

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-114848

(P2017-114848A)

(43) 公開日 平成29年6月29日(2017.6.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L 4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
	C 0 7 K 16/18	

審査請求 有 請求項の数 21 O L 外国語出願 (全 82 頁)

(21) 出願番号	特願2016-215442 (P2016-215442)	(71) 出願人	390023582
(22) 出願日	平成28年11月2日 (2016.11.2)		財団法人工業技術研究院
(31) 優先権主張番号	62/250,107		I N D U S T R I A L T E C H N O L O G Y R E S E A R C H I N S T I T U T E
(32) 優先日	平成27年11月3日 (2015.11.3)		台湾新竹縣竹東鎮中興路四段195號
(33) 優先権主張国	米国 (US)		No. 195, Sec. 4, Chung Hsing Rd., Chutung, Hsinchu, Taiwan 31040
		(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体-薬物複合体 (ADC) およびそれを形成するための方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 抗体 - 薬物複合体 (ADC) およびそれを形成するための方法の提供。

【解決手段】 式 (I) で表される抗体 - 薬物複合体 (ADC)。以下のステップを含む抗体 - 薬物複合体 (ADC) を形成するための方法。抗体と還元剤とを緩衝液中で反応させて第 1 の溶液を作るステップ；有機相または水相中でリンカー - 薬物ユニットを調製して第 2 の溶液を作るステップ；前記第 1 の溶液と前記第 2 の溶液を混合して混合溶液を作ることによりコンジュゲーションを行うステップ；および前記混合溶液を精製するステップ。A - (L - D) p (I) (A は抗体；L はグリコペプチドを有するリンカーユニット；D は薬物ユニット；p は 1 ~ 26 の整数)

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) の抗体 - 薬物複合体 (A D C) またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物 :



式中、

p は 1 から 26 までの範囲の整数であり、

A は抗体であり、かつ

- (L - D) はリンカー - 薬物ユニットであり、

L はグリコペプチドを有するリンカーユニットであり、D は薬物ユニットであり、

前記抗体は、前記抗体のシステイン残基を介して前記リンカーユニットにコンジュゲートする。

10

【請求項 2】

前記抗体が全長抗体または抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体 (A D C) 。

【請求項 3】

前記抗体が、キメラ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヒト化抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヒト抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、マウス抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ラット抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヤギ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、またはウサギ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメントである、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体 (A D C) 。

20

【請求項 4】

前記抗体が、腫瘍、慢性リンパ性白血病 (C L L)、または急性骨髄性白血病 (A M L) の治療に用いられる治療用抗体である、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体 (A D C) 。

【請求項 5】

前記抗体が、Herceptin、Erbibitux、HLX-07、EG12014、抗-EpCAM Ab および IgG1、リツキシマブ (Rituximab)、イブリツモマブチウキセタン (Ibritumomab tiuxetan)、トシツモマブ (Tositumomab)、ブレンツキシマブベドチン (Brentuximab vedotin)、アテムツズマブ (Alemtuzumab)、IGN101、アデカツムマブ (Adecatumumab)、ラベツズマブ (Labetuzumab)、huA33、ペムツモマブ (Pemtumomab)、オレゴボマブ (Oregovomab)、CC49 (ミンレツモマブ (minretumomab))、cG250、J591、MOv18、MORAb-003 (ファーレツズマブ (farletuzumab))、3F8、ch14.18、KW-2871、hu3S193、IgN311、ベパシズマブ (Bevacizumab)、IM-2C6、CDP791、エタラシズマブ (Etaracizumab)、ボロシキシマブ (Volociximab)、セツキシマブ (Cetuximab)、パニツムマブ (Panitumumab)、ニモツズマブ (Nimotuzumab)、806、トラスツズマブ (Trastuzumab)、ペルツズマブ (Pertuzumab)、MM-121、AMG102、METMAB、SCH900105、AVE1642、IMC-A12、MK-0646、R1507、CP751871、KB004、IIIA4、マパツムマブ (Mapatumumab) (HGS-ETR1)、HGS-ETR2、CS-1008、デノスマブ (Denosumab)、シブロットズマブ (Sibrotuzumab)、F19、81C6、ヒト化抗HER2 mAb、OvaRex、Panorex、Cetuximab Erbitux、Vitaxin、Campath I/H、Smart MI95、LymphoCide、Smart ID10、Oncolymp、Allomune、Avastin、Epratuzumab、またはCEAcideを含む、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体 (A D C) 。

30

40

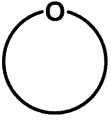
【請求項 6】

前記リンカーユニットが

- C - S A A s - A A s -

50

【化 3】



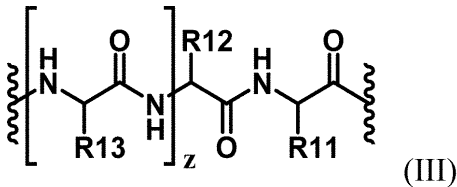
はテトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、テトラヒドロピラン、またはジヒドロピラン環であり、R 8 および R 10 はそれぞれ独立に、単結合、メチレン、ヒドロキシメチレン、エチレン、エチリデン、ヒドロキシエチレン、ヒドロキシエチリデン、ジヒドロキシエチレン、ジヒドロキシエチリデン、ビニレン、ビニリデン、プロピレン、プロピリデン、トリメチレン、ヒドロキシプロピレン、ヒドロキシプロピリデン、ヒドロキシトリメチレン、ジヒドロキシプロピレン、ジヒドロキシプロピリデン、ジヒドロキシトリメチレン、トリヒドロキシプロピレン、トリヒドロキシプロピリデンまたはトリヒドロキシトリメチレンであり、各 R 9 はそれぞれ独立に、ヒドロキシル、メチル、ヒドロキシメチル、エチル、ヒドロキシエチル、ジヒドロキシエチル、プロピル、ヒドロキシプロピル、ジヒドロキシプロピルもしくはトリヒドロキシプロピルであるか、または同じ環炭素中の任意の 2 つの R 9 が、それらが結合する炭素と共にカルボニル基を形成するか、または任意の 2 つの R 9、R 8 および任意の 1 つの R 9、もしくは R 10 および任意の 1 つの R 9 が、元のテトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、テトラヒドロピランもしくはジヒドロピラン環と縮合する第 2 のテトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、テトラヒドロピランもしくはジヒドロピラン環を形成するか、または任意の 2 つの R 9、R 8 および任意の 1 つの R 9、もしくは R 10 および任意の 1 つの R 9 がメチレン、エチリデン、1 - プロピリデン、2 - プロピリデンもしくはベンジリデン基と共に、元のテトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、テトラヒドロピランもしくはジヒドロピラン環と縮合する環状アセタールもしくはケタール環 (k e t a l r i n g) を形成し；

10

20

- A A s - が、式 (I I I) のペプチドユニットであり；

【化 4】



30

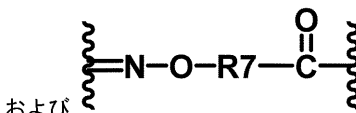
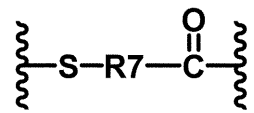
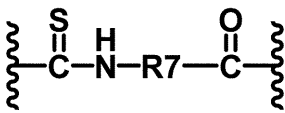
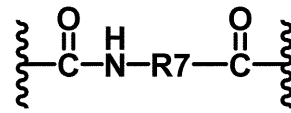
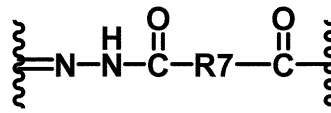
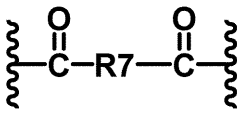
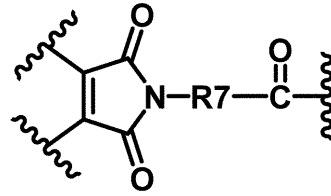
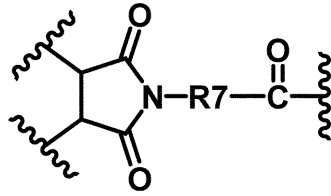
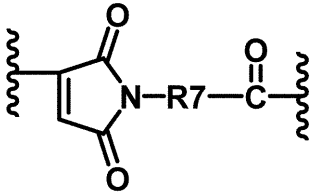
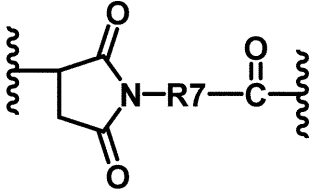
式中、z は 0 から 10 までの範囲の整数であり、R 11 は、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NHCONH_2$ 、 $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_4NH_2$ または $-(CH_2)_4NHCONH_2$ であり、R 12 は H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、sec - ブチル、イソブチル、tert - ブチル、シクロブチル、フェニルまたはベンジルであり、R 13 は水素、メチル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、sec - ブチル、イソブチル、tert - ブチル、シクロブチル、シクロヘキシル、フェニル、ベンジル、p - ヒドロキシベンジル、 $-CH_2OH$ 、 $-CH(OH)CH_3$ 、 $-CH_2CH_2SCH_3$ 、 $-CH_2CONH_2$ 、 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CONH_2$ 、 $-CH_2CH_2COOH$ 、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NHCOCH_3$ 、 $-(CH_2)_3NHCHO$ 、 $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_4NH_2$ 、 $-(CH_2)_4NHCOCH_3$ 、 $-(CH_2)_4NHCHO$ 、 $-(CH_2)_3NHCONH_2$ 、 $-(CH_2)_4NHCONH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$ 、2 - ピリジルメチル、3 - ピリジルメチル、または 4 - ピリジルメチルである、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体 (A D C)。

40

【請求項 7】

C - が、

【化5】



および

からなる群より選ばれたコンジュゲートユニット (conjugating unit) であり、

式中、R7が、-1,5-ペンチレン-、-1,6-ヘキシレン-、-1,4-シクロヘキシレン-、-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-および-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-CH₂-からなる群より選ばれ、かつrが2~5までの範囲の整数である、請求項6に記載の抗体-薬物複合体(ADC)。

【請求項8】

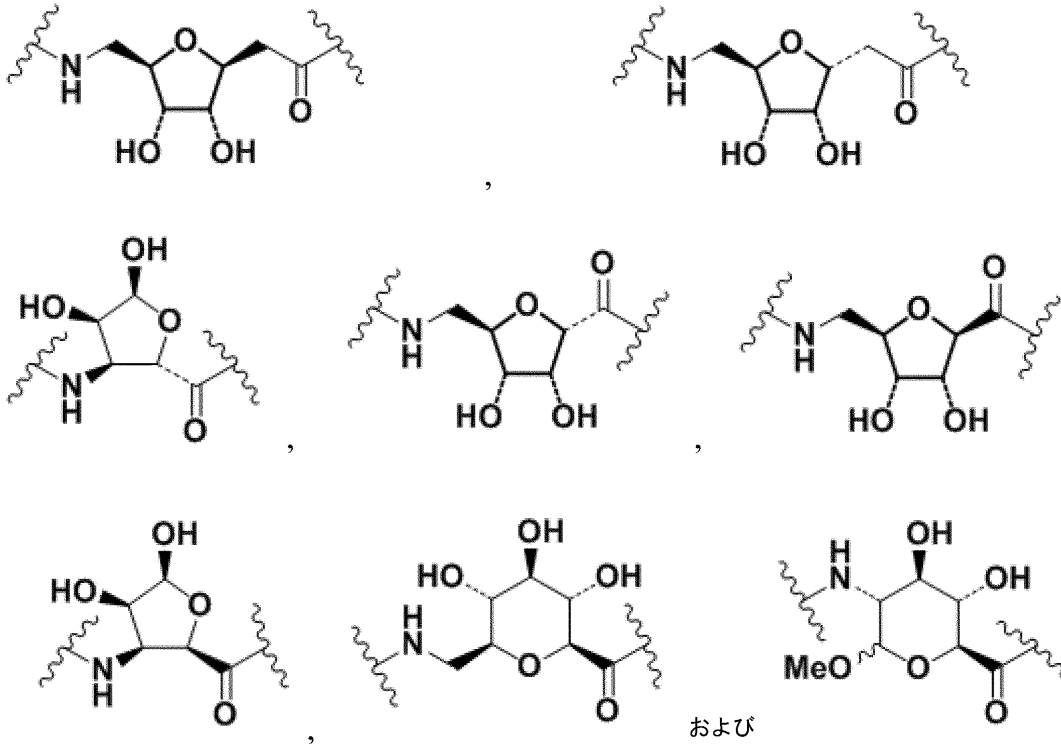
-S A A s-が、

10

20

30

【化 6】



10

20

からなる群より選ばれた糖アミノ酸ユニットである、請求項 6 に記載の抗体 - 薬物複合体 (ADC)。

【請求項 9】

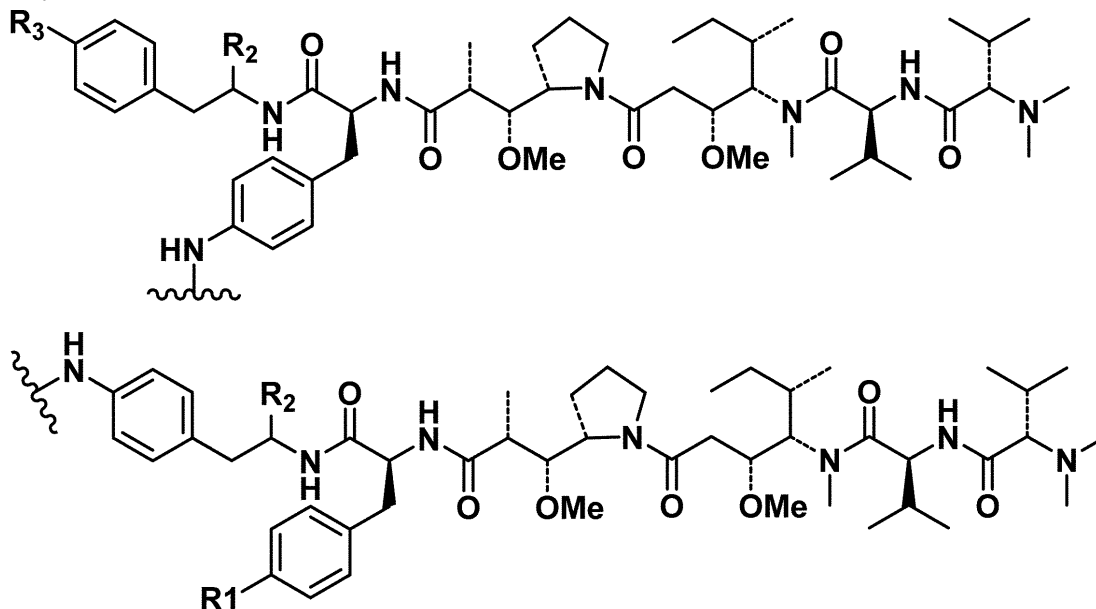
- AAs - が、- Val - Cit -、- Val - Lys -、- Val - Arg -、- Phe - Cit -、- Phe - Lys - および - Phe - Arg - からなる群より選ばれたペプチドユニットである、請求項 6 に記載の抗体 - 薬物複合体 (ADC)。

【請求項 10】

前記薬物ユニットが、

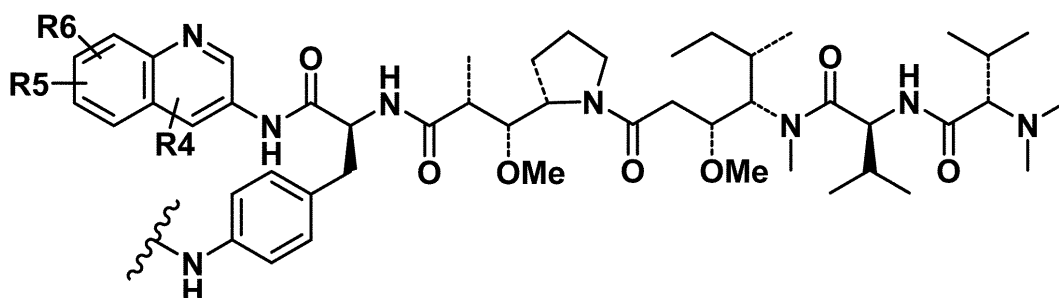
30

【化 7】



10

および



20

からなる群より選ばれた細胞毒性薬であり、

式中、R 1、R 2、R 3、R 4、R 5 および R 6 がそれぞれ独立に、水素、アミノ、ニトロ、ハロゲン、ヒドロキシル、メトキシ、エトキシ、カルボン酸、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、メチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、ジエチルアミノ、1 - ピロリジニル、1 - ピペリジニル、1 - ピペラジニル、アミノカルボニル、メチルアミノカルボニル、ジメチルアミノカルボニル、エチルアミノカルボニル、ジエチルアミノカルボニル、1 - ピロリジニルカルボニル、1 - ピペリジニルカルボニル、1 - ピペラジニルカルボニル、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、またはフェニルである、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体 (ADC)。

30

【請求項 1 1】

前記薬物ユニットが標的細胞に対して細胞増殖抑制または細胞毒性活性を有する、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体 (ADC)。

【請求項 1 2】

前記薬物ユニットが、アマニチン (amanitin)、アントラサイクリン (anthracycline)、アウリスタチン (auristatin)、バッカチン (baccatin)、カリケアマイシン (calicheamicin)、カンプトテシン (camptothecin)、セマドチン (cemadotin)、コルヒチン (colchicin)、コルセミド (colcemid)、コンブレタスタチン (combretastatin)、クリプトフィシン (cryptophysin)、ディスコデルモリド (discodermolide)、デュオカルマイシン (duocarmycin)、エキノマイシン (echinomycin)、エリュテロピン (eleutherobin)、エポチロン (epothilone)、エストラムスチン (estramustine)、レキシトロプシン (lexitropsin)、メイタンシノイド (maytansinoid)、ネトロプシン (netropsin)、ピューロマイシン (puromycin)、ピロロベンゾジアゼピン (pyrrolobenzodiazepine)、リゾキシ (rhizoxin)、タキサン (taxane)、チューブリシン (tubulysin)、およ

40

50

びビンカアルカロイド (vinca alkaloid) からなる群より選ばれた細胞毒性薬である、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物複合体 (ADC)。

【請求項 13】

抗体 - 薬物複合体 (ADC) を形成するための方法であって、以下のステップを含む、方法：

抗体と還元剤とを緩衝液中で反応させて第 1 の溶液を作るステップ；

有機相または水相中でリンカー - 薬物ユニットを調製して第 2 の溶液を作るステップであって、前記リンカーはグリコペプチドを有する、ステップ；

前記第 1 の溶液と前記第 2 の溶液を混合して混合溶液を作ることによりコンジュゲーションを行うステップであって、前記混合溶液中の有機溶媒の濃度が約 0 % (v/v) から約 20 % (v/v) の範囲である、ステップ；および

前記混合溶液を精製するステップ。

【請求項 14】

前記抗体が、前記抗体のシステイン残基を介して前記リンカーユニットにコンジュゲートする、請求項 13 に記載の、抗体 - 薬物複合体 (ADC) を形成するための方法。

【請求項 15】

前記抗体が全長抗体または抗体フラグメントである、請求項 13 に記載の、抗体 - 薬物複合体 (ADC) を形成するための方法。

【請求項 16】

前記抗体が、キメラ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヒト化抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヒト抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、マウス抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ラット抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヤギ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、またはウサギ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメントである、請求項 13 に記載の、抗体 - 薬物複合体 (ADC) を形成するための方法。

【請求項 17】

前記抗体が、Herceptin、Erbibitux、HLX-07、EG12014、抗-EpCAM Ab および IgG1、リツキシマブ (Rituximab)、イブリツモマブチウキセタン (Ibritumomab tiuxetan)、トシツモマブ (Tositumomab)、ブレンツキシマブベドチン (Brentuximab vedotin)、アレムツズマブ (Alemtuzumab)、IGN101、アデカツムマブ (Adecatumumab)、ラベツズマブ (Labetuzumab)、huA33、ペムツモマブ (Pemtumomab)、オレゴボマブ (Oregovomab)、CC49 (ミンレツモマブ (minretumomab))、cG250、J591、MOv18、MORAb-003 (ファーレツズマブ (farletuzumab))、3F8、ch14.18、KW-2871、hu3S193、IgN311、ベバシズマブ (Bevacizumab)、IM-2C6、CDP791、エタラシズマブ (Etaracizumab)、ボロシキシマブ (Volociximab)、セツキシマブ (Cetuximab)、パニツムマブ (Panitumumab)、ニモツズマブ (Nimotuzumab)、806、トラスツズマブ (Trastuzumab)、ペルツズマブ (Pertuzumab)、MM-121、AMG102、METMAB、SCH900105、AVE1642、IMC-A12、MK-0646、R1507、CP751871、KB004、IIIA4、マパツムマブ (Mapatumumab) (HGS-ETR1)、HGS-ETR2、CS-1008、デノスマブ (Denosumab)、シブロットズマブ (Sibrotuzumab)、F19、81C6、ヒト化抗HER2 mAb、OvaRex、Panorex、Cetuximab Erbbitux、Vitaxin、Campath I/H、Smart MI95、LymphoCide、Smart ID10、Oncolymp、Allomune、Avastin、Epratuzumab、またはCEAcideを含む、請求項 13 に記載の、抗体 - 薬物複合体 (ADC) を形成するための方法。

【請求項 18】

前記還元剤および還元条件を、前記抗体中に存在する鎖間ジスルフィド結合のうち少なくとも 1 つが一对の遊離チオールに変わるように選択する、請求項 13 に記載の、抗体 -

10

20

30

40

50

薬物複合体 (ADC) を形成するための方法。

【請求項 19】

前記還元剤が、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、2-アミノエタンチオール、ジチオトレイトール(DTT)、および2-メルカプトエチルアミン塩酸塩(2-MEA)からなる群より選ばれる、請求項13に記載の、抗体-薬物複合体(ADC)を形成するための方法。

【請求項 20】

前記抗体と前記リンカー-薬物ユニットのモル当量比を、前記抗体-薬物複合体が約3.5~約5.5の範囲の平均DARを有するように選択する、請求項13に記載の、抗体-薬物複合体(ADC)を形成するための方法。

10

【請求項 21】

前記有機溶媒が、ジメチルスルホキシド(DMSO)、アセトニトリル(ACN)、N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、プロピレングリコール(PG)、またはこれらの組み合わせを含む、請求項13に記載の、抗体-薬物複合体(ADC)を形成するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年11月3日に提出された米国仮特許出願第62/250107号の利益を主張し、その全体が参照として本明細書に援用される。

20

【0002】

技術分野

本技術分野は、抗体-薬物複合体(antibody-drug conjugate, ADC)およびそれを形成するための方法に関し、より詳細には、グリコペプチドを含有するリンカー-毒素とコンジュゲートされた抗体を含む抗体-薬物複合体(ADC)およびそれを形成するための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

抗体はそれらの対応する抗原について高度の識別能力を有しており、また多くの細胞毒性薬物の分子は、癌細胞を選択的に殺傷することができないため、癌治療に用いることはできない。よって、抗体と毒性の強い薬物(例えば毒素)との結合は、高度選択的および特異的な複合体薬物(conjugated drug)となる。

30

【0004】

抗体-薬物複合体(ADC)は、抗体、リンカー、および薬物(例えば毒素)から構成される。しかし、これらの毒素は、高用量での実施が必要であるため、細胞毒性が高い(IC50<1nM)ように思われる。ADCに一般的に用いられる毒素の1つは、MMAEおよびMMAFのようなアウリスタチン誘導体である。

【0005】

ADCに一般的に用いられるリンカーの1つは、MC-Val-Citである。これら一般的に用いられるリンカーの中で、Seattle Geneticsにより開発されたMC-Val-Cit-PABが、最も広く利用されている系である。ADCの毒素は、リンカーと毒素との間の結合をカテプシンBで切断することにより遊離される。しかし、リンカー系は難水溶解性である。このことは、ADCのコンジュゲーションプロセスにおいてリンカー-毒素を溶解するためには、高含有量、20%の有機溶媒を共溶媒として用いることを要し、これによりコンジュゲーション反応が均一相中で完了できるようになる。

40

【0006】

しかしながら、上述した有機溶媒の導入は、抗体の変性または抗体凝集を引き起こす可

50

能性があり、さらにはADCの収量低下または生成物の不良につながり得る。加えて、有機溶媒の不完全な除去が、最終的なADC生成物が品質管理をパスできなくなる原因の1つとなる可能性がある。

【0007】

よって、新規なADC薬物の開発は、人の抗癌医療のニーズを満たすことを手助けする上での課題である。

【発明の概要】

【0008】

概要

本開示は、式(I)の抗体-薬物複合体(ADC)またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を提供する:



式(I)中、pは1から26までの範囲の整数であり、Aは抗体であり、-(L-D)はリンカー-薬物ユニットである。Lはグリコペプチドを有するリンカーユニットであり、Dは薬物ユニットである。抗体は、抗体のシステイン残基を介してリンカーユニットにコンジュゲートする。

【0009】

本開示はまた、上述の抗体-薬物複合体(ADC)を形成するための方法も提供する。当該方法は、抗体と還元剤とを緩衝液中で反応させて第1の溶液を作るステップ、有機相または水相中でリンカー-薬物ユニットを調製して第2の溶液を作るステップであって、リンカーがグリコペプチドを有する、ステップ、第1の溶液と第2の溶液とを混合して混合溶液を作ることによりコンジュゲーションプロセスを行うステップ、および混合溶液を精製するステップ、を含む。混合溶液中の有機溶媒の濃度は約0%(v/v)~約2%(v/v)の範囲である。

【0010】

添付の図面を参照にしながら、下記の実施形態において詳細な説明を行う。より具体的には、本発明は以下を提供する:

[1]

式(I)の抗体-薬物複合体(ADC)またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物:



式中、

pは1から26までの範囲の整数であり、

Aは抗体であり、かつ

-(L-D)はリンカー-薬物ユニットであり、

Lはグリコペプチドを有するリンカーユニットであり、Dは薬物ユニットであり、

前記抗体は、前記抗体のシステイン残基を介して前記リンカーユニットにコンジュゲートする;

[2]

前記抗体が全長抗体または抗体フラグメントである、[1]の抗体-薬物複合体(ADC);

[3]

前記抗体が、キメラ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヒト化抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヒト抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、マウス抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ラット抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヤギ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、またはウサギ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメントである、[1]の抗体-薬物複合体(ADC);

[4]

前記抗体が、腫瘍、慢性リンパ性白血病(CLL)、または急性骨髄性白血病(AML)

10

20

30

40

50

) の治療に用いられる治療用抗体である、[1]の抗体 - 薬物複合体 (ADC) ;

[5]

前記抗体が、Herceptin、Erbix、HLX-07、EG12014、抗-EpCAM AbおよびIgG1、リツキシマブ (Rituximab)、イブリツモマブチウキセタン (Ibritumomab tiuxetan)、トシツモマブ (Tositumomab)、ブレンツキシマブベドチン (Brentuximab vedotin)、アテムツズマブ (Alemtuzumab)、IGN101、アデカツムマブ (Adecatumumab)、ラベツズマブ (Labetuzumab)、huA33、ペムツモマブ (Pemtumomab)、オレゴボマブ (Oregovomab)、CC49 (ミンレツモマブ (minretumomab))、cG250、J591、MOv18、MORAb-003 (ファーレツズマブ (farletuzumab))、3F8、ch14.18、KW-2871、hu3S193、IgN311、ベバシズマブ (Bevacizumab)、IM-2C6、CDP791、エタラシズマブ (Etaracizumab)、ボロシキシマブ (Volociximab)、セツキシマブ (Cetuximab)、パニツムマブ (Panitumumab)、ニモツズマブ (Nimotuzumab)、806、トラスツズマブ (Trastuzumab)、ペルツズマブ (Pertuzumab)、MM-121、AMG102、METMAB、SCH900105、AVE1642、IMC-A12、MK-0646、R1507、CP751871、KB004、IIIA4、マパツムマブ (Mapatumumab) (HGS-ETR1)、HGS-ETR2、CS-1008、デノスマブ (Denosumab)、シブロツツマブ (Sibrotuzumab)、F19、81C6、ヒト化抗HER2 mAb、OvaRex、Panorex、Cetuximab Erbix、Vitaxin、Campath I/H、Smart MI95、LymphoCide、Smart ID10、Oncolymp、Allomune、Avastin、Epratuzumab、またはCEAcideを含む、[1]の抗体 - 薬物複合体 (ADC) ;

10

20

[6]

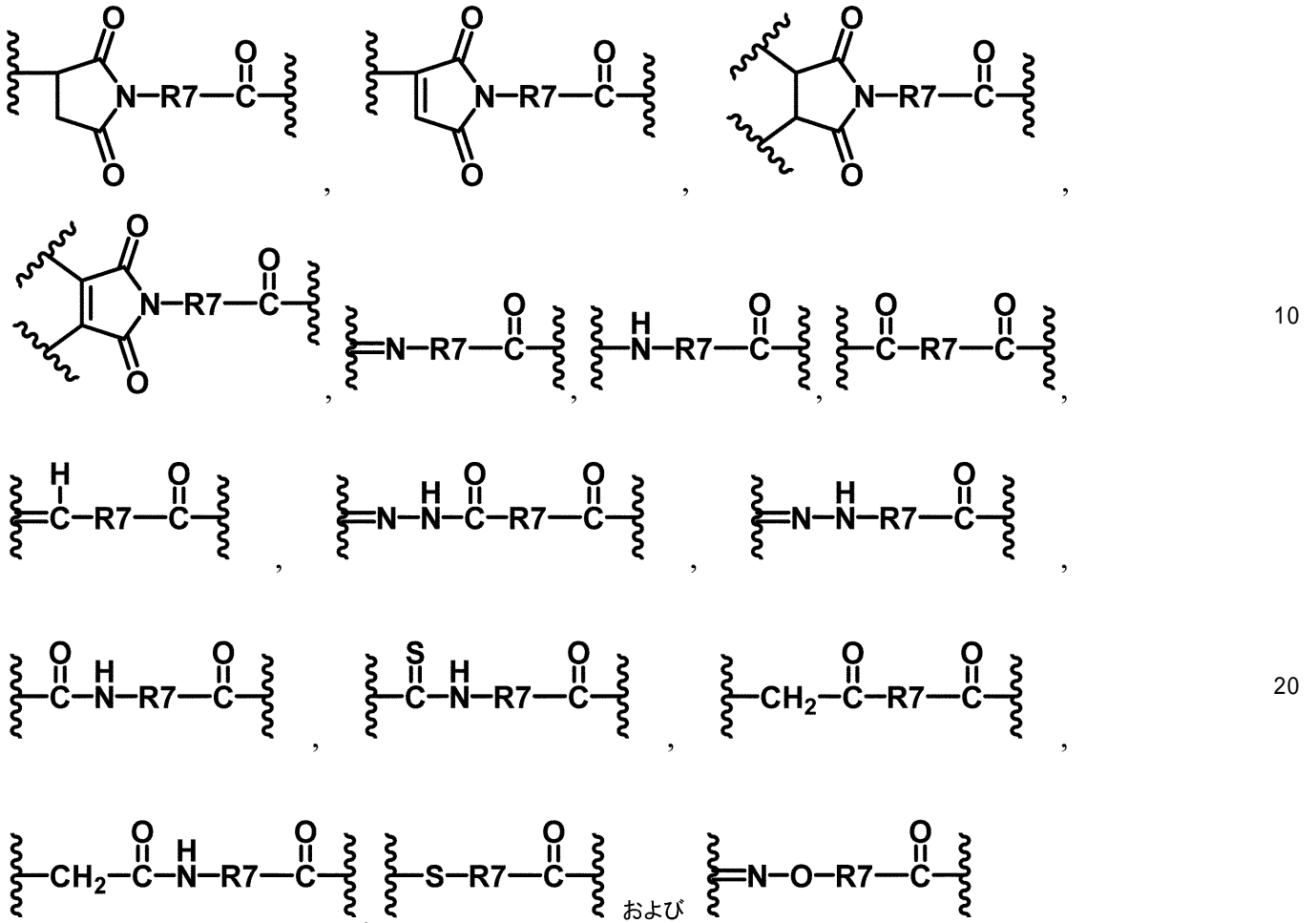
前記リンカーユニットが

- C - S A A s - A A s -

であり、式中、

C - が、

【化1】



10

20

30

40

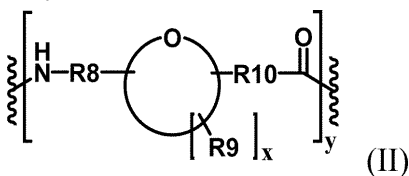
50

からなる群より選ばれたコンジュゲートユニット (conjugating unit) であり、

式中、R7は、-C1~C10アルキレン-、-C3~C8カルボシクロ (carbocyclo)-、-O-(C1~C8アルキル)-、-アリーレン-、-C1~C10アルキレン-アリーレン-、-アリーレン-C1~C10アルキレン-、-C1~C10アルキレン-(C3~C8カルボシクロ)-、-(C3~C8カルボシクロ)-C1~C10アルキレン-、-C3~C8ヘテロシクロ-、-C1~C10アルキレン-(C3~C8ヘテロシクロ)-、-(C3~C8ヘテロシクロ)-C1~C10アルキレン-、-(CH₂CH₂O)_r-および-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-からなる群より選ばれたものであり、かつrは1から10までの範囲の整数であり；

-S A A s - が、式 (I I) :

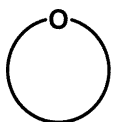
【化2】



の糖アミノ酸ユニットであり、

式中、xは1から8までの範囲の整数であり、yは1から4までの範囲の整数であり、

【化3】



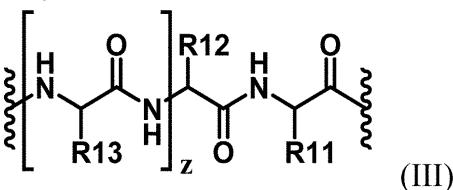
はテトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、テトラヒドロピラン、またはジヒドロピラン環であり、R8およびR10はそれぞれ独立に、単結合、メチレン、ヒドロキシメチレン

、エチレン、エチリデン、ヒドロキシエチレン、ヒドロキシエチリデン、ジヒドロキシエチレン、ジヒドロキシエチリデン、ビニレン、ビニリデン、プロピレン、プロピリデン、トリメチレン、ヒドロキシプロピレン、ヒドロキシプロピリデン、ヒドロキシトリメチレン、ジヒドロキシプロピレン、ジヒドロキシプロピリデン、ジヒドロキシトリメチレン、トリヒドロキシプロピレン、トリヒドロキシプロピリデンまたはトリヒドロキシトリメチレンであり、各 R₉ はそれぞれ独立に、ヒドロキシル、メチル、ヒドロキシメチル、エチル、ヒドロキシエチル、ジヒドロキシエチル、プロピル、ヒドロキシプロピル、ジヒドロキシプロピルもしくはトリヒドロキシプロピルであるか、または同じ環炭素中の任意の 2 つの R₉ が、それらが結合する炭素と共にカルボニル基を形成するか、または任意の 2 つの R₉、R₈ および任意の 1 つの R₉、もしくは R₁₀ および任意の 1 つの R₉ が、元のテトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、テトラヒドロピランもしくはジヒドロピラン環と縮合する第 2 のテトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、テトラヒドロピランもしくはジヒドロピラン環を形成するか、または任意の 2 つの R₉、R₈ および任意の 1 つの R₉、もしくは R₁₀ および任意の 1 つの R₉ がメチレン、エチリデン、1 - プロピリデン、2 - プロピリデンもしくはベンジリデン基と共に、元のテトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、テトラヒドロピランもしくはジヒドロピラン環と縮合する環状アセタールもしくはケタール環 (k e t a l r i n g) を形成し；

