

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-510864

(P2018-510864A)

(43) 公表日 平成30年4月19日(2018.4.19)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	Z N A	4 B 0 6 4
C12P 21/02 (2006.01)	C12P 21/02	B	4 C 0 7 6
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	L	4 C 0 8 5
A61K 47/68 (2017.01)	A61K 47/68		4 H 0 4 5
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-547459 (P2017-547459)	(71) 出願人	391015708 ブリストルマイヤーズ スクイブ カンパニー
(86) (22) 出願日	平成28年3月1日 (2016.3.1)	(74) 代理人	B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B B C O M P A N Y
(85) 翻訳文提出日	平成29年10月19日 (2017.10.19)	(74) 代理人	アメリカ合衆国O 8 5 4 3 ニュージャージー州 ブリンストン、ルート206アンド・プロビンス・ライン・ロード
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/020192	(74) 代理人	62/130,673
(87) 國際公開番号	W02016/144608	(74) 代理人	100100158 弁理士 鮫島 瞳
(87) 國際公開日	平成28年9月15日 (2016.9.15)	(74) 代理人	100126778 弁理士 品川 永敏
(31) 優先権主張番号	62/130,673	(74) 代理人	100156155 弁理士 水原 正弘
(32) 優先日	平成27年3月10日 (2015.3.10)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

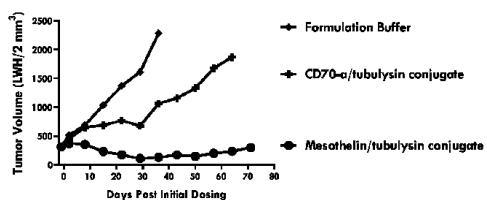
(54) 【発明の名称】 トランスグルタミナーゼによって結合可能な抗体およびそれによって製造される結合体

(57) 【要約】

抗体はトランスグルタミナーゼの基質である、少なくとも1つのグルタミンを含むC末端伸長部を重鎖に持ち、このような抗体を用いてトランスグルタミナーゼによって介在される抗体-薬物結合体の製造が可能になる。

Fig. 3

N87 Median Tumor Growth



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの重鎖が、 E E Q Y A S T Y (配列番号： 1) 、 E E Q Y Q S T Y (配列番号： 2) 、 E E Q Y N S T Y (配列番号： 3) 、 E E Q Y Q S (配列番号： 2 のアミノ酸 1 から 6) 、 E E Q Y Q S T (配列番号： 2 のアミノ酸 1 から 7) 、 E Q Y Q S T Y (配列番号： 2 のアミノ酸 2 から 8) 、 Q Y Q S (配列番号： 6 のアミノ酸 3 から 6) 、または Q Y Q S T Y (配列番号： 2 のアミノ酸 3 から 8) を含むアミノ酸配列を有する C 末端伸長部を持つ、全長抗体。

【請求項 2】

C 末端伸長部が、 E E Q Y A S T Y (配列番号： 1) 、 E E Q Y Q S T Y (配列番号： 2) または E E Q Y N S T Y (配列番号： 3) を含むアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の全長抗体。 10

【請求項 3】

C 末端伸長部が、 E E Q Y A S T Y (配列番号： 1) から成るアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の全長抗体。

【請求項 4】

C 末端伸長部が、 E E Q Y Q S T Y (配列番号： 2) から成るアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の全長抗体。

【請求項 5】

C 末端伸長部が、 E E Q Y N S T Y (配列番号： 3) から成るアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の全長抗体。 20

【請求項 6】

C 末端伸長部が、 E E Q Y Q S (配列番号： 2 のアミノ酸 1 から 6) 、 E E Q Y Q S T (配列番号： 2 のアミノ酸 1 から 7) 、 E Q Y Q S T Y (配列番号： 2 のアミノ酸 2 から 8) 、 Q Y Q S (配列番号： 6 のアミノ酸 3 から 6) 、または Q Y Q S T Y (配列番号： 2 のアミノ酸 3 から 8) から成るアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の全長抗体。

【請求項 7】

I g G 1 アイソタイプである、請求項 1 に記載の全長抗体。

【請求項 8】

配列番号： 4 に記載のアミノ酸配列を有する定常領域を持つ、請求項 1 に記載の全長抗体。 30

【請求項 9】

以下のステップ：

(a) 少なくとも 1 つの重鎖が、 E E Q Y A S T Y (配列番号： 1) 、 E E Q Y Q S T Y (配列番号： 2) 、または E E Q Y N S T Y (配列番号： 3) を含むアミノ酸配列を有する C 末端伸長部を持つ、全長抗体を提供すること；

(b) 式：

【化 1】

NH₂-X-D

40

[式中、 D は薬物を示し、 X は薬物 D およびアミン基 NH₂ を結合する二価のリンカーを示す]

のアミンドナーを提供すること；

(c) トランスグルタミナーゼの存在下で、該抗体および該アミンドナーを接触させること；および

(d) C 末端伸長部におけるグルタミンと該アミンドナーのアミン基 NH₂ との間に、アミド結合を形成することによって、該抗体および該アミンドナーに抗体薬物結合体を形成させること

を含む、抗体 - 薬物結合体を製造する方法。 50

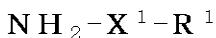
【請求項 10】

以下のステップ：

(a) 少なくとも 1 つの重鎖が、 E E Q Y A S T Y (配列番号：1)、 E E Q Y Q S T Y (配列番号：2)、または E E Q Y N S T Y (配列番号：3) を含むアミノ酸配列を有する C 末端伸長部を持つ、全長抗体を提供すること；

(b) 式：

【化 2】



[式中、 R¹ は第一反応性官能基を示し、 X¹ は反応性官能基 R¹ およびアミン基 NH₂ を結合する二価のリンカーを示す] 10

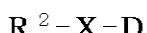
のアミンドナーを提供すること；

(c) トランスグルタミナーゼの存在下で、該抗体および該アミンドナーを接触させること；

(d) C 末端伸長部におけるグルタミンと該アミンドナーのアミン基 NH₂ との間にアミド結合を形成することによって、該抗体および該アミンドナーに第一反応性官能基 R¹ が結合した修飾抗体を形成させること；

(e) 式：

【化 3】



[式中、 R² は第一反応性官能基 R¹ と共有結合的に反応する第二反応性官能基であり、 D は薬物であり、 X は薬物 D および第二反応性官能基 R² を結合する二価のリンカーである] 20

