

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7042254号

(P7042254)

(45)発行日 令和4年3月25日(2022.3.25)

(24)登録日 令和4年3月16日(2022.3.16)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54
A 6 1 K	31/404 (2006.01)	A 6 1 K	31/404
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00

請求項の数 25 (全79頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-506725(P2019-506725)

(86)(22)出願日 平成29年8月7日(2017.8.7)

(65)公表番号 特表2019-524798(P2019-524798
A)

(43)公表日 令和1年9月5日(2019.9.5)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/045694

(87)国際公開番号 WO2018/031448

(87)国際公開日 平成30年2月15日(2018.2.15)

審査請求日 令和2年6月17日(2020.6.17)

(31)優先権主張番号 62/373,666

(32)優先日 平成28年8月11日(2016.8.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 508285606

ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ, アズ リプレゼンテッド バイ ザ セクレタリー, デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービスズ アメリカ合衆国 メリーランド 20892-7660, ベセスダ, エグゼキュティブ プールバード 6011, スイート 325, エムエスシー 7660, ナショナル インスティテューツ オブ ヘルス, オフィス オブ テクノロジー トランスファー

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

最終頁に続く

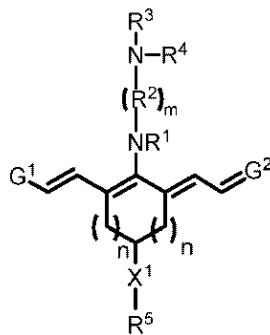
(54)【発明の名称】 近赤外光開裂性コンジュゲートおよびコンジュゲート前駆体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式 I

【化75】



(I)

の化学構造を有するコンジュゲートまたはその薬学的に許容され得る塩であって、

式中、mは、1、2、3、4、または5であり；

各nは、独立して、1、2、または3であり；

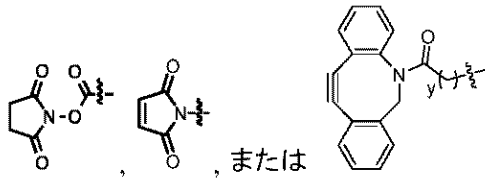
R¹およびR⁴は、独立して、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、
-ROH、-RC(O)OH、-C(O)-R、または-C(O)-O-Rであり、ここで、Rはアルキルであり；

R^2 は $C(R^c)_2$ であり、ここで、各 R^c は、独立して、H、ハロ、アルキル、またはアリールであり、または $(R^2)_m$ は、集合的に、フェニルであり；

R^3 は $-L_1-C(O)-X^2-$ 薬物であり、ここで、 L_1 は存在しないかリンカー部分であり、 X^2 はO、N(H)、またはN(CH₃)であり；

R^5 は $-(CH_2)_x-L_2-R^a$ であり、ここで、 x は1以上の整数であり、 L_2 はリンカー部分であるかまたは存在せず、 R^a は、 $-C(O)N(H)R^b$ 、 $-N(H)C(O)R^b$ 、 $-N(H)R^b$ 、 $-SR^b$ 、

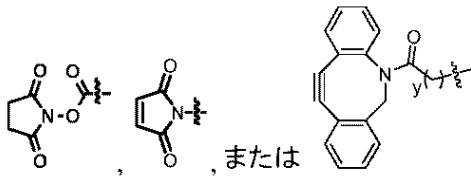
【化76】



10

であり、ここで、 y は1以上の整数であり、 R^b は標的剤、

【化77】



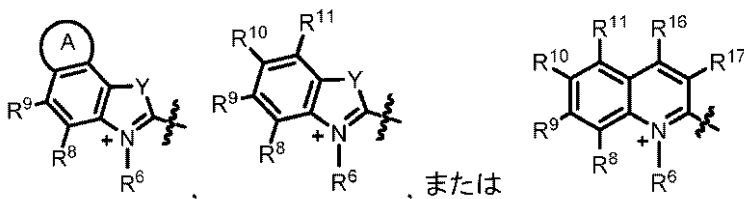
20

であり；

X^1 は、O、N、またはCH₂であり；

G¹ は、

【化78】

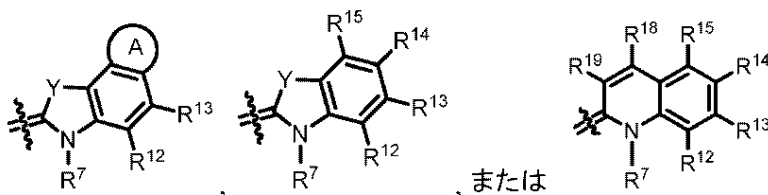


30

であり；

G² は、

【化79】



40

であり；

R^6 および R^7 は、独立して、アルキルスルホナート、H、アルキル、アルコキシ、または置換アミノアルキルであり；

$R^8 \sim R^{19}$ は、独立して、H、アルキル、アミノ、アルコキシ、またはアルキルスルホナートであり；

各 Y は、独立して、 $C(R^d)_2$ 、S、O、Se、または $N(R^d)$ であり、ここで、各 R^d は、独立して、アルキルまたはHであり；

50

各 A 環は、独立して、縮合されている 6 員のアリール環、脂肪族環、ヘテロ脂肪族環、またはヘテロアリール環である、コンジュゲートまたはその薬学的に許容され得る塩。

【請求項 2】

R¹ および R⁴ は、独立して、C₁ ~ C₄ アルキル、-ROH、-RCOOH、または -RCF₃ であり、ここで、R は C₁ ~ C₄ アルキルであり、任意に、R¹ および R⁴ は、独立して、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、t-ブチル、または -(CH₂)₂OH である、請求項 1 に記載のコンジュゲート。

【請求項 3】

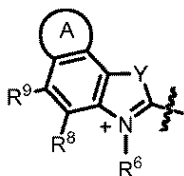
A 環が、任意に置換されたスルホナートで置換された縮合フェニル環である、請求項 1 または 2 に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 4】

G¹ は

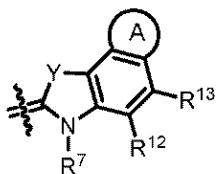
【化 8 0】



であり、かつ G² は

20

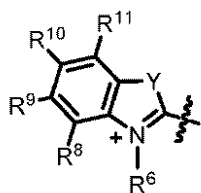
【化 8 1】



であり；または

G¹ は

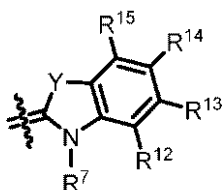
【化 8 2】



30

であり、かつ G² は

【化 8 3】



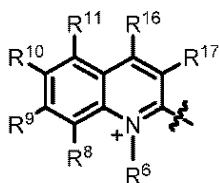
40

であり；または

G¹ は

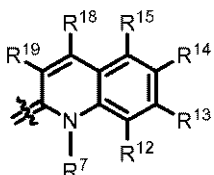
50

【化 8 4】



であり、かつ G 2 は

【化 8 5】



であり、

ここで、各 Y は同一であり、

R 6 および R 7 は同一であり、

R 8 ~ R 1 1 および R 1 6 ~ R 1 7 は、R 1 2 ~ R 1 5 および R 1 8 ~ R 1 9 とそれぞれ
同一である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

(i) 各 Y は C (C H 3) 2 であり；

(i i) R 6 および R 7 は、 - (C H 2) p S O 3 - または - (C H 2) p N (C H 3)
3 + であり、ここで、 p は、 1、 2、 3、 4、 または 5 であり；

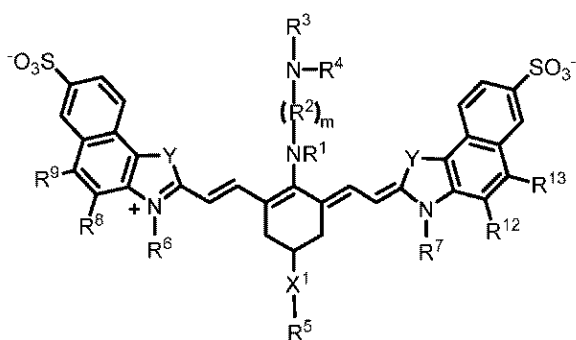
(i i i) R 8 ~ R 1 9 は H であり；または

(i v) (i)、 (i i)、 および (i i i) の任意の組み合わせ
である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

【請求項 6】

式 I I

【化 8 6】



(II)

の構造を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

【請求項 7】

R 3 は、

10

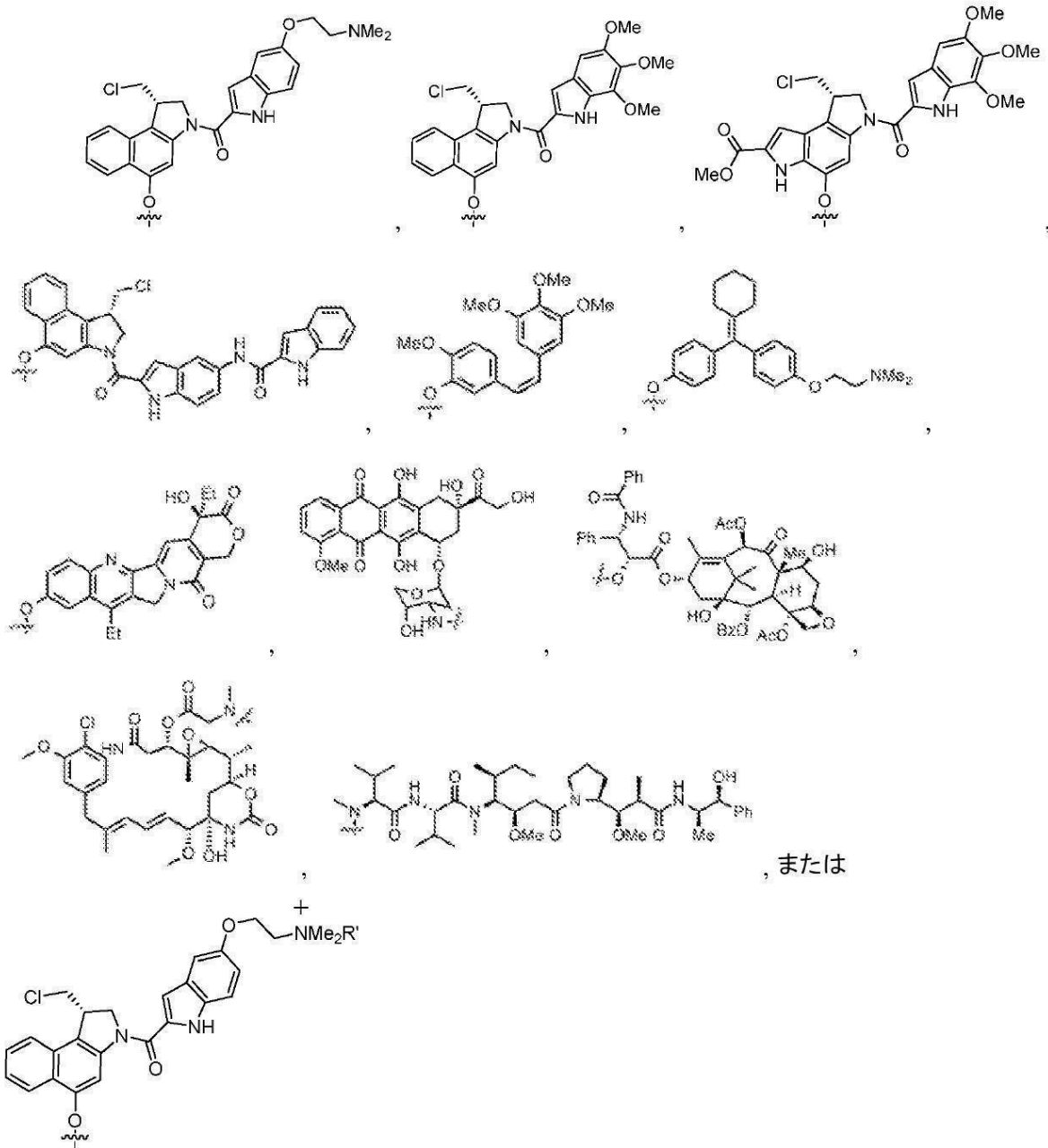
20

30

40

50

【化 8 8】



10

20

, または

30

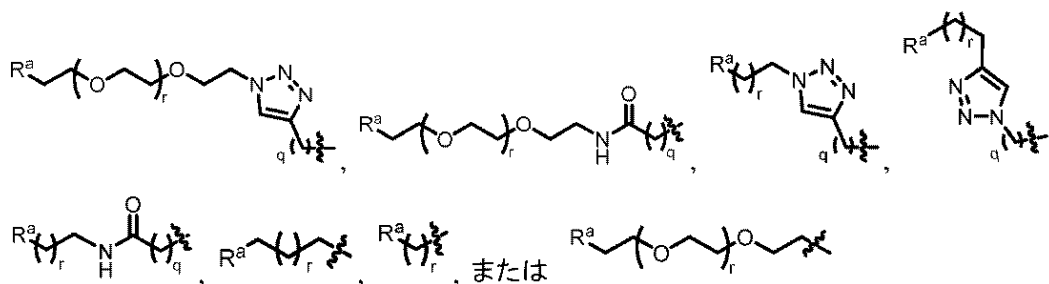
であり、ここで、R' は、C₁ ~ C₁₀ アルキルまたはアルキルスルホネートである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

【請求項 9】

R⁵ は、

40

【化 8 9】



50

であり、ここで、 q および r は、独立して、1、2、3、4、または5である、請求項1～8のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

【請求項10】

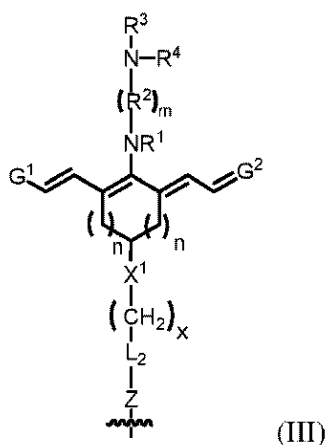
R^b は標的剤であり、任意に、ここで、 R^b は抗体である、請求項1～9のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

【請求項11】

R^5 は $-(CH_2)_x-L_2-R^a$ であり、ここで、 x は1以上の整数であり、 L_2 はリンカー部分であるかまたは存在せず、 R^a は、 $-C(O)N(H)R^b$ 、 $-N(H)C(O)R^b$ 、 $-N(H)R^b$ 、または $-SR^b$ であり、ここで、 R^b は標的剤であり、前記コンジュゲートは、1つまたは複数の、 R^b に結合したさらなる部分をさらに含み、前記さらなる部分の各々は、独立して、式III

10

【化90】



20

の化学構造を有し、

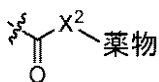
ここで、 m 、 n 、 x 、 $R^1 \sim R^4$ 、 X^1 、 G^1 、 G^2 、および L_2 は、請求項1に定義のとおりであり、 Z は、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、または $-S-$ である、請求項1～10のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

【請求項12】

30

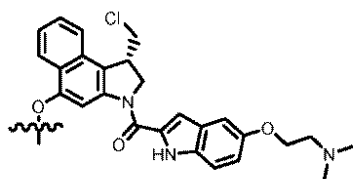
R^b は抗体であり、 R^3 は

【化91】



であり、ここで、 $-X^2-$ 薬物は

【化92】



40

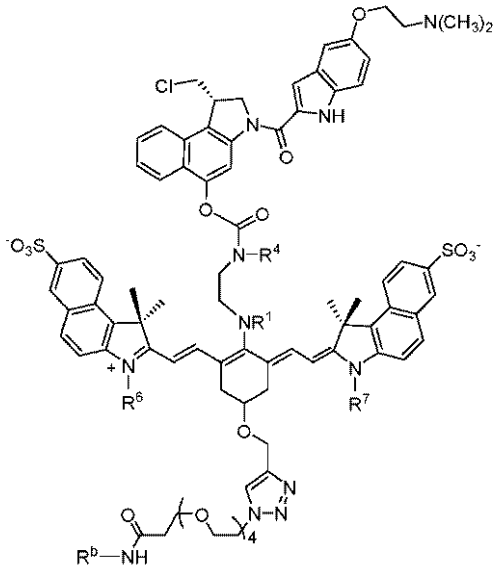
である、請求項1～11のいずれかに記載のコンジュゲート。

【請求項13】

前記コンジュゲートは、

50

【化 9 3】



10

であり、式中、 R^1 および R^4 は、メチル、エチル、 n -プロピル、 i -プロピル、 t -ブチル、または $-(CH_2)_2OH$ であり；

R^6 および R^7 は、 $-(CH_2)_4SO_3^-$ または $-(CH_2)_4N(CH_3)_3^+$ であり；

20

R^b は抗体であり、任意に、ここで、前記抗体は、パニツムマブまたはトラスツズマブである、請求項 1 に記載のコンジュゲート。

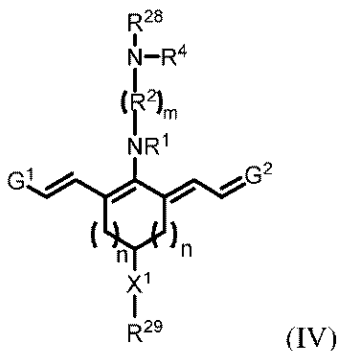
【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートおよび薬学的に許容され得るキャリアを含む薬学的組成物であって、 R^b は標的剤である、薬学的組成物。

【請求項 1 5】

式 I V

【化 9 4】



30

の構造を有する前駆体化合物またはその塩であって、

式中、 m は、1、2、3、4、または 5 であり；

各 n は、独立して、1、2、または 3 であり；

R^1 および R^4 は、独立して、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、 $-ROH$ 、 $-RC(O)OH$ 、 $-C(O)-R$ 、または $-C(O)-O-R$ であり、ここで、 R はアルキルであり；

R^2 は $C(R^c)_2$ であり、ここで、各 R^c は、独立して、 H 、ハロ、アルキル、またはアリールであり、または $(R^2)_m$ は、集合的に、フェニルであり；

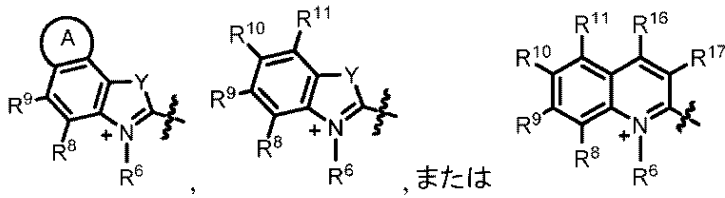
X^1 は、 O 、 N 、または CH_2 であり；

G^1 は、

40

50

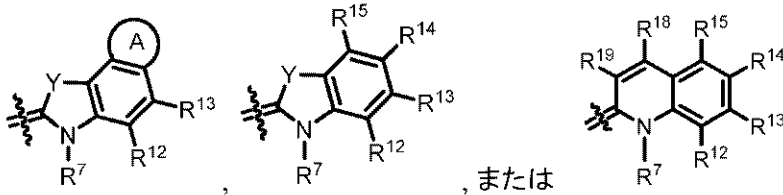
【化95】



であり；

G 2 は、

【化96】



であり；

R 6 および R 7 は、独立して、アルキルスルホナート、H、アルキル、アルコキシ、または置換アミノアルキルであり；

R 8 ~ R 1 9 は、独立して、H、アルキル、アミノ、アルコキシ、またはアルキルスルホナートであり；

各 Y は、独立して、C (R d) 2、S、O、Se、または N (R d) であり、ここで、各 R d は、独立して、アルキルまたは H であり；

各 A 環は、独立して、縮合されている 6 員のアリール環、脂肪族環、ヘテロ脂肪族環、またはヘテロアリール環であり；

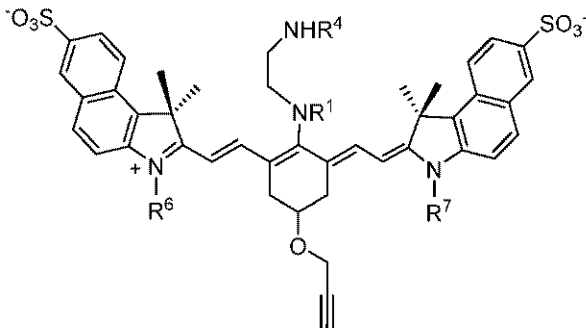
R 2 8 は、水素または保護基であり；

R 2 9 は、- (C H 2) u - C C H であり、ここで、u は、1、2、3、4、または 5 である、前駆体化合物またはその塩。

【請求項16】

前記前駆体化合物は、

【化97】



であり、

式中、R 1 および R 4 は、メチル、エチル、n - プロピル、i - プロピル、t - ブチル、または - (C H 2) 2 O H であり；

R 6 および R 7 は、- (C H 2) p S O 3 - または - (C H 2) p N (C H 3) 3 + であり、ここで、p は、1、2、3、4、または 5 である、請求項 1 5 に記載の前駆体化合物。

【請求項17】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートを含む組成物であって、

10

20

30

40

50

前記コンジュゲートを提供する工程であって、R^bは標的剤である、工程；およびその後、近赤外範囲の選択された波長および選択された強度を有する有効量の光の標的化利用により前記コンジュゲートに照射して開裂反応を誘起し、前記コンジュゲートから薬物を放出させる、工程を含む、方法において使用するための組成物。

【請求項18】

光の標的化利用により前記コンジュゲートに照射する工程が、波長が650～900nmの光を生じるレーザーを前記コンジュゲートに照射することを含む、請求項17に記載の組成物。

【請求項19】

前記方法が、

前記コンジュゲートの蛍光レベルをモニタリングする工程；および前記蛍光レベルが標的レベル未満に低下した場合に照射を停止する工程をさらに含む、請求項17または請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

前記方法が、

標的分子を含むか、または含むと疑われる生物試料を提供する工程；前記生物試料を前記コンジュゲートと接触させる工程であって、前記コンジュゲートの標的剤が前記標的分子を認識して、前記標的分子に結合することができる、工程；およびその後、前記光の標的化利用により前記生物試料に照射する工程をさらに含む、請求項17～19のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項21】

請求項17～19のいずれか1項に記載の組成物であって、前記方法が、前記薬物で処置することができる状態を有すると被験体を同定する工程；治療有効量の前記コンジュゲートで前記組成物を前記被験体に投与する工程；およびその後、前記被験体の標的化部分への近赤外範囲の波長および選択された強度を有する前記有効量の光の標的化利用によって前記コンジュゲートに照射し、それにより、前記コンジュゲートの少なくともいくつかの分子から前記薬物を放出する工程であって、任意に、前記標的化部分に利用された光の前記有効量が5～250J/cm²である、工程をさらに含む、組成物。

【請求項22】

前記被験体が腫瘍を有し、前記被験体の前記標的化部分が腫瘍位置に隣接する領域を含み、任意に、前記方法が、治療有効量の前記コンジュゲートで前記組成物を前記被験体に投与する前に、前記被験体から腫瘍の少なくとも一部を切除する工程をさらに含む、請求項21に記載の組成物。

【請求項23】

請求項17～19のいずれか1項に記載の組成物であって、前記方法が、治療有効量の前記コンジュゲートで前記組成物を、前記薬物で処置することができる状態を有すると疑われる被験体に投与する工程；その後、近赤外範囲の波長および選択された強度を有する光量の前記被験体の標的化部分への標的化利用によって前記コンジュゲートに照射する工程であって、前記光量が、前記コンジュゲートの蛍光を生じさせるのに十分であるが、前記コンジュゲートの開裂を誘起し、前記コンジュゲートから前記薬物を放出させるには不十分である、工程；前記被験体の前記標的化部分中の前記コンジュゲートから任意の蛍光を検出する工程；およびその後、蛍光が検出された場合に、近赤外範囲の波長および選択された強度を有する前記有効量の光の前記被験体の前記標的化部分への標的化利用によって前記コンジュゲートに照射し、それにより、前記コンジュゲートの少なくともいくつかの分子から前記薬物を放出する、工程をさらに含む、組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 2 4】

前記状態が、前記薬物で処置することができる腫瘍であり、前記被験体の前記標的化部分が前記腫瘍部位を含み、前記方法が、治療有効量の前記コンジュゲートを投与する前に前記被験体から前記腫瘍の少なくとも一部を切除する工程をさらに含む、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

(i) 前記状態が前記薬物で処置することができる腫瘍であり、(i i) 前記被験体の前記標的化部分が前記腫瘍部位を含み、(i i i) 前記被験体の前記標的化部分中に蛍光が検出され、前記方法が、前記被験体の前記標的化部分中の前記蛍光を検出した後に前記被験体から前記腫瘍の少なくとも一部を切除する工程；およびその後、前記有効量の光の前記被験体の前記標的化部分への標的化利用によって前記コンジュゲートに照射する工程をさらに含む、請求項 2 3 に記載の組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、2016年8月11日に出願された米国仮出願第62/373,666号の利益を主張し、この米国仮出願は、その全体が本明細書において参考として援用される。

20

【0 0 0 2】

分野

本開示は、コンジュゲート、特に、ヘプタメチンシアニンフルオロフォアを含む標的剤 - 薬物コンジュゲート、コンジュゲート前駆体、ならびにコンジュゲートの作製方法および使用方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

近年の抗体 - 薬物コンジュゲートの臨床での成功により、高分子治療と小分子治療の組み合わせが有利であることが実証されてきた。この刺激的な分野において残された課題は、部位特異的に薬物が送達される改善された開裂選択性を提供するリンカーストラテジーを特定することである。部位特異的様式で利用することができる外部刺激に頼る抗体 - 薬物開裂の化学的性質を開発することが魅力的な解決法となるであろう。

30

【0 0 0 4】

近赤外範囲（例えば、650 ~ 900 nm）の光は、この文脈において固有の可能性を有する。これらの波長は、有意な組織透過性、最低毒性を示し、さらに、診断および治療の両方の用途について臨床的に実証されている。近赤外蛍光画像化は一定の臨床的状況における日常業務であり、革新的応用（例えば、手術中の腫瘍境界を光学的に画定する方法など）が開発中である。光毒性小分子を使用した光に基づく治療法は、がんおよび皮膚障害の処置において多様な歴史がある。

40

【0 0 0 5】

しかし、既存のアプローチは、固有の腫瘍選択性がほとんど無い、多くの場合酵素による内因性の反応を使用した細胞内プロセスに依存する。結果として、抗原特異的機序または抗原非依存性機序のいずれかによって良性組織が抗体を取り込むことによりの外れの薬物放出が、特に抗体 - 薬物コンジュゲートの異化を担う器官において、起こり得、用量制限毒性をもたらし得る。さらに、循環系への不完全な放出が重要な問題であり得る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

50

概要

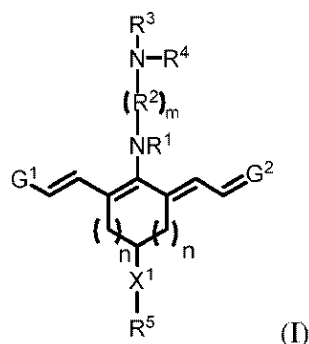
本開示は、ヘプタメチンシアニフルオロフォアを含む標的剤 - 薬物コンジュゲート、前記コンジュゲートの前駆体、ならびに前記コンジュゲートおよび前駆体の作製方法および使用方法の実施形態に関する。標的剤は、標的部位への薬物の優先的送達または標的化送達を促進する。開示のコンジュゲートの実施形態は、近赤外光を照射した場合に光分解を経て、それにより、分子内開裂および薬物の放出が引き起こされる。好都合なことに、コンジュゲートのいくつかの実施形態はフルオロフォアであり、光分解および薬物放出のすぐ後に蛍光は消失する。開示の標的剤 - 薬物コンジュゲートの実施形態は、併用薬の放出を伴う部位特異的送達および選択的活性化に有用である。被験体内のコンジュゲートの位置を視覚化するためかつ / または薬物放出の指標として、投与されたコンジュゲートの蛍光レベルをモニタリングすることができる。

10

【0007】

標的剤 - 薬物コンジュゲートならびに薬物および反応性基を含む中間体コンジュゲートは、式 I

【化1】



20

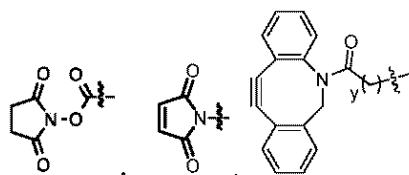
の化学構造を有するコンジュゲートまたはその薬学的に許容され得る塩である。

【0008】

式 I に関して、 m は、1、2、3、4、または 5 であり；各 n は、独立して、1、2、または 3 である。 R^1 および R^4 は、独立して、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、 $-ROH$ 、 $-RC(O)OH$ 、 $-C(O)-R$ 、または $-C(O)-O-R$ であり、ここで、 R はアルキルである。 R^2 は $C(R^c)_2$ であり、ここで、各 R^c は、独立して、 H 、ハロ、アルキル、またはアリールであり、または $(R^2)_m$ は、集散的に、フェニルである。 R^3 は $-L_1-C(O)-X^2$ - 薬物であり、ここで、 L_1 は存在しないかリンカー部分であり、 X^2 は O 、 $N(H)$ 、または $N(CH_3)$ である。 R^5 は $-(CH_2)_x-L_2-R^a$ であり、ここで、 x は 1 以上の整数であり、 L_2 はリンカー部分であるかまたは存在せず、 R^a は、

30

【化2】

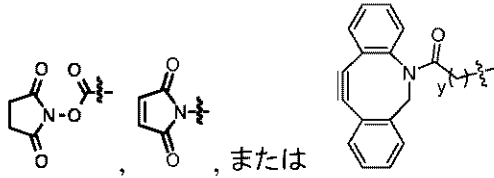


40

(式中、 y は 1 以上の整数である)、 $-C(O)N(H)R^b$ 、 $-N(H)C(O)R^b$ 、 $-N(H)R^b$ または $-SR^b$ であり、 R^b は標的剤、

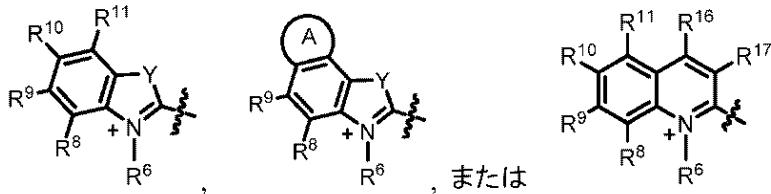
50

【化3】



であり、G¹は、

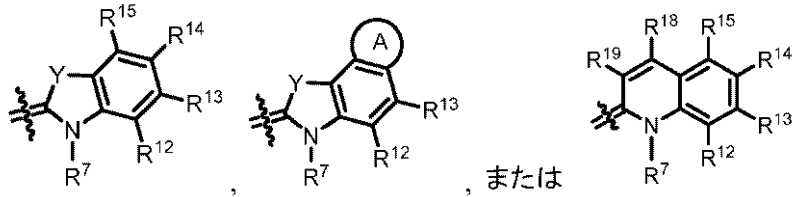
【化4】



10

であり、G²は、

【化5】



20

である。R⁶およびR⁷は、独立して、H、アルキル、アルコキシ、アルキルスルホナート、または置換アミノアルキルである。R⁸～R¹⁹は、独立して、H、アルキル、アミノ、アルコキシ、またはアルキルスルホナートである。各Yは、独立して、C(R^d)₂、S、O、Se、またはN(R^d)であり、ここで、各R^dは、独立して、Hまたはアルキルである。各A環は、独立して、縮合されている6員の脂肪族環、ヘテロ脂肪族環、アリール環、またはヘテロアリール環である。

