

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-524363
(P2024-524363A)

(43)公表日 令和6年7月5日(2024.7.5)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	39/385 (2006.01)	A 6 1 K	39/385	4 C 0 8 5	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全140頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-580402(P2023-580402)	(71)出願人	516205959		
(86)(22)出願日	令和4年6月28日(2022.6.28)		ビヨンディス・ビー・ブイ.		
(85)翻訳文提出日	令和6年2月26日(2024.2.26)		Byondis B. V.		
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/067693		オランダ国、エヌエルー 6 5 4 5 シー		
(87)国際公開番号	WO2023/275025		エム・ナイメーヘン、ミクロベーク 2 2		
(87)国際公開日	令和5年1月5日(2023.1.5)		Microweg 2 2, NL-6 5 4		
(31)優先権主張番号	21182160.8		5 CM Nijmegen, Netherlands		
(32)優先日	令和3年6月28日(2021.6.28)	(74)代理人	110003708		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		弁理士法人鈴榮特許総合事務所		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(72)発明者	エルヘルスマ、ロナルド・クリスティアン		
			オン		
			オランダ国、6 5 4 5 シーエム・ナイ		
			メーヘン、ミクロベーク 2 2		
		(72)発明者	パールブル、デニス・クリスティアン・		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 ホスホ抗原を含む複合体及び治療における使用

(57)【要約】

本発明は、ホスホ抗原と結合したターゲティング部分を含む新規の複合体、並びに疾患、例えば、がん、感染性疾患及び自己免疫疾患の治療における、必要に応じて他の治療剤と併用する、その使用に関する。ターゲティング部分は、抗体又はその結合断片であってもよい。ホスホ抗原は、プロドラッグであってもよい。さらに、本発明は、複合体の製造で使用するホスホ抗原を含むリンカー薬物化合物及び前記免疫複合体を含む医薬組成物に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫調節部分と共有結合したターゲティング部分を含む複合体であって、前記免疫調節部分がホスホ抗原である、複合体。

【請求項 2】

前記ターゲティング部分が腫瘍ターゲティング抗体又はその抗原結合断片である、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 3】

前記ホスホ抗原が、ピロホスフェート、ピロホスホネート、ビスホスホネート、モノホスフェート若しくはモノホスホネート又はそのプロドラッグであり、かつ、アシルアルコ

10

【請求項 4】

前記ターゲティング部分が連結部分を介して前記ホスホ抗原と結合している、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 5】

式 I :

$$T^m - (L - (pAg)_x)_y \quad (I)$$

(式中、

T^m は、ターゲティング部分を表し、

L は、連結部分を表し、

pAg は、ホスホ抗原を表し、

x は、連結部分あたりのホスホ抗原の数を表し、かつ 1 ～ 5 の整数であり、

y は、 T^m (ターゲティング部分) あたりの $L - (pAg)_x$ の数を表し、かつ 1 ～ 10 である)

で表される、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 6】

y が 1 ～ 8 である、請求項 5 に記載の複合体。

【請求項 7】

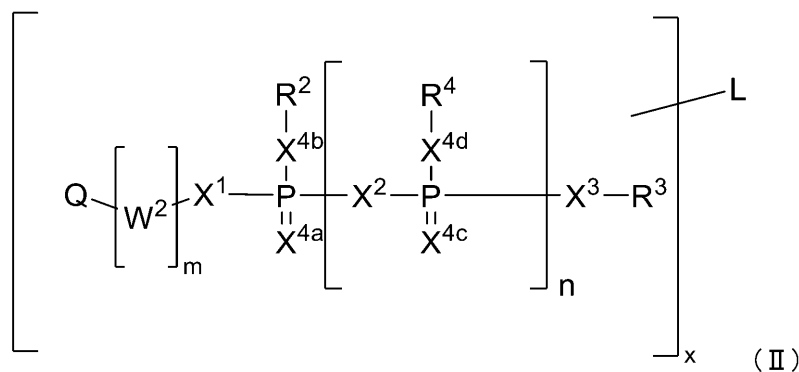
前記連結部分が切断可能なリンカーを含む、請求項 4 ～ 6 のいずれか一項に記載の複合体。

30

【請求項 8】

式 (II) :

【化 1】



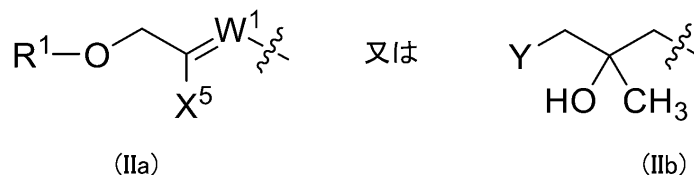
40

(式中、

Q は、式 II a 又は式 II b :

50

【化 2】



で示す構造であり；

Y はハロゲンであり；

W¹ は、N、CH 又は CF、好ましくは CH であり；

W² は、CH₂、CHF、CF₂ 又は O であり；

X¹ は、O、S、NH、CH₂、CHF 又は CF₂ であり；

X² は、O、CH₂、CHF 又は CF₂ であり；

X³ は、存在しないか又は O 若しくは NH であり；

X^{4 a ~ d} は、それぞれ独立して O 及び S から選択され；

X⁵ は、CH₃、CH₂F、CHF₂、CF₃ 又は CCl₃ であり；

x は、1 ~ 5 の整数であり；

m は、1、2 又は 3 であり；

n は、0、1 又は 2 であり；

R¹ は、H、又は、連結部分（L）若しくはプロドラッグ部分との接続部であり；

R² は、H、又は、連結部分（L）、Cat+ 若しくはプロドラッグ部分との接続部であり；

R³ は、H、又は、連結部分（L）、Cat+ 若しくはプロドラッグ部分との接続部であり；

R⁴ は、H、又は、連結部分（L）、Cat+ 若しくはプロドラッグ部分との接続部であり；

n が 0 である場合、R³ と R² は C₁ ~ 6（ヘテロ）アルキル基によって接続しており；

n が 1 又は 2 である場合、R³ と R⁴ は C₁ ~ 6（ヘテロ）アルキル基によって接続している）

で表される構造を有する、連結部分（L）と共有結合した 1 個以上のホスホ抗原を含むリンカー-薬物化合物。

【請求項 9】

Q が式 I I a で示す構造である、請求項 8 に記載のリンカー-薬物化合物。

【請求項 10】

W¹ が CH であり、X⁵ が CH₃ であり、R¹ が H 又は連結部分（L）との接続部である、請求項 9 に記載のリンカー-薬物化合物。

【請求項 11】

X³ が O であり、R³ が切断可能な連結部分との接続部であり、R¹ が H である、請求項 9 又は 10 に記載のリンカー-薬物化合物。

【請求項 12】

W² が CH₂ であり、m が 1 である、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載のリンカー-薬物化合物。

【請求項 13】

X¹ が CH₂ である、請求項 8 ~ 12 のいずれか一項に記載のリンカー-薬物化合物。

【請求項 14】

X³ が O であり、R³ が切断可能な連結部分との接続部であり、W¹ が CH であり、X⁵ が CH₃ であり、R¹ が H であり、W² が CH₂ であり、m が 1 であり、X¹ が CH₂ である、請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載のリンカー-薬物化合物。

【請求項 15】

n が 0 又は 1 であり、X^{4 a ~ b} 及び X^{4 c ~ d}（存在する場合）が O であり、R² 及び

10

20

30

40

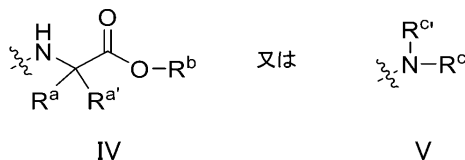
50

【請求項 16】

ー ピバロイルオキシメチル（POM）基及びイソプロピルオキシカルボニルオキシメチル（POC）基、

一 式 I V 又は式 V :

【化 3】



10

(式中；

R^b は、H、ベンジル又は置換若しくは非置換 (C₁ ~ 8) アルキルであり、

20

で示す構造、

からなる群から選択されるプロドラッグ部分である、請求項 8 に記載のリンカー-薬物化合物。

【請求項 17】

R² 及び R³ が、POM基及びPOC基から独立して選択される、請求項16に記載のリンカー-薬物化合物。

【請求項 18】

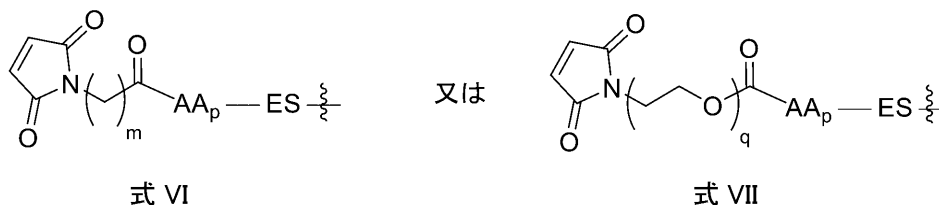
n が 0 であり、R² が置換若しくは非置換の 5 員環若しくは 6 員環（ヘテロ）アリール基で、R³ が式 I V 若しくは式 V で示す構造であるか、又はその逆である、請求項 16 に記載のリンカー—薬物化合物。

30

【請求項 19】

前記連結部分 (L) が、式 V I 又は式 V I I :

【化 4】



40

(式中、

mは1～10の整数、好ましくは5であり；

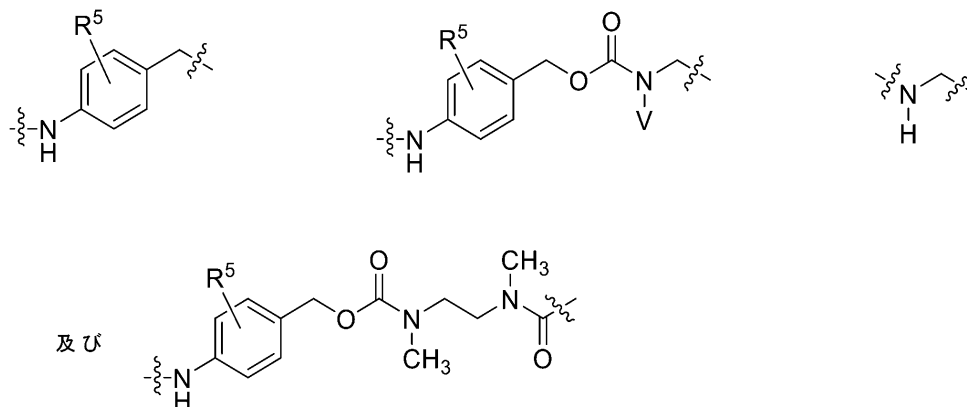
A Aはアミノ酸、好ましくは天然アミノ酸であり；

p は、 $0、1、2、3$ 又は 4 であり；

q は $1 \sim 12$ の整数、好ましくは 2 であり；

ES は、存在しないか、又は以下から選択される延長スパーサーである：

【化 5】



10

(式中、 R^4 は、H、ハロゲン、 CF_3 、 $C_1 \sim 4$ アルキル、 $C_2 \sim 4$ アルケニル、 $C_2 \sim 4$ アルキニル、 $C_1 \sim 4$ アルコキシル又は $C_1 \sim 4$ アルキルチオ、好ましくは H、F、 CH_3 、 CF_3 、より好ましくは H 又は F であり；

V は、H、エチル、 $-(CH_2CH_2O)_p-O Me$ 、 $CH_2CH_2SO_2Me$ 又は $CH_2CH_2N(Me)_2$ であり；

p は 1 ～ 12 の整数である)

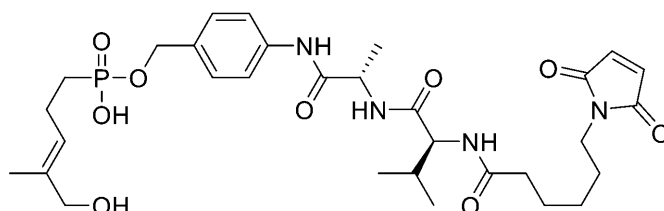
で示す構造を含む、請求項 8 ～ 18 のいずれか一項に記載のリンカー－薬物化合物。

20

【請求項 20】

以下の構造

【化 6】



XD18

30

を有する、請求項 8 に記載のリンカー－薬物化合物。

【請求項 21】

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の複合体の製造における、請求項 8 ～ 20 のいずれか一項に記載のリンカー－薬物化合物の使用。

【請求項 22】

医薬品として使用するための、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 23】

がん、自己免疫疾患又は感染症を治療するための、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の複合体。

40

【請求項 24】

請求項 8 ～ 20 のいずれか一項に記載のリンカー－薬物化合物と複合化された、腫瘍ターゲットング抗体又はその抗原結合断片を含む、複合体。

【請求項 25】

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の複合体及び 1 つ以上の薬学的添加剤を含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ホスホ抗原 (phosphoantigen) と結合したターゲットング部分、例えば

50

抗体又はその結合断片、を含む新規の複合体、並びに、がん、感染性疾患及び自己免疫疾患といった疾患の治療における、必要に応じて他の治療剤と併用する、その使用に関する。さらに、本発明は、前記複合体の製造に使用するためのホスホ抗原を含むリンカー—薬物化合物及び前記免疫複合体を含む医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

がんを治療するための通常の方法は、手術、細胞毒性剤による化学療法及び放射線療法又はこれらの組合せを含む。細胞毒性剤又は放射線照射による治療は、その毒性及び非特異的性質のために、重篤な副作用をもたらす場合が多い。新生物細胞の根絶において、免疫系が重要な役割を果たすことが発見されたので、最近のがん治療は、がんを治療するためのツールとして免疫系の構成要素を用いることを目指している。

10

【0003】

がんの免疫療法の一つのアプローチは、がん患者において抗腫瘍免疫応答を活性化することを目指して、「免疫チェックポイント」、例えば、Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）又はプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）をターゲットすることである。CTLA-4とPD-1は、いずれも、免疫細胞の活性化を制限するように機能する負のフィードバック系に関連するタンパク質である。腫瘍細胞は、その表面に免疫チェックポイントリガンドを過剰発現することにより、この抑制機構を「悪用して」、免疫系の細胞による攻撃から自らを保護し、免疫系から逃避できる。免疫チェックポイントの、そのリガンドとの相互作用による活性化は、T細胞の不活性化と疲弊をもたらす。免疫チェックポイント阻害剤、例えば、免疫チェックポイント又はそのリガンドと結合する抗体は、がん細胞上に過剰発現した免疫チェックポイントをブロックする新しい抗がん薬である。認可された免疫チェックポイント阻害剤の例は、メラノーマの治療のために2011年に認可されたイピリムマブ（CTLA-4をブロック；商品名ヤーボイ（登録商標）、BMSが製造）、PD-1抗体ニボルマブ（商品名オプジーボ（登録商標）で販売され、BMSが開発）、及びペムブロリズマブ（商品名キイトルーダ（登録商標）、別のPD-1阻害剤、Merckが製造）である。チェックポイント阻害剤は抗腫瘍応答を再活性化できるが、活性化された免疫細胞は、正常組織も攻撃でき、免疫学的に有害な副作用をもたらす。

20

【0004】

がん治療への別のアプローチは、抗体薬物複合体（ADC）の使用を含む。ADCは、腫瘍特異的抗原に対するモノクローナル抗体の特異性を、化学的な細胞毒性剤の細胞殺傷活性と組み合わせる。ADCの抗体は、ターゲティング剤及び細胞毒性ペイロードの運搬体として働く。抗体が標的と結合すると、細胞毒性ペイロードと結合したADCが、標的である腫瘍細胞に効率的に取り込まれる。細胞毒性ペイロードは、リンカーを介して抗体上へグラフトされた細胞毒性剤の不活性前駆体（プロドラッグ）であってもよく、リンカーは、血液中では安定で、腫瘍細胞の内部へ取り込まれた後、例えば細胞内プロテアーゼによって切断される。リンカーの切断は、腫瘍細胞においてペイロードの活性な細胞毒性型の放出を引き起こす可能性がある。ADCは、健康な組織への毒性と非特異的副作用を大幅に軽減できるという利点がある。臨床的に認可されているADCには、ゲムツズマブ（抗CD33）オゾガマイシン（マイロターゲット（登録商標）；Wyeth Pharmaceuticals、Pfizerの子会社）、ブレンツキシマブ（抗CD30）ベドチン（アドセトリス（登録商標）；Seattle Genetics/Millennium Pharmaceuticals）、（アドー）トラスツズマブ（抗HER2）エムタンシン（Kadcyla（登録商標）；Genentech/Roche）、イノツズマブ（抗CD22）オゾガマイシン（ベスポンサ（登録商標）；Wyeth Pharmaceuticals、Pfizerの子会社）、エンホルツマブ（抗ネクチン-4）ベドチン（パドセブ（商標）；Astellas Pharma/Seattle Genetics）、ファムートラスツズマブデルクステカン（エンハーツ（登録商標）；Daiichi Sankyo/AstraZeneca）、ポラツズマブ（抗CD79b）ベドチン（ポライビー（商標）；Genentech/Roche）、及びサシツズマブ（抗TROP-2）ゴビテカン（トロデルビー（Trodelvy）（商標）；

30

40

50

Immunomedics) が含まれる。更に多くが臨床開発中である。

【0005】

がん治療への更に別のアプローチは、免疫系、特にT細胞を活性化して、腫瘍細胞を攻撃して破壊する治療用化合物を用いる免疫療法である。そのような治療用化合物は、免疫細胞受容体のアゴニストであってもよく、大きな分子又は相対的に小さい化学構造であってもよい。そのような化合物の例は、トール様受容体 (TLR) を活性化するリガンドである。いくつかのTLRリガンドが、がんの治療で認可されている。最初に認可されたTLRリガンド (TLRアゴニスト) は、バチルスカルメット・ゲラン (BCG) と呼ばれるマイコバクテリウム・ボビス (*Mycobacterium bovis*) の弱毒株の一部である。最初、結核ワクチンとして開発されたBCGは、活性TLR2/4リガンドを含有し、膀胱がんの治療に用いられている。他の認可されたTLRリガンドは、TLR4リガンドのモノホスホリル脂質A (MPLA) 及び低分子TLR7アゴニストのイミキモド、イミダゾキノリンである。

【0006】

TLRリガンドは免疫複合体としても用いられている。そのような免疫複合体は、腫瘍微小環境における免疫系細胞の局所での活性化の誘導を目的として、TLRリガンドについてのターゲティング媒体として、腫瘍抗原に対して特異的な抗体を含む。TLRアゴニストが抗HER抗体と連結した、乳がんを治療するための免疫複合体は、国際公開第2017/072662号 (Novartis A.G.) に記載されている。TLR8アゴニストペイロードを有する抗HER複合体は、Silverback Therapeutics (ImmunoTAC (商標) SBT6050) により開発された。Bolt Therapeutics (国際公開第2020/047187号) 及びAckerman et al., 2021, Nature Cancer, , Vol. 2(8), 18-33も、TLR7/8アゴニスト (T785) と切断不可能なリンカーを介して複合化された腫瘍ターゲティングモノクローナル抗体を含むTLR免疫複合体を記載する；腫瘍抗原と結合した腫瘍ターゲティング抗体は、Fcエフェクター機能によって、腫瘍微小環境 (TME) に存在する抗原提示細胞を活性化し、一方、抗体と結合したTLRアゴニストは、そのTLR受容体を介してAPCを直接的に刺激し、これにより抗腫瘍免疫を促進する。

【0007】

がん細胞に対して細胞毒性を示すことが知られたT細胞の特定のサブセットは、 $\gamma\delta$ T細胞 (γ 鎖及び δ 鎖で構成されたT細胞受容体 (TCR) を有するT細胞) である。 $\gamma\delta$ T細胞は、感染及び腫瘍細胞への迅速な自然免疫応答を生じる能力により、Tリンパ球の独特なサブセットと考えられている。腫瘍浸潤 $\gamma\delta$ T細胞は、多くの異なる悪性腫瘍で見いだされた (Gentles et al., Nature Medicine, 2015, 21(8), 938-945)。 $\gamma\delta$ T細胞、又はより具体的には、 $\gamma\delta$ T細胞の主要なサブセットを形成する $V\gamma9V\delta2$ T細胞は、「ホスホ抗原」として知られた特定の抗原セットによって活性化される。天然に存在するホスホ抗原は、低分子アルキルピロホスフェート、例えば、4-ヒドロキシ-3-メチル-ブター-2-エニル-ピロホスフェート (HMBPP) 及びイソペンテニルピロホスフェート (IPP) である。これらの天然ホスホ抗原は病原性細胞が産生し、HMBPPはIPPの直接前駆体である (HMBPPは、ヒトでは存在しない病原性ホスフェート抗原である)。細菌及び寄生生物は、非メバロン酸経路 (MEP) 経路又は2-C-メチル-D-エリスリトール 4-ホスフェート/1-デオキシ-D-キシルロース 5-ホスフェート (MEP/DOXP) 経路でイソプレノイド前駆体を産生し、結果として、イソプレノイド前駆体IPPの生合成が可能である。ヒトでは、pAg産生はメバロン酸経路によって駆動される。

【0008】

TLRアゴニストとは対照的に、ホスホ抗原は、骨髄細胞又はT細胞上に提示された受容体と直接的には作用しない。細胞内 (例、がん細胞内) において、ホスホ抗原と、細胞表面分子であるブチロフィリン3A1 (BTN3A1) の細胞内ドメインが結合すると、BTN3A1複合体の細胞外部分の立体構造の変化を引き起こすと考えられ、BTN2A1も同様と考えられる (Sandstrom A, et al., 2014, Immunity, 40(4), 490-50

10

20

30

40

50

0, doi: 10.1016/j.immuni.2014.03.003)。

【0009】

細胞外BTN3A1／BTN2A1複合体の立体構造の変化は、 $\gamma\delta$ TCRとの結合を生じ、活性化 $\gamma\delta$ T細胞によるサイトカイン産生及び腫瘍／病原性細胞の殺傷をもたらす(Rigau et al., Science, 2020, 367, 642)。したがって、治療剤としてホスホ抗原を用いる $\gamma\delta$ T細胞の活性化は間接的である；ホスホ抗原は、細胞(例、腫瘍細胞又は感染細胞)内から作用して、前記細胞表面の細胞外BTN3A1／BTN2A1複合体の立体構造を変化させ、次に、 $\gamma\delta$ T細胞上の $\gamma\delta$ TCRに活性化シグナルを伝える。そして、 $\gamma\delta$ T細胞は、腫瘍細胞又は感染細胞に対し細胞殺傷効果を発揮する。

【0010】

ピロホスフェートHMBPPは、薬物動態学的特性が悪い(血漿中で急速に加水分解される)ため、(窒素性)ビスホスホネート類似体、加えて(モノホスフェート)プロドラッグ型(対象へ投与された後、活性なホスホ抗原へ変換される)が開発されている。ホスホ抗原プロドラッグにおいて、ホスホネート基の負荷電の非結合酸素原子は、例えば細胞膜中への拡散を増加させるために、中性基で保護されている。当該保護基は細胞内に入ると除去され、活性ホスホ抗原を放出する。ホスホ抗原(特に、ビスホスホネートホスホ抗原)の半減期を向上させるための別のアプローチは、国際公開第2012/042024号に記載されている。ホスホ抗原は、送達媒体としての役割を果たす無機ナノ粒子及び脂質ナノベクターと複合体化された。生じたナノ粒子は、特定の細胞を標的とするためにその表面においてターゲティングリガンドでコーティングできるとされた。その例には、抗体のようながん細胞へのターゲティングを誘導する分子が含まれる。ヒトトランスフェリンの使用が例示された。

【0011】

ホスホ抗原は、対象への投与のために、in vivoで、又は抗原提示細胞と共にin vitroで $\gamma\delta$ T細胞を増殖させることで、 $\gamma\delta$ T細胞の腫瘍細胞への細胞毒性の向上を目的として、がん治療での使用について試験されている。BrHPP(ホスホスチム(Phosphostim)、Innate Pharmaが製造)及びゾレドロネート(Zoledronate)(Novartis)といった合成ホスホ抗原が、がんの患者における臨床試験の対象物になっている。試験の対象であるホスホ抗原は、受け入れられる安全性プロファイルを示した。しかし、それらの効力は、全般的に十分ではなかった(Sebestyen et al., Nature Reviews Drug Discovery, 2020, 19(3), 169-184)。

【0012】

そのような治療のための受け入れられる治療可能時間域／治療濃度域を見いだすことは、ブチロフィリン(BTN3A1／BTN2A1)複合体を(過剰)発現する細胞、例えば腫瘍細胞又は病原性細胞へホスホ抗原を送達するための、より強力で、選択的で、効果的な方法によって、大幅に向上する可能性がある。

【発明の概要】

【0013】

本発明は、例えば、がんの治療においてホスホ抗原を用いるより効果的で選択的な方法を提供する。本発明は、免疫調節部分と共有結合したターゲティング部分を含む複合体であって、免疫調節部分がホスホ抗原(pAg)である複合体に関する。好ましくは、ターゲティング部分は、腫瘍ターゲティング抗体又はその抗原結合断片である。そのような複合体は、がん、感染症、自己免疫疾患といった疾患の治療において、 $\gamma\delta$ T細胞を活性化するために使用できる。本発明の複合体は、単独で、又は他の治療剤と併用して使用できる。

【0014】

好ましくは、本発明の複合体は、ターゲティング部分として腫瘍ターゲティング抗体又はその抗原結合断片を含む免疫複合体である。ターゲティング部分として腫瘍ターゲティング抗体を含む本発明の複合体は、ホスホ抗原を局在した腫瘍細胞へ特異的に送達するために使用でき、それらは、抗体又はその抗原結合断片が腫瘍特異的抗原又は腫瘍関連抗原

10

20

30

40

50

(TAA)と結合した後、腫瘍細胞内に取り込まれてもよい。本発明はまた、本発明の複合体の製造で使用するリンカー-薬物化合物であって、「薬物」がホスホ抗原であるリンカー-薬物化合物を提供する。さらに、本発明は、本発明の複合体及び1以上の薬学的添加剤を含む医薬組成物を提供する。本発明の複合体は、例えば、がんの治療のための薬剤として用いてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】さまざまな免疫細胞集団を識別するFCC／ゲーティングストラテジー。まず、時間ゲートを適用して一定の流れを確保した(A)。引き続き、FSC-A対FSC-Hプロット(B)及びSSC-A対SSC-Hプロット(C)で、リンパ球ダブレットを除外した。その後、生存細胞を選択し(D)、続いて、リンパ球を選択した(E)。その後、CD3陰性CD56陽性細胞をNK細胞として同定した(F)。CD3陽性細胞を、Vd2陽性細胞とVd1陽性細胞に分けた(G)。CD3陽性Vd2陰性Vd1陰性リンパ球も、CD8陽性細胞傷害性T細胞に細分した(H)。

10

【図2】Vδ2γδT細胞によるCD107a(図2A)又はIFNγ(図2C)の産生。活性化のレベルは、IFNγ⁺又はCD107a⁺であるVδ2γδT細胞の割合で示す。測定は、4人の健康なドナーで実施し、全てのドナーのVδ2γδT細胞集団について示す。(図2及び4のいくつかのグラフでは、「IFNγ」を「IFNγ」と記載)1人の代表するドナーについて、CD107a⁺産生(図2B)及びIFNγ産生(図2D)を、さまざまな濃度のプロドラッグ／HMBPP(M)で前処理したRaji細胞と共培養した全PBMCからゲーティングされたNK細胞、Vδ1γδT細胞、又はCD8⁺T細胞に関して示した。

20

【図3】PHAで活性化した、Vδ2γδT細胞(A、I)、NK細胞(B、J)、Vδ1γδT細胞(C、K)、及びCD8⁺T細胞(D、L)のCD107a若しくはIFNγ産生、又は、刺激していない、Vδ2γδT細胞(E、M)、NK細胞(F、N)、Vδ1γδT細胞(G、O)、及びCD8⁺T細胞(H、P)のCD107a若しくはIFNγ産生。FACSプロットは、代表する健康なドナーのCD107a(A~H)又はIFNγ(I~P)プロファイルを示す。

【図4】さまざまな濃度のADC又はリツキシマブで前処理したRaji細胞とPBMCの共培養後の、ゲーティング化Vδ2γδT細胞(A、E)、NK細胞(B、F)、Vδ1γδT細胞(C、G)、及びCD8⁺T細胞(D、H)によるCD107a(A~D)及びIFNγ(E~H)産生。活性化のレベルは、IFNγ⁺又はCD107a⁺の免疫細胞サブセットの割合で示す。測定は、3人(ADC-XD13-r、ADC-XD13-i)又は4人(ADC-XC4-r、ADC-XC4-i、ADC-XD4-r、ADC-XD4-i、リツキシマブ)の健康なドナーで実施した。結果は、1人の代表するドナーについて示す。

30

【図5】ADC又はリツキシマブで処理したRaji細胞との共培養後のVδ2γδT細胞の、CD107a(A、C、E)又はIFNγ(B、D、F)産生の、EC50(A~B)、Vδ2γδT細胞陽性の最大の割合(C~D)、及び蛍光強度中央値(MFI、E~F)。MFIは、CD107a⁺又はIFNγ⁺Vδ2γδT細胞で求めた。測定は、3人(ADC-XD13-r)又は4人(ADC-XC4-r、ADC-XD4-r、リツキシマブ)の健康なドナーで実施し、各記号は、個々のドナーを表す。

40

【図6】ADC-XC4-r(A)、ADC-XD4-r(B)、ADC-XD13-r(C)、リツキシマブ(D)で前処理したRaji細胞と共培養した、電子的ゲーティング化Vδ2γδT細胞の代表的なIFNγ／CD107aプロファイル。

【図7】6日間のインキュベーション後に測定したRaji細胞生存に対する、リツキシマブ、ゾレドロネート、HMBPP、pAg複合体、又は陽性対照としてのデュオカルマイシンの直接的効果。デュオカルマイシンを陽性対照として用いた。(A)さまざまな濃度の化合物をRaji細胞とインキュベートし、細胞死を確認した。対照及び遊離薬物は1つのグラフに示し、異なるpAg複合体は、読みやすさのために3つのグラフに分けた

50

。(B)最も高いpAg複合体又はリツキシマブ(濃度10 μ g/mL)の細胞生存率(%)の概要。

【図8】さまざまな濃度のpAg複合体又はリツキシマブで前処理したRaji細胞とPBMCの共培養後の、ゲーティング化V δ 2 γ δ T細胞によるCD107a産生。活性化のレベルは、CD107a+である免疫細胞サブセットの割合で示す。測定は、健康なドナーで実施した。各プロットは異なる実験を表し、各文字は用いられたドナーを示す。同じドナーを2つの異なる実験において試験した場合、「-1」又は「-2」で示した。

【図9】さまざまな濃度のpAg複合体又はリツキシマブで前処理したRaji細胞とPBMCの共培養後の、ゲーティング化V δ 2 γ δ T細胞によるCD107a(A、D、G)、IFN γ (B、E、H)及びTNF α (C、F、I)産生。箱ひげ図は、EC₅₀(A、B、C)、細胞活性化率(%) (D、E、F)又は蛍光強度中央値(MFI、G、H、I)を示す。箱ひげ図(D~I)中のドットは平均値を表す。表5~表10をグラフで表示したものである。全ての実験で、TNF α 産生を検討しなかった点に留意されたい。

【図10】pAg複合体で前処理したRaji細胞と共培養した γ δ T細胞による、CD107a産生とIFN γ 産生(EC₅₀、%活性、及びMFI)の間の相関。pAg複合体の活性は、異なるドナーでの異なる実験で試験し、幾何平均EC₅₀(A)又は平均活性化率(B)、及び「蛍光強度中央値」の平均(MFI、C)を、各pAg複合体について計算した。CD107aとIFN γ の、EC₅₀、活性化率及びMFIの間の相関をプロットした。リツキシマブは点線で示した。

【図11】ADC-XD65-r、ADC₈-XD65-r又はリツキシマブで前処理したRaji細胞との共培養後のCD107a(A、D)、IFN γ (B、E)及びTNF α (C、F)の、EC₅₀(A~C)及び陽性V δ 2 γ δ T細胞の最大割合(D~F)。測定は2人の健康なドナーで実施した。

【図12】pAg複合体で前処理したRaji細胞のV δ 2 γ δ T細胞による殺傷。Raji細胞は、化合物なし(エフェクター+標的; E+T; 灰色の四角形)、HMBPP(+記号)、又は、さまざまな濃度のADC-XD18-r(黒色の丸)、ADC-XD18-i(白抜きの丸、点線)若しくはリツキシマブ(灰色の菱形)で、16時間前処理し、続いて、増殖V δ 2 γ δ T細胞と1時間共培養した。その後、Raji細胞の殺傷を、フローサイトメトリーを用いて評価した。(A)ドナー由来の増殖V δ 2 γ δ T細胞によるRaji細胞の用量依存的殺傷。(B)リツキシマブ効力と増殖V δ 2 γ δ T細胞上のCD16発現の間の相関。(C、D)まとめたグラフは、試験を行った全てドナーの、死んだRaji細胞の割合のEC₅₀(C)及び効力(D)を示す。

【図13】複数のCD20陽性細胞株での前処理後のADC-XD18-i、ADC-XD18-r、リツキシマブ及びHMBPPのV δ 2 γ δ T細胞に対する活性。(A)HMBPPで前処理した細胞株との共培養後のCD107a陽性V δ 2 γ δ T細胞の割合。(B~F)さまざまな濃度のADC-XD18-i、ADC-XD18-r又はリツキシマブで前処理した細胞株との共培養後のCD107a陽性V δ 2 γ δ T細胞の割合。全ての実験は、グラフに示す2人の健康なドナーで実施した。

【図14】さまざまな濃度のADC-XD18-t、ADC-XD18-i又はトラスツズマブで前処理した、BT-474(A、E、I)、SK-BR-3(B、F、J)、SK-OV-3(C、G、K)又はHCT-116細胞(D、H、L)との共培養後の、CD107a(A~D)、IFN γ (E~H)又はTNF α (I~L)を産生するV δ 2 γ δ T細胞の割合。結果は、2人(BT-474、SK-OV-3、及びHCT-116)及び4人(SK-BR-3)から、1人の代表するドナーについて示している。

【図15】pAg複合体又はトラスツズマブで処理した細胞株との6時間の共培養後のV δ 2 γ δ T細胞のCD107a(A、D)、IFN γ (B、E)又はTNF α (C、F)産生のEC₅₀(A~C)及び効力(D~F)。各記号は健康なドナーを表し、幾何平均(A~C)又は平均(D~F)を示している。

【図16】HMBPPで前処理した細胞株との6時間の共培養後のCD107a陽性(A)、IFN γ 陽性(B)又はTNF α 陽性(C)V δ 2 γ δ T細胞の割合。各記号は個々

の健康なドナーを表し、平均を示している。

【図 17】さまざまな濃度の ADC-XD18-t、ADC-XD18-i 又はトラスツズマブで前処理した、BT-474、SK-BR-3、SK-OV-3 又は HCT-116 細胞との共培養後の CD107a を産生する NK 細胞の割合。結果は、2 人 (BT-474、SK-OV-3、及び HCT-116) 及び 4 人 (SK-BR-3) から、1 人の代表するドナーについて示している。

【図 18】さまざまな濃度の pAg 複合体又は対照化合物で前処理した Raji 細胞又は MOLM-13 細胞と PBMC の共培養後の、ゲーティング化 $V\delta 2 \gamma \delta T$ 細胞による CD107a 産生。(A) HMBPP で前処理した Raji 細胞又は MOLM-13 細胞との共培養後の $V\delta 2 \gamma \delta T$ 細胞の % 活性 (CD107a)。(B~E) 前処理した Raji 細胞 (上部) 又は MOLM-13 細胞 (下部) との共培養後のさまざまな健康なドナーに由来する PBMC における $V\delta 2 \gamma \delta T$ 細胞の活性化のレベル。各プロットは、異なる実験を表し、各文字はドナーを示す。(F~H) まとめたグラフは、試験を行った全てのドナーの EC₅₀ (F)、効力 (G)、及び蛍光強度中央値 (MFI、H) を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

発明の詳細な説明

本発明では、免疫調節部分と共有結合したターゲティング部分を含む複合体であって、免疫調節部分がホスホ抗原 (pAg) 部分である、複合体を提供する。

【0017】

複合体

本発明は、免疫調節部分と共有結合したターゲティング部分を含む複合体であって、免疫調節部分がホスホ抗原 (pAg) 部分である、複合体を提供する。

【0018】

本発明の複合体は、標的細胞を特異的に結合するターゲティング部分を含む。好ましくは、ターゲティング部分は、腫瘍ターゲティング抗体又はその抗原結合断片である。ターゲティング部分は、送達媒体としての役割を果たす；それは、ターゲティング部分と共有結合した pAg を標的細胞へ送達する。pAg は、例えば (ポリペプチド) ターゲティング部分におけるアミノ酸側鎖と直接結合してもよい。好ましくは、pAg は連結部分を介してターゲティング部分と複合化される。

【0019】

本発明の好ましい複合体は、一般式 I：

$$T_m - (L - (pAg)_x)_y \quad (I)$$

(式中、Tm はターゲティング部分、好ましくは抗体又はその抗原結合断片を表し、L は連結部分を表し、pAg はホスホ抗原を表し、x は連結部分あたりのホスホ抗原の数を表し、かつ 1~5 であり、y は Tm あたりの L - (pAg)_x (ターゲティング部分あたりのリンカー部分) の平均数を表し、かつ 1~10 の整数、好ましくは 1~8 の整数である)

で表すことができる。式 I における複合体あたりの pAg の数 (Tm に対する pAg の比) は、x に y を掛けた数である。Tm に対する pAg の比の平均は、1 から、16 又は 20 若しくはそれ以上までであってもよい。ターゲティング部分あたりの pAg ユニットの比は、例えば、ホスホ抗原又はターゲティング部分のいずれかの構造的又は機能的特徴によって、変えることができる。実際、ターゲティング部分あたりの pAg の数が、2~8 若しくは 2~6、又は 2 のような少ない場合であっても、十分な治療効果を提供する可能性がある。好ましくは、連結部分は 1 個又は 2 個の pAg を有する。大半の場合、各連結部分の pAg は 1 で十分の可能性がある。好ましくは、Tm に対する標的 pAg の比は、2 (x が 1 で y が 2) である。

【0020】

リンカー部分は、好ましくは、切断可能なリンカー部分である。本発明の複合体において、直鎖状又は分枝鎖状のリンカー部分を用いてもよい。複数のホスホ抗原が 1 個のター

ゲティング部分と結合している場合、各ホスホ抗原は、別々の連結部分によってターゲット部分と共有結合してもよい。実際、ターゲット部分が抗体であり、かつ連結が還元型鎖間ジスルフィドで生じる場合、1個のターゲット部分と結合した多くても8個の別々の連結部分があってもよく、その結果、各ホスホ抗原がそれ自体の連結部分により保有される場合、ターゲット部分あたり8個のホスホ抗原を生じる。別の分枝鎖状リンカー部分では、連結部分あたり1～5個のホスホ抗原（ x が、1、2、3、4又は5）を含んでいてもよい。特に、 T_m に対する pAg の比が高いことが望まれる場合、又はターゲット部分で利用できる結合場所が限られる場合、分枝鎖状リンカーが好ましい。例えば、ターゲット部分あたりのホスホ抗原の数を増加させるために、2個の pAg （ x が2）を有する分枝鎖状リンカーを使用できる。そのような連結部分を使用することで、例えば、8個の連結部分のみで、16個のホスホ抗原をターゲット部分と結合できる。抗体は、そのアミノ酸配列中に、ジスルフィド結合を形成し、還元されてリンカー-薬物分子と複合化できるシステインを追加するように改変できる。例えば、追加のシステインは、国際公開第2015/177360号に開示されているように、例えば41C位に導入できる。連結部分が結合できる複合化に利用できるシステインを最大で10個有する抗体では、リンカーあたり2個の pAg （ x が2）を有する分枝鎖状リンカーを使用した場合、20（ x が2で y が10）以上のDARとすることができる。最適な条件下では、ターゲット部分における全ての結合部位が連結部分によって占有される。実際には複合体の混合物が生成する可能性があり、その場合、ターゲット部分あたりのホスホ抗原の正確な数は反応条件に依存して若干変化する可能性があり、 y 値は平均数である。

10

20

【0021】

ホスホ抗原を含む本発明の複合体は、それを必要としている対象へ同時に又は逐次的に投与できる他の薬学的活性化化合物と併用して用いてもよい。さらに、ターゲット部分は、ホスホ抗原及び異なるペイロードの組合せを保有してもよい。そのような「複数のペイロード」アプローチの利点は、異なる活性物質が同じターゲット部分によってターゲットされることである。ペイロード間の比はもちろん、（複合化の）反応条件及び結合部位が適切に設定されなければならない。各ペイロードについての別々のリンカー-薬物化合物は、例えば、ターゲット部分上の異なる結合部位（例、異なる型のアミノ酸）で複合化されてもよく、並びに／又は、異なるペイロードの結合、分布及び薬物抗体比（DAR）を調節するために異なる複合化方法及び／若しくは異なる化学的性質のリンカーによって複合化されてもよい。複数の細胞毒性ペイロードを有する抗体薬物複合体（ADC）は当技術分野において知られている。本発明の複合体は、ホスホ抗原を、例えば全体的な所望の治療効果を増強するようにデザインされた細胞毒性ペイロード又は別の免疫調節ペイロードと組み合わせてもよい。したがって、非標的部位でのホスホ抗原の標的ではない組織への非特異的な結合及び／又は効果が減少する。

30

【0022】

当技術分野においてよく知られているように、ADCにおける薬物の結合は、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）又は逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）によって決定できる。HICは、平均DAR（本発明の複合体における T_m に対する pAg の比）を決定するために特に適している。

40

【0023】

ターゲット部分

ターゲット部分は、標的細胞と特異的に又は好んで結合し、ターゲット抗体若しくはその抗原結合断片、又は例えば核酸（アプタマー）若しくは、酵素阻害剤、酵素基質、受容体リガンド及び／若しくは融合タンパク質であってもよい（ポリ）ペプチドといった別のターゲット部分であってもよい。また、低分子阻害剤を、ターゲット部分として使用できる（結果として、低分子薬物複合体（SMDC）を生じる）。ターゲット部分の標的に対する結合特異性（及び親和性）は、本発明の複合体が治療効果を発揮する体内の部位を決定する。

【0024】

50

したがって、適切なターゲティング部分を選択することで、ホスホ抗原が治療効果を発揮しなければならない部位に送達されることが保証される。

【0025】

好ましくは、本発明の複合体におけるターゲティング部分は、抗体又はその抗原結合断片である。ターゲティング部分が抗体又はその抗原結合断片である場合、複合体は、一般的に免疫複合体又は抗体薬物複合体（ADC）と呼ばれる。ターゲティング部分は、標的細胞で発現した抗原、例えば、腫瘍関連抗原を高特異性で認識する抗体である。抗体又はその断片の抗原に対する特異性は、エフェクター分子（又は「ペイロード」）の標的細胞への特異的な送達を可能にし、健康な組織にはほとんど影響を及ぼさない。エフェクター分子は、リンカーを介して抗体と共有結合し、そのリンカーは、エフェクター分子が、少なくとも抗体が標的細胞、例えばがん細胞に達するまで、抗体と接続されたままであることを保証する。エフェクター分子は、抗体が標的と結合した場合に、標的細胞上又は中（複合体が内部へ取り込まれた時）でその効果を発揮する。エフェクター分子は、細胞毒性剤、放射性同位元素又は免疫調節部分であってもよい。本発明の複合体において、エフェクター分子はホスホ抗原である。

10

【0026】

抗体

この明細書では、用語「抗体」は、好ましくは、2つの重鎖及び2つの軽鎖を含む抗体を指す。一般的に、抗体又はその抗原結合断片は治療活性を有するが、そのような独立した効果は、ADCの分野において知られているように、必ずしも必要ではない。本発明で用いることができる抗体は、アイソタイプ、例えば、IgA、IgE、IgG又はIgM抗体であってもよい。好ましくは、抗体はIgG抗体、より好ましくはIgG₁又はIgG₂抗体である。抗体は、キメラ、ヒト化又はヒト抗体であってもよい。好ましくは、抗体はヒト化又はヒト抗体である。更により好ましくは、抗体は、ヒト化又はヒトIgG抗体、より好ましくはヒト化又はヒトIgG₁モノクローナル抗体である。抗体は、κ又はλ軽鎖、好ましくはκ軽鎖を有してもよく、すなわち、ヒト化又はヒトIgG₁-κ抗体であってもよい。

20

【0027】

この明細書では、用語「抗原結合断片」は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、若しくは還元型IgG（rIgG）断片、一本鎖（sc）抗体、単ドメイン（sd）抗体、ダイアボディ又はミニボディを含む。

30

【0028】

「ヒト化」の非ヒト（例．げっ歯類）抗体は、非ヒト抗体に由来した最小配列を含有する抗体（例．非ヒト→ヒトキメラ抗体）である。非ヒト抗体をヒト化するためのさまざまな方法が当技術分野において知られている。例えば、重鎖（HC）及び軽鎖（LC）の可変領域（VR）における抗原結合相補性決定領域（CDR）は、非ヒト種、一般的にはマウス、ラット又はウサギ由来の抗体から導き出される。これらの非ヒトCDRは、抗体の機能的特性、例えば、結合親和性及び特異性が少なくとも部分的に保持されるように、HC及びLCの可変領域のヒトフレームワーク領域（FR、すなわち、FR1、FR2、FR3及びFR4）と、組み合わせられる。抗体パフォーマンスを更に洗練させるために、例えば、低免疫原性を保持しながら結合親和性を向上させるために、ヒトFRの選択したアミノ酸を対応する元の非ヒト種アミノ酸と交換してもよい。このようにしてヒト化された可変領域は、通常、ヒト定常領域と組み合わせられる。非ヒト抗体のヒト化のための代表的な方法は、Winter及び共同研究者の方法である（Jones et al, 1986, Nature, 321, 522-525; Riechmann et al, 1988, Nature, 332, 323-327; Verhoeyen et al, 1988, Science 239, 1534-1536）。あるいは、非ヒト抗体は、ヒトにおいて天然で産生される抗体バリエーションとの類似性を増加させるように、そのアミノ酸配列を改変してヒト化できる。例えば、元の非ヒト種FRの選択されたアミノ酸は、抗体の結合親和性を保持しながら免疫原性を低下させるために、その対応するヒトアミノ酸と交換できる。詳細については、Jones et al, 前掲; Riechmann et al., 前掲及びPresta, 1

40

50

992, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596を参照。以下の総説とそこで引用されている参考文献も参照。Vaswani and Hamilton, 1998, Ann. Allergy, Asthma and Immunol., 1, 105-115; Harris, 1995, Biochem. Soc. Transactions, 23, 1035-1038及びHurle and Gross, 1994, Curr. Op. Biotech., 5, 428-433.

【0029】

C D Rは、Kabat (in Kabat, E.A. et al, (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, NIH publication no. 91-3242, pp. 662, 680, 689)、Chothia (et al, 1989, Nature, 342, 877-883) 又はIMGT (Lefranc, 1999, The Immunologist, 7, 132-136) の方法で決定できる。

10

【0030】

通常、抗体は、抗原標的、好ましくは内在化しても内在化しなくてもよい膜に結合する抗原標的と結合する少なくとも1つのHC及びLC可変領域を含む、単一特異性（1つの抗原に対して特異的；そのような抗原は、種間で共通であってもよく、又は種間で類似のアミノ酸配列を有してもよい）又は二重特異性（種の2つの異なる抗原に対して特異的）抗体である。好ましくは、抗体は、（抗原）標的と結合した後、標的細胞内に取り込まれ、その後、本発明の複合体ではホスホ抗原である活性エフェクター分子が、細胞内に放出される。

【0031】

がん治療で使用する本発明の複合体で用いてもよいターゲティング抗体は、腫瘍特異的又は腫瘍関連抗原と選択的に結合する腫瘍ターゲティング抗体であってもよい。腫瘍特異的抗原は腫瘍細胞上にのみ存在し、一方、腫瘍関連抗原は、正常（健康な）細胞と比較して場合、がん細胞において高いレベルで発現（例．過剰発現）する抗原である。

20

【0032】

本発明の複合体の抗体又は抗原結合断片が結合する抗原標的は、例えば、アネキシンA1、B7H3、B7H4、BCMA、CA6、CA9、CA15-3、CA19-9、CA27-29、CA125、CA242（がん抗原242）、CAIX、CCR2、CCR5、CD2、CD19、CD20、CD22、CD24、CD30（腫瘍壊死因子8）、CD33、CD37、CD38（サイクリックADPリボースヒドロラーゼ）、CD40、CD44、CD47（インテグリン関連タンパク質）、CD56（神経細胞接着分子）、CD70、CD71、CD73、CD74、CD79、CD115（コロニー刺激因子1受容体）、CD123（インターロイキン-3受容体）、CD138（シンデカン1）、CD203c（ENPP3）、CD303、CD333、CDCP1、CEA、CEACAM、クローディン4、クローディン7、CLCA-1（C型レクチン様分子-1）、CLL1、c-MET（肝細胞増殖因子受容体）、Cripto、DLL3、EGFL、EGFR、EPCAM、EphA2、EphB3、ETBR（エンドセリンB型受容体）、FAP、FcRL5（Fc受容体様タンパク質5、CD307）、FGFR3、FOLR1（葉酸受容体α）、FRbeta、GCC（グアニリルシクラーゼC）、GD2、GITR、GLOBO H、GPA33、GPC3、GPNMB、HER2、p95HER2、HER3、HMW-MAA（高分子量メラノーマ関連抗原）、インテグリンα（例．αvβ3及びαvβ5）、IGF1R、TM4SF1（L6）、ルイスA様糖鎖、ルイスX、ルイスY（CD174）、LGR5、LIV1、メゾテリン（MSLN）、MN（CA9）、MUC1、MUC16、NaPi2b、ネクチン-4、Notch3、PD-L1、PSMA、PTK7、SLC44A4、STEAP-1、5T4（又はTPBG、トロホブラスト糖タンパク質）、TF（組織因子、トロンプラスチン、CD142）、TF-Ag、Tag72、TNFα、TNFR、TROP2（腫瘍関連カルシウムシグナルトランスデューサー2）、uPAR、VEGFR及びVLAからなる群から選択してもよい。

30

40

【0033】

当技術分野において知られた適切な抗体の例には、ブリナツモマブ（CD19）、リツ

50

キシマブ（CD20）又は他の抗CD20抗体、例えば、オファツムマブ、ウブリツキシマブ若しくはオクレリズマブ、エブラツズマブ（CD22）、イラツムマブ及びブレンツキシマブ（CD30）、ゲムツズマブ、バダスツキシマブ（CD33）、テツルマブ（CD37）、ダラツムマブ、イサツキシマブ（CD38）、ビバツズマブ（CD44）、アレムツズマブ（CD52）、ロルボツズマブ（CD56）、ボルセツズマブ（CD70）、ミラツズマブ（CD74）、ポラツズマブ（CD79）、ロバルピツズマブ（DLL3）、フツキシマブ（EGFR）、オボルツズマブ（EPCAM）、ファルレツズマブ（FOLR1）、グレムバツムマブ（GPNMB）、トラスツズマブ、ペルツズマブ及びマルゲツキシマブ（HER2）、エタラシズマブ（インテグリン）、アネツマブ（メゾテリン）、パンコマブ（MUC1）、エンホルツマブ（ネクチン-4）、H8、A1及びA3（5T4）、並びにTROP2に対する抗体、例えば、サシツズマブ、ダトポタマブ及びPF-06664178が含まれる。ターゲティング部分がCD20（例、リツキシマブ）、HER2（例、トラスツズマブ）に対する腫瘍ターゲティング抗体、又は抗CD123抗体である本発明の複合体を、実施例で示している。

10

【0034】

pAg部分のpAg活性は細胞内で発揮される必要があるため、細胞内に移行する抗体が好ましい。

【0035】

抗体又はその抗原結合断片は、該当する場合、（1）操作された、すなわち、例えば、半減期を増加させるために、リンカー-薬物が結合する部位を提供するために、及び／又は、エフェクター機能を増加若しくは減少させるために、1つ以上の変異が導入されてもよい、定常領域；あるいは（2）操作された、すなわち、例えばリンカー-薬物が結合する部位を提供するために、1つ以上の変異が導入されてもよい、可変領域を含んでいてもよい。抗体又はその抗原結合断片は、組換えで、合成的に、又は他の知られた適切な方法により、製造してもよい。抗体のFc媒介性エフェクター機能を減少させ得る変異は、例えば、Leabman et al., 2013, MAbs, 5(6):896-903及びBruhns P, et al., 2015, Immunol Rev., 268(1):25-51. doi: 10.1111/imr.12350. PMID: 26497511に記載されたものなどの変異である。

20

【0036】

本発明の複合体は、野生型若しくは部位特異的（特定の複合化部位、例えば、システイン又は非天然アミノ酸が、抗体タンパク質配列の中へ操作されていることを意味する）、又はその組合せであってもよく、当技術分野において知られた方法により製造できる。

30

【0037】

本発明の免疫複合体は、免疫調節部分としてホスホ抗原（pAg）を含有する。本発明の免疫複合体は、pAgペイロードを、がん細胞のような抗原提示細胞へ非常に効率的に送達し、抗原提示細胞内に活性なホスホ抗原を生じることが見いだされた。抗原提示細胞は、その表面にある特定の腫瘍抗原を発現又は過剰発現する腫瘍細胞であってもよい。そのような細胞は、BTN3A1／BTN2A1受容体複合体分子のようなpAgによるγδT細胞の間接的活性化に關与するTCR活性化分子も発現又は過剰発現する可能性がある。

40

【0038】

ホスホ抗原（pAg）

ホスホ抗原は、抗原提示細胞の存在下で、γδT細胞（より具体的にはVγ9Vδ2細胞）を刺激できる相対的に質量が小さい非ペプチド抗原を含む。この明細書全体で、用語「ホスホ抗原」又は「pAg」は、天然に存在するホスホ抗原、加えて、修飾pAg、例えば、天然に存在するpAgの類似体を含む、天然に存在しない（合成）pAg又はそのプロドラッグを指す。本発明における使用に適したpAgは、ピロホスフェート（ジホスフェート）、ピロホスホネート、ビスホスホネート（又はジホスホネート）、モノホスフェート若しくはモノホスホネート又はそのプロドラッグであってもよい。本発明の複合体及びリンカー-薬物で使用する好ましいpAgは、（モノ）ホスホネートである。本発明

50

の複合体及びリンカー-薬物化合物で使用する好ましいホスホ抗原は、アリルアルコール基、例えば、天然ホスホ抗原、例えばHMBPPに存在するアリルアルコール基を含む。好ましくは、ホスホ抗原はアリルアルコール基を含むモノホスホネートである。

【0039】

本発明の複合体又はリンカー-薬物化合物の一部としての「ホスホ抗原」は、必ずしもホスホ抗原をその活性型で含有するとは限らない。複合体又はリンカー-薬物化合物におけるホスホ抗原は、活性なホスホ抗原の不活性前駆体型を含んでいてもよく、及び／又は複合体が標的と結合し、かつプロセッシングされた後のみ、活性なホスホ抗原を放出してもよい。したがって、複合体又はリンカー-薬物化合物の一部として結合した状態のホスホ抗原は、それから放出される活性なホスホ抗原とは構造的に異なってもよい。例えば、連結部分からの分離又は連結部分の切断が、機能的に活性なホスホ抗原の形成を導く構造的再編成及び／又は化学若しくは酵素反応を惹起する可能性がある。また、例えば環境の変化に対して応答し、又は標的部位での酵素活性の結果として、プロドラッグ部分が除去され又は再配置されることで、機能的に活性なホスホ抗原が放出される可能性がある。

【0040】

細胞pAg活性を有する化合物は、標的細胞でのpAg受容体との結合によって、直接的に活性を示すことができると考えられている（「直接的pAg」）。この受容体は、細胞表面分子の細胞内ドメインであるブチロフィリン3A1（BTN3A1）と考えられている。天然の直接的pAgの例はHMBPPである。HMBPPは、病原性細菌が産生する。HMBPPなどの天然pAgにおけるアリル型アルコールが、BTN3A1結合とpAg活性の最大化に重要であることが見いだされた。HMBPPなどの直接的pAgは、その細胞内B30.2ドメインにおいて直接BTN3A1と結合する。HMBPPの類似体、例えば、BrHPP、IHPP及びClHPPといったハロヒドリンも当該技術分野において知られている（Wiemer et al., 2020, Chem. Med. Chem., 15, 1030-1039）。

【0041】

他の化合物は、IPPの蓄積により間接的pAg活性を示す。そのような化合物は、「間接的pAg」ということができる。間接的pAgは、（内因性）直接的pAg、例えばIPPの細胞レベル及びVγ9Vδ2 T細胞の同時活性化を増加させる経路に作用する。直接的pAgとは対照的に、間接的pAgは、標的細胞におけるブチロフィリン受容体と直接的には相互作用せず、それらはpAg前駆体（直接的pAgへ酵素的に又は化学的に変換される化合物）でもない。間接的pAgは、例えば、下流の酵素、例えば、ファルネシルピロリン酸シンターゼ（FPPS）を阻害する化合物であってもよい。FPPSの阻害は、IPPの使用を阻止し、細胞においてIPPの蓄積をもたらす。FPPS阻害剤としては、アミノビスホスホネート（N-BP）、例えばゾレドロネートが知られている（Wiemer et al., 2020, Chem. Med. Chem., 15, 1030-1039; Park et al., 2021, Frontiers in Chemistry, Vol. 8, Article 612728）。

【0042】

ゾレドロネート、パミドロネート及びアレンドロネートといったアミノビスホスホネート（N-BP）は、ヒドロキシアパタイト（HA）と特異的に結合する能力のために「骨ターゲティング剤」としても知られている（Farrell et al., 2018, Bone Reports, 9, 47-60）。アレンドロネートはまた、骨ターゲティング剤としての機能を用いて、トラスツズマブを骨転移へ標的とすることを目的として、トラスツズマブと複合化された（Tian et al., 2021, Sci. Adv., 7, 2-11）。アレンドロネートは、その負電荷のため、HAに対する親和性が高く、骨と優先的に結合する。したがって、Tianらは、アレンドロネートのような負に帯電したアミノビスホスホネートを、骨関連疾患を治療する抗体のターゲティング剤として使用することを提案した。

【0043】

本発明の複合体では、例えば抗体（ターゲティング部分）とその特異的な結合パートナー（例．腫瘍特異的抗原）との特異的結合が、pAgをその標的部位に導くが、その逆は

ない（p A g はターゲティング部分ではない）。本発明の複合体では、ホスホ抗原が、その治療効果を発揮しなければならない部位に送達されることを保証するのは、ターゲティング部分（例．抗体）の結合特異性と親和性である。

【0044】

本発明で使用する好ましい p A g は、アリル型アルコール又はそのプロドラッグ（例．プロドラッグ基が除去された後に、又はイソプレレン単位を介して若しくはイソプレレン単位と複合化したリンカー部分が切断された後に、アリル型アルコールが生成される p A g）を含む。そのような化合物は、直接的 p A g 活性（B T N 3 A 1 リガンドとして働く p A g）を有する p A g の例であると考えられる。別の前駆体では、例えば、（直接的）p A g 活性を有する化合物へ代謝される化合物、又は直接的 p A g のプロドラッグ若しくは前駆体が、本発明の複合体で p A g として使用できる。

10

【0045】

V γ 9 V δ 2 T 細胞におけるホスホ抗原の活性は、実施例に例示されているように、細胞アッセイにおいて測定できる。用いられる細胞に基づくアッセイにおいて、第1の工程では、標的細胞、例えば、腫瘍細胞、例えば、C D 2 0 陽性バーキットリンパ腫ヒト腫瘍細胞株 R a j i 由来の細胞が、ホスホ抗原又は本発明のホスホ抗原含有複合体と（一晚）インキュベートされる。

【0046】

この第1の工程において、ホスホ抗原又は本発明の複合体は、標的（腫瘍）細胞内に取り込まれる。内部移行（及び複合体の場合、リンカーの切断）の後、ホスホ抗原は、B T N 3 A 1 受容体の細胞内ドメインと結合し、そのことが B T N 3 A 1 / B T N 2 A 1 ダイマーの活性化をもたらす。

20

【0047】

第1の工程からの前処理され洗浄された腫瘍細胞は、第2の工程で γ δ T 細胞と共培養できる。V γ 9 V δ 2 T 細胞が活性化された場合、細胞は、サイトカインを産生して免疫を活性化し、かつ細胞毒性顆粒を放出（脱顆粒）して標的細胞を殺傷する。

【0048】

γ δ T 細胞におけるホスホ抗原の活性を評価するために、モネンシン及び／又はブレフェルジン A を、γ δ T 細胞と標的の共培養物中に加える。これは、活性化細胞が産生したサイトカイン（例．インターフェロン γ（I F N γ）及び腫瘍壊死因子 α（T N F α））を捕捉する。抗サイトカイン抗体が細胞内に移行することを可能にするサポニンの存在下での蛍光標識抗体での染色は、サイトカイン産生細胞を同定する。C D 1 0 7 a に対する蛍光標識抗体も、共培養物中に加えることができ、脱顆粒を起こしている細胞を染色する。脱顆粒は、腫瘍細胞の殺傷と相関する（Aktas et al., 2009, Cell Immunol., 254(2), 149-154）。

30

【0049】

したがって、蛍光標識した免疫細胞特異的マーカーと、C D 1 0 7 a 及びサイトカインマーカーを組み合わせることにより、前処理した標的細胞と共培養した後に、γ δ T 細胞及び／又は他の免疫細胞サブセットの活性化状態の決定が可能である。