の部位を含む薬物と修飾抗体を接触させること；並びに

(f) 第一および第二反応性官能基 R¹ および R² を反応させて、抗体 - 薬物結合体を形成させること

を含む、抗体 - 薬物結合体を製造する方法。

【請求項 11】

抗体が、抗体の重鎖の C 末端伸長部のグルタミン残基の側鎖におけるアミド結合を介して薬物部位に共有結合し、 C 末端伸長部が E E Q Y A S T Y (配列番号：1)、 E E Q Y Q S T Y (配列番号：2)、 E E Q Y N S T Y (配列番号：3)、 E E Q Y Q S (配列番号：2 のアミノ酸 1 から 6)、 E E Q Y Q S T (配列番号：2 のアミノ酸 1 から 7)、 E Q Y Q S T Y (配列番号：2 のアミノ酸 2 から 8)、 Q Y Q S (配列番号：6 のアミノ酸 3 から 6)、または Q Y Q S T Y (配列番号：2 のアミノ酸 3 から 8) を含むアミノ酸配列を有する、抗体 - 薬物結合体。 30

【請求項 12】

C 末端伸長部が E E Q Y A S T Y (配列番号：1) から成るアミノ酸配列を持つ、請求項 11 に記載の抗体 - 薬物結合体。

【請求項 13】

C 末端伸長部が E E Q Y Q S T Y (配列番号：2) から成るアミノ酸配列を持つ、請求項 11 に記載の抗体 - 薬物結合体。 40

【請求項 14】

C 末端伸長部が E E Q Y N S T Y (配列番号：3) から成るアミノ酸配列を持つ、請求項 11 に記載の抗体 - 薬物結合体。

【請求項 15】

C 末端伸長部が E E Q Y Q S (配列番号：2 のアミノ酸 1 から 6)、 E E Q Y Q S T (配列番号：2 のアミノ酸 1 から 7)、 E Q Y Q S T Y (配列番号：2 のアミノ酸 2 から 8)、 Q Y Q S (配列番号：6 のアミノ酸 3 から 6)、または Q Y Q S T Y (配列番号：2 のアミノ酸 3 から 8) から成るアミノ酸配列を持つ、請求項 11 に記載の抗体 - 薬物結合

体。

【請求項 1 6】

抗体が抗 C D 7 0 または抗メソテリン抗体である、請求項 1 1 に記載の抗体 - 薬物結合体。

【請求項 1 7】

薬物部位が D N A マイナーグループ結合剤またはツブリシン類似体である、請求項 1 1 に記載の抗体 - 薬物結合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、トランスグルタミナーゼ酵素によって薬物部位に結合可能であるような修飾抗体、およびそのような抗体から製造される結合体に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

(本発明の背景)

現在強い関心が寄せられている抗癌剤の 1 種は、抗体 - 薬物結合体 (A D C) であり、免疫結合体としても知られている。 A D C において、治療剤 (薬物) は抗体に共有結合しており、その抗原は癌細胞に発現している。抗体は、抗原に結合することによって、 A D C を癌に送達する働きをする。そこに到達すると、共有結合の切断または抗体の分解によって、治療剤が癌部位において放出される。逆に言えば、 A D C が血液系を循環している間、治療剤は抗体に共有結合しているため、不活性に保たれる。このように、 A D C における治療剤は、局所的放出のために、通常の化学療法剤と比べてはるかに有用でありうる (すなわち、細胞毒性) 。このように、 A D C は 3 つの要素を含む： (1) 抗体、 (2) 薬物、および (3) 抗体と薬物とを共有結合によって結合するリンカー。 A D C の総括としては、 S c h r a m a e t a l . 2 0 0 6 を参照されたい。

【0 0 0 3】

A D C の製造において重要なステップは、共有結合によって結合させるステップであり、結合ステップとも称される。効率的な結合のための多くの方法が開示されてきた。最近多くの興味を生じさせているものは、トランスグルタミナーゼ (T G アーゼ) 、特に細菌のトランスグルタミナーゼ (B T G) が介在する結合体である。例えば、 J e g e r e t a l . 2 0 1 0 を参照されたい。

【0 0 0 4】

B T G は、グルタミンのカルボキサミド側鎖 (アミンアクセプター) とリシンの - アミノ基 (アミンドナー) との間にアミド結合を形成する。特異的に、トランスグルタミナーゼはグルタミン残基に関して選択性があり、例えば、タンパク質ループの可動性部位に位置し、特定のアミノ酸に隣接していることが必要であるが、リシン残基に関しては乱雑であり、例えば、リシンの - アミノの代替として、アルキレンアミノ化合物のアミノ基を容易に許容する。 F o n t a n a e t a l . 2 0 0 8 を参照されたい。

【0 0 0 5】

典型的な B T G 介在結合体において、以下に示されるように、グルタミン残基は抗体に存在し、一方でアミノ基はリンカー - 薬物部位に位置する：

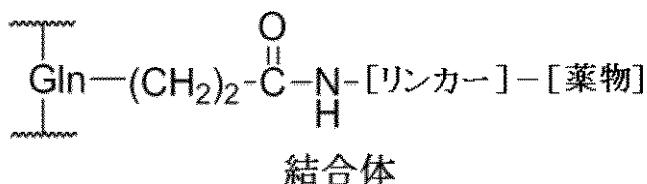
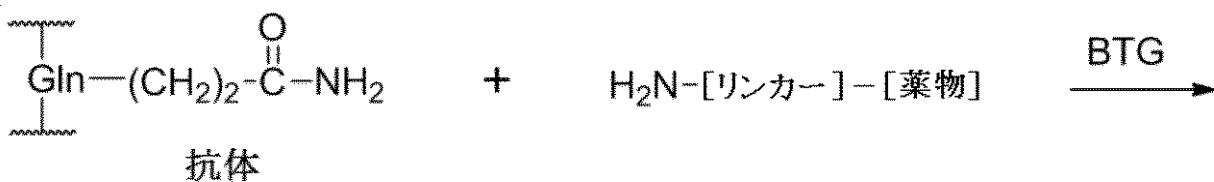
10

20

30

40

【化1】



10

20

30

40

50

このスキームにおいて、抗体はアミンアクセプターとして働き、 $\text{H}_2\text{N}-[\text{リンカー}]-[\text{薬物}]$ 部位はアミンドナーとして働く。