30

【0009】

G¹およびG²は、実質的に同じであってもよいし、互いに異なってもよい。いくつかの実施形態では、各Yは同一であり、R⁶およびR⁷は同一であり、R⁸～R¹¹およびR¹⁶～R¹⁷は、R¹²～R¹⁵およびR¹⁸～R¹⁹とそれぞれ同一である。上記実施形態のいずれかまたは全てにおいて、Yは、C(CH₃)₂であり得る。上記実施形態のいずれかまたは全てにおいて、R⁶およびR⁷は、-(CH₂)_pSO₃-または-(CH₂)_pN(CH₃)₃⁺であり得、ここで、pは、1、2、3、4、または5である。上記実施形態のいずれかまたは全てにおいて、R¹およびR⁴は、独立して、C₁～C₄アルキル、-ROH、-RCOOH、または-RCF₃であり得、ここで、RはC₁～C₄アルキルである。

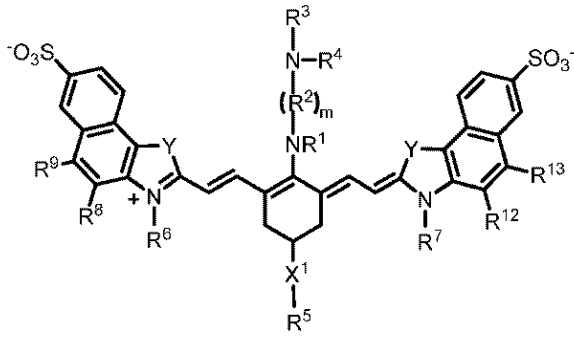
40

【0010】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、式IIの構造を有し、式中、R¹～R⁹、R¹²、R¹³、m、X¹、およびYは、前に定義したとおりである。

50

【化6】



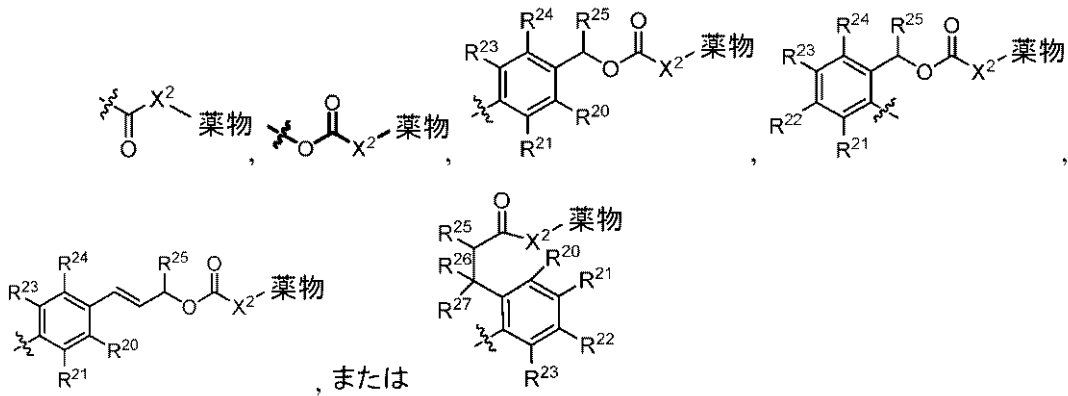
(II)

10

【0011】

上記実施形態のいずれかまたは全てにおいて、R³は、

【化7】

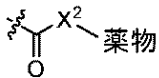


20

であり得、ここで、R²⁰ ~ R²⁷は、独立して、H、アルキル、-NO₂、-NR^{e2}、-NR^{e3}、アルコキシ、またはスルホナートであり、ここで、各R^eは、独立して、H、ハロ、またはアルキルである。いくつかの実施形態では、R²⁰ ~ R²⁵はHである。ある特定の実施形態では、R³は、

30

【化8】



である。上記実施形態のいずれかまたは全てにおいて、薬物は抗がん薬であり得る。1つの実施形態では、薬物は、デュオカルマイシン（例えば、デュオカルマイシンDMなど）である。

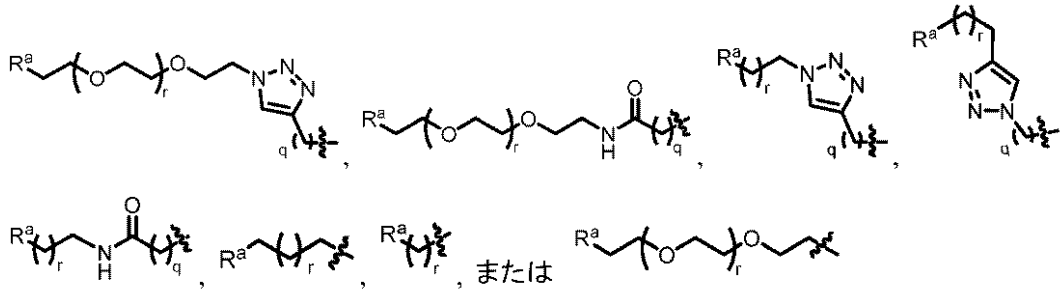
【0012】

上記実施形態のいずれかまたは全てにおいて、R⁵は、

40

50

【化 9】



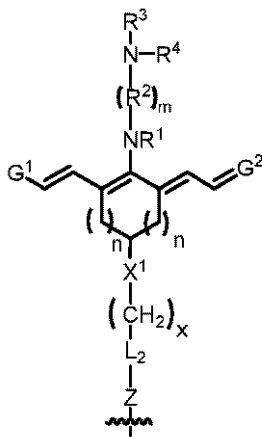
10

であり得、ここで、 q および r は、独立して、1、2、3、4、または5である。いくつかの実施形態では、 R^b は、抗体などの標的剤である。

【0013】

上記実施形態のいずれかまたは全てにおいて、 R^5 は $-(CH_2)_x-L_2-R^a$ であり得、ここで、 x は1以上の整数であり、 L_2 はリンカー部分であるかまたは存在せず、 R^a は、 $-C(O)N(H)R^b$ 、 $-N(H)C(O)R^b$ 、 $-N(H)R^b$ 、または $-SR^b$ であり、ここで、 R^b は標的剤であり、コンジュゲートは、1つまたは複数の、 R^b に結合したさらなる部分をさらに含み、さらなる部分の各々は、独立して、式 III

【化 10】



20

30

の化学構造を有し、ここで、 m 、 n 、 x 、 $R^1 \sim R^4$ 、 X^1 、 G^1 、 G^2 、および L_2 は、前に定義したとおりであり、 Z は、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、または $-S-$ である。

【0014】

薬学的組成物は、式 I に従うコンジュゲート（ここで、 R^b は標的剤である）および薬学的に許容され得るキャリアを含む。

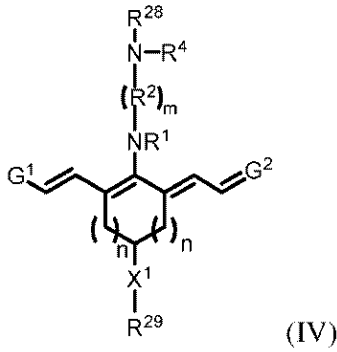
【0015】

開示の標的剤-薬物コンジュゲートを調製するための前駆体化合物の実施形態は、式 IV :

40

50

【化 1 1】



10

の化学構造またはその塩を有する。

【0016】

式IVに関して、 m 、 n 、 R^1 、 R^2 、 R^4 、 G^1 、 G^2 、および X^1 は、前に定義したとおりであり； R^{28} は、水素または保護基であり； R^{29} は、 $-(CH_2)_u-C(CH_3)_2-$ であり、ここで、 u は、1、2、3、4、または5である。いくつかの実施形態では、 R^{28} は水素である。

【0017】

本明細書に開示されるコンジュゲートを使用する方法は、式Iに従うコンジュゲートを提供する工程であって、 R^b は標的剤である、工程；およびその後、近赤外範囲の選択された波長および選択された強度を有する有効量の光の標的化利用によりコンジュゲートに照射して開裂反応を誘起し、コンジュゲートから薬物を放出させる、工程を含む。いくつかの実施形態では、光の標的化利用によりコンジュゲートに照射する工程は、波長が650～900nmの光を生じるレーザーをコンジュゲートに照射することを含む。上記実施形態のいずれかまたは全てにおいて、本方法は、コンジュゲートの蛍光レベルをモニタリングする工程、および蛍光レベルが標的レベル未満に低下した場合に照射を中止する工程をさらに含み得る。

20

【0018】

上記実施形態のいずれかまたは全てにおいて、本方法は、(i)標的分子を含むか、または含むと疑われる生物試料を提供する工程；(ii)生物試料を前記コンジュゲートと接触させる工程であって、コンジュゲートの標的剤が標的分子を認識して、標的分子に結合することができる、工程；および(iii)その後、光の標的化利用により生物試料に照射する工程をさらに含み得る。

30

【0019】

上記実施形態のいずれかまたは全てにおいて、本方法は、(i)薬物で処置することができる状態を有すると被験体を同定する工程；(ii)治療有効量のコンジュゲートまたはコンジュゲートを含む薬学的組成物を被験体に投与する工程；および(iii)その後、被験体の標的化部分への近赤外範囲の波長および選択された強度を有する有効量の光の標的化利用によってコンジュゲートに照射し、それにより、コンジュゲートの少なくともいくつかの分子から前記薬物を放出する工程をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、被験体は腫瘍を有し、被験体の標的化部分が腫瘍位置に隣接する領域を含む。上記実施形態のいずれかまたは全てにおいて、標的化部分に利用された光の有効量は5～250J/cm²であり得る。

40

【0020】

本明細書に開示される通りのコンジュゲートを使用する別の方法は、(i)治療有効量のコンジュゲートまたはコンジュゲートを含む薬学的組成物を、薬物で処置することができる状態を有すると疑われる被験体に投与する工程；(ii)その後、近赤外範囲の波長および選択された強度を有する光量の被験体の標的化部分への標的化利用によってコンジュゲートに照射する工程であって、光量が、コンジュゲートの蛍光を生じさせるのに十分

50

であるが、コンジュゲートの開裂を誘起し、コンジュゲートから薬物を放出させるには不十分である、工程；(iii)被験体の標的化部分中のコンジュゲートから任意の蛍光を検出する工程；および(iv)その後、蛍光が検出された場合に、近赤外範囲の波長および選択された強度を有する有効量の光の被験体の標的化部分への標的化利用によってコンジュゲートに照射し、それにより、コンジュゲートの少なくともいくつかの分子から薬物を放出する、工程を含む。

【0021】

本発明の前述および他の目的、特徴、および利点は、添付の図面を参照することにより、以下の詳細な説明からより明らかとなるであろう。

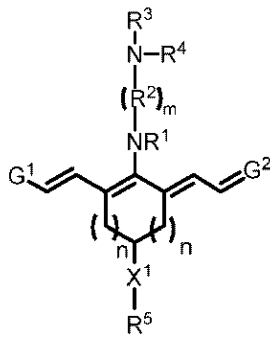
本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

10

(項目1)

式I

【化75】



(I)

20

の化学構造を有するコンジュゲートまたはその薬学的に許容され得る塩であって、

式中、 m は、1、2、3、4、または5であり；

各 n は、独立して、1、2、または3であり；

R^1 および R^4 は、独立して、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、 $-ROH$ 、 $-RC(O)OH$ 、 $-C(O)-R$ 、または $-C(O)-O-R$ であり、ここで、 R はアルキルであり；

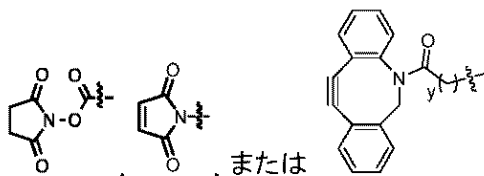
R^2 は $C(R_c)_2$ であり、ここで、各 R_c は、独立して、 H 、ハロ、アルキル、またはアリールであり、または $(R^2)_m$ は、集合的に、フェニルであり；

30

R^3 は $-L_1-C(O)-X^2$ -薬物であり、ここで、 L_1 は存在しないかリンカー部分であり、 X^2 は O 、 $N(H)$ 、または $N(CH_3)$ であり；

R^5 は $-(CH_2)_x-L_2-R^a$ であり、ここで、 x は1以上の整数であり、 L_2 はリンカー部分であるかまたは存在せず、 R^a は、 $-C(O)N(H)R^b$ 、 $-N(H)C(O)R^b$ 、 $-N(H)R^b$ 、 $-SR^b$ 、

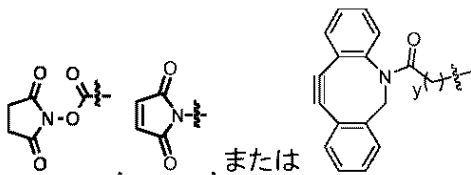
【化76】



40

であり、ここで、 y は1以上の整数であり、 R^b は標的剤、

【化77】



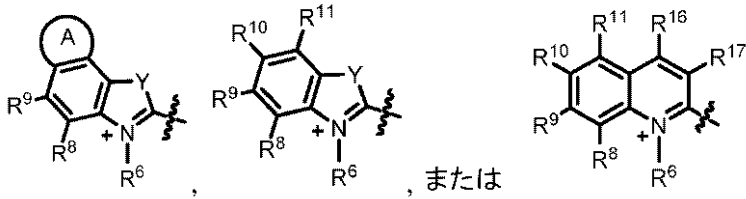
50

であり；

X_1 は、O、N、または CH_2 であり；

G_1 は、

【化78】

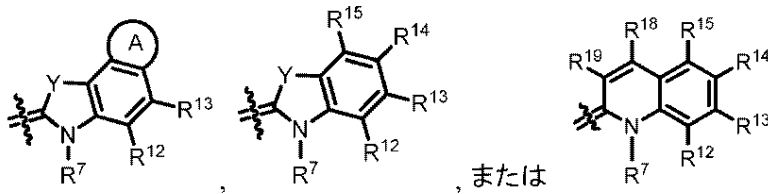


10

であり；

G_2 は、

【化79】



20

であり；

R_6 および R_7 は、独立して、アルキルスルホナート、H、アルキル、アルコキシ、または置換アミノアルキルであり；

$R_8 \sim R_{19}$ は、独立して、H、アルキル、アミノ、アルコキシ、またはアルキルスルホナートであり；

各Yは、独立して、 $C(R_d)_2$ 、S、O、Se、または $N(R_d)$ であり、ここで、各 R_d は、独立して、アルキルまたはHであり；

各A環は、独立して、縮合されている6員のアリール環、脂肪族環、ヘテロ脂肪族環、またはヘテロアリール環である、コンジュゲートまたはその薬学的に許容され得る塩。

30

(項目2)

R_1 および R_4 は、独立して、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $-ROH$ 、 $-RCOOH$ 、または $-RCF_3$ であり、ここで、Rは $C_1 \sim C_4$ アルキルであり、任意選択的に、 R_1 および R_4 は、独立して、メチル、エチル、*n*-プロピル、*i*-プロピル、*t*-ブチル、または $-(CH_2)_2OH$ である、項目1に記載のコンジュゲート。

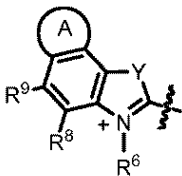
(項目3)

A環が、任意選択的に置換されたスルホナートで置換された縮合フェニル環である、項目1または2に記載のコンジュゲート。

(項目4)

G_1 は

【化80】

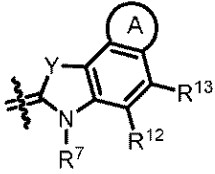


40

であり、かつ G_2 は

50

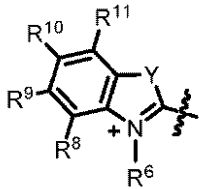
【化 8 1】



であり；または

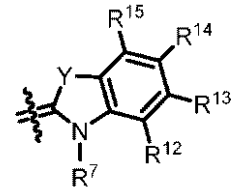
G 1は

【化 8 2】



であり、かつ G 2は

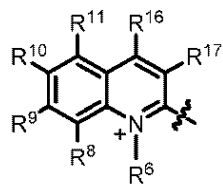
【化 8 3】



であり；または

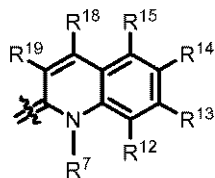
G 1は

【化 8 4】



であり、かつ G 2は

【化 8 5】



であり、

ここで、各 Y は同一であり、

R 6 および R 7 は同一であり、

R 8 ~ R 11 および R 16 ~ R 17 は、R 12 ~ R 15 および R 18 ~ R 19 とそれぞれ同一である、項目 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

(項目 5)

(i) 各 Y は $C(CH_3)_2$ であり；

10

20

30

40

50

(ii) R₆およびR₇は、-(CH₂)_pSO₃⁻または-(CH₂)_pN(CH₃)₃⁺であり、ここで、pは、1、2、3、4、または5であり；

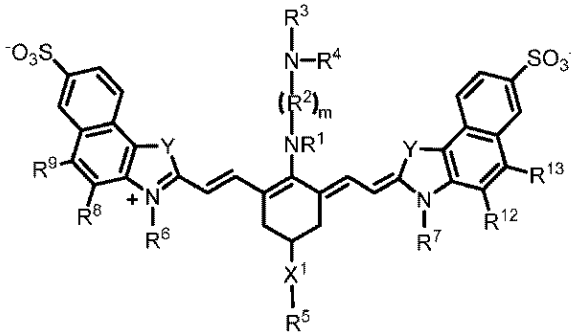
(iii) R₈~R₁₉はHであり；または

(iv) (i)、(ii)、および(iii)の任意の組み合わせである、項目1~4のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

(項目6)

式II

【化86】



(II)

10

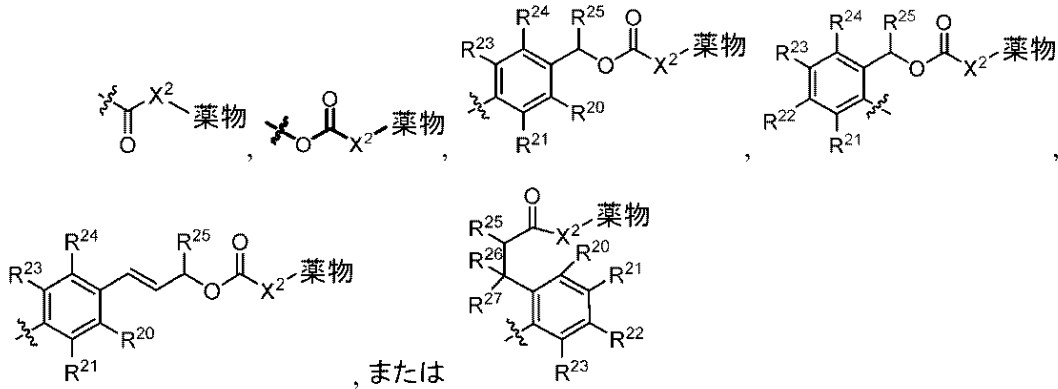
の構造を有する、項目1~5のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

20

(項目7)

R₃は、

【化87】



30

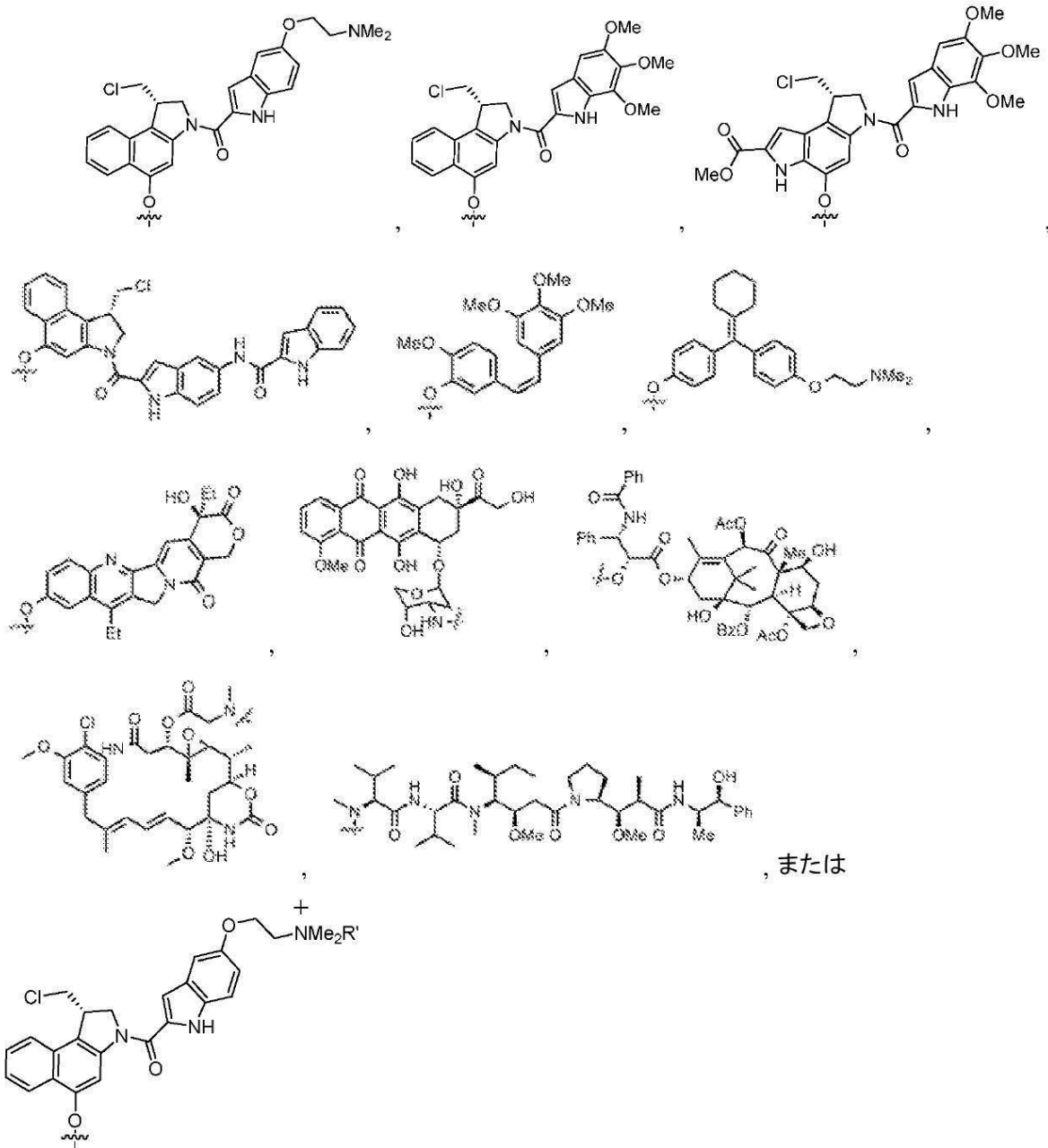
であり、ここで、R₂₀~R₂₇は、独立して、H、アルキル、-NO₂、-NR^e₂、-NR^e₃、アルコキシ、またはスルホネートであり、ここで、各R^eは、独立して、H、ハロ、またはアルキルであり、任意選択的に、ここで、R₂₀~R₂₅はHである、項目1~6のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

(項目8)

-X₂-薬物は、

40

【化 8 8】



10

20

, または

30

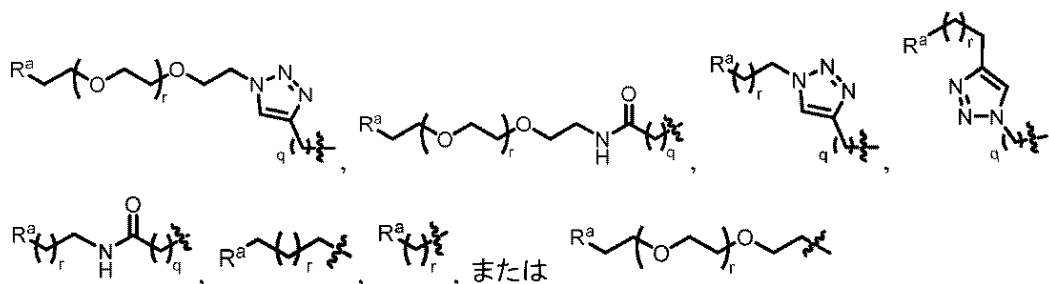
であり、ここで、R'は、C₁ ~ C₁₀アルキルまたはアルキルスルホネートである、項目1 ~ 7のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

(項目9)

R₅は、

40

【化 8 9】



50

であり、ここで、 q および r は、独立して、1、2、3、4、または5である、項目1～8のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

(項目10)

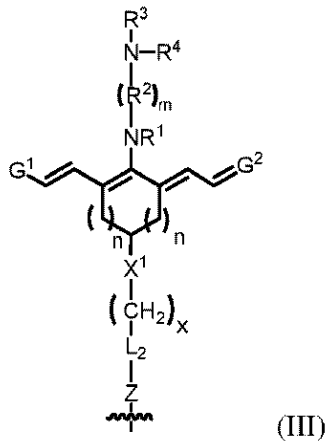
R_b は標的剤であり、任意選択的に、ここで、 R_b は抗体である、項目1～9のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

(項目11)

R^5 は $-(CH_2)_x-L_2-R^a$ であり、ここで、 x は1以上の整数であり、 L_2 はリンカー部分であるかまたは存在せず、 R^a は、 $-C(O)N(H)R^b$ 、 $-N(H)C(O)R^b$ 、 $-N(H)R^b$ 、または $-SR^b$ であり、ここで、 R^b は標的剤であり、前記コンジュゲートは、1つまたは複数の、 R^b に結合したさらなる部分をさらに含み、前記さらなる部分の各々は、独立して、式III

10

【化90】



20

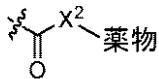
の化学構造を有し、

ここで、 m 、 n 、 x 、 R^1 ～ R^4 、 X^1 、 G^1 、 G^2 、および L_2 は、項目1に定義のとおりであり、 Z は、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、または $-S-$ である、項目1～10のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

(項目12)

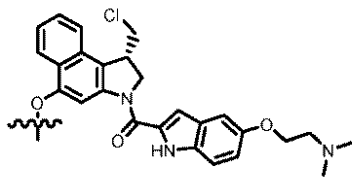
R_b は抗体であり、 R^3 は

【化91】



であり、ここで、 $-X^2-$ 薬物は

【化92】



40

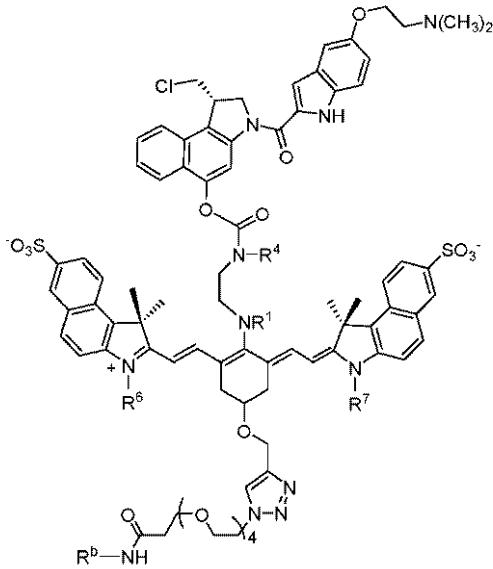
である、項目1～11のいずれかに記載のコンジュゲート。

(項目13)

前記コンジュゲートは、

50

【化 9 3】



10

であり、式中、 R^1 および R^4 は、メチル、エチル、 n -プロピル、 i -プロピル、 t -ブチル、または $-(CH_2)_2OH$ であり；

R^6 および R^7 は、 $-(CH_2)_4SO_3^-$ または $-(CH_2)_4N(CH_3)_3^+$ であり；

20

R^b は抗体であり、任意選択的に、ここで、前記抗体は、パニツムマブまたはトラスツズマブである、項目1に記載のコンジュゲート。

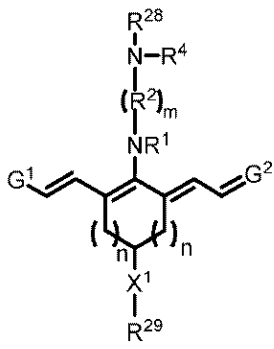
(項目14)

項目1～13のいずれか1項に記載のコンジュゲートおよび薬学的に許容され得るキャリアを含む薬学的組成物であって、 R^b は標的剤である、薬学的組成物。

(項目15)

式IV

【化 9 4】



(IV)

30

の構造を有する前駆体化合物またはその塩であって、

式中、 m は、1、2、3、4、または5であり；

各 n は、独立して、1、2、または3であり；

R^1 および R^4 は、独立して、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、 $-ROH$ 、 $-RC(O)OH$ 、 $-C(O)-R$ 、または $-C(O)-O-R$ であり、ここで、 R はアルキルであり；

R^2 は $C(R_c)_2$ であり、ここで、各 R_c は、独立して、 H 、ハロ、アルキル、またはアリールであり、または $(R^2)_m$ は、集合的に、フェニルであり；

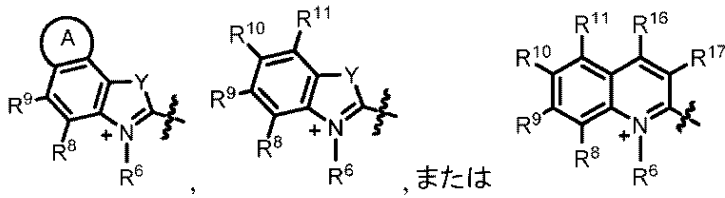
X^1 は、 O 、 N 、または CH_2 であり；

G^1 は、

40

50

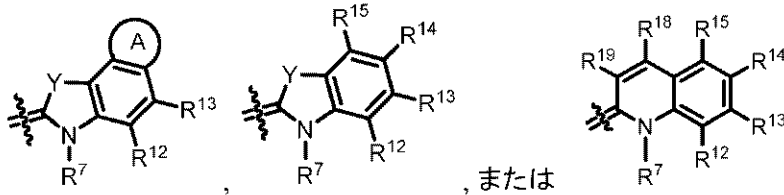
【化 9 5】



であり；

G 2 は、

【化 9 6】



であり；

R 6 および R 7 は、独立して、アルキルスルホナート、H、アルキル、アルコキシ、または置換アミノアルキルであり；

R 8 ~ R 1 9 は、独立して、H、アルキル、アミノ、アルコキシ、またはアルキルスルホナートであり；

各 Y は、独立して、C (R^d)₂、S、O、Se、または N (R^d) であり、ここで、各 R^d は、独立して、アルキルまたは H であり；

各 A 環は、独立して、縮合されている 6 員のアリール環、脂肪族環、ヘテロ脂肪族環、またはヘテロアリール環であり；

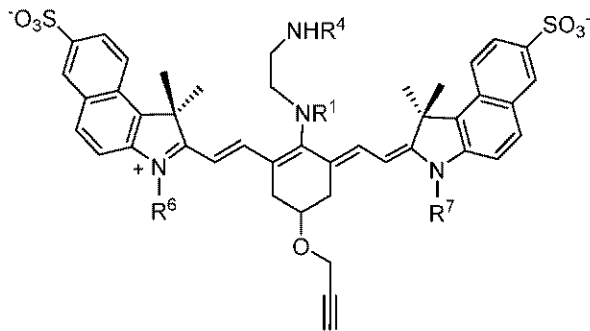
R 2 8 は、水素または保護基であり；

R 2 9 は、-(CH₂)_u-C(CH₃)₂-であり、ここで、u は、1、2、3、4、または 5 である、前駆体化合物またはその塩。

(項目 1 6)

