

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5289935号  
(P5289935)

(45) 発行日 平成25年9月11日(2013.9.11)

(24) 登録日 平成25年6月14日(2013.6.14)

(51) Int.Cl.

<b>C07D 475/04</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C07D 475/04</b>	<b>C S P</b>
<b>A61K 31/519</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A61K 31/519</b>	
<b>A61P 35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A61P 35/00</b>	
<b>A61P 43/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A61P 43/00</b>	<b>1 2 1</b>
<b>A61P 35/02</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A61P 35/02</b>	

F 1

請求項の数 25 (全 38 頁) 最終頁に続く

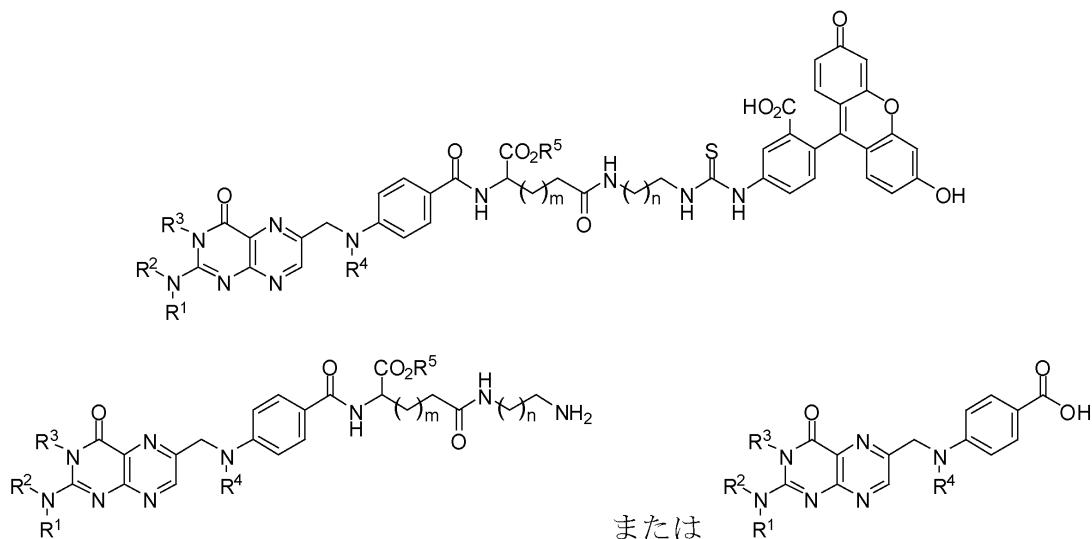
(21) 出願番号 特願2008-501969 (P2008-501969)  
 (86) (22) 出願日 平成18年3月14日 (2006.3.14)  
 (65) 公表番号 特表2008-538743 (P2008-538743A)  
 (43) 公表日 平成20年11月6日 (2008.11.6)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2006/009153  
 (87) 國際公開番号 WO2006/101845  
 (87) 國際公開日 平成18年9月28日 (2006.9.28)  
 審査請求日 平成21年3月12日 (2009.3.12)  
 (31) 優先権主張番号 60/662,277  
 (32) 優先日 平成17年3月16日 (2005.3.16)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 504389588  
 エンドサイト、インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国・インディアナ州 479  
 06・ウエスト ラファイエット・ケント  
 アヴェニュー 3000  
 (74) 代理人 110000176  
 一色國際特許業務法人  
 (72) 発明者 シューケン  
 アメリカ合衆国・インディアナ州 479  
 06・ウエスト ラファイエット・アッシュ  
 ランド・ストリート 2845  
 (72) 発明者 ブラホフ、イオントチョ、ラドスラホフ  
 アメリカ合衆国・インディアナ州 479  
 06・ウエスト ラファイエット・シュー  
 ティングスター コート 1041  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ブテロイン酸およびその結合体の合成と精製

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下式のいずれかである化合物、または、その塩を精製する方法であって

(式中、

m は、0から4であり、かつ、nは、1から4であり、

20

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、およびR<sup>4</sup>は、それぞれ独立に、水素、アルキル、アシル、または、適切に選択された窒素保護基であるか、あるいは、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は共に結合して窒素保護基を形成し、かつ、

R<sup>5</sup>は、水素、アルキル、またはカルボキシル保護基である）、

(a)前記化合物を、イオン交換クロマトグラフィー支持体に接触させる工程、

(b)10以上のpHを持つ移動相によって、前記化合物を含む第1の分画を溶出させる工程

(c)第1の分画のpHを3以下に下げる工程、および

(d)前記化合物を沈殿させる工程

を含む方法。

10

#### 【請求項2】

前記溶液が、葉酸、葉酸誘導体、またはそれらの混合物をさらに含むことを特徴とする、請求項1の方法。

#### 【請求項3】

(e)葉酸、または葉酸誘導体を含む第2の分画を溶出させる工程、をさらに含み、前記第1の分画と第2の分画とは実質的に分離されていることを特徴とする、請求項2の方法。

#### 【請求項4】

前記イオン交換クロマトグラフィー支持体が、サッカリド系イオン交換樹脂を含むことを特徴とする、請求項1～3のいずれかの方法。

20

#### 【請求項5】

前記イオン交換クロマトグラフィー支持体が、サッカリド系陰イオン交換樹脂を含むことを特徴とする、請求項1～3のいずれかの方法。

#### 【請求項6】

前記イオン交換クロマトグラフィー支持体が、セルロース、アミロース、またはそれらの組み合わせを含むサッカリド系陰イオン交換樹脂を含むことを特徴とする、請求項1～3のいずれかの方法。

#### 【請求項7】

前記イオン交換クロマトグラフィー支持体が、セファデックスDEAE、セファデックスQA、PEIセルロース、QAセルロース、DEAEセルロース、およびそれらの組み合わせから成るグループから選ばれるサッカリド系陰イオン交換樹脂を含むことを特徴とする、請求項1～3のいずれかの方法。

30

#### 【請求項8】

前記移動相が、11以上のpHを持つことを特徴とする、請求項1～3のいずれかの方法。

#### 【請求項9】

前記移動相が、11から13の範囲のpHを持つことを特徴とする、請求項1～3のいずれかの方法。

#### 【請求項10】

前記移動相が、アンモニアまたはその塩を実質的に含まないことを特徴とする、請求項1～3のいずれかの方法。

40

#### 【請求項11】

前記沈殿させる工程が、95重量%以上の純度を有する沈殿物をもたらすことを特徴とする、請求項1～3のいずれかの方法。

#### 【請求項12】

前記沈殿させる工程が、98重量%以上の純度を有する沈殿物をもたらすことを特徴とする、請求項1～3のいずれかの方法。

#### 【請求項13】

前記沈殿させる工程が、99重量%以上の純度を有する沈殿物をもたらすことを特徴とする、請求項1～3のいずれかの方法。

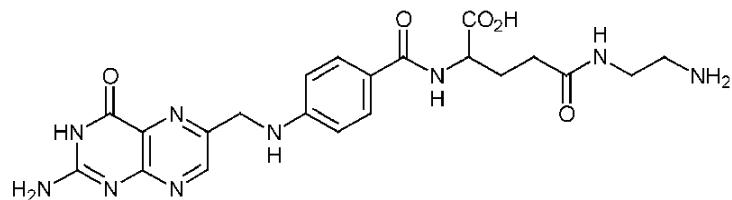
#### 【請求項14】

50

前記沈殿させる工程が、葉酸を実質的に含まない沈殿物をもたらすことを特徴とする、請求項1～3のいずれかの方法。

【請求項15】

前記化合物が、下式：

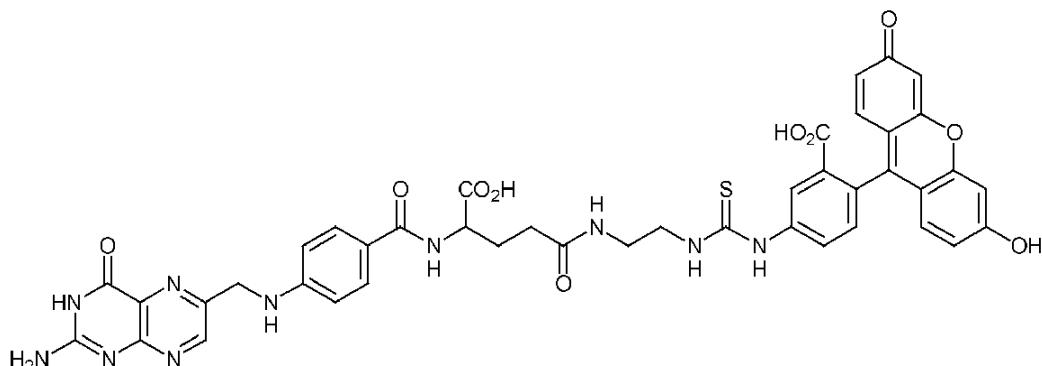


10

であることを特徴とする、請求項1～3のいずれかの方法。

【請求項16】

前記化合物が、下式：

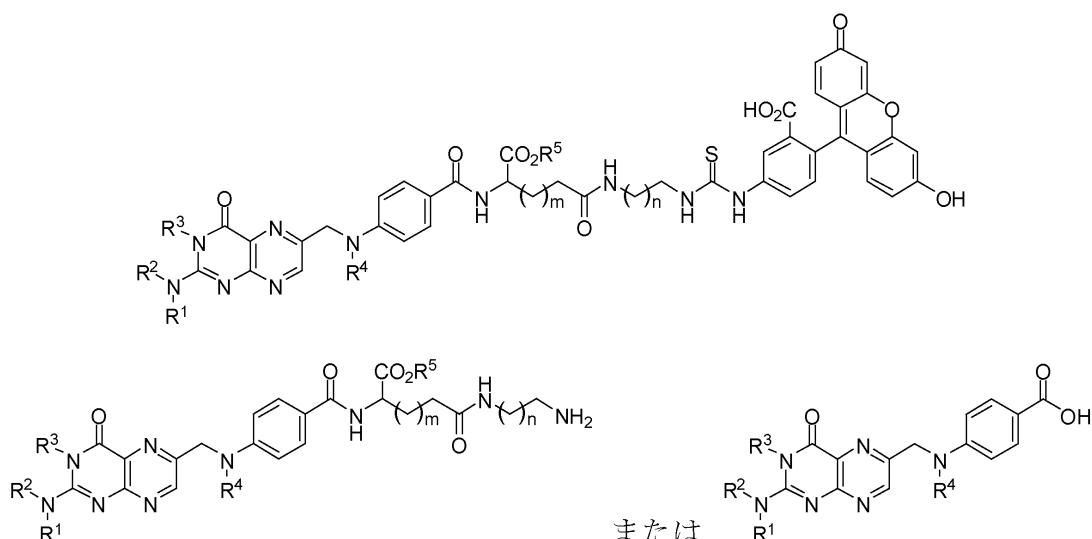


20

であることを特徴とする、請求項1の方法。

【請求項17】

下式のいずれかである化合物、または、その塩を精製する方法であって、



30

40

(式中、

mは、0から4であり、かつ、nは、1から4であり、

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、およびR<sup>4</sup>は、それぞれ独立に、水素、アルキル、アシル、または、適切に選択された窒素保護基であるか、あるいは、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は共に結合して窒素保護基を形成し、かつ、

R<sup>5</sup>は、水素、アルキル、またはカルボキシル保護基である）、

(a)前記化合物を含む溶液を、セファデックスDEAE、セファデックスQA、PEIセルロース

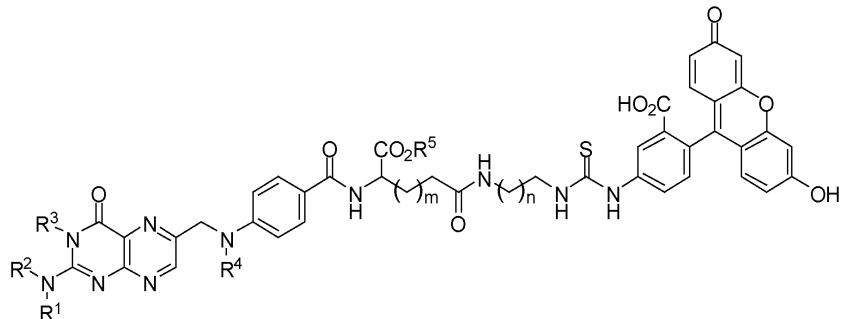
50

、QAセルロース、DEAEセルロース、およびそれらの組み合わせから成るグループから選ばれる陰イオン交換クロマトグラフィー支持体に接触させる工程、および

(b) 前記化合物を含む第1の分画を溶出させる工程  
を含む方法。

【請求項18】

下式の結合体を精製する方法であって、



10

(a) 第1の逆相クロマトグラフィー支持体に、結合体を含む溶液を接触させる工程、

(b) リン酸塩を含み6から8の範囲のpHを有する移動相によって、結合体のリン酸塩複合体を含む第1の分画を溶出させる工程、

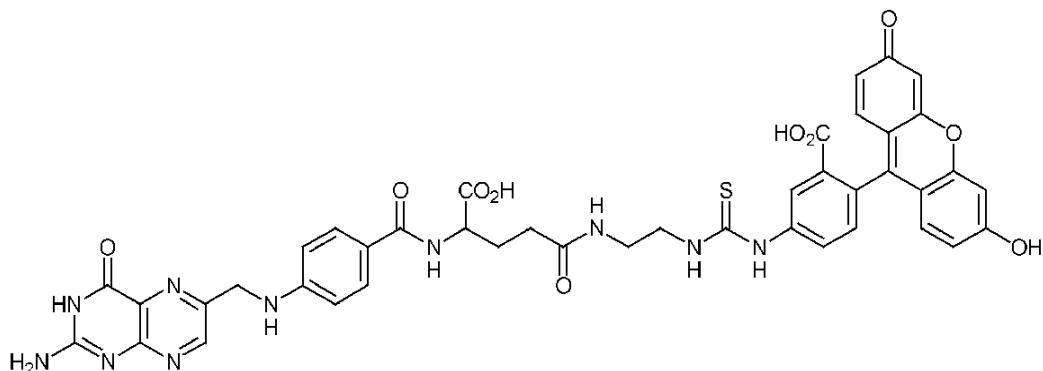
(c) 第2の逆相クロマトグラフィー支持体に、結合体のリン酸塩複合体の溶液を接触させる工程、および

20

(d) 水を含む移動相によって、結合体を含む第2の分画を溶出させる工程であって、該第2の分画は実質的にリン酸塩を含まないことを特徴とする工程  
を含む方法。

【請求項19】

前記結合体が、下式：



30

の化合物であることを特徴とする、請求項18の方法。

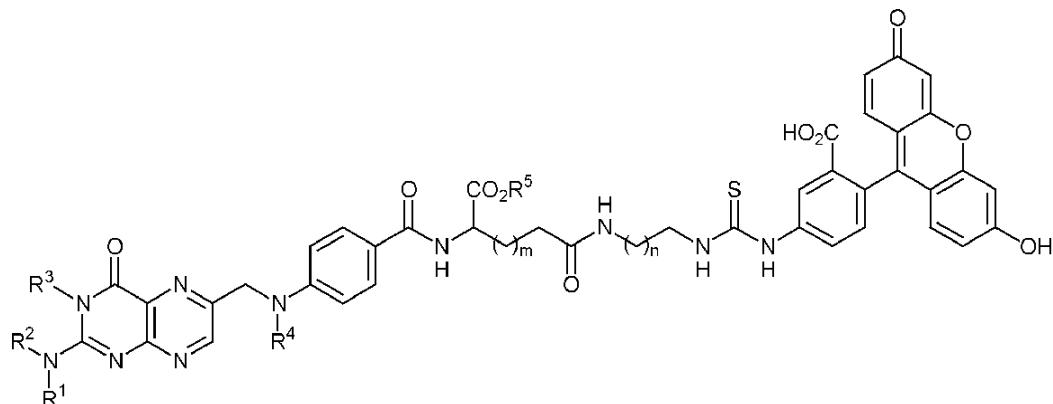
【請求項20】

前記溶出させる工程(b)および前記溶出させる工程(d)において、前記移動相がアセトニトリルをさらに含むことを特徴とする、請求項18の方法。

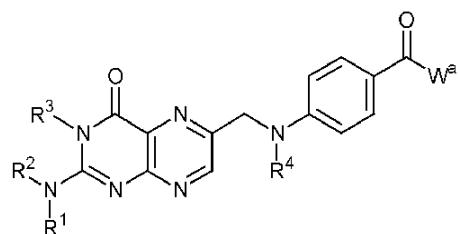
40

【請求項21】

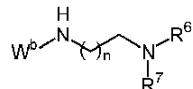
下式：



の化合物を調製する方法であって、  
下式：

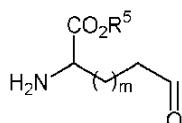


の化合物を、下式：

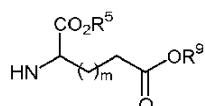


の化合物と反応させる工程を含む方法。

(上記の式中、W^aはOHであって、W^bは下式：



の化合物であるか、あるいは、W^aは下式：



の化合物であって、W^bはHであり、

R^1およびR^2は、水素および窒素保護基から成るグループからそれぞれ独立に選ばれるか  
、あるいは、R^1およびR^2は共に結合して窒素保護基を形成し、

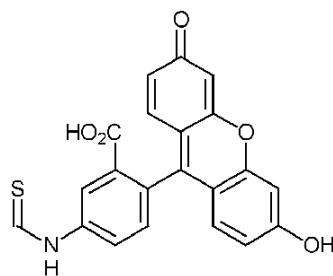
R^3およびR^4は、水素および窒素保護基から成るグループからそれぞれ独立に選ばれ、

R^5は、水素、またはカルボン酸保護基であり、

nは、0、1、2、3、および4から成るグループから選ばれる整数であり、

mは、1、2、3、および4から成るグループから選ばれる整数であり、

R^6およびR^7は、水素および窒素保護基から成るグループからそれぞれ独立に選ばれる  
か、R^6およびR^7は共に結合して窒素保護基を形成するか、あるいは、R^6はHであって、R  
7は下式：



の化合物であり、かつ、

R<sup>9</sup> は、水素またはアルキル基である。)

