

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7695773号
(P7695773)

(45)発行日 令和7年6月19日(2025.6.19)

(24)登録日 令和7年6月11日(2025.6.11)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/46

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

D

A 6 1 K 47/55 (2017.01)

A 6 1 K 39/395

E

A 6 1 K 47/56 (2017.01)

A 6 1 K 39/395

N

A 6 1 P 31/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

T

請求項の数 29 (全97頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-554924(P2019-554924)

(86)(22)出願日 平成30年4月6日(2018.4.6)

(65)公表番号 特表2020-516613(P2020-516613
A)

(43)公表日 令和2年6月11日(2020.6.11)

(86)国際出願番号 PCT/GB2018/050928

(87)国際公開番号 WO2018/185495

(87)国際公開日 平成30年10月11日(2018.10.11)

審査請求日 令和3年3月16日(2021.3.16)

審査番号 不服2023-6191(P2023-6191/J1)

審査請求日 令和5年4月14日(2023.4.14)

(31)優先権主張番号 1705686.2

(32)優先日 平成29年4月7日(2017.4.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

(73)特許権者 518120289

センタウリ セラピューティクス リミテ
ッド英国 イーシー 1 エヌ 2 エイチエー ロ
ンドン ホルボーン サーカス 3 4 1
スト フロア タビエス イン ハウス

(74)代理人 100097456

弁理士 石川 徹

(72)発明者 マイケル ウェストビー

英国 シーティー 1 3 7 エヌディー ケ
ント サンドウィッチ ディスカバリー
パーク シーノオー センタウリ セラピ
ューティクス リミテッド

(72)発明者 メラニー グロソップ

英国 シーティー 1 3 7 エヌディー ケ
最終頁に続く

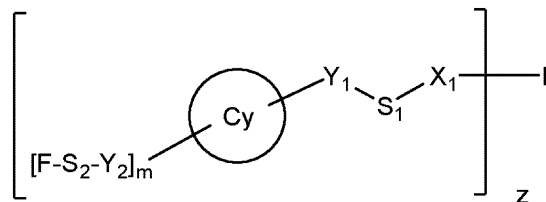
(54)【発明の名称】 新規化合物及びそれらの治療上の使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(I)の化合物又はその医薬として許容し得る塩である、イムノコンジュゲート:

【化1】



(I)

10

(式中、

Lは、抗体又はその抗原結合性断片から選択された結合部位を表し;

S₁は、-(CH₂)₂-NHCO-シクロヘキシル-CH₂-3-ピロリジン-2,5-ジオン-、-(CH₂)₂-NH
CO-シクロヘキシル-CH₂-3-ピロリジン-2,5-ジオン-S-(CH₂)₃-C(=NH)-、-(CH₂)₂-NHC
O-(CH₂)₃-CO-、又は-(CH₂)₂-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-3-ピロリジン-2,5-ジオン-
を表し;S₂は、-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₄-CONH-CH₂-、-(C
H₂)₃-NH-CH₂-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄

20

$-(\text{CH}_2)_2-\text{NHCO}-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_3-\text{NHCO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{12}-(\text{CH}_2)_2-\text{NHCO}-\text{CH}_2-$ 、又は $-(\text{CH}_2)_3-\text{NHCO}-(\text{CH}_2)_3-\text{NHCO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-(\text{CH}_2)_2-\text{NHCO}-\text{CH}_2-$ を表し；

z は、2～20から選択された整数を表し；

X_1 は、 $-\text{S}-$ 又は $-\text{N}(\text{H})-$ を表し；

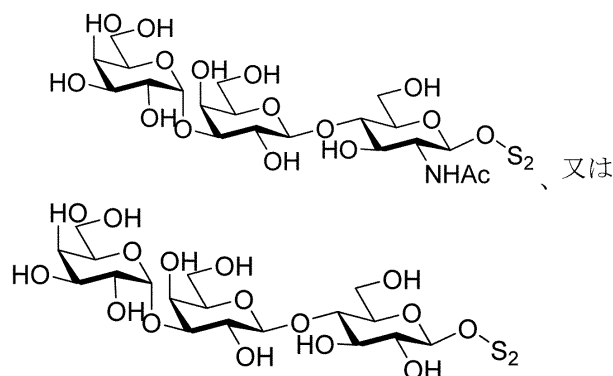
Y_1 は、結合、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、又は $-\text{O}-$ を表し；

Y_2 は、結合、 $-\text{O}-$ 、又は $-\text{NHC}(\text{O})-$ を表し；

F は、ガラクトシル-、1,3-ガラクトシル-、1,4-N-アセチルグルコサミン、1-3ガラクトビオース、1-3-、1-4-ガラクトトリオース、ガリリペンタサッカリド、又は下記式のひとつに示された構造

【化2】

10



20

(式中、 S_2 は、 S_2 基への付着点をいう)

を表し；

m は、1～4から選択された整数を表し；かつ

Cy は、フェニル、ビフェニル、又はトリフェニルを表し、 Cy が、ビフェニル又はトリフェニルを表す場合、該 $-\text{Y}_1-\text{S}_1-\text{X}_1-\text{L}$ 基は、該フェニル環のうちのいずれの上にも存在してもよく、かつ1つ又は複数の該 $[\text{F}-\text{S}_2-\text{Y}_2]_m$ -基は、該フェニル環のうちのいずれの上にも存在してもよい。

【請求項2】

30

Y_1 が、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ を表す、請求項1記載のイムノコンジュゲート。

【請求項3】

Y_2 が、結合もしくは $-\text{O}-$ ；又は $-\text{O}-$ を表す、請求項1又は2記載のイムノコンジュゲート。

【請求項4】

m が、1～3；1もしくは3；又は2もしくは3；又は1もしくは2；又は1；又は2；又は3；又は4から選択された整数を表す、請求項1～3のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

【請求項5】

z が、2；又は4.9；又は5；又は7；又は8；又は10；又は11；又は14；又は15；又は17；又は20を表す、請求項1～4のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

【請求項6】

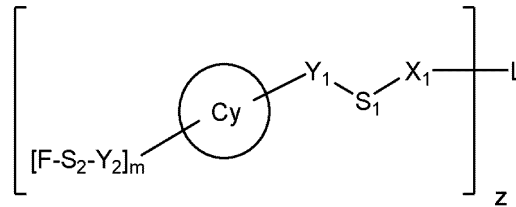
40

Cy が、フェニルもしくはビフェニル；又はビフェニルもしくはトリフェニル；又はフェニルもしくはトリフェニル；又はビフェニルを表す、請求項1～5のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

【請求項7】

式(I)^aの化合物又はその医薬として許容し得る塩である、イムノコンジュゲート：

【化 3】

(I)^a

10

(式中、

Lは、抗体又はその抗原結合性断片から選択された結合部位を表し；

S₁は、-(CH₂)₂-NHCO-シクロヘキシル-CH₂-3-ピロリジン-2,5-ジオン-、-(CH₂)₂-NHCO-シクロヘキシル-CH₂-3-ピロリジン-2,5-ジオン-S-(CH₂)₃-C(=NH)-、-(CH₂)₂-NHCO-(CH₂)₃-CO-、又は-(CH₂)₂-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-3-ピロリジン-2,5-ジオン-を表し；

S₂は、-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₄-CONH-CH₂-、-(CH₂)₃-NH-CH₂-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₁₂-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-、又は-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-を表し；

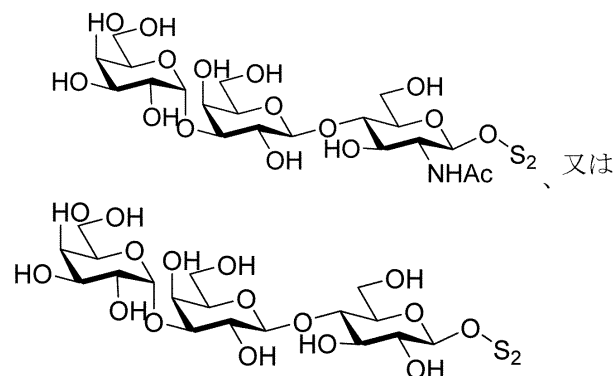
20

zは、2～20から選択された整数を表し；

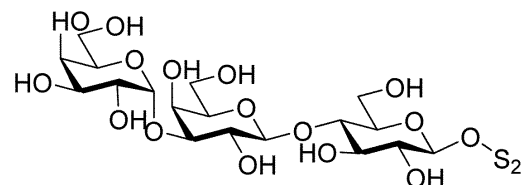
X₁は、-S-又は-N(H)-を表し；Y₁は、-C(O)NH-を表し；Y₂は、-O-を表し；

Fは、ガラクトシル-、-1,3-ガラクトシル-、-1,4-N-アセチルグルコサミン、1-3ガラクトピオース、1-3-、1-4-ガラクトトリオース、ガリリペンタサッカリド、又は下記式のひとつに示された構造

【化 4】



30



40

(式中、S₂は、S₂基への付着点をいう)を表し；

mは、1又は3から選択された整数を表し；かつ

Cyは、ビフェニルを表し、該-Y₁-S₁-X₁-L基は、該フェニル環のうちのどちらの上にも存在してもよく、かつ1つ又は複数の該[F-S₂-Y₂]_m-基は、該フェニル環のうちのどちらの上にも存在してもよい。

【請求項 8】

前記抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項1～7のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 9】

前記抗体が、ヒト化抗体、ヒト抗体、マウス抗体、又はキメラ抗体である、請求項1～8

50

のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 10】

前記抗原結合性断片が、抗原結合性断片(Fab)又は単鎖可変断片(scFv)である、請求項1～9のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 11】

前記断片が、Fab、Fab₂、F(ab)₂、及びscFvからなる群から選択される、請求項10記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 12】

前記抗体又はその抗原結合性断片が、EGFR抗体又はその断片から選択される、請求項1～11のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 13】

前記EGFR抗体又はその断片が、セツキシマブ、セツキシマブFab、又はニモツズマブである、請求項12記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 14】

前記EGFR抗体又はその断片が、配列番号:1～4に対して少なくとも80%の配列同一性を有する、請求項12記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 15】

前記抗体又はその抗原結合性断片が、CD20抗体又はその断片から選択される、請求項1～11のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 16】

前記CD20抗体又はその断片が、リツキシマブ又はリツキシマブFabである、請求項15記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 17】

前記抗体又はその抗原結合性断片が、病原体特異抗体又はその断片から選択される、請求項1～11のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 18】

Fが、ガラクトシル-1,3-ガラクトシル-1,4-N-アセチルグルコサミン、1-3ガラクトピオース、1-3-1-4-ガラクトトリオース、又はガリリペンタサッカリドから選択される、請求項1～17のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 19】

下記のいずれか1つから選択される化合物、又はその医薬として許容し得る塩である、請求項1又は7記載のイムノコンジュゲート：

10

20

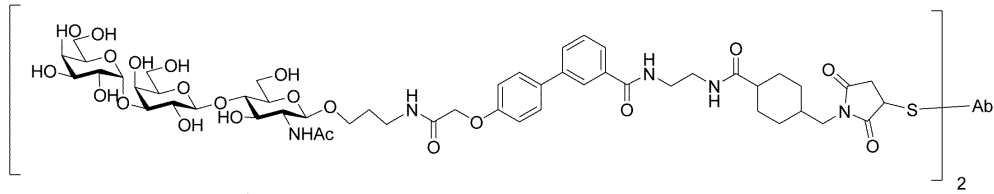
30

40

50

【化 5】

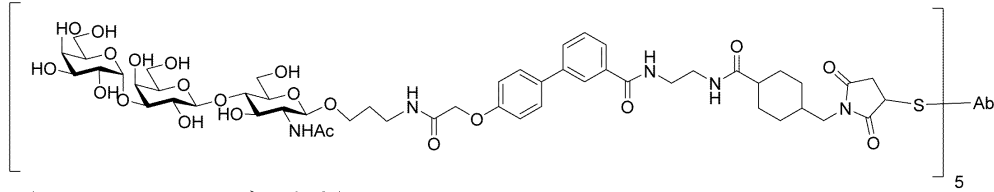
実施例 1



(Abはセツキシマブを表す) ;

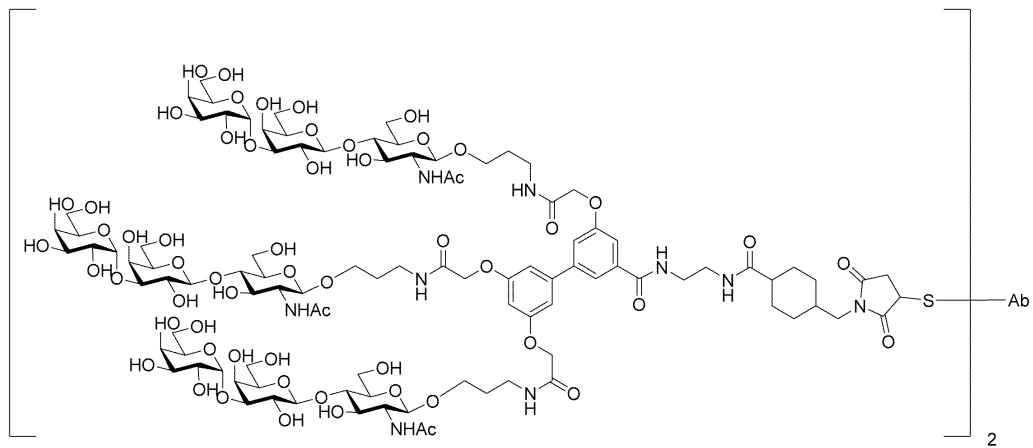
10

実施例 2



(Abはセツキシマブを表す) ;

実施例 3



(Abはセツキシマブを表す) ;

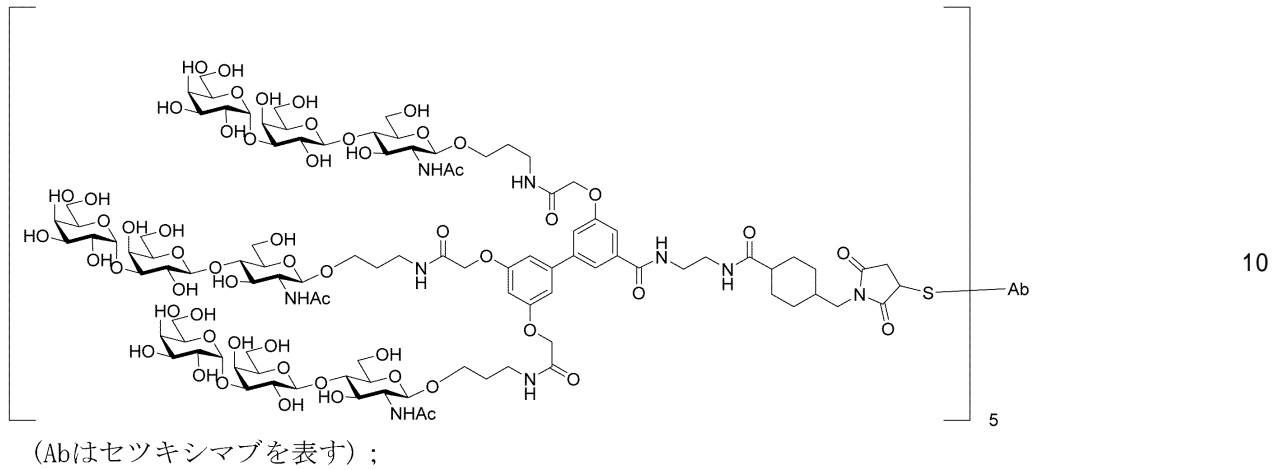
20

30

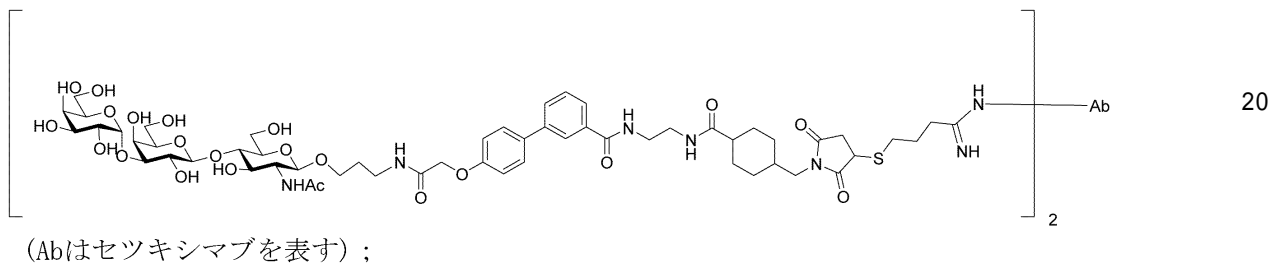
40

50

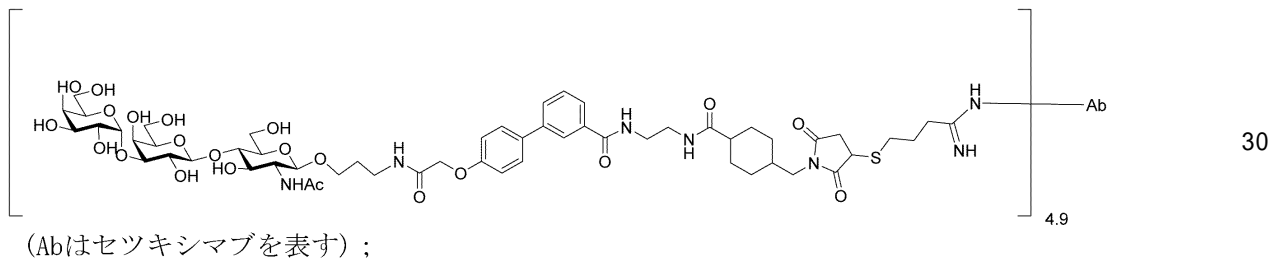
実施例 4



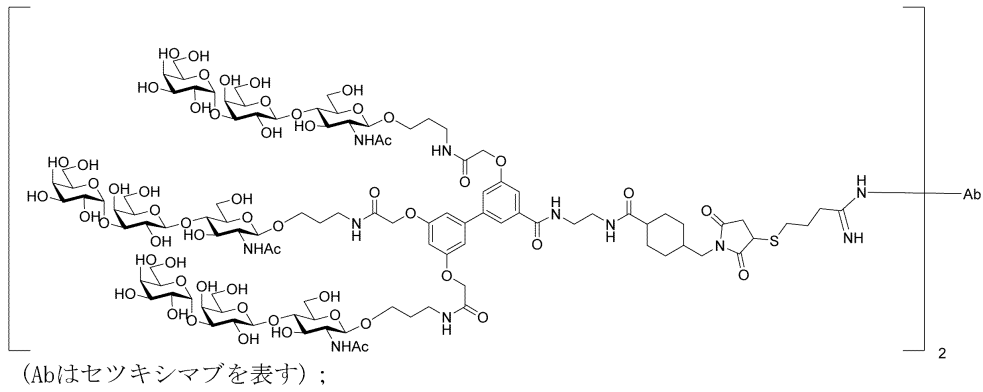
実施例 5



実施例 6

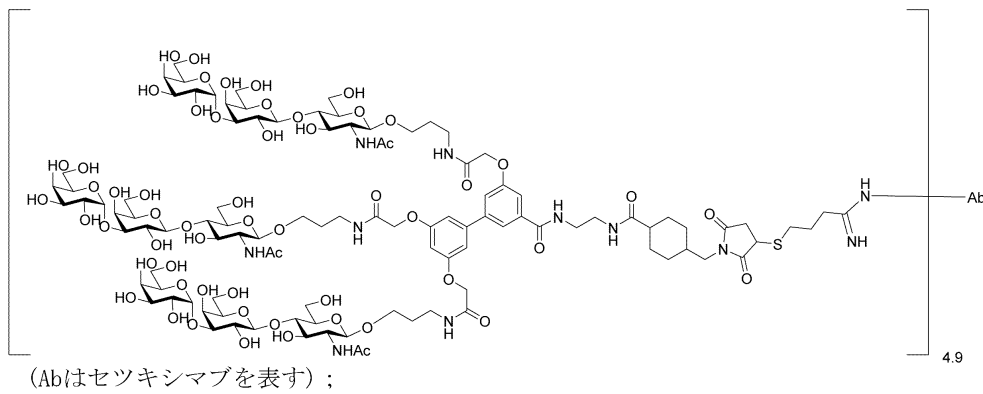


実施例 7



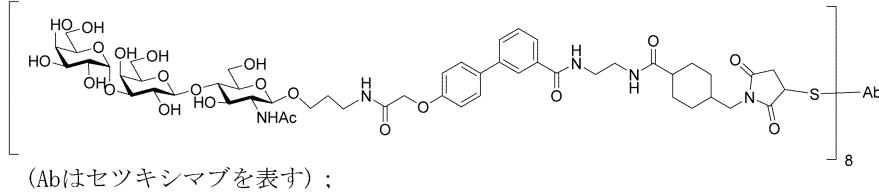
10

実施例 8



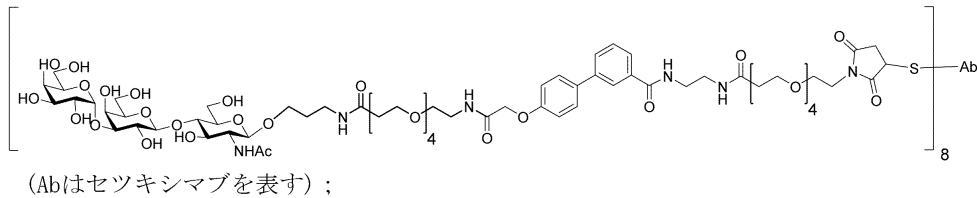
20

実施例 9



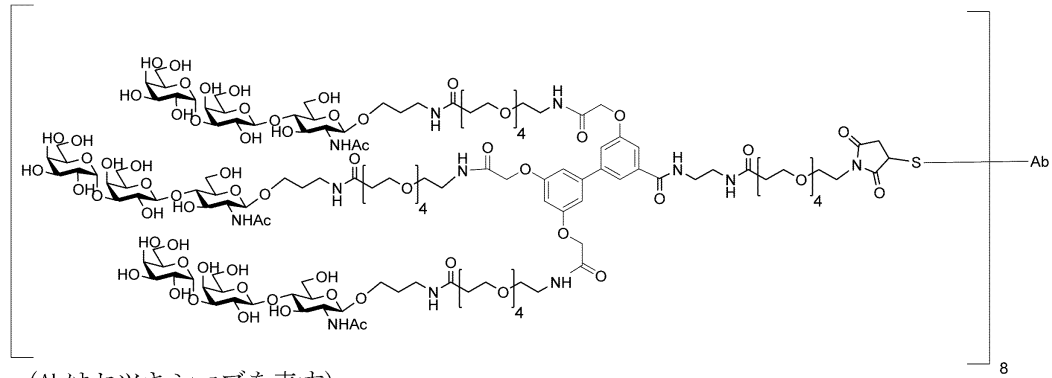
30

実施例 10



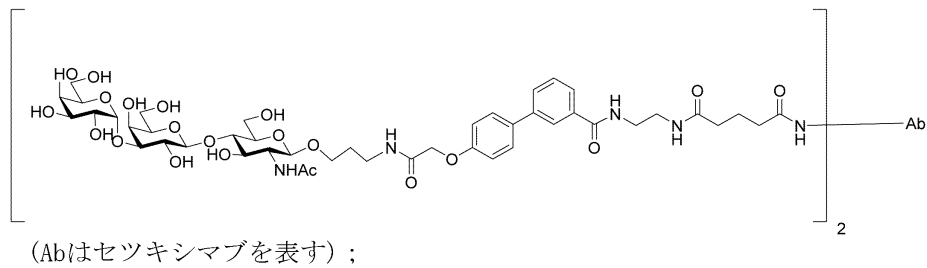
40

実施例 11



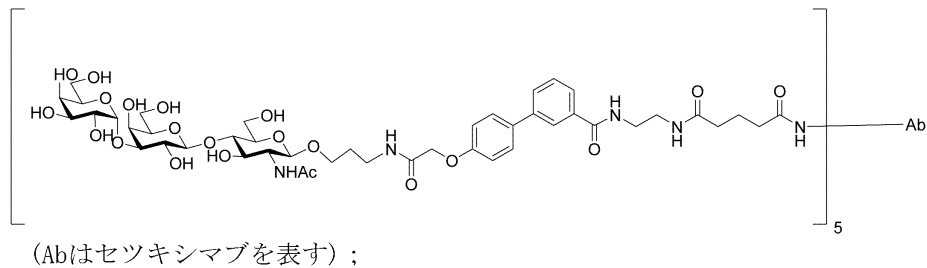
10

実施例 12



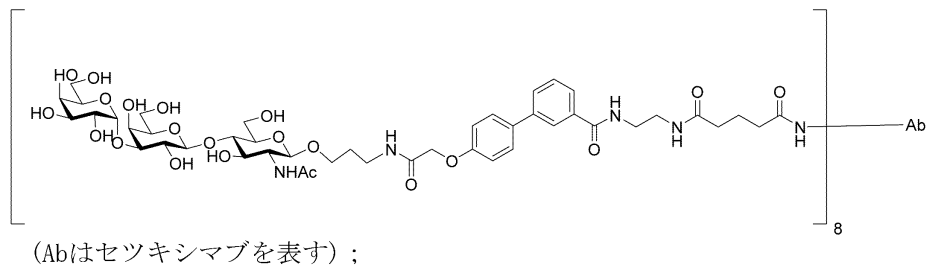
20

実施例 13



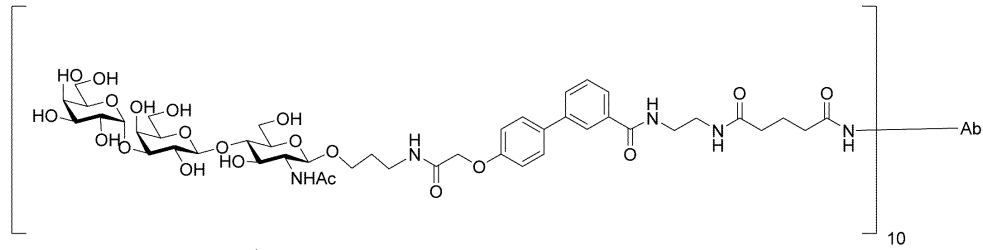
30

実施例 14



40

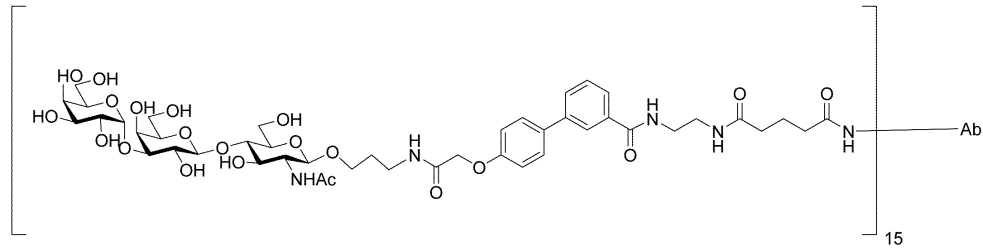
実施例 15



(Abはセツキシマブを表す) ;

10

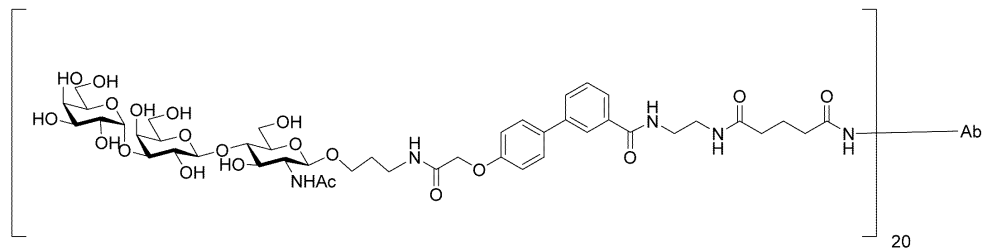
実施例 16



(Abはセツキシマブを表す) ;

20

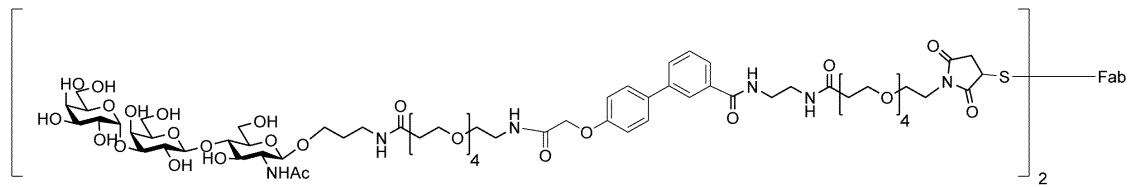
実施例 17



(Abはセツキシマブを表す) ;

30

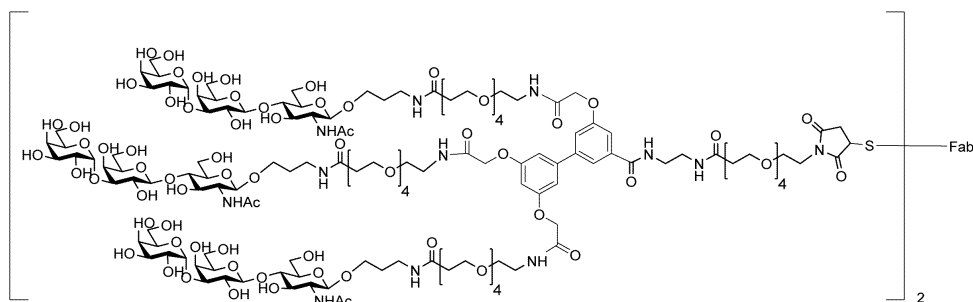
実施例 18



(Fabはセツキシマブ-Fabを表す) ;

40

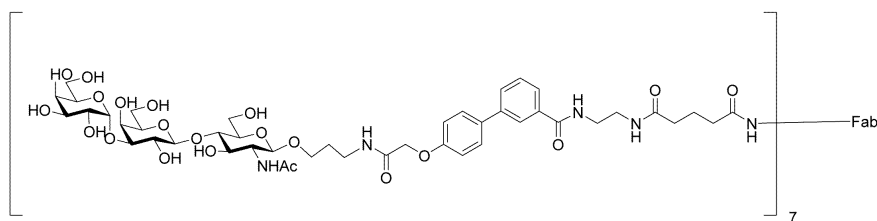
実施例 19



10

(Fabはセツキシマブ-Fabを表す) ;

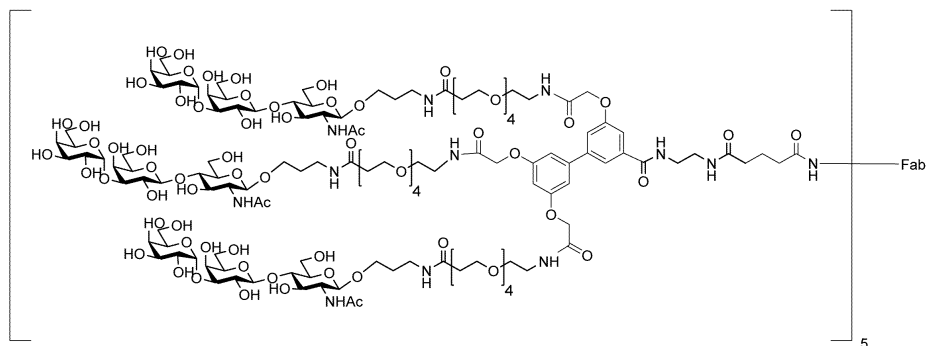
実施例 20



20

(Fabはセツキシマブ-Fabを表す) ;

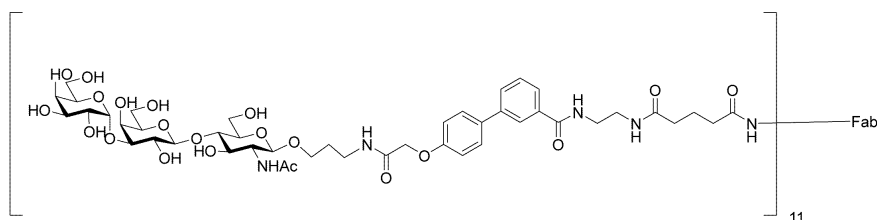
実施例 21



30

(Fabはセツキシマブ-Fabを表す) ;

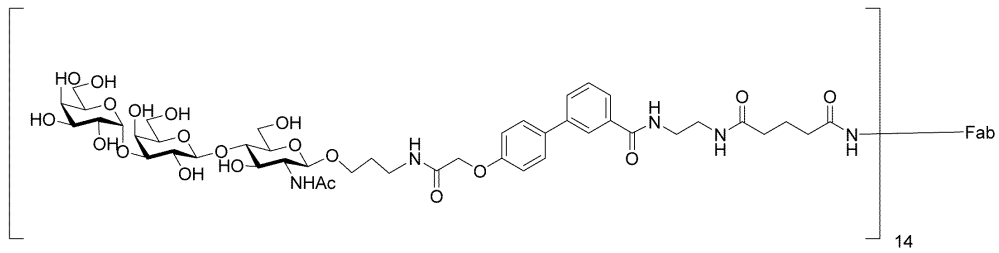
実施例 22



40

(Fabはセツキシマブ-Fabを表す) ;

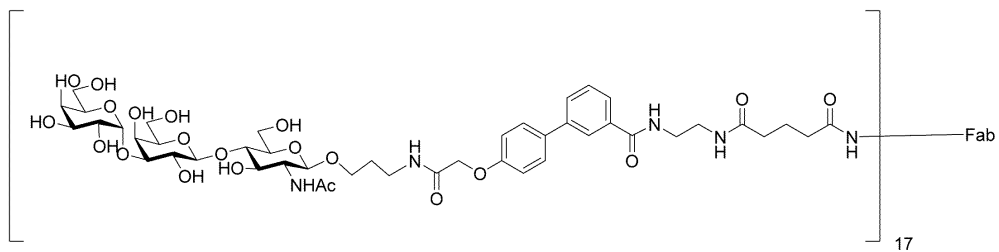
実施例 23



(Fabはセツキシマブ-Fabを表す) ;

10

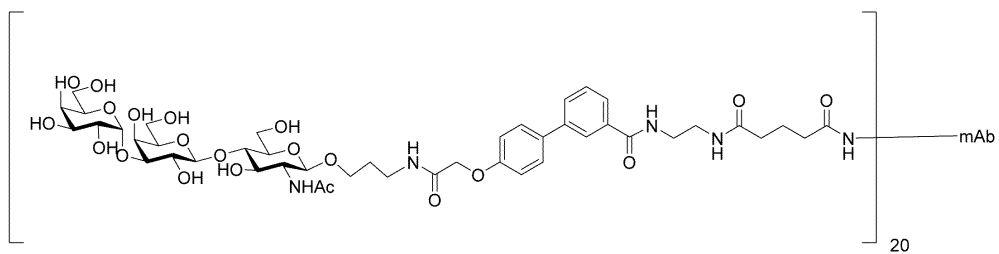
実施例 24



(Fabはセツキシマブ-Fabを表す) ;

20

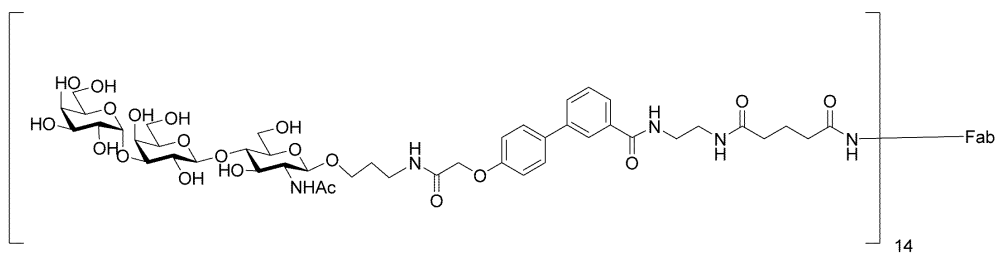
実施例 25



(mAbはリツキシマブを表す) ; 及び

30

実施例 26



(Fabはリツキシマブ-Fabを表す)

40

。

【請求項 20】

請求項1～19のいずれか1項記載のイムノコンジュゲートを含む医薬組成物。

【請求項 21】

1つ以上のさらなる治療薬剤をさらに含む、請求項20記載の医薬組成物。

【請求項 22】

療法における使用のための、請求項1～19のいずれか1項記載のイムノコンジュゲートを含む医薬組成物。

【請求項 23】

50

がんの治療における使用のための、請求項12～14のいずれか1項記載のイムノコンジュゲートを含む医薬組成物。

【請求項24】

がんの治療における使用のための、請求項15又は16記載のイムノコンジュゲートを含む医薬組成物。

【請求項25】

前記がんが、血液がんである、請求項24記載の医薬組成物。

【請求項26】

前記血液がんが、白血病又はリンパ腫である、請求項25記載の医薬組成物。

【請求項27】

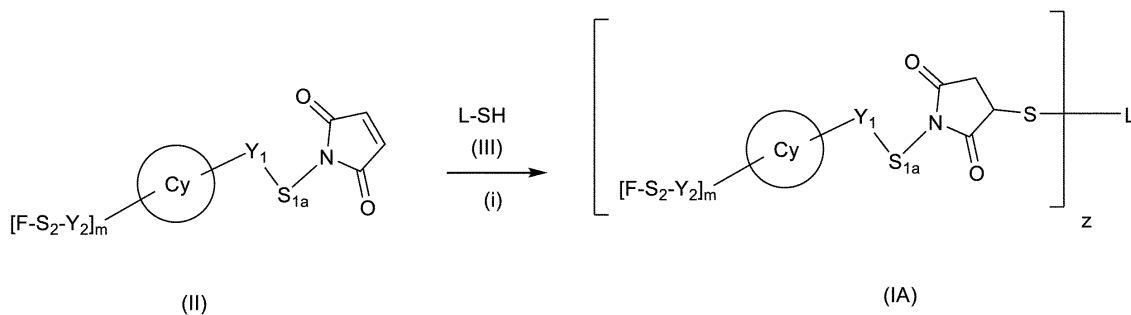
細菌感染症の治療における使用のための、請求項17記載のイムノコンジュゲートを含む医薬組成物。

【請求項28】

請求項1記載のイムノコンジュゲートを調製するためのプロセスであって：

(a)前記抗体又は抗原結合性断片が少なくとも1個の反応性チオール基を有する式(III)の化合物を、式(II)の化合物と反応させることにより、 S_1 が $-(CH_2)_2-NHCO-$ シクロヘキシル- CH_2-3- ピロリジン-2,5-ジオン-又は $-(CH_2)_2-NHCO-(CH_2CH_2O)_4-(CH_2)_2-3-$ ピロリジン-2,5-ジオン-を表し、かつ X_1 が $-S-$ を表す式(IA)の化合物を調製すること：

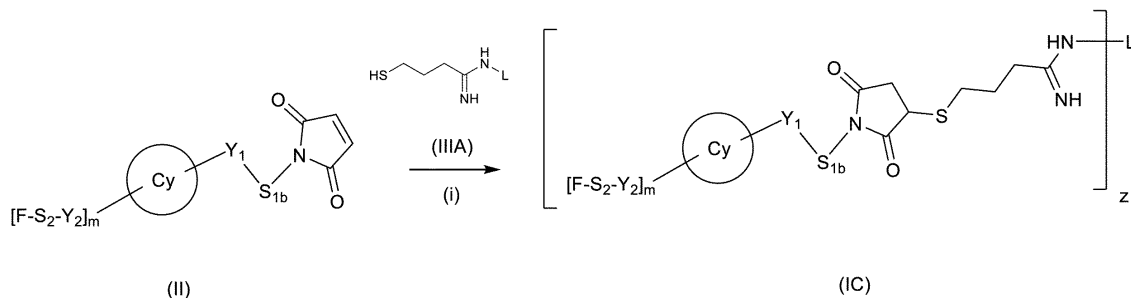
【化6】



(式中、 F 、 S_2 、 Y_2 、 m 、 Cy 、 Y_1 、及び L は、請求項1に定義されたものであり、 S_{1a} は、 $-(CH_2)_2-NHCO-$ シクロヘキシル- CH_2- 又は $-(CH_2)_2-NHCO-(CH_2CH_2O)_4-(CH_2)_2-$ を表す)；又は