10

- A A s - が、式 (I I I) のペプチドユニットであり；

【化 4】



20

式中、z は 0 から 10 までの範囲の整数であり、R₁₁ は、- (C H₂)₃ N H C (= N H) N H₂、- (C H₂)₃ N H₂、- (C H₂)₃ N H C O N H₂、- (C H₂)₄ N H C (= N H) N H₂、- (C H₂)₄ N H₂ または - (C H₂)₄ N H C O N H₂ であり、R₁₂ は H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、s e c - ブチル、イソブチル、t e r t - ブチル、シクロブチル、フェニルまたはベンジルであり、R₁₃ は水素、メチル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、s e c - ブチル、イソブチル、t e r t - ブチル、シクロブチル、シクロヘキシル、フェニル、ベンジル、p - ヒドロキシベンジル、- C H₂ O H、- C H (O H) C H₃、- C H₂ C H₂ S C H₃、- C H₂ C O N H₂、- C H₂ C O O H、- C H₂ C H₂ C O N H₂、- C H₂ C H₂ C O O H、- (C H₂)₃ N H C (= N H) N H₂、- (C H₂)₃ N H₂、- (C H₂)₃ N H C O C H₃、- (C H₂)₃ N H C H O、- (C H₂)₄ N H C (= N H) N H₂、- (C H₂)₄ N H₂、- (C H₂)₄ N H C O C H₃、- (C H₂)₄ N H C H O、- (C H₂)₃ N H C O N H₂、- (C H₂)₄ N H C O N H₂、- C H₂ C H₂ C H (O H) C H₂ N H₂、2 - ピリジルメチル、3 - ピリジルメチル、または 4 - ピリジルメチルである、[1] の抗体 - 薬物複合体 (A D C) ；

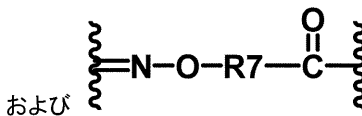
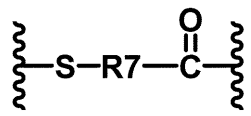
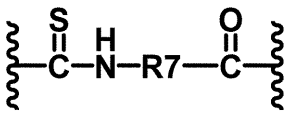
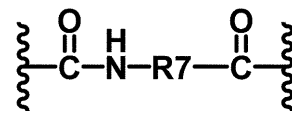
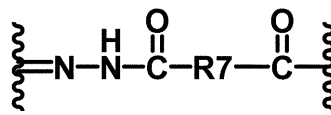
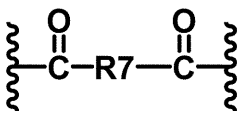
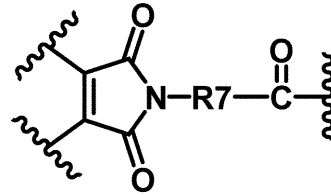
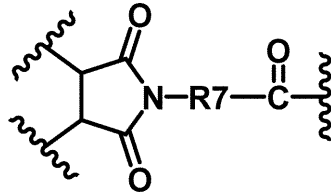
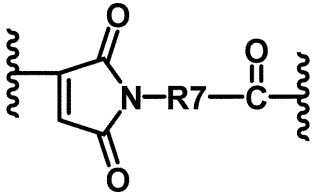
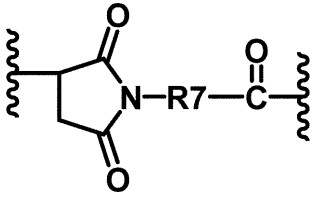
30

[7]

C - が、

40

【化5】



からなる群より選ばれたコンジュゲートユニット (conjugating unit) であり、

式中、R7が、-1,5-ペンチレン-、-1,6-ヘキシレン-、-1,4-シクロヘキシレン-、-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-および-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-CH₂-からなる群より選ばれ、かつrが2~5までの範囲の整数である、[6]の抗体-薬物複合体(ADC)；

[8]

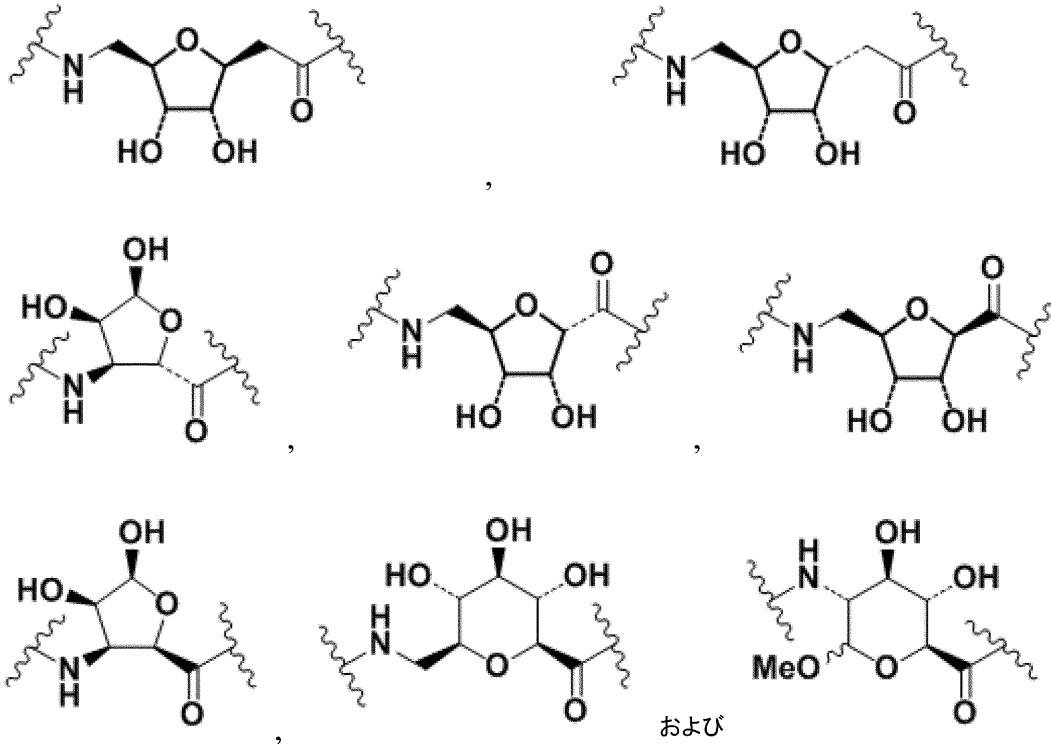
-S A A s - が、

10

20

30

【化6】



10

20

からなる群より選ばれた糖アミノ酸ユニットである、[6]の抗体-薬物複合体(ADC) ;

[9]

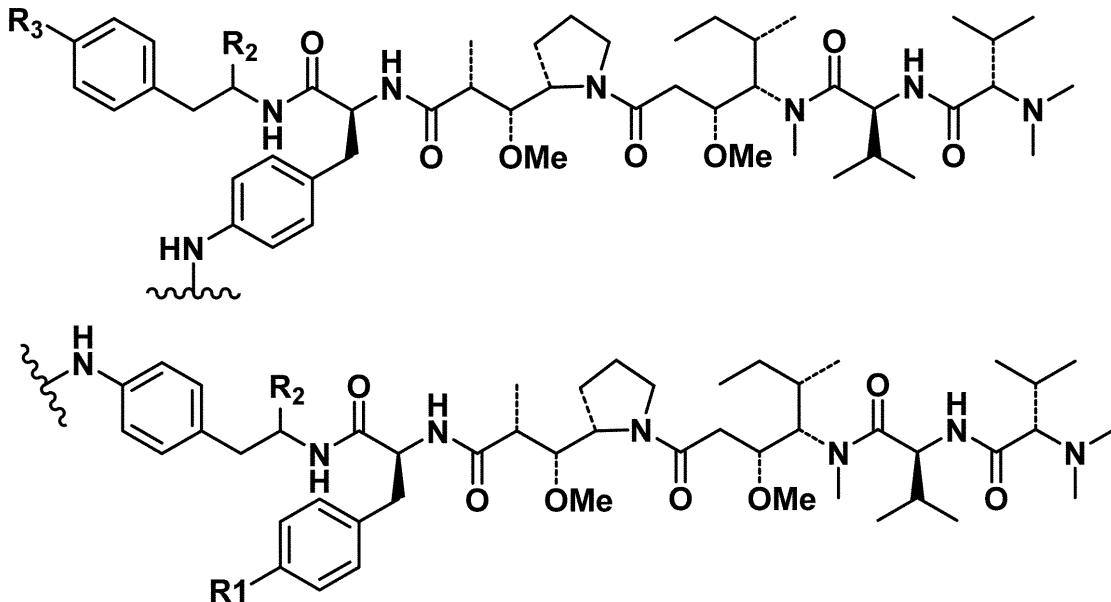
-AAs-が、-Val-Cit-、-Val-Lys-、-Val-Arg-、-Phe-Cit-、-Phe-Lys-および-Phe-Arg-からなる群より選ばれたペプチドユニットである、[6]の抗体-薬物複合体(ADC) ;

[10]

前記薬物ユニットが、

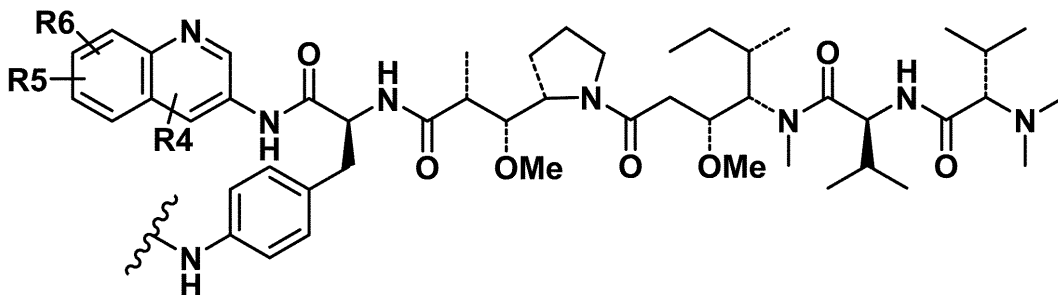
30

【化 7】



10

および



20

からなる群より選ばれた細胞毒性薬であり、

式中、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅およびR₆がそれぞれ独立に、水素、アミノ、ニトロ、ハロゲン、ヒドロキシル、メトキシ、エトキシ、カルボン酸、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、メチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、ジエチルアミノ、1-ピロリジニル、1-ピペリジニル、1-ピペラジニル、アミノカルボニル、メチルアミノカルボニル、ジメチルアミノカルボニル、エチルアミノカルボニル、ジエチルアミノカルボニル、1-ピロリジニルカルボニル、1-ピペリジニルカルボニル、1-ピペラジニルカルボニル、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、またはフェニルである、[1]の抗体-薬物複合体(ADC)；

30

[11]

前記薬物ユニットが標的細胞に対して細胞増殖抑制または細胞毒性活性を有する、[1]の抗体-薬物複合体(ADC)；

[12]

前記薬物ユニットが、アマニチン(amanitin)、アントラサイクリン(anthracycline)、アウリスタチン(auristatin)、バッカチン(baccatin)、カリケアマイシン(calicheimycin)、カンプトテシン(camptothecin)、セマドチン(cemadotin)、コルヒチン(colchicin)、コルセミド(colcemid)、コンブレタスタチン(combretastatin)、クリプトフィシン(cryptophysin)、ディスコデルモリド(discodermolide)、デュオカルマイシン(duocarmycin)、エキノマイシン(echinomycin)、エリュテロピン(eleutherobin)、エポチロン(epothilone)、エストラムスチン(estramustine)、レキシトロプシン(lexitropsin)、メイタンシノイド(maytansinoid)、ネトロプシン(netropsin)、ピューロマイシン(puromycin)、ピロロベンゾジアゼピン(pyrrolobenzodiazepine)、リゾキシシン(rhizoxin)、タキサン(taxane)、チューブリシン(tubulysin)、およびビンカアルカロイド(vinca alkaloid)からなる群より選ばれた細胞毒性薬である、[

40

50

1]の抗体 - 薬物複合体 (ADC) ;

[13]

抗体 - 薬物複合体 (ADC) を形成するための方法であって、以下のステップを含む、方法 :

抗体と還元剤とを緩衝液中で反応させて第1の溶液を作るステップ ;

有機相または水相中でリンカー - 薬物ユニットを調製して第2の溶液を作るステップであって、前記リンカーはグリコペプチドを有する、ステップ ;

前記第1の溶液と前記第2の溶液を混合して混合溶液を作ることによりコンジュゲーションを行うステップであって、前記混合溶液中の有機溶媒の濃度が約0% (v/v) から約20% (v/v) の範囲である、ステップ ; および

前記混合溶液を精製するステップ ;

[14]

前記抗体が、前記抗体のシステイン残基を介して前記リンカーユニットにコンジュゲートする、[13]の、抗体 - 薬物複合体 (ADC) を形成するための方法 ;

[15]

前記抗体が全長抗体または抗体フラグメントである、[13]の、抗体 - 薬物複合体 (ADC) を形成するための方法 ;

[16]

前記抗体が、キメラ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヒト化抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヒト抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、マウス抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ラット抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヤギ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、またはウサギ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメントである、[13]の、抗体 - 薬物複合体 (ADC) を形成するための方法 ;

[17]

前記抗体が、Herceptin、Erbix、HLX-07、EG12014、抗-EpCAM AbおよびIgG1、リツキシマブ (Rituximab)、イブリツモマブチウキセタン (Ibritumomab tiuxetan)、トシツモマブ (Tositumomab)、ブレンツキシマブベドチン (Brentuximab vedotin)、アレムツズマブ (Alemtuzumab)、IGN101、アデカツムマブ (Adecatumumab)、ラベツズマブ (Labetuzumab)、huA33、ペムツモマブ (Pemtumomab)、オレゴボマブ (Oregovomab)、CC49 (ミンレッツモマブ (minretumomab))、cG250、J591、MOv18、MORAb-003 (ファーレッツマブ (farletuzumab))、3F8、ch14.18、KW-2871、hu3S193、IGN311、ベパシズマブ (Bevacizumab)、IM-2C6、CDP791、エタラシズマブ (Etaracizumab)、ボロシキシマブ (Volociximab)、セツキシマブ (Cetuximab)、パニツムマブ (Panitumumab)、ニモツズマブ (Nimotuzumab)、806、トラスツズマブ (Trastuzumab)、ペルツズマブ (Pertuzumab)、MM-121、AMG102、METMAB、SCH900105、AVE1642、IMC-A12、MK-0646、R1507、CP751871、KB004、IIIA4、マパツムマブ (Mapatumumab) (HGS-ETR1)、HGS-ETR2、CS-1008、デノスマブ (Denosumab)、シブロットマブ (Sibrotuzumab)、F19、81C6、ヒト化抗HER2 mAb、OvaRex、Panorex、Cetuximab Erbix、Vitaxin、Campath I/H、Smart MI95、LymphoCide、Smart ID10、Oncolymp、Allomune、Avastin、Epratuzumab、またはCEAcideを含む、[13]の、抗体 - 薬物複合体 (ADC) を形成するための方法 ;

[18]

前記還元剤および還元条件を、前記抗体中に存在する鎖間ジスルフィド結合のうち少なくとも1つが一对の遊離チオールに変わるように選択する、[13]の、抗体 - 薬物複合体 (ADC) を形成するための方法 ;

10

20

30

40

50

[1 9]

前記還元剤が、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、2-アミノエタンチオール、ジチオトレイトール(DTT)、および2-メルカプトエチルアミン塩酸塩(2-MEA)からなる群より選ばれる、[13]の、抗体-薬物複合体(ADC)を形成するための方法；

[2 0]

前記抗体と前記リンカー-薬物ユニットのモル当量比を、前記抗体-薬物複合体が約3.5~約5.5の範囲の平均DARを有するように選択する、[13]の、抗体-薬物複合体(ADC)を形成するための方法；

[2 1]

前記有機溶媒が、ジメチルスルホキシド(DMSO)、アセトニトリル(ACN)、N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、プロピレングリコール(PG)、またはこれらの組み合わせを含む、[13]の、抗体-薬物複合体(ADC)を形成するための方法。

【図面の簡単な説明】

【0011】

添付の図面を参照しながら以下の詳細な説明および実施例を読むことにより、本発明をより十分に理解することができる：

【図1】図1は、本開示のある実施形態による抗体-薬物複合体(ADC)を形成するための方法を説明するフロー図である。

【図2】図2は、本開示の1実施形態によるEG12014-MHT-71のHICプロファイルを示している。

【図3A】図3Aは、本開示の1実施形態によるEG12014-MHT-71のHICプロファイルを示している。

【図3B】図3Bは、本開示の1実施形態によるEG12014-MHT-71のHICプロファイルを示している。

【図4】図4は、本開示の1実施形態によるIgG1-MHT-47のHICプロファイルを示している。

【図5】図5は、本開示の1実施形態によるIgG1-MHT-47のHICプロファイルを示している。

【図6】図6は、本開示の1実施形態によるHerceptin(登録商標)-MHT-47のHICプロファイルを示している。

【図7】図7は、本開示の1実施形態によるHerceptin(登録商標)-CCH-038のHICプロファイルを示している。

【図8】図8は、本開示の1実施形態によるErbibitux-CCH-028のHICプロファイルを示している。

【図9】図9は、本開示の1実施形態によるErbibitux-CCH-035のHICプロファイルを示している。

【図10】図10は、本開示の1実施形態によるErbibitux-CCH-041のHICプロファイルを示している。

【図11】図11は、本開示の1実施形態によるErbibitux-FCW-016のHICプロファイルを示している。

【図12】図12は、本開示の1実施形態によるErbibitux-CCH-038のHICプロファイルを示している。

【図13A】図13Aは、本開示の1実施形態によるErbibitux-WHY-46のHICプロファイルを示している。

【図13B】図13Bは、本開示の1実施形態によるErbibitux-WHY-46のSECプロファイルを示している。

【図14A】図14Aは、本開示の1実施形態によるErbibitux-MHT-71のHICプロファイルを示している。

【図14B】図14Bは、本開示の1実施形態によるErbibitux-MHT-71のS

10

20

30

40

50

ECプロファイルを示している。

【図15】図15は、本開示の1実施形態によるHLX-07-MHT-71のHICプロファイルを示している。

【図16A】図16Aは、本開示の1実施形態によるコンジュゲートしていない抗-EpCAM AbのHICプロファイルである。

【図16B】図16Bは、本開示の1実施形態によるコンジュゲートした抗-EpCAM-MHT-71のHICプロファイルである。

【図17A】図17Aは、本開示のある実施形態によるErbixおよびErbix-ADCの40における熱ストレス安定性試験の結果を示している。

【図17B】図17Bは、本開示のある実施形態によるErbixおよびErbix-ADCの50における熱ストレス安定性試験の結果を示している。

【図18】図18は、本開示のある実施形態による4下での液体形態のErbix-MHT-71の貯蔵安定性試験の結果を示している。

【図19】図19は、本開示のある実施形態によるErbix、Erbix-ADC、APEA-AF、およびMMAE注入マウスの腫瘍増殖の変化の結果を示している。

【図20】図20は、本開示のある実施形態によるErbix、Erbix-ADC、APEA-AF、およびMMAE注入マウスの体重の変化の結果を示している。

【発明を実施するための形態】

【0012】

詳細な説明

以下の詳細な説明においては、説明の目的で、開示される実施形態が十分に理解されるように多数の特定の詳細が記載される。しかし、これらの特定の詳細がなくとも、1つまたは複数の実施形態が実施可能であることは明らかであろう。また、図を簡潔とするため、周知の構造および装置は概略的に示される。

【0013】

本開示は、水溶解度が高まった新規なリンカー-毒素を含むADCを提供する。ADCのコンジュゲーションプロセスにおいて、有機溶媒の使用が減り、ひいては回避され、これによりADCの凝集、および残留した有機溶媒により引き起こされる問題が低減される。故に、ADCの安定性が改善される。

【0014】

前述の新規リンカー-毒素は、ペントース（例えばリボース、キシロースまたはアラビノースなど）およびヘキソース（例えばグリコサミンまたはグルコースなど）のような糖類（sugar groups）を、カテプシンBに認識され得る、Val-CitおよびPhe-Citのようなジペプチドリンカーに導入するように設計されている。換言すると、そのC末端にカテプシンBにより認識されるジペプチドおよびそのN末端に高親水性の糖アミノ酸ユニットを有することを特徴とする新規糖アミノ酸含有リンカーを、新規リンカー-毒素が含むことで、当該リンカーまたはリンカー含有物質の水溶解度を改善する。リンカーのC末端におけるカルボン酸基およびN末端におけるアミノ基はいずれも、スペーサ、リンカー、リガンド、薬物、毒素、イメージング分子（imaging molecule）、抗体、ペプチドまたは送達分子を結合させるための連結点となり得る。

【0015】

本開示では、数個の抗体と糖アミノ酸含有リンカー-毒素とがコンジュゲートして新規ADCを形成する。1実施形態において、本出願は、式(I)の抗体-薬物複合体(ADC)またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を提供する：

$A - (L - D)_p$ (I)

式(I)中、Aは抗体を表す。いくつかの実施形態において、抗体は、全長抗体または抗体フラグメントであってよい。いくつかの実施形態において、抗体は、キメラ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヒト化抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヒト抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、またはマウス抗体もしくはその

10

20

30

40

50

機能的に活性なフラグメントであり得る。他の実施形態において、抗体は、ラット抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヤギ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、またはウサギ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメントなどのような他の種 (species) 由来の抗体であり得る。いくつかの実施形態において、抗体は、抗体のシステイン残基を介してリンカーユニットにコンジュゲートする。いくつかの実施形態において、抗体は、腫瘍、慢性リンパ性白血病 (CLL)、または急性骨髄性白血病 (AML) の治療に用いられる治療用抗体であってよい。ある実施形態では、抗体には、Herceptin、Erbbitux、HLX-07、EG12014、抗-EpCAM Ab、IgG1、リツキシマブ (Rituximab)、イブリツモマブチウキセタン (Ibritumomab tiuxetan)、トシツモマブ (Tositumomab)、ブレンツキシマブ ベドチン (Brentuximab vedotin)、アレムツズマブ (Alemtuzumab)、IGN101、アデカツムマブ (Adecatumumab)、ラベツズマブ (Labetuzumab)、huA33、ペムツモマブ (Pemtumomab)、オレゴボマブ (Oregovomab)、CC49 (ミンレツモマブ (minretumomab))、cG250、J591、MOv18、MORAb-003 (ファーレツズマブ (farletuzumab))、3F8、ch14.18、KW-2871、hu3S193、IgN311、ベバシズマブ (Bevacizumab)、IM-2C6、CDP791、エタラシズマブ (Etaracizumab)、ボロシキシマブ (Volociximab)、セツキシマブ (Cetuximab)、パニツムマブ (Panitumumab)、ニモツズマブ (Nimotuzumab)、806、トラストズマブ (Trastuzumab)、ペルツズマブ (Pertuzumab)、MM-121、AMG102、METMAB、SCH900105、AVE1642、IMC-A12、MK-0646、R1507、CP751871、KB004、IIIA4、マパツムマブ (Mapatumumab) (HGS-ETR1)、HGS-ETR2、CS-1008、デノスマブ (Denosumab)、シブロツツマブ (Sibrotuzumab)、F19、または81C6が含まれ得る。しかしながら、上述の抗体は単に例であり、本発明の範囲が限定されることは意図されていないと理解されるべきである。抗体における鎖間ジスルフィド結合が遊離チオールに還元されてリンカーに結合することのできるものであれば、その抗体は本開示に用いることができる。

【0016】

1実施形態において、抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってよい。抗体は、例えば、癌細胞抗原、ウイルス抗原、微生物抗原、タンパク質、ペプチド、炭水化物、化学薬品、核酸、またはそのフラグメントを含む特定の抗原決定基に対するものであり得る。ポリクローナル抗体を作製する方法は、従来技術において既知である。目的の抗原に対するモノクローナル抗体 (mAb) は、従来技術において既知である任意の技術を用いて作製され得る。これらには、限定はされないが、元はKohlerおよびMilsteinにより記述された (1975, Nature 256, 495-497) ハイブリドーマ技術 (hybridoma technique)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72)、ならびにEBV-ハイブリドーマ技術 (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) が含まれる。かかる抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、およびIgDを含む任意の免疫グロブリンクラスおよびその任意のサブクラスのものであってよい。本開示で用いるmAbsを産生するハイブリドーマは、*in vitro*または*in vivo*で培養することができる。

【0017】

モノクローナル抗体は、例えば、ヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、抗体フラグメント、またはキメラ抗体 (例えば、ヒト-マウス抗体) であり得る。ヒトモノクローナル抗体は、従来技術において既知である多数の技術のいずれかによって作製することができる (例えば、Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72-79; and Olsson et al., 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16)。

【0018】

抗体はまた二重特異性抗体であってよい。二重特異性抗体を作製するための方法は従来技術において既知である。従来の全長二重特異性抗体の作製は、2つの免疫グロブリン

の重鎖-軽鎖ペアの共発現に基づくものであり、2つの鎖は異なる特異性を有する（例えばMilstein et al., 1983, Nature 305:537-539; 国際特許公開第W O 9 3 / 0 8 8 2 9 号公報, Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659参照）。

【0019】

異なるアプローチによれば、所望の結合特異性を持つ抗体可変領域（抗体-抗原結合部位）は、免疫グロブリン定常領域配列に融合される。融合は、ヒンジ、C H 2、およびC H 3領域の少なくとも1部分を含む免疫グロブリン重鎖定常領域とするのが好ましい。融合の少なくとも1つに、軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域（C H 1）が存在することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードする配列を持つ核酸と、必要であれば、免疫グロブリン軽鎖が、別々の発現ベクターに挿入され、かつ適した宿主生物にコトランスフェクト（co-transfected）される。このことは、コンストラクションに用いられる3つのポリペプチド鎖の割合が等しくないことで最適な収量が得られる実施形態において、3つのポリペプチドフラグメントの互いの比率の調整に柔軟性を与える。しかしながら、等しい割合での少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高収量につながる場合、または割合が特に重要なものではない場合には、2つまたは3つすべてのポリペプチド鎖のコード配列を1つの発現ベクターに挿入することが可能である。

10

【0020】

例えば、二重特異性抗体は、第1の結合特異性を持つハイブリッド免疫グロブリン重鎖を一方の腕に、ハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペア（第2の結合特異性を備えている）を他方の腕に有し得る。二重特異性分子の半分のみ免疫グロブリン軽鎖が存在することで容易な分離の方法が得られるため、この非対称構造は、望まない免疫グロブリン鎖の組み合わせからの所望の二重特異性化合物の分離を容易にする（国際特許出願号W O 9 4 / 0 4 6 9 0号公報、その全体が参照することにより本明細書に援用される）。

20

【0021】

二重特異性抗体の生成のさらなる詳細については、例えば、Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology 121:210; Rodrigues et al., 1993, J. Immunology 151:6954-6961; Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167; Carter et al., 1995, J. Hematotherapy 4:463-470; Merchant et al., 1998, Nature Biotechnology 16:677-681を参照されたい。このような技術を用いることで、本明細書で定義されるような疾病の治療または予防に使用するために二重特異性抗体を作製することができる。

30

【0022】

二重機能抗体（Bifunctional antibody）はまた、欧州特許公開E P A 0 1 0 5 3 6 0号公報にも記載されている。この参照文献に開示されているように、ハイブリッドまたは二重機能性抗体は、生物学的（つまり細胞融合技術）により、または特に架橋剤もしくはジスルフィド架橋形成試薬（disulfide-bridge forming reagent）を用いて化学的に得られ、かつ抗体全体およびそのフラグメントを含み得る。かかるハイブリッド抗体を得るための方法が、例えば、国際特許公開W O 8 3 / 0 3 6 7 9号公報、および欧州特許公開E P A 0 2 1 7 5 7 7号公報に開示されており、両者は参照することにより本明細書に援用される。

【0023】

抗体はまた、標的抗原（例えば、癌抗原、ウイルス抗原、微生物抗原または細胞もしくはマトリックスに結合したその他の抗体）に免疫特異的に結合する抗体の機能的に活性なフラグメント、誘導体または類似体であってもよい。この点において、「機能的に活性な」とは、フラグメント、誘導体または類似体が、そのフラグメント、誘導体または類似体の由来元の抗体が認識したのと同じ抗原を認識できることを意味する。具体的には、例示的な実施形態において、免疫グロブリン分子のイデオタイプの抗原性は、抗原を特異的に認識するC D R配列に対してC末端にあるフレームワークおよびC D R配列の欠失により高めることができる。どのC D R配列が抗原に結合するかを判断するのに、従来技術において既知である任意の結合アッセイ法（例えば、B I A コアアッセイ）により、C D R配列を含有する合成ペプチドを、抗原と共に結合アッセイに使用することができる（例え

40

50

ば、Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md.; Kabat et al., 1980, J. Immunology 125(3):961-969参照)。

【0024】

他の有用な抗体には、限定はされないが、抗体のF(ab')₂フラグメント、Fabフラグメント、Fab'、Fvフラグメントならびに重鎖および軽鎖ダイマー、または例えばFvsもしくは単鎖抗体(SCA)であるその任意の最小フラグメントのような抗体のフラグメントが含まれる(例えば、米国特許第4946778号; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; and Ward et al., 1989, Nature 334:544-54に記載されている)。

10

【0025】

ヒトおよび非ヒト部分の両方を含むキメラおよびヒト化モノクローナル抗体のような組換え抗体であって、標準的な組換えDNA技術を用いて作製され得る組換え抗体もまた、利用可能である(例えば、米国特許第4816567号; および米国特許第4816397号参照)。ヒト化抗体は、ヒト以外の種に由来する1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)と、ヒト免疫グロブリン分子に由来するフレームワーク領域と、を有するヒト以外の種に由来する抗体分子である(米国特許第5585089号参照)。キメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、従来技術において既知である組換えDNA技術により、例えば、国際特許公開第WO87/02671号; 欧州特許公開第0184187号; 欧州特許公開第0171496号; 欧州特許公開第0173494号; 国際特許公開第WO86/01533号; 米国特許第4816567号; 欧州特許公開第012023号; Berter et al., 1988, Science 240:1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Cancer Res. 47:999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314:446-449; Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oiet al., 1986, BioTechniques 4:214; U.S. Pat. No. 5,225,539; Jones et al., 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan et al., 1988, Science 239:1534; および Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060に記載された方法を用い、作製することができる。

20

【0026】

完全ヒト抗体を用いることもできる。ヒト抗体は、例えば、内在性免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子を発現することができないがヒト重鎖および軽鎖遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて作製され得る。トランスジェニックマウスを、通常の方式により、選択された抗原、例えば、本開示のポリペプチドの全部または一部で免疫する。抗原に対するモノクローナル抗体は従来ハイブリドーマ技術を用いて得ることができる。トランスジェニックマウス内のヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化中に再編成し(rearrange)、続いてクラススイッチングおよび体細胞突然変異を起こす。よって、かかる技術を用いると、治療上有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE抗体を作製することができる。ヒト抗体を作製するこの技術の概要については、LonbergおよびHuszar(1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93)を参照されたい。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を作製するこの技術の詳細な議論、ならびにかかる抗体を作製するためのプロトコールについては、例えば、米国特許第5625126号; 5633425号; 5569825号; 5661016号; および5545806号を参照されたい。他のヒト抗体は、市販品、例えばAbgenix, Inc. (Freemont, Calif.) および Genpharm (San Jose, Calif.) から入手可能である。

30

40

【0027】

選択されたエピトープを認識するヒト抗体はまた、「誘導選択(guided selection)」と称される技術を用いても生成され得る。このアプローチでは、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えばマウス抗体を用いて、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選別を誘導する(例えば、Jespers et al., 1994, Biotechnology 12:899-903参照)。ヒト

50

抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーなどの従来技術において既知である各種技術を用いても生成され得る（例えば、Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Quan and Carter, 2002, "The rise of monoclonal antibodies as therapeutics," in Anti-IgE and Allergic Disease, Jardieu, P. M. and Fick Jr., R. B, eds., Marcel Dekker, New York, N.Y., Chapter 20, pp. 427-469参照）。

【0028】

他の実施形態において、抗体は、抗体の融合タンパク質またはその機能的に活性なフラグメントである。例えば、抗体は、N-末端またはC-末端いずれかにおける共有結合（例えばペプチド結合）により、抗体ではない別のタンパク質のアミノ酸配列（またはその一部、例えばタンパク質の少なくとも10、20もしくは50アミノ酸部分）と融合され得る。

10

【0029】

抗体には類似体および誘導体も含まれ、それらはつまり、共有結合が抗体にその抗原結合免疫特異性 (antigen binding immunospecificity) を保持させ得るものであるならば、任意のタイプの分子の共有結合によって修飾される。例えば、それらに限定するものではないが、抗体の誘導体および類似体には、例えばグリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護基 (protectin/blocking group) による誘導体化 (derivatization)、タンパク質切断 (proteolytic cleavage)、細胞性抗体ユニットまたは他のタンパク質との結合などによってさらに修飾されているものが含まれる。多くの化学修飾のいずれかは、限定はされないが、特異的な化学的切断 (specific chemical cleavage)、アセチル化、ホルミル化、チュニカマイシン存在下での代謝合成 (metabolic synthesis) などが含まれる公知の技術によって実施され得る。加えて、類似体または誘導体は、1つまたは複数の非天然アミノ酸を含んでよい。

20

【0030】

抗体は、Fcレセプターと相互作用するアミノ酸残基に修飾（例えば置換、欠失または付加）を有してよい。詳細には、抗体には、抗FcドメインとFcRnレセプター間の相互作用に関与すると確認されたアミノ酸残基に修飾を有する抗体が含まれる（例えば、国際特許公開WO97/34631号参照、その全体が参照することにより本明細書に援用される）。標的抗原に免疫特異的な抗体は、市販品もしくはその他のソースから得るか、または例えば化学合成もしくは組換え発現技術のような当業者に知られた任意の方法により作製することが可能である。癌細胞抗原に免疫特異的な抗体をコードするヌクレオチド配列は、例えば、GenBankデータベースもしくはそれに類似するデータベース、文献刊行物から、または通常のクローニングおよびシーケンシングにより得ることができる。

30

【0031】

癌の治療に用いることのできる抗体の例には、限定はされないが、ヒト化抗HER2モノクローナル抗体、HERCEPTIN（登録商標）（トラスツズマブ；Genentech）；非ホジキンリンパ腫患者の治療に用いるキメラ抗CD20モノクローナル抗体であるRITUXAN（登録商標）（リツキシマブ；Genentech）；卵巣癌の治療に用いるマウス抗体であるOvaRex（AltaRex Corporation, MA）；大腸癌の治療に用いるマウスIgG2a抗体であるPanorex（Glaxo Wellcome, NC）；頭頸部癌のような上皮成長因子陽性癌 (epidermal growth factor positive cancer) の治療に用いる抗-EGFR IgGキメラ抗体であるCetuximab Erbitux（Imclone Systems Inc., NY）；肉腫の治療に用いるヒト化抗体であるVitaxin（Medimmune, Inc., MD）；慢性リンパ性白血病（CLL）の治療に用いるヒト化IgG1抗体であるCampath 1/H（Leukosite, MA）；急性骨髄性白血病（AML）の治療に用いるヒト化抗CD33 IgG抗体であるSmart MI95（Protein Design Labs, Inc., CA）；非ホジキンリンパ腫の治療に用いるヒト化抗

40

50

CD22 IgG抗体であるLymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ); 非ホジキンリンパ腫の治療に用いるヒト化抗HLA-DR抗体であるSmart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA); 非ホジキンリンパ腫の治療に用いる放射標識マウス抗-HLA-Dr10抗体であるOncoly m (Techniclone, Inc., CA); ホジキン病または非ホジキンリンパ腫の治療に用いるヒト化抗-CD2 mAbであるAllomune (BioTransplant, CA); 肺および大腸癌の治療に用いる抗-VEGFヒト化抗体であるAvastin (Genentech, Inc., CA); 非ホジキンリンパ腫の治療に用いる抗-CD22抗体であるEpratuzumab (Immunomedics, Inc., NJ and Amgen, CA); ならびに大腸癌の治療に用いるヒト化抗-CEA抗体であるCEAcide (Immunomedics, NJ)が含まれる。 10