【0006】

ポリペプチド鎖におけるグルタミン残基の位置はBTG介在トランスアミド化に対する感受性に大きな影響を有する。抗体におけるグルタミン残基は全て通常はBTGの基質ではなく、BTGの感受性を誘導するためには、抗体にいくつかの修飾を行うことが必要である。一般に、抗体は重鎖のアスパラギン297(N297)がグリコシル化(N-結合型グリコシル化)されている。N297A置換によるグリコシル化部位の除去、または翻訳後、酵素による脱グリコシル化のいずれかによる抗体の脱グリコシル化によって、隣接するグルタミン295(Q295)がBTG感受性になることが、Jege et al. 2010によって発見された。彼らはまた、N297Q置換によってグリコシル化が除去されるだけではなく、同じくアミンアクセプターである第二のグルタミン残基(297位)もまた導入されることを示した。このように、単純な脱グリコシル化によって、抗体ごとに2つ(重鎖ごとに1つ、Q295において)のBTG反応性のグルタミン残基が生成し、さらに、N297Q置換を有する抗体は、4つ(重鎖ごとに2つ、Q295およびQ297の位置において)のBTG反応性グルタミン残基を有する。

【0007】

トランスグルタミナーゼによって介在されるADCの製造に関する開示としては、以下が挙げられる: Dennler et al. 2014, Innate Pharma 2013, Jege et al. 2010, Pons et al. 2013、およびSrop et al., 2013。

【0008】

特に、Pons et al. 2013において、トランスグルタミナーゼ反応性にするために、鎖の1つのC末端に位置しうる4つのアミノ酸のグルタミン含有タグを有する抗体の修飾が開示される。(他の文脈において、タグの結合または抗体の鎖のC末端の伸長部もまた開示されている。例えば、Liu et al. 2014を参照されたい。)

【0009】

さらに一般的にタンパク質(抗体を含む)のラベル化または修飾に関する、他のトランスグルタミナーゼの開示としては以下が挙げられる: Bregeon 2014, Bregeon et al. 2013 and 2014, Chen et al. 2005, Fischer et al. 2014, Kamiya et al. 2011, Lin et al. 2006, Mero et al. 2009, Mindt et al. 2008, Sato 2002, Sato et al. 2001、および Sugimura et al. 2007。

【0010】

本明細書において、第一著者または発明者および年号によって引用される文書の完全な引用は、本明細書の最後に列挙される。

【発明の概要】

【0011】

ある実施態様において、本発明は、重鎖の少なくとも1つのC末端に、トランスグルタミナーゼの基質であるグルタミンを少なくとも1つ含む伸長部を加えることによって該C末端を修飾することで、トランスグルタミナーゼ、特にBTGの基質であるグルタミン残基を導入するように修飾された完全長抗体を提供する。当該伸長部は、EEQYASTY(配列番号：1)、EEQYQSTY(配列番号：2)、EEQYNSTY(配列番号：3)、EEQYQS(配列番号：2のアミノ酸1から6)、EEQYQST(配列番号：2のアミノ酸1から7)、EQYQSTY(配列番号：2のアミノ酸2から8)、QYQS(配列番号：6のアミノ酸3から6)、またはQYQSTY(配列番号：2のアミノ酸3から8)を含むアミノ酸配列を有する。10

【0012】

好ましくは、当該伸長部はEEQYASTY(配列番号：1)、EEQYQSTY(配列番号：2)、またはEEQYNSTY(配列番号：3)から成るアミノ酸配列を有する。。

【0013】

我々はまた、いくつかのC末端伸長部が調整されたまたは切断されたバリアントもまた、グルタミン反応性であることを発見した。このような調整されたバリアントはEEQYQS(配列番号：2のアミノ酸1から6)、EEQYQST(配列番号：2のアミノ酸1から7)、EQYQSTY(配列番号：2のアミノ酸2から8)、QYQS(配列番号：6のアミノ酸3から6)、またはQYQSTY(配列番号：2のアミノ酸3から8)によって例示される。調整された配列は、グルタミン反応性であるためにはセリンの存在(配列番号：2のアミノ酸6)が必要であると考えられる。20

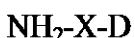
【0014】

別の実施態様において、以下のステップを含む、抗体-薬物結合体の製造方法が示される：

(a) 少なくとも1つの重鎖が、EEQYASTY(配列番号：1)、EEQYQSTY(配列番号：2)、またはEEQYNSTY(配列番号：3)を含むアミノ酸配列を有するC末端伸長部を持つ、全長抗体を提供すること；30

(b) 式：

【化2】



[式中、Dは薬物を示し、Xは薬物Dおよびアミン基NH₂を結合する二価のリンカー基を示す]

のアミンドナーを提供すること；

(c) トランスグルタミナーゼの存在下で、抗体およびアミンドナーを接触させること；および40

(d) C末端伸長部におけるグルタミンとアミンドナー部位のアミン基NH₂との間にアミド結合を形成することによって、抗体およびアミンドナーに抗体薬物結合体を形成させること。

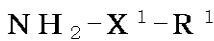
【0015】

本明細書はさらに、以下のステップを含む、抗体-薬物結合体を製造する別の方法を提供する：

(a) 抗体が、少なくとも1つの重鎖に、EEQYASTY(配列番号：1)、EEQYQSTY(配列番号：2)、またはEEQYNSTY(配列番号：3)を含むアミノ酸配列を有するC末端伸長部を加えることによって修飾された、全長抗体を提供すること；50

(b) 式 :

【化3】



[式中、

R^1 は第一反応性官能基を示し、 X^1 は反応性官能基 R^1 と、アミン基 NH_2 とを結合する二価のリンカーを示す]

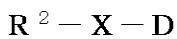
のアミンドナーを提供すること;

(c) トランスグルタミナーゼの存在下で、抗体およびアミンドナーを接触させること;

(d) C末端伸長部におけるグルタミンと、アミンドナーのアミン基 NH_2 との間にアミド結合を形成することによって、抗体およびアミンドナーに、第一反応性官能基 R^1 が結合した修飾抗体を形成させること;

(e) 式 :

【化4】



[式中、 R^2 は、第一反応性官能基 R^1 と共有結合的に反応する第二反応性官能基であり、 D は薬物であり、 X は薬物 D と第二反応性官能基 R^2 とを結合する二価のリンカーである]

