

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7706668号

(P7706668)

(45)発行日 令和7年7月11日(2025.7.11)

(24)登録日 令和7年7月3日(2025.7.3)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 47/68 (2017.01)

A 6 1 K 47/68

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

Y

A 6 1 K 31/4745 (2006.01)

A 6 1 K 31/4745

A 6 1 K 47/65 (2017.01)

A 6 1 K 47/65

A 6 1 K 47/54 (2017.01)

A 6 1 K 47/54

請求項の数 13 (全96頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-551627(P2024-551627)

(86)(22)出願日 令和5年3月10日(2023.3.10)

(65)公表番号 特表2025-509142(P2025-509142
A)

(43)公表日 令和7年4月11日(2025.4.11)

(86)国際出願番号 PCT/EP2023/056097

(87)国際公開番号 WO2023/170247

(87)国際公開日 令和5年9月14日(2023.9.14)

審査請求日 令和6年10月17日(2024.10.17)

(31)優先権主張番号 22305279.6

(32)優先日 令和4年3月11日(2022.3.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

早期審査対象出願

(73)特許権者 520144853

マブリンク ビオシオンス

フランス, 6 9 0 0 9 リヨン, リュ

ウ ラ フラテルネル 2, リュ ゴルジュ

ドゥ ル 3 1

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100095360

弁理士 片山 英二

(74)代理人 100103182

弁理士 日野 真美

(74)代理人 100131990

弁理士 大野 玲恵

(72)発明者 ヴィリセル, ワラン

フランス国 6 9 2 8 0 サントーコンソ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体-薬物コンジュゲート及びそれらの使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(I)の抗体-薬物コンジュゲートであって、

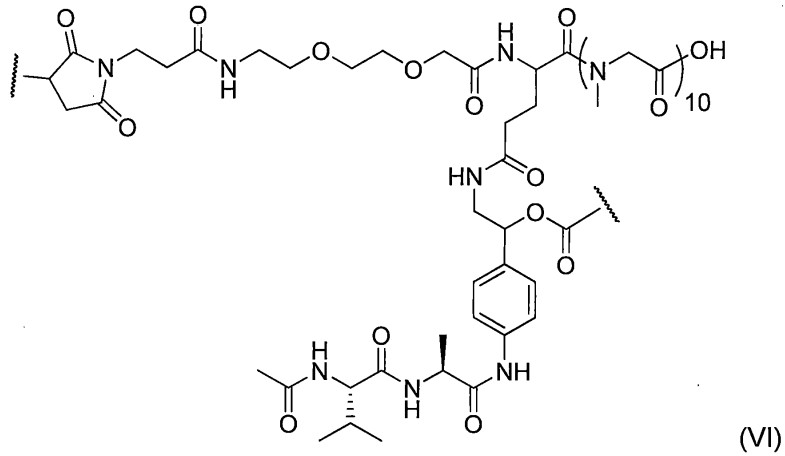
A b - [L - D] p (I)、

式中、

- A b は、配列番号12の葉酸受容体アルファに特異的に結合する抗葉酸受容体アルファ(F R α)抗体であり、

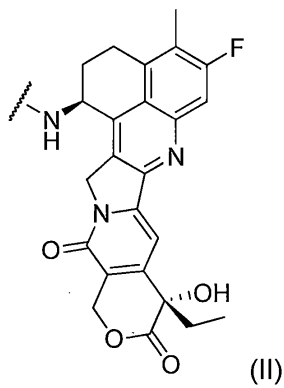
- L は、下記式(VI)で表される、切断可能なリンカー部分であり、Lは前記抗体の1つ以上のチオール残基に共有結合しており、

【化 5】



10

— Dは、Lに結合した、下記式（I I）で表されるエキサテカンの薬物部分であり、
【化 1】



20

— pは、1～8である、
式（I）の抗体－薬物コンジュゲート。

30

【請求項 2】

pが6～8である、請求項 1 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 3】

pが8である、請求項 1 または 2 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

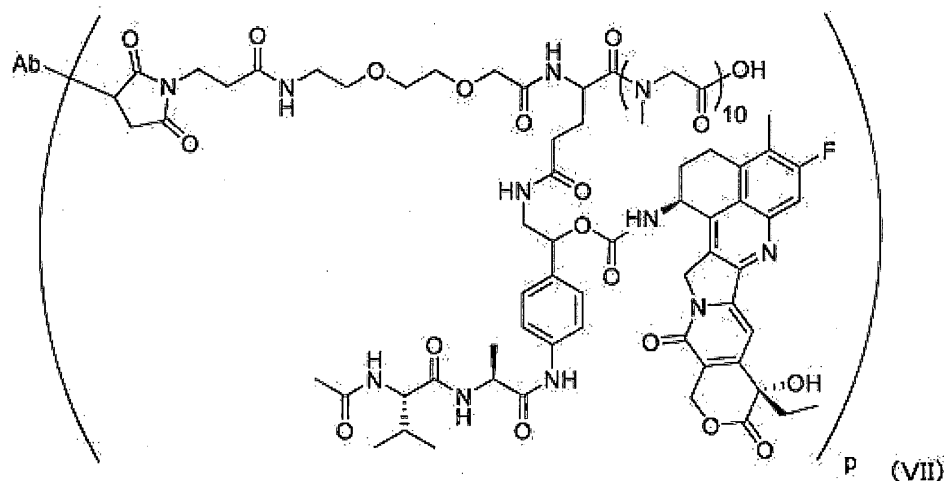
【請求項 4】

前記抗体－薬物コンジュゲートが、下記式（V I I）の抗体－薬物コンジュゲートであり、

40

50

【化 6】



10

式中、Abは、典型的にはIgG1Fc定常領域のロイシン234及びロイシン235におけるアラニン置換を含む、抗FR α 抗体、又はそのサイレントIgG1バリエーションであり、pは4～8である、

請求項1記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項5】

20

Abが、ファルレッズマブ、又はそのサイレントIgG1バリエーションである、
請求項4記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項6】

Abが、以下のいずれか：

(i) 配列番号1のHCDR1、配列番号2のHCDR2、及び配列番号3のHCDR3を含む可変重鎖ポリペプチド、並びに配列番号4のLCDR1、配列番号5のLCDR2、及び配列番号6のLCDR3を含む可変軽鎖ポリペプチド；又は

(ii) 配列番号7のVHを含む可変重鎖ポリペプチド及び配列番号8のVLを含む可変軽鎖ポリペプチド

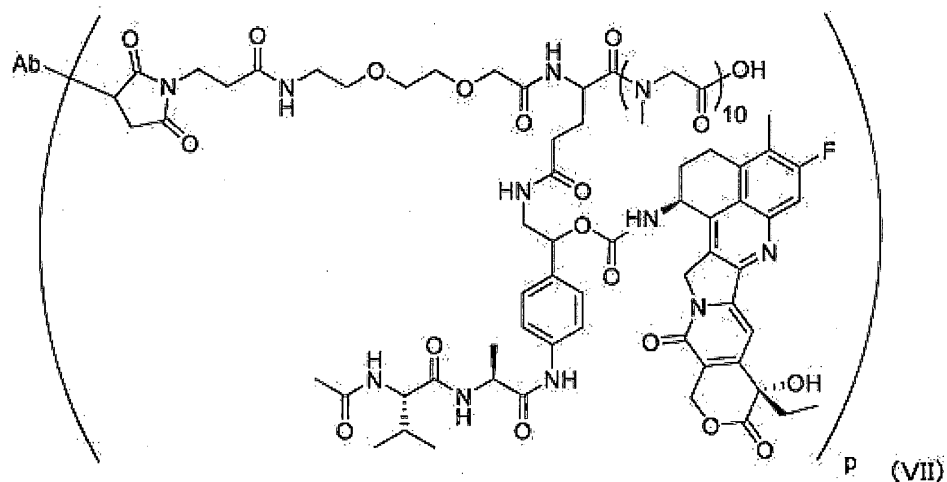
のいずれかを含む抗FR α 抗体である、請求項1～5のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

30

【請求項7】

下記式(VII)の抗体-薬物コンジュゲートであって、

【化 6】



40

式中、Abは、

配列番号7のVHを含む可変重鎖ポリペプチド及び配列番号8のVLを含む可変軽鎖ポ

50

リペプチド

を含む抗 F R α 抗体であり、

I g G 1 F c 定常領域は、ロイシン 2 3 4 及びロイシン 2 3 5 におけるアラニン置換を含み、

p は 8 である、

式 (V I I) の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 8】

医薬品として、必要とする対象において使用するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 9】

必要とする対象において腫瘍の治療に使用するための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 10】

前記腫瘍が、固形腫瘍である、請求項 9 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 11】

前記固形腫瘍が、卵巣癌、乳癌、肺癌、又は中皮腫からなる群から選択される、請求項 10 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 12】

卵巣癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌からなる群から選択される、癌の治療を必要とする対象における癌の治療に使用するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲートを、1 つ以上の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又は担体と組み合わせて含み、場合により他の活性成分を含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

抗体が葉酸受容体アルファ (F R α) に特異的に結合し、薬物が、好ましくはトポイソメラーゼ I の阻害剤、例えば、エキサテカン等のカンプトテシン類似体の中から選択される、抗体-薬物コンジュゲートが以下に開示される。そのような抗体-薬物コンジュゲートは、特に、卵巣癌、乳癌又は肺癌等の癌を含む増殖性疾患の治療に有用である。

【背景技術】

【0002】

抗体-薬物コンジュゲート (以下、「ADC」と呼ぶ) は、新しいクラスの治療薬、特に癌治療薬である。そのような ADC は、両方ともリンカーによって共有結合された少なくとも抗体及びペイロード (例えば、細胞傷害性薬物) を含む。したがって、ADC は、抗体標的の特異性とペイロードの効率 (例えば、化学療法剤の細胞傷害性活性) とを組み合わせるように設計されている。有効な ADC は、高い特異性及び低い全身毒性を示すはずである。

【0003】

毒性の文脈内で、ADC に使用される抗体は、その抗原に正確かつ有効に結合する必要があり、これは、適切な標的抗原が標的細胞上で優先的又は排他的に発現されることを意味する。

【0004】

ADC を設計する場合、最終活性薬物をリガンド標的化単位に共有結合的に付着させる一方で、細胞内在化後又は疾患組織微小環境における選択的酵素機構による活性薬物単位の最終放出を可能にする必要がある。これに関して、(自己犠牲化学に関連する) いくつかのペプチダーゼ及びグリコシダーゼ感受性切断可能リンカー化学戦略が開発された。これらの切断可能なリンカー及びそれらの対応する切断機構は周知であり、いくつかの刊行

10

20

30

40

50

物に記載されている（例えば、Bargh J G et al., Chem. Soc. Rev., 2019, 48, 4361, Toki et al. J. Org. Chem. 2002, 67, 6, 1866-1872, Scott et al. Bioconjugate Chem. 2006, 17, 3, 831-840）。この酵素感受性切断可能実体の選択は、コンジュゲートの有効性及び忍容性に影響を及ぼすADCの重要な設計属性である。

【0005】

細胞毒素又は薬物を抗体にコンジュゲートするために使用されてきたリンカータイプの例としては、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィド、及びペプチド含有リンカーが挙げられるが、これらに限定されない。リンカーは、例えば、リソソーム区画内の低pHによる切断を受けやすいもの、又は腫瘍組織で優先的に発現されるプロテアーゼ、例えばカテプシン（例えば、カテプシンB、C、D）等のプロテアーゼによる切断を受けやすいものの中から選択される。有効なリンカーは、ペイロードの正確かつ適時の放出を確実にすることができる。毒性との関連において、リンカー自体が毒性を駆動するようには見えない場合であっても、リンカーの安定性がペイロードによって発揮される毒性に影響を及ぼし得ることもまた明らかである。実際、安定なリンカーは、標的特異的な様式でペイロードを放出することができるが、非安定なリンカーは、ペイロードの不正確な放出を受ける可能性がより高く（例えば、非特異的な切断に起因して）、非特異的な全身毒性をもたらす。

【0006】

ADCに使用されるペイロードは非常に強力であり、ピコモル範囲のインビトロ阻害濃度を有する細胞傷害性薬物であることが多い。一般的なペイロードは、例えば、微小管阻害剤（例えば、メイタンシン誘導体（DM1/DM4）、アウリスタチン（MMAE/MMAF）、エリブリン）及びDNAアルキル化剤（カリケアマイシン、ピロロベンゾジアゼピン、インドリノベンゾジアゼピン、又はデュオカルマイシン等）である。

【0007】

ADCは有望な治療薬であると思われるが、いくつかのADCは毒性が高すぎる可能性があり、これらの化合物の治療域を制限するか、又は更なる臨床開発を妨げる。更に、現在承認されているか又は臨床研究中のADCのほとんどは、上記の微小管及びDNA標的化剤に基づく。したがって、微小管及びDNA標的化剤に対して抵抗性であるか又は抵抗性になる腫瘍を有効に治療するために、他の作用機構を有するペイロードに基づく新しい分化ADCが必要とされている。

【0008】

したがって、高い特異性、最大効率及び低い毒性を示す有効なADCは、その成分のそれぞれの適切な組合せを必要とする。可能な戦略の総説については、例えば、Khong orzul et al 2019 (Molecular cancer research, DOI:10.1158/1541-7786.MCR-19-0582)を参照されたい。国際公開第2019081455号及びConilh et al (2021, Pharmaceuticals, 14(3), 247)は更に、特にトポイソメラーゼI阻害剤ペイロードであるエキサテカンに基づき、親水性単分散ポリサルコシン（PSAR）薬物-リンカープラットフォームを使用したHER2標的化抗体-薬物コンジュゲートを報告している。

【0009】

Cheng et al (2018, DOI:10/1158/1535-7163.MCT-17-1215)及び国際公開第2017151979号は、典型的には3~4分子のエリブリン（MORAb-202）にコンジュゲートされたファルレツズマブを用いたADC及び腫瘍の治療におけるその使用を報告している。このADCのエリブリンペイロードの作用機序は微小管阻害である。

【0010】

Moore et al (2018, Future Oncol. 14(17)1669-1678)は、卵巣癌の治療のための、ペイロードとして平均3~4個のメイタンシノ

10

20

30

40

50

イド分子とコンジュゲートされたヒト化抗 F R α 抗体であるミルベツキシマブを含む、A D C ミルベツキシマブソラブタンシンを用いた第 I E I 相試験の結果を報告している。この A D C のメイタンシンペイロードの作用機序は、微小管阻害である。

【発明の概要】

【0011】

したがって、有効であり、高い特異性、低い毒性（改善された治療指数）及びペイロードの他とは異なる作用機序を有する抗 F R α 抗体を含む抗体－薬物コンジュゲートが依然として必要とされている。

【0012】

実施例に示されるように、本開示は、特に、ミルベツキシマブソラブタンシン等の他のペイロード及び薬物リンカーと共に F R α －発現抗体を標的とする参照先行技術の A D C と比較した場合に、固形腫瘍癌モデルにおいて優れたインビボ有効性及び低い毒性を有するトポイソメラーゼ I 阻害剤に基づく抗 F R α 抗体－薬物コンジュゲートを提供する。

【0013】

したがって、本開示の第 1 の目的は、式 (I) の抗体－薬物コンジュゲート (A D C) に関し、

A b－[L－D] p (I)、

式中、

A b は、配列番号 12 に特異的に結合する抗葉酸受容体アルファ (F R α) 抗体であり、
L は、好ましくはチオール残基を介して当該抗葉酸受容体アルファ (F R α) 抗体に結合した切断可能なリンカー部分であり、

D は、L に結合した細胞傷害性薬物部分であり、

p は 1～8、好ましくは 6～8、より好ましくは p は 8 である。

【0014】

特定の実施形態では、A b は、ヒト I g G 1 アイソタイプ定常領域を含む抗体である。

【0015】

好ましい実施形態では、A b は、ヒト I g G 1 アイソタイプの変異体又は化学的に修飾された定常領域を含む抗体であり、当該変異体又は化学的に修飾された定常領域は、野生型ヒト I g G 1 アイソタイプ定常領域を有する対応する抗体と比較した場合、当該抗体に A D C C 活性を付与しないか、又は低下した A D C C 活性を付与する。

【0016】

他の特定の実施形態では、A b は、ヒト I g G 4 アイソタイプ定常領域、又は変異体若しくは化学修飾された I g G 4 定常領域を含む抗体であり、当該変異体又は化学修飾された定常領域は、野生型 I g G 4 アイソタイプ定常領域を有する対応する抗体と比較した場合、当該抗体に A D C C 活性を付与しないか、又は低下した A D C C 活性を付与する。

【0017】

好ましい実施形態では、A b は、以下：

(a) 配列番号 1 の H C D R 1、配列番号 2 の H C D R 2、配列番号 3 の H C D R 3 を含む可変重鎖ポリペプチド、並びに配列番号 4 の L C D R 1、配列番号 5 の L C D R 2 及び配列番号 6 の L C D R 3 を含む可変軽鎖ポリペプチド；又は

(b) 配列番号 7 の V H を含む可変重鎖ポリペプチド及び配列番号 8 の V L を含む可変軽鎖ポリペプチド

のいずれかを含む抗 F R α 抗体である。

【0018】

特定の実施形態では、当該 A b は、配列番号 9 の重鎖と、配列番号 10 の軽鎖とを含むか、又はそれらから本質的になる。

【0019】

特定の実施形態では、当該 A b は、配列番号 11 の重鎖と、配列番号 10 の軽鎖とを含むか、又はそれらから本質的になる。

【0020】

10

20

30

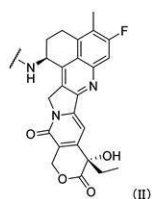
40

50

特定の実施形態では、DはトポイソメラーゼⅠの阻害剤であり、好ましくはカンプトテシン類似体からなる群から選択され、より好ましくはDは以下の式(ⅠⅠ)のエキサテカンの薬物部分である。

【0021】

【化1】



10

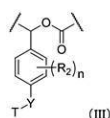
【0022】

特定の実施形態では、Lは、式-A-W-の切断可能なリンカー部分であり、式中、Aは、Abに連結された任意選択のストレッチャ単位であり、Wは、Dに連結された切断可能な部分である。より特定の実施形態では、Lは、リソソームプロテアーゼ感受性リンカーであり、Wは、例えば、バリン-シトルリン(Val-Cit)、アラニン-アラニン-アスパラギン(Ala-Asn)、バリン-アラニン(Val-Ala)及びフェニルアラニン-リジン(Phe-Lys)からなる群から選択される切断可能なペプチド部分を含む。別の特定の実施形態では、Lはプロテアーゼ感受性切断可能リンカーであり、Wは、好ましくはβ-グルクロニド又はβ-ガラクトシド部分から選択される糖切断可能単位を含む。別の特定の実施形態では、Lはグルタチオン感受性リンカーであり、Wはジスルフィド部分を含む。特定の実施形態では、Wは以下の式(ⅠⅠⅠ)であって、

20

【0023】

【化2】



式中、

各R₂は、電子求引基及びC₁~C₄アルキルからなる群から独立して選択され、

30

nは、0、1又は2であり、

Tは、糖切断可能単位又はポリペプチド切断可能単位であり、

Tが糖切断可能単位である場合、YはOであり、又はTがポリペプチド切断可能単位である場合、YはNR₃であり、

R₃は、H、C₁~C₂₄アルキル、C₂~C₆アルケニル；場合により置換されたポリエーテル、6~10個の環原子を有するアリール、C₃~C₈シクロアルキル、3~10個の環原子を有するヘテロシクロアルキル、5~10個の環原子を有するヘテロアリール、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択され、

当該アルキル及びアルケニルは、-O-、-S-、-C(O)-、-NR'-、-C(O)NR'-、-NR'-C(O)-、-NR'-C(O)-NR'-、-NR'-C(O)-O-、-O-C(O)NR'-及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

R'及びR'は、H及びC₁~C₆アルキルから独立して選択される、式(ⅠⅠⅠ)、並びにその薬学的に許容される塩である。

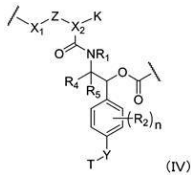
【0024】

好ましい実施形態では、Lは式(ⅠⅤ)のリンカー-A-W-に対応し、

【0025】

50

【化 3】



式中、

X_1 は、コネクタ単位であり、

Z は、任意のスペーサであり、

X_2 は、コネクタ単位であり、

K は、好ましくはポリサルコシン及びポリエチレングリコールから選択される、任意選択の疎水性マスキング実体であり、

R_1 は、 H 、 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル；場合により置換されたポリエーテル、6～10個の環原子を有するアリール、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、3～10個の環原子を有するヘテロシクロアルキル、5～10個の環原子を有するヘテロアリール、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択され、

当該アルキル及びアルケニルは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NR''-$ 、 $-C(O)NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-$ 、 $-NR''-C(O)-NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)NR''-$ 及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

R_4 は、 H 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル及び $C_2 \sim C_6$ アルケニルからなる群から選択され、当該アルキル及びアルケニルは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 及び $-NR''-$ から選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

R_5 は、 H 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル及び $C_2 \sim C_6$ アルケニルからなる群から選択され、当該アルキル及びアルケニルは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 及び $-NR''-$ から選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されている。

【0026】

より特定の実施形態では、 X_1 及び X_2 は、1つ以上のアミノ酸、1つ以上の N -置換アミノ酸、場合により置換されたポリエーテル、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキレン、6～10個の環原子を有するアリーレン、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキレン、5～10個の環原子を有するヘテロシクロアルキレン、5～10個の環原子を有するヘテロアリーレン、 $C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン、及びそれらの任意の組合せからなる群から独立して選択され、

当該アルキレン及びアルケニレンは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NR''-$ 、 $-C(O)NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-$ 、 $-NR''-C(O)-NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)NR''-$ 及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

当該アルキレン、アリーレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、ヘテロアリーレン、及びアルケニレンは、ハロゲン、オキソ、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_6$ シクロアルキル、5～10個の環原子を有するヘテロシクリル、6～10個の環原子を有するアリール、5～10個の環原子を有するヘテロアリール、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ、 $-(CO)-R'$ 、 $-O-(CO)-R'$ 、 $-(CO)-O-R'$ 、 $-(CO)-NR''R''R''$ 、 $-NR''-(CO)-R'$ 、及び $-NR''R''R''$ から選択される1つ以上の置換基で場合により置換され、

R' 、 R'' 及び R''' は、 H 及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立して選択される。

【0027】

より特定の実施形態では、 Z は、1つ以上のアミノ酸、1つ以上の N -置換アミノ酸、場合により置換されたポリエーテル、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキレン、6～10個の環原子を有するアリーレン、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキレン、5～10個の環原子を有するヘテロシクロアルキレン、5～10個の環原子を有するヘテロアリーレン、 $C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン、

及びそれらの任意の組合せからなる群から独立して選択され、

当該アルキレン及びアルケニレンは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NR''-$ 、 $-C(O)NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-$ 、 $-NR''-C(O)-NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)NR''-$ 及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

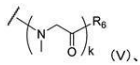
当該アルキレン、アリーレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、ヘテロアリーレン、及びアルケニレンは、ハロゲン、オキソ、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_6$ シクロアルキル、5～10個の環原子を有するヘテロシクリル、6～10個の環原子を有するアリール、5～10個の環原子を有するヘテロアリール、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ、 $-(CO)R'$ 、 $-O-(CO)R'$ 、 $-(CO)-O-R'$ 、 $-(CO)-NR''R''R''$ 、 $-NR''-(CO)-R'$ 、及び $-NR''R''R''$ から選択される1つ以上の置換基で場合により置換され、 R' 、 R'' 及び R''' は、 H 及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立して選択される。

【0028】

特定の実施形態では、 K は、ポリサルコシン、好ましくは以下の式 (V) のポリサルコシンであり、

【0029】

【化4】



20

式中、 k は2～50、好ましくは4～30の整数であり、

R_6 は OH 又は NH_2 に対応する。

【0030】

特定の実施形態では、 T は、グルクロニド又はガラクトシドである糖切断可能単位である。

【0031】

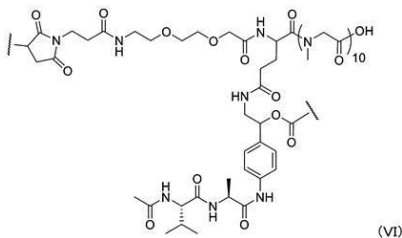
他の特定の実施形態では、 T は、好ましくは $Val-Cit$ 、 $Val-Ala$ 及び $Phe-Lys$ から選択されるジペプチドである。

【0032】

特定の実施形態では、 L は、当該抗体の1つ以上のチオール残基に共有結合しており、好ましくは、当該 L は式 (VI) のリンカーに対応する。

【0033】

【化5】



40

【0034】

特定の実施形態では、 Ab は、抗原結合部分を含有する全長抗体又は抗体断片を含む。

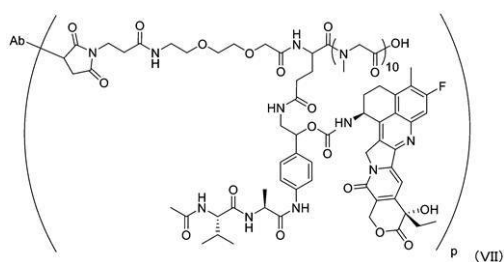
【0035】

特定の実施形態では、抗体薬物コンジュゲートは、以下の式 (VII) に対応し、

【0036】

50

【化 6】



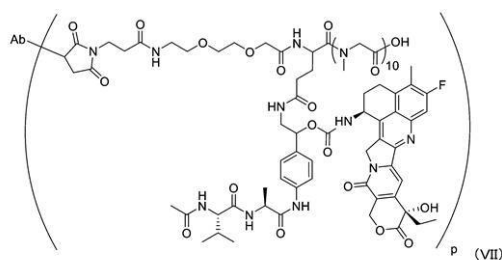
式中、A bは、典型的にはI g G 1 F c 定常領域のロイシン 2 3 4 及びロイシン 2 3 5 におけるアラニン置換を含む、抗 F R α 抗体、例えば、ファルレッズマブ、又はそのサイレント I g G 1 バリエントであり、p は 4 ~ 8 である。

【 0 0 3 7 】

好ましい実施形態では、抗体薬物コンジュゲートは、以下の式 (V I I) に対応し、

【 0 0 3 8 】

【化 7】



(VII)

式中、A bは、抗 F R α 抗体、例えば、ファルレッズマブ、又はそのサイレント I g G 1 バリエント、典型的には、L A L A 変異とも呼ばれる I g G 1 F c 定常領域のロイシン 2 3 4 及びロイシン 2 3 5 におけるアラニン置換を含むヒト I g G 1 の変異体バリエントであり、p は 8 である。

【 0 0 3 9 】

式 (I) の A D C のより好ましい実施形態では、

A bは、

(i) 配列番号 1 の H C D R 1、配列番号 2 の H C D R 2、配列番号 3 の H C D R 3 を含む可変重鎖ポリペプチド並びに

(i i) 配列番号 4 の L C D R 1、配列番号 5 の L C D R 2 及び配列番号 6 の L C D R 3 を含む可変軽鎖ポリペプチド；

を含む、抗薬酸受容体アルファ抗体又はその抗原結合断片であり、

L は、式 - A - W - の切断可能なリンカーであり、式中、A は、A b に連結された任意のストレッチャ単位であり、W は、D に連結された切断可能な部分であり、

D はエキサテカンであり、

p は 1 ~ 8、例えば 4 ~ 8、好ましくは 6 ~ 8 であり、例えば p は 7 ~ 8 である。

【 0 0 4 0 】

本開示の別の目的は、医薬品として使用するための、好ましくは腫瘍、例えば固形腫瘍の治療に使用するための、より具体的には卵巣癌、乳癌、肺癌、又は中皮腫からなる群から選択される上記 A D C に関する。

【 0 0 4 1 】

本開示の別の目的は、腫瘍、例えば固形腫瘍、より具体的には卵巣癌、乳癌、肺癌、又は中皮腫からなる群から選択される腫瘍を治療するための医薬品又は医薬組成物の調製における上記 A D C の使用に関する。

【 0 0 4 2 】

特定の実施形態では、ADCは、好ましくは、卵巣癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌からなる群から選択される癌の治療に使用され得る。

【0043】

本開示は更に、場合により他の活性成分、例えば抗癌剤又は免疫チェックポイント阻害剤等の免疫治療薬を含む、1つ以上の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又は担体と組み合わせて、本明細書に開示される抗体-薬物コンジュゲートを含む医薬組成物に関する。

【0044】

本開示はまた、本開示のADCを得るためのプロセスに関し、方法は、

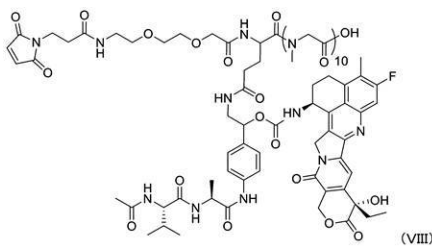
(a) 本明細書で定義される抗FR α 抗体の産生に適した条件下で宿主細胞を培養することと、

(b) 当該抗FR α 抗体を単離することと、

(c) 式(VIII)のリンカーLに結合したエキサテカンの合成と、

【0045】

【化8】



(d) 当該抗FR α 抗体を式(VIII)の化合物にコンジュゲートし、それによって、本開示のADCを得ることと、を含む。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】実施例4による、コンジュゲートの前臨床げっ歯動物有効性、薬物動態及び忍容性データを表す。

【図2】実施例5による葉酸受容体アルファ細胞外発現のフローサイトメトリ評価を表す。

【図3】実施例6による、いくつかの葉酸受容体アルファ陽性癌性細胞株に対する化合物メシル酸エキサテカンのインビトロ細胞傷害性データを表す。

【図4】実施例7による、組換えヒト葉酸受容体アルファタンパク質に対するコンジュゲートのインビトロELISA結合実験を表す。

【図5】実施例8による、組換えヒト葉酸受容体アルファタンパク質に対するコンジュゲートのインビトロ表面プラズモン共鳴(SPR)結合実験を表す。

【図6】実施例9による、コンジュゲートのインビトロ葉酸受容体アルファ陽性癌細胞結合親和性を表す。

【図7】実施例10による、コンジュゲートのエキスピボヒト血漿安定性を表す。

【図8】実施例11による、葉酸受容体アルファ陰性乳癌細胞株BT-474に対するコンジュゲートのインビトロ細胞傷害性アッセイを表す。

【図9】実施例12による、葉酸受容体アルファ陽性SW-620異種移植片癌モデルにおけるコンジュゲートのインビボ有効性評価を表す。

【図10】実施例12による、第2の葉酸受容体アルファ陽性SW-620異種移植片癌モデルにおけるコンジュゲートのインビボ有効性評価を表す。

【図11】実施例12による、葉酸受容体アルファ陽性OV-90異種移植片癌モデルにおけるコンジュゲートのインビボ有効性評価を表す。

【図12】実施例12による、第2の葉酸受容体アルファ陽性OV-90異種移植片癌モデルにおけるコンジュゲートのインビボ有効性評価を表す。

【図13】実施例12による、葉酸受容体アルファ陽性KB異種移植片癌モデルにおけるコンジュゲートのインビボ有効性評価を表す。

【図14】実施例12による、葉酸受容体アルファ陽性PA-1異種移植片癌モデルにおけるコンジュゲートのインビボ有効性評価を表す。

【図15】実施例12による、第3の葉酸受容体アルファ陽性OV-90異種移植片癌モデルにおけるコンジュゲートのインビボ有効性評価を表す。

【図16】実施例12による、葉酸受容体アルファ陽性IGROV-1異種移植片癌モデルにおけるコンジュゲートのインビボ有効性評価及び腫瘍再移植チャレンジを表す。

【図17】実施例12による、葉酸受容体アルファ陰性BT-474異種移植片乳癌モデルにおけるコンジュゲートのインビボ有効性評価を表す。

【図18】実施例13による、高用量でのコンジュゲートのインビボSCIDマウス及びCD-1マウスの忍容性評価を表す。

【図19】実施例14による、コンジュゲートの総mAb、総ADC及び遊離エキサテカン副成分のインビボラット薬物動態評価を表す。

【図20】実施例15による、コンジュゲートのインビボマウス肺炎症性評価を表す。

【図21】実施例15による、コンジュゲートのインビボマウス肺炎症性評価を表す。

【図22】実施例16による、インビボカニクイザル用量範囲設定毒性試験を表す。

【発明を実施するための形態】

【0047】

定義

本開示がより容易に理解され得るように、特定の用語が最初に定義される。更なる定義は、詳細な説明を通して記載される。

【0048】

「FR α 」又は「葉酸受容体アルファ」という用語は、特に記載のない限り、配列番号12に定義されるヒト葉酸受容体アルファを指す。この配列は、UniprotKBのエントリーP15328 (FOLR1_HUMAN) でも利用可能なFOLR1遺伝子 (Homo sapiens) によってコードされる葉酸受容体アルファのアミノ酸配列に対応する。

【0049】

本明細書で言及される「抗体」という用語は、全抗体及び任意の抗原結合断片（すなわち、「抗原結合部分」）又はその鎖を含む。天然に存在する「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互に連結された少なくとも2本の重（H）鎖及び2本の軽（L）鎖を含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではVHと略す）及び重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、CH1、CH2及びCH3の3つのドメインから構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではVLと略す）及び軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメインCLからなる。VH領域及びVL領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれるより保存されている領域が散在する、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域に更に細分され得る。各VH及びVLは、3つのCDR及び4つのFRから構成されており、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置される。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的補体系の第1の成分（C1q）を含む、宿主組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。抗体の「抗原結合部分」（又は単に「抗原部分」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原（例えばFR α の一部）に特異的に結合する能力を保持する抗体の全長又は1つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によって行うことができることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例としては、Fab断片、VL、VH、CL及びCH1ドメインからなる一価断片；F(ab)₂断片；ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片；VHドメイン及びCH1ドメインからなるFd断片；抗体の単一アームのVLドメイン及びVHドメインからなるFv断片；ヒンジ領域に修飾されたIgG重鎖、例えばIgG4を有する単一アーム、ドメイン抗体断片 (Ward et al., 1989 Nature 341: 544-546)、

10

20

30

40

50

又はVHドメインからなるナノボディ断片からなるUniBody；及び単離された相補性決定領域（CDR）；又はそのような抗原結合部分を含む任意の融合タンパク質が挙げられる。更に、Fv断片の2つのドメイン、VL及びVHは別々の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え法を使用して、VL及びVH領域が対になって一価分子（一本鎖Fv（scFv）として知られる）を形成する一本鎖タンパク質として作製することを可能にする合成リンカーによって連結することができる。例えば、Bird et al., 1988 Science 242: 423-426；及びHuston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879-5883）を参照されたい。そのような一本鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されることが意図される。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技術を使用して得られ、断片は、インタクトな抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。

10

【0050】

本明細書で使用される「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指す（例えば、FR α に特異的に結合する単離された抗体は、FR α 以外の他の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかしながら、FR α に特異的に結合する単離された抗体は、他の種由来のFR α 分子等の他の抗原に対して交差反応性を有し得る。更に、単離された抗体は、他の細胞物質及び／又は化学物質を実質的に含まない可能性がある。

【0051】

「抗原を認識する抗体」及び「抗原に特異的な抗体」という語句は、本明細書では「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と互換的に使用される。

20

【0052】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」という用語は、単一分子組成の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性及び親和性を示す。

【0053】

本明細書で使用される場合、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によって提供される抗体クラス（例えば、IgM、IgE、IgG、例えばIgG1又はIgG4）を指す。

【0054】

本明細書で使用される「K_D」という用語は、k_{off}とk_{on}の比（すなわち、k_{off}/k_{on}）から得られ、モル濃度（M）として表される平衡解離定数を指すことを意図している。K_D値は抗体の濃度（特定の実験に必要な抗体の量）に関連するので、K_D値が低いほど（低濃度）、結果として抗体の親和性がより高い。抗体のK_D値は、当技術分野で十分に確立された方法を使用して決定することができる。mAbのK_D値を決定するための好ましい方法は、Harlow, et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988), Coligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N. Y., 1992, 1993, 及びMuller, Meth Enzymol 1983に見出され得、これらの参考文献は参照により全体が本明細書に組み込まれる。抗体のK_Dを決定する方法は、表面プラズモン共鳴を使用することによるか、又はBiacore（登録商標）等のバイオセンサシステムを使用することによる（親和性評価Rich RL, Day YS, Morton TA, Myszk DG. High-resolution and high-throughput protocols for measuring drug/human serum albumin interactions using BIACORE（登録商標）. Anal Biochem. 2001）に関する詳細な情報についても参照）。

30

40

【0055】

50

本明細書で使用される「 k_{assoc} 」又は「 k_a 」又は「 k_{on} 」という用語は、特定の抗体－抗原相互作用の会合速度を指すことを意図しており、一方、本明細書で使用される「 k_{dis} 」又は「 k_d 」又は「 k_{off} 」という用語は、特定の抗体－抗原相互作用の解離速度を指すことを意図している。

【0056】

本明細書で使用されるとき、用語「親和性」とは、単一の抗原部位における抗体と抗原との間の相互作用の強さを指す。各抗原部位内で、抗体「アーム」の可変領域は、多数の部位で抗原と弱い非共有結合力を介して相互作用し、相互作用が多いほど、親和性がより強くなる。