(b)前記抗体又は抗原結合性断片が少なくとも1個の反応性チオール基を有する式(IIIA)の化合物を、式(II)の化合物と反応させることにより、 S_1 が $-(CH_2)_2-NHCO-$ シクロヘキシル- CH_2-3- ピロリジン-2,5-ジオン- $S-(CH_2)_3-C(=NH)-$ を表し、 X_1 が $-NH-$ を表す式(IC)の化合物を調製すること：

【化7】

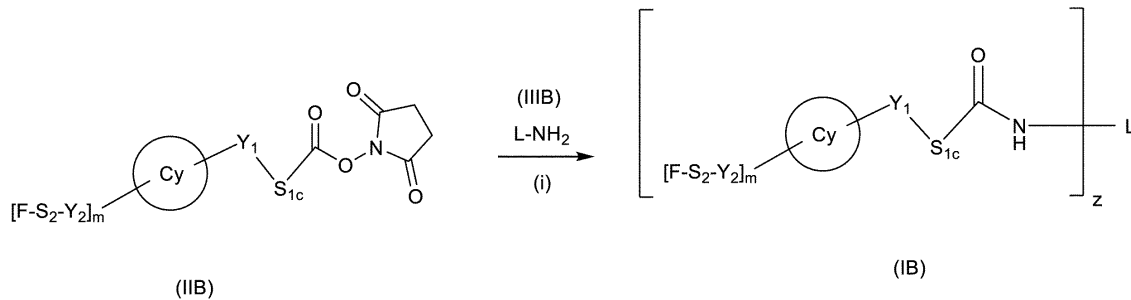


(式中、 F 、 S_2 、 Y_2 、 m 、 Cy 、 Y_1 、及び L は、請求項1に定義されたものであり、 S_{1b} は、 $-(CH_2)_2-NHCO-$ シクロヘキシル- CH_2- を表す)；又は

(c)式(IIB)の化合物を、前記抗体又は抗原結合性断片が少なくとも1個の反応性アミノ基

を有する式(IIIB)の化合物と反応させることにより、 S_1 が $-(CH_2)_2-NHCO-(CH_2)_3-CO-$ を表し、かつ X_1 が $-NH-$ を表す式(IB)の化合物を調製すること:

【化 8】



10

(式中、F、 S_2 、 Y_2 、m、Cy、 Y_1 、及びLは、請求項1に定義されたものであり、 S_{1c} は、 $-(CH_2)_2-NHCO-(CH_2)_3-$ を表す);及び/又は

(d)式(I)の化合物又はその保護された誘導体の、さらなる式(I)の化合物又はその保護された誘導体への相互変換を含む、前記プロセス。

【請求項 2 9】

請求項28に記載の式(II)もしくは式(IIB)の化合物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(発明の分野)

本発明は、免疫応答を、規定された治療標的に結び付ける能力を持つ新規化合物、がん及び感染性疾患の治療における該化合物の使用、該化合物を含有する組成物、それらの調製のためのプロセス、並びに該プロセスにおいて使用される新規中間体に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

(発明の背景)

30

疾患と闘うために、個体の免疫系を動員する新規方法を見つけることが必要である。ヒト免疫系は、潜在的に有害な病原体又は変異したヒト細胞(がん成長の原因となり得る)を同定するために外来シグナルを求め体を絶えず調査し、かつ排除のためにそれらを標的化している。該病原体又は変異したヒト細胞に対して動員され、免疫系を駆動し、その脅威を排除することができる天然の抗体が存在する。

【0 0 0 3】

がんは、体の他の部分へ侵襲又は播種する可能性のある異常な細胞増殖を伴う疾患群である。2012年において、がんは、約1410万人に発生している。これは、約820万人の死亡を引き起こし、これは総ヒト死亡数の14.6%を占める。男性における最も一般的ながん型は、肺がん、前立腺がん、結腸直腸がん、及び胃がんである。女性において最も一般的な型は、乳がん、結腸直腸がん、肺がん、及び子宮頸がんである。免疫応答が、がん性細胞の同定及び排除において、極めて重要な役割を果たすことが、よく確立されている。がんとの戦いを助けるために、個体の免疫系を強化することによりがんと闘う薬物が、存在する。がん細胞に対し特異的な免疫応答をより良く標的化することができ、且つより広い範囲の患者自身の腫瘍関連抗原を生じさせることができることが、必要である。患者自身の腫瘍に対する予め存在する天然の抗体を標的化することは、この必要性に合致している。細菌性、ウイルス性、及び真菌性の感染症を治療する新規方法を確定することが、急務である。抗微生物薬抵抗性は、大きな世界規模の健康上の脅威となってきた。例えば、米国において200万人超が、毎年、あるクラスの抗生物質に対し抵抗性のある細菌に感染すると推定される(米国疾病管理予防センター、2013年)。

40

50

【 0 0 0 4 】

感染症又はがんを治療するための斬新なアプローチが、2つの結合部位を含む免疫リンカーについて述べているWO2005/079423に開示されている。第一の結合部位は、個体の免疫応答成分に結合することが可能である。第二の結合部位は、抗原、病原体、化学物質のような任意の化合物又は外来物質、又はがんにおいて認められる変化した細胞のような内在性物質に結合することが可能である。該免疫リンカー分子の結果としての作用は、個体の予め存在する免疫応答が、標的、すなわちがん細胞又は特異的病原体へ転用されることである。該第一の結合部位の例は、該個体の免疫系により異物として認識され、従って、免疫応答の引き金を引くであろう、化合物又は物質を含む

【 0 0 0 5 】

第一の結合部位の典型例は、小分子ハプテンジニトロフェニル(DNP)、ラムノース、又は -1,6-グルカンを含む。第一の結合部位の更なる例は、ヒト血清抗体抗- -ガラクトシルに結合することが可能である糖質分子(すなわち、ガラクトシル- -1,3-ガラクトシル- -1,4-N-アセチルグルコサミン;「抗Gal」)である。

【 0 0 0 6 】

免疫の機能は、多価性に依存するため、抗Gal動員は、抗Galの濃度だけでなく、標的に対する抗体の親和性にも依存するであろう。

【 0 0 0 7 】

前記第二の結合部位の例は、特定の標的分子に結合する抗体又はその断片を含む。該第二の結合部位のさらなる例は、確立された治療用抗体又はその機能的断片を含む。このように標的とされる細胞又は病原体は、免疫系によって外来性のものと認識されることができ、破壊のための印をつけることができる。このように、天然の抗体が、これらの腫瘍細胞又は病原体に対して動員され、免疫系を利用して脅威を排除することができる。

【 0 0 0 8 】

WO98/34957は、 -ガラクトシルエピトープで標識された抗体を使用する免疫応答の刺激を記載している。該文書は、免疫系の刺激が、 -ガラクトシルエピトープの、抗体の定常領域内の操作されたグリコシル化部位内への組み込みに依存する実施態様を記載している。 -1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを発現する細胞株での該適切に操作された抗体の産生が、 -ガラクトシルエピトープの付加をもたらすと報告されている。この場合、組み込まれたエピトープの数は、グリコシル化のために操作された残基の数に依存した。本アプローチの不利な点は、導入することができる -ガラクトシル残基の数の制限である(部位特異的なアミノ酸修飾の数により制限される)。該アプローチのさらなる不利な点は、 -1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼが、糖質誘導体の集団を搬送することであり、このことは、抗ガラクトシル抗体動員に最適ではない可能性があり、免疫動員性エピトープの数を更に制限する。従って、抗体部位に対して、 -ガラクトシルエピトープの最適化されたローディング及び提示を可能にして、免疫応答を最大化するリンカー分子が必要である。

【 0 0 0 9 】

従って、第二の結合部位(すなわち、抗体又は抗原結合性断片)の位置に対し、第一の結合部位(すなわち、ヒト抗- -ガラクトシル抗体へ結合することが可能である糖質分子)の数及び位置を制御するために最適化されているスペーサー基を含むリンカー分子が非常に必要とされている。かかるリンカー分子は、免疫動員の有効性を最適化する一方で、可能性のある副作用を最小化することができるように、天然の抗体を引き付けるように設計され、従って効果的な抗がん療法及び感染物質に対する療法の提供において非常に有用である。

【 発明の概要 】

【 0 0 1 0 】

(発明の概要)

本発明の第1の態様により、ヒト抗- -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子にリンカーを介して連結された抗体又はその抗原結合性断片を含むイムノコンジュ

10

20

30

40

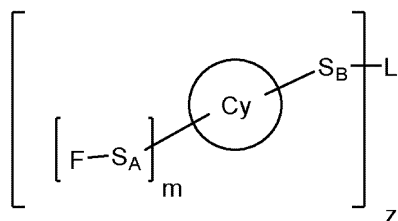
50

ゲートであって、該リンカーが、ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である1つ以上の糖質エピトープを提示することが可能である少なくとも1つのフェニル環を含むことを特徴とする、前記イムノコンジュゲートが提供される。

【0011】

本発明の第2の態様により、式(A)の化合物又はその医薬として許容し得る塩であるイムノコンジュゲートが提供される：

【化1】



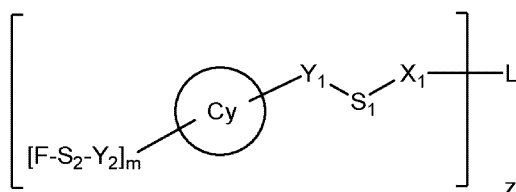
(A)

(式中、Fは、ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子であり；Cyは、フェニル、ビフェニル、又はトリフェニルであり； S_A 及び S_B は、F及びLの最適な距離のために選択されたスペーサーを示し；mは、1～5から選択された整数を表し；zは、1～30から選択された整数を表し；かつLは、抗体又はその抗原結合性断片である)。

【0012】

本発明のさらなる態様により、式(I)の化合物又はその医薬として許容し得る塩が提供される：

【化2】



(式中、

Lは、抗体又はその抗原結合性断片から選択された結合部位を表し；

S_1 は、 $-\text{CH}_2-$ 基のうちの1～10個が、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $=\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、シクロヘキシル、又はピロリジン-2,5-ジオンから選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、 $-(\text{CH}_2)_a-$ 又は $-(\text{CH}_2)_b-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_c-(\text{CH}_2)_d-$ 基から選択されたスペーサーを表し；

aは、1～35から選択された整数を表し；

bは、0～5から選択された整数を表し；

cは、1～20から選択された整数を表し；

dは、1～20から選択された整数を表し；

S_2 は、 $-\text{CH}_2-$ 基のうちの1～3個が、 $-\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、及び $-\text{NHC}(\text{O})-$ から選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、 $-(\text{CH}_2)_e-$ 又は $-(\text{CH}_2)_f-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_g-(\text{CH}_2)_h-$ 基から選択されたスペーサーを表し；

eは、1～15から選択された整数を表し；

fは、1～10から選択された整数を表し；

gは、1～20から選択された整数を表し；

hは、1～5から選択された整数を表し；

zは、1～30から選択された整数を表し；

X_1 は、抗体又は抗原結合性断片付着部位を表し；

Y_1 及び Y_2 は独立して、結合、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$

O)O-、-SC(O)-、-C(O)S-、-NH₂SO₂-、-SO₂NH-、又は-NHC(O)NH-基を表し；

Fは、ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子を表し；

mは、1～5から選択された整数を表し；かつ

Cyは、フェニル、ビフェニル、トリフェニルを表し、Cyが、ビフェニル又はトリフェニルを表す場合、該-Y₁-S₁-X₁-L基は、該フェニル環のうちのいずれの上に存在してもよく、1つ又は複数の該[F-S₂-Y₂]_m-基は、該フェニル環のうちのいずれの上に存在してもよい。

【図面の簡単な説明】

【0013】

(図面の簡単な説明)

【図1】図1は、実施例1～4の還元SDS PAGE分析である。

【図2】図2は、実施例5～8の還元SDS PAGE分析である。

【図3】図3は、実施例1～8のモノマー含量SECの分析である。

【図4】図4は、実施例1～8の化合物のM86 IgMデータである。

【図5】図5は、実施例1～4の化合物のM86 IgGデータである。

【図6】図6は、10nMセツキシマブと比較した、実施例5(図6A)、実施例6(図6B)、実施例7(図6C)、及び実施例8(図6D)を10nMで使用する、抗 α -ガラクトシルIgM抗体の細胞表面への捕獲を示す。

【図7】図7は、hIVIG抗 α -ガラクトシルIgGをA431細胞へと動員する実施例18～23の化合物の用量設定である。

【図8】図8は、抗ガラクトシルM86 IgM抗体を、A431細胞へと動員する実施例9～24の化合物の用量設定である。

【図9】図9は、20%ヒト血清(HS)又は熱不活化ヒト血清(HI HS) + 25 μ g/ml M86 IgMを使用した、A431細胞上の実施例13～17、20、22、23、及び24の化合物のC3b沈着データである。

【図10】図10は、実施例20及び23の化合物のファゴサイトーシスデータである。

【図11】図11は、抗ガラクトシルM86 IgM抗体をRaji細胞へと動員する実施例25及び26の化合物の用量設定である。

【図12】図12は、セツキシマブコンジュゲート(実施例9～17)の還元SDS-PAGEゲル分析である。

【図13】図13は、セツキシマブ-Fabコンジュゲート(実施例18～24)の還元SDS-PAGEゲル分析である。

【図14】図14は、実施例20(図14A)、22(図14B)、及び23(図14C)のMS分析である。

【図15】図15は、リツキシマブ及びリツキシマブ-Fabコンジュゲート(実施例25(図15B)及び26(図15C))の還元SDS-PAGE(図15A)及びSEC分析である。

【図16】図16は、セツキシマブ-FabのSDS-PAGE(図16A)、MS(図16B)、及びSEC(図16C)分析である。

【図17】図17は、リツキシマブのSDS-PAGE(図17A)及びSEC分析(図17B)並びにリツキシマブ-FabのSEC分析(図17C)である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

(発明の詳細な説明)

本発明の第1の態様により、ヒト抗 α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子にリンカーを介して連結された抗体又はその抗原結合性断片を含むイムノコンジュゲートであって、該リンカーが、ヒト抗 α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である1つ以上の糖質エピトープを提示することが可能である少なくとも1つのフェニル環を含むことを特徴とする、前記イムノコンジュゲートが提供される。

【0015】

本発明の第1の態様の一実施態様において、該リンカーは、フェニル、ビフェニル、又はトリフェニル基を含む。本発明の第1の態様のさらなる実施態様において、前記リンカ

10

20

30

40

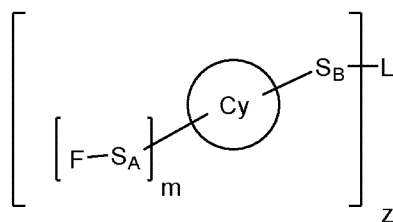
50

ーは、ビフェニル基を含む。

【 0 0 1 6 】

本発明の第2の態様により、式(A)の化合物又はその医薬として許容し得る塩であるイムノコンジュゲートが提供される：

【化 3 】



10

(A)

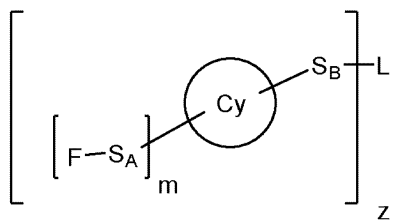
(式中、Fは、ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子であり；Cyは、フェニル、ビフェニル、又はトリフェニルであり； S_A 及び S_B は、F及びLの最適な距離のために選択されたスペーサーを示し；mは、1～5から選択された整数を表し；zは、1～30から選択された整数を表し；かつLは、抗体又はその抗原結合性断片である)。

【 0 0 1 7 】

言及し得る本発明の第2の態様により、式(A)の化合物又はその医薬として許容し得る塩であるイムノコンジュゲートが提供される：

20

【化 4 】



(A)

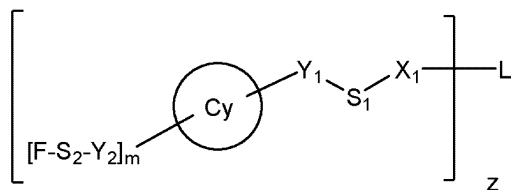
30

(式中、Fは、ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子であり；Cyは、フェニル、ビフェニル、又はトリフェニルであり； S_A 及び S_B は、F及びLの最適な距離のために選択されたスペーサーを示し；mは、1～5から選択された整数を表し；zは、1～10から選択された整数を表し；かつLは、抗体又はその抗原結合性断片である)。

【 0 0 1 8 】

本発明のさらなる態様により、式(I)の化合物又はその医薬として許容し得る塩が提供される：

【化 5 】



40

(I)

(式中、

Lは、抗体又はその抗原結合性断片から選択された結合部位を表し；

S_1 は、 $-\text{CH}_2-$ 基のうちの1～10個が、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $=\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}$

50

(O)-、シクロヘキシル、又はピロリジン-2,5-ジオンから選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、 $-(CH_2)_a-$ 又は $-(CH_2)_b-(CH_2-CH_2-O)_c-(CH_2)_d-$ 基から選択されたスペーサーを表し;

aは、1～35から選択された整数を表し;

bは、0～5から選択された整数を表し;

cは、1～20から選択された整数を表し;

dは、1～20から選択された整数を表し;

S_2 は、 $-CH_2-$ 基のうちの1～3個が、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、及び $-NHC(O)-$ から選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、 $-(CH_2)_e-$ 又は $-(CH_2)_f-(CH_2-CH_2-O)_g-(CH_2)_h-$ 基から選択されたスペーサーを表し;

eは、1～15から選択された整数を表し;

fは、1～10から選択された整数を表し;

gは、1～20から選択された整数を表し;

hは、1～5から選択された整数を表し;

zは、1～30から選択された整数を表し;

X_1 は、抗体又は抗原結合性断片付着部位を表し;

Y_1 及び Y_2 は独立して、結合、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-NHSO_2-$ 、 $-SO_2NH-$ 、又は $-NHC(O)NH-$ 基を表し;

Fは、ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子を表し;

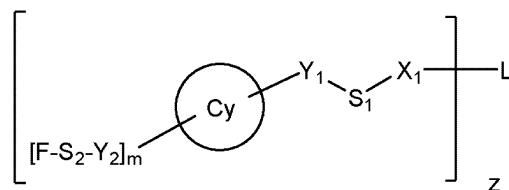
mは、1～5から選択された整数を表し;かつ

Cyは、フェニル、ビフェニル、トリフェニルを表し、Cyが、ビフェニル又はトリフェニルを表す場合、該 $-Y_1-S_1-X_1-L$ 基は、該フェニル環のうちのいずれの上にもよく、1つ又は複数の該 $[F-S_2-Y_2]_m$ -基は、該フェニル環のうちのいずれの上にも存在してもよい)。

【0019】

言及し得る本発明のさらなる態様により、式(I)の化合物又はその医薬として許容し得る塩が提供される:

【化6】



(I)

(式中、

Lは、抗体又はその抗原結合性断片から選択された結合部位を表し;

S_1 は、 $-CH_2-$ 基のうちの1～10個が、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $=N(H)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、シクロヘキシル、又はピロリジン-2,5-ジオンから選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、 $-(CH_2)_a-$ 又は $-(CH_2)_b-(CH_2-CH_2-O)_c-(CH_2)_d-$ 基から選択されたスペーサーを表し;

aは、1～35から選択された整数を表し;

bは、0～5から選択された整数を表し;

cは、1～20から選択された整数を表し;

dは、1～20から選択された整数を表し;

S_2 は、 $-CH_2-$ 基のうちの1～3個が、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、及び $-NHC(O)-$ から選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、 $-(CH_2)_e-$ 又は $-(CH_2)_f-(CH_2-CH_2-O)_g-(CH_2)_h-$ 基から選択されたスペーサーを表し;

eは、1～15から選択された整数を表し;

fは、1～10から選択された整数を表し；

gは、1～20から選択された整数を表し；

hは、1～5から選択された整数を表し；

zは、1～10から選択された整数を表し；

X₁は、抗体又は抗原結合性断片付着部位を表し；

Y₁及びY₂は独立して、結合、-O-、-S-、-NH-、-NHC(O)-、-C(O)NH-、-OC(O)-、-C(O)O-、-SC(O)-、-C(O)S-、-NH₂SO₂-、-SO₂NH-、又は-NHC(O)NH-基を表し；

Fは、ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子を表し；

mは、1～5から選択された整数を表し；かつ

Cyは、フェニル、ビフェニル、トリフェニルを表し、Cyが、ビフェニル又はトリフェニルを表す場合、該-Y₁-S₁-X₁-L基は、該フェニル環のうちのいずれの上に存在してもよく、1つ又は複数の該[F-S₂-Y₂]_m-基は、該フェニル環のうちのいずれの上に存在してもよい。

【0020】

本発明は、選択された抗体又はその断片上の単一又は複数の部位へのコンジュゲーションに加えて、1つ又は複数の糖質のエピトープを提示する能力を可能にし、従って、標的結合有効性を保持すると同時に天然の抗体の最適な動員を可能にする、新規のイムノコンジュゲートリンカーの説明及び使用を含む。本発明は、当業者が、最適な抗Gal動員のために選択された抗体又はその断片1つあたりの糖質の最適な数を細かく調整し、かつ標的有効性を保持することを提供する。

【0021】

モノクローナル抗体は、がんを患う患者の転帰を大きく向上させてきたが、しかしながら、特定の患者集団は、これらの療法に対して固有の抵抗性を示し、かつ良好な転帰が観察されることがあるものの、これらは、長続きしないこともあり、mAb療法に対する獲得耐性は、問題であり続けており、増加した抗体有効性が望まれる。腫瘍は、増加した受容体発現、又はシグナル伝達経路への変化、又は減少した免疫応答を介するものなどの、抗体治療に対する抵抗性又は減少した反応をもたらす機構を示すか又は発達させることができる(Reslan, L.の文献: Mabs 2009, 3, 222)。例えば、患者は、EGFRシグナル伝達に影響を及ぼすKRAS変異の発現から生ずるセツキシマブに対する固有の抵抗性を示すことがある(Lievre, A.の文献: J. Clin. Oncol. 2008, 26, 374)。加えて、患者が、初めはセツキシマブに良好に反応する場合でも、大部分は、最終的に抵抗性を獲得してしまうであろう(Bianco, R.の文献: Endocr. Relat. Cancer 2005, S159; Brand, T.M.の文献: Cancer Biol. Ther. 2011, 11, 777)。

【0022】

治療用抗体に対する抵抗性の更なる例は、リツキシマブ(抗CD20モノクローナル抗体)で治療した非ホジキンリンパ腫患者の症例にみられる。リツキシマブに対する抵抗性が、およそ半数の治療未経験患者で観察される。リツキシマブ療法に初めは反応を示す患者は、しばしば、抵抗性を獲得してしまう。抵抗性の機構は複雑であり、抵抗性を克服する戦略は、患者において限定された成功を示しており(Best Pract. Res. Clin. Haematol. 2011, 203-216)、従って、治療用抗体の活性を向上させて、患者の反応を増加させ延長させることが、依然として切実に必要とされている。

【0023】

多くのアプローチが、抗体薬物コンジュゲート(ADC)、抗体毒素コンジュゲート(免疫毒素)、及び強化されたエフェクター機構、例えば、増加した抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)を有する操作された抗体を含む治療用抗体の有効性を改善するよう取り入れられてきた。これらの尽力にもかかわらず、臨床的な成功を達成している療法は殆どなく、毒性などの副作用が、重要な問題として残っている(Beck, A.の文献: Nat. Rev. Drug. Discov. 2017)。

従って、mAbsを修飾して有効性を強化し、患者の転帰を向上させる新たな戦略が必要とされている。

10

20

30

40

50

【0024】

-Galエピトープ(Gal 1,3Gal 1,4GlcNAc-R)は、糖脂質及び糖タンパク質上に天然に産生され、分岐オリゴ糖上に複数のエピトープを提示するユニークな糖質である(J. Immunology (2007), 178 (7), 4676-87)。この -Galエピトープは、例えば、複数のグリコシル化部位上でのGal 1,3-Galの合成を触媒することが周知の酵素であるトランスフェラーゼである 1-,3-GTによって合成される(WO98/34957)。本方法は効率的であるものの、この合成は、既存又は操作されたグリコシル化部位を当てにしており、1コンジュゲーション部位あたり1つの -Gal単位を可能にするのみである。

【0025】

従って、天然の免疫系を最適に利用する -Galトリサッカライド単位の1つ又は複数のいずれかの提示に好適なモジュラーアプローチに対して、興味深い必要性が存在する。

10

【0026】

本発明の化合物は、結合部位L(すなわち、抗体又はその断片)の位置に対し、F基(すなわち、ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子)の数及び位置を制御しかつ提示するために最適化されているリンカー分子を含む。例えば、剛性のある環状基は、Lに対し1個以上のF基の最適配置のためのスカフォールドを提供するという利点を有する。Lに対するF基の正確な数及び配向が、L基の性質に応じて変動するということは、理解されるであろう。更に、単一のフェニル環、ビフェニル環、又はトリフェニル環を含む環状基の存在は、宿主から生じた免疫応答を増強するために、複数のF基(すなわち、ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子)を提示するという著しい利点を提供する。複数の結合基の化学的提示は、当該技術分野においてこれまでに公知であったが、これは、単一の6員環系(すなわちフェニル)、結合により連結された2個の6員環系(ビフェニル)、又は2つの結合により連結された3員の環系(トリフェニル)のいずれかを使用する本発明とは対照的に、1以上のアミノ酸基(例えば、WO2014/178878を参照されたい)又は分岐したリンカー基(例えば、US2014/0112975を参照されたい)を使用して達成されている。この相違の技術的效果は、本発明の化合物が、当該技術分野において先に公知であるリンカーよりもより容易に調製され得るとともに、有利にはキラル中心の存在を回避し得るということであり、プロテアーゼ分解をより受けにくいということである。本発明の化合物の合成はまた、樹脂を使用せず、従って大規模医薬品製造のための拡大に適しているという利点を提供する。従って、本発明の化合物は、単に治療的に効果があるのみではなく、宿主からの免疫応答を増強するという利点及び拡大縮小できる高収率の容易で効率的な合成も提供する。加えて、本発明のリンカーは、不安定ではなく、従って当該技術分野において先に公知の多くの化合物により必要とされるような、「切断可能なリンカー」成分を典型的には含まない(例えば、US8,828,956を参照されたい)。更に、本発明のリンカーは、当業者が、合成の容易さ及び効率とともに、基の特定の左手及び右手の組合せを選択することを可能にして、抗体又はその断片コンジュゲーション部位あたりの最適な数のF基を可能にした。

20

30

【0027】

Fab、Fab'、Fab'2、Fab Fab₃、F(ab)₂、Fv、scFv、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ナノボディなどのモノクローナル抗体断片もまた、腫瘍学の分野で公知である。それらのより小さいサイズから生ずる増加した腫瘍透過性、より容易な製造(それらは、大腸菌(E. coli)又は酵母中に発現させることができ、増加した利便性及びより効率的なスケールアップがもたらされる)、及び減少した免疫原性を含む、完全長mAbsに勝るいくつかの利点が、報告されている。しかしながら、scFvs又はFab断片などの断片は、完全長mAbsと比較した場合、有効性が減少してしまうことがある。例えば、Fab断片上にFcドメインを欠くことは、多くの場合、抗腫瘍反応の成分となるADCCに駆動される有効性の可能性を無くしてしまう(Nelson, A. L.の文献: mAbs 2009, 2, 77)。

40

【0028】

このように、抗体断片の利益は、多くの場合、それらに関連する機能の喪失によって相殺される。最適な数の -Gal部位が、抗体断片にコンジュゲートした新たな構築体を提供

50

するための本発明のフェニルを含有するリンカーの使用は、抗体断片の抗腫瘍作用を強めることへの新たなアプローチを提供する。

【0029】

mAb及びそれらの断片の双方について、例えば、追加のシステイン残基の組み込みによる、制御された部位特異的なコンジュゲーションが、当技術分野において周知である。そのようなアプローチは、特に、標的結合エピトープを破壊することなく該mAb又は断片の誘導体化を可能とすること、及びローディングが制御されるようにすることによっていくつかの利点を提供し、すなわち、一定の化学量論が達成される(Shen, B. Q.の文献: Nat. Biotechnol. 2012, 30, 184)。部位特異的なコンジュゲーションの1つの制限は、コンジュゲートした部位の低いローディングが結果として生じ得ることであり、これは、有効性を制限する可能性がある。コンジュゲーション部位1つあたり複数の -Ga部位の提示を可能にする本発明のフェニルを含有するリンカーの使用は、コンジュゲーション部位の数が少ない場合であっても、高い -Gal/抗体比(高ローディング)を達成する方法を提供する。

10

【0030】

(リンカーの定義)

一実施態様において、 S_1 は:

-CH₂-基のうちの1~5個(例えば、2、3、又は5個)が、-S-、=N(H)-、-C(=O)-、-NHC(O)-、シクロヘキシル、又はピロリジン-2,5-ジオンから選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、-(CH₂)_a-(例えば、-(CH₂)₂-NHCO-シクロヘキシル-CH₂-3-ピロリジン-2,5-ジオン-、-(CH₂)₂-NHCO-シクロヘキシル-CH₂-3-ピロリジン-2,5-ジオン-S-(CH₂)₃-C(=NH)-、もしくは-(CH₂)₂-NHCO-(CH₂)₃-COなど);又は

20

-CH₂-基のうちの1~5個(例えば、2個)が、-NHC(O)-もしくはピロリジン-2,5-ジオンから選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、-(CH₂)_b-(CH₂-CH₂-O)_c-(CH₂)_d-(例えば、-(CH₂)₂-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-3-ピロリジン-2,5-ジオン-など)から選択されたスペーサーを表す。

【0031】

更なる実施態様において、 S_1 は:

-CH₂-基のうちの1~10個が、-O-、-S-、=N(H)-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、シクロヘキシル、又はピロリジン-2,5-ジオンから選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、-(CH₂)_a-(例えば、-(CH₂)₂-NHCO-シクロヘキシル-CH₂-ピロリジン-2,5-ジオン-、又は-(CH₂)₂-NHCO-シクロヘキシル-CH₂-ピロリジン-2,5-ジオン-S-(CH₂)₃-C(=NH)-など)

30

から選択されたスペーサーを表す。

【0032】

a、b、c、d、e、f、g、及びhが、基FとLの間の好適なリンカー長を維持するように選択されることは理解されるであろう。FとLの間の好適なリンカー長の例は、約5 ~ 約50

以上の長さ、約6 ~ 約45、約7 ~ 約40、約8 ~ 約35、約9 ~ 約30、約10 ~ 約25、約11 ~ 約20、約12 ~ 約15の範囲である。従って一実施態様において、a、b、c、d、e、f、g、及びhは、45を超えない合計の整数、例えば5~45、例えば7~42、例えば30以下、例えば5~30、例えば7~29を表す。

40

【0033】

一実施態様において、aは、1~30から選択された整数を表す。更なる実施態様において、aは、2~30から選択された整数を表す。更なる実施態様において、aは、2、4、6、9、11、18、又は30から選択された整数を表す。更なる実施態様において、aは、6~30から選択された整数を表す。更なる実施態様において、aは、6、11、18、又は30から選択された整数を表す。更なる実施態様において、aは、5~15から選択された整数を表す。更なる実施態様において、aは、6~11から選択された整数を表す。更なる実施態様において、aは、6、7、又は11から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、aは、6から選択された整数を表す。代わりの実施態様において、aは、7から選択された整数を表す。

50

す。代替の実施態様において、aは、11から選択された整数を表す。

【0034】

一実施態様において、bは、0～3から選択された整数を表す。更なる実施態様において、bは、0又は3から選択された整数を表す。更なる実施態様において、bは、1～3から選択された整数を表す。更なる実施態様において、bは、2又は3から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、bは、3から選択された整数を表す。

【0035】

一実施態様において、cは、1～15から選択された整数を表す。更なる実施態様において、cは、1～12から選択された整数を表す。更なる実施態様において、cは、4～12から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、cは、4又は12から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、cは、4から選択された整数を表す。

10

【0036】

一実施態様において、dは、1～15から選択された整数を表す。更なる実施態様において、dは、2～13から選択された整数を表す。更なる実施態様において、dは、2、5、又は13から選択された整数を表す。更なる実施態様において、dは、13から選択された整数を表す。代替の実施態様において、dは、3から選択された整数を表す。

【0037】

一実施態様において、Y₁は、結合、-C(O)NH-、又は-O-を表す。更なる実施態様において、Y₁は、-C(O)NH-を表す。

【0038】

20

一実施態様において、S₂は、
-CH₂-基の1又は2個が、-N(H)-、-C(O)NH-及び-NHC(O)-から選択された1又は2の基により任意に置換されている、-(CH₂)_e- (例えば、-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₄-CONH-CH₂-、-(CH₂)₃-NH-CH₂-もしくは-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-など)；又は
-CH₂-基の1～3個が、1～3の-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h- (例えば、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₁₂-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-もしくは-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-など)；
から選択されたスペーサーを表す。

30

【0039】

更なる実施態様において、S₂は：
-CH₂-基の1又は2個が、-C(O)NH-又は-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_e- (例えば、-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-、-(CH₂)₃-NHCO-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₄-CONH-CH₂-もしくは-(CH₂)₃-NH-CH₂-など)；又は
-CH₂-基の1又は2個が、-C(O)NH-又は-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h- (例えば、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₂-(OCH₂CH₂)₄-NHCO-CH₂-もしくは-(CH₂)₄-NHCO-(CH₂)₂-(OCH₂CH₂)₄-NHCO-CH₂-など)；
から選択されたスペーサーを表す。

【0040】

40

また更なる実施態様において、S₂は：
-CH₂-基の1又は2個が、1又は2の-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_e- (例えば、-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-もしくは-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-など)；又は
-CH₂-基の1～3個が、1～3の-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h- (例えば、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₁₂-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-もしくは-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-など)；
から選択されたスペーサーを表す。

【0041】

50

なおまた更なる実施態様において、 S_2 は:

-CH₂-基のうちの1個又は2個が、-N(H)-、-C(O)NH-、及び-NHC(O)-から選択された1個又は2個の基で任意に置換されている、-(CH₂)_e-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-など); 又は

-CH₂-基のうちの1~3個が、1~3個の-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-など)

から選択されたスペーサーを表す。

【0042】

なおまた更なる実施態様において、 S_2 は:

-CH₂-基のうちの1個又は2個、例えば、1個が、-N(H)-、-C(O)NH-、及び-NHC(O)-から選択される1個又は2個、例えば、1個の基により任意に置換されている、-(CH₂)_e-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-など)

から選択されたスペーサーを表す。

【0043】

なおまた更なる実施態様において、 S_2 は:

-CH₂-基のうちの1個が、-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_e-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-など); 又は

-CH₂-基のうちの2個が、-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-など)

から選択されたスペーサーを表す。

【0044】

一実施態様において、 e は、1~10から選択された整数を表す。更なる実施態様において、 e は、3~10から選択された整数を表す。更なる実施態様において、 e は、3、5、9、又は10から選択された整数を表す。更なる実施態様において、 e は、5~9から選択された整数を表す。更なる実施態様において、 e は、5又は9から選択された整数を表す。更なる実施態様において、 e は、4~10から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、 e は、4、5、又は10から選択された整数を表す。なおまた更なる実施態様において、 e は、5から選択された整数を表す。

【0045】

一実施態様において、 f は、1~8から選択された整数を表す。更なる実施態様において、 f は、2~8から選択された整数を表す。更なる実施態様において、 f は、2~6から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、 f は、4~8から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、 f は、4又は8から選択された整数を表す。なおまた更なる実施態様において、 f は、4から選択された整数を表す。

【0046】

一実施態様において、 g は、1~15から選択された整数を表す。更なる実施態様において、 g は、4~12から選択された整数を表す。更なる実施態様において、 g は、4又は12から選択された整数を表す。更なる実施態様において、 g は、1~5から選択された整数を表す。更なる実施態様において、 g は、1~4から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、 g は、4から選択された整数を表す。

【0047】

一実施態様において、 h は、1~4から選択された整数を表す。更なる実施態様において、 h は、4から選択された整数を表す。

【0048】

一実施態様において、 Y_2 は、結合、-O-、又は-NHC(O)-を表す。更なる実施態様において、 Y_2 は、結合又は-O-を表す。また更なる実施態様において、 Y_2 は、-O-を表す。

【0049】

一実施態様において、 m は、1~4から選択された整数を表す。更なる実施態様において、 m は、1~3から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、 m は、1又は3か

10

20

30

40

50

ら選択された整数を表す。また更なる実施態様において、mは、2又は3から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、mは、1又は2から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、mは、1から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、mは、2から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、mは、3から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、mは、4から選択された整数を表す。

【0050】

更なる実施態様において、zは、1～25から選択された整数を表す。更なる実施態様において、zは、1～20から選択された整数を表す。更なる実施態様において、zは、2～20から選択された整数(例えば、2、4、9、5、7、8、10、11、14、15、17、又は20)を表す。更なる実施態様において、zは、1～8から選択された整数を表す。更なる実施態様において、zは、1～5から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、zは、2～5から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、zは、2又は5から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、zは、2から選択された整数を表す。また更なる実施態様において、zは、5から選択された整数を表す。

10

【0051】

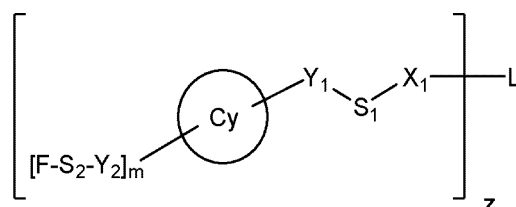
一実施態様において、Cyは、フェニル又はピフェニルを表す。更なる実施態様において、Cyは、ピフェニル又はトリフェニルを表す。また更なる実施態様において、Cyは、フェニル又はトリフェニルを表す。なおまた更なる実施態様において、Cyは、ピフェニルを表す。

【0052】

本発明のさらなる態様により、式(I)^aの化合物又はその医薬として許容し得る塩が提供される：

20

【化7】



(I)^a

30

(式中、

Lは、抗体又はその抗原結合性断片から選択された結合部位を表し；

S₁は：

-CH₂-基のうちの2個、3個、又は5個が、-S-、=N(H)-、-C(=O)-、-NHC(O)-、シクロヘキシル、又はピロリジン-2,5-ジオンから選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、-(CH₂)_a-；又は

-CH₂-基のうちの2個が、-NHC(O)-又はピロリジン-2,5-ジオンから選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、-(CH₂)_b-(CH₂-CH₂-O)_c-(CH₂)_d-から選択されたスペーサーを表し；

40

aは、6、7又は11から選択された整数を表し；

bは、3から選択された整数を表し；

cは、4から選択された整数を表し；

dは、3から選択された整数を表し；

S₂は：

-CH₂-基のうちの1個が、-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_e-；又は

-CH₂-基のうちの2個が、-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h-

から選択されたスペーサーを表し；

50

eは、5から選択された整数を表し；
 fは、4から選択された整数を表し；
 gは、4から選択された整数を表し；
 hは、4から選択された整数を表し；
 zは、2～20から選択された整数を表し；
 X₁は、-S-又は-N(H)-を表し；
 Y₁は、-C(O)NH-を表し；
 Y₂は、-O-を表し；
 Fは、ヒト抗- -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子を表し；
 mは、1又は3から選択された整数を表し；かつ

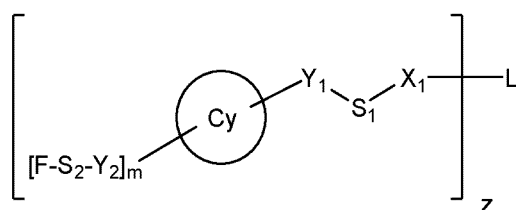
10

Cyは、ビフェニルを表し、該-Y₁-S₁-X₁-L基は、該フェニル環のうちのどちらの上に存在してもよく、かつ1つ又は複数の該[F-S₂-Y₂]_m-基は、該フェニル環のうちのどちらの上に存在してもよい)。

【0053】

言及し得る本発明のさらなる態様により、式(I)^aの化合物又はその医薬として許容し得る塩が提供される：

【化8】



20

(I)^a

(式中、

Lは、抗体又はその抗原結合性断片から選択された結合部位を表し；

S₁は、-CH₂-基のうちの1～5個が、-O-、-S-、=N(H)-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、シクロヘキシル、又はピロリジン-2,5-ジオンから選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、-(CH₂)_a-基から選択されたスペーサーを表し；