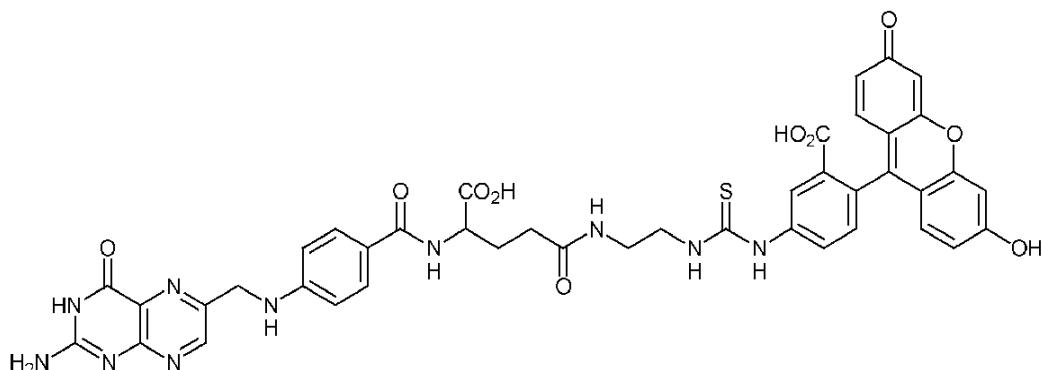
10

**【請求項 2 2】**

R<sup>5</sup> が水素であり、R<sup>9</sup> がメチルであることを特徴とする、請求項 2 1 の方法。

**【請求項 2 3】**

下式：



20

の化合物、または、その製薬学的に受容可能な塩、水和物、もしくは溶媒化合物であって、少なくとも95モルパーセント、または少なくとも95重量%の純度を持つ形で単離されることを特徴とする化合物。

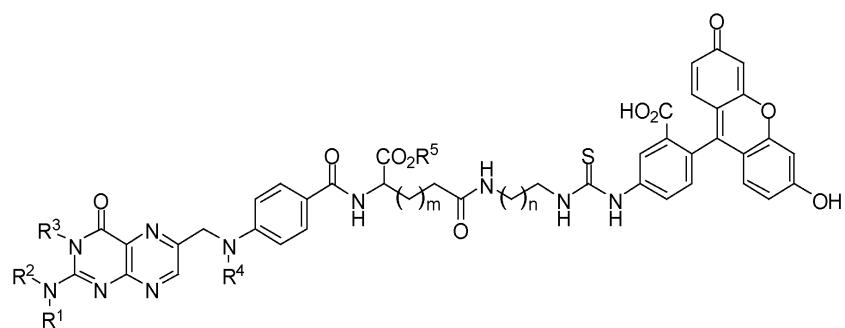
**【請求項 2 4】**

1種以上のビスフルオレセイン成分を実質的に含まない形としてさらに単離されることを特徴とする、請求項 2 3 の化合物。

30

**【請求項 2 5】**

哺乳動物における病原細胞集団の内因性免疫反応介在性除去を強化するための薬物の製造における、有効量の結合体を含む組成物の使用方法であって、前記組成物が、1種以上のビスフルオレセイン成分を実質的に含まず、かつ、前記結合体が下式またはその塩であることを特徴とする方法、



40

(式中、

m は、0から4であり、かつ、n は、1から4であり、

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、およびR<sup>4</sup>は、それぞれ独立に、水素、アルキル、アシル、または、適切に選択された窒素保護基であるか、あるいは、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は共に結合して窒素保護基を形成し、かつ、

50

R<sup>5</sup>は、水素、アルキル、またはカルボキシル保護基である)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ブテロイン酸およびブテロイン酸の類縁体および誘導体の精製、および、他の化合物に結合した、ブテロイン酸、およびブテロイン酸の類縁体および誘導体の精製に関する。本発明はまた、他の化合物に結合した、ブテロイン酸、ならびにブテロイン酸類縁体および誘導体の調製方法に関する。本発明はさらに、他の化合物に結合した、ブテロイン酸、ならびにブテロイン酸の類縁体および誘導体によって患者を治療する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

ブテロイン酸は、ビタミン受容体に基づく標的化のような治療において結合体として使用される薬剤に結合可能な、葉酸誘導体を作製するのに好適な開始材料である。ビタミン-薬剤結合体は、例えば、ビタミン受容体を一意に発現するか、過剰に発現するか、または好んで発現する癌細胞を標的とすることが可能である。例示として、ブテロイン酸は、ガンマカルボキシル結合エチレンジアミン架橋を介してフルオレセインに結合される葉酸誘導体を含む結合体の調製のための開始材料として、従来から使用されている。この結合体は、米国特許出願第09/822,379号に記載されている。なお、この出願の開示を引用することにより本明細書に含める。この結合体は、癌細胞のような病原細胞を、フルオレセインによって標識することによって、癌細胞に抗原性を持たせ、そうすることによって免疫系がそれら癌細胞を認識し除去するようにさせる。

20

【0003】

ブテロイン酸は、様々な従来手段、例えば、合成、葉酸の微生物分解、葉酸の酵素的分解、およびその他の従来法によって調製されてよい。一般に、これらの方法によって調製されたブテロイン酸は、多くの場合相当量の葉酸が混入する。例えば、酵素分解によって調製されるブテロイン酸は、25%もの大量の葉酸を含むことがある。従って、ブテロイン酸の調製品から、葉酸混入物およびその他の不純物を除去するための効率的な方法が求められている。

30

【0004】

ブテロイン酸の結合体を含むビタミン-薬剤結合体は、合成法を用いて調製されてもよい。ある場合には、これらの合成法は、副産物、不純物、またはその他の混入物の形成をもたらすことがある。従って、これら副産物、不純物、またはその他の混入物の形成を回避するか、または、ビタミン-薬剤結合体からこれらの副産物、不純物、またはその他の混入物を取り除くための、合成および/または精製方法が求められている。

【発明の開示】

【0005】

ブテロイン酸、ブテロイン酸誘導体、およびそれらの混合物を精製する方法が記載される。ブテロイン酸、ブテロイン酸誘導体、およびそれらの混合物をクロマトグラフィーによって精製するための一つの例示の実施態様では、(a)ブテロイン酸、ブテロイン酸誘導体、またはそれらの混合物を含む溶液を、イオン交換クロマトグラフィー支持体に接触させる工程；(b)約10以上のpHを持つ移動相によって、ブテロイン酸、ブテロイン酸誘導体、またはそれらの混合物を含む第1の分画を溶出させる工程；(c)第1の分画のpHを約3以下に下げる工程；および(d)ブテロイン酸、ブテロイン酸誘導体、またはそれらの混合物を沈殿させる工程、を含む方法が本明細書に記載される。

40

【0006】

ブテロイン酸、ブテロイン酸誘導体、またはそれらの混合物をクロマトグラフィーによって精製する、もう一つの例示の実施態様では、(a)ブテロイン酸、ブテロイン酸誘導体、またはそれらの混合物を含む溶液を、陰イオン交換クロマトグラフィー支持体に接触させる工程；および(b)ブテロイン酸、ブテロイン酸誘導体、またはそれらの混合物を含

50

む第1の分画を溶出させる工程、を含む方法が本明細書に記載される。

【0007】

本明細書に記載される方法はまた、(e) プテロイン酸、プテロイン酸誘導体、またはそれらの混合物を含む第2の分画であって、第1の分画とは実質的に分離される第2の分画を溶出させる工程を、要すれば任意に含んでもよい。実質的分離とは、第1および第2の分画の溶出の際、時間、指定の分画数、または、その他の定量的または定性的評価によって、第1および第2の分画は実質的に重複しないことが示される分離を含む。

【0008】

本明細書に記載されるクロマトグラフィー法のクロマトグラフィー支持体は、イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂、サッカリド系樹脂、サッカリド系イオン交換樹脂、サッカリド系陰イオン交換樹脂等を含むが、ただしこれらに限定されない。本明細書に記載されるクロマトグラフィー法における移動相は、約10以上、約11以上、または、約11から約13の範囲のpHを持つ水相を含むが、ただしこれらに限定されない。一つの例示の変異態様では、移動相は、アンモニアまたはその塩を含まないか、実質的に含まない。本明細書に記載されるクロマトグラフィー法における移動相はまた、有機共溶媒、例えば、アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、MeOH、EtOH等を含むアルコール類、その他を要すれば任意に含んでもよい。

10

【0009】

もう一つの例示の実施態様では、プテロイン酸またはその酸誘導体、および、フルオレセインまたはその誘導体を含む、結合体を精製する方法が記載される。一つの態様では、これらの方  
20  
法は、(a) 第1の逆相クロマトグラフィー支持体に、結合体を接触させる工程；(b) リン酸塩を含みかつ約6から約8の範囲のpHを持つ移動相によって、結合体のリン酸塩複合体を含む第1の分画を溶出させる工程；(c) 第2の逆転相クロマトグラフィー支持体に第1の分画を接触させる工程；および(d) 水を含む移動相によって、結合体を含むが、リン酸塩を実質的に含まない第2の分画を溶出させる工程、を含む。

20

【0010】

本明細書に記載されるクロマトグラフィー法用のクロマトグラフィー支持体は、逆相樹脂、例えば、C8樹脂、C18樹脂、そのキャップ付き改良版等を含むが、ただしこれらに限定されない。本明細書に記載されるクロマトグラフィーの移動相は、中性に近いpH、または、やや中性を上回るpH、例えば、約7.1から約7.7の範囲のpH、例示としては約7.4のpHを有する水相を含むが、ただしこれらに限定されない。一つの例示の変異態様では、移動相は、1種以上のリン酸塩を含む。もう一つの例示の変異態様では、移動相は、リン酸塩を含まないか、または実質的にリン酸塩を含まない。本明細書に記載されるクロマトグラフィー法の移動相はまた、有機共溶媒、例えば、MeOH、EtOH、アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル等を要すれば任意に含んでよい。

30

【0011】

もう一つの例示の実施態様では、本明細書に記載される方法は、指定の純度、例えば、約95%以上、98%以上、および99%以上の純度を含む純度を持つ、プテロイン酸、プテロイン酸誘導体、およびそれらの混合物を含む精製化合物および組成物、および、プテロイン酸またはその誘導体、および、フルオレセインまたはその誘導体を含む精製結合体を供給するために実施される。本明細書で用いる場合、純度の定量は、重量パーセント、モルパーセント等に基づく。さらに、純度の定量は、いくつかの指定の成分、例えば、葉酸、フルオレセイン成分、ビスフルオレセイン化合物等の非含有、または実質的非含有に基づくものであってもよい。さらに、純度の定量値は、本明細書によって記載される方法によって精製される化合物および組成物の溶液にも適用が可能である。これらの例では、重量パーセントおよびモルパーセントを含む純度の定量値は、溶媒を除いた溶液の成分に関するものである。

40

【0012】

もう一つの例示の実施態様では、プテロイン酸またはその誘導体と、フルオレセインまたはその誘導体との結合体を調製するための方法が記載される。

50

**【0013】**

もう一つの例示の実施態様では、いくつかの指定の純度要求を満たす化合物および組成物が記載される。一つの態様では、その化合物および／または組成物は、ブテロイン酸、ブテロイン酸誘導体、およびその混合物を含む。もう一つの態様では、化合物および／または組成物は、ブテロイン酸またはその誘導体と、フルオレセインまたはその誘導体との結合体を含む。一つの変異態様では、本明細書に記載される、例示の化合物および／または組成物の純度要求は、約95%以上、98%以上、および99%以上の純度を含み、また、重量パーセント、モルパーセント等に基づいていてもよい。もう一つの変異種では、本明細書に記載される、例示の化合物および／または組成物の純度要求は、いくつかの指定の成分、例えば、葉酸、フルオレセイン成分、ビスフルオレセイン化合物等の、非含有、または実質的な非含有に基づく純度定量値を含む。

10

**【0014】**

もう一つの例示の実施態様では、病原細胞に対する介入または除去に反応する病的状態からの救済を必要とする患者、哺乳類、または動物を治療するための方法が記載される。一つの態様では、患者、哺乳動物、または動物における病原細胞集団の、内因性免疫反応介在性除去を強化する方法が記載される。本明細書に記載される例示の方法は、救済を必要とする患者、哺乳動物、または動物に対して、リガンド-フルオレセイン結合体を含む組成物の有効量を投与する工程を含む。もう一つの例示の態様では、救済を必要とする、患者、哺乳動物、または動物に投与される組成物が、1種以上のビスフルオレセイン成分について指定の最大レベルしか、例えば、0.1%または0.05%以下しか含まない、または、1種以上のビスフルオレセイン成分を含まないか、または実質的に含まない方法が、本明細書に記載される。

20

**【0015】**

本明細書に記載される合成法は、単独で用いられてもよいし、あるいは、ビタミン-薬剤結合体を供給するために本明細書において記載される精製法と組み合わせて用いられてもよいことが了解されよう。

**【0016】****〔関連出願の相互参照〕**

本出願は、米国特許法119(e)条の下に、2005年3月16日出願米国仮出願第60/662,277号の利益を主張する。なお、この引用出願の開示を、参考することにより本明細書に含める。

30

**【発明を実施するための最良の形態】****【0017】**

本明細書には、ブテロイン酸、ブテロイン酸の誘導体および類縁体、および／またはこれらの混合物を精製する方法が記載される。一つの実施態様では、本方法は、(a)ブテロイン酸、ブテロイン酸誘導体または類縁体、および／またはこれらの混合物を含む溶液を、イオン交換クロマトグラフィー支持体に接触させる工程；(b)約10以上のpHを持つ移動相によって、ブテロイン酸、ブテロイン酸誘導体または類縁体、またはこれらの混合物を含む第1の分画を溶出させる工程；(c)第1の分画のpHを約3以下に下げる工程；および(d)ブテロイン酸、ブテロイン酸の誘導体または類縁体、および／またはこれらの混合物を沈殿させる工程、を含む。

40

**【0018】**

一つの変異態様では、本明細書に記載される方法はさらに、(e)葉酸、葉酸酸誘導体、またはこれらの混合物を含む第2の分画であって、第1の分画とは実質的に分離される第2の分画を溶出させる工程、を含んでもよい。実質的な分離は、任意の数の客観的、定量的または定性的な基準によって決められてもよく、例えば、経過時間、分画数、基礎評価、または、溶出分画間の重複の程度を、従って、第1の分画および／または第2の分画の間の交差混入の確率および程度を評価する、その他の方法を含む基準によって決められてもよい。いくつかのサッカリド系クロマトグラフィー支持体または樹脂では、葉酸分画の方が、時間的に遅く溶出するブテロイン酸よりも時間的に先に溶出することが観察されて

50

いる。例示として、DEAEセルロースクロマトグラフィー支持体では、葉酸分画の方が、時間的に遅く溶出するプロトロイン酸分画よりも時間的に先に溶出することが観察されている。しかしながら、異なるサッカリド系クロマトグラフィー支持体を含む異なるクロマトグラフィー支持体では、本明細書に記載される第1および第2の分画の溶出順序は変わってもよいと理解しなければならない。

#### 【0019】

もう一つの実施態様では、本明細書に記載される方法は、(a)プロトロイン酸、プロトロイン酸誘導体、またはそれらの混合物を含む溶液を、陰イオン交換クロマトグラフィー支持体に接触させる工程；および(b)プロトロイン酸、プロトロイン酸誘導体、またはそれらの混合物を含む第1の分画を溶出させる工程、を含む。

10

#### 【0020】

一つの変異態様では、溶出工程は、約11以上、または約11.5以上のpHを持つ移動相を含む。もう一つの変異態様では、pHは、約11から約13の範囲を持つ。移動相のpHは、多種多様な塩基、例えば、NaOH、KOH、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub>、KHCO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>OH等を含む、ただしこれらに限定されない塩基を加えることによって、調整あるいは実現されてもよい。

#### 【0021】

一つの態様では、本明細書に記載されるクロマトグラフィー法のクロマトグラフィー支持体は、イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂、サッカリド系樹脂、サッカリド系イオン交換樹脂、サッカリド系陰イオン交換樹脂等を含むが、ただしこれらに限定されない。サッカリド系クロマトグラフィー支持体としては、1種以上のセルロース、アミロース、アガロース、セファロース、およびセファデックス樹脂、およびそれらの組み合わせが挙げられる。もう一つの態様では、サッカリド系クロマトグラフィー支持体としては、イオン交換樹脂、例えば、陰イオン交換樹脂、および陽イオン交換樹脂が挙げられる。例示のサッカリド系イオン交換樹脂としては、ジエチルアミノエチル(DEAE)セルロース、または4級アミン(QA)セルロース固体支持体、例えば、それぞれWhatmanおよび/またはSigmaから入手が可能なDE23、DE32、DE51、DE52、DE53、およびQA52が挙げられる。一つの例示の変異態様では、クロマトグラフィー支持体は、あらかじめ膨潤させた、微細顆粒DE52陰イオン交換器である(Whatman、カタログ番号4057-200)。もう一つの例示の変異態様では、クロマトグラフィー支持体は、あらかじめ膨潤させた微細顆粒DE32陰イオン交換器である。さらに別の固体支持体としては、DEAEセファデックス、CMセファデックス、セファデックスQA、セファロースQA等が挙げられる。

20

#### 【0022】

もう一つの実施態様では、移動相は、水を含む逆相移動相である。もう一つの実施態様では、移動相は、水と塩を含む逆相移動相である。もう一つの実施態様では、移動相は、水と有機溶媒を含む逆相移動相である。もう一つの実施態様では、移動相は、水、塩、および有機溶媒を含む逆相移動相である。もう一つの態様では、移動相は、実質的に、または完全に、アンモニア、またはその塩を含まない。

#### 【0023】

もう一つの実施態様では、移動相は、中性pH、または中性pHに近いpHを含む、指定のpHの水を含む逆相移動相である。一つの変異態様では、pHは、やや中性よりも高く、例えば、約7.1から約7.7の範囲のpHである。一つの態様では、移動相のpHは、約7.3から約7.5の範囲にあるか、あるいは、約7.4のpHにある。もう一つの実施態様では、移動相は、水および塩を含む逆相移動相である。もう一つの実施態様では、移動相は、水および有機溶媒を含む逆相移動相である。もう一つの実施態様では、移動相は、水、塩、および有機溶媒を含む逆相移動相である。もう一つの態様では、移動相は、実質的に、または完全に、アンモニア、またはその塩を含まない。

40

#### 【0024】

クロマトグラフィープロフィールは、その相対的組成が一定であるか、または相対的組成が変動する移動相を用いてもよく、例えば、イソクラティックプロフィール、ステップファンクション、単純濃度勾配、複合濃度勾配、直線濃度勾配、対数濃度勾配、上記プロ

50

フィールの組み合わせ等を含むが、ただしこれらに限定されない。

【0025】

もう一つの実施態様では、本明細書に記載される方法で使用される移動相はさらに、一成分として、有機溶媒、例えば、アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、MeOH、EtOH等を含むアルコール類、およびその他を任意に含んでもよい。移動相が、二つの成分、例えば、塩基性pHを持つ水性成分、および有機溶媒成分を含む場合、移動相は、イソクラティックモード、または濃度勾配モードのクロマトグラフィー支持体を通じて溶出されてもよい。濃度勾配モードは、広範囲のプロフィール、例えば、直線、対数、双曲線、放物線、指數関数、階段、およびそれらの組み合わせを含むプロフィールに従ってもよいことが了解される。