【0050】

γ δ T 細胞の、前処理した腫瘍細胞を殺傷する能力は、共培養後の死んだ腫瘍細胞の割合を決定することにより調べることができる。腫瘍細胞は、蛍光タグで容易に同定でき、その死細胞は、γ δ T 細胞との共培養から早くも1時間後には決定できる。

40

【0051】

ホスホ抗原類似体

（化学的）類似体は、天然ホスホ抗原とは構造的特徴で異なるが、天然ホスホ抗原と機能的生物活性（特に γ δ T 細胞に対して（間接的な）免疫刺激活性を示す）で類似する化合物である。類似体は、本発明の免疫複合体及びリンカー-薬物化合物での使用に関連して、安定性、作用強度、生物学的利用能又は連結部分との結合など、天然に存在する p A g の1つ以上の特徴を向上させるようにデザインできる。天然ホスホ抗原には、H M B P

50

P及びIPPなどのピロホスフェート（ジホスフェート）が含まれる。天然ホスホ抗原の既知の類似体には、プロモヒドリソピロホスフェート（BrHPP）、及び、C-HMBPPなどのピロホスホネートが含まれる。当技術分野において知られたホスホ抗原活性を有するホスホネートには、2個のホスフェート基の間の中心炭素の置換基で異なるビスホスホネートが更に含まれる。その例には、エチドロネート、クロドロネート、チルドロネート及びビスホスホネートの作用強度を増加させると考えられる、中心炭素の置換基の1つに窒素又はアミノ基を有するビスホスホネートの一群が含まれる（Drake et al., Mayo Clin. Proc., 2008, 83(9), 1032-1045）。これらの窒素含有ビスホスホネートのホスホ抗原には、ゾレドロネート（ゾレドロロン酸）、アレンドロネート、リセドロネート、イバンドロネート、パミドロネート、ネリドロネート及びオルパドロネートが含まれる。

10

【0052】

作用強度が増加したとされる別のホスホ抗原類似体であるホスホラミダイトエステルは、国際公開第2005/05258号（Innate Pharma）に記載され、例えば、N-HDMAPPであり、天然HMBPPに存在するイソプレレン単位が、ピロホスフェートとNH基を介して結合している。

【0053】

ホスホ抗原プロドラッグ

プロドラッグについて、ホスホ抗原の不活性前駆体は、保護基（例、ホスホネート基の負荷電の非結合酸素原子上の中性保護基）の除去又は変換後に、活性なホスホ抗原へ変換されるものを意味する。本発明のホスホ抗原をプロドラッグの形で含む複合体が身体へ投与された後、保護基は、標的部位において代謝的に除去されてもよい。プロドラッグは、ホスホ抗原と連結部分の結合によって形成されてもよい。この場合、ホスホ抗原プロドラッグ部分とターゲティング部分を結合させるために用いた複合体のリンカーが切断されて、活性ホスホ抗原が放出されるため、及び／又は、保護基がホスホ抗原から除去されるため、活性ホスホ抗原が形成されてもよい。好ましくは、活性なホスホ抗原を放出するそのような変換は、健康な及び／又は標的ではない組織におけるホスホ抗原の望まれず、かつ非特異的な副作用を防止するために、本発明の複合体が治療効果を発揮しなければならない部位に到達した後に、例えば、それが腫瘍細胞の内部へ取り込まれた後に、又は少なくとも腫瘍微小環境内でのみ生じる。

20

30

【0054】

例えば、ある特定のビスホスホネートは、骨塩に対する高い親和性を有し、「骨ターゲティング剤」として用いられる。そのようなビスホスホネートは、そのビスホスホネートと複合化された異なる薬物についてのターゲティング分子として働き、薬物を骨に標的化し、薬物は、例えば骨に局在する細胞に対して治療効果を発揮する（Farrell et al., 2018, Bone Reports, 9, 47-60）。

【0055】

対照的に、本発明の複合体において、ホスホ抗原は、ターゲティング部分（例、腫瘍特異的抗体）と複合化される。本発明の複合体において、ホスホ抗原がその治療効果を発揮しなければならない部位に送達されることを保証するのは、ターゲティング部分の結合特異性である。

40

【0056】

本発明では、ホスホ抗原の望まれない反応性（例、ホスホ抗原それ自体による標的ではない組織との結合）は、活性なホスホ抗原ではなく、そのプロドラッグを複合体に含めることで更に防止できる。

【0057】

例えばビスホスホネートの負荷電ホスホネート基を、プロドラッグ部分でマスクしてもよい。プロドラッグは、複合体のターゲティング部分によって標的部位へ送達され、そこで活性なホスホ抗原へ変換される。

【0058】

50

プロドラッグの型には、当技術分野において知られた保護基、例えば、アリアルエステル、アリアルアミド又はピバロイルオキシメチル（POM）プロドラッグが含まれる。C-HMBP（モノホスホネート）ホスホ抗原類似体／プロドラッグは国際公開第2019/182904号に記載されている。天然ホスホ抗原、例えばHMBPPと同程度に強力であるホスホ抗原プロドラッグを合成することを目的として、（モノホスホネート）ホスホ抗原のアリアルオキシトリエステルホスホラミダイトプロドラッグが、Davey et al., 2018, J. Med. Chem., 61, 2111-2117に記載のとおり合成された。これらのプロドラッグでは、モノホスホネート基が、アリアルモチーフ及びアミノ酸エステル部分によってマスクされている。これらの化合物（「HMBP ProPagens」）は、その分子におけるホスフェート部分とイソプレノイド部分との間の-P-O-結合の切断のために、血清中での安定性がかなり低かった。-P-O-結合における酸素が炭素によって置き換えられている、類似した「ProPagens」化合物は、国際公開第2020/008189号に記載されている。ホスホ抗原（プロドラッグ）の提案された構造活性相関（SAR）は、Wiemer et al., 2020, Chem. Med. Chem., 15, 1030-1039により記載されている。

10

【0059】

切断可能な連結部分は、アリアルアルコールのアルコール基を介してホスホ抗原と共有結合してもよい。この場合、アリアルアルコールは、切断可能な連結部分が切断された場合に細胞内で（再）形成される。

【0060】

本発明の複合体の一部としてのホスホ抗原プロドラッグにおけるプロドラッグ部分は、同じであっても異なってもよい。例えば、全てのプロドラッグ部分がPOM基であってもよく、又はホスホ抗原は、例えば「proTide」基、例えばアリアルオキシ及びアミノ酸エステルラジカルの組合せ、例えば、国際公開第2020/008189号又は国際公開第2019/182904号においてホスホ抗原プロドラッグについて記載されたものを含んでもよい。

20

【0061】

適切なホスホネートプロドラッグ技術及びホスホネートプロドラッグの合成は、当技術分野において知られている。そのようなプロドラッグ技術は、例えば、Pradere et al., 2014, Chem. Rev., 114, 9154-9218に更に概説され、カルボニルオキシメチルプロドラッグ部分、例えば、ピバロイルオキシメチル（POM）及びイソプロピルオキシカルボニルオキシメチル（POC）誘導体、S-アシル-2-チオエチル（SATE）及びS-[(2-ヒドロキシエチル)スルフィジル]-2-チオエチル（DTE）に基づくプロドラッグ、シクロサリゲニル（cycloSal）ホスフェート及びホスホネートに基づくプロドラッグ及びアルコキシアルキルモノエステル（ヘキサデシルオキシプロピル（HDP）、オクタデシルオキシエチル（ODE））に基づくプロドラッグ、ホスホラミダイト及びホスホンアミダイトに基づくプロドラッグ（アリアルオキシアミノ酸アミデート（ProTide）プロドラッグを含む）、並びにホスホルジアミデート及びホスホノジアミデートの使用を含む。

30

【0062】

リンカー-薬物化合物

本発明はまた、連結部分と共有結合した少なくとも1個のホスホ抗原を含むリンカー-薬物化合物を提供する。そのようなリンカー-薬物化合物は、本発明の複合体の合成における中間体として用いてもよい。例えば、ターゲティング部分が抗体又はその抗原結合断片である場合、本発明の1つ以上のリンカー-薬物化合物は、ターゲティング抗体と結合して本発明の複合体が生成できる。

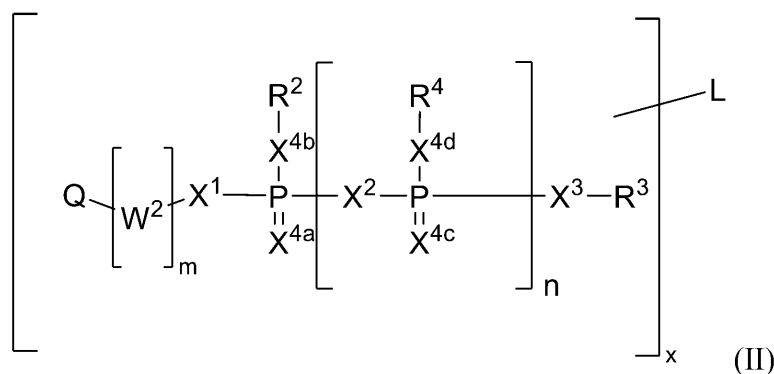
40

【0063】

本発明のリンカー-薬物化合物は、少なくとも1個のホスホ抗原（pAg又は「薬物」）及び連結部分（L又は「リンカー」）を含む。そのようなリンカー-薬物分子は、本発明の複合体の製造に使用できる。本発明の好ましいリンカー-薬物化合物は、一般式II

50

【化 1】

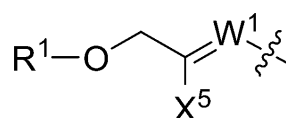


10

(式中、

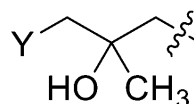
Qは、式ⅠⅠa又は式ⅠⅠb：

【化 2】



(Ⅱa)

又は



(Ⅱb)

20

で示す構造であり；

Yはハロゲンであり；

W¹は、N、CH又はCF、好ましくはCHであり；W²は、CH₂、CHF、CF₂又はOであり；X¹は、O、S、NH、CH₂、CHF又はCF₂であり；X²は、O、CH₂、CHF又はCF₂であり；X³は、存在しないか又はO若しくはNHであり；X^{4a~d}は、それぞれ独立してO及びSから選択され；X⁵は、CH₃、CH₂F、CHF₂、CF₃又はCCl₃であり；

30

xは、1～5の整数であり；

mは、1、2又は3であり；

nは、0、1又は2であり；

R¹は、H、又は、連結部分（L）若しくはプロドラッグ部分との接続部であり；R²は、H、又は、連結部分（L）、Cat+若しくはプロドラッグ部分との接続部であり；R³は、H、又は、連結部分（L）、Cat+若しくはプロドラッグ部分との接続部であり；R⁴は、H、又は、連結部分（L）、Cat+若しくはプロドラッグ部分との接続部であり；

40

あるいは、nが0である場合、R³とR²はC_{1~6}（ヘテロ）アルキル基によって接続している；又はnが1若しくは2である場合、R³とR⁴はC_{1~6}（ヘテロ）アルキル基によって接続している）

で表されていてもよい。

【0064】

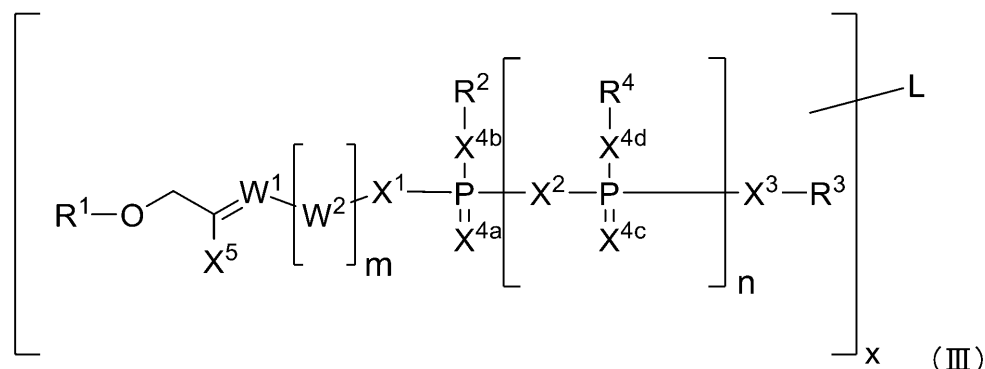
Qが式ⅠⅠbで示す構造のリンカー-薬物化合物は、（E）-4-ヒドロキシ-3-メチル-ブタ-2-エニルピロホスフェート（HMBPP）類似体、例えば、BrHPP（ホスホスチム）、IHPP又はClHPPと類似するホスホ抗原を有してもよい。

【0065】

50

本発明の好ましい態様において、リンカー-薬物化合物は、式 I I で示される化合物を包含し、式中、Q は式 I I a で示す構造である。そのような化合物は一般式 I I I :

【化 3】



10

(式中、

W^1 は、N、CH 又は CF、好ましくは CH であり；

W^2 は、CH₂、CHF、CF₂ 又は O であり；

X^1 は、O、S、NH、CH₂、CHF 又は CF₂ であり；

X^2 は、O、CH₂、CHF 又は CF₂ であり；

X^3 は、存在しないか又は O 若しくは NH であり；

$X^{4a \sim d}$ は、それぞれ独立して O 及び S から選択され；

X^5 は、CH₃、CH₂F、CHF₂、CF₃ 又は CCl₃ であり；

x は、1～5 の整数であり；

m は、1、2 又は 3 であり；

n は、0、1 又は 2 であり；

R^1 は、H、又は、連結部分 (L) 若しくはプロドラッグ部分との接続部であり；

R^2 は、H、又は、連結部分 (L)、Cat+ 若しくはプロドラッグ部分との接続部であり；

R^3 は、H、又は、連結部分 (L)、Cat+ 若しくはプロドラッグ部分との接続部であり；

R^4 は、H、又は、連結部分 (L)、Cat+ 若しくはプロドラッグ部分との接続部であり；

あるいは、n が 0 である場合、 R^3 と R^2 は C₁～6 (ヘテロ) アルキル基によって接続している；又は

n が 1 若しくは 2 である場合、 R^3 と R^4 は C₁～6 (ヘテロ) アルキル基によって接続している)

で表される。

【0066】

外側の角括弧の間の構造式は pag を表し、L はリンカー部分を表す。1 つのリンカー-薬物分子あたり、連結部分との接続部は 1 のみである (しかし、x が 1 より大きい場合、1 つの (分枝鎖状) リンカー部分に複数の pag が接続する)。

40

【0067】

好ましくは、n は 0 又は 1 であり、最も好ましくは 0 である。n が 1 又は 2 である場合、 X^2 は好ましくは O である。n が 1 であり X^2 が CH₂ であるか、n が 1 であり X^2 が O のホスホ抗原を有するリンカー-薬物化合物は、同様に、本発明の一部である。この場合、各 $X^{4a \sim d}$ は、好ましくは O である。そのようなリンカー-薬物化合物において、 R^3 又は R^1 は、連結部分との接続部であってもよく、好ましくは、 R^3 が連結部分との接続部を表す。

【0068】

n が 2 である場合、 X^2 は式 I I において 2 回出現し、 X^{2a} 及び X^{2b} とされ、それ

50

らは、O、CH₂、CHF及びCF₂から独立して選択できる。nが2である場合、R⁴も2回出現し、R^{4a}及びR^{4b}とされ、それらは、H、連結部分(L)との接続部、Cat+との接続部及びプロドラッグ部分との接続部から独立して選択できる。nが2である場合、X^{4c}及びX^{4d}についても同様である。これらは2回(X^{4c}、X^{4ci}、X^{4d}及びX^{4di})出現し、O及びSから独立して選択してもよい。

【0069】

mが2又は3である場合、W²は、式IIにおいて複数回出現し、各W²は、CH₂、CHF、CF₂又はOから独立して選択できる。好ましくは、W²はCH₂である。好ましい態様において、mは1であり、最も好ましくは、mが1である場合、W²がCH₂である。

10

【0070】

Cat+は、水素イオンを含む、(有機又は無機)陽イオンを表す。

【0071】

X¹は、好ましくはCH₂、O又はS、最も好ましくはCH₂である。

【0072】

各X^{4a~d}(存在する場合)は、好ましくはOである。nが1又は0で、X^{4a~b}及びX^{4c~d}(存在する場合)がOで、R²及びR⁴(存在する場合)が好ましくはHの化合物は、本発明の一部である。好ましくは、nが0で、X^{4a}及びX^{4b}がOであり、R²が好ましくはHである。

【0073】

Qが式IIaで示す構造であるリンカー-薬物化合物では、W¹は、好ましくはCH又はCF、最も好ましくはCHである。

20

【0074】

Qが式IIaで示す構造である場合、X⁵は好ましくはCH₃である。

【0075】

Qが式IIaで示す構造であるリンカー-薬物化合物では、R¹は、好ましくはH又は連結部分(L)との接続部、最も好ましくはHである。

【0076】

Qが式IIaで示す構造であるリンカー-薬物化合物では、好ましくは、W¹はCHで、X⁵はCH₃で、X¹はCH₂で、R₁はHであり、その結果、アリル型アルコール基を有するpAgを有するリンカー-薬物分子を生じる。好ましくは、W¹がCHで、X⁵がCH₃で、X¹がCH₂で、R₁がHである場合、W₂はCH₂でmは1である。W¹がCHで、W²がCH₂で、mが1で、X⁵がCH₃で、X¹がOで、R₁がHである場合、ホスホ抗原は、天然ホスホ抗原、例えばHMBPPに存在するアリルアルコール鎖を含む。

30

【0077】

好ましいリンカー-薬物化合物は、Qが式IIaで示す構造で、X³がOで、R³が切断可能な連結部分との接続部で、W¹がCHで、X⁵がCH₃で、R¹がHで、W²がCH₂で、mが1で、X¹がCH₂のものである。

【0078】

そのような化合物において、R²、R³及び／又はR⁴は、単独でプロドラッグ部分であってもよく、又は、X^{4b}、X^{4d}及び／若しくはX³(存在する場合)と組み合わせたプロドラッグ部分であってもよい(プロドラッグ部分は-X^{4b}-R²、-X^{4d}-R⁴及び／又は-X³-R³である)。

40

【0079】

好ましくは、Qが式IIaで示す構造であるリンカー-薬物化合物では、W¹はCHで、W²はCH₂で、X^{4a~d}はOで、R²及びR⁴はHで、X⁵はCH₃で、mは1である。

【0080】

好ましい態様では、Qは式IIaで示す構造で、W¹はCHで、W²はCH₂で、nは

50

0で、 $X^4 a \sim b$ はOで、 X^5 は CH_3 で、 m は1である。

【0081】

式IIにおいて、 x は、連結部分(L)あたりのホスホ抗原(pAg)の数を表し、角括弧の間の構造は、好ましくは本発明のリンカー-薬物化合物に用いるホスホ抗原の構造である。 X は1~5の整数であってもよい(各連結部分が1~5個のpAgを有する)。好ましくは、連結部分は1個又は2個のpAgを有する。大半の場合、各連結部分が1個のpAgを有するので十分である。

【0082】

連結部分との接続部は R^1 (の一部)であってもよく、あるいは、連結部分は、 R^2 、 R^3 若しくは R^4 であってもよい(と接続してもよい)。好ましくは R^1 又は R^3 、より好ましくは R^3 が、連結部分との接続部である。連結部分が R^3 で接続される場合、 X^3 は好ましくはOである。 R^3 がリンカー部分との接続部である場合、好ましくは X^3 はOであり、 R^1 は好ましくはHである。

10

【0083】

連結部分が R^2 又は R^4 で結合している場合、 $X^4 b$ 又は $X^4 d$ は、好ましくはOである。

【0084】

好ましいリンカー-薬物化合物は、Qが式IIaで示す構造で、 X^3 がOで、 R^3 が切断可能な連結部分との接続部で、好ましくは、 W^1 がCHで、 X^5 が CH_3 で、 R^1 がHで、 W^2 が CH_2 で、 m が1で、 X^1 が CH_2 のものである。そのような化合物では、 n は好ましくは0である。

20

【0085】

「連結部分との接続部」は、リンカーがホスホ抗原と接続する分子における位置を意味する。「接続部」は、 R^1 、 R^2 、 R^3 又は R^4 (リンカーが接続している箇所に依存)が、リンカーとホスホ抗原の残りとの間の、リンカー-薬物化合物の実際の(残りの)構造的要素を表すことを意味するとは限らない。例えば、用いるリンカーに依存して、 R^1 が連結部分との接続部を表す場合、これはまた、リンカーが、リンカー-薬物分子におけるホスホ抗原の酸素原子と直接的に結合している状況も含む。別の例では、 R^1 は連結部分(L)との接続部である。 R^1 が連結部分(L)との接続部である場合、好ましくは、 W^1 はCHで、 W^2 は CH_2 で、 m は1で、 X^5 は CH_3 で、 X^1 は CH_2 である。そのようなリンカー-薬物分子が本発明の複合体に組み込まれた場合、投与後のリンカーの切断は、アリールアルコール基(複合体から放出される実際の機能的に活性なホスホ抗原では、 R^1 がH)が(再)形成される可能性がある。 R^1 はまたプロドラッグ部分であってもよい。適切なアルコールプロドラッグ部分は当技術分野において知られている。例えば、アルコールは、エステルに基づくプロドラッグ基によってマスクできる。活性アルコールの生成は、エステル結合の(細胞)エステラーゼによる加水分解に依存し、アルコール(薬物)及びカルボン酸(遊離基)を代謝的に再生される。

30

【0086】

R^2 、 R^3 及び R^4 は、それぞれ、独立して、H、又は、連結部分(L)、 Ca^{t+} 若しくはプロドラッグ部分との接続部であってもよい。好ましい態様において、本発明の化合物はモノホスホネート(n が0)であり、したがって、 R^4 は存在しない。

40

【0087】

Ca^{t+} は、水素イオンを含む(有機又は無機)陽イオンを表す(及び製剤緩衝液又は血漿中で交換されてもよい)。 R^2 、 R^3 及び/又は R^4 が Ca^{t+} である場合、 Ca^{t+} は、同一であっても異なってもよい。好ましくは、 R^2 、 R^3 及び/又は R^4 が Ca^{t+} である場合、 $X^4 b$ 及び $X^4 d$ (存在する、すなわち、 n が0ではない場合)並びに/又は X^3 はOであり、 O^-Ca^{t+} を生じる。

【0088】

本発明の別の態様において、 n が0である場合、 R^3 及び R^2 は $C_1 \sim 6$ (ヘテロ)アルキル基によって接続している。この場合、 R^3 及び R^2 は一緒になって置換又は非置換

50

の5～8員環を形成する。そのような態様では、好ましくは連結部分は R^1 で接続する。別の態様では、 n が0ではない場合、 R^3 及び R^4 は $C_{1\sim6}$ （ヘテロ）アルキル基によって同様の様式で接続してもよい。

【0089】

R^2 、 R^3 及び／又は R^4 はまた、単独でプロドラッグ部分であってもよく、又は、 X^{4b} 、 X^{4d} 及び／若しくは X^3 （存在する場合）と組み合わせたプロドラッグ部分であってもよい（プロドラッグ部分は $-X^{4b}-R^2$ 、 $-X^{4d}-R^4$ 及び／又は $-X^3-R^3$ ）。

【0090】

「プロドラッグ部分」は、非酵素的又は酵素的に切断される（活性化合物を放出する）基であってもよい。「プロドラッグ部分」は、本発明の複合体が対象に投与された後、その分子における別の位置の第2のプロドラッグ部分の放出を誘導する可能性がある。好ましくは、プロドラッグの形でのホスホ抗原は、標的細胞（例、腫瘍細胞）の内部で、例えばプロドラッグ部分の酵素的除去により、機能的に活性なホスホ抗原へ変換される。

10

【0091】

当技術分野において知られたプロドラッグ技術の例には、ピバロイルオキシメチル（POM）又はイソプロピルオキシカルボニルオキシメチル（POC）基の使用が含まれる。好ましい態様において、少なくとも R^2 及び R^3 は、POM基又はPOC基から独立して選択される（例えば、 n が0である場合）。 n が1又は2である場合、 R^4 も同様にPOM又はPOC基であってもよい。

20

【0092】

この種のホスホ抗原プロドラッグは、例えば、国際公開第2019/182904号に記載されている。そのようなホスホ抗原プロドラッグは、本発明のリンカー-薬物化合物及び複合体におけるpAg源として使用できる。

【0093】

別の例では、遊離基の組合せが使用できる。そのようなプロドラッグ技術の例は、モノホスフェート及びモノホスホネートの細胞内送達のために開発された「ProTide」技術である。ProTideプロドラッグにおけるモノホスフェート又はモノホスホネート基のヒドロキシルは、芳香族基及びアミノ酸エステル部分によってマスクされ（又は置換され）、それらが細胞内で酵素的に切断されて、遊離モノホスフェート及びモノホスホネートを放出する（Mehellou et al. 2018, Journal of Medicinal Chemistry, 61(6), 2211-2226）。

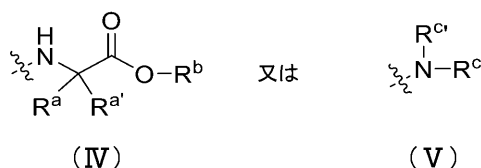
30

【0094】

したがって、ホスホ抗原がモノホスフェート又はモノホスホネートであり、かつ R^2 及び R^3 が「ProTide」遊離基の組合せである本発明のリンカー-薬物化合物及び複合体も、本発明の一部である。ホスホ抗原がProTideプロドラッグである場合、 R^2 が芳香族部分で、かつ R^3 がアミノ酸エステル部分であるか、又はその逆である。本発明の好ましい態様において、 n が0である場合、 R^2 又は R^3 の一方が、置換又は非置換（ヘテロ）アリール基であってもよく、 R^2 又は R^3 のもう一方は、式IV及び式V：

【化4】

40



（式中；

R^a 及び $R^{a'}$ は、H、置換されていてもよいアミノ酸側鎖、及び置換されていてもよい $C_{1\sim14}$ アルキル鎖を含む無極性側鎖から独立して選択され、

R^b は、H、ベンジル又は置換若しくは非置換（ $C_{1\sim8}$ ）-アルキルであり、

50

R^c 及び $R^{c'}$ は、H、又は置換されていてもよい ($C_1 \sim 6$) -アルキル、($C_3 \sim 6$) シクロアルキル、アリール若しくはヘテロアリールから独立して選択されるか、 R^c 及び $R^{c'}$ は、それらが結合している窒素と一緒に、置換されていてもよい環、例えば、アジリジノ、アゼチジノ、モルホリノ、ピペラジノ、ピロリジノ又はピペリジノ環を形成してもよい)

で示す構造から選択されてもよい。

【0095】

R^c 及び／又は $R^{c'}$ における置換基は、カルボン酸の生物学的等価体、アミノ、テトラゾール、スルホネート、ヒドロキシル、ハロ又はアルキルである。

【0096】

R^b が置換アルキルである場合、置換基は、ヒドロキシ、アミノ、ハロ、ニトロ、シアノ、カルボキシ、 NR_xR_y 、($C_1 \sim 6$) アルコキシ、($C_1 \sim 6$) アルカノイル、($C_1 \sim 6$) アルコキシカルボニル、($C_1 \sim 6$) アルキルチオ及び($C_2 \sim 6$) アルカノイルオキシからなる群から独立して選択される1つ以上の基であってもよく、 R_x 及び R_y は、H、($C_1 \sim C_6$) アルキル、($C_3 \sim 6$) シクロアルキル及び($C_3 \sim 6$) シクロアルキル($C_1 \sim 6$) アルキルからなる群から独立して選択される。または、 R_x 及び R_y は、それらが結合する窒素と一緒に、アジリジノ、アゼチジノ、モルホリノ、ピペラジノ、ピロリジノ又はピペリジノ基を形成する。

【0097】

連結部分

本発明の複合体又はリンカー-薬物化合物で使用する連結部分(又は「リンカー」)は、好ましくは合成リンカーである。リンカーの構造は、リンカーが低分子量のエフェクター分子(ホスホ抗原)とたやすく化学的に結合できるように、そして、得られたリンカー-薬物化合物が、別の物質、例えばポリペプチド(例、抗体)とたやすく複合化できるような構造である。リンカーの選択は、血中における複合体の安定性に影響し、低分子エフェクター化合物(ホスホ抗原)が放出される場合には、放出される様式に影響することができる。適切なリンカーは、例えば、Ducry et al, 2010, Bioconjugate Chem., 21, 5-13; King and Wagner, 2014, Bioconjugate Chem., 25, 825-839; Gordon et al., 2015, Bioconjugate Chem., 26, 2198-2215; Tsuchikama and An, 2018, Protein & Cell, 9, 33-46 DOI: 10.1007/s13238-016-0323-0; Polakis, 2016, Pharmacological Reviews, 68 (1), 3-19, DOI: 10.1124/pr.114.009373; Bargh et al., 2019, Chem. Soc. Rev., 48, 4361-4374, DOI: 10.1039/c8cs00676h、国際公開第02/83180号、同第2004/043493号、同第2010/062171号、同第2011/133039号、同第2015/177360号及び同第2018/069375号に記載されている。リンカーは、例えば、van Delft, F and Lambert, J.M., 2021, Chemical Linkers in Antibody-Drug Conjugates (ADCs), 1st Ed. Royal Society of Chemistry, ISBN-10: 1839162635に記載のとおり、切断可能であっても切断不可能であってもよい。リンカー-薬物を抗体と結合させる別の方法は、トランスペプチダーゼ、例えば細菌ソルターゼ又は植物アスパラギニルエンドペプチダーゼを用いて、適切な合成ペプチドと結合した化学的部分を部位特異的に結合させることを可能にすることである。ソルターゼA (Sort-A) は、C末端ペプチド配列(LPX TG)を認識し、この配列内のスレオニンと、結合相手(例、グリシントグづけペイロードであるADC)のN末端のグリシンとの間に結合を作成する(Combs et al., 2015, the AAPS Journal, Vol. 17, No. 2, 339-351, DOI: 10.1208/s12248-014-9710-8)。抗体薬物複合化は、部位特異的糖鎖工学によっても、例えば、エンドβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ(ENGase)及びモノサッカリルトランスフェラーゼ変異体を用いることで、達成できる(Manabe et al., 2021, Chem Rec, (11), 3005-3014, doi: 10.1002/tcr.202100054; Wang et al., 2019, Annu Rev Biochem, 20;88, 433-459, doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-012911)。

10

20

30

40

50

10

20

30

40



【 0 1 0 1 】

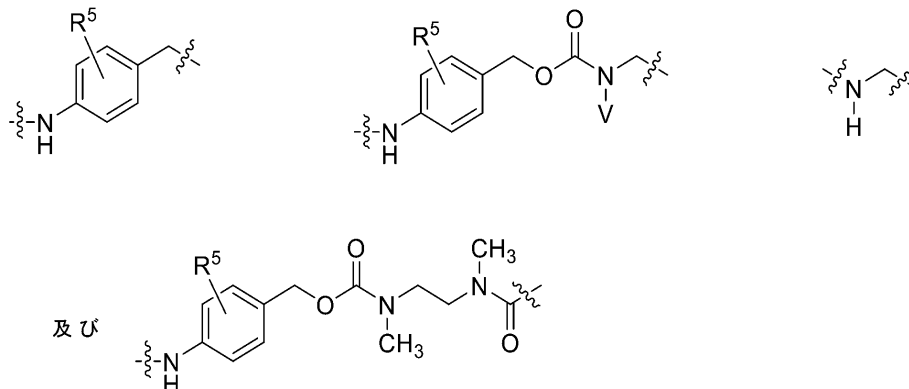
適切なアミノ酸の組合せは当技術分野において知られており、アラニン、グリシン、リジン、フェニルアラニン、バリン及びシトルリンからなる群から選択されるアミノ酸を含む。好ましくは p は 2 である。 p が 2 である場合、 AA_2 は、例えば、フェニルアラニルリジン、バリルアラニン、バリルシトルリン又はバリルリジンであってもよい。 p が 2 である場合、 AA_2 は、好ましくはバリルアラニン又はバリルシトルリンである。 p が 3 である場合、 AA_3 は、例えばアラニルフェニルアラニルリジンであってもよく、 p が 4 で

ある場合、 AA_4 は、例えばグリシルグリシルフェニルアラニルグリシンであってもよい。

【0102】

「 q 」は、1～12の整数、好ましくは2である； ES は、存在しないか、又は以下から選択される延長スペーサーである：

【化6】



10

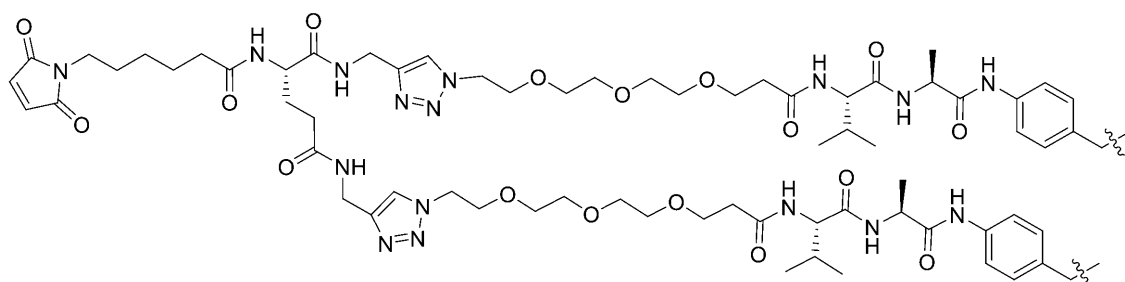
(式中、 R^5 は、 H 、ハロゲン、 CF_3 、 $C1\sim4$ アルキル、 $C2\sim4$ アルケニル、 $C2\sim4$ アルキニル、 $C1\sim4$ アルコキシル又は $C1\sim4$ アルキルチオ、好ましくは H 、 F 、 CH_3 又は CF_3 、より好ましくは H 又は F であり； V は、 H 、エチル、 $-(CH_2CH_2O)_p-OMe$ 、 $CH_2CH_2SO_2Me$ 又は $CH_2CH_2N(Me)_2$ であり、 p は1～12の整数である)。

20

【0103】

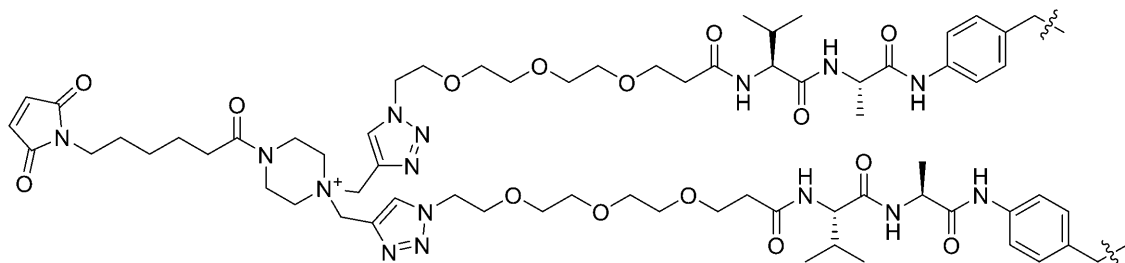
連結部分は分枝鎖状であってもよく、その場合、複数のホスホ抗原を保有できる1個の連結部分を生じる。分枝鎖状の連結部分の例は以下のとおり：

【化7】



30

及び



40

【0104】

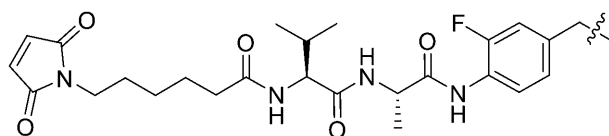
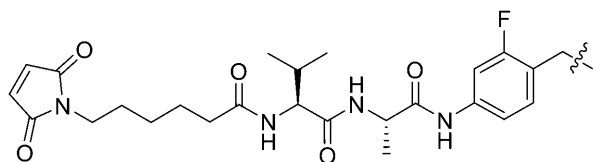
これらの分枝鎖状リンカー部分は、ターゲティング部分に対する pAg の比（「 DAR 」）が相対的に高い複合体を得るために使用できる。そのような分枝鎖状リンカーを用いて、 DAR が16、更に20以上の複合体を合成できる。本発明の抗体に基づく複合体の DAR は、わずか約2であってもよい。しかし、標的腫瘍細胞での発現が相対的に低いことが知られている腫瘍特異的標的に対する抗体では、ターゲティング部分に対する pAg の比が高い複合体が好ましい可能性がある。本発明のリンカー-薬物化合物で使用するリ

50

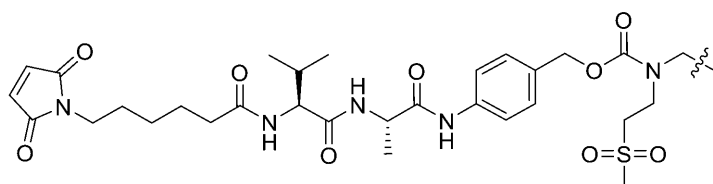
ンカー薬物化合物は、例えば、以下から選択される連結部分を含むしてもよい：

【 0 1 0 5 】

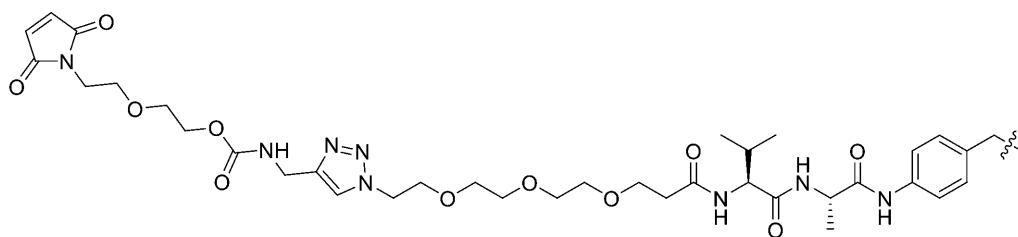
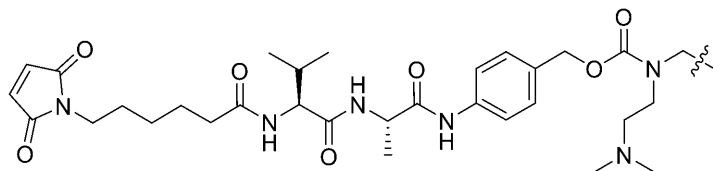
【 化 8 - 1 】



10



20



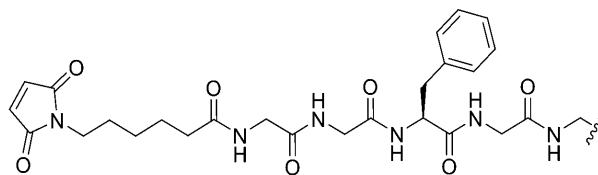
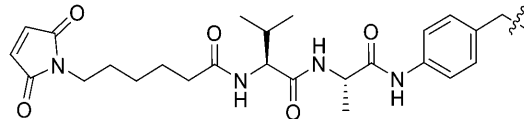
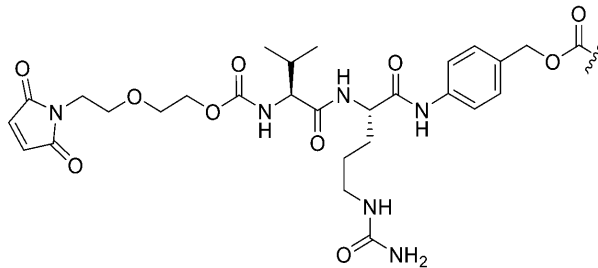
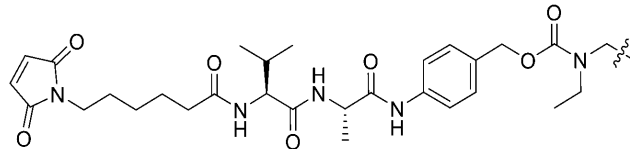
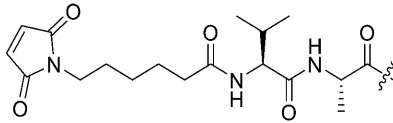
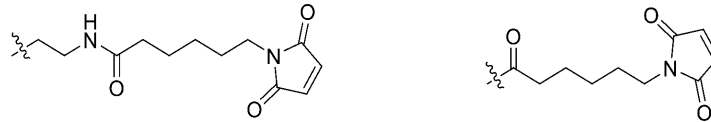
30

【 0 1 0 6 】

40

50

【化 8 - 2】



10

20

30

【0107】

リンカー部分（L）は、pAgと結合して、式IIに示す一般式のリンカー-薬物化合物を生じてよい。

【0108】

本発明のリンカー-薬物化合物は、ターゲティング部分と結合して、本発明の複合体を生成できる。本発明の好ましい複合体は、本発明のリンカー-薬物化合物と結合した腫瘍ターゲティング抗体又はその抗原結合断片を含む。

【0109】

本発明の具体的な態様において、本発明の複合体の一部としてのホスホ抗原はモノホスホネートプロドラッグであり、ここで、ホスホネート基の負荷電の非結合酸素原子は、ProTide部分（（ヘテロ）アリール基及びアミノエステルラジカル）の組合せ又は1以上のPOM若しくはPOCのようなプロドラッグ部分により保護され、一方、切断可能な連結部分は、ホスホ抗原分子中の、リンカーが切断されるとHMBPPなどのホスホ抗原に存在するアリル型アルコールに変換されるイソプレレン単位と結合していてもよい。

40

50

【0110】

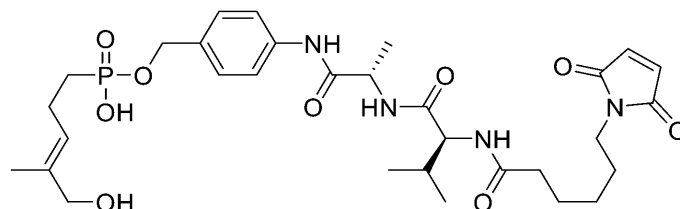
本発明の連結部分と共有結合した少なくとも1個のホスホ抗原を含むリンカー-薬物化合物は、本発明の複合体に含まれている場合、ある特定の原子又は原子群を欠損又は獲得してもよく、例えば、それは、複合体に含まれていない場合の本発明の同じリンカー-薬物化合物と比較して、水素原子を欠損してもよいことを理解する必要がある。これは、例えば、本発明のリンカー-薬物化合物が、例えば、ヒドロキシル部分へのエステル化を介してポリペプチドと複合化するための可能性がある。

【0111】

本発明のリンカー-薬物分子の合成例は、実施例において更に示している。本発明の好ましいリンカー-薬物化合物の例は、以下の構造式のXD18である：

10

【化9】



XD18

【0112】

リンカー-薬物XD18に基づく本発明の複合体は、抗体（例．実施例で例示されているように、リツキシマブ）あたり1～20個、好ましくは1～8個、より好ましくは2個のリンカー-薬物分子を含んでいてもよい。

20

【0113】

本発明の複合体の合成

本発明の複合体を合成するために、本発明の1つ以上のリンカー-薬物化合物を適切なターゲット部分と結合させてもよい。ターゲット部分がポリペプチド（抗体又はその結合断片）である場合、リンカー-薬物化合物は、適切なポリペプチドに存在する反応性天然アミノ酸残基、例えばリジン若しくはシステインを介して、又はN末端若しくはC末端を介して、複合化してもよい。あるいは、天然若しくは非天然の反応性アミノ酸残基が適切なポリペプチド中へ遺伝子操作されてもよく、又は反応基が翻訳後修飾によって導入されてもよい。

30

【0114】

本発明の複合体は、本発明のリンカー-薬物化合物を抗体又はその抗原結合断片と、例えば抗体のリジンε-アミノ基を介して、好ましくはアミン反応基を含む中間体、例えば、活性化エステルを用いて、複合化することで製造してもよい。そのような方法は通常の抗体薬物複合体（ADC）を製造するために知られている。

【0115】

あるいは、免疫複合体は、当技術分野において知られた方法及び条件を用いて、鎖間のジスルフィド結合の還元によって生成されるシステインの側鎖の遊離チオールを介してリンカーを複合化することで製造でき、例えば、Doronina et al, 2006, Bioconjugate Chem., 17, 114-124を参照されたい。製造過程は、溶媒露出した鎖間ジスルフィドの部分的還元、続いて、生じたチオールの、マイケル受容体含有リンカー、例えばマレイミド含有リンカー、αハロ酢酸アミド又はエステルでの修飾を含む。システイン結合ストラテジーは、還元型ジスルフィドあたり最大2個のリンカー含有リンカー-薬物を生じる。

40

【0116】

本発明の複合体におけるターゲティング部分として用いられる好ましい抗体は、ヒトIgGである。大半のヒトIgG分子は、4つの溶媒露出ジスルフィド結合を有し、そのことは、抗体あたり0から8までの整数の結合する連結部分と等しい。ターゲット部分あた

50

りの結合したホスホ抗原の正確な数は、連結部分あたりのホスホ抗原の数、ジスルフィド還元 の程度、及びその後の複合化反応におけるリンカー含有リンカー薬物のモル当量によって決まる。全ての4つのジスルフィド結合の完全な還元は、抗体あたり8個のリンカー部分を有する均一な構築物を与え、一方、部分的還元は、通常、抗体あたり0個、2個、4個、6個又は8個の連結部分を有する不均一な混合物を生じる。

【0117】

好ましい態様において、本発明は、本発明のリンカー薬物化合物が、抗体又はその抗原結合断片と、抗体又はその抗原結合断片のシステイン残基を介して結合している複合体に関する。

【0118】

抗体又はその抗原結合断片との部位特異的複合化

抗体は多くのリジン残基及びシステインジスルフィド結合を含有するため、通常の複合化は、分析的特徴づけ及び製造に関して課題を提示する不均一な混合物を生じる。さらに、これらの混合物の個々の構成物は、その薬物動態、効力及び安全性プロファイルに関して異なる物理化学的特性及び薬理を示し、この様式を最適化することへの合理的なアプローチの妨げになる。

【0119】

複合体の均一性を向上させるために、本発明の（イムノ）複合体に用いられる抗体は、リンカーの部位特異的複合化を可能にするように改変してもよい。部位特異的な、薬物の抗体への複合化の方法は、C.R. Behrens and B. Liu, 2014, mAbs, 6 (1), 1-8に包括的に概説されており、国際公開第2015/177360号、同第2005/084390号及び同第2006/034488号に記載されている。

【0120】

部位特異的免疫複合体は、変異型抗体又はその抗原結合断片の適切な位置における操作されたシステイン残基の側鎖を介して、リンカー薬物化合物を抗体又はその抗原結合断片と複合化させることによって製造するのが好ましい。操作されたシステインは、通常、他のチオール、例えばシステイン又はグルタチオンでキャップされて、ジスルフィドを形成する。これらのキャップされた残基は、リンカー薬物結合を行う前に、キャップをはずす必要がある。リンカー薬物と操作された残基との結合は、（1）天然の鎖間ジスルフィドと変異型ジスルフィドの両者を還元し、その後、 CuSO_4 若しくはデヒドロアスコルビン酸といった穏やかな酸化剤を用いて天然の鎖間システインを再酸化し、続いて、キャップがない操作されたシステインとリンカー薬物とを標準的な複合化を行う方法、又は（2）鎖間ジスルフィド結合より速く変異型ジスルフィドを還元する穏やかな還元剤を用い、続いて、キャップがない操作されたシステインとリンカー薬物とを標準的な複合化を行う方法、で達成される。リンカー薬物を部位特異的に複合化する適切な方法は、例えば、還元と再酸化について記載する国際公開第2015/177360号、穏やかな還元剤を使用する方法を記載する国際公開第2017/137628号、及び還元された鎖間システインとキャップされていない操作されたシステインを結合する方法について記載する国際公開第2018/215427号に見いだすことができる。

【0121】

医薬組成物

別の側面では、本発明は、本発明の複合体を含む組成物に関し、好ましくは組成物は医薬組成物であり、より好ましくは1つ以上の薬学的に許容される添加剤を更に含む。そのような組成物を、以後、本発明の組成物という。組成物は、液体製剤、凍結乾燥製剤であってもよく、又は、カプセル剤若しくは錠剤の形態であってもよい。

【0122】

本発明の免疫複合体を含む医薬組成物は、通常、静脈内注入前に（水への）溶解（すなわち、再構成）を必要とする凍結乾燥ケーキ（凍結乾燥粉末）、又は使用前に解凍を必要とする凍結（水性）溶液の形態をとる。したがって、好ましい態様において、本発明は、本発明の免疫複合体を含む凍結乾燥組成物に関し、好ましくは組成物は医薬組成物であり

10

20

30

40

50

、より好ましくは1つ以上の薬学的に許容される添加剤を更に含む。別の好ましい態様において、本発明は、水及び本発明の免疫複合体を含む凍結組成物に関し、好ましくは組成物は医薬組成物であり、より好ましくは1つ以上の薬学的に許容される添加剤を更に含む。これに関連して、凍結溶液は大気圧であることが好ましく、凍結溶液は、0℃未満で本発明の液体組成物を凍結させて得られたものであることが好ましい。（凍結乾燥前の）本発明の医薬組成物に配合する適切な薬学的に許容される添加剤には、緩衝液（例．クエン酸、ヒスチジンなどのアミノ酸又はコハク酸を有する塩の水溶液）、凍結乾燥保護剤（例．スクロース、トレハロース）、浸透圧調節剤（例．塩化ナトリウムなどの塩化物の塩）、界面活性剤（例．ポリソルベート）及び増量剤（例．マンニトール、グリシン）が含まれる。凍結乾燥タンパク質製剤に用いる添加剤は、凍結乾燥工程及び保存中にタンパク質変性を防止する能力に基づいて選択される。

10

【0123】

医学用途

別の側面では、本発明は、医薬品として使用するための、好ましくは、がん、自己免疫疾患又は感染性疾患を治療するための、本発明の複合体又は本発明の組成物を提供する。本発明の複合体は、例えば、腫瘍細胞及び／又は感染細胞に $\gamma\delta T$ 細胞の細胞毒性を誘導するために使用できる。

【0124】

複合体及び組成物を、以後、本発明で使用する製造物と集合的にいう。

【0125】

第1の態様において、本発明の製造物の用途は、固形腫瘍又は血液悪性腫瘍の治療である。第2の態様において、本発明の製造物の用途は、自己免疫疾患の治療である。第3の態様において、本発明の製造物の用途は、感染性疾患、例えば、細菌、ウイルス、真菌、寄生虫又は他の感染症の治療である。

20

【0126】

本発明におけるがんは、好ましくは、本発明で使用する製造物が結合する抗原を発現する腫瘍である。そのような腫瘍は、固形腫瘍又は血液悪性腫瘍であってもよい。これまでに説明した本発明で使用する製造物で治療できる腫瘍又は血液悪性腫瘍の例には、乳がん；脳がん（例．神経膠芽腫）；頭頸部がん；甲状腺がん；耳下腺がん、副腎がん（例．神経芽細胞腫、傍神経節腫又は褐色細胞腫）；骨がん（例．骨肉腫）；軟部肉腫（STS）；眼がん（例．ぶどう膜黒色腫）；食道がん；胃がん；小腸がん；結腸直腸がん；尿路上皮細胞がん（例．膀胱、陰茎、尿管又は腎がん）；卵巣がん；子宮がん；膣がん、外陰部のがん及び子宮頸がん；肺がん（特に、非小細胞肺癌（NSCLC）及び小細胞肺癌（SCLC））；黒色腫；中皮腫（特に、悪性胸膜及び腹膜中皮腫）；肝臓がん（例．肝細胞がん）；膵臓がん；皮膚がん（例．基底細胞腫、扁平上皮がん又は隆起性皮膚線維肉腫）；精巣がん；前立腺がん；急性骨髄性白血病（AML）；慢性骨髄性白血病（CML）；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；骨髄異形成症候群（MDS）；芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍（BPDCN）；ホジキンリンパ腫；非ホジキンリンパ腫（NHL）（ろ胞性リンパ腫（FL）、CNSリンパ腫及びびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（DLBCL）を含む）；軽鎖アミロイドーシス；形質細胞性白血病；及び多発性骨髄腫（MM）が含まれるが、これには限定されない。

30

40

【0127】

本発明における自己免疫疾患は、好ましくは、本発明で使用する製造物が結合する抗原に関連した自己免疫疾患である。自己免疫疾患は、正常な体細胞及び体内組織に対する異常な免疫応答から生じた状態を表す。少なくとも80種類の幅広い自己免疫疾患がある。器官特異的で、かつある特定の組織を冒すことに限定される疾患もあれば、身体中の多くの組織に影響する全身性炎症性疾患と類似する疾患もある。これらの徴候及び症状の出現及び重症度は、生じる炎症応答の場所及びタイプに依存し、時間と共に変動する可能性がある。これまでに説明した本発明で使用する製造物で治療できる自己免疫疾患の例には、関節リウマチ；若年性皮膚筋炎；乾癬；乾癬性関節炎；ループス；サルコイドーシス；ク

50

ローン病；湿疹；腎炎；ぶどう膜炎；多発性筋炎；神経炎、例えば、ギラン・バレー症候群；脳炎；くも膜炎；全身性硬化症；自己免疫媒介性筋骨格系及び結合組織疾患；神経筋変性疾患、例えば、アルツハイマー病、多発性硬化症（MS）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、視神経脊髄炎、並びに大、中、小血管の川崎及びヘノッホ・シェンライン血管炎；寒冷及び温式凝集素症；自己免疫性溶血性貧血（AIHA）；免疫性血小板減少性紫斑病、ITP）、1型糖尿病；橋本甲状腺炎；グレーブス病；グレーブス眼症；副腎炎；下垂体炎；尋常性天疱瘡；アジソン病；強直性脊椎炎；ベーチェット症候群；セリアック病；グッドパスチャー症候群；重症筋無力症；サルコイドーシス；強皮症；原発性硬化性胆管炎、後天性表皮水疱症及び類天疱瘡が含まれるが、これには限定されない。

【0128】

本発明における感染性疾患は、好ましくは、本発明で使用する製造物が結合する抗原に関連した感染性疾患である。そのような感染性疾患は、細菌、ウイルス、真菌、寄生虫又は他の感染症であってもよい。これまでに説明した本発明で使用する製造物で治療できる感染性疾患の例には、マラリア；トキソプラズマ症；ニューモシスチス・イロベチ（*pneumocystis jirovecii*）類鼻疽；細菌性赤痢；リステリア；シクロスポラ属（*Cyclospora*）又はらい菌（*mycobacterium leprae*）が引き起こす疾患；結核；及びHIV陽性個体、免疫抑制治療中の個体、又は、嚢胞性線維症若しくは良性増殖性疾患（例、胞状奇胎又は子宮内膜症）といった先天異常の個体のような免疫不全個体における感染が含まれるが、これには限定されない。

【0129】

この明細書に記載の製造物の用途は、この明細書に記載の医薬品の製造のためであってもよい。この明細書に記載の本発明で使用する製造物は、好ましくは、治療方法のためであり、使用のための製造物が、対象、好ましくはそれを必要としている対象へ、治療有効量で投与される。したがって、あるいは、他の態様と組み合わせて、ある態様では、本発明は、がん、自己免疫疾患又は感染性疾患、特にがんを治療する医薬品の製造のための本発明の製造物の使用に関する。本発明で治療できる限定するものではないがん又は他の疾患については、これまでの説明を参照されたい。

【0130】

あるいは、他の態様と組み合わせて、ある態様では、本発明は、がん、自己免疫疾患又は感染性疾患、特にがんを治療する方法であって、前記治療を必要としている対象へ本発明で使用する製造物の治療有効量を投与することを含む、方法に関する。本発明で治療できる、限定するものではないがん又は他の疾患については、これまでの説明を参照されたい。

【0131】

本発明で使用する製造物は、対象に投与するためのものである。本発明で使用する製造物は、有効量の組成物を必要としている対象に投与することで、これまでに説明した治療方法で使用する。この明細書では、用語「対象」は、哺乳動物として分類される全ての動物を指し、霊長類及びヒトが含まれるが、これには限定されない。対象は、好ましくはヒトである。「治療有効量」は、所望の応答をもたらすのに、又は症状若しくは徴候を寛解させるのに十分な量を意味する。特定の対象についての治療有効量は、治療されている状態、対象の健康状態、投与方法、経路及び用量並びに副作用の重症度といった因子に応じて変化してもよい。

【0132】

組合せ使用

別の態様では、本発明は、本発明で使用する製造物を提供し、1つ以上の他の治療剤と組み合わせて使用する。本発明で使用する製造物は、1つ以上の他の治療剤と同時に又は逐次的に用いてもよい。

【0133】

適切な化学療法剤には、アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード、ヒドロキシウレア、ニトロソウレア、テトラジン（例、テモゾロミド）及びアジリジン（例、マイ

10

20

30

40

50

トマイシン) ; DNA 損傷応答に干渉する薬物、例えば、PARP 阻害剤、ATR 及び ATM 阻害剤、CHK1 及びCHK2 阻害剤、DNA-PK 阻害剤、並びにWEE1 阻害剤 ; 代謝拮抗剤、例えば葉酸代謝拮抗剤 (例、ペメトレキセド)、フルオロピリミジン (例、ゲムシタビン)、デオキシヌクレオシド類似体及びチオプリン ; 微小管阻害剤、例えば、ビンカアルカロイド及びタキサン ; トポイソメラーゼI 及びII 阻害剤 ; 細胞毒性抗生物質、例えば、アントラサイクリン及びブレオマイシン ; 低メチル化剤、例えば、デシタビン及びアザシチジン ; ヒストンデアセチラーゼ阻害剤 ; オールトランスレチノイン酸 ; 並びに三酸化ヒ素が含まれる。適切な放射線療法剤には、放射性同位元素、例えば、 ^{131}I エーメタヨードベンジルグアニジン (MIBG)、リン酸ナトリウムとしての ^{32}P 、塩化 ^{223}Ra 、塩化 ^{89}Sr 及び ^{153}Sm ジアミンテトラメチレンホスホネート (EDTMP) が含まれる。ホルモン治療剤として使用される適切な物質には、ホルモン合成の阻害剤、例えば、アロマターゼ阻害剤及びGnRH 類似体 ; ホルモン受容体アンタゴニスト、例えば、選択的エストロゲン受容体調節物質 (例、タモキシフェン及びフルベストラント) 並びに抗アンドロゲン剤、例えば、ピカルタミド、エンザルタミド及びフルタミド ; CYP17A1 阻害剤、例えば、アピラテロン ; 並びにソマトスタチン類似体が含まれる。

10

【0134】

ターゲット化治療剤は、腫瘍形成及び増殖に関与する特定のタンパク質に干渉する治療剤であり、低分子薬 ; タンパク質、例えば、治療用抗体 ; ペプチド及びペプチド誘導体 ; 又はタンパク質-低分子ハイブリッド、例えば、ADC であってもよい。ターゲット化低分子薬の例には、TLR リガンド、mTOR 阻害剤、例えば、エベロリムス、テムシロリムス及びラパマイシン ; キナーゼ阻害剤、例えば、イマチニブ、ダサチニブ及びニロチニブ ; VEGF 阻害剤、例えば、ソラフェニブ及びレゴラフェニブ ; EGFR / HER2 阻害剤、例えば、ゲフィチニブ、ラパチニブ及びエルロチニブ ; 並びにCDK4 / 6 阻害剤、例えば、パルボシクリブ、リボシクリブ及びアベマシクリブが含まれる。ペプチド又はペプチド誘導体ターゲット化治療剤の例には、プロテアソーム阻害剤、例えば、ボルテゾミブ及びカルフィルゾミブが含まれる。

20

【0135】

適切な抗炎症薬には、D-ペニシラミン、アザチオプリン及び6-メルカプトプリン、シクロスポリン、抗TNF 生物製剤 (例、インフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、ゴリムマブ、セルトリズマブ又はセルトリズマブベゴル)、レンフルノミド (lenflunomide)、アバタセプト、トシリズマブ、アナキンラ、ウステキヌマブ、リツキシマブ、ダラツムマブ、オフアツムマブ、オビヌツズマブ、セクキヌマブ、アプレミラスト、アセトレチン (acetrelin)、並びにJAK 阻害剤 (例、トファシチニブ、バリシチニブ又はウパダシチニブ) が含まれる。

30

【0136】

免疫治療剤には、免疫応答を誘導、増強又は抑制する物質、例えば、サイトカイン (IL-2 及びIFN- α) ; 免疫調節イミド薬、例えば、サリドマイド、レナリドミド、ポマリドミド又はイミキモド ; 治療用がんワクチン、例えば、タリモジンラヘルパレブペク ; 細胞に基づく免疫治療剤、例えば、樹状細胞ワクチン、養子T 細胞又はキメラ抗原受容体改変T 細胞 ; 及び治療用 (二重特異性) 抗体又は抗体依存性細胞傷害 (ADCC)、抗体依存性細胞性食作用 (ADCP)、若しくは細胞上の膜結合型リガンドと結合した時にFc 領域を介する補体依存性細胞傷害 (CDC) を引き起こすことができる他のADC が含まれる。

40

【0137】

本発明において、治療は、好ましくは、がん、自己免疫疾患又は感染性疾患を防止し、元の状態に戻し、治療させ、寛解させ、及び／又は遅らせることである。これは、がん、自己免疫疾患若しくは感染性疾患の少なくとも1つの症状の重症度が低下しており、及び／又は、がん、自己免疫疾患若しくは感染性疾患に関連した少なくとも1つのパラメーターが改善されていることを意味してもよい。

