

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-506768

(P2025-506768A)

(43)公表日 令和7年3月13日(2025.3.13)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 0 7 K	2/00 (2006.01)	C 0 7 K	2/00	Z N A	4 B 0 6 4
A 6 1 K	47/65 (2017.01)	A 6 1 K	47/65		4 C 0 7 6
A 6 1 K	38/19 (2006.01)	A 6 1 K	38/19		4 C 0 8 4
A 6 1 K	38/18 (2006.01)	A 6 1 K	38/18		4 C 0 8 5
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12		4 C 0 8 6
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全110頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-549592(P2024-549592)	(71)出願人	523096827
(86)(22)出願日	令和5年2月22日(2023.2.22)		アラリス バイオテック アーゲー
(85)翻訳文提出日	令和6年10月17日(2024.10.17)		スイス国 8 8 0 4 アウ, リートホー
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/054455		フシュトラーセ 1 1
(87)国際公開番号	WO2023/161291	(74)代理人	100136629
(87)国際公開日	令和5年8月31日(2023.8.31)		弁理士 鎌田 光宣
(31)優先権主張番号	22158100.2	(74)代理人	100080791
(32)優先日	令和4年2月22日(2022.2.22)		弁理士 高島 一
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	100125070
			弁理士 土井 京子
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV)	(74)代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(74)代理人	100174296
			弁理士 當麻 博文
		(74)代理人	100137729
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 2つ以上のペイロードを含むペプチドリンカー

(57)【要約】

本発明は、(a)第一級アミンを含むアミノ酸残基と(b)2つ以上のペイロードとを含むペプチドリンカーであって、該2つ以上のペイロードの各々が、独立して、(i)該ペプチドリンカーのN末端、(ii)該ペプチドリンカーのC末端、又は(iii)該ペプチドリンカーに含まれるアミノ酸残基の側鎖に結合(attach)することができるペプチドリンカーに関する。更に、本発明は、本発明のペプチドリンカーを含む抗体-ペイロードコンジュゲート、該抗体-ペイロードコンジュゲートを作製する方法、及びその使用に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 第一級アミンを含むアミノ酸残基と、
- b) 2つ以上のペイロードと

を含むペプチドリinkerであって、

前記2つ以上のペイロードの各々を、独立して、

- i) 前記ペプチドリinkerのN末端、
- ii) 前記ペプチドリinkerのC末端、又は
- iii) 前記ペプチドリinkerに含まれるアミノ酸残基の側鎖

に結合 (attach) させることができる、ペプチドリinker。

10

【請求項 2】

前記アミノ酸残基に含まれる前記第一級アミンが、

- a) リジン、リジン誘導体、若しくはリジン模倣体の側鎖における第一級アミン；又は
- b) 構造 $\text{NH}_2 - (\text{Y}) - \text{COOH}$ を有するN末端アミノ酸残基に含まれる第一級アミン

である、請求項 1 に記載のペプチドリinker。

【請求項 3】

Y が $(\text{R}_2\text{C})_n$ であり、n が、1 ~ 20、1 ~ 15、1 ~ 10 の範囲の整数である、請求項 2 に記載のペプチドリinker。

【請求項 4】

各 (R_2C) - モノマーの少なくとも1つのR部分が水素であるか、又は各 (R_2C) - モノマーの両方のR部分が水素である、請求項 3 に記載のペプチドリinker。

20

【請求項 5】

前記リンカーが、25以下、20以下、15以下、14以下、13以下、12以下、11以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下のアミノ酸残基を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のペプチドリinker。

【請求項 6】

前記リンカーが、少なくとも1つのアルギニン及び/又はヒスチジンの残基を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のペプチドリinker。

【請求項 7】

前記リンカーが、前記配列モチーフ RK を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチドリinker。

30

【請求項 8】

前記リンカーが、配列番号 1 ~ 29 又は 82 ~ 93 に記載のアミノ酸配列のいずれか1つを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のペプチドリinker。

【請求項 9】

前記リンカーが、2つ ~ 4つのペイロードを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のペプチドリinker。

【請求項 10】

前記リンカーが、(N → C 方向に) 以下の構造：

[ペイロード 1] - [(Aa)_m - (Lys) - (Aa)_n - (Arg / His) - (Aa)_o] - [ペイロード 2]；(式中、

40

[ペイロード 1] 及び [ペイロード 2] は、ペイロードであり、

(Aa) は、任意のアミノ酸残基であってよく；

m、n、及び o は、0 ~ 10、好ましくは 0 ~ 6、より好ましくは 0 ~ 4 の範囲の整数であってよく；

(Arg) は、アルギニン残基、アルギニン模倣体、又はアルギニン誘導体であってよく；

(His) は、ヒスチジン残基、ヒスチジン模倣体、又はヒスチジン誘導体であってよく

50

(L y s) は、リジン残基、リジン模倣体、又はリジン誘導体である)
 からなるか又は含み、

[ペイロード 1] が、(A a) 又は (L y s) の残基の N 末端に直接又は間接的に結合 (a t t a c h) しており、

[ペイロード 2] が、(A a) 又は (A r g / H i s) の残基の C 末端に直接又は間接的に結合 (a t t a c h) している、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のペプチドリンカー。

【請求項 1 1】

前記 2 つ以上のペイロードのうち少なくとも 1 つが、化学リンカーを介して前記ペプチドリンカーに結合 (a t t a c h) する、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のペプチドリンカー。

10

【請求項 1 2】

前記化学リンカーが、酵素的及び / 又は化学的に切断可能なリンカーである、請求項 1 1 に記載のペプチドリンカー。

【請求項 1 3】

前記化学リンカーが、自壊性リンカーであるか又は自壊性リンカーを含む、請求項 1 1 又は 1 2 に記載のペプチドリンカー。

【請求項 1 4】

前記自壊性リンカーが、

- a) p - アミノベンジルアルコール部分 ; 又は
- b) 2 , 4 - ビス (ヒドロキシメチル) アニリン部分 ; 又は
- c) p - アミノベンジル第四級アンモニウム ; 又は
- d) エチレンジアミンベースの部分 ; 又は
- e) (アミノメチル) ピロリジンベースの部分 ; 又は
- f) アミノメチルベースの部分

20

を含む、請求項 1 3 に記載のペプチドリンカー。

【請求項 1 5】

前記 p - アミノベンジルアルコール部分に含まれるヒドロキシル基が、ペイロードとカルバマートを形成する、請求項 1 4 に記載のペプチドリンカー。

【請求項 1 6】

前記 2 , 4 - ビス (ヒドロキシメチル) アニリン部分に含まれるヒドロキシル基の各々が、ペイロードとカルバマートを形成する、請求項 1 4 に記載のペプチドリンカー。

30

【請求項 1 7】

前記 p - アミノベンジル第四級アンモニウムに含まれる第四級アンモニウムカチオンが、前記ペイロードに含まれるアミンを起源とする、請求項 1 4 に記載のペプチドリンカー。

【請求項 1 8】

前記エチレンジアミンベースの部分又は前記 (アミノメチル) ピロリジンベースの部分に含まれるアミノ基が、ペイロードとカルバマートを形成する、請求項 1 4 に記載のペプチドリンカー。

40

【請求項 1 9】

前記アミノメチルベースの部分に含まれるアミノ基が、ペイロードとヘミアミナル又はチオヘミアミナルを形成する、請求項 1 4 に記載のペプチドリンカー。

【請求項 2 0】

少なくとも 1 つのペイロードが、前記ペプチドリンカーに含まれるアミノ酸残基の側鎖に結合 (a t t a c h) する、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載のペプチドリンカー。

【請求項 2 1】

少なくとも 1 つのペイロードが、グルタミン酸残基、アスパラギン酸残基、トリプトファン残基、システイン残基、リジン残基、チロシン残基、セリン残基、若しくはスレオニ

50

ン残基、又はそれらの各々の誘導体若しくは模倣体の側鎖に結合 (a t t a c h) する、請求項 2 0 に記載のペプチドリンカー。

【請求項 2 2】

前記ペプチドリンカーが、2つのペプチド部分を含み、前記2つのペプチド部分が、それらのN末端アミノ酸残基を介してジカルボン酸リンカー又はその活性化バージョンと接続されている、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のペプチドリンカー。

【請求項 2 3】

前記リンカーが、構造：

[ペイロード 1] - [ペプチド 1] - [ジカルボン酸] - [ペプチド 2] - [ペイロード 2] ; (式中、

10

[ペイロード 1] 及び [ペイロード 2] は、ペイロードであり、

[ペプチド 1] は、第 1 のペプチド部分であり、

[ペプチド 2] は、第 2 のペプチド部分であり、

[ジカルボン酸] は、ジカルボン酸である)

からなるか又は含み、

[ペプチド 1] 及び / 又は [ペプチド 2] のうちの少なくとも 1 つが遊離アミンを含み、好ましくは、前記遊離アミンが、リジン残基、リジン模倣体、又はリジン誘導体の側鎖に含まれ、

[ペプチド 1] の N 末端及び [ペプチド 2] の N 末端が、前記ジカルボン酸を介して接続されており、

20

[ペイロード 1] が、好ましくは化学リンカーを介して [ペプチド 1] の C 末端に結合 (a t t a c h) しており、

[ペイロード 2] が、好ましくは化学リンカーを介して [ペプチド 2] の C 末端に結合 (a t t a c h) している、請求項 2 2 に記載のペプチドリンカー。

【請求項 2 4】

前記ペイロードが、

- ・毒素；
- ・サイトカイン；
- ・成長因子；
- ・放射性核種；
- ・ホルモン；
- ・抗ウイルス剤；
- ・抗菌剤；
- ・蛍光色素；
- ・免疫調節 / 免疫賦活剤；
- ・半減期延長部分；
- ・溶解度増大部分；
- ・ポリマー - 毒素コンジュゲート；
- ・核酸；
- ・ビオチン若しくはストレプトアビジンの部分；
- ・ビタミン；
- ・タンパク質分解剤 (「 P R O T A C 」) ；
- ・受容体のリガンド若しくは基質；
- ・標的結合 (b i n d i n g) 部分；及び / 又は
- ・抗炎症剤

30

40

のうちの少なくとも 1 つである、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載のペプチドリンカー。

【請求項 2 5】

前記毒素が、

- ・ピロロベンゾジアゼピン (例えば、P B D) ；

50

- ・アウリスタチン（例えば、MMAE、MMAF）；
- ・マイタンシノイド（例えば、マイタンシン、DM1、DM4、DM21）；
- ・デュオカルマイシン；
- ・ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ（NAMPT）阻害剤；
- ・ツブリシン；
- ・エンジン（例えば、カリケアマイシン）；
- ・アントラサイクリン誘導体（PNU）（例えば、ドキシソルピシン）；
- ・ピロールベースのキネシン紡錘体タンパク質（KSP）阻害剤；
- ・クリプトフィシン；
- ・薬物排出ポンプ阻害剤；
- ・サンドラマイシン；
- ・チミジル酸合成酵素阻害剤；
- ・アマニチン（例えば、 α -アマニチン）；及び
- ・カンプトテシン（例えば、エキサテカン、デルクステカン）

10

からなる群から選択される少なくとも1つである、請求項24に記載のペプチドリンカー。

【請求項26】

前記2つ以上のペイロードが、同一である、請求項1～25のいずれか一項に記載のペプチドリンカー。

【請求項27】

前記2つ以上のペイロードのうち少なくとも2つが、互いに異なる、請求項1～25のいずれか一項に記載のペプチドリンカー。

20

【請求項28】

前記リンカーが、トランスグルタミナーゼの基質として機能するのに適している、請求項1～27のいずれか一項に記載のペプチドリンカー。

【請求項29】

請求項1～28のいずれか一項に記載のペプチドリンカーにコンジュゲートしている抗体を含む、抗体-ペイロードコンジュゲート。

【請求項30】

前記ペプチドリンカーが、前記抗体に含まれるグルタミン残基の α -カルボキサミド基と前記ペプチドリンカーのアミノ酸残基に含まれる前記第一級アミンとの間に形成されるイソペプチド結合（bond）を介して前記抗体にコンジュゲートしている、請求項29に記載の抗体-ペイロードコンジュゲート。

30

【請求項31】

前記抗体が、IgG抗体である、請求項29又は30に記載の抗体-ペイロードコンジュゲート。

【請求項32】

前記ペプチドリンカーが、前記抗体のFcドメインに含まれるグルタミン残基にコンジュゲートしている、請求項31に記載の抗体-ペイロードコンジュゲート。

【請求項33】

前記ペプチドリンカーがコンジュゲートする前記グルタミン残基が、IgG抗体のCH₂ドメインのグルタミン残基Q295（EU付番）である、請求項32に記載の抗体-ペイロードコンジュゲート。

40

【請求項34】

前記ペプチドリンカーがコンジュゲートする前記グルタミン残基が、分子工学によって前記抗体の重鎖又は軽鎖に導入されている、請求項31に記載の抗体-ペイロードコンジュゲート。

【請求項35】

分子工学によって前記抗体の重鎖又は軽鎖に導入されている前記グルタミン残基が、アグリコシル化IgG抗体のCH₂ドメインのN297Q（EU付番）である、請求項34

50

に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【請求項 36】

分子工学によって前記抗体の重鎖又は軽鎖に導入されている前記グルタミン残基が、(a) 前記抗体の重鎖若しくは軽鎖に組み込まれている又は (b) 前記抗体の重鎖若しくは軽鎖の N 末端若しくは C 末端に融合しているペプチドに含まれている、請求項 34 に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【請求項 37】

前記 Gln 残基を含む前記ペプチドが、前記抗体の重鎖の C 末端に融合している、請求項 36 に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【請求項 38】

前記 IgG 抗体が、グリコシル化 IgG 抗体である、請求項 31 ~ 34 又は 36 ~ 37 のいずれか一項に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【請求項 39】

前記 IgG 抗体が、前記 C_H2 ドメインの残基 N297 (EU 番号) でグリコシル化されている、請求項 38 に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【請求項 40】

前記抗体が、ブレンツキシマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、イノツズマブ、アベルマブ、セツキシマブ、リツキシマブ、ダラツムマブ、ベルツズマブ、ベドリズマブ、オクレリズマブ、トシリズマブ、ウステキヌマブ、ゴリムマブ、オビヌツズマブ、サシツズマブ、ベランタマブ、ボラツズマブ、エンホルツマブ、エンドレコロマブ、ゲムツズマブ、ロンカスツキシマブ、メクボタマブ、アデカツズマブ、D93、ガチポツズマブ、ラベツズマブ、ツサミタマブ、ウピフィタマブ、リファスツズマブ、ミルベツキシマブ、ソフィツズマブ、アネツマブ、チソツマブ、コフィツズマブ、プラルザタマブ、ラドリアツズマブ、ベランタマブ、パトリツマブ、セツキシマブ、ニモツズマブ、マツズマブ、ポルツズマブ、シタツズマブ、ツコツズマブ、及びエンドレコロマブからなる群から選択される、請求項 29 ~ 39 のいずれか一項に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【請求項 41】

前記抗体が、ブレンツキシマブ、ゲムツズマブ、トラスツズマブ、イノツズマブ、ボラツズマブ、エンホルツマブ、サシツズマブ、及びベランタマブからなる群から選択される、請求項 29 ~ 40 のいずれか一項に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【請求項 42】

前記抗体が、ボラツズマブ、又はトラスツズマブ、又はエンホルツマブである、請求項 29 ~ 41 のいずれか一項に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【請求項 43】

請求項 1 ~ 28 のいずれかに記載のペプチドリンカーを抗体にコンジュゲートするステップを含む、抗体 - ペイロードコンジュゲートを調製する方法。

【請求項 44】

トランスグルタミナーゼ (TG) を用いて 2 つ以上のペイロードを含むペプチドリンカーを抗体にコンジュゲートさせる方法であって、a) 前記抗体、前記ペプチドリンカー、及び前記 TG を流体内で混合し、それにより前記 TG の触媒作用下において 1 段階で前記リンカー - ペイロードを前記抗体にコンジュゲートさせることと、b) ステップ a) で得られたコンジュゲートを前記流体から抽出することと、を含む方法。

【請求項 45】

前記ペプチドリンカーが、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載のペプチドリンカーである、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記ペプチドリンカーが、前記ペプチドリンカーのアミノ酸残基に含まれる第一級アミンを介して、前記抗体中に含まれるグルタミン残基にコンジュゲートする、請求項 44 又は 45 に記載の方法。

【請求項 47】

10

20

30

40

50

前記抗体が、抗体断片である、請求項 4 3 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記抗体が、I g A、I g D、I g E、I g G、又は I g M の抗体である、請求項 4 3 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記ペプチドリンカーが、前記抗体の F c ドメインに含まれるグルタミン残基にコンジュゲートする、請求項 4 3 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記ペプチドリンカーがコンジュゲートする前記グルタミン残基が、I g G 抗体の C_H 2 ドメインのグルタミン残基 Q 2 9 5 (E U 付番) である、請求項 4 3 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 5 1】

前記ペプチドリンカーがコンジュゲートする前記グルタミン残基が、分子工学によって前記抗体の重鎖又は軽鎖に導入されている、請求項 4 3 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

分子工学によって前記抗体の重鎖又は軽鎖に導入されている前記グルタミン残基が、アグリコシル化 I g G 抗体の C_H 2 ドメインの N 2 9 7 Q (E U 付番) である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

分子工学によって前記抗体の重鎖又は軽鎖に導入されている前記グルタミン残基が、(a) 前記抗体の重鎖若しくは軽鎖に組み込まれている又は (b) 前記抗体の重鎖若しくは軽鎖の N 末端若しくは C 末端に融合しているペプチドに含まれている、請求項 5 2 に記載の方法。

20

【請求項 5 4】

前記 G 1 n 残基を含む前記ペプチドが、前記抗体の重鎖の C 末端に融合している、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記抗体が、グリコシル化 I g G 抗体である、請求項 4 3 ~ 5 1 又は 5 3 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 5 6】

前記 I g G 抗体が、前記 C_H 2 ドメインの残基 N 2 9 7 (E U 番号) でグリコシル化されている、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記抗体が、ブレンツキシマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、イノツズマブ、アベルマブ、セツキシマブ、リツキシマブ、ダラツムマブ、ベルツズマブ、ベドリズマブ、オクレリズマブ、トシリズマブ、ウステキヌマブ、ゴリムマブ、オビヌツズマブ、サシツズマブ、ベランタマブ、ポラツズマブ、エンホルツマブ、エンドレコロマブ、ゲムツズマブ、ロンカスツキシマブ、メクボタマブ、アデカツズマブ、D 9 3、ガチポツズマブ、ラベツズマブ、ツサミタマブ、ウピフィタマブ、リファスツズマブ、ミルベツキシマブ、ソフイツズマブ、アネツマブ、チソツマブ、コフィツズマブ、プラルザタマブ、ラドリアツズマブ、ベランタマブ、パトリツマブ、セツキシマブ、ニモツズマブ、マツズマブ、ポルツズマブ、シタツズマブ、ツコツズマブ、及びエンドレコロマブからなる群から選択される、請求項 4 3 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 5 8】

前記抗体が、ブレンツキシマブ、ゲムツズマブ、トラスツズマブ、イノツズマブ、ポラツズマブ、エンホルツマブ、サシツズマブ、及びベランタマブからなる群から選択される、請求項 4 3 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記抗体が、ポラツズマブ、又はトラスツズマブ、又はエンホルツマブである、請求項

50

43～58のいずれか一項に記載の方法。

【請求項60】

前記ペプチドリンカーが、前記抗体に含まれるGln残基の α -カルボキサミド基にコンジュゲートする、請求項43～59のいずれか一項に記載の方法。

【請求項61】

前記ペプチドリンカーが、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、又は95%のコンジュゲーション効率でグリコシル化抗体にコンジュゲーションするのに適している、請求項43～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項62】

前記トランスグルタミナーゼが、微生物トランスグルタミナーゼ(MTG)である、請求項43～61のいずれか一項に記載の方法。

【請求項63】

前記微生物トランスグルタミナーゼが、ストレプトマイセス属の種、特にストレプトマイセス・モバラエンシス(*Streptomyces mobaraensis*)に由来する、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

前記抗体を2～100モル当量のリンカーと接触させる、請求項43～63のいずれか一項に記載の方法。

【請求項65】

前記抗体が、0.1～50mg/mLの濃度で前記コンジュゲーション反応に添加される、請求項43～64のいずれか一項に記載の方法。

【請求項66】

前記トランスグルタミナーゼが、200U/mg抗体未満の濃度で前記コンジュゲーション反応に添加される、請求項43～65のいずれか一項に記載の方法。

【請求項67】

前記コンジュゲーション反応が、緩衝溶液中で実施される、請求項43～66のいずれか一項に記載の方法。

【請求項68】

前記緩衝溶液が、

a) 5～10の範囲のpH；及び/又は

b) 10～1000mMの範囲の緩衝液濃度；及び/又は

c) 250mM未満の範囲の塩濃度

を含む、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

請求項43～68のいずれか一項に記載の方法で生成された抗体-ペイロードコンジュゲート。

【請求項70】

請求項29～42又は請求項69のいずれか1つに記載の抗体-ペイロードコンジュゲートと、少なくとも1つの薬学的に許容し得る成分と、を含む医薬組成物。

【請求項71】

少なくとも1つの追加の治療的に活性のある剤を含む、請求項70に記載の医薬組成物。

【請求項72】

治療及び/又は診断において使用するための、請求項29～42若しくは請求項69のいずれか一項に記載の抗体-ペイロードコンジュゲート又は請求項70若しくは71に記載の医薬組成物。

【請求項73】

新生物疾患、神経疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、又は感染性疾患
・に罹患している、

10

20

30

40

50

- ・を発症するリスクがある、及び / 又は
- ・と診断された

患者の処置における使用のための、請求項 29 ~ 42 若しくは請求項 69 のいずれか一項に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート又は請求項 68 若しくは 69 に記載の医薬組成物。

【請求項 74】

前記抗体 - ペイロードコンジュゲートがポラツズマブを含み、前記新生物疾患が B 細胞関連がんである、請求項 73 に記載の使用のための抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物。

【請求項 75】

前記 B 細胞関連がんが、非ホジキンリンパ腫であり、特に、前記 B 細胞関連がんが、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫である、請求項 74 に記載の使用のための抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物。

10

【請求項 76】

ベンダムスチン及び / 又はリツキシマブと組み合わせて投与される、請求項 74 又は 75 に記載の使用のための抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物。

【請求項 77】

前記抗体 - ペイロードコンジュゲートが、トラスツズマブを含み、前記新生物疾患が、HER2 陽性がん、特に HER2 陽性の乳がん、胃がん、卵巣がん、又は肺がんである、請求項 73 に記載の使用のための抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物。

20

【請求項 78】

ラパチニブ、カペシタピン、及び / 又はタキサンと組み合わせて投与される、請求項 77 に記載の使用のための抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物。

【請求項 79】

前記抗体 - ペイロードコンジュゲートが、エンホルツマブ又はエンホルツマブバリアントを含み、前記新生物疾患が、ネクチン - 4 陽性がん、特にネクチン - 4 陽性の膵臓がん、肺がん、膀胱がん、又は乳がんである、請求項 73 に記載の使用のための抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物。

【請求項 80】

白金系 (platinum-based) 化学療法剤及び / 又はペンブロリズマブと組み合わせて投与される、請求項 79 に記載の使用のための抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物。

30

【請求項 81】

新生物疾患、神経疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、又は感染性疾患

- ・に罹患している、
- ・を発症するリスクがある、及び / 又は
- ・と診断された

患者を処置するための医薬を製造するための、請求項 29 ~ 42 若しくは請求項 69 のいずれか一項に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート又は請求項 70 若しくは 71 に記載の医薬組成物の使用。

40

【請求項 82】

新生物疾患を処置又は予防する方法であって、請求項 29 ~ 42 若しくは請求項 69 のいずれか一項に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート又は請求項 70 若しくは 72 に記載の医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

本発明は、トランスグルタミナーゼを用いて抗体 - ペイロードコンジュゲートを作製する方法に関する。本発明は更に、抗体 - ペイロードコンジュゲートを作製するための、2 つ以上のペイロードを含むペプチドリンカーを提供する。更に、本発明の抗体 - ペイロー

50

ドコンジュゲートを含む医薬組成物及びその使用も包含される。

【0002】

抗体ベースの治療薬は、がん及び免疫疾患等の様々な疾患の標的治療において重要な役割を果たしている。近年、薬物を標的部位に有効に送達するために、抗体薬物複合体（ADC）が広く研究されている。多くのADCが印象的な抗がん活性を示す一方で、多くの患者がこれら処置（treatment）に応答しなかったり、有効性の兆候が現れる前に重度の副作用を経験したり、一定期間後に再発を経験したりするため、好ましい薬物様特性を有し、薬物開発を支援するために十分な量及び質を合理的なコストで生産することができ、治療薬として好適な新規ADCフォーマットに対する医療上のニーズは依然として大きい。

10

【0003】

ADCの調製における重要なステップは、ペイロードの抗体への共有結合性コンジュゲートステップである。現在臨床開発されているほとんどのADCは、平均薬物対抗体比（DAR）が3.5～4.0の範囲になるように平均修飾度を慎重に制御しながら、抗体の内因性のリジン又はシステインの残基にコンジュゲートさせることによって作製されている。更に最近では、DARが7～8であるADCが著しく改善された有効性を示したが、それははるかにより毒性の高いペイロードを腫瘍部位に送達するためである（Ogita et al., 2016, Clin Cancer Res, 22(20): 5097-5108）。

【0004】

酵素的コンジュゲーションが大きな関心を集めているが、その理由は、これらコンジュゲーション反応が通常迅速であり、部位特異的であり、かつ生理学的条件下で行うことができるためである。利用可能な酵素の中でも、ストレプトマイセス・モバラエンシス（Streptomyces mobaraensis）という種由来の微生物トランスグルタミナーゼ（MTG）は、抗体を含む機能性部分の従来の化学的タンパク質コンジュゲーションに代わる魅力的な選択肢として関心が高まっている。MTGは、生理学的条件下において、タンパク質又はペプチドの「反応性」グルタミンとタンパク質又はペプチドの「反応性」リジン残基との間のトランスアミド化反応を触媒するが、後者は5-アミノペンチル基等の単純で低分子量の第一級アミンであってもよい（Jeger et al., 2010, Angew. Chem. Int. Ed., 49, 9995-9997）。

20

30

【0005】

ヒトアイソタイプの完全長IgG抗体は、重鎖の295位に保存されたグルタミン残基（Q295）を含有する。このグルタミン295残基はN-グリコシル化部位（N297）に近接しているため、一般には、抗体がN-グリコシル化されると完全長抗体のQ295はTGaseにアクセスできなくなると考えられていた。完全長抗体にTGaseを作用させるためには、TGaseを介したコンジュゲーションの前に、抗体のFc領域を脱グリコシル化又は変異させてN-グリコシル化部位を除去していた。しかし、Jegerらは、トランスグルタミナーゼを酵素として用いる抗体のコンジュゲーションはQ295残基で起こり、PNGase Fでアスパラギン残基297（N297）のグリカン部分を除去した際にのみコンジュゲーションが可能であるが、グリコシル化抗体を効率的にコンジュゲートすることはできなかった（コンジュゲーション効率20%未満）と記載している（Jeger et al., 2010, Angew. Chem. Int. Ed., 49, 9995-9997; Mindt et al., 2008, Biocomb Chem, 9, 271-278）。

40

【0006】

あるいは、受容体グルタミン部位を提供するために、グルタミン含有配列「タグ」を抗体の軽鎖又は重鎖に挿入していた（例えば、国際公開第2012/059882号参照）。従って、歴史的に、部位特異的ADC技術は、免疫原性及びインビボでの不安定性をも

50

たらず可能性のある人工抗体変異体に依存していた。

【0007】

Hu及びAllenは、人工トランスグルタミナーゼを用いて、ネイティブなグリコシル化抗体のQ295でコンジュゲーションを達成できることを見出した（国際公開第2015/191883号）。実際、著者らは、野生型トランスグルタミナーゼと比較して、人工トランスグルタミナーゼを用いた方がコンジュゲーション効率が高いことを示した。

【0008】

更に最近では、Spycherらによって、ペイロードをコンジュゲートするために抗体を事前に脱グリコシル化する必要のない野生型トランスグルタミナーゼベースのコンジュゲーションアプローチが開示された（Spycherら、国際公開第2019/057772号及び国際公開第2019/188061号）。驚くべきことに、Spycherらは、リジン又はグリシンベースのリンカーを用いて高いコンジュゲーション効率を示すことができた。

10

【0009】

概略的には、Hu及びAllen（国際公開第2015/191883号）並びにSpycherら（国際公開第2019/057772号及び国際公開第2020/188061号）には、2段階及び1段階のコンジュゲーションアプローチが記載されている。しかし、Hu及びAllenもSpycherらも、1段階で2つ以上のペイロードを含むリンカーをネイティブなグリコシル化抗体にコンジュゲートすることを実験的に実証してはいない。対照的に、DAR4 ADCを得るためには、第1段階で2つの官能基を含むリンカーを抗体にコンジュゲートさせ、次いで第2段階でペイロードを抗体-リンカーコンジュゲートに化学的に結合（couple）させる2段階プロセスが必要であると推論されていた。具体的には、2つ以上のペイロードを含むリンカーを1段階で抗体に直接コンジュゲートすることは、トランスグルタミナーゼの結合（binding）ポケットにおける立体障害のため非効率的であろうと仮定されていた。別の懸念は、2つ以上のペイロードを含むリンカーは溶解性が低く、凝集しやすいと報告されていることであった。

20

【0010】

更に最近、ある研究グループが、野生型トランスグルタミナーゼを用いたDAR4 ADCの調製について報告した（Yamazaki et al., 2021, Nat Comm）。ADCの合成には、抗体のリエンジニアリング（N297をアラニンに変異させることによって、アスパラギン残基297のグリカン部分を除去する）及び2段階化学酵素的アプローチの両方を必要としており、このことは、DAR4 ADCを単純な1段階プロセスで得ることが困難であることを更に示している。

30

【0011】

製造の観点からは、1段階プロセスが明らかに好ましい。残念ながら、ネイティブなグリコシル化抗体と2つ以上のペイロードを含むリンカーとの効率的なコンジュゲーションは、これまでのところ達成されていない。その結果、2つのネイティブなグリコシル化抗体に効率的にコンジュゲートすることができる2つ以上のペイロードを含むリンカーが、当技術分野において必要とされている。

【0012】

従って、本発明が目的とする技術的課題は、ネイティブなグリコシル化抗体に効率的にコンジュゲートするための2つ以上のペイロードを含むリンカーを提供することとすることができる。

40

【発明の概要】

【0013】

本発明は、本明細書で提供される実施形態及び特許請求の範囲において特徴付けられる。具体的には、本発明は、とりわけ以下の実施形態に関する：

1.

a) 第一級アミンを含むアミノ酸残基と、

b) 2つ以上のペイロードと

50

を含むペプチドリinkerであって、

該2つ以上のペイロードの各々を、独立して、

- i) 該ペプチドリinkerのN末端、
- ii) 該ペプチドリinkerのC末端、又は
- iii) 該ペプチドリinkerに含まれるアミノ酸残基の側鎖

に結合 (attach) させることができる、ペプチドリinker。

【0014】

2. 該アミノ酸残基に含まれる該第一級アミンが、

- a) リジン、リジン誘導体、若しくはリジン模倣体の側鎖における第一級アミン；又は
- b) 構造 $\text{NH}_2 - (\text{Y}) - \text{COOH}$ を有するN末端アミノ酸残基に含まれる第一級アミ

10

ン

である、実施形態1に記載のペプチドリinker。

【0015】

3. Yが $(\text{R}_2\text{C})_n$ であり、nが、1~20、1~15、1~10の範囲の整数である、実施形態2に記載のペプチドリinker。

【0016】

4. 各 (R_2C) - モノマーの少なくとも1つのR部分が水素であるか、又は各 (R_2C) - モノマーの両方のR部分が水素である、実施形態3に記載のペプチドリinker。

【0017】

5. 該リンカーが、25以下、20以下、15以下、14以下、13以下、12以下、11以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下のアミノ酸残基を含む、実施形態1~4のいずれか1つに記載のペプチドリinker。

20

【0018】

6. 該リンカーが、少なくとも1つのアルギニン及び/又はヒスチジンの残基を含む、実施形態1~5のいずれか1つに記載のペプチドリinker。

【0019】

7. 該リンカーが、該配列モチーフRKを含む、実施形態1~6のいずれか1つに記載のペプチドリinker。

【0020】

8. 該リンカーが、配列番号1~29に記載のアミノ酸配列のいずれか1つを含む、実施形態1~7のいずれか1つに記載のペプチドリinker。

30

【0021】

9. 該リンカーが、2つ~4つのペイロードを含む、実施形態1~8のいずれか1つに記載のペプチドリinker。

【0022】

10. 該2つ以上のペイロードのうちの少なくとも1つが、化学リンカーを介して該ペプチドリinkerに結合 (attach) する、実施形態1~9のいずれか1つに記載のペプチドリinker。

【0023】

11. 該化学リンカーが、酵素的及び/又は化学的に切断可能なリンカーである、実施形態10に記載のペプチドリinker。

40

【0024】

12. 該化学リンカーが、自壊性リンカーであるか又は自壊性リンカーを含む、実施形態10又は11に記載のペプチドリinker。

【0025】

13. 該自壊性リンカーが、

- a) p - アミノベンジルアルコール部分；又は
- b) 2, 4 - ビス(ヒドロキシメチル)アニリン部分；又は
- c) p - アミノベンジル第四級アンモニウム；又は

50

- d) エチレンジアミンベースの部分；又は
- e) (アミノメチル)ピロリジンベースの部分；又は
- f) アミノメチルベースの部分

を含む、実施形態 1 2 に記載のペプチドリンカー。

【0026】

14. 該 p - アミノベンジルアルコール部分に含まれるヒドロキシル基が、ペイロードとカルバマートを形成する、実施形態 1 3 に記載のペプチドリンカー。

【0027】

15. 該 2, 4 - ビス(ヒドロキシメチル)アニリン部分に含まれるヒドロキシル基の各々が、ペイロードとカルバマートを形成する、実施形態 1 3 に記載のペプチドリンカー。 10

【0028】

16. 該 p - アミノベンジル第四級アンモニウムに含まれる第四級アンモニウムカチオンが、該ペイロードに含まれるアミンを起源とする、実施形態 1 3 に記載のペプチドリンカー。

【0029】

17. 該エチレンジアミンベースの部分又は該(アミノメチル)ピロリジンベースの部分に含まれるアミノ基が、ペイロードとカルバマートを形成する、実施形態 1 3 に記載のペプチドリンカー。

【0030】

18. 該アミノメチルベースの部分に含まれるアミノ基が、ペイロードとヘミアミナル又はチオヘミアミナルを形成する、実施形態 1 3 に記載のペプチドリンカー。 20

【0031】

19. 少なくとも1つのペイロードが、該ペプチドリンカーに含まれるアミノ酸残基の側鎖に結合(attach)している、実施形態 1 ~ 1 8 のいずれか1つに記載のペプチドリンカー。

【0032】

20. 少なくとも1つのペイロードが、グルタミン酸残基、アスパラギン酸残基、トリプトファン残基、システイン残基、リジン残基、チロシン残基、セリン残基、若しくはスレオニン残基、又はそれらの各々の誘導體若しくは模倣体の側鎖に結合(attach)している、実施形態 1 9 に記載のペプチドリンカー。 30

【0033】

21. 該ペプチドリンカーが、2つのペプチド部分を含み、該2つのペプチド部分が、それらのN末端アミノ酸残基を介してジカルボン酸リンカー又はその活性化バージョンと接続されている、実施形態 1 ~ 2 0 のいずれか1つに記載のペプチドリンカー。

【0034】

22. 該ペイロードが、

- ・毒素；
- ・サイトカイン；
- ・成長因子；
- ・放射性核種；
- ・ホルモン；
- ・抗ウイルス剤；
- ・抗菌剤；
- ・蛍光色素；
- ・免疫調節/免疫賦活剤；
- ・半減期延長部分；
- ・溶解度増大部分；
- ・ポリマー-毒素コンジュゲート；
- ・核酸；

40

50

- ・ビオチン若しくはストレプトアビジンの部分；
- ・ビタミン；
- ・タンパク質分解剤（「P R O T A C」）；
- ・受容体のリガンド若しくは基質；
- ・標的結合（b i n d i n g）部分；及び／又は
- ・抗炎症剤

のうちの少なくとも1つである、実施形態1～21のいずれか1つに記載のペプチドリンカー。

【0035】

23. 前記毒素が、

- ・ピロロベンゾジアゼピン（例えば、P B D）；
- ・アウリスタチン（例えば、M M A E、M M A F）；
- ・マイタンシノイド（例えば、マイタンシン、D M 1、D M 4、D M 2 1）；
- ・デュオカルマイシン；
- ・ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ（N A M P T）阻害剤；
- ・ツブリシン；
- ・エンジン（例えば、カリケアマイシン）；
- ・アントラサイクリン誘導体（P N U）（例えば、ドキシソルピシン）；
- ・ピロールベースのキネシン紡錘体タンパク質（K S P）阻害剤；
- ・クリプトフィシン；
- ・薬物排出ポンプ阻害剤；
- ・サンドラマイシン；
- ・チミジル酸合成酵素阻害剤；
- ・アマニチン（例えば、 α -アマニチン）；及び
- ・カンプトテシン（例えば、エキサテカン、デルクステカン）

からなる群から選択される少なくとも1つである、実施形態22に記載のペプチドリンカー。

【0036】

24. 該2つ以上のペイロードが、同一である、実施形態1～23のいずれか1つに記載のペプチドリンカー。

【0037】

25. 該2つ以上のペイロードのうちの少なくとも2つが、互いに異なる、実施形態1～23のいずれか1つに記載のペプチドリンカー。

【0038】

26. 該リンカーが、トランスグルタミナーゼの基質として機能するのに適している、実施形態1～25のいずれか1つに記載のペプチドリンカー。

【0039】

27. 実施形態1～26のいずれか1つに記載のペプチドリンカーにコンジュゲートしている抗体を含む、抗体-ペイロードコンジュゲート。

【0040】

28. 該ペプチドリンカーが、該抗体に含まれるグルタミン残基の γ -カルボキサミド基と該ペプチドリンカーのアミノ酸残基に含まれる該第一級アミンとの間に形成されるイソペプチド結合（b o n d）を介して該抗体にコンジュゲートしている、実施形態27に記載の抗体-ペイロードコンジュゲート。

【0041】

29. 該抗体が、I g G抗体である、実施形態27又は28に記載の抗体-ペイロードコンジュゲート。

【0042】

30. 該ペプチドリンカーが、該抗体のF cドメインに含まれるグルタミン残基にコンジュゲートしている、実施形態29に記載の抗体-ペイロードコンジュゲート。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

31. 該ペプチドリンカーがコンジュゲートする該グルタミン残基が、I g G 抗体の C_H2 ドメインのグルタミン残基 Q 2 9 5 (E U 付番) である、実施形態 3 0 に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【 0 0 4 4 】

32. 該ペプチドリンカーがコンジュゲートする該グルタミン残基が、分子工学によって該抗体の重鎖又は軽鎖に導入されている、実施形態 2 9 に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【 0 0 4 5 】

33. 分子工学によって該抗体の重鎖又は軽鎖に導入されている該グルタミン残基が、アグリコシル化 I g G 抗体の C_H2 ドメインの N 2 9 7 Q (E U 付番) である、実施形態 3 2 に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。 10

【 0 0 4 6 】

34. 分子工学によって該抗体の重鎖又は軽鎖に導入されている該グルタミン残基が、(a) 該抗体の重鎖若しくは軽鎖に組み込まれている又は (b) 該抗体の重鎖若しくは軽鎖の N 末端若しくは C 末端に融合しているペプチドに含まれている、実施形態 3 2 に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【 0 0 4 7 】

35. 該 G 1 n 残基を含む該ペプチドが、該抗体の重鎖の C 末端に融合している、実施形態 3 4 に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。 20

【 0 0 4 8 】

36. 該 I g G 抗体が、グリコシル化 I g G 抗体である、実施形態 2 9 ~ 3 2 又は 3 4 ~ 3 5 のいずれか 1 つに記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【 0 0 4 9 】

37. 該 I g G 抗体が、該 C_H2 ドメインの残基 N 2 9 7 (E U 番号) でグリコシル化されている、実施形態 3 6 に記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【 0 0 5 0 】

38. 該抗体が、ブレンツキシマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、イノツズマブ、アベルマブ、セツキシマブ、リツキシマブ、ダラツムマブ、ベルツズマブ、ベドリズマブ、オクレリズマブ、トシリズマブ、ウステキヌマブ、ゴリムマブ、オビヌツズマブ、サシツズマブ、ベランタマブ、ポラツズマブ、エンホルツマブ、エンドレコロマブ、ゲムツズマブ、ロンカスツキシマブ、メクボタマブ、アデカツズマブ、D 9 3、ガチポツズマブ、ラベツズマブ、ツサミタマブ、ウピフィタマブ、リファスツズマブ、ミルベツキシマブ、ソフィツズマブ、アネツマブ、チソツマブ、コフィツズマブ、プラルザタマブ、ラドリアツズマブ、ベランタマブ、パトリツマブ、セツキシマブ、ニモツズマブ、マツズマブ、ボルツズマブ、シタツズマブ、ツコツズマブ、及びエンドレコロマブからなる群から選択される、実施形態 2 7 ~ 3 7 のいずれか 1 つに記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。 30

【 0 0 5 1 】

39. 該抗体が、ブレンツキシマブ、ゲムツズマブ、トラスツズマブ、イノツズマブ、ポラツズマブ、エンホルツマブ、サシツズマブ、及びベランタマブからなる群から選択される、実施形態 2 7 ~ 3 8 のいずれか 1 つに記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。 40

【 0 0 5 2 】

40. 該抗体が、ポラツズマブ、又はトラスツズマブ、又はエンホルツマブである、実施形態 2 7 ~ 3 9 のいずれか 1 つに記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【 0 0 5 3 】

41. 実施形態 1 ~ 2 6 のいずれかに記載のペプチドリンカーを抗体にコンジュゲートするステップを含む、抗体 - ペイロードコンジュゲートを調製する方法。

【 0 0 5 4 】

42. トランスグルタミナーゼ (T G) を用いて 2 つ以上のペイロードを含むペプチドリンカーを抗体にコンジュゲートさせる方法であって、 a) 該抗体、該ペプチドリンカー 50

一、及び該 T G を流体内で混合し、それにより該 T G の触媒作用下において 1 段階で該リンカー - ペイロードを該抗体にコンジュゲートさせることと、b) ステップ a) で得られたコンジュゲートを該流体から抽出することと、を含む方法。

【0055】

43. 該ペプチドリンカーが、実施形態 1 ~ 26 のいずれか 1 つに記載のペプチドリンカーである、実施形態 42 に記載の方法。

【0056】

44. 該ペプチドリンカーが、ペプチドリンカーのアミノ酸残基に含まれる第一級アミンを介して、該抗体中に含まれるグルタミン残基にコンジュゲートする、実施形態 42 又は 43 に記載の方法。

【0057】

45. 該抗体が、抗体断片である、実施形態 41 ~ 44 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0058】

46. 該抗体が、I g A、I g D、I g E、I g G、又は I g M の抗体である、実施形態 41 ~ 44 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0059】

