

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-509099
(P2024-509099A)

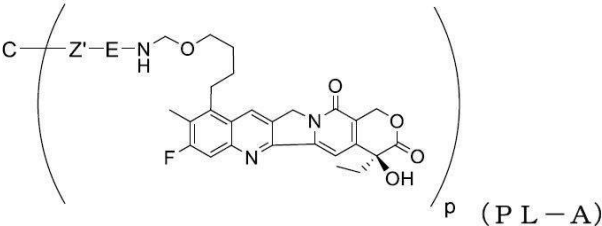
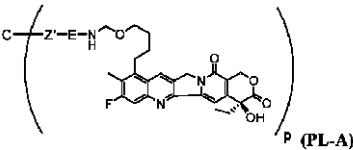
(43)公表日 令和6年2月29日(2024.2.29)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68		4 C 0 8 5
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L	4 C 0 8 6
A 6 1 K	47/65 (2017.01)	A 6 1 K	47/65		4 H 0 4 5
A 6 1 K	31/4745(2006.01)	A 6 1 K	31/4745		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
				(全111頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-551711(P2023-551711)	(71)出願人	523017349		
(86)(22)出願日	令和4年2月25日(2022.2.25)		メディボストン リミテッド		
(85)翻訳文提出日	令和5年10月3日(2023.10.3)		中華人民共和国 香港, コーズウェイ		
(86)国際出願番号	PCT/IB2022/051660		ベイ, ハイサン アベニュー 33, リ		
(87)国際公開番号	WO2022/180581		ー ガーデン ワン, 19エフ, ルーム		
(87)国際公開日	令和4年9月1日(2022.9.1)		1902		
(31)優先権主張番号	63/153,530	(74)代理人	100078282		
(32)優先日	令和3年2月25日(2021.2.25)		弁理士 山本 秀策		
(33)優先権主張国・地域又は機関		(74)代理人	100113413		
	米国(US)		弁理士 森下 夏樹		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100181674		
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		弁理士 飯田 貴敏		
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A	(74)代理人	100181641		
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		弁理士 石川 大輔		
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	230113332		
	最終頁に続く			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 抗HER2抗体-薬物コンジュゲートおよびその使用

(57)【要約】

治療用毒素として、カンプトテシン誘導体にコンジュゲートされた新しい抗HER2ADCが開示される。式(PL-A)のADC(例えば、化合物MB-2aおよびMB-3a(トラスツズマブメディテカン))の抗腫瘍効果により、これらの化合物はがんなどの細胞増殖性疾患の治療に有用である。



【選択図】

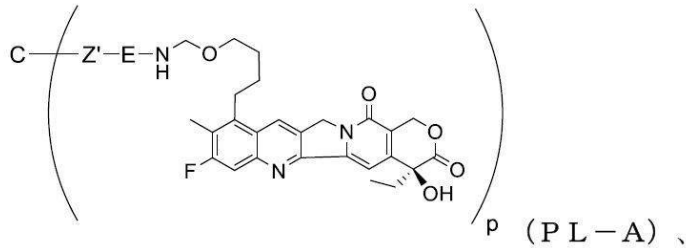
図1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 PL-A の構造を有する化合物、

【化 8 3】

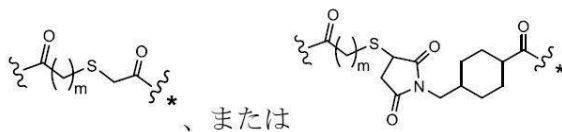


またはその薬学的に許容される塩であって、式中、

E は、2～8 個のアミノ酸を含むペプチドであり、式中、E は、一つ以上のポリオールで任意選択的に置換され、ペプチドの N 末端は、Z' に共有結合しており、

Z' は、 $-C(=O)-L^1-Y'$ 、

【化 8 4】



であり、式中、m は、1～10 の整数を表し、* は、当該 C に共有結合された部位を示し、

L^1 は、 $-(C_1-C_{10} \text{ アルキレン})-$ 、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nN(R_1)C(=O)-L^2-*$ 、または $-CH_2(OCH_2CH_2)_nN(R_1)C(=O)-L^2-*$ であり、式中、n は、1～10 の整数を表し、式中、* は、Y' に共有結合された部位を示し、

L^2 は $-(C_1-C_{10} \text{ アルキレン})-$ であり、 R_1 は $-H$ または $-CH_3$ であり、

Y' は、細胞結合剤上に存在する反応性求核基との求電子基の反応によって形成される基であり、

p は、約 2～10 の平均数である、薬物対抗体比 (DAR) であり、

C は、HER2 を標的とする結合剤であり、

配列番号 1 と少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖と、

配列番号 2 と少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖と、を含む、化合物またはまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項 2】

C が、

配列番号 1 と少なくとも 85%、90%、または 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖と、

配列番号 2 と少なくとも 85%、90%、95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖と、を含む、結合剤である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

C が、

配列番号 1 の重鎖アミノ酸配列と、

配列番号 2 の軽鎖アミノ酸配列と、を含む、結合剤である、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

C が、抗体またはその抗原結合断片である結合剤である、請求項 1～3 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 5】

C が、トラスツズマブ（ハーセプチン）、トラスツズマブ-dkst（Ogivri）、トラスツズマブ-pkrb（Herzuma）、トラスツズマブ-dttb（Ontuzant）、トラスツズマブ-qyp（Trazimera）、またはトラスツズマブ-anns（Kanjinti）である結合剤である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6】

L^1 が、 $-(C_1-C_{10}\text{アルキレン})-$ である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 7】

L^1 が、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nN(R^1)C(=O)-L^2-*$ または $-CH_2(OCH_2CH_2)_nN(R^1)C(=O)-L^2-*$ であり、式中、 n は、1～10 の整数を表し、式中、 $*$ は、 Y' に共有結合された部位を示す、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 8】

L^1 が、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NHC(=O)CH_2CH_2-*$ または $-CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NHC(=O)CH_2CH_2-*$ であり、式中、 $*$ は、 Y' に共有結合された部位を示す、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の化合物。

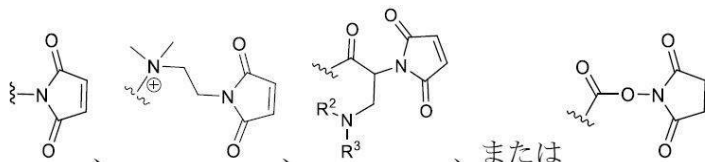
【請求項 9】

Y' が、マイケルアクセプター基、スクシンイミド、エポキシド、またはハロゲンから形成される、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 10】

Y' が、

【化 8 5】



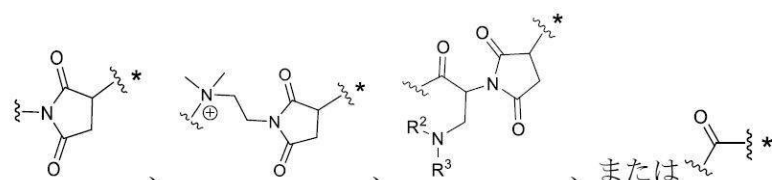
から形成され、

式中、 R^2 および R^3 は各々独立して、 $-H$ または C_1-C_3 アルキルである、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 11】

Y' が、

【化 8 6】



であり、

式中、 R^2 および R^3 は各々独立して、 $-H$ または C_1-C_3 アルキルであり、 $*$ は、前記 C に共有結合された部位を示す、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 12】

Z' が、以下から形成される、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の化合物。

10

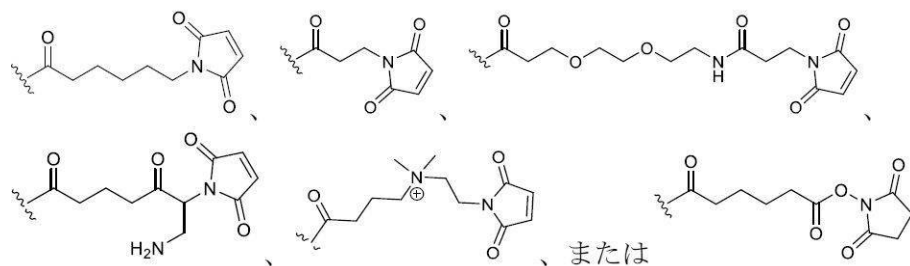
20

30

40

50

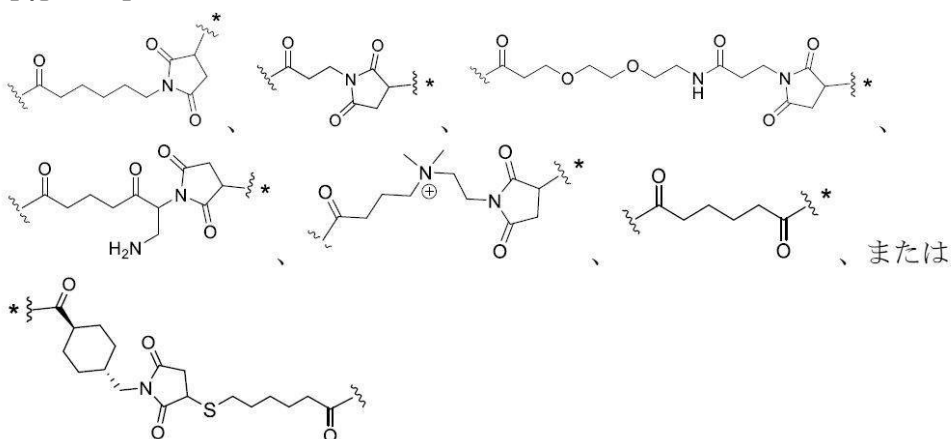
【化 8 7】



【請求項 1 3】

Z' が、

【化 8 8】



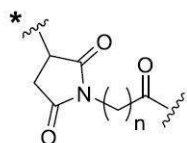
であり、

式中、*は、Cに共有結合された部位を示す、請求項1～12のいずれか一項に記載の化合物

【請求項 1 4】

Z' が、

【化 8 9】

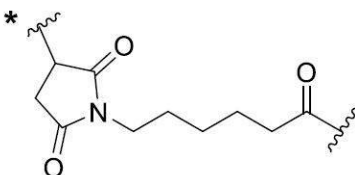


であり、式中、*が、Cへの共有結合を示し、nが、2～10の整数である、請求項1に記載の化合物。

【請求項 1 5】

Z' が、

【化 9 0】



であり、式中、*が、Cへの共有結合を示す、請求項14に記載の化合物。

【請求項 1 6】

Eが、2つ、3つ、4つ、または5つのアミノ酸のペプチドである、請求項1～15のいずれか一項に記載の化合物。

10

20

30

50

50

50

50

50

50

50

50



50

50

50

50



50

50

l y - G l y - G l y - *、- A l a - V a l - A l a - *、- G l y - V a l - G l y
 - *、- A l a - V a l - G l y - *、- G l y - P h e - L y s - *、- L y s - P h
 e - G l y - *、- L e u - A l a - L e u - *、- V a l - A l a - L e u - *、- L
 e u - A l a - V a l - *、- V a l - A l a - V a l - *、- A l a - V a l - A l a
 - G l y - * (配列番号 10)、- G l y - P h e - G l y - G l y - * (配列番号 11
)、- G l y - G l y - P h e - G l y - * (配列番号 12)、- A l a - V a l - G l y
 - G l y - * (配列番号 13)、- A l a - A l a - A l a - A l a - * (配列番号 1
 4)、- A l a - V a l - A l a - A l a - * (配列番号 15)、- A l a - L e u - A
 l a - L e u - * (配列番号 16)、- L e u - A l a - L e u - A l a - * (配列番号
 17)、- G l y - P h e - L e u - G l y - * (配列番号 18) および - G l y - L e
 u - P h e - G l y - * (配列番号 19) からなる群から選択され、

式中、*は、Z'に共有結合した前記ペプチドのN末端を示す、請求項1～20のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 24】

Eが、 $-L-Ala-D-Val-*$ 、 $-L-Val-D-Ala-*$ 、 $-L-Val-D-Lys-*$ 、 $-L-Val-D-Arg-*$ 、 $-L-Val-D-Cit-*$ 、 $-L-Val-D-Arg-*$ 、 $-L-Val-D-Cit-*$ 、 $-L-Val-D-Lys-*$ 、 $-L-Val-D-Arg-*$ 、 $-L-Arg-D-Arg-*$ 、 $-L-Ala-D-Ala-*$ 、 $-L-Ala-D-Lys-*$ 、 $-L-Ala-D-Arg-*$ 、 $-L-Ala-D-Ala-L-Ala-*$ 、 $-L-Ala-D-Val-L-Ala-*$ 、 $-L-Ala-D-Ala-Gly-*$ 、および $-L-Ala-D-Val-Gly-*$ からなる群から選択され、

式中、*は、Z'に共有結合した前記ペプチドのN末端を示す、請求項23に記載の化合物。

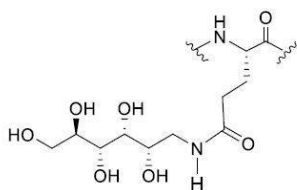
【請求項 25】

E が、 $-(L-Va l)-(L-A l a)-$ を含む、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 26】

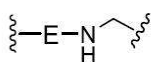
E が、以下の構造を有するアミノ酸を含む、請求項 25 に記載の化合物。

【化 9 3】



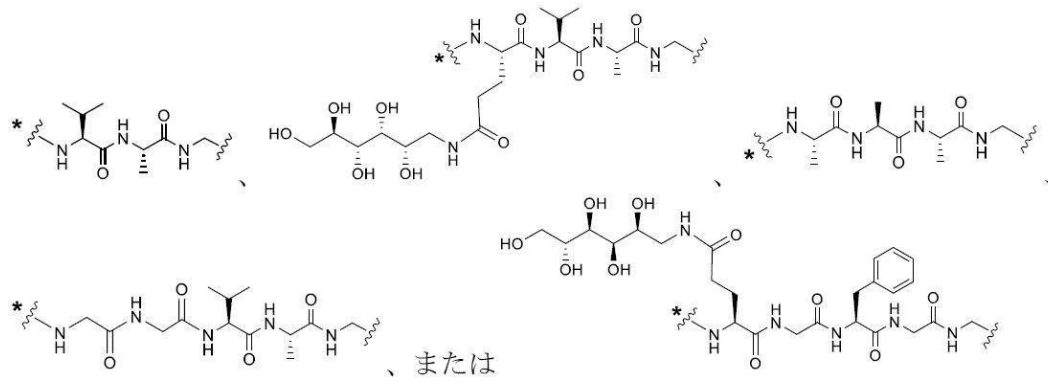
【請求項 27】

【化 9 4】



が、以下の構造のうちの一つを有し、式中、*は、Z' に共有結合した前記ペプチドの N 末端を示す、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の化合物。

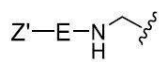
【化 9 5】



10

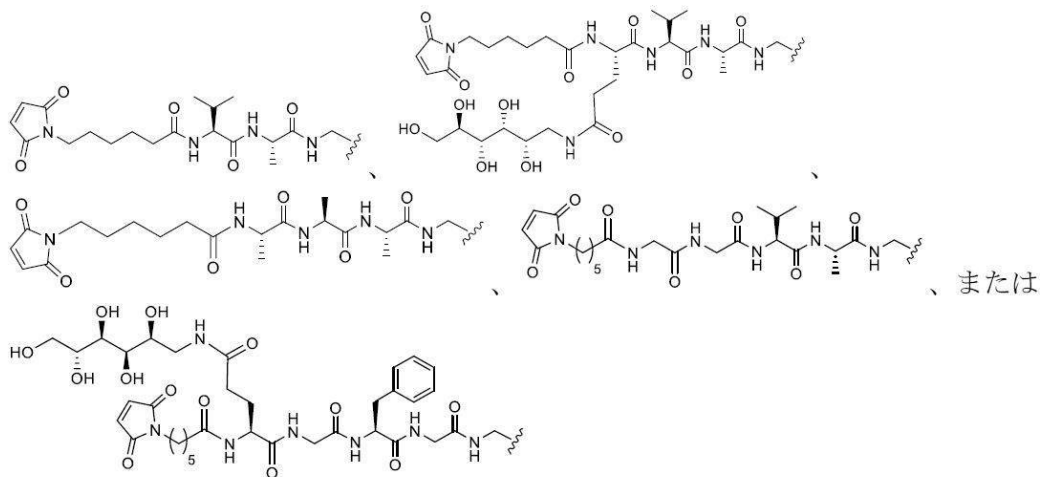
【請求項 2 8】

【化 9 6】



が、以下の構造のうちの一つから形成される、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の化合物。

【化 9 7】

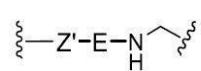


20

30

【請求項 2 9】

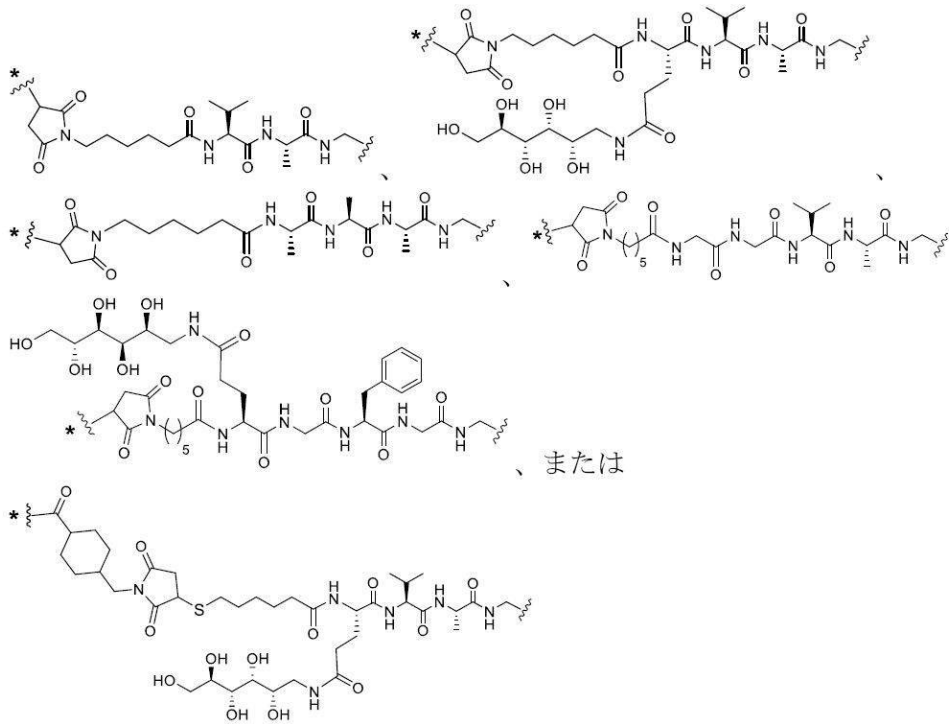
【化 9 8】



が、以下の構造のうちの一つであり、式中、* は、前記 C への付着点を示す、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の化合物。

40

【化 9 9】



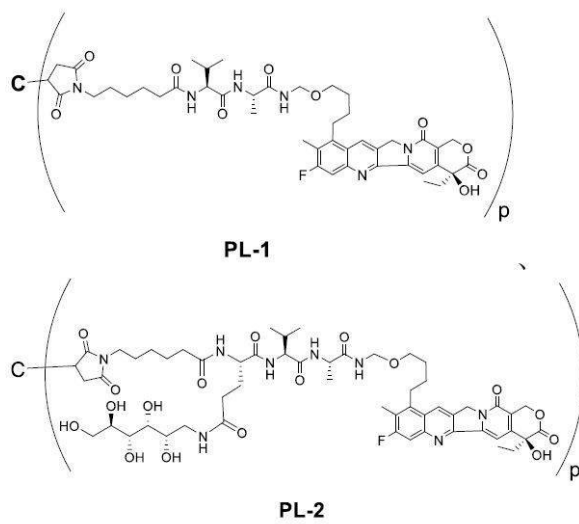
10

20

【請求項 3 0】

前記化合物が、以下の構造のうちの一つ、またはその薬学的に許容される塩であり：

【化 1 0 0】

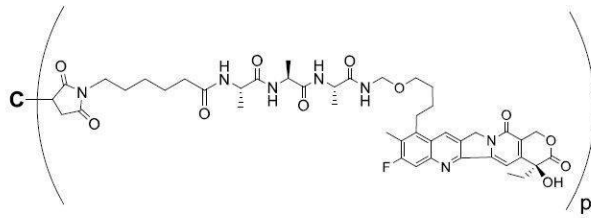


30

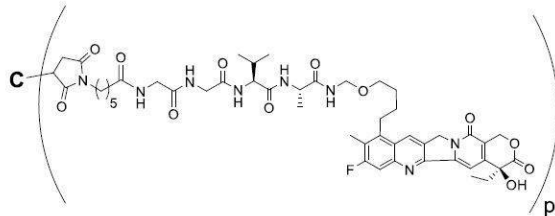
40

50

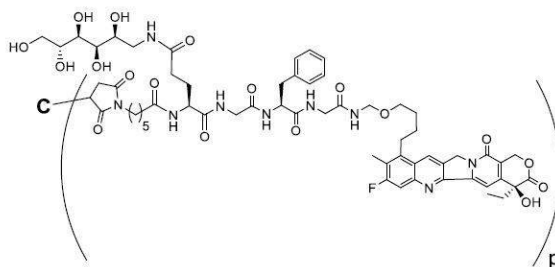
【化 1 0 1】



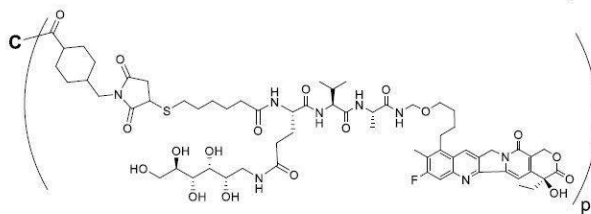
PL-3



PL-4



PL-5



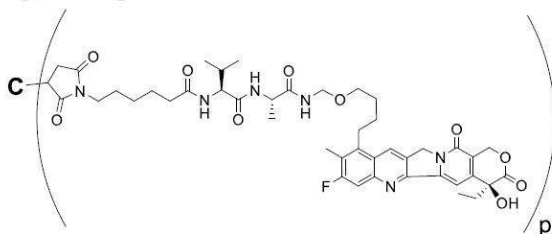
PL-6

式中、 p は約 2 ～ 10、4 ～ 8、または 7 ～ 8 である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3 1】

前記化合物が、以下の構造のうちの一つ、またはその薬学的に許容される塩である、請求項 30 に記載の化合物。

【化 1 0 2】



PL-1

【請求項 3 2】

前記化合物が、以下の構造のうちの一つ、またはその薬学的に許容される塩であり

10

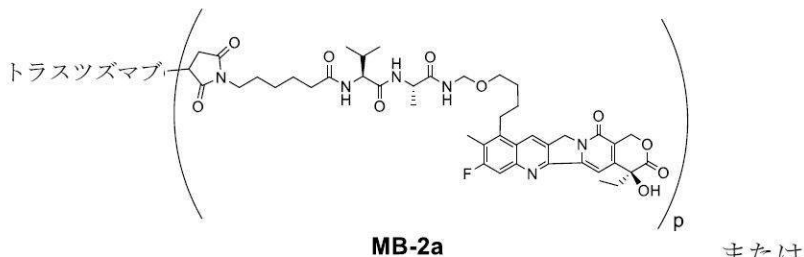
20

30

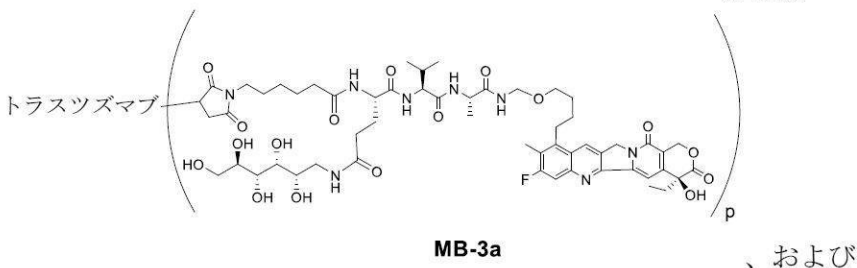
40

50

【化 1 0 3】



10



式中、 p は約 4 ～ 8、または 7 ～ 8 である、請求項 1 および 3 0 ～ 3 1 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 3 3】

p が、約 7 ～ 8 である、請求項 3 0 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項 3 4】

p が、8 である、請求項 3 0 ～ 3 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 3 5】

請求項 1 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩を含む、医薬組成物。

【請求項 3 6】

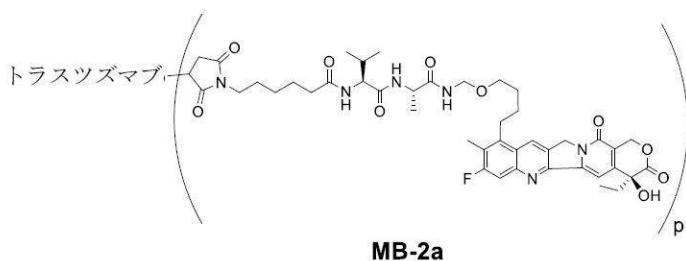
それを必要とする対象に、請求項 1 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、がんを治療する方法。

【請求項 3 7】

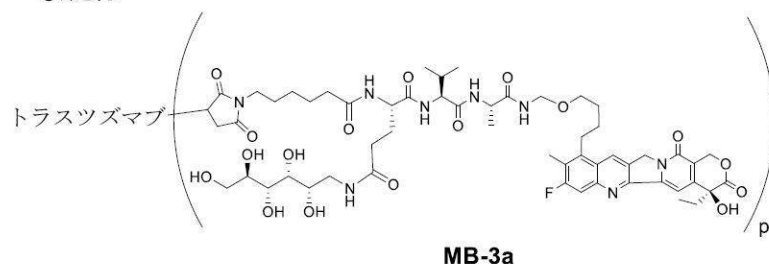
前記化合物が、

30

【化 1 0 4】



または



40

またはその薬学的に許容される塩である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

p が、約 4 ～ 8、または 7 ～ 8 である、請求項 3 7 に記載の方法。

50

【請求項 39】

p が、約 7 ～ 8 である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

p が、8 である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記がんが、肺がん、尿路上皮がん、結腸直腸がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がん、乳がん、膀胱がん、胃がん、消化管間質腫瘍、子宮頸がん、食道がん、扁平上皮がん、腹膜がん、肝臓がん、肝細胞がん、結腸がん、直腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、子宮体がん、唾液腺がん、腎臓がん、外陰がん、甲状腺がん、陰茎がん、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨髓腫、または肉腫である、請求項 36 ～ 40 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 42】

前記がんが、乳がんである、請求項 36 ～ 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

前記がんが、胃がんである、請求項 36 ～ 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

前記がんが、肺がんである、請求項 36 ～ 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

前記肺がんが、非小細胞肺がんである、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記がんが、卵巣がんである、請求項 36 ～ 41 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 47】

前記がんが、転移性である、請求項 36 ～ 46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 48】

前記がんが、低 H e r 2 発現によって特徴付けられる、請求項 36 ～ 46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

前記がんが、中 H e r 2 発現によって特徴付けられる、請求項 36 ～ 46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

前記がんが、高 H e r 2 発現によって特徴付けられる、請求項 36 ～ 46 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 51】

前記がんが、トラスツズマブ抵抗性である、請求項 36 ～ 50 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年2月25日出願の米国仮出願第63／153，530号の恩典を主張し、当該出願の全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

配列表

【0002】

本出願は、A S C I I フォーマットで電子的に提出された配列リストを含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2022年2月17日に作成された当該 A S C I I コピーは、M D B - 0 0 2 W O _ S L t x t という名称であり、サイズは 10，140 バイトである。

【0003】

H E R 2（ヒト上皮成長因子受容体 2）は、乳がんなどのがんの発生に関与していることから、重要な治療標的として浮上してきた。例えば、H E R 2 遺伝子の過剰発現は、乳

50

がん症例の最大 25～30%、胃がん症例や胃食道がん症例の一部で認められている。HER2 の過剰発現は、より速い増殖速度と予後不良に関連し得るため、新しい有効な抗 HER2 治療薬に対するニーズが依然として存在する。

【発明の概要】

【0004】

抗体薬物コンジュゲート (ADC) は、新しいクラスの治療法として大きな関心を集めている。例えば、ADC は、腫瘍細胞への細胞傷害性薬剤の標的送達のためにモノクローナル抗体 (mAb) を利用し、それによって、従来の非標的モードを使用して用いることができなかった高度な細胞傷害性薬剤の使用を可能にすることができる。典型的にはリンカーを介した、典型的には抗体への細胞傷害性薬剤の付着を特徴とする ADC の設計は、リンカーへの付着のための薬剤上のコンジュゲーションハンドルの存在、および条件付きで安定した様式で抗体に薬剤を付着させるためのリンカー技術を含む、様々な要因の検討を伴う。最適でない設計は、ADC 効力の低下、コンジュゲートの免疫学的特異性の不足、およびコンジュゲートからの薬剤の非特異的放出による毒性の上昇をもたらし得る。

10

【0005】

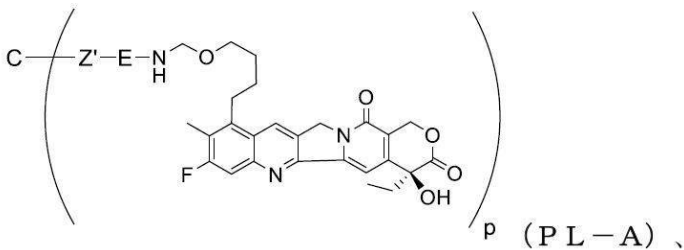
本発明は、少なくとも部分的に、治療用毒素として、カンプトテシン誘導体にコンジュゲートされた抗 HER2 ADC の抗腫瘍治療効果に基づく。本明細書に記載される ADC は、がんなどの細胞増殖性疾患の治療に有用である。

【0006】

実施形態において、本発明は、式 PL-A の構造を有する化合物、

20

【化 1】



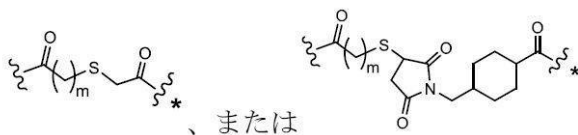
またはその薬学的に許容される塩を特徴とし、式中、

30

E は、2～8 個のアミノ酸を含むペプチドであり、式中、E は、一つ以上のポリオールで任意選択的に置換され、ペプチドの N 末端は、Z' に共有結合しており、

Z' は、 $-C(=O)-L^1-Y'$ 、

【化 2】



であり、式中、m は、1～10 の整数を表し、* は、当該 C に共有結合された部位を示し、

40

L^1 は、 $-(C_1-C_{10} \text{ アルキレン })-$ 、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nN(R_1)C(=O)-L^2-*$ 、または $-CH_2(OCH_2CH_2)_nN(R_1)C(=O)-L^2-*$ であり、式中、n は、1～10 の整数を表し、式中、* は、Y' に共有結合された部位を示し、

L^2 は $-(C_1-C_{10} \text{ アルキレン })-$ であり、 R_1 は $-H$ または $-CH_3$ であり、

Y' は、細胞結合剤上に存在する反応性求核基との求電子基の反応によって形成される基であり、

p は、約 2～10 の平均数である、薬物対抗体比 (DAR) であり、

C は、HER2 を標的とする結合剤であり、

50

配列番号 1 と少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖と、
配列番号 2 と少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖と、を含む。

【0007】

実施形態では、C は、

配列番号 1 と少なくとも 85 %、90 %、または 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖と、

配列番号 2 と少なくとも 85 %、90 %、95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖と、を含む、結合剤である。

【0008】

実施形態では、C は、

配列番号 1 の重鎖アミノ酸配列と、

配列番号 2 の軽鎖アミノ酸配列と、を含む、結合剤である。

【0009】

式 (PL-A) による例示的化合物には、本明細書に記載される MB-2a および MB-3a (トラスツズマブメディテカン) が含まれる。

【0010】

実施形態では、C は、抗体またはその抗原結合断片である結合剤である。

【0011】

実施形態では、C は、トラスツズマブ (Herceptin)、トラスツズマブ-dkst (Ogivri)、トラスツズマブ-pkrb (Herzuma)、トラスツズマブ-dttb (Ontruzant)、トラスツズマブ-qyp (Trazimera)、またはトラスツズマブ-anns (Kanjinti) である結合剤である。

【0012】

実施形態では、 L^1 は、 $-(C_1-C_{10} \text{アルキレン})-$ である。

【0013】

実施形態では、 L^1 は、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nN(R_1)C(=O)-L^2-*$ または $-CH_2(OCH_2CH_2)_nN(R_1)C(=O)-L^2-*$ であり、式中、 n は、1~10 の整数を表し、式中、 $*$ は、 Y' に共有結合された部位を示す。

【0014】

実施形態では、 L^1 は、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NHC(=O)CH_2CH_2-*$ または $-CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NHC(=O)CH_2CH_2-*$ であり、式中、 $*$ は、 Y' に共有結合された部位を示す。

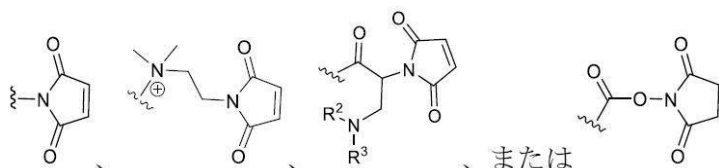
【0015】

実施形態では、 Y' は、マイケルアクセプター基、スクシンイミド、エポキシド、またはハロゲンから形成される。

【0016】

実施形態では、 Y' は、

【化 3】



から形成され、

式中、 R^2 および R^3 は各々独立して、 $-H$ または C_1-C_3 アルキルである。

【0017】

実施形態では、 Y' は、

10

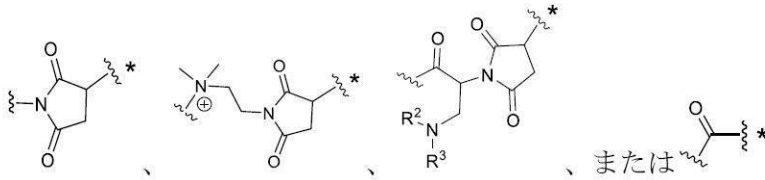
20

30

40

50

【化 4】



であり、

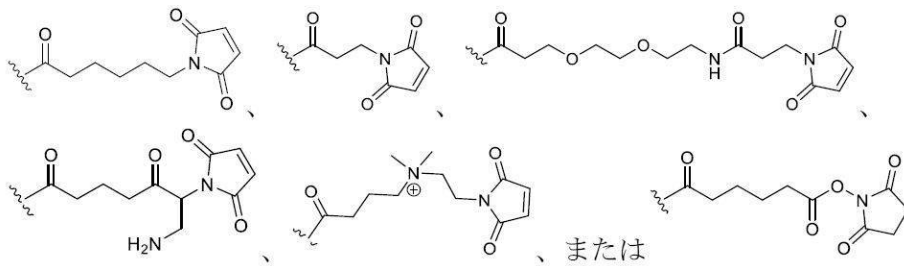
式中、 R^2 および R^3 は各々独立して、 $-H$ または $C_1 - C_3$ アルキルであり、 $*$ は、当該 C に共有結合された部位を示す。

10

【0018】

実施形態では、 Z' は、以下から形成される。

【化 5】

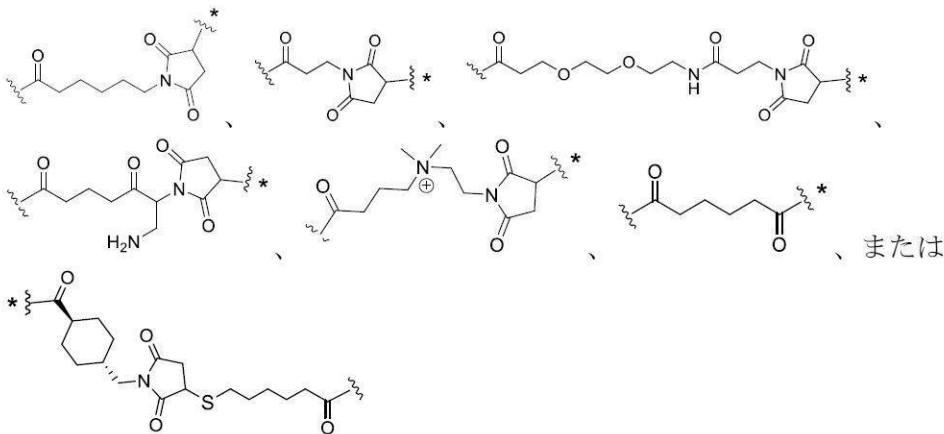


20

【0019】

実施形態では、 Z' は、

【化 6】



30

であり、

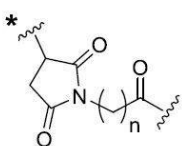
式中、 $*$ は、 C に共有結合された部位を示す。

【0020】

実施形態では、 Z' は

40

【化 7】



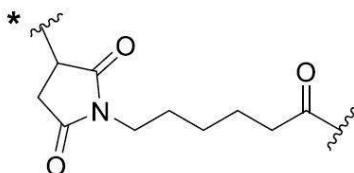
であり、式中、 $*$ は、 C への共有結合を示し、 n は、 $2 \sim 10$ の整数である。

【0021】

実施形態では、 Z' は

50

【化 8】



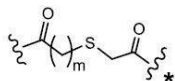
であり、式中、*は、Cへの共有結合を示す。

【0022】

実施形態では、Z'は

10

【化 9】



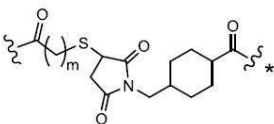
であり、式中、*は、当該Cに共有結合された部位を示す。実施形態では、mは、1である。実施形態では、mは、2である。実施形態では、mは、3である。実施形態では、mは、4である。実施形態では、mは、5である。実施形態では、mは、6である。実施形態では、mは、7である。実施形態では、mは、8である。実施形態では、mは、9である。実施形態では、mは、10である。

【0023】

20

実施形態では、Z'は

【化 10】



であり、式中、*は、当該Cに共有結合された部位を示す。実施形態では、mは、1である。実施形態では、mは、2である。実施形態では、mは、3である。実施形態では、mは、4である。実施形態では、mは、5である。実施形態では、mは、6である。実施形態では、mは、7である。実施形態では、mは、8である。実施形態では、mは、9である。実施形態では、mは、10である。

30

【0024】

実施形態では、Eは、2つ、3つ、4つ、または5つのアミノ酸のペプチドである。

【0025】

実施形態では、Eは、2つ、3つ、または4つのアミノ酸のペプチドである。

【0026】

実施形態では、当該ペプチド中の各アミノ酸が、Lアミノ酸であるか、または当該ペプチド中の少なくとも一つのアミノ酸が、Dアミノ酸である。

【0027】

実施形態では、Eは、グリシン、アラニン、バリン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、およびロイシンから選択される一つ以上のアミノ酸を含み、当該グルタミンまたはグルタミン酸は、ポリオールによって任意選択的に置換される。

40

【0028】

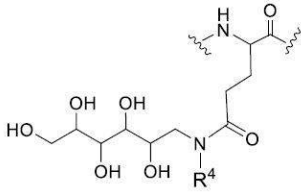
実施形態では、Eは、グリシン、アラニン、バリン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、およびロイシンから選択されるアミノ酸を含み、当該グルタミンまたはグルタミン酸は、ポリオールによって任意選択的に置換される。

【0029】

実施形態では、Eは、以下の構造を有するアミノ酸を含み、

50

【化 1 1】

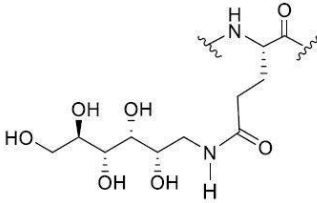


式中、R⁴は、-HまたはC₁-C₆アルキルである。

【0030】

実施形態では、Eは、以下の構造を有するアミノ酸を含む。

【化 1 2】



【0031】

実施形態では、Eは、-Ala-Val-*, -Val-Ala-*, -Gly-Gly-*, -Val-Cit-*, -Cit-Val-*, -Leu-Ala-*, -Ala-Leu-*, -Leu-Cit-*, -Cit-Leu-*, -Leu-Ala-*, -Ala-Leu-*, -Lys-Lys-*, -Ala-Lys-*, -Lys-Ala-*, -Val-Lys-*, -Lys-Val-*, -Tyr-Arg-*, -Arg-Tyr-*, -Arg-Arg-*, -Ala-Ala-*, -Phe-Lys-*, -Lys-Phe-*, -Thr-Thr-*, -Thr-Met-*, -Met-Thr-*, -Met-Tyr-*, -Tyr-Met-*, -Phe-Gln-*, -Gln-Phe-*, -Gly-Ser-*, -Leu-Gln-*, -Gln-Leu-*, -Ser-Ala-*, -Ser-Gly-*, -Val-Thr-*, -Thr-Val-*, -Val-Gln-*, -Ser-Val-*, -Val-Ser-*, -Ala-Met-*, -Met-Ala-*, -Val-Arg-*, -Arg-Val-*, -Phe-Ala-*, -Ala-Phe-*, -Cit-Val-*, -Gln-Val-*, -Phe-Arg-*, -Arg-Phe-*, -Ala-Ala-Ala-*, -Gly-Gly-Gly-*, -Ala-Val-Ala-*, -Gly-Val-Gly-*, -Ala-Val-Gly-*, -Gly-Phe-Lys-*, -Lys-Phe-Gly-*, -Leu-Ala-Leu-*, -Val-Ala-Leu-*, -Leu-Ala-Val-*, -Val-Ala-Val-*, -Ala-Val-Ala-Gly-* (配列番号10)、-Gly-Phe-Gly-Gly-* (配列番号11)、-Gly-Gly-Phe-Gly-* (配列番号12)、-Ala-Val-Gly-Gly-* (配列番号13)、-Ala-Ala-Ala-Ala-* (配列番号14)、-Ala-Val-Ala-Ala-* (配列番号15)、-Ala-Leu-Ala-Leu-* (配列番号16)、-Leu-Ala-Leu-Ala-* (配列番号17)、-Gly-Phe-Leu-Gly-* (配列番号18) および -Gly-Leu-Phe-Gly-* (配列番号19) からなる群から選択され、式中、*は、Z'に共有結合したペプチドのN末端を示す。

【0032】

実施形態では、Eは、-L-Ala-D-Val-*, -L-Val-D-Ala-*, -L-Val-D-Lys-*, -L-Val-D-Arg-*, -L-Val-D-Cit-*, -L-Val-D-Arg-*, -L-Val-D-Cit-*, -L-Val-D-Lys-*, -L-Val-D-Arg-*, -L-Arg-D-Arg-*, -L-Ala-D-Ala-*, -L-Ala-D-Lys-*, -L-Ala-D-

10

20

30

40

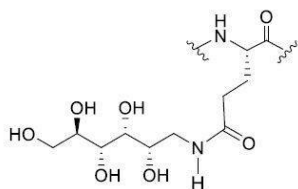
50

Arg-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Val-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-Gly-*, および -L-Ala-D-Val-Gly-* からなる群から選択され、式中、*は、Z' に共有結合したペプチドのN末端を示す。

