

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6608823号
(P6608823)

(45) 発行日 令和1年11月20日(2019.11.20)

(24) 登録日 令和1年11月1日(2019.11.1)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/537 (2006.01)	A 6 1 K 31/537
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 0 7 D 498/18 (2006.01)	C 0 7 D 498/18
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68

請求項の数 51 (全 61 頁)

(21) 出願番号	特願2016-537780 (P2016-537780)	(73) 特許権者	515254806 レゲネロン ファーマシューティカルズ、 インコーポレーテッド アメリカ合衆国 ニューヨーク州 105 91-6707 タリタウン オールド ソウ ミル リバー ロード 777
(86) (22) 出願日	平成26年8月26日(2014.8.26)	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(65) 公表番号	特表2016-528304 (P2016-528304A)	(72) 発明者	トマス ニトリ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 109 65 パール リバー エヌ. リンコルン ストリート 236
(43) 公表日	平成28年9月15日(2016.9.15)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/052757		
(87) 国際公開番号	W02015/031396		
(87) 国際公開日	平成27年3月5日(2015.3.5)		
審査請求日	平成29年8月25日(2017.8.25)		
(31) 優先権主張番号	61/869,954		
(32) 優先日	平成25年8月26日(2013.8.26)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/934,313		
(32) 優先日	平成26年1月31日(2014.1.31)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

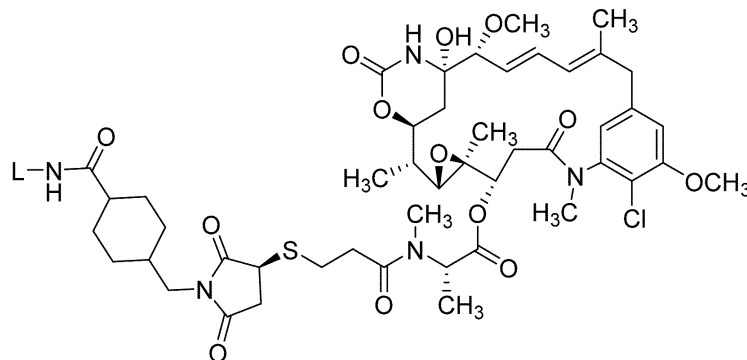
(54) 【発明の名称】 マクロライドジアステレオマーを含む医薬組成物、その合成方法、及び治療上の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式IIaの化合物を含む組成物であって：

【化1】



IIa

式中、Lは、抗体又はその抗原結合断片であり、かつ

式IIaの化合物が、50%より高いジアステレオマー過剰率で存在し、該ジアステレオマー過剰率が、式IIaの硫黄原子に結合されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有する少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含む組成物に基づく、前記組成物。

【請求項2】

Lが、腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片であり、さらに、該腫瘍関連抗原が、AFP、ALK、BAGEタンパク質、 β -カテニン、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、炭酸脱水酵素IX、カスパーゼ-8、CD20、CD40、CDK4、CEA、CLEC12A、cMET、CTLA4、サイクリン-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGEタンパク質、GD2、GD3、GloboH、グリピカン-3、GM3、gp100、HER2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、IGF1R、LGR5、LMP2、MAGEタンパク質、MART-1、メソセリン、ML-IAP、MUC1、MUC16又はCA-125、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ES01、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PDGFR- α 、PDGFR- β 、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA、FOLH1、RAGEタンパク質、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、サバイピン、TAG-72、TGF- β 、TMPRSS2、Tn、TNFRSF17、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼ、及びウロプラキン-3からなる群から選択される、請求項1記載の組成物。

10

【請求項3】

前記腫瘍関連抗原が、EGFRvIII、HER2、及びMUC16からなる群から選択される、請求項2記載の組成物。

【請求項4】

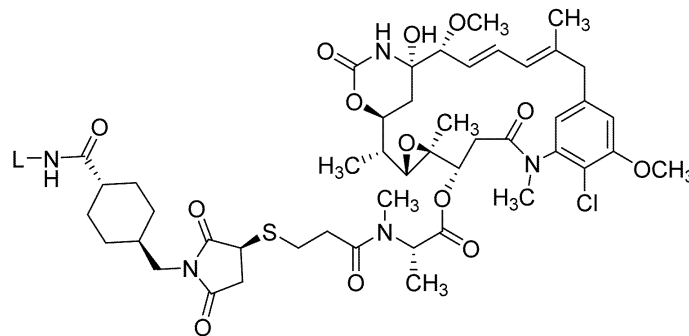
式IIaの化合物が、95%より高いジアステレオマー過剰率で存在し、該ジアステレオマー過剰率が、式IIaの硫黄原子に結合されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有する少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含む組成物に基づく、請求項3記載の組成物。

20

【請求項5】

ジアステレオマー過剰で存在する前記化合物が、以下の構造を有する式IIaの化合物である、請求項1～4のいずれか1項記載の組成物：

【化2】



30

【請求項6】

請求項1記載の組成物を含む、医薬組成物。

【請求項7】

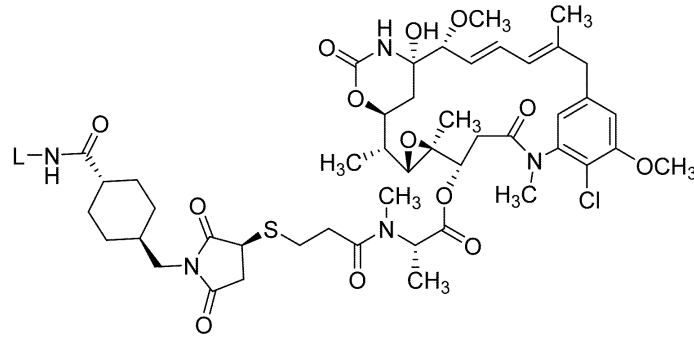
式IIaの化合物が、95%より高いジアステレオマー過剰率で存在し、該ジアステレオマー過剰率が、式IIaの硫黄原子に結合されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有する少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含む組成物に基づく、請求項6記載の医薬組成物。

40

【請求項8】

ジアステレオマー過剰で存在する前記化合物が、以下の構造を有する式IIaの化合物である、請求項7記載の医薬組成物：

【化5】



10

【請求項9】

請求項1~5のいずれか1項記載の化合物、又は、請求項6~8のいずれか1項記載の組成物を含む、疾患を治療するための医薬組成物であって、非経口投与用に製剤化されている、前記医薬組成物。

【請求項10】

前記疾患が、癌、自己免疫疾患、及び炎症性疾患から選択される、請求項9記載の医薬組成物。

【請求項11】

腫瘍関連抗原と関連した疾患又は障害を治療するための医薬組成物であって、該腫瘍関連抗原は、AFP、ALK、BAGEタンパク質、 β -カテニン、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、炭酸脱水酵素IX、カスパーゼ-8、CD20、CD40、CDK4、CEA、CLEC12A、cMET、CTLA4、サイクリン-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGEタンパク質、GD2、GD3、GloboH、グリピカン-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、IGF1R、LGR5、LMP2、MAGEタンパク質、MART-1、メソセリン、ML-IAP、Muc1、Muc16又はCA-125、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ES01、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PDGFR- α 、PDGFR- β 、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA、FOLH1、RAGEタンパク質、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、サバイピン、TAG-72、TGF- β 、TMPRSS2、Tn、TNFRSF17、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼ、及びウロプラキリン-3からなる群から選択され、該医薬組成物は、請求項1~5のいずれか1項記載の化合物、又は、請求項6~8のいずれか1項記載の組成物を含み、該医薬組成物は、非経口投与用に製剤化されている、前記医薬組成物。

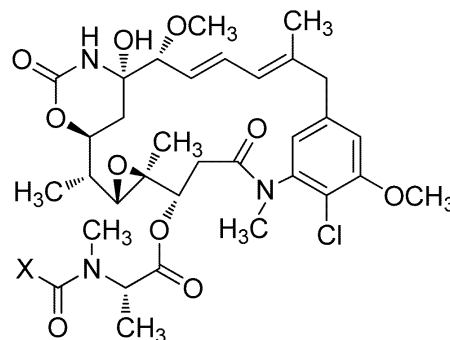
20

30

【請求項12】

式Iの化合物を含む組成物であって：

【化7】



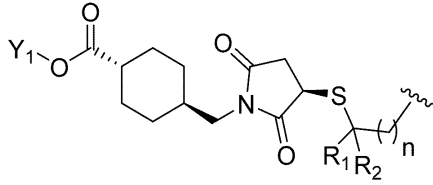
I

40

(式中、
Xは、

50

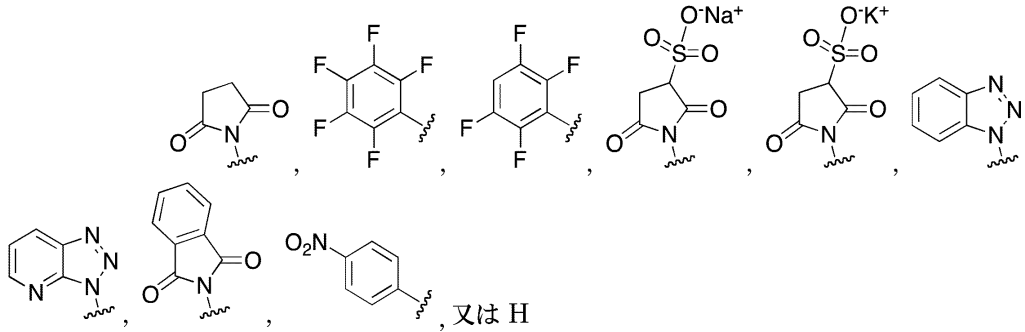
【化 8】



であり、

Y₁は、

【化 9】



であり、

R₁及びR₂は、独立に、H又はアルキルから選択され、かつ

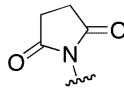
nは、独立に、0又は1～50の整数である。）、

式Iの化合物は、50%より高いジアステレオマー過剰率で存在し、該ジアステレオマー過剰率は、式Iの硫黄原子に結合されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有する少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含む組成物に基づき、アルキルは、メチル、エチル、1-プロピル、2-プロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、t-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、及びイソヘキシルから選択される、前記組成物。

【請求項 1 3】

Y₁が、

【化 1 0】



であり、

R₁及びR₂がHであり、かつ

nが1～10の整数である、請求項12記載の組成物。

【請求項 1 4】

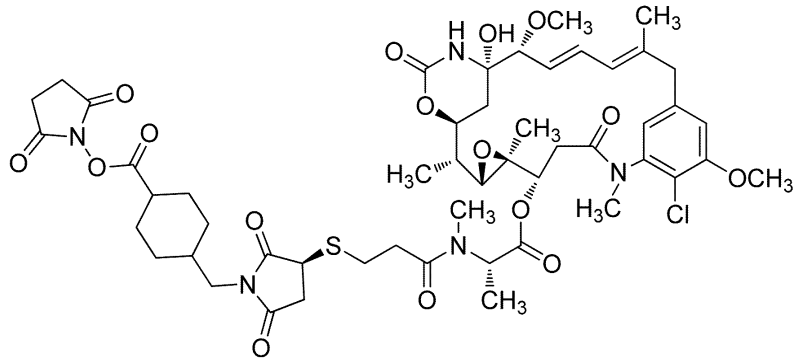
式Iの化合物が、

10

20

30

【化 1 1】



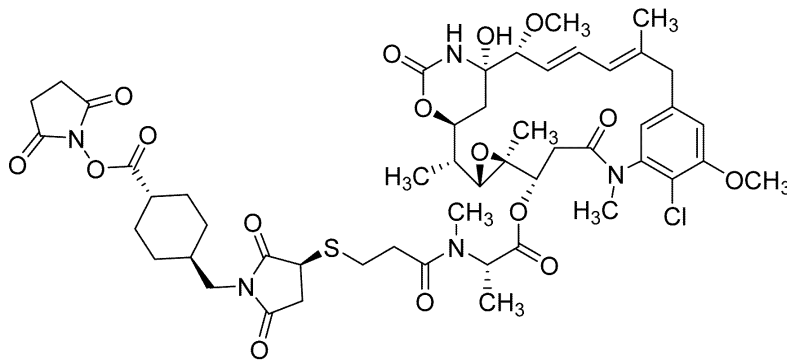
10

である、請求項12又は13記載の組成物。

【請求項 1 5】

式Iの化合物が、

【化 1 2】



20

である、請求項14記載の組成物。

【請求項 1 6】

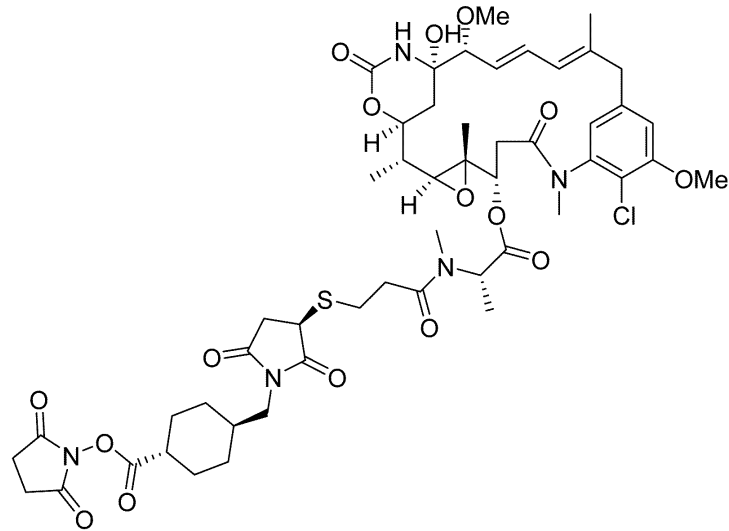
前記ジアステレオマー過剰率が、少なくとも95%であり、該ジアステレオマー過剰率が、式Iの硫黄原子に結合されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有する少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含む組成物に基づく、請求項12又は13記載の組成物。

30

【請求項 1 7】

以下の構造を有する式(1)の化合物：

【化 1 4】



10

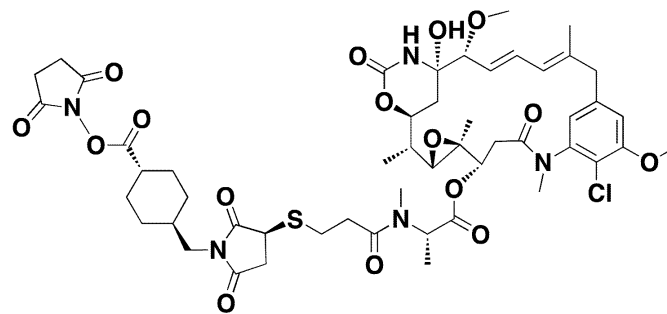
を、抗体又はその抗原結合断片と結合させることによって作製される、抗体-薬剤コンジュゲート。

【請求項 1 8】

立体異性体的に純粋である、式(i)の化合物：

20

【化 1 5】



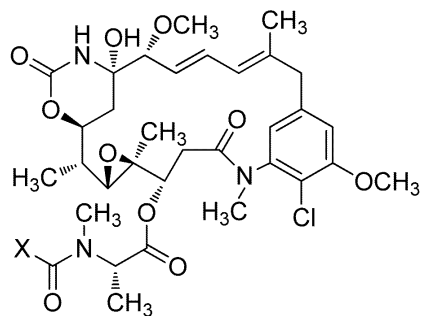
(i)

30

【請求項 1 9】

式Iの化合物を製造するための方法であって：

【化 1 6】

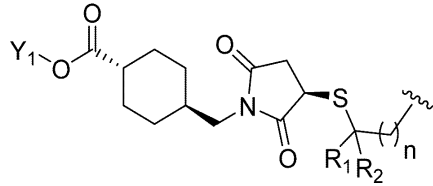


I

40

(式中、
Xは、

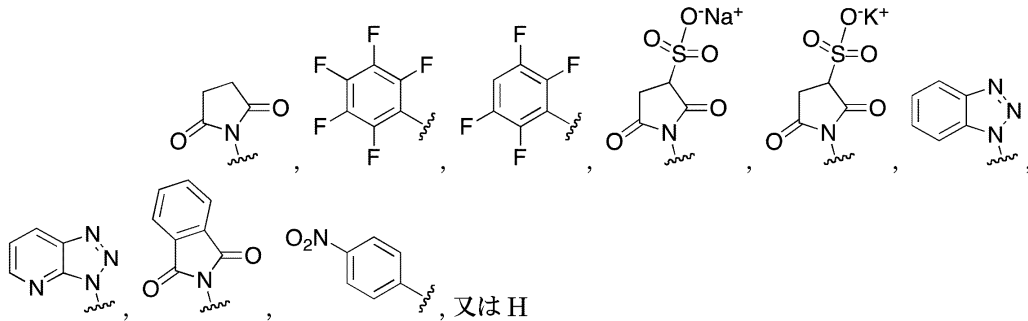
【化17】



であり、

Y₁は、

【化18】



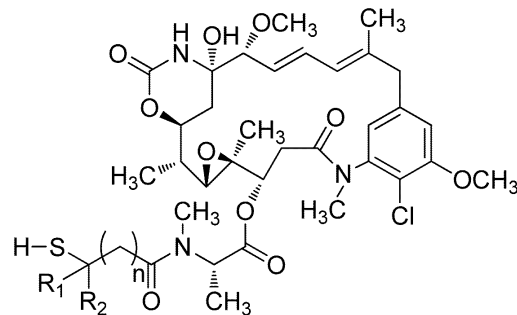
であり、

R₁及びR₂は、独立に、H又はアルキルから選択され、かつ

nは、独立に、0又は1~50の整数である。)、

(a)(i)式IIIの化合物：

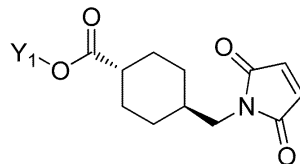
【化19】



III;

(ii)式IVの化合物：

【化20】



IV

(iii)シリカゲル、及び

(iv)有機溶媒及び水を含む希釈剤

を接触させる工程、及び

(b)式Iの化合物を単離する工程を含み、

式Iの化合物が、50%より高いジアステレオマー過剰率で存在し、該ジアステレオマー過剰率が、式Iの硫黄原子に結合されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有する少

10

20

30

40

50

なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含む組成物に基づく、前記方法。

【請求項20】

前記有機溶媒がアセトニトリルを含む、請求項19記載の方法。

【請求項21】

前記有機溶媒及び水が、約1:1~約4:1又は約1:1~約10:1の有機溶媒:水の体積比で存在する、請求項19記載の方法。

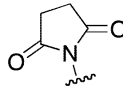
【請求項22】

式IIIの化合物と式IVの化合物のモル比が、約1:1~約1:3である、請求項19記載の方法。

【請求項23】

Y_1 が、

【化21】



であり、

R_1 及び R_2 がHであり、かつ

n が1である、請求項19記載の方法。

【請求項24】

成分(i)~(iv)が、約18時間接触される、請求項19~23のいずれか1項記載の方法。

【請求項25】

式IVの化合物が、式IIIの化合物に対して、化学量論的過剰で存在する、請求項19~24のいずれか1項記載の方法。

【請求項26】

工程(a)の後に追加的な量の式IVの化合物を接触させることをさらに含む、請求項19~25のいずれか1項記載の方法。

【請求項27】

工程(a)において、式IVの化合物と式IIIの化合物のモル比が、約2.3:1である、請求項19~25のいずれか1項記載の方法。

【請求項28】

工程(a)において、式IVの化合物と式IIIの化合物のモル比が、約1.5:1である、請求項19記載の方法。

【請求項29】

工程(b)における式Iの化合物の単離が、濾過により達成される、請求項19~24のいずれか1項記載の方法。

【請求項30】

式Iの化合物を抗体又はその抗原結合断片と結合させて抗体-薬剤コンジュゲートを作製することをさらに含む、請求項19~29のいずれか1項記載の方法。

【請求項31】

式Iの化合物が、S、O、又は NR_3 を介して前記抗体又は抗原結合断片に結合され、 R_3 がH又はアルキルである、請求項30記載の方法。

【請求項32】

式Iの化合物が、

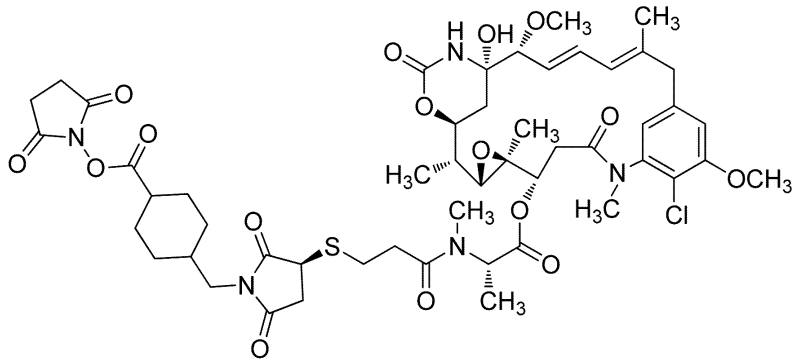
10

20

30

40

【化 2 2】

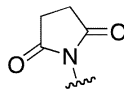


10

であり、

Y_1 が、

【化 2 3】



であり、

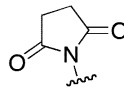
R_1 及び R_2 がHであり、かつ

n が1である、請求項19～31のいずれか1項記載の方法。

【請求項 3 3】

Y_1 が、

【化 2 4】



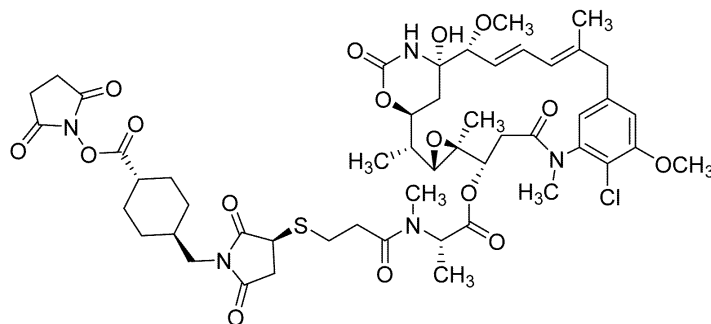
であり、

R_1 及び R_2 がHであり、

n が1であり、かつ

式Iの化合物が、

【化 2 5】



40

である、請求項19～32のいずれか1項記載の方法。

【請求項 3 4】

前記抗体又はその抗原結合断片が、腫瘍関連抗原に特異的に結合することができ、さらに、該腫瘍関連抗原が、AFP、ALK、BAGEタンパク質、 β -カテニン、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、炭酸脱水酵素IX、カスパーゼ-8、CD20、CD40、CDK4、CEA、CLEC12A、cMET、CTLA4、サイクリン-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGEタンパク質、GD2、GD3、GloboH、グリピカン-3、GM3、gp100、