47. 該ペプチドリンカーが、該抗体の F c ドメインに含まれるグルタミン残基にコンジュゲートする、実施形態 41 ~ 46 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0060】

48. 該ペプチドリンカーがコンジュゲートする該グルタミン残基が、I g G 抗体の C_H2 ドメインのグルタミン残基 Q295 (E U 付番) である、実施形態 41 ~ 47 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0061】

49. 該ペプチドリンカーがコンジュゲートする該グルタミン残基が、分子工学によって該抗体の重鎖又は軽鎖に導入されている、実施形態 41 ~ 47 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0062】

50. 分子工学によって該抗体の重鎖又は軽鎖に導入されている該グルタミン残基が、アグリコシル化 I g G 抗体の C_H2 ドメインの N297Q (E U 付番) である、実施形態 49 に記載の方法。

【0063】

51. 分子工学によって該抗体の重鎖又は軽鎖に導入されている該グルタミン残基が、(a) 該抗体の重鎖若しくは軽鎖に組み込まれている又は (b) 該抗体の重鎖若しくは軽鎖の N 末端若しくは C 末端に融合しているペプチドに含まれている、実施形態 50 に記載の方法。

【0064】

52. 該 Gln 残基を含む該ペプチドが、該抗体の重鎖の C 末端に融合している、実施形態 51 に記載の方法。

【0065】

53. 該抗体が、グリコシル化 I g G 抗体である、実施形態 41 ~ 49 又は 51 ~ 52 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0066】

54. 該 I g G 抗体が、該 C_H2 ドメインの残基 N297 (E U 番号) でグリコシル化されている、実施形態 53 に記載の方法。

【0067】

55. 該抗体が、ブレンツキシマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、イノツズマブ、アベルマブ、セツキシマブ、リツキシマブ、ダラツムマブ、ベルツズマブ、ベドリズマブ、オクレリズマブ、トシリズマブ、ウステキヌマブ、ゴリムマブ、オビヌツズマブ、サシツズマブ、ベランタマブ、ボラツズマブ、エンホルツマブ、エンドレコロマブ、ゲムツズマブ、ロンカスツキシマブ、メクボタマブ、アデカツズマブ、D93、ガチポツズマブ

10

20

30

40

50

、ラベツズマブ、ツサミタマブ、ウピフィタマブ、リファスツズマブ、ミルベツキシマブ、ソフィツズマブ、アネツマブ、チソツマブ、コフィツズマブ、プラルザタマブ、ラドリアツズマブ、ベランタマブ、パトリツマブ、セツキシマブ、ニモツズマブ、マツズマブ、ボルツズマブ、シタツズマブ、ツコツズマブ、及びエンドレコロマブからなる群から選択される、実施形態 41 ~ 54 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0068】

56. 該抗体が、ブレンツキシマブ、ゲムツズマブ、トラスツズマブ、イノツズマブ、ボラツズマブ、エンホルツマブ、サシツズマブ、及びベランタマブからなる群から選択される、実施形態 41 ~ 55 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0069】

57. 該抗体が、ボラツズマブ、又はトラスツズマブ、又はエンホルツマブである、実施形態 41 ~ 56 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0070】

58. 該ペプチドリinkerが、該抗体に含まれる Gl n 残基の -カルボキサミド基にコンジュゲートする、実施形態 41 ~ 57 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0071】

59. 該ペプチドリinkerが、少なくとも 20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、又は 95% のコンジュゲーション効率でグリコシル化抗体にコンジュゲーションするのに適している、実施形態 41 ~ 58 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0072】

60. 該トランスグルタミナーゼが、微生物トランスグルタミナーゼ (MTG) である、実施形態 41 ~ 59 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0073】

61. 該微生物トランスグルタミナーゼが、ストレプトマイセス属の種、特にストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) に由来する、実施形態 60 に記載の方法。

【0074】

62. 該抗体を 2 ~ 100 モル当量のリンカーと接触させる、実施形態 41 ~ 61 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0075】

63. 該抗体が、0.1 ~ 50 mg/mL の濃度で該コンジュゲーション反応に添加される、実施形態 41 ~ 62 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0076】

64. 該トランスグルタミナーゼが、200 U/mg 抗体未満の濃度で該コンジュゲーション反応に添加される、実施形態 41 ~ 63 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0077】

65. 該コンジュゲーション反応が、緩衝溶液中で実施される、実施形態 41 ~ 64 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0078】

66. 該緩衝溶液が、
 a) 5 ~ 10 の範囲の pH ; 及び / 又は
 b) 10 ~ 1000 mM の範囲の緩衝液濃度 ; 及び / 又は
 c) 250 mM 未満の範囲の塩濃度
 を含む、実施形態 65 に記載の方法。

【0079】

67. 実施形態 41 ~ 66 のいずれか 1 つに記載の方法で生成された抗体 - ペイロードコンジュゲート。

【0080】

68. 実施形態 27 ~ 40 又は実施形態 67 のいずれか 1 つに記載の抗体 - ペイロー

10

20

30

40

50

ドコンジュゲートと、少なくとも1つの薬学的に許容し得る成分と、を含む医薬組成物。

【0081】

69. 少なくとも1つの追加の治療的に活性のある剤を含む、実施形態68に記載の医薬組成物。

【0082】

70. 治療及び/又は診断における使用のための、実施形態27~40若しくは実施形態67のいずれか1つに記載の抗体-ペイロードコンジュゲート又は実施形態68若しくは69に記載の医薬組成物。

【0083】

71. 新生物疾患、神経疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、又は感染性疾患
- ・に罹患している、
 - ・を発症するリスクがある、及び/又は
 - ・と診断された

10

患者の処置における使用のための、実施形態27~40若しくは実施形態67のいずれか1つに記載の抗体-ペイロードコンジュゲート又は実施形態68若しくは69に記載の医薬組成物。

【0084】

72. 該抗体-ペイロードコンジュゲートがポラツズマブを含み、該新生物疾患がB細胞関連がんである、実施形態71に記載の使用のための抗体-ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物。

20

【0085】

73. 該B細胞関連がんが、非ホジキンリンパ腫であり、特に、該B細胞関連がんが、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫である、実施形態72に記載の使用のための抗体-ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物。

【0086】

74. ベンダムスチン及び/又はリツキシマブと組み合わせて投与される、実施形態72又は73に記載の使用のための抗体-ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物。

【0087】

75. 該抗体-ペイロードコンジュゲートが、トラスツズマブを含み、該新生物疾患が、HER2陽性がん、特にHER2陽性の乳がん、胃がん、卵巣がん、又は肺がんである、実施形態71に記載の使用のための抗体-ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物。

30

【0088】

76. ラパチニブ、カペシタピン、及び/又はタキサンと組み合わせて投与される、実施形態75に記載の使用のための抗体-ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物。

【0089】

77. 該抗体-ペイロードコンジュゲートが、エンホルツマブ又はエンホルツマブバリアントを含み、該新生物疾患が、ネクチン-4陽性がん、特にネクチン-4陽性の膵臓がん、肺がん、膀胱がん、又は乳がんである、実施形態71に記載の使用のための抗体-ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物。

40

【0090】

78. 白金系(platinum-based)化学療法剤及び/又はペンプロリズマブと組み合わせて投与される、実施形態77に記載の使用のための抗体-ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物。

【0091】

79. 新生物疾患、神経疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、又は感染性疾患
- ・に罹患している、
 - ・を発症するリスクがある、及び/又は
 - ・と診断された

患者を処置するための医薬を製造するための、実施形態27~40若しくは実施形態67

50

のいずれか1つに記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート又は実施形態68若しくは69に記載の医薬組成物の使用。

【0092】

80. 新生物疾患を処置又は予防する方法であって、実施形態27~40若しくは実施形態67のいずれか1つに記載の抗体 - ペイロードコンジュゲート又は実施形態68若しくは69に記載の医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む方法。

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図1】リンカー-Ac-RKAA-PABC-(MMAE)₂の化学構造。

【図2】リンカー-Ac-RKAA-PABC-PABC-(MMAE)₂の化学構造。 10

【図3】リンカー-MMAE-PABC-AA-C₂-RKAA-PABC-MMAEの化学構造。

【図4】リンカー-Ac-RKAA-PABC-(Exa)₂の化学構造。

【図5】リンカー-Ac-ARK-PABC-(Exa)₂の化学構造。

【図6】リンカー-Ac-RKARA-PABC-(Exa)₂の化学構造。

【図7】リンカー-Ac-RKAAAA-PABC-(Exa)₂の化学構造。

【図8】リンカー-Ac-RKAAAAAA-PABC-(Exa)₂の化学構造。

【図9】リンカー-Ac-RKASGG-PABC-(Exa)₂の化学構造。

【図10】リンカー-Ac-RKHA-PABC-(Exa)₂の化学構造。

【図11】リンカー-Ac-RKHAAPABC-(Exa)₂の化学構造。 20

【図12】リンカー-Ac-HKA-PABC-(Exa)₂の化学構造。

【図13】リンカー-Ac-RKAA-PABC-(G-Exa)₂の化学構造。

【図14】リンカー-Exa-PABC-AA-C₂-RKAA-PABC-Exaの化学構造。

【図15】リンカー-GGR-PABC-(Exa)₂の化学構造。

【図16】リンカー-GGRG-PABC-(G-Exa)₂の化学構造。

【図17】リンカー-Ac-RKAA-PABC-(G-Exa')₂の化学構造。

【図18】リンカー-GGRG-PABC-(G-Exa')₂の化学構造。

【図19】リンカー-Ac-E(A-PABC-MMAE)ARKAA-PABC-(MMAE)₂の化学構造。 30

【図20】リンカー-(MMAE)₂-PABC-AA-C₂-RKAA-PABC-(MMAE)₂の化学構造。

【図21】リンカー-Exa-PABC-AA-C₂-RKAA-PABC-(MMAE)₂の化学構造。

【図22】リンカー-May-C₅-RKA(A-PABC-MMAE)A-EDA-コルチゾールの化学構造。

【図23】リンカー-RhKAA-PABC-(MMAE)₂の化学構造。

【図24】リンカー-NH₂-C₅-GRG-PABC-(MMAE)₂の化学構造。

【図25】リンカー-RKVCit-PABC-PABC-(MMAE)₂の化学構造。

【図26】リンカー-Exa-PABC-RA-C₃-RKAR-PABC-MMAEの化学構造。 40

【図27】クリプトフィシン-AA-C₂-RKVA-クリプトフィシンの化学構造。

【図28】リンカー-KAR-PABC-EDA-BHMC-(MMAF)₂の化学構造。

【図29】リンカー-RK-E(PEG12-FA)AA-PABC-MMAEの化学構造

。

【図30】リンカー-E(AA-AM-Dxd)RKAA-AM-Dxdの化学構造。

【図31】リンカー-cRGD-PEG4-RKAH-PABC-EDA-PNUの化学構造。

【図32】リンカー-ビオチン-RKAN-PABQ-Rifalogの化学構造。

【図33】リンカー-May-RKGGFG-PABC-AMP-AEの化学構造。 50

【図34】リンカーレシキモド - C i t V - C 2 - R K G P - S T I N G の化学構造。

【図35】リンカー C (M a y) - R K A A - A M - M a y の化学構造。

【図36】リンカー K (S M C C - M a y) - R K A A - (V a l C i t - P A B C - M M A E)₂ の化学構造。

【図37】リンカー S (G l y c o) - R K A A - (A A - P A B C - M M A E)₂ の化学構造。

【図38】リンカー E x a - g l u c - C 3 - R K - C 3 - g l u c - E x a の化学構造。

【図39】リンカー D (A A - A M - D x d) - D (A A - A M - D x d) - R K A A - A M - D x d の化学構造。

【図40】リンカー (E (A A - P A B C - G - D x d))₂ R K V C i t - P A B C - P A B C - (G - D x d)₂ の化学構造。

【図41】リンカー N H₂ - P E G 2 - P A B C - (M M A E)₂ の化学構造。

【図42】リンカー M M A E - P A B C - A A - C 2 - K A R - P A B C - M M A E の化学構造。

【図43】リンカー R K N (P A B C - M M A E) A - P A B C - M M A E の化学構造。

【図44】ネクチン - 4 陽性固形腫瘍モデルにおける、ベンチマーク抗体であるエンホルツマブドチンと比較した本発明の2つのDAR4リンカーの抗腫瘍有効性。

【図45】CD79b陽性液状腫瘍モデルにおける本発明の2つのDAR4リンカーの抗腫瘍有効性。

【発明を実施するための形態】

【0094】

すなわち、本発明は、少なくとも部分的には、2つ以上のペイロードを含むペプチドリンカーをネイティブなグリコシル化抗体に効率的にコンジュゲートさせることができるという驚くべき知見に基づいている。添付の実施例から分かるように、少なくとも60%という極めて高い効率で単一の反応ステップにおいて2つ以上のペイロードを含むペプチドリンカーをネイティブなグリコシル化抗体にコンジュゲートさせることができる。更には、80~100%の効率で単一の反応ステップにおいて2つのペイロードを含むペプチドリンカーをネイティブなグリコシル化抗体にコンジュゲートさせることができる。

【0095】

本発明者らが驚いたことに、本発明に係るペプチドリンカーは、30%未満のコンジュゲーション効率しか達成しなかった非ペプチドリンカー（当技術分野で公知のアミノ - P E G リンカー等；実施例9参照）とは対照的に、DAR 4のADCの1段階コンジュゲーションに特によく適していることが判明した。

【0096】

更に驚くべきことに、全てのペプチドリンカーで高いコンジュゲーション効率が達成された。1段階での2つ以上のペイロードを含むリンカーとネイティブなグリコシル化抗体との定量的なコンジュゲーションが報告されたことはないことに留意することが重要である。この観点から、このように高い効率で2つ以上の嵩高いペイロードを含むペプチドリンカーをネイティブなグリコシル化抗体にコンジュゲートさせることができることは、更に驚くべきことであると考えなければならない。

【0097】

これら極めて高いコンジュゲーション効率に加えて、本発明者らは、本発明のペプチドリンカーとコンジュゲートした抗体がインピボで活性を有することを見出した（実施例11参照）。更に、驚くべきことに、そのN末端及びC末端にペイロードを含むペプチドリンカーとコンジュゲートした抗体は、ベンチマーク抗体であるエンホルツマブドチンよりも強い抗腫瘍活性を有するということが判明した。

【0098】

具体的な実施形態においては、本発明は、

a) 第一級アミンを含むアミノ酸残基と、

10

20

30

40

50

b) 2つ以上のペイロードと
 を含むペプチドリンカーであって、
 該2つ以上のペイロードの各々を、独立して、
 i) 該ペプチドリンカーのN末端、
 i i) 該ペプチドリンカーのC末端、又は
 i i i) 該ペプチドリンカーに含まれるアミノ酸残基の側鎖
 に結合 (a t t a c h) させることができる、ペプチドリンカーに関する。

【0099】

従って、本発明は、ペプチド部分に共有的に結合 (a t t a c h) した2つ以上のペイロードを含むペプチドリンカーに関する。従来技術において、薬物対抗体 (D A R) 比 > 4 を有する抗体 - ペイロードコンジュゲートを生成するための2段階アプローチが想定されており、該アプローチでは、第1の段階において2つの反応性基を含むリンカーを微生物トランスグルタミナーゼによってグリコシル化抗体にコンジュゲートさせ、第2の段階においてペイロード分子を抗体 - リンカーコンジュゲートに含まれる反応性基に結合 (a t t a c h) させる (国際公開第2019/057772号及び同第2015/191883号) 。特に、内因性コンジュゲーション部位 Q 2 9 5 へのアクセスが限られていること及びトランスグルタミナーゼの基質結合 (b i n d i n g) ポケットのスペースが限られていることから、単一の反応ステップで毒素等の嵩高いペイロードを含むリンカーをネイティブなグリコシル化抗体にコンジュゲートさせることは困難であると考えられてきた。このように困難であることが知られているにもかかわらず、本発明者らは、驚くべきことに、極めて高いコンジュゲーション効率で2つ以上のペイロードを含む本発明のペプチドリンカーをグリコシル化抗体にコンジュゲートできることを見出した。

【0100】

本発明の意味における「ペプチドリンカー」は、少なくとも2つのアミノ酸残基を含む分子であって、該2つのアミノ酸残基がペプチド結合 (b o n d) を介して結合 (c o u p l e) している分子である。ペプチドリンカーは、微生物トランスグルタミナーゼの基質として適していると想定される。特に、ペプチドリンカーは抗体に含まれるグルタミン残基とのコンジュゲートに適していると想定される。そのため、本発明に係るペプチドリンカーは、第一級アミンを含むアミノ酸残基を少なくとも1つ含んでいなければならない。

【0101】

従って、具体的な実施形態においては、本発明は、アミノ酸残基に含まれる第一級アミンが、

a) リジン、リジン誘導体、若しくはリジン模倣体の側鎖における第一級アミン；又は
 b) 構造 $NH_2 - (Y) - COOH$ を有するN末端アミノ酸残基に含まれる第一級アミンである本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0102】

すなわち、好ましい実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸残基は、リジン残基である。このような実施形態においては、ペプチドリンカーは、少なくとも1つのリジン残基を含むペプチド部分を含む。

【0103】

しかし、本発明に係るリンカーはまた、リジン模倣体又はリジン誘導体を含んでいてもよいが、ただし、該リジン模倣体又はリジン誘導体は、アミノ酸側鎖に遊離第一級アミンを含む。

【0104】

特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸残基は、リジン模倣体であってよい。「リジン模倣体」という用語は、本明細書で使用される場合、リジンとは異なる構造を有するが、リジンと類似の特徴を有し、従って、ペプチド又はタンパク質の機能及び/又は構造を大きく変化させることなく該ペプチド又はタンパク質中のリジンを置き換えるために使用することができる化合物を指す。特定の実施形態においては、リジン模倣

10

20

30

40

50

体は、第一級アミンと α -炭素原子とを接続する脂肪族鎖の長さ又は組成がリジンと異なる場合がある。従って、特定の実施形態においては、リジン模倣体は、オルニチン、ホモリジン、又は2,7-ジアミノヘプタン酸であり得る（ホモリジンを含有する例示的なリンカーを図23に示す）。特定の実施形態においては、リジン模倣体は、 α -ホモリジン等の α -アミノ酸であってもよい。

【0105】

特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸残基は、リジン誘導体であってもよい。「リジン誘導体」という用語は、本明細書で使用される場合、リジン又はリジン模倣体に含まれる1つ以上の官能基が修飾又は置換されているリジン又はリジン模倣体を指す。本発明では、リジン誘導体の側鎖におけるアミノ基は修飾されておらず、その結果、タンパク質におけるグルタミン残基へのコンジュゲーションに利用可能になることが好ましい。従って、本発明のペプチドリンカーに含まれる「リジン誘導体」は、好ましくは、修飾又は置換された α -アミノ基及び β -又は γ -カルボキシル基を含む。

10

【0106】

特定の実施形態においては、アミノ酸残基に含まれる第一級アミンは、構造 $\text{NH}_2 - (\text{Y}) - \text{COOH}$ を有するN末端アミノ酸残基に含まれる第一級アミンであってもよい。

【0107】

特定の実施形態においては、第一級アミンは、 α -アミノ酸の α -アミノ基であってもよい。 α -アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンを含む、任意のタンパク質原性 α -アミノ酸であり得る。

20

【0108】

特に好ましい実施形態においては、第一級アミンは、グリシン残基の α -アミノ基であってもよい。このような実施形態においては、グリシン残基がペプチドリンカーのN末端アミノ酸残基であり、その結果、 α -アミノ基が微生物トランスグルタミナーゼを介したグリシン残基へのコンジュゲーションに利用可能になることが好ましい。

【0109】

第一級アミンを含むアミノ酸は、非標準アミノ酸又は合成アミノ酸であってもよい。「非標準アミノ酸」とは、本発明で使用される場合、タンパク質原性アミノ酸のセットの一部ではないが、天然源から得ることができる任意のアミノ酸であり得る。しかし、一部の非標準アミノ酸は、天然に存在するペプチド及び/又はタンパク質中にみられる場合もあることに留意しなければならない。「合成アミノ酸」は、本発明で使用される場合、アミノ酸 ($\text{NH}_2 - (\text{Y}) - \text{COOH}$) の一般的な定義に該当する、すなわち、アミノ基及びカルボキシル基を含むが、自然界にはみられない任意の分子であり得る。従って、非天然アミノ酸は、化学合成によって得られることが好ましい。非標準アミノ酸と合成アミノ酸との区別は、場合によっては不確実である場合もあることを理解されたい。例えば、合成アミノ酸として定義されたアミノ酸が、後の時点で自然界において同定され、非標準アミノ酸として再分類されることもある。非標準アミノ酸又は合成アミノ酸は、 β -、 γ -、 δ -、 ϵ -、又は ζ -アミノ酸であってもよい。

30

40

【0110】

特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、構造 $\text{NH}_2 - (\text{Y}) - \text{COOH}$ を有し得る。

【0111】

特定の実施形態においては、部分Yは、1~200個の原子の骨格を含む炭素、任意で、1つ以上の原子において置換された少なくとも10個の原子、例えば10~100個の原子又は20~100個の原子の骨格を含む炭素を含んでいてよく、任意で、該骨格を含む炭素は、直鎖状炭化水素であるか、あるいは環状基、対称若しくは非対称に分岐した炭化水素、単糖、二糖、直鎖状若しくは分岐状オリゴ糖（非対称に分岐又は対称に分岐）、他の天然の直鎖状若しくは分岐状オリゴマー（非対称に分岐又は対称に分岐）、又はより

50

一般的には、任意の連鎖成長若しくは段階成長重合プロセスから得られる任意の二量体、三量体、若しくはそれ以上のオリゴマー（直鎖状、非対称に分岐、又は対称に分岐）を含む。

【0112】

Yは、更に、任意の直鎖状、分岐状、及び/又は環状のC₂₋₃₀アルキル、C₂₋₃₀アルケニル、C₂₋₃₀アルキニル、C₂₋₃₀ヘテロアルキル、C₂₋₃₀ヘテロアルケニル、C₂₋₃₀ヘテロアルキニル（任意で、1つ以上の同素環式芳香族化合物ラジカル又は複素環式化合物ラジカルが挿入されていてもよい）；特に、任意の直鎖状若しくは分岐状のC₂₋₅アルキル、C₅₋₁₀アルキル、C₁₁₋₂₀アルキル、-O-C₁₋₅アルキル、-O-C₅₋₁₀アルキル、-O-C₁₁₋₂₀アルキル、又はCH₂-CH₂-O-)₁₋₂₄、又は(CH₂)_{x1}-(CH₂-O-CH₂)₁₋₂₄-(CH₂)_{x2}-基（式中、x1及びx2は、独立して、0~20の範囲から選択される整数である）、アミノ酸、オリゴペプチド、グリカン、サルフェート、ホスフェート、又はカルボキシレートであってよい。幾つかの実施形態においては、Yは、C₂₋₆アルキル基を含み得る。

10

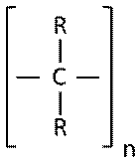
【0113】

特定の実施形態においては、本発明は、Yが-(R₂C)_n-であり、nが1~20、1~15、1~10の範囲の整数である、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

すなわち、Yは、以下の構造を有し得る：

【0114】

【化1】



20

【0115】

特定の実施形態においては、Yは、置換又は非置換のアルキル又はアルケニル鎖であってよい。Yが置換又は非置換のアルケニル鎖である場合、連続する炭素分子に結合（attach）している少なくとも2つのR部分が存在していなければならないことを理解されたい。

30

【0116】

「置換アルキル」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、アルキル基の任意の炭素に結合（attach）している追加の基（複数可）を有するアルキル基を指す。すなわち、置換アルキルは、構造-(R₂C)_n-（式中、各Rは、独立して、水素、又はアルキル、低級アルキル、アリール、アシル、ハロゲン、アルキルハロ、ヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノ、アシルアミノ、アシルオキシ、アリールオキシ、アリールオキシアルキル、メルカプト、飽和及び不飽和の両方の環状炭化水素、複素環、並びに他の有機基等の官能基であり得る）を含み得る。

【0117】

特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、構造NH₂-(Y)-COOH（式中、Yは-(R₂C)_n-であり、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20である）を有し得る。特定の実施形態においては、構造-(R₂C)_n-に含まれる少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、又は5つの部分Rは、アルキル、低級アルキル、アリール、アシル、ハロゲン、アルキルハロ、ヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノ、アシルアミノ、アシルオキシ、アリールオキシ、アリールオキシアルキル、メルカプト、飽和及び不飽和の両方の環状炭化水素、複素環、並びに他の有機基等の官能基であってよい。

40

【0118】

具体的な実施形態においては、本発明は、各-(R₂C)-モノマーの少なくとも1つのR部分が水素である、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

50

【0119】

すなわち、特定の実施形態においては、各 - (R₂C) - モノマーの一方の R 部分は水素であってよいが、他方の R 部分は、アルキル、低級アルキル、アリール、アシル、ハロゲン、アルキルハロ、ヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノ、アシルアミノ、アシルオキシ、アリールオキシ、アリールオキシアルキル、メルカプト、飽和及び不飽和の両方の環状炭化水素、複素環、並びに他の有機基等の官能基であってよい。あるいは、各 - (R₂C) - モノマーの一方の R 部分は水素であってよく、他方の R 部分は存在していなくてよい（アルケンの場合）。特定の実施形態においては、部分 Y に含まれる幾つかの - (R₂C) - モノマーは、2つの水素置換基を含んでいてよく、同じ部分 Y に含まれる幾つかの - (R₂C) - モノマーは、1つの水素置換基及び本明細書において定義される1つの置換基 R を含んでいてよい。

10

【0120】

具体的な実施形態においては、本発明は、各 - (R₂C) - モノマーの両方の R 部分が水素である、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0121】

特定の実施形態においては、構造 - (R₂C)_n - は、構造 - (R₂C)_n - に含まれる全ての部分 R が水素原子である非置換アルキル鎖であってよい。すなわち、特定の実施形態においては、構造 - (R₂C)_n - は、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、又はオクタデシル基であってよい。

20

【0122】

すなわち、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、構造 NH₂ - (Y) - COOH (式中、Y は - (CH₂)_n - であり、n は 1 ~ 20 の整数である) を有し得る。特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、構造 NH₂ - (Y) - COOH (式中、Y は - (CH₂)_n - であり、n は 1 ~ 15 の整数である) を有し得、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、構造 NH₂ - (Y) - COOH (式中、Y は - (CH₂)_n - であり、n は 1 ~ 10 の整数である) を有し得、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、構造 NH₂ - (Y) - COOH (式中、Y は - (CH₂)_n - であり、n は 1 ~ 9 の整数である) を有し得、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、構造 NH₂ - (Y) - COOH (式中、Y は - (CH₂)_n - であり、n は 1 ~ 8 の整数である) を有し得、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、構造 NH₂ - (Y) - COOH (式中、Y は - (CH₂)_n - であり、n は 1 ~ 7 の整数である) を有し得、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、構造 NH₂ - (Y) - COOH (式中、Y は - (CH₂)_n - であり、n は 1 ~ 6 の整数である) を有し得る。

30

【0123】

特定の実施形態においては、Y は、構造 - (CH₂)_n - (式中、n は 1 である) を有し得る。すなわち、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、グリシンであってよい。

40

【0124】

特定の実施形態においては、Y は、構造 - (CH₂)_n - (式中、n は 2 である) を有し得る。すなわち、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、アラニンであってよい。

【0125】

特定の実施形態においては、Y は、構造 - (CH₂)_n - (式中、n は 3 である) を有し得る。すなわち、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、4 - アミノ酪酸であってよい。

【0126】

特定の実施形態においては、Y は、構造 - (CH₂)_n - (式中、n は 4 である) を有

50

し得る。すなわち、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、5 - アミノペンタン酸であってよい。(5 - アミノペンタン酸を含有する例示的なリンカーを図24に示す)

【0127】

特定の実施形態においては、Yは、構造 - (CH₂)_n - (式中、nは5である)を有し得る。すなわち、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、6 - アミノヘキサン酸であってよい。

【0128】

特定の実施形態においては、Yは、構造 - (CH₂)_n - (式中、nは6である)を有し得る。すなわち、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、7 - アミノヘプタン酸であってよい。

10

【0129】

特定の実施形態においては、Yは、構造 - (CH₂)_n - (式中、nは7である)を有し得る。すなわち、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、8 - アミノオクタン酸であってよい。

【0130】

特定の実施形態においては、Yは、構造 - (CH₂)_n - (式中、nは8である)を有し得る。すなわち、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、9 - アミノノナン酸であってよい。

【0131】

特定の実施形態においては、Yは、構造 - (CH₂)_n - (式中、nは9である)を有し得る。すなわち、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、10 - アミノデカン酸であってよい。

20

【0132】

特定の実施形態においては、Yは、構造 - (CH₂)_n - (式中、nは10である)を有し得る。すなわち、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、11 - アミノウンデカン酸であってよい。

【0133】

特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、構造 NH₂ - (CH₂)_n - X - (CH₂)_n - COOH (式中、Xは、置換又は非置換のアルキル鎖又はヘテロアルキル鎖であり、nは、0 ~ 20、0 ~ 10、又は0 ~ 6の整数である)を有し得る。

30

【0134】

すなわち、特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、構造 NH₂ - (CH₂)_n - X - COOH (式中、Xは、置換又は非置換のアルキル鎖又はヘテロアルキル鎖であり、nは、1 ~ 20、1 ~ 10、又は1 ~ 6の整数である)を有し得る。

【0135】

特定の実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、構造 NH₂ - X - (CH₂)_n - COOH (式中、Xは、置換又は非置換のアルキル鎖又はヘテロアルキル鎖であり、nは、1 ~ 20、1 ~ 10、又は1 ~ 6の整数である)を有し得る。

【0136】

好ましい実施形態においては、第一級アミンを含むアミノ酸は、少なくとも1つのメチレン基(CH₂)を含む。より好ましくは、少なくとも1つのメチレン基は、第一級アミンに直接結合(couple)する。すなわち、第一級アミンを含むアミノ酸は、好ましくは構造 NH₂ - CH₂ - を含む。

40

【0137】

好ましい実施形態においては、本発明は、アミノ酸残基に含まれる第一級アミンが、
a) リジン、リジン誘導体、若しくはリジン模倣体の側鎖における第一級アミン；又は
b) 構造 NH₂ - (CH₂)_n - COOH (式中、nは1 ~ 10の範囲の整数である)を有するN末端アミノ酸残基に含まれる第一級アミンである、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

50

【0138】

特定の実施形態においては、ペイロードはペプチドリンカーのN末端に結合 (attach) する。このような実施形態においては、アミノ酸残基に含まれる第一級アミンは、リジン、リジン誘導体、又はリジン模倣体の側鎖における第一級アミンであることが好ましく、リジン残基の側鎖における第一級アミンであることがより好ましい。

【0139】

特定の実施形態においては、本発明は、リンカーが25個、20個、15個、14個、13個、12個、11個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個以下のアミノ酸残基を含む、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0140】

本発明に係るペプチドリンカーは、好ましくは、少なくとも2つのアミノ酸残基かつ25個以下のアミノ酸残基を含む。好ましい実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーに含まれる全てのアミノ酸残基が、単一のペプチドを形成する。しかし、ペプチドリンカーは2つ以上のペプチド部分を含み得ることを理解されたい。例えば、特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、2つのペプチド部分を含み得、該2つのペプチド部分は、ペプチド結合 (bond) によってではなく、共有的に互いに接続される。このようなペプチドリンカーの例を以下に更に与える。

【0141】

特定の実施形態においては、本発明は、リンカーの正味電荷が中性又は正である、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0142】

ペプチドの正味電荷は、通常、中性pH (7.0) で計算される。最も単純なアプローチでは、正に荷電したアミノ酸残基 (Arg、Lys、及びHis) の数と負に架電したアミノ酸残基 (Asp及びGlu) の数を足し、2つの群の差を計算することによって正味電荷を求める。リンカーが荷電官能基を含む非標準アミノ酸又はアミノ酸誘導体を含む場合、当業者は、中性pHにおける正味電荷を適宜計算することができる。

【0143】

特定の実施形態においては、ペイロードもリンカーの正味電荷に寄与し得る。しかし、当業者は、好ましくは中性pH (7.0) で、任意のペイロードを含むリンカー全体の正味電荷を計算する方法について認識している。

【0144】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーの正味電荷は、アミノ酸模倣体及びアミノ酸誘導体を含むリンカーに含まれるアミノ酸残基のみに基づいて計算される。従って、具体的な実施形態においては、本発明は、ペプチドリンカーに含まれるアミノ酸残基の正味電荷が中性又は正である、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0145】

特定の実施形態においては、本発明は、リンカーが負に荷電したアミノ酸残基を含まない、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0146】

すなわち、リンカーは、負に荷電したアミノ酸模倣体及びアミノ酸誘導体を含む、負に荷電したアミノ酸残基を含んでいなくてもよい。負に荷電したアミノ酸残基とは、中性pH (7.0) で負電荷を保有するアミノ酸、アミノ酸模倣体、又はアミノ酸誘導体である。負に荷電した標準アミノ酸は、グルタミン酸及びアスパラギン酸である。しかし、負に荷電した非標準アミノ酸、アミノ酸模倣体、及びアミノ酸誘導体は、当技術分野で公知である。

【0147】

本発明に係るペプチドリンカーは、1つ以上のグルタミン酸残基又はアスパラギン酸残基を含んでいてもよいことに留意しなければならない。しかし、アスパラギン酸又はグルタミン酸の側鎖に含まれるカルボキシル基がペイロードに結合 (couple) していることが好ましい。

10

20

30

40

50

【0148】

具体的な実施形態においては、本発明は、リンカーが少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸残基を含む、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0149】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは正に荷電したリジン残基を含み、これはトランスグルタミナーゼを介して抗体にコンジュゲートするための第一級アミンを提供する。しかし、本明細書では、ペプチドリンカーが少なくとも1つの追加の正に荷電したアミノ酸を含むことが好ましい。追加の正に荷電したアミノ酸は、アルギニン又はヒスチジン等の標準アミノ酸残基であってよい。しかし、追加の正に荷電したアミノ酸は、非標準アミノ酸であってよい。

10

【0150】

具体的な実施形態においては、本発明は、リンカーが少なくとも1つのアルギニン残基を含む、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0151】

アルギニン残基を含むリンカーをグリコシル化抗体に高効率でコンジュゲートさせることができることが、本明細書において実証された。従って、本明細書では、本発明に係るペプチドリンカーが少なくとも1つのアルギニン残基を含むことが好ましい。アルギニン残基はまた、アルギニン模倣体又はアルギニン誘導体で置換されてもよいことに留意されたい。

【0152】

アルギニン残基は、ペプチドリンカーの任意の位置に位置してよい。特定の実施形態においては、アルギニン残基は、第一級アミンを含むアミノ酸残基に隣接している。特定の実施形態においては、アルギニン残基は、第一級アミンを含むアミノ酸、すなわち、リジン残基、リジン模倣体、又はリジン誘導体（例えば、R Kモチーフ）のN末端に結合（couple）する。特定の実施形態においては、アルギニン残基は、第一級アミンを含むアミノ酸、すなわち、リジン残基、リジン模倣体、又はリジン誘導体（例えば、K Rモチーフ）のC末端に結合（couple）する。特定の実施形態においては、アルギニン残基は、別のアミノ酸残基、好ましくはアラニン残基（K A R又はR A Kのモチーフ）を介して、第一級アミンを含むアミノ酸、すなわち、リジン残基、リジン模倣体、又はリジン誘導体に結合（couple）する。特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、アルギニン残基及びヒスチジン残基を含む。

20

30

【0153】

具体的な実施形態においては、本発明は、リンカーが少なくとも1つのヒスチジン残基を含む、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0154】

ヒスチジン残基を含むリンカーをグリコシル化抗体に高効率でコンジュゲートさせることができることが、本明細書において実証された。従って、本明細書では、本発明に係るペプチドリンカーが少なくとも1つのヒスチジン残基を含むことが好ましい。ヒスチジン残基はまた、ヒスチジン模倣体又はヒスチジン誘導体で置換されてもよいことに留意されたい。

40

【0155】

ヒスチジン残基は、ペプチドリンカーの任意の位置に位置してよい。特定の実施形態においては、ヒスチジン残基は、第一級アミンを含むアミノ酸残基に隣接している。特定の実施形態においては、ヒスチジン残基は、第一級アミンを含むアミノ酸、すなわち、リジン残基、リジン模倣体、又はリジン誘導体（例えば、H Kモチーフ）のN末端に結合（couple）する。特定の実施形態においては、ヒスチジン残基は、第一級アミンを含むアミノ酸、すなわち、リジン残基、リジン模倣体、又はリジン誘導体（例えば、K Hモチーフ）のC末端に結合（couple）する。特定の実施形態においては、ヒスチジン残基は、別のアミノ酸残基、好ましくはアラニン残基（K A H又はH A Kのモチーフ）を介して、第一級アミンを含むアミノ酸、すなわち、リジン残基、リジン模倣体、又はリ

50

ジン誘導体に結合 (couple) する。特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ヒスチジン残基及びアルギニン残基を含む。

【0156】

具体的な実施形態においては、本発明は、リンカーが配列モチーフ R K を含む、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0157】

配列モチーフ R K (アルギニル-リシル) を含むペプチドリンカーは、リンカーが2つ以上のペイロードを含む場合であっても、極めて高い効率でグリコシル化抗体にコンジュゲートできることが本発明者らによって示された。R K モチーフに含まれるリジン残基は、それを介して抗体に含まれるグルタミン残基にペプチドリンカーがコンジュゲートする第一級アミンを含有することを理解されたい。すなわち、R K モチーフに含まれるリジン残基は、好ましくは第一級アミンを含むアミノ酸である。

10

【0158】

本明細書では、モチーフ R K がアミノ酸であるアルギニン及びリジンからなることが好ましい。しかし、アルギニン及び/又はリジンの残基は、アルギニン模倣体/誘導体及び/又はリジン模倣体/誘導体で置換されてもよいことを理解されたい。

【0159】

すなわち、特定の実施形態においては、モチーフ R K はアルギニン模倣体を含んでよい。「アルギニン模倣体」という用語は、本明細書で使用される場合、アルギニンとは異なる構造を有するが、アルギニンと類似の特徴を有し、従って、ペプチド又はタンパク質の機能及び/又は構造を大きく変化させることなく該ペプチド又はタンパク質中のアルギニンを置き換えるために使用することができる化合物を指す。アルギニン模倣体は、グアニジノ基と炭素原子とを接続する脂肪族鎖の長さ又は組成がアルギニンと異なる場合がある。あるいは又はそれに加えて、アルギニン模倣体は、グアニジノ基自体がアルギニンと異なる場合がある。すなわち、アルギニン模倣体は、グアニジノ基と類似の物理化学的特性を有する官能基を含み得る。特定の実施形態においては、アルギニン模倣体は、ホモアルギニン、2-アミノ-3-グアニジノ-プロピオン酸、ウレイドアラニン、又はシトルリンであってよい。

20

【0160】

特定の実施形態においては、モチーフ R K はアルギニン誘導体を含み得る。「アルギニン誘導体」という用語は、本明細書で使用される場合、アルギニン又はアルギニン模倣体に含まれる1つ以上の官能基が修飾又は置換されているアルギニン又はアルギニン模倣体を指す。アルギニン誘導体は、グアニジノ基が置換又は修飾されたアルギニン又はアルギニン模倣体であってよい。特定の実施形態においては、アルギニン誘導体は、メチルアルギニンであってよい。実施形態においては、残基 R がリンカーの N 末端位置に位置する場合、R は、アミノ基が修飾又は置換されたアルギニン誘導体となり得る。特定の実施形態においては、アルギニン又はアルギニン模倣体のアミノ基はアセチル化されてもよい。

30

【0161】

特定の実施形態においては、モチーフ R K は、本明細書の他の箇所で定義した通りのリジン模倣体又はリジン誘導体を含み得る。

40

【0162】

特定の実施形態においては、モチーフ R K は、リジン模倣体/誘導体及びアルギニン模倣体/誘導体を含み得る。

【0163】

特定の実施形態においては、リジン残基、又はリジン模倣体若しくはリジン誘導体は、アルギニン残基、又はアルギニン模倣体若しくはアルギニン誘導体から1アミノ酸残基だけ離れていてよい。すなわち、本発明のペプチドリンカーは、配列モチーフ R X K 又は K X R (式中、X は任意のアミノ酸であってよい) を含み得る。好ましい実施形態においては、リジン残基、又はリジン模倣体若しくはリジン誘導体は、アラニン残基によってアル

50

ギニン残基、又はアルギニン模倣体若しくはアルギニン誘導体から隔てられていてよい。すなわち、本発明のペプチドリンカーは、配列モチーフ R A K 又は K A R を含み得る。配列モチーフ K A R を含むリンカーが極めて高いコンジュゲーション効率でグリコシル化抗体にコンジュゲートできることが、実施例 10 で実証された。

【0164】

具体的な実施形態においては、本発明は、リンカーが配列モチーフ H K を含む、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0165】

配列モチーフ H K (ヒスチジル - リシル) を含むペプチドリンカーは、リンカーが 2 つ以上のペイロードを含む場合であっても、非常に高い効率でグリコシル化抗体にコンジュゲートできることが本発明者らによって示された (例えば、実施例 3)。H K モチーフに含まれるリジン残基は、それを介して抗体に含まれるグルタミン残基にペプチドリンカーがコンジュゲートする第一級アミンを含有することを理解されたい。すなわち、H K モチーフに含まれるリジン残基は、好ましくは第一級アミンを含むアミノ酸である。

10

【0166】

本明細書では、モチーフ H K がアミノ酸であるヒスチジン及びリジンからなることが好ましい。しかし、ヒスチジン及び / 又はリジンの残基は、ヒスチジン模倣体 / 誘導体及び / 又はリジン模倣体 / 誘導体で置換されていてもよいことを理解されたい。

【0167】

すなわち、特定の実施形態においては、モチーフ H K はヒスチジン模倣体を含んでいてよい。「ヒスチジン模倣体」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒスチジンとは異なる構造を有するが、ヒスチジンと類似の特徴を有し、従って、ペプチド又はタンパク質の機能及び / 又は構造を大きく変化させることなく該ペプチド又はタンパク質中のヒスチジンを置き換えるために使用することができる化合物を指す。ヒスチジン模倣体は、イミダゾール基と炭素原子とを接続する脂肪族鎖の長さ又は組成がヒスチジンと異なる場合がある。あるいは又はそれに加えて、ヒスチジン模倣体は、イミダゾール基自体がヒスチジンと異なる場合がある。すなわち、ヒスチジン模倣体は、イミダゾール基と類似の物理化学的特性を有する官能基を含み得る。特定の実施形態においては、ヒスチジン模倣体は、ホモヒスチジンであってよい。

20

【0168】

特定の実施形態においては、モチーフ H K はヒスチジン誘導体を含み得る。「ヒスチジン誘導体」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒスチジン又はヒスチジン模倣体に含まれる 1 つ以上の官能基が修飾又は置換されているヒスチジン又はヒスチジン模倣体を指す。ヒスチジン誘導体は、イミダゾール基が置換又は修飾されたヒスチジンはヒスチジン模倣体であってよい。実施形態においては、残基 H がリンカーの N 末端位置に位置する場合、H は、アミノ基が修飾又は置換されたヒスチジン誘導体となり得る。特定の実施形態においては、ヒスチジン又はヒスチジン模倣体のアミノ基はアセチル化されてもよい。