【0032】

癌の治療に有用な他の抗体には、限定はされないが、以下の抗原(括弧内に例示の癌が示されている): CA125(卵巣癌)、CA15-3(癌種(carcinoma))、CA19-9(癌種)、L6(癌種)、Lewis Y(癌種)、Lewis X(癌種)、 α -フェトプロテイン(癌種)、CA242(大腸癌)、胎盤性アルカリフォスファターゼ(placental alkaline phosphatase)(癌種)、前立腺特異的膜抗原(prostate specific membrane antigen)(前立腺癌)、前立腺酸性フォスファターゼ(prostatic acid phosphatase)(前立腺癌)、上皮成長因子(癌種)、MAGE-1(癌種)、MAGE-2(癌種)、MAGE-3(癌種)、MAGE-4(癌種)、抗トランスフェリンレセプター(癌種)、p97(メラノーマ)、MUC1-KLH(乳癌)、CEA(大腸癌)、gp100(メラノーマ)、MART1(メラノーマ)、前立腺特異抗原(PSA)(前立腺癌)、IL-2レセプター(T細胞白血病およびリンパ種)、CD20(非ホジキンリンパ腫)、CD52(白血病)、CD33(白血病)、CD22(リンパ種)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(癌種)、CD38(多発性骨髄腫)、CD40(リンパ種)、ムチン(癌種)、P21(癌種)、MPG(メラノーマ)、およびNeu癌遺伝子産物(oncogene product)(癌種)に対する抗体が含まれる。いくつかの特定の有用な抗体には、限定はされないが、BR96 mAb (Trail et al., 1993, Science 261:212-215)、BR64 (Trail et al., 1997, Cancer Research 57:100-105)、S2C6 mAbのようなCD40抗原に対するmAbs (Francisco et al., 2000, Cancer Res. 60:3225-3231)とそのキメラ型およびヒト化変異体、cD33抗原に対するmAbs; EphA2抗原に対するmAbs; 1F6 mAbおよび2F2 mAbのようなCD70抗原に対するmAbsとそのキメラ型およびヒト化変異体、AC10のようなCD30抗原に対するmAbs (Bowen et al., 1993, J. Immunol. 151:5896-5906; Wahl et al., 2002, Cancer Res. 62(13):3736-42)とそのキメラ型およびヒト化変異体が含まれる。その他多くの腫瘍関連抗原に結合するインターナライジング抗体が利用可能であり、かつすでに評価されている(例えばFranke et al., 2000, Cancer Biother. Radiopharm. 15:459-76; Murray, 2000, Semin. Oncol. 27:64-70; Breitling et al., Recombinant Antibodies, John Wiley, and Sons, New York, 1998参照)。 20 30

【0033】

いくつかの実施形態では、自己免疫疾患の治療または予防に用いられる公知の抗体が、本開示の組成および方法に基づいて用いられる。自己免疫性抗体の産生を担う細胞の抗原に免疫特異的な抗体は、市販品もしくはその他のソースから得るか、または例えば化学合成もしくは組換え発現技術のような当業者に知られた任意の方法により作製することが可能である。 40

【0034】

いくつかの実施形態では、抗体は、例えば、抗核抗体; 抗-dsDNA; 抗-ssDNA、抗-カルジオリピン抗体IgM、IgG; 抗-リン脂質抗体IgM、IgG; 抗-SM抗体; 抗-ミトコンドリア抗体; 甲状腺抗体; ミクロソーム抗体; サイログロブリン抗体; 抗-SCl70; 抗-Jo; 抗-U1RNP; 抗-La/SSB; 抗-SSA 50

; 抗 - S S B ; 抗 - 壁細胞 (perital cell) 抗体 ; 抗 - ヒストン ; 抗 - R N P ; C A N C A ; P A N C A ; 抗セントロメア ; 抗フィブリラリン、および抗 - G B M 抗体のような、自己免疫疾患の治療に対して免疫特異的なものである。1実施形態において、抗体は、自己免疫疾患に関連する活性化リンパ球に結合する。

【 0 0 3 5 】

ある実施形態では、抗体は、標的細胞 (例えば、活性化リンパ球) で発現するレセプターまたはレセプター複合体に結合することができる。レセプターまたはレセプター複合体には、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、T N F レセプタースーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカインレセプター、ケモカインレセプター、主要組織適合タンパク質 (major histocompatibility protein)、レクチンまたは補体制御タンパク質 (complement control protein) が含まれ得る。適した免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーの限定されない例は、C D 2、C D 3、C D 4、C D 8、C D 1 9、C D 2 2、C D 2 8、C D 7 9、C D 9 0、C D 1 5 2 / C T L A 4、P D 1、および I C O S である。適した T N F レセプタースーパーファミリーメンバーの限定されない例は、C D 2 7、C D 4 0、C D 9 5 / F a s、C D 1 3 4 / O X 4 0、C D 1 3 7 / 4 1 B B、T N F R 1、T N F R 2、R A N K、T A C I、B C M A、オステオプロテグリン、A p o 2 / T R A I L R 1、T R A I L R 2、T R A I L R 3、T R A I L R 4、および A P O 3 である。適したインテグリンの限定されない例は、C D 1 1 a、C D 1 1 b、C D 1 1 c、C D 1 8、C D 2 9、C D 4 1、C D 4 9 a、C D 4 9 b、C D 4 9 c、C D 4 9 d、C D 4 9 e、C D 4 9 f、C D 1 0 3、および C D 1 0 4 である。適したレクチンの限定されない例は、C 型、S 型、および I 型レクチンである。

10

20

【 0 0 3 6 】

別の特定な実施形態において、ウイルスまたは微生物抗原に免疫特異的な有用な抗体は、モノクローナル抗体である。抗体は、キメラ、ヒト化またはヒトモノクローナル抗体であり得る。本明細書で使用される場合に、用語「ウイルス抗原」には、限定されないが、免疫応答を引き出し得る任意のウイルスペプチド、ポリペプチドタンパク質 (例えば、H I V g p 1 2 0、H I V n e f、R S V F 糖タンパク質、インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ、インフルエンザウイルスヘマグルチニン、H T L V t a x、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 (例えば、g B、g C、g D および g E) ならびに B 型肝炎表面抗原) が含まれる。本明細書で使用される場合に、用語「微生物抗原」には、限定はされ

30

40

【 0 0 3 7 】

ウイルスまたは微生物抗原に免疫特異的な抗体は、市販品、例えば B D B i o s c i e n c e s (San Francisco, Calif.)、C h e m i c o n I n t e r n a t i o n a l , I n c . (Temecula, Calif.)、もしくは V e c t o r L a b o r a t o r i e s , I n c . (Burlingame, Calif.) から入手するか、または例えば化学合成もしくは組換え発現技術のような当業者に知られた任意の方法により作製することが可能である。ウイルスまたは微生物抗原に免疫特異的な抗体をコードするヌクレオチド配列は、例えば、G e n B a n k データベースもしくはそれに類似するデータベース、文献刊行物から、または通常のクローニングおよびシーケンシングによって得ることができる。

【 0 0 3 8 】

特定の実施形態において、有用な抗体は、本明細書に開示された方法によるウイルスまたは微生物感染の治療または予防に有用なものである。ウイルス感染または微生物感染の治療に有用である利用可能な抗体の例には、限定されないが、R S V 感染患者の治療に有用なヒト化抗 - 呼吸器合胞体ウイルス (R S V) モノクローナル抗体である S Y N A G I S (M e d i m m u n e , I n c . , M D) ; H I V 感染の治療に有用な C D 4 融合抗体である P R O 5 4 2 (P r o g e n i c s) ; B 型肝炎ウイルスの治療に有用なヒト抗体である O S T A V I R (P r o t e i n D e s i g n L a b s , I n c . , C A) ; サ

50

イトメガロウイルス (CMV) の治療に有用なヒト化 IgG1 抗体である PROTOVIR (Protein Design Labs, Inc., CA); および抗-LPS 抗体が含まれる。

【0039】

感染症の治療に有用な他の抗体には、限定されないが、細菌 (例えば、化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、肺炎レンサ球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、インフルエンザ菌 (*Hemophilus influenzae*)、クレブシエラ肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、クレブシエラオツェーナ (*Klebsiella ozaenas*)、クレブシエラリノシエロモーティス (*Klebsiella rhinoscleromatis*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、カンピロバクター (ビブリオ) フィータス (*Campylobacter (Vibrio) fetus*)、アエロモナスハイドロフィラ (*Aeromonas hydrophila*)、セレウス菌 (*Bacillus cereus*)、エドワードシエラタルダ (*Edwardsiella tarda*)、エンテロコリチカ菌 (*Yersinia enterocolitica*)、ペスト菌 (*Yersinia pestis*)、仮性結核菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)、志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*)、フレキシネル菌 (*Shigella flexneri*)、ソンネ赤痢菌 (*Shigella sonnei*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*)、フランベジアトレポネーマ (*Treponema pertenuis*)、トレポネーマカラテネウム (*Treponema carateneum*)、ヴァンサンボレリア (*Borrelia vincentii*)、ボレリアブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、黄疸出血病レプトスピラ (*Leptospira icterohemorrhagiae*)、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、ニューモシスチスカリニ (*Pneumocystis carinii*)、野兔病菌 (*Francisella tularensis*)、ウシ流産菌 (*Brucella abortus*)、ブタ流産菌 (*Brucella suis*)、マルタ熱菌 (*Brucella melitensis*)、マイコプラズマ属の種 (*Mycoplasma spp.*)、発疹チフスリケッチア (*Rickettsia prowazekii*)、リケッチアツツグムシ (*Rickettsia tsutsugumushi*)、クラミジア属の種 (*Chlamydia spp.*); 病原菌 (例えばコクシジオイデスイミチス (*Coccidioides immitis*)、アスペルギルスフミガーツフ (*Aspergillus fumigatus*)、カンジダアルビカンス (*Candida albicans*)、プラストミセスデルマティティディス (*Blastomyces dermatitidis*)、クリプトコッカスネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、ヒストプラズマカプスラーツム (*Histoplasma capsulatum*); 原生動物 (赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)、トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*)、口腔トリコモナス (*Trichomonas tenax*)、腸トリコモナス (*Trichomonas hominis*)、膣トリコモナス (*Trichomonas vaginalis*)、ガンビアトリパノソーマ (*Trypanosoma gambiense*)、ローデシアトリパノソーマ (*Trypanosoma rhodesiense*)、クルーズトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*)、ドノバンリーシュマニア (*Leishmania donovani*)、熱帯リーシュマニア (*Leishmania tropica*)、ブラジルリーシュマニア (*Leishmania braziliensis*)、ニューモシスティス性肺炎 (*Pneumocystis pneumonia*)、三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*)、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、四日熱マラリア原虫 (*Plasmodium malariae*); または蠕虫 (蟯虫 (*Enterobius vermicularis*)、ヒト鞭虫 (*Trichuris trichiura*)、回虫 (*Ascaris lumbricoides*)、トリヒナ (*Trichinella spiralis*)、糞線虫 (*Stroglyoides stercoralis*)、日本住血吸虫 (*Schistosoma japonicum*)、マンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、ビルハルツ住血吸虫 (*Schistosoma haematobium*)、および十二指腸虫 (hookworms) の病原株に由来する抗原に対する抗体が含まれる。

【0040】

ウイルス性疾患の治療のための本開示における有用な他の抗体には、限定されないが、限定しない例として：ポックスウイルス科 (Poxviridae)、ヘルペスウイルス科 (Herpesviridae)、単純ヘルペスウイルス1、単純ヘルペスウイルス2、アデノウイルス科 (Adenoviridae)、パポウイルス科 (Papovaviridae)、エンテロウイルス科 (Enterovirida

10

20

30

40

50

e)、ピコルナウイルス科 (Picornaviridae)、パルボウイルス科 (Parvoviridae)、レオウイルス科 (Reoviridae)、レトロウイルス科 (Retroviridae)、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎、はしか、呼吸器合胞体ウイルス、風疹、アルボウイルス科 (Arboviridae)、ラブドウイルス科 (Rhabdoviridae)、アレナウイルス科 (Arenaviridae)、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、非A/非B型肝炎ウイルス、ライノウイルス科 (Rhinoviridae)、コロナウイルス科 (Coronaviridae)、ロタウイルス科 (Rotoviridae)、およびヒト免疫不全ウイルスを含む病原性ウイルスの抗原に対する抗体が含まれる。

【0041】

抗体はまた、標的細胞または標的細胞群上に存在する抗体であってもよい。例えば、膜貫通ポリペプチドおよび他のマーカーは、1つまたは複数の正常細胞（例えば非癌性細胞）に比べ、1つまたは複数の特定のタイプの標的細胞（例えば癌細胞）の表面で特異的に発現し得る。しばしば、かかるマーカーは、正常細胞の表面におけるそれらに比べ、標的細胞の表面でより多量に発現するか、またはより優れた免疫原性を示す。かかる細胞表面抗原ポリペプチドの同定は、抗体に基づく療法 (antibody-based therapy) による破壊 (destruction) のための、細胞に特異的にターゲティングする能力を生みだしてきた。よって、いくつかの実施形態では、抗体には、限定はされないが、腫瘍関連抗原 (TAA) に対する抗体が含まれる。かかる腫瘍関連抗原は、従来技術において公知であり、かつ従来技術で周知である方法および情報を用いて作製し、抗体の生成に使用することができる。

10

20

【0042】

式 (I) 中、- (L - D) はリンカー - 薬物ユニットであり、このうち L は、グリコペプチドを有するリンカーユニットを表し、D は薬物ユニットを表す。式 (I) 中、p は、式 (I) における抗体 A に存在する鎖間ジスルフィド結合の数に応じた 1 から 26 までの範囲の整数であり得る。1実施形態では、p は 2 から 8 までの範囲の整数、または整数 4 であり得る。1実施形態では、p は 2 から 12 までの範囲の整数、または整数 8 であり得る。1実施形態では、p は 2 から 26 までの範囲の整数、または整数 12 であり得る。1実施形態では、p は整数 26 であり得る。

【0043】

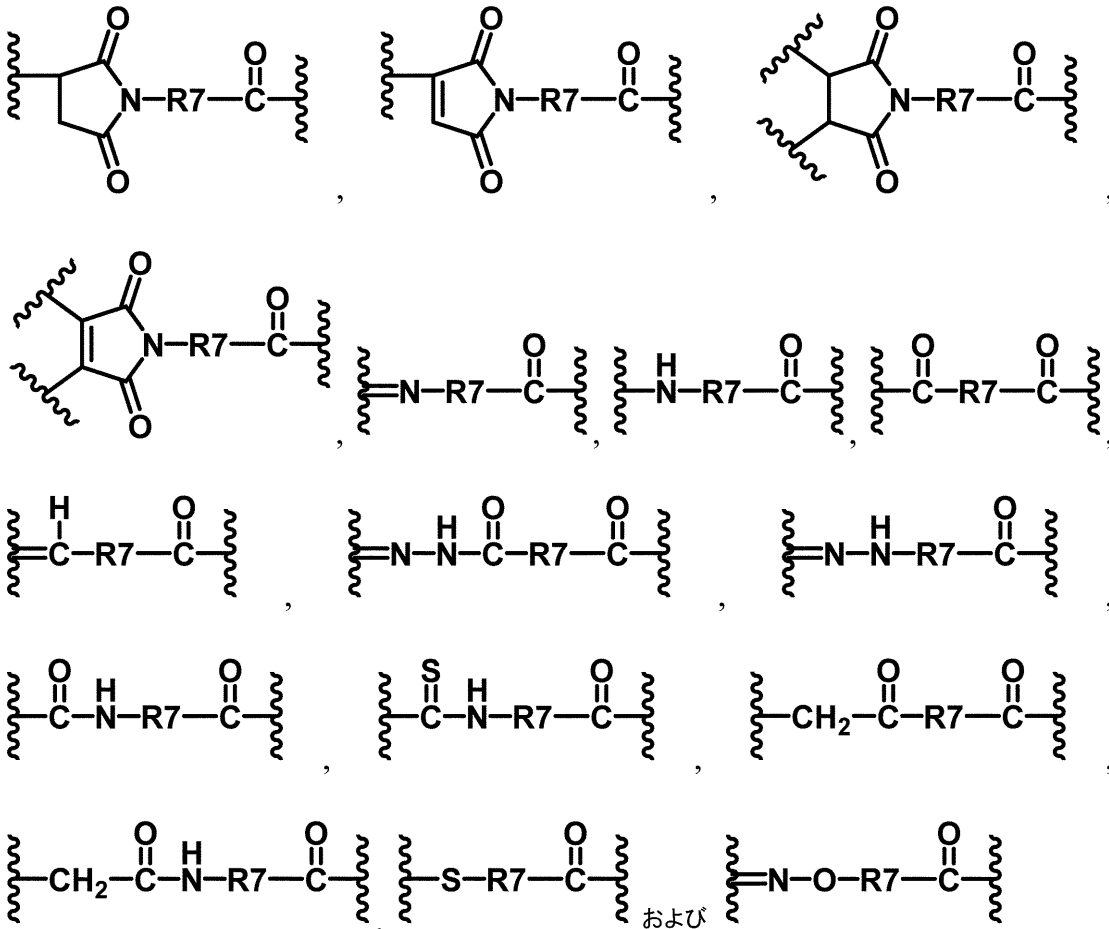
いくつかの実施形態において、本開示のリンカーユニット (- L -) は、糖アミノ酸 (sugar amino acid) ユニット (- S A A s -) およびペプチドユニット (- A A s -) を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドユニットは、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチドまたはドデカペプチドであり得る。

30

【0044】

他の実施形態において、本開示のリンカーユニット (- L -) は、式 - C - S A A s - A A s - であり得る。式中、C - は、

【化 8】



10

20

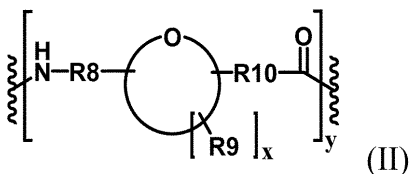
30

からなる群より選ばれたコンジュゲートユニット (conjugating unit) であり、式中、R7 は、-C1~C10アルキレン-、-C3~C8カルボシクロ-、-O-(C1~C8アルキル)-、-アリーレン-、-C1~C10アルキレン-アリーレン-、-アリーレン-C1~C10アルキレン-、-C1~C10アルキレン-(C3~C8カルボシクロ)-、-(C3~C8カルボシクロ)-C1~C10アルキレン-、-C3~C8ヘテロシクロ-、-C1~C10アルキレン-(C3~C8ヘテロシクロ)-、-(C3~C8ヘテロシクロ)-C1~C10アルキレン-、-(CH₂CH₂O)_r-および-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-からなる群より選ばれ、rは1から10までの範囲の整数である。

【0045】

式中、本開示の糖アミノ酸ユニット(-S A A s-)は、式(II)によって表される

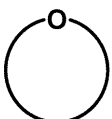
【化 9】



40

式(II)中、xは1から8までの範囲の整数であってよく、yは1から4までの整数であってよく、

【化 10】



はテトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、テトラヒドロピランまたはジヒドロピラン環で

50

あってよく、R 8 および R 10 の各々はそれぞれ独立に、単結合、メチレン、ヒドロキシメチレン、エチレン、エチリデン、ヒドロキシエチレン、ヒドロキシエチリデン、ジヒドロキシエチレン、ジヒドロキシエチリデン、ビニレン、ビニリデン、プロピレン、プロピリデン、トリメチレン、ヒドロキシプロピレン、ヒドロキシプロピリデン、ヒドロキシトリメチレン、ジヒドロキシプロピレン、ジヒドロキシプロピリデン、ジヒドロキシトリメチレン、トリヒドロキシプロピレン、トリヒドロキシプロピリデンまたはトリヒドロキシトリメチレンであってよく、各 R 9 はそれぞれ独立に、ヒドロキシル、メチル、ヒドロキシメチル、エチル、ヒドロキシエチル、ジヒドロキシエチル、プロピル、ヒドロキシプロピル、ジヒドロキシプロピルもしくはトリヒドロキシプロピルであり得るか、または同じ環炭素中の任意の 2 つの R 9 が、それらが結合する炭素と共にカルボニル基を形成するか、または任意の 2 つの R 9、R 8 および任意の 1 つの R 9、もしくは R 10 および任意の 1 つの R 9 が元のテトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、テトラヒドロピランもしくはジヒドロピラン環に縮合する第 2 のテトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、テトラヒドロピランもしくはジヒドロピラン環を形成するか、または任意の 2 つの R 9、R 8 および任意の 1 つの R 9、もしくは R 10 および任意の 1 つの R 9 がメチレン、エチリデン、1 - プロピリデン、2 - プロピリデンもしくはベンジリデン基と共に元のテトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、テトラヒドロピランもしくはジヒドロピラン環に縮合する環状アセタールもしくはケタール環を形成する。

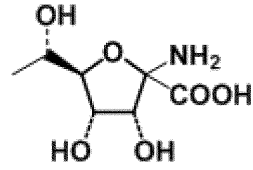
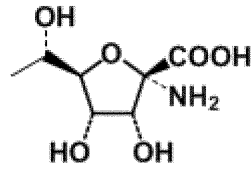
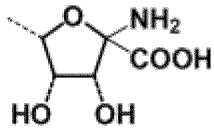
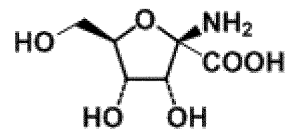
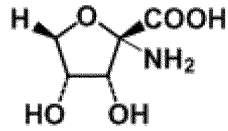
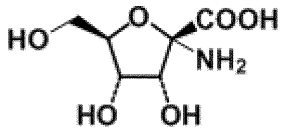
10

【 0 0 4 6 】

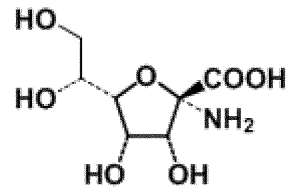
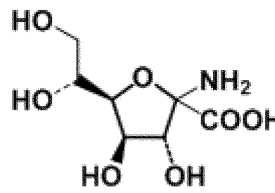
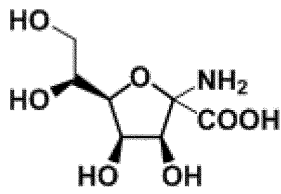
本開示において、上記糖アミノ酸の例には、限定はされないが：

20

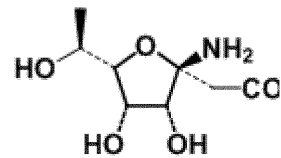
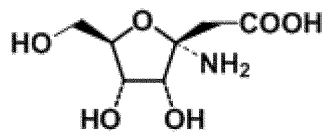
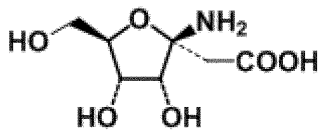
【化 1 1】



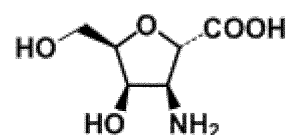
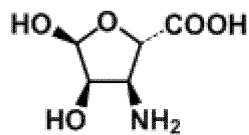
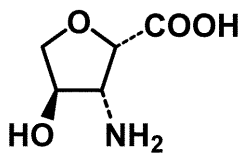
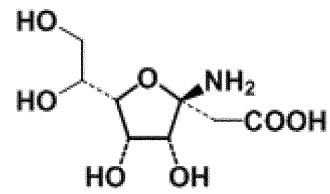
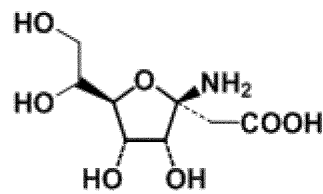
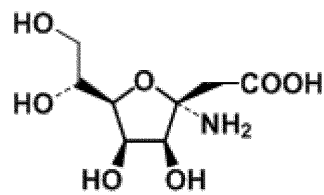
10

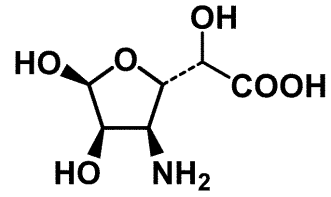
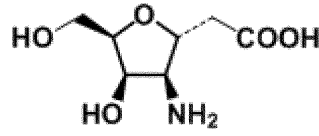
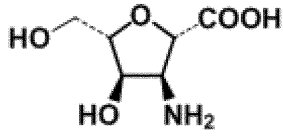
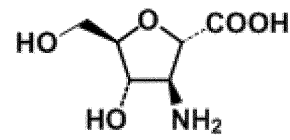
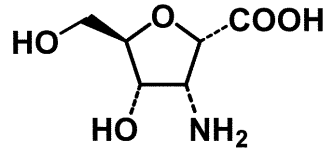
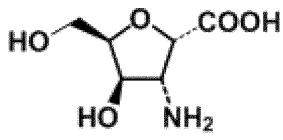


20

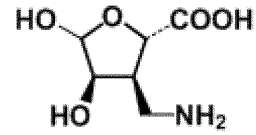
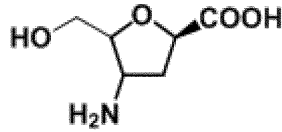
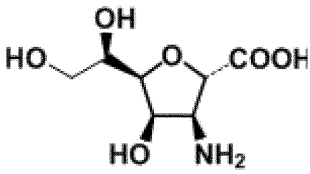
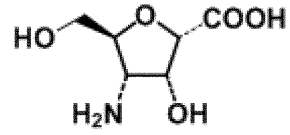
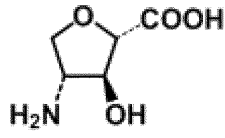
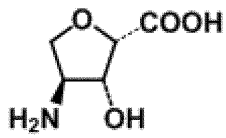


30

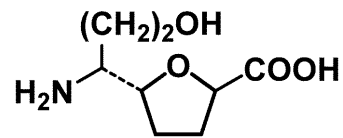
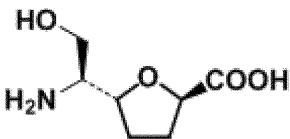
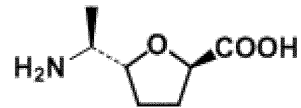
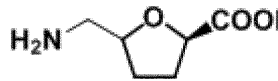




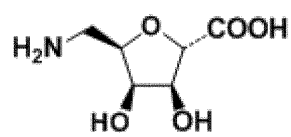
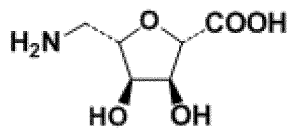
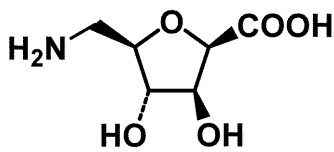
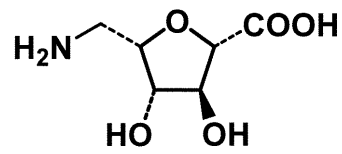
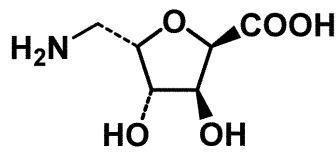
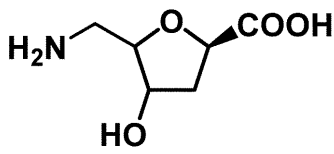
10



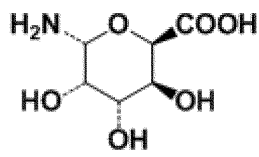
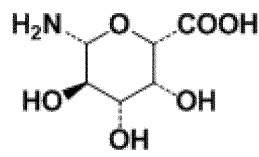
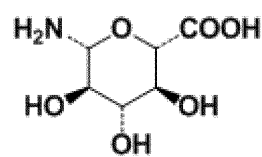
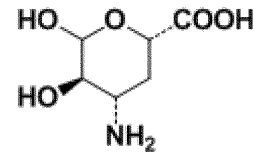
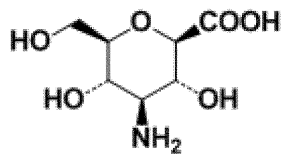
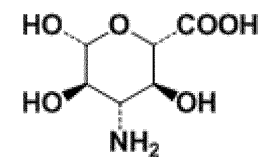
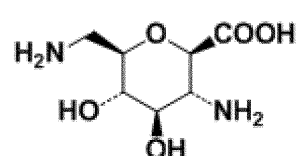
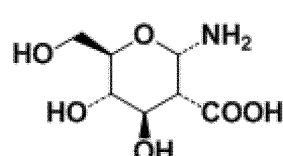
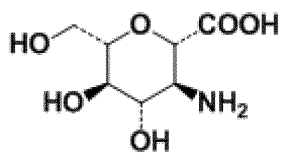
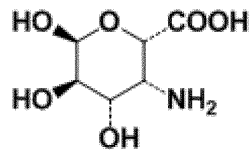
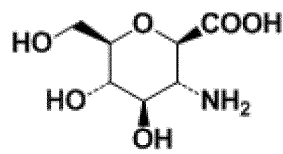
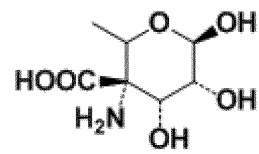
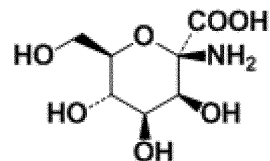
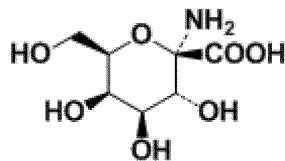
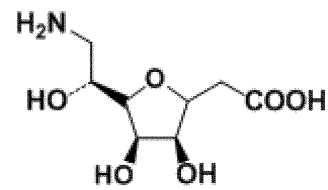
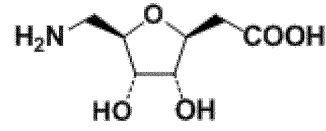
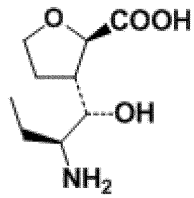
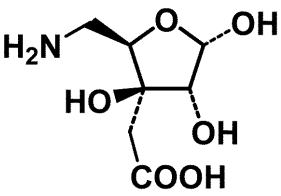
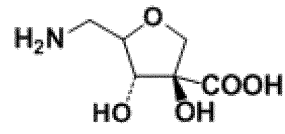
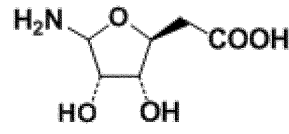
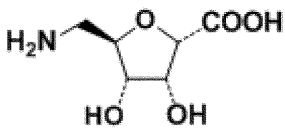
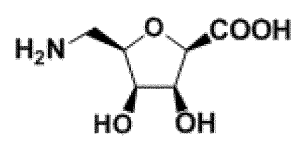
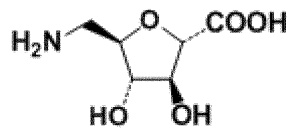
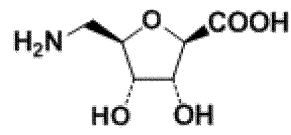
20



30



40

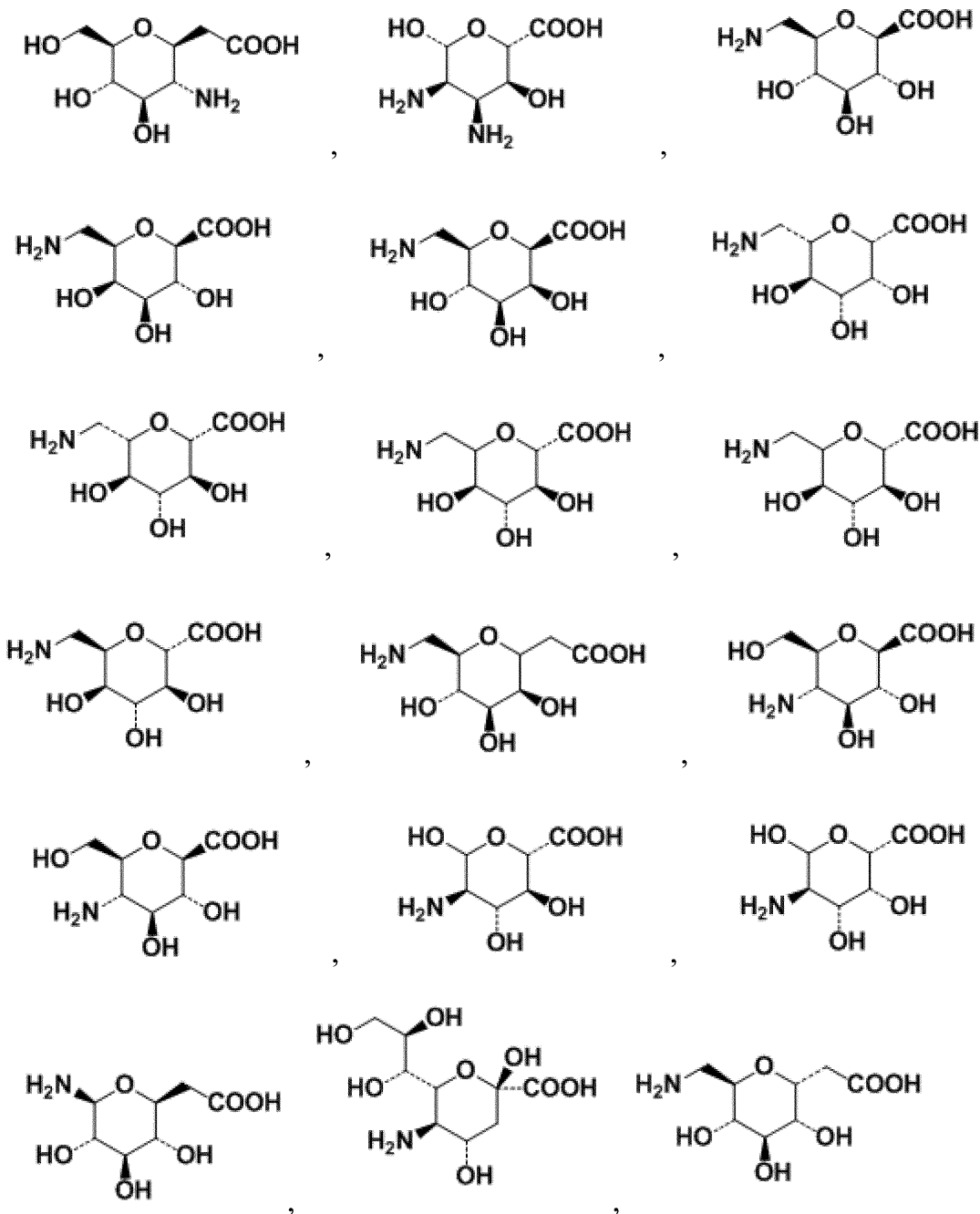


10

20

30

40



10

20

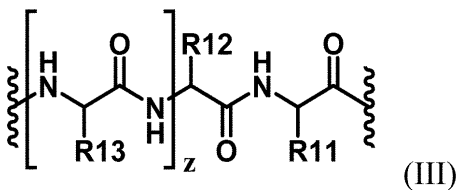
30

が含まれる。

【 0 0 4 7 】

1実施形態では、ペプチドユニット(- A A s -)は式(I I I)により表される：

【 化 1 2 】



40

式(I I I)中、 z は0から10までの範囲の整数であり、 $R11$ は、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NHCONH_2$ 、 $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_4NH_2$ または $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$ であってよく、 $R12$ は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、*sec*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル、シクロブチル、フェニルまたはベンジルであってよく、 $R13$ は、水素、メチル、イソプロピル、シクロ

50

プロピル、ブチル、*sec*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル、シクロブチル、シクロヘキシル、フェニル、ベンジル、*p*-ヒドロキシベンジル、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、2-ピリジルメチル、3-ピリジルメチルまたは4-ピリジルメチルであり得る。