10

【0026】

もう一つの実施態様では、カラムクロマトグラフィーからの溶出液は、任意の従来技術、例えば、紫外線(UV)吸収、蛍光発光、屈折率(RI)、液体クロマトグラフィー質量分析(LCMS)、タンデム質量分析(MS/MS)等を含むが、これらに限定されない技術によって監視される。例示として、溶出液は、監視に基づいて1個以上の分画に分割され、所望の産物を含み、かつ、指定の閾値以上の純度を持つ分画が、プールされる。このプールされた分画は沈殿工程に含められる。

【0027】

沈殿工程のもう一つの実施態様では、溶出液の複数の分画、またはプールされた分画の中に含まれるブテロイン酸、またはその類縁体または誘導体は、該溶液のpHを、約3.5以下、約3以下、約2.5以下、または約2以下のpHに下げることによって溶液から沈殿させる。このpHは、pHを、約3.5以下、約3以下、約2.5以下、または約2以下に下げることが可能な酸であれば、様々ある内の任意の酸、またはそれらの任意の組み合わせを加えることによって下げるてもよい。例示の酸としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸およびその塩、リン酸およびその塩、硝酸等が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。

20

【0028】

一つの態様では、この沈殿した、および/または、精製されたブテロイン酸、またはその類縁体または誘導体は、約95%以上の純度、約96%以上、約97%以上、約98%以上、約99%以上、または約100%の純度に精製される。もう一つの態様では、沈殿したブテロイン酸、またはその類縁体または誘導体は、実質的に葉酸を含まない。沈殿したブテロイン酸またはその類縁体または誘導体の純度は、任意の従来技術、例えば、各種クロマトグラフィーまたは分光光度技術、例えば、高圧または高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、核磁気共鳴分光法、TLC、UV吸収分光法、蛍光分光法等を含む技術を用いて測定してよい。

30

【0029】

もう一つの態様では、沈殿または精製したブテロイン酸、ブテロイン酸類縁体、および/またはブテロイン酸誘導体は、実質的に純粋と理解される純度、または、1種以上の望まない、または不要な成分、不純物、または混入物を実質的に含まないものと理解される純度を有する。例示として、これらの化合物の純度は、1種以上の成分についてあるパーセント以下、例えば、約5%以下の不純物、約4%以下の不純物、約3%以下の不純物、約2%以下の不純物、または約1%以下の不純物しか有さないものとして理解されてよい。同様に、これらの化合物の純度は、ある特定の化合物についてあるパーセント以下、例えば、葉酸について約5%以下、約4%以下、約3%以下、約2%以下、または約1%以下しか有さないものとして理解されてよい。

40

【0030】

もう一つの実施態様では、ブテロイン酸、ブテロイン酸類縁体、およびブテロイン酸誘導体は、本明細書に記載される合成法によって調製される。これらの合成法は、全体として高い純度を持つ、例えば、約95%以上の純度、約96%以上の純度、約97%以上の純度、約98%以上の純度、約99%以上の純度、または約100%の純度を持つ化合物をもたらす。同様に、本明細書に記載される合成法によって調製されるブテロイン酸、ブテロイン酸類縁体、およびブテロイン酸誘導体の純度は、使用される合成法単独で、または、本明細書に記載

50

される精製法と組み合わせた結果、ある特定の成分についてあるパーセント以下、例えば、葉酸について約5%以下、約4%以下、約3%以下、約2%以下、または約1%以下しか有さないものと理解してよい。

#### 【0031】

得られたブテロイン酸、ブテロイン酸類縁体、ブテロイン酸誘導体、またはそれらの混合物における特定成分は、回避または除去してもよいことが了解される。これらの成分は、本明細書に記載される合成過程を用いることによって回避されてもよい。さらに、これらの成分は、本明細書に記載される精製法によって除去されてもよい。従って、本発明はまた、本明細書に記載される合成過程によって調製されるか、本明細書に記載される精製法の使用によって生成、またはもたらされるか、あるいは、これらの合成過程および生成法の組み合わせによってもたらされる材料をも含むことを理解しなければならない。10

#### 【0032】

一つの実施態様では、ブテロイン酸またはブテロイン酸誘導体は、分解過程、例えば、葉酸または葉酸誘導体の分解によって得られる。一つの態様では、ブテロイン酸またはブテロイン酸誘導体は、酵素分解過程、例えば、葉酸または葉酸誘導体の酵素分解によって得られる。もう一つの態様では、ブテロイン酸またはブテロイン酸誘導体は、微生物による分解過程、例えば、葉酸または葉酸誘導体の微生物分解によって得られる。もう一つの態様では、ブテロイン酸およびブテロイン酸誘導体は、化学的分解過程、例えば、葉酸または葉酸誘導体の化学的分解によって得られる。もう一つの実施態様では、ブテロイン酸またはブテロイン酸誘導体は、化学的合成によって得られる。20

#### 【0033】

微生物分解過程の一実施態様では、葉酸またはその誘導体は、*Alcaligenes faecalis*、*Pseudomonad*、*Pseudomonad ATCC 25301*、*flavobacterium*、*flavobacterium baccalis*等と、該葉酸またはその誘導体の試料を接触させることによって、加水分解されてブテロイン酸となる。葉酸の微生物分解を実行するための例示の条件は、Houlihan et al., Anal. Biochem., 46:1-6(1972), Pratt et al., J. Biol. Chem., 243:6367(1968); Levy et al., J. Biol. Chem., 242:2933(1967); Scott, Methods in Enzymology, 66:657-60(1980); Lemon et al., 「細菌分解によるブテロイルグルタミン酸のブテロイン酸への変換 (Conversion of pteroylglutamic acid to pteroic acid by bacterial degradation)」、Archives of Biochemistry 19:311-16(1948) によって記載される。なお、これらの開示を引用することにより本明細書に含める。30

#### 【0034】

酵素分解過程の一実施態様では、葉酸またはその誘導体は、1種以上の酵素、例えば、カルボキシペプチダーゼG、カルボキシペプチダーゼAのようなカルボキシペプチダーゼ、アミダーゼ、リパーゼ、エステラーゼ、およびプロテアーゼ、およびそれらの組み合わせと、該葉酸またはその誘導体の試料を接触させることによって、加水分解されてブテロイン酸となる。カルボキシペプチダーゼGの場合、やや塩基性のpH、例示としては約7.3のpHにおいて、酵素と葉酸を接触させる。葉酸の酵素的分解を実行するための例示の条件は、Harvison & Kalman, J. Med. Chem. 35:1227-33(1992); Nomura et al., J. Org. Chem., 65:5016-21(2000); 米国特許第4,337,339号に記載される。なお、これらの開示を引用することにより本明細書に含める。40

#### 【0035】

化学的分解過程の一実施態様では、葉酸またはその誘導体は、一般に、混和可能な有機共溶媒を要すれば任意に添加した水性媒体に、酸性または塩基性加水分解またはけん化条件の下に、葉酸またはその誘導体の試料を接触することによって、加水分解されてブテロイン酸となる。

#### 【0036】

もう一つの実施態様では、本明細書に記載される方法によって精製されるブテロイン酸、またはブテロイン酸の類縁体または誘導体は、従来の分解または合成過程によって得られるもので、葉酸またはその類縁体または誘導体が混入している。例示として、葉酸また50

はその類縁体または誘導体を、プロテロイン酸、または、その対応する類縁体または誘導体に変換する酵素分解過程は、完全な変換まで進行しなくともよい。従って、得られた混合物は、プロテロイン酸またはその誘導体、葉酸またはその誘導体、および／または、酵素分解過程または加水分解過程の際に形成される、1種以上の部分的に分解した、または加水分解した中間産物または副産物を含んでもよい。例示として、葉酸またはその誘導体の相対量は、約1%から約50%、または約1%から約25%の範囲に亘る。

### 【0037】

プロテロイン酸またはプロテロイン酸の誘導体の化学的合成の一実施態様では、プロテロイン酸、またはプロテロイン酸の誘導体または類縁体は、もう一つの分子と結合してビタミン-薬剤結合体を形成する。一つの態様では、ビタミン-薬剤結合体は、例示として、米国特許出願第10/765,336号に記載される結合体である。もう一つの態様では、ビタミン-薬剤結合体は、プロテロイン酸、またはプロテロイン酸の類縁体または誘導体と、抗原成分とから成る結合体であって、米国特許出願第09/822,379号に記載される結合体を含む。なお、これらの開示を引用することにより本明細書に含める。

### 【0038】

もう一つの態様では、ビタミン-薬剤結合体は、下式：

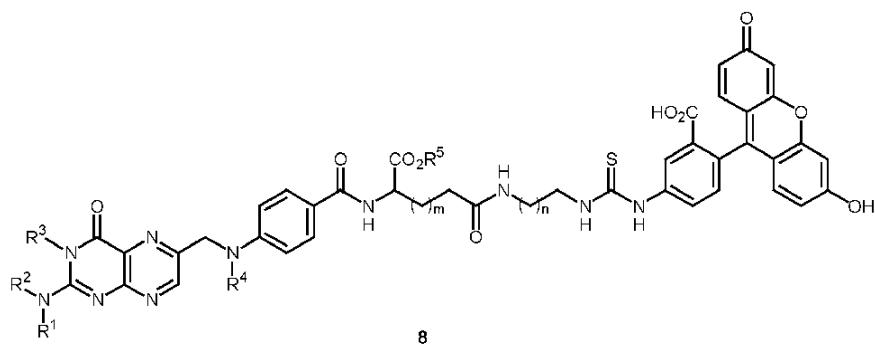


(式中、Vは、ビタミン、またはその類縁体または誘導体であり、かつ、Lは、約1から約100原子の長さを持つ、任意に付加される2価のリンカーである。)によって記載されてもよい。原子は、炭素、窒素、酸素、珪素、リン等から選ばれる。これらの原子はそれぞれ、水素、ハロゲン、および／または、一つ以上の官能基によって任意に置換される。例示の官能基としては、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、オキソ、チオノ、任意に置換されるイミノ、任意に置換されるヒドロキシリイミノ、任意に置換されるヒドラジノ、アジド、任意に置換されるアルキル、任意に置換されるアルケニル、任意に置換されるアルキニル、任意に置換されるアルコキシ、任意に置換されるアルキルチオ、任意に置換されるアルキルスルフォニル、任意に置換されるアルキルスルフォニルオキシ、任意に置換されるアルキルスルフォニルアミノ、任意に置換されるアミノ、任意に置換されるアルデヒドおよびその誘導体、任意に置換されるケトンおよびその誘導体、カルボン酸およびその誘導体、任意に置換されるアリール、アミノ酸側鎖、ペプチド、それらの組み合わせ等が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。これらの官能基は共に結合して、元素に付着する環構造を形成してもよい。

### 【0039】

もう一つの態様では、ビタミン-薬剤結合体は、プロテロイン酸またはその類縁体または誘導体と、フルオレセインまたはその類縁体または誘導体との結合体である。もう一つの態様では、ビタミン-薬剤結合体は、式I：

[式I]



(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、およびR<sup>4</sup>は、それぞれ独立に、水素、アルキル、アシル、または、適切に選択された窒素保護基であるか、または、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は共に結合して窒素保護基を形成し；R<sup>5</sup>は、水素、アルキル、または適切に選ばれるカルボキシリ保護基であり；mは0-4の整数であり；かつ、nは1-4の整数である。もう一つの態様では、ビタミン-薬剤結

10

20

30

40

50

合体は、化合物8aである（式Iの化合物で、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、および、R<sup>5</sup>が水素で、mは1、nは1である。）の化合物である。

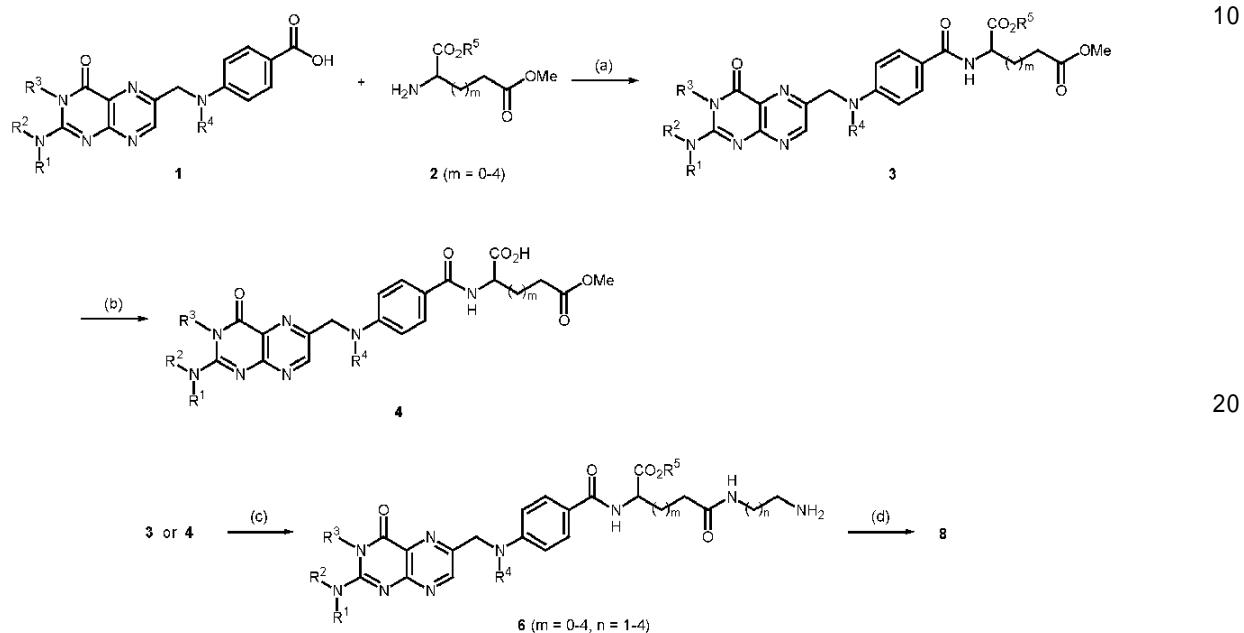
#### 【0040】

プロロイン酸およびその誘導体の、フルオレセイン結合体の、例示の化学的合成法が、スキーム1に示される。

#### 【0041】

#### 【スキーム1】

スキーム1



((a)アミド結合剤；(b) -カルボキシル基の選択的脱保護；(c)H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, n=1-4(5)、(d)1.FITC(7)；2.R<sup>1</sup>からR<sup>5</sup>のどれか一つの任意の脱保護)

上式において、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、およびR<sup>4</sup>は、それぞれ独立に、水素、アルキル、アシリル、または、適切に選択された窒素保護基であるか、または、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は共に結合して窒素保護基を形成し；R<sup>5</sup>は、水素、アルキル、または適切に選ばれるカルボキシル保護基であり；mは0-4の整数であり；かつ、nは1-4の整数である。

#### 【0042】

保護された、プロロイン酸類縁体1は、保護されたアミノ酸類縁体2と反応してアミド3を形成する。プロロイン酸1に好適な保護基R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、およびR<sup>4</sup>としては、例えば、アセチル、トリフルオロアセチル等のようなアミド保護基、tert-Boc、TeoC、Cbz、Fmoc等のようなカルバメート保護基、およびその他が挙げられる。アミノ酸類縁体2に好適な保護基R<sup>5</sup>としては、例えば、メチル、トリメチルシリルエチル、tert-ブチル等のようなエステル保護基、およびその他が挙げられる。R<sup>5</sup>がtert-ブチルである一態様では、得られたアミド3は、酸によって選択的に脱保護されてアミド4を生成する。この態様では、プロロイン酸類縁体1およびアミノ酸類縁体2の上に存在する保護基は、-カルボキシレート保護基の存在下に-カルボキシレート保護基の選択的脱保護を可能とするように適切に選ばれることが理解される。

#### 【0043】

アミド3、または対応する脱保護類縁体4のどちらかが、式H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> (n=1-4である)のアルキレンジアミンによって処理されてアミン6を生ずる。末端のメチルエステルは置換されてアミド結合を形成する。アミン6は、フルオレセインイソチオシアネート(FITC、7)によって処理されて、ビタミン-薬剤結合体8を形成する。

#### 【0044】

本明細書に記載される合成には、多種多様なアミド結合試薬および条件が適用可能であ

10

20

30

40

50

り、例えば、カルボン酸誘導体、例えば、酸塩化物等；活性化エステル、例えば、ペンタフルオロフェニルエステル、ヒドロキシベンゾトリアゾールエステル等；結合試薬、例えば、(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノフォスフォニウムヘキサフルオロfosfate (PyBOP)、BOP、BOPCI、DCC、EDC、HBTU、TBTU、PyBrOP等、が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。本明細書に記載されるアミド結合工程のために適切な溶媒としては、N,N-ジメチルフォルムアミド (DMF)、ジメチルスルフォキシド (DMSO)、クロロフォルム、ジクロロメタン (DCM)、N-メチルピロリジノン (NMP) 等が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。本明細書に記載されるアミド結合工程は、広範囲の温度において、例えば、約0 から約50 の範囲の温度において、例示として室温において実行されてよい。

10

## 【0045】

本明細書に記載される脱保護工程は、任意の従来のやり方で、例えば、Greene & Wuts, 「有機合成における保護基 (Protective Groups in Organic Synthesis)」、2d Ed., John Wiley & Sons, New York, 1991に記載される試薬および反応条件を用いて実行してもよい。なお、この開示を引用することにより本明細書に含める。脱保護試薬および条件の選択は、脱保護工程が、脱保護される化合物の上に存在する、他の保護基を含む他の官能基に、予期しない悪影響を及ぼすことなく進行することが可能となるように選ばれることが了解される。例えば、スキーム 1において、保護基R<sup>5</sup>は、保護基R<sup>4</sup>の存在下に、かつ、保護基R<sup>4</sup>に影響を及ぼすことなく除去される。一つの例示の実施態様では、保護基R<sup>5</sup>はtert-ブチルエステルであり、保護基R<sup>4</sup>はトリフルオロアセチルアミドである。酸感受性保護基を脱保護するための、例示の脱保護剤としては、トリフルオロ酢酸 (TFA)、HCl、HBr、AcOH、HCO<sub>2</sub>H等が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。脱保護反応は、各種溶媒、例えば、水、DCM、EtOAc、AcOH等を含む溶媒において実行してよいが、ただし溶媒はこれらに限定されない。反応条件の中に、脱保護反応の速度を上げるためにおよび/または総収率を上げるために、溶媒としてAcOHを使用することと合わせて、陽イオンスカベンジャーを含めてよいことが了解される。本明細書に記載される脱保護反応は、様々な温度において、例えば、約0 から約50 の範囲の温度において、例示として室温において実行されてよい。

