】図12A～12B：Ab内部移行の画像。図12A：m208F2とともに4で20分間インキュベートし、インキュベーション前(W)、37で15分(X)、30分(Y)および60分(Z)洗浄したMCF-7細胞。細胞を固定し透過処理を施した。m208F2 Abは抗マウスIgG Alexa488を用いて、Lamp-1はウサギ抗Lamp-1抗体を二次抗ウサギIgG Alexa555とともに用いて可視化した。図12B：MCF-7細胞を37で30分間抗hIGF-1Rマウス抗体とともにインキュベートし、上記のように染色した。共局在はImageJソフトウェアの共局在ハイライター(highliter)プラグインを用いて確認した。

【図13】図13：抗体分解におけるリソソーム経路の関与。

【図14】図14：酸性pHは5種類のマウス抗IGF-1R抗体の結合能を低下させる。

【図15】図15A～15D：c208F2 Mabの第1のヒト化型の結合特徴。hz208F2 VH3/VL3 mAbの結合特性をヒト細胞株MCF-7(A)、サル細胞株COS-7(B)およびヒトインスリン受容体を発現するトランスフェクトマウス細胞株(C)で評価した。マウスおよびキメラの両208F2 mAbの結合を並行して評価した。トランスフェクト(transfected)細胞株(D)でのhIRの発現を確認するために抗hIR抗体クローナルGRO5を用いた。

【図16】図16：hz208F2 VH3/VL3抗体表面減衰。

【図17】図17：両フローセルにて、流速 $30\mu l$ /分でランニングバッファーとしてHBS-EP+を用い、カルボキシメチルデキストランマトリックスに化学的にグラフトした12.000RU前後のマウス抗Tag Hisモノクローナル抗体で活性化したCM5センサーチップを用い、25の温度でSPRに基づくBiacore X100装置

10

20

30

40

50

で得られたセンサーグラムの重畠。各センサーグラム（第1のものを三角で示し、第2のものを菱形で示す）は全サイクルに相当する。1 - 第2のフローセルでの組換えh - IGF - 1R ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) の溶液の1分間の注入 2 - 第1のセンサーグラムでは：各90秒で5回のランニングバッファーの注入。第2のセンサーグラムでは：各90秒で漸増濃度範囲での抗IGF - 1R c208F2抗体溶液の5回の注入 3 - 解離動態速度の決定のための300秒の減衰 4 - 10 mM グリシン、HCl pH 1.5バッファーの45秒の注入による表面の再生

【図18】図18：漸増濃度範囲の抗IGF - 1R c208F2溶液で得られたセンサーグラムに対するプランクセンサーグラム(HBS - EP+の5回の注入)の減算に相当するセンサーグラムを灰色で示す。下記パラメーター： $k_{on} = (1.206 \pm 0.036) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $k_{off} = (7.81 \pm 0.18) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $R_{max} = 307.6 \pm 0.3 \text{ RU}$ を用いた1:1モデルに相当する理論的センサーグラムを細い黒線で示す。c208F2の算出濃度をグラフに示す：最高濃度(24 nM)のみを定数と見なす)。

【図19】図19：解離定数は各抗体に関して行った4回の実験の平均に相当し、pM単位で表される比： $k_{off}/k_{on} \times 10^{12}$ に相当する。エラーバーは標準誤差($n=4$)に相当する。

【図20】図20：半減期は、各抗体に関して行った4回の実験の平均に相当し、時間の単位で表される比： $L_n(2)/k_{off}/3600$ に相当する。エラーバーは標準誤差($n=4$)に相当する。

【図21】図21：3つの異なる化合物とカップリングされた抗IGF - 1Rの細胞傷害性。5種類のキメラ抗体、抗IGF - 1RをE - 13、G - 13またはF - 63のいずれかとカップリングさせた。無関連抗体c9G4もまた同じ化合物とカップリングさせた。

【図22】図22A～22C：MCF - 7異種移植モデルにおけるc208F2 - E - 13(図22A)、c208F2 - G - 13(図22B)およびc208F2 - F - 63(図22C)のin vivo評価。

【図23】図23A～23B：MCF - 7異種移植モデルにおけるADC対照(c9G4 - E13およびc9G4 - G - 13)と比較したc208F2 - E - 13(図23A)およびc208F2 - G - 13(図23B)の両方のin vivo評価。

【図24】図24Aおよび24B：酸性pHはヒト化IGF - 1R抗体hz208F2 H076/L024(A)およびhz208F2(H077/L018(B))の結合能を低下させる。

【図25】図25：正常細胞でのc208F2 - G - 13の細胞傷害性の評価。

【図26】図26：G - 13とカップリングされたhz208F2のヒト化変異体の細胞傷害性。無関連抗体c9G4もまた同じ化合物とカップリングさせた。

【図27】図27：MCF - 7異種移植モデルにおける208F2 - G - 13とc208F2 - G - 13のヒト化型のin vivo評価。

【図28】図28Aおよび28B：MCF - 7異種移植モデルにおける1回の注入と比較した4回の注入のc208F2 - G - 13(28A)またはhz208F2 - 4 - G - 13(28B)のいずれかのin vivo評価。

【図29】図29Aおよび29B：CaOV - 3異種移植モデルにおけるc208F2 - E - 13(29A)およびc208F2 - G - 13(29B)のin vivo評価。

【実施例】

【0300】

実施例1：IGF - 1R ECDに対するマウス抗体の作製

ヒトIGF - 1受容体(hIGF - 1R)のヒト細胞外ドメイン(ECD)に対して生成したマウスモノクローナル抗体(Mab)を作製するために、5個体のBALB/cマウスを $10 \mu\text{g}$ のrhIGF - 1Rタンパク質(R&D Systems、カタログ番号391 - GR)で3回皮下免疫した。別途、一部の動物で、 $10 \mu\text{g}$ のIGF - 1Rマウス細胞外ドメイン(ECD)(R&D Systems、カタログ番号6630 - GR/

10

20

30

40

50

Fc)での3回の付加的免疫誘導も行った。初回の免疫誘導はフロイントの完全アジュvant (Sigma、セントルイス、MD、USA) の存在下で行った。以降の免疫誘導にはフロイントの不完全アジュvant (Sigma) を加えた。融合3日前に、免疫マウスに10 µgのrhIGF-1Rタンパク質で追加免疫を行った。次に、脾細胞およびリンパ球をそれぞれ脾臓の灌流および近位リンパ節の細断により調製し、5個体の免疫マウスのうち1個体（総てのマウスの血清力価測定の後に選択）から採取し、SP2/0-Ag14骨髄腫細胞 (ATCC、ロックヴィル、MD、USA) と融合させた。融合プロトコールはKohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975) に記載されている。融合細胞に対してHAT選択を行う。一般に、特にマウス起源のモノクローナル抗体またはそれらの機能的フラグメントの調製には、特にマニュアル “Antibodies” (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) に記載されている技術を参照することができる。融合のおよそ10日後に、ハイブリッド細胞のコロニーをスクリーニングした。一次スクリーニングとして、ハイブリドーマの上清を、ヒト乳房MCF7腫瘍細胞 (ATCC) および/または細胞表面にサルIGF-1Rを発現するCOS7細胞（アフリカミドリザル腎臓SV40形質転換）を用いたFACS分析によって、IGF-1R ECDタンパク質に対して生成したMabの分泌に関して評価した。より厳密には、フローサイトメトリーによる選択のために、 10^5 細胞 (MCF7またはCOS7のいずれか) を96ウェルプレートの各ウェルの1%BSAおよび0.01%アジ化ナトリウムを含有するPBS (FACSバッファー) 中に4で播種した。2000rpmで2分の遠心分離後に、バッファーを除去し、供試するハイブリドーマ上清を加えた。4で20分のインキュベーション後、細胞を2回洗浄し、FACSバッファー (#A11017, Molecular Probes Inc.、ユージーン、USA) で1/500希釈したAlexa 488コンジュゲートヤギ抗マウス抗体を加え、4で20分間インキュベートした。FACSバッファーでの最終洗浄後、各試験管に終濃度40 µg/mlでヨウ化プロピジウムを加えた後に、FACS (Facscalibur、Becton-Dickinson) により細胞を分析した。細胞単独およびAlexa 488コンジュゲート二次抗体とともにインキュベートした細胞を含有するウェルを陰性対照として含めた。アイソタイプ対照を各実験で使用した (Sigma、ref M90351MG)。蛍光強度の平均値 (MFI) を算出するために少なくとも5000細胞を評価した。

【0301】

加えて、内部移行する抗体のみを選択するために内部移行アッセイを行った。このアッセイでは、MCF7腫瘍細胞株を試験前にフェノールレッド不含の、1%L-グルタミンおよび10%のFACSを含むRMP11640中で3日間培養した。次に、トリプシンを用いて細胞を解離させ、100 µlの細胞懸濁液を $4 \cdot 10^5$ 細胞/mlで、96マルチウェルプレートのフェノールレッド不含の、1%L-グルタミンおよび5%FBSを含むRPMI1640中に播種した。2000rpmで2分の遠心分離後に、細胞を50 µlのハイブリドーマ上清または対照抗体溶液 (1 µg/mlの陽性対照およびアイソタイプ対照) のいずれかに再懸濁させた。4で20分のインキュベーション時間の後、細胞を2000rpmで2分遠心分離し、冷(4)または温(37)いずれかの完全培養地に再懸濁させた。次に、細胞を37または4のいずれかで2時間インキュベートした。その後、細胞をFACSバッファーで3回洗浄した。Alexa 488標識ヤギ抗マウスIgG抗体を20分間インキュベートし、細胞を3回洗浄した後、ヨウ化プロピジウム陰性細胞集団でのFACS分析を行った。

【0302】

FACS分析の後、(i)ハイブリドーマ上清とともに、4でインキュベートした細胞の表面上で検出された蛍光シグナルと、37でインキュベートした細胞で得られたものとの差異、および(ii)細胞表面上に残留するIGF-1Rのパーセンテージの、2つのパラメーターを決定した。

【0303】

10

20

30

40

50

残留 h I G F - 1 R のパーセンテージは、下記のように算出される：

$$\% \text{ 残留 I G F - 1 R} = (\text{MFI}_{\text{Ab}}_{37} / \text{MFI}_{\text{Ab}}_{4}) \times 100.$$

【0304】

加えて、組換えヒト (h I G F - 1 R) およびマウス (m I G F - 1 R) タンパク質、ならびに組換えヒトインスリン受容体 (h I R) タンパク質への抗体結合を検討するためには、3種類の E L I S A を行った（クローニング前または後のいずれか）。r h - I G F - 1 R および / または r m - I G F - 1 R への結合を示し、r h I R には結合しない抗体を分泌するハイブリドーマを保持した。簡単に述べれば、96ウェル E L I S A プレート (Costar 3690、Corning、NY、USA) を 4 にて一晩、P B S 中 0.6 μg / ml の r h I G F - 1 R タンパク質 (R & D Systems、カタログ番号 391 - GR) または 1 μg / ml の r m I G F - 1 R タンパク質 (R & D Systems、カタログ番号 6630 - GR / Fc) または 1 μg / ml の r h I R タンパク質 (R & D Systems、カタログ番号 1544 - IR / CF) 100 μl / ウェルでコーティングした。次に、これらのプレートを 37 にて 2 時間、0.5% ゼラチンを含有する P B S (# 22151、Serva Electrophoresis GmbH、ハイデルベルク、ドイツ) でプロッキングした。プレートを軽く打ち付けることで飽和バッファーを排出したところで、各ウェルに 100 μl の各上清希釈液（無希釈ハイブリドーマ上清も上清連続希釈液も）を加え、37 で 1 時間インキュベートした。3回の洗浄後、100 μl セイヨウワサビペルオキシダーゼコンジュゲートポリクローナルヤギ抗マウス IgG (# 115 - 035 - 164、Jackson Immuno - Research Laboratories, Inc.、ウェストグローブ、PA、USA) を、0.1% ゼラチンおよび 0.05% Tween 20 (w : w) を含有する P B S 中 1 / 5000 希釈で 37 にて 1 時間加えた。次に、E L I S A プレートを 3 回洗浄し、T M B (# U P 664782、Uptima、Interchim、フランス) 基質を加える。室温で 10 分のインキュベーション時間後、1M 硫酸を用いて反応を停止させ、450 nm での光学密度を測定する。

【0305】

対象とする抗体を分泌するハイブリドーマを拡大培養し、限界希釈によりクローニングした。アイソタイプ分類を行ったところで、各コードの 1 クローンを拡大培養し、凍結させた。さらなる特性決定のため、対象とする各抗体を Cell Line (Integra Biosciences) と呼ばれる *in vitro* 生産系で生産した。

【0306】

結合特異性 F A C S 分析に取り組むためのさらなるアッセイを、IM 9 細胞（ヒト I R 発現 B リンパ芽球）ならびに h I G F - 1 R トランスフェクト細胞と非トランスフェクト細胞に対して行った。

【0307】

選択された抗体に対応するデータを総て表 7 にまとめ、5つの選択抗体が MCF - 7 乳癌細胞またはトランスフェクト細胞のいずれかで発現された天然ヒト I G F - 1 R を強く認識することを示した。それらの抗体はまた COS - 7 細胞でサル I G F - 1 R も認識する。これらの抗体は、IM 9 細胞で発現の高いヒトインスリン受容体とは交差反応しない。これらの抗体は E L I S A プレートに直接コーティングされた場合の r h I G F - 1 R E C D タンパク質をあまり認識しないことを述べておかなければならぬ。

【0308】

【表8】

表7

ハイブリドーマ名	アイソタイプ	CNCM	ELISA(SNT 5µg/ml)			MCF7 内部移行アセト(SNT 5µg/ml)			FACS(SNT at 5µg/ml)		
			D.O. 450 nm	MFI		4°C	37°C	残留 rh IGF1R 率%	△(MFI 4°C - MFI 37°C)	M9 (h IR ⁺)	Cos-7(ナ ル IGF1R ⁺)
208F2	IgG1 K	I-4757	0.163	0.099	0.140	355	94	27	261	4	106
212A11	IgG1 K	I-4773	0.232	0.102	0.141	390	106	27	284	7	125
213B10	IgG1 K	I-4774	0.399	0.127	0.110	386	115	30	271	7	122
214F8	IgG1 K	I-4775	0.349	0.102	0.115	386	111	29	275	7	132
219D6	IgG1 K	I-4736	0.329	0.112	0.106	349	106	30	243	7	114
										2110	21

【0309】

実施例2：FACS分析によるヒト天然IGF-1Rへの抗体結合

10

20

30

40

50

5つのマウスIGF-1R抗体をキメラ化した。マウスおよびキメラ両方のIGF-1R抗体の結合特性をヒトMCF-7乳癌細胞株(ATCC#HTB-22)にて漸増抗体濃度を用い、FACS分析により評価した。この目的で、細胞(1×10^6 細胞/m¹)を4にてFACSバッファー(PBS、0.1%BSA、0.01%NaN₃)中、IGF-1R抗体とともに20分間インキュベートした。次に、それらの細胞を3回洗浄し、暗所、4にてさらに20分間、Allexa 488とカップリングした適当な二次抗体とともにインキュベートした後、FACSバッファー中に3回洗浄した。すぐに生細胞に抗IGF-1R抗体の結合がなされ、これを、ヨウ化プロピジウム(死細胞を染色する)を用いて確認した。各抗体で得られたシグナル強度の最大値をB_{max}と呼び、蛍光強度の平均(MFI)で表した。モル濃度(M)で表される結合のEC₅₀は、非直線回帰分析(GraphPad Prism 4.0)を用いて算出した。

【0310】

各マウスまたはキメラAbの力価測定曲線は、生成した総ての抗体が典型的な飽和特性で天然IGF-1R型を認識できることを示した(図1A)。抗体のランク付けを行い、マウスおよびキメラの両Abの結合特性を比較するために、各化合物の結合EC₅₀を、非直線回帰分析を用いて決定した。各マウスAbとその対応するキメラ型のEC₅₀の比較は、これら2つの形態が同じ結合特性を示し、Abのキメラ化がIGF-1R認識に影響を及ぼさなかったことを示した(図1B-C)。キメラ抗体のEC₅₀値およびB_{max}値を表8にまとめた。

【0311】

【表9】

10

20

30

表8

AC	B _{max}	EC ₅₀
c208F2	981	6.7E-10
c212A11	991	6.7E-10
c214F8	1069	5.0E-10
c219D6	993	4.7E-10
c213B10	1103	4.4E-10

【0312】

実施例3：有意なレベルのIRを発現するIGF-1RまたはIRトランスフェクト細胞またはIM9細胞のいずれかを使用することによる抗体特異性の確認

生成された抗体のIGF-1RとIRに対する特異性を確認するために、hIGF-1RまたはhIRのいずれかを発現する安定なトランスフェクト体を、FACS分析により評価した。簡単に述べれば、漸増濃度のキメラmAbをFACSバッファー(PBS、0.1%BSA、0.01%NaN₃)中、4で20分間、細胞とともにインキュベートした。次に、細胞を3回洗浄し、Allexa 488とカップリングした適当な二次抗体とともにインキュベートした後、暗所、4にてさらに20分間インキュベートし、その後、FACSバッファー中に3回洗浄した。すぐに生細胞に抗IGF-1R抗体の結合がなされ、これを、ヨウ化プロピジウム(死細胞を染色する)を用いて確認した。モル濃度(M)で表される結合EC₅₀は、非直線回帰分析(GraphPad Prism 4.0)を用いて算出した。

【0313】

hIGF-1Rトランスフェクト細胞株(図2A)と非トランスフェクト細胞で得られた力価測定曲線(図2B)から、ヒトIGF-1Rに対するキメラAbの結合特異性が確認された。EC₅₀値およびB_{max}値を表9にまとめた。

40

50

【0314】

【表10】

表9

Ac	B _{max}	EC ₅₀ (M)
c208F2	2008	3.2E-10
c212A11	2513	4.4E-10
c214F8	2094	2.7E-10
c219D6	2521	5.5E-10
c213B10	2029	3.3E-10

10

【0315】

h I Rへのマウスおよびキメラの両抗体の結合の不在を確認するために、ヒトI R (h I R)を発現する安定な細胞株を用いた。マウスおよびキメラの両A bによるヒト細胞表面h I Rの認識は、F A C S分析により行った。漸増濃度のマウスまたはキメラいずれのm A bをF A C Sバッファー (P B S 、 0 . 1 % B S A 、 0 . 0 1 % N a N ₃)中、4にて20分間、h I R ⁺トランスフェクト細胞株上でインキュベートした。次に、細胞を3回洗浄し、A l e x a 488とカップリングした適当な二次抗体とともにインキュベートした後、暗所、4にてさらに20分間インキュベートし、その後、F A C Sバッファー中に3回洗浄した。すぐに生細胞に抗I G F - 1 R抗体の結合がなされ、これを、ヨウ化プロピジウム(死細胞を染色する)を用いて確認した。モル濃度(M)で表される結合E C ₅₀は、非直線回帰分析(G r a p h P a d P r i m s 4 . 0)を用いて算出した。抗h I R抗体クローニングR O 5を陽性対照として用いた。マウスおよびキメラ9G4抗体を無関連抗体として導入した。

20

【0316】

トランスフェクト細胞の細胞表面での高レベルのh I R発現は、市販の抗h I R抗体G R O 5を用いて確認した(図3Aおよび3B)。高濃度のマウス(図3A)またはキメラ(図3B)いずれかのh I G F - 1 R A bを用いても、h I R ⁺トランスフェクト細胞の細胞表面での結合は見られなかった。これらの結果は、マウス抗h I G F - 1 R A bもキメラ抗h I G F - 1 R A bもh I Rを認識しなかったことを示した。

30

【0317】

h I G F - 1 RとI Rの認識のこの特異性はまた、h I Rを発現するBリンパ腫細胞株であるIM9細胞を用いたF A C S分析によても示された(図4)。このF A C S分析では、プロトコールは上記のものと同じであり、抗ヒト二次A bの交差反応性を避けるためにマウス抗体を用いた(IM9細胞はそれらの細胞表面にヒトI gを発現する)。図4に示す結果は、ここでも、G R O 5抗h I R抗体を用いた場合にも予想されたシグナルが見られたが、評価したマウス抗体にこの細胞株上で有意な結合シグナルを示したものはないことを示した。

40

【0318】

実施例4：F A C S分析およびB i a c o r e分析によるサル天然I G F - 1 Rへの抗体結合

規制毒性試験の第1の前提条件の1つは、選択された化合物を評価するために適切な動物種を見つけることである。本明細書に記載の抗体系列はマウスI G F - 1 Rを認識できないので、毒性評価に最も可能性のある種は非ヒト靈長類(N H P)である。

【0319】

サルI G F - 1 Rに対する抗I G F - 1 R抗体の結合を評価するために、マウスおよびキメラの両抗h I G F - 1 R抗体の結合をまず、漸増抗体濃度を用い、C O S - 7細胞株でF A C S分析により評価した。細胞(1 × 1 0 ⁶細胞 / m l)をF A C Sバッファー(

50

PBS、0.1%、BSA、0.01%NaN₃)中、4で20分間、抗IGF-1R抗体とともにインキュベートした。次に、細胞を3回洗浄し、Allexa 488とカップリングした適当な二次抗体とともにインキュベートした後、暗所、4にてさらに20分間インキュベートし、最後にFACSバッファー中で3回洗浄した。ヨウ化プロピジウム(死細胞を染色する)を用いて確認される生細胞に対する抗IGF-1R抗体の結合をすぐに評価した。モル濃度(M)で表される結合EC₅₀は、非直線回帰分析(Graph Pad Prism 4.0)を用いて算出した。

【0320】

COS-7サル細胞株で得られた力価測定曲線は、総ての抗hIGF-1R Abがサル細胞株の表面で発現されたIGF-1Rを特異的に認識したことを示した(図5A)。
マウスおよびキメラの各Abに関するEC₅₀の決定は、これらの2形態はサルIGF-1Rに対するそれらの結合特性に関して十分匹敵したことを示した(図5B)。これらの結果は、生成された総ての抗hIGF-1RがサルIGF-1Rを認識したことを示した。

【0321】

ヒトとサルのIGF-1Rに対するキメラ抗体認識の大きさを確認するために、COS-7細胞とトランスフェクトIGF-1R細胞での結合EC₅₀の比較を行った。図5Cに示される結果は、総ての抗体によるヒトおよびサルIGF-1Rの同等の認識を示した。

【0322】

別の種類のサルにおける認識を確認するために、細胞をIGF-1R型カニクイザルでトランスフェクトして可溶性サルIGF-1R ECDを作製し、hIGF-1RまたはカニクイザルIGF-1Rのいずれかに対するその結合特性を比較するためにキメラ抗体の1つ(c208F2)を用いてBiacore試験を行った。

【0323】

認識試験は、X100装置にて、抗Tag His抗体(HisキャプチャーキットGE Healthcare カタログ番号28-9950-56)により活性化したCM5センサーチップを用いて行った。アミンキット化学を用い、11000RUを越える抗体をカルボキシメチルデキストランマトリックスに化学的にグラフトした。これらの試験は、ランニングおよびサンブル希釈バッファーとしてHBS-EPバッファー(GE Healthcare)を用い、25にて流速30μl/分で行った。マカク属IGF-1Rと比較してhIGF-1Rに対する208F2抗体のキメラ型(c208F2)の結合の速度パラメーターを定義するためにシングルサイクル動態スキームを用いた。

【0324】

ヒト(R&D Systemsカタログ番号305-GR-50)またはカニクイザル(自家作製)のうち1つのいずれかの配列に基づく、2本の鎖と、付加的なC末端10Hisタグとともに発現される2本の鎖の細胞外ドメインから構成されるIGF-1Rヘテロ四量体の可溶性組換え型の溶液を、160RU前後の抗原を捕捉するために定義された希釈で第2のフローセルに1分注入した。捕捉相の後、両フローセルにランニングバッファーを5回注入する(各90秒注入)、または漸増する5種類の濃度範囲のc208F2を注入した(各90秒注入)。5回目の注入の終了時に、解離速度を定義するためにランニングバッファーを通した。

【0325】

次に、10mMグリシン、HCl pH 1.5バッファーを30秒間注入して表面を再生した。

【0326】

コンピューターで計算されたシグナルは、フローセル2(捕捉されたIGF-1Rを含む)の応答とフローセル1(IGF-1R分子を含まない)の応答の間の差異に相当する(図6)。

【0327】

10

20

30

40

50

各 IGF - 1R 分子（ヒトまたはカニクイザル）に関して、漸増濃度範囲の c208F2 の注入によるシグナルを、5回のバッファー注入で得られたシグナル（二重参照）の減算により補正した。得られたセンサーグラムを、Biaevaluation ソフトウェアを 1:1 モデルとともに用いて分析した。動態速度は独立に（各 IGF - 1R に対する c208F2 の結合の 2つの動態速度）または一般に（ヒトおよびカニクイザル IGF - 1R に対する c208F2 の結合の同じ動態速度）評価する。フィッティングの質は、0.05RU 未満の Chi2/Rmax 比により評価した。

【0328】

各 IGF - 1R に関して個別に定義された結合の動態速度（表 10 参照）は近く、同じ動態速度を有する両センサーグラムのフィッティングは良好な質である。

10

【0329】

c208F2 抗体は、組換えヒト IGF - 1R とカニクイザル IGF - 1R を約 0.2 nM の解離定数（KD）で同様に認識する。この研究で定義された親和性は、160RU 前後の捕捉ヒトおよびカニクイザル IGF - 1R レベルに関する抗体の機能的親和性（アビディティー）に相当する。

【0330】

【表 11】

表 10

IGF1R	kon [1/M.s]	koff [1/s]	Kd [nM]	Chi2/Rmax
ヒト	1,52E+06	3,40E-04	0,23	0,045
カニクイザル	1,85E+06	3,10E-04	0,17	0,032
ヒトおよびカニクイザル	1,52E+06	3,33E-04	0,22	0,039

20

【0331】

実施例 5 : IGF - 1R リン酸化に対する生成抗体の固有の効果

抗体チロシンキナーゼ受容体と結合した際に促進作用を誘導し得ることはよく知られている。本発明者らはこのようなアゴニスト抗体を選択したくはなかったので、キメラ抗体を用いて hIGF - 1R リン酸化の評価を検討した。

30

【0332】

この目的で、MCF - 7 細胞を無血清培地で一晩インキュベートした。次に、IGF - 1 (100 nM) または供試 Ab のいずれかを 37 度で 10 分間加えた (10 μg / ml)。培地を排出し、細胞を 4 度にて 90 分間、HCl バッファー (pH 7.5)、15% NaCl (1 M)、10% 洗剤混合物 (10 mM Tris - HCl、10% Igепа1 溶解バッファー) (Sigma Chemical Co.)、5% デオキシコール酸ナトリウム (Sigma Chemical Co.)、1 個のプロテアーゼ阻害剤カクテルコンプリート TM 錠 (Roche)、1% ホスファターゼ阻害剤カクテル Set II (Calbiochem) を含有する溶解バッファー (pH 7.5) 中で崩壊させた。これらの溶解液を 4 度での遠心分離により明澄化し、100 度 5 分間加熱し、-20 度維持するか、またはそのまま 4 ~ 12% SDS - PAGE ゲルにロードした。一次抗体のインキュベーションを室温で 2 時間行った後、HRP 結合二次抗体とのインキュベーションを室温で 1 時間行った。メンプランを TBS T 中で洗浄した後、タンパク質を ECL で可視化した。プロットを、Image J ソフトウェアを用いて定量した。GAPDH を用いてホスホタンパク質値を正規化した。IGF - 1 に応答した hIGF - 1R のリン酸化を 100% の刺激と見なした。hIGF - 1R のリン酸化に対する抗 hIGF - 1R Ab の効果を、IGF - 1 により誘導されたリン酸化の % として求めた。

40

【0333】

図 7 に記載される結果は、IGF - 1 と比較した場合の 3 回の独立した実験のキメラ抗 IGF - 1R Ab に応答した pIGF - 1R の % の平均 + / - S.D. を表す。示されたように、MCF - 7 細胞が 10 μg の抗 IGF - 1R Ab とともにインキュベートさ

50

れた場合に、h I G F - 1 R の有意なリン酸化は検出されなかったか、または低い（< 10 %）しか検出されなかった。

【0334】

実施例 6：マウス I G F - 1 R 抗体による、I G F - 1 に応答した I G F - 1 R リン酸化の阻害

選択された抗体の特性決定を行うために、I G F 1 により誘導されたリン酸化を阻害するそれらの能力を検討した。この目的で、M C F - 7 細胞を無血清培地で一晩インキュベートした。次に、細胞をマウス抗 h I G F - 1 R A b とともに 5 分間インキュベートした後、37 度 2 分間 I G F - 1 を添加した。培地を排出し、細胞を 4 度 90 分間、10 mM Tris HCl バッファー (pH 7.5)、15% NaCl (1M)、10% 洗剤混合物 (10 mM Tris-HCl、10% Igепа1 溶解バッファー) (Sigma Chemical Co.)、5% デオキシコール酸ナトリウム (Sigma Chemical Co.)、1 個のプロテアーゼ阻害剤カクテルコンプリート TM 錠 (Roche)、1% ホスファターゼ阻害剤カクテル Set II (Calbiochem) を含有する溶解バッファー (pH 7.5) 中でかき集めさせた。これらの溶解液を 4 度の遠心分離により明澄化し、100 度 5 分間加熱し、-20 度維持するか、またはそのまま 4 ~ 12% SDS-PAGE ゲルにロードした。一次抗体のインキュベーションを室温で 2 時間行った後、HRP 結合二次抗体とのインキュベーションを室温で 1 時間行った。メンプランを T B S T 中で洗浄した後、タンパク質を E C L で可視化した。プロットを、Image J ソフトウェアを用いて定量した。GAPDH を用いてホスホタンパク質値を正規化した。I G F - 1 に応答した h I G F - 1 R のリン酸化を 100% の刺激と見なした。h I G F - 1 R のリン酸化に対する抗 h I G F - 1 R A b の効果を、I G F - 1 により誘導されたリン酸化の%として求めた。

【0335】

総ての抗 I G F - 1 R A b が I G F - 1 に応答して h I G F - 1 R のリン酸化を強く阻害した（80% を越える低下）（図 8）。I G F 1 により誘導された h I G F - 1 R のリン酸化の最良の阻害剤は、m 2 0 8 F 2、m 2 1 2 A 1 1 および m 2 1 4 F 8 M a b である。

【0336】

実施例 7：F A C S 分析による生成 I G F - 1 R 抗体の結合後の I G F - 1 R 内部移行の研究

M C F - 7 細胞を 4 度 20 分間、10 µg / ml のキメラ抗体とともにインキュベートした。次に、細胞を洗浄し、4 度または 37 度 4 時間インキュベートした。細胞表面結合抗体の量を、二次抗体を用いて決定した。4 時間のインキュベーション時間後に 4 度測定された M F I と 37 度測定された M F I との間の差異として定義される M F I は、内部移行された A b の量に相当した。M F I を図 9 および表 11 に示した。10 µg / ml の A b の内部移行パーセンテージは、次：100^{*} (4 度の M F I - 37 度の M F I) / 4 度の M F I のように算出され、表 11 に示された。

【0337】

【表12】

表11

Abs	内部移行率%	ΔMFI	$\Delta MFI_{EC_{50}}$
c208F2	83	288	1.8E-10
c212A11	80	322	2.7E-10
c214F8	87	403	2.2E-10
c219D6	80	353	4.4E-10
c231B10	85	369	2.3E-10

10

【0338】

サルIgF-1Rも認識した抗体がこの受容体を内部移行することができたかどうかを決定するために、同じ内部移行試験を行った。表12にまとめた結果は、総ての供試抗体がサルIgF-1R内部移行を媒介できることを示した。

【0339】

【表13】

20

表12

Ab	マウス Ab		キメラ Ab	
	ΔMFI	内部移行率%	ΔMFI	内部移行率%
208F2	53	74	52	67
212A11	83	73	98	75
214F8	76	71	98	72
219D6	80	71	102	74
213B10	84	74	101	73

30

【0340】

細胞表面結合抗体減少の動態をさらに評価した。この目的で、MCF-7細胞を96ウェルプレートに播種し、4で20分間、10 μ g/mlのマウスとともにインキュベートした。次に、37にて10、20、30、60または120分間、培地内で細胞を洗浄して結合していない抗体を除去した。各時点で、細胞を遠心分離した後、氷上にて二次抗マウスIgG-Alexa488で表面標識して、細胞表面に残留する抗体の量を決定した。各マウスAbおよび各時点の蛍光強度を4でのシグナル(残留IgF-1R%)により正規化し、指数減衰に当てはめて半減期($t_{1/2}$)を求めた。 $t_{1/2}$ は、シグナルの50%の低下を得るために必要な時間と考えた。図10に示されるように、総てのマウスAbの表面レベルは最初の30分で急速に低下し、低下は60分のインキュベーション後にほぼ最大となった(図10A)。算出された半減期はマウスAbに応じて10~18分の間を含んだ(図10B)。

40

【0341】

細胞表面シグナルの低下がAbの内部移行によるものであって、受容体の脱落によるものではなかったことを確認するために、細胞を37で0、30および60分間、マウスAbとともにインキュベートした(図11)。次に、細胞結合抗体(w/o透過処理)お

50

および細胞表面結合 + 内部移行 A b (透過処理有り) に相当する全抗体シグナルを決定するために、細胞を固定し、透過処理を施すか、または施さなかった。内部移行 A b (細胞質) の量は次のように決定した：透過処理後の M F I - M F I w/o 透過処理。この試験は、細胞表面結合 A b の減少は細胞質 A b の増加によるものであり、A b が内部移行したことを見出すということを示した(図 11)。加えて、透過処理後のシグナル(全体)の低下により示されるように、A b の分解は 1 時間のインキュベーション後に始まった。

【0342】

実施例 8：共焦点分析による生成 IGF-1R 抗体の結合後の IGF-1R 内部移行の研究

抗体の内部移行をさらに確認するため、細胞輸送後の抗体の細胞下分布を評価するため 10 に共焦点顕微鏡観察を行った。細胞を抗 h IGF-1R Ab 37 とともにインキュベートし、固定し、透過処理を施した。従って、細胞を、二次抗体 Alexa-488 をウサギ抗 Lamp-1 抗体(二次抗ウサギ IgG Alexa 555 を用いて可視化した)を用いて染色した。37 でのインキュベーション前に、マウス 208F2 Ab は MCF-7 細胞の膜上に局在した(図 12A)。ImageJ ソフトウェアの共局在ハイライタープラグインを用いてリソームマーカー Lamp-1 との共局在は見られなかつた。細胞表面結合抗体は、37 で 15 分のインキュベーション後に劇的に減少した。細胞表面結合抗体の減少と同時に、細胞内抗体が小胞に検出された。Lamp-1 との共局在はまれにしか見られなかつた。30 分のインキュベーション後に、細胞表面結合抗体はほとんど検出されなかつた。しかしながら、リソームでの Ab の共局在は増加した。1 時間のインキュベーション後には、細胞内 Ab 染色ならびに Lamp-1 との共局在数は低下した。細胞表面結合抗体のこの動態およびその細胞内蓄積は、FACS による抗体表面減衰尺度の動態と相關していた。加えて、FACS 試験すでに記載したように、マウス Ab の分解は、共焦点顕微鏡によれば、1 時間のインキュベーション後に始まった。

【0343】

他の総ての h IGF-1R マウス抗体の内部移行およびそれらの Lamp-1 との共局在もまた評価した(図 12B)。37 で 30 分のインキュベーション後に、細胞内抗体が検出され、Lamp-1 との共局在が見られ、このことは選択された総ての抗 IGF-1R 抗体がリソームに効果的に内部移行されたことを示す。

【0344】

実施例 9：リソーム阻害剤バフィロマイシン A 1 を用いた Ab 分解の阻害

抗体がリソームに到達してそこで分解されることを確認するために、細胞をリソーム機能の強力な阻害剤であるバフィロマイシン A 1 で処理したか、または非処理とした。次に、細胞を 4 度 10 μg/ml の供試 Ab とともにインキュベートし、洗浄し、37 度 2 時間インキュベートした。内部移行した Ab は細胞透過処理後に二次抗マウス IgG - Alexa 488 Ab を用いて検出された。バフィロマイシン A 1 の添加は細胞内 Ab の分解を防ぎ(図 13)、このことは Ab が効果的に内部移行され、リソームで分解されたことを示す。

【0345】

実施例 10：抗体 - IGF-1R 結合に対する pH の影響

抗体はそれらの内部移行能に基づいて選択され、リソームコンパートメントに入る前に初期エンドソームと共に存在することが上記で示されたので、対象とするアプローチは、Ab / h IGF-1R 結合の安定性が pH 環境によって調節された抗体、優先的には、pH 環境が酸性となった場合に IGF-1R から優先的に解離される抗体を選択することになった。実際に、初期エンドソームとリソームの間の主要な違いはそれらの管腔 pH であり、エンドソームコンパートメントでは pH はおよそ 6 であり、リソームコンパートメントでは pH は約 4.5 である。

【0346】

リガンド結合(IGF1)後に一度、内部移行されると、h IGF-1R は再循環経路を介して細胞表面に戻ることがよく知られている。

10

20

30

40

50

【0347】

特定の理論に関連付けるものではないが、本明細書の仮説は、酸性pHで早期にそれらの標的からより放出されやすい抗体はおそらく膜への標的再循環に有利であり、結果として、ADCアプローチのより良い候補と考えられるはずであるというものである。

【0348】

本発明者らの抗体にこのような特性を示すものがあるか、また、この特性が細胞傷害活性と相關するかどうかを検討するために、MCF-7細胞株でのマウス抗hIGF-1R

Mabの結合を、種々のpHのバッファー中で行った。漸増濃度のマウスマAbをMCF-7細胞株上で4にて20分間、5~8の範囲の種々のpHでインキュベートした。次に、細胞を3回洗浄し、FACSバッファー中で、Allexa 488とカップリングした適当な二次抗体とともにインキュベートした。細胞を暗所、4にてさらに20分間インキュベートした後、FACSバッファー中で3回洗浄した。すぐに生細胞に抗hIGF-1R抗体の結合がなされ、これを、ヨウ化プロピジウム（死細胞を染色する）を用いて確認した。モル濃度（M）で表される結合のEC₅₀は、非直線回帰分析（Graph Pad Prism 4.0）を用いて算出した。図14に示されるように、選択された総てのマウス抗IGF-1R抗体が酸性pHでより低い結合能を示した。10

【0349】

MCF-7細胞株でのヒト化抗IGF-1R Mabの結合は種々のpHで行った。漸増濃度のヒト化mAbをMCF-7細胞株上で4にて20分間、5~8の範囲の種々のpHでインキュベートした。次に、細胞を3回洗浄し、FACSバッファー中で、Allexa 488とカップリングした適当な二次抗体とともにインキュベートした。細胞を暗所、4にてさらに20分間インキュベートした後、FACSバッファー中で3回洗浄した。すぐに生細胞に抗IGF-1Rヒト化抗体の結合がなされ、これを、ヨウ化プロピジウム（死細胞を染色する）を用いて確認した。モル濃度（M）で表される結合のEC₅₀は、非直線回帰分析（Graph Pad Prism 4.0）を用いて算出した。図24に示されるように、ヒト化抗IGFR抗体は酸性pHでより低い結合能を示した。20

【0350】

実施例12：208F2 Mabのヒト化型の評価

12.1 第1のヒト化型hz208F2 VH3/VL3 (hz208F2 H026

/L024とも呼称)の結合および内部移行の評価

c208F2 mAbの第1のヒト化型の結合をMCF-7、COS-7およびNIH3T3 IR⁺細胞株で評価した。漸増濃度のm208F2、c208F2またはhz208F2 VH3VL3を各細胞株に4で20分間加えた。次に、細胞を洗浄し、供試mAbの結合を、対応する二次抗体を用いて可視化した。トランスフェクト細胞株でのヒトIRの発現を確認するために、市販の抗hIR抗体クローニングR05を用い、その認識特性を例示した（図15D）。

【0351】

MCF-7細胞（図15A）またはサルCOS-7（図15B）細胞でヒト化型とマウス型またはキメラ型のいずれかと比較したところ、供試したこれら3つの型に近似した特徴が示された。ヒト化のプロセスは、ヒトイインスリン受容体に対する交差反応性に関してマウス型およびキメラ型に完全に匹敵する抗体の認識特異性を改変しなかった（図15C）。

【0352】

ヒト細胞株MCF-7およびサル細胞株COS-7に対する208F2の第1のヒト化型の算出EC₅₀は、mAb 208F2のマウス型またはキメラ型のいずれで決定されたものとも同等であった。

【0353】

mAb hz208F2 VH3/VL3の内部移行能をフローサイトメトリーにより評価した。MCF-7細胞を4で20分間、10μg/mlの抗体とともにインキュベートした。次に、細胞を洗浄し、4または37で4時間インキュベートした。細胞表

10

20

30

40

50

面結合抗体の量を、二次抗体を用いて決定した。4時間のインキュベーション時間後に4で測定されたMFIと37で測定されたMFIの間の差異として定義されるMFIは、内部移行されたAbの量に相当した。MFIを図16および表13に示した。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のAbにおける内部移行のパーセンテージは、次 $100^*(4\text{でのMFI}-37\text{でのMFI})/4\text{でのMFI}$ のように算出され、表13に示す。よって、ヒト化h_z208F2 VH3/VL3は、対応するマウスおよびキメラ208F2抗体で測定されたものと同等の結合および内部移行特性を有していた。

【0354】

【表14】

10

表13a

	ΔMFI	内部移行率%
m208F2	294	88
c208F2	278	82
H _z 208F2 VH3/VL3	344	87

【0355】

20

12.2 後続h_z208F2ヒト化型の結合の評価

mAb 208F2をヒト化し、16のヒト化変異体（12.1に記載の第1の型と含む）の結合特性を評価した。ヒト化変異体の結合特性は、FACS分析により、ヒトMC-F-7乳腺癌細胞株およびサル細胞株Cos-7にて、漸増抗体濃度を用いて評価した。この目的で、細胞（ 1×10^6 細胞/ml）を4で20分間、FACSバッファー（PBS、0.1%BSA、0.01%NaN₃）中で、抗IgG-1R抗体とともにインキュベートした。次に、これらの細胞を3回洗浄し、暗所、4にてさらに20分間、Allexa 488とカップリングした適当な二次抗体とともにインキュベートした後、FACSバッファー中で3回洗浄した。すぐに生細胞に抗IgG-1R抗体の結合がなされ、これを、ヨウ化プロピジウム（死細胞を染色する）を用いて確認した。モル濃度（M）で表される結合のEC₅₀は、非直線回帰分析（GraphPad Prism 4.0）を用いて算出した。

30

【0356】

ヒト化変異体のEC₅₀は、総てのヒト化変異体がヒトおよびサルの両細胞株で同等の結合特性を示したことを示した。

【0357】

ヒト化抗体のEC₅₀を表13bにまとめた。

【0358】

【表15】

表13b

		EC50 (M)	
		MCF-7	Cos-7
ヒト化変異体	hz208F2 H026/L024	7.09E-10	5.1E-10
	hz208F2 H037/L018	4.9E-10	7.4E-10
	hz208F2 H047/L018	7.7E-10	9.2E-10
	hz208F2 H049/L018	4.9E-10	6.9E-10
	hz208F2 H051/L018	5.7E-10	7.2E-10
	hz208F2 H052/L018	8.4E-10	9.9E-10
	hz208F2 H057/L018	5.8E-10	8.3E-10
	hz208F2 H068/L018	1.1E-09	1.2E-09
	hz208F2 H070/L018	4.6E-10	7.3E-10
	hz208F2 H071/L018	5.5E-10	1.1E-09
	hz208F2 H076/L018	6.5E-10	1.1E-09
	hz208F2 H077/L018	7.7E-10	1.1E-09
	hz208F2 H037/L021	4.8E-10	8.2E-10
	hz208F2 H049/L021	6.6E-10	8.5E-10
	hz208F2 H052/L021	5.7E-10	1.2E-09
	hz208F2 H076/L021	5.8E-10	1.1E-09

【0359】

12.3 別のhz208F2ヒト化型の内部移行の評価

MCF-7細胞を、4にて20分間、10 µg / mlのヒト化抗体とともにインキュベートした。次に、細胞を洗浄し、4または37で4時間インキュベートした。細胞表面結合抗体の量を、FacsCaliburフローサイトメーター(Becton Dickinson)にて二次抗体を用いて決定した。4時間のインキュベーション時間後に4で測定されたMFIと37で測定されたMFIの間の差異として定義されるMFIは、内部移行されたAbの量に相当した。MFIを表13cに示した。10 µg / mlのAbにおける内部移行のパーセンテージは、次のように算出された：100 * (4でのMFI - 37でのMFI) / 4でのMFI。ヒト化抗体hz208F2 H077 / L018は、IGF-1Rの有意な内部移行を誘導することができる。

【0360】

【表16】

表13c

ΔMFI	内部移行率 %
hz208F2 H077/L018	468

【0361】

実施例13：可溶性組換えヒトIGF-1Rに対する208F2抗体の5つのキメラ抗I

10

20

30

40

50

G F - 1 R 抗体 (c 2 0 8 F 2 、 c 2 1 3 B 1 0 、 c 2 1 2 A 1 1 、 c 2 1 4 F 8 および c 2 1 9 D 6) およびヒト化型 (V H 3 / V L 3) の結合の解離定数 (K D) の定義