30

【0169】

特定の実施形態においては、モチーフ H K は、本明細書の他の箇所定義した通りのリジン模倣体又はリジン誘導体を含み得る。

40

【0170】

特定の実施形態においては、モチーフ H K は、リジン模倣体 / 誘導体及びヒスチジン模倣体 / 誘導体を含み得る。

【0171】

特定の実施形態においては、リジン残基、又はリジン模倣体若しくはリジン誘導体は、アルギニン残基、又はアルギニン模倣体若しくはアルギニン誘導体から 1 アミノ酸残基だけ離れていてよい。すなわち、本発明のペプチドリンカーは、配列モチーフ H X K 又は K X H (式中、X は任意のアミノ酸であってよい) を含み得る。好ましい実施形態においては、リジン残基、又はリジン模倣体若しくはリジン誘導体は、アラニン残基によってアル

50

ギニン残基、又はアルギニン模倣体若しくはアルギニン誘導体から隔てられていてよい。すなわち、本発明のペプチドリンカーは、配列モチーフHAK又はKAHを含み得る。

【0172】

具体的な実施形態においては、本発明は、リンカーが配列番号1~29又は82~93に記載のアミノ酸配列のいずれか1つを含む、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0173】

すなわち、本発明に係るペプチドリンカーは、配列番号1~29又は82~93に記載のアミノ酸配列のいずれか1つを含み得る。

【0174】

すなわち、特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列RKA A (配列番号1)を含み得る。配列RKA Aを含む幾つかのリンカーが本明細書に示されている(図1、2、3、4、13、14、17、20、21、30、35、36、37、及び39参照)。好ましくは、1つ以上のペイロードはペプチドRKA AのN末端及び/又はC末端に結合(attach)している。

【0175】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列ARK (配列番号2)を含み得る。配列番号ARKを含むリンカーを図5に例示する。好ましくは、1つ以上のペイロードはペプチドARKのN末端及び/又はC末端に結合(attach)している。

【0176】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列RKARA (配列番号3)を含み得る。配列RKARAを含むリンカーを図6に例示する。好ましくは、1つ以上のペイロードはペプチドRKARAのN末端及び/又はC末端に結合(attach)している。

【0177】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列RKA A A A (配列番号4)を含み得る。配列RKA A A Aを含むリンカーを図7に例示する。好ましくは、1つ以上のペイロードはペプチドRKA A A AのN末端及び/又はC末端に結合(attach)している。

【0178】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列RKA A A A A A (配列番号5)を含み得る。配列RKA A A A A Aを含むリンカーを図8に例示する。好ましくは、1つ以上のペイロードはペプチドRKA A A A A AのN末端及び/又はC末端に結合(attach)している。

【0179】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列RKA A S G S G (配列番号6)を含み得る。配列RKA A S G S Gを含むリンカーを図9に例示する。好ましくは、1つ以上のペイロードはペプチドRKA A S G S GのN末端及び/又はC末端に結合(attach)している。

【0180】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列RKH A (配列番号7)を含み得る。配列RKH Aを含むリンカーを図10に例示する。好ましくは、1つ以上のペイロードはペプチドRKH AのN末端及び/又はC末端に結合(attach)している。

【0181】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列RKH A A A (配列番号8)を含み得る。配列RKH A A Aを含むリンカーを図11に例示する。好ましくは、1つ以上のペイロードはペプチドRKH A A AのN末端及び/又はC末端に結合(attach)している。

【0182】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列RKH A A A A (配列番号9)を含み得る。配列RKH A A A Aを含むリンカーを図12に例示する。好ましくは、1つ以上のペイロードはペプチドRKH A A A AのN末端及び/又はC末端に結合(attach)している。

10

20

30

40

50

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 G G R (配列番号 9) を含み得る。配列 G G R を含むリンカーを図 15 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド G G R の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (a t t a c h) している。

【 0 1 8 3 】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 G G R G (配列番号 10) を含み得る。配列 G G R G を含むリンカーを図 16 及び 18 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド G G R G の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (a t t a c h) している。

【 0 1 8 4 】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 E A R K A A (配列番号 11) を含み得る。配列 E A R K A A を含むリンカーを図 19 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド E A R K A A の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (a t t a c h) している。更に、1 つ以上のペイロードはグルタミン酸残基の側鎖に結合 (a t t a c h) していることが好ましい。アミンを含むペイロードがグルタミン酸残基の側鎖に結合 (a t t a c h) している場合、リンカーのペプチド配列を Q A R K A A (配列番号 84) とみなすこともできることを理解されたい。

【 0 1 8 5 】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 R K A E A (配列番号 12) を含み得る。配列 R K A E A を含むリンカーを図 22 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド R K A E A の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (a t t a c h) している。更に、1 つ以上のペイロードはグルタミン酸残基の側鎖に結合 (a t t a c h) していることが好ましい。アミンを含むペイロードがグルタミン酸残基の側鎖に結合 (a t t a c h) している場合、リンカーのペプチド配列を R K A Q A (配列番号 85) とみなすこともできることを理解されたい。

【 0 1 8 6 】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 H K A (配列番号 13) を含み得る。配列 H K A を含むリンカーを図 12 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド H K A の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (a t t a c h) している。

【 0 1 8 7 】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 R h K A A (配列番号 14) を含み得る。配列 R h K A A を含むリンカーを図 23 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド R h K A A の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (a t t a c h) している。

【 0 1 8 8 】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 X G R G (配列番号 15) (式中、X は、構造 $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$ (式中、n は、1 ~ 20、好ましくは 1 ~ 10 の整数である) を有する) を含み得る。配列 X G R G を含むリンカーを図 24 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド X G R G の C 末端に結合 (a t t a c h) している。

【 0 1 8 9 】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 R K V C i t (配列番号 16) を含み得る。配列 R K V C i t を含むリンカーを図 25 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチドは、ペプチド配列 R K V C i t の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (a t t a c h) している。

【 0 1 9 0 】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 R K A R (配列番号 17) を含み得る。配列 R K A R を含むリンカーを図 26 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド R K A R の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (a t t a c h) している。

10

20

30

40

50

【0191】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 R K V A (配列番号 18) を含み得る。配列 R K V A を含むリンカーを図 27 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド R K V A の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (attach) している。

【0192】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 K A R (配列番号 19) を含み得る。配列番号 K A R を含むリンカーを図 28 及び 42 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド K A R の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (attach) している。

10

【0193】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 R K E A A (配列番号 20) を含み得る。配列 R K E A A を含むリンカーを図 29 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド R K E A A の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (attach) している。更に、1 つ以上のペイロードはグルタミン酸残基の側鎖に結合 (attach) していることが好ましい。アミンを含むペイロードがグルタミン酸残基の側鎖に結合 (attach) している場合、リンカーのペプチド配列を R K Q A A (配列番号 86) とみなすこともできることを理解されたい。

【0194】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 R K D A (配列番号 82) を含み得る。配列 R K D A を含むリンカーを図 43 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド R K D A の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (attach) している。更に、1 つ以上のペイロードはアスパラギン酸残基の側鎖に結合 (attach) していることが好ましい。アミンを含むペイロードがアスパラギン酸残基の側鎖に結合 (attach) している場合、リンカーのペプチド配列を R K N A (配列番号 83) とみなすこともできることを理解されたい。

20

【0195】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 E R K A A (配列番号 21) を含み得る。配列 E R K A A を含むリンカーを図 30 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド E R K A A の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (attach) している。更に、1 つ以上のペイロードはグルタミン酸残基の側鎖に結合 (attach) していることが好ましい。アミンを含むペイロードがグルタミン酸残基の側鎖に結合 (attach) している場合、リンカーのペプチド配列を Q R K A A (配列番号 87) とみなすこともできることを理解されたい。

30

【0196】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 R K A H (配列番号 22) を含み得る。配列 R K A H を含むリンカーを図 31 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド R K A H の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (attach) している。

【0197】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 R K A N (配列番号 23) を含み得る。配列 R K A N を含むリンカーを図 32 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド R K A N の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (attach) している。

40

【0198】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 R K G G F G (配列番号 24) を含み得る。配列 R K G G F G を含むリンカーを図 33 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド R K G G F G の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (attach) している。

【0199】

50

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 R K G P (配列番号 25) を含み得る。配列 R K G P を含むリンカーを図 34 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド R K G P の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (attach) している。

【0200】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 K R K A A (配列番号 26) を含み得る。配列 K R K A A を含むリンカーを図 36 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド K R K A A の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (attach) している。更に、1 つ以上のペイロードはリジン残基のうちの 1 つ、好ましくは N 末端リジン残基の側鎖に結合 (attach) していることが好ましい。

10

【0201】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 S R K A A (配列番号 27) を含み得る。配列 S R K A A を含むリンカーを図 37 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド S R K A A の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (attach) している。更に、1 つ以上のペイロードはセリン残基の側鎖に結合 (attach) していることが好ましい。

【0202】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 D D R K A A (配列番号 28) を含み得る。配列 D D R K A A を含むリンカーを図 39 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド D D R K A A の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (attach) している。更に、1 つ以上のペイロードはアスパラギン酸残基の側鎖に結合 (attach) していることが好ましい。アミンを含むペイロードがアスパラギン酸残基の側鎖に結合 (attach) している場合、リンカーのペプチド配列を D N R K A A (配列番号 88)、N D R K A A (配列番号 89)、又は N N R K A A (配列番号 90) とみなすこともできることを理解されたい。

20

【0203】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、ペプチド配列 E E R K V a l C i t (配列番号 29) を含み得る。配列は、ペプチド配列 E E R K V a l C i t を含むリンカーを図 40 に例示する。好ましくは、1 つ以上のペイロードはペプチド配列 E E R K V a l C i t の N 末端及び / 又は C 末端に結合 (attach) している。更に、1 つ以上のペイロードはグルタミン酸残基の側鎖に結合 (attach) していることが好ましい。アミンを含むペイロードがグルタミン酸残基の側鎖に結合 (attach) している場合、リンカーのペプチド配列を E Q R K V a l C i t (配列番号 91)、Q E R K V a l C i t (配列番号 92)、又は Q Q R K V a l C i t (配列番号 93) とみなすこともできることを理解されたい。

30

【0204】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、図 1 ~ 40 又は 42 ~ 43 に示されるリンカーのいずれか 1 つである。

【0205】

特定の実施形態においては、本発明は、リンカーが 2 つ ~ 4 つのペイロードを含む、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

40

【0206】

本発明に係るペプチドリンカーは、微生物トランスグルタミナーゼを用いる 4 以上のペイロード対抗体比を有する抗体 - ペイロードコンジュゲートの作製に使用することができる。ネイティブなグリコシル化抗体は、重鎖のグルタミン残基 295 (Q295) に単一のコンジュゲーション部位を有する。抗体は 2 本の重鎖を含むので、2 つのペイロードを含むリンカーを各グルタミン残基にコンジュゲートさせると、4 つのペイロードを含む抗体 - ペイロードコンジュゲートが得られる。同様に、3 つ又は 4 つのペイロードを含むリンカーを各グルタミン残基にコンジュゲートさせると、それぞれ 6 つ又は 8 つのペイロードを含む抗体 - ペイロードコンジュゲートが得られる。従って、特定の実施形態において

50

は、本発明に係るペプチドリンカーは、2つ、3つ、又は4つのペイロードを含む。

【0207】

本発明者らは、2つ以上のペイロードをペプチドリンカーに結合(couple)させる様々な方法を特定した。特定の実施形態においては、2つのペイロードをペプチドリンカーのC末端に結合(couple)させることができる(図1、2、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、23、24、25、28、36、37、及び40参照)。他の実施形態においては、2つのペイロードをペプチドリンカーのN末端に結合(couple)させることができる(図20参照)。更に別の実施形態においては、1つ又は2つのペイロードを、ペプチドリンカーのN末端及びペプチドリンカーのC末端にそれぞれ結合(couple)させることができる(図3、14、20、21、22、26、27、31、32、33、34、及び38参照)。

10

【0208】

ペプチドリンカーのN末端にもC末端にもペイロードが結合(attach)していない実施形態においては、それぞれの末端が修飾されていることが好ましい。すなわち、ペプチドリンカーのN末端は、好ましくはアセチル化され、ペプチドリンカーのC末端は、好ましくはアミド化される。

【0209】

ペプチドリンカーの末端にペイロードを結合(couple)させることに加えて、1つ以上のペイロードをアミノ酸側鎖に結合(couple)させることもできる(図19、22、29、30、35、36、37、39、及び40参照)。当業者は、ペイロードの結合を可能にする官能基をそのアミノ酸側鎖に有するアミノ酸残基について認識している。側鎖に官能基を有するアミノ酸としては、Biochemistry 2017, 56, 30, 3863~3873にdeGruiterらによって記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない。更に、ペイロードは、pAcF、CpK、pAMF、SCpHK、AzK、Secを含むがこれらに限定されない非標準アミノ酸の側鎖に結合(couple)することもできる。

20

【0210】

すなわち、特定の実施形態においては、本発明は、少なくとも1つのペイロードが、ペプチドリンカーに含まれるグルタミン酸残基、アスパラギン酸残基、トリプトファン残基、システイン残基、リジン残基、チロシン残基、セリン残基、若しくはスレオニン残基の側鎖に結合(attach)している、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

30

【0211】

具体的な実施形態においては、1つ又は2つのペイロードを、グルタミン酸又はアスパラギン酸の側鎖のカルボン酸に結合(attach)させることができる(図19、22、29、30、39、及び40参照)。

【0212】

具体的な実施形態においては、1つ又は2つのペイロードを、リジン側鎖のアミンに結合(attach)させることができる(図36参照)。

【0213】

具体的な実施形態においては、1つ又は2つのペイロードを、システイン側鎖のチオールに結合(attach)させることができる(図35参照)。

40

【0214】

具体的な実施形態においては、1つ又は2つのペイロードを、セリン、スレオニン、又はチロシンの側鎖のヒドロキシルに結合(attach)させることができる(図37参照)。

【0215】

ペイロードは、ペプチドリンカーに直接結合(couple)させることができる。例えば、アミンを含むペイロードは、イソペプチド結合(bond)を介してペプチドリンカーのC末端に結合(couple)させることができる(図27参照)。同様に、カル

50

ボキシルを含むペイロードは、イソペプチド結合 (bond) を介してペプチドリンカーのN末端に結合 (couple) することができ (図32参照)、又はチオールを含むペイロードは、ペプチドリンカーに含まれるシステイン残基の側鎖に結合 (couple) させることができる。

【0216】

しかし、本明細書では、化学リンカーを介してペプチドリンカーにペイロードを結合 (couple) させることが好ましい。特に、2つのペイロードをペプチドリンカーのN末端又はC末端のいずれかに結合 (attach) させる場合、2つのペイロードとN末端又はC末端との間に化学リンカーを使用することが好ましい。

【0217】

従って、具体的な実施形態においては、本発明は、2つ以上のペイロードのうち少なくとも1つが化学リンカーを介してペプチドリンカーに結合 (attach) している、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0218】

本発明においては、2つ以上のペイロードのうち少なくとも1つが化学リンカーを介してペプチドリンカーに結合 (couple) していることが好ましい。しかし、更により好ましくは、全てのペイロードが化学リンカーを介してペプチドリンカーに結合 (couple) している。

【0219】

化学リンカーは様々な目的を有し得る。特定の実施形態においては、化学リンカーは、単にペプチドリンカーに1つのペイロードを結合 (couple) させる「アダプター」として機能する。例えば、アミド結合 (bond) を介してペプチドリンカーのC末端にペイロードを結合 (couple) させるために、アミン基を含む化学リンカーを使用することができる。このような実施形態においては、これら追加の官能基を介してペイロードを化学リンカーに結合 (couple) させることができるようにするために、化学リンカーはアミン以外の1つ以上の官能基を含むことが好ましい。

【0220】

特定の実施形態においては、化学リンカーは、幾つかのペイロードをペプチドリンカーに結合 (couple) させるための「増幅器部分」として機能する。例えば、二置換アミンを含む化学リンカーをデンドロンとして使用して、2つのペイロードを結合 (attach) させることができる (増幅器を含有する例示的なリンカーを図36及び37に示す)。増幅器の別の例は、2,6-ビス-(ヒドロキシメチル)-p-クレゾール部分 (図28に示す) である。

【0221】

同様に、アミド結合 (bond) を介してペプチドリンカーのN末端に1つ以上のペイロードを結合 (couple) させるために、カルボキシル基を含む化学リンカーを使用することができる。例えば、アミンを含むペイロードをペプチドのN末端に結合 (couple) させるために、ジカルボン酸分子を使用することができる (図22、31、及び33参照)。

【0222】

更に、ペプチドリンカーに含まれるアミノ酸側鎖にペイロードを結合 (couple) させるために、相溶性官能基を含む化学リンカーを使用することもできる。

【0223】

上記に開示した実施形態のいずれにおいても、当業者は、化学物質が「アダプター」として機能するか又は「増幅器部分」として機能するかにかかわらず、ペプチドリンカーにペイロードを結合 (couple) させるのに適した化学リンカーを同定することができる。すなわち、当業者は、ペプチドリンカーに含まれる官能基を対象となるペイロードを結合 (couple) させるために必要な官能基を有するリンカーを同定することができる。

【0224】

10

20

30

40

50

しかし、化学リンカーは、ペイロード（複数可）とペプチドリンカーとの間のアダプターとして機能することができるだけでなく、他の機能を果たすこともできる。

【0225】

すなわち、特定の実施形態においては、本発明は、化学リンカーが酵素的及び/又は化学的に切断可能なリンカーである、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0226】

切断可能なリンカーは、当技術分野において公知の任意の酵素的及び/又は化学的に切断可能なリンカーであってよく、参照により全体が本明細書に組み込まれるBarghら（Chem. Soc. Rev., 2019, 48, 4361）によって記載されているものを含むが、これらに限定されない。

10

【0227】

切断可能なリンカーには、抗体からのペイロードの放出を制御及び/又は促進できるという利点がある。例えば、1つ以上のペイロードを、酵素的及び/又は化学的に切断可能な化学リンカーを介してペプチドリンカーに結合（couple）させることができる。

【0228】

特定の実施形態においては、化学リンカーはインビボで切断可能である。切断可能なリンカーは、化学的若しくは酵素的に不安定な又は分解可能な結合（linkage）を含み得る。切断可能なリンカーは、一般に、細胞質での還元、リソソームでの酸性条件への曝露、又は細胞内若しくは細胞外の特異的プロテアーゼ若しくは他の酵素による切断等、ペイロードを遊離させる生物学的プロセスに依存している。切断可能なリンカーには、一般に、化学的又は酵素的に切断可能な1つ以上の化学結合（bond）が組み込まれている。特定の実施形態においては、リンカーは、ヒドラゾン基及び/又はジスルフィド基等の化学的に不安定な基を含む。化学的に不安定な基を含むリンカーは、血漿と幾つかの細胞質区画との間の差異特性を利用する。ヒドラゾン含有リンカーのペイロード放出を促進する細胞内条件は、エンドソーム及びリソソームの酸性環境であり、一方、ジスルフィド含有リンカーは、例えばグルタチオン等のチオールを高濃度で含有する細胞質で還元される。特定の実施形態においては、化学的に不安定な基の近傍の置換基を用いて立体障害を導入することによって、化学的に不安定な基を含むリンカーの血漿安定性を増大させることができる。

20

【0229】

ヒドラゾン又はカーボナート等の酸に不安定な基は、血液の中性pH環境（pH 7.3 ~ 7.5）では全身循環中に無傷のままであり、ADCが細胞の弱酸性のエンドソーム（pH 5.0 ~ 6.5）及びリソソーム（pH 4.5 ~ 5.0）の区画に内部移行すると、加水分解を受けてペイロードを放出する。このpH依存性の放出メカニズムは、ペイロードの非特異的放出と関連している。リンカーのヒドラゾン基の安定性を高めるために、リンカーを化学修飾、例えば置換によって変化させてもよく、それにより、循環中の損失を最小限に抑えながらリソソームでより効率的な放出を達成することができるようになる。ヒドラゾン又はカーボナートを含有するリンカーは、追加の切断部位、例えば、追加の酸に不安定な切断部位及び/又は酵素に不安定な切断部位を含有していてもよい。カーボナートの酸に不安定な基を有する例示的なリンカーを図34に示す。

30

40

【0230】

化学リンカーに含まれ得る他の酸に不安定な基としては、シス-アコニチル含有リンカーが挙げられる。シス-アコニチル化学物質は、酸性条件下でアミドの加水分解を加速させるために、アミド結合（bond）と並置しているカルボン酸を使用する。

【0231】

切断可能な化学リンカーは、ジスルフィド基を含んでいてもよい。ジスルフィドは生理学的pHで熱力学的に安定であり、細胞質が細胞外環境に比べて著しくより還元的な環境を提供する細胞内に内部移行した際にペイロードを放出するように設計されている。ジスルフィド結合（bond）の切断には、一般に、（還元型）グルタチオン（GSH）等の細胞質チオール補因子の存在が必要であり、その結果、ジスルフィドを含有するリンカー

50

は循環中に適度に安定しており、細胞質で選択的にペイロードを放出する。細胞内酵素であるプロテインジスルフィドイソメラーゼ又はジスルフィド結合 (bond) を切断することができる類似の酵素も、細胞内でのジスルフィド結合 (bond) の優先的切断に寄与し得る。GSHは、細胞内では、循環中のGSH又はシステイン(最も豊富に存在する低分子チオール)の約5 μMと著しく低い濃度と比べて、0.5 ~ 10 mMの濃度範囲で存在すると報告されている。不規則な血流により低酸素状態が引き起こされる腫瘍細胞では、還元酵素の活性が高まるため、グルタチオン濃度が更に高くなる。特定の実施形態においては、リンカーの化学修飾、例えば、ジスルフィド結合 (bond) に隣接する立体障害の使用によって、ジスルフィドを含有するリンカーのインピボにおける安定性を高めることができる。ジスルフィド基を有する例示的なリンカーを図35に示す。

10

【0232】

使用可能な別の種類の切断可能なリンカーは、酵素によって特異的に切断される化学リンカーである。このようなリンカーは、典型的にはペプチドベースであるか又は酵素の基質として作用するペプチド領域を含む。ペプチドベースのリンカーは、化学的に不安定なリンカーよりも、血漿中及び細胞外環境においてより安定である傾向がある。ペプチド結合 (bond) は、一般に血清安定性が良好であるが、それは、内因性の阻害物質及びリソソームと比較して血液のpH値が好ましくなく高いことに起因して、リソソームタンパク質分解酵素の血液中での活性が非常に低いためである。抗体からのペイロードの放出は、リソソームプロテアーゼ、例えば、カテプシン、レグマイン、及びプラスミンの作用によって特異的に起こる。これらリソソームプロテアーゼは、特定の腫瘍細胞内に高レベルで存在し得るが、腫瘍微小環境においては細胞外にみられる場合もある。ペプチドベースのリンカーは、マトリックスメタロプロテイナーゼ等の非リソソーム細胞外プロテアーゼによって切断することもできる。非ペプチドベースのリンカーは、グリコシダーゼによって特異的に切断することもできる。

20

【0233】

例示的な実施形態においては、切断可能なペプチドは、Gly - Phe - Leu - Gly (配列番号30)、Ala - Leu - Ala - Leu (配列番号31)、Gly - Gly - Phe - Gly (配列番号32)等のテトラペプチド、又はAla - Ala、Ala - Arg、Val - Cit、Val - Ala、Met - (D) Lys、Asn - (D) Lys、Val - (D) Asp、Phe - Lys、Ile - Val、Asp - Val、His - Val、NorVal - (D) Asp、Ala - (D) Asp、Met - Lys、Asn - Lys、Ile - Pro、Me3Lys - Pro、フェニルGly - (D) Lys、Met - (D) Lys、Asn - (D) Lys、Pro - (D) Lys、Met - (D) Lys、Asn - (D) Lys、Met - (D) Lys、Asn - (D) Lys等のジペプチドから選択される。特定の実施形態においては、より長いペプチドは疎水性であるので、長いポリペプチドよりもジペプチドが好ましい。すなわち、配列番号1 ~ 29又は82 ~ 93に記載のアミノ酸を含むリンカーは、上記のジペプチド又はテトラペプチドのモチーフのいずれかを更に含んでもよい。好ましくは、上記のジペプチド又はテトラペプチドのモチーフは、ペイロードに直接結合 (couple) するか、又は自壊性スペーサーを介してペイロードに結合 (couple) する。

30

40

【0234】

酵素的に切断可能なリンカーは、酵素的切断部位からペイロードを空間的に分離させるために自壊性スペーサーを含んでもよい。ペプチドリンカーにペイロードを直接結合 (attach) させると、ペイロードのアミノ酸付加物がタンパク質分解によって放出され、それにより、活性が損なわれる可能性がある。自壊性スペーサーを使用することにより、アミド (bond) 又はグリコシド結合 (bond) の加水分解時に、完全な活性があり化学的に修飾されていないペイロードを脱離させることができる。

【0235】

特定の実施形態においては、本発明は、自壊性リンカーが

a) p - アミノベンジルアルコール部分 ; 又は

50

- b) 2, 4 - ビス(ヒドロキシメチル)アニリン部分; 又は
- c) p - アミノベンジル第四級アンモニウム; 又は
- d) エチレンジアミンベースの部分; 又は
- e) (アミノメチル)ピロリジンベースの部分; 又は
- f) アミノメチルベースの部分

を含む、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0236】

自壊性スパーサーの1つに、二官能性パラアミノベンジルアルコール基があり、これはアミノ基を介してペプチドに結合(link)し、アミド結合(bond)を形成するが、一方、アミン含有薬物は、カルバマート官能基を介してリンカーのベンジル型水酸基(PABC)に結合(attach)することができる。得られたプロドラッグは、プロテアーゼを介した切断時に活性化され、1, 6 - 脱離反応が引き起こされて、未修飾の薬物、二酸化炭素、及びリンカー基のレムナントが放出される。この自壊性基の複素環式バリエーションについても記載されている。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7, 989, 434号参照。パラアミノベンジルアルコール部分は、カーボナートの形成を通じてフェノール又はヒドロキシルを含有するペイロードをさせるために使用することもできる(図34参照)。パラアミノベンジル部分はまた、第四級アンモニウム(PABQ)の形成を通じて第三級又はヘテロアリール - アミンを含有するペイロードを結合(link)させるために使用することもできる(図32参照)。すなわち、特定の実施形態においては、本発明は、p - アミノベンジル第四級アンモニウムに含まれる第四級アンモニウムカチオンがペイロードに含まれるアミンを起源とする、本発明に係るペプチドリンカーに関する。好ましくは、ペイロードに含まれるアミンは、第三級アミン又はヘテロアリールアミンである。

【0237】

別の自壊性スパーサーは、2, 4 - ビス(ヒドロキシメチル)アニリン基であり、これはアミノ基を通してペプチドに結合(link)し、アミド結合(bond)を形成するが、一方、アミン含有薬物は、リンカーの2つのベンジル型ヒドロキシル基を介し、2つのカルバマート官能基を通して結合(attach)することができる。得られたプロドラッグは、プロテアーゼを介した切断時に活性化され、逐次1, 6 - 及び1, 4 - 脱離プロセスを介してペイロードを放出する。

【0238】

ヒドロキシル含有薬物の場合、好適な自壊性スパーサーとしては、エチレンジアミンベースのカルバマート(EDA)(図22 31参照)、(アミノメチル)ピロリジンベースのカルバマート(AMP)(図33参照)、又はアミノメチル部分(AM)(図30、39、及び40参照)が挙げられるが、これらに限定されない。この後者の放出メカニズムは、1, 2 - 脱離を容易に受けて所望のアルコールを放出するヘミアミナル官能基の不安定性を利用したものである。

【0239】

チオール含有薬物の場合、好適な自壊性スパーサーとしては、アミノメチル部分(AM)が挙げられるが、これらに限定されない(図35参照)。この後者の放出メカニズムは、容易に1, 2 - 脱離を受けて所望のチオールを放出するチオヘミアミナル官能基の不安定性を利用したものである。

【0240】

幾つかの実施形態においては、酵素的に切断可能なリンカーは、 α - グルクロン酸ベースのリンカーである。ペイロードの容易な放出は、リソソーム酵素である α - グルクロニダーゼによる α - グルクロニドグリコシド結合(bond)の切断を通して実現することができる。この酵素はリソソーム内に豊富に存在し、幾つかの腫瘍型では過剰発現しているが、細胞外での酵素活性は低い。 α - グルクロン酸ベースのリンカーは、 α - グルクロニドの親水性の性質から、抗体 - ペイロードコンジュゲートの凝集しやすい傾向を回避するために使用することができる(図38参照)。

10

20

30

40

50

【0241】

上述の通り、具体的な実施形態においては、本発明は、化学スパーサーが自壊性リンカーであるか又は自壊性リンカーを含む、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0242】

本明細書では、ペイロードが自壊性リンカーを介してペプチドリンカーに結合 (attach) し、未修飾の薬物の放出を促進することが好ましい。更により好ましくは、自壊性リンカーは、プロテアーゼ又はペプチダーゼによって効率的に切断されるペプチド配列に結合 (couple) する。切断可能なペプチドは、ペプチドリンカーの一部として、又はペプチドリンカーとペイロード (複数可) とを接続する化学リンカーの一部として定義することができる。

10

【0243】

自壊性リンカーは、当技術分野において公知の任意の自壊性リンカーであってよい。しかし、自壊性リンカーが p - アミノベンジルアルコール部分又は 2 , 4 - ビス (ヒドロキシメチル) アニリン部分を含むことが好ましい。

【0244】

すなわち、具体的な実施形態においては、本発明は、自壊性リンカーが p - アミノベンジルアルコール部分又は 2 , 4 - ビス (ヒドロキシメチル) アニリン部分を含む、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0245】

p - アミノベンジルアルコール部分を含む自壊性リンカーは、ペプチドの C 末端にペイロードを結合 (couple) させるために使用することができる。すなわち、p - アミノベンジルアルコール部分のアミノ基は、アミド結合 (bond) を介してペプチドリンカーの C 末端カルボキシル基に結合 (couple) することができる (例えば、図 3 参照)。あるいは又はそれに加えて、p - アミノベンジルアルコール部分のアミノ基は、ペプチドリンカーにおけるアスパラギン酸又はグルタミン酸の残基の側鎖におけるカルボキシル基とアミド結合 (bond) を介して結合 (couple) することができる (例えば、図 19 又は 22 参照)。

20

【0246】

ペイロードは、カルバマートを介して p - アミノベンジルアルコール部分のヒドロキシ基に結合することができる。特定の実施形態においては、p - アミノベンジルアルコール部分が結合することができるペプチドリンカーの C 末端アミノ酸は、限定するものではないが、配列モチーフバリニン - シトルリン等のペプチダーゼによって効率的に切断されるモチーフで構成され得る。

30

【0247】

本発明に係るペプチドリンカーは、1つを超える p - アミノベンジルアルコール部分を含んでいてもよいことを理解されたい。例えば、本発明に係るペプチドリンカーは、2つのペプチド部分を含んでよく、該2つのペプチド部分は、それらの N 末端を介して互いに連結される。このような実施形態においては、ペプチドリンカーは2つの C 末端を有し、両方の C 末端が p - アミノベンジルアルコール部分を介してペイロードにコンジュゲートすることができる。両末端に (p - アミノベンジルアルコール部分を介して C 末端に、そして、第2のペプチド部分及び p - アミノベンジルアルコール部分を介して N 末端に) 結合 (attach) しているペイロードを含む例示的なリンカーを図 3 に示す。

40

【0248】

p - アミノベンジルアルコール部分は、ペイロードをアミノ酸側鎖に結合 (couple) させるために使用することもできる。例えば、ペイロードは p - アミノベンジルアルコール部分を介してグルタミン酸又はアスパラギン酸の残基の側鎖におけるカルボキシル基に結合 (couple) することができる。p - アミノベンジルアルコール部分は、図 19、22、30、39、及び 40 に示すように、グルタミン酸又はアスパラギン酸の残基の側鎖におけるカルボキシル基に直接又は1つ以上のアミノ酸残基を介して結合 (couple) することができる。特定の実施形態においては、p - アミノベンジルアルコー

50

ル部分は、バリン - シトルリン配列又はアラニン - アラニン配列を介して、グルタミン酸又はアスパラギン酸の残基の側鎖におけるカルボキシル基に結合 (couple) することができる。

【0249】

特定の実施形態においては、アミンを含むペイロードは、2つ以上のアミノベンジルアルコール部分によってペプチドリンカーにおけるカルボキシル基に結合 (couple) することができる (図3参照)

【0250】

2, 4 - ビス (ヒドロキシメチル) アニリン部分を含む自壊性リンカーは、ペプチドリンカーに含まれる単一の官能基に2つのペイロードを結合 (couple) させるために使用することができる。すなわち、2, 4 - ビス (ヒドロキシメチル) アニリン部位は、そのアミノ基を介してペプチドリンカーに含まれるカルボキシル基に結合 (couple) することができる。次いで、ペイロードは、カルバマートを介して各ヒドロキシシル基に結合 (couple) することができる。2つのペイロードが2, 4 - ビス (ヒドロキシメチル) アニリン部分を介してペプチドリンカーのC末端に結合 (couple) している例示的なペプチドリンカーを図1に示す。

【0251】

2, 4 - ビス (ヒドロキシメチル) アニリン部分を含むリンカーを使用することにより、2つを超えるペイロードを含むペプチドリンカーを得ることができる。例えば、4つのペイロードを含むリンカーは、2つのペイロードを2, 4 - ビス (ヒドロキシメチル) アニリン部分を介して (間接的に第2のペプチド部分を介して) ペプチドリンカーのN末端に結合 (couple) させ、そして、2つのペイロードを別の2, 4 - ビス (ヒドロキシメチル) アニリン部分を介してペプチドリンカーのC末端に結合 (couple) させることによって得ることができる (図20参照)。同様に、3つのペイロードを含むペプチドリンカーは、2つのペイロードを2, 4 - ビス (ヒドロキシメチル) アニリン部分を介して結合 (couple) させ、そして、第3のペイロードをp - アミノベンジルアルコール部分を介してペプチドリンカーに結合 (couple) させることによって得ることができる (図19参照)。

【0252】

具体的な実施形態においては、本発明は、p - アミノベンジルアルコール部分に含まれるヒドロキシシル基がカルバマートをペイロードと形成する、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0253】

上述したように、ペイロードはカルバマートを介してp - アミノベンジルアルコール部分に結合 (attach) することができる。すなわち、ペイロードは、好ましくは、カルバマートの形成を受けるのに適した遊離アミン基を含む。当業者は、p - アミノベンジルアルコール部分とアミンを含むペイロードとの間にカルバマートを形成する方法について認識している。

【0254】

具体的な実施形態においては、本発明は、p - アミノベンジルアルコール部分に含まれるヒドロキシシル基がペイロードとカーボナートを形成する、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0255】

ペイロードは、カーボナートを介してp - アミノベンジルアルコール部分に結合 (attach) することができる。すなわち、ペイロードは、好ましくは、カーボナートの形成を受けるのに適した遊離ヒドロキシシル基を含む (図34参照)。当業者は、p - アミノベンジルアルコール部分とヒドロキシシルを含むペイロードとの間にカーボナートを形成する方法について認識している。

【0256】

具体的な実施形態においては、本発明は、2, 4 - ビス (ヒドロキシメチル) アニリン

10

20

30

40

50

部分に含まれる各ヒドロキシル基がペイロードとカルバマートを形成する、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0257】

すなわち、本発明に係るペプチドリンカーに含まれる2,4-ビス(ヒドロキシメチル)アニリン部分は、2つの個々のアミンを含むペイロードと2つのカルバマートを形成し得る。

【0258】

具体的な実施形態においては、本発明は、p-アミノベンジル部分がペイロードと第四級アンモニウムを形成する、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0259】

上述したように、ペイロードは第四級アンモニウムを介してp-アミノベンジルに結合(attach)することができる。すなわち、ペイロードは、好ましくは、第四級アンモニウムの形成を受けるのに適した第三級アミン又はヘテロアリアルアミンを含む。当業者は、p-アミノベンジル部分と第三級アミン又はヘテロアリアルアミンを含むペイロードとの間に第四級アンモニウムを形成する方法について認識している。

【0260】

具体的な実施形態においては、本発明は、自壊性リンカーがエチレンジアミンカルバマート(EDA)部分を含む、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0261】

すなわち、ペイロードは、エチレンジアミンカルバマート(EDA)部分を介して本発明に係るペプチドリンカーに結合(couple)することができる。EDA部分は、ペプチドのC末端に直接結合(couple)することもでき、アミド結合(bond)を介してアスパラギン酸又はグルタミン酸の側鎖に結合(couple)することもできる。EDA部分は、好ましくは、ヒドロキシル基を含むペイロードとカルバマート形成を受ける。EDA部分を含むリンカーの例を図22及び31に示す。図28に示すように、EDA部位を使用して2つのペイロードに連結された増幅器を接続することもできる。

【0262】

具体的な実施形態においては、本発明は、自壊性リンカーが(アミノメチル)ピロリジンベースのカルバマート(AMP)部分を含む、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0263】

すなわち、ペイロードは、(アミノメチル)ピロリジンベースのカルバマート(AMP)部分を介して本発明に係るペプチドリンカーに結合(couple)することができる。AMP部分は、ペプチドのC末端に直接結合(couple)することもでき、アミド結合(bond)を介してアスパラギン酸又はグルタミン酸の側鎖に結合(couple)することもできる。AMP部分は、好ましくは、ヒドロキシル基を含むペイロードとのカルバマート形成を受ける。AMP部分を含むリンカーの例を図33に示す。

【0264】

具体的な実施形態においては、本発明は、自壊性リンカーがアミノメチル(AM)部分を含む、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0265】

すなわち、ペイロードは、アミノメチル(AM)部分を介して本発明に係るペプチドリンカーに結合(couple)することができる。AM部分は、ペプチドのC末端に直接結合(couple)することもでき、アミド結合(bond)を介してアスパラギン酸又はグルタミン酸の側鎖に結合(couple)することもできる。AM部位は、好ましくは、ヒドロキシル基を含むペイロードを連結し、それによってヘミアミナルを形成するために使用される。AM部分を含むリンカーの例を図30、39、及び40に示す。しかし、AM部位はまた、チオール基を含むペイロードを連結し、それによってチオヘミアミナルを形成するためにも使用される。チオール含有ペイロードを有するAM部位を含むリンカーの例を図35に示す。

10

20

30

40

50

【0266】

具体的な実施形態においては、本発明は、少なくとも1つのペイロードが、ペプチドリンカーに含まれるグルタミン酸残基、アスパラギン酸残基、トリプトファン残基、システイン残基、リジン残基、チロシン残基、セリン残基、若しくはスレオニン残基の側鎖に結合 (attach) している、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0267】

上述したように、1つ以上のペイロードは、ペプチドリンカーに含まれるアミノ酸側鎖に結合 (couple) することができる。当業者は、ペイロードをアミノ酸側鎖、すなわち、グルタミン酸又はアスパラギン酸の残基の側鎖におけるカルボキシル基、システイン残基の側鎖におけるチオール基、リジン残基の側鎖におけるアミノ基、又はチロシン、セリン、若しくはスレオニン残基の側鎖におけるヒドロキシ基に結合 (couple) させるのに適した化学リンカーを認識している。アミノ酸側鎖にペイロードを含むリンカーの例を図19、22、29、30、35、36、37、39、及び40に示す。

10

【0268】

具体的な実施形態においては、本発明は、ペプチドリンカーが2つのペプチド部分を含み、該2つのペプチド部分が、それらのN末端アミノ酸残基を介してジカルボン酸リンカー ($\text{HO}_2\text{C} - \text{R} - \text{CO}_2\text{H}$) と接続される、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0269】

本発明の範囲内の特定のリンカーは、2つのペプチド部分を含み、該2つのペプチド部分は、それらのN末端アミノ酸残基を介して連結している (例として、図3参照)。2つのペプチド部分のN末端アミノ酸は、ジカルボン酸を介して連結することもでき、該ジカルボン酸に含まれる各カルボン酸基がペプチド部分のN末端アミノ基とアミド結合 (bond) を形成する。

20

【0270】

任意のジカルボン酸を用いて、N末端アミノ酸残基を介して2つのペプチド部分を連結させることができる。特定の実施形態においては、ジカルボン酸は、脂肪族ジカルボン酸であってよい。すなわち、ジカルボン酸は、エタン二酸、プロパン二酸、ブタン二酸、ペンタン二酸、ヘキサン二酸、ヘプタン二酸、オクタン二酸、ノナン二酸、又はデカン二酸であってよい。特定の実施形態においては、2つのペプチド部分は、それらのN末端アミノ酸を介してブタン二酸分子と連結される (図3、14、20、21、27、及び34参照)。特定の実施形態においては、2つのペプチド部分は、それらのN末端アミノ酸を介してペンタン二酸分子と連結される (図26参照)。脂肪族ジカルボン酸は、置換又は非置換のアルキル鎖又はアルケニル鎖を含んでいてよい。

30

【0271】

特定の実施形態においては、ジカルボン酸は、芳香族ジカルボン酸であってよい。芳香族ジカルボン酸としては、限定するものではないが、フタル酸、イソフタル酸、又はテレフタル酸が挙げられる。

【0272】

N末端アミノ酸を介して2つのペプチド部分を連結すると、抗体中に含まれるグルタミン残基にコンジュゲートするのに好適であり得る遊離N末端アミノ基を含まないペプチドコンストラクトが得られることを理解されたい。従って、2つのN末端で連結されたペプチド部分を含むペプチドリンカーは、好ましくは、抗体中に含まれるグルタミン部分にペプチドリンカーをコンジュゲートすることができるようにするためにリジン残基、リジン模倣体、又はリジン誘導体を含む。

40

【0273】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーに含まれる第1のペプチド部分は、配列番号1~8、11~14、16~29、又は82~93に記載のアミノ酸配列のいずれかを含み得る。第2のペプチド部分は、任意のアミノ酸配列を有してよい。特定の実施形態においては、第2のペプチド部分は、2~100、好ましくは2~50、より好ましくは2~25、更に好ましくは2~10、最も好ましくは2~5のアミノ酸残基長を有し

50

得る。特定の実施形態においては、第2のペプチド部分は、ジペプチド又はトリペプチドであってよい。しかし、第2のペプチド部分は、単一のアミノ酸又はより長いペプチドであってもよいことに留意されたい。ペイロードの効率的な放出を可能にするために、第2のペプチド部分は、好ましくは、ペプチダーゼによって効率的に切断されるペプチド配列を含む。特定の実施形態においては、第2のペプチド部分は、配列 A s n、A l a、A l a - A l a、A l a - A s n、V a l - A l a、V a l - C i t、A l a - A r g、A r g - A l a、A l a - A l a - A r g（配列番号34）、A l a - A r g - A l a（配列番号35）、A l a - A l a - A s n（配列番号36）を有し得る。