50

Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、IGF1R、LGR5、LMP2、MAGEタンパク質、MART-1、メソセリン、ML-IAP、Muc1、Muc16又はCA-125、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ES01、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PDGFR-、PDGFR-、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA、FOLH1、RAGEタンパク質、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、サバイピン、TAG-72、TGF-、TMPRSS2、Tn、TNFRSF17、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼ、及びウロプラキリン-3からなる群から選択される、請求項30又は31記載の方法。

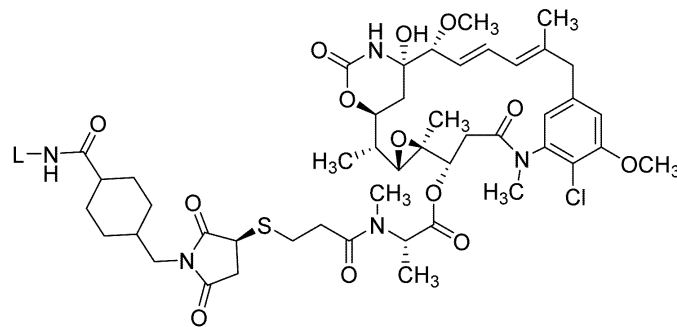
【請求項35】

前記腫瘍関連抗原が、EGFRvIII、Her2、及びMuc16からなる群から選択される、請求項34記載の方法。

【請求項36】

式IIaの化合物を製造するための方法であって：

【化28】



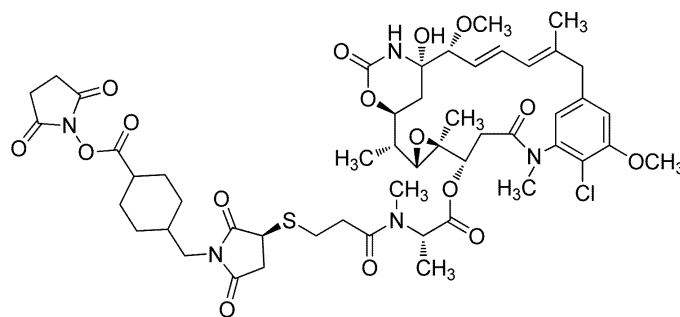
IIa

式中、Lは、抗体又はその抗原結合断片であり、かつ

式IIaの化合物は、50%より高いジアステレオマー過剰率で存在し、該ジアステレオマー過剰率が、式IIaの硫黄原子に結合されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有する少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含む組成物に基づき、該方法は、

(a) 抗体又はその抗原結合断片を式Iの化合物と反応させる工程であって、式Iの化合物が、

【化29】



であり、式Iの化合物が、50%より高いジアステレオマー過剰率で存在し、該ジアステレオマー過剰率が、式Iの硫黄原子に結合されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有する少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含む組成物に基づく、前記工程、及び

(b) 式IIaの化合物を精製する工程、を含む、前記方法。

【請求項37】

Lが、腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片であり、さらに、該腫瘍関連抗原が、AFP、ALK、BAGEタンパク質、-カテニン、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、炭酸脱水酵素IX、カスパーゼ-8、CD20、CD40、CDK4、CEA、CLEC12A、cMET、CTLA4、サイクリン-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EphA2、

10

20

30

40

50

Fra-1、FOLR1、GAGEタンパク質、GD2、GD3、GloboH、グリピカン-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、IGF1R、LGR5、LMP2、MAGEタンパク質(例えば、MAGE-1、-2、-3、-4、-6、及び-12)、MART-1、メソセリン、ML-IAP、Muc1、Muc16又はCA-125、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ESO1、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PDGFR-、PDGFR-、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA、FOLH1、RAGEタンパク質、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、サバイピン、TAG-72、TGF-、TMPRSS2、Tn、TNFRSF17、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼ、及びウロプラキン-3からなる群から選択される、請求項36記載の方法。

【請求項38】

前記腫瘍関連抗原が、EGFRvIII、Her2、及びMuc16からなる群から選択される、請求項37記載の方法。

【請求項39】

式IIaの化合物が、95%より高いジアステレオマー過剰率で存在し、該ジアステレオマー過剰率が、式IIaの硫黄原子に結合されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有する少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含む組成物に基づく、請求項36記載の方法。

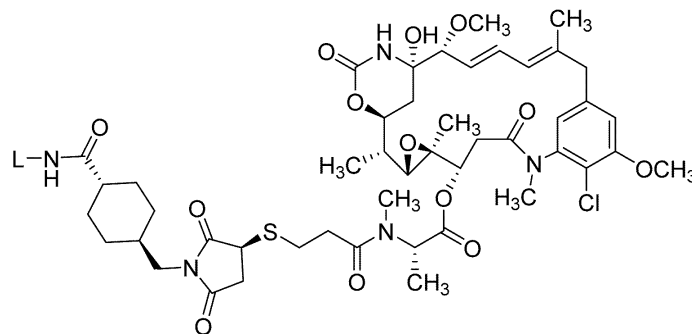
【請求項40】

式Iの化合物が、95%より高いジアステレオマー過剰率で存在し、該ジアステレオマー過剰率が、式Iの硫黄原子に結合されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有する少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含む組成物に基づく、請求項36記載の方法。

【請求項41】

ジアステレオマー過剰で存在する前記化合物が、以下の構造を有する式IIaの化合物である、請求項36又は40記載の方法：

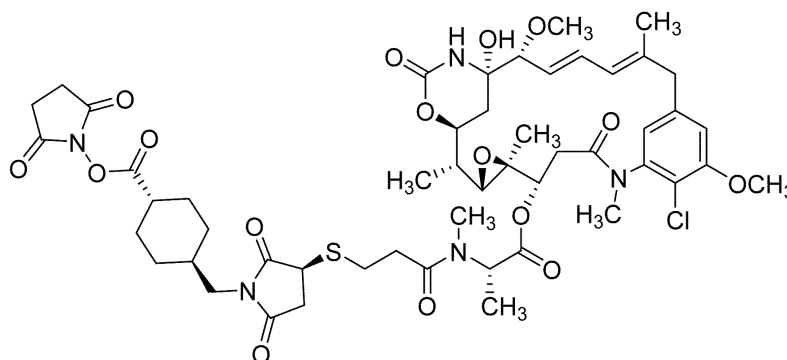
【化32】



【請求項42】

式Iの化合物が、

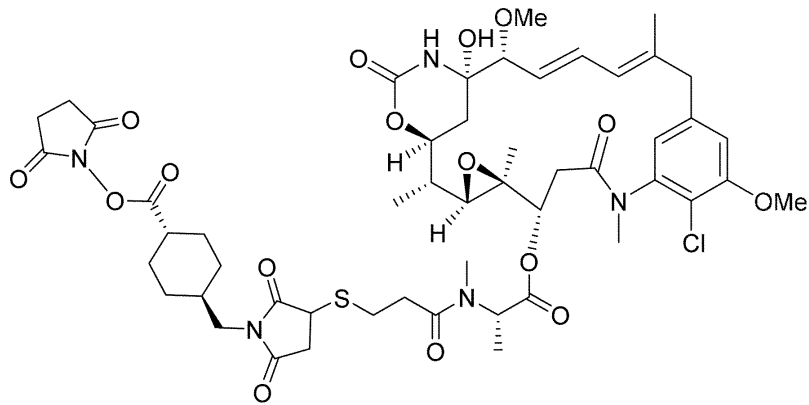
【化37】



である、請求項36記載の方法。

【請求項43】

式Iの化合物を含む組成物であって：
【化43】



(I)

10

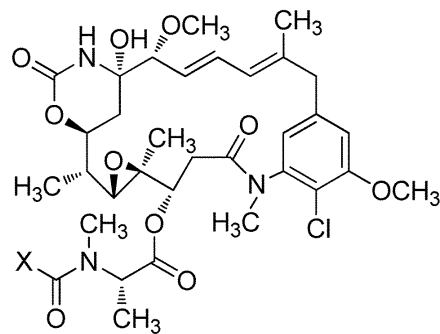
式Iの化合物が、実質的に図1に示される¹H NMRによって特徴付けられ、式Iの化合物が、95%より高いジアステレオマー過剰率で該組成物中に存在し、該ジアステレオマー過剰率が、式Iの硫黄原子に結合されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有する少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含む組成物に基づく、前記組成物。

【請求項44】

20

式Iの化合物のジアステレオマーであって：

【化44】



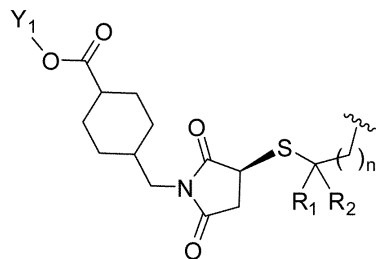
I

30

(式中、

Xは、

【化45】

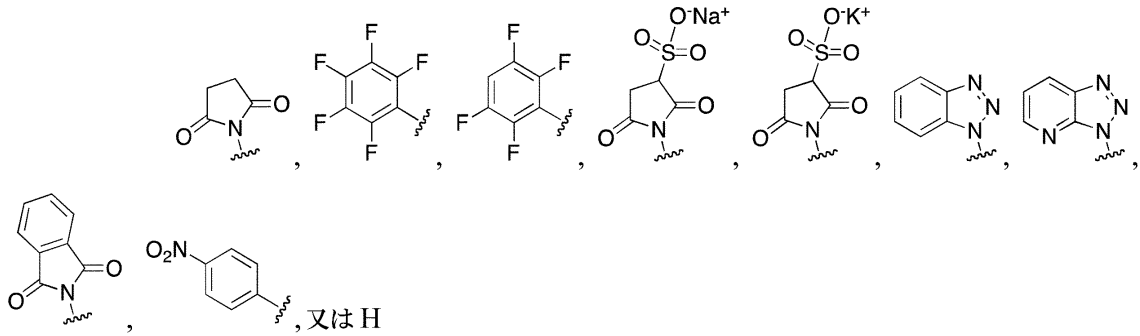


40

であり、

Y₁は、

【化46】



10

であり、

R_1 及び R_2 は、独立に、H又はアルキルから選択され、かつ

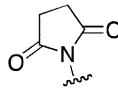
n は、独立に、0又は1~50の整数である。）、

式1の化合物の該ジアステレオマーは、50%より高いジアステレオマー過剰率で存在し、該ジアステレオマー過剰率は、式1の硫黄原子に結合されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有する少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含む組成物に基づく、前記ジアステレオマー。

【請求項45】

Y_1 が、

【化47】



であり、

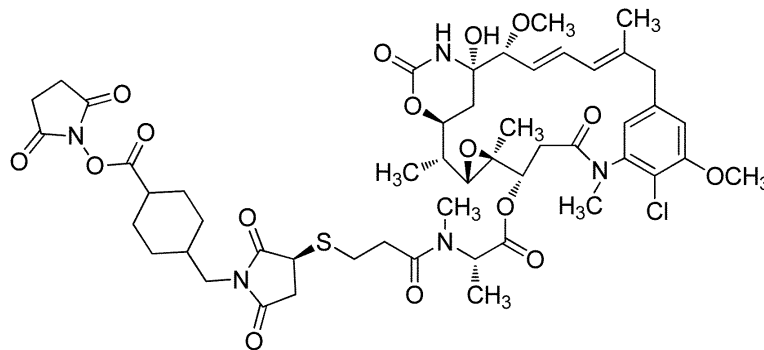
R_1 及び R_2 がHであり、かつ

n が1~10の整数である、請求項44記載のジアステレオマー。

【請求項46】

前記ジアステレオマーが：

【化48】



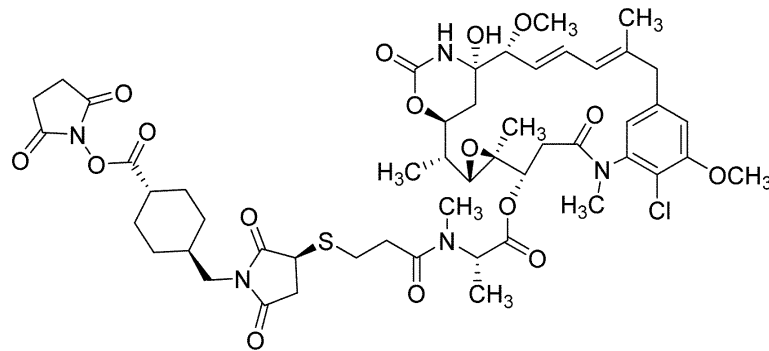
40

である、請求項44記載のジアステレオマー。

【請求項47】

前記ジアステレオマーが：

【化49】



10

である、請求項44記載のジアステレオマー。

【請求項48】

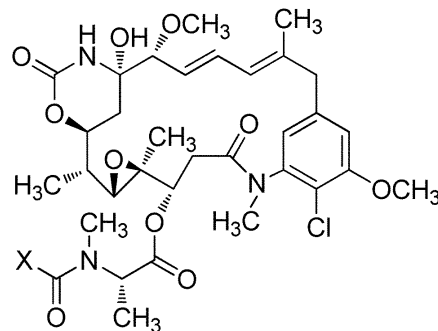
前記ジアステレオマーが、95%より高いジアステレオマー過剰率で存在し、該ジアステレオマー過剰率は、式Iの硫黄原子に結合されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有する少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含む組成物に基づく、請求項44記載のジアステレオマー。

【請求項49】

実質的に図1に示される¹H NMRによって特徴付けられる、式Iの化合物のジアステレオマーであって：

20

【化50】



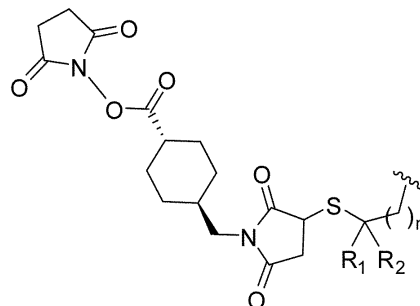
I

30

(式中、

Xは、

【化51】



40

であり、

R_1 及び R_2 は、独立に、H又はアルキルから選択され、かつ
nは、独立に、0又は1~50の整数である。))

式Iの化合物のジアステレオマーが、95%より高いジアステレオマー過剰率で得られ、

50

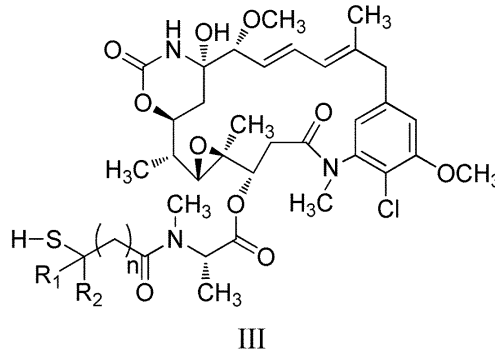
該ジアステレオマー過剰率が、式Iの硫黄原子に結合されるキラル炭素において異なる立体化学配置を有する少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含む組成物に基づく、前記ジアステレオマー。

【請求項50】

請求項49記載の化合物であって、

(a)(i)式IIIの化合物：

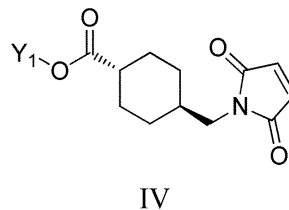
【化53】



10

(ii)式IVの化合物：

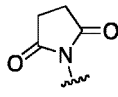
【化54】



20

(式中、Y₁は

【化55】



30

である。)

(iii)シリカゲル、及び

(iv)有機溶媒及び水を含む希釈剤

を接触させる工程、及び

(b)請求項49記載の式Iの化合物を単離する工程を含む方法によって製造される、前記化合物。

【請求項51】

請求項50記載の工程(b)の化合物を、抗体又はその抗原結合断片と接触させることにより製造される、抗体-薬剤コンジュゲート。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

増殖性疾患には、異常な細胞の制御されない増殖及び拡散により特徴付けられる。これらの細胞の拡散が制御されないと、それは死をもたらすことがある。増殖性疾患、例えば癌は、手術、放射線、化学療法、ホルモンベースの療法、及び/又は免疫療法により治療することができる。これらの方法のいくつか、特に化学療法は、該異常な細胞の拡散を制限する抗増殖薬の使用に基づいている。しかしながら、抗増殖薬は一般に、その細胞殺傷能において区別をすることができず、単純に細胞が複製しているかどうかに基づいて正常細胞と異常細胞の両方に作用する。それにもかかわらず、大抵の抗増殖薬が有効であるためには、異常細胞が増殖している場所において比較的高濃度であることが要求される。本

50

件開示が取り組むのは、全身的に、又は異常細胞の近傍で、正常細胞の重大な死を引き起こすこともなく、これらの細胞が増殖する場所で十分な抗増殖薬を提供する、この組み合わせである。

【 0 0 0 2 】

腫瘍を標的とするプローブ(抗体又は成長因子など)とシュードモナス又はジフテリア毒素などの毒素とのコンジュゲートの使用を含む、標的化薬剤送達の種々の手法が試みられている。癌治療に使用するためのコンジュゲートは、それにより抗増殖薬を異常細胞の集団へと標的化する。最近、毒素であるメイタンシンを含むコンジュゲートが、癌治療に利用されている。メイタンシンは抗増殖薬として多大な有効性を示すが、該化合物の毒性は、正常細胞に対しても問題を起こすことが証明されている。癌治療薬としての使用のために十分な活性を有するメイタンシンをベースとしたコンジュゲートを開発することへの需要が存在する。メイタンシンをベースとしたコンジュゲートが異常細胞の集団の抑制又は殺傷についてより活性になり、又はより有効になるほど、コンジュゲートに要求される濃度がより低くなり、その利益により正常細胞を損傷する全体的なリスクを低減することができる。

10

【 0 0 0 3 】

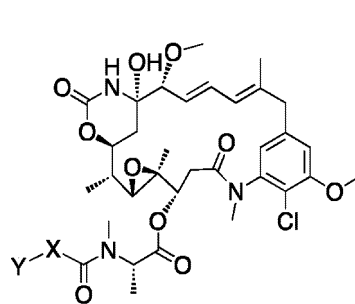
多くの抗増殖性化合物、例えばメイタンシノイドファミリーのマクロライドは非対称の構造を示し、従ってラセミ混合物の形態で、不斉中心ごとに配置「R」及び「S」、又は(+)及び(-)を有する分離した鏡像異性体の形態で、及び種々のジアステレオマーの形態で存在し得る。本件開示では、単一のメイタンシノイドジアステレオマーの標的化送達が、そのそれぞれのジアステレオマーの混合物の送達と比較して、向上した抑制性細胞増殖プロファイルを呈することを示す。従って、本明細書に記載される実施態様に従うジアステレオマーを使用して、特定の疾患及び状態、特に癌の治療に有効となり得る向上した治療プロファイルを有する医薬製品を製造することができる。

20

【 0 0 0 4 】

本件開示は複数の式(1)の薬剤分子を含む組成物に関する：

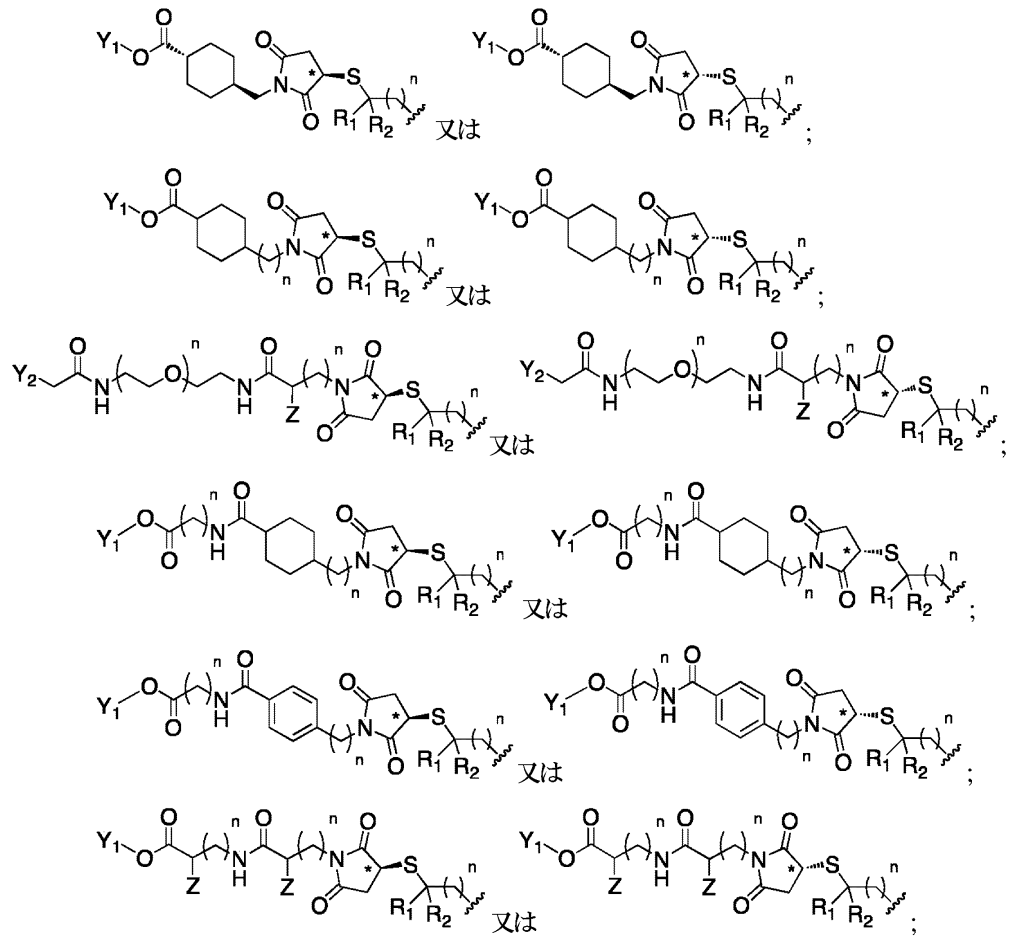
【化1】



30

(式中、Xは

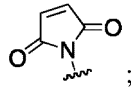
【化2】



10

20

Y₂は-Cl、-Br、-I、又は
【化4】



であり；

ZはH又はSO₃Hであり；

R₁及びR₂は独立にH又はアルキルから選択され；

それぞれのnは独立に、0又は1～50の整数である）；

ここで、該組成物中に存在する該薬剤分子が第一ジアステレオマー及び第二ジアステレオマーの少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含み、さらにここで、該第一ジアステレオマー及び第二ジアステレオマーが、式X中で(*)によって表されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有することを除いて他は同一であり、該キラル炭素原子が硫黄原子に結合した炭素原子であり、かつ該第一又は第二ジアステレオマーが50%より高いジアステレオマー過剰率で存在する。