50

【0138】

本発明において、対象は、生き延びた者であってもよく、及び／又は病気にかかっていないと考えられてもよい。あるいは、疾患又は状態が、停止又は遅延していてもよい。本発明において、生活の質の向上及び観察される鎮痛とは、対象が必要とする鎮痛薬の量が、治療の開始時点より少ない可能性があることを意味してもよい。これに関連して、「より少ない」とは、5%少ない、10%少ない、20%少ない、30%少ない、40%少ない、50%少ない、60%少ない、70%少ない、80%少ない、90%少ないことを意味してもよい。対象は、もはや鎮痛薬を必要としなくてもよい。これらの生活の質の向上及び観察される鎮痛は、少なくとも1週間、2週間、3週間、4週間、1月、2月、3月、4月、5月、6月又はそれ以上の治療後に対象で、見られ、検出され、又は評価されてもよく、前記対象の治療の開始時点での生活の質及び観察された鎮痛と比較してもよい。

10

【0139】

一般的な定義

本発明の複合体及びリンカー-薬物は、1つ以上のキラル中心及び／又は二重結合を有してもよく、したがって、立体異性体、例えば、二重結合異性体（すなわち、幾何異性体）、位置異性体、鏡像異性体又はジアステレオマーとして存在してもよい。したがって、明細書に示す化学構造は、立体異性的に純粋な形（例、幾何的に純粋、鏡像異性的に純粋又はジアステレオ異性的に純粋）並びに鏡像異性体混合物及び立体異性体混合物を含む、例示し、特定した化合物の全ての可能な鏡像異性体及び立体異性体を包含する。鏡像異性体混合物及び立体異性体混合物は、当業者によく知られた分離技術又はキラル合成技術を用いて、その構成要素、鏡像異性体又は立体異性体へ分解できる。化合物は、エノール形、ケト形及びその混合物を含むいくつかの互変異性形で存在する可能性がある。したがって、明細書に示した化学構造は、例示し、特定した化合物の全ての可能な互変異性形を含む。いくつかの異性体の形、例えば、ジアステレオマー、鏡像異性体及び幾何異性体は、当業者により物理的及び／又は化学的方法により分離できることも理解されている。構造式又は物質名からキラル中心があると当業者は理解するが、キラリティーが示されていない場合、各キラル中心について、ラセミ混合物、純粋なR鏡像異性体及び純粋なS鏡像異性体の3つ全てが個々に参照される。化合物の構造が特定の鏡像異性体として示されている場合、この発明は、その特定の鏡像異性体に限定されないことを理解する必要がある。2つの部分が一緒に結合する場合、これは、これらの部分が原子として存在しないことを意味し、原子価のコンプライアンスは電子結合の置換で満たされる。これらは全て当技術分野において知られている。

20

30

【0140】

この明細書及び特許請求の範囲に開示した化合物は、エキソ及びエンド位置異性体として存在してもよい。他に説明がない限り、明細書及び特許請求の範囲における化合物の記載は、化合物の個々のエキソ位置異性体と個々のエンド位置異性体の両者、加えてその混合物を含むことが意図される。さらに、この明細書及び特許請求の範囲に開示された化合物は、シス及びトランス異性体として存在してもよい。他に説明がない限り、明細書及び特許請求の範囲における化合物の記載は、化合物の個々のシス異性体と個々のトランス異性体の両者、加えてその混合物を含むことが意図される。例えば、化合物の構造がシス異性体として示されている場合、対応するトランス異性体、又はシス及びトランス異性体の混合物が、この発明から排除されないことを理解する必要がある。

40

【0141】

この文書及びその特許請求の範囲において、動詞「含むこと」及びその活用形は、その語の後の項目が含まれるが、具体的に言及されていない項目は排除されないことを意味するように、その限定されない意味で用いられる。加えて、不定冠詞「1つの(a, an)」による要素への言及は、文脈が、その要素の1つ及び1つだけあることを明らかに要求しない限り、その要素の1つより多くが存在する可能性を排除しない。したがって、不定冠詞「1つの(a, an)」は、通常、「少なくとも1つ」を意味する。

【0142】

50

数値に付随して用いる場合の「約」又は「およそ」（例．約 10）は、好ましくは、その値が、その値の 1 % 多い又は少ない所定の値であってもよいことを意味する。

【0143】

物質のパラメーターをこの発明で検討する場合、他に特定しない限り、パラメーターは、生理学的条件で決定され、測定され、又は明らかにされることが仮定される。生理学的条件は当業者に知られており、水性溶媒系、大気圧、6～8のpH、室温（RT）から約37℃まで（約20℃～約40℃）、及び緩衝液塩又は他の構成要素の適切な濃度を含む。電荷は平衡を伴う場合が多いことは理解されている。電荷を保有又は所有すると言われる部分は、それがそのような電荷を所有又は保有しない状態より頻繁に、それがそのような電荷を所有又は保有する状態で見いだされる部分である。そのようなものとして、当業者によって理解されているように、荷電されるこの明細書で示した原子は、特定の条件下で非荷電であってもよく、中性部分は、特定の条件下で荷電されてもよい。

10

【0144】

この明細書で引用した全ての特許及び論文は、全体として参照によりこの明細書に組み入れられる。

【0145】

以下の実施例は、例示を目的としてのみ提供し、本発明の範囲を限定することを決して意図するものではない。

【実施例】

【0146】

一般的手順

溶媒：

20

さまざまなベンダー製の試薬グレード又はHPLCグレードの溶媒を使用した。

NMRスペクトル：

NMRスペクトルは、Bruker AVANCE400（¹Hでは400MHz；¹³Cでは101MHz）で記録した。

化学シフト：

化学シフトは、内部標準であるテトラメチルシラン又は残留非重水素化溶媒に対してppmで示す。

生成物のUPLC測定：

30

生成物は、流量0.4mL／分でWaters ACQUITY UPLC BEH C18カラム（1.7μm粒子サイズ、2.1×50mm）を装着したWaters UPLC-MS（SQD 2検出器付き）で測定した。（MeCN／水×0.1%ギ酸）。

HPLC精製：

分取HPLCによる精製は、Waters SunFire Prep C18 OBD 5μmカラム（19×150mm）を装着したShimadzu Prominence 20APシステムにより流量17mL／分で行った。

【0147】

一般的手順X X A：クロロメチルカルバメートによるアルコールのアルキル化

パラホルムアルデヒド（3当量）及びトリメチルシリルクロリド（TMSCl）（2.75当量）を、順次、ジクロロメタン（DCM）中のカルバメート（2.5当量）（0.45Mカルバメート）の懸濁液（室温）へ、窒素雰囲気下に加えた。混合物を1時間攪拌し、次いで濃縮し、DCMと共に蒸発させ、高真空で2分間乾燥させた。淡黄色のオイル状物をDCM（0.6Mカルバメート）中に溶解した。

40

【0148】

次いで、この溶液のアリコート（通常1.5当量のクロロメチルカルバメート）を、DCM（0.24M）中のアルコール（1当量）の冷却（0℃）した混合物に加えた。N,N-ジイソプロピルエチルアミン（DIEPEA、3当量）を加え、5分間攪拌した後、反応物を室温に温めた。30～60分後、UPLC-MSを用いて変換を評価し、不完全な場合には、ストック溶液を更に加えた。クロロメチルカルバメートの添加ごとに、化学量論

50

的量のD I P E Aを加え、塩基性のp Hを維持した。完全な変換が観察された時点で、M e O Hで反応を停止し、濃縮し、精製した。

【0149】

一般的手順X X B：ホスホン酸ジクロリドのホスホネートジエステルからの製造

トリメチルシリルプロミド (T M S B r、10当量) を、D C M (0.2 M) 中のホスホネートジエステル (1当量) の冷却 (0℃) 溶液へ、窒素雰囲気下、5分間かけて加えた。30分後に氷浴を取り除き、反応物を室温で3.5時間攪拌した。窒素ガスでパージしたロータリーエバポレーターを用いて、溶液を濃縮し、粗生成物を窒素雰囲気下でD C M (0.2 M) に溶解し、0℃に冷却した。ジメチルホルムアミド (D M F、2滴) を加え、続いて、塩化オキサリル (3当量) を滴下した。冷却浴を1時間かけて室温まで温め、16時間攪拌した。反応物を窒素雰囲気下で濃縮し、D C M (3×10 mL) と共に蒸発させて、更に精製することなく使用できる粗ホスホン酸ジクロリドを得た。

10

【0150】

一般的手順X X C：S e O₂によるアリル酸化

工程1 S e O₂ (0.7当量) 及びサリチル酸 (0.1当量) をD C Mに溶解し (0.9 M S e O₂)、t-B u O O H (4.5当量) を室温に加えた。15分間激しく攪拌した後、D C M (0.82 M) 中のアルケン (1当量) を加えた。生じた反応混合物を、U P L C-M S分析がアルケンの完全な消費を示すまで (通常16~48時間)、激しく攪拌した。反応混合物を0℃に冷却し、次いで、飽和水溶液N a H C O₃ (用いた1 mLのt B u O O Hにつき10 mL) で慎重にクエンチした。混合物を、沈澱した塩が溶解するのを助けるために水で希釈し、生成物を、U P L C-M S分析で水相に生成物が存在しなくなるまで、D C M (又はより極性の化合物ではE t O A c) で3~6回、抽出した。合わせた有機層をN a₂ S O₄上で乾燥し、ろ過し、濃縮して、アリル型アルコール及び対応するアルデヒド生成物の混合物を得た。

20

【0151】

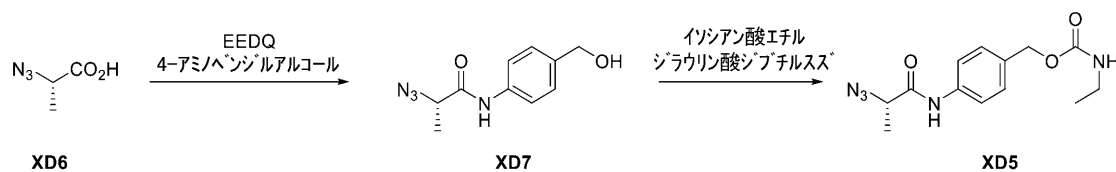
工程2 粗生成物をE t O A c (0.2 M) に溶解し、A c O H (5当量)、引き続いて、N a B H (O A c)₃ (5当量) を加えた。反応混合物を、U P L C-M S分析がアルデヒドの完全な消費を示すまで (通常1~3時間)、50℃で攪拌した。次いで、反応混合物を室温に冷却し、水 (1~5体積) を加えた。水層を、U P L C-M S分析で水相中に生成物が存在しなくなるまで、E t O A c (2~6×) で抽出した。合わせた有機層を、少量の飽和N a H C O₃水溶液及びブラインで洗浄し、N a₂ S O₄で乾燥し、ろ過し、濃縮し、精製した。

30

【0152】

実施例1 カルバミン酸エステル (X D 5) の合成

【化10】



40

【0153】

(S)-2-アジド-N-(4-(ヒドロキシメチル)フェニル)プロパンアミド (X D 7)

(S)-2-アジドプロピオン酸 (6.73 g、58.5 mmol) と(4-アミノフェニル)メタノール (10.0 g、82 mmol) を、D C M (228 mL) 及びM e O H (75 mL) 中に溶解した。0℃に冷却後、N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン (E E D Q、28.9 g、117 mmol) を加え、混合物を室温で終夜攪拌し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、D C M中の0~40% E t O A c) により、アジ化物X D 7 (9.3 g、72%) を黄色の液体として得た。MS (ESI⁺) C₁₀H₁₃N₄O₂⁺ [M+H]⁺ 計算値221.10、実測値221.11。

50

【0154】

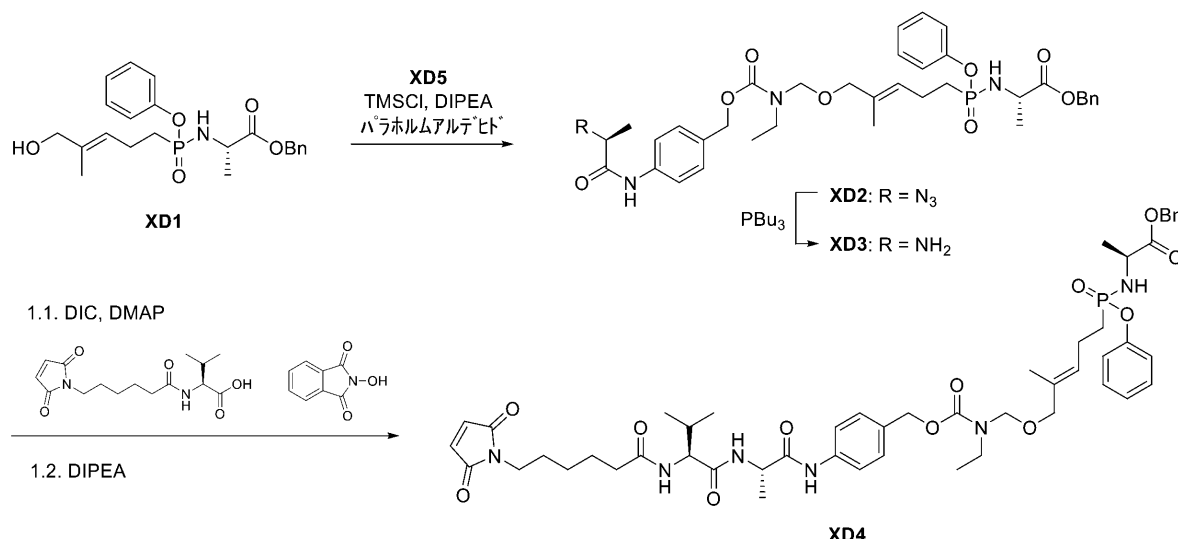
エチルカルバミン酸(S)-4-(2-アジドプロパンアミド)ベンジルエステル (XD5)

XD7 (3.8 g、17.2 mmol) のテトラヒドロフラン (THF、100 mL) 溶液に、0℃で、ジラウリン酸ジブチルスズ (2.57 mL、4.31 mmol) とイソシアン酸エチル (2.05 mL、25.9 mmol) を加え、混合物を室温で5時間撹拌した。反応混合物をシリカゲル上で濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中の0～50%ジエチルエーテル、続いてヘプタン中の0～100% EtOAc) で精製して、アジ化物XD5 (4.25 g、85%) を白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 8.29 (br s, 1H), 7.52 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 5.04 (s, 2H), 4.92 (br s, 1H), 4.18 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 3.22 (quint, J = 6.7 Hz, 2H), 1.61 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.12 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₁₃H₁₇N₅NaO₃⁺ [M+Na]⁺ 計算値314.1、実測値314.1。

10

【0155】

実施例2 pAg (プロドラッグ) 部分XD1からのリンカー-薬物化合物XD4の合成【化11】



20

30

【0156】

((E)-5-((((4-((S)-2-アジドプロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(エチル)アミノ)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステル (XD2)

XD1 (100 mg、0.240 mmol、Kadri et al., J. Med. Chem. 2020, 63, 11258-11270に記載のとおり製造) を、一般手順XXAに従い、カルバミン酸エステルXD5と反応させた。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0～5% MeOH) により、XD2 (134 mg、78%) を無色のオイル状物として得た。MS (ESI⁺) C₃₆H₄₆N₆O₈P⁺ [M+H]⁺ 計算値721.3、実測値721.6。

40

【0157】

((E)-5-((((4-((S)-2-アミノプロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(エチル)アミノ)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステル (XD3)

アジ化物XD2 (134 mg、0.186 mmol) のTHF/水 (2 mL、9:1) 溶液を、窒素ガスで15分間パージした。室温でトリブチルホスフィン (0.116 mL、0.465 mmol) を加え、混合物を室温で4時間撹拌した。反応物を濃縮し、含まれる水分をMeCN (2×7 mL) 及びトルエン (1×7 mL) と共に蒸発させて除去した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0～20% MeOH) で精製して、アミンXD3 (97 mg、75%) を得た。MS (ESI⁺) C₃₆H₄₈

50

$\text{N}_4\text{O}_8\text{P}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 計算値695.3、実測値695.5。

【0158】

((E)-5-((((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)-3-メチルブタンアミド)プロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(エチル)アミノ)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステル (XD4)

(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)-L-バリン (26.5 mg、0.085 mmol、国際公開第2013/122823号に記載のとおり製造)、DMAP (1.0 mg、8.5 μmol) 及びN-ヒドロキシフタルイミド (13.9 mg、0.085 mmol) のTHF (0.8 mL) 懸濁液 (室温) に、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド (DIC; 0.013 mL、0.085 mmol) を加えた。3時間後、室温で反応混合物を濃縮し、DCM (約1 mL) 中に懸濁した。次いで、XD3 (41 mg、0.059 mmol) のDMF (0.5 mL) 溶液にオレンジ／赤の上清を加え、室温で75分間撹拌した。濃縮後、粗生成物をRP-HPLC (水／MeCN、40%から90%勾配、修飾剤は使用せず) で精製した。生成物画分の凍結乾燥により、XD4 (10.9 mg、13%) を得た。MS (ESI⁺) $\text{C}_{51}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{P}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 計算値987.5、実測値987.7。

10

【0159】

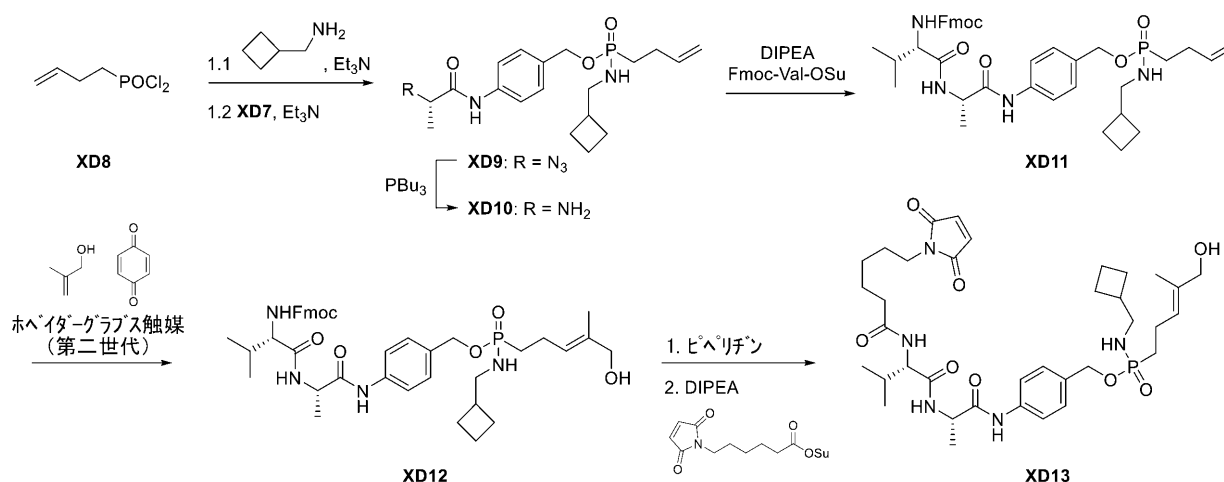
リンカー-薬物化合物XD4を抗体と結合させて、複合体ADC-XD4-r及びADC-XD4-iを、実施例22に記載のとおり製造した。これらの $\gamma\delta\text{T}$ 細胞に対する効果を、実施例23に記載のとおり試験した。

20

【0160】

実施例3 リンカー-薬物化合物XD13の合成

【化12】



30

【0161】

P-(ブタ-3-エン-1-イル)-N-(シクロブチルメチル)ホスホンアミデート 4-((S)-2-アジドプロパンアミド)ベンジルエステル (XD9)

40

最初に、シクロブタンメタンアミン (166 mg、1.95 mmol) と Et_3N (0.544 mL、3.90 mmol) のDCM (3.8 mL) 溶液に、 -78°C で、ブタ-3-エン-1-イルホスホン酸ジクロリド (XD8、338 mg、1.95 mmol、Kadri et al. J. Med. Chem. 2020, 63, 11258-11270に記載のとおり製造) を滴下した。5分後に冷却浴を取り除き、45分間撹拌を続けた。

【0162】

別のフラスコで、アルコールXD7 (429 mg、1.95 mmol) と Et_3N (0.544 mL、3.90 mmol) を、窒素雰囲気下でDCM (3.8 mL) に溶解し、混合物を -78°C に冷却した。次に、最初の工程で調製した溶液をろ過し、アルコールX

50

D 7を含む溶液に直接加えた。DCM (2 mL) を使用して移し替えを完了した。5 分後に反応物を室温に温め、5 時間攪拌した。反応を1-メチルピペラジン (0.1 mL) でクエンチした。濃縮後、粗生成物を EtOAc (50 mL) に溶解し、塩酸 (0.1 M、30 mL) で洗浄した。水相を EtOAc (15 mL) で抽出し、合わせた有機相を飽和 NaHCO₃ 水溶液、水及びブラインで洗浄し、MgSO₄ で乾燥し、ろ過し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM 中の 0~80% EtOAc) により、アジ化物 XD9 (363 mg、46%) を無色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 8.21 (br s, 1H), 7.56 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.85 (ddt, J = 16.9, 10.3, 6.4 Hz, 1H), 5.09-4.96 (m, 3H), 4.89 (dd, J = 11.9, 7.6 Hz, 1H), 4.24 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 2.88 (br s, 2H), 2.43-2.27 (m, 4H), 2.13-1.97 (m, 2H), 1.97-1.75 (m, 4H), 1.70-1.55 (m, 5H)。MS (ESI⁺) C₁₉H₂₉N₅O₃P⁺ [M+H]⁺ 計算値406.2、実測値406.4。

10

【0163】

P-(ブタ-3-エン-1-イル)-N-(シクロブチルメチル)ホスホンアミデート 4-((S)-2-アミノプロパンアミド)ベンジルエステル (XD10)

アジ化物 XD9 (244 mg、0.602 mmol) の THF (1.8 mL) / 水 (0.2 mL) 溶液を、窒素ガスで15分間パージした。室温でトリブチルホスフィン (0.376 mL、1.51 mmol) を加え、混合物を22時間攪拌した。反応物を濃縮し、MeCN (2×7 mL) 及びトルエン (1×7 mL) と共に蒸発させ、粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM 中の 0~20% MeOH) で精製してアミン XD10 (182 mg、80%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) ppm = 7.63 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.89 (ddt, J = 16.9, 10.3, 6.4 Hz, 1H), 5.07 (dq, J = 17.0, 1.6 Hz, 1H), 5.02-4.89 (m, 3H), 3.58 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 2.99-2.85 (m, 2H), 2.50-2.39 (m, 1H), 2.38-2.27 (m, 2H), 2.12-2.01 (m, 2H), 1.98-1.77 (m, 4H), 1.77-1.66 (m, 2H), 1.37 (d, J = 7.0 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₁₉H₃₁N₃O₃P⁺ [M+H]⁺ 計算値380.2、実測値380.3。

20

【0164】

((2S)-1-(((2S)-1-((4-(((ブタ-3-エン-1-イル((シクロブチルメチル)アミノ)ホスホリル)オキシ)メチル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-3-メチル-1-オキソブタン-2-イル)カルバミン酸(9H-フルオレン-9-イル)メチルエステル (XD11)

30

アミン XD10 (182 mg、0.48 mmol) と DIPEA (0.079 mL、0.46 mmol) の THF (4.8 mL) 溶液に、室温で、Fmoc-Val-OSu (220 mg、0.50 mmol) を加えた。70分後、ゲル状の混合物が形成された。ゲルをばらばらにする酢酸エチル (4.0 mL) を加え、攪拌を4時間続けた。反応混合物を EtOAc / イソプロピルアルコール (9:1) で希釈し、飽和 NaHCO₃ 水溶液とブラインで洗浄した。有機相を Na₂SO₄ で乾燥し、ろ過し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM 中の 0~10% MeOH) により、アミド XD11 (279 mg、83%) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 10.00 (s, 1H), 8.17 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.74 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.46-7.38 (m, 3H), 7.37-7.27 (m, 4H), 5.87 (ddt, J = 16.9, 10.4, 6.3 Hz, 1H), 5.08-4.91 (m, 2H), 4.84 (dd, J = 12.1, 7.6 Hz, 1H), 4.77 (dd, J = 12.1, 7.6 Hz, 1H), 4.57 (dt, J = 11.1, 6.8 Hz, 1H), 4.43 (quint, J = 7.0 Hz, 1H), 4.34-4.18 (m, 3H), 3.92 (dd, J = 8.9, 7.1 Hz, 1H), 2.87-2.73 (m, 2H), 2.39-2.26 (m, 1H), 2.26-2.15 (m, 2H), 2.05-1.90 (m, 3H), 1.85-1.59 (m, 6H), 1.31 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.86 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₃₉H₅₀N₄O₆P⁺ [M+H]⁺ 計算値701.4、実測値701.5。

40

【0165】

((2S)-1-(((2S)-1-((4-((((シクロブチルメチル)アミノ)((E)-5-ヒドロキシ-4-メチル

50

ペンタ-3-エン-1-イル)ホスホリル)オキシ)メチル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-3-メチル-1-オキソブタン-2-イル)カルバミン酸(9H-フルオレン-9-イル)メチルエステル(XD12)

アミドXD11(100mg、0.143mmol)、2-メチルプロペ-2-エン-1-オール(0.126ml、1.50mmol)及び1,4-ベンゾキノン(1.5mg、0.014mmol)を、窒素雰囲気下、室温で1,2-ジクロロエタン(1.2mL)中に懸濁した。室温で第二世代ホベイダーグラブス触媒(4.5mg、7.1 μ mol、CAS:301224-40-8)を加え、懸濁液を45℃に加熱した。4時間後、第二世代ホベイダーグラブス触媒(4.5mg、7.1 μ mol)を更に加え、45℃で攪拌を終夜続けた。1,4-ベンゾキノン(2.3mg、0.021mmol)と第二世代ホベイダーグラブス触媒(8.9mg、0.014mmol)を更に加え、反応を5時間続けた。反応物を室温に冷却し、1,4-ビス(3-イソシアノプロピル)ピペラジン(SnatchCat、12.6mg、0.057mmol)を加え、混合物を30分間攪拌した。フラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、DCM中の0~10%MeOH)により、XD12(39mg、交差メタセシスの前に、内部位置に、望ましくないZ異性体とsm中の二重結合異性化に由来する不純物が混入(m/z 731.6))を得た。この物質を更に精製することなく次の工程で使用した。MS(ESI⁺)C₄₁H₅₄N₄O₇P⁺[M+H]⁺計算値745.4、実測値745.6。

【0166】

N-(シクロブチルメチル)-P-((E)-5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホンアミデート 4-((S)-2-((S)-2-アミノ-3-メチルブタンアミド)プロパンアミド)ベンジルエステル(XD13)

ジペプチドXD12(39mg、0.052mmol)を室温でDMF(1mL)に溶解した。ピペリジン(0.39ml、3.9mmol)を加え、混合物を30分間攪拌した。濃縮後、エーテル(8mL)を加え、混合物を室温で15分間攪拌した。生成物は十分に溶解せず、フラスコに付着した。ピペッティングによりエーテルを除去し、フラスコをエーテル(1×)ですすいだ。残ったオイル状物を真空中で乾燥させて、無色のオイル状物(24.5mg)を得た。

【0167】

この物質を、室温でDMF(0.5mL)に溶解し、6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノ酸 2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル(14.5mg、0.047mmol)とDIPEA(0.025ml、0.141mmol)を、順次加えた。反応混合物を室温で3時間攪拌した。濃縮後、粗生成物をRP-HPLC(水/MeCN、70:30から50:50勾配、修飾剤は使用せず)で精製し、純粋なXD13(16.2mg、43%、2工程)を得た。¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 9.91 (s, 1H), 8.13 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.62-7.56 (m, 2H), 7.31 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.00 (s, 2H), 5.35 (td, J = 7.2, 1.3 Hz, 1H), 4.83 (dd, J = 12.3, 7.6 Hz, 1H), 4.76 (dd, J = 12.1, 7.8 Hz, 1H), 4.63 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.54 (dt, J = 11.0, 6.8 Hz, 1H), 4.39 (quint, J = 7.0 Hz, 1H), 4.17 (dd, J = 8.6, 6.9 Hz, 1H), 3.76 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 3.36 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.88-2.72 (m, 2H), 2.39-2.26 (m, 1H), 2.23-2.10 (m, 4H), 2.02-1.88 (m, 3H), 1.87-1.70 (m, 2H), 1.69-1.57 (m, 4H), 1.56-1.52 (m, 3H), 1.52-1.40 (m, 4H), 1.30 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.18 (quint, J = 7.5 Hz, 2H), 0.86 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.9 Hz, 3H)。MS(ESI⁺)C₃₆H₅₅N₅O₈P⁺[M+H]⁺計算値716.4、実測値716.6。

【0168】

リンカー-薬物化合物XD13を抗体と結合させて、複合体ADC-XD13-r及びADC-XD13-iを、実施例22に記載のとおり製造した。これらの $\gamma\delta$ T細胞に対する効果を、実施例23に記載のとおり試験した。

【0169】

実施例4 カルボン酸XT2の合成

10

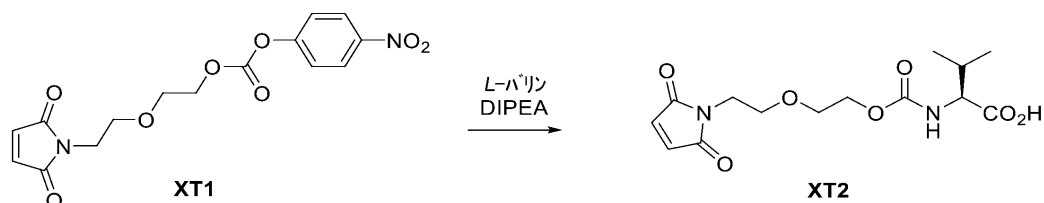
20

30

40

50

【化 1 3】



【0170】

((2-(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)エトキシ)カルボニル)-L-バリン (XT2)

10

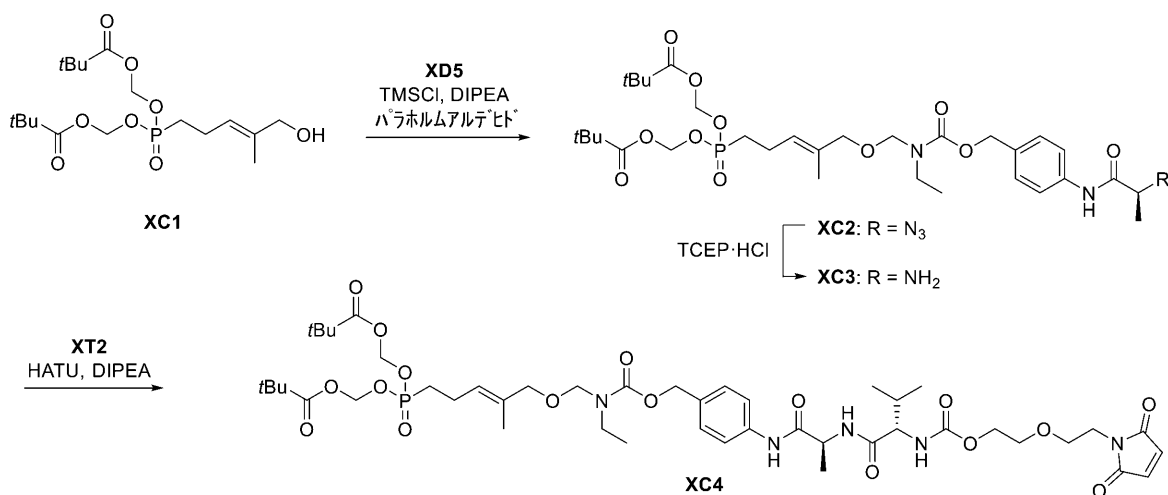
L-バリン (167 mg、1.4 mmol) と炭酸エステル XT1 (500 mg、1.4 mmol、Elgersma et al., Mol. Pharm., 2015, 12, 1813-1835 に記載のとおり製造) の DMF (5 mL) 溶液に、0℃で、DIPEA (0.249 mL、1.40 mmol) を加え、得られた混合物を室温で10日間攪拌した。混合物を濃縮し、EtOAc (25 mL) に溶解し、塩酸 (1 M、50 mL) で洗浄した。水相を EtOAc (25 mL) で抽出し、合わせた有機相を乾燥 (MgSO₄) し、ろ過し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM 中の 0~40% MeOH) により、酸 XT2 (250 mg、53%) を透明なオイル状物として得た。MS (ESI⁺) C₁₄H₂₁N₂O₇⁺ [M+H]⁺ 計算値 329.1、実測値 329.2。

20

【0171】

実施例 5 リンカー (プロ) ドラッグ化合物 XC4 の合成

【化 1 4】



30

【0172】

(S,E)-(((5-((((4-(2-アジドプロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(エチル)アミノ)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホリル)ビス(オキシ))ビス(メチレン)ビス(2,2-ジメチルプロパン酸)エステル (XC2)

40

アルコール XC1 (70 mg、0.171 mmol、Wiemer, Chem. Biol. 2014, 21, 945-954 に記載のとおり製造) を、実施例 1 に記載の一般手順 X X A に従い、カルバミン酸エステル XD5 と反応させた。反応完了後、溶媒の半量をロータリーエバポレーターで除去した。次いで、粗混合物をシリカゲルカラムに直接ロードし、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中の 0~100% EtOAc) で精製した。アジ化物 XC2 (140 mg、定量) を不純な無色のオイル状物として得、更に精製することなく次の工程で使用した。MS (ESI⁺) C₃₂H₅₁N₅O₁₁P⁺ [M+H]⁺ 計算値 712.3、実測値 712.5。

【0173】

50

(S,E)-((((5-((((4-(2-アミノプロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(エチル)アミノ)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホリル)ビス(オキシ))ビス(メチレン)ビス(2,2-ジメチルプロパン酸)エステル (XC3)

アジ化物XC2 (70 mg、0.098 mmol)のTHF (1.85 mL) / 水 (0.093 mL) 溶液に、室温でトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩 (TEP·HCl、85 mg、0.295 mmol)を加え、得られた混合物を18時間攪拌した。懸濁液を脱脂綿でろ過し、THFですすぎ、ろ液をシリカゲル上で濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、DCM中の0~10% MeOH)により、アミンXC3 (15 mg、22%)を無色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) ppm = 7.51 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.61-5.52 (m, 4H), 5.35-5.13 (m, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.65 (br s, 2H), 3.80 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 3.70 (br d, J = 1.0 Hz, 2H), 3.27 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 2.27-2.09 (m, 2H), 1.91-1.71 (m, 2H), 1.58-1.45 (m, 3H), 1.42 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.13 (s, 18H), 1.09-1.00 (m, 3H)。MS (ESI⁺) C₃₂H₅₃N₃O₁₁P⁺ [M+H]⁺ 計算値686.3、実測値686.7。

10

【0174】

((((E)-5-((((4-((2S,5S)-13-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-5-イソプロピル-2-メチル-4,7-ジオキソ-8,11-ジオキサ-3,6-ジアザトリデカンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(エチル)アミノ)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホリル)ビス(オキシ))ビス(メチレン)ビス(2,2-ジメチルプロパン酸)エステル (XC4)

20

アミンXC3 (15 mg、0.022 mmol)に、酸XT2 (7.2 mg、0.022 mmol)のDMF (0.500 mL)溶液を加えた。混合物を氷浴中で冷却し、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]ピリジニウム-3-オキシドヘキサフルオロリン酸 (HATU、10.0 mg、0.026 mmol)とDIPEA (7.6 μL、0.044 mmol)を順次加え、得られた混合物を室温まで徐々に温めながら攪拌した。室温で1.5時間攪拌した後、反応物を真空中で濃縮し、粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、DCM中の0~8% MeOH)で精製して、XT2が混入したXC4 (18 mg)を得た。生成物をEtOAcに溶解し、次いで、飽和NaHCO₃水溶液 / 水 (1:1)、水及びブラインで洗浄した。有機相をNa₂SO₄で乾燥し、ろ過し、濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、DCM中の0~8% MeOH)で更に精製して、XC4 (10 mg、45%)を無色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 8.80-8.51 (m, 1H), 7.65-7.52 (m, 2H), 7.33-7.28 (m, 2H), 7.14-6.94 (m, 1H), 6.70 (s, 2H), 5.67 (d, J = 12.9 Hz, 4H), 5.39-5.27 (m, 1H), 5.16 (br s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.77 (br s, 1H), 4.74-4.63 (m, 2H), 4.30 (br s, 1H), 4.09 (br s, 1H), 4.03 (br t, J = 5.5 Hz, 1H), 3.84 (br s, 1H), 3.76-3.60 (m, 5H), 3.55 (br s, 2H), 3.44-3.29 (m, 2H), 2.38-2.18 (m, 3H), 1.98-1.70 (m, 2H), 1.65-1.53 (m, 3H), 1.46 (br d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.23 (s, 18H), 1.18-1.10 (m, 3H), 1.01 (br d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.96 (br d, J = 6.9 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₄₆H₇₁N₅O₁₇P⁺ [M+H]⁺ 計算値996.5、実測値996.7。

30

40

【0175】

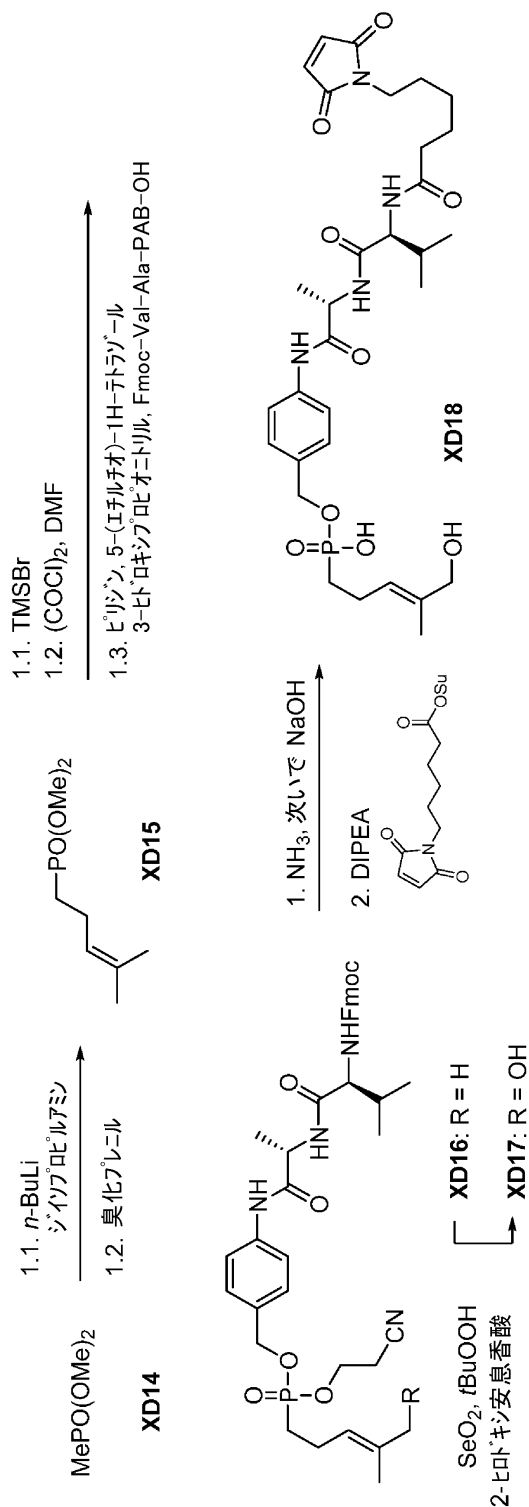
リンカー-薬物化合物XC4を抗体と結合させて、複合体ADC-XC4-r及びADC-XC4-iを、実施例22に記載のとおり製造した。これらのγδT細胞に対する効果を、実施例23に記載のとおり試験した。

【0176】

実施例6 リンカー-薬物化合物XD18の製造

【0177】

【化 1 5】



10

20

30

40

【 0 1 7 8 】

(4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸ジメチルエステル (XD15)

攪拌中のジイソプロピルアミン（13.0 ml、92.7 mmol）のTHF（280 mL）溶液（-78℃）に、n-ブチルリチウム（ヘキサン中1.6 M、55.4 ml、88.6 mmol）を加えた。得られた溶液を-78℃で20分間攪拌した。次に、シリンジを使用してメチルホスホン酸ジメチルエステル（8.73 ml、80.6 mmol）をゆっくりと加え、混合物を1時間攪拌した。臭化プレニル（11.6 ml、101 mmol）をシリンジを使用してゆっくりと加え、次いで溶液を一晩、室温に温めた。反応物を氷浴上で冷却し、飽和NH₄Cl水溶液でクエンチし、Et₂O（3×）で抽出した。

50

合わせた有機相をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥し、ろ過し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー（シリカゲル、エーテル中の0～3% MeOH）で精製した。生成物の画分を濃縮し、DCM（3×）と共に蒸発させてわずかなメタノールを除去し、ホスホン酸ジエステルXD15（12.88g、83%）を黄色の液体として得た。 ^1H NMR（400 MHz, CDCl_3 ）ppm = 5.14-5.07 (m, 1H), 3.74 (d, J = 10.8 Hz, 6H), 2.33-2.22 (m, 2H), 1.83-1.71 (m, 2H), 1.69 (s, 3H), 1.62 (s, 3H)。MS (ESI⁺) $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}_3\text{P}^+$ [M+H]⁺ 計算値193.1、実測値193.1。

【0179】

((2S)-1-(((2S)-1-((4-(((2-シアノエトキシ)(4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホリル)-オキシ)メチル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-3-メチル-1-オキソブタン-2-イル)カルバミン酸(9H-フルオレン-9-イル)メチルエステル (XD16)

10

工程1 DCM（1.8mL）中の(4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸ジクロリド（97.0mg、0.485mmol、一般手順XXBに従いホスホン酸ジエステルXD15から製造）に、5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール（6.31mg、0.048mmol）を加えた。溶液を-78℃に冷却し、3-ヒドロキシプロパンニトリル（0.033mL、0.485mmol）とピリジン（0.047mL、0.582mmol）を加えた。-78℃で30分間攪拌した後、反応物を室温に温め、2.5時間攪拌した。

【0180】

工程2 別のフラスコで、Fmoc-Val-Ala-PAB（250mg、0.485mmol）をピリジン（1.0mL）に溶解した。0℃に冷却後、工程1で製造したホスホン酸クロリドのDCM溶液を、カニューレを使用して、ピリジン溶液に滴下した。反応物を0℃で30分間攪拌し、次いで、室温で1時間攪拌した。UPLC-MS分析は、反応が50%の変換で停止したことを示した。反応物を-30℃で一晩保管し、次いで、工程1で2.5時間の攪拌を室温で一晩の攪拌に変えて、同じ量で繰り返した。翌日、得られた溶液を一晩保管した反応混合物に0℃に加えた。0℃で30分間、そして室温で1時間攪拌した後に、反応が完全に終了したことが観察された。溶液を濃縮し、粗生成物をシリカゲルにドライロードし、フラッシュクロマトグラフィー（シリカゲル、DCM中の0～25%アセトン）で精製して、ホスホン酸ジエステル混合物XD16（127mg、37%）を不純な白色の固体として得た。MS (ESI⁺) $\text{C}_{39}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}^+$ [M+H]⁺ 計算値715.3、実測値715.5。

20

30

【0181】

((2S)-1-(((2S)-1-((4-(((2-シアノエトキシ)((E)-5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホリル)オキシ)メチル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-3-メチル-1-オキソブタン-2-イル)カルバミン酸(9H-フルオレン-9-イル)メチルエステル (XD17)

SeO_2 （71mg、0.64mmol）と2-ヒドロキシ安息香酸（17mg、0.12mmol）を、DCM（0.7mL）に溶解し、室温でt-BuOOH（水中に70%、0.66mL、4.81mmol）を加えた。15分間激しく攪拌した後、溶液をXD16（127mg、0.178mmol）のDCM（1.1mL）懸濁液にピペッティングした。得られた混合物を終夜激しく攪拌した。混合物を0℃に冷却し、発泡が停止するまで、飽和 NaHCO_3 水溶液でゆっくりとクエンチした。水を加えて沈殿した塩を溶解した。生成物をDCM（3×）で抽出し、合わせた有機相を Na_2SO_4 で乾燥し、シリカゲル上で濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー（シリカゲル、DCM中の0～5% MeOH）により、アルコールXD17（45mg、35%）を次の工程で使用する純粋な白色の固体として得た。MS (ESI⁺) $\text{C}_{39}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_8\text{P}^+$ [M+H]⁺ 計算値731.3、実測値731.6。

40

【0182】

((E)-5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)-3-メチルブタンア

50

ミド)プロパン-アミド)ベンジルエステル (X D 1 8)

工程 1 THF (1.0 mL) 中のホスホン酸エステル X D 1 7 (45 mg、0.062 mmol) を MeOH (9.0 mL) で希釈した。次いで、室温でアンモニアのメタノール溶液 (7 M、2.35 mL) を加え、混合物を室温で 3 時間攪拌した。次に、室温で NaOH 水溶液 (2 M、1.15 mL) を加え、混合物を 15 分間攪拌した。反応物を氷浴上で冷却し、AcOH 水溶液 (1 M、23.5 mL) を加えた。濁った溶液が得られたので、シリンジフィルターでろ過した。ろ液を真空中で濃縮し、ジオキサン/水 (1:1、1 mL) に溶解した。溶液を凍結乾燥して 200 mg の白色の固体を得た (生成物と塩の混合物)。

【0183】

工程 2 生成物を DMF (1 mL) に溶解し、室温で DIPEA (0.049 mL、0.281 mmol) と 6-マレイミドヘキサン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (70.4 mg、0.228 mmol) を加え、混合物を 30 分間攪拌した。過剰の塩基を 0 °C で AcOH 水溶液 (1 M、0.52 mL) によりクエンチし、混合物を濃縮した。粗生成物を分取 RP-HPLC (水×0.1% TFA/MeCN×0.1% 2,2,2-トリフルオロ酢酸 (TFA)/MeCN、90:10 から 45:55 勾配) で精製した。MeCN をロータリーエバポレーターで除去し、水性の混合物を凍結乾燥して X D 1 8 (26.5 mg、2 工程で 89%) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 9.92 (s, 1H), 8.14 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.99 (s, 2H), 5.33 (td, J = 7.1, 1.0 Hz, 1H), 4.84 (br d, J = 7.6 Hz, 2H), 4.61 (br s, 1H), 4.39 (quint, J = 6.9 Hz, 1H), 4.17 (dd, J = 8.5, 6.9 Hz, 1H), 3.74 (s, 2H), 3.36 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.26-2.06 (m, 4H), 2.02-1.91 (m, 1H), 1.66-1.54 (m, 2H), 1.50 (s, 3H), 1.51-1.39 (m, 4H), 1.30 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.26-1.12 (m, 3H), 0.86 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₃₁H₄₆N₄O₉P⁺ [M+H]⁺ 計算値 649.3、実測値 649.6。

【0184】

実施例 7 リンカー-薬物化合物 X C 9 の合成

【0185】

10

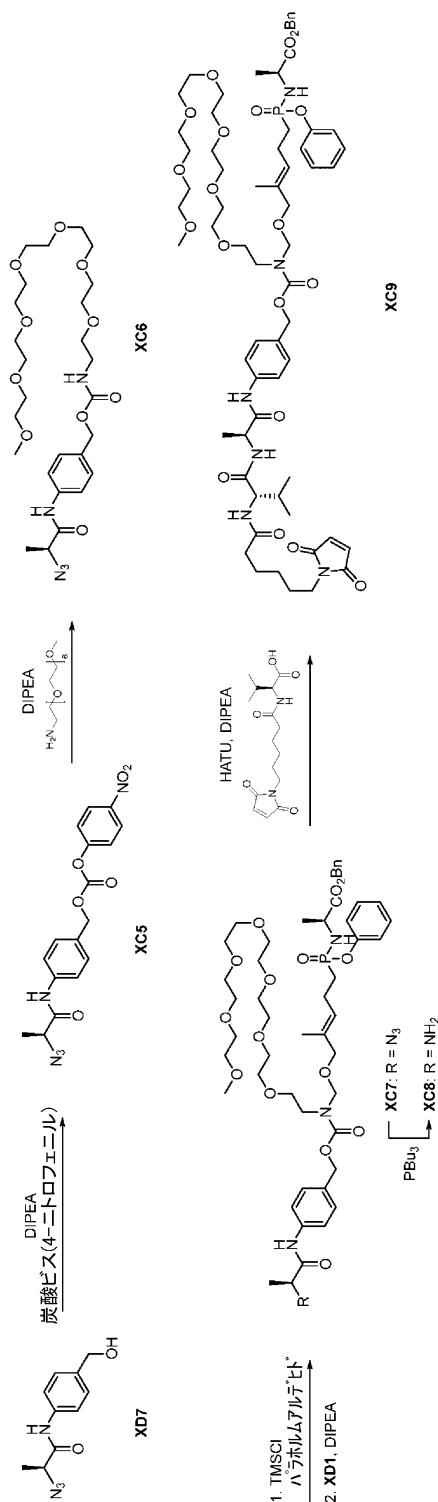
20

30

40

50

【化 1 6】



10

20

30

40

【0186】

(4-ニトロフェニル) (S)-4-(2-アジドプロパンアミド)ベンジル 炭酸エステル (XC5)

アルコールXD7 (1.60 g、7.27 mmol) のTHF (20 mL) 溶液に、0℃で、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (4.42 g、14.5 mmol) とDIPEA (1.90 mL、10.9 mmol) を加えた。得られた混合物を室温で18時間攪拌し、次いで、真空中で濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0～5% EtOAc) により、炭酸エステルXC5 (1.97 g、70%) を淡黄色のオイル状物として得た。MS (ESI⁺) C₁₇H₁₆N₅O₆⁺ [M+H]⁺ 計算値386.1、実測値386.2。

【0187】

50

(2,5,8,11,14,17,20-ヘプタオキサドコサン-22-イル)カルバミン酸(S)-4-(2-アジドプロパンアミド)ベンジルエステル (XC6)

炭酸エステルXC5 (624 mg、1.62 mmol) のTHF (10.8 mL) 溶液 (0℃) に、2,5,8,11,14,17,20-ヘプタオキサドコサン-22-アミン (550 mg、1.62 mmol) とDIPEA (0.340 mL、1.94 mmol) を加え、得られた明るい黄色の溶液を、室温まで徐々に温めながら18時間攪拌した。濃縮後、粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~6% MeOH) で精製して、カルバミン酸エステルXC6 (875 mg、92%) を淡黄色のオイル状物として得た。MS (ESI⁺) C₂₆H₄₄N₅O₁₀⁺ [M+H]⁺ 計算値586.3、実測値586.4。

【0188】

((E)-23-(((4-((S)-2-アジドプロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-27-メチル-2,5,8,11,14,17,20,25-オクタオキサ-23-アザトリアコンタ-27-エン-30-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステル (XC7)

アルコールXD1 (100 mg、0.240 mmol、Kadri, H. et al. J. Med. Chem. 2020, 63, 11258-11270に記載のとおり製造) を、一般手順XXAに従い、カルバミン酸エステルXC6と反応させた。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~11% MeOH) により、不純なアジ化物XC7 (313 mg) を無色のオイル状物として得、更に精製することなく次の工程で使用了。MS (ESI⁺) C₄₉H₇₁N₆NaO₁₅P⁺ 計算値1037.5、実測値1037.7。

【0189】

((E)-23-(((4-((S)-2-アミノプロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-27-メチル-2,5,8,11,14,17,20,25-オクタオキサ-23-アザトリアコンタ-27-エン-30-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステル (XC8)

アジ化物XC7 (121 mg、0.119 mmol) のTHF (1.14 mL) / 水 (0.13 mL) 溶液を、窒素ガスで15分間パージした。0℃でトリブチルホスフィン (0.074 mL、0.298 mmol) を加え、混合物を室温で5.5時間攪拌し、真空中で濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~15% MeOH) で精製して、アミンXC8 (62 mg、52%) を黄色のオイル状物として得た。MS (ESI⁺) C₄₉H₇₄N₄O₁₅P⁺ [M+H]⁺ 計算値989.5、実測値989.8。

【0190】

((E)-23-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)-3-メチルブタンアミド)プロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-27-メチル-2,5,8,11,14,17,20,25-オクタオキサ-23-アザトリアコンタ-27-エン-30-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステル (XC9)

冷却 (0℃) したアミンXC8 (62 mg、0.063 mmol) と(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)-L-バリン (19.5 mg、0.063 mmol、国際公開第2013/122823号に記載のとおり製造) のDMF (1 mL) 溶液に、HATU (28.6 mg、0.075 mmol) とDIPEA (0.022 mL、0.125 mmol) を加えた。得られた黄色の混合物を室温で1.5時間攪拌し、真空中で濃縮した。残留物をEtOAcに溶解し、飽和NaHCO₃水溶液/水 (1:1)、水及びブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~10% MeOH) で精製して、無色のオイル状物を得た。オイル状物をMeCN/ミリQ水 (1:1) に溶解し、分取RP-HPLC (水/MeCN、60:40から10:90勾配、修飾剤は使用せず) で精製した。生成物の画分をプールし、MeCNをロータリーエバポレーターで除去した。次いで、水性の混合物を凍結乾燥して、マレイミドXC9 (25 mg、31%) を無色のオイル状物として得た。MS (ESI⁺) C₆₄H₉₄N₆O₁₉P⁺ [M+H]⁺ 計算値1281.6、実測値1282.0。

【0191】

実施例8 リンカー-薬物化合物XC13の合成

10

20

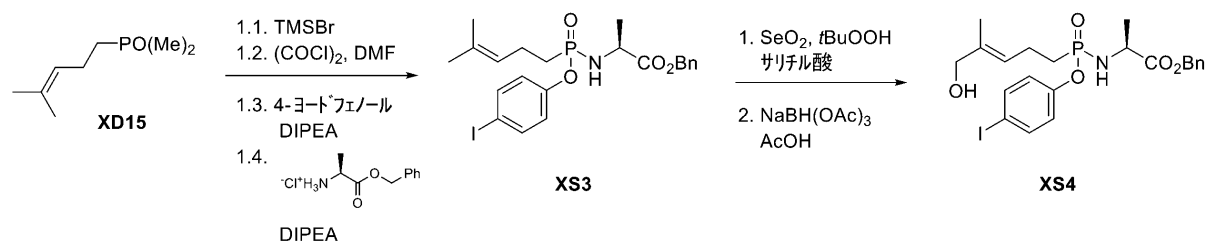
30

40

50

(E)-((5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(4-ヨードフェノキシ)ホスホリル)アラニンベンジルエステル (XS4) の製造

【化17】



10

【0192】

((4-ヨードフェノキシ)(4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホリル)アラニンベンジルエステル (XS3)

トルエン (27 mL) 中の (4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸ジクロリド (837 mg、4.16 mmol、一般手順 XXB に従い、ホスホン酸ジエステル XD15 (1.00 g、5.20 mmol) から製造) に、 -78°C で、4-ヨードフェノール (1.83 g、8.33 mmol) と DIPEA (1.45 mL、8.33 mmol) のトルエン (27 mL) 溶液を滴下した。反応混合物を -78°C で 30 分間攪拌した。L-アラニンベンジルエステル塩酸塩 (1.89 g、8.74 mmol) と DIPEA (3.05 mL、17.5 mmol) を加え、反応混合物を室温にして、2 時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中の 0~50% EtOAc) で精製して、XS3 (0.490 g、22%、約 3:2 のジアステレオマー混合物) を黄色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 7.60-7.53 (m, 2H), 7.41-7.28 (m, 5H), 7.00-6.93 (m, 2H), 5.14-5.06 (m, 3H), 4.15-4.04 (m, 1H), 3.31 (t, J = 10.4 Hz, 0.6H), 3.22 (t, J = 10.5 Hz, 0.4H), 2.41-2.28 (m, 2H), 1.96-1.80 (m, 2H), 1.69 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.33 (d, J = 7.1 Hz, 1.9H), 1.27 (d, J = 7.1 Hz, 1.1H)。MS (ESI⁺) C₂₂H₂₈INO₄P⁺ [M+H]⁺ 計算値 528.08、実測値 528.26。

20

【0193】

(E)-((5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(4-ヨードフェノキシ)ホスホリル)アラニンベンジルエステル (XS4)

アルケン XS3 (0.434 g、0.823 mmol) のアリル酸化を、一般手順 XXC に従って行った。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中の 40~100% EtOAc) で精製して、アルコール XS4 (0.254 g、57%、約 3:2 のジアステレオマー混合物) を無色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 7.61-7.54 (m, 2H), 7.40-7.28 (m, 5H), 7.00-6.93 (m, 2H), 5.47-5.39 (m, 1H), 5.15-5.07 (m, 2H), 4.17-4.02 (m, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.36 (t, J = 10.3 Hz, 0.6H), 3.27 (dd, J = 11.6, 9.6 Hz, 0.4H), 2.49-2.35 (m, 2H), 2.01-1.83 (m, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.34 (d, J = 7.0 Hz, 1.8H), 1.25 (d, J = 7.1 Hz, 1.2H)。MS (ESI⁺) C₂₂H₂₈INO₅P⁺ [M+H]⁺ 計算値 544.07、実測値 544.32。

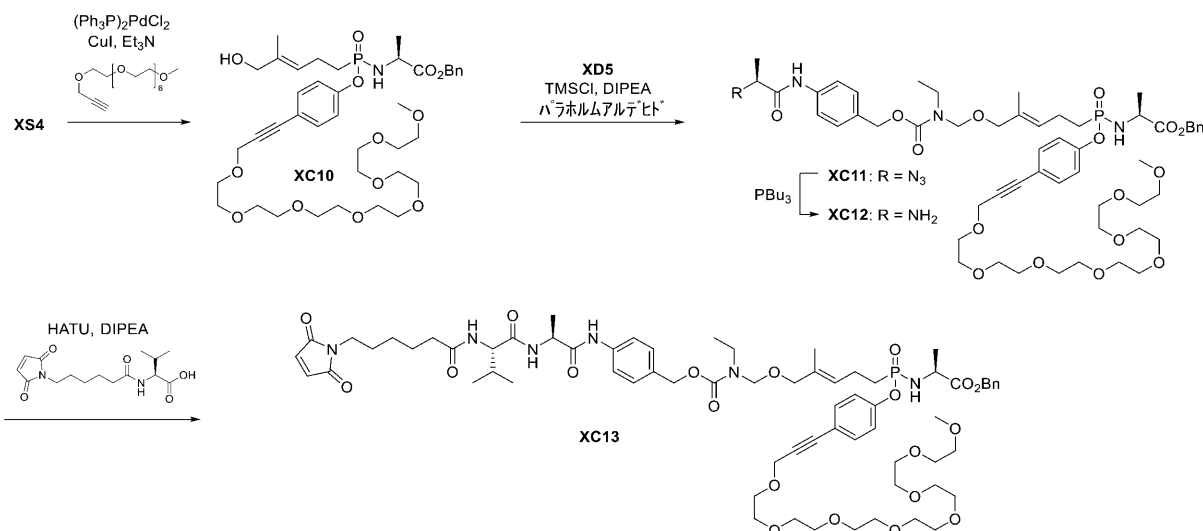
40

【0194】

リンカー-薬物化合物 XC13 を XS4 から以下の反応スキームに従って合成した。

50

【化 18】



10

【0195】

((4-(2,5,8,11,14,17,20,23-オクタオキサヘキサコス-25-イン-26-イル)フェノキシ)((E)-5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステル (XC10)

20

XS4 (50 mg、0.092 mmol)、2,5,8,11,14,17,20,23-オクタヘキサコス-25-イン (34.8 mg、0.092 mmol)、ビス(トリフェニルホスフィノ)パラジウムクロリド (3.23 mg、4.60 μmol) 及び Cu(I)I (1.753 mg、9.20 μmol) に、脱気した Et_3N (0.2 mL、1.44 mmol) を加えた。混合物を室温で4時間攪拌した。濃縮後、粗生成物をDCMに再度溶解し、再び濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~11% MeOH) で精製して、アルコールXC10 (67 mg、83%) を茶色のオイル状物として得た。MS (ESI⁺) $\text{C}_{40}\text{H}_{61}\text{NO}_{13}\text{P}^+$ [M+H]⁺ 計算値794.4、実測値794.6。

【0196】

((4-(2,5,8,11,14,17,20,23-オクタオキサヘキサコス-25-イン-26-イル)フェノキシ)((E)-5-((((4-((S)-2-アジドプロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(エチル)アミノ)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステル (XC11)

30

アルコールXC10 (67 mg、0.076 mmol) を、一般手順XXAに従いカルバミン酸エステルXD5と反応させた。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~8% MeOH) により、アジ化物XC11 (54 mg、65%) を淡茶色のオイル状物として得た。MS (ESI⁺) $\text{C}_{54}\text{H}_{78}\text{N}_6\text{O}_{16}\text{P}^+$ [M+H]⁺ 計算値1097.5、実測値1097.8。

【0197】

((4-(2,5,8,11,14,17,20,23-オクタオキサヘキサコス-25-イン-26-イル)フェノキシ)((E)-5-((((4-((S)-2-アミノプロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(エチル)アミノ)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステル (XC12)

40

アジ化物XC11 (54 mg、0.049 mmol) のTHF (0.473 mL) / 水 (0.053 mL) 溶液を、窒素ガスで15分間パージした。室温でトリブチルホスフィン (0.031 mL、0.123 mmol) を加え、混合物を室温で5.5時間攪拌し、真空中で濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~15% MeOH) により、アミンXC12 (42 mg、80%) を淡黄色のオイル状物として得た。MS (ESI⁺) $\text{C}_{54}\text{H}_{80}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{P}^+$ [M+H]⁺ 計算値1071.5、実測値1071.9。