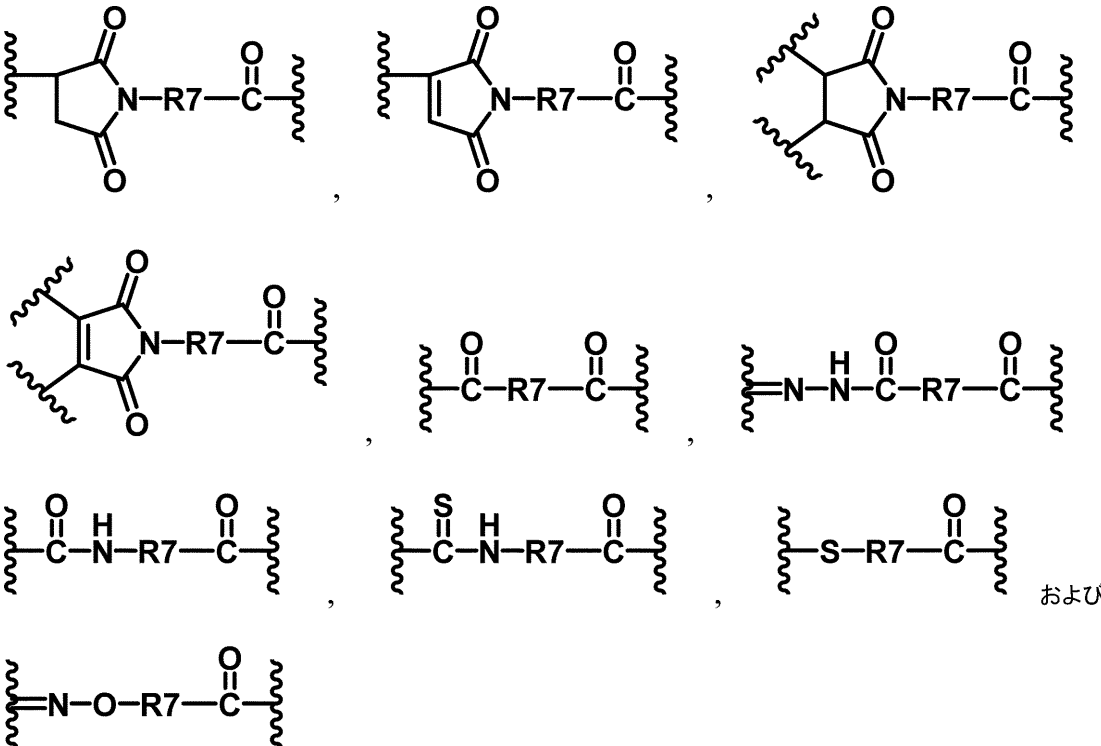
【0048】

いくつかの実施形態において、ペプチドユニット ($-\text{AAs}-$) は、1つまたは複数の酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼによって酵素的に切断されて薬物ユニット ($-\text{D}$) を遊離させることができる。

【0049】

別の実施形態では、 $\text{C}-$ は、

【化13】



からなる群より選ばれたコンジュゲートユニット (conjugating unit) であり、式中 R7 は、 $-1, 5$ -ペンチレン-、 $-1, 6$ -ヘキシレン-、 $-1, 4$ -シクロヘキシレン-、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ および $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ からなる群より選ばれ、かつ r は 2 から 5 までの範囲の整数である。

【0050】

さらに別の実施形態では、 $-\text{SAAs}-$ は、

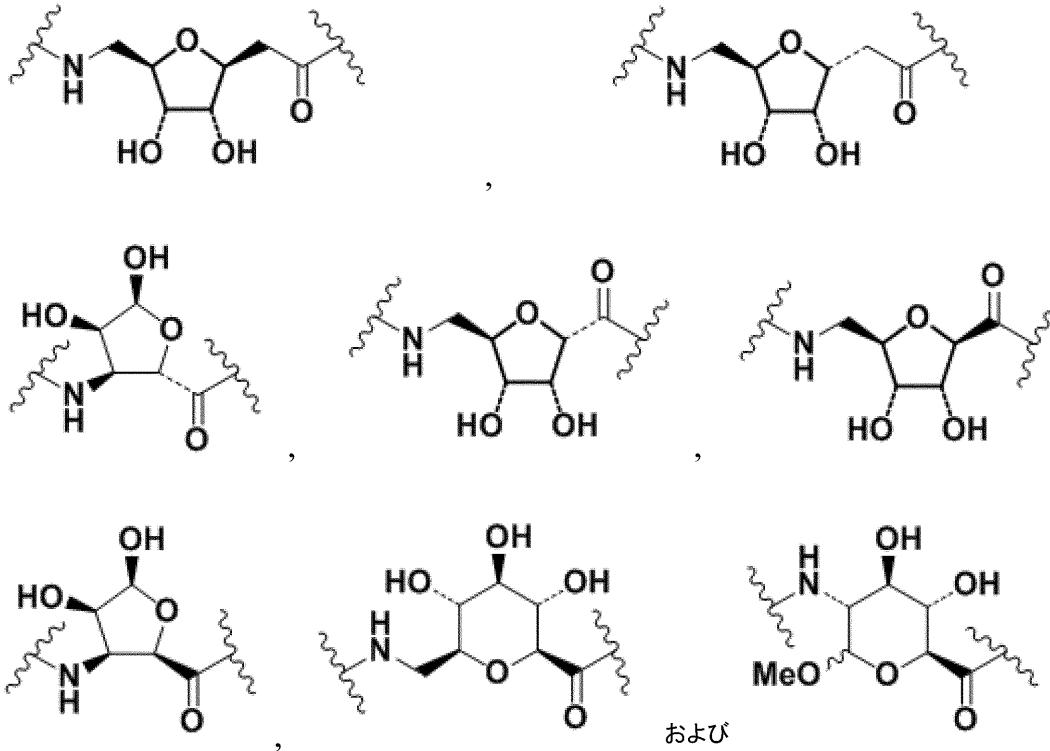
10

20

30

40

【化 1 4】



からなる群より選ばれた糖アミノ酸ユニットである。

【0051】

1実施形態では、ペプチドユニット(-AAs-)は、-Val-Cit-、-Val-Lys-、-Val-Arg-、-Phe-Cit-、-Phe-Lys-および-Phe-Arg-からなる群より選ばれたものであってよい。

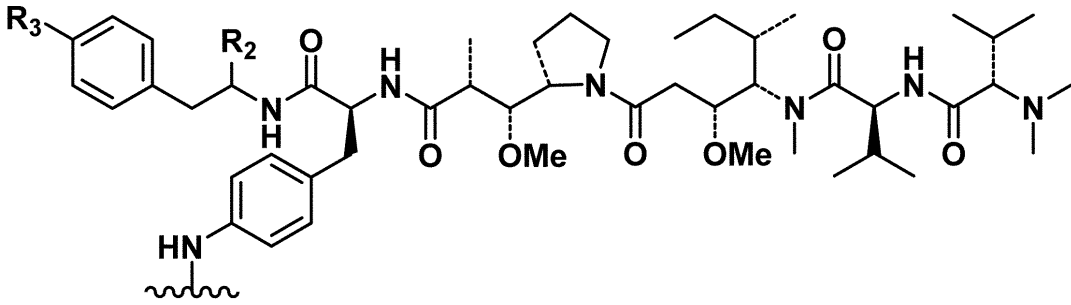
【0052】

しかしながら、上記の構造は単なる例であり、本発明の範囲が限定されることを意図していない、ということが理解されるべきである。

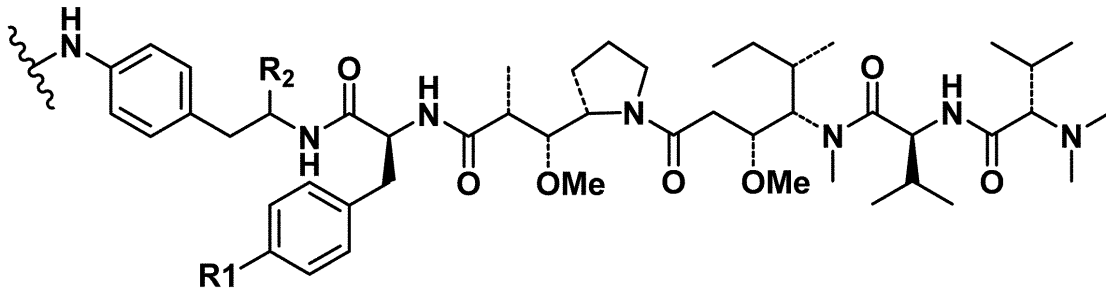
【0053】

1実施形態において、薬物ユニット(-D)は、

【化15】

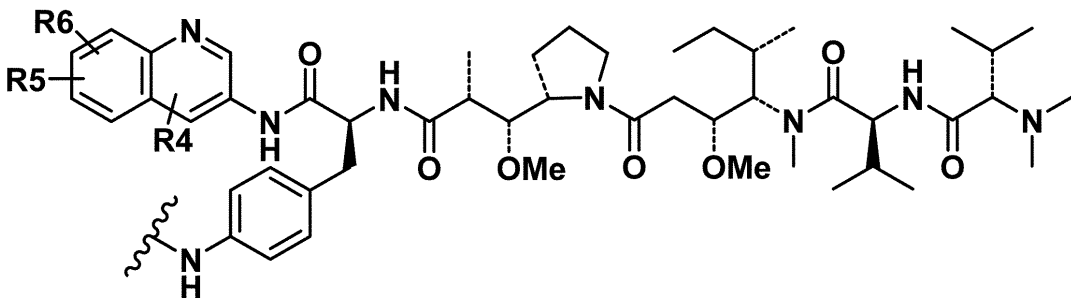


10



20

および



30

からなる群より選ばれた細胞毒性薬であり、式中、R1、R2、R3、R4、R5およびR6はそれぞれ独立に、水素、アミノ、ニトロ、ハロゲン、ヒドロキシル、メトキシ、エトキシ、カルボン酸、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、メチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、ジエチルアミノ、1-ピロリジニル、1-ピペリジニル、1-ピペラジニル、アミノカルボニル、メチルアミノカルボニル、ジメチルアミノカルボニル、エチルアミノカルボニル、ジエチルアミノカルボニル、1-ピロリジニルカルボニル、1-ピペリジニルカルボニル、1-ピペラジニルカルボニル、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、またはフェニルである。

40

【0054】

1実施形態において、薬物ユニット(-D)は、アマニチン(amanitin)、アントラサイクリン(anthracycline)、アウリストアチン(auristatin)、バッカチン(baccatin)、カリケアマイシン(calicheamicin)、カンプトテシン(camptothecin)、セマドチン(cemadotin)、コルヒチン(colchicine)、コルセミド(colcemid)、コンブレタスタチン(combretastatin)、クリプトフィシン(cryptophysin)、ディスコデルモリド(discoodermolide)、デュオカルマイシン(duocarmycin)、エキノマイシン(echinomycin)、エリュテロピン(eleutherobin)、エポチロン(epothilone)、エストラムスチン(estramustine)、レキシトロプシン(lexitropsin)、メイタンシノイド(maytansinoid)、ネトロプシン(netropsin)、ピューロマイシン(puromycin)、ピロロベンゾジアゼピン(pyrrolobenzodiazepine)、リゾキシシン(rhizoxin)、タキサン(taxane)、チューブリシン(tubulysin)、およびビンカアルカロイド(vinca alkaloid)からなる群より選ばれた細胞毒性薬である。

50

【0055】

いくつかの実施形態では、薬物ユニット(-D)は、カリケアマイシン(calicheamycin)、カンプトテシン(camptothecin)、メイタンシノイド(maytansinoid)またはアントラサイクリン(anthracycline)であり得る。いくつかの実施形態では、薬物ユニットは、タキサン(taxane)、トポイソメラーゼ阻害薬(topoisomerase inhibitor)、ビンカアルカロイド(vinca alkaloid)または同種のものであり得る。いくつか代表的な実施形態では、適した細胞毒性薬には、例えばDNAマイナーグループバインダー(minor groove binder)(例えば、エニジーン(enediyne)およびレキシトロプシン(lexitropsin)、CBI化合物;米国特許第6130237号も参照)、デュオカルマイシン(duocarmycin)、タキサン(taxane)(例えばパクリタキセル(paclitaxel)およびドセタキセル(docetaxel))、ピューロマイシン(puromycin)、ならびにビンカアルカロイド(vinca alkaloid)が含まれる。他の細胞毒性薬には、例えば、CC-1065、SN-38、トポテカン(topotecan)、ドキシソルビシン(doxorubicin)、リゾキシシン(rhizoxin)、シアノモルホリノ-ドキシソルビシン(cyanomorpholino-doxorubicin)、エキノマイシン(echinomycin)、コンプレタスタチン(combretastatin)、ネトロプシン(netropsin)、エポチロン(epothilone)、エストラムスチン(estramustine)、クリプトフィシン(cryptophysin)、セマドチン(cemadotin)、メイタンシノイド(maytansinoid)、ディスコデルモリド(discodermolide)、エリュテロピン(eleutherobin)またはミトキサントロン(mitoxantrone)が含まれる。

10

【0056】

いくつかの実施形態では、薬物ユニット(-D)は抗チューブリン剤であり得る。抗チューブリン剤の例には、アウリスタチン(auristatin)、タキサン(taxane)およびビンカアルカロイド(vinca alkaloid)が含まれる。他の抗チューブリン剤には、例えば、バッカチン誘導体(baccatin derivative)、セマドチン(cemadotin)、コルヒチン(colchicine)、コルセミド(colcemid)、コンプレタスタチン(combretastatin)、クリプトフィシン(cryptophysin)、ディスコデルモリド(discodermolide)、エリュテロピン(eleutherobin)、エストラムスチン(estramustine)、メイタンシノイド(maytansinoid)、ノコダゾール(nocodazole)またはタキサン類似体(taxane analog)が含まれる。

20

【0057】

ある実施形態では、細胞毒性薬は、メイタンシノイド(maytansinoid)または別のグループの抗チューブリン剤であり得る。例えば、特定の実施形態において、メイタンシノイドはメイタンシン(maytansine)またはDM-1である(ImmunoGen, Inc.; Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131も参照)。

30

【0058】

ある実施形態では、細胞毒性薬または細胞増殖抑制剤はドラスタチン(dolastatin)であり得る。ある実施形態では、細胞毒性薬または細胞増殖抑制剤はアウリスタチン類(auristatin class)のものである。よって、特定の実施形態において、細胞毒性薬または細胞増殖抑制剤はMMAEである。

【0059】

別の実施形態では、抗体-薬物複合体(ADC)を形成するための方法100も提供される。図1は、本開示のある実施形態による抗体-薬物複合体(ADC)を形成するための方法100を説明するフロー図である。

40

【0060】

まず、方法100は、第1の溶液を作ることによりステップ102に進む。第1の溶液は、抗体と還元剤を緩衝液中で反応させることにより作る。いくつかの実施形態において、抗体は全長抗体または抗体フラグメントであり得る。いくつかの実施形態において、抗体は、キメラ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヒト化抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヒト抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、またはマウス抗体もしくはその機能的に活性なフラグメントであってよい。他の実施形態において、抗体は、ラット抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、ヤギ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント、またはウサギ抗体もしくはその機能的に活性なフラグメント

50

トなどのような他の種 (species) 由来の抗体であり得る。いくつかの実施形態において、抗体は、上述した任意の適した抗体であってよい。ある実施形態では、抗体には、H e r c e p t i n、E r b i t u x、H L X - 0 7、E G 1 2 0 1 4、抗 - E p C A M A b、I g G 1、リツキシマブ (Rituximab)、イブリツモマブチウキセタン (Ibritumomab tiuxetan)、トシツモマブ (Tositumomab)、ブレンツキシマブ ベドチン (Brentuximab vedotin)、アテムツズマブ (Alemtuzumab)、I G N 1 0 1、アデカツムマブ (Adecatumumab)、ラベツズマブ (Labetuzumab)、h u A 3 3、ペムツモマブ (Pemtumomab)、オレゴボマブ (Oregovomab)、C C 4 9 (ミンレツモマブ (minretumomab))、c G 2 5 0、J 5 9 1、M O v 1 8、M O R A b - 0 0 3 (ファーレツズマブ (farletuzumab))、3 F 8、c h 1 4 . 1 8、K W - 2 8 7 1、h u 3 S 1 9 3、I g N 3 1 1、ベバシズマブ (Bevacizumab)、I M - 2 C 6、C D P 7 9 1、エタラシズマブ (Etaracizumab)、ボロシキシマブ (Volociximab)、セツキシマブ (Cetuximab)、パニツムマブ (Panitumumab)、ニモツズマブ (Nimotuzumab)、8 0 6、トラスツズマブ (Trastuzumab)、ペルツズマブ (Pertuzumab)、M M - 1 2 1、A M G 1 0 2、M E T M A B、S C H 9 0 0 1 0 5、A V E 1 6 4 2、I M C - A 1 2、M K - 0 6 4 6、R 1 5 0 7、C P 7 5 1 8 7 1、K B 0 0 4、I I I A 4、マパツムマブ (Mapatumumab) (H G S - E T R 1)、H G S - E T R 2、C S - 1 0 0 8、デノスマブ (Denosumab)、シブロツツマブ (Sibrotuzumab)、F 1 9、または 8 1 C 6 が含まれ得る。他の抗体の説明については関連する段落における記載を参照することができ、よって不要な繰り返しを避けるために再度説明しない。

10

20

【0061】

ステップ 1 0 2 において、抗体の初期濃度は 2 0 m g / m L 未満であり得る。例えば、抗体の初期濃度は約 1 から約 2 0 m g / m L の範囲内であり得る。しかし、抗体の初期濃度これらに限定されるものではない。抗体の初期濃度は、必要に応じて、2 0 m g / m L より高くてもよい。

【0062】

1 実施形態では、還元剤は、トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P)、2 - アミノエタンチオール、ジチオトレイトール (D T T)、2 - メルカプトエチルアミン塩酸塩 (2 - M E A)、およびその他の適した還元剤からなる群より選ばれ得る。1 実施形態では、緩衝液は、2 5 m M のホウ酸ナトリウム、2 5 m M の N a C l、および 1 m M のジエチレントリアミン五酢酸 (D T P A) からなるホウ酸塩緩衝液 (p H 8)、2 . 6 7 m M の K C l、1 . 4 7 m M の K H ₂ P O ₄、1 3 7 . 9 3 m M の N a C l、および 8 . 0 6 m M の N a ₂ H P O ₄ - 7 H ₂ O からなる P B S 緩衝液 (p H 7 . 4)、または適した p H 値の他の緩衝液であってよい。

30

【0063】

ステップ 1 0 2 において、還元剤と抗体とのモル当量比は、例えば所望の遊離チオールの数、および D A R 値のような抗体 - 薬物複合体の所望の特性などの実際のニーズに応じて調整可能である。

【0064】

理論的に、D A R 値は、還元後、還元抗体中に生じる遊離チオールの数に相当する。また、還元剤と抗体とのモル当量比は還元剤の還元能力の影響を受け得る。よって、還元剤および還元条件を、抗体中に存在する鎖間ジスルフィド結合が所望の数の遊離チオールに変わるように選択する。

40

【0065】

理論的に、1 モル当量の T C E P は、抗体中に 2 つの遊離チオールを生じさせる。よって、所望の平均 D A R 値 3 . 5 ~ 4 . 0 を得るために、1 . 7 5 ~ 2 モル当量の T C E P を用いて、抗体中に平均数 3 . 5 ~ 4 . 0 の遊離チオールを生じさせることができる。しかしながら、反応に用いる T C E P の実際のモル当量は、前述の理論値よりも大きいものであり得ること理解されなければならない。

【0066】

50

例えば、平均DAR値2.6を得るために、理論上は、平均数2.6の遊離チオールを生成するべくTCPEPと抗体とのモル当量比を1.3に調整することができる。しかし、反応に用いるTCPEPの実際のモル当量は、1.3モル当量よりも大きいものであり得る。同様に、平均DAR値1.2を得るために、理論上は、平均数1.2の遊離チオールを生成するべくTCPEPと抗体とのモル当量比を約6に調整することができる。しかし、反応に用いるTCPEPの実際のモル当量は、6モル当量よりも大きいものであり得る。

【0067】

本開示の1実施形態では、平均DAR値3.5~4.0を得るために、抗体中に平均数3.5~4.0の遊離チオールを生成するべくTCPEPと抗体とのモル当量比を約1.8~2.8の範囲内に調整することができる。別の実施形態では、平均DAR値3.5~4.0を得るために、TCPEPと抗体とのモル当量比を2.1~2.5とすることができる。さらに別の実施形態では、4.0よりも大きい、例えば5.4の平均DAR値、を得るために、TCPEPと抗体とのモル当量比を約3.4とすることができる。

10

【0068】

ステップ102において、反応は室温（例えば15~25℃）から40℃で約1~3時間行うことができる。反応の後、抗体は還元されて遊離チオールが生じる。

【0069】

次いで、方法100は、有機相または水相中でリンカー-薬物ユニットを調製して第2の溶液を作ることによりステップ104に進み、このうちリンカーはグリコペプチドを有する。1実施形態において、有機相には、ジメチルスルホキシド（DMSO）、アセトニトリル（ACN）、N,N-ジメチルアセトアミド（DMA）、プロピレングリコール（PG）などが含まれ得る。リンカー-薬物ユニットを調製するために用いる有機溶媒の濃度は、約0%（v/v）から100%（v/v）の範囲、例えば0%、10%（v/v）、20%、30%（v/v）、50%、75%、または100%（v/v）であってよい。

20

【0070】

いくつかの実施形態において、グリコペプチドには、単糖類、二糖類または多糖類が含まれ得る。いくつかの実施形態において、グリコペプチドを有するリンカー-薬物ユニットは、MHT-47、MHT-71、MHT-81a、MHT-93、MHT-98a、CCH-28、CCH-35、CCH-38、FCW-016、WHY-46およびCCH-41からなる群より選ばれ得る。いくつかの実施形態において、グリコペプチドを有するリンカー-薬物ユニットは、上述の適したリンカー-毒素のいずれかであってよい。他のリンカー-薬物ユニットの説明については関連する段落における記載を参照することができる。よって不要な繰り返しを避けるために再度ここで説明はしない。

30

【0071】

次に方法100は、第1の溶液と第2の溶液を混合して混合溶液を作ることによりコンジュゲーションプロセスを行うことによって、ステップ106に進む。

【0072】

いくつかの実施形態において、混合溶液中の有機溶媒の濃度は約0%（v/v）から約20%（v/v）の範囲である。例えば、混合溶液中の有機溶媒の濃度は、0~2%（v/v）、2~5%（v/v）、5~7%（v/v）、7~10%（v/v）、10~15%（v/v）、または15~20%（v/v）であってよい。ステップ106において、第1の溶液の還元抗体は、有機溶媒を0~20%（v/v）含有する共溶媒系中でリンカー-薬物ユニットとコンジュゲートしてADCを形成する。ステップ106において、コンジュゲーションプロセスは、約0.5~2時間、0~10℃で行うことができる。例えば、1実施形態では、コンジュゲーションプロセスは0.5時間4℃で行うことができる。

40

【0073】

先行研究では各種ADCが開発されているが、コンジュゲーションプロセス時に有機溶媒の含有量が高い共溶媒系が必要であるということに留意すべきである。例えば、Sea

50

title Geneticsにより提示されたコンジュゲーションプロセスでは、モノクローナル抗体中の鎖間ジスルフィド結合を還元してチオール基を遊離するために2.75モル当量のトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)が還元剤として用いられる。しかしながら、還元抗体は、20%(v/v)の有機溶媒を含有する共溶媒系中でMC-Val-Cit-PABのマレイミドとコンジュゲートする。この先行研究においては、共溶媒中の有機溶媒の含有量が減少すると、リンカー-毒素が完全に溶解されず、均一相中で抗体にコンジュゲートすることができないため、コンジュゲーション効率が低下することになる。

【0074】

これに対し、本開示は、水溶解度の高い新規なリンカー-毒素を用いてADCを形成する。リンカーは、糖アミノ酸を有して、リンカーの親水性を高めると共に、最終的なADC生成物の安定性を高めるように設計されている。よって、ADCのコンジュゲーションプロセス時に用いられる有機溶媒の含有量は有効に減少し、かつADCの高いコンジュゲーション効率が達成される。加えて、減少した有機溶媒の含有量のために、後続の精製および分析がより容易になる。また、改善されたリンカー-毒素の親水性はADCの凝集をも低減するため、ADCの安定性が増す。試料の保管および製剤設計に大きなメリットがある。グリコペプチドを有するリンカーユニット含有の抗体-薬物複合体は、グリコペプチドを有さないリンカーユニット含有の抗体-薬物複合体に比べて、安定性が高まる。

10

【0075】

20%の有機溶媒を必要とするSeattle Geneticsにより開発されたMC-Val-Cit-PABに比して、本開示は、糖アミノ酸を有するリンカー-毒素がADCのコンジュゲーションプロセス時に有機溶媒の使用を大幅に減らすことができる、ということを実証した。また、特定のリンカー-毒素を用いるコンジュゲーションプロセスは、純水相(pure aqueous phase)中に行えるということも証明された。純水相中でコンジュゲートされたADCは凝集がほとんどない。SECで分析したHMWSは0.1%未満である(以下の実施例20、21および図13B、14Bを参照)。

20

【0076】

さらに、現在のところ、市販のADC薬物、Kadcyla(登録商標)およびAdcetris(登録商標)は凍結結晶(frozen crystal)の形態で保存され、かつ復元(reconstitution)後1日以内に使用しなければならない。一方、本開示のADCは優れた安定性を備え、液体の形態で4か月以上4で保存することができる(以下の実施例19および図18を参照)。

30

【0077】

加えて、本開示では、抗体とリンカー-薬物ユニットとのモル当量比は、抗体-薬物複合体が約3.5から約4.0の範囲内の平均DARを有し得るように選択される。ADCの平均DARは実際のニーズに応じて調整可能であることが理解されなければならない。例えば、いくつかの実施形態において、ADCの平均DARは4.0より大きくてよい。

【0078】

最後に、方法100は、混合溶液を精製することによりステップ108に進む。いくつかの実施形態において、脱塩カラムまたはタンジェンシャルフロー過(tangential flow filtration, TFF)を用いて混合溶液を精製し、コンジュゲートしていない(unconjugated)リンカー-毒素を除去して、精製ADCを得ることができる。溶出時に、緩衝液を、PBS緩衝液(2.67mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄, 137.93mM NaCl, 8.06mM Na₂HPO₄·7H₂O, pH7.4)のような別の適した緩衝溶液、またはSGN(20mMクエン酸ナトリウム, 6.3%(w/v)トレハロース, 0.2mg/mLポリソルベート80, pH6.0)のようなその他の配合溶液(formulation solution)に変えることができる。

40

【0079】

疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)分析によれば、本開示で得られるADCの平均DAR(薬物-抗体比)は約3.5から約4.0であり、かつコンジュゲーション

50

効率は90%より大きく、例えば92%、93%、94%、95%または96%である。サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）分析によれば、コンジュゲーションプロセス中に有意な高分子量種（high molecular weight species, H M W S）は生成されない。加えて、本開示で得られるADCは優れた熱安定性、貯蔵安定性および腫瘍増殖抑制能力を備える。

【0080】

リンカー-毒素および抗体-薬物複合体を形成するための方法、ならびに抗体-薬物複合体の特性を説明するために、調製例および実施例を以下に記載する。

【実施例】

【0081】

調製例および実施例

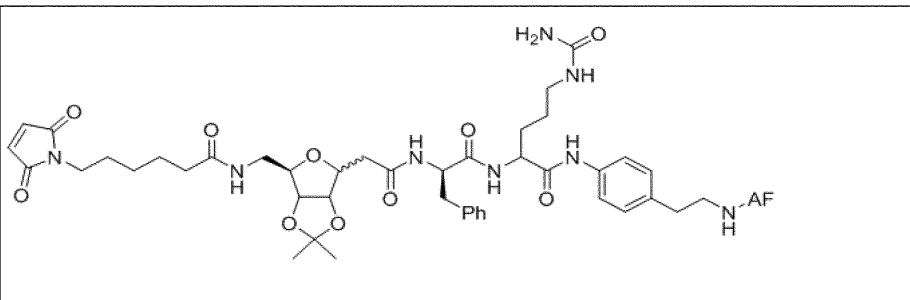
以下の調製例および実施例により本開示が詳細に説明される。それらのうち、MMAE（周知の毒素）およびアウリスタチンF（AF，周知の毒素）はConcortis Biotherapeuticsから購入した。Z-Val-Cit-OHおよび各種糖アミノ酸は文献に基づいて合成した。上記化合物の構造は、当業者にはよく知られたものであり、簡潔とするためにここでは説明はしない。

【0082】

リンカー-毒素に用いた略称およびそれらの対応する化学構造が表1に挙げられている。

【0083】

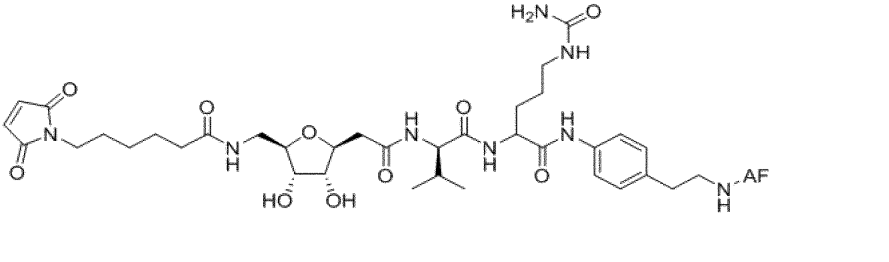
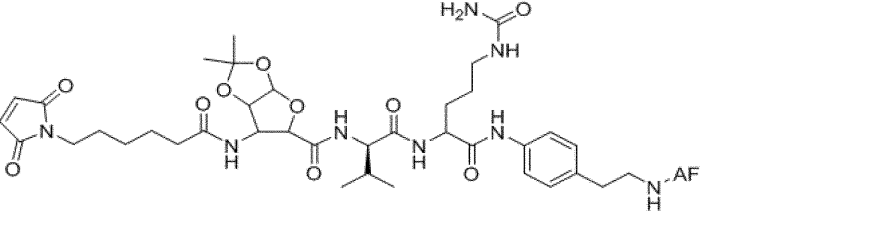
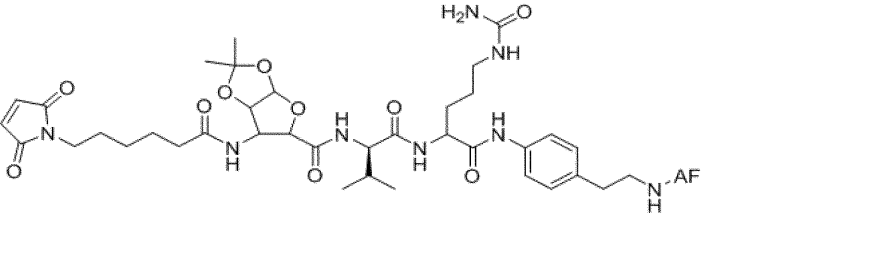
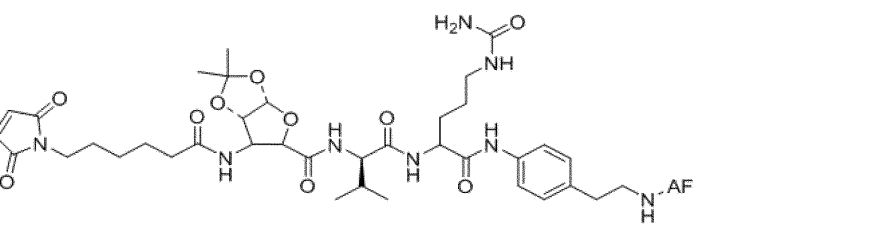
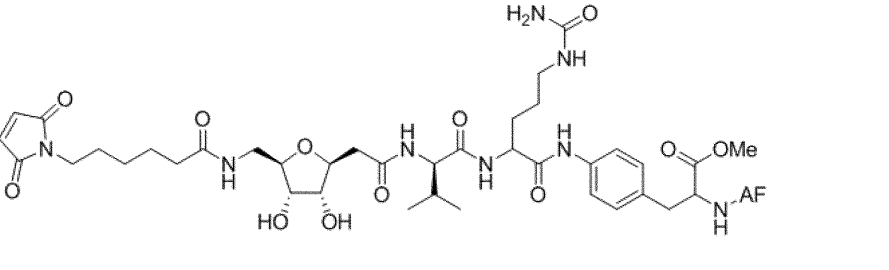
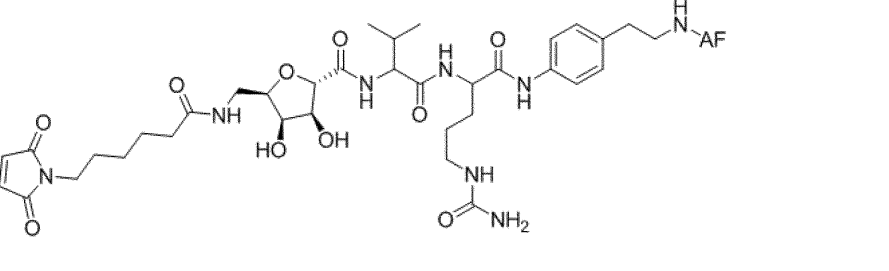
【表1】

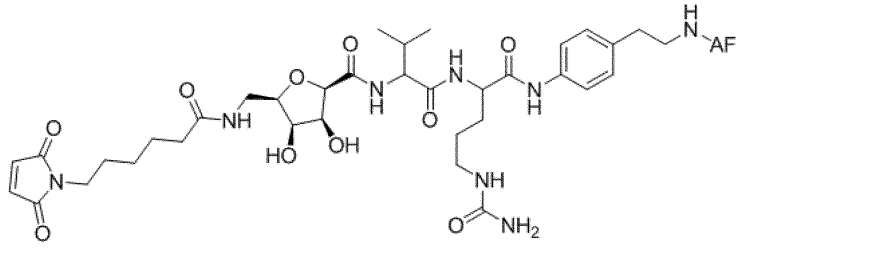
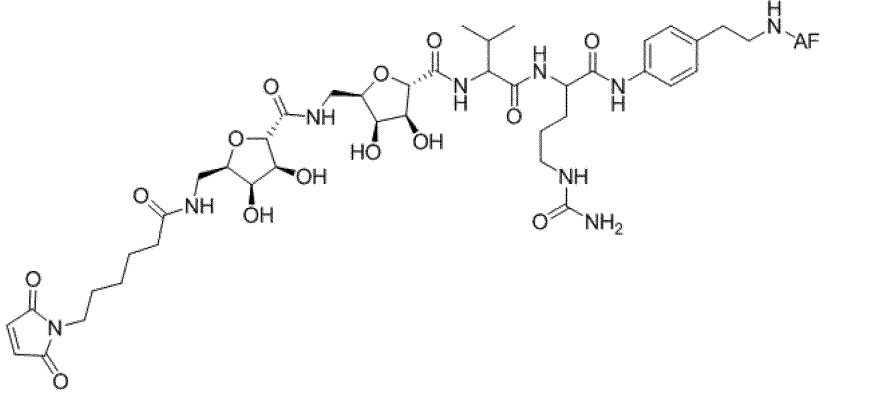
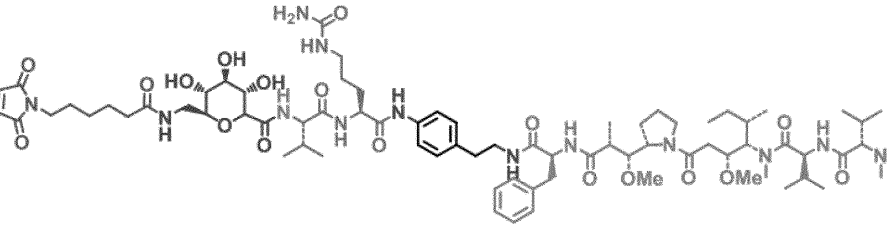
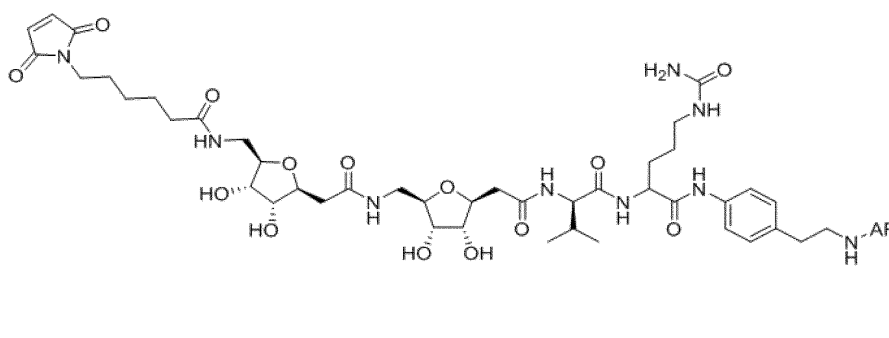
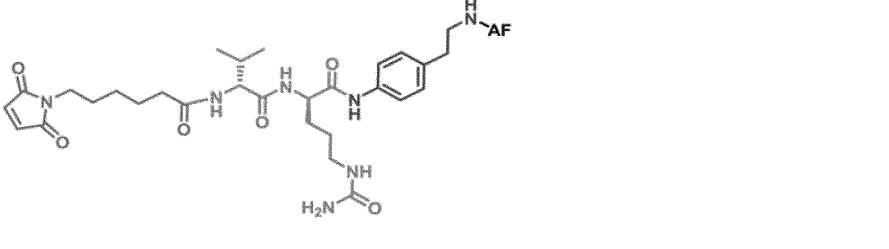
MHT-47	
--------	---