【0005】

一実施態様において、本件開示は複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を提供する（式中、nは1であり、かつR₁及びR₂は、それぞれ独立に、水素である）。

【0006】

別の実施態様において、複数の式Iの薬剤分子を含む組成物は、約60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれより高いジアステレオマー過剰率で該組成物中に存在する。

【0007】

特定の実施態様において、式Iの薬剤分子は、約90%～約100%、又は約95%～約100%、又は約98%～約100%のジアステレオマー過剰率で該組成物中に存在する。

【0008】

別の実施態様において、少なくとも2つのジアステレオマーの1つが、図1の¹H NMRスペクトルにより特徴づけられる、複数の式Iの薬剤分子を含む組成物。

【0009】

本明細書で用いられる用語「約」は、特定の記載される数値を参照して用いられる場合、その値が1%以下で記載された値から変化してもよいことを意味する。例えば、本明細書で用いられる表現「約100」は、99及び101並びにその間の全ての値（例えば、99.1、99.2、99.3、99.4など）を含む。

【0010】

別の実施態様において、本件開示は複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を提供し、ここで、該薬剤分子は50%より高いジアステレオマー過剰率で該組成物中に存在し、50%より高いジアステレオマー過剰率では存在しない式Iの薬剤分子を含む対応する組成物よりも高い抗増殖活性を示す。

【0011】

さらに、本明細書における開示は、治療有効量の第二の薬剤又は追加の薬剤、例えば化学療法剤、抗炎症剤、抗生物質などをさらに含む、複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を提供する。

【0012】

一実施態様において、本件開示は下記構造により表される複数の式Iの薬剤分子、又はその混合物を、50%より高いジアステレオマー過剰率で含む組成物を提供する：

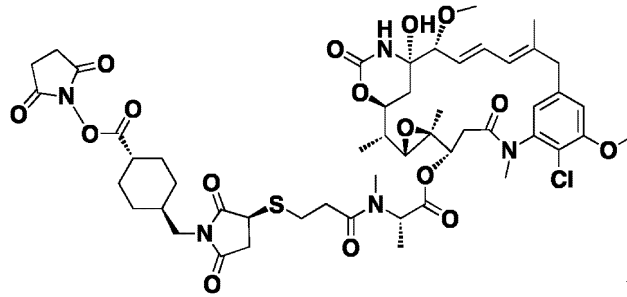
10

20

30

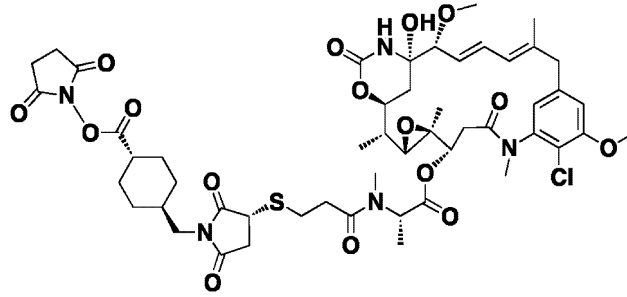
40

【化5】



又は

10



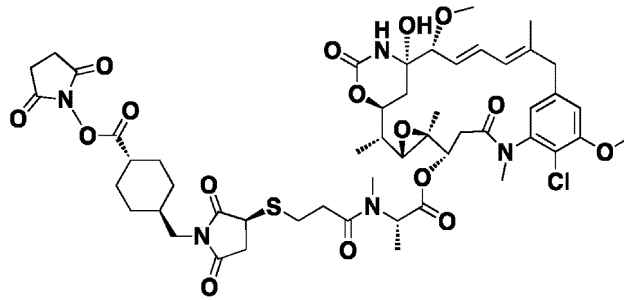
。

【0013】

20

一実施態様において、少なくとも2つのジアステレオマーの1つは、式(i)の化合物である

【化6】



(i)

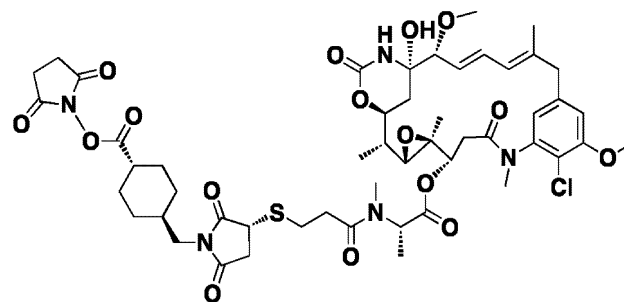
30

。

【0014】

別の実施態様において、少なくとも2つのジアステレオマーの1つは、式(ii)の化合物である

【化7】



(ii)

40

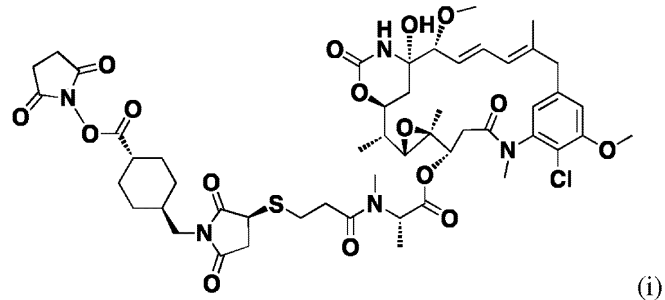
。

【0015】

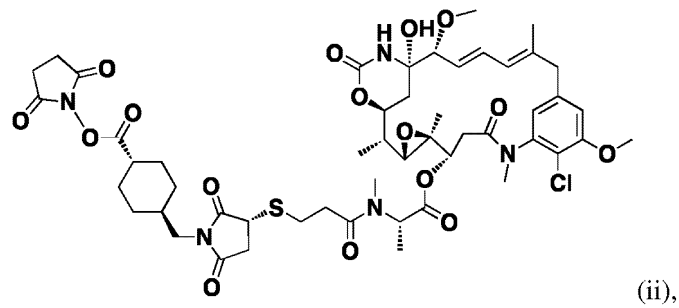
また、本件開示は式(i)又は(ii)の化合物も提供し、ここで、該化合物は立体異性体的に(steromerically)純粋である

50

【化 8】



10

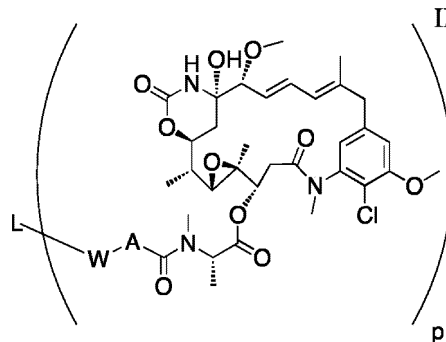


【 0 0 1 6 】

20

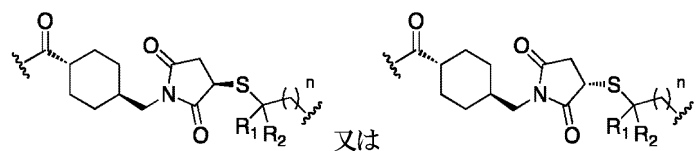
また、本件開示は複数の式IIのリガンド-薬剤コンジュゲートを含む組成物を提供し：

【化 9】



30

(式中、
Aは、
【化 1 0】



40

であり；
Wは、S、O、又はNR₃から選択され；
Lはリガンドであり；
さらに式中；
Lは、細胞又は細胞集団と結合することができ；
R₁、R₂、及びR₃は、それぞれ独立に、H又はアルキルから選択され；
nは、0又は1～10の整数であり；
pは、1～10の整数である)

50

ここで、該リガンド-薬剤コンジュゲートが50%より高いジアステレオマー過剰率で該組成物中に存在する。

【0017】

一実施態様において、該開示は複数の式IIのリガンド-薬剤コンジュゲートを含む組成物を提供する（式中、 n は1であり、かつ R_1 及び R_2 はそれぞれ独立に、水素である）。

【0018】

一実施態様において、複数の式IIのリガンド-薬剤コンジュゲートを含む組成物は、約60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高いジアステレオマー過剰率で該組成物中に存在する。特定の実施態様において、式IIの該薬剤分子は約90%～約100%、又は約95%～約100%、又は約98%～約100%のジアステレオマー過剰率で該組成物中に存在する。

10

【0019】

別の実施態様において、該開示は複数の式IIのリガンド-薬剤コンジュゲートを50%より高いジアステレオマー過剰率で含み、50%より高いジアステレオマー過剰率では存在しない式IIのリガンド-薬剤コンジュゲートを含む、対応する組成物よりも高い抗増殖活性を示す組成物を提供する。

【0020】

一実施態様において、該開示は複数の式IIのリガンド-薬剤コンジュゲートを含む組成物を提供し、ここで、該リガンドは抗体又はその抗原結合断片である。該抗体又はその抗原結合断片を開発して、腫瘍関連抗原と特異的に結合することができ、式IIに関して、 n は1とすることができ、かつ R_1 及び R_2 はそれぞれ独立に水素とすることができ、

20

【0021】

特定の実施態様において、該開示は複数の式IIのリガンド-薬剤コンジュゲートを含む組成物を提供し、ここで、該リガンドは腫瘍関連抗原と特異的に結合する抗体、又はその抗原結合断片であり、かつ該リガンド-薬剤コンジュゲートは、約50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高いジアステレオマー過剰率で該組成物中に存在する。

【0022】

特定の実施態様において、本件開示は複数の式IIのリガンド-薬剤コンジュゲートを含む組成物を提供し、ここで、該抗体又はその抗原結合断片は、腫瘍関連抗原に特異的に結合し、さらにここで、該腫瘍関連抗原は、AFP、ALK、BAGEタンパク質、 β -カテニン、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、炭酸脱水酵素IX、カスパーゼ-8、CD20、CD40、CDK4、CEA、CLEC12A、cMET、CTLA4、サイクリン-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGEタンパク質（e.g.、GAGE-1、-2）、GD2、GD3、GloboH、グリピカン-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、IGF1R、LGR5、LMP2、MAGEタンパク質（e.g.、MAGE-1、-2、-3、-4、-6、及び-12）、MART-1、メソセリン、ML-IAP、Muc1、Muc16（CA-125）、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ES01、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PDGFR- α 、PDGFR- β 、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA（FOLH1）、RAGEタンパク質、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、サバイピン、TAG-72、TGF- β 、TMPRSS2、Tn、TNFRSF17、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼ、及びウロプラキリン-3からなる群から選択される。

30

40

【0023】

いくつかの実施態様において、該抗体、又は抗原結合断片は、上記抗体から変化しているが、所与の腫瘍関連抗原に結合する能力を保持するアミノ酸配列を有する。そのようなバリエーション抗体及び抗体断片は、親配列と比較した場合、1以上のアミノ酸の付加、欠失、又は置換を含むが、記載の抗体のものと本質的に同等である生物活性を示す。

【0024】

2つのコンジュゲートが、例えば、同じモル濃度の用量にて類似の実験条件下、単回用量又は複数回用量のいずれかとして投与された際に、その吸収の速度及び程度が有意差を

50

示さない薬学的同等物又は薬学的代替物である場合、両者は生物学的に同等であるとみなされる。いくつかのコンジュゲートが、その吸収の程度において同等であるが、その吸収速度においては同等ではない場合において、これらコンジュゲートは、同等物又は薬学的代替物であるとみなされ、そして係る吸収速度における差が意図的であり、標識において反映され、例えば長期的使用における有効な体内薬剤濃度への到達に必須ではなく、試験される特定の薬剤製品にとって医学的に無意味であるとみなされるため、これらが生物学的に同等であると依然としてみなされ得る。

【 0 0 2 5 】

一実施態様において、2つのコンジュゲートは、その安全性、純度及び効力において臨床的に有意義な差がない場合、生物学的に同等である。

10

【 0 0 2 6 】

一実施態様において、参照産物及び生物学的産物の間で切り替えない継続的療法と比較して、免疫原性の臨床的に有意な変化又は有効性の減弱化を含む有害効果のリスクにおいて増大が予想されずに、患者に対して、参照産物及び生物学的産物の間でこのような切り替えを1回以上行うことができる場合、2つのコンジュゲートは、生物学的に同等である。

【 0 0 2 7 】

一実施態様において、2つのコンジュゲートが両方とも、使用条件（単数又は複数）について共通の作用機序（単数又は複数）により、そのような機序が公知である範囲で作用する場合、それらは生物学的に同等である。

20

【 0 0 2 8 】

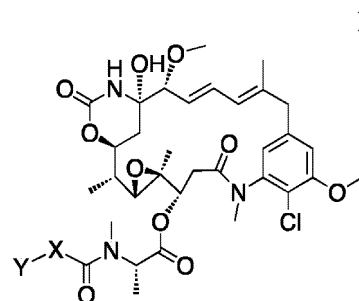
生物学的同等性は、インビボ及びインビトロの方法によって示すことができる。生物学的同等性の測定は、例えば、(a) 時間の関数として血液、血漿、血清又は他の生物学的流体における該コンジュゲート又はその代謝物の濃度を測定する、ヒト又は他の哺乳動物におけるインビボ検査；(b) ヒトインビボバイオアベイラビリティデータと相関され、これを合理的に予測するインビトロ検査；(c) 時間の関数として該コンジュゲート（又はその標的）の適切な急性薬理学的効果を測定する、ヒト又は他の哺乳動物におけるインビボ検査；及び(d) コンジュゲートの安全性、有効性又はバイオアベイラビリティ又は生物学的同等性を確立する十分に制御された臨床試験における検査を含む。

【 0 0 2 9 】

また、本件開示は複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を製造するための新規の方法を提供する：

30

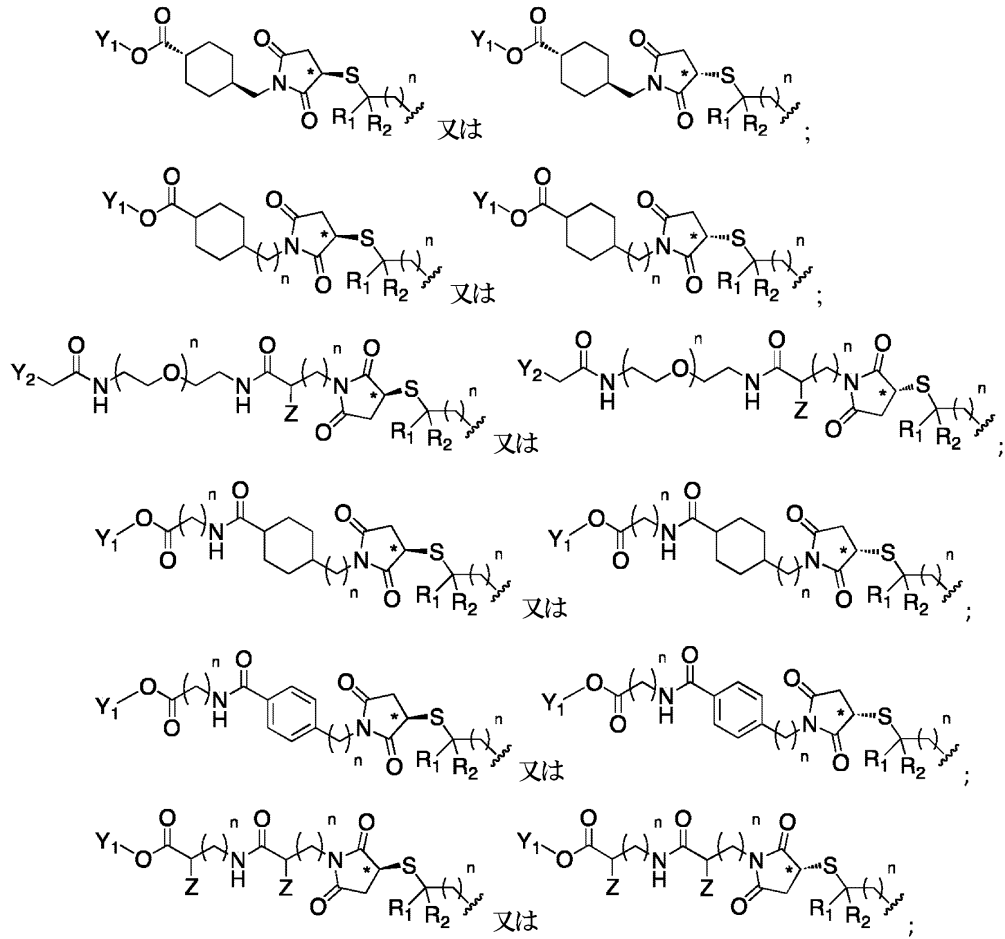
【 化 1 1 】



40

（式中、Xは

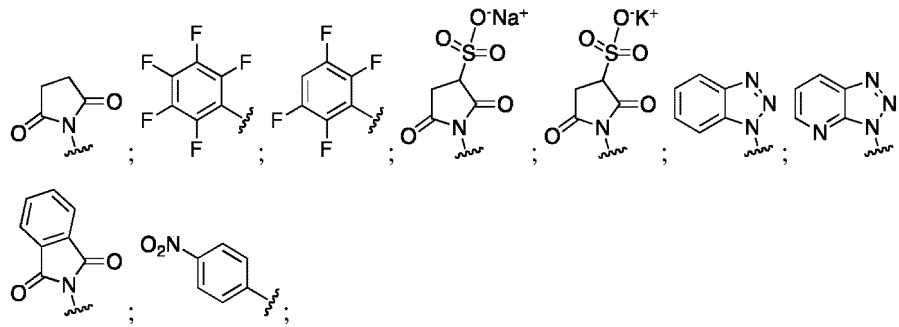
【化 1 2】



10

20

【化13】

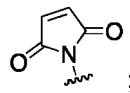


10

又はHであり；

Y_2 は-Cl、-Br、-I、又は

【化14】



であり；

R_1 及び R_2 は独立にH又はアルキルから選択され；

20

それぞれのnは独立に、0又は1～50の整数である)

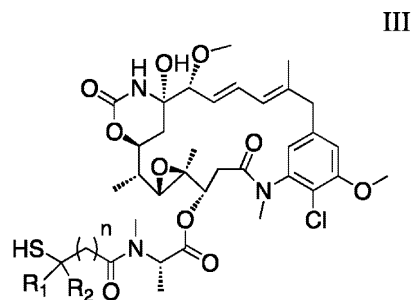
ここで、該組成物中に存在する該薬剤分子が、第一ジアステレオマー及び第二ジアステレオマーである少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含み、さらにここで、該第一ジアステレオマー及び第二ジアステレオマーが、式X中で(*)によって表されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有することを除いて他は同一であり、該キラル炭素原子が硫黄原子に結合した炭素原子であり、かつ該第一又は第二ジアステレオマーが50%より高いジアステレオマー過剰率で存在する。

該方法は、

(a) (i) 式IIIを有する出発物質：

【化15】

30



(ii) 式IVの化合物：

40

こと；及び

(c) 工程(b)の混合物から式Iの粗製化合物を取り出すことを含む。

【0030】

特定の実施態様において、本件開示は複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を製造するための方法を提供し、ここで、該方法は工程(d)をさらに含み、さらにここで、工程(d)は先に説明した工程(c)で得られる式Iの化合物を精製することを含む。

【0031】

特定の実施態様において、本件開示は複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を製造するための方法を提供し、ここで、前記固体基体はシリカゲル、セライト、アルミナ、ゼオライト、及び破砕モレキュラーシーブからなる群から選択される。また、固体基体に類似のものも、該固体基体がマクロライドIIIを適正に配置させ、マレイミドIVを立体選択的に付加させる限りにおいて利用可能である。

10

【0032】

特定の実施態様において、本件開示は複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を製造するための方法を提供し、ここで、nは1であり、かつR₁及びR₂はそれぞれ独立に水素である。

【0033】

特定の実施態様において、本件開示は複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を製造するための方法を提供し、ここで、前記有機溶媒はDMF、DMA、HMPT、NMP、アセトニトリル、ジオキサン、アセトン、DMSO、THF、酢酸エチル、酢酸メチル、塩化メチレン、プロピレンカルボナート、又はこれらの混合物などの極性非プロトン性溶媒を含む。

20

【0034】

特定の実施態様において、本件開示は複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を製造するための方法を提供し、ここで、該極性非プロトン性溶媒はアセトニトリルを含む。

【0035】

特定の実施態様において、本件開示は複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を製造するための方法を提供し、ここで、該有機溶媒及び水は、約1:1～約4:1又は約1:1～約10:1の比で存在する。

【0036】

特定の実施態様において、本件開示は複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を製造するための方法を提供し、ここで、式IIIを有する出発物質と式IVの化合物のモル比は、約1:1～約1:3である。

30

【0037】

特定の実施態様において、本件開示は複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を製造するための方法を提供し、式Iの化合物を抗体又はその抗原結合断片と結合させて抗体-薬剤コンジュゲートを作製することをさらに含む。