【0033】

実施形態では、Eは、-(L-Val)-(L-Ala)-を含む。実施形態では、Eは、以下の構造を有するアミノ酸をさらに含む。

【化13】

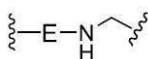


10

【0034】

実施形態では、

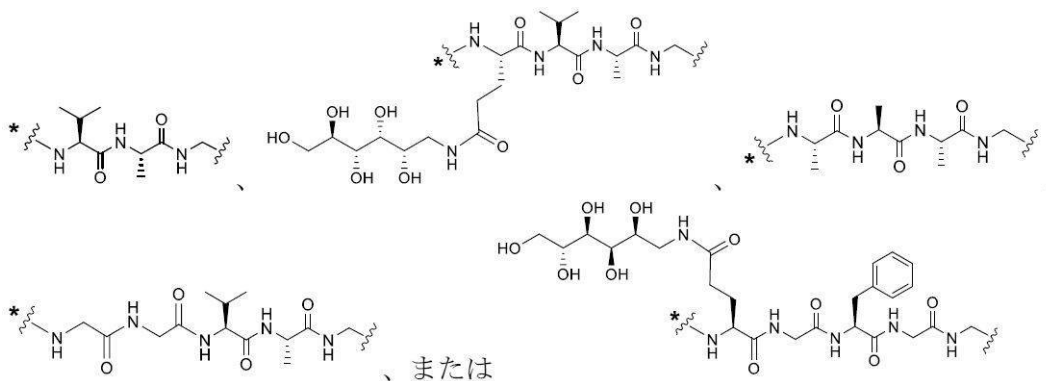
【化14】



20

は、以下の構造のうちの一つを有し、式中、*は、Z' に共有結合したペプチドのN末端を示す。

【化15】

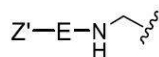


30

【0035】

実施形態では、

【化16】

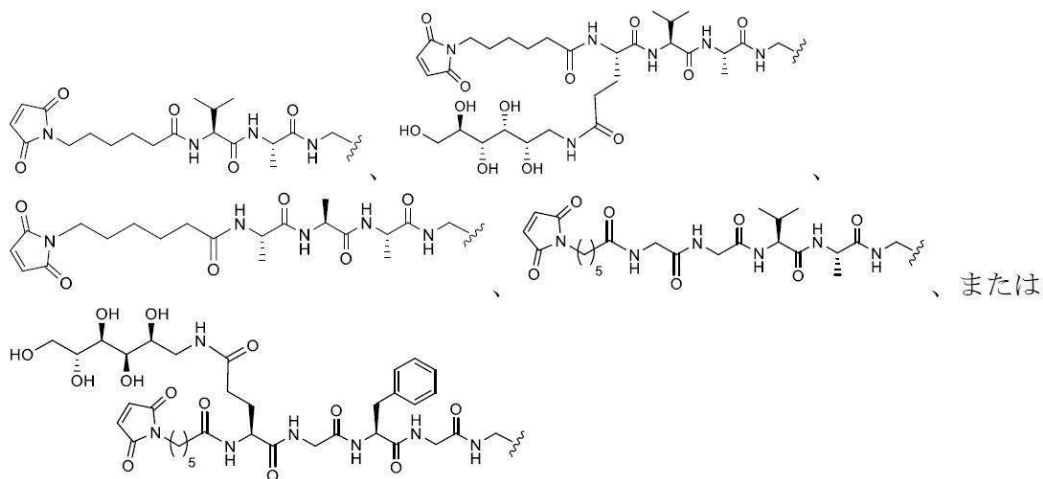


40

は、以下の構造のうちの一つから形成される。

50

【化 1 7】

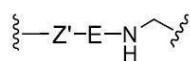


10

【0036】

実施形態では、

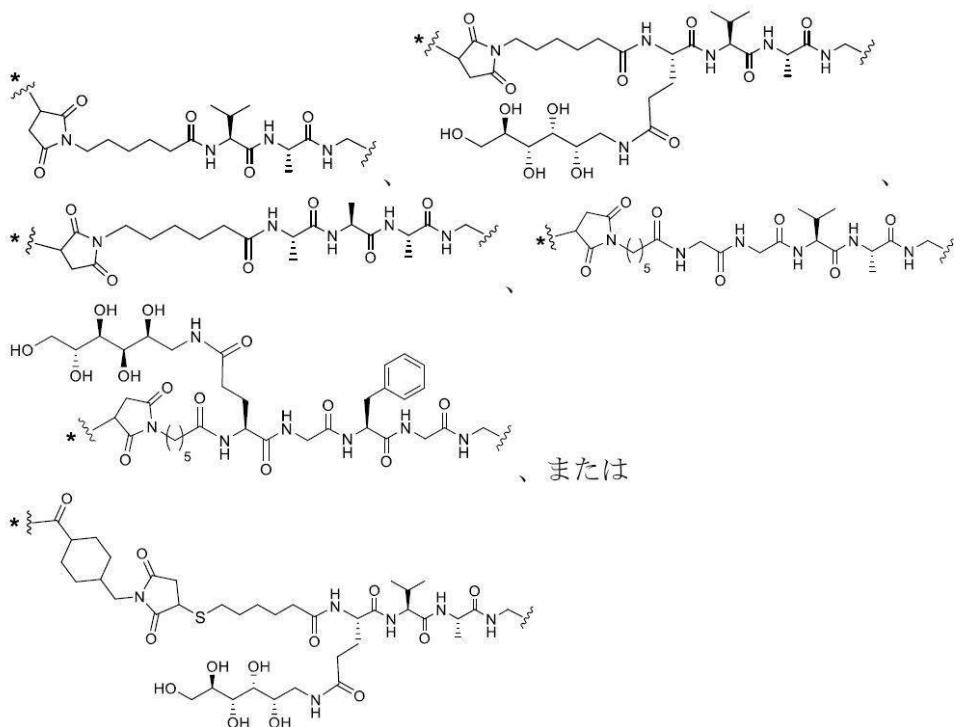
【化 1 8】



20

は、以下の構造のうちの一つであり、式中、*は、Cへの付着点を示す。

【化 1 9】



30

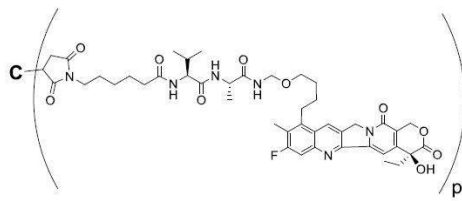
【0037】

実施形態では、化合物は、以下の構造のうちの一つ、またはそのその薬学的に許容される塩であり、

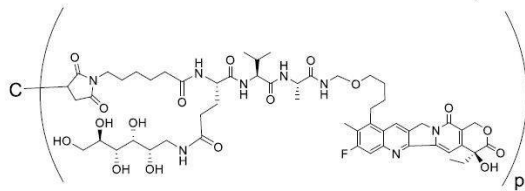
40

50

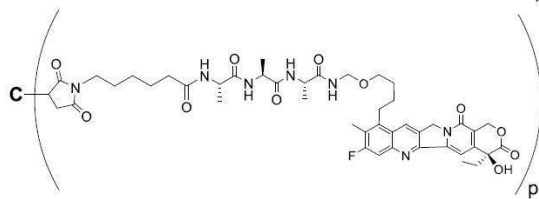
【化 20】



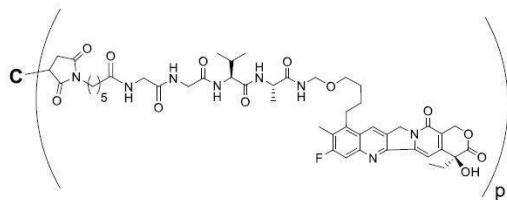
PL-1



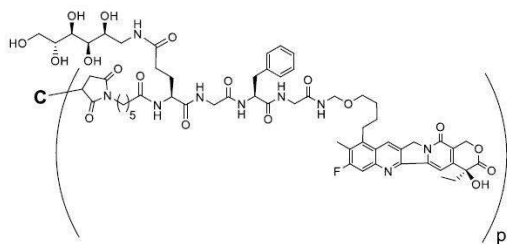
PL-2



PL-3

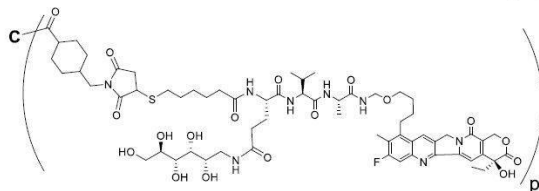


PL-4



PL-5

、または



PL-6

式中、 p は約 2 ～ 10、4 ～ 8、または 7 ～ 8 である。

【0038】

実施形態では、化合物は、以下の構造のうちの一つ、またはそのその薬学的に許容される塩であり、

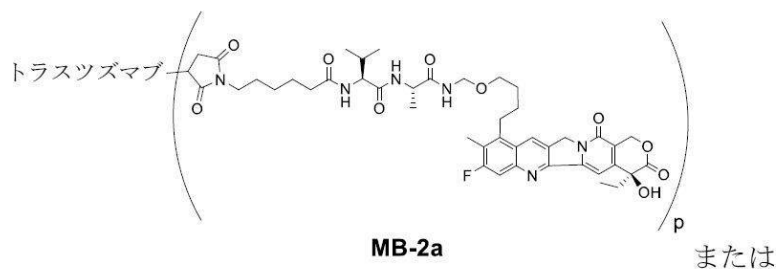
10

20

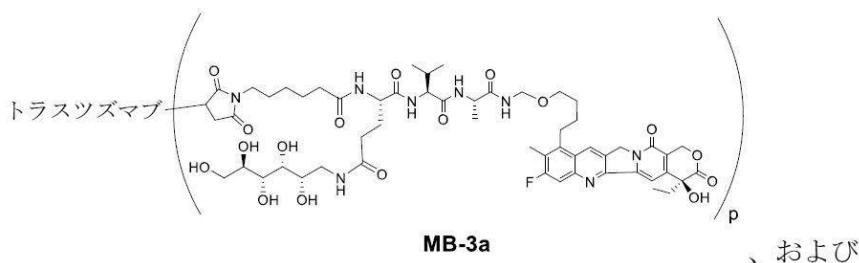
30

40

【化 2 1】



10



式中、 p は約 4 ～ 8 、または 7 ～ 8 である。

【0039】

実施形態では、 p は、約 7 ～ 8 である。

20

【0040】

実施形態では、 p は、8 である。

【0041】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される任意の化合物またはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を特徴とする。

【0042】

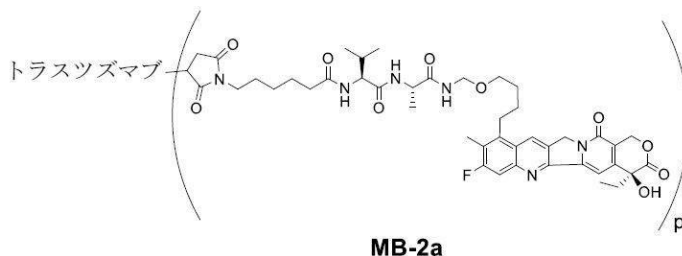
別の態様では、本発明は、有効量の本明細書に記載される任意の化合物またはその薬学的に許容される塩を、それを必要とする対象に投与することを含む、癌の治療方法の特徴とする。

【0043】

実施形態において、前述の化合物は、

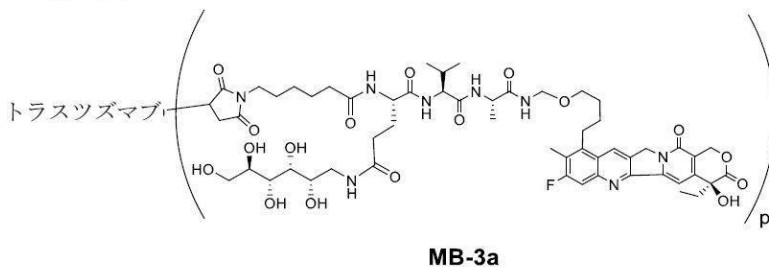
30

【化 2 2】



または

40



またはその薬学的に許容される塩である。

【0044】

50

実施形態では、p は、約 4 ～ 8、または 7 ～ 8 である。

【0045】

実施形態では、p は、約 7 ～ 8 である。

【0046】

実施形態では、p は、8 である。

【0047】

実施形態では、がんは肺がん、尿路上皮がん、結腸直腸がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がん、乳がん、膀胱がん、胃がん、消化管間質腫瘍、子宮頸がん、食道がん、扁平上皮がん、腹膜がん、肝臓がん、肝細胞がん、結腸がん、直腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、子宮体がん、唾液腺がん、腎臓がん、外陰がん、甲状腺がん、陰茎がん、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨髄腫、または肉腫である。

10

【0048】

実施形態では、がんは、乳がんである。

【0049】

実施形態では、がんは、胃がんである。

【0050】

実施形態では、がんは、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）である。

【0051】

実施形態では、がんは、卵巣がんである。

【0052】

実施形態では、がんは、転移性である。

20

【0053】

実施形態では、がんは、低 Her 2 発現を特徴とする。

【0054】

実施形態では、がんは、中 Her 2 発現を特徴とする。

【0055】

実施形態では、がんは、高 Her 2 発現を特徴とする。

【0056】

実施形態では、がんは、トラスツズマブ抵抗性である。

【図面の簡単な説明】

30

【0057】

【図1】図1A～1Fは、NCI-N87細胞株（図1A）、JIMT-1細胞株（図1B）、MDA-MB-468細胞株（図1C）、SK-OV-3細胞株（図1D）、SK-Br-3細胞株（図1E）、およびMCF-7細胞株（図1F）におけるADC代謝物のインビトロ細胞増殖阻害活性の例示的な結果を示す。DXdは、DS-8201a（Enhertu）の細胞内代謝物であり、MB-1は本明細書に記載される特定のADCの代謝物である。

【0058】

【図2】図2A～2Cは、ADC HIC-HPLCMB-2a（図2A）、MB-3a（図2B）およびDS-8201a（Enhertu）（図2C）のHIC-HPLCを示す。

40

【0059】

【図3-1】（図3A） 図3A～3Dは、Her 2 高発現細胞株NCI-N87（図3A）、トラスツズマブ遮断を伴うNCI-N87（図3B）、中Her 2 発現を有し、トラスツズマブ抵抗性細胞株であるJIMT-1（図3C）、およびHer 2 陰性細胞株MDA-MB-468（図3D）におけるADCのインビトロ細胞増殖阻害活性の例示的な結果を示す。（図3B） 同上。

【図3-2】（図3C） 同上。（図3D） 同上。

【0060】

【図4】図4は、NCI-N87 CDXモデルにおける抗体薬物コンジュゲート（AD

50

C) の腫瘍増殖抑制効果を示す。MB-2 a および MB-3 a は、本式によって包含される ADC であり、ビヒクル対照、トラスツズマブ、および ADC DS-8201 a (Enhertu) とともに研究された。この図に示されるように、MB-2 a (用量 1 mg/kg および 4 mg/kg) ならびに MB-3 a (用量 1 mg/kg および 4 mg/kg) は、強力な抗腫瘍効果を実証した。DS-8201 a (Enhertu) は、比較のために試験に含まれた。

【0061】

【図5】図5は、JIMT-1 CDXモデルにおける抗体薬物コンジュゲート(ADC)の腫瘍増殖抑制効果を示す。この研究において、研究されたMB-2 a および MB-3 a (トラスツズマブメディテカン) の三つすべての用量が、有意な抗腫瘍効果を示した。DS-8201 a (Enhertu) は、比較のために試験に含まれた。

10

【0062】

【図6】図6は、MB-2 a および MB-3 a の 2.5 mg/kg i.v. 単回投与を使用した抗腫瘍効果を示す、図5からのデータの選択を示す。

【0063】

【図7】図7は、MB-2 a および MB-3 a の 5 mg/kg i.v. 単回投与を使用した抗腫瘍効果を示す、図5からのデータの選択を示す。

【0064】

【図8】図8は、MB-2 a および MB-3 a の 10 mg/kg i.v. 単回投与を使用した抗腫瘍効果を示す、図5からのデータの選択を示す。

20

【0065】

【図9】図9は、MB-3 a、DS-8201 a およびトラスツズマブの親水性の比較を示す。

【0066】

【図10】図10は、MB-3 a、DS-8201 a およびトラスツズマブの抗原結合親和性を示す。

【0067】

【図11】図11は、MB-3 a、DS-8201 a および T-DM1 のバイスタンダー効果を示す。各試験化合物について、グラフは、SK-BR-3 と DAN-G-Luc の共培養における DAN-G-Luc 生存率(左) および DAN-G-Luc 細胞単独における DAN-G-Luc 生存率(右)を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0068】

本発明は、リンカー構造部分を介して抗HER2抗体にコンジュゲートされた抗腫瘍薬剤を含む抗体薬物コンジュゲートに関する。こうした化合物は、HER2過剰発現および/または転移性および/またはトラスツズマブ抵抗性であり得る、がん(例えば、乳がんおよび胃がん)の治療に特に有用であり得る。

【0069】

定義

別段の記載がない限り、本明細書で使用される以下の用語および語句は、以下の意味を有することが意図される。商品名が本明細書で使用される場合、文脈によって別段の指示がない限り、商品名は、製品の配合物、ジェネリック医薬品、および商品名の製品の原薬を含む。

40

【0070】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、特定の抗原に特異的に結合する薬剤を指す。いくつかの実施形態では、この用語は、特異的結合を付与するのに十分な免疫グロブリン構造要素を含む任意のポリペプチドまたはポリペプチド複合体を包含する。例示的な抗体としては、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、抗体は、マウス、ウサギ、霊長類、またはヒト抗体に特徴的である一つ以上の定常領域配列を含んでもよい。いくつかの実施形態

50

では、抗体は、当該技術分野で既知であるヒト化、霊長化、キメラなどの一つ以上の配列要素を含んでもよい。多くの実施形態では、「抗体」という用語は、代替の提示において抗体の構造的および機能的特徴を利用するための、当該技術分野で既知の、または開発された構築物または形式のうちの一つ以上を指すために使用される。例えば、実施形態では、本発明に従って利用される抗体は、インタクトなIgA、IgG、IgEまたはIgM抗体、二重または多重特異的抗体（例えば、Zybodies（登録商標）など）、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fd'断片、Fd断片、およびその単離されたCDRまたはセットなどの抗体断片、一本鎖Fv；ポリペプチド-Fc融合、単ドメイン抗体（例えば、IgNARまたはその断片などのサメ単ドメイン抗体、）、ラクダ（cameloid）抗体、マスクされた抗体（例えば、Probodies（登録商標））、Small Modular Immunopharmaceuticals（「SMIPs（商標）」）、一本鎖またはタンデムダイアボディ（TandAb（登録商標））、VHH、Anticalins（登録商標）、Nanobodies（登録商標）ミニボディ、Bites（登録商標）、アンキリン反復タンパク質またはDARPinS（登録商標）、Avimers（登録商標）、DARTs、TCR様抗体、Adnectins（登録商標）、Affilins（登録商標）、Trans-bodies（登録商標）、Affibodies（登録商標）、TrimerX（登録商標）、Microproteins、Fynomers（登録商標）、Centyrins（登録商標）、およびKALBITORS（登録商標）から選択されるがこれらに限定されない形式である。いくつかの実施形態では、抗体は、天然に産生された場合に有するであろう共有結合的修飾（例えば、グリカンの付着）を欠く場合がある。いくつかの実施形態では、抗体は、共有結合的修飾（例えば、グリカン、ペイロード〔例えば、検出可能な部分、治療部分、触媒部分など〕、または他のペンダント基〔例えば、ポリ-エチレングリコールなど〕の付着）を含有してもよい。多くの実施形態では、抗体は、そのアミノ酸配列が、相補性決定領域（CDR）として当業者によって認識される一つ以上の構造要素を含むポリペプチドであるか、またはそれを含み、いくつかの実施形態では、抗体は、そのアミノ酸配列が、参照抗体に見られるものと実質的に同一である少なくとも一つのCDR（例えば、少なくとも一つの重鎖CDRおよび／もしくは少なくとも一つの軽鎖CDR）を含むポリペプチドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、抗体剤は、そのアミノ酸配列が、免疫グロブリン可変ドメインとして当業者によって認識される構造要素を含むポリペプチドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、抗体剤は、免疫グロブリン結合ドメインに対して相同であるか、または大部分が相同である結合ドメインを有するポリペプチドタンパク質である。

10

20

30

40

50

【0071】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から取得される抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る考えられる自然発生的な変異を除き、同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に指向する。「モノクローナル」という修飾語句は、実質的に均質な抗体群から取得されたときの抗体の特徴を示すが、任意の特定の方法による抗体の生成が必要とはみなされないものとする。

【0072】

本明細書で使用される場合、「ヒト抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリン配列から生成された（または集合した）可変領域および定常領域を有する抗体を含むことが意図される。いくつかの実施形態では、抗体（または抗体構成成分）は、そのアミノ酸配列が、例えば一つ以上のCDR、および具体的にCDR3中で、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされない残基または要素を含む（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的変異誘発によって、またはインビボでの体細胞変異によって（最初に）導入された可能性がある配列変異を含む）にもかかわらず、「ヒト」とであるとみなされ得る。

【0073】

当該技術分野で既知であるように、「ヒト化」という用語は、そのアミノ酸配列が、非ヒト種（例えば、マウス）において作られた参照抗体由来の V_H および V_L 領域配列を含む抗体（または抗体構成成分）を指すために一般的に使用されるが、抗体をより「ヒト様」の、すなわち、ヒト生殖系列配列とより類似した状態にすることが意図される、参照抗体に対するそれらの配列の修飾も含む。いくつかの実施形態では、「ヒト化」抗体（または抗体構成成分）は、目的の抗原に免疫特異的に結合し、実質的にヒト抗体のようなアミノ酸配列を有するフレームワーク（FR）領域、および実質的に非ヒト抗体のようなアミノ酸配列を有する相補性決定領域（CDR）を有する抗体である。ヒト化抗体は、少なくとも一つ、および典型的には二つの可変ドメイン（Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv）の実質的にすべてを含み、その中で、CDR領域のすべて、または実質的にすべてが、非ヒト免疫グロブリン（すなわち、ドナー免疫グロブリン）のCDR領域に対応し、フレームワーク領域のすべて、または実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のフレームワーク領域である。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分、典型的には、ヒト免疫グロブリン定常領域の一部分を含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、軽鎖、ならびに重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有する。抗体はまた、重鎖定常領域のCH₁、ヒンジ、CH₂、CH₃、および任意選択的にCH₄領域を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、ヒト化 V_L 領域のみを含有する。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、ヒト化 V_H 領域のみを含有する。いくつかの特定の実施形態では、ヒト化抗体は、ヒト化 V_H および V_L 領域を含有する。

10

20

【0074】

「インタクトな抗体」は、抗体クラスに適切な抗原結合可変領域、ならびに軽鎖定常ドメイン（CL）および重鎖定常ドメイン、CH₁、CH₂、CH₃、およびCH₄を含む抗体である。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列バリエーションであってもよい。

【0075】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部分（その抗原結合および／または可変領域を含む）を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、直鎖状抗体、一本鎖抗体分子、scFv、scFv-Fc、抗体断片から形成された多重特異性抗体断片、Fab発現ライブラリによって産生された断片、または標的抗原（例えば、がん細胞抗原、ウイルス抗原、もしくは微生物抗原）に免疫特異的に結合する上記のいずれかのエピトープ結合断片が挙げられる。

30

【0076】

「抗原」は、抗体が特異的に結合する実体である。

【0077】

本明細書で使用される場合、「結合」という用語は、典型的には、二つ以上の実体間の非共有結合的会合を指すことが理解されるであろう。「直接」結合は、実体または部分間の物理的接触を伴い、間接結合は、一つ以上の中間実体との物理的接触による物理的相互作用を伴う。二つ以上の実体間の結合は、典型的には、相互作用する実体または部分が、別個に、またはより複雑な系の文脈で（例えば、担体実体に共有結合的にもしくは別の方法で会合しながら、および／または生物系もしくは細胞中で）研究される場合を含む、様々な文脈のいずれかで評価され得る。いくつかの実施形態では、「結合」は、免疫グロブリン分子と、免疫グロブリンが特異的である抗原との間に生じるタイプの非共有結合的相互作用を指す。免疫学的結合相互作用の強度、または親和性は、相互作用の解離定数（K_d）の観点から表され得、K_dが小さいほどより高い親和性を表す。選択されたポリペプチドの免疫学的結合特性は、当該技術分野で周知の方法を使用して定量化され得る。一つそのような方法は、抗原結合部位／抗原複合体形成および解離の速度を測定することを伴い、この速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、および両方向の速度に等しく影響する幾何学的パラメータに依存する。したがって、「オンレート定数」（K_o

40

50

n) および「オフレート定数」(K_{off})の両方は、濃度ならびに会合および解離の実際の速度の計算によって決定され得る。(Nature 361:186-87 (1993)を参照されたい)。 K_{off}/K_{on} の速度は、親和性に関連しないすべてのパラメータの削除を可能にし、解離定数 K_d に等しい。(一般に、Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473を参照されたい。)

【0078】

「特異的結合」および「特異的に結合する」という用語は、抗体または抗体誘導体が、多数の他の抗原とではなく、標的抗原のその対応するエピトープと高度に選択的な様式で結合することを意味する。典型的には、抗体または抗体誘導体は、少なくとも約 $1 \times 10^{-7} M$ 、および好ましくは $10^{-8} M \sim 10^{-9} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $10^{-11} M$ 、または $10^{-12} M$ の親和性で結合し、所定の抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的抗原(例えば、BSA、カゼイン)への結合に対するその親和性よりも少なくとも二倍高い親和性で、所定の抗原に結合する。「特異性」という用語は、所与の標的抗原、例えばヒト標的抗原と特異的に結合(例えば、免疫反応)する細胞結合剤(例えば、抗体またはその断片などの本明細書に記載されるような)の能力を指す。

【0079】

一般に、「タンパク質」は、ポリペプチド(すなわち、ペプチド結合によって互いに連結された少なくとも二つのアミノ酸の鎖)である。タンパク質は、アミノ酸以外の部分を含んでもよい(例えば、糖タンパク質であってもよい)、および/またはそうでなければ、処理もしくは修飾されてもよい。当業者であれば、「タンパク質」が、(シグナル配列を有するかもしくは有しない)細胞によって産生される完全なポリペプチド鎖であり得るか、またはその機能的部分であり得ることを理解するであろう。当業者であれば、タンパク質が、例えば、一つ以上のジスルフィド結合によって連結されたか、または他の手段によって会合した、二つ以上のポリペプチド鎖を含む場合があり得ることをさらに理解するであろう。

【0080】

「阻害する」または「の阻害」という用語は、測定可能な量低減すること、または完全に防止することを意味する。

【0081】

「実質的な」または「実質的に」という用語は、混合または試料の集団の過半数、すなわち、50%超、好ましくは、集団の50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%超を指す。

【0082】

「細胞傷害活性」という用語は、薬剤またはカンプトテシンコンジュゲートまたはカンプトテシンコンジュゲートの細胞内代謝産物の細胞殺滅効果を指す。細胞傷害活性は、 IC_{50} 値として表現されてもよく、これは、細胞の半分が生存する単位体積当たりの濃度(モルまたは質量)である。

【0083】

「細胞増殖抑制活性」という用語は、薬剤またはカンプトテシンコンジュゲートまたはカンプトテシンコンジュゲートの細胞内代謝産物の抗増殖効果を指す。

【0084】

本明細書で使用される場合、「細胞傷害性薬剤」という用語は、細胞傷害活性を有し、細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、化学療法剤、ならびに細菌、真菌、植物、または動物起源の小分子毒素または酵素的に活性な毒素などの毒素(その合成類似体および誘導体を含む)を含むことが意図される。

【0085】

本明細書で使用される場合、「細胞増殖抑制剤」という用語は、細胞の成長または増殖を含む、細胞の機能を阻害する物質を指す。細胞増殖抑制剤には、タンパク質阻害剤、例

10

20

30

40

50

えば、酵素阻害剤などの阻害剤が含まれる。細胞増殖抑制剤は、細胞増殖抑制活性を有する。

【0086】

「がん」および「がん性」という用語は、典型的には調節されていない細胞成長によって特徴付けられる哺乳動物における生理学的状態または障害を指すか、またはそれを説明する。「腫瘍」は、一つ以上のがん性細胞を含む。

【0087】

本明細書で使用される場合、「患者」または「対象」という用語は、例えば、実験、診断、予防、および／または治療目的のために、提供される本明細書に記載の化合物が本発明に従って投与される任意の生物を指す。典型的な対象には、動物が含まれる。「動物」という用語は、動物界の任意のメンバーを指す。いくつかの実施形態では、「動物」とは、任意の発育段階のヒトを指す。いくつかの実施形態では、「動物」とは、任意の発育段階の非ヒト動物を指す。ある特定の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳動物（例えば、齧歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、および／またはブタ）である。いくつかの実施形態では、動物には、哺乳動物、鳥、爬虫類、両生類、魚、昆虫、および／または寄生虫が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子操作された動物、および／またはクローンであり得る。実施形態では、動物は、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、およびヒトなどの哺乳動物、昆虫、寄生虫である。実施形態では、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、および／または病状（例えば、がん）を患っている、および／またはそれらにかかりやすい場合がある。本明細書で使用される場合、「患者集団」または「対象の集団」は、複数の患者または対象を指す。

10

20

【0088】

本明細書で使用される場合、用語「正常」は、「個体」または「対象」という用語を修飾するために使用される場合、特定の疾患もしくは病状を有しておらず、またその疾患もしくは病状の保因者でもない個体または個体の群を指す。「正常」という用語はまた、正常または野生型の個体または対象から単離された生物学的標本または試料を修飾するために、本明細書で使用される（例えば、「正常な生物学的試料」）。

【0089】

疾患、障害、および／または病状（例えば、本明細書に記載される任意のがん）に「罹患している」個体は、その疾患、障害、および／または病状と診断されているか、またはそれらの一つ以上の症状を示す。

30

【0090】

疾患、障害、および／または病状「にかかりやすい」個体は、その疾患、障害、および／または病状と診断されていない、および／またはそれらの症状を示していない可能性がある。いくつかの実施形態では、疾患、障害、および／または病状（例えば、がん）にかかりやすい個体は、以下のうちの一つによって特徴付けられ得る：（１）疾患、障害、および／または病状の発症に関連した遺伝子変異、（２）疾患、障害、および／または病状の発症に関連した遺伝子多型、（３）疾患、障害、および／または病状に関連したタンパク質の発現および／または活性の増加および／または減少、（４）疾患、障害、および／または病状の発症に関連した習慣および／またはライフスタイル、（５）疾患、障害、および／または病状の家族歴、（６）特定の細菌またはウイルスに対する反応、（７）特定の化学物質に対する曝露。いくつかの実施形態では、疾患、障害、および／または病状にかかりやすい個体は、その疾患、障害、および／または病状を発症するであろう。いくつかの実施形態では、疾患、障害、および／または病状にかかりやすい個体は、その疾患、障害、および／または病状を発症しないであろう。

40

【0091】

「治療する」または「治療」という用語は、文脈によって別段の指示がない限り、特定の疾患、障害、および／または病状（例えば、がん）を部分的もしくは完全に軽減する、改善する、緩和する、阻害する、それらの発病を遅延させる、それらの進行を遅延させる

50

、それらの重症度を低減する、および／またはそれらの一つ以上の症状もしくは特徴の発生の低減する、治療用分子（例えば、本明細書に記載される任意の化合物）の任意の投与を指す。そのような治療は、関連する疾患、障害および／または状態の兆候を示さない対象、および／または疾患、障害および／または状態の初期兆候のみを示す対象のものであり得る。代替的または追加的に、そのような治療は、関連する疾患、障害および／または状態の一つ以上の確立された徴候を示す対象であり得る。あるいは、薬理学的および／または生理学的効果は、予防的、すなわち、疾患またはその症状を完全または部分的に予防する（例えば、疾患またはその症状の発病を遅延させるか、またはその進行を減速させる）効果であってもよい。この点で、本発明の方法は、「予防有効量」の結合剤を投与することを含む。「予防有効量」は、所望の予防的結果を達成するための、必要な投与量および期間での有効な量を指す。したがって、目的が、がんの発症または広がりなどの望ましくない生理学的変化または障害を阻害するか、または減速（減少）させることである処置（予防的処置を含む）。本発明の目的のために、有益なまたは所望の臨床結果としては、検出可能か検出不可能かにかかわらず、症状の軽減、疾患の程度の減少、疾患の安定した（すなわち、悪化していない）状態、疾患進行の遅延または減速、疾患状態の改善または緩和、および寛解（部分または完全）が挙げられるが、これらに限定されない。治療はまた、治療を受けない場合の予測生存と比較した生存の延長を含み得る。治療を必要とするものには、すでに病状または障害を有するもの、ならびに病状または障害を有する傾向があるものが含まれる。

10

【0092】

がんの文脈において、「治療すること」という用語は、腫瘍細胞を殺滅すること、腫瘍細胞、がん細胞、または腫瘍の成長を阻害すること、腫瘍細胞またはがん細胞の複製を阻害すること、全腫瘍負荷を軽減することまたはがん性細胞の数を減少させること、および疾患に関連した一つ以上の症状を改善することのいずれかまたはすべてを含む。

20

【0093】

自己免疫疾患の文脈において、「治療すること」という用語は、自己免疫性抗体を産生する細胞を含むがこれに限定されない、自己免疫疾患状態に関連した細胞の複製を阻害すること、自己免疫抗体負荷を軽減すること、および自己免疫疾患の一つ以上の症状を改善することのいずれかまたはすべてを含む。

【0094】

「治療有効量」または「有効量」という用語は、哺乳動物における疾患または障害（例えば、本明細書に記載されるような）を治療または予防するのに有効なコンジュゲートの量を指す。がんの場合、治療有効量のコンジュゲートは、がん細胞の数を減少させる、腫瘍サイズを低減する、末梢器官へのがん細胞浸潤を阻害する（すなわち、ある程度減速させる、好ましくは停止させる）、腫瘍転移を阻害する（すなわち、ある程度減速させる、好ましくは停止させる）、腫瘍成長をある程度阻害する、および／またはがんに関連した症状のうちの一つ以上をある程度緩和することが可能である。薬物が成長を阻害する、および／または既存のがん細胞を殺滅することができる程度で、薬物は、細胞増殖抑制性および／または細胞傷害性であってもよい。がん療法について、有効性は、例えば、疾患進行までの時間（TTP）を評価すること、および／または奏効率（RR）を決定することによって測定され得る。

30

【0095】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される形態」という用語は、その薬学的に許容される塩、エステル、水和物、溶媒和物、多形体、異性体、プロドラッグ、および同位体標識誘導体を含むがこれらに限定されない、開示された化合物の形態を指す。一実施形態では、「薬学的に許容される形態」は、その薬学的に許容される塩、エステル、プロドラッグ、および同位体標識誘導体を含むが、これらに限定されない。実施形態では、「薬学的に許容される形態」は、その薬学的に許容される異性体および立体異性体、プロドラッグ、ならびに同位体標識誘導体を含むが、これらに限定されない。

40

【0096】

50

実施形態では、薬学的に許容される形態は、薬学的に許容される塩である。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される塩」という用語は、化合物（例えば、カンプトテシン、カンプトテシンペイロード、またはカンプトテシンコンジュゲート）の薬学的に許容される有機塩または無機塩を指す。いくつかの態様では、化合物は、少なくとも一つのアミノ基を含有することができ、それに応じて、酸付加塩は、アミノ基で形成され得る。例示的な塩としては、硫酸塩、トリフルオロ酢酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、重酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチシン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、糖酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トールエンスルホン酸塩、およびパモ酸塩（すなわち、1, 1'-メチレンビス-(2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸塩)）が挙げられるが、これらに限定されない。薬学的に許容される塩は、酢酸イオン、コハク酸イオン、または他の対イオンなどの別の分子の包含を伴ってもよい。対イオンは、親化合物上の電荷を安定化する任意の有機または無機部分であってもよい。さらに、薬学的に許容される塩は、その構造に二つ以上の荷電原子を有してもよい。複数の荷電原子が薬学的に許容される塩の一部である場合は、複数の対イオンを有することができる。したがって、薬学的に許容される塩は、一つ以上の荷電原子および／または一つ以上の対イオンを有することができる。

10

20

【0097】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」という用語は、活性薬剤（例えば、本明細書に記載される式(I)～(III)のいずれかに従った化合物）が、一つ以上の薬学的に許容される担体と一緒に製剤化される組成物を指す。いくつかの実施形態では、活性薬剤は、関連する集団に投与されたときに所定の治療効果を達成する統計的に有意な確率を示す治療レジメンにおける投与に適切な単位用量で存在する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、固体または液体形態での投与のために特別に製剤化されてもよく、以下に適合されたものを含む：経口投与、例えば、ドレンチ（水性または非水性の溶液または懸濁液）、錠剤、例えば、口腔、舌下、全身吸収を標的としたもの、ボラス、粉末、顆粒、舌に塗布するためのペースト、例えば、滅菌溶液もしくは懸濁液または徐放性製剤としての、例えば、皮下、筋肉内、静脈内、または硬膜外注射による非経口投与、例えば、皮膚、肺、または口腔に塗布されるクリーム、軟膏、または制御放出パッチもしくはスプレーとしての局所塗布、例えば、ペッサリー、クリーム、または発泡体としての腔内または直腸内、舌下、眼内、経皮、あるいは経鼻、肺、および他の粘膜表面。

30

40

【0098】

本明細書で使用される場合、「担体」または「薬学的に許容される担体」は、組成物がともに投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。いくつかの例示的な実施形態では、担体には、例えば、水とオイル（石油起源のオイル、動物起源のオイル、野菜または合成起源のオイル（例として、ピーナッツ油、大豆油、ミネラルオイル、ゴマ油など））といった、無菌液体が含まれ得る。いくつかの実施形態では、担体は一つ以上の固体成分であるか、またはこれらを含む。いくつかの実施形態では、担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、ならびにそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。例えばレシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には必要な粒径を維持することによって、および界面活性剤の使用によって、適切な流動性が維持され得る。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成され得る。場合によっては、等張剤、例えば、糖類、多価アルコール、例えば、マニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを組成物中に含むことが望ましくあり得る。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に含むことによってもたらされ得る。

50

【0099】

本明細書で使用される場合、「キット」という用語は、材料を送達するための任意の送達システムを指す。そのような送達システムは、様々な診断または治療試薬（例えば、適切な容器中のオリゴヌクレオチド、酵素など）および／または支持材料（例えば、緩衝液、アッセイを実施するための書面による説明など）の、ある場所から別の場所へ保存、輸送、または送達を可能にするシステムを含み得る。例えば、キットは、関連する反応試薬および／または支持材料を含有する一つ以上の筐体（例えば、箱、カートリッジ、ボトル、アンプルなど）を含む。本明細書で使用される場合、「細分化キット」という用語は、各々が全キット構成要素のサブ部分を含む、二つ以上の別々の容器を含む送達システムを指す。容器は、一緒にまたは別々に、意図されたレシピエントに送達されてもよい。例えば、第一の容器が、アッセイで使用するための酵素を含有してもよい一方で、第二の容器は、オリゴヌクレオチドを含有する。「細分化キット」という用語は、Federal Food, Drug, and Cosmetic Actの第520条(e)の下で規制される分析物特異的試薬(ASR)を含有するキットを包含することが意図されるが、これに限定されない。実際には、各々が全キット構成要素のサブ部分を含む、二つ以上の別々の容器を含む任意の送達システムが、「細分化キット」という用語に含まれる。対照的に、「組み合わせキット」は、単一の容器中に（例えば、所望の構成要素の各々を収容する単一の箱中に）、構成要素のすべてを含有する送達システムを指す。「キット」という用語は、細分化キットおよび組み合わせキットの両方を含む。

10

【0100】

本明細書で使用される場合、「投与」という用語は、典型的には、組成物であるか、または組成物中に含まれる薬剤の送達を達成するための、対象または系への組成物の投与を指す。当業者であれば、適切な状況において、対象、例えばヒトへの投与に利用され得る様々な経路を認識するであろう。投与経路の例としては、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（すなわち、局所）、経粘膜、および直腸投与が挙げられる。例えば、いくつかの実施形態では、投与は、眼、経口、非経口、局所などであってもよい。実施形態では、投与は、非経口（例えば、静脈内投与）である。実施形態では、静脈内投与は、静脈内注入である。いくつかの特定の実施形態では、投与は、気管支（例えば、気管支注入による）、口腔、皮膚（例えば、真皮、皮内、皮間、経皮などへの局所のうちの一つ以上であり得るか、またはそれを含み得る）、腸内、動脈内、皮内、胃内、髄内、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、髄腔内、静脈内、脳室内、特定の器官内（例えば、肝内）、粘膜、鼻、経口、直腸、皮下、舌下、局所、気管（例えば、気管内注入による）、膣、硝子体などであってもよい。

20

30

【0101】

本明細書で使用される場合、「求核」という用語は、電子が豊富であり、反応性部位として作用する共有されていない電子対を有し、正に荷電したまたは電子不足の部位と反応する、反応性基を指す。本発明での使用に好適な求核基の例としては、アミノ基（例えば、一級アミン、二級アミン、ヒドロキシアミン、および／またはヒドラジン）、チオール、フェノール、ならびにアルコールが挙げられるが、これらに限定されない。実施形態では、求核官能基は、アミノ、ヒドラジノ、ヒドロキシアミノ、ヒドロキシ、またはチオを含む。実施形態では、求核官能基は、カルボキサミド、N-ヒドロキシカルボキサミド、カルボキシルヒドラジド、またはグアニジノである。実施形態では、求核基は、チオール基であるか、またはチオール基を含む。特定の求核基は、求電子基と反応することができ、塩基で活性化されなければならない。例えば、多官能性化合物中に求核チオール基およびヒドロキシル基がある場合、プロトン除去し、チオレートまたはヒドロキシレートアニオンを提供して、求電子基との反応を可能にするために、化合物は水性塩基と混合されなければならない。塩基が反応に関与することが望ましい場合を除き、非求核塩基が好ましい。いくつかの実施形態では、塩基は、緩衝液の構成成分として存在し得る。

40

【0102】

本明細書で使用される場合、「求電子」という用語は、求核攻撃の影響を受けやすい、

50

すなわち、入ってくる求核基との反応の影響を受けやすい反応性基を指す。求電子基の選択は、対の反応物の求核基との反応が可能であるように行われ得る。例えば、求核反応性基がアミノ基である場合、求電子基は、アミノ基と反応するように選択され得る。類似的に、求核反応性基がチオール部分である場合、対応する求電子基は、チオール反応性基などであり得る。本発明での使用に好適な求電子基の例としては、カルボン酸エステル、酸塩化物基、無水物、イソシアナート、チオイソシアナート、エポキシド、活性化ヒドロキシル基、スクシンイミジルエステル、スルホスクシンイミジルエステル、マレイミド、およびエテンスルホニルが挙げられるが、これらに限定されない。実施形態では、求電子基は、アルデヒド、 α -ハロケトン、マレイミド、スクシンイミド、ヒドロキシスクシンイミド、イソチオシアナート、イソシアナート、アシルアジド、塩化スルホニル、トシレートエステル、グリオキサール、エポキシド、オキシラン、炭酸塩、イミドエステル、無水物、フルオロフェニルエステル、ヒドロキシメチルホスフィン誘導体、炭酸塩、ハロアセチル、クロロトリアジン、ハロアセチル、ハロゲン化アルキル、アジリジン、アクリロイル誘導体、ケトン、カルボン酸、エステル、塩化アセチル、または無水酢酸である。実施形態では、求電子基は、マレイミド基またはスクシンイミド基であるか、またはそれを含む。カルボン酸基は、求核剤と反応するように活性化されてもよく、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) またはジシクロヘキシル尿素 (DHU) などの脱水剤の存在下での好適なヒドロキシル含有化合物との反応を含む。例えば、カルボン酸は、DCC の存在下でアルコキシ置換 N-ヒドロキシスクシンイミドまたは N-ヒドロキシスルホスクシンイミドと反応して、それぞれ反応性求電子基である、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルおよび N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステルを形成することができる。カルボン酸はまた、塩化アシル (例えば、塩化アセチル) などのハロゲン化アシルとの反応によって活性化されて、反応性無水物基を提供してもよい。さらなる実施例では、カルボン酸は、例えば、交換反応が可能な塩化チオニルまたは塩化アシルを使用して、酸塩化物基に変換されてもよい。