前記前駆体化合物は、

【化 9 7】



であり、

式中、R 1 および R 4 は、メチル、エチル、*n*-プロピル、*i*-プロピル、*t*-ブチル、または -(CH₂)₂OH であり；

R 6 および R 7 は、-(CH₂)_pSO₃- または -(CH₂)_pN(CH₃)₃⁺ であり、ここで、p は、1、2、3、4、または 5 である、項目 1 5 に記載の前駆体化合物。

(項目 1 7)

項目 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートを提供する工程であって、R^b は標

10

20

30

40

50

的剤である、工程；および

その後、近赤外範囲の選択された波長および選択された強度を有する有効量の光の標的化利用により前記コンジュゲートに照射して開裂反応を誘起し、前記コンジュゲートから薬物を放出させる、工程を含む、方法。

(項目18)

光の標的化利用により前記コンジュゲートに照射する工程が、波長が650~900nmの光を生じるレーザーを前記コンジュゲートに照射することを含み、項目17に記載の方法。

(項目19)

前記コンジュゲートの蛍光レベルをモニタリングする工程；および

前記蛍光レベルが標的レベル未満に低下した場合に照射を停止する工程をさらに含み、項目17または項目18に記載の方法。

(項目20)

標的分子を含むか、または含むと疑われる生物試料を提供する工程；

前記生物試料を前記コンジュゲートと接触させる工程であって、前記コンジュゲートの標的剤が前記標的分子を認識して、前記標的分子に結合することができる、工程；およびその後、前記光の標的化利用により前記生物試料に照射する工程をさらに含み、項目17~19のいずれか1項に記載の方法。

(項目21)

前記薬物で処置することができる状態を有すると被験体を同定する工程；

治療有効量の前記コンジュゲートまたは前記コンジュゲートを含む薬学的組成物を前記被験体に投与する工程；および

その後、前記被験体の標的化部分への近赤外範囲の波長および選択された強度を有する前記有効量の光の標的化利用によって前記コンジュゲートに照射し、それにより、前記コンジュゲートの少なくともいくつかの分子から前記薬物を放出する工程であって、任意選択的に、前記標的化部分に利用された光の前記有効量が5~250J/cm²である、工程

をさらに含み、項目17~19のいずれか1項に記載の方法。

(項目22)

前記被験体が腫瘍を有し、前記被験体の前記標的化部分が腫瘍位置に隣接する領域を含み、任意選択的に、治療有効量の前記コンジュゲートまたは前記コンジュゲートを含む薬学的組成物を前記被験体に投与する前に、前記被験体から腫瘍の少なくとも一部を切除する工程をさらに含み、項目21に記載の方法。

(項目23)

治療有効量の前記コンジュゲートまたは前記コンジュゲートを含む薬学的組成物を、前記薬物で処置することができる状態を有すると疑われる被験体に投与する工程；

その後、近赤外範囲の波長および選択された強度を有する光量の前記被験体の標的化部分への標的化利用によって前記コンジュゲートに照射する工程であって、前記光量が、前記コンジュゲートの蛍光を生じさせるのに十分であるが、前記コンジュゲートの開裂を誘起し、前記コンジュゲートから前記薬物を放出させるには不十分である、工程；

前記被験体の前記標的化部分中の前記コンジュゲートから任意の蛍光を検出する工程；および

その後、蛍光が検出された場合に、近赤外範囲の波長および選択された強度を有する前記有効量の光の前記被験体の前記標的化部分への標的化利用によって前記コンジュゲートに照射し、それにより、前記コンジュゲートの少なくともいくつかの分子から前記薬物を放出する、工程

をさらに含み、項目17~19のいずれか1項に記載の方法。

(項目24)

前記状態が、前記薬物で処置することができる腫瘍であり、前記被験体の前記標的化部分

10

20

30

40

50

が前記腫瘍部位を含み、前記方法が、
 治療有効量の前記コンジュゲートを投与する前に前記被験体から前記腫瘍の少なくとも一部を切除する工程
 をさらに含む、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 5)

(i) 前記状態が前記薬物で処置することができる腫瘍であり、(i i) 前記被験体の前記標的化部分が前記腫瘍部位を含み、(i i i) 前記被験体の前記標的化部分中に蛍光が検出され、前記方法が、

前記被験体の前記標的化部分中の前記蛍光を検出した後に前記被験体から前記腫瘍の少なくとも一部を切除する工程；および

その後、前記有効量の光の前記被験体の前記標的化部分への標的化利用によって前記コンジュゲートに照射する工程

をさらに含む、項目 2 3 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 2 】

【図 1】図 1 は、例示的なヘプタメチンシアニン - 薬物コンジュゲートからの薬物の光誘起開裂を示す反応スキームである。

【 0 0 2 3 】

【図 2】図 2 は、本明細書中に開示の前駆体化合物についての合成スキームである。

【 0 0 2 4 】

【図 3】図 3 は、薬物を含む中間体コンジュゲートについての合成スキームである。

【 0 0 2 5 】

【図 4】図 4 は、標的剤へのコンジュゲーションのための調製における図 3 の中間体コンジュゲートへの反応性部分の付加についての合成スキームである。

【 0 0 2 6 】

【図 5】図 5 は、パニツムマブへのヘプタメチンシアニン - デュオカルマイシン DM コンジュゲート (C Y (M e) - D u o D M) のコンジュゲーションについての合成スキームである。

【 0 0 2 7 】

【図 6】図 6 は、パニツムマブへのヘプタメチンシアニン - デュオカルマイシン DM コンジュゲート (C Y (E t) - D u o D M) のコンジュゲーションについての合成スキームである。

【 0 0 2 8 】

【図 7】図 7 は、コンジュゲートの注射およびその後の皮膚外面への所望の波長の光の標的化送達による、腫瘍を有する被験体を処置するための開示の標的剤 - 薬物コンジュゲートの使用法の 1 つの実施形態を例示する概要図である。

【 0 0 2 9 】

【図 8】図 8 は、図 5 および 6 のコンジュゲートの SDS - PAGE 分析を示す。

【 0 0 3 0 】

【図 9】図 9 は、C Y (M e) - P a n - D u o D M および C Y (E t) - P a n - D u o D M の暗所での安定性を示すグラフである。

【 0 0 3 1 】

【図 10】図 10 は、C Y (E t) - P a n - D u o D M (D O L 4) にて氷上で 1 時間、37 °C で 6 時間、そして 37 °C で 2 4 時間処置した M D A - M B - 4 6 8 生細胞および M C F - 7 生細胞の蛍光および明視野顕微鏡画像を示す。近赤外蛍光を、C y 7 チャネルを使用して画像化した。

【 0 0 3 2 】

【図 11】図 11 A および 11 B は、C Y (M e) - P a n - D u o D M (各光照射量 (l i g h t d o s e) での第 1 のバー) または C Y (E t) - P a n - D u o D M (各光照射量での第 2 のバー) の常駐下での M D A - M B - 4 6 8 細胞の近赤外光依存性成長阻害に及ぼ

10

20

30

40

50

す光照射量および波長の影響を示す。各コンジュゲートの標識度は4であった。

【0033】

【図12】図12Aおよび12Bは、時間の関数としてのMDA-MB-468腫瘍担持マウスにおけるCY(Et)-Pan-DuoDM(DOL4)の生体内分布および腫瘍局在を示す。連続蛍光画像を、背側(12A)および腹側(12B)から撮影した。

【0034】

【図13】図13Aおよび13Bは、注射後の時間の関数としての図12Aおよび12Bにおけるマウスの腫瘍および肝臓の正規化蛍光強度(13A)および標的対バックグラウンド比(13B)のグラフである。エラーバーは、S.E.M.(n=5)を示す。

【0035】

【図14】図14は、CY(Et)-PanDuoDM(DOL4)の注射から4日後に、690nmの光の照射量を上昇させながら腫瘍を照射する前および照射した後のMDA-MB-468腫瘍担持マウスの連続蛍光画像を示す。

【0036】

【図15】図15は、0J照射量点と比較した近赤外光照射量の関数としての平均腫瘍蛍光強度を示すグラフである。各時点での第1のバーは、照射なしの蛍光である。各時点での第2のバーは、表示の光照射量後の蛍光である。

【0037】

【図16】図16は、腫瘍成長に及ぼすCY(Et)-PanDuoDM(DOL4)コンジュゲートのin vivoでの影響を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0038】

詳細な説明

本開示は、ヘプタメチンシアニフルオロフォアを含む標的剤-薬物コンジュゲート、コンジュゲートの前駆体、ならびにコンジュゲートおよび前駆体の作製方法および使用方法の実施形態に関する。近赤外脱ケージ化ストラテジーは、ケージ化成分としてヘプタメチンシアニフルオロフォア足場を使用する。有効量の近赤外光での照射により、標的剤-薬物コンジュゲートからの薬物の開裂が誘起される。

【0039】

このアプローチにより、種々の臨床背景で既に使用されている近赤外光学ツールを使用して生物活性小分子を標的的特異的に送達することが可能となる。有利な特徴は、コンジュゲートの蛍光特性を使用して標的剤-標的の結合を評価することができるという点である。さらに、治療的光照射量の投与後、そのシグナルの喪失により、薬物放出のリアルタイムでの評価が可能となる。

【0040】

開示のコンジュゲートのある特定の実施形態は、抗体および抗がん剤を含み、腫瘍への抗がん剤の部位特異的送達に有用である。薬物の有効搭載量(drug payload)の放出過程を細胞内在化と分離することにより、細胞外の標的剤-薬物コンジュゲートの一部分は薬物カーゴを局所腫瘍環境内に放出する。好都合なことに、この局在化放出は、抗原陽性細胞から近接する抗原陰性細胞へ分子を効果的に移動させるはずであり、治療有効性に重要であり得るバイスタンダー効果を達成するはずである。

【0041】

I. 定義

以下の用語および略語の説明は、本開示をよりの確に説明し、本開示の実施において当業者をガイドするために提供される。本明細書中で使用される場合、文脈上そうでないと明確に示されない限り、「含む(comprising)」は、「含む(including)」を意味し、単数形「a」または「an」または「the」は、複数の参照事項を含む。用語「または」は、文脈上そうでないと明確に示されない限り、記述された代替の要素のうちの単一要素または2つもしくはそれより多くの要素の組み合わせをいう。

【0042】

10

20

30

40

50

別段説明が無い限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本開示に属する当業者に一般に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書中に記載の方法および材料に類似するかまたはそれらと等価である方法および材料を、本開示の実施または試験で使用するができるが、適切な方法および材料を以下に記載する。材料、方法、および実施例は、単なる例示に過ぎず、制限するものであることを意図していない。本開示の他の特徴は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

【0043】

別段の指示が無い限り、明細書または特許請求の範囲で使用される成分、分子量、百分率、温度、および時間などの量を表す全ての数値は、用語「約」で修飾されていると理解すべきである。したがって、別段の指示が無い限り、暗示的または明示的に、記載される数値パラメータは近似値であり、その近似値は、求められる所望の特性および/または標準的な試験条件/方法下での検出限度に依存し得る。実施形態を考察した先行技術と直接的かつ明示的に区別する場合、用語「約」を記載しない限り、実施形態の数値は近似値ではない。

10

【0044】

化学分野の一般用語の定義を、Richard J. Lewis, Sr. (ed.), *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, John Wiley & Sons, Inc. 出版, 1997 (ISBN 0-471-29205-2)に見出すことができる。分子生物学における共通用語の定義を、Benjamin Lewin, *Genes VII*, published by Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); および Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, published by Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); ならびに他の類似の参考文献に見出すことができる。

20

【0045】

本開示の種々の実施形態の再検討を容易にするために、特定の用語を以下に説明する。

30

【0046】

脂肪族：実質的に炭化水素系の化合物、またはそのラジカル（例えば、ヘキサンラジカルについては C_6H_{13} ）であり、脂肪族としては、アルカン、アルケン、アルキンが挙げられ、それらは、その環式バージョンを含み、さらに、直鎖および分枝鎖配置を含み、ならびに全ての立体異性体および位置異性体も含む。明確な別段の記載が無い限り、脂肪族基は、1~25個の炭素原子（例えば、1~15個、1~10個、1~6個、または1~4個の炭素原子）を含む。用語「低級脂肪族」は、1~10個の炭素原子を含む脂肪族基をいう。脂肪族鎖は、置換されていても、非置換であってもよい。「非置換脂肪族」と明確に言及しない限り、脂肪族基は、非置換であるまたは置換されているのいずれかであり得る。脂肪族基は、1つまたは複数の置換基（脂肪族鎖中の各メチレン炭素に対して最大2個までの置換基、または、脂肪族鎖中の $-C=C-$ 二重結合の各炭素に対して最大1個までの置換基、または、末端メチン基の炭素に対して最大1個までの置換基）で置換されてよい。例示的な置換基には、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルキルアミノ、アルキルチオ、アシル、アルデヒド、アミド、アミノ、アミノアルキル、アリーール、アリーールアルキル、カルボキシル、シアノ、シクロアルキル、ジアルキルアミノ、ハロ、ハロ脂肪族、ヘテロ脂肪族、ヘテロアリーール、ヘテロ環状脂肪族、ヒドロキシル、オキシ、スルホンアミド、スルフヒドリル、チオアルコキシ、または他の官能基が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0047】

アルコキシ：構造 $-OR$ （式中、Rは、置換または非置換アルキルである）を有する基。

50

メトキシ (- O C H ₃) は、例示的なアルコキシ基である。置換アルコキシでは、R は、非干渉性の置換基で置換されたアルキルである。

【 0 0 4 8 】

アルコキシカルボニル：構造 - (O) C - O - R (式中、R は、置換または非置換アルキルである) を有する基。

【 0 0 4 9 】

アルキル：飽和炭素鎖を有する炭化水素基。前記鎖は、分岐鎖、非分岐鎖、または環状鎖 (シクロアルキル) であり得る。低級アルキルという用語は、鎖が 1 ~ 1 0 個の炭素原子を含むことを意味する。別段の指定が無い限り、アルキルという用語は、置換および非置換のアルキルを含む。

10

【 0 0 5 0 】

アルキルカルボニル：構造 - (O) C - R (式中、R は、置換または非置換アルキルである) を有する基。

【 0 0 5 1 】

アルキルスルホナート：構造 - R - S O ₃ - (式中、R は、置換または非置換アルキルである) を有する基。

【 0 0 5 2 】

アミノ：構造 - N (R) R ' (式中、R および R ' は、独立して、水素、ハロアルキル、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール (例えば、任意選択的に置換されたフェニルまたはベンジルなど)、ヘテロアリール、アルキルスルファノ、または他の官能基である) を有する基。「一級アミノ」基は、- N H ₂ である。「一置換アミノ」は、上記のように置換されたラジカル - N (H) R を意味し、一置換アミノには、例えば、メチルアミノ、(1 - メチルエチル) アミノ、およびフェニルアミノなどが含まれる。「二置換アミノ」は、上記のように置換されたラジカル - N (R) R ' を意味し、二置換アミノには、例えば、ジメチルアミノ、メチルエチルアミノ、およびジ (1 - メチルエチル) アミノなどが含まれる。アミノという用語はまた、荷電三置換アミノ基、例えば、- N (R) (R ') R + (式中、R、R '、および R ' ' は、独立して、水素、ハロアルキル、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール (例えば、任意選択的に置換されたフェニルまたはベンジルなど)、ヘテロアリール、アルキルスルファノ、または他の官能基である) を含む。

20

【 0 0 5 3 】

アミノアルキル：化学官能基 - R N H ₂ または - R N H ₃ + (式中、R はアルキル基である)。「置換アミノアルキル」は、アミノ基が置換されていることを意味する (例えば、- R N (R ') R ' ' または - R N (R ') (R ' ' +) 式中、R '、R ' '、および R ' ' ' は、独立して、水素、ハロアルキル、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール (例えば、任意選択的に置換されたフェニルまたはベンジルなど)、ヘテロアリール、アルキルスルファノ、または他の官能基である))。

30

【 0 0 5 4 】

抗体：イムノグロブリン遺伝子またはイムノグロブリン遺伝子のフラグメントによって実質的にコードされている 1 つまたは複数のポリペプチドを含むタンパク質 (またはタンパク質複合体)。認識されているイムノグロブリン遺伝子には、 κ 、 λ 、 μ 、 δ 、 ϵ 、および α 定常領域遺伝子、ならびに無数のイムノグロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は、 κ または λ のいずれかに分類される。重鎖は、 μ 、 δ 、 ϵ 、または α に分類され、これらに基づいて順に、イムノグロブリンクラス I g G、I g M、I g A、I g D、および I g E がそれぞれ定められる。鳥類および爬虫類では、I g Y 抗体は、哺乳動物の I g G と同等である。

40

【 0 0 5 5 】

イムノグロブリン (抗体) の基本構造単位は、一般に、四量体である。各四量体は、ポリペプチド鎖の 2 つの同一の対から構成され、各対は 1 つの「軽」鎖 (約 2 5 k D a) および 1 つの「重」鎖 (約 5 0 ~ 7 0 k D a) を有する。各鎖の N 末端は、主に抗原認識を担う、約 1 0 0 ~ 1 1 0 個またはそれより多くのアミノ酸の可変領域を定める。用語「可変

50

軽鎖」(V_L)および「可変重鎖」(V_H)は、それぞれ、これらの軽鎖および重鎖をいう。

【0056】

IgY抗体の構造は、哺乳動物IgGの構造と類似し、2つの重鎖(「」鎖；およそ67~70kDa)および2つの軽鎖(22~30kDa)を有する。IgY分子の分子量は約180kDaであるが、しばしば、ゲル上では約3%の炭水化物の存在に起因してスメアとして泳動される。IgY抗体の重鎖(H)は、4つの定常ドメインと、抗原結合部位を含む1つの可変ドメインから構成される。

【0057】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」には、完全な(intact)イムノグロブリンおよびいくつかの十分に特徴づけられたフラグメントが含まれる。例えば、標的タンパク質(またはタンパク質もしくは融合タンパク質内のエピトープ)に結合するFab、Fv、および一本鎖Fv(SCFv)もまた、前述のタンパク質(またはエピトープ)への特異的結合剤であろう。これらの抗体フラグメントを、以下のように定義する：(1)Fab、抗体全体を酵素パインで消化して完全な軽鎖および1つの重鎖の一部を得ることによって生成された、抗体分子の一価の抗原結合フラグメントを含むフラグメント；(2)Fab'、抗体全体をペプシンで処理し、その後還元して、インタクトな軽鎖および重鎖の一部を生成することによって得た抗体分子のフラグメント；1抗体分子あたり2つのFab'フラグメントが得られる；(3)(Fab')₂、抗体全体を酵素ペプシンで処理し、その後の還元を行わないことによって得た抗体のフラグメント；(4)F(ab')₂、2つのジスルフィド結合によって相互に保持された2つのFab'フラグメントの二量体；(5)Fv、2本の鎖として発現された、軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含む遺伝子操作されたフラグメント；および(6)単鎖抗体、遺伝的に融合した一本鎖分子として適切なポリペプチドリンカーによって連結された、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域を含む遺伝子操作された分子。これらのフラグメントの作製方法は、ルーティンである(例えば、Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, CSHL, New York, 1999を参照のこと)。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」には、部位特異的コンジュゲーションを容易にするための1つまたは複数の非天然(すなわち、天然に存在しない)アミノ酸(例えば、p-アセチル-フェニルアラニン)を含む抗体が含まれる。

【0058】

本開示の方法で用いる抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル工程であり得、例えば、標的抗原などの標的に特異的に結合する。単なる例として、モノクローナル抗体を、Kohler and Milsteinの古典的方法(Nature 256:495-97, 1975)またはその派生的方法にしたがって、マウスハイブリドーマから調製することができる。モノクローナル抗体生成の詳細な手順は、Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, CSHL, New York, 1999に記載されている。

【0059】

抗原：動物内での抗体の産生またはT細胞応答を刺激することができる化合物、組成物、または物質(動物内に注射または吸収される組成物が含まれる)。抗原は、特異的な体液性免疫または細胞性免疫の生成物と反応する(異種免疫原によって誘導される生成物が含まれる)。本明細書中で使用される場合、「標的抗原」は、標的剤によって認識および結合される抗原(抗原のエピトープを含む)である。「特異的結合」は、排他的結合を必要としない。いくつかの実施形態では、抗原を、細胞または組織の抽出物から得る。いくつかの実施形態では、標的抗原は、腫瘍細胞上の抗原である。抗原は、全長タンパク質である必要はない。使用が意図される抗原には、タンパク質の任意の免疫原性フラグメント(例えば、抗体が特異的に結合することができる少なくとも1つのエピトープを有する任意の抗原など)が含まれる。

【0060】

10

20

30

40

50

アリール：別段の指定が無い限り、単一の環（例えば、フェニル）または少なくとも1つの環が芳香族である縮合多環（multiple condensed rings）（例えば、キノリン、インドール、およびベンゾジオキサソールなど）（但し、結合点がアリール基の芳香族部分の原子を介し、且つ、結合点の芳香族部分はその芳香環内に炭素のみを含むことを条件とする）を有する6～15個の炭素原子の一価の芳香族炭素環式基。任意の芳香環部分がヘテロ原子を含む場合、前記基はヘテロアリールであり、アリールではない。アリール基は、単環式、二環式、三環式、または四環式である。別段の指定が無い限り、アリールという用語は、置換および非置換アリールを含む。

【0061】

生物試料：本明細書中で使用される場合、「生物試料」は、被験体（例えば、ヒト被験体または動物被験体など）または他のタイプの生物（例えば、植物、細菌、または昆虫など）から得た試料をいう。被験体由来の生物試料には、細胞、組織、血清、血液、血漿、尿、唾液、脳脊髄液（CSF）、または他の体液が含まれるが、これらに限定されない。本明細書中に開示の方法の特定の例では、生物試料は組織試料である。

10

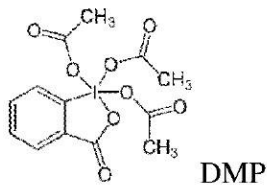
【0062】

コンジュゲート：直接または間接的に相互に連結されている2つまたはそれより多くの部分。例えば、第1の部分は、第2の部分に共有結合により連結されていてもよい。間接的な結合が、例えば、「リンカー」（2つの部分の間に配置された分子または原子群）の使用などによって、可能である。

DMP：デス - マーチンペルヨージナン

20

【化12】



【0063】

薬物：本明細書中で使用される場合、用語「薬物」は、被験体に投与した場合に生理学的効果があり、疾患の処置、緩和、治癒、予防、または診断での使用が意図されているか、そうでなければ、身体または精神の幸福を向上させるために使用される物質をいう。用語「小分子薬物」は、分子量が1,000ダルトン未満の薬物をいう。

30

【0064】

抗がん薬は、悪性腫瘍を処置するために使用される薬物である。例示的な抗がん薬には、アビラテロン、アクチノマイシンD、アルトレタミン、アミホスチン、アナストロゾール、アスパラギナーゼ、ベキサロテン、ピカルタミド、プレオマイシン、プセレリン、プスルファン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル シスプラチン、クラドリピン、クロドロネート、コンプレタスタチンA4、シクロホスファミド、シプロテロン、シタラピン、ダカルバジン、ダウノルピシン、デガレリクス、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドキシソルピシン、デュオカルマイシンDM、エピルピシン、エチニルエストラジオール、エトポシド、エキセメスタン、5 - フルオロウラシル、フルダラビン、フルタミド、フォリン酸、フルベストラント、ゲムシタピン、ゴセレリン、イバンドロン酸、イダルピシン、イフォスファミド、イリノテカン、ランレオチド、レナリドミド、レトロゾール、リュープロレリン、メドロキシプロゲステロン、メゲストロール、メルファラン、メスナ、メトトレキサート、オクトレオチド、パミドロナート、ペメトレキセド、マイトマイシン (mitocmycin)、ミトタン、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペントスタチン (pentastatin)、ピポブロマン (pipbroman)、プリカマイシン、プロカルバジン、ラルチトレキセド、スチルベストロール、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、トポテカン、トリプトレリン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピノレルピン、およびゾレドロン

40

50

酸 (z o l e n d r o n i c a c i d) が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 5 】

有効量または治療有効量：被験体または所与の割合の被験体に有益または治療的な効果をもたらすのに十分な量。

【 0 0 6 6 】

エピトープ：抗原決定基。エピトープは、抗原性である、すなわち、特異的な免疫応答を惹起する、分子上の特定の化学基または連続もしくは不連続なペプチド配列である。抗体は、抗体の三次元構造および適合する（または同族）エピトープに基づいて、特定の抗原性エピトープに結合する。

【 0 0 6 7 】

ハロゲン：ハロゲンおよびハロという用語は、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、およびそのラジカルをいう。

【 0 0 6 8 】

ヘテロ脂肪族：少なくとも1つのヘテロ原子を有する（すなわち、1つまたは複数の炭素原子が少なくとも1つの孤立電子対を有する原子（典型的には、窒素、酸素、リン、ケイ素、または硫黄）に置き換えられている）脂肪族の化合物または基。ヘテロ脂肪族の化合物または基は、置換または非置換、分枝鎖状または非分枝鎖状、環式または非環式であり得、「ヘテロ環」、「ヘテロシクリル」、「ヘテロ環状脂肪族 (heterocycloaliphatic)」、または「複素環式」の基が含まれる。

【 0 0 6 9 】

ヘテロアルキル：少なくとも1つのヘテロ原子（例えば、N、O、Sなど）またはS(O)_n（式中、nは1または2である）を含む上記定義のアルキル基。別段の指定が無い限り、ヘテロアルキルという用語は、置換および非置換のヘテロアルキルを含む。

【 0 0 7 0 】

ヘテロアリール：少なくとも1つのヘテロ原子を有する（すなわち、環内の1つまたは複数の炭素原子が少なくとも1つの孤立電子対を有する原子（典型的には、窒素、酸素、リン、ケイ素、または硫黄）に置き換えられている）芳香族の化合物または基。別段の指定が無い限り、ヘテロアリールという用語は、置換および非置換のヘテロアリールを含む。

【 0 0 7 1 】

リガンド：受容体に結合する分子であって、生物学的効果を有する分子。

【 0 0 7 2 】

リンカー：2つの部分の間に配置された分子または原子群。本明細書中で使用される場合、用語「リンカー」は、シアニンフルオロフォアと標的剤または反応性基との間に配置された原子群、またはシアニンフルオロフォアと薬物との間に配置された原子群をいう。

【 0 0 7 3 】

近赤外（近IR、NIR）：650～2500 nmの範囲内の波長。別段の指定が無い限り、本明細書中で使用される用語「近赤外」および「NIR」は、650～900 nmの範囲内の波長をいう。

【 0 0 7 4 】

薬学的に許容され得るキャリア：本開示において有用な薬学的に許容され得るキャリア（ビヒクル）は従来存在する。Remington: The Science and Practice of Pharmacy, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21st Edition (2005)は、本明細書中に開示される1つまたは複数の標的剤 - 薬物コンジュゲートの薬学的送達に適切な組成物および製剤 (formulation) を記載している。

【 0 0 7 5 】

一般に、キャリアの性質は、使用される特定の投与様式に依存するであろう。例えば、非経口製剤は、通常、ビヒクルとして薬学的および生理学的に許容され得る流体（例えば

10

20

30

40

50

、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、デキストロース水溶液、またはグリセロールなど)を含む注射用流体を含む。いくつかの例では、薬学的に許容され得るキャリアは、被験体への投与(例えば、非経口、筋肉内、または皮下注射による)に適切に無菌であり得る。生物学的に中性のキャリアに加えて、投与すべき薬学的組成物は、少量の非毒性補助剤(湿潤剤または乳化剤、保存剤、およびpH緩衝剤など(例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレート))を含むことができる。

【0076】

薬学的に許容され得る塩：開示のコンジュゲートの生物学的に適合可能な塩であり、この塩は、当該分野で周知の種々の有機および無機の対イオンに由来し、例に過ぎないが、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム、およびテトラアルキルアンモニウムなどが挙げられ；分子が塩基性官能基を含む場合、有機酸または無機酸の塩(例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、酒石酸塩、メシル酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、およびシュウ酸塩など)の塩が挙げられる。薬学的に許容され得る酸付加塩は、生物学的にも他の点でも望ましくない酸パートナーにより形成されている一方で、遊離塩基の生物学的有効性を保持している塩(例えば、無機酸(例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、およびリン酸など)および有機酸(例えば、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンサルホン酸、エタンサルホン酸、p-トルエンサルホン酸、およびサリチル酸など))である。薬学的に許容され得る塩基付加塩には、無機塩基由来の塩(例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、マンガン塩、およびアルミニウム塩など)が含まれる。例示的な塩は、アンモニウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、カルシウム塩、およびマグネシウム塩である。薬学的に許容され得る非毒性有機塩基に由来する塩には、第一級、第二級、および第三級アミン、置換アミン(天然に存在する置換アミンを含む)、環状アミン、および塩基性イオン交換樹脂(例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミン、2-ジメチルアミノエタノール、2-ジエチルアミノエタノール、ジシクロヘキシルアミン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、ヒドラバミン、コリン、ベタイン、エチレンジアミン、グルコサミン、メチルグルカミン、テオプロミン、プリン、ピペラジン、ペペリジン、N-エチルピペリジン、およびポリアミン樹脂など)の塩が含まれるが、これらに限定されない。例示的な有機塩基は、イソプロピルアミン、ジエチルアミン、エタノールアミン、トリメチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、コリン、およびカフェインである。(例えば、S. M. Berger, "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci., 1977; 66: 1-19(本明細書において参考として援用される)を参照のこと)。

【0077】

保護基：有機化合物の合成を合成するとき、しばしば、特定の官能基は、必要とされる試薬または化学的環境を切り抜けることができない。これらの基は保護されなければならない。保護基または保護用の基を、その後の化学反応における化学選択性を得るために官能基の化学修飾によって分子内に導入する。種々の例示的な保護基または保護用の基は、Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, by Peter G. M. Wuts and Theodora W. Greene (October 30, 2006)(本明細書において参考として援用される)に開示されている。