【0038】

特定の実施態様において、本件開示は複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を製造するための方法を提供し、ここで、式Iの化合物は抗体又は抗原結合断片に、S、O、又はNR₃を介して結合されている。

【0039】

一実施態様において、本件開示は複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を製造するための方法を提供し、ここで、式Iの薬剤分子は約60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれより高いジアステレオマー過剰率で該組成物中に存在する。

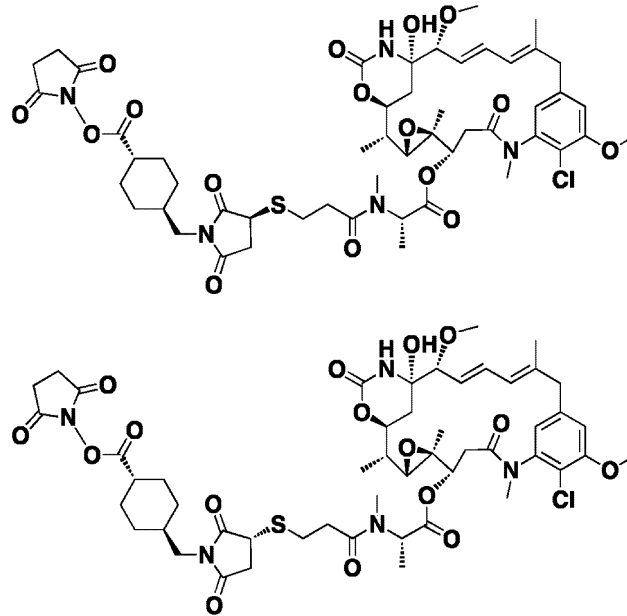
40

【0040】

一実施態様において、本件開示は下記構造により表される複数の式Iの薬剤分子を、50%より高いジアステレオマー選択的過剰率で含む組成物を製造するための方法を提供する

：

【化19】



又は

10

。本発明の組成物を製造するための特定の代表的な方法は、本明細書の実施例中に記載されているが、他の方法、例えばラセミ混合物又はジアステレオマー混合物のクロマトグラフィー分離（例えば、極性非プロトン性溶媒混合物を使用した順相、逆相、又はキラル固定相上でのHPLCなど）も、本発明の範囲内にあると企図している。

20

【0041】

また、本件開示は組成物に関し、ここで、複数の式Iの薬剤分子、又は前記式IIのリガンド-薬剤コンジュゲートは、治療有効量で該組成物中に含まれ、医薬として許容し得る希釈剤、担体、又は賦形剤をさらに含む。

【0042】

一実施態様において、本件開示は治療有効量の第二の化学療法剤をさらに含む、複数の式IIの薬剤分子を含む組成物を提供する。

【0043】

多くの実施態様において、本件開示の式(I)及び/又は(II)の化合物を含み、1以上の追加の化合物又は治療法と組み合わせ投与され得る。共投与及び組み合わせ治療法は、別々の、又は一緒の同時投与に限定されず、順次投与も含む。

30

【0044】

組み合わせ治療法は、式(I)及び/又は(II)の1以上の化合物、及び1以上の他の治療薬を含む組成物を含む単一の医薬投与製剤を投与すること；並びにそれ自体が分離した医薬投与製剤中に、本件開示の式(I)及び/又は(II)の化合物及び1以上の追加の薬剤（複数可）を含む組成物を投与することを含む。例えば、式(I)及び/又は(II)の化合物と、細胞毒性剤、化学療法剤、又は増殖阻害剤とを含む組成物を、結合製剤のように単一の投与組成物中で一緒にして患者に投与することができ、又はそれぞれの薬剤を分離した投与製剤で投与することができる。分離投与製剤が使用される場合、式(I)及び/又は(II)の化合物及び1以上の追加の薬剤を含む組成物は、同時に、又は時間差をもって個別に、すなわち、順次投与することができる。

40

【0045】

そのような追加の治療薬の限定されない例としては、サイトカイン阻害剤（例えば、インターロイキン-1（IL-1）阻害剤（例えば、リロナセプト又は小分子IL-1拮抗剤であるアナキンラ、又は抗IL-1抗体））；IL-18阻害剤（例えば、小分子IL-18拮抗剤、又は抗IL-18抗体）；IL-4阻害剤（例えば、小分子IL-4拮抗剤、抗IL-4抗体、又は抗IL-4受容体抗体）；IL-6阻害剤（例えば小分子IL-6拮抗剤、抗IL-6抗体、又は抗IL-6受容体抗体）；アスピリン；NSAIDs；ステロイド（例えば、プレドニゾン、メトトレキサートなど）；低用量

50

シクロスポリンA；腫瘍壊死因子（TNF）阻害剤又はTNF受容体阻害剤（例えば、小分子TNF拮抗剤若しくはTNFR拮抗剤又は抗TNF抗体若しくは抗TNFR抗体）；尿酸合成阻害剤（例えば、アロプリノール）；尿酸排出促進剤（例えば、プロベネシド、スルフィンピラゾン、ベンズプロマロンなど）；他の炎症阻害剤（例えば、カスパーゼ-1、p38、IKK1/2、CTLA-4lgなどの阻害剤）；及び/又はコルチコステロイドが挙げられる。追加の治療薬（複数可）は、1以上の式（I）及び/又は(II)の化合物の投与の前に、その投与と同時に、又はその投与後に、投与することができる（本件開示を目的として、そのような投与レジメンを、1以上の式（I）及び/又は（II）の化合物の、治療薬と「組み合わせた」投与とみなすものとする）。

【0046】

本明細書で使用される用語「細胞毒性剤」は、細胞機能を阻害又は妨害し、かつ/又は細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、及び ^{186}Re ）、化学療法剤、及び細菌、真菌、植物、又は動物由来の酵素的に活性な毒素などの毒素、又はその断片を含めるものと意図される。

【0047】

「化学療法剤」は癌の治療に有用な化学化合物である。化学療法剤の例として挙げられるのは、アルキル化剤（例えばチオテパ及びシクロホスファミド（CYTOXAN（登録商標）））；スルホン酸アルキル（例えばブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファン）；アジリジン（例えばベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドーパ（meturedopa）、及びウレドーパ（uredopa））；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスファオルアミド（triethylenethiophosphoramidate）及びトリメチロロメラミン（trimethylolomelamine）を含むエチレンイミン及びメチラメラミン（methylamelamines）；ナイトロジェンマスタード（例えばクロランブシル、クロルナファジン、コロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノブエンピキン（novembichin）、フェネステリン（phenesterine）、ブレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード）；ニトロソ尿素（nitrosoureas）（例えばカルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン）；抗生物質（例えばアクラシノマイシン、アクチノマイシン、オートラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン（carabycin）、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、ケラマイシン（quelamycin）、ロドルピシン（rodorubicin）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン）；代謝拮抗剤（例えばメトトレキサート及び5-フルオロウラシル（5-FU））；葉酸類似体（例えばデノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサート）；プリン類似体（例えばフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン）；ピリミジン類似体（例えばアンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン）；アンドロゲン（例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン）；抗副腎剤（anti-adrenals）（例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン）；葉酸補充液（例えばフロリン酸（frolinic acid））；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド（aldophosphamide glycoside）；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート（edatraxate）；デフォファミン（defofamine）；デメコルチン；ジアジクオン；エルフォルニチン（elfornithine）；酢酸エリプチニウム（elliptinium acetate）；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン

10

20

30

40

50

；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィリン酸 (podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）；ラゾキサソ；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキサソ類、例えばパクリタキセル (TAXOL（登録商標）, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、及びドセタキセル (TA XOTERE（登録商標）; Aventis Antony, フランス)；クロランブシル；ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金類似体（例えばシスプラチン及びカルボプラチン）；ピンブラスチン；白金；エトポシド (VP-16)；イフォスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン (DMF0)；レチノイン酸；エスペラマイシン；カベシタピン；及び上記のいずれかの医薬として許容し得る塩、酸、又は誘導体がある。また、この定義に含まれるものには、腫瘍に対するホルモン作用を調節、又は阻害するように作用する抗ホルモン剤があり、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン (keoxifen)、LY 117018、オナプリストン及びトレミフェン (Fareston) のような抗エストロゲン；フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリンのような抗アンドロゲン；並びに上記のいずれかの医薬として許容し得る塩、酸又は誘導体がある。

10

20

【0048】

本明細書で使用される「増殖阻害剤」は、インビトロ又はインビボのいずれかで細胞、特に癌細胞の増殖を阻害する化合物又は組成物を指す。増殖阻害剤の例を挙げると、G1期停止、及びM期停止を誘導する薬剤のような、(S期以外の箇所)細胞周期進行を遮断する薬剤がある。古典的なM期遮断剤を挙げると、ピンカス (vincas) (ピンクリスチン及びピンブラスチン)、TAXOL (登録商標)、及びトポII阻害剤 (例えばドキシソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びブレオマイシン)がある。G1期を停止するこれらの薬剤 (例えば、DNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル及びara-Cなど)は、S期停止にも影響を及ぼす。

30

【0049】

また、本発明は、医薬組成物を提供する。そのような組成物は治療有効量の活性剤及び医薬として許容し得る担体を含む。「医薬として許容し得る」という用語は、連邦政府もしくは州政府の監督機関によって承認されたこと、又は動物、より具体的には、ヒトに使用するために米国薬局方若しくは他の一般に認められた薬局方に記載されていることを意味する。「担体」という用語は、治療薬と共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、又はビヒクルを指す。このような医薬担体は水及び油のような滅菌液体とすることができ、例えば、落花生油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などのような石油、動物、植物又は合成由来のものを挙げることもできる。適当な医薬賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどが挙げられる。また、該組成物は、所望する場合、少量の湿潤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤を含むこともできる。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放性製剤などの形態をとることができる。該組成物は、従来の結合剤及びトリグリセリドのような担体を用いて坐剤として処方することができる。経口製剤は、医薬等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような標準担体を含むことができる。適当な医薬担体の例は、E. W. Martinによる「レミントン薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」に記

40

50

載されている。

【0050】

一実施態様において、前記組成物は、ヒトへの静脈内投与に適応した医薬組成物として慣例の方法に従って処方される。必要な場合、該組成物はまた、可溶化剤及び注射部位の痛みを和らげるためのリドカインなどの局所麻酔剤を含んでもよい。該組成物を点滴によって投与する場合、該組成物を、無菌の医薬等級の水又は生理食塩水を含む点滴ボトルを用いて与えることができる。該組成物を注射によって投与する場合、注射用滅菌水又は生理食塩水のアンプルを提供して、投与前に成分を混合してもよい。

【0051】

本件開示の活性剤は、中性又は塩形態として処方することができる。医薬として許容し得る塩を挙げると、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されたもののように遊離アミノ基を用いて形成されたものと、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、第二鉄水酸化物、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導されたもののような遊離カルボキシル基を用いて形成されたものがある。

【0052】

医学的状態の治療に有効となる本件開示の活性剤の量は、本記載に基づく標準の臨床技術によって決定することができる。さらに、インビトロアッセイを任意に利用して、最適な投与量範囲を特定する助けとすることができる。また、処方において採用すべき正確な用量は、投与経路、及び状態の重症度にも依存し、かつ医師の判断及びそれぞれの対象の環境に従って決定されるべきである。しかしながら、静脈内投与について適当な投与量範囲は、一般に活性化化合物約0.5~20 mg/kg体重である。鼻内投与について適当な投与量範囲は、一般に約0.01 pg/kg体重~1 mg/kg体重である。有効な用量は、インビトロ試験系又は動物モデル試験系に由来する用量反応曲線から推定することができる。

【0053】

一実施態様において、本件開示は、医学的障害を患っている個体の該医学的障害を治療する方法であって、該個体に有効量の式(I)及び/又は(II)の化合物を含む組成物を投与することを含み、かつ追加の治療を順次、又は連続的に施すこと、又は少なくとも1つの追加の治療薬を投与することをさらに含む前記方法を提供する。

【0054】

別の実施態様において、本件開示は前記方法による治療に感受性がある疾患を治療するための方法に関し、該方法は、それを必要とする患者に式(I)及び/又は(II)の化合物を含む治療有効量の組成物を非経口的に投与することを含む。

【0055】

本件開示は、式(I)、式(II)、式(i)、式(ii)の化合物、又はこれらの組み合わせを含む組成物及び/又はその医薬製剤の、医学的障害の治療、予防、及び/又は改善のための医薬の製造における使用をさらに含む。

【0056】

本件開示は、式(I)、式(II)、式(i)、式(ii)の化合物、又はこれらの組み合わせを含む組成物及び/又はその医薬製剤の、腫瘍の治療、予防、及び/又は改善のための医薬の製造における使用をさらに含む。

【0057】

本明細書の実施態様は主に癌などの増殖性障害に関して記載されているが、また本明細書の組成物は、自己免疫性疾患及び他の免疫学的疾患及び機能不全、炎症性疾患、感染性疾患、神経変性性疾患、骨の障害、及び心血管疾患から選択される医学的障害の治療においても有用となり得ることが想定される。さらに、特定の細胞、細胞種、組織及び/又は器官に毒性物質を標的化送達することから利益を得ることができるあらゆる障害が、本発明の範囲内に含まれる。

【0058】

最後に、本明細書の実施態様は式(I)及び式(II)により表される化合物の混合物を含む

10

20

30

40

50

組成物を含むことができる。

【0059】

以下の記載においてなされる特定の実施態様への言及は、本件開示の原理のみを例示するものと考えられる。さらに、多くの改変及び変更が当業者には直ちに明らかであるので、それは、本明細書に記載の通り示されるまさにその構成及びプロセスに、本件開示を限定することを意図するものではない。したがって、全ての適切な改変及び等価物が、本件開示の範囲内にあり、続く特許請求の範囲により規定されると、考えることができる。

【0060】

本明細書及び続く特許請求の範囲で使用される語「含む (comprise)」、「含んでいる (comprising)」、「含む (include)」、及び「含んでいる (including)」は、述べられた特徴、整数、成分、又は工程の存在を明示するものであると意図されるが、それらは、1つ以上の追加のその特徴、整数、成分、又は工程の存在又は追加を除外しない。

10

【0061】

本明細書の実施態様のいずれかに使用される一般用語は、以下の通り定義され得る。しかし、述べられた意味は、用語自体の範囲を限定すると解釈されるべきでない。

【0062】

本明細書で使用される用語「コンジュゲート」は、リガンド、リンカー、及び生物活性分子を有する化合物を指す。例示的な例には、式(II)の化合物がある。

【0063】

本明細書で使用される用語「スペーサー」は、リガンドを生物活性分子から空間的に分離し、細胞内でリンカーを異化させるために使用される、リンカーの化学的ビルディングブロックを指す。

20

【0064】

本明細書で使用される用語「マクロライド」は、マクロライド環を有する任意の生物活性分子を指す。

【0065】

記号

【化20】



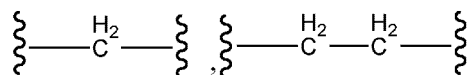
30

は、結合点を表示する。

【0066】

本明細書で使用される用語「アルキル」は、直鎖若しくは分枝鎖又はそれらの組み合わせを有する炭化水素基を指す。アルキル基は一価、二価、又は環式基とすることができる。一価アルキル基の例としては、メチル、エチル、1-プロピル、2-プロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、t-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシルなどがある。二価アルキル基の例の例示の方法の1つとしては、

【化21】



40

が挙げられる。

【0067】

環式アルキル基の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどが挙げられる。典型的なアルキル基は1~10個の炭素原子、1~9個の炭素原子、1~8個の炭素原子、1~7個の炭素原子、1~6個の炭素原子、1~5個の炭素原子、1~4個の炭素原子、1~3個の炭素原子、1~2個の炭素原子、又は1つの炭素原子を有する。典型的なシクロアルキルは、3~7員の単環式環基である。

【0068】

本明細書で使用される語句「医薬として許容し得る塩」は、本明細書に記載されるコン

50

ジュゲート化合物、例えば式(I)及び(II)の化合物の有機塩と無機塩の両方を指す。該塩は、医薬として許容し得るものであり、硫酸塩、クエン酸塩、硝酸塩、リン酸塩、アスコルビン酸塩、臭化物、グルコン酸塩、安息香酸塩、シュウ酸塩、パントテン酸塩などがある。本明細書での医薬として許容し得る塩が、その構造内に2以上の荷電した原子並びに1以上の対イオンを含み得ることに留意されたい。医薬として許容し得る塩としての本明細書でのコンジュゲート化合物の製造は、当業者に周知である。

【0069】

本明細書で使用される「リガンド」という用語は、第二の分子又は化合物と特異的に、又は選択的に、相互作用し、かつ/又は結合する任意の分子又は化合物を意味する。特定の実施態様において、リガンドは抗体又はその抗原結合断片である。本発明との関連で使用 10
するに適したリガンドの他の例を挙げると、例えば、アプタマー、特定の抗原と特異的に相互作用するペプチド（例えば、ペプチボディ）、受容体分子、及び抗原結合スキャフォールド（例えば、DARPin、HEATリピートタンパク質、ARMリピートタンパク質、テトラトリコペプチドリピートタンパク質、及び天然のリピートタンパク質に基づく他のスキャフォールドなど[例えば、Boersma及びPluckthunの文献、2011、Curr. Opin. Biotechnol. 22:849-857、及びそこに引用された引用文献を参照されたい]）がある。

【0070】

抗体は未加工の免疫グロブリンとして、又は種々のペプチダーゼでの消化によって生産される多数のよく特徴づけられた断片として、存在する。例えば、ペプシンはヒンジ領域のジスルフィド結合より下で抗体を消化し、 $F(ab)'_2$ を生産する。 $F(ab)'_2$ は、それ自体が 20
ジスルフィド結合によって V_H-C_H に結合されている軽鎖であるFabのダイマーである。 $F(ab)'_2$ は穏やかな条件下で還元され、ヒンジ領域でジスルフィド結合を切断し、これにより該 $F(ab)'_2$ ダイマーはFab'モノマーへと変換される。このFab'モノマーは實質的に、ヒンジ領域の部分を有するFabである。種々の抗体断片が未加工の抗体の消化の観点で定義されているが、当業者はそのような断片が、化学的に、又は組換えDNA法を使用することにより一から合成できることを認識するであろう。従って、本明細書で使用される抗体という用語はまた、全長抗体の改変により生産された抗体断片、又は組換えDNA法を用いた一から合成された抗体断片（例えば、単鎖Fv (scFv)、単一可変ドメイン (Dab)）若しくはファージ、大腸菌、又は酵母のディスプレイライブラリ（例えば、McCaffertyらの文献 (1990) Nature 348:552-554を参照されたい）などのディスプレイライブラリを用いて同 30
定された抗体断片をも含む。

【0071】

抗体を製造する方法は、当技術分野で公知である。例えば、Kohler及びMilsteinの文献 (1975) Nature 256:495-497; Harlow及びLaneの文献 (1988) 「抗体：実験室手引き (Antibodies: a Laboratory Manual)」 (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y.) を参照されたい。ヒト以外の生物、例えばマウス、ラット、ウサギ、ウシから単離される抗体は、キメラ化又はヒト化を介してよりヒトに類似のものとすることができる。

【0072】

本明細書で使用される用語「ヒト抗体」は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域を有する抗体を含むものとする。本発明のヒトmAbは、ヒト免疫グロブリン配列によりコードされていないアミノ酸残基(例えば、インビトロのランダム若しくは部位特異的な変異誘発により、又はインビボの体細胞突然変異により導入された変異)を、例えばCDR中に、とりわけCDR3中に含み得る。しかし、本明細書で使用される用語「ヒト抗体」は、別な哺乳動物種の生殖細胞系に由来するCDR配列がヒトFR配列にグラフトされたmAbを含むものではない。

【0073】

本明細書で使用される用語「治療上有効な量」は、投与される目的である所望の効果を生み出す量を指す。正確な量は治療の目的に依存するが、公知の技法を利用して当業者により確認可能である(例えば、Lloydの文献(1999)「医薬配合の技能、科学、及び技術 (The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding)」を参照されたい)。

10

20

30

40

50

【0074】

本明細書で使用される用語「ラセミ体」は、1対の鏡像異性体の等モル混合物を意味する。また、用語「ラセミ体」は、ラセミ混合物のことも指す。

【0075】

本明細書で使用される用語「鏡像異性体」は、互いの鏡像と重ね合わせることができない化合物を指す。鏡像異性体は(R)配置又は(S)配置のいずれかで存在し得る。

【0076】

用語「立体選択的な合成」は、2以上の可能な立体異性体の中から、単一の立体異性体又は鏡像異性体に富む異性体混合物を形成させる化学反応を指す。

【0077】

用語「ジアステレオマー過剰率」は、所望の単一ジアステレオマーと組成物中の残りのジアステレオマーのモル画分間の差を指す。ジアステレオマー過剰率は以下のように計算される。

$$(\text{単一のジアステレオマーの量}) - (\text{他のジアステレオマーの量}) / 1$$

例えば、1を90%、2、3、4、又はこれらの混合物を10%含む組成物は、80% [(90-10)/1]のジアステレオマー過剰率を有する。1を95%、及び2、3、4、又はこれらの混合物を5%含む組成物は、90% [(95-5)/1]のジアステレオマー過剰率を有する。1を99%、及び2、3、4、又はこれらの混合物を1%含む組成物は、98% [(99-1)/1]のジアステレオマー過剰率を有する。ジアステレオマー過剰率は、同様にして1、2、3、又は4のいずれの1つに対しても計算することができる。

【0078】

本明細書で使用される用語「立体異性体的に (stereomerically) 純粋な」とは、示された立体異性体とその化合物の他の立体異性体よりも高い程度で存在する、例えば、化合物が、ジアステレオマー過剰率で存在する化合物を指す。いくつかの実施態様において、本明細書に記載される立体異性体的に純粋な化合物は、該化合物の1つの立体異性体を重量にして80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、又は97%以上含む。