20

## 【0046】

スキーム 1 の工程(c)は、種々の溶媒、例えば、THF、エーテル、DMF、DMSO、クロロフォルム、DCM、NMP等を含む、ただしこれらに限定されない溶媒の中で実行されてもよく、種々の温度、例えば、約0 から約50 の範囲の温度において、例示として室温において実行されてもよい。同様に、スキーム 1 の工程(d)は、種々の溶媒、例えば、THF、DMF、DMSO、クロロフォルム、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、NMP、水等を含む、ただしこれらに限定されない溶媒の中で実行されてもよく、種々の温度、例えば、約0 から約50 の範囲の温度において、例示として室温において実行されてもよい。工程(d)に例示される反応に、さらに塩基を加えてよく、例えば、一般にR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>R<sup>3</sup>Nによって表されるアミン塩基類、Et<sub>3</sub>N、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA)、ピリジン、ルチジン、コリジン、4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) 等を含む、ただしこれらに限定されない塩基を加えてよい。

30

## 【0047】

いくつかの保護基は、ジアミンH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>と反応させることによって、工程(c)において同時に除去されると好都合であることが了解される。例えば、R<sup>4</sup>が、トリフルオロアセチル等のようなアミド保護基である場合、二つのメチルエステルは置換されて、ガムマ-グルタメートのアミドを形成し、アミド保護基はN(10)において除去される。一つの変異態様では、基R4は、ジアミンH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>との反応に対して安定であるように選ばれる。

40

## 【0048】

もう一つの変異態様では、プロロイン酸類縁体1およびアミノ酸類縁体2の反応は、保護されたプロロイン酸類縁体1を、脱離基を有する、対応するカルボン酸誘導体に変換することによって実現される。この脱離基は、アミノ酸類縁体2のアミンによって置換されて

50

アミド3を形成する。スキーム1に示される合成、およびその変法はまた、本明細書に記載される通り、ブテロイン酸類縁体、およびブテロイン酸類縁体の誘導体のフルオレセイン結合体を調製するのにも使用が可能であることが了解される。

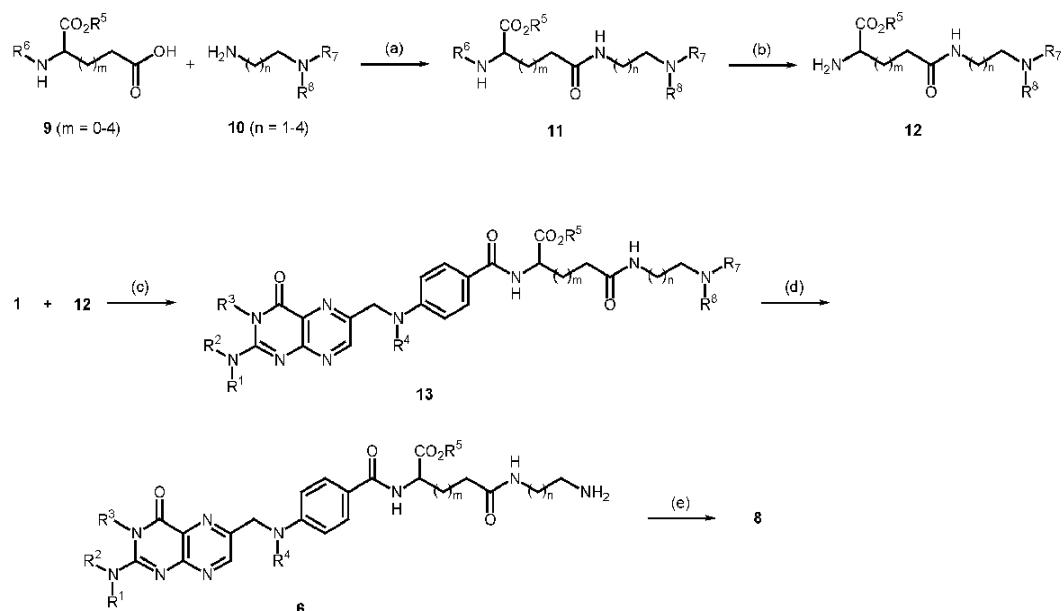
#### 【0049】

ブテロイン酸、およびブテロイン酸誘導体の結合体に関する、もう一つの例示の化学的合成法がスキーム2に示される。

#### 【0050】

#### [スキーム2]

スキーム2



(a) アミド結合剤；(b) アミノ酸アミン基の選択的脱保護；(c) アミド結合反応、(d) アルキレンジアミンの選択的脱保護、(e) 1.FITC(7)；2. $R^1$ から $R^5$ のどれか一つの任意の脱保護）

上式において、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、および $R^4$ は、それぞれ独立に、水素、アルキル、アシリル、または、適切に選択された窒素保護基であり； $R^5$ は、水素、アルキル、または適切に選ばれたカルボキシル保護基であり； $m$ は0-4の整数であり； $n$ は1-4の整数であり；かつ、 $R^6$ 、 $R^7$ 、および $R^8$ は、それぞれ独立に、水素、または適切に選択された窒素保護基である。

#### 【0051】

保護されたアミノ酸類縁体9は、保護されたアルキレンジアミン10と反応してアミド11を形成する。アミノ酸類縁体7の例示の保護基 $R^6$ としては、Fmoc、Cbz、tert-Boc等が挙げられる。アルキレンジアミン10の例示の保護基 $R^7$ としては、tert-Boc、Fmoc、Cbz等が挙げられる。保護基は、脱保護される分子の上に存在し続ける他の官能基の性質を変えることなく、他の保護基の存在下に1種以上の選択的脱保護を可能とするように選ばれることができ理解される。得られたアミド11は脱保護されてアミノ酸アミン12を生成し、これは、保護されたブテロイン酸類縁体1と結合してアミド13を形成する。ここでブテロイン酸1の例示の保護基 $R^4$ は本明細書に記載する通りである。得られたアミド13は脱保護されてアルキレンジアミンアミン6を生成する。いくつかの変異態様では、カルボキシル保護基 $R^5$ の性質に応じて、末端アミン保護基 $R^7$ および $R^8$ を除去するために用いられる条件がまた、このカルボキシル保護基 $R^5$ を除去することもあってよい。例えば、 $R^5$ がtert-ブチル基であり、 $R^7$ がtert-Boc保護基であり、かつ、 $R^8$ が水素である場合、極性溶媒における酸処理によって両保護基が除去されてもよい。アミン6はFITCと反応して、ブテロイン酸結合FITC結合体8を生成する。

#### 【0052】

本明細書に記載する通り、スキーム2に記載される合成に対しては、広く各種のアミド

10

20

40

50

結合試薬および条件も適用が可能であり、例えば、カルボン酸誘導体、例えば、酸塩化物等；活性化エステル、例えば、ペントフルオロフェニルエステル、ヒドロキシベンゾトリアゾールエステル等；結合剤、例えば、PyBOP、BOP、BOPCI、DCC、EDC、HBTU、TBTU、PyBrOP等、が適用可能であるが、ただしこれらに限定されない。本明細書に記載されるアミド結合工程に好適な溶媒としては、DMF、DMSO、クロロフォルム、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、NMP等が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。本明細書に記載されるアミド結合工程は、様々な温度において、例えば、約0 から約50 の範囲の温度において、例示として室温において実行されてよい。

#### 【0053】

本明細書に記載される脱保護工程は、任意の従来のやり方で、例えば、Greene & Wuts, 10 に記載される試薬および反応条件を用いて実行してもよい。脱保護試薬および条件の選択は、脱保護工程が、脱保護される化合物の上に存在する、他の保護基を含む他の官能基に、予期しない悪影響を及ぼすことなく進行することが可能となるように選ばれることが了解される。例えば、スキーム 2において、保護基R<sup>6</sup>は、保護基R<sup>5</sup>、R<sup>7</sup>、およびR<sup>8</sup>の存在下に、かつ、それらの保護基に影響を及ぼすことなく除去される。一つの例示の実施態様では、保護基R<sup>6</sup>はFmoc基であり、保護基R<sup>5</sup>はtert-Buエステルであり、保護基R<sup>7</sup>はtert-BOCであり、かつ、R<sup>8</sup>は水素である。塩基感受性保護基を脱保護するための、例示の脱保護剤としては、DBU、ピペリジン、モルフォリン、TBAF等が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。脱保護反応は、各種溶媒、例えば、水、THF、エーテル、DMF、NMP、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、EtOAc、等を含む、ただしこれらに限定されない溶媒の中で実行してよい。本明細書に記載される脱保護反応は、様々な温度において、例えば、約0 から約50 の範囲の温度において、例示として室温において実行されてよい。 20

#### 【0054】

スキーム 2 の工程(c)は、本明細書に記載される結合剤および反応条件を用いて工程(a)の場合と同様に実行してよい。各種溶媒、例えば、THF、エーテル、DMF、DMSO、クロロフォルム、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、NMP等を含む、ただしこれらに限定されない溶媒を用い、かつ、様々な温度において、例えば、約0 から約50 の範囲の温度において、例示として室温において実行してよい。同様に、スキーム 1 の工程(d)は、各種溶媒、例えば、THF、DMF、DMSO、クロロフォルム、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、NMP、水等を含む、ただしこれらに限定されない溶媒中で実行してよく、かつ、様々な温度において、例えば、約0 から約50 の範囲の温度において、例示として室温において実行してよい。工程(d)に例示される反応に、さらに塩基を加えてよく、例えば、一般にR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>R<sup>3</sup>Nによって表されるアミン塩基類、Et<sub>3</sub>N、DIPEA、ピリジン、ルチジン、コリジン、DMAP等を含む、ただしこれらに限定されない塩基を加えてよい。 30

#### 【0055】

脱保護工程(d)は、任意の従来のやり方で実行してもよい。例示の一実施態様では、保護基R<sup>7</sup>は、酸に対して化学的感受性を持つtert-Boc基であり、一方、他の保護基、例えば、R<sup>4</sup>としてはトリフルオロアセチルアミドのように、またはR<sup>5</sup>としてはメチルエステルのように、酸に対して感受性を持たない。もう一つの例示の実施態様では、保護基R<sup>5</sup>はtert-ブチルエステルで、保護基R<sup>7</sup>はtert-Boc基であり、共に酸に対して化学的感受性を持つが、一方、他の保護基は酸に対する感受性を持たない。このような酸感受性保護基を脱保護するための、例示の脱保護剤としては、TFA、HCl、HBr、AcOH、HCO<sub>2</sub>H等が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。脱保護反応は、各種溶媒、例えば、水、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、EtOAc、AcOH等を含む、ただしこれらに限定されない溶媒中で実行してよい。反応条件の中に、脱保護反応の速度を上げるためにおよび/または総収率を上げるために、溶媒としてAcOHを使用することと合わせて、陽イオンスカベンジャーを含めてもよいことが了解される。本明細書に記載される脱保護反応は、様々な温度において、例えば、約0 から約50 の範囲の温度において、例示として室温において実行されてよい。 40

#### 【0056】

化合物8の上に残留する保護基がある場合にそれらを取り除くために、スキーム 2 に記

10

20

30

40

50

載される合成に、任意に脱保護工程(e)をさらに含めてよい。例えば、R<sup>4</sup>がアミド保護基であり、R<sup>5</sup>がカルボン酸保護基である場合、化合物8によって例示される遊離アミノ酸誘導体を調製するために、それらの保護基は取り除かれてもよい。例示の一実施態様では、スキーム2の結合工程(e)は、化合物8の保護形を生ずる。この保護形では、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、およびR<sup>5</sup>は水素であり、かつ、R<sup>4</sup>はトリフルオロアセチルである。保護基R<sup>5</sup>は、保護された化合物8を、各種溶媒、例えば、水、アルコール、二相性THF/水等の中で、塩基、例えば、0.5M NH<sub>4</sub>OHのようなNH<sub>4</sub>OH、LiOH、NaOH、KOH、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub>を含む、ただしこれらに限定されない塩基に接触させることによって、同時に除去してもよい。例示として、このような塩基感受性保護基を除去するための反応条件のpHは、約9よりも大きい。例示として、反応は室温において行われる。

10

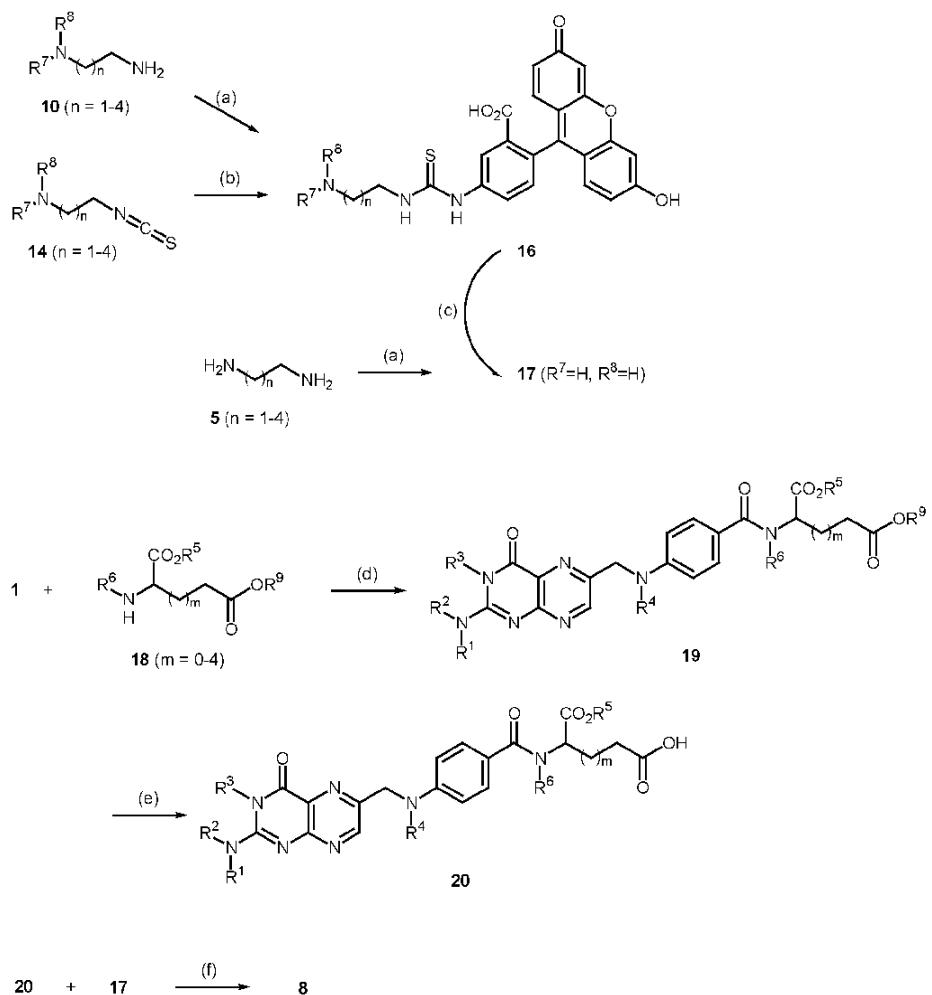
## 【0057】

プロトイン酸およびその誘導体のフルオレセイン結合体の、もう一つの例示の化学的合成をスキーム3に示す。

## 【0058】

## [スキーム3]

スキーム3



(a) FITC(7) ; (b) フルオレセイン-NH<sub>2</sub>(15) ; (c) アミン基の脱保護 ; (d) アミド結合試薬 ; (e) カルボン酸基の選択的脱保護 ; (f) 1. アミド結合剤 ; 2. R<sup>1</sup>からR<sup>6</sup>のどれか一つの任意の脱保護 )

上式において、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、およびR<sup>4</sup>は、それぞれ独立に、水素、アルキル、アシリル、または、適切に選択された窒素保護基であり；R<sup>5</sup>は、水素、アルキル、または適切に選ばれたカルボキシル保護基であり；mは0-4の整数であり；nは1-4の整数であり；かつ、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、およびR<sup>8</sup>は、それぞれ独立に、水素、または適切に選択された窒素保護基である。

20

30

40

50

## 【0059】

保護されたアルキレンジアミン16は、(i)アルキレンジアミン5をFITC(7)と反応させるか；(ii)保護されたアルキレンジアミン10をFITC(7)と反応させるか；または、(iii)保護されたイソチオシアネート14をフルオレセインアミン(15)と反応させるか、そのいずれかによって調製してもよい。このアミンは脱保護されて17を生成する。プロロイン酸誘導体1は、三重に保護されたアミノ酸18と結合して、葉酸誘導体19を生成する。保護基R<sup>5</sup>およびR<sup>9</sup>は、それぞれ他方とは独立に化学的に除去されるように選ばれる。保護基R<sup>9</sup>は除去されてカルボン酸20を生成し、このカルボン酸はアミン17に結合して結合体8を生成する。

## 【0060】

スキーム3において、化合物5、10、14と化合物7および15との反応として適宜示される、イソチオシアネートとアミンとの反応は、各種溶媒、例えば、EtOH、MeOH、THF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、DMF、CHCl<sub>3</sub>等を含む、ただしこれらに限定されない溶媒中で実行してよい。反応は、様々な温度において、例えば、約0℃から約100℃の範囲の温度において、例示として反応に使用される溶媒を還流しながら実行されてよい。

10

## 【0061】

本明細書に記載される脱保護反応と同様に、脱保護工程(c)は、従来の任意のやり方で実行してよい。例示の一実施態様では、保護基R<sup>7</sup>は、酸に対して化学的感受性を持つtert-Boc基である。このような酸感受性保護基を脱保護するための、例示の脱保護剤としては、TFA、HCl、HBr、AcOH、HCO<sub>2</sub>H等が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。脱保護反応は、各種溶媒、例えば、水、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、EtOAc、AcOH等を含む、ただしこれらに限定されない溶媒中で実行してよい。反応条件の中に、脱保護反応の速度を上げるためにおよび/または総収率を上げるために、溶媒としてAcOHを使用することと合わせて、陽イオンスカベンジャーを含めてもよいことが了解される。本明細書に記載される脱保護反応は、様々な温度において、例えば、約0℃から約50℃の範囲の温度において、例示として室温において実行されてよい。

20

## 【0062】

スキーム3の工程(d)および(f)は、本明細書に記載されるやり方と同様にして従来の結合剤および反応条件を用いて実行してよい。各種の溶媒、例えば、THF、エーテル、DMF、DMSO、クロロフォルム、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、NMP等を含む、ただしこれらに限定されない溶媒を用い、また、様々な温度において、例えば、約0℃から約50℃の範囲の温度において、例示として室温において実行してよい。