【0078】

特異的結合パートナー：関与する分子の三次元構造に依存する特異的な非共有結合性相互作用によって相互作用する一対の分子のメンバー。特異的結合パートナーの例示的な対には、抗原/抗体、ハプテン/抗体、受容体/リガンド、核酸鎖/核酸相補鎖、基質/酵素、インヒビター/酵素、炭水化物/レクチン、ピオチン/アビジン(例えば、ピオチン/ストレプトアビジンなど)、およびウイルス/細胞受容体が含まれる。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 9 】

置換基：反応の結果として分子内の別の原子と置き換わる、原子または原子群。用語「置換基」は、典型的には、親炭化水素鎖または親炭化水素環上の1つの水素原子または置換基が二重結合を介して結合する場合に2つの水素原子と置き換わる、原子または原子群をいう。用語「置換基」はまた、分子に対して複数の結合点を有する原子群を包含し得る（例えば、親炭化水素鎖または親炭化水素環上の2つまたはそれより多くの水素原子と置き換わる）。かかる例では、置換基を、別段の指定が無い限り、親炭化水素鎖または親炭化水素環に対して任意の空間的配向で結合させることができる。例示的な置換基には、例えば、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基、アルキルアミノ基、アルキルチオ基、アシル基、アルデヒド基、アミド基、アミノ基、アミノアルキル基、アリー

10

【 0 0 8 0 】

置換された：1つまたは複数の置換基が基本化合物に連結されている、基本化合物（例えば、アリールまたは脂肪族化合物など）またはそのラジカルであって、各置換基が典型的には基本化合物上の水素原子と置き換えられている、基本化合物またはそのラジカル。単なる例示であり、制限ではないが、置換されたアリール化合物は、アリール基礎の閉じられた環に連結されている脂肪族基を有し得る（例えば、トルエンなど）。さらに、単なる例示であり、制限ではないが、長鎖炭化水素は、この炭化水素に結合したヒドロキシル基を有し得る。

20

【 0 0 8 1 】

スルホナート含有基： SO_3^- を含む基。スルホナート含有基という用語には、 $-\text{SO}_3^-$ 基および $-\text{RSO}_3^-$ 基（式中、Rは、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである）が含まれる。

【 0 0 8 2 】

標的：開示の標的剤 - 薬物コンジュゲートが特異的に結合することができる目的分子。標的の例には、組織試料中に存在するタンパク質および核酸配列が含まれる。標的領域は、標的分子が位置するか、または位置する可能性がある領域である。

30

【 0 0 8 3 】

標的剤：標的部位（例えば、被験体の体内の標的にされた位置（例えば、特定の器官、オルガネラ、生理学的系、組織、または病変部位（例えば、腫瘍、感染領域、または組織損傷領域など）など）への優先的または標的化された送達を促進する剤。標的剤は、種々の機序（例えば、標的部位内の選択的濃度など）または特異的結合パートナーへの結合により機能する。適切な標的剤には、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖タンパク質および他のグリコシル化分子、オリゴヌクレオチド、リン脂質、リポタンパク質、アルカロイド、およびステロイドが含まれるが、これらに限定されない。例示的な標的剤には、抗体、抗体フラグメント、アフィボディ、アプタマー、アルブミン、サイトカイン、リンホカイン、成長因子、ホルモン、酵素、免疫調節薬、受容体タンパク質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アビジン、およびナノ粒子などが含まれる。標的剤のうち特に有用なものは、抗体、核酸配列、および受容体リガンドであるが、特異的結合パートナーの任意の対をこの目的で容易に使用することができる。

40

【 0 0 8 4 】

処置する / 処置：本明細書中で使用される場合、用語「処置する」および「処置」は、状態（すなわち、障害または疾患）に関連する少なくとも1つの徴候または症状を阻害または軽減することを意味する。腫瘍に関して、処置は、腫瘍成長の阻害および / または腫瘍容積の低下を意味し得る。処置は、例えば、腫瘍のいくつかまたは全ての臨床症状の重症

50

度の低下、腫瘍のより遅い進行（例えば、腫瘍を有する被験体を延命させることによる）、腫瘍再発数の減少、被験体の健康全般もしくは幸福の改善、または特定の障害もしくは疾患に特異的な当該分野で周知の他のパラメーターによる改善をもたらし得る。

【0085】

II. コンジュゲート

ヘプタメチンシアニンフルオロフォア、薬物、および標的剤、またはさらなるコンジュゲーションに適切な反応性基を含むコンジュゲートの実施形態を本明細書中に開示する。図1は、例示的な先行技術のヘプタメチンシアニン-薬物コンジュゲート（式中、Rは、H、アルキル、アルコキシ、アルキルスルホナート、または置換アミノアルキルであり、「ケージ化」部分は薬物を含む）を示す。図1に示すように、コンジュゲートは、近赤外光を照射した場合に光分解を経て、それにより、C4'-N結合が加水分解に対して不安定になる。これによってC4'-窒素の脱ケージ化が引き起こされ、C4'-窒素が自発的にペンダント（pendant）カルバマート基へ向かって環化し、薬物の有効搭載量（drug payload）が排出される。光分解は、ジオキセタン中間体を介して進行する一重項酸素媒介位置選択的シアニンポリエン開裂プロセスを含む。図1の例示的なコンジュゲートは標的剤を含まないが、光分解機序は、本明細書中に開示のコンジュゲートと同一である。

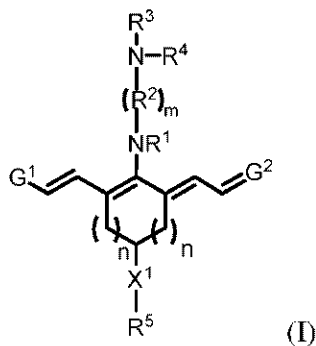
10

【0086】

ヘプタメチンシアニン発色団、薬物、および標的剤、またはさらなるコンジュゲーションに適切な反応性基を含むコンジュゲートは、式I

【化13】

20



30

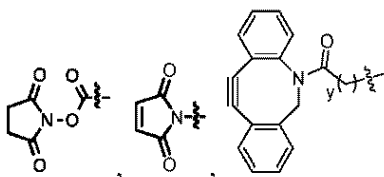
の化学構造を有するコンジュゲートまたはその薬学的に許容され得る塩である。

【0087】

式Iに関して、mは、1、2、3、4、または5であり；各nは、独立して、1、2、または3である。R¹およびR⁴は、独立して、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、-ROH、-RC(O)OH、-C(O)-R、または-C(O)-O-Rであり、ここで、Rはアルキルである。R²はC(R^c)₂であり、ここで、各R^cは、独立して、H、ハロ、アルキル、またはアリールであり、または(R²)_mは、集散的に、フェニルである。R³は-L₁-C(O)-X²-薬物であり、ここで、L₁は存在しないかリンカー部分であり、X²はO、N(H)、またはN(CH₃)である。R⁵は-(CH₂)_x-L₂-R^aであり、ここで、xは1以上の整数であり、L₂はリンカー部分であるかまたは存在せず、R^aは、

40

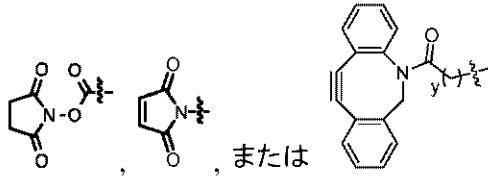
【化14】



（式中、yは1以上の整数である）、-C(O)N(H)R^b、-N(H)C(O)R^b、-N(H)R^bまたは-SR^bであり、R^bは標的剤、

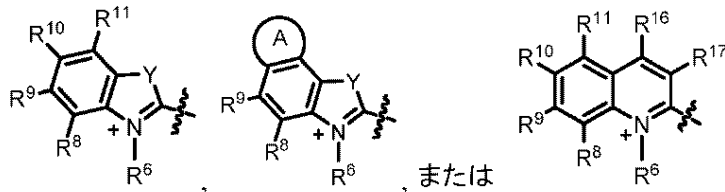
50

【化15】



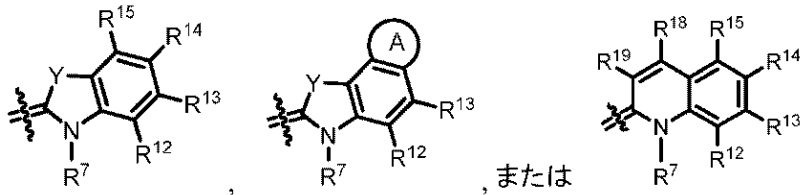
であり、G¹は、

【化16】



であり、G²は、

【化17】



である。R⁶およびR⁷は、独立して、H、アルキル、アルコキシ、アルキルスルホナート、または置換アミノアルキルである。R⁸～R¹⁹は、独立して、H、アルキル、アミノ、アルコキシ、またはアルキルスルホナートである。各Yは、独立して、C(R^d)₂、S、O、Se、またはN(R^d)であり、ここで、各R^dは、独立して、Hまたはアルキルである。各A環は、独立して、縮合されている6員の脂肪族環、ヘテロ脂肪族環、アリール環、またはヘテロアリール環である。

【0088】

いくつかの実施形態では、R¹およびR⁴は、独立して、低級アルキル、-ROH、-RCOOH、または-RCF₃であり、ここで、Rは低級アルキルである。ある特定の実施形態では、R¹およびR⁴は、独立して、C₁～C₄アルキルまたは-ROHであり、ここで、RはC₁～C₄アルキルである。例えば、R¹およびR⁴は、独立して、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、t-ブチル、または-(CH₂)₂OHであり得る。ある特定の実施形態では、R¹およびR⁴は同一である。1つの実施形態では、R¹およびR⁴はエチルである。別の実施形態では、R¹およびR⁴はメチルである。R¹およびR⁴の同一性は、その後の薬物放出を伴う環化を誘起するのに適切な波長に影響を及ぼす。例えば、R¹およびR⁴のメチル基をエチル基で置き換えることにより、一例を挙げれば、有効波長が50nmだけレッドシフトする(すなわち、690nmから740nmへシフトする)ことを示された。したがって、R¹およびR⁴を、コンジュゲートからの薬物放出を誘起するのに有効な波長に「調整する」ために使用することができる。当業者は、波長が長いほど被験体の組織内のより深部まで透過し得ることを理解する。

【0089】

いくつかの実施形態では、R²は-CH₂-であり、mは1、2、または3である。ある特定の例では、mは2であり、(R²)_mは-CH₂CH₂-である。いくつかの実施形態では、各nは1である。

【0090】

10

20

30

40

50

R⁶ および R⁷ は、独立して、H、アルキル、アルコキシ、アルキルスルホナート、または置換アミノアルキルである。いくつかの実施形態では、R⁶ および R⁷ は、独立して、アルキルスルホナートまたは置換アミノアルキル（例えば、 $-(CH_2)_pSO_3^-$ または $-(CH_2)_pN(CH_3)_3^+$ であり、式中、p は、1、2、3、4、または5である）である。1つの実施形態では、R⁶ および R⁷ は、 $-(CH_2)_4SO_3^-$ である。別の実施形態では、R⁶ および R⁷ は、 $-(CH_2)_4N(CH_3)_3^+$ である。ある特定の実施形態では、R⁸ ~ R¹⁹ は水素である。各 Y は、独立して、C(R^d)₂、S、O、Se、または N(R^d) であり、ここで、各 R^d は、独立して、H またはアルキルである。いくつかの例では、各 Y は、独立して、C(CH₃)₂ または S である。R^b が標的剤であり、Y が C(R^d)₂ である場合、少なくとも1つの R^d は、アルキルであり得る。ある特定の実施形態では、各 Y は C(CH₃)₂ である。

10

【0091】

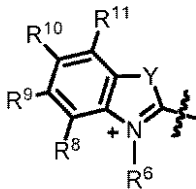
各 A 環は、独立して、縮合されている6員の脂肪族環、ヘテロ脂肪族環、アリール環、またはヘテロアリール環である。A 環は、置換されていても、非置換であってもよい。いくつかの実施形態では、A 環は、任意選択的に置換されたスルホナートで置換された縮合フェニル環である。例えば、A 環は、 $-SO_3^-$ で置換された縮合フェニル環であり得る。ある特定の例では、スルホン化 A 環（例えば、スルホン化フェニルなど）を含めることにより、コンジュゲートを *in vivo* で投与した場合に生体内分布が改善され、そして/または、開裂を誘起してコンジュゲートから薬物を放出させるのに有効な波長のレッドシフトが起きる。

20

【0092】

2つのヘテロ環部分、G¹ および G² は、実質的に類似であってもよいし、互いに異なってもよい。いくつかの実施形態では、G¹ は、

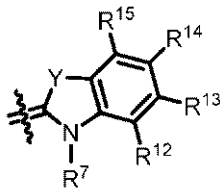
【化18】



30

であり、G² は、

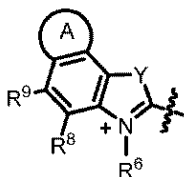
【化19】



であるか、または G¹ は、

40

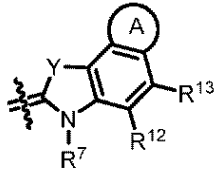
【化20】



であり、G² は、

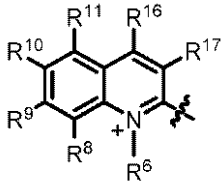
50

【化 2 1】



であるか、または G 1 は、

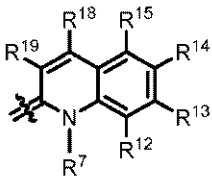
【化 2 2】



10

であり、G 2 は、

【化 2 3】



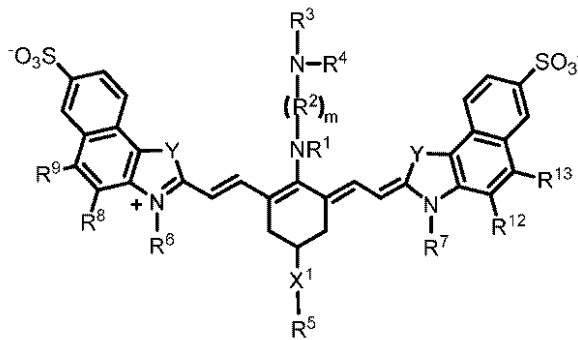
20

であり、ここで、各 Y は同一であり、R 6 および R 7 は同一であり、R 8 ~ R 1 1 および R 1 6 ~ R 1 7 は、R 1 2 ~ R 1 5 および R 1 8 ~ R 1 9 とそれぞれ同一である。

【0 0 9 3】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、式 I I の構造を有し、式中、R 1 ~ R 9、R 1 2、R 1 3、m、X 1、および Y は、前に定義したとおりである。

【化 2 4】



(II)

30

【0 0 9 4】

ある特定の実施形態では、コンジュゲートは、式 I I (式中、R 6 および R 7 は同一であり、R 8 および R 1 2 は同一であり、R 9 および R 1 3 は同一である) の構造を有する。

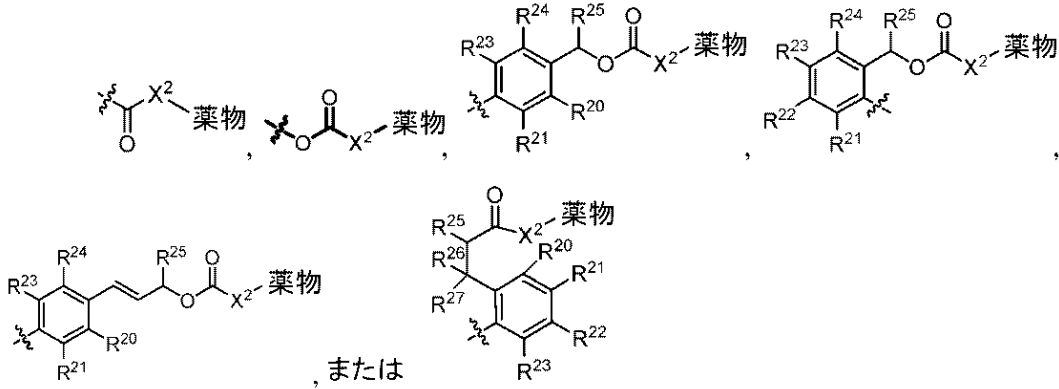
【0 0 9 5】

R 3 は - L 1 - C (O) - X 2 - 薬物であり、ここで、L 1 はリンカー部分であるかまたは存在せず、X 2 は、O、N (H)、または N (C H 3) である。1つの実施形態では、L 1 は存在しない。1つの独立した実施形態では、L 1 は、置換または非置換の脂肪族部分またはヘテロ脂肪族部分を含む少なくとも1つの置換基で置換されたアリールまたはヘテロアリールであり、ここで、アリール環またはヘテロアリール環は、窒素原子への結合部位であり、置換基は、- C (O) - X 2 - 薬物部分に結合する。いくつかの実施形態では、R 3 は、

40

50

【化25】



10

であり、ここで、X²は、O、N(H)、またはN(CH₃)であり、R²⁰~R²⁷は、独立して、H、アルキル、-NO₂、-NR^e₂、-NR^e₃、アルコキシ、またはスルホナートであり、ここで、各R^eは、独立して、H、ハロ、またはアルキルである。ある特定の実施形態では、R²⁰~R²⁵はHである。いくつかの例では、R³は、-C(O)-X²-薬物である。

【0096】

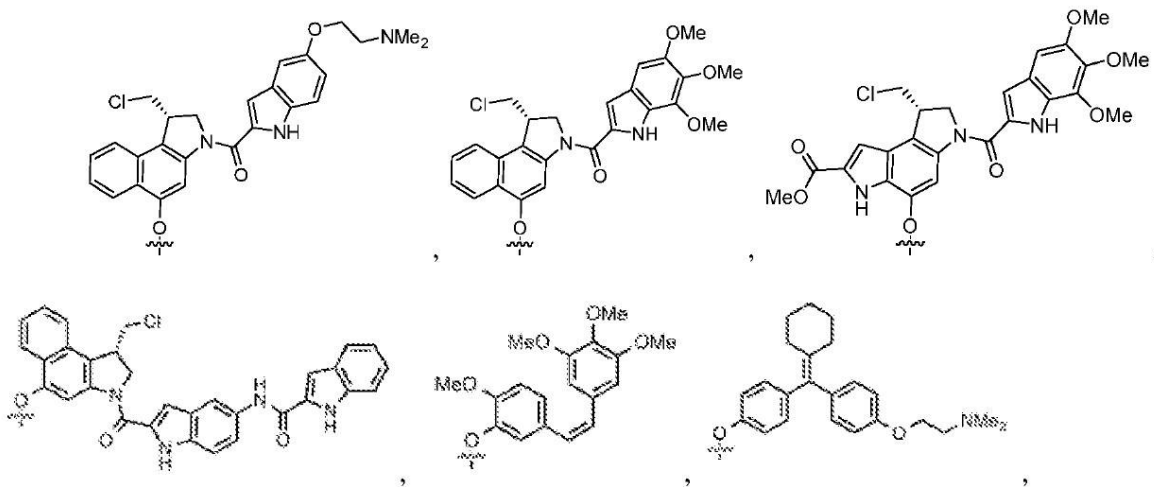
薬物は、R³部分の残部へのコンジュゲーションが可能な任意の薬物であり得る。いくつかの実施形態では、薬物は、小分子薬物（例えば、分子量が1,000ダルトン未満の薬物）である。ある特定の実施形態では、薬物部分は抗がん薬である。1つの実施形態では、薬物は、抗乳がん薬である。いくつかの実施形態では、薬物は、デュオカルマイシン（例えば、デュオカルマイシンDMまたはデュオカルマイシンSAなど）である。デュオカルマイシンは、DNA副溝結合アルキル化剤である細胞傷害性抗生物質であり、固形腫瘍に対する使用に適切である。別の例示的な薬物は、ヘミアステルリン（微小管動態を破壊し、いくらかの用量で微小管を脱重合させる、天然物）である。

20

【0097】

例示的な-X²-薬物部分には、以下が含まれるが、これらに限定されない。

【化26】

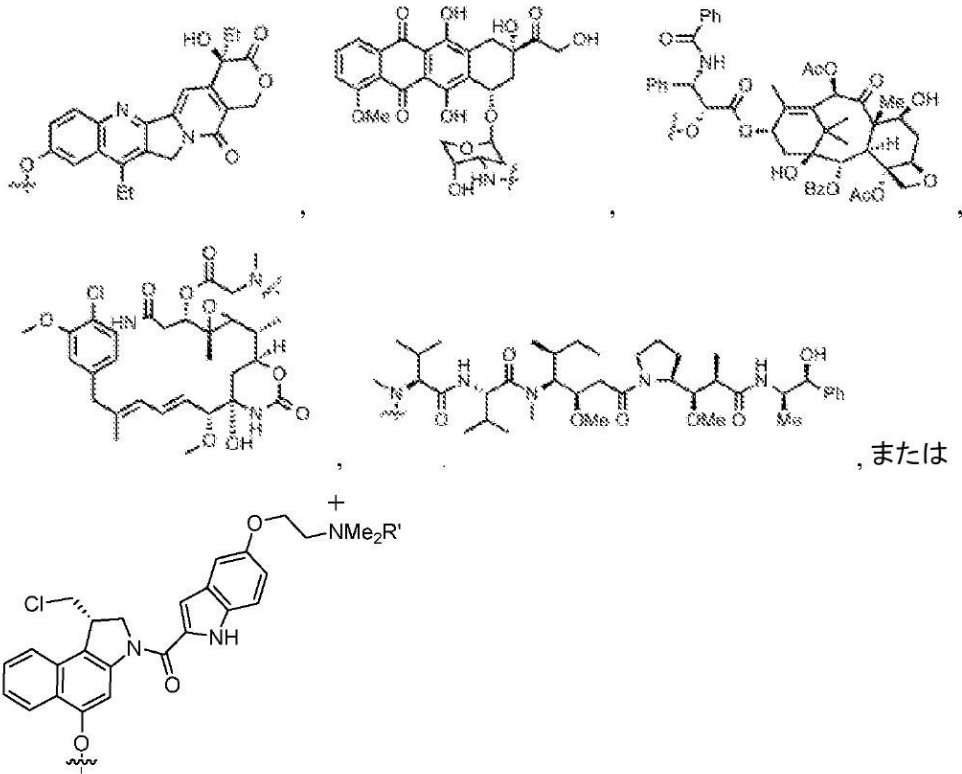


30

40

50

【化 2 7】



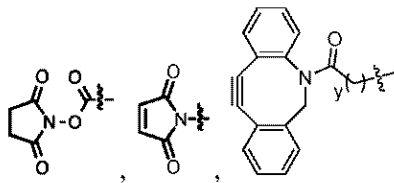
10

20

式中、 R' は、低級アルキルまたはアルキルスルホネート（例えば、メチルまたは $-(CH_2)_4SO_3-$ など）である。

R^1 は $-(CH_2)_x-L_2-R^a$ であり、ここで、 x は 1 以上の整数であり、 L_2 はリンカー部分であるかまたは存在せず、 R^a は、

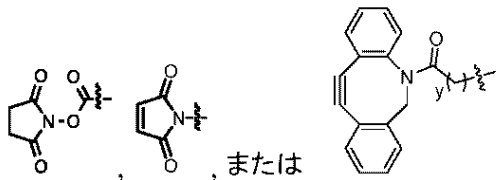
【化 2 8】



30

（ここで、 y は 1 以上の整数である）、 $-C(O)N(H)R^b$ 、 $-N(H)C(O)R^b$ 、 $-N(H)R^b$ 、または $-SR^b$ であり、ここで、 R^b は標的剤、

【化 2 9】



40

である。いくつかの実施形態では、 L_2 は、脂肪族、ヘテロ脂肪族、またはヘテロアリール-脂肪族である。1つの実施形態では、 R^a は、 $-C(O)N(H)R^b$ または $-N(H)C(O)R^b$ である。1つの独立した実施形態では、 R^b は標的剤である。例示的な標的剤には、抗体、リガンド、および核酸鎖などが含まれるが、これらに限定されない。ある特定の例では、標的剤は抗体である。1つの実施形態では、 R^a は、 $-C(O)N(H)R^b$ または $-N(H)C(O)R^b$ であり、 R^b は抗体である。1つの独立した実施形態では、 R^b はリガンド（例えば、細胞表面上の受容体に結合することができるリガン

50

ド)である。

【0098】

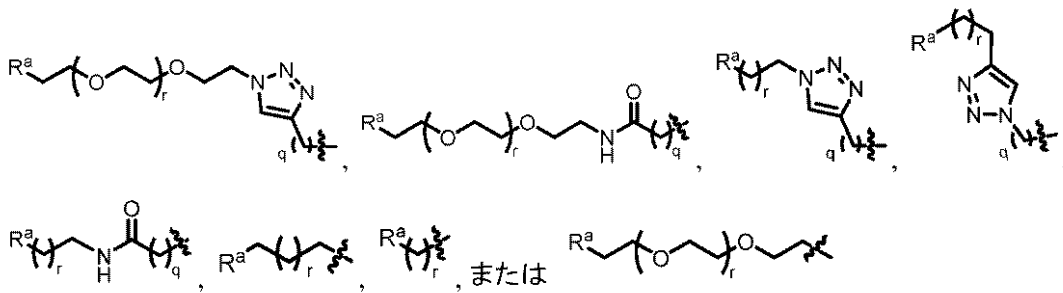
例示的な抗体には、標的分子（例えば、疾患、感染、または環境への曝露に関連するバイオマーカーなど）を認識して結合することができる抗体が含まれる。バイオマーカーには、タンパク質、ペプチド、脂質、代謝産物、および核酸が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、抗体は、腫瘍バイオマーカー（例えば、腫瘍細胞内もしくは腫瘍細胞上でのみ見出されるタンパク質、または1つまたは複数のがんに関連する細胞表面受容体に対するタンパク質など）を認識して結合することができる。例えば、パニツムマブは、ヒト上皮成長因子受容体1（HER1）を認識して結合するヒトモノクローナル抗体であり；HER1は、多数の腫瘍型で過剰発現され、いくつかの炎症性疾患にも関連する。トラスツズマブおよびペルツズマブは、いくつかの乳がんで過剰発現される、HER2/neu受容体に結合するモノクローナル抗体である。ブレンツキシマブは、古典的ホジキンリンパ腫および全身性未分化大細胞リンパ腫で発現される細胞膜タンパク質CD30を標的とするモノクローナル抗体である。

10

【0099】

例示的なR⁵基には、以下が含まれ、

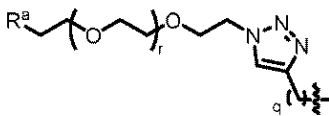
【化30】



20

式中、qおよびrは、独立して、1、2、3、4、または5である。ある特定の例では、R⁵は、

【化31】



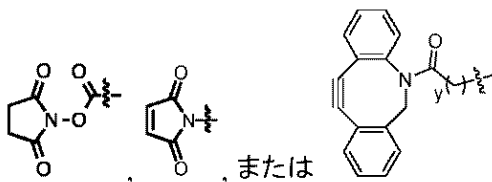
30

であり、式中、qおよびrは、独立して、1、2、3、4、または5である。

【0100】

いくつかの実施形態では、R^aまたはR^bは、

【化32】



40

であり、式Iまたは式IIのコンジュゲートは、さらなるコンジュゲーション反応（例えば、標的剤へのコンジュゲーションなど）に使用することができる中間体コンジュゲートである。