【0079】

本明細書に記載される種々の実施態様に従ったコンジュゲートは、当技術分野の任意の公知の方法により製造することができる。コンジュゲートを生産するための例示的な手順は、後に記載する実施例中で提供される。

【0080】

一実施態様において、該コンジュゲートはi) リガンドを式(I)の薬剤分子と反応させて式(II)のコンジュゲートを形成させ、かつii) 該コンジュゲートを精製することにより製造することができる。

【0081】

代りの実施態様において、該コンジュゲートは、リガンド、リンカー、及び生物活性マクロライドを単一の反応において反応させることにより製造される。いったん本発明に従って該コンジュゲートを製造したら、それを精製することができる。

【0082】

一実施態様において、本明細書に記載される式(I)の薬剤分子を含む組成物及び/又は式(II)のコンジュゲート化合物を含む組成物は、インビトロで種々の癌細胞株の増殖を抑制する能力に関して評価することができる。例えば、式(I)の薬剤分子を含む組成物及び/又は式(II)のコンジュゲート化合物を含む組成物を、インビトロで蒔かれた癌細胞に所定の日数の間適用し、生存した細胞を、公知の方法によるアッセイで測定することができる。

【0083】

上記の記載、例、及びデータは、本発明の組成物の製造及び使用を完全に記載する。本発明の多くの実施態様を、本発明の趣旨及び範囲から逸脱しないように、作成することができるので、本発明は、この後に添付される特許請求の範囲内にある。

【0084】

本明細書及びこの後の実施例に引用された引用文献は全て、特許、公開特許出願、及び

10

20

30

40

50

引用文献を含めて引用により明白にその全体として組み込まれる。

【0085】

記載及び以下に表される実施例は、主題発明を説明するために提供される。当業者は、これらの実施例が例示のためのみに提供され、本発明を限定する目的には含まれていないことを認識するであろう。

【0086】

本明細書に開示される実施態様は、以下に記載される非限定的な例により、より詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0087】

【図1】図1は、メイタンシン-3-N-メチル-L-アラニン-プロパンアミジル-3-チオ-3-スクシンイミジル-N-メチルシクロヘキシル-4-trans-カルボキシスクシネート(5)の¹H-NMRスペクトルを示す。該¹H-NMRスペクトルは少なくとも95%のジアステレオマー過剰率で存在する単一のジアステレオマーと一致するが、これは、該スペクトルが他のジアステレオマーに帰属する共鳴により複雑化されていないためである(比較の目的で、実施例2にはジアステレオマー混合物の¹H-NMRスペクトルが記載されている)。

【0088】

【図2】図2は、メイタンシン-3-N-メチル-L-アラニン-プロパンアミジル-3-チオ-3-スクシンイミジル-N-メチルシクロヘキシル-4-trans-カルボキシスクシネートのジアステレオマー混合物(6)の¹H-NMRスペクトルを示す。

【0089】

【図3】図3は、SKBR3細胞において、単一のジアステレオマー化合物コンジュゲートHER2-5が(インビトロ及びインビボのロットで)0.3 nMのIC₅₀値を有し、対してジアステレオマーコンジュゲートの混合物HER2-6は0.9 nMのIC₅₀値を有することを示している。

【0090】

【図4】図4は、BT474細胞において、該単一のジアステレオマー化合物コンジュゲートHER2-5が(インビトロで)4.6 nMのIC₅₀値を有し、一方該HER2-5の(インビボの)ロットは4.0 nMのIC₅₀値を有し、これに対し該ジアステレオマーコンジュゲートの混合物HER2-6は11.6 nMのIC₅₀値を有することを示している。

【0091】

【図5】図5は、NCI-N87細胞において、該単一のジアステレオマー化合物コンジュゲートHER2-5が(インビトロで)0.6 nMのIC₅₀値を有し、一方該HER2-5の(インビボの)ロットは0.4 nMのIC₅₀値を有し、これに対し該ジアステレオマーコンジュゲートの混合物HER2-6は1.0 nMのIC₅₀値を有することを示している。

【0092】

【図6】図6は、HEK293/hEGFRvIII細胞において、単一のジアステレオマー化合物コンジュゲートEGFRvIII-5が0.4 nMのIC₅₀値を有し、一方ジアステレオマーコンジュゲートの混合物EGFRvIII-6は0.5 nMのIC₅₀値を有することを示している。

【0093】

【図7】図7は、MMT/hEGFRvIII細胞において、該単一のジアステレオマー化合物コンジュゲートEGFRvIII-5が0.5 nMのIC₅₀値を有し、一方該ジアステレオマーコンジュゲートの混合物EGFRvIII-6はほぼ20倍高い9.8 nMのIC₅₀値を有することを示している。

【0094】

【図8】図8は、U251/hEGFRvIII細胞において、該単一のジアステレオマー化合物コンジュゲートEGFRvIII-5が2.4 nMのIC₅₀値を有し、一方該ジアステレオマーコンジュゲートの混合物EGFRvIII-6は3.3 nMのIC₅₀値を有することを示している。

【0095】

【図9】図9は、Ovcar-3細胞において、単一のジアステレオマー化合物コンジュゲートMUC16-5が6.3 nMのIC₅₀値を有し、一方ジアステレオマーコンジュゲートの混合物MUC16-6は16.0 nMのIC₅₀値を有することを示している。

10

20

30

40

50

【0096】

【図10】図10は、PC3/MUC16long細胞において、該単一のジアステレオマー化合物コンジュゲートMUC16-5が0.34 nMの IC_{50} 値を有し、一方該ジアステレオマーコンジュゲートの混合物MUC16-6は0.80 nMの IC_{50} 値を有することを示している。

【0097】

【図11】図11は、HER2-5及び対照試薬を投与した後のマウスにおける腫瘍成長曲線を示している。マウスにPBSビヒクル()、300 μ g/kg DM1-SMe()、及び15 mg/kgのアイソタイプ対照mAb()を与えた。また、マウスにHER2 mAb()、HER2-5()、及びアイソタイプ対照-5()も、1 mg/kg (A)、5 mg/kg (B)、及び15 mg/kg (C)の用量で与えた。マウスは黒の矢印で示したように、コンジュゲートと対照試薬を、一旦3週間投与を受けた(.群はN = 8、平均 \pm SE.)。

10

【0098】

【図12】図12は、腫瘍移植後79日目のPBSビヒクル対照群の終了時にHER2-5及び対照試薬を投与した後の腫瘍体積の変化を示している。それぞれの投与群について個々の腫瘍多サイズを示している。マウスにPBSビヒクル()、300 μ g/kg DM1-SMe()、及び15 mg/kgアイソタイプ対照mAb()を与えた。また、マウスにHER2 mAb()、HER2-5()、及びアイソタイプ対照-5()も、1 mg/kg (A)、5 mg/kg (B)、及び15 mg/kg (C)の用量で与えた。群はN = 8、平均 \pm SD。

【0099】

【図13】図13は、HER2-5及び対照試薬を投与した後の動物体重のパーセンテージ変化を示している。マウスにPBSビヒクル()、300 μ g/kg DM1-SMe()、及び15 mg/kgアイソタイプ対照mAb()を与えた。また、マウスにHER2 mAb()、HER2-5()、及びアイソタイプ対照-5()も、1 mg/kg (A)、5 mg/kg (B)、及び15 mg/kg (C)の用量で与えた。黒矢印で示されているように、マウスに1週間に1回のコンジュゲート及び対照試薬の投与を3回行った(.群はN = 8、平均 \pm SE.)。

20

【実施例】

【0100】

(実験の詳細)

(UVにより検出できなかった化合物についての)プロトンNMRスペクトルは、Varian Inova 300MHz装置で取得し、質量スペクトルは、エレクトロスプレーイオン化源及び四重極イオントラップ分析器を備えたAgilent 1100シリーズLC/MSD で収集した。Bruker ultraFlex Xtreme MALDI-TOF-TOF質量分析計を利用して、全てのコンジュゲートを分析した。出発物質及び溶媒は全て、市販品を購入し、特に記述しない限り精製せずに使用した。

30

【0101】

(実施例1)

マレイミジルメチル-4-trans-シクロヘキシルカルボキシ-スクシネート(3)の合成：
マレイミジルメチル-4-trans-シクロヘキサンカルボン酸(2)：標記化合物をMarnettらの文献(J. Med. Chem.、1996、39、1692-1670)に記載された方法の変形版を利用して2段階(工程A及び工程B)で製造した。

【0102】

工程A：trans-4-アミノメチルシクロヘキサンカルボン酸(7.00 g、44.5 mmol)の1,4-ジオキサン(70 mL)溶液を無水マレイン酸(4.89 g、49.9 mmol)で処理し、周囲温度で48時間撹拌した。該反応物を真空中で蒸発させて白色固体とし、これを保存するか、さらなる精製を行うことなく次の工程へと進めることができる。

40

【化 2 2】

¹H NMR

(300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.11 (m, 1H), 6.44 (d, 1H, *J* = 13 Hz), 6.24 (d, 1H, *J* = 13 Hz), 3.05 (t, 2H, *J* = 6 Hz), 2.13 (tt, 1H, *J* = 12 Hz, 4 Hz), 1.90 (m, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.44 (m, 1H), 1.28 (m, 2H), 0.96 (m, 2H).

【 0 1 0 3 】

工程B：工程Aからのマレイン酸モノアミド（36.8 g、144 mmol）及び酢酸ナトリウム（13.6 g、165 mmol）を無水酢酸（368 mL）に溶解し、ガラス反応容器中に密封し、120
 で3時間加熱した。冷却した反応混合物（黒いシロップ）を水（3 L）の上に注ぎ、攪拌し、ジクロロメタンで抽出した。該有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、焼結ガラスロート上で濾過し、透明な濾液を蒸発させ、高真空下乾燥させて標記化合物を黄色固体として得た（7.00 g、20%）。

10

【化 2 3】

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.73 (s, 2H), 3.40 (d, 2H, *J* = 7 Hz), 2.28 (m, 1H), 2.06 (m, 2H), 1.75 (m, 3H), 1.42 (m, 2H), 1.03 (m, 2H).

【 0 1 0 4 】

マレイミジルメチル-4-*trans*-シクロヘキサシクロヘキサカルボキシスクシネート(3)：先の工程Bの産物（10.0 g、42.1 mmol）をAr下ジクロロメタン（50 mL）で溶解させ、*N*-ヒドロキシスクシンイミド（7.27 g、63.2 mmol）及び1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩（EDAC、12.4 g、64.5 mmol）で処理し、該反応物を周囲温度で一晩攪拌した。得られた茶色溶液をジクロロメタンで希釈し、水及び塩水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、焼結ガラスロート上で濾過し、濾液を濃縮し、真空中で乾燥させた。次いで、この産物を熱した酢酸エチルに溶解し、活性炭（1.5 g）で処理し、濾過し、濾液を冷却した。結晶産物の濾過、冷酢酸エチルでの洗浄、及び続いての吸引乾燥により、標記化合物を黄褐色固体として得た（5.52 g、39%）。

20

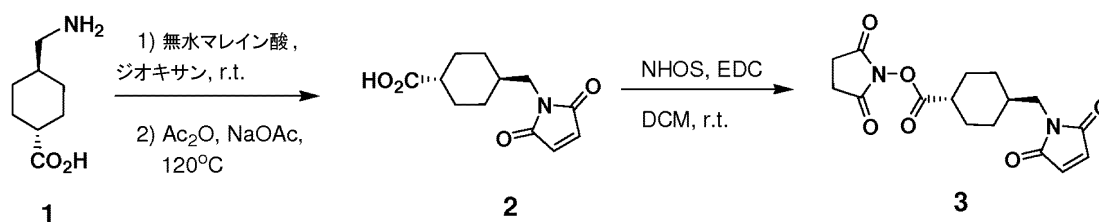
【化 2 4】

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.72 (s,

2H), 3.42 (m, 2H), 2.85 (br s, 4H), 2.56 (tt, 1H, *J* = 12 Hz, 4 Hz), 2.18 (m, 2H), 1.80 (m, 2H), 1.70 (m, 1H), 1.56 (m, 2H), 1.09 (m, 2H).

30

【化 2 5】



40

【 0 1 0 5 】

(実施例2)

メイタンシン-3-*N*-メチル-L-アラニン-プロパンアミド-3-チオール(4)：当技術分野でM1として知られている標記化合物を、Whitesidesらの文献（*J. Org. Chem.*、1991、56、2648-2650）に記載された方法の変形版を利用して製造した。メイタンシン-3-*N*-メチル-L-Ala-(3-メチルジスルファニル)プロパンアミド(DM1-SMe、2.42g、3.09mmol、Ho及びCarrozellaの文献、米国特許出願第2007/003792 A1と同様の方法によって製造した)を、アセ

50

トニトリル(30mL)に溶かし、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(8.23g、28.7 mmol)の水(30mL)溶液で処理し、飽和NaHCO₃水溶液(5mL)の添加によりpHを約3まで上げ、フラスコをArでパージし、該反応物を、周囲温度でゴム製セプタムをして(泡立ちのために通気口を作った)攪拌した。2時間後、該反応物を塩水(約100mL)で処理し、Arで5分間バブリングし(遊離メチルメルカプタンを除去するため)、相を分離した。水相を酢酸エチル(EtOAc)で2回抽出し、NaClで飽和させ、さらに2回EtOAcで抽出した。次いで、合わせた有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濾液を濃縮し、真空中で乾燥させると、標記化合物を白色固体として得た(2.24g、98%)。

【化 2 6】

¹H NMR (300

10

MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 6.76 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 6.63 (d, 1H, *J* = 11 Hz), 6.59 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 6.35 (m, 2H), 5.59 (dd, 1H, *J* = 15 Hz, 9 Hz), 5.36 (q, 1H, *J* = 6.5 Hz), 4.68 (dd, 1H, *J* = 12 Hz, 3 Hz), 4.21 (t, 1H, *J* = 10 Hz), 3.92 (s, 3H), 3.60 (d, 1H, *J* = 13 Hz), 3.42 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 3.29 (s, 3H), 3.14 (s, 3H), 3.05 (d, 1H, *J* = 13 Hz), 2.95 (d, 1H, *J* = 10 Hz), 2.77 (s, 3H), 2.75 – 2.47 (m, 6H), 2.11 (dd, 1H, *J* = 14 Hz, 3 Hz), 1.58 (s, 3H), 1.47 (d, 1H, *J* = 14 Hz), 1.40 (m, 1H), 1.22 (m, 6H), 0.73 (s, 3H).

MS(ESI、ポジティブ): C₃₅H₄₈ClN₃O₁₀Sの計算値、737.3; 実測値738.3 (M+H), 720.3 (M-H₂O+H)。

20

【 0 1 0 6】

メイタンシン-3-N-メチル-L-アラニン-プロパンイミジル-3-チオ-3-スクシンイミジル-N-メチルシクロヘキシル-4-trans-カルボキシスクシネート(5): 以下の手順は当技術分野において公知でない新たな方法を記載する。先の工程の産物(4、2.23 g、3.02 mmol)及びマレイミジルメチル-4-シクロヘキサカルボキシスクシネート(3、1.50 g、4.49 mmol)を4:1 アセトニトリル/水(75 mL)に溶解し、分取TLCプレートからかきとられた微細シリカゲル(11.2 g)で処理し、該フラスコをArでパージし、該混合物を周囲温度でゴム製セプタムをして攪拌した。18時間後、より多くの3(0.77 g、2.3 mmol)及びアセトニトリル(MeCN、10 mL)を加え、該反応物をさらに6時間攪拌した。該混合物をセライト上で濾過し、固体をMeCN及び酢酸エチル(EtOAc)で洗浄し、濾液を真空中で濃縮して金色固体とし、これを120gシリカゲルカートリッジ(ジクロロメタン中の50~100% 1:1 EtOAc/MeCN、33分かけて、75 mL/分)上でのフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製した。純粋なカラム画分を真空中で蒸発させ、乾燥させることにより、標記化合物をクリーム色固体(2.09 g)として得た。不純画分の濃縮及び前記の80gシリカゲルカートリッジ上での再精製により、追加のバッチのクリーム色固体(0.22 g)を得て、標記化合物の全収量を2.31 g(71%)にした。

30

【化 2 7】

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.85

40

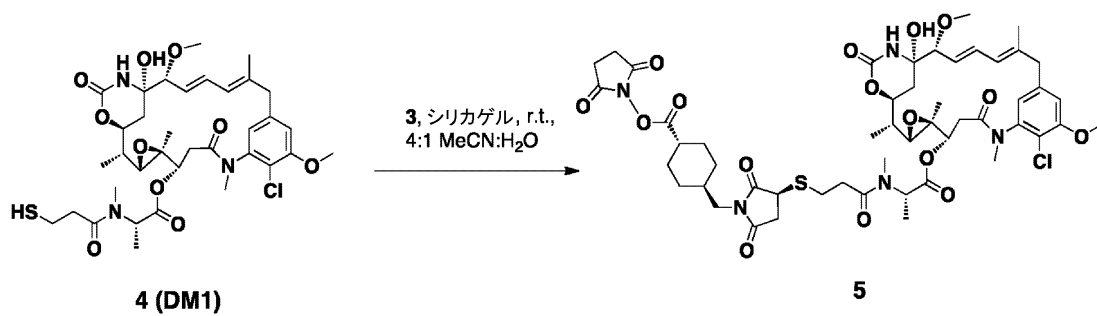
(d, 1H, *J* = 4 Hz), 6.72 (m, 1H), 6.65 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 6.44 (dd, 1H, *J* = 15 Hz, 11 Hz), 6.25 (s, 1H), 5.67 (dd, 1H, *J* = 16 Hz, 9 Hz), 5.41 (m, 1H), 4.79 (d, 1H, *J* = 11 Hz), 4.30 (t, 1H, *J* = 11 Hz), 3.72 (m, 2H), 3.51 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 3.37 (m, 4H), 3.27 (m, 1H), 3.23 (s, 3H), 3.16 – 2.99 (m, 4H), 2.85 (m, 7H), 2.62 (m, 3H), 2.39 (ddd, 1H, *J* = 19 Hz, 12 Hz, 4 Hz), 2.18 (br m, 2H), 1.77 (br m, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.60 – 1.47 (m, 4H), 1.31 (m, 6H), 1.05 (m, 2H), 0.82 (s, 3H).

MS (ESI、ポジティブ): C₅₁H₆₆ClN₅O₁₆Sの計算値、1071.4; 実測値1072.4 (M+H)、1054.9 (M-H₂O+H); [α]_D²⁰_{589nm} = -52.4 (c = 0.00301、MeOH)。単一のジアステレオマー

50

の¹H-NMRについては、図1を参照されたい。

【化28】



10

【0107】

(実施例3)

メイタンシン-3-N-メチル-L-アラニン-プロパンアミジル-3-チオ-3-スクシンイミジル-N-メチルシクロヘキシル-4-trans-カルボキシスクシネートのジアステレオマー混合物(6) : 5の混合立体異性体試料を米国特許出願第20100129314号の実施例XIに従って合成した。

【化29】

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.85-6.6 (m), 6.4 (m), 6.1 (m), 5.8-5.4 (m), 5.2 (m), 4.92-4.79 (m), 4.4-4.1 (m), 4.03 (s), 3.82 (m), 3.8-2.2 (m), 2.1 (m), 2.07 (s), 2.0-0.8 (m).