【0057】

本明細書で使用される場合、「抗原に特異的に結合する」、例えば「FR α に特異的に結合する」抗体又はタンパク質は、本開示のFR α 等の抗原上に提示されたエピトープに検出可能に結合する抗体を指すことが意図される。それは、典型的には、200 nM以下、100 nM以下、50 nM、40 nM以下、又は約30 nMの K_D でヒトFR α に結合する抗体又はADCを指すことが意図される。典型的には、 K_D は、 10^{-3} pM $\sim$ 200 nM、特に0.1 pM $\sim$ 100 nM、特に0.1 pM $\sim$ 50 nM、又は1 pM $\sim$ 50 nM、特に1 pM $\sim$ 30 nM、10 pM $\sim$ 50 nM、0.1 nM $\sim$ 200 nM、又は0.1 nM $\sim$ 100 nM、又は1 nM $\sim$ 50 nM、特に1 nM $\sim$ 30 nMに含まれる。典型的には、本開示のADCはFR α に特異的であり、上記定義の K_D を有する。

【0058】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、原核細胞又は真核細胞を指す。真核細胞、例えば哺乳動物宿主細胞、酵母又は糸状菌が好ましく、特に哺乳動物細胞が、適切に折り畳まれた免疫学的に活性な抗体を組み立て、分泌する可能性が原核細胞よりも高いので好ましい。

【0059】

本明細書で使用される場合、「ADCC」又は「抗体依存性細胞傷害性」活性という用語は、細胞枯渇活性を指す。ADCC活性は、市販のADCCアッセイ、例えば、PromegaによってRef # G7015で市販されているADCC Reporter Bioassayによって測定することができる。

【0060】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、任意のヒト又は非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」という用語は、全ての脊椎動物、例えば哺乳動物及び非哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類を含む。「対象」という用語は「患者」という用語も包含する。

【0061】

本明細書で使用される場合、ADCの式(I)中の「薬物」又はDという用語はまた、「ペイロード」、すなわち抗体（又は断片）にコンジュゲートされた部分を指す。薬物Dは、古典的な化学療法剤に限定されると解釈されるべきではない。例えば、Dは、所望の生物学的活性を有するタンパク質、ペプチド又はポリペプチドを包含し得る。好ましくは、それは、細胞毒素等の治療部分を指す。「細胞毒素」又は「細胞傷害剤」は、細胞に有害な（例えば、殺傷する）任意の薬剤を含む。

【0062】

別段の指定がない限り、本開示は、本明細書に記載の化合物又は薬物又は細胞毒素、並びにそれらの互変異性体、エナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ体又は混合物、並びにそれらの水和物、エステル、溶媒和物又は薬学的に許容される塩を包含する。

【0063】

本明細書に示される任意の式はまた、重水素標識化合物又は ^{14}C 標識化合物等の化合物の非標識形態及び同位体標識形態を表すことを意図している。

【0064】

「薬学的に許容される塩」という用語は、本開示の化合物の生物学的有効性及び特性を

10

20

30

40

50

在する場合、 X_2 は三価コネクタ単位であり得る。

【0070】

「アミノ酸」という用語は、天然又は非天然アミノ酸を指す。 $-CONR1-$ 又は $-CONR1'-$ 基のCO部分は、 X_2 が1つ以上のアミノ酸からなる場合、 X_2 コネクタ単位の一部と見なすことができる。アミノ酸の非網羅的な列挙には、リジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン、チロシン、システイン、セレノシステイン、グリシン及びホモアラニンが含まれる。

【0071】

スペーサは、抗体-薬物-コンジュゲートの2つの成分、例えば2つのコネクタ単位に共有結合する二価アームである。

【0072】

スペーサ単位の非網羅的なリストには、アルキレン、ヘテロアルキレン（したがって、Si、N、O及びSから選択される少なくとも1つのヘテロ原子によって中断されたアルキレン）；アルコキシ；ポリエーテル、例えばポリアルキレングリコール及び典型的にはポリエチレングリコール；グリシン、アラニン、プロリン、バリン、N-メチルグリシン等の1つ以上の天然又は非天然アミノ酸； $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ； $C_3 \sim C_8$ カルボシクロ；アリーレン、及びそれらの任意の組合せが含まれる。例えば、スペーサは、2価の直鎖アルキレン基、好ましくは $(CH_2)_4$ である。

【0073】

例えば、スペーサは、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-、 $-C_1 \sim C_{10}$ ヘテロアルキレン-、 $-C_3 \sim C_8$ カルボシクロ-、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})-$ 、 $-アリーレン-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-アリーレン-、 $-アリーレン-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $(C_3 \sim C_8 \text{カルボシクロ})-$ 、 $-(C_3 \sim C_8 \text{カルボシクロ})-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-、 $-C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $(C_3 \sim C_8 \text{ヘテロシクロ})-$ 、 $-(C_3 \sim C_8 \text{ヘテロシクロ})-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ ヘテロアルキレン- $C(=O)-$ 、 $-C_3 \sim C_8$ カルボシクロ- $C(=O)-$ 、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})-C(=O)-$ 、 $-アリーレン-C(=O)-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-アリーレン- $C(=O)-$ 、 $-アリーレン-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $(C_3 \sim C_8 \text{カルボシクロ})-C(=O)-$ 、 $-(C_3 \sim C_8 \text{カルボシクロ})-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)-$ 、 $-C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ- $C(=O)-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $(C_3 \sim C_8 \text{ヘテロシクロ})-C(=O)-$ 、 $-(C_3 \sim C_8 \text{ヘテロシクロ})-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $C(=O)-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-NH-、 $-C_1 \sim C_{10}$ ヘテロアルキレン-NH-、 $-C_3 \sim C_8$ カルボシクロ-NH-、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})-NH-$ 、 $-アリーレン-NH-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-アリーレン-NH-、 $-アリーレン-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-NH-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $(C_3 \sim C_8 \text{カルボシクロ})-NH-$ 、 $-(C_3 \sim C_8 \text{カルボシクロ})-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-NH-、 $-C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ-NH-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $(C_3 \sim C_8 \text{ヘテロシクロ})-NH-$ 、 $-(C_3 \sim C_8 \text{ヘテロシクロ})-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-NH-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-S-、 $-C_1 \sim C_{10}$ ヘテロアルキレン-S-、 $-C_3 \sim C_8$ カルボシクロ-S-、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})-S-$ 、 $-アリーレン-S-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-アリーレン-S-、 $-アリーレン-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-S-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $(C_3 \sim C_8 \text{カルボシクロ})-S-$ 、 $-(C_3 \sim C_8 \text{カルボシクロ})-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-S-、 $-C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ-S-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $(C_3 \sim C_8 \text{ヘテロシクロ})-S-$ 、 $-(C_3 \sim C_8 \text{ヘテロシクロ})-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-S-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-O- $C(=O)-$ 、 $-C_3 \sim C_8$ カルボシクロ-O- $C(=O)-$ 、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})-O- $C(=O)-$ 、 $-アリーレン-O- $C(=O)-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-アリーレン-O- $C(=O)-$ 、 $-アリーレン-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-O- $C(=O)-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $(C_3 \sim C_8 \text{カルボシクロ})-O- $C(=O)-$ 、 $-(C_3 \sim C_8 \text{カルボシ$$$$

10

20

30

40

50

クロ) $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-O-C(=O)-$ 、 $-C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ $-O-C(=O)-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-(C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ) $-O-C(=O)-$ 、及び $-(C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ) $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-O-C(=O)-$ からなる群から選択され得る。

【0074】

上記の基のいずれかは、 $-X$ 、 $-R'$ 、 $-O$ 、 $-OR'$ 、 $=O$ 、 $-SR'$ 、 $-N$ 、 R'_2 、 $-NR'_3$ 、 $=NR'$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-N=C=O$ 、 $-NCS$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $=N_2$ 、 $-N_3$ 、 $-NR'C(=O)R'$ 、 $-C(=O)R'$ 、 $-C(=O)NR'_2$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_3H$ 、 $-S(=O)_2R'$ 、 $-OS(=O)_2OR'$ 、 $-S(=O)_2NR'$ 、 $-S(=O)R'$ 、 $-OP(=O)(OR'_2)-P(=O)(OR')_2$ 、 $-PO_3^-$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-C(=O)X$ 、 $-C(=S)R'$ 、 $-CQR'$ 、 $-CO_2$ 、 $-C(=S)OR'$ 、 $C(=O)SR'$ 、 $C(=S)SR'$ 、 $C(=O)NR'_2$ 、 $C(=S)NR'_2$ 、及び $C(=NR')NR'_2$ から選択される置換基のうちの1つ以上で場合により置換され、各 X は独立して、ハロゲン： $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、又は $-I$ であり、各 R' は、独立して、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は $-C_3 \sim C_{10}$ 複素環である。

【0075】

本明細書で使用される場合、「アルキル」という用語は、一価の飽和炭化水素鎖（直鎖又は分岐鎖を有する）を指す。例えば、アルキルは、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキルを指す。好ましくは、アルキルは「低級アルキル」、すなわち、1、2、3、4、5 又は 6 個の炭素有するアルキル基（直鎖又は分岐鎖の $C_1 \sim C_6$ アルキル基）である。例えば、これには、メチル、エチル、 n -プロピル、 i -プロピル、 n -ブチル、 i -ブチル、 sec -ブチル、 $tert$ -ブチル、 n -ペンチル、 n -ヘキシル等が挙げられる。

【0076】

例えば、単独で又はアルキレングリコールの一部として使用されるアルキレンは、本明細書で定義される二価の飽和、直鎖又は分岐アルキル基を指す。

【0077】

アルケニル及びアルキニルは、2～20 個の炭素原子、好ましくは 2～12 個、より好ましくは 2～6 個、特に 2～4 個の少なくとも部分的に不飽和の直鎖又は分岐鎖の炭化水素基を指す。アルケニル基は、少なくとも 1 つの $C=C$ 二重結合を含み、アルキニル基は、少なくとも 1 つの

【0078】

【化10】

$C \equiv C$

三重結合を含む。

【0079】

本明細書で使用される場合、「 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル」又は「炭素環」という用語は、3～8 個、好ましくは 3～6 個の炭素原子を有する飽和又は不飽和環状基を指す。シクロアルキルは、単一の環又は互いに縮合した複数の環を有することができる。シクロアルキルはまた、スピロ環を含むことができる。適切なシクロアルキル基としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル及びシクロヘキシルが挙げられる。

【0080】

本明細書で使用される場合、「 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキレン」又は「カルボシクロ」という用語は、本明細書で定義される二価シクロアルキルを指す。

【0081】

本明細書で使用される場合、「ハロゲン」という用語は、フルオロ ($-F$)、クロロ ($-Cl$)、ブロモ ($-Br$)、又はヨード ($-I$) 基を指す。

【0082】

本明細書で使用される場合、「 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル」という用語は、本明細書で定義される 1 つ以上のハロゲン基によって置換されている本明細書で定義される $C_1 \sim C_6$

アルキルを指す。適切な $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル基としては、トリフルオロメチル及びジクロロメチルが挙げられる。

【0083】

本明細書で使用される場合、「ヘテロアルキル」という用語は、1～12個の炭素原子、好ましくは1～10個、より好ましくは1～6個の炭素原子、並びにO、N、Si及びSからなる群から選択される1～3個のヘテロ原子からなる直鎖又は分岐炭化水素鎖を指し、窒素及び硫黄原子は場合により酸化され得（例えば、スルホキシド又はスルホン）、窒素ヘテロ原子は、場合により四級化され得る。ヘテロ原子O、N及びSは、ヘテロアルキル基の任意の内部位置又はアルキル基が分子の残りの部分に結合している位置に配置されてもよい。

10

【0084】

ヘテロアルキレンは、上で定義した二価ヘテロアルキルを指す。ヘテロアルキレン基の場合、ヘテロ原子はまた、鎖末端のいずれか又は両方を占めることができる。

【0085】

本明細書で使用される場合、「 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ」という用語は—O—アルキル基を指し、アルキル基は本明細書で定義される $C_1 \sim C_6$ アルキルである。適切な $C_1 \sim C_6$ アルコキシ基としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシが挙げられる。

【0086】

本明細書で使用される場合、「 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ」という用語は、本明細書で定義される1つ以上のハロゲン基によって置換された、本明細書で定義される $C_1 \sim C_6$ アルコキシ基を指す。好適なハロアルコキシとしては、トリフルオロメトキシが挙げられる。

20

【0087】

本明細書で使用される場合、「6～10個の環原子を有するアリール」という用語は、6～10個の環原子を含む、単環又は一緒に縮合した複数の芳香環を有する多価不飽和芳香族ヒドロカルビル基を指し、少なくとも1つの環は芳香族である。芳香環は、これに縮合した1～2個の付加環（本明細書で定義されるシクロアルキル、ヘテロシクリル又はヘテロアリール）を場合により含み得る。適切なアリール基としては、ベンゾピラニル、ベンゾジオキサニル、ベンゾジオキサニル等のヘテロシクリルに縮合したフェニル、ナフチル及びフェニル環が挙げられる。

30

【0088】

アリーレンは、上で定義した二価アリーール基を指す。

【0089】

本明細書で使用される場合、「5～10個の環原子を有するヘテロアリーール」という用語は、5～10個の原子を含む、単環又は一緒に縮合した又は共有結合した複数の芳香環を有する多価不飽和芳香環系を指し、少なくとも1つの環は芳香族であり、少なくとも1つの環原子はN、O及びSから選択されるヘテロ原子である。窒素及び硫黄ヘテロ原子は場合により酸化され得、窒素ヘテロ原子は場合により四級化され得る。そのような環は、アリーール、シクロアルキル又はヘテロシクリル環に縮合していてもよい。そのようなヘテロアリーールの非限定的な例としては、フラニル、チオフエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、トリアゾリル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、テトラゾリル、オキサトリアゾリル、チアトリアゾリル、ピリジニル、ピリミジニル、ピラジニル、ピリダジニル、オキサジニル、ジオキシニル、チアジニル、トリアジニル、インドリル、イソインドリル、ベンゾフラニル、イソベンゾフラニル、ベンゾチオフエニル、イソベンゾチオフエニル、インダゾリル、ベンズイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、プリニル、ベンゾチアジアゾリル、キノリニル、イソキノリニル、シノリニル、キナゾリニル及びキナリニルが挙げられる。

40

【0090】

本明細書で使用される場合、「3～10個の環原子を有するヘテロシクリル」、「3～10個の環原子を有するヘテロシクロアルキル」又は「ヘテロシクリル」という用語は、

50

3～10個の環原子、好ましくは3～8個の環原子を有する飽和又は不飽和環式基を指し、少なくとも1個の環原子は、N、O及びSから選択されるヘテロ原子である。窒素及び硫黄ヘテロ原子は場合により酸化され得、窒素ヘテロ原子は場合により四級化され得る。複素環は、縮合又は架橋環並びにスピロ環を含むことができる。複素環の例としては、限定されないが、テトラヒドロピリジル、ピペリジニル、モルホリニル、テトラヒドロフランニル、テトラヒドロチエニル、ピペラジニル、1-アゼパニル、イミダゾリニル、1,4-ジオキサニル等が挙げられる。

【0091】

本明細書で使用される場合、「ヘテロシクロ」又は「ヘテロシクロアルキレン」という用語は、本明細書で定義される二価複素環を指す。

【0092】

更に、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アルキレン、アリーレン、ヘテロアルキル、ヘテロアルキレン、 $C_3 \sim C_8$ 炭素環、 $C_3 \sim C_8$ 炭素環、 $C_3 \sim C_8$ 複素環、 $C_3 \sim C_8$ 複素環、ポリエーテルという用語は、 $-X$ 、 $-R'$ 、 $-O$ 、 $-OR'$ 、 $=O$ 、 $-SR'$ 、 $-S$ 、 $-NR'_2$ 、 $-NR'_3$ 、 $=NR'$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-N=C=O$ 、 $-NCS$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $=N_2$ 、 $-N_3$ 、 $-NRC(=O)R'$ 、 $-C(=O)R'$ 、 $-C(=O)NR'_2$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_3H$ 、 $-S(=O)_2R'$ 、 $-OS(=O)_2OR'$ 、 $-S(=O)_2NR'$ 、 $-S(=O)R'$ 、 $-OP(=O)(OR')_2$ 、 $-P(=O)(OR')_2$ 、 $-PO_3^-$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-C(=O)R'$ 、 $-C(=O)X$ 、 $-C(=S)R'$ 、 $-CQ_2R'$ 、 $-CQ_2$ 、 $-C(=S)OR'$ 、 $C(=O)SR'$ 、 $C(=S)SR'$ 、 $C(=O)NR'_2$ 、 $C(=S)NR'_2$ 、及び $C(=NR')NR'_2$ から選択される置換基のうちの1つ以上で場合により置換された基を指し、各Xは独立して、ハロゲン： $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、又は $-I$ であり、各 R' は、独立して、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は $-C_3 \sim C_{10}$ 複素環である。

【0093】

本明細書で使用される場合、「ポリエーテル」という用語は、エーテル結合を含むポリマーを指す。ポリエーテル中のエーテル部分の数は、2～100の間、好ましくは2～25の間、特に2～10の間に含まれ得る。ポリエーテルの例には、ポリエチレングリコールが含まれる。

【0094】

電子求引基は、通常は共鳴又は誘導効果によって、隣接する原子からそれ自体に向かって電子密度を引き込む原子又は基を指す。電子求引基には、ハロゲン、ハロアルキル($-CF_3$ 等)、 $-CN$ 、 $-SO_3H$ 、 $-NO_2$ 、及び $-C(O)R$ 基($R=H$ 、 OH 、又はアルコキシである)が含まれる。有利には、電子求引基は $-NO_2$ である。一実施形態では、電子求引基は、フェニル環のY-T置換基に対してオルト位にある。

【0095】

本明細書で使用される場合、「保護基」という用語は、分子中の再生官能基又は他の官能基を攻撃しない容易に入手可能な試薬によって選択的に除去することができる化学置換基を指す。適切な保護基は当技術分野で公知であり、開発が続けられている。適切な保護基は、例えば、Wutz et al. (「Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Fourth Edition,」Wiley-Interscience, 2007)に見出され得る。ある種の実施形態では、Wutz et al. (696～927頁)によって記載されているアミノ基を保護するための保護基が使用される。アミノ保護基の代表的な例には、t-ブチルオキシカルボニル(Boc)、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)、アセチル(Ac)、カルボキシベンジル基(Cbz)、ベンジル基(Bn)、アリル、トリフルオロアセチル、アリルオキシカルボニル(Alloc)基及び2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル(Troc)が含まれるが、これらに限定されない。

【0096】

疎水性マスキング実体は、化合物の見かけの疎水性を低下させることができる基を指す

10

20

30

40

50

。疎水性マスキング実体は、ポリサルコシン及びポリエチレングリコールから選択することができる。エチレングリコール又はサルコシン部分の数は、広範囲で変化し得る。例えば、疎水性マスキング実体中のエチレングリコール又はサルコシン部分の数は、2～500の間、好ましくは5～100の間、特に5～25の間に含まれ得る。一実施形態では、疎水性マスキング実体は、6個～24個のサルコシン部分を含む、好ましくは10個～12個のサルコシン部分を含むポリサルコシンである。

【0097】

本明細書で使用される場合、「結合された」という用語は、連結を指す。この連結は、式(I)中のダッシュ「-」によっても表される。連結は、共有結合、又は静電気力等による非共有結合相互作用であり得る。好ましくは、結合は共有結合である。本明細書で使

10

【0098】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」又は「治療」という用語は、(1)疾患を阻害すること、例えば、疾患、状態又は障害の病状又は総体症状を経験しているか又は示している個体における疾患、状態又は障害を阻害すること(すなわち、病態及び／又は総体症状の更なる発症を阻止すること)；(2)疾患を改善する、例えば、疾患、状態又は障害の病態又は総体症状を経験又は示している個体における疾患、状態又は障害を改善すること(すなわち、病態及び／又は総体症状を逆転させること)、例えば、疾患の重症度を低下させること、又は疾患の1つ以上の症状を軽減又は緩和すること

20

【0099】

本明細書で使用される場合、ADCの「治療有効量」又は「有効量」は、具体的に記載された目的を実行するのに十分な量であり、例えば、投与後に治療効果、例えば腫瘍成長速度又は腫瘍体積の阻害又は減少、癌の症状の減少、又は治療有効性の何らかの徴候をもたらすのに十分な量である。癌の場合、治療有効量のADCは、癌細胞の数を減少させ、腫瘍サイズを減少させ、腫瘍転移を阻害(例えば、低速又は停止)し、腫瘍成長を阻害(例えば、低速又は停止)し、及び／又は1つ以上の症状を軽減することができる。

【0100】

本明細書で使用される場合、2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮した、配列によって共有される同一の位置の数の関数(すなわち、同一性% = 同一の位置の数 / 位置の総数 × 100)である。配列の比較及び2つの配列間の同一性パーセントの決定は、以下に記載されるように、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。

30

【0101】

2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Needleman and Wunschアルゴリズム(NEEDLEMAN、及びWunsch)を使用して決定することができる。

【0102】

2つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間の同一性パーセントはまた、例えば、EMBOSS Needle(ペアワイズアライメント; www.ebi.ac.ukで入手可能)を使用して決定され得る。例えば、EMBOSS Needleは、BLOSUM62マトリックス、10の「ギャップオープンペナルティ」、0.5の「ギャップエクステン

40

ドペナルティ」、偽の「エンドギャップペナルティ」、10の「エンドギャップオープンペナルティ」及び0.5の「エンドギャップエクステン

50

核酸配列を有する２つの分子は、化学的及び／又は生物学的修飾に関係なく同一である。

【０１０３】

本開示のＡＤＣの作製に使用するための抗体Ａｂ

本開示のＡＤＣを作製する際に使用するための抗体Ａｂは、配列番号１２に特異的に結合する抗葉酸受容体アルファ（ＦＲα）抗体である。

【０１０４】

好ましくは、そのような抗体には、単離され、下記の表１に記載されるようなそれらの可変重鎖及び軽鎖アミノ酸配列並びにヒト定常アイソタイプによって構造的に特徴付けられる下記の抗体が含まれる。

【０１０５】

【表１】

表１：可変重鎖及び軽鎖アミノ酸配列

抗体	VH アミノ酸配列	VL アミノ酸配列	アイソタイプ定常領域
mAb1 ファルレッズマブ-LALA	配列番号7	配列番号8	IgG1 LALA
mAb2 ファルレッズマブ	配列番号7	配列番号8	IgG1

【０１０６】

IgG1 LALAは、J. Virol 2001 Dec; 75 (24) : 12161-8 (Hezareh et al)による）にも開示されている残基234及び235におけるロイシンからアラニンへのアミノ酸置換を含む変異体IgG1 Fc領域に対応する。

【０１０７】

mAb1の全長軽鎖及び重鎖並びに対応するコード配列を以下の表２に示す。

【０１０８】

【表２】

表２：全長重鎖及び軽鎖アミノ酸及びDNAコード配列

抗体	アミノ酸配列	DNAコード配列
mAb1 ファルレッズマブ-LALA	重鎖：配列番号9 軽鎖：配列番号10	重鎖：配列番号13 軽鎖：配列番号14

【０１０９】

mAb1抗体のVH CDR1（HCDR1とも呼ばれる）、VH CDR2（HCDR2とも呼ばれる）、VH CDR3（HCDR1とも呼ばれる）、VL CDR1（LCDR1とも呼ばれる）、VL CDR2（LCDR2とも呼ばれる）、VL CDR3（HCDR3とも呼ばれる）のアミノ酸配列の例を表３に示す。

【０１１０】

表３において、本開示のいくつかの抗体のCDR領域が、Kabatシステムを使用して描写される。読み取りを容易にするために、CDR領域は、以下、それぞれHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3と呼ばれる。

【０１１１】

【表３】

表３：KabatによるmAb1のCDR領域（国際公開第2017151979号にも開示されている）

元の抗体	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb1 ファルレッズマブ-LALA	配列番号1	配列番号2	配列番号3	配列番号4	配列番号7	配列番号6

【０１１２】

以下の表４及び表５は、ＡＤＣの抗体と比較して有用なアミノ酸及びヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

を提供する。

【0113】

【表4】

表4：本発明を実施するための有用なアミノ酸及びヌクレオチド配列の簡単な説明

配列番号	タイプ*	説明
1	aa	HCDR1 mAb1(ファルレツズマブ)
2	aa	HCDR2 mAb1(ファルレツズマブ)
3	aa	HCDR3 mAb1(ファルレツズマブ)
4	aa	LCDR1 mAb1(ファルレツズマブ)
5	aa	LCDR2 mAb1(ファルレツズマブ)
6	aa	LCDR3 mAb1(ファルレツズマブ)
7	aa	VH mAb1(ファルレツズマブ)
8	aa	VL mAb1(ファルレツズマブ)
9	aa	FcサイレントファルレツズマブーLALAの重鎖(全長)
10	aa	ファルレツズマブの軽鎖(全長)
11	aa	ファルレツズマブの重鎖(全長)
12	aa	ヒト葉酸受容体アルファ(FRa)
13	nt	mAb1(FcーサイレントファルレツズマブーLALA)の重鎖(全長)
14	nt	ファルレツズマブの軽鎖(全長)
15	nt	ファルレツズマブの重鎖(全長)
16	aa	ミルベツキシマブの重鎖(全長)
17	aa	ミルベツキシマブの軽鎖(全長)

* a a はアミノ酸配列である

n t はヌクレオチド配列である

【0114】

【表 5 - 1】

表 5：本発明を実施するために有用なアミノ酸及びヌクレオチド配列

配列番号	詳細な配列
1	GYGLS
2	MISSGGSYTTYADSVKG
3	HGDDPAWFAY
4	SVSSSISSNNLH
5	GTSNLAS
6	QQWSSYPMYT
7	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFTFSGYGLSWVRQAPGKGLEWVAMISSG GSYTTYADSVKGRFAISRDNANTLFLQMDSLRLPEDTGVYFCARHGDDPAWFAYW GQGTPVTVSS
8	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSVSSSISSNNLHWYQQKPGKAPKRWIYGTSNLA SGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDATYYCQQWSSYPMYTFGQGGTKVEIK
9	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFTFSGYGLSWVRQAPGKGLEWVAMISSG GSYTTYADSVKGRFAISRDNANTLFLQMDSLRLPEDTGVYFCARHGDDPAWFAYW GQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNNHTQ KSLSLSPGK
10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSVSSSISSNNLHWYQQKPGKAPKRWIYGTSNLA SGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDATYYCQQWSSYPMYTFGQGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFTFSGYGLSWVRQAPGKGLEWVAMISSG GSYTTYADSVKGRFAISRDNANTLFLQMDSLRLPEDTGVYFCARHGDDPAWFAYW GQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNNHTQ KSLSLSPGK
12	MAQRMTTQLLLLLLVWVAVVGAEQTRIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLH EQCRPWRKNACCSTNTSQAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLEYE CSPNLGPWIIQQVDQSWRKERVNLVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGNW WTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTSHYKVSNNYRSGSGRCIQMWFD AQQNPNEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS

10

20

30

【0115】

40

50

(表 5 の続き)

30

40

【表 5 - 3】

(表 5 の続き)

配列番号	詳細な配列
15	GCGGCCGCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCCTGGTGCTGACCCTGAAAG GCGTCCAGTGTGAAGTCCAATTAGTTCGAGAGTGGCGGGGGGTCGTCCAACCCG GCCGTTTCATTACGGCTCTCCTGCTCCGCCTCTGGGTTACCTTCTCGGGGTACGG CCTATCATGGGTCCGTCAAGCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTCGCCATGATT AGTAGCGGGGGGAGCTATACCTATTACGCCGACAGTGTGAAGGGGCGATTTCGCCA TTAGTAGGGACAATGCAAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGGAAGTTCGTTGAGACC CGAGGACACGGGTGTCTACTTTTGCACGCTCACGGTGACGATCCAGCCTGGTTC GCATATTGGGGGCAGGGTACCCCCGTTACGGTCTCGAGCGCTAGCACAAAGGGC CCTAGTGTGTTTCTCTGGCTCCCTCTTCCAAATCCACTTCTGGTGGCACTGCTGC TCTGGGATGCCTGGTGAAGGATTACTTTCTGAACCTGTGACTGTCTCATGGAAGT CTGGTGTCTGACTTCTGGTGTCCACACTTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGA CTGACTCTCTGTCTGTGTGCTGCTGACCTCTTCTCATCTCTGGGAACCCAGAC CTACATTTGTAATGTGAACCACAAACCATCCAACACTAAAGTGGACAAAAAAGTG GAACCCAAATCCTGTGACAAAACCCACACCTGCCACCTTGTCTGCCCCCTGAAC TGCTGGGAGGACCTTCTGTGTTTCTGTTCCCCCCCCAAACCAAAGGATACCCTGATG ATCTCTAGAACCCCTGAGGTGACATGTGTGGTGGTGGATGTGTCTCATGAGGACC CTGAGGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGAGTGGAAAGTCCACAATGCCAAAAC CAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAATTCAACCTACAGAGTGGTCAAGTGTGCTGACT GTGCTGCATCAGGATTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGTAAAGTCTCAAACA AGGCCCTGCCTGCTCCAATTGAGAAAAACAATCTCAAAGGCCAAGGGACAGCCTAG GGAACCCAGGTCTACACCCTGCCACCTTCAAGAGACGAAGTACCAAAAAACAG GTGTCCCTGACATGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCTTCTGACATGCTGTGGTGGATG GGAGTCAAATGGACAGCCTGAGAACAACACTCAAAAACAACCCCTGTGCTGGAT TCTGATGGCTCTTTCTTTCTGTACTCCAAACTGACTGTGGACAAGTCTAGATGGCA GCAGGGGAATGTCTTTTCTTGTCTGTCTCATGCATGAGGCTCTGCATAACCACTACA CTCAGAAATCCCTGTCTCTGTCTCCCGGGAATGATAGTAAAAGCTT
16	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYD GDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
17	DIVLTQSPSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGQPRLLIYRAS NLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

【0117】

一実施形態では、A b は、

(i) 配列番号 1 の H C D R 1、配列番号 2 の H C D R 2、配列番号 3 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域；及び、

(i i) 配列番号 4 の L C D R 1；配列番号 5 又は 8 の L C D R 2；及び配列番号 6 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

を有する単離された組換え抗体であり、

当該抗体は、配列番号 12 の葉酸受容体アルファに特異的に結合する。

40

【0118】

特定の実施形態では、A b は、

(a) 配列番号 1 の H C D R 1、配列番号 2 の H C D R 2、配列番号 3 の H C D R 3 を含む可変重鎖ポリペプチド、並びに配列番号 4 の L C D R 1、配列番号 5 の L C D R 2 及び配列番号 6 の L C D R 3 を含む可変軽鎖ポリペプチド；又は

(b) 配列番号 7 の V H を含む可変重鎖ポリペプチド及び配列番号 8 の可変軽鎖ポリペプチド V L

のいずれかを含む組換え抗体である。

【0119】

50

特定の実施形態では、A b は、配列番号 9 の重鎖及び配列番号 10 の軽鎖を含むか又はそれらから本質的になる組換え抗体である。

【0120】

特定の実施形態では、A b は、配列番号 11 の重鎖及び配列番号 10 の軽鎖を含むか又はそれらから本質的になる組換え抗体である。

【0121】

特定の実施形態では、A b は、配列番号 16 の重鎖及び配列番号 17 の軽鎖を含むか又はそれらから本質的になる組換え抗体である。

【0122】

特定の実施形態では、A b は、以下の特性のうちの 1 つ以上を有する抗 F R α 抗体である。

【0123】

(i) A b が、B i a c o r e (登録商標) アッセイ等の表面プラズモン共鳴によって測定した場合に 100 nM 以下の K_D で、好ましくは 50 nM 以下の K_D で葉酸受容体受容体 α (F R α) に結合する、

(ii) A b が、内在化抗体であり、特に F R α 発現腫瘍細胞において内在化する、

(iii) A b が、特に安定性の問題又は凝集なしに、抗体当たり 4 ~ 8 個のペイロードのコンジュゲーションを可能にする。

【0124】

先の実施形態と組み合わせられ得るある種の実施形態では、A b は、上で定義された組換え抗体の内在化抗体断片である。

【0125】

抗体に関して本明細書で使用される「内在化する」とは、細胞への特異的結合時に細胞の脂質二重層外膜を通して内部区画（すなわち、「内在化」）に、好ましくは細胞内の分解区画に取り込まれ得る抗体を指す。

【0126】

抗体断片には、F a b、F a b'、F a b' - S H、F (a b₂) F v、U n i B o d y 及び s c F v 断片、ダイアボディ、単ドメイン又はナノボディ及び他の断片が含まれるが、これらに限定されない。「ダイアボディ」という用語は、2 つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指し、この断片は、同じポリペプチド鎖 (V H - V L) 中の軽鎖可変ドメイン (V L) に連結された重鎖可変ドメイン (V H) を含む。同じ鎖上の 2 つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対形成し、2 つの抗原結合部位を作り出すことを強いられる。単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全部若しくは一部又は軽鎖可変ドメインの全部若しくは一部を含む抗体断片である。ある種の実施形態では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である (D o m a n t i s, I n c., W a l t h a m, M A; 例えば、米国特許第 6, 248, 516 号参照)。抗体断片は、限定されないが、インタクト抗体のタンパク質分解消化、並びに本明細書に記載の組換え宿主細胞による産生を含む様々な技術によって作製することができる。

【0127】

ある種の実施形態では、A b は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、親非ヒト抗体と少なくとも同じ親和性（又は優れた親和性）を有しながら、ヒトに対する免疫原性を低下させるためにヒト化される。好ましい実施形態では、本開示の抗体はヒト化抗体である。一般に、ヒト化抗体は、C D R (又はその一部) が非ヒト抗体、例えばマウス抗 F R α 内在化抗体に由来し、フレームワーク領域（又はその一部）がヒト抗体配列に由来する 1 つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、場合により、ヒト定常領域の少なくとも一部を含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体中のいくつかのフレームワーク残基は、例えば、抗体の特異性又は親和性を回復又は改善するために、非ヒト抗体（例えば、C D R 残基が由来する抗 F R α マウス抗体）からの対応する残基で置換される。いくつかの特定の実施形態では、ヒト化抗体中のいくつかの C D R 残基も、例えば抗体の

10

20

30

40

50

特異性又は親和性を回復又は改善するために置換される。ヒト化抗体及びその作製方法は、例えば、Almagro及びFransson、Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)に概説されており、更に、例えば、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); 米国特許第5,821,337号、同第7,527,791号、同第6,982,321号、及び同第7,087,409号; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (特異性決定領域 (SDR) グラフト化を記載); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (「リサーフェシング」を記載); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (「FRシャッフリング」を記載); 及びOsbourne et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (FRシャッフリングへの「ガイドされた選択」アプローチを記載)に更に記載される。

【0128】

好ましくは、Abはヒト化又はヒトサイレント抗体、好ましくはヒト化サイレントIgG1抗体である。

【0129】

本明細書で使用される場合、「サイレント」抗体という用語は、ADCC活性アッセイで測定した場合にADCC活性を示さない又は低い抗体を指す。

【0130】

一実施形態では、「ADCC活性がない又は低い」という用語は、サイレント抗体が、野生型対応IgGアイソタイプを有する対応する抗体で観察されるADCC活性の少なくとも10%未満、例えば50%未満のADCC活性を示すことを意味する。

【0131】

サイレンシングされたエフェクター機能は、抗体のFc定常部分における変異によって得ることができ、当該技術分野: Strohl 2009 (AA&N297A) Baudino 2008, D265A (Baudino et al., J. Immunol. 181 (2008): 6664-69, Strohl, CO Biotechnology 20 (2009): 685-91)に記載されているか、又はSaunders 2019 (Front. Immunol., 07 June 2019, doi:10.3389/fimmu.2019.01296)にも概説されている。サイレントIgG1抗体の例は、IgG1 Fcアミノ酸配列におけるL234A及びL235A変異を含むいわゆるLALA変異、又はLeu235Gluと対になったSer228Proを含む。Pro331Serはまた、サイレントIgG1抗体を生成するために、Ledu234Glu及びLeu235Phe (LALA-PG) と場合により組み合わせて使用されてもよい。サイレントIgG1抗体の別の例は、アグリコシル化抗体又は非グリコシル化抗体をもたらすN297A変異を含む。サイレントIgG4抗体の例は、Ser228Proを含む。

【0132】

特定の実施形態では、Abは、ファルレツズマブ、又は国際公開第2005080431号若しくは国際公開第2017151979号に開示されている他の抗FR α 抗体である。

【0133】

他の特定の実施形態では、Abは、ミルベツキシマブ又はミレブツキシマブのサイレントLALA変異体である。

【0134】

好ましい実施形態では、Abは、ファルレツズマブのサイレントLALA変異体、又は国際公開第2005080431号若しくは国際公開第2017151979号に開示されている他の抗FR α 抗体である。

10

20

30

40

50

【0135】

変異体アミノ酸配列を有する抗体は、コード核酸分子の変異誘発（例えば部位特異的又はPCR媒介変異誘発）に続いて、本明細書に記載の機能アッセイを使用して、保持された機能（すなわち、上記の機能）についてコードされた変化した抗体を試験することによって得ることができる。

【0136】

保存的修飾を有する抗体

ある種の実施形態では、Abは、HCDR1、HCDR2及びHCDR3配列を含む重鎖可変領域と、LCDR1、LCDR2及びLCDR3配列を含む軽鎖可変領域とを有し、これらのCDR配列の1つ又は全てが、本明細書に記載のmAb1（ファルレツズマブのサイレントLALA変異体バージョン）抗体に基づく特定のアミノ酸配列、又は1、2若しくは3つのアミノ酸保存的修飾によってファルレツズマブのCDR配列とは異なる類似のCDR配列を有する当該抗体の機能的バリエーションを有し、抗体又はタンパク質が、特にADCとして使用される場合、mAb1抗体の所望の機能的特性を保持する。