30

aは、6又は11から選択された整数を表し；

S₂は、-CH₂-基のうちの1～3個が、-N(H)-、-C(O)NH-、及び-NHC(O)-から選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、-(CH₂)_e-基から選択されたスペーサーを表し；

eは、5から選択された整数を表し；

zは、2～5から選択された整数を表し；

X₁は、-S-又は-N(H)-を表し；

Y₁は、-C(O)NH-を表し；

Y₂は、-O-を表し；

Fは、ヒト抗- -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子を表し；

40

mは、1又は3から選択された整数を表し；かつ

Cyは、ビフェニルを表し、該-Y₁-S₁-X₁-L基は、該フェニル環のうちのどちらの上に存在してもよく、かつ1つ又は複数の該[F-S₂-Y₂]_m-基は、該フェニル環のうちのどちらの上に存在してもよい)。

【0054】

更なる実施態様において、本発明は、実施例1～26の化合物又はその医薬として許容し得る塩を含む式(I)の化合物を提供する。

【0055】

更なる実施態様において、本発明は、実施例1～26の化合物の遊離塩基である式(I)の化合物を提供する。

50

【 0 0 5 6 】

更なる実施態様において、本発明は、実施例 1～8 の化合物又はその医薬として許容し得る塩を含む式(1)の化合物を提供する。

【 0 0 5 7 】

更なる実施態様において、本発明は、実施例 1～8 の化合物の遊離塩基である式(1)の化合物を提供する。

【 0 0 5 8 】

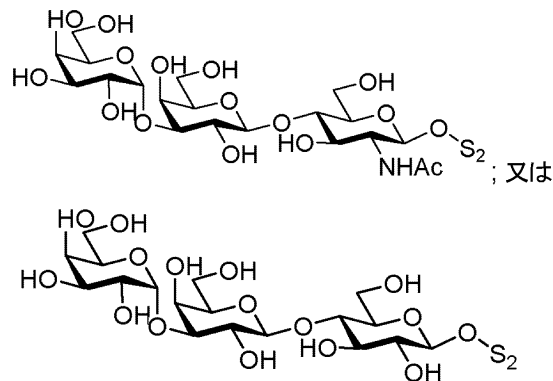
(Gal)

本明細書における用語「ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子」への言及は、該ヒトの免疫応答成分(すなわち、抗- α -ガラクトシル抗体)に結合し、結果的にヒトにおける免疫応答を誘起することが可能である糖(すなわち糖質)部位を含む。一実施態様において、該抗- α -ガラクトシル抗体は、抗- α -ガラクトシルIgG抗体又は抗- α -ガラクトシルIgM抗体である。かかる糖質分子の例は、 α -ガラクトシル化合物及びそれらの修飾された誘導体である。好適な糖質分子の更なる例は、腫瘍細胞の選択的標的化及び死滅における使用に適している、US2012/0003251に列挙された α -galエピトープであり、これらのエピトープは、引用により本明細書中に組み込まれている。一実施態様において、Fは、ガラクトシル- α -1,3-ガラクトシル- α -1,4-N-アセチルグルコサミン、1-3ガラクトビオース、1-3- α -1,4-ガラクトトリオース又はガリリペンタサッカリド(galilipentasaccharide)から選択される。

【 0 0 5 9 】

ひとつの特定の実施態様において、Fは、下記式：

【 化 9 】

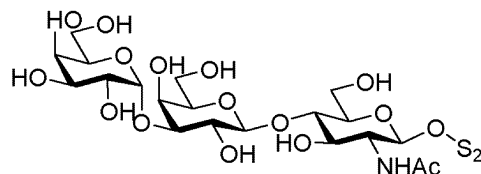


(式中、 S_2 は、 S_2 基への付着点をいう)のひとつに示された構造を有する。

【 0 0 6 0 】

ひとつの特定の実施態様において、Fは、下記式：

【 化 1 0 】



(式中、 S_2 は、 S_2 基への付着点をいう)に示された構造を有する。

【 0 0 6 1 】

(抗体及びそれらの抗原結合性断片)

本明細書における用語「抗体(単数)」又は「抗体(複数)」への言及は、公知の抗原に結合する分子又は分子の活性断片、特に、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原に免疫特異的に結合する結合部位を含む分子を指す。本発明による免疫グロブリンは、任意のクラス(IgG、IgM、IgD、IgE、IgA、及びIgY)

、又はサブクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2)もしくは免疫グロブリン分子のサブクラス(アイソタイプ)(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4におけるIgG、もしくはIgA1及びIgA2におけるIgA)のものとすることができる。

【0062】

本発明の範囲内で、「抗体(単数)」又は「抗体(複数)」という用語はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、二重特異性抗体、ヒト抗体、及びヒト化抗体、並びにそれらの活性断片を含む。公知抗原に結合する分子の活性断片の例としては、Fab免疫グロブリン発現ライブラリーの産物及び上で言及した抗体及び断片のいずれかのエピトープ結合性断片を含む、Fab、F(ab²)、scFv、及びFv断片が挙げられる。

【0063】

本明細書で使用される、「モノクローナル抗体」という用語は、実験室で単一のクローンから量産され、かつただ1つの抗原を認識する抗体を指す。モノクローナル抗体は、典型的には、通常は短命な抗体産生B細胞を、がん細胞などの増殖が速い細胞(「不死」細胞と呼ばれることもある)に融合することによって作製される。得られたハイブリッド細胞、又はハイブリドーマは、急速に増殖し、大量の抗体を産生するクローンを生じさせる。本発明の目的のために、「モノクローナル抗体」はまた、完全な単クローン性にはまだ到達していないマザークローンによって産生される抗体を含むものとも理解される。

【0064】

本明細書で使用される、「キメラ抗体」という用語は、通常、組換えDNA技術によって調製される、マウス由来の可変領域、すなわち、結合領域、及び異なる起源又は種に由来して得た定常領域の少なくとも一部を含むモノクローナル抗体を指す。マウス可変領域及びヒト定常領域を含むキメラ抗体は、例示的な実施態様である。そのようなマウス/ヒトキメラ抗体は、マウス免疫グロブリン可変領域をコードするDNAセグメント及びヒト免疫グロブリン定常領域をコードするDNAセグメントを含む発現された免疫グロブリン遺伝子の産物である。本開示に包含される「キメラ抗体」の別の形態は、クラス又はサブクラスが、修飾されているか元の抗体のものから変えられているものである。そのような「キメラ」抗体は、「クラススイッチ抗体」とも称される。キメラ抗体を製造するための方法は、現在当技術分野において周知である慣用の組換えDNA技術及び遺伝子トランスフェクション技術を含む。例えば、Morrison, S. L.らの文献: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855;米国特許第5,202,238号及び米国特許第5,204,244号を参照されたい。

【0065】

本明細書で使用される、「ヒト化抗体」又は「抗体のヒト化バージョン」という用語は、フレームワーク又は「相補性決定領域」(CDR)が、親の免疫グロブリンのものと比較して異なる特異性の免疫グロブリンのCDRを含むよう修飾されている抗体を指す。ある例示的な実施態様において、VH及びVLのCDRが、ヒト抗体のフレームワーク領域内に移植され、「ヒト化抗体」が調製される。例えば、Riechmann, L.らの文献: Nature 332 (1988) 323-327;及びNeuberger, M. S.らの文献: Nature 314 (1985) 268-270を参照されたい。重鎖及び軽鎖の可変フレームワーク領域を、同一又は異なるヒト抗体配列に由来して得ることができる。該ヒト抗体配列は、天然に存在するヒト抗体の配列とすることができる。ヒト重鎖及び軽鎖可変フレームワーク領域は、例えば、Lefranc, M.-P.の文献: Current Protocols in Immunology (2000)-Appendix 1P A.1P.1-A.1P.37に列記されており、かつ、例えば、IMGT、the international ImMunoGeneTics information System(登録商標)(<http://imgt.cines.fr>)又は<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>を介して利用可能である。任意に、フレームワーク領域を、さらなる変異によって修飾することができる。例示的なCDRは、キメラ抗体に対して上で記載した抗原を認識する配列を表すものに対応する。ある実施態様において、そのようなヒト化バージョンは、ヒト定常領域とキメラ化される。本明細書で使用される「ヒト化抗体」という用語はまた、例えば、「クラススイッチ」すなわち、Fc部分の変化又は変異(例えば、IgG1からIgG4及び/又はIgG1/IgG4変異)によって、特に、C1q結合及び/又はFcR結合に関して、定常領域で修飾されて、本開示による性質を生じさせるそのような抗体を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来して得た可変領域及び定常領域を有する抗体を含むことが意図される。ヒト抗体は、最新技術において周知である(van Dijk, M. A.及びvan de Winkel, J. G.の文献: Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374)。ヒト抗体は、内因性免疫グロブリン産生の非存在下で、免疫化するとヒト抗体の全レパートリー又はそれらのうちの選択されたものを産生することができるトランスジェニック動物(例えば、マウス)内で産生させることもできる。そのような生殖系列変異マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの導入は、抗原曝露時のヒト抗体の産生をもたらす(例えば、Jakobovits, A.らの文献: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A.らの文献: Nature 362 (1993) 255-258; Brueggemann, M. D.らの文献: Year Immunol. 7 (1993) 33-40を参照されたい)。ヒト抗体を、ファージディスプレイライブラリー内に産生させることもできる(Hoogenboom, H. R.及びWinter, G.の文献: J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J. D.らの文献: J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597)。Cole, A.ら及びBoerner, P.らの技術もまた、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である(Cole, A.らの文献: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A. R. (1985) p. 77; 及びBoerner, P.らの文献: J. Immunol. 147 (1991) 86-95)。既に言及されたように、本開示によれば、本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語はまた、例えば、「クラススイッチ」、すなわち、Fc部分の変化又は変異(例えば、IgG1からIgG4へのかつ/又はIgG1/IgG4変異)によって、例えば、C1q結合及び/又はFcR結合に関して、本開示による性質が生じるように定常領域で修飾されたそのような抗体を含む。

10

20

【 0 0 6 7 】

本明細書で使用される「単鎖抗体」は、VHドメイン及びVLドメインが、2つのドメインが連携して抗原結合性部位を形成するのを可能とするペプチドリンカーによって連結されている単鎖Fv分子(scFv)(Birdらの文献: 1988, Science 242: 423-426, Hustonらの文献: 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879-5883)、又は二重特異性単鎖Fv(WO03/11161)を指す。

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用される、「二重特異性抗体」という用語は、2つ(又はそれを超える)異なる抗原に結合する抗体を指す。

30

【 0 0 6 9 】

本明細書で使用される、「抗体断片」という用語は、完全長抗体の一部、例えば、場合により、その可変ドメイン、又は少なくともその抗原結合性部位を指す。抗体断片の例としては、抗体断片から形成されるダイアボディ、単鎖抗体分子、及び多重特異性抗体が挙げられる。scFv抗体は、例えば、Huston, J. S.の文献: Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-88に記載されている。抗体断片は、いくつかの公知の技術によって本発明の抗体から誘導することができる。例えば、精製したモノクローナル抗体を、ペプシンなどの酵素で切断して、それに対してHPLCゲル濾過を行うことができる。その後、Fab断片を含有する適切な画分を集め、膜濾過などによって濃縮する。抗体の活性断片の単離のための一般的な技術のさらなる説明については、例えば、Khaw, B. A.らの文献: J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseauxらの文献: Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986を参照されたい。

40

【 0 0 7 0 】

本明細書で使用される、「特異的な」及び「特異的に」という用語は、互換的に使用されて、他の生体分子が、対象となる生体分子に特異的に結合する抗体に、有意に結合しないことを示す。ある実施態様において、ペプチド内のエピトープを含むペプチド以外の生体分子への結合のレベルは、結果として、ELISA又は親和性決定によって無視できる(例えば、決定できない)ほどの結合親和性となる。

【 0 0 7 1 】

「無視できるほどの結合」によって、ペプチド内のエピトープを含むペプチドへの結合

50

よりも、少なくとも約85%、特定のには少なくとも約90%、より特定のには少なくとも約95%、さらにより特定のには少なくとも約98%であるが、とりわけ少なくとも約99%及び最高で100%少ない結合が意味される。

【0072】

本明細書で使用される、「エピトープ」という用語は、抗原結合性分子(例えば、抗体又は抗体断片)が結合する標的分子(例えば、タンパク質などの抗原)上の部位を指す。エピトープは、標的分子の連続するか又は隣接し非連続な残基(例えば、アミノ酸残基)双方から形成することができる。連続する残基(例えば、アミノ酸残基)から形成されるエピトープは、通常、線状エピトープとも称される。エピトープは、通常、少なくとも5個かつ最大で約12個の残基、多くの場合、6個~10個の残基(例えば、アミノ酸残基)を含む。

10

【0073】

本明細書で使用される、「CDR」という用語は、抗体の超可変領域を指す。「超可変領域」、「HVR」、又は「HV」という用語は、本明細書で使用される場合、配列が超可変でありかつ/又は構造的に規定されたループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は、6つの超可変領域;VHに3つ(H1、H2、H3)、及びVLに3つ(L1、L2、L3)を含む。いくつかの超可変領域の描写が、使用されており、本明細書に包含される。Kabat相補性決定領域は、配列可変性に基づくものであり、最もよく使用される(Kabatらの文献:「免疫学的に意義のあるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版. Public Health Service, アメリカ国立衛生研究所, Bethesda, Md. (1991))。「CDR」という用語の前の「HC」及び「LC」という文字は、それぞれ、重鎖及び軽鎖のCDRを指す。

20

【0074】

本明細書で使用される、「相同性」及び「同一性」という用語は、互換的に使用される。配列間の配列相同性又は同一性の計算は、以下のように行われる。

【0075】

2つのアミノ酸配列又は2つの核酸配列のパーセント(%)同一性を決定するために、該配列は、最適な比較目的のために整列される(例えば、最適な整列のために第1及び第2のアミノ酸又は核酸配列の一方又は双方にギャップを導入することができ、かつ比較目的のために非相同の配列を無視することができる)。好ましい実施態様において、比較目的のために整列される参照配列の長さは、該参照配列の長さうちの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、更により好ましくは少なくとも60%、及び更により好ましくは少なくとも70%、75%、80%、82%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%である。その後、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置のアミノ酸残基又はヌクレオチドが比較される。第1の配列内の位置が、第2の配列内の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドで占有されている場合、該分子は、該位置で同一である(本明細書で使用されるアミノ酸又は核酸の「同一性」は、アミノ酸又は核酸の「相同性」と等価である)。2つの配列間のパーセント同一性は、該2つの配列の最適な整列のために導入される必要があるギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮に入れた、該配列によって共有される同一な位置の数の関数である。

30

40

【0076】

2つの配列間の配列の比較及びパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。好ましい実施態様において、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性が、BLOSUM 62マトリックス又はPAM250マトリックスのいずれかを使用し、かつ16、14、12、10、8、6、又は4のギャップ重み付け(gap weight)及び1、2、3、4、5、又は6の長さ重み付け(length weight)を使用して、GCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>で入手可能)のGAPプログラムに組み込まれている、Needlemanらの文献: (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453のアルゴリズムを使用して決定される。さらに別の好ましい実施態様において、2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性が、NWSgapdna.CMPマトリックスを使用し、かつ40、50、60、70、又は80のギャップ

50

重み付け及び1、2、3、4、5、又は6の長さ重み付けを使用して、GCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>で入手可能)のGAPプログラムを使用して決定される。特に好ましいパラメーターのセット(及び実務家が、どのパラメーターを、分子が、本発明の配列同一性又は相同性制限の範囲内であるのかどうかを決定するのに適用すべきか確信がない場合に使用すべきものは、ギャップペナルティーが12、ギャップ伸長ペナルティーが4、かつフレームシフトギャップペナルティーが5のBLOSUM 62スコアリングマトリックスである。

【0077】

あるいは、2つのアミノ酸又はヌクレオチド配列間のパーセント同一性を、PAM120重み付け残基表(PAM120 weight residue table)、12のギャップ長さペナルティー、及び4のギャップペナルティーを使用して、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれているMeyersらの文献: (1989) CABIOS 4:11-17)のアルゴリズムを使用して決定することができる。

【0078】

本明細書で使用される、「保存的アミノ酸置換」という用語は、アミノ酸残基の類似の側鎖を有するアミノ酸残基での置き換えを指す。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、本技術分野において規定されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、無電荷の極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 γ -分岐側鎖を有するアミノ酸(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)、並びに芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が含まれる。

【0079】

一実施態様において、前記抗体は、ポリクローナル抗体である。一実施態様において、前記抗体は、ヒト化抗体、ヒト抗体、マウス抗体、又はキメラ抗体である。

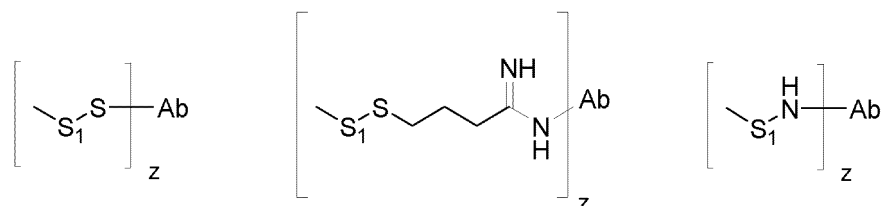
【0080】

一実施態様において、前記その抗原結合性断片は、抗原結合性断片(Fab)又は単鎖可変断片(scFv)である。更なる実施態様において、該断片は、Fab、Fab₂、F(ab)₂、及びscFvからなる群から選択される。X₁が、任意の適当な抗体又は抗原結合性断片付着部位を表すことができること、及び該基の選択が、抗体内の付着点として選択されたアミノ酸残基次第であることが認識されるであろう。

【0081】

一実施態様において、X₁は、-S-又は-N(H)-を表す。本実施態様において、Lは、3つの以下の構造のうちの1つによって式(I)の化合物にコンジュゲートされている:

【化11】



(式中、S₁及びzは、本明細書で定義された通りであり、Abは、反応性のチオール又はリジン基で終端している抗体又はその抗原結合性断片を表す)。このようなチオール又はシステイン基を反応させることは、抗体又はその抗原結合性断片上で利用可能であろうし、又はこれらは、ペプチド鎖に対する部位特異的な修飾によって導入されて、操作されたアミノ酸残基を介する追加のコンジュゲーション点を生み出すであろう(Nat. Biotechnol. 2008、925; Nat. Biotechnol. 2012、184)。あるいは、部位特異的なアミノ酸が、所望の

ペプチド鎖に組み込まれて、部位特異的なコンジュゲーションのためのオルソゴナルな化学反応性を可能にし得る(OPRD (2016)、20、852-866)。オルソゴナルな反応性を有するアミノ酸の例としては、p-アセチルフェニルアラニン(pAcPhe, J. Mol. Biol. 2011, 595)、パラ-アジドメチル-L-フェニルアラニン(pAMF, Bioconjug. Chem 2014, 351)、N6-((2-アジドエトキシ)カルボニル)-L-リジン(Bioconjug. Chem. 2015, 2249)が挙げられる。

【0082】

本発明の抗体又は抗原結合性断片が、がん細胞又は特異的病原体のいずれかである治療標的に結合するように構成されるであろうことが認識されるであろう。

【0083】

一実施態様において、抗体又は抗原結合性断片は、がん細胞に結合するように構成される。更なる実施態様において、抗体又は抗原結合性断片は、腫瘍細胞上のその細胞表面発現が、健常細胞上のその発現とは異なる腫瘍関連抗原に特異的に結合する。

【0084】

好ましい実施態様において、該抗体又は抗原結合性断片は、がん細胞又は病原体上の標的に結合する。好ましい標的としては:EGFR、HER2、HER3、CD22、EpCAM、PSMA、PSCA、FLT-3、CD30、CD20、CD33、CD23、CD2、CD37、CD25、CD73、CD47、LGR-5、CD80、CD86、CD70、CD74、CD40、CD19、CD79b、CA-125、c-met、CXCR4、DR5、PD-1、PD1L、LeY、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MIP-1A、MIP-1B、KIT、TRAIL受容体(R1及びR2)、CXCR4、CEACAM、IGF-1R、炭酸脱水酵素IX、PDGFRα、CD137、CD276、メソテリン、VEGFR、P-カドヘリン、CD56、細菌Psl、細菌リボ多糖、細菌LPSのガラクトサン-IIIエピトープ、細菌PcrV、RSV Fタンパク質が挙げられる。

【0085】

(抗EGFR抗体)

更なる実施態様において、前記抗体又は抗原結合性断片は、上皮増殖因子受容体(EGFR)結合エピトープである。EGFRは、ヒトのがんのいくつかの種類において過剰発現されることがよく知られている。あるがん細胞上の高い発現は、EGFRを新たな療法のための魅力的な標的とする。一実施態様において、このEGFR結合抗体又は抗原結合性断片は:EGFR (ErbB-1)、HER2/c-neu(ErbB-2)、Her 3(ErbB-3)、及びHer 4(ErbB-4)から選択されるEGFRサブファミリーのいずれかに結合するエピトープである。好適なEGFR結合抗体の例としては、セツキシマブ、ニモズマブ、マツズマブ、ザルツムマブ、及びパニツムマブが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【表 1】

配列番号	配列
セツキシマブ重鎖 (配列番号: 1)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSP GKGLEWLGVIWSSGNTDYN
	TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYD YEFAYWGQGLTVTSAA
	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSG
	LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGP
	SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNS
	TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPOVYTLPPSRDEL
	TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
セツキシマブ軽鎖 (配列番号: 2)	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGS PRLLIKYASESISGIPS
	RFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGT KLELKRTVAAPSVFIFPP
	SDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSSTYLSSTLT
	LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

【0086】

更なる実施態様において、前記EGFR抗体は、(a)Liらの文献: (2005) Cancer Cell 7, 301-11;(b) Duboisらの文献: (2008) Anal. Chem. 80, 1737-45;及び(c)www.imgt.orgで利用可能なIMGTデータベース;www.drugbank.ca、又はWO2016/196682に開示されている重鎖及軽鎖配列の双方を含むハイブリッドマウス/ヒトキメラ抗体であるセツキシマブである。

【0087】

さらなる実施態様において、前記セツキシマブ抗体又はその抗原結合性断片は、EGFRを認識し特異的に結合し、かつ配列番号:1及び2に対して少なくとも80%、82%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖及び軽鎖可変ドメインを有する。

【0088】

更なる実施態様において、EGFR結合抗体の断片が、Lの例として選択されてもよい。典型例としては、セツキシマブFab(Li, S.らの文献: (2005) Cancer Cell 7, 301-311);セツキシマブscFv(US7,060,808);パニツムマブFab(Sickmier E. A. らの文献: (2016) PLoS One 11, 9, e0163366);パニツムマブscFv(US6,235,883)、及びD2C7 scFv(US 2013/0022598; Clin Cancer Res 2013, 19(17), 4717-4727)が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 8 9 】

(抗CD20抗体)

更なる実施態様において、前記抗体又は抗原結合性断片は、CD20結合エピトープである。CD20発現細胞(例えば、B細胞)の除去が、白血病及びリンパ腫などの血液がんの治療において治療的利益を有することはよく知られている。好適なCD20結合抗体の例としては、リツキシマブ、オクレリズマブ、オフアツムマブ、及びオビヌツズマブが挙げられるが、これらに限定されない。

【表 2】

リツキシマブ 重鎖 (配列番号: 3)	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPG NGDTSY
	NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGT TVTVS
リツキシマブ 軽鎖 (配列番号: 4)	AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQS
	SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELL G
	GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQY
	NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRD
	ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SR
	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVYIHWFAQKPGSSPKPWYATSNLASGV VR
	FSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP S
	DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS SL
	SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 0 9 0 】

更なる実施態様において、前記CD20抗体は、(a)US5,736,137、(b)Wang, B.らの文献: (2013) Analyst 138, 3058-3065、及び(c)www.imgt.orgで利用可能なIMGTデータベース;www.drugbank.ca.に開示されている重鎖及軽鎖配列の双方を含むハイブリッドマウス/ヒトキメラ抗体であるリツキシマブである。

【 0 0 9 1 】

さらなる実施態様において、リツキシマブ抗体又はその抗原結合性断片は、CD20を認

識し特異的に結合し、配列番号:3及び4に対して少なくとも80%、82%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖及び軽鎖可変ドメインを有する。

【0092】

更なる実施態様において、CD20結合抗体の断片が、Lの例として選択されてもよい。典型例としては、リツキシマブFab(Du, J.らの文献: (2007) J. Biological Chem. 282, 15073-15080)が挙げられるが、これに限定されない。

【0093】

更なる実施態様において、前記CD20抗体又はその断片は、リツキシマブ又はリツキシマブFabから選択される。

【0094】

(病原体特異抗体標的)

代替の実施態様において、前記抗体又は抗原結合性断片は、特異的病原体に結合するように構成される。更なる実施態様において、前記抗体又は抗原結合性断片は、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)及び緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)に結合するように構成される。好適な抗体の例としては、WO2015/196011、WO2012/170807、及びWO2014/074528に報告されているものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0095】

(コンジュゲート)

本明細書において開示される任意の抗体又はその断片を、1つ以上の -Galを有する本明細書に記載される環状スパーサーリンカーにコンジュゲートさせ得る。本発明は、抗体又はその断片の有効性を保持しつつ、リンカー1つあたりコンジュゲーション部位1つあたりの -Galユニットの最適な数を選択することができることに関する。コンジュゲーションの種類は、リンカーの末端の官能性、及び抗体又はその断片の表面反応性又は選択された反応性部位に基づいて、単離された物質の最高の収率及び純度を可能にするよう当業者によって選択され得る。ある実施態様において、コンジュゲーションは、マレイミド部位へのチオール付加によって容易に行われる。あるいは、コンジュゲーションは、アミノ基とNHSエステルなどの活性化エステルとの間のアミド結合形成によって容易に行われ得る。

【0096】

コンジュゲートが、複数のコンジュゲーション反応に繋がるいくつかの反応性部位を含む場合、上述の範囲が、抗体又はその断片1つあたりのリンカー分子の実際の数又は平均の数を指すことがあると理解されるべきである。

【0097】

本明細書で使用される、「LAR」(リンカー:抗体比)という用語は、成功裏に抗体又はその断片にコンジュゲートしたリンカー分子の実際の数又は平均の数を指す。LARは、本明細書で「z」として定義された整数の値と等価である。リンカーローディングを決定するさまざまな方法が、当技術分野において公知である。ある実施態様において、LARは、リンカーの代替ペイロードとしてのMal-vc-PAB-MMAEの反応によって決定され、HICを使用して分析される。

【0098】

(コンジュゲートの性質)

本明細書に記載されるさまざまな実施態様のうちのいずれかにおいて、抗体又はその断片は、抗Galの最適な動員を可能としつつ、その標的に対するその結合有効性を保持することが可能であろう。一実施態様において、セツキシマブは、平均で5個まで、例えば、20個まで、特に、30個までのリンカー分子にコンジュゲートしつつも、EGFRに結合するその能力を保持する。

【0099】

ある実施態様において、本発明のコンジュゲートは、以下の性質:

a)リンカーの抗体又はその断片へのコンジュゲーションが、コンジュゲートしていない対

10

20

30

40

50

応物と比べて、標的への結合有効性を有意に変化させてはならない；

b) -Galを含むリンカーのコンジュゲーションが、オリゴ糖の親水性の性質を原因とする高レベルの凝集を同時に伴うことなく、高レベルのLARを可能にし得る；

c) -Galを含むリンカーの付加が、抗体又はその断片がより安定となることを可能にし得る；

d) 選択されたリンカー及び/又はコンジュゲーション手法に応じた重鎖又は軽鎖コンジュゲーションの優先；

e) 高多重度の -Galユニットを含む1つの選択されたリンカーのコンジュゲーションが、等しいローディングの -Galを使用するいくつかのコンジュゲーション部位と比較して、最適な性質を示し得る；

f) リンカーの抗体又はその断片へのコンジュゲーションが、強化された薬物動態学的プロファイルに繋がり得る

のうちの1つ以上を示し得る。

【0100】

(塩及びそれらの誘導体)

式(I)の化合物及びそれらの亜群への言及はまた、例えば以下で述べられるように、それらのイオン形態、塩、溶媒和物、異性体(幾何異性体及び立体化学異性体(stereochemical isomer)を含む)、互変異性体、N-オキシド、エステル、同位体及び保護された形態も含み；好ましくは、それらの塩又は互変異性体又は異性体又はN-オキシド又は溶媒和物；並び

に、より好ましくは、それらの塩又は互変異性体又はN-オキシド又は溶媒和物、更により好ましくは、それらの塩又は互変異性体又は溶媒和物を含む。以下において、本発明のいずれかの態様において定義されるような、化合物並びにそれらのイオン形態、塩、溶媒和物、異性体(幾何異性体及び立体化学異性体を含む)、互変異性体、N-オキシド、エステル、同位体及び保護された形態(化学プロセス時の中間体化合物は除く)は、「本発明の化合物」と称される。

【0101】

式(I)の化合物は、塩の形態、例えば酸付加塩、又は特定の場合においてカルボン酸塩、スルホン酸塩及びリン酸塩などの有機塩基及び無機塩基の塩で存在することができる。かかる塩は全て、本発明の範囲内であり、且つ式(I)の化合物への言及は、これらの化合物の塩形態を含む。一実施態様において、式(I)の化合物は、リン酸塩として存在する。

【0102】

本発明の塩は、「医薬用塩：特性、選択及び使用(Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use)」、P. Heinrich Stahl(編集者)、Camille G. Wermuth(編集者)、ISBN: 3-90639-026-8、ハードカバー、388頁、2002年8月に記載された方法のような、従来の化学的方法により、塩基部位を含む親化合物から合成することができる。一般に、かかる塩は、これらの化合物の塩基形態の、水もしくは有機溶媒中、又はこれら2種の混合物中での、好適な塩基又は酸との反応により、調製することができ；一般に、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノール、又はアセトニトリルのような非水性媒体が使用される。

【0103】

酸付加塩(単塩又は複塩)は、無機及び有機の双方の様々な酸により、形成されてよい。酸付加塩の例は、酢酸、2,2-ジクロロ酢酸、アジピン酸、アルギン酸、アスコルビン酸(例えばL-アスコルビン酸)、L-アスパラギン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、4-アセトアミド安息香酸、ブタン酸、(+)-カンファー酸、カンファースルホン酸、(+)-(1S)-カンファー-10-スルホン酸、カプリン酸、カプロン酸、カプリル酸、桂皮酸、クエン酸、シクラミン酸、ドデシル硫酸、エタン-1,2-ジスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ギ酸、フマル酸、ガラクトール酸、ゲンチシン酸、グルコヘプトン酸、D-グルコン酸、グルクロン酸(例えばD-グルクロン酸)、グルタミン酸(例えばL-グルタミン酸)、-オキソグルタル酸、グリコール酸、馬尿酸、ハロゲン化水素酸(例えば、臭化水素酸、塩化水素酸、ヨウ化水素酸)、イセチオン酸、乳酸(例えば、(+)-L-乳酸、(±)-DL-乳酸)、

10

20

30

40

50

ラクトビオン酸、マレイン酸、リンゴ酸、(-)-L-リンゴ酸、マロン酸、(±)-DL-マンデル酸、メタンスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ナフタレン-1,5-ジスルホン酸、1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸、ニコチン酸、硝酸、オレイン酸、オロチン酸、シュウ酸、パルミチン酸、パモ酸、リン酸、プロピオン酸、ピルビン酸、L-ピログルタミン酸、サリチル酸、4-アミノ-サリチル酸、セバシン酸、ステアリン酸、コハク酸、硫酸、タンニン酸、(+)-L-酒石酸、チオシアン酸、p-トルエンスルホン酸、ウンデシレン酸、及び吉草酸、並びに、アシル化されたアミノ酸及び陽イオン交換樹脂からなる群から選択される酸により形成された単塩又は複塩を含む。

【0104】

塩の一つの特定の群は、酢酸、塩酸、ヨウ化水素酸、リン酸、硝酸、硫酸、クエン酸、乳酸、コハク酸、マレイン酸、リンゴ酸、イセチオン酸、フマル酸、ベンゼンスルホン酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸(メシラート)、エタンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、吉草酸、酢酸、プロパン酸、ブタン酸、マロン酸、グルクロン酸及びラクトビオン酸から形成された塩からなる。一つ特定の塩は、塩酸塩である。別の特定の塩は、ヘミ硫酸塩としても公知の、硫酸水素塩である。

10

【0105】

塩は、単に例として、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム、テトラアルキルアンモニウムなどを更に含む。

【0106】

式(I)の化合物が、アミン官能基を含む場合、これらは、例えば当業者に周知の方法に従うアルキル化剤との反応により、四級アンモニウム塩を形成することができる。かかる四級アンモニウム化合物は、式(I)の範囲内である。

20

【0107】

本発明の化合物は、それから塩が形成される元の酸のpKaに応じて、単塩又は複塩として存在してよい。

【0108】

本発明の化合物の塩形態は、典型的には、医薬として許容し得る塩であり、且つ医薬として許容し得る塩の例は、Bergeらの文献、1977年、「医薬として許容し得る塩(Pharmaceutically Acceptable Salts)」、J. Pharm. Sci., 第66巻、1-19頁で述べられている。しかしながら、医薬として許容し得ない塩もまた、その後医薬として許容し得る塩へと変換され得る中間体形態として調製され得る。例えば本発明の化合物の精製又は分離において有用であり得る、かかる医薬として許容し得ない塩形態もまた、本発明の一部を形成している。

30

【0109】

有機化学の技術分野の業者は、多くの有機化合物が、それらがその中で反応されるか又はそれらから沈殿もしくは結晶化される溶媒と共に、複合体を形成することができることを理解するであろう。これらの複合体は、「溶媒和物」として公知である。例えば、水との複合体は、「水和物」として公知である。本発明の化合物の医薬として許容し得る溶媒和物は、本発明の範囲内である。

【0110】

アミン官能基を含む式(I)の化合物はまた、N-オキシドも形成することができる。アミン官能基を含む式(I)の化合物への本明細書における言及もまた、N-オキシドを含む。

40

【0111】

化合物が、いくつかのアミン官能基を含む場合、1個又は2個以上の窒素原子は、酸化され、N-オキシドを形成してよい。N-オキシドの特定の例は、第三級アミン又は含窒素ヘテロ環の窒素原子のN-オキシドである。

【0112】

N-オキシドは、過酸化水素又は過酸(例えばペルオキシカルボン酸)のような酸化剤による、対応するアミンの処理により、形成することができ、これは例えば、「マーチの最新有機化学(Advanced Organic Chemistry by Jerry March)」、第4版、Wiley Intersc

50

ienceの第 頁を参照されたい。より特定すると、N-オキシドは、L. W. Deadyの手順(Syn. Comm. 1977, 7, 509-514)により生成することができ、そこではアミン化合物は、m-クロロペルオキシ安息香酸(mCPBA)と、例えばジクロロメタンなどの不活性溶媒中で反応される。

【0113】

最終脱保護段階の前に生成され得る、式(I)の化合物の特定の保護された誘導体は、それ自体は医薬活性を有さないが、特定の場合、経口的又は非経口的に投与され、その後体内で代謝され、薬理的活性がある本発明の化合物を形成することができる。当業者により理解されるであろう。従ってかかる誘導体は、「プロドラッグ」と説明される。本発明の化合物のかかるプロドラッグは全て、本発明の範囲内に含まれる。本発明の化合物に適しているプロドラッグの官能性の例は、Drugs of Today, 第19巻9号、1983年、499 - 538頁、及び「化学のトピックス(Topics in Chemistry)」第31章、306 - 316頁、及びH. Bundgaardの「プロドラッグ設計(Design of Prodrugs)」Elsevier、1985年、第1章において説明されている(そこに記載されている開示は引用により本明細書に組み入れられる)。例えばH. Bundgaardの「プロドラッグ設計」(そこに記載されている開示は引用により本明細書に組み入れられる)により説明されている、当業者により「プロ部位」として知られている特定の部位が、かかる官能基が本発明の化合物内に存在する場合は、好適な官能基上に配置されてよいことが、当業者により更に理解されるであろう。

10

【0114】

それらの多形体も、本発明の化合物及び様々な塩の範囲内に含まれる。

20

【0115】

式(I)の化合物は、数多くの異なる幾何異性体及び互変異性体の形態で存在してよく、且つ式(I)の化合物への言及は、そのような形態の全てを含む。不確かさを避けるために、化合物が、いくつかの幾何異性体又は互変異性体の一つとして存在することができ、且つただ一つが、具体的に説明されるか又は示される場合、それにもかかわらず他のもの全てが、式(I)により包含される。

【0116】

本発明は、全ての医薬として許容し得る同位体標識された本発明の化合物、すなわち、1つ以上の原子が、同じ原子番号を有するが、原子質量もしくは質量数が、自然界で通常認められる原子質量もしくは質量数とは異なる原子により置き換えられている、式(I)の化合物を含む。

30

【0117】

本発明の化合物に含まれるのに適した同位体の例は、水素の同位体、例えば ^2H (D)及び ^3H (T)、炭素の同位体、例えば ^{11}C 、 ^{13}C 及び ^{14}C 、フッ素の同位体、例えば ^{18}F 、窒素の同位体、例えば ^{13}N 及び ^{15}N 、酸素の同位体、例えば ^{15}O 、 ^{17}O 及び ^{18}O などを含む。

【0118】

特定の同位体標識された式(I)の化合物、例えば、放射性同位元素を組み込んでいるものは、薬物及び/又は基質の組織分布試験において有用である。式(I)の化合物はまた、それらが標識された化合物と他の分子、ペプチド、タンパク質、酵素又は受容体との間の複合体の形成を検出又は同定するために使用することができる点で、価値のある診断特性を有することもできる。検出又は同定の方法は、放射性同位体、酵素、蛍光物質、化学発光物質(例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、エクオリン及びルシフェラーゼ)などのような標識物質により標識されている化合物を使用することができる。放射性同位元素トリチウム、すなわち ^3H (T)、及び炭素-14、すなわち ^{14}C は、それらの組み込みの容易さ及び素早い検出手段の観点で、この目的のために特に有用である。

40

【0119】

重水素、すなわち ^2H (D)などの、より重い同位体による置換は、より大きい代謝安定性、例えば増加したインビボ半減期又は減少された必要用量などから生じる、特定の治療的利点をもたらすことがあり、結果的に一部の状況においては好ましいことがある。

【0120】

50

^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 及び ^{13}N などの、陽電子放出同位体による置換は、標的占有率を試験するための、陽電子放出断層撮影(PET)試験において有用である可能性がある。

【0121】

同位体標識された式(I)の化合物は一般に、当業者に公知の従来の技術によるか、又は先に利用された非標識試薬の代わりに、好適に同位体標識された試薬を使用する、付随の実施例及び調製物において説明されるものに類似したプロセスにより、調製されることができる。

【0122】

(式(I)の化合物の調製方法)

この項目において、文脈が別に指摘しない限りは本出願の全ての他の項目におけるように、式(I)への言及はまた、本明細書に定義されたような他の亜群及びそれらの例を全て含む。

【0123】

本明細書に記載された本発明に関連する化合物は、以下の「プロセス及びスキーム」に例示したような、段階的合成シーケンスにおいて調製されてよい。これらの合成は、様々な中心構造の調製を伴い、これらは次にそれにより二つの結合部位を接続するリンカーの分枝及び長さの選択が可能である。式(I)の化合物は、当業者に周知の合成方法に従い、調製されることができる。例えば、当業者は、化学工程及び保護基の選択は、合成がうまくいくように、任意の順番で管理されてよいことを理解するであろう。

【0124】

ある実施態様において、式(A)の化合物は、1つ以上のリンカー成分を含むリンカー(S_B)を含み得る。例示的なリンカー成分としては、6-マレイミドカプロイル(MC)、マレイミドプロパノイル(MP)、バリン-シトルリン(vc)、アラニン-フェニルアラニン(ala-phe)、4-(2-ピリジルチオ)ペンタン酸N-サクシニミジル(SPP)、及び4-(n-マレイミドメチル)シクロヘキサン 1-カルボキシレート(SMCC)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0125】