10

20

【0103】

別段の指示がない限り、「アルキル」という用語は、それ自体で、または別の用語の一部として、指示された数の炭素原子を有する置換または非置換の直鎖または分岐鎖、飽和または不飽和炭化水素を指す (例えば、「 $-C_1-C_8$ アルキル」または「 $-C_1-C_{10}$ 」アルキルは、それぞれ、1~8 つまたは 1~10 個の炭素原子を有するアルキル基を指す)。炭素原子の数が指示されない場合、アルキル基は、1~8 つの炭素原子を有する。代表的な直鎖「 $-C_1-C_8$ アルキル」基としては、-メチル、-エチル、-n-プロピル、-n-ブチル、-n-ペンチル、-n-ヘキシル、-n-ヘプチル、および-n-オクチルが挙げられるが、これらに限定されず、一方で、分岐鎖 $-C_3-C_8$ アルキルとしては、-イソプロピル、-sec-ブチル、-イソブチル、-tert-ブチル、-イソペンチル、および-2-メチルブチルが挙げられるが、これらに限定されず、不飽和 $-C_2-C_8$ アルキルとしては、-ビニル、-アリル、-1-ブテニル、-2-ブテニル、-イソブチレニル、-1-ペンテニル、-2-ペンテニル、-3-メチル-1-ブテニル、-2-メチル-2-ブテニル、-2,3-ジメチル-2-ブテニル、-1-ヘキシル、2-ヘキシル、-3-ヘキシル、-アセチレニル、-プロピニル、-1-ブチニル、-2-ブチニル、-1-ペンチニル、-2-ペンチニル、および-3-メチル1-ブチニルが挙げられるが、これらに限定されない。アルキル基は、非置換である場合もある。アルキル基は、一つ以上の基で置換され得る。他の態様では、アルキル基は、飽和している。

30

40

【0104】

別段の指示がない限り、「アルキレン」は、それ自体で、または別の用語の一部として、所定の数の炭素原子、典型的には 1~10 個の炭素原子の、かつ親アルカンの同一のまたは二つの異なる炭素原子からの二つの水素原子の除去によって得られる二つの一価ラジカル中心を有する、置換または非置換の飽和、分岐鎖もしくは直鎖、または環状炭化水素ラジカルを指す。典型的なアルキレンラジカルとしては、メチレン ($-CH_2-$)、1,2-エチレン ($-CH_2CH_2-$)、1,3-プロピレン ($-CH_2CH_2CH_2-$)、

50

1, 4-ブチレン ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい態様では、アルキレンは、分岐鎖または直鎖炭化水素である（すなわち、環状炭化水素ではない）。

【0105】

別段の指示がない限り、「アリール」は、それ自体で、または別の用語の一部として、親芳香環系の単一の炭素原子からの一つの水素原子の除去によって得られる、所定の数の炭素原子、典型的には6～20個の炭素原子の置換または非置換の一価炭素環式芳香族炭化水素ラジカルを意味する。いくつかのアリール基は、例示的な構造において「Ar」として表される。典型的なアリール基としては、ベンゼン、置換ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ピフェニルなどに由来するラジカルが挙げられるが、これらに限定されない。例示的なアリール基は、フェニル基である。

10

【0106】

別段の指示がない限り、「アリーレン」は、それ自体で、または別の用語の一部として、二つの共有結合を有し（すなわち、二価であり）、オルト、メタ、またはパラの配向であり得る、上記で定義されたアリール基である。

【0107】

別段の指示がない限り、「 C_3-C_8 複素環」は、それ自体で、または別の用語の一部として、3～8つの炭素原子（環メンバーとも称される）およびN、O、P、またはSから独立して選択される一つから四つのヘテロ原子環メンバーを有し、親環系の環原子からの一つの水素原子の除去によって得られる、一価の置換または非置換、芳香族または非芳香族、単環式または二環式環系を指す。複素環の一つ以上のN、C、またはS原子は、酸化し得る。ヘテロ原子を含む環は、芳香族または非芳香族であり得る。環原子のすべてが芳香族性に関与する複素環は、ヘテロアリールと称され、そうでなければヘテロ炭素環と称される。別段の記載がない限り、複素環は、安定した構造をもたらす任意のヘテロ原子または炭素原子で、そのペンダント基に付着する。したがって、ヘテロアリールは、C連結ヘテロアリールと称されるその芳香環系の芳香族炭素を介して、またはN連結ヘテロアリールと称されるその芳香環系の非二重結合N原子（すなわち、 $=\text{N}-$ ではない）を介して結合されてもよい。したがって、窒素含有複素環は、C連結またはN連結であってもよく、ピロール-1-イル（N連結）およびピロール-3-イル（C連結）などのピロール部分、ならびにイミダゾール-1-イルおよびイミダゾール-3-イル（両方ともN連結）、およびイミダゾール-2-イル、イミダゾール-4-イル、およびイミダゾール-5-イル部分（すべてC連結）などのイミダゾール部分を含む。

20

30

【0108】

別段の指示がない限り、「 C_3-C_8 ヘテロアリール」は、芳香族 C_3-C_8 複素環であり、下付き記号は、複素環の環状環系の炭素の総数、またはヘテロアリールの芳香環系の芳香族炭素の総数を示し、環系のサイズまたは環縮合の有無を含意しない。 C_3-C_8 複素環の代表的な例としては、ピロリジニル、アゼチジニル、ピペリジニル、モルホリニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ベンゾフラニル、ベンゾチオフエン、インドリル、ベンゾピラゾリル、ピロリル、チオフエニル（チオフエン）、フラニル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリミジニル、ピリジニル、ピラジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、およびイソキサゾリルが挙げられるが、これらに限定されない。明示的に示された場合、複素環またはヘテロアリールの環系のサイズは、環中の原子の総数によって示される。例えば、5または6員ヘテロアリールとしての指定は、ヘテロアリールの複素芳香環系中の芳香族原子の総数（すなわち、5または6）を示すが、その環系中の芳香族ヘテロ原子または芳香族炭素の数を暗示するものではない。縮合ヘテロアリールは、そのような文脈によって明示的に記載または暗示され、典型的には、一緒に縮合して縮合複素芳香環系を構成する各芳香環中の芳香族原子の数によって示される。例えば、5, 6員ヘテロアリールは、芳香族6員環に縮合した芳香族5員環であり、環のうちの一方または両方が、芳香族ヘテロ原子を有するか、またはヘテロ原子が、二つの環の間で共有される。

40

50

【0109】

複素環が非芳香族のままであり、縮合環システムの非芳香族部分との付着を介してより大きい構造の一部であるように、アリールまたはヘテロアリールに縮合した複素環は、複素環がアリールまたはヘテロアリールとの環縮合によって置換される、任意選択的に置換された複素環の一例である。同様に、縮合環系の芳香族部分との付着を介してより大きい構造の一部である複素環または炭素環に縮合したアリールまたはヘテロアリールは、アリールまたは複素環が複素環または炭素環との環縮合によって置換される、任意選択的に置換されたアリールまたは複素環の一例である。

【0110】

別段の指示がない限り、「 $C_3 - C_8$ ヘテロシクロ」は、それ自体で、または別の用語の一部として、複素環の水素原子のうちの 하나가結合で置き換えられる（すなわち、二価である）、上記で定義された $C_3 - C_8$ 複素環を指す。別段の指示がない限り、「 $C_3 - C_8$ ヘテロアリーレン」は、それ自体で、または別の用語の一部として、ヘテロアリール基の水素原子のうちの 하나가結合で置き換えられる（すなわち、二価である）、上記で定義された $C_3 - C_8$ ヘテロアリール基を指す。

10

【0111】

別段の指示がない限り、「 $C_3 - C_8$ 炭素環」は、それ自体で、または別の用語の一部として、親環系の環原子からの一つの水素原子の除去によって得られる、3、4、5、6、7または8員の一価、置換または非置換、飽和または非飽和の非芳香族単環式または二環式炭素環である。代表的な $C_3 - C_8$ 炭素環としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンタジエニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、1, 3-シクロヘキサジエニル、1, 4-シクロヘキサジエニル、シクロヘプチル、1, 3-シクロヘプタジエニル、1, 3, 5-シクロヘプタトリエニル、シクロオクテニル、およびシクロオクタジエニルが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0112】

別段の指示がない限り、「 $C_3 - C_8$ カルボシクロ」は、それ自体で、または別の用語の一部として、炭素環基の水素原子のもう一方が結合で置き換えられる（すなわち、二価である）、上記で定義された $C_3 - C_8$ 炭素環基を指す。

【0113】

別段の指示がない限り、「ヘテロアルキル」という用語は、それ自体で、または別の用語と組み合わせて、別段の記載がない限り、完全に飽和しているか、または1～3度の不飽和を含有し、所定の数の炭素原子ならびにO、N、Si、およびSからなる群から選択される一個から十個、好ましくは一個から三個のヘテロ原子からなる、安定した直鎖もしくは分岐鎖炭化水素、またはそれらの組み合わせを意味し、窒素および硫黄原子は、任意選択的に酸化してもよく、窒素ヘテロ原子は、任意選択的に四級化されてもよい。ヘテロ原子O、N、およびSは、ヘテロアルキル基の任意の内部位置、またはアルキル基が分子の残りの部分に付着する位置に配置されてもよい。ヘテロ原子Siは、アルキル基が分子の残りの部分に付着する位置を含む、ヘテロアルキル基の任意の位置に配置されてもよい。例としては、 $-CH_2-CH_2-O-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$ 、 $-CH_2-S-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$ 、 $-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$ 、 $-CH=CH-O-CH_3$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 、 $-CH_2-CH=N-O-CH_3$ 、および $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$ が挙げられる。例えば、 $-CH_2-NH-OCH_3$ および $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$ などの最大二つのヘテロ原子が、連続していてもよい。典型的には、 $C_1 - C_4$ ヘテロアルキルまたはヘテロアルキレンは、1～4つの炭素原子および1つまたは2つのヘテロ原子を有し、 $C_1 - C_3$ ヘテロアルキルまたはヘテロアルキレンは、1～3つの炭素原子および1つまたは2つのヘテロ原子を有する。いくつかの態様では、ヘテロアルキルまたはヘテロアルキレンは、飽和している。

30

40

【0114】

50

別段の指示がない限り、「ヘテロアルキレン」という用語は、それ自体で、または別の用語と組み合わせて、 $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ および $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ によって例示されるような、ヘテロアルキル（上述のとおり）に由来する二価基を意味する。ヘテロアルキレン基については、ヘテロ原子はまた、鎖末端のいずれかまたは両方を占有し得る。なおさらに、アルキレンおよびヘテロアルキレン連結基については、連結基の配向は暗示されない。

【0115】

別段の指示がない限り、「アミノアルキル」は、それ自体で、または別の用語と組み合わせて、本明細書に定義されるアルキル部分が、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、またはシクロアルキルアミノ基で置換される、ヘテロアルキルを意味する。例示的な非限定的なアミノアルキルは、 $-CH_2NH_2$ 、 $-CH_2CH_2NH_2$ 、 $-CH_2CH_2NHCH_3$ 、および $-CH_2CH_2N(CH_3)_2$ であり、(R)または(S)配置の $-CH(CH_3)NH_2$ および $-C(CH_3)CH_2NH_2$ などの分岐種をさらに含む。あるいは、アミノアルキルは、ラジカル炭素以外の sp^3 炭素がアミノまたはアルキルアミノ部分で置き換えられており、その sp^3 窒素がアルキルの sp^3 炭素を置き換えるが、ただし、少なくとも一つの sp^3 炭素が残ることを条件とする、本明細書に定義されるアルキル部分、基、または置換基である。アミノアルキル部分をより大きい構造または別の部分に対する置換基と称する場合、アミノアルキルは、アミノアルキルのアルキル部分の炭素ラジカルを介してその構造または部分に共有結合している。

【0116】

別段の指示がない限り、「アルキルアミノ」および「シクロアルキルアミノ」は、それ自体で、または別の用語と組み合わせて、アルキルまたはシクロアルキルラジカルのラジカル炭素が窒素ラジカルで置き換えられているが、ただし、少なくとも一つの sp^3 炭素が残ることを条件とする、本明細書に記載されるアルキルまたはシクロアルキルラジカルを意味する。アルキルアミノがその窒素において別のアルキル部分で置換されるような場合、得られた置換ラジカルは、ジアルキルアミノ部分、基、または置換基と称され、窒素を置換するアルキル部分は、独立して選択される。例示的および非限定的なアミノ、アルキルアミノ、およびジアルキルアミノ置換基としては、 $-N(R')_2$ の構造を有するものが挙げられ、これらの例における R' は独立して、水素または C_{1-6} アルキル、典型的には水素またはメチルから選択され、一方で、ヘテロシクロアルキル中に含まれるシクロアルキルアミンにおいて、両方の R' はそれらが付着する窒素と一緒に、複素環を定義する。両方の R' が水素またはアルキルである場合、その部分は、それぞれ、一級アミノ基および三級アミン基として記載される場合がある。一方の R' が水素であり、他方がアルキルである場合、その部分は、二級アミノ基として記載される。一級および二級アルキルアミノ部分が、カルボニル含有求電子中心に対して求核剤としてより反応性である一方で、三級アミンは、より塩基性である。

【0117】

「置換アルキル」および「置換アリール」はそれぞれ、一つ以上の水素原子、典型的には一つが各々独立して置換基で置き換えられる、アルキルおよびアリールを意味する。典型的な置換基としては、 $-X$ 、 $-R'$ 、 $-OH$ 、 $-OR'$ 、 $-SR'$ 、 $-N(R'_2)-N(R')_3$ 、 $=NR'$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR'C(=O)R'$ 、 $-C(=O)R'$ 、 $-C(=O)N(R'_2)$ 、 $-S(=O)_2R'$ 、 $-S(=O)_2NR$ 、 $-S(=O)R'$ 、 $-OP(=O)(OR'_2)$ 、 $-P(=O)(OR')_2$ 、 $-PO_3=$ 、 PO_3H_2 、 $-C(=O)R'$ 、 $-C(=S)R'$ 、 $-C_2OR'$ 、 $-CO_2-$ 、 $-C(=S)OR'$ 、 $-C(=O)SR'$ 、 $-C(=S)SR'$ 、 $-C(=O)N(R'_2)-C(=S)N(R)_2$ 、および $-C(=NR)N(R')_2$ が挙げられるが、これらに限定されず、式中、各 X は独立して、ハロゲン： $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、および $-I$ からなる群から選択され、式中、各 R' は独立して、 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_6-C_{20}$ アリール、 $-C_3-C_{14}$ 複素環、保護基、およびプロドラッグ部分からなる群から選択される。

【0118】

より典型的には、置換基は、 $-X$ 、 $-R'$ 、 $-OH$ 、 $-OR'$ 、 $-SR'$ 、 $-N(R_2')$ 、 $-N(R')_3$ 、 $=NR'$ 、 $-NR' C(=O)R$ 、 $-C(=O)R'$ 、 $-C(=O)N(R')_2$ 、 $-S(=O)_2R'$ 、 $-S(=O)_2NR'$ 、 $-S(=O)R'$ 、 $-C(=O)R'$ 、 $-C(=S)R$ 、 $-C(=O)N(R')_2$ 、 $-C(=S)N(R')_2$ 、および $-C(=NR)N(R')_2$ からなる群から選択され、式中、各 X は独立して、 $-F$ および $-CI$ からなる群から選択されるか、または $-X$ 、 $-R$ 、 $-OH$ 、 $-OR'$ 、 $-N(R')_2$ 、 $-N(R')_3$ 、 $-NR' C(=O)R'$ 、 $-C(=O)N(R')_2$ 、 $-S(=O)_2R'$ 、 $-S(=O)_2NR'$ 、 $-S(=O)R'$ 、 $-C(=O)R'$ 、 $-C(=O)N(R_2')$ 、 $-C(=NR)N(R')_2$ 、保護基、およびプロドラッグ部分からなる群から選択され、式中、各 X は、 $-F$ であり、式中、各 R' は独立して、水素、 $-C_{1-20}$ アルキル、 $-C_{6-20}$ アリール、 $-C_{3-14}$ 複素環、保護基、およびプロドラッグ部分からなる群から選択される。いくつかの態様では、アルキル置換基は、 $-N(R')_2$ 、 $-N(R')_3$ 、および $-C(=NR)N(R')_2$ からなる群から選択され、式中、 R は、水素および $-C_{1-20}$ アルキルからなる群から選択される。他の態様では、アルキルは、一連のエチレンオキシ部分で置換されて、PEG単位を定義する。上述のアルキレン、炭素環、カルボシクロ、アリーレン、ヘテロアルキル、ヘテロアルキレン、複素環、ヘテロシクロ、ヘテロアリール、およびヘテロアリーレン基も、同様に置換されてもよい。

【0119】

本明細書で使用される場合、「保護基」は、それが連結される原子または官能基が望ましくない反応に参与する能力を防止または低減する部分を意味する。原子または官能基の典型的な保護基は、Greene (1999), "Protective Groups In Organic Synthesis, 3RD Ed.", Wiley Interscienceに示される。酸素、硫黄、および窒素などのヘテロ原子の保護基は、場合によっては、求電子化合物とのそれらの望ましくない反応を最小化または回避するために使用される。他の場合では、保護基は、保護されていないヘテロ原子の求核性および／または塩基性を低減または排除するために使用される。保護される酸素の非限定的な例は、 $-OR^{PR}$ によって示され、式中、 R^{PR} は、ヒドロキシルの保護基であり、ヒドロキシルは典型的には、エステル（例えば、酢酸塩、プロピオン酸塩、または安息香酸塩）として保護される。ヒドロキシルの他の保護基は、有機金属試薬または他の高度に塩基性の試薬の求核性に干渉することを回避し、ヒドロキシルは典型的には、エーテルとして保護され、アルキルまたはヘテロシクロアルキルエーテル（例えば、メチルまたはテトラヒドロピラニルエーテル）、アルコキシメチルエーテル（例えば、メトキシメチルまたはエトキシメチルエーテル）、任意選択的に置換されたアリールエーテル、ならびにシリルエーテル（例えば、トリメチルシリル (TMS)、トリエチルシリル (TES)、tert-ブチルジフェニルシリル (TBDPS)、tert-ブチルジメチルシリル (TBS/TBDMs)、トリイソプロピルシリル (TIPS)、および [2-(トリメチルシリル)エトキシ]-メチルシリル (SEM)) を含む。窒素保護基としては、 $-NHR^{PR}$ または $-N(R^{PR})_2$ にあるような、一級アミンまたは二級アミンに対するものが挙げられ、式中、 R^{PR} のうちの少なくとも一つは、窒素原子保護基であるか、または R^{PR} の両方が一緒に、保護基を含む。

【0120】

保護基は、分子中の他の場所での所望の化学変換をもたらすのに必要な反応条件下で、および必要に応じて新たに形成された分子の精製中に、保護基の望ましくない副反応または早期喪失を防止または回避することができ、その新しく形成された分子の構造または立体化学的完全性に悪影響を及ぼさない条件下で除去され得る場合に好適である。限定ではなく一例として、好適な保護基は、官能基の保護について前述したものを含み得る。好適な保護基は、ペプチドカップリング反応で使用される保護基である場合もある。

【0121】

「芳香族アルコール」は、それ自体で、またはより大きい構造の一部として、ヒドロキシル官能基 $-OH$ で置換された芳香環系を指す。したがって、芳香族アルコールは、その

芳香環系の芳香族炭素に結合されたヒドロキシル官能基を有する、本明細書に記載される任意のアリール、ヘテロアリール、アリーレン、およびヘテロアリーレン部分を指す。芳香族アルコールは、その芳香環系が、この部分の置換基である場合のように、より大きい部分の一部であってもよい、または環縮合によってより大きい部分に埋め込まれてもよく、一つ以上の他のヒドロキシル置換基を含む本明細書に記載される部分で任意選択的に置換されてもよい。フェノールアルコールは、芳香環としてフェノール基を有する芳香族アルコールである。

【0122】

「脂肪族アルコール」は、それ自体で、またはより大きい構造の一部として、ヒドロキシル官能基-OHに結合された非芳香族炭素を有する部分を指す。ヒドロキシ含有炭素は、一級アルコール、または直鎖状もしくは環状構造内の二次もしくは三級脂肪族アルコールを定義するために、非置換（すなわち、メチルアルコール）であってもよく、または一つ、二つ、もしくは三つの任意選択的に置換された分岐鎖または非分岐鎖アルキル置換基を有してもよい。より大きい構造の一部である場合、アルコールは、ヒドロキシ含有炭素を介して、本明細書に記載されるアルキルもしくは他の部分の炭素を介してこのヒドロキシ含有炭素に、またはこのアルキルもしくは他の部分の置換基を介して結合することによって、この構造の置換基であってもよい。脂肪族アルコールは、ヒドロキシ官能基がその環状環系の非芳香族炭素に結合される、非芳香族環状構造（すなわち、任意選択的に置換される炭素環およびヘテロ炭素環）を企図する。

【0123】

本明細書で使用される場合、「アリールアルキル」または「ヘテロアリールアルキル」は、アリール部分がアルキル部分に結合される、すなわち、アリール-アルキルである置換基、部分、または基を意味し、アルキル基およびアリール基は、上述のとおり、例えば、 $C_6H_5-CH_2-$ または $C_6H_5-CH(CH_3)CH_2-$ である。アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキルは、そのアルキル部分の sp^3 炭素を介して、より大きい構造または部分に関連している。

【0124】

本明細書で使用される場合、「スクシンイミド部分」は、スクシンイミド環系で構成される有機部分を指し、これは、典型的にはその環系のイミド窒素に結合されたアルキレン含有部分でさらに構成される、式(PL-A)の化合物中の一つのタイプのY'中に存在する。スクシンイミド部分は、典型的には、カンプトテシンペイロード化合物(式II)のマレイミド環系への細胞結合剤のチオール基のマイケル付加から生じる。したがって、スクシンイミド部分は、チオ置換スクシンイミド環系で構成され、カンプトテシンコンジュゲート中に存在するとき、そのイミド窒素は、カンプトテシンコンジュゲートの細胞結合剤の残りの部分で置換され、式IIの化合物のマレイミド環系上に存在した置換基で任意選択的に置換される。

【0125】

本明細書で使用される場合、「酸-アミド部分」は、加水分解によってそのカルボニル-窒素結合のうちの一つの切断を受けたスクシンイミド部分のチオ置換スクシンイミド環系から生じるアミド置換基を有するコハク酸を指す。コハク酸-アミド部分をもたらす加水分解は、抗体-チオ置換基の脱離を介して結合されるリンカーの早期喪失を被る可能性がより低いリンカーを提供する。チオ置換スクシンイミド部分のスクシンイミド環系の加水分解は、式IIの化合物のマレイミド環系中に存在する任意の置換基、および標的化リガンドによって導入されたチオ置換基に少なくとも部分的に起因するスクシンイミド環系の二つのカルボニル炭素の反応性の差による、酸-アミド部分の位置化学異性体をもたらすことが期待される。

【0126】

本明細書で使用される場合、「プロドラッグ」という用語は、化学的または生物学的プロセス（すなわち、化学反応または酵素的生体内変化）を介して、体内でより生物学的に活性な化合物へと形質転換される、生物学的にあまり活性ではないか、または不活性化

10

20

30

40

50

合物を指す。典型的には、生物学的に活性な化合物は、プロドラッグ部分で化合物を化学的に修飾することによって、生物学的にあまり活性ではない状態にされる（すなわち、プロドラッグに変換される）。いくつかの態様では、プロドラッグは、II型プロドラッグであり、これは、細胞外、例えば、消化液中、または身体の循環系中、例えば、血液中で生体活性化される。例示的なプロドラッグは、エステルおよび（ β -D-グルコピラノシドである。

【0127】

多くの場合、本明細書に記載されるコンジュゲート、リンカー、および構成成分の集合は、反応性基を指す。「反応性基」またはRGは、カンプトテシンペイロードもしくはカンプトテシンコンジュゲートのリンカーの構成成分、またはカンプトテシンのいずれかとの結合を形成することができる反応性部位（RS）を含有する基である。RSは、反応性基（RG）内の反応性部位である。反応性基としては、ジスルフィド結合またはチオエーテル結合を形成するチオール基、ヒドラゾン結合を形成するアルデヒド、ケトン、またはヒドラジン基、ペプチド結合を形成するカルボン酸またはアミノ基、エステル結合を形成するカルボン酸またはヒドロキシ基、スルホンアミド結合を形成するスルホン酸、カルバメート結合を形成するアルコール、およびスルホンアミド結合またはカルバメート結合を形成するアミンが挙げられる。以下の表は、反応性基、反応性部位、および反応性部位の反応後に形成され得る例示的な官能基を例示している。この表は、限定するものではない。当業者であれば、表中に記載されるR'およびR''部分が、効果的に、RGを例示的官能基のうちの一つに変換する際に提供される結合形成に適合する任意の有機部分（例えば、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、または置換アルキル、アリール、もしくはヘテロアリール基）であることを理解するであろう。また、本発明の実施形態に適用される場合、R'が、場合により、自己安定化リンカーまたは任意選択的な二次リンカーの一つ以上の構成成分を表してもよく、R''が、場合により、任意選択的な二次リンカー、カンプトテシン、安定化単位、または検出単位の一つ以上の構成成分を表してもよいことが理解されるであろう。

【表8】

RG	RS	例示的な官能基
1) R'-SH	-S-	R'-S-R'' R'-S-S-R''
2) R'-C(=O)OH	-C(=O)-	R'-C(=O)NH-R''
3) R'-C(=O)ONHS	-C(=O)-	R'-C(=O)NH-R''
4) R'S(=O) ₂ -OH	-S(=O) ₂ -	R'S(=O) ₂ NH-R''
5) R'-CH ₂ -X (X is Br, I, Cl)	-CH ₂ -	R'-CH ₂ -S-R''
6) R'-NH ₂	-N-	R'-NHC(=O)R''

【0128】

本発明によって想定される置換基および変数の組み合わせは、安定した化合物の形成をもたらすもののみである。本明細書で使用される場合、「安定した」という用語は、製造を可能にするのに十分な安定性を有し、本明細書に詳述される目的（例えば、対象への治療的または予防的投与）に有用であるのに十分な時間にわたって化合物の完全性を維持する化合物を指す。

【0129】

本発明の化合物は、その調製後、好ましくは、単離および精製されて、95%以上の重量を含有する（「実質的に純粋な」）組成物を得て、これは次いで、本明細書に記載されるように使用または製剤化される。

【0130】

本明細書で使用される場合、「コンジュゲート」という用語は、細胞結合剤に連結された本明細書に記載される化合物またはその誘導体を指す。

【0131】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、「細胞結合剤に連結可能な」という用語は、本明細書に記載される化合物またはその誘導体を細胞結合剤に結合するのに好適な少なくとも一つの連結基またはその前駆体を含む、化合物またはその誘導体を指す。

【0132】

所与の基の「前駆体」という用語は、任意の脱保護、化学修飾、またはカップリング反応によってその基につながり得る任意の基を指す。

【0133】

「細胞結合剤に連結された」という用語は、好適な結合基またはその前駆体を介して細胞結合剤に結合された、本明細書に記載される化合物のうちの少なくとも一つまたはその誘導体を含む、コンジュゲート分子を指す。

10

【0134】

「異常な細胞成長」および「増殖性障害」という用語は、本出願において互換的に使用される。本明細書で使用される場合、別段の指示がない限り、「異常な細胞成長」は、正常な調節機構（例えば、接触阻害の喪失）とは無関係の細胞成長を指す。これには、例えば、（１）変異チロシンキナーゼの発現または受容体チロシンキナーゼの過剰発現によって増殖する腫瘍細胞（腫瘍）、（２）異常なチロシンキナーゼ活性化が生じる他の増殖性疾患の良性および悪性細胞、（３）受容体チロシンキナーゼによって増殖する任意の腫瘍、（４）異常なセリン／トレオニンキナーゼ活性化によって増殖する任意の腫瘍、および（５）異常なセリン／トレオニンキナーゼ活性化が生じる他の増殖性疾患の良性および悪性細胞、の異常な成長が含まれる。

20

【0135】

「がん」および「がん性」という用語は、典型的には調節されていない細胞成長によって特徴付けられる哺乳動物における生理学的状態を指すか、またはそれを説明する。「腫瘍」は、一つ以上のがん性細胞、および／または良性もしくは前がん性細胞を含む。

【0136】

「治療剤」は、抗体、ペプチド、タンパク質、酵素などの生物学的薬剤または化学療法剤の両方を包含する。

【0137】

「化学療法剤」は、がんの治療に有用な化合物である。

【0138】

「代謝産物」は、特定の化合物、その誘導体、またはそのコンジュゲート、またはその塩の体内での代謝を介して産生される産物である。化合物、その誘導体、またはそのコンジュゲートの代謝産物は、当該技術分野で既知の日常的な技術を使用して特定されてもよく、それらの活性は、本明細書に記載されるものなどの試験を使用して決定されてもよい。そのような生成物は、例えば、投与された化合物の酸化、ヒドロキシル化、還元、加水分解、アミド化、脱アミド化、エステル化、脱エステル化、酵素的切断などから生じ得る。したがって、本発明は、本発明の化合物、その誘導体、またはそのコンジュゲートを、その代謝産物を得るのに十分な期間にたつて哺乳動物と接触させることを含むプロセスによって産生される化合物、その誘導体、またはそのコンジュゲートを含む、本発明の化合物、その誘導体、またはそのコンジュゲートの代謝産物を含む。

40

【0139】

本明細書で定義される場合、「リンカー」、「リンカー部分」、または「連結基」は、細胞結合剤および細胞傷害性化合物などの二つの基と一緒に接続する部分を指す。典型的には、リンカーは、それが接続している二つの基が連結される条件下で、実質的に不活性である。二官能性架橋剤は、リンカー部分の各末端の一つで、二つの反応性基を含み得、その結果、一つの反応性基が、最初に細胞傷害性化合物と反応して、リンカー部分および第二の反応性基を有する化合物を提供することができ、第二の反応性基が次いで、細胞結合剤と反応することができる。あるいは、二官能性架橋剤の一端が、最初に細胞結合剤と反応して、リンカー部分および第二の反応性基を有する細胞結合剤を提供することができ、第二の反応性基が次いで、細胞傷害性化合物と反応することができる。連結部分は、特

50

定の部位での細胞傷害性部分の放出を可能にする化学結合を含有してもよい。好適な化学結合は、当該技術分野で周知であり、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、酸不安定結合、光不安定結合、ペプチダーゼ不安定結合、およびエステラーゼ不安定結合を含む（例えば、米国特許第5,208,020号、同第5,475,092号、同第6,441,163号、同第6,716,821号、同第6,913,748号、同第7,276,497号、同第7,276,499号、同第7,368,565号、同第7,388,026号、および同第7,414,073号を参照されたい）。ジスルフィド結合、チオエーテルおよびペプチダーゼ不安定結合が好ましい。本発明で使用され得る他のリンカーとしては、米国公開第2005/0169933号に記載され、詳述されるものなどの切断不可能なリンカー、または荷電リンカーもしくは親水性リンカーが挙げられ、US 2009/0274713、US 2010/01293140、およびWO 2009/134976に記載され、それらの各々は、参照により本明細書に明示的に組み込まれ、それらの各々は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

10

【0140】

「アミノ酸」という用語は、自然発生的アミノ酸および合成アミノ酸、ならびに自然発生的アミノ酸と類似した様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。自然発生的アミノ酸は、遺伝コードによってコードされるアミノ酸、ならびに後に修飾されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸、セリノシチエン（selinocysteine）、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、自然発生的アミノ酸と同じ基本的化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムに結合された炭素を有する化合物を指す。そのような類似体は、修飾R基（例えば、ノルロイシン）または修飾ペプチド骨格を有するが、自然発生的アミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。特に使用され得る1つのアミノ酸は、アルギニンの誘導体であり、肝臓における尿素の形成に関与するシトルリンである。アミノ酸模倣体とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、自然発生的アミノ酸と類似した様式で機能する化合物を指す。「非天然アミノ酸」という用語は、上述の二十個の自然発生的アミノ酸の「D」立体化学形態を表すことが意図される。非天然アミノ酸という用語は、天然アミノ酸の相同体またはそのD異性体、および天然アミノ酸の合成的に修飾された形態を含むことがさらに理解される。合成的に修飾された形態としては、最大2つの炭素原子だけ短くまたは長くされた側鎖を有するアミノ酸、任意選択的に置換されたアリール基を含むアミノ酸、ハロゲン化基、好ましくはハロゲン化アルキル基およびアリール基を含んだアミノ酸、ならびにN置換アミノ酸、例えば、N-メチルアラニンが挙げられるが、これらに限定されない。アミノ酸またはペプチドは、アミノ酸またはペプチドの末端アミンまたは末端カルボン酸を介して、リンカー／スペーサーまたは細胞結合剤に付着することができる。アミノ酸はまた、システインのチオール基、リジンのイプシロンアミン、またはセリンもしくはトレオニンの側鎖ヒドロキシルなどであるがこれらに限定されない、側鎖反応性基を介して、リンカー／スペーサーまたは細胞結合剤に付着することができる。

20

30

【0141】

実施形態では、アミノ酸は、 $\text{NH}_2 - \text{C}(\text{R}^{\text{aa}}, \text{R}^{\text{aa}}) - \text{C}(=\text{O})\text{OH}$ によって表され、式中、 R^{aa} および R^{aa} は各々独立して、H、1~10個の炭素原子を有する任意選択的に置換された直鎖状、分岐鎖状、もしくは環状のアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルであるか、あるいはRおよびN末端窒素原子と一緒に、複素環（例えば、プロリンにあるような）を形成し得る。「アミノ酸残基」という用語は、 $-\text{NH} - \text{C}(\text{R}^{\text{aa}}, \text{R}^{\text{aa}}) - \text{C}(=\text{O})\text{O}-$ などの、1つの水素原子がアミンから除去される、および／またはヒドロキシル基がアミノ酸のカルボキシ末端から除去されるときに対応する残基を指す。

40

【0142】

本明細書で使用される場合、アミノ酸は、LまたはD異性体であり得る。別段の指定が

50

ない限り、アミノ酸が参照される場合、それは、LもしくはD異性体またはそれらの混合物であり得る。実施形態では、ペプチドがそのアミノ酸配列によって参照される場合、アミノ酸の各々は、別段の指定がない限り、LまたはD異性体であり得る。ペプチド中のアミノ酸のうちの1つがD異性体として指定される場合、他のアミノ酸は、別段の指定がない限り、L異性体である。例えば、ペプチドD-A l a-A l aは、D-A l a-L-A l aを意味する。

【0143】

アミノ酸およびペプチドは、遮断基によって保護され得る。遮断基は、アミノ酸またはペプチドのN末端を望ましくない反応から保護し、薬物-リガンドコンジュゲートの合成中に使用され得る原子または化学的部分である。これは、合成全体を通してN末端に付着したままであるはずであり、その除去を選択的に達成する化学的または他の条件によって、薬物コンジュゲートの合成の完了後に除去されてもよい。N末端保護に好適な遮断基は、ペプチド化学の技術分野で周知である。例示的な遮断基としては、メチルエステル、tert-ブチルエステル、9-フルオレニルメチルカルバメート (Fmoc)、およびカルボベンズオキシ (Cbz) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0144】

「プロテアーゼによって切断可能なペプチド」という用語は、プロテアーゼの切断認識配列を含有するペプチドを指す。本明細書で使用される場合、プロテアーゼは、ペプチド結合を切断することができる酵素である。プロテアーゼの切断認識配列は、タンパク質分解的切断中にプロテアーゼによって認識される特定のアミノ酸配列である。多くのプロテアーゼ切断部位が当該技術分野で既知であり、これらおよび他の切断部位は、リンカー部分に含まれ得る。例えば、Matayoshi et al. Science 247: 954 (1990)、Dunn et al. Meth. Enzymol. 241: 254 (1994)、Seidah et al. Meth. Enzymol. 244: 175 (1994)、Thornberry, Meth. Enzymol. 244: 615 (1994)、Weber et al. Meth. Enzymol. 244: 595 (1994)、Smith et al. Meth. Enzymol. 244: 412 (1994)、Bouvier et al. Meth. Enzymol. 248: 614 (1995) Hardy et al, AMYLOID PROTEIN PRECURSOR IN DEVELOPMENT, AGING, AND ALZHEIMER'S DISEASE, ed. Masters et al. pp. 190-198 (1994) を参照されたい。

【0145】

ペプチド配列は、プロテアーゼによって切断されるその能力に基づいて選択され、その非限定的な例としては、カテプシンB、C、D、H、L、およびS、ならびにフリンが挙げられる。好ましくは、ペプチド配列は、適切な単離プロテアーゼによってインビトロで切断されることが可能であり、これは、当該技術分野で既知のインビトロプロテアーゼ切断アッセイを使用して試験され得る。

【0146】

別の実施形態では、ペプチド配列は、リソソームプロテアーゼによって切断されるその能力に基づいて選択される。リソソームプロテアーゼは、主にリソソーム中に位置するプロテアーゼであるが、エンドソーム中に位置することもできる。リソソームプロテアーゼの例としては、カテプシンB、C、D、H、L、およびS、ならびにフリンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0147】

別の実施形態では、ペプチド配列は、がん性細胞の表面上、または腫瘍細胞の近傍で細胞外に見られるプロテアーゼなど、腫瘍関連プロテアーゼによって切断されるその能力に基づいて選択され、そのようなプロテアーゼの非限定的な例としては、チメットオリゴペプチダーゼ (TOP)、CD10 (ネプリライシン)、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP2またはMMP9など)、II型膜貫通型セリンプロテアーゼ (ヘプシン、テス

10

20

30

40

50

チシン、TMPRSS4、またはマトリプターゼ／MT-SPL)、レグマイン、および以下の参考文献に記載される酵素が挙げられる(Current Topics in Developmental Biology: Cell Surface Proteases, vol. 54 Zucker S. 2003, Boston, MA)。腫瘍関連プロテアーゼによって切断されるペプチドの能力は、当該技術分野で既知のインビトロプロテアーゼ切断アッセイを使用して試験され得る。

【0148】

「カチオン」という用語は、正電荷を有するイオンを指す。カチオンは、一価(例えば、 Na^+ 、 K^+ など)、二価(例えば、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} など)、または多価(例えば、 Al^{3+} など)であり得る。実施形態では、カチオンは、一価である。

【0149】

HER2

HER2は、ヒト上皮細胞成長因子受容体2関連がん遺伝子として識別される典型的な成長因子受容体がん遺伝子のがん遺伝子産物の一つであり、185kDaの分子量を有し、チロシンキナーゼドメインを有する膜貫通型受容体タンパク質である。HER2は、HER1(EGFR、ErbB-1)、HER2(neu、ErbB-2)、HER3(ErbB-3)、およびHER4(ErbB-4)からなるEGFRファミリーのメンバーであり、そのホモ二量体形成または別のEGFR受容体HER1、HER3、またはHER4とのヘテロ二量体形成によって細胞内チロシン残基で自己リン酸化され、それ自体がそのように活性化されることが知られており、それによって正常細胞および腫瘍細胞における細胞増殖、分化、生存において重要な役割を果たす。

【0150】

本発明で使用されるHER2タンパク質としては、ヒトまたは非ヒト哺乳類(ラットまたはマウスなど)のHER2発現細胞から直接精製することができ、または上述の細胞の細胞膜画分を調製して使用することもできる。さらに、HER2は、インビトロ合成または遺伝子工学による宿主細胞での産生によって得ることができる。遺伝子工学では、具体的には、HER2 cDNAを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写および翻訳に必要な酵素、基質およびエネルギー物質を含有する溶液中でHER2タンパク質を合成することにより、あるいは他の原核生物または真核生物の形質転換宿主細胞でHER2を発現させることにより、HER2タンパク質を得ることができる。あるいは、上述の遺伝子操作されたHER2発現細胞、またはHER2を発現する細胞株をHER2タンパク質として使用してもよい。

【0151】

HER2のDNA配列およびアミノ酸配列は、公開データベース上で開示されており、例えば、アクセッション番号M11730(GenBank)、NP_004439.2(NCBI)などを参照可能である。

【0152】

さらに、タンパク質は、HER2の上記いずれかのアミノ酸配列において、一個または数個のアミノ酸が置換、欠失および／または付加されたアミノ酸配列からなり、また、当該タンパク質と同等の生物学的活性を有するタンパク質もHER2に含まれる。

【0153】

ヒトHER2タンパク質は、N末端22アミノ酸残基からなるシグナル配列、630アミノ酸残基からなる細胞外ドメイン、23アミノ酸残基からなる膜貫通ドメイン、および580アミノ酸残基からなる細胞内ドメインからなる。

【0154】

HER2は、乳がん、胃がん、肺がん(例えば、非小細胞肺がん)、および卵巣がんなどの様々ながん型で過剰発現され、乳がんの予後不良因子であると報告されている。

【0155】

抗HER2抗体

抗HER2抗体とは、腫瘍細胞を標的とすることのできる抗体であり、すなわち、腫瘍

10

20

30

40

50

細胞を認識する特性、腫瘍細胞に結合する特性、腫瘍細胞に内在化する特性、腫瘍細胞に対する殺細胞活性などを有する抗体であり、抗腫瘍活性を有する薬剤とリンカーを介してコンジュゲートされ、抗体－薬剤コンジュゲートを形成することができる。本明細書に記載される化合物、組成物、および方法における使用に適した非限定的な抗HER2抗体には、以下の例示的特性のいずれか、またはそれらの任意の組み合わせを有するものが含まれる：

(1) 以下の特性を有する抗HER2抗体：

(a) HER2に特異的に結合し、

(b) HER2に結合することによってHER2発現細胞に内在化する活性を有する。

(2) 上記(1)に記載の抗体は、HER2の細胞外ドメインに結合する。

(3) 上記(1)または(2)に記載の抗体であって、抗体は、モノクローナル抗体である。

(4) 上記(1)～(3)のいずれかに記載の抗体であって、抗体は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性および／または補体依存性細胞傷害(CDC)活性を有する。

(5) 上記(1)～(4)のいずれかに記載の抗体であって、抗体は、マウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体である。

(6) 上記(1)～(5)のいずれかに記載の抗体であって、抗体は、ヒト化モノクローナル抗体である。

【0156】

トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標))は、組換えヒト化抗HER2モノクローナル抗体(huMAb4D5-8、rhumaB HER2)と名付けられたマウス抗HER2抗体4D5のヒト化モノクローナル抗体である。トラスツズマブは、HER2の細胞外ドメインIVに特異的に結合し、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を誘導するか、またはHER2からのシグナル伝達の阻害を介して抗がん効果を発揮する。トラスツズマブはHER2を過剰発現する腫瘍に高い効果を示すため、HER2を過剰発現する転移性乳がん患者の治療薬として1999年に米国で、2001年に日本で発売された。

【0157】

トラスツズマブは乳がんの治療に治療効果があるが、HER2を過剰発現する乳がん患者の一部は、トラスツズマブ治療に対する応答が全くないか、または弱い反応しか示さない。本発明の抗HER2抗体薬物コンジュゲートに使用される抗HER2抗体は、いかなる生物種に由来してもよく、生物種の好ましい例として、ヒト、ラット、マウス、およびウサギが含まれ得る。抗体がヒト種以外に由来する場合、周知の技術を使用してキメラ化またはヒト化されることが好ましい。本発明の抗体は、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もよく、好ましくはモノクローナル抗体である。

【0158】

トラスツズマブは、配列番号1によって表されるアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号2によって表されるアミノ酸配列からなる軽鎖と、を含む。

【0159】

トラスツズマブの重鎖アミノ酸配列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNIDKDTYIHWVRQA
PGKGLEWVARITYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY
LQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVT VSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVT VSS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTCPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLV LHQDWLN GK
EYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDS DGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYT

Q K S L S L S P G K (配列番号 1)

【0160】

トラスツズマブの軽鎖アミノ酸配列：

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q
E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G
L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 2)

【0161】

K a b a t によるトラスツズマブの C D R 配列は：

【表 9】

HCDR1：	G F N I K D T Y I H (配列番号 3)
HCDR2：	R I Y P T N G Y T R Y A D S V K G (配列番号 4)
HCDR3：	W G G D G F Y A M D Y (配列番号 5)
LCDR1：	R A S Q D V N T A V A (配列番号 6)
LCDR2：	S A S F L Y S (配列番号 7)
LCDR3：	Q Q H Y T T P P T (配列番号 8)

【0162】

いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 抗体は、(a) 配列番号 3 のアミノ酸配列、(b) 配列番号 4 のアミノ酸配列、および (c) 配列番号 5 のアミノ酸配列から選択される一つ、二つ、または三つの配列を含む。実施形態では、

【0163】

いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 抗体は、配列番号 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 抗体は、配列番号 2 と少なくとも 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0164】

いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 抗体は、配列番号 1 と少なくとも 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号 2 と少なくとも 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0165】

実施形態では、抗体は、配列番号 1 の配列によって規定される重鎖のカルボキシル末端のリジン残基を欠く。実施形態では、抗体は、配列番号 1 のアミノ酸残基 1 ～ 4 4 9 からなるアミノ酸配列からなる重鎖、および配列番号 2 のアミノ酸残基 1 ～ 2 1 4 からなるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む。

【0166】

いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 抗体は、トラスツズマブである。

【0167】

いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 抗体は、トラスツズマブのバイオシミラーである。本発明の A D C はまた、市販されている、あるいは「イノベーター」抗体構築物と類似性の高い、またはそのバイオシミラーである抗体構築物に対しても有効である。バイオシミラー A D C は、イノベーター製品（例えば、トラスツズマブ）の免疫コンジュゲートと同様の性能を示すことが期待される。本明細書で使用される場合、生物学的製剤に関する「バイオシミラー」という用語は、臨床的に不活性な成分にわずかな差異はあるものの、生物学的製剤が、参照製剤と非常に類似しており、生物学的製剤と参照製剤との間に、製剤の安全性、純度、および効力に関して、臨床的に意義のある差異はないことを意味する。

【0168】

いくつかの実施形態では、抗HER2抗体は、トラスツズマブバイオシミラーである。いくつかの実施形態では、抗HER2トラスツズマブのバイオシミラーは、トラスツズマブ-dkst (Ogivri)、トラスツズマブ-pkrb (Herzuma)、トラスツズマブ-dttb (Ointruzant)、トラスツズマブ-qyp (Trazimera)、およびトラスツズマブ-anns (Kanjinti) からなる群から選択される。

【0169】

他の実施形態では、抗HER2抗体は、トラスツズマブと互換性がある。実施形態では、前述の交換可能な抗HER2抗体は、トラスツズマブのバイオシミラーであり、任意の所与の患者において、トラスツズマブと同じ臨床結果をもたらすことが期待される。

10

【0170】

他の実施形態では、抗HER2抗体は、トラスツズマブのバイオベターである。実施形態では、「バイオベター」生物学的製剤は、FDA承認生物学的製剤と同じクラスであり、参照生物学的製剤と同じ標的タンパク質を対象としているが同一ではなく、参照製剤よりも安全性、有効性、安定性、投与経路などの点で改善されている。

【0171】

抗体の結合および抗腫瘍活性

腫瘍細胞に対する抗体の結合活性は、フローサイトメトリーを使用して確認することができる。腫瘍細胞への抗体の内在化は、(1) 治療用抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を使用して細胞内に取り込まれた抗体を蛍光顕微鏡下で可視化するアッセイ (Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761)、(2) 治療用抗体（蛍光標識）を使用して、細胞内に取り込まれた蛍光強度を測定するアッセイ (Molecular Biology of the Cell, Vol. 15, 5268-5282, December 2004)、または(3) 治療用抗体に結合する免疫毒素を使用したMab-ZAPアッセイであって、毒素が細胞内に取り込まれると放出され、細胞増殖を阻害する、Mab-ZAPアッセイ (Bio Techniques 28: 162-165, January 2000) を使用して確認することができる。免疫毒素としては、ジフテリア毒素触媒ドメインとタンパク質Gの組換え複合タンパク質を使用することができる。

20

【0172】

抗体の抗腫瘍活性は、細胞増殖に対する阻害活性を決定することによってインビトロで確認することができる。例えば、抗体の標的タンパク質を過剰発現するがん細胞株を培養し、抗体を培養系内に様々な濃度で添加して、病巣形成、コロニー形成、およびスフェロイド増殖に対する阻害活性を決定する。抗腫瘍活性は、例えば、標的タンパク質を高度に発現する腫瘍細胞株を移植したヌードマウスに抗体を投与し、がん細胞の変化を測定することによって、インビボで確認することができる。

30

【0173】

抗体-薬物コンジュゲートにコンジュゲートされた化合物は抗腫瘍効果を発揮するため、抗体自体が抗腫瘍効果を有することが好ましいが、必須ではない。腫瘍細胞に対する抗腫瘍化合物の細胞障害活性を特異的かつ選択的に発揮するためには、抗体が腫瘍細胞に内在化して移行する特性を有することが重要であり、また好ましい。

40

【0174】

抗HER2抗体の産生

本発明のHER2に対する抗体は、例えば、HER2またはHER2のアミノ酸配列から選択される任意のポリペプチドで動物を免疫化し、インビボで産生された抗体を回収および精製する、当業者において通常実施されている方法に従って得ることができる。抗原として使用されるHER2の生物学的種はヒトに限定されず、マウスやラットなどヒト以外の動物由来のHER2やラットp185neuで動物を免疫化することができる。この場合、得られた異種HER2に結合する抗体とヒトHER2との交差反応を調べることによって、ヒト疾患に適用可能な抗体を選択することができる。

50

【0175】

さらに、モノクローナル抗体は、HER2に対する抗体を産生する抗体産生細胞と骨髄腫細胞とを公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature, (1975) 256, pp. 495-497; Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, pp. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)）に従って融合させることによって確立されたハイブリドーマから得ることができる。

【0176】

抗原として使用されるHER2は、遺伝子工学を使用して宿主細胞中にHER2遺伝子を発現させることによって得ることができる。具体的には、HER2遺伝子を発現する能力を有するベクターが産生され、得られたベクターが宿主細胞中にトランスフェクトされて遺伝子を発現し、次いで発現されたHER2が精製される。

【0177】

あるいは、上述の遺伝子操作されたHER2発現細胞、またはHER2を発現する細胞株をHER2タンパク質として使用してもよい。抗HER2抗体は、当業者に公知の手順によって得ることができる。以下、HER2に対する抗体を得る方法を具体的に記載する。

【0178】

抗原の調製

抗HER2抗体の作製に使用される抗原の例は、HER2、またはHER2の連続する少なくとも6個のアミノ酸を含む部分アミノ酸配列からなるポリペプチド、または所与のアミノ酸配列もしくはその担体を付加することによって得られる誘導体を含む。

【0179】

HER2は、ヒト腫瘍組織または腫瘍細胞から直接精製され、使用され得る。さらに、HER2は、それをインビトロで合成することによって、または遺伝子工学による宿主細胞で作製することによって得ることができる。

【0180】

遺伝子工学に関しては、具体的には、HER2 cDNAを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写および翻訳に必要な酵素、基質およびエネルギー物質を含有する溶液中でHER2を合成することにより、あるいは他の原核生物または真核生物の形質転換宿主細胞でHER2を発現させることにより、HER2を得ることができる。

【0181】

さらに、膜タンパク質であるHER2の細胞外ドメインを抗体の定常領域にライゲーションすることによって得られる融合タンパク質を適切な宿主ベクター系で発現させることによって、抗原を分泌タンパク質として得ることもできる。

【0182】

HER2 cDNAは、例えば、HER2 cDNAを発現するcDNAライブラリーを鋳型とし、HER2 cDNAを特異的に増幅するプライマーを使用してポリメラーゼ鎖反応を行う、いわゆるPCR法によって得ることができる（PCR; Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, pp. 487-489）。

【0183】

ポリペプチドのインビトロ合成として、例えば、Roche Diagnostics, Inc. によって製造されたRapid Translation System (RTS) を例示することができるが、それに限定されない。

【0184】

原核宿主細胞の例は、大腸菌および枯草菌（Bacillus subtilis）を含む。宿主細胞を標的遺伝子で形質転換するために、宿主細胞はレプリコン、すなわち宿主と適合性のある生物種由来の複製起点と調節配列からなるプラスミドベクターによって形質転換される。さらに、ベクターは、好ましくは、形質転換細胞に表現型選択性を付与できる配列を有する。

10

20

30

40

50

【0185】

真核宿主細胞の例は、脊椎動物細胞、昆虫細胞、および酵母細胞を含む。脊椎動物細胞は、例えば、シミアンCOS細胞（Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650; ATCC: American Type Culture Collection）、マウス線維芽細胞NIH3T3' ATCC No. CRL-1658）、ジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220）のチャイニーズハムスター卵巢細胞（CHO細胞; ATCC: CCL-61）などが用いられることが多いが、細胞はこれらに限定されるものではない。

10

【0186】

このようにして得られた形質転換体は、当業者において通常行われる方法に従って培養することができ、この形質転換体の培養により、目的とするポリペプチドが細胞内または細胞外に産生される。

【0187】

培養に使用される適切な培地は、使用される宿主細胞に応じて、一般的に使用される様々な培養培地から選択することができる。大腸菌が使用される場合、例えば、アンピシリンまたはIPMGなどの抗生物質を必要に応じて添加したLB培地を使用することができる。

【0188】

このような培養によって形質転換体によって細胞内または細胞外的に産生された組換えタンパク質は、タンパク質の物理的または化学的特性を利用した公知の様々な分離方法のいずれかによって分離および精製され得る。

20

【0189】

方法の具体的な例は、一般的なタンパク質沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、および親和性クロマトグラフィーなどの各種液体クロマトグラフィー、透析、ならびにそれらの組み合わせを含む。

【0190】

さらに、六つのヒスチジン残基（配列番号9）のタグを発現させる組換えタンパク質に付着させることによって、タンパク質をニッケル親和性カラムで効率的に精製することができる。あるいは、IgG Fc領域を発現される組換えタンパク質に付着させることによって、タンパク質をタンパク質Aカラムで効率的に精製することができる。

30

【0191】

上述の方法を組み合わせることによって、標的ポリペプチドを、高収率および高純度で大量に容易に作製することができる。

【0192】

上述の形質転換体自体を抗原として使用し得る。HER2を発現する細胞株も、抗原として使用され得る。このような細胞株の例は、ヒト乳がん株SK-BR-3、BT-474、KPL-4、およびJIMT-1、ヒト胃がん株NCI-N87、およびヒト卵巣がん株SK-OV-3を含む。本発明の細胞株は、HER2を発現する限り、これらの細胞株に限定されない。

40

【0193】

抗HER2モノクローナル抗体の作製

HER2に特異的に結合する抗体の例は、HER2に特異的に結合するモノクローナル抗体を含み、このような抗体を得る方法は、以下に記載されるとおりである。

【0194】

モノクローナル抗体の作製は、一般に以下の操作工程を必要とする：

(a) 抗原として使用されるバイオポリマーを精製すること、または抗原発現細胞を調製する工程；

50

- (b) 抗原の注射によって動物を免疫化し、血液を収集し、その抗体価をアッセイして、脾臓の摘出時期を決定することによって、抗体産生細胞を調製する工程；
- (c) 骨髄腫細胞（以下、「骨髄腫」という）を調製する工程；
- (d) 抗体産生細胞を骨髄腫と融合する工程；(e) 所望の抗体を産生するハイブリドーマの群をスクリーニングする工程；
- (f) ハイブリドーマを単一細胞クローンに分割する工程（クローン化）；
- (g) 任意で、ハイブリドーマを培養するか、または大量のモノクローナル抗体を産生させるために、ハイブリドーマを移植した動物を飼育する工程；
- (h) こうして作製されたモノクローナル抗体の生物学的活性および結合特異性を調べる、または標識試薬としての特性について同様にアッセイする工程、など。

10

【0195】

以下、本発明のモノクローナル抗体の作製方法について、上記の工程に従って詳細に説明するが、本発明の方法は、これに限定されるものではなく、例えば、脾臓細胞および骨髄腫以外の抗体産生細胞を使用できる。

【0196】

抗原の精製

抗原として、上述の方法によって調製されたHER2またはその部分ペプチドを使用することができる。

【0197】

さらに、HER2を発現する組換え細胞から調整した膜画分、またはHER2を発現する組換え細胞そのもの、および当業者に公知の方法によって化学合成された本発明のタンパク質の部分ペプチドも、抗原として使用することができる。

20

【0198】

さらに、HER2発現細胞株もまた、抗原として使用され得る。

【0199】

抗体産生細胞の調製

工程(a)で得られた抗原を、フロイント完全アジュバントまたは不完全アジュバントなどのアジュバント、または硫酸アルミニウムカリウムなどの補助剤と混合し、得られた混合物を免疫原として使用して実験動物を免疫化する。別の方法は、抗原発現細胞を免疫原として使用して実験動物を免疫化することを含む。実験動物として、公知のハイブリドーマ作製方法で使用されるいずれかの動物を支障なく使用することができる。具体的には、例えば、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマなどを使用することができる。しかしながら、抽出された抗体産生細胞と融合される骨髄腫細胞の入手の容易さの観点から、免疫化される動物としてマウスまたはラットを使用することが好ましい。

30

【0200】

さらに、使用されるマウスまたはラットの系統は特に限定されず、例えばマウスの場合、例えば、A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BL、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、RII、SJL、SWR、WB、129等の各種系統を使用することができ、ラットの場合、例えば、Wistar、Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer等を使用することができる。

40

【0201】

これらのマウスおよびラットは、例えば、日本クレア株式会社および日本チャールス・リバー株式会社などの実験動物飼育業者／販売代理店から市販されている。

【0202】

免疫化対象動物として、以下に説明する骨髄腫細胞との融合性を考慮すると、マウスの場合、BALB/c系統、およびラットの場合、WistarおよびLow系統が特に好ましい。

【0203】

さらに、ヒトとマウスの抗原相同性を考慮すると、自己抗体を除去する生物学的機能が

50

低下したマウス、すなわち自己免疫疾患を有するマウスを用いることも好ましい。

【0204】

このようなマウスまたはラットの免疫化時の年齢は、好ましくは5～12週齢、より好ましくは6～8週齢である。

【0205】

HER2またはその組換え体で動物を免疫化するために、例えば、Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochimistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Ill. (1964)などに詳細に記載されている公知の方法を使用することができる。

10

【0206】

これらの免疫化方法のうち、本発明における好ましい具体的な方法は、例えば、以下のとおりである。

【0207】

すなわち、まず抗原として機能する膜タンパク質画分または抗原を発現させる細胞の一方または両方が動物の皮内または腹腔内に投与する。しかしながら、免疫効率を高めるためには、両投与経路を併用することが好ましく、皮内投与を前半に行い、腹腔内投与を後半に行う場合、あるいは最終投与時のみに行う場合、特に免疫効率を高めることができる。

20

【0208】

抗原の投与スケジュールは、免疫化対象動物の種類、個体差などに応じて変化する。しかしながら、一般的には、抗原の投与頻度が3～6回、投与間隔が2～6週間である投与スケジュールが好ましく、抗原の投与頻度が3～4回、投与間隔が2～4週間である投与スケジュールがより好ましい。

【0209】

さらに、抗原の用量は、動物の種類、個人差などに応じて変化するが、用量は概して0.05～5mg、好ましくは約0.1～0.5mgに設定される。

【0210】

ブースター免疫は、上述の抗原投与から1～6週間後、好ましくは1～4週間後、より好ましくは1～3週間後に実施される。免疫原が細胞である場合、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞を使用する。

30

【0211】

ブースター免疫実施時の抗原の用量は、動物の種類やサイズなどに応じて変化するが、例えば、マウスの場合、用量は概して0.05～5mg、好ましくは0.1～0.5mg、より好ましくは約0.1～0.2mgに設定される。免疫原が細胞である場合、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞を使用する。

【0212】

抗体産生細胞を含む脾臓細胞またはリンパ球は、ブースター免疫から1～10日後、好ましくは2～5日後、より好ましくは2～3日後に、免疫化動物から無菌的に除去される。この時、抗体価を測定し、抗体価を十分に上昇させた動物を抗体産生細胞の供給源として使用する場合、その後の操作をより効率的に行うことができる。

40

【0213】

ここで使用される抗体価の測定方法の例は、RIA法およびELISA法を含むが、方法はこれらに限定されない。例えば、ELISA法を用いる場合、本発明における抗体価の測定は、以下に記載される手順に従って実施することができる。

【0214】

まず、ELISA用96ウェルプレートなどの固相表面に精製または部分精製した抗原を吸着させ、抗原が吸着していない固相表面をウシ血清アルブミン(BSA)などの抗原

50

とは無関係のタンパク質で覆う。表面を洗浄した後、一次抗体として連続希釈したサンプル（例えばマウス血清）と接触させ、サンプル中の抗体を抗原に結合させる。

【0215】

さらに、二次抗体として、マウス抗体に対して酵素で標識した抗体を加え、マウス抗体に結合させる。洗浄後、酵素の基質を添加し、基質の分解などにより発色して生じる吸光度の変化を測定し、その測定値に基づいて抗体価を算出する。

【0216】

免疫化動物の脾臓細胞またはリンパ球からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法に従って行うことができる（例えば、Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977), 6, p. 511; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550; Walsh, Nature (1977), 266, p. 495）。例えば、脾臓細胞の場合、脾臓をホモジナイズしてステンレスメッシュで濾過して細胞を得、イーグル最小必須培地（MEM）に懸濁して抗体産生細胞を分離する一般的な方法を採用することができる。

【0217】

骨髓腫細胞（以下、「骨髓腫細胞」という）の調製

細胞融合に使用する骨髓腫細胞は、特に限定されず、公知の細胞株から適切な細胞を選択することができる。しかしながら、融合細胞からハイブリドーマを選択する場合の利便性を考慮すると、選択手順が確立されているHGPRT（ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ）欠損株を使用することが望ましい。

【0218】

より具体的には、HGPRT欠損株の例は、マウス由来のX63-Ag8 (X63)、NS1-ANS/1 (NS1)、P3X63-Ag8.U1 (P3U1)、X63-Ag8.653 (X63.653)、SP2/0-Ag14 (SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7 (45.6TG)、FO、S149/5XXO、およびBU.1、ラット由来の210.RSY3.Ag.1.2.3 (Y3)、ならびにヒト由来のU266AR (SKO-007)、GM1500.GTG-A12 (GM1500)、UC729-6, LICR-LOW-HMy2 (HMy2) および8226AR/NIP4-1 (NP41)を含む。これらのHGPRT欠損株は、例えば、ATCCなどから入手可能である。

【0219】

これらの細胞株は、8-アザグアニン培地〔グルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシンおよびウシ胎児血清（以下「FCS」という）を添加したRPMI1640培地に8-アザグアニンを添加して得られる培地〕、Iscove's Modified Dulbecco's Medium（以下、「IMDM」）、またはDulbecco's Modified Medium（以下、「DMEM」）などの適切な培地で継代培養される。この場合、細胞融合を行う3～4日前に、細胞融合当日に 2×10^7 細胞以上となるように、通常の培地（例えば、10%のFCSを含有するASF104培地（味の素株式会社が製造））中で細胞の継代培養を行う。

【0220】

細胞融合

抗体産生細胞と骨髓腫細胞との融合は、公知の方法（Weir, D. M. Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. I II., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochimistry, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Ill. (1964) など）に従って、細胞の生存率が過度に低下しないような条件下で行うことができる。

【0221】

このような方法として、例えば、ポリエチレングリコールなどのポリマーを高濃度で含む溶液中で抗体産生細胞と骨髄腫細胞を混合する化学的方法、電気刺激を用いる物理的方法などを用いることができる。これらの方法の中で、化学的方法の具体的な例は以下に記載する通りである。

【0222】

すなわち、高濃度でポリマーを含有する溶液にポリエチレングリコールを用いる場合、分子量1500～6000、より好ましくは2000～4000のポリエチレングリコールの溶液中で抗体産生細胞と骨髄腫細胞を30～40℃、好ましくは35～38℃の温度で1～10分間、好ましくは5～8分間混合する。

【0223】

ハイブリドーマ群の選択

上述の細胞融合によって得られたハイブリドーマを選択する方法は、特に限定されない。通常、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）選択法（Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550）が使用される。

【0224】

この方法は、アミノプテリンの存在下で生存できないHGPRT欠損株の骨髄腫細胞を使用してハイブリドーマを得る場合に有効である。すなわち、未融合細胞とハイブリドーマをHAT培地で培養することによって、アミノプテリンに耐性のあるハイブリドーマのみが選択的に生存し増殖することが許容される。

【0225】

単一細胞クローンへの分割（クローニング）

ハイブリドーマのクローニング法として、メチルセルロース法、ソフトアガロース法、または限界希釈法などの公知の方法を使用することができる（例えば、Barbara, B. M. and Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)を参照のこと）。これらの方法の中で、特に、メチルセルロース法などの三次元培養法が好ましい。例えば、細胞融合によって産生されるハイブリドーマの群を、ClonaCell-HY Selection Medium D (StemCell Technologies, Inc., #03804による製造)などのメチルセルロース培地に懸濁し、培養する。その後、形成されたハイブリドーマコロニーを収集し、それによりモノクローナルハイブリドーマを得ることができる。収集したそれぞれのハイブリドーマコロニーを培養し、得られたハイブリドーマ培養上清において安定した抗体価を有することが確認されたハイブリドーマを、HER2モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【0226】

ハイブリドーマの培養によるモノクローナル抗体の調製

こうして選択されたハイブリドーマを培養することによって、モノクローナル抗体を効率的に得ることができる。しかしながら、培養前に、標的モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングを行うことが好ましい。

【0227】

こうしたスクリーニングでは、公知の方法を採用することができる。本発明における抗体価の測定は、例えば、上述の項目（b）で説明したELISA法によって実施することができる。上述の方法によって得られたハイブリドーマは、液体窒素中、または-80℃以下のフリーザー中で凍結状態で保存することができる。クローニング終了後、培地をHT培地から通常培地に変更し、ハイブリドーマを培養する。

【0228】

大規模な培養は、大型培養ボトルを使用した回転培養またはスピナー培養によって行われる。大規模な培養によって得られた上清から、本発明のタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体は、ゲル濾過などの当業者に公知の方法を使用して精製することによ

10

20

30

40

50

って得ることができる。

【0229】

さらに、ハイブリドーマは、ハイブリドーマと同系統のマウス（例えば、上述のBALB/c）またはNu/Nuマウスの腹腔内に注入してハイブリドーマを増殖させることにより、本発明のモノクローナル抗体を大量に含有する腹水を得ることができる。

【0230】

ハイブリドーマを腹腔内に投与する場合、その3～7日前に2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン（プリスタン）などの鉱油を投与すると、大量の腹水を得ることができる。

【0231】

例えば、ハイブリドーマと同じ系統のマウスの腹腔内に免疫抑制剤を事前に注射し、T細胞を不活化させる。20日後、 $10^6 \sim 10^7$ 個のハイブリドーマクローン細胞を無血清培地（0.5 ml）に懸濁し、懸濁液をマウスの腹腔内に投与する。一般に、腹部が膨張して腹水で満たされると、マウスから腹水が採取される。この方法によって、モノクローナル抗体は、培養液の約100倍またはそれ以上の濃度で得ることができる。

【0232】

上述の方法によって得られたモノクローナル抗体は、例えば、Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)に記載された方法によって精製することができる。

【0233】

こうして得られたモノクローナル抗体は、HER2に対して高い抗原特異性を有する。本発明のモノクローナル抗体の例は、マウスモノクローナル抗体4D5（ATCC CRL 10463）を含むことができるが、これに限定されない。

【0234】

モノクローナル抗体のアッセイ

こうして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプとサブクラスは、以下のように決定することができる。

【0235】

まず、同定法の例は、Ouchterlony法、ELISA法、およびRIA法を含む。

【0236】

Ouchterlony法は簡単であるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合、濃縮操作が必要である。

【0237】

一方、ELISA法またはRIA法を使用する場合、培養上清を抗原吸着固相と直接反応させ、各種免疫グロブリンアイソタイプおよびサブクラスに対応する抗体を二次抗体として使用することによって、モノクローナル抗体のアイソタイプおよびサブクラスを同定することができる。

【0238】

さらに、より簡単な方法として、市販の同定キット（例えば、Bio-Rad Laboratories, Inc.製のMouse Typer Kit）なども使用され得る。

【0239】

さらに、タンパク質の定量は、Folin Lowry法および280 nmの吸光度（ $1.4 (OD_{280}) = \text{イムノグロブリン } 1 \text{ mg/ml}$ ）に基づく計算法により行うことができる。

【0240】

さらに、(2)の(a)～(h)の工程を再度行うことによって、モノクローナル抗体を別途独立して得る場合であっても、(g)の工程で得られたHER2抗体と同等の細胞

10

20

30

40

50

障害活性を有する抗体を得ることが可能である。このような抗体の一例として、(g)の工程で得られたHER2抗体と同じエピトープに結合する抗体を例示することができる。新たに産生されたモノクローナル抗体が抗HER2抗体が結合する部分ペプチドまたは部分三次構造に結合する場合、モノクローナル抗体が抗HER2抗体と同じエピトープに結合すると判定することができる。さらに、モノクローナル抗体が、抗HER2抗体とHER2の結合を競合すること（すなわち、モノクローナル抗体が抗HER2抗体とHER2の結合を阻害すること）を確認することによって、特定のエピトープ配列または構造が決定されていない場合でも、モノクローナル抗体が、抗HER2抗体と同じエピトープに結合することを決定することができる。モノクローナル抗体が抗HER2抗体と同じエピトープに結合することが確認されると、モノクローナル抗体は、抗HER2抗体と同等の抗原結合親和性または生物学的活性を有することが強く期待される。

10

【0241】

その他の抗体

本発明の抗体は、上記のHER2に対するモノクローナル抗体だけでなく、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体などのヒトに対する異種抗原性を低下させる目的で人為的な改変によって得られる組換え抗体も含む。これらの抗体は、公知の方法を使用して作製することができる。

【0242】

キメラ抗体として、抗体可変領域および抗体定常領域が異なる生物種に由来する抗体、例えば、マウスまたはラット由来抗体可変領域とヒト由来抗体定常領域が連結したキメラ抗体を例示することができる（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984) 参照）。本発明のキメラ抗体の例は、ヒトIgG1またはIgG2の重鎖定常領域を含むキメラ抗体4D5を含むが、これらに限定されない。

20

【0243】

ヒト化抗体として、ヒト由来抗体に相補性決定領域(CDR)のみを組み込んで得られる抗体（Nature (1986) 321, pp. 522-525 参照）、CDRグラフトリング法（WO90/07861）によりCDR配列のみならずフレームワークのアミノ酸残基の一部をヒト抗体にグラフトして得られる抗体、遺伝子変換変異誘発戦略（U.S. Pat. No. 5, 821, 337）を用いてヒト化抗体などを例示することができる。

30

【0244】

本明細書で使用される場合、用語「いくつかの」は、1~10、1~9、1~8、1~7、1~6、1~5、1~4、1~3、または1または2を指す。

【0245】

本明細書におけるアミノ酸置換として、保存的アミノ酸置換が好ましい。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸側鎖に関連するアミノ酸グループ内で起こる置換を指す。好ましいアミノ酸基は以下の通りである：酸性基（アスパラギン酸およびグルタミン酸）、塩基性基（リジン、アルギニン、およびヒスチジン）、非極性基（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、およびトリプトファン）、ならびに非荷電極性ファミリー（グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、およびチロシン）。より好ましいアミノ酸基は以下の通りである：脂肪族ヒドロキシ基（セリンおよびスレオニン）、アミド含有基（アスパラギンおよびグルタミン）、脂肪族基（アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン）、ならびに芳香族基（フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシン）。こうしたアミノ酸置換は、元のアミノ酸配列を有する物質の特性を損なわない範囲で行われることが好ましい。

40

【0246】

上記の重鎖アミノ酸配列と高い相同性を有する配列と、上記の軽鎖アミノ酸配列と高い相同性を有する配列とを組み合わせることによって、上記の各抗体と同等の生物活性を有する抗体を選択することができる。このような相同性は、一般に、80%以上の相同性、好ましくは90%以上の相同性、より好ましくは95%以上の相同性、最も好ましくは9

50

9%以上の相同性である。さらに、重鎖または軽鎖アミノ酸配列において、一個から数個のアミノ酸残基が置換、欠失または付加されたアミノ酸配列を組み合わせることにより、上記の各抗体と同等の生物学的活性を有する抗体を選択することも可能である。本明細書で使用される場合、用語「相同性」は、「同一性」と同じ意味で使用される。

【0247】

二つのアミノ酸配列間の相同性は、Blastアルゴリズムバージョン2.2.2のデフォルトパラメータを使用して決定することができる。(ltschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) Blastアルゴリズムはまた、サイト:www.ncbi.nlm.nih.gov/bblastにアクセスすることによってインターネットを介して使用することができる。

10

【0248】

さらに、本発明の抗体は、HER2に結合するヒト抗体を含む。抗HER2ヒト抗体は、ヒト染色体に由来する抗体の配列のみを有するヒト抗体を指す。抗HER2ヒト抗体は、ヒト抗体の重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを使用する方法によって得ることができる(Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, pp. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nucl. Acids Res. (1998) 26, pp. 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, pp. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, pp. 722-727, etc. 参照)。

20

【0249】

このようなヒト抗体産生マウスは、具体的には以下のように作製することができる。ノックアウト動物とトランスジェニック動物を作製し、これらを交配させることにより、内因性免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子座を破壊し、代わりにヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子座を酵母人工染色体(YAC)ベクター等を介して導入した遺伝子改変動物を作製する。

30

【0250】

さらに、組換えDNA技術によれば、このようなヒト抗体の重鎖および軽鎖の各々をコードするcDNA、好ましくは、このようなcDNAを含むベクターを使用して真核細胞を形質転換し、組換えヒトモノクローナル抗体を産生する形質転換細胞を培養することにより、抗体を培養上清からも得ることができる。

【0251】

ここで、宿主として、例えば真核細胞として、好ましくは、CHO細胞、リンパ球、または骨髓腫細胞などの哺乳類細胞が使用され得る。

40

【0252】

さらに、ヒト抗体ライブラリーから選択されるファージディスプレイ由来のヒト抗体を得る方法(see Wormstone, I. M. et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), pp. 2301-2308; Carmen, S. et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), pp. 189-203; Siriwardena, D. et al., Ophthalmology (2002) 109 (3), pp. 427-

50

431, etc. 参照) もまた公知である。

【0253】

例えば、ヒト抗体の可変領域を単鎖抗体 (s c F v) としてファージ表面上に発現させ、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法 (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), pp. 1105-1116) を使用することができる。

【0254】

抗原との結合に基づいて選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。

【0255】

抗原に結合するs c F vのDNA配列が決定されていれば、その配列からなる発現ベクターを調製し、適切な宿主に導入して発現させることにより、ヒト抗体を得ることができる (WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO95/01438、WO95/15388; Annu. Rev. Immunol. (1994) 12, pp. 433-455, Nature Biotechnology (2005) 23 (9), pp. 1105-1116 参照)。

【0256】

抗体の特性の比較に使用するための別の指標の一例として、抗体の安定性を例示することができる。示差走査熱量計 (DSC) は、タンパク質の相対的構造安定性の好ましい指標として使用される熱変性中間点温度 (T_m) を迅速かつ正確に測定することができる装置である。DSCを使用してT_m値を測定し、値を比較することによって、熱安定性の差異を比較することができる。抗体の貯蔵安定性は、抗体の熱安定性とある程度の相関を示すことが知られており (Lori Burton, et al., Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, pp. 265-273)、好ましい抗体は、熱安定性を指標として使用することによって選択することができる。抗体を選択するための他の指標の例としては、適切な宿主細胞での収率が高いこと、水溶液中での凝集性が低いことなどが挙げられる。例えば、最も高い収率を示す抗体が、常に最高の熱安定性を示すとは限らないため、上記のような指標に基づいて総合的に評価を行うことによって、ヒトへの投与に最適な抗体を選択する必要がある。

【0257】

本発明では、抗体の改変バリエーションも含まれる。改変バリエーションは、本発明の抗体を化学的または生物学的改変に供することによって得られるバリエーションを指す。化学的に改変されたバリエーションの例としては、化学的部分をアミノ酸骨格に連結することによって化学的に改変されたバリエーション、N-結合型またはO-結合型の炭水化物鎖で化学的に改変されたバリエーションなどが挙げられる。生物学的に改変されたバリエーションの例としては、翻訳後改変 (N-結合またはO-結合グリコシル化、N末端またはC末端プロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、またはメチオニンの酸化など) によって得られたバリエーション、および原核宿主細胞中で発現されることによってメチオニン残基がN末端に付加されたバリエーションが挙げられる。さらに、本発明の抗体または抗原の検出または単離を可能にするように標識された抗体、例えば、酵素標識抗体、蛍光標識抗体、および親和性標識抗体も、改変バリエーションの意味に含まれる。このような本発明の抗体の改変バリエーションは、抗体の安定性および血中滞留性の向上、抗原性の低減、抗体や抗原の検出または単離などに有用である。

【0258】

さらに、本発明の抗体 (グリコシル化、デフコシル化など) に連結されたグリカンの改変を制御することによって、抗体依存性細胞傷害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖の改変を制御する技術として、WO99/54342、WO00/61739、WO02/31140などが公知である。しかしながら、技術はそれに限定されるものでは

ない。本発明の抗体には、糖鎖の改変が調節された抗体も含まれる。

【0259】

抗体遺伝子を最初に単離し、次いで適切な宿主に遺伝子を導入して抗体を作製する場合、適切な宿主と適切な発現ベクターとの組み合わせが使用され得る。抗体遺伝子の具体例は、本明細書に記述された抗体の重鎖配列をコードする遺伝子と、その軽鎖配列をコードする遺伝子との組合せを含む。宿主細胞を形質転換する場合、重鎖配列遺伝子と軽鎖配列遺伝子を同じ発現ベクター内、また異なる発現ベクター内に別々に挿入することもできる。

【0260】

真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、および真核微生物を使用することができる。動物細胞としては、哺乳類動物細胞、例えば、シミアンCOS細胞（Gluzman, Y, Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650）、マウス線維芽細胞NIH3T3（ATCC No. CRL-1658）、ジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220）のチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞；ATCC：CCL-61）が例示できる。原核細胞を使用する場合、例えば、大腸菌および枯草菌を例示できる。

10

【0261】

形質転換を介して所望の抗体遺伝子をこれらの細胞に導入し、こうして形質転換された細胞をインビトロで培養することによって、抗体を得ることができる。上記の培養法では、抗体の塩基配列によって収率が異なる場合があるため、同等の結合活性を有する抗体の中から収率を指標として医薬品として製造しやすい抗体を選択することができる。したがって、本発明の抗体では、形質転換宿主細胞を培養する工程、および培養工程で得られた培養物から所望の抗体を採取する工程を含むことを特徴とする、抗体を作製する方法によって得られる抗体も含まれる。

20

【0262】

培養哺乳類細胞で産生された抗体の重鎖のカルボキシル末端のリジン残基は欠失していることが知られており（Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)）、培養哺乳類細胞で産生された抗体の重鎖のカルボキシル末端の二つのアミノ酸残基（グリシンおよびリジン）が欠失しており、カルボキシル末端に新たに位置するプロリン残基がアミド化していることも知られている（Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)）。しかしながら、このような重鎖配列の欠失および改変は、抗体の抗原結合親和性およびエフェクター機能（補体の活性化、抗体依存性細胞傷害など）に影響を与えない。したがって、本発明による抗体には、このような改変を施した抗体およびその機能性断片も含まれ、重鎖のカルボキシル末端のアミノ酸が一個または二個欠失した欠失バリエーション、欠失バリエーションをアミド化して得られるバリエーション（例えば、カルボキシル末端プロリン残基がアミド化された重鎖）も含まれる。本発明による抗体の重鎖のカルボキシル末端に欠失を有する欠失バリエーションの種類は、抗原結合親和性とエフェクター機能が保存されている限り、上記のバリエーションに限定されない。本発明による抗体を構成する二つの重鎖は、全長重鎖および上記の欠失バリエーションからなる群から選択される一つの型であってもよく、またはそれらから選択される二つの型の組み合わせであってもよい。各欠失バリエーションの量の比率は、本発明による抗体を産生する培養哺乳類細胞の種類や培養条件によって影響され得るが、本発明による抗体の主要成分として含有される二つの重鎖の両方においてカルボキシル末端のアミノ酸残基が一つ欠失している場合を例示することができる。

30

40

【0263】

本発明の抗体のアイソタイプとして、例えば、IgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）を例示することができ、IgG1またはIgG2を例示することが好ましい。

50

【0264】

抗体の生物学的活性としては、一般に、抗原結合活性、抗原に結合して抗原を発現する細胞で内在化する活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を強化する活性、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性、補体依存性細胞傷害（CDC）活性、および抗体依存性細胞媒介性貪食（ADCP）などを例示することができる。本発明の抗体の生物学的活性は、HER2に対する結合活性であり、好ましくは、HER2に結合してHER2発現細胞に内在化する活性である。さらに、本発明の抗体は、細胞内に内在化する活性に加え、ADCC活性、CDC活性、および／またはADCP活性を有してもよい。

【0265】

得られた抗体は、均質になるまで精製することができる。抗体の分離および精製は、通常のタンパク質分離および精製法を使用して行うことができる。例えば、抗体は、カラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩沈殿、透析、分取ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動などを適切に選択し、組み合わせることによって分離および精製することができる（Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))が、この方法はそれに限定されるものではない。

【0266】

このようなクロマトグラフィーの例としては、親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、および吸着クロマトグラフィーが挙げられる。このようなクロマトグラフィーは、HPLCまたはFPLCなどの液体クロマトグラフィーを使用して行うことができる。

【0267】

親和性クロマトグラフィーで使用されるカラムとして、タンパク質Aカラムおよびタンパク質Gカラムを例示することができる。例えば、タンパク質Aカラムを使用するカラムとして、Hyper D、POROS、Sephacrose FF (Pharmacia Corporation) 等を挙げるすることができる。

【0268】

さらに、抗原を固定化した担体を使用することにより、抗原に対する抗体の結合特性を利用して抗体を精製することもできる。

【0269】

抗HER2抗体を含む抗体-薬剤コンジュゲート

いくつかの態様では、本発明は、細胞結合剤（例えば、本明細書に記載の抗HER2抗体）およびカンプトテシン誘導体を含むコンジュゲートを特徴とする。

【0270】

実施形態では、抗HER2抗体（例えば、トラスツズマブ）へのコンジュゲーションに適した化合物は、2020年2月25日に出願された米国仮特許出願第62/981,197号に記載される化合物を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例えば、好適な化合物は、USN62/981,197に記載される式(I)、(II)、および(III)の化合物を含む。

【0271】

なおさらなる態様では、本発明は、式(PL-A')の化合物、 $\{D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'\}_p-C(PL-A')$ 、またはその薬学的に許容される塩を特徴とし、式中、Dは、以下の構造式によって表され：

10

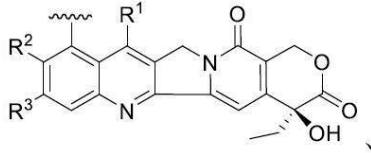
20

30

40

50

【化 2 3】



式中、

R^1 は独立して、 $-H$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_2-C_6 アルキニル、シリル、 C_3-C_6 シクロアルキル、 C_1-C_6 ハロゲン化アルキル、 C_2-C_6 ハロゲン化アルケニル、または C_2-C_6 ハロゲン化アルキニルであり、

R^2 は独立して、 $-H$ 、 $-F$ 、 $-N(R^4)_2$ 、 $-N(R^4)(R^5)$ 、 $-OR^4$ 、 $-SR^4$ 、 $-S(=O)R^5$ 、 $-SO_2R^5$ 、 C_1-C_6 アルキル、もしくは C_1-C_6 フルオロアルキルであり、 R^3 は、 $-H$ 、 $-F$ 、 $-CN$ 、 $-OCH_3$ 、 $-CH_3$ 、もしくは $-CF_3$ であるか、または R^2 および R^3 は一緒に、式 $-O(CH_2)_nO-$ もしくは $-O(CF_2)_nO-$ の基を形成し、式中、 n は、1 もしくは 2 であり、

R^4 は独立して、 $-H$ または C_1-C_4 アルキルであり、

R^5 は独立して、 C_1-C_4 アルキルであり、

L_1 は独立して、存在しないか、または $-(C_1-C_{10} \text{ アルキレン})-$ であり、

L_2 は独立して、存在しないか、または $-OCH_2-L_3-*$ 、 $-SCH_2-L_3-*$ 、 $-S(=O)-L_3-*$ 、 $-SO_2-L_3-*$ 、 $-C(=O)-L_3-*$ 、 $-N(R^6)CH_2-L_3-*$ 、 $-N(R^6)C(=O)-L_3-*$ 、 $-N(R^6)C(=O)N(R^7)-L_3-*$ 、 $-C(=O)N(R^6)CH_2-L_3-*$ 、 $-OC(=O)N(R^6)CH_2-L_3-*$ 、もしくは $-N(R^6)C(=O)OCH_2-L_3-*$ であり、式中、 $*$ は、 Q' に共有結合された部位を示し、

L_3 は独立して、 $-(C_1-C_{10} \text{ アルキレン})-$ 、 $-CH_2OCH_2CH_2-$ 、または $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$ であり、

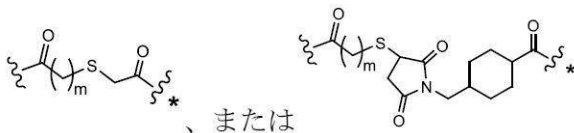
各 R^6 および R^7 は独立して、 $-H$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_1-C_6 フルオロアルキル、 C_3-C_6 シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、またはベンジルであり、

Q' は、 $-O-$ または $-S-$ であり、

E は、2～10 個のアミノ酸を含むペプチドであり、式中、 E は、一つ以上のポリオールで任意選択的に置換され、ペプチドの N 末端は、 Z' に共有結合しており、

Z' は、 $-C(=O)-L_4-Y'$ 、

【化 2 4】



、または

であり、式中、 m は、1～10 の整数を表し、 $*$ は、当該 C に共有結合された部位を示し、

L_4 は、 $-(C_1-C_{10} \text{ アルキレン})-$ 、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nN(R^8)C(=O)-L_5-*$ 、または $-CH_2(OCH_2CH_2)_nN(R^8)C(=O)-L_5-*$ であり、式中、 n は、1～10 の整数を表し、式中、 $*$ は、 Y' に共有結合された部位を示し、

L_5 は、 $-(C_1-C_{10} \text{ アルキレン})-$ であり、

R^8 は、 $-H$ または $-CH_3$ であり、

C は、細胞結合剤を表し、

Y' は、当該細胞結合剤上に存在する反応性求核基との求電子基の反応によって形成される基であり、

式中、 R^2 および R^3 が結合して $-OCH_2O-$ を形成する場合、 R^1 は、 $-CH_2CH$

$2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ではなく、
pは、1～18の値を有する。

【0272】

式(PL-A')の例示的化合物は、本明細書に記載されるMB-2aおよびMB-3a(トラスツズマブメディカン)などの式(PL-A)の化合物を含む。

【0273】

実施形態では、 L_4 は、 $-(C_1-C_{10}\text{アルキレン})-$ である。

【0274】

実施形態では、 L_4 は、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{R}^8)\text{C}(=\text{O})-\text{L}_5-\ast$ または $-\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{R}^8)\text{C}(=\text{O})-\text{L}_5-\ast$ であり、式中、nは、1～10の整数を表し、式中、 $\ast$ は、 Y' に共有結合された部位を示す。

10

【0275】

実施形態では、 L_4 は、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\ast$ 、または $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\ast$ であり、式中、 $\ast$ は、 Y' に共有結合された部位を示す。

【0276】

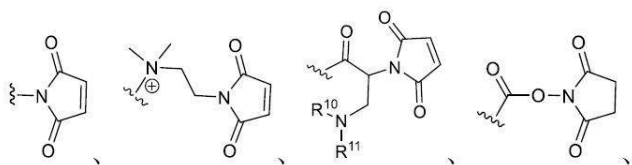
実施形態では、 Y' は、マイケルアクセプター基、スクシンイミド、エポキシド、またはハロゲンから形成される。

【0277】

20

実施形態では、 Y' は、以下から形成され、

【化25】



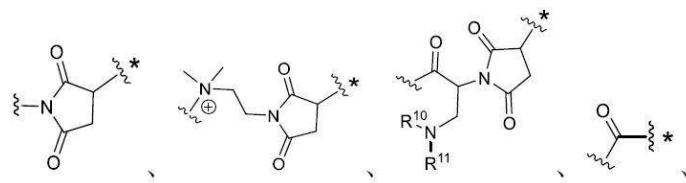
式中、 R^{10} および R^{11} は各々独立して、 $-\text{H}$ または C_1-C_3 アルキルである。