30

## 【0063】

本明細書に記載される脱保護反応と同様に、脱保護工程(e)は、従来の任意のやり方で実行してよい。例示の一実施態様では、保護基R<sup>9</sup>は、酸に対して化学的感受性を持つtert-Boc基である。このような酸感受性保護基を脱保護するための、例示の脱保護剤としては、TFA、HCl、HBr、AcOH、HCO<sub>2</sub>H等が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。脱保護反応は、各種溶媒、例えば、水、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、EtOAc、AcOH等を含む溶媒において実行してよいが、ただし溶媒はこれらに限定されない。反応条件の中に、脱保護反応の速度を上げるためにおよび/または総収率を上げるために、溶媒としてAcOHを使用することと合わせて、陽イオンスカベンジャーを含めてもよいことが了解される。本明細書に記載される脱保護反応は、様々な温度において、例えば、約0℃から約50℃の範囲の温度において、例示として室温において実行されてよい。

40

## 【0064】

化合物8の上に残留する保護基がある場合にそれらを取り除くために、スキーム3に記載される合成に、任意に脱保護工程(f)をさらに含めてもよい。例えば、R<sup>4</sup>がアミド保護基であり、R<sup>5</sup>がカルボン酸保護基である場合、化合物8によって示される遊離アミノ酸誘導体を調製するために、それらの保護基は取り除かれてもよい。例示の一実施態様では、スキーム3の結合工程(f)は、化合物8の保護形を生ずる。この保護形では、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、およびR<sup>3</sup>は、水素であり、かつ、R<sup>4</sup>はトリフルオロアセチルであり、R<sup>5</sup>はメチルである。保護

50

基R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は、保護された化合物8を、各種溶媒、例えば、水、アルコール、二相性THF/水等の中で、塩基、例えば、0.5M NH<sub>4</sub>OHのようなNH<sub>4</sub>OH, LiOH, NaOH, KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>等を含む、ただしこれらに限定されない塩基に接触させることによって、同時に除去してもよい。例示として、このような塩基感受性保護基を除去するための反応条件のpHは、約9よりも大きい。例示として、反応は室温において行われる。

## 【0065】

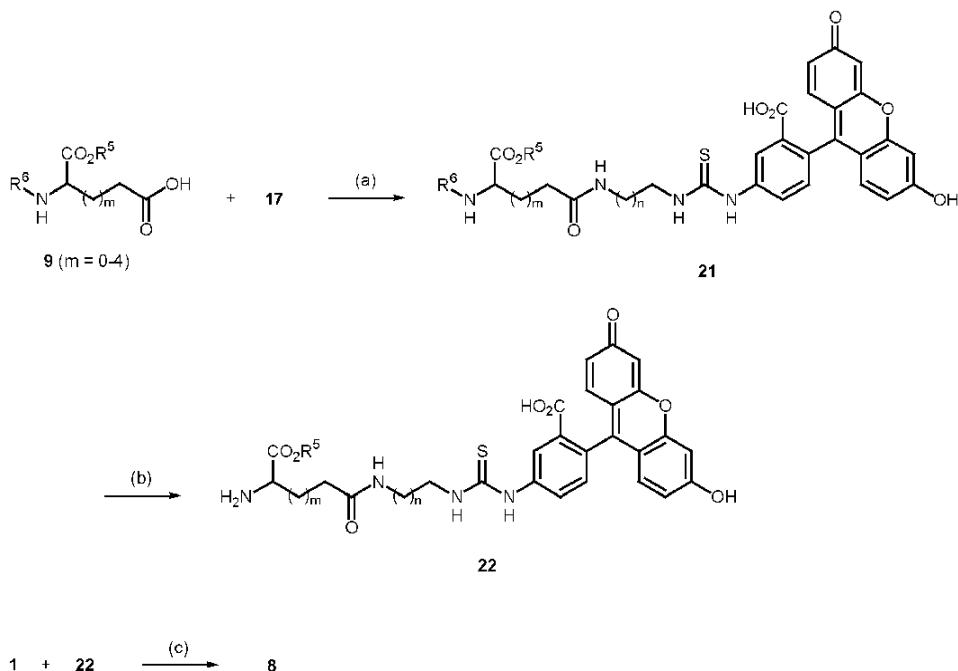
それとは別に、プロロイン酸およびその誘導体のフルオレセイン結合体の、例示の化学的合成をスキーム3aに示す。

## 【0066】

【スキーム3a】

10

スキーム3a



20

((a)アミド結合試薬 ; (b)アミノ酸アミン基の選択的脱保護 ; (c)アミド結合試薬 )

## 【0067】

図示のように、アミン17は、保護されたアミノ酸類縁体9と結合してアミド21を生成する。アミド21は脱保護されてアミン22を生成し、アミン22は、保護されたプロロイン酸類縁体1と結合して、ビタミン-フルオレセイン結合体8を生成する。

## 【0068】

本明細書に記載される、プロロイン酸類縁体の、およびプロロイン酸類縁体の誘導体のフルオレセイン結合体を調製するには、スキーム1、2、および3に示す合成法、およびそれらの変法を使用してもよいことが理解される。プロロイン酸類縁体、およびプロロイン酸類縁体誘導体としては、フォリン酸、プロロポリグルタミン酸、テトラヒドロプロテリン、ジヒドロフォレート、テトラヒドロフォレート、アミノプロテリン、アメトプロテリン、N<sup>10</sup>-メチルフォレート、2-デアミノヒドロキシフォレート、3'5'-ジクロロ-4-アミノ-4-デオキシ-N<sup>10</sup>-メチルプロロイルグルタミン酸等の外に、これらの化合物のデアザおよびジデアザ類縁体、例えば、1-デアザメトプロテリン、3-デアザメトプロテリン、および他のデアザおよびジデアザ類縁体、例えば、1-デアザ、3-デアザ、5-デアザ、8-デアザ、10-デアザ類縁体、および1,5-ジデアザ、5,10-ジデアザ、8,10-ジデアザ、および5,8-ジデアザ類縁体が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。例えば、グルタミン酸塩に加えてさらに、またはグルタミン酸塩の代わりに1種以上のアミノ酸を含む、他の葉酸塩類縁体も、本明細書に記載される過程および手順に従って調製されてもよい。具体的には、スキーム1、2、および3において、チロシン、システイン、システイン酸、フェニルアラニ

40

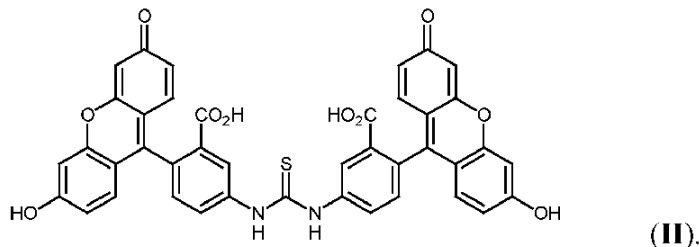
50

ン、リシン、および、他の多くの天然および非天然のアミノ酸の保護形で、これらのスキームに具体的に記載される、保護されたグルタミン酸化合物を置換してもよい。従って、グルタミン酸塩とは異なるアミノ酸のブテロイルアミドであることによって葉酸塩とは異なる、葉酸類縁体も本発明の中に含まれると想定される。さらに、このようなアミドも、本明細書に記載される合成法および過程を用いることによってブテロイン酸類縁体および誘導体から調製することが可能であることを理解しなければならない。

**[0069]**

さらに、ブテロイン酸、葉酸、ブテロイン酸および葉酸の類縁体および誘導体、および、これらの化合物の内の任意の化合物の結合体の調製時に、副産物、混入物、不純物、および／またはその他の成分が形成されてもよいことが理解される。これらの副産物、混入物、不純物、および／またはその他の成分を、本明細書に記載される精製法によって除去してもよい。一つの実施態様では、その他の成分は葉酸である。もう一つの実施態様では、その他の成分は、ビスフルオレセイン誘導体、例えば、ビスフルオレセイン誘導体である。例示の、ビスフルオレセイン誘導体の一つは、式IIの化合物である。

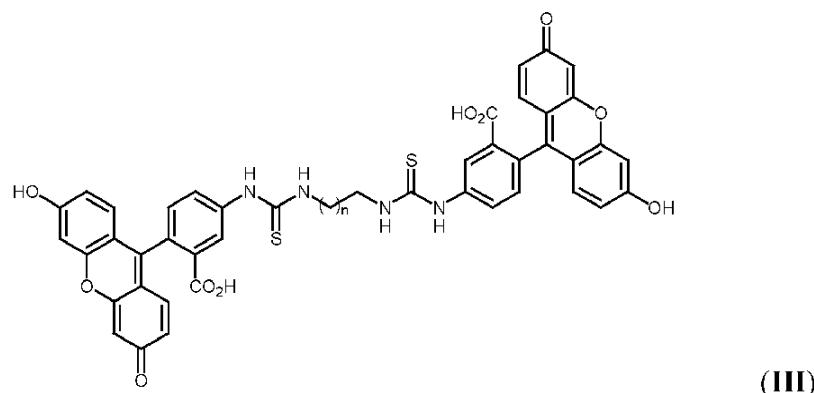
**[式II]**



**[0070]**

例示の、もう一つのビスフルオレセイン誘導体は、式IIIの化合物である。

**[式III]**



上式において、nは1-4の整数である。

**[0071]**

さらに、副産物、混入物、または不純物は、適切な合成ルートを選択するか、または合成ルートを修飾することによって回避することが可能であることが理解される。一例示態様では、式IIの化合物は、本明細書に記載される各種合成法および過程から、水を注意深く除去することによって、実質的にまたは完全に回避される。さらに別の例示態様では、式IIの化合物は、1モル当量と正確に同じ、またはやや少ないFITC試薬を用いることによって回避される。

**[0072]**

さらに別の例示態様では、式IIIの化合物は、スキーム1に示されるように、1モル当量と正確に同じ、またはやや少ないアルキレンジアミン試薬5を用いることによって、実質的にまたは完全に回避される。さらに別の例示態様では、式IIIの化合物は、アルキレンジアミン試薬5の導入に続いて、FITCの添加前に、反応産物を精製し、そうすることによ

40

50

つて実質的に全ての残存アルキレンジアミン試薬5を取り除くことによって、例えば、スキーム1に示す中間体アミン6を精製し、そうすることによってアルキレンジアミン5を実質的に、または完全に取り除くことによって回避される。

#### 【0073】

もう一つの例示態様では、式IIIの化合物は、アルキレンジアミンの合成等価物、例えば、スキーム2に示す、モノ保護アルキレンジアミン10を用いることによって回避されてもよい。また、もう一つの例示態様では、式IIIの化合物は、ブテロイン酸、葉酸、またはブテロイン酸または葉酸の類縁体または誘導体との結合に先立って、スキーム3に示すようにFITC中間体16を調製することによって、回避されてもよい。この後者の態様では、式IIIの化合物は、アルキレンジアミン試薬、例示として化合物5を、1モル当量に対して正確に、少なくともやや過剰に用いることによって、または例示として実質的に過剰に用いることによって、回避されることが理解される。この後者の態様では、生成化合物16、または後続の生成物、例えば、17、21、または22は、それらがアルキレンジミン試薬5から調製される場合、精製によって式IIIの化合物を部分的または完全に除去してもよいことが理解される。10

#### 【0074】

例示として、ブテロイン酸、またはその誘導体の結合体は、本明細書に記載される方法から任意に選ばれる方法を、例えば、本明細書に記載するイオン交換クロマトグラフィー支持体を用いる、本明細書に記載する方法から任意に選ばれる方法による精製と組み合わせて用いることによって、合成することが可能である。20

#### 【0075】

もう一つの態様では、ブテロイン酸またはその誘導体と、フルオレセインまたはその誘導体とを含む結合体を精製する方法が提供される。一態様では、この方法は、(a)第1の逆相クロマトグラフィー支持体に結合体を含む溶液を接触させる工程；(b)指定のpHの水を含む移動相によって、結合体のリン酸複合体を含む第1の分画を溶出させる工程；(c)第2の逆相クロマトグラフィー支持体に第1の分画を接触させる工程；および、(d)水を含む移動相によって結合体を含む第2の分画を溶出させる工程であって、第2の分画がリン酸塩を実質的に、または完全に含まないように行われる工程、を含む。溶出工程(b)は、水と1種以上のリン酸塩から調製された水性の移動相によって実行されてもよい。指定のpHは、約6から約8の範囲；約7から約8の範囲；または約7.1から約7.5の範囲；または例示として約7.4のpHであってもよい。溶出工程(d)は、好適にリン酸塩を実質的にまたは完全に含まない移動相を含むことが理解される。30

#### 【0076】

一態様では、逆相クロマトグラフィー支持体は、改変シリカ支持体であって、例えば、C8シリカ、C18シリカ、および、改変C8および/またはC18シリカ、例えば、キャップ付きまたは脱活性化シリカ等、およびそれらの組み合わせを含むシリカ支持体であるが、ただしこれらに限定されない。

#### 【0077】

本明細書に記載される方法における使用が記載される一つのクロマトグラフィーカラムまたは複数のカラムは、従来技術を用いて再生し、ブテロイン酸、またはその類縁体または誘導体の、さらに新たな混合物の精製または分離のために再使用してもよいことが理解される。再生は、分離のために使用される移動相よりも高い溶出傾向指数(eluotropic index)、または溶出力を持つ溶媒によってクロマトグラフィーの固相支持体を洗浄することを含む。例えば、精製は、逆相固相支持体、および、水、例えば、純水、または、水に溶解した無機塩の溶液を含有する移動相を含んでもよい。移動相はまた、有機溶媒、例えば、アセトニトリル(ACN)、メタノール、テトラヒドロフラン(THF)等も含んでもよい。この例示のクロマトグラフィー分離では、移動相は、水とアセトニトリルの、一定のまたは変動する割合の混合物であってもよく、例えば、90:10水/アセトニトリル、あるいは、9:1から90:10までの水/アセトニトリルの直線濃度勾配等であってもよい。次いで、カラムは、より高い溶出傾向指数を持つ移動相、例示としては、水のパーセントに対して相対4050

的に高いパーセントの有機溶媒を含む、例えば、60:40または50:50の水／アセトニトリルを含む移動相、によって洗浄されて再生される。上記例示の実施態様は限定的なものではなく、クロマトグラフィー分離のために好適なものであれば任意の移動相を、また、カラム再生のために好適なものであれば任意の方法を使用してよい。

#### 【0078】

もう一つの例示実施態様では、ブテロイン酸またはその類縁体または誘導体と、フルオレセインまたはその誘導体とを含む結合体を精製するための方法であって、多価の陽イオン、例えば、アルカリ土類金属陽イオンとの複合体形成によって精製する方法が本明細書において記載される。例示の陽イオンとしては、マグネシウム、カルシウム、ベリリウム、ストロンチウム、バリウム等が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。結合体の塩、例えば、ナトリウム塩および／またはカリウム塩を調製するのに、従来法を使用してもよい。陽イオン交換は、例示として、極性溶媒、例えば水において、多価の陽イオン液とナトリウムまたはカリウム液を混合することによって実現される。多価の陽イオン塩溶液は、通常の塩、例えば、塩化マグネシウム、塩化カルシウムなどから調製される。得られた複合体は、極性溶媒から沈殿または結晶化される。結合体の多価陽イオン塩の沈殿を促進するために、極性溶媒に共溶媒を加えてよいことが理解される。10

#### 【0079】

結合体の多価陽イオン塩は、適切な通常の樹脂を用いたイオン交換クロマトグラフィーによって、中性形または他の塩の形、例えば、ナトリウムおよびカリウム塩に復帰させてよい。20

#### 【0080】

もう一つの例示実施態様では、病原性細胞集団、例えば、癌細胞または病原性生物を抱える宿主の治療処置のための方法が提供される。具体的には、本方法は、癌細胞または他の病原性因子に対し高い親和度をもって結合することが可能な、単離リガンド-フルオレセイン結合体を用いる。本方法は、病原細胞を抗原性とし、宿主の免疫系によるそれらの認識と除去を実現することによって、病原細胞集団の、免疫反応介在性の除去の強化をもたらす。この方法では、リガンド-フルオレセイン結合体は、少なくとも1種のビスフルオレセイン誘導体の形成を回避するために、本明細書に記載する通りに合成されるか、および／または、少なくとも1種のビスフルオレセイン誘導体を回避するために、前述の通りに精製されてもよい。30

#### 【0081】

本明細書に記載される方法および組成物によれば、「単離リガンド-フルオレセイン結合体」という用語は、少なくとも1種のビスフルオレセイン誘導体を除去するように精製または操作されたリガンド-フルオレセイン結合体、あるいは、少なくとも1種のビスフルオレセイン誘導体の形成を回避するように合成されたリガンド-フルオレセイン結合体、またはその両方を指す。

#### 【0082】

もう一つの例示の実施態様では、本方法は、病原細胞集団の、免疫反応介在性の除去を強化するために、単離リガンド-フルオレセイン結合体に加えて、内因性免疫反応を刺激することが可能な治療因子、殺細胞剤、化学療法剤、腫瘍浸透強化剤、細胞毒性免疫細胞、または抗菌剤を使用することによる、併用治療を利用することも可能である。40

#### 【0083】

例示として、本方法は、病原細胞集団を抱える宿主における病原細胞集団の、内因性免疫反応介在性の除去を強化するために利用される。本法は、各種の病態、例えば、癌および感染病の原因となる病原細胞の集団に適用することが可能である。従って、病原細胞集団は、良性腫瘍および悪性腫瘍を含む腫瘍形成性癌細胞集団であってもよいし、あるいは、非腫瘍形成性であってもよい。この癌細胞集団は、自発的に発生してもよいし、あるいは、宿主動物の生殖系列に存在する突然変異、または体細胞突然変異のような過程を通じて発生してもよいし、あるいは、化学的、ウィルス的、または放射線によって誘発されてもよい。本法は、例えば、上皮癌、肉腫、リンパ腫、ホジキン病、メラノーマ、中皮種、50

バーキットリンパ腫、鼻咽頭癌、白血病、および骨髄腫のような癌を治療するために利用することが可能である。癌細胞集団としては、口内、甲状腺、内分泌腺、皮膚、胃、食道、咽頭、すい臓、結腸、膀胱、骨、卵巣、子宮頸、子宮、乳房、睾丸、前立腺、直腸、腎臓、肝臓、および肺の癌が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。