組換え可溶性ヒト - I G F - 1 R に対する抗体の結合の解離定数 (K D) は、解離速度 (k_{off}) と会合速度 (k_{on}) の間の比により定義した。動態試験は、 Biacore X 100 装置にて、マウス抗 Tag His モノクローナル抗体により活性化した C M 5 センサーチップを用いて行った。 1 2 0 0 0 R U 前後の抗体を、アミンキット化学を用いてカルボキシメチルデキストランマトリックスに化学的にグラフトする。

【 0 3 6 2 】

これらの試験は、ランニングおよびサンプル希釈バッファーとして H B S - E P + バッファー (GE Health care) を用い、 2 5 にて流速 3 0 μ l / 分で行った。

10

【 0 3 6 3 】

その 2 つの C 末端 1 0 ヒスチジンタグにより捕捉された可溶性組換えヒト I G F - 1 R への抗 I G F - 1 R 抗体の結合の動態パラメーターを定義するためにシングルサイクル動態スキームを用いた。

【 0 3 6 4 】

1 - 2 本の 鎮と付加的 C 末端 1 0 - His タグとともに発現される 2 本 鎮の細胞外ドメインのヒト I G F - 1 R ヘテロ四量体の可溶性組換え型 (R & D Systems カタログ番号 3 0 5 - G R - 5 0) の溶液を第 2 のフローセルに 1 0 μ g / m l の濃度で 1 分間注入した。本試験で実現した 2 4 サイクルのそれぞれにおいて平均 5 8 7 R U (標準偏差 2 4 R U) の可溶性受容体が捕捉された。

20

【 0 3 6 5 】

2 - この捕捉相の後、両フローセルにランニングバッファーを 5 回注入するか (各 9 0 秒注入) 、または漸増する 5 種類の濃度範囲の、 6 種類の抗体のうちの 1 つを注入した (各 9 0 秒注入) 。 5 回目の注入の終了時に、解離速度を定義するためにランニングバッファーを 5 分間通した。

【 0 3 6 6 】

3 - 次に、 1 0 mM グリシン、 H C l p H 1 . 5 のバッファーを 4 5 秒間注入して表面を再生した。

【 0 3 6 7 】

コンピューターで計算されたシグナルは、フローセル 2 (捕捉された I G F - 1 R を含む) の応答とフローセル 1 (I G F - 1 R 分子を含まない) の応答の間の差異に相当する。

30

【 0 3 6 8 】

各 I G F - 1 R 分子に関して、漸増濃度範囲の 1 つの抗体の注入によるシグナルを、 5 回のバッファー注入で得られたシグナル (二重参照) の減算により補正した (図 1 7 参照) 。

【 0 3 6 9 】

得られたセンサーグラムを、 Bi a e v a l u a t i o n ソフトウェアを 1 : 1 モデルとともに用いて分析した。

【 0 3 7 0 】

各抗体について、 2 つの異なる濃度範囲、すなわち、各抗体について実施した最初の 2 回の試験では 4 0 、 2 0 、 1 0 、 5 および 2 . 5 n M およびあとの 2 回の試験では 2 4 、 1 2 、 6 、 3 および 1 . 5 n M を用いて 4 回の試験を行った。

40

【 0 3 7 1 】

本試験で供試した 6 つの抗体について、試験データは、より高い濃度が定数と定義された場合に有意な k_{off} 値を有する 1 : 1 モデルによく適合し、他の 4 つの濃度が計算される (図 1 8 参照) 。

【 0 3 7 2 】

比 : k_{off} / k_{on} として算出される解離定数 (K D) および比 : L n (2) / k_{off} として算出されるそれらの複合体の半減期を図 1 9 および 2 0 に示す。これらは各抗

50

体について行った4回の独立した試験の平均に相当する。エラーバーは値の標準誤差($n = 4$)に相当する。

【0373】

解離定数は10~100pMの範囲である。 $\text{c}208\text{F}2$ 抗体は、 h-IGF-1R に対してより弱い親和性(より高い解離定数値)を示し(K_D 75pM前後)、そのヒト化型は少なくともキメラ型と同等に良好である(K_D 60pM前後)。他の4つの抗 IGF-1R キメラ抗体は、 hIGF1-R に対して全く同等の親和性を示す(K_D 30pM前後)。この親和性の違いは主として解離速度または結果としての複合体の半減期に関連している。 $208\text{F}2$ では、キメラ型およびヒト化型(VH3/VL3)の場合、複合体の半減期は2~3時間の間である。他の4つのキメラ抗体では、平均半減期は7.0~9.4時間の間である。10

【0374】

これらの極めて緩慢な解離速度は、それらの両 Fab アームにより2つの隣接する h-IGF-1R 分子に同時に結合できる抗体の二価構造に明らかに関連している。この場合、捕捉された IGF-1R 分子のレベルは解離速度に影響を持ち得る。本試験で定義された親和性は、捕捉された600RU前後の h-IGF-1R のレベルに対する抗体の機能的親和性(アビディティ)に相当する。上記に示されるデータ(表10)と実施例13に示される値の間に見られる K_D の3倍の違いは、 hIGF-1R の捕捉レベルの違い(実施例4では600RUと160RU)に関連している。20

【0375】

実施例14：本発明の薬物の合成

以下の実施例では下記の略号を使用する。

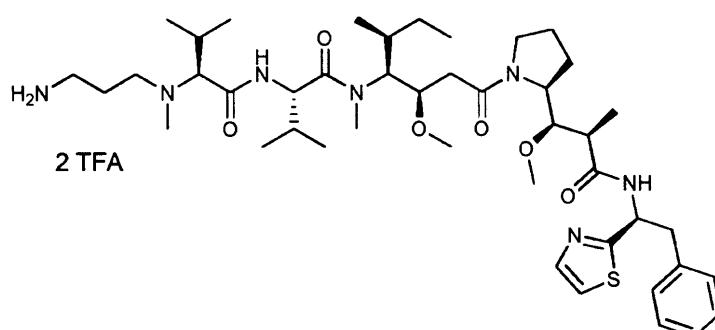
a q .	水性
e e	鏡像体過剰率
e q u i v	当量
E S I	エレクトロスプレーイオン化
L C / M S	液体クロマトグラフィーと質量分析の組み合わせ
H P L C	高速液体クロマトグラフィー
N M R	核磁気共鳴
s a t .	飽和
U V	紫外線

【0376】

参照化合物1

(S)-2-((S)-2-((3-アミノプロピル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N-((3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-((S)-2-((1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-((S)-2-フェニル-1-(チアゾール-2-イル)エチル)アミノ)プロピル)ピロリジン-1-イル)-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル)-N,3-ジメチルブタンアミド, ピストリフルオロ酢酸

【化27】



20

30

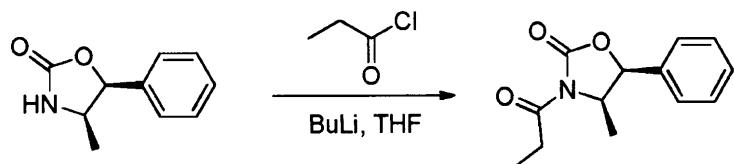
40

50

【0377】

化合物1A：(4R,5S)-4-メチル-5-フェニル-3-プロパノイル-1,3-オキサゾリジン-2-オン

【化28】



10

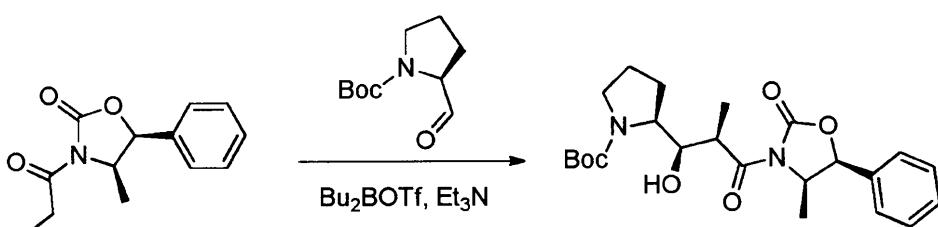
(4R,5S)-4-メチル-5-フェニル-1,3-オキサゾリジン-2-オン (5.8 g、32.7 mmol、1.00当量) を不活性雰囲気中でテトラヒドロフラン (THF、120 mL) に溶かした。この混合物を -78 に冷却し、n-ブチルリチウム (14.4 mL) を滴下した。-78 で 30 分間振盪した後、塩化プロパノイル (5.7 mL) を加えた。-78 で 30 分間、次いで、周囲温度で一晩振盪を続けた。この反応混合物を濃縮した後、200 mL の水に再溶解させた。溶液の pH を重炭酸ナトリウム飽和水溶液で 7 に調整した。この水相を 100 mL の酢酸エチル (EtOAc) で 3 回抽出した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮し、6.8 g (89%) の化合物 1A を黄色油状物の形態で得た。

20

【0378】

化合物1B：(2S)-2-[(1R,2R)-1-ヒドロキシ-2-メチル-3-[(4R,5S)-4-メチル-2-オキソ-5-フェニル-1,3-オキサゾリジン-3-イル]-3-オキソプロピル] ピロリジン-1-カルボン酸 *tert*-ブチル

【化29】



30

化合物 1A (17.6 g、75.45 mmol、1.00当量) を不活性雰囲気中、ジクロロメタン (DCM、286 mL) に溶かした。この溶液を氷浴で冷却した。トリエチルアミン (TEA、12.1 mL、1.15当量) および Bu2BOTf (78.3 mL、1.04当量) を、反応混合物の温度を 2 より低く保持しながら滴下した。0 で 45 分間振盪を続け、その後、この反応物を -78 に冷却した。DCM (42 mL) 中、(2S)-2-ホルミルピロリジン-1-カルボン酸 *tert*-ブチル (8.5 g、42.66 mmol、0.57 当量) の溶液を滴下した。-78 で 2 時間、次いで 0 で 1 時間、最後に周囲温度で 1 時間振盪を続けた。この反応物を 72 mL のリン酸バッファー (pH = 7.2 ~ 7.4) および 214 mL のメタノールで中和し、0 に冷却した。メタノール中 30% 過酸化水素の溶液 (257 mL) を、温度を 10 より低く維持しながら滴下した。0 で 1 時間振盪を続けた。この反応物を 142 mL の水で中和した後、減圧下で濃縮した。得られた水溶液を 200 mL の EtOAc で 3 回抽出した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣を、シリカカラムにて EtOAc および石油エーテルの混合物 (EtOAc : PE = 1 : 8) を用いて精製し、13.16 g (40%) の化合物 1B を無色の油状物の形態で得た。

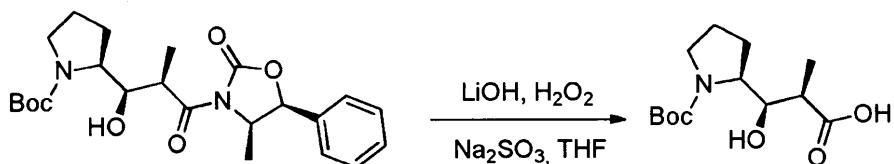
40

【0379】

化合物1C：(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(tert-butylcarbamoyl)propanoyl]pyrrolidine-2-yl]-3-hydroxy-2-methylpropanoic acid

50

【化30】

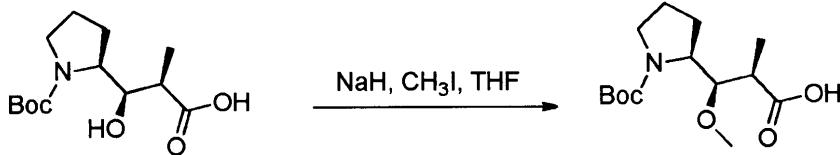


化合物 1 B (13.16 g、30.43 mmol、1.00 当量) を過酸化水素 (水中 30%、15.7 mL) の存在下で THF (460 mL) に溶かした後、氷浴で冷却した。水酸化リチウム水溶液 (0.4 mol / L、152.1 mL) を、反応温度を 4 より 10 低く保持しながら滴下した。この反応混合物を 0 度で 2.5 時間振盪した。Na₂SO₃ 水溶液 (1 mol / L、167.3 mL) を、温度を 0 に保持しながら滴下した。この反応混合物を周囲温度で 14 時間振盪した後、150 mL の冷重炭酸ナトリウム飽和溶液で中和し、50 mL の DCM で 3 回洗浄した。水溶液の pH を 1 M KHSO₄ 水溶液で 2 ~ 3 に調整した。この水溶液を 100 mL の EtOAc で 3 回抽出した。有機相を合わせ、飽和 NaCl 溶液で 1 回洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮し、7.31 g (88%) の化合物 1 C を無色の油状物の形態で得た。

【0380】

化合物 1 D : (2R, 3R) - 3 - [(2S) - 1 - [(tert - プトキシ) カルボニル] ピロリジン - 2 - イル] - 3 - メトキシ - 2 - メチルプロパン酸 20

【化31】

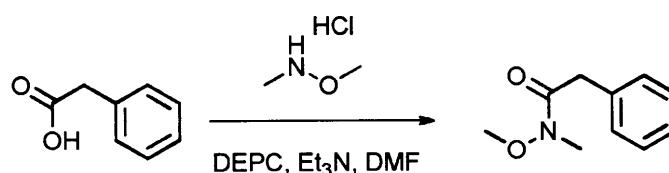


化合物 1 C (7.31 g、26.74 mmol、1.00 当量) を不活性雰囲気中、ヨードメタン (25.3 mL) の存在下で THF (135 mL) に溶かした。この反応媒体を氷浴で冷却し、その後、NaH (油中 60%、4.28 g) を少量ずつ加えた。この反応物を 0 度で 3 日、振盪下で放置した後、100 mL の重炭酸ナトリウム飽和水溶液で中和し、50 mL のエーテルで 3 回洗浄した。水溶液の pH を 1 M KHSO₄ 水溶液で 30 3 に調整した。この水溶液を 100 mL の EtOAc で 3 回抽出した。有機相を合わせ、100 mL の Na₂S₂O₃ (水中 5%) で 1 回、NaCl 鮑和溶液で 1 回洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮し、5.5 g (72%) の化合物 1 D を無色の油状物の形態で得た。

【0381】

化合物 1 E : N - メトキシ - N - メチル - 2 - フェニルアセトアミド

【化32】



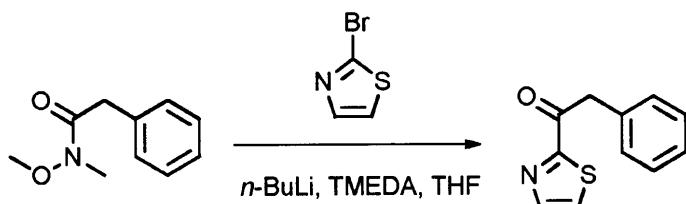
2 - フェニル酢酸 (16.2 g、118.99 mmol、1.00 当量) をジメチルホルムアミド (DMF、130 mL) に溶かした後、-10 に冷却した。ジエチルホスホシアニデート (DEPC、19.2 mL)、メトキシ (メチル) アミン塩酸塩 (12.92 g、133.20 mmol、1.12 当量) およびトリエチルアミン (33.6 mL) を加えた。この反応混合物を -10 度で 30 分、次いで、周囲温度で 2.5 時間振盪し 50

た。次に、これを1リットルのEtOAcで2回抽出した。有機相を合わせ、500mLのNaHCO₃(飽和)で2回、400mLの水で1回洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカカラムにてEtOAcとPEの混合物(1:100から1:3)を用いて精製し、20.2g(95%)の化合物1Eを黄色油状物の形態で得た。

【0382】

化合物1F：2-フェニル-1-(1,3-チアゾール-2-イル)エタン-1-オン

【化33】



10

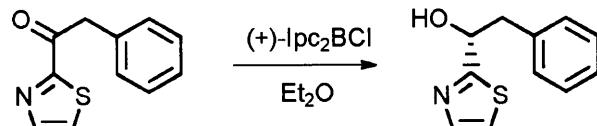
テトラメチルエチレンジアミン(TMEDA、27.2mL)を不活性雰囲気中、THF 300mLに溶かした後、-78℃に冷却し、その後、n-BuLi(67.6mL、2.5M)を滴下した。2-ブロモ-1,3-チアゾール(15.2mL)を滴下し、-78℃で30分振盪を続けた。THF(100mL)に溶かした化合物1E(25g、139.50mmol、1.00当量)を滴下した。-78℃で30分間、次いで、-10℃で2時間振盪を続けた。この反応物を500mLのKHSO₄(飽和)で中和した後、1リットルのEtOAcで3回抽出した。有機相を合わせ、400mLの水で2回および700mLのNaCl(飽和)で2回洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカカラムにてEtOAcとPEの混合物(1:100から1:10)を用いて精製し、25g(88%)の化合物1Fを黄色油状物の形態で得た。

20

【0383】

化合物1G：(1R)-2-フェニル-1-(1,3-チアゾール-2-イル)エタン-1-オール

【化34】



30

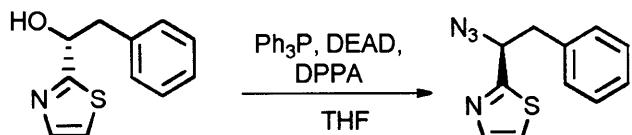
不活性雰囲気中、(+)-B-クロロジイソピノカンフェイルボラン((+)-Ipc₂BCl、110.8mL)に、エーテル(300mL)中、化合物1F(15g、73.8mmol、1.00当量)の溶液を滴下した。この反応混合物を0℃で24時間振盪した後、NaOH(水中10%)とH₂O₂(水中30%)の(1:1)混合物300mLで中和し、最後に500mLのEtOAcで3回抽出した。有機相を合わせ、300mLのK₂CO₃(飽和)で2回および500mLのNaCl(飽和)で1回洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカカラムにてEtOAcとPEの混合物(1:20から1:2)を用いて精製し、6.3g(42%)の化合物1Gを白色固体の形態で得た。

40

【0384】

化合物1H：2-[(-S)-1-アジド-2-フェニルエチル]-1,3-チアゾール

【化35】

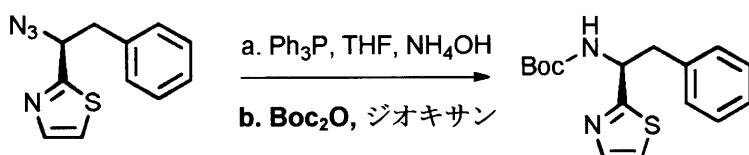


化合物1G (6 g、29.23 mmol、1.00当量)を、不活性雰囲気中、トリフェニルホスフィン (13 g、49.56 mmol、1.70当量)の存在下でTHF (150 mL)に溶かした後、0℃に冷却した。アゾジカルボン酸ジエチル (DEAD、7.6 mL)、次いで、ジフェニルホスホリルアジド (DPPA、11 mL)を滴下した後、冷却浴を外し、溶液を振盪下、周囲温度で48時間放置した。この媒体を減圧下で濃縮した。残渣をシリカカラムにてEtOAcとPEの混合物 (1:100から1:30)を用いて精製し、8 gの部分的に精製された化合物1Hを黄色油状物の形態で得た。化合物1Hはそのまま次の工程で使用した。

【0385】

化合物1I : N - [(1S) - 2 - フェニル - 1 - (1,3 - チアゾール - 2 - イル) エチル] カルバミン酸 *t e r t* - ブチル

【化36】

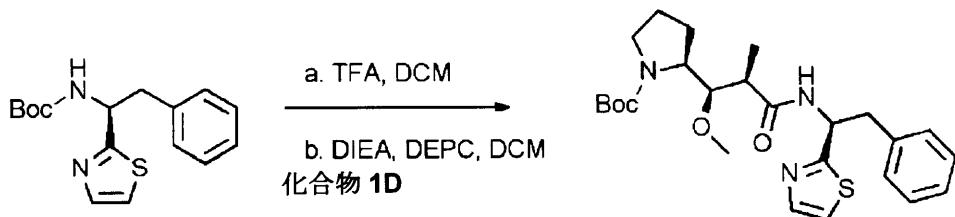


化合物1H (6.5 g、28.2 mmol、1.00当量)を不活性雰囲気中、トリフェニルホスフィン (6.5 g、33.9 mmol、1.20当量)の存在下でTHF (100 mL)に溶かし、2時間50℃に加熱した。次に、アンモニア (70 mL)を加え、3時間加熱を続けた。この反応物を冷却し、500 mLの水で中和した後、500 mLのEtOAcで3回抽出した。有機相を合わせ、500 mLの1N HClで2回抽出した、水相を合わせ、水酸化ナトリウム溶液 (水中10%)を加えることによりpH 8~9とした後、500 mLのDCMで3回抽出した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮し、4.8 g (83%)の(1S) - 2 - フェニル - 1 - (1,3 - チアゾール - 2 - イル)エタン - 1 - アミンを黄色油状物の形態で得た。次に、この化合物を、それが精製可能となるように、Boc基 ((*t e r t* - ブトキシ)カルボニル)で保護した。これを不活性雰囲気中、1,4 - ジオキサン (40 mL)に溶かした後、0℃に冷却した。20 mLの1,4 - ジオキサンに希釈した(Boc)₂O (10.26 g、47.01 mmol、2.00当量)を滴下した。冷却浴を外し、溶液を周囲温度で一晩、振盪下で放置した後、300 mLの水で中和し、500 mLのEtOAcで2回抽出した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカカラムにてEtOAcとPEの混合物 (1:100から1:20、ee = 93%)を用いて精製した。次に、これをヘキサン / アセトン混合物 (約5~10/1、1 g / 10 mL)中で再結晶させ、6 g (84%)の化合物1Iを白色固体の形態で得た (ee > 99%).

【0386】

化合物1J : (2S) - 2 - [(1R, 2R) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 2 - [(1S) - 2 - フェニル - 1 - (1,3 - チアゾール - 2 - イル) エチル] カルバモイル] エチル] ピロリジン - 1 - カルボン酸 *t e r t* - ブチル

【化37】

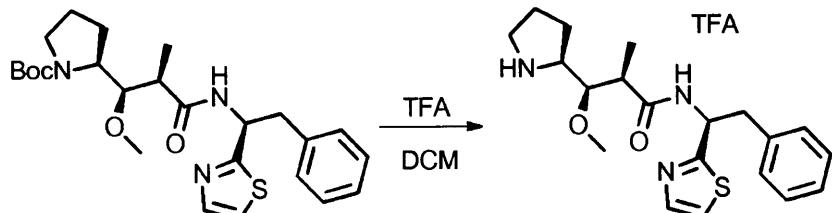


化合物 1 I (3 g、9.86 mmol、1.00当量) を不活性雰囲気中、10 mL の D C M に溶かした。トリフルオロ酢酸 (T F A、10 mL) を加え、溶液を周囲温度で一晩、振盪下で放置した後、減圧下で濃縮し、2.0 g (64%) の (1 S) - 2 - フェニル - 1 - (1,3 - チアゾール - 2 - イル) エタン - 1 - アミン；トリフルオロ酢酸を黄色油状物の形態で得た。この中間体を 20 mL の D C M に再溶解させ、その後、化合物 1 D (1.8 g、6.26 mmol、1.05当量)、D E P C (1.1 g、6.75 mmol、1.13当量) およびジイソプロピルエチルアミン (D I E A、1.64 g、12.71 mmol、2.13当量) を加えた。この反応混合物を周囲温度で一晩、振盪下で放置した後、減圧下で濃縮した。残渣をシリカカラムにて E t O A c と P E の混合物 (1 : 100 から 1 : 3) を用いて精製し、2.3 g (81%) の化合物 1 J を淡黄色固体の形態で得た。

【0387】

化合物 1 K : (2R,3R) - 3 - メトキシ - 2 - メチル - N - [(1S) - 2 - フェニル - 1 - (1,3 - チアゾール - 2 - イル) エチル] - 3 - [(2S) - ピロリジン - 2 - イル] プロパンアミド；トリフルオロ酢酸

【化38】

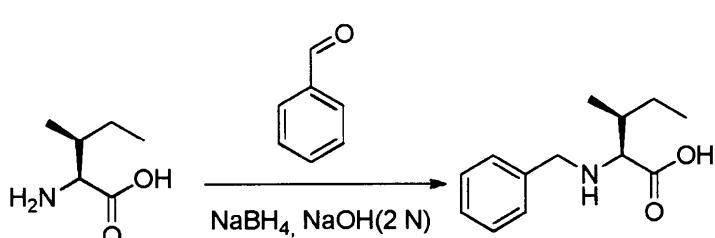


化合物 1 J (2.25 g、4.75 mmol、1.00当量) を不活性雰囲気中、10 mL の D C M に溶かした。T F A (10 mL) を加え、溶液を周囲温度で一晩、振盪下で放置した後、減圧下で濃縮し、2.18 g (94%) の化合物 1 K を黄色油状物の形態で得た。

【0388】

化合物 1 L : (2S,3S) - 2 - (ベンジルアミノ) - 3 - メチルペンタン酸

【化39】



2 N 水酸化ナトリウム溶液 (375 mL) に、(2S,3S) - 2 - アミノ - 3 - メチルペンタン酸 (98.4 g、750 mmol、1.00当量) を周囲温度で少量ずつ加えた。ベンズアルデヒド (79.7 g、751.02 mmol、1.00当量) を手早く加

10

20

30

40

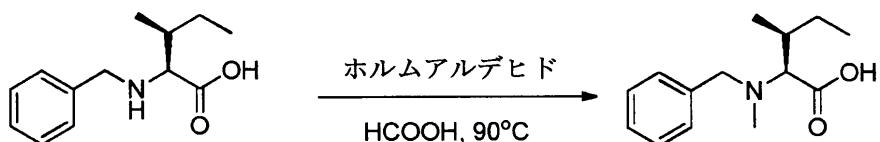
50

え、得られた溶液を30分振盪した。水素化ホウ素ナトリウム(10.9g、288.17mmol、0.38当量)を、温度を5~15の間に保持しながら少量ずつ加えた。周囲温度で4時間振盪を続けた。この反応混合物を200mLの水で希釈した後、200mLのEtOAcで2回洗浄した。水溶液のpHを2N塩酸溶液で7に調整した。生じた沈殿を濾取し、149.2g(90%)の化合物1Lを白色固体の形態で得た。

【0389】

化合物1M：(2S,3S)-2-[ベンジル(メチル)アミノ]-3-メチルペンタン酸

【化40】



10

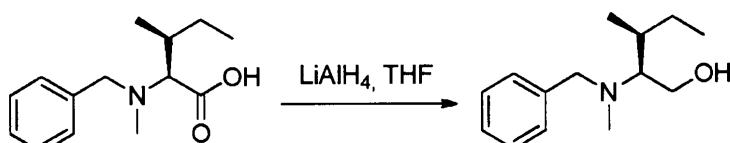
化合物1L(25g、112.97mmol、1.00当量)を不活性雰囲気中、ホルムアルデヒド(水中36.5%、22.3g)の存在下でギ酸(31.2g)に溶かした。溶液を90で3時間振盪した後、減圧下で濃縮した。残渣を250mLのアセトン中で摩碎した後、濃縮した。この摩碎/蒸発操作を、500mLのアセトンを用いて2回繰り返し、21.6g(81%)の化合物1Mを白色固体の形態で得た。

20

【0390】

化合物1N：(2S,3S)-2-[ベンジル(メチル)アミノ]-3-メチルペンタン-1-オール

【化41】



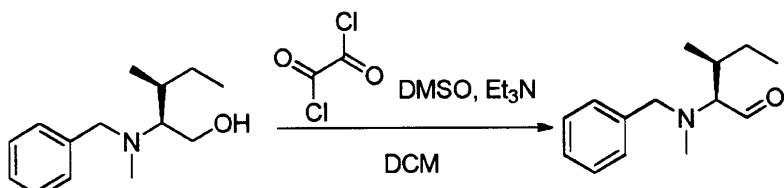
30

LiAlH₄(0.36g)を不活性雰囲気中、0で10mLのTHFに懸濁させた。化合物1M(1.5g、6.37mmol、1.00当量)を、温度を0~10の間に保持しながら少量ずつ加えた。この反応混合物を65で2時間振盪した後、再び0に冷却し、その後、360μlの水、1mLの15%水酸化ナトリウムおよび360μlの水を順次加えて中和した。沈殿したアルミニウム塩を濾去した。濾液を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカカラムにてEtOAcとPEの混合物(1:50)を用いて精製し、820mg(58%)の化合物1Nを淡黄色油状物の形態で得た。

【0391】

化合物1O：(2S,3S)-2-[ベンジル(メチル)アミノ]-3-メチルペンタナ-オール

【化42】



40

塩化オキサリル(0.4mL)を不活性雰囲気中、DCM(15mL)に溶かした。溶

50

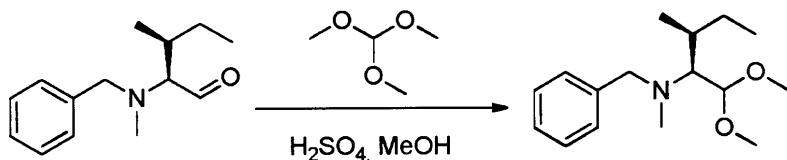
液を -70 に冷却し、D C M (10 mL) 中、ジメチルスルホキシド (D M S O (0.5 mL) の溶液を 15 分間滴下した。この反応混合物を 30 分振盪し、その後、D C M (10 mL) 中、化合物 1 N (820 mg, 3.70 mmol, 1.00 当量) の溶液を 15 分間滴下した。この反応混合物をさらに 30 分、低温で振盪した後、トリエチルアミン (2.5 mL) をゆっくり加えた。この反応混合物を -50 で 1 時間振盪した後、冷却浴を外し、温度を常温に戻しながら、反応物を 25 mL の水で中和した。この溶液を 30 mL の NaCl 飽和水溶液で 1 回洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカカラムにて EtOAc と PE の混合物 (1 : 200) を用いて精製し、0.42 g (52%) の化合物 1 O を黄色油状物の形態で得た。

【0392】

10

化合物 1 P : (2S, 3S)-N-ベンジル-1,1-ジメトキシ-N,3-ジメチルペニタン-2-アミン

【化43】



化合物 1 O (4.7 g, 21.43 mmol, 1.00 当量) を 0 で 20 mL のメタノールに溶かした。濃硫酸 (4.3 mL) を滴下し、0 で 30 分間振盪を続けた。オルトギ酸トリメチル (21.4 mL) を加え、冷却浴を外し、反応媒体を周囲温度で 3 時間、振盪下で放置した。この反応媒体を 200 mL の EtOAc で希釈し、100 mL の 10% Na2CO3 および 200 mL の飽和 NaCl で順次洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮し、3.4 g (60%) の化合物 1 P を淡黄色油状物の形態で得た。

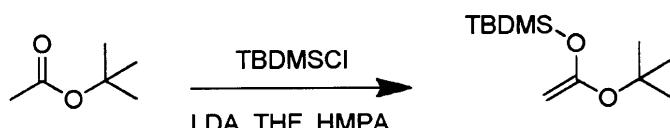
20

【0393】

化合物 1 Q : [[1 - (tert-ブトキシ)エテニル] オキシ] (tert-ブチル)ジメチルシラン

【化44】

30



ジイソプロピルアミン (20 g, 186.71 mmol, 1.08 当量) を不活性雰囲気中、170 mL の THF に溶かし、-78 に冷却した。nBuLi (2.4 M, 78.8 mL) を滴下し、溶液を低温で 30 分振盪し (LDA-リチウムジイソプロピルアミドを得るために)、その後、酢酸 tert - ブチル (20 g, 172.18 mmol, 1.00 当量) を加えた。この反応混合物を -78 で 20 分振盪した後、ヘキサメチルホスホルアミド (HMPA, 25.8 mL) および 35 mL の THF 中、tert ブチルジメチルクロロシラン (TBDMSCl, 28 g, 185.80 mmol, 1.08 当量) の溶液を加えた。低温でさらに 20 分間振盪を続けた後、冷却浴を外した。この溶液を減圧下で濃縮した。残渣を 100 mL の水に再溶解させ、100 mL の PE で 3 回抽出した。有機相を合わせ、500 mL の NaCl 飽和水溶液で 1 回洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣を蒸留により精製し、16.6 g (83%) の化合物 1 Q を無色の油状物の形態で得た。

40

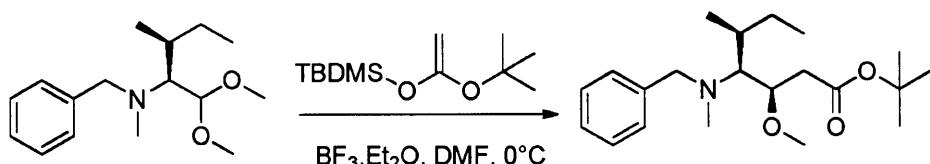
【0394】

化合物 1 R : (3R, 4S, 5S)-4-[ベンジル(メチル)アミノ]-3-メトキシ

50

- 5 - メチルヘプタン酸 *tert* - ブチル

【化 4 5】

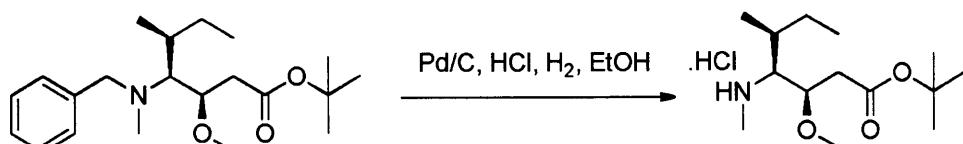


化合物 1P (2.0 g、7.54 mmol、1.00 当量) および化合物 1Q (2.6 g、11.28 mmol、1.50 当量) を不活性雰囲気中、33 mL の DCM に溶かした。この溶液を 0 に冷却した。DMF (1.2 g) を 7.5 mL の DCM 中、 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2.1 g) の溶液とともに滴下した。0 で 24 時間振盪を続けた。この反応媒体を 30 mL の炭酸ナトリウム (10%) で 1 回および 50 mL の NaCl 飽和水溶液で 2 回洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカカラムにて EtOAc と PE の混合物 (1:100) を用いて精製し、1.82 g (91%) の化合物 1R を黄色油状物の形態で得た。

【0395】

化合物 1S : (3R, 4S, 5S) - 3 - メトキシ - 5 - メチル - 4 - (メチルアミノ) ヘプタン酸塩酸塩

【化 4 6】

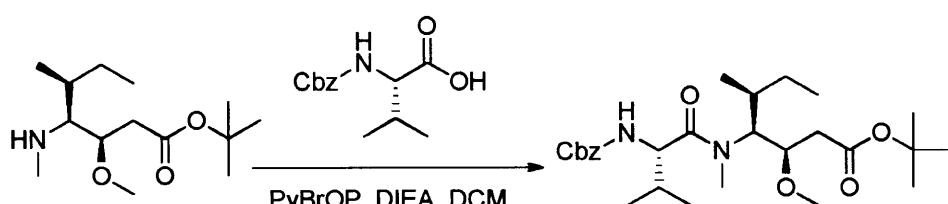


化合物 1R (2.4 g、6.87 mmol、1.00 当量) を不活性雰囲気中、 Pd/C (0.12 g) および濃塩酸 (0.63 mL) の存在下で 35 mL のエタノールに溶かした。窒素雰囲気を水素雰囲気に置き換え、反応媒体を周囲温度で 18 時間、振盪下で放置した。この反応媒体を濾過し、減圧下で濃縮した。残渣を 50 mL のヘキサン中で摩碎し、上清を取り出し、減圧下で乾燥させた後、1.66 g (82%) の化合物 1S を白色固体の形態で得た。

【0396】

化合物 1T : (3R, 4S, 5S) - 4 - [(2S) - 2 - [[(ベンジルオキシ)カルボニル]アミノ] - N, 3 -ジメチルブタンアミド] - 3 - メトキシ(methoxy) - 5 - メチルヘプタン酸 *tert* - ブチル

【化 4 7】



(2S) - 2 - [[(ベンジルオキシ)カルボニル]アミノ] - 3 - メチルブタン酸 (15 g、0.40 mmol、1.00 当量) を DIEA (38.3 mL) およびプロモトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyBOP 、32.3 g) の存在下で 300 mL の DCM に溶かした。この溶液を周囲温度で 30 分振盪した後、化合物 1S (15.99 g、0.42 mmol、1.07 当量) を加えた。この反応媒体を 2 時間振盪した後、濃縮した。残渣をアセトニトリル (ACN) と水の混合物 (40 分で 3

10

20

30

40

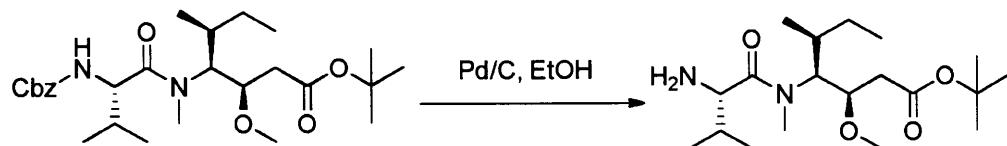
50

0 : 70 から 100 : 0) を用いて逆相 (C18) で精製し、17 g (58%) の化合物 1T を無色の油状物の形態で得た。

【0397】

化合物 1U : (3R, 4S, 5S)-4-[[(2S)-2-アミノ-N, 3-ジメチルブタノアミド]-3-メトキシ-5-メチルヘプタン酸tert-ブチル

【化48】



10

化合物 1T (76 mg、0.15 mmol、1.00 当量) を不活性雰囲気中、Pd/C (0.05 g) の存在下で 10 mL のエタノールに溶かした。窒素雰囲気を水素雰囲気に置き換え、この反応物を周囲温度で 2 時間振盪した。反応媒体を濾過し、減圧下で濃縮し、64 mg の化合物 1U を無色の油状物の形態で得た。

【0398】

化合物 1V : (3R, 4S, 5S)-4-[[(2S)-2-[[[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]アミノ]-N, 3-ジメチルブタノアミド]-3-メトキシ-5-メチルヘプタノエート

20

【化49】



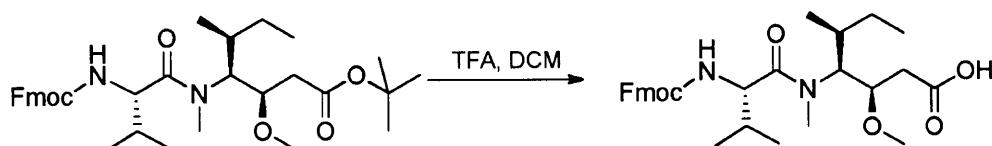
化合物 1U (18.19 g、50.74 mmol、1.00 当量) を重炭酸ナトリウム (12.78 g、15.2 mmol、3.00 当量) およびクロロギ酸 9H-フルオレン-9-イルメチル (Fmoc-Cl、19.69 g、76 mmol、1.50 当量) の存在下で 400 mL の 1,4-ジオキサン / 水混合物 (1:1) に溶かした後、周囲温度で 2 時間振盪した。次に、この反応媒体を 500 mL の水で希釈し、200 mL の EtOAc で 3 回抽出した。有機相を合わせ、200 mL の NaCl 饱和水溶液で 1 回洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮し、40 g の部分的に精製された化合物 1V を淡黄色油状物の形態で得た。

30

【0399】

化合物 1W : (3R, 4S, 5S)-4-[[(2S)-2-[[[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]アミノ]-N, 3-ジメチルブタノアミド]-3-メトキシ-5-メチルヘプタン酸

【化50】



40

化合物 1V (40 g、68.88 mmol、1.00 当量) を中性雰囲気中、600 mL の DCM に溶かした。TFA (300 mL) を加えた。この溶液を周囲温度で 2 時間振盪した後、減圧下で濃縮した。残渣をシリカカラムにてメタノールと DCM の混合物 (1

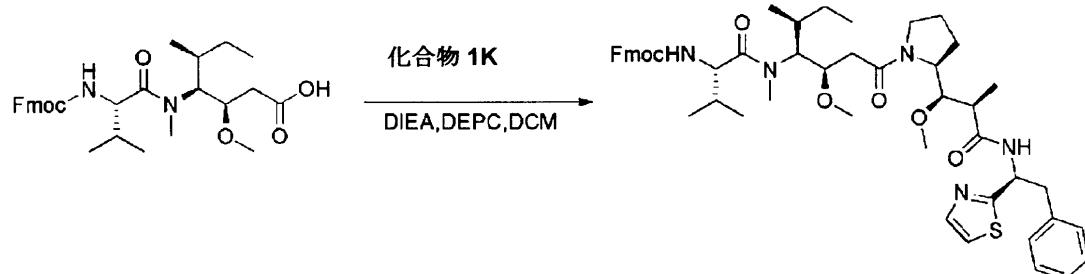
50

: 10) を用いて精製し、23.6 g (65%) の化合物 1W を無色の油状物の形態で得た。

【0400】

化合物 1X : N - [(1 S) - 1 - [[(3 R , 4 S , 5 S) - 3 - メトキシ - 1 - [(2 S) - 2 - [(1 R , 2 R) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 2 - [[(1 S) - 2 - フエニル - 1 - (1 , 3 - チアゾール - 2 - イル) エチル] カルバモイル] エチル] ピロリジン - 1 - イル] - 5 - メチル - 1 - オキソヘプタン - 4 - イル] (メチル) カルバモイル] - 2 - メチルプロピル] カルバミン酸 9 H - フルオレン - 9 - イルメチル

【化 51】

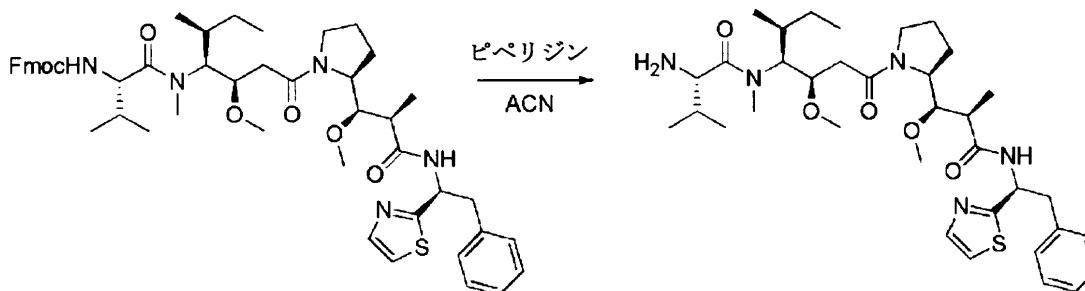


化合物 1W (2.53 g、4.82 mmol、1.08 当量) を化合物 1K (2.18 g、4.47 mmol、1.00 当量)、D E P C (875 mg、5.37 mmol、1.20 当量) および D I E A (1.25 g、9.67 mmol、2.16 当量) の存在下で 20 mL の D C M に溶かした。この反応混合物を周囲温度で一晩、振盪下で放置した後、50 mL の飽和 K H S O₄ および 100 mL の水で順次洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカカラムにてメタノールと D C M の混合物 (1:200 から 1:40) を用いて精製し、2.8 g (71%) の化合物 1X を淡黄色固体の形態で得た。

【0401】

化合物 1Y : (2S) - 2 - アミノ - N - [(3 R , 5 S) - 3 - メトキシ - 1 - [(2 S) - 2 - [(1 R , 2 R) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 2 - [[(1 S) - 2 - フエニル - 1 - (1 , 3 - チアゾール - 2 - イル) エチル] カルバモイル] エチル] ピロリジン - 1 - イル] - 5 - メチル - 1 - オキソヘプタン - 4 - イル] - N , 3 - ジメチルブタンアミド

【化 52】



化合物 1X (2.8 g、3.18 mmol、1.00 当量) をピペリジン (3 mL) の存在下でアセトニトリル (ACN、12 mL) に溶かし、周囲温度で 18 時間、振盪シアで放置した。この反応物を 50 mL の水で中和した後、100 mL の D C M で 2 回抽出した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカカラムにてメタノールと D C M の混合物 (1:100 から 1:40) を用いて精製し、1.2 g (57%) の化合物 1Y を黄色固体の形態で得た。

【0402】

化合物 1ZA : (2S) - 2 - [[(t e r t - プトキシ) カルボニル] (メチル) アミ

10

20

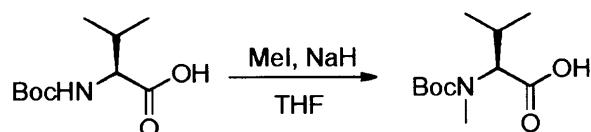
30

40

50

ノ] - 3 - メチルブタン酸

【化 5 3】

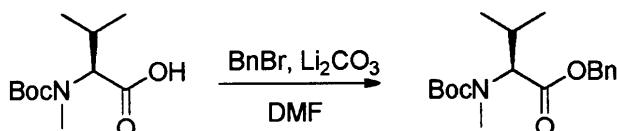


(2S)-2-[[(tert-butylcarbamoyl)methyl]-3-methylbutanoic acid (63 g, 289.97 mmol, 1.00当量)を不活性雰囲気中、ヨードメタン(181 mL)の存在下でTHF(1000 mL)に溶かした。この溶液を0℃に冷却した後、水素化ナトリウム(116 g, 4.83 mol, 16.67当量)を少量ずつ加えた。この反応混合物を0℃で1.5時間振盪した後、冷却浴を外し、18時間振盪を続けた。この反応物を200 mLの水で中和した後、減圧下で濃縮した。残った水相を4リットルの水で希釈し、200 mLのEtOAcで1回洗浄し、そのpHを1N塩酸溶液で3~4の間に調整した。得られた混合物を1.2 LのEtOAcで3回抽出した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮し、60 g (89%)の化合物1ZAを黄色油状物の形態で得た。