【0278】

実施形態では、 Y' は、

30

【化26】



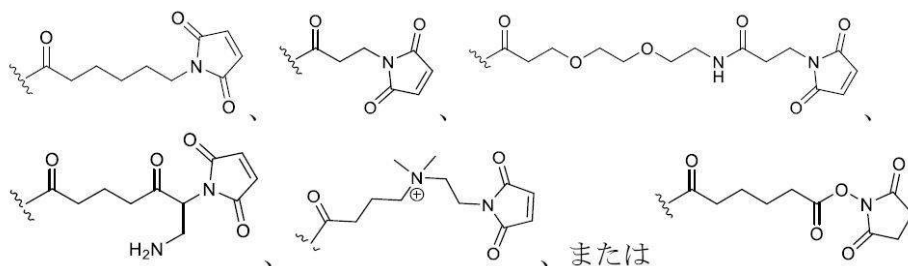
であり、式中、 R^{10} および R^{11} は各々独立して、 $-\text{H}$ または C_1-C_3 アルキルであり、 $\ast$ は、当該Cに共有結合された部位を示す。

【0279】

40

実施形態では、 Z' は、以下から形成される。

【化27】

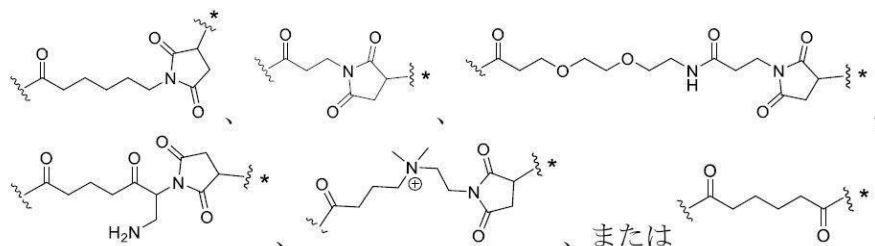


50

【0280】

実施形態では、Z' は、

【化28】



10

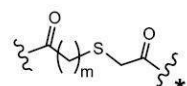
であり、

式中、*は、Cに共有結合された部位を示す。

【0281】

実施形態では、Z' は

【化29】



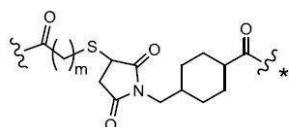
20

であり、式中、*は、当該Cに共有結合された部位を示す。実施形態では、mは、1である。実施形態では、mは、2である。実施形態では、mは、3である。実施形態では、mは、4である。実施形態では、mは、5である。実施形態では、mは、6である。実施形態では、mは、7である。実施形態では、mは、8である。実施形態では、mは、9である。実施形態では、mは、10である。

【0282】

実施形態では、Z' は

【化30】



30

であり、式中、*は、当該Cに共有結合された部位を示す。実施形態では、mは、1である。実施形態では、mは、2である。実施形態では、mは、3である。実施形態では、mは、4である。実施形態では、mは、5である。実施形態では、mは、6である。実施形態では、mは、7である。実施形態では、mは、8である。実施形態では、mは、9である。実施形態では、mは、10である。

【0283】

実施形態では、Eは、2つ、3つ、または4つのアミノ酸のペプチドである。前述のペプチド中の各アミノ酸が、Lアミノ酸であるか、または前述のペプチド中の少なくとも一つのアミノ酸が、Dアミノ酸である。

40

【0284】

実施形態では、Eは、グリシン、アラニン、バリン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、およびロイシンから選択される一つ以上のアミノ酸を含み、当該グルタミンまたはグルタミン酸は、ポリオールによって任意選択的に置換される。

【0285】

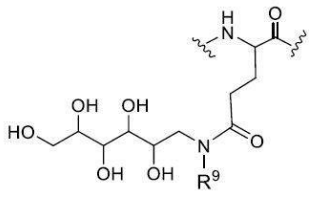
実施形態では、Eは、グリシン、アラニン、バリン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、およびロイシンから選択されるアミノ酸を含み、当該グルタミンまたはグルタミン酸は、ポリオールによって任意選択的に置換される。

50

【0286】

実施形態では、Eは、以下の構造を有するアミノ酸を含み、

【化31】

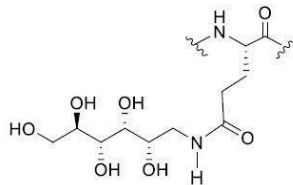


式中、 R^9 は、 $-H$ または C_1-C_6 アルキルである。

【0287】

実施形態では、Eは、以下の構造を有するアミノ酸を含む。

【化32】



【0288】

実施形態では、Eは、 $-Ala-Val-*$ 、 $-Val-Ala-*$ 、 $-Gly-Gly-*$ 、 $-Val-Cit-*$ 、 $-Cit-Val-*$ 、 $-Leu-Ala-*$ 、 $-Ala-Leu-*$ 、 $-Leu-Cit-*$ 、 $-Cit-Leu-*$ 、 $-Leu-Ala-*$ 、 $-Ala-Leu-*$ 、 $-Lys-Lys-*$ 、 $-Ala-Lys-*$ 、 $-Lys-Ala-*$ 、 $-Val-Lys-*$ 、 $-Lys-Val-*$ 、 $-Tyr-Arg-*$ 、 $-Arg-Tyr-*$ 、 $-Arg-Arg-*$ 、 $-Ala-Ala-*$ 、 $-Phe-Lys-*$ 、 $-Lys-Phe-*$ 、 $-Thr-Thr-*$ 、 $-Thr-Met-*$ 、 $-Met-Thr-*$ 、 $-Met-Tyr-*$ 、 $-Tyr-Met-*$ 、 $-Phe-Gln-*$ 、 $-Gln-Phe-*$ 、 $-Gly-Ser-*$ 、 $-Leu-Gln-*$ 、 $-Gln-Leu-*$ 、 $-Ser-Ala-*$ 、 $-Ser-Gly-*$ 、 $-Val-Thr-*$ 、 $-Thr-Val-*$ 、 $-Val-Gln-*$ 、 $-Ser-Val-*$ 、 $-Val-Ser-*$ 、 $-Ala-Met-*$ 、 $-Met-Ala-*$ 、 $-Val-Arg-*$ 、 $-Arg-Val-*$ 、 $-Phe-Ala-*$ 、 $-Ala-Phe-*$ 、 $-Cit-Val-*$ 、 $-Gln-Val-*$ 、 $-Phe-Arg-*$ 、 $-Arg-Phe-*$ 、 $-Ala-Ala-Ala-*$ 、 $-Gly-Gly-Gly-*$ 、 $-Ala-Val-Ala-*$ 、 $-Gly-Val-Gly-*$ 、 $-Ala-Val-Gly-*$ 、 $-Gly-Phe-Lys-*$ 、 $-Lys-Phe-Gly-*$ 、 $-Leu-Ala-Leu-*$ 、 $-Val-Ala-Leu-*$ 、 $-Leu-Ala-Val-*$ 、 $-Val-Ala-Val-*$ 、 $-Ala-Val-Ala-Gly-*$ （配列番号10）、 $-Gly-Phe-Gly-Gly-*$ （配列番号11）、 $-Gly-Gly-Phe-Gly-*$ （配列番号12）、 $-Ala-Val-Gly-Gly-*$ （配列番号13）、 $-Ala-Ala-Ala-Ala-*$ （配列番号14）、 $-Ala-Val-Ala-Ala-*$ （配列番号15）、 $-Ala-Leu-Ala-Leu-*$ （配列番号16）、 $-Leu-Ala-Leu-Ala-*$ （配列番号17）、 $-Gly-Phe-Leu-Gly-*$ （配列番号18）および $-Gly-Leu-Phe-Gly-*$ （配列番号19）、からなる群から選択され、式中、 $*$ は、 Z' に共有結合したペプチドのN末端を示す。

【0289】

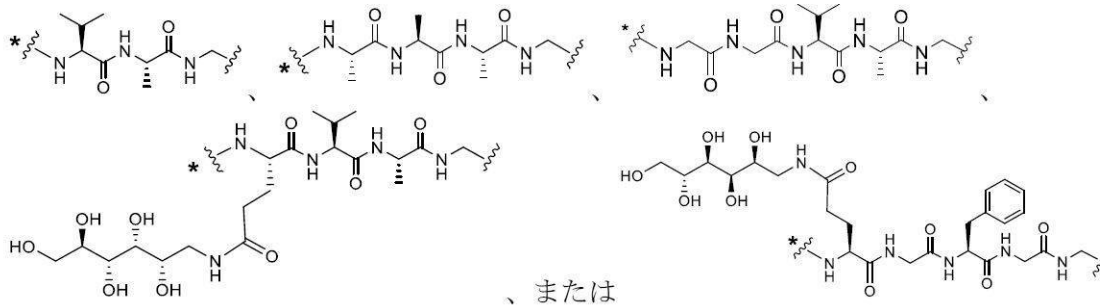
実施形態では、Eは、 $-L-Ala-D-Val-*$ 、 $-L-Val-D-Ala-*$ 、 $-L-Val-D-Lys-*$ 、 $-L-Val-D-Arg-*$ 、 $-L-Val-D-Cit-*$ 、 $-L-Val-D-Arg-*$ 、 $-L-Val-D-Cit-*$ 、 $-L-V$

a l-D-Lys-*, -L-Val-D-Arg-*, -L-Arg-D-Arg-*,
 -, -L-Ala-D-Ala-*, -L-Ala-D-Lys-*, -L-Ala-D-Arg-*,
 -, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Val-L-Ala-*,
 -, -L-Ala-D-Ala-Gly-*, および -L-Ala-D-Val-Gly-
 * からなる群から選択され、式中、*は、Z' に共有結合したペプチドのN末端を示す。

【0290】

実施形態では、-E-NH-CH₂-は、以下の構造のうちの一つを有し、式中、*は、Z' に共有結合したペプチドのN末端を示す。

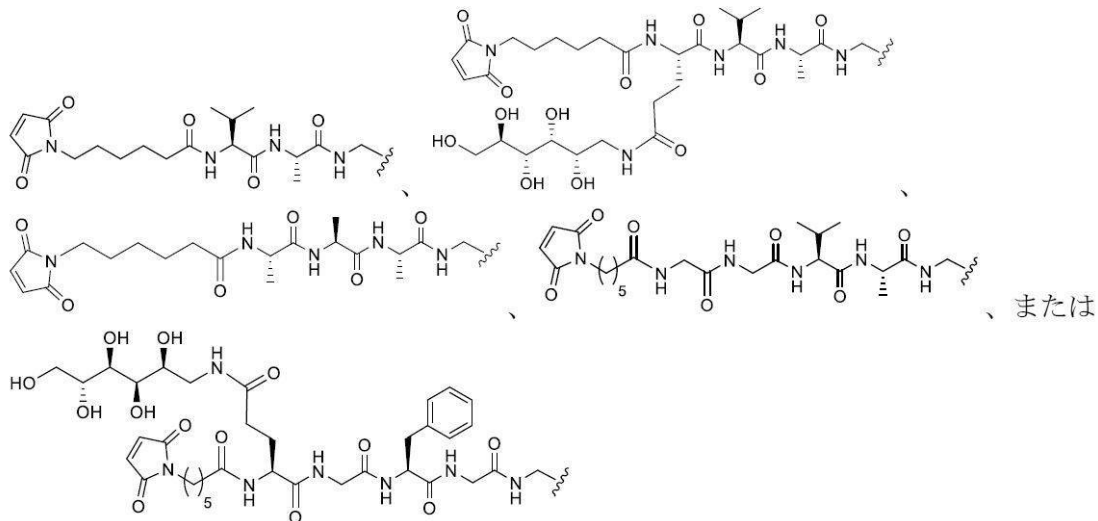
【化33】



【0291】

実施形態では、Z' -E-NH-CH₂は、以下の構造のうちの一つから形成される。

【化34】



【0292】

実施形態では、Z' -E-NH-CH₂は、以下の構造のうちの一つであり、式中、*は、Cへの付着点を示す。

10

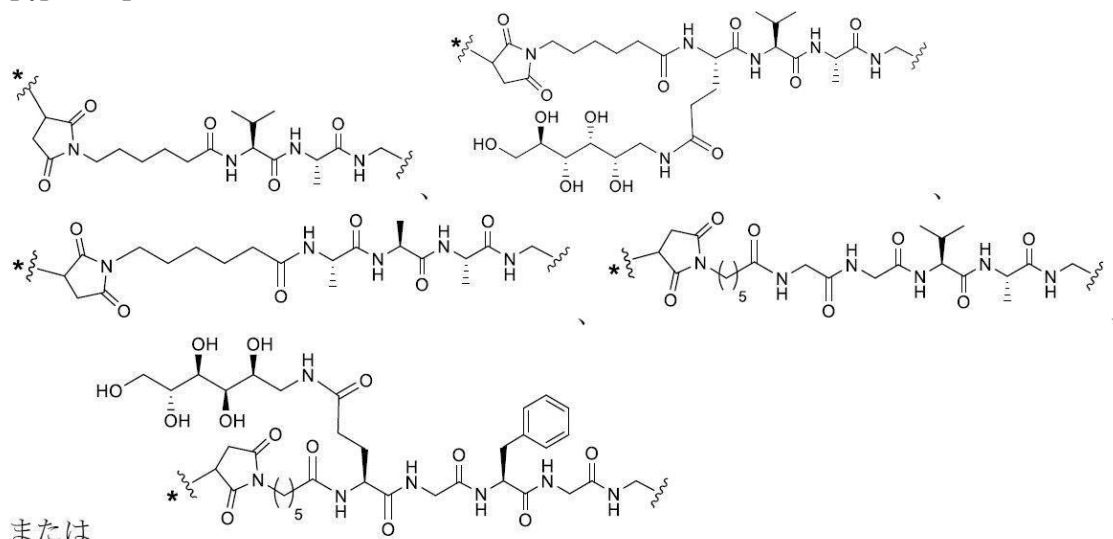
20

30

40

50

【化 3 5】



10

【0 2 9 3】

実施形態では、 R^1 が $-H$ または $-CH_2CH_3$ であり、 R^2 が $-OH$ またはアルコキシであり、 R^3 が $-H$ である場合、 $-L_1-L_2-Q'-$ は、 $-CH(R')C_2HO-$ または $-CH(R')(CH_2)_2O-$ ではなく、式中、 R' は、 $-H$ 、または C_1-C_6 アルキル、アルコキシ、置換アルキル、フェニル、または $PhCH_2-$ である。実施形態では、 R^1 が $-H$ または $-CH_2CH_3$ であり、 R^2 が $-OH$ またはアルコキシであり、 R^3 が $-H$ である場合、 $-L_1-L_2-Q'-$ は、 $-CH(R')C_2HO-$ または $-CH(R')(CH_2)_2O-$ ではなく、式中、 R' は、 $-H$ 、または C_1-C_6 アルキル、アルコキシ、置換アルキル、フェニル、または $PhCH_2-$ である。

20

【0 2 9 4】

実施形態では、 L_1 および L_2 のうちの少なくとも一つが存在する。

【0 2 9 5】

実施形態では、 R^1 、 R^2 、および R^3 のうちの少なくとも一つは、 $-H$ ではない。

【0 2 9 6】

実施形態では、 R^1 は独立して、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_2-C_6 アルキニル、シリル、 C_3-C_6 シクロアルキル、 C_1-C_6 ハロゲン化アルキル、アルケン、またはアルキンである。

30

【0 2 9 7】

実施形態では、 R^1 は独立して、 $-H$ または C_1-C_6 アルキルである。

【0 2 9 8】

実施形態では、 R^2 は独立して、 $-H$ 、 $-F$ 、 $-N(R^4)_2$ 、 $-N(R^4)(R^5)$ 、 $-OR^4$ 、 $-SR^4$ 、 $-S(=O)R^5$ 、 $-SO_2R^5$ 、 C_1-C_6 アルキル、または C_1-C_6 フルオロアルキルであり、 R^3 は独立して、 $-H$ 、 $-F$ 、 $-CN$ 、 $-OCH_3$ 、 $-CH_3$ 、または $-CF_3$ である。

40

【0 2 9 9】

実施形態では、 R^2 は独立して、 C_1-C_6 アルキル、 C_1-C_6 フルオロアルキル、または $-F$ である。

【0 3 0 0】

実施形態では、 R^3 は独立して、 $-H$ 、 $-F$ 、 $-CN$ 、または $-CF_3$ である。

【0 3 0 1】

実施形態では、 R^3 は独立して、 $-F$ 、 $-CN$ 、 $-OCH_3$ 、 $-CH_3$ 、または $-CF_3$ である。

【0 3 0 2】

実施形態では、 R^2 および R^3 は結合して、 $-O(CH_2)_nO-$ または $-O(CF_2$

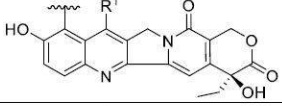
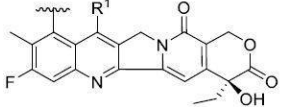
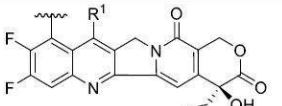
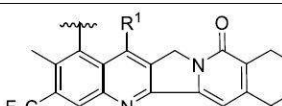
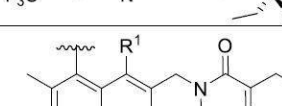
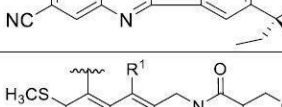
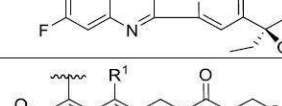
50

) n O-を形成し、式中、 n は、1 または 2 である。

【0303】

実施形態では、D は、以下の構造のうちの一つによって表される。

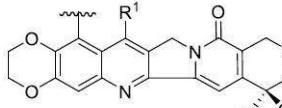
【化36】

	(D-I)、
	(D-II)、
	(D-III)、
	(D-IV)、
	(D-V)、
	(D-VI)、
	(D-VII)、 または

10

20

【化37】

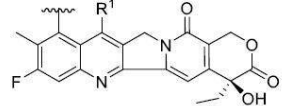
	(D-VIII)
---	----------

30

【0304】

実施形態では、D は、以下である。

【化38】

	(D-IX)
---	--------

40

【0305】

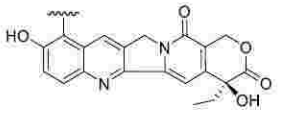
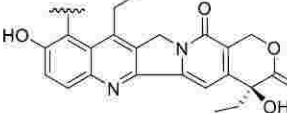
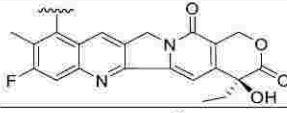
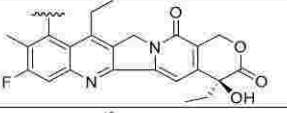
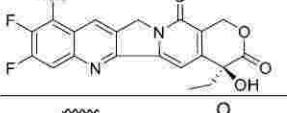
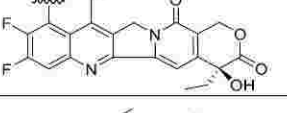
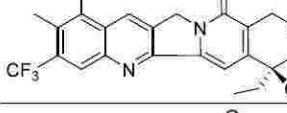
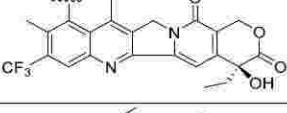
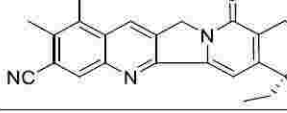
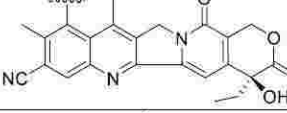
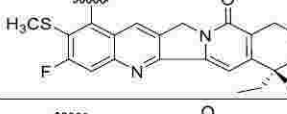
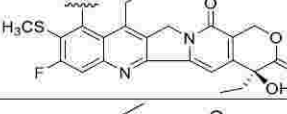
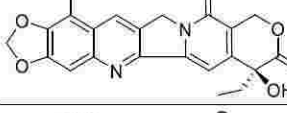
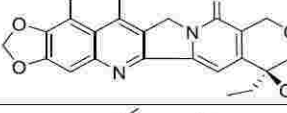
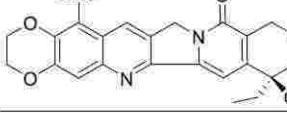
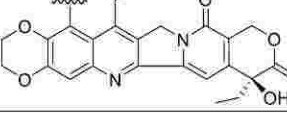
実施形態では、 R^1 は、-H または $C_1 - C_6$ アルキルである。

【0306】

実施形態では、D は、以下の構造のうちの一つによって表される。

50

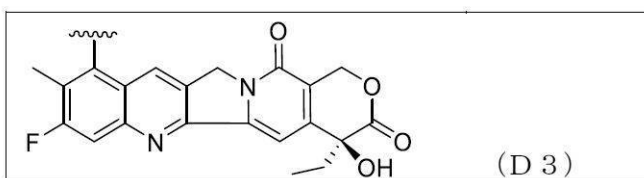
【化 3 9】

	(D 1) 、		(D 2) 、
	(D 3) 、		(D 4) 、
	(D 5) 、		(D 6) 、
	(D 7) 、		(D 8) 、
	(D 9) 、		(D 10) 、
	(D 11) 、		(D 12) 、
	(D 13) 、		(D 14) 、
	(D 15) 、ま たは		(D 16)

【0307】

実施形態では、D は、以下である。

【化 4 0】



【0308】

実施形態では、 L_1 は、 $-(C_1-C_{10} \text{アルキレン})-$ であり、 L_2 は、存在しない。

【0309】

実施形態では、 L_1 は、 $-(C_1-C_{10} \text{アルキレン})-$ であり、 L_2 は、 $-N(R^6)CH_2-L_3-*$ または $-N(R^6)C(=O)-L_3-*$ であり、式中、* は、 Q' に共有結合された部位を示す。

【0310】

実施形態では、 L^1 は、存在せず、 L^2 は、 $-N(R^6)CH_2-L_3-*$ または $-N(R^6)C(=O)-L_3-*$ であり、式中、* は、 Q' に共有結合された部位を示す。

【0311】

実施形態では、 L_3 は、 $-(C_1-C_{10} \text{アルキレン})-$ である。

【0312】

実施形態では、 R^6 は、 $-H$ または $-CH_3$ である。

10

20

30

40

50

【0313】

実施形態では、 L_1-L_2 は、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、または $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ である。

【0314】

実施形態では、 L_1-L_2 は、 $-OCH_2CH_2-*$ 、 $-OCH_2CH_2OCH_2CH_2-*$ 、 $-SCH_2CH_2-*$ 、 $-SCH_2CH_2OCH_2CH_2-*$ 、 $-S(=O)CH_2-*$ 、 $-SO_2CH_2-*$ 、 $-C(=O)CH_2-*$ 、 $-NHCH_2CH_2-*$ 、 $-N(CH_3)CH_2CH_2-*$ 、 $-N(CF_3)CH_2CH_2-*$ 、 $-NHC(=O)CH_2-*$ 、 $-CH_2NHC(=O)CH_2-*$ 、 $-CH_2CH_2NHC(=O)CH_2-*$ 、 $-CH_2N(CH_3)C(=O)CH_2-*$ 、 $-N(CH_3)C(=O)CH_2-*$ 、 $-N(CH_3)C(=O)CH_2CH_2-*$ 、 $-C(=O)NHCH_2CH_2-*$ 、 $-NHC(=O)NHCH_2CH_2-*$ 、 $-NHC(=O)OCH_2CH_2-*$ 、 $-CH_2OC(=O)NHCH_2CH_2-*$ 、または $-C(=O)N(CH_3)CH_2CH_2-*$ であり、式中、*は、Q'に共有結合された部位を示す。

10

【0315】

実施形態では、 L_1-L_2-Q' は、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2O-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2O-$ 、 $-CH_2CH_2OCH_2CH_2O-$ 、 $-CH_2SCH_2CH_2O-$ 、 $-CH_2NHC(=O)CH_2O-$ 、 $-CH_2CH_2NHC(=O)CH_2O-$ 、 $-CH_2N(CH_3)C(=O)CH_2O-$ 、 $-OCH_2CH_2O-$ 、 $-OCH_2CH_2CH_2O-$ 、 $-SCH_2CH_2CH_2O-$ 、 $-SCH_2CH_2O-$ 、 $-NHCH_2CH_2O-$ 、 $-NHCH_2CH_2CH_2O-$ 、 $-N(CH_3)CH_2CH_2O-$ 、 $-C(=O)NHCH_2CH_2O-$ 、 $-NHC(=O)CH_2O-$ 、 $-CH_2S(=O)CH_2O-$ 、 $-CH_2SO_2CH_2O-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2S-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2S-$ 、 $-CH_2CH_2OCH_2CH_2S-$ 、 $-CH_2SCH_2CH_2S-$ 、 $-CH_2NHC(=O)CH_2S-$ 、 $-OCH_2CH_2CH_2S-$ 、 $-SCH_2CH_2CH_2S-$ 、 $-NHCH_2CH_2CH_2S-$ 、 $-N(CH_3)CH_2CH_2S-$ 、 $-C(=O)NHCH_2CH_2S-$ 、 $-NHC(=O)CH_2S-$ 、 $-CH_2S(=O)CH_2S-$ 、または $-CH_2SO_2CH_2S-$ である。

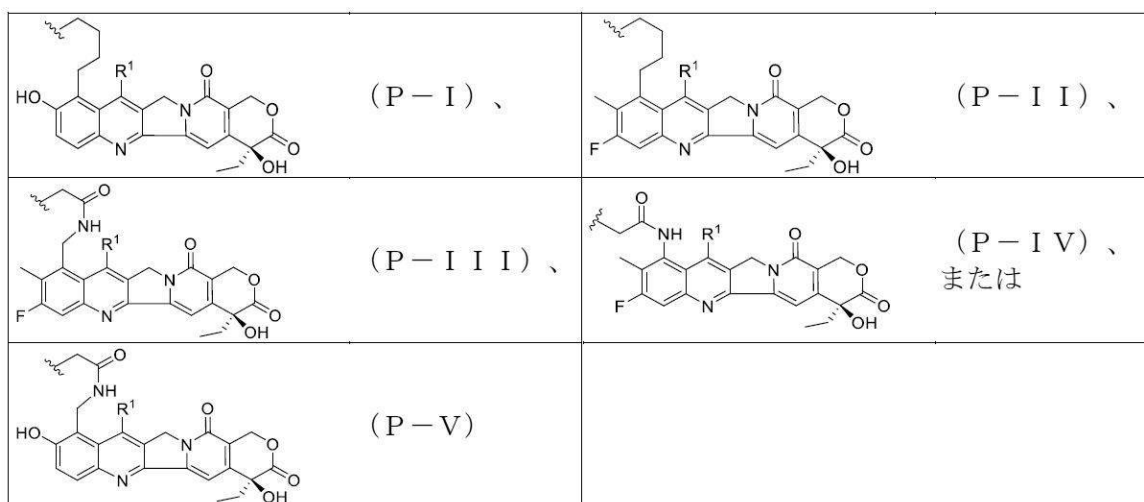
20

【0316】

実施形態では、 $D-L_1-L_2$ は、以下である構造によって表される。

30

【化41】



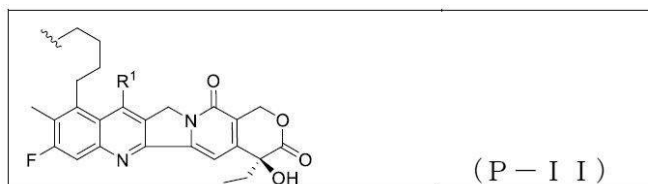
40

【0317】

実施形態では、 $D-L_1-L_2$ は、以下である構造によって表される。

50

【化 4 2】



【0 3 1 8】

実施形態では、 R^1 は、 $-H$ または $C_1 - C_6$ アルキルである。

【0 3 1 9】

実施形態では、 R^1 は、 $-H$ または $-CH_2CH_3$ である。

【0 3 2 0】

実施形態では、 Q' は、 $-O-$ である。

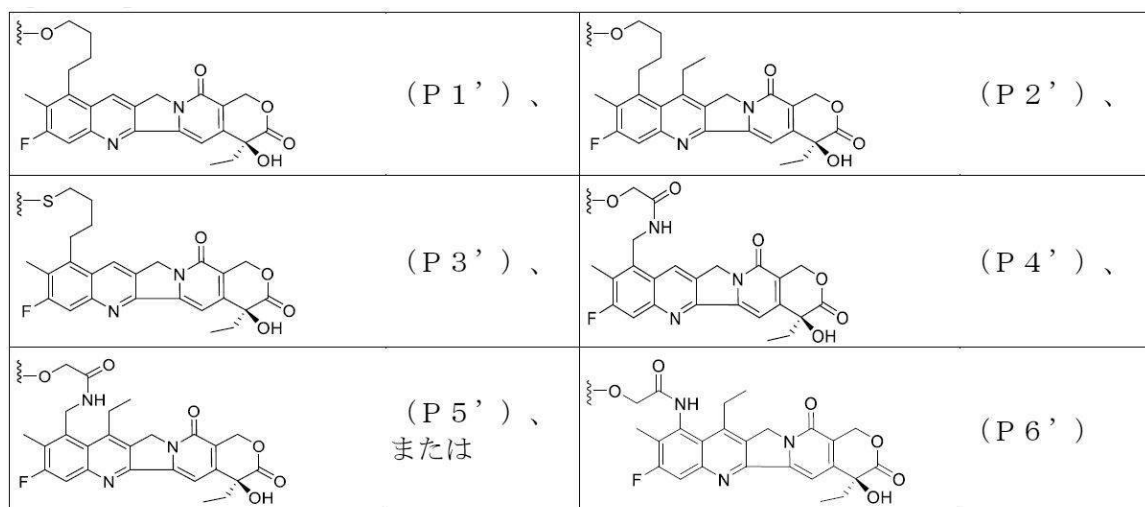
【0 3 2 1】

実施形態では、 Q' は、 $-S-$ である。

【0 3 2 2】

実施形態では、 $D-L_1-L_2-Q'-$ は、以下の構造のうちの一つを有する。

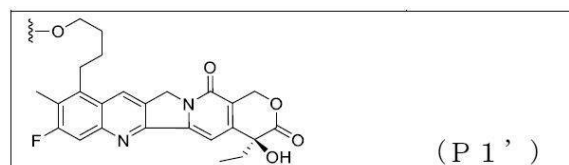
【化 4 3】



【0 3 2 3】

実施形態では、 $D-L_1-L_2-Q'-$ は、以下である。

【化 4 4】



【0 3 2 4】

実施形態では、 $D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'-$ は、以下の構造のうちの一つから形成される。

10

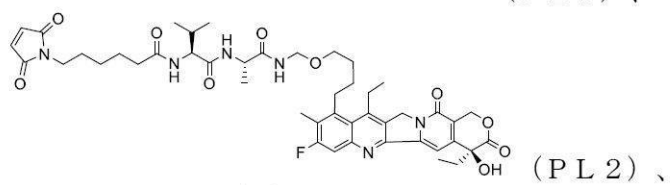
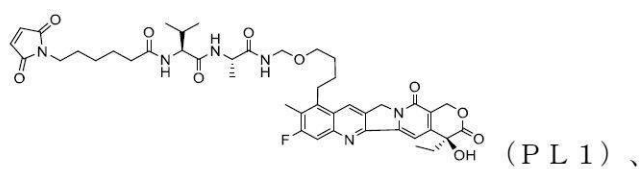
20

30

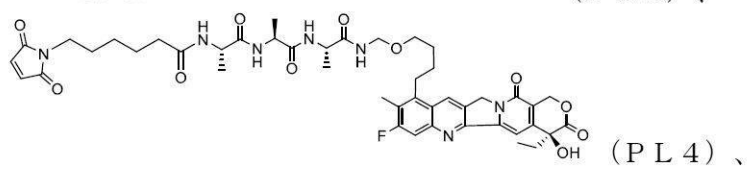
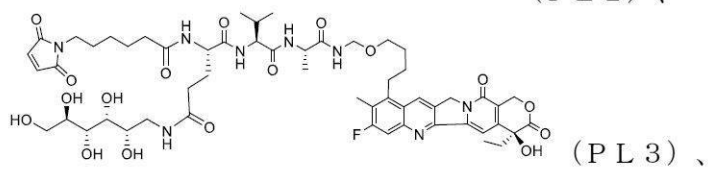
40

50

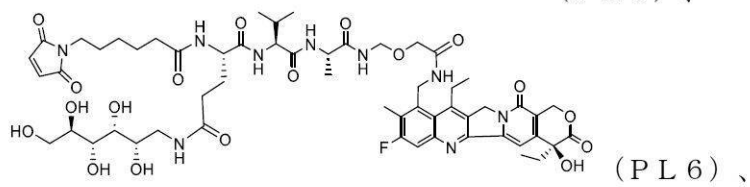
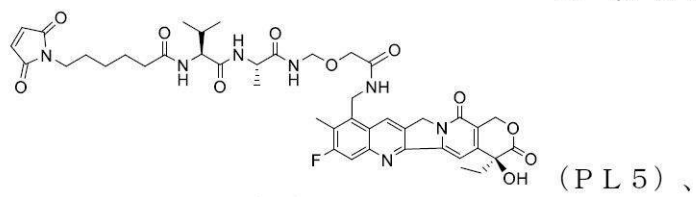
【化 4 5】



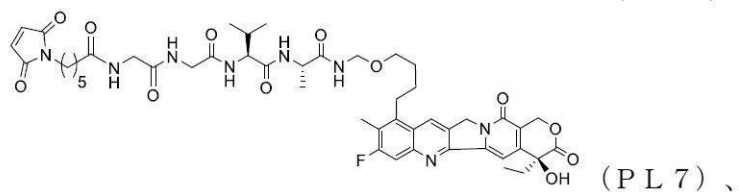
10



20



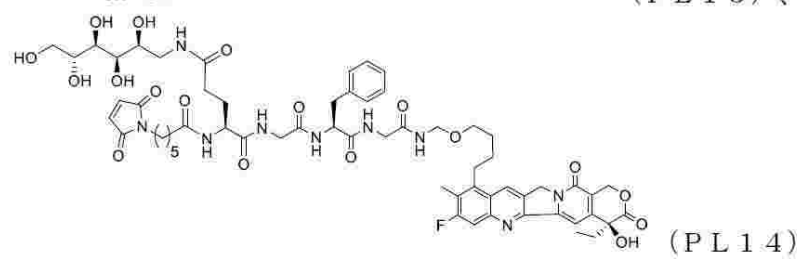
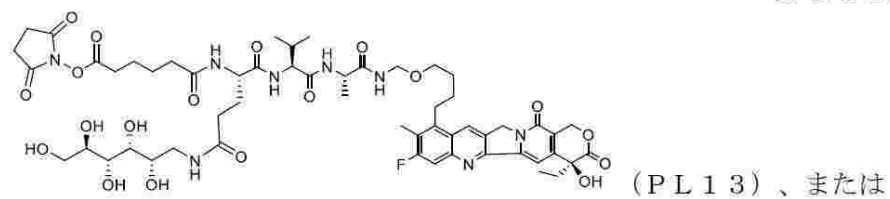
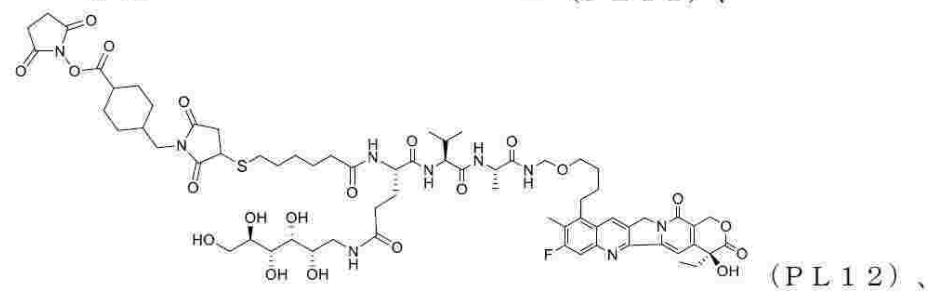
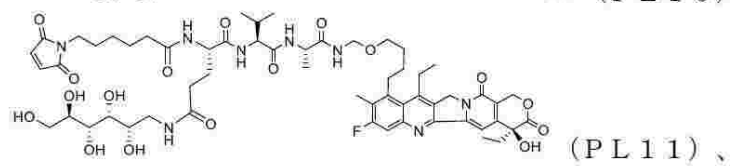
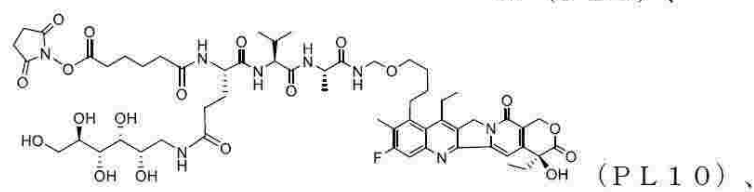
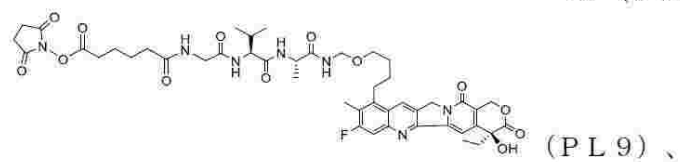
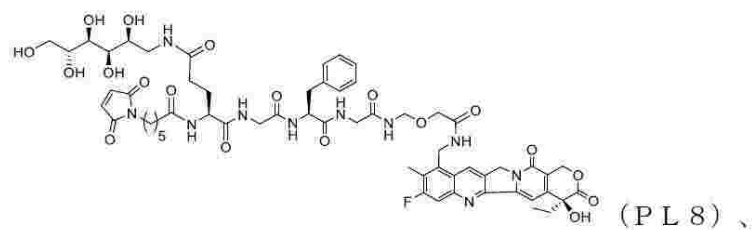
30



40

50

【化 4 6】



【0325】

実施形態では、 $D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'-$ は、MB-2から形成される。

10

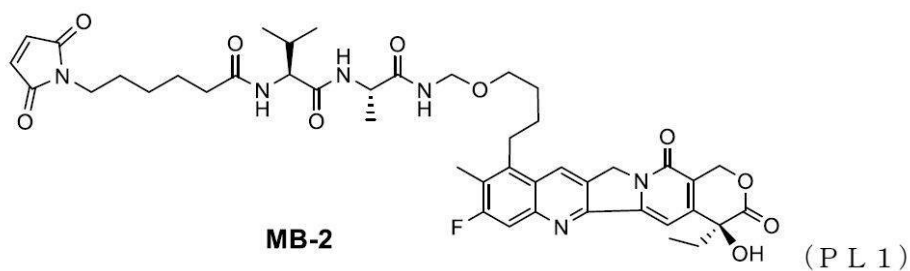
20

30

40

50

【化 4 7】

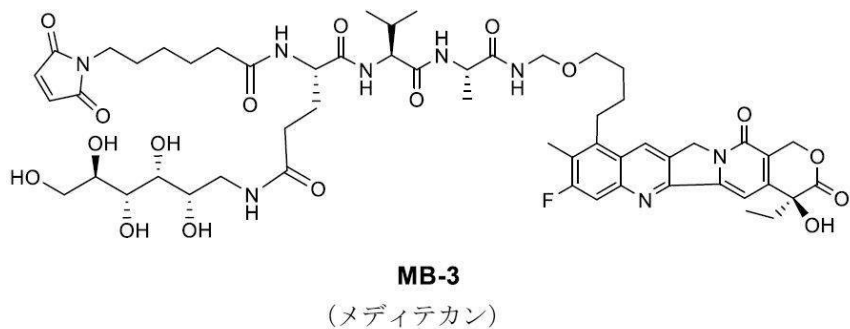


【 0 3 2 6 】

10

実施形態では、 $D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'-$ は、MB-3（メディテカン）から形成される。

【化 4 8】

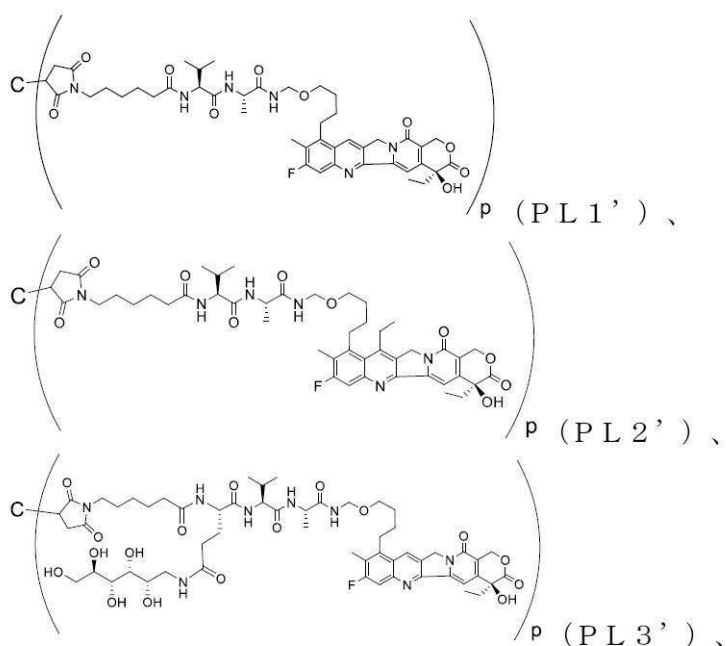


20

【 0 3 2 7 】

実施形態では、 $\{D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'\}_p-C$ は、以下の構造のうちの1つであり、式中、Cは、モノクローナル抗体であり、pは、薬物対抗体比(DAR)であり、pは、約2~10、4~8、または7~8(例えば、3.2~8.0)の範囲の平均数である。

【化 4 9】

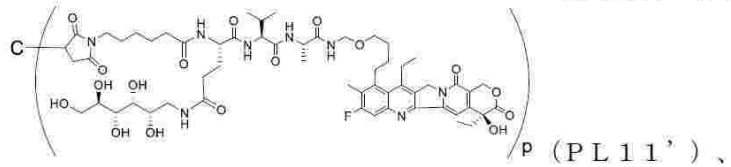
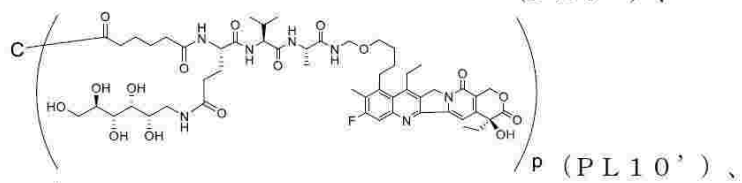
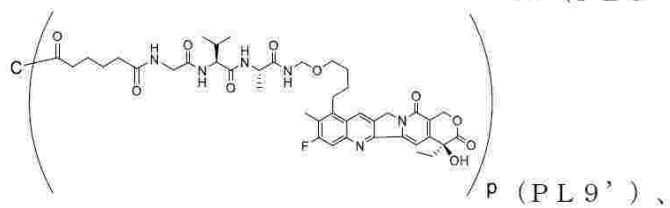
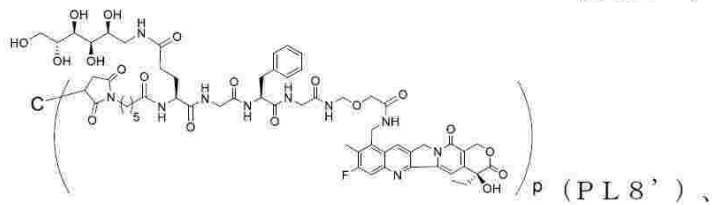
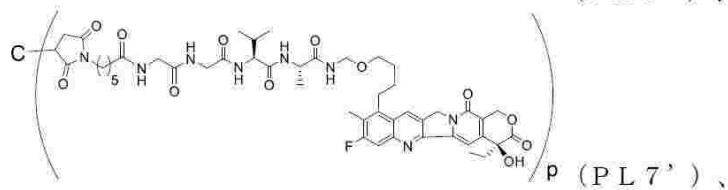
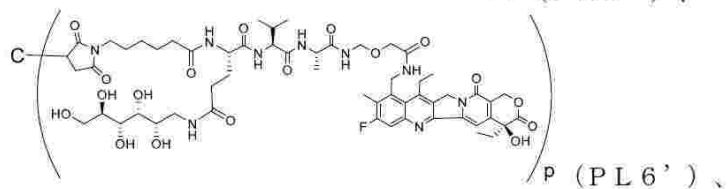
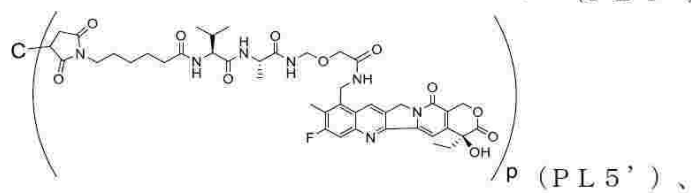
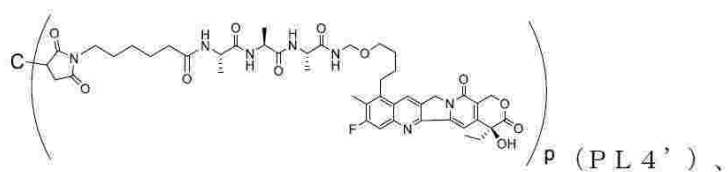