【0137】

ある種の実施形態では、Abは、HCDR1、HCDR2及びHCDR3配列を含む重鎖可変領域と、LCDR1、LCDR2及びLCDR3配列を含む軽鎖可変領域とを有し、これらのCDR配列の1つ以上は、本明細書に記載のミレブツキシマブ（又はミルベツキシマブのサイレントLALA変異体バージョン）抗体に基づく特定のアミノ酸配列、又は1、2若しくは3つのアミノ酸保存的修飾によってファルレツズマブのCDR配列とは異なる類似のCDR配列を有する当該抗体の機能的バリエーションを有し、抗体又はタンパク質は、特にADCとして使用される場合、mAb1抗体の所望の機能的特性を保持する。

【0138】

抗FR α 抗体の所望の機能的特性としては、限定されないが、以下が挙げられる。

(i) 抗FR α 抗体は、5 nM未満、例えば約0.5 nMのEC50でEliSアッセイ（実施例に記載）によって決定されるように葉酸受容体 α （FR α ）に結合する、

(ii) 抗FR α 抗体は、Biacore（登録商標）アッセイ等の表面プラズモン共鳴によって測定した場合に100 nM以下のK_Dで、好ましくは50 nM以下のK_Dで葉酸受容体受容体 α （FR α ）に結合する（例えば、実施例に記載のSPR Biacore親和性アッセイを用いて決定した場合）、

(iii) 抗FR α は、内在化抗体であり、特にFR α 発現腫瘍細胞において内在化する、

(iv) 抗FR α は、特に安定性の問題又は凝集なしに、抗体当たり4～8個のペイロードのコンジュゲーションを可能にし、薬物-抗体比は、例えば、実施例に記載されるようにRPLC-MSによって決定される、

(v) そのようなバリエーション抗FR α 抗体を含むADCは、例えば、実施例で使用されるFR α 陰性細胞株におけるインビトロ有効性アッセイを使用して、FR α 陰性細胞株（BT-474乳癌細胞株等）において、抗FR α 抗体としてmAb1を含む対応する対照ADCと同様又はより低いインビトロ有効性を提供する、及び／又は、

(vi) そのようなバリエーション抗FR α 抗体を有するADCは、例えば実施例で使用される異種移植片モデルの1つを使用して、腫瘍担持マウス異種移植片モデルにおいて、抗FR α 抗体としてmAb1を有する対応する対照ADCと同様又はより高いインビトロ有効性を提供する。

【0139】

本明細書で使用される場合、「保存的配列修飾」という用語は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているアミノ酸置換を指すことを意図している。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極

10

20

30

40

50

性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。したがって、本開示の抗体のCDR領域内の1つ以上のアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置き換えることができ、変化した抗体を、本明細書に記載される機能アッセイを使用して、保持された機能について試験することができる。

【0140】

修飾は、部位特異的変異誘発及びPCR媒介変異誘発等の当技術分野で公知の標準的な技術によって本開示の抗体に導入することができる。

【0141】

特定の実施形態では、Abは、配列番号1～6の対応するCDRと100%同一である6つのCDR、並びにそれぞれ配列番号7及び8で特定される対応するフレームワークアミノ酸領域と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一であるフレームワークアミノ酸領域を含む抗FR α 抗体であり、当該抗FR α 抗体は以下の特性を有する。

(i) 抗FR α 抗体は、5 nM未満、例えば約0.5 nMのEC50でElisaアッセイ（実施例に記載）によって決定されるように葉酸受容体 α （FR α ）に結合する、

(ii) 抗FR α は、Biacore（登録商標）アッセイ等の表面プラズモン共鳴によって測定した場合に100 nM以下のK_Dで、好ましくは50 nM以下のK_Dで葉酸受容体受容体 α （FR）に結合する、

(iii) 抗FR α は、内在化抗体であり、特にFR α 発現腫瘍細胞において内在化する、

(iv) 抗FR α は、特に安定性の問題又は凝集なしに、抗体当たり4～8個のペイロードのコンジュゲーションを可能にし、薬物-抗体比は、例えば、実施例に記載されるようにRPLC-MSによって決定される、

(v) そのようなバリエーション抗FR α 抗体を含むADCは、例えば、実施例で使用されるFR α 陰性細胞株におけるインビトロ有効性アッセイを使用して、FR α 陰性細胞株（BT-474乳癌細胞株等）において、抗FR α 抗体としてmAb1を含む対応する対照ADCと同様又はより低いインビトロ有効性を提供する、及び／又は、

(vi) そのようなバリエーション抗FR α 抗体を有するADCは、例えば実施例で 사용되는異種移植片モデルの1つを使用して、腫瘍担持マウス異種移植片モデルにおいて、抗FR α 抗体としてmAb1を有する対応する対照ADCと同様又はより高いインビトロ有効性を提供する。

【0142】

特定の実施形態では、Abは、ミレブツキシマブの対応するCDRと100%同一である6つのCDRと、ミレブツキシマブの対応するフレームワークアミノ酸領域と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一であるフレームワークアミノ酸領域とを含む抗FR α 抗体であり、当該抗FR α 抗体は以下の特性を有する。

(i) 抗FR α は、5 nM未満、例えば約0.5 nMのEC50でElisaアッセイ（実施例に記載）によって決定されるように葉酸受容体 α （FR α ）に結合する、

(ii) 抗FR α は、Biacore（登録商標）アッセイ等の表面プラズモン共鳴によって測定した場合に100 nM以下のK_Dで、好ましくは50 nM以下のK_Dで葉酸受容体受容体 α （FR）に結合する、

(iii) 抗FR α は、内在化抗体であり、特にFR α 発現腫瘍細胞において内在化する、

(iv) 抗FR α は、特に安定性の問題又は凝集なしに、抗体当たり4～8個のペイロードのコンジュゲーションを可能にし、薬物-抗体比は、例えば、実施例に記載されるようにRPLC-MSによって決定される、

10

20

30

40

50

(v) そのようなバリエーション抗FR α 抗体を含むADCは、例えば、実施例で使用されるFR α 陰性細胞株におけるインビトロ有効性アッセイを使用して、FR α 陰性細胞株（BT-474乳癌細胞株等）において、抗FR α 抗体としてmAb1を含む対応する対照ADCと同様又はより低いインビトロ有効性を提供する、及び／又は、

(vi) そのようなバリエーション抗FR α 抗体を有するADCは、例えば実施例で使用される異種移植片モデルの1つを使用して、腫瘍担持マウス異種移植片モデルにおいて、抗FR α 抗体としてmAb1を有する対応する対照ADCと同様又はより高いインビトロ有効性を提供する。

【0143】

フレームワーク又はFc操作

本開示のADCで使用するために、Abはまた、前のセクションに開示された抗体の操作されたバージョンを含み得、例えば抗体の特性を改善するためにVH及び／又はVL内のフレームワーク残基に修飾が行われたものを含む。典型的には、そのようなフレームワーク修飾は、抗体の免疫原性を低下させるために行われる。例えば、1つのアプローチは、1つ以上のフレームワーク残基を対応する生殖系列配列に「復帰変異する（backmutate）」ことである。より具体的には、体細胞変異を受けた抗体は、抗体が由来する生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含み得る。そのような残基は、抗体フレームワーク配列を、抗体が由来する生殖系列配列と比較することによって同定することができる。フレームワーク領域配列をそれらの生殖系列配置に戻すために、体細胞変異は、例えば部位特異的変異誘発又はPCR媒介変異誘発によって生殖系列配列に「復帰変異」することができる。そのような「復帰変異」抗体も本発明に包含されることが意図される。

【0144】

別のタイプのフレームワーク修飾は、T細胞エпитープを除去し、それによって抗体の潜在的な免疫原性を低下させるために、フレームワーク領域内、又は更には1つ以上のCDR領域内の1つ以上の残基を変異させることを含む。

【0145】

フレームワーク又はCDR領域内で行われた修飾に加えて、又はその代わりとして、抗体は、典型的には、血清半減期、補体固定、Fc受容体結合、及び／又は抗原依存性細胞傷害性等の抗体の1つ以上の機能特性を変化させるための、Fc領域内の修飾を含むように操作され得る。

【0146】

更に、Abは、化学的に修飾され得る（例えば、1つ以上の化学部分を抗体に結合させることができる）か、又はそのグリコシル化を変化させるように修飾され得る抗体であり、ここでも抗体の1つ以上の機能特性を変化させる。これらの実施形態の各々を以下で更に詳細に説明する。

【0147】

本明細書で使用される場合、「アイソタイプ定常領域」又は「Fc領域」という用語は、天然配列Fc領域及びバリエーションFc領域を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために交換可能に使用される。ヒトIgG重鎖Fc領域は、一般に、位置C226又はP230からIgG抗体のカルボキシル末端までのアミノ酸残基を含むものとして定義される。Fc領域の残基の番号付けは、KabattのEUINデックスの番号付けである。Fc領域のC末端リジン（残基K447）は、例えば、抗体の産生又は精製中に除去され得る。したがって、本開示の抗体の組成物は、全てのK447残基が除去された抗体集団、K447残基が除去されていない抗体集団、及びK447残基を有する及び有さない抗体の混合物を有する抗体集団を含み得る。

【0148】

1つの特定の実施形態では、CH1のヒンジ領域は、ヒンジ領域内のシステイン残基の数が変化するように、例えば、増加又は減少するように修飾される。このアプローチは、Bodmer et al.による米国特許第5,677,425号に更に記載されている。CH1のヒンジ領域のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖及び重鎖のアセンブリを容易

10

20

30

40

50

にするように、又は抗体の安定性を増加若しくは減少させるように変化される。

【0149】

他の実施形態では、Fc領域は、抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を媒介する抗体の能力を低下させるように、及び／又は1つ以上のアミノ酸を修飾することによってFcγ受容体に対する抗体の親和性を低下させるように修飾される。エフェクター機能が低下した、特にADCCが低下したそのような抗体には、サイレント抗体が含まれる。

【0150】

ある種の実施形態では、IgG1アイソタイプのFcドメインが使用される。いくつかの特定の実施形態では、IgG1 Fc断片の変異体バリエーション、例えば、抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を媒介する及び／又はFcγ受容体に結合するADCの能力を低減又は排除するサイレントIgG1 Fcが使用される。IgG1アイソタイプサイレント変異体の好ましい例は、J. Virol. 2001 Dec; 75 (24): 12161-8 (Hezareh et al.による)に記載されるように、ロイシンが、アミノ酸位置234及び235においてアラニンによって置き換えられているIgG1である。別の例は、LALA-PG三重変異を有するIgG1アイソタイプサイレント変異体であり、LALA変異に加えて、位置329のプロリンがグリシンに置換されている。

【0151】

ある種の実施形態では、Fcドメインは、Fcドメインの位置297におけるグリコシル化を防止するサイレントFc変異体である。例えば、Fcドメインは、位置297にアスパラギンのアミノ酸置換を含む。そのようなアミノ酸置換の例は、グリシン又はアラニンによるN297の置換である。

【0152】

更に別の実施形態では、抗体のグリコシル化が修飾される。例えば、非グリコシル化抗体を作製することができる（すなわち、抗体はグリコシル化を欠く）。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるように変化させることができる。そのような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1つ以上の部位を改変することによって達成され得る。例えば、1つ以上の可変領域フレームワークのグリコシル化部位の排除をもたらす、それによりその部位でのグリコシル化を排除する、1つ以上のアミノ酸置換が行われ得る。そのような非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高め得る。そのようなアプローチは、Coe et al.による米国特許第5,714,350号及び同第6,350,861号に更に詳細に記載されている。

【0153】

本開示によって企図される本明細書の抗体の別の修飾は、ペグ化若しくはヘシル化又は関連技術である。抗体は、例えば、抗体の生物学的（例えば、血清）半減期を延長させるようにペグ化され得る。抗体をペグ化するために、抗体又はそのフラグメントは、1つ以上のPEG基が抗体又は抗体フラグメントに付着するようになる条件下で、典型的には、PEGの反応性エステル又はアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール（PEG）と反応させられる。ペグ化は、反応性PEG分子（又は類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応又はアルキル化反応によって行うことができる。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（1〜C10）アルコキシー若しくはアリールオキシーポリエチレングリコール又はポリエチレングリコール-マレイミド等の他のタンパク質を誘導体化するために使用されているいずれかの形態のPEGを包含するよう意図される。特定の実施形態では、ペグ化される抗体は、非グリコシル化抗体である。タンパク質をペグ化する方法は当技術分野で公知であり、本開示の抗体に適用することができる。例えば、Nishimura et al.による欧州特許第0154316号及びIshikawa et al.による欧州特許第0401384号を参照されたい。

【0154】

本開示によって企図される抗体の別の修飾は、得られる分子の半減期を増加させるための、少なくとも本開示の抗体の抗原結合領域と血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン又はその断片とのコンジュゲート又はタンパク質融合物である。そのようなアプローチ

10

20

30

40

50

は、例えば、B a l l a n c e e t a l . の欧州特許第 0 3 2 2 0 9 4 号に記載されている。

【 0 1 5 5 】

本開示の A D C の作製に使用するための抗体の作製

本開示の抗体は、当業者に公知の従来技術を用いて得ることができる。本開示の抗体をコードする核酸並びにこれらの抗体を産生するトランスフェクトマの生成に関する更なる情報については、当業者は国際出願番号国際公開第 2 0 0 5 0 8 0 4 3 1 号を参照することもできる。

【 0 1 5 6 】

例えば、抗体又はその抗体断片を発現させるために、部分的又は全長の軽鎖及び重鎖をコードする D N A を、標準的な分子生物学又は生化学技術（例えば、目的とする抗体を発現するハイブリドーマを使用する D N A 化学合成、P C R 増幅又は c D N A クローニング）によって得ることができ、遺伝子が転写制御配列及び翻訳制御配列に作動可能に連結されるように、D N A を発現ベクターに挿入することができる。この文脈において、「作動可能に結合された」という用語は、ベクター内の転写及び翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写及び翻訳を調節するそれらの意図された機能を果たすように、抗体遺伝子がベクターにライゲーションされることを意味するよう意図されている。発現ベクター及び発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と適合するように選択される。抗体軽鎖遺伝子及び抗体重鎖遺伝子は、別々のベクターに挿入され得るか、又はより典型的には、両方の遺伝子が同じ発現ベクターに挿入される。抗体遺伝子は、標準的な方法（例えば、抗体遺伝子フラグメント及びベクター上の相補的制限部位のライゲーション、又は制限部位が存在しない場合の平滑末端ライゲーション）によって発現ベクターに挿入される。本明細書に記載される抗体の軽鎖及び重鎖可変領域が使用されて、それらを、V H セグメントがベクター内の C H セグメントに作動可能に連結され、V L セグメントがベクター内の C L セグメントに作動可能に連結されるように、所望のアイソタイプの重鎖定常領域及び軽鎖定常領域をすでにコードしている発現ベクターに挿入することによって、任意の抗体アイソタイプの全長抗体遺伝子を作製することができる。追加的又は代替的に、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることができる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドがインフレームで抗体鎖遺伝子のアミノ末端に結合されるようにベクターにクローン化され得る。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチド又は異種シグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質からのシグナルペプチド）であってもよい。

【 0 1 5 7 】

抗体鎖遺伝子に加えて、本明細書に開示される組換え発現ベクターは、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を有する。「調節配列」という用語は、抗体鎖遺伝子の転写又は翻訳を制御するプロモータ、エンハンサ及び他の発現制御要素（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことを意図している。調節配列の選択を含む発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベル等の因子に依存し得ることが当業者には理解されよう。哺乳動物宿主細胞発現のための調節配列には、サイトメガロウイルス（C M V）、シミアンウイルス 4 0（S V 4 0）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス主要後期プロモータ（A d M L P））、及びポリオーマ由来のプロモータ及び／又はエンハンサ等の、哺乳動物細胞における高レベルのタンパク質発現を指示するウイルス要素が含まれる。あるいは、ユビキチンプロモータ又は P-グロビンプロモータ等の非ウイルス調節配列を使用してもよい。更に、調節要素は、S V 4 0 初期プロモータ及びヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の長い末端反復配列からの配列を含む、S R a プロモータ系等の異なる供給源からの配列から構成された。

【 0 1 5 8 】

抗体鎖遺伝子及び調節配列に加えて、本開示の組換え発現ベクターは、宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列（例えば、複製起点）及び選択可能マーカ遺伝子等の追加の配列を有し得る。選択可能マーカ遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を

10

20

30

40

50

容易にする（例えば、全てAxel et al.による米国特許第4,399,216号、同第4,634,665号及び同第5,179,017号を参照されたい）。例えば、典型的には、選択可能マーカ遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞上のG418、ハイグロマイシン又はメトトレキサート等の薬物に対する耐性を付与する。選択可能マーカ遺伝子には、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子（メトトレキサート選択／増幅を伴うdhfr宿主細胞での使用のため）及びneo遺伝子（G418選択のため）が含まれる。

【0159】

軽鎖及び重鎖の発現のために、重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクター（複数可）を標準的な技術によって宿主細胞にトランスフェクトする。「トランスフェクション」という用語の様々な形態は、原核生物又は真核生物の宿主細胞への外因性DNAの導入に一般的に使用される多種多様な技術、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクション等を包含することを意図している。本開示の抗体を原核生物宿主細胞又は真核生物宿主細胞のいずれかにおいて発現させることが理論的に可能である。真核細胞、例えば哺乳動物宿主細胞、酵母又は糸状真菌における抗体の発現は、そのような真核細胞、特に哺乳動物細胞が、適切に折り畳まれた免疫学的に活性な抗体を集合させ分泌する可能性が原核細胞よりも高いために論じられる。

【0160】

本開示のADCの作製に使用するための好ましい抗体の重鎖及び軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、表3及び4に記載されている（特に配列番号13～15を参照）。

【0161】

本開示の組換え抗体を発現するための哺乳動物宿主細胞には、DHFR選択可能マーカ（Kaufman and Sharp, 1982に記載）と共に使用されるdhfr-CHO細胞（Urlaub and Chasin, 1980に記載）、CHOK1 dhfr+細胞株、NSO骨髓腫細胞、COS細胞及びSP2細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣（CHO細胞）が含まれる。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞に導入される場合、抗体は、宿主細胞における抗体の発現、及び場合により、宿主細胞が増殖される培養培地への抗体の分泌に十分な期間にわたって宿主細胞を培養することによって産生される。抗体は、例えば、標準的なタンパク質精製方法を使用して、それらの分泌後に培養培地から回収及び精製することができる。

【0162】

リンカーL

本明細書で使用される場合、「リンカー」又は「リンカー部分」は、薬物部分等の化合物を抗体部分等の別の部分に共有結合することができる任意の化学部分を指す。

【0163】

本開示のADCは、一方の側でAbに結合し、他方の側で薬物Dに結合した切断可能なリンカー部分Lを含み、当該抗FR α 抗体は前のセクションに開示されている。

【0164】

特定の実施形態では、リンカーLは、抗体Abの1つ以上のチオール残基、例えば抗体配列の天然又は人工システイン残基に共有結合している。

【0165】

本明細書で使用される場合、「切断可能」という用語は、特定の環境条件下（酸化還元電位又はpH等）又は細胞内環境に応答して、例えば細胞内のADCの内在化後に特定のリソソーム酵素下で切断され得るリンカーを指す。

【0166】

特定の実施形態では、Lは、式-A-W-（式中、Aは、Abに連結された任意のストレッチャ単位であり、Wは、Dに連結された切断可能な部分である）の切断可能なリンカー部分である。

【0167】

特定の実施形態では、任意要素のストレッチャ単位Aは、1つ以上のアミノ酸、1つ以

10

20

30

40

50

上のN-置換アミノ酸、場合により置換されたポリエーテル、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキレン、6～10個の環原子を有するアリーレン、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキレン、5～10個の環原子を有するヘテロシクロアルキレン、5～10個の環原子を有するヘテロアリーレン、 $C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択され得、

当該アルキレン及びアルケニレンは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NR''-$ 、 $-C(O)NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-$ 、 $-NR''-C(O)-NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)NR''-$ 及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

当該アルキレン、アリーレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、ヘテロアリーレン、及びアルケニレンは、ハロゲン、オキソ、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_6$ シクロアルキル、5～10個の環原子を有するヘテロシクリル、6～10個の環原子を有するアリール、5～10個の環原子を有するヘテロアリール、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ、 $-(CO)-R'$ 、 $-O-(CO)-R'$ 、 $-(CO)-O-R'$ 、 $-(CO)-NR''R'''$ 、 $-NR''-(CO)-R'$ 、及び $-NR''R'''$ から選択される1つ以上の置換基で場合により置換され、

R' 、 R'' 及び R''' は、H及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立して選択され、

【0168】

本開示のADCに使用され得る切断可能なリンカーの例としては、酸感受性又は酸不安定性リンカー、例えば酸不安定性ヒドラゾンリンカー、リソソームプロテアーゼ感受性リンカー、 α -グルクロニドリンカー又はグルタチオン感受性ジスルフィドリンカーが挙げられる。

【0169】

Lがリソソームプロテアーゼ感受性リンカーである特定の実施形態では、Wは、バリニンシトルリン(VaI-Cit)、アラニン-アラニン-アスパラギン(Ala-Ala-Asn)、バリニン-アラニン(VaI-Ala)及びフェニルアラニン-リジン(Ph-e-Lys)からなる群から選択され得る切断可能なペプチド部分を含む。好ましくは、Wはバリニン-アラニンペプチド部分を含む。

【0170】

Lがプロテアーゼ感受性リンカーである他の特定の実施形態では、Wは、好ましくは β -グルクロニド又は β -ガラクトシド部分から選択される糖切断可能単位を含む。

【0171】

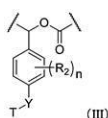
Lがグルタチオン感受性リンカーである他の特定の実施形態では、Wはジスルフィド部分を含む。

【0172】

好ましい実施形態では、Lは式 $-A-W-$ の切断可能なリンカー部分であり、式中、Wは以下の式(III)であって、

【0173】

【化11】



式中、

各 R_2 は、電子求引基及び $C_1 \sim C_4$ アルキルからなる群から独立して選択され、

n は、0、1又は2であり、

Tは、糖切断可能単位又はポリペプチド切断可能単位であり、

Tが糖切断可能単位である場合、YはOであり、又はTがポリペプチド切断可能単位である場合、Yは、 NR_3 であり、

R_3 は、H、 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル；場合により置換されたポリエーテル、6～10個の環原子を有するアリール、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、3～10

10

20

30

40

50

個の環原子を有するヘテロシクロアルキル、5～10個の環原子を有するヘテロアリール、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択され、

当該アルキル及びアルケニルは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NR''-$ 、 $-C(O)NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-$ 、 $-NR''-C(O)-NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)NR''-$ 及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

R'' 及び R''' は、H及び $C_1\sim C_6$ アルキルから独立して選択される、式(III)並びにその薬学的に許容される塩である。

【0174】

特定の実施形態では、Tは、グルクロニド又はガラクトシドである糖切断可能単位である。

10

【0175】

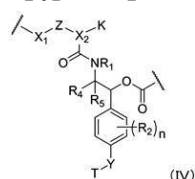
他の特定の実施形態では、Tは、好ましくはVal-Cit、Val-Ala及びPhe-Lysから選択されるジペプチドである。

【0176】

より特定の実施形態では、Lは式(IV)のリンカー-A-Wに対応し、

【0177】

【化12】



20

式中、

X_1 は、コネクタ単位であり、

Zは、任意のスペーサであり、

X_2 は、コネクタ単位であり、

Kは、好ましくはポリサルコシン及びポリエチレングリコールから選択される、任意選択の疎水性マスキング実体であり、

30

R_1 は、H、 $C_1\sim C_{24}$ アルキル、 $C_2\sim C_6$ アルケニル；場合により置換されたポリエーテル、6～10個の環原子を有するアリール、 $C_3\sim C_8$ シクロアルキル、3～10個の環原子を有するヘテロシクロアルキル、5～10個の環原子を有するヘテロアリール、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択され、

当該アルキル及びアルケニルは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NR''-$ 、 $-C(O)NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-$ 、 $-NR''-C(O)-NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)NR''-$ 及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

R_4 は、H、 $C_1\sim C_6$ アルキル及び $C_2\sim C_6$ アルケニルからなる群から選択され、当該アルキル及びアルケニルは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 及び $-NR''-$ から選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

40

R_5 は、H、 $C_1\sim C_6$ アルキル及び $C_2\sim C_6$ アルケニルからなる群から選択され、当該アルキル及びアルケニルは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 及び $-NR''-$ から選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断される。

【0178】

式(IV)のリンカーの好ましい実施形態では、 X_1 及び X_2 は、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のN-置換アミノ酸、場合により置換されたポリエーテル、 $C_1\sim C_{12}$ アルキレン、6～10個の環原子を有するアリーレン、 $C_3\sim C_8$ シクロアルキレン、5～10個の環原子を有するヘテロシクロアルキレン、5～10個の環原子を有するヘテロアリーレン、 $C_2\sim C_{10}$ アルケニレン、及びそれらの任意の組合せからなる群から独立して選択

50

され、

当該アルキレン及びアルケニレンは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NR''-$ 、 $-C(O)NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-$ 、 $-NR''-C(O)-NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)NR''-$ 及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

当該アルキレン、アリーレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、ヘテロアリーレン、及びアルケニレンは、ハロゲン、オキソ、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_6$ シクロアルキル、5～10個の環原子を有するヘテロシクリル、6～10個の環原子を有するアリール、5～10個の環原子を有するヘテロアリール、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ、 $-(CO)-R'$ 、 $-O-(CO)-R'$ 、 $-(CO)-O-R'$ 、 $-(CO)-NR''R'''$ 、 $-NR''-(CO)-R'$ 、及び $-NR''R'''$ から選択される1つ以上の置換基で場合により置換され、

R' 、 R'' 及び R''' は、 H 及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立して選択される。

【0179】

式(IV)のリンカーの他の好ましい実施形態では、Zは、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のN-置換アミノ酸、場合により置換されたポリエーテル、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキレン、6～10個の環原子を有するアリーレン、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキレン、5～10個の環原子を有するヘテロシクロアルキレン、5～10個の環原子を有するヘテロアリーレン、 $C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン、及びそれらの任意の組合せからなる群から独立して選択され、

当該アルキレン及びアルケニレンは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NR''-$ 、 $-C(O)NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-$ 、 $-NR''-C(O)-NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)NR''-$ 及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

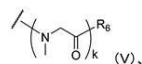
当該アルキレン、アリーレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、ヘテロアリーレン、及びアルケニレンは、ハロゲン、オキソ、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_6$ シクロアルキル、5～10個の環原子を有するヘテロシクリル、6～10個の環原子を有するアリール、5～10個の環原子を有するヘテロアリール、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ、 $-(CO)-R'$ 、 $-O-(CO)-R'$ 、 $-(CO)-O-R'$ 、 $-(CO)-NR''R'''$ 、 $-NR''-(CO)-R'$ 、及び $-NR''R'''$ から選択される1つ以上の置換基で場合により置換され、

R' 、 R'' 及び R''' は、 H 及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立して選択される。

【0180】

式(IV)又は(V)のリンカーLの他の実施形態では、Kは、好ましくは以下の式(V)のポリサルコシンであり、

【化13】



式中、kは2～50、好ましくは4～30の整数であり、

R_6 はOH又は NH_2 に対応する。

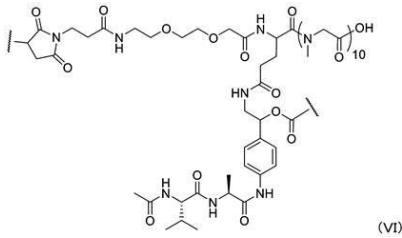
【0181】

式(IV)又は(V)のリンカーLの他の実施形態では、Kは、好ましくは2～50個の間のエチレングリコール部分を含むポリエチレングリコール部分(PEG)である。

【0182】

好ましい実施形態では、Lは式(VI)のリンカーに対応する。

【化 1 4】



【0 1 8 3】

好ましくは、当該リンカー L は、抗体 A b の 1 つ以上のチオール残基、例えば抗体 A b の 8 個のチオール残基に共有結合している。

【0 1 8 4】

ペイロード

一実施形態では、本開示の D は、X のカルボニル官能基の側で X に連結されたペイロードである。一実施形態では、X と D との間の連結は、X のカルボニル官能基と D のアミノ基との間で起こる。

【0 1 8 5】

ペイロード D は、A D C 設計の重要な構成要素である。ペイロードは、治療剤又は薬物であり得る。「薬物」という用語は、特に、生物学的プロセスを調節することができ、及び／又は生物学的活性を有する薬剤を指す。

【0 1 8 6】

特定の実施形態では、ペイロード D は、腫瘍細胞の細胞質内部の内在化 A D C からの放出後に活性化される細胞傷害性薬物である。それは、理想的には、（抗体に連結された場合）非腫瘍細胞に影響を及ぼさずに腫瘍細胞を破壊することができなければならない。ペイロードはまた、理想的には、全身循環及びリソソームにおいて高い安定性を有するべきである。それは、好ましくは、癌細胞株についてインビトロでナノモル濃度以下の I C 5 0 値及び水性環境中で十分な溶解性を有するべきである。

【0 1 8 7】

特定の実施形態では、細胞傷害性薬物は、アウリスタチン（モノメチルアウリスタチン E（MMAE）、モノメチルアウリスタチン F（MMAF）を含む）、メイタンシノイド（例えばメイタンシン）、カリケアマイシン、デュオカルマイシン、及びアントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ジヒドロオキシアントラシンジオン）等の DNA 損傷剤、又はカンプトテシン又はそれらの類似体等のトポイソメラーゼ I の阻害剤から選択される。

【0 1 8 8】

特定の実施形態では、D は、タキソン、サイトカラシン B、アウリスタチン（モノメチルアウリスタチン E を含む）、グラミシジン D、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒシン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシン D、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びピューロマイシン並びにそれらの類似体又はホモログからなる群から選択される。

【0 1 8 9】

特定の実施形態では、D は、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アプレーション剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラクスンブシル、マイファラン、カルムスチン（BSNU）及びロムスチン（CCNU）、シクロソスアミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシン C 及びシス-ジクロロジアミン白金（IE）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前はダウノマイシン）及びドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノ

10

20

30

40

50

マイシン（以前はアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン及びアントラマイシン（AMC））及び抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチン及びビンブラスチン）からなる群から選択される。

【0190】

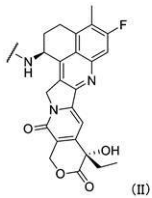
好ましくは、DはトポイソメラーゼIの阻害剤であり、カンプトテシン類似体、インドカルバゾール類似体、フェナントリジン類似体、フルオロキノロン類似体、キノキサリン、エボジアミン、アクリジン、ナフチリジン、デオキシニボマイシン類似体、アングスチン類似体、スチルベンチアゾール類似体、ピロロキナゾリノキノリンアルカロイド又はインデノイソキノリン類似体（総説については、Sela et al., A patent review of topoisomerase I inhibitors (2016-present), 2021, Expert Opinion on Therapeutic Patents, 31(6), 473-508を参照されたい）を含むがこれらに限定されず、好ましくは、カンプトテシン及びそれらの類似体からなる群から選択され、イリノテカン、トポテカン、カンプトテシン、SN-38、エキサテカン、DXd、シラテカン、コシテカン、ルトテカン、ギマテカン、ベロテカン、ルビテカン（総説についてはSriram et al., Camptothecin and its analogues: a review on their chemotherapeutic potential, 2005, Natural Product Research, 14(9), 393-412を参照されたい）を含むがこれらに限定されない。

【0191】

好ましい実施形態では、Dは、以下の式(II)のエキサテカンの薬物部分である。

【0192】

【化15】



【0193】

本開示のADC

一実施形態では、本開示は、抗FR α 抗体が薬物（特にエキサテカン）に連結されているADCを提供する。リンカーLは上に定義した通りである。

【0194】

好ましくは、そのようなADCは、FR α を発現する腫瘍細胞に有効量の薬物、例えばトポイソメラーゼIの阻害剤、好ましくはエキサテカンを選択的に送達することができる。

【0195】

一実施形態では、本開示は、式(I)ADCを提供し、

Ab-[L-D]_p (I)、

式中、

—Abは、配列番号12に特異的に結合する抗葉酸受容体アルファ(FR α)抗体であり、

—Lは、チオール残基を介して当該抗体に結合した切断可能なリンカー部分であり、

—Dは、Lに結合した細胞傷害性薬物部分、例えばトポイソメラーゼIの阻害剤であり、

—pは、1~8、好ましくは6~8、より好ましくはpは8である。

【0196】

Ab、L及びDは、前のセクションで定義されている。

【0197】

薬物対抗体比又は「DAR」とも呼ばれる「p」という用語は、式(I)のADCにお

ける抗体部分当たりの薬物部分の数、又は抗体A b当たりの－L－D部分の数に対応する。

【0198】

薬物抗体比は、原則として、単一のADCに対して正確な値を有するが、その値は、典型的にはコンジュゲーション工程に関連するある程度の不均一性のために、多くのADCを含有する組成物を記載するために使用される場合、平均値であることが多いことが理解される。ADCの試料の平均負荷量は、本明細書では薬物抗体比又は「DAR」とも呼ばれる。いくつかの実施形態では、DAR(p)は、約1～約8（すなわち、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5及び8）、好ましくは約4～約8、より好ましくは約6～約8、更により好ましくは約8である。

【0199】

したがって、式(I)の複数コピーのADCを含む組成物において、「p」は、抗体A b当たりの－L－D部分の平均数を指す。8に近い平均p数の場合、ADCは「DAR8」であると考えられる。

【0200】

薬物－抗体比を測定するための方法は、実施例に開示されているか、又は例えばConi l h e t a l (P h a r m a c e u t i c a l s 2021, 14(3), 247)に記載されている。

【0201】

リンカーLを介した抗体への薬物負荷は、抗体部分上の付着部位の数によって制限され得る。いくつかの実施形態では、ADCのリンカー部分(L)は、抗体部分上の1つ以上のアミノ酸残基上の化学的に活性な基を介して抗体部分に結合する。例えば、リンカーは、遊離アミノ酸、イミノ、ヒドロキシル、チオール又はカルボキシル基（例えば、N末端又はC末端、1つ以上のリジン残基のεアミノ基、1つ以上のグルタミン酸残基又はアスパラギン酸残基の遊離カルボキシル基、又は1つ以上のシステイン残基のスルフヒドリル基）を介して抗体部分に結合され得る。リンカーが結合している部位は、抗体部分のアミノ酸配列中の天然残基であり得るか、又は例えばDNA組換え技術（例えば、システイン又は非天然アミノ酸残基をアミノ酸配列に導入することによって）又はタンパク質生化学によって（例えば、還元、pH調整、又は加水分解によって）抗体部分に導入され得る。

【0202】

結合部位が鎖間システインチオール基である場合、抗体は、リンカーが結合し得るシステインチオール基を1つ又は少数しか有し得ない。実際、ほとんどの反応性システインチオールは、一般に鎖間ジスルフィド架橋として存在する。抗体へのリンカー－毒素の過剰結合は、鎖間ジスルフィド架橋を形成するために利用可能なシステイン残基を還元することによって抗体を不安定化し得る。したがって、最適な薬物抗体比は、抗体部分を不安定化することなく、かつ薬物動態特性を低下させることなく、（抗体当たりの結合薬物部分の数を増加させることによって）ADCの効力を増加させるはずである。

【0203】

特定の実施形態では、－L－Dは、抗体の鎖間反応性チオール残基に結合している。全長の重鎖及び軽鎖を有する典型的な抗体は、8個の利用可能な鎖間反応性チオール残基を含む。したがって、特定の実施形態では、ADCは、8個の－L－D部分が抗体A bの8個の鎖間反応性チオール残基に共有結合しているDAR8 ADCであり、最も好ましくは、－L－は式(VI)に対応する。

【0204】

特定の実施形態では、本開示のADCは、以下の式(VII)に対応し、

【0205】

10

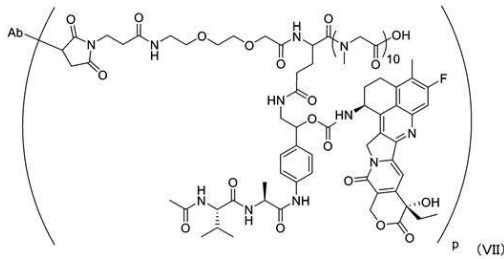
20

30

40

50

【化 16】



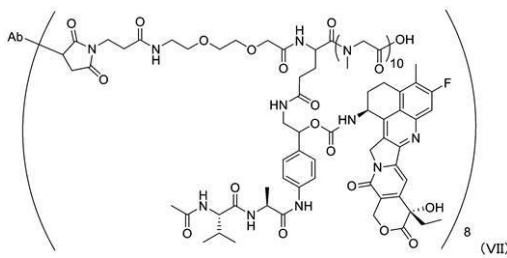
式中、A bは、前のセクションで定義した抗F R αであり、pは、4～8、好ましくは6～8である。