【0274】

すなわち、特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、構造：

10

[ペイロード1] - [ペプチド1] - [ジカルボン酸] - [ペプチド2] - [ペイロード2]；（式中、

[ペイロード1]及び[ペイロード2]は、ペイロードであり、

[ペプチド1]は、第1のペプチド部分であり、

[ペプチド2]は、第2のペプチド部分であり、

[ジカルボン酸]は、ジカルボン酸である）

を有し得、

該ペプチド部分1及び/又は2のうちの少なくとも1つは遊離アミンを含み、

ペプチド1のN末端及びペプチド2のN末端は、該ジカルボン酸を介して接続しており、

20

ペイロード1は、好ましくは化学リンカーを介してペプチド1のC末端に結合（a t t a c h）しており、そして

ペイロード2は、好ましくは化学リンカーを介してペプチド2のC末端に結合（a t t a c h）している）。

【0275】

好ましくは、遊離アミン基を含むペプチド部分は、本明細書の他の箇所に定義したようなリジン残基、リジン模倣体、若しくはリジン誘導體、又は配列番号1～8、11～14、16～29、若しくは82～93に記載のアミノ酸配列のいずれか1つを含むペプチドリンカーを含むペプチド部分である。

【0276】

30

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、配列番号1～8、11～14、16～29、又は82～93に記載の配列を含む第1のペプチド部分及び配列 A l a - A l a を含む第2の部分を含み得、該第1及び第2のペプチド部分は、それらのN末端アミノ酸を介してブタン二酸分子と連結されている。

【0277】

特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、配列 R K A A を含む第1のペプチド部分及び配列 A l a - A l a を含む第2の部分を含み得、該第1及び第2のペプチド部分は、それらのN末端アミノ酸を介してブタン二酸分子と連結されている。

【0278】

2つのペプチド部分をそれらのN末端アミノ酸残基を介して結合（c o u p l e）させる代わりに、第2のペプチド部分を第1のペプチド部分のアミノ酸側鎖に結合（c o u p l e）させてもよい。すなわち、ペプチドリンカーに含まれる第1のペプチド部分は、配列番号6、11～12、20～21、23、26～29、又は82～93に記載のアミノ酸配列のいずれかを含有し得る。第2のペプチド部分、すなわちアミノ酸側鎖に位置するのは、任意のアミノ酸配列を有してよい。特定の実施形態においては、第2のペプチド部分は、ジペプチド又はトリペプチドであってよい。しかし、第2のペプチド部分は、単一のアミノ酸又はより長いペプチドであってもよいことに留意されたい。ペイロードの効率的な放出を可能にするために、第2のペプチド部分は、好ましくは、ペプチダーゼによって効率的に切断されるペプチド配列を含む。特定の実施形態においては、第2のペプチド部分は、配列 A s n、A l a、A l a - A l a、A l a - A s n、V a l - A l a、

40

50

Val - Cit、Ala - Arg、Arg - Ala、Ala - Ala - Arg (配列番号 34)、Ala - Arg - Ala (配列番号 35)、Ala - Ala - Asn (配列番号 36) を有し得る。

【0279】

本発明に係るペプチドリンカーは、2つ以上のペイロードを含む。2つ以上のペイロードを含むペプチドリンカーは、好ましくは化学合成によって得られる。

【0280】

当業者は、化学合成によってペイロードをアミノ酸ベースのリンカーに結合 (couple) させる方法を認識している。例えば、アミンを含むペイロード (例えば、アウリスタチン類似体の場合)、又はチオールを含むペイロード (例えば、マイタンシン類似体の場合)、又はヒドロキシルを含有するペイロード (例えば、SN-38類似体の場合) を、化学合成によってアミノ酸ベースのリンカーのC末端に結合 (attach) させることができる。しかし、当業者は、化学合成によってペイロードをアミノ酸又はアミノ酸誘導体のN末端、C末端、又は側鎖に結合 (couple) させるために利用することができる更なる反応及び反応性基を認識している。化学合成によってペイロードをアミノ酸ベースのリンカーに結合 (couple) させるために使用することができる典型的な反応としては、限定するものではないが、ペプチドカップリング、活性化エステルカップリング (NHSエステル、PFPエステル)、クリック反応 (CuAAC、SPAAC)、マイケル付加 (チオールマレイミドコンジュゲーション) が挙げられる。

【0281】

ペイロードのペプチドへの結合 (couple) については、例えば、Costoplus et al. (Peptide - Cleavable Self - immolative Maytansinoid Antibody - Drug Conjugates Designed To Provide Improved Bystander Killing. ACS Med Chem Lett. 2019 Sep 27; 10 (10): 1393 - 1399)、Sonzini et al. (Improved Physical Stability of an Antibody - Drug Conjugate Using Host - Guest Chemistry. Bioconjug Chem. 2020 Jan 15; 31 (1): 123 - 129)、Boder et al. (Synthesis and biological evaluation of RGD and isoDGR peptidomimetic - amanitin conjugates for tumor - targeting. Beilstein J. Org. Chem. 2018, 14, 407 - 415)、Nunes et al. (Use of a next generation maleimide in combination with THIOMAB™ antibody technology delivers a highly stable, potent and near homogeneous THIOMAB™ antibody - drug conjugate (TDC). RSC Adv., 2017, 7, 24828 - 24832)、Doronina et al. (Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity. Bioconjug Chem. 2006 Jan - Feb; 17 (1): 114 - 24)、Nakada et al. (Novel antibody drug conjugates containing exatecan derivative - based cytotoxic payloads. Bioorg Med Chem Lett. 2016 Mar 15; 26 (6): 1542 - 1545)、及び Dickgiesser et al. (Site - Specific Conjugation of Native Antibodies Using Engineered Microbial Transglutaminases. Bioconju

10

20

30

40

50

g Chem. 2020 Mar 12. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00061)により、従来技術において広範囲に記載されている。

【0282】

ペイロードは、本発明に係るペプチドベースのリンカー又はペプチドを含むリンカーのN末端及び/又はC末端に結合(couple)できることを理解されたい。特定の実施形態においては、ペイロードは、ペプチド又はアミノ酸残基のN末端アミノ基又はC末端カルボキシル基に直接結合(couple)することができる。

【0283】

当業者は、ペイロードをアミノ酸残基に結合(couple)させるのに適した反応性を認識している。例えば、アミンを含むペイロードは、アミド結合(bond)を介してアミノ酸残基のC末端カルボキシル基に結合(couple)することができる。あるいは、チオール基又は及びヒドロキシル基を含むペイロードは、それぞれチオエステル結合(bond)又はエステル結合(bond)を介してアミノ酸のC末端カルボキシル基に結合(couple)することができる(図34参照)。カルボン酸基を含むペイロードは、アミド結合(bond)を介してアミノ酸残基のN末端アミノ基に結合(couple)することができる(図32参照)。

10

【0284】

特定の実施形態においては、ペイロードは、本発明に係るリンカーに含まれるペプチド又はアミノ酸残基のN末端及び/又はC末端に間接的に結合(couple)することができる。当業者は、ペイロードを本発明に係るリンカーに含まれるアミノ酸残基のN末端アミノ基又はC末端カルボキシル基に結合(couple)させるために使用することができるリンカー分子について認識している。

20

【0285】

特定の実施形態においては、ヒドロキシル基を含むペイロードは、リンカー分子を介してアミノ酸残基のN末端に結合(couple)することができる。例えば、ヒドロキシル基を含むペイロードは、カルバマートリンカーを介してN末端アミノ基に結合(couple)することができる。

【0286】

特定の実施形態においては、チオール基を含むペイロードは、リンカー分子を介してアミノ酸残基のN末端に結合(couple)することができる。例えば、チオール基を含むペイロードは、チオカルバマートリンカーを介してN末端アミノ基に結合(couple)することができる。あるいは、チオール基を含むペイロードは、カルボキシル基及びチオール基を含むアルキルリンカー分子を介してN末端アミノ基に結合(couple)することもできる。特定の実施形態においては、アルキルリンカー分子は、ペイロードが3-メルカプトプロピオン酸リンカー分子に含まれるチオール基と二硫黄結合(bond)を形成する3-メルカプトプロピオン酸リンカー分子であってもよい。

30

【0287】

特定の実施形態においては、アミド基を含むペイロードは、リンカー分子を介してアミノ酸残基のN末端に結合(couple)することができる。例えば、アミン基を含むペイロードは、ジカルボン酸リンカー分子を介してN末端アミノ基に結合(couple)することができ、該ジカルボン酸リンカーに含まれるカルボン酸基の各々がペイロード及びN末端アミノ酸残基のアミノ基とアミド結合(bond)を形成する。本発明でリンカー分子として使用することができるジカルボン酸の例は、限定するものではないが、コハク酸又はピメリン酸である。

40

【0288】

本発明に係るペプチドリンカーに含まれるアミノ酸残基のN末端にペイロードを間接的に結合(couple)させるための代替リンカー分子又は本発明に係るペプチドリンカーに含まれるアミノ酸残基のC末端にペイロードを間接的に結合(couple)させるのに適したリンカー分子は、当技術分野において記載されており、本発明に包含される。

【0289】

50

本発明者らは、驚くべきことに、ペプチドリンカーのN末端及びC末端にペイロードが結合 (attach) しているペプチドリンカーは、全てのペイロードがペプチドリンカーのC末端に結合 (attach) しているリンカーよりも強い抗腫瘍活性を有することを見出した (実施例 11 及び実施例 12 参照)。

【0290】

従って、具体的な実施形態においては、本発明は、1つ以上のペイロードが、アミンを含むペプチドリンカーのN末端に結合 (attach) しており、1つ以上のペイロードが、該アミンを含むペプチドリンカーのC末端に結合 (attach) している、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0291】

特定の実施形態においては、1つ又は2つのペイロードが、アミンを含むペプチドリンカーのN末端に結合 (attach) してよく、1つ又は2つのペイロードが、該アミンを含むペプチドリンカーのC末端に結合 (attach) してよい。すなわち、ペプチドリンカーは、DAR4、DAR6、又はDAR8のリンカーであってよい。

【0292】

特定の実施形態においては、1つのペイロードが、アミンを含むペプチドリンカーのN末端に結合 (attach) してよく、1つのペイロードが、該アミンを含むペプチドリンカーのC末端に結合 (attach) してよい。このような実施形態においては、ペプチドリンカーは、「直鎖状」DAR4リンカーであってよい。

【0293】

アミンを含むペプチドリンカーは、本明細書で定義されるリジン模倣体又はリジン誘導体を含むペプチドリンカーを含む、本明細書に開示されるリジンを含むペプチドリンカーのいずれか1つであってよい。

【0294】

特定の実施形態においては、「直鎖状」DAR4リンカーは、以下の構造 (N C方向) :

[ペイロード1] - [(Aa)_m - (Lys) - (Aa)_n] - [ペイロード2]; (式中、

[ペイロード1]及び[ペイロード2]は、ペイロードであり、

Aaは、任意のアミノ酸残基であってよく;

m及びnは、0~10、好ましくは0~6、より好ましくは0~4の範囲の整数であってよく;

Lysは、リジン残基、リジン模倣体、又はリジン誘導体である)を有し得、

[ペイロード1]は、(Aa)又は(Lys)の残基のN末端に直接又は間接的に結合 (attach) しており、

[ペイロード2]は、(Aa)又は(Lys)の残基のC末端に直接又は間接的に結合 (attach) している。

【0295】

特定の実施形態においては、「直鎖状」DAR4リンカーは、以下の構造:

[ペイロード1] - [(Aa)_m - (Arg/His) - (Aa)_n - (Lys) - (Aa)_o] - [ペイロード2]; (式中、

[ペイロード1]及び[ペイロード2]は、ペイロードであり、

Aaは、任意のアミノ酸残基であってよく;

m、n、及びoは、0~10、好ましくは0~6、より好ましくは0~4の範囲の整数であってよく;

Argは、アルギニン残基、アルギニン模倣体、又はアルギニン誘導体であってよく;

Hisは、ヒスチジン残基、ヒスチジン模倣体、又はヒスチジン誘導体であってよく

Lysは、リジン残基、リジン模倣体、又はリジン誘導体である)

を有し得、

10

20

30

40

50

[ペイロード1]は、(Aa)又は(Arg/His)の残基のN末端に直接又は間接的に結合(attach)しており、

[ペイロード2]は、(Aa)又は(Lys)の残基のC末端に直接又は間接的に結合(attach)している)。

【0296】

特定の実施形態においては、「直鎖状」DAR4リンカーは、以下の構造：

[ペイロード1] - [(Aa)_m - (Lys) - (Aa)_n - (Arg/His) - (Aa)_o] - [ペイロード2]；(式中、

[ペイロード1]及び[ペイロード2]は、ペイロードであり、

Aaは、任意のアミノ酸残基であってよく；

m、n、及びoは、0～10、好ましくは0～6、より好ましくは0～4の範囲の整数であってよく；

Argは、アルギニン残基、アルギニン模倣体、又はアルギニン誘導体であってよく；

Hisは、ヒスチジン残基、ヒスチジン模倣体、又はヒスチジン誘導体であってよく

Lysは、リジン残基、リジン模倣体、又はリジン誘導体である)

を有し得、

[ペイロード1]は、(Aa)又は(Lys)の残基のN末端に直接又は間接的に結合(attach)しており、

[ペイロード2]は、(Aa)又は(Arg/His)の残基のC末端に直接又は間接的に結合(attach)している)。

【0297】

ペイロードは、ペプチドリンカーのN末端及びC末端に直接又は間接的に結合(attach)できることを理解されたい。一実施形態においては、第1のペイロードはペプチドリンカーのN末端アミノ基に直接結合(attach)することができ、第2のペイロードはペプチドリンカーのC末端カルボキシル基に直接結合(attach)することができる。

【0298】

しかし、ペイロードは、例えば本明細書に記載の化学リンカーのいずれか1つを用いて、ペプチドリンカーのN末端及びC末端に間接的に結合(attach)することが好ましい。特に、ペイロードは、本明細書の他の箇所により詳細に記載されているように、ジカルボン酸及び第2のペプチド部分を介してペプチドリンカーのN末端に間接的に結合(attach)することができる。更に、全てのペイロードが、本明細書に開示される自壊性部位のいずれか1つ等の自壊性部位を介して、ペプチドリンカー又は化学リンカーに結合(attach)することが好ましい。

【0299】

特定の実施形態においては、本発明は、ペイロードが、

- ・毒素；
- ・サイトカイン；
- ・成長因子；
- ・放射性核種；
- ・ホルモン；
- ・抗ウイルス剤；
- ・抗菌剤；
- ・蛍光色素；
- ・免疫調節/免疫賦活剤；
- ・半減期延長部分；
- ・溶解度増大部分；
- ・ポリマー-毒素コンジュゲート；
- ・核酸；
- ・ビオチン若しくはストレプトアビジンの部分；

10

20

30

40

50

- ・ ビタミン；
- ・ タンパク質分解剤（「P R O T A C」）；
- ・ 受容体のリガンド；
- ・ 標的結合（b i n d i n g）部分；及び/又は
- ・ 抗炎症剤

のうちの少なくとも1つである、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0300】

特定の実施形態においては、ペイロードはサイトカインであってよい。「サイトカイン」という用語は、本発明で使用される場合、他の細胞の機能に影響を与え、免疫又は炎症応答における細胞間の相互作用を調節する任意の分泌ポリペプチドを意味する。サイトカインとしては、どの細胞に産生されるかにかかわらず、モノカイン、リンホカイン、及びケモカインが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、モノカインは、一般に単球によって産生及び分泌されるといわれているが、ナチュラルキラー細胞、線維芽細胞、好塩基球、好中球、内皮細胞、脳星状細胞、骨髄間質細胞、表皮ケラチノサイト、及びBリンパ球等の他の多くの細胞もモノカインを産生する。リンホカインは、一般にリンパ球細胞によって産生されるといわれている。サイトカインの例としては、インターロイキン-1（I L - 1）、インターロイキン-6（I L - 6）、腫瘍壊死因子（T N F）、及び腫瘍壊死因子（T N F）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0301】

特定の実施形態においては、ペイロードは抗炎症剤であってもよい。「抗炎症剤」という用語は、本発明で使用される場合、その主な作用機序及び使用が炎症を処置する領域におけるものである剤のクラスに加えて、有用な抗炎症効果を有する別の治療クラスからの任意の他の剤も意味する。このような抗炎症剤としては、非ステロイド性抗炎症薬（N S A I D）、疾患修飾性抗リウマチ薬（D M A R D）、マクロライド系抗生物質、及びスタチン等が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、N S A I Dとしては、サリチル酸塩（例えば、アスピリン）、アリアルプロピオン酸（例えば、イブプロフェン）、アントラニル酸（例えば、メフェナム酸）、ピラゾール（例えば、フェニルブタゾン）、環状酢酸（インドメタシン）、及びオキシカム（例えば、ピロキシカム）が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明の方法において使用するための抗炎症剤としては、スリンダク、ジクロフェナク、テノキシカム、ケトロラク、ナプロキセン、ナブメトン、ジフルニサル、ケトプロフェン、アリアルプロピオン酸、テニダップ、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジン、セレコキシブ、ロフェコキシブ、メロキシカム、エトリコキシブ、バルデコキシブ、メトトレキサート、エタネルセプト、インフリキシマブ、アダリムマブ、アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、ロキシスロマイシン、エリスロマイシン、イブプロフェン、デクスイブプロフェン、フルルピプロフェン、フェノプロフェン、フェンブフェン、ベノキサプロフェン、デクスケトプロフェン、トルフェナム酸、ニメスリド、及びオキサプロジンが挙げられる。

20

30

【0302】

特定の実施形態においては、抗炎症剤は、抗炎症性サイトカインであってもよく、これは、標的特定の抗体にコンジュゲートしたときに、例えば自己免疫疾患によって引き起こされる炎症を改善することができる。抗炎症活性を有するサイトカインは、特に限定されないが、I L - 1 R A、I L - 4、I L - 6、I L - 10、I L - 11、I L - 13、又はT G F - であってよい。

40

【0303】

特定の実施形態においては、ペイロードは成長因子であってもよい。「成長因子」という用語は、本発明で使用される場合、細胞の成長、増殖、細胞分化、及び/又は細胞成熟を刺激することができる天然に存在する物質を指す。成長因子は、タンパク質又はステロイドホルモンの形態で存在する。成長因子は、様々な細胞プロセスを制御するために重要である。成長因子は、典型的には、細胞間のシグナル伝達分子として作用する。しかし、

50

細胞の成長、増殖、細胞分化、及び細胞成熟を促進する能力は成長因子間で異なる。成長因子の例の非限定的なリストには、塩基性線維芽細胞成長因子、アドレノメデュリン、アンジオポエチン、自己分泌型細胞運動刺激因子、骨形成タンパク質、脳由来神経栄養因子、表皮成長因子、上皮成長因子、線維芽細胞成長因子、グリア細胞株由来神経栄養因子、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、成長分化因子 - 9、肝細胞成長因子、肝細胞がん由来成長因子、インスリン成長因子、インスリン様成長因子、遊走刺激因子、ミオスタチン、神経成長因子、及び他のニューロトロフィン、血小板由来成長因子、トランスフォーミング成長因子、トランスフォーミング成長因子、腫瘍壊死因子、血管内皮成長因子、胎盤成長因子、ウシ胎児ソマトトロフィン、及びサイトカイン（例えば、IL - 3 及び IL - 6 については IL - 1 - 補因子、IL - 2 - t 細胞成長因子、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、並びに IL - 7 等）が含まれる。

10

【0304】

特定の実施形態においては、ペイロードはホルモンであってもよい。「ホルモン」という用語は、本発明で使用される場合、生物の他の部分の細胞に影響を与えるメッセージを発信する、身体のある部分における細胞又は腺によって放出される化学物質を指す。本発明において有用なホルモンの例は、限定するものではないが、メラトニン (MT)、セロトニン (5-HT)、チロキシン (T4)、トリヨードチロニン (T3)、エピネフリン又はアドレナリン (EPI)、ノルエピネフリン又はノルアドレナリン (NRE)、ドーパミン (DPM 又は DA)、抗ミューラー管ホルモン又はミューラー管抑制ホルモン (AMH)、アディポネクチン (Acrop30)、副腎皮質刺激ホルモン又はコルチコトロピン (ACTH)、アンジオテンシノーゲン及びアンジオテンシン (AGT)、抗利尿ホルモン又はバソプレシン (ADH)、心房性ナトリウム利尿ペプチド又はアトリオペプチン (ANP)、カルシトニン (CT)、コレシストキニン (CCK)、コルチコトロピン放出ホルモン (CRH)、エリスロポエチン (EPO)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、ガストリン (GRP)、グレリン、グルカゴン (GCG)、ゴナドトロフィン放出ホルモン (GnRH)、成長ホルモン放出ホルモン (GHRH)、ヒト絨毛性ゴナドトロフィン (hCG)、ヒト胎盤性ラクトゲン (HPL)、成長ホルモン (GH 又は hGH)、インヒピン、インスリン (INS)、インスリン様成長因子又はソマトメジン (IGF)、レプチン (LEP)、黄体形成ホルモン (LH)、メラノサイト刺激ホルモン (MSH 又は -MSH)、オレキシン、オキシトシン (OXT)、副甲状腺ホルモン (PTH)、プロラクチン (PRL)、リラキシン (RLN)、セクレチン (SCT)、ソマトスタチン (SRIF)、トロンボポエチン (TPO)、甲状腺刺激ホルモン又はサイロトロピン (TSH)、サイロトロピン放出ホルモン (TRH)、コルチゾール、アルドステロン、テストステロン、デヒドロエピアンドロステロン (DHEA)、アンドロステンジオン、ジヒドロテストステロン (DHT)、エストロン、エストリオール (E3)、プロゲステロン、カルシトリオール、カルシジオール、プロスタグランジン (PG)、ロイコトリエン (LT)、プロスタサイクリン (PGI2)、トロンボキサン (TXA2)、プロラクチン放出ホルモン (PRH)、リポトロピン (PRH)、脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、神経ペプチド Y (NPY)、ヒスタミン、エンドセリン、膵臓ポリペプチド、レニン、並びにエンケファリンである。具体的な実施形態においては、ホルモンは、コルチゾールである。

20

30

40

【0305】

特定の実施形態においては、ペイロードは抗ウイルス剤であってもよい。「抗ウイルス剤」という用語は、本発明で使用される場合、哺乳動物におけるウイルスの形成及び/又は複製を阻害するのに有効な剤（化合物又は生物学的）を意味する。これには、哺乳動物におけるウイルスの形成及び/又は複製に必要な宿主又はウイルスの機構のいずれかに干渉する剤が含まれる。抗ウイルス剤としては、例えば、リバビリン、アマンタジン、VX - 497 (メリメポディブ、Vertex Pharmaceuticals)、VX - 498 (Vertex Pharmaceuticals)、レボピリン、ピラミジン、セブレン (マキサミン)、XTL - 001 及び XTL - 002 (XTL Biophar

50

m a c e u t i c a l s) が挙げられる。

【 0 3 0 6 】

特定の実施形態においては、ペイロードは抗菌剤であってもよい。「抗菌剤」という用語は、本発明で使用される場合、(i) 細菌の成長を阻害、低減、若しくは防止する、(i i) 対象において感染を生じさせる細菌の能力を阻害若しくは低下させる、又は(i i i) 環境において増殖する又は感染性を維持する細菌の能力を阻害若しくは低下させることが可能な任意の物質、化合物、物質の組み合わせ、又は化合物の組み合わせを指す。「抗菌剤」という用語は、細菌の感染性又は病原性を低下させることができる化合物も指す。

【 0 3 0 7 】

本発明においてペイロードとして使用することができる好適な抗生物質としては、マクロライド、ペニシリン、セファロスポリン、キノロン、フルオロキノロン、スルホンアミド、テトラサイクリン、モノバクタム、カルバペネム、アミノグリコシド、リファマイシン、 β -ラクタム、アンサマイシン、オキサゾリジノン、ストレプトグラミン、グリコペプチド、ポリペプチド、及びアルスフェナミン、又はそれらの薬学的に許容し得る塩が挙げられるが、これらに限定されず、より好ましくは、該抗生物質は、エリスロマイシン、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、クリンダマイシン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、チゲサイクリン、トリメトプリム、ピオシアニン、バンコマイシン、ストレプトマイシン、ジヒドロストレプトマイシン、アミカシン、アプラマイシン、アルベカシン、アストロマイシン、ベカナマイシン、ジベカシン、フラマイセチン、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、イセパマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン、パロモマイシン、ロドストレプトマイシン、リボスタマイシン、シソマイシン、スペクチノマイシン、トブラマイシン、ベルダマイシン、ポリミキシン、グリシルサイクリン、カルバペネム、カルバセフェム、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、リンコマイシン、ダプトマイシン、ノボピオシン、クリンダマイシン、エタンブトール、ホスホマイシン、フシジン酸、フラゾリドン、イソニアジド、リネゾリド、メトロニダゾール、ムピロシン、ニトロフアントイン、プラテンシマイシン、ピラジナミド、キヌプリスチン、ベンザルコニウム、ダルホプリスチン、リファンピン、リファンピシン、リファブチン、リファキシミン、リファログ、チニダゾール、ピオマイシン、及びカプレオマイシン、又はそれらの薬学的に許容し得る塩から選択される。

【 0 3 0 8 】

特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、ペイロードとしてリファログ (r i f a l o g) を含む (図 3 2 参照) 。

【 0 3 0 9 】

特定の実施形態においては、ペイロードは免疫調節剤であってもよい。「免疫調節剤」という用語は、併用療法について本発明で使用される場合、宿主の免疫系を抑制、マスク、又は増強する作用を有する物質を指す。免疫調節剤の例としては、サイトカイン、ペプチド模倣体、及び抗体 (例えば、ヒト、ヒト化、キメラ、モノクローナル、ポリクローナル、Fv、ScFv、Fab若しくはF(ab)₂の断片、又はエピトープ結合 (b i n d i n g) 断片) 等のタンパク質性剤、核酸分子 (例えば、アンチセンス核酸分子、iRNA、及び三重らせん)、低分子、有機化合物、並びに無機化合物が挙げられるが、これらに限定されない。具体的には、免疫調節剤としては、メトトレキサート、レフルノミド、シクロホスファミド、サイトキサン、イムラン、シクロスポリンA、ミノサイクリン、アザチオプリン、抗生物質 (例えば、FK506 (タクロリムス))、メチルプレドニゾロン (MP)、コルチコステロイド、ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシン (シロリムス)、ミゾリピン、デオキシスベルグアリン、ブレキナール、マロノニトリロアミド (例えば、レフルナミド)、T細胞受容体調節因子、及びサイトカイン受容体調節因子が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 3 1 0 】

特定の実施形態においては、免疫調節剤は免疫賦活剤であってもよい。「免疫賦活剤」

という用語は、本発明で使用される場合、好ましくは、免疫応答（例えば、特定の病原体に対する免疫応答）を惹起し得る任意の物質又は物質を指す。免疫細胞活性化化合物としては、Toll様受容体（TLR）アゴニストが挙げられる。このようなアゴニストとしては、病原体関連分子パターン（PAMP）、例えば細菌由来の免疫調節因子（別名、危険シグナル）等の感染模倣組成物及び損傷関連分子パターン（DAMP）、例えばストレス又は損傷を受けた細胞を模倣する組成物が挙げられる。TLRアゴニストとしては、核酸又は脂質組成物（例えば、モノホスホリリピドA（MPLA））が挙げられる。一例では、TLRアゴニストは、シトシン-グアノシンオリゴヌクレオチド（CpG-ODN）、PEI-CpG-ODN等のポリ（エチレンイミン）（PEI）-縮重オリゴヌクレオチド（ODN）、又は二本鎖デオキシリボ核酸（DNA）等のTLR9アゴニストを含む。別の例では、TLRアゴニストは、ポリイノシン-ポリシチジル酸（ポリ（I:C））、PEI-ポリ（I:C）、ポリアデニル酸-ポリウリジル酸（ポリ（A:U））、PEI-ポリ（A:U）、又は二本鎖リボ核酸（RNA）等のTLR3アゴニストを含む。他の例示的なワクチン免疫賦活化合物としては、STINGアゴニスト（例えば、STINGアゴニスト-3、国際公開第2017175147A1号の実施例10から抽出）、リポ多糖（LPS）、ケモカイン/サイトカイン、真菌-グルカン（レンチナン等）、イミキモド、CRX-527、及びOM-174が挙げられる。

10

【0311】

特定の実施形態においては、免疫賦活剤は、限定するものではないが、イミキモド、レシキモド、852-A、ベサトリモド、AZD8848、モトリモド、又はセルガントリモド等のToll様受容体（TLR）7/8アゴニストであってもよい。

20

【0312】

特定の実施形態においては、本発明のペプチドリンカーは、2つの異なる免疫賦活剤を含んでもよい。例えば、本発明のペプチドリンカーは、STINGアゴニスト3及びレシキモドを含み得る（図34参照）。

【0313】

特定の実施形態においては、ペイロードは、半減期延長部分又は溶解度増大部分であってもよい。半減期延長部分は、例えば、PEG部分（ポリエチレングリコール部分；PEG化）、他のポリマー部分、PAS部分（プロリン、アラニン、及びセリンを含むオリゴペプチド；PAS化）、又は血清アルブミン結合剤である。溶解度増大部分は、例えば、PEG部分（PEG化）又はPAS部分（PAS化）である。

30

【0314】

特定の実施形態においては、ペイロードは、ポリマー-毒素コンジュゲートであってもよい。ポリマー-毒素コンジュゲートは、1つ又は多数のペイロード分子を運ぶことができるポリマーである。例としては、Mersana therapeuticsによって開発されたフレキシマーポリマー-毒素、Mablinkによって開発されたPSARポリマー-毒素、Amunixによって開発されたXTENポリマー-毒素が挙げられる。あるいは、ポリマー-毒素コンジュゲートは、本明細書に開示される毒素のいずれを含んでもよい。

【0315】

特定の実施形態においては、ペイロードはヌクレオチドであってもよい。核酸ペイロードの一例は、MultiCell Technologies, Inc.によって開発された、腫瘍溶解特性及び免疫活性化特性を有する非常に小さな非コード二本鎖RNAであるMCT-485である。

40

【0316】

特定の実施形態においては、ペイロードは蛍光色素であってもよい。「蛍光色素」という用語は、本発明で使用される場合、第1の波長で光を吸収し、該第1の波長よりも長い第2の波長で発光する色素を指す。特定の実施形態においては、蛍光色素は、650~900nmの波長で発光する近赤外蛍光色素である。この領域では、組織の自家蛍光が少なく、蛍光消光が少ないため、バックグラウンド干渉を最小限に抑えながら、深部組織への

50

透過が増強される。従って、近赤外蛍光イメージングを用いて、本発明の抗体 - ペイロードコンジュゲートが結合 (b i n d) している組織を手術中に可視化することができる。「近赤外蛍光色素」は当技術分野で公知であり、市販されている。特定の実施形態においては、近赤外蛍光色素は、I R D y e 8 0 0 C W、C y 7、C y 7 . 5、N I R C F 7 5 0 / 7 7 0 / 7 9 0、D y L i g h t 8 0 0、又はA l e x a F l u o r 7 5 0 であり得る。

【 0 3 1 7 】

特定の実施形態においては、ペイロードは放射性核種を含んでいてもよい。「放射性核種」という用語は、本発明で使用される場合、例えば、Y、I n、T b、A c、C u、L u、T c、R e、C o、F e等の放射性金属の正に荷電したイオンを含む医学的に有用な放射性核種、例えば9 0 Y、1 1 1 I n、6 7 C u、7 7 L u、9 9 T c、1 6 1 T b、2 2 5 A c等に関する。放射性核種は、D O T A又はN O D A - G A等のキレート剤に含まれていてもよい。更に、放射性核種は、治療用放射性核種、又は後述する通りイメージング技術において造影剤として使用することができる放射性核種であってもよい。放射性核種又は放射性核種を含む分子は当技術分野で公知であり、市販されている。

10

【 0 3 1 8 】

特定の実施形態においては、ペイロードは、受容体のリガンド又は受容体の基質であってもよい。特に、ペイロードは、がん細胞で強く発現することが知られている受容体のリガンド又は基質であってもよい。すなわち、このような受容体のリガンド又は基質を本発明のペプチドリンカーを介して抗体に結合 (c o u p l e) させることにより、抗体 - ペイロードコンジュゲートの特異性を改善することができ、がん細胞等の標的細胞への抗体 - ペイロードコンジュゲートの内部移行を更に改善することができる。例えば、葉酸受容体 F R を過剰発現しているがん細胞のターゲティングを改善するために、ペイロードは葉酸であってもよい。しかし、ペイロードは、F R に高親和性で結合 (b i n d) する葉酸の誘導体又は類似体であってもよい。更に、ペイロードは、F R の任意の他のリガンド又は基質、特にF R に高親和性で結合 (b i n d) するリガンド又は基質であってもよい。

20

【 0 3 1 9 】

他の実施形態においては、ペイロードは、ビオチン受容体のリガンド又は基質であってもよい。すなわち、ペイロードは、ビオチン、ビオチンの類似体若しくは誘導体、又はビオチン受容体に高親和性で結合 (b i n d) する任意の他の分子であってもよい。

30

【 0 3 2 0 】

他の実施形態においては、ペイロードは、上皮成長因子受容体 (E G F R) のリガンド又は基質であってもよい。すなわち、ペイロードは、上皮成長因子 (E G F)、又はE G F Rに高親和性で結合 (b i n d) するその任意の誘導体、類似体、若しくは断片であってもよい。更にペイロードは、E G F Rに高親和性で結合 (b i n d) する任意の分子であってもよい。

【 0 3 2 1 】

がん細胞で強く発現することが知られている受容体を標的とするためにペイロードとして使用することができるペプチド / 低分子リガンドの他の例としては、腫瘍ホーミングペプチド : R G D ペプチド及びその誘導体 (i R G D、シレンギチド、S F I T G v 6、C N G R C 等)、細胞外マトリックスホーミングペプチド (D A G、Z D 2、C S G、P 1 G F - 2、B T 1 7 1 8)、腫瘍関連マクロファージターゲティング剤 (R P - 1 8 2、M 2 p e p、m U N O)、E G F Rターゲティングペプチド (G E 1 1)、A n g i o p e p - 2、異常な細胞シグナル伝達経路を標的とするペプチド (L P 4、N B D、H 1)、P S M A 結合剤 (尿素ベース又はホスホラミデートベースの結合剤) が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【 0 3 2 2 】

本明細書では、「リガンド」及び「基質」の両方を、特定の親和性で受容体に結合 (b i n d) する分子として定義する。しかし、「リガンド」は通常低分子であり、一方「基

50

質」は通常ペプチド又はタンパク質等の高分子であることを理解されたい。本発明に係るペプチドリンカーに含まれるリガンド又は基質は、天然に存在するリガンド若しくは基質、天然に存在するリガンド若しくは基質の誘導体、又は天然に存在するリガンド若しくは基質の化学的に修飾されたバージョンであってもよいことを理解されたい。

【0323】

特定の実施形態においては、ペイロードはビタミンであってもよい。ビタミンは、葉酸を含む葉酸塩、フォラシン、及びビタミンB9からなる群から選択してよい。ビタミンは、ビオチン、ビタミンB7からなる群から選択してよい。

【0324】

具体的な実施形態においては、本発明は、毒素が、

- ・ピロロベンゾジアゼピン（例えば、PBD）；
- ・アウリスタチン（例えば、MMAE、MMAF）；
- ・マイタンシノイド（例えば、マイタンシン、DM1、DM4、DM21）；
- ・デュオカルマイシン；
- ・ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ（NAMPT）阻害剤；
- ・ツブリシン；
- ・エンジン（例えば、カリケアマイシン）；
- ・アントラサイクリン誘導体（PNU）（例えば、ドキシソルピシン）；
- ・ピロールベースのキネシン紡錘体タンパク質（KSP）阻害剤；
- ・クリプトフィシン；
- ・薬物排出ポンプ阻害剤；
- ・サンドラマイシン；
- ・チミジル酸合成酵素阻害剤；
- ・アマニチン（例えば、 α -アマニチン）；及び
- ・カンプトテシン（例えば、エキサテカン、デルクステカン）

10

20

からなる群から選択される少なくとも1つである、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0325】

すなわち、本発明のペプチドリンカーは、好ましくは毒素ペイロードを含む。「毒素」という用語は、本発明で使用される場合、細胞又は生物にとって有毒な任意の化合物に関する。好ましくは、毒素は、細胞又は生物によって産生される。しかし、毒素は、細胞又は生物によって産生される毒素の化学的誘導体又は類似体であってもよい。毒素は、限定するものではないが、低分子、ペプチド、又はタンパク質であってもよい。具体例は、神経毒、壊死毒、血液毒、及び細胞毒である。特定の実施形態においては、毒素は、新生物疾患の処置において使用される毒素である。すなわち、本発明の方法で毒素を抗体にコンジュゲートさせ、抗体の標的特異性によって悪性細胞に又は悪性細胞中に送達することができる。

30

【0326】

特定の実施形態においては、毒素は、アウリスタチンであってもよい。「アウリスタチン」という用語は、本発明で使用される場合、有糸分裂阻害剤のファミリーを指す。アウリスタチン誘導体も用語「アウリスタチン」の定義に含まれる。アウリスタチンの例としては、アウリスタチンE（AE）、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）、及びドラスタチンの合成類似体が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0327】

特定の実施形態においては、毒素は、マイタンシノイドであってもよい。本発明の文脈において、「マイタンシノイド」という用語は、最初にアフリカの低木メイテヌス・オバツス（Maytenus ovatus）から単離された一群の高度細胞毒性薬、更にはマイタンシノール（Maytansinol）及び天然マイタンシノールのC-3エステル（米国特許第4,151,042号）；合成マイタンシノールのC-3エステル類似体

50

(Kupchan et al., J. Med. Chem. 21: 31 - 37, 1978; Higashide et al., Nature 270: 721 - 722, 1977; Kawai et al., Chem. Farm. Bull. 32: 3441 - 3451; 及び米国特許第5,416,064号); 単純カルボン酸のC-3エステル(米国特許第4,248,870号; 同第4,265,814号; 同第4,308,268号; 同第4,308,269号; 同第4,309,428号; 同第4,317,821号; 同第4,322,348号; 及び同第4,331,598号); 並びにN-メチル-L-アラニンの誘導体とのC-3エステル(米国特許第4,137,230号; 同第4,260,608号; 及びKawai et al., Chem. Pharm Bull. 12: 3441, 1984)を指す。本発明の方法において使用することができる又は本発明の抗体-ペイロードコンジュゲートに含めることができる例示的なマイタンシノイドは、マイタンシン、DM1、DM3、DM4、及び/又はDM21である。

10

【0328】

特定の実施形態においては、毒素は、デュオカルマイシンであってもよい。好適なデュオカルマイシンは、例えば、デュオカルマイシンA、デュオカルマイシンB1、デュオカルマイシンB2、デュオカルマイシンCI、デュオカルマイシンC2、デュオカルマイシンD、デュオカルマイシンSA、デュオカルマイシンMA、及びCC-1065であり得る。「デュオカルマイシン」という用語は、デュオカルマイシンの合成類似体、例えばアドゼレシン、ビゼレシン、カルゼレシン、KW-2189、及びCBI-TMIも指すことが理解されるべきである。

20

【0329】

特定の実施形態においては、毒素は、NAMPT阻害剤であってもよい。「NAMPT阻害剤」及び「ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ阻害剤」という用語は、本発明で使用される場合、NAMPTの活性を低下させる阻害剤を指す。「NAMPT阻害剤」という用語には、NAMPT阻害剤のプロドラッグも含まれ得る。NAMPT阻害剤の例としては、FK866(APO866とも呼ばれる)、GPP78塩酸塩、ST118804、STF31、ピリジルシアノグアニジン(CH-828とも呼ばれる)、GMX-1778、及びP7C3が挙げられるが、これらに限定されない。追加のNAMPT阻害剤は、当技術分野で公知であり、本明細書に記載される組成物及び方法において使用するのに好適であり得る。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2015/054060号、米国特許第8,211,912号、及び同第9,676,721号参照。幾つかの実施形態においては、NAMPT阻害剤はFK866である。幾つかの実施形態においては、NAMPT阻害剤はGMX-1778である。

30

【0330】

特定の実施形態においては、毒素は、ツブリシンであってもよい。ツブリシンは、細胞毒性ペプチドであり、9つのメンバー(A~I)を含む。ツブリシンAは、抗がん剤としての潜在的な用途を有している。それは、細胞をG2/M期で停止させる。ツブリシンAは、ピンラスチンよりも効率的に重合を阻害し、単離された微小管の脱重合を誘導する。ツブリシンAは、様々な腫瘍細胞株に対して強力な細胞分裂阻害効果を有し、そのIC50はピコモル範囲である。本発明の方法で使用することができる他のツブリシンは、ツブリシンEであり得る。

40

【0331】

特定の実施形態においては、毒素は、エンジンであってもよい。「エンジン」という用語は、本発明で使用される場合、二重結合(bond)によって分離されている2つの三重結合(bond)を含有する9員環及び10員環のいずれかを特徴とする一群の細菌天然産物を指す(例えば、K.C.Nicolaou; A.L.Smith; E.W.Yue(1993). "Chemistry and biology of natural and designed enediynes". PNAS 90(13): 5881 - 5888参照; この全内容は参照により本明細書に組み込まれる)。幾つかのエンジンはベルグマン環化を受けることができ、その結果生じるジラジカルである1,4-

50

デヒドロベンゼン誘導体は、DNAの糖骨格から水素原子を引き抜くことができ、その結果DNA鎖が切断される（例えば、S. Walker; R. Landovitz; W. D. Ding; G. A. Ellestad; D. Kahne (1992). "Cleavage behavior of calicheamicin gamma 1 and calicheamicin T". Proc Natl Acad Sci U.S.A. 89 (10): 4608 - 12 参照; この全内容は参照により本明細書に組み込まれる)。DNAとの反応性によって多くのエンジンに抗生物質の特徴が付与され、幾つかのエンジンは、抗がん抗生物質として臨床的に研究されている。エンジンの非限定的な例は、ジネミシン、ネオカルチノスタチン、カリケアマイシン、エスペラミシンである（例えば、Adrian L. Smith and K. C. Bicolaou, "The Eneidyne Antibiotics" J. Med. Chem., 1996, 39 (11), pp 2103 - 2117; 及び Donald Borders, "Eneidyne antibiotics as antitumor agents," Informa Healthcare; 1st edition (Nov. 23, 1994, ISBN - 10: 0824789385 参照; これらの全内容は参照により本明細書に組み込まれる)。具体的な実施形態においては、毒素は、カリケアマイシンであってよい。

10

【0332】

特定の実施形態においては、毒素は、ドキソルビシンであってよい。「ドキソルビシン」は、本発明で使用される場合、ストレプトマイセス属の細菌であるストレプトマイセス・ペウセチウス (*Streptomyces peucetius*) 変種カエシウス (*caesius*) に由来するアントラサイクリンファミリーのメンバーを指し、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エビルビシン、及びイダルビシンを含む。

20

【0333】

特定の実施形態においては、毒素は、キネシン紡錘体タンパク質阻害剤であってよい。「キネシン紡錘体タンパク質阻害剤」という用語は、細胞分裂中に双極紡錘体の組み立てに關与するキネシン紡錘体タンパク質を阻害する化合物を指す。キネシン紡錘体タンパク質阻害剤は、がんの処置のために研究されている。キネシン紡錘体タンパク質阻害剤の例としては、イスピネシブが挙げられる。更に、「キネシン紡錘体タンパク質阻害剤」という用語には、GlaxoSmithKline製のSB715992又はSB743921、及びCombinatoRx製のペンタミジン/クロルプロマリンが含まれる。