【0403】

化合物1ZB : (2S)-2-[[(tert-butylcarbamoyl)methyl] (メチル)アミノ] - 3 - メチルブタン酸ベンジル

【化 5 4】

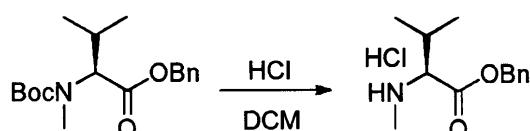


化合物1ZA (47 g, 203.21 mmol, 1.00当量)をLi₂CO₃ (15.8 g, 213.83 mmol, 1.05当量)の存在下でDMF(600 mL)に溶かした。この溶液を0℃に冷却した後、臭化ベンジル(BnBr) 57.9 g, 338.53 mmol, 1.67当量)を滴下した。この反応混合物を一晩振盪下で放置した後、400 mLの水で中和し、濾過した。得られた溶液を500 mLのEtOAcで2回抽出した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカカラムにてEtOAcとPEの混合物(1:100から1:20)を用いて精製し、22.5 g (34%)の化合物1ZBを黄色油状物の形態で得た。

【0404】

化合物1ZC : (2S)-3-メチル-2-(メチルアミノ)ブタン酸ベンジル塩酸塩

【化 5 5】

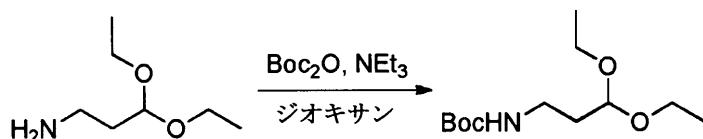


化合物1ZB (22.5 g, 70.00 mmol, 1.00当量)を150 mLのDCMに溶かした。気体塩酸をバブリングさせた。この反応物を周囲温度で1時間振盪した後、減圧下で濃縮し、17 g (94%)の化合物1ZCを黄色固体の形態で得た。

【0405】

化合物1ZD : N - (3,3 - ジエトキシプロピル)カルバミン酸tert - ブチル

【化56】

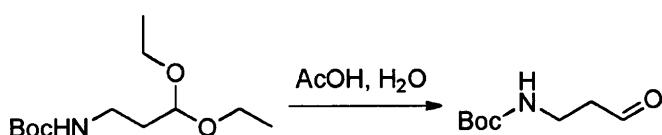


3,3-ジエトキシプロパン-1-アミン(6 g、40.76 mmol、1.00当量)をTEA(4.45 g、43.98 mmol、1.08当量)の存在下で1,4-ジオキサン(30 mL)に溶かした後、0℃に冷却した。20 mLの1,4-ジオキサンに希釈した(Boc)₂O(9.6 g、43.99 mmol、1.08当量)を滴下した。この溶液を0℃で2時間、次いで、周囲温度で一晩振盪した後、10 mLの水で中和した。pHをHCl(1%)で5に調整した。この溶液を50 mLのEtOAcで3回抽出した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮し、8.21 g(81%)の化合物1ZD淡黄色油状物の形態で得た。

【0406】

化合物1ZE : N-(3-オキソプロピル)カルバミン酸tert-ブチル

【化57】

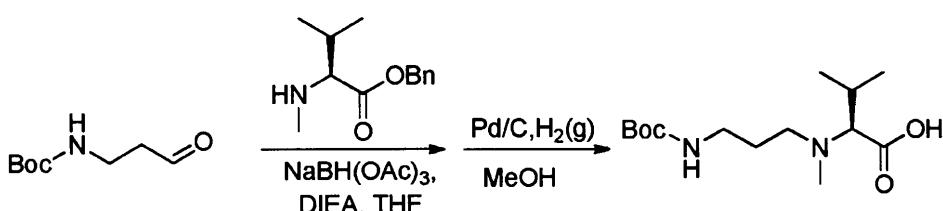


化合物1ZD(8.20 g、33.15 mmol、1.00当量)を18.75 mLの酢酸に溶かし、周囲温度で一晩、振盪下で放置した。次に、この反応媒体を30 mLのEtOAcで3回抽出した。有機相を合わせ、30 mLの飽和NaCl溶液で3回洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮し、5 g(87%)の化合物1ZEを暗赤色油状物の形態で得た。

【0407】

化合物1ZF : (2S)-2-[3-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]プロピル](メチル)アミノ]-3-メチルブタン酸

【化58】



化合物1ZE(2.4 g、13.86 mmol、1.00当量)を化合物1ZC(3.56 g、13.81 mmol、1.00当量)およびDIPEA(9.16 mL、4.00当量)の存在下で50 mLのTHFに溶かした。この反応混合物を周囲温度で30分振盪した後、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム(5.87 g、27.70 mmol、2.00当量)を加えた。一晩振盪を続けた後、反応物を100 mLの水で中和し、50 mLのEtOAcで3回抽出した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカカラムにてEtOAcとPEの混合物(1:4)を用いて部分的に精製した。得られた粗生成物をPd/C(1.2 g)の存在下で20 mLのメタノールに再溶解させ、常温および常圧で20分間水素化した。この反応媒体を濾過し、減圧下で濃縮し、200 mg(5%)の化合物1ZFを白色固体の形態で得た。

【0408】

化合物1ZG : N-(3-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(3R,4S,5

10

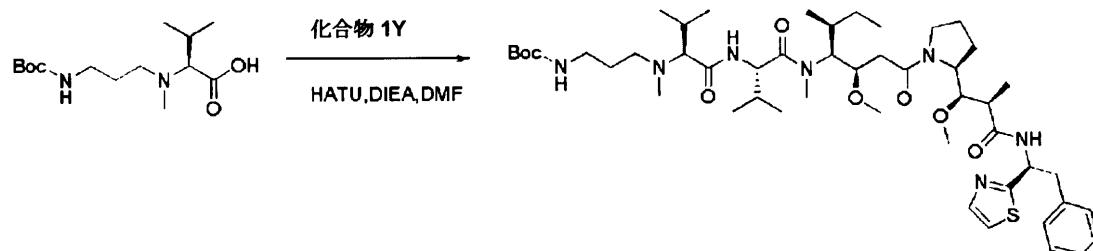
20

30

40

50

S) - 3 - メトキシ - 1 - [(2 S) - 2 - [(1 R , 2 R) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 2 - [[(1 S) - 2 - フェニル - 1 - (1 , 3 - チアゾール - 2 - イル) エチル] カルバモイル] チル] ピロリジン - 1 - イル] - 5 - メチル - 1 - オキソヘプタン - 4 イル] (メチル) カルバモイル] - 2 - メチルプロピル] カルバモイル] - 2 - メチルプロピル] (メチル) アミノ] プロピル) カルバミン酸 t e r t - ブチル
【化 5 9】



化合物 1 Y (5 0 m g 、 0 . 0 8 m m o l 、 1 . 0 0 当量) を化合物 1 Z F (2 6 . 2 m g 、 0 . 0 9 m m o l 、 1 . 2 0 当量) 、 D I E A (3 7 . 7 m L) および O - (7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル) - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロスフェート (H A T U 、 4 3 . 3 m g 、 0 . 1 1 m m o l 、 1 . 5 0 当量) の存在下で 2 m L の D M F に溶かした。この反応物を周囲温度で一晩、振盪下で放置した後、 1 0 m L の水で希釈し、 5 m L の E t O A c で 3 回抽出した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮し、 1 0 0 m g の化合物 1 Z G を部分的に精製された無色の油状物の形態を得た。

【 0 4 0 9 】

化合物 1 Z G (9 0 m g 、 0 . 1 0 m m o l 、 1 . 0 0 当量) を中性雰囲気中、 2 m L の D C M に溶かし、この溶液を氷浴で冷却した。 T F A (1 m L) を加え、この反応物を周囲温度で 2 時間振盪した後、減圧下で濃縮した。残渣を分取 H P L C (P r e - H P L C - 0 0 1 S H I M A D Z U 、 S u n F i r e P r e p C 1 8 O B D カラム、 5 μ m 、 1 9 × 1 5 0 m m ; 溶出相 : 0 . 0 5 % の T F A で緩衝させた水 / A C N ; 7 分で 1 8 % から 3 1 % A C N へ、次いで、 2 分で 3 1 % から 1 0 0 % A C N への勾配 ; W a t e r s 2 4 8 9 U V 検出器 2 5 4 n m および 2 2 0 n m) により精製した。化合物 1 を 2 5 % (2 3 m g) の収率で白色固体の形態を得た。

【 0 4 1 0 】

L C / M S / U V (A t l a n t i s T 3 カラム、 3 μ m 、 4 . 6 × 1 0 0 m m ; 3 5 ; 1 m L / 分、 水中 3 0 % から 6 0 % A C N へ (6 分で 2 0 m M 酢酸アンモニウム) ; E S I (C 4 4 H 7 3 N 7 O 6 S 、 正確な質量 8 2 7 . 5 3) m / z : 8 2 9 (M H +) 、 5 . 8 4 分 (9 3 . 7 % 、 2 5 4 n m) 。

【 0 4 1 1 】

¹H N M R (3 0 0 M H z , C D ₃ O D , p p m) : (回転異性体の存在) 7 . 8 5 - 7 . 8 0 (m , 1 H) ; 7 . 6 9 - 7 . 6 6 (m , 1 H) , 7 . 4 0 - 7 . 1 0 (m , 5 H) , 5 . 8 0 - 5 . 6 3 (m , 1 H) , 4 . 8 0 - 4 . 6 5 (m , 2 H) , 4 . 2 2 - 4 . 0 0 (m , 1 H) , 3 . 8 9 - 0 . 7 4 (m , 5 H) 。

【 0 4 1 2 】

参照化合物 2

(S) - 2 - ((S) - 2 - (((2 - アミノピリジン - 4 - イル) メチル) (メチル) アミノ) - 3 - メチルブタンアミド) - N - ((3 R , 4 S , 5 S) - 1 - ((S) - 2 - ((1 R , 2 R) - 3 - (((1 S , 2 R) - 1 - ヒドロキシ - 1 - フェニルプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - オキソプロピル) ピロリジン - 1 - イル) - 3 - メトキシ - 5 - メチル - 1 - オキソヘプタン - 4 - イル) - N , 3 - ジメチルブタンアミド , トリフルオロ酢酸

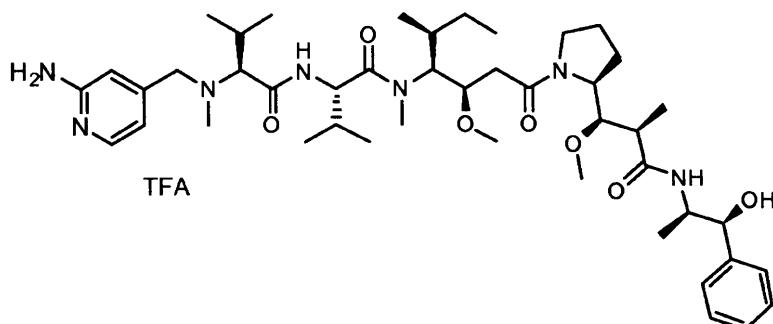
10

20

30

40

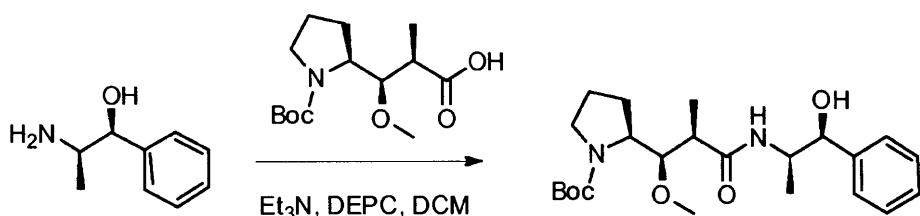
【化 6 0】



【0 4 1 3】

化合物 2 A : (S) - 2 - ((1 R , 2 R) - 3 - (((1 S , 2 R) - 1 - ヒドロキシ - 1 - フェニルプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - オキソプロピル) ピロリジン - 1 - カルボン酸 t e r t - ブチル

【化 6 1】

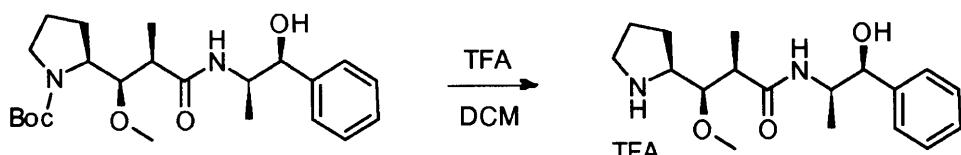


化合物 1 D (2 . 5 g 、 8 . 7 0 m m o l 、 1 . 0 0 当量) および (1 S , 2 R) - 2 - アミノ - 1 - フェニルプロパン - 1 - オール (1 . 3 1 5 g 、 8 . 7 0 m m o l 、 1 . 0 0 当量) を不活性雰囲気中、 D M F (3 5 m L) に溶かした。この溶液を 0 に冷却した後、 D E P C (1 . 3 9 m L) および T E A (1 . 8 2 m L) を滴下した。この反応混合物を 0 で 2 時間、次いで、周囲温度で 4 時間振盪した。この反応混合物を 2 0 0 m L の水で希釈し、 5 0 m L の E t O A c で 3 回抽出した。有機相を合わせ、 5 0 m L の K H S O 4 (1 m o l / L) で 1 回、 5 0 m L の N a H C O 3 (飽和) で 1 回、 5 0 m L の N a C l (飽和) で 1 回洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮し、 3 . 6 g (9 8 %) の化合物 2 A を黄色固体の形態で得た。

【0 4 1 4】

化合物 2 B : (2 R , 3 R) - N - ((1 S , 2 R) - 1 - ヒドロキシ - 1 - フェニルプロパン - 2 - イル) - 3 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - ((S) - ピロリジン - 2 - イル) プロパンアミド 2 , 2 , 2 - トリフルオロ酢酸塩

【化 6 2】



化合物 2 A (2 . 7 g 、 6 . 4 2 m m o l 、 1 . 0 0 当量) を不活性雰囲気中、 D C M (4 0 m L) に溶かした後、 0 に冷却した。 T F A (2 5 m L) を加え、この溶液を 0 で 2 時間振盪した。この反応混合物を減圧下で濃縮し、 4 . 4 g の化合物 2 B を黄色油状物の形態で得た。

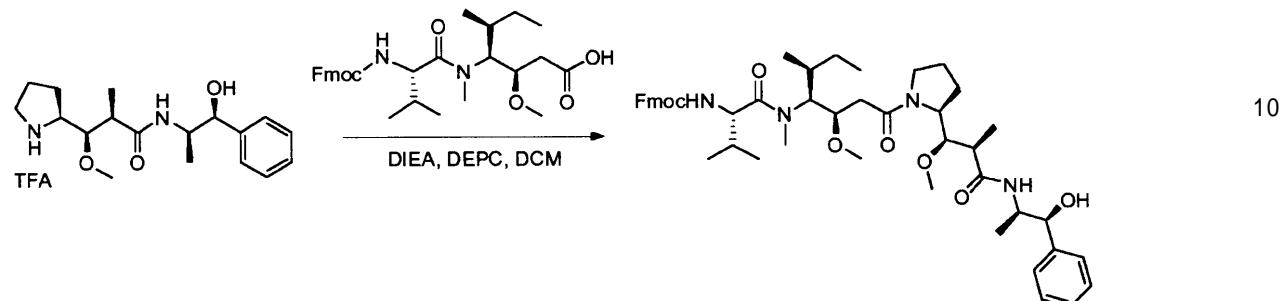
【0 4 1 5】

化合物 2 C : ((S) - 1 - (((3 R , 4 S , 5 S) - 1 - ((S) - 2 - ((1 R ,

50

2 R) - 3 - (((1 S , 2 R) - 1 - ヒドロキシ - 1 - フェニルプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - オキソプロピル) ピロリジン - 1 - イル) - 3 - メトキシ - 5 - メチル - 1 - オキソヘプタン - 4 - イル) (メチル) アミノ) - 3 - メチル - 1 - オキソブタン - 2 - イル) カルバミン酸 (9 H - フルオレン - 9 - イル) メチル

【化 6 3】

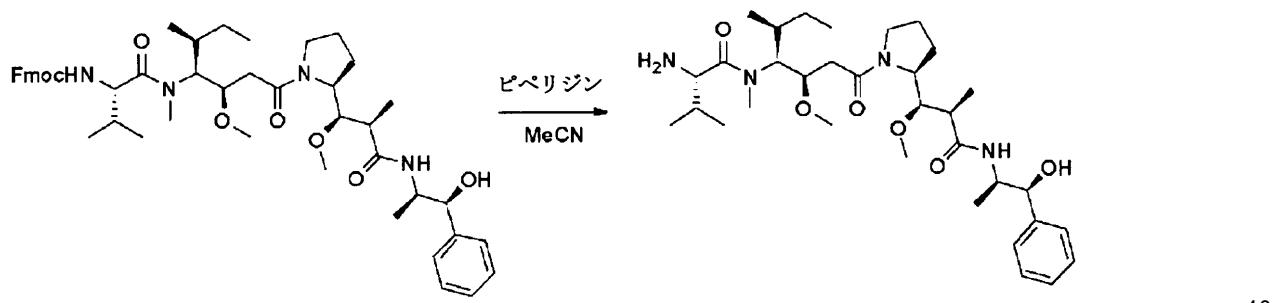


化合物 2 B (4 . 4 g 、 10 . 13 mmol 、 1 . 00 当量) および 1 W (5 . 31 g 、 10 . 12 mmol 、 1 . 00 当量) を不活性雰囲気中、 D C M (45 mL) に溶かした。この溶液を 0 に冷却した後、 D E P C (1 . 62 mL) および D I E A (8 . 4 mL) を滴下した。この反応混合物を 0 で 2 時間、次いで、周囲温度で一晩振盪した。この反応混合物を 100 mL の水で希釈し、 50 mL の D C M で 3 回抽出した。有機相を合わせ、 50 mL の K H S O 4 (1 mol / L) で 1 回、 50 mL の N a H C O 3 (飽和) で 1 回、 50 mL の N a C l (飽和) で 1 回洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、圧力下で濃縮し、 3 . 3 g (39 %) の化合物 2 C を黄色固体の形態で得た。

【 0 4 1 6 】

化合物 2 D : (S) - 2 - アミノ - N - ((3 R , 4 S , 5 S) - 1 - ((S) - 2 - ((1 R , 2 R) - 3 - (((1 S , 2 R) - 1 - ヒドロキシ - 1 - フェニルプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - オキソプロピル) ピロリジン - 1 - イル) - 3 - メトキシ - 5 - メチル - 1 - オキソヘプタン - 4 - イル) - N , 3 - ジメチルブタンアミド

【化 6 4】



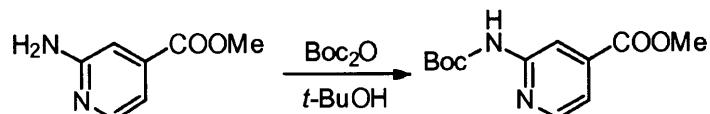
化合物 2 C (300 mg 、 0 . 36 mmol 、 1 . 00 当量) を不活性雰囲気中、 A C N (2 mL) およびピペリジン (0 . 5 mL) に溶かした。この溶液を周囲温度一晩、振盪下で放置した後、減圧下で蒸発乾固した。残渣をシリカカラムにて D C M と M e O H の混合物 (1 : 100) を用いて精製し、 150 mg (68 %) の化合物 2 D を白色固体の形態で得た。

【 0 4 1 7 】

化合物 2 E : 2 - ((t e r t - プトキシカルボニル) アミノ) イソニコチン酸メチル

40

【化 6 5】

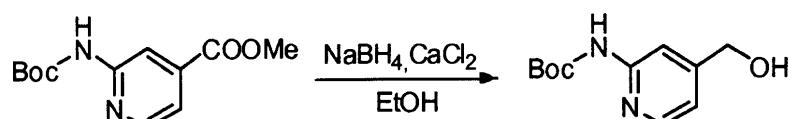


2 - アミノピリジン - 4 - カルボン酸メチル (2 g、13.14 mmol、1.00 当量) を *tert* - ブタノール (20 mL) に溶かし、その後、二炭酸ジ - *tert* - ブチル (4.02 g、18.42 mmol、1.40 当量) を加えた。この反応混合物を 60 で一晩振盪した後、この反応を 1 M NaHCO_3 水溶液 (50 mL) の添加により停止させた。固体を濾別し、50 mL の EtOH で洗浄した後、真空乾燥させ、2.5 g (75 %) の化合物 2E を白色固体の形態で得た。

【0418】

化合物 2F : (4 - (ヒドロキシメチル) ピリジン - 2 - イル) カルバミン酸 *tert* - ブチル

【化 6 6】

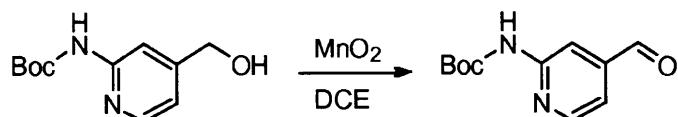


化合物 2E (2.5 g、9.91 mmol、1.00 当量) および CaCl_2 (1.65 g) を EtOH (30 mL) に溶かした。この溶液を 0 に冷却した後、 NaBH_4 (1.13 g、29.87 mmol、3.01 当量) を徐々に加えた。この溶液を周囲温度で一晩、振盪下で放置した後、この反応を水 (50 mL) の添加により停止させた。この混合物を 20 mL の EtOAc で 3 回抽出した。有機相を合わせ、20 mL の NaCl (飽和) で 2 回洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮し、2.0 g (90 %) の化合物 2F を無色の固体の形態で得た。

【0419】

化合物 2G : (4 - ホルミルピリジン - 2 - イル) カルバミン酸 *tert* - ブチル

【化 6 7】

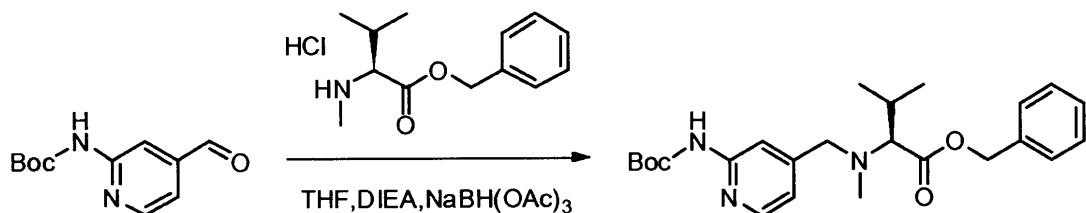


化合物 2F (2.5 g、11.15 mmol、1.00 当量) を DCE (25 mL) に溶かした後、19.4 g (223.14 mmol、20.02 当量) の MnO_2 を加えた。この混合物を 70 で一晩、振盪下で放置した後、固体を濾去した。濾液を蒸発乾固させ、1.4 g (57 %) の化合物 2G を白色固体の形態で得た。

【0420】

化合物 2H : (S) - 2 - ((2 - ((*tert* - ブトキシカルボニル) アミノ) ピリジン - 4 - イル) メチル) (メチル) アミノ) - 3 - メチルブタン酸ベンジル

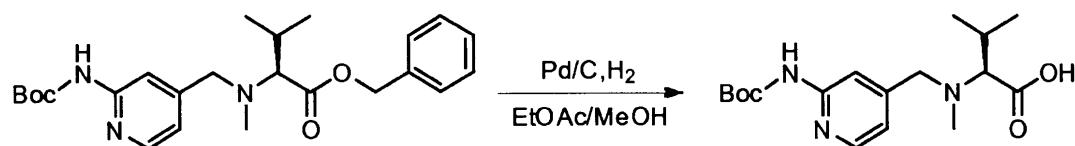
【化68】



【0421】

化合物 2I：(S)-2-(((2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ピリジン-4-イル)メチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタン酸

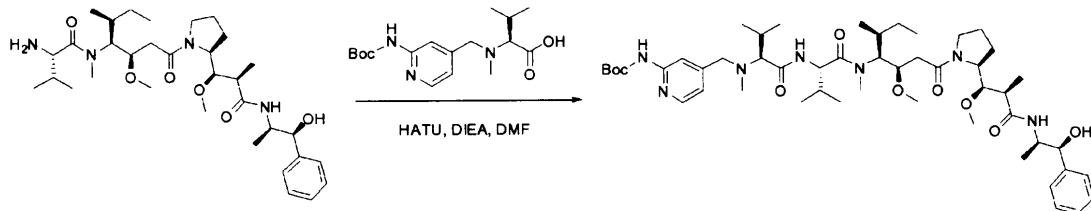
【化69】



【0422】

化合物 2J：(4-((3S,6S,9S,10R)-9-((S)-sec-ブチル)-10-((2-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S,2R)-1-ヒドロキシ-1-フェニルプロパン-2-イル)アミノ)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソプロピル)ピロリジン-1-イル)-2-オキソエチル)-3,6-ジイソプロピル-2,8-ジメチル-4,7-ジオキソ-11-オキサ-2,5,8-トリアザドデシル)ピリジン-2-イル)カルバミン酸 tert-ブチル

【化70】



化合物 2J は、DMF (3 mL) 中、アミン 2D (85.2 mg、0.14 mmol、1.50当量)、酸 2I (31.7 mg、0.09 mmol、1.00当量)、HATU (42.9 mg、0.11 mmol、1.20当量) および DIEA (36.7 mg、0.28 mmol、3.02当量) から、化合物 1ZG と同様にして製造された。蒸発乾固

10

20

30

40

50

の後、100mgの粗生成物を白色固体の形態で得た。

【0423】

化合物2J(100mg、0.11mmol、1.00当量)を2mLのDCMおよび1mLのTFAに溶かした。この反応物を周囲温度で1時間振盪した後、減圧下で濃縮した。残渣(80mg)を分取HPLC(Pre-HPLC-001 SHIMADZU、SunFire Prep C18 OBDカラム、5μm、19×150mm；溶出相：0.05%TFAで緩衝させた水/AcN；10分で20%から40%AcNへ、次いで、2分で40%から100%AcNへの勾配；Waters 2489 UV検出器254nmおよび220nm)により精製した。化合物2を6%(6.3mg)の収率で白色固体の形態で得た。
10

【0424】

LC/MS/UV(Ascentis Express C18カラム、2.7μm、4.6×100mm；40；1.8mL/分、6分で水(0.05%TFA)中10%から95%AcNへ)；ESI(C₄₅H₇₃N₇O₇、正確な質量823.56)m/z：824.5(MH⁺)および412.9(M.2H⁺/2、100%)、3.21分(99.2%、210nm)

【0425】

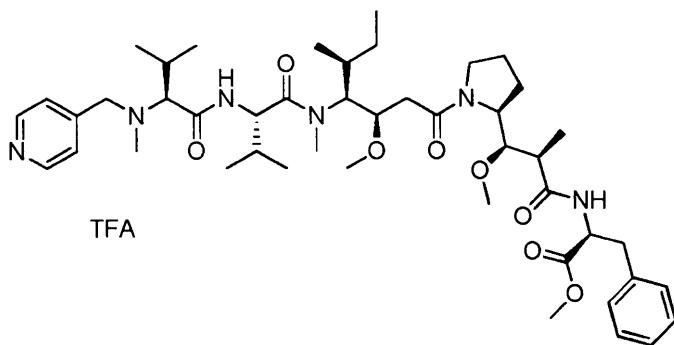
¹H NMR(400MHz, CD₃OD, ppm)：(回転異性体の存在) 7.81 - 7.79 (m, 1H); 7.39 - 7.29 (m, 5H); 6.61 - 6.59 (m, 2H); 4.84 - 4.52 (m, 1H); 4.32 - 4.02 (m, 1H); 3.90 - 2.98 (m, 10H); 2.90 - 2.78 (m, 1H); 2.55 - 0.81 (m, 39H)。
20

【0426】

参照化合物3

((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-ジメチル-2-((S)-3-メチル-2-(メチル(ピリジン-4-イルメチル)アミノ)ブタンアミド)ブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノヨリ)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-3-フェニルプロパン酸メチル,トリフルオロ酢酸

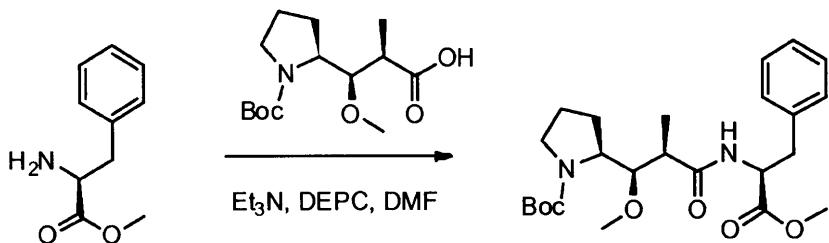
【化71】



【0427】

化合物3A：(S)-2-((1R,2R)-1-メトキシ-3-((((S)-1-メトキシ-1-オキソ-3-フェニルプロパン-2-イル)アミノ)-2-メチル-3-オキソプロピル)ピロリジン-1-カルボン酸tert-ブチル
40

【化 7 2】

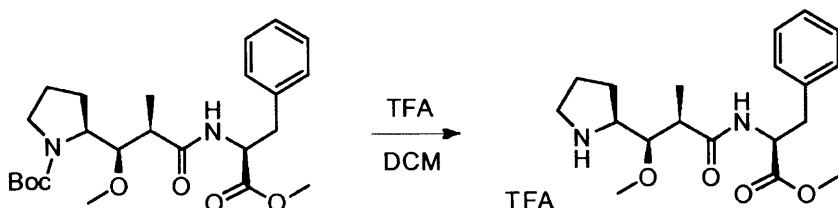


化合物 1 D (3 g、10.44 mmol、1.00当量) および(S)-2-アミノ-3-フェニルプロパン酸メチル(2.25 g、12.55 mmol、1.20当量)を不活性雰囲気中、DMF(40 mL)に溶かした。この溶液を0℃に冷却した後、DEPC(1.67 mL、1.05当量)およびTEA(3.64 mL、2.50当量)を滴下した。この反応混合物を0℃で2時間、次いで、周囲温度で一晩振盪した。この反応混合物を100 mLの水で希釈し、50 mLのEtOAcで3回抽出した。有機相を合わせ、100 mLのKHSO₄(1 mol/L)で1回、100 mLのNaHCO₃(飽和)で1回、100 mLのNaCl(飽和)で1回洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、圧力下で(under pressure)濃縮し、4 g(85%)の化合物3 Aを無色の油状物の形態で得た。

[0 4 2 8]

化合物 3B : (S)-2-((2R,3R)-3-メトキシ-2-メチル-3-((S)-ピロリジン-2-イル)プロパンアミド)-3-フェニルプロパン酸メチルの2,2,2-トリフルオロ酢酸塩

【化 7 3】

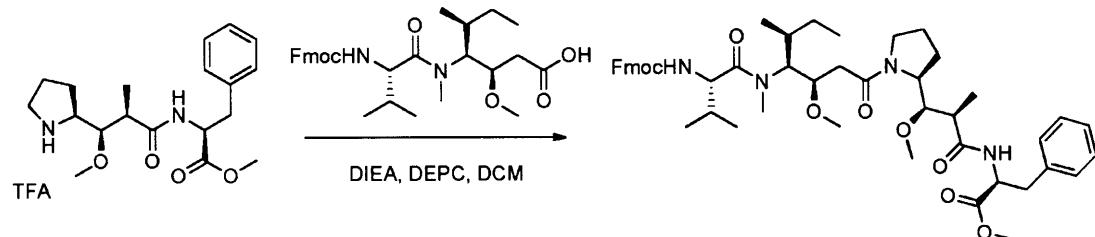


化合物 3 A (5 g、11.15 mmol、1.00 当量) は、不活性雰囲気中、DCM (40 mL) に溶かした。TFA (25 mL) を加え、溶液を 2 時間振盪した。この反応混合物を減圧下で濃縮し、8 g の化合物 3 B を黄色油状物の形態で得た。

[0 4 2 9]

化合物 3C : (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-3-フェニルプロパン酸メチル

【化 7 4】

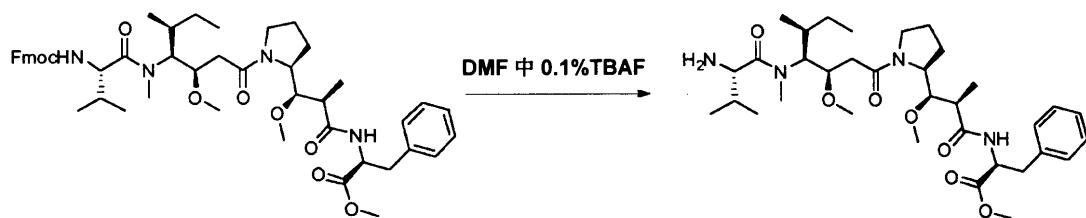


化合物3B(8.03g、17.36mmol、1.00当量)および1W(9.1g、17.34mmol、1.00当量)を不活性雰囲気中、DCM(80mL)に溶かした。この溶液を0℃に冷却した後、DEPC(2.8mL)およびDIEA(12mL)を滴下した。この反応混合物を0℃で2時間、次いで、周囲温度で一晩振盪した。反応混合物を200mLの水で希釈し、50mLのDCMで3回抽出した。有機相を合わせ、50mLのKHSO₄(1mol/L)で1回、50mLのNaHCO₃(飽和)で1回、50mLのNaCl(飽和)で1回洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮し、5g(34%)の化合物3Cを黄色固体の形態で得た。

【0430】

化合物3D：(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-アミノ-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-3-フェニルプロパン酸メチル

【化75】



10

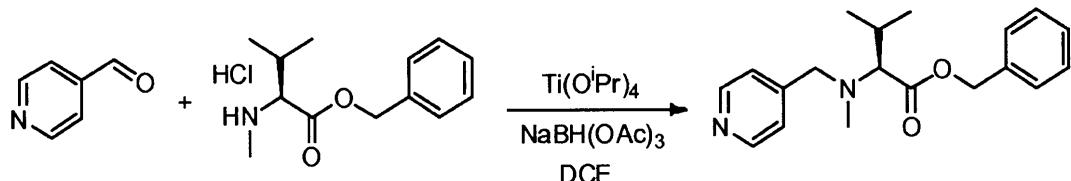
20

化合物3C(5.5g、6.43mmol、1.00当量)を不活性雰囲気中、DMF(100mL)中、フッ化テトラブチルアンモニウム(TBAF、2.61g、9.98mmol、1.55当量)の溶液に溶かした。この溶液を周囲温度で2時間振盪した後、100mLの水で希釈し、50mLのEtOAcで3回抽出した。有機相を合わせた後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮し、3.3g(81%)の化合物3Dを黄色固体の形態で得た。

【0431】

化合物3E：(S)-3-メチル-2-(メチル(ピリジン-4-イルメチル)アミノ)ブタン酸ベンジル

【化76】



30

ピリジン-4-カルバルデヒド(1g、9.34mmol、1.00当量)を化合物1ZC(2.9g、11.25mmol、1.21当量)およびチタンイソプロポキシド(IV)(4.19mL、1.40当量)の存在下で10mLの1,2-ジクロロエタン(DCE)に溶かした。この混合物を周囲温度で30分間振盪した後、2.77gのNaBH(OAc)₃(13.07mmol、1.40当量)を加えた。この反応媒体を振盪下で一晩放置した後、100mLの水で中和し、この混合物を50mLのAcOEtで3回抽出した。有機相を合わせ、蒸発乾固させた。残渣をシリカカラムにてEtOAcとPEの混合物(1:20)を用いて精製し、1.3g(45%)の化合物3Eを無色の油状物の形態で得た。

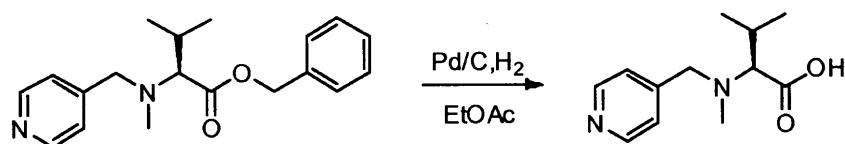
40

【0432】

化合物3F：(S)-3-メチル-2-(メチル(ピリジン-4-イルメチル)アミノ)ブタン酸

50

【化77】



化合物3E (800 mg、2.56 mmol、1.00当量)をPd/C (300 mg)の存在下で30mLのAcOEtに溶かし、周囲温度および大気圧下で3時間水素化した。この反応媒体を濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカカラムにてDCMとMeOHの混合物(100:1から5:1)を用いて精製し、100mg (18%)の化合物3Fを白色固体の形態で得た。
10

【0433】

化合物3D (50 mg、0.08 mmol、1.00当量)および3F (26.34 mg、0.12 mmol、1.50当量)を3mLのDCMに溶かした。この溶液を0℃に冷却した後、0.018mLのDEPCおよび0.0392mLのDIEAを加えた。この反応物を0℃で2時間、次いで、周囲温度で一晩振盪した。この反応媒体を減圧下で濃縮し、残基(70 mg)を分取HPLC (Pre-HPLC-001 SHIMADZU、SunFire Prep C18 OBDカラム、5 μm、19 × 150 mm；溶出相：0.05%のTFAで緩衝させた水/ACN；10分で20%から40%ACNへ、次いで、2分で40%から100%ACNへの勾配；Waters 2545 UV検出器 254 nmおよび220 nm)により精製した。化合物3を27% (20 mg)の收率で白色固体の形態で得た。
20

【0434】

LC/MS/UV (Ascentis Express C18カラム、2.7 μm、4.6 × 100 mm；40℃；1.5 mL/min、8分で水(0.05%TFA)中10%から95%ACN)；ESI (C₄₆H₇₂N₆O₈、正確な質量836.5) m/z: 837.5 (MH⁺) および419.4 (M + 2H⁺/2 (100%))、7.04分 (90.0%、210 nm)
30

【0435】

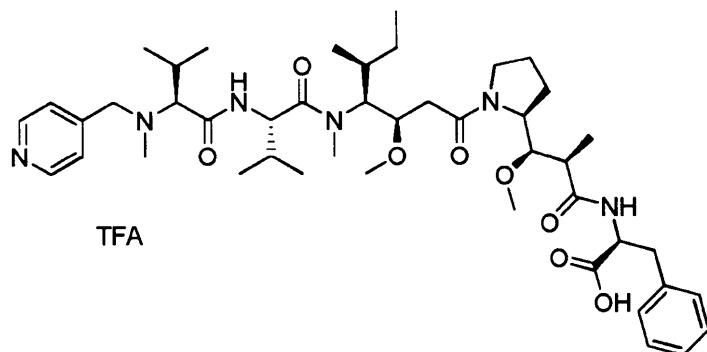
¹H NMR (400MHz, CD₃OD, ppm): (回転異性体の存在) 8.76 - 8.74 (m, 2H); 8.53 - 8.48 (m, 0.4H, NHCO不完全交換); 8.29 - 8.15 (m, 0.8H, NHCO不完全交換); 8.01 (s, 2H), 7.31 - 7.22 (m, 5H), 4.88 - 4.68 (m, 3H); 4.31 - 4.07 (m, 2H); 3.94 - 2.90 (m, 18H); 2.55 - 0.86 (m, 38H)。

【0436】

参照化合物4

(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-ジメチル-2-((S)-3-メチル-2-(メチル(ピリジン-4-イルメチル)アミノ)ブタンアミド)ブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-3-フェニルプロパン酸、トリフルオロ酢酸
40

【化78】



10

【0437】

化合物3(100mg、0.11mmol、1.00当量)を水(5mL)、ACN(5mL)およびピペリジン(2.5mL)の混合物に溶かした。この反応混合物を振盪下で一晩放置した後、減圧下で濃縮した。残渣を分取HPLC(Pre-HPLC-001 SHIMADZU、SunFire Prep C18 OBDカラム、5μm、19×150mm；溶出相：0.05%TFAで緩衝させた水/ACN；10分で20%から40%ACNへ、次いで、2分で40%から100%ACNへの勾配；Waters 2545 UV検出器 254nmおよび220nm)により精製し、20mg(20%)の化合物4を白色固体の形態で得た。

【0438】

LC/MS/UV(Ascentis Express C18カラム、2.7μm、4.6×100mm；40；1.5mL/分、8分で水(0.05%TFA)中10%から95%ACNへ)；ESI(C₄₅H₇₀N₆O₈、正確な質量822.5)m/z: 823.5(MH⁺)および412.4(M. 2H⁺/2、100%)、6.84分(89.1%、210nm)。

【0439】

¹H NMR(400MHz, CD₃OD, ppm): (回転異性体の存在) 8.79 - 8.78 (m, 2H); 8.09 (m, 2H); 7.30 - 7.21 (m, 5H); 4.80 - 4.80 (m, 1H), 4.36 - 0.87 (m, 58H)。

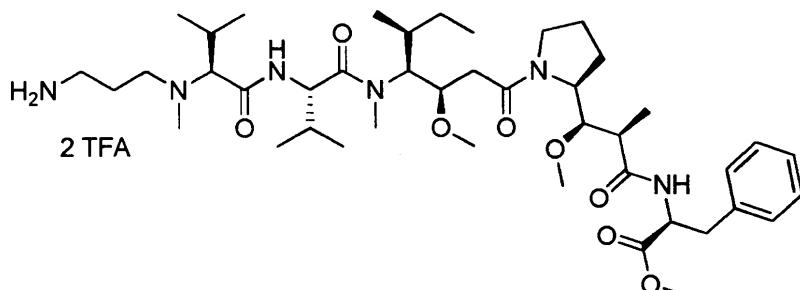
30

【0440】

参照化合物6

(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-アミノプロピル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-3-フェニルプロパン酸メチル, ビストリフルオロ酢酸

【化79】



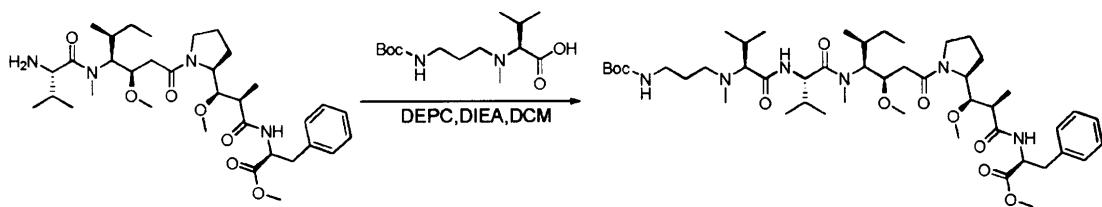
40

【0441】

化合物6A: (2S)-2-[(2R)-2-[(R)-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(3-[tert-ブトキシ

50

) カルボニル]アミノ]プロピル) (メチル)アミノ]-3-メチルブタンアミド]-N, 3-ジメチルブタンアミド]-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル]ピロリジン-2-イル] (メトキシ)メチル]プロパンアミド]-3-フェニルプロパン酸メチル
【化80】



10

化合物3D (157.5 mg、0.25 mmol、1.00当量)を0で不活性雰囲気中、カルボン酸1ZF (78.7 mg、0.27 mmol、1.10当量)、DEPC (46 μl)およびDIEA (124 μl)の存在下で3mLのDCMに溶かした。この反応混合物を低温で2時間振盪した後、冷却浴を外し、4時間振盪を続けた。次に、これを減圧下で濃縮し、200mgの化合物6Aを粗黄色油状物の形態で得た。これはそのまま次の工程で使用した。

【0442】

化合物6A (200 mg、0.22 mmol、1.00当量)を不活性雰囲気中、0で、2mLのDCMに溶かした。TFA (1 mL)を滴下し、冷却浴を外した。この反応混合物を周囲温度で1時間振盪した後、減圧下で濃縮した。残渣を分取HPLC (Pre-HPLC-001 SHIMADZU、SunFire Prep C18 OBDカラム、5 μm、19 × 150 mm；溶出相：0.05% TFAで緩衝させた水 / ACN；10分で20%から40% ACNへ、次いで、2分で40%から100% ACNへの勾配；Waters 2489 UV検出器 254 nmおよび220 nm)により精製し、60 mg (2工程の収率26%)の化合物6を白色固体の形態で得た。

20

【0443】

L C / M S / U V (Zorbax Eclipse Plus C8、3.5 μm、4.6 × 150 mm；1 mL/分、40、18分で水 (0.1% H₃PO₄) 中30から80%メタノール)；ESI (C₄₃H₇₄N₆O₈、正確な質量802.56) m/z : 804 (MH⁺)；11.50分 (91.5%、210 nm)。

30

【0444】

¹H NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): (回転異性体の存在) 8.52 (d, 0.3H, NHCO不完全交換)；8.25 (d, 0.5H, NHCO不完全交換)；7.30-7.22 (m, 5H)；4.9-4.6 (m, 3H)；4.2-4.0 (m, 1H)；4.0-0.86 (m, 61H)。

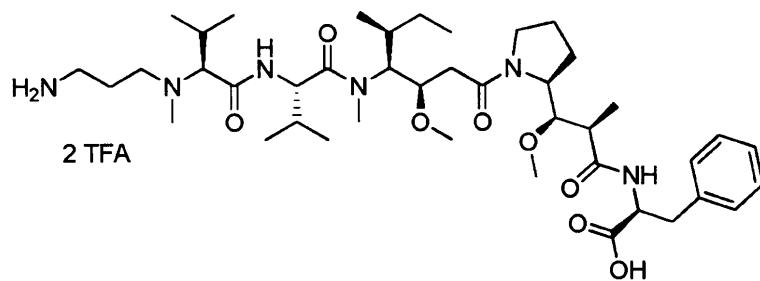
【0445】

参考化合物7

(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-アミノプロピル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N, 3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-3-フェニルプロパン酸, ビストリフルオロ酢酸