【0206】

より好ましい実施形態では、本開示のADCは、以下の式(VII)に対応し、

【0207】

【化 17】



式中、A bは、前のセクションで定義した抗F R αである。

【0208】

特定の実施形態では、本開示のADCは式(I)に対応し、式中、

(i) A bは、

・配列番号1のH C D R 1、配列番号2のH C D R 2、配列番号3のH C D R 3を含む可変重鎖ポリペプチド及び

・配列番号4のL C D R 1、配列番号5のL C D R 2及び配列番号6のL C D R 3を含む可変軽鎖ポリペプチド；

を含む、抗葉酸受容体アルファ抗体又はその抗原結合断片であり、

(ii) Lは、式-A-W-の切断可能なリンカーであり、式中、Aは、A bに連結された任意のストレッチャ単位であり、Wは、Dに連結された切断可能な部分であり、

(iii) Dは、トポイソメラーゼIの阻害剤、例えば、エキサテカンであり、及び

(iv) pは1～8、好ましくは8である。

【0209】

特定の実施形態では、本開示のADCは式(I)に対応し、式中、

(i) A bは、配列番号9の重鎖及び配列番号10の軽鎖を含む抗体であり、

(ii) Lは、式-A-W-の切断可能なリンカーであり、式中、Aは、A bに連結された任意のストレッチャ単位であり、Wは、Dに連結された切断可能な部分であり、

(iii) Dは、トポイソメラーゼIの阻害剤、例えば、エキサテカンであり、及び

(iv) pは、1～8、好ましくは6～8、例えば約8である。

【0210】

特定の実施形態では、本開示のADCは、式(I)のADCであり、式中、

(i) A bは、配列番号11の重鎖及び配列番号10の軽鎖を含む抗体であり、

(ii) Lは、式-A-W-の切断可能なリンカーであり、式中、Aは、A bに連結された任意のストレッチャ単位であり、Wは、Dに連結された切断可能な部分であり、

(iii) Dは、トポイソメラーゼIの阻害剤、例えば、エキサテカンであり、及び

(iv) pは、1～8、好ましくは6～8、例えば約8である。

【0211】

好ましい実施形態では、本開示のADCは、Abが配列番号9の重鎖と配列番号10の軽鎖とを含む抗体である式(VII)のADCである。

【0212】

別の特定の実施形態では、本開示のADCは、Abが配列番号11の重鎖と配列番号10の軽鎖とを含む抗体である式(VII)のADCである。

【0213】

医薬組成物—製剤

別の態様では、本開示は、薬学的に許容される担体と共に製剤化された、本明細書に開示されるADC（例えば、式(VI)のリンカーLに結合したmAb1、それ自体がエキサテカン等の薬物に結合される）の1つ又は組合せを含有する組成物、例えば医薬組成物を提供する。

【0214】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」としては、生理学的に適合性である任意の及び全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤等が挙げられる。本開示の医薬製剤は、安定剤、界面活性剤、緩衝剤、抗菌保存剤、保護剤、酸化防止剤、キレート剤、増量剤から選択される1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を更に含み得る。

【0215】

本明細書で使用される場合、「溶媒」は、水性製剤等の液体製剤の調製のための任意の薬学的に許容される（すなわち、ヒト又は別の哺乳動物への投与のために安全かつ非毒性である）及び有用な成分である。例示的な溶媒には、滅菌注射用水(WFI)又は静菌注射用水(BWFI)等の水、pH緩衝液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩水、リンゲル液又はデキストロース溶液、及びそれらの組合せが含まれる。好ましくは、溶媒は、開示のための滅菌水又は注射用の静菌水(BWFI)である。

【0216】

本明細書で使用される場合、安定剤は、特にアンフォールディング及び凝集に対するタンパク質安定性を増加させる化合物である。好ましくは、安定剤は、医薬製剤中の適切な添加剤又は賦形剤として当局によって認められている。

【0217】

安定剤は糖類であってもよい。本明細書における「糖類」は、単糖類、二糖類、三糖類、多糖類、糖アルコール、還元糖、非還元糖等を含む一般的な組成物(CH_2O)_n及びその誘導体を含む。本明細書における糖類の例には、グルコース、スクロース、トレハロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、デキストラン、グリセリン、デキストラン、エリスリトール、グリセロール、アラビトール、シリトール、ソルビトール、マンニトール、メリビオース、メレチトース、ラフィノース、マンノトリオース、スタキオース、マルトース、ラクツロース、マルツロース、グルシトール、マルチトール、ラクチトール、イソマルツロース等が含まれる。

【0218】

本開示の医薬製剤中の安定剤の濃度は、1～500mMの間に含まれる。

【0219】

本明細書で使用される場合、「界面活性剤」は、界面活性剤を指す。界面活性剤は、一般に、疎水性領域の露出を減少させ、したがって、吸着部位に対する競合によっても防止されるタンパク質—タンパク質相互作用及び界面誘導凝集を減少させるために、タンパク質製剤に添加される。

【0220】

本明細書における界面活性剤の例としては、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート20及びポリソルベート80）；ポロキサマー（例えば、ポロキサマー188）；トリトン(Triton)；ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate、SDS)；ラウリル硫酸ナトリウム；オクチルグリコシドナトリウム；ラウリル、ミリスチル、リノレ

10

20

30

40

50

イルー又はステアリルースルホベタイン；ラウリルー、ミリスチルー、リノレイルー又はステアリルースルコシン；リノレイルー、ミリスチルー又はセチルーベタイン；ラウロアミドプロピルー、コカミドプロピルー、リノールアミドプロピルー、ミリスタミドプロピルー、パルミドプロピルー又はイソステアラミドプロピルーベタイン（例えば、ラウロアミドプロピル）；ミリスタミドプロピルー、パルミドプロピルー又はイソステアラミドプロピルージメチルアミン；ナトリウムメチルココイルー又は二ナトリウムメチルオレイルタウラート；ポリエチルグリコール、ポリプロピルグリコール、並びにエチレンとプロピレングリコールとのコポリマー（例えば、Pluronic、PF68等）が挙げられる。薬学的に許容される界面活性剤の他の例としては、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（Tween）、ポリエチレンーポリプロピレングリコール、ポリオキシエチレンステアラート、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、例えばポリオキシエチレンモノラウリルエーテル、アルキルフェニルポリオキシエチレンエーテル（Triton-X）、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレンコポリマー（ポロキサマー、プルロニック）及びドデシル硫酸ナトリウム（SDS）が挙げられる。最も適切なポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルは、ポリソルベート20（Tween 20（商標）の商標で販売されている）及びポリソルベート80（Tween 80（商標）の商標で販売されている）である。

【0221】

最も適切なポリエチレンーポリプロピレンコポリマーは、Pluronic（登録商標）F68又はPoloxamer 188（商標）の名称で販売されているものである。最も適切なポリオキシエチレンアルキルエーテルは、Brj（商標）の商標で販売されているものである。最も適切なアルキルフェノールーポリオキシエチレンエーテルは、Triton-Xの商品名で販売されている。

【0222】

本開示の医薬製剤中の界面活性剤の濃度は、0.01～0.1%（w/v）の間に含まれ得る。

【0223】

本明細書で使用される場合、「緩衝剤」という用語は、それを含む溶液がその酸／塩基コンジュゲート成分の作用によるpHの変化に耐えることをもたらす薬剤を指す。pHをこの範囲に制御する緩衝剤の例としては、アセタート、スクシナート、グルコナート、ヒスチジン、シトラート、グリシルグリシン及び他の有機酸緩衝剤が挙げられる。

【0224】

「防腐剤」は、細菌、真菌、又は別の感染因子による汚染及び／又は作用を低減するために本明細書の製剤に添加することができる化合物である。防腐剤の添加は、例えば、複数回使用（複数回用量）製剤の製造を促進し得る。可能性のある防腐剤の例には、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ヘキサメトニウムクロリド、ベンザルコニウムクロリド（アルキル基が長鎖であるアルキルベンジルジメチルアンモニウムクロリドの混合物）、及びベンゼトニウムクロリドが含まれる。他の種類の防腐剤としては、フェノール、ブチル及びベンジルアルコール等の芳香族アルコール、メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びw-クレゾールが挙げられる。

【0225】

本明細書で一般的に使用される「保護剤」は、タンパク質と組み合わせた場合、凍結乾燥及び／又はその後の冷蔵保存時のタンパク質の化学的及び／又は物理的不安定性を有意に減少させる物質である。例示的な保護剤としては、糖及びそれらの対応する糖アルコール、例えばスクロース、ラクトース、トレハロース、デキストラン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール及びマンニトール；アミノ酸、例えばアルギニン又はヒスチジン；リオトロピック塩、例えば硫酸マグネシウム；ポリオール、例えば、プロピレングリコール、グリセロール、ポリ（エチレングリコール）又はポリ（プロピレングリコール）；及びそれらの組合せが挙げられる。保護剤の更なる例としては、ゼラチ

ン、デキストリン、修飾デンプン及びカルボキシメチルセルロースが挙げられる。

【0226】

保護剤は、「凍結保護量」中の予備凍結乾燥製剤に添加され得る。これは、保護剤の凍結保護量の存在下でのタンパク質の凍結乾燥後、タンパク質がその物理的及び化学的安定性及び完全性を本質的に保持することを意味する。

【0227】

本明細書で一般的に使用される「抗酸化剤」は、酸化反応を制限し、タンパク質の安定性及び安全性を維持するために一般的に使用される薬学的に許容される賦形剤である。酸化防止剤の例は、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム、ヒスタミン、メチオニン、アスコルビン酸、グルタチオン、ビタミンE、ポリエチレンイミンである。

【0228】

本開示の医薬製剤中の抗酸化剤濃度は、5～25 mMの間に含まれ得る。

【0229】

「キレート剤」は、タンパク質の安定性を維持するために一般的に使用される薬学的に許容される賦形剤である。キレート剤の例には、エデト酸二ナトリウム、ジエチレントリアミン五酢酸、クエン酸、ヘキサホスファート、チオグリコール酸、亜鉛が含まれる。

【0230】

本明細書で一般的に使用される「増量剤」は、凍結乾燥混合物に質量を加え、凍結乾燥ケーキの物理的構造に寄与する（例えば、開孔構造を維持する本質的に均一な凍結乾燥ケーキの製造を容易にする）ために一般的に使用される薬学的に許容される賦形剤である。例示的な増量剤としては、マンニトール、グリシン、ラクトース、変性デンプン、ポリエチレングリコール）、及びソルビトールが挙げられる。

【0231】

医薬組成物の形態、投与経路、投与量及びレジメンは、治療される状態、疾患の重症度、患者の年齢、体重及び性別に自然に依存する。

【0232】

本開示の医薬組成物は、局所、経口、非経口、腹腔内、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下又は眼内投与等、好ましくは腹腔内又は静脈内のために製剤化することができる。

【0233】

好ましくは、医薬組成物は、注射可能な製剤に対して薬学的に許容されるビヒクルを含有する。これらは、特に等張性の滅菌生理食塩水（リン酸一ナトリウム若しくは二ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウム若しくはマグネシウム等、又はこのような塩の混合物）、又は場合に応じて滅菌水又は生理食塩水を添加すると注射可能な溶液の構成を可能にする乾燥組成物、特に凍結乾燥組成物であり得る。

【0234】

投与に使用される用量は、様々なパラメータの関数として、特に使用される投与様式、関連する病態、又は所望の治療期間の関数として適合させることができる。

【0235】

医薬組成物を調製するために、有効量のADCを薬学的に許容される担体又は水性媒体に溶解又は分散させることができる。

【0236】

注射使用に適した医薬形態には、滅菌水溶液又は分散液；ゴマ油、落花生油又は水性プロピレングリコールを含む製剤；及び滅菌注射用溶液又は分散液の即時調製のための滅菌粉末又は凍結乾燥物が含まれる。全ての場合において、形態は無菌でなければならず、容易な注射可能性が存在する程度に流動性でなければならない。それは、製造及び保管の条件下で安定していなければならず、細菌及び真菌等の微生物の汚染作用から保護されなければならない。

【0237】

遊離塩基又は薬理学的に許容される塩としての活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロース等の界面活性剤と適切に混合された水中で調製することができる。分散液は

10

20

30

40

50

、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びそれらの混合物中及び油中で調製することもできる。これらの調製物は、通常の保存条件及び使用条件下で、微生物の成長を防止するための防腐剤を含有する。

【0238】

本開示のADCは、中性形態又は塩形態の組成物に製剤化することができる。薬学的に許容される塩には、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基で形成される）が含まれ、無機酸、例えば塩酸若しくはリン酸、又は酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等の有機酸で形成される。遊離カルボキシル基で形成された塩は、無機塩基、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、又は水酸化第2鉄、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等の有機塩基から誘導することもできる。

10

【0239】

滅菌注射溶液は、必要量の活性化合物を、必要に応じて上に列挙した様々な他の成分と共に適切な溶媒に組み込み、続いて濾過滅菌することによって調製される。一般に、分散液は、様々な滅菌された活性成分を、基本的な分散媒体及び上に列挙したものからの必要な他の成分を含む滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分+任意の追加の所望の成分の粉末をその以前に滅菌濾過された溶液から得る真空乾燥及び凍結乾燥技術である。

【0240】

直接注射のためのより多くの又は高濃度の溶液の調製も企図され、溶媒としてのDMSOの使用は、極めて迅速な浸透をもたらし、高濃度の活性薬剤を小さな腫瘍領域に送達することが想定される。

20

【0241】

製剤化すると、溶液は、投与製剤と適合する様式で、治療上有効な量で投与される。製剤は、上記の注射液の種類等の様々な剤形で容易に投与されるが、薬物放出カプセル等も使用することができる。

【0242】

水溶液での非経口投与の場合、例えば、溶液は、必要に応じて適切に緩衝されるべきであり、液体希釈剤は、まず十分な生理食塩水又はグルコースで等張性にされるべきである。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下及び腹腔内投与に特に適している。これに関連して、使用することができる滅菌水性媒体は、本開示に照らして当業者に公知である。例えば、1つの投与量を1mlの等張性NaCl溶液に溶解し、1000mlの皮下注入液に添加するか、又は提案された注入部位に注射することができる（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」15th Edition, pages 1035-1038及び1570-1580を参照されたい）。治療される対象の状態に応じて、投与量のいくらかの変動が必然的に生じるであろう。投与の責任者は、いずれにせよ、個々の対象に対する適切な用量を決定する。

30

【0243】

本開示のADCは、用量当たり約0.0001~1.0ミリグラム、又は約0.001~0.1ミリグラム、又は約0.1~1.0ミリグラム、又は更には1.0~約10ミリグラムを含むように治療用混合物中に製剤化され得る。複数回投与することもできる。

40

【0244】

本開示のADCを含む医薬製剤は、「すぐに使用可能な」注射製剤又は凍結乾燥製剤であり得る。

【0245】

特定の実施形態では、本開示のADCを含む医薬製剤は、プレフィルドシリンジで供給されてもよい。

【0246】

本開示のADCの使用及び方法

本開示のADCは、治療的有用性を有する。例えば、これらの分子は、様々な障害を治

50

療又は予防するために、対象に、例えばインビボで投与することができる。

【0247】

本開示のADCを医薬品として、特にそれを必要とする対象の癌、特にFR α を発現する腫瘍細胞を有する癌、より具体的には固形腫瘍を有する癌、より具体的には卵巣癌、乳癌、肺癌又は中皮腫からなる群から選択される癌の治療に使用するための医薬品として使用することが本明細書で企図される。

【0248】

「癌」という用語は、典型的には調節されていない細胞増殖を特徴とする哺乳動物における生理学的状態を指す又は記載する。癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫（髄芽腫及び網膜芽細胞腫を含む）、肉腫（脂肪肉腫及び滑膜細胞肉腫を含む）、神経内分泌腫瘍（カルチノイド腫瘍、ガストリノーマ及び膵島細胞癌を含む）、中皮腫、シュワン細胞腫（聴神経腫瘍を含む）、髄膜腫、腺癌、黒色腫、並びに白血病又はリンパ性悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。そのような癌のより具体的な例には、扁平上皮癌（例えば、上皮扁平上皮癌）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺癌及び肺癌の扁平上皮癌を含む肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌を含む胃癌（gastric cancer又はstomach cancer）、膵臓癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌又は腎癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、精巣癌、食道癌、胆道の腫瘍、並びに頭頸部癌が含まれる。

【0249】

本開示のADCは、卵巣癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌からなる群から選択される癌の治療に特に有用である。

【0250】

したがって、本開示は、癌、特に上に列挙した癌の1つ、より好ましくは卵巣癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌からなる群から選択される癌を治療する方法であって、治療上有効量の本明細書に開示される式（I）のADCを投与することを含む方法に関する。

【0251】

上で開示されるように使用するためのADCは、唯一の有効成分として、例えば上記の疾患の治療若しくは予防のための他の薬物、例えば抗ウイルス薬、抗炎症薬若しくは細胞傷害薬、抗増殖薬、化学療法薬若しくは抗腫瘍薬と例えばアジュバントとして伴って、又は組み合わせて投与され得る。

【0252】

例えば、上に開示されるように使用するためのADCは、AZT、IFN- α 、抗CD20 mAb、抗CD25 mAb、抗PD1 mAb、抗PDL-1 mAb、抗CTLA4 mAb、化学療法剤と組み合わせて使用され得る。

【0253】

そのような抗PD1又は抗PDL1抗体の例には、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、セミブリマブ、又はアテゾリズマブが含まれるが、これらに限定されない。

【0254】

適切な抗腫瘍剤としては、限定されないが、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、メクロレタミン、クロラムブシル、メルファラン、ニトロソ尿素、テモゾロミド）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、バルルビシン）、タキサン（パクリタキセル、ドセタキセル等）、エポチロン、トポイソメラーゼIの阻害剤（イリノテカン又はトポテカン等）、トポイソメラーゼIIの阻害剤（エトポシド、テニポシド又はタフルボシド等）、ヌクレオチド類似体及び前駆体類似体（アザシチジン、アザチオプリン、カペシタビン、シタラビン、フルロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、メルカプトプリン、メトトレキサート又はチオグアニン等）、ペプチド抗生物質（ブレオマイシン、コリスチン、グラミシ

10

20

30

40

50

ジン等)、白金ベースの抗新生物剤(カルボプラチン、シスプラチン及びオキサリプラチン等)、レチノイド(トレチノイン、アトリレチノイン、ベキサロテン等)、ビンカルカロイド及び誘導体(ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン)、抗VEGF剤(ベバシズマブ、ラニビズマブ、スニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ、標的療法、例えばキナーゼ阻害剤(例えば、イブルチニブ、イデラリシブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ベムラフェニブ、ビスモデギブ)、プロテアソーム阻害剤(例えば、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ)、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤(ボリノスタット又はロミデプシン等)が挙げられ得る。

【0255】

前述のように、本開示は、なお更なる態様において、治療有効量の本開示のADCと、少なくとも1つの第2の原薬との同時投与、例えば同時投与又は逐次投与を含む方法を提供し、当該第2の原薬は、抗ウイルス剤、抗炎症剤又は細胞傷害剤、抗増殖剤、化学療法剤又は他の抗腫瘍剤であり、例えば上に示される。

10

【0256】

本明細書に開示される組成物(例えば、ADCを含む)及び使用説明書からなるキットも本開示の範囲内である。キットは、少なくとも1つの追加の試薬、又は1つ以上の追加の抗体若しくはタンパク質(例えば、第1の抗体とは異なる標的抗原上のエピトープに結合する相補的活性を有する抗体)を更に含むことができる。キットは、典型的には、キットの内容物の使用目的を示すラベルを含む。ラベルという用語は、キット上若しくはキットと共に供給される、又はキットに付随する任意の書面又は記録された材料を含む。キットは、患者が、上で定義されるような、特にFR α 発現腫瘍を有するADC処置に応答するであろう群に属するかどうかを診断するためのツールを更に含み得る。

20

【0257】

本開示のADCを作製するプロセス

本開示の抗体は、当技術分野で公知の任意の技術によって、リンカーLによって少なくとも1つの薬物にコンジュゲートさせることができる。そのような技術は、例えば、Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 3rd Edition, 2013, Academic Press (eBook ISBN: 9780123822406)に記載されている。抗体に治療剤をコンジュゲートさせるための方法に関する更なる情報については、Lyon et al., 「Chapter six-Conjugation of Anticancer Drugs Through Endogenous Monoclonal Antibody Cysteine Residues」, 2012, Methods in Enzymology, 502, 123-138 (doi:10.1016/B978-0-12-416039-2.00006-9); Chapter 2-7 of 「Antibody-Drug Conjugates: Fundamentals, Drug Development, and Clinical Outcomes to Target Cancer」, 3 November 2016, eBook ISBN: 9781119060727, doi:10.1002/9781119060727 and Panowksi S et al. 2014 Jan 1; 6(1): 34-45を参照されたい。

30

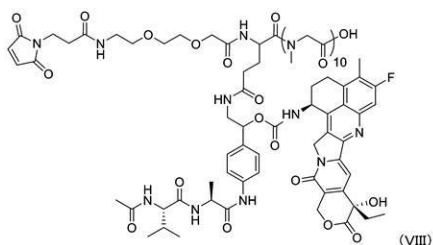
【0258】

- 一実施形態では、式(I)のADCを得るためのプロセスは、以下の工程を含む：
 - 一前のセクションで定義された抗体Abをコードする核酸の発現に適した条件下で宿主細胞を培養する工程、
 - 一抗体を単離する工程、
 - 一式(VIII)のリンカーLに結合したエキサテカンの合成工程、

【0259】

40

【化 18】



－当該抗体を式（V I I I）の化合物にコンジュゲートさせ、それによって式（I）のADCを得る工程。

【0260】

抗体は、上記で説明したように得ることができる。抗体は、潜在的なコンジュゲーション部位として使用することができる4つのアクセス可能な鎖間ジスルフィド結合を含む。4つの鎖間ジスルフィド結合は、例えば、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）又はジチオスレイトール（DTT）によって還元することができ、その結果、共役を利用可能な8個のチオール基が生じる。

【0261】

式（V I I I）の部分－L－Dは、有機合成の分野で公知の手順（化学反応、抽出、蒸発、沈殿、クロマトグラフィ、濾過、研和、結晶化等）及び分析化学の分野の当業者に公知の分析手順に従って調製することができる。このような反応及び技術の詳細は、Richard Larock, *Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations*, 2nd Ed (2010), 及びthe multi-volume series edited (Michael B. Smithらによる) *Compendium of Organic Synthetic Methods* (1974 et seq.) を含む多くの論文に見出すことができる。出発物質及び試薬は、商業的供給源から得てもよく、又は文献の方法を用いて調製してもよい。

【0262】

エキサテカン化合物は、公知の手順に従って合成することができる（米国特許第5834476号；国際公開第2019044946号又はSugimori et al., 1998, *J. Med. Chem.*, 41 (13), 2308–2318 doi:10.1021/jm970765qを参照）。エキサテカン、評判の高い供給元（例えば、MedChemExpressカタログ番号HY-13631A又はCarbosynthカタログ番号FE72401）から購入することもできる。

【0263】

式（I）の最終ADCは、公知の手順に従って、抗体の天然又は操作されたシステインチオール残基への－L－D成分のコンジュゲーション後に得られる。例えば、Lyon et al., 「Chapter six-Conjugation of Anticancer Drugs Through Endogenous Monoclonal Antibody Cysteine Residues」, 2012, *Methods in Enzymology*, 502, 123–138 (doi:10.1016/B978-0-12-416039-2.00006-9) 又はSJ Walsh et al., *Site-selective modification strategies in antibody-drug conjugates*, *Chem. Soc. Rev.*, 2021, 50, 1305–1353, doi:10.1039/D0CS00310Gを参照されたい。典型的には、抗体成分は、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）又はジチオスレイトール（DTT）等の還元剤で還元され、－L－D成分を添加し、抗体のシステインチオール残基と共有結合的に反応させ、最終ADC化合物を精製し、緩衝液交換する。

【0264】

完全に説明された本発明は、以下の実施形態及び実施例によって更に説明されるが、これらは例示にすぎず、更なる限定を意図するものではない。

【0265】

特定の実施形態

1. 式 (I) の抗体-薬物コンジュゲートであって、

$Ab-[L-D]_p$ (I)、

式中、

-Abは、配列番号12に特異的に結合する抗葉酸受容体アルファ (FR α) 抗体であり、

-Lは、好ましくはチオール残基を介して当該抗体に結合した切断可能なリンカー部分であり、

-Dは、Lに結合した細胞傷害性薬物部分であり、

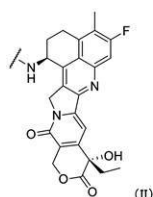
-pは1~8、好ましくは6~8、より好ましくはpは8である、

式 (I) の抗体-薬物コンジュゲート。

2. DがトポイソメラーゼIの阻害剤であり、好ましくはカンプトテシン類似体からなる群から選択され、より好ましくはDは、下記式 (II) のエキサテカンの薬物部分である、実施形態1に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【0266】

【化19】



3. Lが式-A-W-の切断可能なリンカー部分であり、式中、AはAbに連結された任意のストレッチャ単位であり、WはDに連結された切断可能な部分である、実施形態1~2のいずれか1つに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

4. Lがリソソームプロテアーゼ感受性リンカーであり、Wが、例えばバリン-シトルリン (Val-Cit)、アラニン-アラニン-アスパラギン (Ala-Ala-Asn)、バリン-アラニン (Val-Ala) 及びフェニルアラニン-リジン (Phe-Lys) からなる群から選択される切断可能なペプチド部分を含む、実施形態3に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

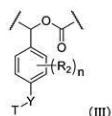
5. Lがプロテアーゼ感受性切断可能リンカーであり、Wが好ましくは β -グルクロニド又は β -ガラクトシド部分から選択される糖切断可能単位を含む、実施形態3に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

6. Lがグルタチオン感受性リンカーであり、Wがジスルフィド部分を含む、実施形態3に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

7. Wが下記式 (III) であって、

【0267】

【化20】



式中、

各R₂は、電子求引基及びC₁~C₄アルキルからなる群から独立して選択され、

nは、0、1又は2であり、

Tは、糖切断可能単位又はポリペプチド切断可能単位であり、

Tが糖切断可能単位である場合、YはOであり、又はTがポリペプチド切断可能単位で

ある場合、Yは、 NR_3 であり、

R_3 は、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{24}$ アルキル、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ アルケニル；場合により置換されたポリエーテル、6～10個の環原子を有するアリール、 $\text{C}_3 \sim \text{C}_8$ シクロアルキル、3～10個の環原子を有するヘテロシクロアルキル、5～10個の環原子を有するヘテロアリール、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択され、

当該アルキル及びアルケニルは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})-\text{NR}'$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(\text{O})\text{NR}'$ 及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

R' 及び R' は、 H 及び C_6 アルキルから独立して選択される、式(III)のもの

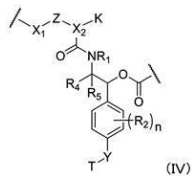
10

並びにその薬学的に許容される塩である、実施形態3に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

8. Lが式(IV)のリンカー-A-W-に対応し、

【0268】

【化21】



20

式中、

X_1 は、コネクタ単位であり、

Zは、任意のスペーサであり、

X_2 は、コネクタ単位であり、

Kは、好ましくはポリサルコシン及びポリエチレングリコールから選択される、任意選択の疎水性マスキング実体であり、

R_1 は、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{24}$ アルキル、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ アルケニル；場合により置換されたポリエーテル、6～10個の環原子を有するアリール、 $\text{C}_3 \sim \text{C}_8$ シクロアルキル、3～10個の環原子を有するヘテロシクロアルキル、5～10個の環原子を有するヘテロアリール、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択され、

30

当該アルキル及びアルケニルは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})-\text{NR}'$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(\text{O})\text{NR}'$ 及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

R_4 は、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル及び $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ アルケニルからなる群から選択され、当該アルキル及びアルケニルは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 及び $-\text{NR}'$ から選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、かつ

R_5 は、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル及び $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ アルケニルからなる群から選択され、当該アルキル及びアルケニルは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 及び $-\text{NR}'$ から選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されている、

40

実施形態7に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

9. X_1 及び X_2 は、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のN-置換アミノ酸、場合により置換されたポリエーテル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ アルキレン、6～10個の環原子を有するアリレン、 $\text{C}_3 \sim \text{C}_8$ シクロアルキレン、5～10個の環原子を有するヘテロシクロアルキレン、5～10個の環原子を有するヘテロアリレン、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{10}$ アルケニレン、及びそれらの任意の組合せからなる群から独立して選択され、

当該アルキレン及びアルケニレンは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})-\text{NR}'$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(\text{O})\text{NR}'$ 及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

50

O) $-O-$ 、 $-O-C(O)NR''$ 、及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

当該アルキレン、アリーレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、ヘテロアリーレン、及びアルケニレンは、ハロゲン、オキソ、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_6$ シクロアルキル、5～10個の環原子を有するヘテロシクリル、6～10個の環原子を有するアリール、5～10個の環原子を有するヘテロアリール、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ、 $-(CO)-R'$ 、 $-O-(CO)-R'$ 、 $-(CO)-O-R'$ 、 $-(CO)-NR''R'''$ 、 $-NR''-(CO)-R'$ 、及び $-NR''R'''$ から選択される1つ以上の置換基で場合により置換され、
 R' 、 R'' 及び R''' は、H及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立して選択される、

実施形態8に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

10. Zが、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のN-置換アミノ酸、場合により置換されたポリエーテル、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキレン、6～10個の環原子を有するアリーレン、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキレン、5～10個の環原子を有するヘテロシクロアルキレン、5～10個の環原子を有するヘテロアリーレン、 $C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン、及びそれらの任意の組合せからなる群から独立して選択され、

当該アルキレン及びアルケニレンは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NR''$ 、 $-C(O)NR''$ 、 $-NR''-C(O)-$ 、 $-NR''-C(O)-NR''R'''$ 、 $-NR''-(CO)-O-$ 、 $-O-C(O)NR''$ 、及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

当該アルキレン、アリーレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、ヘテロアリーレン、及びアルケニレンは、ハロゲン、オキソ、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_6$ シクロアルキル、5～10個の環原子を有するヘテロシクリル、6～10個の環原子を有するアリール、5～10個の環原子を有するヘテロアリール、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ、 $-(CO)-R'$ 、 $-O-(CO)-R'$ 、 $-(CO)-O-R'$ 、 $-(CO)-NR''R'''$ 、 $-NR''-(CO)-R'$ 、及び $-NR''R'''$ から選択される1つ以上の置換基で場合により置換され、

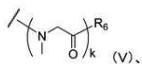
R' 、 R'' 及び R''' は、H及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立して選択される、

実施形態8～9のいずれか1つに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

11. Kが、好ましくは以下の式(V)のポリサルコシンであり、

【0269】

【化22】



式中、kは2～50、好ましくは4～30の整数であり、

R_6 はOH又は NH_2 に対応する、

実施形態8～10のいずれか1つに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

12. Tがグルクロニド又はガラクトシドである糖切断可能単位である、実施形態7～11のいずれか1つに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

13. Tが、好ましくはVal-Cit、Val-Ala及びPhe-Lysから選択されるジペプチドである、実施形態7～11のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

14. Lが当該抗体の1つ以上のチオール残基に共有結合しており、

好ましくは、当該Lが式(VI)のリンカーに対応する、

実施形態1～3のいずれか1つに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【0270】

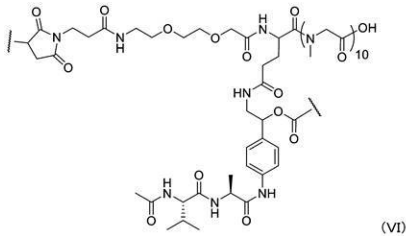
10

20

30

40

【化 2 3】

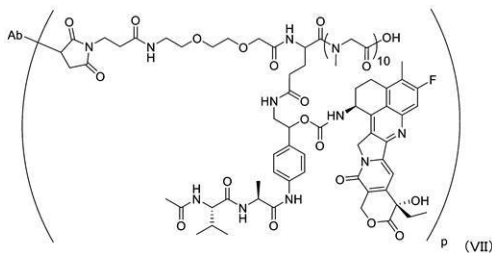


15. 当該抗体が、全長抗体又は抗原結合部分を含有する抗体断片を含む、実施形態 1～14 のいずれか 1 つに記載の抗体－薬物コンジュゲート。

16. 以下の式 (VII) に対応し、

【0 2 7 1】

【化 2 4】



式中、Ab は、典型的には IgG1 Fc 定常領域のロイシン 234 及びロイシン 235 におけるアラニン置換を含む、抗 FR α 抗体、例えば、ファルレツズマブ、又はそのサイレント IgG1 バリエーションであり、p は 4～8、好ましくは 8 である、

実施形態 1～15 のいずれか 1 つに記載の抗体－薬物コンジュゲート。

17.

－Ab は、ヒト IgG1 アイソタイプ定常領域、又は変異体若しくは化学的に修飾された定常領域を含む抗体であり、当該変異体若しくは化学的に修飾された定常領域は、野生型ヒト IgG1 アイソタイプ定常領域を有する対応する抗体と比較した場合、当該抗体に ADCC 活性を付与しないか、又は低下した ADCC 活性を付与する、又は

－Ab は、ヒト IgG4 アイソタイプ定常領域、又は変異体若しくは化学的に修飾された定常領域を含む抗体であり、当該変異体若しくは化学的に修飾された定常領域は、野生型 IgG4 アイソタイプ定常領域を有する対応する抗体と比較した場合、当該抗体に ADCC 活性を付与しないか、又は低下した ADCC 活性を付与する、

実施形態 1～16 のいずれか 1 つに記載の抗体－薬物コンジュゲート。

18. Ab が、以下

(i) 配列番号 1 の HCDR1、配列番号 2 の HCDR2、配列番号 3 の HCDR3 を含む可変重鎖ポリペプチドと、配列番号 4 の LCDR1、配列番号 5 の LCDR2 及び配列番号 6 の LCDR3 を含む可変軽鎖ポリペプチド；又は

(ii) 配列番号 7 の VH を含む可変重鎖ポリペプチド及び配列番号 8 の VL を含む可変軽鎖ポリペプチド

のいずれかを含む抗 FR α 抗体である、実施形態 1～17 のいずれか 1 つに記載の抗体－薬物コンジュゲート。

19. Ab が、以下

(i) 配列番号 9 の重鎖及び配列番号 10 の軽鎖；又は

(ii) 配列番号 11 の重鎖及び配列番号 10 の軽鎖

のいずれかを含むか、又は本質的にそれからなる、実施形態 1～18 のいずれか 1 つに記載の抗体－薬物コンジュゲート。

20.