30

【0334】

特定の実施形態においては、毒素は、参照により組み込まれる米国特許出願公開第20180078656A1号、同第20210163458A1号、同第20210228726A1号に記載されているクリプトフィシン又は誘導体であってよい。

【0335】

特定の実施形態においては、毒素は、サンドラマイシンであってよい。サンドラマイシンは、ノカルジオイデス属 (*Nocardiooides*) の種 (ATCC 39419) から最初に単離されたデブシペプチドであり、細胞毒性及び抗腫瘍活性を有することが示されている。

40

【0336】

特定の実施形態においては、毒素は、チミジン合成酵素 (又はチミジル酸合成酵素) 阻害剤であってよい。チミジル酸合成酵素阻害剤は、酵素であるチミジル酸合成酵素を阻害する化学剤であり、抗がん化学療法として有望である。この阻害により、デオキシウリジン酸 (dUMP) のC5のメチル化が防止され、それにより、デオキシチミジン酸 (dTMP) の合成が阻害される。dTTPに必要な前駆体であるdTMPが不足すると、細胞はDNA合成を適切に行うことができなくなるため、下流の効果として細胞死が促進される。本発明において、チミジル酸合成酵素阻害剤は、限定するものではないが、ラルチトレキセド、ペメトレキセド、ノラトレキシド、ZD9331、GS7904L、フルオロウラシル、BGC-945、及びOSI-7904Lであってよい。

【0337】

50

特定の実施形態においては、毒素は、アマトキシンであってもよい。アマトキシン（
- アマニチン、 - アマニチン、及びアマニチンを含む）は、8つのアミノ酸で構成される環状ペプチドである。これらはタマゴテングタケ（*Amanita phalloides*）というキノコから単離することもでき、合成によって構成単位から調製することもできる。アマトキシンは、哺乳動物細胞のDNA依存性RNAポリメラーゼIIを特異的に阻害し、これによって細胞の転写及びタンパク質の生合成に影響を及ぼす。細胞内の転写が阻害されると、成長及び増殖が停止する。共有結合（bound）はしていないが、アマニチンとRNAポリメラーゼIIとの複合体は非常に強固である（ $KD = 3 \text{ nM}$ ）。酵素からアマニチンが解離するのは非常に緩徐なプロセスであるため、影響を受けた細胞が回復する可能性は低い。細胞内で転写阻害が長く続きすぎると、細胞はプログラム細胞死（アポトーシス）を受ける。好ましい一実施形態においては、「アマトキシン」という用語は、本発明で使用される場合、例えば、国際公開第2010/115630号、同第2010/115629号、同第2012/119787号、同第2012/041504号、及び同第2014/135282号に記載されているような - アマニチン又はそのバリエーションを指す。

10

【0338】

特定の実施形態においては、毒素は、カンプトテシンであってもよい。「カンプトテシン」という用語は、本発明で使用される場合、トポイソメラーゼI阻害剤として機能するカンプトテシン又はカンプトテシン誘導体を意味することが意図される。例示的なカンプトテシンとしては、例えば、トポテカン、エキサテカン、デルクステカン、イリノテカン、DX-8951f、SN38、BN80915、ルルトテカン、9-ニトロカンプトテシン、及びアミノカンプトテシンが挙げられる。ヒトがん患者を処置するために使用されるカンプトテシンを含む様々なカンプトテシンが報告されている。幾つかのカンプトテシンについては、例えば、Kehrer et al., *Anticancer Drugs*, 12(2): 89-105, (2001) 又は Li et al., *ACS Med. Chem. Lett.* 2019, 10, 10, 1386-1392) に記載されている。特定の実施形態においては、カンプトテシンは、Li et al., *ACS Med. Chem. Lett.* 2019, 10, 10, 1386~1392) に化合物10として示されているエキサテカン誘導体である。特定の実施形態においては、カンプトテシン誘導体は、グリシン化エキサテカン（G-Exa；図13及び16参照）である。

20

30

【0339】

本発明の意味での毒素は、薬物排出トランスポーターの阻害剤であってもよい。毒素及び薬物排出トランスポーターの阻害剤を含む抗体-ペイロードコンジュゲートは、細胞内部に移行したときに、薬物排出トランスポーターの阻害剤が毒素の細胞外への排出を防ぐという利点を有し得る。本発明において、薬物排出トランスポーターは、P-糖タンパク質であってもよい。幾つかの一般的なP-糖タンパク質の薬理的阻害剤としては、アミオダロン、クラリスロマイシン、シクロスポリン、コルヒチン、ジルチアゼム、エリスロマイシン、フェロジピン、ケトコナゾール、ランソプラゾール、オメプラゾール、及び他のプロトンポンプ阻害剤、ニフェジピン、パロキセチン、レセルピン、サキナビル、セルトラリン、キニジン、タモキシフェン、ベラパミル、及びデュロキセチンが挙げられる。エラクリダール及びCP100356は、他の一般的なP-gp阻害剤である。ゾスキダル及びタリキダルも、これを念頭に開発された。最後に、バルスポダル及びリベルサンは、そのような剤の他の例である。

40

【0340】

本発明に係るペプチドリンカーは、少なくとも2つのペイロードを含む。これら2つ以上のペイロードは、同一であってもよく、構造が異なってもよい。

【0341】

すなわち、具体的な実施形態においては、本発明は、2つ以上のペイロードが同一である、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0342】

50

ペプチドリンカーに2つ以上の同一のペイロードを結合(couple)させることで、抗体-ペイロードコンジュゲートの標的組織又は細胞におけるペイロードの濃度を高めることができる。例えば、抗体-ペイロードコンジュゲートのペプチドリンカーが2つ以上の同一の毒素を含む場合(その結果、 $DAR > 4$ ADCとなる)、標的組織又は細胞における毒素濃度は、従来の $DAR 2$ ADCに比べて高くなる。本発明のペプチドリンカーを用いると、4つ、6つ、又は8つの同一のペイロード分子を含むADCを得ることができる。

【0343】

具体的な実施形態においては、本発明は、2つ以上のペイロードのうちの少なくとも2つが互いに異なる、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

10

【0344】

特定の実施形態においては、本発明のペプチドリンカーは、2つの異なるペイロードを抗体にコンジュゲートさせることができる。第2のペイロードを用いることにより、有効性及び効力に関して現在の治療アプローチを超える、まったく新しいクラスの抗体-ペイロードコンジュゲートを開発することが可能になる。また、イメージング及び療法又は外科術中/術後のためのデュアルタイプのイメージング等、新たな応用分野も想定されている(Azhdarinia A. et al., Dual-Labeling Strategies for Nuclear and Fluorescence Molecular Imaging: A Review and Analysis. Mol Imaging Biol. 2012 Jun; 14(3): 261-276 参照)。例えば、術前陽電子放射断層撮影(PET)用の分子造影剤及び切除縁のガイド描写用の近赤外蛍光(NIRF)色素を包含する二重標識抗体は、がんの診断、病期分類、及び切除を大幅に向上させることができる(Houghton J.L. et al., Site-specifically labeled CA19.9-targeted immunconjugates for the PET, NIRF, and multimodal PET/NIRF imaging of pancreatic cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Dec 29; 112(52): 15850-5 参照)。PET及びNIRF光イメージングは、それぞれ疾患の位置を突き止め、手術中に腫瘍縁を特定するための非侵襲的な全身イメージングを可能にする補完的な臨床用途を提供する。しかし、これまでこのような二重標識プローブの作製は、好適な部位特異的方法がないことから困難であった。化学的手段によって2つの異なるプローブを結合(attach)させると、プローブがランダムにコンジュゲートするため、解析及び再現性がほぼ不可能になる。

20

30

【0345】

具体的な実施形態においては、本発明は、1つのペイロードがイメージング/検出目的(蛍光分子又は放射性リガンド)に役立ち、1つのペイロードが処置目的に役立つ、セラノスティック剤(治療と診断とを組み合わせた戦略)をもたらす、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0346】

更に、Levengood M.らの研究(Orthogonal Cysteine Protection Enables Homogeneous Multi-Drug Antibody-Drug Conjugates. Angewandte Chemie, Volume 56, Issue 3, January 16, 2017)では、2つの異なるアウリスタチン毒素(異なる物理化学的特性を有し、補完的な抗がん活性を発揮する)が結合(attach)している二重薬物標識抗体は、個々のアウリスタチン成分で構成されたADCに対しては不応性であった細胞株及び異種移植モデルにおいて活性を付与した。このことは、二重標識ADCによって、単一の従来のADC単独よりも効果的にがんの不均一性及び抵抗性に対処できるようになることを示唆している。

40

【0347】

従って、特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、少なくとも2

50

つの異なる毒素を含む。少なくとも2つの異なる毒素は、当技術分野で公知の及び/又は本明細書に開示される毒素のいずれかであってよい。特に、本発明に係るペプチドリンカーに結合(couple)している2つ以上の毒素は、異なる作用様式を有していてもよい。

【0348】

特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、1つ以上のアウリスタチン及び1つ以上のカンプトテシンを含む。特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、1つ以上のMMAE分子及び1つ以上のエキサテカン又はエキサテカン誘導体を含む(図21参照)。

【0349】

特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、2つの異なるアウリスタチンを含む。特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、MMAE及びMMAFを含む。

【0350】

特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、毒素及びホルモンを含む。特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、毒素及びコルチゾールを含む。特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、アウリスタチン及びコルチゾールを含む。特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、MMAE及びコルチゾールを含む(図22参照)。特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、アウリスタチン、メイタンシノイド、及びコルチゾールを含む。

【0351】

ADCに対する抵抗性機序の1つには、がん細胞から細胞毒性部分が能動的に排出されることが含まれるので、別の二重薬物の用途は、細胞毒性薬の排出機序を特異的に遮断する薬物を追加的にかつ同時に送達することを含み得る。従って、このような二重標識ADCは、従来のADCよりも効果的にADCに対するがんの抵抗性を克服するのに役立つ可能性がある。

【0352】

特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、少なくとも1つの毒素及び少なくとも1つの受容体のリガンドを含んでいてもよく、好ましくは、該受容体は、がん細胞において発現する受容体である。特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、少なくとも1つの毒素及び葉酸分子を含み得る。

【0353】

特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、3つの異なるペイロードを含む。

【0354】

具体的な実施形態においては、本発明は、リンカーがトランスグルタミナーゼの基質として機能するのに好適である、本発明に係るペプチドリンカーに関する。

【0355】

すなわち、本発明に係るペプチドリンカーは、トランスグルタミナーゼの基質として機能するように設計されている。トランスグルタミナーゼは、自然界では主に、グルタミン残基の側鎖の -カルボキサミド基(- (C=O)NH₂)とリジン残基の側鎖の -アミノ基(-NH₂)との間のイソペプチド結合(bond)の形成を触媒し、その後アンモニア(NH₃)を放出する酵素である。しかし、この酵素はむしろ寛容であり、リジンの -アミノ基以外の第一級アミンを受け入れることが当技術分野において知られている。

【0356】

本明細書では、トランスグルタミナーゼによってペプチドリンカーが抗体のグルタミン残基にコンジュゲートすることが好ましい。そのため、ペプチドリンカーは、トランスグルタミナーゼの基質として機能するために第一級アミンを含んでいなければならない。第

10

20

30

40

50

一級アミンは、好ましくは、リジン、リジン模倣体、若しくはリジン誘導体の側鎖、又は本明細書において上に定義した構造 $\text{NH}_2 - (\text{Y}) - \text{COOH}$ を有するアミノ酸残基に含まれる。トランスグルタミナーゼは、本明細書で定義される任意のトランスグルタミナーゼ、好ましくは、本明細書で定義される微生物トランスグルタミナーゼであってよい。

【0357】

具体的な実施形態においては、本発明は、本発明に係るペプチドリンカーにコンジュゲートしている抗体を含む抗体 - ペイロードコンジュゲートに関する。

【0358】

すなわち、本発明は、本明細書で定義されるペプチドリンカーのいずれかを含む抗体 - リンカーコンジュゲートを更に包含する。本明細書では、本発明に係るアミンを含むペプチドリンカーが、抗体におけるグルタミン残基にコンジュゲートしていることが好ましい。

10

【0359】

このように、具体的な実施形態においては、本発明は、抗体に含まれるグルタミン残基の - カルボキサミド基とペプチドリンカーのアミノ酸残基に含まれる第一級アミンとの間に形成されるイソペプチド結合 (bond) を介してペプチドリンカーが抗体にコンジュゲートしている、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲートに関する。

【0360】

「抗体」という用語は、本明細書では最も広い意味で用いられ、具体的には、所望の生物活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成される多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体)、及び抗体断片を網羅する。「抗体」及び「抗体 (複数)」という用語は、天然に存在する形態の抗体 (例えば、IgG、IgA、IgM、IgE) を広く包含する。

20

【0361】

抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。抗体はヒト起源であってもよいが、同様にマウス、ラット、ヤギ、ロバ、ハムスター、又はウサギ由来であってもよい。コンジュゲートが治療用である場合、任意でマウス又はウサギの抗体をキメラ化又はヒト化してもよい。

【0362】

抗体はまた、二重特異性 (例えば、DVD - IgG、crossMab、付加IgG - HC融合体) 又は二重パラトピック (biparatopic) であってもよい。概要については、Brinkmann and Kontermann; Bispecific antibodies; Drug Discov Today; 2015; 20(7); p. 838 - 47 参照。

30

【0363】

「抗体」という用語は更に、抗体の抗原結合 (binding) 断片も包含する。好ましくは、本発明に係るペプチドリンカーは、IgG抗体の $\text{C}_{\text{H}2}$ ドメインにおけるグルタミン残基295 (Q295) にコンジュゲートする。従って、本明細書では、本発明の抗体又は抗体断片が $\text{C}_{\text{H}2}$ ドメインを含むことが好ましい。

【0364】

$\text{C}_{\text{H}2}$ ドメインを含む抗体の断片又は組換えバリエーションは、例えば、

- ・単なる重鎖ドメインを含む抗体フォーマット (サメ抗体 / IgNAR ($\text{V}_{\text{H}} - \text{C}_{\text{H}1} - \text{C}_{\text{H}2} - \text{C}_{\text{H}3} - \text{C}_{\text{H}4} - \text{C}_{\text{H}5}$)₂ 又はラクダ抗体 / hcIgG ($\text{V}_{\text{H}} - \text{C}_{\text{H}2} - \text{C}_{\text{H}3}$)₂)
- ・scFv - Fc ($\text{V}_{\text{H}} - \text{V}_{\text{L}} - \text{C}_{\text{H}2} - \text{C}_{\text{H}3}$)₂
- ・Fcドメイン及び1つ以上の受容体ドメインを含むFc融合ペプチド

であってよい。

40

【0365】

具体的な実施形態においては、本発明は、抗体がIgG抗体である、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲートに関する。

50

【0366】

「IgG」とは、本発明で使用される場合、認識される免疫グロブリンガンマ遺伝子によって実質的にコードされている抗体のクラスに属するポリペプチドを意味する。ヒトでは、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4のサブクラス又はアイソタイプを含む。マウスでは、IgGは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3を含む。完全長IgGは、2本の免疫グロブリン鎖の同一の2対からなり、各対は1本の軽鎖及び1本の重鎖を有し、各軽鎖は免疫グロブリンドメインVL及びCLを含み、各重鎖は免疫グロブリンドメインVH、C₁(C_H1とも呼ばれる)、C₂(C_H2とも呼ばれる)及びC₃(C_H3とも呼ばれる)を含む。ヒトIgG1の文脈では、KabataのEUインデックスに従って、「C_H1」は、118～215位を指し、C_H2ドメインは231～340位を指し、C_H3ドメインは341～447位を指す。IgG1はヒンジドメインも含み、これはIgG1の場合216～230位を指す。

10

【0367】

好ましい実施形態においては、抗体は、IgG1抗体である。特に好ましい実施形態においては、抗体は、ヒトIgG1抗体である。

【0368】

具体的な実施形態においては、本発明は、ペプチドリンカーが、抗体のFcドメインに含まれるグルタミン残基にコンジュゲートしている、本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲートに関する。

【0369】

すなわち、本発明に係るペプチドリンカーは、好ましくは、抗体のFcドメインに含まれるグルタミン残基にコンジュゲートする。本発明のリンカーは、トランスグルタミナーゼの基質として機能し得る抗体のFcドメインにおける任意のGln残基にコンジュゲートすることができる。典型的には、Fcドメインという用語は、本発明で使用される場合、IgA、IgD、及びIgGの最後の2つの定常領域免疫グロブリンドメイン(C_H2及びC_H3)、並びにIgE、IgY、及びIgMの最後の3つの定常領域ドメイン(C_H2、C_H3、及びC_H4)を指す。すなわち、本発明に係るリンカーは、抗体のC_H2、C_H3、及び適用可能な場合はC_H4のドメインにコンジュゲートすることができる。

20

【0370】

例えば、本発明に係るペプチドリンカーは、内因性のグルタミン残基(例えば、IgG1抗体のQ295)、又は遺伝子工学によって抗体のFcドメインに導入されたグルタミン残基にコンジュゲートすることができる。

30

【0371】

すなわち、特定の抗体では、本発明は、ペプチドリンカーがコンジュゲートするグルタミン残基が、IgG抗体のC_H2ドメインのグルタミン残基Q295(EU付番)である、本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲートに関する。

【0372】

Q295はIgG型抗体において極めてよく保存されたアミノ酸残基であることを理解することが重要である。特に、ヒトのIgG1、2、3、4、並びにウサギ及びラットの抗体において保存されている。従って、Q295を使用できることは、治療用抗体-ペイロードコンジュゲート又は抗体が非ヒト起源であることが多い診断用コンジュゲートを作製する上で大きな利点となる。従って、本発明に係る方法は、極めて汎用性が高く、広く適用可能なツールを提供する。残基Q295はIgG型抗体の間で極めてよく保存されているにもかかわらず、マウス及びラットのIgG2a抗体等、一部のIgG型抗体はこの残基を有しない。従って、本発明の方法で使用される抗体は、好ましくはC_H2ドメインの残基Q295(EU付番)を含むIgG型抗体であると理解されたい。

40

【0373】

トランスグルタミナーゼを用いたC_H2のGln残基へのリンカーのコンジュゲーションについて論じた文献では、小さな低分子量の基質に焦点が当てられてきた。しかし、従来技術の文献では、このようなコンジュゲーションを達成するためには、N297位にお

50

けるアスパラギン残基の脱グリコシル化又はアグリコシル化抗体の使用が必要であると記載されていた（国際公開第2015/015448号、同第2017/025179号、同第2013/092998号）。

【0374】

しかし、かなり驚くべきことに、そして全ての予想に反して、上述のペプチドリンカー構造を用いることにより、グリコシル化抗体のQ295への部位特異的コンジュゲーションが実際に効率的に可能になる。特に、2つ以上のペイロードを含むペプチドリンカーの結合(couple)は、そのほとんどが90%を超えるコンジュゲーション効率で達成された。

【0375】

Q295が、ネイティブの状態ではグリコシル化されているN297に非常に近接しているにもかかわらず、本発明に係る方法では、指定のペプチドリンカーを用いると、依然としてQ295に効率的にコンジュゲートさせることができる。

【0376】

示されているように、本発明に係る方法は、グリコシル化を防ぐためにN297を前もって酵素的に脱グリコシル化することも、アグリコシル化抗体を使用することも、N297を別のアミノ酸に置換することも、T299A変異を導入することも必要としない。

【0377】

これら2点は、製造面において大きな利点となる。酵素的脱グリコシル化ステップはGMPの観点から望ましくないが、その理由は、脱グリコシル化酵素（例えば、PNGase F）及び切断されたグリカンの両方を培地から確実に除去しなければならないからである。

【0378】

更に、ペイロードを結合(attach)させるために抗体を遺伝的に操作する必要がないため、免疫原性を増大させ、抗体の全体的な安定性を低下させる可能性のある配列が挿入されるのを回避することができる。

【0379】

N297の別のアミノ酸への置換も望ましくない作用を有する場合があるが、その理由は、Fcドメイン全体の全体的な安定性(Subedi et al, The Structural Role of Antibody N-Glycosylation in Receptor Interactions. Structure 2015, 23(9), 1573-1583)及びコンジュゲート全体の有効性に影響を及ぼす可能性があり、その結果、抗体の凝集が増加し、溶解度が低下する可能性がある(Zheng et al.; The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. Mabs - Austin 2011, 3(6), 568-576)ためである。更に、N297に存在するグリカンは、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)等を惹起することから、重要な免疫調節効果を有する。これら免疫調節効果は、脱グリコシル化、又はアグリコシル化抗体を得るための上述の他のアプローチのいずれかによって失われてしまう。更に、確立された抗体の任意の配列改変は規制上の問題につながる可能性があり、これは、承認され、臨床的に検証された抗体をADCコンジュゲーションの出発点として使用することが非常に多いため問題となる。

【0380】

従って、本発明のペプチドリンカーを使用する本発明に係る方法は、部位特異的にペイロードが結合(bind)している化学量論的に明確に規定されたADCを容易にかつ問題なく作製することを可能にする。

【0381】

上記に鑑みて、本発明の方法は、好ましくは、CH2ドメインの残基N297(EU付番)がグリコシル化されている抗体のCH2ドメインの残基Q295(EU付番)におけるIgG抗体のコンジュゲーションに使用される。しかし、本発明の方法は、残基Q29

10

20

30

40

50

5、又は内因性 G 1 n 残基であっても分子工学によって導入された G 1 n 残基であってもよい抗体の任意の他の好適な G 1 n 残基における脱グリコシル化又はアグリコシル化抗体のコンジュゲーションも包含することが明示される。

【 0 3 8 2 】

従って、具体的な実施形態においては、本発明は、ペプチドリンカーをコンジュゲートするグルタミン残基が分子工学によって抗体の重鎖又は軽鎖に導入されている、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲートに関する。

【 0 3 8 3 】

「分子工学」という用語は、本発明で使用される場合、核酸配列を操作するための分子生物学的方法の使用を指す。本発明では、分子工学を用いて抗体の重鎖又は軽鎖に G 1 n 残基を導入することができる。一般に、抗体の重鎖又は軽鎖に G 1 n 残基を導入するための2つの異なる戦略が本発明では想定されている。第1に、抗体の重鎖又は軽鎖の単一残基を G 1 n 残基で置換し得る。第2に、2つ以上のアミノ酸残基からなる G 1 n 含有ペプチドタグを抗体の重鎖又は軽鎖に組み込み得る。そのために、ペプチドタグを重鎖若しくは軽鎖の内部位置、すなわち重鎖若しくは軽鎖の2つの既存のアミノ酸残基の間に組み込んでよく、又はそれらを置き換えることによって組み込んでよく、又はペプチドタグを抗体の重鎖若しくは軽鎖の N 末端若しくは C 末端に融合（付加）させてもよい。

【 0 3 8 4 】

例えば、得られた抗体が微生物トランスグルタミナーゼによって本発明のリンカーとコンジュゲートすることができる限り、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ残基を G 1 n 残基で置換してもよい。特定の実施形態においては、抗体は、I g G 抗体の C H 2 ドメインのアミノ酸残基 N 2 9 7（E U 付番）が置換されている抗体であり、特に、置換は N 2 9 7 Q 置換である。N 2 9 7 Q 変異を含む抗体は、抗体の重鎖 1 本あたり 1 つを超えるリンカーにコンジュゲートすることができる。例えば、N 2 9 7 Q 変異を含む抗体を 4 つのリンカーにコンジュゲートさせることができ、この場合、1 つのリンカーが抗体の第 1 の重鎖の残基 Q 2 9 5 にコンジュゲートし、1 つのリンカーが抗体の第 1 の重鎖の残基 N 2 9 7 Q にコンジュゲートし、1 つのリンカーが抗体の第 2 の重鎖の残基 Q 2 9 5 にコンジュゲートし、1 つのリンカーが抗体の第 2 の重鎖の残基 N 2 9 7 Q にコンジュゲートする。当業者は、I g G 抗体の残基 N 2 9 7 を G 1 n 残基で置換するとアグリコシル化抗体が得られることを認識している。

【 0 3 8 5 】

すなわち、特定の実施形態においては、本発明は、分子工学によって抗体の重鎖又は軽鎖に導入されたグルタミン残基がアグリコシル化 I g G 抗体の C H 2 ドメインの N 2 9 7 Q（E U 付番）である、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲートに関する。

【 0 3 8 6 】

具体的な実施形態においては、本発明は、分子工学によって抗体の重鎖又は軽鎖に導入されたグルタミン残基が、（ a ）抗体の重鎖若しくは軽鎖に組み込まれているか又は（ b ）抗体の重鎖若しくは軽鎖の N 末端若しくは C 末端に融合しているペプチドに含まれている、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲートに関する。

【 0 3 8 7 】

抗体の単一アミノ酸残基を置換する代わりに、トランスグルタミナーゼがアクセス可能な G 1 n 残基を含むペプチドタグを抗体の重鎖又は軽鎖に導入してもよい。このようなペプチドタグは、抗体の重鎖又は軽鎖の N 末端又は C 末端に融合させてよい。あるいは、ペプチドタグを抗体の重鎖又は軽鎖の好適な位置に挿入してもよい。好ましくは、トランスグルタミナーゼがアクセス可能な G 1 n 残基を含むペプチドタグを抗体の重鎖の C 末端に融合させる。更により好ましくは、トランスグルタミナーゼがアクセス可能な G 1 n 残基を含むペプチドタグを I g G 抗体の重鎖の C 末端に融合させる。抗体の重鎖の C 末端に融合し、微生物トランスグルタミナーゼの基質として機能することができる幾つかのペプチドタグが、国際公開第 2 0 1 2 / 0 5 9 8 8 2 号及び同第 2 0 1 6 / 1 4 4 6 0 8 号に記載されている。

10

20

30

40

50

【0388】

従って、具体的な実施形態においては、本発明は、Gln残基を含むペプチドが抗体の重鎖のC末端に融合している、本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲートに関する。

【0389】

抗体の重鎖又は軽鎖に導入することができる、特に抗体の重鎖のC末端に融合することができる例示的なペプチドタグは、LLQGG(配列番号70)、LLQG(配列番号37)、LSLSQG(配列番号38)、GGGLLQGG(配列番号39)、GLLQG(配列番号40)、LLQ(配列番号41)、GSPLAQSHGG(配列番号42)、GLLQGGG(配列番号43)、GLLQGG(配列番号44)、GLLQ(配列番号45)、LLQLLQGA(配列番号46)、LLQGA(配列番号47)、LLQYQGA(配列番号48)、LLQGS(配列番号49)、LLQYQG(配列番号50)、LLQLLQG(配列番号51)、SLLQG(配列番号52)、LLQLQ(配列番号53)、LLQLLQ(配列番号54)、LLQGR(配列番号55)、EEQYASTY(配列番号56)、EEQYQSTY(配列番号57)、EEQYNSTY(配列番号58)、EEQYQS(配列番号59)、EEQYQST(配列番号60)、EQYQSTY(配列番号61)、QYQS(配列番号62)、QYQSTY(配列番号63)、YRYRQ(配列番号64)、DYALQ(配列番号65)、FGLQRPY(配列番号66)、EQKLISEEDL(配列番号67)、LQR(配列番号68)、及びYQR(配列番号69)である。

10

20

【0390】

当業者は、例えばSambrook, Joseph. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Pressに記載されているような分子クローニングの方法によって抗体のアミノ酸残基を置換する又はペプチドタグを抗体に導入する方法を認識している。

【0391】

一般に、当業者は、抗体のどの位置にペプチドリンカーがコンジュゲートするかを決定する方法を認識している。例えば、コンジュゲーション部位は、抗体-ペイロードコンジュゲートのタンパク質分解消化及び得られた断片のLC-MS分析によって決定することができる。例えば、サンプルを、それぞれ取扱説明書に従って、Glycinator(Genovis)で脱グリコシル化し、その後トリプシンゴールド(質量分析グレード、Promega)で消化してよい。従って、1µgのタンパク質を50ngのトリプシンと共に37で一晚インキュベートしてよい。LC-MS分析は、Synapt-G2質量分析計(Waters)に連結したnanoAcquity HPLCシステムを用いて行ってよい。そのために、100ngのペプチド溶液をAcquity UPLC Symmetry C18トラップカラム(Waters、部品番号186006527)にロードし、流速5µL/分の1%緩衝液A(水、0.1%ギ酸)及び99%緩衝液B(アセトニトリル、0.1%ギ酸)で3分間トラップしてよい。次いで、ペプチドを25分以内に3% 65%緩衝液Bへの直線勾配で溶出してよい。データは、正極性の分離モード及び50~2000m/zの質量範囲で取得することができる。他の機器の設定は以下の通りであってよい: キャピラリー電圧3.2kV、サンプリングコーン40V、抽出コーン4.0V、ソース温度130、コーンガス35L/h、ナノフローガス0.1bar、及びパージガス150L/h。質量分析計は、[Glu1]-フィブリノペプチドで較正してよい。

30

40

【0392】

更に、当業者は、抗体-ペイロードコンストラクトの薬物対抗体(DAR)比又はペイロード対抗体比を求める方法を認識している。例えば、DARは、疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)又はLC-MSによって求めることができる。

【0393】

疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)では、サンプルを0.5M硫酸アンモニ

50

ウムに調整し、MAB PAK HIC Butylカラム(5 μm、4.6 × 100 mm、Thermo Scientific)を介してA(1.5 M硫酸アンモニウム、25 mM Tris HCl、pH 7.5)からB(20%イソプロパノール、25 mM Tris HCl、pH 7.5)へのフル勾配を用いて、1 mL/分及び30 で20分間にわたって評価してよい。通常、40 μgのサンプルを使用してよく、280 nmにおけるシグナルを記録してよい。相対HIC保持時間(HIC-RRT)は、ADC DAR 2種の絶対保持時間をそれぞれの非コンジュゲートmAbの保持時間で除することにより算出することができる。

【0394】

LC-MS DARを求める場合、最終濃度が0.025 mg/mLになるようにADCをNH₄HCO₃で希釈してよい。その後、40 μLのこの溶液を室温で5分間1 μLのTCEP(500 mM)で還元し、次いで、10 μLのクロロアセトアミド(200 mM)を添加することによってアルキル化し、続いて、暗所において37 で一晩インキュベートしてよい。逆相クロマトグラフィーについては、Dionex U3000システムをソフトウェアChromleonと組み合わせて使用してよい。システムは、70 に加熱されたRP-1000カラム(1000、5 μm、1.0 × 100 mm、Sepax)及び波長214 nmに設定されたUV検出器を備えていてよい。溶媒Aは0.1%ギ酸を含む水からなり得、溶媒Bは0.1%ギ酸を含む85%アセトニトリルを含み得る。還元及びアルキル化されたサンプルをカラムにロードし、14分間にわたって30 55%溶媒Bの勾配によって分離してよい。DAR種を同定するために、液体クロマトグラフィーシステムをSynapt-G2質量分析計に連結してもよい。質量分析計のキャピラリー電圧は3 kV、サンプリングコーンは30 Vに設定してよく、抽出コーンは合計5 Vの値になるようにしてよい。ソース温度は150 に、脱溶媒温度は500 に、コーンガスは20 L/hに、脱溶媒ガスは600 L/hに設定してよく、取得は600~5000 Daの質量範囲においてポジティブモードで1秒のスキャンタイムで行ってよい。機器はヨウ化ナトリウムで較正してよい。MassLynxのMaxEnt1アルゴリズムで収束するまでスペクトルのデコンボリューションを実行してよい。クロマトグラフのピークにDAR種を割り当てた後、逆相クロマトグラムの積分ピーク面積に基づいてDARを計算することができる。

【0395】

具体的な実施形態においては、本発明は、IgG抗体がグリコシル化IgG抗体である、本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲートに関する。

【0396】

すなわち、本明細書では、本発明に係るペプチドリンカーがグリコシル化IgG抗体にコンジュゲートすることが好ましい。本発明に係るペプチドリンカーがネイティブなグリコシル化IgG抗体にコンジュゲートすることが特に好ましい。ネイティブなIgG抗体は、グルタミン残基295(Q295)に単一のコンジュゲーション部位を含む。従って、本明細書では、本発明に係るペプチドリンカーがネイティブなグリコシル化抗体の残基Q295にコンジュゲートすることが特に好ましい。ネイティブなIgG抗体の唯一のグリコシル化部位は、アスパラギン残基297(N297)である。

【0397】

従って、具体的な実施形態においては、本発明は、IgG抗体がCH2ドメインの残基N297(EU番号)でグリコシル化されている、本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲートに関する。

【0398】

特に好ましい実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、N297位がグリコシル化されているIgG抗体のQ295位にコンジュゲートする。より好ましくは、抗体は、IgG1抗体である。

【0399】

具体的な実施形態においては、本発明は、抗体が、ブレンツキシマブ(抗CD30)、

トラスツズマブ（抗Her2/neu）、ゲムツズマブ（抗CD33）、イノツズマブ（抗CD22）、アベルマブ（抗PD-L1）、セツキシマブ（抗EGFR）、リツキシマブ（抗CD20）、ダラツムマブ（抗CD38）、ベルツズマブ（抗HER2）、ベドリズマブ（抗インテグリン47）、オクレリズマブ（抗CD20）、トシリズマブ（抗IL-6-R）、ウステキヌマブ（抗IL-12/23）、ゴリムマブ（抗TNF）、オビヌツズマブ（抗CD20）、サシツズマブ（抗Trop-2）、ベランタマブ（抗BCMA）、ボラツズマブ（抗CD79b）、エンホルツマブ（抗ネクチン-4）、エンドレコロマブ（抗EpCAM）、ゲムツズマブ（抗CD33）、ロンカスツキシマブ（抗CD19）、メクボタマブ（抗AXL）、アデカツムマブ（抗EpCAM）、D93（抗dn-コラーゲン）、ガチボツズマブ（抗TA-MUC1）、ラベツズマブ（抗がん胎児性細胞接着分子5）、ツサミタマブ（抗CEACAM5）、ウピフィタマブ（抗NaPib）、リファスツズマブ（抗NaPib）、ミルベツキシマブ（抗FR）、ソフィツズマブ（抗MUC16）、アネツマブ（抗メソセリン）、チソツマブ（抗TF）、コフィツズマブ（抗Trop-2）、プラルザタマブ（抗CD166）、ラドリアツズマブ（抗LIV-1）、ベランタマブ（抗BCMA）、パトリツマブ（抗ERBB3）、セツキシマブ（抗EGFR）、ニモツズマブ（抗EGFR）、マツズマブ（抗EGFR）、ポルツズマブ（抗HER2）、シタツズマブ（抗TACSTD1）、ツコツズマブ（抗EpCAM）、及びエンドレコロマブ（抗EpCAM）からなる群から選択される、本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲートに関する。

10

【0400】

20

具体的な実施形態においては、本発明は、抗体が、ブレンツキシマブ（抗CD30）、ゲムツズマブ（抗CD30）、トラスツズマブ（抗Her2/neu）、イノツズマブ（抗CD22）、ボラツズマブ（抗CD79b）、エンホルツマブ（抗ネクチン-4）、サシツズマブ（抗Trop-2）、及びベランタマブ（抗BCMA）からなる群から選択される、本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲートに関する。

【0401】

特定の実施形態においては、本発明は、抗体がボラツズマブ（抗CD79b）又はトラスツズマブ（抗Her2/neu）又はエンホルツマブ（抗ネクチン-4）である、本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲートに関する。

【0402】

30

具体的な実施形態においては、本発明は、抗体が、CD30、Her2/neu、CD33、CD22、PD-L1、EGFR、CD20、CD38、HER2、インテグリン47、CD20、IL-6-R、IL-12、IL-23、TNF、CD20、Trop-2、BCMA、CD79b、ネクチン-4、EpCAM、CD33、CD19、AXL、dn-コラーゲン、TA-MUC1、がん胎児性細胞接着分子5、CEACAM5、NaPib、FR、MUC16、メソセリン、TF、CD166、LIV-1、ERBB3、EGFR、及びTACSTD1、好ましくは、CD30、Her2/neu、CD22、CD79b、ネクチン-4、Trop-2、及びBCMA、より好ましくは、CD79b、Her2/neu、及びネクチン-4からなる群から選択される抗原に特異的に結合（bind）する、本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲートに関する。

40

【0403】

具体的な実施形態においては、本発明は、本発明に係るペプチドリンカーを抗体にコンジュゲートさせるステップを含む、抗体-ペイロードコンジュゲートの調製方法に関する。

【0404】

すなわち、本明細書で開示される2つ以上のペイロードを含むペプチドリンカーのいずれかを抗体にコンジュゲートさせることができる。特に、本明細書に開示されるアミンを含むペプチドリンカーのいずれかを、トランスグルタミナーゼを介して抗体のグルタミン残基にコンジュゲートさせることができる。本明細書の他の箇所に開示されているように、ペプチドリンカーがコンジュゲートするグルタミン残基は、内因性のグルタミン残基（

50

例えば、I g G 抗体の Q 2 9 5) であってもよく、分子工学によって抗体に導入されたグルタミン残基であってもよい。

【 0 4 0 5 】

具体的な実施形態においては、本発明は、トランスグルタミナーゼ (T G) を用いて 2 つ以上のペイロードを含むペプチドリンカーを抗体にコンジュゲートさせる方法であって、 (a) 該抗体、該ペプチドリンカー、及び該 T G を流体内で混合し、それにより該 T G の触媒作用下において 1 段階でリンカー - ペイロードを該抗体にコンジュゲートさせることと、 (b) ステップ (a) で得られたコンジュゲートを該流体から抽出することと、を含む方法に関する。

【 0 4 0 6 】

従って、本発明は更に、トランスグルタミナーゼを用いて、 2 つ以上のペイロードを含むペプチドリンカーを 1 段階反応で抗体にコンジュゲートさせる方法を包含する。そのためには、抗体を本発明に係るペプチドリンカー及びトランスグルタミナーゼと流体中で混合してよい。本発明の意味における「流体」とは液体である。好ましくは、液体は水溶液であり、更により好ましくは緩衝水溶液である。

【 0 4 0 7 】

本発明に係るペプチドリンカーは、該ペプチドリンカーを含む溶液を、抗体を含む溶液及びトランスグルタミナーゼを含む溶液と混合することにより、抗体及びトランスグルタミナーゼと混合することができる。あるいは、ペプチドリンカー、抗体、及びトランスグルタミナーゼを個別に含む溶液を水溶液に添加してもよい。特に、各成分を規定の濃度で水溶液に添加してよい。本発明に係るペプチドリンカーは、トランスグルタミナーゼの触媒作用下で抗体にコンジュゲートする。すなわち、個々の成分は、ペプチドリンカーの抗体への効率的なコンジュゲートに適した条件下で混合することができる。このような条件は、本明細書の他の箇所で定義されている。

【 0 4 0 8 】

第 2 の方法ステップでは、得られた抗体 - ペイロードコンジュゲートを液体から除去しなければならない。当業者は、水溶液から抗体 - ペイロードコンジュゲートを単離する方法を認識している。更に、当業者は、抗体 - ペイロードコンジュゲートをコンジュゲートしていない抗体若しくはペプチドリンカーから、又は不完全にコンジュゲートしている抗体から分離する方法を認識している。例えば、本発明に係る抗体ペイロードコンジュゲートは、 H P L C によって混合物から単離することができる。

【 0 4 0 9 】

「流体からコンジュゲートを抽出する」ことは、「混合物からコンジュゲートを単離すること」と同義であると理解されたい。すなわち、トランスグルタミナーゼ及びコンジュゲートしていない抗体及びペプチドリンカーを流体から除去することによって、コンジュゲートを抽出することもできる。

【 0 4 1 0 】

本発明に係る方法において使用されるペプチドリンカーは、本明細書において開示されるペプチドリンカーのいずれか 1 つであってもよく、特に、本明細書において上記で提供された定義に該当する任意のペプチドリンカー又は実験例に示される任意のペプチドリンカーであってもよい。

【 0 4 1 1 】

従って、具体的な実施形態においては、本発明は、ペプチドリンカーが本発明のペプチドリンカーである、本発明に係る方法に関する。

【 0 4 1 2 】

更に、抗体は、本明細書の他の箇所に、すなわち本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲートについてより詳細に定義した通りの抗体であってもよい。

【 0 4 1 3 】

特に、ペプチドリンカーは、配列番号 1 ~ 2 9 又は 8 2 ~ 9 3 に記載のアミノ酸配列を含んでいてよい。更に、リンカーは、図 1 ~ 4 0 又は 4 2 ~ 4 3 に示すリンカーのいずれ

10

20

30

40

50

が1つであってよい。

【0414】

すなわち、具体的な実施形態においては、本発明は、ペプチドリンカーが、ペプチドリンカーのアミノ酸残基に含まれる第一級アミンを介して抗体中に含まれるグルタミン残基にコンジュゲートする、本発明に係る方法に関する。

【0415】

具体的な実施形態においては、本発明は、抗体が抗体断片である、本発明に係る方法に関する。

【0416】

具体的な実施形態においては、本発明は、抗体がIgA、IgD、IgE、IgG、又はIgMの抗体である、本発明に係る方法に関する。 10

【0417】

具体的な実施形態においては、本発明は、ペプチドリンカーが、抗体のFcドメインに含まれるグルタミン残基にコンジュゲートする、本発明に係る方法に関する。

【0418】

具体的な実施形態においては、本発明は、ペプチドリンカーがコンジュゲートするグルタミン残基が、IgG抗体のC_H2ドメインのグルタミン残基Q295（EU付番）である、本発明に係る方法に関する。

【0419】

具体的な実施形態においては、ペプチドリンカーがコンジュゲートするグルタミン残基が分子工学によって抗体の重鎖又は軽鎖に導入されている、本発明に係る方法に関する。 20

【0420】

具体的な実施形態においては、本発明は、分子工学によって抗体の重鎖又は軽鎖に導入されたグルタミン残基がアグリコシル化IgG抗体のC_H2ドメインのN297Q（EU付番）である、本発明に係る方法に関する。

【0421】

具体的な実施形態においては、本発明は、分子工学によって抗体の重鎖又は軽鎖に導入されたグルタミン残基が、(a)抗体の重鎖若しくは軽鎖に組み込まれているか又は(b)抗体の重鎖若しくは軽鎖のN末端若しくはC末端に融合しているペプチドに含まれている、本発明に係る方法に関する。 30