20

MS (ESI、ポジティブ) : C₅₁H₆₆ClN₅O₁₆Sの計算値、1071.4 ; 実測値1072.4 (M+H)。ジアステレオマー混合物の¹H-NMRについては、図2を参照されたい。

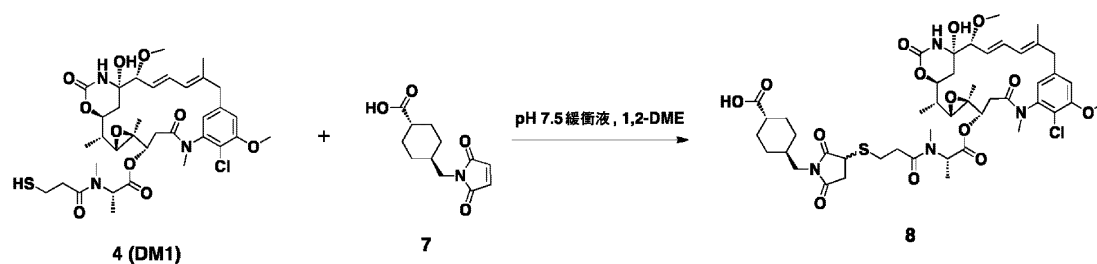
【0108】

(実施例4)

ラセミ体メイタンシン-3-N-メチル-L-アラニン-プロパンアミジル-3-チオ-3-スクシンイミジル-N-メチルシクロヘキシル-4-trans-カルボン酸(8) : trans-1,4-(マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸7 (167 mg、0.701 mmol) の1,2-ジメトキシエタン (8 mL) 溶液を4 (340 mg、0.461 mmol) の1,2-ジメトキシエタン (15 mL) 溶液に加えた。次いで、該混合物をpH 7.5の緩衝液 (20 mL) 及び数滴の飽和NaHCO₃水溶液で処理し、pHを維持した。反応混合物をアルゴン下室温で一晩攪拌し、次いで減圧下で濃縮した。粗製残渣をC18カラム、20-40 μmカラム (100 g) を用いた逆相クロマトグラフィーにより精製し、水 (0.1% AcOH) 中アセトニトリル (0.1% AcOH) の勾配 (10~95%を25分かけて) で溶出し、凍結乾燥すると、8 (330 mg、0.338 mmol、収率73%) を白色固体として得た。MS m/z : 977.2 [MH⁺]、957.2 [M-18]、999.2 [M+ Na] ; 純度 : >98% (LC/MSによる)。

30

【化30】



40

【0109】

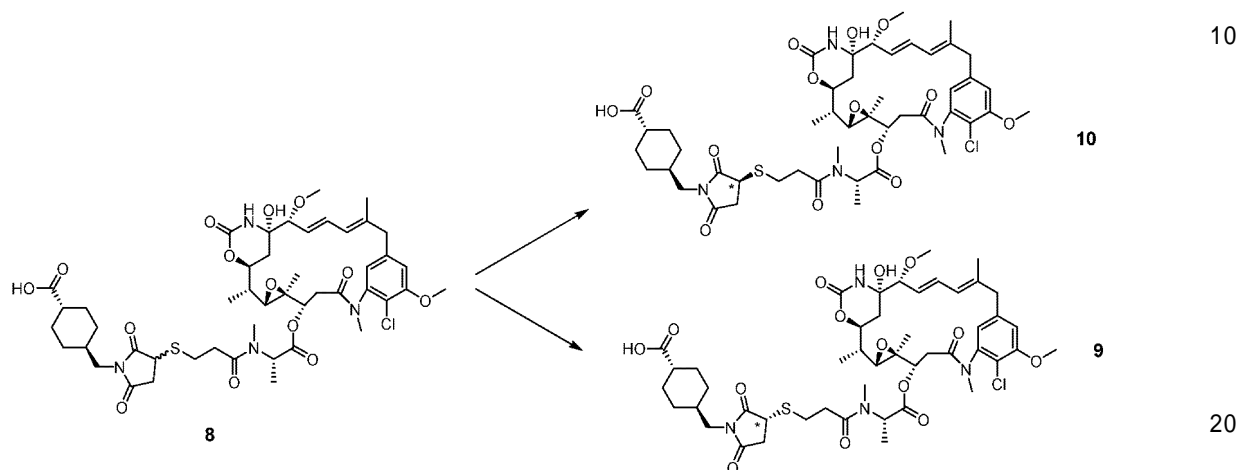
(実施例5)

単一ジアステレオマー(R*)-メイタンシン-3-N-メチル-L-アラニン-プロパンアミジル-3-チオ-3-スクシンイミジル-N-メチルシクロヘキシル-4-trans-カルボン酸(9)及び(S*)-メイタンシン-3-N-メチル-L-アラニン-プロパンアミジル-3-チオ-3-スクシンイミジル-N-メ

50

チルシクロヘキシル-4-trans-カルボン酸(10)への8のキラル分離 (S*及びR*はキラリティーが未知の単一立体異性体を表す) : 化合物8 (20 mg) のジアステレオマー混合物を0.5 mlアセトニトリルに溶解し、セミプレップキラルカラム (Chiralcel OJ、溶媒系、6:1:1ヘキサン : IPA:エタノール) を用いて分離し、3.5 mgの10をより速く流れる化合物として与え (MS m/z : 977.2 [MH⁺]、957.2 [M-18]、999.2 [M+ Na] ; 純度 : >95% (LC/MSによる) 、RT = 32分) 、かつ4.6 mgの9をより遅く流れる化合物として与える (MS m/z : 977.2 [MH⁺]、957.2 [M-18]、999.2 [M+ Na] ; 純度 : >95% (LC/MSによる) 、R_f = 48分) 。

【化31】

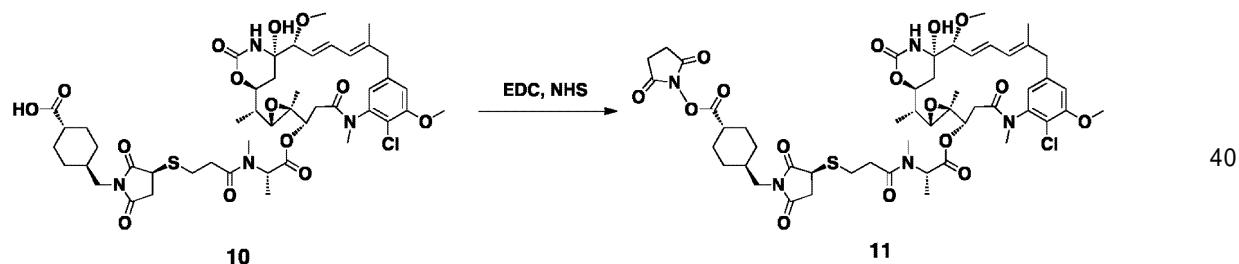


【0110】

(実施例6)

(S*)-メイタンシン-3-N-メチル-L-アラニン-プロパンアミジル-3-チオ-3-スクシンイミジル-N-メチルシクロヘキシル-4-trans-カルボン酸(11)の合成 : 10 (2.5 mg、0.0026 mmol) の溶液をジクロロメタン (1 mL) に溶解し、次いで、N-ヒドロキススクシンイミド (NHS、6.0 mg、0.052 mmol) 及び1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDCI、13 mg、0.065 mmol) で処理した。該反応混合物をアルゴン下室温で一晩攪拌し、水、続いて塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した。溶媒を減圧下蒸発させて粗製残渣を得て、これをC18、20-40 μmカラム (30 g) を用いた逆相クロマトグラフィーにより精製し、水 (0.1% AcOH) 中アセトニトリル (0.1% AcOH) の勾配 (10~95%を18分かけて) で溶出し、凍結乾燥すると、11を得た。MS m/z : 1073.2 [MH⁺]、1054.4[M-18] ; 純度 : 95% (LC/MSによる) 。

【化32】



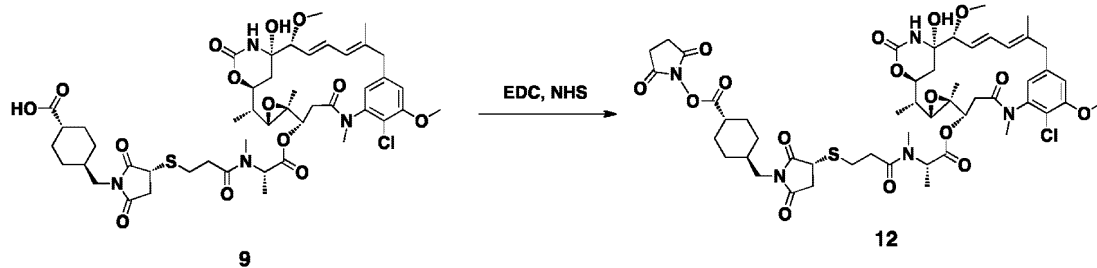
【0111】

(実施例7)

(R*)-メイタンシン-3-N-メチル-L-アラニン-プロパンアミジル-3-チオ-3-スクシンイミジル-N-メチルシクロヘキシル-4-trans-カルボン酸 (12) : 9 (3 mg、0.003 mmol) の溶液をジクロロメタン (1 mL) に溶解し、次いで、N-ヒドロキススクシンイミド (NHS、3.0 mg、0.026mmol) 及び1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDCI、7 mg、0.036 mmol) で処理した。該反応混合物をアルゴン下室温で一晩攪拌し、

水、続いて塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した。溶媒を減圧下で蒸発させると粗製残渣を得て、これをC18カラム、20-40 μm (15 g)を用いた逆相クロマトグラフィーにより精製し、水 (0.1% AcOH) 中アセトニトリル (0.1% AcOH) の勾配 (10 ~ 95%を18分かけて) で溶出し、凍結乾燥すると、12を得た。MS m/z : 1073.2 [MH⁺]、1054.4[M-18]、純度: 95% (LC/MSによる)。

【化33】



10

【0112】

(実施例8)

コンジュゲートの製造及び特徴づけ

【0113】

先の実施例で製造された2つの異なるメイタンシン-リンカー組成物 (化合物5及び化合物6) を、種々の抗腫瘍抗原モノクローナル抗体に結合した。化合物5が主にリンカー-DM1細胞毒性化合物の単一ジアステレオマーを含むのに対し、化合物6は種々のリンカー-DM1ジアステレオマーの混合物を含む。本実施例において使用される抗体はCarterらの文献、PNAS 1992 89 4285のhumAb4D5-8に由来する可変領域を有する抗HER2抗体、WO2013075048 A1のクローン131に由来する可変領域を有する抗EGFRvIII抗体、及びWO2007001851のクローン3A5に由来する可変領域を有する抗MUC16抗体である。

20

【0114】

該抗体をCHO細胞で発現させ、プロテインAにより精製した。また、癌とは無関係の感染症抗原に由来する非結合性のアイソタイプ対照抗体も、本実施例において使用した。

【0115】

該抗体 (10 mg/ml) を50 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 8.0、及び10% (v/v) DMA中で、6倍過剰量の化合物5又は6と1時間周囲温度で結合させた。該コンジュゲートを、サイズ排除クロマトグラフィーにより精製し、滅菌濾過した。タンパク質及びリンカーペイロード濃度は、UVスペクトル分析及びMALDI-TOF質量分析により決定した。サイズ排除HPLCは、使用した全コンジュゲートが、95%超モノマー性であることを確立し、RP-HPLCは、0.5%未満の結合されていないリンカーペイロードがあることを確立した。タンパク質に基づく収率を、表1に報告する。全ての結合された抗体を、UVにより、Hamblettらの文献 (Cancer Res., 2004 10 7063) に従ってリンカーペイロードロード値 (loading value) に関して、未加工対コンジュゲートの質量差により分析した。結果を表1にまとめる。

30

【表1】

化合物	$\epsilon_{252 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$	$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$
5	26790	5700
6*	26790	5700

抗体	$\epsilon_{252 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$	$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$
HER2	81847	215388
EGFRvIII	79579	209420
MUC16	88671	248380
アイソタイプ対照	81718	233480

抗体 コンジュゲート	ペイロード：抗体 (UV)	ペイロード：抗体 (MS)	収率 %
HER2-5 (インビボ)	2.7	2.7	66
HER2-5 (インビトロ)	3.1	2.4	75
HER2-6 (インビトロ)	2.9	2.4	70
EGFRvIII-5	2.8	2.3	56
EGFRvIII-6	2.9	2.2	56
MUC16-5	2.4	2.0	76
MUC16-6	2.3	2.1	96
アイソタイプ対照-5	3.3	3.3	67

* 吸光係数は、化合物5から使用した。

【0116】

(実施例9)

インビトロ細胞毒性アッセイ

【0117】

細胞を、PDLコートしてある96ウェルプレートに、ウェルあたり10,000 (SK-BR-3及びNCI-N87)、15,000 (BT-474)、3000 (Ovcar-3及びPC3/Muc16)、2000 (HEK293/hEGFRvIII)、1500 (U251/hEGFRvIII)、又は400 (MMT/hEGFRvIII) 細胞で、完全増殖培地に播種し、一晚成長させた。細胞生存率曲線のために、連続希釈した抗体-薬剤コンジュゲート又は遊離のペイロードを、1 μM ~ 1 pMの範囲の最終濃度で細胞に加え、3日間インキュベートした。各濃度を2連で実施し、それぞれの標準偏差を報告した。細胞をCCK8(Dojindo社製)と共に、最後の1~3時間インキュベートし、450nmでの吸光度(OD_{450})を、Flexstation3(Molecular Devices社製)で測定した。ジギトニン(40 nM)処理した細胞からのバックグラウンド OD_{450} レベルを全てのウェルから差し引き、生存可能性を、未処理の対照のパーセンテージとして表す。 IC_{50} 値を、10点反応曲線上で、4パラメータロジスティック方程式から決定した(GraphPad Prism)。曲線及び IC_{50} 値は全て、MALDI-TOF実験からのローディングに基づいてペイロード当量に対して補正する。

【0118】

本来的にアイソタイプ対照結合を607倍上回るHER2を発現するSKBR3細胞(乳癌株)において、該単一ジアステレオマー化合物コンジュゲートHER2-5は(インビトロ及びインビボのロットにおいて)0.3 nMの IC_{50} 値を有し、一方、該ジアステレオマー化合物コンジュゲートの混合物HER2-6は0.9 nMの IC_{50} 値を有していた(表2、図3)。小さなインビトロロットを最初に結合して細胞増殖アッセイにのみ使用し、一方、次いでより大きなインビボロットを結合して、インビトロ及びインビボ実験の両方に使用した。結合していないHER2抗

10

20

30

40

50

体は、ほとんど抗増殖活性を有さなかった。

【0119】

本来的にアイソタイプ対照結合を426倍上回るHER2を発現するBT474細胞（乳癌株）において、該単一ジアステレオマー化合物コンジュゲートHER2-5は（インビトロで）4.6 nMの IC_{50} 値を有し、一方該HER2-5の（インビボの）ロットは4.0 nMの IC_{50} 値を有し、対して該ジアステレオマー化合物コンジュゲートの混合物HER2-6は11.6 nMの IC_{50} 値を有していた（表2、図4）。結合していないHER2抗体は、ほとんど抗増殖活性を有さなかった。

【0120】

本来的にアイソタイプ対照結合を869倍上回るHER2を発現するNCI-N87細胞（乳癌株）において、該単一ジアステレオマー化合物コンジュゲートHER2-5は（インビトロで）0.6 nMの IC_{50} 値を有し、一方該HER2-5の（インビボの）ロットは0.4 nMの IC_{50} 値を有し、一方、該ジアステレオマー化合物コンジュゲートの混合物HER2-6は1.0 nMの IC_{50} 値を有していた（表2、図5）。結合していないHER2抗体は、ほとんど抗増殖活性を有さなかった。

【0121】

本来的にアイソタイプ対照結合を360倍上回るhEGFRvIIIを発現するHEK293/hEGFRvIII細胞において、両方のコンジュゲート（単一及び混合物のジアステレオマー）は、0.4 nMの IC_{50} 値を示した（表3、図6）。結合していないEGFRvIII抗体は、ほとんど抗増殖活性を有さなかった。

【0122】

アイソタイプ対照結合を280倍上回るhEGFRvIIIを発現するMMT/hEGFRvIII細胞において、該単一ジアステレオマー化合物コンジュゲートEGFRvIII-5は0.5 nMの IC_{50} 値を有し、一方該ジアステレオマー化合物コンジュゲートの混合物EGFRvIII-6は9.8 nMの IC_{50} 値を有していた（表2、図7）。結合していないEGFRvIII抗体は、ほとんど抗増殖活性を有さなかった。

【0123】

アイソタイプ対照結合を165倍上回るhEGFRvIIIを発現するU251/hEGFRvIII細胞において、該単一ジアステレオマー化合物コンジュゲートEGFRvIII-5は2.4 nMの IC_{50} 値を有し、一方該ジアステレオマー化合物コンジュゲートの混合物EGFRvIII-6は3.3 nMの IC_{50} 値を有していた（表3、図7）。結合していないEGFRvIII抗体は、ほとんど抗増殖活性を有さなかった。

【0124】

本来的にアイソタイプ対照結合を373倍上回るMUC16を発現するOvcar-3細胞（卵巣癌株）において、該単一ジアステレオマー化合物コンジュゲートMUC16-5は6.3 nMの IC_{50} 値を有し、一方該ジアステレオマー化合物コンジュゲートの混合物MUC16-6は16.0 nMの IC_{50} 値を有していた（表4、図8）。結合していないMuc16抗体は、ほとんど抗増殖活性を有さなかった。

【0125】

アイソタイプ対照結合を105倍上回るMUC16を発現するPC3/MUC16細胞において、該単一ジアステレオマー化合物コンジュゲートMUC16-5は0.34 nMの IC_{50} 値を有し、一方該ジアステレオマー化合物コンジュゲートの混合物MUC16-6は0.8 nMの IC_{50} 値を有していた（表4、図9）。結合していないMuc16抗体は、ほとんど抗増殖活性を有さなかった。

【0126】

図3、4、及び5において、メイタンシン-3-N-メチル-L-Ala-(3-メチルジスルファニル)プロパンアミド（DM1-SMe、Ho及びCarrozzellaの文献、米国特許出願第2007/0037972 A1に従って製造される）をこれらのアッセイにおけるペイロードを表すのに選択した。化合物4は、インビトロ又はインビボで使用するにはあまりにも反応性が高すぎたため、信頼性に欠く結果を与えた。

【0127】

インビトロでの結果を標的ベースで以下の表2~4に要約する。本実施例では、本発明の単一のジアステレオマー薬剤を含む抗腫瘍抗体-薬剤コンジュゲートが、多くの場合、ジ

10

20

30

40

50

アステレオマー混合物を含む対応する抗体-薬剤コンジュゲートよりも高いインビトロでの殺傷効能を示した。分析した標的について、該単一のジアステレオマーの抗体-薬剤コンジュゲートは、試験される特定の細胞株に依存して典型的に2倍～3倍のオーダーで、対応する混合物コンジュゲートよりも高い効能をもっていた。

【表 2】

抗体 コンジュゲート	SKBR3 IC50 (nM)	BT474 IC50 (nM)	N87 IC50 (nM)
HER2-5 (インビボ)	0.3	4.0	0.4
HER2-5 (インビトロ)	0.3	4.6	0.6
HER2-6 (インビトロ)	0.9	11.6	1.0

10

【表 3】

抗体 コンジュゲート	HEK293/hEGFRvIII IC50 (nM)	MMT/hEGFRvIII IC50 (nM)	U251/hEGFRvIII IC50 (nM)
EGFRvIII-5	0.4	0.5	2.4
EGFRvIII-6	0.5	9.8	3.3

20

【表 4】

抗体 コンジュゲート	Ovcar-3 IC50 (nM)	PC3/MUC16 IC50 (nM)
MUC16-5	6.3	0.34
MUC16-6	16.0	0.80

【 0 1 2 8 】

(実施例10)

(インビボ試験)

【 0 1 2 9 】

抗HER2単一ジアステレオマーコンジュゲート(「HER2-5」)のインビボでの有効性を測定するため、HER2+胃癌異種移植片を有するマウスにおいて試験を実施した。これは、過去Barokら(Barok Mらの文献、Can Letters 2011)により、このモデルにおいて有効性が報告されていたためである。具体的には、 5×10^6 個のNCI-N87細胞(ATCC CRL-5822)をCB-17 SCIDマウス(Taconic社)の右わき腹下部に皮下的に移植した。いったん腫瘍が平均体積 150 mm^3 に達したら、マウスを無作為に8群に分け、HER2-5又は対照試薬を投与した。対照試薬としては、PBSビヒクル、遊離DM1-SMe、アイソタイプ対照、アイソタイプ対照-5、又はHER2が含まれた。マウスに週に1回の投与を3週間にわたって行い、試験の間中、週に2回腫瘍体積及び体重をモニタリングした。コンジュゲートを1、5、及び15 mg/kgで投与したが、これは、これらの用量が過去のLewis-Phillipsらによるインビボ試験(Lewis-Phillips Gらの文献、Can Res 2008)において有効であることが示されたためであった。

40

【 0 1 3 0 】

現在のN87腫瘍モデルにおいて、HER2-5は明白な抗腫瘍有効性を示し、5及び15 mg/kgの用量で最初の腫瘍体積の有意な低下を引き起こし、かつより高用量ではいくつかの腫瘍の根絶を引き起こした(図11及び12)。また、対照薬剤と比較した腫瘍成長の有意な遅延も1 mg/kg用量レベルにおいて観察された。投与後に有害事象は観察されず、HER2-5を与えられたマウスは試験の間中大きな体重増加を示した(図13)。

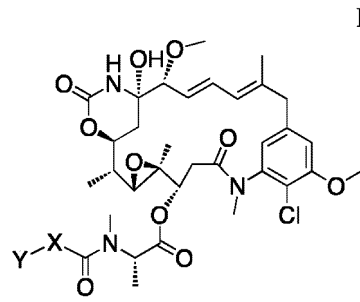
本件出願は、以下の構成の発明を提供する。

50

(構成1)

複数の式Iの薬剤分子を含む組成物であって、

(化1)



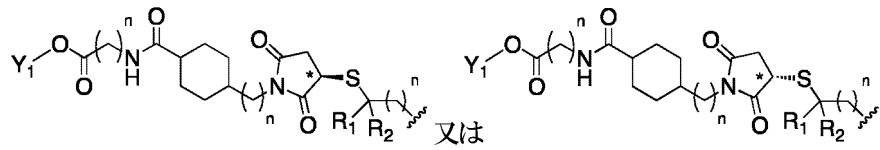
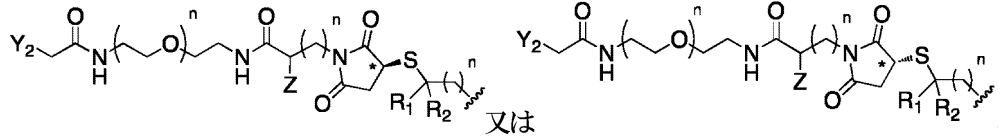
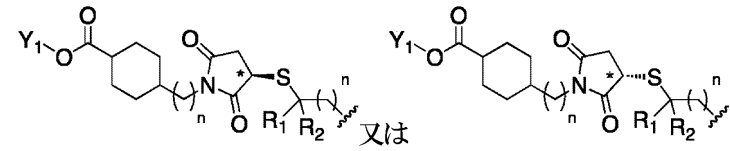
10

(式中、Xは

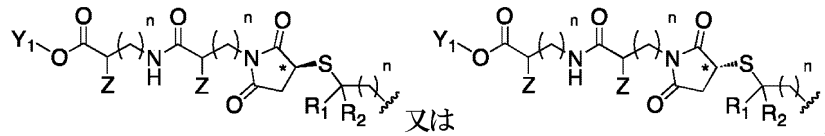
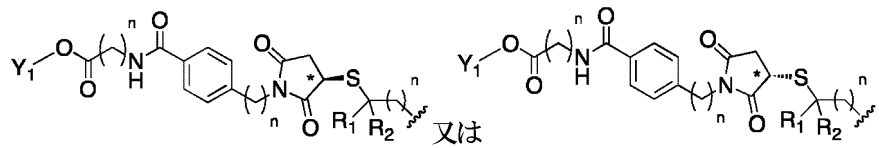
(化2)