【0198】

50

((4-(2,5,8,11,14,17,20,23-オクタオキサヘキサコス-25-イン-26-イル)フェノキシ)((E)-5-((((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)-3-メチルブタンアミド)プロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(エチル)アミノ)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステル(XC13)

冷却(0℃)したアミンXC12(42mg、0.039mmol)と(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)-L-バリン(12.2mg、0.039mmol、国際公開第2013/122823号に記載のとおり製造)のDMF(1mL)溶液に、HATU(17.9mg、0.047mmol)とDIPEA(0.014mL、0.078mmol)を加えた。得られた黄色の混合物を室温で1.5時間攪拌し、真空下で濃縮した。残留物をEtOAcに溶解し、飽和NaHCO₃水溶液/水(1:1)、水及びブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、DCM中の0~10%MeOH)で精製して、無色のオイル状物を得た。オイル状物を分取RP-HPLC(水/MeCN、60:40から10:90勾配、修飾剤は使用せず)で精製した。生成物の画分をプールし、MeCNをロータリーエバポレーターで除去した。次いで、水性の混合物を凍結乾燥してマレイミドXC13(21mg、40%)を白色の固体として得た。MS(ESI⁺)C₆₉H₁₀₀N₆O₂OP⁺[M+H]⁺計算値1363.7、実測値1364.1。

10

【0199】

実施例9 リンカー薬物化合物XS2の合成

20

(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)グリシルグリシル-L-フェニルアラニン 2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル(XD20)の製造

【化19】



【0200】

(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)グリシルグリシル-L-フェニルアラニン 2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル(XD20)

30

N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC、459mg、2.222mmol)を、XD19(1.05g、2.22mmol)と1-ヒドロキシピロリジン-2,5-ジオン(256mg、2.22mmol、欧州特許出願公開第2907824号に記載のとおり合成)のTHF(40mL)懸濁液に室温に加えた。3.5時間攪拌した後、混合物をろ過し、残留物をDCMで徹底的に洗浄した。ろ液をEtOAcで希釈し、次いで濃縮した。白色の固体を少量のEtOAc中に懸濁し、次いでろ過してO-succinylエステルXD20(612mg、48%)を白色の固体として得た。MS(ESI⁺)C₂₇H₃₂N₅O₉⁺[M+H]⁺計算値570.2、実測値570.4。

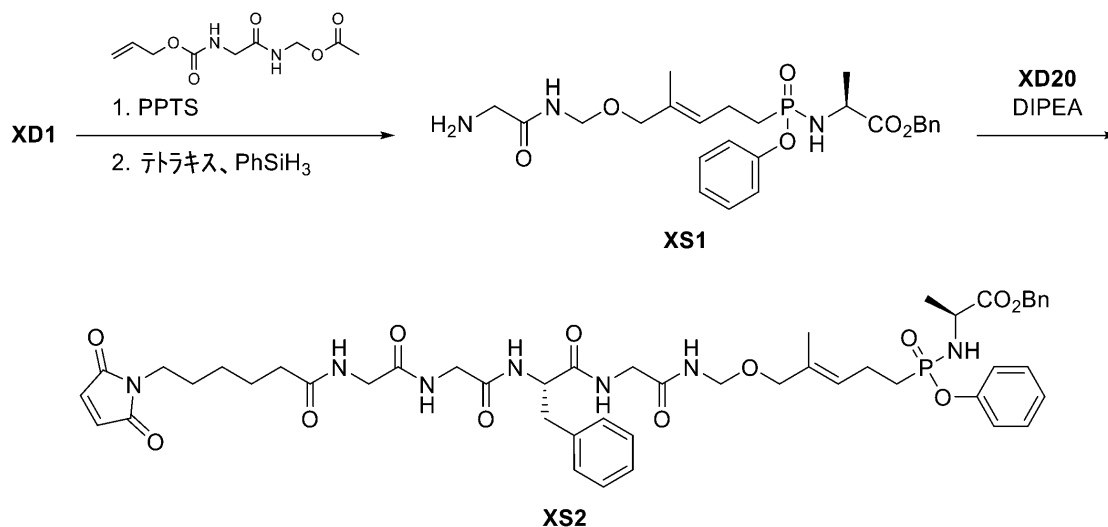
【0201】

((E)-5-((2-((S)-2-(2-(2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド)アセトアミド)アセトアミド)-3-フェニルプロパンアミド)アセトアミド)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステル(XS2)の製造

40

50

【化 2 0】



10

【0 2 0 2】

((E)-5-((2-アミノアセトアミド)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステル (XS1)

工程 1 フラスコに、酢酸(2-(((アリルオキシ)カルボニル)アミノ)アセトアミド)メチルエステル (0.152 g、0.659 mmol、Brailsford et al. Tetrahedron, 2018, 74, 1951-1956に記載のとおり製造)とp-トルエンスルホン酸ピリジニウム (PPTS; 10.6 mg、0.042 mmol)を窒素雰囲気下に加えた。トルエン (1.3 mL)中のアルコールXD1 (0.110 g、0.264 mmol、Kadri et al. J. Med. Chem. 2020, 63, 11258-11270に記載のとおり製造)を加え、反応混合物を80℃で1時間攪拌した。室温に冷却後、Et₃N (4滴)を加え、反応混合物を濃縮し、DCM (1 mL)と共に蒸発させた。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の20~100% EtOAc)で精製して、(E)-((5-((2-(((アリルオキシ)カルボニル)アミノ)アセトアミド)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-アラニンベンジルエステル (0.120 g、収率68%)を、ジアステレオマーの混合物として得た。MS (ESI⁺) C₂₉H₃₉N₃O₈P⁺ [M+H]⁺ 計算値588.25、実測値588.42。

20

30

【0 2 0 3】

工程 2 10 mLのバイアルを窒素ガスでパージし (3× 真空/窒素ガスのサイクル)、Pd (PPh₃)₄ (4.2 mg、0.0036 mmol)を入れた。次いで、DCM (1.80 mL)中のAlloc保護アミン (0.120 g、0.180 mmol、工程1で製造)を加え、続いて、PhSiH₃ (0.155 mL、1.26 mmol)を加えた。反応混合物を1時間攪拌した。反応混合物をDCMで希釈し、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の5~15% MeOH)で精製して、XS1 (63.7 mg、70%、約3:2のジアステレオマー混合物)を黄色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 8.01 (br s, 1H), 7.46-7.22 (m, 7H), 7.22-7.16 (m, 2H), 7.16-7.09 (m, 1H), 5.48 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 5.27-4.91 (m, 2H), 4.82-4.64 (m, 2H), 4.19-4.00 (m, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.47 (t, J = 10.2 Hz, 1H), 3.42-3.28 (m, 2H), 2.49-2.34 (m, 2H), 2.02-1.84 (m, 4H), 1.65 (s, 3H), 1.32 (d, J = 7.0 Hz, 1.8H), 1.25 (d, J = 7.1 Hz, 1.2H)。MS (ESI⁺) C₂₅H₃₅N₃O₆P⁺ [M+H]⁺ 計算値504.2、実測値504.4。

40

【0 2 0 4】

((E)-5-((2-((S)-2-(2-(2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサナミド)アセトアミド)アセトアミド)-3-フェニルプロパンアミド)アセトアミド)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニンベンジル

50

エステル (XS2)

アミンXS1 (25.7 mg、0.051 mmol) のDMF (0.51 mL) 溶液に、OsuエステルXD20 (31.7 mg、0.056 mmol)、続いてDIPEA (0.027 mL、0.153 mmol) を加えた。反応混合物を室温で60分間攪拌した。OsuエステルXD20 (5.81 mg、10.2 μmol) を更に加え、40分間攪拌した後、最後のOsuエステルXD20 (5.81 mg、10.2 μmol) を加え、続いて30分間攪拌した。反応混合物を濃縮し、トルエン (2 mL) と共に蒸発させて、真空中で乾燥した。粗生成物をDCM (5 mL) に溶解し、シリンジフィルターでろ過し、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~8% MeOH) で精製した。生成物をRP-HPLC (水/MeCN、70:30から45:55勾配、修飾剤は使用せず) で更に精製した。MeCNの蒸発、その後の凍結乾燥によりXS2 (14.8 mg、30%、約3:2のジアステレオマー混合物) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 8.50-8.43 (m, 1H), 8.27 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 8.10 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.06 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 8.00 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.38-7.27 (m, 7H), 7.27-7.21 (m, 4H), 7.20-7.11 (m, 4H), 6.98 (s, 2H), 5.63 (dd, J = 12.5, 10.4 Hz, 0.4H), 5.52 (dd, J = 13.3, 10.0 Hz, 0.6H), 5.44-5.36 (m, 1H), 5.13-5.02 (m, 2H), 4.55-4.46 (m, 3H), 4.00-3.90 (m, 1H), 3.77 (s, 2H), 3.74-3.69 (m, 2H), 3.66 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 3.63-3.55 (m, 1H), 3.38-3.35 (m, 2H), 3.06 (dd, J = 13.8, 4.5 Hz, 1H), 2.81 (dd, J = 13.8, 9.8 Hz, 1H), 2.31-2.19 (m, 2H), 2.11 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.88-1.75 (m, 2H), 1.57-1.53 (m, 3H), 1.52-1.42 (m, 4H), 1.24-1.18 (m, 3H), 1.13 (d, J = 7.1 Hz, 2H)。MS (ESI⁺) C₄₈H₆₁N₇O₁₂P⁺ [M+H]⁺ 計算値958.4、実測値958.8。

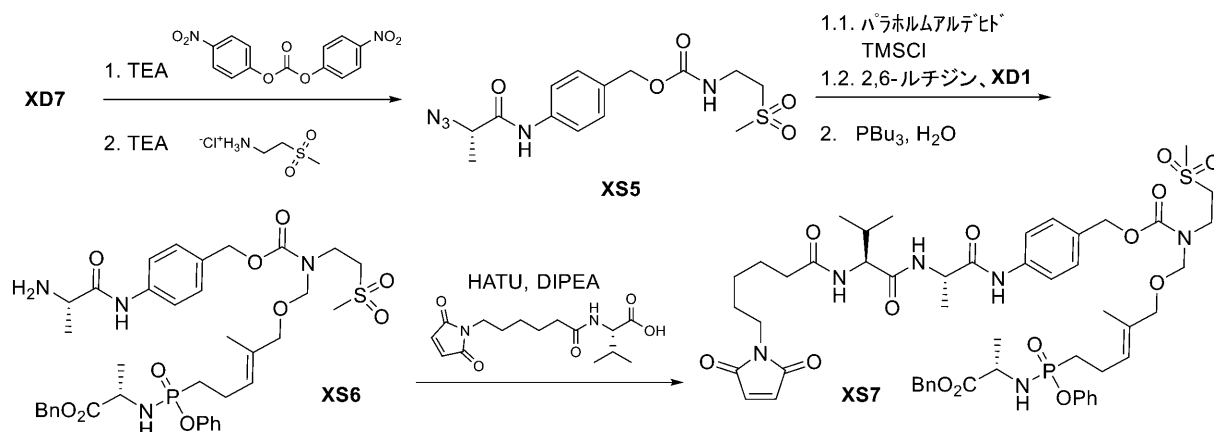
10

20

【0205】

実施例10 リンカー薬物化合物XS7の合成

【化21】



30

【0206】

(2-(メチルスルホニル)エチル)カルバミン酸(S)-4-(2-アジドプロパンアミド)ベンジルエステル (XS5)

工程1 XD7 (1.14 g、5.18 mmol、実施例1に記載のとおり製造) のTHF (17 mL) 溶液に、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (3.15 g、10.4 mmol)、続いてDIPEA (1.36 mL、7.76 mmol) を加えた。反応混合物を室温で終夜攪拌した。反応混合物を濃縮し、粗生成物をEt₂O (20 mL) 中で15分間攪拌し、ろ過した。この工程を2回繰り返し、ろ液を合わせ、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中の0~50% EtOAc) により、対応する炭酸エステル (1.57 g、79%) を得た。MS (ESI⁺) C₁₇H₁₆N₅O₆⁺ [M+H]⁺ 計算値386.1、実測値386.2。

40

【0207】

50

工程2 炭酸エステル中間体 (0.340 g、0.882 mmol) を THF (4.4 mL) に溶解し、0℃で2-(メチルスルホニル)エタン-1-アミン塩酸塩 (0.148 g、0.926 mmol) と TEA (0.258 mL、1.85 mmol) を加えた。反応混合物を室温にして、3時間攪拌した後、反応混合物を濃縮し、EtOAc (30 mL) に溶解し、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (3×20 mL) とブライン (20 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~100% EtOAc) で精製して、カルバミン酸エステルXS5 (0.260 g、80%) を白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 8.11 (br s, 1H), 7.57-7.51 (m, 2H), 7.33 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.42 (br s, 1H), 5.07 (s, 2H), 4.24 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 3.72 (q, J = 6.1 Hz, 2H), 3.25 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.93 (s, 3H), 1.65 (d, J = 7.0 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₁₄H₁₉N₅NaO₅S⁺ [M+Na]⁺ 計算値392.1、実測値392.1。

10

【0208】

((E)-5-((((4-((S)-2-アミノプロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(2-(メチルスルホニル)エチル)アミノ)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステル (XS6)

工程1 カルバミン酸エステルXS5 (0.186 g、0.503 mmol) のDCM (2.5 mL) 溶液に、パラホルムアルデヒド (18 mg、0.60 mmol) を加えた。反応混合物を5分間攪拌し、次いでTMSCl (0.070 mL、0.55 mmol) を加えた。反応混合物を1時間攪拌し、濃縮し、DCM (1 mL) と共に蒸発させ、真空中で15分間乾燥し、DCM (2.5 mL) に溶解して、溶液Aを得た。アリルアルコールXD1 (84 mg、0.20 mmol) をDCM (1.3 mL) に溶解し、0℃に冷却し、溶液Aの一部 (1.5 mL) を加え、続いて2,6-ルチジン (0.070 mL、0.60 mmol) を加えた。反応混合物を室温にして、2時間攪拌した。溶液A (0.50 mL) と2,6-ルチジン (0.023 mL、0.20 mmol) を更に加え、混合物を1時間攪拌した。溶液A (0.50 mL) と2,6-ルチジン (0.023 mL、0.20 mmol) を更に加え、混合物を終夜攪拌した。数滴のn-BuOHを加えて反応をクエンチし、混合物を濃縮し、ペプタン (1 mL)、トルエン (1 mL) 及びDCM (1 mL) と共に蒸発させた。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~100% EtOAc) で精製して、((E)-5-((((4-((S)-2-アジドプロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(2-(メチルスルホニル)エチル)アミノ)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステルの2つのジアステレオマー (0.104 g、65%) を無色のオイル状物として得た。MS (ESI⁺) C₃₇H₄₈N₆O₁₀PS⁺ [M+H]⁺ 計算値799.3、実測値799.6。

20

30

【0209】

工程2 この中間体 (60 mg、0.075 mmol) を THF (0.68 mL) / 水 (0.075 mL) に溶解し、得られた溶液を、窒素ガスで15分間パージした。トリブチルホスフィン (0.047 mL、0.188 mmol) を加え、反応混合物を室温で終夜攪拌した。反応混合物を濃縮し、MeCN (2×2 mL) と共に蒸発させて、真空中で乾燥した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~20% MeOH) で精製して、アミンXS6 (27.5 mg、47%) をジアステレオマーの混合物として得た。MS (ESI⁺) C₃₇H₅₀N₄O₁₀PS⁺ [M+H]⁺ 計算値773.3、実測値773.6。

40

【0210】

リンカー-薬物XS7

アミンXS6 (28 mg、0.036 mmol) 及び(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)-L-バリン (12 mg、0.039 mmol、国際公開第2013/122823号に記載のとおり製造) を、DMF (0.36 mL) に溶解し、HATU (15 mg、0.039 mmol) とDIPEA (0.025 mL、0.14 mmol) を加えた。反応混合物を室温で40分間攪拌し、濃縮し、トルエン (2×1

50

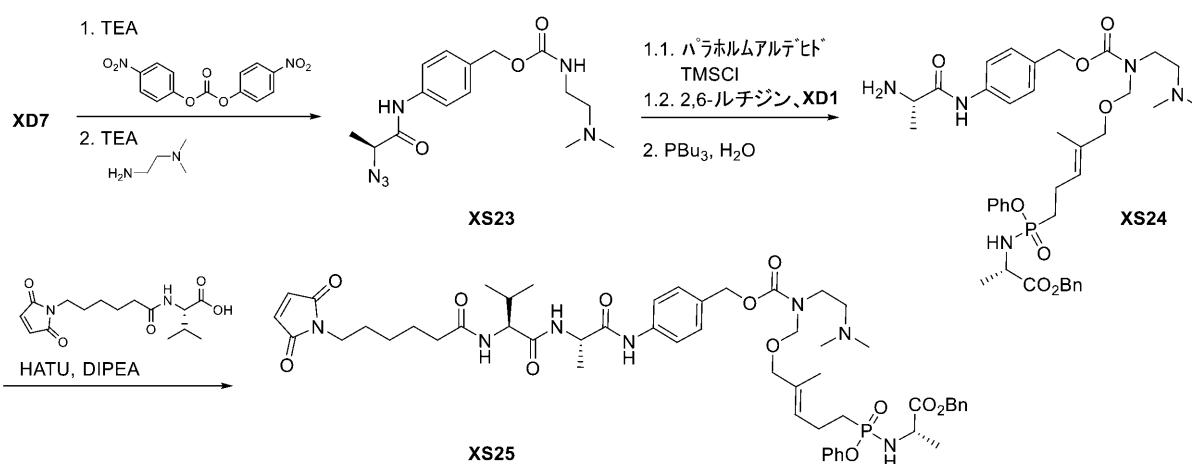
mL) と共に蒸発させた。残留物を EtOAc (10 mL) に溶解し、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (10 mL) で洗浄した。水相を EtOAc (2 × 10 mL) で逆抽出し、合わせた有機相を、水 (10 mL) とブライン (10 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、濃縮した。粗生成物を分取 RP-HPLC (ミリQ水/MeCN、70:30 から 20:80 勾配、修飾剤は使用せず) で精製し、凍結乾燥後に XS7 (17.1 mg、45%) をジアステレオマーの混合物として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 9.94 (s, 1H), 8.14 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.38-7.27 (m, 9H), 7.20-7.10 (m, 3H), 6.99 (s, 2H), 5.62 (t, J = 11.4 Hz, 0.4H), 5.56-5.47 (m, 0.6H), 5.45-5.29 (m, 1H), 5.13-5.01 (m, 4H), 4.74 (s, 2H), 4.38 (quint, J = 7.0 Hz, 1H), 4.17 (dd, J = 8.5, 6.9 Hz, 1H), 4.04-3.89 (m, 1H), 3.81-3.71 (m, 2H), 3.71-3.63 (m, 2H), 3.42-3.33 (m, 4H), 3.05-2.91 (m, 3H), 2.35-2.20 (m, 2H), 2.20-2.07 (m, 2H), 2.03-1.90 (m, 1H), 1.89-1.71 (m, 2H), 1.59-1.44 (m, 7H), 1.30 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.23-1.20 (m, 1H), 1.19-1.15 (m, 2H), 1.13 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 0.86 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₅₂H₇₀N₆O₁₄PS⁺ [M+H]⁺ 計算値1065.4、実測値1065.9。

10

【0211】

実施例 11 リンカー薬物化合物 XS25 の合成

【化22】



20

30

【0212】

(2-(ジメチルアミノ)エチル)カルバミン酸(S)-4-(2-アジドプロパンアミド)ベンジルエステル (XS23)

XD7のPNP炭酸エステルは、XS5の合成で記載したとおりに製造した。炭酸エステル (0.393 g、1.02 mmol) を THF (5.1 mL) に溶解し、0℃で、N,N-ジメチルエタン-1,2-ジアミン (0.137 mL、1.25 mmol) と TEA (0.258 mL、1.85 mmol) を加えた。反応混合物を室温にして、4時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、EtOAc (30 mL) に溶解し、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (3 × 15 mL) で洗浄した。合わせた水相を EtOAc (25 mL) で逆抽出し、合わせた有機相を NaOH 水溶液 (2 × 15 mL、1 N)、ブライン (25 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、蒸発させて、カルバミン酸エステル XS23 (0.299 g、88%) を淡黄色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 8.11 (br s, 1H), 7.56-7.51 (m, 2H), 7.37-7.32 (m, 2H), 5.26 (br s, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.23 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 3.26 (q, J = 5.6 Hz, 2H), 2.39 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.21 (s, 6H), 1.64 (d, J = 7.0 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₁₅H₂₃N₆O₃⁺ [M+H]⁺ 計算値335.2、実測値335.3。

40

【0213】

(((E)-5-((((4-((S)-2-アミノプロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(2-(ジメ

50

チルアミノ)-エチル)アミノ)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステル (XS24)

工程1 カルバミン酸エステルXS23 (0.160 g、0.478 mmol) のDCM (4.8 mL) 溶液に、パラホルムアルデヒド (20 mg、0.67 mmol) を加えた。反応混合物を15分間攪拌し、次いでTMSCL (0.094 mL、0.74 mmol) を加えた。反応混合物を1時間攪拌し、TMSCL (0.094 mL、0.74 mmol) を加え、攪拌を2.5時間続けた。次いで、反応混合物を濃縮し、DCM (1 mL) と共に蒸発させて、15分間真空中で乾燥した。粗製の間接体をDCM (4.8 mL) 中に懸濁し、XD1 (0.493 g、1.18 mmol) のDCM (4.8 mL) 溶液を加えた。反応混合物を15分間攪拌し、続いて2,6-ルチジン (0.167 mL、1.44 mmol) を加えた。20分後、MeOH (2 mL) を加え、反応混合物を濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~20% MeOH) で精製して、(((E)-5-((((4-((S)-2-アジドプロパンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(2-(ジメチルアミノ)エチル)アミノ)メトキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニンベンジルエステルのジアステレオマー混合物 (0.272 g、74%) を、淡黄色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 10.34 (s, 1H), 7.63 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.40-7.26 (m, 9H), 7.20-7.10 (m, 3H), 5.63 (t, J = 11.4 Hz, 0.6H), 5.53 (dd, J = 13.1, 10.2 Hz, 0.4H), 5.46-5.30 (m, 1H), 5.06 (d, J = 13.3 Hz, 4H), 4.71 (s, 2H), 4.09 (q, J = 5.3 Hz, 2H), 4.07-4.02 (m, 1H), 4.02-3.92 (m, 1H), 3.86-3.69 (m, 2H), 3.17 (d, J = 5.1 Hz, 4H), 2.73-2.59 (m, 4H), 2.33-2.16 (m, 2H), 1.87-1.72 (m, 2H), 1.59-1.49 (m, 3H), 1.49-1.40 (m, 3H), 1.28-1.15 (m, 2H), 1.13 (d, J = 7.3 Hz, 1H)。MS (ESI⁺) C₃₈H₅₁N₇O₈P⁺ [M+H]⁺ 計算値764.4、実測値764.7。

10

20

30

40

50

【0214】

工程2 この間接体 (75 mg、0.098 mmol) をTHF (0.884 mL) / 水 (0.098 mL) に溶解し、得られた溶液を、窒素ガスで15分間パージした。トリブチルホスフィン (61 μL、0.245 mmol) を加え、反応混合物を室温で終夜攪拌した。反応混合物を濃縮し、MeCN (2 × 2 mL) と共に蒸発させて、真空中で乾燥した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~25% MeOH) で精製して、アミンXS24の2つのジアステレオマー (33 mg、45%) を、黄色のオイル状物として得た。MS (ESI⁺) C₃₈H₅₃N₅O₈P⁺ [M+H]⁺ 計算値738.4、実測値736.7。

【0215】

リンカー薬物XS25

アミンXS24 (33 mg、0.044 mmol) と(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)-L-バリン (14 mg、0.046 mmol、国際公開第2013/122823号に記載のとおり製造) を、DMF (0.44 mL) に溶解した。HATU (18 mg、0.049 mmol) 及びDIPEA (31 μL、0.18 mmol) を加え、反応混合物を室温で1時間攪拌し、濃縮し、トルエン (1 mL) と共に蒸発させた。水 (1 mL) を加え、得られた上清を除去し、沈殿を水で洗浄した。粗生成物を分取RP-HPLC (ミリQ水×0.1% TFA/MeCN、80:20から30:70勾配) で精製し、凍結乾燥後にXS25 (18 mg、39%) をジアステレオマー混合物として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 9.94 (s, 1H), 9.37 (br s, 1H), 8.14 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.38-7.27 (m, 9H), 7.19-7.10 (m, 3H), 6.99 (s, 2H), 5.63 (t, J = 11.4 Hz, 0.7H), 5.52 (dd, J = 13.1, 10.3 Hz, 0.3H), 5.46-5.30 (m, 1H), 5.10-5.06 (m, 2H), 5.06-5.04 (m, 2H), 4.71 (s, 2H), 4.38 (quint, J = 7.0 Hz, 1H), 4.16 (dd, J = 8.5, 6.9 Hz, 1H), 4.06-3.88 (m, 1H), 3.84-3.73 (m, 2H), 3.64-3.55 (m, 2H), 3.39-3.36 (m, 2H), 3.29-3.18 (m, 2H), 2

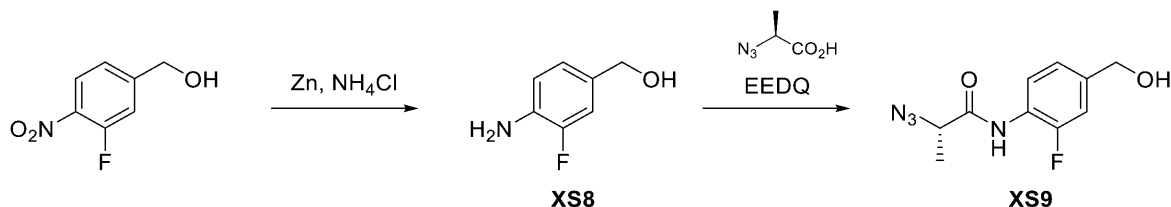
.85-2.70 (m, 6H), 2.31-2.21 (m, 2H), 2.21-2.08 (m, 2H), 1.95 (dq, $J = 13.6, 6.8$ Hz, 1H), 1.88-1.73 (m, 2H), 1.60-1.52 (m, 3H), 1.52-1.43 (m, 4H), 1.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.21 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.19-1.11 (m, 2H), 0.86 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.82 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H)。MS (ESI⁺) $C_{53}H_{73}N_7O_{12}P^+$ $[M+H]^+$ 計算値1030.5、実測値1030.9。

【0216】

実施例12 リンカー薬物化合物XS12の合成

A アジ化物XS9の製造

【化23】



10

【0217】

(4-アミノ-3-フルオロフェニル)メタノール (XS8)

(3-フルオロ-4-ニトロフェニル)メタノール (0.610 g、3.56 mmol) の MeOH (8.9 mL) と THF (8.9 mL) 溶液に、亜鉛粉末 (2.33 g、35.6 mmol) 及び塩化アンモニウム (1.91 g、35.6 mmol) を加えた。反応混合物を室温で24時間攪拌し、セライトでろ過し、MeOH (20 mL) で洗浄した。ろ液を濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~10% MeOH) で精製して、アニリンXS8 (0.312 g、62%) をオレンジ色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 7.01 (dd, $J = 11.7, 1.9$ Hz, 1H), 6.98-6.87 (m, 1H), 6.75 (dd, $J = 9.0, 8.1$ Hz, 1H), 4.55 (s, 2H)。MS (ESI⁺) $C_7H_9FNO^+$ $[M+H]^+$ 計算値142.1、実測値142.1。

20

【0218】

(S)-2-アジド-N-(2-フルオロ-4-(ヒドロキシメチル)フェニル)プロペンアミド (XS9)

(S)-2-アジドプロピオン酸 (0.180 g、1.56 mmol) の MeOH (1.8 mL) 溶液を、アニリンXS8 (0.309 g、2.19 mmol) の DCM (5.9 mL) 溶液に加えた。溶液を0℃に冷却し、EEDQ (0.774 g、3.13 mmol) を加えた。15分後、反応混合物を室温にして、終夜攪拌した。反応混合物を濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~100% EtOAc) で精製して、アミドXS9 (0.416 g、100%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 8.42-8.29 (m, 1H), 8.26 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.20-7.14 (m, 1H), 7.14-7.09 (m, 1H), 4.66 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 4.26 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.79 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 1.66 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H)。MS (ESI⁺) $C_{10}H_{12}FN_4O_2^+$ $[M+H]^+$ 計算値239.1、実測値239.2。

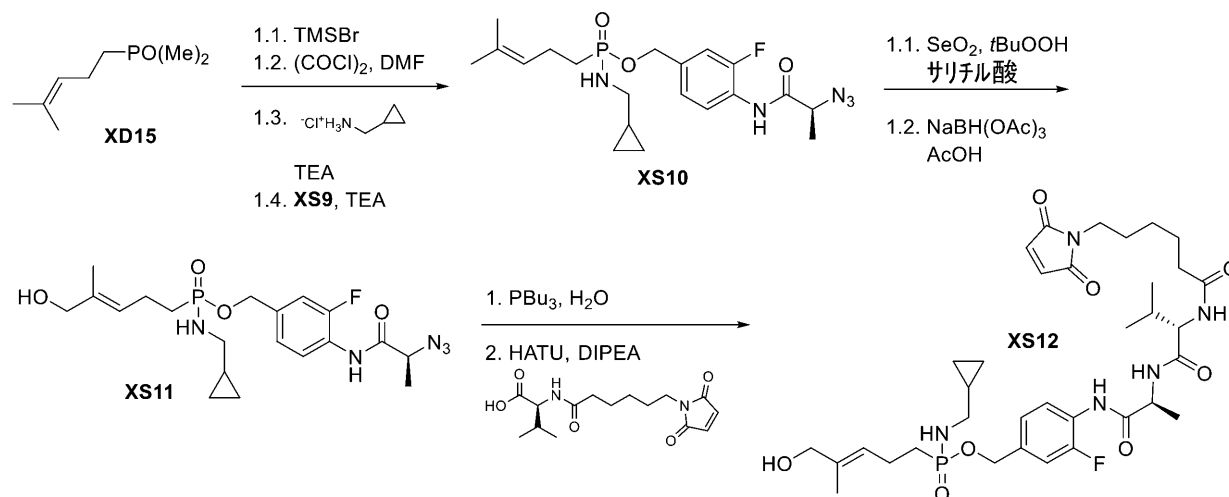
30

【0219】

B リンカー薬物化合物XS12の製造

40

【化 2 4】



10

【0220】

N-(シクロプロピルメチル)-P-(4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホンアミデート 4-((S)-2-アジドプロパンアミド)-3-フルオロベンジルエステル (XS10)

シクロプロピルメタンアミン塩酸塩 (0.128 g、1.19 mmol) を DCM (1.0 mL) 中に懸濁し、 -78°C に冷却した。(4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸ジクロリド (0.300 g、1.19 mmol、一般手順 XXB に従いホスホン酸ジエステル XD15 (0.323 g、1.50 mmol) から製造) の DCM (2.0 mL) 溶液を加え、続いて、TEA (0.333 mL、2.39 mmol) を加えた。反応混合物を -78°C で 1 時間攪拌し、室温にして、2 時間攪拌した。反応混合物を -78°C に冷却し、ベンジルアルコール XS9 (0.379 g、1.43 mmol) の DCM (4.0 mL) 溶液を加え、続いて TEA (0.200 mL、1.43 mmol) を加えた。反応混合物を室温にして、2 時間攪拌した。TEA (0.100 mL、0.717 mmol) を加え、反応混合物を 1 時間攪拌して濃縮した。粗生成物を EtOAc (50 mL) と塩酸 (15 mL、1 M) の間で分配し、水相を EtOAc (3 × 15 mL) で逆抽出した。合わせた有機相をブライン (10 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM 中の 0~100% EtOAc) で精製して、ホスホンアミデート XS10 の 2 つのジアステレオマー (0.194 g、37%) を、無色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 8.39 (br s, 1H), 8.28 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.21-7.10 (m, 2H), 5.16-5.10 (m, 1H), 5.06-4.99 (m, 1H), 4.93-4.87 (m, 1H), 4.30-4.23 (m, 1H), 2.80-2.69 (m, 2H), 2.63-2.54 (m, 1H), 2.37-2.24 (m, 2H), 1.89-1.77 (m, 2H), 1.77-1.61 (m, 9H), 0.99-0.86 (m, 1H), 0.53-0.46 (m, 2H), 0.18-0.10 (m, 2H)。MS (ESI⁺) C₂₀H₃₀FN₅O₃P⁺ [M+H]⁺ 計算値 438.2、実測値 438.4。

20

30

【0221】

N-(シクロプロピルメチル)-P-(E)-5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホンアミデート 4-((S)-2-アジドプロパンアミド)-3-フルオロベンジルエステル (XS11)

アルケン XS10 (0.183 g、0.418 mmol) のアリル酸化を、一般手順 XC に従って行った。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、EtOAc 中の 0~5% MeOH) で精製して、アルコール XS11 の 2 つのジアステレオマー (80 mg、44%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 8.38 (br s, 1H), 8.28 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.18 (dd, J = 11.4, 1.9 Hz, 1H), 7.15-7.09 (m, 1H), 5.49-5.40 (m, 1H), 5.07-4.99 (m, 1H), 4.94-4.86 (m, 1H), 4.27 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 3.99 (br s, 2H), 2.75 (dt, J = 8.5, 6.8 Hz, 2H), 2.64-2.55 (m, 1H), 2.43-2.31 (m, 2H), 1.92-1.74 (m, 2H), 1.68-1.65 (m, 6H),

40

50

1.62-1.51 (m, 1H), 0.98-0.86 (m, 1H), 0.53-0.47 (m, 2H), 0.15 (q, J = 4.8 Hz, 2H)。MS (ESI⁺) C₂₀H₃₀FN₅O₄P⁺ [M+H]⁺ 計算値454.2、実測値454.5。

【0222】

リンカー-薬物XS12

工程1 アジ化物XS11 (74mg、0.16mmol)をTHF (1.5mL) / 水 (0.16mL) に溶解し、得られた溶液を、窒素ガスで15分間パージした。トリブチルホスフィン (0.102mL、0.408mmol) を加え、反応混合物を室温で終夜攪拌した。反応混合物を濃縮し、MeCN (3 × 1mL) と共に蒸発させ、真空中で乾燥した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~20% MeOH) で精製して、N-(シクロプロピルメチル)-P-((E)-5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホンアミデート 4-((S)-2-アミノプロパンアミド)-3-フルオロベンジルエステルの2つのジアステレオマー (51mg、73%) を、オイル状物として得た。MS (ESI⁺) C₂₀H₃₂FN₃O₄P⁺ [M+H]⁺ 計算値428.2、実測値428.4。

10

【0223】

工程2 中間体アミン (47mg、0.11mmol) と(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)-L-バリン (36mg、0.12mmol、国際公開第2013/122823号に記載のとおりに製造) を、DMF (1.1mL) に溶解した。HATU (46mg、0.12mmol) とDIPEA (0.077mL、0.44mmol) を加え、反応混合物を室温で30分間攪拌した。HATU (4.2mg、0.011mmol) を加え、反応混合物を15分間攪拌し、濃縮し、トルエン (1mL) と共に蒸発させた。残留物をEtOAc (10mL) 及び飽和NaHCO₃水溶液 (10mL) 間で分配した。水相をEtOAc (2 × 10mL) で逆抽出し、合わせた有機相を水 (10mL) / ブライン (5mL) とブライン (10mL) で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、濃縮した。粗生成物を分取RP-HPLC (ミリQ水/MeCN、90:10から40:60勾配、修飾剤は使用せず) で精製し、凍結乾燥後にXS12のジアステレオマー混合物 (30mg、38%) を白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 9.67 (s, 1H), 8.22 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.86 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.28 (dd, J = 11.7, 1.8 Hz, 1H), 7.17 (dd, J = 8.4, 1.5 Hz, 1H), 7.00 (s, 2H), 5.40-5.33 (m, 1H), 4.92-4.78 (m, 2H), 4.73 (dt, J = 11.4, 6.9 Hz, 1H), 4.64 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 4.52 (quint, J = 7.0 Hz, 1H), 4.22-4.15 (m, 1H), 3.79-3.73 (m, 2H), 3.37 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.73-2.63 (m, 2H), 2.25-2.06 (m, 4H), 2.02-1.89 (m, 1H), 1.73-1.62 (m, 2H), 1.53 (s, 3H), 1.52-1.43 (m, 4H), 1.31 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.23-1.13 (m, 2H), 0.94-0.86 (m, 1H), 0.84 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.81 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.42-0.35 (m, 2H), 0.17-0.11 (m, 2H)。MS (ESI⁺) C₃₅H₅₂FN₅O₈P⁺ [M+H]⁺ 計算値720.4、実測値720.7。

20

30

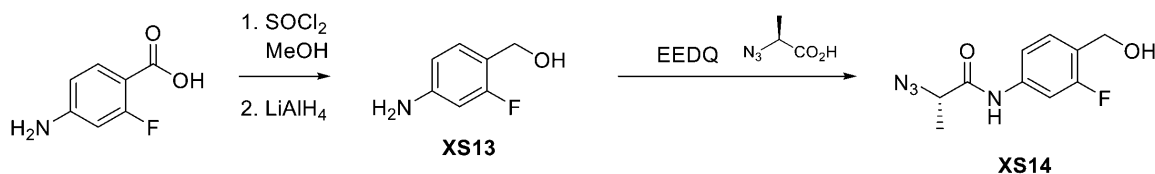
【0224】

実施例13 リンカー-薬物化合物XS17の合成

A アジ化物XS14の製造

【化25】

40



【0225】

(4-アミノ-2-フルオロフェニル)メタノール (XS13)

工程1 4-アミノ-2-フルオロ安息香酸 (1.00g、6.45mmol) をMeOH (3.2mL) 中に懸濁し、0℃に冷却した。塩化チオニル (0.706mL、9.67m

50

mol) を滴下し、次いで、反応混合物を 1 時間還流した。MeOH (5.0 mL) を加え、反応混合物を室温で 2 時間攪拌した。混合物を飽和 NaHCO₃ 水溶液 (100 mL) に加え、生成物を EtOAc (3 × 75 mL) で抽出した。合わせた有機相をブライン (2 × 50 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、濃縮し、MeOH (10 mL) と共に蒸発させて、真空中で乾燥し、4-アミノ-2-フルオロ安息香酸メチルエステル (1.01 g、93%) を茶色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 7.76 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 6.41 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 6.33 (dd, J = 12.9, 2.3 Hz, 1H), 4.15 (br s, 2H), 3.86 (s, 3H)。MS (ESI⁺) C₈H₉FN₂O₂⁺ [M+H]⁺ 計算値 170.1、実測値 170.2。

【0226】

工程 2 0℃ の中間体エステル (0.486 g、2.87 mmol) の THF (19 mL) 溶液に、THF 中の LiAlH₄ (3.59 mL、8.62 mmol) を滴下した。反応混合物を室温にして、3 時間攪拌した。反応混合物を 0℃ に冷却し、Na₂SO₄・10H₂O (3.5 g) とセライト (3.5 g) の混合物を少量ずつ加えてクエンチした。混合物をろ過し、残留物を THF (10 mL) で洗浄した。ろ液を真空中で濃縮して、ベンジルアルコール XS13 (0.367 g、91%) をオフホワイトの固体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 7.13 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 6.45-6.40 (m, 1H), 6.40-6.35 (m, 1H), 4.61 (d, J = 5.4 Hz, 2H), 3.82-3.68 (m, 2H), 1.61 (t, J = 5.9 Hz, 1H)。MS (ESI⁺) C₇H₉FN₂O⁺ [M+H]⁺ 計算値 142.1、実測値 142.1。

【0227】

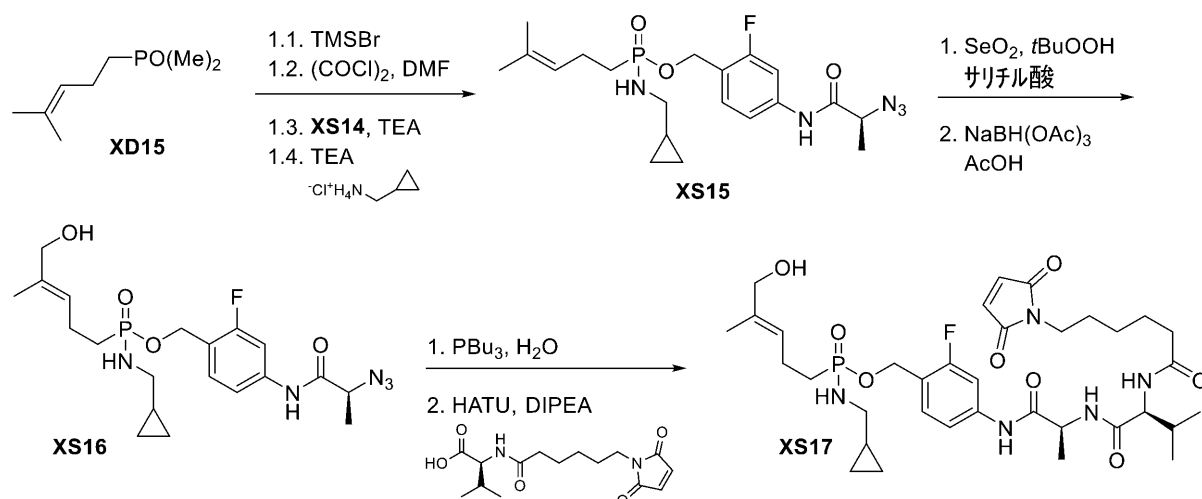
(S)-2-アジド-N-(3-フルオロ-4-(ヒドロキシメチル)フェニル)プロペンアミド (XS14)

(S)-2-アジドプロピオン酸 (0.210 g、1.83 mmol) の MeOH (2.1 mL) 溶液を、アニリン XS13 (0.361 g、2.55 mmol) の DCM (6.8 mL) 溶液に加えた。溶液を 0℃ に冷却し、EEDQ (0.902 g、3.65 mmol) を加えた。15 分後、反応混合物を室温にして、終夜攪拌した。反応混合物を濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM 中の 0~100% EtOAc) で精製して、アミド XS14 (0.902 g、定量) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 8.21-8.08 (m, 1H), 7.55 (dd, J = 11.8, 2.1 Hz, 1H), 7.37 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 7.16 (dd, J = 8.3, 2.2 Hz, 1H), 4.75-4.69 (m, 2H), 4.29-4.19 (m, 1H), 1.81-1.74 (m, 1H), 1.65 (d, J = 7.0 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₁₀H₁₂FN₄O₂⁺ [M+H]⁺ 計算値 239.1、実測値 239.2。

【0228】

B リンカー薬物化合物 XS17 の製造

【化26】



10

20

30

40

50

【0229】

N-(シクロプロピルメチル)-P-(4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホンアミデート 4-((S)-2-アジドプロパンアミド)-2-フルオロベンジルエステル (XS15)

シクロプロピルメタンアミン塩酸塩 (0.128 g、1.19 mmol) を DCM (1.0 mL) 中に懸濁し、 -78°C に冷却した。(4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸ジクロリド (0.300 g、1.19 mmol、一般手順 XXB に従いホスホン酸ジエステル XD15 (0.323 g、1.50 mmol) から製造) の DCM (2.0 mL) 溶液を加え、続いて、TEA (0.333 mL、2.39 mmol) を加えた。反応混合物を -78°C で 1 時間攪拌し、室温にして、2 時間攪拌した。反応混合物を -78°C に冷却し、ベンジルアルコール XS14 (0.379 g、1.43 mmol) の DCM (4.0 mL) 溶液を加え、続いて、TEA (0.200 mL、1.43 mmol) を加えた。反応混合物を室温にして、2 時間攪拌した。TEA (0.030 mL、0.215 mmol) を加え、反応混合物を 1 時間攪拌して濃縮した。残留物を EtOAc (50 mL) と塩酸 (15 mL、1 M) の間で分配し、水相を EtOAc (3 × 15 mL) で逆抽出した。合わせた有機相をブライン (10 mL) で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥し、濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM 中の 0 ~ 100 % EtOAc) で精製して、ホスホンアミデート XS15 のジアステレオマー混合物 (0.294 g、56 %) を無色のオイル状物として得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ppm = 8.27 (s, 1H), 7.60 (dd, J = 11.8, 2.1 Hz, 1H), 7.40 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 7.15 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 5.14-5.09 (m, 1H), 5.09-4.96 (m, 2H), 4.27-4.20 (m, 1H), 2.83-2.69 (m, 2H), 2.64-2.52 (m, 1H), 2.35-2.22 (m, 2H), 1.88-1.76 (m, 2H), 1.75-1.62 (m, 9H), 1.00-0.88 (m, 1H), 0.54-0.45 (m, 2H), 0.18-0.12 (m, 2H)。MS (ESI^+) $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{FN}_5\text{O}_3\text{P}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 計算値 438.2、実測値 438.4。

10

20

【0230】

N-(シクロプロピルメチル)-P-((E)-5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホンアミデート 4-((S)-2-アジドプロパンアミド)-2-フルオロベンジルエステル (XS16)

アルケン XS15 (0.288 g、0.658 mmol) のアリル酸化を、一般手順 XC に従って行った。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、EtOAc 中に 0 ~ 5 % MeOH) で精製して、XS16 (64 mg、32 %) をジアステレオマー混合物として得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ppm = 8.25 (s, 1H), 7.60 (dd, J = 11.7, 2.1 Hz, 1H), 7.39 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 7.15 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 5.46-5.40 (m, 1H), 5.08-4.97 (m, 2H), 4.24 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 3.98 (s, 2H), 2.81-2.71 (m, 2H), 2.68-2.52 (m, 1H), 2.41-2.30 (m, 2H), 1.91-1.71 (m, 2H), 1.68-1.63 (m, 6H), 1.59-1.52 (m, 1H), 1.01-0.86 (m, 1H), 0.54-0.45 (m, 2H), 0.18-0.13 (m, 2H)。MS (ESI^+) $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{FN}_5\text{O}_4\text{P}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 計算値 454.2、実測値 454.5。

30

【0231】

リンカー—薬物 XS17

工程1 アジ化物 XS16 (61 mg、0.14 mmol) を THF (1.2 mL) / 水 (0.14 mL) に溶解し、得られた溶液を、窒素ガスで 15 分間パージした。トリブチルホスフィン (84 μL 、0.336 mmol) を加え、反応混合物を室温で終夜攪拌した。反応混合物を濃縮し、MeCN (3 × 1 mL) と共に蒸発させて、真空中で乾燥した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM 中の 0 ~ 20 % MeOH) で精製して、N-(シクロプロピルメチル)-P-((E)-5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホンアミデート 4-((S)-2-アミノプロパンアミド)-2-フルオロベンジルエステルの 2 つのジアステレオマー (44 mg、77 %) を、オイル状物として得た。MS (ESI^+) $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{FN}_3\text{O}_4\text{P}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 計算値 428.2、実測値 428.6。

40

【0232】

50

工程 2 中間体アミン (44 mg、0.10 mmol) と (6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)-L-バリン (34 mg、0.11 mmol、国際公開第2013/122823号に記載のとおり製造) を、DMF (1.0 mL) に溶解した。HATU (43 mg、0.11 mmol) 及び DIPEA (72 μ L、0.41 mmol) を加え、反応混合物を室温で 90 分間攪拌し、濃縮し、トルエン (1 mL) と共に蒸発させた。残留物を EtOAc (10 mL) 及び飽和 NaHCO₃ 溶液 (10 mL) 間で分配した。水相を EtOAc (2 $\times$ 10 mL) で逆抽出し、合わせた有機相を水 (10 mL) とブライン (10 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、濃縮した。粗生成物を分取 RP-HPLC (ミリQ水/MeCN、90:10 から 40:60 勾配、修飾剤は使用せず) で精製した。MeCN の蒸発、その後の凍結乾燥により XS17 (32 mg、43%) をジアステレオマー混合物として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 10.13 (s, 1H), 8.19 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.59 (dd, J = 12.6, 1.9 Hz, 1H), 7.40 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 6.99 (s, 2H), 5.38-5.31 (m, 1H), 4.91-4.79 (m, 2H), 4.70 (dt, J = 11.4, 6.8 Hz, 1H), 4.66-4.60 (m, 1H), 4.36 (quint, J = 7.0 Hz, 1H), 4.16 (dd, J = 8.5, 6.9 Hz, 1H), 3.75 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.36 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.73-2.59 (m, 2H), 2.22-2.07 (m, 4H), 1.96 (dq, J = 13.6, 6.8 Hz, 1H), 1.70-1.58 (m, 2H), 1.52 (s, 3H), 1.51-1.42 (m, 4H), 1.30 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.23-1.13 (m, 2H), 0.90-0.88 (m, 1H), 0.86 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.41-0.34 (m, 2H), 0.18-0.09 (m, 2H)。MS (ESI⁺) C₃₅H₅₂FN₅O₈P⁺ [M+H]⁺ 計算値 720.4、実測値 720.7。

10

20

【0233】

実施例 14 リンカー薬物化合物 XS22 の合成

A アジ化物 XS19 の製造

【化27】



30

【0234】

L-アラニン 4-((S)-2-アジドプロパンアミド)ベンジルエステル (XS19)

工程 1 Fmoc-Ala-OH (0.386 g、1.240 mmol) を DCM (12 mL) に溶解し、0°C に冷却した。DMAP (12 mg、0.099 mmol) を加え、続いて、EDC (0.291 g、1.52 mmol) と HOBT (0.155 g、1.01 mmol) を加えた。15 分間攪拌した後、アルコール XD7 (0.300 g、1.36 mmol) を加え、反応混合物を室温にして、終夜攪拌した。反応混合物を水 (15 mL) に加え、水相を DCM (2 $\times$ 15 mL) で抽出した。合わせた有機相をブライン (15 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中の 0~80% EtOAc) で精製して、(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)-L-アラニン 4-((S)-2-アジドプロパンアミド)ベンジルエステル (0.406 g、64%) を白色の固体として得た。MS (ESI⁺) C₂₈H₂₈N₅O₅⁺ [M+H]⁺ 計算値 514.2、実測値 514.5。

40

【0235】

工程 2 中間体エステル (0.404 g、0.786 mmol) を DMF (5.3 mL) に溶解し、ピペリジン (0.389 mL、3.93 mmol) を加えた。反応混合物を 20 分間攪拌し、次いで濃縮し、トルエン (2 $\times$ 5 mL) と共に蒸発させた。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM 中の 0~15% MeOH) で精製し

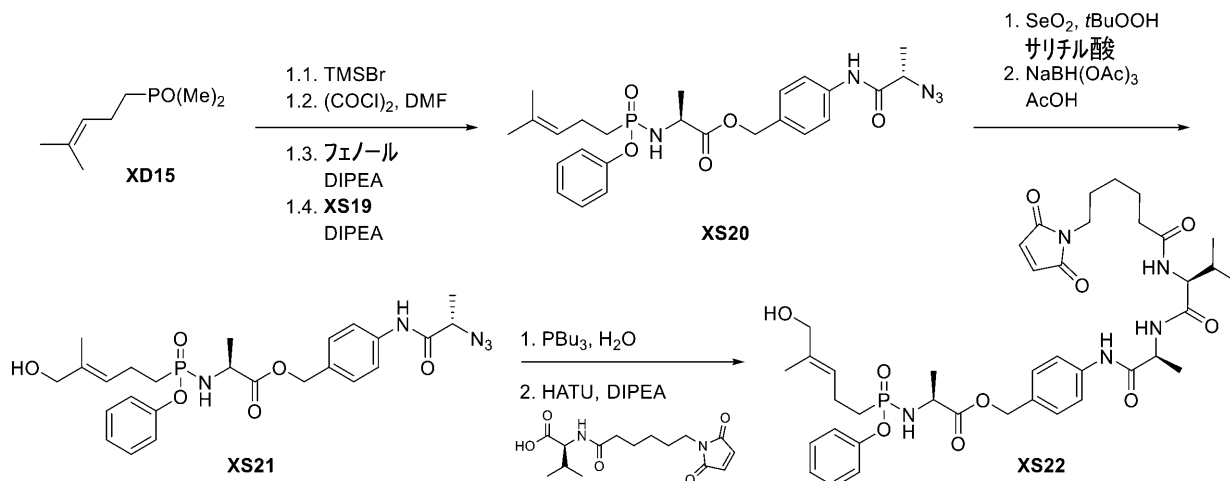
50

て、アミンXS19 (0.219 g、96%) を無色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 10.22 (s, 1H), 7.60 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.05 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 4.03 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 3.44 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 1.79 (br s, 2H), 1.45 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.17 (d, J = 7.0 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₁₃H₁₈N₅O₃⁺ [M+H]⁺ 計算値292.1、実測値292.3。

【0236】

B リンカー薬物化合物XS22の製造

【化28】



10

20

【0237】

((4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニン 4-((S)-2-アジドプロパンアミド)ベンジルエステル (XS20)

トルエン (4.5 mL) 中の(4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸ジクロリド (0.176 g、0.700 mmol、一般手順XXBに従いホスホン酸ジエステルXD15 (0.189 g、0.875 mmol) から製造) に、-78℃で、フェノール (66 mg、0.70 mmol) 及びDIPEA (0.122 mL、0.700 mmol) のトルエン (4.5 mL) 溶液を滴下した。反応混合物を室温にして、2.5時間攪拌した。アミンXS19 (0.214 g、0.735 mmol) とDIPEA (0.128 mL、0.735 mmol) を-78℃で加え、反応混合物を室温にして、2時間攪拌した。DIPEA (0.128 mL、0.735 mmol) を加え、反応混合物を90分間攪拌し、濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~100% EtOAc) で精製して、ホスホンアミデートXS20のジアステレオマー混合物 (0.100 g、28%) を淡黄色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 8.13 (br s, 1H), 7.57-7.51 (m, 2H), 7.37-7.27 (m, 4H), 7.22-7.08 (m, 3H), 5.17-5.08 (m, 1H), 5.07-5.01 (m, 2H), 4.24 (qd, J = 7.0, 1.6 Hz, 1H), 4.16-4.04 (m, 1H), 3.29 (t, J = 10.1 Hz, 0.5H), 3.18 (td, J = 10.4, 3.4 Hz, 0.5H), 2.40-2.30 (m, 2H), 1.96-1.81 (m, 2H), 1.77-1.73 (m, 3H), 1.69 (br s, 3H), 1.65 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.25 (q, J = 7.0 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₂₅H₃₃N₅O₅P⁺ [M+H]⁺ 計算値514.2、実測値514.5。

30

40

【0238】

((E)-5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニン 4-((S)-2-アジドプロパンアミド)ベンジルエステル (XS21)

アルケンXS20 (0.100 g、0.195 mmol) のアリル酸化を、一般手順XCに従って行った。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~100% EtOAc) で精製して、アルコールXS21の2つのジアステレオマー (27 mg、26%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 8.48-8.34 (m,

50

1H), 7.58-7.51 (m, 2H), 7.32-7.23 (m, 4H), 7.22-7.16 (m, 2H), 7.15-7.09 (m, 1H), 5.44-5.35 (m, 1H), 5.12-5.01 (m, 2H), 4.22-4.16 (m, 1H), 4.16-3.99 (m, 1H), 3.98 (s, 2H), 3.45 (t, J = 10.2 Hz, 0.5H), 3.30 (dd, J = 11.4, 10.3 Hz, 0.5H), 2.49-2.32 (m, 2H), 2.00-1.80 (m, 2H), 1.65 (d, J = 6.0 Hz, 3H), 1.62 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.29 (d, J = 7.1 Hz, 1.4H), 1.21 (d, J = 7.1 Hz, 1.6H)。MS (ESI⁺) C₂₅H₃₃N₅O₆P⁺ [M+H]⁺ 計算値530.2、実測値530.5。

【0239】

リンカー-薬物XS22

工程1 アジ化物XS21 (27mg、0.050mmol)をTHF (0.45mL) / 水 (0.050mL) に溶解し、得られた溶液を、窒素ガスで15分間パージした。トリブチルホスフィン (0.032mL、0.126mmol) を加え、反応混合物を室温で終夜攪拌した。反応混合物を濃縮し、MeCN (3×1mL) と共に蒸発させて、真空中で乾燥した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~20% MeOH) で精製して、(((E)-5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニン 4-((S)-2-アミノプロパンアミド)ベンジルエステルの2つのジアステレオマー (15mg、58%) を、無色のオイル状物として得た。MS (ESI⁺) C₂₅H₃₅N₃O₆P⁺ [M+H]⁺ 計算値504.2、実測値504.6。

【0240】

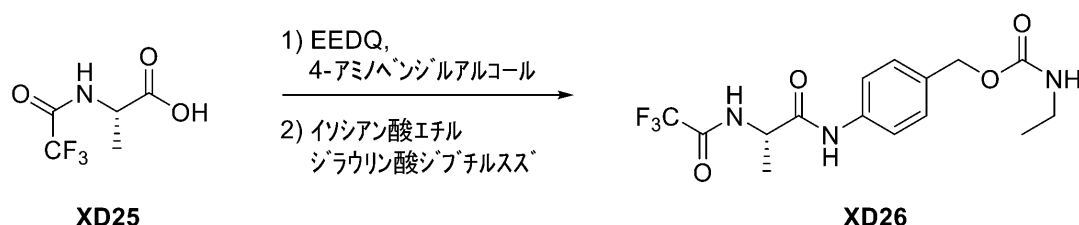
工程2 中間体アミン (15mg、0.029mmol) 及び(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)-L-バリン (9.9mg、0.032mmol、国際公開第2013/122823号に記載のとおりに製造) を、DMF (0.29mL) に溶解した。HATU (13mg、0.035mmol) とDIPEA (0.020mL、0.12mmol) を加え、反応混合物を室温で75分間攪拌し、濃縮し、トルエン (1mL) と共に蒸発させた。残留物をEtOAc (10mL) 及び飽和NaHCO₃ 溶液 (10mL) 間で分配した。水相をEtOAc (2×10mL) で逆抽出し、合わせた有機相を水 (10mL) とブライン (10mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、濃縮した。粗生成物を分取RP-HPLC (ミリQ水/MeCN、80:20から30:70勾配、修飾剤は使用せず) で精製し、凍結乾燥後にリンカー-薬物化合物XS22のジアステレオマー混合物 (10mg、44%) を白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 9.94 (s, 1H), 8.14 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.37-7.22 (m, 4H), 7.17-7.10 (m, 3H), 6.99 (s, 2H), 5.58 (dd, J = 12.5, 10.4 Hz, 0.5H), 5.48 (dd, J = 13.2, 10.1 Hz, 0.5H), 5.35 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 5.07-4.94 (m, 2H), 4.65 (td, J = 5.6, 0.8 Hz, 1H), 4.38 (quint, J = 7.0 Hz, 1H), 4.17 (dd, J = 8.5, 6.9 Hz, 1H), 4.01-3.87 (m, 1H), 3.77 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 3.36 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.31-2.20 (m, 2H), 2.20-2.07 (m, 2H), 2.03-1.91 (m, 1H), 1.87-1.74 (m, 2H), 1.55-1.52 (m, 3H), 1.52-1.43 (m, 4H), 1.30 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.21-1.06 (m, 5H), 0.86 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₄₀H₅₅N₅O₁₀P⁺ [M+H]⁺ 計算値796.4、実測値796.6。

【0241】

実施例15 リンカー-薬物化合物XD24の合成

A カルバミン酸エステルXD26の製造

【化29】



10

20

30

40

50

【0242】

エチルカルバミン酸(S)-4-(2-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)プロパンアミド)ベンジルエステル(XD26)

工程1 アミドXD25(11.4g、61.6mmol、Z.P. Tachrim et al. Molecules, 2007, 22, 1748に記載のとおり製造)のDCM(275mL)とMeOH(175mL)の溶液を0℃に冷却し、EEDQ(30.5g、123mmol)と(4-アミノフェニル)メタノール(10.6g、86.0mmol)を加えた。1時間後、オレンジ色の溶液を室温に温め、終夜撹拌した。反応物を濃縮し、粗生成物を、エーテル(500mL)中、室温で1時間撹拌した。混合物をろ過し、固体をエーテルで洗浄して、(S)-N-(4-(ヒドロキシメチル)フェニル)-2-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)プロパンアミドの最初の生産物(10.8g、61%)を白色の固体として得た。ろ液を濃縮し、粗生成物をEtOAc(150mL)に溶解した。溶液を塩酸(2M、90mL)で洗浄し、水相をEtOAc(3×125mL)で逆抽出した。合わせた有機相をブライン(10mL)で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗生成物を少量のDCM中に懸濁し、30分間撹拌し、次いで、この厚いケーキをろ過した。固体を集め、真空中で乾燥して、(S)-N-(4-(ヒドロキシメチル)フェニル)-2-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)プロパンアミドの第2の生産物(4.66g、収率26%)をクリーム状の固体として得た。MS(ESI⁺) C₁₂H₁₄F₃N₂O₃ [M+H]⁺ 計算値291.10、実測値291.24。

10

【0243】

工程2 (S)-N-(4-(ヒドロキシメチル)フェニル)-2-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)プロパンアミド(3.24g、11.2mmol)のTHF(80mL)溶液に、0℃でジラウリン酸ジブチルズズ(1.66mL、2.79mmol)とイソシアン酸エチル(1.33mL、16.7mmol)を加えた。冷却浴を取り除き、混合物を室温で3時間撹拌した。反応混合物をシリカゲル上で濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー(最初にスタンナン不純物をヘプタン中の0~80%勾配のエーテルで除去し、続いて、生成物をヘプタン中の0~100%勾配のEtOAcで溶出した)で精製して、カルバミン酸エステルXD26(3.62g、2工程で78%)を白色の固体として得た。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) ppm = 10.18(s, 1H), 9.71(s, 1H), 7.58(d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.30(d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.16(br t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.95(s, 2H), 4.62-4.42(m, 1H), 3.02(qd, J = 7.2, 5.6 Hz, 2H), 1.42(d, J = 7.3 Hz, 3H), 1.01(t, J = 7.3 Hz, 3H)。MS(ESI⁺) C₁₅H₁₈F₃N₃NaO₄⁺ [M+Na]⁺ 計算値384.1、実測値384.3。