40

【化 8 1】



【0446】

化合物6(70mg、0.08mmol、1.00当量)を水(5mL)、ACN(2.5mL)とピペリジン(5mL)の混合物に溶かした。この反応混合物を周囲温度で一晩、振盪下で放置した後、減圧下で濃縮した。残渣を分取HPLC(Pre-HPLC-001 SHIMADZU、SunFire Prep C18 OBDカラム、5μm、19×150mm；溶出相：0.05%TFAで緩衝させた水/ACN；10分で20%から40%ACNへ、次いで、2分で40%から100%ACNへの勾配；UV Waters 2489 UV検出器 254nmおよび220nm)により精製し、14.6mg(21%)の化合物7を白色固体の形態で得た。

【0447】

LC/MS/UV(Ascentis Express C18、2.7μm、4.6×100mm；1.5mL/分、40、8分で水(0.05%TFA)中0から80%メタノール；ESI(C₄₂H₇₂N₆O₈、正確な質量788.54)m/z:790(MH⁺)、5.71分(96.83%、210nm)。

【0448】

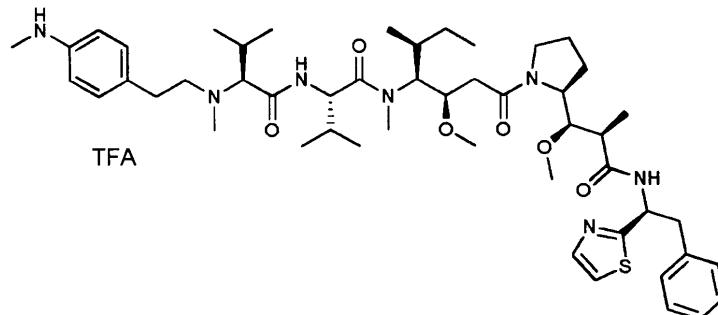
¹H NMR(300MHz, CD₃OD, ppm): (回転異性体の存在) 8.42 (d, 0.3H, NHCO不完全交換)；8.15 (d, 0.2H, NHCO不完全交換)；7.31-7.21 (m, 5H)；4.9-4.6 (m, 3H)；4.25-4.0 (m, 1H)；4.0-0.86 (m, 59H)。

【0449】

化合物11

(S)-N-((3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-((S)-2-((1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-((S)-2-フェニル-1-(チアゾール-2-イル)エチル)アミノ)プロピル)ピロリジン-1-イル)-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル)-N,3-ジメチル-2-((S)-3-メチル-2-(メチル(4-(メチルアミノ)フェネチル)アミノ)ブタンアミド)ブタンアミド,トリフルオロ酢酸

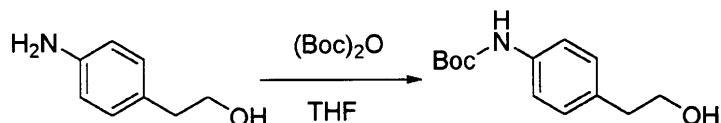
【化 8 2】



【0450】

化合物11A:N-[4-(2-ヒドロキシエチル)フェニル]カルバミン酸tert-ブチル

【化 8 3】



T H F (2 0 0 m L) 中、2 - (4 - アミノフェニル) エタノール (1 0 g 、 7 2 . 9 mmol 、 1 当量) の溶液に、二炭酸ジ - t e r t - プチル (1 6 . 7 g 、 7 7 mmol 、 1 . 0 5 当量) を加え、この反応物を周囲温度で一晩攪拌した。この混合物を E t O A c (2 0 0 m L) で希釈し、水 (2 0 0 m L) 、次いで、H C l 1 M (1 0 0 m L) 、次いで、飽和 N a H C O₃ 水溶液 (1 0 0 m L) 、次いで、ブライン (1 0 0 m L) で洗浄した。有機相を M g S O₄ で乾燥させた後、減圧下で蒸発乾固させた。粗生成物をヘプタン (1 5 0 m L) で 2 回摩碎し、真空下で乾燥させ、化合物 1 1 A を白色固体として得た (1 4 . 7 g 、 8 4 %) 。 10

【 0 4 5 1 】

化合物 1 1 B : N - [4 - (2 - オキソエチル) フェニル] カルバミン酸 t e r t - プチル

【化 8 4】

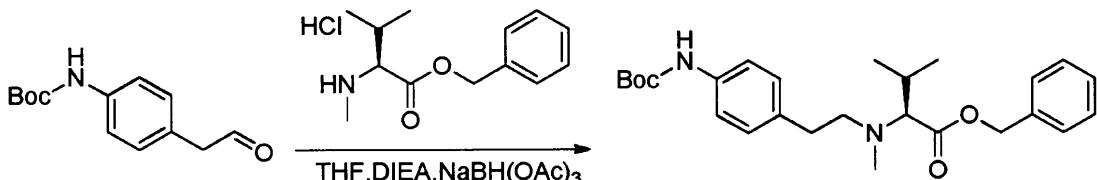


化合物 1 1 A (2 . 5 g 、 1 0 . 5 mmol 、 1 . 0 0 当量) を 2 5 m L の D C M に溶かした後、 - 7 8 に冷却した。D C M (1 0 m L) 中デス・マーチン・ペルヨージナン溶液 (D M P 、 6 . 7 1 g 、 1 5 . 8 mmol 、 1 . 5 当量) を滴下した。冷却浴を外し、周囲温度で 1 時間振盪を続けた。この反応物を重炭酸ナトリウム飽和水溶液と N a₂S₂O₃ 饱和水溶液の 5 0 / 5 0 混合物 6 0 m L で中和した。得られた溶液を 3 0 m L の E t O A c で 3 回抽出した。有機相を合わせ、N a C l 饱和水溶液で 2 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲル (E t O A c / P E 1 / 1 5) で精製し、1 . 0 g (4 0 %) の化合物 1 1 B を淡黄色固体の形態で得た。 30

【 0 4 5 2 】

化合物 1 1 C : (2 S) - 2 - [[2 - (4 - [[(t e r t - プトキシ) カルボニル] アミノ] フェニル) エチル] (メチル) アミノ] - 3 - メチルブタン酸ベンジル

【化 8 5】



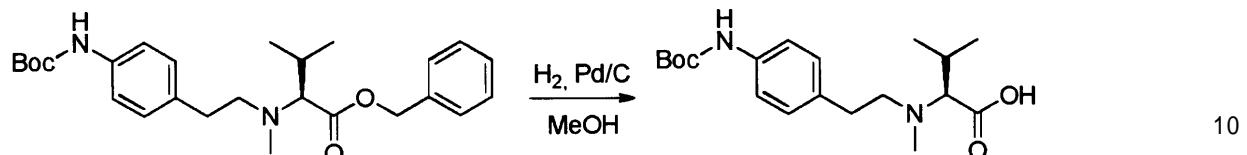
化合物 1 Z C (3 . 5 g 、 1 3 . 6 mmol 、 1 . 1 当量) を D I E A (6 . 4 g 、 4 9 . 7 mmol 、 4 . 0 当量) 、アルデヒド 1 1 B (2 . 9 g 、 1 2 . 3 mmol 、 1 . 0 当量) およびトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (5 . 2 3 g 、 4 9 . 7 mmol 、 2 . 0 当量) の存在下で T H F (3 0 m L) に溶かした。この反応混合物を周囲温度で一晩、振盪下で放置した後、6 0 m L の重炭酸ナトリウム飽和溶液で中和した。得られた溶液を 3 0 m L の E t O A c で 3 回抽出した。有機相を合わせ、N a C l 饱和水溶液で 2 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲル 50

ル(E t O A c / P E 1 : 2 0)で精製し、3 . 7 g (6 8 %)の化合物 1 1 C を黄色油状物の形態で得た。

【 0 4 5 3 】

化合物 1 1 D : (2 S) - 2 - [[2 - (4 - [[(t e r t - プトキシ) カルボニル] アミノ] フェニル) エチル] (メチル) アミノ] - 3 - メチルブタン酸

【 化 8 6 】

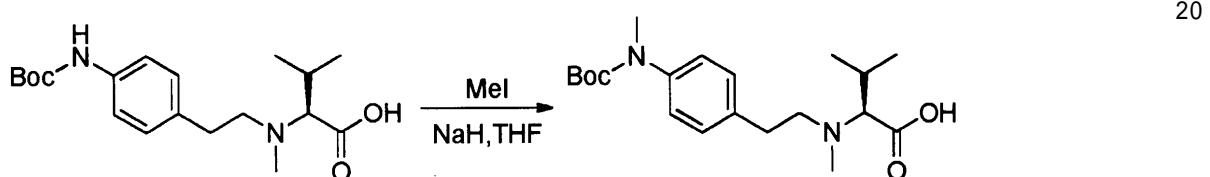


化合物 1 1 C (2 g 、 4 . 5 m m o l 、 1 当量) を P d / C (2 g) の存在下で 1 0 m L のメタノールに溶かし、常温および常圧で 2 時間水素化した。この反応媒体を濾過し、減圧下で濃縮し、1 . 2 g (7 5 %) の化合物 1 1 D を黄色油状物の形態で得た。

【 0 4 5 4 】

化合物 1 1 E : (2 S) - 2 - [[2 - (4 - [[(t e r t - プトキシ) カルボニル] (メチル) アミノ] フェニル) エチル] (メチル) アミノ] - 3 - メチルブタン酸

【 化 8 7 】

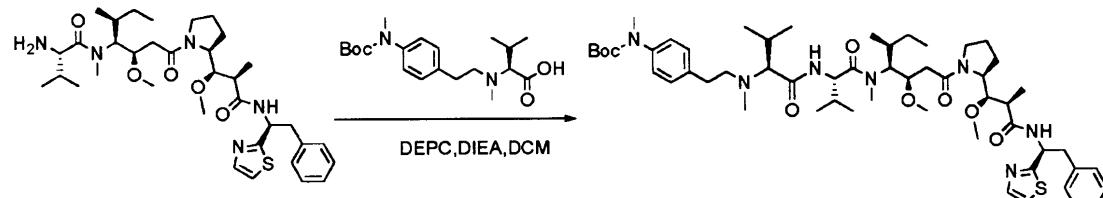


化合物 1 1 D (1 . 2 g 、 3 . 4 m m o l 、 1 . 0 0 当量) を不活性雰囲気中、 T H F (2 0 m L) に溶かした。反応媒体を氷浴で冷却し、その後、 N a H (油中 6 0 % 、 5 4 9 m g 、 1 3 . 7 m m o l 、 4 . 0 当量) を少量ずつ加えた後、ヨードメタン (4 . 9 g 、 3 4 m m o l 、 1 0 当量) を加えた。この反応物を周囲温度で(at ambient temperature)一晩、振盪下で放置した後、水で中和し、 1 0 0 m L の E t O A c で洗浄した。水溶液の p H を 1 N H C l で 6 ~ 7 に調整した。この水溶液を 1 0 0 m L の E t O A c で 3 回抽出した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮し、 8 0 0 m g (6 4 %) の化合物 1 1 E を黄色固体の形態で得た。

【 0 4 5 5 】

化合物 1 1 F : N - [4 - (2 - [[(1 S) - 1 - [[(1 S) - 1 - [[(3 R , 4 S , 5 S) - 3 - メトキシ - 1 - [(2 S) - 2 - [(1 R , 2 R) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 2 - [[(1 S) - 2 - フェニル - 1 - (1 , 3 - チアゾール - 2 - イル) エチル] カルバモイル] エチル] ピロリジン - 1 - イル] - 5 - メチル - 1 - オキソヘプタン - 4 イル] (メチル) カルバモイル] - 2 - メチルプロピル] カルバモイル] - 2 - メチルプロピル] (メチル) アミノ] エチル) フェニル] - N - メチルカルバミン酸 t e r t - プチル

【 化 8 8 】



化合物 1 1 F は、アミン 1 Y (1 5 0 m g 、 0 . 2 2 m m o l 、 1 . 2 当量) および酸

50

11E (70mg、0.19mmol、1.0当量)から、化合物6Aと同様にして製造された。シリカゲル(EtOAc/PE 1:1)での精製後、100mg(52%)の目的生成物を淡黄色固体の形態で得た。

【0456】

化合物11は、中間体11F(100mg、0.1mmol)から、化合物1と同様にして製造された。残渣を分取HPLC(Pre-HPLC-001 SHIMADZU、SunFire Prep C18 OBDカラム、5μm、19×150mm；溶出相：0.05%TFAで緩衝させた水/ACN；10分で20%から40%ACNへ、次いで、2分で40%から100%ACNへの勾配；Waters 2489 UV検出器254nmおよび220nm)により精製した。化合物11を39%(39.7mg)の収率で白色固体の形態で得た。
10

【0457】

LC/MS/UV(Eclipse Plus C8、3.5μm、4.6×150mm；1mL/分、40、18分で水(0.05%TFA)中50から95%メタノール)；ESI(C₅₀H₇₇N₇O₆S、正確な質量903.57)m/z:904.5(MH⁺)、7.53分(93.68%、254nm)。

【0458】

¹H NMR(300MHz, CD₃OD, ppm): (回転異性体の存在) 8.84 (d, 0.5H, NHCO不完全交換)；8.7-8.5 (m, 0.9H, NHCO不完全交換)；7.76-7.73 (m, 1H)；7.55 - 7.4 (m, 1H)；7.28 - 7.22 (m, 7H)；7.08-7.05 (m, 2H)；5.51-5.72 (m, 1H)；4.9-4.80 (m, 2H)；4.3-0.7 (m, 60H)。
20

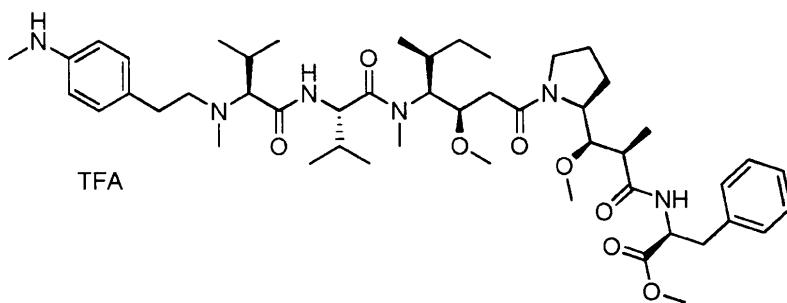
【0459】

化合物12

(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-ジメチル-2-((S)-3-メチル-2-(メチル(4-(メチルアミノ)フェネチル)アミノ)ブタンアミド)ブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-3-フェニルプロパン酸メチル,トリフルオロ酢酸

【化89】

30



【0460】

40

化合物1の合成の最終段階と同様にして、化合物12をアミン3D(118mg、0.19mmol)および酸11E(82mg、0.22mmol)から2段階で製造した。最終残渣を分取HPLC(Pre-HPLC-001 SHIMADZU、SunFire Prep C18 OBDカラム、5μm、19×150mm；溶出相：0.05%TFAで緩衝させた水/ACN；10分で20%から40%ACNへ、次いで、2分で40%から100%ACNへの勾配；Waters 2489 UV検出器254nmおよび220nm)により精製した。化合物12を7%(13.7mg)の収率で白色固体の形態で得た。

【0461】

LC/MS/UV(Eclipse Plus C8、3.5μm、4.6×150mm)

50

m ; 1 mL / 分、40、18分で水(0.05%TFA)中40から95%メタノール) ; ESI(C₄₉H₇₈N₆O₈、正確な質量878.59)m/z:879.7(MH⁺)、10.07分(90.6%、254nm)。

【0462】

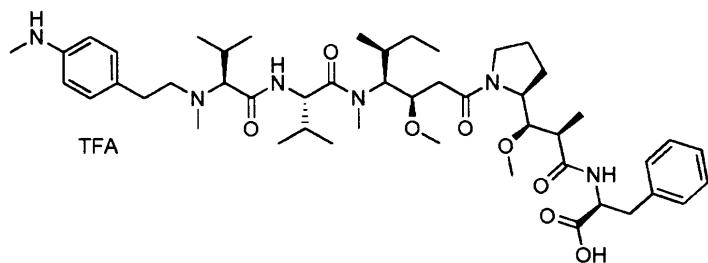
¹H-NMR(300MHz, CD₃OD, ppm): (回転異性体の存在) 7.40(se, 2H); 7.38-7.22(m, 7H); 4.95-4.7(m, 3H); 4.2-4.0(m, 1H); 3.9-0.86(m, 62H)。

【0463】

化合物13

(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-ジメチル-2-((S)-3-メチル-2-(メチル(4-(メチルアミノ)フェニル)アミノ)ブタンアミド)ブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-3-フェニルプロパン酸,トリフルオロ酢酸

【化90】



10

20

30

化合物13は、化合物12(100mg、0.10mmol)から、化合物7と同様にして製造された。残渣を分取HPLC(Pre-HPLC-001 SHIMADZU、SunFire Prep C18 OBDカラム、5μm、19×150mm; 溶出相: 0.05%TFAで緩衝させた水/AcN; 10分で20%から40%AcNへ、次いで、2分で40%から100%AcNへの勾配; Waters 2489 UV検出器254nmおよび220nm)により精製した。化合物13を20%(20mg)の収率で白色固体の形態を得た。

【0464】

LC/MS/UV(Ascentis Express C18、2.7μm、4.6×100mm; 1.5mL/分、40、8分で水(0.05%TFA)中10から95%メタノール); ESI(C₄₈H₇₆N₆O₈、正確な質量864.57)m/z:865.6(MH⁺)、6.05分(90.9%、210nm)。

【0465】

¹H NMR: (300MHz, CD₃OD, ppm): (回転異性体の存在) 7.32-7.19(m, 9H); 4.9-4.65(m, 3H); 4.2-4.0(m, 1H); 3.9-0.86(m, 59H)。

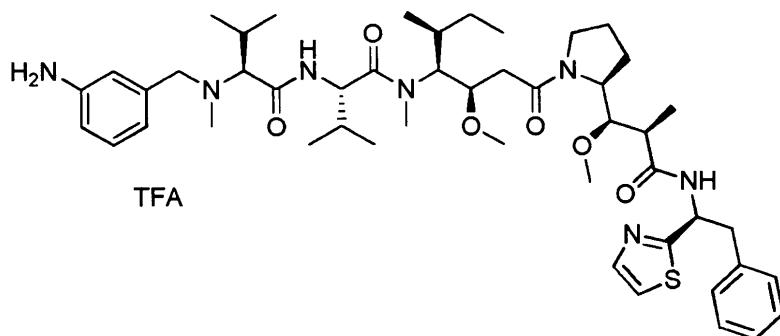
【0466】

化合物14

(S)-2-((S)-2-((3-アミノベンジル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N-((3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-((S)-2-((1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-((S)-2-フェニル-1-(チアゾール-2-イル)エチル)アミノ)プロビル)ピロリジン-1-イル)-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル)-N,3-ジメチルブタンアミド,トリフルオロ酢酸

40

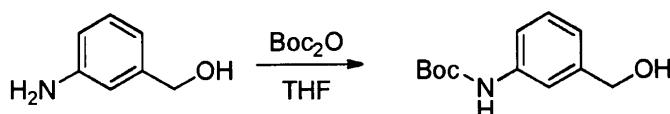
【化91】



【0467】

化合物14A：(3-(ヒドロキシメチル)フェニル)カルバミン酸tert-ブチル

【化92】



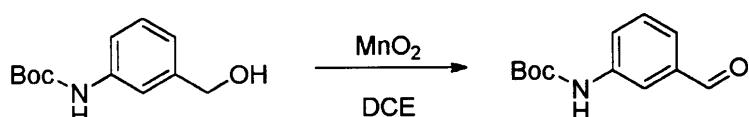
20

(3-アミノフェニル)メタノール(3g、24.36mmol、1.00当量)をTHF(60mL)に溶かし、その後、二炭酸ジ-tert-ブチル(6.38g、29.23mmol、1.20当量)を加えた。この反応混合物を周囲温度で一晩、振盪下で放置した後、この反応物を200mLの水を加えて希釈した。生成物を100mLのAcEtで3回抽出した後、有機相を再び合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮し、粗生成物(13.85gの化合物14A)を黄色油状物の形態で得た。

【0468】

化合物14B：(3-ホルミルフェニル)カルバミン酸tert-ブチル

【化93】



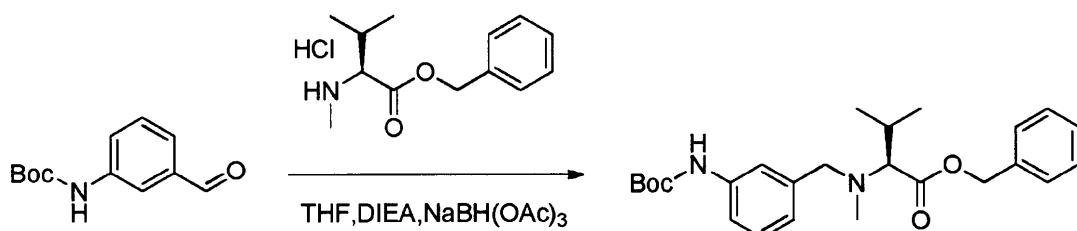
30

化合物14A(13.8g、61.81mmol、1.00当量)をDCE(400mL)に溶かした後、MnO₂(54g、621.14mmol、10.05当量)を加えた。この混合物を周囲温度で3日間、振盪下で放置し、その後、これらの固体を濾去した。濾液を蒸発乾固させ、残渣をシリカカラムにてEtOAcとPEの混合物(1:30)を用いて精製し、3g(22%)の化合物14Bを白色固体の形態で得た。

【0469】

化合物14C：(S)-2-((3-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ベンジル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタン酸ベンジル

【化94】



40

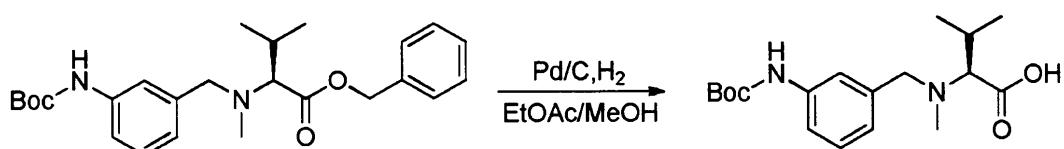
50

化合物14B(1g、4.52mmol、1.00当量)を化合物1ZC(1.16g、4.50mmol、1.00当量)、DIEA(3mL)およびNaBH(OAc)₃(1.92g、9.06mmol、2.01当量)の存在下で20mLのTHFに溶かした。この反応混合物を周囲温度で一晩、振盪下で放置した後、100mLの水で中和し、50mLのAcOEtで3回抽出した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカカラムにてEtOAcとPEの混合物(1:50)を用いて精製し、1.9g(99%)の化合物14Cを白色固体の形態で得た。

【0470】

化合物14D：(S)-2-((3-((tert-ブトキカルボニル)アミノ)ベンジル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタン酸

【化95】

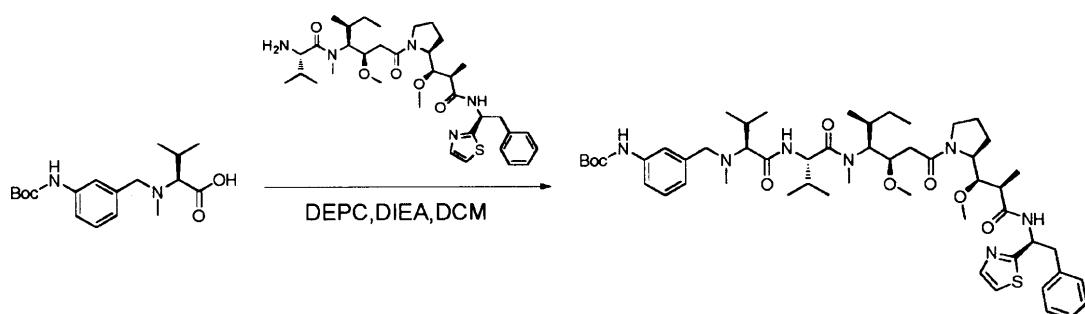


化合物14C(1g、2.34mmol、1.00当量)をPd/C(400mg)の存在下で30mLのAcOEtおよび4mLのメタノールに溶かし、周囲温度および大気圧で1時間水素化した。この反応媒体を濾過し、減圧下で濃縮し、680mg(86%)の化合物14Dを白色固体の形態で得た。

【0471】

化合物14E：(3-((3S,6S,9S,10R)-9-((S)-sec-ブチル)-3,6-ジイソプロピル-10-(2-((S)-2-((1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-(((S)-2-フェニル-1-(チアゾール-2-イル)エチル)アミノ)プロピル)ピロリジン-1-イル)-2-オキソエチル)-2,8-ジメチル-4,7-ジオキソ-11-オキサ-2,5,8-トリアザドデシル)フェニル)カルバミン酸tert-ブチル

【化96】



化合物14Eは、DCM(3mL)中、アミン1Y(100mg、0.15mmol、1.00当量)、酸14D(102.27mg、0.30mmol、2.00当量)、DEPC(0.053mL)およびDIEA(0.046mL)から、化合物3と同様にして合成された。粗生成物(80mg)をシリカカラムにてEtOAcとPEの混合物(1:1)を用いて精製し、100mg(67%)の化合物14Eを淡黄色固体の形態で得た。

【0472】

化合物14は、中間体14E(100mg、0.10mmol、1.00当量)から、化合物2と同様にして合成された。粗生成物(80mg)を分取HPLC(Pre-HPLC-001 SHIMADZU、SunFire Prep C18 OBDカラム、5μm、19×150mm；溶出相：0.05%TFAで緩衝させた水/AcN；10分

10

20

30

40

50

で20%から40%ACNへ、次いで、2分で40%から100%ACNへの勾配；Waters 2545 UV検出器 254 nmおよび220 nm)により精製した。化合物14を10%(10 mg)の収率で白色固体の形態で得た。

【0473】

LC/MS/UV (Eclipse plus C8カラム、3.5 μm、4.6 × 150 mm; 40 °C; 1.0 mL/min、18分で水(0.05%TFA)中40%から95%MeOH); ESI (C₄₈H₇₃N₇O₆S、正確な質量875.5) m/z: 876.5 (MH⁺) および438.9 (M+2H⁺/2、100%)、11.35分(95.6%、210 nm)。

【0474】

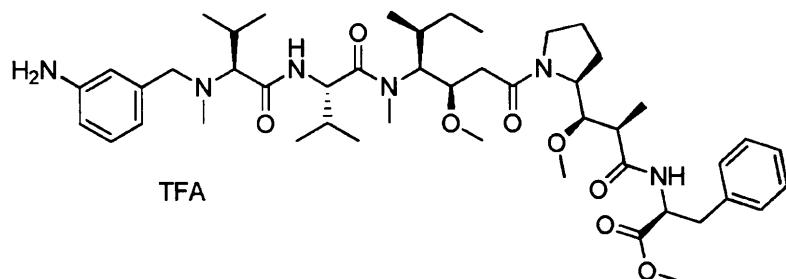
¹H NMR (400MHz, CD₃OD, ppm): (回転異性体の存在) 8.92 - 8.86 (m, 0.4H, NH不完全交換); 8.70 - 8.54 (m, 0.6H, NH不完全交換); 7.88 - 7.78 (m, 1H); 7.60 - 7.50 (m, 1H); 7.45 - 6.97 (m, 9H); 5.80 - 5.65 (m, 1H); 4.85 - 4.70 (m, 1H); 4.40 - 0.80 (m, 56H)。

【0475】

化合物15

(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-アミノベンジル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-3-フェニルプロパン酸メチル, トリフルオロ酢酸

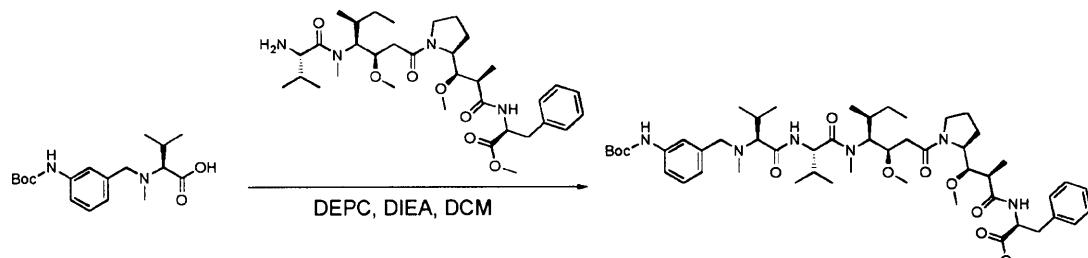
【化97】



【0476】

化合物15A : (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-(tert-ブトキカルボニル)アミノ)ベンジル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-3-フェニルプロパン酸メチル

【化98】



化合物15Aは、DCM(5 mL)中、アミン3D(200 mg、0.32 mmol、1.00当量)、酸14D(212.6 mg、0.63 mmol、2.00当量)、DEPC(0.1103 mL)およびDIEA(0.157 mL、3.00当量)から、化合

10

20

30

40

50

物3と同様にして合成された。粗生成物をシリカカラムにてEtOAcとPEの混合物(1:1)を用いて精製し、200mg(67%)の化合物15Aを黄色固体の形態で得た。

【0477】

化合物15：化合物15は、中間体15A(200mg、0.21mmol、1.00当量)から、化合物2と同様にして合成された。粗生成物を分取HPLC(Pre-HPLC-001 SHIMADZU、SunFire Prep C18 OBDカラム、5μm、19×150mm；溶出相：0.05%TFAで緩衝させた水/ACN；10分で20%から40%ACNへ、次いで、2分で40%から100%ACNへの勾配；Waters UV検出器 2545 254nmおよび220nm)により精製した。化合物15を19%(38.6mg)の収率で白色固体の形態で得た。
10

【0478】

L C / M S / U V (Ascentis Express C18カラム、2.7μm、4.6×100mm；40；1.5mL/分、8分で水(0.05%TFA)中10%から95%MeOH)；ESI(C₄₇H₇₄N₆O₈、正確な質量850.5)m/z: 851.5(MH⁺)および426.4(M+2H⁺/2、100%)、6.61分(91.1%、210nm)。

【0479】

¹H NMR(400MHz, CD₃OD, ppm)：(回転異性体の存在) 7.53 - 7.42 (m, 1H); 7.35 - 7.18 (m, 8H); 4.88 - 4.79 (m, 2H); 4.42 - 4.00 (m, 3H); 3.93 - 2.71 (m, 22H); 2.61 - 0.81 (m, 33H)。
20

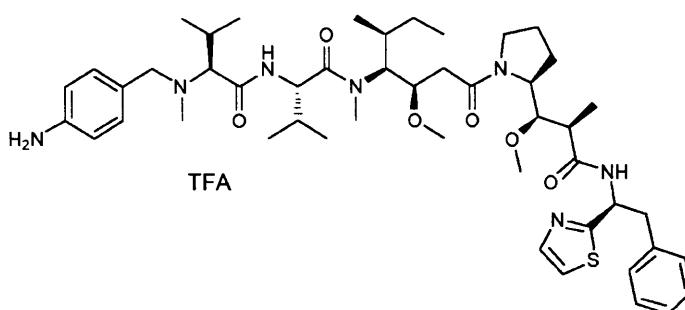
【0480】

化合物20

(S)-2-((S)-2-((4-アミノベンジル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N-((3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-((S)-2-((1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-(((S)-2-フェニル(phnyl)-1-(チアゾール-2-イル)エチル)アミノ)プロピル)ピロリジン-1-イル)-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル)-N,3-ジメチルブタンアミド,トリフルオロ酢酸

【化99】

30



【0481】

40

化合物20は、アミン1ZCおよび対応するアルデヒドから、化合物1と同様にして製造された。

【0482】

化合物20の製造に関する4-ニトロベンズアルデヒドは市販品であった。

【0483】

化合物20の合成はニトロ基を還元することにより完了した。これは次のように行った：
(2S)-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-[(1S,2R)-1-ヒドロキシ-1-フェニルプロパン-2-イル]カルバモイル]-1-メトキシ-2-メチルエチル]ピロリジン-1-イル]-3-メトキシ-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N,3-ジメチル-2-[(2S)-3-メ
50

チル - 2 - [メチル [(4 - ニトロフェニル) メチル] アミノ] ブタンアミド] ブタンアミド (40 mg、 0.05 mmol、 1.0 当量) を 15 mL のエタノールに溶かした。二水和塩化スズ (II) (317 mg、 1.4 mmol、 3.0 当量) を加え、 この溶液を周囲温度で 3 日間、 振盪下で放置した。この反応物を 50 mL の水で中和した後、 50 mL の EtOAc で 3 回抽出した。有機相を合わせ、 無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、 濾過し、 減圧下で濃縮し、 化合物 20 を粗状態で得た (純度 : 93.2% ; 量 : 21.6 mg)。

【 0484 】

化合物を分取 HPLC (Pre - HPLC - 001 SHIMADZU、 SunFire Prep C18 OBD カラム、 5 μm、 19 × 150 mm ; 溶出相 : 0.05% TFA で緩衝させた水 / ACN ; 10 分で 20% から 40% ACN へ、 次いで、 2 分で 40% から 100% ACN への勾配 ; Waters 2489 UV 検出器 254 nm および 220 nm) により精製し、 対応する TFA 塩を白色固体の形態で得た。

【 0485 】

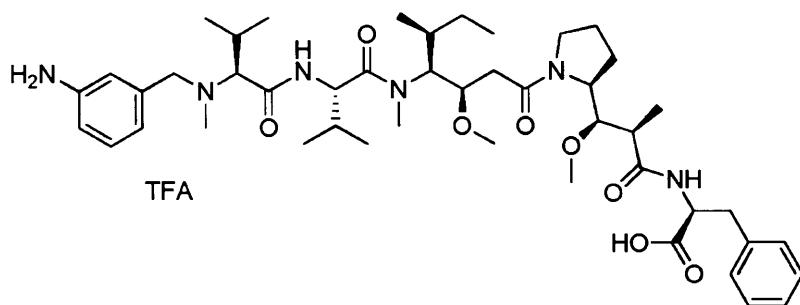
¹H NMR: (400MHz, CD₃OD, ppm): (回転異性体の存在) 7.85-7.80 (m, 1H); 7.6-7.5 (m, 1H); 7.4-7.15 (m, 5H); 7.1-7.05 (m, 2H); 6.73-6.70 (m, 2H); 5.8-5.55 (m, 1H); 5.0-4.7 (m, 2H); 4.25-4.05 (m, 1H); 4.0-0.8 (m, 54H)。LC/MS/UV ESI: (C₄₈H₇₃N₇O₇S, 正確な質量 875.53) m/z 876 (MH⁺) , 439 [75%, (M.2H⁺)/2]; UV: RT = 4.83 分 (96.8%, 254 nm)。¹H NMR (400MHz, CD₃OD, ppm): (回転異性体の存在) 7.85-7.80 (m, 1H); 7.6-7.5 (m, 1H); 7.4-7.1 (m, 7H); 6.76-6.72 (m, 2H); 5.8-5.55 (m, 1H); 4.9-4.65 (m, 2H); 4.25-4.05 (m, 1H); 4.0-0.8 (m, 54H)。

【 0486 】

化合物 29

(S) - 2 - ((2R, 3R) - 3 - ((S) - 1 - ((3R, 4S, 5S) - 4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - ((3 - アミノベンジル) (メチル) アミノ) - 3 - メチルブタンアミド) - N , 3 - ジメチルブタンアミド) - 3 - メトキシ - 5 - メチルヘプタノイド) ピロリジン - 2 - イル) - 3 - メトキシ - 2 - メチルプロパンアミド) - 3 - フェニルプロパン酸, トリフルオロ酢酸

【 化 100 】



【 0487 】

化合物 15 (100 mg、 0.10 mmol、 1.00 当量) を水 (5 mL) 、 ACN (5 mL) とピペリジンの混合物 (2.5 mL) に溶かした。この反応混合物を周囲温度で一晩、 振盪下で放置した後、 減圧下で濃縮した。残渣を分取 HPLC (Pre - HPLC - 001 SHIMADZU、 SunFire Prep C18 OBD カラム、 5 μm、 19 × 150 mm ; 溶出相 : 0.05% TFA で緩衝させた水 / ACN ; 10 分で 20% から 40% ACN へ、 次いで、 2 分で 40% から 100% ACN への勾配 ; Waters 2545 UV 検出器 254 nm および 220 nm) により精製し、 20 mg (20%) の化合物 29 を白色固体の形態で得た。

【 0488 】

LC / MS / UV (Eclipse Plus C8 カラム、 3.5 μm、 4.6 × 150 mm ; 40 ; 1.0 mL / 分、 18 分で水 (0.05% TFA) 中 40% から 95

% MeOH) ; ESI (C₄₆H₇₂N₆O₈、正確な質量 836.54) m/z : 837.5 (MH⁺) および 419.4 (M + 2H⁺ / 2, 100%)、10.61分 (92.5%、210nm)。

【0489】

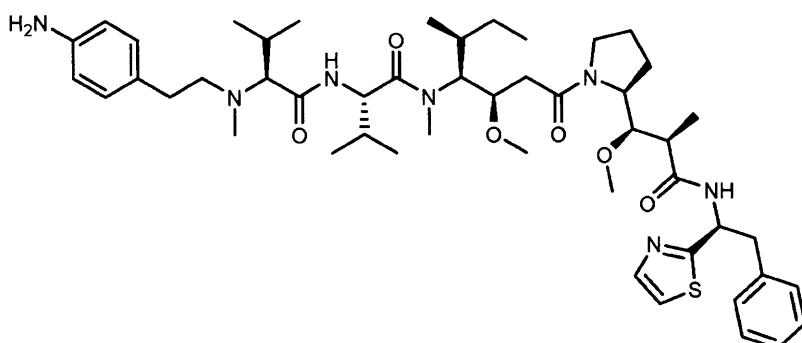
¹H NMR: (400MHz, CD₃OD, ppm): (回転異性体の存在) 7.38 - 7.15 (m, 6H); 7.00 - 6.99 (m, 3H); 4.85 - 4.68 (m, 2H); 4.37 - 3.38 (m, 11H); 3.31 - 2.70 (m, 8H); 2.60 - 0.82 (m, 35H)。

【0490】

化合物 6 1

(S)-2-((S)-2-((4-アミノフェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N-((3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-((S)-2-(1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-((S)-2-フェニル-1-(チアゾール-2-イル)エチル)アミノ)プロピル)ピロリジン-1-イル)-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル)-N,3-ジメチルブタンアミド

【化101】



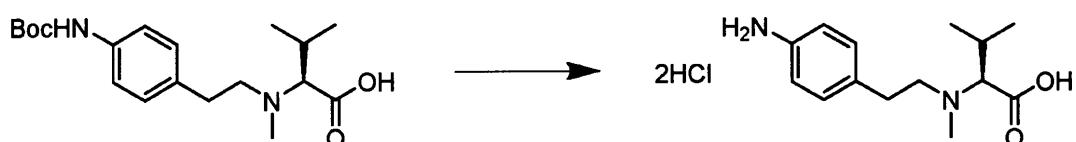
10

20

【0491】

化合物 6 1 A : N - (4 - アミノフェネチル) - N - メチル - L - バリン二塩酸塩

【化102】



30

化合物 11 D (962mg, 2.75mmol) をプロパン-2-オール中 HCl の市販溶液 (5~6M) 10ml に溶かし、室温で 2 時間攪拌した。TLC 分析は、出発材料の完全な消費を示した。溶媒を減圧下で蒸発させ、得られた黄色固体を Et₂O (2 × 10ml) で摩碎した。生成物を真空下で乾燥させ、化合物 6 1 A を黄色固体として得た (322mg, 47%)。

【0492】

40

化合物 6 1 : カルボン酸 6 1 A (73mg, 0.23mmol, 1 当量) およびアミン 1 Y (150mg, 0.23mmol, 1 当量) を乾燥 DMF (2ml) に溶かした。DIEA (158μl, 0.90mmol, 4 当量) および DECP (DEPC とも呼ばれる) (51μl, 0.34mmol, 1.5 当量) を加え、この反応物を室温で 4 時間攪拌した。LC-MS による分析は、出発材料の完全な消費を示した。溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (DCM / MeOH) により精製し、化合物 6 1 を淡黄色固体として得た (83mg, 40%)。

【0493】

¹H NMR: (500MHz, DMSO-d₆, ppm): (回転異性体の存在), 8.86 (d, 0.5H, NHCO); 8.65 (d, 0.5H, NHCO), 8.11-8.05 (m, 1H, NHCO), 7.80 (d, 0.5H, チアゾール), 7.78 (d,

50

0.5H, チアゾール), 7.65 (d, 0.5H, チアゾール), 7.63 (d, 0.5H, チアゾール), 7.32 - 7.12 (m, 5H), 6.83 (d, J=8.3 Hz, 2H), 6.45 (d, J=8.3 Hz, 2H), 5.56 - 5.49 (m, 0.5 H), 5.42 - 5.35 (m, 0.5H), 4.78 (s, 2H, NH₂), 4.74 - 4.46 (m, 2H), 4.01 - 0.66 (m, 57H)。

【0494】

HPLC (X bridge Shield C18、3.5 μm、4.6 × 50 mm; 3.5 mL/min、4.0 - 2.25 minで水 (0.1% TFA) 中 0 から 95% MeCN、次いで、0.5 分間 95% MeCN、Tr = 1.31 min (96.5%、220 nm))。

m/z (Q-TOF ESI⁺) 890.5558 (2%、MH⁺、C₄₉H₇₆N₇O₆S 理論値 890.5572)、445.7834 (100%、(MH₂)²⁺、C₄₉H₇₇N₇O₆S 理論値 445.7823)。 10

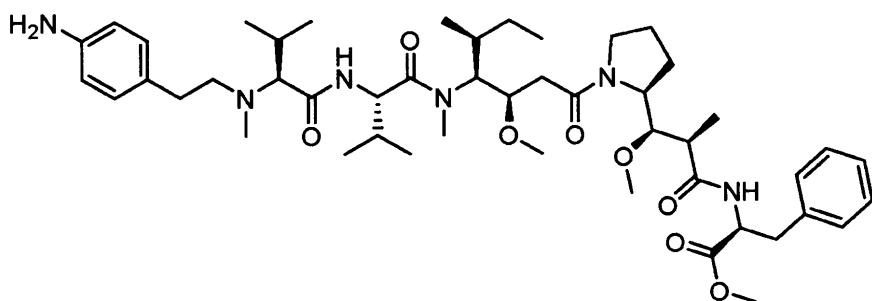
【0495】

化合物 62

((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-アミノフェニル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル) -L-フェニルアラニン酸メチル

【化103】

20



【0496】

30

化合物 62 は、カルボン酸 61A (69 mg、0.21 mmol、1当量)、アミン 3D (135 mg、0.21 mmol、1当量)、DIPEA (75 μl、0.43 mmol、2当量) および DECP (49 μl、0.32 mmol、1.5 当量) を用い、化合物 61 と同様にして製造された。粗生成物をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (DCM / MeOH) により精製し、化合物 62 を帯黄色固体として得た (82 mg、45%)。

【0497】

¹H NMR: (500MHz, DMSO-d₆, ppm): (回転異性体の存在), 8.50 (d, J=8.3, 0.5H, NHCO); 8.27 (d, J=8.0, 0.5H, NHCO), 8.15-8.04 (m, 1H, NHCO), 7.27 - 7.13 (m, 5H), 6.86 - 6.79 (m, 2H), 6.48 - 6.42 (m, 2H), 4.78 (s, 2H, NH₂), 4.74 - 4.44 (m, 3H), 4.01 - 3.72 (m, 1.5H), 3.66 (s, 1.5H, CO₂Me), 3.63 (s, 1.5H, CO₂Me), 3.57 - 0.65 (m, 55.5H)。 40

【0498】

HPLC (X bridge Shield C18、3.5 μm、4.6 × 50 mm; 3.5 mL/min、4.0 - 2.25 minで水 (0.1% TFA) 中 0 から 95% MeCN、次いで、0.5 分間 95% MeCN、Tr = 1.29 min (95.3%、220 nm))。

m/z (Q-TOF ESI⁺) 865.5800 (2%、MH⁺、C₄₈H₇₇N₆O₈ 理論値 865.5797)、433.2937 (100%、(MH₂)²⁺、C₄₈H₇₈N₆O₈ 理論値 433.2935)。

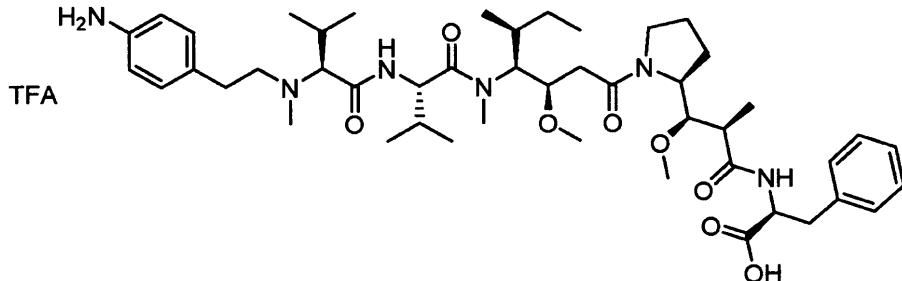
【0499】

50

化合物 6 3

((2 R , 3 R) - 3 - ((S) - 1 - ((3 R , 4 S , 5 S) - 4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - ((4 - アミノフェネチル) (メチル) アミノ) - 3 - メチルブタンアミド) - N , 3 - ジメチルブタンアミド) - 3 - メトキシ - 5 - メチルヘプタノイル) ピロリジン - 2 - イル) - 3 - メトキシ - 2 - メチルプロパノイル) - L - フェニルアラニン 2 , 2 , 2 - トリフルオロ酢酸塩