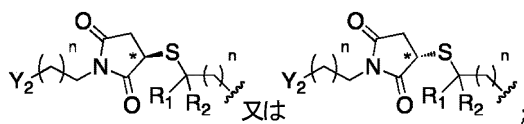
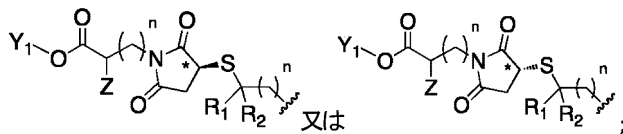
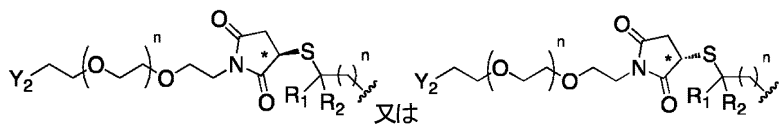
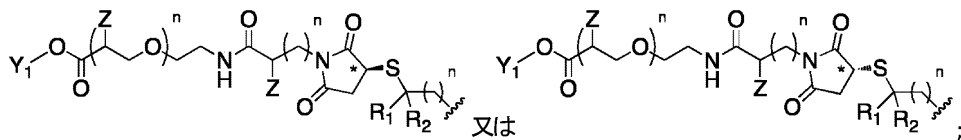
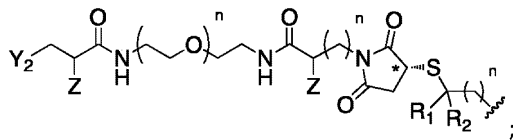
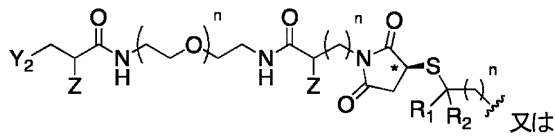
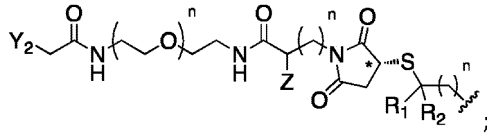
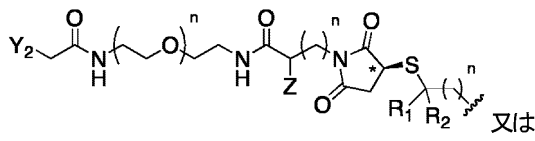
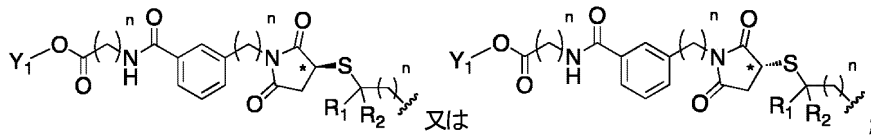
20



30



40

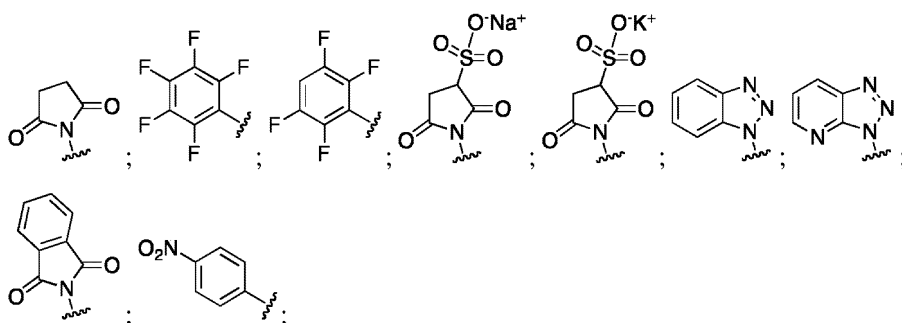


であり；

YはY₁又はY₂であり、

さらに式中、Y₁は、

(化3)



10

20

30

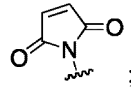
40

50

又はHであり；

Y_2 は-Cl、-Br、-I、又は

(化4)



であり；

ZはH又は SO_3H であり；

R_1 及び R_2 は独立にH又はアルキルから選択され；

nは0~50の整数である)；かつ

該組成物中に存在する該薬剤分子が、第一ジアステレオマー及び第二ジアステレオマーの少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含み、さらにここで、該第一ジアステレオマー及び第二ジアステレオマーが、式X中で(*)によって表されたキラル炭素で異なる立体化学配置を有することを除いて、他は同一であり、該キラル炭素原子が硫黄原子に結合した炭素原子であり、かつ該第一又は第二ジアステレオマーが50%より高いジアステレオマー過剰率で存在する、前記組成物。

(構成2)

nが1であり、 R_1 及び R_2 がそれぞれ独立して水素である、構成1記載の組成物。

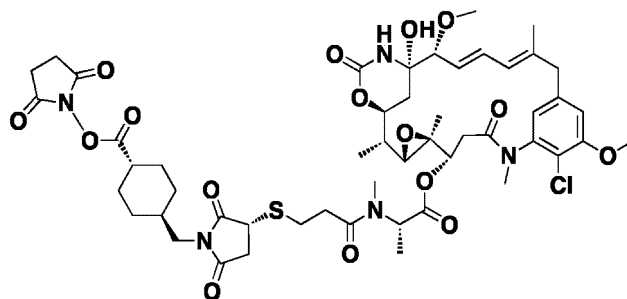
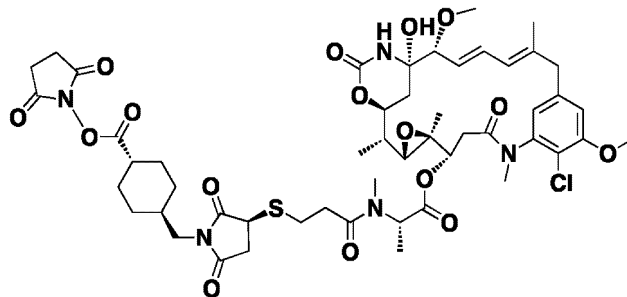
(構成3)

前記薬剤分子が少なくとも95%のジアステレオマー過剰率で前記組成物中に存在する、構成1記載の組成物。

(構成4)

式Iが、50%より高いジアステレオマー過剰率で、下記式

(化5)

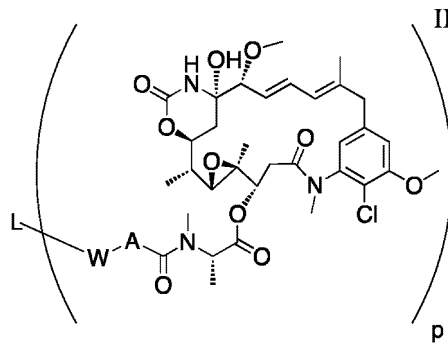


又はその混合物により表される、構成1記載の組成物。

(構成5)

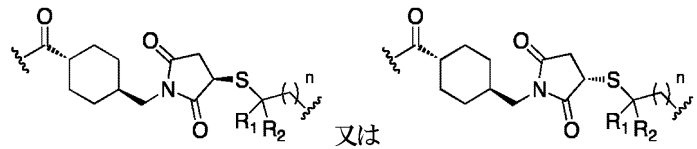
複数の式IIのリガンド-薬剤コンジュゲートを含む組成物であって、

(化6)



10

(式中、Aは、
(化7))



又は

であり；

20

Wは、S、O、又はNR₃から選択され；

Lはリガンドであり；

さらに式中；

Lは、細胞又は細胞集団と結合することができ；

R₁、R₂、及びR₃は、それぞれ独立に、H又はアルキルから選択され；

nは、0～10の整数であり；

pは、1～10の整数である)；かつ

該リガンド-薬剤コンジュゲートが50%より高いジアステレオマー過剰率で該組成物中に存在する、前記組成物。

(構成6)

30

前記リガンドが抗体又はその抗原結合断片であり、WがNHであり、かつR₁、R₂がそれぞれ独立にHから選択される、構成5記載の組成物。

(構成7)

前記抗体又はその抗原結合断片が、腫瘍関連抗原と特異的に結合する、構成6記載の組成物。

(構成8)

前記リガンド-薬剤コンジュゲートが95%より高いジアステレオマー過剰率で該組成物中に存在する、構成7記載の組成物。

(構成9)

前記腫瘍関連抗原が、AFP、ALK、BAGEタンパク質、-カテニン、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、炭酸脱水酵素IX、カスパーゼ-8、CD40、CDK4、CEA、CTLA4、CLEC12A、サイクリン-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGEタンパク質(例えば、GAGE-1、-2)、GD2、GD3、GloboH、グリピカン-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、LMP2、MAGEタンパク質(例えば、MAGE-1、-2、-3、-4、-6、及び-12)、MART-1、メソセリン、ML-IAP、Muc1、Muc16(CA-125)、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ESO1、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA(FOLH1)、RAGEタンパク質、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、サバイピン、TAG-72、TGF-、TMPRSS2、Tn、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼ、及びウロプラキシン-3からなる群から選択される、構成7記載の組成物。

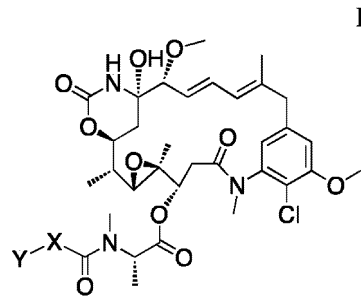
40

50

(構成10)

複数の式Iの薬剤分子を含む組成物を製造する方法であって、

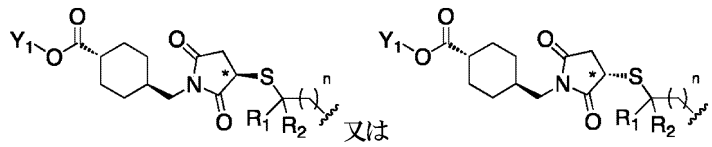
(化8)



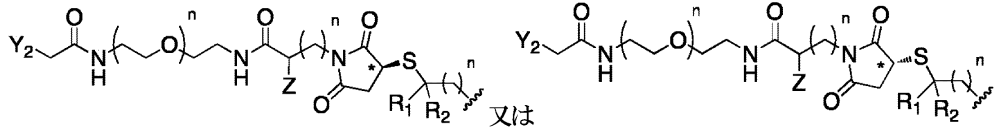
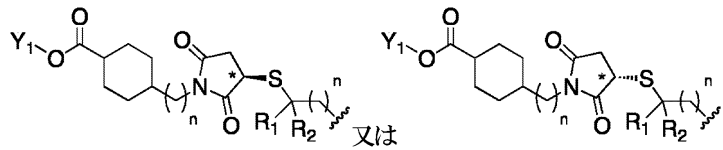
10

(式中、Xは

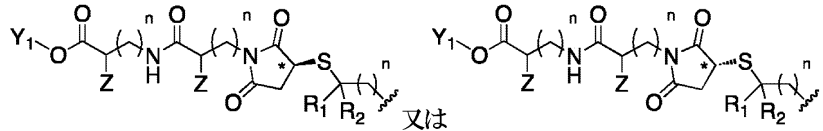
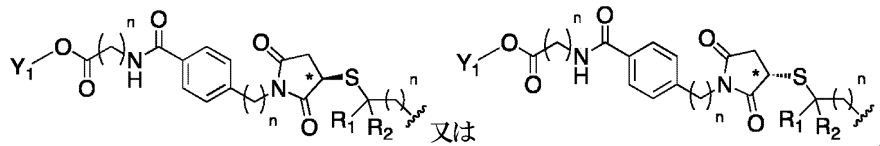
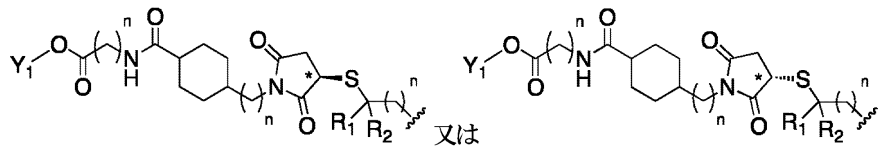
(化9)



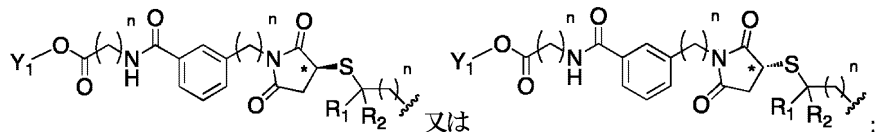
20

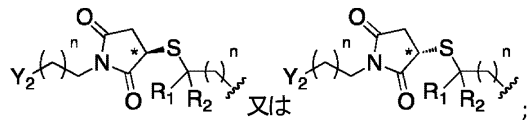
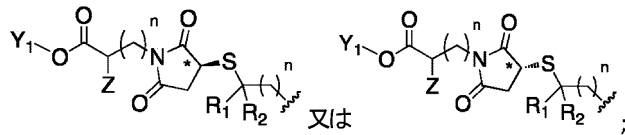
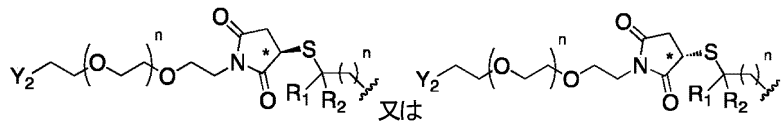
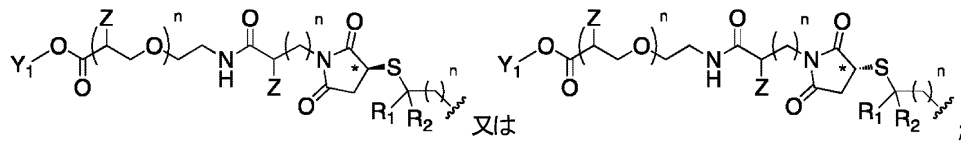
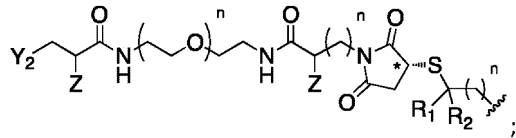
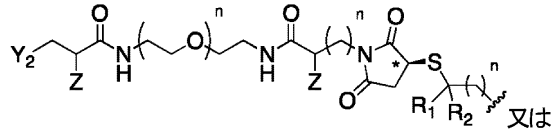
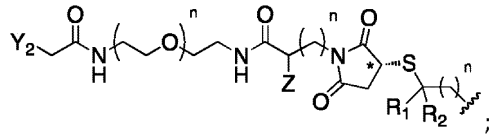
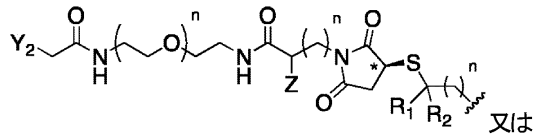


30

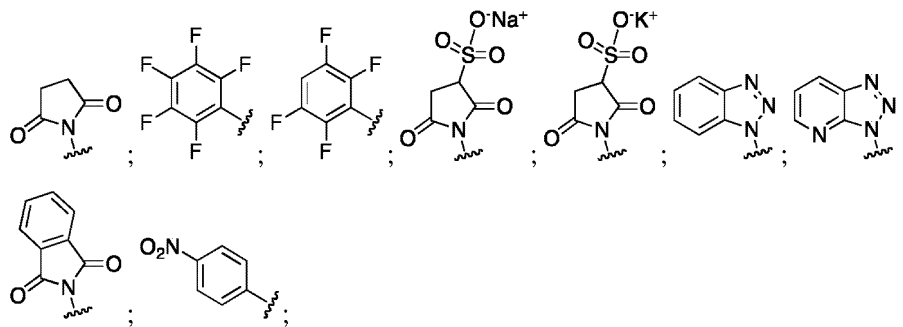


40

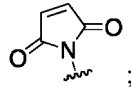




であり；
YはY₁又はY₂であり、
さらに式中Y₁は、
(化10)



又はHであり；
Y₂は-Cl、-Br、-I、又は
(化11)



であり；

R_1 及び R_2 は独立に H 又はアルキルから選択され；

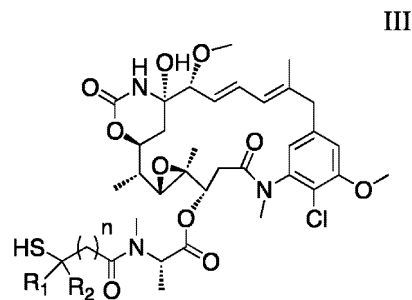
n は 0 ~ 50 の整数である）；かつ

該組成物中に存在する該薬剤分子は第一ジアステレオマー及び第二ジアステレオマーの少なくとも2つのジアステレオマーの混合物を含み、さらにここで、該第一ジアステレオマー及び第二ジアステレオマーが、式X中で(*)によって表されたキラル炭素において異なる立体化学配置を有することを除いて、他は同一であり、該キラル炭素原子が硫黄原子に結合した炭素原子であり、かつ該第一又は第二ジアステレオマーが50%より高いジアステレオマー過剰率で存在し；

該方法が、

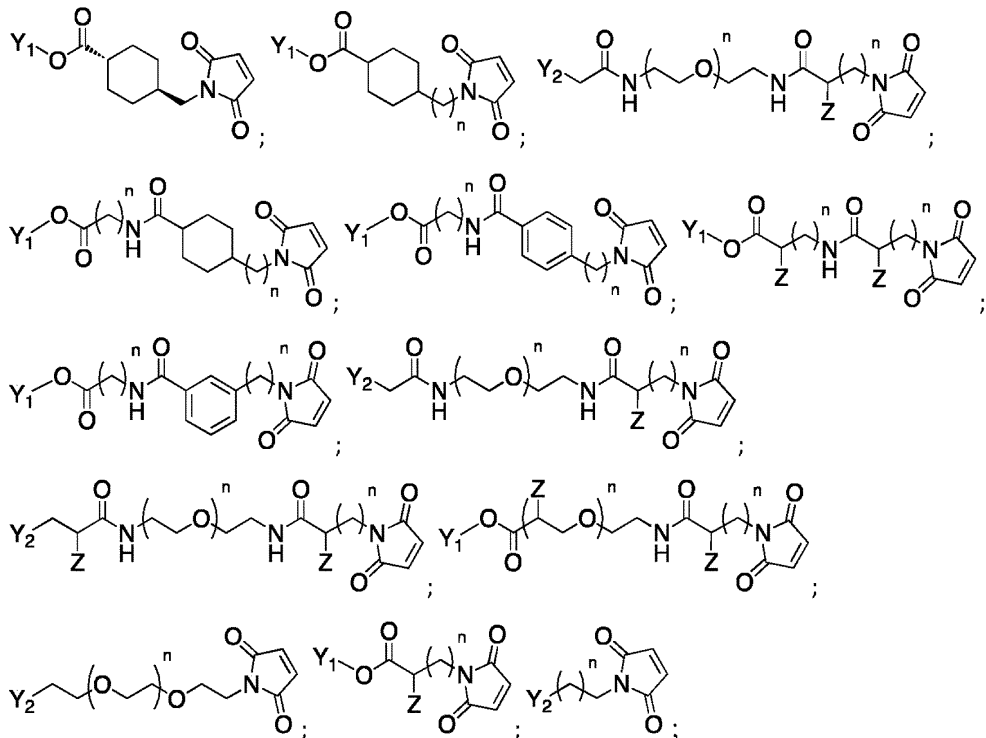
(a) (i) 式IIIを有する出発物質；

(化12)



(ii) 式IVの化合物；

(化13)



(式中 Y_1 は、

(化14)

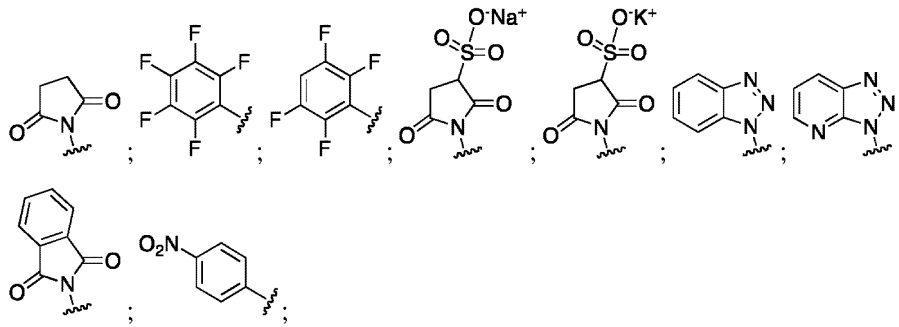
10

20

30

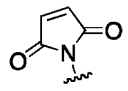
40

50



10

又はHであり；
Y₂は-Cl、-Br、-I、又は
(化15)



であり；
ZはH又はSO₃Hであり；
R₁及びR₂はH又はアルキルから独立に選択され；かつ
それぞれのnは0～50の整数である）；

20

(iii) 有機溶媒、
(iv) 水、及び
(v) 固体基体
を含む混合物を提供すること；

(b) 工程(a)の混合物を、一部の該出発物質が式Iの化合物に変換されるまで反応させる
こと；及び

(c) 工程(b)の混合物から式Iの粗製化合物を取り出すこと、を含む、前記方法。

(構成11)

(d) 工程(c)において得られた式Iの化合物を精製すること、をさらに含む、構成10記載
の方法。

30

(構成12)

前記固体基体が、シリカゲル、セライト、アルミナ、ゼオライト、及び破碎モレキュラ
ーシーブからなる群から選択される、構成10記載の方法。

(構成13)

nが1であり、R₁及びR₂がそれぞれ独立に水素である、構成10記載の方法。

(構成14)

前記有機溶媒が極性非プロトン性溶媒を含む、構成10記載の方法。

(構成15)

前記極性非プロトン性溶媒がアセトニトリルを含む、構成14記載の方法。

40

(構成16)

前記有機溶媒及び水が、約1:1～約4:1、又は約1:1～約10:1の比率で存在する、構成10
記載の方法。

(構成17)

前記式IIIを有する出発物質と前記式IVの化合物のモル比が、約1:1～約1:3である、構
成10記載の方法。

(構成18)

前記式Iの化合物と抗体又はその抗原結合断片とを結合させ、抗体-薬剤コンジュゲート
を作製することをさらに含む、構成10記載の方法。

(構成19)