10

20

30

MHT-71		10
MHT-81a		20
MHT-93		30
MHT-98a		40
CCH-028		40
CCH-035		

CCH-038	
CCH-041	
FCW-016	
WHY-46	
MHT-87	

10

20

30

40

【表 2】

抗体	メーカー名
EG12014	EirGenix
ヒト IgG1	Sigma
Erbitux(登録商標) (セツキシマブ)	Merck
Herceptin(登録商標) (トラスツズマブ)	Roch
HLX-07	Henlix Inc.
抗EpCAM	Dr. Han-Chung Wu

10

【 0 0 8 5 】

< リンカー - 毒素 >

調製例 1

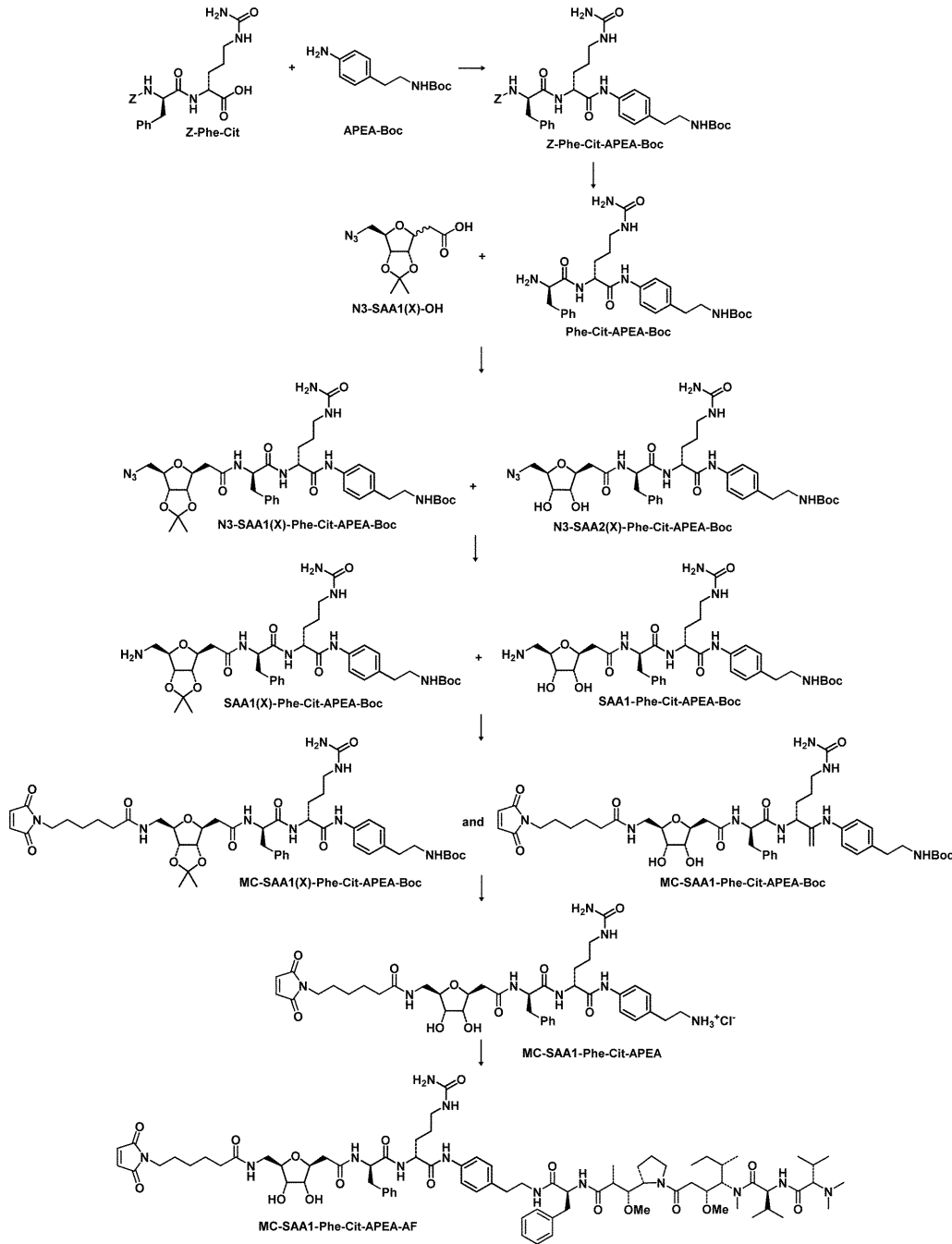
MHT - 47 [MC - S A A 1 - P h e - C i t - A P E A - A F] の合成

20

リンカー - 毒素 MHT - 47 を、次のスキームに示される手順に従って合成した。

【 0 0 8 6 】

【化16】



10

20

30

40

50

【0087】

ステップ1

Z-Phe-Cit (9.13 g, 20 mmol) をジクロロメタン (750 mL) およびイソプロパノール (250 mL) の混合物に入れてから、ジペプチドが完全に溶解するまで攪拌した。次いで、APEA-Boc (7.09 g, 30 mmol) および EEDQ (7.42 g, 30 mmol) を加え、その混合物を室温で3日間攪拌した。溶媒を減圧下で除去してから、ジエチルエーテル (300 mL) をその残留物に加えた。その混合物を濾別し、粗生成物をジエチルエーテル (300 mL) 中に再懸濁させた。この手順を3回繰り返した。最後に、収集した固形の生成物を真空下で乾燥し、Z-Phe-Cit-APEA-Boc を得た (9.53 g, 収率 70.6%)。PMR によりその生成物の特性を決定した。

【0088】

ステップ2

Z-Phe-Cit-APEA-Boc (2.02 g, 3 mmol) を THF (250

mL) およびメタノール(50 mL)の混合物中に溶解した。触媒量のPd/C(10%)を加えた後、その反応混合物に水素バルーンを適用し終夜撹拌した。触媒をセライトのパッドで濾別し、その濾液を減圧下で蒸発させて、Phe-Cit-APEA-Bocを白色の固体として得た(1.61 g, 99%)。

【0089】

ステップ3

N3-SAA1(X)-OH(633 mg) およびPhe-Cit-APEA-Boc(1.33 g)が入ったDCMおよびDMFの混合物(10:1, 110 mL)の溶液に、HBTU(1.118 g) およびDIPEA(1.02 mL)を加えた。17時間後、DCMを減圧下で除去した。水およびジエチルエーテルを、残っている粗DMF溶液に加え、濾過した後にベージュ色の固体を得た。その固体を高濃度クエン酸水溶液で数回洗浄し、大部分のHOBtおよびDMFを除去した。最後に、N3-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Bocを分取HPLCで精製した(0.1% TFAを含む水中に50%アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3カラム 30 x 250 mm)。アセトニトリルを減圧下で蒸発させ、残りの水溶液を凍結乾燥した。N3-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc およびN3-SAA1-Phe-Cit-APEA-Bocからなる白色の固体を得た(1 g)。LC-MS: N3-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc (C₃₈H₅₃N₉O₉) required [MH⁺] = 780.9, found [MH⁺] = 781.8; N3-SAA1-Phe-Cit-APEA-Boc (C₃₅H₄₉N₉O₉) required [MH⁺] = 740.8, found [MH⁺] = 741.7。

【0090】

ステップ4

N3-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc およびN3-SAA1-Phe-Cit-APEA-Bocの混合物(100 mg)をメタノール(50 mL)中に溶解した。触媒量のPd/C(10%)を加えた後、その反応混合物に水素バルーンを適用し終夜撹拌した。触媒をセライトのパッドで濾別した後、メタノールを減圧下で除去し、SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc およびSAA1-Phe-Cit-APEA-Bocからなる白色の固体を得た(78 mg)。

【0091】

ステップ5

SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc およびSAA1-Phe-Cit-APEA-Boc(210 mg)の入ったMeOH(50 mL)の溶液に、MC-OPFP(103 mg)を加え、続いてDIPEA(0.047 mL)を加えた。17時間後、その反応混合物を濃縮した。その粗生成物を分取HPLCで精製し(0.1% TFAを含む水中に50%アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3カラム 30 x 500 mm; 流速40 mL/min)、MC-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc およびMC-SAA1-Phe-Cit-APEA-Bocの溶液を得た。

【0092】

ステップ6

MC-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc およびMC-SAA1-Phe-Cit-APEA-Bocの溶液を濃塩酸(10 eq.)で処理した。その反応を、加水分解が完了するまで分析HPLCで観察した。アセトニトリルを減圧下で除去し、水溶液を凍結乾燥した後に、固体のMC-SAA1-Phe-Cit-APEAを得た。LC-MS: MC-SAA1-Phe-Cit-APEA (C₄₀H₅₄N₈O₁₀) required [MH⁺] = 807.4, found [MH⁺] = 809.1。

【0093】

ステップ7

MC-SAA1-Phe-Cit-APEA(110 mg)をDCMおよびDMFの混合物(10:1, 10 mL)中に溶解してから、アウリスタチンF(93 mg)、HB

10

20

30

40

50

TU (55 mg)、およびDIPEA (0.077 mL)をそれぞれ加えた。17時間後、DCM、DMFおよびDIPEAを減圧下で除去した。その粗生成物を分取HPLCで精製した(0.1% TFAを含む水中に35%アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3カラム 30 x 250 mm; 流速40 mL/min)。目的画分(target fraction)中のアセトニトリルを減圧下で除去し、残った水溶液を凍結乾燥して、MHT-47を白色の固体として得た(20 mg)。LC-MS: MC-SAA1-Phe-Cit-APEA-AF (MHT-47) ($C_{80}H_{119}N_{13}O_{17}$) required $[MH^+] = 1534.9$, found $[MH^+] = 1538.0$ 。

【0094】

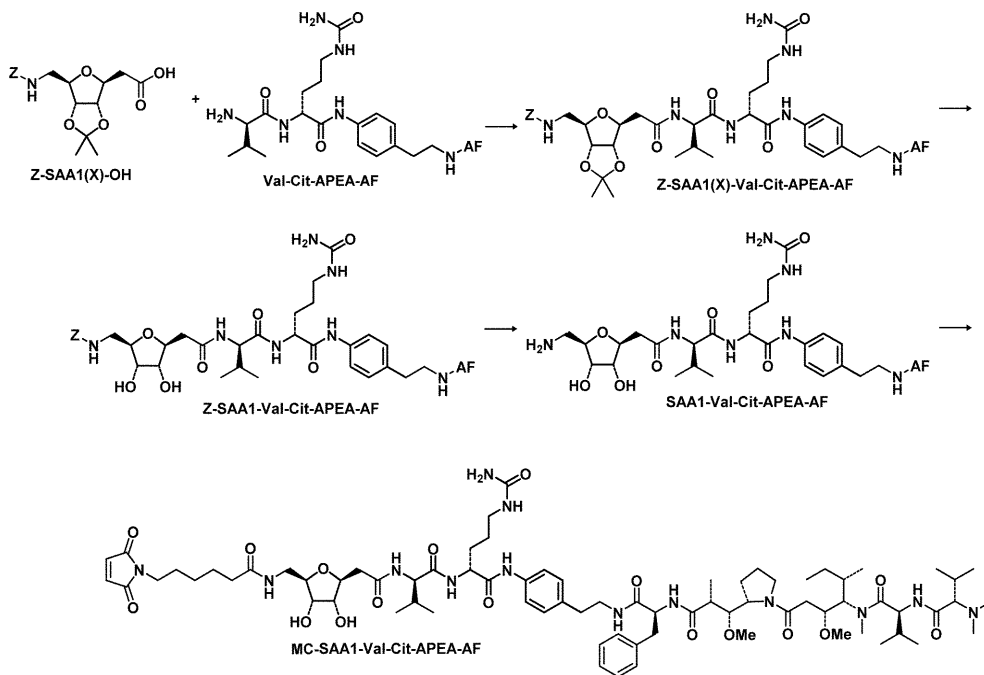
調製例2

MHT-71 [MC-SAA1-Val-Cit-APEA-AF]の合成

次のスキームに示される手順に従ってリンカー-毒素MHT-71を合成した。

【0095】

【化17】



【0096】

ステップ1

Z-SAA1(X)-OH (26.1 mg) および Val-Cit-APEA-AF (80 mg) の入ったDCMおよびDMFの混合物(10:1, 4.4 mL)の溶液に、HBTU (32.5 mg) およびDIPEA (0.029 mL)をそれぞれ加えた。18時間後、溶媒を減圧下で除去し、その粗生成物を分取HPLCで精製した(0.1% TFAを含む水中に45%アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3カラム 30 x 500 mm; 流速65 mL/min; RT 11 min)。アセトニトリルを除去した後、Z-SAA1(X)-Val-Cit-APEA-AFが完全にZ-SAA1-Val-Cit-APEA-AFに変わるまで、その水溶液を冷蔵庫に終夜置いた。次いで、その水溶液を凍結乾燥し、Z-SAA1-Val-Cit-APEA-AFを白色の固体として得た(63 mg, 2工程で収率63%)。

【0097】

ステップ2

Z-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (63 mg) をメタノール(5 mL)中に溶解し、次にPd/C触媒を加えた。次いで、その反応混合物に水素バルーンを適用し3時間攪拌した。Pd/Cをセライトのパッドで濾別してから、その濾液を減圧下で蒸発させ、SAA1-Val-Cit-APEA-AFを白色の固体として得た(52.5

10

20

30

40

50

mg)。

【0098】

ステップ3

SAA1-Val-Cit-APEA-AF (40 mg) および MC-OPFP (11.6 mg) の入ったメタノール (4 mL) の溶液に、DIPEA (0.0056 mL) を加えた。その反応物を終夜撹拌してから、減圧下で蒸発させた。その粗生成物を分取 HPLC で精製し (0.1% TFA を含む水中に 35% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 30 x 500 mm; 流速 70 mL/min; RT 18 min)、MC-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (MHT-71) を白色の固体として得た (27 mg; 47%)。LC-MS: MC-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (MHT-71) ($C_{76}H_{120}N_{13}O_{17}$) required $[MH^+] = 1486.9$, found $[MH^+] = 1487.2$ 。

【0099】

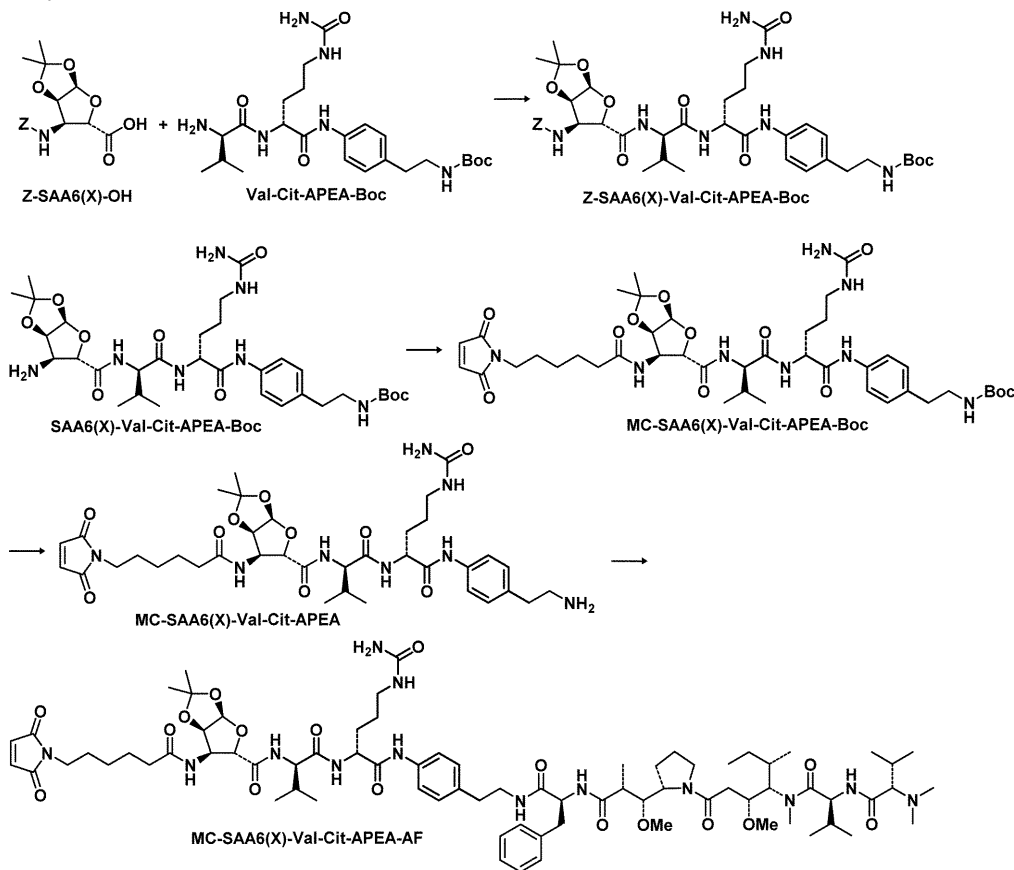
調製例3

MHT-81a [MC-SAA6-Val-Cit-APEA-AF] の合成

次のスキームに示される手順に従ってリンカー-毒素 MHT-81a を合成した。

【0100】

【化18】



【0101】

ステップ1

Z-SAA6(X)-OH (100 mg) の入ったジクロロメタン (10 mL) の溶液に、プロトンスポンジ (63 mg) および HBTU (170 mg) を加えた。次いで、Val-Cit-APEA-Boc (150 mg) の入った DMF (1 mL) の溶液を加え、終夜静置した。溶媒を除去した後、その粗生成物を分取 HPLC で精製して (0.1% TFA を含む水中に 50% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 30 * 500 mm; 流速 70 mL/min; RT 15 min)、Z-SAA6(X)-Val-Cit-APEA-Boc を白色の固体として得た (122.1 mg)。LC-MS: Z

10

20

30

40

50

- S A A 6 (X) - V a l - C i t - A P E A - B o c (C ₄₀ H ₅₇ N ₇ O ₁₁) r e q u i r e d [M H ⁺] = 8 1 2 . 4 2 , f o u n d [M H ⁺] = 8 1 3 . 2 .

【 0 1 0 2 】

ステップ 2

Z - S A A 6 (X) - V a l - C i t - A P E A - B o c (5 0 m g) をメタノール (2 m L) 中に溶解し、次に触媒 P d / C を加えた。次いで、その反応混合物に水素バルーンを適用し 1 7 時間置いた。触媒 P d / C をセライトのパッドで濾別し、メタノール減圧下で蒸発させて、S A A 6 (X) - V a l - C i t - A P E A - B o c を白色の固体として得た (3 7 . 4 m g) 。

【 0 1 0 3 】

ステップ 3

S A A 6 (X) - V a l - C i t - A P E A - B o c (4 7 m g) および M C - O P F P (2 8 m g) を D M F (4 m L) 中に溶解した。その反応混合物に D I P E A (0 . 0 1 4 1 m L) を加えた。5 時間後、D M F および D I P E A を減圧下で除去した。その粗生成物を分取 H P L C で精製し (0 . 1 % T F A を含む水中に 5 0 % アセトニトリル ; U V 2 1 0 n m ; O D S - 3 カラム 3 0 * 5 0 0 m m ; 流速 4 5 ~ 5 0 m L / m i n ; R T 1 0 . 8 m i n) M C - S A A 6 (X) - V a l - C i t - A P E A - B o c を白色の固体として得た (4 2 . 5 m g) 。 L C - M S : M C - S A A 6 (X) - V a l - C i t - A P E A - B o c (C ₄₂ H ₆₂ N ₈ O ₁₂) r e q u i r e d [M H ⁺] = 8 7 1 . 4 6 , f o u n d [M H ⁺] = 8 7 1 . 5 .

【 0 1 0 4 】

ステップ 4

D C M (1 0 m L) 中の M C - S A A 6 (X) - V a l - C i t - A P E A - B o c (4 2 . 5 m g) を室温下 T F A (0 . 1 m L) で処理した。1 7 時間後、D C M および T F A を減圧下で除去し、淡黄色の固体である M C - S A A 6 (X) - V a l - C i t - A P E A を得た (4 0 m g) 。 L C - M S : M C - S A A 6 (X) - V a l - C i t - A P E A (C ₃₇ H ₅₄ N ₈ O ₁₀) r e q u i r e d [M H ⁺] = 7 7 1 . 4 0 , f o u n d [M H ⁺] = 7 7 1 . 9 .

【 0 1 0 5 】

ステップ 5

M C - S A A 6 (X) - V a l - C i t - A P E A (3 2 m g) およびアウリスタチン F (2 7 m g) を D C M および D M F の混合物 (1 0 : 1 , 1 2 m L) 中に溶解した。次いで、H B T U (2 0 . 5 m g) および D I P E A (0 . 0 2 2 m L) をそれぞれ加えた。1 7 時間後、D C M および D M F を減圧下で除去した。その粗生成物を分取 H P L C で精製し (0 . 1 % T F A を含む水中に 4 0 % アセトニトリル ; U V 2 1 0 n m ; O D S - 3 カラム 3 0 * 5 0 0 m m ; 流速 3 0 m L / m i n) 、 M C - S A A 6 (X) - V a l - C i t - A P E A - A F を白色の固体として得た (1 5 m g) 。 L C - M S : M C - S A A 6 (X) - V a l - C i t - A P E A - A F (C ₇₇ H ₁₁₉ N ₁₃ O ₁₇) r e q u i r e d [M H ⁺] = 1 4 9 8 . 8 9 , f o u n d [M H ⁺] = 1 5 0 0 . 7 .

【 0 1 0 6 】

調製例 4

M H T - 9 3 [M C - S A A 7 - V a l - C i t - A P E A - A F] の合成

次のスキームに示される手順に従ってリンカー - 毒素 M H T - 9 3 を合成した。

【 0 1 0 7 】

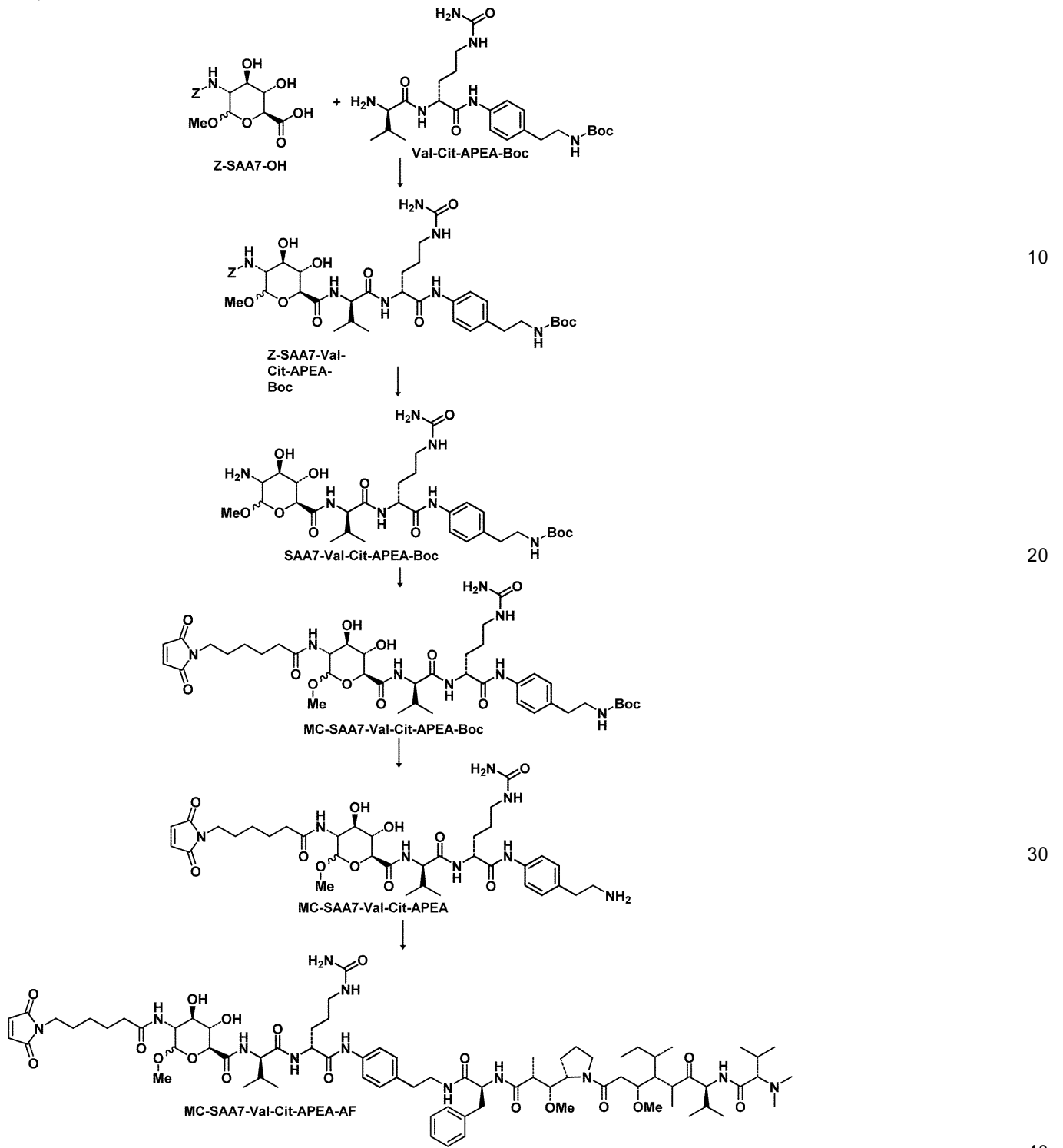
10

20

30

40

【化19】



10

20

30

40

【0108】

ステップ1

Val-Cit-APEA-Boc (2.46 g, 5 mmol) および Z-SAA7-OH (1.71 g, 5 mmol) を DMF (100 mL) 中に溶解した。次いで、DIP EA (646.2 mg, 5 mmol) および HATU (1.90 g, 5 mmol) をその反応混合物に加えた。その混合物を室温で16時間攪拌した後、溶媒を減圧下で蒸発させた。その残留物を、白色の微粉末が形成されるまで、酢酸エチル (200 mL) と共に数時間攪拌した。その固体生成物を濾別した。その白色粉末を水 (200 mL) 中で15分間煮沸してから、熱いうちに濾過した。その生成物を、温水 (50 mL, 2回) で洗浄し、最後に真空下で乾燥して Z-SAA7-Val-Cit-APEA-Boc を得た。

50

【0109】

ステップ2

Z-SAA7-Val-Cit-APEA-Boc (200 mg) をメタノール (50 mL) 中に溶解し、次に触媒 Pd/C を加えた。次いで、その反応物に水素バルーンを適用し 17 時間置いた。触媒をセライトのパッドで濾別した。メタノールを減圧下で蒸発させて、SAA7-Val-Cit-APEA-Boc を白色の固体として得た (148 mg)。

【0110】

ステップ3

SAA7-Val-Cit-APEA-Boc (240 mg)、MC-OPFP (144 mg) および DIPEA (0.072 mL) を DMF (20 mL) 中に溶解した。5 時間後、DMF および DIPEA を減圧下で除去した。その残留物を、H₂O (20 mL) 中で 45% アセトニトリルと混合してから、遠心分離した。液体部分を除去した後、MC-SAA7-Val-Cit-APEA-Boc を白色の固体として得た (200 mg)。LC-MS: MC-SAA7-Val-Cit-APEA-Boc (C₄₁H₆₂N₈O₁₃) required [MH⁺] = 875.45, found [MH⁺] = 875.8。

10

【0111】

ステップ4

DCM (30 mL) 中の MC-SAA7-Val-Cit-APEA-Boc (200 mg) を室温下 TFA (0.5 mL) で処理した。17 時間後、DCM および TFA を減圧下で除去し、淡黄色の固体 MC-SAA7-Val-Cit-APEA を得た (180 mg)。LC-MS: MC-SAA7-Val-Cit-APEA (C₃₆H₅₄N₈O₁₁) required [MH⁺] = 775.4, found [MH⁺] = 776.0。

20

【0112】

ステップ5

MC-SAA7-Val-Cit-APEA (80 mg) および アウリスタチン F (77 mg) を、DCM および DMF の混合物 (10:1, 16.6 mL) 中に溶解した。次いで、HBTU (64 mg) および DIPEA (0.064 mL) をそれぞれ加えた。17 時間後、DCM および DMF を減圧下で除去した。その粗生成物を分取 HPLC で精製し (0.1% TFA を含む水中に 40% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 30 * 250 mm; 流速 25 mL/min; RT 10.42 min)、MC-SAA7-Val-Cit-APEA-AF (MHT-93) を白色の固体として得た (50.9 mg)。LC-MS: MC-SAA7-Val-Cit-APEA-AF (MHT-93) (C₇₇H₁₂₀N₁₂O₁₈) required [MH⁺] = 1503.0, found [MH⁺] = 1504.1

30

【0113】

調製例 5

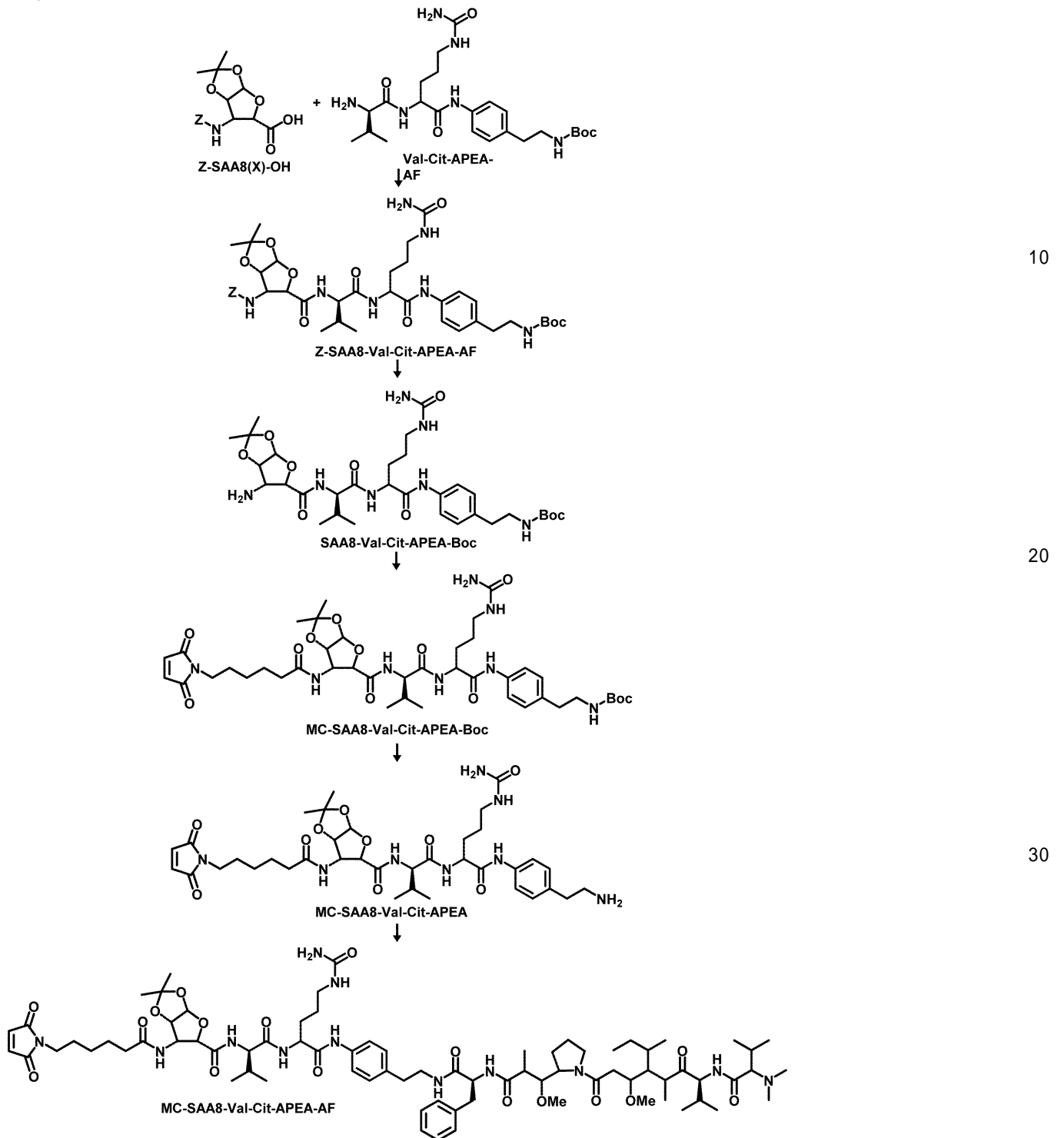
MHT-98a [MC-SAA8-Val-Cit-APEA-AF] の合成

40

次のスキームに示される手順に従ってリンカー-毒素 MHT-98a を合成した。

【0114】

【化20】



【0115】

ステップ1

Z-SAA8(X)-OH (100 mg) の入った DCM (10 mL) の溶液に、プロトンスポンジ (63 mg) および HBTU (170 mg) を加えた。次いで、Val-Cit-APEA-Boc (150 mg) の入った DMF (1 mL) の溶液を加え、その反応混合物を終夜置いた。溶媒を除去した後、その残留物を分取 HPLC で精製し (0.1% TFA を含む水中に 55% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 30 * 500 mm; 流速 60 mL/min; RT 13 min)、Z-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc を白色の固体として得た (144.6 mg)。LC-MS: Z-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc (C₄₀H₅₇N₇O₁₁) required [MH⁺] = 812.4, found [MH⁺] = 813.4。

40

50

【0116】

ステップ2

Z-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc (70 mg) を MeOH (10 mL) 中に溶解し、次に触媒 Pd/C を加えた。次いで、その反応物に水素バルーンを適用し 17 時間置いた。次いで、触媒をセライトのパッドで濾過した。その濾液を減圧下で蒸発させ、SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc を白色の固体として得た (54 mg)。

【0117】

ステップ3

SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc (44 mg) および MC-OPFP (24.2 mg) を DMF (4 mL) 中に溶解してから、DIPEA (0.0141 mL) を加えた。5 時間後、DMF および DIPEA を減圧下で除去し、その残留物を分取 HPLC で精製して (0.1% TFA を含む水中に 45% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 30 * 250 mm; 流速 35 ~ 40 mL/min; RT 13 min)、MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc を白色の固体として得た (40 mg)。LC-MS: MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc ($C_{42}H_{62}N_8O_{12}$) required $[MH^+] = 871.5$, found $[MH^+] = 872.0$ 。