ある実施態様において、式(A)の化合物は、抗体上の遊離チオールと反応して、共有結合を形成することが可能であるリンカー(S_B)を含み得る。本発明の化合物は、以下のリンカー試薬:BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SI A、SIAB、SMCC、SMPB、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC、sulfo-SMPB、及びSVSBを使用して調製された抗体コンジュゲートを明示的に企図するが、これらに限定されない。抗体上のチオール基と反応性である、ピロリジン-2,5-ジオン(マレイミド)以外の他の官能基としては、ヨードアセトアミド、プロモセトアミド(bromocetamide)、ピニルピリジンジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアネート、イソチオシアネート、活性化エステル、ハロゲン化スルホニル、及び酸塩化物が挙げられる。

【0126】

ある実施態様において、リンカーは、抗体上の求電子性基と反応することが可能である官能基を有する。例示的な求電子性基としては、アルデヒド基、ケトン基、及びカルボニル基が挙げられるが、これらに限定されない。更に、リンカーの反応性の官能基のヘテロ原子は、抗体上の求電子性基と反応し得る。典型例としては、ヒドラジン、オキシム、アミノ、ヒドラジド、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、及びアリアルヒドラジドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0127】

ある実施態様において、式(A)の化合物は、抗体上の遊離アミンと反応して共有結合を形成することが可能であるリンカー(S_B)を含み得る。本発明の化合物は:N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)、2-スクシンイミド-1,1,3,3-テトラ-メチルウロニウムテトラフルオロボラート(TSTU)、及びベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート(PyBOP)などのカルボン酸活性化剤を使用して調整された抗体コンジュゲートを明示的に企図するが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

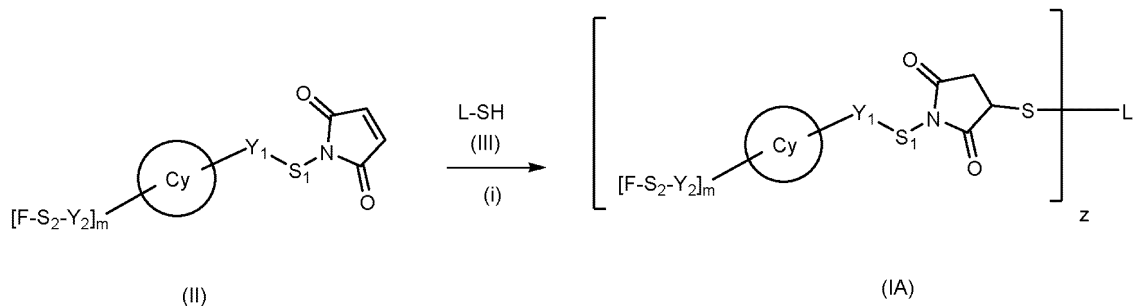
【 0 1 2 8 】

本発明のさらなる態様により、先に定義されたような式(I)の化合物を調製するためのプロセスが提供され、該プロセスは以下を含む:

【 0 1 2 9 】

(a)前記抗体又は抗原結合性断片が、少なくとも1個の反応性チオール基を有する式(III)の化合物を、 S_1 が、マレイミドで終端している式(II)の化合物と反応させることにより、 X_1 が-S-を表す式(IA)の化合物を調製すること:

【 化 1 2 】



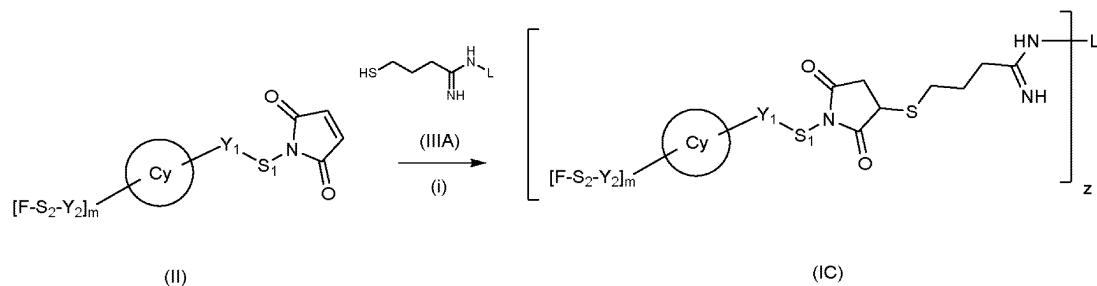
10

(式中、F、 S_2 、 Y_2 、m、z、Cy、 Y_1 、及び S_1 は、先に定義されたようなものである);又は

【 0 1 3 0 】

(b)前記抗体又は抗原結合性断片が、少なくとも1個の反応性チオール基を有する式(IIIA)の化合物を、 S_1 が、マレイミドで終端している式(II)の化合物と反応させることにより、 X_1 が、-NH₂を表し、かつ S_1 が、-S-CH₂-CH₂-CH₂-C(=NH)-を含む式(IC)の化合物を調製すること:

【 化 1 3 】



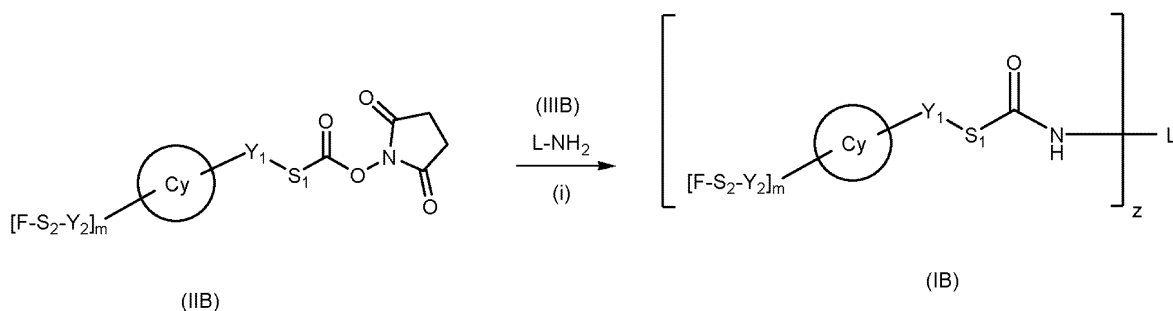
30

(式中、F、 S_2 、 Y_2 、m、z、Cy、 Y_1 、 S_1 、及びLは、先に定義されたようなものである);又は

【 0 1 3 1 】

(c) S_1 が、N-ヒドロキシコハク酸イミド基で終端している式(IIIB)の化合物を、前記抗体又は抗原結合性断片が、少なくとも1個の反応性アミノ基を有する式(IIIB)の化合物と反応させることにより、 X_1 が、-NH₂を表す式(IB)の化合物を調製すること:

【 化 1 4 】



50

(式中、F、S₂、Y₂、m、z、Cy、Y₁、S₁、及びLは、先に定義されたようなものである);
及び/又は

【0132】

(d)式(I)の化合物又はその保護された誘導体の、さらなる式(I)の化合物又はその保護された誘導体への相互変換。

【0133】

プロセス(a)及び(b)は、通常、チオール-マレイミド反応;マレイミドなどの、-不飽和ケトンとの反応性チオール基のマイケル付加反応を含む。

【0134】

好ましい条件としては、室温で本明細書に記載されるような適当なバッファー中での反応性チオールを有する抗体又はその断片とのリンカー-マレイミド中間体のインキュベーションが含まれる。典型的なリンカー:抗体比(LAR)は、抗体又はその断片上に存在する遊離チオール基の数に依存するが、典型的には、2~8の範囲である。

10

【0135】

プロセス(c)は、通常、活性化エステルの存在下でのアミド結合形成反応を含む。典型的な条件は、室温で適当なバッファー中での反応性アミノを有する抗体又はその断片とのリンカー-NHSエステルのインキュベーションを含む。典型的なリンカー:抗体比(LAR)は、該抗体又はその断片上に存在する遊離アミノ基の数に依存するが、典型的には2~20の範囲である。

【0136】

20

プロセス(d)は典型的には、当業者に公知の相互変換手順を含む。例えば、式(I)の化合物において、第一の置換基は、当業者に公知の方法により、第二の代わりの置換基へ変換されてよい。広範な周知の官能基相互変換が、前駆体化合物の式(I)の化合物への変換に関して、当業者に公知であり、且つ「マーチの最新有機化学」、第4版、John Wiley & Sons、1992年に記載されている。例えば、有機スズ試薬(Stille反応)、グリニャール試薬を使用するような、可能性のある金属を触媒とする官能基化、及び窒素求核試薬との反応は、「パラジウム試薬及び触媒(Palladium Reagents and Catalysts)」[Jiro Tsuji、Wiley、ISBN 0-470-85032-9]、及び「有機合成に関する有機パラジウム化学の手引き(Handbook of Organo Palladium Chemistry for Organic Synthesis)」[第1巻、Ei-ichi Negishi編集、Wiley、ISBN 0-471-31506-0]に記載されている。

30

【0137】

好適であれば、プロセス(a)、(b)、及び(c)において先に説明された反応は、当業者に公知の1つ以上の反応により後続されるか又は先行され、且つ他の式(I)の化合物を提供するために先に定義された必要な置換を達成するために、適した順番で実行される。その条件を文献に認めることができるようなかかる反応の非限定的例は、以下を含む：

反応性官能基の保護、

反応性官能基の脱保護、

ハロゲン化、

脱ハロゲン化、

脱アルキル化、

40

アミン、アニリン、アルコール、及びフェノールのアルキル化及びアリール化、

ヒドロキシル基の光延反応、

好適な基の環化付加反応、

ニトロ、エステル、シアノ、アルデヒドの還元、

遷移金属を触媒とするカップリング反応、

アシル化、

スルホニル化/スルホニル基の導入、

エステル基のケン化/加水分解、

エステル基のアミド化又はエステル交換、

カルボキシル基のエステル化又はアミド化、

50

ハロゲン交換、
アミン、チオール又はアルコールによる求核置換、
還元的アミノ化、
カルボニル基及びヒドロキシルアミン基のオキシム形成、
S-酸化、
N-酸化、
塩化。

【0138】

式(III)の化合物は、反応に利用可能な少なくとも1個の反応性チオール基を有しているもよい。反応性チオール基の生成は、TCEPを使用する抗体又は抗原結合性断片の還元によって達成されてもよい。

10

【0139】

好ましい条件は、1.1eqのTCEP:Ab、4.2eqのTCEP:Ab、又は8eqのTCEP:Abのいずれかを含む。

【0140】

あるいは、反応性チオール基の生成は、抗体又は抗原結合性断片上の少なくとも1個のリジン残基の、トラウト(Traut)試薬(2-イミノチオラン)などのチオール化剤との反応によって達成されてもよい。

【0141】

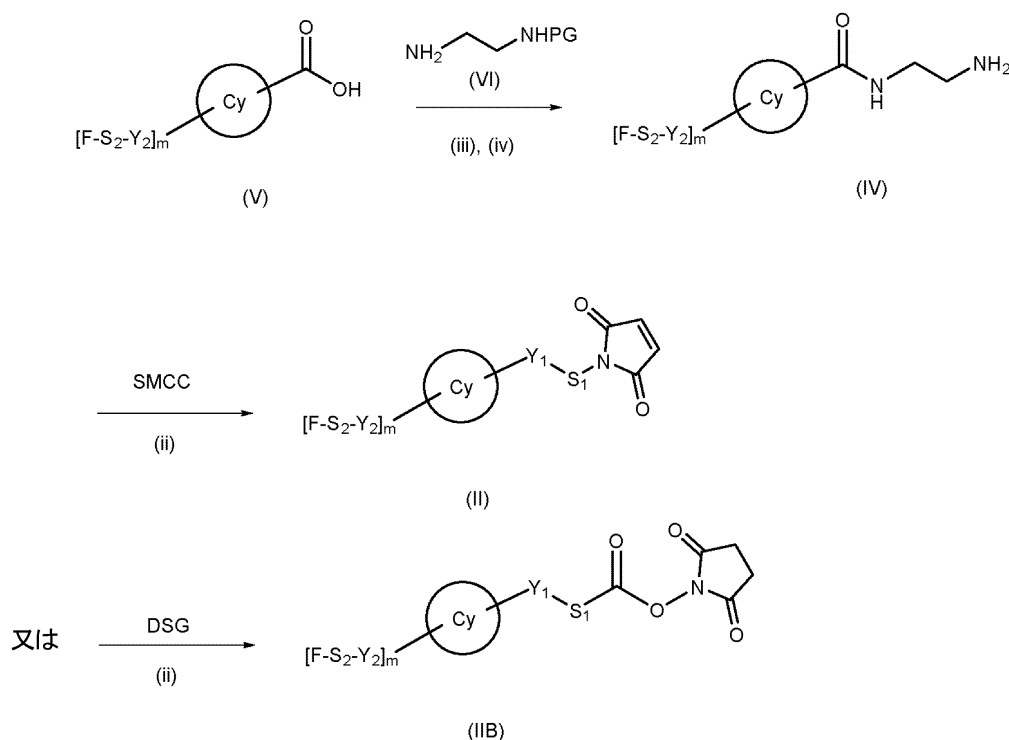
好ましい条件は、低LARに対しての12.2eqの2-イミノチオラン:Ab、及び高LARに対しての30.5eqの2-イミノチオラン:Abを含む。

20

【0142】

式(II)及び(IIb)の化合物は、式(V)及び(VI)の化合物から、サクシニミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)又はジ(N-スクシンイミジル)グルタレート(DSG)との反応を続けて、スキーム1に記載した方法により調製されてもよい:

【化15】



30

40

スキーム 1

(式中、PGは、モノメトキシトリチルなどの保護基であり;S₁は、マレイミド又はNHSで終端しており、Y₁は、CONHであり、かつS₂、Y₂、m、Cy、及びFは、先に定義されたよう

50

なものである)。

【0143】

式(II)の化合物は、式(IV)の化合物から調製されてよく、末端アミノ基の反応性マレイミド基への相互変換である。好ましい条件は、室温で、DMSO中での末端アミノ基のサクシニミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)との反応を含む。あるいは、式(IIB)の化合物は、末端アミノ基の反応性NHS基への相互変換によって、式(IV)の化合物から調製されてよい。好ましい条件は、DMF及びDMSO又はそれらの組み合わせなどの適当な無水の有機溶媒中での架橋剤ジ-(N-サクシニミジル)グルタレートとの反応を含む。

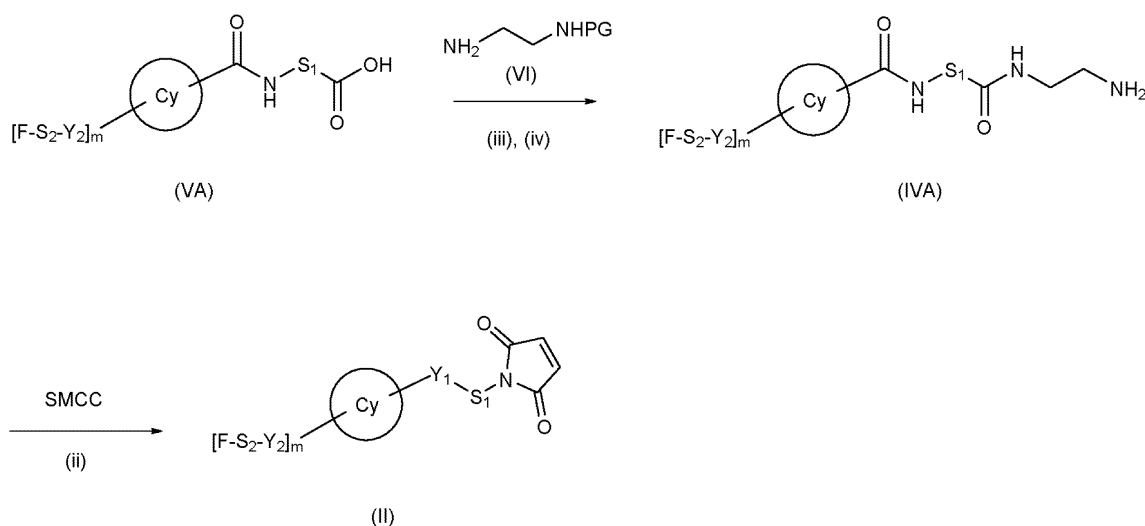
【0144】

式(IV)の化合物は、プロセス工程(iii)及び(iv)、並びにアミド結合形成工程とそれに続く適当な脱保護工程により、式(V)及び(VI)の化合物から調製されてよい。典型的なアミド結合形成工程は、有機塩基の存在下、有機溶媒中でホスフェートを含む試薬、トリアジンベースの試薬、又はカルボジイミドを含む試薬のいずれかを使用するカルボン酸の活性化を含む。好ましい条件は、DMF又はDMFとDMSOとの混合物中、トリエチルアミン又はジイソプロピルエチルアミンのいずれかを伴うHATU((1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジンイウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート)を含む。PGが、モノメトキシトリチルを含む場合、脱保護反応は、酸で媒介される。好ましい条件は、室温で0.2M HCl水を含む。

【0145】

あるいは、式(II)の化合物は、式(VA)の化合物から、サクシニミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)との反応を続けるスキーム1Aに記載した方法により調製されてもよい:

【化16】



スキーム1A

(式中、PGは、モノメトキシトリチルなどの保護基であり;S₁は、マレイミドで終端しており、Y₁は、CONHであり、かつS₂、Y₂、m、Cy、及びFは、先に定義されたようなものである)。

【0146】

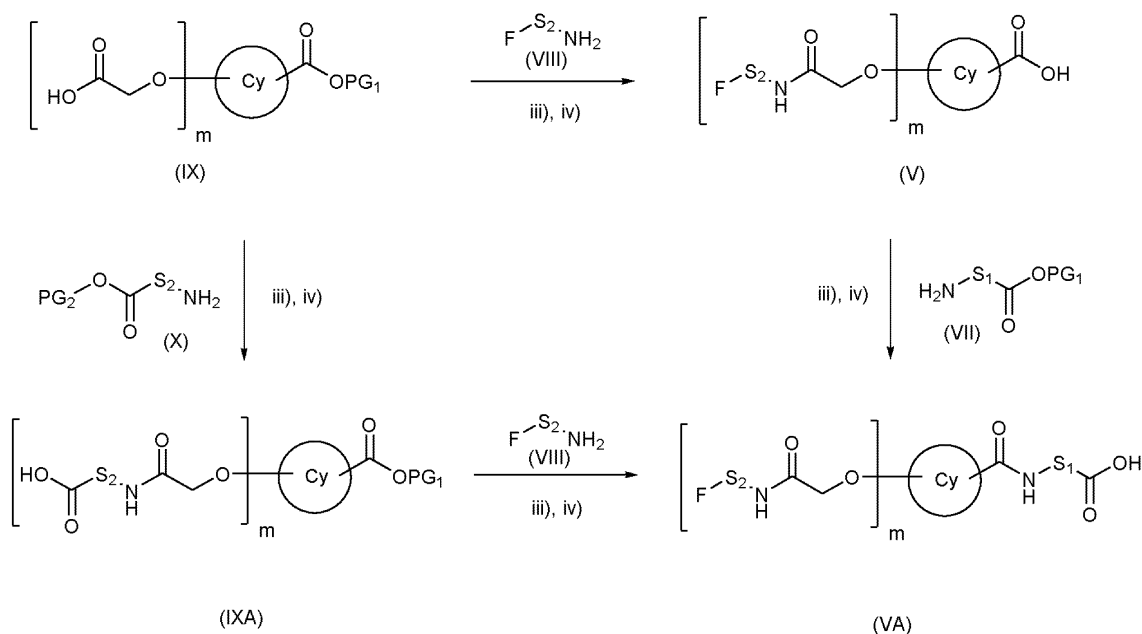
式(II)の化合物は、スキーム1に既に記載したように、プロセス工程(iii)及び(iv)により、式(VA)及び(VI)の化合物から調製されてよい。末端アミノ基の反応性マレイミド基への相互変換は、SMCCを使用してスキーム1においてプロセス工程(ii)について記載したように達成し得る。

【0147】

式(V)及び(VA)(式中、S₂は、-NHCO-CH₂-で終端している)の化合物は、式(VIII)、(IX

)、及び(IXA)の化合物から、スキーム2に記載した方法により調製されてもよい:

【化17】



10

スキーム 2

20

(式中、m、Cy、 S_1 、 S_2 、及びFは、先に定義されたようなものであり、 PG_1 は、tert-ブチル、メチル、エチル、又はベンジルのいずれかを含む保護基であり、かつ PG_2 は、メチル、エチル、又はtert-ブチルのいずれかを含むオルソゴナル保護基である)。

【0148】

式(V)、(IXA)、及び(VA)の化合物は、プロセス工程(iii)及び(iv)、アミド結合形成工程とそれに続く適当な脱保護反応により、式(IX)の化合物から調製されてよい。 PG が、ベンジルを含む場合、脱保護反応は、接触水素化によって媒介される。好ましい条件は、水素雰囲気(15~70psi(103~483kPa))下で、MeOH/EtOH又は水又はそれらの任意の組合せ中の10%Pd/Cを含む。あるいは、脱保護は、相間移動反応により媒介されてよい。好ましい条件は、TEA及び水の、室温で16時間を含む。

30

【0149】

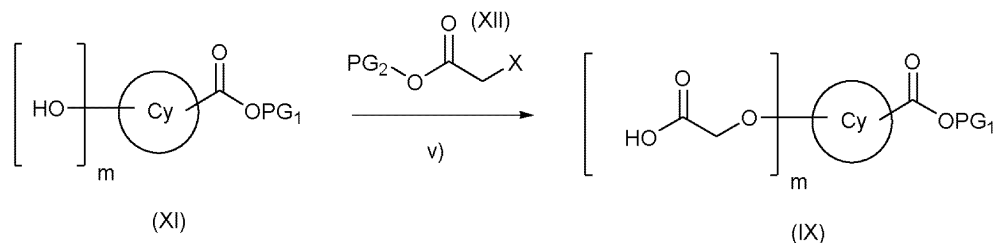
PG が、メチル、エチル、又はtert-ブチルを含む場合、該保護基により必要とされる酸又は塩基に媒介される脱保護反応が、採用される。酸で媒介される脱保護条件が必要とされる場合、好ましい条件は、必要に応じDCM又は水の共溶媒を伴う、TFA、ジオキサン中の4M HCl、又は水中37% HClを含む。塩基により介される条件が必要とされる場合、好ましい条件は、水を含むメタノール又はTHFのような水性媒体中の水酸化ナトリウム又は水酸化リチウムのいずれかを含む。

【0150】

式(IX)の化合物は、スキーム3に記載した方法により、式(XI)及び式(XII)の化合物から調製されてよい。

40

【化18】



スキーム 3

50

(式中、m及びCyは、先に定義されたようなものであり、PG₁は、tert-ブチル、メチル、エチル、又はベンジルのいずれかを含む保護基であり、PG₂は、メチル、エチル、又はtert-ブチルのいずれかを含むオルソゴナル保護基であり、かつXは、Cl、Br、又はIである)。

【0151】

式(IX)の化合物は、プロセス工程(v)のアルキル化反応により、式(XI)及び式(XII)の化合物から調製されてよい。典型的な条件は、室温で、極性有機溶媒中の無機塩基を含む。好ましい条件は、DMF中の炭酸カリウムを含む。

【0152】

Cyがビフェニル又はトリフェニルである場合、式(XI)の化合物は、ビノトリ-フェニル単位を構築するための、鈴木反応の利用により調製されてよい。好ましい条件は、100 ~ 110 °Cでの、ジオキサン及び水中の炭酸ナトリウム、酢酸カリウム、又は炭酸水素ナトリウムとの、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)又は[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]ジクロロパラジウム(II)ジクロロメタン錯体を含む。TBSのような、好適な必要とされる保護基が利用される場合、そのような保護基は、フッ化物が媒介する脱保護を使用し、脱保護されてよい。好ましい条件は、室温でTHF中のTBAFを含む。

【0153】

あるいは、Cyがビノトリ-フェニルである場合、式(XI)の化合物は、上記及び本明細書に説明されたような条件を使用し、ビノトリ-フェニル単位を構築するための、鈴木反応の利用により直接調製されてよい。

【0154】

式(III)、(IIIA)、(IIIB)、(VI)、(VIII)、(XII)、(VII)、及び(X)の化合物は、市販のものか又は本明細書記載の方法に従い調製されるかのいずれかである。

【0155】

本明細書記載の特定の間体は、当該技術分野においてこれまで公知ではない新規化合物を表していることは理解されるであろう。従って、本発明の更なる態様に従い、先に定義されたような式(II)、(IIB)、(V)、(VA)、(IX)、又は(XI)の化合物から選択された中間体化合物が提供される。

【0156】

当業者は、本明細書記載の「実施例及び調製物」に関して最高の収量を生じさせるために、上述の工程の好適な組合せを選択することができることを理解するであろう。

【0157】

(医薬組成物)

式(I)の化合物は単独で投与されることが可能であるが、他方でこれは医薬組成物(例えば製剤)として存在することが好ましい。

【0158】

従って更なる態様により、本発明は、医薬組成物、並びに本明細書記載のように、本発明の化合物の少なくとも1種を、1種以上の医薬として許容し得る賦形剤及び任意に他の治療薬又は予防薬と一緒に、含有している(例えば混合している)医薬組成物の製造方法を提供する。該医薬組成物が、1種以上のさらなる治療薬剤を含む場合、該薬剤が、さらなる別の式(I)の化合物を含み得ることが認識されるであろう。

【0159】

この医薬として許容し得る賦形剤(複数可)は、例えば、担体(例えば、固形、液体又は半固形の担体)、アジュバント、希釈剤、充填剤又は増量剤、造粒剤、コーティング剤、放出制御剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、防腐剤、抗酸化剤、緩衝剤、懸濁化剤、増粘剤、矯味矯臭剤、甘味料、味覚遮蔽剤、安定化剤、又は医薬組成物において常用される任意の他の賦形剤から選択することができる。様々な型の医薬組成物のための賦形剤の例は、以下に、より詳細に示される。

【0160】

本明細書において使用される用語「医薬として許容し得る」は、正当な医学的判断の範囲内で、妥当なベネフィット/リスク比に釣り合って、過度の毒性を伴わず(すなわち、一

10

20

30

40

50

般に安全と認められる(GRAS))、また刺激、アレルギー反応、又は他の問題点もしくは合併症を伴わずに、対象(例えばヒト)の組織と接触して使用するのに適している、化合物、物質、組成物、及び/又は剤形に関連している。各担体、賦形剤などはまた、製剤の他の構成成分と適合性があるという意味で「許容され得」なければならない。

【0161】

本発明の化合物を含有する医薬組成物は、公知の技術に従い製剤化することができ、例えば、「レミントン薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」、Mack Publishing Company、イーストン、PA、USAを参照されたい。

【0162】

本医薬組成物は、非経口、鼻腔内、気管支内、舌下、眼内、耳内、経直腸、腔内、又は経真皮投与に適した任意の形状であることができる。本組成物が非経口的投与のために意図される場合、これらは、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下投与のため、又は注射、点滴もしくは他の送達手段による標的臓器もしくは組織への直接送達のために、製剤化されることができる。この送達は、ポラス注射、短期間の点滴、もしくは長期間の点滴によることができ、かつ受動送達を介してか又は好適な輸液ポンプもしくは注射器ドライバの利用を通じてであることができる。

【0163】

非経口的投与に適応された医薬製剤は、とりわけ、溶解した形態の活性成分を安定化し且つこの製剤を意図されたレシピエントの血液と等張とするために、抗酸化物質、緩衝液、静菌剤、共溶媒、界面活性剤、有機溶媒混合物、シクロデキストリン錯体形成剤、乳化剤(乳剤製剤の形成及び安定化のために)、リポソームの形成のためのリポソーム成分、高分子ゲル形成のためのゲル化ポリマー、凍結乾燥保護剤、及びそれらの薬剤の組合せを含んでよい、水性及び非水性の滅菌注射溶液を含む。非経口的投与のための医薬製剤はまた、懸濁化剤及び増粘剤を含んでよい、水性及び非水性の滅菌懸濁液の形状をとることができる(R. G. Stricklyの文献、「経口及び注射用製剤を安定化する賦形剤(Solubilizing Excipients in oral and injectable formulations)」、Pharmaceutical Research, Vol 21(2) 2004, p 201-230)。

【0164】

本製剤は、例えば、密封したアンプル、バイアル及び予め充填された注射器などの、単位-投与量又は反復-投与量の容器内で提示されてよく、且つ使用直前に滅菌液体担体、例えば注射用水の添加のみを必要とする、フリーズドライされた(凍結乾燥された)状態で保管されてよい。

【0165】

本医薬製剤は、本発明の化合物を凍結乾燥することにより調製することができる。凍結乾燥は、組成物をフリーズドライする手順をいう。従ってフリーズドライ及び凍結乾燥は、本明細書において同義的に使用される。

【0166】

要時調製注射溶液及び懸濁液は、滅菌した散剤、顆粒剤及び錠剤から調製されてよい。

【0167】

非経口注射用の本発明の医薬組成物はまた、医薬として許容し得る滅菌した水性又は非水性の溶液、分散液、懸濁液又は乳液、並びに使用直前に滅菌注射用溶液もしくは分散液へ再構成するための滅菌散剤を含むことができる。

【0168】

好適な水性及び非水性の担体、希釈剤、溶媒又はビヒクルの例は、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、カルボキシメチルセルロース及びそれらの好適な混合物、植物油(例えば、ヒマワリ油、ベニバナ油、トウモロコシ油、又はオリーブ油)、並びにオレイン酸エチルのような注射用有機エステルを含む。例えば、レシチンのような増粘剤又はコーティング物質の使用により、分散剤の場合必要とされる粒子サイズを維持することにより、及び界面活性剤の使用により、適切な流動性が維持されることができる。

【 0 1 6 9 】

本発明の組成物はまた、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤のようなアジュバントを含んでもよい。微生物の作用の防止は、様々な抗菌薬及び抗真菌薬、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などの含有により確実にすることができる。糖類、塩化ナトリウムなどの、張度を調節するため薬剤を含有することをもまた、望ましい。注射用医薬剤形の延長された吸収は、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンのような吸収を遅延する薬剤を含有することによりもたらされ得る。

【 0 1 7 0 】

本発明のひとつの好ましい実施態様において、本医薬組成物は、例えば注射又は点滴による、静脈内投与に適した形状である。静脈内又は皮下投与のために、溶液は、そのまま

10

【 0 1 7 1 】

別の好ましい実施態様において、本医薬組成物は、皮下(s.c.)投与に適した形態である。

【 0 1 7 2 】

本発明の化合物は、担体と共に製剤化され、且つナノ粒子の形状で投与されてよく、ナノ粒子の増大した表面積はそれらの吸収を補助する。加えて、ナノ粒子は、細胞へ直接浸透する可能性をもたらす。ナノ粒子薬物送達システムは、「薬物送達のためのナノ粒子技術(Nanoparticle Technology for Drug Delivery)」、Ram B Gupta及びUday B. Kompella編集、Informa Healthcare, ISBN 9781574448573、第13版、2006年3月刊

20

【 0 1 7 3 】

本医薬組成物は典型的には、およそ1%(w/w)～およそ95%(w/w)の活性成分及び99%(w/w)～5%(w/w)の医薬として許容し得る賦形剤又は賦形剤の組合せを含有している。好ましくは、本組成物は、およそ20%(w/w)～およそ90%(w/w)の活性成分及び80%(w/w)～10%の医薬として許容し得る賦形剤又は賦形剤の組合せを含有する。本医薬組成物は、およそ1%～およそ95%、好ましくはおよそ20%～およそ90%の活性成分を含有する。本発明による医薬組成物は、例えば、アンプル、バイアル、坐薬、予め充填した注射器、ドラギー、錠剤又はカプセル剤の形態のような、単位剤形であってよい。

30

【 0 1 7 4 】

この医薬として許容し得る賦形剤(複数可)は、この製剤の望ましい物理的形状に従い選択することができ、且つ例えば、希釈剤(例えば、充填剤又は増量剤のような固形希釈剤；並びに、溶媒及び共溶媒のような液体希釈剤)、崩壊剤、緩衝剤、滑沢剤、流動助剤、放出制御剤(例えば、放出を抑制又は遅延するポリマー又はワックス)、結合剤、造粒剤、色素、可塑剤、抗酸化剤、防腐剤、矯味矯臭剤、味覚遮蔽剤、張度調節剤、及びコーティング剤から選択することができる。

【 0 1 7 5 】

当業者は、製剤において使用するための構成成分の好適な量を選択する専門知識を有するであろう。例えば、錠剤及びカプセル剤は典型的には、(薬物投与量に応じて)0～20%の崩壊剤、0～5%の滑沢剤、0～5%の流動助剤、及び/又は0～99%(w/w)の充填剤/もしくは増量剤を含む。これらはまた、0～10%(w/w)のポリマー結合剤、0～5%(w/w)の抗酸化剤、0～5%(w/w)の色素も含む。徐放錠剤は、加えて、0～99%(w/w)の放出制御(例えば遅延)ポリマー(投与量に応じて)を含むであろう。錠剤又はカプセル剤のフィルムコートは、典型的には、0～10%(w/w)のポリマー、0～3%(w/w)の色素、及び/又は0～2%(w/w)の可塑剤を含む。

40

【 0 1 7 6 】

非経口又は皮下製剤は典型的には、0～20%(w/w)の緩衝液、0～50%(w/w)の共溶媒、及び/又は0～99%(w/w)の注射用水(WFI)(投与量に応じ及びフリーズドライされる場

50

合)を含む。筋肉内デポ剤のための製剤はまた、0～99%(w/w)の油分も含む。

【0177】

本発明の化合物はまた、固形分散剤として製剤化され得る。固形分散剤は、2種以上の固形物の均質な極めて細かい分散相である。固形分散剤の一つの型である、固溶体(分子の分散系)は、医薬技術における使用に関して周知であり((Chiou及びRiegelmanの文献、J. Pharm. Sci., 60, 1281-1300 (1971)を参照されたい)、且つ水に溶けにくい薬物の溶解速度の増加及び生物学的利用能の増加に有用である。

【0178】

本医薬製剤は、通常プリスターパックである、単独の包装内に治療過程全てを含む「患者用パック」において、患者へ提供されてよい。患者用パックは、従来の処方に勝る利点を有し、ここでは薬剤師は、バルク供給品から医薬品の患者用の供給を分割し、その場合患者は、通常患者の処方箋には記載されない、患者用パックに含まれた添付文書に常にアクセスできる。添付文書の封入は、医師の指示を患者が順守することを改善することが示されている。患者用パックの一例は、予め充填された注射器を含む。かかる予め充填された注射器は、既に薬物物質を含む。針が装着されている予め充填された注射器の先端部分は、ノズルキャップにより封止されている。注射前に、ノズルキャップを、先端部分から取り外し、針がそこに装着される。次にプランジャーロッドを、先端部分へと押し込むことにより、ガasketをスライドさせ、その結果薬物が放出される。

10

【0179】

鼻腔送達のための組成物は、軟膏、クリーム、スプレー、貼付剤、ゲル剤、液滴、及び挿入物(例えば、眼内挿入物)を含む。かかる組成物は、公知の方法に従い製剤化されることができる。

20

【0180】

経直腸又は腔内投与のための製剤の例は、ペッサリー及び坐薬を含み、これらは例えば、活性化化合物を含有する、造形された成形可能な物質又はワックス状物質から形成されてよい。活性化化合物の溶液を、経直腸投与のために使用してもよい。

【0181】

吸入による投与のための組成物は、吸入可能な粉末組成物又は液体もしくは粉末スプレーの形状をとることができ、且つ粉末吸入装置又はエアロゾル計量分配装置を使用し、標準的な形態で投与されることができる。かかる装置は、周知である。吸入による投与のために、粉末化された製剤は典型的には、活性化化合物を、乳糖のような不活性の固形の粉末化された希釈剤と一緒に含有する。

30

【0182】

本発明の化合物は、一般に単位剤形で提示され、従って典型的には、所望のレベルの生物活性を提供するのに十分な化合物を含む。例えば、製剤は、1ng～2gの活性成分を、例えば1ng～2mgの活性成分を含んでよい。これらの範囲内で、化合物の特定の部分範囲は、0.1mg～2gの活性成分(より一般には、10mg～1g、例えば50mg～500mg)、又は1μg～20mg(例えば、1μg～10mg、例えば0.1mg～2mgの活性成分)である。

【0183】

この活性化化合物は、所望の治療効果を達成するのに十分な量で、それらを必要とする患者(例えば、ヒト又は動物患者)へ、投与されるであろう。

40

【0184】

(治療上の使用)

本発明のさらなる態様により、療法における使用のための、本明細書に定義される式(I)の化合物が提供される。

【0185】

本発明の化合物の治療上の使用が、抗体又はその抗原結合性断片の選択によって決定されることが認識されるであろう。

【0186】

例えば、抗体又はその抗原結合性断片が、EGFR抗体(例えば、セツキシマブもしくは二

50

モツズマブ)又はその断片である場合の実施態様において、式(I)の化合物は、がんの治療における使用のためのものである。

【0187】

したがって、本発明のさらなる態様により、前記抗体又はその抗原結合性断片が、がんの治療における使用のためのEGFR抗体(例えば、セツキシマブもしくはニモツズマブ)又はその断片である、本明細書に定義されたような式(I)の化合物が提供される。

【0188】

本発明のさらなる態様により、それを必要としている個体に、前記抗体又はその抗原結合性断片が、EGFR抗体(例えば、セツキシマブもしくはニモツズマブ)又はその断片である、本明細書に定義されたような式(I)の化合物を投与することを含むがんを治療する方法が提供される。

10

【0189】

更に、前記抗体又はその抗原結合性断片が、病原体特異抗体又はその断片である場合の実施態様において、式(I)の化合物は、細菌感染症の治療における使用のためのものである。

【0190】

したがって、本発明のさらなる態様により、前記抗体又はその抗原結合性断片が、細菌感染症の治療における使用のための病原体特異抗体又はその断片である、本明細書に定義されたような式(I)の化合物が提供される。

【0191】

本発明のさらなる態様により、それを必要としている個体に、前記抗体又はその抗原結合性断片が、病原体特異抗体又はその断片である、本明細書に定義されたような式(I)の化合物を投与することを含む、細菌感染症を治療する方法が提供される。

20

【0192】

本発明の化合物は一般に、例えばヒト又は動物患者、好ましくはヒトである、そのような投与を必要とする対象へ、投与される。

【0193】

本発明の化合物は典型的には、治療的又は予防的に有用であり、且つ一般に無毒である量で投与されるであろう。しかしながら、特定の状況において(例えば生命を脅かす疾患の症例において)、本発明の化合物を投与する恩恵は、あらゆる毒性作用又は副作用の欠点を上回り、そのような症例において、ある程度の毒性を伴う量で、本発明の化合物を投与することは望ましいと考えられる。

30

【0194】

本発明の化合物は、有益な治療効果を維持するために、長期間にわたり投与されてよい(すなわち、慢性投与)、又は短期間のみ投与されてよい(すなわち、急性投与)。あるいは、これらは、連続様式で又は間欠的投薬を提供する様式(例えば、パルス様式)で、投与されてよい。

【0195】

本発明の化合物の典型的一日量は、100pg~100mg/kg体重の範囲、より典型的には5ng~25mg/kg体重、及びより一般には体重1kgにつき10ng~15mg(例えば、10ng~10mg、及びより典型的には1µg/kg~20mg/kg、例えば1µg~10mg/kg)であることができるが、必要ならば、より高い又はより低い投与量を投与してよい。本発明の化合物は、毎日ペースで、或いは例えば2日毎、又は3日毎、又は4日毎、又は5日毎、又は6日毎、又は7日毎、又は10日毎、又は14日毎、又は21日毎、又は28日毎の反復ペースのいずれかで投与することができる。あるいは、本発明の化合物は、点滴により、1日に複数回投与することができる。

40

【0196】

本発明の化合物は、例えば、1~1500mg、2~800mg、又は5~500mg、例えば2~200mg又は10~1000mgの投与量の範囲で、投与されてよく、投与量の特定の例は、10、20、50及び80mgを含む。本発明の化合物は、各日1回又は2回以上投与してよい。本