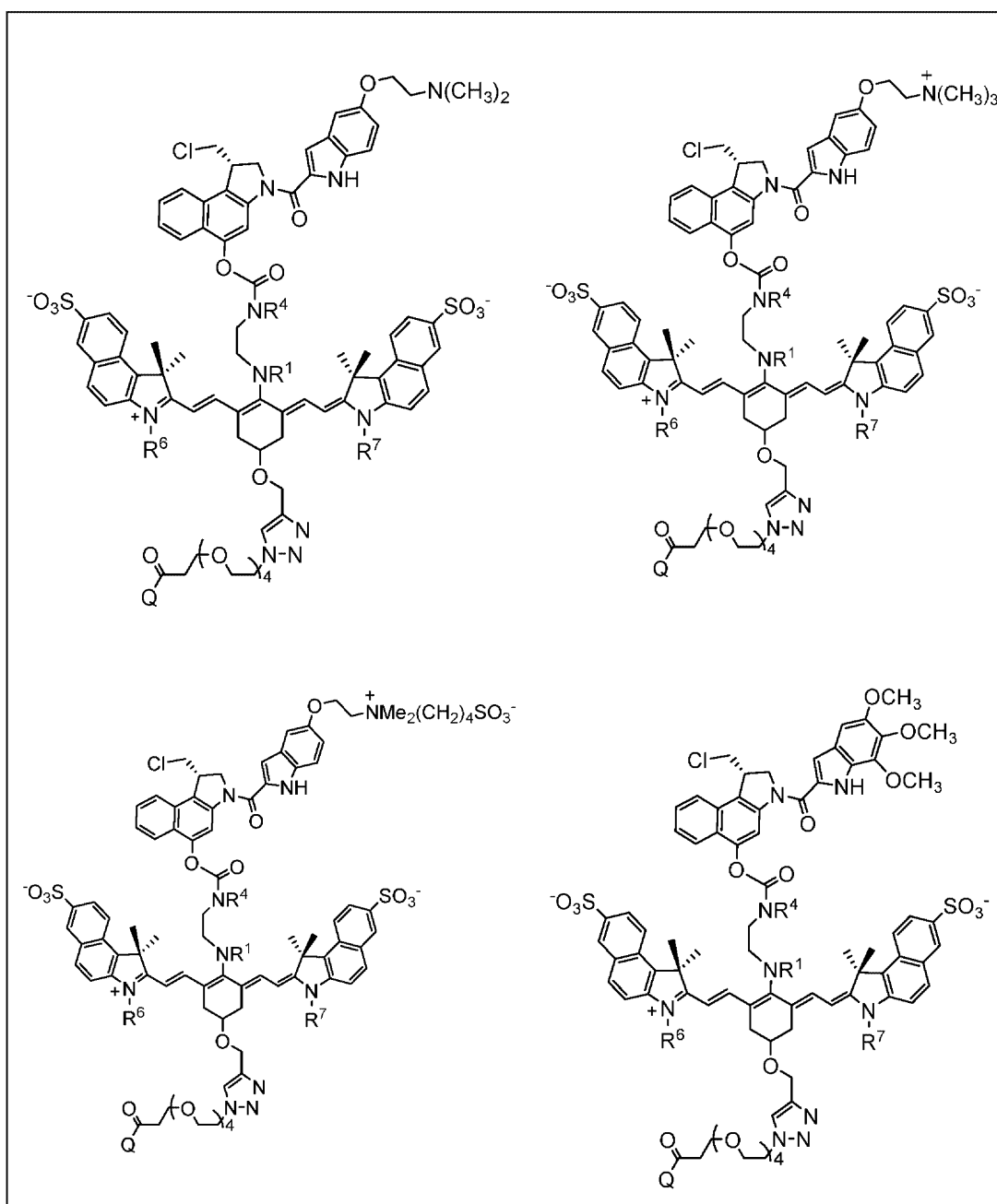
【0101】

好都合なことに、R⁵の位置は、複数のヘプタメチンシアニン-薬物部分の、単一の標的剤（例えば、抗体など）へのコンジュゲーションを容易にする。そのような実施形態にお

50

【表 1 - 1】

Table 1



10

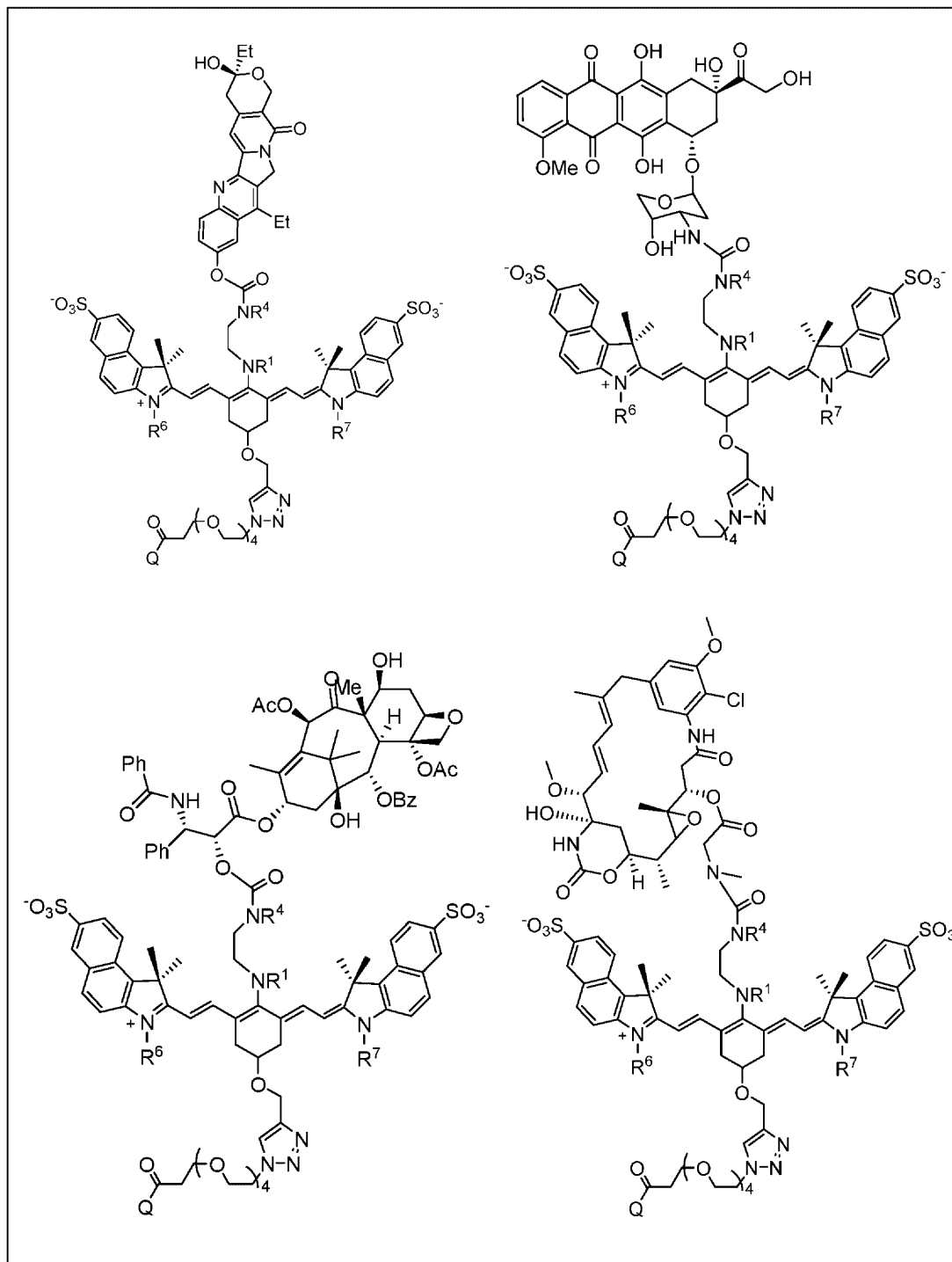
20

30

40

50

【表 1 - 3】



10

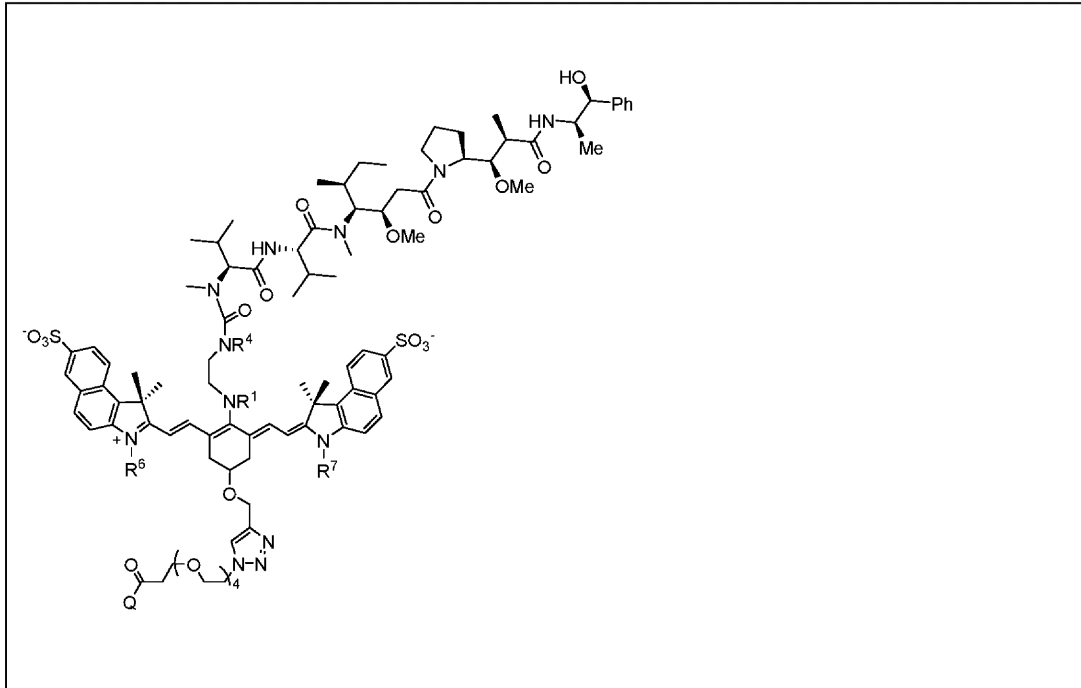
20

30

40

50

【表 1 - 4】



10

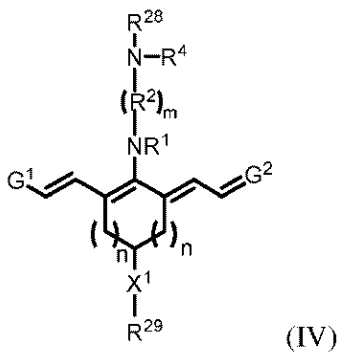
20

【 0 1 0 3】

I I I . 前駆体化合物

式 I ~ I I I のコンジュゲートを作製するのに有用な前駆体化合物の実施形態は、式 I V

【化 3 5】



30

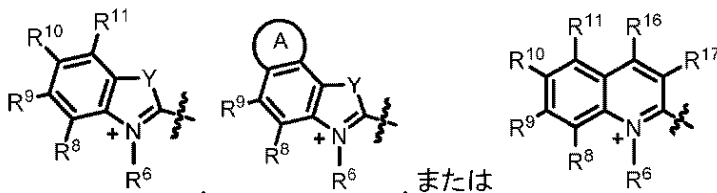
の構造またはその塩を有する。

【 0 1 0 4】

式 I V に関して、 m は、1、2、3、4、または 5 であり；各 n は、独立して、1、2、または 3 である。 R^1 および R^4 は、独立して、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、 $-ROH$ 、 $-RC(O)OH$ 、 $-C(O)-R$ 、または $-C(O)-O-R$ であり、ここで、 R はアルキルである。 R^2 は $C(R^C)_2$ であり、ここで、各 R^C は、独立して、 H 、ハロ、アルキル、またはアリールであり、または $(R^2)_m$ は、集合的に、フェニルである。 X^1 は、 O 、 N 、または CH_2 である。 G^1 は、

40

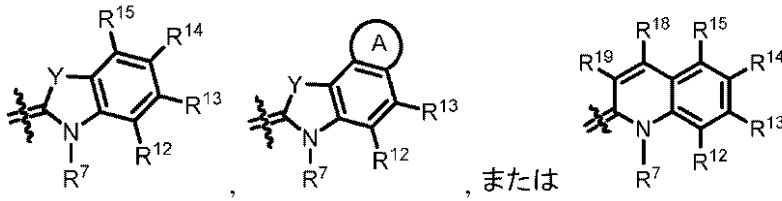
【化 3 6】



50

である。G 2 は、

【化 3 7】



である。R 6 および R 7 は、独立して、H、アルキル、アルコキシ、アルキルスルホナート、または置換アミノアルキルである。R 8 ~ R 1 9 は、独立して、H、アルキル、アミノ、アルコキシ、またはアルキルスルホナートである。各 Y は、独立して、C (R d) 2、S、O、Se、または N (R d) であり、ここで、各 R d は、独立して、H またはアルキルである。各 A 環は、独立して、縮合されている 6 員の脂肪族環、ヘテロ脂肪族環、アリール環、またはヘテロアリール環である。R 2 8 は、水素または保護基である。R 2 9 は、- (C H 2) u - C C H であり、ここで、u は、1、2、3、4、または 5 である。

【0105】

適切な保護基には、tert-ブチルオキシカルボニル (BOC) および 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (FMOC) が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、R 2 8 は水素である。

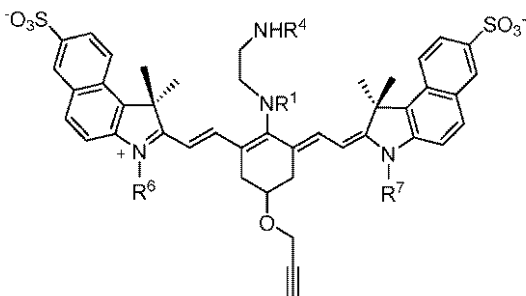
【0106】

2つのヘテロ環部分 G 1 および G 2 は、実質的に同一であってもよく、互いに異なってもよい。いくつかの実施形態では、2つのヘテロ環部分は、前述のように実質的に同一である。R 6 および R 7 は、独立して、H、アルキル、アルコキシ、アルキルスルホナート、または置換アミノアルキルである。いくつかの実施形態では、R 6 および R 7 は、独立して、アルキルスルホナートまたは置換アミノアルキル (例えば、- (C H 2) p S O 3 - または - (C H 2) p N (C H 3) 3 + などであり、式中、p は、1、2、3、4、または 5 である) である。1つの実施形態では、R 6 および R 7 は、- (C H 2) 4 S O 3 - である。別の実施形態では、R 6 および R 7 は、- (C H 2) 4 N (C H 3) 3 + である。ある特定の実施形態では、R 8 ~ R 1 9 は水素である。各 Y は、独立して、C (R d) 2、S、O、Se、または N (R d) であり、ここで、各 R d は、独立して、H またはアルキルである。いくつかの例では、各 Y は、独立して、C (C H 3) 2 または S である。ある特定の実施形態では、各 Y は C (C H 3) 2 である。いくつかの実施形態では、各 A 環は、縮合アリール環 (例えば、任意選択的に置換されたスルファートで置換された縮合フェニル環など) である。

【0107】

ある特定の例では、前駆体化合物は、

【化 3 8】



であり、式中、R 1 および R 4 は、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、t-ブチル、または - (C H 2) 2 O H であり；R 6 および R 7 は、- (C H 2) p S O 3 - または - (C H 2) p N (C H 3) 3 + であり、ここで、p は、1、2、3、4、または

5である。

【0108】

IV. 合成

開示のコンジュゲートおよび前駆体化合物の実施形態を、シアニフルオロフォアから合成する。式IVの1つの前駆体化合物の例示的な合成を、スキーム1(図2)に示す。インドレニン1を1,4-ブタンスルトンと反応させてスルホン化インドレニン2を生成する。スルホン化インドレニン2を塩化物3と反応させて、中心環上にアルキニル基を含むヘプタメチンシアニン4を生成する。N,N'-ジメチルエチレンジアミンリンカーを化合物4と反応させて、式IVの前駆体化合物5を得る。式IVの他の前駆体化合物を、所望どおりの化合物1の異型およびジアミンリンカーを使用して合成することができる。インドレニン(indole)1を-(CH₂)₄N(CH₃)₃⁺で置換するために、プロモ-ブチル-アンモニウムブロミドまたはTfO-ブチル-アンモニウムトリフラートを使用することができる。

10

【0109】

スキーム2(図3)に示すように、薬物(例えば、デュオカルマイシンDM7)を、アシル化反応によって前駆体化合物5にコンジュゲートして中間体コンジュゲート8を生成することができる。中間体コンジュゲート8は、標的剤(例えば、抗体またはリガンド)へのさらなるコンジュゲーションに適切である。

【0110】

銅触媒クリック反応を使用して、NHSエステルを形成することができる。第1の反応では、アジド基およびカルボン酸部分を含むリンカーを、8のアルキニル基と反応させる。その後、スキーム3(図4)に示すように、N,N,N',N'-テトラメチル-O-(N-スクシンイミジル)ウロニウムテトラフルオロボラートを反応物に添加して、NHSエステル13(この例では、R=メチル)を生成する。第1の工程では、標的剤(例えば、抗体など)をNHSエステルにコンジュゲートして、式IおよびIIのコンジュゲートを生成することができる(図5および6)。

20

【0111】

V. 薬学的組成物

本開示はまた、本明細書中に開示の少なくとも1つのコンジュゲートを含む薬学的組成物を含む。薬学的組成物のいくつかの実施例は、薬学的に許容され得るキャリアおよび少なくとも1つのコンジュゲートを含む。有用な薬学的に許容され得るキャリアおよび賦形剤は、当該分野で公知である。

30

【0112】

1つまたは複数のコンジュゲートを含む薬学的組成物を、例えば、投与様式および/または画像化すべき位置に応じた種々の方法で製剤する(formulate)ことができる。非経口製剤は、薬学的および生理学的に許容され得る流体ビヒクル(例えば、水、生理食塩水、他の平衡塩類溶液、デキストロース水溶液、またはグリセロールなど)である注射用流体を含み得る。賦形剤には、例えば、非イオン性可溶化剤(例えば、クレモフォール(登録商標)など)またはタンパク質(例えば、ヒト血清アルブミンまたは血漿調製物など)が含まれ得る。所望する場合、投与すべき薬学的組成物はまた、非毒性補助物質(例えば、湿潤剤または乳化剤、保存剤、およびpH緩衝剤など(例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウラート)など)を含み得る。

40

【0113】

薬学的組成物の形態は、選択される投与様式によって決定される。開示の薬学的組成物の実施形態は、実質的に任意の投与様式(例えば、局所、眼球、経口、口内、全身、経鼻、注射、経皮、直腸、膣などが含まれる)に適切な形態または吸入もしくはガス注入による投与に適切な形態を取り得る。一般に、開示の薬学的組成物の実施形態は、注射、全身、または経口で投与される。

【0114】

有用な注射用調製物には、水性または油性ビヒクル中の活性化合物の無菌の懸濁液、溶液

50

、または乳濁液が含まれる。組成物はまた、製剤用剤 (formulating agent) (例えば、懸濁化剤、安定剤、および/または分散剤など) を含む得る。注射用製剤は、単位剤形 (例えば、アンプルまたは複数回用量容器) で与えられてよく、また、添加された保存剤を含んでいてよい。組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液、または乳濁液などの形態を取ってよく、また、製剤用剤 (formulatory agent) (例えば、懸濁化剤、安定剤、および/または分散剤など) を含んでいてよい。例えば、ポーラス注射または連続注入によって非経口投与を行うことができる。あるいは、コンジュゲートは、使用前に適切なビヒクル (例えば、滅菌水) で再構成するための粉末形態であり得る。

【0115】

全身用製剤には、注射 (例えば、皮下、静脈内、筋肉内、髄腔内、または腹腔内への注射) による投与のためにデザインされた製剤および経皮、経粘膜、経口、または肺への投与のためにデザインされた製剤が含まれる。

10

【0116】

経口用製剤は、液体 (例えば、シロップ、溶液、または懸濁液) または固体 (例えば、散剤、錠剤、またはカプセル) であり得る。経口用製剤を、内皮バリアを横断するための標的化リガンドと連結することができる。いくつかのコンジュゲート製剤を、例えば、ジサッカリドを使用した噴霧乾燥によって乾燥させて、コンジュゲートの粉末を形成することができる。固体組成物は、薬学的に許容され得る賦形剤 (例えば、結合剤 (例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース) ; 充填剤 (例えば、ラクトース、マンニトール、微結晶性セルロース、またはリン酸水素カルシウム) ; 滑沢剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、またはシリカ) ; 崩壊剤 (例えば、ジャガイモデンプンまたはグリコール酸デンプンナトリウム) ; または湿潤剤 (例えば、ラウリル硫酸ナトリウム) など) を使用した従来の手段によって調製される。錠剤を、当該分野で周知の方法によって、例えば、糖、薄膜、または腸溶コーティングを使用してコーティングすることができる。かかる剤形の実際の調製方法は、当業者に公知であるか、明らかである。

20

【0117】

経口投与のための液体調製物は、例えば、エリキシル、溶液、シロップ、または懸濁液の形態を取り得る。かかる液体調製物を、薬学的に許容され得る添加物 (例えば、懸濁化剤 (例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または水素化食用脂肪) ; 乳化剤 (例えば、レシチンまたはアカシア) ; 非水性ビヒクル (例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、クレモフォール (登録商標)、または分別植物油 (fractionated vegetable oils)) ; および保存剤 (例えば、メチル p - ヒドロキシベンゾアートまたはプロピル p - ヒドロキシベンゾアートまたはソルビン酸) など) を使用した従来の手段によって調製することができる。調製物はまた、緩衝塩、保存剤、矯味矯臭剤、着色剤、および甘味剤を適宜含むことができる。経口投与用調製物を、周知のとおり、フルオロフォアの制御放出をもたらすように適切に製剤することができる。

30

【0118】

直腸および膣の投与経路のために、コンジュゲートを、溶液 (停留浣腸用) の坐剤または従来の坐剤基剤 (例えば、カカオバターまたは他のグリセリドなど) を含む軟膏として製剤することができる。

40

【0119】

経鼻投与または吸入もしくはガス注入による投与のために、コンジュゲートを、適切な噴射剤 (例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、フッ化炭素、二酸化炭素、または他の適切なガス) を使用した圧縮パックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレーまたはミストの形態で都合よく送達することができる。圧縮エアロゾルの場合、投薬単位を、定量を送達するための弁を提供することによって決定することができる。

【0120】

本明細書中に記載のコンジュゲートを含む薬学的組成物のある特定の実施形態を、正確な

50

投薬量の個別投与に適切な単位剤形で製剤することができる。薬学的組成物は、所望する場合、1つまたは複数の、コンジュゲートを含む単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサーデバイスで与えられてよい。パックは、例えば、金属またはプラスチックの箔（例えば、プリスターパックなど）を含み得る。パックまたはディスペンサーデバイスに、投与のための説明書を添付することができる。コンジュゲートの投与量は、少なくとも一部が、処置される被験体、標的（例えば、腫瘍のサイズ、位置、および特徴）、および投与様式に依存し、これは当業者に公知である。これらの範囲内で、投与すべき製剤は、コンジュゲートにNIR光を照射してコンジュゲートから薬物を放出させる場合に、処置される被験体に治療有効量の薬物を提供するのに有効な量で、本明細書中に開示のコンジュゲートのある量を含む。

10

【0121】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、コンジュゲート以外の第2の治療剤を含む。前記第2の剤は、例えば、抗腫瘍剤または血管形成インヒビターであり得る。

【0122】

VI. 光誘起開裂

開示の式Iのコンジュゲートの実施形態は、予め選択した標的領域へのある有効な期間にわたる所望の波長、強度、および/または表面積を有する光の利用によって光活性化される。光活性化により、コンジュゲートからの薬物の開裂が生じる。波長は、近赤外範囲内で選択される（例えば、650nm~2500nm、例えば650~900nmなど）。いくつかの実施形態では、光源は、650~800nmまたは680~750nmの範囲内の波長を有する光を生じるレーザーである。適切な光強度は、標的部位および利用方法に応じて、1mW/cm²~1000mW/cm²（例えば、1~750mW/cm²または300~700mW/cm²など）の範囲であり得る。近赤外光源を、商業的供給元（Thorlabs（Newton, NJ）、Laser Components, USA（Hudson, NH）、およびProPhotonix（Salem, NH）などが含まれる）から得ることができる。いくつかの実施形態では、NIR光の有効量は、10~250J（例えば、10~200J、10~150J、または10~100Jなど）である。標的領域（例えば、腫瘍に隣接する領域）に照射する場合、NIR光の有効量は、1~250J/cm²（例えば、1~250J/cm²など、5~250J/cm²、10~250J/cm²、10~200J/cm²、10~150J/cm²、10~100J/cm²、または30~100J/cm²など）であり得る。

20

30

【0123】

いくつかのin vivo実施形態では、被験体の標的化領域への光の外部利用によって照射が実施される。NIR光は、組織内を深さ数cmまで経皮的に透過することができる。他の実施形態では、光の内部利用によって（例えば、内視鏡、光ファイバーカテーテル、または埋め込み型蛍光デバイスの使用などによって）照射が実施されてよい。標的組織（例えば、腫瘍など）が外部光利用に不適切な深さに位置する場合、内部利用を使用することができる。例えば、内視鏡を、肺内、胃内、または膀胱内への光送達のために使用することができる。ある特定の実施形態では、標的領域を、光の利用前に外科的に露呈する。

【0124】

光利用のための表面積を、一般に標的組織（例えば、腫瘍または腫瘍の一部）または標的組織に対して外部の皮膚領域を含むように選択する。in vivo生物試料のために外部光の標的化利用を所望する場合、表面積を、適切な光アプリアケーター（例えば、マイクロレンズ、フレネルレンズ、またはディヒューザー装置など）の使用によって調節することができる。標的化内部光利用のために、所望の内視鏡または光ファイバーカテーテルの直径を選択することができる。いくつかの利用では、光散乱溶液を充填した留置カテーテルを標的組織に隣接して、内部で配置することができ、光ファイバー光源をカテーテル中に挿入することができる（例えば、Madsenら, Lasers in Surgery and Medicine 2001, 29, 406-412を参照のこと）。

40

【0125】

50

コンジュゲートの少なくともいくつかの分子からの薬物の開裂を誘起するのに有効な照射量を送達するのに十分な時間にわたって照射を実施する。いくつかの実施形態では、照射有効量は、少なくとも 10 J/cm^2 (例えば、少なくとも 30 J/cm^2 、少なくとも 50 J/cm^2 、または少なくとも 100 J/cm^2 など) である。照射有効量は、 $1 \sim 250 \text{ J/cm}^2$ の範囲 (例えば、 $5 \sim 250 \text{ J/cm}^2$ 、 $10 \sim 250 \text{ J/cm}^2$ 、 $10 \sim 200 \text{ J/cm}^2$ 、 $10 \sim 150 \text{ J/cm}^2$ 、 $10 \sim 100 \text{ J/cm}^2$ 、または $30 \sim 100 \text{ J/cm}^2$ など) であり得る。

【0126】

VII. 使用方法

式Iまたは式IIのコンジュゲートは、*in vivo*、*ex vivo*、または *in vitro* での使用に適切である。いくつかの実施形態では、 R^b が標的剤であり、 Y が $C(R^d)_2$ である場合、少なくとも1つの R^d はH以外である。1つを超えるヘプタメチンシアニン-薬物部分を、各標的剤にコンジュゲートすることができる。例えば、コンジュゲートは、 $1 \sim 6$ (例えば、 $1 \sim 4$ または $2 \sim 4$ など) の標識度 (DOL) を有してよく、ここで、DOLは、標的剤にコンジュゲートしているヘプタメチンシアニン-薬物部分の数である。1つの実施形態では、各ヘプタメチンシアニン-薬物部分は、同一の薬物を含む。1つの独立した実施形態では、ヘプタメチンシアニン-薬物部分は異なる薬物を含み、それにより、単一のコンジュゲートが複数の薬物を送達することが可能となる。

10

【0127】

開裂反応を誘起し、コンジュゲートの少なくともいくつかの分子から薬物を放出させるための近赤外範囲の選択された波長および選択された強度を有する有効量の光の標的化利用によりコンジュゲートに照射する。例えば、コンジュゲートに有効量の光を照射する場合、コンジュゲート分子の少なくとも 10% 、少なくとも 20% 、少なくとも 40% 、少なくとも 60% 、または少なくとも 80% から薬物を放出することができる。いくつかの実施形態では、薬物の $10 \sim 100\%$ (例えば、 $20 \sim 100\%$ 、 $40 \sim 100\%$ 、 $60 \sim 100\%$ 、または $80 \sim 100\%$ など) が放出される。コンジュゲートが1を超えるDOLを有する場合、コンジュゲートに有効量の光を照射したとき、DOLが1のコンジュゲートと比較して、より多くの量の薬物をコンジュゲートから放出させることができる。1つの実施形態では、近赤外光を照射した場合に特定のコンジュゲートが光分解を経ることを確認するために、生物試料の非存在下でコンジュゲートを評価する。

20

30

【0128】

好都合なことに、コンジュゲートは、照射前に蛍光性であり、開裂反応後に蛍光性を喪失する。コンジュゲートが1を超えるDOLを有する場合、DOLが1のコンジュゲートと比較して、蛍光が有利に増加する。照射中にコンジュゲートの蛍光レベルをモニタリングすることができ、蛍光レベルが標的レベル未満に低下した場合に照射を停止することができる。コンジュゲートから薬物が放出されるにつれて、蛍光が減少する。したがって、所望のまたは十分な比率のコンジュゲートが開裂および薬物放出を経た時を決定するために、蛍光レベルをモニタリングする場合がある。

【0129】

生物試料を、式Iまたは式IIのコンジュゲートと、*in vivo*、*ex vivo*、または *in vitro* で接触させることができる。コンジュゲートとの接触後、開裂反応を誘起してコンジュゲートから薬物を放出させるために、生物試料に近赤外線を照射する。いくつかの実施形態では、コンジュゲートの投与と近赤外照射の利用との間にある期間の時間を経過させ、それにより、コンジュゲートが標的部位に蓄積して標的部位に結合する時間を提供する。前記期間の時間は、数時間から数日 (例えば、 $1 \sim 7$ 日間または 12 時間 ~ 2 日間など) であり得る。

40

【0130】

いくつかの実施形態では、式IまたはIIのコンジュゲートは、生物試料中に存在するか、または存在すると疑われる標的 (例えば、抗原または受容体) を *in vitro*、*in vivo*、または *ex vivo* で直接または間接的に認識して結合することができる標

50

的剤を含む。1つの実施形態では、生物試料を、コンジュゲートが生物試料中に存在する場合に近赤外蛍光を生じさせるのに適切な条件下で視覚化する。蛍光により、生物試料中の標的の存在も確認される。蛍光を検出するために試料を視覚化する前に、過剰な、結合していないコンジュゲートを、(例えば、組織試料を洗浄することによって)生物試料から除去することができる。

【0131】

1つの非限定的な例では、標的を含み得る生物試料(例えば、組織試料)を、標的を認識して結合することができる抗体を含む式IまたはIIのコンジュゲートと接触させる。別の非限定的な例では、標的を含み得る生物試料を、標的を認識して結合することができる第1の抗体と合わせ;その後、生物試料を、抗抗体抗体(anti-antibody antibody)を含むコンジュゲートと接触させる。別の非限定的な例では、生物試料を、受容体に結合することができるリガンドを含むコンジュゲートと接触させる。例えば、置換基R^bは、細胞表面上の受容体に結合することができる受容体リガンドであり得る。

10

【0132】

いくつかの実施形態では、被験体は、薬物で処置することができる状態を有すると同定される。薬物を含む式IもしくはIIのコンジュゲート、または該コンジュゲートを含む薬学的組成物の治療有効量を被験体に投与する。コンジュゲートの治療有効量は、被験体の標的化部分への近赤外範囲の波長および選択された強度を有する有効量の光の標的化利用によって照射した場合に、治療有効量の薬物を放出させるのに十分な量である。照射した場合に各コンジュゲートが1つを超える薬物分子を放出することができるので、コンジュゲートが1を超えるDOLを有する場合に、コンジュゲートの治療有効量を減少させることができる。

20

【0133】

ある特定の実施形態では、光源は、650~900nmの範囲内の波長(例えば、650~800nmまたは680~750nmの波長など)および1~1000mW/cm²の強度(例えば、300~700mW/cm²など)を有する光を提供する。1つの実施形態では、光は、690nmの波長および500mW/cm²の強度を有する。別の実施形態では、光は、740nmの波長および500mW/cm²の強度を有する。有効量は、10~250Jの範囲(例えば、10~200J、10~150J、または10~100Jなど)であり得る。標的領域(例えば、腫瘍に隣接する領域)に照射する場合、NIR光の有効量は、1~250J/cm²(例えば、1~250J/cm²など、例えば、5~250J/cm²、10~250J/cm²、10~200J/cm²、10~150J/cm²、10~100J/cm²、または30~100J/cm²など)であり得る。

30

【0134】

1つの実施形態では、被験体は腫瘍を有し、式IまたはIIのコンジュゲートは、腫瘍の抗原またはリガンド結合受容体を認識して結合することができる標的剤を含む。適切な腫瘍には、固形腫瘍塊(例えば、腹腔内腫瘍(例えば、卵巣、前立腺、結腸直腸)、乳房腫瘍、または頭頸部腫瘍など)が含まれるが、これらに限定されない。標的剤は、例えば、腫瘍抗原を認識して結合する抗体であり得る。治療有効量のコンジュゲート、その薬学的に許容され得る塩、または前記コンジュゲートを含む薬学的組成物は、任意の適切な手段(非経口投与、静脈内投与、皮下投与、経口投与、直腸投与、腔投与、または局所投与が含まれるが、これらに限定されない)によって被験体に投与される。投与されたコンジュゲートに、腫瘍の位置に隣接する領域へのNIR光の標的化利用によって照射する。

40

【0135】

図7を参照して、腫瘍110を有する被験体100を、抗腫瘍薬および腫瘍細胞表面上の抗原または受容体を認識して結合することができる抗体またはリガンドを含むコンジュゲートで処置することができる。コンジュゲートの被験体への投与が、腫瘍成長を損なわせ得、そして/または腫瘍退縮を引き起こし得る。