10

【0118】

ステップ4

DCM (2 mL) 中の MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc (40 mg) を、室温下 TFA (0.1 mL) で処理した。17 時間後、DCM および TFA を減圧下で除去し、淡黄色の固体である MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA を得た (40 mg)。LC-MS: MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA ($C_{37}H_{54}N_8O_{10}$) required $[MH^+] = 771.4$, found $[MH^+] = 771.9$ 。

20

【0119】

ステップ5

MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA (25.6 mg) および アウリスタチン F (24.5 mg) を DCM および DMF の混合物 (10:1, 5.5 mL) 中に溶解した。次いで、HBTU (20.5 mg) および DIPEA (0.022 mL) をそれぞれ加えた。17 時間後、DCM および DMF を減圧下で除去した。その残留物を分取 HPLC で精製し (0.1% TFA を含む水中に 40% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 30 * 250 mm; 流速 35 ~ 40 mL/min)、化合物 MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-AF (MHT-98a) を白色の固体として得た (3.3 mg)。LC-MS: MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-AF (MHT-98a) ($C_{78}H_{120}N_{12}O_{17}$) required $[MH^+] = 1497.9$, found $[MH^+] = 1500.5$ 。

30

【0120】

調製例 6

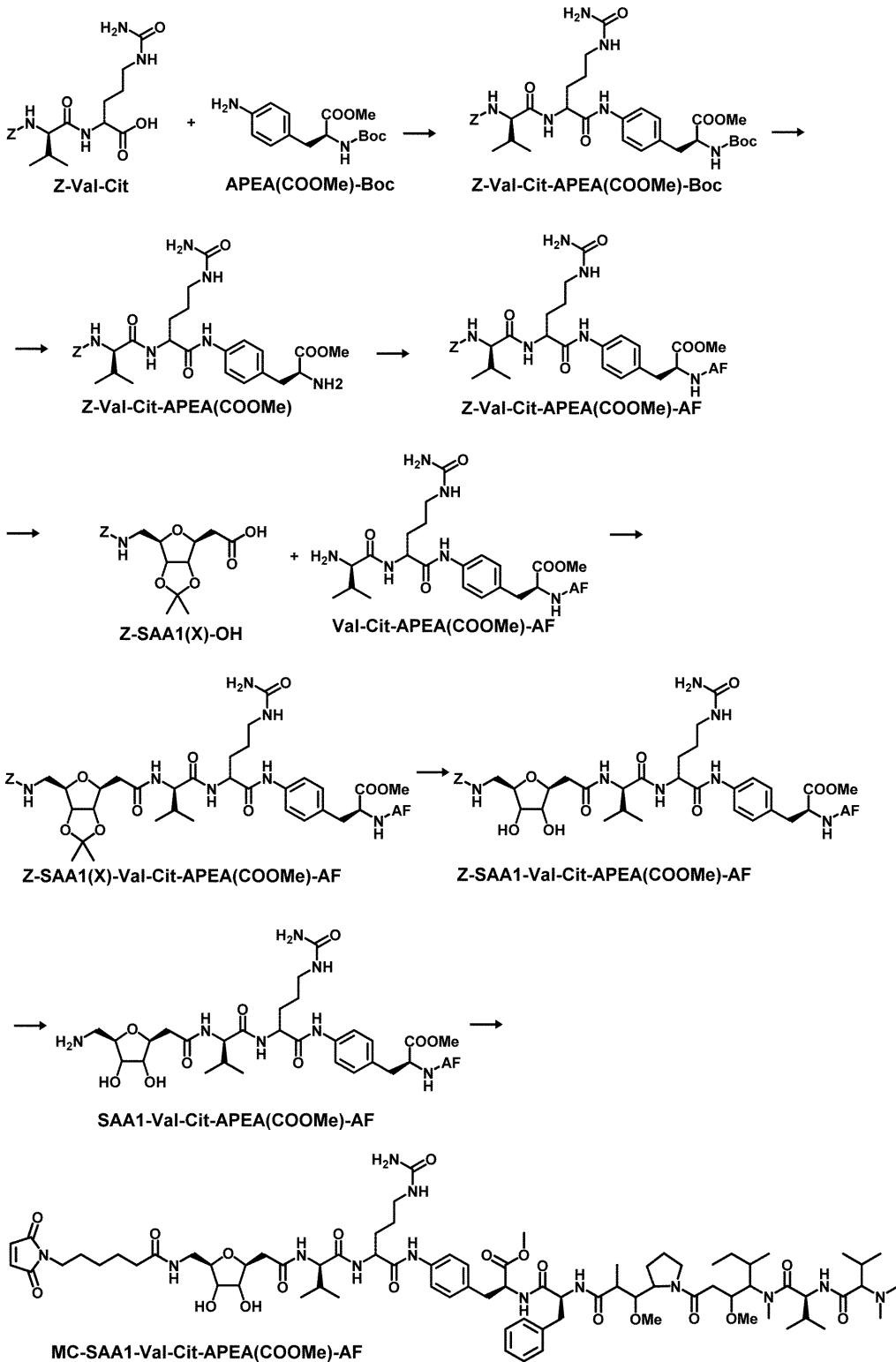
CCH-028 [MC-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF] の合成

40

下記スキームに示される手順に従ってリンカー-毒素 CCH-028 を合成した。

【0121】

【化 2 1】



10

20

30

40

【 0 1 2 2 】

ステップ 1

Z-Val-Cit-OH (3.24 g, 7.93 mmol) をジクロロメタンおよびメタノールの混合物 (3 : 1, 80 mL) 中に加えた。APEA(COOMe)-Boc (2.8 g, 9.52 mmol) を加えた後、カップリング試薬 EEDQ (2.47 g, 9.52 mmol) を入れた。その混濁液を室温で攪拌した。未溶解の Z-Val-Cit が徐々に見えなくなり、溶液が次第に澄んできた。48 時間後、HPLC で調べたときに反応は完全に完了していた。その反応混合物を、厚いペーストが形成されるまで減圧下で蒸発させた。その混合物を濾別し、n-ヘキサン (50 mL, 2 回)、水 (50 mL,

50

2回)およびジエチルエーテル(50 mL, 2回)で洗浄した。最後に、その固体生成物を真空下で乾燥してZ-Val-Cit-APEA(COOMe)-Bocを茶色の粉末として得た(75.0 mg, 1.4%)。

【0123】

ステップ2

Z-Val-Cit-APEA(COOMe)-Boc(75.0 mg, 0.11 mmol)をジクロロメタン(8 mL)中に加えてから、室温下トリフルオロ酢酸(0.09 mL)で処理した。4時間後、減圧下で溶媒を蒸発させた。その残留物を水(10 mL)と混合し、凍結乾燥して、Z-Val-Cit-APEA(COOMe)を白色粉末として得た(96.0 mg)。

10

【0124】

ステップ3

アウリスタチンF(80.0 mg, 0.102 mmol)を少量のDMF(1 mL)中に溶解してから、DCM(10 mL)で希釈した。その溶液を氷浴中に浸漬してから、Z-Val-Cit-APEA(COOMe)(71.4 mg, 0.102 mmol)およびHATU(43.0 mg, 0.113 mmol)を入れた。DIPEA(0.071 mL)を加えた後、氷浴を取り除いた。その混合物を室温で4時間攪拌した後、減圧下で溶媒を蒸発させ、その残留物を分取HPLCで精製して(0.1% TFAを含む水中に43%アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3カラム30*250 mm; 流量24 mL/min)、Z-Val-Cit-APEA(COOMe)-AFを白色の固体として得た(82.0 mg, 61%)。

20

【0125】

ステップ4

Z-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(82.0 mg, 0.062 mmol)を、塩酸(0.24 mmol)を含有するエタノール(10 mL)中に溶解した。Pd/C(10%, 10 mg)を入れた後、その反応混合物に水素バルーンを適用し終夜攪拌した。触媒Pd/Cをセライトのパッドで濾別してから、その濾液を減圧下で蒸発させた。その残留物を水(10 mL)と混合し、凍結乾燥して、Val-Cit-APEA(COOMe)-AFを白色粉末として得た(72.8 mg, 96%)。LC-MS: Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(C₆₁H₉₉N₁₁O₁₂) required [MH⁺] = 1178.8, found [MH⁺] = 1179.7。

30

【0126】

ステップ5

Z-SAA1(X)-OH(22.0 mg, 0.06 mmol)をジクロロメタン(10 mL)中に溶解した。HATU(25.3 mg, 0.066 mmol)を加えた後、その反応混合物を氷浴中に浸漬し、続いてDIPEA(0.032 mL, 0.06 mmol)を加えた。10分後、氷浴を取り除き、室温でVal-Cit-APEA(COOMe)-AF(72.8 mg, 0.06 mmol)の入ったDMF(3 mL)の溶液をその反応混合物に加えた。3時間後、減圧下で溶媒を蒸発させ、その粗生成物を分取HPLCで精製した(0.1% TFAを含む水中に45%アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3カラム30x250 mm; 流量24 mL/min)。アセトニトリルの除去後、その水溶液を室温で終夜置いて、Z-SAA1(X)-Val-Cit-APEA(COOMe)-AFを完全に加水分解させた。次いで、その水溶液を凍結乾燥し、Z-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AFを白色の固体として得た(43.5 mg, 2工程で収率49%)。LC-MS: Z-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(C₇₉H₁₂₀N₁₂O₁₈) required [MH⁺] = 1525.9, found [MH⁺] = 1526.8。

40

【0127】

ステップ6

Z-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(43.5 mg, 0.

50

0.29 mmol) を、塩酸 (0.06 mmol) を含有するエタノール (5 mL) 中に溶解した。Pd/C (10%, 4.7 mg) を入れた後、その反応混合物に水素バルーンを適用し終夜撹拌した。触媒 Pd/C をセライトのパッドで濾別してから、その濾液を減圧下で蒸発させた。その残留物を水 (5 mL) と混合し、凍結乾燥して SAA1-Val-Cit-APEA (COOMe) - AF を白色粉末として得た (38.4 mg, 94%)

【0128】

ステップ7

【0129】

SAA1-Val-Cit-APEA (COOMe) - AF (15.0 mg, 0.011 mmol) および MC-OPFP (4.5 mg, 0.012 mmol) の入った DMF (4 mL) の溶液に、DIPEA (0.004 mL) を加えた。その混合物を室温で1時間撹拌してから、減圧下で蒸発させた。その粗生成物を分取 HPLC で精製して (0.1% TFA を含む水中に 36% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 30 x 250 mm; 流量 2.4 mL/min)、MC-SAA1-Val-Cit-APEA (COOMe) - AF を白色の固体として得た (10.0 mg; 60%)。LC-MS: MC-SAA1-Val-Cit-APEA (COOMe) - AF (C₇₈H₁₂₁N₁₃O₁₉) required [MH⁺] = 1544.9, found [MH⁺] = 1545.8。

【0130】

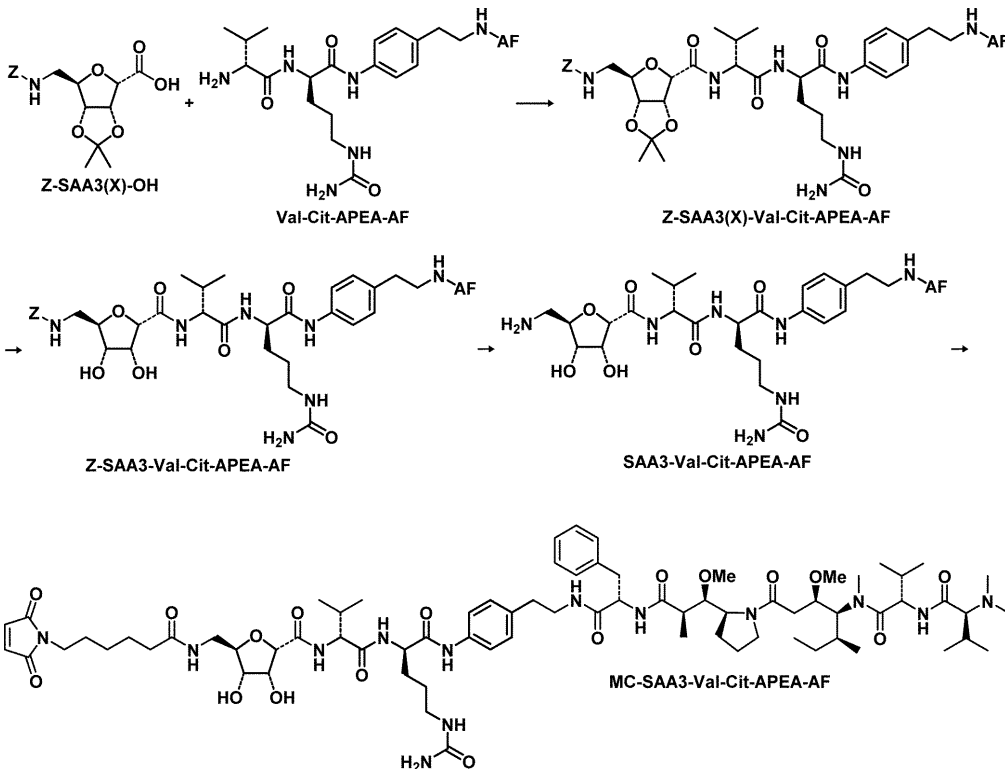
調製例7

CCH-035 [MC-SAA3-Val-Cit-APEA-AF] の合成

下記スキームに示される手順に従ってリンカー-毒素 CCH-035 を合成した。

【0131】

【化22】



【0132】

ステップ1

Z-SAA3(X)-OH (18.2 mg, 0.052 mmol) および Val-Cit-APEA-AF (60.0 mg, 0.052 mmol) の入った DCM および DMF の混合物 (10:1, 6 mL) の溶液に、HATU (22.0 mg, 0.0572 mmol)

1) および DIPEA (0.027 mL, 0.156 mmol) をそれぞれ加えた。18 時間後、溶媒を減圧下で除去し、その粗生成物を分取 HPLC で精製した (0.1% TFA を含む水中に 43% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 30 × 250 mm; 流速 2.4 mL/min)。アセトニトリルを除去した後、その水溶液を、アセトニド基が完全に除去されるまで、室温下に終夜置いた。その水溶液を凍結乾燥し、Z-SAA3-Val-Cit-APEA-AF を白色の固体として得た (48.0 mg, 2 工程で収率 65%)。

【0133】

ステップ 2

Z-SAA3-Val-Cit-APEA-AF (48.0 mg, 0.034 mmol) を、塩酸 (0.014 mL) を含有するエタノール (5 mL) 中に溶解した。Pd/C (10%, 4.7 mg) を入れた後、その反応混合物に水素バルーンを適用し 5 時間攪拌した。触媒 Pd/C をセライトのパッドで濾別してから、その濾液を減圧下で蒸発させた。その生成物を水 (5 mL) と混合し、凍結乾燥し、SAA3-Val-Cit-APEA-AF を白色の固体として得た (42.0 mg, 94%)。

10

【0134】

ステップ 3

SAA3-Val-Cit-APEA-AF (20.0 mg, 0.015 mmol) および MC-OPFP (6.3 mg, 0.0165 mmol) の入った DMF (4 mL) の溶液に DIPEA (0.006 mL) を加えた。その反応物を室温で 1 時間攪拌してから、減圧下で蒸発させた。その粗生成物を分取 HPLC で精製し (0.1% TFA を含む水中に 36% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 30 × 250 mm; 流速 2.4 mL/min)、MC-SAA3-Val-Cit-APEA-AF を白色の固体として得た (12.2 mg; 55%)。LC-MS: MC-SAA3-Val-Cit-APEA-AF ($C_{75}H_{117}N_{13}O_{17}$) required $[MH^+] = 1473.8$, found $[MH^+] = 1473.6$ 。

20

【0135】

調製例 8

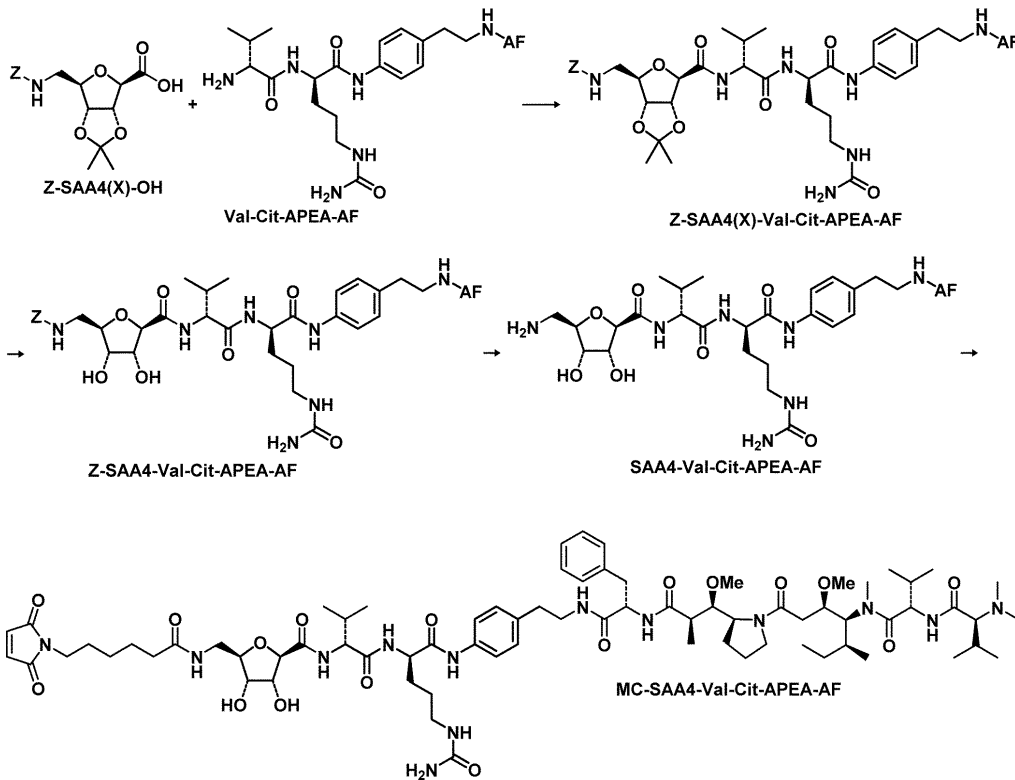
CCH-038 [MC-SAA4-Val-Cit-APEA-AF] の合成

下記スキームに示される手順に従ってリンカー-毒素 CCH-038 を合成した。

30

【0136】

【化23】



10

20

【0137】

ステップ1

Z-SAA4(X)-OH (15.2 mg, 0.043 mmol) および Val-Cit-APEA-AF (50.0 mg, 0.043 mmol) の入った DCM および DMF の混合物 (10:1, 6 mL) の溶液に、HATU (18.1 mg, 0.0473 mmol) および DIPEA (0.023 mL, 0.129 mmol) をそれぞれ加えた。18 時間後、溶媒を減圧下で除去し、その粗生成物を分取 HPLC で精製した (0.1% TFA を含む水中に 43% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 30 x 250 mm; 流速 24 mL/min)。アセトニトリルを除去した後、その水溶液を、アセトニドが完全に除去されるまで、室温下に終夜置いた。その水溶液を凍結乾燥し、Z-SAA3-Val-Cit-APEA-AF を白色の固体として得た (32.4 mg, 2 工程で収率 53%)。

30

【0138】

ステップ2

Z-SAA3-Val-Cit-APEA-AF (32.4 mg, 0.0229 mmol) を、塩酸 (0.09 mmol) を含有するエタノール (5 mL) 中に溶解した。Pd/C (10%, 4.0 mg) を入れた後、その反応混合物に水素バルーンを適用し 5 時間攪拌した。触媒 Pd/C をセライトのパッドで濾別してから、その濾液を減圧下で蒸発させた。その生成物を水 (5 mL) と混合し、凍結乾燥して SAA4-Val-Cit-APEA-AF を白色の固体として得た (30.0 mg, 98%)。

40

【0139】

ステップ3

SAA4-Val-Cit-APEA-AF (20.0 mg, 0.015 mmol) および MC-OPFP (6.3 mg, 0.0165 mmol) の入った DMF (4 mL) の溶液に DIPEA (0.006 mL) を加えた。その反応物を室温で 1 時間攪拌してから、減圧下で蒸発させた。その粗生成物を分取 HPLC で精製し (0.1% TFA を含む水中に 36% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 30 x 250 mm; 流速 24 mL/min)、MC-SAA4-Val-Cit-APEA-AF を白色の固体として得た (15.6 mg; 70%)。LC-MS: MC-SAA4-Val-Cit-A

50

PEA-AF(CCH-038) (C₇₅H₁₁₇N₁₃O₁₇) required
 [MH⁺] = 1473.8, found [MH⁺] = 1473.6.

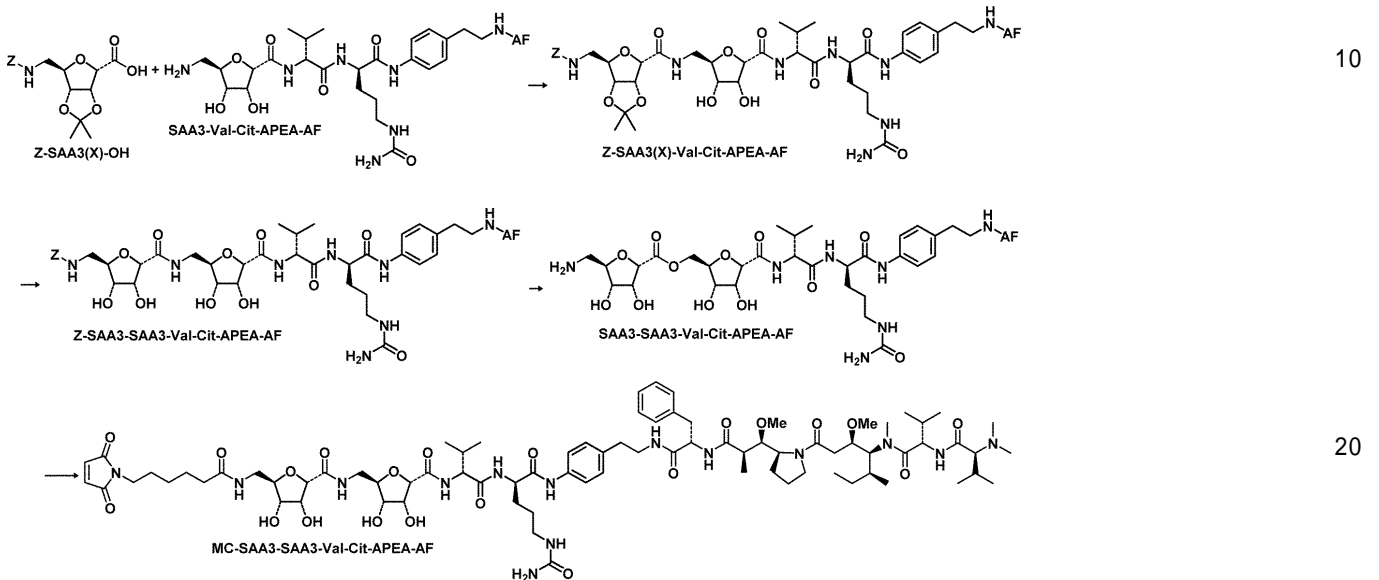
【0140】

調製例 9

CCH-041 [MC-SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF] の合成
 下記スキームに示される手順に従ってリンカー-毒素CCH-041を合成した。

【0141】

【化24】



【0142】

ステップ 1

Z-SAA3(X)-OH (14.5 mg, 0.041 mmol) および SAA3-Val-Cit-APEA-AF (54.5 mg, 0.041 mmol) の入った DCM および DMF の混合物 (10:1, 6 mL) の溶液に、HATU (17.3 mg, 0.045 mmol) および DIPEA (0.02 mL, 0.123 mmol) をそれぞれ加えた。18 時間後、溶媒を減圧下で蒸発させ、その粗生成物を分取 HPLC で精製した (0.1% TFA を含む水中に 41% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 30 x 250 mm; 流速 24 mL/min)。アセトニトリルを除去した後、その水溶液を、ケタール基が完全に加水分解されるまで、終夜室温下に置いた。その水溶液を凍結乾燥し、Z-SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF を白色の固体として得た (21.3 mg, 2 工程で収率 33%)。

30

【0143】

ステップ 2

Z-SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF (21.3 mg, 0.0135 mmol) を、塩酸 (0.052 mmol) を含有するエタノール (5 mL) 中に溶解した。Pd/C (10%, 2.5 mg) を入れた後、その反応混合物に水素バルーンを適用し 5 時間攪拌した。触媒 Pd/C をセライトのパッドで濾別してから、その濾液を減圧下で蒸発させた。その生成物を水 (5 mL) と混合し、凍結乾燥して SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF を白色の固体として得た (16.1 mg, 81%)。

40

【0144】

ステップ 3

SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF (16.1 mg, 0.0109 mmol) および MC-OPFP (4.5 mg, 0.012 mmol) の入った DMF (5 mL) の溶液に、DIPEA (0.004 mL) を加えた。その反応混合物を室温で 1 時間攪拌してから、減圧下で蒸発させた。その粗生成物を分取 HPLC で精製し (0.1

50

% T F A を含む水中に 3 3 % アセトニトリル ; U V 2 1 0 n m ; O D S - 3 カラム 3 0 x 2 5 0 m m ; 流 速 2 4 m L / m i n) 、 M C - S A A 3 - S A A 3 - V a l - C i t - A P E A - A F (C C H - 0 4 1) を 白 色 の 固 体 と し て 得 た (9 . 2 m g ; 5 2 %) 。 L C - M S : M C - S A A 3 - S A A 3 - V a l - C i t - A P E A - A F (C C H - 0 4 1) (C ₈₁ H ₁₂₆ N ₁₄ O ₂₁) r e q u i r e d [M H ⁺] = 1 6 3 3 . 0 , f o u n d [M H ⁺] = 1 6 3 3 . 2 。

【 0 1 4 5 】

調製例 1 0

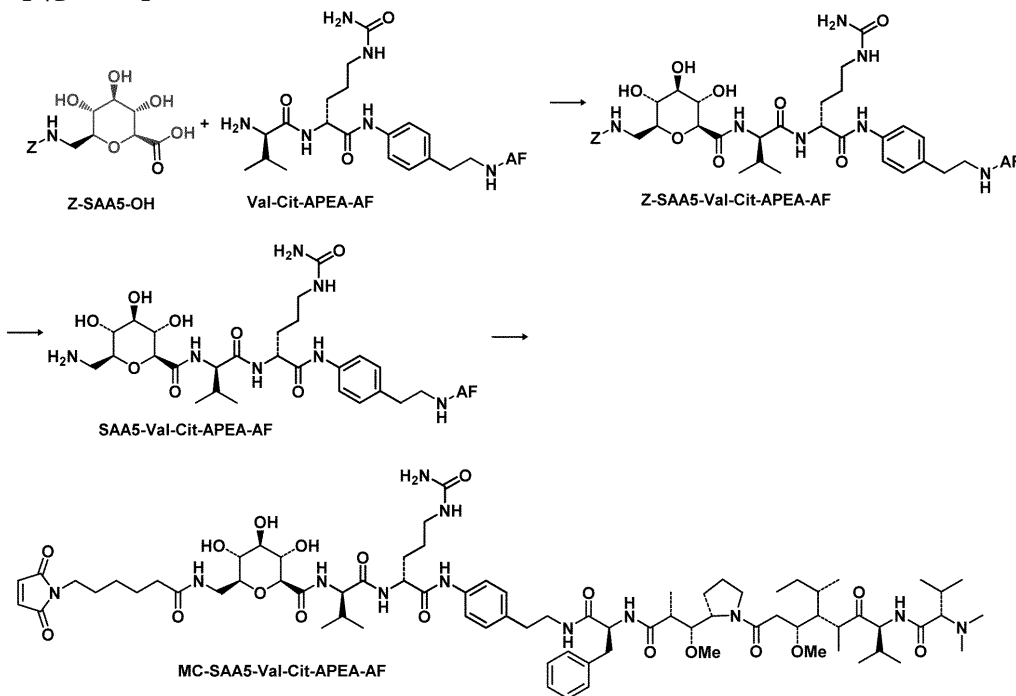
F C W - 0 1 6 [M C - S A A 5 - V a l - C i t - A P E A - A F] の 合 成

下 記 ス キー ム に 示 さ れ る 手 順 に 従 っ て リ ン カ ー - 毒 素 F C W - 0 1 6 を 合 成 し た 。

10

【 0 1 4 6 】

【 化 2 5 】



20

30

【 0 1 4 7 】

ステップ 1

H A T U (4 0 m g , 0 . 1 0 6 0 m m o l) を 、 V a l - C i t - A P E A - A F (9 9 m g , 0 . 0 8 8 4 m m o l) 、 Z - S A A 5 - O H (3 6 m g , 0 . 1 0 6 0 m m o l) お よ び D I P E A (0 . 0 4 6 m L , 0 . 2 6 5 1 m m o l) が 入 っ た D M F (2 m L) お よ び ジ ク ロ ロ メ タ ン (2 0 m L) の 混 合 物 の 攪 拌 溶 液 に 加 へ た 。 室 温 で 1 2 時 間 攪 拌 し た 後 、 溶 媒 を 蒸 発 さ せ 、 そ の 残 留 物 を 分 取 H P L C で 精 製 し て (0 . 1 % T F A を 含 む 水 中 に 4 3 % ア セ ト ニ ト リ ル ; U V 2 1 0 n m ; O D S - 3 カ ラ ム 3 0 x 2 5 0 m m ; 流 速 2 4 m L / m i n) 、 Z - S A A 5 - V a l - C i t - A P E A - A F を 白 色 の 粉 末 と し て 得 た (3 3 m g , 2 6 %) 。 L C - M S : Z - S A A 5 - V a l - C i t - A P E A - A F (C ₇₅ H ₁₁₅ N ₁₁ O ₁₇) r e q u i r e d [M + 2 H] ²⁺ = 7 2 1 . 9 , f o u n d [M + 2 H] ²⁺ = 7 2 3 . 6 。

40

【 0 1 4 8 】

ステップ 2

Z - S A A 5 - V a l - C i t - A P E A - A F (3 5 . 0 m g , 0 . 0 2 4 m m o l) を 、 H C l (0 . 0 4 8 m m o l) を 含 有 す る エ タ ノ ール (8 m L) 中 に 溶 解 し た 。 P d / C (1 0 % , 2 . 6 m g) を 入 れ た 後 、 そ の 反 応 混 合 物 に 水 素 バ ル ーン を 適 用 し 1 6 時 間 攪 拌 し た 。 触 媒 P d / C を セ ラ イ ト の パ ッ ド で 濾 別 し て か ら 、 そ の 濾 液 を 減 圧 下 で 蒸 発 さ せ た 。 そ の 生 成 物 を 水 (1 0 m L) と 混 合 し 、 凍 結 乾 燥 し て 、 S A A 5 - V a l - C i t - A P E A - A F を 白 色 の 固 体 と し て 得 た (3 0 . 0 m g , 9 5 %) 。 L C - M S :

50

SAA5 - Val - Cit - APEA - AF (C₆₇H₁₀₉N₁₁O₁₅) required [M+2H]²⁺ = 654.9, found [M+2H]²⁺ = 656.6。

【0149】

ステップ3

SAA5 - Val - Cit - APEA - AF (16.5 mg, 0.0126 mmol) および MC - OPFP (5.7 mg, 0.0151 mmol) の入った DMF (3 mL) の溶液に、DIPEA (0.0066 mL, 0.0378 mmol) を加えた。その反応物を室温で3時間攪拌してから、減圧下で蒸発させた。その粗生成物を分取 HPLC で精製し (0.1% TFA を含む水中に36% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS - 3 カラム 30 × 250 mm; 流速 24 mL/min)、MC - SAA5 - Val - Cit - APEA - AF (FCW - 016) を白色の固体として得た (12.0 mg; 63%)。LC - MS: MC - SAA5 - Val - Cit - APEA - AF (FCW - 016) (C₇₇H₁₂₀N₁₂O₁₈) required [M+2H]²⁺ = 751.4, found [M+2H]²⁺ = 753.1。

10

【0150】

調製例11

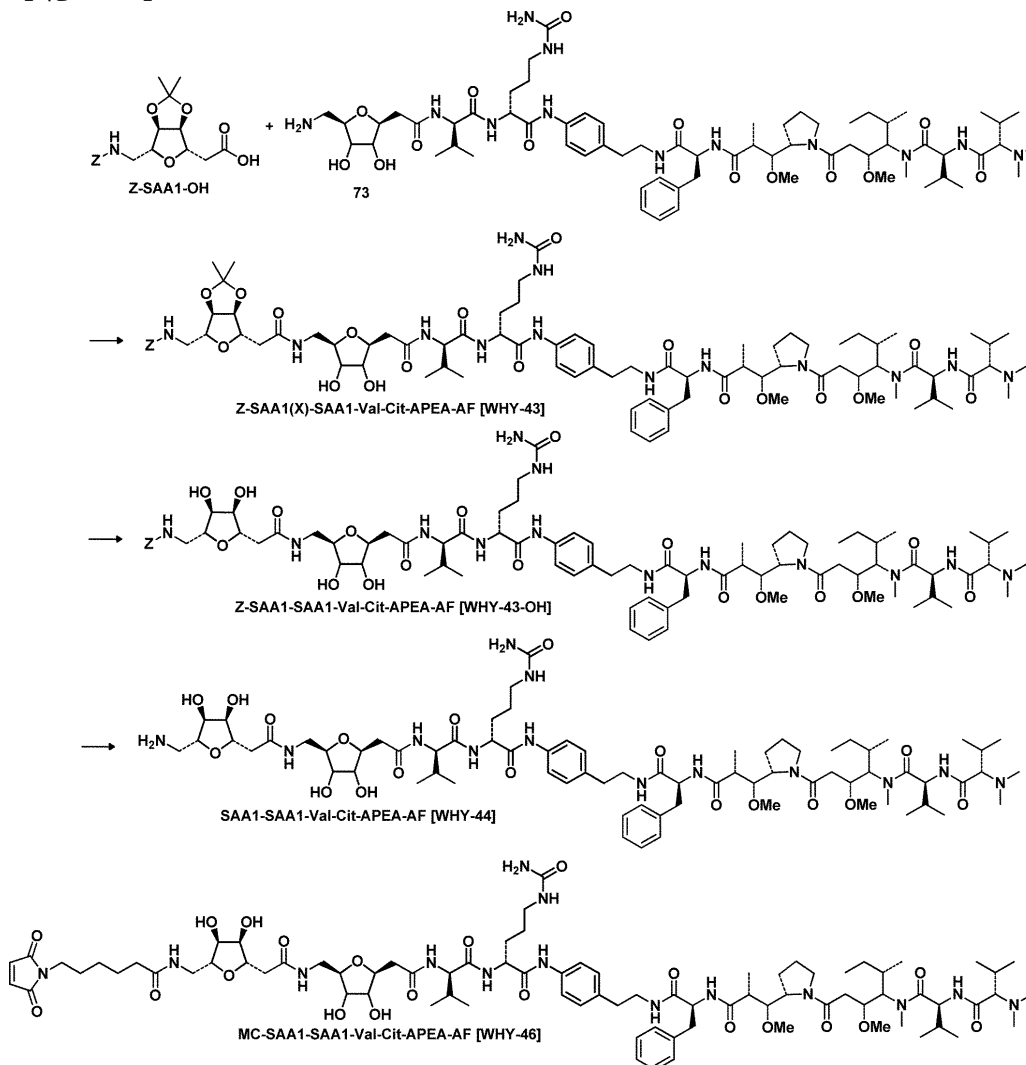
WHY - 46 [MC - SAA1 - SAA1 - Val - Cit - APEA - AF] の合成