【0422】

具体的な実施形態においては、本発明は、Gln残基を含むペプチドが抗体の重鎖のC末端に融合している、本発明に係る方法に関する。

【0423】

具体的な実施形態においては、本発明は、抗体がグリコシル化IgG抗体である、本発明に係る方法に関する。

【0424】

特定の実施形態においては、本発明は、IgG抗体がC_H2ドメインの残基N297（EU番号）でグリコシル化されている、本発明に係る方法に関する。

【0425】

具体的な実施形態においては、本発明は、抗体が、ブレンツキシマブ（抗CD30）、トラスツズマブ（抗Her2/neu）、ゲムツズマブ（抗CD33）、イノツズマブ（抗CD22）、アベルマブ（抗PD-L1）、セツキシマブ（抗EGFR）、リツキシマブ（抗CD20）、ダラツムマブ（抗CD38）、ベルツズマブ（抗HER2）、ベドリズマブ（抗インテグリン 4 7）、オクレリズマブ（抗CD20）、トシリズマブ（抗IL-6-R）、ウステキヌマブ（抗IL-12/23）、ゴリムマブ（抗TNF）、オビヌツズマブ（抗CD20）、サシツズマブ（抗Trop-2）、ベランタマブ（抗BCMA）、ポラツズマブ（抗CD79b）、エンホルツマブ（抗ネクチン-4）、エンドレコロマブ（抗EpCAM）、ゲムツズマブ（抗CD33）、ロンカスツキシマブ（抗CD19）、メクボタマブ（抗AXL）、アデカツムマブ（抗EpCAM）、D93（抗d 40 50

n - コラーゲン)、ガチボツズマブ(抗TA-MUC1)、ラベツズマブ(抗がん胎児性細胞接着分子5)、ツサミタマブ(抗CEACAM5)、ウピフィタマブ(抗NaPi2b)、リファスツズマブ(抗NaPi2b)、ミルベツキシマブ(抗FR)、ソフィツズマブ(抗MUC16)、アネツマブ(抗メソセリン)、チソツマブ(抗TF)、コフィツズマブ(抗Trop-2)、プラルザタマブ(抗CD166)、ラドリアツズマブ(抗LIV-1)、ベランタマブ(抗BCMA)、パトリツマブ(抗ERBB3)、セツキシマブ(抗EGFR)、ニモツズマブ(抗EGFR)、マツズマブ(抗EGFR)、ポルツズマブ(抗HER2)、シタツズマブ(抗TACSTD1)、ツコツズマブ(抗EpCAM)、及びエンドレコロマブ(抗EpCAM)からなる群から選択される、本発明に係る方法に関する。

10

【0426】

具体的な実施形態においては、本発明は、抗体が、ブレンツキシマブ(抗CD30)、ゲムツズマブ(抗CD30)、トラスツズマブ(抗Her2/neu)、イノツズマブ(抗CD22)、ポラツズマブ(抗CD79b)、エンホルツマブ(抗ネクチン-4)、サシツズマブ(抗Trop-2)、及びベランタマブ(抗BCMA)からなる群から選択される、本発明に係る方法に関する。

【0427】

具体的な実施形態においては、本発明は、抗体がポラツズマブ(抗CD79b)又はトラスツズマブ(抗Her2/neu)又はエンホルツマブ(抗Nectin-4)である、本発明に係る方法に関する。

20

【0428】

具体的な実施形態においては、本発明は、抗体が、CD30、Her2/neu、CD33、CD22、PD-L1、EGFR、CD20、CD38、HER2、インテグリン47、CD20、IL-6-R、IL-12、IL-23、TNF、CD20、Trop-2、BCMA、CD79b、ネクチン-4、EpCAM、CD33、CD19、AXL、dn-コラーゲン、TA-MUC1、がん胎児性細胞接着分子5、CEACAM5、NaPi2b、FR、MUC16、メソセリン、TF、CD166、LIV-1、ERBB3、EGFR、及びTACSTD1、好ましくは、CD30、Her2/neu、CD22、CD79b、ネクチン-4、Trop-2、及びBCMA、より好ましくは、CD79b、Her2/neu、及びネクチン-4からなる群から選択される抗原に特異的に結合(bind)する、本発明に係る方法に関する。

30

【0429】

具体的な実施形態においては、本発明は、ペプチドリンカーが、抗体に含まれるGln残基の-カルボキサミド基にコンジュゲートする、本発明に係る方法に関する。

【0430】

具体的な実施形態においては、本発明は、ペプチドリンカーが、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、又は95%のコンジュゲーション効率でグリコシル化抗体にコンジュゲートするのに好適である、本発明に係る方法に関する。

【0431】

すなわち、特定の実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、又は95%の効率でグリコシル化抗体にコンジュゲートすることができる。好ましい実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、少なくとも70%の効率でグリコシル化抗体にコンジュゲートすることができる。別の好ましい実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、少なくとも75%の効率でグリコシル化抗体にコンジュゲートすることができる。別の好ましい実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、少なくとも80%の効率でグリコシル化抗体にコンジュゲートすることができる。別の好ましい実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、少なくとも85%の効率でグリコシル化抗体にコンジュゲートすることができる。別の好ましい実施形態にお

40

50

いては、本発明に係るペプチドリンカーは、少なくとも90%の効率でグリコシル化抗体にコンジュゲートすることができる。別の好ましい実施形態においては、本発明に係るペプチドリンカーは、少なくとも95%の効率でグリコシル化抗体にコンジュゲートすることができる。好ましくは、グリコシル化抗体はグリコシル化IgG抗体であり、より好ましくは残基N297(EU付番)でグリコシル化されたIgG抗体である。

【0432】

当業者は、抗体と特定のペプチドリンカーとのコンジュゲーション効率を求める方法を認識している。例えば、コンジュゲーション効率は、本明細書に記載の通り求めることができる。すなわち、抗体、特にIgG1抗体を、1~5mg/mLの濃度で、好適な緩衝液中において抗体1mgあたり5~20eqモル当量のリンカー及び3~6Uの微生物トランスグルタミナーゼと共に37°Cで20~48時間又は実施例1に記載の通りインキュベートしてよい。インキュベーション期間後、還元条件下でLC-MS分析によりコンジュゲーション効率を求めることができる。微生物トランスグルタミナーゼは、例えば、Zedira(ドイツ)から入手可能なストレプトマイセス・モバラエンシス由来のMTGであってよい。好適な緩衝液は、Tris、MOPS、HEPES、PBS、又はBisTrisの緩衝液であってよい。しかし、緩衝液系の選択は異なってもよく、リンカーの化学的性質に大きく依存し得ることを理解されたい。しかし、当業者であれば、本発明の開示に基づいて最適な緩衝液条件を特定することができる。あるいは、コンジュゲーション効率は、Spycherら(Dual, Site-Specific Modification of Antibodies by Using Solid-Phase Immobilized Microbial Transglutaminase, ChemBioChem 2019, 18(19): 1923-1927)に記載の通り求め、Benjaminら(Thiolation of Q295: Site-Specific Conjugation of Hydrophobic Payloads without the Need for Genetic Engineering, Mol. Pharmaceutics 2019, 16: 2795-2807)に従って分析してもよい。

【0433】

特定の実施形態においては、抗体は、5~10U/mg抗体の濃度の微生物トランスグルタミナーゼ(MTG、Zedira)及び5モル当量の指定のリンカーペイロードを含む50mM Tris pH7.6中において、5mg/mLのネイティブなグリコシル化モノクローナル抗体を37°Cで24時間、回転サーモミキサー内でインキュベートすることによってコンジュゲートさせることができる。しかし、条件、特に緩衝液条件及びペプチドリンカー濃度は、ペイロード(複数可)の特性に応じて調整してよいことを理解されたい。しかし、当業者であれば、本発明に提供される教示に基づいて最適な反応条件を特定することができる。

【0434】

具体的な実施形態においては、本発明は、トランスグルタミナーゼが微生物トランスグルタミナーゼ(MTG)である、本発明に係る方法に関する。

【0435】

本発明の方法において使用するためのトランスグルタミナーゼは、本発明のペプチドリンカーを抗体にコンジュゲートさせるのに適した任意のトランスグルタミナーゼであってよい。トランスグルタミナーゼはいかなる起源であってよく、例えば、トランスグルタミナーゼは、細菌、古細菌、又は真核生物起源であってよい。

【0436】

特定の実施形態においては、トランスグルタミナーゼは、ヒトトランスグルタミナーゼを含む哺乳動物トランスグルタミナーゼであってよい。特定の実施形態においては、トランスグルタミナーゼは、細菌及び真菌のトランスグルタミナーゼを含む微生物トランスグルタミナーゼであってよい。

【0437】

10

20

30

40

50

具体的な実施形態においては、本発明は、微生物トランスグルタミナーゼがストレプトマイセス属の種、特にストレプトマイセス・モバラエンシスに由来する、本発明に係る方法に関する。

【0438】

すなわち、本発明の方法において使用される微生物トランスグルタミナーゼは、ストレプトマイセス属の種、特に、ストレプトマイセス・モバラエンシスに由来してよく、優先的にはネイティブな酵素に対して80%の配列同一性を有するものである。従って、MTGはネイティブな酵素であってもよく、ネイティブな酵素の遺伝子操作されたバリエーションであってもよい。

【0439】

このような微生物トランスグルタミナーゼの1つは、Zedira (ドイツ) から市販されている。それは、大腸菌 (*E. coli*) で組換え的に産生される。ストレプトマイセス・モバラエンシストランスグルタミナーゼは、配列番号78に開示されているアミノ酸配列を有する。他のアミノ酸配列を有するS・モバラエンシスMTGバリエーションも報告されており、これも本発明に包含される (配列番号79及び80)。

【0440】

そのような微生物トランスグルタミナーゼの1つは、Jin et al. 2016, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* に記載されているS・モバラエンシス由来のMTG-TXバリエーションであってもよく、これは、高い耐塩性並びに幅広いpH及び温度安定性を示す。

【0441】

別の実施形態においては、ストレプトマイセス・ラバカナム (*Streptomyces ladakanum*) (以前はストレプトベルチキリウム・ラバカナム (*Streptoverticillium ladakanum*) として知られていた) 由来の微生物トランスグルタミナーゼを使用してもよい。ストレプトマイセス・ラバカナムトランスグルタミナーゼ (米国特許第6,660,510B2号) は、配列番号81に開示されているアミノ酸配列を有する。

【0442】

上記のトランスグルタミナーゼはいずれも、配列が改変されていてもよい。幾つかの実施形態においては、配列番号78~81のいずれか1つと80%、85%、90%、95%、又はそれ以上の配列同一性を有するトランスグルタミナーゼを使用してもよい。

【0443】

ACTIVA TGと呼ばれる別の好適な微生物トランスグルタミナーゼがAjinomotoから市販されている。Zedira製のトランスグルタミナーゼと比較すると、ACTIVA TGはN末端のアミノ酸を4つ欠いているが、同様の活性を有する。

【0444】

本発明の文脈において使用することができる更なる微生物トランスグルタミナーゼは、Kieliszek及びMisiwicz (*Folia Microbiol (Praha)*, 2014; 59(3): 241-250)、国際公開第2015/191883 A1号、同第2008/102007 A1号、及び米国特許出願公開第2010/0143970号に開示されており、これらの全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0445】

特定の実施形態においては、微生物トランスグルタミナーゼの変異体バリエーションを、リンカーの抗体へのコンジュゲーションに使用することができる。すなわち、本発明の方法において使用される微生物トランスグルタミナーゼは、配列番号78又は79に記載のS・モバラエンシストランスグルタミナーゼのバリエーションであってもよい。特定の実施形態においては、配列番号78に記載の組換えS・モバラエンシストランスグルタミナーゼは、変異G254Dを含み得る。特定の実施形態においては、配列番号78に記載の組換えS・モバラエンシストランスグルタミナーゼは、変異G254D及びE304Dを含み得る。特定の実施形態においては、配列番号78に記載の組換えS・モバラエンシストラン

10

20

30

40

50

スグルタミナーゼは、変異 D 8 E 及び G 2 5 4 D を含み得る。特定の実施形態においては、配列番号 7 8 に記載の組換え S . モバラエンシストランスグルタミナーゼは、変異 E 1 2 4 A 及び G 2 5 4 D を含み得る。特定の実施形態においては、配列番号 7 8 に記載の組換え S . モバラエンシストランスグルタミナーゼは、変異 A 2 1 6 D 及び G 2 5 4 D を含み得る。特定の実施形態においては、配列番号 7 8 に記載の組換え S . モバラエンシストランスグルタミナーゼは、変異 G 2 5 4 D 及び K 3 3 1 T を含み得る。

【 0 4 4 6 】

具体的な実施形態においては、本発明は、トランスグルタミナーゼが、2 0 0 U / m g 抗体未満の濃度でコンジュゲーション反応に添加される、本発明に係る方法に関する。

【 0 4 4 7 】

微生物トランスグルタミナーゼは、抗体をリンカーと効率的にコンジュゲートさせることができる任意の濃度でコンジュゲーション反応に添加してよい。特定の実施形態においては、コンジュゲーション反応における微生物トランスグルタミナーゼの濃度は、同じ反応において使用される抗体の量に依存し得る。例えば、微生物トランスグルタミナーゼは、2 0 0 U / m g 抗体、1 5 0 U / m g 抗体、1 0 0 U / m g 抗体、9 0 U / m g 抗体、8 0 U / m g 抗体、7 0 U / m g 抗体、6 0 U / m g 抗体、5 0 U / m g 抗体、4 0 U / m g 抗体、3 0 U / m g 抗体、2 0 U / m g 抗体、1 0 U / m g 抗体、又は 6 U / m g 抗体未満の濃度でコンジュゲーション反応に添加してよい。

【 0 4 4 8 】

特定の実施形態においては、微生物トランスグルタミナーゼを 1 U / m g 抗体の濃度でコンジュゲーション反応に添加してよい。特定の実施形態においては、微生物トランスグルタミナーゼを 3 U / m g 抗体の濃度でコンジュゲーション反応に添加してよい。特定の実施形態においては、微生物トランスグルタミナーゼを 5 U / m g 抗体の濃度でコンジュゲーション反応に添加してよい。特定の実施形態においては、微生物トランスグルタミナーゼを 6 U / m g 抗体の濃度でコンジュゲーション反応に添加してよい。特定の実施形態においては、微生物トランスグルタミナーゼを 7 . 5 U / m g 抗体の濃度でコンジュゲーション反応に添加してよい。特定の実施形態においては、微生物トランスグルタミナーゼを 1 0 U / m g 抗体の濃度でコンジュゲーション反応に添加してよい。

【 0 4 4 9 】

特定の実施形態においては、微生物トランスグルタミナーゼを 1 ~ 1 0 0 U / m g 抗体の濃度でコンジュゲーション反応に添加してよい。特定の実施形態においては、微生物トランスグルタミナーゼを 3 ~ 5 0 U / m g 抗体の濃度でコンジュゲーション反応に添加してよい。特定の実施形態においては、微生物トランスグルタミナーゼを 5 ~ 2 5 U / m g 抗体の濃度でコンジュゲーション反応に添加してよい。

【 0 4 5 0 】

特定の実施形態においては、微生物トランスグルタミナーゼを 1 ~ 2 0 U / m g 抗体、好ましくは 3 ~ 1 5 U / m g 抗体の濃度、より好ましくは 5 ~ 1 0 U / m g 抗体の濃度でコンジュゲーション反応に添加してよい。

【 0 4 5 1 】

好ましくは、本発明の方法で使用するためのトランスグルタミナーゼは微生物トランスグルタミナーゼである。しかし、非微生物起源のトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素によっても同等の反応を実施できることに留意されたい。従って、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲートは、非微生物起源のトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素を用いて作製することもできる。

【 0 4 5 2 】

具体的な実施形態においては、本発明は、抗体を 0 . 1 ~ 5 0 m g / m L の濃度でコンジュゲーション反応に添加する、本発明に係る方法に関する。

【 0 4 5 3 】

抗体は、抗体の効率的なコンジュゲーションを得るのに適した任意の濃度でコンジュゲーション反応に添加してよい。しかし、抗体を 0 . 1 ~ 5 0 m g / m L の範囲の濃度でコ

10

20

30

40

50

ンジュゲーション反応に添加することが好ましい。すなわち、具体的な実施形態においては、本発明は、抗体を 0.1 ~ 50 mg/mL、好ましくは 0.25 ~ 25 mg/mL/mL、より好ましくは 0.5 ~ 12.5 mg/mL、更により好ましくは 1 ~ 10 mg/mL、更により好ましくは 2 ~ 7.5 mg/mL、最も好ましくは約 5 mg/mL の濃度でコンジュゲーション反応に添加する、本発明に係る方法に関する。

【0454】

あるいは、抗体を 1 ~ 20 mg/mL、好ましくは 2.5 ~ 20 mg/mL、より好ましくは 5 ~ 20 mg/mL、最も好ましくは 5 ~ 17 mg/mL の範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加してもよい。

【0455】

具体的な実施形態においては、本発明は、抗体を 2 ~ 100 モル当量のペプチドリンカーと接触させる、本発明に係る方法に関する。

【0456】

効率的なコンジュゲーションを得るためには、リンカーをモル過剰に抗体に添加することが好ましい。すなわち、特定の実施形態においては、抗体は、少なくとも 2 モル当量、5 モル当量、10 モル当量、20 モル当量、30 モル当量、40 モル当量、50 モル当量、60 モル当量、70 モル当量、80 モル当量、90 モル当量、又は 100 モル当量のリンカーと混合される。

【0457】

すなわち、具体的な実施形態では、本発明は、抗体を 2 ~ 100 モル当量のリンカー、好ましくは 2 ~ 80 モル当量のリンカー、より好ましくは 2 ~ 70 モル当量のリンカー、更により好ましくは 2 ~ 60 モル当量のリンカー、更により好ましくは 2 ~ 50 モル当量のリンカー、更により好ましくは 2 ~ 40 モル当量のリンカー、更により好ましくは 2 ~ 30 モル当量のリンカー、更により好ましくは 2 ~ 25 モル当量のリンカー、更により好ましくは 2 ~ 20 モル当量のリンカー、更により好ましくは 2 ~ 15 モル当量のリンカー、最も好ましくは 2 ~ 10 モル当量のリンカーと接触させる、本発明に係る方法に関する。

【0458】

あるいは、抗体を 2.5 ~ 100 モル当量のリンカー、好ましくは 2.5 ~ 80 モル当量のリンカー、より好ましくは 2.5 ~ 70 モル当量のリンカー、更により好ましくは 2.5 ~ 60 モル当量のリンカー、更により好ましくは 2.5 ~ 50 モル当量のリンカー、更により好ましくは 2.5 ~ 40 モル当量のリンカー、更により好ましくは 2.5 ~ 30 モル当量のリンカー、更により好ましくは 2.5 ~ 20 モル当量のリンカー、更により好ましくは 2.5 ~ 15 モル当量のリンカー、更により好ましくは 2.5 ~ 10 モル当量のリンカー、最も好ましくは 2.5 ~ 8 モル当量のリンカーと接触させてもよい。

【0459】

あるいは、抗体を 5 ~ 100 モル当量のリンカー、好ましくは 5 ~ 80 モル当量のリンカー、より好ましくは 5 ~ 70 モル当量のリンカー、更により好ましくは 5 ~ 60 モル当量のリンカー、更により好ましくは 5 ~ 50 モル当量のリンカー、更により好ましくは 5 ~ 40 モル当量のリンカー、更により好ましくは 5 ~ 30 モル当量のリンカー、更により好ましくは 5 ~ 20 モル当量のリンカー、更により好ましくは 5 ~ 15 モル当量のリンカー、最も好ましくは 5 ~ 10 モル当量のリンカーと接触させてもよい。

【0460】

具体的な実施形態においては、本発明は、コンジュゲーション反応が緩衝溶液中で実施される、本発明に係る方法に関する。

【0461】

本発明に係る方法は、好ましくは 5 ~ 10 の範囲の pH で実施される。従って、好ましい実施形態においては、本発明は、リンカーの抗体へのコンジュゲーションが、5 ~ 10 範囲の pH で、好ましくは 6 ~ 9 の範囲の pH で、より好ましくは 6 ~ 8.5 の範囲の pH で、更により好ましくは 6.5 ~ 8 の範囲の pH で、最も好ましくは 6.6 ~ 7.6 の

10

20

30

40

50

範囲の pH で達成される、本発明に係る方法に関する。

【0462】

特定の実施形態においては、本発明は、リンカーの抗体へのコンジュゲーションが pH 6.6 で達成される、本発明に係る方法に関する。

【0463】

特定の実施形態においては、本発明は、リンカーの抗体へのコンジュゲーションが pH 7.6 で達成される、本発明に係る方法に関する。

【0464】

本発明の方法は、ペイロードのリンカーへのコンジュゲーションに適した任意の緩衝液中で実施することができる。本発明の方法に適した緩衝液としては、限定するものではないが、Tris、MOPS、HEPES、PBS、又は BisTris の緩衝液が挙げられる。緩衝液の濃度は、特に抗体及び / 又はリンカーの濃度に依存し、10 ~ 1000 mM、10 ~ 500 mM、10 ~ 400 mM、10 ~ 250 mM、10 ~ 150 mM、又は 10 ~ 100 mM の範囲であってよい。更に、緩衝液は、本発明の方法を実施するのに適した任意の塩濃度を有してよい。例えば、本発明の方法において使用される緩衝液は、250 mM、200 mM、150 mM、140 mM、130 mM、120 mM、110 mM、100 mM、90 mM、80 mM、70 mM、60 mM、50 mM、40 mM、30 mM、20 mM、又は 10 mM の塩濃度を有していてもよく、又は塩を含んでいなくてもよい。

10

【0465】

すなわち、具体的な実施形態においては、本発明は、緩衝溶液が、

- a) 5 ~ 10 の範囲の pH ; 及び / 又は
- b) 10 ~ 1000 mM の範囲の緩衝液濃度 ; 及び / 又は
- c) 250 mM 未満の範囲の塩濃度

を有する、本発明に係る方法に関する。

20

【0466】

好ましい実施形態においては、本発明は、緩衝溶液が、

- a) 6 ~ 9 の範囲の pH ; 及び / 又は
- b) 10 ~ 1000 mM の範囲の緩衝液濃度 ; 及び / 又は
- c) 250 mM 未満の範囲の塩濃度

を有する、本発明に係る方法に関する。

30

【0467】

より好ましい実施形態においては、本発明は、緩衝溶液が、

- a) 6 ~ 8 の範囲の pH ; 及び / 又は
- b) 10 ~ 500 mM の範囲の緩衝液濃度 ; 及び / 又は
- c) 150 mM 未満の塩濃度

を有する、本発明に係る方法に関する。

【0468】

更により好ましい実施形態においては、本発明は、緩衝溶液が、

- a) 6 ~ 8 の範囲の pH ; 及び / 又は
- b) 10 ~ 200 mM の範囲の緩衝液濃度 ; 及び / 又は
- c) 50 mM 未満の塩濃度

を有する、本発明に係る方法に関する。

40

【0469】

好ましい実施形態においては、本発明の方法は、50 mM Tris (pH 7.6) 中、好ましくは無塩で実施される。

【0470】

別の好ましい実施形態においては、本発明の方法は、50 mM BisTris (pH 6.6) 中、好ましくは無塩で実施される。

【0471】

50

別の好ましい実施形態においては、本発明の方法は、50 mM BisTris (pH 7.5) 中、好ましくは無塩で実施される。

【0472】

最適な反応条件（例えば、pH、緩衝液、塩濃度）はペイロードによって異なり得、リンカー及び/又はペイロードの物理化学的特性にある程度依存することに留意しなければならない。しかし、本発明の方法を実施するのに適した反応条件を特定するために、当業者が過度の実験を行う必要はない。

【0473】

本出願は、上に開示したリンカー、抗体、MTG、及び/又は緩衝液濃度の任意の組み合わせを包含することを理解されたい。

【0474】

特定の実施形態においては、本発明は、抗体を2~80モル当量のリンカーと接触させる；及び/又は微生物トランスグルタミナーゼを1~20 U/mg 抗体の範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加し、任意で、抗体を0.1~20 mg/mLの範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加する、本発明に係る方法に関する。

【0475】

好ましい実施形態においては、本発明は、抗体を2~50モル当量のリンカーと接触させる；及び/又は微生物トランスグルタミナーゼを1~15 U/mg 抗体の範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加し、任意で、抗体を1~20 mg/mLの範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加する、本発明に係る方法に関する。

【0476】

より好ましい実施形態においては、本発明は、抗体を2~30モル当量のリンカーと接触させる；及び/又は微生物トランスグルタミナーゼを2~15 U/mg 抗体の範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加し、任意で、抗体を2.5~20 mg/mLの範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加する、本発明に係る方法に関する。

【0477】

更により好ましい実施形態においては、本発明は、抗体を2~20モル当量のリンカーと接触させる；及び/又は微生物トランスグルタミナーゼを5~15 U/mg 抗体の範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加し、任意で、抗体を2.5~20 mg/mLの範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加する、本発明に係る方法に関する。

【0478】

更により好ましい実施形態においては、本発明は、抗体を2~15モル当量のリンカーと接触させる；及び/又は微生物トランスグルタミナーゼを5~15 U/mg 抗体の範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加し、任意で、抗体を5~20 mg/mLの範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加する、本発明に係る方法に関する。

【0479】

最も好ましい実施形態においては、本発明は、抗体を2.5~12.5モル当量のリンカーと接触させる；及び/又は微生物トランスグルタミナーゼを5~15 U/mg 抗体の範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加し、任意で、抗体を5~20 mg/mLの範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加する、本発明に係る方法に関する。

【0480】

別の好ましい実施形態においては、本発明は、抗体を2~20モル当量のリンカーと接触させる；及び/又は微生物トランスグルタミナーゼを5~15 U/mg 抗体の範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加し、任意で、抗体を2.5~20 mg/mLの範囲の濃度でコンジュゲーション反応に添加する、本発明に係る方法に関する。

【0481】

上に開示した特定の反応混合物は、本明細書に開示される緩衝液条件のいずれとも自由に組み合わせることができることに留意されたい。しかし、上記で定義した特定の成分は、6~8の範囲のpHで混合されることが好ましい。

【0482】

10

20

30

40

50

具体的な実施形態においては、本発明は、本発明に係る方法で生成された抗体 - ペイロードコンジュゲートに関する。

【0483】

すなわち、本発明は更に、前述の方法ステップのいずれかを用いて作製された抗体 - リンカーコンジュゲートに関する。

【0484】

具体的な実施形態においては、本発明は、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲートと、少なくとも1つの薬学的に許容し得る成分とを含む医薬組成物に関する。

【0485】

すなわち、本発明は更に、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲートを含む医薬組成物に関する。 10

【0486】

「医薬組成物」という用語は、本明細書で使用される場合、化学物質又は有効成分を含む任意の組成物であって、疾患の医学的な治療、処置、又は予防に使用することを意図しており、有効成分が有効となることを可能にするような形態である組成物を指す。特に、医薬組成物は、該組成物が投与される対象にとって許容できないほどの毒性のある賦形剤を含有しない。医薬組成物は滅菌されている、すなわち、無菌でありかつ全ての生存している微生物及びその芽胞を含まない。本発明の医薬組成物は、好ましくは液体である。

【0487】

医薬組成物に含まれる抗体 - ペイロードコンストラクトに含まれるペイロードの種類は、医薬組成物の意図する用途によって異なる。医薬組成物を疾患の処置に使用する実施形態においては、ペイロードは、好ましくは薬物である。疾患が新生物疾患である場合、ペイロードは、好ましくは毒素である。医薬組成物を診断で使用する実施形態においては、ペイロードは、好ましくは造影剤である。 20

【0488】

本発明に係る医薬組成物は、本明細書に開示される抗体 - 薬物コンジュゲートを含み得る。抗体 - 薬物コンジュゲートを含む医薬組成物は、好ましくは疾患の処置に使用される。

【0489】

本発明に係る医薬組成物は、少なくとも1つの薬学的に許容し得る成分を含み得る。 30

【0490】

薬学的に許容し得る成分とは、対象に対して非毒性である、医薬製剤中の有効成分以外の成分を指す。薬学的に許容し得る成分としては、緩衝液、賦形剤、安定剤、又は保存剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0491】

凍結乾燥製剤又は水溶液の形態の本明細書に記載される抗体 - ペイロードコンジュゲートの医薬製剤は、所望の純度を有するこのようなコンジュゲートを1つ以上の任意の薬学的に許容し得る成分と混合することにより調製される (Flemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Oslo, A. Ed. (1980))。薬学的に許容し得る成分は、一般に、使用される投薬量及び濃度でレシピエントにとって非無性であり、そして、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸等の緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（例えば、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；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、若しくはベンジルアルコール；メチル若しく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m - クレゾール）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、若しくはリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤； 40 50

スクロース、マンニトール、トレハロース、若しくはソルビトール等の糖類；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；並びに／又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含むが、これらに限定されない。本明細書における例示的な薬学的に許容し得る成分としては、更に、広範囲（*insertional*）薬物分散剤、例えば、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（*sHASEGP*）、例えば、*rHuPH20*（*HYLENE X*（登録商標）、*Baxter International, Inc.*）等のヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質が挙げられる。*rHuPH20*を含む特定の例示的な*sHASEGP*及びその使用方法は、米国特許公開第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載されている。例えば、*sHASEGP*をコンドロイチナーゼ等の1つ以上の追加のグリコサミノグリカナーゼと組み合わせてもよい。

【0492】

具体的な実施形態においては、本発明は、少なくとも1つの追加の治療的に活性のある剤を含む、本発明に係る医薬組成物に関する。

【0493】

すなわち、抗体-ペイロードコンジュゲートを含む医薬組成物は、1つ以上の追加の治療的に活性のある剤を含んでいてもよい。抗体-ペイロードコンジュゲートは、様々な治療領域で使用できることを理解されたい。このように、医薬組成物中の追加の治療的に活性のある剤は、医薬組成物の用途に応じて変化し得る。

【0494】

特定の実施形態においては、本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲートを含む医薬組成物は、がんの処置に使用することができる。このような実施形態においては、医薬組成物は、1つ以上の追加の抗がん薬を含んでいてもよい。本明細書では、「抗がん」薬という用語は、がんの処置に従来使用されている薬物の1つ又は組み合わせを指す。

【0495】

例えば、本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲートを含む医薬組成物は、1つ以上の化学療法剤を更に含んでいてもよい。本明細書で使用される場合、用語「化学療法剤」又は「化学治療剤」又は「化学療法薬」とは、転移又は新生物の成長を低減、防止、軽減、制限、及び／又は遅延させる、あるいは新生物の壊死若しくはアポトーシス又は任意の他の機序によって直接新生物細胞を殺傷する、あるいは別の方法で、新生物疾患を有する対象における転移又は新生物の成長を低減、防止、軽減、制限、及び／又は遅延させるために薬学的に有効な量で使用することができる剤を意味する。化学療法剤としては、例えば、フルオロピリミジン；ピリミジンヌクレオシド；プリンヌクレオシド；抗葉酸剤、白金剤；アントラサイクリン／アントラセンジオン；エピポドフィロトキシン；カンプトテシン；ホルモン；ホルモン複合体；抗ホルモン剤；酵素、タンパク質、ペプチド、並びにポリクローナル抗体及び／又はモノクローナル抗体；ピンカアルカロイド；タキサン；エポチロン；抗微小管剤；アルキル化剤；代謝拮抗剤；トポイソメラーゼ阻害剤；抗ウイルス剤；並びに他の様々な細胞毒性及び細胞分裂阻害剤が挙げられる。

【0496】

具体的な実施形態においては、本発明は、治療及び／若しくは診断において使用するための、本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲート又は本発明に係る医薬組成物に関する。

【0497】

すなわち、本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物は、対象の処置において又は対象における疾患若しくは病態の診断において使用することができる。個体又は対象は、好ましくは哺乳動物である。哺乳動物としては、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト、及びマカク等の非ヒト霊長類）、ウサギ、及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態においては、個体又は対象はヒトである。本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲート又は抗体-ペイロードコンジュゲートを含む医薬組成物を治

療に使用する場合、ペイロードが薬物であることが好ましい。本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲート又は抗体 - ペイロードコンジュゲートを含む医薬組成物を診断に使用する場合、リンカーがペイロードとして少なくとも1つの造影剤を含むことが好ましい。

【0498】

具体的な実施形態においては、本発明は、
新生物疾患、神経疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、又は感染性疾患

- ・に罹患している、
- ・を発症するリスクがある、及び/又は
- ・と診断された

患者の処置において使用するための、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲート又は本発明に係る医薬組成物に関する。

10

【0499】

具体的な実施形態においては、本発明は、新生物疾患に罹患している患者の処置において使用するための、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲート又は本発明に係る医薬組成物に関する。

【0500】

がんに罹患している患者は、以前にいかなる抗がん療法で治療されたこともない患者であってよい。しかし、がんに罹患している患者は、以前の抗がん処置に対して不応であった患者であってよい。

【0501】

「新生物疾患」という用語は、本発明で使用される場合、細胞の制御不能な異常成長を特徴とする状態を指す。新生物疾患にはがんも含まれる。がんの例としては、がん腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が挙げられるが、これらに限定されない。このようながんのより具体的な例としては、乳がん、前立腺がん、結腸がん、扁平上皮がん、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、卵巣がん、頸部がん、消化器がん、膵臓がん、神経膠芽腫、肝臓がん、膀胱がん、肝細胞がん、結腸直腸がん、子宮頸がん、子宮内膜がん腫、唾液腺がん腫、腎臓がん、外陰がん、甲状腺がん、肝がん腫、皮膚がん、黒色腫、脳腫瘍、卵巣がん、神経芽細胞腫、骨髄腫、各種頭頸部がん、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、ユーイング肉腫、及び末梢神経上皮腫が挙げられる。好ましいがんとしては、肝臓がん、リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、ユーイング肉腫、及び末梢神経上皮腫が挙げられる。

20

30

【0502】

すなわち、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲートは、好ましくはがんの治療に使用される。このように、特定の実施形態においては、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲートは、腫瘍細胞上に存在する抗原に特異的に結合 (bind) する抗体を含む。特定の実施形態においては、抗原は、腫瘍細胞の表面上の抗原であってよい。特定の実施形態においては、腫瘍細胞の表面上の抗原は、抗体 - ペイロードコンジュゲートが抗原に結合 (bind) すると、抗体 - ペイロードコンジュゲートと共に細胞内部に移行し得る。

【0503】

本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲートをがんの処置に使用する場合、抗体 - ペイロードコンジュゲートは、抗体 - ペイロードコンジュゲートが結合 (bind) する腫瘍細胞を殺傷するか又は増殖を阻害する能力を有する少なくとも1つのペイロードを含むことが好ましい。特定の実施形態においては、少なくとも1つのペイロードは、抗体 - ペイロードコンジュゲートが腫瘍細胞内部に移行した後に細胞毒性活性を示す。特定の実施形態においては、少なくとも1つのペイロードは毒素である。

40

【0504】

具体的な実施形態においては、本発明は、自己免疫疾患に罹患している患者の処置において使用するための、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲート又は本発明に係る医薬組成物に関する。

50

【0505】

具体的な実施形態においては、本発明は、細菌感染症又はウイルス感染症に罹患している患者の処置において使用するための、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲート又は本発明に係る医薬組成物に関する。

【0506】

特定の実施形態においては、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲート及び/又は医薬組成物は、B細胞関連がんの処置において使用することができる。

【0507】

従って、具体的な実施形態においては、本発明は、本発明に従って使用するための抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物であって、該抗体 - ペイロードコンジュゲートがポラツズマブを含み、該新生物疾患がB細胞関連がんである抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物に関する。

10

【0508】

そのために、抗体 - ペイロードコンジュゲートが本明細書に開示される抗CD79b抗体を含むことが好ましく、好ましくは、該抗CD79b抗体はCD79bに結合(bind)すると標的細胞内部に移行する。特定の実施形態においては、抗CD79b抗体は、配列番号71に記載の重鎖及び配列番号72に記載の軽鎖を有するポラツズマブである。更に、抗体 - ペイロードコンジュゲートが少なくとも1つの毒素を含むことが好ましい。

【0509】

特定の実施形態においては、抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物に含まれる抗CD79b抗体は、図1～図40に示されるリンカーのいずれか1つ又は本明細書に開示されるリンカーのいずれか1つにコンジュゲートすることができる。

20

【0510】

B細胞関連がんは、高、中、及び低悪性度のリンパ腫(例えば、粘膜関連リンパ組織B細胞リンパ腫及び非ホジキンリンパ腫(NHL)等のB細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、並びにホジキンリンパ腫、並びにT細胞リンパ腫を含む)、並びに白血病(続発性白血病、B細胞白血病(CD5+Bリンパ球)等の慢性リンパ性白血病(PLL)、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病等の骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病(ALL)等のリンパ性白血病、及び骨髄異形成を含む)、並びに好塩基球、好酸球、好中球、及び単球等の多形核白血球、樹状細胞、血小板、赤血球、並びにナチュラルキラー細胞を含む追加の造血細胞のがんを含む他の血液学的不がん及び/又はB細胞若しくはT細胞の関連がんからなる群から選択されるいずれか1つであってよい。また、以下から選択されるがん性B細胞増殖障害も含まれる:リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、侵襲性NHL、再発性侵襲性NHL、再発性低悪性度NHL、難治性NHL、難治性低悪性度NHL、慢性リンパ性白血病(PLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリーセル白血病(HCL)、急性リンパ性白血病(ALL)、及びマントル細胞リンパ腫。

30

【0511】

具体的な実施形態においては、本発明は、B細胞関連がんが非ホジキンリンパ腫であり、特に、B細胞関連がんがびまん性大細胞型B細胞リンパ腫である、本発明に従って使用するための抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物に関する。

40

【0512】

更に、抗CD79b抗体 - ペイロードコンジュゲート及び/又は抗CD79b抗体 - ペイロードコンジュゲートを含む医薬組成物は、B細胞関連がんの処置に適した他の治療と併用してもよい。

【0513】

従って、具体的な実施形態においては、本発明は、本発明に従って使用するための抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物であって、ベンダムスチン及び/又はリツキシマブと組み合わせて投与される抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物に関する

50

る。

【0514】

抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物は、ベンダムスチン及び/又はリツキシマブ等の追加の治療剤と必ずしも同時に投与しなければならないわけではないことを理解されたい。その代わりに、抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物は、同じ疾患の処置に使用される他の治療剤とは異なる投与スケジュールで、結果的に異なる日に投与されてもよい。

【0515】

特定の実施形態においては、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲート及び/又は医薬組成物は、HER2陽性がんの処置において使用することができる。

10

【0516】

すなわち、具体的な実施形態においては、本発明は、本発明に従って使用するための抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物であって、抗体 - ペイロードコンジュゲートがトラスツズマブを含み、新生物疾患が、HER2陽性がん、特にHER2陽性の乳がん、胃がん、卵巣がん、又は肺がんである、抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物に関する。

【0517】

そのために、抗体 - ペイロードコンジュゲートは本明細書に開示される抗HER2/neu抗体を含むことが好ましく、好ましくは、該抗HER2/neu抗体は、HER2/neuに結合(bind)すると標的細胞内部に移行する。特定の実施形態においては、抗HER2/neu抗体は、配列番号73に記載の重鎖及び配列番号74に記載の軽鎖を有するトラスツズマブである。更に、抗体 - ペイロードコンジュゲートは少なくとも1つの毒素を含むことが好ましい。

20

【0518】

特定の実施形態においては、抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物に含まれる抗HER2/neu抗体は、図1~図40に示されるリンカーのいずれか1つ又は本明細書に開示されるリンカーのいずれか1つにコンジュゲートすることができる。

【0519】

HER2陽性がんは、本明細書で使用される場合、限定するものではないが、HER2陽性の乳がん、胃がん、卵巣がん、又は肺がんであり得る。当業者であれば、がんがHER2陽性がんであるかどうかを判定することができる。例えば、腫瘍細胞は生検で単離することができる。HER2/neuの存在は当技術分野で公知の任意の方法で判定することができる。

30

【0520】

更に、抗HER2/neu抗体 - ペイロードコンジュゲート及び/又は抗HER2/neu抗体 - ペイロードコンジュゲートを含む医薬組成物は、HER2細胞陽性がんの処置に適した他の治療と併用してもよい。

【0521】

従って、具体的な実施形態においては、本発明は、本発明に従って使用するための抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物であって、ラパチニブ、カペシタピン、及び/又はタキサンと組み合わせて投与される、抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物に関する。

40

【0522】

抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物は、ラパチニブ、カペシタピン、及び/又はタキサン等の追加の治療剤と必ずしも同時に投与しなければならないわけではないことを理解されたい。その代わりに、抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物は、同じ疾患の処置に使用される他の治療剤とは異なる投与スケジュールで、結果的に異なる日に投与されてもよい。

【0523】

特定の実施形態においては、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲート及び/又は

50

医薬組成物は、ネクチン - 4 陽性がんの処置に使用することができる。

【0524】

すなわち、具体的な実施形態においては、本発明は、本発明に従って使用するための抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物であって、抗体 - ペイロードコンジュゲートがエンホルツマブ又はエンホルツマブバリアントを含み、新生物疾患が、ネクチン - 4 陽性がん、特にネクチン - 4 陽性の膵臓がん、肺がん、膀胱がん、又は乳がんである抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物に関する。

【0525】

そのために、抗体 - ペイロードコンジュゲートが本明細書に開示される抗ネクチン - 4 抗体を含むことが好ましく、好ましくは、該抗ネクチン - 4 抗体はネクチン - 4 に結合 (bind) すると標的細胞内部に移行する。特定の実施形態においては、抗ネクチン - 4 抗体は、配列番号75に記載の重鎖及び配列番号76又は77に記載の軽鎖を有するエンホルツマブである。更に、抗体 - ペイロードコンジュゲートは少なくとも1つの毒素を含むことが好ましい。

10

【0526】

特定の実施形態においては、抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物に含まれる抗ネクチン - 4 抗体は、図1～図40に示されるリンカーのいずれか1つ又は本明細書に開示されるリンカーのいずれか1つにコンジュゲートすることができる。

【0527】

ネクチン - 4 陽性がんは、本明細書で使用される場合、限定するものではないが、ネクチン - 4 陽性の膵臓がん、肺がん、膀胱がん、又は乳がんであり得る。当業者であれば、がんがネクチン - 4 陽性がんであるかどうかを判定することができる。例えば、腫瘍細胞は生検で単離することができ、ネクチン - 4 の存在は当技術分野で公知の任意の方法で判定することができる。

20

【0528】

本発明に係る抗ネクチン - 4 抗体 - ペイロードコンジュゲート及び/又は抗ネクチン - 4 抗体 - ペイロードコンジュゲートを含む医薬組成物は、以前手術前又は手術後にPD - 1 又はPD - L1 阻害剤を白金系 (platinum - based) 化学療法剤と組み合わせ投与されたことのある患者に単独で投与してよい。

【0529】

更に、抗ネクチン - 4 抗体 - ペイロードコンジュゲート及び/又は抗ネクチン - 4 抗体 - ペイロードコンジュゲートを含む医薬組成物は、ネクチン - 4 陽性がんの処置に適した他の治療と併用してもよい。

30

【0530】

従って、具体的な実施形態においては、本発明は、本発明に従って使用するための抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物であって、シスプラチン系化学療法剤及び/又はペンプロリズマブと組み合わせて投与される、抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物に関する。

【0531】

抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物は、シスプラチン系化学療法剤及び/又はペンプロリズマブ等の追加の治療剤と必ずしも同時に投与しなければならないわけではないことを理解されたい。その代わりに、抗体 - ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物は、同じ疾患の処置に使用される他の治療剤と異なるスケジュールで、結果的に異なる日に投与されてもよい。

40

【0532】

具体的な実施形態においては、本発明は、新生物疾患、神経疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、又は感染性疾患

- ・に罹患している、
- ・を発症するリスクがある、及び/又は
- ・と診断された

50

患者を処置するための医薬を製造するための、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲート又は本発明に係る医薬組成物の使用に関する。

【0533】

具体的な実施形態においては、本発明は、新生物疾患を処置又は予防する方法であって、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲート又は本発明に係る医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む方法に関する。

【0534】

具体的な実施形態においては、本発明は、術前、術中、又は術後のイメージングにおいて使用するための、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲート又は本発明に係る医薬組成物に関する。