【0136】

図7に示す例では、コンジュゲート120が、静脈内注射によって投与される。ある期間

50

の時間を経過させ、その間に、抗体部分またはリガンド部分が腫瘍に結合するので、コンジュゲートが腫瘍部位に優先的に蓄積する。その後、被験体の標的部分に、外部光アプリケーション 130 を使用して、有効量の所望の波長の NIR 光エネルギーを選択的に照射する。光アプリケーション 130 は、腫瘍 110 の領域に限定された標的領域に光活性化エネルギーを当てて、それにより、腫瘍 110 内および腫瘍 110 周囲のコンジュゲート分子の開裂を選択的に誘起し、コンジュゲートから放出された抗腫瘍薬の送達を標的化する。

【0137】

開示のコンジュゲートまたは前記コンジュゲートを含む薬学的組成物の実施形態は、セラノスティックな (theranostic) 用途 (すなわち、状態を診断し、次いで、処置すること) に適切である。いくつかの実施形態では、治療有効量の本明細書中に開示のコンジュゲートまたは前記コンジュゲートを含む薬学的組成物を、薬物で処置することができる状態を有すると疑われる被験体に投与する。コンジュゲートは、その後、近赤外範囲の波長および選択された強度を有する光量の被験体の標的化部分への標的化利用によって照射され、光量は、シアニン発色団を励起し、コンジュゲートの蛍光を誘起するのに十分であるが、コンジュゲートから薬物を放出させるには不十分である。被験体の標的化部分中のコンジュゲートから任意の蛍光が検出され、それによって状態を有する被験体を診断する。蛍光が検出された場合に、コンジュゲートは、その後、近赤外範囲の波長およびコンジュゲートの少なくともいくつかの分子から薬物を放出し状態を処置するのに十分な選択された強度を有する有効量の光の標的化利用によって照射されてもよい。

【0138】

いくつかのセラノスティックな実施形態では、状態は、腫瘍であり、被験体の標的化された部分は、腫瘍部位を含む。NIR 光の標的化利用の前に、投与したコンジュゲートを、コンジュゲートの蛍光を誘起するのに十分であるが、開裂を誘起するには不十分な波長および強度を有する光に腫瘍を曝露することによって視覚化する。いくつかの例では、光へ腫瘍を曝露する前に外科的切除によって腫瘍部位を露出させる。ガイドンスとして蛍光の領域を使用して、腫瘍を切除する。次いで、残存するコンジュゲートおよび/または腫瘍組織に、上記の NIR 光の標的化利用によって照射して、コンジュゲートの少なくともいくつかの分子から薬物を放出させ、任意の非切除がん組織を処置する。

【0139】

1つの実施形態では、前記コンジュゲートまたは前記コンジュゲートを含む薬学的組成物の治療有効量を被験体に投与する前に、腫瘍の少なくとも一部を被験体から切除する。1つの独立した実施形態では、前記コンジュゲートまたは前記コンジュゲートを含む薬学的組成物の治療有効量が、腫瘍またはその一部の外科的切除前に被験体に投与される。

【0140】

治療有効量の第2の剤を、コンジュゲートまたはその塩と共投与することができる。コンジュゲート (またはその塩) および第2の剤を、個別に、または単一の組成物中で一緒に投与することができる。第2の剤を、同一の経路または異なる経路によって投与することができる。同時に投与する場合、コンジュゲート (またはその塩) および第2の剤を、単一の薬学的組成物中で組み合わせてもよく、2つの薬学的組成物として同時に投与してもよい。第2の剤は、例えば、化学療法剤 (例えば、抗腫瘍剤または血管形成インヒビターなど)、抗炎症剤、抗感染症剤、抗酸化剤、またはその任意の組み合わせであり得る。

【0141】

別の実施形態では、式 I または II の標的剤 - 薬物コンジュゲートが薬物によって処置または回復することができる状態を有するか、または有すると疑われる被験体から得た組織試料に有効に結合するかどうかを決定し、そして/または薬物が被験体の状態に有効であり得るかどうかを決定するために *in vitro* または *ex vivo* 評価を実施することができる。コンジュゲートは、薬物と、標的分子に結合することまたは標的分子と会合することができると考えられる R^b において部分とを含む。1つの非限定的な例では、 R^b は、標的受容体に結合することができる受容体リガンドまたは抗体である。コンジュゲートを組織試料と合わせ、その後、試料に有効量の近赤外光を照射する。1つの実施形態

10

20

30

40

50

では、組織試料を洗浄して過剰な、結合していないコンジュゲートを除去し、組織試料の蛍光を評価する。蛍光は、コンジュゲートが組織試料に結合していることを示す。近赤外光での照射後、蛍光を再度評価することができる。蛍光の減少（または停止）は、薬物の放出を示す。例えば、細胞傷害性を評価することによって薬物の有効性を評価することもできる。

【0142】

式Iまたは式II（式中、R^aまたはR^bは、スクシンイミジル基、マレイミジル基、またはジベンゾシクロオクチニル基を含む）のコンジュゲートの実施形態は、最適な標的剤へのカスタマイズされたコンジュゲーションに適切である。1つの非限定的な例では、腫瘍試料を被験体から得、腫瘍に対して有効であり得る薬物を含むコンジュゲートを選択する。腫瘍上の抗原を特異的に認識して結合する抗体または腫瘍上の受容体の特異的に認識して結合するリガンドを、当業者に公知の方法によって調製する。次いで、調製した抗体またはリガンドを、選択されたコンジュゲートのR^bと反応させて、被験体への投与に適切なカスタマイズされたコンジュゲートを得る。

10

【0143】

式IVの前駆体化合物は、選択された薬物および選択された標的剤へのカスタマイズされたコンジュゲーションに適切である。1つの実施形態では、前駆体化合物を製薬会社を使用して、薬物と標的剤との所望の組み合わせを有するコンジュゲートが開発される。別の実施形態では、前駆体化合物を研究者または臨床研究者が使用して、研究目的で、または被験体を処置するためのカスタマイズされたコンジュゲートを開発するのに有用な薬物と標的剤との所望の組み合わせを有するコンジュゲートが開発される。

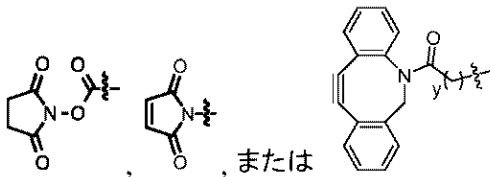
20

【0144】

VIII. キット

キットも本開示の特徴である。キットの実施形態は、少なくとも1つの、一般式IもしくはIIのコンジュゲートまたは一般式IVの前駆体化合物を含む。1つの実施形態では、キットは、式IまたはII（式中、R^bは標的剤（例えば、抗体）である）のコンジュゲートを含む。別の実施形態では、キットは、R^aまたはR^bが

【化39】



30

（ここで、yは1以上の整数である）である中間体コンジュゲートを含み、キットを、所望の標的剤を含むさらなるコンジュゲートを調製するために使用することができ、ここで、前述の標的剤は中間体化合物と反応して、標的剤を含むコンジュゲートを提供することができる。さらに別の実施形態では、キットは式IVの前駆体化合物を含み、キットは、所望の標的剤および所望の薬物を有するコンジュゲートを調製するために使用される。

【0145】

40

いくつかの実施形態では、キットはまた、コンジュゲートまたは前駆体化合物を溶解または懸濁させることができる少なくとも1つの溶液を含む。キットはまた、1つまたは複数の容器（例えば、使い捨ての試験管またはキュベットなど）を含み得る。キットは、R^aまたはR^bが反応性基である場合の所望の標的剤をコンジュゲートするために、および/または所望の標的剤および式IVの前駆体化合物由来の所望の薬物を含むコンジュゲートを調製するために、式IまたはIIのコンジュゲートを使用するための説明書をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、式I、II、またはIVの化合物を標的剤へコンジュゲートするためおよび/または式IVの化合物を薬物へコンジュゲートするために適切な試薬をさらに含む。

【0146】

50

キットのいくつかの実施形態では、コンジュゲートまたは前駆体化合物を固体として提供し、溶液を液体形態で提供する。1つの実施形態では、溶液は、溶解したコンジュゲートを被験体に投与することができるように、または、 R^a もしくは R^b が反応性基である溶解したコンジュゲート（薬物および反応性基を含む中間体化合物）を標的剤にコンジュゲートすることができるように式IまたはIIのコンジュゲートを溶解させるのに適切である。1つの独立した実施形態では、溶液は、薬物および/または標的剤へのその後のコンジュゲーションのために式IVの前駆体化合物を溶解させるのに適切である。意図する用途に適切な濃度で溶液を提供することができる。あるいは、後で使用前に希釈される濃縮液として溶液を提供することができる。ある特定の実施形態では、コンジュゲートまたは前駆体化合物を、1つまたは複数の容器（例えば、試験管またはキュベット）中に予め計量して入れる。

10

【実施例】

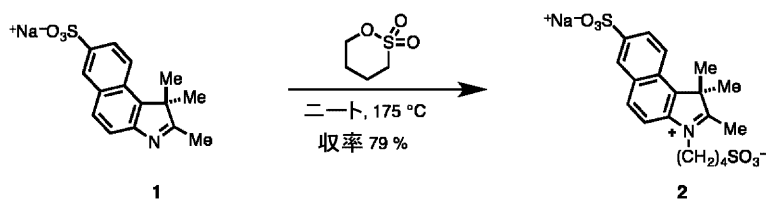
【0147】

IX. 実施例

実施例1

合成

【化40】



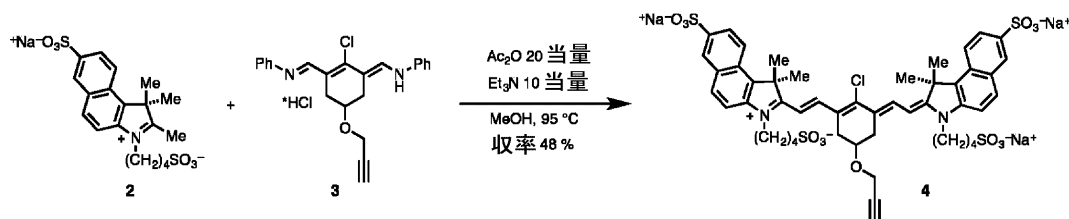
20

(2) : インドレニン1 (75 mg、0.24 mmol) が入っているマイクロ波バイアルに、1,4-ブタンスルトン (1.5 mL) を添加した。上部空間にアルゴンをフラッシュし、淡褐色懸濁液をマイクロ波反応器中にて175 で7時間加熱した。ジエチルエーテル (10 mL) をバイアルに入れ、濃厚なスラリーを遠心分離して褐色ペレットを得た。粗固体を水に溶解させ、逆相クロマトグラフィ (C18 Agゴールドカラム、0-20% MeCN / 水) によって精製した。溶媒を真空中で除去して、2 (85 mg、収率79%) を黄褐色固体として得た。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) 8.41 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.36 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.33 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.20 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.94 (dd, $J = 8.7, 1.7$ Hz, 1H), 4.59 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.94 (s, 3H), 2.55 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.02 (p, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.80 (p, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.75 (s, 6H); C19H22NO6S2 (M) $^-$ のMS (ESI) 計算値424.1、実測値424.1。

30

【0148】

【化41】



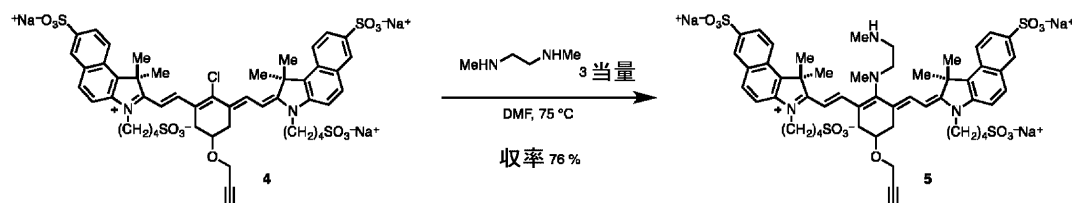
40

(4) : マイクロ波バイアルに、インドレニン2 (50 mg、0.11 mmol) および塩化物3 (12 mg、0.028 mmol) を添加した。次いで、MeOH (3 mL)、トリエチルアミン (39 μL 、0.28 mmol)、および無水酢酸 (53 μL 、0.56 mmol) を連続して添加した。黄色溶液を95 に75分間加熱し、その間に反応物が深緑色に移行した。反応物を冷却し、飽和NaHCO₃水溶液中へ入れて希釈して黄褐色沈殿を得た。粗固体を水に溶解させ、逆相クロマトグラフィ (C18 Agゴールドカラ

50

ム、0 - 30 % MeCN / 水) によって精製した。生成物含有画分を凍結乾燥して、4 (15 mg、収率 48 %) を綿毛様緑色固体として得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 8.39 (d, J = 14.1 Hz, 2H), 8.32 - 8.23 (m, 4H), 8.16 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.88 - 7.78 (m, 4H), 6.45 (d, J = 14.2 Hz, 2H), 4.54 - 4.24 (m, 6H), 4.12 (m, 1H), 3.50 (t, J = 2.3 Hz, 1H), 3.11 - 2.99 (m, 2H), 2.86 (dd, J = 15.8, 6.9 Hz, 2H), 2.54 (t, J = 7.3 Hz, 4H), 1.96 (s, 6H), 1.95 (s, 6H), 1.93 - 1.85 (m, 4H), 1.86 - 1.77 (m, 4H); MS (ESI) calculated for C₄₉H₅₀ClN₂O₁₃S₄ (M/z)³⁻ 345.7, observed 346.0. 【0149】

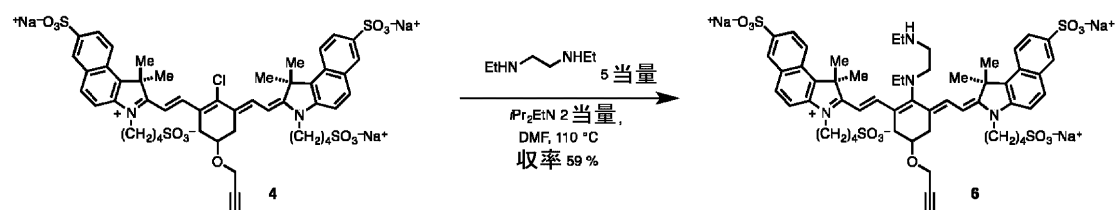
【化42】



(5) : 1 ドラムバイアルに、塩化物 4 (15 mg、0.014 mmol) および DMF (0.8 mL) を添加した。N, N'-ジメチルエチレンジアミン (5.0 μL、0.047 mmol) を添加し、反応物を 75 に 10 分間加熱し、その間に反応物の色は緑色から暗青色に移行した。反応物を冷却し、H₂O (8 mL) で希釈し、溶液を逆相クロマトグラフィ (C₁₈ ゴールドカラム、0 - 30 % MeCN / 水) によって直接精製した。生成物含有画分を凍結乾燥して、5 (12 mg、収率 76 %) を綿毛様青色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) 8.43 (d, J = 1.8 Hz, 2H), 8.28 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.09 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.00 (dd, J = 8.9, 1.6 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 13.6 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.20 (d, J = 13.7 Hz, 2H), 4.34 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.32 - 4.26 (m, 4H), 4.24 - 4.16 (m, 1H), 4.02 - 3.92 (m, 2H), 3.49 (s, 3H), 3.42 - 3.33 (m, 4H), 2.99 - 2.83 (m, 5H), 2.84 - 2.67 (m, 5H), 2.15 - 2.03 (m, 4H), 2.00 (s, 6H), 1.99 (s, 6H), 1.98 - 1.90 (m, 4H); MS (ESI) c

【0150】

【化43】



(6) : 1 ドラムバイアルに、塩化物 4 (22 mg、0.020 mmol) および DMF (1.5 mL) を添加した。N, N'-ジエチルエチレンジアミン (14 μL、0.10 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (7.0 μL、0.040 mmol) を添加し、反応物を 110 に 20 分間加熱し、その間に反応物の色は緑色から暗青色に移行した。反応物を冷却し、H₂O (8 mL) で希釈し、溶液を逆相クロマトグラフィ (C₁₈ ゴールドカラム、0 - 30 % MeCN / 水) によって直接精製した。生成物含有画分を凍結乾燥して、5 (14 mg、収率 59 %) を綿毛様の青みがあった緑色固体として得た。¹H NMR (500 MHz, Methanol-d₄) 8.42 (d, J = 1.8 Hz, 2H), 8.29 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.09 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.00 (dd, J = 8.9, 1.9 Hz, 2H), 7.94 (d, J = 13.7 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.20

10

20

30

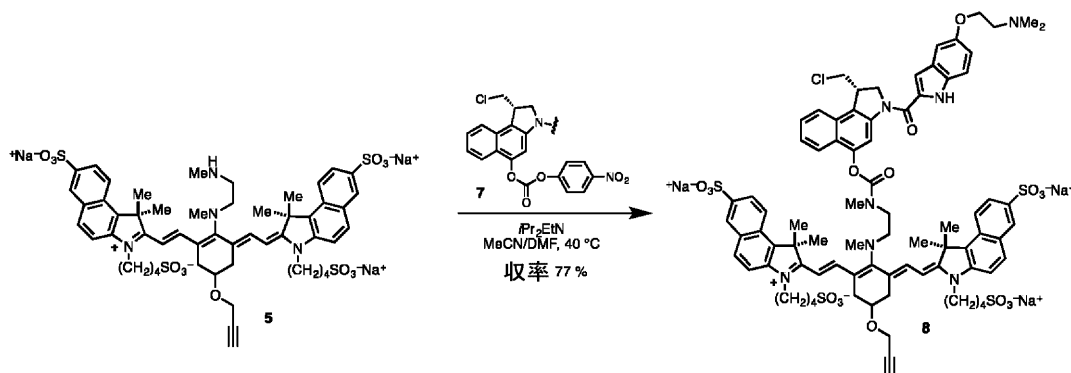
40

50

(d, J = 13.8 Hz, 2H), 4.34 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.28 (t, J = 7.3 Hz, 4H), 4.22 - 4.16 (m, 1H), 3.94 - 3.85 (m, 2H), 3.81 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.20 - 3.11 (m, 2H), 2.99 - 2.86 (m, 9H), 2.75 (dd, J = 15.3, 6.1 Hz, 2H), 2.16 - 1.90 (m, 20H), 1.44 (t, J = 6.9 Hz, 3H), 1.23 (t, J = 7.2 Hz, 3H); MS (ESI) calculated for C₅₅H₇₀N₄O₁₃S₄ (M+5H)²⁺ 561.2, observed 561.4.

【 0 1 5 1 】

【 化 4 4 】



10

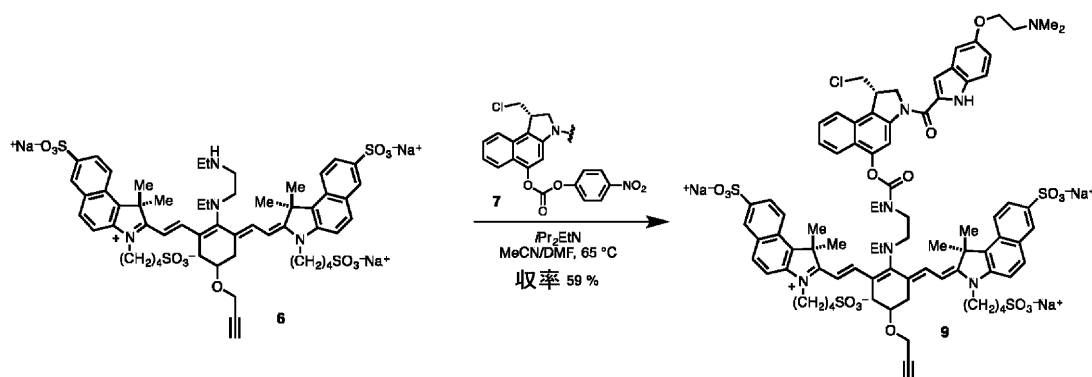
(8) : 1 ドラムバイアルに、デュオカルマイシンDM (1 . 0 m g 、 0 . 0 0 1 7 m m o l) および M e C N (0 . 1 5 m L) を添加した。ジイソプロピルエチルアミン (0 . 9 μ L 、 0 . 0 0 5 m m o l) 、 および 4 - ニトロフェニル - クロロホルマート (0 . 7 0 m g 、 0 . 0 0 3 5 m m o l) を含む M e C N (0 . 1 m L) の溶液を連続的に添加した。透明な淡黄色溶液を室温で 4 0 分間攪拌し、その後の H P L C で、混合カルボナート 7 への 8 0 % 変換が示された。別の容器中でジアミン 5 (2 . 5 m g 、 0 . 0 0 2 2 m m o l) を DMF (0 . 4 m L) にアルゴン下で溶解させ、これにジイソプロピルエチルアミン (1 . 2 μ L 、 0 . 0 0 7 0 m m o l) を添加した。この DMF 溶液を混合カルボナート 7 と合わせ、暗青色混合物を 4 0 に 6 0 分間加熱した。反応物を冷却し、H₂O (7 m L) で希釈し、溶液を逆相クロマトグラフィ (C 1 8 ゴールドカラム、0 4 0 % M e C N / 水) によって直接精製した。生成物含有画分を凍結乾燥して、8 (2 . 2 m g 、 収率 7 7 %) を綿毛様青色固体として得た。C₈₀H₈₆ClN₇O₁₇S₄ (M + H)²⁻ の MS (E S I) 計算値 7 9 0 . 2 、 実測値 7 9 0 . 3 .

20

30

【 0 1 5 2 】

【 化 4 5 】



40

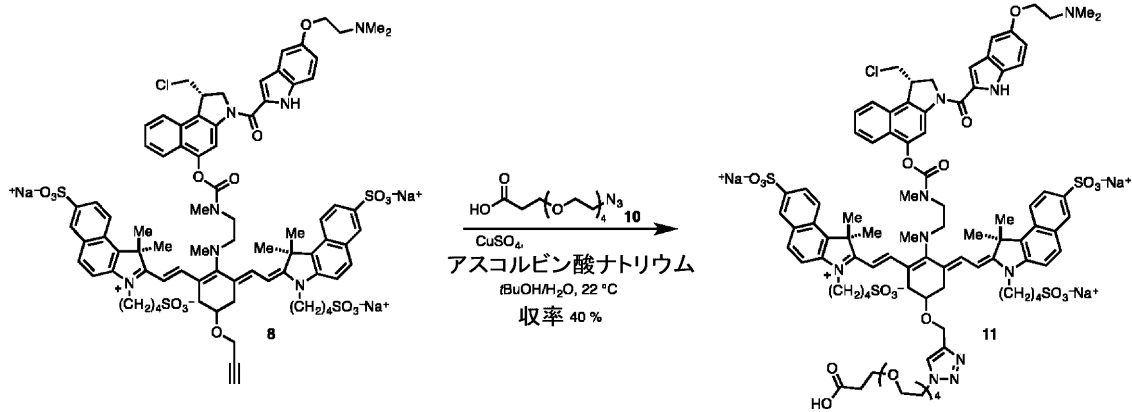
(9) : 1 ドラムバイアルに、デュオカルマイシンDM (4 . 9 m g 、 0 . 0 0 8 5 m m o l) および M e C N (0 . 2 m L) を添加した。ジイソプロピルエチルアミン (3 . 7 μ L 、 0 . 0 2 1 m m o l) 、 および 4 - ニトロフェニル - クロロホルマート (2 . 5 m g 、 0 . 0 1 3 m m o l) を含む M e C N (0 . 2 5 m L) の溶液を連続的に添加した。透明な淡黄色溶液を室温で 4 0 分間攪拌し、その後の H P L C で、混合カルボナート 7 へ

50

の80%変換が示された。別の容器中でジアミン6(6.7mg、0.0056mmol)をDMF(1.0mL)にアルゴン下で溶解させ、これにジイソプロピルエチルアミン(8.0μL、0.046mmol)を添加した。このDMF溶液を混合カルボナート7と合わせ、暗青色混合物を65に60分間加熱した。反応物を冷却し、H₂O(7mL)で希釈し、溶液を逆相クロマトグラフィ(C₁₈ゴールドカラム、0.35%MeCN/水)によって直接精製した。生成物含有画分を凍結乾燥して、9(5.5mg、収率59%)を綿毛様の青みがかった緑色固体として得た。C₈₂H₉₀ClN₇O₁₇S₄(M+H)²⁻のMS(ESI)計算値804.3、実測値804.2。

【0153】

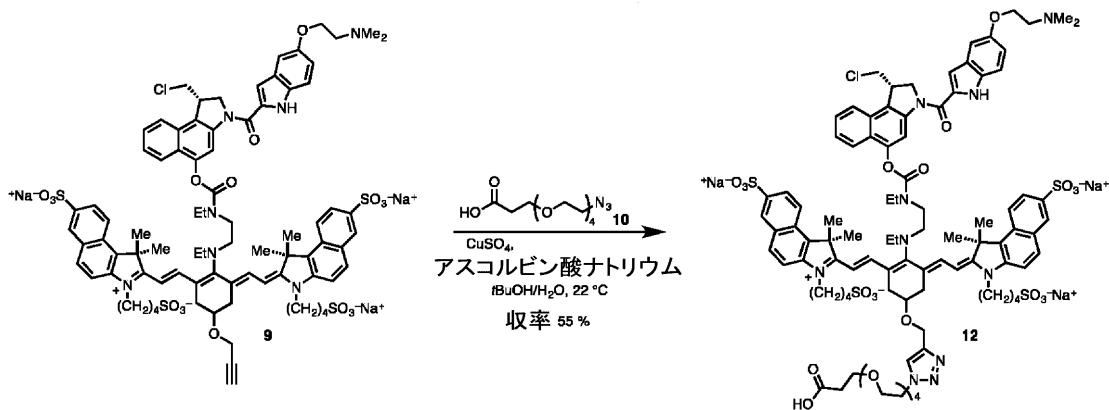
【化46】



(11): 8(2.1mg、0.013mmol)および10(0.5mg、0.002mmol)が入っている1ドラムバイアルに、水/t-ブタノール混合物(1.0mL、3:1 v/v)を添加した。深青色溶液に、攪拌しながらアルゴンを1分間注入した。硫酸銅(0.03mg、0.0002mmol)およびアスコルビン酸ナトリウム(0.02mg、0.001mmol)を、5mg/mLのストック水溶液から添加した。反応物を22で30分間攪拌し、攪拌終了時点でLC/MSにより8の消費が示された。反応物を水(4mL)で希釈し、溶液を逆相分取HPLC(5-90%MeCN/0.1%(NH₄)₂CO₃水溶液)によって直接精製した。生成物含有画分を凍結乾燥して、11(1.0mg、収率40%)を綿毛様青色固体として得た。C₉₁H₁₀₇ClN₁₀O₂₃S₄(M+H)²⁻のMS(ESI)計算値935.8、実測値936.1。

【0154】

【化47】



(12): 9(5.5mg、0.0033mmol)および10(1.3mg、0.0043mmol)が入っている1ドラムバイアルに、水/t-ブタノール混合物(1.2mL、1:1 v/v)を添加した。深青色溶液に、攪拌しながらアルゴンを1分間注入した。硫酸銅(0.08mg、0.0005mmol)およびアスコルビン酸ナトリウム(

10

20

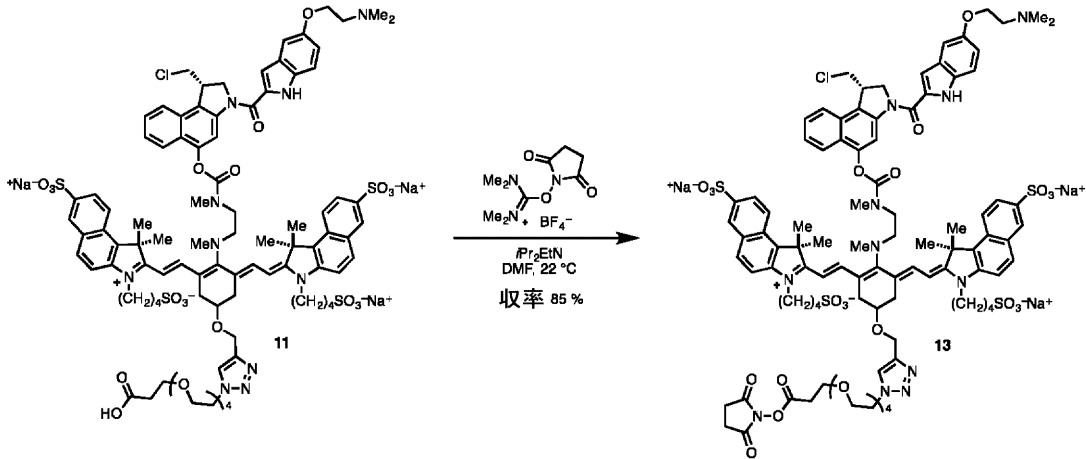
30

40

50

0.45 mg、0.0023 mmol) を、5 mg/mL のストック水溶液から添加した。反応物を 22 で 30 分間攪拌し、攪拌終了時点で LC/MS により 9 の消費が示された。反応物を水 (4 mL) で希釈し、溶液を逆相分取 HPLC (5 - 90% MeCN / 0.1% (NH₄)₂CO₃ 水溶液) によって直接精製した。生成物含有画分を凍結乾燥して、12 (3.5 mg、収率 55%) を綿毛様青色固体として得た。C₉₃H₁₁₁ClN₁₀O₂₃S₄ (M+H)²⁻ の MS (ESI) 計算値 949.8、実測値 950.5。

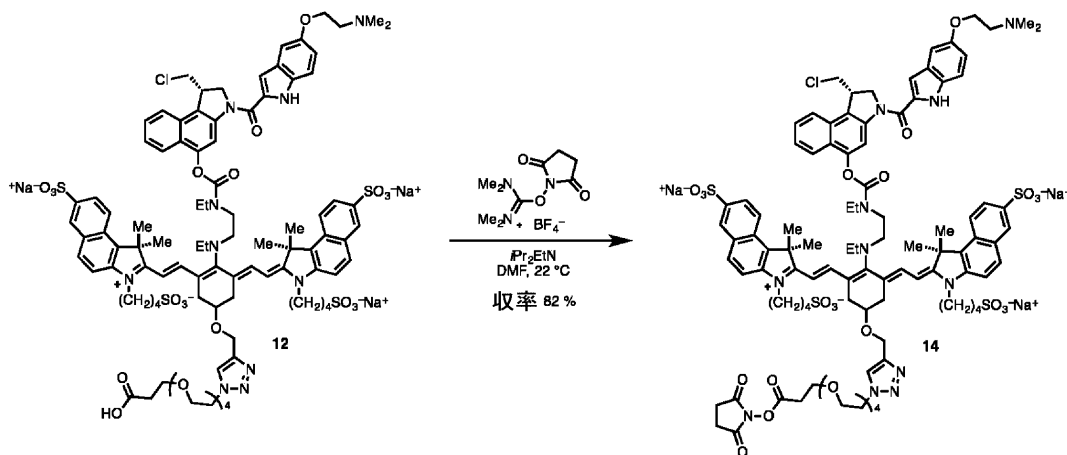
【化 48】



(13) : 1 ドラムバイアルに、11 (1.0 mg、0.00046 mmol) および N, N, N', N' - テトラメチル - O - (N - スクシンイミジル) ウロニウムテトラフルオロボレート (0.2 mg、0.0006 mmol) を添加した。DMF (0.5 mL) をバイアルに入れ、その後に N, N - ジイソプロピルエチルアミン (0.1 μL、0.0006 mmol) を入れた。深青色溶液を 22 で 30 分間攪拌し、攪拌終了時点で LC/MS により 11 の消費が示された。反応物を酢酸エチル (1.0 mL) 中に沈殿させた。微細懸濁液を遠心分離し、上清をデカントし、ペレットをジエチルエーテル (0.5 mL) に再度懸濁させた。ジエチルエーテルを使用して手順を 2 回繰り返し、ペレットを真空下 (0.1 Torr 未満) に 1 時間置いて、13 (0.9 mg、収率 85%) を暗青色固体として得た。C₉₅H₁₁₀ClN₁₁O₂₅S₄ (M+H)²⁻ の MS (ESI) 計算値 984.3、実測値 984.4。