30

40

50

【化 5 0】



10

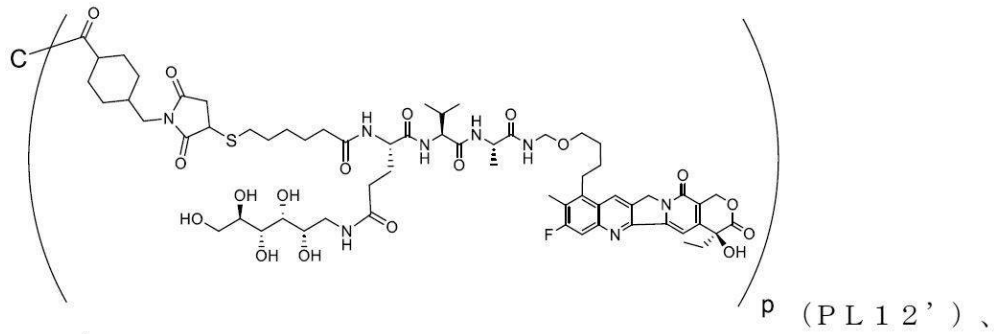
20

30

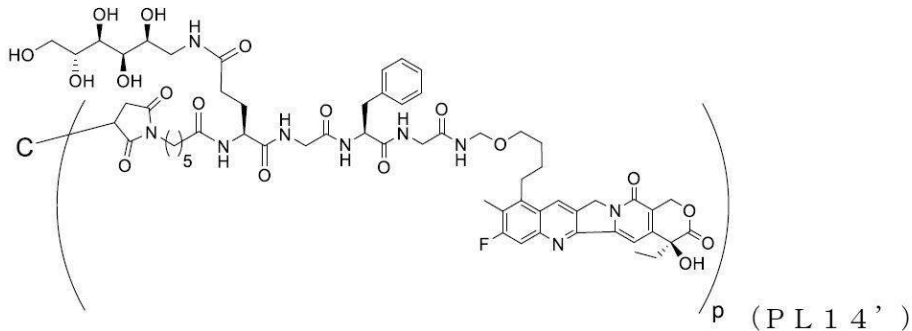
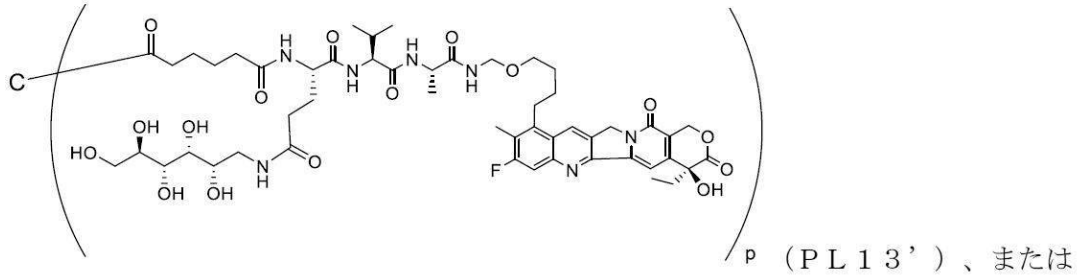
40

50

【化 5 1】



10

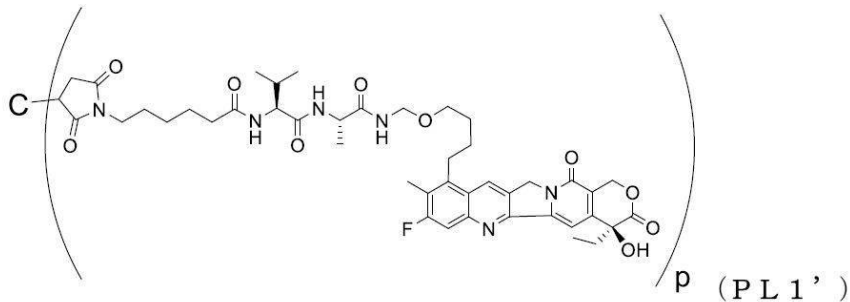


20

【0328】

実施形態では、 $\{D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'\}_p-C$ は、

【化 5 2】



30

であり、式中、Cは、モノクローナル抗体であり、pは、薬物対抗体比(DAR)である。実施形態では、pは、約2~10、4~8、または7~8(例えば、3.2~8.0)の範囲の平均数である。

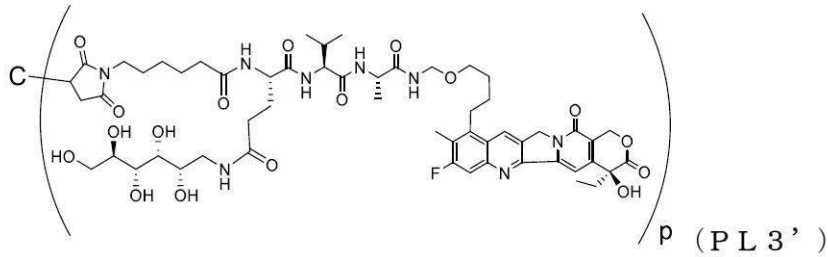
40

【0329】

実施形態では、 $\{D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'\}_p-C$ は、

50

【化 5 3】



であり、式中、Cは、モノクローナル抗体であり、pは、薬物対抗体比（DAR）である 10
。実施形態では、pは、約2～10、4～8、または7～8（例えば、3.2～8.0）
の範囲の平均数である。

【0330】

実施形態では、Cは、抗HER2抗体である。

【0331】

実施形態では、Cは、トラスツズマブ（ハーセプチン）である。

【0332】

実施形態では、Cは、トラスツズマブ-dkst（Ogivri）である。

【0333】

実施形態では、Cは、トラスツズマブ-pkrb（Herzuma）である。 20

【0334】

実施形態では、Cは、トラスツズマブ-dttb（Ontuzant）である。

【0335】

実施形態では、Cは、トラスツズマブ-qyp（Trazimera）である。

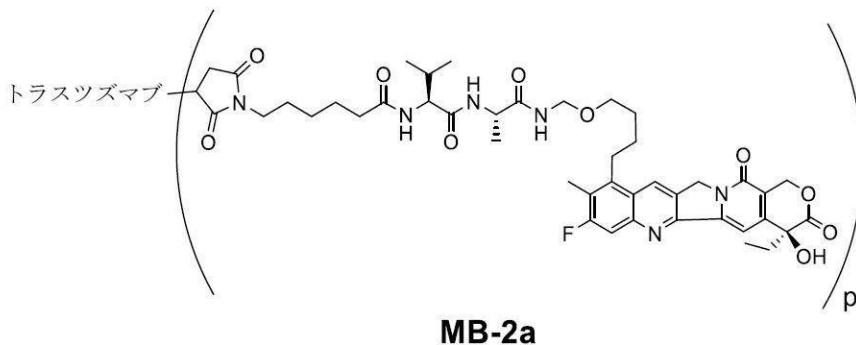
【0336】

実施形態では、Cは、トラスツズマブ-アン（Kanjinti）である。

【0337】

実施形態では、 $\{D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'\}_p$ -Cは、MB-2
aであり、

【化 5 4】

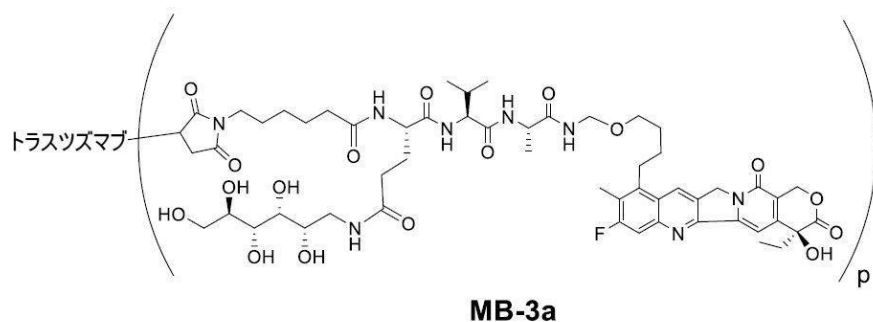


式中、pは、薬物対抗体比（DAR）である。実施形態では、pは、約4～8または7～
8（例えば、7.9）の範囲の平均数である。

【0338】

実施形態では、 $\{D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'\}_p$ -Cは、MB-3
a（トラスツズマブメディテカン）であり、

【化 5 5】



10

式中、 p は、薬物対抗体比（DAR）である。実施形態では、 p は、約 4～8 もしくは 7～8 の範囲の平均数であるか、または、 p は 8 である。

【0339】

本明細書に記載されるコンジュゲート（例えば、MB-2a および MB-3a のような式 PL-A' または式 PL-A に従う任意の化合物）は、少なくともカンプトテシン誘導体の共有結合を含み得る。

【0340】

実施形態では、下付き文字 p は、細胞結合剤上のカンプトテシンペイロード部分の数を表し、1～18、1～12、または 1～8 の値を有する。個々のカンプトテシンコンジュゲートは、カンプトテシンコンジュゲート化合物とも称され得る。本明細書の実施形態では、個々のカンプトテシンコンジュゲートの細胞結合剤にコンジュゲートされた 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または 18 個のカンプトテシンペイロード部分が存在し得る。

20

【0341】

実施形態では、個々のカンプトテシンコンジュゲートの集団は、各細胞結合剤（すなわち、カンプトテシンコンジュゲート組成物）に結合されたカンプトテシンペイロード部分の数を除いて実質的に同一であり、その結果、 p は、カンプトテシンコンジュゲート組成物の細胞結合剤に結合されたカンプトテシンペイロード部分の平均数を表す。実施形態のその群では、 p は、1～約 18、1～約 10、または 1～約 8、2～約 6、3～約 5、または 6～約 8 の範囲の平均数である。実施形態では、 p は、約 2～10、4～8、または 7～8（例えば、3.2～8.0）の範囲の平均数である。実施形態では、 p は、約 2 である。実施形態では、 p は、約 4 である。実施形態では、 p は、約 6 である。実施形態では、 p は、約 8 である。実施形態では、 p は、約 10 である。実施形態では、 p は、約 12 である。実施形態では、 p は、2 である。実施形態では、 p は、4 である。実施形態では、 p は、8 である。実施形態では、 p は、3～4 の値を有する。実施形態では、 p は、4～5 の値を有する。実施形態では、 p は、5～6 の値を有する。実施形態では、 p は、6～7 の値を有する。実施形態では、 p は、7～8 の値を有する。実施形態では、 p は、7.4～8 の値を有する。実施形態では、 p 値は、組成物中の主要な ADC の平均薬物負荷ならびに薬物負荷を指す。

30

40

【0342】

実施形態では、コンジュゲーション（例えば、本明細書に記載される MB-2a または MB-3a のような式 PL-A' または式 PL-A に従う任意の化合物に見出されるように）は、還元された鎖間ジスルフィドを介して行われ、細胞結合剤にコンジュゲートされた約 1～8 個、または 3～5 個、または 6～8 個のカンプトテシンペイロード化合物が存在し得る。

【0343】

実施形態では、コンジュゲーション（例えば、本明細書に記載される MB-2a または MB-3a のような式 PL-A' または式 PL-A に従う任意の化合物に見出されるような）は、還元された鎖間ジスルフィドと同様に、導入されたシステイン残基を介して行わ

50

れ、細胞結合剤にコンジュゲートされた1～8個、または1～10個、または1～12個、または1～18個のカンプトテシンペイロード化合物が存在し得る。

【0344】

実施形態では、コンジュゲーション（例えば、本明細書に記載されるMB-2aまたはMB-3aのような式PL-A'または式PL-Aに従う任意の化合物に見出されるように）は、導入されたシステイン残基を介して行われ、細胞結合剤にコンジュゲートされた2個、または3個、または4個、または5個、または6個、または7個、または8個のカンプトテシンペイロード化合物が存在し得る。

【0345】

実施形態では、コンジュゲーション（例えば、本明細書に記載されるMB-2aまたはMB-3aのような式PL-A'または式PL-Aに従う任意の化合物に見出されるように）は、リジン残基を介して行われ、細胞結合剤にコンジュゲートされた約1～10個、または1～12個、または1～14個、または1～18個のカンプトテシンペイロード化合物が存在し得る。

【0346】

共有結合的付着のための細胞結合剤上の反応性基

実施形態では、細胞結合剤は、式PL-A'または式PL-Aに従うもの（例えば、MB-2aまたはMB-3a）のようなコンジュゲートを形成するために、ペプチド放出性リンカーに結合される。上述のように、さらに他の連結構成成分は、本明細書に記載されるコンジュゲート中に存在して、カンプトテシン化合物と細胞結合剤との間に追加の空間を提供する目的を果たすことができる。実施形態では、細胞結合剤は、細胞結合剤のヘテロ原子を介して、リンカー単位に結合されている。

【0347】

その結合のための細胞結合剤上に存在し得るヘテロ原子には、硫黄（一実施形態では、標的化リガンドのチオール基からの）、酸素（一実施形態では、標的化リガンドのカルボキシル基またはヒドロキシル基からの）、および任意選択的に置換された窒素（一実施形態では、標的化リガンドの一級もしくは二級アミン官能基からの、または別の実施形態では、任意選択的に置換されたアミド窒素からの）が含まれる。これらのヘテロ原子は、細胞結合剤の天然状態の標的化リガンド上に、例えば、自然発生的抗体中に存在し得るか、または化学修飾または生物学的工学を介して標的化リガンドに導入され得る。

【0348】

一実施形態では、細胞結合剤は、チオール官能基を有し、その結果、細胞結合剤は、チオール官能基の硫黄原子を介して、カンプトテシンペイロード化合物に結合される。

【0349】

別の実施形態では、細胞結合剤は、カンプトテシンペイロード化合物（例えば、本明細書に記載される式(II)に従った、または本明細書に記載される式(I)の化合物から形成された任意の化合物）の活性化エステルと反応することができる1つ以上のリジン残基を有し、したがって、細胞結合剤の窒素原子、および化合物のC=O基からなるアミド結合を提供する。

【0350】

さらに別の態様では、細胞結合剤は、一つ以上のチオール基を導入するための化学修飾が可能な一つ以上のリジン残基を有する。これらの実施形態では、細胞結合剤は、チオール官能基の硫黄原子を介してカンプトテシンペイロード化合物に共有結合で結合される。そのような様式リジンを修飾するために使用され得る試薬には、N-スクシンイミジルS-アセチルチオアセテート(SATA)および2-イミノチオラン塩酸塩(トラウトの試薬)が含まれるが、これらに限定されない。

【0351】

別の実施形態では、細胞結合剤は、一つ以上のチオール官能基を提供するような修飾が可能な一つ以上の炭水化物基を有する。カンプトテシンコンジュゲート中の化学修飾細胞結合剤は、チオール官能基の硫黄原子を介してカンプトテシンペイロード化合物に結合さ

れる。

【0352】

さらに別の実施形態では、細胞結合剤は、アルデヒド（-CHO）官能基を提供するために酸化され得る一つ以上の炭水化物基を有する（例えば、Laguzza, et al., 1989, J. Med. Chem. 32 (3): 548-55 参照）。これらの実施形態では、対応するアルデヒドは、カンプトテシンペイロード化合物の反応部位と相互作用して、カンプトテシンペイロード化合物と細胞結合剤との間に結合を形成する。標的化リガンド上の反応性カルボニル含有官能基と相互作用することができる、カンプトテシンペイロード化合物上の反応性部位には、ヒドラジンおよびヒドロキシルアミンが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0353】

いくつかの態様では、細胞結合剤は、反応性官能基 Y と相互作用することによって結合を形成して、式 P L - A ' 中の Y ' と標的化リガンドに対応する細胞結合剤との間に共有結合を形成することができる。標的化リガンドと相互作用する能力を有する官能基 Y は、細胞結合剤の性質に依存する。実施形態では、反応性基は、細胞結合剤を形成するために、その付着前にカンプトテシンペイロード化合物上に存在するマレイミドである。カンプトテシンペイロード化合物への細胞結合剤の共有結合的付着は、ペイロード化合物のマレイミド官能基 Y と相互作用して、チオ置換スクシンイミドを形成する細胞結合剤のチオール官能基を介して達成される。チオール官能基は、細胞結合剤の天然状態の細胞結合剤上に、例えば、自然発生的残基中に存在し得るか、または化学修飾を介してもしくは生物学的工学によって細胞結合剤に導入され得る。

20

【0354】

さらに別の実施形態では、細胞結合剤は、抗体であり、チオール基は、抗体の鎖間ジスルフィドの還元によって生成される。したがって、実施形態では、カンプトテシンペイロード化合物は、還元された鎖間ジスルフィドからのシステイン残基にコンジュゲートされている。

【0355】

さらに別の実施形態では、細胞結合剤は、抗体であり、チオール官能基は、例えば、システイン残基の導入によって、抗体に化学的に導入される。したがって、実施形態では、カンプトテシンペイロード化合物は、細胞結合剤の導入されたシステイン残基を介して、細胞結合剤にコンジュゲートされている。

30

【0356】

バイオコンジュゲーションについて、薬物コンジュゲーションの部位が、コンジュゲーションの容易さ、薬物-リンカー安定性、得られたバイオコンジュゲーションの生物物理学的特性への影響、およびインビトロ細胞傷害性を含む、多くのパラメータに影響を与え得ることが観察されている。薬物-リンカー安定性に関して、細胞結合剤への薬物-リンカー部分のコンジュゲーションの部位は、場合によっては、遊離薬物の早期放出を引き起こすために、脱離反応を受けるコンジュゲートされた薬物-リンカー部分の能力に影響を与え得る。標的化リガンド上のコンジュゲーションの部位には、例えば、還元された鎖間ジスルフィドならびに操作された部位の選択されたシステイン残基が含まれる。実施形態では、本明細書に記載されるカンプトテシンコンジュゲートを形成するためのコンジュゲーション方法は、還元されたジスルフィド結合からのチオール残基を使用するコンジュゲーション方法と比較して、あまり脱離反応の影響を受けにくい遺伝子操作された部位（例えば、Kabataに記載されるEUIンデックスに従った239位）のチオール残基を使用する。他の実施形態では、本明細書に記載されるカンプトテシンコンジュゲートを形成するためのコンジュゲーション方法は、（例えば、鎖間ジスルフィド還元から生じる）脱離反応の影響をより受けやすい部位のチオール残基を使用する。

40

【0357】

合成方法

例示的な合成方法を本明細書に記載する。さらに他の例示的な合成方法には、参照によ

50

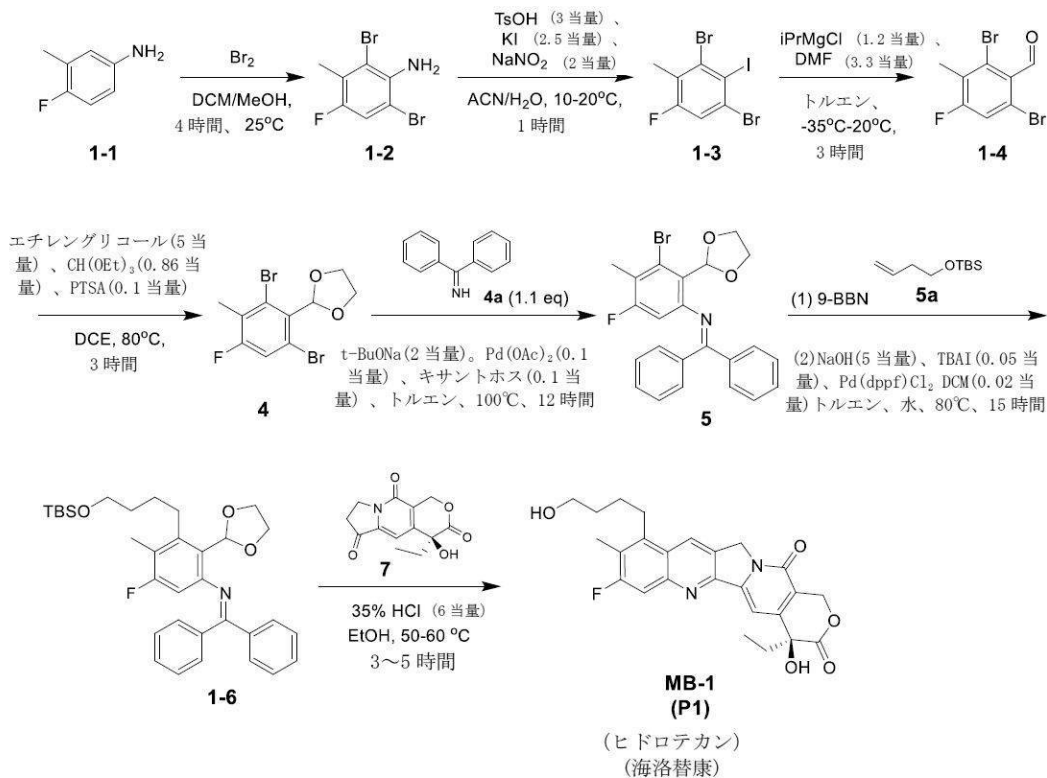
りその全体が本明細書に組み込まれる米国仮出願第 62 / 981, 197 号に記載される方法や、当技術分野で公知の方法が含まれる。

【0358】

実施形態では、スキーム 1 は、記載される化合物 MB-1（ヒドロテカン、海洛替康）（P1）の例示的な合成方法を提供する。

スキーム 1

【化 56】



10

20

【0359】

実施形態では、スキーム 2 は、記載される連結可能なペイロード（PL1）、（PL2）、（PL4）、および（PL7）を調製するための例示的な合成方法を提供する。

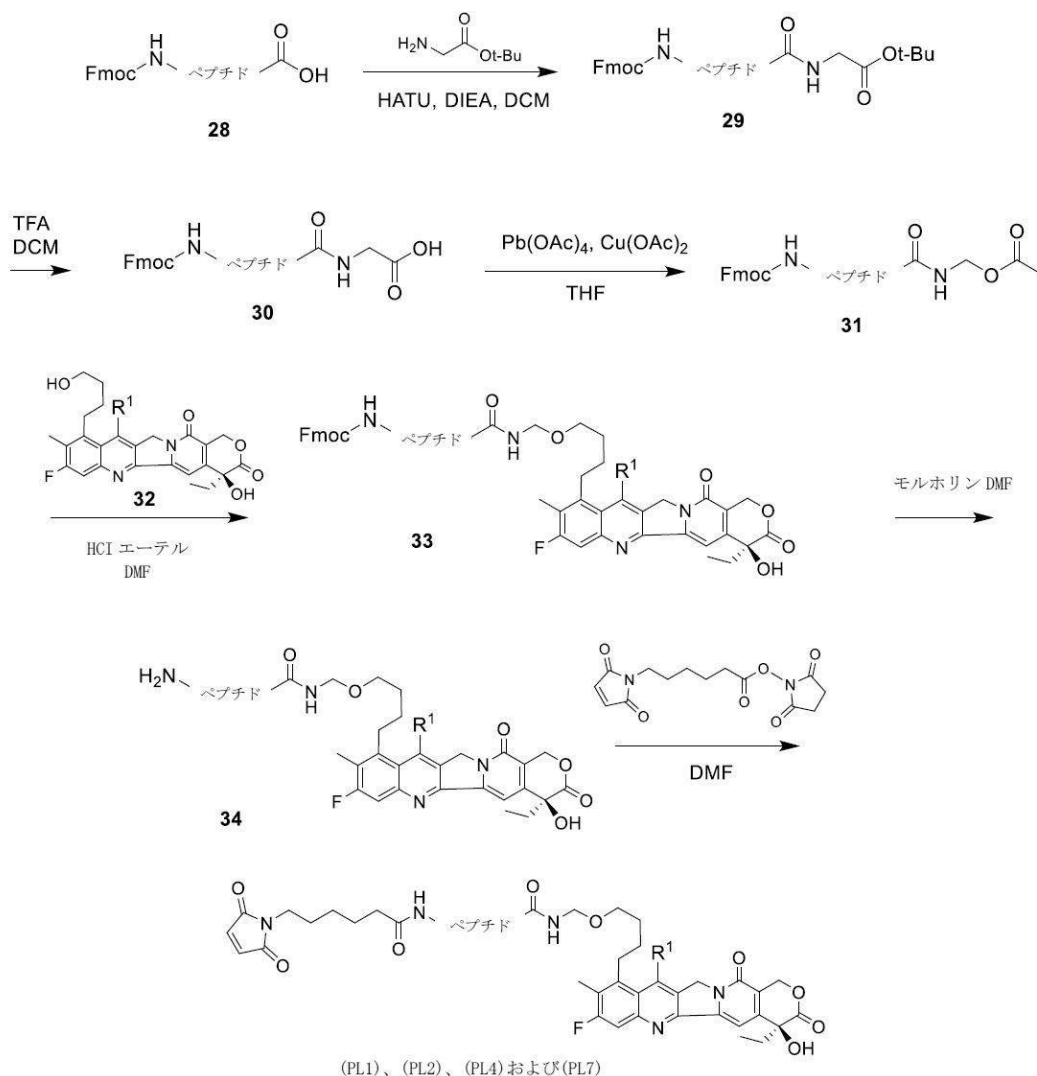
スキーム 2

30

40

50

【化 5 7】



10

20

30

【 0 3 6 0 】

実施形態では、スキーム 3 は、記載される化合物 MB-2 (PL1) の例示的な合成方法を提供する。

スキーム 3

40

50

S3

1-8

MB-1

1-9

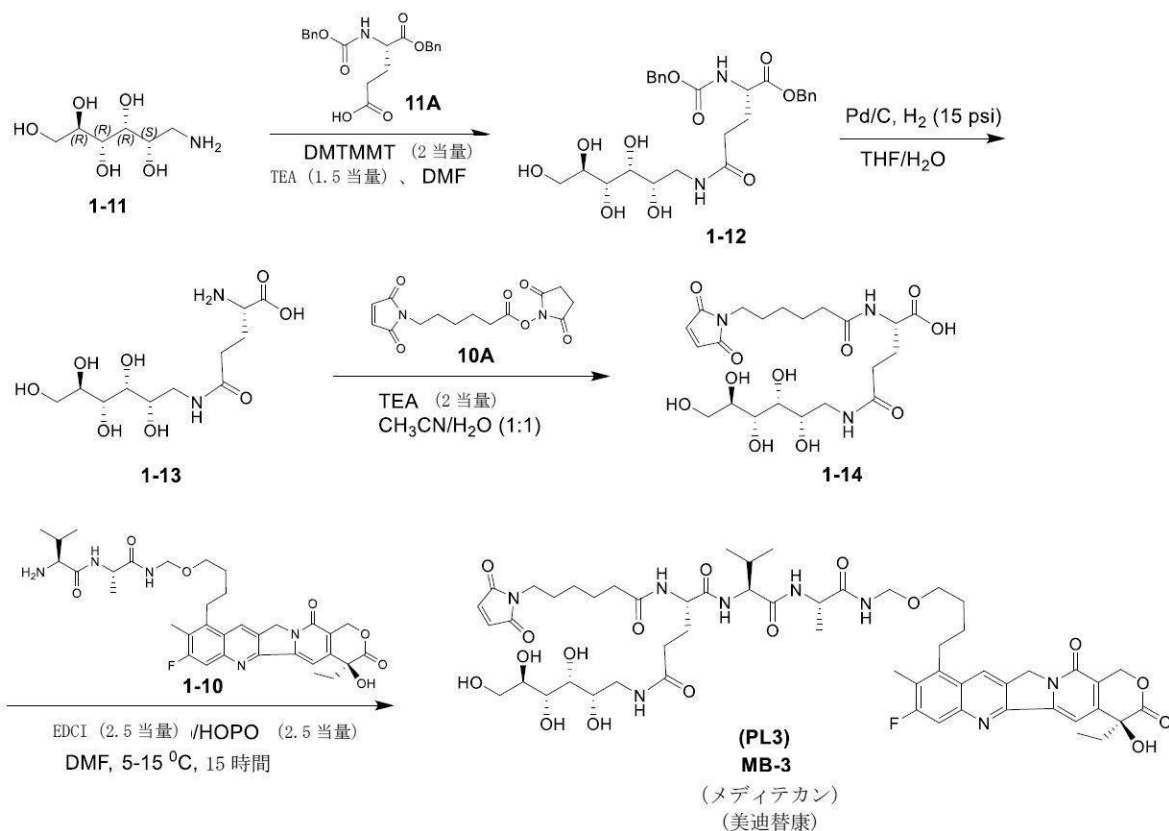
1-10

(PL1)

MB-2

スキーム 4

【化 5 9】



10

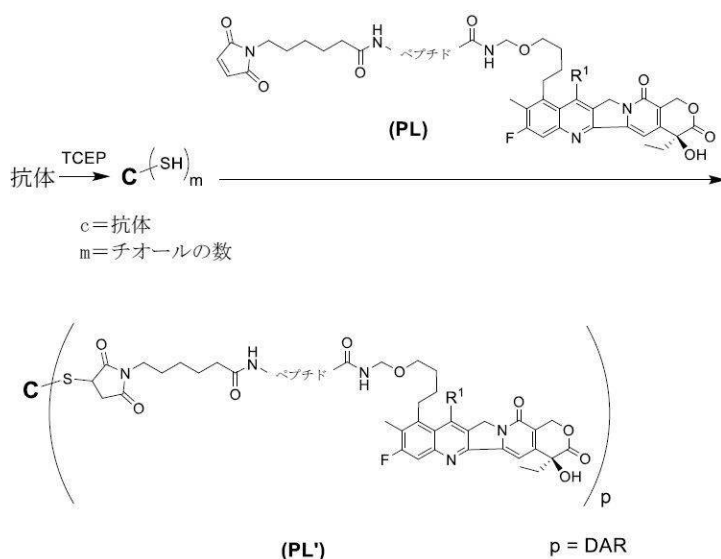
20

【0362】

実施形態では、スキーム 5 は、コンジュゲート (PL') を調製するための例示的な一般的方法を提供する。

スキーム 5

【化 6 0】



30

40

【0363】

実施形態における、7~8 または 8 の薬物対抗体比 (DAR) を用いてコンジュゲート (PL') を調製するための例示的な実験手順：

抗体 C を、50 mM の pH 7.4 リン酸緩衝液および 10 mM の DTPA (ジエチレントリアミン五酢酸) 中のトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (TCEP) の

50

8 当量（ジスルフィド結合当たり 2 当量）で、25℃において 2 時間処理し、続いて、DMSO 中のペイロード（PL）の 12 当量を添加する（DMSO の体積は、リン酸緩衝液の体積の約 12～15% である）。得られた反応溶液を、25℃で 1 時間、チューブ回転器上で回転させる。反応混合物を、製剤緩衝液を用いて数サイクル、限外濾過チューブ（30KD）を使用して直ちに精製する。得られたコンジュゲート（PL'）は、通常、7～8 または 8 の薬物対抗体比（DAR）を有し、95% を超える単量体がサイズ排除クロマトグラフィによって測定される。

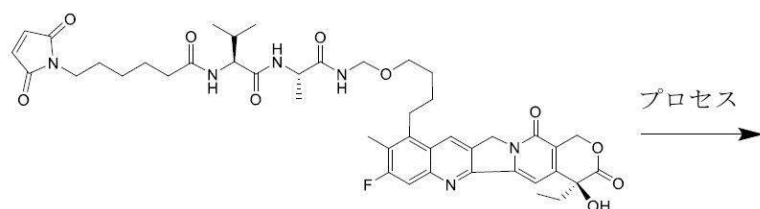
【0364】

実施形態では、抗体薬物コンジュゲートは、MB-2a である。実施形態では、スキーム 6 は、記載される抗体薬物コンジュゲート MB-2a の例示的な合成方法を提供する。

10

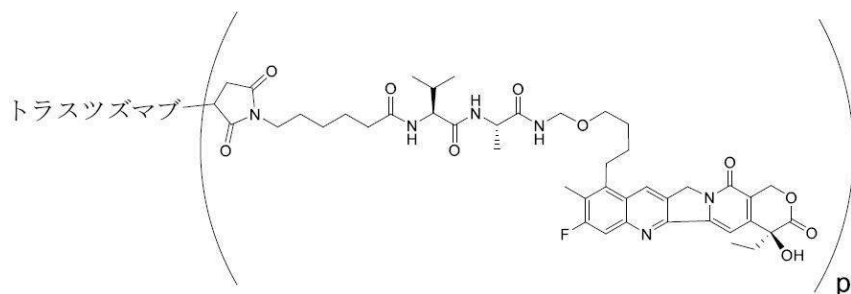
スキーム 6

【化 61】



MB-2

20



MB-2a

30

【0365】

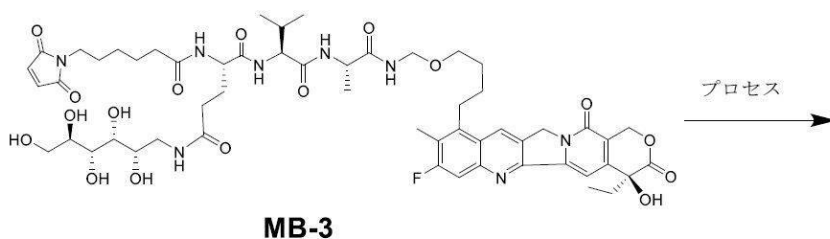
実施形態では、抗体薬物コンジュゲートは、MB-3a（トラスツズマブメディテカン）である。実施形態では、スキーム 7 は、記載される抗体薬物コンジュゲート MB-3a（トラスツズマブメディテカン）の例示的な合成方法を提供する。

スキーム 7

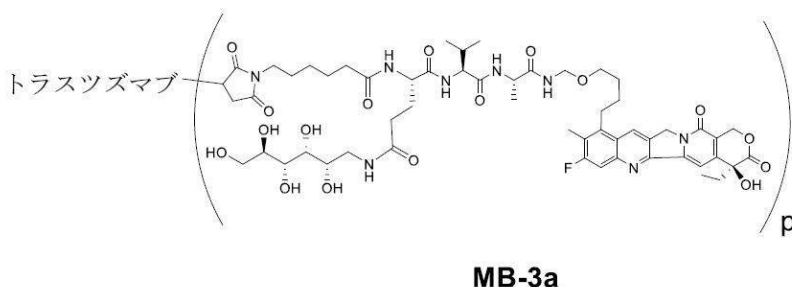
40

50

【化 6 2】



10



【 0 3 6 6 】

治療方法

別の態様では、本発明は、細胞増殖性疾患もしくは障害を治療する方法、または異常な細胞増殖を阻害する方法を特徴とし、当該方法は、本明細書に記載されるように、MB-2aもしくはMB-3a（トラスツズマブメディテカン）などの式（P L - A）の任意の化合物、またはその薬学的に許容される塩、または式（P L - A）の任意の化合物（例えば、MB-2aまたはMB-3a（トラスツズマブメディテカン））、またはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を投与することを含む。

20

【 0 3 6 7 】

実施形態では、本方法は、がんを治療するためのものである。実施形態では、がんは、HER2過剰発現によって特徴付けられる、および／または転移性である、および／またはトラスツズマブ抵抗性である。

30

【 0 3 6 8 】

実施形態では、がんは、腺がん、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、絨毛がん、CNS腫瘍、結腸がんまたは結腸直腸がん、びまん性橋髄腫（DIPG）、子宮内膜がん、食道がん、ユーイング肉腫、卵管がん、胆嚢がん、胃がん、膠芽腫、頭頸部がん、血液がん、ホジキンリンパ腫、腎臓がん、喉頭がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、メルケル細胞がん、中皮腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群（MDS）、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、骨肉腫、膵がん、腹膜がん、前立腺がん、卵巣がん、腎がん、横紋筋肉腫、唾液腺がん、肉腫、皮膚がん、小腸がん、扁平上皮がん、精巣がん、甲状腺がん、子宮がん、またはウィルムス腫瘍である。

40

【 0 3 6 9 】

実施形態では、がんは肺がん、尿路上皮がん、結腸直腸がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がん、乳がん、膀胱がん、胃がん、消化管間質腫瘍、子宮頸がん、食道がん、扁平上皮がん、腹膜がん、肝臓がん、肝細胞がん、結腸がん、直腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、子宮体がん、唾液腺がん、腎臓がん、外陰がん、甲状腺がん、陰茎がん、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨髄腫、または肉腫である。

【 0 3 7 0 】

実施形態では、がんは、乳がん、胃がん、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、および卵巣がんであり、乳がんの予後不良因子であると報告されている。

【 0 3 7 1 】

実施形態では、がんは、低HER2発現を特徴とする。

50

【0372】

実施形態では、がんは、中HER2発現を特徴とする。

【0373】

実施形態では、がんは、高HER2発現を特徴とする。

【0374】

実施形態では、がんは、HER2過剰発現を特徴とする。

【0375】

実施形態では、がんは、トラスツズマブ抵抗性である。

【0376】

実施形態では、がんは、乳がんである。実施形態では、乳がんは、転移性である。実施形態では、乳がんは、低Her2発現を特徴とする。実施形態では、乳がんは、中Her2発現を特徴とする。実施形態では、乳がんは、高Her2発現を特徴とする。実施形態では、乳がんは、トラスツズマブ抵抗性である。

10

【0377】

実施形態では、がんは、胃がんである。実施形態では、胃がんは、転移性である。実施形態では、胃がんは、低Her2発現を特徴とする。実施形態では、胃がんは、中Her2発現を特徴とする。実施形態では、胃がんは、高Her2発現を特徴とする。実施形態では、胃がんは、トラスツズマブ抵抗性である。

【0378】

実施形態では、胃がんは、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）である。実施形態では、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）は、転移性である。実施形態では、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）は、低Her2発現を特徴とする。実施形態では、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）は、中Her2発現を特徴とする。実施形態では、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）は、高Her2発現を特徴とする。実施形態では、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）は、トラスツズマブ抵抗性である。

20

【0379】

実施形態では、がんは、卵巣がんである。実施形態では、卵巣がんは、転移性である。実施形態では、卵巣がんは、低Her2発現を特徴とする。実施形態では、卵巣がんは、中Her2発現を特徴とする。実施形態では、卵巣がんは、高Her2発現を特徴とする。実施形態では、卵巣がんは、トラスツズマブ抵抗性である。

30

【0380】

腫瘍、転移、または制御不能な細胞成長によって特徴付けられる他の疾患もしくは障害を含むがこれに限定されないがんは、カンプトテシンコンジュゲートの投与によって治療または阻害され得る。

【0381】

他の実施形態では、有効量のカンプトテシンコンジュゲートおよび化学療法剤の投与を必要とする患者にそれを行うことを含む、がんを治療するための方法が提供される。一実施形態では、化学療法剤は、それによるがんの治療が難治性であることがわかっていないものである。別の実施形態では、化学療法剤は、それによるがんの治療が難治性であることがわかっているものである。カンプトテシンコンジュゲートは、がんの治療として外科手術も受けた患者に投与され得る。

40

【0382】

実施形態では、患者は、放射線療法などの追加の治療も受ける。特定の実施形態では、カンプトテシンコンジュゲートは、化学療法剤または放射線療法と同時に投与される。別の特定の実施形態では、化学療法剤または放射線療法は、カンプトテシンコンジュゲート（例えば、MB-2aまたはMB-3a（トラスツズマブメディテカン））の投与の前または後に投与される。

【0383】

化学療法剤は、一連のセッションにわたって投与され得る。標準治療の化学療法剤などの化学療法剤のうちのいずれか一つまたは組み合わせが投与され得る。

50

【0384】

さらに、カンプトテシンコンジュゲートを用いたがんの治療方法は、化学療法または放射線療法の代替として提供され、化学療法または放射線療法は、例えば、治療される対象に対して過剰に毒性であることが証明されているか、またはそれを証明することができ、例えば、許容できない、もしくは耐え難い副作用をもたらす。治療される患者は、任意選択的に、どの治療が許容可能であるか、または耐えられるかに応じて、外科手術、放射線療法、または化学療法などの別のがん治療で治療され得る。

【0385】

実施形態では、本明細書に記載の治療方法は、MB-2a、またはその薬学的に許容される塩の投与を含む。

10

【0386】

実施形態では、本明細書に記載の治療方法は、MB-3a（トラスツズマブメディテカン）の投与を含む。

【0387】

組成物および投与方法

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される任意の化合物（例えば、MB-2aおよびMB-3a（トラスツズマブメディテカン）などの式（PL-A）の任意の化合物）または本明細書に記載されるその薬学的に許容される塩を含む、医薬組成物を特徴とする。実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される担体を含む。

【0388】

実施形態では、医薬組成物は、MB-2aまたはMB-3a（トラスツズマブメディテカン）などの式（PL-A）によるコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩を含む。

20

【0389】

実施形態では、医薬組成物は、MB-2a、またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0390】

実施形態では、医薬組成物は、MB-3a（トラスツズマブメディテカン）、またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0391】

実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるカンプトテシンコンジュゲート（例えば、MB-2aまたはMB-3a（トラスツズマブメディテカン）などの式（PL-A）の任意の化合物）および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。カンプトテシンコンジュゲートは、細胞結合剤が結合する抗原の発現に関連する障害の治療のために、化合物が患者に投与されることを可能にする任意の形態であり得る。例えば、コンジュゲートは、液体または固体の形態であり得る。好ましい投与経路は、非経口である。非経口投与には、皮下注射、静脈内、筋肉内、胸骨内注射または注入技術が含まれる。一態様では、組成物は、非経口投与される。一態様では、コンジュゲートは、静脈内投与される。投与は、例えば、注入またはボラス注射による任意の便利な経路によるものであり得る。

30

【0392】

医薬組成物は、組成物を患者に投与すると、化合物が生体利用可能になることを可能にするように製剤化され得る。組成物は、1つ以上の投与単位の形態をとることができる。

40

【0393】

医薬組成物の調製で使用する材料は、使用される量で非毒性であり得る。医薬組成物中の活性成分の最適な投与量は、様々な要因に依存することが当業者には明らかであろう。関連する要因には、動物のタイプ（例えば、ヒト）、化合物の特定の形態、投与方法、および用いられる組成物が含まれるが、これらに限定されない。

【0394】

組成物は、例えば、液体の形態であり得る。液体は、注射による送達に有用であり得る。注射による投与のための組成物において、界面活性剤、防腐剤、湿潤剤、分散剤、懸濁

50

化剤、緩衝液、安定剤、および等張剤のうちの1つ以上も含まれ得る。

【0395】

液体組成物は、溶液、懸濁液、または他の同様の形態であるかどうかにかかわらず、以下のうちの1つ以上も含み得る：注射用水などの滅菌希釈剤、食塩溶液、好ましくは生理食塩水、リンガー溶液、等張塩化ナトリウム、溶媒または懸濁媒体として機能し得る合成モノまたはジシルセリドなどの固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、シクロデキストリン、プロピレングリコールまたは他の溶媒；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなどの酸化防止剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；アミノ酸、酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩などの緩衝液；非イオン性界面活性剤、ポリオールなどの洗剤；および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張性調整剤。非経口組成物は、アンプル、使い捨てシリンジ、またはガラス、プラスチック、もしくは他の材料で作製された複数回用量バイアルに封入され得る。生理食塩水は、例示的なアジュバントである。注射用組成物は、好ましくは滅菌である。