【化 1 0 4】



10

【 0 5 0 0 】

化合物 6 2 (2 3 m g 、 0 . 0 3 m m o l) を水 (1 m l) とアセトニトリル (1 m l) の混合物に溶かした。ピペリジン (0 . 7 5 m l) を加え、この混合物を室温で 5 時間攪拌した。TLC 分析は、出発材料の完全な消費を示した。溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣を分取 HPLC (SunFire Prep カラム C 1 8 OBD、5 μm、19 × 150 mm ; 移動相 : 0 . 1 % T F A で緩衝させた水 / M e C N ; 1 0 分で 2 0 % から 4 0 % M e C N へ、次いで、2 分で 4 0 % から 1 0 0 % M e C N への勾配 ; 検出器 U V Waters 2545 254 nm および 220 nm) により精製した。化合物 6 3 を白色固体として得た (1 4 m g 、 6 6 %)。

20

【 0 5 0 1 】

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, ppm): (回転異性体の存在), 12.7 (s(br), 1H, CO₂H), 9.58 (m(br), 1H); 9.04 - 8.89 (m, 1H), 8.41 (d, 0.6H, NHCO), 8.15 (d, 0.4H, NHCO), 7.27 - 7.13 (m, 5H), 7.13 - 6.99 (m(br), 2H), 6.90 - 6.64 (s(br), 2H), 4.77 - 3.40 (m, 10H), 3.34 - 2.75 (m, 20H), 2.34 - 1.94 (m, 4H), 1.90 - 0.7 (m, 25H)。

30

【 0 5 0 2 】

HPLC (X b r i d g e S h i e l d C 1 8 , 3 . 5 μm、4 . 6 × 5 0 m m ; 3 . 5 m l / 分、4 0 、2 . 2 5 分で水 (0 . 1 % T F A) 中 0 から 9 5 % M e C N へ、次いで、0 . 5 分間 9 5 % M e C N 、T r = 1 . 2 4 分 (1 0 0 % 、2 2 0 n m) 。 m / z (Q - T O F E S I ⁺) 8 5 1 . 5 6 4 1 (6 % 、 M H ⁺ 、 C₄H₇N₆O₈ 理論値 8 5 1 . 5 6 4 1) 、 4 2 6 . 2 8 5 4 (1 0 0 % 、 (M H₂)²⁺ 、 C₄H₇N₆O₈ 理論値 4 2 6 . 2 8 5 7) 。

【 0 5 0 3 】

実施例 1 5 : 薬物の抗増殖性の活性

40

方法 :

細胞培養 A 5 4 9 (非小細胞肺癌 - A T C C C C L - 1 8 5) 細胞および M D A - M B - 2 3 1 (乳腺癌 - A T C C H T B - 2 6) 細胞をそれぞれ、5 % ウシ胎児血清 (F C S) を含むイーグルの最小必須培地 (M E M) および 1 0 % F C S を含むダルベッコの改変イーグル培地 (D M E M) で培養した。M C F 7 (乳管癌 - A T C C H T B - 2 2) 細胞および S N - 1 2 C (腎臓癌 - A T C C) 細胞は、1 0 % F C S を含有する R P M I 1 6 4 0 培地 (M C F 7 細胞の場合にはフェノールレッド不含) で維持した。総ての培地にファンギゾン (1 . 2 5 μg / m L) およびペニシリソ - ストレプトマイシン (1 0 0 U / 1 0 0 μg / m L) を添加した。細胞を 3 7 °C のインキュベーターにて、5 % C O₂ および 9 5 % 大気湿度の標準条件下で培養した。

50

【0504】

4つの腫瘍細胞株での抗増殖性活性 選択された薬物を、4細胞株の包括的パネルでATPlite増殖アッセイ(Perkin Elmer、Villebon sur Yvette、フランス)を用い、それらの抗増殖性の活性に関して調べた。0日目に、細胞を96ウェルプレートに、細胞が72時間の薬物処理期間に対数細胞増殖期に留まることを保証する濃度で播種した(A549では 10^3 細胞/ウェル、MCF7、MDA-MB-231およびSN12Cでは 2.10^3)。24時間のインキュベーション期間の後、総ての細胞を供試化合物の希釈系で処理した(1%DMSO中10倍溶液 $11\mu L$ -6ウェル/条件)。チップ上への化合物の接着を避けるため、2つの連続する希釈の間でチップを交換した。次に、細胞を37、5%CO₂インキュベーターに入れた。4日目に、細胞の生存率を、生細胞により放出されるATPを定量することにより評価した。生細胞の数を溶媒処理細胞の数と比較して分析した。EC₅₀値は、GraphPadソフトウェア(GraphPad Software Inc., CA, USA)により提供されているアルゴリズムを用いて実行される曲線フィッティング分析(シグモイド用量反応、可変ヒル傾き係数を用いる非線形回帰モデル)で評価した。

【0505】

結果：種々の薬物：

上記の方法に従いMDA-MB-231細胞株でのそれらの抗増殖活性を決定するために種々の薬物を試験した。測定された活性はEC₅₀<0.1μMの値を示した。

【0506】

上記で例示した薬物の中から選択された少數の下記の例は、それらの十分に顕著な抗増殖活性を示す：

実施例12：EC₅₀= 5.80×10^{-10} M；実施例13：EC₅₀= 7.95×10^{-8} M；実施例15：EC₅₀= 1.70×10^{-10} M；実施例27：EC₅₀= 1.20×10^{-10} M。

【0507】

種々の細胞株：

化合物15を、上記の方法に従い種々の細胞株(A549、MDA-MB-231、MCF-7、SN12C)で試験した。測定された活性は、総ての供試細胞株でEC₅₀<0.1μMの値を示した。

【0508】

【表17】

EC ₅₀ (M)	A549	MDA-MB-231	MCF-7	SN12C
化合物15	1.45×10^{-10}	1.70×10^{-10}	7.15×10^{-10}	2.18×10^{-10}

【0509】

比較例：

以下の比較例でフェニル環上での置換(アミノ対カルボキシル)を検討したところ、アミノ置換基を含んでなる本発明による薬物の抗増殖活性の向上が示された。

【0510】

10

20

30

40

【表 1 8】

N°	構造	EC ₅₀ (M)	
		A549	MDA-MB-231
12		1.48x10 ⁻¹⁰	5.80x10 ⁻¹⁰
15		1.45x10 ⁻¹⁰	1.70x10 ⁻¹⁰
比較例 1		3.76x10 ⁻⁹	2.29x10 ⁻⁹
13		2.71x10 ⁻⁸	7.95x10 ⁻⁸
比較例 2		4.03x10 ⁻⁷	9.75x10 ⁻⁷

【0511】

実施例 16：薬物 - リンカー部分の合成化合物 E - 1 1

(4 - ((3R, 4S, 7S, 10S) - 4 - ((S) - sec - プチル) - 7, 10 - ジイソプロピル - 3 - (2 - ((S) - 2 - ((1R, 2R) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - オキソ - 3 - ((S) - 2 - フェニル - 1 - (チアゾール - 2 - イル) エチル) アミノ) プロピル) ピロリジン - 1 - イル) - 2 - オキソエチル) - 5, 11 - ジメチル - 6, 9 - ジオキソ - 2 - オキサ - 5, 8, 11 - トリアザトリデカン - 13 - イル) フェニル) (メチル) カルバミン酸 4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) ヘキサンアミド) - 3 - メチルブタンアミド) - 5 - ウレイドペンタンアミド) ベンジル 2, 2, 2 - トリフルオロ酢酸塩

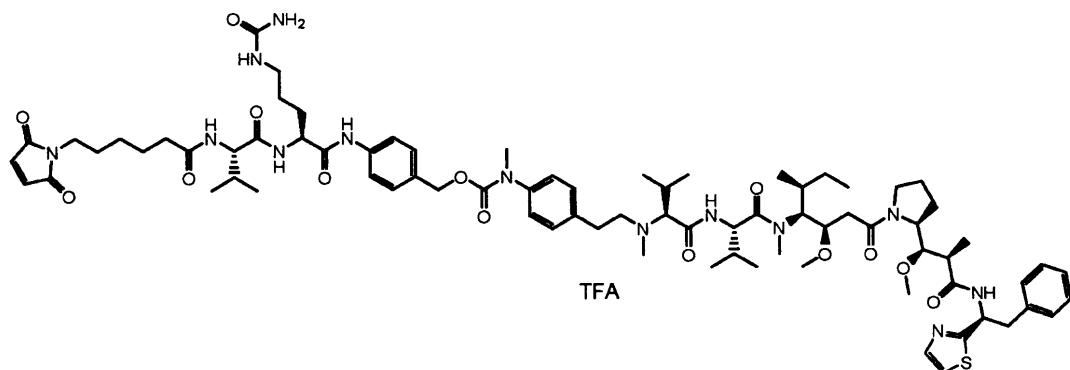
10

20

30

40

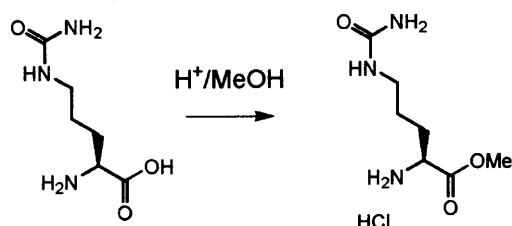
【化105】



【0512】

化合物E-11-1：(S)-2-アミノ-5-ウレイドペンタン酸メチル塩酸塩

【化106】

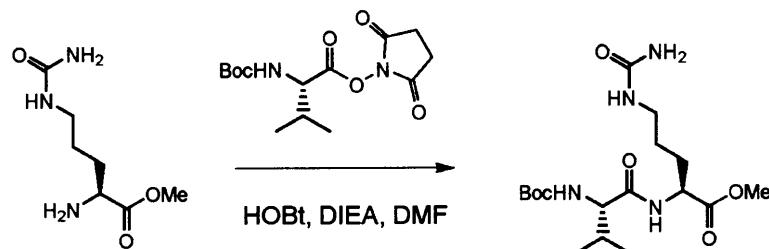


塩化アセチル(10mL)を、0°で攪拌しながらMeOH(120mL)に滴下した。20分後、L-シトルリン(10g、57mmol、1.00当量)を加え、この混合物を一晩還流下で加熱した。溶媒を減圧下で蒸発させ、15g(116%)の化合物E-11-1を白色固体として得た。この生成物をそれ以上乾燥させずに次の工程で使用した。

【0513】

化合物E-11-2：(S)-2-((S)-2-((tert-ブトキカルボニル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタン酸メチル

【化107】



化合物E-11-1(13g、57.6mmol、1.1当量)を0°で不活性雰囲気下、DMF(140mL)に溶かした。DIPEA(30mL、173mmol、3.0当量)、ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt-10.59g、69.1mmol、1.2当量)およびBoc-L-バリンヒドロキシスクシンイミドエステル(Boc-Val-Osu-18.1g、57.6mmol、1.0当量)を加えた。この反応混合物を周囲温度で一晩振盪した後、溶媒を減圧下で蒸発させた。残渣を水(100mL)に溶かしDCM(150mL)で2回抽出した。有機相を合わせ、Na₂SO₄で乾燥させ、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲル(DCM/MeOH)で精製し、18.8g(84%)の化合物E-11-2を白色固体として得た。

【0514】

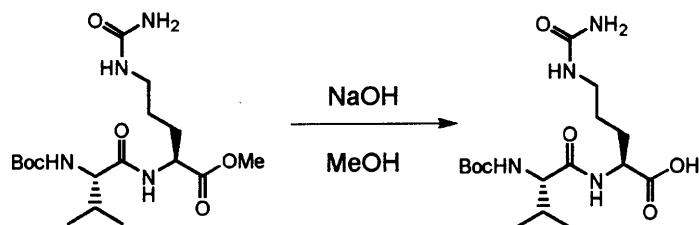
10

30

40

50

化合物 E - 11 - 3 : (S) - 2 - ((S) - 2 - ((t e r t - プトキシカルボニル) アミノ) - 3 - メチルブantanアミド) - 5 - ウレイドペンタン酸
【化 108】



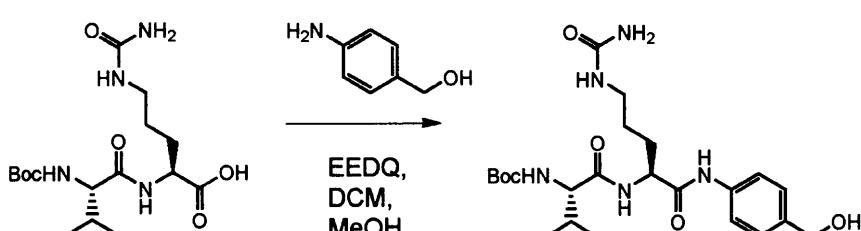
10

化合物 E - 11 - 2 (18 . 8 g、48 . 4 mmol、1 当量) を 0 °C で MeOH (200 mL) に溶かした。NaOH 1 M 溶液 (72 mL、72 mmol、1 . 5 当量) を加え、この混合物を室温で 2 時間攪拌した。MeOH を減圧下で除去し、残った水溶液を HCl 1 M で酸性化した。水相を蒸発乾固させ、残渣をシリカゲル (DCM / MeOH) で精製し、18 g (99 %) の化合物 E - 11 - 3 を白色固体として得た。

【0515】

化合物 E - 11 - 4 : ((S) - 1 - (((S) - 1 - ((4 - (ヒドロキシメチル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソ - 5 - ウレイドペンタン - 2 - イル) アミノ) - 3 - メチル - 1 - オキソブantan - 2 - イル) カルバミン酸 t e r t - ブチル
【化 109】

20



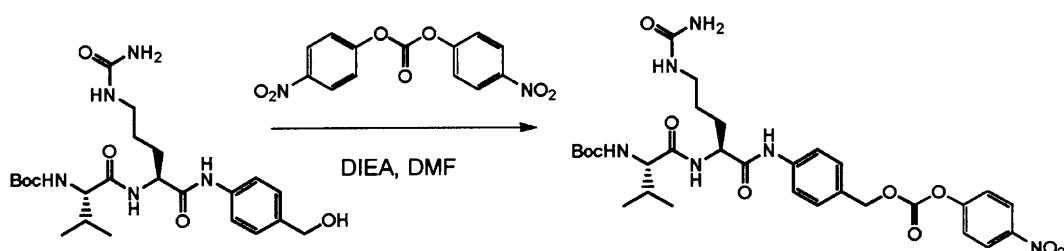
化合物 E - 11 - 3 (5 g、13 . 4 mmol、1 当量) を乾燥 DCM (65 mL) と乾燥 MeOH (35 mL) の混合物に溶かした。(4 - アミノフェニル) メタノール (1 . 81 g、14 . 7 mmol、1 . 1 当量) および N - エトキシカルボニル - 2 - エトキシ - 1 , 2 - ジヒドロキノリン (EEDQ - 6 . 60 g、26 . 7 mmol、2 当量) を加え、この混合物を暗所で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣をシリカゲル (DCM / MeOH) で精製し、5 . 2 g (73 %) の化合物 E - 11 - 4 を灰白色固体として得た。

30

【0516】

化合物 E - 11 - 5 : ((S) - 3 - メチル - 1 - (((S) - 1 - ((4 - (((4 - ニトロフェノキシ) カルボニル) オキシ) メチル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソ - 5 - ウレイドペンタン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソブantan - 2 - イル) カルバミン酸 t e r t - ブチル
【化 110】

40



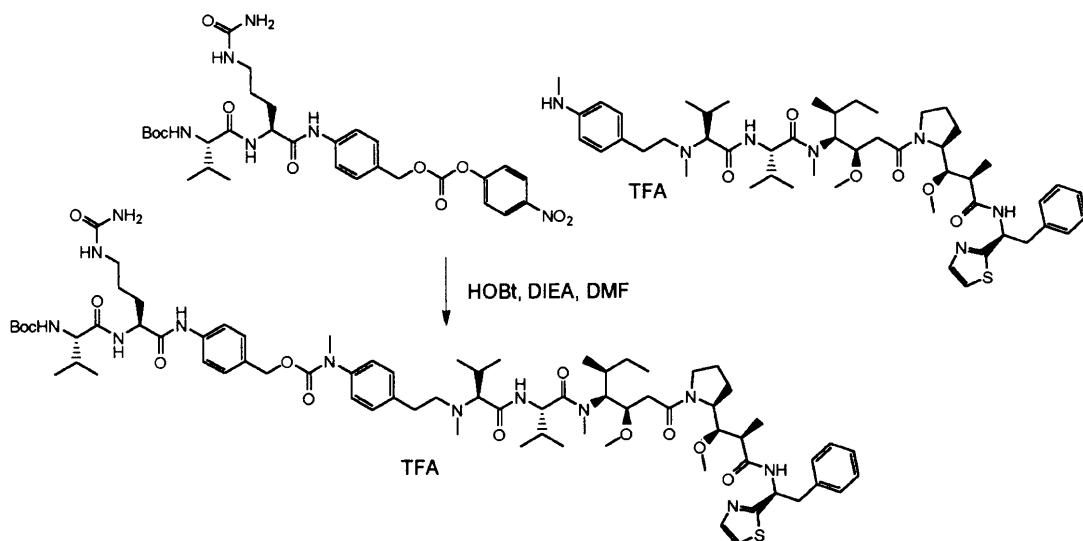
50

化合物E-11-4(1.1g、2.29mmol、1当量)を不活性雰囲気下、周囲温度で乾燥DMF(5ml)に溶かした。炭酸ビス(4-ニトロフェニル)(1.40g、4.59mmol、2当量)、次いで、DIEA(600μl、3.44mmol、1.5当量)を加え、得られた黄色溶液を一晩攪拌した。DMFを減圧下で蒸発させ、残渣をシリカゲル(DCM/MeOH)で精製し、1.27g(84%)の化合物E-11-5を灰白色固体として得た。

【0517】

化合物E-11-6 : (4-((3R,4S,7S,10S)-4-((S)-sec-ブチル)-7,10-ジイソプロピル-3-(2-((S)-2-((1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-(((S)-2-フェニル-1-(チアゾール-2-イル)エチル)アミノ)プロピル)ピロリジン-1-イル)-2-オキソエチル)-5,11-ジメチル-6,9-ジオキソ-2-オキサ-5,8,11-トリアザトリデカン-13-イル)フェニル)(メチル)カルバミン酸4-((S)-2-((S)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ベンジル2,2,2-トリフルオロ酢酸塩

【化111】

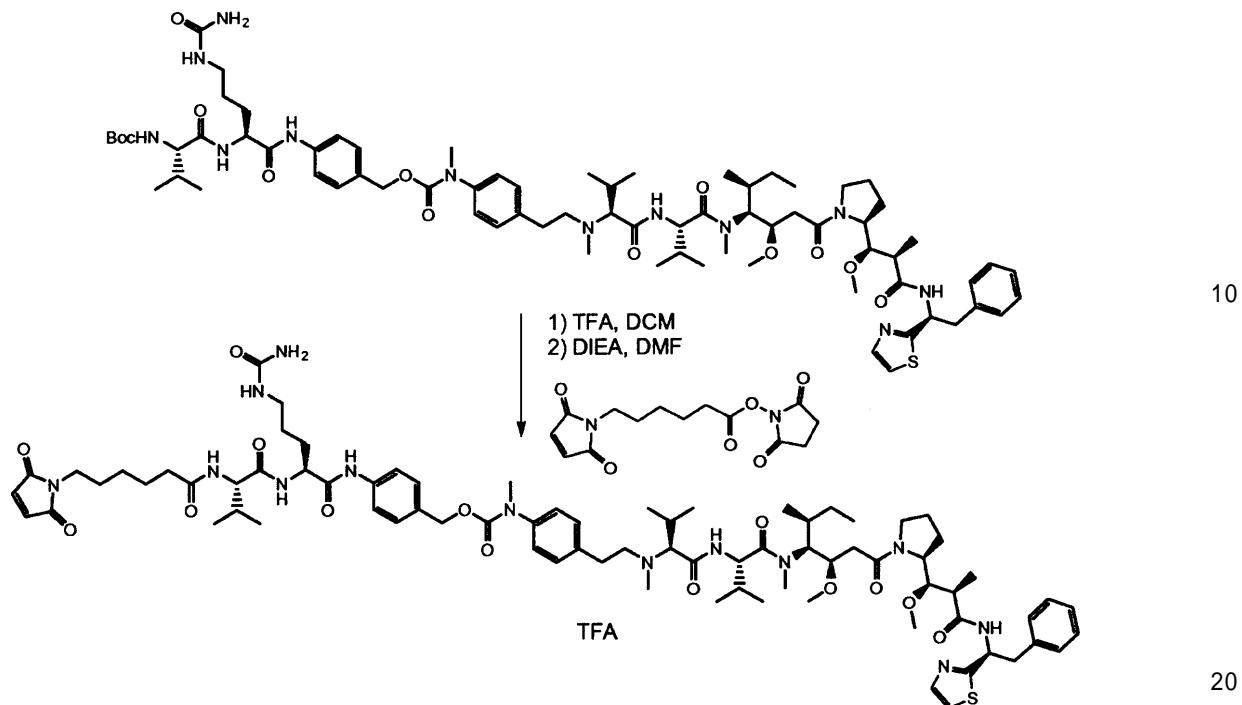


カーボネートE-11-5(114mg、0.177mmol、1.2当量)およびアニリン11F(150mg、0.147mmol、1当量)を乾燥DMF(4mL)に溶かした。HOBr(38mg、0.295mmol、2当量)およびDIEA(54μL、0.295mmol、2当量)を加え、この混合物を週末にわたって室温で攪拌した。DMFを減圧下で蒸発させ、残渣を、DCMで溶出するシリカでのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。生成物を分取HPLC(Waters 600E、Sunfire Prep C18 OBDカラム、5μm、19×100mm；溶出相：0.1%TFAで緩衝させた水/MeCN；15分で5%から100%MeCNへの勾配；Waters 2487 UV検出器 220nm)により再精製した。選択された画分を合わせ、凍結乾燥させ、化合物E-11-6を白色固体として得た(89mg、39%)。

【0518】

化合物E-11 :

【化 1 1 2】



化合物 E - 11 - 6 (21 mg、0.014 mmol、1.0 当量) を D C M (0.25 mL) に溶かし、T F A (40 μ L) を加えた。この溶液を室温で 2 時間攪拌し、その後、L C - M S 分析は出発材料の完全な消費を示した。この混合物を軽く冷却 (液体窒素浴) すると同時に D M F (0.5 mL) 、次いで、T F A を中和するための D I E A (100 μ L) を加えた。その後、冷却浴を外し、6 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサン酸 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル (4 mg、0.012 mmol、1 当量) を加えた。この混合物を室温で 48 時間攪拌し、生成物を分取 H P L C (Waters 600E、SunFire Prep C18 OBD カラム、5 μ m、19 × 100 mm ; 溶出相 : 0.1% T F A で緩衝させた水 / M e C N ; 15 分で 5 % から 100 % M e C N への勾配 ; Waters 2487 UV 検出器 220 nm) により精製した。選択した画分を合わせ、凍結乾燥させ、化合物 E - 11 を白色固体として得た (11 mg、54 %)。

【0519】

m/z (Q - T O F M S E S I +) 1524.8282 (2 %、M N a⁺、C₇H₁₁N₁O₁S 理論値 1524.8299) 、751.9283 (100 %、(M H₂)²⁺、C₇H₁₁N₁O₁S 理論値 751.9276) 。

【0520】

化合物 E - 12

((2 R , 3 R) - 3 - ((S) - 1 - ((3 R , 4 S , 5 S) - 4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - ((4 - (((4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (6 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサンアミド) - 3 - メチルブタノアミド) - 5 - ウレイドベンタノアミド) ベンジル) オキシ) カルボニル) (メチル) アミノ) フェネチル) (メチル) アミノ) - 3 - メチルブタノアミド) - N , 3 - ジメチルブタノアミド) - 3 - メトキシ - 5 - メチルヘプタノイル) ピロリジン - 2 - イル) - 3 - メトキシ - 2 - メチルプロパノイル) - L - フェニルアラニン酸メチル 2 , 2 , 2 - トリフルオロ酢酸塩

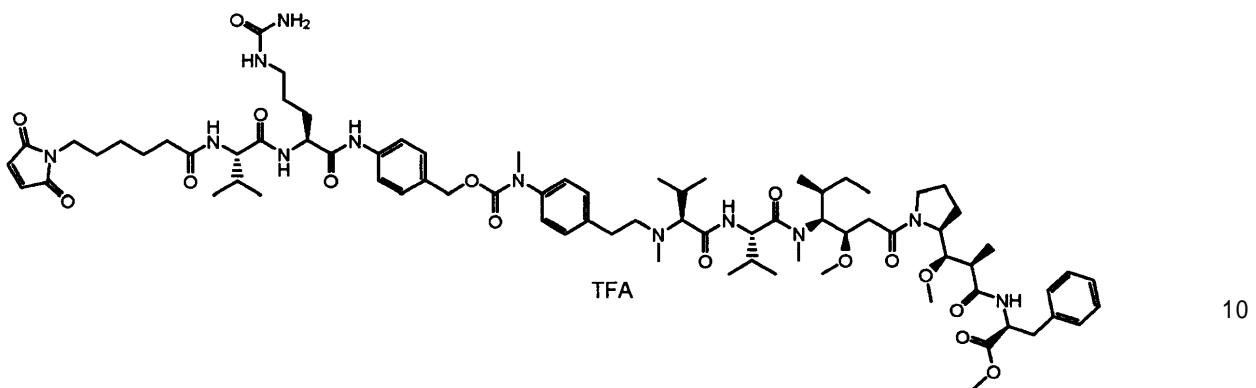
30

40

50

40

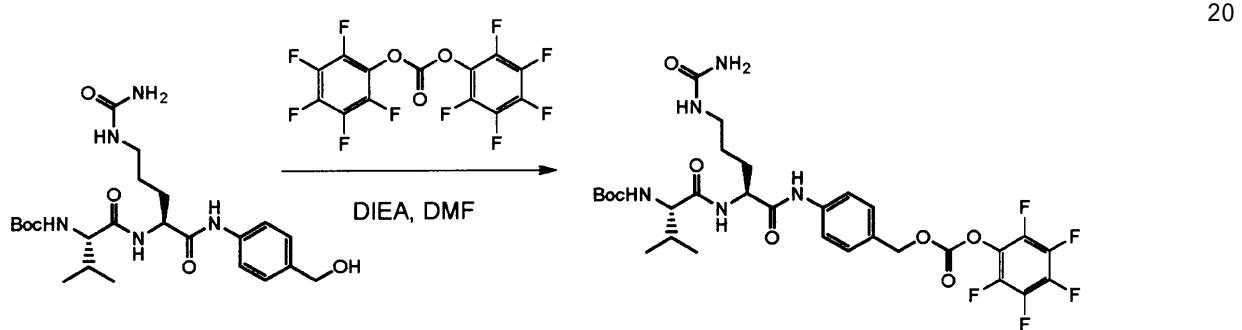
【化113】



【0521】

化合物E-12-1：((S)-3-メチル-1-オキソ-1-((S)-1-オキソ-1-(4-(((ペルフルオロフェノキシ)カルボニル)オキシ)メチル)フェニル)アミノ)-5-ウレイドペンタン-2-イル)アミノ)ブタン-2-イル)カルバミン酸tert-ブチル

【化114】



化合物E-11-4 (670 mg、1.26 mmol、1当量)を0℃で不活性雰囲気下、乾燥DMF (6 ml)に溶かした。炭酸ビス(ペルフルオロフェニル) (991 mg、2.51 mmol、2当量)、次いで、DIEA (329 μl、1.89 mmol、1.5当量)を加え、得られた無色の溶液を室温で30分間攪拌した。DMFを減圧下で蒸発させ、残渣をシリカゲル (DCM / MeOH) で精製し、836 mg (96%) の化合物E-12-1を灰白色固体として得た。

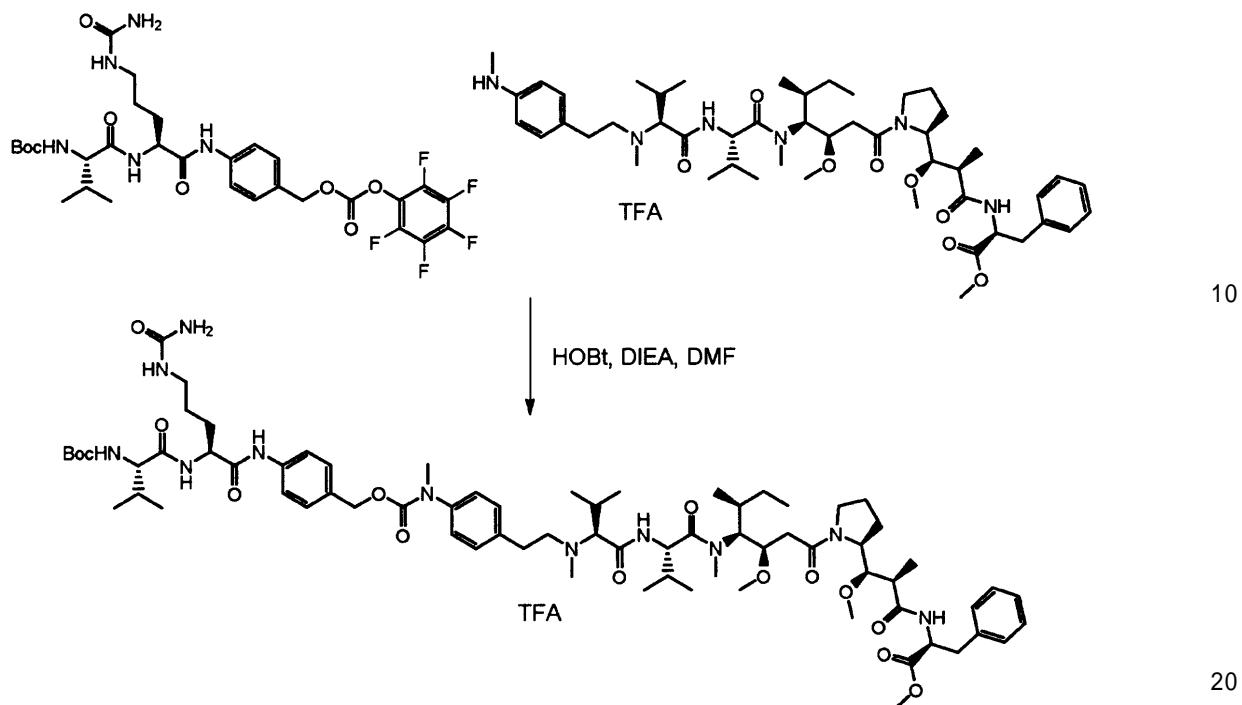
【0522】

化合物E-12-2：((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-3-メチルブタノアミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタノアミド)-N₂，3-ジメチルブタノアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン酸メチル 2,2,2-トリフルオロ酢酸塩

30

40

【化115】

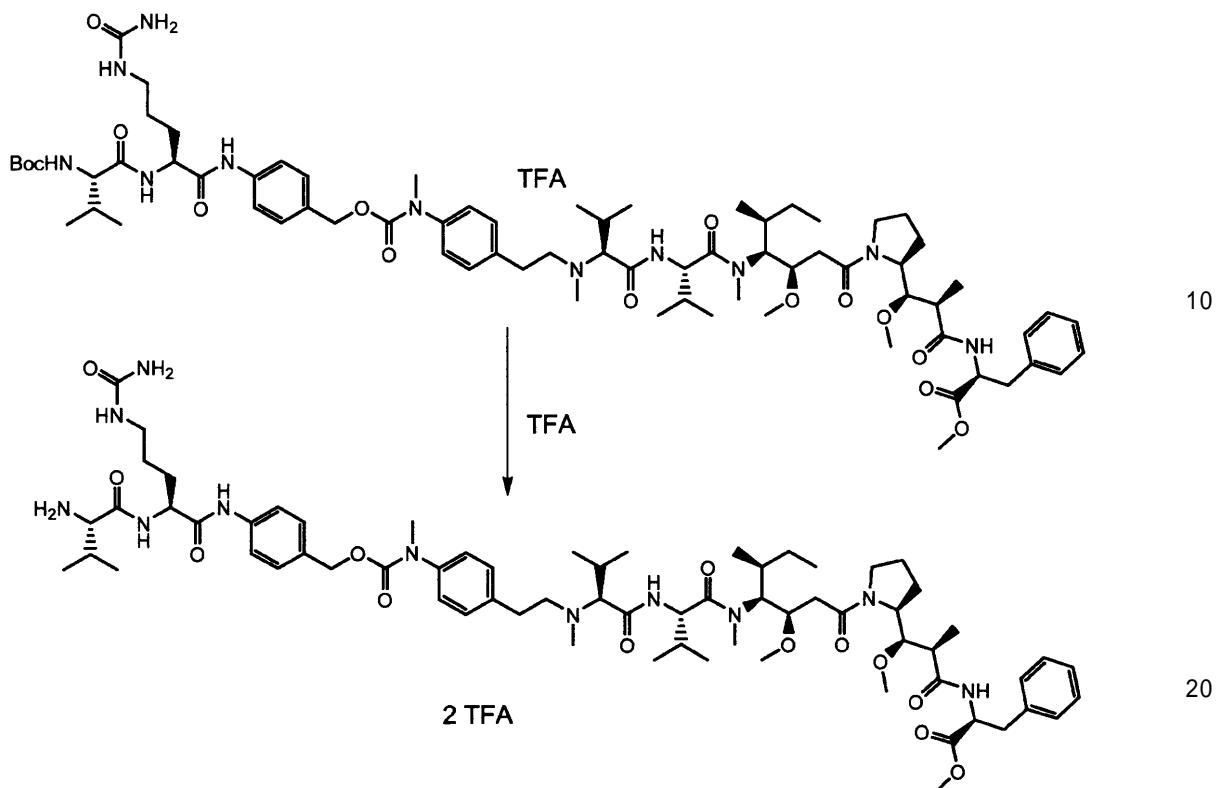


アニリン 12 (165 mg、0.189 mmol、1.0当量)を0で不活性雰囲気下、DMF (5 mL)に溶かした。カーボネートE-12-1 (194 mg、0.282 mmol、1.5当量)、HOEt (51 mg、0.375 mmol、2当量)およびDIEA (66 μL、0.375 mmol、2当量)を加え、この混合物を室温で8時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣を分取HPLC (Waters 600E、SunFire Prep C18 OBDカラム、5 μm、19 × 100 mm；溶出相：0.1%TFAで緩衝させた水/MeCN；15分で5%から100%MeCNへの勾配；Waters 2487 UV検出器 220 nm)により精製した。選択した画分を合わせ、凍結乾燥させ、化合物E-12-7を白色固体として得た (247 mg、77%)。

【0523】

化合物E-12-3：((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-(((4-((S)-2-((S)-2-アミノ-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ペニジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン酸メチル ビス(2,2,2-トリフルオロ酢酸塩)

【化116】

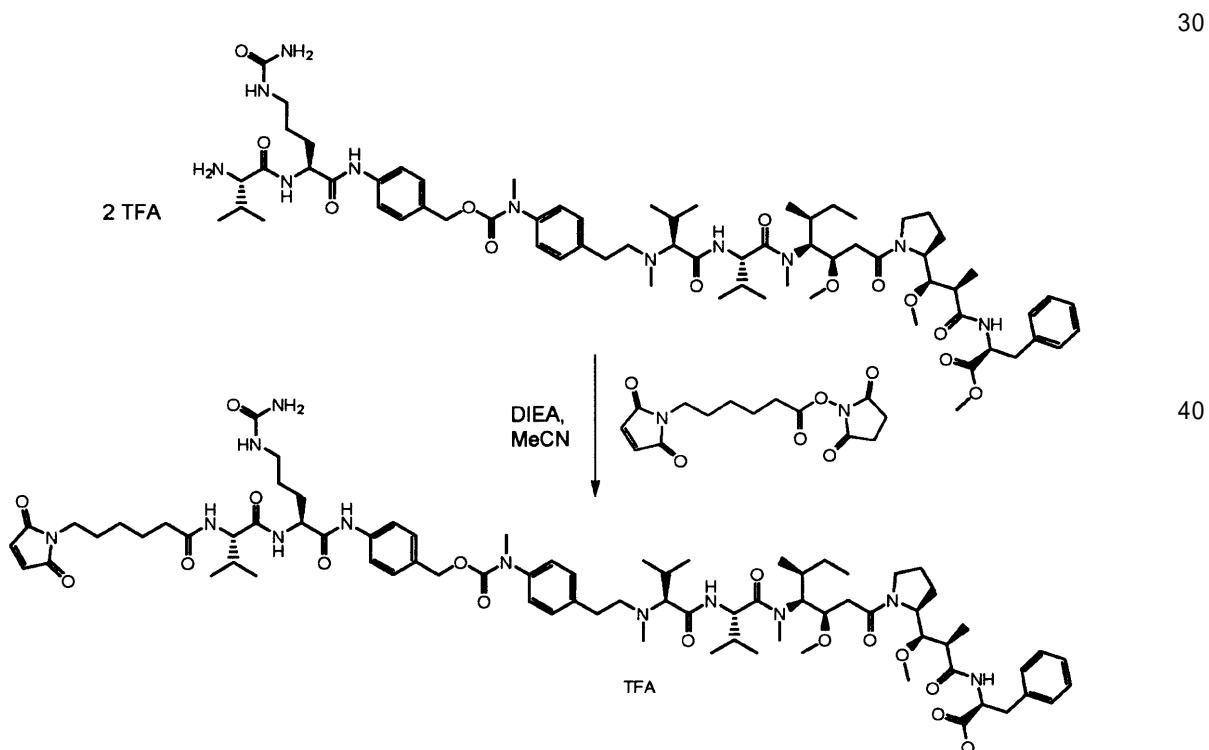


化合物E-12-2(5.6mg、4.04μmol、1.0当量)をTFA(100μL)に溶かした。5分後、2mLの水を加え、この混合物を一晩凍結乾燥させ、化合物E-12-3を灰白色固体として得た(5.6mg、98%)。

【0524】

化合物E-12:

【化117】



化合物E-12-3(5.6mg、4μmol、1.0当量)をアセトニトリル(0.5mL)に溶かし、DIEA(5μL、7当量)、次いで、6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イル(2.5mg、8μmol、2当量)を加えた。この混合物を室温で6時間攪拌した。LC-MSにより反応を管理した後、200μlの水を加え、得られた溶液を分取HPLC(Waters 600E、SunFire Prep C18 OBDカラム、5μm、19×100mm；溶出相：0.1%TFAで緩衝させた水/MeCN；15分で5%から100%MeCNへの勾配；Waters 2487 UV検出器220nm)により精製した。選択した画分を合わせ、凍結乾燥させ、化合物E-12を白色固体として得た(4.6mg、70%)。

10

【0525】

m/z(Q-TOF MS ESI+) 739.4389(100%、(MH₂)²⁺、C₇₈H₁₁₈N₁₂O₁₆理論値739.4389)。

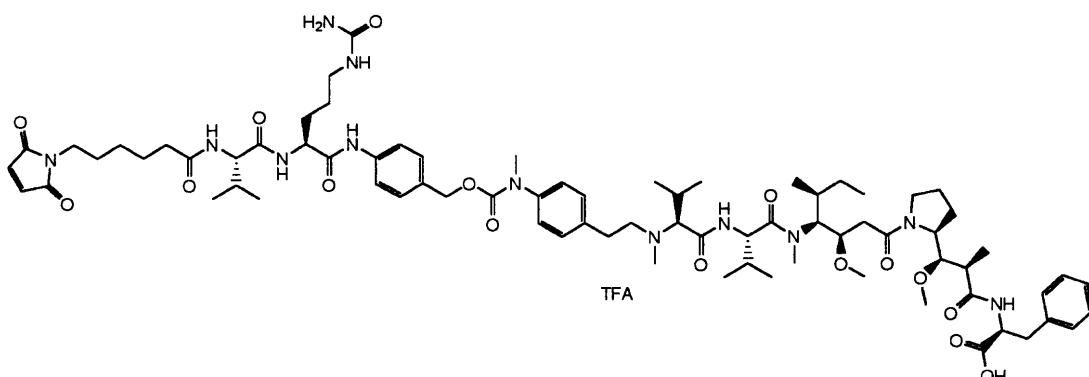
【0526】

化合物E-13

((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-((6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペントンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン 2,2,2-トリフルオロ酢酸塩

20

【化118】



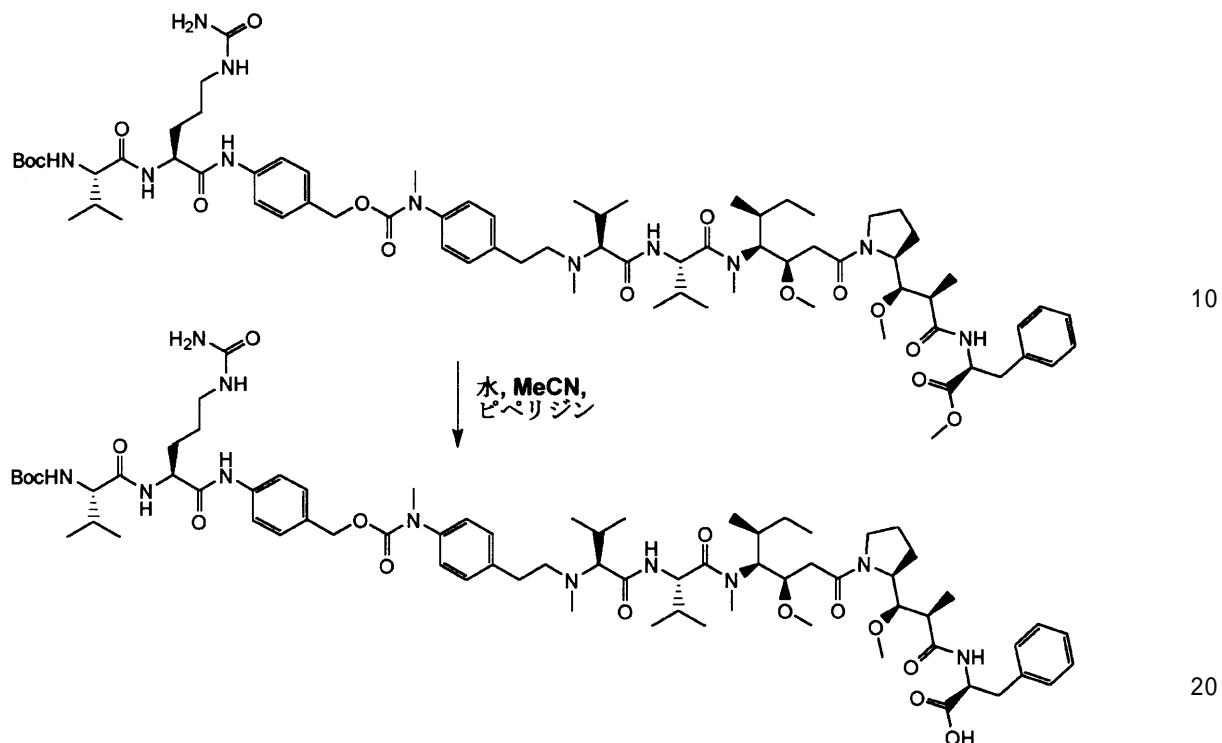
30

【0527】

化合物E-13-1 : ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペントンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン

40

【化119】

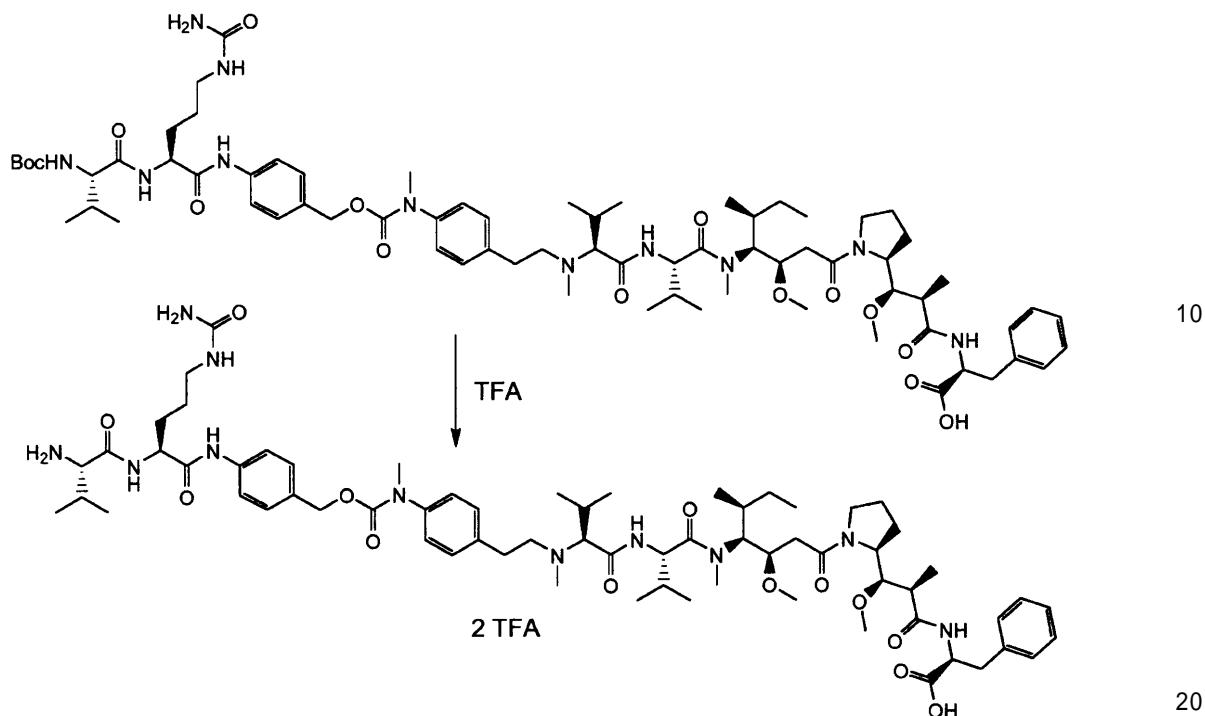


化合物E-12-2 (185mg、0.123mmol、1.0当量)を室温で水(5mL)とアセトニトリル(5mL)の混合物に溶かした。ピペリジン(3.67mL、300当量)を加え、この混合物を室温で6時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発乾固させ、残渣をEt₂O(60mL)で摩碎した。この固体をEt₂O(20mL)で2回すすぎ、真空下で乾燥させ、化合物E-13-1を灰白色固体として得た(175mg、95%)。