#### 【0084】

例示として、病原細胞集団はまた、外来性病原体、または、外来性病原体、例えばウイルスを宿す、細胞集団であってもよい。本法は、外来性病原体、例えば、細菌、真菌、ウイルス、マイコプラズマ、および寄生虫に対して適用が可能である。本法によって治療が可能な感染介在因子は、動物における疾病発生の原因となる、従来技術で認知済みの任意の感染性生物、例えば、グラム陰性またはグラム陽性の球菌または桿菌、DNAおよびRNAウイルス、例えば、パピローマウイルス、パルボウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、およびワクシニアウイルスのようなDNAウイルス、および、例えば、アレナウイルス、コロナウイルス、ライノウイルス、RSウイルス、インフルエンザウイルス、ピコルナウイルス、パラミクソウイルス、レオウイルス、レトロウイルス、およびラブドウイルスのようなRNAウイルス、を含む。葉酸受容体は、従来から細菌細胞の上に特定されている(Kumar et al., J. Biol. Chem. 262, 7171-79(1987))。

#### 【0085】

興味あるのは、抗生物質に対して耐性を持つ細菌、例えば、抗生物質耐性を持つ連鎖球菌種およびブドウ球菌種、あるいは、抗生物質に対して感受性を持つが、繰り返し感染を起こし、抗生物質で治療されて最終的に耐性菌を生ずる細菌である。このような微生物は、単離リガンド-フルオレセイン結合体を、上記抗生物質耐性細菌株の発生を回避するために通常よりも低用量で患者に投与される抗生物質と併用することによって、治療することが可能である。本法はまた、任意の真菌、マイコプラズマ種、寄生虫、または、動物の病気の原因となるその他の感染性微生物に対しても適用が可能である。本発明の方法によって治療することが可能な真菌の例としては、カビとして生育する真菌または酵母様の真菌であって、病気、例えば、白癬、ヒストプラスマ症、blastomycosis、アスペルギルス症、クリプトコックス症、スポロトリクス症、コクシジオイデス症、パラコクシジオイデス症、およびカンジダ症の原因となる真菌が挙げられる。

#### 【0086】

本法はまた、寄生虫感染症、例えば、体内寄生条虫、血液寄生吸虫、組織寄生回虫、アメーバ、およびプラスモジウム、トリパノソーマ、リーシュマニア、およびトキソプラスマ種などによって誘発される感染を含む、感染症の治療に利用することが可能である。対象とされる寄生虫は、葉酸受容体を発現し、葉酸塩またはブテロイン酸、または葉酸塩またはブテロイン酸の誘導体に結合するものである。

#### 【0087】

抗活性性を有し、細菌細胞壁前駆体に特異的に結合することが知られるペニシリンおよびセファロスポリンも、本発明に従って使用される、単離リガンド-フルオレセイン結合体の調製において、リガンドとして使用することが可能である。この単離リガンド-フルオレセイン結合体は、内因性病原体を抱える細胞集団であって、病原体特異的抗原が、該病原体を宿す細胞の表面に優勢に発現され、かつ、該抗原に対して特異的に結合するリガンドに対し受容体として働く細胞集団を指向することが可能である。

#### 【0088】

例示として、本法は、ヒトの臨床医学と、獣医学的応用の両方のために使用することが可能である。従って、病原性微生物の集団を抱え、かつ、単離リガンド-フルオレセイン結合体によって治療される宿主動物は、ヒトであってもよいし、あるいは、獣医学的応用の場合には、実験動物、農業動物、飼養動物、または野生動物であってもよい。本法は、宿主動物、例えば、ヒト、実験動物、例えば、げっ歯類(例えば、マウス、ラット、ハムスター等)、ウサギ、サル、チンパンジー、飼養動物、例えば、イヌ、ネコ、およびウサギ、農業動物、例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、および、捕獲された野生動物、例えば、クマ、パンダ、ライオン、トラ、ヒョウ、ゾウ、シマウマ、キリン、ゴリラ、

イルカ、およびクジラを含む、ただしこれらに限定されない、宿主動物に対して適用することが可能である。

#### 【0089】

例示として、単離リガンド-フルオレセイン結合体は、宿主動物に対し、非経口的に、例えば、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、または静脈内に投与される。もう一つの実施態様では、この結合体は、宿主動物に対し、他の医学的に有用な過程によって投与することが可能であり、また、有効であれば任意の用量で、適切であれば任意の剤形において、例えば、徐放剤形を含む剤形において、使用することが可能である。本法は、腫瘍の外科的切除、放射線治療、化学療法、または、生物学的な治療、例えば、他の免疫療法、例えば、モノクロナール抗体治療、免疫変調剤による治療、免疫エフェクター細胞の同系輸送、造血増殖因子、サイトカイン、およびワクチン接種を含むがこれらに限定されない、治療と組み合わせて用いることも可能である。10

#### 【0090】

例示として、適切なリガンドとしては、葉酸、葉酸の類縁体および誘導体、および、他の葉酸受容体結合性分子、例えば、ブテロイン酸およびその誘導体、および、その他のビタミン類が挙げられる。葉酸塩およびブテロイン酸誘導体としては、葉酸受容体結合性ブテリジン、例えば、テトラヒドロブテリン、ジヒドロフォレート、テトラヒドロフォレート、およびこれらのデアザおよびジデアザ類縁体が挙げられる。「デアザ」および「ジデアザ」類縁体という用語は、天然の葉酸構造において、一つの炭素原子によって、一つ以上の窒素原子が置換された、従来技術で認知済みの類縁体を指す。例えば、デアザ類縁体としては、1-デアザ、3-デアザ、5-デアザ、8-デアザ、および10-デアザ類縁体が挙げられる。ジデアザ類縁体としては、1,5ジデアザ、5,10-ジデアザ、8,10-ジデアザ、および5,8-ジデアザ類縁体が挙げられる。上記誘導体は、葉酸受容体に結合する。本明細書に記載される方法において有用な他の誘導体としては、葉酸受容体結合性類縁体、例えば、アミノブテリン、アメトブテリン(メトトレキセート)、N<sup>10</sup>-メチルフォレート、2-デアミノ-ヒドロキシフォレート、デアザ類縁体、例えば、1-デアザメトブテリンまたは3-デアザメトブテリン、および3',5'-ジクロロ-4-アミノ-4-デオキシ-N<sup>10</sup>-メチルブテロイルグルタミン酸(ジクロロメトトレキセート)が挙げられる。20

#### 【0091】

リガンドとして使用が可能な他の適切なビタミンとしては、ニアシン、パントテン酸、リボフラビン、チアミン、ビオチン、ビタミンB<sub>12</sub>、および脂溶性ビタミンA、D、E、およびKが挙げられる。(米国特許第5,108,921、5,416,016、5,635,382、および5,688,488号を参照されたい。なお、これらを引用することにより本明細書に含める。)これらのビタミン、およびそれらの受容体結合性類縁体および誘導体は、本明細書に記載される手順に従って、フルオレセインに結合させることができる。30

#### 【0092】

その他の適切なリガンドとしては、ライプラリースクリーニングによって特定されるペプチドリガンド、腫瘍特異的ペプチド、腫瘍特異的アプタマー、腫瘍特異的糖質、腫瘍特異的モノクロナールまたはポリクロナール抗体、抗体のFabまたはscFv(すなわち、単鎖可変領域)断片、例えば、転移癌細胞の上に特異的に発現される、またはそれを通じて転移癌細胞に一意に接近が可能な、EphA2またはその他のタンパクを指向する抗体のFab断片、組み合わせライプラリーから得られる有機小分子、EGF、FGFのような増殖因子、インスリンおよびインスリン様増殖因子、および相同ポリペプチド、ソマトスタチンおよびその類縁体、トランスフェリン、脂質タンパク複合体、胆汁酸塩、セレクチン、ステロイドホルモン、Arg-Gly-Asp含有ペプチド、レチノイド、各種ガレクチン、-オピオイド受容体リガンド、コレシストキニンA受容体リガンド、アンギオテンシンAT1またはAT2受容体に対して特異的なリガンド、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体リガンド、-ラクタム系抗生物質、抗菌剤を含む有機小分子、および、他の、腫瘍細胞、感染性微生物の表面に優勢に発現される受容体に対して特異的に結合する分子、または、それらの分子の内の任意の分子断片、などが挙げられる。4050

## 【0093】

感染性微生物に結合するリガンドの場合において興味のあるのは、従来技術において、微生物に好んで結合する傾向のあることが知られる、任意の分子、例えば、抗体またはその他の薬剤である。本法はまた、受容体であって、腫瘍、細菌、ウィルス、マイコプラズマ、真菌、寄生虫、またはその他の病原の表面に優勢に発現される受容体、または他の細胞表面タンパクの結晶構造に基づいて、特定の受容体の結合ポケットに適合するよう10に設計された分子、例えば、抗菌剤、であるリガンドにも適用される。任意の腫瘍抗原、または、腫瘍細胞表面に好んで発現される他のリガンドも利用が可能であることが理解される。リガンドは、受容体が、病原細胞の上においてリガンド結合が可能なように優勢に発現されることによって、宿主細胞における病原細胞集団を特異的に除去することが可能となっていなければならない。病原細胞の除去を最大化するように、複数の単離リガンド-フルオレセイン結合体の組み合わせを用いることも考慮の対象となる。

## 【0094】

例示として、本明細書に記載される方法は、免疫原物質としてフルオレセイン、またはその誘導体を用いる。フルオレセインおよびその誘導体は、宿主動物において抗体生産を惹起することが可能か、あるいは、受動的に投与される抗体に対して結合することが可能でなければならない。一つの例示実施態様では、宿主動物は、この非天然抗原（すなわち、フルオレセイン）に対する免疫化を通じて新規な免疫を発達させることができある。能動的免疫化は、新規免疫反応を誘導するために、通常のワクチン接種スケジュールとは別に投与予定が組まれる、非天然抗原の複数回の注入を含む。従って、単離リガンド-フルオレセイン結合体を用いると、以前に獲得された体液性または細胞性免疫を、宿主動物における病原細胞に向け、そうすることによって外来細胞または病原微生物を除去することが可能である。  
20

## 【0095】

宿主動物が、非天然抗原（すなわち、フルオレセイン）に対する免疫化を通じて新規免疫を発達させる実施態様では、新規免疫を確立するために、宿主動物に対し、ハプテンであるフルオレセインを免疫原性とするような担体に結合させたフルオレセインを用いて、あらかじめ免疫化してもよい。フルオレセインに対する新規免疫を強化するために、この担体-フルオレセイン結合体と共に、当業者に既知の任意のアジュバント、例えば、フロイントのアジュバント、サボニンアジュバント、Alum（登録商標）（Pierce Chemical Co.）等を投与することも可能である。例示として、使用が可能な担体としては、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、*haliotis tuberculata*（トコブシ）ヘモシアニン（HtH）、不活性化ジフテリア毒素、不活性化破傷風トキソイド、*Mycobacterium tuberculosis*（ヒト結核菌）の精製タンパク誘導体（PPD）、ウシ血清アルブミン（BSA）、卵白アルブミン（OVA）、g-グロブリン、サイログロブリン、ペプチド抗原、および、合成担体、例えば、ポリ-L-リシン、デンドリマー、およびリポソーム、が挙げられる。  
30

## 【0096】

担体（例えば、KLHまたはBSA）は、複合体を形成するための、任意の、従来技術で認知済みの方法を用いてフルオレセインに結合されてよい。このような結合としては、担体がフルオレセインに対して、直接的に、または、結合基、例えば、2価のリンカーを介して間接的に行われる、共有結合、イオン結合、または水素結合、が挙げられる。例示として、フルオレセイン-担体結合体の形成は、結合体のそれぞれの成分における、酸、アルデヒド、ヒドロキシ、アミノ、またはヒドロゾ基同士の間の、アミド、エステル、またはイミノ結合の形成による共有結合によって行われる。リンカーが用いられる実施態様では、リンカーは、約1から約30個の炭素原子、または約2から約20個の炭素原子を含むことが可能である。より低い分子量のリンカー（すなわち、約20から約500の分子量を持つもの）も使用が可能である。リンカーはまた、担体をフルオレセインに連結するための間接手段、例えば、中間リンカー、スペーサーアーム、または架橋分子による接続等の手段を含んでもよい。  
40

## 【0097】

10

20

30

40

50

担体-フルオレセイン結合体については、少なくとも1種のビスフルオレセイン混入物を除去するために、当業者に既知の任意の方法によって精製されてもよい。例示として、担体-フルオレセイン結合体からビスフルオレセイン混入物または不純物を除去するために限外ろ過工程を使用することが可能である。ビスフルオレセイン混入物を含まないように精製された、これらの担体-フルオレセイン結合体を含む医薬組成物は、本発明の考慮の対象となる。

#### 【0098】

もう一つの例示の実施態様では、受動免疫を確立するために、フルオレセインに向けられた抗体が宿主動物に投与されてもよい。この抗体は、血清から収集された天然の抗体であってもよいし、あるいは、下記のようなモノクロナール抗体であってもよい。すなわち、遺伝子工学的に加工された抗体、例えば、ヒト化抗体を含む人工抗体であってもよいし、またはなくともよいモノクロナール抗体である。受動免疫を活性化するために、ある特定量の抗体試薬を利用すること、および、受動的に投与された抗体がフルオレセインに向けられるように、単離リガンド-フルオレセイン結合体を使用することは、患者において誘導された抗体力価が治療的に有用でない場合に用いられる、標準的な試薬セットにおいて得られる利点を提供する。受動的に投与される抗体は、単離リガンド-フルオレセイン結合体と「同時投与」されてもよく、ここで同時投与とは、単離リガンド-フルオレセイン結合体の投与に先だって、同時に、または、続いて行われる、抗体の投与と定義される。

#### 【0099】

単離リガンド-フルオレセイン結合体は、病原細胞集団の、内因性の免疫反応介在性の除去を強化する。内因性免疫反応としては、体液反応、細胞性免疫反応、および、宿主動物に内在する、他の任意の免疫反応、例えば、補体介在性細胞分解、抗体依存性細胞傷害（ADCC）、食作用をもたらす抗体オプソニン作用、アポトーシスシグナルをもたらす、抗体結合による受容体の集塊化、抗増殖または分化、輸送されたハプテンに対する、免疫細胞の直接認識、が挙げられる。内因性免疫反応が、免疫細胞の増殖および移動のような過程を調節する、サイトカインの分泌を用いることも考慮の対象とされる。内因性免疫反応は、複数の免疫細胞タイプの参加、例えば、B細胞、T細胞、例えば、ヘルパーおよび細胞傷害性T細胞を含むT細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、好中球、LAK細胞等の参加を含むことが可能である。

#### 【0100】

腫瘍細胞または感染性微生物に対し、単離リガンド-フルオレセイン結合体を高密度に結合させることによって、誘導された抗体、または受動的に投与される抗体を、これらの侵入細胞または微生物を改めて指向させること、および、補体性分解、ADCC、抗体依存性食作用、または、抗体による受容体の集塊化によって病原細胞の殺戮を実現することも、考慮の対象となる。この細胞傷害過程はさらに、他のタイプの免疫反応、例えば、細胞免疫のほかにも、二次免疫、すなわち、引き寄せられた抗原提示細胞が不要な細胞を食べ、免疫系に、天然の腫瘍抗原または外来病原体の抗原を提示して、それらの抗原を担持する細胞または微生物を除去させる二次免疫を含んでもよい。

#### 【0101】

病原細胞集団の、内因性免疫反応介在性の除去を強化するために、治療因子を含有する少なくとももう1種の組成物を、上に詳述した方法論と組み合わせて宿主に投与してもよいし、あるいは、1種を超える治療因子を投与してもよい。この治療因子は、内因性免疫反応を刺激することが可能な化合物、化学療法剤、抗菌剤、または、投与される単離リガンド-フルオレセイン結合体の効力を補充することが可能な、他の治療因子の中から選ぶことが可能である。本明細書に記載される方法は、前述の結合体のほかにも、内因性免疫反応を刺激することが可能な化合物または組成物、例えば、サイトカインまたは免疫細胞増殖因子、例えば、インターロイキン1-18、幹細胞因子、基本的FGF、EGF、G-CSF、GM-CSF、FLK-2リガンド、HILDA、MIP-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、TGF- $\alpha$ 、M-CSF、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、可溶性CD23、LIF、およびそれらの組み合わせを含む、ただしこれらに限定されない化合物

10

20

30

40

50

物または組成物を、宿主に投与することによって実現される。

#### 【0102】

例示の一実施態様では、これらのサイトカインの治療的に有効な組み合わせが使用される。これらのサイトカインの治療的に有効な組み合わせも使用される。一つの実施態様では、治療的有効量の、例えばIL-2が、1日当たり複数回投与処方において、約0.1 MIU/m<sup>2</sup>/投与/日から約60 MIU/m<sup>2</sup>/投与/日の範囲の量として、また、例えばIFN- $\gamma$ が、1日当たり複数回投与処方において、約0.1 MIU/m<sup>2</sup>/投与/日から約10 MIU/m<sup>2</sup>/投与/日の範囲の量として、使用できる(MIU=100万国際単位、m<sup>2</sup>=平均的ヒトのおよその体表面積)。もう一つの実施態様では、治療的有効量のIL-12およびIFN- $\gamma$ が使用され、さらにもう一つの実施態様では、治療的有効量のIL-15およびIFN- $\gamma$ が使用される。もう一つの実施態様では、IL-2、IFN- $\gamma$ またはIFN- $\alpha$ 、およびGM-CSFが組み合わせて使用される。使用される治療因子(单数または複数)、例えば、IL-2、IL-12、IL-15、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、およびGM-CSFは、それらの組み合わせを含め、ナチュラルキラー細胞および/またはT細胞を活性化することが可能である。それとは別に、治療因子またはそれらの組み合わせは、例えばインターフェロンおよびGM-CSFと組み合わせたインターロイキンを含め、他の免疫エフェクター細胞、例えば、マクロファージ、B細胞、好中球、NK細胞、NKT細胞、T細胞、LAK細胞等を活性化することが可能である。他のインターロイキンおよびインターフェロンおよびコロニー刺激因子の組み合わせを含め、他にも効果的であれば、どのようなサイトカインの組み合わせであっても、その使用は考慮の対象とされる。10