50

発明の化合物は、連続して投与することができる(すなわち、治療レジメンの期間にわたり休みなく毎日服用)。あるいは、本発明の化合物は、間欠的に投与することができる(すなわち、1週間のようによ所定の期間連続して服用し、その後1週間のようによ期間中断し、その後1週間のようによ別の期間連続して服用し、且つ治療レジメンの期間を通じてそのようにする)。間欠投与に関する治療レジメンの例は、投与が、1以上のサイクルについて、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9又は10又はそれよりも多いサイクルについて、1週間オン、1週間オフ；又は、2週間オン、1週間オフ；又は、3週間オン、1週間オフ；又は、2週間オン、2週間オフ；又は、4週間オン、2週間オフ；又は、1週間オン、3週間オフのサイクルであるレジメンを含む。

【0197】

ひとつの特定の投薬スケジュールにおいて、患者には、最長10日間、特に1週間に最大5日間の期間について毎日1時間の、本発明の化合物の点滴が与えられ、かつこの治療は、2～4週間のようによ望ましい間隔で、特に3週間毎で、繰り返されるであろう。

【0198】

より特定すると、患者は、5日間にわたり毎日1時間の期間、本発明の化合物を、点滴で与えられ、かつこの治療は、3週間毎に繰り返されてよい。

【0199】

別の特定の投薬スケジュールにおいて、患者には、30分～1時間に及ぶ点滴、それに続けて、例として1～5時間の可変期間の、例えば3時間の、維持点滴が与えられる。

【0200】

更なる特定の投薬スケジュールにおいて、患者には、12時間～5日間の期間の持続点滴が、特に24時間～72時間の持続点滴が与えられる。

【0201】

しかしながら、最終的には、投与される本発明の化合物の量、及び使用される組成物の型は、治療される疾患の性質又は生理的状态に対応するものであろうし、かつ医師の裁量によるであろう。

【0202】

本発明の化合物は、単剤として又は他の治療薬との併用で使用可能であることが認識されるであろう。併用実験は、例えば、Chou TC, Talalay P.の文献、「投与量-効果関係の定量分析：多剤又は酵素阻害剤の併用効果(Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors)」、Adv Enzyme Regulat, 1984;22: 27-55に説明されたように、実行することができる。

【0203】

本発明の化合物が、1、2、3、4種又はそれよりも多い治療薬(好ましくは1又は2種、より好ましくは1種)との併用療法において投与される場合、これらの薬剤は、同時に又は連続して投与され得る。後者の場合、2種以上の薬剤は、ある期間内に、有利な又は相乗効果が達成されることを確実にするのに十分である量及び様式で、投与されるであろう。連続投与される場合、これらは、密に間をあけた間隔で(例えば、5～10分の期間にわたり)又はより長い間隔で(例えば、1、2、3、4時間もしくはそれ以上間をあけて、又は必要ならば更により長い期間間をあけて)投与されることができ、その正確な投薬レジメンは、治療薬(複数可)の特性に見合ったものである。これらの用量は、例えば7、14、21又は28日毎に繰り返され得る、治療の1コースにつき、例えば、1回、2回又はそれ以上投与されてよい。

【0204】

併用の各成分の投与の好ましい方法及び順番並びに各投薬量及びレジメンが、投与される特定の他の医学的薬剤及び本発明の化合物、それらの投与経路、治療される特定の腫瘍、及び治療される特定の宿主によって左右されることが認識されるであろう。投与の最適な方法及び順番並びに投薬量及びレジメンは、慣習的方法を使用し、本明細書に記載した情報を考慮し、当業者により容易に決定され得る。

【0205】

10

20

30

40

50

併用として与えられる場合の本発明の化合物と1種以上の他の治療薬(複数可)の重量比は、当業者により決定されてよい。該比及び正確な用量及び投与頻度は、当業者に周知であるように、特定の本発明の化合物及び使用される他の治療薬(複数可)、治療される特定の状態、治療される状態の重症度、特定の患者の年齢、体重、性別、食事、投与時間、及び全身の生理的状态、投与の様式、並びに個体が服用する他の薬物によって決まる。更に、有効一日量を、治療される対象の反応に応じて、かつ/又は本発明の化合物を処方する医師の評価に応じて、減少又は増加させてよいことは、明白である。本発明の化合物と別の治療薬の特定の重量比は、1/10~10/1、より特定すると1/5~5/1、更により特定すると1/3~3/1の範囲であってよい。

【0206】

(抗がん治療)

治療(又は阻害)され得るがん(及びそれらの良性の対応物)の例は、例えば、膀胱及び尿路、乳房、消化管(食道、胃(胃の)、小腸、結腸、直腸、及び肛門)、肝臓(肝細胞癌)、胆嚢及び胆管系、膵臓外分泌腺、腎臓、肺(例えば、腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、気管支肺癌及び中皮腫)、頭頸部(例えば、舌、口腔、喉頭、咽頭、鼻咽頭、扁桃腺、唾液腺、鼻腔及び副鼻腔のがん)、卵巣、ファローピウス管、腹膜、膣、陰門、陰茎、子宮頸部、子宮筋層、子宮内膜、甲状腺(例えば、甲状腺濾胞状癌)、副腎、前立腺、皮膚及び付属器の癌腫(例えば、メラノーマ、基底細胞癌、扁平上皮癌、角化棘細胞腫、異形成母斑)のような、上皮起源の腫瘍(腺癌、扁平癌腫、移行上皮癌及び他の癌腫を含む様々な型の腺腫及び癌腫);リンパ系の血液学的悪性腫瘍及び関連状態(例えば、急性リンパ性白血病[ALL]、慢性リンパ球性白血病[CLL]、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫[DLBCL]のようなB細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、パーキットリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫及び白血病、ナチュラルキラー[NK]細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、ヘアリー細胞白血病、意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症、形質細胞腫、多発性骨髄腫、及び移植後リンパ増殖性障害)、骨髄系の血液学的悪性腫瘍及び関連状態(例えば、急性骨髄性白血病[AML]、慢性骨髄性白血病[CML]、慢性骨髄単球性白血病[CMML]、好酸球増加症候群、例えば真性赤血球増加症、本態性血小板血症、及び原発性骨髄線維症などの骨髄増殖障害、骨髄増殖性症候群、骨髄異形成症候群、及び前骨髄球性白血病)を含む、血液学的悪性腫瘍(すなわち、白血病、リンパ腫)、並びに前がん状態の血液学的障害及び境界悪性腫瘍の障害;間葉起源の腫瘍、例えば、軟組織、骨又は軟骨の肉腫、例えば骨肉腫、線維肉腫、軟骨肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、血管肉腫、カポジ肉腫、ユーイング肉腫、滑膜肉腫、類上皮肉芽腫、消化管間質腫瘍、良性及び悪性の組織球種、並びに隆起性皮膚線維肉腫など;中枢神経系又は末梢神経系の腫瘍(例えば、星状細胞腫、神経膠腫及び膠芽細胞腫、髄膜腫、上衣細胞腫、松果体腫瘍、及び神経鞘腫);内分泌腫瘍(例えば、下垂体腫瘍、副腎腫瘍、島細胞腫、副甲状腺腫瘍、カルチノイド腫瘍、及び甲状腺の髄様癌);眼球及び付属器の腫瘍(例えば、網膜芽細胞腫);生殖細胞及び絨毛性腫瘍(例えば、奇形腫、精上皮腫、未分化胚細胞腫、胞状奇胎、及び絨毛癌);並びに、小児及び胎児性腫瘍(例えば、髄芽腫、神経芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、及び未分化神経外胚葉性腫瘍);又は、患者を悪性腫瘍の影響を受けやすくする、先天性もしくはそれ以外の症候群(例えば、色素性乾皮症)を含むが、これらに限定されるものではない。

【0207】

一実施態様において、前記がんは、固形腫瘍である。更なる実施態様において、前記がんは、乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、肝臓がん、前立腺がん、又は肺がんである。

【0208】

一実施態様において、前記がんは、血液学的悪性腫瘍を含む。更なる実施態様において、前記血液学的悪性腫瘍は、骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、又は慢性リンパ球性白血病のうちの1つである。

【0209】

本発明の化合物と一緒に(同時に又は様々な時間間隔でのいずれかで)投与されてよい他

10

20

30

40

50

の抗がん治療薬又は抗がん治療の例は、以下を含むが、これらに限定されるものではない：

- ・トポイソメラーゼIインヒビター；
- ・代謝拮抗薬；
- ・チューブリン標的化薬；
- ・DNA結合剤及びトポイソメラーゼIIインヒビター；
- ・アルキル化剤；
- ・モノクローナル抗体；
- ・抗-ホルモン薬；
- ・シグナル伝達阻害剤；
- ・プロテアソームインヒビター；
- ・DNAメチル基転移酵素；
- ・サイトカイン及びレチノイド；
- ・クロマチン標的化療法；
- ・放射線治療；並びに
- ・免疫療法薬のような、その他の治療薬及び予防薬。

10

【0210】

本発明の化合物はまた、放射線治療、光力学療法、遺伝子治療；手術及び食事制限のような、非化学療法的治療と組合せて投与されてよい。

【0211】

別の化学療法薬との併用療法において使用するために、本発明の化合物及び1、2、3、4種又はそれよりも多い他の治療薬を、例えば、2、3、4種又はそれよりも多い治療薬を含有する剤形中に、すなわち、全ての成分を含有する単一の医薬組成物中に、一緒に製剤化することができる。代替の実施態様において、個別の治療薬は、個別に製剤化され、且つ任意にそれらの使用説明書を伴う、キットの形態で一緒に提供されてよい。

20

【0212】

(抗感染症療法)

感染物質の例は、細菌、真菌、寄生生物、又はウイルスなどの、任意の病原体を含む。従って一実施態様において、感染物質により媒介された及び/又は引き起こされた疾患又は障害は、細菌感染症である。

【0213】

そのような細菌感染症の例は、以下の細菌：黄色ブドウ球菌(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)を含む)などの、スタフィロコッカス種；クロストリジウム種(例えば、クロストリジウム・ディフィシル(*Clostridium difficile*)、破傷風菌(*Clostridium tetani*)及びボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*))；エンテロバクター種、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)；赤痢菌(*Shigella dysenteriae*)などの、シゲラ種；カンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*)などの、カンピロバクター種；エンテロコッカス・フェーカリス(*Enterococcus faecalis*)などの、エンテロコッカス種；炭疽菌(*Bacillus anthracis*)；ペスト菌(*Yersinia pestis*)、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、連鎖球菌種(*Streptococcal species*)；サルモネラ・ティフィムリウム(*Salmonella typhimurium*)、腸炎菌(*Salmonella enterica*)；クラミジア種、梅毒トレポネーマ(*Treponema pallidum*)、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、ボレリア・ブルグドルフェリ(*Borrelia burgdorferi*)、コレラ菌(*Vibrio cholerae*)、ジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、ヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)；アシネトバクター・バウマンニ(*Acinetobacter baumannii*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、クレブシエラ肺炎菌(*Klebsiella pneumoniae*)、及び大腸菌(*Escherichia coli*)などの、グラム陰性菌(並びに、抗生物質の1以上のクラスに対し耐性がある菌株、特に多剤耐性(MDR)菌株を含む)による感染症を含む。

30

40

【0214】

(ワクチン療法)

本発明のさらなる態様により、本明細書に定義されたようなイムノコンジュゲートを含

50

むワクチンが提供される。

【 0 2 1 5 】

本発明のさらなる態様により、本明細書に定義されたようなイムノコンジュゲートを含むアジュバントが提供される。

【実施例】

【 0 2 1 6 】

(実施例)

本発明は、以下の実施例において説明した具体的な実施態様を参照し、ここで例示されるが、限定されるものではない。化合物は、AutoNom(MDL)又はChemDrawなどの自動命名法パッケージを使用し命名されるか、又は化学物質の供給業者により命名される。

【 0 2 1 7 】

以下の合成手順は、使用される方法の例証のために提供され；所定の調製又は工程に関して、使用される前駆体は、所与の説明における工程に従い合成される個別のバッチに必ずしも由来するものではない。

【 0 2 1 8 】

(分析方法)

LCMS

システム1

LCMS Agilent 1100(クオターナリーポンプ)；質量分析計：Waters Micromass ZQ。

カラム：XBridge C18、4.6×50mm、5 μm。

溶媒：A = 水；B = アセトニトリル、C = 水中10mMギ酸アンモニウム；D = アセトニトリル中0.05%ギ酸。

カラム温度：25、注入容積：5 μL。

【 0 2 1 9 】

(LCMS方法A：4.5分間の酸性ラン)

【表3】

時間(分)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	流量(mL/分)
0	95	0	0	5	2.0
3.5	0	95	0	5	2.0
4.5	0	95	0	5	2.0
4.6	95	0	0	5	2.0

(LCMS方法B：4.5分間の緩衝ラン)

【表4】

時間(分)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	流量(mL/分)
0	0	5	95	0	2.0
3.5	0	95	5	0	2.0
4.5	0	95	5	0	2.0
4.6	0	5	95	0	2.0

(LCMS方法C：8分間の酸性ラン)

10

20

30

40

50

【表 5】

時間(分)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	流量 (mL/分)
0	95	0	0	5	2.0
3.5	5	90	0	5	2.0
8.0	5	90	0	5	2.0
8.10	95	0	0	5	2.0

【 0 2 2 0 】

10

(システム2)

LCMS Agilent 1100(クオターナリーポンプ) ; 質量分析計 : PE SCIEX API 2000 MS/MS。

カラム : Agilent Poroshell 120カラム、SB-C18、4.6mm×30mm、2.7 μm

溶媒 : A = 水 ; B = アセトニトリル中0.1%ギ酸。

カラム温度 : 20 、注入容積 : 5 μL。

【 0 2 2 1 】

(LCMS方法D : 4.5分間の酸性ラン)

【表 6】

20

時間(分)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	流量 (mL/分)
0.5	95	5	0	5	2.0
1.5	0	100	0	5	2.0
4.0	0	100	0	5	2.0
4.3	95	5			
4.5	95	5	0	5	2.0

【 0 2 2 2 】

30

(NMR)

NMRの詳細は、Oxford Instruments AS400のいずれかで記録した。

【 0 2 2 3 】

(略語)

以下の略語が使用される場合、下記の意味が適用される :

AcOHは、酢酸であり ;

aq.は、水性であり ;

brは、ブロードー重線であり ;

は、ppmでの化学シフトであり ;

dは、二重線であり ;

40

ddは、二重線の二重線であり ;

dddは、二重線の二重線の二重線であり ;

DCMは、ジクロロメタンであり ;

DIPEAは、ジイソプロピルエチルアミンであり ;

DMFは、ジメチルホルムアミドであり ;

DMSOは、ジメチルスルホキシドであり ;

DMSO-d₆は、過重水素化(perdeuterated)ジメチルスルホキシドNMR溶媒であり ;

DSGは、ジ-(N-スクシンイミジル)グルタレートであり ;

EtOHは、エタノールであり ;

EtOAcは、酢酸エチルであり ;

50

HATUは、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートであり；

HPLCは、高圧液体クロマトグラフィーであり；

IMSは、工業用変性アルコール(典型的にはEtOH中5%～10% MeOH)であり；

μは、マイクロであり；

mは、多重線であり；

Malは、マレイミドであり；

MeCNは、アセトニトリルであり；

MeOHは、メタノールであり；

minsは、分間であり；

mLは、ミリリットルであり；

MMTrは、モノメトキシトリチルであり；

MSは、質量分析であり；

NH₃は、アンモニア又は水酸化アンモニウム(28%水溶液)であり；

NHSは、N-ヒドロキシコハク酸イミド；又はN-ヒドロキシサクシニミジルであり；

NMRは、核磁気共鳴であり；

Pd/Cは、パラジウム炭素(典型的には5%～10%)の水素化触媒(水-湿潤)であり；

Pd(PPh₃)₄は、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)であり；

ppmは、百万分率であり；

qは、四重線であり；

Rtは、保持時間であり；

sは、一重線であり；

SMCCは、サクシニミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートであり；

tは、三重線であり；

TBAFは、フッ化テトラ-n-ブチルアンモニウムであり；

TBMEは、tert-ブチルメチルエーテルであり；

TEAは、トリエチルアミンであり；

TBSは、tert-ブチルジメチルシリルオキシであり；

TFAは、トリフルオロ酢酸であり；かつ

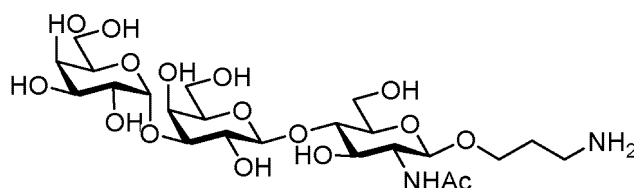
THFは、テトラヒドロフランである。

【0224】

-Galに言及される場合、以下の中間体を適用する：

3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミン

【化19】



本中間体は、Bovinらの文献(Mendeleev Communications (2002), (4), 143-145)に記載された方法により調製され得る。

【0225】

調製物1～19は、先に記載されたようなプロセス(a)～(d)及びスキーム1、1A、2、及び3により説明される、実施例へのコンジュゲーションに必要とされる重要なリンカー分子から中間体を調製するために使用される方法を説明している。

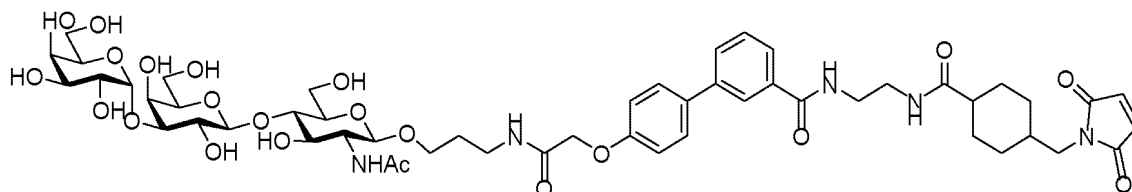
【 0 2 2 6 】

(調製物 1

4'-(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-N-(2-(4-((2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)メチル)シクロヘキサン-1-カルボキシアミド)エチル)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキサミド)

【 化 2 0 】

10



DMSO(400 μ L)中の4'-(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-N-(2-アミノエチル)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキサミド(調製物3、5.0mg、2.26 μ mol)の溶液に、DMSO(100 μ L)中のSMCC(2.2mg、6.57 μ mol)の溶液を加えた。得られた溶液を、室温で18時間攪拌し、その後真空下乾燥させた。粗製残渣を、直接次の工程で使用した。

LCMS方法B:Rt=1.97分、ES⁺ MS m/z 1118.5 [M+H]⁺

20

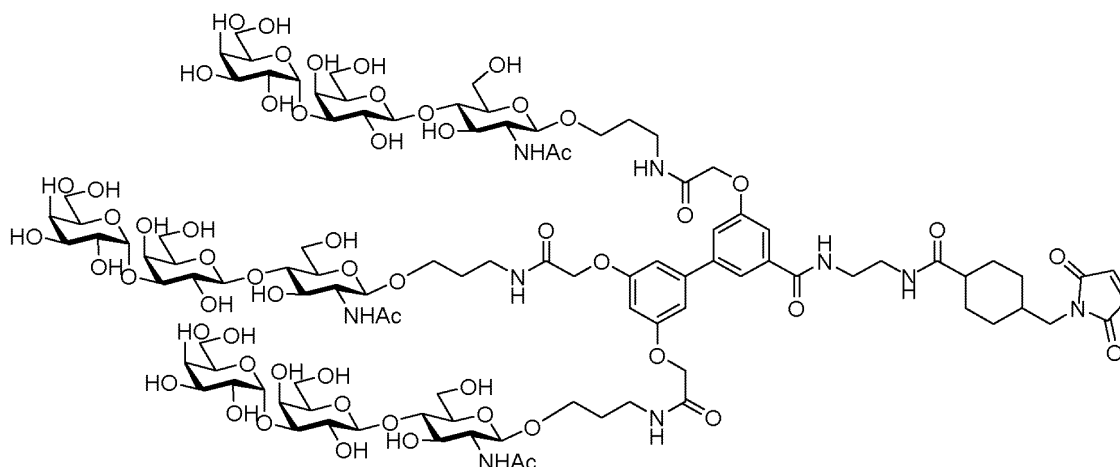
【 0 2 2 7 】

(調製物 2

2,2',2''-((5'-((2-(4-((2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)メチル)シクロヘキサン-1-カルボキシアミド)エチル)カルバモイル)-[1,1'-ビフェニル]-3,3',5-トリイル)トリス(オキシ))トリス(N-(3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アセトアミド))

30

【 化 2 1 】



40

50

DMSO(400 μ L)中の2,2',2''-((5'-((2-アミノエチル)カルバモイル)-[1,1'-ビフェニル]-3,3',5-トリイル)トリス(オキシ))トリス(N-(3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アセトアミド)(調製物4、5.0mg、2.26 μ mol)の溶液に、DMSO(100 μ L)中のSMCC(0.69mg、2.05 μ mol)の溶液を加えた。得られた溶液を、室温で18時間攪拌し、その後、真空下乾燥させた。粗製残渣を、次の工程に直接採用した。

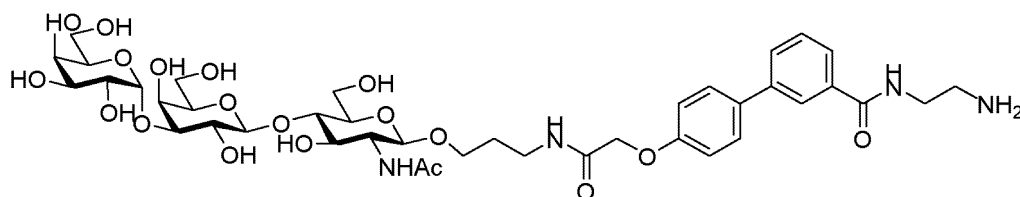
LCMS方法B:Rt=1.57分、ES⁺ MS m/z 1218.5 [M+2H]⁺/2、理論質量:2435.4

【0228】

(調製物3)

4'-(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-N-(2-アミノエチル)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキサミド)

【化22】



(工程1)

DMF(0.5mL)中の4'-(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボン酸(調製物6、38.3mg、44.7 μ mol)の溶液に、Et₃N(21.8 μ L、156.4 μ mol)を加え、それに続き、DMF(0.5mL)中のN¹-((4-メトキシフェニル)ジフェニルメチル)エタン-1,2-ジアミン(調製物19、19.3mg、58.1 μ mol)の溶液を加えた。反応液を、室温で1.5時間攪拌した。

【0229】

(工程2)

0.2 M HCl(aq)を、pH3~4まで滴加し、溶液を室温で18時間攪拌した。反応液を、真空下濃縮し、0.1%のアンモニアを含む水中5~40%のMeCNを使用して溶出させる逆相カラムクロマトグラフィーを使用して精製すると、表題化合物が無色の固形物(12.4mg、28%)として得られた。

LCMS方法B:Rt=1.32分、ES⁺ MS m/z 899.3 [M+H]⁺

【0230】

(調製物4)

2,2',2''-((5'-((2-アミノエチル)カルバモイル)-[1,1'-ビフェニル]-3,3',5-トリイル)トリス(オキシ))トリス(N-(3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アセトアミド))

10

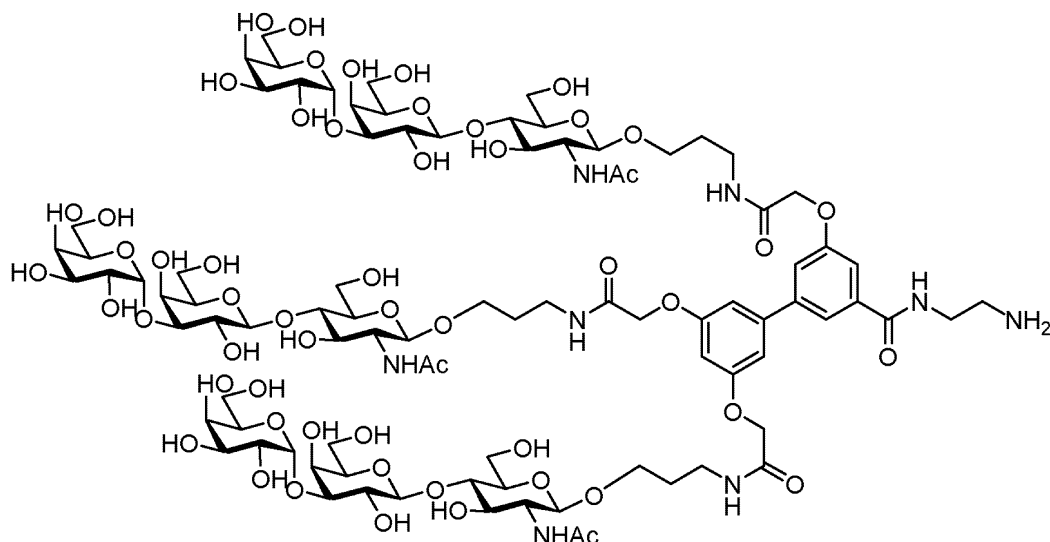
20

30

40

50

【化 2 3】



10

(工程1)

DMF(0.5mL)中の3',5,5'-トリス(2-(((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボン酸(調製物5、66.0mg、30.4 μ mol)の溶液に、 Et_3N (14.8 μ L、106.4 μ mol)を加え、それに続きDMF(0.5mL)中の N^1 -((4-メトキシフェニル)ジフェニルメチル)エタン-1,2-ジアミン(調製物19、13.1mg、39.5 μ mol)の溶液を加えた。反応液を、室温で1.5時間撹拌した。

20

【0 2 3 1】

(工程2)

0.2 M HCl(aq)を、pH3~4まで滴加し、溶液を、室温で18時間撹拌した。反応液を、真空下濃縮し、0.1%のアンモニアを含む水中5~40%のMeCNで溶出させる逆相カラムクロマトグラフィーを使用して精製すると、表題化合物が、無色の固形物として得られた(47.0mg、70%)。

30

LCMS方法B:Rt=1.57分、 ES^+ MS m/z 1106.9 $[\text{M}+2\text{H}]^+/2$ 、理論質量:2216.1

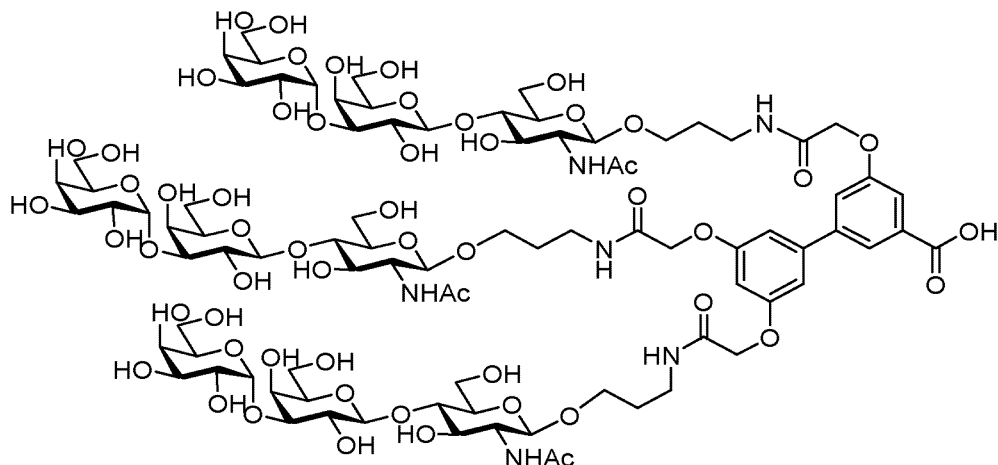
【0 2 3 2】

(調製物5)

3',5,5'-トリス(2-(((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボン酸)

40

【化 2 4】



10

(方法A)

MeOH/水(1:1v/v、7.1mL)に溶解させたベンジル 3',5,5'-トリス(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート(調製物7、71.2mg、31.4 μ mol)に、10% Pd/C(7.1mg)を加えた。反応物を、攪拌しながら室温で3時間50psi(345kPa)で水素化した。反応液を、Dicaliteで濾過し、真空下濃縮した。残渣を、水(2mL)に溶解させ、SiliCyc le DMT樹脂(50mg)と共に30分攪拌し、濾過すると、無色の溶液が得られた。溶液を真空下濃縮すると、表題化合物が、無色の固形物として得られた(61.2mg、89%)。LCMS方法B:Rt=1.27分、ES⁺ MS m/z 1088.4 [M+2H]⁺/2、理論質量:2174.4 MALDI-ToF 2195.8 [M-H+Na]⁺

20

【0 2 3 3】

調製物3は、以下の方法によって調製されてもよい:

30

【0 2 3 4】

(方法B)

水(7mL)に溶解させたベンジル 3',5,5'-トリス(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート(調製物7、278mg、123 μ mol)に、TEA(7mL)を加え、反応液を室温で16時間激しく攪拌した。反応液を、真空下濃縮し、0.1%のNH₃を含む5~40%のMeCN/水で溶出させる逆相カラムクロマトグラフィーを使用して精製すると、表題化合物が、無色の固形物として得られた(224mg、83%)。

40

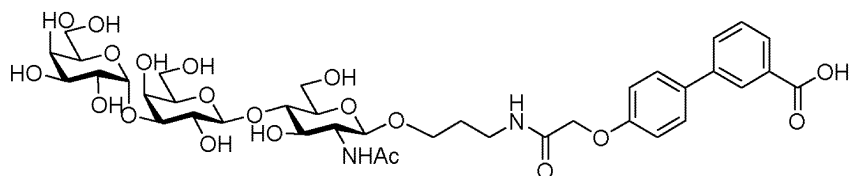
【0 2 3 5】

(調製物6)

4'-((2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボン酸)

50

【化 2 5】



MeOH/水(1:1v/v、5mL)に溶解させたベンジル 4'-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート(調製物8、93.5mg、98.7 μ mol)に、Pd/C(10%、10mg)を加えた。反応を、水素(50psi(345kPa))の雰囲気下に置き、室温で3時間撹拌した。触媒を、シリンジフィルターによる濾過によって除去し、溶媒を、減圧下除去すると、粗生成物が得られ、それを、0.1%のNH₃を含む5~40%のMeCN/水で溶出させる逆相カラムクロマトグラフィーを使用して精製すると、表題化合物が、無色の固形物として得られた(71.6mg 84%)。

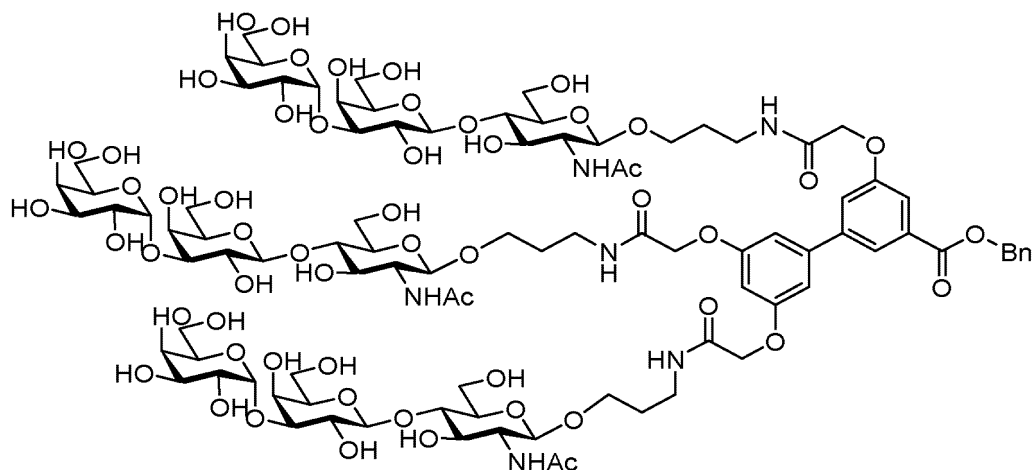
LCMS方法A:Rt=1.83分、ES⁺ MS m/z 857.57 [M+H]⁺

【 0 2 3 6】

(調製物7

ベンジル 3',5,5'-トリス(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート)

【化 2 6】



DMSO(1.25mL)及びDMF(3.75mL)に溶解させた -Gal(100mg、166 μ mol)に、トリエチルアミン(52.1 μ L、374 μ mol)及び2,2',2''-((5'-((ベンジルオキシ)カルボニル)-[1,1'-ビフェニル]-3,3',5-トリイル)トリス(オキシ))トリ酢酸(調製物9、21.2mg、41.5 μ mol)を加えた。HATU(63.1mg、166 μ mol)の溶液を、DMF(1.25mL)溶液として加え、反応液を、窒素下室温で16時間撹拌した。反応液を、真空下濃縮し、0.1%のNH₃を含む水中10~40%のMeCNで溶出させる逆相カラムクロマトグラフィーを使用して精製すると、表題化合物が、無色の固形物として得られた(71.2mg、76%)。

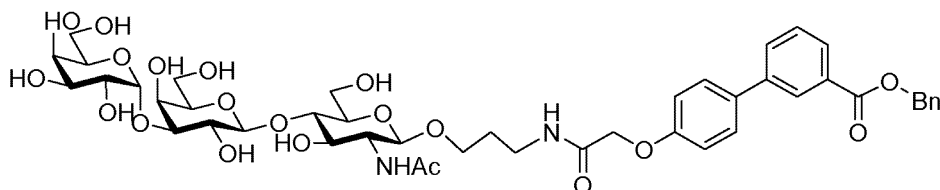
LCMS方法B:Rt=1.80分、ES⁺ MS m/z 1313.3 [M+2H]⁺/2、理論質量:2624.3

【 0 2 3 7】

(調製物 8)

ベンジル 4'-((3'-((3'-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート)

【化 2 7】



10

DMF(7.5mL)中の2-((3'-((ベンジルオキシ)カルボニル)-[1,1'-ビフェニル]-4-イル)オキシ)酢酸(調製物10、55.0mg、152 μ mol)に、TEA(63.4 μ L、455 μ mol)を加え、それに続きDMSO(500 μ L)中の β -Gal(119mg、197 μ mol)を加えた。HATU(86.6mg、228 μ mol)をDMF(500 μ L)中の溶液として加え、反応液を、窒素下室温で16時間撹拌したままとした。反応液を、真空下濃縮し、0.1%のNH₃を含む7~60%のMeCN/水で溶出させる逆相カラムクロマトグラフィーを使用して精製すると、表題化合物が、無色の固形物として得られた(93.5mg、65%)。

20

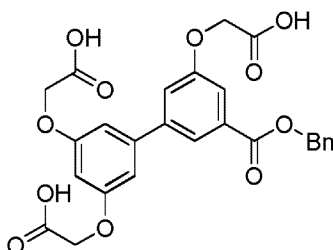
LCMS方法B:Rt=2.54分、ES⁺ MS m/z 947.62 [M+H]⁺

【 0 2 3 8】

(調製物 9)

2,2',2''-((5'-((ベンジルオキシ)カルボニル)-[1,1'-ビフェニル]-3,3',5-トリイル)トリス(オキシ))トリ酢酸)

【化 2 8】



30

DCM /TFA/水(10/10/1 v/v/v、5mL)に溶解させたトリ-tert-ブチル 2,2',2''-((5'-((ベンジルオキシ)カルボニル)-[1,1'-ビフェニル]-3,3',5-トリイル)トリス(オキシ))トリアセテート(調製物11、100mg、147 μ mol)の溶液を、室温で16時間撹拌した。この反応液を真空において濃縮し、MeOH(1mL)中に溶解し、水(10mL)により沈殿させた。沈殿を濾過により収集し、水で洗浄し、真空下で乾燥させ、表題化合物を無色の固形物(57.8 mg, 77%)として得た。

40

LCMS方法A:Rt=2.48分、ES⁻ MS m/z 509.3 [M-H]⁻

【化 2 9】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 13.05 (3H, br s), 7.90 (1H, s), 7.55-7.45 (3H, m), 7.45-7.30 (4H, m), 6.80 (2H, d), 6.50 (1H, t), 5.40 2H, s), 4.85 (2H, s), 4.75 (4H, s).

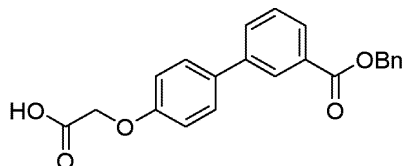
【 0 2 3 9】

(調製物 10)

2-((3'-((ベンジルオキシ)カルボニル)-[1,1'-ビフェニル]-4-イル)オキシ)酢酸)

50

【化 3 0】



表題化合物を、調製物12を使用して調製物9について記載した方法により調製し、0.1% NH₃を含む5～40%のMeCN/水で溶出させる逆相カラムクロマトグラフィーを使用して精製した。

LCMS方法B: Rt=2.43分、ES⁺ MS m/z 363.2 [M+H]⁺

【化 3 1】

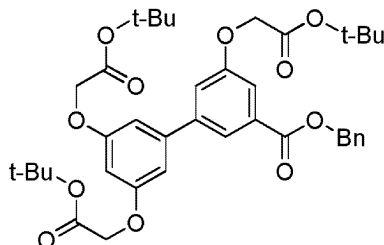
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 13.00 (1H, s), 8.15 (1H, t), 7.90-7.85 (2H, m), 7.65-7.55 (3H, m), 7.50-7.45 (2H, m), 7.45-7.30 (3H, m), 7.00-6.95 (2H, m), 5.40 (2H, s), 4.70 (2H, s).

【 0 2 4 0】

(調製物11)

トリ-tert-ブチル 2,2',2''-((5'-((ベンジルオキシ)カルボニル)-[1,1'-ビフェニル]-3,3',5'-トリイル)トリス(オキシ))トリアセテート

【化 3 2】



DMF(10mL)に溶解させたベンジル 3',5,5'-トリヒドロキシ-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート(調製物13、356mg、1.06mmol)に、プロモ酢酸tert-ブチル(625 μL、4.23mmol)及び炭酸カリウム(1.17g、8.47mmol)を加えた。得られた懸濁液を、窒素下で16時間攪拌し、その後真空下濃縮した。残渣を、水(10mL)に溶解させ、EtOAc(2×10mL)で抽出した。合わせた有機層を、ブライン(10mL)、2M NaOH水(10mL)で洗浄し、MgSO₄で乾燥し、真空下濃縮した。残渣を、ヘプタン中7～60%のEtOAcで溶出させるシリカゲルカラムクロマトグラフィーを使用して精製し、表題化合物をクリアな無色のゴム質として得た(618mg、86%)。

LCMS方法C: Rt=4.34分、質量イオンは観察されなかった。

【化 3 3】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 7.85 (1H, s), 7.55-7.50 (1H, m), 7.45-7.25 (6H, m), 6.70 (2H, d), 6.45-6.40 (1H, m), 5.35 (2H, s), 4.55 (2H, s), 4.50 (4H, s), 1.45 (27H, s)

【 0 2 4 1】

(調製物12)

ベンジル 4'-(2-(tert-ブトキシ)-2-オキソエトキシ)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート

10

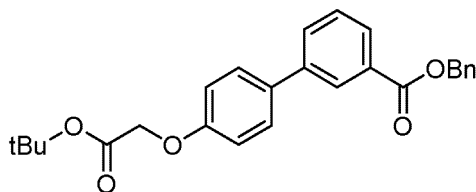
20

30

40

50

【化 3 4】



DMF(5mL)中のベンジル 4'-ヒドロキシ-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート(調製物 14、368mg、1.21mmol)及びブromo酢酸tert-ブチル(178 μ L、1.21mmol)の溶液に、炭酸カリウム(200mg、1.45mmol)を添加し、この反応液を、室温で20時間、引き続き50 で2時間撹拌した。この反応液を真空において濃縮し、得られた残渣を、水(20mL)とDCM(20mL)との間で分配した。有機層を分離し、水層をDCM(20mL)により再度抽出した。合わせた有機抽出液を、水(10mL)で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、真空において濃縮した。残渣を、ヘキサン中0~15%のEtOAcで溶離する、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、表題化合物を油状物(510mg、100%)として得た。LCMS方法D:Rt=3.85分、質量イオンは観察されなかった

10

【化 3 5】

^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ ppm 8.25 (1H, t), 8.01-7.99 (1H, dt), 7.76-7.71 (1H, m), 7.58-7.31 (8H, m), 7.06-6.95 (2H, m), 5.39 (2H, s), 4.56 (2H, s), 1.50 (9H, s).