20

30

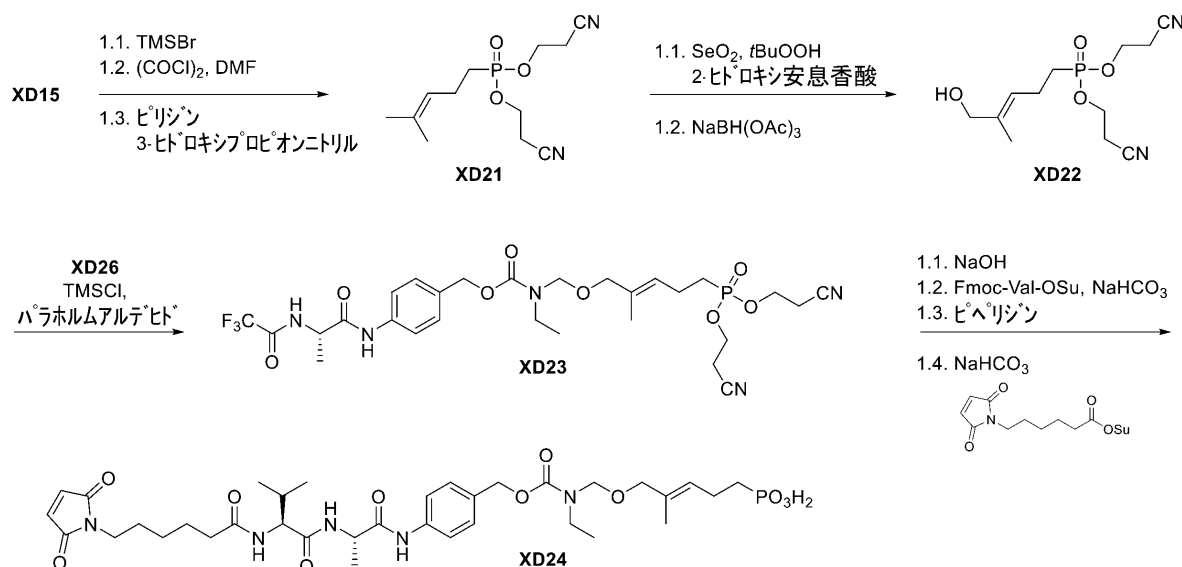
【0244】

B リンカー—薬物化合物XD24の製造

40

50

【化 3 0】



10

【 0 2 4 5】

(4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸ビス(2-シアノエチル) (XD21)

(4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸ジクロリド (1.04 g、5.20 mmol、一般手順XXBに従いホスホン酸ジエステルXD15から製造)のDCM (3.3 mL) 溶液を、冷却 (−78℃) した3-ヒドロキシプロパンニトリル (0.746 mL、10.9 mmol) とピリジン (0.883 mL、10.9 mmol) のDCM (17 mL) 溶液に滴下した。30分後、反応物を室温に温めた。45分後に、室温で3-ヒドロキシプロパンニトリル (0.267 mL、3.90 mmol) とピリジン (0.315 mL、3.90 mmol) を更に加え、攪拌を3時間続けた。反応物をEtOAc (100 mL) と塩酸 (1 M、20 mL) の混合物に注いだ。各相を分離し、水相をEtOAc (3×30 mL) で抽出した。合わせた有機相をブライン (20 mL) で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、ろ過し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (DCM中の0～100% EtOAc) により、ホスホン酸ジアルキルXD21 (986 mg、70%) を淡黄色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 5.12 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 4.37-4.20 (m, 4H), 2.77 (t, J = 6.1 Hz, 4H), 2.33 (dq, J = 14.4, 7.4 Hz, 2H), 1.96-1.83 (m, 2H), 1.70 (s, 3H), 1.64 (s, 3H)。MS (ESI⁺) C₁₂H₂₀N₂O₃P⁺ [M+H]⁺ 計算値271.1、実測値271.2。

20

30

【 0 2 4 6】

(E)-(5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸ビス(2-シアノエチル) (XD22)

アルケンXD21 (0.986 g、3.65 mmol) のアリル酸化を、一般手順XXCに従って行った。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0～6% MeOH) で精製して、アルコールXD22 (0.586 g、56%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 5.44 (td, J = 7.1, 1.3 Hz, 1H), 4.34-4.24 (m, 4H), 4.01 (s, 2H), 2.77 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 2.41 (dq, J = 15.5, 7.6 Hz, 2H), 2.01-1.87 (m, 2H), 1.69 (s, 3H)。MS (ESI⁺) C₁₂H₁₉N₂NaO₄P⁺ [M+Na]⁺ 計算値309.1、実測値309.2。

40

【 0 2 4 7】

(E)-(((5-(ビス(2-シアノエトキシ)ホスホリル)-2-メチルペンタ-2-エン-1-イル)オキシ)メチル)(エチル)カルバミン酸(S)-4-(2-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)プロパンアミド)ベンジルエステル (XD23)

アルコールXD22 (100 mg、0.349 mmol) を、DIPEAに代えて2,6-ルチジンを使用する一般手順XXAに従い、カルバミン酸エステルXD26と反応させ

50

た。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー（シリカゲル、DCM中の0～4% MeOH）で精製して、カルバミン酸エステルXD23（217mg、94%）を無色のオイル状物として得た。¹H NMR（400 MHz, DMSO-d₆, 330Kで測定）ppm = 10.11 (s, 1H), 9.60 (br d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.40 (br s, 1H), 5.07 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.51 (quint, J = 7.1 Hz, 1H), 4.23-4.10 (m, 4H), 3.78 (br s, 2H), 3.30 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 2.91 (t, J = 5.9 Hz, 4H), 2.26 (dq, J = 14.1, 7.2 Hz, 2H), 1.95-1.81 (m, 2H), 1.58 (br s, 3H), 1.43 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.09 (t, J = 7.1 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₂₈H₃₈F₃N₅O₈P⁺ [M+H]⁺ 計算値660.2、実測値660.6。

【0248】

10

リンカー薬物XD24

工程1 アミドXD23（44.5mg、0.067mmol）をMeOH（1.1mL）に溶解した。水（0.135mL）を加え、混合物を0℃に冷却した。NaOH水溶液（2M、0.135mL、0.270mmol）を加え、2分後に氷浴を取り除き、室温で攪拌を続けた。2時間後に、NaOH水溶液（2M、0.135mL、0.270mmol）を更に加え、室温で反応を合計9時間続けた。反応物を0℃に冷却し、塩酸（1M、0.304mL）を加えた。次いで、更に精製することなく、溶液を次の工程で使用した。

【0249】

工程2 工程1の溶液をAcOH水溶液（1M、0.170mL）で処理し、混合物を濃縮した。粗生成物を水（0.4mL）に溶解し、固体のNaHCO₃（16.9mg、0.201mmol）を加え、続いて室温でTHF（0.4mL）中のFmoc-Val-OSu（29.4mg、0.067mmol）を加えた。混合物を室温で24時間攪拌し、次いで濃縮した。

20

【0250】

工程3 工程3で製造した粗生成物をDMF（2.0mL）中に懸濁し、ピペリジン（0.8mL）を室温に加えた。1時間攪拌した後、反応物を濃縮し、再度DMF（2.0mL）に溶解した。Et₃N（0.8mL）を加え、混合物を5分間攪拌し、最終懸濁液を得た。混合物を濃縮し、この工程を再度繰り返して残留するピペリジンを完全に除去した。白色の固体をエーテル（5mL）中に懸濁し、混合物を30分間攪拌した。上清を注意深く除去し、UPLC-MS分析により上清中にFmoc残基が存在しなくなるまで、この工程を繰り返した。固体を真空中で乾燥した。

30

【0251】

工程4 固体を水（0.4mL）に溶解し、固体のNaHCO₃（17.0mg、0.200mmol）を加え、続いて、室温で、THF（0.4mL）中の6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサン酸 2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル（20.8mg、0.068mmol）を加えた。3時間攪拌した後、THFの大半を、室温での短時間のロータリーエバポレーションで除去した。次いで、水溶液をミリQ水中の10% MeCN（8mL）で希釈し、透明な溶液を分取RP-HPLC（水×0.025% NH₄OH / MeCN、10～40% 勾配）で精製した。塩基性溶出液の直接酸性化を確実にするために、生成物はあらかじめAcOH水溶液（1M、0.5mL）を入れた試験管に集めたことに留意されたい。生成物の画分を直ちに凍結し、続いて凍結乾燥して、表題化合物XD24（11.5mg）を白色の固体として得た。¹H NMR（400 MHz, D₂O）ppm = 7.49-7.39 (m, 2H), 7.39-7.30 (m, 2H), 6.73 (s, 2H), 5.53-5.30 (m, 1H), 5.09 (br s, 2H), 4.70 (s, 2H; D₂Oの残留溶媒のピークに隠れる。HSQCで観察された相関関係による), 4.39 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 4.03 (br d, J = 7.4 Hz, 1H), 3.87-3.72 (m, 2H), 3.36 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.34-3.26 (m, 2H), 2.24 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.20-2.08 (m, J = 4.1 Hz, 2H), 2.01 (dq, J = 13.6, 6.8 Hz, 1H), 1.64-1.37 (m, 12H), 1.24-1.11 (m, 2H), 1.06 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.96-0.81 (m, 6H)。MS (ESI⁻) C₃₅H₅₁N₅O₁₁P⁻ [M-H]⁻ 計算値7

40

50

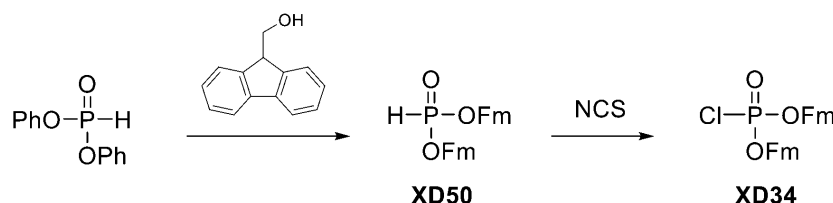
48.3、実測値748.8。

【0252】

実施例17 リンカー薬物化合物XD44、XD45及びXD46の合成

A ホスホクロリド酸ビス((9H-フルオレン-9-イル)メチル)(XD34)の製造

【化31】



10

【0253】

ホスホン酸ビス((9H-フルオレン-9-イル)メチル)(XD50)

(9H-フルオレン-9-イル)メタノール(4.55 g、23.2 mmol)を、窒素雰囲気下、室温で、ホスホン酸ジフェニル(2.13 mL、10.6 mmol)の乾燥ピリジン(20 mL)溶液に加え、混合物を2時間攪拌した。反応物を濃縮し、EtOAc(250 mL)に溶解した。有機相を塩酸(2×、1 M)とブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、ろ過し、シリカゲル上で濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、ヘプタン中の0~85% EtOAc/DCM(1:4))により、ホスホン酸XD50(3.46 g、75%)を無色のワックス状物として得た。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) ppm = 7.76-7.66 (m, 4H), 7.58-7.45 (m, 4H), 7.42-7.31 (m, 4H), 7.31-7.22 (m, 4H), 7.19-7.12 (m, 1H), 6.68 (d, J = 705.8 Hz, 1H), 4.34-4.21 (m, 4H), 4.15-4.08 (m, 2H)。MS (ESI⁺) C₂₈H₂₄O₃P⁺ [M+H]⁺ 計算値439.2、実測値439.3。

20

【0254】

ホスホクロリド酸ビス((9H-フルオレン-9-イル)メチル)(XD34)

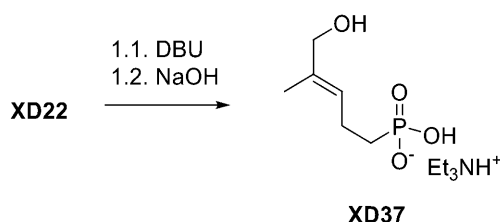
ホスホン酸XD50(8.57 g、19.6 mmol)をトルエン(98 mL)に溶解し、オーバーヘッドスペースを窒素ガスでパージした。室温でNCS(3.13 g、23.5 mmol)を加え、次いで、反応混合物を40℃で2時間攪拌した。室温に冷却後、反応混合物をろ過し、濃縮した。残留物をMeCN(10 mL)と共に蒸発させて白色の固体を得た。ヒートガンで穏やかに加熱して、全ての固体をMeCN(25 mL)に溶解した。溶液を-30℃まで徐々に冷却すると、白色の固体の沈殿が開始した。フラスコを-30℃で一晩保管し、次いで室温に温めた後、ろ過した。氷冷MeCN(10 mL)で固体を洗浄して、塩化物XD34(8.03 g、収率87%)を白色の固体として得た。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) ppm = 7.76-7.71 (m, 4H), 7.56-7.48 (m, 4H), 7.43-7.36 (m, 4H), 7.33-7.25 (m, 4H), 4.46 (dt, J = 9.7, 7.1 Hz, 2H), 4.36-4.28 (m, 2H), 4.25-4.19 (m, 2H)。MS (ESI⁺) C₂₈H₂₄ClO₄P⁺ [M+NH₄]⁺ 計算値490.1、実測値490.3。

30

【0255】

B ホスホン酸エステルXD37の製造

【化32】



40

【0256】

(E)-(5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸水素トリエチルアンモニ

50

ウム (XD37)

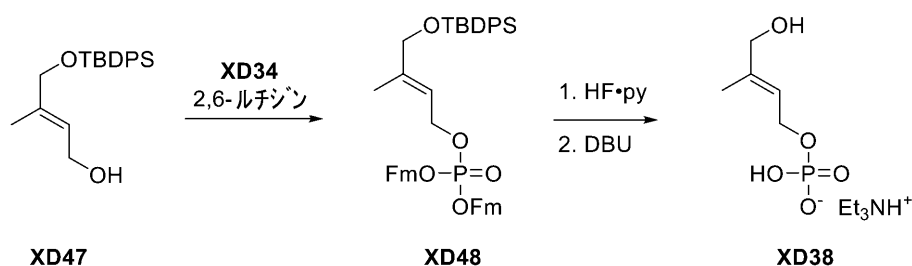
DBU (0.401 mL、2.66 mmol) を、0℃でXD22 (305 mg、1.07 mmol) のTHF (10 mL) 溶液に加えた。冷却浴を2分後に取り除き、反応物を室温で4時間攪拌し、もっぱら、1つの保護基が脱保護された生成物を得た。混合物をエーテル (30 mL) で希釈し、15分間攪拌した後、エマルジョンを沈殿させた (15分間)。上清をデカンテーションし、残留物をMeOH (10 mL) と水 (1.25 mL) に溶解した。NaOH水溶液 (2 M、3.20 mL、6.40 mmol) を0℃で加え、混合物をこの温度で30分間攪拌した。氷浴を取り除き、室温で反応を3.5時間続けた。次いで、反応混合物をDOWEX 50WX8-200水素型カラム (5 g、溶出液が無色で中性になるまで、事前にメタノールで洗浄) にロードした。生成物をメタノールで溶出した。生成物の画分をプールし、Et₃N (0.148 mL、1.07 mmol) を加えた。メタノールをロータリーエバポレーターで除去し、水相をMeCNで希釈し、続いて凍結乾燥してXD37 (259 mg、98%) を無色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) ppm = 5.51-5.42 (m, 1H), 3.91 (s, 2H), 3.19 (q, J = 7.3 Hz, 6H), 2.40-2.27 (m, 2H), 1.67 (s, 3H), 1.69-1.58 (m, 2H), 1.31 (t, J = 7.3 Hz, 9H)。MS (ESI⁻) C₆H₁₂O₄P⁻ [M-H]⁻ 計算値179.1、実測値179.1。

10

【0257】

C リン酸エステルXD38の製造

【化33】



20

【0258】

(E)-ビス((9H-フルオレン-9-イル)メチル) (4-((tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ)-3-メチルブタ-2-エン-1-イル) リン酸エステル (XD48)

30

アルコールXD47 (1.35 g、3.97 mmol、Serra, S. Tetrahedron: Asymmetry, 2014, 25, 1561-1572に記載のとおり合成)、5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール (0.043 g、0.331 mmol) 及び2,6-ルチジン (1.54 mL、13.2 mmol) のMeCN (5 mL) 溶液に、0℃で、MeCN/DCM (1:1、5 mL) 中のXD34 (1.45 g、3.31 mmol) を加えた。冷却浴を取り除き、反応物を室温で75分間攪拌した。混合物を濃縮し、粗生成物をEtOAc (100 mL) に溶解した。懸濁液を塩酸 (1 M、約50 mL) で洗浄し、水相をEtOAc (1×) で逆抽出した。合わせた有機相をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中の0~60% Et₂O/DCM (1:1)) で精製して、XD48 (1.95 g、76%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 7.76-7.69 (m, 4H), 7.67-7.61 (m, 4H), 7.58-7.49 (m, 4H), 7.45-7.31 (m, 10H), 7.30-7.22 (m, 4H), 5.75-5.67 (m, 1H), 4.54 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 4.30-4.23 (m, 4H), 4.20-4.13 (m, 2H), 4.02 (s, 2H), 1.56 (s, 3H), 1.04 (s, 9H)。MS (ESI⁺) C₄₉H₄₉NaO₅PSi⁺ [M+H]⁺ 計算値799.3、実測値799.6。

40

【0259】

(E)-4-ヒドロキシ-3-メチルブタ-2-エン-1-イル リン酸水素トリエチルアンモニウム (XD38)

工程1 TBDPS-エーテルXD48 (911 mg、1.17 mmol) を、窒素雰囲気下で、テフロン (登録商標) 製チューブ中のTHF/ピリジン (1:1、6 mL) に溶

50

解した。混合物を 0℃ に冷却し、HF・py (2 mL、70% HF) を加えた。0℃ で 80 分間攪拌した後、反応混合物を、攪拌しながら、冷却 (0℃) した飽和 NaHCO₃ 水溶液と EtOAc の混合物に注意深く注いだ。発泡の停止後、各相を分離し、水相を EtOAc (3×) で抽出した。合わせた有機相を塩酸 (1 M) とブラインで洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、ろ過し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM 中の 0~55% EtOAc) により、対応するアルコール (418 mg、66%) を得た。

【0260】

工程 2 アルコール (313 mg、0.581 mmol) を THF (13 mL) に溶解した。混合物を -78℃ に冷却し、DBU (0.219 mL、1.45 mmol) を加えた。5 分後に冷却浴を取り除き、混合物を室温で 45 分間攪拌した。この間に粘着性の沈殿物が形成された。反応物をエーテル (約 10 mL) で希釈し、2 分間攪拌した後、反応物をデカンテーションした。残留物を少量の MeCN (約 2 mL) に溶解し、少量の MeOH を加えて透明な溶液を得た。次いで反応物をエーテル (約 70 mL) で希釈した。濁った混合物を 5 分間攪拌し、次いで、一晚静置した。上清をデカンテーションによって除去した後、MeCN/MeOH に溶解し、エーテルで沈殿させる工程を 3 回繰り返した。残留物を真空中で乾燥させて、209 mg のオイル状物を得た。この物質をエタノール (2 mL) に溶解し、DOWEX 50WX8-200 水素型カラム (5 g、溶出液が無色で中性になるまで、事前にエタノールで洗浄) にロードした。生成物をエタノールで溶出した。生成物の画分を合わせ、Et₃N (0.083 mL) を加え、無色透明な溶液を濃縮して XD38 (125 mg、76%) を無色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) ppm = 5.71-5.59 (m, 1H), 4.47 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.25-3.11 (m, 6H), 1.70 (s, 3H), 1.31 (t, J = 7.3 Hz, 9H)。MS (ESI⁻) C₅H₁₀O₅P⁻ [M-H]⁻ 計算値 181.0、実測値 181.1。

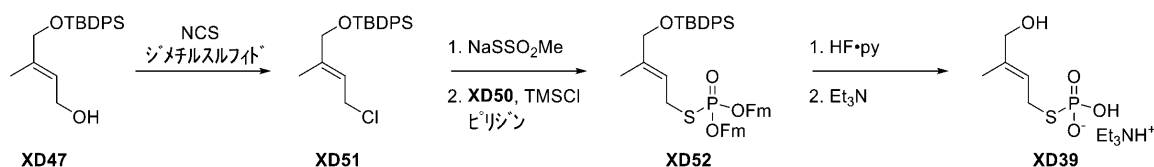
10

20

【0261】

D チオリン酸エステル XD39 の製造

【化34】



30

【0262】

(E)-tert-ブチル((4-クロロ-2-メチルブタ-2-エン-1-イル)オキシ)ジフェニルシラン (XD51)

NCS (1.02 g、7.63 mmol) を乾燥 DCM (25 mL) に溶解し、混合物を -40℃ に冷却した。DMS (0.695 mL、9.40 mmol) を攪拌しながら滴下し、次いで反応物を 0℃ に温め、10 分間攪拌した。反応物を -40℃ に冷却し、乾燥 DCM (5 mL) に溶解させたアルコール XD47 (2.00 g、5.87 mmol、Serra, S. Tetrahedron: Asymmetry, 2014, 25, 1561-1572 に記載のとおり合成) を加えた。反応物を 2.5 時間かけて 0℃ に温め、次いで、0℃ で更に 90 分間攪拌した。ブライン (30 mL) を 0℃ で加え、各相を分離した。水相を DCM (40 mL) で抽出し、合わせた有機相を Na₂SO₄ で乾燥し、ろ過し、真空中で濃縮した。ほぼ無色の粗製のオイル状物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中の 0~20% DCM) で精製して、塩化物 XD51 (1.93 g、92%) を無色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 7.72-7.64 (m, 4H), 7.47-7.36 (m, 6H), 5.85 (tq, J = 8.1, 1.5 Hz, 1H), 4.16 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.09 (s, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.08 (s, 9H)。

40

【0263】

チオリン酸 (E)-O,O-ビス((9H-フルオレン-9-イル)メチル) S-(4-((tert-ブチルジフェ

50

ニルシリル)オキシ)-3-メチルブタ-2-エン-1-イル)エステル (XD52)

工程1 メタンチオスルホン酸ナトリウム (262 mg、1.95 mmol) を、塩化物 XD51 (700 mg、1.95 mmol) の DMF (4 mL) 溶液 (室温) に加えた。5 時間攪拌した後、混合物を水 (50 mL) に注ぎ、混合物を EtOAc / ヘプタン (1 : 1、2 × 30 mL) で抽出し、合わせた有機相を水 (2 × 30 mL) とブライン (30 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、ろ過し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中の 0 ~ 15 % EtOAc) により、メタンチオスルホン酸(E)-S-(4-((tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ)-3-メチルブタ-2-エン-1-イル)エステル (725 mg、86 %) を、無色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 7.71-7.61 (m, 4H), 7.51-7.34 (m, 6H), 5.75 (tq, J = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 4.10 (s, 2H), 3.91 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 3.27 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 1.08 (s, 9H)。

10

【0264】

工程2 XD50 (570 mg、1.30 mmol) を、窒素雰囲気下で MeCN (2.75 mL) とピリジン (5.6 mL) に溶解した。溶液を氷浴上で冷却し、TMSCl (0.825 mL、6.51 mmol) を滴下した。5 分後に冷却浴を取り除き、反応物を室温で 45 分間攪拌した。続いてメタンチオスルホン酸(E)-S-(4-((tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ)-3-メチルブタ-2-エン-1-イル)エステル (706 mg、1.62 mmol) を加え、混合物を室温で 15 分間攪拌した。トルエン (10 mL) を加え、混合物を濃縮した。再度、残留物をトルエン (10 mL) と共に蒸発させて、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中の 0 ~ 50 % の「1 : 1 エーテル / DCM」) で精製して、XD52 (818 mg、79 %) を無色のワックス状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 7.73 (t, J = 6.9 Hz, 4H), 7.65-7.59 (m, 4H), 7.59-7.52 (m, 4H), 7.44-7.32 (m, 10H), 7.32-7.24 (m, 4H), 5.63-5.50 (m, 1H), 4.51-4.36 (m, 2H), 4.33-4.15 (m, 4H), 3.96 (s, 2H), 3.40 (dd, J = 12.0, 8.0 Hz, 2H), 1.53 (s, 3H), 1.02 (s, 9H)。

20

【0265】

チオリン酸O-水素 (E)-S-(4-ヒドロキシ-3-メチルブタ-2-エン-1-イル)エステル トリエチルアンモニウム (XD39)

工程1 TBDPS-エーテル XD52 (800 mg、1.01 mmol) を、XD38 の手順と同様に、1 時間 45 分間、HF・py と反応させた。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM 中の 0 ~ 40 % EtOAc) で精製して、対応するアルコール (452 mg、81 %) を無色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 7.75 (t, J = 6.8 Hz, 4H), 7.61-7.53 (m, 4H), 7.45-7.36 (m, 4H), 7.36-7.27 (m, 4H), 5.45 (tq, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 4.48-4.39 (m, 2H), 4.31-4.19 (m, 4H), 3.89 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 3.36 (dd, J = 13.6, 7.9 Hz, 2H), 1.59 (s, 3H)。MS (ESI⁺) C₃₃H₃₂O₄PS⁺ [M+H]⁺ 計算値 555.2、実測値 555.5。

30

【0266】

工程2 アルコール (272 mg、0.490 mmol) を THF (3 mL) に溶解し、Et₃N (0.75 mL、5.38 mmol) を室温で加えた。7 時間後にオイル状の沈殿が形成され、MeCN (2 mL) を加え、続いてトリエチルアミン (0.5 mL、3.59 mmol) を加えて透明な溶液を得た。一晩攪拌を続け、続いて透明な溶液を約 1 mL に濃縮し、トルエン (6 mL) と共に蒸発させた。オイル状の残留物を MeCN (約 0.7 mL) に溶解し、次いで、攪拌しながらエーテル (7 mL) をゆっくりと加えることで、沈殿させた。5 分間攪拌した後、エマルジョンを沈殿させ、次いで溶液をデカンテーションにより除去すると、オイル状の物質が残留した。MeCN / エーテル処理を 4 回繰り返し、次いで、残留物を真空中で乾燥して、トリエチルアミン塩 XD39 (123 mg、83 %) を無色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) ppm = 5.63 (tq, J = 7.9, 1.3 Hz, 1H), 3.93 (s, 2H), 3.48 (dd, J = 9.4, 8.4 Hz, 2H),

40

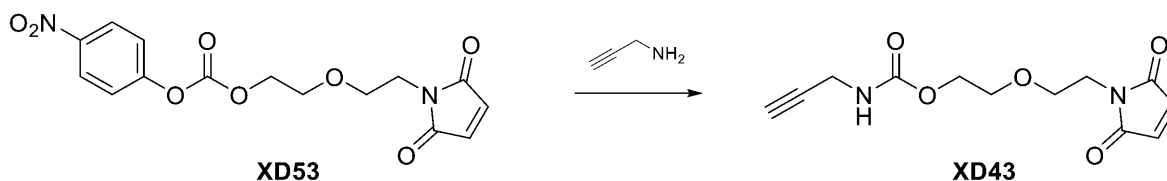
50

3.19 (q, $J = 7.4$ Hz, 6H), 1.71 (d, $J = 0.8$ Hz, 3H), 1.32 (t, $J = 7.3$ Hz, 9H)。MS (ESI⁻) $C_5H_{10}O_4PS^-$ [M-H]⁻ 計算値197.0、実測値197.0。

【0267】

E アルキンリンカーXD43の製造

【化35】



10

【0268】

プロパ-2-イン-1-イルカルバミン酸2-(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)エチルエステル(XD43)

THF (10 mL) 中のPNP炭酸エステルXD53 (511 mg、1.46 mmol、Elgersma, R. C. et al. Mol. Pharm. 2015, 12, 1813-1835に従い合成)に、0℃でプロパルギルアミン(0.093 mL、1.46 mmol)を加えた。冷却浴を取り除き、混合物を室温で2時間攪拌した。混合物を濃縮し、粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、ヘプタン中の0~70% EtOAc)で精製して、XD43 (265 mg、68%)を白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 7.60 (br t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.02 (s, 2H), 4.07-3.96 (m, 2H), 3.74 (dd, $J = 5.8, 2.4$ Hz, 2H), 3.61-3.48 (m, 7H), 3.07 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H)。

20

【0269】

F 一般手順XXD：リン酸エステルのCDI活性化と、ホスホン酸エステル、リン酸エステル又はチオリン酸エステルとのカップリング

リン酸のモノトリエチルアミン塩(1.0当量)を、窒素雰囲気下でDMF (0.15 M)に溶解し、CDI (2.1当量)を室温に加えた。30分間攪拌した後、乾燥MeOH (1.0当量)を加え、混合物を室温で15分間攪拌し、濃縮した。残留物をDMFと共に蒸発させて粗生成物Aを得た。

【0270】

別のフラスコで、ホスホン酸、リン酸又はチオリン酸反応物のモノトリエチルアミン塩(1.2当量)をDMFと共に蒸発させ、次いで、窒素雰囲気下でDMF (0.36 M)に再度溶解した。次いで、粗生成物Aが入ったフラスコ(室温)に、混合物をカニュレを使用して入れた。同量のDMFを使用してフラスコをすすぎ、移し替えを完了した。混合物を、窒素雰囲気下、室温で攪拌し、UPLC-MSによる分析が本質的に完全な変換を示したら(通常、20~24時間)、反応物を濃縮し、分取HPLCで精製した。生成物画分の凍結乾燥により生成物を得た。

30

【0271】

G 一般手順XXE：クリック反応

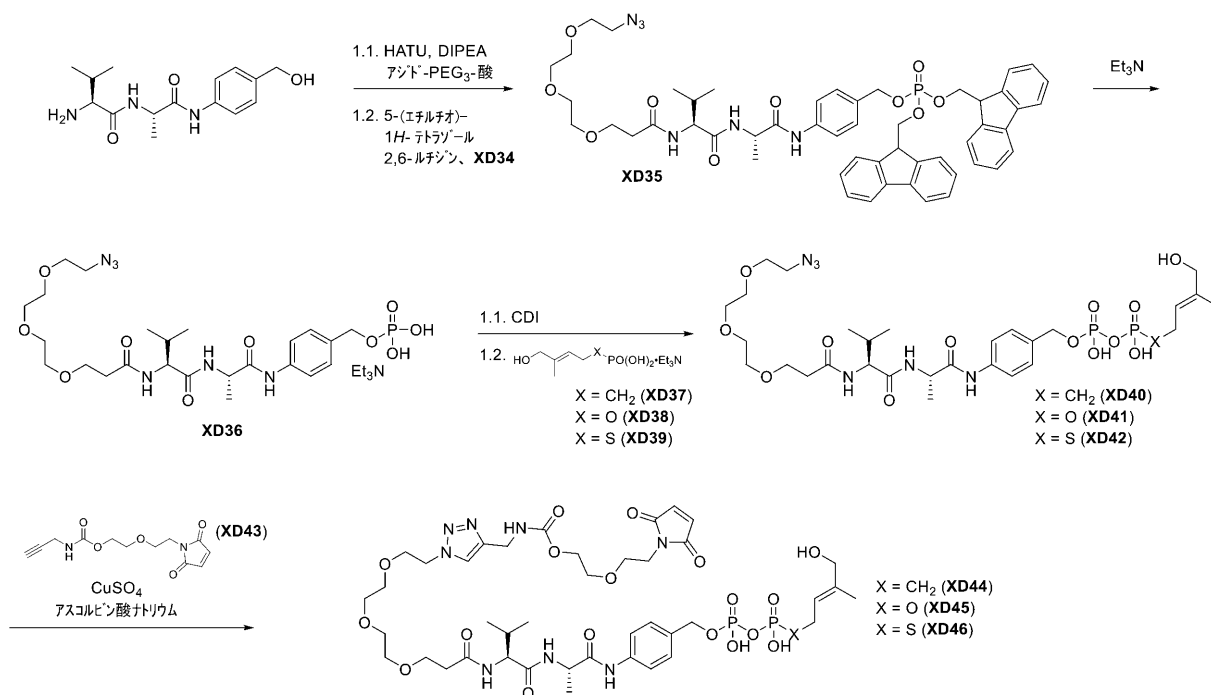
窒素ガスでパージした水(0.034 M)中の硫酸銅(II)五水和物(0.77当量)を、室温で、固体のアジ化物(1.0当量)とアルキン(1.4当量)が入ったフラスコに加えた。同量のTHFを加えて均一な水/THF (1:1)溶液を得た。フラスコのヘッドスペースを、短時間、窒素ガスでパージし、窒素ガスでパージした水(0.13 M)中のアスコルビン酸ナトリウム(1.5当量)を加えた。UPLC-MS分析により完全な変換が示されるまで(通常、1~2時間)、反応物を室温で攪拌した。THFの大半を、室温での短時間のロータリーエバポレーションで除去し、水相をミリQ水中のMeCN/25 mM NH₄HCO₃ (1:9)に溶解した。不溶性の物質を、シリンジフィルターを使用して除去し、ろ液を分取HPLCで精製した。生成物画分の凍結乾燥により生成物を得た。

40

【0272】

50

H リンカー 薬物化合物 XD 4 4、XD 4 5 及び XD 4 6 の製造 【化 3 6】



10

20

【0273】

(4-((14S,17S)-1-アジド-14-イソプロピル-17-メチル-12,15-ジオキソ-3,6,9-トリ
オキサ-13,16-ジアザオクタデカン-18-アミド)ベンジル)リン酸ビス((9H-フルオレン-
9-イル)メチル)エステル (XD35)

工程1 3-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)プロピオン酸 (142 mg、
0.574 mmol) を DMF (1 mL) に溶解した。DMF (3.0 mL) 中の Val-
Ala-PAB (160 mg、0.545 mmol) を加え、続いて、室温で HATU
(228 mg、0.600 mmol) と DIPEA (0.143 mL、0.818 mmol)
を加えた。反応物を 30 分間攪拌し、濃縮した。粗生成物を MeOH (1 mL) に溶
解し、溶液をメタノールで予め洗浄した短い DOWEX 50WX8 プラグに通過させること
で、塩基性不純物を除去した。生成物をメタノールで溶出し、粗生成物をシリカゲル上で
濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM 中の 0~8% MeOH)
により、アミド (262 mg、92%) をクリーム状の固体として得た。MS (ESI⁺) C₂
4H₃₉N₆O₇⁺ [M+H]⁺ 計算値 523.3、実測値 523.6。

30

【0274】

工程2 MeCN (3.7 mL) 中の、生成したアミド (977 mg、1.87 mmol)
) と 5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール (19 mg、0.15 mmol) に、窒素雰囲気
下、室温で 2,6-ルチジン (719 μL、6.17 mmol) を加え、続いて塩化物 XD
34 (884 mg、1.87 mmol) の DCM (3.7 mL) 溶液を加え、混合物を室
温で攪拌した。塩化物 XD 34 を、80 分後 (88 mg、0.187 mmol) と 140
分後 (177 mg、0.374 mmol) に、更に加えた。反応時間が 185 分となっ
た後に、2,6-ルチジン (218 μL、1.87 mmol) を更に加え、反応を 2 時間続
けた後に、メタノール (1 mL) でクエンチした。混合物を濃縮し、粗生成物を EtOAc
(80 mL) と塩酸 (40 mL、1 M) に溶解した。少量の MeCN (4 mL) を加えて
残留する固体を溶かし、各相を分離した。水相を EtOAc (80 mL) で抽出し、合
わせた有機相をブラインで洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。粗生成物をフラッシュクロ
マトグラフィー (シリカゲル、DCM 中の 0~5% MeOH) で精製して、リン酸エステル
XD 35 (1.40 g、収率 66%) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm
= 9.94 (s, 1H), 8.18 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.89-7.82 (m, 5H), 7.55 (d, J =

40

50

8.6 Hz, 2H), 7.52-7.44 (m, 4H), 7.42-7.34 (m, 4H), 7.30-7.24 (m, 4H), 7.09 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 4.60 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.40 (quint, J = 7.0 Hz, 1H), 4.25-4.17 (m, 5H), 4.15-4.11 (m, 2H), 3.62-3.56 (m, 4H), 3.55-3.46 (m, 8H), 3.39-3.36 (m, 2H), 2.50-2.36 (m, 2H), 2.02-1.93 (m, 1H), 1.31 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 0.88 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.84 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₅₂H₅₉N₆O₁₀PNa⁺ [M+H]⁺ 計算値981.4、実測値981.8。

【0275】

4-((14S,17S)-1-アジド-14-イソプロピル-17-メチル-12,15-ジオキソ-3,6,9-トリオキサ-13,16-ジアザオクタデカン-18-アミド)ベンジルリン酸 (XD36)

トリエチルアミン (0.25 mL) を、リン酸エステル XD35 (160 mg、0.167 mmol) の MeCN (1 mL) 溶液 (室温) に加え、反応物を 24 時間攪拌した。反応物をトルエン (8 mL) で希釈し、次いで濃縮した。粗生成物をエーテル (10 mL) 中に懸濁し、ろ過し、固体をエーテルで繰り返し洗浄して、リン酸アルキルエステル XD36 (108 mg、92%) をモノトリエチルアンモニウム塩として得た。(注：この生成物は不純物 (m/z 606) を含み、これはリン酸エステルからのアルコールの脱離と、トリエチルアミンによる中間体アザキノンメチドの捕捉で形成された可能性がある。この不純物は次の工程では反応しないので、更に精製する必要はない。) MS (ESI⁻) C₂₄H₃₈N₆O₁₀P⁻ [M-H]⁻ 計算値601.2、実測値601.7。

【0276】

アジ化物 XD40

リン酸アルキルエステル XD36 (107 mg、0.152 mmol) を、一般手順 XXD に従いホスホン酸エステル XD37 と反応させた。粗生成物を分取 RP-HPLC (ミリQ 水中の 25 mM NH₄HCO₃ / MeCN、90 : 10 から 50 : 50 勾配) で精製し、凍結乾燥後にホスホノホスフェート XD40 (60.5 mg、50%) をふわふわした白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O) ppm = 7.44-7.39 (m, 4H), 5.38 (br t, J = 7.1 Hz, 1H), 4.91 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 4.40 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 4.12 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 3.88 (s, 2H), 3.73 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.66-3.55 (m, 10H), 3.42 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 2.63-2.48 (m, 2H), 2.26-2.14 (m, 2H), 2.11-1.99 (m, 1H), 1.74-1.61 (m, 2H), 1.56 (s, 3H), 1.43 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 0.92 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.6 Hz, 3H)。MS (ESI⁻) C₃₀H₄₉N₆O₁₃P₂⁻ [M-H]⁻ 計算値763.3、実測値763.7。

【0277】

アジ化物 XD41

リン酸アルキルエステル XD36 (142 mg、0.202 mmol) を、一般手順 XXD に従いリン酸アルキルエステル XD38 と反応させた。粗生成物を分取 RP-HPLC (ミリQ 水中の 25 mM NH₄HCO₃ / MeCN、90 : 10 から 50 : 50 勾配) で精製し、凍結乾燥後にピロリン酸エステル XD41 (65.9 mg、41%) をふわふわした白色の固体として得た。MS (ESI⁻) C₂₉H₄₇N₆O₁₄P₂⁻ [M-H]⁻ 計算値765.3、実測値765.6。

【0278】

アジ化物 XD42

リン酸アルキルエステル XD36 (142 mg、0.202 mmol) を、一般手順 XXD に従いリン酸アルキルエステル XD39 と反応させた。粗生成物を分取 RP-HPLC (ミリQ 水中の 25 mM NH₄HCO₃ / MeCN、90 : 10 から 50 : 50 勾配) で精製し、凍結乾燥後にアジ化物 XD42 (88.6 mg、54%) をふわふわした白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O) ppm = 7.48-7.39 (m, 4H), 5.51 (td, J = 7.9, 1.1 Hz, 1H), 4.96 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 4.40 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 4.12 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 3.88 (s, 2H), 3.73 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.67-3.54 (m, 10H), 3.47-3.36 (m, 4H), 2.63-2.48 (m, 2H), 2.13-1.98 (m, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.43 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 0.92 (br d, J = 6.8 Hz, 3H), 0

.91 (br d, $J = 6.6$ Hz, 3H)。MS (ESI⁻) $C_{29}H_{47}N_6O_{13}P_2S^-$ [M-H]⁻ 計算値781.3、実測値781.5。

【0279】

リンカー-薬物XD44

アジ化物XD40 (18.5 mg、0.023 mmol) を、一般手順X X E に従いアルキンXD43 と反応させた。分取RP-HPLC (ミリQ 水中の25 mM NH₄ HCO₃ / MeCN、90:10 から50:50 勾配) による精製で、凍結乾燥後にホスホホスフェートXD44 (11.6 mg、47%) をふわふわした白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O) ppm = 7.88 (s, 1H), 7.41 (s, 4H), 6.74 (s, 2H), 5.38 (br t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.91 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.53 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 4.38 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.31 (s, 2H), 4.17-4.04 (m, 3H), 3.92-3.83 (m, 4H), 3.70 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.66-3.57 (m, 6H), 3.57-3.43 (m, 8H), 2.62-2.47 (m, 2H), 2.27-2.14 (m, 2H), 2.10-1.97 (m, 1H), 1.74-1.61 (m, 2H), 1.55 (s, 3H), 1.41 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H)。MS (ESI⁻) $C_{42}H_{63}N_8O_{18}P_2^-$ [M-H]⁻ 計算値1029.4、実測値1029.8。

10

【0280】

リンカー-薬物XD45

アジ化物XD41 (30.2 mg、0.038 mmol) を、一般手順X X E に従いアルキンXD43 と反応させた。分取RP-HPLC (ミリQ 水中の25 mM NH₄ HCO₃ / MeCN、90:10 から50:50 勾配) による精製で、凍結乾燥後にピロリン酸エステルXD45 (36.2 mg、90%) をふわふわした白色の固体として得た。MS (ESI⁻) $C_{41}H_{61}N_8O_{19}P_2^-$ [M-H]⁻ 計算値1031.4、実測値1031.7。

20

【0281】

リンカー-薬物XD46

アジ化物XD42 (27.1 mg、0.033 mmol) を、一般手順X X E に従いアルキンXD43 と反応させた。分取RP-HPLC (ミリQ 水中の25 mM NH₄ HCO₃ / MeCN、90:10 から50:50 勾配) による精製で、凍結乾燥後にリンカー-薬物化合物XD46 (22.6 mg、63%) をふわふわした白色の固体として得た。MS (ESI⁻) $C_{41}H_{61}N_8O_{18}P_2S^-$ [M-H]⁻ 計算値1047.3、実測値1047.7。

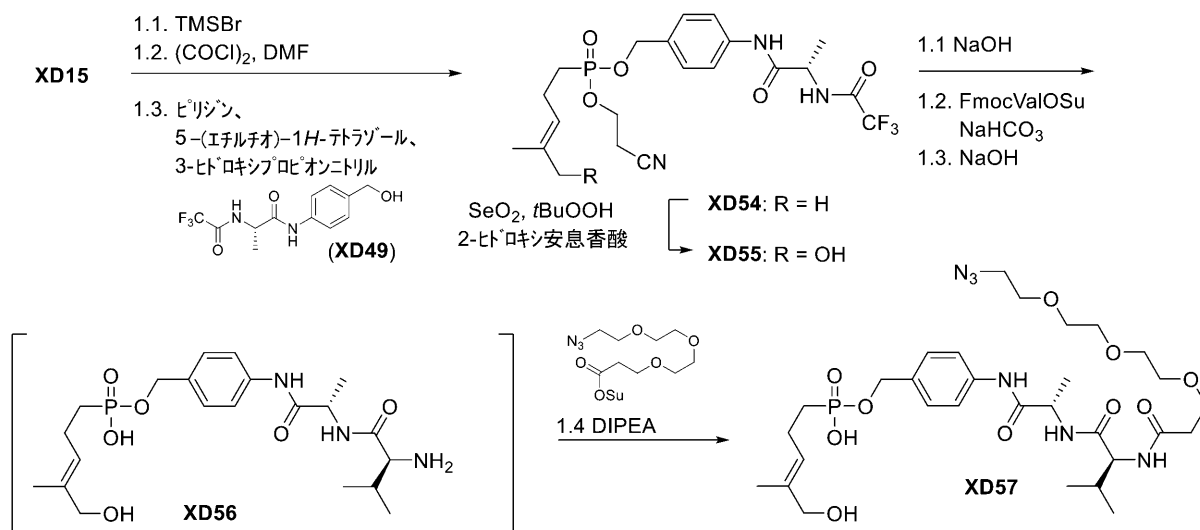
30

【0282】

実施例18 リンカー-薬物化合物XD58の合成

A アジ化物XD57の製造

【化37】



40

【0283】

50

(4-((S)-2-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)プロパンアミド)ベンジル) (4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸2-シアノエチル (XD54)

(4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸ジクロリド (540 mg、2.69 mmol、一般手順XXBに従いホスホン酸ジエステルXD15から製造)のDCM (4.3 mL)溶液を、5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール (35.0 mg、0.269 mmol)が入った、窒素ガスでパージしたバイアルに加えた。溶液を-78℃に冷却し、3-ヒドロキシプロパンニトリル (0.184 mL、2.69 mmol)と2,6-ルチジン (0.313 mL、2.69 mmol)を順次加えた。-78℃で30分間攪拌した後、反応物を室温に温め、2.5時間攪拌した。次いで、XD49 (780 mg、2.69 mmol、XD26の合成で記載のとおり製造)のTHF/DCM (11 mL、3:1、透明な溶液を得るにはヒートガンによる穏やかな加熱が必要で、その後室温に冷却する)溶液を、室温で急速に反応混合物に加えた。3時間後、2,6-ルチジン (0.313 mL、2.69 mmol)を更に加え、反応を90分間続けた。混合物をEtOAc (50 mL)で希釈し、塩酸 (50 mL、1 M)で洗浄した。水相をEtOAc (2×25 mL)で逆抽出し、合わせた有機相をブライン (25 mL)で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、ろ過し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~40%アセトン)で不完全に分離し、純粋ではない生成物を、再度、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~4% MeOH)で精製して、純粋なXD54 (630 mg、48%)を得た。MS (ESI⁺) C₂₁H₂₇F₃N₃NaO₅P⁺ [M+Na]⁺ 計算値512.2、実測値512.5。

10

20

【0284】

(4-((S)-2-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)プロパンアミド)ベンジル) ((E)-5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸2-シアノエチル (XD55)

アルケンXD54 (0.625 g、1.28 mmol)のアリル酸化を、一般手順XXCに従って行った。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM中の0~8% MeOH)で精製して、アルコールXD55 (0.411 g、64%)を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 10.22 (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 7.61 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.39-5.29 (m, 1H), 5.05-4.91 (m, 2H), 4.66 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.48 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 4.18-4.02 (m, 2H), 3.76 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 2.88 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.26-2.13 (m, 2H), 1.90-1.76 (m, 2H), 1.52 (s, 3H), 1.41 (d, J = 7.3 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₂₁H₂₇F₃N₃NaO₆P⁺ [M+Na]⁺ 計算値528.2、実測値528.4。

30

【0285】

アジ化物XD57

工程1 NaOH水溶液 (2 M、1.31 mL、2.62 mmol)を、XD55 (396 mg、0.655 mmol)のMeOH (4.6 mL)/水 (0.6 mL)溶液 (0℃)に加えた。10分後、NaOH水溶液 (2 M、1.31 mL、2.62 mmol)を更に加え、次いで、冷却浴を取り除いた。2時間後、反応物を0℃に冷却し、塩酸 (1 M、2.95 mL、4.5当量)を加え、続いてAcOH水溶液 (1 M、1.97 mL、3.0当量)を加えた。次いで混合物を濃縮した。MS (ESI⁺) C₁₆H₂₆N₂O₅P⁺ [M+H]⁺ 計算値357.2、実測値357.4。

40

【0286】

工程2 粗生成物を水 (5 mL)に溶解し、NaHCO₃ (165 mg、1.97 mmol)とiPrOH (5 mL)を加えた。Fmoc-Val-OSu (286 mg、0.655 mmol)を、室温で攪拌しながら加え、続いてTHF (2.5 mL)を加えた。2.5時間後、反応をAcOH水溶液 (1 M、2 mL)でクエンチし、濃縮した。粗生成物をMeCN (3×)と共に蒸発させてわずかな水を除去了。得られた固体を、上清中にOSuエステルが検出されなくなるまで、EtOAc (20 mL)により、40℃で攪拌しながら、繰り返し洗浄し、白色の固体を得た。

【0287】

50

工程 3 精製していない固体の MeOH / 水 (10 mL、9 : 1) 溶液 (0 °C) に NaOH 水溶液 (2 M、1.31 mL、2.62 mmol) を加え、次いで、混合物を室温で 45 分間攪拌した。反応を 0 °C で AcOH 水溶液 (1 M、3.9 mL) によりクエンチした。次いで、メタノールをロータリーエバポレーターで除去し水性懸濁液を水で希釈し、ろ過した。固体を水で洗浄し、水相を凍結乾燥して中間体 XD56 (840 mg) を白色の固体として得た。今後の反応では、精製していない XD56 の純度 35 wt% に相当する定量的変換を工程 1 ~ 3 で想定した。MS (ESI⁺) C₂₁H₃₅N₃O₆P⁺ [M+H]⁺ 計算値 456.2、実測値 456.5。

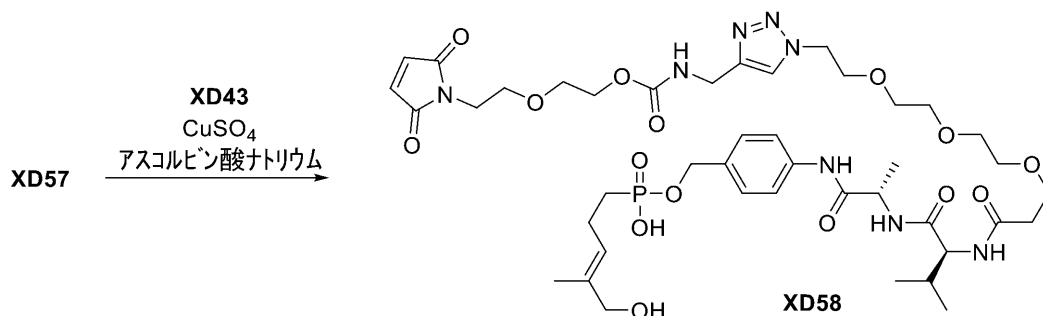
【0288】

工程 4 中間体 XD56 の一部 (490 mg 粗製、理論上の最大値 0.365 mmol) を室温で DMF (4 mL) 中に懸濁した。DMF (1 mL) 中の DIPEA (0.254 mL、1.46 mmol) 及び 3-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)プロパン酸 2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル (146 mg、0.424 mmol) を加え、混合物を 70 分間攪拌した。混合物を濃縮し、粗生成物を分取 RP-HPLC (ミリQ 水中の 25 mM NH₄HCO₃ / MeCN、90 : 10 から 50 : 50 勾配) で直ちに精製し、凍結乾燥後にアジ化物 XD57 (163.6 mg、64%) を白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O) ppm = 7.52-7.41 (m, 4H), 5.40 (br t, J = 7.4 Hz, 1H), 4.94 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 4.45 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 4.17 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 3.91 (s, 2H), 3.78 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.71-3.61 (m, 10H), 3.51-3.44 (m, 2H), 2.69-2.55 (m, 2H), 2.28-2.16 (m, 2H), 2.16-2.04 (m, 1H), 1.77-1.65 (m, 2H), 1.58 (s, 3H), 1.49 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 0.98 (br d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.96 (br d, J = 6.4 Hz, 3H)。MS (ESI⁻) C₃₀H₄₈N₆O₁₀P⁻ [M-H]⁻ 計算値 683.3、実測値 683.6。

【0289】

B リンカー-薬物化合物 XD58 の製造

【化38】



【0290】

リンカー-薬物 XD58

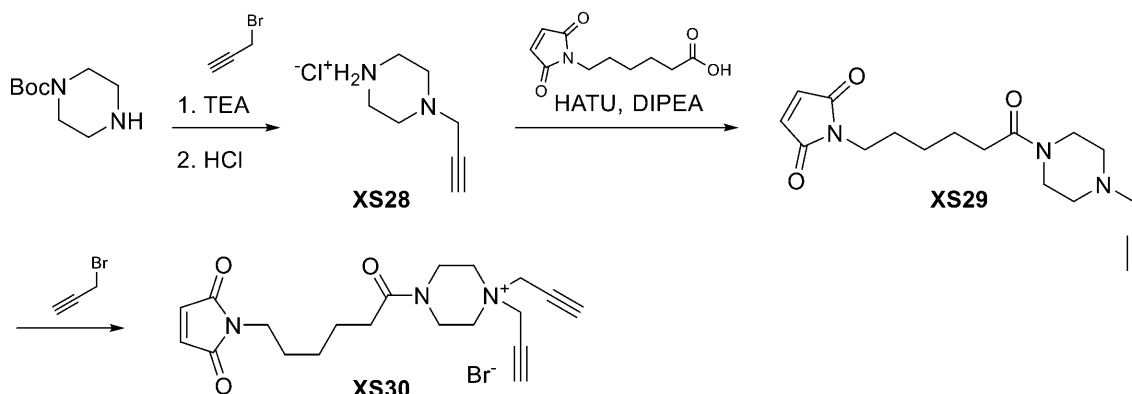
アジ化物 XD57 (21.4 mg、0.030 mmol) を、一般手順 X X E に従いアルキン XD43 と反応させた。分取 RP-HPLC (ミリQ 水中の 25 mM NH₄HCO₃ / MeCN、90 : 10 から 50 : 50 勾配) による精製で、凍結乾燥後にリンカー-薬物化合物 XD58 (19.7 mg、67%) をふわふわした白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O) ppm = 7.92 (br s, 1H), 7.39 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.70 (s, 2H), 5.30 (br t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.83 (br d, J = 4.6 Hz, 2H), 4.49 (br t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.35 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 4.27 (br s, 2H), 4.08 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 4.05 (br s, 2H), 3.87-3.82 (m, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.67 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.63-3.53 (m, 6H), 3.53-3.40 (m, 8H), 2.61-2.42 (m, 2H), 2.11 (br s, 2H), 2.06-1.92 (m, 1H), 1.69-1.54 (m, 2H), 1.49 (s, 3H), 1.38 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 0.87 (d, J = 7.6 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 7.4 Hz, 3H)。MS (ESI⁻) C₄₂H₆₂N₈O₁₅P⁻ [M-H]⁻ 計算値 949.4、実測値 949.8。

【0291】

実施例19 リンカー-薬物化合物XD59の合成

A ジアルキンリンカーXS30の製造

【化39】



10

【0292】

1-(プロパ-2-イン-1-イル)ピペラジン (XS28)

工程1 ピペラジン-1-カルボン酸tert-ブチルエステル (3.44 g、18.5 mmol) の MeCN (17 mL) 溶液 (0℃) に、DIPEA (5.87 mL、33.6 mmol) を加え、続いて臭化プロパルギル (トルエン中に80%、1.80 mL、16.8 mmol) を加えた。反応混合物を室温にして、2時間攪拌した。次いで、EtOAc (25 mL) 及び水 (25 mL) 間で分配した。水相を EtOAc (12 mL) で抽出し、合わせた有機相をブライン (30 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中の0~50% EtOAc) により、4-(プロパ-2-イン-1-イル)ピペラジン-1-カルボン酸tert-ブチルエステル (3.56 g、15.9 mmol、94%) を淡黄色のオイル状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm = 3.47 (t, J = 5.1 Hz, 4H), 3.32 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 2.51 (t, J = 5.1 Hz, 4H), 2.26 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 1.46 (s, 9H)。MS (ESI⁺) C₁₂H₂₁N₂O₂⁺ [M+H]⁺ 計算値225.2、実測値225.2。

20

【0293】

工程2 生成物の一部 (2.82 g、12.6 mmol) を DCM (6.3 mL) に溶解し、4 M HCl のジオキサン (28.3 mL、113 mmol) 溶液を、攪拌しながら滴下した。反応混合物を室温で4時間攪拌した。得られた懸濁液をろ過し、残留物を DCM (2×5 mL) で洗浄した。白色の固体を真空中で乾燥させて、アミンXS28 (2.48 g、定量) を塩酸塩として得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O) ppm = 3.98 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 3.52 (br s, 8H), 3.06 (t, J = 2.5 Hz, 1H)。MS (ESI⁺) C₇H₁₃N₂⁺ [M+H]⁺ 計算値125.1、実測値125.1。

30

【0294】

((S)-1-(((S)-1-((4-(ヒドロキシメチル)フェニル)アミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)アミノ)-3-メチル-1-オキソブタン-2-イル)カルバミン酸アリルエステル (XS29)

40

6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサン酸 (1.90 g、9.00 mmol) の DCM (45 mL) 溶液に、DIPEA (6.28 mL、36.0 mmol) を加え、続いて HATU (3.59 g、9.45 mmol) を加えた。反応混合物を1時間攪拌し、次いでアミンXS28 (1.87 g、9.45 mmol) を加えた。反応混合物を30分間攪拌し、その後、EtOAc (50 mL) と飽和 NaHCO₃ 水溶液 (50 mL) の間で分配した。水相を EtOAc (2×50 mL) で抽出し、合わせた有機相を水 (50 mL) とブライン (50 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、EtOAc 中の0~0.1% Et₃N) で精製して、アミドXS29 (2.20 g、77%) を淡黄色

50

のオイル状物として得た。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) ppm = 7.00 (s, 2H), 3.43 (d, 4H), 3.38 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.29 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 3.16 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.45-2.33 (m, 4H), 2.26 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.54-1.42 (m, 4H), 1.29-1.25 (m, 2H)。MS (ESI^+) $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 計算値318.2、実測値318.3。

【0295】

臭化4-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)-1,1-ジ(プロパ-2-イン-1-イル)ピペラジン-1-イウム (XS30)

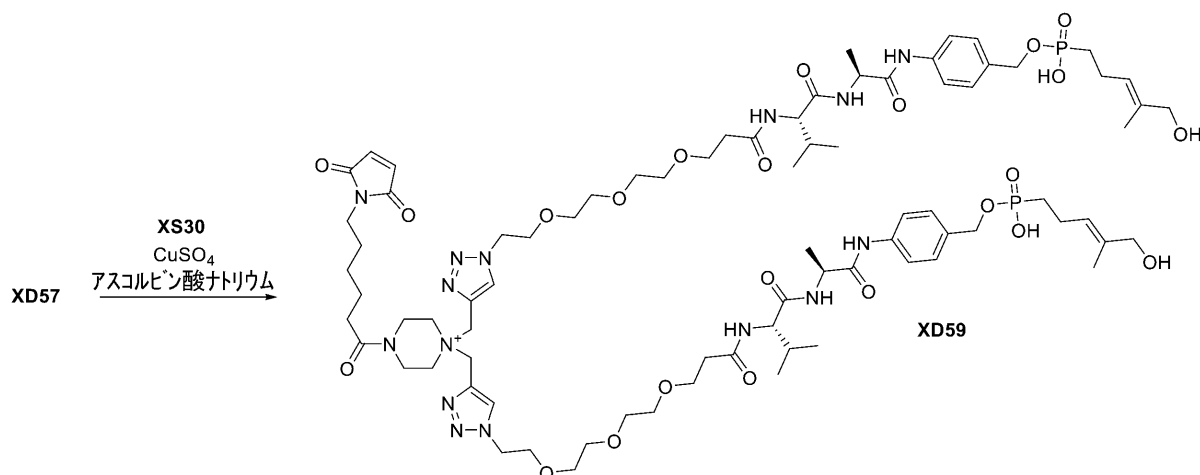
0℃のアミンXS29 (0.528 g、1.66 mmol) のMeCN (3.3 mL) 溶液に、臭化プロパルギル (トルエン0.926 mL中に80%、8.32 mmol) を加えた。反応混合物を室温にし、終夜攪拌し、その後、エーテル (45 mL) に攪拌しながら滴下した。オイル状の沈殿が形成され、上清をデカンテーションにより除去した。残留物をエーテル (5 mL) で洗浄し、続いてMeCN/トルエン (4:1) 混合物に溶解し、濃縮して、四級アミンXS30 (0.710 g、79%) を淡黄色のオイル状物として得た。

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) ppm = 7.01 (s, 2H), 4.59 (d, $J = 2.1$ Hz, 4H), 4.15 (t, $J = 2.2$ Hz, 2H), 3.90-3.79 (m, 4H), 3.60-3.48 (m, 4H), 3.39 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.34 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.55-1.44 (m, 4H), 1.30-1.25 (m, 2H)。MS (ESI^+) $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_3^+$ $[\text{M}]^+$ 計算値356.2、実測値356.4。