の部位を含む薬物と修飾抗体を接触させること; 並びに

(f) 第一および第二反応性官能基 R^1 および R^2 を反応させて、抗体 - 薬物結合体を形成させること。

【0016】

別の実施態様において、本発明は抗体 - 薬物結合体を提供し、ここで、抗体は、抗体の重鎖のC末端伸長部におけるグルタミン残基の側鎖におけるアミド結合を介して、薬物部位に共有結合しており、C末端伸長部は E E Q Y A S T Y (配列番号: 1)、E E Q Y Q S T Y (配列番号: 2)、または E E Q Y N S T Y (配列番号: 3) を含むアミノ酸配列を有する。好ましくは、抗体は抗 C D 7 0 または抗メソテリン抗体である。好ましくは、薬物部位は D N A マイナーグループ結合剤(特に、結合の際に D N A もまたアルキル化するもの)またはツブリシン類似体である。

【図面の簡単な説明】

【0017】

図 1 a および 1 b は、合わせて、アミンドナー (A) の合成のスキームを示す。

【0018】

図 2 は、1段階結合反応によって合成された結合体の活性を示す。

【0019】

図 3 は、2段階結合反応によって合成された2つの結合体の活性を比較している。

【発明を実施するための形態】

【0020】

実施態様の記述

I g G 1 アイソタイプである抗体は、重鎖の定常領域の、297 - 300 位において、アミノ酸配列 E E Q Y N S T Y (配列番号: 3、K a b a t におけるものと同様に E U ごとの番号付け) を含む。前記のように、グルタミン残基 Q 295 は、297 番目の位置に通常結合しているグリコシド基が N 結合型グリコシド結合の形成を防ぐために、酵素によって除去されるか、または N 297 の置換が設計されているかのいずれかによって欠失していかなければ、トランスグルタミナーゼの基質ではない。

【0021】

我々は、配列 E E Q Y N S T Y (配列番号: 3) が抗体の重鎖の C 末端に、その伸長部として付加されている場合、グルタミン残基はトランスグルタミナーゼの基質となり、ト

10

20

30

40

50

ransglutamidaseが介在する結合に適するように抗体を修飾できることを発見した。さらに、我々は、この配列のバリエントである、E E Q Y A S T Y (配列番号：1) および E E Q Y Q S T Y (配列番号：2) が同様に有効であることを発見した。これらにおいて、いずれのグルタミン残基も、トランスグルタミナーゼ反応性であることが発見された。

【0022】

ADCにおいて抗体に結合する薬物部位の数は、薬物 - 抗体比またはDARと称される。それぞれの重鎖に、E E Q Y A S T Y (配列番号：1) またはE E Q Y N S T Y (配列番号：3) を含むアミノ酸配列を有するC末端伸長部を持つ抗体の例において、DARの理論的最大値は、それぞれの重鎖に1つの薬物部位が結合した、2である。それぞれの重鎖に、E E Q Y Q S T Y (配列番号：2) を含むアミノ酸配列を有するC末端伸長部を持つ抗体の例において、DARの理論値は、各伸長部のそれぞれのグルタミン残基に1つの薬物部位が結合した、4である。当業者にとって当然のことながら、結合反応は常に100%の効率ではなく、所定のADC合成について、少ない数、例えば、最大理論値が2である場合に1.7のDARの観測値、または最大理論値が4である場合に3.5のDARの観測値が得られる。

【0023】

好ましくは、本発明に用いられる抗体は、2つの同一の重鎖、および2つの同一の軽鎖(カッパまたはラムダ)を有する全長抗体である。好ましくは、両方の重鎖は本発明に記載のC末端伸長部を有する。好ましくは、抗体はIgG1アイソタイプである。さらに好ましくは、抗体は、配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有するIgG1バリエントである、重鎖の定常領域を持つ。このバリエントは、R214/E356/M358のアロタイプであり、適宜、K447が翻訳後に除去されたC末端を持つ(Kabatにおけるものと同様にEUごとの番号付け)。抗体は好ましくは、モノクローナル抗体であり、さらに好ましくは、ヒトモノクローナル抗体である。

【0024】

我々は、抗体が、天然の抗体に生じるようにC末端のリシンを有する場合、当該リシンがアミンドナーとして働き、抗体の重鎖を架橋しうることを発見した。そのため、C末端のリシンを除去することが望ましい。また、抗体が組み換えによって生成される場合、いくつかの重鎖のC末端鎖のリシン残基(図2における447位のアミノ酸)は、発現の間、または宿主細胞での生産から酵素によって精製するステップの間に、しばしば除去され、不均一な生成物(いずれのリシンも存在するもの、1つのリシンが除去されたもの、またはいずれのリシンも除去されたもの)を生じる。このような不均一性は望ましくない。初期生成物をさらに酵素処理することによって、または、組み換え発現を用いて核酸配列からC末端のリシンのコドンを除去することによって、両方のリシンを意図的に除去することで、より不均一な生成物を得ることができる。McDonough et al. 1992。本明細書において開示されるシステイン置換を有し、重鎖のC末端のリシン残基を欠損した抗体のバリエントもまた、本発明の範囲内である。両方のC末端のグリシンおよびリシンが除去された抗体のバリエントもまた既知であり、本発明の範囲に含まれる。

【0025】

本発明において用いられる好ましいトランスグルタミナーゼは、ストレプトミセス・モバラエンシス(*Streptomyces mobaraensis*)からのBTGであり、市販されているか、または組み換えによって調製できる。

【0026】

本発明のC末端伸長部を有する抗体は、1段階または2段階の反応によって結合可能である。

【0027】

模式的に、1段階結合は、これに限定されるものではないが、例として、1つのグルタミン(すなわち、配列番号：1または番号：3に記載のもの)を有するC末端伸長部を持つ抗体を用いて、以下のように表すことができる。