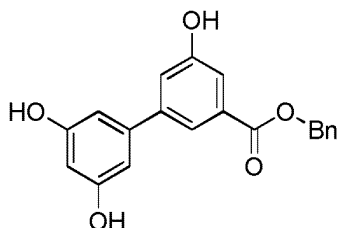
20

【 0 2 4 2】

(調製物 13

ベンジル 3',5,5'-トリヒドロキシ-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート)

【化 3 6】



30

THF(12mL)に溶解させた粗製ベンジル 3',5'-ビス((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)-5-ヒドロキシ-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート(調製物16、1.27g、2.46mmol)の溶液に、TBAF溶液(THF中1M、6.15mL、6.15mmol)を滴加した。反応液を、窒素下、室温で90分間撹拌し、その後EtOAc(100mL)で希釈した。有機相を、水(2 \times 50mL)で洗浄し、 MgSO_4 上で乾燥させ、真空において濃縮した。残渣を、DCM中5% MeOHにより溶離する、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを使用し精製し、表題化合物を淡褐色固形物(356mg、3工程を通して43%)として得た。

40

LCMS方法A:Rt=2.66分、 ES^- MS m/z 335.3 $[\text{M}-\text{H}]^-$

【化 3 7】

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ ppm 7.60 (1H, t), 7.45-7.40 (2H, m), 7.40-7.20 (4H, m), 7.15-7.10 (1H, m), 6.45 (2H, d), 6.20 (1H, t), 5.30 (2H, s).

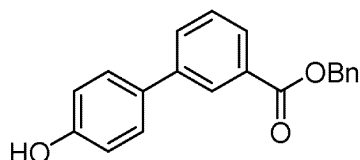
【 0 2 4 3】

(調製物 14

ベンジル 4'-ヒドロキシ-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート)

50

【化 3 8】



DMF(5mL)中の塩化ベンジル(295 μ L、2.56mmol)の溶液に、4'-ヒドロキシビフェニル-3-カルボン酸(500mg、2.33mmol)及び炭酸カリウム(322mg、2.33mmol)を添加した。この反応混合液を、室温で20時間攪拌し、その後真空中で濃縮した。残渣を、水(20mL)とジエチルエーテル(20mL)との間で分配した。有機層を分離し、水層を、ジエチルエーテル(20mL)により再度抽出した。合わせた有機抽出液を、水(10mL)で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、真空において濃縮した。残渣を、ヘキサン中0~30%のEtOAcで溶離する、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、表題化合物を白色固形物(378mg、53%)として得た。

LCMS方法D:Rt=3.48分、ES⁺ MS m/z 305.0 [M+H]⁺

【化 3 9】

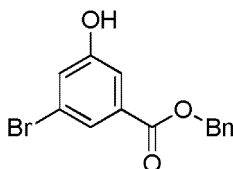
¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ ppm 8.26-8.24 (1H, m), 8.03-7.98 (1H, m), 7.75-7.71 (1H, m), 7.51-7.43 (5H, m), 7.42-7.31 (3H, m), 6.95-6.90 (2H, m), 5.40 (2H, s).

【 0 2 4 4】

(調製物 15

ベンジル 3-ブromo-5-ヒドロキシ安息香酸)

【化 4 0】



DMF(25mL)中に溶解させた3-ブromo-5-ヒドロキシ安息香酸(4.08g、18.8mmol)の溶液へ、K₂CO₃(2.60g、18.8mmol)を添加し、5分後臭化ベンジル(2.24mL、18.8mmol)を、10分間かけて滴加した。この反応液を、窒素下室温で16時間攪拌した。追加のK₂CO₃(520mg、3.76mmol)及び臭化ベンジル(450 μ L、3.79mmol)を添加し、この反応液を3時間攪拌した。反応液を真空において濃縮し、残渣を、EtOAc(30mL)と水(30mL)との間で分配した。水層を、EtOAc(2 x 20mL)により抽出し、合わせた有機層を、ブライン(30mL)で洗浄した。有機層を、MgSO₄上で乾燥させ、真空において濃縮した。残渣を、ヘブタン中5%のEtOAcで溶離する、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、表題化合物を無色の固形物(3.88g、67%)として得た。

LCMS方法A:Rt=3.36分、ES⁻ MS m/z 307.2 [M-H]⁻

【化 4 1】

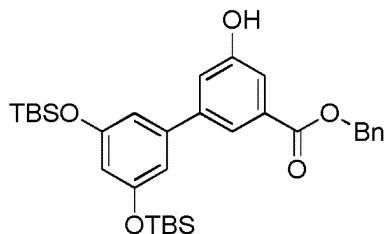
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 7.75 (1H, t), 7.50-7.45 (1H, m), 7.45-7.30 (5H, m), 7.20 (1H, t), 5.30 (2H, s), 5.30 (1H, br s).

【 0 2 4 5】

(調製物 16

ベンジル 3',5'-ビス((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)-5-ヒドロキシ-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート)

【化 4 2】



ジオキサン / 水(30mL、5 : 1v/v)中に溶解させた3-ブromo-5-ヒドロキシ安息香酸ベンジル(調製物15、755mg、2.46mmol)、炭酸ナトリウム(912mg、8.60mmol)及び((5-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(tert-ブチルジメチルシラン)(調製物17、1.87g、2.95mmol)の混合液を、窒素で30分間脱気した。Pd(PPh₃)₄(284mg、246 μmol)を添加し、この反応液を、窒素下、100℃で90分間加熱した。室温に冷却した後、EtOAc(100mL)及び水(50mL)を添加した。これらの層を分離し、水相を、EtOAc(2 × 25mL)により戻し洗浄した。合わせ有機相を、MgSO₄上で乾燥させ、真空において濃縮した。残渣をヘプタン(100mL)により処理し、得られた混合物を5分間超音波処理し、その後濾過し、固形物を除去した。濾液を真空において濃縮し、粗表題化合物を透明な茶色油状物(1.27g)として得て、これを次工程で直接使用した。

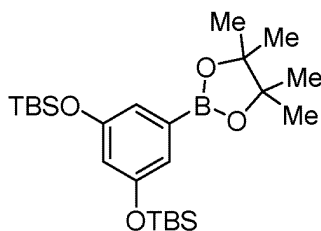
LCMS方法C:Rt=5.47分、ES⁺ MS m/z 565.4 [M+H]⁺

【 0 2 4 6】

(調製物17)

((5-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(tert-ブチルジメチルシラン))

【化 4 3】



イソヘキサン(15mL)中に溶解させた1,3-ビス((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)ベンゼン(調製物18、1.00g、2.95mmol)及びビス(ピナコラト)ジボロン(750mg、2.95mmol)の溶液を、窒素を使用し1時間脱気した。[Ir(OMe)(COD)]₂(19.6mg、59.1 μmol)及び4,4'-ジ-tert-ブチル-2,2'-ビピリジン(15.9mg、59.0 μmol)を添加し、反応液を密封し、110℃で16時間加熱した。反応液を冷却し、真空において濃縮し、次工程で直接使用した(1.87g)。

LCMS方法C:Rt=6.19分、ES⁺ MS m/z 465.4 [M+H]⁺

【化 4 4】

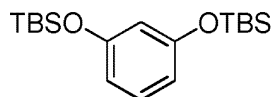
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 6.85 (2H, d), 6.40 (1H, t), 1.25 (12H, s), 0.95 (18H, s), 0.15 (12H, s).

【 0 2 4 7】

(調製物18)

1,3-ビス((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)ベンゼン)

【化 4 5】



DCM(40mL)中に溶解させたレゾルシノール(2.00g、18.2mmol)及びイミダゾール(3.71g、54.5mmol)に、tert-ブチルジメチルクロロシラン(8.21g、54.5mmol)を添加した。沈殿が形成され、更にDCM(40mL)を添加し、その後窒素下室温で16時間撹拌した。この反応液を濾過し、濾液を真空において濃縮した。残渣を、ヘプタン中0~10%EtOAcにより溶離するシリカゲルカラムクロマトグラフィーを使用して精製し、表題化合物を無色の油状物(6.18g、>99%)として得た。

10

LCMS方法C:Rt=5.39分、ES⁺ MS m/z 339.3 [M+H]⁺

【化 4 6】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 6.95 (1H, t), 6.35 (2H, dd), 6.25 (1H, t), 1.85 (18H, s), 0.10 (12H, s).

【 0 2 4 8】

(調製物19

N¹-((4-メトキシフェニル)ジフェニルメチル)エタン-1,2-ジアミン)

20

【化 4 7】



DCM(175mL)中のエチレンジアミン(54.0mL、809.6mmol)の溶液に、DCM(175mL)中のMMTクロリド(25.0g、81.0mmol)の溶液を撹拌しながら1時間かけてゆっくりと加えた。得られた溶液を、16時間室温で撹拌した。反応液を、10%炭酸カリウム水溶液(400mL)及びブライン(400mL)で洗浄した。有機層をとり、硫酸マグネシウムで乾燥し、真空下濃縮すると、表題化合物が、粘稠な淡黄色の油状物として得られた(26.1g、97%)。LCMS方法B:Rt=2.73分、イオン化は観察されなかった。

30

【化 4 8】

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ ppm 7.52-7.42 (4H, m), 7.40-7.34 (2H, m), 7.31-7.22 (4H, m), 7.20-7.15 (2H, m), 6.84-6.77 (2H, m), 3.80 (3H, s), 2.84-2.78 (2H, m), 2.27-2.18 (2H, m).

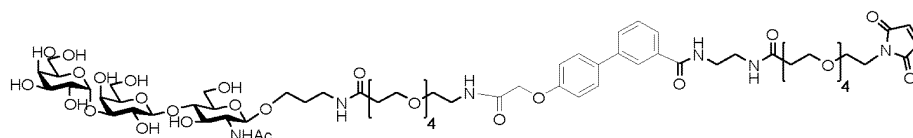
【 0 2 4 9】

(調製物20

4'-((2-((2-(3-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)エチル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-N-(2-(3-(2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エトキシ)プロパンアミド)エチル)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキサミド)

40

【化 4 9】



50

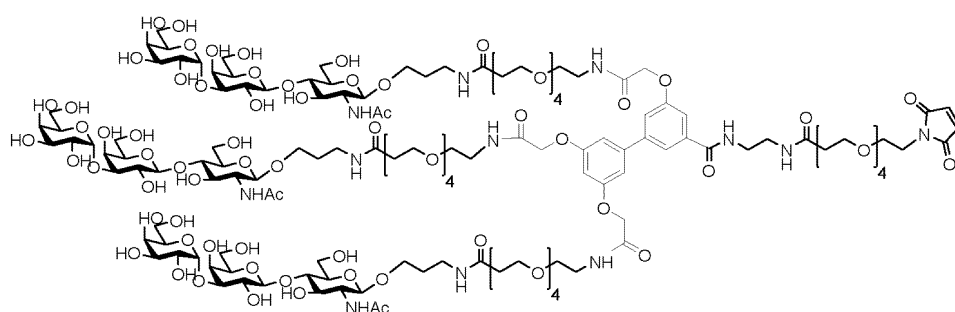
DMF(100mM)中の調製物24の溶液を、DMF中の等体積のMal-PEG4-NHS(80mM、0.8eq)に加え、反応液を、室温で2時間静置した。反応液を、50mMの終濃度として保管し、コンジュゲーション工程で直的使用した。

【0250】

(調製物21

3,3',3''-(((2,2',2''-((5'-((2-(3-(2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エトキシ)プロパンアミド)エチル)カルバモイル)-[1,1'-ビフェニル]-3,3',5-トリイル)トリス(オキシ))トリス(アセチル))トリス(アザンジイル))トリス(エタン-2,1-ジイル))トリス(オキシ))トリス(N-(3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)プロパンアミド))

【化50】



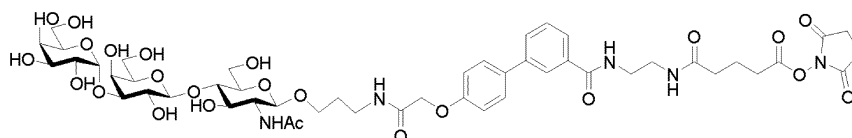
DMF:DMSO(3:1、25mM)中の調製物25の溶液を、DMF中の等体積のMal-PEG4-NHS(80mM、0.8eq)に加え、反応液を室温で2時間静置した。反応液を、20mMの終濃度として保管し、コンジュゲーション工程で直接使用した。

【0251】

(調製物22

2,5-ジオキソピロリジン-1-イル 5-((2-(4'-(2-(((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシアミド)エチル)アミノ)-5-オキソペンタノエート)

【化51】



4'-(2-(((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-N-(2-アミノエチル)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキサミド(調製物3、21.76mg、24mmol)を、攪拌しながら1:1の無水のDMF:DMSO(1062 μL)に溶解させた。ジ-(N-サクシニミジル)グルタレート(39.49mg、120mmol)を、1:1の無水のDMF:DMSO(400 μL)中300mM溶液として加えた。反応液を、陽圧の窒素雰囲気中室温で1時間攪拌した。反応液を、水中1%のTFA中1~50%のMeCNで溶出させる逆相カラムクロマトグラフィー(10×250mm Hichrom ACE 10)を使用して精製した。所望の画

分を、乾固するまで24時間かけて凍結乾燥すると、表題化合物が無色のガラス質として得られた(23mg、88%)。

MS m/z 1110.3 $[M+H]^+$

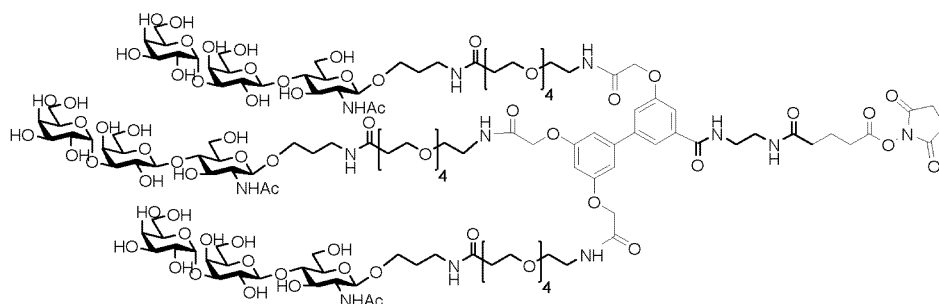
【0252】

(調製物23)

2,5-ジオキソピロリジン-1-イル 5-オキソ-5-((2-(3',5,5'-トリス(2-((2-(3-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)エチル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシアミド)エチル)アミノ)ペンタノエート)

10

【化52】



20

表題化合物を、調製物25を使用して、調製物22について記載した方法により調製し、コンジュゲーション工程に直接採用した。

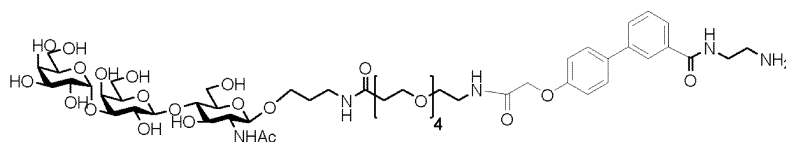
【0253】

(調製物24)

4'-((2-((2-(3-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)エチル)アミノ)-2-オキソエトキシ)-N-(2-アミノエチル)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキサミド)

30

【化53】



表題化合物を、4'-(2,2-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-2-18-ジオキソ-6,9,12,15-テトラオキサ-3,19-ジアザドコシル)オキシ)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボン酸(WO2017060729)を使用して、調製物3について記載した方法により調製した。

40

LCMS (方法 B): R_t =1.66分; ES^+ MS m/z 1145.4 $[M+H]^+$

【0254】

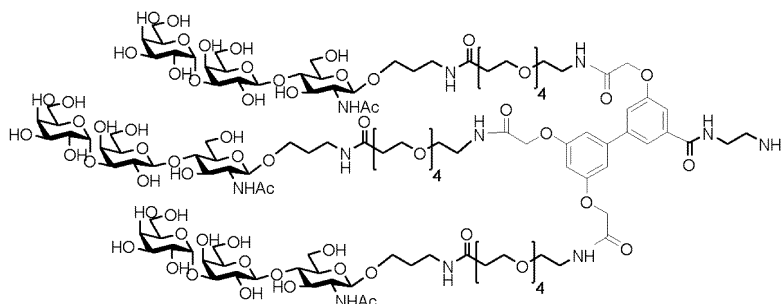
(調製物25)

3,3',3'-(((2,2',2''-((5'-((2-アミノエチル)カルバモイル)-[1,1'-ビフェニル]-3,3',5-トリイル)トリス(オキシ))トリス(アセチル))トリス(アザンジール))トリス(エタン-2,1-ジイル))トリス(オキシ))トリス(N-(3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5

50

S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピル)プロパンアミド))

【化 5 4】



10

表題化合物を、3',5,5'-トリス((2,2-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)2,18-ジオキソ-6,9,12,15-テトラオキサ-3,19-ジアザドコシル)オキシ)-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボン酸(WO2017060729)を使用して、調製物3について記載した方法により調製した。

20

LCMS (方法 B): Rt=1.52分; ES⁺ MS m/z 1479.0 [M+2H]⁺/2; 理論質量: 2958.0

【 0 2 5 5】

(実施例)

(材料及び方法:)

vcMMAE (vcE): ADCB TOX001、DMA中10mM

TCEP - Biovectra Cat 1300 ロット: 42359

N-アセチルシステイン - Sigma A7250 ロット: WXBC3104V

ジメチルアセトアミド - Sigma-Aldrich 271012 ロット: STBF9638V

30

KNE緩衝液: 50mM KPI、50mM NaCl、2mM EDTA、pH 7.5

PBS: Sigma、P5368 SLBQ7495、WFI: Sigma W3500 RNBF6963を使用して再構成されたもの

1.76 M HEPES、pH 10.8

2-イミノチオラン HCl: Sigma I6256 SLBS1775V

ポリソルベート80: Sigma-Aldrich P8074 BCBG4547V

LARは、リンカー:抗体比である。

DARは、薬物:抗体比である。

SECは、サイズ排除クロマトグラフィーである。

【 0 2 5 6】

40

(サイズ排除HPLC(SEC)によるモノマー含量)

各コンジュゲートの総含量を、10% IPA、0.2M リン酸カリウム、0.25M 塩化カリウム、pH 6.95中0.5mL/分のTOSOH TSKゲル G3000SWXL 7.8mm×30cm、5μmカラムでのクロマトグラフィーによって評価した。試料は、ニートでのせられ、データは、214、252、及び280nmで収集された。報告されるデータは全て、280nmでのものである。

【 0 2 5 7】

(疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC))

HICを、移動相A-1.5M (NH₄)₂SO₄、25mM NaPi、pH 6.95±0.05と移動相B - 75% 25mM NaPi、pH 6.95±0.05、25% IPAとの間の12分の直線的なグラジエントを使用して、0.8mL/分で、TOSOH Butyl-NPR 4.6mm×3.5cm、2.5μmカラムで行った。試

50

料を、10 μ Lの最高の充填量までニートでのせ、データは、280、252、及び214nmで収集し;報告されたデータは全て、214nmでのものである。

【0258】

(ポリマー系逆相クロマトグラフィー(PLRP))

逆相を、0.1% TFA 25% MeCNと0.1% TFA 50% MeCNとの間の25分の直線的なグラジエントを使用して、0.25mL/分/80 で、Polymer Labs PLRP-S 2.1mm \times 50mm、5 μ m、1000 カラムで行った。10 μ gを5 μ L 0.1M DTTと混合し、0.5 M トリス/Cl、pH 8.0で50 μ Lとし、37 で15分間インキュベートすることによって、試料を還元した。還元した試料を、49%アセトニトリル、49%水、2%ギ酸を使用して1:1で希釈して、還元を停止させ、PLRP分析まで試料を安定化させた。20 μ Lの該試料を、分析用のカラムにのせた。全てのデータは、214nmで報告される。

10

【0259】

注:HIC及びPLRPでは、 β -Galの親水性のために個々のリンカーローディングを分離することはできない。リンカー:Ab比(LAR)を、最初のチオール反応性の抗体及び完了した反応混合物の一定分量のvcE追跡(vcE chase)によって決定した。

【0260】

それぞれの実施例のデータを、図1~3及び12~17に例示する。

【0261】

(抗体コンジュゲート(セツキシマブ))

【0262】

20

152,000Daの分子量を有するセツキシマブ(Merck Serono;ロットNo:223155、exp:09/2020を、以下のコンジュゲーションのために使用した。計算は、 $1.45\text{cm}^{-1}\text{mg/mL}^{-1}$ のAbs_{0.1%} 280 nm、4.7mg/mLのUV分析、及び214nmでのSECによる検量線に基づくものである。

【0263】

(セツキシマブの還元及びそれに続くマレイミドを含むリンカーへのコンジュゲーションのための概略方法(実施例1~4))

セツキシマブ(4.7mg/mL)に、6% 0.5M トリス-Cl、0.025M EDTA、pH 8.5を追加し、1.1eqのTCEP:mAb(平均LAR=2に対し)又は4.2 TCEP:mAb(平均LAR=5に対し)とともに、室温でそれぞれ90分間及び120分間インキュベートした。還元の程度を分析するために、還元した試料の一定分量を、モル過剰の代替ペイロードMal-vc-PAB-MMAEとコンジュゲートして、DARを決定した(HIC分析を使用した)。この還元した試料に、8eqのリンカー-マレイミドを加え、反応液を、室温で60分インキュベートした。インキュベーション後に、反応を、N-アセチルシステイン(10mM水溶液)の添加によって30分間クエンチした。試料を、G25樹脂でPBS中に精製し、残りの結合していないリンカーを、Vivaspin 6装置を使用して10透析体積(DIA volumes)の膜透析濾過で除去した。

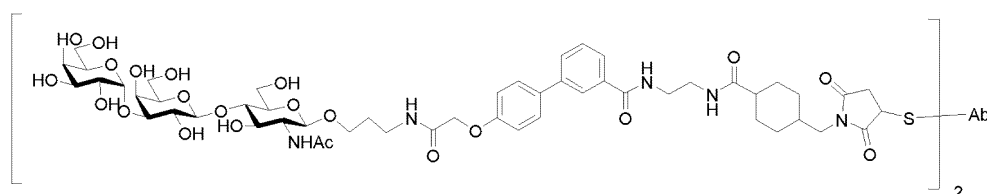
30

【0264】

(実施例1)

【化55】

40



平均LAR:2; β -Galユニットの平均総数:2

%モノマー[SEC]:98.8%(図3を参照されたい)

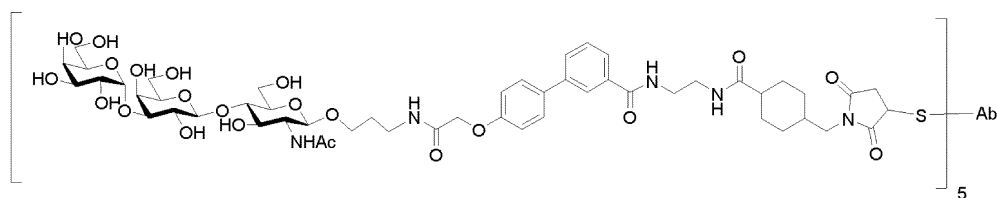
前駆体:調製物1

【0265】

50

(実施例2)

【化56】



平均LAR:5; -Galユニットの平均総数:5

10

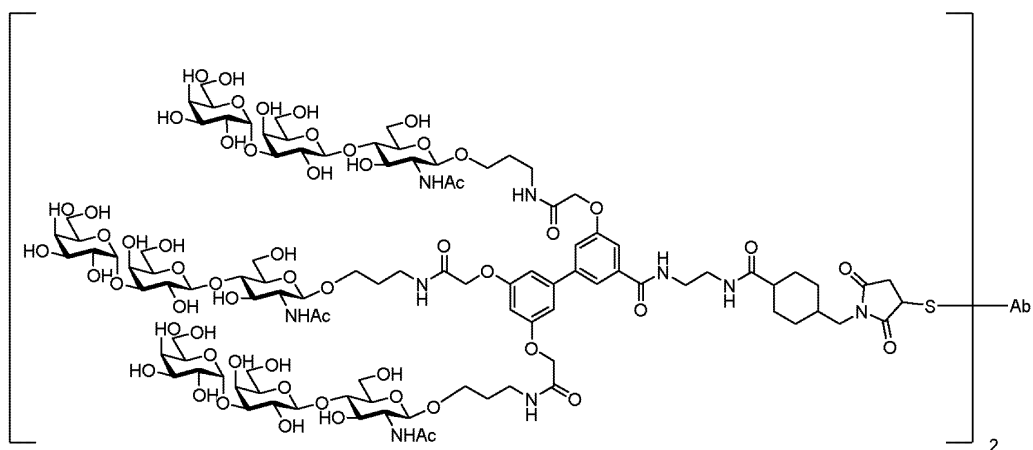
%モノマー[SEC]:99.4%(図3を参照されたい)

前駆体:調製物1

【0266】

実施例3

【化57】



20

平均LAR:2; -Galユニットの平均総数:6

%モノマー[SEC]:99.5%(図3を参照されたい)

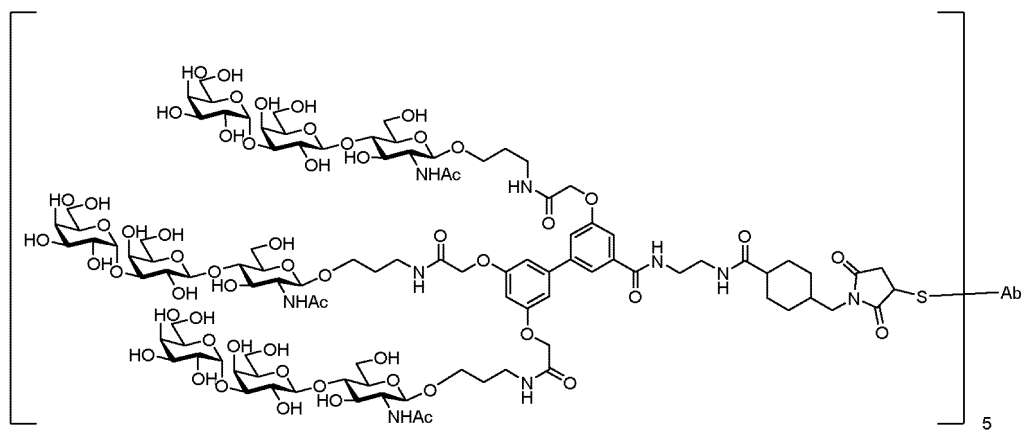
30

前駆体:調製物2

【0267】

実施例4

【化58】



40

平均LAR:5; -Galユニットの平均総数:15

%モノマー[SEC]:99.0%(図3を参照されたい)

前駆体:調製物2

50

【0268】

(セツキシマブリジンのチオールへの相互変換及びそれに続くマレイミドを含むリンカーへのコンジュゲーションのための概略方法(実施例5~8))

セツキシマブ(4.7mg/mL)を、プロテインA樹脂(GE Healthcare, HiTrap MabSelect SURE 1mL)に結合させ、その後、カラムを、50mM KPI、50mM NaCl、2mM EDTA、pH 7.5で洗浄し、mAbを、pH 3で4CV 0.1M グリシンで溶出させた。標的タンパク質を含む溶出画分(UV280吸光度によってプール)に、pH 10.8の20% 1.76M HEPESを追加した。その後、セツキシマブを、12.2eqの2-イミノチオラン:mAb(低LAR試料に対して)又は30.5eqの2-イミノチオラン:mAb(高LAR試料に対して)と共に23℃で120分ンキュベートした。試料の一定分量を、5mM His、50mM トレハロース pH 6.0でバッファー交換し、モル過剰の代替ペイロードMal-vc-PAB-MMAEとコンジュゲートさせてDARを決定した。カップリングの前に、残りのチオール化混合物を、5mM His、50mM トレハロース、pH 6.0中へのNAP25バッファー交換によってクエンチした。リンカー-マレイミドコンジュゲーションは、最終5%のDMAを使用して、4eqのリンカー-マレイミド:チオールを使用して23℃で120分行った。インキュベーションしてすぐに、試料を、G25樹脂によってPBSにバッファー交換した。過剰のリンカーを、10DV膜透析濾過(Vivaspin6)によって除去した。実験の間ずっと、遊離チオールの量を、Ellmanのアッセイを使用してモニターすることができる。

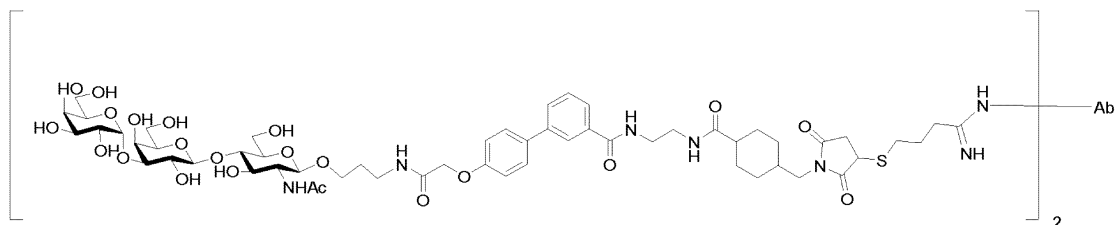
10

【0269】

(実施例5)

20

【化59】



平均LAR:2; -Galユニットの平均総数:2

30

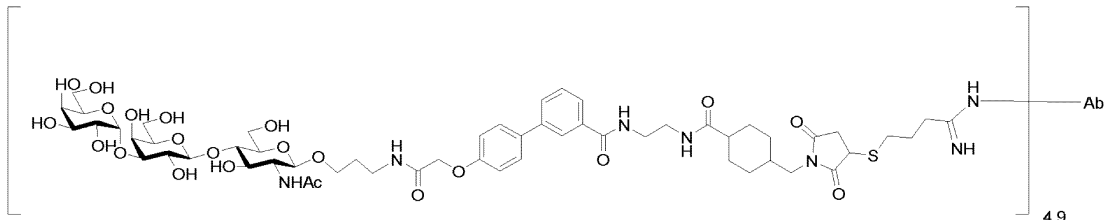
%モノマー[SEC]:95.0%(図3を参照されたい)

前駆体:調製物1

【0270】

(実施例6)

【化60】



40

平均LAR:4.9; -Galユニットの平均総数:4.9

%モノマー[SEC]:90.3%(図3を参照されたい)

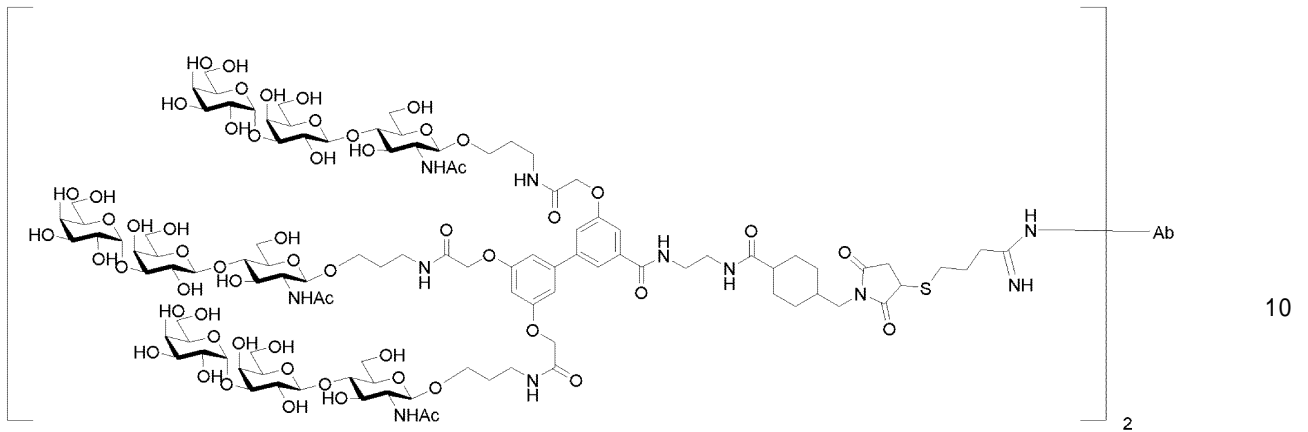
前駆体:調製物1

【0271】

(実施例7)

50

【化 6 1】



平均LAR:2; -Galユニットの平均総数:6

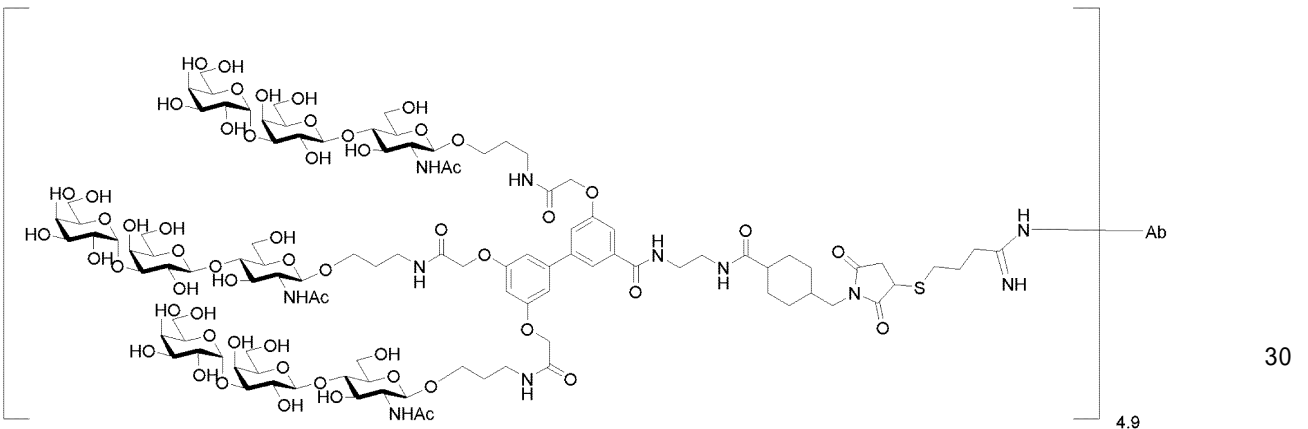
%モノマー[SEC]:90.4%(図3を参照されたい)

前駆体:調製物2

【 0 2 7 2】

(実施例8)

【化 6 2】



平均LAR:4.9; -Galユニットの平均総数:14.7

%モノマー[SEC]:80.8%(図3を参照されたい)

前駆体:調製物2

【 0 2 7 3】

(平均LAR=8を得るためのセツキシマブの還元及びそれに続くマレイミドを含むリンカーへのコンジュゲーションのための概略方法(実施例9~11))

セツキシマブ(4.7mg/mL)に、6% 0.5 M トリス-Cl、0.025 M EDTA (pH 8.5)を約 pH=7.5まで追加し、8eqのTCEP:mAbと共に室温で90分インキュベートした。還元を分析するために、還元した試料の一定分量を、モル過剰の代替ペイロードMal-vc-PAB-MMAEとコンジュゲートさせてDARを決定した(HIC分析を使用した)。

【 0 2 7 4】

還元した試料に、16又は32eqのリンカー-マレイミドのいずれかを加え、反応液を、室温で60分インキュベートした。インキュベーション後に、反応液を、N-アセチルシステイン(10mM水溶液)の添加によって30分クエンチし、試料を、G25樹脂でPBS中に精製し、残りの結合していないリンカーを、Vivaspin6 30kDa PES装置を使用する10透析体積の膜透析濾過で除去した。

【 0 2 7 5】

10

20

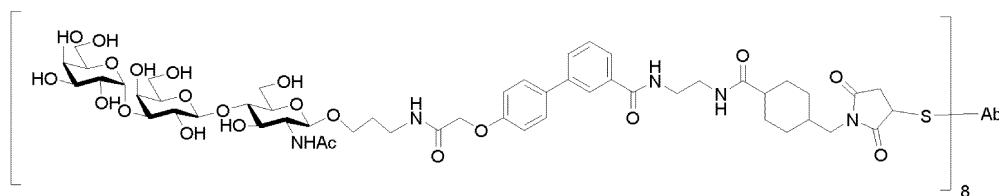
30

40

50

(実施例9)

【化63】



平均LAR:8; -Galユニットの平均総数:8

10

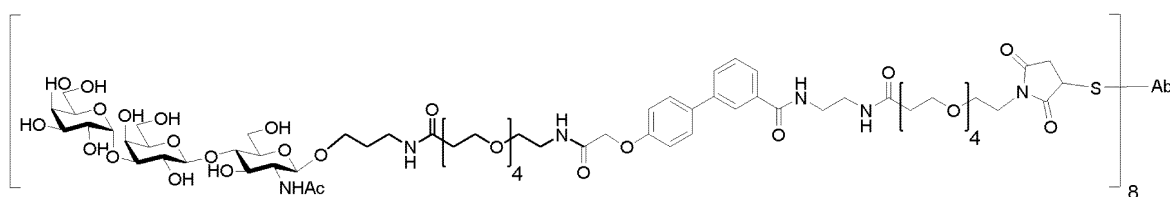
SEC分析:Rt=15.3分、98.3%モノマー含量

前駆体:調製物1

【0276】

(実施例10)

【化64】



20

平均LAR:8; -Galユニットの平均総数:8

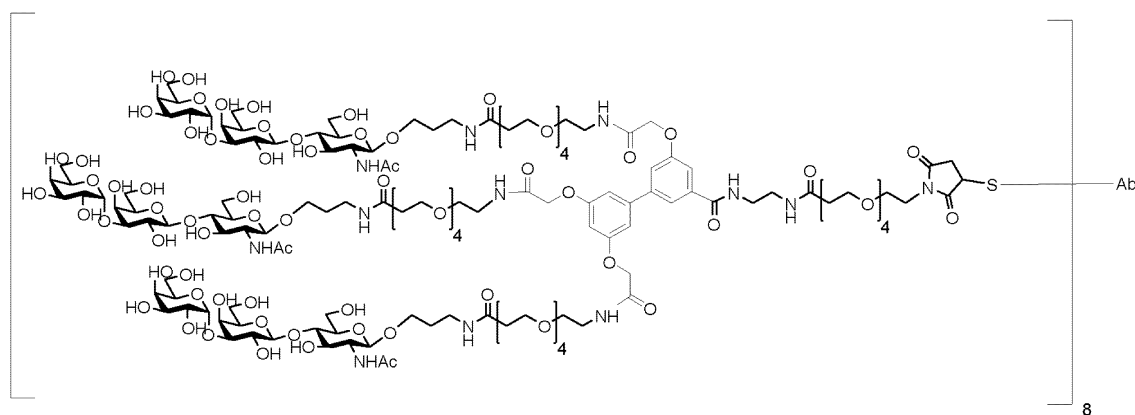
SEC分析:Rt=14.8分、98.5%モノマー含量

前駆体:調製物20

【0277】

(実施例11)

【化65】



30

平均LAR:8; -Galユニットの平均総数:8

SEC分析:Rt=14.1分、97.0%モノマー含量

前駆体:調製物21

【0278】

(セツキシマブのN-ヒドロキシコハク酸イミドを含有するリンカーへの直接リジンコンジュゲーションのための概略方法(実施例12~16))

セツキシマブ(20mg)を、プロテインA樹脂(GE Healthcare, HiTrap MabSelect Sure, 1mL)に結合させ、カラムを、pH=8の50mM KPi、50mM NaCl、及び2mM EDTAの溶液で洗浄した。抗体を、pH=3の100mMクエン酸バッファーで溶出させ、約6mg/mLへの濃縮と共に、リジンコンジュゲーションバッファー(50mM NaPi、150mM NaCl、2

50

mM EDTA、pH=8)中にバッファー交換した。溶液を、SECで分析して、リジンコンジュゲーションに適した溶液中にセツキシマブを得た(18.2mg、収率91%、6.4mg/mL、100%モノマー含量)。