2つの糖ユニットを含有するリンカー - 毒素 WHY - 46 を下記スキームに示される手順に従って合成した。

20

【0151】

【化26】



30

40

50

【0152】

ステップ1

Z-SAA1(X)-OH (28.0 mg, 0.076 mmol) をジクロロメタン (1 mL) 中に溶解した。HATU (23.4 mg, 0.061 mmol) を加えた後、その反応混合物を氷浴中に浸漬し、続いてDIPEA (7.9 mg, 0.061 mmol) を加えた。10分後、氷浴を取り除き、室温でSAA1-Val-Cit-APEA-AF (70.0 mg, 0.051 mmol) の入ったDMF (3 mL) の溶液をその反応混合物に加えた。1時間後、減圧下で溶媒を蒸発させ、その粗生成物を分取HPLCで精製した (0.1% TFA を含む水中に39% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 30 x 250 mm; 流速 25 mL/min)。アセトニトリルを除去した後、その水溶液を室温で終夜置き、Z-SAA1(X)-SAA1-Val-Cit-APEA-AF を完全に加水分解させた。次いで、その水溶液を凍結乾燥し、Z-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF を白色の固体として得た (64 mg, 2工程で収率78%)。LC-MS: Z-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (C₈₁H₁₂₅N₁₃O₂₀) required [MH⁺] = 1602.0, found [MH⁺] = 1601.5。

10

【0153】

ステップ2

Z-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (64.0 mg, 0.042 mmol) を、塩酸 (0.136 mmol) を含有するエタノール (20 mL) 中に溶解した。Pd/C (10%, 6.5 mg) を入れた後、その反応混合物に水素バルーンを適用し終夜攪拌した。触媒Pd/Cをセライトのパッドで濾別してから、濾液を減圧下で蒸発させた。その生成物を水 (10 mL) と混合し、凍結乾燥してSAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF を白色の固体として得た (60.0 mg, 97%)。LC-MS: SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (C₇₃H₁₁₉N₁₃O₁₈) required [MH⁺] = 1466.9, found [MH⁺] = 1467.5。

20

【0154】

ステップ3

SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (30.0 mg, 0.019 mmol) およびDIPEA (7.4 mg, 0.057 mmol) をDMF (2 mL) 中に溶解した。その反応混合物を氷浴中に浸漬した後、MC-OPFP (9.0 mg, 0.023 mmol) を加えた。10分後、氷浴を取り除き、その混合物を室温で1時間攪拌した。減圧下で溶媒を蒸発させ、その粗生成物を分取HPLCで精製して (0.1% TFA を含む水中に33% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 30 x 250 mm; 流量 25 mL/min)、MC-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF を白色の固体として得た (18.5 mg, 53%)。LC-MS: MC-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (WHY-46) (C₈₃H₁₃₀N₁₄O₂₁) required [MH⁺] = 1660.0, found [MH⁺] = 1660.7。

30

40

【0155】

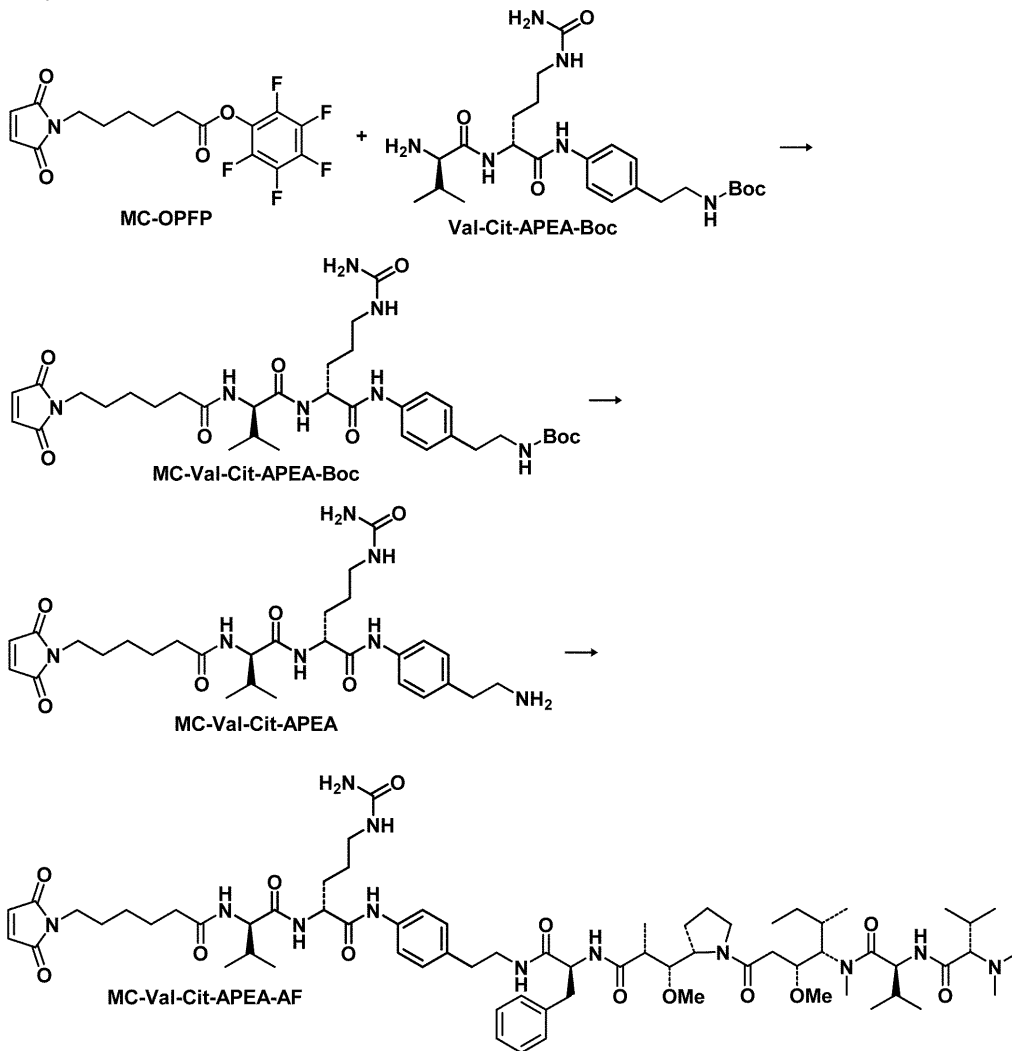
比較調製例12

MHT-87 [MC-Val-Cit-APEA-AF] の合成

下記スキームに示される手順に従ってリンカー-毒素MHT-87を合成した。

【0156】

【化27】



10

20

【0157】

ステップ1

Val-Cit-APEA-Boc (65 mg) および MC-OPFP (50 mg) を DMF (5 mL) 中に溶解してから、DIPEA (0.023 mL) を加えた。5 時間後、DMF および DIPEA を減圧下で除去した。次いで、その粗生成物を分取 HPLC で精製し (0.1% TFA を含む水中に 50% アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3 カラム 50 x 500 mm; 流速 80 mL/min; RT 13.60 min)、MC-Val-Cit-APEA-Boc を白色の固体として得た (40 mg)。LC-MS: 88 (C₃₄H₅₁N₇O₈) required [MH⁺] = 686.4, found [MH⁺] = 687.3。

30

【0158】

ステップ2

DCM (5 mL) 中の MC-Val-Cit-APEA-Boc (40 mg) を室温下 TFA (300 L) で処理した。17 時間後、DCM および TFA を減圧下で除去し、MC-Val-Cit-APEA を淡黄色の固体として得た (46 mg)。LC-MS: MC-Val-Cit-APEA (C₂₉H₄₃N₇O₆) required [MH⁺] = 586.3, found [MH⁺] = 586.7。

40

【0159】

ステップ3

MC-Val-Cit-APEA (37 mg) および アウリスタチン F (47 mg) を DCM および DMF の混合物 (10:1, 3.7 mL) 中に溶解した。次いで、HBTU (37 mg) および DIPEA (0.037 mL) を加えた。17 時間後、DCM および

50

DMFを減圧下で除去し、その粗生成物を分取HPLCで精製して(0.1% TFAを含む水中に40%アセトニトリル; UV 210 nm; ODS-3カラム 30 * 250 mm; 流速25 mL/min; RT 14 min)、MC-Val-Cit-APEA-AF (MHT-87)を白色の固体として得た(9 mg)。LC-MS: MC-Val-Cit-APEA-AF (MHT-87) (C₇₀H₁₀₉N₁₁O₁₃) required [MH⁺] = 1312.8, found [MH⁺] = 1315.2。

【0160】

<抗体-薬物複合体(ADC)>

<抗体-リンカー-毒素>

実施例 1

有機溶媒を6.7%含有する共溶媒系中でのEG12014-MHT-71のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、12 mLのEG12014 (EirGenix Inc. 製) (初期濃度: 12.5 mg/mL)を269 µLの10 mM TCEP (2.5モル当量)で、37 °Cで2時間処理した。次に、30% (v/v) DMSO中で調製した3.55 mLの3 mM リンカー-毒素MHT-71 (9.9モル当量)を上記抗体溶液に加え、4 °Cで30分置いた(混合溶液中の有機溶媒の最終濃度は約6.7%)。1.5 mLの0.1 M システインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム (ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K)を用いてEG12014-MHT-71を精製した。溶出中は、緩衝液をPBS緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O)に変えた。疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) (後述)およびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) (後述)を用い、平均薬物-抗体比 (DAR) および高分子量種 (HMWS) を決定した。

【0161】

HIC (疎水性相互作用クロマトグラフィー) 分析

Butyl NPR (4.6 x 35 mm) TOSOHカラムを備えたAgilent HPLCを用い、薬物-抗体比 (DAR) プロファイルの分析を行った。移動相Aは25 mMリン酸ナトリウム、1.5 M硫酸アンモニウムからなり、pH 6.95、移動相Bは25 mMリン酸ナトリウム、25% イソプロパノールからなり、pH 6.95のものとした。試料15 µLを流速0.8 mL/minでカラムに注入しグラジエントモード (gradient mode) 下で分離した: 0 - 100% 移動相B、12分間。280 nmでの吸光度を検出した。

【0162】

SEC (サイズ排除クロマトグラフィー) 分析

Yarra 3 µm SEC-3000 (300 x 7.8 mm) カラムを備えたWaters PDA996 HPLCを用い、抗体モノマーと凝集生成物 (aggregation product) とをサイズによって分けた。移動相は、0.020 Mリン酸カリウム、0.025 M塩化カリウム、およびイソプロパノール5% (v/v) からなり、pH 6.95のものとした。試料30 µLを流速0.5 mL/minでカラムに注入し、イソクラティック条件 (isocratic condition) 下で分離した。280 nmでの吸光度を検出した。メインピークより前に溶出したすべての種 (species) をまとめて、高分子量種 (HMWS) とする。

【0163】

図2は、ADCのDARが主に2および4に分布していることを示している。EG12014-MHT-71の平均DARは約3.7である。コンジュゲーション効率は約95%である。

【0164】

実施例 2

水相中におけるEG12014-MHT-71のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、0.14 mLのEG12014 (EirGenix Inc. 製) (初期濃度: 7.5 mg/mL)を3.4 µLの5 mM TCEP (2.4 モル当量)で、37 で2時間処理した。次に、ddH₂O中で調製した13.9 µLの5 mM リンカー-毒素MHT-71 (9.9 モル当量)を上記抗体溶液に加え、4 で30分置いた (純水相)。15 µLの0.2 Mシステインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム (ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K)を用いてEG12014-MHT-71を精製した。溶出中は、緩衝液をPBS緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O)に変えた。HICおよびSECを用い、平均DARおよびHMWSを決定した。

10

【0165】

図3Aは、ADCのDARが主に2および4に分布していることを示している。EG12014-MHT-71の平均DARは約3.9である。コンジュゲーション効率は約96%である。

【0166】

実施例3

水相中におけるEG12014-MHT-71のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、0.14 mLのEG12014 (EirGenix Inc. 製) (初期濃度: 7.5 mg/mL)を4.8 µLの5 mM TCEP (3.4 モル当量)で、37 で2時間処理した。次に、ddH₂O中で調製した13.9 µLの5 mM リンカー-毒素MHT-71 (9.9 モル当量)を上記抗体溶液に加え、4 で30分置いた (純水相)。15 µLの0.2 Mシステインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム (ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K)を用いてEG12014-MHT-71を精製した。溶出中は、緩衝液をPBS緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O)に変えた。HICおよびSECを用い、平均DARおよびHMWSを決定した。

20

【0167】

図3Bは、ADCのDARが主に4および6に分布していることを示している。EG12014-MHT-71の平均DARは約5.4である。コンジュゲーション効率は約99%である。

30

【0168】

実施例4

有機溶媒を16.7%含有する共溶媒系中でのIgG1-MHT-47のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、0.1 mLのヒトIgG1 (Sigma) (初期濃度: 2.6 mg/mL)を1.6 µLの2.5 mM TCEP (2.4 モル当量)で、37 で2時間処理した。次に、75% (v/v) DMSO中で調製した29.0 µLの363 µM リンカー-毒素MHT-47 (9.9 モル当量)を上記抗体溶液に加え、4 で30分置いた (混合溶液中の有機溶媒の最終濃度は約16.7%)。5 µLの0.1 Mシステインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム (ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K)を用いてIgG1-MHT-47を精製した。溶出中は、緩衝液をPBS緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O)に変えた。HICおよびSECを用い、平均DARおよびHMWSを決定した。

40

【0169】

図4は、ADCのDARが主に2および4に分布していることを示している。IgG1-MHT-47の平均DARは約3.7である。コンジュゲーション効率は約93%である。

【0170】

50

実施例 5

有機溶媒を 2% 含有する共溶媒系中での I g G 1 - M H T - 4 7 のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、60 μ L のヒト I g G 1 (S i g m a) (初期濃度：5.7 mg / mL) を 1.2 μ L の 10 mM T C E P (2.2 モル当量) で、37 で 2 時間処理した。次に、30% (v / v) D M S O 中で調製した 4.6 μ L の 3 mM リンカー - 毒素 M H T - 4 7 (6 モル当量) を上記抗体溶液に加え、4 で 30 分置いた (混合溶液中の有機溶媒の最終濃度は約 2%)。0.5 μ L の 0.2 M システインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , M W C O : 4 0 K) を用いて I g G 1 - M H T - 4 7 を精製した。溶出中は、緩衝液を P B S 緩衝液 (2.67 mM K C l , 1.47 mM K H ₂ P O ₄ , 137.93 mM N a C l , 8.06 mM N a ₂ H P O ₄ - 7 H ₂ O) に変えた。H I C および S E C を用い、平均 D A R および H M W S を決定した。

【0171】

図 5 は、A D C の D A R が主に 2 および 4 に分布していることを示している。I g G 1 - M H T - 4 7 の平均 D A R は約 3.7 である。コンジュゲーション効率は約 93% である。

【0172】

実施例 6

5.5% の有機溶媒を含有する共溶媒系中での H e r c e p t i n (登録商標) - M H T - 4 7 のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、0.3 mL の H e r c e p t i n (登録商標) (トラスツズマブ) (R o c h e) (初期濃度：10.3 mg / mL) を 5.2 μ L の 10 mM T C E P (2.5 モル当量) で、37 で 2 時間処理した。次に、30% (v / v) D M S O 中で調製した 69.1 μ L の 3 mM リンカー - 毒素 M H T - 4 7 (9.9 モル当量) を上記抗体溶液に加え、4 で 30 分置いた (混合溶液中の有機溶媒の最終濃度は約 5.5%)。20 μ L の 0.1 M システインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , M W C O : 4 0 K) を用いて H e r c e p t i n (登録商標) - M H T - 4 7 を精製した。溶出中は、緩衝液を P B S 緩衝液 (2.67 mM K C l , 1.47 mM K H ₂ P O ₄ , 137.93 mM N a C l , 8.06 mM N a ₂ H P O ₄ - 7 H ₂ O) に変えた。H I C および S E C を用い、平均 D A R および H M W S を決定した。

【0173】

図 6 は、A D C の D A R が主に 2 および 4 に分布していることを示している。H e r c e p t i n (登録商標) - M H T - 4 7 の平均 D A R は約 3.7 である。コンジュゲーション効率は約 92% である。

【0174】

実施例 7

水相中における H e r c e p t i n (登録商標) - C C H - 0 3 8 のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、0.22 mL の H e r c e p t i n (登録商標) (トラスツズマブ) (R o c h e) (初期濃度：11.3 mg / mL) を 4.2 μ L の 10 mM T C E P (2.5 モル当量) で、37 で 2 時間処理した。次に、d d H ₂ O 中で調製した 55.4 μ L の 3 mM リンカー - 毒素 C C H - 0 3 8 (9.9 モル当量) を上記抗体溶液に加え、4 で 30 分置いた (純水相)。2 μ L の 0.2 M システインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , M W C O : 4 0 K) を用いて H e r c e p t i n (登録商標) - C C H - 0 3 8 を精製した。溶出中は、緩衝液を P B S 緩衝液 (2.67 mM K C l , 1.47 mM K H ₂ P O ₄ , 137.93 mM N a C l , 8.06 mM N a ₂ H P O ₄ - 7 H ₂ O) に変えた。H I C および S E C を用い、平均 D A R および H M W S を決定した。

【0175】

図 7 は、A D C の D A R が主に 2 および 4 に分布していることを示している。H e r c

e p t i n (登録商標) - C C H - 0 3 8 の平均 D A R は約 4 . 0 である。コンジュゲーション効率は約 9 7 % である。

【 0 1 7 6 】

実施例 8

有機溶媒を 1 . 6 % 含有する共溶媒系中での E r b i t u x (登録商標) - C C H - 0 2 8 のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、0 . 6 m L の E r b i t u x (登録商標) (セツキシマブ) (M e r c k) (初期濃度: 4 . 2 m g / m L) を 3 . 8 μ L の 1 0 m M T C E P (2 . 2 モル当量) で、3 7 °C で 2 時間処理した。次に、3 0 % (v / v) D M S O 中で調製した 3 4 . 2 μ L の 3 m M リンカー - 毒素 C C H - 0 2 8 (6 モル当量) を上記抗体溶液に加え、4 °C で 3 0 分置いた (混合溶液中の有機溶媒の最終濃度は約 1 . 6 %)。1 0 0 μ L の 0 . 1 M システインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , M W C O : 4 0 K) を用いて E r b i t u x (登録商標) - C C H - 0 2 8 を精製した。溶出中は、緩衝液を P B S 緩衝液 (2 . 6 7 m M K C l , 1 . 4 7 m M K H ₂ P O ₄ , 1 3 7 . 9 3 m M N a C l , 8 . 0 6 m M N a ₂ H P O ₄ - 7 H ₂ O) に変えた。H I C および S E C を用い、平均 D A R および H M W S を決定した。

10

【 0 1 7 7 】

図 8 は、A D C の D A R が主に 2 および 4 に分布していることを示している。E r b i t u x (登録商標) - C C H - 0 2 8 の平均 D A R は約 3 . 8 である。コンジュゲーション効率は約 9 5 % である。

20

【 0 1 7 8 】

実施例 9

有機溶媒を 1 . 7 % 含有する共溶媒系中での E r b i t u x (登録商標) - C C H - 0 3 5 のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、0 . 6 m L の E r b i t u x (登録商標) (セツキシマブ) (M e r c k) (初期濃度: 4 . 3 m g / m L) を 3 . 9 μ L の 1 0 m M T C E P (2 . 2 モル当量) で、3 7 °C で 2 時間処理した。次に、3 0 % (v / v) D M S O 中で調製した 3 5 . 2 μ L の 3 m M リンカー - 毒素 C C H - 0 3 5 (6 モル当量) を上記抗体溶液に加え、4 °C で 3 0 分置いた (混合溶液中の有機溶媒の最終濃度は約 1 . 7 %)。5 0 μ L の 0 . 2 M システインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , M W C O : 4 0 K) を用いて E r b i t u x (登録商標) - C C H - 0 3 5 を精製した。溶出中は、緩衝液を P B S 緩衝液 (2 . 6 7 m M K C l , 1 . 4 7 m M K H ₂ P O ₄ , 1 3 7 . 9 3 m M N a C l , 8 . 0 6 m M N a ₂ H P O ₄ - 7 H ₂ O) に変えた。H I C および S E C を用い、平均 D A R および H M W S を決定した。

30

【 0 1 7 9 】

図 9 は、A D C の D A R が主に 2 および 4 に分布していることを示している。E r b i t u x (登録商標) - C C H - 0 3 5 の平均 D A R は約 3 . 6 である。コンジュゲーション効率は約 9 4 % である。

40

【 0 1 8 0 】

実施例 1 0

有機溶媒を 1 . 5 % 含有する共溶媒系中での E r b i t u x (登録商標) - C C H - 0 4 1 のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、0 . 8 5 m L の E r b i t u x (登録商標) (セツキシマブ) (M e r c k) (初期濃度: 3 . 8 m g / m L) を 4 . 9 μ L の 1 0 m M T C E P (2 . 2 モル当量) で、3 7 °C で 2 時間処理した。次に、3 0 % (v / v) D M S O 中で調製した 4 4 . 5 μ L の 3 m M リンカー - 毒素 C C H - 0 4 1 (6 モル当量) を上記抗体溶液に加え、4 °C で 3 0 分置いた (混合溶液中の有機溶媒の最終濃度は約 1 . 5 %)。8 0 μ L の 0 . 2 M システインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム (T h e r m o F i s h e r

50

Scientific, MWCO: 40K) を用いて Erbitux (登録商標) - CCH - 041 を精製した。溶出中は、緩衝液を PBS 緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 137.93 mM NaCl, 8.06 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) に変えた。HIC および SEC を用い、平均 DAR および HMWS を決定した。

【0181】

図10は、ADCのDARが主に2および4に分布していることを示している。Erbitux (登録商標) - CCH - 041 の平均DARは約3.9である。コンジュゲーション効率は約96%である。

【0182】

実施例11

有機溶媒を1.4%含有する共溶媒系中での Erbitux (登録商標) - FCW - 016 のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、0.4 mL の Erbitux (登録商標) (セツキシマブ) (Merck) (初期濃度: 3.5 mg/mL) を 4.0 μL の 5 mM TCEP (2.1 モル当量) で、37 で2時間処理した。次に、100% (v/v) DMSO 中で調製した 5.70 μL の 10 mM リンカー - 毒素 FCW - 016 (6 モル当量) を上記抗体溶液に加え、4 で30分置いた (混合溶液中の有機溶媒の最終濃度は約1.4%)。15 μL の 0.1 M システインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム (ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K) を用いて Erbitux (登録商標) - FCW - 016 を精製した。溶出中は、緩衝液を PBS 緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 137.93 mM NaCl, 8.06 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) に変えた。HIC および SEC を用い、平均 DAR および HMWS を決定した。

【0183】

図11は、ADCのDARが主に2および4に分布していることを示している。Erbitux (登録商標) - FCW - 016 の平均DARは約4.0である。コンジュゲーション効率は約96%である。

【0184】

実施例12

水相中における Erbitux (登録商標) - CCH - 038 のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、2.0 mL の Erbitux (登録商標) (セツキシマブ) (Merck) (初期濃度: 4.5 mg/mL) を 13.6 μL の 10 mM TCEP (2.1 モル当量) で、37 で2時間処理した。次に、dd H_2O 中で調製した 123.2 μL の 3 mM リンカー - 毒素 CCH - 038 (6 モル当量) を上記抗体溶液に加え、4 で30分置いた (純水相)。20 μL の 0.2 M システインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム (ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K) を用いて Erbitux (登録商標) - CCH - 038 を精製した。溶出中は、緩衝液を PBS 緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 137.93 mM NaCl, 8.06 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) に変えた。HIC および SEC を用い、平均 DAR および HMWS を決定した。

【0185】

図12は、ADCのDARが主に2および4に分布していることを示している。Erbitux (登録商標) - CCH - 038 の平均DARは約3.8である。コンジュゲーション効率は約95%である。

【0186】

実施例13

水相中における Erbitux (登録商標) - WHY - 46 のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、2.3 mL の Erbitux (登録商標) (セツキシマブ) (Merck) (初期濃度: 4.3 mg/mL) を 14.5 μL の 10 mM TCEP (2.2

10

20

30

40

50

モル当量)で、37 で2時間処理した。次に、ddH₂O中で調製した131.5 μLの3 mMリンカー-毒素WHY-46(6モル当量)を上記抗体溶液に加え、4 で30分置いた(純水相)。250 μLの0.2 Mシステインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム(ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K)を用いてErbix(登録商標)-WHY-46を精製した。溶出中は、緩衝液をPBS緩衝液(2.67 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na₂HPO₄・7H₂O)に変えた。HICおよびSECを用い、平均DARおよびHMWSを決定した。

【0187】

図13Aは、ADCのDARが主に2および4に分布していることを示している。Erbix(登録商標)-WHY-46の平均DARは約3.9である。コンジュゲーション効率は約96%である。図13Bは、HMWSが0.1%しか生成されなかったことを示している。

10

【0188】

実施例14

水相中におけるErbix(登録商標)-MHT-71のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、23.5 mLのErbix(登録商標)(セツキシマブ)(Merck)(初期濃度: 4.7 mg/mL)を159 μLの10 mM TCEP(2.1モル当量)で、37 で2時間処理した。次に、ddH₂O中で調製した1.52 mLの3 mMリンカー-毒素MHT-71(6モル当量)を上記抗体溶液に加え、4 で30分置いた(純水相)。127 μLの0.2 Mシステインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム(ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K)を用いてErbix(登録商標)-MHT-71を精製した。溶出中は、緩衝液をPBS緩衝液(2.67 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na₂HPO₄・7H₂O)に変えた。HICおよびSECを用い、平均DARおよびHMWSを決定した。

20

【0189】

図14Aは、ADCのDARが主に2および4に分布していることを示している。Erbix(登録商標)-MHT-71の平均DARは約3.6である。コンジュゲーション効率は約95%である。図14Bは、有意のHMWSが生成されなかったことを示している。

30

【0190】

実施例15

水相中におけるHLX-07-MHT-71のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、0.5 mLのHLX-07(Henlix Inc.製)(初期濃度: 4.4 mg/mL)を3.6 μLの10 mM TCEP(2.4モル当量)で、37 で2時間処理した。次に、ddH₂O中で調製した140 μLの755 μMリンカー-毒素MHT-71(7モル当量)を上記抗体溶液に加え、4 で30分置いた(純水相)。20 μLの0.1 Mシステインを加えて反応を停止させた。脱塩カラム(ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K)を用いてHLX-07-MHT-71を精製した。溶出中は、緩衝液をPBS緩衝液(2.67 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na₂HPO₄・7H₂O)に変えた。HICおよびSECを用い、平均DARおよびHMWSを決定した。

40

【0191】

図15は、ADCのDARが主に2および4に分布していることを示している。HLX-07-MHT-71の平均DARは約3.8である。コンジュゲーション効率は約96%である。

【0192】

実施例16

50

水相中における抗 - E p C A M - M H T - 7 1 のコンジュゲーション

ホウ酸塩緩衝液中、60 μ L の抗 - E p C A M A b (c l o n e E p A b 3 - 5 , I g G 2 b) (D r . H a n - C h u n g W u ' s l a b 製) (初期濃度 : 3 . 9 m g / m L) を 3 . 3 μ L の 5 m M T C E P (8 モル当量) で、37 で 5 時間処理した。次に、d d H ₂ O 中で調製した 10 . 4 μ L の 3 m M リンカー - 毒素 M H T - 7 1 (15 モル当量) を上記抗体溶液に加え、4 で 1 時間置いた (純水相) 。 0 . 5 μ L の 0 . 2 M シス테인を加えて反応を停止させた。脱塩カラム (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , M W C O : 40 K) を用いて抗 - E p C A M - M H T - 7 1 を精製した。溶出中は、緩衝液を P B S 緩衝液 (2 . 67 m M K C l , 1 . 47 m M K H ₂ P O ₄ , 137 . 93 m M N a C l , 8 . 06 m M N a ₂ H P O ₄ - 7 H ₂ O) 10 に変えた。抗 - E p C A M - M H T - 7 1 のコンジュゲーションプロファイルを H I C により分析した。コンジュゲートしていない (U n c o n j u g a t e d) 抗 - E p C A M A b のピークが消失したが、これは抗 - E p C A M 抗体のすべてがリンカー - 毒素 M H T - 7 1 にコンジュゲートしたことを示している。

【 0 1 9 3 】

図 16 A は、コンジュゲートしていない抗 - E p C A M A b の H I C プロファイルを示し、図 16 B は、リンカー - 毒素 M H T - 7 1 とコンジュゲートした抗 - E p C A M A b の H I C プロファイルを示している。

【 0 1 9 4 】

< 熱ストレス試験 >

実施例 17

P B S 中の 500 μ L の 3 m g / m L E r b i t u x , E r b i t u x - L 1 - M M A E (市販のリンカー - 毒素 M C - V a l - C i t - P A B - M M A E (L 1 - M M A E) ; C o n c o r t i s B i o t h e r a p e u t i c s) , E r b i t u x - M H T - 87 , E r b i t u x - M H T - 71 , または E r b i t u x - W H Y - 46 を、40 の水浴でインキュベートし、0、1 および 2 週目にサンプリングし、S E C 分析を行った。Y a r r a 3 μ m S E C - 3000 (300 x 7 . 8 m m) カラムを備える W a t e r s P D A 996 H P L C を使用し、抗体モノマーと凝集生成物をサイズによって分離した。移動相を、0 . 020 M リン酸カリウム、0 . 025 M 塩化カリウム、およびイソプロパノール 5 % (v / v) で構成し、p H 6 . 95 とした。30 μ L の試料を 30 流速 0 . 5 m L / m i n でカラムに注入し、イソクラティック条件下で分離した。280 n m での吸光度を検出した。メインピークより前に溶出したすべての種 (s p e c i e s) を合わせ、高分子量種 (H M W S) とする。

【 0 1 9 5 】

図 17 A は、そのリンカーが糖アミノ酸ユニットを含む E r b i t u x - M H T - 71 および E r b i t u x - W H Y - 46 が、そのリンカーがいかなる糖アミノ酸ユニットも含まない E r b i t u x - L 1 - M M A E および E r b i t u x - M H T - 87 に比べ、H M W S の割合が低いことを示している。よって、この実験により、糖アミノ酸ユニットを有するリンカーは、親水性を高めるのみならず、A D C の熱安定性を著しく高めるとい 40 うことが実証された。

【 0 1 9 6 】

実施例 18

P B S 中の 500 μ L の 3 m g / m L E r b i t u x , E r b i t u x - L 1 - M M A E (市販のリンカー - 毒素 M C - V a l - C i t - P A B - M M A E (L 1 - M M A E) ; C o n c o r t i s B i o t h e r a p e u t i c s) , E r b i t u x - M H T - 87 , E r b i t u x - M H T - 71 , および E r b i t u x - W H Y - 46 を、50 の水浴でインキュベートした。次いで、抗体および A D C を 0、4、7、および 24 時間の時点でサンプリングし、S E C 分析を行った。Y a r r a 3 μ m S E C - 3000 (300 x 7 . 8 m m) カラムを備える W a t e r s P D A 996 H P L C を使用し、抗体モノマーと凝集生成物をサイズによって分離した。移動相を、0 . 020 M リン 50

酸カリウム、0.025 M塩化カリウム、およびイソプロパノール5% (v/v) で構成し、pH 6.95とした。30 μ Lの試料を流速0.5 mL/minでカラムに注入し、イソクラティック条件下で分離した。280 nmでの吸光度を検出した。メインピークより前に溶出したすべての種 (species) をまとめて、高分子量種 (HMWS) とする。

【0197】

図17Bは、そのリンカーが糖アミノ酸ユニットを含むErbitux-MHT-71およびErbitux-WHY-46が、そのリンカーがいかなる糖アミノ酸ユニットも含まないErbitux-L1-MMAEおよびErbitux-MHT-87に比べ、HMWSの割合が低いことを示している。よって、この実験により、糖アミノ酸ユニットを有するリンカーは、その親水性を高めるのみならず、ADCの熱安定性をも著しく高めるということが実証された。

10

【0198】

<貯蔵試験>

実施例19

水相中でコンジュゲートしたErbitux-MHT-71を脱塩カラムで精製した。溶出中は、緩衝液を、20 mMクエン酸ナトリウム、6.3% (w/v)トレハロース、0.2 mg/mLポリソルベート80、pH 6.0 (SGN)に変えた。Erbitux-MHT-71を100 μ L/チューブずつに分け、4 で保管して、貯蔵安定性試験を行った。Erbitux-MHT-71を毎週または隔週サンプリングし、17週間にわたり抗体濃度、HICおよびSECの分析を行った。

20

【0199】

図18は、Erbitux-MHT-71の抗体濃度が4か月にわたって有意な変化がなく (<10%)、Erbitux-MHT-71の平均DARが4か月にわたって有意な変化がなく (<5%)、かつErbitux-MHT-71のHMWS生成が4か月後も依然非常に低かった (0.2%) ことを示している。

【0200】

<力価試験>

実施例20

EGFR発現頭頸部癌細胞株FaDuとEGFR非発現頭頸部癌細胞株RPMI2650とを、9種類のグリコペプチドリンカーを含有するADCで処置し、それぞれ異なるEGFR発現腫瘍細胞におけるそれらの選択毒性を分析した。

30

【0201】

FaDu細胞およびRPMI細胞を、 2.5×10^3 および 4×10^3 細胞/ウェルの密度でCorning CellBIND 96ウェルプレート内にそれぞれ播種した。37、5% CO₂ インキュベーターで24時間インキュベートした後、古い培地を除き、ADC含有培地を、FaDu細胞には 10^{-7} から 10^{-13} Mまでの濃度で、RPMI細胞には 10^{-6} から 10^{-12} Mまでの濃度で細胞に加えた (対数連続希釈)。次いで、37、5% CO₂ インキュベーターで120時間インキュベートした。120時間インキュベートした後、細胞を一度リンスし、MTT法で細胞生存率をアッセイした。その古い培地を吸引し、100 μ Lの0.5 mg/mL MTT含有培地を各ウェル中に加えた。4時間インキュベートした後、MTT試薬を除去し、その沈殿をDMSO中に溶解した。細胞の測光強度 (photometry intensity) を吸収波長570 nmのマイクロプレートリーダー (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems) で測定した。細胞生存率は次の等式により計算した。

40

【0202】

(数1)

$$\text{細胞生存率 (\%)} = (\text{Ins} - \text{Inb}) / (\text{Inc} - \text{Inb}) \times 100\%$$

この等式中、「Ins」は所定の毒素とインキュベートした細胞の測光強度であり、「Inb」は細胞が播種されていないブランクウェルの強度であり、「Inc」は培地のみでインキュベートした細胞の強度である (陽性対照)。

50

【0203】

各薬物濃度 (n = 6) で120時間毒素に曝した後のFaDu細胞の*in vitro*生存率を記録し、Origin softwareのSigmoidal modelを用い、データをフィットさせてIC50値を得た。

【0204】

表3は、EGFR発現頭頸部癌細胞株FaDu細胞における9種類のグリコペプチドリナー含有ADCのIC50値が、0.5nMよりも著しく低いことを示している。FaDu細胞における9種類のグリコペプチドリナー含有ADCの力価は非常に高いものである。Erbix-MHT-93を除く、他8種類のグリコペプチドリナー含有ADCは、腫瘍細胞での選択毒性が高い。選択毒性は、EGFR発現頭頸部癌細胞株FaDu細胞において、EGFR非発現頭頸部癌細胞株RPMI2650細胞の2000倍超である。選択毒性は、市販のリナー-毒素MC-Val-Cit-PAB-MMAE (Concortis Biotherapeutics) にコンジュゲートされたErbix-L1-MMAEの選択毒性よりも優れており(約1246倍)、かつリナーがいかなる糖アミノ酸ユニットを含まないErbix-MHT-87の選択毒性作用(約366倍)よりも優れている。