【0535】

すなわち、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲートは、医療用イメージングにおいて使用することができる。そのために、特定の標的分子、細胞、又は組織に結合 (bind) している間に抗体 - ペイロードコンジュゲートを可視化することができる。特定のペイロードを可視化するために、当技術分野では様々な技術が知られている。例えば、ペイロードが放射性核種である場合、抗体 - ペイロードコンジュゲートが結合 (bind) する分子、細胞、又は組織を PET 又は SPECT によって可視化することができる。ペイロードが蛍光色素の場合、抗体 - ペイロードコンジュゲートが結合 (bind) する分子、細胞、又は組織は蛍光イメージングによって可視化することができる。特定の実施形態においては、本発明に係る抗体 - ペイロードコンジュゲートは、2つの異なるペイロード、例えば、放射性核種及び蛍光色素を含む。この場合、抗体 - ペイロードコンジュゲートが結合 (bind) する分子、細胞、又は組織は、PET / SPECT 及び蛍光イメージング等の2つの異なる及び / 又は補完的なイメージング技術を用いて可視化することができる。

【0536】

抗体 - ペイロードコンジュゲートは、術前、術中、及び / 又は術後のイメージングに使用することができる。

【0537】

術前イメージングは、特定の疾患又は病態を診断する際に特定の標的分子、細胞、又は組織を可視化し、任意で手術のガイダンスを提供するために手術前に実施され得る全てのイメージング技術を包含する。術前イメージングは、腫瘍上の抗原に特異的に結合 (bind) し、放射性核種を含むペイロードにコンジュゲートする抗体を含む抗体 - リンカーコンジュゲートを用いることによって、手術を実施する前に PET 又は SPECT により腫瘍を可視化するステップを含んでいてもよい。

【0538】

術中イメージングは、特定の標的分子、細胞、又は組織を可視化し、外科医にガイダンスを提供するために手術中に実施され得る全てのイメージング技術を包含する。特定の実施形態においては、近赤外蛍光イメージングによって手術中に腫瘍を可視化するために、近赤外蛍光色素を含む抗体 - リンカーコンジュゲートを使用することができる。術中イメージングにより、外科医が手術中に特定の組織、例えば腫瘍組織を特定することができるようになるため、腫瘍組織を完全に除去することができるようになる。

【0539】

術後イメージングは、特定の標的分子、細胞、又は組織を可視化し、手術の結果を評価するために手術後に実施され得る全てのイメージング技術を包含する。術後イメージングは術前と同様に行うことができる。

【0540】

特に、本発明は、2つ以上の異なるペイロードを含む抗体 - ペイロードコンジュゲートに関する。例えば、抗体 - リンカーコンジュゲートは、放射性核種及び近赤外蛍光色素を含み得る。このような抗体 - ペイロードコンジュゲートは、PET / SPECT 及び近赤外蛍光イメージングによるイメージングに使用することができる。このような抗体の利点

10

20

30

40

50

は、PET又はSPECTによって手術の前及び後に標的組織、例えば腫瘍を可視化するために使用できることである。同時に、手術中に近赤外イメージングによって腫瘍を可視化することもできる。

【0541】

具体的な実施形態においては、本発明は、本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲート又は本発明に係る医薬組成物であって、特に、該抗体-ペイロードコンジュゲートが術中画像誘導がん手術において使用するための2つのペイロードを含む抗体-ペイロードコンジュゲート又は本発明に係る医薬組成物に関する。

【0542】

上述したように、本発明の抗体-ペイロードコンジュゲートは、標的分子、細胞、又は組織を可視化し、手術中に外科医又はロボットを誘導するために使用することができる。すなわち、抗体-ペイロードコンジュゲートは、例えば近赤外イメージングによって手術中に腫瘍組織を可視化し、腫瘍組織を完全に除去できるようにするために使用することができる。

【0543】

本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物は、疾患を効率的に処置するか又は診断目的に十分な量又は投薬量で、ヒト又は動物の対象に投与してよい。

【0544】

本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物は、非経口、肺内、及び経鼻、並びに局所処置が望ましい場合には、病巣内、子宮内、又は膀胱内への投与を含む任意の好適な手段によって投与することができる。非経口注入は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下への投与を含む。投与が短期間であるか慢性的であるかに一部依存するが、任意の好適な経路、例えば静脈内注射又は皮下注射等の注射によって投薬を行ってもよい。単回投与又は様々な時点にわたる複数回投与、ポラス投与、及びパルス注入を含むがこれらに限定されない様々な投薬スケジュールが本明細書において企図される。

【0545】

本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物は、適正医療行為に合致した方法で製剤化、投薬、及び投与してよい。この状況において考慮すべき要因は、処置される具体的な障害、処置される具体的な哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び医師に公知の他の要因を含む。本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物は、必ずしもそうである必要はないが、任意で、対象となる障害を予防又は処置するために現在使用されている1つ以上の剤と共に製剤化される。このような他の剤の有効量は、製剤中に存在する抗体-ペイロードコンジュゲートの量、障害又は処置の種類、及び上で論じた他の要因に依存する。これらは、一般的に、本明細書に記載するのと同じ投薬量及び投与経路で、又は本明細書に記載する投薬量の約1~99%で、又は任意の投薬量で、そして、実験的に/臨床的に適切であると判断された任意の経路によって用いられる。

【0546】

疾患を予防又は処置するため、(単独で使用するとき又は1つ以上の他の追加の治療剤と併用するときの)本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物の適切な投薬量は、処置される疾患の種類、抗体-ペイロードコンジュゲートの種類、疾患の重症度及び経過、抗体-リンカーコンジュゲートが予防目的で投与されるか又は治療目的で投与されるか、薬歴、患者の臨床歴及び抗体-リンカーコンジュゲートに対する応答、並びに主治医の裁量に依存する。本発明に係る抗体-ペイロードコンジュゲート又は医薬組成物は、好適には一度に又は一連の治療にわたって患者に投与される。

【実施例】

【0547】

一般法

抗体トラスツズマブ(Herceptin(登録商標)、Roche、薬局で購入)、並びに全てのペプチド-リンカー及びリンカー-ペイロード(それぞれLifeTein

10

20

30

40

50

及び Levena Biopharma によってカスタム合成) は市販されていた。配列番号 71 及び 72 の配列からなる重鎖及び軽鎖を有するポラツズマブ並びに配列番号 75 及び 76 の配列からなる重鎖及び軽鎖を有するエンホルツマブをコードしている DNA コンストラクトを、懸濁液に適応した CHO-K1 細胞に一過的にトランスフェクトし、無血清/動物成分不含培地で発現させた。プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー (Mab Select Sure カラム; GE Healthcare) によって上清からタンパク質を精製した。

【0548】

5 mg/mL のネイティブなグリコシル化モノクローナル抗体、5 ~ 10 U/mg の濃度の微生物トランスグルタミナーゼ (MTG、Zedira)、及び 5 ~ 20 モル当量の指定のリンカー-ペイロードを Tris 50 mM pH 7.6 又は BisTris pH 6.0 ~ 6.8 中において 37 °C で 24 時間、回転サーモミキサー内で混合することによって、コンジュゲーション反応を実施した。DTT 還元条件下で LC-MS 又は RPLC によってコンジュゲーション効率を評価した。50 mM DTT (最終) 及び 50 mM Tris 緩衝液中において 37 °C で 15 分間サンプルをインキュベートすることにより、サンプルの還元を達成した。

10

【0549】

LCMS: 還元後、Acquity UPLC H-Class System (Waters) 及び ACQUITY UPLC BEH C18 カラムに連結された Xevo G2-XS QTOF (Waters) でサンプルを分析した。デコンボリューションしたスペクトルからコンジュゲーション効率 (CE) を計算し、% で提示した。以下の式による計算のために、両糖型 (G1F 及び G0F) から得られる強度を考慮した。

20

【0550】

【数 1】

$$CE \% = \frac{\sum((\text{Int}(\text{G0F} + \text{G1F}))_{c_j})}{\sum(\text{Int}(\text{G0F} + \text{G1F}))_{c_j, n_{c_j}}}$$

(式中、 c_j = コンジュゲートしている、 n_{c_j} = コンジュゲートしていない)。

【0551】

RPLC: 還元後、BioResolve RP mAb Polyphenyl カラムを用いて UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher) でサンプルを分析した。式に従って RPLC クロマトグラムから抽出した相対ピーク面積を用いてコンジュゲーション効率 (CE) を計算し、% で提示した。

30

【0552】

【数 2】

$$CE \% = \frac{\sum((\text{Int}(\text{relative peak area}))_{c_j})}{\sum(\text{Int}(\text{relative peak area}))_{c_j, n_{c_j}}}$$

(式中、 c_j = コンジュゲートしている、 n_{c_j} = コンジュゲートしていない)。

40

【0553】

実施例 1: トラツズマブ DAR4 ADC を調製するための様々な MMAE リンカー-ペイロードコンストラクトのコンジュゲーション

方法

反応条件: 5 mg/mL のネイティブな薬局で購入した完全にグリコシル化されたトラツズマブ抗体 (薬局で購入した Herceptin (登録商標))、5 U/mg の濃度の MTG、及び 5 モル当量の指定のリンカー-ペイロードを、Tris 50 mM pH 7.6 中において 37 °C で 24 時間、回転式サーモミキサー内で。上記の通り LCMS によってコンジュゲーション効率を評価した。

50

【 0 5 5 4 】

結果

驚くべきことに、DAR4 ADCを調製するために、本発明に係る様々なMMAEリンカー-ペイロードコンストラクトを用いると、ネイティブな完全にグリコシル化されたトラスツマブに対する優れたコンジュゲーション効率を得られた(表1)。

【 0 5 5 5 】

【表1】

表1. トラスツマブDAR4 ADCを調製するために様々なMMAEリンカー-ペイロードコンストラクトを用いて得られたコンジュゲーション効率 (%)

DAR4 ADCを調製するためのMMAEを含むリンカーペイロード	トラスツマブに対するコンジュゲーション効率 (%)
RKAA-PABC-(MMAE) ₂ (配列番号1; 図1)	90%
RKAA-PABC-PABC-(MMAE) ₂ (配列番号1; 図2)	90%
MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE (配列番号1; 図3)	95%

10

【 0 5 5 6 】

実施例2: DAR4 ADCを調製するための様々なMMAEリンカー-ペイロードコンストラクトと2つの他の抗体とのコンジュゲーション

20

本発明の汎用性を実証するために、様々なMMAEリンカーペイロードを用い、2つの異なる親抗体: ポラツマブ及びエンホルツマブを用いてDAR4 MMAE ADCを作製した。

【 0 5 5 7 】

方法

5 mg/mLの指定のネイティブなグリコシル化抗体、6~7.5 U/mgの濃度のMTG、及び5モル当量の指定のリンカー-ペイロードをTris 50 mM pH 7.6中において37°Cで24時間、回転サーモミキサー内で混合することによって、コンジュゲーション反応を行った。上記の通りLCMSによってコンジュゲーション効率を評価した。

30

【 0 5 5 8 】

結果

驚くべきことに、DAR4 ADCを調製するために、本発明に係る様々なMMAEリンカー-ペイロードコンストラクトを用いると、それぞれネイティブな完全にグリコシル化されたポラツマブ(表2a)及びエンホルツマブ(表2b)の抗体に対する優れたコンジュゲーション効率を得られた。

【 0 5 5 9 】

【表2a】

表2a. ポラツマブDAR4 ADCを調製するために様々なMMAEリンカー-ペイロードコンストラクトを用いて得られたコンジュゲーション効率 (%)

40

DAR4 ポラツマブADCを調製するためのMMAEを含むリンカーペイロード	ポラツマブに対するコンジュゲーション効率 (%)
RKAA-PABC-(MMAE) ₂ (配列番号1; 図1)	91%
RKAA-PABC-PABC-(MMAE) ₂ (配列番号1; 図2)	89%
MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE (配列番号1; 図3)	96%

【 0 5 6 0 】

50

【表 2 b】

表 2 b. エンホルツマブ D A R 4 A D C を調製するために様々な MMAE リンカー - ペイロードコンストラクトを用いて得られたコンジュゲーション効率 (%)

DAR4エンホルツマブADCを調製するためのMMAEを含むリンカー - ペイロード	エンホルツマブに対するコンジュゲーション効率 (%)
RKAA-PABC-(MMAE) ₂ (配列番号1; 図1)	90%
RKAA-PABC-PABC-(MMAE) ₂ (配列番号1; 図2)	92%
MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE (配列番号1; 図3)	96%

10

【0561】

実施例 3 : エキサテカン D A R 4 A D C を調製するための様々なエキサテカンリンカー - ペイロードコンストラクトのコンジュゲーション

本発明の広範な適用性を実証するために、トラスツズマブ D A R 4 エキサテカン A D C を調製するためのエキサテカン (トポイソメラーゼ I 阻害剤) を含むリンカー - ペイロードを設計し、評価した。

【0562】

方法

反応条件 : 5 m g / m L のネイティブなグリコシル化トラスツズマブ抗体、10 U / m g の濃度の M T G、及び 7 . 5 ~ 12 . 5 モル当量の指定のリンカー - ペイロードを、B i s T r i s p H 6 . 6 中において 37 °C で 24 時間、回転式サーモミキサー内で。上記の通り L C M S 又は R P L C によってコンジュゲーション効率を評価した。

20

【0563】

結果

驚くべきことに、D A R 4 A D C を調製するために、本発明に係る様々なエキサテカンリンカー - ペイロードコンストラクトを用いると、ネイティブな完全にグリコシル化されたトラスツズマブに対する優れたコンジュゲーション効率を得られた (表 3)。

【0564】

【表 3】

表 3. トラスツズマブ D A R 4 A D C を調製するために様々なエキサテカンリンカー - ペイロードコンストラクトを用いて得られたコンジュゲーション効率 (%)

30

DAR4 ADCを調製するためのエキサテカンを含むリンカー - ペイロード	トラスツズマブに対するコンジュゲーション効率 (%)
RKAA-PABC-(Exa) ₂ (配列番号1; 図4)	92%
ARK-PABC-(Exa) ₂ (配列番号2; 図5)	91%
RKARA-PABC-(Exa) ₂ (配列番号3; 図6)	90%
RKAAAA-PABC-(Exa) ₂ (配列番号4; 図7)	99%
RKAAAAA PABC-(Exa) ₂ (配列番号5; 図8)	95%
RKAASGSG-PABC-(Exa) ₂ (配列番号6; 図9)	92%
RKHA-PABC-(Exa) ₂ (配列番号7; 図10)	94%
RKHAHA-PABC-(Exa) ₂ (配列番号8; 図11)	98%
HKA-PABC-(Exa) ₂ (配列番号13; 図12)	80%
RKAA PABC-(G-Exa) ₂ (配列番号1; 図13)	91%
Exa-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-Exa (配列番号1; 図14)	88%
GGR-PABC-(Exa) ₂ (配列番号9; 図15)	98%
GGRG-PABC-(G-Exa) ₂ (配列番号10; 図16)	99%

40

【0565】

50

実施例 4 : D A R 4 A D C を調製するための様々なエキサテカン類似体リンカー - ペイロードコンストラクトのトラスツズマブへのコンジュゲーション

反応の高い許容性を実証するために、L i 5 2 0 1 9 に記載のエキサテカンの類似体 (化合物 1 0) を用いて、D A R 4 A D C を調製するためのリンカー - ペイロードコンストラクトを評価した。この類似体を、実施例 4 及び実施例 5 の枠内ではエキサテカン' (又は E x a ') と呼ぶ。

【 0 5 6 6 】

方法

反応条件 : 5 m g / m L のネイティブなグリコシル化トラスツズマブ抗体、1 0 U / m g の濃度の M T G、及び 7 . 5 モル当量の指定のリンカー - ペイロードを、B i s T r i s p H 6 . 6 中において 3 7 ° C で 2 4 時間、回転式サーモミキサー内で。上記の通り L C M S によってコンジュゲーション効率を評価した。

10

【 0 5 6 7 】

結果

驚くべきことに、D A R 4 A D C を調製するために、本発明に係る様々なエキサテカン' リンカー - ペイロードコンストラクトを用いると、ネイティブな完全にグリコシル化されたトラスツズマブに対する優れたコンジュゲーション効率を得られた (表 4)。

【 0 5 6 8 】

【表 4】

表 4 . トラスツズマブ D A R 4 A D C を調製するために様々なエキサテカン' リンカー - ペイロードコンストラクトを用いて得られたコンジュゲーション効率 (%)

20

DAR4 ADCを調製するためのエキサテカン類似体を含むリンカーペイロード	トラスツズマブに対するコンジュゲーション効率 (%)
RKAA-PABC-(G-Exa') ₂ (配列番号1; 図17)	99%
GGRG-PABC-(G-Exa') ₂ (配列番号10; 図18)	99%

【 0 5 6 9 】

実施例 5 : D A R 4 A D C を調製するための様々なエキサテカン (又はエキサテカン類似体) リンカー - ペイロードコンストラクトと 2 つの他の抗体とのコンジュゲーション

30

反応の汎用性を実証するために、様々なエキサテカン (E x a) 又はエキサテカン類似体 (E x a ') リンカー - ペイロードコンストラクトを 2 つの追加の抗体 : ポラツズマブ及びエンホルツマブにコンジュゲートさせて、ポラツズマブ D A R 4 E x a 又はポラツズマブ D A R 4 E x a ' 及びエンホルツマブ D A R 4 E x a 又はエンホルツマブ D A R 4 E x a ' A D C を作製した。

【 0 5 7 0 】

方法

5 m g / m L の指定のネイティブなグリコシル化抗体、7 . 5 U / m g の濃度の M T G、及び 1 0 モル当量の指定のリンカー - ペイロードを、T r i s 5 0 m M p H 7 . 6 中において 3 7 ° C で 2 4 時間、回転式サーモミキサー内で混合することによって、コンジュゲーション反応を行った。上記の通り R P L C によってコンジュゲーション効率を評価した。

40

【 0 5 7 1 】

結果

驚くべきことに、D A R 4 A D C を調製するために、本発明に係る様々なエキサテカン (又は類似体) リンカー - ペイロードコンストラクトを用いると、それぞれネイティブな完全にグリコシル化されたポラツズマブ (表 5 a) 及びエンホルツマブ (表 5 b) の抗体に対する優れたコンジュゲーション効率を得られた。

【 0 5 7 2 】

50

【表 5 a】

表 5 a. ポラツズマブ DAR 4 ADC を作製するために様々なエキサテカン (E x a)) 又はエキサテカン類似体 (E x a') リンカー-ペイロードコンストラクトを用いて得られたコンジュゲーション効率 (%)

ポラツズマブ DAR 4 ADC を調製するためのエキサテカン (又は類似体) を含むリンカーペイロード	ポラツズマブに対するコンジュゲーション効率 (%)
RKAA-PABC-(G-Exa) ₂ (配列番号1; 図13)	95%
RKAA-PABC-(G-Exa') ₂ (配列番号1; 図17)	100%
GGRG-PABC-(G-Exa) ₂ (配列番号10; 図16)	98%
GGRG-PABC-(G-Exa') ₂ (配列番号10; 図18)	100%

10

【0573】

【表 5 b】

表 5 b. エンホルツマブ DAR 4 ADC を作製するために様々なエキサテカン (E x a)) 又はエキサテカン類似体 (E x a') リンカー-ペイロードコンストラクトを用いて得られたコンジュゲーション効率 (%)

エンホルツマブ DAR 4 ADC を調製するためのエキサテカン (又は類似体) を含むリンカーペイロード	エンホルツマブに対するコンジュゲーション効率 (%)
RKAA-PABC-(G-Exa) ₂ (配列番号1; 図13)	95%
RKAA-PABC-(G-Exa') ₂ (配列番号1; 図17)	98%
GGRG-PABC-(G-Exa) ₂ (配列番号10; 図16)	100%
GGRG-PABC-(G-Exa') ₂ (配列番号10; 図18)	100%

20

【0574】

実施例 6 : トラスツズマブ DAR 6 又は DAR 8 ADC を調製するための様々な MMAE リンカー-ペイロードコンストラクトのコンジュゲーション

30

本発明の幅広い適用性を実証するために、DAR > 4 の ADC を生成することを目指した。そのため、DAR 6 又は DAR 8 ADC を作製するために、様々な MMAE リンカー-ペイロードコンストラクトを設計し、評価した。

【0575】

方法

反応条件 : 5 mg / mL のネイティブなグリコシル化トラスツズマブ抗体、8 U / mg の濃度の MTG、及び 5 モル当量の指定のリンカー-ペイロードを、BisTris 50 mM pH 7.5 中において 37 °C で 22 時間、回転式サーモミキサー内で。上記の通り LCMS によってコンジュゲーション効率を評価した。

【0576】

結果

40

際立ったことに、リンカー-ペイロードコンストラクト 1 つあたり 3 つ又は 4 つの MMAE 部分を含有する本発明に係る構造は、ネイティブな完全にグリコシル化されたトラスツズマブに対して良好な又は優れたコンジュゲーション効率 (表 6) をもたらし、その結果、トラスツズマブ-DAR 6 MMAE 又は DAR 8 MMAE ADC が得られた。コンジュゲーション効率は、驚くべきことに、67% 超と、DAR 2 ADC をもたらすリジンベースのリンカーについて歴史的に示されているもの (40% のコンジュゲーション効率しか達成できなかった国際公開第 2015/191883 号の実施例 5 参照) よりも著しく高かった。

【0577】

50

【表 6】

表 6. トラスツズマブ DAR 6-MMAE 又は DAR 8-MMAE ADC を作製するための様々な MMAE リンカー-ペイロードコンストラクトを用いて得られたコンジュゲーション効率 (%)

DAR 6 又は DAR 8 ADC を調製するための MMAE を含む リンカー-ペイロード	トラスツズマブに対するコンジュゲーション効率 (%)
E(A-PABC-MMAE)-ARKAA-PABC-(MMAE) ₂ (配列番号 11; 図 19)	99%
(MMAE) ₂ -PABC-AA-RKAA-PABC-(MMAE) ₂ (配列番号 1; 図 20)	67%

10

【0578】

実施例 7: 4 つの MMAE 及び 2 つのエキサテカンを含む DAR 6 トラスツズマブ二重ペイロード ADC を調製するための MMAE-エキサテカンリンカー-ペイロードコンストラクトのコンジュゲーション

本発明が 1 つのリンカー-ペイロード中に異なる種類の薬物を含むリンカー-ペイロードも含み得ることを実証するために、2 つの異なる薬物 (MMAE 及び エキサテカン) を含有する構造を設計し、トラスツズマブにコンジュゲートさせた結果、4 つの MMAE 及び 2 つのエキサテカンを含む DAR 6 トラスツズマブ二重ペイロード ADC が得られた。

【0579】

方法

反応条件: 5 mg/mL のネイティブなグリコシル化トラスツズマブ抗体、8 U/mg の濃度の MTG、及び 5 モル当量の指定のリンカー-ペイロードを、BisTris 50 mM pH 7.5 中において 37 °C で 2 時間、回転式サーモミキサー内で。上記の通り LCMS によってコンジュゲーション効率を評価した。

20

【0580】

結果

驚くべきことに、リンカー-ペイロードコンストラクト 1 つあたり 2 つの異なる種類の薬物 (すなわち、2 x MMAE 及び 1 x エキサテカン) を含有する本発明に係る構造は、ネイティブな完全にグリコシル化されたトラスツズマブに対する良好なコンジュゲーション効率 (表 7) をもたらし、その結果、4 つの MMAE 及び 2 つのエキサテカンを含む DAR 6 トラスツズマブ二重ペイロード ADC が得られた。

30

【0581】

【表 7】

表 7. 4 つの MMAE 及び 2 つのエキサテカンを含む DAR 6 トラスツズマブ二重ペイロード ADC を作製するために MMAE-エキサテカンリンカー-ペイロードを用いて得られたコンジュゲーション効率 (%)

4 つの MMAE 及び 2 つのエキサテカンを含む DAR 6 ADC を調製するための二重ペイロード MMAE-エキサテカンを含むリンカー-ペイロード	トラスツズマブに対するコンジュゲーション効率 (%)
Exa-PABC-AA-RKAA-PABC-(MMAE) ₂ (配列番号 1; 図 21)	79%

40

【0582】

実施例 8: 2 つの MMAE、2 つのマイタンシン、及び 2 つのコルチゾールを含む DAR 6 トラスツズマブ三重ペイロード ADC を調製するための MMAE-マイタンシン-コルチゾールリンカー-ペイロードコンストラクトのコンジュゲーション

本発明が 1 つのリンカー-ペイロードコンストラクト上に 3 つの異なる薬物の種類及びペイロードのクラスを含むこともできることを実証するために、3 つの異なるペイロード (MMAE、マイタンシン、及びコルチゾール CS) を含有する構造を設計し、トラスツズマブにコンジュゲートさせた結果、2 つの MMAE、2 つのマイタンシン、及び 2 つの

50

コルチゾールを含むDAR6トラスツズマブ三重ペイロードADCが得られた。

【0583】

方法

反応条件：5 mg/mLのネイティブなグリコシル化トラスツズマブ抗体、8 U/mgの濃度のMTG、及び5モル当量の指定のリンカー-ペイロードを、BisTris 50 mM pH 7.5中において37℃で22時間、回転式サーモミキサー内で。上記の通りLCMSによってコンジュゲーション効率を評価した。

【0584】

結果

驚くべきことに、リンカーペイロードコンストラクト1つあたり3つの異なる種類のペイロード（すなわち、1×MMAE、1×May、及び1×CS）を含有する本発明に係る構造は、ネイティブな完全にグリコシル化されたトラスツズマブに対する優れたコンジュゲーション効率（表8）をもたらし、その結果、2つのMMAE、2つのマイタンシン、及び2つのコルチゾールを含むDAR6トラスツズマブ三重ペイロードADCが得られた。

【0585】

【表8】

表8. 2つのMMAE、2つのマイタンシン、及び2つのコルチゾールを含むトラスツズマブDAR6トラスツズマブ三重ペイロードADCを作製するためにMMAE-マイタンシン-コルチゾールリンカーペイロードを用いて得られたコンジュゲーション効率（%）

2つのMMAE、2つのマイタンシン、及び2つのコルチゾールを含むDAR6 ADCを調製するための三重ペイロードMMAE-May-CSを含有するリンカーペイロード	トラスツズマブに対するコンジュゲーション効率（%）
May-RKAE(A-PABC-MMAE)A-コルチゾール(配列番号12;図22)	99%

【0586】

実施例9：トラスツズマブDAR4 ADCを調製するための、ペプチドを含有する（本発明に係る）又はペプチドを含まない（本発明に係るものではない）MMAEリンカー-ペイロードコンストラクトのコンジュゲーション

【0587】

方法

反応条件：5 mg/mLのネイティブなグリコシル化トラスツズマブ抗体、8 U/mgの濃度のMTG、及び5モル当量の指定のリンカー-ペイロードを、BisTris 50 mM pH 7.5中において37℃で22時間、回転式サーモミキサー内で。上記の通りLCMSによってコンジュゲーション効率を評価した。

【0588】

結果

ペプチド及び2つのMMAEを含む本発明に係るリンカーは、ネイティブな完全にグリコシル化されたトラスツズマブに対する優れたコンジュゲーション効率（表9）を提供し、その結果、トラスツズマブ-DAR4 MMAE ADCが得られたが、一方、顕著な対照として、アミノ-PEG及び2つのMMAEを有する構造（ただし、ペプチドを含まないため本発明に係るものではない）は、ネイティブな完全にグリコシル化されたトラスツズマブに対するコンジュゲーションが非常に不良であった。

【0589】

10

20

30

40

50

【表 6】

表 6. トラスツズマブ DAR 4 ADC を作製するために MMAE リンカー - ペイロード コンストラクトを使用して得られたコンジュゲーション効率 (%)

DAR4 ADC を調製するための MMAE を含む リンカー - ペイロード	トラスツズマブ に対する コンジュゲーション 効率 (%)
RKAA-PABC-(MMAE) ₂ (配列番号 1; 図 1)	95%
NH2-PEG2-PABC-(MMAE) ₂ (図 41)*	26%

*本発明に係るものではない

10

【0590】

実施例 10 : 最適反応条件の特定

最適なコンジュゲーション効率に到達するためのリンカー - ペイロード濃度の重要性を実証するために、様々なリンカー - 配列及びリンカー - ペイロード濃度をトラスツズマブへのコンジュゲーションについて試験した。

【0591】

方法

標準コンジュゲーションプロトコルとして、以下のパラメータを使用した : 回転式サーモミキサー内で、3.5 mg/mL のネイティブなグリコシル化トラスツズマブ抗体及び 5 U/mg の濃度の MTG を Tris 50 mM pH 7.6 中において 37 °C で 24 時間。リンカー - ペイロード MMAE - PABC - AA - C2 - KAR - PABC - MMAE、RKN (PABC - MMAE) A - PABC - MMAE、及び RKAA - PABC - (MMAE)₂ を、2 ~ 80 モル当量の範囲の様々な濃度で反応混合物に添加した。パラメータを表 7 に示す。上記の通り LCMS によってコンジュゲーション効率を評価した。

20

【0592】

結果

驚くべきことに、試験したリンカー - ペイロードの配列に関係なく、5 ~ 20 当量のリンカー - ペイロードを反応に添加した場合、極めて高いコンジュゲーション効率を得られた。

30

【0593】

【表 7】

表 7. 様々な反応条件下における MMAE - PABC - AA - C2 - KAR - PABC - MMAE、RKN (PABC - MMAE) A - PABC - MMAE、及び RKAA - PABC - (MMAE)₂ のトラスツズマブに対するコンジュゲーション効率

コンジュゲーション効率に及ぼす反応パラメーターの影響						
パラメータ	トラスツズマブ に対する MMAE - PABC - AA - C2 - KAR - PABC - MMAE のモル当量 (図 42) のモル当量					
	2	5	10	20	40	80
CE (%)	54%	94%	99%	96%	75%	31%
パラメータ	トラスツズマブ に対する RKN (PABC - MMAE) A - PABC - MMAE (配列番号 83; 図 43) のモル当量					
	2	5	10	20	40	80
CE (%)	50%	82%	84%	56%	19%	2%
パラメータ	トラスツズマブ に対する RKAA - PABC - (MMAE) ₂ (配列番号 1; 図 1) のモル当量					
	2	5	10	20	40	80
CE (%)	69%	97%	100%	99%	91%	68%

40

【0594】

実施例 11 : 抗ネクチン - 4 DAR 4 ADC はネクチン - 4 陽性固形腫瘍モデルにおいてインビボで効率的な腫瘍成長阻害を示す

本発明に係る抗ネクチン - 4 ADC である ARA - 04 - MMAE - PABC - AA -

50

C2 - R K A A - P A B C - M M A E (D A R 4 . 0) 及び A R A - 0 4 - R K A A - P A B C - (M M A E) ₂ (D A R 3 . 8) を、 S U M 1 9 0 P T (ネ ク チ ン - 4 陽 性、 固 形 腫 瘍) 異 種 移 植 モ デ ル に お け る 腫 瘍 成 長 阻 害 に つ い て イ ン ビ ボ で 調 べ た。

【 0 5 9 5 】

方法

S U M 1 9 0 P T 異 種 移 植 片 に つ い て は、 2×10^6 個 の 細 胞 を C B 1 7 S C I D マウス (J a n v i e r) の 乳 腺 脂 肪 パ ッ ド に 注 射 し た。 腫 瘍 の 寸 法 及 び 体 重 を 週 3 回 記 録 し た。 体 積 = (幅) ² × 長 さ × 0 . 5 と い う 式 に 従 っ て 腫 瘍 体 積 を 計 算 し た。 平 均 腫 瘍 サ イ ズ が 約 2 0 0 m m ³ に 達 し た 時 点 で、 非 ラ ン ダ ム 層 別 化 プ ロ ト コ ル を 用 い て、 そ れ ぞ れ 6 匹 の マ ウ ス を 含 む 処 理 群 に マ ウ ス を 割 り 付 け た。 無 作 為 化 当 日 に A D C を 1 回 静 脈 注 射 し た。 本 発 明 に 係 る A D C は、 実 施 例 2 に 記 載 し た よ う に 社 内 で 生 成 し た。 エ ン ホ ル ツ マ ブ デ チ ン (D A R 4) は 市 販 さ れ て お り、 薬 局 で 購 入 し た。 A R A - 0 4 - M M A E - P A B C - A A - C 2 - R K A A - P A B C - M M A E (D A R 4 . 0) 及 び A R A - 0 4 - R K A A - P A B C - (M M A E) ₂ (D A R 3 . 8) を、 マ ウ ス の 体 重 1 k g あ た り 1 0 μ g の ペ イ ロ ード 用 量 (1 0 μ g / k g) に 相 当 す る A D C 用 量 で 注 射 し た。 エ ン ホ ル ツ マ ブ デ チ ン (D A R 4) は、 マ ウ ス の 体 重 1 k g あ た り 1 5 μ g の ペ イ ロ ード 用 量 (1 5 μ g / k g) で 注 射 し た。 対 照 群 の マ ウ ス に は P B S を 注 射 し た。 全 て の マ ウ ス 実 験 は ス イ ス の ガ イ ド ラ イ ン に 従 っ て 行 わ れ、 ス イ ス の チ ュ ー リ ッ ヒ の 獣 医 局 の 承 認 を 得 た。

10

【 0 5 9 6 】

結果

本 発 明 に 係 る A D C で あ る A R A - 0 4 - M M A E - P A B C - A A - C 2 - R K A A - P A B C - M M A E 及 び A R A - 0 4 - R K A A - P A B C - (M M A E) ₂ を、 S U M 1 9 0 P T 異 種 移 植 モ デ ル に お い て エ ン ホ ル ツ マ ブ デ チ ン と 比 較 し た。

20

【 0 5 9 7 】

1 0 μ g / k g 体 重 の 単 回 i . v . 注 射 に よ り、 本 発 明 に 係 る A D C で は 全 て の マ ウ ス に お い て 効 率 的 な 抗 腫 瘍 応 答 が 得 ら れ た (図 4 4)。 エ ン ホ ル ツ マ ブ デ チ ン を 1 5 μ g / k g 投 与 し た と こ ろ、 一 過 性 の 腫 瘍 退 縮 が み ら れ た が、 処 理 後 2 0 日 目 に は 腫 瘍 の な い 個 体 は お ら ず、 4 0 日 目 以 降 に は 6 匹 中 6 匹 の 動 物 で 顕 著 な 再 成 長 が み ら れ た。 最 も 驚 く べ き こ と に、 A R A - 0 4 - M M A E - P A B C - A A - C 2 - R K A A - P A B C - M M A E は 6 匹 中 4 匹 の マ ウ ス で よ り 良 好 な 有 効 性 を 示 し、 完 全 な 長 期 奏 効 に 至 っ た が、 対 照 的 に、 A R A - 0 4 - R K A A - P A B C - (M M A E) ₂ を 同 用 量 で 注 射 し た 結 果、 6 匹 中 6 匹 の マ ウ ス で 約 2 0 日 間 腫 瘍 が 制 御 さ れ、 そ の 後 腫 瘍 が 再 成 長 し た。 従 っ て、 非 常 に 驚 く べ き こ と に、 こ れ ら デ ー タ は、 ペ プ チ ド リ ン カ ー の 各 N 末 端 及 び C 末 端 に ペ イ ロ ード が 結 合 (c o u p l e) し て い る A R A - 0 4 - M M A E - P A B C - A A - C 2 - R K A A - P A B C - M M A E は、 ペ プ チ ド リ ン カ ー の C 末 端 に し か ペ イ ロ ード が 結 合 (c o u p l e) し て い な い A R A - 0 4 - R K A A - P A B C - (M M A E) ₂ と 比 較 し て よ り 効 率 的 な 抗 腫 瘍 活 性 を 示 し た。

30

【 0 5 9 8 】

そ れ ぞ れ の ベ ン チ マ ー ク A D C (エ ン ホ ル ツ マ ブ デ チ ン) と 同 じ 抗 体 及 び ペ イ ロ ード か ら な る 本 発 明 に 係 る 抗 ネ ク チ ン - 4 A D C、 A R A - 0 4 - M M A E - P A B C - A A - C 2 - R K A A - P A B C - M M A E、 及 び A R A - 0 4 - R K A A - P A B C - (M M A E) ₂ は イ ン ビ ボ で 活 性 が あ る と ま と め ら れ る。 驚 く べ き こ と に、 ペ プ チ ド リ ン カ ー の 各 N 末 端 及 び C 末 端 に ペ イ ロ ード が 結 合 (c o u p l e) し て い る A R A - 0 4 - M M A E - P A B C - A A - C 2 - R K A A - P A B C - M M A E だ け が、 延 命 効 果 を も た ら ず 優 れ た 有 効 性 を 示 し た。

40

【 0 5 9 9 】

実 施 例 1 2 : 抗 C D 7 9 b D A R 4 A D C は、 C D 7 9 b 陽 性 液 状 腫 瘍 モ デ ル に お い て イ ン ビ ボ で 効 率 的 な 腫 瘍 成 長 阻 害 を 示 す

本 発 明 に 係 る 抗 C D 7 9 b A D C で あ る A R A - 0 1 - M M A E - P A B C - A A -

50

C2 - R K A A - P A B C - M M A E (D A R 4 . 0) 及び A R A - 0 1 - R K A A - P A B C - (M M A E) ₂ (D A R 3 . 9) を、 R a m o s (C D 7 9 b 陽性、液状腫瘍) 異種移植モデルにおけるインビボ腫瘍成長阻害について調べた。

【0600】

方法

R a m o s 異種移植片については、 20×10^6 個の細胞を C B 1 7 S C I D マウス (J a n v i e r) に皮下注射した。腫瘍の寸法及び体重を週3回記録した。体積 = (幅)² × 長さ × 0.5 という式に従って腫瘍体積を計算した。平均腫瘍サイズが約 200 mm^3 に達した時点で、非ランダム層別化プロトコルを用いて、それぞれ6匹のマウスを含む処理群にマウスを割り付けた。無作為化当日に A D C を1回静脈注射した。本発明に係る A D C は、実施例2に記載したように社内で生成した。A R A - 0 1 - M M A E - P A B C - A A - C 2 - R K A A - P A B C - M M A E (D A R 4 . 0) 及び A R A - 0 1 - R K A A - P A B C - (M M A E) ₂ (D A R 3 . 9) を、マウスの体重 1 kg あたり $25 \mu\text{g}$ のペイロード用量 ($25 \mu\text{g} / \text{kg}$) に相当する A D C 用量で1回静脈内注射した。対照群のマウスには P B S を注射した。全てのマウス実験はスイスのガイドラインに従って行われ、スイスのチューリッヒの獣医局の承認を得た。

10

【0601】

結果

本発明に係る A D C である A R A - 0 1 - M M A E - P A B C - A A - C 2 - R K A A - P A B C - M M A E 及び A R A - 0 1 - R K A A - P A B C - (M M A E) ₂ を、 R a m o s 異種移植モデルにおいて互いに比較した。

20

【0602】

$25 \mu\text{g} / \text{kg}$ の単回 i . v . 注射により、本発明に係る A D C では全てのマウスにおいて P B S で処理した対照群と比較して効率的な抗腫瘍応答を示した (図 4 5) 。驚くべきことに、全ての動物で腫瘍の体積が一過性に減少し、その後腫瘍が再成長した、同用量で注射された A R A - 0 1 - R K A A - P A B C - (M M A E) ₂ と比較して、A R A - 0 1 - M M A E - P A B C - A A - C 2 - R K A A - P A B C - M M A E は、A R A - 0 1 - M M A E - P A B C - A A - C 2 - R K A A - P A B C - M M A E は、処理後21日目に6匹中5匹のマウスで腫瘍が完全に消失したという優れた有効性を示した。これらデータは、実施例11の結果を裏付けるものであり、驚くべきことに、ペプチドリンカーの各 N 末端及び C 末端にペイロードが結合 (c o u p l e) している A D C は、ペイロードが C 末端にしか結合 (c o u p l e) していない比較対象の A D C よりも効率的な抗腫瘍活性を示すという知見を立証するものである。

30

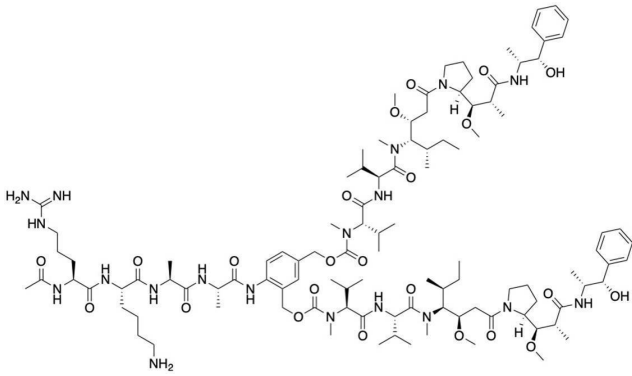
【0603】

本発明に係る抗 C D 7 9 b A D C である A R A - 0 1 - M M A E - P A B C - A A - C 2 - R K A A - P A B C - M M A E 及び A R A - 0 1 - R K A A - P A B C - (M M A E) ₂ はインビボで活性があるとまとめられる。驚くべきことに、ペプチドリンカーの各 N 末端及び C 末端にペイロードが結合 (c o u p l e) している A R A - 0 1 - M M A E - P A B C - A A - C 2 - R K A A - P A B C - M M A E は、ペプチドリンカーの C 末端にしかペイロードが結合 (c o u p l e) していない A R A - 0 1 - R K A A - P A B C - (M M A E) ₂ と比較して延命効果を提供する優れた有効性を示し、これは、M M A E - P A B C - A A - C 2 - R K A A - P A B C - M M A E リンカーでは R K A A - P A B C - (M M A E) ₂ と比較して優れた抗腫瘍有効性が得られたことを示す図 1 1 に示したデータを裏付けるものである。