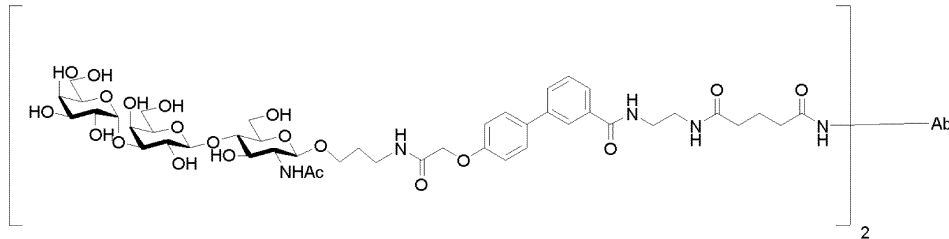
【0279】

上記のセツキシマブの溶液を、6%v/v DMF共溶媒と共に、5、10、15、20又は38いずれかのモル当量の調製物22と30 で2時間インキュベートした。反応を、1mMまでのグリシンの添加によってクエンチし、コンジュゲートを、PBS中にバッファー交換し、透析濾過して過剰のリンカーを除去した。

【0280】

(実施例12)

【化66】



平均LAR:2; -Galユニットの平均総数:2

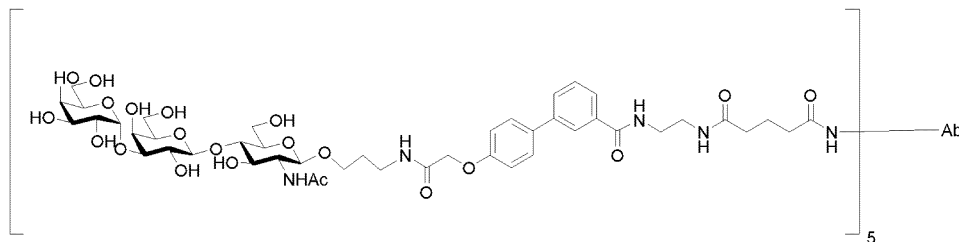
SEC分析:Rt=15.0分。モノマー含量は決定されず。

前駆体:調製物22(5eq)

【0281】

(実施例13)

【化67】



平均LAR:5; -Galユニットの平均総数:5

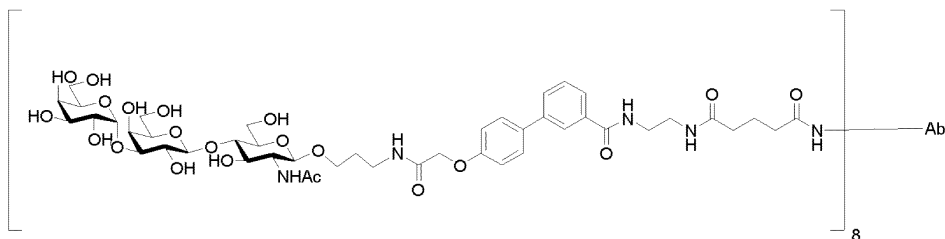
SEC分析:Rt=14.9分。モノマー含量は決定されず。

前駆体:調製物22(10eq)

【0282】

(実施例14)

【化68】



平均LAR:8; -Galユニットの平均総数:8

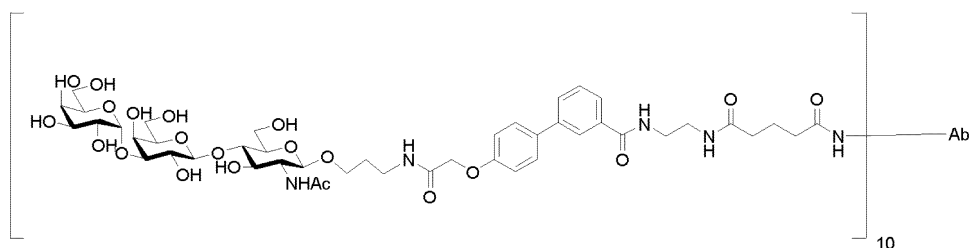
SEC分析:Rt=14.8分。モノマー含量は決定されず。

前駆体:調製物22(15eq)

【 0 2 8 3 】

(実施例15)

【 化 6 9 】



10

平均LAR:10; -Galユニットの平均総数:10

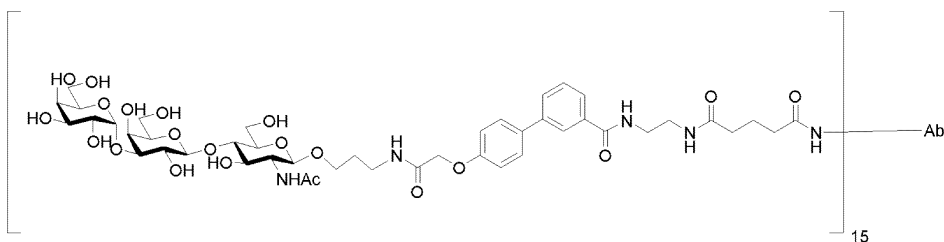
SEC分析:Rt=14.7分。モノマー含量は決定されず。

前駆体:調製物22(20eq)

【 0 2 8 4 】

(実施例16)

【 化 7 0 】



20

平均LAR:15; -Galユニットの平均総数:15

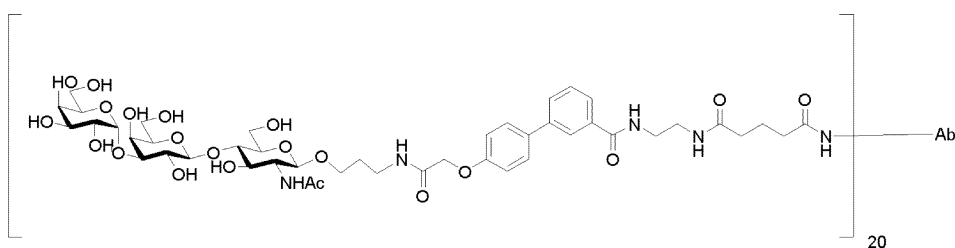
SEC分析:Rt=14.2分、94.3%モノマー含量

前駆体:調製物22(38eq)

【 0 2 8 5 】

(実施例17)

【 化 7 1 】



30

実施例17を、60当量の調製物22(10%v/v DMFと共に)を2時間、それに続きさらなる40eqの調製物22(4%v/v DMFと共に)を2時間使用して、概略方法3により調製した。

平均LAR:20; -Galユニットの平均総数:20

SEC分析:Rt=13.9分、98.4%モノマー含量

前駆体:調製物22

(Fab断片コンジュゲート(セツキシマブ))

【 0 2 8 6 】

(セツキシマブのセツキシマブ-Fabへの消化)

セツキシマブ(60mg、4.7mg/mL)を、消化バッファー(20mM NaPi、20mM システイン、10mM EDTA、pH=7)中にバッファー交換し、20mg/mLで3mLまで濃縮した。固定化パパイン(3mL、Thermo Fisher 20341、ローディング:250 μg/mL 樹脂、活性:

40

50

16～40 BAEE/mgバパインを)、消化バッファーで平衡化させ、前記濃縮したセツキシマブと共に37℃で15時間インキュベートした。消化産物を、濾過によって集め、プロテインAカラムを通して溶出させた。結合していないFab断片を、該カラムに通し、通過画分を集めた。Fab断片に対して、Vivaspin遠心分離(10kDa MWCOフィルター)によって50mM NaPi、150mM NaCl、及び2mM EDTA、pH=8への不連続的な透析濾過を行った。達成された終濃度は、5.6mg/mLであった(図16を参照されたい)。

【0287】

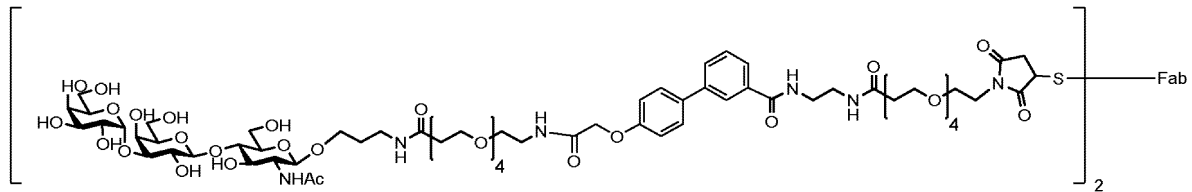
(LAR=2を得るセツキシマブ-Fabの還元及びそれに続くマレイミドを含むリンカーへのコンジュゲーションのための概略方法(実施例18及び19))

コンジュゲーションバッファー(50mM NaPi、150mM NaCl、及び2mM EDTA、pH=8)中5.6mg/mLのセツキシマブ-Fabを、5モル当量のTCEP(水中10mM)の添加によって室温で90分間還元させた。調製物20(5モル当量)又は調製物21(7.5モル当量)の溶液を加え、反応液を室温で1時間インキュベートした。該コンジュゲートを、PBSを使用してバッファー交換し、透析濾過して、所望の物質を得た。該コンジュゲートを、SEC及びSDS-PAGEによって分析した。

【0288】

(実施例18)

【化72】



20

平均LAR:2; -Galユニットの平均総数:2

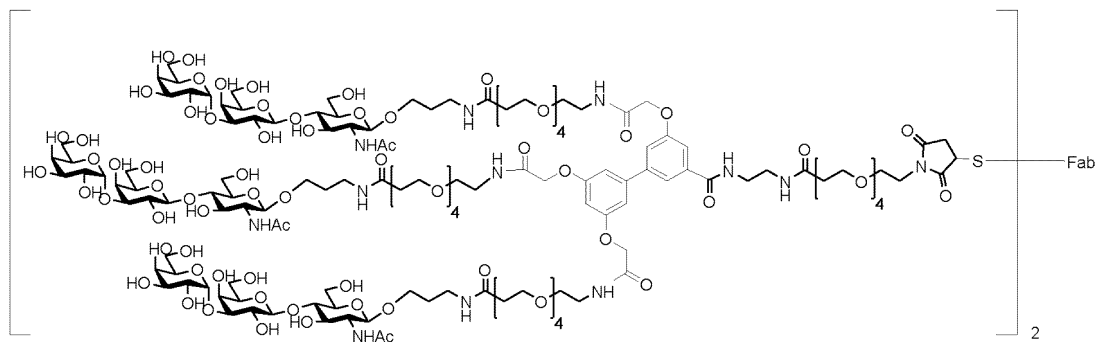
SEC分析:Rt=18.2分、94.7%モノマー含量

前駆体:調製物20

【0289】

(実施例19)

【化73】



40

平均LAR:2; -Galユニットの平均総数:6

SEC分析:Rt=17.4分、91.7%モノマー含量

前駆体:調製物21

【0290】

(平均LAR=7～14を得るセツキシマブ-FabのNHSを含有するリンカーへのリジンコンジュゲーションのための概略方法(実施例20～24))

コンジュゲーションバッファー(50mM NaPi、150mM NaCl、及び2mM EDTA、pH=8)中5.6mg/mLのセツキシマブ-Fabを、9%v/vのDMF共溶媒と共に、調製物22(15、30

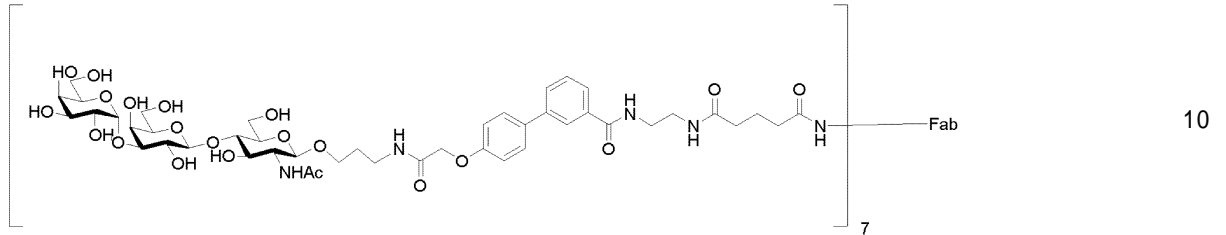
50

、及び40当量)及び調製物23(20当量)と30 で2時間インキュベートした。反応液を、1 mM濃度までのグリシンの添加によってクエンチし、コンジュゲートを、PBSにバッファ交換し透析濾過して過剰のリンカーを除去した。

【0291】

(実施例20)

【化74】



平均LAR:7; -Galユニットの平均総数:7

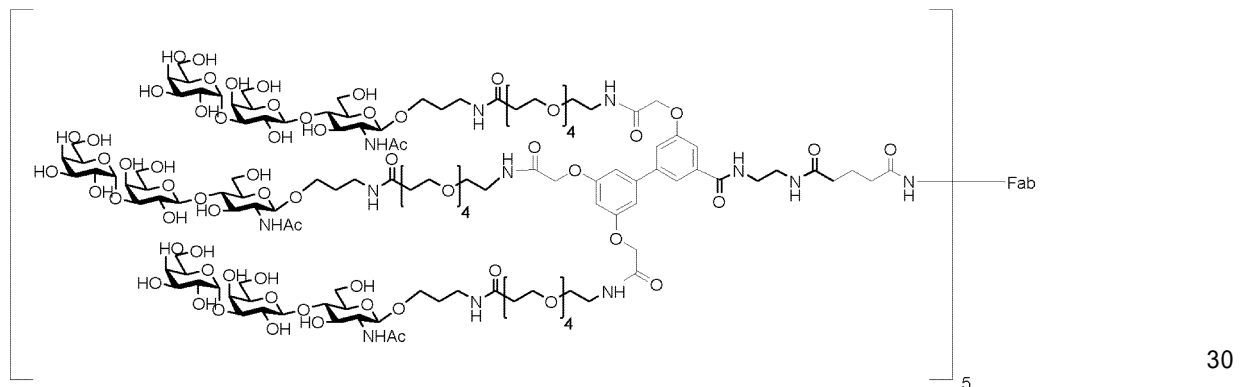
SEC分析:Rt=18.0分、99%モノマー含量

前駆体:調製物22(15eq)

【0292】

(実施例21)

【化75】



平均LAR:5; -Galユニットの平均総数:15

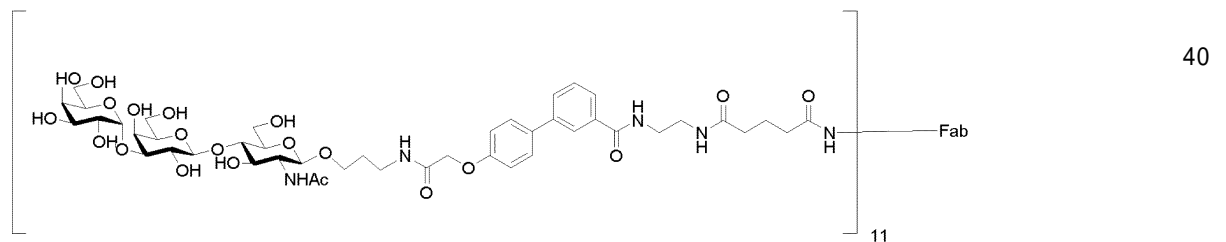
SEC分析:Rt=17.4分、99%モノマー含量

前駆体:調製物23(20eq)

【0293】

(実施例22)

【化76】



平均LAR:11; -Galユニットの平均総数:11

SEC分析:Rt=17.3分、96.9%モノマー含量

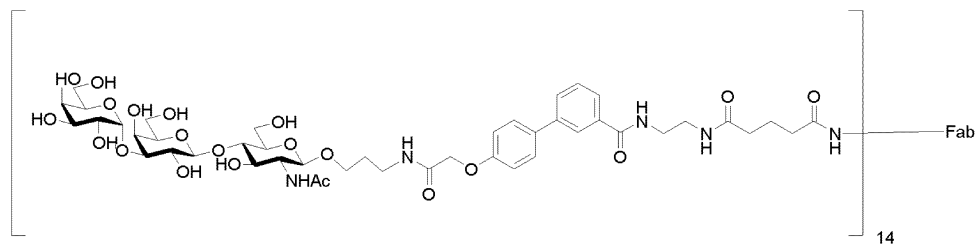
前駆体:調製物22(30eq)

【0294】

50

(実施例23)

【化77】



10

平均LAR:14; -Galユニットの平均総数:14

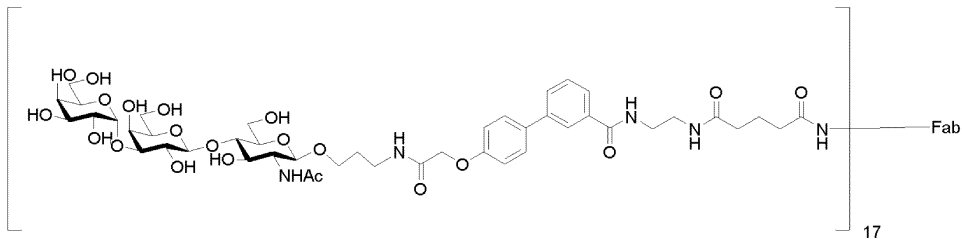
SEC分析:Rt=17.1分、95.7%モノマー含量

前駆体:調製物22(40eq)

【0295】

(実施例24)

【化78】



20

実施例24を、60当量の調製物22(20%v/vのDMFと共に)を2時間、それに続きさらなる40eqの調製物22(4%v/vのDMFと共に)を2時間使用して、概略方法4により調製した。

平均LAR:17; -Galユニットの平均総数:17

SEC分析:Rt=15.9分、90.2%モノマー含量

前駆体:調製物22(60+40eq)

【0296】

30

(抗体コンジュゲート(リツキシマブ))

クエン酸ナトリウム無水物(7.35mg/mL)、塩化ナトリウム(9mg/mL)、及び水と共に、ポリソルベート80(0.7mg/mL)中に製剤化されたリツキシマブ(Roche-Rituxan、ロットNo:B6105B92UI)。

【0297】

(リツキシマブのN-ヒドロキシコハク酸イミドを含有するリンカーへの直接リジンコンジュゲーションのための概略方法(実施例25))

リツキシマブを、500mMリン酸バッファー(50mM NaPi、150mM NaCl、2mM EDTA、pH=8)を使用してpH=7.9にpH調整した。

【0298】

40

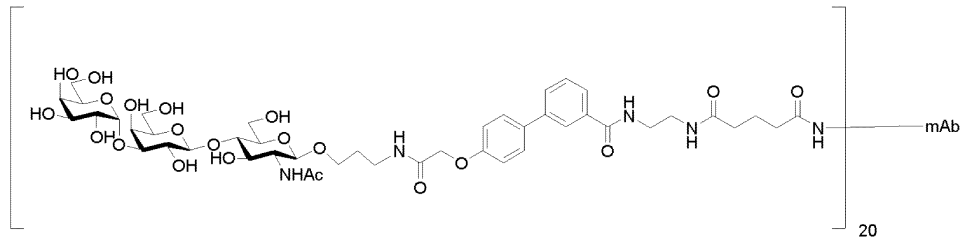
上記のリツキシマブの溶液を、10%v/vのDMF共溶媒と共に、40モル当量の調製物22と30 で2時間インキュベートし、それに続き、40モル当量の調製物22(4%v/vのDMFとともに)の2回目の添加を行った。反応液を、1mMまでのグリシンの添加によってクエンチし、コンジュゲートを、PBSにバッファー交換し、透析濾過して過剰のリンカーを除去した。

【0299】

(実施例25)

50

【化 7 9】



平均LAR:20; -Galユニットの平均総数:20

SEC分析:Rt=14.4分、98.5%モノマー含量

前駆体:調製物22

【0300】

(Fab断片コンジュゲート(リツキシマブ))

【0301】

(リツキシマブのリツキシマブ-Fabへの消化)

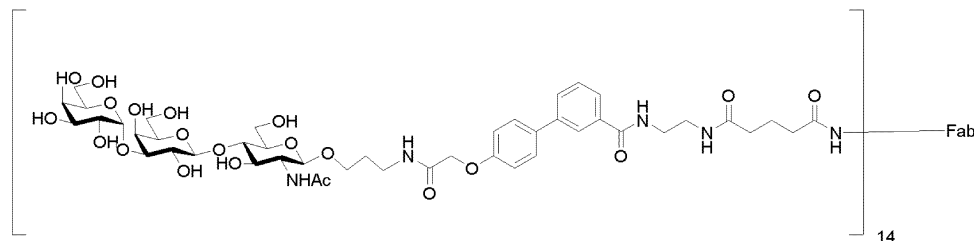
リツキシマブ(60mg、4.7mg/mL)を、消化バッファー(20mM NaPi、20mM システイン、10mM EDTA、pH=7)にバッファー交換し、20mg/mLまで濃縮した。固定化パパイン(w/w 1/160、Thermo Fisher 20341、ローディング:250 µg/mL樹脂、活性:16~40BAEE/mgパパイン)を、消化バッファー中に平衡化させ、濃縮したリツキシマブと共に37 °Cで5~18時間インキュベートした。消化産物を、濾過によって集め、プロテインAカラムを通して溶出させた。結合していないFab断片を、該カラムに通し、通過画分を集めた。Fab断片に対して、50mM NaPi、150mM NaCl、及び2mM EDTA、pH=8中へのVivaspin遠心分離(10kDa MWCOフィルター)によって不連続的な透析濾過を行った。達成された終濃度は、11.7mg/mLであった。

上記のリツキシマブ-Fabの溶液を、25% v/vのDMF共溶媒と共に、40モル当量の調製物22と30 °Cで2時間インキュベートし、それに続き、40モル当量の調製物22(9% v/vのDMFと共に)2回目の添加を行った。反応液を、1mMまでのグリシンの添加によってクエンチし、コンジュゲートを、PBSにバッファー交換し、透析濾過して過剰のリンカーを除去した。

【0302】

(実施例26)

【化 8 0】



平均LAR:14; -Galユニットの平均総数:14

SEC分析:Rt=16.9分、87.5%モノマー含量

前駆体:調製物22

【0303】

(-ガラクトシルIgM抗体を使用するフローサイトメトリーアッセイ)

フローサイトメトリーを使用して、ヒト細胞株上の受容体へのL(セツキシマブとしての)の結合及びF(ヒト抗- -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子としての)の結合を示した。A431細胞が、EGFR受容体を顕著に過剰発現することは周知であるために、該細胞を、EGFR結合mAb(セツキシマブ)を捕獲するために使用した。二次フィコエ

リトリン(PE)標識抗ヒトIgM抗体を使用して、化合物への α -ガラクトシルIgM抗体の結合を検出した。

【0304】

A431細胞(ATCC CRL-1555)を集め、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(Sigma D8662) + 0.1%BSA(ウシ血清アルブミン - Sigma A2153)中に 5×10^6 細胞/mLで再浮遊させた。その後、 5×10^5 細胞を、以下に示されるようなさまざまな濃度の化合物又はバッファー単独と共に、室温で450rpmで振盪しながら1時間インキュベートした。

【0305】

該細胞を、 $2 \times 200 \mu\text{L}$ PBS + 0.1%BSAで洗浄してから、PBS + 0.1%BSA中 $32 \mu\text{g/mL}$ で $50 \mu\text{L}$ の抗 α -ガラクトシルIgM抗体(Absolute Antibody Ab00532-15.0)を添加し、4℃で1時間インキュベートした。更に、該細胞を、 $2 \times 200 \mu\text{L}$ PBS + 0.1%BSAで洗浄してから、 $100 \mu\text{L}$ の抗ヒトIgM-PE(Biolegend 314508)の1:40希釈物で4℃で1時間処理した。 $2 \times 200 \mu\text{L}$ PBS + 0.1%BSAの最終洗浄後、細胞を、 $200 \mu\text{L}$ PBS + 0.1%BSA中に再浮遊させ、フローサイトメーター(FC500 Beckman Coulter)で評価した。全ての試料からのデータを、Kaluzaソフトウェアパッケージ(Beckman Coulter)で解析した。

【0306】

図4は、実施例1(図4A)、実施例2(図4B)、実施例3(図4C)、実施例4(図4D)、実施例5(図4E)、実施例6(図4F)、実施例7(図4G)、及び実施例8(図4H)を10nMで使用した、抗 α -ガラクトシルIgM抗体の細胞表面への捕獲を示す。蛍光強度(PE)の変化は、分子の各末端での結合事象のために生じる。

【0307】

(α -ガラクトシルIgG抗体を使用するフローサイトメトリーアッセイ)

フローサイトメトリーを使用して、ヒト細胞株上の受容体へのL(セツキシマブとして)の結合、及びF(ヒト抗 α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子として)の結合を明らかにした。A431細胞が、EGFR受容体を顕著に過剰発現することは周知であるために、該細胞を、EGFR結合mAb(セツキシマブ)を捕獲するために使用した。フィコエリトリン(PE)標識 α -ガラクトシルIgG抗体を使用し、化合物の結合を検出した。

【0308】

A431細胞(ATCC CRL-1555)を収集し、リン酸緩衝食塩水(PBS)(Sigma D8662) + 0.1%BSA(ウシ血清アルブミン - Sigma A2153)中に 5×10^6 細胞/mLで再浮遊させた。次に、 5×10^5 細胞を、10nMの化合物、バッファー単独、又は10nMセツキシマブと、450rpmで振盪しながら室温で1時間インキュベートした。該細胞を、 $2 \times 200 \mu\text{L}$ PBS + 0.1%BSAで洗浄し、その後、PBS + 0.1%BSA中 $575 \mu\text{g/mL}$ の $50 \mu\text{L}$ のPE標識抗 α -ガラクトシルIgG抗体を添加し、4℃で1時間インキュベートした。抗 α -ガラクトシルIgG抗体(Absolute Antibody Ab00532.10.0)は、Cambridge Research BiochemicalsによってPEでカスタム標識されている。 $2 \times 200 \mu\text{L}$ PBS + 0.1%BSAの最終洗浄後、細胞を、 $200 \mu\text{L}$ PBS + 0.1%BSA中に再浮遊させ、フローサイトメーター(FC500 Beckman Coulter)上で評価した。全ての試料からのデータを、Kaluzaソフトウェアパッケージ(Beckman Coulter)において解析した。

【0309】

図5は、バッファー単独と比較した、実施例1(図5A)、実施例2(図5B)、実施例3(図5C)、及び実施例4(図5D)を10nMで使用する、細胞表面への抗 α -ガラクトシルIgG抗体の捕獲を示す。蛍光強度(PE)の変化は、分子の各末端での結合事象のために生じる。

【0310】

図6は、10nMセツキシマブと比較した、実施例5(図6A)、実施例6(図6B)、実施例7(図6C)、及び実施例8(図6D)を10nMで使用する細胞表面への抗 α -ガラクトシルIgG抗体の捕獲を示す。蛍光強度(PE)の変化は、分子の各末端での結合事象のために生じる。

【0311】

(hIVIG由来の α -ガラクトシルIgG抗体及びA431細胞を使用するフローサイトメトリーアッセイ)

フローサイトメトリーを使用して、ヒト細胞株(A431)上に発現されたEGFRへのL(Fab断片として)の結合及びF(ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子として)の結合を明らかにした。2次フィコエリトリン(PE)標識抗ヒトIgG抗体を使用し、化合物への α -ガラクトシルIgG抗体の結合を検出した。

【0312】

A431細胞(ATCC CRL-1555)を収集し、リン酸緩衝食塩水(PBS)(Sigma D8662) + 0.1%BSA(ウシ血清アルブミン - Sigma A2153)中に 5×10^6 細胞/mLで再浮遊させた。次に、 5×10^5 細胞を、最大で1000nMのさまざまな化合物濃度、バッファー単独、又は1000nMのコンジュゲートしていないFab断片を用いて450rpmで振盪しながら室温で1時間インキュベートした。細胞を、 $2 \times 200 \mu\text{L}$ PBS + 0.1%BSAで洗浄し、その後、 $50 \mu\text{L}$ のPBS + 0.1%BSA中hIVIG抗Gal IgG(70 $\mu\text{g}/\text{ml}$)(ヒトIVIGからカスタム精製)を添加し、4で1時間インキュベートした。細胞を、 $2 \times 200 \mu\text{L}$ PBS + 0.1%BSAで洗浄し、その後、 $100 \mu\text{L}$ の2次抗IgG-PE(クローン HP6017、Biolegend 409393)を添加した。該細胞を、暗所で4で30分インキュベートした。

10

【0313】

$2 \times 200 \mu\text{L}$ PBS + 0.1%BSAの最終洗浄後、細胞を、 $200 \mu\text{L}$ PBS + 0.1%BSA中に再浮遊させ、フローサイトメーター(FC500 Beckman Coulter)上で評価した。全ての試料からのデータを、Kaluzaソフトウェアパッケージ(バージョン1.5a、Beckman Coulter)において解析した。

【0314】

20

図7は、最小の動員が観察されるコンジュゲートしていないFab断片と比較した、実施例18~23のhIVIGからの抗Gal IgG抗体のA431細胞への用量関連性化合物駆動型動員を示す。

【0315】

(α -ガラクトシルIgM抗体及びA431細胞を使用するフローサイトメトリーアッセイ)

化合物を、セツキシマブ及び/又はコンジュゲートしていないFab断片と比較して、最高で1000nMのさまざまな濃度で、上記フローサイトメトリーアッセイプロトコールに従い試験した。

【0316】

図8は、コンジュゲートしていないFab断片及び/又はセツキシマブと比較した、 α -ガラクトシルIgM抗体のA431細胞への用量関連性化合物駆動型動員を示す。

30

【0317】

(C3b 抗体を使用するフローサイトメトリーアッセイ)

フローサイトメトリーを使用して、化合物の対象となる細胞株への結合、及びC3b補体成分の該細胞への動員を明らかにした。A431細胞がEGFR受容体を顕著に過剰発現することは周知であるため、該細胞を、EGFR結合抗体又は抗体断片を捕獲するために使用した。フィコエリトリン(PE)にコンジュゲートした抗C3b抗体を使用して、種々の濃度の化合物の添加後の、血清由来の細胞へのC3b分子の動員を検出した。

【0318】

A431細胞(ATCC CRL-1555)を収集し、リン酸緩衝食塩水(PBS)(Sigma D8662) + 0.1%BSA(ウシ血清アルブミン - Sigma A2153)中に 5×10^6 細胞/mLで再浮遊させた。次に、 5×10^5 細胞を、最高で10000ng/mlのさまざまな化合物濃度、バッファー単独、又はセツキシマブFab断片及び/又はセツキシマブの種々の濃度を用いて、450rpmで振盪しながら室温で1時間インキュベートした。細胞を、 $2 \times 200 \mu\text{L}$ PBS + 0.1%BSAで洗浄し、その後、 $100 \mu\text{L}$ PBS及び $100 \mu\text{L}$ 20%ヒト血清(HS)(Patricell 23590)又は熱不活化ヒト血清(HIHS)を25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ M86 IgM(Absolute Antibody)と共に添加し、37で25分インキュベートした。

40

【0319】

該細胞を、 $2 \times 200 \mu\text{L}$ PBS + 0.1%BSAで洗浄し、その後、 $100 \mu\text{L}$ の抗C3b-PE(3E7/C3b、Biolegend 846104)を添加した。該細胞を、暗所で、4で30分インキュベート

50

した。2 × 200 μL PBS + 0.1 % BSAの最終洗浄後、該細胞を、200 μL PBS + 0.1 % BSA中に再浮遊させ、フローサイトメーター(FC500 Beckman Coulter)上で評価した。全ての試料からのデータを、Kaluzaソフトウェアパッケージ(バージョン 1.5a、Beckman Coulter)において解析した。

【0320】

図9は、セツキシマブFab断片及び/又はセツキシマブと比較した、様々な濃度の実施例13~17、20、22、23、及び24を用いた、A431細胞上のC3b沈着のレベルを示す。熱不活化ヒト血清を採用した場合、全ての実施例について、バックグラウンドに対して<5倍の変化が観察された(代表的なHI HSデータをここに示す)。

【0321】

(マクロファージによる標的細胞のファゴサイトーシス)

ファゴサイトーシスを使用して、細胞株上の受容体へのL(セツキシマブのFab断片として)の結合、及びF(ヒト抗-αガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子として)の結合の機能的作用を明らかにした。EGFRを発現することが報告されているA431細胞を、標的細胞として使用した。単球由来マクロファージを、エフェクター細胞として使用した。精製hIVIGを、抗Gal抗体の起源として用いた。測定される積分強度の増加は、標的細胞のファゴサイトーシスを原因として生じる。そのような増加は、対照条件下(細胞単独又はコンジュゲートしていないFab断片の存在下)では観察されなかった。

【0322】

エフェクター細胞を、96ウェルプレート(Corning 3603)内でインサイチュ分化させた。簡単に述べると、ロイコリダクションシステムチャンバー(leukoreduction system chamber)内に保管された各健康なドナー由来の血液を、National Health Service(アデンプルックズ病院(Addenbrooke's Hospital), Cambridge, UK)から購入した。末梢血単核細胞(PBMC)を、製造業者の説明書(STEMCELL Technologies 07861)に従いLymphoprep(商標)システムを用いて単離した。単球を、EasySep(商標)ヒトCD14 Positive Selection Kit II (STEMCELL Technologies 17858)を用いる正の選択によってPBMCから単離し、100ng/mlで組換えヒトGM-CSF(Peprotech 300-03)を追加したImmunoCult(商標)SF Macrophage Medium (STEMCELL Technologies 10961)中に再浮遊させ、細胞培養インキュベーター(5%CO₂、37℃)内に20,000細胞/ウェルでプレATINGした。分化5日後、マクロファージを、さらに2日間、100ng/ml IFN-γ(Peprotech 300-02)及び1ng/mlリポ多糖(Invitrogen tlr1-eblps)を用いてM1表現型に向けて極性化させた。A431細胞(ATCC CRL-1555)を、10%ウシ胎仔血清(Gibco(登録商標)10500-064)を追加したダルベッコ変法イーグル培地(Gibco(登録商標) 61965-026)中で培養し、標的細胞として使用した。標的細胞を、細胞解離バッファー(Cell Dissociation Buffer)(Gibco(登録商標)13151014)を用いて回収し、計数し、1.0 × 10⁶細胞あたり1 μlの10 mM pHrodo Green STPエステル(Thermo Fisher Scientific P35369)で37℃で30分標識した。細胞を完全培地中で洗浄し、計数し、その後、さまざまな濃度の実施例23、実施例20、又はセツキシマブ-Fabを用いて、振盪しながら室温で1時間処理した。その後、細胞を無培地培地中で洗浄し、70 μg/ml hIVIG(ヒトIVIGからカスタム精製)と氷上で30分インキュベートし、ダルベッコリン酸溶液(Gibco(登録商標)14190-094)中で洗浄し、IncuCyte(登録商標)(Sartorius)中37℃で最長12時間、エフェクター細胞(標的:エフェクター比5:1)と共培養した。画像を、2時間おきに取得した。データを、IncuCyte(登録商標)ZOOMソフトウェア(バージョン2016A、Sartorius)を用いて解析した。グラフは、GraphPad Prism(バージョン6)を用いて作成した。

【0323】

図10は、コンジュゲートしていないFab断片と比較した、1nMの実施例20及び実施例23の存在下での代表的な化合物媒介性ファゴサイトーシスを示す。標的細胞(EGFR発現A431細胞)は、エフェクター細胞(マクロファージ)によって貪食された。積分強度の増加は、標的細胞の化合物駆動型ファゴサイトーシスを原因として生じる。

【0324】

10

20

30

40

50

(Raji細胞での α -ガラクトシルIgM抗体を使用するフローサイトメトリーアッセイ)

フローサイトメトリーを使用して、ヒト細胞株上の受容体へのL(リツキシマブ又はリツキシマブFabとして)、及びF(ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子として)の結合を明らかにした。Raji細胞が、CD20受容体を顕著に過剰発現することが周知であるため、該細胞を用いて、CD20結合mAb又はFabを捕獲する。2次フィコエリトリン(PE)標識抗ヒトIgM抗体を使用して、化合物への α -ガラクトシルIgM抗体の結合を検出した。

【0325】

Raji細胞(ATCC(登録商標)CCL-86(商標))を収集し、リン酸緩衝食塩水(PBS)(Gibco(登録商標)14190-094)+0.1%BSA(ウシ血清アルブミン - Sigma A2153)中に 5×10^6 細胞/mLで再浮遊させた。その後、 5×10^5 細胞を、以下に示されるようなさまざまな濃度の化合物又はバッファー単独と共に、450rpmで振盪しながら、室温で1時間インキュベートした。細胞を、 $2 \times 200 \mu\text{L}$ PBS+0.1%BSAで洗浄し、その後、PBS+0.1%BSA中32 $\mu\text{g/mL}$ の50 μL の抗 α -ガラクトシルIgM抗体(Absolute Antibody Ab00532-15.0)を添加し、4 で1時間インキュベートした。細胞を、 $2 \times 200 \mu\text{L}$ PBS+0.1%BSAでさらに洗浄してから、100 μL の抗ヒトIgM-PE(Biolegend 314508)の1:40希釈物を用いて、4 で1時間処理した。2 \times 200 μL PBS+0.1%BSAの最終洗浄後、細胞を、200 μL PBS+0.1%BSA中に再浮遊させ、フローサイトメーター(BD FACSVerser(商標)、BD)で評価した。全ての試料からのデータを、FlowJo(登録商標)社ソフトウェアパッケージで解析した。グラフを、GraphPad Prism(バージョン6)を用いて作成した。

【0326】

図11は、リツキシマブ及びそのFab断片と比較した、Raji細胞への α -ガラクトシルIgM抗体の用量関連性化合物駆動型動員を示す。

本件出願は、以下の態様の発明を提供する。

(態様1)

ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子にリンカーを介して連結された抗体又はその抗原結合性断片を含むイムノコンジュゲートであって、該リンカーが、ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である1つ以上の糖質エピトープを提示することが可能である少なくとも1つのフェニル環を含むことを特徴とする、前記イムノコンジュゲート。

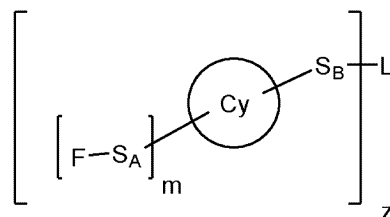
(態様2)

前記リンカーが、フェニル、ビフェニル、もしくはトリフェニル基;又はビフェニル基を含む、態様1記載のイムノコンジュゲート。

(態様3)

式(A)の化合物又はその医薬として許容し得る塩である、態様1又は態様2記載のイムノコンジュゲート:

(化1)



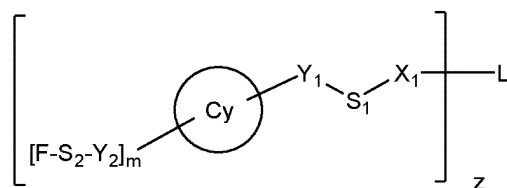
(A)

(式中、Fは、ヒト抗- α -ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子であり;Cyは、フェニル、ビフェニル、又はトリフェニルであり;S_A及びS_Bは、F及びLの最適な距離のために選択されたスペーサーを示し;mは、1~5から選択された整数を表し;zは、1~10から選択された整数を表し;かつLは、抗体又はその抗原結合性断片である)。

(態様 4)

式(I)の化合物又はその医薬として許容し得る塩である、態様1～3のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート:

(化 2)



(I)

10

(式中、

Lは、抗体又はその抗原結合性断片から選択された結合部位を表し;

S₁は、-CH₂-基のうちの1～10個が、-O-、-S-、=N(H)-、-C(=O)-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、シクロヘキシル、又はピロリジン-2,5-ジオンから選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、-(CH₂)_a-又は-(CH₂)_b-(CH₂-CH₂-O)_c-(CH₂)_d-基から選択されたスペーサーを表し;

aは、1～35から選択された整数を表し;

bは、0～5から選択された整数を表し;

20

cは、1～20から選択された整数を表し;

dは、1～20から選択された整数を表し;

S₂は、-CH₂-基のうちの1～3個が、-N(H)-、-C(O)NH-、及び-NHC(O)-から選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、-(CH₂)_e-又は-(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h-基から選択されたスペーサーを表し;

eは、1～15から選択された整数を表し;

fは、1～10から選択された整数を表し;

gは、1～20から選択された整数を表し;

hは、1～5から選択された整数を表し;

zは、1～30から選択された整数を表し;

30

X₁は、抗体又は抗原結合性断片付着部位を表し;

Y₁及びY₂は独立して、結合、-O-、-S-、-NH-、-NHC(O)-、-C(O)NH-、-OC(O)-、-C(O)O-、-SC(O)-、-C(O)S-、-NH₂SO₂-、-SO₂NH-、又は-NHC(O)NH-基を表し;