【0156】

【化 49】



(14) : 1 ドラムバイアルに、12 (2.0 mg、0.0010 mmol) および N, N, N', N' - テトラメチル - O - (N - スクシンイミジル) ウロニウムテトラフルオロボレート (0.6 mg、0.002 mmol) を添加した。DMF (0.5 mL) をバイ

アルに入れ、その後にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.3 μL、0.002 mol)を入れた。深青色溶液を22 で30分間攪拌し、攪拌終了時点でLC/MSにより12の消費が示された。反応物をジエチルエーテル(1.0 mL)中に沈殿させた。微細懸濁液を遠心分離し、上清をデカントし、ペレットを酢酸エチル(0.5 mL)に再度懸濁させた。次に、ジエチルエーテルを使用して手順を2回繰り返し、ペレットを真空下(0.1 Torr未満)に1時間置いて、14(1.7 mg、収率82%)を暗青色固体として得た。C₉H₁₁ClN₁O₂S₄(M+H)²⁺のMS(ESI)計算値998.3、実測値998.4。

【0157】

実施例2

パニツムマブへのコンジュゲーションおよび特徴づけ

化合物12および14を、パニツムマブと1M PBS(pH8.5)中にて22 で1時間合わせて、CY(Me)-Pan-DuoDMコンジュゲートおよびCY(Et)-Pan-DuoDMコンジュゲートをそれぞれ得た(図5および6)。コンジュゲートを、PD10 Sephadex G25カラムでのゲルクロマトグラフィおよび50mM PBS中での4 で16時間の透析(交換1回)によって精製した。1~4の標識度(DOL;すなわち、1抗体あたりのCY-薬物コンジュゲートの数)を得た。

【0158】

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行って、抗体コンジュゲートの純度を評価した。NuPAGE4~12%ビス-Trisゲル(ThermoFisher Scientific)に、5 μgのCY(Me)-Pan-DuoDM(DOL3)、CY(Et)-Pan-DuoDM(DOL3および4)、およびPan(NuPAGE LDS試料緩衝液および50mM(pH7.4)PBSの1:4(v/v)溶液中)をロードし、非還元条件下、1xMES SDS泳動緩衝液中にて200Vで35分間泳動した。BenchMark染色済みタンパク質標準(ThermoFisher Scientific)を、分子量比較のために使用した。蛍光画像を、赤色epi光(630nm)励起を使用したImageQuant LAS 4000(GE Healthcare)および670nmロングパス発光フィルターを使用して得た。曝露時間は300秒であった。ゲルをSimplyBlue SafeStain(ThermoFisher Scientific)で1時間染色し、白色透視(1秒の曝露時間)によって画像化した。図8は、DOL3のCY(Et)-Pan-DuoDM(1)、DOL4のCY(Et)-Pan-DuoDM(2)、DOL3のCY(Me)-Pan-DuoDM(3)、Pan(4)、および分子量標準(5)のSDS-PAGE分析を示す。

【0159】

CY(Me)-Pan-DuoDMコンジュゲートおよびCY(Et)-Pan-DuoDMコンジュゲートを、安定性について評価した。両コンジュゲートは安定であったが、CY(Et)-Pan-DuoDMは、75時間にわたって暗所で、1.5分の1倍のより少ない薬物を放出した(図9)。

【0160】

MDA-MB-468細胞またはMCF-7細胞(2x10⁴細胞/皿)を、#1.5カバーガラスボトムディッシュ(Cellviss)上にプレートし、一晚接着させた。細胞を1 μMのCY(Et)-Pan-DuoDM(DOL4)と氷上で1時間インキュベートし、培地を置換し、画像化した。あるいは、細胞をコンジュゲートと氷上で1時間インキュベートし、培地を置換し、37 で6時間または24時間インキュベートし、画像化した。蛍光顕微鏡法を、プラン-フルオリート油浸対物レンズを使用したEvos FL自動細胞画像化システム(ThermoFisher Scientific)を倍率100xで使用して行った。近赤外蛍光を、Cy7LEDライトキューブ(ex710±20nm、em775±23nm)を使用して得た。ImageJを使用して画像処理を行った。図10は、コンジュゲートはMDA-MB-468(EGFR+)細胞に結合

10

20

30

40

50

したが、MCF-7 (EGFR-) 細胞には結合しなかったことを示す。

【0161】

実施例3

細胞光分解および細胞傷害性

MDA-MB-468 (EGFR過剰発現) ヒト乳がん細胞株およびMCF-7 (正常なEGFR発現) ヒト乳がん細胞株を、NCI DTP, DCTD Tumor Repositoryから入手した。MDA-MB-468を、2mM L-グルタミン、11mM D-グルコース、24mM重炭酸ナトリウム、10%熱失活ウシ胎児血清、100単位/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシン、および0.25μg/mLアンホテリシンBを補足したRPMI中で培養した。MCF-7を、4mM L-グルタミン、25mM D-グルコース、44mM重炭酸ナトリウム、10%熱失活ウシ胎児血清、100単位/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシン、および0.25μg/mLアンホテリシンBを補足したDMEM中で培養した。両細胞株を、20%O₂および5%CO₂雰囲気下にて37℃で成長させた。0.25%トリプシン-EDTA (0.9mM) を含むPBSでのトリプシン処理後に適切な細胞数を毎週継代することによって、保存培養を、持続的な指数関数的成長の中で維持した。

10

【0162】

CY(Me)-Pan-DuoDMは、690nmに吸収極大を有すると判断した。メチル置換基のエチル基への置き換えにより約50nmのレッドシフトが引き起こされ、CY(Et)-Pan-DuoDMは、740nmに吸収極大を有すると判断した。

20

【0163】

MDA-MB-468細胞またはMCF-7細胞を、96ウェルプレート(5×10⁴細胞/ウェル)に播種し、一晚接着させた。初期播種密度は、アッセイ期間中に細胞が指数関数的成長の中で維持されることを確実にするような密度であった。連続投与アッセイのために、培地を、CY(Me)-Pan-DuoDM(DOL3)、CY(Et)-Pan-DuoDM(DOL3)、DuoDM、またはDMSOを含む培地と置換した。細胞を、690nmまたは740nmのLED(20mW/cm²)による表示の線量の照射に曝露した、または暗所に保持した。照射時間を、以下の式にしたがって計算することができる。

【数1】

30

$$\text{照射時間(s)} = \frac{\text{光照射量(J/cm}^2\text{)}}{\text{光パワー(W/cm}^2\text{)}}$$

【0164】

ブレインキュベーションアッセイのために、培地を、試験化合物を含む培地と置換し、暗所にて37℃で24時間インキュベートし、培地を新鮮なインヒビターを含まない培地と置換し、上記のように照射した。37℃で72時間のインキュベーション後、5mg/mLのPBSストック溶液由来の20μLのMTT(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド)を各ウェルに添加し、37℃で4時間インキュベートした。培地を除去し、100μLのDMSOを各ウェルに添加してMTTホルマザンを可溶化し、マイクロプレートリーダーを使用して550nmの吸光度を記録した。薬物効果を、DMSO(インヒビターなし)コントロールに対する細胞生存率(%)として表した。半数阻害濃度(IC₅₀)を、GraphPad Prism 6を使用した生存率(%)対濃度データのS字状曲線フィッティングから得た。全ての実験を4連で行い、エラーバーは標準偏差を表す。

40

【0165】

表2は、CY(Me)-Pan-DuoDMまたはCY(Et)-Pan-DuoDMの存在下でのEGFR陽性細胞およびEGFR陰性細胞の近赤外光依存性成長阻害を示す。

50

【表 2】

表2

種	細胞株	照射条件 ^a	IC ₅₀ ^b	倍数 Δ ^c
CY(Me)- Pan- DuoDM	MDA-MB-468 (EGFR+)	+hv	62.0 ± 1.2 pM	203
		-hv	12.6 ± 0.7 nM	
	MCF-7 (EGFR-)	+hv	48.8 ± 1.6 nM	2
		-hv	90.0 ± 2.2 nM	
CY(Et)- Pan- DuoDM	MDA-MB-468 (EGFR+)	+hv	57.1 ± 0.9 pM	292
		-hv	16.7 ± 1.9 nM	
	MCF-7 (EGFR-)	+hv	65.4 ± 1.0 nM	<2
		-hv	>100 nM	
DuoDM	MDA-MB-468 (EGFR+)	±hv	7.0 ± 0.6 pM	-
	MCF-7 (EGFR-)	±hv	13.3 ± 1.1 pM	

10

20

a 光分解前に培地を交換した； b 30 J / cm²、690 nm； c 平均 IC₅₀ 値 ± 標準偏差 (n = 4)； d 比 - h / + h

【0166】

図 11 A (690 nm) および 11 B (740 nm) は、CY (Me) - Pan - DuoDM (各光照射量での第 1 のバー) または CY (Et) - Pan - DuoDM (各光照射量での第 2 のバー) の常駐下での (すなわち、アッセイ中の培地交換なし) MDA - MB - 468 細胞の近赤外光依存性成長阻害に及ぼす光照射量および波長の影響を示す。両コンジュゲートの DOL は 3 であった。50% 成長阻害を達成するために必要な光線量 (light dosage) (h_{1/2} (細胞生存率 50% を達成するために必要な光照射量)) を、非線形カーブフィッティングによって計算した。エラーバーは、標準偏差 (n = 4) を表す。CY (Me) - Pan - DuoDM については、h_{1/2} は 690 nm で 10.5 ± 2.2 J / cm² であり、740 nm で 17.0 ± 3.5 J / cm² であった。CY (Et) - Pan - DuoDM については、h_{1/2} は 690 nm で 8.0 ± 2.5 J / cm² であり、740 nm で 4.4 ± 2.6 J / cm² であった。

30

【0167】

実施例 4

生体内分布および In Vivo での光分解

全ての in vivo 手順を、Guide for the Care and Use of Laboratory Animal Resources (1996)、米国 National Research Council にしたがって実施し、国立がん研究所 / NIH Animal Care and Use Committee によって承認された。6 ~ 8 週齢の雌性ホモ接合体無胸腺ヌードマウスを、Charles River Laboratories International, Inc. (NCI - Frederick) から購入した。処置中、マウスをイソフルランで麻酔した。MDA - MB - 468 細胞 (6 × 10⁶) を、各マウスの右背側に皮下注射した。細胞注射の 8 ~ 9 日後に実験を行った。およそ 5 ~ 7 mm に到達した腫瘍を、研究のために選択した。

40

【0168】

生体内分布：MDA - MB - 468 腫瘍担持マウスの腹側および背側の蛍光連続画像を、尾静脈を経由する 100 μg の CY (Et) - Pan - DuoDM (DOL 4) の i.v. 注射前ならびに 0、1、3、6、9、24、48、72、96、120、144、およ

50

び168時間後に得た。800nm蛍光チャンネルを使用したPearl Imager (LI-COR Biosciences)を用いて、画像を収集した。関心領域(ROI)を、白色光を参照して蛍光画像上に配置して、腫瘍、肝臓、および左背側(すなわち、標的の反対側のバックグラウンド組織)の蛍光強度を測定した。Pearl Camソフトウェア(LI-COR Biosciences)を使用して、各ROI内の平均蛍光強度を計算した。標的対バックグラウンド比(TBR)を、以下の式を使用して計算した(n=5)。

【数2】

$$TBR = \frac{\text{平均標的強度} - \text{平均バックグラウンド強度}}{\text{平均非標的強度} - \text{平均バックグラウンド強度}}$$

10

【0169】

図12Aおよび12Bは、時間の関数としてのCY(Et)-Pan-DuodM(DOL4)の生体内分布および腫瘍局在を示す。MDA-MB-468腫瘍担持マウスの連続蛍光画像を、背側(12A)および腹側(13B)から取得した。n=5。図13Aおよび13Bは、注射後の時間の関数としての図12Aおよび12B由来のマウスの腫瘍および肝臓の正規化された蛍光強度(13A)および標的対バックグラウンド比(13B)のグラフである。エラーバーは、S.E.M.(n=5)を表す。さらなる研究(データ示さず)により、蛍光が標識度(すなわち、単一の抗体にコンジュゲートされたCY(Et)-DuodM部分の数)に比例すること、および、注射後少なくとも7日間は相違が持続することが証明された。

20

【0170】

in Vivo近赤外照射: CY(Et)-Pan-DuodM(DOL4、100μg)を、尾静脈を經由してMDA-MB-468腫瘍担持マウス(n=5マウス/状態)にi.v.投与した。注射から4日後に、腫瘍を、レーザーシステム(BWF5-690-8-600-0.37; B&W Tek, Inc.)を使用して0、10、20、30、50、および100J/cm²照射量の690nm光(0.5W/cm²)に曝露した。第2のコホートを照射せずに維持した。腫瘍を表示の照射量に曝露した直後に、照射マウスおよび対応する非照射マウスの背側蛍光連続画像を、800nm蛍光チャンネルを使用したPearl Imagerを使用して取得した。関心領域(ROI)を腫瘍上に配置し、0J照射量点の強度を100%に設定したPearl Camソフトウェアを使用して平均蛍光強度を決定した。図14および15は、近赤外照射の関数としてのMDA-MB-468腫瘍の蛍光シグナルを示す。図14は、CY(Et)-PanDuodM(DOL4)の注射から4日後に690nm光の照射量の増加を伴う腫瘍の照射前および照射後のMDA-MB-468腫瘍担持マウスの連続蛍光画像である。照射コホート由来の画像を示す; 非照射コホートは、0J/cm²照射量点に類似する; n=5。図15は、0J/cm²照射量点と比較した近赤外光照射量の関数としての平均腫瘍蛍光強度を示すグラフである。エラーバーはS.E.M.(n=5)を表す。***p<0.001、****p<0.0001。各時点での第1のバーは、照射なしの蛍光である。各時点での第2のバーは、表示の光照射量後の蛍光である。図14および15は、コンジュゲートの腫瘍特異的局在および標的化照射の際の蛍光の喪失を明確に証明している。

30

40

【0171】

図16は、腫瘍成長に及ぼすコンジュゲートのin vivo効果を示すグラフである。MDA-MB-468細胞(6×10⁶)を、マウスの右背側に皮下注射した。腫瘍担持マウスを、以下の処置のために無作為に抽出して3群(n=4~5)に分けた: (1) 処置なし(コントロール、

【化50-1】



50

); (2、
【化50-2】



) 10 μ gのCY(Et)-PanDuoDM DOL4 i.v., 4日目に100 J /
cm²のNIR光を施した; (3、
【化50-3】



) 30 μ gのCY(Et)-PanDuoDM DOL4 i.v., 4日目に100 J /
cm²のNIR光を施した。腫瘍成長は、コントロール群と比較して、30 μ g i.v.
の照射群で有意に阻害された。

10

【0172】

実施例5

開示のコンジュゲートでの腫瘍の処置

腫瘍を有する被験体を処置のために同定し、選択する。被験体を、臨床所見に基づき、そ
して/または腫瘍の存在を証明するための試験を行うことによって選択することができる。

【0173】

式Iまたは式IIのコンジュゲート、その薬学的に許容され得る塩、またはその薬学的組
成物を臨床医によって治療に有効であると判断された用量で投与することによって被験体
を処置する。コンジュゲートを、任意の適切な手段(例えば、非経口注射、静脈内注射、
または皮下注射など)によって投与する。いくつかの例では、コンジュゲートを、腫瘍内
に直接注射する。いくつかの例では、コンジュゲートの位置を、シアニフルオロフォア
の蛍光を誘起するのに適切な波長を有する光に曝露し、それにより、シアニフルオロフ
ォアを励起させ、コンジュゲートの蛍光を検出することによってモニタリングする。コン
ジュゲートの腫瘍への結合を可能にするのに十分な期間を経た後にモニタリングを実施す
ることができる。

20

【0174】

投与したコンジュゲートは、その後に、被験体の標的化部分への近赤外範囲の波長および
選択された強度を有する有効量の光の標的化利用によって照射され、それにより、コンジ
ュゲートの少なくともいくつかの分子から薬物を放出する。好都合なことに、被験体の標
的化部分は、腫瘍に隣接する。コンジュゲートの腫瘍への結合を可能にするのに十分な期
間を経た後に照射を実施することができる。例えば、コンジュゲートの投与から数時間後
~数日後(例えば、コンジュゲートの投与から1~7日後など)に照射を実施することが
できる。いくつかの例では、薬物の放出を、in vivoでのコンジュゲートの蛍光放
射の減少をモニタリングすることによって評価する。

30

【0175】

いくつかの例では、腫瘍の少なくとも一部を、近赤外光の標的化利用前に外科的に切除し
、その後にコンジュゲートの少なくともいくつかの分子から薬物を放出させる。蛍光よっ
て導かれる手術を使用して、組織切除の位置および範囲を決定する。

40

【0176】

いくつかの場合、被験体は腫瘍を有すると疑われ、腫瘍の存在を、被験体へのコンジュゲ
ートの投与および疑われる腫瘍部位でのコンジュゲートの蛍光のモニタリングによって確
認する。疑われる腫瘍部位でのコンジュゲートおよび蛍光の蓄積により、腫瘍が存在する
と診断される。その後、投与されたコンジュゲートは、上記のように照射されて、コンジ
ュゲートの少なくともいくつかの分子から薬物を放出する。

【0177】

治療有効量の第2の剤を、コンジュゲートまたはその塩と共投与することができる。コン
ジュゲート(またはその塩)および第2の剤を、個別にまたは単一の組成物中で一緒に投
与することができる。第2の剤を、同一の経路または異なる経路によって投与することが

50

できる。同時に投与する場合、コンジュゲート（またはその塩）および第2の剤を、単一の薬学的組成物中で組み合わせてもよく、2つの薬学的組成物として同時に投与してもよい。第2の剤は、例えば、抗腫瘍剤または血管形成インヒビターであり得る。

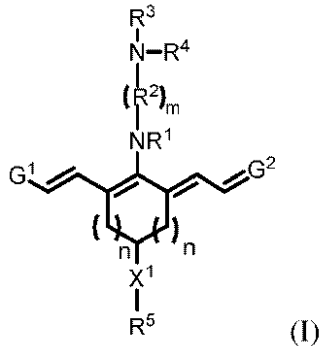
【0178】

代表的な実施形態を、以下の番号をつけた項目に記載する。

【0179】

1. 式 I

【化50-4】



10

の化学構造を有するコンジュゲートまたはその薬学的に許容され得る塩であって、

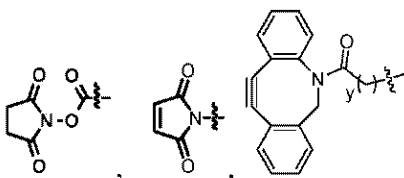
式中、 m は、1、2、3、4、または5であり；

各 n は、独立して、1、2、または3であり；

R^1 および R^4 は、独立して、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、
 $-ROH$ 、 $-RC(O)OH$ 、 $-C(O)-R$ 、または $-C(O)-O-R$ であり、ここで、 R はアルキルであり；
 R^2 は $C(R^c)_2$ であり、ここで、各 R^c は、独立して、 H 、ハロ、アルキル、またはアリアルであり、または $(R^2)_m$ は、集合的に、フェニルであり；
 R^3 は $-L_1-C(O)-X^2$ - 薬物であり、ここで、 L_1 は存在しないかリンカー部分であり、 X^2 は O 、 $N(H)$ 、または $N(CH_3)$ であり；
 R^5 は $-(CH_2)_x-L_2-R^a$ であり、ここで、 x は1以上の整数であり、 L_2 はリンカー部分であるかまたは存在せず、 R^a は、

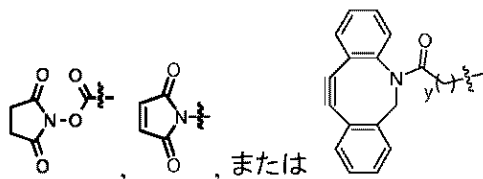
20

【化51】



(式中、 y は1以上の整数である)、 $-C(O)N(H)R^b$ 、 $-N(H)C(O)R^b$ 、
 $-N(H)R^b$ 、または $-SR^b$ であり、ここで、 R^b は標的剤、

【化52】



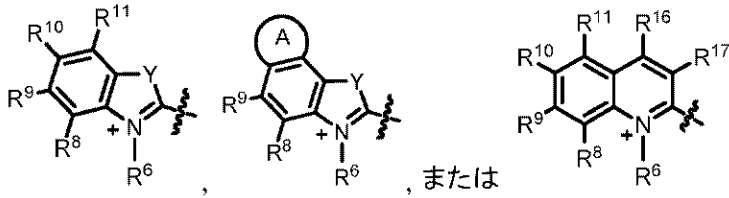
であり； X^1 は、 O 、 N 、または CH_2 であり； G^1 は、

30

40

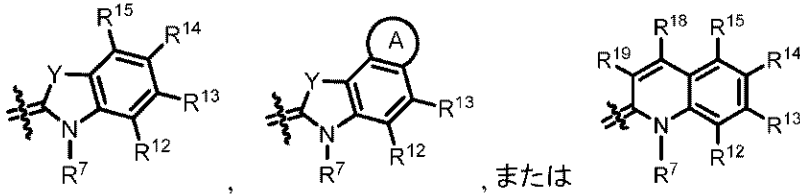
50

【化53】



であり；G 2 は、

【化54】



であり；R 6 および R 7 は、独立して、H、アルキル、アルコキシ、アルキルスルホナート、または置換アミノアルキルであり；R 8 ~ R 1 9 は、独立して、H、アルキル、アミノ、アルコキシ、またはアルキルスルホナートであり；各 Y は、独立して、C (R d) 2、S、O、Se、または N (R d) であり、ここで、各 R d は、独立して、H またはアルキルであり；各 A 環は、独立して、縮合されている 6 員の脂肪族環、ヘテロ脂肪族環、アリール環、またはヘテロアリール環である、コンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩。

【0180】

2 . R 1 および R 4 は、独立して、C 1 ~ C 4 アルキル、- ROH、- RCOOH、または - RCF 3 であり、ここで、R は C 1 ~ C 4 アルキルである、項目 1 に記載のコンジュゲート。

【0181】

3 . R 1 および R 4 は、独立して、メチル、エチル、n - プロピル、i - プロピル、t - ブチル、または - (CH 2) 2 OH である、項目 1 に記載のコンジュゲート。

【0182】

4 . R 1 および R 4 は、エチルである、項目 1 に記載のコンジュゲート。

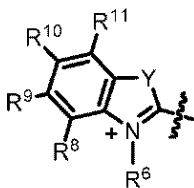
【0183】

5 . A 環が、任意選択的に置換されたスルホナートで置換された縮合フェニル環である、項目 1 ~ 4 のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【0184】

6 . G 1 は

【化55】



であり、かつ G 2 は

10

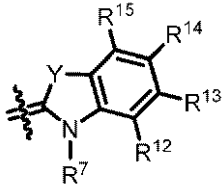
20

30

40

50

【化 5 6】

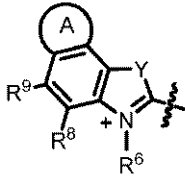


であり；または

G 1 は

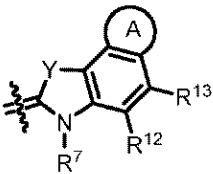
10

【化 5 7】



であり、かつ G 2 は

【化 5 8】

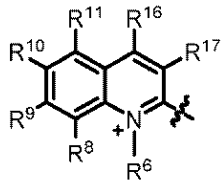


20

であり；または

G 1 は

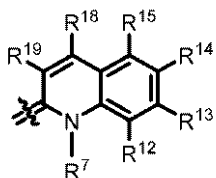
【化 5 9】



30

であり、かつ G 2 は

【化 6 0】



40

であり、

ここで、各 Y は同一であり、R 6 および R 7 は同一であり、R 8 ~ R 1 1 および R 1 6 ~ R 1 7 は、R 1 2 ~ R 1 5 および R 1 8 ~ R 1 9 とそれぞれ同一である、項目 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載のコンジュゲート。

【0 1 8 5】

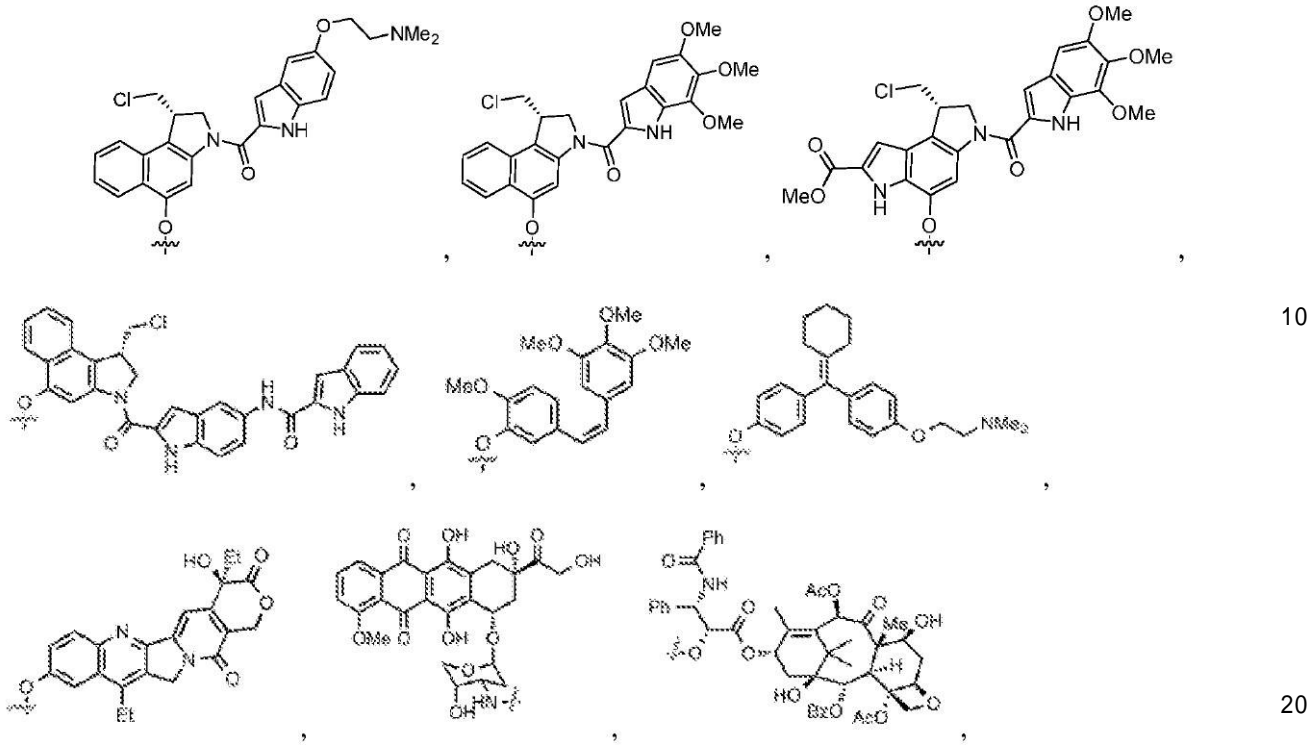
7 . 各 Y は C (C H 3) 2 である、項目 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載のコンジュゲート。

【0 1 8 6】

8 . R 6 および R 7 は、 - (C H 2) p S O 3 - または - (C H 2) p N (C H 3) 3 +

50

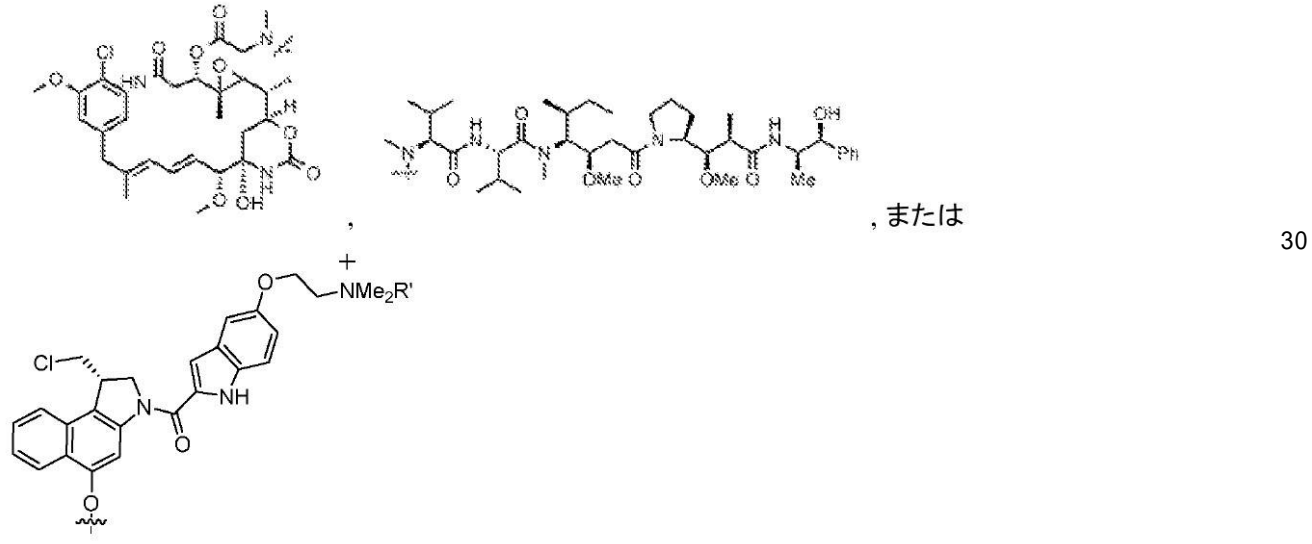
【化64-1】



10

20

【化64-2】



, または

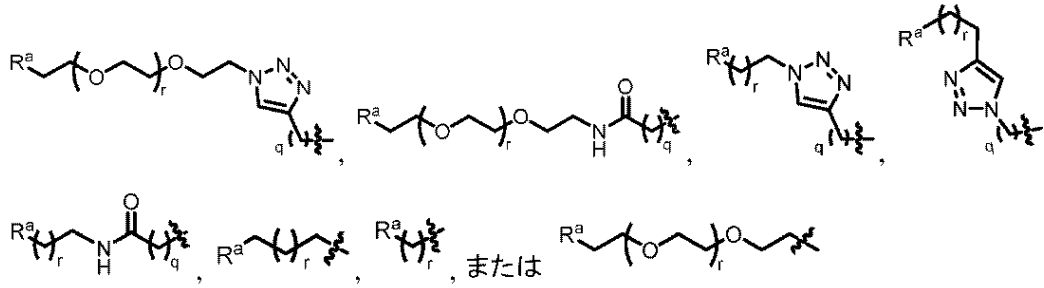
30

であり、ここで、R'は、C₁ ~ C₁₀アルキルまたはアルキルスルホネートである、項目1 ~ 13のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