10

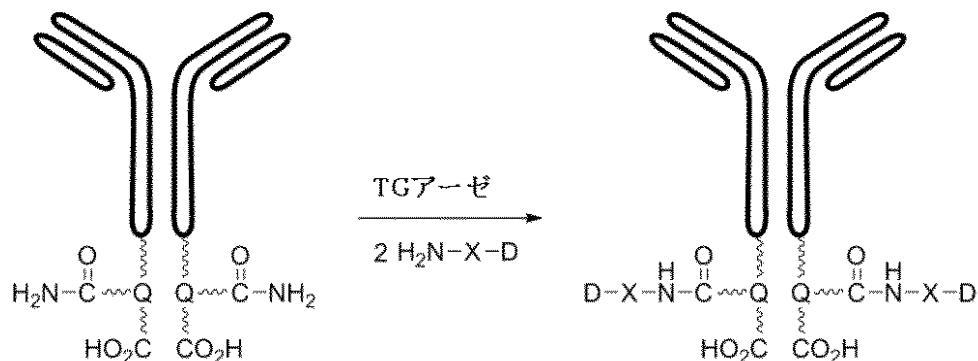
20

30

40

50

【化5】



【0028】

アミンドナーは、式(I)：

【化6】



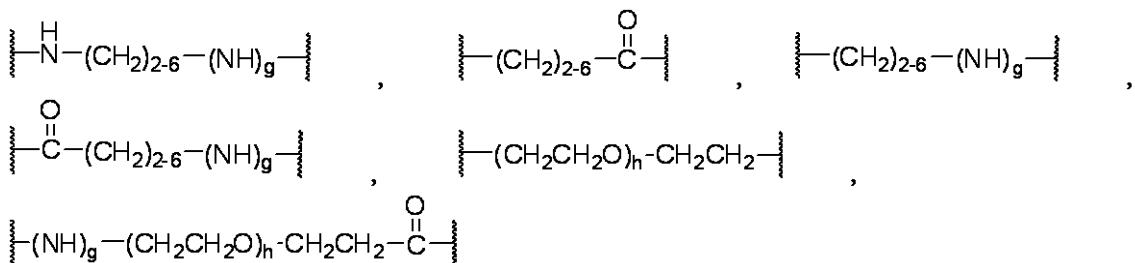
[式中、Dは薬物であり、Xは薬物Dとトランスグルタミナーゼ反応性アミン基H₂Nとを結合する二価のリンカーである]

で表すことができる。

【0029】

リンカーXは、アルキレン鎖およびポリ(エチレングリコール)鎖の単体または組み合せを含んでもよく、以下のように示される：

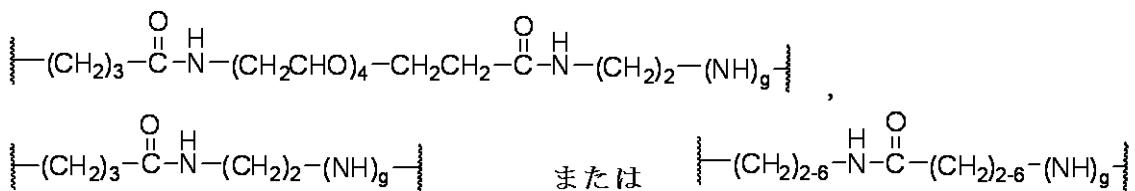
【化7】



[式中、下付文字gは0または1であり、下付文字hは1から24であり、好ましくは2から4である]

およびこれらの組み合せ。これらの断片は以下に示されるように結合することができる：

【化8】



【0030】

リンカーXはまた、標的部位に到達した後に、結合体から薬物Dを放出するための切断可能な基を含むことができる。切断可能な基の例としては、ジスルフィド(ジスルフィド交換によって切断される)、ヒドラゾン(低pHにおいて切断される)およびペプチド(酵素切断)などが挙げられる。あるいは、切断可能な基が存在しない場合、結合体からの薬物Dの放出は、抗体の異化を介して起こりうる。

50

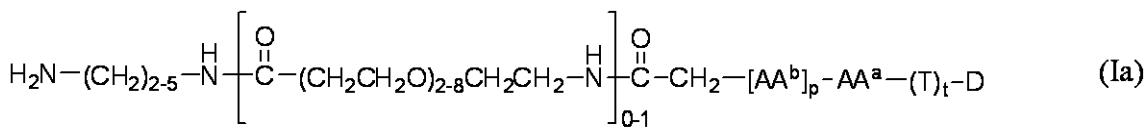
【0031】

また、リンカーXは、以下の明細書でさらに記述される、自己犠牲基を含みうる。

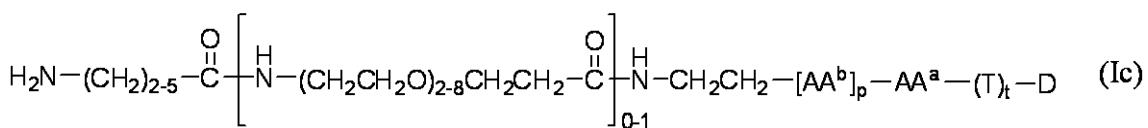
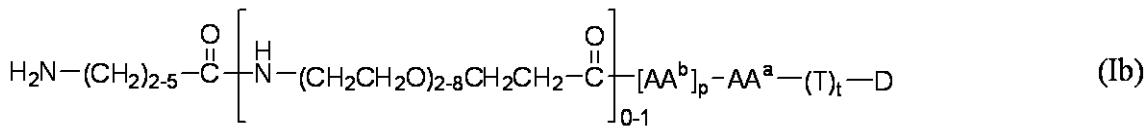
【0032】

切断可能なペプチドを有するアミンドナー部位(I)の好ましい態様は、式(Ia)から(Ic):

【化9】



10



〔式中、

Dは薬物であり;

20

AA^aおよびそれぞれのAA^bは独立して、アラニン、-アラニン、-アミノ酪酸、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、-カルボキシグルタミン酸、シトルリン、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、リシン、メチオニン、ノルロイシン、ノルバリン、オルニチン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンから成る群から選択され;

pは1、2、3、または4であり;

Tは自己犠牲基であり;

tは0または1である]

30

によって示される。

【0033】

式(Ia)、(Ib)および(Ic)において、-AA^a-[AA^b]_p-は、長さがpの値によって決定されるポリペプチドを表す(pが1であればジペプチド、pが3であればテトラペプチド、など)。AA^aはポリペプチドのカルボキシ末端に存在する。反対に最後のAA^bは、ポリペプチドのアミノ末端に存在する。好ましいポリペプチド-AA^a-[AA^b]_p-は、Val-Cit、Val-Lys、Lys-Val-Ala、Asp-Val-Ala、Val-Ala、Lys-Val-Cit、Ala-Val-Cit、Val-Gly、Val-Gln、およびAsp-Val-Citであり、これらは、H₂N-Val-Cit-CO₂Hのように、一般的なNからC方向に記述されている。さらに好ましくは、ポリペプチドは、Val-Cit、Val-Lys、またはVal-Alaである。好ましくは、ポリペプチド-AA^a-[AA^b]_p-は、標的(癌)細胞内に存在する酵素、例えば、カテプシン、特にカテプシンBによって切断可能である。