【0528】

化合物E-13-2 : ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-(((4-((S)-2-((S)-2-アミノ-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ビロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルブロパノイル)-L-フェニルアラニン ビス(2,2,2-トリフルオロ酢酸塩)

【化120】



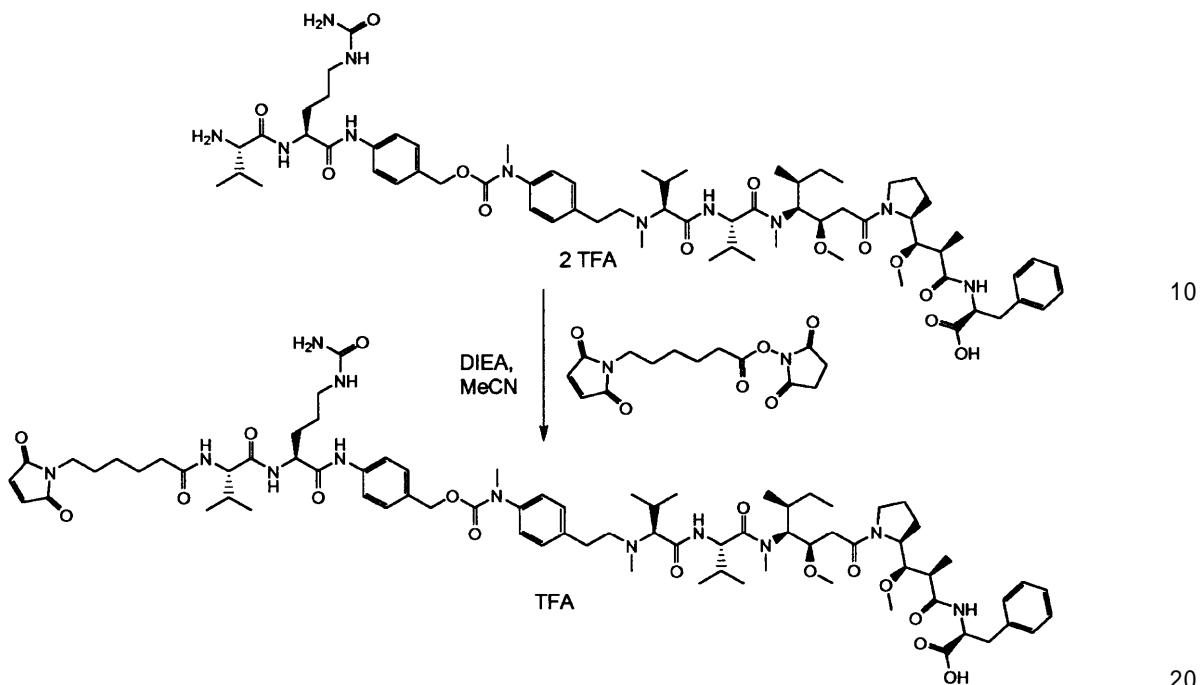
化合物E-13-1(175mg、0.128mmol、1.0当量)をTFA(200μL)に溶かした。5分後、水(1mL)およびアセトニトリル(1mL)を加え、この溶液を一晩凍結乾燥させ、化合物E-13-2を灰白色固体として得た(180mg、87%)。

【0529】

化合物E-13 : ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-(((4-((S)-2-((2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン、2,2,2-トリフルオロ酢酸塩

30

【化121】



化合物E-13-2(80mg、0.058mmol、1.0当量)をアセトニトリル(1.5mL)とDMF(0.4mL)の混合物に溶かした。DIEA(50μL、0.289mmol、5当量)、次いで、6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イル(36mg、0.116mmol、2当量)を加えた。この混合物を室温で3時間攪拌した。LC-MSにより反応を管理した後、溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣を分取HPLC(Waters 600E、SunFire Prep C18 OBDカラム、5μm、19×100mm；溶出相：0.1%TFAで緩衝させた水/MeCN；15分で5%から100%MeCNへの勾配；Waters 2487 UV検出器220nm)により精製した。選択した画分を合わせ、凍結乾燥させ、化合物E-13を白色固体として得た(32mg、35%)。

【0530】

m/z (Q-TOF MS ESI-) 1461.8336(100%、 $(M-H)^-$ 、 $C_{77}H_{113}N_{12}O_{16}$ 理論値 1461.8403)。 m/z (Q-TOF MS ESI+) 1463.8565(2%、 MH^+ 、 $C_{77}H_{115}N_{12}O_{16}$ 理論値 1463.8549)、732.4317(100%、 $(MH_2)^{2+}$ 、 $C_{77}H_{116}N_{12}O_{16}$ 理論値 732.4311)。

【0531】

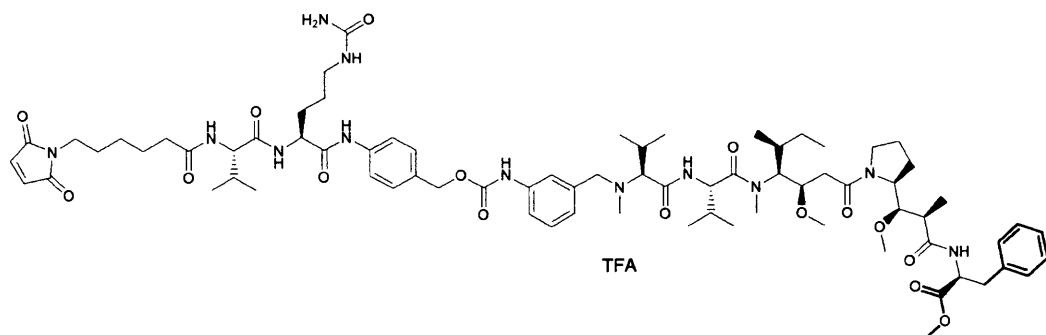
化合物E-15

((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((3-((4-((S)-2-((S)-2-((2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドベンタンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)ベンジル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン酸メチル 2,2,2-トリフルオロ酢酸塩

30

40

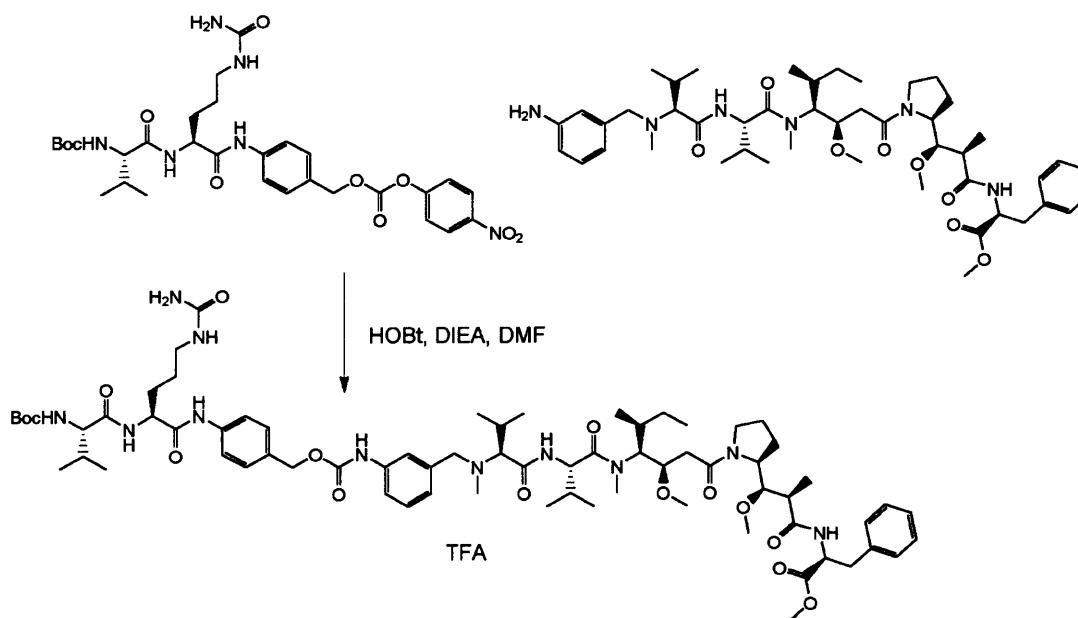
【化122】



【0532】

化合物E-15-1：((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-(((4-(((S)-2-((S)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)ベンジル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン酸メチル 2,2,2-トリフルオロ酢酸塩

【化123】



化合物E-15-1は、DMF(2mL)中、カーボネートE-11-5(28mg、0.044mmol、1当量)、アニリン15(42mg、0.044mmol、1当量)、HOEt(3mg、0.022mmol、0.5当量)、およびDIEA(15μL、0.087mmol、2当量)を用い、化合物E-11-6と同じ方法に従って製造された。化合物E-15-1を白色固体として単離した(8.2mg、13%)。

【0533】

化合物E-15-2：((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-(((4-(((S)-2-((S)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)ベンジル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)ビス(2,2,2-トリフルオロ酢酸塩)

10

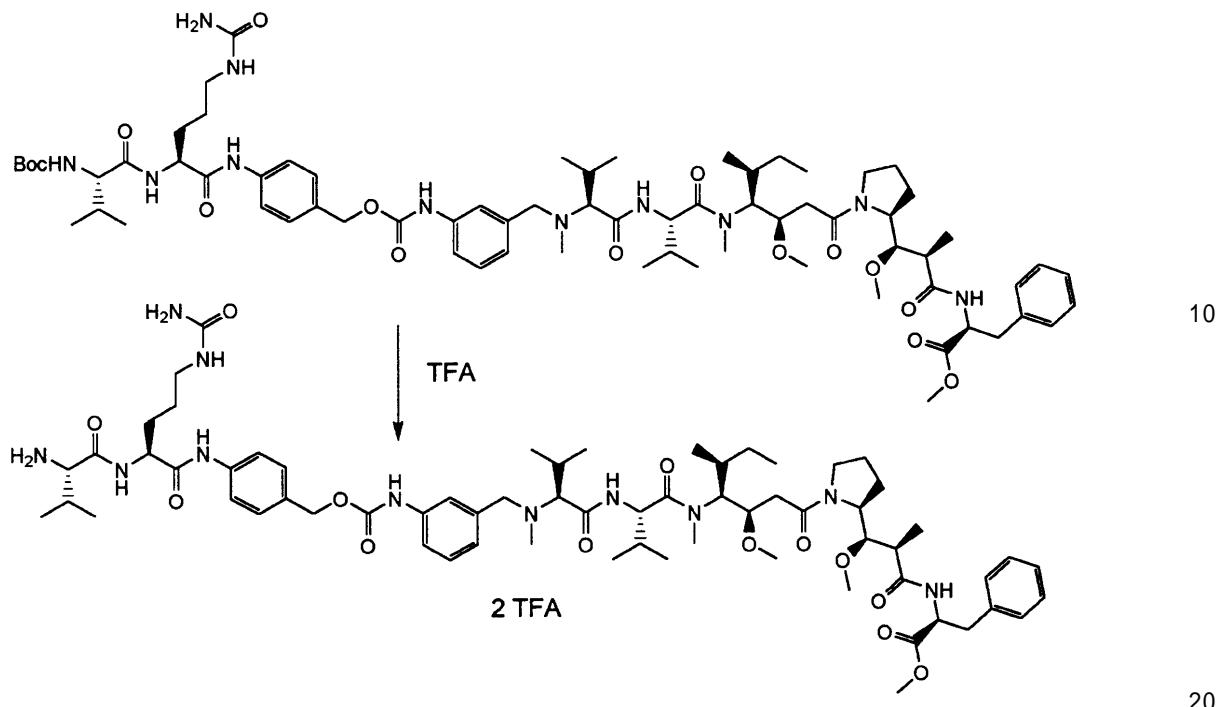
20

30

40

50

【化124】

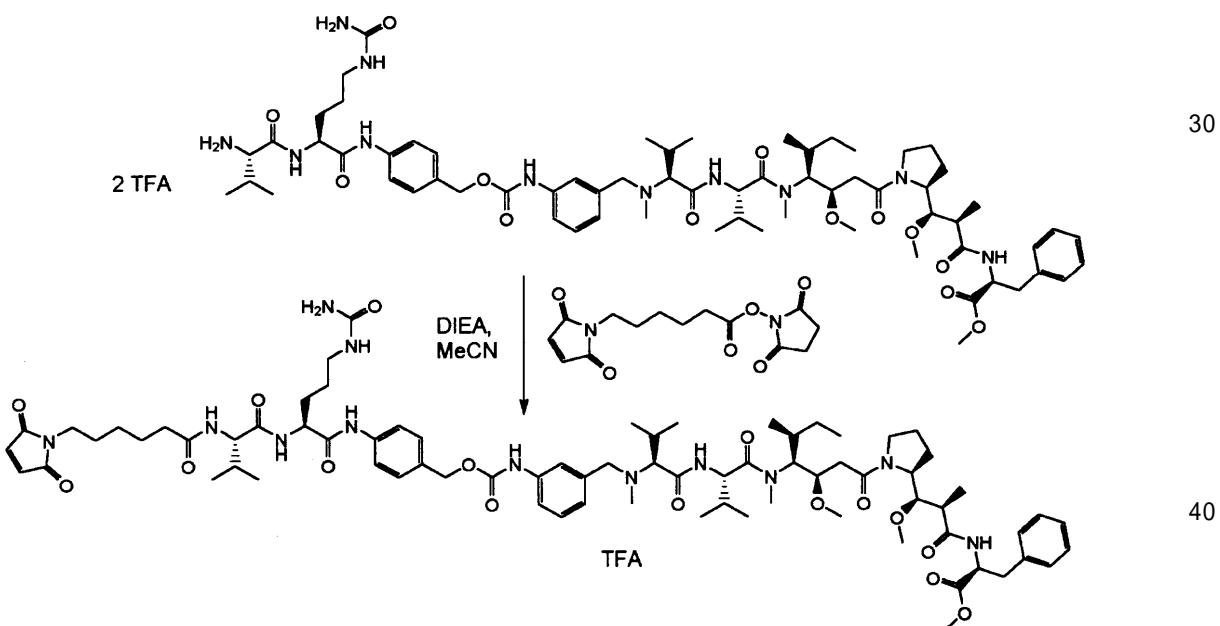


化合物E-15-1(8.2mg、5.58μmol、1.0当量)をTFA(200μL)に溶かした。5分後、水(1mL)を加え、この溶液を一晩凍結乾燥させ、化合物E-15-8を白色固体として得た(7.6mg、99%)。

【0534】

化合物E-15:

【化125】



化合物E-15は、アセトニトリル(0.5mL)中、アミンE-15-2(7.6mg、5.55μmol、1当量)、6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イル(2mg、6.65μmol、1.2当量)およびDIEA(5μL、0.028mmol、5当量)を用い、化合物E-12と同じ方法に従って製造された。化合物E-15を白色固体として単離した(4.2mg、48%)。

【0535】

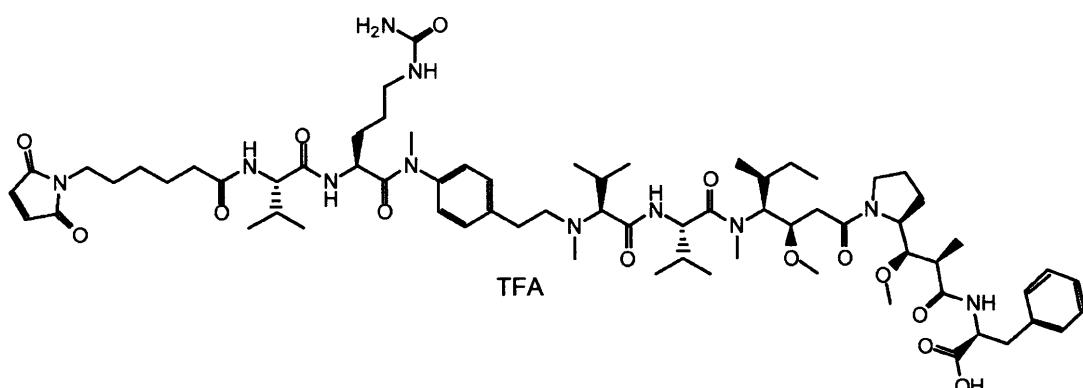
m/z (Q-TOF MS ESI+) 1471.8169 (2%、MNa⁺、C₇H₁₁N₁O₁NaO₁ 理論値 1471.8211)、725.4223 (100%、(MH₂)²⁺、C₇H₁₁N₁O₁ 理論値 725.4232)、483.9482 (10%、(MH₃)³⁺、C₇H₁₁N₁O₁ 理論値 483.9513)。

【0536】

化合物F-13

((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-((6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)-3-メチルブタンアミド)-N-メチル-5-ウレイドペンタノニアミド)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン 2,2,2-トリフルオロ酢酸酸

【化126】



10

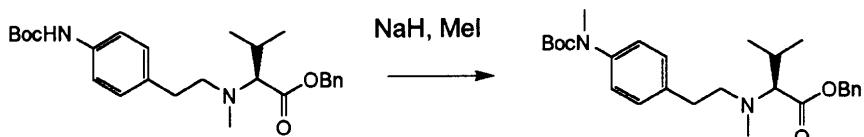
20

【0537】

化合物F-13-1 : N - (4 - ((tert-ブトキカルボニル)(メチル)アミノ)フェネチル) - N - メチル - L - バリン酸ベンジル

30

【化127】



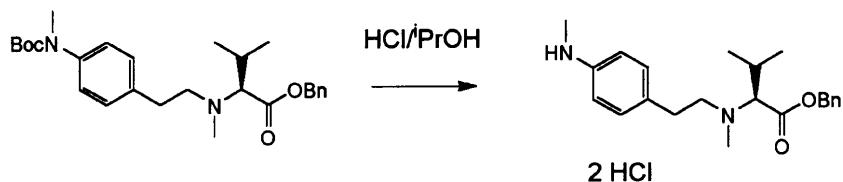
化合物11C (250mg、0.567mmol、1当量)をTHF (10ml)に溶かした後、NaH (鉛油中60%懸濁液、68mg、1.702mmol、3当量)を加えた。この混合物を5分間攪拌した後、ヨードメタン (106μL、1.702mmol、3当量)を加えた。この反応物を室温で2時間攪拌した後、水で急冷し、EtOAc (100mL)と水 (50mL)とで分離した。有機相をMgSO₄で乾燥させ、蒸発乾固させ、化合物F-13-1を黄色油状物として得 (250mg、97%)、これをそれ以上精製せずに用いた。

40

【0538】

化合物F-13-2 : N - メチル - N - (4 - (メチルアミノ)フェネチル) - L - バリン酸ベンジル

【化128】

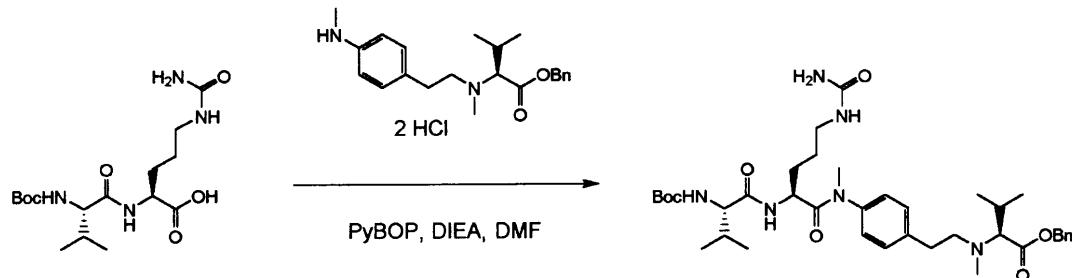


Boc保護アニリンF-13-1(250mg、0.550mmol、1当量)をMeOH(5mL)に溶かした後、ⁱPrOH中HClの市販溶液(5~6M)1mLを加えた。この溶液を室温で2時間攪拌した後、減圧下で蒸発乾固させた。得られた黄色油状物をEt₂Oで摩碎し、化合物F-13-2を黄色固体として得た(202mg、94%)。

【0539】

化合物F-13-3: N-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N-メチル-5-ウレイドペンタンアミド)フェネチル)-N-メチル-L-バリン酸ベンジル

【化129】

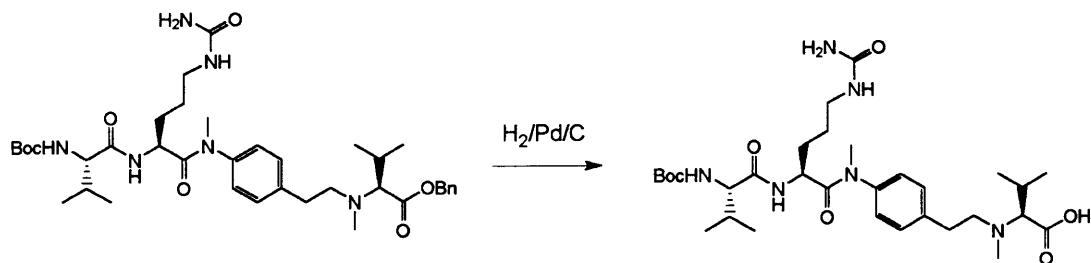


酸E-11-3(190mg、0.508mmol、1.5当量)を乾燥DMF(1mL)に溶かした後、DIEA(118μL、0.677mmol、2当量)、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロスulfate(PyBOP-264mg、0.508mmol、1.5当量)およびアニリンF-13-2(120mg、0.339mmol、1当量)を加えた。この混合物を室温で一晩攪拌し、溶媒を減圧下で蒸発させた。残渣を分取HPLC(Waters 600E、SunFire Prep C18 OBDカラム、5μm、19×100mm；溶出相：0.1%TFAで緩衝させた水/MeCN；15分で5%から100%MeCNへの勾配；Waters 2487 UV検出器220nm)により精製した。選択した画分を合わせ、凍結乾燥させ、化合物F-13-3を白色固体として得た(140mg、45%)。

【0540】

化合物F-13-4: N-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N-メチル-5-ウレイドペンタンアミド)フェネチル)-N-メチル-L-バリン

【化130】



10

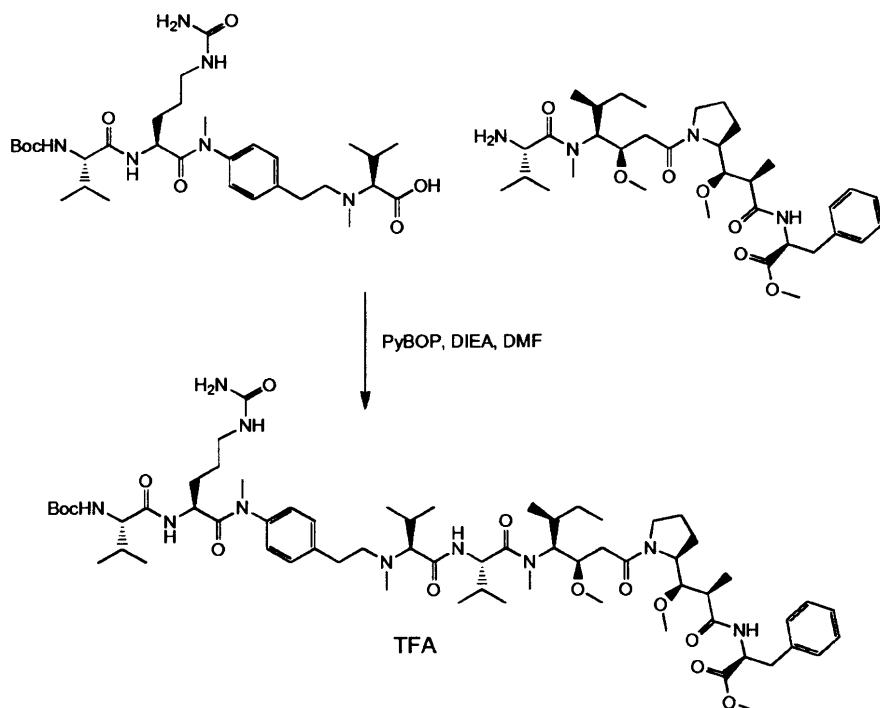
化合物F-13-3(116mg、0.163mmol、1当量)をPd/C10%(30mg)の存在下でMeOH(5ml)に溶かし、周囲温度および大気圧下で2時間水素化した。この反応媒体を濾過し、減圧下で濃縮し、110mg(99%)の化合物F-13-4をベージュの固体として得た。

【0541】

化合物F-13-5: ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N-メチル-5-ウレイドペンタンアミド)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン酸メチル2,2,2-トリフルオロ酢酸塩

20

【化131】



30

40

アミン3D(89mg、0.140mmol、1当量)および酸F-13-4(145mg、0.210mmol、1.5当量)を乾燥DMF(4mL)に溶かし、PyBOP(109mg、0.210mmol、1.5当量)およびDIPEA(73μL、0.420mmol、3当量)を加えた。この混合物を室温で1時間攪拌し、溶媒を蒸発させた。残渣をEtOAcと水とで分離し、有機相をMgSO4で乾燥させ、濾過し、減圧下で蒸発させた。粗生成物を分取HPLC(Waters 600E, SunFire Pre

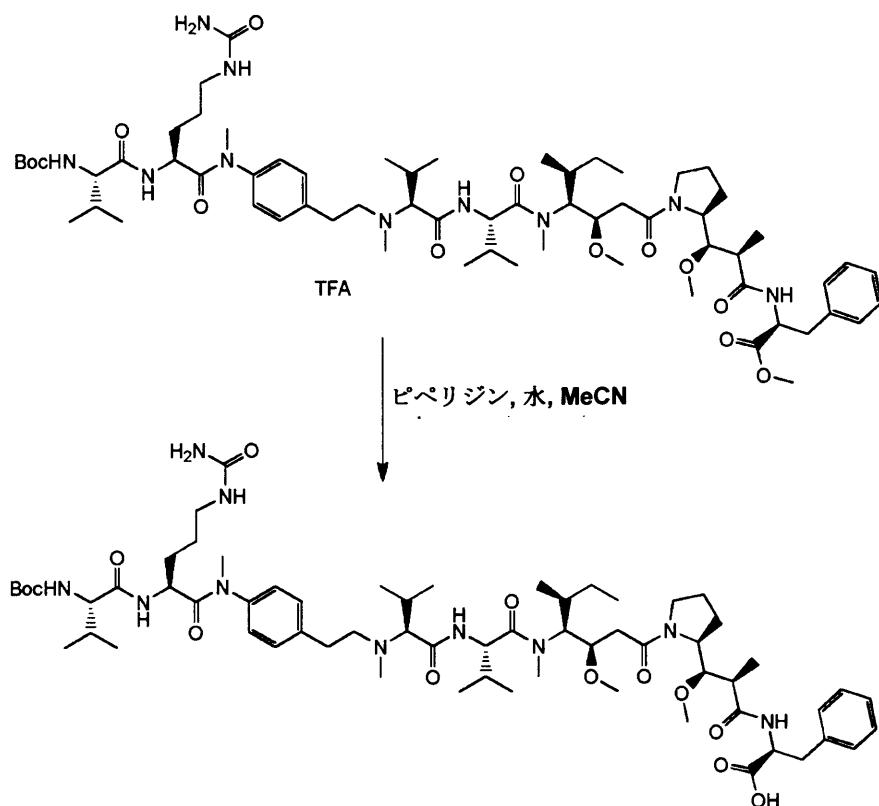
50

p C 18 OBDカラム、 $5 \mu\text{m}$ 、 $19 \times 100 \text{ mm}$ ；溶出相：0.1%TFAで緩衝させた水 / MeCN；15分で5%から100%MeCNへの勾配；Waters 2487 UV検出器 220 nm)により精製した。選択した画分を合わせ、凍結乾燥させ、化合物F-13-5を白色固体として得た(140 mg、73%)。

【0542】

化合物F-13-6：((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N-メチル-5-ウレイドペンタンアミド)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン 2,2,2-トリフルオロ酢酸塩

【化132】

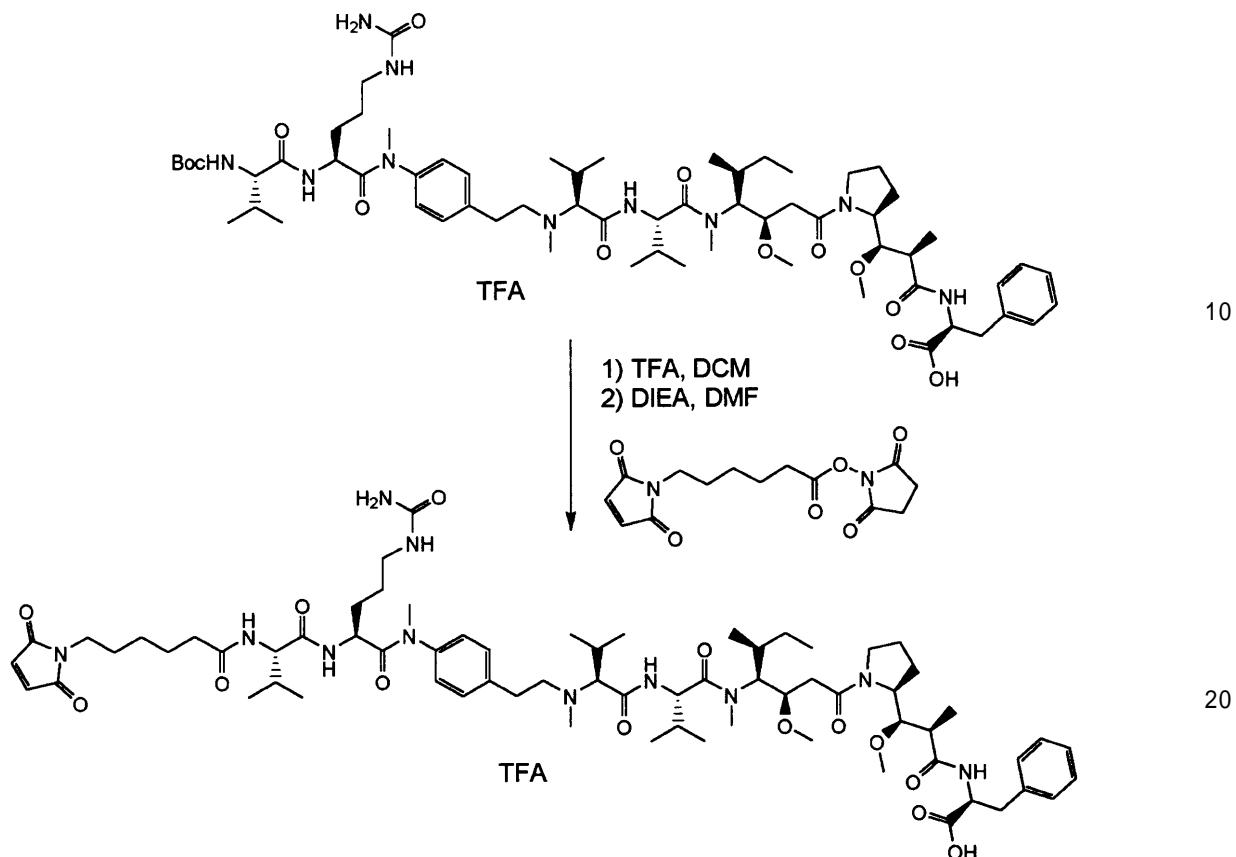


化合物F-13-5(140 mg、0.104 mmol、1当量)を水(4 mL)、アセトニトリル(4 mL)およびピペリジン(2 mL)の混合物に溶かし、室温で4時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣を分取HPLC(Waters 600E、SunFire Prep C18 OBDカラム、 $5 \mu\text{m}$ 、 $19 \times 100 \text{ mm}$ ；溶出相：0.1%TFAで緩衝させた水 / MeCN；15分で5%から100%MeCNへの勾配；Waters 2487 UV検出器 220 nm)により精製した。選択した画分を合わせ、凍結乾燥させ、化合物F-13-6を白色固体として得た(115 mg、83%)。

【0543】

化合物F-13：

【化 1 3 3】



化合物 F - 13 は、化合物 E - 11 と同じ方法に従い、D C M (0 . 5 m L) および T F A (1 0 0 μ L 、 3 0 当量) 中、 B o c 保護アミン F - 13 - 6 (5 5 m g 、 0 . 0 4 1 m m o l 、 1 . 0 当量) を用い、次いで、 D M F (1 m L) で希釈し、 D I E A (3 2 0 μ L 、 4 5 当量) で急冷した後、 6 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサン酸 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル (1 5 m g 、 0 . 0 4 9 m m o l 、 1 . 2 当量) と反応させて製造された。分取 H P L C による精製および凍結乾燥の後に、化合物 F - 13 を白色固体として得た (1 4 m g 、 2 4 %) 。

【0544】

m/z (Q - T O F M S E S I +) 1 3 1 4 . 8 0 6 7 (2 % 、 MH^+ 、 $C_{6_9}H_{10_8}N_{1_1}O_{1_4}$ 理論値 1 3 1 4 . 8 0 7 2) 、 6 5 7 . 9 0 6 7 (1 0 0 % 、 $(MH^+)_2$ 、 $C_{6_9}H_{10_9}N_{1_1}O_{1_4}$ 理論値 6 5 7 . 9 0 7 2) 。

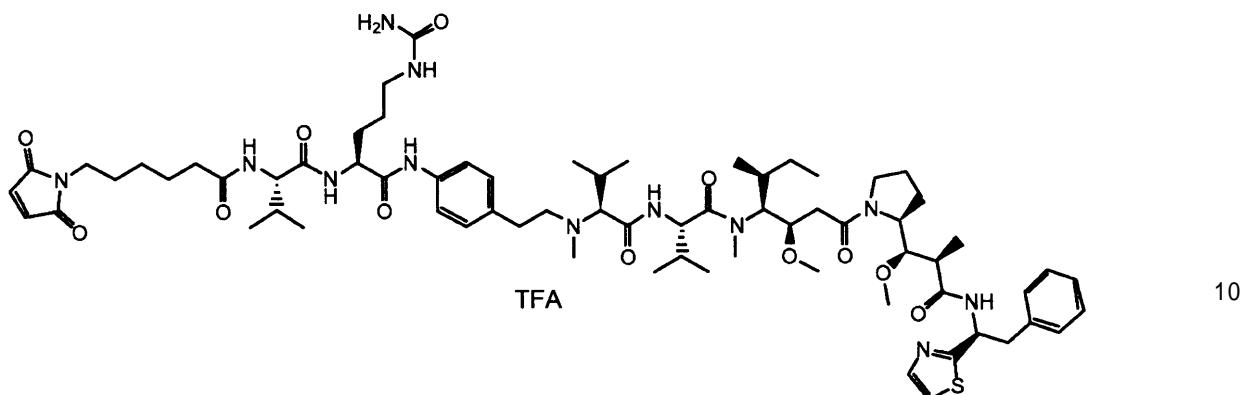
【0545】

化合物 F - 6 1

N - ((S) - 1 - (((S) - 1 - ((4 - ((3 R , 4 S , 7 S , 1 0 S) - 4 - ((S) - s e c - ブチル) - 7 , 1 0 - ジイソプロピル - 3 - (2 - ((S) - 2 - ((1 R , 2 R) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - オキソ - 3 - (((S) - 2 - フェニル - 1 - (チアゾール - 2 - イル) エチル) アミノ) プロピル) ピロリジン - 1 - イル) - 2 - オキソエチル) - 5 , 1 1 - ジメチル - 6 , 9 - ジオキソ - 2 - オキサ - 5 , 8 , 1 1 - トリアザトリデカン - 1 3 - イル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソ - 5 - ウレイドペンタン - 2 - イル) アミノ) - 3 - メチル - 1 - オキソブタン - 2 - イル) - 6 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサンアミド 2 , 2 , 2 - トリフルオロ酢酸塩

30

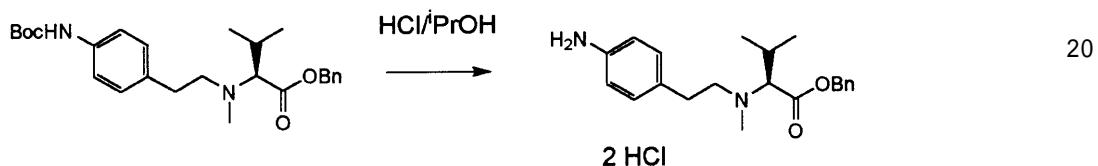
【化134】



【0546】

化合物F-61-1 : N - (4 - アミノフェネチル) - N - メチル - L - バリン酸ベンジル二塩酸塩

【化135】

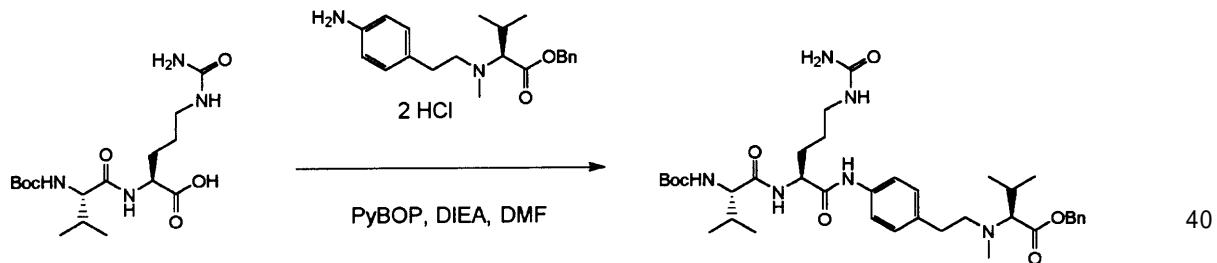


化合物11C (1.0 g、2.27 mmol、1当量) をⁱ PrOH 中 HCl の市販溶液 (5~6 M) 8 mL に溶かした。この混合物を室温で2時間攪拌した後、減圧下で蒸発乾固させた。残渣を Et₂O (30 mL) で2回摩碎し、真空下で乾燥させ、化合物F-61-1を白色固体として得た (916 mg、98%)。

【0547】

化合物F-61-2 : N - (4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - ((tert-ブトキシカルボニル)アミノ) - 3 - メチルブタンアミド) - 5 - ウレイドペンタンアミド) フェネチル) - N - メチル - L - バリン酸ベンジル

【化136】



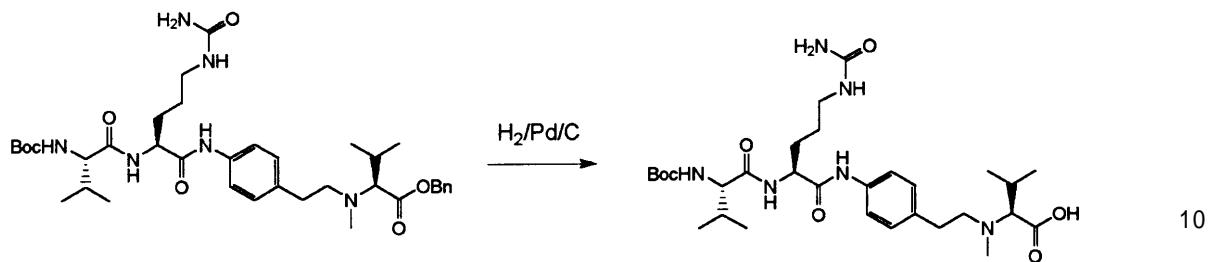
酸E-11-3 (769 mg、2.05 mmol、1.5当量) を乾燥DMF (2.5 mL) に溶かした後、DIEA (957 μL、5.48 mmol、4当量) およびPyBOP (1.07 g、2.05 mmol、1.5当量) を加えた。アニリンF-61-1 (566 mg、1.369 mmol、1当量) を加え、この混合物を室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣をシリカゲル (DCM / MeOH) で精製し、969 mg (102%) の化合物F-61-2を白色固体として得た。

【0548】

化合物F-61-3 : N - (4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - ((tert-ブトキシ

50

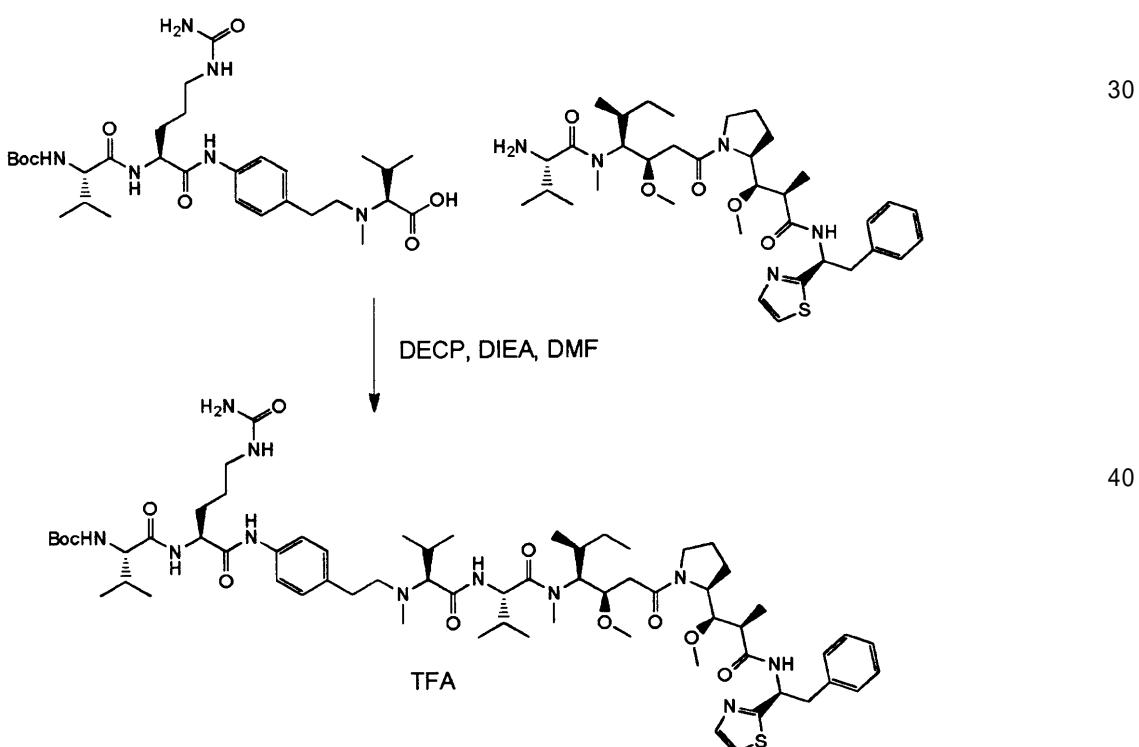
カルボニル)アミノ) - 3 - メチルブタンアミド) - 5 - ウレイドペンタンアミド)フェ
ネチル) - N - メチル - L - バリン
【化 137】



化合物 F - 61 - 2 (969 mg、1.28 mmol、1当量) を P d / C 10% (270 mg) の存在下で M e O H (20 ml) に溶かし、周囲温度および大気圧下で 3 時間水素化した。この反応媒体を濾過し、減圧下で濃縮し、残渣をシリカゲル (D C M / M e O H / A c O H) で精製し、520 mg (67%) の化合物 F - 61 - 3 を白色固体として得た。

【 0549 】

化合物 F - 61 - 4 : ((S) - 1 - ((S) - 1 - ((4 - ((3R, 4S, 7S,
10S) - 4 - ((S) - sec - ブチル) - 7 , 10 - ジイソプロピル - 3 - (2 -
(S) - 2 - ((1R, 2R) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - オキソ - 3 - ((S)
- 2 - フェニル - 1 - (チアゾール - 2 - イル)エチル)アミノ)プロピル)ピロリジ
ン - 1 - イル) - 2 - オキソエチル) - 5 , 11 - ジメチル - 6 , 9 - ジオキソ - 2 - オ
キサ - 5 , 8 , 11 - トリアザトリデカン - 13 - イル)フェニル)アミノ) - 1 - オキ
ソ - 5 - ウレイドペンタン - 2 - イル)アミノ) - 3 - メチル - 1 - オキソブタン - 2 -
イル)カルバミン酸 t e r t - ブチル 2 , 2 , 2 - トリフルオロ酢酸塩
【化 138】