#### 【0103】

それ自体が細胞傷害性であり、腫瘍の透過性を上げるように動作し、本法において使用するのに好適な化学療法剤としては、副腎皮質ホルモン、アルキル化剤、抗アンドロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン、エストロゲン、代謝拮抗物質、例えばシトシンアラビノシド、プリン類縁体、ピリミジン類縁体およびメトトレキセート、ブスルファン、カルボプラチニン、クロラムブシリ、シスプラチニンおよびその他の白金化合物、タモキシフェン、タキソール、シクロフォスファミド、植物アルカロイド、プレドニゾン、ヒドロキシ尿素、テニポシド、抗生物質、例えばマイトイシンCおよびブレオマイシン、ナイトロジエンマスターード、ニトロソ尿素、ビンクリスチン、ビンプラスチニン、炎症剤および炎症促進剤、および、他の、任意の、従来技術で認知済みの化学療法剤が挙げられる。本明細書に記載される結合体の投与に対して補佐的に投与される、他の治療剤としては、ペニシリン類、セファロスボリン類、バンコマイシン、エリスロマイシン、クリンダマイシン、リファンピン、クロラムフェニコール、アミノグリコシド、ゲンタマイシン、アンフォテリシンB、アシクロビル、トリフルリジン、ガンシクロビル、ジドブジン、アマンタジン、リバビリン、および、他の、任意の、従来技術で認知済みの抗菌化合物が挙げられる。2030

#### 【0104】

例示の一実施態様では、病原細胞集団の除去は、治療反応をもたらす、腫瘍塊または病原微生物の低減または除去を含む。腫瘍の場合、除去は、一次腫瘍細胞の除去、または、転移した細胞、または、一次腫瘍から解離しつつある細胞の除去を含む。任意の治療法、例えば、腫瘍の外科的切除、放射線治療、化学療法、または生物学的療法による、腫瘍除去を行った後の、腫瘍の再発を阻止するための予防処置も考慮の対象となる。予防処置は、単離リガンド-フルオレセイン結合体による初回治療、例えば、1日当たり複数回投与処方による治療、および/または、初回治療(单複)の後に数日または数ヶ月の間隔を置いて施される、追加の治療、または一連の治療であってもよい。40

#### 【0105】

もう一つの例示の実施態様では、宿主動物における病原細胞集団を「標識」し、そうすることによって内因性免疫反応によるか、または同時投与される抗体による特異的除去を実現するのに有効な量の、単離リガンド-フルオレセイン結合体を含む、医薬組成物が提供される。もう一つの実施態様では、組成物はさらに、病原細胞の除去を促進するのに有効な量の追加の因子、すなわち、殺細胞性因子、腫瘍浸透強化剤、化学療法剤、抗菌剤、細胞傷害性免疫細胞、および、内因性免疫反応を刺激することが可能な化合物、から成る50

グループから選ばれる因子を含んでもよい。この医薬組成物は、治療的有効量の、単離リガンド-フルオレセイン結合体と、治療因子とを含み、該因子は、サイトカイン、例えば、IL-2、IL-12、またはIL-15を含んでもよく、あるいは、IL-2、IL-12、またはIL-14を含むサイトカインと、IFN- $\alpha$ またはIFN- $\beta$ のようなインターフェロンとの組み合わせ、および、インターフェロン、インターロイキン、およびGM-CSFのようなコロニー刺激因子の組み合わせを含んでもよい。

#### 【0106】

単離リガンド-フルオレセイン結合体の、毎日の単位用量は、宿主の状態、治療される病状、投与ルートと組織分布、および他の治療処置、例えば、放射線治療との併用の可能性に応じて、大きく変動してよい。患者に投与される有効量は、体表面積、患者の体重、および、患者の状態に関する医師の評価に依存する。有効量は、約1 ng/kgから約1 mg/kg、約1 μg/kgから約500 μg/kg、または、約1 μg/kgから約100 μg/kgの範囲に亘ってもよい。

10

#### 【0107】

誘導された抗体を腫瘍細胞または感染性微生物に向けるために、または、フルオレセインに対する体液性反応を誘導するために、単離リガンド-フルオレセイン結合体の投与のために有効な、任意の投与処方を用いることが可能である。例えば、単離リガンド-フルオレセイン結合体および治療因子は、単一用量として投与されてもよいし、あるいは、分割されて、複数回の1日用量の処方として投与されてもよい。さらに、連日治療に代わるものとして、不規則処方、例えば、週当たり1から3日の処方を用いてもよく、このような断続的な、または不規則な連日投与処方も、毎日の治療と等価と見なされる。一つの実施態様では、病原細胞集団を除去するために、単離リガンド-フルオレセイン結合体と治療因子とを複数回注入することによって宿主を治療する。もう一つの実施態様では、宿主に、単離リガンド-フルオレセイン結合体を複数回（好ましくは、約2から約50回）、例えば、12 - 72時間、または48 - 72時間の間隔を置いて注入する。この患者に対し、初回の注入（单複）後に数日または数ヶ月の間隔を置いて、単離リガンド-フルオレセイン結合体の追加注入を投与することが可能であり、この追加注入は、病気の再発を予防することが可能である。それとは別に、単離リガンド-フルオレセイン結合体の初回注入（单複）が病気の再発を予防してもよい。

20

#### 【0108】

30

例示として、治療因子は、単離リガンド-フルオレセイン結合体の投与に先だって、引き継いで、または同時に投与されてもよく、かつ、治療因子は、結合体を含む同じ組成物の一部として投与されてもよいし、あるいは、単離リガンド-フルオレセイン結合体とは別の組成物の一部として投与されてもよい。本法においては、その治療組成物が治療因子を治療的に有効な用量において含むものであれば、任意の治療組成物の使用が可能である。さらに、1種を超える単離リガンド-フルオレセイン結合体の使用が可能である。例えば、ブテロイン酸-フルオレセイン結合体と、リボフラビン-フルオレセイン結合体とを組み合わせて使用することも可能である。治療因子は、化学療法剤および抗菌剤の場合には、宿主動物における該化学療法剤または抗菌剤に対する耐性の発達を回避するために、最適用量以下の用量で、併用療法において単離リガンド-フルオレセイン結合体と共に投与されてもよい。

40

#### 【0109】

例示として、単離リガンド-フルオレセイン結合体と治療因子とは、非経口的に注入されてもよく、その注入は、腹腔内注入、皮下注入、筋肉内注入、静脈内注入、または硬膜下腔内注入であってもよい。単離リガンド-フルオレセイン結合体と治療因子とはまた、緩やかなポンプによって輸送されてもよい。非経口剤形の例としては、等張生食液、5%グルコース、またはその他の、公知の製薬学的に受容可能な液性担体、例えば、液体のアルコール、グリコール、エステル、およびアミド等に溶解した、活性薬剤の水性溶液が挙げられる。非経口剤形は、単離リガンド-フルオレセイン結合体および治療因子の用量を含む、再構成可能な凍結乾燥体の形を取ってもよい。本実施態様の一態様では、従来技術で

50

既知の、任意の各種の徐放剤形、例えば、米国特許第4,713,249、5,266,333、および5,417,982号に記載されるような生分解性炭水化物基質を含む剤形が投与されてよい。なお、これらの特許文書を引用することにより本明細書に含める。

#### 【0110】

もう一つの例示の実施態様では、宿主動物が担体-フルオレセイン結合体によってあらかじめ免疫化されている場合、結合体の中のフルオレセイン成分に対して新規な免疫を確立するのに有効な量の、単離された担体-フルオレセイン結合体を含む、医薬組成物が提供される。この担体-フルオレセイン結合体は、上述の投与量または剤形から選ばれる任意の量または剤形として使用が可能であり、かつ、前述の投与処方から選ばれる任意の処方に従って投与することが可能である。

10

#### 【実施例】

#### 【0111】

別様に注記しない限り、全ての反応は室温において行われ；留去は全て減圧下または真空中で行われた；また、実施例の化合物は、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、元素分析、分析的HPLC、UV吸収、および／または蛍光を適宜用いて分析した。

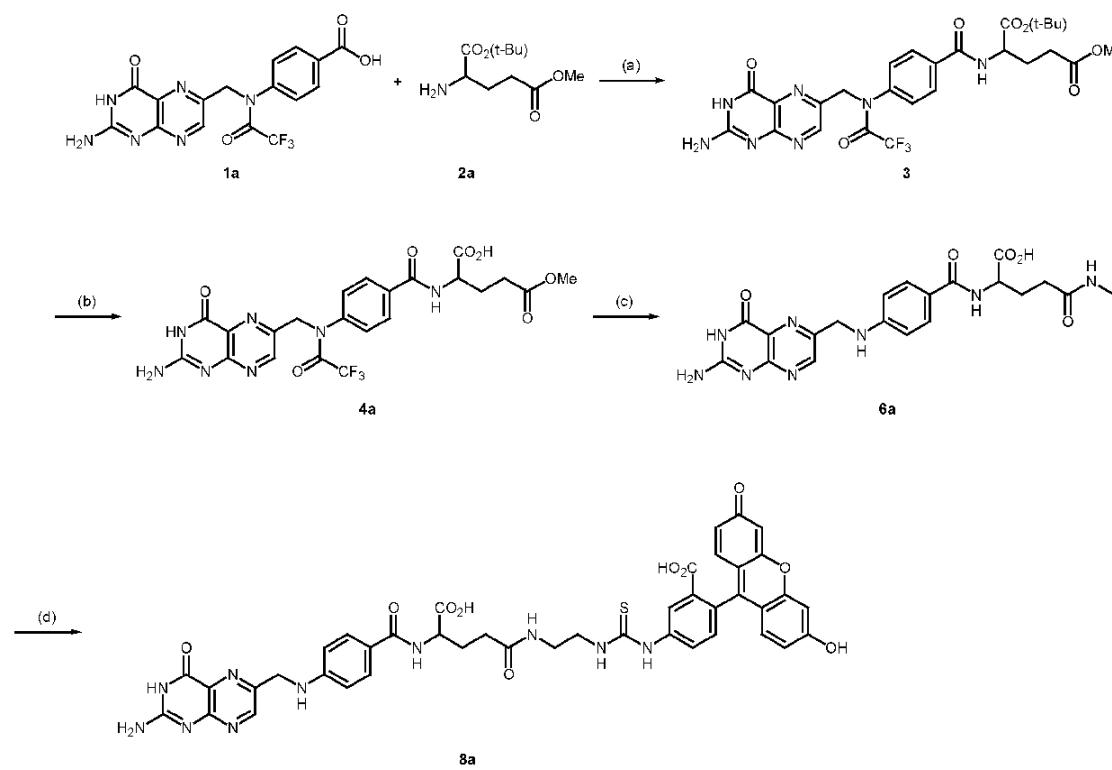
#### 【0112】

<実施例1：ブテロイルグルタメートからの化合物8aの合成>

#### 【0113】

#### 【スキーム4】

スキーム4



#### 【0114】

工程(a)：<sup>N</sup><sup>10</sup>-保護ブテロイン酸1a(119 g, 0.25 mol)、および、DMF(4L)に溶解した、グルタメートの-tert-ブチル、-メチルジエステル(2a, 76g, 0.30 mol)をPyBop(171 g, 0.325 mol)およびDIPEA(109 mL, 0.60 mol)で処理した。18時間後、この混合物を留去したところ、1:1 ACN/メチルtert-ブチルエーテル(MTBE)からジエステル3aが沈殿として得られた。

#### 【0115】

工程(b)：ジエステル3aのtert-ブチル保護基を、ポリ(4-ビニールピリジン)の存在下に1:1 TFA/無水DCMにて化学選択的に除去すると、1:1石油エーテル/MTBEから-酸、-工

20

30

40

50

チルエステル類縁体4aが沈殿として得られた。

【0116】

工程(c)： -酸、 -エチルエステル類縁体4aおよびエチレンジアミン(5a)の混合物を2時間攪拌したところ、EDA-葉酸類縁体6aが形成された。同時に、この反応の際に、N<sup>10</sup>-トリフルオロアセタミド保護基も除去された。化合物6aは、要すれば任意に、DEAE-セルロース固相支持体、例えば、DE52(Whatman、カタログ番号4057-200)によるカラムクロマトグラフィーを用いてさらに精製して、残留するエチレンジアミン(5a)を除去してもよい。

【0117】

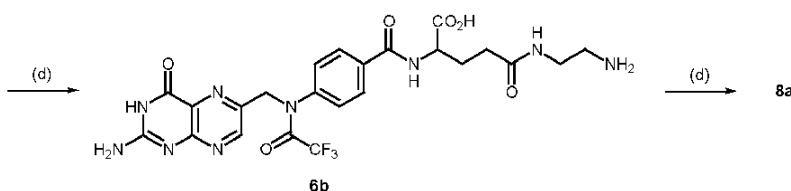
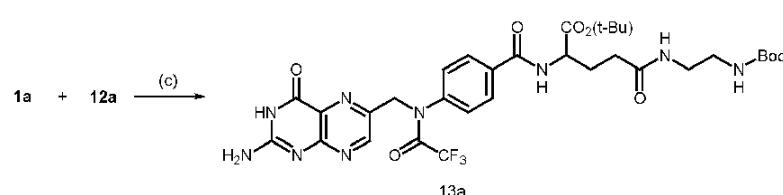
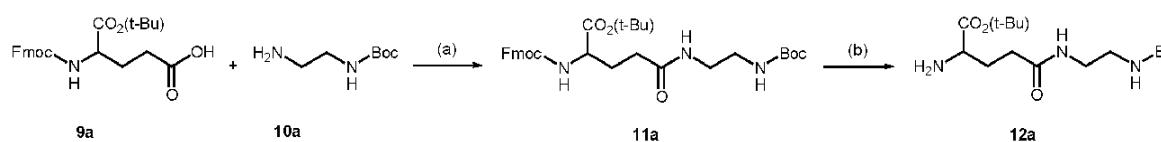
工程(d)：EDA-葉酸類縁体6aを、DMSOに溶解したDIPEAおよび1,1,3,3-テトラメチルグアニジン(TMG)の存在下に、フルオレセインイソチオシアネート(FITC, 7)と縮合したところ8a(218 g)が得られた。これを、1:1 ACN/MTBEから沈殿として収集した。葉酸塩-FITC 8aを、逆相カラムクロマトグラフィー(Biotage C18カートリッジ、100 mMリン酸ナトリウムバッファー／アセトニトリルを移動相として使用)にて精製した。8aを含む分画は、UV吸収(280 nm)にて検出し、プールした。揮発性溶媒を留去し、残留物を、逆相カラムクロマトグラフィー(Biotage C18カートリッジ、水／アセトニトリルを移動相として使用)にて脱塩した。揮発性溶媒を留去し、残留物を凍結乾燥したところ47 g(22%総収率)の8aが得られた。HPLC (Nova-Pak C18カラム、10 mM酢酸アンモニウム／アセトニトリルを移動相として使用)から試料の純度は98%を超えることが示され、かつ、ビスフルオレセイン誘導体IIIa(n=1)は、UVまたは蛍光計測によって検出されなかった。

【0118】

<実施例2：グルタミルエチレンジアミンからの8aの合成>

[スキーム5]

スキーム5



【0119】

工程(a)：THFに溶解した、保護されたグルタミン酸9aおよび保護されたエチレンジアミン10aの混合物を、PyBOPおよびジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)によって処理した。反応混合物をEtOAcで抽出することによってアミド11aを単離した。有機相をまとめて留去したところアミド11aが得られた。

【0120】

工程(b)：アミド11aを、室温において、塩化メチレンに溶解したジアザビシクロウンデカン(DBU)で処理してFmoc保護基を除去した。混合液を留去したところアミン12aが得られた。これは、要すれば任意に精製されてもよい。別法として後述するように、工程(b)-(d)

10

20

30

40

50

)は、精製無しのワンポット反応として単一操作で実行してもよい。

**【0121】**

工程(c)：工程(b)で得られた、アミン12aを含む残留物、または、任意に精製された試料を、DMFに溶解し、PyBOPおよびDIPEAを用いてN<sup>10</sup>-トリフルオロアセチルブテロイン酸(1a)と結合させた。この反応混合物を留去したところ葉酸類縁体13aが得られてもよい。これは、要すれば任意に精製される。別法として後述するように、工程(c)-(d)は、精製無しのワンポット反応として単一操作で実行してもよい。

**【0122】**

工程(d)：工程(c)で得られた、葉酸類縁体13aを含む残留物、または任意に精製された試料を、塩化メチレンに溶解し、陽イオンスカベンジャーとしてのトリフルオロ酢酸(TFA)およびポリ(4-ビニールピリジン)で処理し、Bocおよびtert-ブチル保護基を同時に除去した。二重沈殿(ブチルt-ブチルエーテル、次に1:1メチルt-ブチルエーテル/CH<sub>3</sub>CN)を行ったところ、アミン6bが淡黄色固体として得られた。

**【0123】**

工程(e)：アミン6bを、フルオレセインイソチオシアネート(7)と縮合させたところ、対応するN<sup>10</sup>-トリフルオロアセタミドで保護された類縁体である8aが得られた。これを、沈殿として収集した。この沈殿を水に溶解し、pHを約10以上に上げたところ、N<sup>10</sup>-トリフルオロアセチル保護基が加水分解され、8aが得られた。

**【0124】**

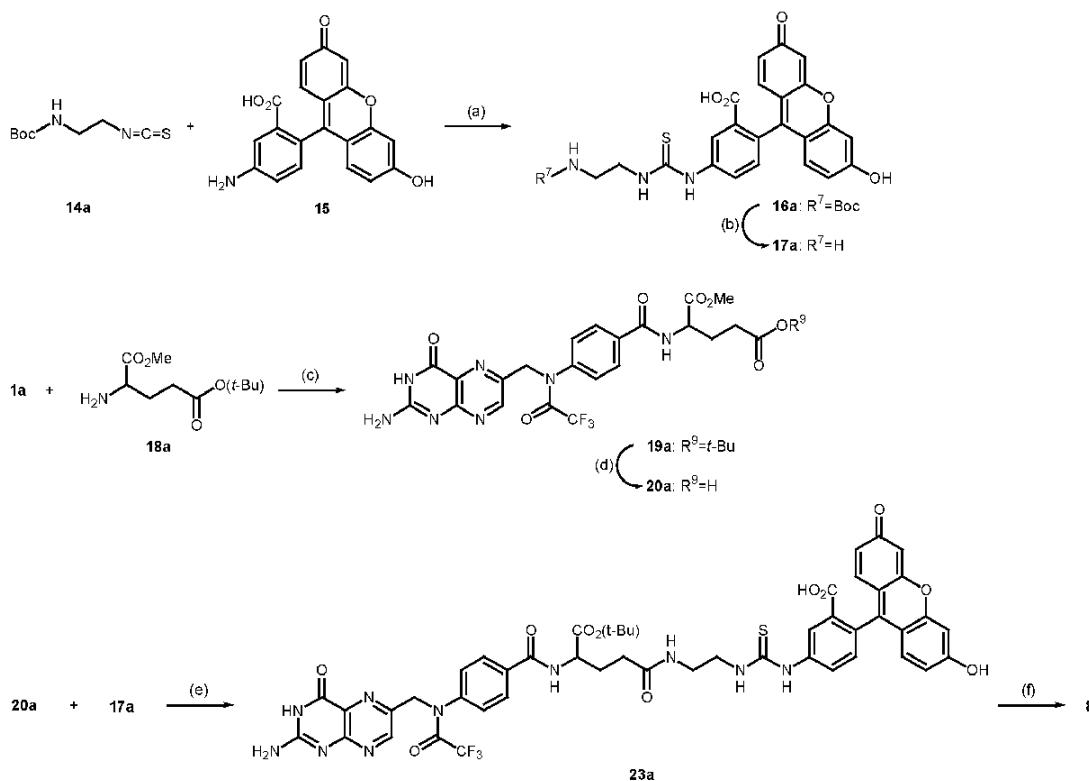
葉酸-FITC 8aを、逆相HPLC(XTerraカラム、90:10 10 mMリン酸ナトリウムバッファー/アセトニトリルを移動相として使用)で精製した。8aを含む分画をUV吸収(280nm)で検出し、プールした。揮発性溶媒を留去した。残留物を、逆相HPLC(XTerraカラム50:50 水/アセトニトリルを移動相として使用)にて脱塩した。揮発性溶媒を留去し、残留物を凍結乾燥したところ8aが橙色固体として得られた。