【0296】

B リンカー-薬物化合物XD59の製造

【化40】



【0297】

リンカー-薬物XD59

水を、攪拌しながら20分間窒素ガスでパージした後で、使用した。THF/水 (1:10、0.55 mL) 中のアルキンXS30 (9.2 mg、0.017 mmol) を、窒素雰囲気下、室温で固体のXD57 (30.1 mg、0.043 mmol) に加えた。次に、水 (1.0 mL) 中の硫酸銅 (II) 五水和物 (8.3 mg、0.033 mmol) を加えて透明な溶液を得た。バイアルの上部空間を窒素ガスでパージし、続いて、水 (0.48 mL) 中のアスコルビン酸ナトリウム (0.013 g、0.064 mmol) を室温で加えて、不透明な懸濁液を得た。さらに、アルキンXS30 (THF/水 (1:10、0.540 mL) 中に10 mg) を、4回に分けて、3時間かけて加え、その時点でUPLC-MS分析で完全な変換が示された。THFを、短時間のロータリーエバポレーションで除去し、水溶液を25 mM NH_4HCO_3 (10 mL) 中の10% MeCNで希釈し、分取RP-HPLC (ミリQ水中の25 mM NH_4HCO_3 / MeCN、90:10から50:50勾配) で精製し、凍結乾燥後にリンカー-薬物化合物XD59 (23

・ 0 mg) を白色の固体として得た。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) ppm = 8.56 (s, 2 H), 7.46 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 7.41 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 6.81 (s, 2H), 5.39 (br t, J = 6.9 Hz, 2H), 4.89 (br d, J = 7.0 Hz, 4H), 4.74 (s, 4H), 4.69 (br t, J = 4.8 Hz, 4H), 4.42 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.16 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 4.10-4.01 (m, 4H), 3.98 (br t, J = 4.7 Hz, 4H), 3.90 (s, 4H), 3.74 (t, J = 5.9 Hz, 4H), 3.68-3.62 (m, 4H), 3.62-3.52 (m, 14H), 3.52-3.43 (m, 4H), 2.68-2.52 (m, 4H), 2.42 (br t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.26-2.14 (m, 4H), 2.09 (dq, J = 13.6, 6.8 Hz, 2H), 1.67 (dt, J = 16.3, 8.2 Hz, 4H), 1.60-1.51 (m, 10H), 1.46 (d, J = 7.3 Hz, 6H), 1.34-1.20 (m, 2H), 0.96 (d, J = 7.1 Hz, 6H), 0.93 (d, J = 7.1 Hz, 6H)。MS (ESI^-) $\text{C}_{80}\text{H}_{122}\text{N}_{15}\text{O}_{23}\text{P}_2^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 計算値1722.8、実測値1723.2。

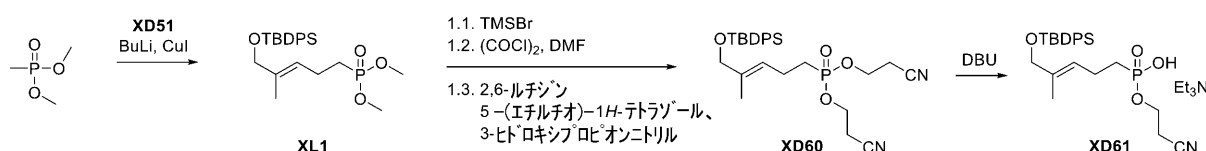
10

【0298】

実施例20 リンカー薬物化合物XD63の合成

A ホスホン酸エステルXD61の製造

【化41】



20

【0299】

(E)-(5-((tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸ジメチルエステル (XL1)

メチルホスホン酸ジメチルエステル (13.1 mL、121 mmol) を THF (440 mL) に溶解し、 -78°C に冷却し、 n -ブチルリチウム (75 mL、121 mmol) を加えた。混合物を -78°C で1時間攪拌し、次いで、 -50°C に温め、続いて CuI (11.5 g、60.4 mmol) を加え、この温度で1時間攪拌した。混合物を再び -78°C に冷却し、THF (110 mL) に溶解した XD51 (19.7 g、54.9 mmol) を加えた。反応物を一晩、室温に温め、次いで、飽和 NH_4Cl 水溶液 (500 mL) でクエンチした。混合物を EtOAc (2 × 500 mL) で抽出し、合わせた有機相をブラインで洗浄し、 MgSO_4 で乾燥し、ろ過し、真空中で濃縮した。粗製の材料をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中の0~100% EtOAc) で精製して、XL1 (23.2 g、収率95%) を黄色のオイル状物として得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ppm = 7.69-7.63 (m, J = 7.9, 1.5 Hz, 4H), 7.44-7.34 (m, 6H), 5.46-5.41 (m, 1H), 4.04 (br s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 2.38-2.28 (m, 2H), 1.83-1.73 (m, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.06 (s, 9H)。MS (ESI^+) $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_4\text{PSi}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 計算値447.2、実測値447.4。

30

【0300】

B リンカー薬物化合物XD63の製造

(E)-(5-((tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸ビス(2-シアノエチル) (XD60)

ホスホン酸エステル XL1 (580 mg、1.30 mmol) を、一般手順 XXB に記載のとおり、ホスホン酸ジクロリドに変換した。次いで、粗生成物を、ピリジンの代わりに2,6-ルチジンを使用した点を除き XD21 の合成で説明したように、3-ヒドロキシプロピオンニトリルと反応させた。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中の20~100% EtOAc) で精製して、ホスホン酸エステル XD60 (360 mg、53%) を無色のオイル状物として得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ppm = 7.69-7.62 (m, 4H), 7.46-7.34 (m, 6H), 5.44 (br t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.34-4.20 (m, 4H), 4.05 (s, 2H), 2.74 (t, J = 6.1 Hz, 4H), 2.45-2.33 (m, 2H), 1.97-1.83 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.06 (s, 9H)。MS (ESI^+) $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_2$

50

$\text{NaO}_4\text{PSi}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 計算値547.2、実測値547.5。

【0301】

(E)-(5-((tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ)-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホン酸2-シアノエチルエステル トリエチルアミン (XD61)

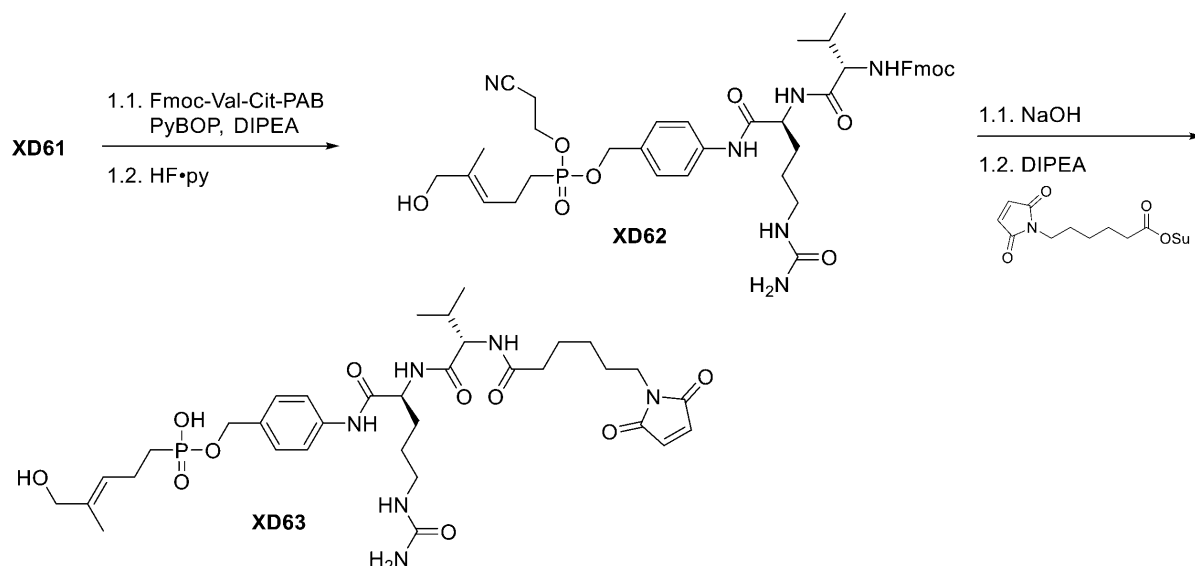
DBU (0.053 mL、0.349 mmol) を、室温でホスホン酸エステル XD60 (122 mg、0.233 mmol) の THF (2 mL) 溶液に加えた。30 分間攪拌した後、混合物を約 0.5 mL に濃縮し、溶液を MeOH (1 mL) で希釈した。次いで、溶液を短い DOWEX 50WX8 (H^+ 型) プラグに通過させ、メタノールで生成物を溶出することで、DBU を除去した。

【0302】

トリエチルアミン (0.032 mL、0.233 mmol) を溶出物に加え、混合物を濃縮し、MeCN (2×) と共に蒸発させた。ホスホン酸エステル XD61 (120 mg、97%) を、ホスホン酸エステル： Et_3N の比が 1：0.6 のトリエチルアミン塩として単離した。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) ppm = 7.71-7.62 (m, 4H), 7.46-7.36 (m, 6H), 5.43 (td, J = 7.3, 1.3 Hz, 1H), 4.08 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 4.05 (s, 2H), 3.20 (q, J = 7.3 Hz, 4H), 2.78 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.38-2.28 (m, 2H), 1.65 (s, 3H), 1.71-1.61 (m, 2H), 1.31 (t, J = 7.3 Hz, 5H), 1.04 (s, 9H)。MS (ESI^-) $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{NO}_4\text{PSi}^-$ [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ 計算値470.2、実測値470.4。

【0303】

【化42】



【0304】

((2S)-1-(((2S)-1-((4-(((2-シアノエトキシ)((E)-5-ヒドロキシ-4-メチルペンタ-3-エン-1-イル)ホスホリル)オキシ)メチル)フェニル)アミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)アミノ)-3-メチル-1-オキソブタン-2-イル)カルバミン酸(9H-フルオレン-9-イル)メチルエステル (XD62)

工程1 ホスホン酸エステル XD61 (187 mg、0.326 mmol) と Fmoc-Val-Cit-PAB (295 mg、0.490 mmol) を丸底フラスコ中で合わせ、DMF (3×8 mL) と共に蒸発させた。次いで、DMF (3.2 mL) を窒素雰囲気下に加え、続いて室温で PyBOP (255 mg、0.490 mmol) と DIPEA (0.057 mL、0.326 mmol) を加えた。5 分後に DIPEA (0.114 mL、0.653 mmol) を更に加え、混合物を 2 時間攪拌した。次いで、反応混合物を、水 (70 mL、0℃) に、ゆっくりと滴下した。ゲルの形成を避けるために、攪拌は穏やかに行う必要がある。白色の懸濁液を 5 分間穏やかに攪拌し、次いで、ろ過した。固体を集め、MeCN (2×) と共に蒸発させてわずかな水を除去した。固体をフラッシュク

ロマトグラフィー（シリカゲル、DCM中の0～12% MeOH）で精製して、生成物（263 mg、76%）を白色の固体として得た。MS (ESI⁺) C₅₈H₇₂N₆O₉PSi⁺ [M+H]⁺ 計算値1055.5、実測値1056.0。

【0305】

工程2 生成物の一部（257 mg、0.244 mmol）を、窒素雰囲気下で、PFA製バイアル中のTHF（3.8 mL）とピリジン（0.370 mL）に懸濁した。バイアルを0℃に冷却し、HF・ピリジン（0.25 mL、70%）を加えた。混合物をこの温度で6時間攪拌し、次いで、冷却した懸濁液をEtOAc中の飽和NaHCO₃水溶液／10% iPrOH混合物（0℃）に、注意深く加えた。5分間攪拌した後、各相を分離し、有機相を塩酸（1 M）とブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、ろ過し、シリカゲル上で濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー（シリカゲル、DCM中の0～15% MeOH）により、アルコールXD62（148 mg、74%）を白色の固体として得た。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm = 10.10 (s, 1H), 8.12 (br d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.74 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.45-7.37 (m, 3H), 7.36-7.29 (m, 4H), 5.97 (br t, J = 5.7 Hz, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.34 (td, J = 7.1, 1.0 Hz, 1H), 5.03-4.91 (m, 2H), 4.67 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.46-4.37 (m, 1H), 4.34-4.18 (m, 3H), 4.14-4.04 (m, 2H), 3.98-3.87 (m, 1H), 3.75 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 3.07-2.90 (m, 2H), 2.88 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.27-2.12 (m, 2H), 2.05-1.93 (m, 1H), 1.91-1.77 (m, 2H), 1.75-1.54 (m, 2H), 1.51 (s, 3H), 1.49-1.29 (m, 2H), 0.88 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。MS (ESI⁺) C₄₂H₅₄N₆O₉P⁺ [M+H]⁺ 計算値817.4、実測値817.8。

【0306】

リンカー薬物XD63

NaOHによるホスホン酸エステルXD62の脱保護、その後の6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノ酸 2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステルとのアミドカップリング、及びRP-HPLCによる精製を、XD57の合成の工程3及び4に、以下の変更を加えて行った。工程3では、5当量のNaOH（2 M）を使用して、反応時間を2時間とした。工程4では、2当量OSuエステルを使用した。リンカー薬物XD63（47.9 mg、36%）を白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O) ppm = 7.46 (s, 4H), 6.82 (s, 2H), 5.40 (br t, J = 7.1 Hz, 1H), 4.90 (br d, J = 7.5 Hz, 2H), 4.45 (br t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.10 (br d, J = 7.9 Hz, 1H), 3.91 (s, 2H), 3.46 (br t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.14 (br t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.31 (br t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.24-2.13 (m, 2H), 2.11-2.00 (m, 1H), 1.99-1.75 (m, 2H), 1.71-1.47 (m, 11H), 1.31-1.19 (m, 2H), 0.95 (br dd, J = 6.4, 2.8 Hz, 6H)。MS (ESI⁺) C₃₄H₅₂N₆O₁₀P⁺ [M+H]⁺ 計算値735.4、実測値735.7。

【0307】

実施例21 リンカー薬物化合物XD65の製造

10

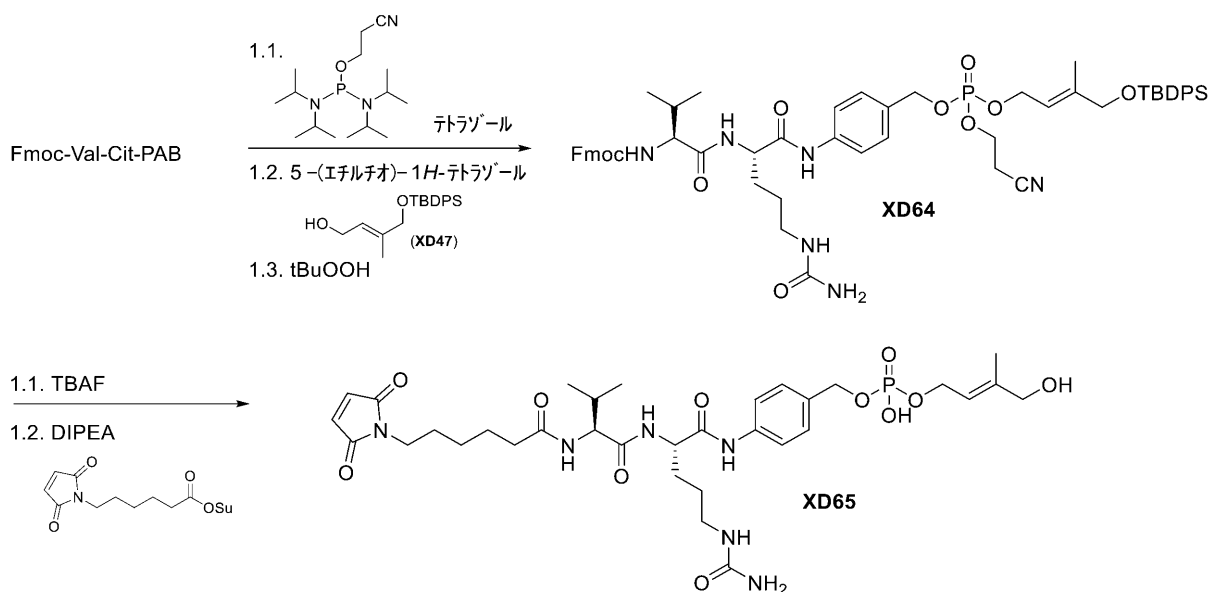
20

30

40

50

【化 4 3】



10

【0308】

((2S)-1-(((2S)-1-((4-((((E)-4-((tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ)-3-メチルブタ-2-エン-1-イル)オキシ)(2-シアノエトキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)フェニル)アミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)アミノ)-3-メチル-1-オキソブタン-2-イル)カルバミン酸(9H-フルオレン-9-イル)メチルエステル (XD64)

20

Fmoc-Val-Cit-PAB (300 mg、0.499 mmol) を、窒素雰囲気下、室温で DMF (7.0 mL) に溶解し、(3-((ビス(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル)オキシ)プロパンニトリル (0.174 mL、0.548 mmol) を加え、続いて MeCN 中のテトラゾール (0.45 M、1.22 mL、0.548 mmol) を滴下した。混合物を室温で 2 時間攪拌した。一方、アルコール XD47 (282 mg、0.828 mmol、Serra, S. Tetrahedron: Asymmetry, 2014, 25, 1561-1572 に記載のとおり合成) と 5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール (143 mg、1.097 mmol) を 10 mL の丸底フラスコに入れ、乾燥 MeCN と共に蒸発させた。残留物を、窒素雰囲気下で DMF (0.5 mL) に溶解し、次いで、混合物を、室温でカニューレを使用して加えた。一晩攪拌した後、tBuOOH (デカン中に 5.5 M、0.199 mL、1.097 mmol) を 0℃ で加え、2 分後、反応物を室温に温め、90 分間攪拌した。次いで反応物を攪拌しながら氷で冷やした水 (70 mL) に注ぎ、5 分後に懸濁液をろ過し、少量の水 (2 × 6 mL) で洗浄した。次いで、固体をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、DCM 中の 0~10% MeOH) で精製して、生成物と Fmoc-Val-Cit-PAB (354 mg) の混合物を得た。この物質を更に精製することなく次の工程で使用した。MS (ESI⁺) C₅₇H₆₉N₆NaO₁₀PSi⁺ [M+Na]⁺ 計算値 1079.5、実測値 1079.9。

30

40

【0309】

リンカー-薬物 XD65

((2S)-1-(((2S)-1-((4-((((E)-4-((tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ)-3-メチルブタ-2-エン-1-イル)オキシ)(2-シアノエトキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)フェニル)アミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)アミノ)-3-メチル-1-オキソブタン-2-イル)カルバミン酸(9H-フルオレン-9-イル)メチルエステル (162 mg、0.153 mmol) を、DMF (3.0 mL) に溶解した。TBAF (THF 中に 1.0 M、458 μL、0.458 mmol) を室温に加えた。35 分後、TBAF (THF 中に 1.0 M、1.30 mL、1.30 mmol) を更に加え、反応を 45 分間続けた。エーテル (約 50 mL) を加えて、上清が濁ったオイル状物を得た。上清を除去し、残ったオイル状物

50

をエーテルで2回処理した（エーテルの添加、攪拌、デカンテーション）。オイル状の残留物をDMF（0.3 mL）に溶解し、酢酸（0.044 mL、0.764 mmol）を加え、続いて、室温でDIPEA（0.080 mL、0.458 mmol）と6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサン酸 2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル（70.6 mg、0.229 mmol）を加えた。25分後、反応が完全に終了したことが観察された。酢酸（0.044 mL、0.764 mmol）を加え、混合物を濃縮した。粗生成物を分取RP-HPLC（ミリQ水×0.1% TFA/MeCN、90:10から40:60勾配）で精製し、生成物の画分を凍結乾燥した。このような酸性条件で凍結乾燥すると、部分的な分解が観察された。純粋ではない生成物の一部を分取RP-HPLC（ミリQ水中の10 mM NH₄HCO₃/MeCN、90:10から65:35勾配）で再度精製し、凍結乾燥後にリンカー-薬物化合物XD65（15.3 mg）を得た。¹H NMR（400 MHz, DMSO-d₆）ppm = 10.09 (s, 1H), 8.12 (br d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.85 (br d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.00 (s, 2H), 6.11-6.03 (m, 1H), 5.58-5.50 (m, 1H), 5.45 (br s, 2H), 4.75 (br d, J = 6.8 Hz, 2H), 4.43-4.28 (m, 3H), 4.19 (dd, J = 8.7, 6.9 Hz, 1H), 3.78 (s, 2H), 3.39-3.34 (m, 2H), 2.97 (dtt, J = 18.9, 12.8, 6.3 Hz, 2H), 2.23-2.06 (m, 2H), 2.02-1.91 (m, 1H), 1.78-1.65 (m, 1H), 1.65-1.29 (m, 10H), 1.22-1.12 (m, 2H), 0.85 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.81 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。MS (ESI⁻) C₃₃H₄₈N₆O₁₁P⁻ [M-H]⁻ 計算値735.3、実測値735.9。

10

20

【0310】

実施例22 リンカー-薬物化合物（LD）からの複合体の合成

表1に記載のADC番号は、実施例で開示したように合成した対応するリンカー-プロドラッグと使用する抗体を示す。

【0311】

表1に示す複合体で使用した抗体は以下のとおり：

- ・抗CD20モノクローナル抗体（MoAb）リツキシマブ（r）
- ・抗Her2 MoAbトラスツズマブ（t）、又は抗体の重鎖（HC）の41位のアミノ酸がシステインに置換されているトラスツズマブ-41C（t_{41c}）
- ・抗CD123 MoAb（Byondis社独自のMoAbであるCD123）
- ・H8-HC41C（重鎖は配列番号8に示すアミノ酸配列を含み、軽鎖は配列番号11に示すアミノ酸配列を含む）として国際公開第2015/177360号に開示されている抗5T4抗体である、抗5T4 MoAb（5T4）
- ・SYD1030（重鎖は配列番号2に示すアミノ酸配列を含み、軽鎖は配列番号5に示すアミノ酸配列を含む）として国際公開第2015/177360号に開示されている重鎖の41位（すなわち、HC41C）に操作されたシステインを有する抗PSMA抗体である、抗PSMA MoAb SYD1030 41C（p_{41c}）
- ・アイソタイプ対照抗体（i）。

30

【0312】

使用したアイソタイプ対照抗体は、受託番号2NY7のヒト抗HIV1 pg120抗体B12の可変ドメイン配列を有し（Zhou et al, 2007, Nature, 445, 732-737）、IgG1κアイソタイプ対照抗体として使用されている（それぞれ、受託番号P01857及びP01834）。

40

【0313】

それぞれの複合体を実施例22a～cに記載の方法に従い合成した。実施例22bに記載したように部位特異的複合化によって製造したDAR2の複合体を除き、表1に示すDARが8未満の全ての複合体は、実施例22aに記載の手順に従って合成した。高いDAR（8以上）の複合体は、実施例22cに記載の手順に従って製造した。DAR（複合体中のpAg抗体比）も表1に示す。

【0314】

50

実施例 2 2 a D A R 2 の複合体の合成

抗体の溶液（10～12 mg/mL）に、T R I S（1 体積%、1 M、p H 8）、E D T A（4 体積%、25 mM）及び T C E P（水中に 5 mM）を加えた。得られた溶液を室温で 2 時間インキュベートした。インキュベーション後、還元された抗体を、4.2 mM のヒスチジン、50 mM のトレハロース（p H 6）で再度緩衝化し、ジメチルアセトアミド（DMA）及びリンカー-薬物化合物（LD）（DMA 中に 10 mM、1 つの S H につき 1.5 当量以上）で処理した。最終的な DMA 含有量は約 10 体積%であった。得られた混合物を、暗所、室温で一晩ローラー混合した。活性炭を加え、懸濁液を暗所で 1 時間ローラー混合し、ろ過し、4.2 mM のヒスチジン、50 mM のトレハロース（p H 6）で洗浄した。溶液を、4.2 mM のヒスチジン、50 mM のトレハロース（p H 6）で再度緩衝化し、滅菌ろ過した。

10

【0315】

実施例 2 2 b 部位特異的複合化による D A R 2 の複合体の合成

D A R 2 の複合体の一部（表 1 に示す A D C - X D 1 8 - C D 1 2 3 4 1 c、A D C - X D 1 8 - 5 T 4 4 1）は、部位特異的複合化で合成し、リンカー-薬物分子は、Kabat ナンバリングシステムで抗体重鎖の 41 位（「41C」）の操作されたシステインによってのみ結合している。これらの複合体は、国際公開第 2015/177360 号及び同第 2017/137628 号に開示された方法で製造した。

【0316】

実施例 2 2 c D A R が高い（D A R 8、D A R 1 6 及び D A R 1 0、D A R 2 0）複合体の合成

20

抗体の溶液（4.2 mM のヒスチジン、50 mM のトレハロース（p H 6）中に 12 mg/mL）に、E D T A（水中に 25 mM、4 % v/v）及び T R I S（水中に 1 M、p H 8、2 % v/v）を加えた。

【0317】

D A R 8 又は D A R 1 6 の複合体では、野生型抗体を使用した。D A R 1 0 又は D A R 2 0 の複合体では、重鎖の Kabat ナンバリングシステムで 41 位のアミノ酸がシステインに置換されている 41C 修飾抗体を使用した。この修飾により、抗体のアミノ酸配列中に、2 つのシステインが更に導入され、これは、次の工程において T C E P で還元され、リンカー-薬物（LD）と結合可能な位置が合計 10 となる。

30

【0318】

T C E P（水中に 10 mM、30 当量）を加え、得られた混合物を室温で一晩インキュベートした。反応物を、4.2 mM のヒスチジン、50 mM のトレハロース（p H 6）を使用して遠心濃縮器（Vivaspin フィルター、分子量カットオフ 30 k D a、P E S）で除去した。

【0319】

DMA を加え、続いてリンカー-薬物の溶液を加えた。D A R 8 及び D A R 1 6 の複合体では、DMA 中に 10 mM、16 当量を加えた。D A R 1 0 及び D A R 2 0 の複合体では、DMA 中に 10 mM、20 当量を加えた。

【0320】

D A R 1 6 及び D A R 2 0 の複合体は、分岐リンカーを有するリンカー-薬物を用いて製造し、各分岐リンカーは 2 つの p A g を有する（表 1 に示すリンカー-薬物 X D 5 9）。DMA の最終濃度は 10 % であった。

40

【0321】

得られた混合物を、遮光下、室温で 3 時間又は一晩インキュベートした。過剰のリンカー-薬物を除去するために、活性炭を加え、混合物を室温で 1 時間インキュベートした。活性炭を、0.2 mm の P E S 又は P V D F フィルターを使用して除去し、得られた A D C を、Vivaspin 遠心分離濃縮器（分子量カットオフ 30 k D a、P E S）を使用して、4.2 mM のヒスチジン、50 mM のトレハロース（p H 6）中に加えた。最後に、A D C 溶液を、0.2 mm の P V D F フィルターを使用して滅菌ろ過した。

50

【0322】

実施例22a又は22bに記載のとおりに合成した複合体のDAR（pAg抗体比）を、目標とするDAR2に近似するために、HICによる簡単なDARの決定を可能にする疎水性のseco-DUBA（SYD980、国際公開第2015/177360号に記載）を使用して、代わりの複合化を行った。

【0323】

目標とするDARが2である複合体で得られた近似DARを表1に示す。実施例22cに記載のとおりに合成した高いDARの複合体では、目標とするDARは、表1で「目標値」として示している。実際のDARは、この値から多少ずれる場合がある（これは、ピークが重複する（目標とするDARが2のADC）か、製造されたADCが完全に還元され／複合化されている（目標とするDARが8、10、16及び20のADC）ため、標準的な方法（HIC）で測定できなかったことを意味する）。

10

【0324】

DAR又は%HMWにおいて、複数の値がコンマで区切られて記載されている場合、これらは同じADCの異なるバッチを指す。

【0325】

表1において、「<LOD」は、検出限界未満を意味する。

【0326】

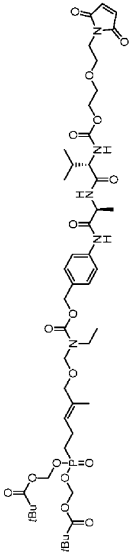
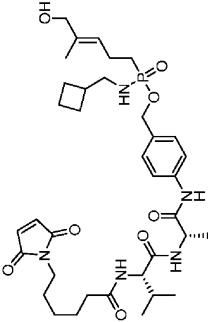
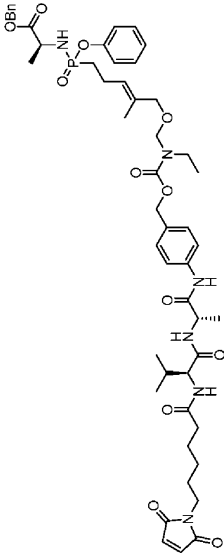
20

30

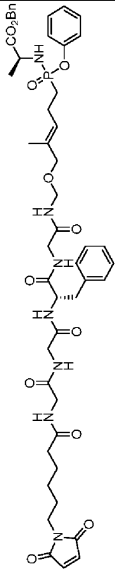
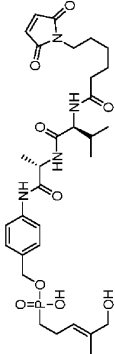
40

50

表1 合成で使用する抗体及びリンカー-薬物(LD)化合物を有する合成コンジュゲート

LD	LDの構造	複合体	MoAb	およその DAR	%HMW
XC4		ADC-XC4-r	リツキシマブ (抗CD20)	2	0.4
		ADC-XC4-i	アイソタイプ ^o (抗HIV)	1.7	0.5
XD13		ADC-XD13-r	リツキシマブ	2	0.3
		ADC-XD13-i	アイソタイプ ^o	1.7	0.1
XD4		ADC-XD4-r	リツキシマブ	1.9, 2.0	0.3, 1.4
		ADC-XD4-i	アイソタイプ ^o	1.6	0.1

【表 1 - 2】

LD	LDの構造	複合体	MoAb	およそのDAR	%HMW
XS2		ADC-XS2-r	リツキシマブ	2.1	0.0
		ADC-XS2-t (or i)	トラスツズマブ、 アイソタイプとして	2.2	0.7
XD18		ADC-XD18-r	リツキシマブ	目標値 8	0.8
		ADC ₈ -XD18-i	アイソタイプ	目標値 8	1.3
		ADC-XD18- CD123 _{41C}	抗CD123 41C MoAb	2.1	1.2
		ADC-XD18-5T _{41C}	抗 5T4 41C MoAb	1.9	1.01
		ADC ₁₀ -XD18- CD123 _{41C}	抗CD123 41C MoAb	目標値10	1.7
		ADC ₁₀ -XD18-p _{41C}	抗 PSMA SYD1030 41C	目標値10	0.8
		ADC-XD18-p _{41C}	抗 PSMA SYD1030 41C	1.8	1.1
				1.9, 2.1, 2.0	< LOD, < LOD, < LOD
				2.2, 2.2	0.7, 1.0
				2.1	0.2

【 0 3 2 8 】

10

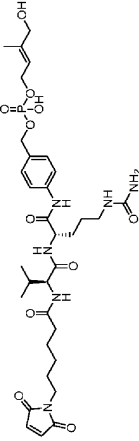
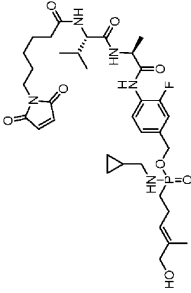
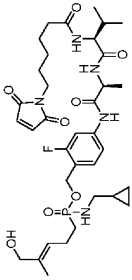
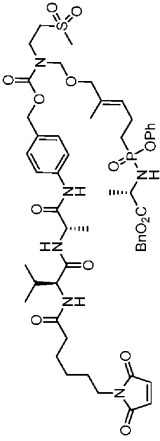
20

30

40

50

【表 1 - 3】

LD	LDの構造	複合体	MoAb	およそのDAR	%HMW
XD65		ADC-XD65-r	リツキシマブ	2.1	< LOD
		ADC-XD65-i	アイソタイプ	2.1	< LOD
		ADC8-XD65-r	リツキシマブ	目標値 8	0.6
		ADC8-XD65-i	アイソタイプ	目標値 8	0.7
XS12		ADC-XS12-r	リツキシマブ	2.0	< LOD
		ADC-XS12-i	アイソタイプ	1.5	0.09
XS17		ADC-XS17-r	リツキシマブ	2.0	0.2
		ADC-XS17-i	アイソタイプ	1.5	0.08
XS7		ADC-XS7-r	リツキシマブ	2.6	0.1
		ADC-XS7-i	アイソタイプ	1.2	< LOD

【 0 3 2 9 】

10

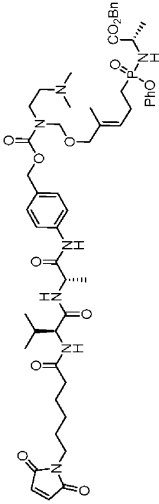
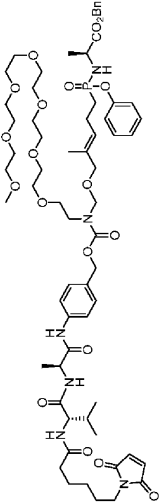
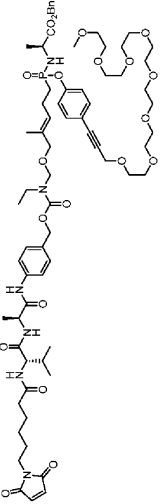
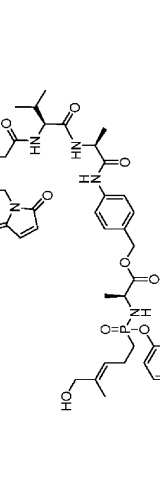
20

30

40

50

【表 1 - 4】

LD	LDの構造	複合体	MoAb	およそのDAR	%HMW
XS25		ADC-XS25-r	リツキシマブ	目標値 2	n.d.
		ADC-XS25-i	アイソタイプ	目標値 2	n.d.
XC9		ADC-XC9-r	リツキシマブ	2.1	0.1
		ADC-XC9-t	トラスツズマブ	2.2	0.7
XC13		ADC-XC13-r	リツキシマブ	2.1	0.1
		ADC-XC13-t	トラスツズマブ	2.2	0.7
XS22		ADC-XS22-r	リツキシマブ	目標値 2	0.9
		ADC-XS22-i	アイソタイプ	目標値 2	0.8

【 0 3 3 0 】

10

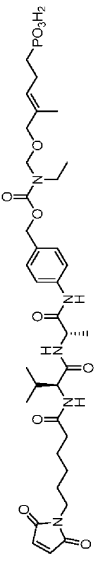
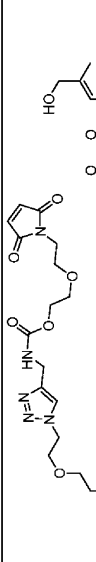
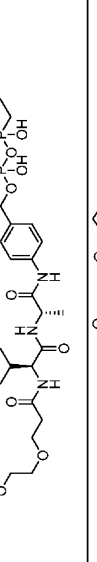
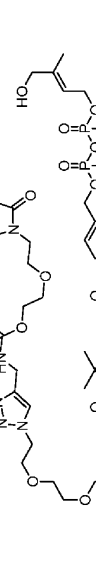
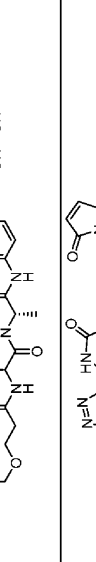
20

30

40

50

【表 1 - 5】

LD	LDの構造	複合体	MoAb	およそのDAR	%HMW
XD24		ADC-XD24-r	リツキシマブ	1.9	0.3
		ADC-XD24-i	アイソタイプ	1.6	0.14
XD44		ADC-XD44-r	リツキシマブ	2.2	< LOD
		ADC-XD44-i	アイソタイプ	2.2	< LOD
XD45		ADC-XD45-r	リツキシマブ	2.2	< LOD
		ADC-XD45-i	アイソタイプ	2.1	< LOD
XD46		ADC-XD46-r	リツキシマブ	2.5	< LOD
		ADC-XD46-i	アイソタイプ	2.4	< LOD
XD58		ADC-XD58-r	リツキシマブ	2.0	< LOD
		ADC-XD58-i	アイソタイプ	2.2	< LOD

【 0 3 3 1 】

10

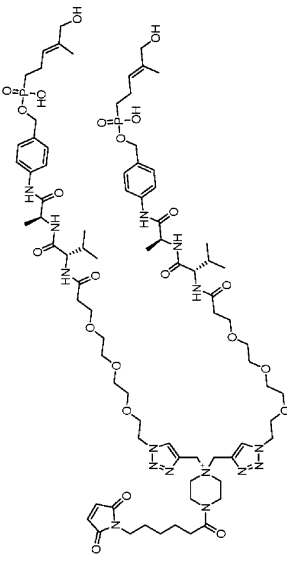
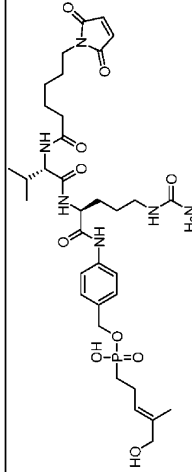
20

30

40

50

【表 1 - 6】

LD	LDの構造	複合体	MoAb	およそのDAR	%HMW
XD59		ADC ₁₆ -XD59-r	リツキシマブ	目標値 16	0.5
		ADC ₁₆ -XD59-i	アイソタイプ	目標値 16	1.1
		ADC ₂₀ -XD59-c41c	抗CD123 41C MoAb	目標値 20	1.6
XD63		ADC-XD63-r	リツキシマブ	2.2	0.75
		ADC-XD63-i	アイソタイプ	1.9	1.7

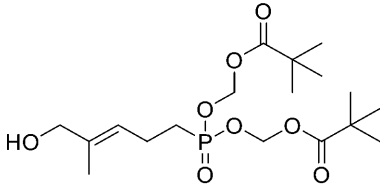
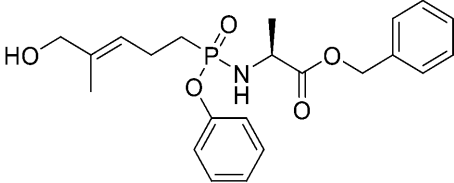
【0332】

実施例 23 プロドラッグ及び複合体の $\gamma\delta$ T 細胞に対する活性

(複合化していない) ホスホ抗原プロドラッグの活性を決定するために、Raji 標的細胞を、エフェクター細胞を含有する末梢血単核球 (PBMC) と共培養する前に、XC1 及び XD1 とプレインキュベートした。ホスホ抗原 HMBPP、ホスホ抗原プロドラッグ XC1、XD1、又は表 1 に列挙した複合体で前処理した (CD20 陽性バーキットリンパ腫ヒト腫瘍細胞株 Raji に由来する) 腫瘍細胞と、PBMC を共培養した後に、選択的な $\gamma\delta$ T 細胞の活性化を *in vitro* で調べた。試験を行ったプロドラッグの構造を表 2 に示す。

【0333】
【表2】

表2 ホスホ抗原プロドラッグ 構造式とコード名

構造式	コード名
	XC1
	XD1

10

【0334】
免疫細胞の供給源として、健康なヒトドナーのP B M Cを用いた。
【0335】

20

活性化されると、V γ 9 V δ 2 γ δ T細胞は、サイトカインを産生して免疫を活性化し、細胞毒性顆粒を放出（脱顆粒）して標的細胞を殺傷する。V γ 9 V δ 2 γ δ T細胞のみが、ホスホ抗原レベルの変動を感知することが知られているが、誘導されるエフェクター機構の一部は、C D 8 + T細胞、N K細胞及びγ δ T細胞の他のサブセットを含む他の免疫細胞と共有される。これらの免疫細胞集団は全て、健康なドナーの血液から単離したP B M C中に存在する。したがって、P B M Cは、in vitroで実験を行い、γ δ T細胞の選択的な活性化を決定する際の良好な細胞供給源である。

【0336】

異なる免疫細胞集団の同定は、蛍光標識したモノクローナル抗体による特異的な染色で達成できる。モネンシン及び／又はブレフェルジンAを、P B M Cと標的の共培養物中に加えると、産生されたI F N γが活性化した細胞に捕捉される。抗I F N γ抗体が細胞内へ移行することを可能にするサポニンの存在下での蛍光標識抗体による染色は、I F N γ産生細胞を同定する。C D 1 0 7 aに対する蛍光標識抗体も、共培養物中に加えることができ、脱顆粒を起こしている細胞を染色する。したがって、蛍光標識した免疫細胞特異的マーカー、C D 1 0 7 aマーカー及びI F N γマーカーと組み合わせることで、前処理した標的細胞と共培養した後のγ δ T細胞及び／又は他の免疫細胞サブセットの活性化状態の決定が可能である。

30

【0337】

材料及び方法

C D 2 0陽性バーキットリンパ腫ヒト腫瘍細胞株R a j i（D S M Z、the German collection of Microorganisms and cell cultures GmbH（Leibniz Institute, Germany））をin vitro実験に用いた。R a j i細胞を、完全増殖培地（C G M）（1 0 %熱不活化（H I）ウシ胎仔血清（F B S）（Gibco- Life Technologies; Carlsbad, CA）及び8 0 U／m Lペニシリンーストレプトマイシン溶液（Lonza Group Ltd, Basel Switzerland）を添加したR P M I 1 6 4 0（Lonza, Walkersville, MD, U S A））中で培養した。R a j i細胞を、5 % C O 2の加湿インキュベーターにおいて3 7℃で維持し、週2回、継代した。

40

【0338】

本発明の複合体（A D C）、非複合体型ホスホ抗原プロドラッグ及びH M B P Pでの刺激について、R a j i細胞を収集し、5 × 1 0⁶細胞／m Lまで希釈し、この細胞懸濁液

50

の $50\ \mu\text{L}$ ($250,000$ 細胞／ウェルに相当) を、 96 ウェルプレートへ播種した。
2 倍濃縮した、プロドラッグ及び ADC の 10 倍段階希釈物を CGM で調製した。播種した Raji 細胞を、段階希釈化合物の $50\ \mu\text{L}$ ／ウェルと共に、 37°C 、 $5\%\ \text{CO}_2$ の加湿インキュベーターで一晩インキュベートした。

【0339】

次の日、過剰の結合していない化合物を除去するために、Raji 細胞及び化合物 (ADC、結合していないホスホ抗原プロドラッグ又は HMBPP) を含む 96 ウェルプレートに CGM を 1 ウェルにつき $100\ \mu\text{L}$ 加えて洗浄し、室温、 $300\times g$ で 3 分間遠心分離し、上清を除去した。

【0340】

免疫細胞の供給源として、健康なヒトドナーの凍結した末梢血単核球 (PBMC) を解凍し、CGM 中に再懸濁し、 37°C 、 $5\%\ \text{CO}_2$ の加湿インキュベーターに一晩置いて、細胞を回復させた。

【0341】

回復した PBMC を収集し、カウントし、CGM で 10×10^6 細胞／mL に希釈し、 $50\ \mu\text{L}$ ／ウェル (0.5×10^6 細胞／ウェルに相当) を Raji 細胞に加えた。2 倍濃縮した抗 CD107a-AlexaFluor 647 溶液を、GolgiStop (モネンシン) 及び GolgiPlug (プレフェルジン A) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を含有する CGM 中で調製し、 $50\ \mu\text{L}$ ／ウェルを、Raji-PBMC 共培養物に加えた。全ての実験において、免疫細胞の非特異的アクチベーターとして知られた 1% フィトヘマグルチニン (PHA-M, Gibco-ThermoFisher) も陽性対照としてウェルに含めた。試料を、 37°C 、 $5\%\ \text{CO}_2$ の加湿インキュベーターで 6 時間インキュベートした。

【0342】

免疫細胞サブセットの特異的な染色について、マルチカラー抗体染色カクテルを、抗 CD3 BUUV396 (全てに含まれるものではない)、抗 CD8 BV421、抗 CD56 PE-Cy7、生死判別染色 780 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)、抗 TCR V δ 1 PerCP-Vio700、FcR ブロッキング試薬 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)、及び抗 TCR V δ 2 BV711 (Biolegend, San Diego, USA) を含有するブリリアント染色緩衝液中で調製した。 6 時間のインキュベーション後、プレートを、室温、 $300\times g$ で 3 分間遠心分離し、上清を捨てた。ペレットを抗体カクテル $50\ \mu\text{L}$ 中に再懸濁し、遮光下、氷上で 30 分間インキュベートした。プレートを、氷冷 FACS 緩衝液 (PBS $1\times$ 、 $0.1\%\ \text{v/w}$ BSA、 $0.02\%\ \text{v/v}$ アジ化ナトリウム (NaN₃)) $100\ \mu\text{L}$ で 2 回洗浄し、続いて、 $300\times g$ で 3 分間遠心分離し、上清を捨てた。細胞を固定し、 $100\ \mu\text{L}$ ／ウェルの Cytotfix/Cytoperm 溶液 (BD bioscience, San Jose, CA, USA) を用いて透過処理し、遮光下、氷上で 20 分間インキュベートした。細胞を、サポニン含有する BD Perm/wash 溶液 (10 倍の BD Perm/Wash 緩衝液を蒸留水で希釈し、使用前に 1 倍溶液を製造) $150\ \mu\text{L}$ で 3 回洗浄し、続いて $300\times g$ で 3 分間遠心分離し、上清を捨てた。最後に、細胞を FACS 緩衝液中に再懸濁し、遮光下、 4°C の冷蔵庫で一晩保存した。

【0343】

3 日目、染色した PBMC/Raji 細胞を、BD Perm/wash 溶液 $150\ \mu\text{L}$ で 1 回洗浄し、続いて、 $300\times g$ で 3 分間遠心分離し、上清を捨てた。ペレットを、Perm/Wash 溶液で希釈した抗 IFN γ BV650 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) の混合物 $50\ \mu\text{L}$ 中に再懸濁し、遮光下、氷上で 30 分間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを氷冷 FACS 緩衝液 $150\ \mu\text{L}$ で 1 回洗浄し、続いて、 $300\times g$ で 3 分間遠心分離し、上清を捨てた。その後、細胞ペレットを、FACS 緩衝液 $150\ \mu\text{L}$ に再懸濁し、試料を、 96 ウェルプレートで分析するために、ハイスループットサンプラーと備えた BD FACSymphony A3 細胞アナライザー (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) で分析した。

【0344】

ゲーティングストラテジー

FlowJo V10.7で分析し、得られた試料をゲーティングし、さまざまな免疫細胞集団を特定した（図1）。まず、時間ゲートを適用して一定の流れを確保し（図1A）、潜在的な不規則さを排除し、その後、FSC-A対FSC-H及びSSC-A対SSC-Hプロットで、ダブレット及び死細胞を除外した（図1B及び図1C）。

【0345】

生存細胞を選択し（図1D）、続いて、FSC/SSCに基づいてリンパ球を選択した（図1E）。次いで、CD3陰性CD56陽性細胞をNK細胞として同定した（図1F）。CD3陽性細胞を、Vδ2陽性細胞とVδ1陽性細胞に更に分けた（図1G）。リンパ球も、CD8陽性細胞傷害性T細胞へ細分し（図1H）、4つのファミリーを得た：

- － NK細胞は、CD3⁻CD56⁺細胞として特定、
- － CD8⁺T細胞は、CD3⁺Vδ1⁻Vδ2⁻CD8⁺として特定、
- － Vδ1γδT細胞は、CD3⁺Vδ1⁺Vδ2⁻として特定、
- － Vδ2γδT細胞は、CD3⁺Vδ1⁻Vδ2⁺として特定。

【0346】

注意すべきことは、Vδ2γδT細胞を染色するためにこの明細書で使用したB6クローンは、Vγ9Vδ2γδT細胞のみを染色し、Vδ2γδT細胞のVγ9⁻集団を染色しない。これらの4つの免疫細胞集団について、CD107a⁺又はIFNγ⁺細胞の割合を決定した。さらに、CD107⁺又はIFNγ⁺細胞集団の蛍光強度の中央値を、細胞あたりの活性の尺度として求めた。CD107aは、脱顆粒についてのマーカーとして説明されており、標的細胞の殺傷と強く相関する。分泌を防ぐプレフェルジンA/モネンシン処理により引き起こされるIFNγの蓄積は、IFNγサイトカイン産生の尺度である。

【0347】

結果／結論

細胞膜透過性プロドラッグはVδ2γδT細胞の活性化を誘導する

プロドラッグXC1及びXD1のいずれも、他の免疫細胞（NK細胞、CD8⁺T細胞、Vδ1γδT細胞）の直接的活性化を誘導することなく（図2B、図2D）、初代ヒトPBMCでVδ2γδT細胞集団のIFNγ産生及び脱顆粒（ずなわち、CD107a）を用量依存的に誘導した（図2A、図2C）。陽性対照フィトヘマグルチニン（PHA-M）は、全ての免疫細胞を活性化でき（図3A～3D、3I～3L）、それらが免疫原としての可能性を保持することを示した。Vδ2γδT細胞のIFNγ産生及び脱顆粒は、HMBPPでの前処理と比較して、XC1及びXD1で前処理したRaji細胞によって、より強力に誘導された（図2A、図2C）。

【0348】

実施例4に記載のとおり、3つのプロドラッグを、リツキシマブ又は非結合アイソタイプ対照と、切断可能なリンカーを介して複合化した。CD20ターゲティングADC-XC4-r、ADC-XD4-r及びADC-XD13-rとプレインキュベートしたRaji細胞は、Vδ2γδT細胞によるIFNγ産生を、それぞれ169ng/ml、220ng/ml、2622ng/mlの平均EC₅₀で、脱顆粒（CD107a）を、それぞれ51.3ng/ml、45.5、470ng/mlの平均EC₅₀で、用量依存的に誘導した（図4、図5A、図5B、図6、表3）。それぞれの非結合対照ADC-XC4-i及びADC-XD4-iは、Vδ2γδT細胞活性化を誘導する作用が小さく、かつ非結合対照ADC-XD13-iはVδ2γδT細胞のIFNγ産生も脱顆粒も誘導しなかったため、強力なVδ2γδT細胞活性化は、標的細胞媒介ADC活性化に依存した（図4）。

【0349】

予測のとおり、CD20結合抗体リツキシマブで前処理したRaji細胞もVδ2γδT細胞を活性化した。しかし、リツキシマブ-ADCは、リツキシマブ自体より多くのVδ2γδT細胞において脱顆粒及びIFNγ産生を誘導し（図5C、図5D）、細胞あた

10

20

30

40

50

りの高いCD107a及びIFN γ 発現も誘導した（図5E、図5F、図6）。

【0350】

リツキシマブで前処理したRaji細胞は、おそらくNK細胞で発現することがよく知られているFc γ Rを介して、NK細胞も活性化した。ADCで前処理したRaji細胞は、活性化されたNK細胞の割合を更に増強しなかった（図4B、図4F）。これらの結果は、腫瘍細胞のCD20結合ADCでの前処理が、リツキシマブよりも、用量依存的、かつ、より強力に、V δ 2 γ δ T細胞のIFN γ 誘導及び脱顆粒をもたらし、標的との結合と内部移行に依存して、この出願のADCが、抗腫瘍免疫応答を向上できることを示した。ADCは、おそらく十分に説明されたFc γ R相互作用により他の免疫細胞を活性化する活性Fcテールを有する。

10

【0351】

【表3】

表3 プロドラッグで前処理したRaji細胞によって誘導された免疫細胞集団におけるIFN γ 又はCD107aの発現

EC₅₀(ng/ml) 50%の活性化が達成される濃度

n.d. 測定せず

GraphPadプリズムでは測定できず

ADC-XC4-r								
ドナー	A		B		C		D	
	EC ₅₀	CI	EC ₅₀	CI	EC ₅₀	CI	EC ₅₀	CI
IFN γ	44	21 - 95	86	62 - 122	122	98 - 153	425	252 - 799
CD107a	12	8 - 17	14	8 - 26	29	26 - 32	151	61 - 517
ADC-XD4-r								
ドナー	A		B		C		D	
	EC ₅₀	CI	EC ₅₀	CI	EC ₅₀	CI	EC ₅₀	CI
IFN γ	64	52 - 78	141	102 - 197	176	110 - 296	500	306 - 904
CD107a	18	8 - 39	19	7 - 49	33	27 - 39	113	87 - 148
ADC-XD13-r								
ドナー	A		B		C		D	
	EC ₅₀	CI	EC ₅₀	CI	EC ₅₀	CI	EC ₅₀	CI
IFN γ	n.d.	n.d.	1711	1665 - 1760	1621	1268 - 2136	4534	3328 - 6483
CD107a	n.d.	n.d.	217	193 - 244	371	304 - 450	823	596 - 1198
リツキシマブ								
ドナー	A		B		C		D	
	EC ₅₀	CI	EC ₅₀	CI	EC ₅₀	CI	EC ₅₀	CI
IFN γ	21	n.d.	1532	830 - 3535	371	141 - 858	162	112 - 252
CD107a	2	#	233	171 - 321	267	151 - 481	109	38 - 353

20

30

40

【0352】

実施例24 さまざまなpAg複合体が誘導するV δ 2 γ δ T細胞活性

複数の合成ホスホ抗原（pAg）複合体をリツキシマブ（抗CD20）と結合させ、CD20陽性Raji細胞と一晩インキュベーションした後に、V δ 2 γ δ T細胞を選択的に活性化する能力を試験した。試験を行った複合体は、表1に記載した。前処理したRaji細胞をPBMCと共培養し、V δ 2 γ δ T細胞、V δ 1 γ δ T細胞、CD8陽性T細胞及びNK細胞の活性化（IFN γ 及びTNF α 産生）及び脱顆粒（CD107a）を、実施例23に記載のとおり、マルチカラーフローサイトメトリーを用いて決定した。

【0353】

50

材料及び方法

細胞結合

R a j i 細胞を、実施例 2 3 に記載のとおり培養した。9 6 ウェルプレートにおける細胞結合について、1 0 0 , 0 0 0 R a j i 細胞／ウェルを、氷冷 F A C S 緩衝液 (P B S 1 × 、 0 . 1 % v / w B S A 、 0 . 0 2 % v / v アジ化ナトリウム (N a N ₃)) で 2 回洗浄し、続いて、氷冷 F A C S 緩衝液で希釈した、さまざまな濃度の p A g 複合体、抗体 (例 . リツキシマブ) 単独、又は非結合アイソタイプ対照 p A g 複合体を 1 ウェルにつき 5 0 μ L 加えた。4 ° C で 3 0 分間のインキュベーション後、細胞を氷冷 F A C S 緩衝液で 2 回洗浄した。その後、A P C 複合体型二次 F (a b ')₂ ヤギ抗ヒト I g G (F c 断片特異的、Jackson Immuno research, 109-136-098, 1 : 6 0 0 0 又は 1 : 5 0 0) を 1 ウェルにつき 5 0 μ L 加えた。4 ° C で 3 0 分後、細胞を 2 回洗浄し、氷冷 F A C S 緩衝液 1 5 0 μ L 中に再懸濁した。蛍光強度を、FACSVerse 又は FACSsymphony (B D Biosciences) を用いるフローサイトメトリーで決定し、蛍光強度中央値 (M F I) として示した。曲線を、GraphPad Prism version 9 において、可変勾配 (4 変数) の非線形回帰によりフィッティングさせた。E C ₅₀ を、GraphPad Prism において曲線のボトムとトップの間の応答の中間の濃度 (μ g / m L) として計算した。結合実験は、2 又は 3 回実施した。

10

【 0 3 5 4 】

直接的な化合物関連細胞死の決定

R a j i 細胞を、9 6 ウェルプレート (9 0 μ L / ウェル、1 0 0 0 細胞 / ウェル) 又は 3 8 4 ウェルプレート (4 5 μ L / ウェル、5 0 0 細胞 / ウェル) における C G M (完全増殖培地、RPMI-1640 (Gibco-Life Technologies; Carlsbad, CA) 、 1 0 % 熱不活化 (H I) ウシ胎仔血清 (F B S) (Gibco-Life Technologies; Carlsbad, C A) 及び 8 0 U / m L ペニシリンーストレプトマイシン溶液 (Gibco-Life Technologies; Carlsbad, CA) を添加) に播種し、3 7 ° C 、 5 % C O ₂ の加湿インキュベーターでインキュベートした。一晩のインキュベーション後、さまざまな濃度の抗体 (例 . リツキシマブ) 、 p A g 複合体又は対照化合物 (毒素 (デュオカルマイシン型) : シクロプロピル D C 1) を 1 0 μ L 又は 5 μ L 加えた。6 日後に、Promega Corporation (Madison, WI) 製の CellTiter-Glo (商標) (C T G) ルミネセンスアッセイキットを製造元の使用説明書に従い、代謝活性を評価した。細胞生存率は、未処理細胞又はビヒクル処理細胞 (増殖培地のみ又は 1 % D M S O) の平均に 1 0 0 を掛けたものに対する生存率として表した。効力は、用量反応曲線 (D R C) のボトムを 1 0 0 % から引くことで計算した。

20

30

【 0 3 5 5 】

機能アッセイ (さまざまな p A g 複合体で誘導される γ δ T 細胞活性の決定)

機能アッセイを、実施例 2 3 に開示したように実施した。大半の実験では、抗 I F N γ B V 6 5 0 に加えて、抗 T N F α P E (B D Biosciences, San Jose, CA, USA, clone Mab11) も細胞内サイトカイン染色工程に含めた。R a j i 細胞の前処理で使用した最も高い化合物濃度は、抗体 / 複合体について 1 5 0 μ g / m L であった。E C ₅₀ を、GraphPad Prism において曲線のボトムとトップの間の応答の中間の濃度 (μ g / m L) として計算した。まとめたグラフにおいて、「 (細胞) 活性化率 (%) 」、並びに C D 1 0 7 a 、 I F N γ 及び T N F α M F I は、最も高い化合物濃度 (例 . 抗体及び p A g 複合体の場合は 1 5 0 μ g / m L 、又は、最も高い化合物のデータに技術的な問題が発生した場合は 3 0 μ g / m L 若しくは 6 μ g / m L) で前処理した R a j i 細胞と共培養した試料から決定した。

40

【 0 3 5 6 】

結果 / 結論

リツキシマブ複合体は、リツキシマブより高い効力及び作用強度で V δ 2 γ δ T 細胞を活性化する

リツキシマブ及び非結合対照と結合した複数の p A g 複合体を、約 2 の薬物抗体比で製

50

造した。それらの R a j i 細胞との結合はリツキシマブ単独（表 4）に匹敵し、非結合アイソタイプ対照は結合を示さなかった。p A g 複合体が C D 2 0 陽性 R a j i 腫瘍細胞に対し直接的に細胞毒性を示すかどうかも確認した。さまざまな濃度の、p A g 複合体、A D C - X C 4 - r、A D C - X D 4 - r、A D C - X D - 1 3 - r、A D C - X S 2 - r、A D C - X D 1 8 - r、A D C - X C 9 - r、A D C - X C 1 3 - r、A D C - X S 7 - r、A D C - X S 1 2 - r、A D C - X S 1 7 及び A D C - X S 2 2 - r、並びにそれぞれの非結合対照 p A g 複合体を、R a j i 細胞と 6 日間インキュベートし、細胞生存率を、CellTiter-Glo（登録商標）を用いて求めた。試験を行った p A g 複合体、H M B P P 及びゾレドロネートのいずれも、実質的な（> 1 5 %）直接的化合物関連細胞死を誘導しなかったが、陽性対照であるデュオカルマイシン型毒素は非常に有効であった（図 7）。したがって、他の p A g 複合体は試験を行わなかった。

10

20

30

40

50

【 0 3 5 7 】

【表 4】

表4 リツキシマブ単独と比較した、リツキシマブ pAg 複合体と Raji 細胞の結合
EC₅₀(μg/ml) 50%の活性化が達成される濃度

pAg 複合体	化合物	EC ₅₀ (μg/mL)	信頼区間
実験1及び2	リツキシマブ [†]	0.6	0.3452 - 1.118
	ADC-XC4-r	0.41	0.2405 - 0.6843
	ADC-XC4-i	>150	N/A
	ADC-XD13-r	0.76	0.4916 - 1.202
	ADC-XD13-i	>150	N/A
	ADC-XD4-r	0.42	0.2274 - 0.7149
	ADC-XD4-i	>150	N/A
	ADC-XS2-r	0.56	0.2949 - 1.053
	ADC-XS2-i	>150	N/A
	ADC-XD18-r	0.55	0.2754 - 1.188
	ADC-XD18-i	>150	N/A
	ADC-XC9-r	0.50	0.2419 - 0.966
	ADC-XC9-i	>150	N/A
	ADC-XC13-r	0.40	0.2307 - 0.6524
	ADC-XC13-i	>150	N/A
	ADC-XS7-r	0.31	0.1551 - 0.5681
	ADC-XS7-i	>150	N/A
	ADC-XS12-r	0.48	0.3316 - 0.6948
	ADC-XS12-i	>150	N/A
	ADC-XS17-r	0.59	0.392 - 0.8666
	ADC-XS17-i	>150	N/A 0
実験3及び4	リツキシマブ [†]	1.221	0.8106 - 1.877
	ADC-XD44-r	1.858	0.8823 - 5.609
	ADC-XD44-i	>150	N/A
	ADC-XD45-r	1.507	0.7492 - 3.601
	ADC-XD45-i	>150	N/A
	ADC-XD46-r	2.629	1.775 - 4.294
実験5、6及び7	ADC-XD46-i	>150	N/A
	リツキシマブ [†]	3.451	1.977 - 7.527
	ADC-XS24-r	1.494	†
	ADC-XS24-i	>150	N/A
	ADC-XS25-r	1.87	†
	ADC-XS25-i	>150	†
	ADC-XD65-r	2.321	0.9457 - 16.12
	ADC-XD65-i	>150	N/A
	ADC ₈ -XD65-r	1.888	0.8547 - 5.452
	ADC ₈ -XD65-i	>150	N/A
	ADC-XD58-r	2.485	1.216 - 7.962
	ADC-XD58-i	>150	N/A
	ADC-XD63-r	4.351	2.662 - 8.947
	ADC-XD63-i	>150	N/A