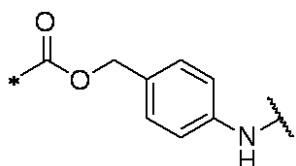
40

【0034】

下付文字tが0または1に等しいことによって示されるように、自己犠牲基Tは、適宜、アミンドナー(Ia)、(Ib)、および(Ic)中に存在する。存在する場合、自己犠牲基は、薬物Dがポリペプチドの酵素切断による薬物の放出を立体的に阻害するのを避けるために、薬物Dとポリペプチドとの間の空間的な隔離を提供する。自己犠牲基Tは、好ましくは、p-アミノベンジルオキシカルボニル(PABC)基であり、この構造は以下:

50

【化10】



に示され、アスタリスク（*）は薬物Dのアミン窒素に結合したPABCの末端を表し、波線

【化11】

10

~~*****~~

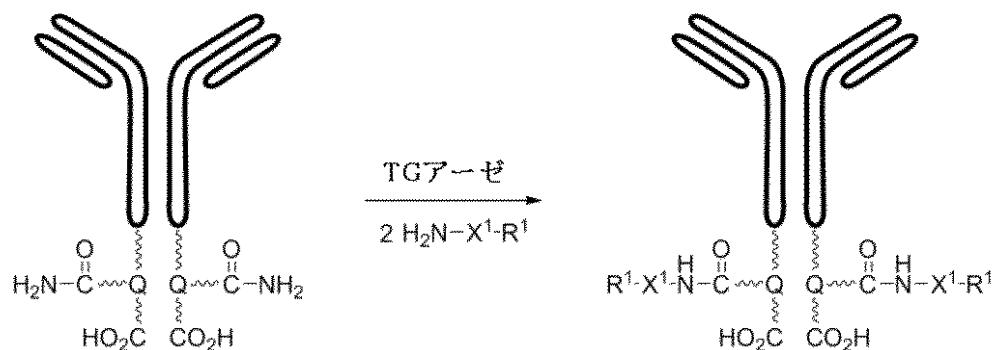
はポリペプチド - AA^a - [AA^b]_p - に結合した末端を表す。

【0035】

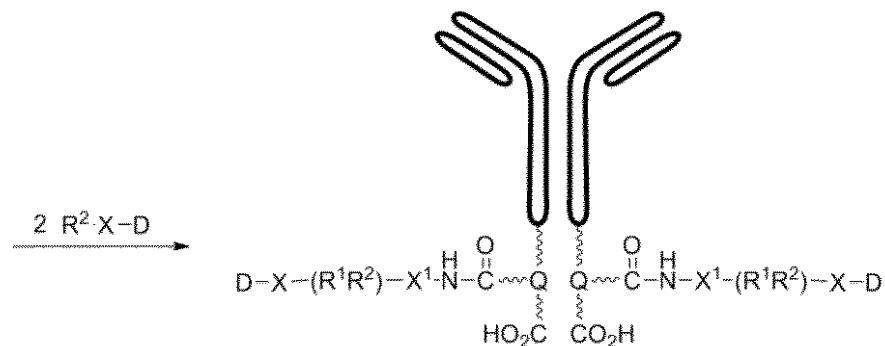
模式的に、2段階反応は、これに限定されるものではないが、例として、それぞれに1つのグルタミンを有するC末端伸長部を持つ抗体を用いて、以下のように表すことができる：

【化12】

20



30



40

【0036】

このスキームにおいて、X¹およびXはリンカーであり、Dは薬物部位であり、R¹およびR²は、互いに共有結合的に反応して(R¹R²)を形成し、ADCの形成を完成させる、相補的反応性官能基である。リンカーXの要素は、1段階反応の文脈において、前記で記述されている。リンカーX¹は、前記でリンカーXについて記載されるように、アルキレンおよびポリ(エチレングリコール)鎖を含みうる。

【0037】

反応性官能基R¹およびR²の組み合わせ、並びにそれらの反応産物(R¹R²)の例は、以下の表Iに示される。

【表1】

表1 - 基R ¹ およびR ² 並びにそれらの反応生成物		
-R ¹ -または-R ² -	R ² - -または -R ¹ -	- (R ¹ R ²) -
	HS- -	
	H ₂ NO- -	

【0038】

このように、表Iに基づいて以下の反応性官能基R¹およびR²の組み合わせが考慮される：

(a) 第一反応性官能基R¹がアジド基であり、第二反応性官能基R²がジベンゾシクロオクチニル基である；

(b) 第一反応性官能基R¹がジベンゾシクロオクチニル基であり、第二反応性官能基R²がアジド基である；

(c) 第一反応性官能基R¹がマレイミド基であり、第二反応性官能基R²がチオール基である；

(d) 第一反応性官能基R¹がマレイミド基であり、第二反応性官能基R²がチオール基である；

(e) 第一反応性官能基R¹がケトン基であり、第二反応性官能基R²がヒドロキシリルアミン基である；

(f) 第一反応性官能基R¹がケトン基であり、第二反応性官能基R²がヒドロキシリルアミン基である。

【0039】

ADCは一般に癌治療に用いられるため、前記薬物は好ましくは、標的癌細胞の死を引き起こす細胞毒性薬である。ADCにおいて用いられる細胞毒性薬としては、以下の種類の化合物およびそれらの類似体および誘導体が挙げられる：

(a) カリケアミシン（例えば、Lee et al., J. Am. Chem. Soc. 1987, 109, 3464および3466を参照されたい）およびウンシアラマイシン（例えば、Davies et al., WO 2007/038868 A2 (2007) およびChowdari et al., US 8,709,431 B2 (2012) を参照されたい）などのエンジイン；

(b) ツブリシン（例えば、Domling et al., US 7,778,814 B2 (2010); Cheng et al., US 8,394,922 B2 (2013)；およびCong et al., US 2014/0227295 A1 (2014) を参照されたい）；

(c) CCC-1065およびデュオカルマイシン（例えば、Boeger, US 6,545,585 B1 (2003)；Sufi et al., US 8,461,117 B2 (2013)；およびZhang et al., US 2012/0301490 A1 (2012) を参照されたい）などの、DNAマイナーグループ結合剤／アルキル化剤；