10

【0205】

【表3】

IC50 (nM)	RPMI 2650	FaDu	<i>In vitro</i> 選択毒性
EGFR 発現	0	2+	
Erbix-L1-MMAE	107.2	0.086	1246
Erbix-MHT-87	27.1	0.074	366
Erbix-MHT-47	80.0	0.037	2162
Erbix-MHT-71	247	0.074	3337
Erbix-MHT-93	57.0	0.16	356
Erbix-FCW-016	>200	0.068	>2941
Erbix-CCH-028	>1000	0.148	>6756
Erbix-CCH-035	>1000	0.176	>5681
Erbix-CCH-038	>1000	0.137	>7299
Erbix-WHY-46	>200	0.091	>2197
Erbix-CCH-041	>1000	0.120	>8333

20

30

40

【0206】

<腫瘍増殖抑制試験>

実施例21

1×10^6 のFaDu細胞を0日目にC.B-17 SCIDマウスに皮下注射した。腫瘍の長さ幅を測定し、腫瘍のサイズを(長さ×幅×幅×1/2)(mm³)で計算して記録した。8日目、平均腫瘍サイズが約100mm³となったとき、賦形剤(DPBS

50

)、Erbitux (登録商標) 5 mg / kg、Erbitux - MHT - 47 5 mg / kg、Erbitux - MHT - 71 5 mg / kg、Erbitux - L1 - MMAE (市販のリンカー - 毒素 MC - Val - Cit - PAB - MMAE (L1 - MMAE) ; Concorthis Biotherapeutics) 5 mg / kg、APEA - AF (市販の AF ; Concorthis Biotherapeutics) 0.1 mg / kg、MMAE (Concorthis Biotherapeutics) 0.1 mg / kg を 1 回 静 脈 注 射 し (1 0 m L / k g B . W . 注 入 量)、薬 力 学 実 験 (pharmacodynamic experiment) を 行 っ た (n = 6)。マウスの腫瘍増殖および体重を週に 2 回ずつ観察した。腫瘍増殖抑制 (TGI) の計算式は、 $TGI (\%) = [1 - (\text{薬物処置群の腫瘍体積} / \text{賦形剤群の腫瘍体積}) \times 100$ である。実験期間中、腫瘍がマウスの体重の 10 % より大きくなるか、腫瘍体積が 1500 mm³ より大きくなるか、または他の副作用が同時に起こった場合、人道的配慮より、CO₂ を用いてマウスを屠殺した。

10

【 0 2 0 7 】

薬物 (Erbitux、Erbitux - ADC、APEA - AF、および MMAE) による処置の 8 日後、Erbitux - MHT - 47、Erbitux - MHT - 71、および Erbitux - L1 - MMAE 群の腫瘍増殖は著しく抑制された。29 日目、Erbitux - MHT - 47、Erbitux - MHT - 71 および Erbitux - L1 - MMAE 群の TGI はそれぞれ 106 ± 1 %、106 ± 1 %、および 105 ± 8 % であり、一方、Erbitux 群の TGI は 27 ± 14 % であった (表 4 参照)。図 19 は、36 日目に Erbitux - L1 - MMAE 群で腫瘍の再発が観察されたことを示している。54 ~ 61 日目に Erbitux - MHT - 47 群で腫瘍の再発が観察された。一方、Erbitux - MHT - 71 群では 117 日目まで腫瘍の再発は観察されなかった。

20

【 0 2 0 8 】

【 表 4 】

TGI (%)±SEM	
8~29日	
賦形剤 (DPBS)	0
Erbitux® (5 mg/kg)	27±14
Erbitux-MHT-47 (5 mg/kg)	106±1
Erbitux-MHT-71 (5 mg/kg)	106±1
Erbitux-L1-MMAE (5 mg/kg)	105±8
APEA-AF (0.1 mg/kg)	11±17
MMAE (0.1 mg/kg)	12±6

30

40

【 0 2 0 9 】

図 20 は、薬物投与 (Erbitux、Erbitux - ADC、APEA - AF、および MMAE) 後に体重低下または他の著しく異常な臨床症状が生じなかったことを示している。

【 0 2 1 0 】

50

【表 5】

BW (%)±SEM	
8~29日	
賦形剤 (DPBS)	106±5
Erbix® (5 mg/kg)	106±1
Erbix-MHT-47 (5 mg/kg)	106±1
Erbix-MHT-71 (5 mg/kg)	108±2
Erbix-L1-MMAE (5 mg/kg)	106±1
APEA-AF (0.1 mg/kg)	108±4
MMEA (0.1 mg/kg)	106±4

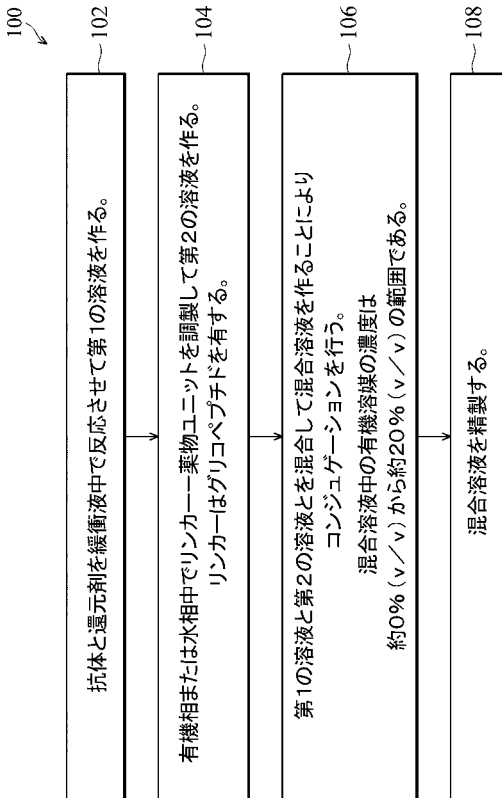
10

20

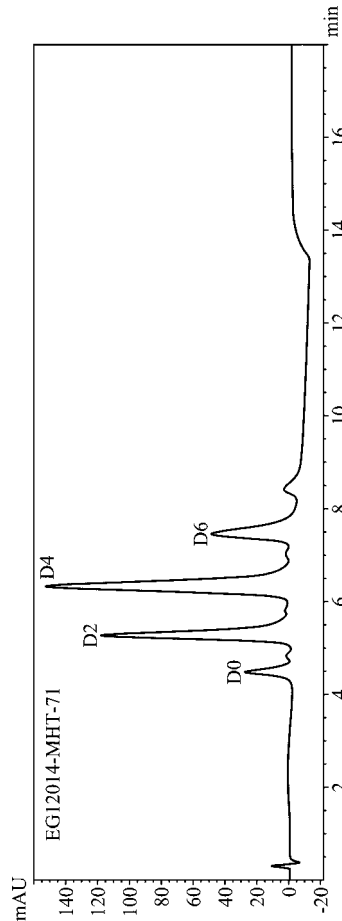
【 0 2 1 1 】

本開示の実施形態に様々な改変および変更を加え得るということは、当業者には明らかであろう。明細書および実施例は単に例示として見なされるように意図されており、本開示の真の範囲は、以下の特許請求の範囲およびそれらの同等物によって示される。

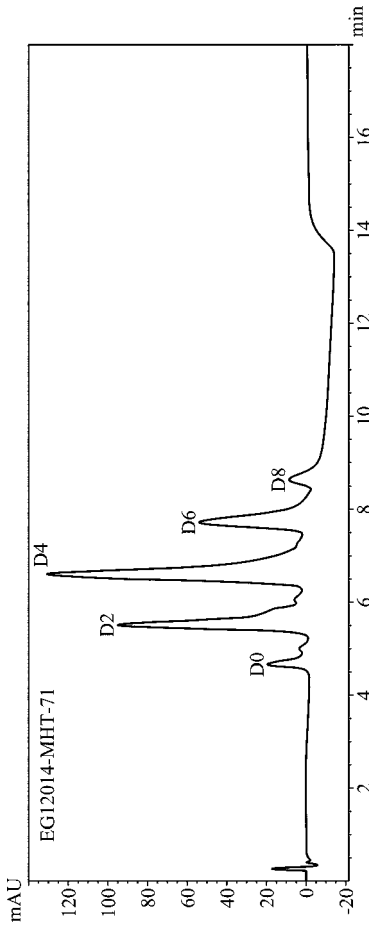
【 図 1 】



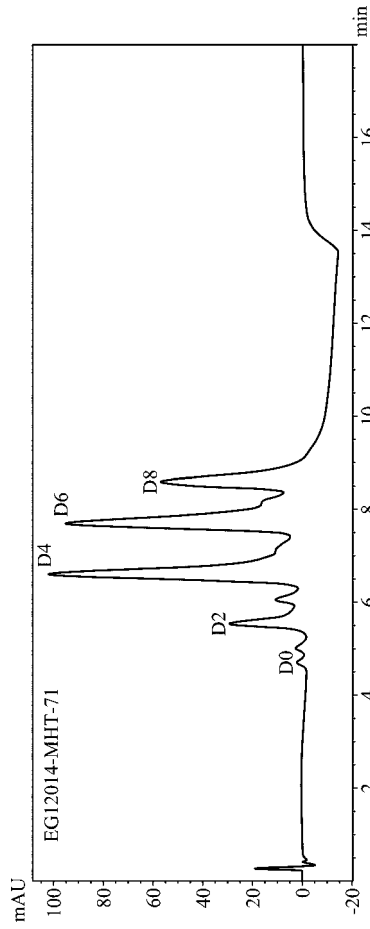
【 図 2 】



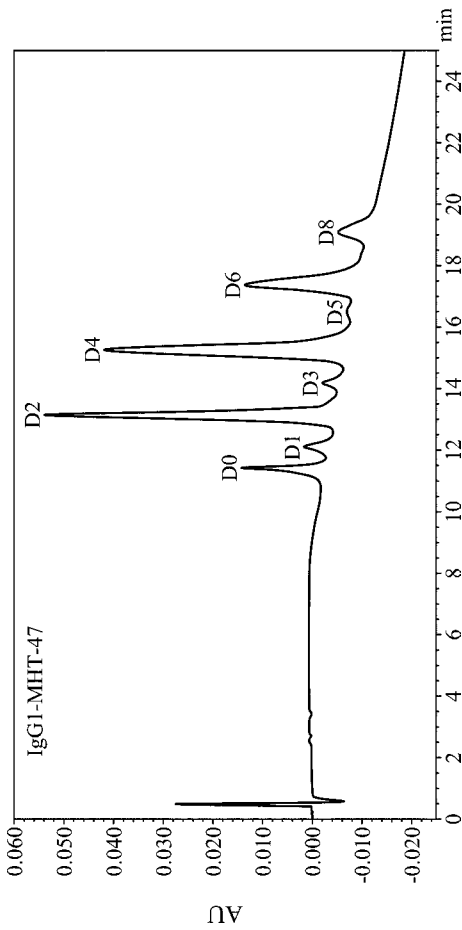
【 図 3 A 】



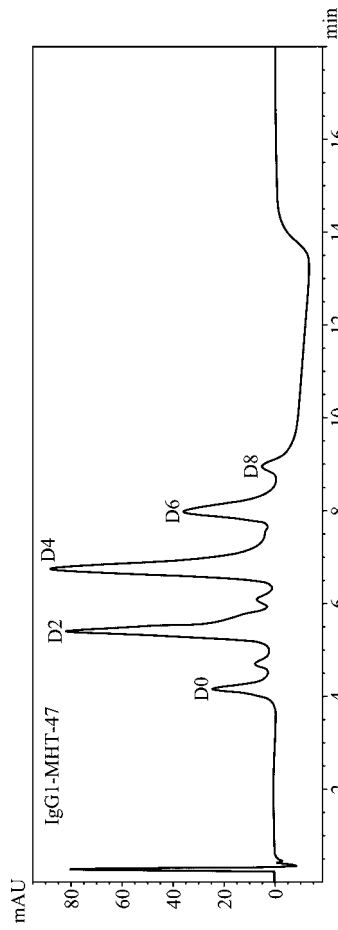
【 図 3 B 】



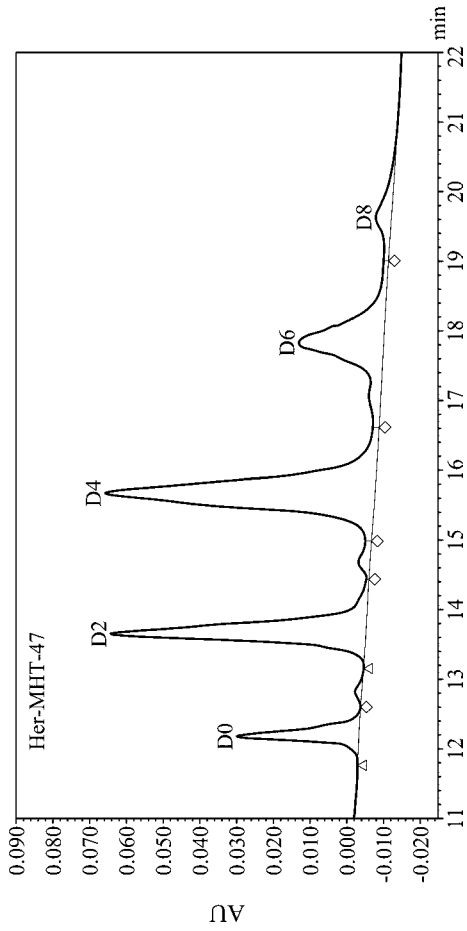
【 図 4 】



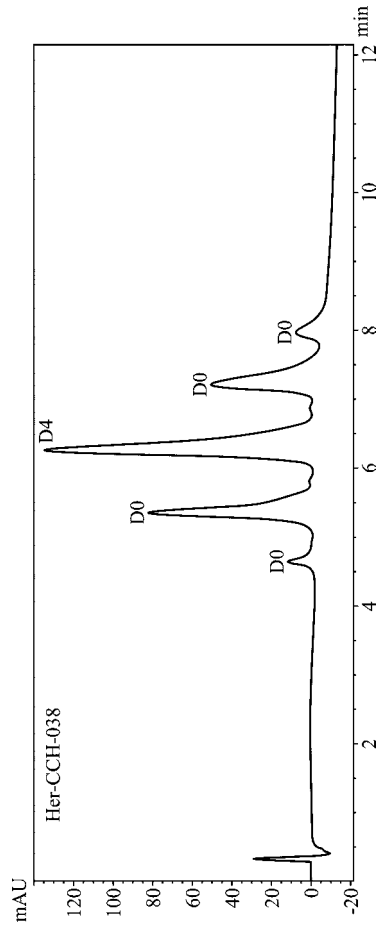
【 図 5 】



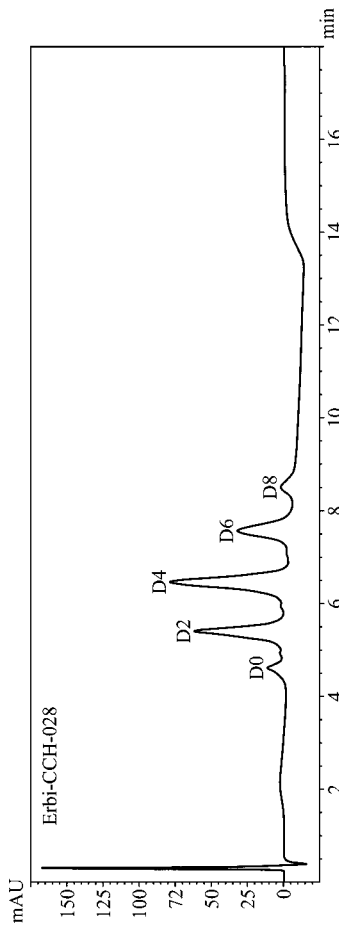
【 図 6 】



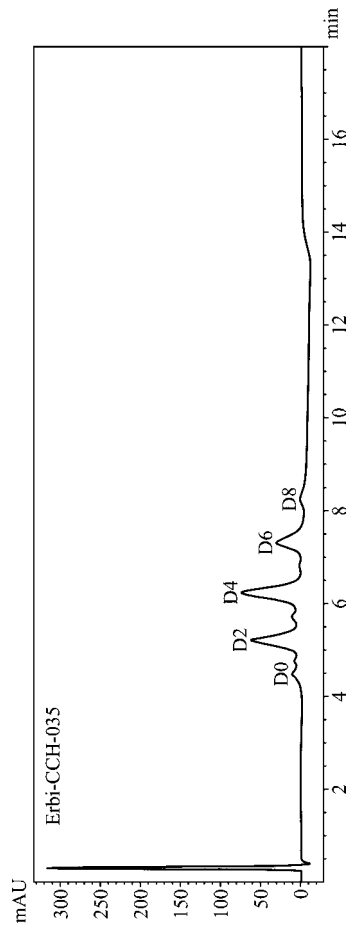
【 図 7 】



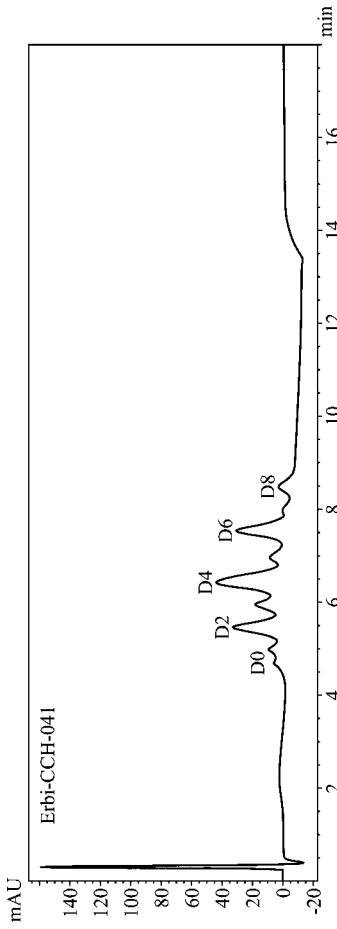
【 図 8 】



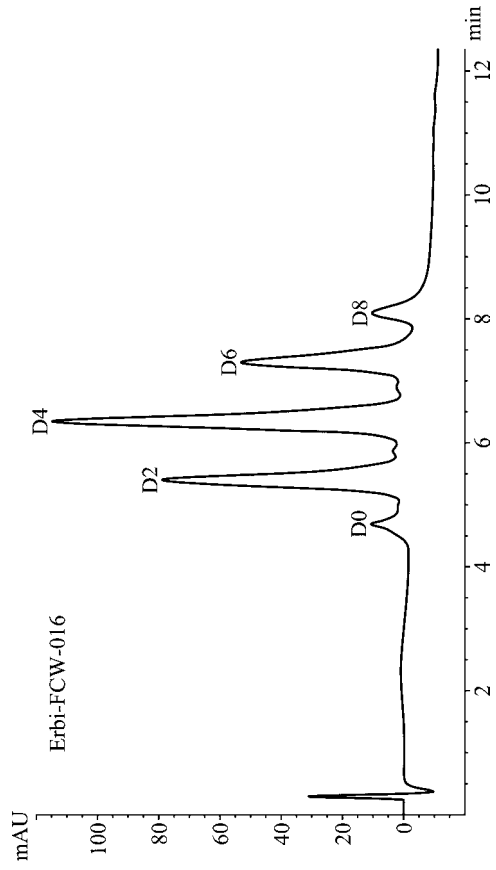
【 図 9 】



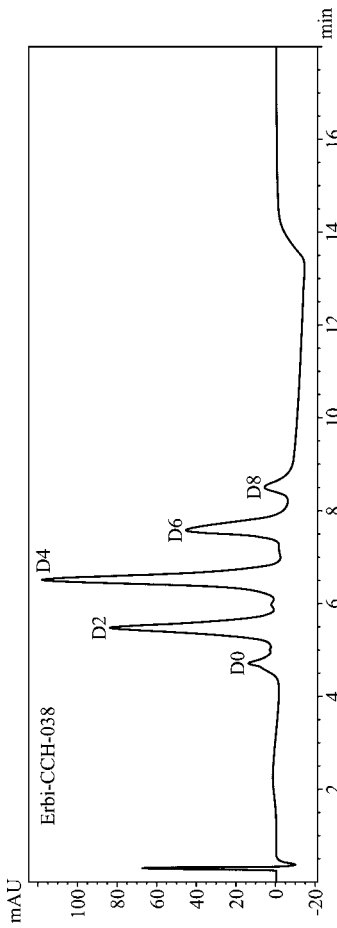
【 1 0 】



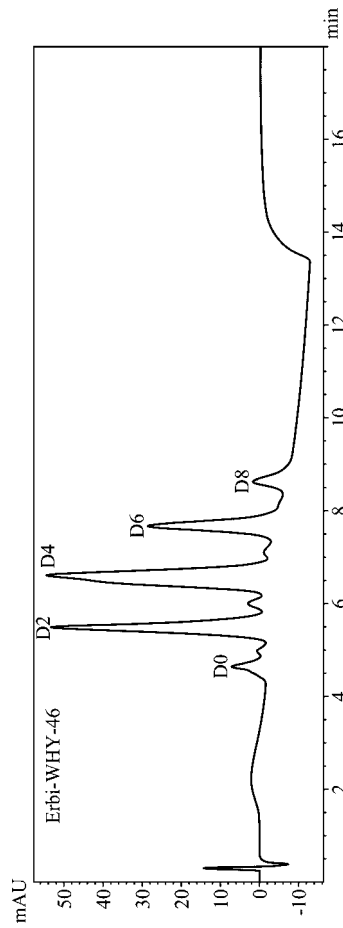
【 1 1 】



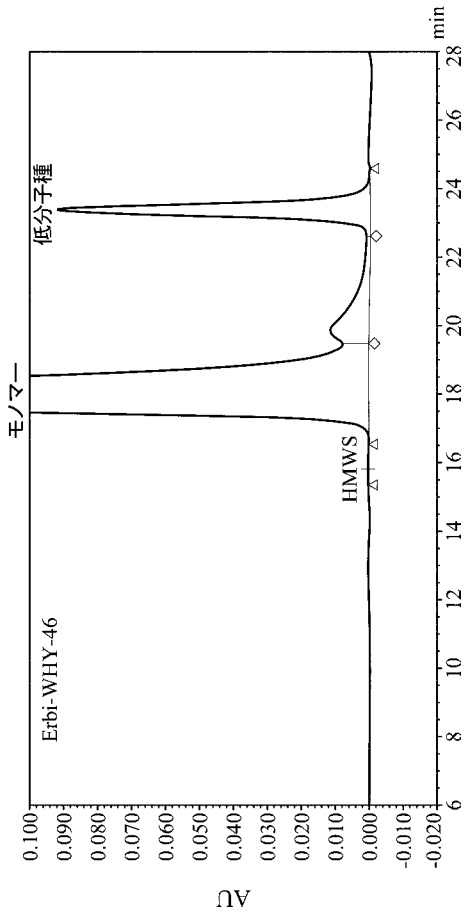
【 1 2 】



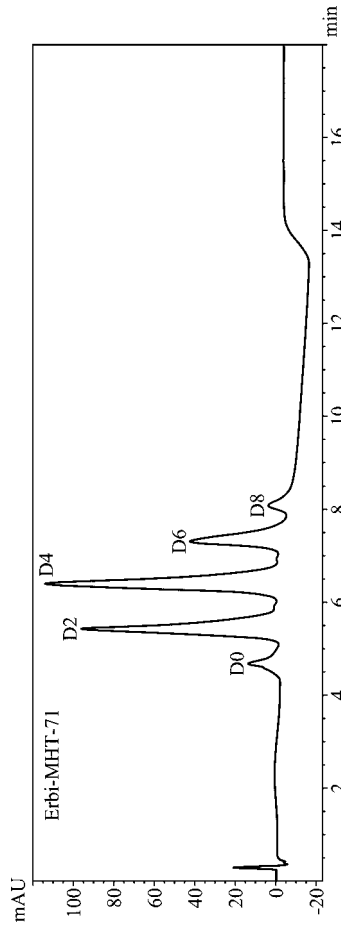
【 1 3 A 】



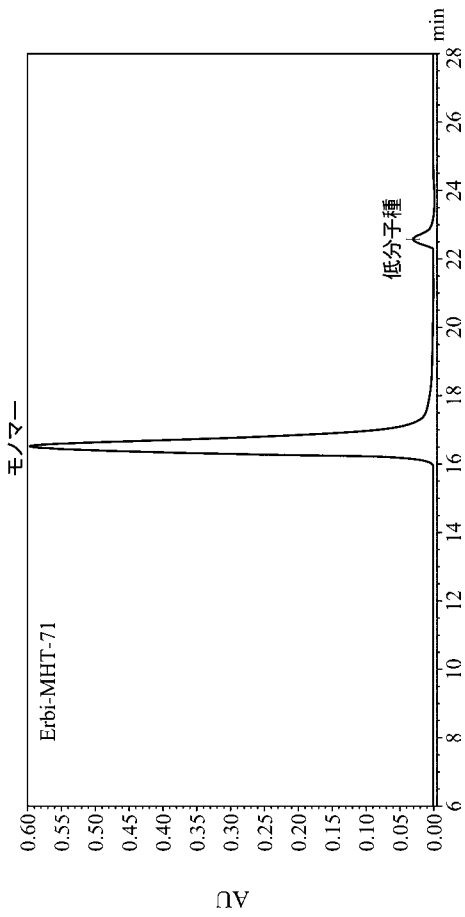
【 図 1 3 B 】



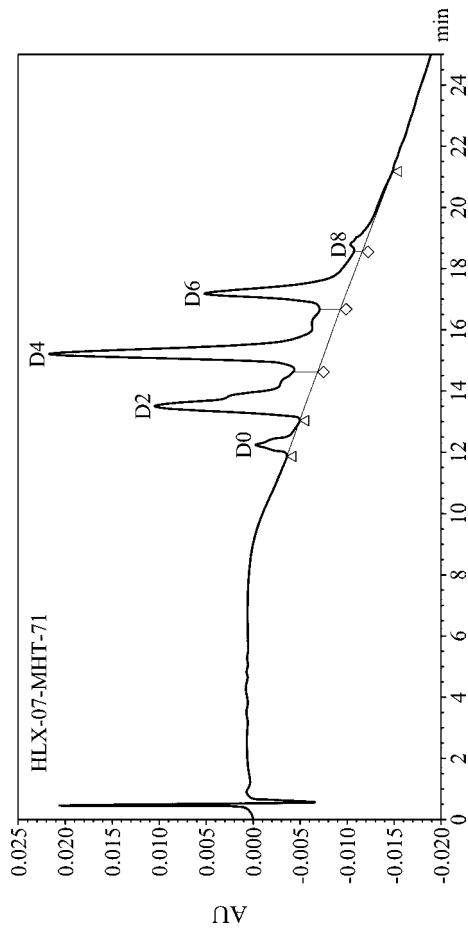
【 図 1 4 A 】



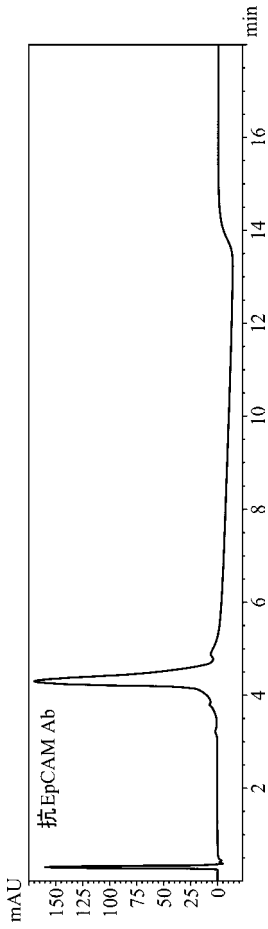
【 図 1 4 B 】



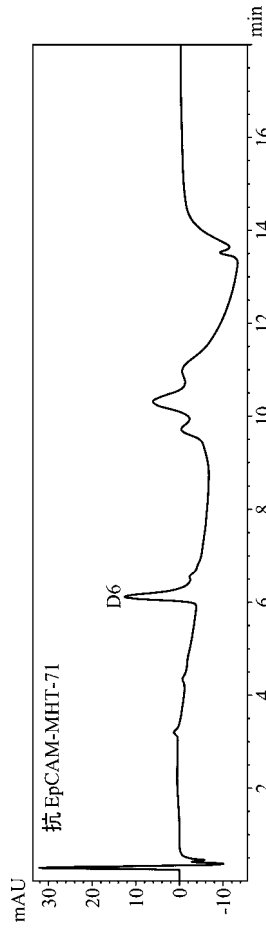
【 図 1 5 】



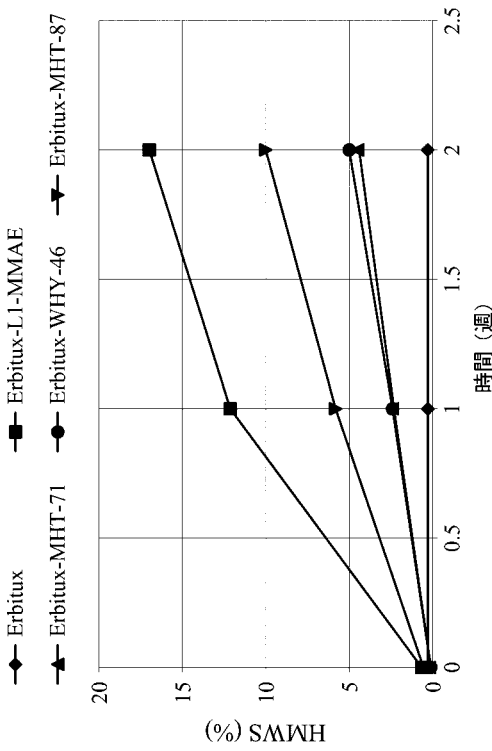
【 図 1 6 A 】



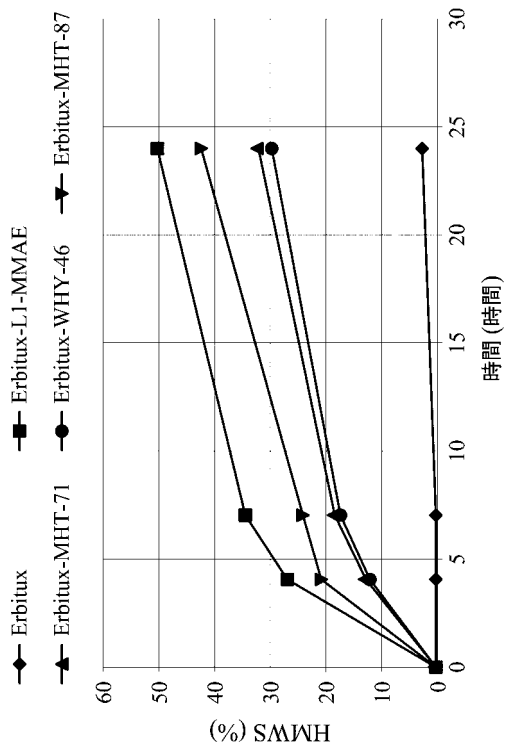
【 図 1 6 B 】



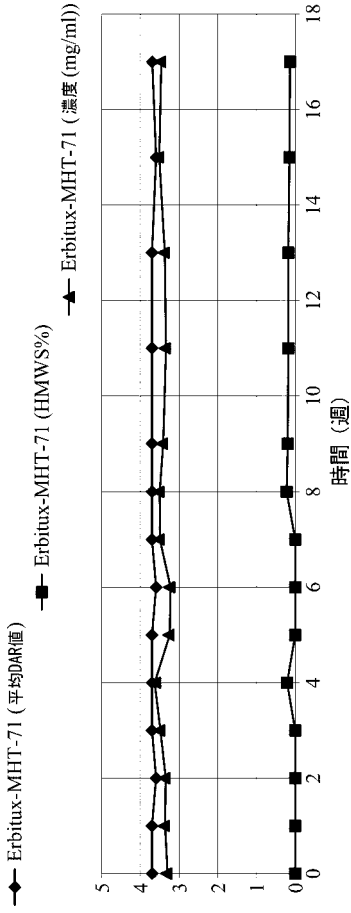
【 図 1 7 A 】



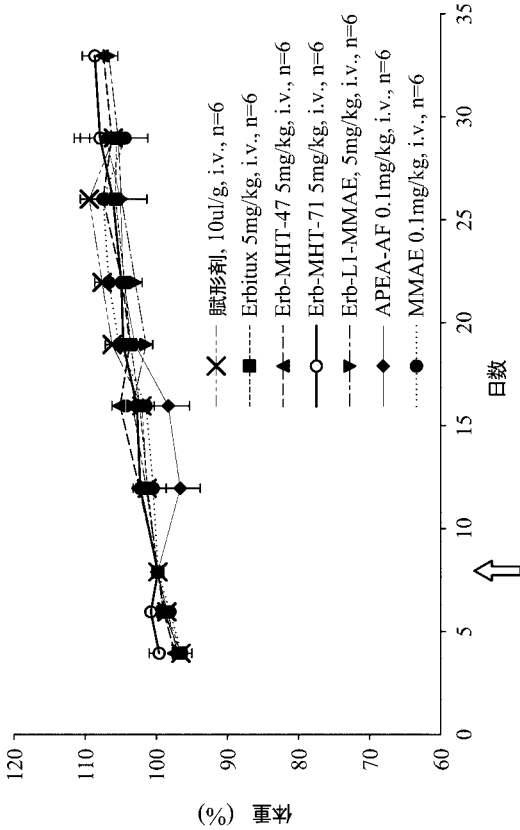
【 図 1 7 B 】



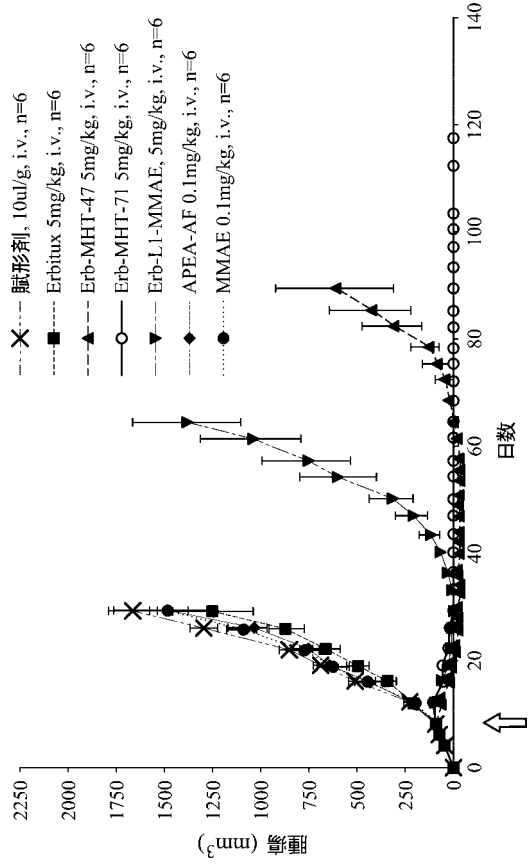
【 図 1 8 】



【 図 2 0 】



【 図 1 9 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 柯 怡如
台湾台北市文山區萬隆里 2 1 鄰萬隆街 5 1 號
- (72)発明者 李 政憲
台湾雲林縣西螺鎮七座里 7 鄰文和路 1 2 號
- (72)発明者 呂 瑞梅
台湾新竹縣竹東鎮員山路 1 3 4 巷 3 6 弄 1 3 號
- (72)発明者 李 昂
台湾新竹市建華里寶山路 6 3 號 6 樓
- (72)発明者 鄭 平福
台湾台北市中山區北安里 1 1 鄰北安路 8 4 1 巷 4 號 5 樓
- (72)発明者 劉 俊旻
台湾新竹市東區新莊里 2 1 鄰新莊街 1 7 5 號 3 樓
- Fターム(参考) 4C085 AA13 AA14 AA16 AA21 AA26 AA27 BB41 BB43 CC02 CC22
CC23 DD59 DD62 DD88 EE01 GG01
4H045 AA11 AA30 BA72 CA40 DA76 EA20

【外国語明細書】
2017114848000001.pdf