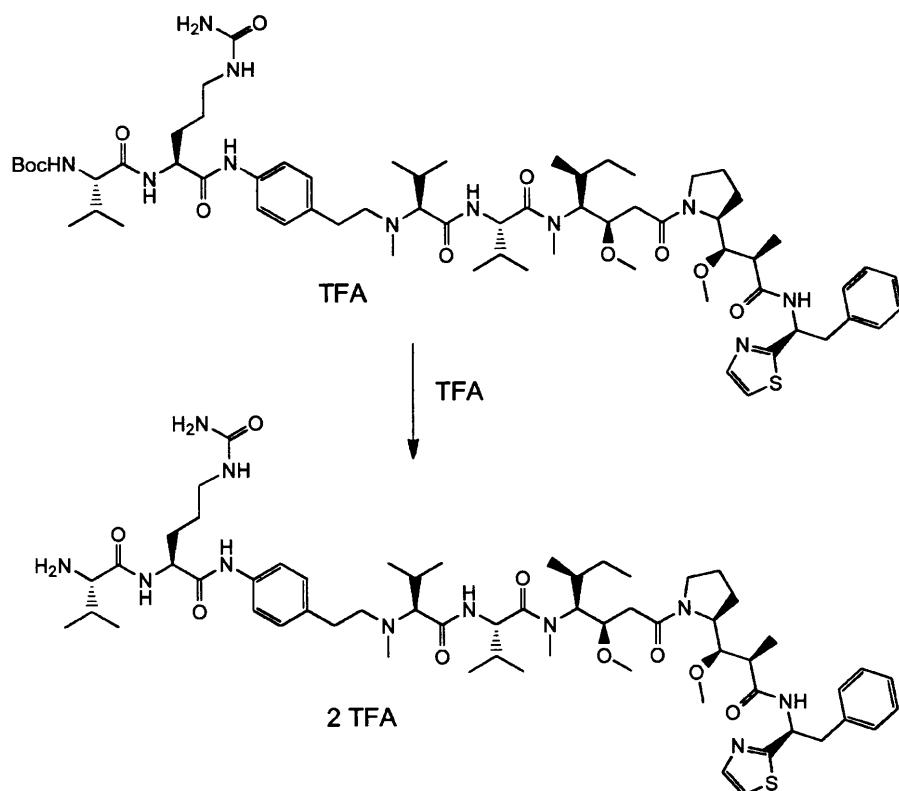
酸 F - 61 - 3 (67.5 mg、0.111 mmol、1.5 当量) を乾燥 D M F (2 m L) および D E C P (17 μ L、0.111 mmol、1.5 当量) に溶かし、D I E
【 50 】

A (39 μL、0.223 mmol、3当量)を加えた。室温で15分間攪拌した後、アミン1Y (50mg、0.074mmol、1当量)を加え、この溶液を一晩攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣を分取HPLC (Waters 600E、SunFire Prep C18 OBDカラム、5 μm、19 × 100 mm; 溶出相: 0.1% TFAで緩衝させた水 / MeCN; 15分で5%から100%MeCNへの勾配; Waters 2487 UV検出器 220 nm)により精製した。選択した画分を合わせ、凍結乾燥させ、化合物F61-4を白色固体として得た (28mg、28%)。

【0550】

化合物F-61-5: (S)-2-((S)-2-アミノ-3-メチルブタンアミド)-N-(4-((3R,4S,7S,10S)-4-((S)-sec-ブチル)-7,10-ジイソプロピル-3-(2-((S)-2-((1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-(((S)-2-フェニル-1-(チアゾール-2-イル)エチル)アミノ)プロピル)ピロリジン-1-イル)-2-オキソエチル)-5,11-ジメチル-6,9-ジオキソ-2-オキサ-5,8,11-トリアザトリデカン-13-イル)フェニル)-5-ウレイド pentanamido bis(2,2,2-trifluoroethyl acetate salt)

【化139】



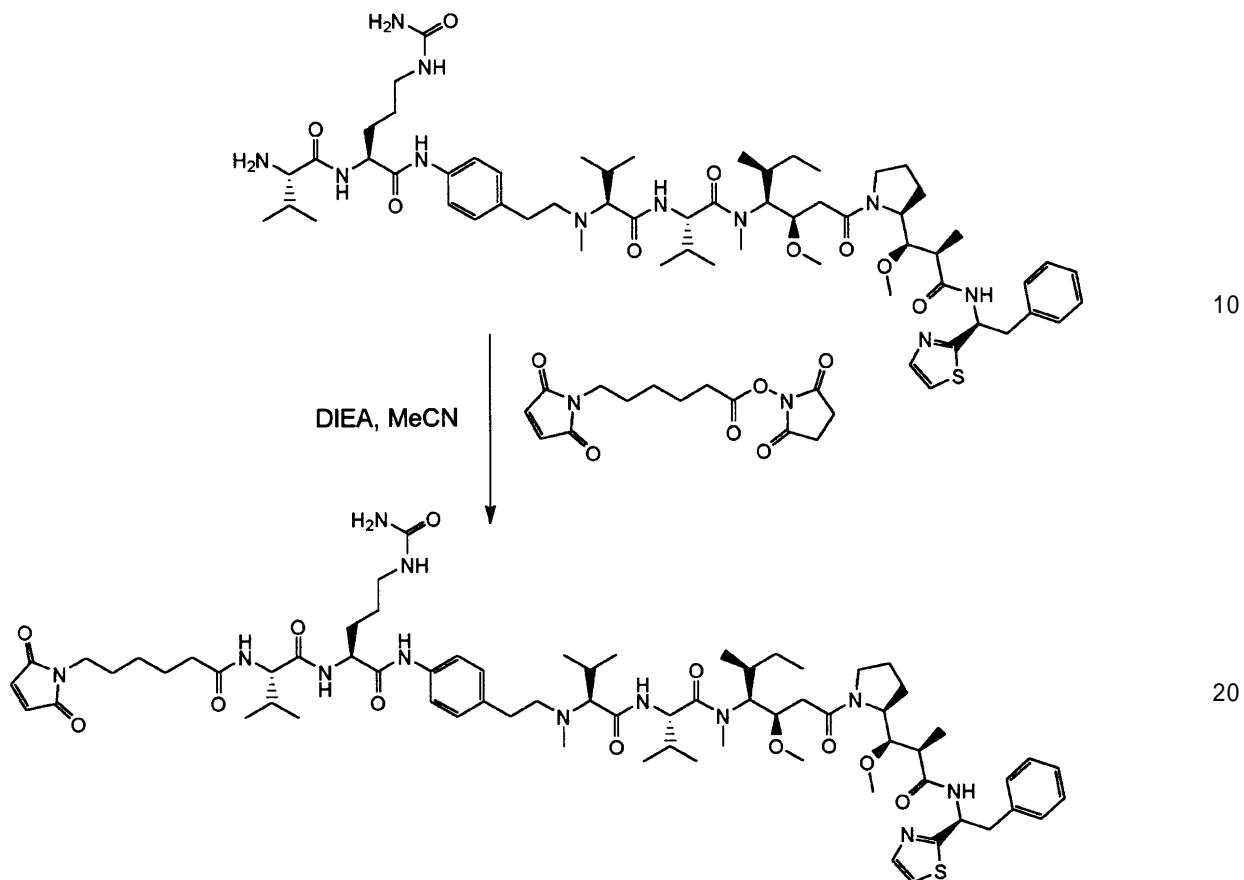
化合物F-61-4 (28mg、0.021mmol、1.0当量)をTFA (200 μL)に溶かした。5分後、水 (2mL)およびアセトニトリル (0.5mL)を加え、溶液を一晩凍結乾燥させ、化合物F-61-5を無色の油状物として得た (38mg、134%)。

【0551】

化合物F-61:

40

【化140】



化合物F-61-5(28.3mg、0.020mmol、1当量)をアセトニトリル(0.5mL)、次いで、6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イル(9mg、0.029μmol、1.4当量)およびDIEA(25μL、0.143mmol、7当量)に溶かした。この混合物を4.5時間攪拌し、その後、HPLC分析は出発材料の存在、スクシニミドの完全な消費を示した。従って、補助的に6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イル(3mg、0.01μmol、0.5当量)を加え、この反応物を1.5時間攪拌した。HPLC分析は出発材料の完全な消費を示した。溶媒を蒸発させて乾固し、残渣をEtOAc/Et₂O(80/20)の混合物で2回摩碎し、化合物F-61を灰白色固体として得た(19.4mg、70%)。

【0552】

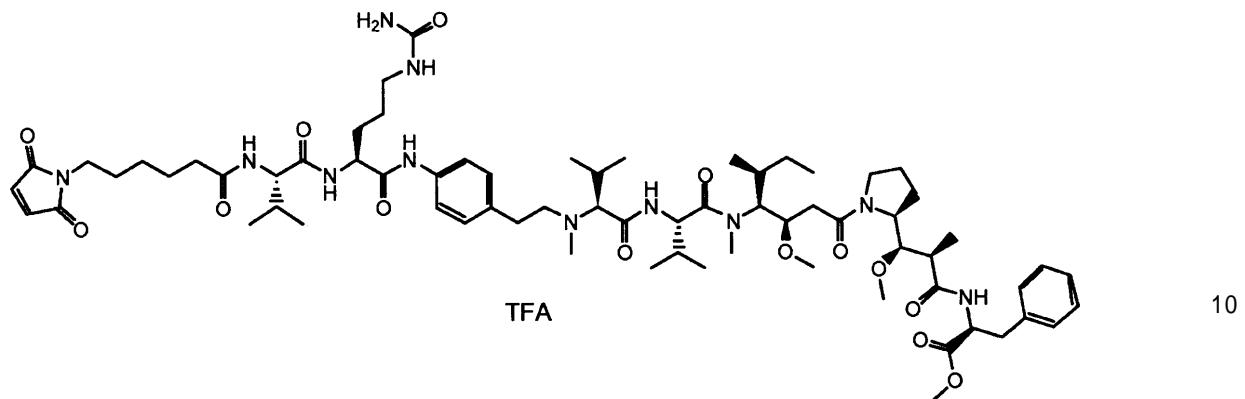
m/z (Q-TOF MS ESI+) 1361.7725 (2%、MNa⁺、C₇H₁₀N₂NaO_{1.2}S 理論値 1361.7666)、670.3961 (100%、(MH₂)²⁺、C₇H₁₀N₂O_{1.2}S 理論値 670.3960)。

【0553】

化合物F-62:

(*(2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタンアミド)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン酸メチル 2,2,2-トリフルオロ酢酸塩*

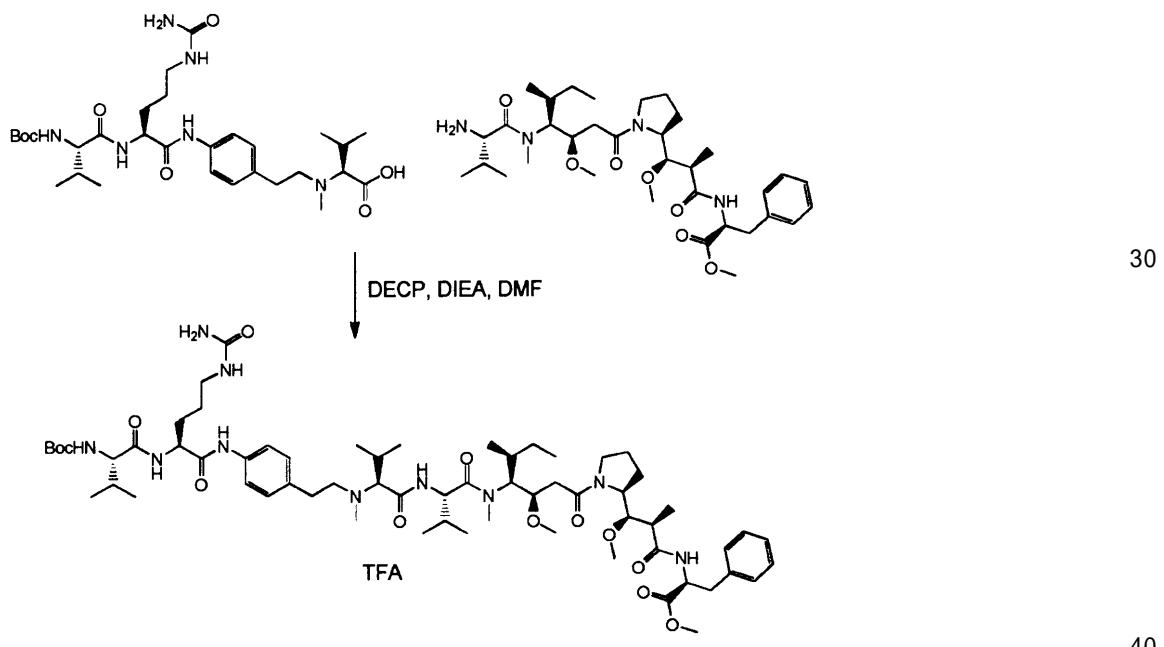
【化141】



【0554】

化合物F-62-1：((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタンアミド)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン酸メチル 2,2,2-トリフルオロ酢酸塩

【化142】



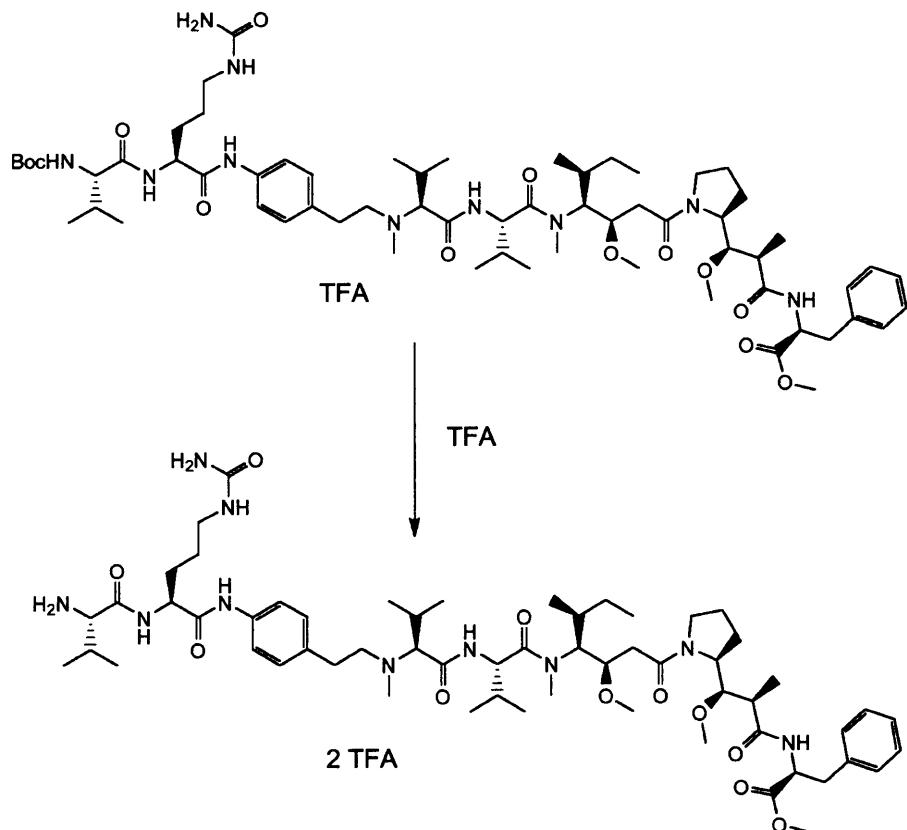
化合物F-62-1は、DMF(2mL)中、アミン3D(100mg、0.158mmol、0.9当量)、酸F-61-3(108mg、0.178mmol、1当量)、DECP(41μL、0.267mmol、1.5当量)およびDIEA(93μL、0.534mmol、3当量)から、化合物F-61-4と同様にして製造された。分取HPLCによる精製の後、化合物F-62-1を白色固体として得た(93mg、39%)。

【0555】

化合物F-62-2：((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-アミノ-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタンアミド)フェネチル)(メチル)アミノ)

50

- 3 - メチルブタンアミド) - N , 3 - ジメチルブタンアミド) - 3 - メトキシ - 5 - メチルヘプタノイル) ピロリジン - 2 - イル) - 3 - メトキシ - 2 - メチルプロパノイル)
 - L - フェニルアラニン酸メチル ビス (2 , 2 , 2 - トリフルオロ酢酸塩)
 【化 143】

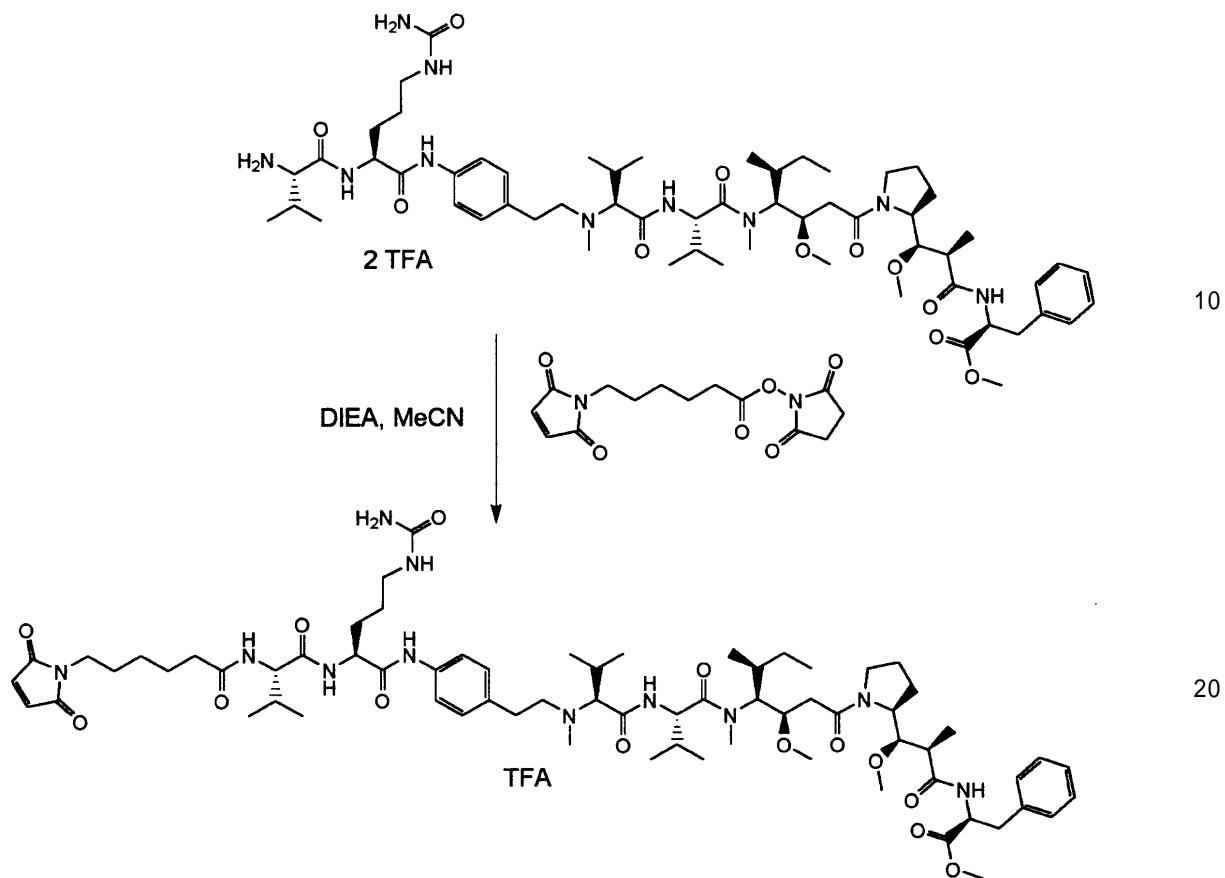


化合物 F - 62 - 1 (35 mg 、 0 . 026 mmol 、 1 . 0 当量) を TFA (200 μ L) に溶かした。10 分後、水 (2 mL) およびアセトニトリル (0 . 5 mL) を加え、溶液を一晩凍結乾燥させ、化合物 F - 62 - 2 を白色固体として得た (34 mg 、 105 %)。

【 0556 】

化合物 F - 62 :

【化144】



アミン F - 62 - 2 (34 mg、5.55 μmol、1当量) をアセトニトリル(3 mL)に溶かした。DIEA (5 μL、0.028 mmol、5当量) および 6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサン酸 2,5-ジオキソピロリジン-1-イル(2 mg、6.65 μmol、1.2当量)を加えた。HPLC 分析は出発材料の完全な消費を示した。溶媒を蒸発させて乾固し、残渣を EtOAc/Et₂O(80/20)の混合物で摩碎した。粗生成物を分取HPLC(Waters 600E、SunFire Prep C18 OBDカラム、5 μm、19 × 100 mm; 溶出相: 0.1% TFAで緩衝させた水/MeCN; 15分で5%から100% MeCNへの勾配; Waters 2487 UV検出器 220 nm)により精製した。選択した画分を合わせ、凍結乾燥させ、化合物F-62を白色固体として得た(5.5 mg、13%)。

【0557】

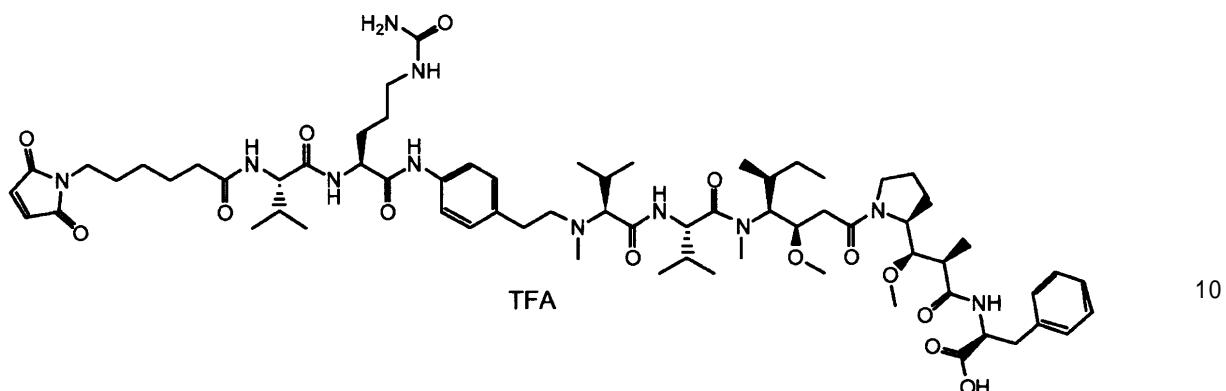
m/z (Q-TOF MS ESI+) 1336.7859 (2%、MNa⁺、C₆₉H₁₀₇N₁₁NaO₁₄ 理論値 1336.7891)、657.9073 (100%、(MH₂)²⁺、C₆₉H₁₀₉N₁₁O₁₄ 理論値 657.9072)。

【0558】

化合物F-63:

(_{(2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタンアミド)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン 2,2,2-トリフルオロ酢酸塩}

【化145】

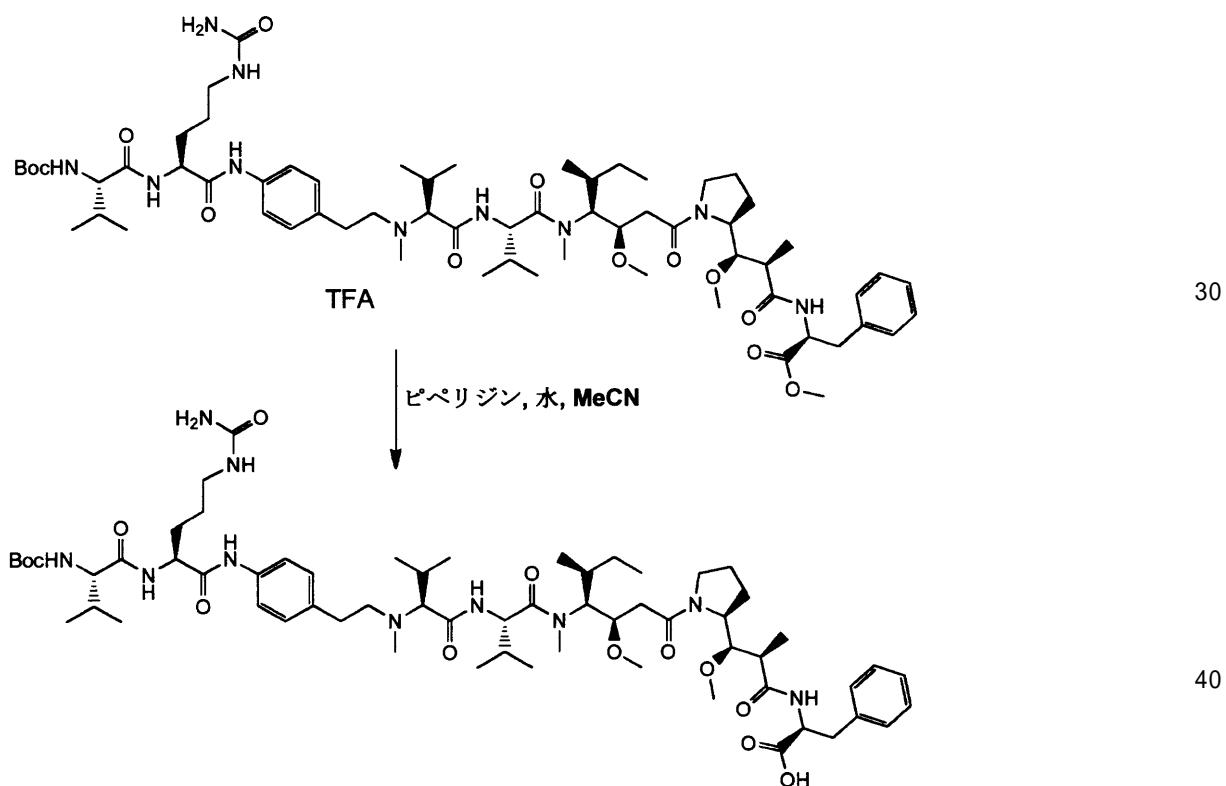


【0559】

化合物F-63-1：((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタンアミド)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン

20

【化146】



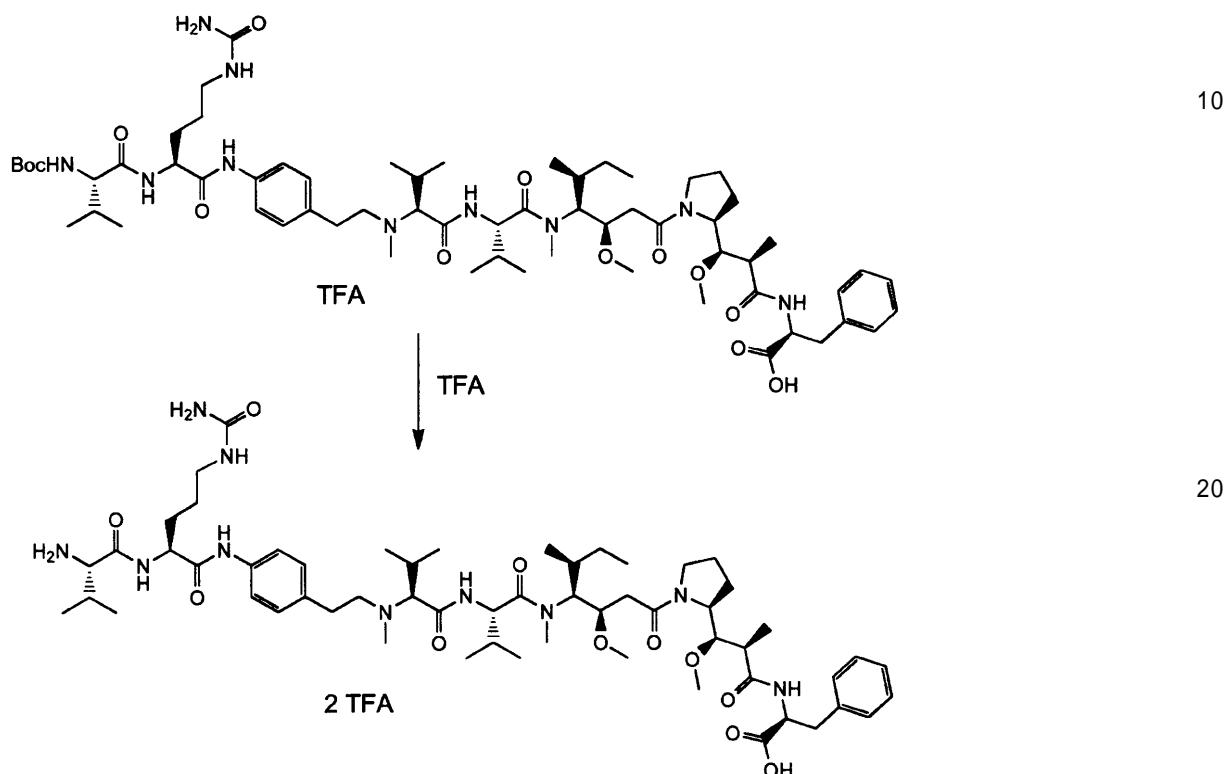
化合物F-62-1(157mg、0.118mmol、1当量)を水(4.5mL)、アセトニトリル(4.5mL)およびビペリジン(3.5mL)の混合物に溶かし、室温で5時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣をEt₂O(60mL)で摩碎した。固体を濾取し、Et₂O(10mL)で2回すすぎ、化合物F-63-1を灰白色固体として得た(153mg、100%)。

【0560】

化合物F-63-2：((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-

50

4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - ((4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - アミノ - 3 - メチルブタンアミド) - 5 - ウレイドペンタンアミド) フェネチル) (メチル) アミノ) - 3 - メチルブタンアミド) - N , 3 - ジメチルブタンアミド) - 3 - メトキシ - 5 - メチルヘプタノイル) ピロリジン - 2 - イル) - 3 - メトキシ - 2 - メチルプロパノイル) - L - フェニルアラニン ビス 2 , 2 , 2 - トリフルオロ酢酸塩
【化 147】

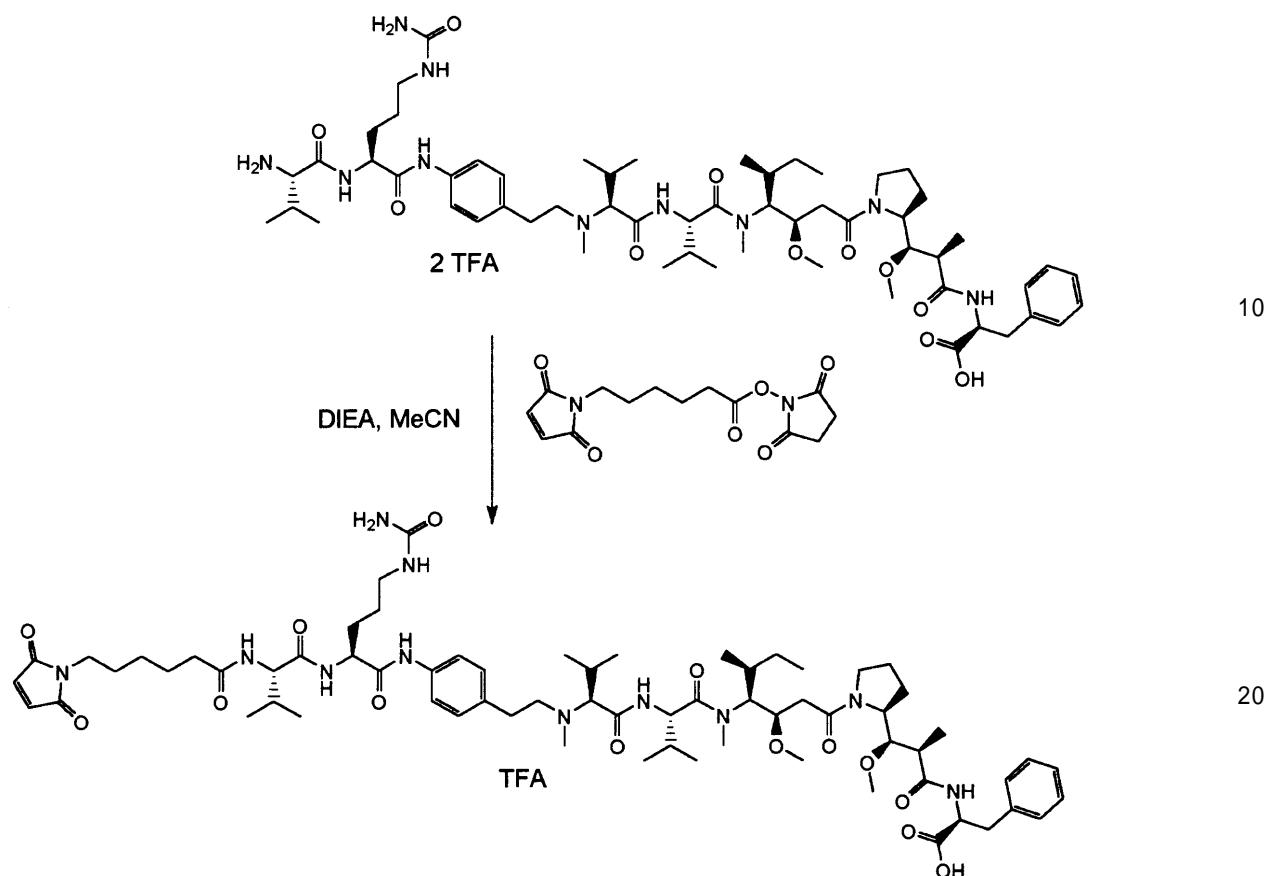


化合物 F - 63 - 1 (153 mg、0 . 127 mmol、1 . 0 当量) を T F A (20 30 0 μL) に溶かした。10 分後、水 (2 mL) およびアセトニトリル (0 . 5 mL) を加え、この溶液を一晩凍結乾燥させ、化合物 F - 63 - 2 を白色固体として得た (34 mg 、 105 %)。

【 0561 】

化合物 F - 63 :

【化148】



アミン F - 63 - 2 (100 mg、0.082 mmol、1当量)をアセトニトリル(2 mL)と DMF (0.5 mL)の混合物に溶かし、6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサン酸 2,5-ジオキソピロリジン-1-イル(45 mg、0.147 mmol、1.8当量)およびDIEA (71 μ L、0.409 mmol、5当量)を加えた。室温で4.5時間攪拌した後、溶媒を減圧下で蒸発させた。粗生成物を分取HPLC (Waters 600E, SunFire Prep C 18 OBDカラム、5 μ m、19 × 100 mm; 溶出相: 0.1% TFAで緩衝させた水 / MeCN; 15分で5%から100% MeCNへの勾配; Waters 2487 UV検出器 220 nm)により精製した。選択した画分を合わせ、凍結乾燥させ、その後、化合物 F - 63 を白色固体として得た(42 mg、36%)。

【0562】

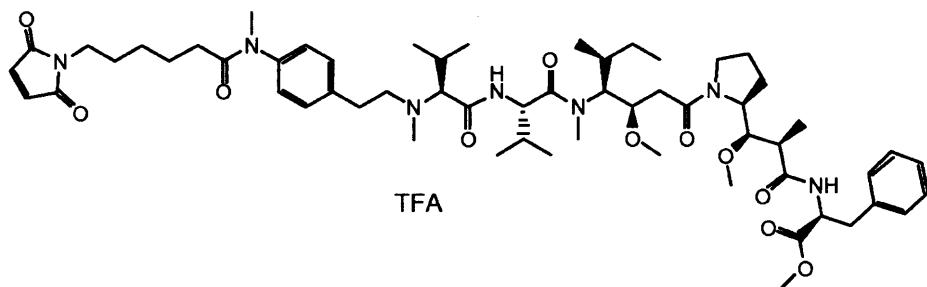
m/z (Q-TOF MS ESI $^+$) 1300.7901 (2%、MH $^+$ 、C₆H₁₀N₁O₁ 理論値 1300.7915)、650.8990 (100%、(MH₂)₂ $^+$ 、C₆H₁₀N₁O₁ 理論値 650.8994)。

【0563】

化合物 G - 12

($(2R,3R)$ -3-((S)-1-(($3R,4S,5S$)-4-((S)-2-((S)-2-((4 -(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-N-メチルヘキサンアミド)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン酸メチル 2,2,2-トリフルオロ酢酸塩

【化149】

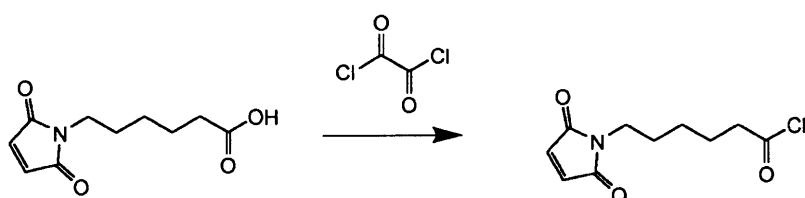


10

【0564】

化合物G-12-1 : N - (4 - アミノフェネチル) - N - メチル - L - バリン酸ベンジ
ルニ塩酸塩

【化150】



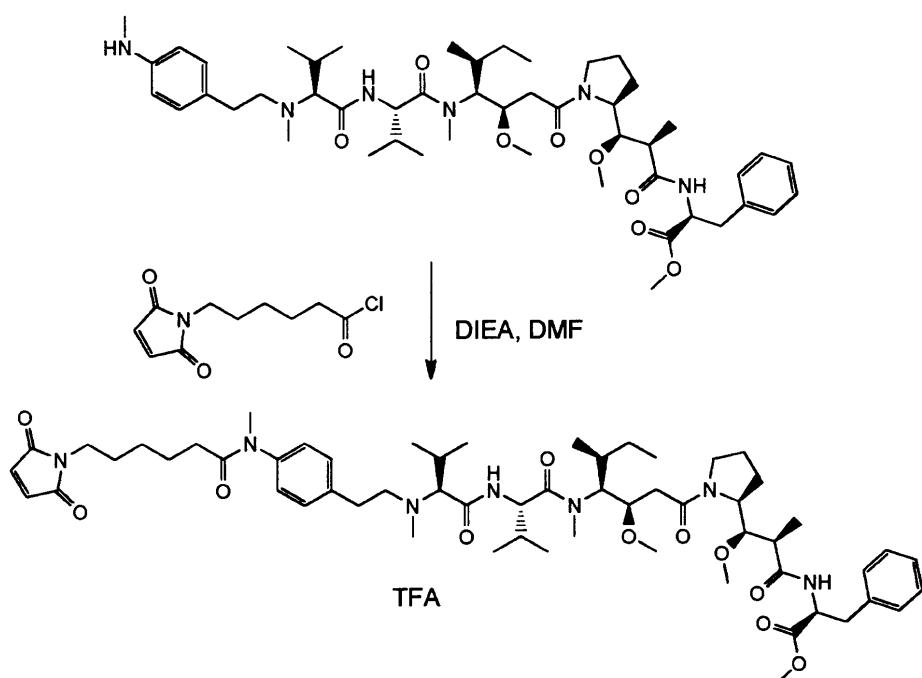
20

塩化オキサリル (3 mL) に 6 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロ
ール - 1 - イル) ヘキサン酸 (200 mg、0 . 947 mmol、1 当量) を溶かした。
この溶液を室温で 5 時間攪拌した後、減圧下で蒸発乾固させた。化合物 G - 12 - 1 をベ
ージュの固体として得 (217 mg、100 %)、精製せずに次の工程で用いた。

【0565】

化合物G-12 :

【化151】



30

40

アニリン 12 (40 mg、0 . 045 mmol、1 当量) を 0 °C で乾燥 DCM (1 mL)
に溶かし、DIEA (8 μL、0 . 045 mmol、1 当量) を加えた。30 分間攪拌
した後、乾燥 DCM (1 mL) 中、化合物 G - 12 - 1 (10 mg、0 . 45 mmol、
1 当量) を加えた。

50

1当量)の溶液を導入し、この反応物を0℃で1時間攪拌した。この混合物をDCM(25mL)で希釈し、水(20mL)で2回、ブライン(10mL)で1回洗浄した。有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で蒸発させ、粗生成物を淡褐色固体として得た(54mg)。これをシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー(DCM/MeOH)、次いで、分取HPLC(Waters 600E, SunFire Prep C18 OBDカラム、5μm、19×100mm; 溶出相: 0.1%TFAで緩衝させた水/MeCN; 15分で5%から100%MeCNへの勾配; Waters 2487 UV検出器 220nm)により精製した。単離された生成物を凍結乾燥させ、白色固体を得(23mg)、これを分取HPLCにより再精製し、選択した画分を合わせ、凍結乾燥させ、化合物G-12を白色固体として得た(9mg、16%)。

10

【0566】

m/z(Q-TOF MS ESI+) 1094.6543(20%、MNa⁺、C₅₉H₈₉N₇NaO₁₁ 理論値1094.6512)、1072.6722(16%、MH⁺、C₅₉H₉₀N₇O₁₁ 理論値1072.6693)、536.8358(100%、(MH₂)²⁺、C₅₉H₉₁N₇O₁₁ 理論値536.8383)。

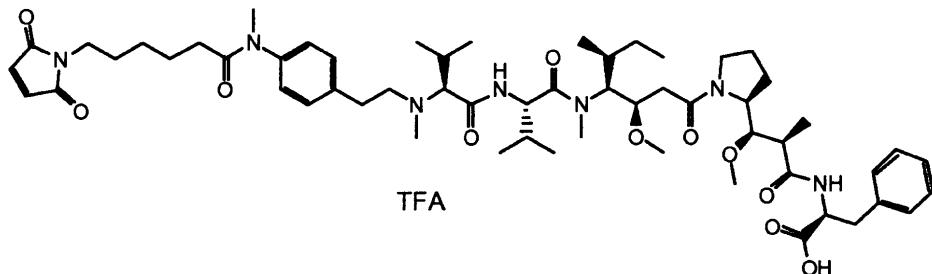
【0567】

化合物G-13

((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-N-メチルヘキサンアミド)フェネチル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン 2,2,2-トリフルオロ酢酸酸

20

【化152】

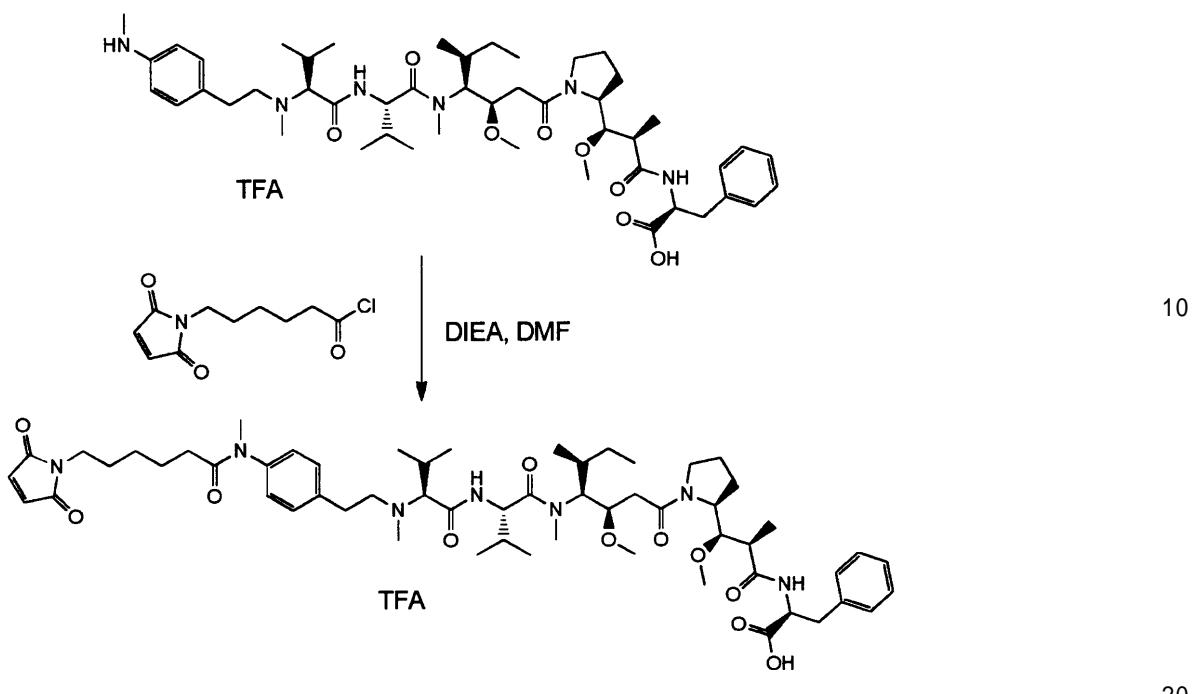


30

【0568】

化合物G-13:

【化153】



アニリン 13 (15 mg、0.015 mmol、1当量)を0で乾燥 DCM (1.5 mL)に溶かし、DIEA (8 μL、0.046 mmol、3当量)を加えた。乾燥 DCM (0.5 mL)中、化合物 G-12-1 (3.5 mg、0.046 mmol、1当量)の溶液を導入し、この反応物を0で1.5時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、粗生成物を分取HPLC (Waters 600E、SunFire Prep C18 OBDカラム、5 μm、19 × 100 mm; 溶出相: 0.1% TFAで緩衝させた水 / MeCN; 15分で5%から100% MeCNへの勾配; Waters 2487 UV検出器 220 nm)により精製した。選択した画分を合わせ、凍結乾燥させ、化合物 G-13 を白色固体として得た (11.4 mg、62%)。

【0569】

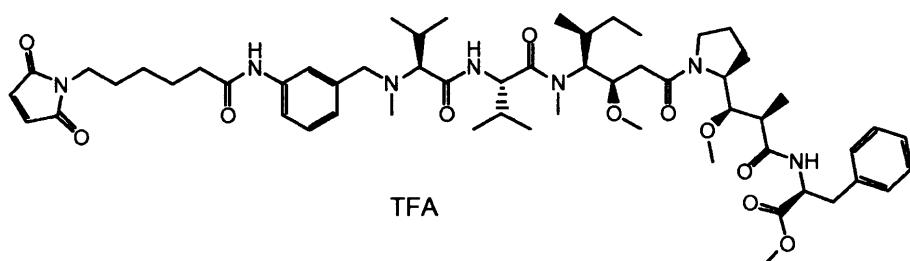
m/z (Q-TOF MS ESI+) 1058.6510 (30%、MH⁺、C₅H₈N₇O₁ 理論値 1058.6536)、529.8285 (100%、(MH₂)²⁺、C₅H₈N₇O₁ 理論値 529.8305)。