(d) エポチロン（例えば、Vite et al., US 2007 / 0275904 A1 (2007) およびUS RE 42930 E (2011) を参照されたい）；

(e) オーリスタチン（例えば、Senter et al., US 6,844,869 B2 (2005) およびDoronina et al., US 7,498,298 B2 (2009) を参照されたい）；

(f) ピロロベンゾジアゼピン（PBD）ダイマー（例えば、Howard et al., US 2013 / 0059800 A1 (2013) ; US 2013 / 0028919 A1 (2013) ; およびWO 2013 / 041606 A1 (2013) を参照されたい）；並びに

(g) DM1 およびDM4（例えば、Chari et al., US 5,208,020 (1993) およびAmphlett et al., US 7,374,762 B2 (2008) を参照されたい）などのメイタンシノイド。

【0040】

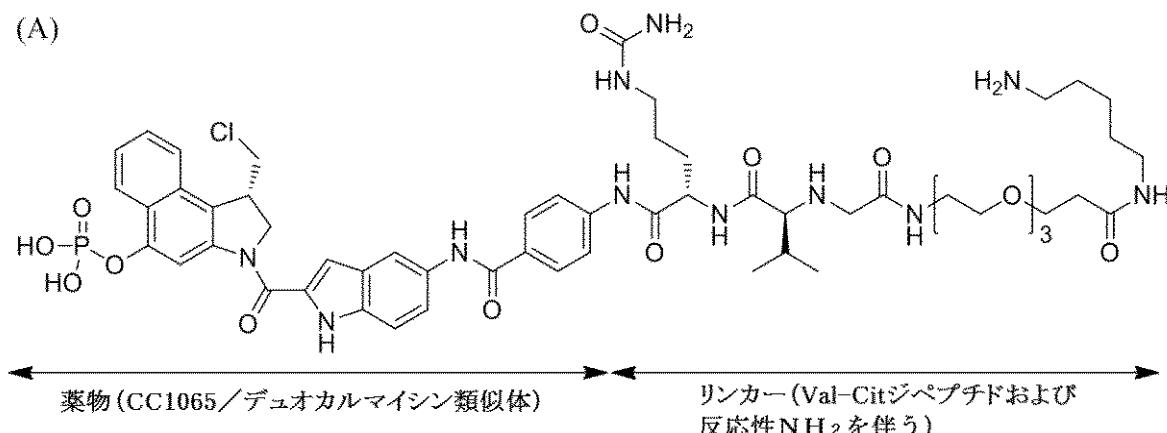
このように、薬物部位Dは、エンジイン、ツブリシン、DNAマイナーグループ結合剤／アルキル化剤、エポチロン、オーリスタチン、ピロロベンゾジアゼピンまたはメイタンシノイド、またはそれらの類似体もしくは誘導体であることができる。好ましい薬物部位Dは、DNAマイナーグループ結合剤／アルキル化剤である。

【0041】

1段階結合反応に用いるために設計されたアミンドナーの例は、以下に示される：

【化13】

(A)



【0042】

化合物(A)において、薬物はDNAのマイナーグループに結合し、次いでDNAをアルキル化する、CC-1065/デュオカルマイシン類似体である。リンカーは、ADCから薬物を放出するためのリンカーの切断を可能にする、リソソーム酵素カテプシンBの基質である、バリン-シトルリン(Val-Cit)ジペプチドを含む。

【0043】

本発明の実施は、以下の実施例を参照することによってさらに理解することができ、これらは限定するためではなく、説明するために提供される。

【実施例】

【0044】

実施例1 - C末端伸長部を有する抗体

抗CD70抗体1F4の重鎖の発現ベクター(Coccia et al. 2010)を、重鎖の定常領域をコードする元の核酸配列を、EEQYAS TYR C末端伸長部(配列番号：5)を含む修飾配列で置換することによって改変した。そのように改変された発現ベクターを、1F4軽(カッパ)鎖の発現ベクターと共に、CHO-S細胞に共導入した。配列番号：6の重鎖の定常領域を有する抗体1F4を生産するために、安定なクローニングを選択し、これによって、末端アルギニンが翻訳後に切り取られた後に、EEQYAS TY(配列番号：1)C末端伸長部を有する抗体1F4が生じる(「抗CD70-a」)

10

20

30

40

50

。

【0045】

同様に、配列番号8の重-CD70y鎖の定常領域を有する抗体1F4を生産するために、配列番号：7の核酸配列が用いられ、これによって、末端アルギニンが翻訳後に切り取られた後に、EEQYQSTY（配列番号：2）を有する抗体1F4が生じる（「抗CD70-b」）。

【0046】

EEQYASTY（配列番号：1）またはEEQYQSTY（配列番号：2）のいずれかの重鎖のC末端伸長部を有する抗メソテリン抗体6A4（Terrett et al. 2012）は、必要な変更を加えて同様に調製した。 10

【0047】

実施例2-トランスグルタミナーゼによって介在される結合

1段階および2段階法による結合のための代表的な方法を、以下に記述する。

【0048】

方法1（1段階法）：50mM Tris-HCl、pH 8.0中の～2mg/mlの抗体を、抗体のmgあたり3ユニットの組み換え細菌トランスグルタミナーゼの存在下で、部位あたり10当量のアミンドナーと反応させた。反応を5時間、37において、穏やかに混合し続けた。 20

【0049】

結合体をカチオン交換クロマトグラフィー精製の前に、0.2μmフィルターで濾過した。SPセファロース高速カチオン交換カラムを、5CV（カラム体積）の50mM HEPES、5mMグリシン、1M NaCl、pH 5.5（緩衝液B）で再生した。再生後に、カラムを3CVの平衡緩衝液、50mM HEPES、5mMグリシン、pH 5.5（緩衝液A）で平衡化した。結合体をロードし、カラムを1回、平衡緩衝液で洗浄した。結合体を6CVにわたって、0-100%Bの直線状勾配で溶出した。溶出液を画分に回収し、SDS-PAGEおよびウェスタン解析によって解析した。 20

【0050】

方法2（2段階法）：PBS、pH 7.4中の、～2mg/mlのC末端伸長部を有する抗体を、抗体のmgあたり3ユニットの組み換え細菌トランスグルタミナーゼの存在下で、トランスグルタミナーゼ反応性グルタミンあたり20当量のO-（2-アミノエチル-O'-(2-アジドエチル)）ペニタエチレングリコール（Sigma Aldrich）と反応させ、一晩、37で穏やかに混合し続けた。 30