(i) Ab は、

・配列番号 1 の H C D R 1、配列番号 2 の H C D R 2、配列番号 3 の H C D R 3 を含む可変重鎖ポリペプチド及び

・配列番号 4 の L C D R 1、配列番号 5 の L C D R 2 及び配列番号 6 の L C D R 3 を含む可変軽鎖ポリペプチド；

を含む、抗葉酸受容体アルファ抗体又はその抗原結合断片であり、

(i i) L は、式 - A - W - の切断可能なリンカーであり、式中、A は、A b に連結された任意のストレッチャ単位であり、W は、D に連結された切断可能な部分であり、

(i i i) D は、トポイソメラーゼ I の阻害剤、例えば、エキサテカンであり、及び

(i v) p は 1 ~ 8、好ましくは 8 である、

実施形態 1 ~ 1 9 のいずれか 1 つに記載の抗体 - 薬物コンジュゲート。

2 1 . A b が以下

(i) 配列番号 9 の重鎖及び配列番号 1 0 の軽鎖を含む抗体若しくは抗原結合断片、又は

(i i) 抗体又は抗原結合断片は、配列番号 1 1 の重鎖及び配列番号 1 0 の軽鎖を含む、

のいずれかである、実施形態 2 0 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート。

2 2 . 医薬品として使用するための、好ましくは腫瘍の治療を必要とする対象における腫瘍、例えば固形腫瘍、より具体的には卵巣癌、乳癌、肺癌又は中皮腫からなる群から選択される腫瘍の治療に使用するための、実施形態 1 ~ 2 1 のいずれか 1 つに記載の抗体 - 薬物コンジュゲート。

2 3 . 卵巣癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌からなる群から選択される、癌の治療を必要とする対象における癌の治療に使用するための、実施形態 1 ~ 2 1 のいずれか 1 つに記載の抗体 - 薬物コンジュゲート。

2 4 . 実施形態 1 ~ 2 1 のいずれか 1 つに記載の抗体 - 薬物コンジュゲートを、場合により他の活性成分を含む、1 つ以上の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又は担体と組み合わせて含む、医薬組成物。

2 5 . 請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の抗体 - 薬物コンジュゲートを得るためのプロセスであって、

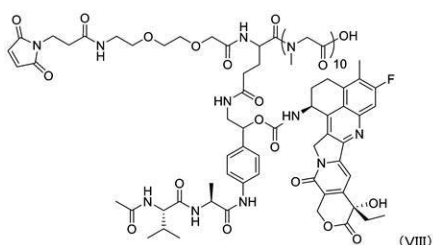
－実施形態 1 ~ 2 1 のいずれか 1 つで定義される抗 F R α 抗体の産生に適した条件下で宿主細胞を培養することと、

－当該抗 F R α 抗体を単離することと、

－式 (V I I I) のリンカー L に結合したエキサテカンの合成と、

【 0 2 7 2 】

【化 2 5 】



－当該抗 F R α 抗体を式 (V I I I) の化合物にコンジュゲートすることと、それによって、実施形態 1 ~ 2 1 のいずれか 1 つで定義された A D C を得ることと、を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の抗体 - 薬物コンジュゲートを得るためのプロセス。

【実施例】

【 0 2 7 3 】

機能アッセイ

E L I S A によるヒト F R α 結合親和性

サンドイッチ E L I S A アッセイを、9 6 ウェル高結合 E L I S A プレート (C o r n

10

20

30

40

50

ing Inc., New York, NY, USA、カタログ番号3590)を使用して行う。2 μ g/mLのPBS (pH7.4)中の100 μ L/ウェルの組換えヒトFR α タンパク質 (Sino Biological、カタログ番号11241-H08H)を用いてプレートをコーティングし、4℃で一晩インキュベートする。PBS-T (PBS + 0.05% Tween-20)で2回洗浄した後、プレートを200 μ L/ウェルのインキュベーション緩衝液 (PBS-T + 0.1% BSA)で室温にて1時間ブロッキングする。プレートをPBS-Tで4回洗浄し、100 μ Lの3倍希釈系列の試験化合物 (抗体又は抗体-薬物コンジュゲート)を添加する。次いで、プレートを暗所で室温にて2時間インキュベートする。PBS-Tによる5回の洗浄の後、プレートを100 μ L/ウェルのヤギ抗ヒトIgG (H+L) HRPコンジュゲート化抗体 (Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-035-088)と室温で1時間インキュベートし、予めインキュベーション緩衝液で1:250000に希釈する。PBS-Tで5回洗浄した後、TMB基質溶液 (Thermo-Fisher、カタログ番号N301)を添加する。0.18MのH₂SO₄でペルオキシダーゼ活性を停止し、Thermo Scientific MultiSkan EXマイクロプレートリーダーを使用して450nm (参照波長650nm)で吸光度を読み取る。GraphPad Prism 9ソフトウェアを使用して、シグモイド固定を行った。

【0274】

SPR Biacore親和性

表面プラズモン共鳴 (SPR) 実験をBiacore T200装置で25℃にて行う。試験される抗体又はADCを、Human Antibody Capture kit (Cytiva、カタログ番号BR100839)で予め官能化したCM5シリーズセンサーチップ上に低密度 (300~500RU)で捕捉する。同様に処理されるガリガンドを省いた官能基化表面/フローセルを参照として使用する。速度論的速度及び親和性を測定するために、組換えヒトFR α (Sino Biological、カタログ番号11241-H08H) 分析物試料を、単一サイクル速度論戦略を使用して、ランニング緩衝液 (HBS-EP+, Cytiva、カタログ番号BR100669)の一定の70 μ L/mL流量で、300秒の接触パルスで、連続で5つの濃度 (0.5、1、2、4、8 nM)で二連で注入する。解離相は、ランニング緩衝液を900秒間注入することによって測定する。二連の間で、表面/フローセルを3MのMgCl₂で再生して分析物トリガンドの両方を除去し、同一の条件を使用して新鮮なリガンド捕捉を行う。データ分析は、参照面及び分析物のゼロ濃度シグナルの減算後にBiacore Evaluationソフトウェアを使用して行う。データを処理し、1:1結合モデルに当てはめて、結合速度定数k_a (オン速度) 及びk_d (オフ速度)、並びにK_D (「親和性」とも呼ばれる平衡解離定数)を決定する。反復実験の平均値及び標準偏差を報告する。

【0275】

フローサイトメトリによる細胞結合親和性

癌性細胞株上に発現された細胞外ヒトFR α への抗体又はADC結合をフローサイトメトリによって評価する。試験される抗体又はADCを、LYNX Rapid APC Antibody Conjugation Kitを製造者のプロトコルに従って使用してAPCフルオロフォアにコンジュゲートする (Bio-Rad、カタログ番号LNK032APC)。500000個の細胞 (フローサイトメトリプラスチックチューブ中の100 μ LのPBSに懸濁したもの)に、試験されるAPC標識抗体又はADCの10 μ g/mL溶液5 μ Lを添加する。細胞を暗所で20分間インキュベートし、遠心分離によってPBSで3回洗浄し、分析のために200 μ LのPBSに再懸濁する。フローサイトメトリを、BD FACSDivaソフトウェア (BD Biosciences)によって制御されるBD Fortessaフローサイトメータを使用して行い、データを、FlowJoソフトウェア (BD Bioscience)を使用して分析する。

【0276】

ヒト血漿における安定性アッセイ

A D C 試料 (P B S 中 $> 6 \text{ mg/mL}$ 溶液) を、スクリーキャップ付き遠心管で純粋な滅菌ヒト血漿 (GeneTex、カタログ番号 G T X 7 3 2 6 5) で希釈して、 $200 \mu\text{g/mL}$ の最終 A D C 濃度 ($5\% \text{ v/v}$ 未満の残留 P B S 体積) を得る。試料を 37°C でインキュベートし、一定分量を 5 分、6 時間、1 日、2 日、3 日、及び 7 日の時点で採取する (一定分量は分析まで -80°C で凍結したままにした)。A D C を、ビオチン化ヒト葉酸受容体アルファ組換えタンパク質 (Sino Biologicals、カタログ番号 1 1 2 4 1 - H 0 8 H) で予めコーティングされた Dynabeads (商標) M - 2 8 0 ストレプトアビジン (Thermo Scientific) 磁気ビーズを使用する免疫捕捉によって血漿から単離する。簡潔には、 $600 \mu\text{L}$ の市販のビーズ溶液を H B S - E P 緩衝液 (Cytiva、カタログ番号 B R 1 0 0 1 8 8) で 2 回洗浄し、 1.2 mL の H B S - E P 緩衝液に再懸濁する。ビオチン化組換え F R α 溶液 $65 \mu\text{L}$ (タンパク質量 $48 \mu\text{g}$) を添加し、溶液を室温で 2 時間攪拌した。次いでビーズを H B S - E P 緩衝液で 3 回洗浄し、 1.2 mL の H B S - E P 緩衝液に再懸濁する。1 回の免疫捕捉のために、 $100 \mu\text{L}$ の前のビーズ溶液を、微量遠心管中の $100 \mu\text{L}$ の H B S - E P 上に添加する。血漿中の A D C 溶液 $10 \mu\text{L}$ (理論的 A D C 量 $2 \mu\text{g}$) を添加し、溶液を室温で 2 時間攪拌する。インキュベーション後、ビーズ-A D C 複合体を H B S - E P 緩衝液で 2 回洗浄し、 $200 \mu\text{L}$ の H B S - E P 緩衝液で再懸濁し、穏やかに攪拌しながら 37°C で一晚 $2 \mu\text{L}/1000 \text{ U}$ の P N G a s e F (New England Biolabs、カタログ番号 P 0 7 0 5 L) を添加することによって脱グリコシル化する。次いで、ビーズを H B S - E P 緩衝液で 2 回、蒸留水で 2 回及び水中 10% アセトニトリル (v/v) で 1 回洗浄する。ビーズを、 $0.1\% (\text{v/v})$ のギ酸を含有する $50 \mu\text{L}$ の 30% アセトニトリル水溶液 (v/v) と共に室温で穏やかに攪拌しながら 30 分間インキュベートする。次いで、脱グリコシル化 A D C を含有する溶出試料を、Bruker Impact II (商標) Q - T o F 質量分析計を備えた Thermo UltiMate 3000 U H P L C システムを使用する変性逆相クロマトグラフィー質量分析によって分析する。移動相 A は水 + 0.1% ギ酸であり、移動相 B はアセトニトリル + 0.1% ギ酸である。カラムは Agilent PEEK PLRP-S $1000 \text{ \AA}$ $2.1 \times 100 \text{ mm}$ $5 \mu\text{m}$ (80°C) である。直線勾配は 25 分で $20\% \text{ B} \sim 50\% \text{ B}$ である。流量は 0.4 mL/分 である。UV 検出を 280 nm でモニターする。Q - T o F 質量分析計は、 m/z 範囲 $500 \sim 5000$ (E S I $^+$) で使用される。Bruker Compass (登録商標) ソフトウェアに含まれる MaxEnt アルゴリズムを使用してデータをデコンボリューションする。安定性データ分析のために、選択された軽鎖 (L C) 及び重鎖 (H C) 溶出時間窓内の生スペクトルのデコンボリューションが実施される。薬物-リンカーの喪失又は修飾は、出発 A D C 材料からの対応する質量シフトに従って同定される。異なる D A R を有する A D C の相対比は、特定の A D C 亜種の強度を総 A D C 種からの強度で割ることによって計算される。最終 D A R 値は、Xu et al., Anal. Biochem., 2011, 412 (1), 56-66 に記載されるように計算される。

【0277】

F R α 陰性細胞株 (B T - 4 7 4 細胞株) におけるインビトロ有効性

A D C の非特異的 (オフターゲット) 細胞傷害性を評価するために、インビトロ細胞傷害性アッセイを B T - 4 7 4 (F R α 陰性) 癌細胞株において実現する。細胞を、細胞株に応じて適切な密度 ($100 \mu\text{L}$ の適切な培養培地中 $1000 \sim 10000$ 細胞/ウェル) で 96 ウェルプレートに播種し、 37°C で 24 時間インキュベートする。培養培地に予め溶解した試験化合物の段階希釈物 ($50 \mu\text{L}$) を添加し、インキュベーションを 37°C で 144 時間行う。MTT (5 mg/mL , $20 \mu\text{L}$, Sigma-Aldrich) をウェルに添加し、インキュベーションを 37°C で 1~2 時間継続した。次いで、培養培地を注意深く除去し、ウェル内容物を酸性化イソプロパノールで均一に溶解する。吸光度値は、MultiskanTM Sky microplate reader (Thermo Scientific) で 570 nm の波長 (参照波長 690 nm) を用いて測定する。未処置対照細胞と比較した I C 50 濃度値を、阻害用量反応曲線フィッティング (G

10

20

30

40

50

raphPad Prism 9) を用いて決定した。

【0278】

癌異種移植片モデルにおけるインビボ有効性

4～5週齢の雌CB-17重症複合免疫不全(SCID)マウスを得、研究開始前に7日間隔離する。PBS(OV-90、SW-620、KB、BT-474細胞株)又はPBS中の50% BD Matrigel(Corning(登録商標))(PA-1、IGROV-1、OVCAR-3、NCI-H2110細胞株)に再懸濁した細胞(マウス当たり5～10×10⁶細胞)をマウスの皮下に接種する。平均腫瘍体積が約120～150mm³に達したら、マウスを無作為化し(典型的には1群当たり7匹のマウス)、PBS(陰性対照)の単回(特に明記しない限り)静脈内注射によって処置するか、又は抗体-薬物コンジュゲートを調べる。腫瘍体積を、キャリパーデバイス(長さ×幅)を使用して3～5日毎に測定し、以下の式 $V = 4/3 \times \pi \times R^3$ (式中、Rは半径を表す)を使用して計算する。腫瘍体積が1500mm³を超えた場合、又は腫瘍が潰瘍化した場合、マウスを 殺する。

【0279】

逆相液体クロマトグラフィー質量分析(RPLC-MS)による薬物-抗体比(DAR)評価:

変性RPLC-QToF分析を使用して、コンジュゲートの薬物-抗体比(DAR)を評価する。簡潔には、ADCを、水/アセトニトリル+0.1%ギ酸(0.4mL/分)の移動相勾配を使用してAgilent PLRP-S 1000Å 2.1×150mm 8μm(80℃)で溶出し、500～3500m/z範囲(ESI⁺)を走査するBruker Impact II(商標)Q-ToF質量分析計を使用して検出する。Bruker Compass(登録商標)ソフトウェアに含まれるMaxEntアルゴリズムを使用してデータをデコンボリューションする。

【0280】

実施例1:エキサテカン系化学薬物-リンカーの合成

材料及び一般的な有機合成方法

全ての溶媒及び試薬は、特に明記しない限り、信頼できる商業的供給源(Sigma-Aldrich、Fluorochem、TCI Chemicals、Acros Organics、Alfa Aesar、Enamine、Thermo Fisher、Carbosynth、WuXi AppTec、Iris Biotech)から入手し、更なる精製を行わずに使用した。無水溶媒は、Sigma-Aldrichから購入した。Fmoc-アミノ酸、2-クロロトリチル、Wang及びRinkアミドポリスチレン1% DVB 100-200メッシュ樹脂(第1のFmoc-サルコシニアミノ酸が予め充填されている)は、Christof Senn Laboratories及びSigma-Aldrichから購入した。メシル酸エキサテカン(MedChemExpress)から購入した。

【0281】

樹脂上合成は、20μmのポリエチレンフリット(Sigma-Aldrich)を備えた空のSPEプラスチックチューブ中で行った。Titramax 101プラットフォームシェーカー(Heidolph)を攪拌に使用した。特に明記しない限り、全ての化学反応は、不活性アルゴン雰囲気下、室温で行った。

【0282】

液体核磁気共鳴スペクトルを、較正のために残留溶媒ピークを使用して、Bruker フーリエ300HD又はBruker AVANCE III HD400分光計で記録した。質量分析は、University Claude Bernard Lyon 1のUMR5246 CNRS InstituteのCentre Commun de Spectrometrie de Masse(CCSM)によって実施された。

【0283】

Macherey-Nagel Chromabond(登録商標)フラッシュカート

リッジ (40~63 μm) を使用して、Teledyne Isco CombiFlash (登録商標) Rf200 デバイスで順相フラッシュクロマトグラフィを行った。Teledyne Isco Combiflash (登録商標) Rf200 デバイス上で Biotage (登録商標) Sfar C18 Duo 100 Å 30 μm カートリッジ又は Interchim Puriflash RP-AQ (30 μm) カートリッジを使用して、又は Agilent 1100 分取二元 HPLC システムを使用して、逆相クロマトグラフィを行った。

【0284】

化学反応及び化合物の特徴付けをそれぞれ監視し、予めコーティングされた 40~63 μm シリカゲル (Macherey-Nagel)、HPLC-UV (Agilent 1100 システム) 又は UHPLC-UV/MS (Bruker Impact II (商標) Q-ToF 質量分析計を備えた Thermo Ultimate 3000 UHPLC システム又は Bruker MicroTOF-Q II 質量分析計を備えた Agilent 1260 HPLC システム) を使用する薄層クロマトグラフィによって分析した。

【0285】

HPLC 方法 1: DAD 検出を備えた Agilent 1100 HPLC システム。移動相 A は水 + 0.1% TFA であり、移動相 B はアセトニトリルであった。カラムは、Agilent Zorbax SB-Aq 4.6 × 150 mm 5 μm (室温) であった。直線勾配は、30 分で 0% B から 50% B になり、続いて 50% B で 5 分間保持した。流量は 1.0 mL/分 であった。

【0286】

HPLC 方法 2: DAD 検出を備えた Agilent 1100 HPLC システム。移動相 A は水 + 0.1% TFA であり、移動相 B はアセトニトリルであった。カラムは、Agilent Poroshell 120 EC-C18 3.0 × 50 mm 2.7 μm (室温) であった。直線勾配は、9 分で 5% B から 80% B になり、続いて 80% B で 1 分間保持した。流量は 0.8 mL/分 であった。

【0287】

HPLC 方法 3: DAD 検出を備えた Agilent 1100 HPLC システム。移動相 A は水 + 0.1% TFA であり、移動相 B はアセトニトリルであった。カラムは、Agilent Poroshell 120 EC-C18 3.0 × 50 mm 2.7 μm (室温) であった。直線勾配は、20 分で 5% B から 80% B になり、続いて 80% B で 2 分間保持した。流量は 0.8 mL/分 であった。

【0288】

HPLC 方法 4: Thermo Ultimate 3000 UHPLC システム + Bruker Impact II (商標) Q-ToF 質量分析計。移動相 A は水 + 0.1% ギ酸であり、移動相 B はアセトニトリル + 0.1% ギ酸であった。カラムは Agilent PLRP-S 1000 Å 2.1 × 150 mm 8 μm (80°C) であった。直線勾配は、25 分で 10% B から 50% B であった。流量は 0.4 mL/分 であった。UV 検出を 280 nm でモニターした。Q-ToF 質量分析計は、m/z 範囲 500~3500 (ESI⁺) で使用した。Bruker Compass (登録商標) ソフトウェアに含まれる MaxEnt アルゴリズムを使用してデータをデコンボリューションした。

【0289】

HPLC 方法 5 (分取方法): DAD 検出を備えた Teledyne Isco CombiFlash (登録商標) Rf200 バイナリ MPLC システム。移動相 A は水 + 0.1% TFA であり、移動相 B はアセトニトリルであった。再使用可能なカートリッジは、Biotage (登録商標) Sfar C18 Duo 100 Å 30 μm (30 g) であった。直線勾配は、35 分で 10% B から 50% B になり、続いて 50% B で 5 分間保持した。流量は 2.5 mL/分 であった。

【0290】

HPLC 方法 6 (分取方法): デュアルループ自動注入器、DAD 検出及びフラクショ

10

20

30

40

50

ンコレクタを備えた Agilent 1100 分取バイナリ HPLC システム。移動相 A は水 + 0.1% TFA であり、移動相 B はアセトニトリルであった。カラムは、Waters SunFire C18 OBD Prep Column、100 Å、5 µm、19 mm × 250 mm (室温) とした。直線勾配は、40 分で 10% B から 60% B になり、続いて 60% B で 5 分間保持した。流量は 25 mL / 分であった。

【0291】

1.1) 単分散ポリサルコシン中間体

1.1.1) 一般的方法

単分散ポリサルコシンの樹脂上合成は、Rink アミド及び 2-クロロトリチル樹脂のためのサブモノマー合成反復手順 (国際公開第 2019081455 号に記載) を使用して、又は Wang 樹脂のための市販の Fmoc-Sar-Sar-OH ジペプチドビルディングブロック (カタログ番号 2313534-20-0) を用いた古典的な Fmoc / SPPS 方法論に従って実現した。樹脂上二量体段階 ($n=2$) は、ジケトピペラジン形成のために回避された。全ての合成収率は、製造業者によって示される初期 Fmoc-サルコシン負荷に基づいて報告される。特に明記しない限り、全ての反応は室温で行った。第 1 の Fmoc-サルコシン残基 (Christof Senn Laboratories) を予め充填した Rink アミド、2-クロロトリチル又は Wang ポリスチレン 1% DVB 100-200 メッシュ樹脂を使用した (0.6 ~ 1 mmol / g の典型的な初期充填量)。Laboratories) を、使用した (0.6 ~ 1 mmol / g の典型的な初期負荷)。

【0292】

1.1.2) ポリサルコシンの伸長

Fmoc-サルコシンを予備充填した Rink アミド、2-クロロトリチル又は Wang 樹脂を、DMF 中 20% ピペリジン (樹脂 100 mg 当たり 1 mL) で室温で 15 分間 2 回処理した。次いで、樹脂を DMF (4 回) 及び DCM (4 回) で洗浄した。樹脂に、Fmoc-Sar-Sar-OH (3 当量)、HATU (2.9 当量) 及び DIPEA (6 当量) の DMF (樹脂 100 mg 当たり 1 mL) 中溶液を添加した。反応容器を 2 時間攪拌し、樹脂を DMF (4 回) 及び DCM (4 回) で洗浄した。樹脂を、DMF 中 20% ピペリジン (樹脂 100 mg 当たり 1 mL) で室温にて 15 分間 2 回処理した。次いで、樹脂を DMF (4 回) 及び DCM (4 回) で洗浄した。

【0293】

Rink アミド又は 2-クロロトリチル樹脂での合成のために、国際公開第 2019081455 号に記載されているように、古典的なサブモノマー合成手順を使用した。プロモアセチル化工程とアミン置換工程とを交互に行うことによって、所望の長さが得られるまで、 $n=3$ のポリサルコシンオリゴマーの伸長を行った。プロモアセチル化工程は、DMF 中 10 当量のプロモ酢酸及び 13 当量のジイソプロピルカルボジイミド (樹脂 100 mg 当たり 2 mL) を添加することによって行った。混合物を 30 分間攪拌し、排出し、DMF で洗浄した (4 回)。アミン置換工程のために、水溶液中 40% (wt) メチルアミン (樹脂 100 mg 当たり 1.5 mL) を添加し、容器を 30 分間振盪し、排水し、DMF (4 回) 及び DCM (4 回) で洗浄した。

【0294】

Wang 樹脂での合成のために、古典的な Fmoc / SPPS 手順を使用した。 $n=3$ のポリサルコシンオリゴマーの伸長は、Fmoc-Sar-Sar-OH ジペプチドビルディングブロック (カタログ番号 2313534-20-0) の反復カップリングによって行った。樹脂に、Fmoc-Sar-Sar-OH (3 当量)、HATU (2.9 当量) 及び DIPEA (6 当量) の DMF (樹脂 100 mg 当たり 1 mL) 中溶液を添加した。反応容器を 90 分間攪拌し、樹脂を DMF (4 回) 及び DCM (4 回) で広範囲に洗浄した。次いで、樹脂を室温で 15 分間、DMF 中 20% ピペリジン (樹脂 100 mg 当たり 1 mL) で 2 回処理した。樹脂を DMF (4 回) 及び DCM (4 回) で洗浄した。このカップリング / Fmoc 脱保護サイクルを、所望のポリサルコシン長が得られるまで繰り返した。必要に応じて、最後のカップリングは、偶数長の最終ポリサルコシンを得るた

めに、Fmoc-Sar-Sar-OHジペプチド単位の代わりに市販のFmoc-Sar-OHアミノ酸を用いて行われる。

【0295】

1. 1. 3) ポリサルコシンの最終的な樹脂上の側官能化、任意のキャッピング、樹脂の切断及び精製

所望の樹脂上ポリサルコシン単分散オリゴマー長に達すると、直交化学官能化が行われる。場合により、その後にFmoc-アミノ酸（例えば、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-β-Ala-OH、Fmoc-アミノ-3, 6-ジオキサオクタン酸、Fmoc-9-アミノ-4, 7-ジオキサノナン酸）による最終的なキャッピングが続く。最終化合物のN末端をキャッピングするFmoc保護基は、使用される直交官能化化学に応じて、樹脂切断の前又は後に除去することができる（後を参照）。

10

【0296】

1. 1. 3. 1) 2-アジドエタン-1-アミン側官能化ポリサルコシン

Rink又は2-クロロトリチル樹脂に、DMF中10当量のブロモ酢酸及び13当量のジイソプロピルカルボジイミド（樹脂100mg当たり2mL）を添加する。混合物を30分間攪拌し、排出し、DMFで洗浄した（4回）。2-アジドエタン-1-アミンのDMF中3モル溶液（樹脂100mg当たり1mL）を添加し、容器を45分間振盪し、排出し、DMF（4回）及びDCM（4回）で洗浄した。その後、1時間のFmoc-Gly-OHカップリング（5当量のFmoc-Gly-OH、4.9当量のHATU、10当量のDIPEAを含むDMF（樹脂100mg当たり1mL））及び20%ピペリジンを含むDMF（樹脂100mg当たり1mL）によるFmoc脱保護を室温で15分間2回行った。樹脂をDMF（4回）及びDCM（4回）で洗浄した。

20

【0297】

最終ポリサルコシン化合物を樹脂から切断した（Rink樹脂及びWang樹脂については100%TFAを2回30分、2-クロロトリチルについては20%TFAを2回15分）。樹脂を濾過し、揮発性物質を減圧下で除去して粗生成物を得、これをInterchim（登録商標）RP-AQ（30μm）カートリッジで精製した。移動相Aは水+0.1%TFAであり、移動相Bはアセトニトリルであった。

【0298】

1. 1. 3. 2) グルタミン酸側官能化ポリサルコシン

Rink、Wang又は2-クロロトリチル樹脂に、Fmoc-Glu(OALL)-OH（3当量）、HATU（2.9当量）及びDIPEA（6当量）を含むDMF（樹脂100mg当たり1mL）の溶液を添加した。反応容器を90分間攪拌し、樹脂をDMF（4回）及びDCM（4回）で広範囲に洗浄した。次いで、樹脂を室温で15分間、DMF中20%ピペリジン（樹脂100mg当たり1mL）で2回処理した。樹脂をDMF（4回）及びDCM（4回）で洗浄した。その後、DMF（樹脂100mg当たり1mL）中Fmoc-アミノ-3, 6-ジオキサオクタン酸（3当量）、HATU（2.9当量）、DIPEA（6当量）と1時間カップリングした。樹脂をDMF（4回）、DCM（4回）で洗浄した。0.25当量のPd(PPh₃)₄及び20当量のフェニルシラン（アルゴン気流下で穏やかに攪拌した）を含有するDCM溶液での2回の30分間の処理によって、アロック保護基を除去した。次いで、樹脂をDMF（5回）及びDCM（5回）で洗浄した。場合により、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）エステルを、50当量のDIC及び60当量のN-ヒドロキシスクシンイミド（樹脂100mg当たり1.5mL）を含有するDMF溶液での90分間の処理によって、最終ポリサルコシン化合物のカルボン酸側鎖に導入した。次いで、樹脂をDMF（4回）及びDCM（4回）で洗浄した。

30

40

【0299】

最終ポリサルコシン化合物を樹脂から切断した（Rink樹脂及びWang樹脂については100%TFAを2回30分、2-クロロトリチルについてはDCM中20%TFAを2回15分）。樹脂を濾過し、揮発性物質を減圧下で除去して粗生成物を得、これをInterchim（登録商標）RP-AQ（30μm）カートリッジで精製した。移動相

50

Aは水+0.1% TFAであり、移動相Bはアセトニトリルであった。

【 0 3 0 0 】

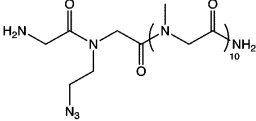
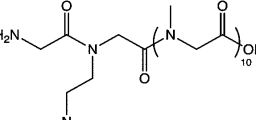
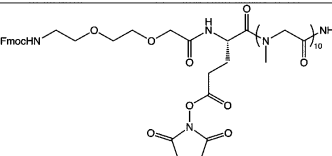
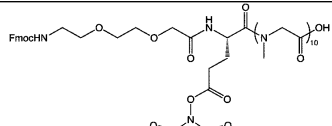
1. 1. 4) 最終ポリサルコシン中間体

得られた化合物を以下の表 6 に示す。

【 0 3 0 1 】

【表 6】

表 6

化合物名 化合物PSR1	構造	樹脂	収率	MS(ESI ⁺)	HPLC保持時間
NH ₂ -Gly-(N ₃)-PSAR10-CONH ₂		Rinkアミド	48%	Calc[M+H] ⁺ =911.5 Obs[M+H] ⁺ =911.5	12.5分
(透明油)					
化合物PSR2		2-クロロトリチル	14%	Calc[M+H] ⁺ =912.5 Obs[M+H] ⁺ =912.5	14.5分 (HPLC法1)
NH ₂ -Gly-(N ₃)-PSAR10-COOH (透明油)					
化合物PSR3		Rinkアミド	49%	Calc[M+2H] ²⁺ =661.3 Obs[M+2H] ²⁺ =661.3	5.9分 (HPLC法2)
NHFmoc-PEG2-(Glu-NHS)-PSAR10-CONH ₂ (白色固体)					
化合物PSR4		Wang	60%	Calc[M+2H] ²⁺ =661.8 Obs[M+2H] ²⁺ =661.8	5.7分 (HPLC法2)
NHFmoc-PEG2-(Glu-NHS)-PSAR10-COOH (白色固体)					

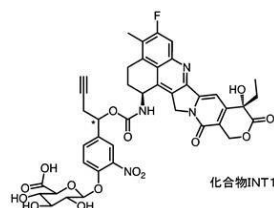
【 0 3 0 2 】

1. 2) 中間化合物の合成

1. 2. 1) 化合物INT1の合成

【 0 3 0 3 】

【化 2 6】



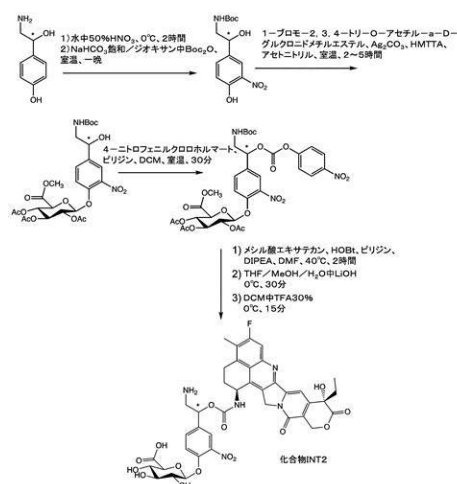
化合物INT1は、特許出願国際公開第2019081455号に記載されている手順に従って合成した。この化合物は、等モルのジアステレオ異性体混合物（アスタリスクによって示される立体中心）である。

【 0 3 0 4 】

1. 2. 2) 化合物INT2、INT2-S及びINT2-Rの合成

【 0 3 0 5 】

【化 27】



10

【0306】

1. 2. 2. 1) tert-ブチル (2-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル)エチル)カルバマートの合成

(±)-オクトパミン塩酸塩 ($1690\text{mg} / 11\text{mmol}$) を丸底フラスコ中で秤量し、 4mL の蒸留水に懸濁した。フラスコを 0°C で冷却し、予め冷却した 65% 硝酸溶液 4mL をゆっくり添加した。反応物を 0°C で 20 分間保持し、HPLC によって評価したところ、出発物質の完全なモノニトロ化が示された。フラスコの内容物を予め冷却した 250mL の三角フラスコに移し、 $8 \sim 9$ の pH 値に達するまで飽和 NaHCO_3 溶液 (約 50mL) で 0°C でゆっくり中和した。次いで、 30mL のジオキサンを添加した後、 Boc_2O ($7202\text{mg} / 13.2\text{mmol}$) を添加した。次いで、反応物を室温に到達させ、一晩攪拌した。次いで、反応物を EtOAc で希釈し、飽和クエン酸溶液で 3 回、飽和 NaCl 溶液で 1 回洗浄した。有機相を MgSO_4 上で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させて粗生成物を得、これをシリカゲルクロマトグラフィ (石油エーテル/ EtOAc 、勾配 $70:30$ から $20:80$) によって精製して、表題化合物 ($1320\text{mg} / 40\%$) を濃厚な黄色～褐色油として得た。 ^1H NMR (300MHz , $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.79 (s, 1H), 7.79 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H), 7.47 (dd, $J=8.6, 2.1\text{Hz}$, 1H), 7.08 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 6.74 (t, $J=5.9\text{Hz}$, 1H), 4.56 (t, $J=6.3\text{Hz}$, 1H), 3.07 (td, $J=6.1, 1.6\text{Hz}$, 2H), 1.31 (s, 9H)。MS m/z (ESI^+): Calcd $[M+H]^+ = 299.1$; Exp $[M+H]^+ = 299.1$ 。HPLC 方法 2、保持時間 = 5.5 分。

20

30

【0307】

1. 2. 2. 2) (2S, 3R, 4S, 5S, 6S)-2-(4-(2-(tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-1-ヒドロキシエチル)-2-ニトロフェノキシ)-6-(メトキシカルボニル)テトラヒドロ-2H-ピラン-3, 4, 5-トリイルトリアセタートの合成。

丸底フラッシュ中、 Ag_2CO_3 ($1500\text{mg} / 5.4\text{mmol}$) 及び $1, 1, 4, 7, 10, 10$ -ヘキサメチルトリエチレントラミン ($251\text{mg} / 1.1\text{mmol}$) を 4mL の無水アセトニトリルに溶解し、室温で 2 時間攪拌した。以前の化合物 tert-ブチル (2-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル)エチル)カルバマート ($292\text{mg} / 0.98\text{mmol}$) 及び 1-ブロモ-2, 3, 4-トリ-O-アセチル- α -D-グルクロニドメチルエステル ($583\text{mg} / 1.46\text{mmol}$) を 0°C で添加し、溶液混合物を室温で 4 時間攪拌した。次いで、反応物をセライトで濾過し、 EtOAc で希釈し、飽和クエン酸溶液で 3 回、飽和 NaCl 溶液で 1 回洗浄した。有機相を MgSO_4 上で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させて粗生成物を得、これをシリカゲ

40

50

ルクロマトグラフィ（石油エーテル／EtOAc、勾配70：30から30：70）によって精製して、表題化合物（244mg／48%）を黄色泡として得た。¹H NMR（300MHz，DMSO-d₆）δ 7.76（dd，J=3.3，2.1Hz，1H），7.60（t，J=7.6Hz，1H），7.36（dd，J=8.7，2.6Hz，1H），6.77（s，1H），5.71（d，J=7.8Hz，1H），5.61（s，1H），5.46（td，J=9.5，1.1Hz，1H），5.21-5.02（m，3H），4.75（dd，J=9.9，1.4Hz，1H），4.62（s，1H），3.65（s，3H），3.17（s，2H），3.10（t，J=6.1Hz，2H），2.81-2.59（m，6H），2.05-1.96（m，9H），1.30（d，J=1.7Hz，9H）。MS m/z（ESI⁺）：Calc [M+Na]⁺=637.2；Exp [M+Na]⁺=637.2。HPLC方法2、保持時間=6.75分。

【0308】

1.2.2.3）（2S，3R，4S，5S，6S）-2-（4-（2-（（tert-ブトキシカルボニル）アミノ）-1-（（4-ニトロフェノキシ）カルボニル）オキシ）エチル）-2-ニトロフェノキシ）-6-（メトキシカルボニル）テトラヒドロ-2H-ピラン-3，4，5-トリイルトリアセタートの合成

以前の化合物（2S，3R，4S，5S，6S）-2-（4-（2-（（tert-ブトキシカルボニル）アミノ）-1-ヒドロキシエチル）-2-ニトロフェノキシ）-6-（メトキシカルボニル）テトラヒドロ-2H-ピラン-3，4，5-トリイルトリアセタート（334mg／0.54mmol）及び4-ニトロフェニルクロロホルマート（219mg／1.09mmol）を6mLの乾燥DCMに0℃で溶解した。無水ピリジン（112mg／1.41mmol）を添加し、混合物を室温で30分間攪拌した。反応物を0.45μmのPTFEフィルタで濾過し、シリカゲルクロマトグラフィ（石油エーテル／EtOAc、勾配85：15から30：70）によって精製して、表題化合物（380mg／90%）を黄色泡として得た。¹H NMR（300MHz，DMSO-d₆）δ 8.39-8.26（m，2H），7.93（d，J=2.2Hz，1H），7.75（d，J=8.8Hz，1H），7.55（dd，J=9.2，1.2Hz，2H），7.46（d，J=8.8Hz，1H），7.20（d，J=4.8Hz，1H），5.77（dd，J=7.7，3.7Hz，1H），5.47（t，J=9.5Hz，1H），5.11（q，J=9.6Hz，2H），4.77（d，J=9.9Hz，1H），3.73-3.59（m，3H），3.59-3.37（m，2H），2.05-1.96（m，9H），1.48-1.35（m，1H），1.32（s，9H）。MS m/z（ESI⁺）：Calc [M+Na]⁺=802.15；Exp [M+Na]⁺=802.15。HPLC方法2、保持時間=8.5分。

【0309】

1.2.2.4）化合物INT2の合成

381mg（0.49mmol）の前の化合物（2S，3R，4S，5S，6S）-2-（4-（2-（（tert-ブトキシカルボニル）アミノ）-1-（（4-ニトロフェノキシ）カルボニル）オキシ）エチル）-2-ニトロフェノキシ）-6-（メトキシカルボニル）テトラヒドロ-2H-ピラン-3，4，5-トリイルトリアセタート、200mg（0.38mmol）のメシル酸エキサテカン及び51mg（0.38mmol）のHOBtを、無水DMF／ピリジンの85：15（v／v）混合物5mLに溶解した。53.5mg（0.51mmol）のDIEAを添加した。反応物を40℃で2時間攪拌し、揮発性物質を減圧下で蒸発させた。粗残渣をシリカゲルクロマトグラフィ（99：1から95：5までのDCM／MeOH勾配）によって精製して、360mg（87%）の中間体化合物（2S，3R，4S，5S，6S）-2-（4-（2-（（tert-ブトキシカルボニル）アミノ）-1-（（（1R，9R）-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10，13-ジオキソ-2，3，9，10，13，15-ヘキサヒドロ-1H，12H-ベンゾ[de]ピラノ[3'，4'：6，7]インドリジノ[1，2-b]キノリン-1-イル）カルバモイル）オキシ）エチル）-2-ニトロフェノ

キシ) - 6 - (メトキシカルボニル) テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3, 4, 5 - トリイルトリアセタートを黄色 / 緑色がかった固体として得た。ESI + [M + Na] + = 1098.3。HPLC方法3、保持時間 = 14.7及び14.9分 (ジアステレオ異性体混合物)。

【0310】

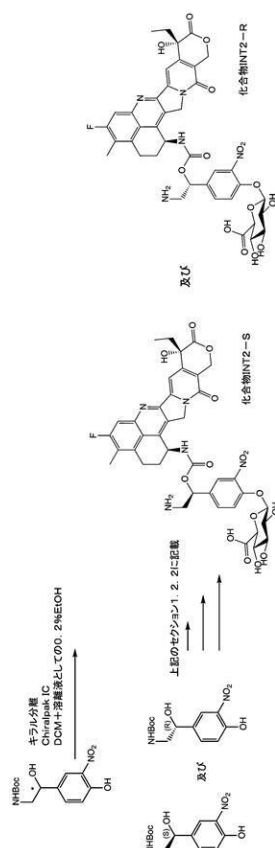
355mg (0.33mmol) のこの中間体化合物を0℃で8mLのMeOH / THF 75 : 25に溶解した。LiOH-水和物 (138mg / 3.3mmol) を水 (1mL) に溶解し、反応容器に添加した。0℃で30分間攪拌した後 (反応、引き続いてHPLC)、混合物を酢酸 (258mg / 4.3mmol) で中和し、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をTFA / DCM (30 : 70 v / v) 溶液を用いて0℃で再溶解し、室温で20分間攪拌した。揮発性物質を減圧下で蒸発させ、粗残渣を水 / ACN (1 : 1 v / v) 溶液に溶解し、HPLC分取方法5を使用して精製して、172mg (62%) の化合物INT2を黄色固体として得た。ESI + [M + H] + = 836.2。HPLC方法3、保持時間 = 7.3及び7.8分 (ジアステレオ異性体混合物)。

【0311】

1.2.2.5) 立体的に純粋な化合物INT2-S及びINT2-Rの合成

【0312】

【化28】



【0313】

1.2.2.5.1) tert-ブチル (2-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル) エチル) カルバマートのラセミ混合物のキラル分離