10

【0396】

特定の障害または病状の治療において有効であるコンジュゲートの量は、障害または病状の性質に依存し、標準的な臨床技術によって決定され得る。さらに、インビトロまたはインビボアッセイを任意選択的に用いて、最適な投与量範囲を特定するのに役立つ。組成物中で用いられる正確な用量はまた、投与経路、および疾患または障害の重篤度に依存し、開業医の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。

20

【0397】

組成物は、好適な投与量が取得されるような有効量の化合物を含む。典型的には、この量は、組成物の重量により化合物の少なくとも約0.01%である。

【0398】

静脈内投与について、組成物は、動物の体重1kg当たり約0.01～約100mgのカンプトテシンコンジュゲートを含むことができる。一態様では、組成物は、動物の体重1kg当たり約1～約100mgのカンプトテシンコンジュゲートを含むことができる。別の態様では、投与される量は、約0.1～約25mg/kg体重の化合物の範囲内である。使用される薬物に応じて、投与量はさらに低くてもよく、例えば、1.0μg/kg～5.0mg/kg、4.0mg/kg、3.0mg/kg、2.0mg/kg、または1.0μg/kg、または1.0μg/kg～500.0μg/kg対象体重である。

30

【0399】

一般に、患者に投与されるコンジュゲートの投与量は、典型的には、約0.01mg/kg～約100mg/kg対象体重、または1.0μg/kg～5.0mg/kg対象体重である。実施形態では、患者に投与される投与量は、約0.01mg/kg～約15mg/kg対象体重である。実施形態では、患者に投与される投与量は、約0.1mg/kg～約15mg/kg対象体重である。実施形態では、患者に投与される投与量は、約0.1mg/kg～約20mg/kg対象体重である。実施形態では、投与される投与量は、約0.1mg/kg～約5mg/kgまたは約0.1mg/kg～約10mg/kg対象体重である。実施形態では、投与される投与量は、約1mg/kg～約15mg/kg対象体重である。実施形態では、投与される投与量は、約1mg/kg～約10mg/kg対象体重である。実施形態では、投与される投与量は、治療サイクルにわたって、約0.1～4mg/kg、さらにより好ましくは0.1～3.2mg/kg、またはさらにより好ましくは0.1～2.7mg/kg対象体重である。

40

【0400】

「担体」という用語は、化合物とともに投与される希釈剤、アジュバント、または賦形剤を指す。そのような医薬担体は、水、ならびに石油、動物、植物、または合成起源のもの、例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油を含む油などの液体であり得る。担体は、生理食塩水、アカシアゴム、ゼラチン、デンプンペースト、タルク、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素であり得る。さらに、補助剤、安定化剤、増粘剤、潤滑剤、および着

50

色剤が使用され得る。一実施形態では、患者に投与される場合、化合物または組成物および薬学的に許容される担体は、滅菌されている。

【0401】

水は、化合物が静脈内投与される場合の例示的な担体である。食塩溶液、および水性デキストロース、およびグリセロール溶液も、液体担体として、特に注射用溶液のために用いられ得る。好適な医薬担体には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、穀粉、胡粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどの賦形剤も含まれる。所望に応じて、本組成物は、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤も含有することができる。

10

【0402】

一実施形態では、コンジュゲートは、動物、特にヒトへの静脈内投与に適合された医薬組成物として、日常的な手順に従って製剤化される。典型的には、静脈内投与のための担体またはビヒクルは、滅菌等張水性緩衝液溶液である。必要に応じて、組成物は、可溶化剤も含むことができる。静脈内投与のための組成物は、任意選択的に、注射部位の痛みを緩和するためのリグノカインなどの局所麻酔薬を含むことができる。一般に、成分は、例えば、活性薬剤の量を示すアンプルまたはサシェなどの密封容器内の凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、単位投与形態で別々にまたは一緒に混合されて供給される。コンジュゲートが注入によって投与される場合、例えば、滅菌医薬品グレードの水または生理食塩水を含有する注入ボトルを用いて分注され得る。組成物が注射によって投与される場合、成分が投与前に混合され得るように、注射用の滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得る。

20

【0403】

医薬組成物は、一般に、滅菌、実質的に等張性、およびU. S. Food and Drug AdministrationのすべてのGood Manufacturing Practice (GMP) 規則に完全に準拠したものとして製剤化される。

【0404】

治療的使用のためのキット

いくつかの態様では、がん治療および自己免疫疾患の治療で使用するためのキットが提供される。そのようなキットは、本明細書に記載されるカンプトテシンコンジュゲートを含む医薬組成物を含むことができる。

30

【0405】

実施形態では、キットは、本明細書に記載される治療方法のいずれかでの使用のための説明書を含むことができる。含まれる説明書は、対象における意図される活性、例えば、がんなどの疾患または病状の治療を達成するための、対象への医薬組成物の投与の説明を提供することができる。実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物の使用に関する説明書は、意図される治療に対する投与量、投与スケジュール、および投与経路に関する情報を含むことができる。容器は、単位用量、バルクパッケージ（例えば、複数回投与パッケージ）または部分単位用量であり得る。本開示のキットで提供される説明書は、典型的には、ラベルまたは添付文書上の書面による説明である。ラベルまたは添付文書は、医薬組成物が、対象における疾患または障害の治療、その発病の遅延、および／またはその軽減に使用されることを示す。

40

【0406】

実施形態では、本明細書に提供されるキットは、好適なパッケージングである。好適なパッケージングには、バイアル、ボトル、瓶、柔軟性パッケージングなどが含まれるが、これらに限定されない。吸入器、経鼻投与デバイス、または注入デバイスなどの特定のデバイスと組み合わせた使用のためのパッケージングも企図される。実施形態では、キットは、滅菌アクセスポートを有することができる（例えば、容器は、皮下注射針によって穿孔可能なストッパーを有する静脈用溶液バッグまたはバイアルであり得る）。

【0407】

50

実施形態では、本明細書に提供されるキットは、本明細書に記載される自己免疫疾患のがんの治療に有用な追加の治療薬を含む。

【0408】

がんに対する集学的療法

腫瘍、転移、または制御不能な細胞成長によって特徴付けられる他の疾患もしくは障害を含むがこれに限定されないがんは、カンプトテシンコンジュゲートの投与によって治療または阻害され得る。

【0409】

他の実施形態では、有効量のカンプトテシンコンジュゲートおよび化学療法剤の投与を必要とする患者にそれを行うことを含む、がんを治療するための方法が提供される。一実施形態では、化学療法剤は、それによるがんの治療が難治性であることがわかっていないものである。別の実施形態では、化学療法剤は、それによるがんの治療が難治性であることがわかっているものである。カンプトテシンコンジュゲートは、がんの治療として外科手術も受けた患者に投与され得る。

【0410】

実施形態では、患者は、放射線療法などの追加の治療も受ける。特定の実施形態では、カンプトテシンコンジュゲートは、化学療法剤または放射線療法と同時に投与される。別の特定の実施形態では、化学療法剤または放射線療法は、カンプトテシンコンジュゲートの投与の前または後に投与される。

【0411】

化学療法剤は、一連のセッションにわたって投与され得る。標準治療の化学療法剤などの化学療法剤のうちのいずれか一つまたは組み合わせが投与され得る。

【0412】

さらに、カンプトテシンコンジュゲートを用いたがんの治療方法は、化学療法または放射線療法の代替として提供され、化学療法または放射線療法は、例えば、治療される対象に対して過剰に毒性であることが証明されているか、またはそれを証明することができ、例えば、許容できない、もしくは耐え難い副作用をもたらす。治療される患者は、任意選択的に、どの治療が許容可能であるか、または耐えられるかに応じて、外科手術、放射線療法、または化学療法などの別のがん治療で治療され得る。

【0413】

本開示は、以下の実施例によって更に例示されるが、それらは本開示の範囲又は趣旨を本明細書に説明される特定の手順に限定すると解釈されるべきではない。実施例は特定の実施形態を説明するために提供されており、それによって本開示の範囲に対する限定が意図されていないことを理解されたい。当業者には自明のことであろうが、本開示の趣旨及び／又は添付の特許請求の範囲から逸脱することなく、様々な他の実施形態、変更、及びそれらの等価物に頼ることができることを更に理解されたい。

【実施例】

【0414】

本発明は、以下に示す実施例に基づいて具体的に説明される。しかしながら、本発明はこれらに限定されない。さらに、決して限定的な方法で解釈されない。さらに、特に記載がない限り、本明細書に記載される試薬、溶媒、および出発物質は、市販の供給業者から容易に入手できる。

【0415】

以下の略語は、以下の用語に使用される。

A D C	抗体－薬物コンジュゲート
A C N	アセトニトリル
D A R	薬物対抗体比
D C C	N，N'－ジシクロヘキシルカルボジイミド
D C M	ジクロロメタン
D I P A	ジイソプロピルアミン

DIPEA	ジイソプロピルエチルアミン
DMF	ジメチルホルムアミド
DMSO	ジメチルスルホキシド
DMTMM	4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド
DMTMMT	4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムテトラフルオロボレート
DTPA	ジエチレントリアミン五酢酸
EDCI	1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド
HOPO	2-ヒドロキシピリジン-1-オキシド
i.v.	静脈内
M	モル
nM	ナノモル
NMM	N-メチルモルホリン
PPTS	ピリジニウムp-トルエンスルホナート
PTSA	4-メチルベンゼンスルホン酸
SEC	サイズ排除クロマトグラフィ
TBS	tert-ブチルジメチルシリル
TCEP	3,3',3''-ホスフィントリイルトリプロパン酸塩酸塩
TEA	トリエチルアミン
TFA	トリフルオロ酢酸
THF	テトラヒドロフラン
TLC	薄層クロマトグラフィ
p-TsOH	p-トルエンスルホン酸
【0416】	

実施例1. 化合物MB-1 (P1) の例示的な合成

2,6-ジブromo-4-フルオロ-3-メチル-アニリン (1-2) の調製についての一般的手順

【化63】



【0417】

CH₂Cl₂/メタノール (1:1、1.2 L) 中の化合物1-1 (70 g、559.36 mmol、1当量) の攪拌溶液に、CH₂Cl₂/メタノール (1:1、200 mL) 中のBr₂ (223.48 g、1.40 mol、72.09 mL、2.5当量) の溶液を、添加漏斗を使用して1.5時間にわたって15℃で滴下した。反応混合物を25℃で4時間攪拌し、TLC (石油エーテル/酢酸エチル=6/1、R_f=0.6) は、出発物質が消費されたことを示した。上述のように3つの追加のバイアルを設置し、4つの反応からの混合物を組み合わせ、濃縮した。得られた残渣に、1N Na₂S₂O₃ (1.5 L) および酢酸エチル (1.5 L) を添加した。溶液を10分間攪拌し、次いで1N Na₂CO₃ (150 mL) で注意深く塩基性化した。これを分液漏斗に移し、有機層を単離した。水層を酢酸エチル (2×1 L) で抽出した。組み合わせた有機層を、1N Na₂S₂O₃ (1 L) で、続いてブライン (1 L) で洗浄し、次いで、Na₂SO₄で乾燥させた。これを濾過し、減圧下で濃縮して、残渣を得た。残渣を石油エーテル (1 L) で粉砕し、濾過して、生成物1-2 (574 g、1.93 mol、収率86%、純度95%) を淡紫色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) δ 7.

1.8 (d, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H), 4.52–4.30 (m, 2H), 2.29 (d, $J = 2.4 \text{ Hz}$, 3H)。

【0418】

1,3-ジブロモ-5-フルオロ-2-ヨード-4-メチル-ベンゼン (1-3) の調製についての一般的手順

【化64】



10

【0419】

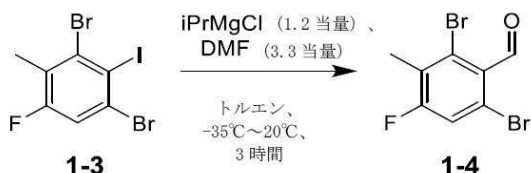
アセトニトリル (700 mL) 中の p-TsOH (90 g、522.2 mmol、3 当量) の溶液に、化合物 1-2 (49.25 g、174.07 mmol、1 当量) を添加した。得られた白色懸濁液を 10~15 °C に冷却し、次いで、水 (105 mL) 中の NaNO₂ (24.02 g、348.14 mmol、2 当量) および KI (73.22 g、435.13 mmol、2.5 当量) の溶液を徐々に添加した。懸濁液は暗褐色になり、ガスが放出された。濃厚な混合物を 10 °C で 10 分間攪拌し、次いで、20 °C でさらに 1 時間攪拌した。TLC (石油エーテル/酢酸エチル = 6/1、 $R_f = 0.6$) は、出発物質が消費されたことを示した。反応混合物を水 (400 mL) に注いだ。1 N の炭酸水素ナトリウム溶液 (200 mL) を添加して、pH を 9~10 に調整し、続いてチオ硫酸ナトリウム (200 mL) の 2 N 溶液を添加した。得られた混合物を酢酸エチル (3 × 500 mL) で抽出した。上述のように、十一個の追加のバイアルを設置した。12 個の反応物からの組み合わせた有機層を組み合わせ、Na₂SO₄ で乾燥させ、減圧下で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィによって精製し、石油エーテルで溶出して、生成物 1-3 (504 g、1.09 mol、収率 56%、純度 85%) を黄色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) δ 7.41 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H), 2.43 (d, $J = 2.4 \text{ Hz}$, 3H)。

20

【0420】

2,6-ジブロモ-4-フルオロ-3-メチル-ベンズアルデヒド (1-4) の調製についての一般的手順

【化65】



30

【0421】

無水トルエン (300 mL) 中の化合物 1-3 (50.4 g、127.98 mmol、1 当量) の溶液に、クロロ (イソプロピル) マグネシウム (テトラヒドロフラン中 2 M、76.80 mL、1.2 当量) の溶液を、内部温度を -25 °C 未満に維持しながら、10 分間添加した。透明な褐色溶液を得て、混合物を 1.5 時間攪拌し、続いて、N,N-ジメチルホルムアミド (30.86 g、422.33 mmol、3.3 当量) を 10 分間で添加した。反応混合物の温度は、添加後 -19 °C に上昇した。反応混合物を 0.5 時間にわたって 20 °C に加温し、1.5 時間攪拌した。TLC (石油エーテル/酢酸エチル = 10/1、 $R_f = 0.45$) は、反応が完了したことを示した。反応混合物を飽和水性 NH₄Cl (50 mL) でクエンチした。上述のように 10 個の追加のバイアルを設置し、11 個すべての反応混合物を組み合わせた。組み合わせた混合物を濾過し、濾液を減圧下で

40

50

蒸発させて、残渣を得た。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィによって精製し、石油エーテルで溶出して、生成物 1-4 (253 g、812.18 mmol、収率 60%、純度 95%) を黄色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) δ 10.22 (s, 1H), 7.40 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 2.37 (d, J = 2.4 Hz, 3H)。

【0422】

2-(2,6-ジブロモ-4-フルオロ-3-メチルフェニル)-1,3-ジオキソラン(4)の調製についての一般的手順。

【化66】



10

【0423】

1,2-ジクロロエタン(430 mL)中の化合物 1-4 (50.6 g、170.99 mmol、1当量)の溶液に、エチレングリコール(53.06 g、878.58 mmol、47.80 mL、5当量)、オルトギ酸トリエチル(25.34 g、170.99 mmol、28.44 mL、1当量)、および p-トルエンスルホン酸(1.47 g、8.55 mmol、0.05 当量)を添加した。反応混合物を 80°C で 3 時間攪拌し、TLC (石油エーテル/酢酸エチル = 10/1、R_f = 0.59) は、反応が完了したことを示した。上述のように 4 つの追加のバイアルを設置し、5 つの反応からの反応混合物を組み合わせた。

20

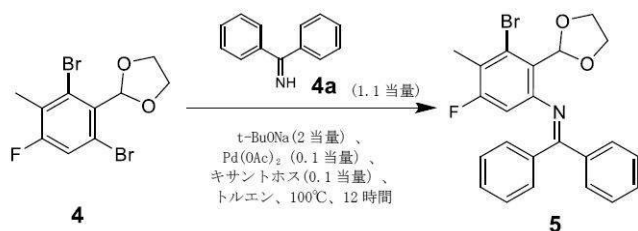
その後、組み合わせた反応混合物を、飽和水性 Na₂CO₃ (1 L)、飽和水性 NH₄Cl (1 L)、および水 (1 L) で洗浄した。有機層を Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過し、減圧下で蒸発させて、粗生成物を得た。粗生成物を石油エーテルで 20°C において 15 分間粉碎し、濾過して、生成物 4 (280 g、741.21 mmol、収率 84%、純度 90%) を淡黄色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) δ 7.34 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 4.37-4.31 (m, 2H), 4.11-4.06 (m, 2H), 2.34 (d, J = 2.4 Hz, 3H)。

30

【0424】

N-[3-ブロモ-2-(1,3-ジオキソラン-2-イル)-5-フルオロ-4-メチルフェニル]-1,1-ジフェニルメタンイミン(5)の調製についての一般的手順

【化67】



40

トルエン(100 mL)中の化合物 4 (53 g、155.89 mmol、1当量)の溶液に、化合物 4a (29.67 g、163.69 mmol、27.46 mL、1.05 当量)、ナトリウムtert-ブトキシド(29.97 g、311.78 mmol、2 当量)、酢酸パラジウム(II) (3.5 g、15.59 mmol、0.1 当量)、および 4,5-ビス(ジフェニルホスフィノ)-9,9-ジメチルキサンテン(9.02 g、15.59 mmol、0.1 当量)を N₂ 保護下で添加した。反応混合物を 100°C で 12 時

50

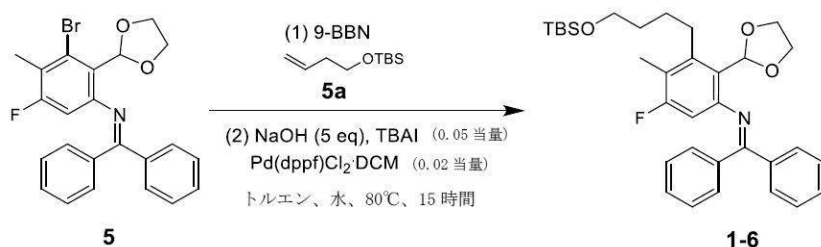
間、 N_2 保護下で攪拌し、TLC（石油エーテル／酢酸エチル＝10／1、 R_f ＝0.32）は、反応が完了したことを示した。上述のように2つの追加のバイアルを設置し、3つすべての反応混合物を組み合わせ、セライトパッドを介して濾過した。濾過ケーキを酢酸エチル（500 mL）で洗浄した。組み合わせた濾液を減圧下で濃縮して、残渣を得た。残渣をカラムクロマトグラフィによって精製し、石油エーテル／酢酸エチル＝10／1で溶出して、生成物5（105 g、214.62 mmol、収率45.61%、純度80%）を黄色固体として得た。生成物をさらなる精製なしで次の工程で使用した。 ^1H NMR（400 MHz，クロロホルム- d ） δ 7.77（br d， J ＝7.3 Hz，2 H），7.54－7.37（m，4 H），7.31（br d， J ＝4.5 Hz，3 H），7.26－7.22（m，1 H），6.48（s，1 H），5.93（d， J ＝10.3 Hz，1 H），4.11－4.05（m，2 H），3.96－3.91（m，2 H），2.23（d， J ＝2.3 Hz，3 H）。

10

【0425】

N－[3－[4－[tert－ブチル（ジメチル）シリル]オキシブチル]－2－（1，3－ジオキサラン－2－イル）－5－フルオロ－4－メチル－フェニル]－1，1－ジフェニル－メタンイミン（1－6）の調製についての一般的手順

【化68】



20

【0426】

トルエン（80 mL）中の化合物5a（5.3 g、28.44 mmol、1当量）の攪拌混合物に、窒素雰囲気下で10℃において、9-BBN（テトラヒドロフラン中0.5 M、68.13 mL、1.2当量）を添加した。得られた混合物を、窒素保護下で80℃において20分間攪拌し、TLC（石油エーテル／酢酸エチル＝1／1、生成物 R_f ＝0.2、 I_2 ）は、反応が完了したことを示した。水（20 mL）中のNaOH（2.27 g、56.78 mmol、2当量）の溶液を、窒素雰囲気下で10℃において上記混合物に添加した。得られた混合物を10℃で10分間攪拌し、続いて、化合物5（10.00 g、22.71 mmol、0.8当量）、ヨウ化テトラブチルアンモニウム（524.31 mg、1.42 mmol、0.05当量）、および[1，1－ビス（ジフェニル－ホスフィノ）フェロセン]パラジウム（II）ジクロリドジクロロメタン付加物（463.7 mg、568.8 μ mol、0.02当量）を、窒素雰囲気下で10℃において添加した。得られた混合物を、窒素雰囲気下で80℃において15時間攪拌し、LCMS（保持時間＝3.620）は、反応が完了したことを示した。上述のように七つの追加のバイアルを設置し、八つすべての反応混合物を組み合わせた。組み合わせた有機層を水（500 mL×3）で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。得られた残渣を、カラムクロマトグラフィ（ SiO_2 、石油エーテル／酢酸エチル＝10／1～5／1）によって精製し、粗生成物を得て、これを逆相HPLCによってさらに精製して、生成物1－6（45 g、82.15 mmol、収率50%、純度80%）を黄色ゴムとして得た。 ^1H NMR（400 MHz，DMSO- d_6 ） δ 7.72－7.61（m，2 H），7.59－7.51（m，1 H），7.50－7.42（m，2 H），7.37－7.22（m，4 H），7.19（br d， J ＝3.5 Hz，1 H），6.03（s，1 H），5.89（s，1 H），4.07－3.99（m，2 H），3.93－3.78（m，2 H），3.65－3.56（m，2 H），2.75－2.64（m，2 H），2.01（s，2 H），1.64（s，1 H），1.59－1.44（m，4 H），0.87

30

40

50

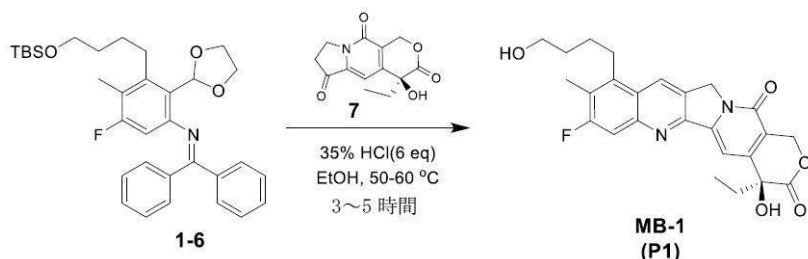
(s, 9H), 0.03 (s, 6H)。

【0427】

(19S)-19-エチル-6-フルオロ-19-ヒドロキシ-8-(4-ヒドロキシブチル)-7-メチル-17-オキサ-3,13-ジアザペンタシクロ[11.8.0.0.2.11.04,9.015,20]ヘニコサ-1(21),2,4,6,8,10,15

(20)-ヘプタエン-14,18-ジオン(MB-1、hydrotecen、海洛替康)の調製についての一般的手順

【化69】



10

【0428】

エタノール(100 mL)中の化合物7(2.4 g、1当量)の溶液に、35% HCl(5.7 g、6当量)を加え、溶液を50~60 °Cに加熱し、次いでエタノール(100 mL)中の化合物1-6(10 g、2当量)を2時間で滴下した。50~60 °Cで1.5時間攪拌した。加熱浴を除去し、反応混合物を室温まで冷却した。メチル-tert-ブチルエーテル(2000 mL)を加えて、生成物を沈殿させた。これを濾過し、固体をメチル-tert-ブチルエーテルで洗浄して、生成物MB-1(ヒドロテカン、海洛替康)を淡黄色固体として得た(2.45 g、収率59%、純度98%)。¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.89 (s, 1H), 7.77 (d, J=11.0 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.54 (br s, 1H), 5.53-5.33 (m, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.80-4.06 (m, 1H), 3.49 (br t, J=5.9 Hz, 2H), 3.19-3.11 (m, 2H), 2.43 (d, J=1.8 Hz, 3H), 1.86 (tt, J=7.2, 14.5 Hz, 2H), 1.62 (br s, 4H), 0.88 (t, J=7.3 Hz, 3H)。

20

30

【0429】

実施例2. 化合物MB-2(PL1)の例示的な合成

C₁₇H₁₄NO₄(S2)の調製についての一般的手順。

【化70】



40

【0430】

ジクロロメタン(1500 mL)中の2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)酢酸(74.92 g、252.10 mmol、2当量)、Trr-樹脂S1(120.00 g、126.05 mmol、1当量)、およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(162.85 g、1.26 mol、219.47 mL、10当量)を充填したカラムを、20 °Cで12時間、窒素で泡立てた。濾過後、残渣をジクロロメタン(3×300 mL)、ジメチルホルムアミドジクロロメタン/メタノール=1/1(3×300 mL)、およびジメチルホルムアミド(3×300 mL)で続いて洗浄した。残渣を高真空でさらに乾燥させて、粗樹脂-C₁₇H₁₄NO₄(150 g、123.66 mmol、収率98.10%、粗純度)を黄色固体として得た。生成物を精製なしで次の工程で

50

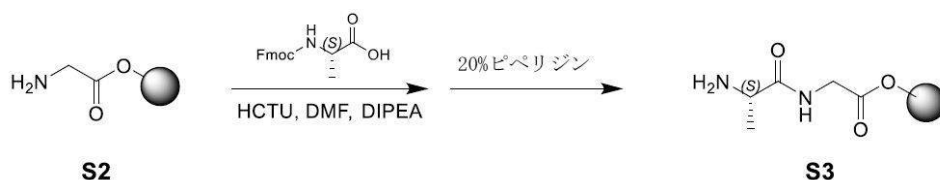
直接使用した。DMF (1200 mL) 中の樹脂- $C_{17}H_{14}NO_4$ (150 g、123.66 mmol、1 当量) を充填したカラムに、ピペリジン (105.30 g、1.24 mol、122.13 mL、10 当量) を添加した。混合物を 20℃ で 1 時間、 N_2 で泡立てた。得られた樹脂を濾過し、続いてジメチルホルムアミド (2×500 mL) およびジクロロメタン (2×500 mL) で洗浄した。樹脂を乾燥させて、樹脂- $C_2H_4NO_2$ (S2) (120 g、121.21 mmol、収率 98.02%) を黄色固体として得て、次の工程で直接使用した。

【0431】

樹脂- $C_5H_9N_2O_3$ (S3) の調製についての一般的手順

【化71】

10



【0432】

ジメチルホルムアミド (1200 mL) 中の (2S)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ) プロパン酸 (75.47 g、242.42 mmol、2 当量) および樹脂- $C_{17}H_{14}NO_4$ (S2) (120 g、121.21 mmol、1 当量) を充填したカラムに、HCTU (O-(6-クロロ-1-ヒドロシベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート) (100.29 g、242.42 mmol、2 当量) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (78.33 g、606.06 mmol、105.56 mL、5 当量) を添加した。混合物を 20℃ で 1 時間、 N_2 で泡立てた。得られた樹脂を濾過し、ジメチルホルムアミド (2×500 mL) およびジクロロメタン (2×500 mL) で連続的に洗浄した。これを乾燥させて、樹脂- $C_{20}H_{19}N_2O_5$ (150 g、粗) を黄色固体として得て、これを次の工程で直接使用した。ジメチルホルムアミド (1200 mL) 中の樹脂- $C_{20}H_{19}N_2O_5$ (150 g、116.91 mmol、1 当量) を充填したカラムに、ピペリジン (99.55 g、1.17 mol、115.46 mL、10 当量) を添加した。混合物を 20℃ で 1 時間、 N_2 で泡立てた。得られた樹脂を濾過し、ジメチルホルムアミド (2×500 mL) およびジクロロメタン (2×500 mL) で連続的に洗浄した。これを乾燥させて、樹脂- $C_5H_9N_2O_3$ (S3) (120 g、粗) を黄色固体として得て、次の工程で直接使用した。

20

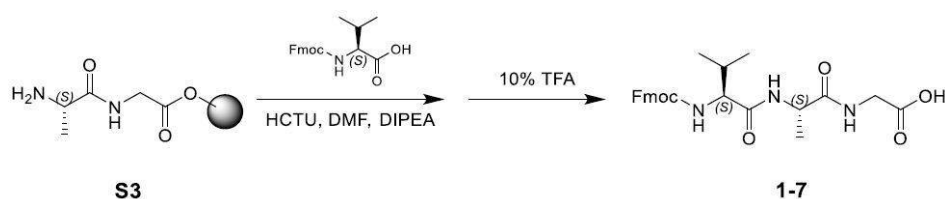
30

【0433】

2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-メチルブタノイル]アミノ]プロパノイル]アミノ]酢酸 (1-7) の調製についての一般的手順

【化72】

40



【0434】

ジメチルホルムアミド (200 mL) 樹脂- $C_5H_9N_2O_3$ (S3) (120 g、112.99 mmol、1 当量) および (2S)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-メチルブタン酸 (76.70 g、225.99 mmol、2 当量) を充填したカラムに、O-(6-クロロ-1-ヒドロシベンゾトリアゾール-1

50

－イル)－1, 1, 3, 3－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (93.49 g、225.99 mmol、2当量) および N, N－ジイソプロピル－エチルアミン (73.02 g、564.97 mmol、98.41 mL、5当量) を添加した。混合物を 20℃ で 12 時間、N₂ で泡立てた。得られた樹脂を濾過し、ジメチルホルムアミド (2×500 mL) およびジクロロメタン (2×500 mL) で連続的に洗浄した。樹脂を、トリフルオロ酢酸／ジクロロメタン (10%、3×500 mL) でクエンチした。有機層を組み合わせ、減圧下で濃縮して、残渣を得た。残渣を 20℃ で 12 時間、n－ヘキサンで粉砕した。これを濾過して、生成物 1－7 (60 g、39.05 mmol、収率 34.56%、純度 90%) を白色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.17 (br t, J=5.7 Hz, 1H), 7.99 (d, J=7.5 Hz, 1H), 7.89 (d, J=7.3 Hz, 2H), 7.74 (t, J=6.6 Hz, 2H), 7.45－7.38 (m, 3H), 7.37－7.29 (m, 2H), 4.39－4.19 (m, 4H), 3.93－3.66 (m, 3H), 2.03－1.92 (m, 1H), 1.22 (d, J=7.1 Hz, 3H), 0.85 (dd, J=6.9, 9.8 Hz, 6H)。

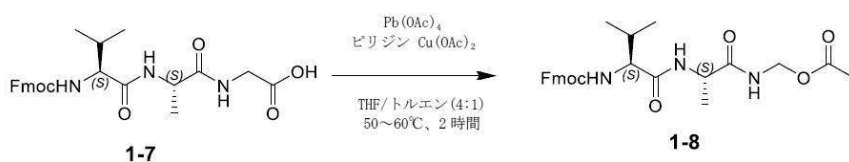
10

【0435】

[[(2S)－2－[[(2S)－2－(9H－フルオレン－9－イルメトキシカルボニルアミノ)－3－メチル－ブタノイル] アミノ] プロパノイル] アミノ] 酢酸メチル (1－8) の調製についての一般的手順。

20

【化73】



【0436】

THF (1000 mL) およびトルエン (250 mL) 中の化合物 1～7 (90.0 g)、ピリジン (30.6 g、2当量)、酢酸鉛 (IV) (189 g、2当量)、および Cu(OAc)₂ (3.6 g、0.1当量) の溶液を、50～60℃ で 2 時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却し、濾過して不溶性塩を除去した。濾液を THF/MTBE (1:4) で希釈して、所望の生成物を沈殿させた。濾過し、固体を THF/MTBE (1:4) で洗浄して、生成物 1－8 を淡黄色固体 (84.2 g、収率=90.8%、純度 91.9%) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.03－7.93 (m, 1H), 7.89 (d, J=7.5 Hz, 2H), 7.74 (br t, J=6.3 Hz, 2H), 7.47－7.36 (m, 3H), 7.36－7.28 (m, 2H), 5.16－5.02 (m, 1H), 4.39－4.26 (m, 2H), 4.22 (br d, J=3.9 Hz, 2H), 3.93－3.82 (m, 1H), 1.98 (s, 2H), 1.78 (s, 1H), 1.27－1.13 (m, 3H), 0.92－0.75 (m, 6H)。

30

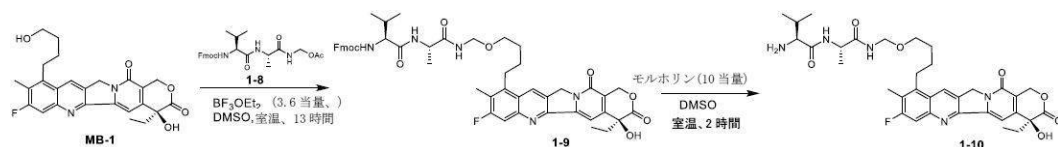
40

【0437】

(2S)－2－アミノ－N－[[(1S)－2－[4－[[(19S)－19－エチル－6－フルオロ－19－ヒドロキシ－7－メチル－14, 18－ジオキソ－17－オキサ－3, 13－ジアザペンタシクロ [11.8.0.0^{2,11}.0^{4,9}.0^{15,20}] ヘニコサー 1 (21), 2, 4, 6, 8, 10, 15 (20)－ヘプタエン－8－イル] ブトキシメチルアミノ]－1－メチル－2－オキソ－エチル]－3－メチル－ブタンアミド (1－10) の調製についての一般的手順

50

【化 7 4】



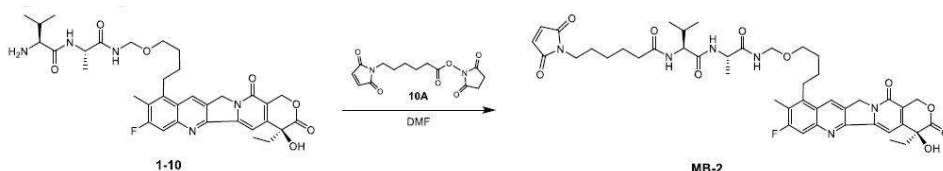
【0 4 3 8】

無水DMSO (90 mL) 中のMB-1 (ヒドロテカン) (10.7 g、0.0236 mol) および化合物1-8 (14.7 g、0.0306 mol、1.3当量) の攪拌溶液に、BF₃ エーテル酸 (12.1 g、0.0852 mol、3.6当量) を室温で加えた。反応溶液を、室温で13時間攪拌し続けた。反応サンプルのLCMSでは、生成物1-9の約75%が生成され、出発物質MB-1の6%が残ることが示された。モルホリン (20.5 g、0.236 mol) を反応溶液に加え、反応溶液を室温で2時間攪拌し続けた。これを、分取HPLC (C18カラム、移動相CH₃CN/H₂O) により直接精製し、凍結乾燥後のオフホワイト固体として生成物1-10を得た (9.1 g、y = 59%、純度96.1%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.87 (s, 1H), 8.68 (br s, 1H), 8.09 (br s, 1H), 7.77 (br d, J = 10.6 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.29 (br s, 2H), 4.55 (br s, 2H), 4.28 (br s, 1H), 3.46 (br s, 1H), 3.45-3.42 (m, 1H), 3.14 (br s, 2H), 3.02 (br s, 1H), 2.43 (br s, 3H), 1.88 (br dd, J = 7.9, 14.8 Hz, 3H), 1.70 (br s, 2H), 1.58 (br s, 2H), 1.19 (br d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.88 (br t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.82 (br d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.73 (br d, J = 6.6 Hz, 3H)。

【0 4 3 9】

6-(2.5-ジオキソピロール-1-イル)-N-[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-[(19S)-19-エチル-6-フルオロ-19-ヒドロキシ-7-メチル-14,18-ジオキソ-17-オキサ-3,13-ジアザペンタシクロ[11.8.0.0^{2,11}.0^{4,9}.0^{15,20}]ヘニコサ-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-ヘプタン-8-イル]プトキシメチルアミノ]-1-メチル-2-オキソ-エチル]カルバモイル]-2-メチル-プロピル]ヘキサンアミド (MB-2) の調製についての一般的手順

【化 7 5】



【0 4 4 0】

N,N-ジメチルホルムアミド (10 mL) 中の化合物1-10 (400 mg、613.8 μmol、1当量) の溶液に、化合物10A (283.8 mg、920.6 μmol、1.5当量) を添加した。反応混合物を15℃で12時間攪拌した。LCMS (生成物の保持時間 = 2.080) は、化合物1-10のすべてが消費され、所望のMSを有する新たなピークが検出されたことを示した。反応混合物を濾過し、濾液を移動相として、アセトニトリルおよび脱イオン水を使用した分取HPLCによって精製して、生成物MB-2 (173 mg、203.9 μmol、収率33.36%、純度95.74%) を白色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.87 (s, 1H), 8.57 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 7.2 Hz, 1H),

7.81–7.71 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.52 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 5.49–5.37 (m, 1H), 5.30 (s, 2H), 4.54 (dq, J=6.6, 10.1 Hz, 2H), 4.21 (quin, J=7.1 Hz, 1H), 4.10 (dd, J=6.8, 8.4 Hz, 1H), 3.48–3.41 (m, 2H), 3.37–3.34 (m, 2H), 3.20–3.08 (m, 2H), 2.43 (d, J=2.0 Hz, 3H), 2.18–2.01 (m, 2H), 1.95–1.79 (m, 3H), 1.68 (br d, J=7.0 Hz, 2H), 1.58 (br s, 2H), 1.51–1.38 (m, 4H), 1.20–1.10 (m, 5H), 0.88 (t, J=7.3 Hz, 3H), 0.76 (dd, J=6.8, 9.3 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 173.09, 172.54, 172.26, 171.09, 170.85, 160.54, 156.86, 152.36, 150.00, 147.85, 145.38, 140.13, 134.46, 129.33, 128.33, 125.02, 124.04, 119.05, 110.14, 96.73, 72.40, 69.18, 66.72, 65.27 (br s, 1C), 57.44, 50.49 (br s, 1C), 48.29, 37.02, 34.88, 30.31 (br s, 1C), 29.00, 27.78, 27.62 (br s, 1C), 26.73 (br s, 1C), 25.78, 24.89, 19.18, 18.03 (br d, J=5.8 Hz, 1C), 11.46, 7.80. HRMS (ESI-TOF) m/z: [M+H]⁺ 計算値 845.39; 実測値 845.3859.