Fは、ヒト抗-ガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子を表し;

mは、1～5から選択された整数を表し;かつ

Cyは、フェニル、ビフェニル、トリフェニルを表し、Cyが、ビフェニル又はトリフェニルを表す場合、該-Y₁-S₁-X₁-L基は、該フェニル環のうちのいずれの上にも存在してもよく、かつ1つ又は複数の該[F-S₂-Y₂]_m-基は、該フェニル環のうちのいずれの上にも存在してもよい)。

(態様 5)

40

S₁が:

-CH₂-基のうちの1～5個(例えば、2、3、又は5個)が、-S-、=N(H)-、-C(=O)-、-NHC(O)-、シクロヘキシル、又はピロリジン-2,5-ジオンから選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、-(CH₂)_a-(例えば、-(CH₂)₂-NHCO-シクロヘキシル-CH₂-3-ピロリジン-2,5-ジオン-、-(CH₂)₂-NHCO-シクロヘキシル-CH₂-3-ピロリジン-2,5-ジオン-S-(CH₂)₃-C(=NH)-、もしくは-(CH₂)₂-NHCO-(CH₂)₃-COなど);又は

-CH₂-基のうちの1～5個(例えば、2個)が、-NHC(O)-もしくはピロリジン-2,5-ジオンから選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、-(CH₂)_b-(CH₂-CH₂-O)_c-(CH₂)_d-(例えば、-(CH₂)₂-NHCO-(CH₂-CH₂-O)₄-(CH₂)₂-3-ピロリジン-2,5-ジオン-など)

から選択されたスペーサーを表す、態様4記載のイムノコンジュゲート。

50

(態様 6)

X_1 が、-S-又は-N(H)-を表す、態様4又は5記載のイミノコンジュゲート。

(態様 7)

a が、1 ~ 30;又は2 ~ 30;又は2、4、6、9、11、18、もしくは30;又は6 ~ 30;又は6、11、18、もしくは30;又は5 ~ 15;又は6 ~ 11;又は6、7、もしくは11;又は6;又は7;又は11から選択された整数を表す、態様4 ~ 6のいずれか1項記載のイミノコンジュゲート。

(態様 8)

b が、0 ~ 3;又は0もしくは3;又は1 ~ 3;又は2もしくは3;又は3から選択された整数を表す、態様4 ~ 7のいずれか1項記載のイミノコンジュゲート。

(態様 9)

c が、1 ~ 15;又は1 ~ 12;又は4 ~ 12;又は4もしくは12;又は4から選択された整数を表す、態様4 ~ 8のいずれか1項記載のイミノコンジュゲート。

(態様 10)

d が、1 ~ 15;又は2 ~ 13;又は2、5、もしくは13;又は13;又は3から選択された整数を表す、態様4 ~ 9のいずれか1項記載のイミノコンジュゲート。

(態様 11)

Y_1 が、結合、-C(O)NH-、もしくは-O-;又は-C(O)NH-を表す、態様4 ~ 10のいずれか1項記載のイミノコンジュゲート。

(態様 12)

S_2 が:

-CH₂-基のうちの1個又は2個が、-N(H)-、-C(O)NH-、及び-NHC(O)-から選択された1個又は2個の基で任意に置換されている、-(CH₂)_e-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₄-CONH-CH₂-、-(CH₂)₃-NH-CH₂-、もしくは-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-など);又は

-CH₂-基のうちの1 ~ 3個が、1 ~ 3個の-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₁₂-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-、もしくは-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-など)

から選択されたスペーサーを表すか;

又は S_2 が:

-CH₂-基のうちの1個又は2個が、-C(O)NH-又は-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_e-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-、-(CH₂)₃-NHCO-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₄-CONH-CH₂-、もしくは-(CH₂)₃-NH-CH₂-など)、又は-CH₂-基のうちの1個又は2個が、-C(O)NH-又は-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₂-(OCH₂CH₂)₄-NHCO-CH₂-、もしくは-(CH₂)₄-NHCO-(CH₂)₂-(OCH₂CH₂)₄-NHCO-CH₂-など)

から選択されたスペーサーを表すか;

又は S_2 が:

-CH₂-基のうちの1個又は2個が、1個又は2個の-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_e-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-、もしくは-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-など);又は

-CH₂-基のうちの1 ~ 3個が、1 ~ 3個の-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₁₂-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-、もしくは-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-など)

から選択されたスペーサーを表すか;

又は S_2 が:

-CH₂-基のうちの1個又は2個が、-N(H)-、-C(O)NH-、及び-NHC(O)-から選択された1個又は2個の基で任意に置換されている、-(CH₂)_e-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-など);又は

10

20

30

40

50

-CH₂-基のうちの1～3個が、1～3個の-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-など)から選択されたスペーサーを表すか;

又はS₂が:

-CH₂-基のうちの1個又は2個、例えば、1個が、-N(H)-、-C(O)NH-、及び-NHC(O)-から選択される1個又は2個、例えば、1個の基により任意に置換されている、-(CH₂)_e-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-など)

から選択されたスペーサーを表すか;

又はS₂が:

-CH₂-基のうちの1個が、-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_e-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-CH₂-など);又は

-CH₂-基のうちの2個が、-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h-(例えば、-(CH₂)₃-NHCO-(CH₂CH₂O)₄-(CH₂)₂-NHCO-CH₂-など)から選択されたスペーサーを表す、態様4～11のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

(態様13)

eが、1～10;又は3～10;又は3、5、9、もしくは10;又は5～9;又は5もしくは9;又は4～10;又は4、5、もしくは10;又は5から選択された整数を表す、態様4～12のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

(態様14)

fが、1～8;又は2～8;又は2～6;又は4～8;又は4もしくは8;又は4から選択された整数を表す、態様4～13のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

(態様15)

gが、1～15;又は4～12;又は4もしくは12;又は1～5;又は1～4;又は4から選択された整数を表す、態様4～14のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

(態様16)

hが、1～4;又は4から選択された整数を表す、態様4～15のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

(態様17)

Y₂が、結合、-O-、もしくは-NHC(O)-;又は結合もしくは-O-;又は-O-を表す、態様4～16のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

(態様18)

mが、1～4;又は1～3;1もしくは3;又は2もしくは3;又は1もしくは2;又は1;又は2;又は3;又は4から選択された整数を表す、態様4～17のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

(態様19)

zが、2～20;又は2;又は4;9;又は5;又は7;又は8;又は10;又は11;又は14;又は15;又は17;又は20から選択された整数を表す、態様4～18のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

(態様20)

Cyが、フェニルもしくはビフェニル;又はビフェニルもしくはトリフェニル;又はフェニルもしくはトリフェニル;又はビフェニルを表す、態様4～19のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

(態様21)

式(I)^aの化合物又はその医薬として許容し得る塩:

(化3)

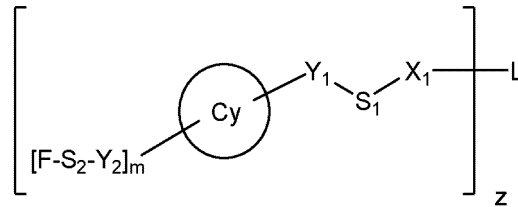
10

20

30

40

50

(I)^a

(式中、

Lは、抗体又はその抗原結合性断片から選択された結合部位を表し；S₁は；-CH₂-基のうちの2個、3個、もしくは5個が、-S-、=N(H)-、-C(=O)-、-NHC(O)-、シクロヘキシル、又はピロリジン-2,5-ジオンから選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、-(CH₂)_a-；又は-CH₂-基のうちの2個が、-NHC(O)-もしくはピロリジン-2,5-ジオンから選択される1つ以上の基により任意に置換されてよい、-(CH₂)_b-(CH₂-CH₂-O)_c-(CH₂)_d-から選択されたスペーサーを表し；aは、6、7、又は11から選択された整数を表し；bは、3から選択された整数を表し；cは、4から選択された整数を表し；dは、3から選択された整数を表し；S₂は；-CH₂-基のうちの1個が、-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_e-；又は-CH₂-基のうちの2個が、-NHC(O)-基により任意に置換されている、-(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h-から選択されたスペーサーを表し；eは、5から選択された整数を表し；fは、4から選択された整数を表し；gは、4から選択された整数を表し；hは、4から選択された整数を表し；zは、2～20から選択された整数を表し；X₁は、-S-又は-N(H)-を表し；Y₁は、-C(O)NH-を表し；Y₂は、-O-を表し；Fは、ヒト抗-βガラクトシル抗体に結合することが可能である糖質分子を表し；mは、1又は3から選択された整数を表し；かつCyは、ピフェニルを表し、該-Y₁-S₁-X₁-L基は、該フェニル環のうちのどちらの上に存在してもよく、かつ1つ又は複数の該[F-S₂-Y₂]_m-基は、該フェニル環のうちのどちらの上に存在してもよい)。

(態様22)

前記抗体が、ポリクローナル抗体である、態様1～21のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

(態様23)

前記抗体が、ヒト化抗体、ヒト抗体、マウス抗体、又はキメラ抗体である、態様1～22のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

(態様24)

前記その抗原結合性断片が、抗原結合性断片(Fab)又は単鎖可変断片(scFv)である、態様1～23のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

(態様25)

10

20

30

40

50

前記断片が、Fab、Fab₂、F(ab)₂、及びscFvからなる群から選択される、
態様24記載のイムノコンジュゲート。

(態様26)

前記抗体又はその抗原結合性断片が、EGFR抗体又はその断片、例えば、セツキシマブ、
セツキシマブFab、又はニモツズマブ、特に、配列番号:1~4に対して少なくとも80%の
配列同一性を有するEGFR抗体又はその断片から選択される、態様1~25のいずれか1項記
載のイムノコンジュゲート。

(態様27)

前記抗体又はその抗原結合性断片が、CD20抗体又はその断片、例えば、リツキシマブ又
はリツキシマブFabから選択される、態様1~25のいずれか1項記載のイムノコンジュゲ
ート。

10

(態様28)

前記抗体又はその抗原結合性断片が、病原体特異抗体又はその断片から選択される、態
様1~25のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

(態様29)

Fが、ガラクトシル-1,3-ガラクトシル-1,4-N-アセチルグルコサミン、1-3ガラ
クトピオース、1-3-1-4-ガラクトトリオース、又はガリリペンタサッカリドから選択
される、態様1~28のいずれか1項記載のイムノコンジュゲート。

(態様30)

実施例1~26のいずれか1つから選択される、態様1又は21記載の化合物、又はその医薬
として許容し得る塩。

20

(態様31)

態様1~30のいずれか1項記載の化合物又はその医薬として許容し得る塩を含む医薬組成
物。

(態様32)

1つ以上のさらなる治療薬剤をさらに含む、態様31記載の医薬組成物。

(態様33)

療法における使用のための、態様1~30のいずれか1項記載の化合物又はその医薬として
許容し得る塩。

(態様34)

がんの治療における使用のための、態様26記載の化合物又はその医薬として許容し得る
塩。

30

(態様35)

がん、例えば血液がん、特に白血病及びリンパ腫の治療における使用のための、態様27
記載の化合物又はその医薬として許容し得る塩。

(態様36)

細菌感染症の治療における使用のための、態様28記載の化合物又はその医薬として許容
し得る塩。

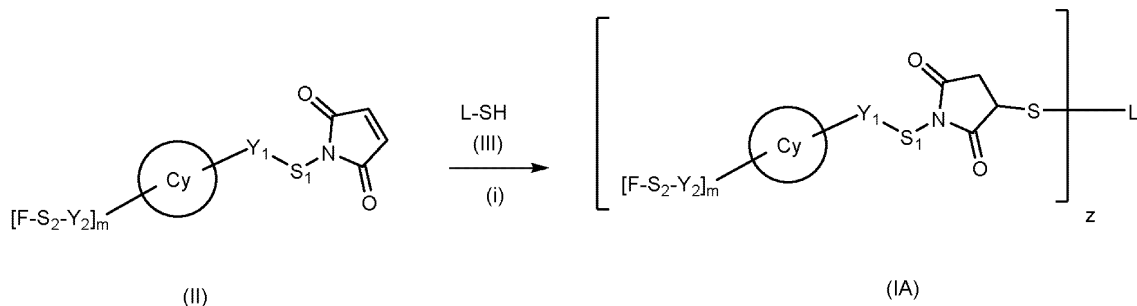
(態様37)

態様4記載の式(I)の化合物を調製するためのプロセスであって:

40

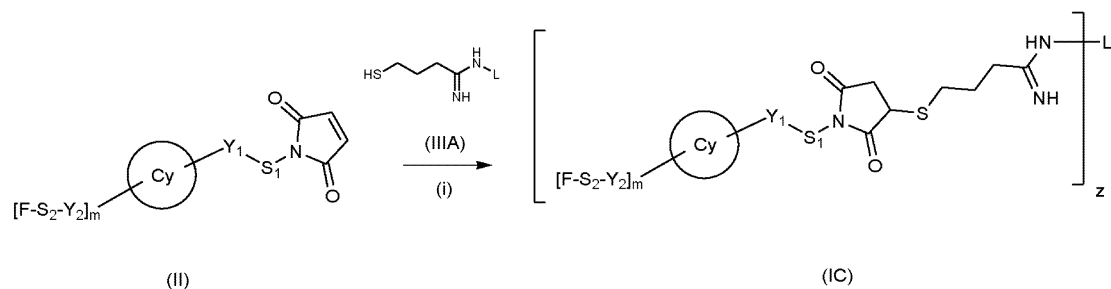
(a)前記抗体又は抗原結合性断片が、少なくとも1個の反応性チオール基を有する式(III)
の化合物を、S₁が、ピロリジン-2,5-ジオンで終端している式(II)の化合物と反応させるこ
とにより、X₁が、-S-を表す式(IA)の化合物を調製すること;

(化4)



10

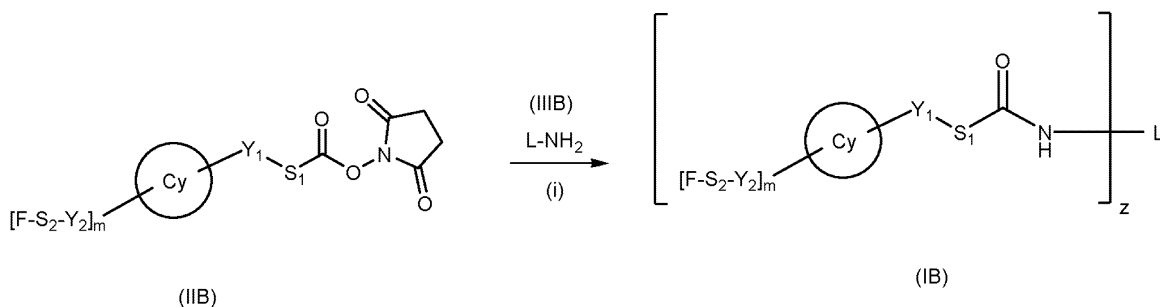
(式中、F、 S_2 、 Y_2 、m、Cy、 Y_1 、及び S_1 は、態様4に定義されたものである);又は
 (b)前記抗体又は抗原結合性断片が、少なくとも1個の反応性チオール基を有する式(IIIA)
)の化合物を、 S_1 が、ピロリジン-2,5-ジオンで終端している式(II)の化合物と反応させる
 ことにより、 X_1 が、 $-NH_2$ を表し、かつ S_1 が、 $-S-CH_2-CH_2-CH_2-C(=NH)-$ を含む式(IC)
 の化合物を調製すること:
 (化5)



20

(式中、F、 S_2 、 Y_2 、m、Cy、 Y_1 、 S_1 、及びLは、態様4に定義されたものである);又は
 (c) S_1 が、N-ヒドロキシコハク酸イミド基で終端している式(IIIB)の化合物を、前記抗体
 又は抗原結合性断片が、少なくとも1個の反応性アミノ基を有する式(IIIB)の化合物と反応
 させることにより、 X_1 が、 $-NH_2$ を表す式(IB)の化合物を調製すること:
 (化6)

30



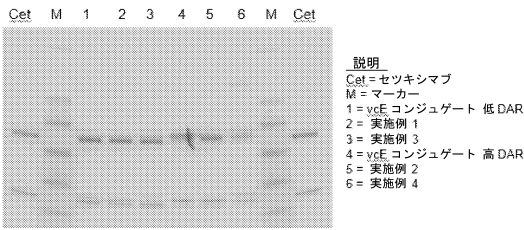
40

(式中、F、 S_2 、 Y_2 、m、Cy、 Y_1 、 S_1 、及びLは、態様4に定義されたものである);及び/
 又は
 (d)式(I)の化合物又はその保護された誘導体の、さらなる式(I)の化合物又はその保護さ
 れた誘導体への相互変換
 を含む、前記プロセス。
 (態様38)
 態様37に記載の式(II)又は式(IIIB)の化合物、又は明細書に記載の式(V)、(VA)、(IX)、
 もしくは(XI)の化合物。

50

【図面】

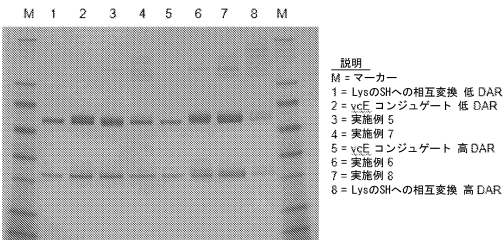
【図 1】



実施例1～4の還元SDS page分析

図 1

【図 2】



実施例5～8の還元SDS page分析

図 2

【図 3 - 0 1】

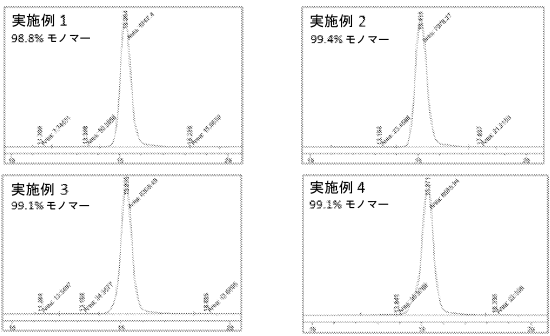


図 3

【図 3 - 0 2】

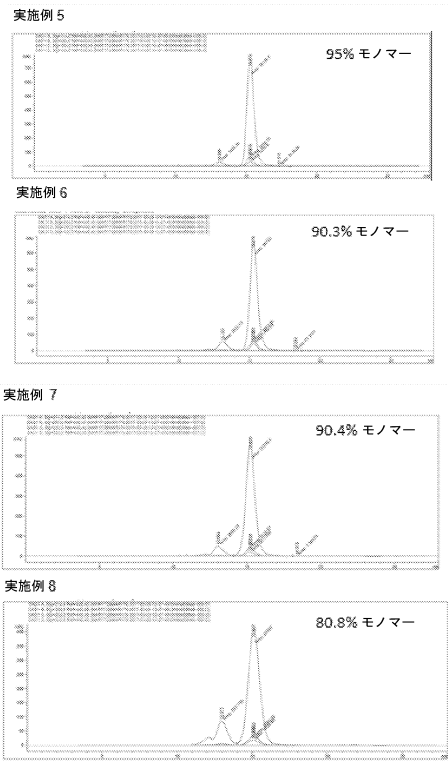


図 3 (続き)

10

20

30

40

50

【図 4 A - C】

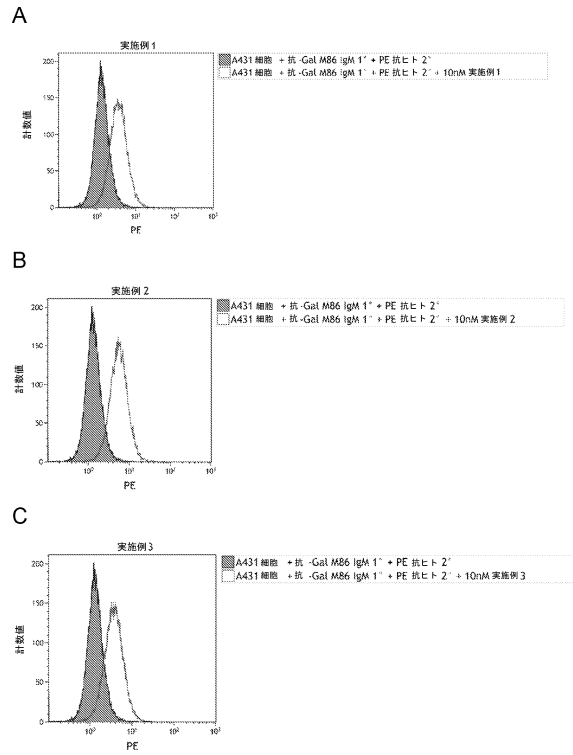


図 4

【図 4 D - F】

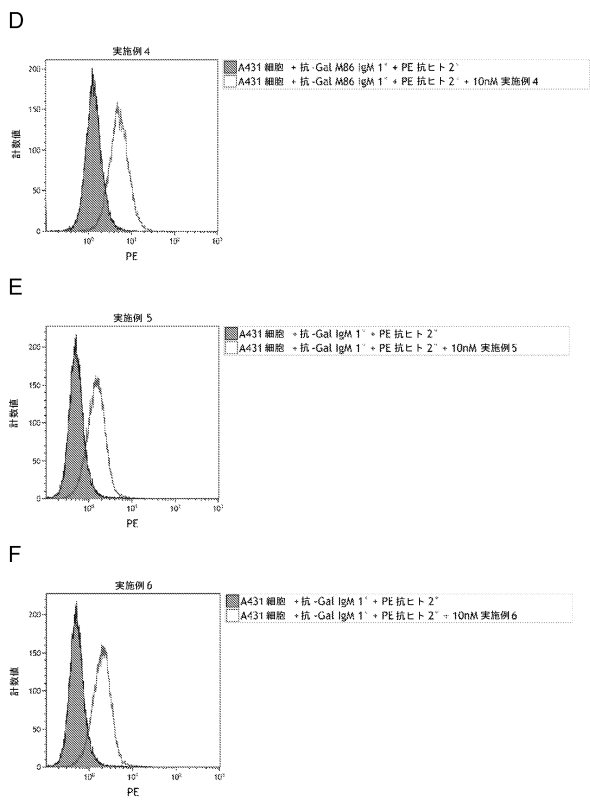


図 4 (続き)

【図 4 G - H】

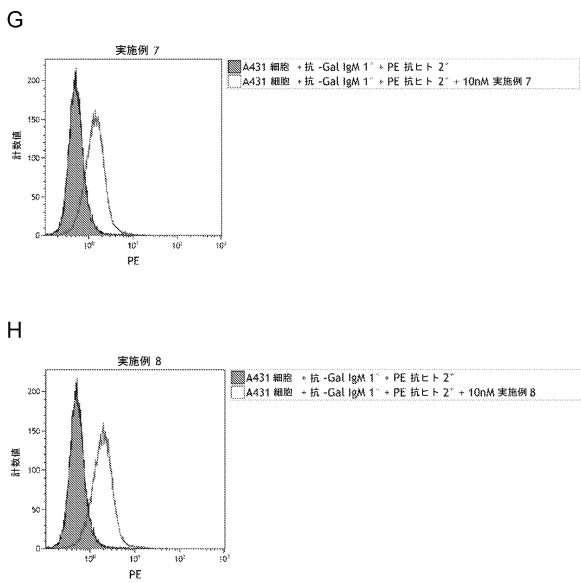


図 4 (続き)

【図 5 A - B】

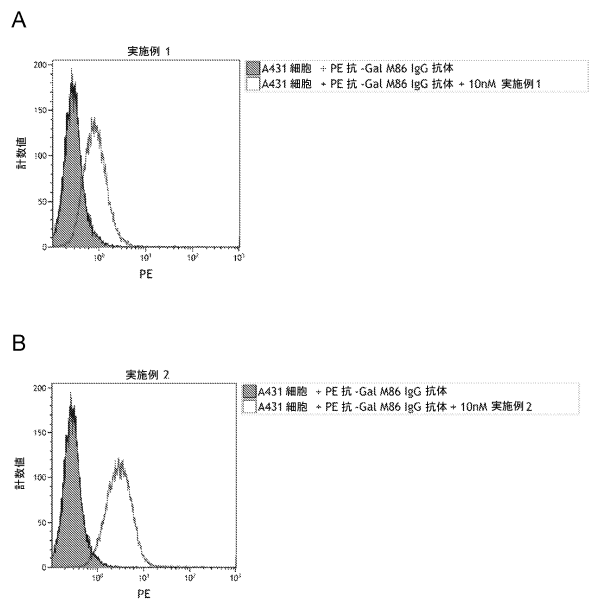
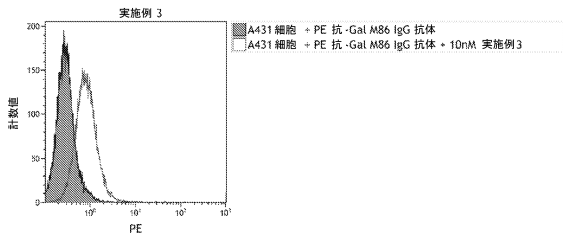


図 5

【図 5 C - D】

C



D

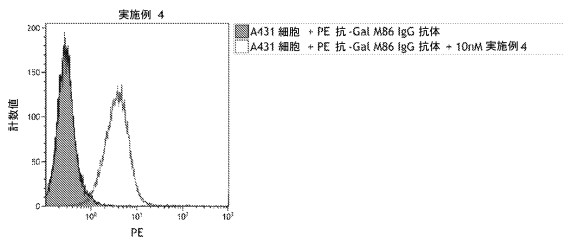
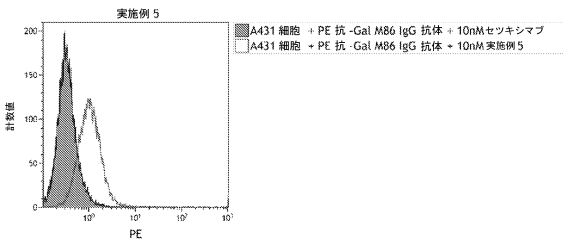


図 5 (続き)

【図 6 A - B】

A



B

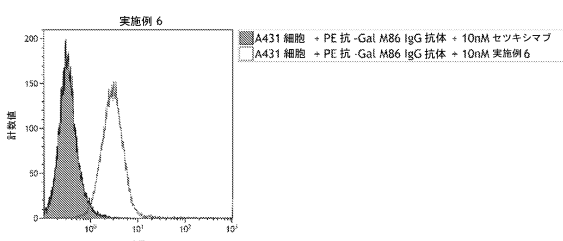
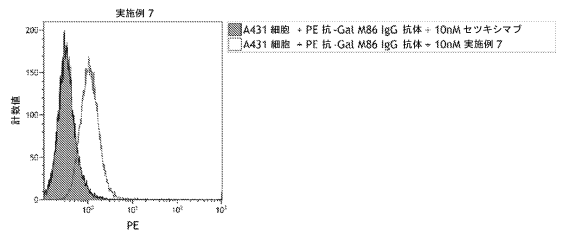


図 6

【図 6 C - D】

C



D

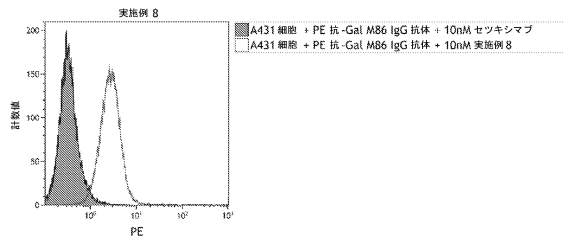
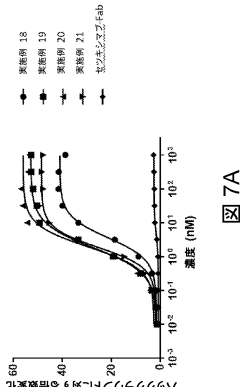
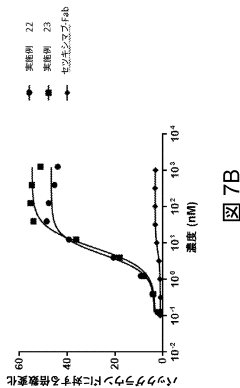


図 6 (続き)

【図 7】



10

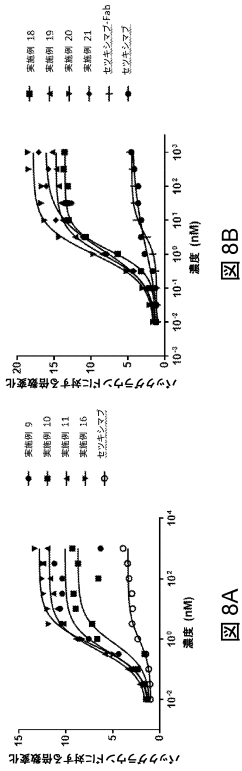
20

30

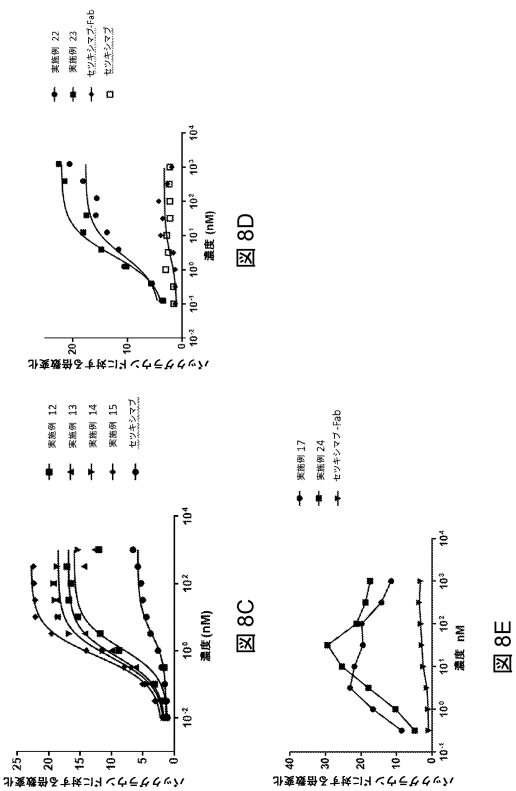
40

50

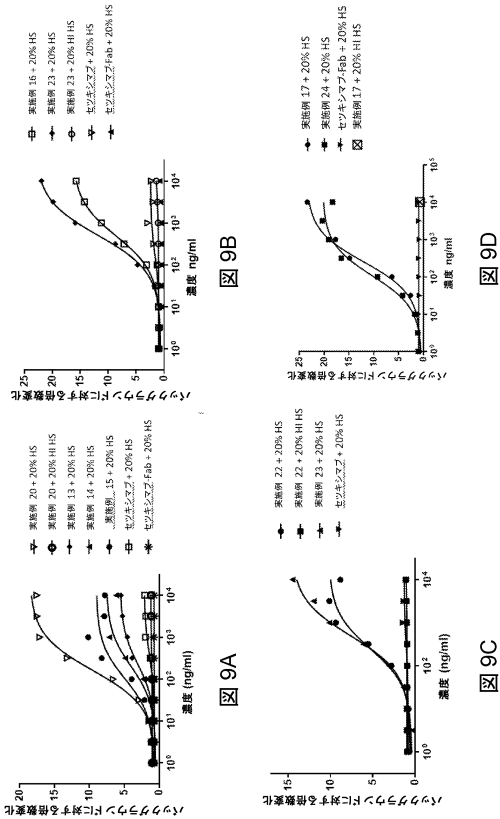
【図 8 A - B】



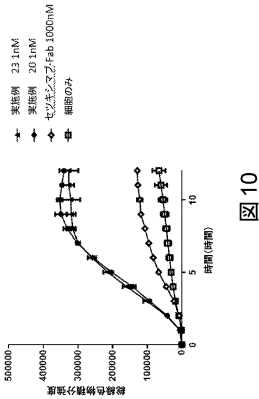
【図 8 C - E】



【図 9】



【図 10】



10

20

30

40

50

【図 1 1】

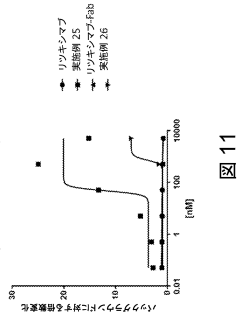


図 11

【図 1 2】

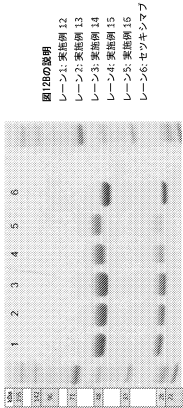


図 12B

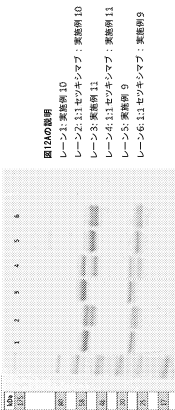


図 12A

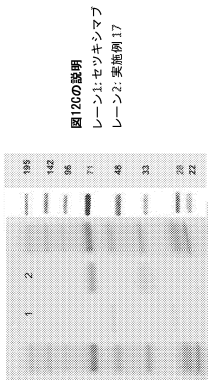


図 12C

【図 1 3 A - C】

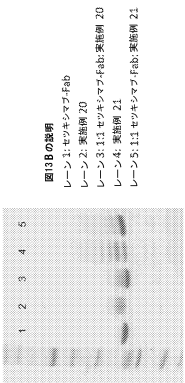


図 13B

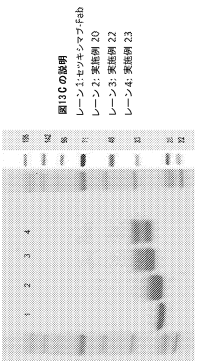


図 13C

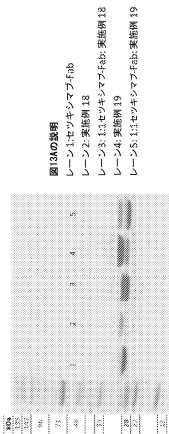


図 13A

【図 1 3 D】

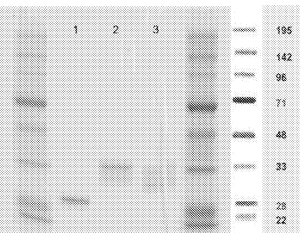


図 13D

図 13D の説明
レーン 1: リツキシマブ-Fab
レーン 2: 実施例 24
レーン 3: 実施例 20

10

20

30

40

50

【 図 1 4 A 】

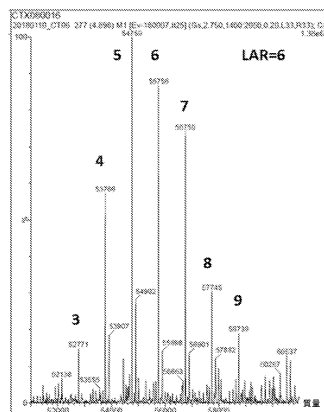


图 14A

【 図 1 4 B - C 】

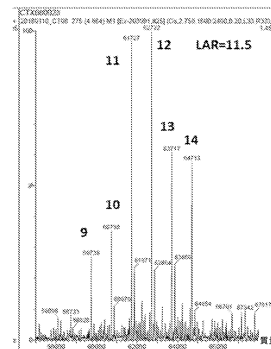


図 14B

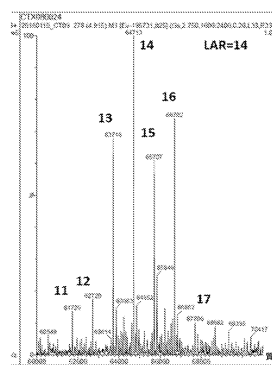
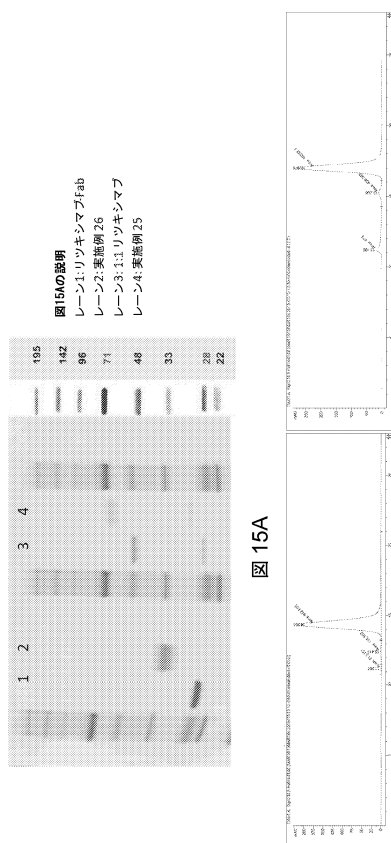


図 14C

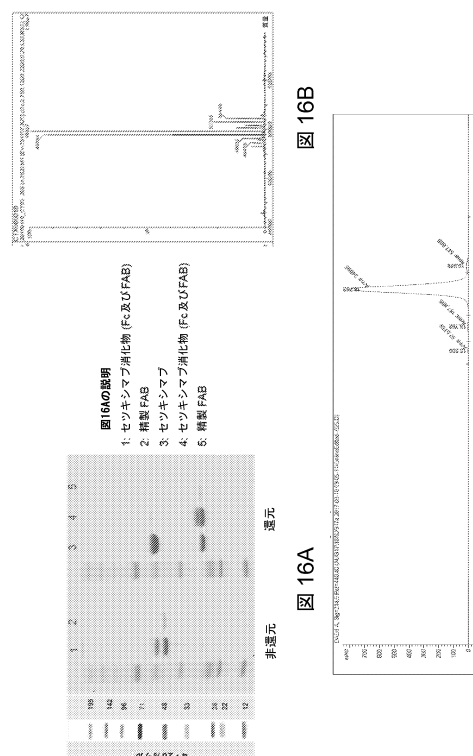
【 図 1 5 】



15C

图 15B

【 図 1 6 】

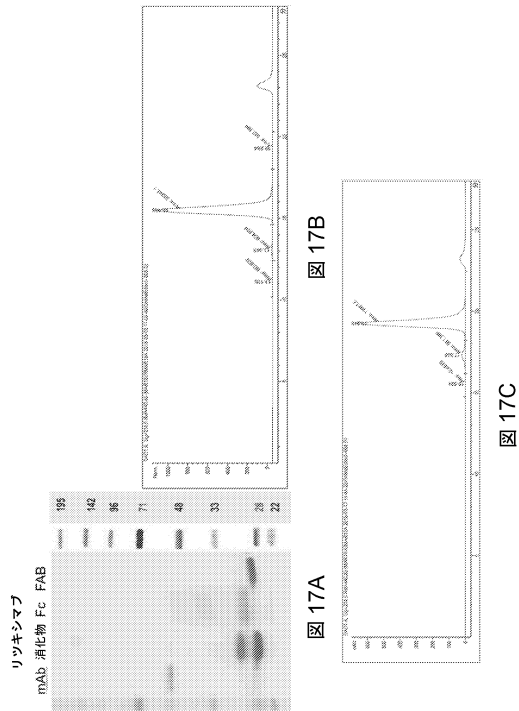


☒ 16B

図 16A

16C

【図 17】



【配列表】

0007695773000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 K	47/55	Z N A
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 K	47/56	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
			C 0 7 K	16/28	
			C 1 2 N	15/13	
			C 1 2 P	21/08	

ント サンドウィッチ ディスカバリー パーク シーノオー センタウリ セラピューティクス リミテッド

(72)発明者 クリスティン ワトソン

英国 シーティー 1 3 7 エヌディー ケント サンドウィッチ ディスカバリー パーク シーノオー センタウリ セラピューティクス リミテッド

(72)発明者 クリストファー ビックフォード

英国 シーティー 1 3 7 エヌディー ケント サンドウィッチ ディスカバリー パーク シーノオー センタウリ セラピューティクス リミテッド

合議体

審判長 中村 浩

審判官 田中 耕一郎

審判官 田中 晴絵

(56)参考文献 特表 2 0 0 1 - 5 1 2 4 3 8 号公報 (J P , A)

特表 2 0 0 7 - 5 2 7 4 1 9 号公報 (J P , A)

特許第 7 0 6 5 7 7 5 (J P , B 1)

J. Org. Chem., 1981, vol. 46, no. 20, pp. 3949-3953

J. Indian Chem. Soc., 1987, vol. 64, no. 1, pp. 34-37

Il Farmaco Ed. Sc., 1973, vol. 28, no. 7, pp. 511-522

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C12N15/00-15/90

C07K1/00-19/00

JSTPlus/ JMEDPlus/ JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)