Teledyne Isco CombiFlash (登録商標) Rf200システムで Chiralflash (登録商標) IC MPLCカラム30x100mm、20µm (Daicelカタログ番号83M73) を使用して、ラセミtert-ブチル (2-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル) エチル) カルバマート (前述のように合成) のキラル分離を行った。移動相はDCM + 0.2% (v / v) EtOH (定組成勾配) であった。流量は12mL / 分であった。試料溶媒は、DCM + 0.2% (v

／v) EtOHであった。分離後の2つのエナンチオマーの質量回収率は80%超であった。

【0314】

tert-ブチル(S)-(2-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル)エチル)カルバマート保持時間は15分であったのに対して、tert-ブチル(R)-(2-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル)エチル)カルバマート保持時間は25分であった。

【0315】

絶対配置を決定するために、両方のエナンチオマーのフェノール位置を、無水THF中1.2モル当量の4-ニトロベンゾイルクロリド及び2モル当量のトリエチルアミンでエステル化した。化合物をシリカゲルでのクロマトグラフィ(石油エーテル/EtOAc、勾配90:10から10:90)によって精製して、4-(2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-1-ヒドロキシエチル)-2-ニトロフェニル4-ニトロベンゾアートを得た。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ 8.51(d, J=9.1Hz, 2H), 8.44(d, J=9.1Hz, 2H), 8.19(d, J=1.9Hz, 1H), 7.88(d, J=10.2Hz, 1H), 7.72(d, J=8.4Hz, 1H), 6.93(t, J=5.9Hz, 1H), 5.84(d, J=4.7Hz, 1H), 4.86-4.76(m, 1H), 3.24(t, J=6.1Hz, 2H), 1.38(s, 9H)。ESI+[M+Na]⁺=470.1。エナンチオマーの絶対配置(予めへプタン/ジクロロメタンの1:1混合物に溶解し、3週間ゆっくりと蒸発させて結晶の形成を誘導した)をX線結晶学によって確認した。ブロック形状の結晶を、パーフルオロエーテル油中のナイロンループ上に載せた。データは、T=150.00(5)Kで動作するOxford Cryosystems低温装置を備えたXcalibur、Atlas、Gemini超回折計を使用して収集した。データは、CuKα線を使用したωスキャンを使用して測定した。二重法を使用するShelXT溶液プログラム及びOlex2(O. V. Dolomanov et al., Olex2: A complete structure solution, refinement and analysis program, J. Appl. Cryst., 2009, 42, 339-341)を使用することによって、構造を解析した。モデルは、F2の完全行列最小二乗最小化を使用して、ShelXL 2018/3(Sheldrick, G. M., Crystal structure refinement with ShelXL, Acta Cryst., 2015, C71, 3-8)で改良された。

【0316】

1.2.2.5.2) 立体的に純粋なINT2-S及びINT2-R化合物の合成

反応条件、反応性又は全体的な収率のいかなる認識できる変化もなしに、前のセクション1.2.2に記載されるように、立体的に純粋な化合物INT2-S及びINT2-Rを合成した。

【0317】

HPLC分取方法5を用いた最終精製により、33mgの化合物INT2-Sを黄色固体として得た。ESI+[M+H]⁺=836.2。HPLC方法3、保持時間=7.3分。

【0318】

HPLC分取方法5を用いた最終精製により、21mgの化合物INT2-Rを黄色固体として得た。ESI+[M+H]⁺=836.2。HPLC方法3、保持時間=7.8分。

【0319】

1.2.3) 化合物INT3の合成

【0320】

10

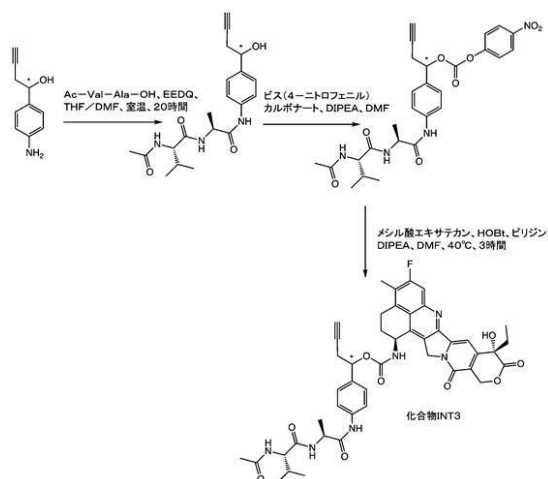
20

30

40

50

【化 29】



10

【0321】

1. 2. 3. 1) Ac-Val-Ala-OH (アセチル-L-バリル-L-アラニン)の合成

L-アラニンベンジルエステル塩酸塩 (542 mg / 2.5 mmol) の 30 mL の DCM 中溶液に、トリエチルアミン (254 mg / 2.5 mmol)、蒸留水 (30 mL)、N- α -アセチル-L-バリン (400 mg / 2.5 mmol) 及び HOBT (339 mg / 2.5 mmol) を順次添加した。次いで、混合物を 0°C に冷却し、EDC-HCl (530 mg / 2.75 mmol) を添加した。得られた混合物を 0°C で一晩撹拌した。反応物を 20 mL の 2 M HCl で希釈し、層を分離した。有機相を 2 M HCl で 2 回、飽和 NaHCO₃ 溶液で 2 回、飽和 NaCl 溶液で 1 回洗浄した。有機相を MgSO₄ 上で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させて、714 mg (89%) のベンジルアセチル-L-バリル-L-アラニナートを白色固体中間体として得た。

20

【0322】

この中間体を 10 mL の EtOAc / MeOH 1 : 1 (v / v) に可溶化し、ステンレス鋼水素化反応器に移した。最初のアルゴンパージの後、触媒量の 5% w t Pd / C を添加した。次いで、反応器を H₂ で 2 回パージし、10 bar の H₂ 圧力下、室温で一晩維持した。反応物を 0.45 μ m の PTFE フィルタで濾過し、真空下で溶媒を除去した後、定量的な量の純粋なアセチル-L-バリル-L-アラニンを白色固体として得た。1H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12.45 (s, 1H), 8.23 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.25-4.11 (m, 2H), 1.94 (dt, J = 13.6, 6.8 Hz, 1H), 1.85 (s, 3H), 1.26 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 0.85 (dd, J = 12.1, 6.8 Hz, 6H)。

30

【0323】

1. 2. 3. 2) (2S)-2-アセトアミド-N-((2S)-1-((4-(1-ヒドロキシブタ-3-イン-1-イル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)-3-メチルブタンアミドの合成

丸底フラッシュ中、420 mg (2.60 mmol) の 1-(4-アミノフェニル)ブタ-3-イン-1-オール (Sharma A. et al., Chem 2018, 4 (10), 2370-2383 に記載されている手順に従って合成した) 及び 600 mg (2.60 mmol) の以前の化合物 Ac-Val-Ala-OH を 20 mL の無水 THF に懸濁した。次いで、予め 5 mL の無水 DMF に溶解した 676 mg (2.74 mmol) の 2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリン (EEDQ) をフラスコに入れ、濁った反応混合物を室温で一晩撹拌した。次いで、揮発性物質を減圧下で蒸発させ、粗残渣を乾式装填し、シリカゲルクロマトグラフィ (99 : 1 から 85 : 15 の DCM / MeOH 勾配) によって精製して、809 mg (83%) の表題化合物を白

40

50

色固体として得た。 ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.84 (s, 1H), 8.18 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 5.44 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 4.62 (q, $J=6.2$ Hz, 1H), 4.39 (p, $J=7.6$, 7.2 Hz, 1H), 4.17 (dd, $J=8.5$, 6.8 Hz, 1H), 2.70 (t, $J=2.6$ Hz, 1H), 1.96 (dt, $J=13.2$, 6.6 Hz, 1H), 1.88 (s, 3H), 1.30 (d, $J=7.1$ Hz, 3H), 0.86 (dd, $J=10.9$, 6.8 Hz, 6H)。ESI+ $[M+H]^+=374.2$ 。HPLC方法2、保持時間=3.95分。

【0324】

1.2.3.3) 1-(4-((S)-2-((S)-2-アセトアミド-3-メチルブタンアミド)プロパンアミド)フェニル)ブタ-3-イン-1-イル(4-ニトロフェニル)カルボナートの合成

94 mg (0.25 mmol) の (2S)-2-アセトアミド-N-((2S)-1-((4-(1-ヒドロキシブタ-3-イン-1-イル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)-3-メチルブタンアミド及び153 mg (0.50 mmol) のビス(4-ニトロフェニル)カルボナートを2 mLの無水DMFに溶解した。98 mg (0.76 mmol) のDIPEAを添加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。揮発性物質を減圧下で除去し、粗残渣をシリカゲルクロマトグラフィ(99:1から90:10のDCM/MeOH勾配)によって精製して、118 mg (87%)の表題化合物を黄色固体として得た。 ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.99 (s, 1H), 8.35-8.26 (m, 2H), 8.22 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.58-7.48 (m, 2H), 7.43 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 5.74 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 4.39 (p, $J=7.2$ Hz, 1H), 4.17 (dd, $J=8.5$, 6.9 Hz, 1H), 3.01-2.84 (m, 3H), 1.99-1.91 (m, 1H), 1.88 (s, 3H), 1.31 (d, $J=7.1$ Hz, 3H), 0.86 (dd, $J=11.2$, 6.8 Hz, 6H)。ESI+ $[M+H]^+=539.1$ 。HPLC方法2、保持時間=6.48分。

【0325】

1.2.3.4) 化合物INT3の合成

43 mg (0.081 mmol) の先の化合物1-(4-((S)-2-((S)-2-アセトアミド-3-メチルブタンアミド)プロパンアミド)フェニル)ブタ-3-イン-1-イル(4-ニトロフェニル)カルボナート、55.5 mg (0.11) のメシル酸エキサテカン及び11.0 mg (0.08 mmol) のHOBtを、2 mLの無水DMF/ピリジンの85:15 (v/v) 混合物に溶解した。11.5 mg (0.09 mmol) のDIPEAを添加した。反応物を40℃で3時間攪拌した。揮発性物質を減圧下で除去した後、反応混合物をシリカゲルクロマトグラフィによって精製して(99:1から95:5までのDCM/MeOH勾配)、42 mg (62%)の化合物INT3を黄色/緑色がかった固体として得た。ESI+ $[M+H]^+=835.3$ 。HPLC方法2、保持時間=6.50及び6.60分(ジアステレオ異性体混合物)。

【0326】

1.2.4) 化合物INT4、INT4-S及びINT4-Rの合成

【0327】

10

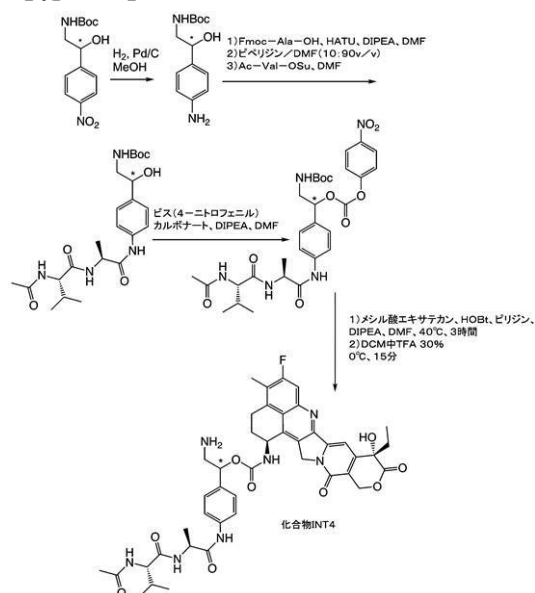
20

30

40

50

【化 30】



10

【0328】

1. 2. 4. 1) tert-ブチル (2- (4-アミノフェニル) -2-ヒドロキシエチル) カルバマートの合成

20

市販の911mg (3.23mmol) のtert-ブチル (2-ヒドロキシ-2- (4-ニトロフェニル) エチル) カルバマート (CAS番号939757-25-2) を含むMeOH溶液をステンレス鋼水素化反応器に移した。最初のアルゴンパージの後、触媒量の5%wt Pd/Cを添加した。次いで、反応器をH₂で2回パージし、反応物を攪拌しながら室温で5時間、10barのH₂圧力下に維持した。反応物を0.45μmのPTFEフィルタで濾過し、真空下でMeOHを除去した後、749mg (92%) の表題化合物を白色固体として得た。ESI+ [M+H]⁺ = 253.2。HPLC方法2、保持時間= 2.73分。

【0329】

1. 2. 4. 2) tert-ブチル (2- (4- ((S) -2- ((S) -2-アセトアミド-3-メチルブタンアミド) プロパンアミド) フェニル) -2-ヒドロキシエチル) カルバマートの合成

30

150mg (0.60mmol) の先の化合物tert-ブチル (2- (4-アミノフェニル) -2-ヒドロキシエチル) カルバマート、222mg (0.71mmol) のFmoc-Ala-OH及び81mg (0.62mmol) のDIPEAを5mLの無水DMFに溶解した。181mg (0.71mmol) のHATUを添加し、反応物を室温で一晩攪拌する。次いで、揮発性物質を減圧下で除去し、粗残渣をシリカゲルのクロマトグラフィ (100:0から90:10までのDCM/MeOH勾配) によって精製して、Fmoc脱保護に直接関与する第1の中間体tert-ブチル (2- (4- ((S) -2- (((9H-フルオレン-9-イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) プロパンアミド) フェニル) -2-ヒドロキシエチル) カルバマートを定量的に得た。HPLC方法2保持時間= 7.7分。

40

【0330】

tert-ブチル (2- (4- ((S) -2- (((9H-フルオレン-9-イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) プロパンアミド) フェニル) -2-ヒドロキシエチル) カルバマートを5mLのDMF/ピペリジン9:1 (v/v) に溶解し、室温で15分間攪拌した。次いで、揮発性物質を減圧下で除去し、粗残渣をシリカゲルクロマトグラフィ (99:1から80:20のDCM/MeOH勾配) によって精製して、130mg (2工程で68%) の第2の中間体tert-ブチル (2- (4- ((S) -2-アミノプロパンアミド) フェニル) -2-ヒドロキシエチル) カルバマートを白色泡状固体として得

50

た。HPLC方法2、保持時間=3.75分。

【0331】

130mg (0.40mmol) のtert-ブチル(2-(4-((S)-2-アミノプロパンアミド)フェニル)-2-ヒドロキシエチル)カルバマート及び124mg (0.48mmol) の市販のAc-Val-OSu (CAS番号56186-37-9) を3mLの無水DMFに溶解し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。次いで、揮発性物質を減圧下で除去し、粗残渣を3mLのDCMで研和して、95mg (51%) の表題化合物を白色固体として得た。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 9.82 (s, 1H), 8.16 (d, J=7.1Hz, 1H), 7.88 (d, J=8.6Hz, 1H), 7.53 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.22 (d, J=8.5Hz, 2H), 6.73-6.58 (m, 1H), 5.27 (d, J=4.4Hz, 1H), 4.58-4.47 (m, 1H), 4.40 (q, J=7.1Hz, 1H), 4.17 (dd, J=8.4, 6.8Hz, 1H), 3.15-2.90 (m, 2H), 1.88 (s, 4H), 1.35 (s, 9H), 1.30 (d, J=7.1Hz, 3H), 0.92-0.73 (m, 6H)。ESI+ [M+H]⁺=487.3。HPLC方法2、保持時間=4.50分。

10

【0332】

1.2.4.3) tert-ブチル(2-(4-((S)-2-((S)-2-アセトアミド-3-メチルブタンアミド)プロパンアミド)フェニル)-2-((4-ニトロフェノキシ)カルボニル)オキシ)エチル)カルバマートの合成

20

286mg (0.62mmol) のtert-ブチル(2-(4-((S)-2-((S)-2-アセトアミド-3-メチルブタンアミド)プロパンアミド)フェニル)-2-ヒドロキシエチル)カルバマート及び375mg (1.23mmol) のビス(4-ニトロフェニル)カルボナートを3mLの無水DMFに溶解した。318mg (2.46mmol) のDIPEAを添加し、反応混合物を室温で3時間攪拌した。揮発性物質を減圧下で除去し、粗残渣をシリカゲルクロマトグラフィ(99:1から90:10のDCM/MeOH勾配)によって精製して、336mg (87%) の表題化合物を黄色固体として得た。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 9.99 (s, 1H), 8.36-8.26 (m, 2H), 8.22 (d, J=6.9Hz, 1H), 7.89 (d, J=8.6Hz, 1H), 7.63 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.56-7.46 (m, 2H), 7.34 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.22 (t, J=5.6Hz, 1H), 5.68 (t, J=6.0Hz, 1H), 4.38 (p, J=7.1Hz, 1H), 4.17 (dd, J=8.5, 6.9Hz, 1H), 3.49-3.34 (m, 2H), 2.01-1.90 (m, 1H), 1.87 (s, 3H), 1.37 (s, 9H), 1.30 (d, J=7.1Hz, 3H), 0.86 (dd, J=11.1, 6.8Hz, 6H)。ESI+ [M+Na]⁺=652.2。HPLC HPLC方法2、保持時間=7.13分。

30

【0333】

1.2.4.4) 化合物INT4の合成

231mg (0.37mmol) の以前の化合物tert-ブチル(2-(4-((S)-2-((S)-2-アセトアミド-3-メチルブタンアミド)プロパンアミド)フェニル)-2-((4-ニトロフェノキシ)カルボニル)オキシ)エチル)カルバマート、150mg (0.28) のメシル酸エキサテカン及び38mg (0.28mmol) のHOBtを、5mLの無水DMF/ピリジンの85:15 (v/v) 混合物に溶解した。40mg (0.31mmol) のDIPEAを添加した。反応物を40℃で3時間攪拌し、揮発性物質を減圧下で蒸発させた。粗残渣をシリカゲルクロマトグラフィ(99:1から90:10までのDCM/MeOH勾配)によって精製した。220mg (85%) の中間体化合物1-(4-((S)-2-((S)-2-アセトアミド-3-メチルブタンアミド)プロパンアミド)フェニル)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)エチル((1R, 9R)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-

40

50

10, 13-ジオキソ-2, 3, 9, 10, 13, 15-ヘキサヒドロ-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-1-イル)カルバマートが褐色黄色固体で得られた。ESI+ [M+H]⁺ = 926.4。HPLC方法2、保持時間 = 6.7及び6.8分(ジアステレオ異性体混合物)。

【0334】

得られた固体をTFA/DCM(30:70 v/v)溶液を用いて0℃で再溶解し、室温で20分間攪拌した。揮発性物質を減圧下で蒸発させ、粗残渣を水/ACN(1:1 v/v)溶液に溶解し、HPLC分取方法5を使用して精製して、171.4mg(73%)の化合物INT4を黄色固体として得た。ESI+ [M+H]⁺ = 826.4。HPLC方法3、保持時間 = 8.3及び8.75分(ジアステレオ異性体混合物)。

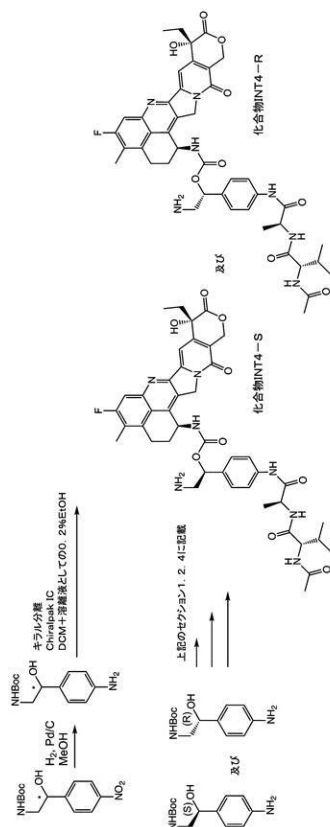
10

【0335】

1.2.4.5) 立体的に純粋な化合物INT4-S及びINT4-Rの合成

【0336】

【化31】



20

30

【0337】

1.2.4.5.1) tert-ブチル(2-(4-アミノフェニル)-2-ヒドロキシエチル)カルバマートのラセミ混合物のキラル分離

Teledyne Isco CombiFlash(登録商標)Rf200システムでChiralflash(登録商標)IC MPLCカラム30x100mm、20µm(DaiceIカタログ番号83M73)を使用して、ラセミtert-ブチル(2-(4-アミノフェニル)-2-ヒドロキシエチル)カルバマートのキラル分離を行った。移動相はDCM+0.2%(v/v)EtOH(定組成勾配)であった。流量は12mL/分であった。試料溶媒は、DCM+0.2%(v/v)EtOHであった。分離後の2つのエナンチオマーの質量回収率は75%超であった。

40

【0338】

tert-ブチル(S)-(2-(4-アミノフェニル)-2-ヒドロキシエチル)カルバマート保持時間は21分であったが、tert-ブチル(R)-(2-(4-アミノフェニル)-2-ヒドロキシエチル)カルバマート保持時間は29分であった。エナンチ

50

オマーの絶対配置（予めヘプタン／エタノールの1：1混合物に溶解し、1週間ゆっくり蒸発させて結晶の形成を誘導した）をX線結晶学によって確認した。ブロック形状の結晶を、パーフルオロエーテル油中のナイロンループ上に載せた。データは、 $T = 150.00(10)$ Kで動作するOxford Cryosystems低温装置を備えたXcalibur、Atlas、Gemini超回折計を使用して収集した。データは、CuK α 線を使用した ω スキャンを使用して測定した。二重法を使用するShelXT溶液プログラム及びOlex2（O. V. Dolomanov et al., Olex2: A complete structure solution, refinement and analysis program, J. Appl. Cryst., 2009, 42, 339–341）を使用することによって、構造を解析した。モデルは、F2の完全行列最小二乗最小化を使用して、ShelXL 2018/3（Sheldrick, G. M., Crystal structure finement with ShelXL, Acta Cryst., 2015, C71, 3–8）で改良された。

【0339】

1. 2. 4. 5. 2) 立体的に純粋なINT4-S及びINT4-R化合物の合成

反応条件、反応性又は全体的な収率のいかなる認識できる変化もなしに、前のセクション1. 2. 4に記載されるように、立体的に純粋な化合物INT4-S及びINT4-Rを合成した。

【0340】

HPLC分取方法5を用いた最終精製により、54 mgの化合物INT4-Sを黄色固体として得た。ESI+ $[M+H]^+ = 826.4$ 。HPLC方法3、保持時間= 8.45分。

【0341】

HPLC分取方法5を用いた最終精製により、46 mgの化合物INT4-Rを黄色固体として得た。ESI+ $[M+H]^+ = 826.4$ 。HPLC方法3、保持時間= 8.90分。

【0342】

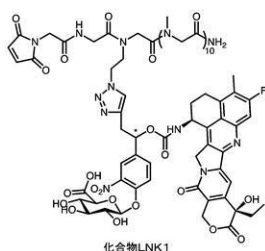
1. 3) 薬物-リンカーの合成

1. 3. 1) グルクロニドベースの薬物-リンカーの合成

1. 3. 1. 1) 化合物LNK1の合成

【0343】

【化32】



44.5 mg (0.049 mmol)の化合物PSR1（アジドーポリサルコシン中間体）及び27.5 (0.033 mmol)の化合物INT1（アルキン-ペイロード）を、0.060 M濃度の化合物INT1に達するように、100 mMのPBS (pH = 7.5) 及びDMSOの1：1 (v/v) 溶液に溶解した。次いで、新たに調製したCuSO₄五水和物及びアスコルビン酸ナトリウム溶液（約250 mg/mL）を、0.08モル当量のCu及び1モル当量のアスコルビン酸ナトリウム（反応混合物中の化合物INT1モル当量に基づく）に達するように反応バイアルに順次添加した。反応物をアルゴンでパージし、40℃で攪拌する。反応をHPLCでモニターし、2時間未満で完了した。次いで、反応混合物を0.1% TFA水溶液/ACN 1：1 (v/v) で希釈し、HPLC分取方法5を用いて精製して、44 mg（出発化合物INT1に基づいて77%）の中間

体化合物 (2S, 3S, 4S, 5R, 6S) - 6 - (4 - (2 - (1 - (3S - アミノ - 3 - グリシル - 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 - デカメチル - 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35 - ウンデカオキソ - 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 - ウンデカアザペンタトリアコンチル) - 1H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 4 - イル) - 1 - ((1R, 9R) - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 10, 13 - ジオキソ - 2, 3, 9, 10, 13, 15 - ヘキサヒドロ - 1H, 12H - ベンゾ [de] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン - 1 - イル) カルバモイル) オキシ) エチル) - 2 - ニトロフェノキシ) - 3, 4, 5 - トリヒドロキシテトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - カルボン酸を黄色固体として得た。ESI + [M + H] + = 1755.7。HPLC 方法 3、保持時間 = 7.51 分及び 7.82 分 (ジアステレオ異性体混合物)。

【0344】

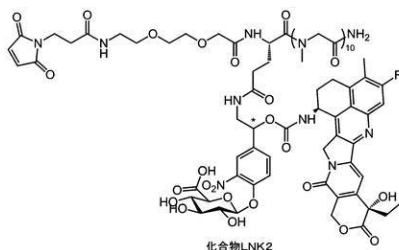
26.0 mg (0.015 mmol) のこの化合物及び 4.11 mg (0.016 mmol) のマレイミド酢酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを無水 DMF (0.1 M 濃度のマレイミド化合物) に溶解した。2.25 mg (0.022 mmol) のトリエチルアミンを加え、反応物の完全な変換が HPLC によって観察されるまで、反応物を 2 時間撹拌した。次いで、反応混合物を 1% TFA 水溶液 / ACN 1 : 1 (v/v) で希釈し、HPLC 分取方法 6 を用いて精製して、16.0 mg (57%) の化合物 LNK1 を黄色固体として得た。ESI + [M + H] + = 1892.7。HPLC 方法 3、保持時間 = 7.95 分及び 8.20 分 (等モルのジアステレオ異性体混合物)。

【0345】

1.3.1.2) 化合物 LNK2 の合成。

【0346】

【化33】



409 mg (0.31 mmol) の化合物 PSR3 (NHS 活性化ポリサルコシン中間体) 及び 172 mg (0.21 mmol) の化合物 INT2 (NH₂-ペイロード) を、小型バイアル (0.080 M 濃度の化合物 INT2) 内で無水 DMF に溶解した。83.5 mg (0.83 mmol) のトリエチルアミンを加え、反応物を室温で 30 分間撹拌した。HPLC によって観察される反応の変換全体の後、DMF 中の 8% (v/v) ピペリジン溶液に達するために、ピペリジンを反応バイアルに直接添加する。次いで、HPLC によって Fmoc 脱保護全体が観察されるまで、反応物を室温で 5 ~ 10 分撹拌する。反応物を 10% TFA 水溶液 / ACN 1 : 1 (v/v) でゆっくり中和し、HPLC 分取方法 5 を使用して精製して、254 mg (出発化合物 INT2 に基づいて収率 67%) の中間体化合物 (2S, 3S, 4S, 5R, 6S) - 6 - (4 - ((9S) - 40 - アミノ - 9 - (2 - (2 - (2 - アミノエトキシ) エトキシ) アセトアミド) - 1 - ((1S, 9S) - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 10, 13 - ジオキソ - 2, 3, 9, 10, 13, 15 - ヘキサヒドロ - 1H, 12H - ベンゾ [de] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン - 1 - イル) アミノ) - 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38 - デカメチル - 1, 6, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40 - トリデカオキソ - 2 - オキサ - 5, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38 - ウ

ンデカアザテトラコンタン-3-イル)-2-ニトロフェノキシ)-3,4,5-トリヒドロキシテトラヒドロ-2H-ピラン-2-カルボン酸を黄色固体として得た。ESI+ [M+H]⁺=1819.7。HPLC方法2、保持時間=4.60分及び4.69分(等モルのジアステレオ異性体混合物)。

【0347】

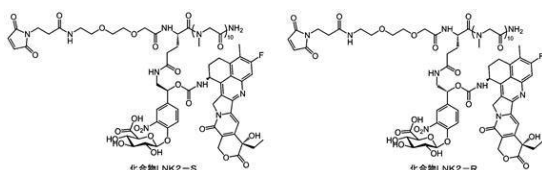
254mg (0.14mmol)のこの化合物及び39.1mg (0.15mmol)のマレイミド酢酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを無水DMF (0.1M濃度のマレイミド化合物)に溶解した。22.6mg (0.22mmol)のトリエチルアミンを添加し、HPLCによって観察される反応の変換全体まで反応物を1時間攪拌した。次いで、反応混合物を1%TFA水溶液/ACN 1:1 (v/v)で希釈し、HPLC分取方法6を用いて精製して、161mg (58%)の最終化合物LNK2を黄色固体として得る。HRMS m/z (ESI+): Calc [M+2H]²⁺=985.8900; Exp [M+2H]²⁺=985.8896; Error=0.4ppm。HPLC方法2、保持時間=7.9分及び8.1分(等モルのジアステレオ異性体混合物)。

【0348】

1.3.1.3) 化合物LNK2-S及びLNK2-Rの合成

【0349】

【化34】



化合物LNK2-S及びLNK2-Rを、化合物LNK2に使用したのと同じ手順を使用して、上記のように合成した。出発材料は、それぞれ、化合物INT2-S及びINT2-R (NH2-ペイロード)並びに化合物PSR3 (NHS活性化ポリサルコシン中間体)であった。

【0350】

53.4mgの化合物LNK2-Sを黄色固体として得た。ESI+ [M+2H]²⁺=985.9。HPLC方法3、保持時間=7.8分。

【0351】

44.0mgの化合物LNK2-Rを黄色固体として得た。ESI+ [M+2H]²⁺=985.9。HPLC方法3、保持時間=8.1分。

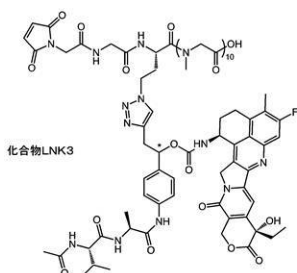
【0352】

1.3.2) ジペプチドベースの薬物-リンカーの合成

1.3.2.1) 化合物LNK3の合成

【0353】

【化35】



化合物LNK1に使用したのと同じ手順を使用して、上記のように最終化合物LNK3を合成した。出発材料は、化合物PSR2 (アジド-ポリサルコシン中間体)及び化合物INT3 (アルキン-ペイロード)であった。

【0354】

14.0 mg (2工程で36%)の化合物LNK3を黄色固体として得た。ESI+ [M+H]⁺=1883.8。HPLC方法3、保持時間=8.82分及び9.07分(等モルのジアステレオ異性体混合物)。

【0355】

1.3.2.2) 化合物LNK4の合成

【0356】

【化36】



10

化合物LNK4は、化合物LNK2に使用したのと同じ手順を使用して、上記のように合成した。出発材料は、化合物PSR4 (NHS活性化ポリサルコシン中間体) 及び化合物INT4 (NH₂-ペイロード) であった。

【0357】

34.9 mg (2工程で46%)の化合物LNK4を黄色固体として得た。HRMS m/z (ESI⁺): Calc [M+2H]²⁺=981.4394; Exp [M+2H]²⁺=981.4398; Error=-0.4 ppm。HPLC方法3、保持時間=8.81分及び8.94分(等モルのジアステレオ異性体混合物)。

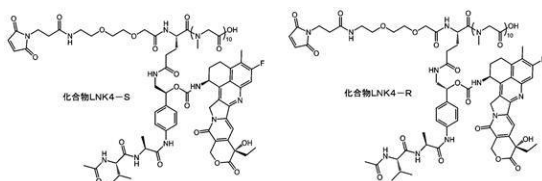
20

【0358】

1.3.2.3) 化合物LNK4-S及びLNK4-Rの合成

【0359】

【化37】



30

化合物LNK4-S及びLNK4-Rは、化合物LNK2に使用したのと同じ手順を使用して、上記のように合成した。出発材料は、それぞれ化合物INT4-S及びINT4-R (NH₂-ペイロード) 並びに化合物PSR4 (NHS活性化ポリサルコシン中間体) であった。

【0360】

18.1 mgの化合物LNK4-Sを黄色固体として得た。ESI+ [M+2H]²⁺=981.4。HPLC方法3、保持時間=8.78分。

40

【0361】

16.3 mgの化合物LNK4-Rを黄色固体として得た。ESI+ [M+2H]²⁺=981.4。HPLC方法3、保持時間=8.96分。

【0362】

実施例2：抗体-薬物コンジュゲートの調製及び特徴付け

2.1) 抗体産生

モノクローナル抗体のアミノ酸配列を文献から得た。ファルレッツズマブ軽鎖(配列番号10)及び重鎖(配列番号11)配列は、World Health Organization (WHO) Drug Information Vol 23, No. 3, 2009に掲載されているInternational Nonproprietary Name

50

s for Pharmaceutical Substances (INN) List 62及び国際公開第2017151979号から入手した。ファルレッズマブの重鎖 (Wines et al. The Journal of Immunology May 15, 2000, 164 (10) 5313-5318) 上にFcサイレンシング変異L234A及びL235A (「LALA」) を含むファルレッズマブ-LALAもまた産生された (重鎖「LALA」配列番号9配列) ミルベツキシマブ軽鎖 (配列番号17) 及び重鎖 (配列番号16) 配列は、特許出願国際公開第2011106528号から得た。ヒトIgG1k非結合アイソタイプ対照は、Sino Biologicals製のカタログ番号HG1K (専売のアミノ酸配列) であった。トラスツマブ (Herceptin (登録商標) 150mg) は、Rocheから購入した。Enhertu (登録商標) (トラスツマブ・デラクテカン) をDaiichi Sankyo/AstraZenecaから購入した。

【0363】

当技術分野で認識されている技術を使用して、CHO K1細胞の一過性トランスフェクションによってモノクローナル抗体を産生した (スイスのEvitria AGに委託)。cDNAを、従来の (PCRに基づかない) クローニング技術を使用して、Evitriaのベクター系にクローニングした。pDNAを、陰イオン交換クロマトグラフィに基づく低エンドトキシン条件下で調製した。DNA濃度は、波長260nmでの吸収を測定することによって決定した。配列の正確さは、サンガーシーケンシング (プラスミド当たり最大2つのシーケンシング反応) で検証した。懸濁液適合CHO K1細胞 (元々はATCCから受け取り、Evitriaでの懸濁培養で無血清増殖に適合した) を抗体産生に使用した。種子を、Evitriaの所有権のある動物成分及び無血清培地中で成長させた。細胞を、Evitriaの独自のトランスフェクション試薬でトランスフェクトした。上清を遠心分離及びその後の濾過 (0.2 µmフィルタ) によって回収した。抗体を、MabSelect SuReプロテインA精製樹脂 (Cytiva) 及びSEC分取樹脂を使用して精製した。抗体材料の純度は、SDS-PAGE及びサイズ排除クロマトグラフィによって確認され、95%超であった。エンドトキシン含有量は、Charles River Endosafe PTSシステムを使用して測定した。

【0364】

2.2) システインコンジュゲート抗体-薬物コンジュゲートの調製

抗体 (PBS 7.4+1 mM EDTA中10mg/mL) の溶液を、必要量 (最終~DAR4 ADCについては2.2モル当量又は最終DAR8 ADCについては14モル当量) のトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) で37℃にて1時間~2時間処理した。還元抗体を、Amicon 30K遠心フィルタデバイス (Millipore) を使用した3回の希釈/遠心分離によって、リン酸カリウム100mM pH7.4+1mM EDTAで緩衝液交換した。最終~DAR4 ADCのために、6モル当量の薬物-リンカー (12mM DMSOストック溶液から) を抗体に添加した。最終DAR8 ADCのために、10~12モル当量の薬物-リンカーを添加した。溶液を室温で30分間インキュベートした。最終的なコンジュゲートを、Amicon 30K遠心フィルタデバイスを使用した4回の希釈/遠心分離によって、PBS pH7.4緩衝液又はヒスチジンスクロース緩衝液 (20mMヒスチジン緩衝液pH6.0、4% (w/v) スクロース+75mM NaCl) のいずれかで緩衝液交換/精製し、滅菌濾過した (0.20 µm PESフィルタ)。

【0365】

最終タンパク質濃度を、Nanodrop Oneデバイス (Thermo Fisher Scientific) を使用して280nmで分光光度的に評価した。

【0366】

2.3) システインコンジュゲート抗体-薬物コンジュゲートの特徴付け

得られたコンジュゲートを以下のように特徴付けた:

逆相液体クロマトグラフィー質量分析 (RP-LC-MS) による薬物-抗体比 (DAR

）評価：

実施例1で上述したHPLC方法4を用いて変性RPLC-QToF分析を行った。簡潔には、水／アセトニトリル＋0.1%ギ酸（0.4mL／分）の移動相勾配を使用してAgilent PLRP-S 1000Å 2.1×150mm 8μm（80℃）でコンジュゲートを溶出し、500～3500m/z範囲（ESI+）を走査するBruker Impact IITM Q-ToF質量分析計を使用して検出した。Bruker Compass（登録商標）ソフトウェアに含まれるMaxEntアルゴリズムを使用してデータをデコンボリューションした。

【0367】

逆相液体クロマトグラフィ（RPLC-UV）：

変性RPLC-UV分析も、上記のHPLC方法4のわずかに修正されたバージョンを使用して、Agilent 1100 HPLC-DADシステムで行った。移動相改質剤0.1%ギ酸を0.1%TFAに置き換え、DAD UV吸光度のみ（質量分析検出器なし）を使用して検出を行った。

【0368】

サイズ排除クロマトグラフィ（SEC）：

SECは、15μL未満のカラム外容量を有するAgilent 1100 HPLCシステム（内径0.12mmのピーク管の短いセクション及びマイクロボリュウムUVフローセルを備えている）で行った。カラムは、Agilent AdvanceBio SEC 300Å 4.6×150mm 2.7μm（30℃で維持）であった。移動相は、100mMリン酸ナトリウム及び200mM塩化ナトリウム（pH6.8）であった。固定相との二次疎水性相互作用を最小限に抑え、細菌増殖を防ぐために、10%アセトニトリル（v/v）を移動相に添加した。流量は0.35mL／分であった。UV検出を280nm又は任意の他の関連波長で監視した。