†:信頼区間は信頼できず; >150:150μg/mL まで用量依存応答なし ;N/A:該当なし

【0358】

製造した p A g 複合体を、R a j i 細胞と一晚インキュベーションし、続いて、V δ 2 γ δ T 細胞を含む P B M C と共培養を 6 時間した後に、選択的 V δ 2 γ δ T 細胞活性化を誘導する能力を試験した。V δ 2 γ δ T 細胞の脱顆粒、I F N γ 及び T N F α 産生についての用量反応曲線を作成した（図 8 における C D 1 0 7 a 産生により例示）。これらの結果は、非結合アイソタイプ対照 p A g 複合体で前処理した R a j i 細胞は、V δ 2 γ δ T 細胞を活性化する程度は小さく、E C 5 0 が信頼性をもって計算できないことが示された。リツキシマブ p A g 複合体について、E C 5 0 及び効力を計算した（表 5 ～ 1 0）。箱ひげ図は、C D 1 0 7 a、I F N γ 及び T N F α E C 5 0、効力、並びに M F I の概要

を示す（図 9）。p A g 複合体が誘導した脱顆粒は、I F N γ 産生と相関した（図 10）。T N F α 産生は、全ての実験で評価しなかったため、このサイトカインの相関グラフは作成しなかった。

【 0 3 5 9 】

図 8 ～ 図 10 及び表 5 ～ 表 10 が示した結果は、p A g 複合体で前処理した R a j i 細胞が、用量依存的に C D 1 0 7 a、I F N γ 及び T N F α 産生を誘導し、その産生が、リツキシマブによる前処理と比較した場合、A D C - X D 6 5 - r（より高い C D 1 0 7 a、I F N γ 及び T N F α の E C₅₀）、A D C - X D 4 4 - r（より高い C D 1 0 7 a 及び I F N γ の E C₅₀）、並びに A D C - X D 1 3 - r 及び A D C - X S 1 2 - r（より高い I F N γ の E C₅₀）を除く大半の p A g 複合体についてより強力（低い E C₅₀）であったことを示している。A D C - X D 6 5 - r を除く全ての p A g 複合体は、リツキシマブよりも多くの V δ 2 γ δ T 細胞を活性化（活性化率（%））し、産生されたサイトカイン及び脱顆粒の量（M F I）はより多かった。全体として、これらの結果は、p A g 複合体とプレインキュベートした R a j i 細胞が、V δ 2 γ δ T 細胞を強力かつ効果的に活性化することを示した。

10

【 0 3 6 0 】

大半の p A g 複合体は、V δ 2 γ δ T 細胞活性の誘導において強力かつ効果的であったが、A D C - X D 6 5 - r はリツキシマブより強力でも効果的でもなかった。したがって、この化合物の D A R 8 を製造した。R a j i 細胞で前処理した場合、A D C₈ - X D 6 5 - r は、C D 1 0 7 a、I F N γ 及び T N F α 産生で測定する V δ 2 γ δ T 細胞活性化の誘導において、A D C - X D 6 5 - r と比較してより強力かつ効果的であった（図 11）。したがって、D A R を増加させることは、活性が弱い p A g 複合体の活性の改善につながる。

20

【 0 3 6 1 】

30

40

50

【 表 5 】

表5 リツキシマブpAg複合体又はリツキシマブで前処理したRaji細胞によって誘導されたVδ2 γδ T 細胞におけるCD107aのEC₅₀ (μg/mL) 空のフィールドはEC₅₀を求めず(試験せず)。左端の文字はドナーを示す。同じドナーで別の実験を行った場合、「1」又は「2」を付加した。 Rmab = リツキシマブ。

	ADC-																			
	XC4-r	XD13-r	XD4-r	XS2-r	XD18-r	XC9-r	XC13-r	XS7-r	XS12-r	XS17-r	XD24-r	XS22-r	XS25-r	XD65-r	XD44-r	XD45-r	XD46-r	XD58-r	XD63-r	Rmab
A1	0.15	0.82	0.11																	0.11
B	0.01		0.02																	0.002
C	0.01	0.22	0.02																	0.23
D1	0.03	0.37	0.03																	0.27
F			0.07					0.05	0.04		0.01									0.24
D2			0.10	0.08	0.03	0.04	0.04													0.83
G		0.04	0.06					0.04	0.16	0.04	0.02									+
H			0.94						0.47	0.41										0.33
I			0.12		0.05			0.07				0.11	0.07							3.68
J					0.06			0.08			0.09	0.10	0.07							+
K			0.21		0.17															1.18
E			0.13		0.07															0.38
L			0.14		0.05						0.10									3.39
M			0.01		0.01				0.02	0.01										+
O					0.12									5.76						0.18
A2					0.05									+						0.36
Q					0.05										0.67	0.01	0.02			0.26
R					0.10											0.02	0.02			0.39
S					0.02	0.01	0.02					0.05	0.02					0.01	0.01	0.82
V				0.03	0.03	0.06	0.05					0.08	0.03					0.03	0.06	0.12
W				0.15	0.09															2.58
Y					0.03										0.36	0.02	0.01			0.43

† = EC₅₀は信頼性をもって求めることができなかった。

表6 リツキシマブpAg複合体又はリツキシマブで前処理したRaji細胞によって誘導されたVδ2 γδ T 細胞におけるIFNγのEC₅₀ (μg/mL) 空のフィールドはEC₅₀ を求めず(試験せず)。左端の文字はドナーを示す。同じドナーで別の実験を行った場合、「1」又は「2」を付加した。 Rmab = リツキシマブ。

	ADC-														Rmab
	XC4-r	XD13-r	XD4-r	XS2-r	XD18-r	XC9-r	XC13-r	XS7-r	XS12-r	XS17-r	XD24-r	XS22-r	XS25-r	XD63-r	
A1	0.43	4.53	0.50												0.16
B	0.04		0.06												0.02
C	0.09	1.71	0.14												1.53
D1	0.12	1.62	0.18												0.37
F			0.48					0.40	0.16		0.08				0.18
D2			0.86	1.20	0.26	0.31	0.26								0.46
G		0.57	0.22					0.24	0.76	0.18	0.30				†
H			4.41						4.91	7.78					0.24
I			0.30		0.14			0.25				0.41	0.21		7.80
J					0.64			0.72				1.57	0.50		†
K			2.55		2.93						3.08				2.26
E			0.61		0.41										0.62
L			0.69		0.37						0.67				6.26
M			0.33		0.12				1.31	0.31					†
O					1.25									39.26	0.26
A2					0.24									†	0.28
Q					0.18									1.69	0.26
R					2.24									0.07	0.48
S					0.05	0.05	0.05							0.20	0.26
V				0.09	0.07	0.18	0.12					0.06	0.06	0.03	11.47
W				0.46	0.31							0.21	0.07	0.08	0.13
Y					0.17										3.54
														1.07	0.76

† = EC₅₀ は信頼性をもって求めることができなかった。

【 表 7 】

表7 リツキシマブpAg複合体又はリツキシマブで前処理したRaji細胞によって誘導されたVδ2 γδ T 細胞におけるTNFαのEC₅₀ (μg/mL) 空のフィールドはEC₅₀ を求めず(試験せず)。左端の文字はドナーを示す。同じドナーで別の実験を行った場合、「1」又は「2」を付加した。
Rmab = リツキシマブ。

	ADC-																			
	XC4-r	XD13-r	XD4-r	XS2-r	XD18-r	XC9-r	XC13-r	XS7-r	XS12-r	XS17-r	XD24-r	XS22-r	XS25-r	XD65-r	XD44-r	XD45-r	XD46-r	XD58-r	XD63-r	Rmab
A1																				
B																				
C																				
D1																				
F			0.04					0.03	0.04		0.005									0.05
D2			0.05	0.05	0.02	0.02	0.03													0.33
G		0.01	0.01					0.000	0.01	0.01	0.003									†
H			0.36						0.72	0.26										0.15
I			0.08		0.04			0.06				0.09	0.06							3.37
J					0.07			0.08				0.10	0.05							†
K			0.19		0.14						0.09									0.59
E			0.10		0.06															0.29
L			0.07		0.03						0.09									1.39
M			0.01		0.01				0.03	0.01										†
O					0.10									1.45						0.12
A2					0.04									†						0.06
Q					0.03										0.19	0.02	0.02			0.20
R					0.21											0.04	0.03			0.16
S					0.02	0.01	0.01					0.04	0.01					0.01	0.01	0.25
V				0.02	0.03	0.06	0.06					0.06	0.03					0.03	0.05	0.06
W				0.07	0.05															2.35
Y					0.02										0.12	0.02	0.01			0.34

† = EC₅₀ は信頼性をもって求めることができなかった。

表8 リツキシマブpAg複合体又はリツキシマブで前処理したRaji細胞によって誘導されたCD107a 陽性Vδ2 γδ T 細胞の割合(%)
空のフィールドは試験せず。左端の文字はドナーを示す。同じドナーで別の実験を行った場合、「1」又は「2」を付加した。
Rmab = リツキシマブ。

	ADC-																			
	XC4-r	XD13-r	XD4-r	XS2-r	XD18-r	XC9-r	XC13-r	XS7-r	XS12-r	XS17-r	XD24-r	XS22-r	XS25-r	XD65-r	XD44-r	XD45-r	XD46-r	XD58-r	XD63-r	Rmab
A1	58	45	51																	15
B	84		77																	32
C		77	82																	12
D1	72	69	72																	10
F			80					82	74		81									36
D2			78	77	78	78	77													72
G		72	76					80	66	73	74									65
H			78						52	68										68
I			75		76			77				73	82							82
J					76			74				74	83							65
K			59		64						68									61
E			82		80															26
L			68		72						68									20
M			84		79				76	81										††
O					75									38						20
A2					60									31						38
Q					78										80	78	80			58
R					42											37	33			30
S					36	23	34					40	35					38	41	5
V				49	42	53	52					56	49					56	56	9
W				49	49															60
Y					66										80	72	81			9

†† = 技術的な問題により除外。

【表 9】

表9 リツキシマブpAg複合体又はリツキシマブで前処理したRaji細胞によって誘導されたIFN γ 陽性V δ 2 $\gamma\delta$ T 細胞の割合(%)
空のフィールドは試験せず。左端の文字はドナーを示す。同じドナーで別の実験を行った場合、「1」又は「2」を付加した。
Rmab = リツキシマブ。

	ADC-																			
	XC4-r	XD13-r	XD4-r	XS2-r	XD18-r	XC9-r	XC13-r	XS7-r	XS12-r	XS17-r	XD24-r	XS22-r	XS25-r	XD65-r	XD44-r	XD45-r	XD46-r	XD58-r	XD63-r	Rmab
A1	49	34	43																	7
B	77		68																	14
C		65	72																	3
D1	71	59	70																	4
F			82					72	61		72									14
D2			73	74	89	74	76													42
G		65	67					73	51	58	64									36
H			69						44	49										43
I			70		65			68				63	72							63
J					63			59			58	71								32
K			51		53															42
E			77		72															9
L			52		57						52									7
M			90		83				79	82										††
O					55									14						5
A2					53									20						17
Q					72										74	69	71			31
R					30											30	6			12
S					38	20	26					22	23					33	37	6
V				47	40	48	40					52	35					48	45	11
W				45	45															34
Y					64										76	65	71			3

†† = 技術的な問題により除外。

【表 10】

表10 リツキシマブpAg複合体又はリツキシマブで前処理したRaji細胞によって誘導されたTNFα陽性Vδ2γδT細胞の割合(%)
空のフィールドは試験せず。左端の文字はドナーを示す。同じドナーで別の実験を行った場合、「1」又は「2」を付加した。
Rmab = リツキシマブ。

	ADC-																		
	XC4-r	XD13-r	XD4-r	XS2-r	XD18-r	XC9-r	XC13-r	XS7-r	XS12-r	XS17-r	XD24-r	XS22-r	XS25-r	XD65-r	XD44-r	XD45-r	XD46-r	XD58-r	XD63-r
A1																			
B																			
C																			
D1																			
F			85					87	84		86								43
D2			86	86	85	86	86												76
G		81	81					83	76	79	82								73
H			85						79	77									76
I			81		84			82				83	85						85
J					81			76			82	79	85						62
K			70		79														75
E			85		85														33
L			70		78						76								32
M			98		95				94	94									††
O					82									51					28
A2					74									53					52
Q					87										84	85	86		63
R					54											51	26		35
S					49	30	51					45	33				51	49	12
V				56	54	63	54					65	52					64	15
W				47	55														59
Y					87										91	83	87		12

†† = 技術的な問題により除外。

10

20

30

40

【0367】

実施例25 pAg ADC-XD18-rで前処理したVδ2γδT細胞によるRaji細胞の効果的殺傷

Vδ2γδT細胞は、リツキシマブのような治療用抗体でオプソニン化された腫瘍細胞を、δT細胞で発現したCD16（古典的な抗体依存性細胞傷害、ADCC）によって、溶解すると考えられる（Sabrina Braza et al., 2011, Haematologica, 96(3), 400-407）。しかし、全てのγδT細胞がCD16を発現するとは限らない（Sabrina Braza et al, 前掲）。Vδ2γδT細胞は、高レベルのpAgを有する腫瘍細胞を強力に殺傷することもできる。これらのpAgは、細胞内でBTN3A1／BTN2A1受容

50

体複合体の立体構造の変化を誘導し、 $\gamma\delta$ T細胞を活性化し、標的細胞を殺傷する (Rigau et al., 前掲)。この例では、腫瘍ターゲティング抗体が p A g を腫瘍細胞へ送達する媒体として使用でき、 $V\delta 2\gamma\delta$ T細胞による特異的な腫瘍細胞殺傷につながるかどうかを確認した。このため、R a j i細胞をリツキシマブ p A g 複合体で前処理し、 $V\delta 2\gamma\delta$ T細胞と1時間共培養した後に、細胞毒性を調べた。

【0368】

材料及び方法

$\gamma\delta$ T細胞増殖

多数の $V\delta 2\gamma\delta$ T細胞を得るために、標準プロトコルを用いて、IL-2 及びゾレドロネートで $V\delta 2\gamma\delta$ T細胞を増殖させた (Kondo et al., 2008, Cytotherapy, 10(8):842-56. doi: 10.1080/14653240802419328)。健康なドナーのバフィーコートから単離した凍結 P B M C (Sanquin, Nijmegen, The Netherlands) を解凍し、1000 国際単位 (IU) の組換えヒト (rh) IL-2 (Miltenyi, 130-097-746) と 5 μ M のゾレドロネート (Merck) に加えた、CTS (商標) OpTmizer (商標) T細胞増殖無血清培地 (CTS 培地、Gibco, A3705001; 基本培地及び濃縮培地は、製造元の使用説明書に従って使用前にあらかじめ混合し、10% 熱不活化 (HI) ウシ胎仔血清 (FBS) (Gibco)、80 U/mL ペニシリンーストレプトマイシン溶液 (Gibco) 及びグルタマックス (Gibco) を添加) 10 mL が入った T25 に、1250 万細胞を播種し、37°C、5% CO₂ の加湿インキュベーターで3日間培養した。3日後、細胞を T75 フラスコへ移し、1000 IU の rh IL-2 を添加した CTS 培地を加えた。8日目、細胞を T175 フラスコへ移し、1000 IU の rh IL-2 を添加した CTS 培地を加えた。13日又は14日後、細胞の純度と表現型をフローサイトメトリーにより評価した。 $V\delta 2\gamma\delta$ T細胞の純度は、使用した9人の健康なドナーの生細胞に対して、67.3、81.7、82.8、84.5、87、90.6、91.2、92及び95.4%であった。14日後、増殖した $V\delta 2\gamma\delta$ T細胞で殺傷アッセイを行った。このため、細胞をペレット化し、完全増殖培地 (CGM; RPMI-1640 (Gibco)、10% 熱不活化 (HI) ウシ胎仔血清 (FBS) (Gibco) 及び80 U/mL のペニシリンーストレプトマイシン溶液 (Gibco) を添加) で200万細胞/mLに再懸濁した。

【0369】

増殖させた $V\delta 2\gamma\delta$ T細胞の表現型及び純度を決定するために、500,000細胞/ウェルをU底96ウェルプレートに加え、氷冷FACS緩衝液 (PBS 1×、0.1% v/w BSA、0.02% v/v アジ化ナトリウム (NaN₃)) で2回洗浄し、細胞ペレットを、氷冷FACS緩衝液で希釈した抗体カクテル：抗 $V\delta 2$ B V 7 1 1 (clone B6, Biolegend, 1:300)、抗 CD 5 6 AlexaFluor647 (clone B159, BD Bioscience, 1:200)、抗 CD 1 6 F I T C (clone 3G8, BD Biosciences, 1:50)、生死判別染色 7 8 0 (ThermoFisher Scientific, 1:1000)、100 μ L中に再懸濁した。暗所、氷上で30分間インキュベーションした後、細胞を氷冷FACS緩衝液で2回洗浄し、続いて、300×gで3分間遠心分離し、上清を捨てた。ペレットを、氷冷FACS緩衝液150 μ L中に再懸濁し、BD FACSymphony A3細胞アナライザー (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) で分析した。FlowJo V10.7により更に分析した。 $V\delta 2\gamma\delta$ T細胞は、生きている $V\delta 2+$ 細胞として定義した。

【0370】

殺傷アッセイ

R a j i細胞を、実施例23に記載のとおり培養した。

【0371】

殺傷アッセイについて、R a j i細胞を、まず、PBS (Gibco, 2326202) で2回洗浄し、その後、暗所、37°Cで、10 μ M細胞増殖色素eFluor 450 (ThermoFisher Scientific, 65-0842-85) によって10分間標識した。4~5倍量のCGMを氷上で5分間かけて添加した後、細胞を、10% HI-FBSを加えたRPMI-1640で3回洗浄し、CGMで200,000細胞/mLに希釈し、50 μ L/ウェルを96ウェ

ルプレート (Greiner Bio-one, 650185, U-bottom) に播種した。その後、CGMで希釈した、さまざまな濃度のリツキシマブ-pAg複合体、リツキシマブ、又は、0.1 mM若しくは0.013 mMのHMBPPを、1ウェルにつき50 μ L加え、37°C、5%CO₂の加湿インキュベーターで16時間インキュベートした。使用したHMBPPの濃度が、最大効力を誘導することが示された点に留意されたい(データは示さず)。16時間後、1ウェルにつきCGMを100 μ L加え、細胞を300×gの遠心分離でペレット化し、上清を除去し、100,000個の増殖したV δ 2 γ δ T細胞(培養14日目)を各ウェルへ1ウェルにつき50 μ L加えた。プレートを、37°C、5%CO₂の加湿インキュベーターで、1時間インキュベートした。その後、細胞を、300×gで3分間の遠心分離によりペレット化し、上清を除去した。細胞を、抗CD19 FITC (Miltenyi 130-113-645)を加えた生死判別染色780 (BD Biosciences, 1000×氷冷FACS緩衝液で希釈)50 μ L中に再懸濁し、暗所、氷上で30分間インキュベートし、細胞を、氷冷FACS緩衝液150 μ Lの添加及び300×gで3分間の遠心分離により、洗浄した。その後、細胞ペレットを、BD cytofix溶液(554655)50 μ Lに再懸濁し、暗所、氷上で15分間のインキュベーションした後、氷冷FACS緩衝液150 μ Lで2回洗浄し、遠心分離(300×g、3分)して上清を除去した。最後に、細胞を氷冷FACS緩衝液150 μ L中に再懸濁し、BD FACSymphony A3細胞アナライザー (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)で分析した。Raji細胞を、eFluor450色素を用いてゲーティングし、死んだRaji細胞の割合を、生死判別染色で決定した。FlowJo V10.7により更に分析した。

10

20

効力 = 最高濃度の化合物で前処理した死んだRaji細胞の割合(%) - 化合物を添加しないで前処理した死んだRaji細胞の割合(%)

【0372】

結果／結論

Raji細胞をリツキシマブで前処理した場合、大半のドナーに由来する増殖させたV δ 2 γ δ T細胞によって用量依存的な殺傷が検出された(図12)。リツキシマブ効力は変動し、予測のとおり、V δ 2 γ δ T細胞上のCD16の発現と相関し、ドナー間で大きく変動した(図12B)。リツキシマブによる前処理が誘導した効力は、HMBPP前処理と比較して、常に低かった。V δ 2 γ δ T細胞を、ADC-XD18-rで前処理したRaji細胞に曝露した場合、用量依存的なRaji細胞の殺傷が観察され、その効力は、HMBPPで前処理したRaji細胞と同様の範囲で、リツキシマブよりも高かった(図12A及び図12D)。非結合アイソタイプpAg複合体の活性は低く、V δ 2 γ δ T細胞活性化についての信頼できるEC₅₀の計算ができなかった(図12A及び図12C)。全体として、これらの結果は、リツキシマブpAg複合体が、TAAに特異的な様式で、強力かつ効果的に、腫瘍細胞を、V δ 2 γ δ T細胞による破壊の標的にできることを示している。

30

【0373】

実施例26 さまざまなB細胞悪性腫瘍に由来したCD20陽性細胞株は、ADC-XD18-rとのブレインキュベーション後、V δ 2 γ δ T細胞を強力かつ効果的に活性化する

40

ADC-XD18-rの活性を、CD20の発現レベルが異なるB細胞悪性腫瘍(CLL、NHL)を代表する複数のCD20陽性細胞株を用いて試験した(表11)。これについて、そのB細胞株を、最初に16時間、化合物で前処理し、その後、PBMと共培養した。V δ 2 γ δ T細胞の活性化を、脱顆粒のレベル(CD107a産生)を決定することにより評価した。

【0374】

材料及び方法

機能アッセイ

Raji細胞を実施例23に記載のとおり培養した。ヒト腫瘍細胞株MEC-1、HG-3、SU-DHL-4及びSU-DHL-8細胞は、German collection of Mic

50

roorganisms and cell cultures GmbH (DSMZ, Leibniz Institute, Germany) から得た。HG-3 及び SU-DHL-4 細胞を、CGM 中で培養した。SU-DHL-8 を、20% 熱不活化 (HI) ウシ胎仔血清 (FBS) (Gibco) 及び 80 U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (Lonza) を追加した RPMI-1640 (Lonza) 中で培養した。MEC-1 細胞を、10% 熱不活化 (HI) ウシ胎仔血清 (FBS) (Gibco- Life Technologies; Carlsbad, CA) 及び 80 U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (Lonza Group Ltd, Basel Switzerland) を追加した IMDM (12-722F, IMDM, Lonza) 中で培養した。全ての細胞を、5% CO₂ の加湿インキュベーターで 37℃ に維持し、週 2 回、継代した。

【0375】

機能アッセイの材料及び方法については、脱顆粒レベルのみを求め、IFN γ 発現レベルを求めなかったことを除いて、実施例 23 を参照されたい。したがって、実験の 3 日目、細胞を BD Perm/wash とインキュベーションする前に、BD FACSymphony A3 細胞アナライザー (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) で直接的に分析した。Raji 細胞の前処理に用いた最も高い化合物濃度は、抗体/ADC について 150 μ g/mL、HMBPP について 0.1 mM であった。EC₅₀ を、GraphPad Prism において曲線のボトムとトップの間の応答の中間の濃度 (μ g/mL) として計算した。まとめたグラフにおいて、「V δ 2 γ δ T 細胞活性化率 (%)」は、最も高い化合物濃度 (例、抗体及び ADC で 150 μ g/mL) で前処理した Raji 細胞と共培養した試料から決定した。

【0376】

CD20 発現レベルの決定

CD20 受容体の発現レベルを、ヒトキャリブレーターキット (Biocytex, CP010) を用いて決定した。標的細胞 (96 ウェルプレート中に 100,000 細胞/ウェル) を、氷冷 FACS 緩衝液 (PBS + 0.1% v/w BSA + 0.02% v/v アジ化ナトリウム (NaN₃)) で 2 回洗浄し、続いて、氷冷 FACS 緩衝液で希釈した、さまざまな濃度の リツキシマブ (抗 CD20) を 1 ウェルにつき 50 μ L 加えた。4℃ で 30 分間のインキュベーション後、細胞を氷冷 FACS 緩衝液で 2 回洗浄し、FACS 緩衝液 50 μ L 中に再懸濁した。その後、ヒトキャリブレーターキットからのビーズ 50 μ L を、96 ウェルプレートの別個のウェルに加えた。APC 複合体型二次 F(ab')₂ ヤギ抗ヒト IgG (Fc 断片特異的、Jackson ImmunoResearch、1:3000、最終 1:6000) の 2 倍濃縮ストックを製造し、50 μ L/ウェルで細胞及びビーズに加えた。暗所、4℃ で 30 分間のインキュベーション後、細胞及びビーズを、氷冷 FACS 緩衝液中で 2 回洗浄し、氷冷 FACS 緩衝液 150 μ L 中に再懸濁した。蛍光強度を、FACSymphony (BD Biosciences) を用いるフローサイトメトリーにより決定し、受容体の絶対数を、製造元の使用説明書に従って決定した。実験は 2 回実施した。

【0377】

結果/結論

この実施例に用いられた B 細胞株は、CD20 をさまざまなレベルで発現した (表 11)。

【0378】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表11 B細胞悪性腫瘍(CLL、NHL)を代表する複数のCD20陽性細胞株におけるCD20発現のレベル、及びCD107aを読み出しとして使用した、ADC-XD18-r又はリツキシマブで前処理した細胞株との共培養後のVδ2γδT細胞のCD107aのEC₅₀(μg/mL)

細胞株	B-細胞腫瘍	リンパ腫の種類	CD20 発現レベル (sABC/細胞)	CD107a EC ₅₀ (μg/mL)			
				ADC-XD18-r		リツキシマブ	
				ドナー Q	ドナー AH	ドナー Q	ドナー AH
Raji	NHL	バーキット	176680	0.100	0.094	0.479	†
HG-3	CLL	N/A	168919	0.059	0.061	0.177	†
MEC-1	CLL	N/A	170964	0.031	0.039	0.414	3.646
SU-DHL-4	NHL	GCB	326856	0.021	0.042	†	2.638
SU-DHL-8	NHL	GCB	7205	0.186	0.228	†	†

† = 不完全な曲線飽和(EC₅₀ の計算は不可能)

【0379】

試験を行った全てのB細胞株は、HMBPP前処理がVδ2γδT細胞の脱顆粒を誘導したため(図13A)、Vδ2γδT細胞を活性化する能力を有した。B細胞株をさまざまな濃度のADC-XD18-rで前処理した場合、それらは全て、リツキシマブ自体より高い効力(活性化率(%))及び作用強度で、Vδ2γδT細胞の強力な活性化を誘導した(図13B~13F、表11)。非結合対照ADCは、Vδ2γδT細胞活性化を、低い/無視できる作用強度及び効力で誘導した。これらの結果は、CD20の発現レベルが低い/高い複数のB細胞悪性腫瘍とプレインキュベートした場合に、ADC-XD18-rはVδ2γδT細胞を活性化したが、非結合pAg複合体での前処理は、Vδ2γδT細胞を活性化できなかったことを示した。

【0380】

実施例27 トラスツズマブ-ADCで前処理したHER2^{high}細胞はVδ2γδT細胞活性化を誘導する

リツキシマブを超えるpAg複合体の活性を示すために、リンカー-薬物XD18をトラスツズマブと複合化して、ADC-XD18-tを製造した。HER2陽性細胞株(表12に記載)のこれらの新規のADCでの前処理及びPBMCとの共インキュベーションにおいて、Vδ2γδT細胞活性を決定した。

【0381】

材料及び方法

機能アッセイ

機能アッセイを、実施例23に開示したように実施した。抗IFNγ BV650に加えて、抗TNFα PE(BD Biosciences, San Jose, CA, USA, clone Mab11)も、大半の実験において、細胞内サイトカイン染色工程に含めた。Raji細胞の前処理で使用した最も高い化合物濃度は、抗体/ADCについて150μg/mL、HMBPPについて0.1mMであった。EC₅₀を、GraphPad Prismにおいて曲線のボトムとトップの間の応答の中間の濃度(μg/mL)として計算した。まとめたグラフにおいて、「Vδ2γδT細胞活性化率(%)」は、最も高い化合物濃度(例. 抗体及びpAg複合体で150μg/mL)で前処理したRaji細胞と共培養した試料から決定した。

【0382】

ヒト腫瘍細胞株SK-BR-3、BT-474、SK-OV-3は、American Type Culture Collection(ATCC、Rockville, MD)から、HCT-116はGerman collection of Microorganisms and cell cultures GmbH(DSMZ、Leibniz Institute, Germany)から入手した。BT-474(ATCC; ATCC-HTB-20)をCGM中で培養し、5%CO₂の加湿インキュベーターにおいて37℃で維持し、週2回、継代した。SK-BR-3、SK-OV-3及びHCT-116を、10%v/w FB

S H I 及び 8 0 U / m L ペニシリンーストレプトマイシン溶液 (Lonza) を含有する M c C o y s 5 A 培地 (Lonza) 中で維持した。

【 0 3 8 3 】

HER2 発現レベルの決定

トラスツズマブを用いて、細胞上の HER2 レベルを決定するように調整した実施例 2 5 を参照されたい。実験は 2 回実施し、平均 s A B C を報告する。

【 0 3 8 4 】

結果／結論

これらの細胞株は、高い (BT-474、SK-BR-3 及び SK-OV-3)、又は低い (HCT-116) レベルの HER2 を発現した (表 1 2)。

【 0 3 8 5 】

【表 1 2】

表 12 選択した細胞株における HER2 の発現レベル

細胞株	腫瘍	HER2 発現レベル (sABC/細胞)
BT-474	乳がん	3,300,000
SK-BR-3	乳がん	3,000,000
SK-OV-3	卵巣がん	2,400,000
HCT-116	結腸直腸がん	21,000

【 0 3 8 6 】

4 つの異なる細胞株を、まず、ADC-XD18-t、ADC-XD18-i 又はトラスツズマブとプレインキュベートし、その後、Vδ2γδT 細胞を含む P B M C と共培養し、免疫細胞の活性化を決定した。代表するドナーからの結果を図 1 4 に示し、全てのドナーの作用強度 (E C 5 0) 及び効力を図 1 5 にまとめた。トラスツズマブとプレインキュベートした BT-474、SK-BR-3 及び SK-OV-3 細胞は、Vδ2γδT 細胞の活性化を、おそらくトラスツズマブ-FcγR 相互作用により、用量依存的様式で誘導した。トラスツズマブで前処理した HCT-116 細胞は、HCT-116 細胞の細胞表面上の少数の HER2 受容体のために、Vδ2γδT 細胞を顕著に活性化できなかったと考えられる (表 1 2)。BT-474、SK-BR-3 及び SK-OV-3 細胞とプレインキュベートした場合、ADC-XD18-t は、脱顆粒 (CD107a)、IFNγ 及び TNFα 産生を、トラスツズマブそれ自体より多い Vδ2γδT 細胞において誘導した。HCT-116 細胞は、ADC-XD18-t とプレインキュベートした場合、Vδ2γδT 細胞を活性化できなかった。これは、HMBPP で前処理した HCT-116 が Vδ2γδT 細胞を活性化できたため (図 1 6)、Vδ2γδT 細胞を活性化する HCT-116 細胞の能力の欠如のためではなかった。BT-474、SK-BR-3、SK-OV-3 及び HCT-116 細胞の非結合アイソタイプ対照-ADC による前処理では、Vδ2γδT 細胞の活性化は無視できるか、その程度は小さかった (図 1 4 に例示)。トラスツズマブで前処理した BT-474、SK-BR-3 及び SK-OV-3 は、おそらく NK 細胞で発現することがよく知られている FcγR を介して、NK 細胞も活性化した。トラスツズマブ p A g 複合体で前処理した BT-474、SK-BR-3 及び SK-OV-3 細胞も、NK 細胞を、類似した程度で活性化でき (図 1 7)、トラスツズマブにより誘導されるエフェクター機能が、p A g 複合体の付加後も損なわれないことを示した。HCT-116 細胞は、トラスツズマブ又はトラスツズマブ-ADC とプレインキュベーションした後、NK 細胞を顕著に活性化せず、免疫細胞を活性化するには、HER2 の発現レベルは、この細胞株では低すぎることを再び示された。全体として、これらの結果は、p A g 複合体が、複数の悪性腫瘍を標的とするさまざまな腫瘍ターゲティング抗体と結合して、Vδ2γδT 細胞活性化を誘導できることを示している。

【 0 3 8 7 】

実施例 2 8 高い p A g 薬抗体比 (D A R) は、腫瘍関連抗原 (T A A) の発現が低い細

胞に対する $V\delta 2\gamma\delta T$ 細胞の活性を向上させる

DARを増加させることが、特にTAAが少数の細胞株において、 $V\delta 2\gamma\delta T$ 細胞を強力かつ効果的に活性化するかどうかを調べた。

【0388】

材料及び方法

$V\delta 2\gamma\delta T$ 細胞活性化アッセイ

機能アッセイ

Raji細胞及びMOLM-13細胞を抗体／ADC／対照で16時間又は40時間前処理することを出いて、実施例23に開示したように機能アッセイを実施した（表13）。さらに、CD107a脱顆粒のレベルのみを決定し、IFN γ 発現のレベルは決定しなかった。したがって、実験の3日目、細胞を、BD Perm/washとインキュベーション前に、BD FACSymphony A3細胞アナライザー（BD Biosciences, San Jose, CA, USA）で直接分析した。Raji細胞及びMOLM-13細胞の前処理に用いた最も高い化合物濃度は、抗体／ADCで150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、HMBPPで0.1 mMであった。EC₅₀を、GraphPad Prismにおいて曲線のボトムとトップの間の応答の中間の濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）として計算した。まとめたグラフにおいて、「 $V\delta 2\gamma\delta T$ 細胞活性化率（%）」は、最も高い化合物濃度（例．抗体及びADCで150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で前処理したRaji細胞又はMOLM-13細胞と共培養した試料から決定した。

【0389】

【表13】

表13 PBMCと共培養する前にRaji細胞又はMOLM-13細胞との前処理に使用する化合物の概要

細胞株	pAg 複合体(詳細は表1を参照)
MOLM-13	ADC-XD18-CD12341C
MOLM-13	ADC10-XD18-CD12341C
MOLM-13	ADC20-XD59-CD12341C
MOLM-13	ADC-XD18-i41C
MOLM-13	ADC8-XD18-i
MOLM-13	ADC16-XD59-i
MOLM-13	抗 CD123 41C MoAb
Raji	ADC-XD18-r
Raji	ADC8-XD18-r
Raji	ADC16-XD59-r
Raji	ADC-XD18-i
Raji	ADC8-XD18-i
Raji	ADC16-XD59-i
Raji	リツキシマブ*

【0390】

CD123発現レベルの決定

CD123受容体の発現レベルを、Qifiキット（DAKO, agilent, USA）を用いて決定した。細胞（96ウェルプレート中に100,000細胞／ウェル）を、氷冷FACS緩衝液（PBS+0.1%v/w BSA+0.02%v/v アジ化ナトリウム（NaN₃））で2回洗浄し、続いて、氷冷FACS緩衝液で希釈したさまざまな濃度の抗CD123（clone 6H6, ThermoFisher Scientific）を1ウェルにつき50 μL 加えた。4℃で30分間のインキュベーション後、細胞を氷冷FACS緩衝液で2回洗浄し、氷冷FACS緩衝液中のAPC複合体型二次F(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG（Fc断片特異的、Jackson ImmunoResearch、最終1:6000）50 μL に再懸濁した。二次抗体の希釈液を、Qifiキットからのペレット化ビーズにも加えた。二次抗体とのインキュベーションを、暗所、氷上、4℃で30分間実施し、その後、細胞及びビーズを、氷冷FACS

S緩衝液で2回洗浄し、氷冷FACS緩衝液150 µL中に再懸濁した。蛍光強度を、FACSVerse又はFACSymphony (BD Biosciences) を用いるフローサイトメトリーにより決定し、受容体の絶対数を、製造元の使用説明書に従って決定した。

【0391】

MOLM-13細胞及びRaji細胞培養

Raji細胞を、実施例23に記載のとおり培養した。CD123陽性急性単球性白血病細胞株MOLM-13 (DSMZ、ACC 554, the German collection of Microorganisms and cell cultures GmbH (Leibniz Institute, Germany)) をCGM中で培養し、5%CO₂の加湿インキュベーターにおいて37℃で維持し、週2回、継代した。

10

【0392】

結果／結論

MOLM-13細胞株は、CD123の発現が低レベルであった(表14)。Raji細胞のCD20発現レベルを表12に示す。

【0393】

【表14】

表14 MOLM-13細胞におけるCD123の発現レベル

細胞株	腫瘍	CD123 発現レベル (sABC/細胞)
MOLM-13	急性単球性白血病	9664

20

【0394】

MOLM-13細胞とRaji細胞のいずれも、HMBPPでの前処理後、Vδ2γδT細胞を活性化できた(図18A)。製造したpAg複合体及び対照化合物を、MOLM-13細胞又はRaji細胞と一晚インキュベーションし、続いて、Vδ2γδT細胞を含むPBMCと6時間共培養した後に、選択的Vδ2γδT細胞活性化を誘導する能力を試験した。Vδ2γδT細胞の脱顆粒についての用量反応曲線を作成した(図18B～18E)。これらの結果は、非結合アイソタイプ対照pAg複合体で前処理した細胞がVδ2γδT細胞を活性化する程度が小さかったことを示した。したがって、EC₅₀値が信頼性をもって計算できなかった。リツキシマブ／抗CD123_{41c} MoAb pAg複合体について、EC₅₀、効力及びMFIを計算した(図18F～H)。

30

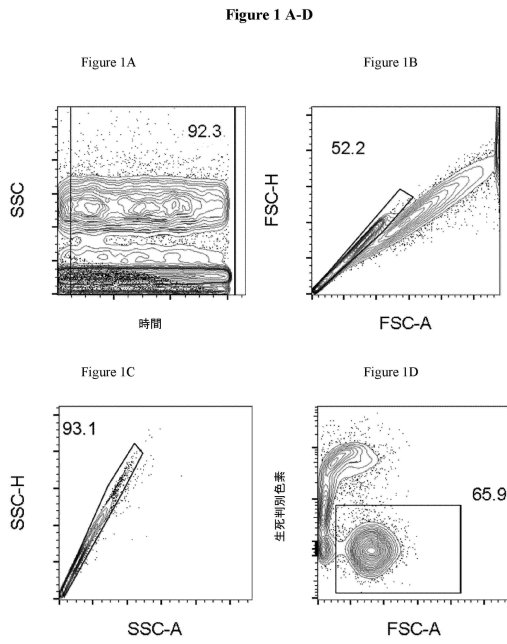
【0395】

抗CD123_{41c} MoAbで前処理したMOLM-13細胞をPBMCと共培養した場合、Vδ2γδT細胞の活性化は、4人のドナーのうち3人で測定されなかった。ADC-XD18-CD123_{41c}で前処理したMOLM-13細胞をPBMCと共培養した場合、活性化されたVδ2γδT細胞の割合は増加した。加えて、細胞あたりの産生されたCD107aの量は、mAb単独と比較してpAg複合体でより高かった(図18H)。DARを増加させることは、CD107a陽性Vδ2γδT細胞の割合のさらなる増加をもたらした(図18G、CD123_{41c} ADC)。高いDARは、抗CD20に基づくADCの効力を向上させず(図4G)、これは、DAR2で既に最大活性に達していたためと考えられる。抗CD20 ADCの作用強度は高いDARで向上したが、非結合アイソタイプ対照の作用強度も向上した。全体として、これらの結果は、抗CD123 pAg複合体が、mAb単独と比較して、Vδ2γδT細胞を良く活性化できること、及び、高いDARが、抗CD123 pAg複合体の効力を向上させることを示している。

40

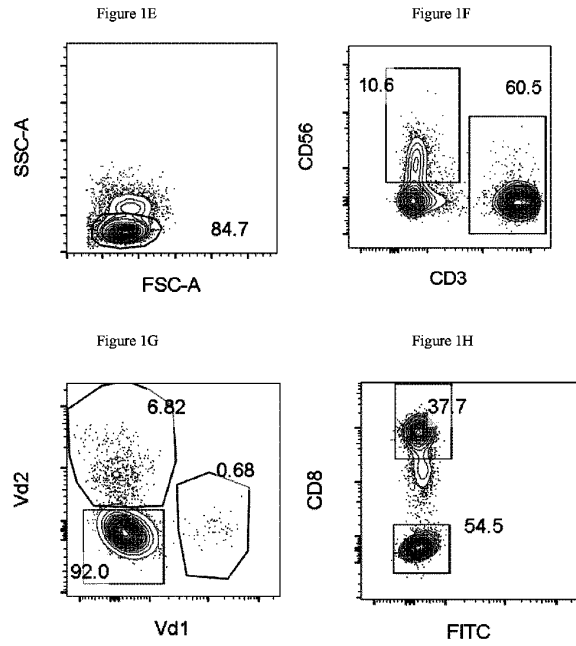
【図面】

【図 1 A - D】



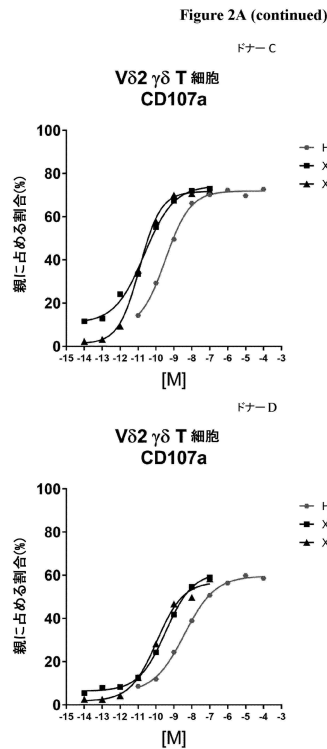
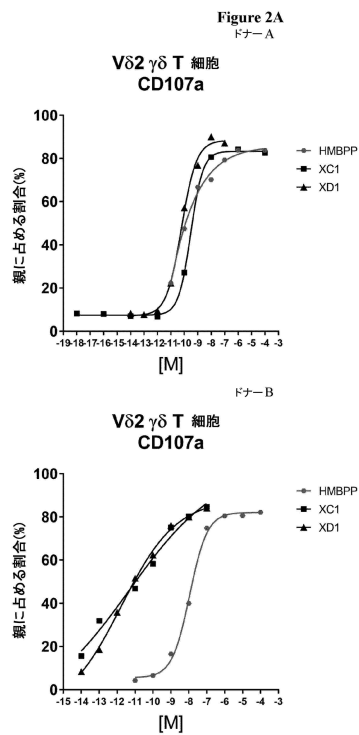
【図 1 E - H】

Figure 1 E-H



【図 2 A】

【図 2 A - 1】



10

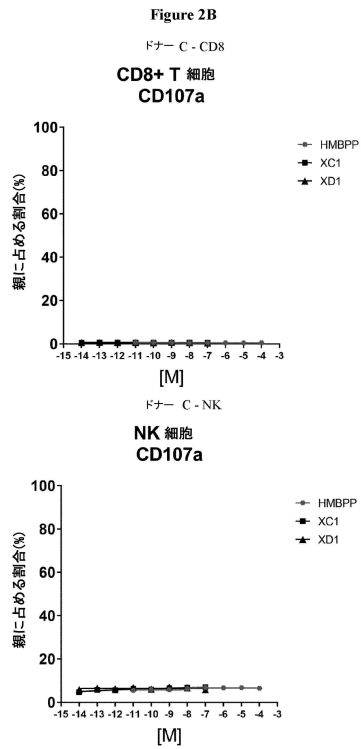
20

30

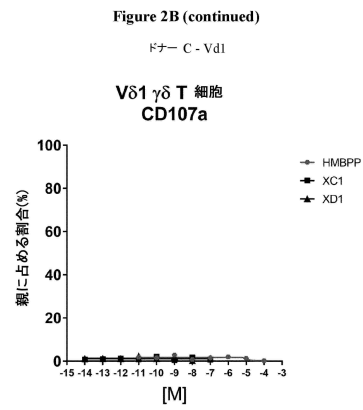
40

50

【図 2 B】



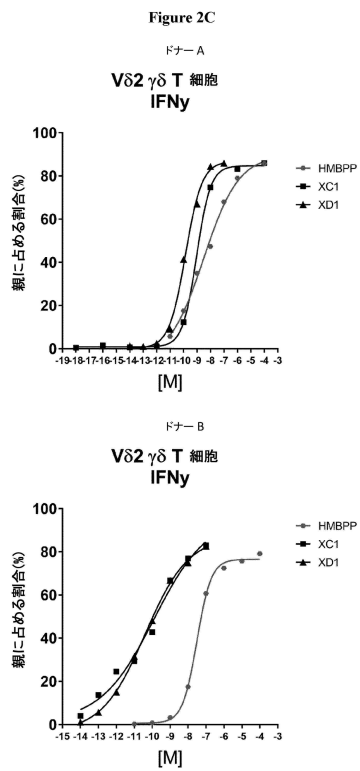
【図 2 B - 1】



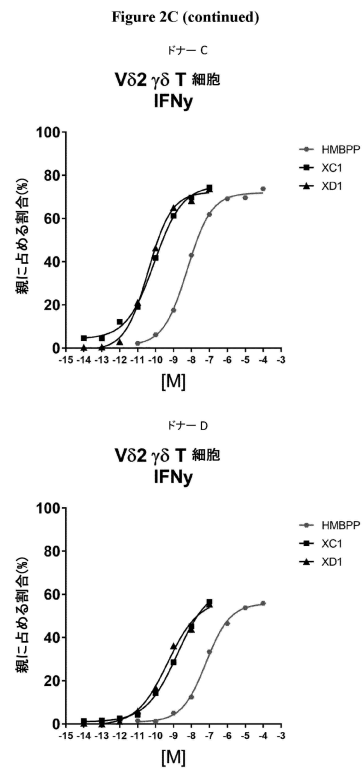
10

20

【図 2 C】



【図 2 C - 1】

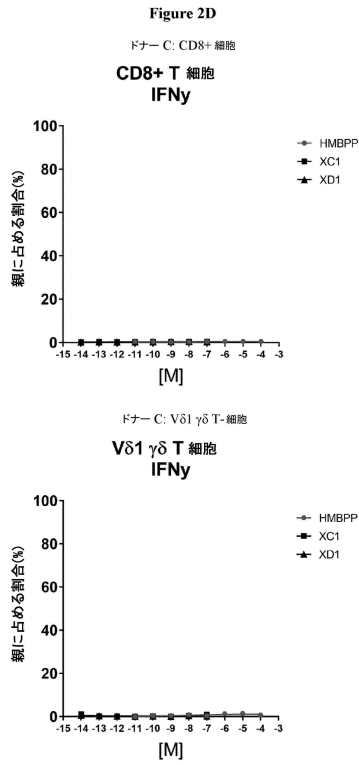


30

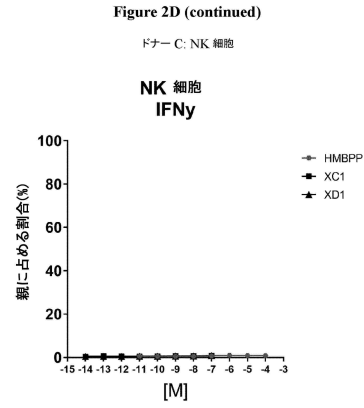
40

50

【図 2 D】



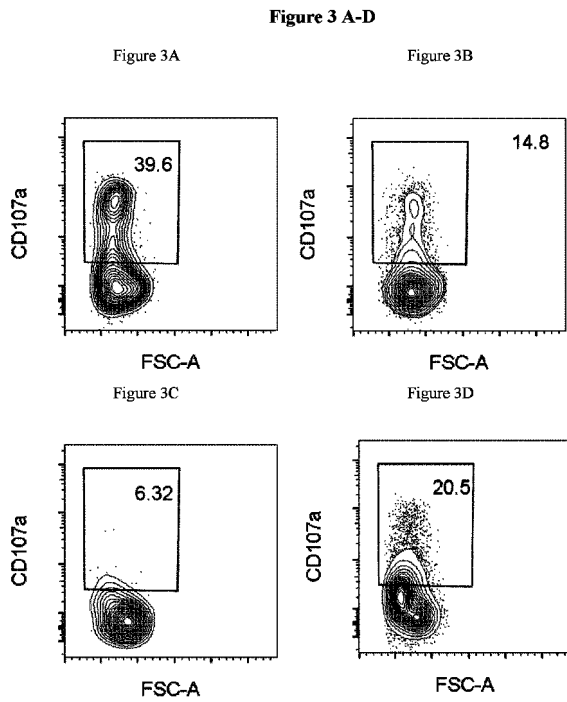
【図 2 D - 1】



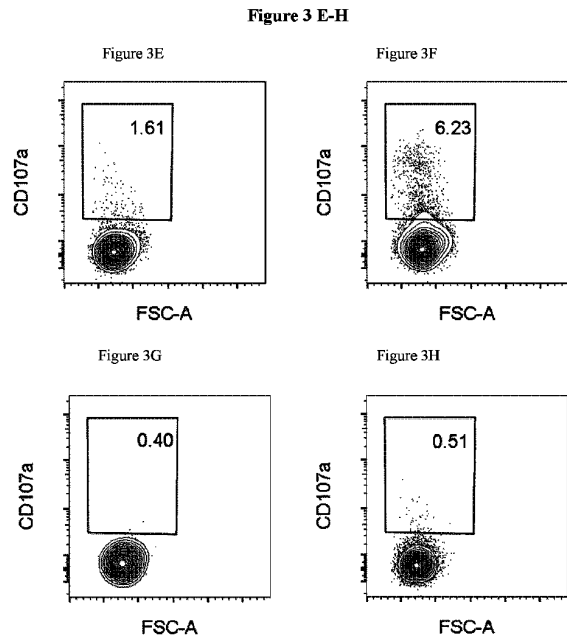
10

20

【図 3 A - D】



【図 3 E - H】



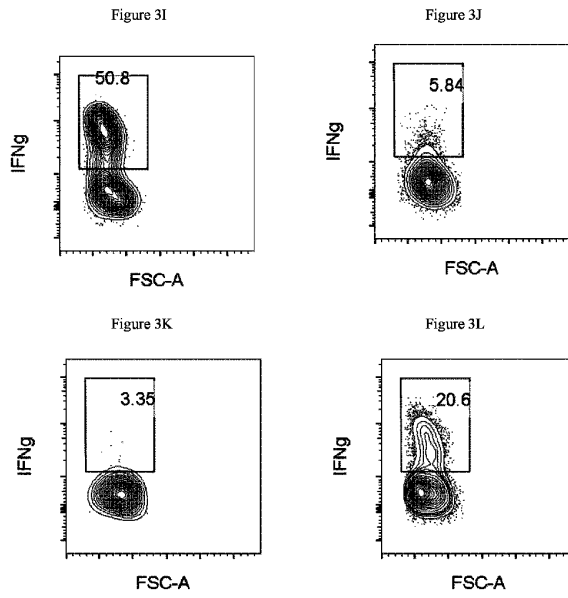
30

40

50

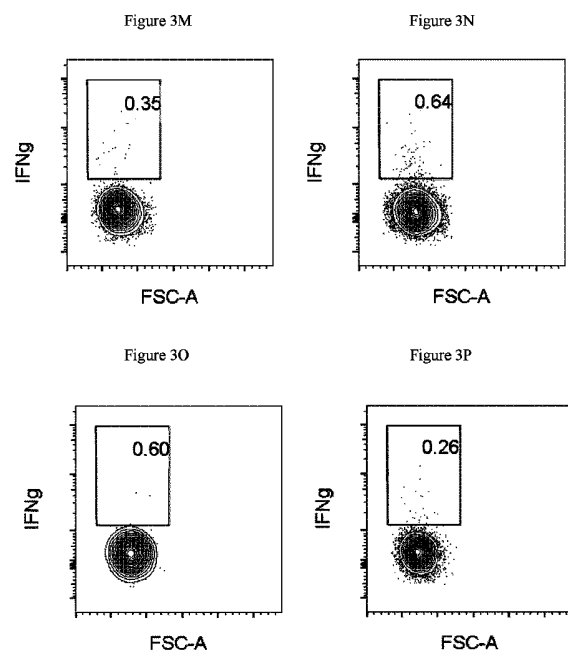
【図 3 I - L】

Figure 3 I-L



【図 3 M - P】

Figure 3 M-P

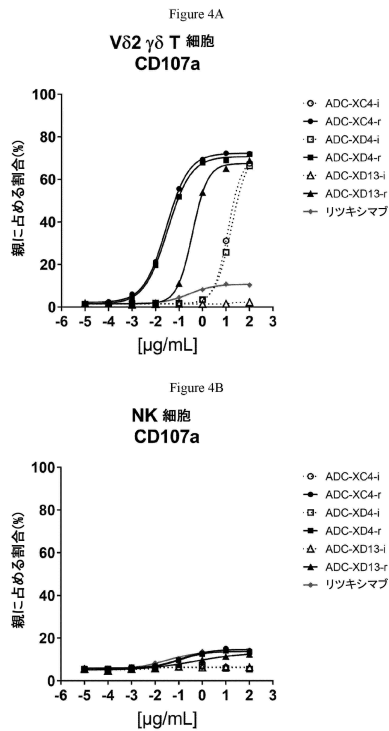


10

20

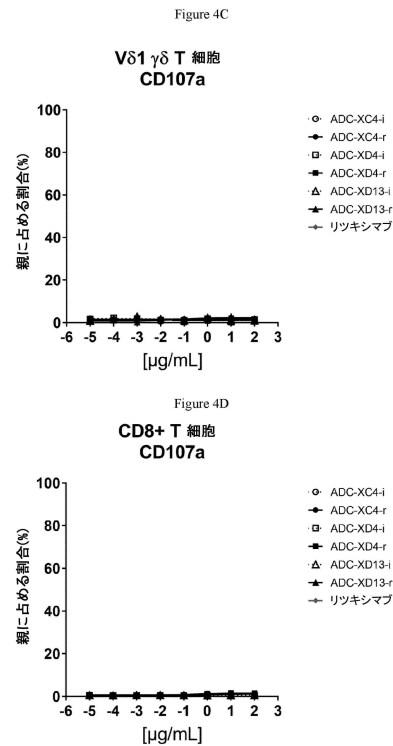
【図 4 A - B】

Figure 4 A-B



【図 4 C - D】

Figure 4 C-D

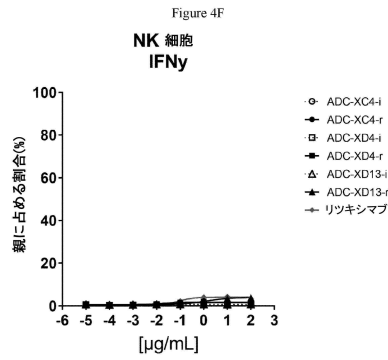
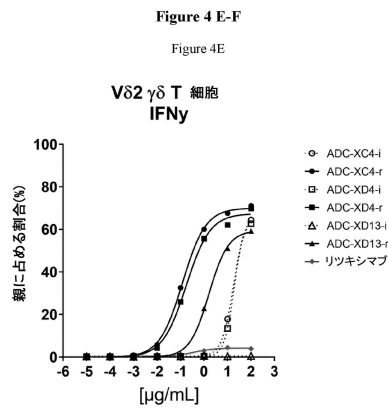


30

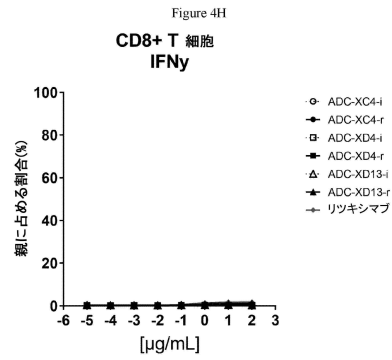
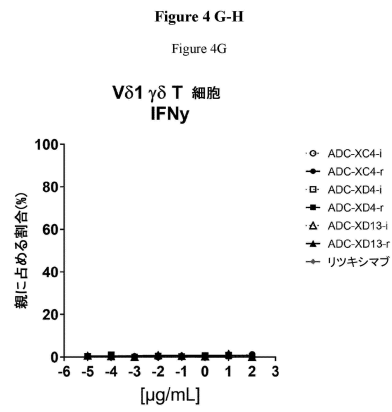
40

50

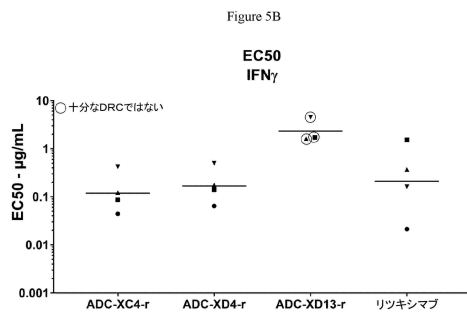
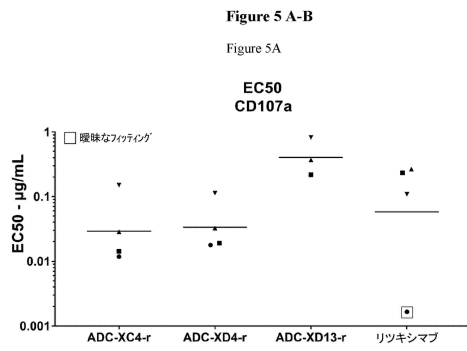
【図 4 E - F】



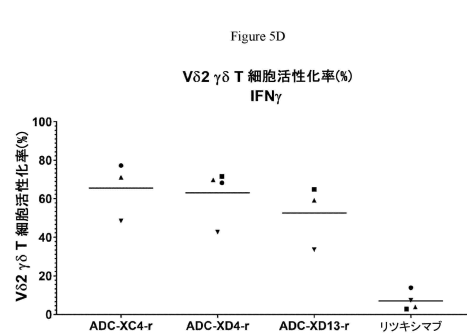
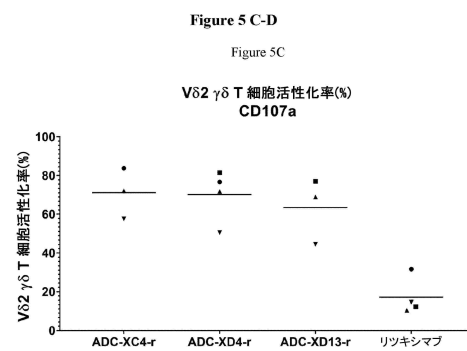
【図 4 G - H】



【図 5 A - B】



【図 5 C - D】



10

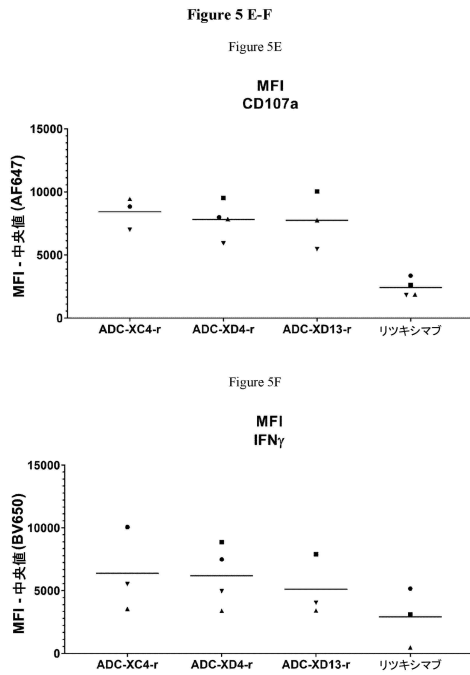
20

30

40

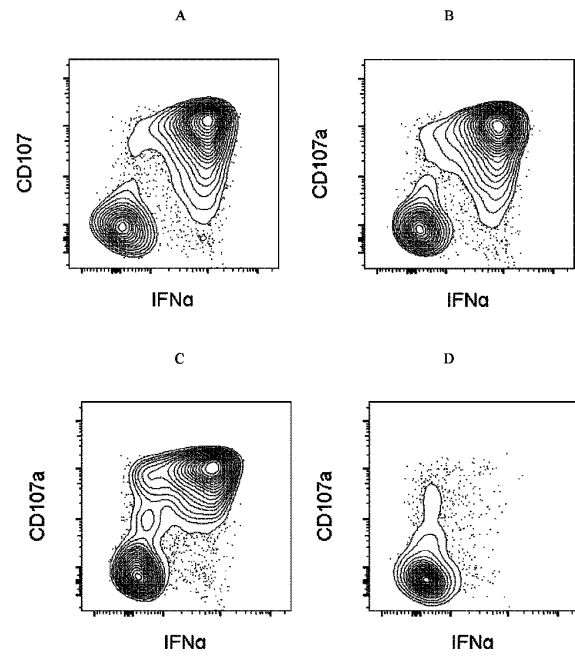
50

【図 5 E - F】



【図 6 A - D】

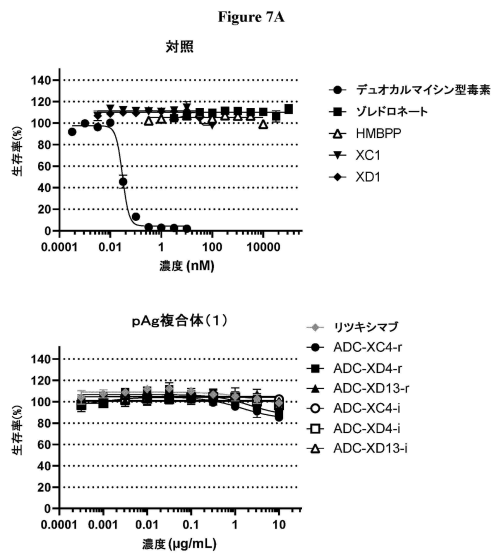
Figure 6 A-D



10

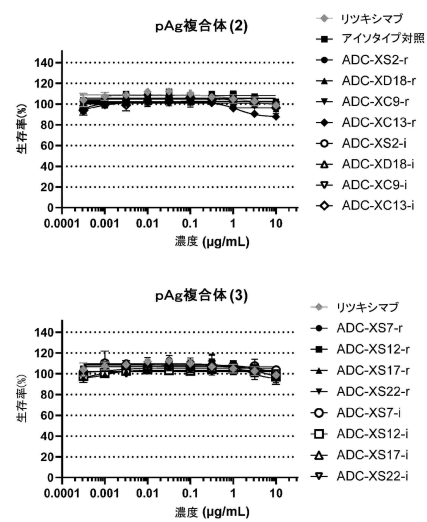
20

【図 7 A】



【図 7 A - 1】

Figure 7A (continued)