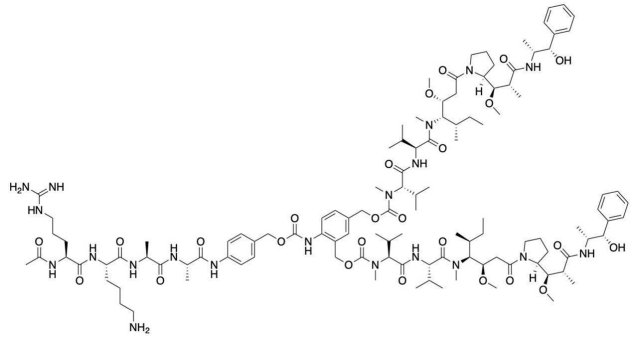
40

【 図面 】

【 図 1 】

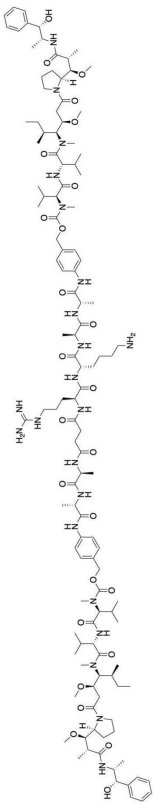


【 図 2 】

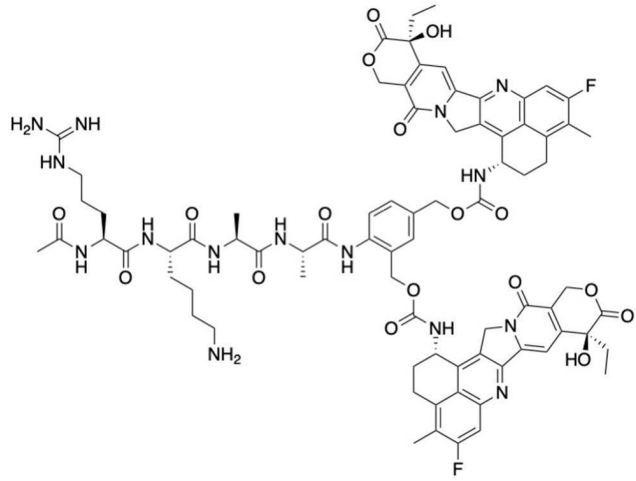


10

【 図 3 】



【 図 4 】



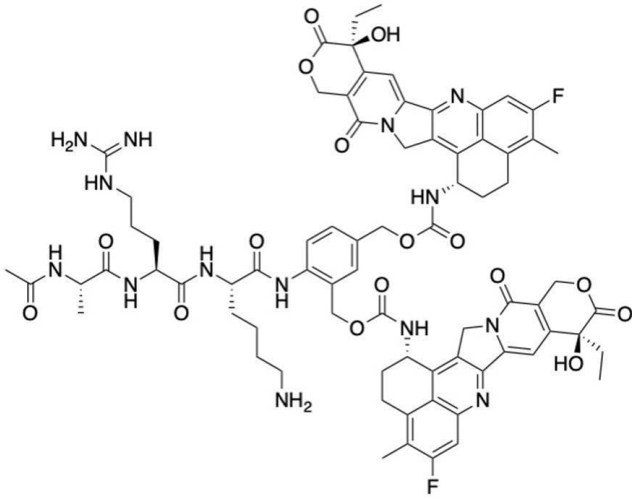
20

30

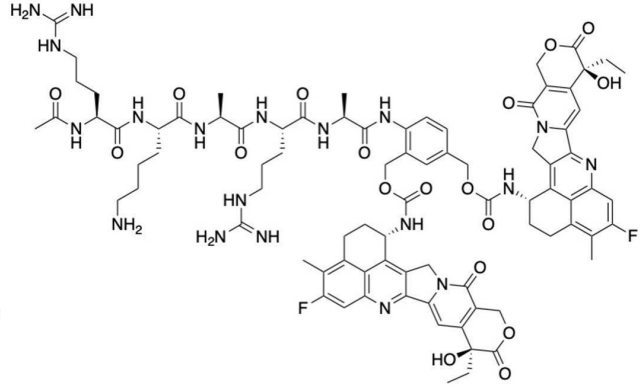
40

50

【 5 】

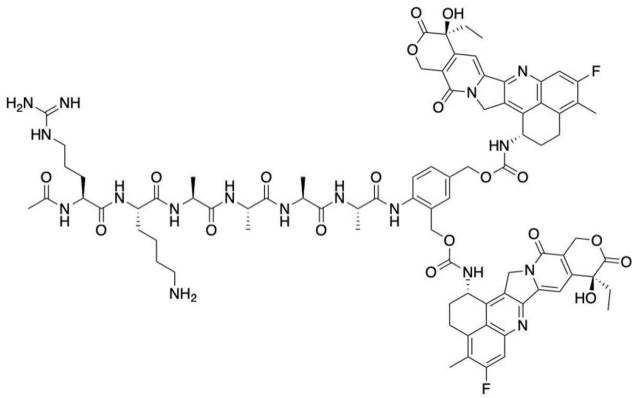


【 6 】

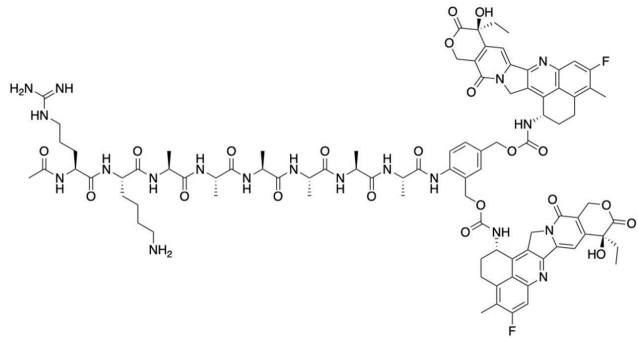


10

【 7 】



【 8 】



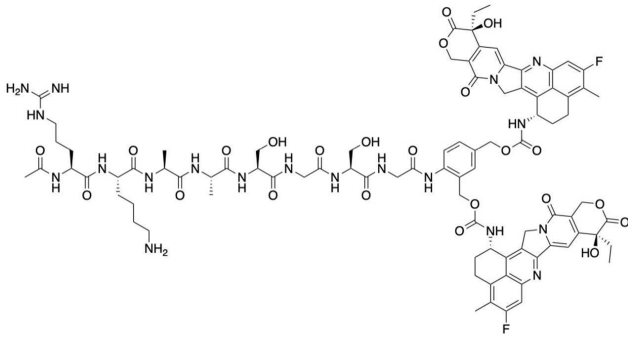
20

30

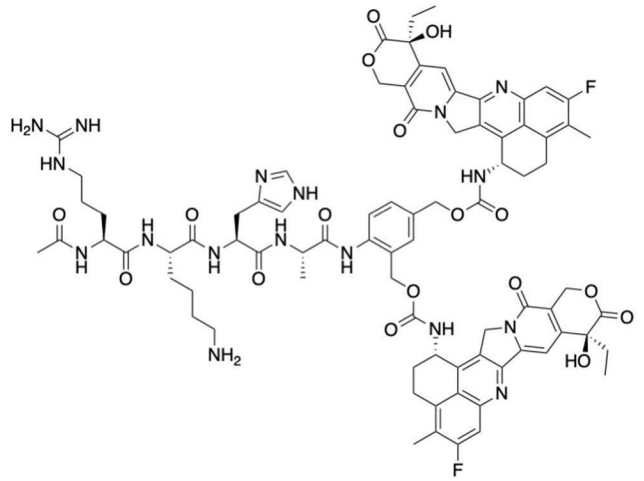
40

50

【 9 】

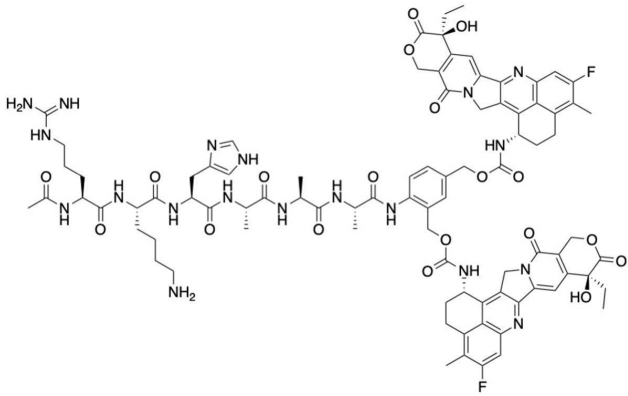


【 10 】

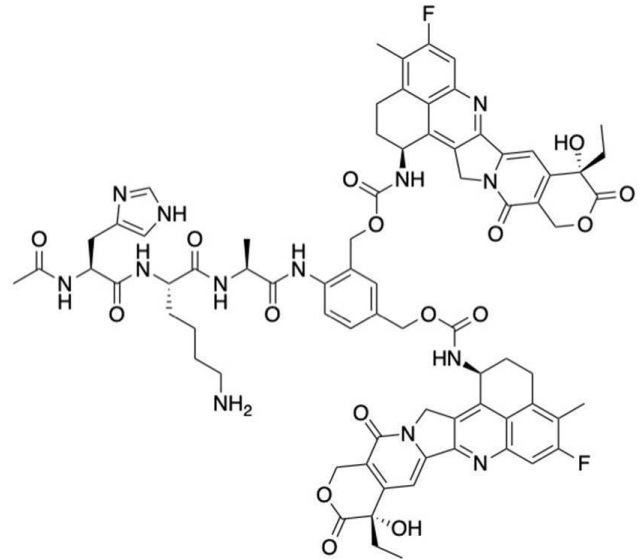


10

【 11 】



【 12 】



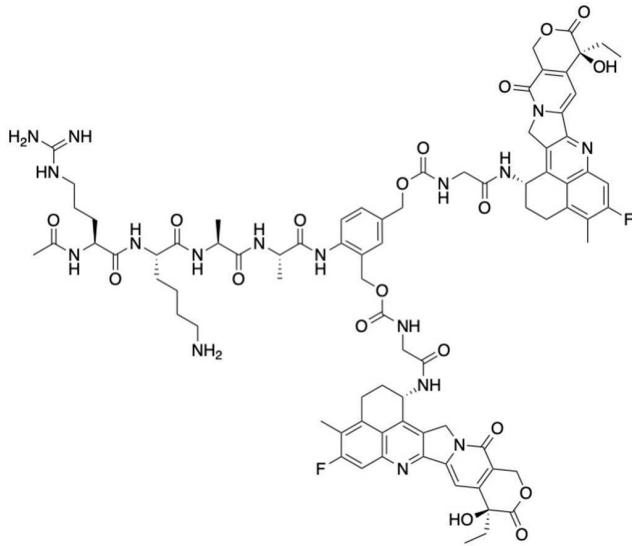
20

30

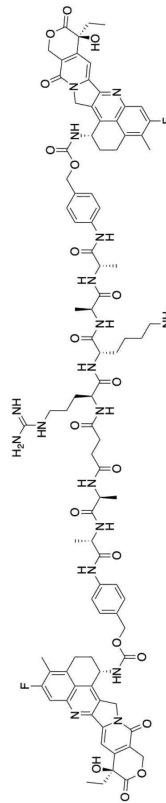
40

50

【 図 1 3 】



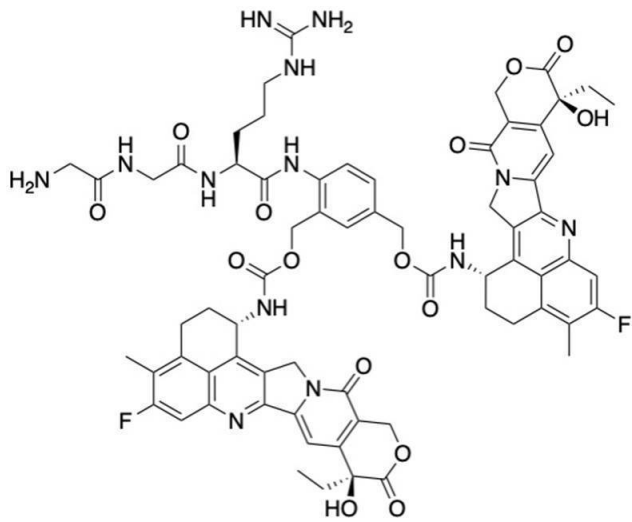
【 図 1 4 】



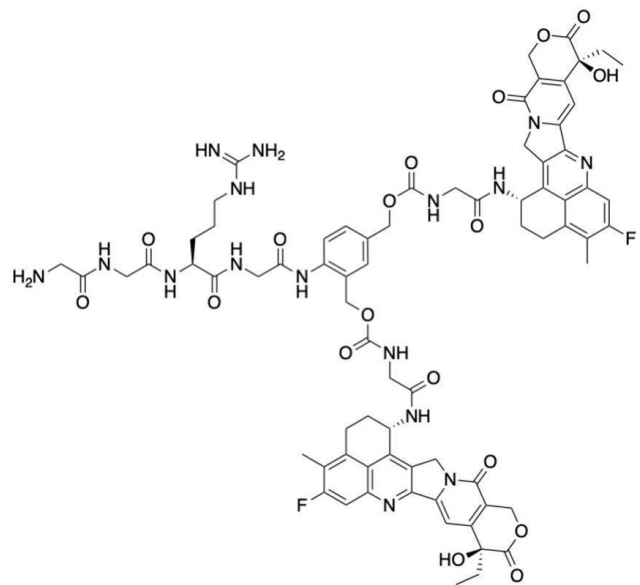
10

20

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

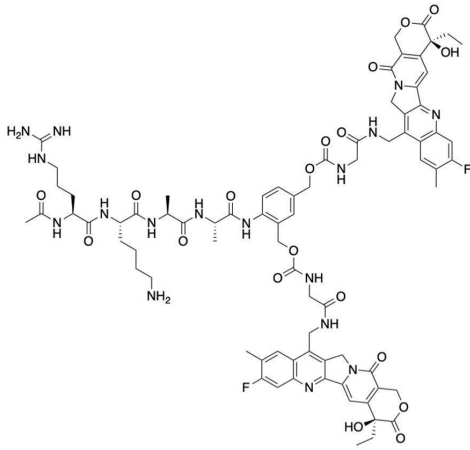


30

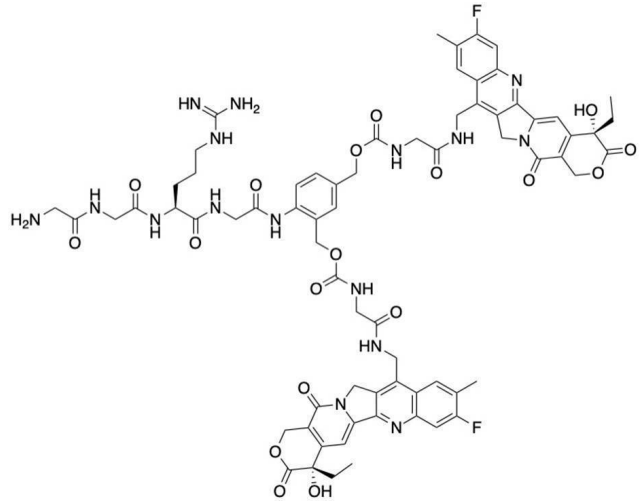
40

50

【 17 】

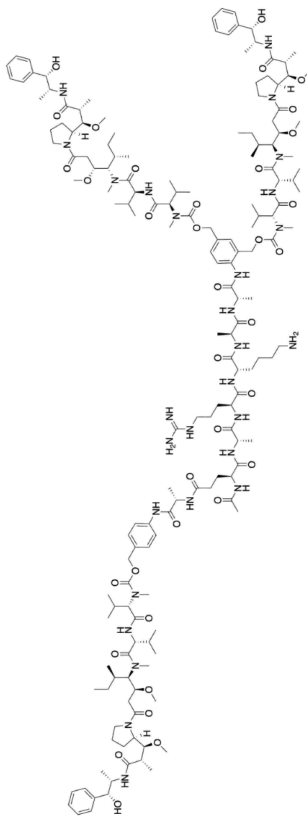


【 18 】

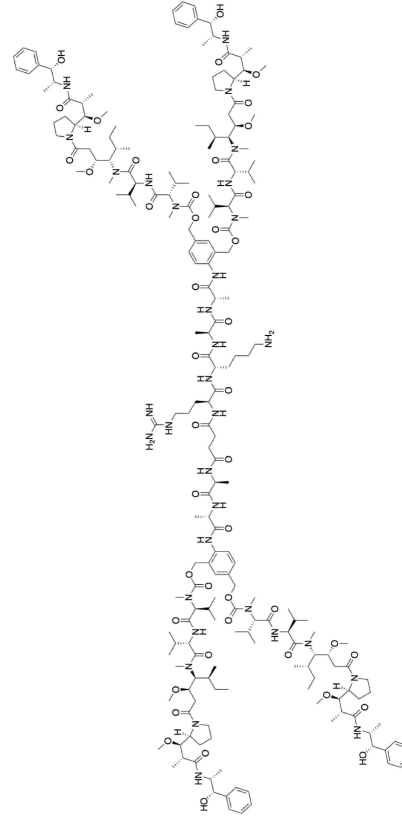


10

【 19 】



【 20 】

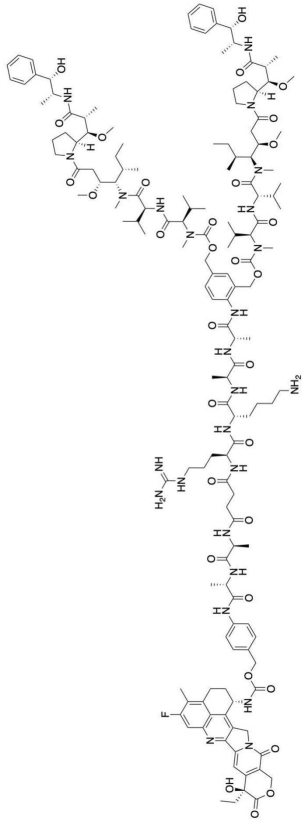


20

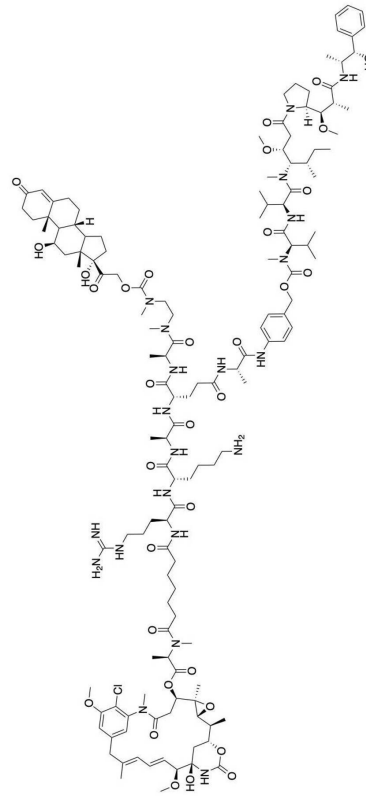
30

40

【 2 1 】



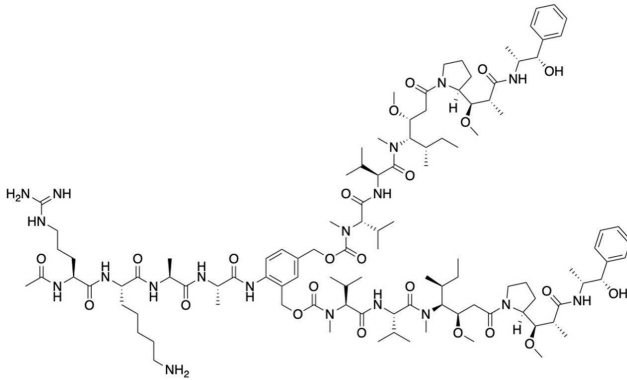
【 2 2 】



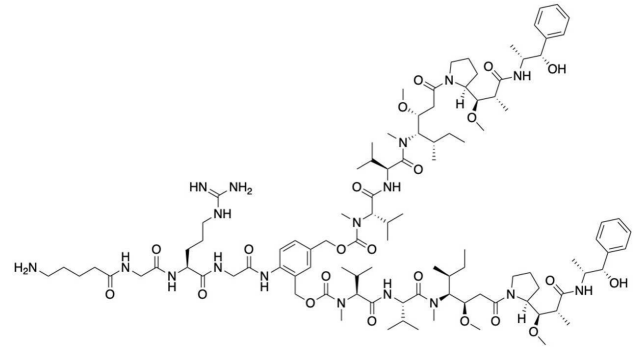
10

20

【 2 3 】



【 2 4 】

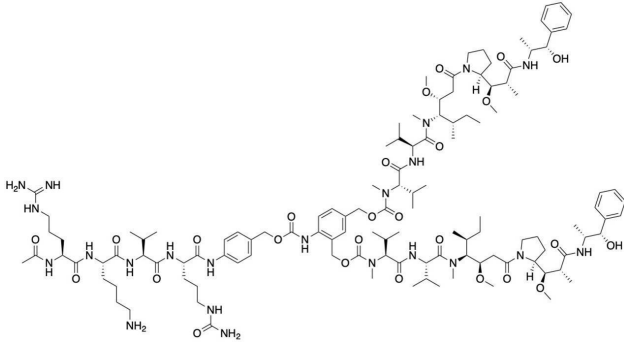


30

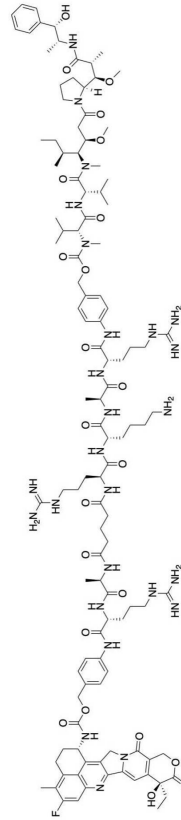
40

50

【 2 5 】



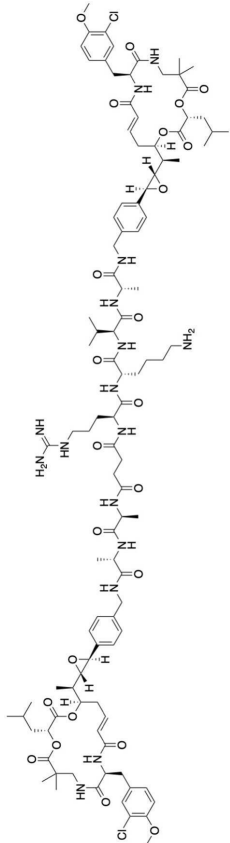
【 2 6 】



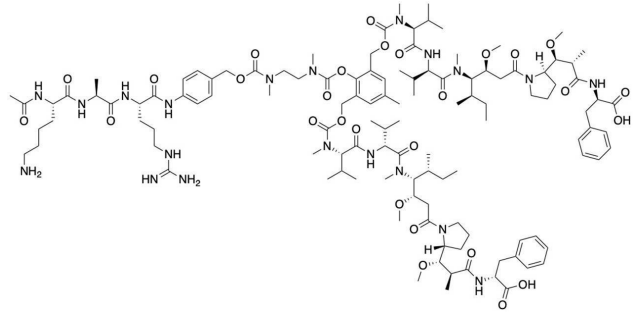
10

20

【 2 7 】



【 2 8 】

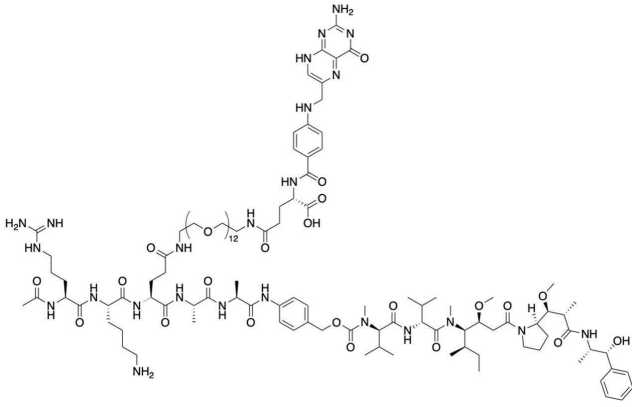


30

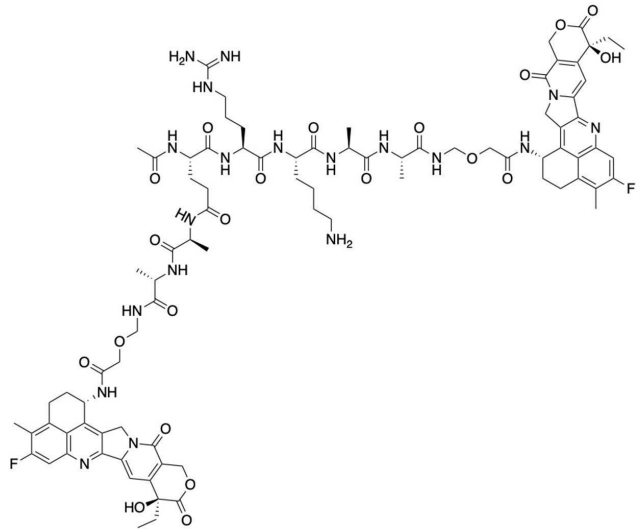
40

50

【 29 】

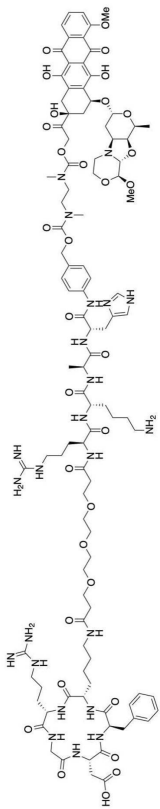


【 30 】

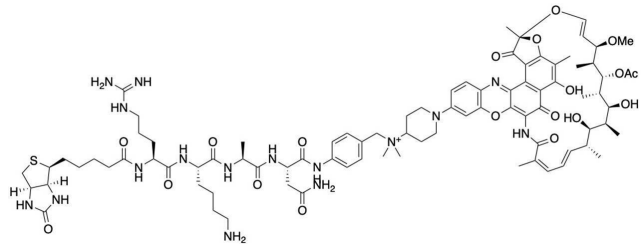


10

【 31 】



【 32 】



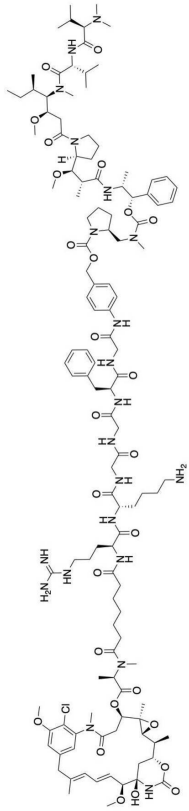
20

30

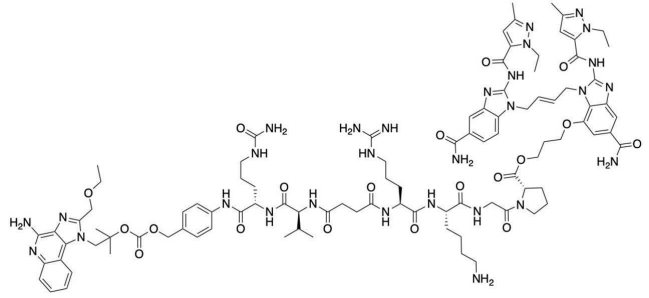
40

50

【 図 3 3 】



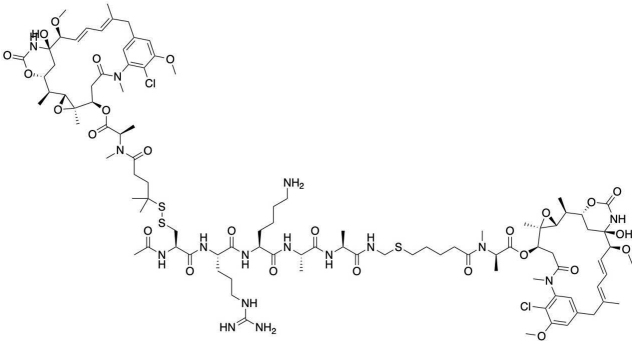
【 図 3 4 】



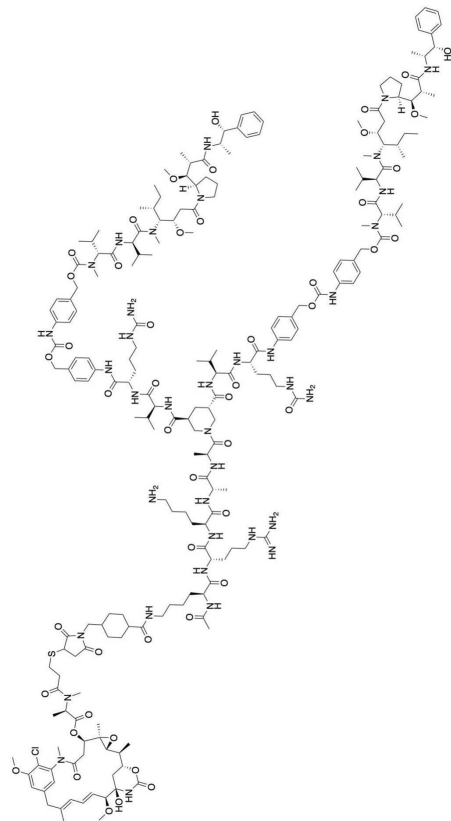
10

20

【 図 3 5 】



【 図 3 6 】

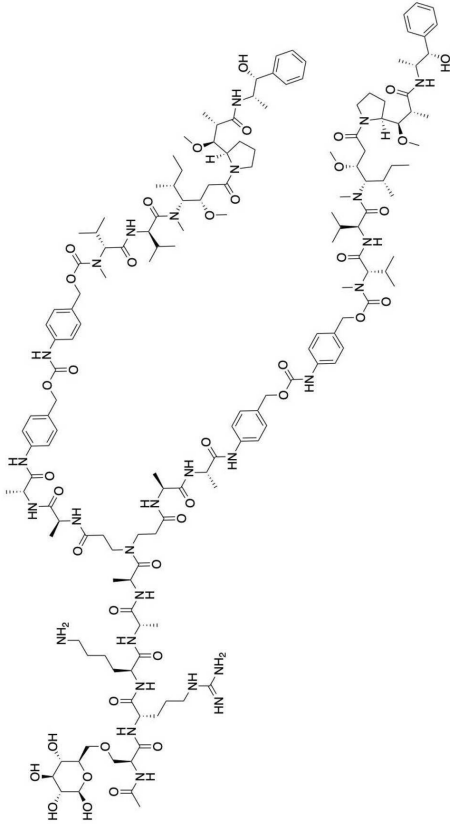


30

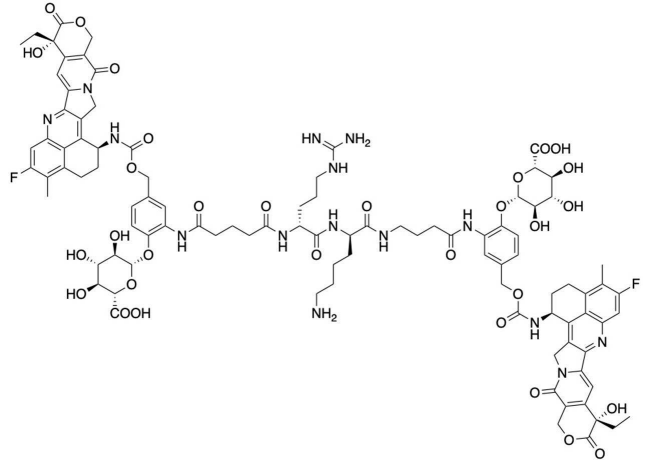
40

50

【 37 】



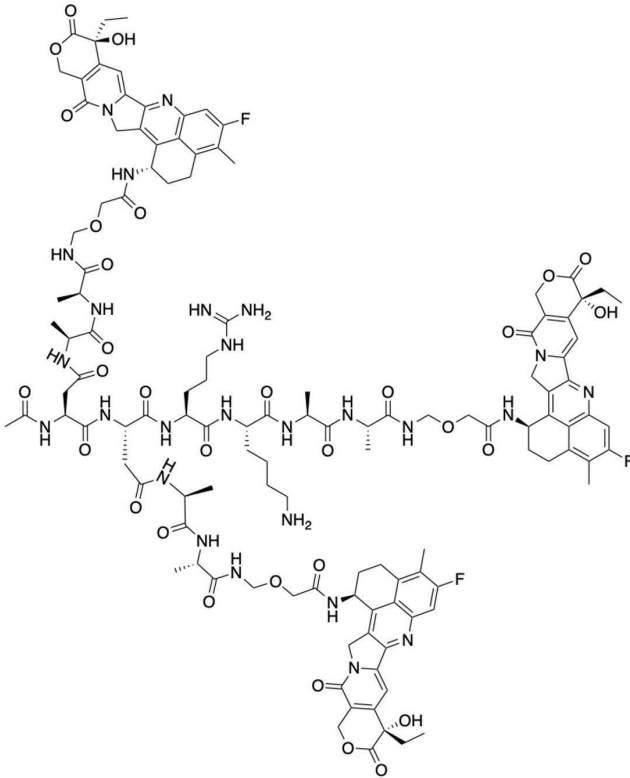
【 38 】



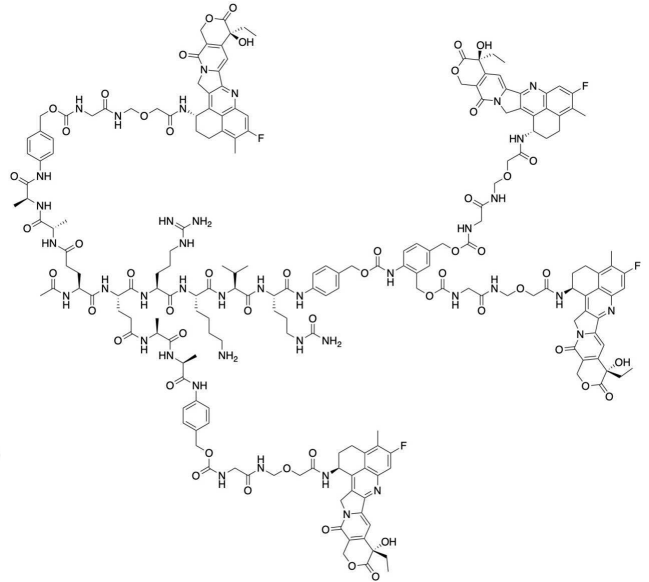
10

20

【 39 】



【 40 】

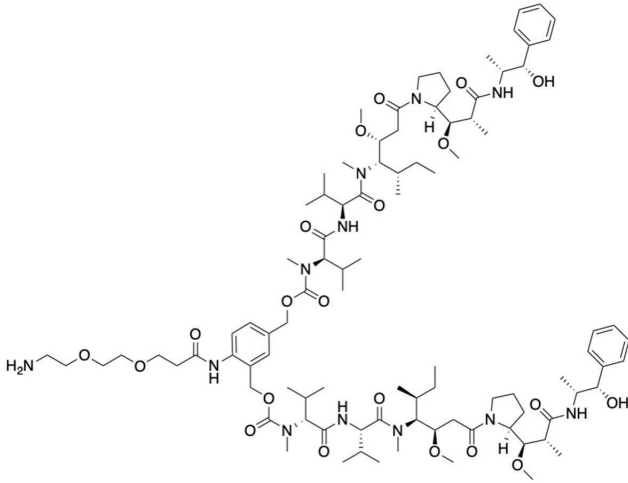


30

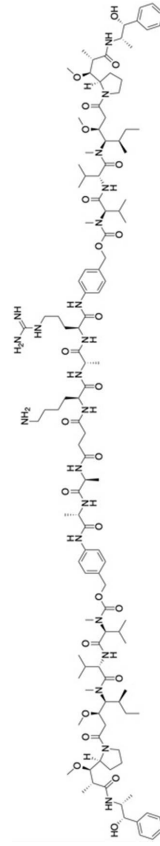
40

50

【 図 4 1 】



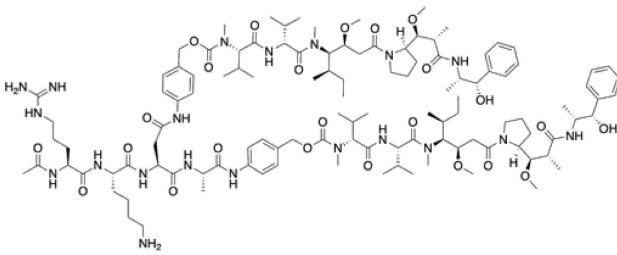
【 図 4 2 】



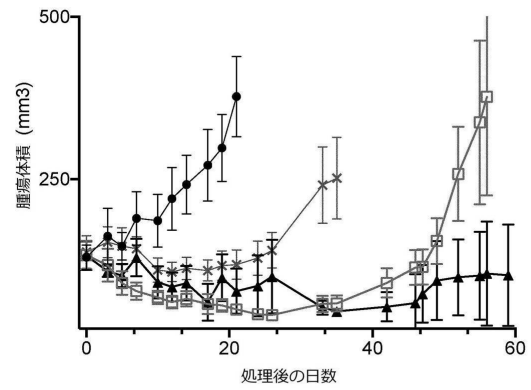
10

20

【 図 4 3 】



【 図 4 4 】



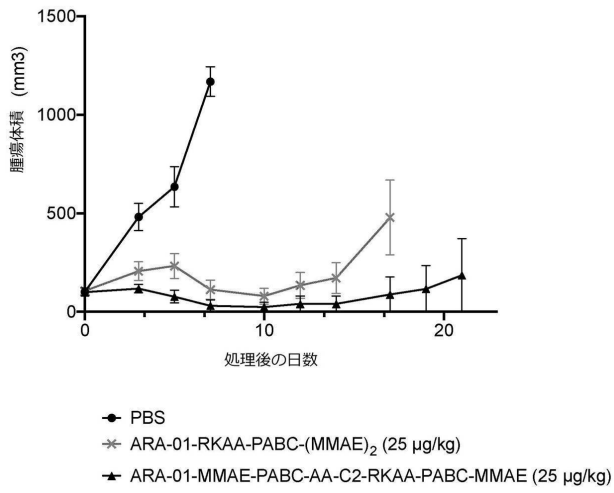
30

40

- PBS
- エンホルツマブベドチン (15 µg/kg)
- ▲ ARA04-MMAE-AA-PABC-C2-RKAA-PABC-MMAE (10 µg/kg)
- ✱ ARA04-RKAA-PABC-(MMAE)₂ (10 µg/kg)

50

【 図 4 5 】



10

【 配列表 】

202550676800001.xml

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

International application No.

PCT/EP2023/054455

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

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

- 1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
 - accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
- 2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
- 3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/054455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K47/68	A61K47/65
	A61P25/00	A61P29/00
	A61P31/00	A61P35/00
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2019/057772 A1 (SCHERRER INST PAUL [CH]) 28 March 2019 (2019-03-28) cited in the application example 6 figures 7, 8 page 6, paragraph 7 - page 8, paragraph 5 page 30, paragraph 3 - page 31, paragraph 1 page 34, paragraph 3 - page 35, paragraph 1 page 36, paragraph 2 - paragraph 4 figures 1, 6 page 4, paragraph 2 - paragraph 4 ----- -/--	1-34, 36-51, 53-82 35,52
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
10 May 2023	22/05/2023	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Monami, Amélie	

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2023/054455

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2019/096867 A1 (DEBIOPHARM RES & MANUFACTURING S A [CH]) 23 May 2019 (2019-05-23)</p> <p>examples 1-14 figures 4-7, 47, 48 compounds 17, 18, 29-32 page 89, paragraph 4</p> <p>-----</p>	<p>1-7, 9-12, 20-27, 29, 31, 38, 40-43, 47, 48, 55, 57-59, 61, 64-82</p>
X	<p>ULRIKE LEURS ET AL: "GnRH-III based multifunctional drug delivery systems containing daunorubicin and methotrexate", EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 52, 6 March 2012 (2012-03-06), pages 173-183, XP028420646, ISSN: 0223-5234, DOI: 10.1016/J.EJMECH.2012.03.016 [retrieved on 2012-03-16] figure 1</p> <p>-----</p>	<p>1, 2, 5, 6, 9, 11, 20, 21, 24, 25, 27</p>
X	<p>WO 2018/154517 A1 (PHILOGEN SPA [IT]) 30 August 2018 (2018-08-30)</p> <p>compounds 3-4</p> <p>-----</p>	<p>1-6, 9, 11-15, 20, 21, 24, 25, 27</p>
X	<p>HECKL ET AL: "The influence of 2,4,6-tribromophenyl isocyanate on the cellular and nuclear uptake of the SV 40 T antigen nuclear localization sequence", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol. 583, no. 1, 23 December 2007 (2007-12-23), pages 32-36, XP022503712, ISSN: 0014-2999 abstract page 32, column 1, paragraph 3 page 33, column 1, paragraph 2 - page 35, column 1, paragraph 2</p> <p>-----</p>	<p>1-7, 9, 11, 20, 21, 24, 27</p>

1

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

page 2 of 2

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/054455

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019057772 A1	28-03-2019	AU 2018337671 A1	26-03-2020
		CA 3075218 A1	28-03-2019
		CA 3177215 A1	28-03-2019
		CN 111163809 A	15-05-2020
		EP 3684419 A1	29-07-2020
		JP 2020534030 A	26-11-2020
		KR 20200057046 A	25-05-2020
		NZ 762376 A	26-08-2022
		US 2021128743 A1	06-05-2021
		WO 2019057772 A1	28-03-2019
WO 2019096867 A1	23-05-2019	AU 2018368520 A1	14-05-2020
		BR 112020008974 A2	17-11-2020
		CA 3082271 A1	23-05-2019
		CN 111655294 A	11-09-2020
		EA 202091203 A1	03-08-2020
		EP 3710064 A1	23-09-2020
		IL 274549 A	30-06-2020
		KR 20200088402 A	22-07-2020
		SG 11202003995P A	28-05-2020
		US 2022062371 A1	03-03-2022
		WO 2019096867 A1	23-05-2019
WO 2018154517 A1	30-08-2018	AU 2018224486 A1	03-10-2019
		EP 3585421 A1	01-01-2020
		US 2019375837 A1	12-12-2019
		WO 2018154517 A1	30-08-2018

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04		4 H 0 4 5
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	50/00 (2006.01)	A 6 1 K	50/00	1 0 0	
A 6 1 K	38/22 (2006.01)	A 6 1 K	38/22		
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04		
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	31/5513(2006.01)	A 6 1 K	31/5513		
A 6 1 K	38/07 (2006.01)	A 6 1 K	38/07		
A 6 1 K	38/08 (2019.01)	A 6 1 K	38/08		
A 6 1 K	31/537(2006.01)	A 6 1 K	31/537		
A 6 1 K	31/7034(2006.01)	A 6 1 K	31/7034		
A 6 1 K	31/395(2006.01)	A 6 1 K	31/395		
A 6 1 K	31/4745(2006.01)	A 6 1 K	31/4745		
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	D	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 K	31/517(2006.01)	A 6 1 P	31/00		
A 6 1 K	31/513(2006.01)	A 6 1 P	35/02		
A 6 1 K	33/243(2019.01)	A 6 1 K	31/517		
C 0 7 K	4/00 (2006.01)	A 6 1 K	31/513		
C 1 2 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 K	33/243		
C 0 7 K	14/52 (2006.01)	C 0 7 K	4/00		
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 1 2 P	21/00	A	
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/52		
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/705		
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 0 7 K	16/00		
		C 0 7 K	19/00		
		C 1 2 N	9/10		

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

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100152308

弁理士 中 正道

(74)代理人 100201558

弁理士 亀井 恵二郎

(74)代理人 100118371

弁理士 駒 谷 剛志

(72)発明者 ベルトラン、ロマン

スイス国、8 8 0 4 アウ、リートホーフシュトラッセ 11、アラリス バイオテック アーゲー内

(72)発明者 アッティンガー - トラー、イザベラ

スイス国、8 8 0 4 アウ、リートホーフシュトラッセ 11、アラリス バイオテック アーゲー内

(72)発明者 フェイ、レイチェル

スイス国、8 8 0 4 アウ、リートホーフシュトラッセ 11、アラリス バイオテック アーゲー内

(72)発明者 グラブロウスキ、ドラガン
スイス国、 8 8 0 4 アウ、リートホーフシュトラッセ 1 1、アラリス バイオテック アーゲー内

(72)発明者 スピッチャー、フィリップ
スイス国、 8 8 0 4 アウ、リートホーフシュトラッセ 1 1、アラリス バイオテック アーゲー内

F ターム (参考) 4B064 AG01 AG26 CA21 CB30 CD20 DA01
4C076 AA95 CC41 EE41 EE59 FF31
4C084 AA02 AA12 AA13 AA17 BA01 BA16 BA44 DA01 DB01 NA02
NA03 NA05 NA12
4C085 AA13 AA14 AA21 AA24 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB42
CC23 DD62 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 BC42 BC46 BC76 CB11 CB22 DA32 EA03 EA08
EA16 GA02 GA07
4H045 AA10 AA20 AA30 BA11 BA12 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17
BA18 BA41 BA54 BA70 BA71 BA72 DA75 EA20 EA50