【0369】

2.4) リジンコンジュゲート抗体-薬物コンジュゲートの調製

抗体ミルベツキシマブ又はファルレツズマブ（100mM KH₂PO₄ pH8.0中10mg／mL）の溶液を、スルホ-SPDB-DM4 CAS番号1626359-59-8（MedChemExpress）の12mMのDMSO溶液で処理して、7.5モル当量のスルホ-SPDB-DM4の最終濃度にした。溶液を室温で3時間インキュベートし、0.20μmのPESフィルタを用いて濾過した。最終的なコンジュゲートを、Amicon 30K遠心フィルタデバイスを使用した5回の希釈／遠心分離によって、PBS pH7.4緩衝液又はヒスチジンスクロース緩衝液（20mMヒスチジン緩衝液pH6.0、4%（w/v）スクロース＋75mMのNaCl）のいずれかで緩衝液交換／精製し、滅菌濾過した（0.20μmのPESフィルタ）。

【0370】

最終タンパク質濃度を、Nanodrop Oneデバイス（Thermo Fisher Scientific）を使用して280nmで分光光度的に評価した。

【0371】

2.5) リジンコンジュゲート抗体-薬物コンジュゲートの特徴付け

得られたコンジュゲートを以下のように特徴付けた：

ネイティブSEC-MSによる平均薬物-抗体比（DAR）評価：

分析前に、50μgのADCに対して50UのIgGZERO（登録商標）（Genovis）酵素を添加することによって、ADCを脱グリコシル化した。ADCを、30℃に維持したAgilent AdvanceBio SEC 200A 1.9μm 2.1×150mm PEEKカラム（カタログ番号PL1980-3201PK）上で分離した。カラムを50mMの酢酸アンモニウム＋10%（v/v）HPLCグレードのイソプロパノール中で平衡化した。実行中、流量を0.075mL／分に維持し、ADCを典型的には3.5～4.5分の間で溶出した。mAb又はADCの溶出後、流れ及び緩衝液の組成を維持した。カラム溶出液をBruker Impact II（商標）Q-ToF

10

20

30

40

50

質量分析計に導き、300～8000 m/z 範囲（ESI⁺）を走査した。原料のキャピラリー電圧は4500 Vに設定した。原料の乾燥ガスは8.0 L/分、噴霧ガスは25 Psiに設定した。供給源の乾燥温度を200℃に設定した。ADCマスペクトルを、Bruker Compass（登録商標）ソフトウェアに含まれるMaxEntアルゴリズムを使用してデコンボリューションし、DARを、各ADCサブ種のイオン強度ピーク高さを使用して計算した。

【0372】

サイズ排除クロマトグラフィ（SEC）：

SECは、15 μL未満のカラム外容量を有するAgilent 1100 HPLCシステム（内径0.12 mmのピーク管の短いセクション及びマイクロボリュームUVフローセルを備えている）で行った。カラムは、Agilent Advance BioSEC 300 Å 4.6×150 mm 2.7 μm（30℃で維持）であった。移動相は、100 mMリン酸ナトリウム及び200 mM塩化ナトリウム（pH 6.8）であった。固定相との二次疎水性相互作用を最小限に抑え、細菌増殖を防ぐために、10%イソプロパノール（v/v）を移動相に添加した。流量は0.35 mL/分であった。UV検出を280 nm又は任意の他の関連波長で監視した。

【0373】

2.6) 合成された抗体-薬物コンジュゲートの概要

【0374】

【表7-1】

表7：

コンジュゲートの名称	薬物-リンカー成分	抗体成分	DAR	デコンボリューション質量分析データ	モノマー純度(%)
T-GLC-EXA	LNK1	トラスツマブ	8	Obs LC-1d:25332 Da(Mass error 0 Da) Obs HC-3d:56274 Da(Mass error 1 Da)	95%+
T-VA-EXA	LNK3	トラスツマブ	8	Obs LC-1d:25323 Da(Mass error 0 Da) Obs HC-3d:56249 Da(Mass error 3 Da)	95%+
F-VA-EXA	LNK4-S	ファルレッツマブ	8	Obs LC-1d:25713 Da(Mass error 1 Da) Obs HC-3d:56140 Da(Mass error 3 Da)	95%+
F-VA-EXA-4	LNK4-S	ファルレッツマブ	4.1	Obs LC-0d:23751 Da(Mass error 0 Da) Obs LC-1d:25712 Da(Mass error 0 Da) Obs HC-0d:50257 Da(Mass error 3 Da) Obs HC-1d:52218 Da(Mass error 2 Da) Obs HC-2d:54179 Da(Mass error 3 Da) Obs HC-3d:56141 Da(Mass error 4 Da)	95%+
F-LALA-VA-EXA	LNK4-S	ファルレッツマブ-LALA	8	Obs LC-1d:25712 Da(Mass error 0 Da) Obs HC-3d:56054 Da(Mass error 1 Da)	95%+
F-LALA-VA-EXA-4	LNK4-S	ファルレッツマブ-LALA	4.2	Obs LC-0d:23751 Da(Mass error 0 Da) Obs LC-1d:25712 Da(Mass error 0 Da) Obs HC-0d:50173 Da(Mass error 2 Da) Obs HC-1d:52133 Da(Mass error 1 Da) Obs HC-2d:54094 Da(Mass error 2 Da) Obs HC-3d:56055 Da(Mass error 2 Da)	95%+
F-GLC-EXA	LNK2-S	ファルレッツマブ	8	Obs LC-1d:25722 Da(Mass error 0 Da) Obs HC-3d:56167 Da(Mass error 2 Da)	95%+

【0375】

【表7-2】

(表7の続き)

コンジュゲートの名称	薬物-リンカー成分	抗体成分	DAR	デコンボリューション質量分析データ	モノマー純度(%)
M-SORAV	スルホ-SPDB-DM4	ミルベツキシマブ	3.35	ネイティブSEC-MSデータ: DAR0種:146391 Da(2% Int.) DAR1種:147351 Da(11% Int.) DAR2種:148310 Da(22% Int.) DAR3種:149270 Da(24% Int.) DAR4種:150230 Da(19% Int.) DAR5種:151191 Da(12% Int.) DAR6種:152152 Da(9% Int.) DAR7種:154084 Da(1% Int.)	95%+
F-SORAV	スルホ-SPDB-DM4	ファルレッツマブ	4.1	ネイティブSEC-MSデータ: DAR1種:147745 Da(4% Int.) DAR2種:148706 Da(10% Int.) DAR3種:149667 Da(22% Int.) DAR4種:150625 Da(27% Int.) DAR5種:151586 Da(21% Int.) DAR6種:152546 Da(10% Int.) DAR7種:153507 Da(4% Int.) DAR8種:154468 Da(2% Int.)	95%+
M-VA-EXA	LNK4-S	ミルベツキシマブ	8	Obs LC-1d:25765 Da(Mass error 0 Da) Obs HC-3d:56259 Da(Mass error 3 Da)	95%+
NEG-VA-EXA	LNK4-S	陰性対照IgG Sino Bio. #HG1K	8	Obs LC-1d:25371 Da(Mass error 1 Da) Obs HC-3d:55148 Da(Mass error 4 Da)	95%+

LC-0d：軽鎖；LC-1d：1つの薬物-リンカーを有する軽鎖；HC-0d：重鎖；HC-1d：1つの薬物-リンカーを有する重鎖；HC-2d：2つの薬物リンカー

を有する重鎖；HC-3d：3つの薬物-リンカーを有する重鎖。主要なグリコフォームがHCについて報告されている。

【0376】

実施例3：一般的な細胞培養の実施及び動物実験

本プロジェクトで使用されるヒト癌細胞株は、American Type Culture Collection (ATCC)、The Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (DSMZ) 又はEuropean Collection of Authenticated Cell Cultures (ECCACC) のいずれかから購入した。実験で使用するために、良好な確立された細胞培養の実施に従って、細胞培養培地及び補充、凍結保存、並びに継代培養手順について元のATCC/DSMZ/ECCACC供給業者からの指示に従って、細胞を培養した。細胞を5%CO₂雰囲気下、37℃で2ヶ月以内インキュベートした。

【0377】

全ての動物手順は、欧州連合指令86/609/EECに従って実施した。実験は、個々の許可の下で、フランス農業省によって認定された動物飼育施設で行った。この研究は、地元の動物倫理委員会(CECCAPP)によって承認された。

【0378】

実施例4：グルクロニド又はジペプチド薬物-リンカー設計のげっ歯類治療指数比較

薬物-リンカー構築物LNK1 (グルクロニド-エキサテカン) 及びLNK3 (ジペプチドVal-Ala-エキサテカン) のマウス治療指数を評価して、2つの酵素切断モダリティグルクロニド及びジペプチドVal-Alaのマウス治療指数を比較した。標的化部分としてトラスツズマブモノクローナル抗体を標的化するモデルヒトHER2を使用し、T-GLC-EXA ADC及びT-VA-EXA ADCを製剤化した。これらのADCを、HER2+胃癌モデルにおけるインビボ有効性及び忍容性(治療指数)に関して比較した。トラスツズマブはマウスにおいて交差反応しないので、このアッセイは、ADCの薬物-リンカー成分の見かけの毒性に関する有用な情報を与える(可能性のある標的媒介毒性は除外される)。

【0379】

インビボ有効性の評価：NCI-N87胃癌細胞を雌SCIDマウス(4週齢)の皮下に移植した。ADCを、腫瘍が約150mm³(群間の初期腫瘍体積の差を最小にするように割り当てられた、群当たり6匹の動物)に成長したときに1mg/kgの準治療用量で静脈内に1回投与した。腫瘍体積をキャリパーデバイスによって3~5日毎に測定し、式(L×W²)/2を使用して計算した。腫瘍体積が1000mm³を超えたとき、マウスを殺した。

【0380】

薬物動態プロファイルの評価：コンジュゲートの単回静脈内3mg/kg用量後のラットにおけるPKプロファイル(経時的なmAb成分に基づく総抗体-薬物コンジュゲート濃度)。ADCを、尾静脈(1群当たり3匹の動物、無作為に割り当てた)を介して雌のSprague-Dawleyラット(4~6週齢、Charles River)に3mg/kgで注射した。様々な時点で眼窩後採血を介して血液をクエン酸チューブに採取し、血漿に処理し、分析まで-80℃で保存した。抗体成分に基づくADC濃度を、ヒトIgG ELISAキット(Stemcell (商標) Technologies)を製造業者のプロトコルに従って使用して評価した。対応するモノクローナル抗体の標準曲線を定量に使用した。PKパラメータ(クリアランス、半減期及びAUC)を、PK関数(Usansky et al., Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, USAAによって開発されたアドイン)を組み込んだMicrosoft (登録商標) Excel (登録商標) ソフトウェアを使用した2コンパートメント解析によって計算した。

【0381】

インビボ忍容性の評価：雌SCIDマウス（ $n=3$ ）を、 200 mg/kg のADC化合物の単回腹腔内高用量で処置した。マウスの体重減少又は毒性の明らかな徴候が12日間にわたって観察された。この実験では、陽性対照としてEnhertu（登録商標）（トラスツズマブデルクスステカン）を使用した。

【0382】

この研究の結果を図1に示す。T-GLC-EXA及びT-VA-EXAは、同様のインビボ有効性（図1A）及び同様のラットPKプロフィール（図1B）を示したが、高用量でマウスの忍容性に有意差を示した（図1C）。少なくともエキサテカンペイロードとの使用のために、ジペプチドVal-Ala切断可能モダリティがより良好な有効性／忍容性プロフィールを提供したと結論付けられた。したがって、この実体は、他のADC構築物にとって好ましいものであった。

【0383】

実施例5：葉酸受容体アルファ（FRa）細胞外結合部位のフローサイトメトリ評価

FRa細胞表面定量化のために、細胞をPE抗FOLR1抗体（BioLegend、カタログ番号908304）と共に室温で20分間インキュベートした。eBioscience（商標）Fixable Viability Dye eFluor（商標）780キット（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号65-0865-18）を製造者の説明書に従って使用して、細胞生存率を評価した。BD FACSDivaソフトウェア（BD Biosciences）によって制御されたBD Fortessaフローサイトメータを使用して分析を行い、FlowJoソフトウェア（BD Bioscience）を使用してデータを分析した。

【0384】

その結果を図2に示す。本研究プログラムの細胞株は、異なるレベルのFRaの細胞外発現を示した。BT-474乳癌細胞は細胞外FRaを発現しなかったため、本研究プログラムの状況では陰性対照細胞株であると考えられた。

【0385】

実施例6：FRa+癌性細胞株に対するメシル酸エキサテカンのインビトロ細胞傷害性アッセイ

化合物メシル酸エキサテカンのインビトロ細胞傷害性を、いくつかのFRa陽性癌性細胞株で評価した。細胞を、細胞株に応じて適切な密度（ $100\text{ }\mu\text{L}$ の適切な培養培地中1000～10000細胞／ウェル）で96ウェルプレートに播種し、 37°C で24時間インキュベートした。培養培地に予め溶解した試験化合物の段階希釈物（ $50\text{ }\mu\text{L}$ ）を添加し、インキュベーションを 37°C で144時間行った。MTT（ 5 mg/mL 、 $20\text{ }\mu\text{L}$ 、Sigma-Aldrich）をウェルに添加し、インキュベーションを 37°C で1～2時間継続した。次いで、培養培地を注意深く除去し、ウェル内容物を酸性化イソプロパノールで均一に溶解した。吸光度値は、Multiskan™ Sky microplate reader（Thermo Scientific）で570nmの波長（参照波長690nm）を用いて測定した。未処置対照細胞と比較したIC50濃度値を、阻害用量反応曲線フィッティング（GraphPad Prism 9）を用いて決定した。

【0386】

その結果を図3に示す。メシル酸エキサテカンは、nM未満～低nMのIC50のインビトロ効力を示し、本発明者らにFRa発現悪性腫瘍のADCペイロードとしてのこの化合物の使用を調査するよう促した。

【0387】

実施例7：ELISAによる組換えFR α 結合親和性

サンドイッチELISAアッセイを、96ウェル高結合ELISAプレート（Corning Inc., New York, NY, USA, カタログ番号3590）を使用して行った。 $100\text{ }\mu\text{L}$ ／ウェルの組換えヒトFRaタンパク質（Sino Biological、カタログ番号11241-H08H）；組換えカニクイザルFRaタンパク質（Sino Biologicalカタログ番号90950-C08H）；組換えラットF

R α タンパク質 (Sino Biological、カタログ番号 81073-R08H) 又は組換えマウスFR α タンパク質 (Sino Biological、カタログ番号 50573-M08H) を使用してPBS (pH 7.4) 中に2 μ g/mLでプレートをコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。PBS-T (PBS+0.05% Tween-20) で2回洗浄した後、プレートを200 μ L/ウェルのインキュベーション緩衝液 (PBS-T+0.1% BSA) で室温にて1時間ブロッキングした。プレートをPBS-Tで4回洗浄し、100 μ Lの3倍希釈系列の試験化合物 (抗体又は抗体-薬物コンジュゲート) を添加した。次いで、プレートを暗所で室温にて2時間インキュベートした。PBS-Tによる5回の洗浄の後、プレートを100 μ L/ウェルのヤギ抗ヒトIgG (H+L) HRPコンジュゲート化抗体 (Jackson ImmunoResearch、カタログ番号 109-035-088) と室温で1時間インキュベートし、予めインキュベーション緩衝液で1:250000希釈した。PBS-Tで5回洗浄した後、TMB基質溶液 (Thermo-Fisher、カタログ番号 N301) を添加した。0.18 MのH₂SO₄でペルオキシダーゼ活性を停止し、Thermo Scientific Multiskan EXマイクロプレートリーダーを使用して450 nm (参照波長 650 nm) で吸光度を読み取った。GraphPad Prism 9ソフトウェアを使用して、シグモイド固定を行った。

【0388】

その結果を図4に示す。図4A: 全ての抗体及びADCが、およそEC₅₀=0.1 nMの同様の組換えヒトFR α 結合親和性を示した。ネイティブ抗体とそれぞれのADC構築物との間で結合の喪失は観察されなかった。結合の喪失は、ファルレツズマブとファルレツズマブ-LALAとそれらのそれぞれのADC構築物との間で観察されなかった。ミルベツキシマブとM-SORAV ADC構築物との間で結合の有意な喪失は観察されなかった。陰性対照ADC NEG-VA-EXAについては、ヒトFR α 結合は検出されなかった。図4B: F-LALA-VA-EXAは、ヒト及びカニクイザルの組換えFR α タンパク質に等しく結合し、ラット及びマウスの組換えFR α タンパク質には結合しない。したがって、F-LALA-VA-EXAは、げっ歯類交差反応性ではなく、カニクイザル交差反応性である。

【0389】

実施例8: SPRによるヒトFR α 結合親和性

表面プラズモン共鳴 (SPR) 実験をBiacore T200装置で25℃にて行った。試験した抗体又はADCを、Human Antibody Capture kit (Cytiva、カタログ番号 BR100839) で予め官能化したCM5シリーズSセンサーチップ上に低密度 (300~500 RU) で捕捉した。同様に処理されるガリガンドを省いた官能基化表面/フローセルを参照として使用した。速度論的速度及び親和性を測定するために、組換えヒトFR (Sino Biological、カタログ番号 11241-H08H) 分析物試料を、単一サイクル速度論戦略を使用して、ランニング緩衝液 (HBS-EP+, Cytiva、カタログ番号 BR100669) の一定の70 μ L/mL流量で、300秒の接触パルスにより、直列に5つの濃度 (0.5、1、2、4、8 nM) で二連で注入した。解離相は、ランニング緩衝液を900秒間注入することによって測定した。2連の間で、表面/フローセルを3 MのMgCl₂で再生して分析物トリガンドの両方を除去し、同一の条件を使用して新鮮なりガンド捕捉を行った。データ分析は、基準面及び分析物のゼロ濃度シグナルの減算後にBiacore Evaluationソフトウェアを使用して行った。データを処理し、1:1結合モデルに当てはめて、結合速度定数k_a (オン速度) 及びk_d (オフ速度)、並びにK_D (「親和性」とも呼ばれる平衡解離定数) を決定した。反復実験の平均値及び標準偏差を報告する。

【0390】

その結果を図5に示す。組換えヒトFR α 結合の喪失は、ネイティブ抗体とそれぞれのADC構築物との間で観察されなかった。結合の喪失は、ファルレツズマブとファルレツズマブ-LALAとそれぞれのADC構築物との間で観察されなかった。驚くべきことに

、ミルベツキシマブ及びミルベツキシマブベースの構築物と比較して、ファルレツズマブ及びファルレツズマブーLALAベースの構築物について約10倍減少した K_D 値（親和定数）が観察された。これは、ミルベツキシマブ及びミルベツキシマブベースの構築物と比較して、ファルレツズマブ及びファルレツズマブーLALAベースの構築物の k_d 値（解離速度定数）が増加した結果であった（会合速度定数 k_a が類似していたことを考慮）。陰性対照IgG₁（Sino Biologicals、カタログ番号HG1K）については、ヒトFR α 結合事象は検出されなかった。

【0391】

実施例9：フローサイトメトリによる細胞結合親和性

癌性細胞株上に発現された細胞外ヒトFR α に対する抗体又はADC結合をフローサイトメトリによって評価した。試験した抗体又はADCを、LYNX Rapid APC Antibody Conjugation Kitを製造者のプロトコルに従って使用してAPCフルオロフォアにコンジュゲートした（Bio-Rad、カタログ番号LNK032APC）。500000個の細胞（フローサイトメトリプラスチックチューブ中の100 μ LのPBSに懸濁したもの）に、試験したAPC標識抗体又はADCの10 μ g/mL溶液5 μ Lを添加した。細胞を暗所で20分間インキュベートし、遠心分離によってPBSで3回洗浄し、分析のために200 μ LのPBSに再懸濁した。BD FACSDivaソフトウェア（BD Biosciences）によって制御されたBD Fortessaフローサイトメータを使用してフローサイトメトリを行い、FlowJoソフトウェア（BD Bioscience）を使用してデータを分析した。

【0392】

その結果を図6に示す。ファルレツズマブとファルレツズマブーLALAとそれぞれのADC構築物との間で、同等のヒトFR α 細胞結合が観察された。天然のミルベツキシマブと天然のファルレツズマブとの結合親和性は同一のようであった。驚くべきことに、その親抗体ミルベツキシマブと比較して、ミルベツキシマブのADC誘導体（M-SORAV）について結合の有意な喪失が観察された。これは、（1）抗体可変領域の一部であるリジンアミノ酸と反応することができるスルホーSPDB-DM4薬物-リンカーの不均一確率的コンジュゲーション、したがって結合親和性の低下；（2）LYNX Rapid APCコンジュゲーションキットがスルホーSPDB-DM4のようなリジンアミノ酸と反応する際のM-SORAVのより低いAPC標識効率、又は（3）（1）と（2）の組合せのいずれかによって説明することができる。試験した全ての化合物について、FR α 陰性対照細胞株BT-474で結合は観察されなかった。

【0393】

実施例10：エクスピボADCヒト血漿安定性

F-VA-EXA及びF-LALA-VA-EXA ADC試料（PBS中>6mg/mL溶液）を、スクリュキャップ付き遠心管で純粋な滅菌ヒト血漿（GeneTex、カタログ番号GTX73265）で希釈して、200 μ g/mLの最終ADC濃度（5% v/v未満の残留PBS体積）を得た。試料を37 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、一定分量を5分、6時間、1日、2日、3日及び7日の時点で採取した（一定分量は分析まで-80 $^{\circ}$ Cで凍結したままにした）。ADCを、ビオチン化ヒト葉酸受容体アルファ組換えタンパク質（Sino Biologicals、カタログ番号11241-H08H）で予めコーティングされたDynabeads（商標）M-280ストレプトアビジン（Thermo Scientific）磁気ビーズを使用する免疫捕捉によって血漿から単離した。簡潔には、600 μ Lの市販のビーズ溶液をHBS-EP緩衝液（Cytiva、カタログ番号BR100188）で2回洗浄し、1.2mLのHBS-EP緩衝液に再懸濁した。ビオチン化組換えFR α 溶液65 μ L（タンパク質量48 μ g）を添加し、溶液を室温で2時間攪拌した。次いでビーズをHBS-EP緩衝液で3回洗浄し、1.2mLのHBS-EP緩衝液に再懸濁した。1回の免疫捕捉のために、100 μ Lの前のビーズ溶液を、微量遠心管中の100 μ LのHBS-EP上に添加した。血漿中のADC溶液10 μ L（理論的ADC量2 μ g）を添加し、溶液を室温で2時間攪拌した。インキュベーション

ン後、ビーズ-ADC複合体をHBS-EP緩衝液で2回洗浄し、200 μ LのHBS-EP緩衝液で再懸濁し、穏やかに攪拌しながら37°Cで一晩2 μ L/1000 UのPNGase F (New England Biolabs、カタログ番号P0705L) を添加することによって脱グリコシル化した。次いで、ビーズをHBS-EP緩衝液で2回、蒸留水で2回及び水中10%アセトニトリル(v/v)で1回洗浄した。ビーズを、0.1% (v/v) のギ酸を含有する50 μ Lの30%アセトニトリル水溶液(v/v)と共に室温で穏やかに攪拌しながら30分間インキュベートした。次いで、脱グリコシル化ADCを含有する溶出試料を、Bruker Impact II (商標) Q-ToF質量分析計を備えたThermo Ultimate 3000 UHPLCシステムを使用する変性逆相クロマトグラフィー質量分析によって分析した。移動相Aは水+0.1%ギ酸であり、移動相Bはアセトニトリル+0.1%ギ酸であった。カラムはAgilent PLRP-S 1000 Å 2.1 $\times$ 100 mm 5 μ m (80°C)であった。直線勾配は、25分で20%Bから50%Bであった。流量は0.4 mL/分であった。UV検出を280 nmでモニターした。Q-ToF質量分析計は、m/z範囲500~5000 (ESI⁺) で使用した。Bruker Compass (登録商標) ソフトウェアに含まれるMaxEntアルゴリズムを使用してデータをデコンボリューションした。安定性データ分析のために、選択された軽鎖(LC)及び重鎖(HC)溶出時間窓内の生スペクトルのデコンボリューションが実施した。薬物-リンカーの喪失又は修飾は、出発ADC材料からの対応する質量シフトに従って同定した。異なるDARを有するADCの相対比は、特定のADC亜種の強度を総ADC種からの強度で割ることによって計算した。最終DAR値は、Xu et al., Anal. Biochem., 2011, 412 (1), 56-66に記載されるように計算した。

【0394】

その結果を図7に示す。F-VA-EXA及びF-LALA-VA-EXA ADCの両方について、90%超の薬物-リンカーのヒト血漿安定性が観察された。マレイミド基の自己安定化加水分解からの+18 Da (+H₂O) の質量シフト(これは48~72時間のADCインキュベーション時間後に完了した)を除いて、この試験中に薬物-リンカーの質量シフトは観察されなかった(早期のエキサテカン放出又は代謝なし)。観察された不安定性のみが、ADCの重鎖上の薬物-リンカー全体のレトロマイケルマレイミド脱コンジュゲートによって引き起こされた(軽鎖上では脱コンジュゲートは観察されなかった)。

【0395】

実施例11: FRa陰性細胞株に対するインビトロ細胞傷害性実験

ADCの非特異的(オフターゲット)細胞傷害性を評価するために、インビトロ細胞傷害性アッセイをBT-474 (FRa陰性) 癌細胞株において実現した。細胞を、細胞株に応じて適切な密度(100 μ Lの適切な培養培地中1000~10000細胞/ウェル)で96ウェルプレートに播種し、37°Cで24時間インキュベートした。培養培地に予め溶解した試験化合物の段階希釈物(50 μ L)を添加し、インキュベーションを37°Cで144時間行った。MTT (5 mg/mL, 20 μ L, Sigma-Aldrich) をウェルに添加し、インキュベーションを37°Cで1~2時間継続した。次いで、培養培地を注意深く除去し、ウェル内容物を酸性化イソプロパノールで均一に溶解した。吸光度値は、Multiskan (商標) Sky microplate reader (Thermo Scientific) で570 nmの波長(参照波長690 nm)を用いて測定した。未処置対照細胞と比較したIC50濃度値を、阻害用量反応曲線フィッティング(GraphPad Prism 9)を用いて決定した。

【0396】

その結果を図8に示す。ソラブタンシン(スルホ-SPDB-DM4)ベースのADCは、VA-EXA(LNK4-S薬物-リンカー)ベースのADCと比較して、より高いレベルのオフターゲット(非FRa媒介)細胞殺傷効力を示した。これは、ミルベツキシマブベースのADC及びファルレツズマブベースのADCの両方で観察されている。VA

ーE X A薬物ーリンカー成分は、臨床設定においてA D Cの忍容性を高めるための良好な前提条件である、ソラブタンシン薬物ーリンカーと比較してオフターゲット毒性が少ない。

【0397】

【表8】

表8：

ADC	薬物ーリンカー成分	BT-474 FRa陰性乳癌モデルにおけるオフターゲット毒性
M-VA-EXA	LNK4-S	+
F-VA-EXA	LNK4-S	+
M-SORAV	スルホーSPDB-DM4	+++
F-SORAV	スルホーSPDB-DM4	+++

【0398】

実施例12：インビボ有効性異種移植片モデル

4～5週齢の雌C B-17重症複合免疫不全（S C I D）マウスをJanvier Labs（Le Genest-Saint-Isle, France）から入手し、試験開始前に7日間隔離した。PBS（OV-90、SW-620、KB、BT-474細胞株）又はPBS（PA-1、IGROV-1、OVCAR-3、NCI-H2110細胞株）中の50%BD Matrigel（Corning（登録商標））に再懸濁した細胞（マウス当たり $5 \sim 10 \times 10^6$ 細胞）をマウスの皮下に接種した。平均腫瘍体積が約 $120 \sim 150 \text{ mm}^3$ に達したら、マウスを無作為化し（典型的には1群当たり7匹のマウス）、PBS（陰性対照）の単回（特に明記しない限り）静脈内注射によって処置するか、又は抗体ー薬物コンジュゲートを調べた。腫瘍体積を、キャリパーデバイス（長さ×幅）を使用して3～5日毎に測定し、以下の式 $V = 4/3 \times \pi \times R^3$ （式中、Rは半径を表す）を使用して計算した。腫瘍体積が 1500 mm^3 を超えた場合、又は腫瘍が潰瘍化した場合、マウスを殺した。

【0399】

IGROV-1腫瘍モデルでは、試験の94日目に腫瘍再移植チャレンジを行った。F-LALA-VA-EXA（ 12 mg/kg 静脈内単回）で処置したマウスに、試験開始時に使用したのと同じ手順を使用してIGROV-1細胞を再移植した（動物の他の側腹部）。5匹の新しいS C I D動物の対照群も、全く同じ手順に従って再移植した。

【0400】

図9に、SW-620癌モデルにおける腫瘍異種移植片実験を示す。F-VA-EXA及びM-SORAVコンジュゲートを、5、10又は 15 mg/kg でIV注射した。F-VA-EXAは 5 mg/kg 以上の用量で非常に活性であったが、比較体M-SORAVは 15 mg/kg で投与しても不活性であった。

【0401】

図10に、SW-620癌モデルにおける腫瘍異種移植片実験を示す。F-VA-EXA及びF-LALA-VA-EXAを1、3及び 6 mg/kg で1回静脈内注射した。非標的化アイソタイプー致陰性対照ADC NEG-VA-EXAを 6 mg/kg でIV注射した。F-VA-EXA及びF-LALA-VA-EXAは、 1 mg/kg 以上の用量で同等に高度に活性であった。非標的化コンジュゲートNEG-VA-EXAは、 6 mg/kg の最高試験用量で不活性であり、コンジュゲートの抗腫瘍活性が標的選択的であることを実証した。

【0402】

図11に、OV-90癌モデルにおける腫瘍異種移植片実験を示す。F-VA-EXA、F-LALA-VA-EXA及びM-SORAVコンジュゲートを 30 mg/kg で静脈内に単回注射した。全てのコンジュゲートは非常に活性であり、全ての群で100%の寛解率であった。しかしながら、M-SORAVコンジュゲートでは有意な毒性が観察された：6匹のマウスのうち6匹が乱れた外観を示し（光沢がなく艶がないヘアコート）、6匹のマウスのうち3匹が虚脱の徴候を示し、6匹のマウスのうち2匹が下痢を有していた。F-VA-EXA及びF-LALA-VA-EXAコンジュゲートでは毒性は観察さ

10

20

30

40

50

れなかった。これらのデータは、M-SORAVと比較して、F-VA-EXA及びF-LALA-VA-EXA構築物の前臨床治療域がより良好であることを示唆している。

【0403】

図12に、OV-90癌モデルにおける腫瘍異種移植片実験を示す。F-VA-EXA、F-LALA-VA-EXA及びM-SORAVコンジュゲートを、準治癒的5及び10mg/kg用量で1回、IV注射した。5mg/kgでは、F-VA-EXA及びF-LALA-VA-EXAは、M-SORAVと比較した場合、同様の有効性及び改善された有効性を示した。10mg/kgでは、F-VA-EXA及びM-SORAVは同様の有効性を示した（ただし、M-SORAV群内でより多くの不均一性が観察された）。10mg/kgでは、F-LALA-VA-EXAがF-VA-EXA及びM-SORAVの両方よりも優れていた。

10

【0404】

図13に、KB癌モデルにおける腫瘍異種移植片実験を示す。F-VA-EXA、F-LALA-VA-EXA及びM-SORAVコンジュゲートを、3、6及び12mg/kgで1回、IV注射した。非標的化アイソタイプ一致陰性対照ADC NEG-VA-EXAを12mg/kgで1回IV注射した。F-VA-EXA、F-LALA-VA-EXA及びM-SORAVは、3mg/kg以上の用量で同等に活性であった。非標的化コンジュゲートNEG-VA-EXAは、12mg/kgの最高試験用量で不活性であり、コンジュゲートの抗腫瘍活性が標的選択的であることを実証した。

【0405】

20

図14に、PA-1癌モデルにおける腫瘍異種移植片実験を示す。F-LALA-VA-EXA及びM-SORAVコンジュゲートを、準治癒的3、6及び12mg/kg用量で1回、IV注射した。非標的化アイソタイプ一致陰性対照ADC NEG-VA-EXAを12mg/kgで1回IV注射した。3mg/kgでは、F-LALA-VA-EXAがM-SORAVを上回った。6mgのF-LALA-VA-EXAでは、M-SORAVをわずかに上回った。12mgのM-SORAVでは、F-LALA-VA-EXAよりも優れていた。全体として、両方のコンジュゲートは、同様のレベルの有効性を示した。12mg/kgの最高試験用量で、非標的化コンジュゲートNEG-VA-EXAは、未処置対照群と比較してわずかに低下した腫瘍増殖速度を示した。

【0406】

30

図15に、OV-90癌モデルにおける腫瘍異種移植片実験を示す。F-LALA-VA-EXA及びM-SORAVコンジュゲートを、3、6及び12mg/kg用量で1回、IV注射した。3、6及び12mg/kgでは、F-LALA-VA-EXAがM-SORAVを上回った。

【0407】

図16に、IGROV-1癌モデルにおける腫瘍異種移植片実験を示す。F-LALA-VA-EXA及びM-SORAVコンジュゲートを、3、6及び12mg/kg用量で1回、IV注射した。非標的化アイソタイプ一致陰性対照ADC NEG-VA-EXAを12mg/kgで1回IV注射した。3、6及び12mg/kgで、F-LALA-VA-EXA及びM-SORAVは、同様のレベルの有効性を示し、強い腫瘍退縮を示した。12mg/kgの最高試験用量で、非標的化コンジュゲートNEG-VA-EXAは、試験の他のFRa標的化ADCよりも顕著ではないが、ある程度のレベルの有効性を示した。試験の94日後に行われた腫瘍再増殖再チャレンジにより、F-LALA-VA-EXAが防御的な免疫記憶応答を誘導できることが確認され、これは、1回の12mg/kg IVでのF-LALA-VA-EXAで治療した群の再移植後に腫瘍増殖が観察されなかったからである（新たな未処置SCIDマウスを用いた陽性対照群は移植後に腫瘍増殖を示した）。

40

【0408】

図17に、葉酸受容体アルファ陰性（FRa neg）BT-474乳癌モデルにおける腫瘍異種移植片実験を示す。F-LALA-VA-EXA及びM-SORAVコンジュ

50

ゲートを5及び10mg/kg用量で1回IV注射した。Enhertu（登録商標）（HER2標的トラスツズマブデルクテカン）を陽性対照として使用し、10mg/kg用量で1回IV注射した。両用量でF-LALA-VA-EXA及びM-SORAVについて有効性は観察されず、これらのコンジュゲートの有効性がFRa選択的であることが確認された。予想通り、また以前に観察されたように（Conilhet al., 2021, Pharmaceuticals, 14(3), 247, doi:10.3390/ph14030247）、Enhertu（登録商標）は、このHER2陽性BT-474癌モデルにおいて有効であった。

【0409】

【表9】

表9：

ADC	SW-620 癌モデルにお けるインビボ 有効性	OV-90癌 モデルにおけ るインビボ有 効性	KB癌モデル におけるイン ビボ有効性	PA-1癌モ デルにおける インビボ有効 性	IGROV-1 癌モデルにお けるインビボ 有効性	BT-474癌 モデルにおけ るインビボ有 効性(FRa neg)
F-VA- EXA	+++	++	+++	++	+++	—
F-LALA- VA-EXA	+++	+++	+++	++	+++	—
M- SORAV	—	++	+++	++	+++	—

【0410】

実施例13：マウスの忍容性実験

マウスの前臨床治療指数を評価するために、F-VA-EXA、F-LALA-VA-EXA及びM-SORAVコンジュゲートを用いてマウスの忍容性実験を行った。雌SCIDマウス（群当たりn=5匹のマウス）を、F-VA-EXA（200mg/kg）、F-LALA-VA-EXA（200mg/kg）又はM-SORAV（100mg/kg）の単回腹腔内用量で処置した。マウスを21日間にわたって体重減少又は毒性の明らかな徴候について慎重にモニターした。

【0411】

同じ実験を、F-LALA-VA-EXAの0、50、100、150又は200mg/kg IVで1回処置した雌CD-1マウスでも行った。

【0412】

結果を（SCIDマウス実験について）以下及び図18に示す。F-VA-EXA及びF-LALA-VA-EXAは、200mg/kgの用量では毒性の明らかな徴候はなく、十分に忍容性であった。対照的に、100mg/kgの用量のM-SORAVで処置した全てのマウスは、毒性の有意な徴候（毛羽立った毛を伴う乱れた外観、下痢、虚脱、閉眼、抑制された行動）を示し、2～3日目に死亡が見出されたか、又は安楽死させなければならなかった。これらの結果は、上述の異種移植片有効性データと共に、比較例M-SORAVと比較して、F-VA-EXA及びF-LALA-VA-EXA構築物の優れた前臨床治療指数を示す。

【0413】

雌CD-1マウスでは、MBK-103は、調査した全ての用量レベル（最大200mg/kg、IV、1回）で用量依存性の有害な全身又は局所作用を引き起こさなかった。体重減少又は挙動の変化は観察されなかった。唯一の注目すべき観察は、最終剖検中の対照群と比較して、全ての群の胸腺及び脾臓の重量のわずかな減少であった。

【0414】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 10 :