**【0125】**

<実施例3：エチレンジアミンイソチオシアネートからの8aの合成>

[スキーム6]

スキーム6



10

20

30

40

50

## 【0126】

工程(a) : EtOHに溶解した、Boc-保護アミノエチルイソチオシアネート(14a, 1.5 mmol)およびフルオレセインアミン(15, 異性体-I、0.3 mmol)の混合物を、還流下に24時間加熱した。EtOH溶媒を留去し、残留物を水に溶解したところ、pHが約10となった。この水相をEtOHで洗浄し、水層のpHを、酸の添加によって4.0に調整したところ、Boc-保護アミン16aが沈殿として得られた。これを凍結乾燥した(収率70%)。

## 【0127】

工程(b) : Boc-保護アミン16aを乾燥CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>に懸濁し、ポリ-(4-ビニールピリジン)を加え、次にトリフルオロ酢酸をゆっくり加えた。得られた、透明黄色溶液を3時間攪拌した。この反応混合液をろ過し、1:1メチルt-ブチルエーテル(MTBE) / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>にて沈殿させた。沈殿をMTBEで洗浄し、高真空下で乾燥したところ、定量的収率にてアミン17aが得られた。

## 【0128】

工程(c) : PyBop (1.01 mmol)およびグルタミン酸(0-t-Bu)OMe(1.01 mmol)を、DMFに懸濁したN<sup>10</sup>-TFA-プロロイン酸(0.84 mmol)の懸濁液に順に加えた。得られた透明な溶液を、ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA, 2.02 mmol)で処理し、3時間攪拌した。減圧下にDMFを除去し、未精製の19aを、1:1 CH<sub>3</sub>CN/MTBEによって沈殿させた。この沈殿を、1:1 CH<sub>3</sub>CN/MTBEによって洗浄し、高真空下で乾燥したところ、定量的収率にて19aが得られた。

## 【0129】

工程(d) : 化合物19aを乾燥CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>に懸濁し、ポリ-(4-ビニールピリジン)およびトリフルオロ酢酸を順に加えた。得られた透明な黄色の溶液を2時間攪拌し、ろ過し、未精製の20aを、1:1 MTBE / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>によって沈殿させた。この沈殿を、MTBEによって洗浄し、高真空下で乾燥したところ20a(収率66%)が得られた。

## 【0130】

工程(e) : PyBop (0.052 mmol)およびDIPEA (0.20 mmol)を、乾燥DMFに溶解した葉酸類縁体20a (0.05 mmol)およびEDA-フルオレセイン17a (0.05 mmol)の溶液に同時に加えた。得られた溶液を2時間攪拌し、未精製の23aをMTBEによって沈殿させた。この沈殿を、MTBEによって洗浄し、高真空下で乾燥したところ、定量的収率にて23aが得られた。

## 【0131】

工程(f) : 化合物23a (0.05 mmol)を、0.5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH=10.6)の氷冷液で処理した。得られた明るい橙色溶液を4時間攪拌し、次いで、1M HClを添加することによってこの反応混合液のpHを約7.6-7.8に調整した。定量的HPLCカラム(溶出液: 5.0mM リン酸ナトリウム / ACN)によって精製したところ、化合物8aを含む精製分画が得られた。減圧下にACNを除去し、濃縮物を凍結乾燥したところ、8aが、橙色粉末として得られた(収率60%)。

## 【0132】

<実施例4: DEAEセルロース陰イオン交換固相支持体の前処置>

DEAEセルロース陰イオン交換固相支持体(例えば、DE32)を、カラムへの充填に先立つて、15倍容量の0.5M HCl溶液中でスラリー状にした。約0.5時間後、上清を傾瀉除去し、固相支持体を、洗浄液のpHが約4となるまで水で洗浄した。固相支持体を15倍容量の0.5M NaOH溶液中でスラリー状にした。約0.5時間後、上清を傾瀉除去し、固相支持体を、洗浄液のpHが約8となるまで水で洗浄した。

## 【0133】

<実施例5: DE32による葉酸からのプロロイン酸の精製>

乾燥した微細顆粒状のDE32陰イオン交換樹脂(DEAEセルロース、Whatmanカタログ番号6055-010)を、実施例4に記載する通りに前処理した。この前処理した樹脂を脱イオン水でスラリー状にし、減圧下に少なくとも1時間脱気し、ガラスカラム(25 x 900 mm)に均一に充填し、カラムに捕捉される気泡が最小となったことを確認した。カラムを移動相(1.0M NaCl / 0.01M NaOH, pH11.5)で平衡化した。プロロイン酸と葉酸を含む混合物(1.0g)を、約pH6において1.0M NaCl (1 mL)に部分的に溶解した。この混合物は、pHを11.5に調整

10

20

30

40

50

した後完全に溶解した。得られた溶液をカラムに負荷し、移動相 (1.0M NaCl/0.01M NaOH) によって溶出した。図1 A を参照すると、溶出はUV吸収(280 nm)によって監視した。葉酸は分画13-31において溶出し、プロテロイン酸は分画35-81において溶出すると判断した。図1 B を参照すると、分画35-75のそれぞれが、逆相HPLCで定量するとプロテロイン酸を含んでいた (99%を超える純度)。このHPLCでは、Nova-Pak C18, 3.9 x 150 mmカラムを用い、99:1から1:1 A/B濃度勾配 (Aは0.1% TFA-H<sub>2</sub>O溶液、Bは0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN溶液) で流速1 mL/分にて溶出し、280 nmで検出した。分画35-75をまとめ、このまとめた分画のpHを、1.0M HClを加えて約2に調整した。得られた沈殿のスラリーを遠心し、上清を傾瀉除去した (3回)。残留物を凍結乾燥したところ、プロテロイン酸0.40 gが得られた。

## 【0134】

10

## &lt;実施例6：DE52による葉酸からのプロテロイン酸の精製&gt;

あらかじめ膨潤させた、微細顆粒状DE52陰イオン交換樹脂 (DEAEセルロース、Whatman カタログ番号4057-200、6 kg) を、脱イオン水(12 L)と混合した。得られたスラリーを、減圧下に少なくとも1時間脱気し、ガラスカラム (100 x 1200 mm) に均一に充填し、カラムに捕捉される気泡が最小となったことを確認した。カラムを移動相 (1.0M NaCl, 0.01M NaOH, pH11.5) で平衡した。約25%の葉酸を含む未精製プロテロイン酸(40 g)を水(500 mL)に溶解し、NaOH溶液を添加することによってpHを11.5に調整した。この溶液をろ過し、カラムに負荷し、移動相によって溶出した。各分画を逆相HPLCによって監視した。プロテロイン酸を約95%を超える純度で含む分画をまとめ、1.0 M HCl溶液を加えることによってpHを約3に調整してプロテロイン酸を沈殿させた。沈殿を凍結乾燥したところ、プロテロイン酸が得られた (分析的逆相HPLCによる定量により20 g、純度>98%)。

## 【0135】

20

2ベッド容量の移動相を流すことによってカラムを再生した。約1週間以上保存されたカラムは、防腐剤、例えば、0.2%塩化ベンザルコニウム液で処理した。

## 【0136】

## &lt;実施例7：フルオレセインからの葉酸-フルオレセインの精製&gt;

あらかじめ膨潤させた、微細顆粒状DE52陰イオン交換樹脂 (DEAEセルロース、Whatman カタログ番号4057-200、1.8 kg) を、実施例6に記載する通りに前処理した。この前処理した樹脂を脱イオン水(4 L)中でスラリー状にし、減圧下に少なくとも1時間脱気し、ガラスカラム (75 x 600 mm) に均一に充填し、カラムに捕捉される気泡が最小となったことを確認した。カラムを移動相 (1.0M NaCl, NaOHにてpH9.0に調整) で平衡化した。約10%のフルオレセインおよび他の不純物を含む未精製葉酸-フルオレセイン結合体(47.9 g)を水(600 mL)に溶解し、1.0M NaOH溶液を添加することによってpHを9.0に調整した。この溶液をろ過し、カラムに負荷し、移動相によって溶出した。各分画を逆相HPLCによって監視した。葉酸-フルオレセイン結合体を約95%を超える純度で含む分画をまとめ、1.0 M HCl溶液を加えることによってpHを約3に調整し、このまとめた分画から葉酸-フルオレセイン結合体を沈殿させた。沈殿を凍結乾燥したところ8a(41.8 g)が得られた。

30

## 【0137】

## &lt;実施例8：HPLCによる8aの精製&gt;

未精製の8a(4 g)の試料を実施例1に記載するように調製し、定量的HPLCによって精製した。このHPLCでは、XTERRA 18, 30 x 300 mm 10 μmカラムを用い、30分間の100:0 ~ 91:9 A/B濃度勾配 (Aは100 mMリン酸ナトリウム(pH7.4)で、BはACN) で、流速35 mL/分で溶出した。溶出した化合物8aが分画として収集された。一方、ビスフルオレセイン誘導体はこの条件下では溶出されないので検出されなかった。各溶出分画は、UV検出器と蛍光検出器の両方を備えた分析的逆相HPLCによって監視した。UVによって98%を超える純度を持ち、UVまたは蛍光 (閾値が0.1%未満) によってEDA-ビスフルオレセインまたはビスフルオレセイン不純物を全く含んでいなかった分画をまとめた。約35 未満の温度でACNを留去した。カラムは、2ベッド容量以上の1:1 A/Bを流すことによって再生させた。

## 【0138】

得られた、リン酸塩を含む8aの溶液を、注入用100%水 (WFI) で平衡化したカラムを用

40

50

いた逆相HPLCによって精製した。このHPLCでは、WFIで30分溶出してリン酸塩を洗い出し、次いで、30分間の100:0~91:9 WFI/ACN 濃度勾配で流速35 mL/分で8aを溶出した。各分画は、UV検出器と蛍光検出器の両方を備えた分析的逆相HPLCによって監視した。UVによって98%を超える純度を持ち、蛍光によって0.05%未満のEDA-ビスフルオレセインまたはビスフルオレセイン不純物しか含んでいなかった分画をプールし、凍結乾燥したところ、8aが粉末として得られた。

#### 【0139】

<実施例9：単離された葉酸-フルオレセイン結合体の固体腫瘍の増殖に及ぼす作用>

6から8週齢（約20-22グラム）の雌性Balb/cマウス（グループ当たり8匹）を、市販のサポニンアジュバント（GPI-0100；Galenica）を使用し、フルオレセイン標識キーホールリソペットヘモシアニン（KLH）を複数箇所に皮下注射することによって免疫した。抗-フルオレセイン抗体力値が全てのマウスにおいて高いことを確かめた後で（マウスの血清サンプルに対するELISAアッセイの結果によって裏付けられた）、各マウスの肩の皮下に $1 \times 10^6$  個のM109細胞（高レベルの葉酸受容体を発現する、同系の肺癌細胞系統；0日目）を注入した。腫瘍細胞移植後における葉酸-フルオレセインによる免疫化は、ガンマカルボキシル-結合エチレンジアミン架橋を介して結合される葉酸-フルオレセイン500, 2000, または5000 nmol/kgを用いて行った。この葉酸-フルオレセイン結合体を24時間間隔で19回腹腔内投与した（1-19日目）。対照動物には、リン酸バッファー生食液（PBS）を注入した。免疫系を刺激するために、組み換えヒトIL-2の20,000 IU/日、1日ずつ連続5回の注入（週5回）を、全てのマウスに対して3週間続けた。組み換えヒトINF- $\gamma$ の25,000 U/日、連続3回の注入も、全てのマウスに対し3週間続けた。次に、この免疫療法の効力を、キャリパーを用いて腫瘍体積（mm<sup>3</sup>）を測ることによって評価した。図2に描かれる腫瘍増殖曲線は、IL-2およびIFN- $\gamma$ と組み合わせた葉酸-フルオレセインによって治療されると、動物の固体腫瘍の増殖が著明に抑制されることを示す。

#### 【0140】

<実施例10：DE52によるEDA-葉酸(6a)の精製>

あらかじめ膨潤させた、微細顆粒状DE52陰イオン交換樹脂（DEAEセルロース、SIGMA）を脱イオン水(12 L)と混合した。このスラリーを、減圧下に少なくとも1時間脱気し、ガラスカラム（100 x 1200 mm）に均一に充填し、カラムに捕捉される気泡が最小となったことを確認した。カラムをpH10.5においてNaOHで平衡化した。エチレンジアミン5aが混入したEDA-葉酸6aのサンプルを、中性pHにおいて水に部分的に溶解し、NaOH溶液を添加することによってpHを10.5に調整した後、完全に溶解した。このpH調整液を負荷した後、カラムを先ず、pH10.5のNaOH液3ベッド容量を用いて溶出し、次に、1.0 M NaCl/NaOH液（pH10.5）2ベッド容量にて溶出した。1.0 M NaCl/NaOH液（pH10.5）で溶出している間に得られた黄色の分画を収集してまとめた。このプールされた分画から、HCl溶液を加えることによってpHを約7に調節して、EDA-葉酸6aを沈殿させた。凍結乾燥した後、6aの小部分をフルオレセインと結合し、蛍光検出器を備えたHPLCによって分析した。式IIおよびIIIのEDA-ビスフルオレセイン化合物は検出されなかった。

#### 【0141】

<実施例11：カルシウムまたはマグネシウム塩としての、化合物8aの精製>

ナトリウム塩としての8a（純度84%）を、水に溶解した10-50 mol当量の塩化マグネシウムまたは塩化カルシウムで処理すると沈殿が得られた。混合物を90-100℃に加熱すると、沈殿は溶解して、黄色の液を形成した。これをろ過し、ゆっくりと室温まで冷却した。得られた黄色の個体をろ過し、水で洗浄し、凍結乾燥したところ、純度93-97%の8aが得られた。このカルシウムまたはマグネシウム塩は、イオン交換によってナトリウム塩に変換してもよい。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0142】

【図1A】図1Aは、プロトイン酸の精製において、DEAEセルロースカラム（DE32）から溶出された分画の280 nmにおけるUV吸収を示す。

10

20

30

40

50

【図1B】図1Bは、プロトイン酸の精製において、DEAEセルロースカラム（DE32）から溶出された分画38のC18逆相HPLCトレースを示す。

【図2】図2は、単離された葉酸-フルオレセイン結合体の、固体腫瘍の増殖に及ぼす効果を示す。

【図1A】

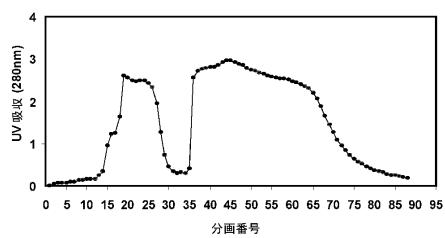


FIG. 1A

【図1B】

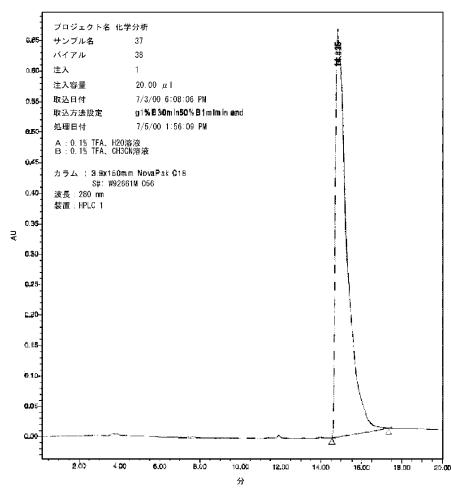


FIG. 1B

【図2】

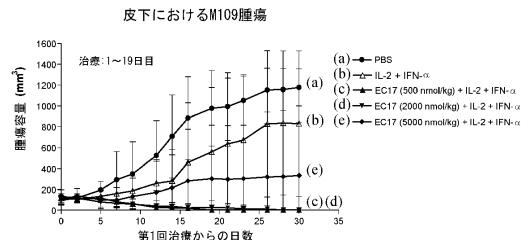


FIG. 2

フロントページの続き

(51) Int.CI.			F	I					
A	6	1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00			
A	6	1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04			
A	6	1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	31/10			
A	6	1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12			
A	6	1 P	33/02	(2006.01)	A 6 1 P	33/02			
A	6	1 P	33/10	(2006.01)	A 6 1 P	33/10			
A	6	1 P	33/14	(2006.01)	A 6 1 P	33/14			
A	6	1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/14			
A	6	1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/16			
A	6	1 P	31/22	(2006.01)	A 6 1 P	31/22			
A	6	1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	31/20			
A	6	1 P	33/12	(2006.01)	A 6 1 P	33/12			
B	0	1 J	41/20	(2006.01)	A 6 1 P	33/02	1	7	1
B	0	1 J	41/12	(2006.01)	A 6 1 P	33/02	1	7	3
					B 0 1 J	41/06			
					B 0 1 J	41/12			Z

(72)発明者 リーモン,クリストファー,ポール

アメリカ合衆国・インディアナ州 47906・ウエスト ラファイエット・ファーム リッジ  
ロード 5830

(72)発明者 サンサプラム,ハリ,クリシュナ

アメリカ合衆国・インディアナ州 47906・ウエスト ラファイエット・サンドパイパー ド  
ライブ サウス 1704

(72)発明者 リ, チュンホン

アメリカ合衆国・デラウェア州 19701・ベー・クリムゾン キング ドライブ 15

審査官 大野 晃

(56)参考文献 米国特許第 0 4 3 3 7 3 3 9 ( U S . A )

米国特許出願公開第2003/0162234(US.A1)

(58)調査した分野(Int.CI., DB名)

C 07D 475 / 04

A 61 K 31 / 519

Campus (STN)

## REGISTRY (STN)