【0570】

化合物 G-15

(_(2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)ベンジル)(メチル)アミノ)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)-L-フェニルアラニン酸メチル_{2,2,2}-トリフルオロ酢酸塩

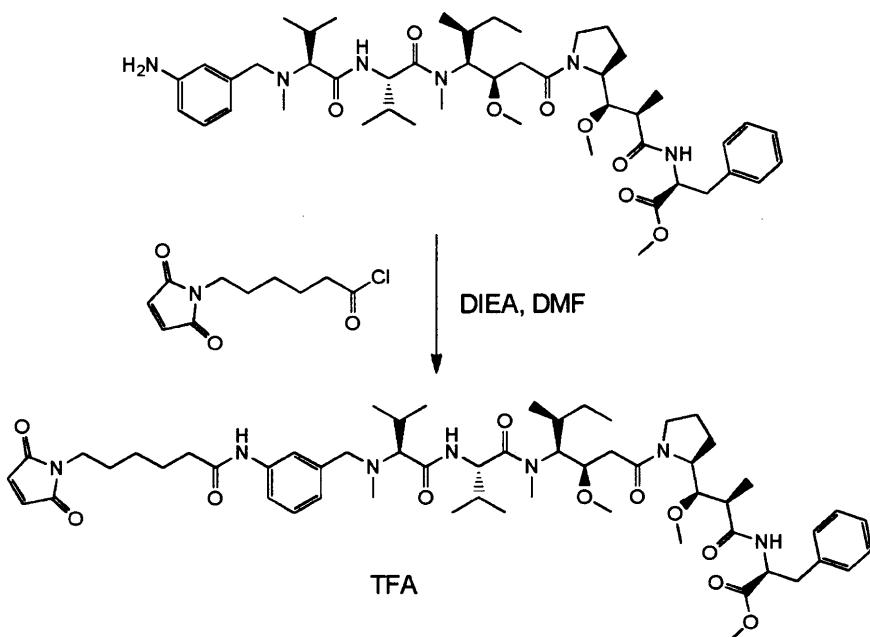
【化154】



【0571】

化合物G-15：

【化155】



アニリン 15 (40 mg、0.047 mmol、1当量)を0℃で乾燥DCM(2 mL)に溶かし、DIEA(10 μL、0.056 mmol、1.2当量)を加えた。乾燥DCM(1 mL)中、化合物G-12-1(108 mg、0.47 mmol、10当量)の溶液を導入し、この反応物を0℃で1.5時間攪拌した。この混合物をDCM(10 mL)で希釈し、水(5 mL)で2回洗浄した。有機相をMgSO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で蒸発させ、粗生成物をベージュの固体として得た。これを分取HPLC(Waters 600E、SunFire Prep C18 OBDカラム、5 μm、19 × 100 mm；溶出相：0.1%TFAで緩衝させた水/MeCN；15分で5%から100%MeCNへの勾配；Waters 2487 UV検出器 220 nm)により精製した。選択した画分を合わせ、凍結乾燥させ、化合物G-15を白色固体として得た(27 mg、50%)。

【0572】

m/z(Q-TOF MS ESI+) 1066.6517(2%、MNa⁺、C₅H₈N₇NaO₁) 理論値 1066.6199)、522.8224(100%、(M H₂)²⁺、C₅H₈N₇O₁ 理論値 522.8226)。

【0573】

実施例17：ADCの合成、精製および特性決定

下記の手順はキメラおよびヒト化IgG1形態に当てはまる。IgG2、IgG4などの他の形態については、当業者ならば一般知識を用いてこの手順を適合させることができると理解されなければならない。

【0574】

抗体(1~5 mg/mL)を、37℃にて2時間、150 mM NaClおよび2 mM EDTAを含有する10 mMホウ酸バッファー pH 8.4中、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP)で部分的に還元した。一般に、それぞれ4前後の薬物-抗体比(DAR)を目標とするために2.5~3 mol当量のTCEPを使用した。部分的抗体還元は、非還元条件下でのSDS-PAGE分析により確認した。遊離した鎖内システイン残基へのリンカー-薬物のカップリングの前に、還元混合物を室温まで放冷した。次に、抗体濃度を150 mM NaClおよび2 mM EDTAを含有する1

10

20

30

40

50

0 mM ホウ酸バッファー pH 8.4 で 1 mg / ml に調整し、ジメチルスルホキシド (DMSO) 中 10 mM 溶液から、抗体に対して 5 モル過剰の薬物を加えた。カップリング中に水性媒体での薬物の溶解度を維持するために、最終 DMSO 濃度は 10 % に調整した。反応は室温で 1 時間行った。薬物過剰分は、薬物 1 モル当たり 1.5 モルの N - アセチルシステインを加えて室温で 1 時間インキュベートすることによって急冷した。150 mM NaCl を含有する 25 mM His バッファー pH 6.5 に対して 4 度で一晩透析した後、抗体 - 薬物複合体を、市販のクロマトグラフィーカラムおよび限外濾過装置に基づく当業者に公知の方法を使用することにより精製した。まず、非結合薬物と ADC 凝集物を S200 (GE Life Sciences) または TSK G3000 SW (Tosoh) カラムでのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により除去した。次に、精製された ADC モノマーを 30 または 50 kDa MWCO 濾過装置での限外濾過またはプロテイン A でのアフィニティーコロマトグラフィーにより 2 ~ 3 mg / ml まで濃縮した。精製された ADC を 0.2 μm フィルターで濾過除菌した後に 4 度で保存した。それらをさらに、薬物コンジュゲーションを確認するために還元条件および非還元条件下で SDS-PAGE により、また、モノマーおよび凝集形態の含量を決定するために分析的 S200 または TSK G3000 SWXL カラムでの SEC により分析した。タンパク質濃度は、標品として IgG を用いたビシンコニン酸 (BCA) アッセイを使用することにより決定した。DAR は各精製 ADC に関して HIC および LC-MS により評価した。一般に、凝集形態の含量は 5 % 未満であり、DAR は 3.5 ~ 5 の間を含んだ。

【0575】

10

実施例 18：種々の薬物とカップリングされた IGF-1R 抗体の細胞傷害性評価

18.1 MCF-7 細胞でのキメラ抗体の評価

5 つの IGF-1R 抗体は急速にリソソームへ内部移行されること、および酸性環境になると低結合能を有することが示された。この点で、これらの Ab は ADC として使用されるべき総ての特性を備えていた。従って、これら 5 つのキメラ抗 IGF-1R 抗体を 3 つの異なる化合物 (G-13; E-13 および F-63) とカップリングさせた。これらの ADC の薬物抗体比は約 4 であった。非特異的細胞傷害性を評価するために、無関連キメラ抗体 c9G4 も同じ DAR でこれらの化合物とカップリングさせた。MCF-7 細胞を完全培養培地で、37 度にて 6 日間、漸増濃度の各 ADC とともにインキュベートした。細胞生存率は、発光細胞生存率アッセイ (CellTiter-Glo, Promega) を用いて評価した。発光シグナルは Mithras プレートリーダー (Berthold Technologies) を用いて読み取った。E-13、G-13 または F-63 のいずれかとカップリングさせた無関連キメラ抗体 c9G4 は、MCF-7 細胞で細胞傷害活性を全く示さなかったかまたは低活性であった (図 21)。これに対して、抗 IGF-1R 抗体を E-13、G-13 または F-63 のいずれかとカップリングさせた後に得られた他の総ての ADC を加えると、MCF-7 細胞の生存率は劇的に低下した。

20

【0576】

30

18.2 正常細胞でのキメラ抗体の評価

IGF-1R の発現レベルを、c208F2 mAb を用いて初代正常細胞 (Promocell GmbH) で評価した。この目的で、細胞 (0.5 × 10⁶ 細胞 / ml) を FACS バッファー (PBS、0.1% BSA、0.01% NaN₃) 中、4 度にて 20 分間、10 μg / ml の c208F2 抗体とともにインキュベートした。次に、それらを 3 回洗浄し、暗所、4 度にてさらに 20 分間、Allexa 488 とカップリングした適当な二次抗体とともにインキュベートした後、FACS バッファー中で 3 回洗浄した。すぐに生細胞に抗 IGF-1R 抗体の結合がなされ、これを、ヨウ化プロピジウム (死細胞を染色する) を用いて確認した。発現レベル (Bmax) は、MCF-7 細胞での IGF-1R 発現 (実施例 2、表 8 参照) に比べて正常細胞では低かった (表 14)。

40

【0577】

【表19】

表14

正常細胞	Bmax	
ヒト大動脈内皮細胞 (HAoEC)	21	10
ヒト肺微小血管内皮細胞 (HPMEC)	33	
ヒト気管支平滑筋細胞 (HBSNC)	26	
ヒト腎臓上皮細胞 (HREpC)	110	
ヒト尿路上皮細胞 (HUC)	181	20

【0578】

ADC c 208F2 - G - 13の細胞傷害性を正常細胞で評価した。これらの細胞を完全培養培地で37にて6日間、漸増濃度のc 208F2 - G - 13とともにインキュベートした。細胞生存率は、発光細胞生存率アッセイ(CellTiter-Glo、Promega)を用いて評価した。発光シグナルはMithrasプレートリーダー(Berthold Technologies)を用いて読み取った。HBSMC、HPMEC、HAoECおよびHREpCでは主要な細胞傷害性は見られなかった(図25)。HUCでは高濃度のc 208F2 - G - 13のみで軽微な細胞傷害性が測定された。

【0579】

18.3 hz 208F2のヒト化変異体の評価

208F2の16のヒト化変異体を化合物G - 13とカップリングさせた。これらのADCの薬物抗体は約4であった。非特異的細胞傷害性を評価するために、無関連キメラ抗体c 9G4も同じDARでこれらの化合物とカップリングさせた。キメラ抗体c 208F2もG - 13とカップリングさせた。MCF - 7細胞を完全培養培地で、37にて6日間、漸増濃度の各ADCとともにインキュベートした。細胞生存率は、発光細胞生存率アッセイ(CellTiter-Glo、Promega)を用いて評価した。発光シグナルはMithrasプレートリーダー(Berthold Technologies)を用いて読み取った。G - 13とカップリングさせた無関連キメラ抗体c 9G4は、MCF - 7細胞で細胞傷害活性を全く示さなかつたかまたは低活性であった(図26)。これに対して、抗IGF - 1R抗体をG - 13とカップリングさせた後に得られた他の総てのADCを加えると、MCF - 7細胞の生存率は劇的に低下した。これら16のヒト化変異体の細胞傷害性誘導能は、表15に示され、また、図26に1つのヒト化変異体で例示されるように、キメラ型c 208F2 - G - 13で測定されたものと少なくとも同等かさらには良好であった。

【0580】

【表 20】

表 15

キメラ mAb	EC50	
	c208F2-G-13	9.0E-11
ヒト化 変異体	Hz208F2 (H026/L024)-G-13	1.1E-10
	hz208F2 (H037/L018)-G-13	3.7E-11
	hz208F2 (H047/L018)-G-13	4.4E-11
	hz208F2 (H049/L018)-G-13	6.6E-11
	hz208F2 (H051/L018)-G-13	3.6E-11
	hz208F2 (H052/L018)-G-13	3.4E-11
	hz208F2 (H057/L018)-G-13	5.2E-11
	hz208F2 (H068/L018)-G-13	6.2E-11
	hz208F2 (H070/L018)-G-13	5.7E-11
	hz208F2 (H071/L018)-G-13	8.5E-11
	hz208F2 (H076/L018)-G-13	5.3E-11
	hz208F2 (H077/L018)-G-13	3.0E-11
	hz208F2 (H037/L021)-G-13	3.9E-11
	hz208F2 (H049/L021)-G-13	5.2E-11
	hz208F2 (H052/L021)-G-13	3.7E-11
	hz208F2 (H076/L021)-G-13	4.5E-11

10

20

30

【0581】

実施例 19 : MCF - 7 異種移植モデルにおける E - 13、G - 13 または F - 63 化合物のいずれかとコンジュゲートされた c208F2 抗体の in vivo 活性

G - 13、E - 13 または F - 63 化合物とカップリングされた c208F2 の in vitro 有効性が in vivo で翻訳可能であったことを確認するために、それらが MCF - 7 異種移植モデルで試験された。

【0582】

総ての動物手順は、科学目的で使用される動物の保護に関する 2010 / 63 / UЕ 指令のガイドラインに従って実施した。プロトコールはピエール・ファーブル研究所の動物倫理委員会により承認されたものである。500 万の MCF - 7 細胞を 7 週齢のスイス / ヌードマウスに皮下注射した。細胞注入前に、MCF - 7 腫瘍の in vivo 成長に必要なエストロゲンを放出させるために、マウスの左側腹部にエストロゲンペレット (Innovative Research of America) を移植した。

40

【0583】

MCF - 7 細胞移植の 20 日後、腫瘍が 120 ~ 150 mm³ の平均サイズに達した際に、腫瘍のサイズと外観に従って動物を 5 個体ずつの群に分けた。種々の処置剤を腹腔内注射により接種した。動物の健康状態を毎日監視した。腫瘍体積を電子カリパスで週に 2 回、試験の終了まで測定した。腫瘍体積は式： / 6 × 長さ × 幅 × 高さで計算する。毒性は週に 3 回、動物の体重に従って評価した。統計分析は各尺度においてマン・ホイットニー検定を用いて行った。総ての化合物を腹膜内に (i.p.) 注射した。この実施例では

50

、E - 13、F - 13またはF - 63のいずれかと約DAR4でカップリングされたc208F2-mAbの抗腫瘍活性は、D20およびD27に7mg/kg用量の2回の注射の後に評価した(図22A、22Bおよび22C)。並行して、キャップされた薬物部分E - 13、F - 13およびF - 63を、7mg/kgのc208F2-E - 13、c208F2-F - 13およびc208F2-F - 63 DAR 約4に相当するものと同等の用量で注射した。

【0584】

c208-E - 13(図22A)、c208F2-G - 13(図22B)またはc208F2-F - 63(図22C)のいずれかの注射は、腫瘍成長を有意に阻害し、完全な腫瘍成長の退縮を誘導しさえした(対応するキャップ薬物に対してp < 0.05)。c208-E - 13、c208F2-G - 13およびc208F2-F - 63の間に統計的な活性の違いは認めることができなかった。キャップ薬物はMCF - 7腫瘍の成長に影響を及ぼさなかった(対照群に対してp > 0.05)。

【0585】

従前に記載したMCF - 7異種移植モデルにおいて、E - 13またはG - 13のいずれかとカップリングされたc208F2およびE - 13またはG - 13のいずれかとカップリングされた無関連抗体c9G4を用いて第2の試験セットを実施した。D20およびD27に、マウスに7mg/kgの各ADCをi.p.注射した(図23Aおよび23B)。

【0586】

c9G4-E - 13とc9G4-F - 13の両方の注射は、MCF - 7異種移植腫瘍の成長にあまり大きくない一時的な影響を及ぼすだけであった。しかしながら、この第2の試験により、D43にADCの高い抗腫瘍活性が示されたことから、c208-E - 13またはc208F2-G - 13のいずれの注射も完全な腫瘍退縮を誘導したことが確認された。

【0587】

実施例20：3⁺MCF - 7異種移植モデルにおけるG - 13化合物とコンジュゲートされたhz208F2抗体のin vivo活性

G - 13化合物とコンジュゲートされた208F2のヒト化型が、in vivoにおいてMCF - 7異種移植モデルで評価された。

【0588】

総ての動物手順は、科学目的で使用される動物の保護に関する2010 / 63 / U E指令のガイドラインに従って実施した。プロトコールはピエール・ファーブル研究所の動物倫理委員会により承認されたものである。500万のMCF - 7細胞を7週齢のスイス/ヌードマウスに皮下注射した。細胞注入前に、MCF - 7腫瘍のin vivo成長に必要なエストロゲンを放出させるために、マウスの左側腹部にエストロゲンペレット(Innovative Research of America)を移植した。

【0589】

MCF - 7細胞移植の20日後、腫瘍が120 ~ 150mm³の平均サイズに達した際に、腫瘍のサイズと外観に従って動物を6個体ずつの群に分けた。種々の処置剤を腹腔内注射により、4日ごとに1回の注射の4回注射プロトコール(Q4d4)として接種した。動物の健康状態を毎日監視した。腫瘍体積を電子カリパスで週に2回、試験の終了まで測定した。腫瘍体積は式： $\sqrt{6} \times \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ}$ で計算する。毒性は週に3回、動物の体重に従って評価した。統計分析は各尺度においてマン・ホイットニー検定を用いて行った。総ての化合物を腹膜内に(i.p.)注射した。この実施例では、G - 13化合物とカップリングされたc208F2-mAbの抗腫瘍活性は、それもまたG - 13とカップリングされた種々のヒト化型に匹敵した(図27)。供試したヒト化型を下表16に記載する。

【0590】

10

20

30

40

【表 2 1】

表 16

ヒト化型	対応する VH/VL	hz 型の他の名称	対応する ADC
208F2_085hz0107 (G1)	H057/L018	n/a	hz208F2 (H057/L018)-G-13
208F2_085hz0119 (G1)	H070/L018	n/a	hz208F2 (H070/L018)-G-13
208F2_085hz0126 (G1)	H077/L018	hz208F2-4	hz208F2 (H077/L018)-G-13
hz208F2 (VH3VL3)	H26/L024	n/a	hz208F2 (H026/L024)-G-13

【0591】

c 2 0 8 - G - 1 3 または 2 0 8 F 2 ヒト化型のいずれの注射も腫瘍成長を有意に阻害し、完全な腫瘍成長の退縮を誘導しさえした（対応する対照に対して $p < 0 . 0 5$ ）。c 2 0 8 F 2 - G - 1 3 および供試したヒト化型の間に統計的に有効な違いは見られなかった。

【0592】

従前に記載した M C F - 7 異種移植モデルにおいて、G - 1 3 とカップリングされた c 2 0 8 F 2 または h z 2 0 8 F 2 - 4 を用いて第 2 の試験セットを実施した（それぞれ図 2 8 A および 2 8 B）。マウスに 3 m g / k g の各 A D C を 4 日ごと 4 回の注射（Q 4 d 4）でまたは 1 回のみ i . p . 注射した。

【0593】

M C F 異種移植モデルにおいて D C を 4 回または 1 回のみ注射した場合に同じ強い抗腫瘍活性が見られた。

【0594】

実施例 2 1 : 2 + C a O V - 3 異種移植モデルにおける G - 1 3 または E - 1 3 化合物と
コンジュゲートされた 2 0 8 F 2 抗体の i n v i v o 活性

抗腫瘍活性を卵巣癌細胞株である C a O V - 3 異種移植モデルとしての 2 + 発現腫瘍でも試験した。この提示のため、D 0 においてマウスに 7×10^6 細胞を皮下注射した。腫瘍がおよそ $1 2 0 \text{ mm}^3$ に達した際（腫瘍細胞注射 1 9 日後）に、動物を対応する腫瘍サイズで 5 個体ずつの 5 群に分け、E - 1 3 または G - 1 3 のいずれかとカップリングされた c 2 0 8 F 2 および E - 1 3 または G - 1 3 のいずれかとカップリングされた無関連抗体 c 9 G 4 を用いて腹膜内処理した。マウスに 3 m g / k g の各 A D C を 4 日ごとに 1 回の注射の 6 回の注射サイクルで i . p . 注射した。異種移植成長速度の観察のためにマウスを追跡した。腫瘍体積は / $6 \times \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ}$ で計算した。

【0595】

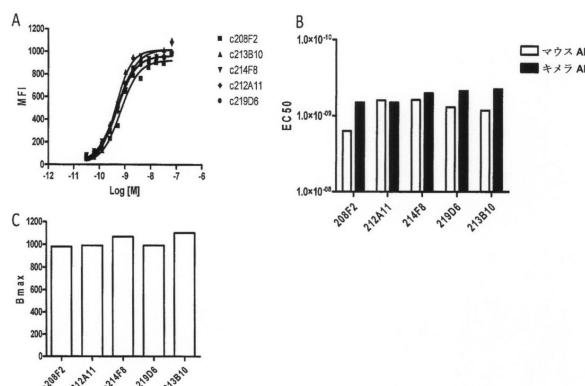
あまり大きくない一時的な成長の緩徐化を誘導した t c 9 G 4 - E - 1 3 に比べ、c 9 G 4 - G - 1 3 の注射は C a O V - 3 異種移植腫瘍の成長に影響を及ぼさなかった。一方で、c 2 0 8 F 2 - E - 1 3 または c 2 0 8 F 2 - G - 1 3 いずれかの注射は、5 0 日目にそれぞれ 9 5 % および 7 7 % の腫瘍成長阻害を誘導した（図 2 9 A および 2 9 B）。

10

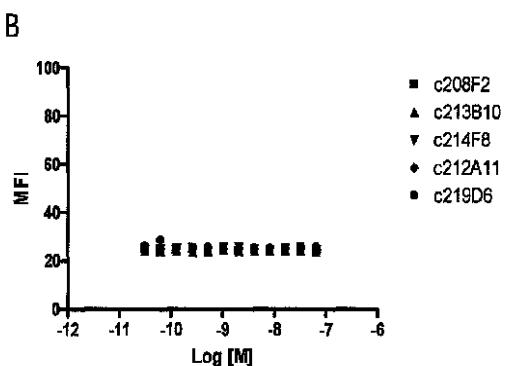
20

30

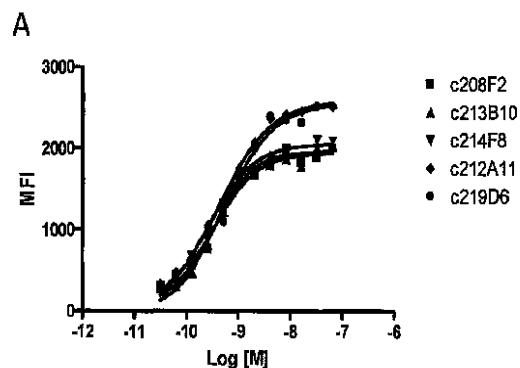
【図1】



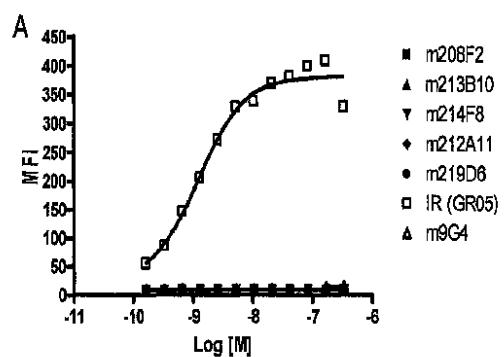
【図2 B】



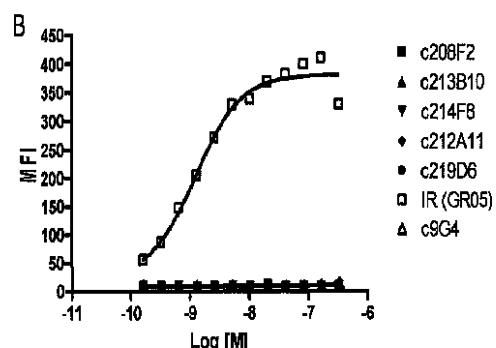
【図2 A】



【図3 A】



【図3 B】



【図4】

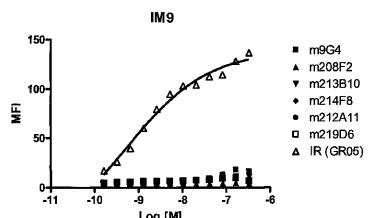
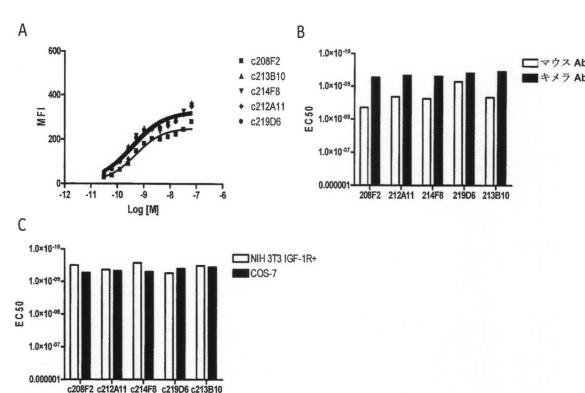
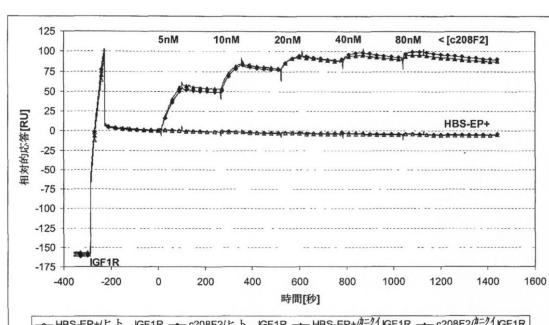


FIGURE 4

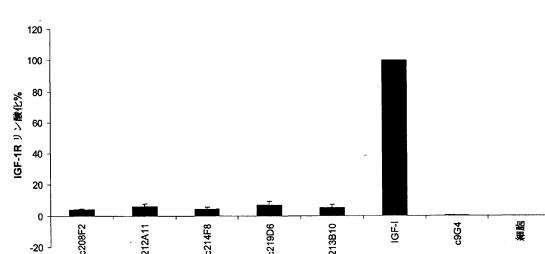
【図5】



【図6】



【図7】



【図9】

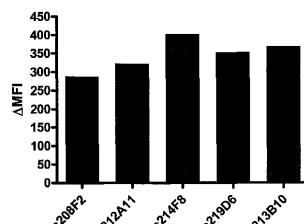
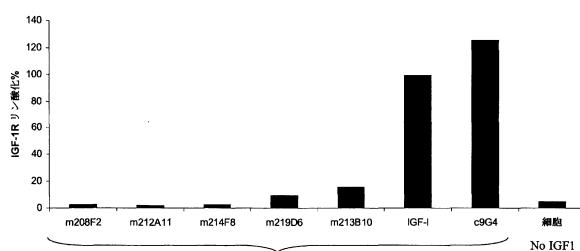


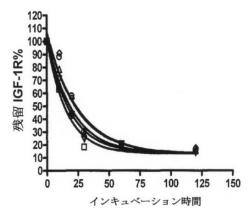
FIGURE 9

【図10】

【図8】



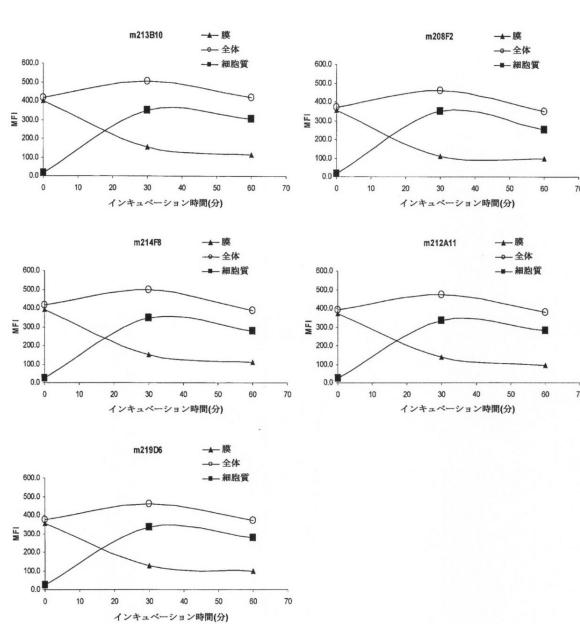
A



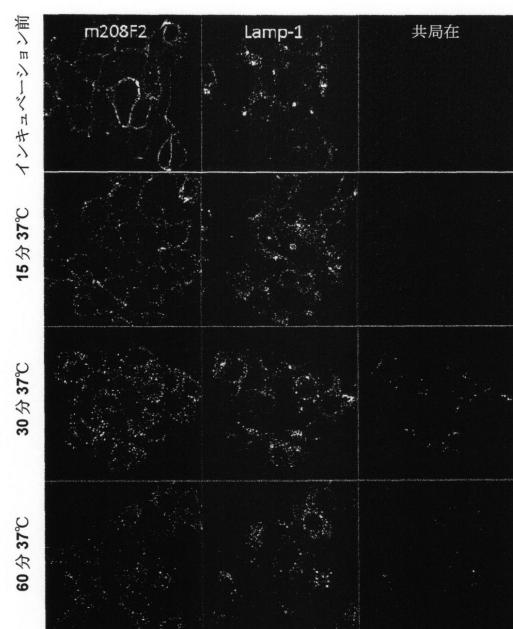
B

	半減期 (t1/2)
Abs	
m208F2	11.11
m212A11	14.3
m213B10	16.81
m214F8	17.85
m219D6	17.85
c213B10	12.83

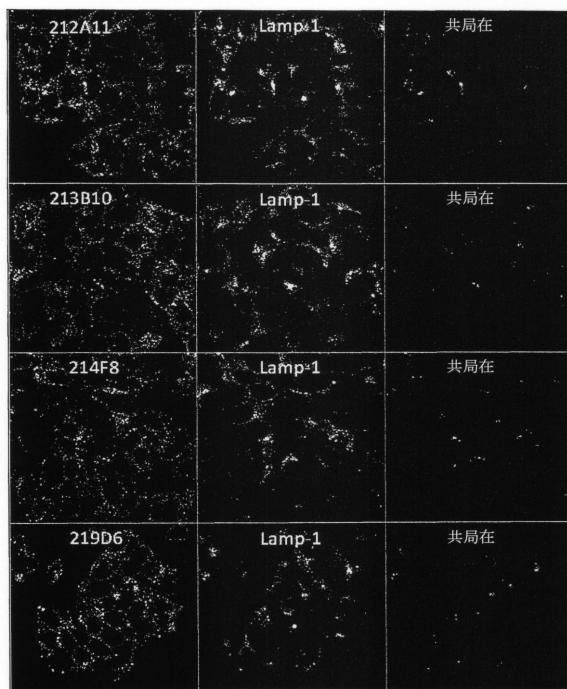
【図11】



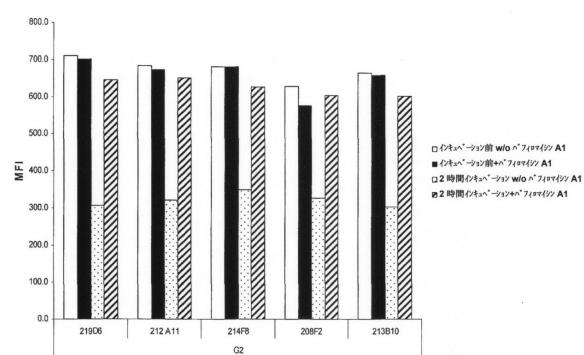
【図12 a】



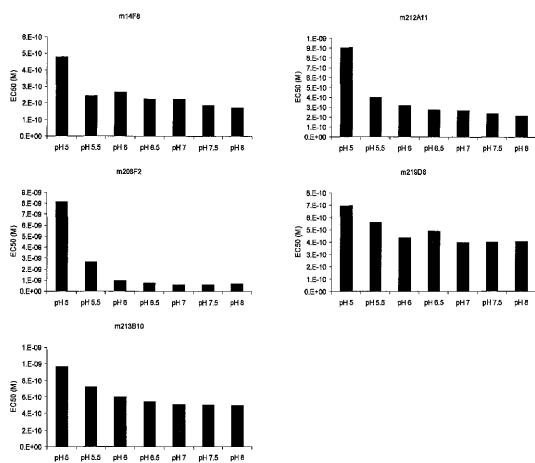
【図 1 2 b】



【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5 A】

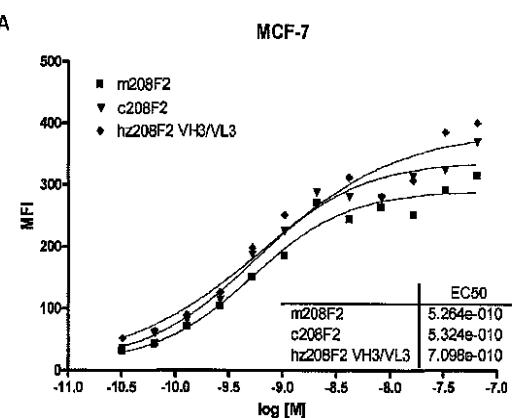
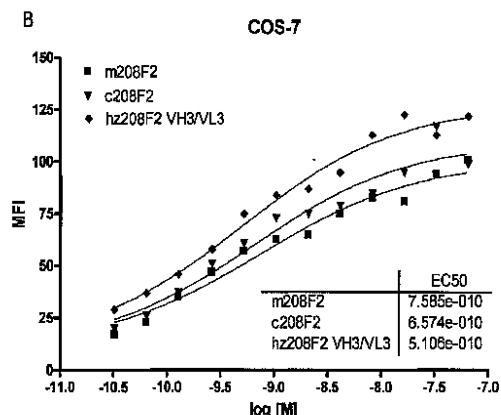
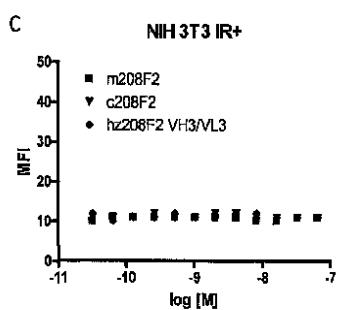


FIGURE 14

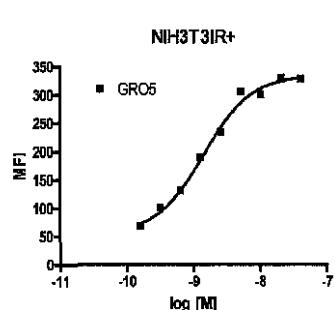
【図 15B】



【図 15C】



【図 15D】



【図 16】

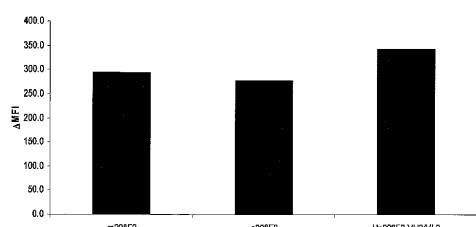
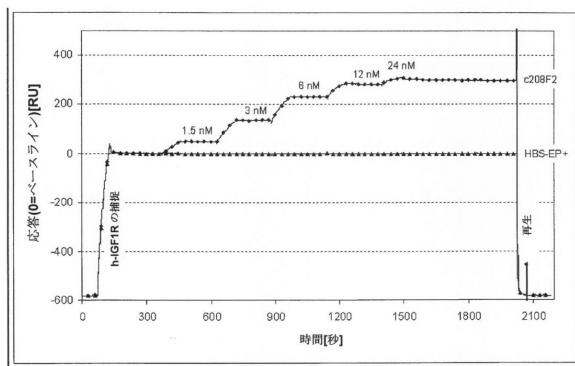
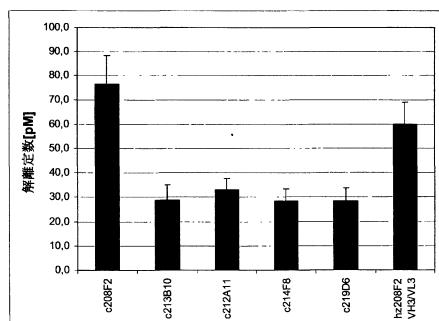


FIGURE 16

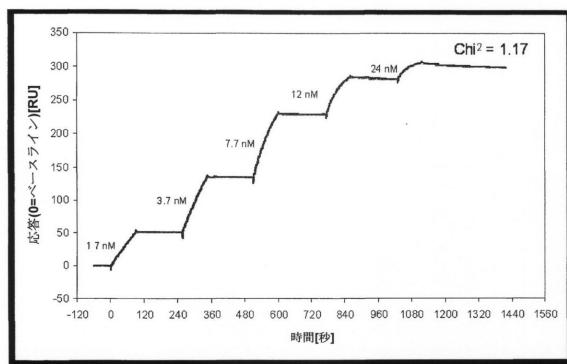
【図 17】



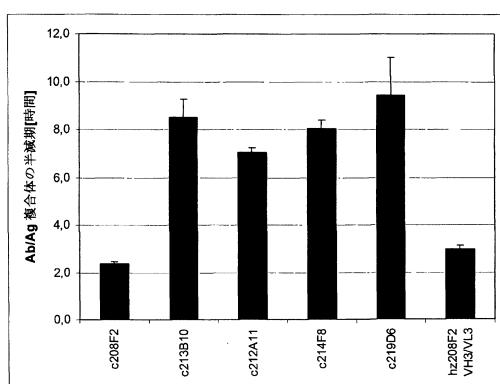
【図 19】



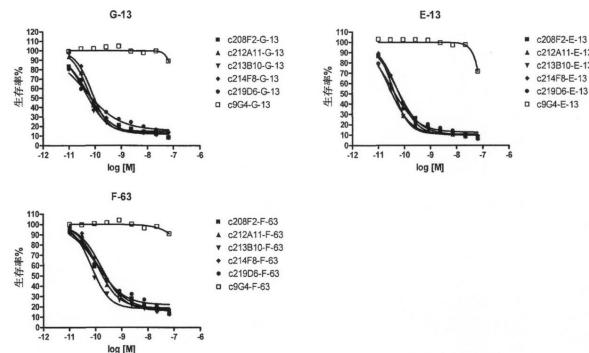
【図 18】



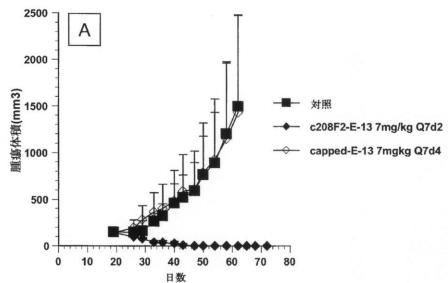
【図20】



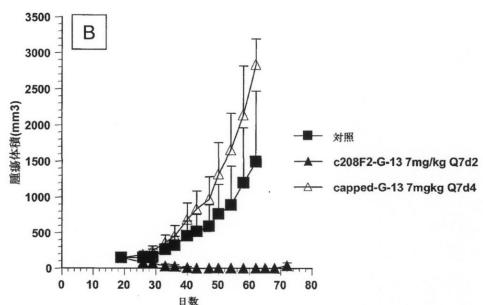
【図21】



【図22 A】

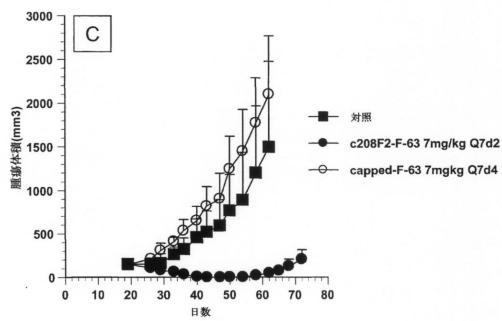


【図22 B】

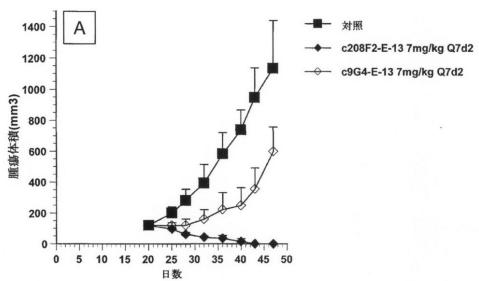


【図22 C】

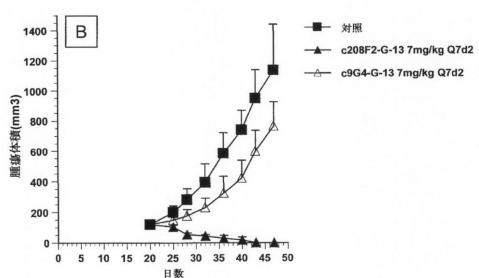
【図22 C】



【図23 A】



【図23 B】



【図24A】

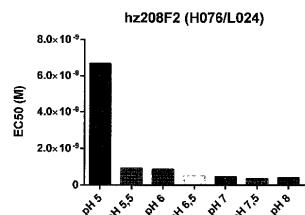
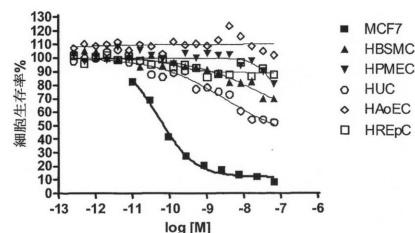


FIGURE 24A

【図25】



【図24B】

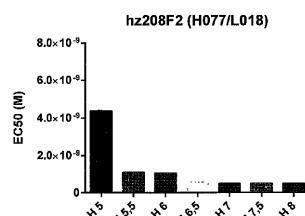
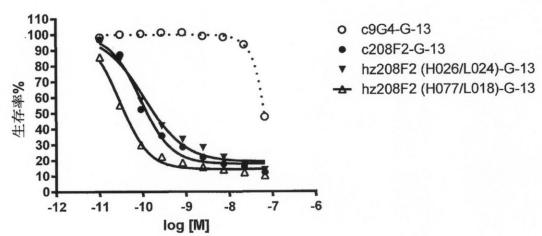
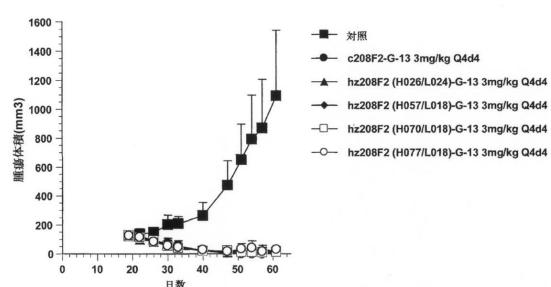


FIGURE 24B

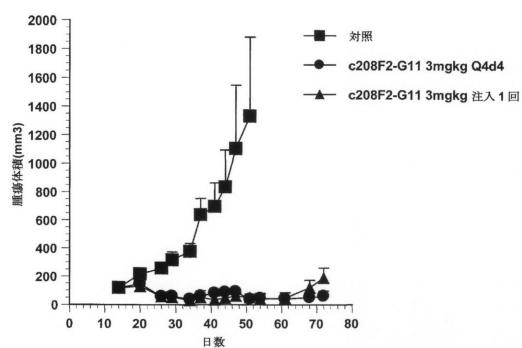
【図26】



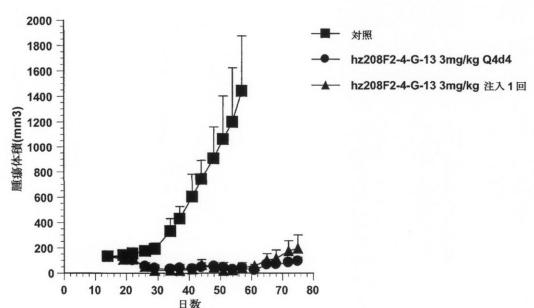
【図27】



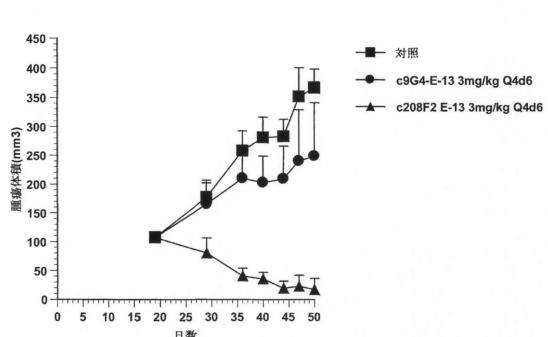
【図28A】



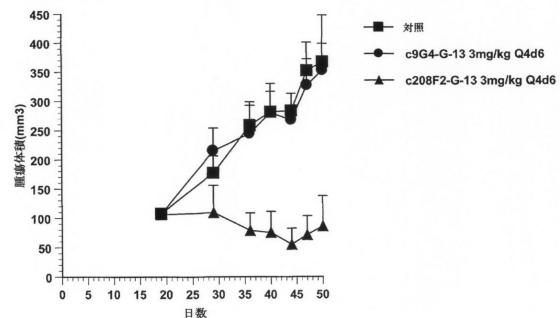
【図28B】



【図29A】



【図29B】



【配列表】

0006258523000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100176083
弁理士 松山 祐子

(72)発明者 イアン、リラット
フランス国カストル、シュマン、ド、モンプレジール、67

(72)発明者 ミシェル、ペレ
フランス国カストル、シュマン、ド、ラ、ピク、45

(72)発明者 リリアンヌ、ゲシュ
フランス国アイゼ、ルート、ド、クリューズ、15

(72)発明者 マチュー、ブルサー
フランス国セセル、イムーブル、レ、テラス、リュ、デュ、リュートナン、ボバーニュ、13ベ
156

(72)発明者 ジャン - フランソワ、アウー
フランス国ボーモン、ルート、デュ、サレーブ、ドメヌ、デュ、サレーブ、30

(72)発明者 ティエリー、シャンピオン
フランス国サン、ジュリアン、アン、ジュヌボア、イムーブル、ル、ケ、ダルマン、アブニユ、ド
、ラ、ガル、4

(72)発明者 アラン、ロベール
フランス国アンヌマス、リュ、ド、ロマニー、12

審査官 石井 裕美子

(56)参考文献 国際公開第2012/054748 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 39 / 00 - 39 / 44
A 61 K 38 / 00 - 38 / 58
A 61 K 9 / 00 - 9 / 72
A 61 K 47 / 00 - 47 / 69
A 61 P 35 / 00
C 07 K 16 / 28
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)