ADC	インビボ異種移植片実験(SCIDマウス)に基づく有効用量(ED)範囲	SCIDマウスにおける最大耐量(MTD)	前臨床的げっ歯類治療指数(MTDをEDで割ったもの)
F-VA-EXA	1~10mg/kg	200mg/kg超	40~200
F-LALA-VA-EXA	1~10mg/kg	200mg/kg超	40~200
M-SORAV	1~10mg/kg	100mg/kg未満	10~100

【0415】

実施例 14 : Sprague-Dawley ラット薬物動態試験

F-VA-EXA 及び F-LALA-VA-EXA コンジュゲートを、尾静脈（無作為に割り当てられた 1 群当たり 6 匹の動物）を介して雌の Sprague-Dawley ラット（4~6 週齢 - Charles River）に 5mg/kg で注射した。血液を、5 分、4 時間、1 日、2 日、4 日、7 日、14 日及び 21 日で眼窩後出血を介してクエン酸チューブに採取し、血漿に処理し、分析まで -80℃ で保存した。

【0416】

捕捉試薬としてヤギポリクローナル抗ヒト IgG (H+L) 一次抗体 (Jackson ImmunoResearch) 及び二次検出抗体としてマウスポリクローナル抗ヒト IgG (H+L) HRP コンジュゲート (Jackson ImmunoResearch) を使用して、ELISA によって総 mAb 濃度を評価した。総 ADC 濃度を、捕捉試薬としてウサギポリクローナル抗エキサテカン抗体 (ref # 6294 / 00000920、Biotem, Apprieu, France で特注) 及び二次検出抗体としてマウスポリクローナル抗ヒト IgG (H+L) HRP コンジュゲート (Jackson ImmunoResearch) を使用して ELISA によって評価した。ADC の標準曲線を定量化のために使用した。

【0417】

薬物動態パラメータ（クリアランス、半減期、Vss 及び AUC）を、PK 関数 (Usansky et al., Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA, USA によって開発されたアドイン) を組み込んだ Microsoft Excel ソフトウェアを使用した 2 コンパートメント解析によって計算した。

【0418】

LC/MS-MS 法を使用し、Agilent 1100 HPLC システム及び Sciex API 4000 MS/MS システムを使用して、遊離エキサテカン濃度を評価した。80:20 (v/v) アセトニトリル/メタノール + 1% ギ酸 + d5-エキサテカン (20 ng/mL) で構成される有機溶液を内部標準として使用してラット血漿試料をタンパク質沈殿させた。試料を、45℃ に維持した Phenomenex Kinetex (登録商標) C8 2.1 x 30 mm 2.6 µm 100 Å カラム (Phenomenex、カタログ番号 00D-4497-AN) 上で勾配溶出モードを使用して分析した。移動相 A は水 + 0.15% ギ酸であり、移動相 B はアセトニトリル/イソプロパノール 80:20 (v/v) + 0.15% ギ酸であった。流量は 0.8 mL/分であった。検出のために、正イオンモードで MRM 走査を使用した。1/x 重み付けを使用した線形最小二乗回帰を使用して、ピーク面積比分析物/重水素化内部標準対公称分析物濃度を使用して、検量線をプロットした。検量線は 0.2 (LLOQ) ~ 500 ng/mL の範囲であった。

【0419】

結果を図 19 に示す。F-VA-EXA 及び F-LALA-VA-EXA は、13~15 日の範囲で同様の分布体積、遅いクリアランス速度及び半減期を有する、循環中の二相性 PK プロフィールを示した（速い分布相、続いて遅い排出相）。総 mAb 曲線及び総 ADC 曲線は、強度、勾配及び形状が類似しており、良好な ADC 安定性（経時的な主要なペイロード脱コンジュゲートなし）を示唆した。遊離エキサテカンペイロードは、実験の

0～48時間の期間中にのみ検出され（親ADC成分よりも 10^6 倍少なく濃縮された）、良好なADC安定性及びエキサテカンの早期脱コンジュゲートがないことを示唆した。

【0420】

実施例15：マウスにおける肺の炎症及び毒性評価

ブレオマイシンは、線維形成に関与する機構の研究及び潜在的な治療法の評価のために肺線維症をモデル化するためにげっ歯類において広く使用されている。ADC肺毒性を評価するために、Walter and Kleeberger, Mouse Models of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis, 2008, Curr. Protoc. Pharmacol. 40:5.46.1-5.46.17によって記載されるような以下の既知の手順でマウスにおいて、ブレオマイシン誘導肺線維症を誘導した。0、4及び8日目に、雌C57/BL6マウス（Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France）をイソフルランで軽く麻酔し、20 μ Lの1mg/kgブレオマイシンPBS溶液（ブレオマイシンベロン、注射用15mg）又はPBS（陰性対照マウス）を鼻腔内投与した。非ブレオマイシン馴化マウスを陰性対照群として含めた。11日目に、マウス（n=6匹/群）を試験したコンジュゲート（10mg/kg i.p.）で処置し、実験期間中、毒性の明らかな徴候及び体重減少についてモニターした。臨床的に承認されたコンジュゲートEnher tu（登録商標）（10mg/kg i.p.）で処置された陽性対照群を含めたが、これは前臨床的に及び患者のごく一部において間質性肺疾患及び肺臓炎を誘発することが知られている。25日目に、全てのマウスを 殺し、気管支肺胞上清を得て（気管支肺胞洗浄によって）、肺器官を回収し、秤量して、PBS中の0.1%（w/v）ホルムアルデヒドで固定した。固定後、肺をPBS溶液中の0.02%（w/v）アジ化ナトリウムですすぎ、組織学的染色のためにパラフィンに包埋した。スライドを抗CD45抗体（Abcam、カタログ番号ab10558、1:500）で染色して、肺における白血球浸潤のレベルを定量した。二次ビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体（Vector Laboratories、カタログ番号BA-1000、1:300）及びアビジン-HRP（Vector Laboratories、カタログ番号A-2004）を検出に使用した。組織学的実験及びイメージングは、Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est (CiQLE) platform (Lyon, France) で外部委託した。Fijiソフトウェア（University of Wisconsin-Madison, USのLaboratory for Optical and Computational Instrumentationが開発し、維持している）のネイティブ機能を使用してIHC画像のランダムセクション（30%ズーム）を処理して、スライド内のCD45陽性細胞をカウントし（肺当たり1スライド）、白血球浸潤のレベルを評価した。非ブレオマイシン馴化マウスから得られた気管支肺胞上清中のリンパ球（CD3/CD4）、好酸球（CCR3/SiglecF）、好中球（Ly6g/Ly6C）及びマクロファージ（F4/80）の総数のモニタリングをフローサイトメトリによって行った。非ブレオマイシン馴化マウスから得られた気管支肺胞上清中の炎症性サイトカインレベルをELISAによって定量した。IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13を、Bio-Plex Pro（商標）マウスサイトカインTh2パネル（Bio-Rad、カタログ番号L60000UKVT）を製造者の説明書に従って使用して定量した。TGF- β 及びIL-17を、それぞれマウスTGF- β 1 DuoSet及びマウスIL-17 DuoSet ELISAキット（R&D systems、カタログ番号DY1679及びDY421）を製造者の説明書に従って使用して定量した。

【0421】

統計的有意性は、GraphPad Prism 9ソフトウェアを用いた一元配置ANOVA（テューキー法）を用いて評価した。p値は、*（ $p < 0.033$ ）、**（ $p < 0.002$ ）、***（ $p < 0.0002$ ）、及び****（ $p < 0.0001$ ）として表され、「ns」は非有意（ $p > 0.123$ ）を表す。

【0422】

IHC CD45の定量結果を図20に示す。陽性対照Enhertu（登録商標）ADCは、未処置（***）及びブレオマイシン馴化（****）陰性対照群の両方と比較した場合、白血球炎症浸潤の有意な増加を引き起こした。F-VA-EXA ADCは、未処置群と比較した場合、白血球炎症性浸潤の有意な増加を引き起こさず、ブレオマイシン馴化（***）対照群と比較した場合、有意な増加を引き起こした。F-LALA-VA-EXAは、未処置及びブレオマイシン馴化陰性対照群の両方と比較した場合、白血球炎症浸潤の有意な増加を引き起こさなかった。これらの前臨床結果に基づいて、F-VA-EXA、特にF-LALA-VA-EXA（Fcサイレントバリエーション）は、臨床状況において間質性肺疾患又は肺臓炎をほとんど又は全く誘発しないと仮定することができる。

10

【0423】

気管支肺胞上清中の炎症性サイトカインレベルを図21Aに示す。陽性対照Enhertu（登録商標）ADCは、未処置群と比較して、IL-13、IL-17及びTGF-βサイトカインレベルの有意な増加を引き起こした。F-VA-EXA及びF-LALA-VA-EXA ADCは、未処置群と比較した場合、サイトカインレベルの有意な増加を引き起こさなかった。

【0424】

気管支肺胞上清中のリンパ球、好酸球、好中球及びマクロファージの総数を図21Bに示す。陽性対照Enhertu（登録商標）は、未処置対照群と比較して、リンパ球、マクロファージ、好中球及び好酸球数の有意な増加を引き起こした。F-VA-EXA及びF-LALA-VA-EXAは、未処置対照群と比較してリンパ球数の有意な増加を示したが、未処置対照群と比較してマクロファージ、好中球及び好酸球の統計学的に有意な増加は示さなかった。

20

【0425】

【表11】

表11：

ADC	ENHERTU (登録商標)	F-VA- EXA	F-LALA- VA-EXA
CD45発現による肺の炎症レベル(白血球浸潤)	+++	++	+/-
気管支肺胞上清におけるサイトカイン発現による肺炎症レベル	++	なし	なし
フローサイトメトリによる気管支肺胞上清中のリンパ球数	+++	++	++
フローサイトメトリによる気管支肺胞上清中のマクロファージ数	++	-	-
フローサイトメトリによる気管支肺胞上清中の好中球数	+++	++	+
フローサイトメトリによる気管支肺胞上清中の好酸球数	+++	++	+

30

【0426】

実施例16：カニクイザルにおける用量範囲決定毒性試験

非ヒト霊長類用量範囲決定毒性研究を、ベトナム起源の目的飼育天然雌カニクイザル（*Macaca fascicularis*）を使用して行った。試験は、Cynbiose SAS（Marcy-l'Etoile, France）で行った。試験プロトコルは、試験施設の動物実験委員会によって承認された。F-LALA-VA-EXA ADCを、30、40、50又は60 mg/kgの用量レベルで、3週間間隔（合計3回）で静脈内投与した（5 mL/kg/h、30分間の注射期間にわたって）。2匹の雌サル／群を試験に使用した（合計8匹の動物）。最後の投与の5日後の最終殺後、肉眼的剖検、臓器重量の測定及び組織病理学的検査を行った。試験中に評価したパラメータには、死亡率、臨床徴候（食物消費の推定を含む）、体重、眼科検査、体温、血液学、凝固、臨床化学、尿検査、臓器重量、並びに広範な組織リストの肉眼的及び顕微鏡的検査が含まれた。ADC製剤緩衝液は、20 mMのヒスチジン pH 6.0、4%（w/v）スクロース及び75 mMのNaClであった。ビヒクルは、生理食塩水0.9%であった。

40

【0427】

結果を図22に示す。F-LALA-VA-EXA ADCは忍容性が良好であり、推

50

定最高非重度毒性用量（HNSTD）は50mg/kg、3回であった。60mg/kgでの投与は、この2匹の動物のうち的一方における急性腎不全のために許容されなかった（葉酸受容体アルファが腎臓で内因的に発現されるので、おそらく標的関連である）。F-LALA-VA-EXAの前臨床治療域は、カニクイザルHNSTDがげっ歯類癌モデルにおいて有効な治療用量をはるかに上回っている（用量のアロメトリックスケーリング後）、有利であると思われる。

本発明は、以下の態様を含む。

< 1 >

式（I）の抗体-薬物コンジュゲートであって、

$Ab - [L - D]_p$ （I）、

式中、

-Abは、配列番号12に特異的に結合する抗葉酸受容体アルファ（FR α ）抗体であり、

-Lは、好ましくはチオール残基を介して前記抗体に結合した切断可能なリンカー部分であり、

-Dは、Lに結合した細胞傷害性薬物部分であり、

-pは、1~8、好ましくは6~8、より好ましくはpは8である、

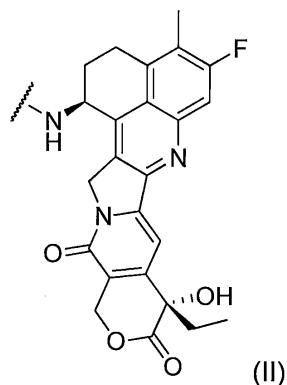
式（I）の抗体-薬物コンジュゲート。

< 2 >

DがトポイソメラーゼIの阻害剤であり、好ましくはカンプトテシン類似体からなる群から選択され、より好ましくはDは、下記式（II）のエキサテカンの薬物部分である、

< 1 >に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【化1】



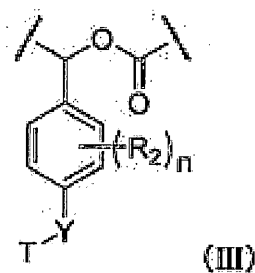
< 3 >

Lが式-A-W-の切断可能なリンカー部分であり、式中、AはAbに連結された任意のストレッチャ単位であり、WはDに連結された切断可能な部分である、< 1 >~< 2 >のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

< 4 >

Wが下記式（III）であって、

【化2】



式中、

各 R_2 は、電子求引基及び $C_1 \sim C_4$ アルキルからなる群から独立して選択され、

n は、0、1又は2であり、

T は、糖切断可能単位又はポリペプチド切断可能単位であり、

T が糖切断可能単位である場合、 Y は O であり、又は T がポリペプチド切断可能単位である場合、 Y は、 NR_3 であり、

R_3 は、 H 、 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル；場合により置換されたポリエーテル、6～10個の環原子を有するアリール、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、3～10個の環原子を有するヘテロシクロアルキル、5～10個の環原子を有するヘテロアリール、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択され、

10

前記アルキル及びアルケニルは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NR''-$ 、 $-C(O)NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-$ 、 $-NR''-C(O)-NR''-$ 、 $-NR''-C(O)O-$ 、 $-O-C(O)NR''-$ 及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

R' 及び R'' は、 H 及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立して選択される、

式 (III) のものである、<3>に記載の抗体-薬物コンジュゲート、

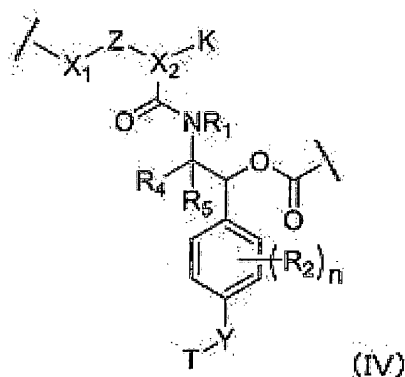
並びにその薬学的に許容される塩。

<5>

L が式 (IV) のリンカー-A-W-に対応し、

【化3】

20



30

式中、

X_1 は、コネクタ単位であり、

Z は、任意のスペーサであり、

X_2 は、コネクタ単位であり、

K は、好ましくはポリサルコシン及びポリエチレングリコールから選択される、任意選択の疎水性マスキング実体であり、

R_1 は、 H 、 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニルからなる群から選択され、場合により置換されたポリエーテル、6～10個の環原子を有するアリール、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、3～10個の環原子を有するヘテロシクロアルキル、5～10個の環原子を有するヘテロアリール、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択され、

40

前記アルキル及びアルケニルは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NR''-$ 、 $-C(O)NR''-$ 、 $-NR''-C(O)-$ 、 $-NR''-C(O)-NR''-$ 、 $-NR''-C(O)O-$ 、 $-O-C(O)NR''-$ 及びトリアゾールから選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、

R_4 は、 H 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル及び $C_2 \sim C_6$ アルケニルからなる群から選択され、

前記アルキル及びアルケニルは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、及び $-NR''-$ から選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断されており、かつ

R_5 は、 H 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル及び $C_2 \sim C_6$ アルケニルからなる群から選択され、前

50

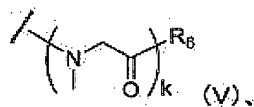
記アルキル及びアルケニルは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、及び $-NR''-$ から選択される1つ以上のヘテロ原子又は化学基によって場合により中断される、

<4>に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

<6>

Kが、好ましくは以下の式(V)のポリサルコシンであり、

【化4】



式中、kは2~50、好ましくは4~30の整数であり、

R_6 はOH又は NH_2 に対応する、

<5>に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

<7>

Tがグルクロニド又はガラクトシドである糖切断可能単位である、<5>~<6>のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

<8>

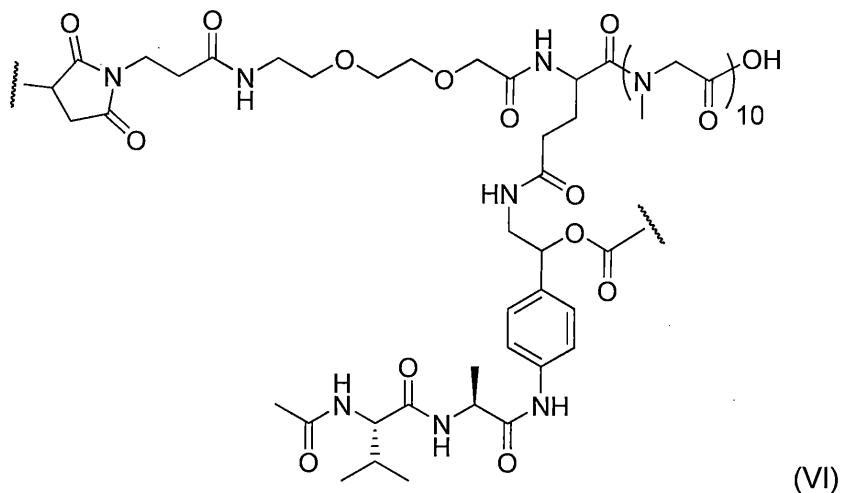
Tが、好ましくはVal-Cit、Val-Ala及びPhe-Lysから選択されるジペプチドである、<5>~<7>のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

<9>

Lが、

式(VI)のリンカーに対応し、

【化5】



(VI)

Lは前記抗体の1つ以上のチオール残基に共有結合している、

<1>~<3>のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

<10>

下記式(VII)に対応し、

10

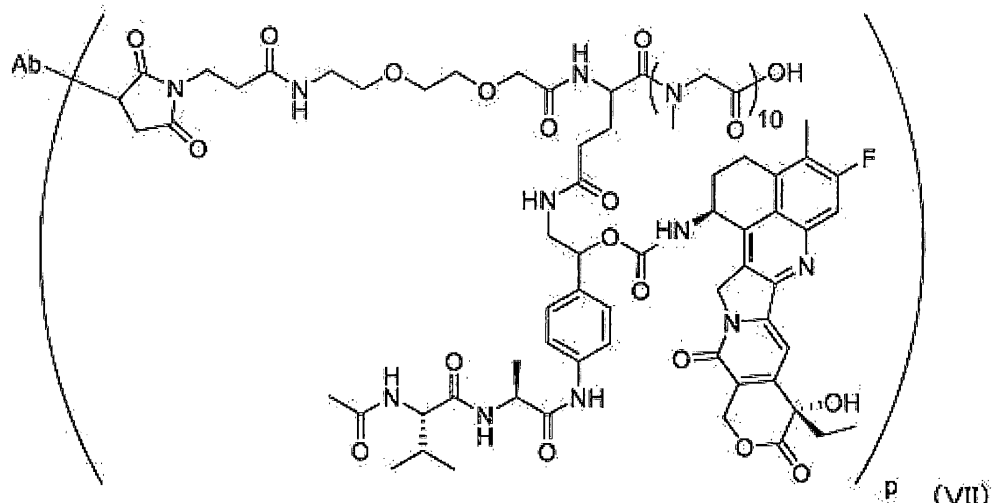
20

30

40

50

【化 6】



10

式中、A bは、典型的にはI g G 1 F c定常領域のロイシン234及びロイシン235におけるアラニン置換を含む、抗F R α抗体、例えば、ファルレッズマブ、又はそのサイレントI g G 1バリエーションであり、pは4～8である、

<1>～<9>のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

20

<11>

A bが、以下のいずれか：

(i) 配列番号1のH C D R 1、配列番号2のH C D R 2、配列番号3のH C D R 3を含む可変重鎖ポリペプチド、並びに配列番号4のL C D R 1、配列番号5のL C D R 2及び配列番号6のL C D R 3を含む可変軽鎖ポリペプチド；又は

(i i) 配列番号7のV Hを含む可変重鎖ポリペプチド及び配列番号8のV Lを含む可変軽鎖ポリペプチド

を含む抗F R α抗体である、<1>～<10>のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

<12>

30

(i) A bは、

・配列番号1のH C D R 1、配列番号2のH C D R 2、配列番号3のH C D R 3を含む可変重鎖ポリペプチド及び

・配列番号4のL C D R 1、配列番号5のL C D R 2及び配列番号6のL C D R 3を含む可変軽鎖ポリペプチド；

を含む、抗葉酸受容体アルファ抗体又はその抗原結合断片であり、

(i i) Lは、式-A-W-の切断可能なリンカーであり、式中、Aは、A bに連結された任意のストレッチャ単位であり、Wは、Dに連結された切断可能な部分であり、

(i i i) Dは、トポイソメラーゼIの阻害剤、例えば、エキサテカンであり、及び

(i v) pは、1～8、好ましくは4～8、より好ましくは約8である、

40

<1>～<11>のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

<13>

医薬品として使用するための、好ましくは腫瘍の治療を必要とする対象において腫瘍、例えば固形腫瘍、より具体的には卵巣癌、乳癌、肺癌、又は中皮腫からなる群から選択される腫瘍の治療に使用するための、<1>～<12>のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

<14>

卵巣癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌からなる群から選択される、癌の治療を必要とする対象における癌の治療に使用するための、<1>～<12>のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

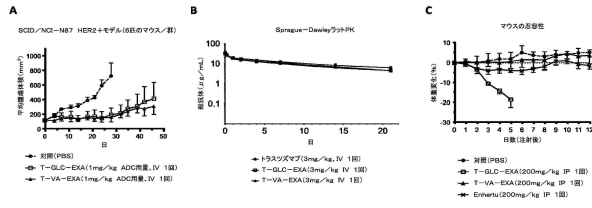
50

< 1 5 >

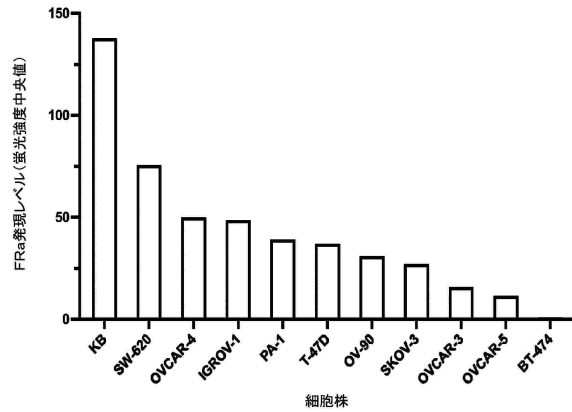
< 1 > ~ < 1 2 > のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲートを、場合により他の活性成分を含む 1 つ以上の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又は担体と組み合わせて含む医薬組成物。

【図面】

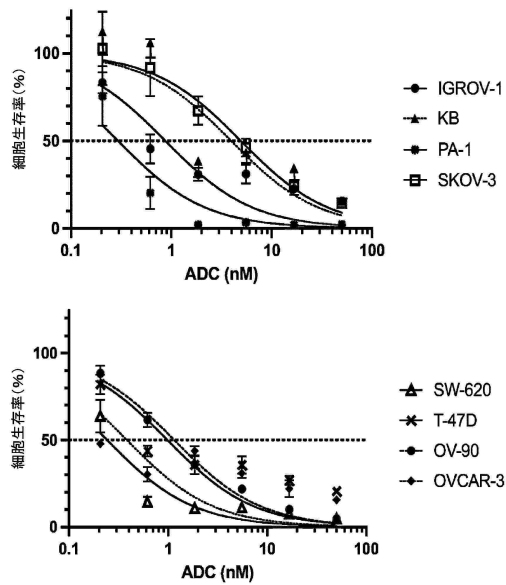
【図 1】



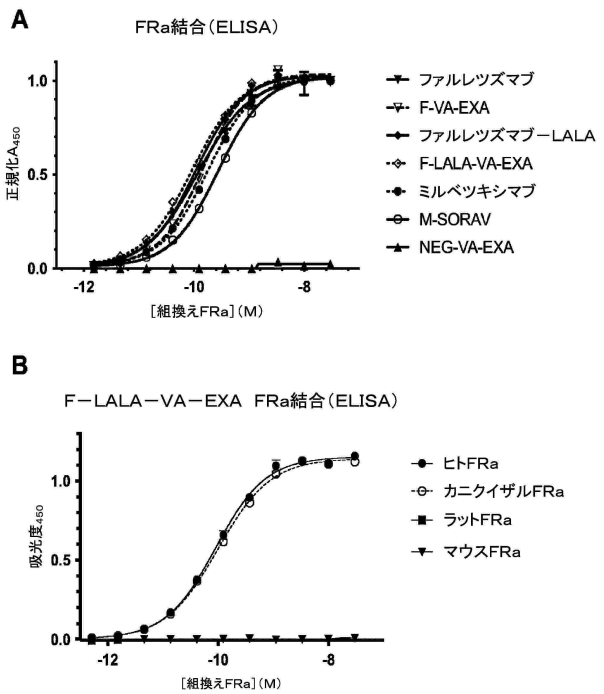
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

20

30

40

50

【図 5】

	k_a (1/M.s)	s.d. k_a (1/M.s)	k_d (1/s)	s.d. k_d (1/s)	K_D (M)	s.d. K_D (M)
ミルベツキシマブ	1.15×10^6	2.12×10^3	2.44×10^{-4}	2.83×10^{-7}	2.11×10^{-10}	7.01×10^{-14}
M-SORAV	1.26×10^6	4.24×10^3	3.27×10^{-4}	1.70×10^{-6}	2.60×10^{-10}	4.95×10^{-13}
ファルレツズマブ	1.90×10^6	1.73×10^6	3.61×10^{-2}	1.81×10^{-2}	2.51×10^{-8}	1.33×10^{-8}
F-VA-EXA	1.00×10^6	0.06×10^6	3.06×10^{-2}	0.03×10^{-2}	3.09×10^{-8}	0.02×10^{-8}
ファルレツズマブー LALA	1.34×10^6	0.58×10^6	3.21×10^{-2}	0.48×10^{-2}	2.55×10^{-8}	0.75×10^{-8}
F-LALA-VA-EXA	1.33×10^6	0.02×10^6	3.68×10^{-2}	0.13×10^{-2}	2.78×10^{-8}	0.07×10^{-8}
NEG CTRL SINO BIO LOGICALS、 カタログ番号HG1K	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NEG-VA-EXA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

k_a : 会合速度定数、反復にわたって計算された平均

s. d. k_a : 会合速度定数の標準偏差

k_d : 解離速度定数、反復にわたって計算された平均

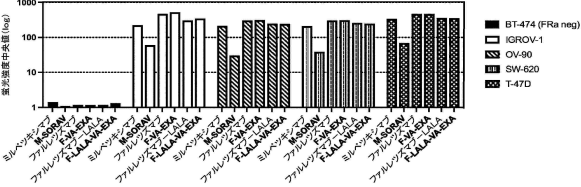
s. d. k_d : 解離速度定数の標準偏差

K_D : 親和定数、 k_d/k_a として計算

s. d. K_D : 親和定数の標準偏差

n. d. 未決定

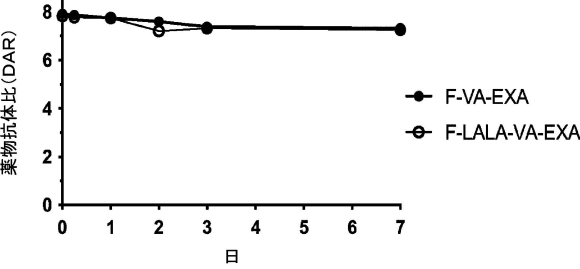
【図 6】



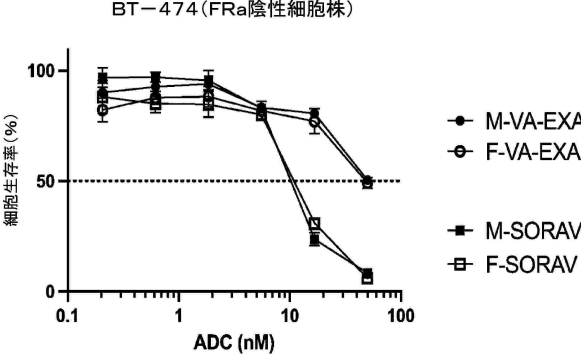
10

20

【図 7】



【図 8】

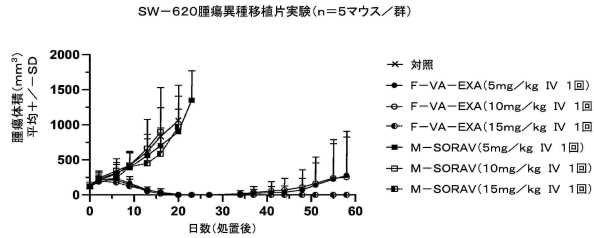


30

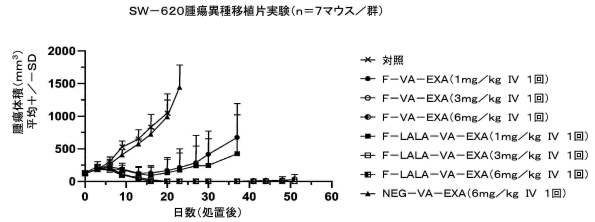
40

50

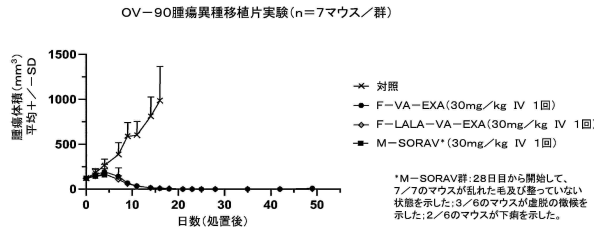
【図 9】



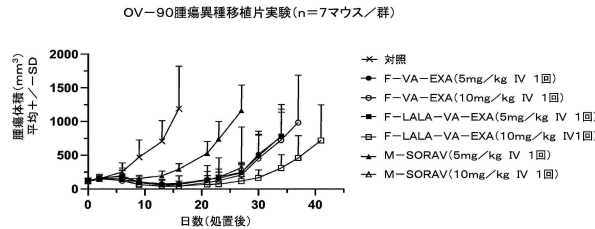
【図 10】



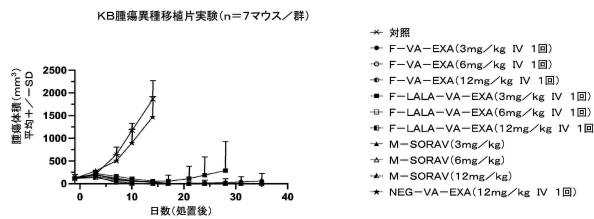
【図 11】



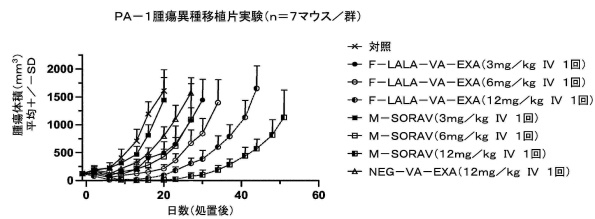
【図 12】



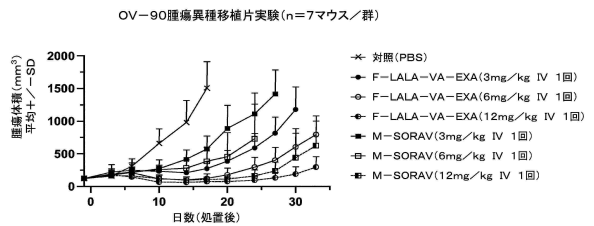
【図 13】



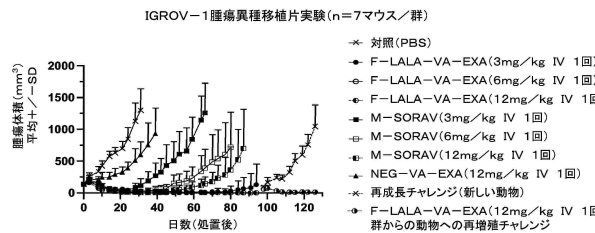
【図 14】



【図 15】



【図 16】



10

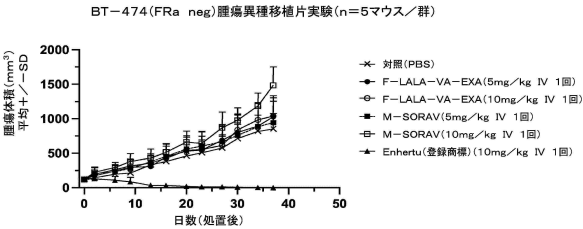
20

30

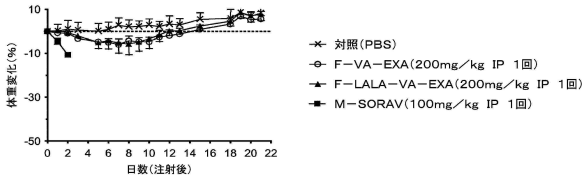
40

50

【図 17】

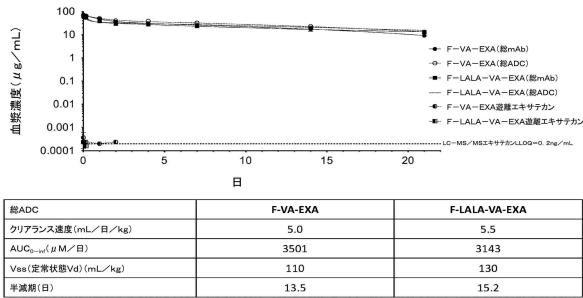


【図 18】



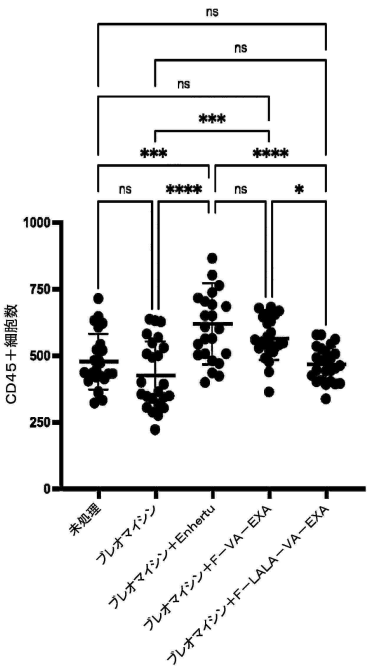
	対照 (PBS)	F-VA-EXA (200 mg/kg)	F-LALA-VA-EXA (200 mg/kg)	M-SORAV (100 mg/kg)
死亡	なし	なし	なし	5/5の死亡 (2日目及び3日目)
致死量 (mg/kg)	N/A	>200 mg/kg	>200 mg/kg	<100 mg/kg
観察された毒性	なし	なし	軽度の下痢を有する1匹の 動物を除いてなし	下痢、虚脱、乱れた毛を 有する乱れた外観、 抑えた挙動、閉眼

【図 19】



総ADC	F-VA-EXA	F-LALA-VA-EXA
クリアランス速度 (mL/kg/日)	5.0	5.5
AUC ₀₋₂₄ (μM/日)	3501	3143
Vss (定常状態Vd) (mL/kg)	110	130
半減期 (日)	13.5	15.2

【図 20】



10

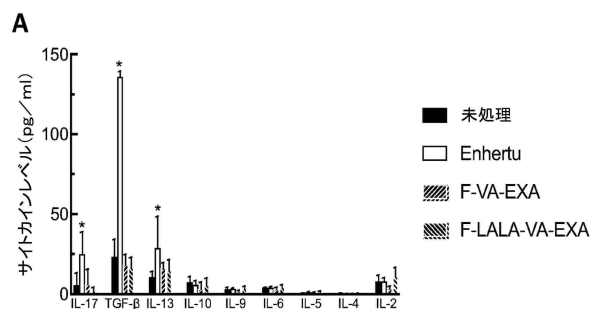
20

30

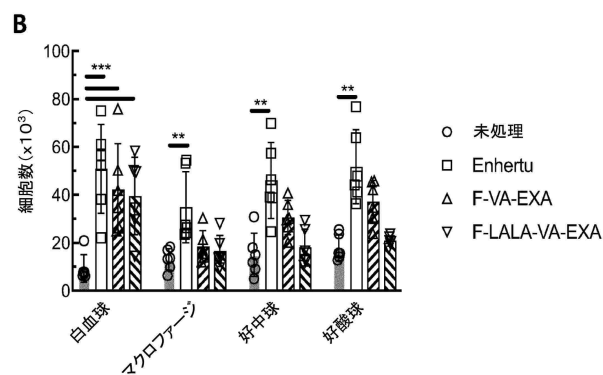
40

50

【図 2 1】



【圖 22】

[illegible]

【配列表】

0007706668000001.xml

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/60	(2017.01)	A 6 1 K	47/60	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
C 0 7 K	7/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	7/00	
			C 0 7 K	19/00	Z N A

ルス, シェミン デ ブルイエレス 2 4

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献

特表 2 0 1 9 - 5 1 6 6 6 4 (J P, A)

特表 2 0 2 0 - 5 3 4 2 7 8 (J P, A)

国際公開第 2 0 2 1 / 0 5 2 4 0 2 (W O, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)