40

【0193】
15. R⁵は、

【化 6 5】



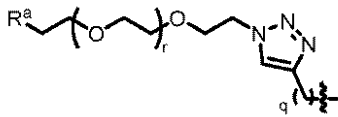
10

であり、ここで、 q および r は、独立して、1、2、3、4、または5である、項目1～14のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0194】

16. R^5 は、

【化 6 6】



20

であり、ここで、 q および r は、独立して、1、2、3、4、または5である、項目1～14のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0195】

17. R^b は標的剤である、項目1～16のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0196】

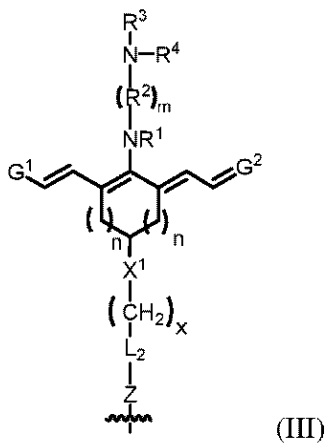
18. R^b は抗体である、項目1～17のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0197】

19. R^5 は $-(CH_2)_x-L_2-R^a$ であり、ここで、 x は1以上の整数であり、 L_2 はリンカー部分であるかまたは存在せず、 R^a は、 $-C(O)N(H)R^b$ 、 $-N(H)C(O)R^b$ 、 $-N(H)R^b$ 、または $-SR^b$ であり、ここで、 R^b は標的剤であり、前記コンジュゲートは、1つまたは複数の、 R^b に結合したさらなる部分をさらに含み、前記さらなる部分の各々は、独立して、式III

30

【化 6 7】



(III)

40

の化学構造を有し、

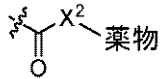
ここで、 m 、 n 、 x 、 R^1 ～ R^4 、 X^1 、 G^1 、 G^2 、および L_2 は、項目1に定義のとおりであり、 Z は、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、または $-S-$ である、項目1～18のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

50

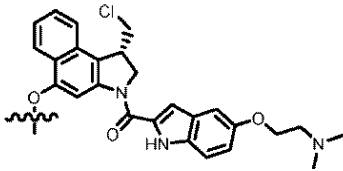
【 0 1 9 8 】

2 0 . R^b は抗体であり、R³ は

【 化 6 8 】

であり、ここで、- X² - 薬物は

【 化 6 9 】



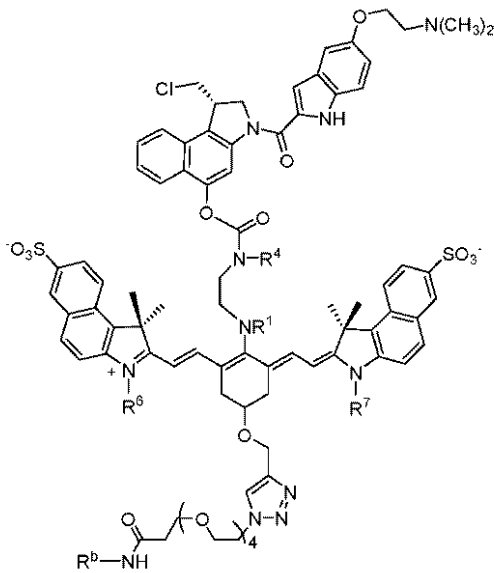
10

である、項目 1 ~ 1 9 のいずれかに記載のコンジュゲート。

【 0 1 9 9 】

2 1 . 前記コンジュゲートは、

【 化 7 0 】



20

30

であり、式中、R¹ および R⁴ は、メチル、エチル、n - プロピル、i - プロピル、t - プロピル、または - (CH₂)₂OH であり；R⁶ および R⁷ は、- (CH₂)₄SO₃⁻ または - (CH₂)₄N(CH₃)₃⁺ であり；R^b は抗体である、項目 1 に記載のコンジュゲート。

【 0 2 0 0 】

2 2 . 前記抗体は、パニツムマブまたはトラスツズマブである、項目 2 1 に記載のコンジュゲート。

【 0 2 0 1 】

2 3 . 項目 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載のコンジュゲートおよび薬学的に許容され得るキャリアを含む薬学的組成物であって、R^b は標的剤である、薬学的組成物。

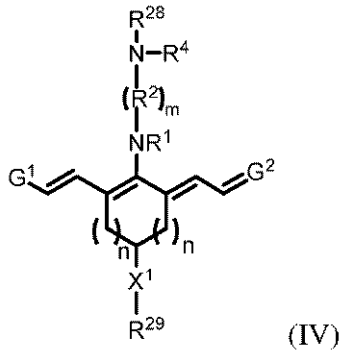
【 0 2 0 2 】

2 4 . 式 I V

40

50

【化 7 1】

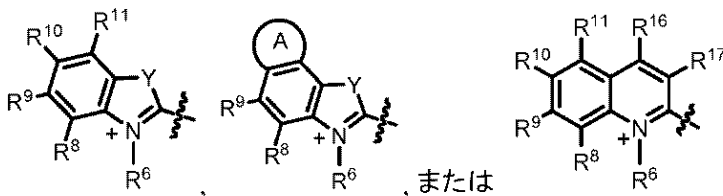


10

の構造を有する前駆体化合物またはその塩であって、
 式中、 m は、1、2、3、4、または5であり；各 n は、独立して、1、2、または3であり； R^1 および R^4 は、独立して、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、 $-ROH$ 、 $-RC(O)OH$ 、 $-C(O)-R$ 、または $-C(O)-O-R$ であり、ここで、 R はアルキルであり； R^2 は $C(R^c)_2$ であり、ここで、各 R^c は、独立して、 H 、ハロ、アルキル、またはアリールであり、または $(R^2)_m$ は、集合的に、フェニルであり； X^1 は、 O 、 N 、または CH_2 であり；
 G^1 は、

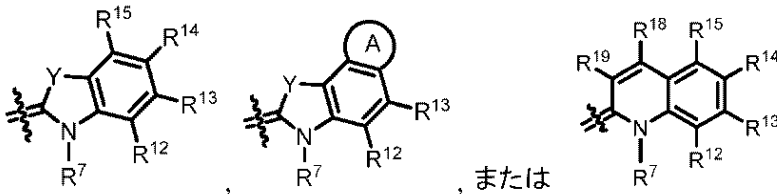
20

【化 7 2】



であり； G^2 は、

【化 7 3】



30

であり； R^6 および R^7 は、独立して、 H 、アルキル、アルコキシ、アルキルスルホナート、または置換アミノアルキルであり； $R^8 \sim R^{19}$ は、独立して、 H 、アルキル、アミノ、アルコキシ、またはアルキルスルホナートであり；各 Y は、独立して、 $C(R^d)_2$ 、 S 、 O 、 Se 、または $N(R^d)$ であり、ここで、各 R^d は、独立して、 H またはアルキルであり；各 A 環は、独立して、縮合されている6員の脂肪族環、ヘテロ脂肪族環、アリール環、またはヘテロアリール環であり； R^{28} は、水素または保護基であり； R^{29} は、 $-(CH_2)_u-C(CH_3)_2$ であり、ここで、 u は、1、2、3、4、または5である、前駆体化合物またはその塩。

40

【0 2 0 3】

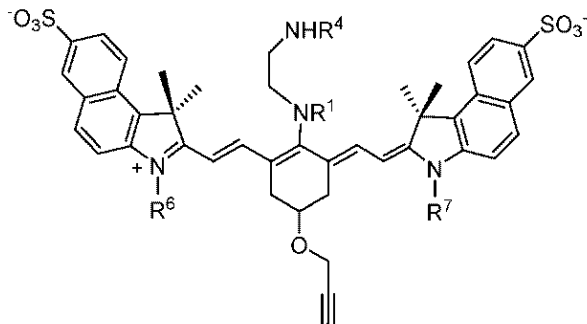
2 5 . R^{28} は、水素である、項目 2 4 に記載の前駆体化合物。

【0 2 0 4】

2 6 . 前記前駆体化合物は、

50

【化 7 4】



10

であり、

式中、R¹およびR⁴は、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、t-ブチル、または-(CH₂)₂OHであり；R⁶およびR⁷は、-(CH₂)_pSO₃⁻または-(CH₂)_pN(CH₃)₃⁺であり、ここで、pは、1、2、3、4、または5である、項目24に記載の前駆体化合物。

【0205】

27. 項目1~22のいずれか1つに記載のコンジュゲートを提供する工程であって、R^bは標的剤である、工程；およびその後、近赤外範囲の選択された波長および選択された強度を有する有効量の光の標的化利用により前記コンジュゲートに照射して開裂反応を誘起し、前記コンジュゲートから薬物を放出させる、工程を含む、方法。

20

【0206】

28. 光の標的化利用により前記コンジュゲートに照射する工程が、波長が650~900nmの光を生じるレーザーを前記コンジュゲートに照射することを含む、項目27に記載の方法。

【0207】

29. 前記コンジュゲートの蛍光レベルをモニタリングする工程；および前記蛍光レベルが標的レベル未満に低下した場合に照射を停止する工程をさらに含む、項目27または項目28に記載の方法。

【0208】

30. 標的分子を含むか、または含むと疑われる生物試料を提供する工程；前記生物試料を前記コンジュゲートと接触させる工程であって、前記コンジュゲートの標的剤が前記標的分子を認識して、前記標的分子に結合することができる、工程；およびその後、前記光の標的化利用により前記生物試料に照射する工程をさらに含む、項目27~29のいずれか1つに記載の方法。

30

【0209】

31. 前記薬物で処置することができる状態を有すると被験体を同定する工程；治療有効量の前記コンジュゲートまたは前記コンジュゲートを含む薬学的組成物を前記被験体に投与する工程；およびその後、前記被験体の標的化部分への近赤外範囲の波長および選択された強度を有する前記有効量の光の標的化利用によって前記コンジュゲートに照射し、それにより、前記コンジュゲートの少なくともいくつかの分子から前記薬物を放出する工程をさらに含む、項目27~29のいずれか1つに記載の方法。

40

【0210】

32. 前記被験体が腫瘍を有し、前記被験体の前記標的化部分が腫瘍位置に隣接する領域を含む、項目31に記載の方法。

【0211】

33. 治療有効量の前記コンジュゲートまたは前記コンジュゲートを含む薬学的組成物を前記被験体に投与する前に、前記被験体から腫瘍の少なくとも一部を切除する工程をさらに含む、項目32に記載の方法。

【0212】

50

34. 前述の標的化部分に利用された光の有効量が $5 \sim 250 \text{ J/cm}^2$ である、項目 31 ~ 33 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0213】

35. 前述の被験体が過去に状態の処置に失敗している、項目 31 ~ 34 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0214】

36. 項目 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の治療有効量のコンジュゲートまたは前記コンジュゲートを含む薬学的組成物を、前記薬物で処置することができる状態を有すると疑われる被験体に投与する工程；その後、近赤外範囲の波長および選択された強度を有する光量の前記被験体の標的化部分への標的化利用によって前記コンジュゲートに照射する工程であって、前記光量が、前記コンジュゲートの蛍光を生じさせるのに十分であるが、前記コンジュゲートの開裂を誘起し、前記コンジュゲートから前記薬物を放出させるには不十分である、工程；前記被験体の前記標的化部分中の前記コンジュゲートから任意の蛍光を検出する工程；およびその後、蛍光が検出された場合に、近赤外範囲の波長および選択された強度を有する有効量の光の前記被験体の前記標的化部分への標的化利用によって前記コンジュゲートに照射し、それにより、前記コンジュゲートの少なくともいくつかの分子から前記薬物を放出する、工程を含む、方法。

10

【0215】

37. 前記状態が、前記薬物で処置することができる腫瘍であり、前記被験体の前記標的化部分が前記腫瘍部位を含み、前記方法が、治療有効量の前記コンジュゲートを投与する前に前記被験体から前記腫瘍の少なくとも一部を切除する工程をさらに含む、項目 36 に記載の方法。

20

【0216】

38. (i) 前記状態が前記薬物で処置することができる腫瘍であり、(ii) 前記被験体の前記標的化部分が前記腫瘍部位を含み、(iii) 前記被験体の前記標的化部分中に蛍光が検出され、前記方法が、前記被験体の前記標的化部分中の前記蛍光を検出した後に前記被験体から前記腫瘍の少なくとも一部を切除する工程；およびその後、前記有効量の光の前記被験体の前記標的化部分への標的化利用によって前記コンジュゲートに照射する工程をさらに含む、項目 36 に記載の方法。

【0217】

開示の発明の原理を適用することができる実施形態が多数存在する可能性を考慮して、例示の実施形態は本発明の好ましい例であることのみを目的とし、本発明の範囲を制限すると解釈されないと認識すべきである。むしろ、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲によって定義される。したがって、本発明者らは、本発明の全てがこれらの特許請求の範囲の範囲および意図に帰属すると主張する。

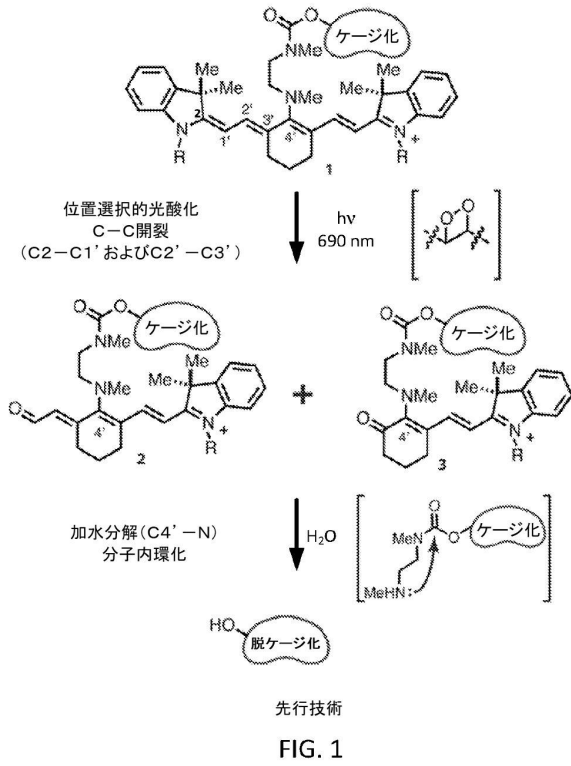
30

40

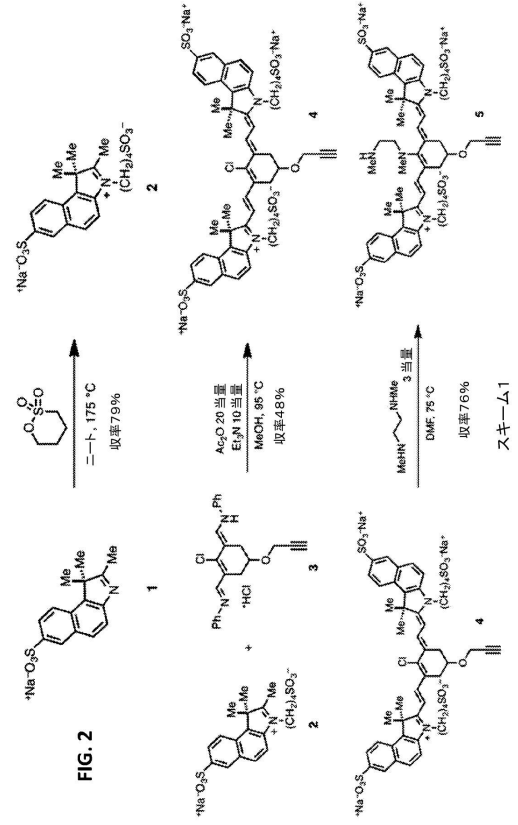
50

【 図 面 】

【 図 1 】



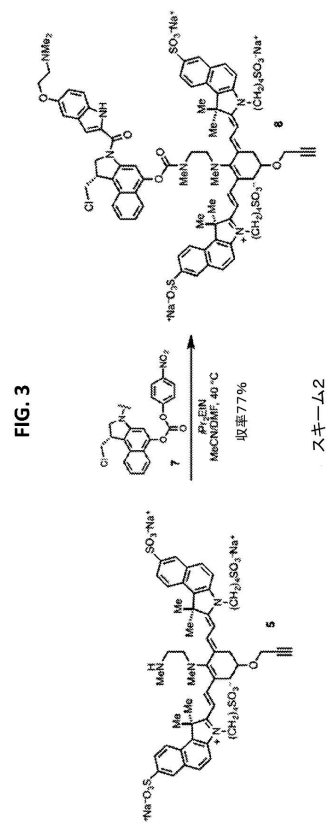
【 図 2 】



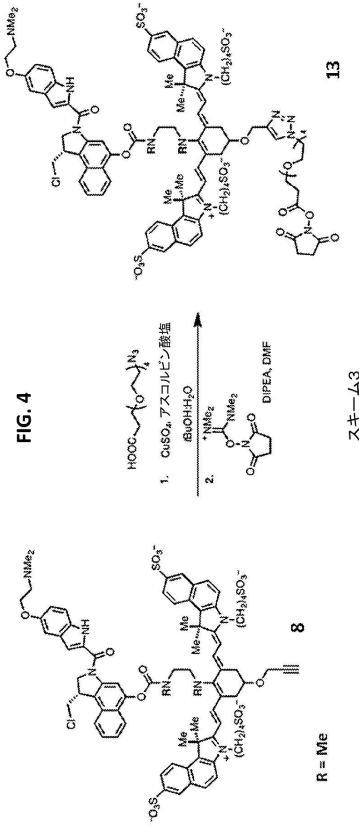
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

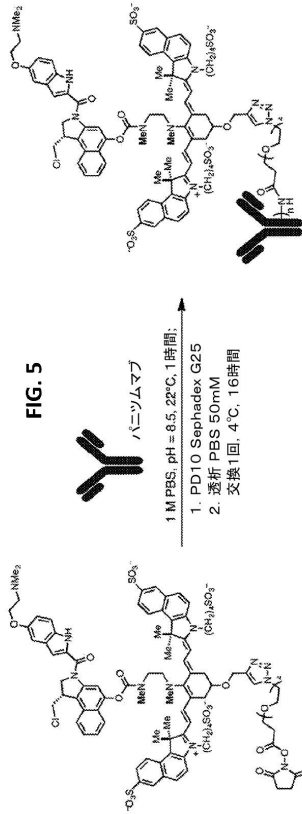


30

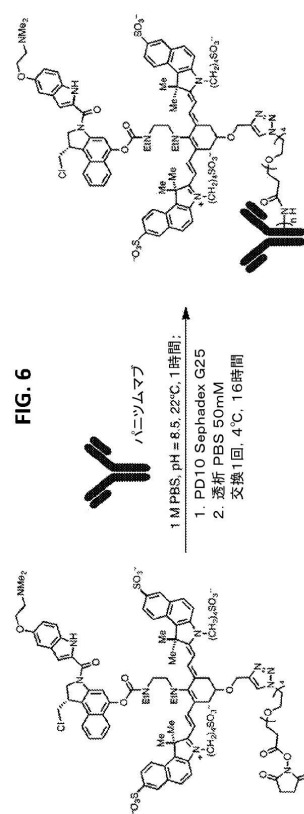
40

50

【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】

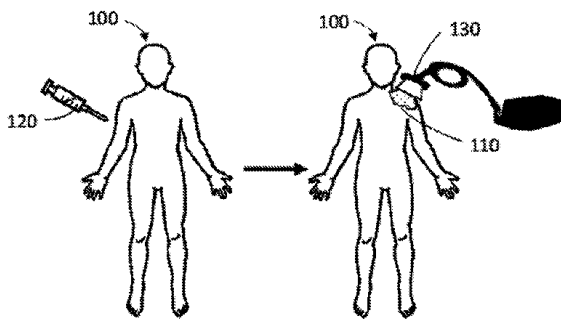


FIG. 7

【 図 8 】

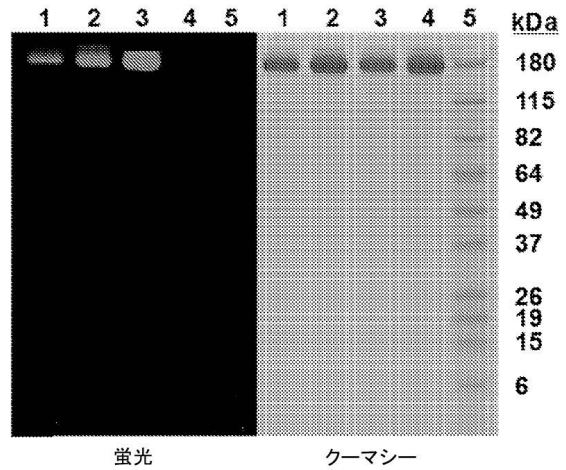


FIG. 8

10

20

30

40

50

【 図 9 】

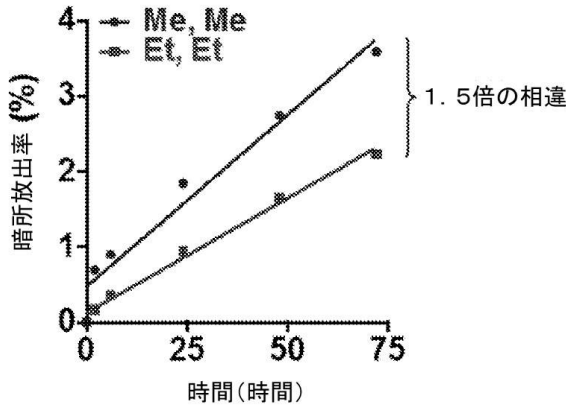


FIG. 9

【 図 10 】

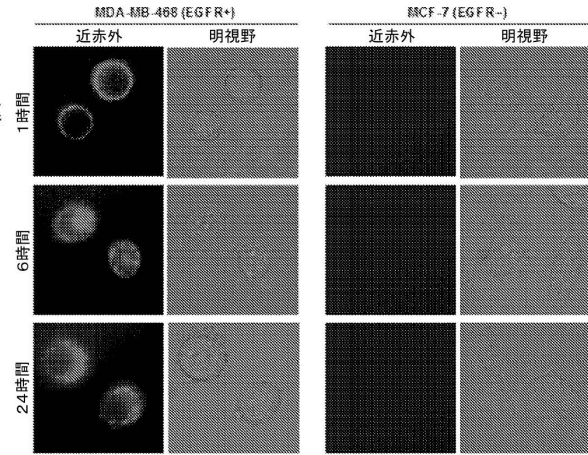


FIG. 10

【 図 11 】

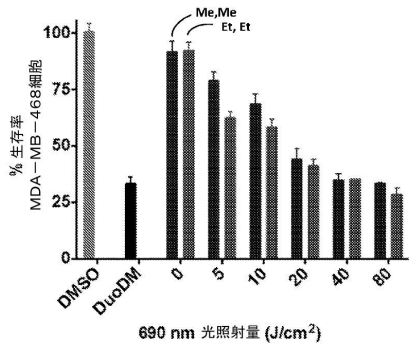


FIG. 11A

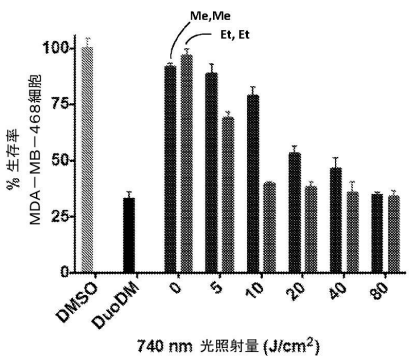


FIG. 11B

【 図 12 】

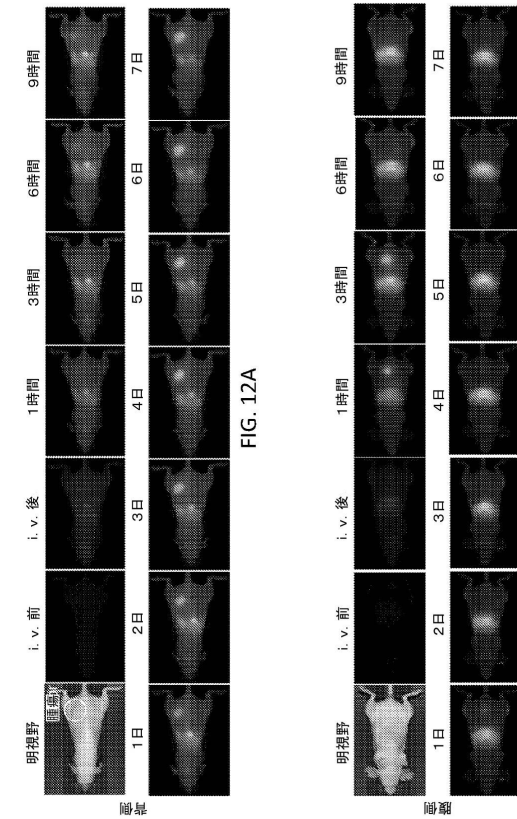


FIG. 12A

FIG. 12B

10

20

30

40

50

【 図 1 3 】

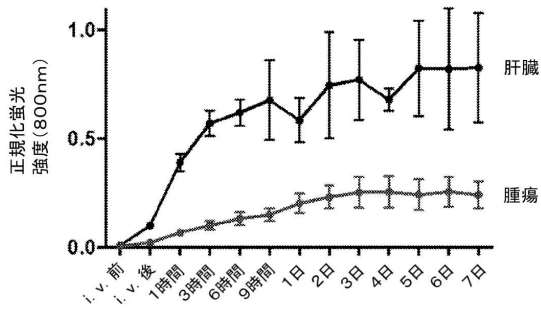


FIG. 13A

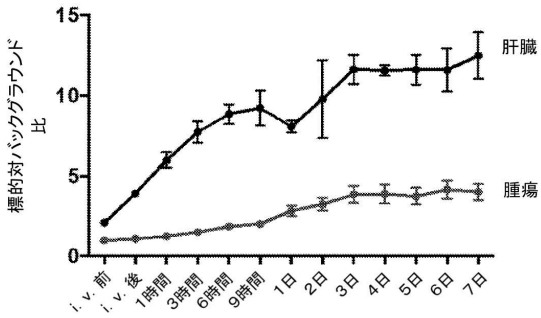


FIG. 13B

【 図 1 5 】

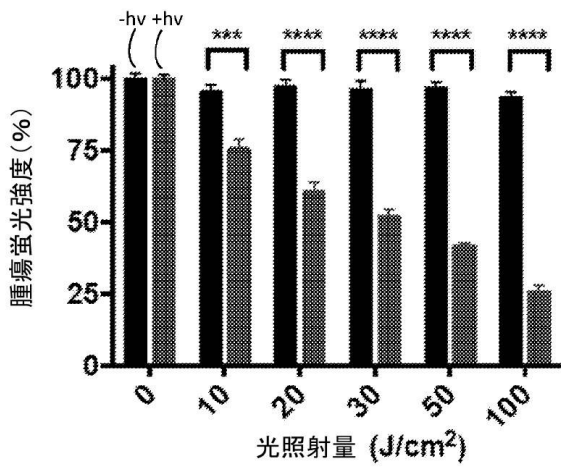


FIG. 15

【 図 1 4 】

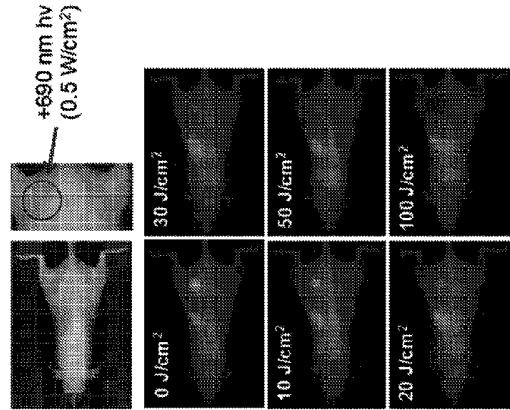


FIG. 14

10

20

【 図 1 6 】

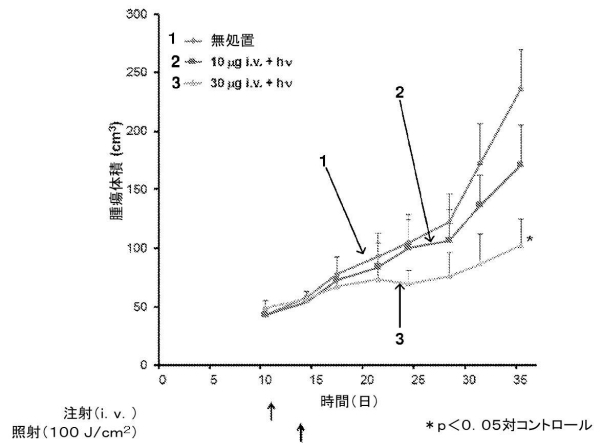


FIG. 16

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 D 209/10 (2006.01)

F I

C 0 7 D 209/10

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 シュナーマン, マーティン ジョン

アメリカ合衆国 メリーランド 21702, フレデリック, ボイルズ ストリート 376, ルーム 225ディー, エヌシーアイ, センター フォー キャンサー リサーチ

(72)発明者 ナニ, ロジャー ラウハウザー

アメリカ合衆国 メリーランド 21702, フレデリック, ボイルズ ストリート 376, ルーム 218ビー, エヌシーアイ, センター フォー キャンサー リサーチ

(72)発明者 ゴーカ, アレクサンダー パトリック

アメリカ合衆国 メリーランド 21702, フレデリック, ボイルズ ストリート 376, ルーム 218ビー, エヌシーアイ, センター フォー キャンサー リサーチ

(72)発明者 小林 久隆

アメリカ合衆国 メリーランド 20892, ベセスダ, センター ドライブ 10, ビルディング 10, ルーム ビー3ビー69, エヌシーアイ, センター フォー キャンサー リサーチ

審査官 鶴見 秀紀

(56)参考文献 Journal of the American Chemical Society, 2013年, Vol.135, pp.11657-11662

Angewandte Chemie, International Edition, 2015年, Vo.54, No.46, pp.13635-13638

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 P 3 5 / 0 0

C 0 7 D 2 0 9 / 1 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)