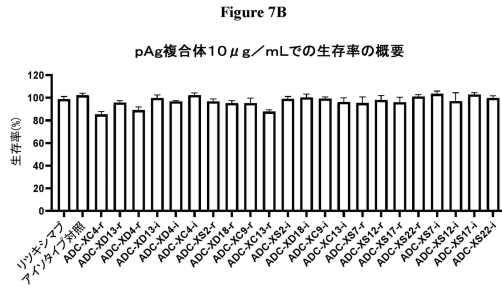


30

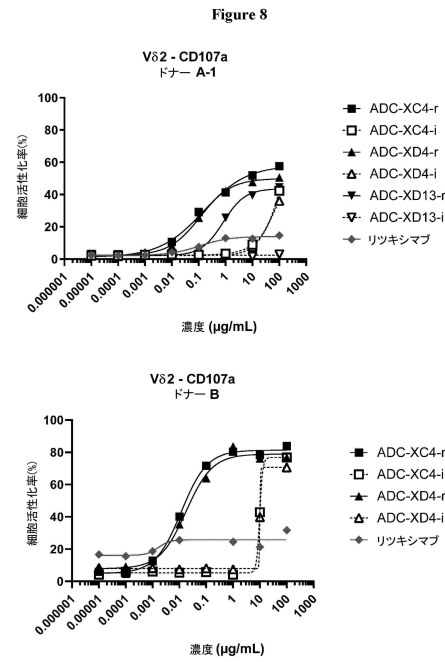
40

50

【図 7 B】



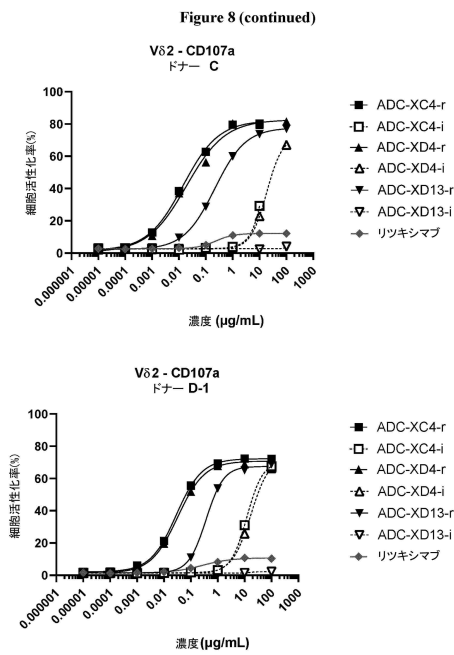
【図 8】



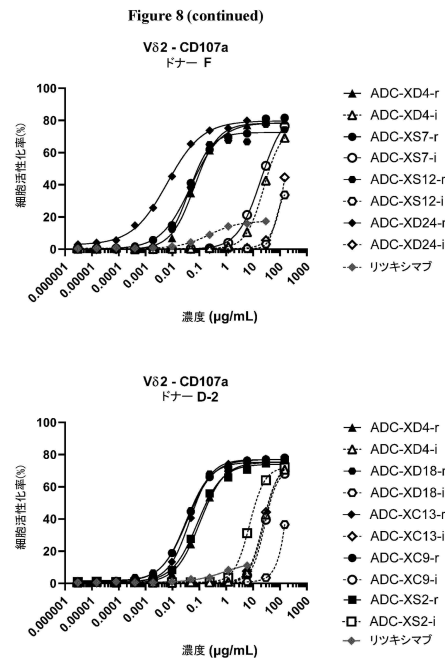
10

20

【図 8 - 1】



【図 8 - 2】

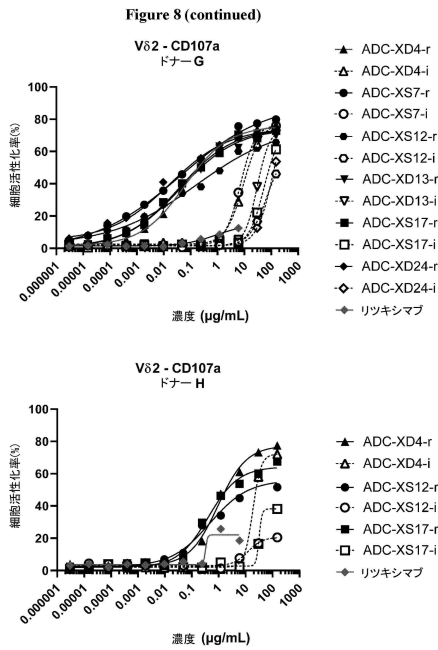


30

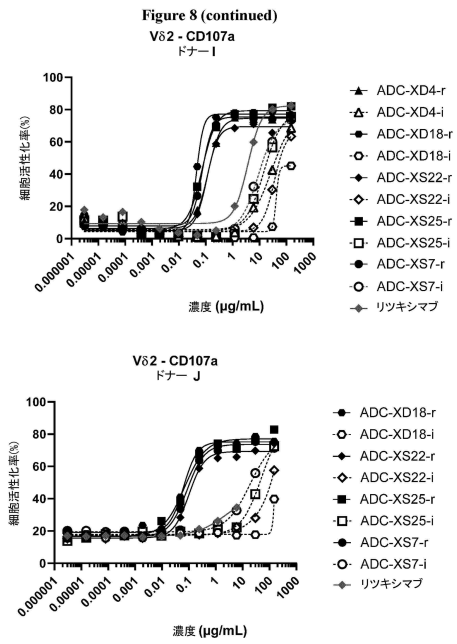
40

50

【図 8 - 3】



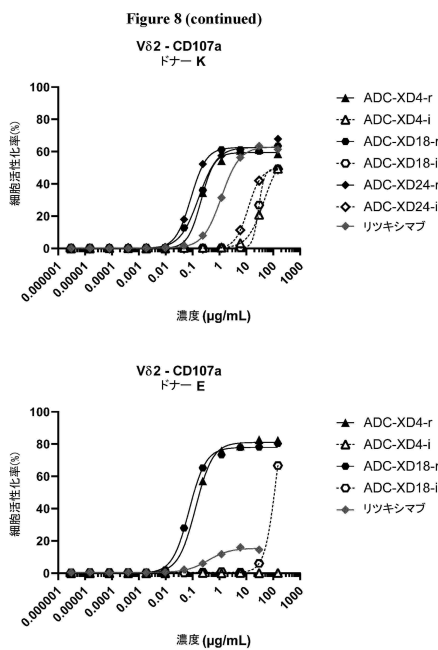
【図 8 - 4】



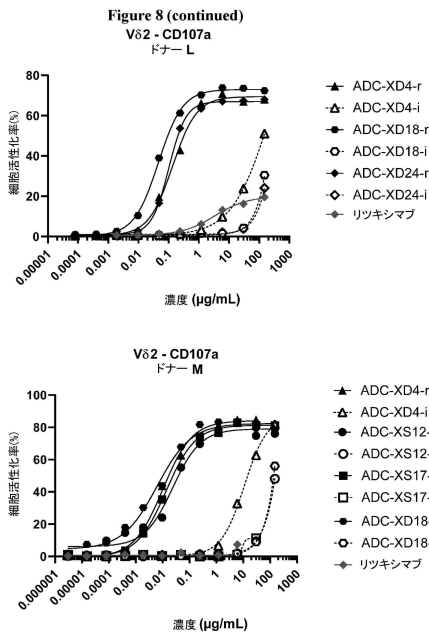
10

20

【図 8 - 5】



【図 8 - 6】

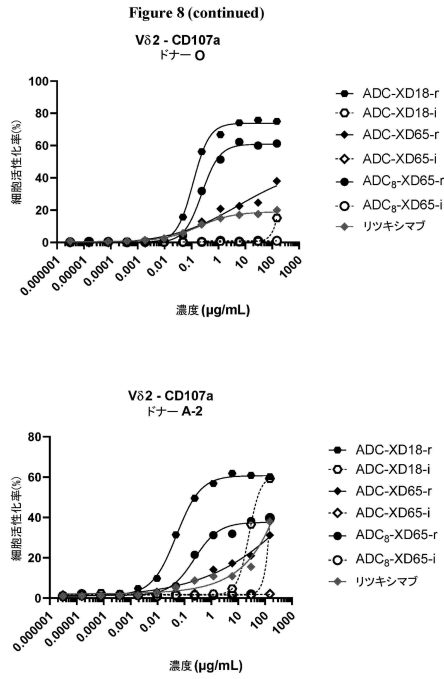


30

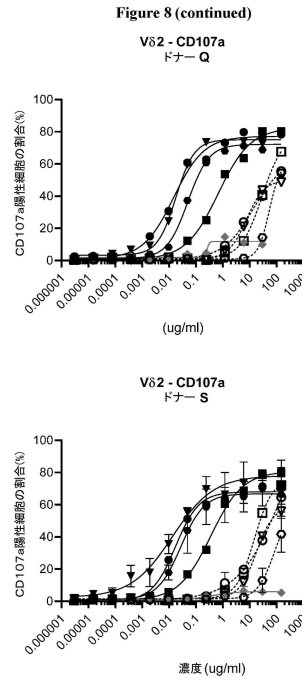
40

50

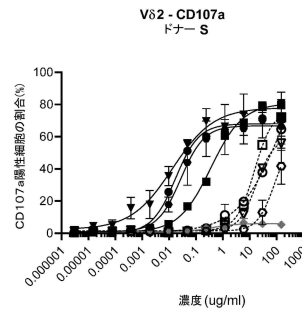
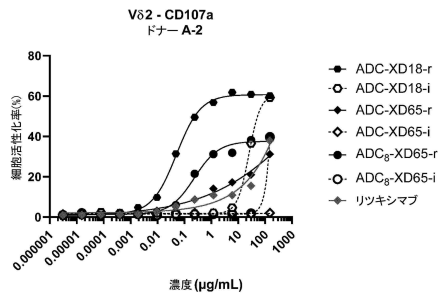
【図 8 - 7】



【図 8 - 8】

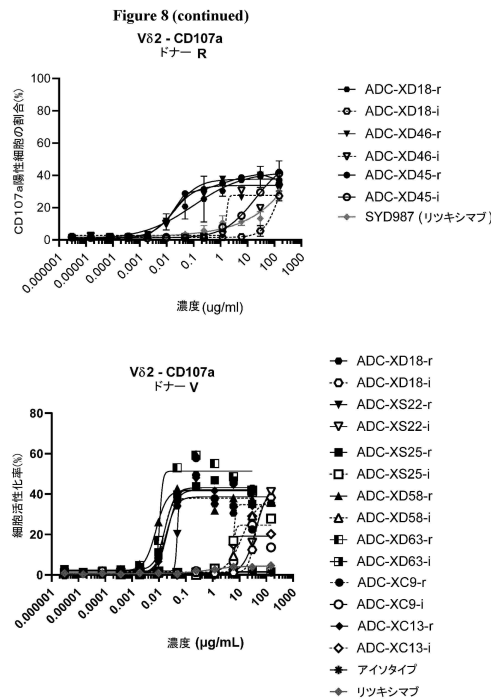


10

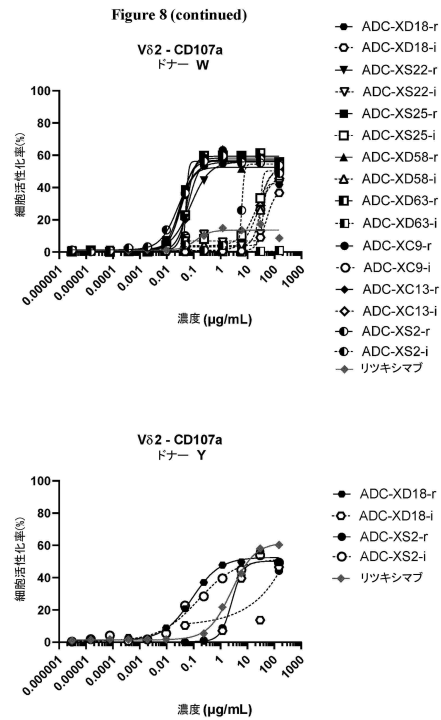


20

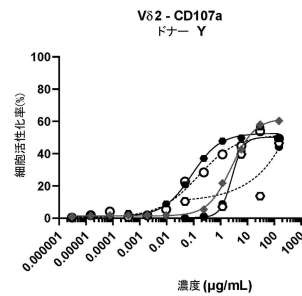
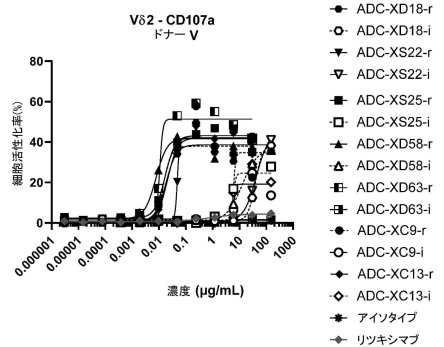
【図 8 - 9】



【図 8 - 10】



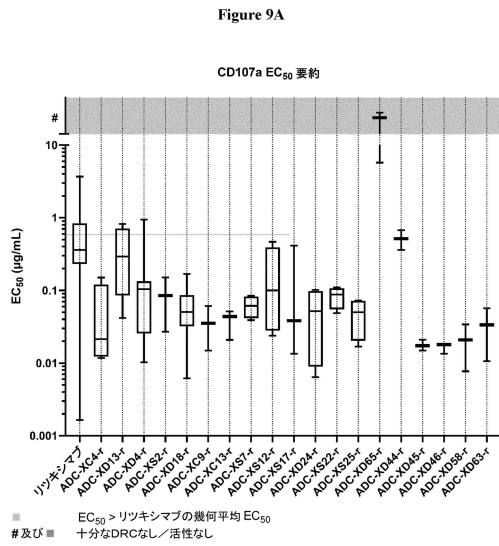
30



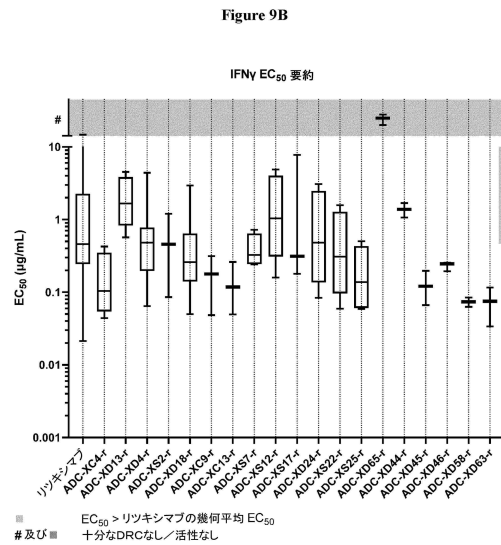
40

50

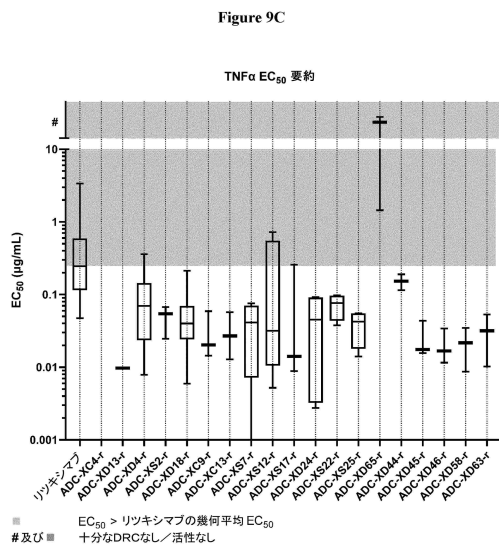
【図 9 A】



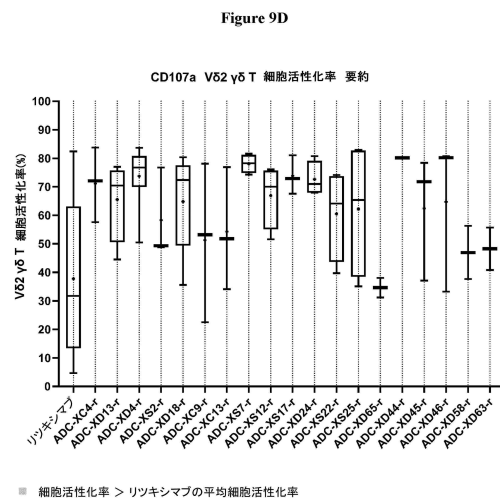
【図 9 B】



【図 9 C】



【図 9 D】



10

20

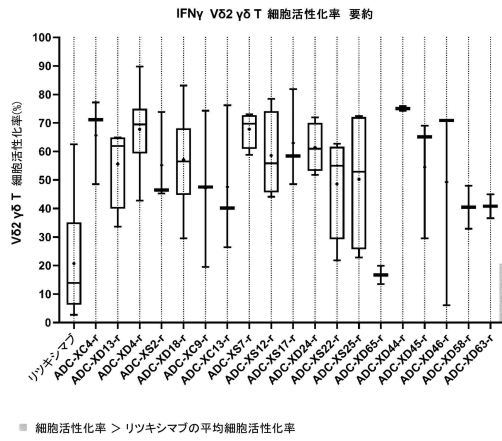
30

40

50

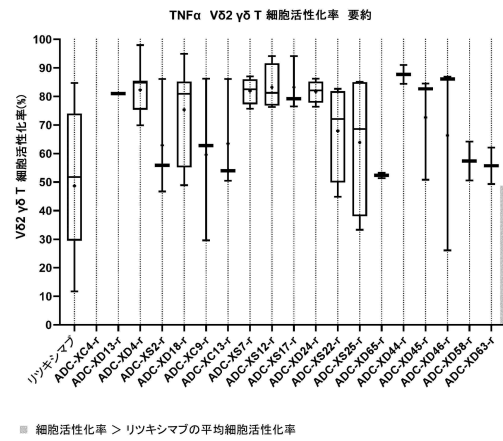
【図 9 E】

Figure 9E



【図 9 F】

Figure 9F

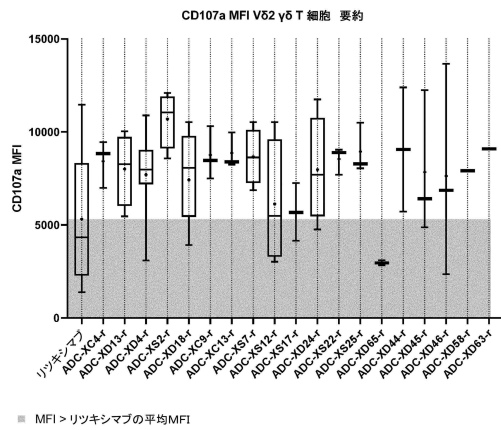


10

20

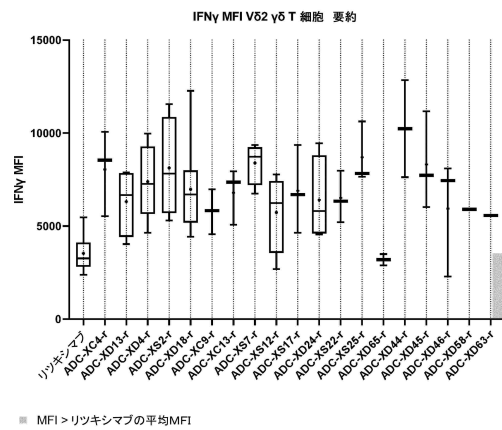
【図 9 G】

Figure 9G



【図 9 H】

Figure 9H



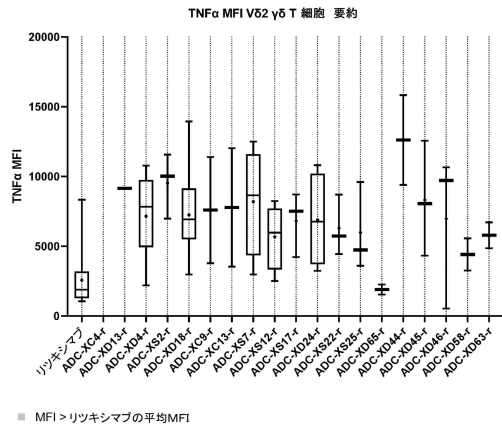
30

40

50

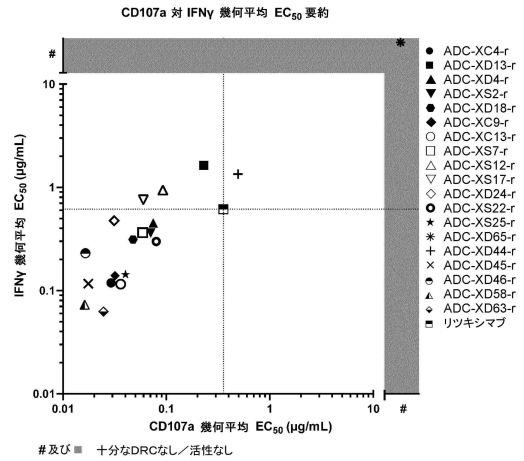
【図 9 I】

Figure 9I



【図 10 A】

Figure 10A

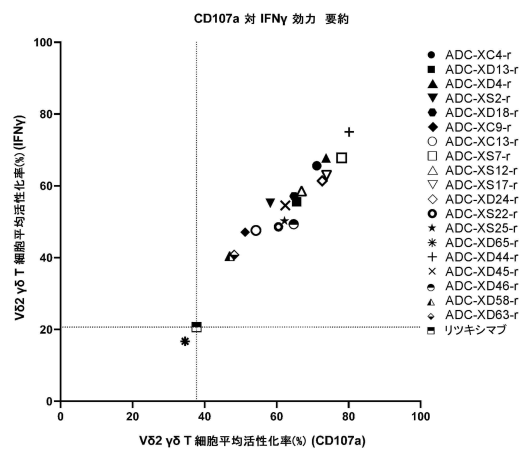


10

20

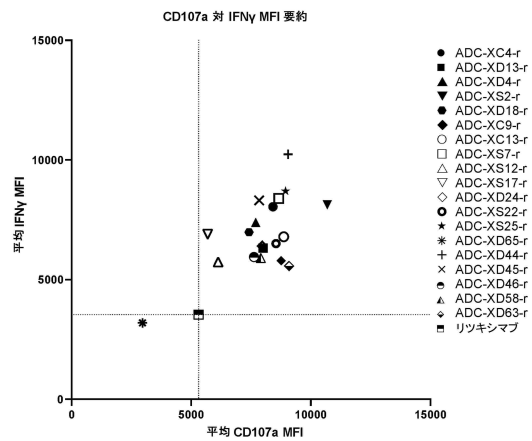
【図 10 B】

Figure 10B



【図 10 C】

Figure 10C

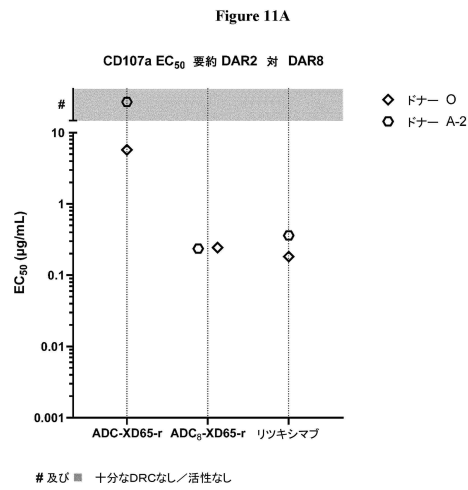


30

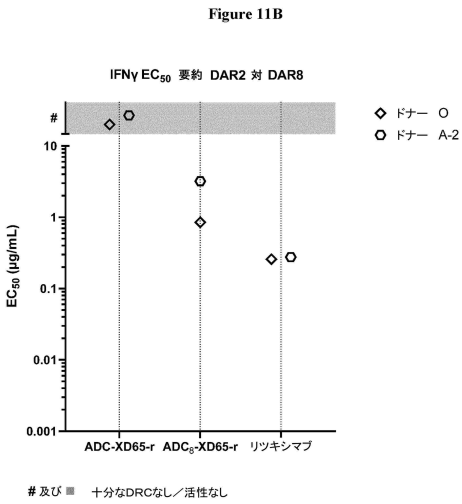
40

50

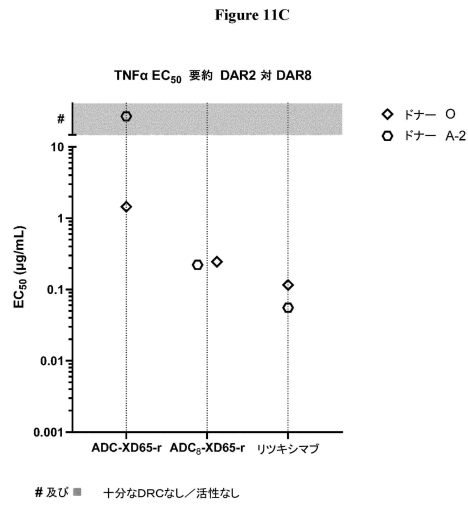
【図 1 1 A】



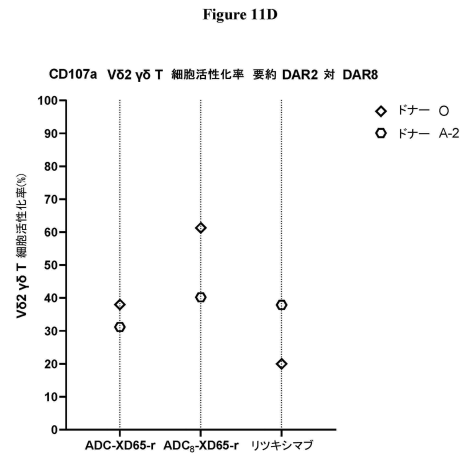
【図 1 1 B】



【図 1 1 C】



【図 1 1 D】



10

20

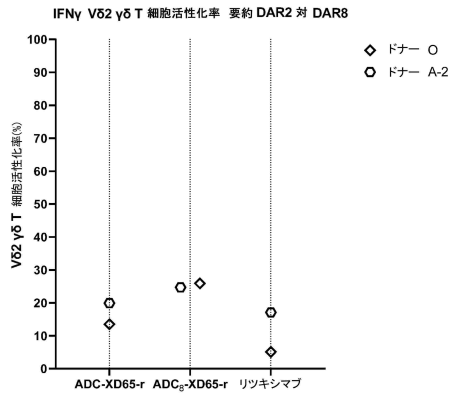
30

40

50

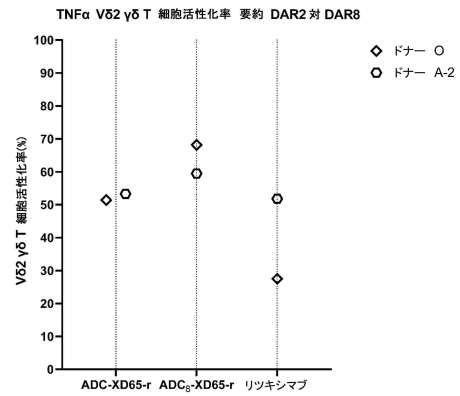
【図 1 1 E】

Figure 11E



【図 1 1 F】

Figure 11F

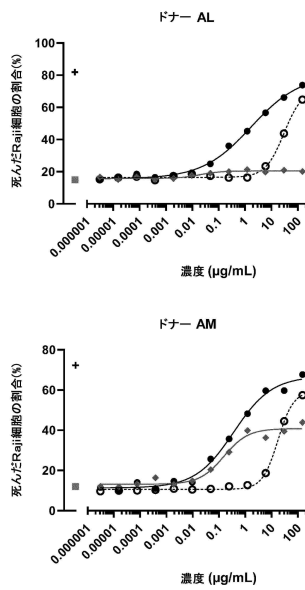


10

20

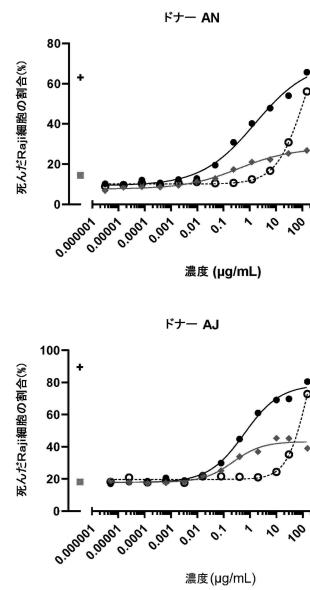
【図 1 2 A】

Figure 12A



【図 1 2 A - 1】

Figure 12A (continued)



30

40

50

【図 1 2 A - 2】

【図 1 2 A - 3】

Figure 12A (continued)

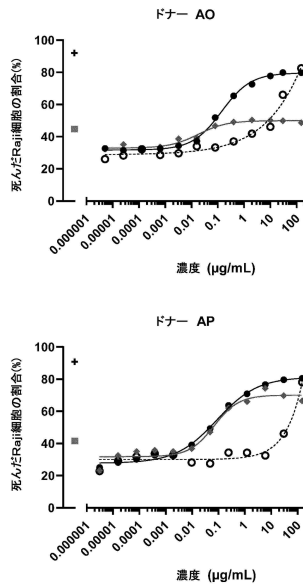
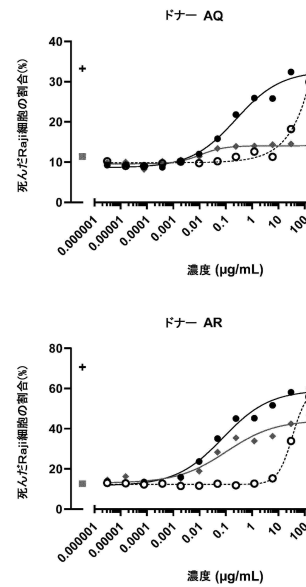


Figure 12A (continued)



10

20

【図 1 2 A - 4】

【図 1 2 B - C】

Figure 12A (continued)

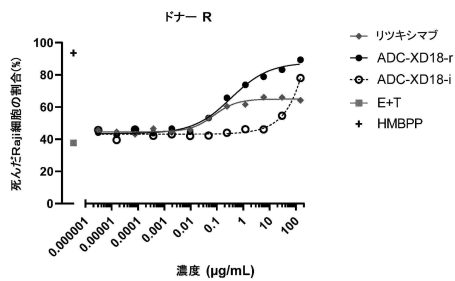


Figure 12B

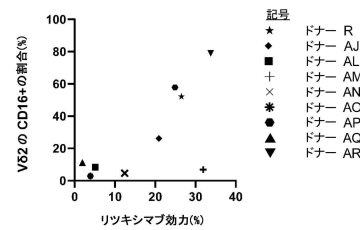
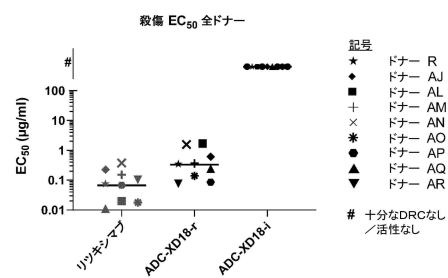


Figure 12C

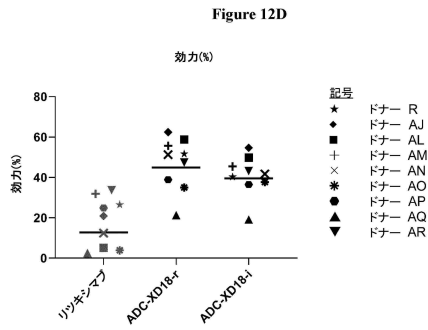


30

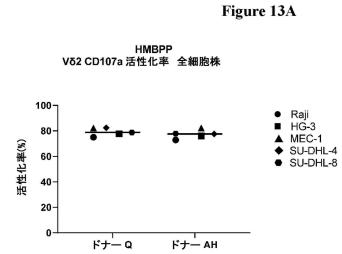
40

50

【図 1 2 D】



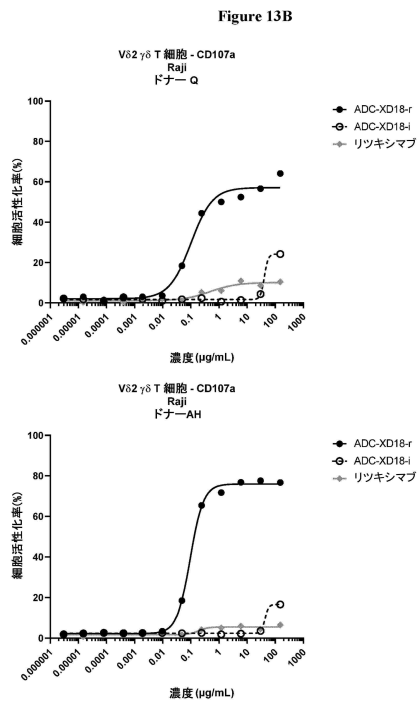
【図 1 3 A】



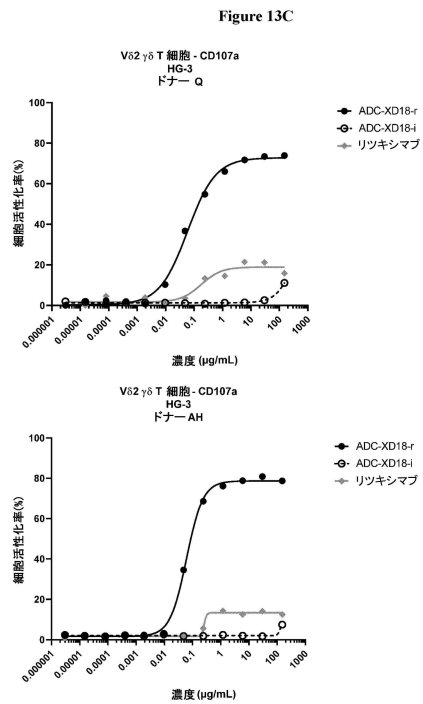
10

20

【図 1 3 B】



【図 1 3 C】

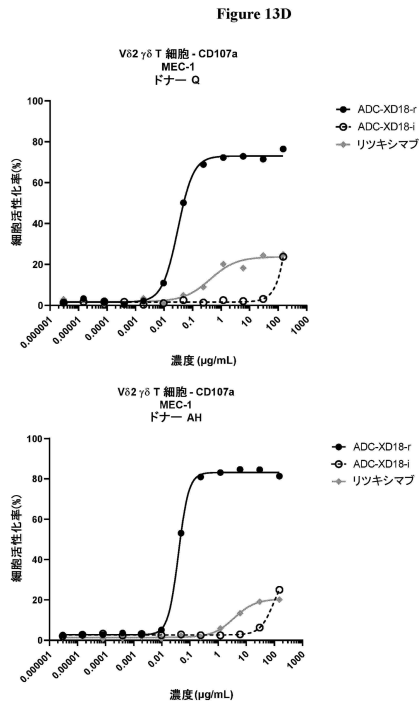


30

40

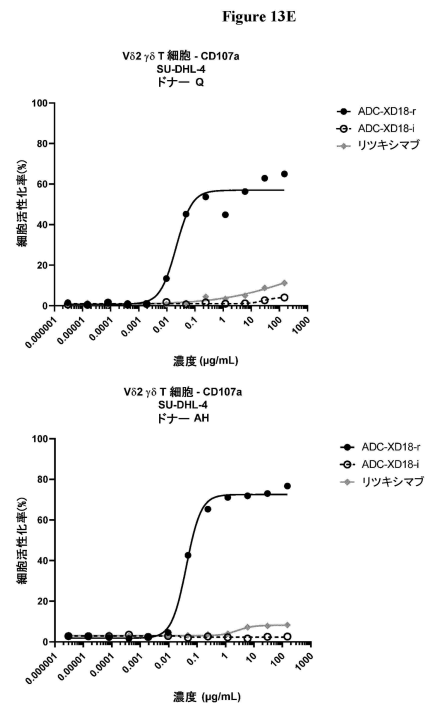
50

【図 13 D】



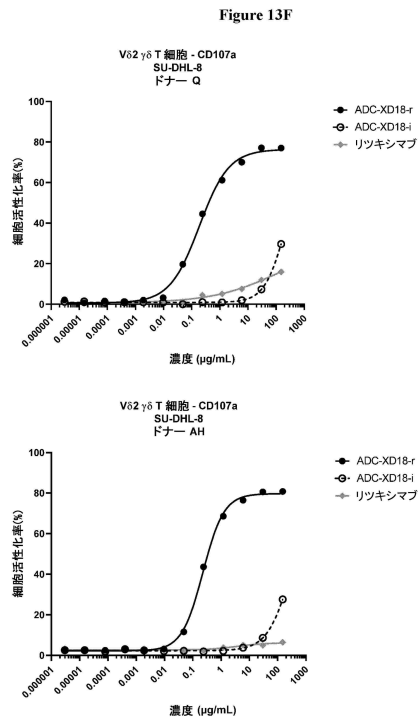
10

【図 13 E】

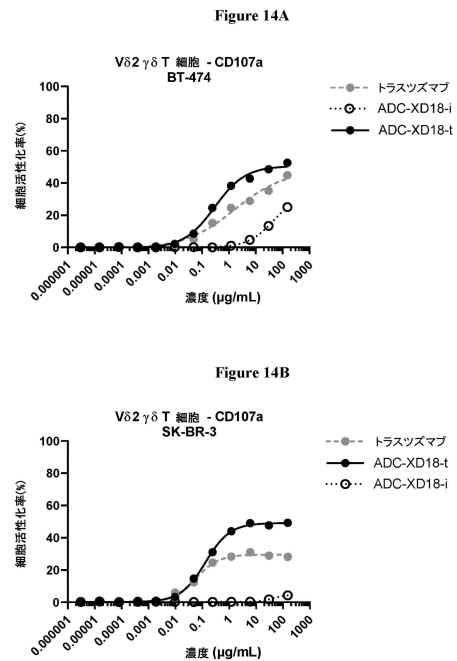


20

【図 13 F】



【図 14 A - B】



30

40

50

【図 1 4 C - D】

Figure 14C

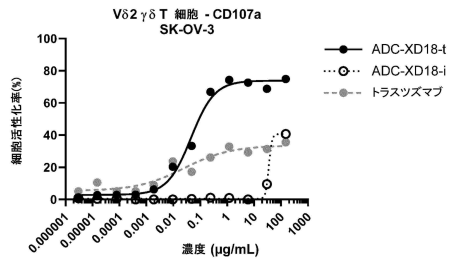
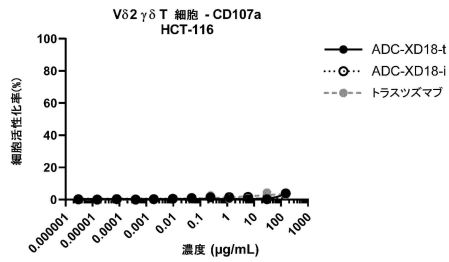


Figure 14D



【図 1 4 E - F】

Figure 14E

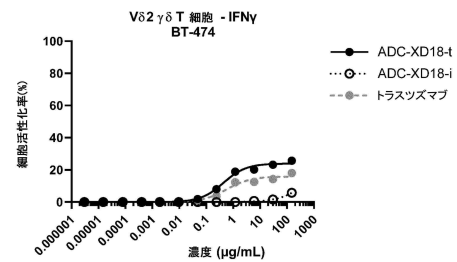
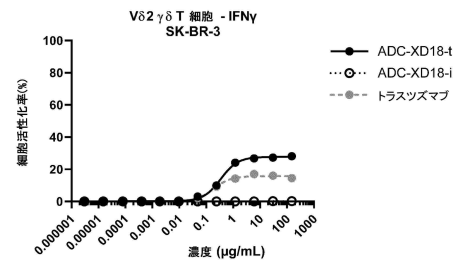


Figure 14F



【図 1 4 G - H】

Figure 14G

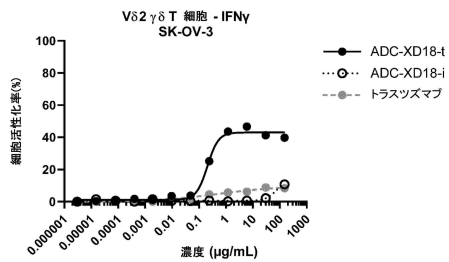
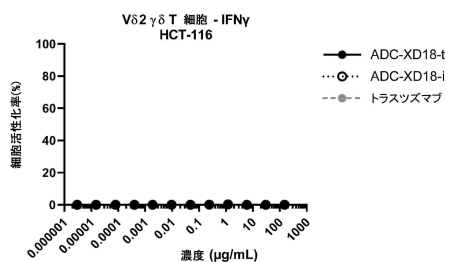


Figure 14H



【図 1 4 I - J】

Figure 14I

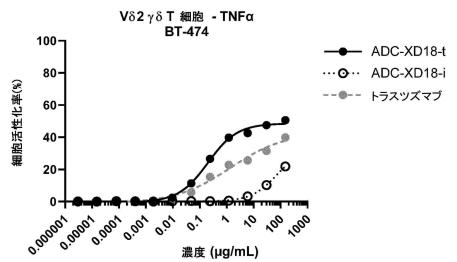
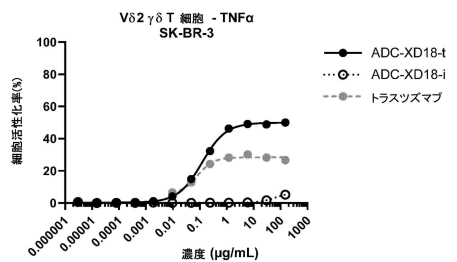


Figure 14J



10

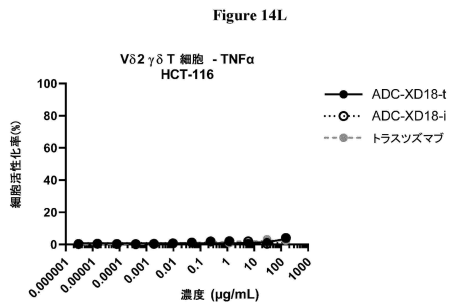
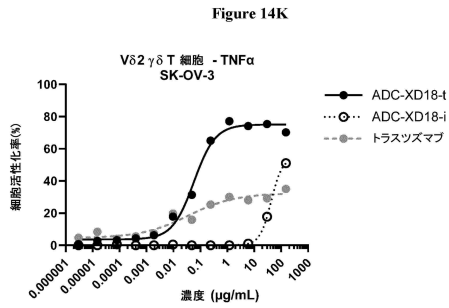
20

30

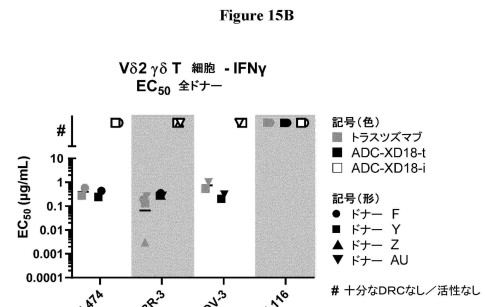
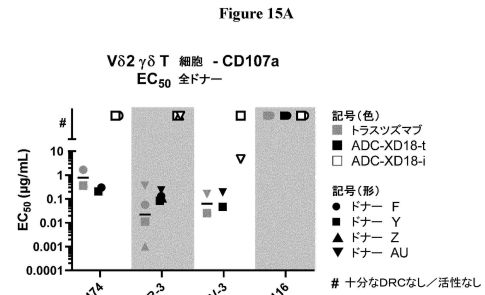
40

50

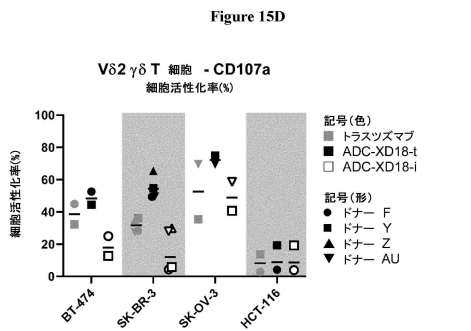
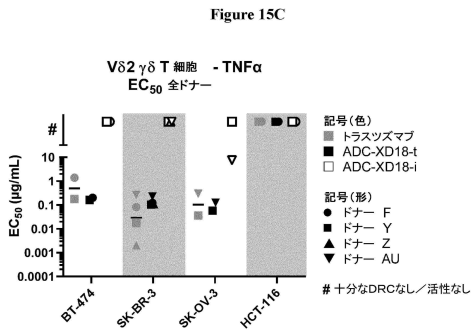
【図 14 K - L】



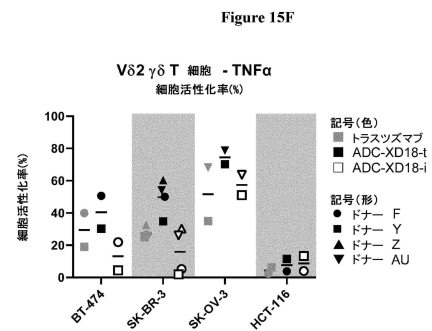
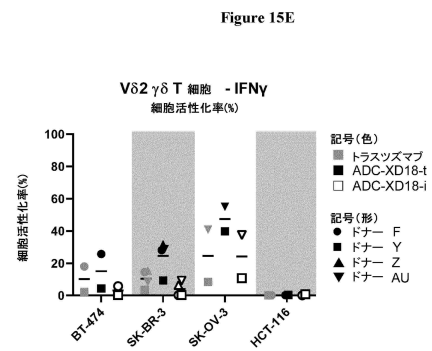
【図 15 A - B】



【図 15 C - D】



【図 15 E - F】



10

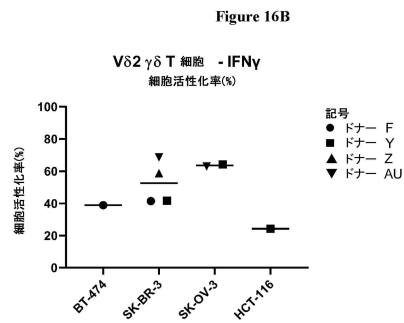
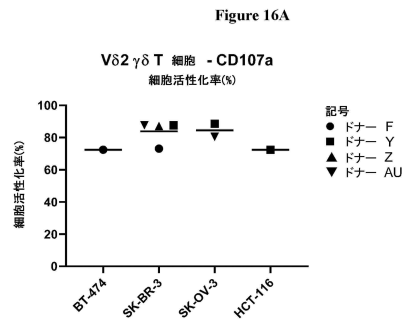
20

30

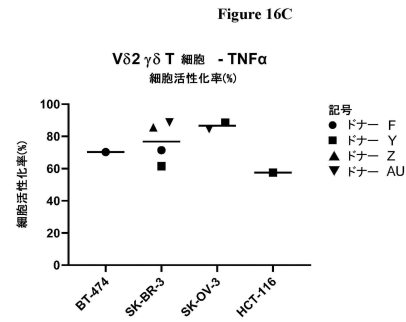
40

50

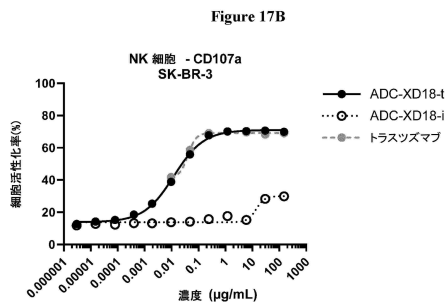
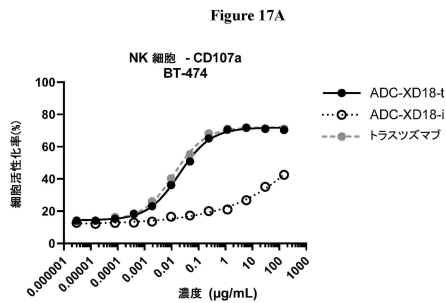
【図 16 A - B】



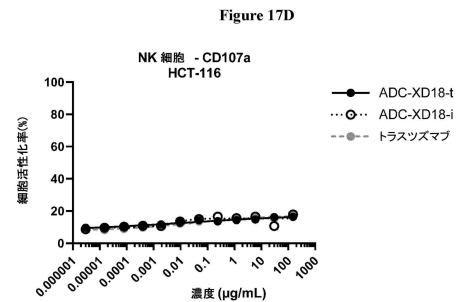
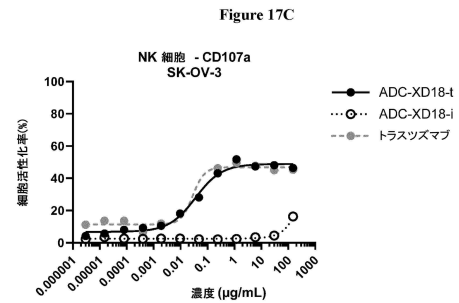
【図 16 C】



【図 17 A - B】



【図 17 C - D】



10

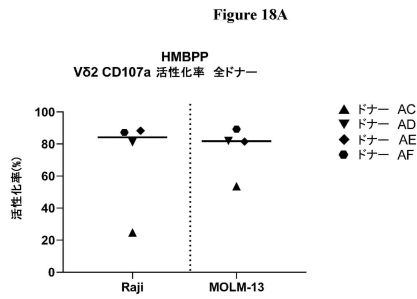
20

30

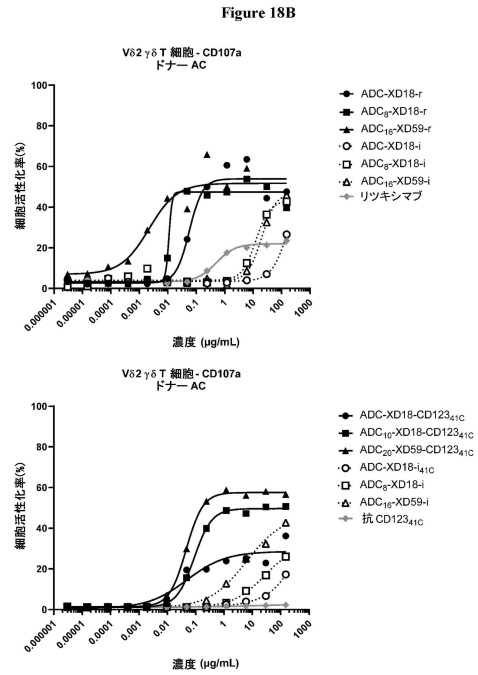
40

50

【図 18 A】



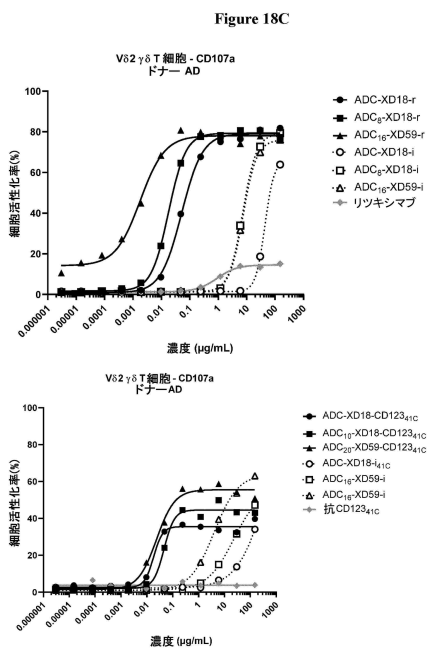
【図 18 B】



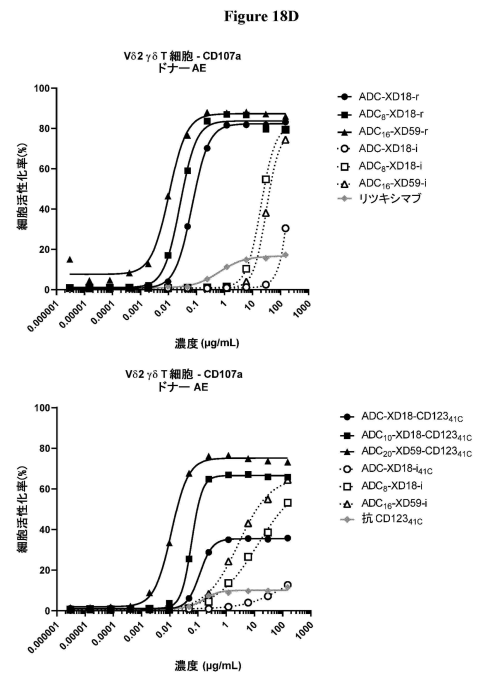
10

20

【図 18 C】



【図 18 D】

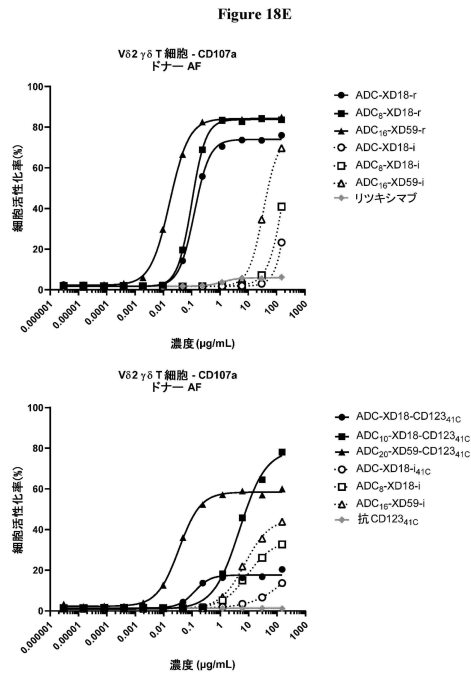


30

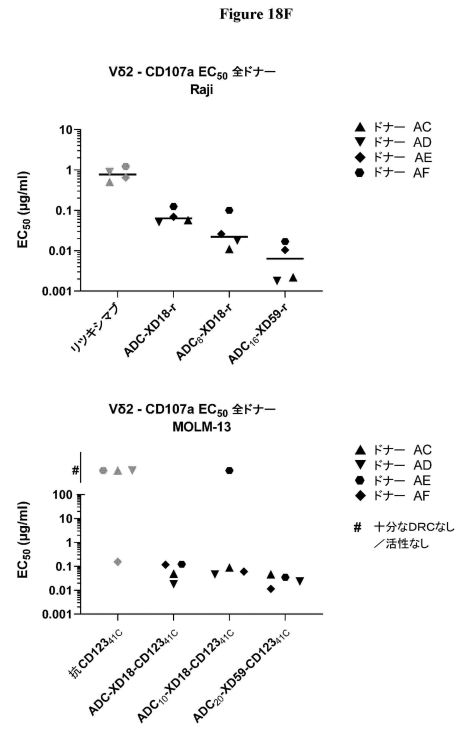
40

50

【図 18 E】



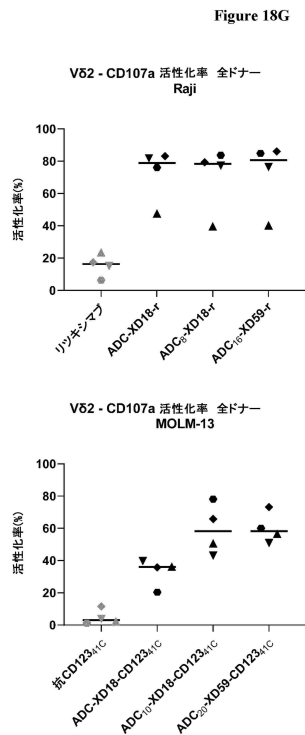
【図 18 F】



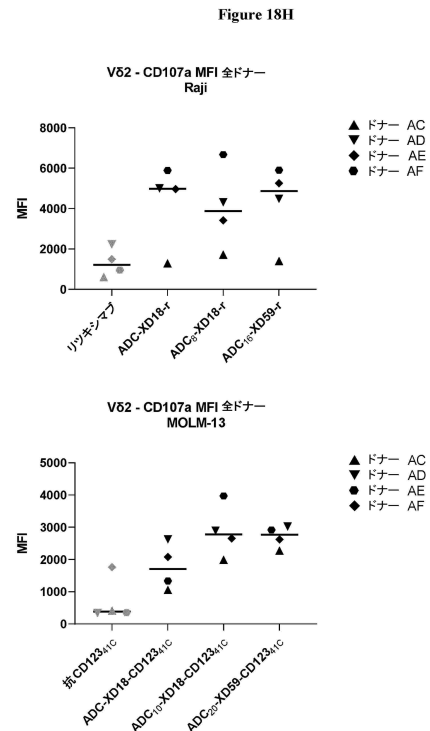
10

20

【図 18 G】



【図 18 H】



30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/067693

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/68 A61P35/00

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tian Zeru ET AL: "Harnessing the power of antibodies to fight bone metastasis", Sci. Adv, 23 June 2021 (2021-06-23), XP055870893, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8221630/pdf/abf2051.pdf [retrieved on 2021-12-09]	1-7, 22, 23, 25
Y	figure 1a, page 2, left column, 2nd paragraph, page 4, left column, last paragraph and page 4ff	19, 21, 24
A	----- -/--	20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 October 2022

Date of mailing of the international search report

12/10/2022

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Burema, Shiri

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/067693

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GINER JOSÉ-LUIS ET AL: "Synthesis and immunological evaluation of the 4-[beta]-glucoside of HMBPP", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 22, no. 2, 17 December 2011 (2011-12-17), pages 811-813, XP029121736, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/J.BMCL.2011.12.055	1, 22, 23, 25
A	figure 1, Abstract, page 811, left column, page 812	20
X	WO 2010/049438 A2 (INNATE PHARMA [FR]; BONNAFOUS CECILE [FR]; SICARD HELENE [FR]) 6 May 2010 (2010-05-06)	1, 22, 23, 25
A	claim 17, page 6, lines 18-21; page 26 Formula (Ic), page 27, line 2	20
X	WO 2008/059052 A1 (INNATE PHARMA [FR]; TIOLLIER JEROME [FR] ET AL.) 22 May 2008 (2008-05-22)	1, 22, 23, 25
A	page 1, lines 10-11 and page 3, lines 28-29; page 63, Formula (IIIc) and page 64, lines 10-11;	20
X	WO 2007/057440 A2 (INNATE PHARMA SA [FR]; TIOLLIER JEROME [FR]; SICARD HELENE [FR]) 24 May 2007 (2007-05-24)	1, 22, 23, 25
A	claims 38 and 52, page 42, Formula (IIIc) and page 43, line 2;	20
X	WO 2005/102385 A1 (INNATE PHARMA [FR]; TIOLLIER JEROME [FR]) 3 November 2005 (2005-11-03)	1, 22, 23, 25
A	page 30, Formula (I) and page 34, line 30, page 39, page 40, lines 24-25	20
X	US 2016/310604 A1 (CHUNG LELAND W K [US] ET AL) 27 October 2016 (2016-10-27)	1, 4-6, 22, 23, 25
A	claims 1+22 ; paragraph [0069] and paragraph [0135]	20
X	US 10 793 625 B2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]) 6 October 2020 (2020-10-06)	1-6, 22, 25
A	column 13, lines 22-31; column 15, lines 12ff; claim 7	20
5	X US 2021/171552 A1 (MEHELLOU YUCEF [GB] ET AL) 10 June 2021 (2021-06-10)	8-12, 14-18
Y	paragraph [0001] and paragraph [0041]	19, 21, 24
A		20
4		

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/067693

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010049438 A2	06-05-2010	NONE	
WO 2008059052 A1	22-05-2008	EP 2083830 A1	05-08-2009
		US 2010029674 A1	04-02-2010
		WO 2008059052 A1	22-05-2008
WO 2007057440 A2	24-05-2007	EP 1948195 A2	30-07-2008
		WO 2007057440 A2	24-05-2007
WO 2005102385 A1	03-11-2005	AT 419008 T	15-01-2009
		AU 2005235271 A1	03-11-2005
		CA 2564562 A1	03-11-2005
		EP 1761278 A1	14-03-2007
		JP 2007534743 A	29-11-2007
		US 2007218086 A1	20-09-2007
		WO 2005102385 A1	03-11-2005
US 2016310604 A1	27-10-2016	CN 102099059 A	15-06-2011
		CN 105288645 A	03-02-2016
		EP 2303337 A1	06-04-2011
		HK 1220635 A1	12-05-2017
		US 2011085974 A1	14-04-2011
		US 2016310604 A1	27-10-2016
		WO 2009152440 A1	17-12-2009
US 10793625 B2	06-10-2020	CN 105682682 A	15-06-2016
		CN 110947002 A	03-04-2020
		US 2015139909 A1	21-05-2015
		WO 2013166156 A2	07-11-2013
US 2021171552 A1	10-06-2021	CA 3137835 A1	09-01-2020
		EP 3818064 A1	12-05-2021
		JP 2021529786 A	04-11-2021
		US 2021171552 A1	10-06-2021
		WO 2020008189 A1	09-01-2020
WO 2019182904 A1	26-09-2019	US 2021115074 A1	22-04-2021
		WO 2019182904 A1	26-09-2019

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 37/00 (2006.01)

F I

A 6 1 P 37/00

テーマコード (参考)

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,J
O,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,M
Z,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,
TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ヨハネス

オランダ国、 6 5 4 5 シーエム・ナイメーヘン、 ミクロベーク 2 2

F ターム (参考)

4C076 AA95 CC07 CC27 CC31 CC41 EE41 EE59

4C085 AA06 BB01 CC23 CC32 EE01