10

【0441】

20

分取HPLC法:

Gilson 281 半分取HPLCシステムおよびPhenomenex Gemini C18 カラム (75×40 mm×3 μ m); 移動相: アセトニトリルおよび水; 流量: 25 mL/分; モニター波長: 220 および 254 nm。グラジエント: 8 分で 30% から 50% のアセトニトリル、0.2 分で 50% から 100% のアセトニトリル、2 分間 100% のアセトニトリル、0.1 分で 100% から 30% のアセトニトリル、次いで 1.2 分間 30% のアセトニトリル。

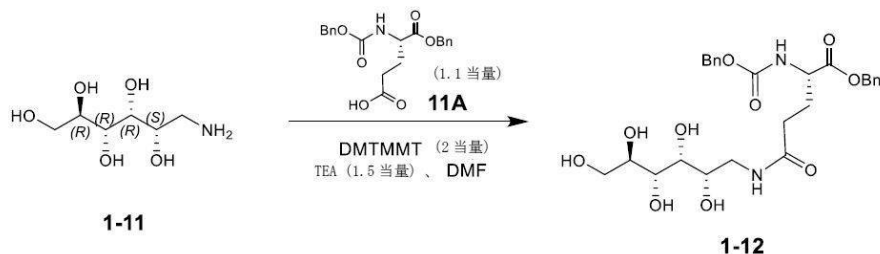
【0442】

実施例 3. MB-3 (メディテカン、美迪替康) (PL3) の合成例

ベンジル (2S) -2- (ベンジルオキシカルボニルアミノ) -5-オキソ-5- [(2S, 3R, 4R, 5R) -2, 3, 4, 5, 6-ペンタヒドロキシヘキシル] アミノ] ペンタノエート (1-12) の調製についての一般的手順。

30

【化76】



40

【0443】

N, N-ジメチルホルムアミド (27 mL) 中の化合物 11A (6.03 g、16.27 mmol、1.1 当量) の溶液に、4- (4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン-2-イル) -4-メチルモルホリニウムテトラフルオロボレート (DMTMMT) (9.7 g、29.59 mmol、2 当量) およびトリエチルアミン (2.24 g、22.19 mmol、1.5 当量) を連続的に添加した。25℃で0.5時間攪拌した後、化合物 1-11 (2.68 g、14.79 mmol、1 当量) を添加し、反応混合物を 25℃で12時間攪拌した。LCMS (生成物の保持時間=0.253) は、出発物質が消費され、所望のMSを有する新たなピークが検出されたことを示した。反応混合物を水 (50

50

mL)で希釈し、ジクロロメタン(6×50mL)で抽出した。組み合わせた有機層をブライン(3×130mL)で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過した。濾液を減圧下で濃縮し、残渣を高真空状態にして、油を得た。油を、逆相HPLC(3kg Agela C18カラム、CH₃CN/H₂O、300mL/分、グラジエント:10分間30%のCH₃CN、30分で30%から45%のCH₃CN、35分間45%のCH₃CN;約15グラムの粗生成物を70mLのDMFに溶解してカラム上に装填した)によって精製して、生成物1-12(4g、6.74mmol、収率46.1%、純度99%)を白色として得た。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ 1.72-1.85(m, 1H) 1.91-2.03(m, 1H) 2.18(br t, J=7.44Hz, 2H) 2.96-3.03(m, 1H) 3.24(dt, J=13.16, 5.17Hz, 2H) 3.37-3.40(m, 2H) 3.44(br s, 2H) 4.04-4.11(m, 1H) 4.29(d, J=6.38Hz, 1H) 4.39-4.45(m, 2H) 4.51(d, J=5.63Hz, 1H) 4.75(d, J=4.63Hz, 1H) 4.96-5.14(m, 4H) 7.19-7.46(m, 10H) 7.68-7.85(m, 2H)。

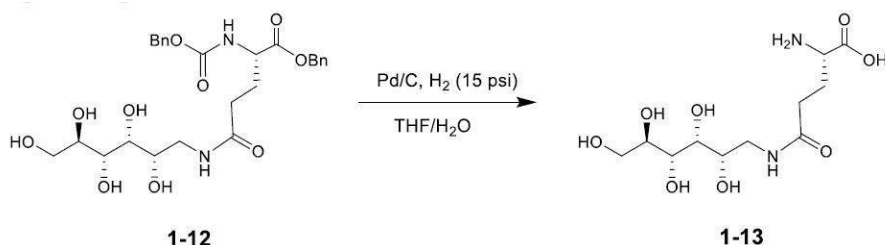
10

【0444】

(2S)-2-アミノ-5-オキソ-5-[[(2S, 3R, 4R, 5R)-2, 3, 4, 5, 6-ペンタヒドロキシヘキシル] アミノ] ペンタン酸(1-13)の調製についての一般的手順。

20

【化77】



【0445】

水(192mL)およびテトラヒドロフラン(48mL)中の化合物1-12(4g、7.48mmol、1当量)の溶液に、Pd/C(15.86g、14.96mmol、10重量%、2当量)を添加した。混合物をH₂(15psi)下で25℃において12時間攪拌した。LCMS(生成物の保持時間=0.137)は、出発物質が消費され、所望の生成物が検出されたことを示した。混合物を、セライトパッドを通して濾過し、濾液を濃縮して、生成物1-13(2g、6.26mmol、収率83.6%、純度97.1%)を白色固体として得た。¹H NMR(400MHz, 重水) δ 3.84(dt, J=7.76, 4.74Hz, 1H) 3.70-3.80(m, 4H) 3.58-3.64(m, 2H) 3.41(dd, J=14.06, 4.03Hz, 1H) 3.25(dd, J=14.06, 7.83Hz, 1H) 2.41(br s, 2H) 2.10(br s, 2H)。

30

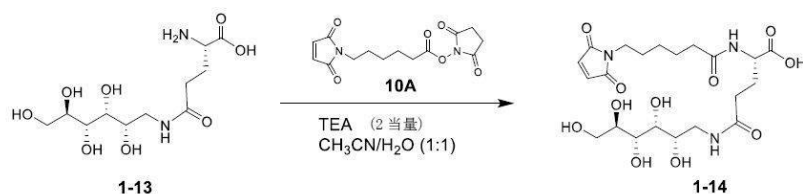
40

【0446】

(2S)-2-[[6-(2, 5-ジオキソピロール-1-イル)ヘキサノイルアミノ]-5-オキソ-5-[[(2S, 3R, 4R, 5R)-2, 3, 4, 5, 6-ペンタヒドロキシヘキシル] アミノ] ペンタン酸(1-14)の調製についての一般的手順。

50

【化 7 8】



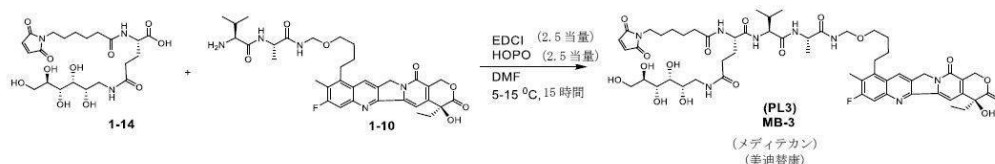
【0 4 4 7】

アセトニトリル (100 mL) および水 (100 mL) 中の化合物 1-13 (含有水および 0.0361 mol または 11.2 g の 1-13) および 10A (11.13 g、0.0361 mol) の攪拌溶液に、10~20℃で TEA (7.3 g、0.0722 mol) を添加した。反応溶液を、10~20℃で 18 時間攪拌し続けた。これを、分取 HPLC (C18 カラム、移動相: CH₃CN および水) により精製し、凍結乾燥後に淡赤色固体として生成物 1-14 を得た (9.7 g、 $y=53\%$ 、純度 95.7%)。¹H NMR (400 MHz, 重水) δ 6.78 (s, 1H) 4.30 (dd, $J=9.11$, 5.07 Hz, 1H) 3.83 (dt, $J=7.89$, 4.74 Hz, 1H) 3.79–3.74 (m, 1H) 3.74–3.68 (m, 2H) 3.65–3.57 (m, 2H) 3.46 (t, $J=6.91$ Hz, 2H) 3.40 (dd, $J=14.06$, 4.16 Hz, 1H) 3.23 (dd, $J=14.00$, 7.89 Hz, 1H) 2.39–2.30 (m, 2H) 2.24 (t, $J=7.27$ Hz, 2H) 2.20–2.08 (m, 1H) 2.04–1.89 (m, 1H) 1.55 (dq, $J=14.04$, 7.19, 7.19, 7.19 Hz, 4H) 1.28–1.17 (m, 2H)。

【0 4 4 8】

(2S)-2-[6-(2.5-ジオキソピロール-1-イル)ヘキサノイルアミノ]-N-[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-[(19S)-19-エチル-6-フルオロ-19-ヒドロキシ-7-メチル-14,18-ジオキソ-17-オキサ-3,13-ジアザペンタシクロ[11.8.0.02,11.04,9.015,20]ヘニコサー-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-ヘプタン-8-イル]ブトキシメチルアミノ]-1-メチル-2-オキソ-エチル]カルバモイル]-2-メチル-プロピル]-N'-[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-ペンタヒドロキシヘキシル]ペンタンジアミド (MB-3、メディテカン、美迪替康) の調製についての一

【化 7 9】



【0 4 4 9】

無水 DMF (400 mL) 中の化合物 1-10 (15 g、純度: 90.1%、0.0207 mol) および化合物 1-14 (8.7 g、0.0173 mol) の攪拌溶液に、EDCI (8.04 g、0.0518 mol) および HOPO (5.75 g、0.0518 mol) の混合物を 5~15℃で加えた。5~15℃で 13.5 時間攪拌し続け、分取 HPLC (C18 カラム、移動相: CH₃CN/H₂O) により精製して、生成物 MB-3 (メディテカン、美迪替康) をオフホワイト固体 (7.1 g、 $y=30.2\%$ 、純度 98.8%) として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.87 (s, 1H), 8.60 (br s, 1H), 8.08 (br d, $J=6.2$ Hz, 1H), 8.00 (br d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.77 (br d, $J=11.5$ Hz, 1H), 7.72 (br s, 1H), 7.63 (br d, $J=9.3$ Hz, 1H)

), 7.32 (s, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.53 (s, 1H), 5.43 (br s, 2H), 5.29 (br s, 2H), 4.74 (br s, 1H), 4.57 (br s, 1H), 4.52 (br d, J=6.6 Hz, 1H), 4.47 (br d, J=5.5 Hz, 1H), 4.38 (br d, J=5.1 Hz, 1H), 4.33 (br s, 1H), 4.26 (br d, J=6.4 Hz, 1H), 4.23 (br d, J=6.6 Hz, 2H), 4.13 (br s, 1H), 3.55 (br d, J=4.4 Hz, 3H), 3.45 (br s, 7H), 3.14 (br s, 3H), 3.00 (br s, 1H), 2.42 (br s, 3H), 2.08 (br d, J=5.7 Hz, 4H), 1.96–1.78 (m, 1H), 1.96–1.78 (m, 4H), 1.69 (br s, 3H), 1.58 (br s, 2H), 1.45 (br s, 4H), 1.18 (br d, J=6.4 Hz, 5H), 0.88 (br t, J=7.1 Hz, 3H), 0.76–0.76 (m, 1H), 0.76 (br dd, J=6.9, 11.4 Hz, 5H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 173.14, 172.49 (d, J=10.3 Hz, 1C), 172.08, 171.53, 171.14, 170.58, 163.06, 160.59, 156.93, 152.35, 150.07, 147.96 (d, J=13.9 Hz, 1C), 145.41, 140.24, 134.48, 129.34, 128.39, 125.08, 124.09, 119.08, 110.24 (br d, J=22.7 Hz, 1C), 96.83, 72.44, 72.10, 71.78, 71.55, 69.67, 69.25, 66.80, 65.33, 63.38, 57.25, 52.34, 50.52, 48.41, 42.09, 37.02, 34.99, 31.98, 30.69, 30.36, 29.01, 27.81, 27.65 (br s, 1C), 26.75, 25.82, 24.80, 19.12, 17.88 (d, J=11.7 Hz, 1C), 11.44 (d, J=5.9 Hz, 1C), 7.81. HRMS (ESI-TOF) m/z: [M+H]⁺ 計算値 1137.52; 実測値 1137.5140.

10

20

30

40

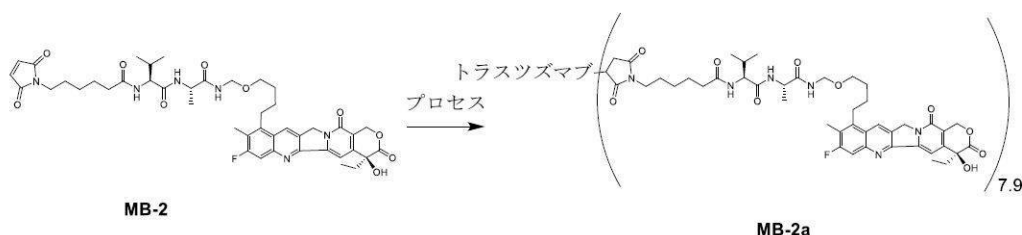
50

【0450】

実施例4. 抗体-薬物コンジュゲートMB-2aおよびMB-3a (トラスツズマブメディカン) の例示的な合成

トラスツズマブ-薬物コンジュゲートMB-2aの調製についての一般的手順

【化80】



【0451】

50 mM コンジュゲーション緩衝液 (pH 7.4): 1 リットルは、6.86 g の $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ および 1.58 g の $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を含有する。

【0452】

10 mM DTPA (ペンテト酸) 溶液: 1 リットルは、3.90 g の DTPA および 1.20 g の NaOH を含有する。

【0453】

25 mM His / His-HCl 製剤緩衝液 (pH 5.5): 1 リットルは、0.90 g の L-ヒスチジン および 4.04 g の L-ヒスチジン塩酸塩一水和物を含有する。

【0454】

抗体調製: 452 mg の凍結乾燥トラスツズマブ粉末を、22 mL の精製水に溶解した。得られた抗体溶液を、限外濾過チューブ (30 KD) を使用して、50 mM コンジュゲーション緩衝液を用いて4サイクル透析して、8.63 mg/mL の抗体濃度を得た (ト

ラスツズマブの吸光係数 $\epsilon_{280} = 213380 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を使用した)。

【0455】

抗体の還元：12.2 mL (105 mg、0.000724 mmol のトラスツズマブ) の上記で調製されたトラスツズマブ溶液を含有するチューブに、6.2 mL の 50 mM コンジュゲーション緩衝液を添加し、続いて 579.2 μL の TCEP (10 mM) および 2.1 mL の 10 mM DTPA を添加した。チューブをサーモミキサに入れ、還元反応を 25℃ で 2 時間実行した。

【0456】

抗体とペイロードとの間のコンジュゲーション：上記のトラスツズマブ還元溶液に、DMSO (1.76 mL) 中の MB-2 (7.45 mg、0.00882 mmol) の溶液を添加した。チューブをサーモミキサに入れ、コンジュゲーション反応を 25℃ で 1 時間実行した。

【0457】

精製：上記のコンジュゲーション反応溶液を、25 mM His / His-HCl 製剤緩衝液を用いた 6 サイクルにわたる限外濾過チューブ (30 KD) を使用した精製に供して、5.5 mL (15.1 mg/mL、抗体収量 = 83 mg、収率 = 79%) の MB-2a を製剤緩衝液中で得た。

【0458】

MB-2a の物理化学的特性化 (ペイロードの吸光係数 $\epsilon_{280} = 4546 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ および $\epsilon_{360} = 17513 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を使用した) (表 1)：

【表 1-1】

表 1

分析項目	方法	結果
単量体レベル	SEC-HPLC	99.4%

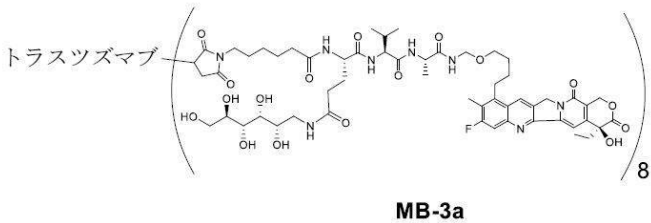
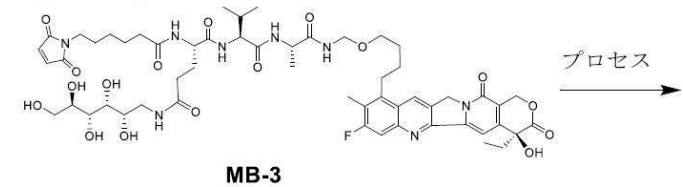
【表 1-2】

DAR	HIC-HPLC	DAR = 7.9 D6 = 5.9% D8 = 94.1%		
濃度	UV-Vis	質量濃度	15.1 mg/mL	
		モル濃度	抗体	98.9 $\mu\text{mol/L}$
			ペイロード	797.3 $\mu\text{mol/L}$

【0459】

トラスツズマブ-薬物コンジュゲート MB-3a の調製についての一般的手順

【化 81】



10

20

30

40

50

【0460】

50 mM コンジュゲーション緩衝液 (pH 7.4) : 1 リットルは、6.86 g の $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ および 1.58 g の $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を含有する。

【0461】

10 mM DTPA (ペンテト酸) 溶液 : 1 リットルは、3.90 g の DTPA および 1.20 g の NaOH を含有する。

【0462】

25 mM His / His-HCl 製剤緩衝液 (pH 5.5) : 1 リットルは、0.90 g の L-ヒスチジンおよび 4.04 g の L-ヒスチジン塩酸塩一水和物を含有する。

【0463】

抗体調製 : 452 mg の凍結乾燥トラスツズマブ粉末を、22 mL の精製水に溶解した。得られた抗体溶液を、限外濾過チューブ (30 KD) を使用して、50 mM コンジュゲーション緩衝液を用いて 4 サイクル透析して、8.63 mg/mL の抗体濃度を得た (トラスツズマブの吸光係数 $\epsilon_{280} = 213380 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を使用した)。

【0464】

抗体の還元 : 12.2 mL (105 mg、0.000724 mmol のトラスツズマブ) の上記で調製されたトラスツズマブ溶液を含有するチューブに、6.2 mL の 50 mM コンジュゲーション緩衝液を添加し、続いて 579.2 μL の TCEP (10 mM) および 2.1 mL の 10 mM DTPA を添加した。チューブをサーモミキサに入れ、還元反応を 25°C で 2 時間実行した。

【0465】

抗体とペイロードとの間のコンジュゲーション : 上記のトラスツズマブ還元溶液に、DMSO (1.77 mL) 中の MB-3 (10.02 mg、0.00886 mmol) の溶液を添加した。チューブをサーモミキサに入れ、コンジュゲーション反応を 25°C で 1 時間実行した。

【0466】

精製 : 上記のコンジュゲーション反応溶液を、25 mM His / His-HCl 製剤緩衝液を用いた 6 サイクルにわたる限外濾過チューブ (30 KD) を使用した精製に供して、6.2 mL (14.6 mg/mL、抗体収量 = 90.5 mg、収率 = 86%) の MB-3a を製剤緩衝液中で得た。

【0467】

MB-3a の物理化学的特性化 (ペイロードの吸光係数 $\epsilon_{280} = 4546 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ および $\epsilon_{360} = 17513 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を使用した) (表 2) :

【表 2】

表 2

分析項目	方法	結果		
単量体レベル	SEC-HPLC	98.4%		
DAR	HIC-HPLC	DAR = 8 D8 = 100%		
濃度	UV-Vis	質量濃度		14.6 mg/mL
		モル濃度	抗体	94.8 $\mu\text{mol/L}$
			ペイロード	772.5 $\mu\text{mol/L}$

【0468】

実施例 5. 毒素および ADC のインビトロアッセイ

96 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 1500 細胞で 175 μL の細胞懸濁液を分注し、加湿インキュベータ (37°C、5% CO_2) で 24 時間インキュベートした。抗体遮断については、 $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ のトラスツズマブ (最終濃度 1 μM) で、細胞 (1500 細胞/mL) をインキュベートした。プレート内の細胞培養培地 (ウシ胎児血清、Invitrogen) に、5 $\times$ 溶液として 25 μL の様々な濃度の化合物を添加し、インキ

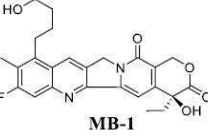
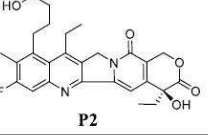
ューベータで120時間インキュベートした。卓上または37℃の水浴中でCCK-8を解凍し、インキュベートしたプレートの各ウェルに10μLのCCK-8を添加し（O.D.読み取りを妨げるため、気泡をウェルに導入しないように注意）、次いで、インキュベータで1～4時間さらにインキュベートした。SpectraMax i3x Microplate Readerを使用して450nmで吸光度を測定し、細胞阻害率を計算した。IC₅₀曲線を、GraphPad Prismソフトウェアを使用してIC₅₀値とともに生成した。

【0469】

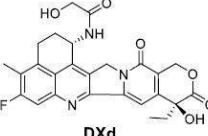
毒素（ADCの予測された代謝産物）のインビトロ細胞傷害性アッセイの結果を、以下の表3および図1A～1Fに要約する。代謝産物MB-1の細胞傷害性は、MB-1がDXdよりも十倍強力である中等度のHer-2発現およびトラスツズマブ耐性細胞株JIMT-1を除いて、複数の細胞株中のDS-8201a（Enhertu）の代謝産物であるDXdと同等である。

【表3-1】

表3

化合物	細胞株（IC ₅₀ 、nM）						
	SK-BR-3	MCF-7	NCI-N87	SK-OV-3	MDA-MB-468	JIMT-1	OVCAR-3
 MB-1	0.77	0.37	1.3	1.0	0.42	0.78	0.10
 P2	>30		>30		>30	>30	

【表3-2】

化合物	細胞株（IC ₅₀ 、nM）						
	SK-BR-3	MCF-7	NCI-N87	SK-OV-3	MDA-MB-468	JIMT-1	OVCAR-3
 DXd	1.9	0.57	3.6	4.7	0.57	8.7	0.20

【0470】

ペイロードMB-3（メディテカン）は、リンカー中のポリオール部分の存在に起因して、MB-2および第一製薬のペイロード、デルクステカンよりも親水性が高い。したがって、MB-3は、ジスルフィド還元されたトラスツズマブとの反応性が高く、DAR値が8である均質なADCであるMB-3a（トラスツズマブメディテカン）が得られる。対照的に、MB-2aおよびDS-8201a（トラスツズマブデルキステカン）は両方とも、低減された抗体に対するペイロードの反応性が低いため、DAR6種の含有率が低い。ADCのHIC-HP LCスペクトルを図2A～2Cに示す。親水性ペイロードMB-3は、コンジュゲーション反応においてより反応性が高く、均質なADCとしてMB-3aが得られる。ADCのMB-2aおよびMB-3aにそれぞれ組み込まれたペイロードMB-2aおよびMB-3aは、DS-8201a（Enhertu）よりも優れたバスタンダー活性を有するADCを可能にするように設計されている。

【0471】

A D C のインビトロ細胞傷害性アッセイの結果を、以下の表 4 および図 3 A ～ 3 D に要約する。M B - 2 a および M B - 3 a などの式 I I I の例示的化合物に加え、比較のために、トラスツズマブおよび A D C トラスツズマブデルクステカン (D S - 8 2 0 1 a) の活性も評価した。表 4 および図 3 A ～ 3 D に示されるように、トラスツズマブ A D C である M B - 2 a および M B - 3 a は、H e r 2 高発現細胞株、N C I - N 8 7 中で、D S - 8 2 0 1 a と同じ効力を示した (図 3 A)。しかしながら、H e r 2 抗原をトラスツズマブで遮断すると、A D C の細胞成長阻害能力は減少した (図 3 B)。さらに、A D C は、H e r 2 陰性細胞株 M D A - M B - 4 6 8 中で強力ではなく (図 3 D)、H e r 2 発現細胞に対する A D C の特異性を実証している。A D C は、中程度レベルの H e r 2 発現を有する J I M T - 1 細胞におけるインビトロアッセイでは感受性ではないが、M B - 2 a および M B - 3 a はそれでもやはり、この細胞株中で D S - 8 2 0 1 a よりも相対的に強力である (図 3 C)。

10

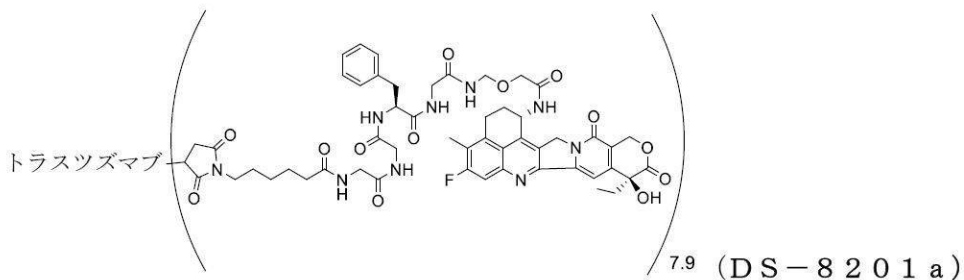
【表 4】

表 4

化合物	細胞株 (I C ₅₀ 、nM)				
	NCI-N87	NCI-N87 トラスツズマブ遮断 を伴う	JIMT-1	MDA-MB-468	SK-Br-3
トラスツズマブ	495				0.56
MB-2a	11.5	37.8	3773	>1000	
MB-3a	11.1	36.4	1815	>1000	0.12
DS-8201a	11.3	29	6496	>1000	0.09

20

【化 8 2】



30

【0 4 7 2】

製剤緩衝液中の A D C の安定性試験では、M B - 2 a、M B - 3 a、および D S - 8 2 0 1 a はすべて室温で安定であった。D A R 値は、2 5 ° C または 3 7 ° C で変化しなかったが、これは、ペイロードが抗体から脱落していないことを示している。M B - 2 a および D S - 8 2 0 1 a 製剤は、3 7 ° C で経時的に高分子量 (H M W) および低分子量 (L M W) 種の増加を示した。M B - 3 a では、3 7 ° C で 6 日後、L M W 種のみがわずかに増加した。M B - 3 a は、親水性のペイロードをより多く組み込んだため、M B - 2 a や D S - 8 2 0 1 a よりも高温での安定性が高い。安定性データを表 5 に示す。

40

50

【表 5】

表 5

ADC	温度	時間 (日)	SEC (%)			HIC DAR
			HMW	単量体	LMW	
MB-2 a	25℃	0	0.6	99.4	/	7.55
		1	0.7	99.3	/	7.52
		3	1.0	98.4	0.6	7.53
	37℃	3	0.7	91.3	8	7.56
		6	3.9	86.0	9.1	7.51
MB-3 a	25℃	0	0.7	99.3	/	8
		1	0.7	99.1	0.2	8
		3	0.7	99.1	0.2	8
	37℃	3	0.8	95.0	4.2	8
		6	0.9	94.2	4.9	8
DS-8201 a	25℃	0	0.9	99.1	/	7.55
		1	1.0	99.0	/	7.55
		3	0.8	99.2	/	7.57
	37℃	3	0.8	94.9	4.3	7.58
		6	3.7	86.6	9.7	7.58

【0473】

実施例 6. NCI-N87 CDX モデルにおける ADC のインビボ有効性

各マウス (Vital Rivers からの雌 Balb/c-Nude) の右脇腹に、腫瘍発生のために 0.2 mL の PBS 中 Matrigel と混合された NCI-N87 腫瘍細胞 (5×10^6) (50:50) を皮下接種した。動物を、腫瘍接種後 6 日目に無作為に群分けし、平均腫瘍体積がおおよそ 160 mm^3 に達したときに、有効性研究のための処置を開始した。各群は、8 匹のマウスを含有した。試験物質および対照物質を、5 mL/kg の体積で尾静脈を介して腫瘍担持マウスに投与した。

【0474】

腫瘍サイズを、キャリパーを使用して二次元で週に二回測定し、体積を、以下の式を使用して mm^3 で表した： $V = 0.5 a \times b^2$ (式中、a および b は、それぞれ腫瘍の長寸法および短寸法であった)。結果を、平均および標準誤差 (平均 $\pm$ SEM) によって表した。

【0475】

統計分析：二元配置 ANOVA を実施して、二群間の腫瘍体積を比較した。すべてのデータを、Graphpad Prism 6.0 を使用して分析し、0.05 未満の P は、統計的に有意であるとみなされた。統計分析および生物学的観察の両方を考慮に入れた。

【0476】

腫瘍成長阻害：T/C 値の計算のために腫瘍サイズを使用した。相対腫瘍増殖率の T/C (%) を、式： $T/C (\%) = (T_i / T_0) / (V_i / V_0) \times 100 \%$ を使用して計算した。相対腫瘍成長阻害を、式： $TGI (\%) = [1 - (T_i / T_0) / (V_i / V_0)] \times 100 \%$ を使用して計算した。

0)] $\times 100\%$ によって計算した。T i は、処置後の各指示された時点で測定された処置群の平均腫瘍体積を指し、T 0 は、群分けしたときの処置群の腫瘍体積を指し、V i は、処置後の各指示された時点で測定されたビヒクル対照群の平均腫瘍体積を指し、V 0 は、群分けしたときのビヒクル対照群の腫瘍体積を指す。T / C が 40 % を超える場合、有効性はなく、T / C が 40 % 以下であり、p 値が 0.05 未満である場合、腫瘍阻害がある。

【0477】

NCI-N87 C D X モデルにおける A D C の抗腫瘍効果は、図 4 および表 6 に示される。図 4 に示されるように、MB-2 a (1 mg / kg および 4 mg / kg の投与量) ならびに MB-3 a (1 mg / kg および 4 mg / kg の投与量) の両方は、強力な抗腫瘍効果を実証し、DS-8201 a (E n h e r t u) よりも有効である。

10

【表 6】

表 6

モデル	ADC	投与量 (mg/Kg、単回静脈内)	退縮		TGI (%) (23日目)	注釈
			部分	完全		
NCI-N87	ビヒクル	該当なし	----	----	----	----
	トラスツズマブ	4	0/8	0/8	16.8	不活性
	MB-2 a	0.25	0/8	0/8	12.0	不活性
	MB-3 a	0.25	0/8	0/8	28.1	不活性
	DS-8201 a	0.25	0/8	0/8	24.7	不活性
	MB-2 a	1	2/8	0/8	75.5	活性
	MB-3 a	1	3/8	0/8	82.4	高度に活性
	DS-8201 a	1	0/8	0/8	52.2	活性
	MB-2 a	4	5/8	3/8	97.1	高度に活性
	MB-3 a	4	5/8	3/8	97.6	高度に活性
	DS-8201 a	4	8/8	0/8	97.3	高度に活性

20

【0478】

実施例 7. J I M T - 1 C D X モデルにおける A D C のインビボ有効性

各マウス (S h a n g h a i L i n g c h a n g B i o t e c h から S c i d - B e i g e) の右脇腹に、腫瘍発生のために 0.2 mL の P B S 中 M a t r i g e l と混合された J I M T - 1 腫瘍細胞 (1×10^7) (50 : 50) を皮下接種した。動物を、腫瘍接種後 6 日目に無作為に群分けし、平均腫瘍体積がおおよそ 175 mm^3 に達したときに、有効性研究のための処置を開始した。各群は、8 匹のマウスを含有した。試験物質および対照物質を、5 mL / kg の体積で尾静脈を介して腫瘍担持マウスに投与した。

30

【0479】

腫瘍サイズを、キャリパーを使用して二次元で週に二回測定し、体積を、以下の式を使用して mm^3 で表した： $V = 0.5 a \times b^2$ (式中、a および b は、それぞれ腫瘍の長寸法および短寸法であった)。結果を、平均および標準誤差 (平均 $\pm$ S E M) によって表した。

40

【0480】

統計分析：二元配置 A N O V A を実施して、二群間の腫瘍体積を比較した。すべてのデータを、G r a p h p a d P r i s m 6.0 を使用して分析し、0.05 未満の P は、統計的に有意であるとみなされた。統計分析および生物学的観察の両方を考慮に入れた。

【0481】

腫瘍成長阻害：T / C 値の計算のために腫瘍サイズを使用した。相対腫瘍増殖率の T / C (%) を、式： $T / C (\%) = (T i / T 0) / (V i / V 0) \times 100\%$ を使用して計算した。相対腫瘍成長阻害を、式： $T G I (\%) = [1 - (T i / T 0) / (V i / V 0)] \times 100\%$ によって計算した。T i は、処置後の各指示された時点で測定された処

50

置群の平均腫瘍体積を指し、 T_0 は、群分けしたときの処置群の腫瘍体積を指し、 V_i は、処置後の各指示された時点で測定されたビヒクル対照群の平均腫瘍体積を指し、 V_0 は、群分けしたときのビヒクル対照群の腫瘍体積を指す。 T/C が40%を超える場合、有効性はなく、 T/C が40%以下であり、 p 値が0.05未満である場合、腫瘍阻害がある。

【0482】

JIMT-1 CDXモデルにおけるADCの抗腫瘍効果は、図5～8および表7に示される。図5は、三つの異なる投与量での、JIMT-1 CDXモデルにおける抗体薬物コンジュゲート(ADC)の効果を示す。この研究において、MB-2aおよびMB-3aの三つすべての用量が、有意な抗腫瘍効果を示した。これらの実験で研究された異なる用量はまた、図6(2.5mg/kg、静脈内単回投与)、図7(5mg/kg、静脈内単回投与)、および図8(10mg/kg、静脈内単回投与)に別々に示される。

【表7】

表7

モデル	ADC	投与量 (mg/Kg、単回静脈内)	退縮		TGI (%) (27日目)	注釈
			部分	完全		
JIMT-1	ビヒクル	該当なし	---	---	---	---
	トラスツズマブ	10	0/8	0/8	22.5	不活性
	MB-2a	2.5	5/8	0/8	83.9	高度に活性
	MB-3a	2.5	3/8	0/8	76.2	活性
	DS-8201a	2.5	1/8	0/8	66.3	活性
	MB-2a	5	6/8	0/8	85.1	高度に活性
	MB-3a	5	7/8	0/8	88.4	高度に活性
	DS-8201a	5	4/8	0/8	78.4	活性
	MB-2a	10	8/8	0/8	90.9	高度に活性
	MB-3a	10	6/8	1/8	90.9	高度に活性
	DS-8201a	10	7/8	0/8	87.5	高度に活性

【0483】

それぞれの個別の刊行物または特許出願が参照により組み込まれると明確に個々に示唆されているかのように、および各参照物の全体が完全に明記されているかのように、本明細書に引用されるすべての出版物および特許出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、あらゆる目的のために援用される。上述の本発明は、理解の明瞭性のために、例示および実施例を用いてある程度詳細に説明してきたが、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなく、特定の変更および修正をそれに対して行うことができることは、本発明の教示に照らして当業者には明らかであろう。

【図面】

【図 1】

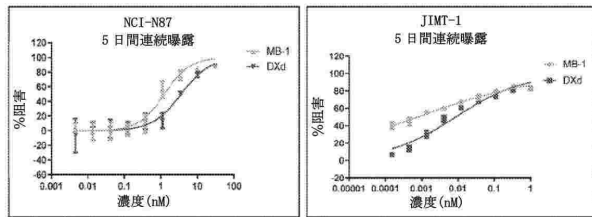


図 1 A

図 1 B

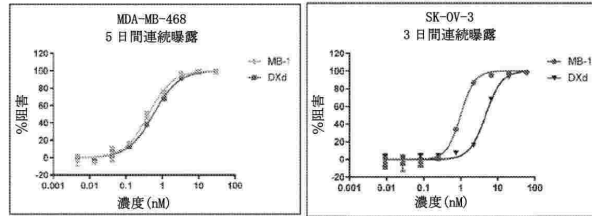


図 1 C

図 1 D

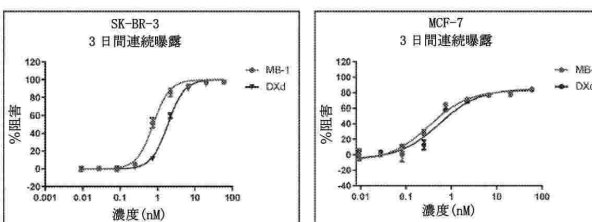


図 1 E

図 1 F

【図 2】

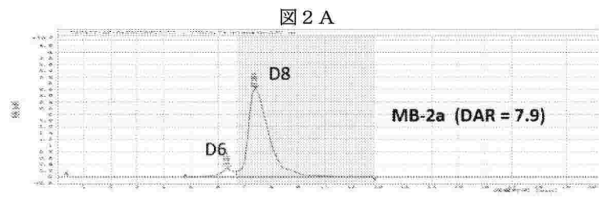


図 2 A

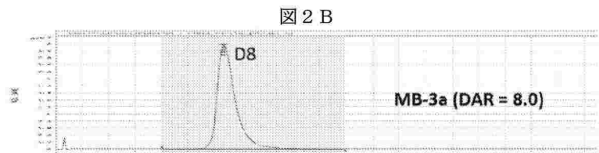


図 2 B

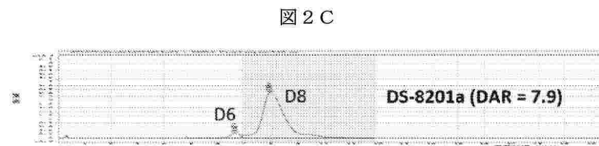


図 2 C

【図 3 - 1】

図 3 A

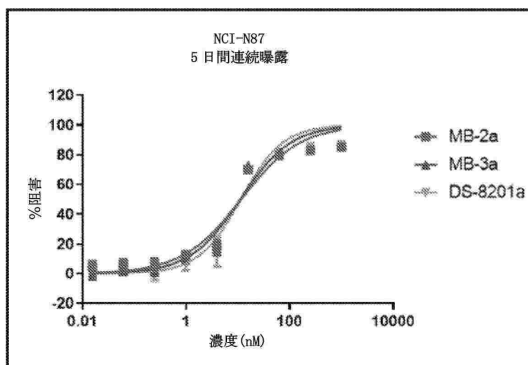
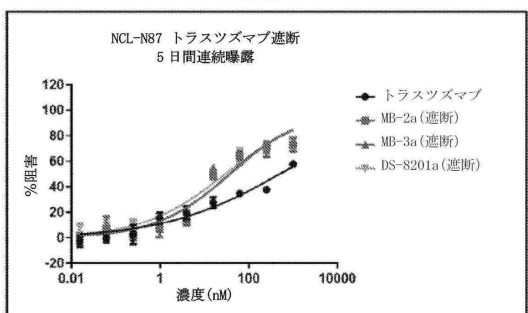


図 3 B



【図 3 - 2】

図 3 C

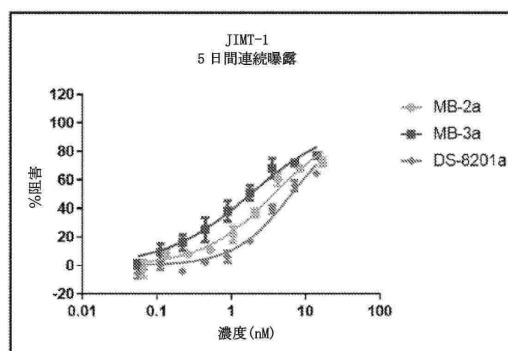
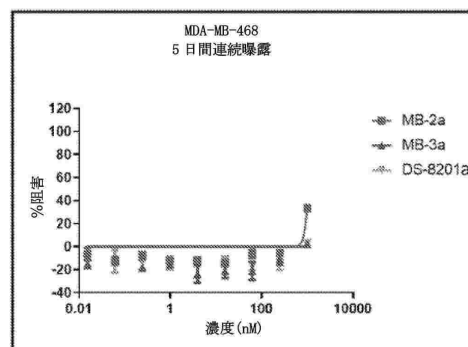


図 3 D



10

20

30

40

50

【図 4】

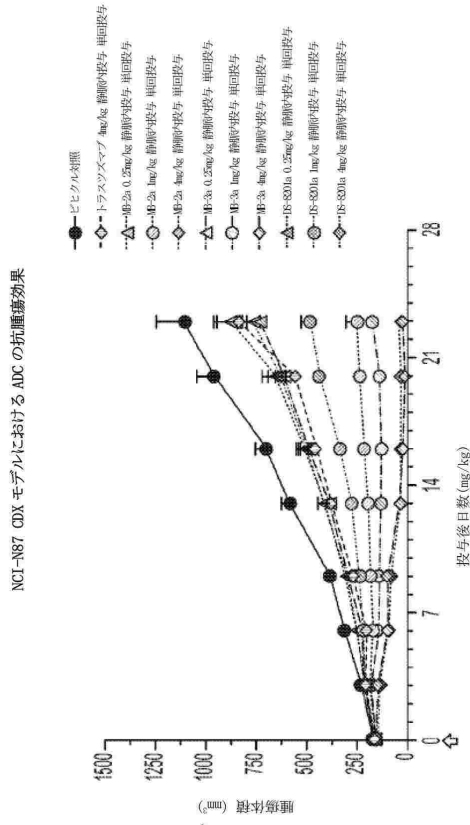


図 4

【図 5】

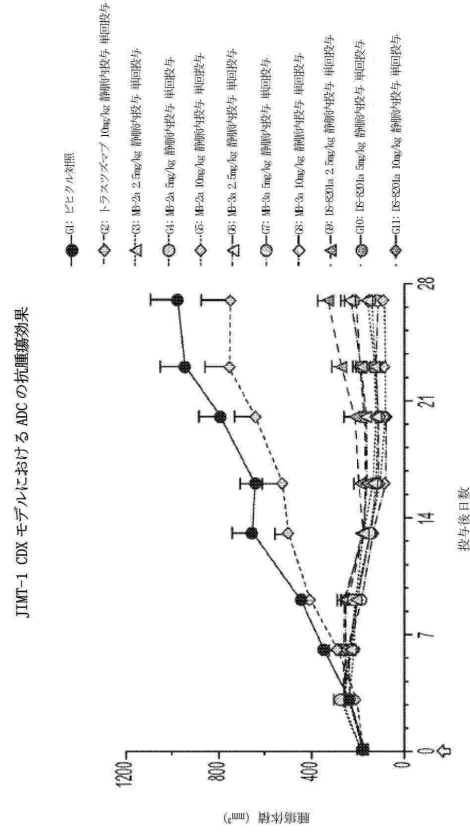


図 5

【図 6】

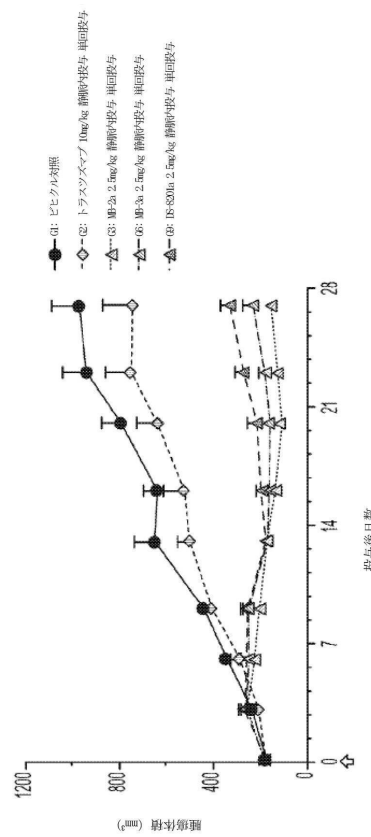


図 6

【図 7】

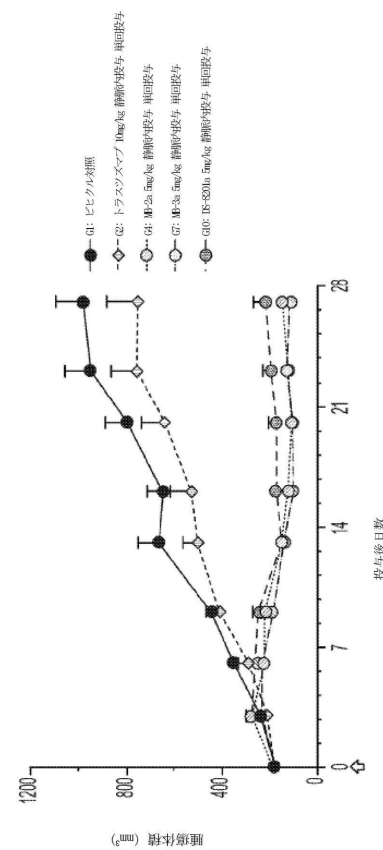


図 7

10

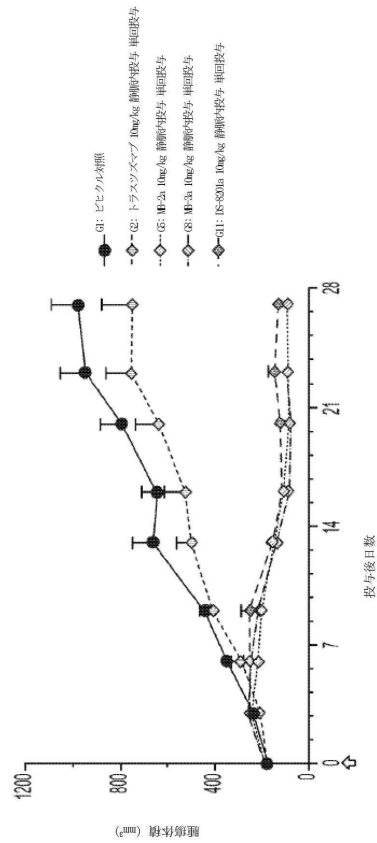
20

30

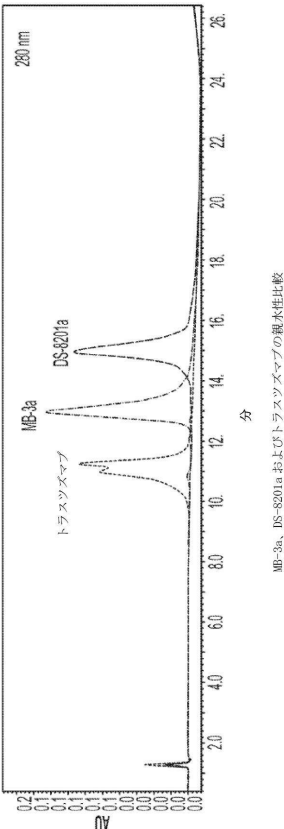
40

50

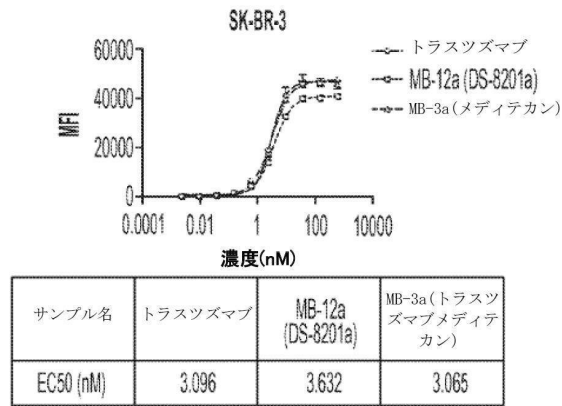
【図 8】



【図 9】



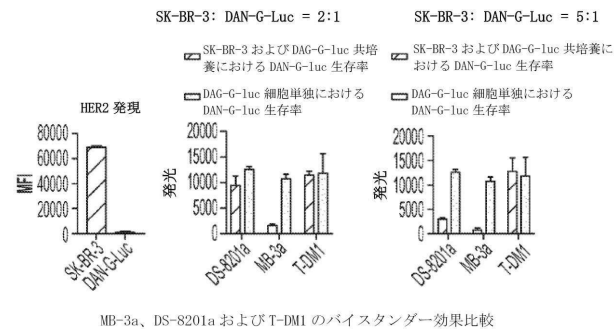
【図 10】



MB-3a、DS-8201a およびトラスツズマブの抗原結合親和性

図 10

【図 11】



【配列表】

2024509099000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2022/051660

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/68 A61P35/00 C07K16/30 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 3 524 267 A1 (DAIICHI SANKYO CO LTD [JP]) 14 August 2019 (2019-08-14) claims 1, 6 examples	1-51
X, P	WO 2021/173773 A1 (MEDIBOSTON INC [US]) 2 September 2021 (2021-09-02) examples -----	1-51
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 August 2022		12/09/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mooren, Nicolai

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2022/051660

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2022/051660

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 3524267 A1	14-08-2019	AU 2017341000 A1	11-04-2019
		BR 112019005247 A2	04-06-2019
		CA 3036941 A1	12-04-2018
		CN 109789211 A	21-05-2019
		EP 3524267 A1	14-08-2019
		JP 2022095908 A	28-06-2022
		JP WO2018066626 A1	18-07-2019
		KR 20190066026 A	12-06-2019
		SG 10201912173R A	27-02-2020
		TW 201818973 A	01-06-2018
		US 2019330368 A1	31-10-2019
		WO 2018066626 A1	12-04-2018

WO 2021173773 A1	02-09-2021	TW 202146055 A	16-12-2021
		US 2021283125 A1	16-09-2021
		WO 2021173773 A1	02-09-2021

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C 0 7 K	7/06
C 0 7 K	5/08	(2006.01)	C 0 7 K	5/08
C 0 7 K	5/10	(2006.01)	C 0 7 K	5/10
C 0 7 K	5/06	(2006.01)	C 0 7 K	5/06

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

弁護士 山本 健策

(72)発明者 リー, ウェイ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 2 0, アクトン, ノウルトン ドライブ 6

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC27 CC41 EE41 EE59
4C085 AA14 AA26 BB36 CC23 EE01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06
GG08
4C086 AA01 AA02 CB22 GA16 MA01 MA04 NA13 ZB26 ZB27
4H045 AA10 AA11 BA09 BA72 DA76 EA20 FA74