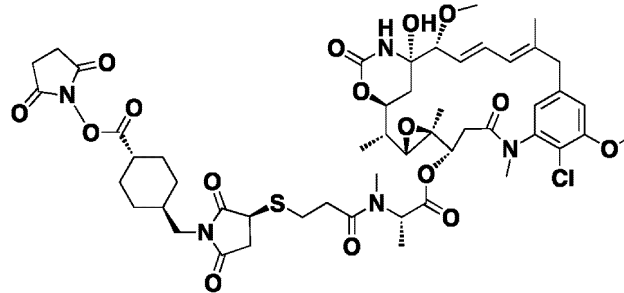
50

前記式Iの化合物がS、O、又はNR₃を介して抗体又は抗原結合断片に結合されている、構成18記載の方法。

(構成20)

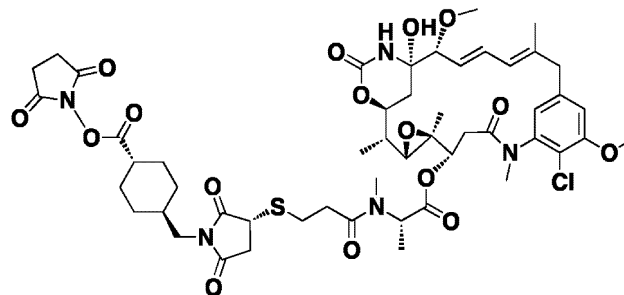
50%より高いジアステレオマー過剰率で、前記式Iが、以下の構造により表される、構成10記載の方法：

(化16)



10

又は



20

(構成21)

前記薬剤分子又は前記リガンド-薬剤コンジュゲートが、前記組成物中に治療有効量で含まれ、かつ医薬として許容し得る希釈剤、担体、又は賦形剤をさらに含む、構成1又は5記載の組成物。

(構成22)

治療有効量の第二の化学療法剤をさらに含む、構成21記載の組成物。

30

(構成23)

前記方法による治療に感受性の疾患を治療する方法であって、それを必要としている患者に治療有効投与量の構成1又は5記載の組成物を非経口的に投与することを含む、前記方法。

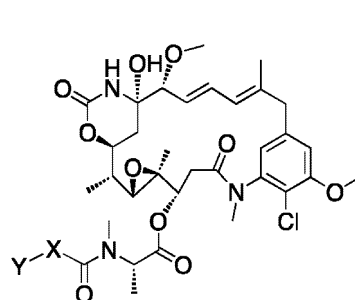
(構成24)

前記疾患が腫瘍、自己免疫疾患、及び炎症性疾患から選択される、構成23記載の方法。

(構成25)

複数の式Iの薬剤分子を含む組成物であって、

(化17)

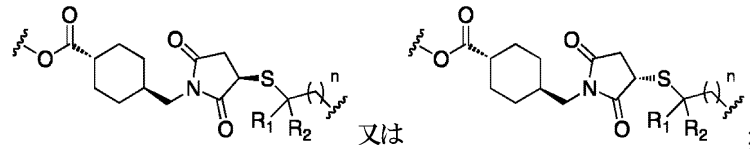


40

(式中Xは、

(化18)

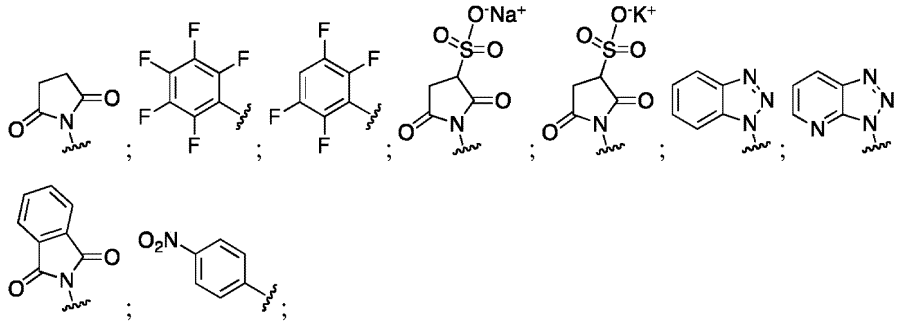
50



であり；

Yは、

(化19)



10

又はHであり；

R₁及びR₂はそれぞれ独立にH又はアルキルから選択され；

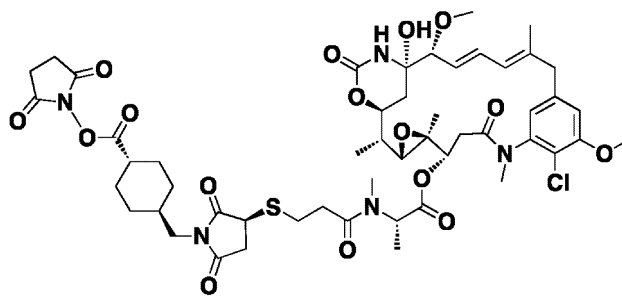
nは0～10の整数である)；かつ

該薬剤分子が50%より高いジアステレオマー過剰率で該組成物中に存在し、かつ50%より高いジアステレオマー過剰率で存在しない式Iの薬剤分子を含む対応組成物よりも高い抗増殖活性を示す、前記組成物。

(構成26)

前記少なくとも2つのジアステレオマーの1つが、式(i)の化合物である、構成1記載の組成物；

(化20)



(i)

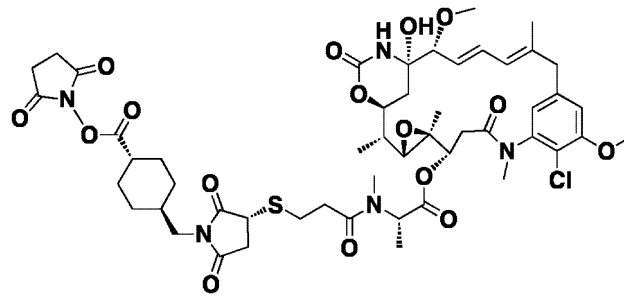
30

(構成27)

前記少なくとも2つのジアステレオマーの1つが、式(ii)の化合物である、構成1記載の組成物；

(化21)

40



(ii)

10

°

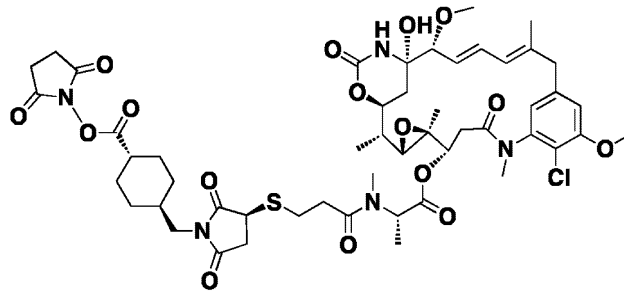
(構成 28)

前記少なくとも2つのジアステレオマーの1つが、図1の¹H NMRスペクトルによって特徴づけられる、構成1記載の組成物。

(構成 29)

立体異性体的に (stereomerically) 純粋である、式(i)の化合物：

(化 22)



(i)

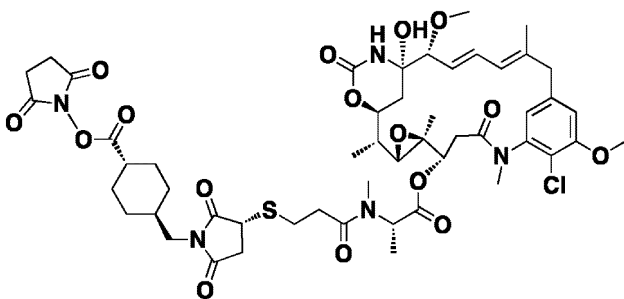
20

°

(構成 30)

立体異性体的に純粋である、式(ii)の化合物：

(化 23)

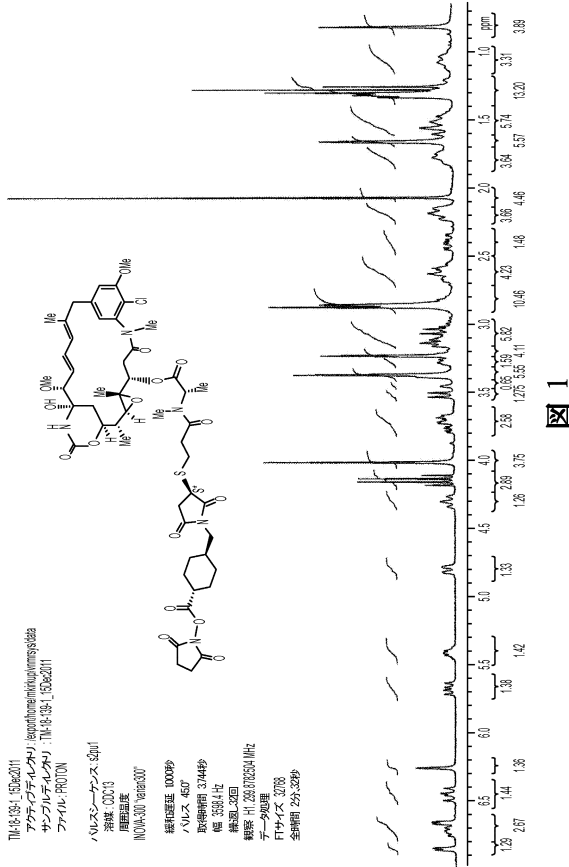


(ii)

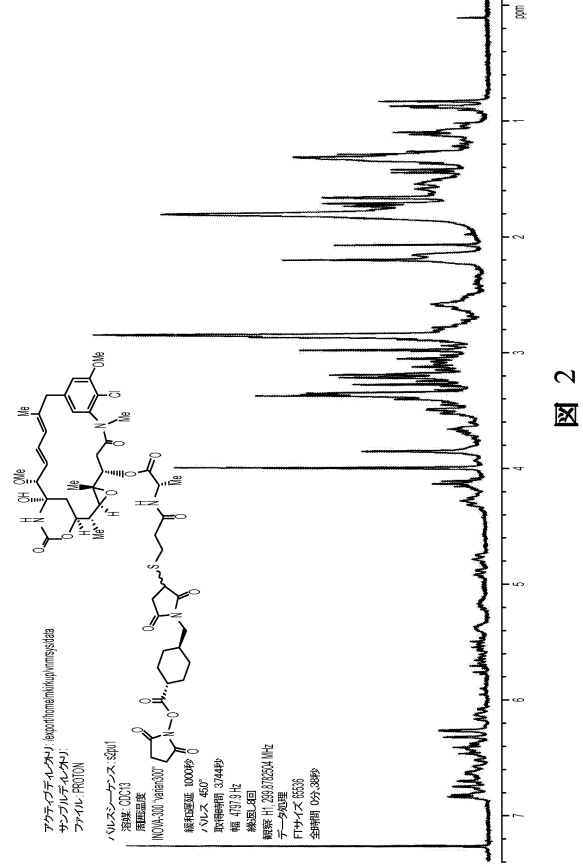
40

°

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】

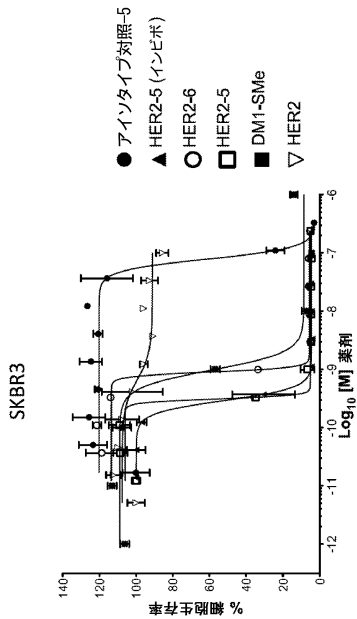


図 3

【 図 4 】

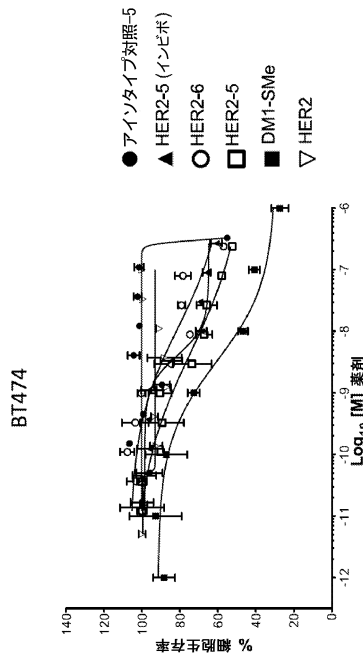


図 4

【 図 5 】

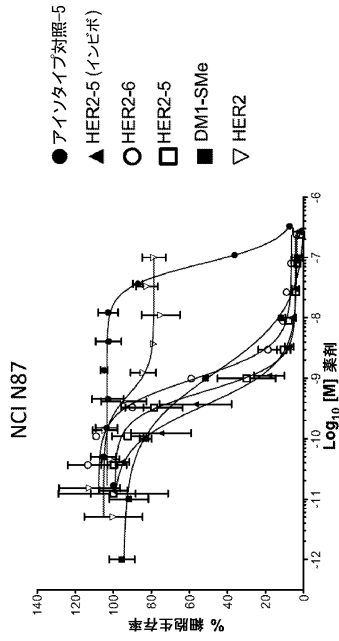


図 5

【 図 6 】

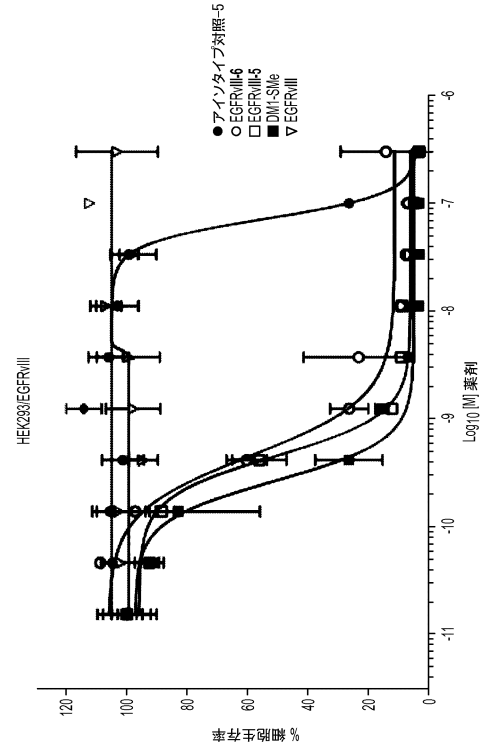


図 6

【 図 7 】

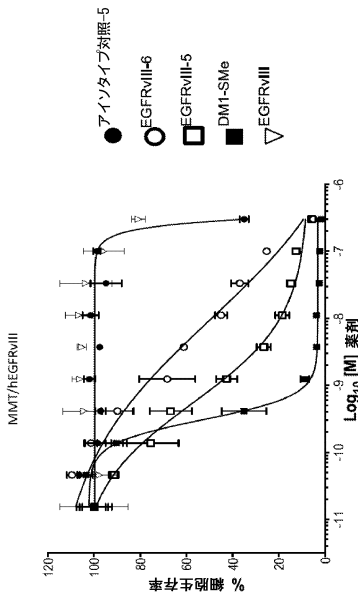


図 7

【 図 8 】

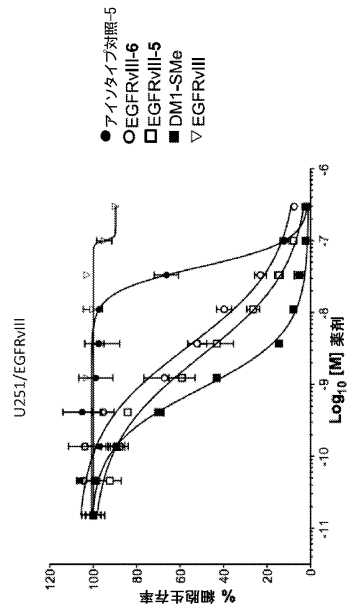


図 8

【 図 9 】

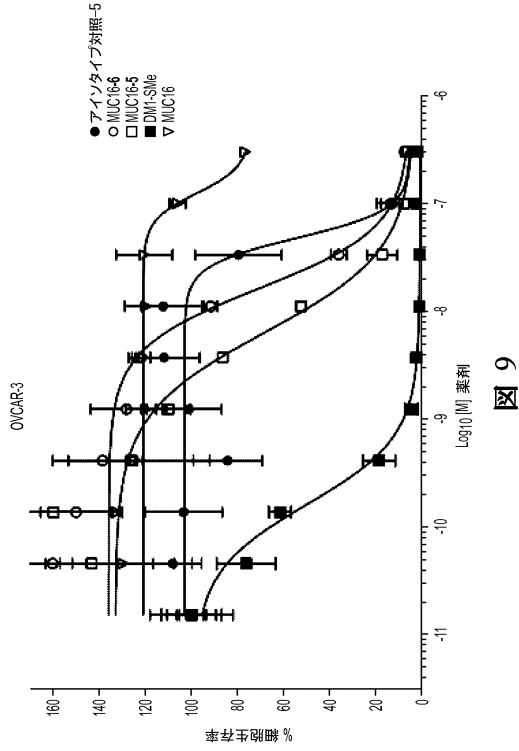


図 9

【 図 10 】

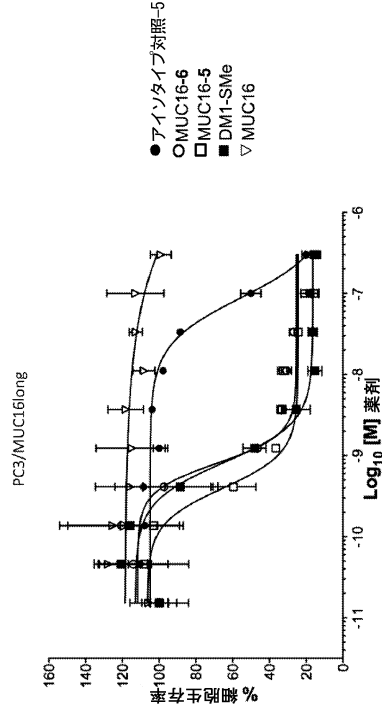


図 10

【 図 11 】

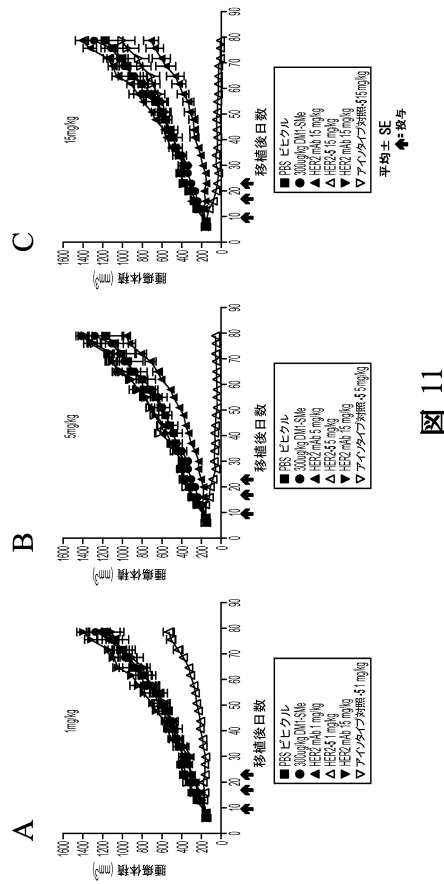
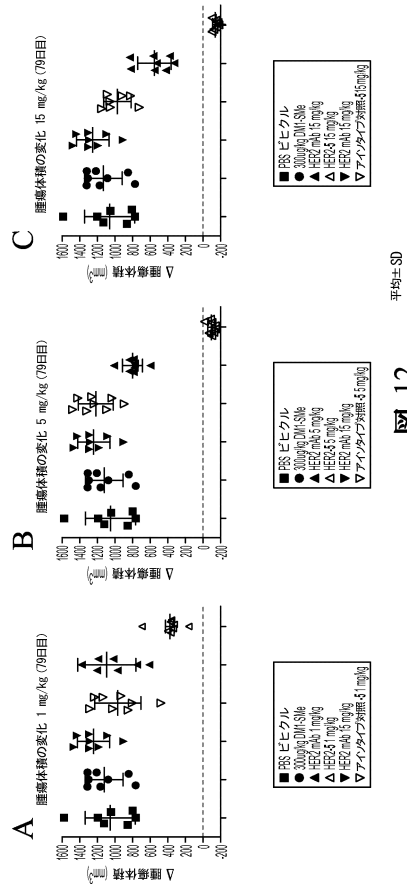


図 11

【 図 12 】



平均±SD

図 12

【 図 13 】

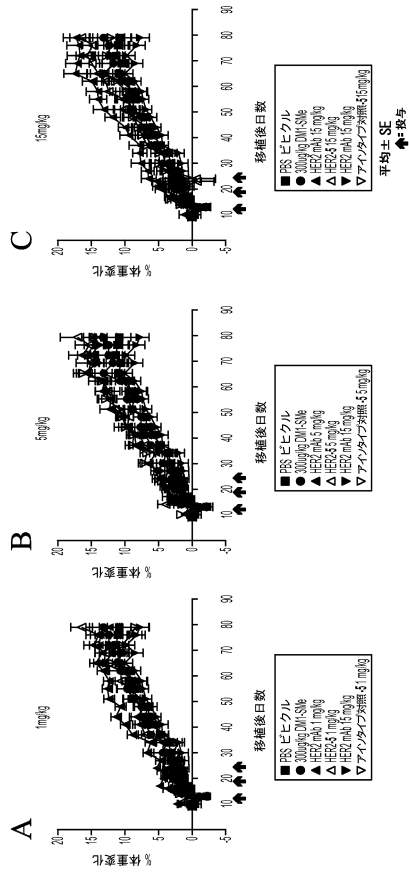


図 13

フロントページの続き

- (72)発明者 ナレシュクマル エフ・ジャイン
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08551 リンゴエス ホワイトハウス ウェイ 6
- (72)発明者 トマス パトリック マーコタン
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19840 ニュートン ワシントン クロッシング ルド
. 518

審査官 谷合 正光

(56)参考文献 特表2013-506709(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/537

A61K 47/68

A61P 35/00

C07D 498/18

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY

/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)