【0051】

アミノアジド修飾抗体（アジド-mAb）はmAb Select Sureカラム（GE Healthcare）を用いて精製し、次いで、あらかじめ1XPBS、pH 8.0で平衡化したカラムにロードした。アジド-mAbを、25mMグリシン、10mMコハク酸、pH 5.0でカラムから溶出した。溶出液を画分に回収して、SDS-PAGEによって解析した。

【0052】

精製したアジド-mAbをPBS、pH 7.4中で透析し、4mg/mlに濃縮した。アジド-mAbは、アジド基に対して5×当量の、ジベンゾシクロオクチン（DIBO）基を有する薬物-リンカー化合物と反応させた。反応は室温で4時間行った。結合体を0.2μmフィルターで濾過し、緩衝液を製剤緩衝液（6X体積）（20mg/mlソルビトール、10mg/mlグリシン、pH 5.0）に交換した。製剤化原薬を、0.2μm PESフィルターを介して無菌チューブに濾過し、-80で保管した。 40

【0053】

2段階反応は、相補的な反応性官能基としてアジドおよびDIBOが例示されているが、他の相補的な反応性官能基の組み合わせを適宜変更して用いることができる事が、当業者には理解される。

【0054】

10

20

30

40

50

実施例 3 - アミンドナー（A）の合成

化合物3 . 4 - ニトロ安息香酸1（A l d r i c h、2 . 3 6 g、1 4 . 1 2 m m o l ）のアセトニトリル（5 0 m L）中の溶液に、炭酸カリウム（1 . 9 5 2 g、1 4 . 1 2 m m o l ）、次いで、（プロモメチル）ベンゼン2（A l d r i c h、1 . 8 4 8 m L、1 5 . 5 3 m m o l ）を加えた。6 0 で一晩攪拌した後、反応液を室温（R T）まで冷却し、濃縮して、アセトニトリルを留去した。得られた白色の固体物を1 0 0 m Lの水および5 0 m Lの酢酸エチル中に溶解した。有機層を分離して、ブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、真空で濃縮した。残留物をトルエン（2 × 8 m L）中に懸濁させ、真空で濃縮して、粗製のベンジル4 - ニトロベンゾアート3（3、3 . 8 6 g、1 5 . 0 1 m m o l 、収率1 0 6 %）を白色の固体物として得た。¹ H N M R (C D C l ₃) 10
8 . 2 6 (m , 4 H) 、7 . 4 4 (m , 5 H) 、5 . 4 2 (s , 2 H) 。

【0 0 5 5】

化合物4 . ベンジル4 - ニトロベンゾアート（3、3 . 7 6 g、1 4 . 6 2 m m o l ）のアセトン（4 0 m L）中の溶液に、0 で、亜鉛末（4 . 7 8 g、7 3 . 1 m m o l ）、次いで、塩化アンモニウム（7 . 8 2 g、1 4 6 m m o l ）の水溶液を加えた。室温で1時間攪拌した後、反応液をセライト^{T M}濾過担体を介して濾過し、次いで真空で濃縮した。残留物を酢酸エチル中に懸濁させ、水、次いでブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、真空で濃縮した。残留物を、I s c o 8 0 gカラムを用いてフラッシュクロマトグラフィーで精製し、0 - 5 0 % 酢酸エチル / ヘキサンで溶出して、ベンジル4 - アミノベンゾアート4（2 . 9 3 g、1 2 . 8 9 m m o l 、収率8 8 %）を白色の固体物として得た。¹ H N M R (C D C l ₃) 20
7 . 9 1 (d , 2 H) 、7 . 3 0 - 7 . 4 1 (m , 5 H) 、6 . 6 5 (d , 2 H) 、5 . 3 3 (s , 2 H) 、4 . 1 2 (s , 2 H) ；M S (E S I) m / z 2 2 8 (M + H) ⁺ 。

【0 0 5 6】

化合物6 . 2 0 0 m L フラスコに、ベンジル4 - アミノベンゾアート4（3 . 6 g、1 5 . 8 4 m m o l ）、(S) - 2 - (((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ)カルボニル)アミノ) - 5 - ウレイドベンタン酸5（C h e m - I m p e x、5 . 2 5 g、1 3 . 2 0 m m o l ）、H O B t 水和物（A l d r i c h、3 . 0 3 g、1 9 . 8 0 m m o l ）、およびE D C (A C T、3 . 5 4 g、1 8 . 4 8 m m o l ）を充填した。フラスコに窒素をバージし、ジクロロメタン（D C M、2 0 m L）、次いで、D M F (5 m L) を加えた。塩化銅（I I）（A l d r i c h、2 . 1 3 0 g、1 5 . 8 4 m m o l ）を次いで加え、均一な黒褐色の溶液が得られた。室温で4時間攪拌した後、さらにH O B t およびE D C を加えた。室温で一晩攪拌を継続した。反応混合物を真空で濃縮して、残留物を2つのバッチに分け、それぞれをI s c o 1 2 0 gカラムを用いてフラッシュクロマトグラフィーで精製し、0 - 1 0 % メタノール / D C M で溶出した。このようにして得られた生成物を最小量のT H F 中に溶解させ、酢酸エチルで希釈し、飽和重炭酸ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、真空で濃縮した。得られた固体物を酢酸エチルで粉碎し、化合物6（3 . 3 4 g、5 . 5 1 m m o l 、収率4 1 . 7 %）を黄色の固体物として得た。M S (E S I) m / z 6 0 7 (M + H) ⁺ 。

【0 0 5 7】

化合物7 . 化合物6（3 . 3 4 g、5 . 5 1 m m o l ）のT H F (2 0 m L) 中の溶液に、室温で、ピペリジン（2 . 7 3 m L、2 7 . 5 m m o l ）を加えた。室温で6 0 分間攪拌した後、反応混合物を真空で濃縮した。粗製の生成物をI s c o 8 0 gカラムを用いてフラッシュクロマトグラフィーで精製し、0 - 2 0 % メタノール / D C M で溶出して、化合物7（2 . 2 4 g、5 . 8 3 m m o l 、収率1 0 6 %）を白色の固体物として得た。M S (E S I) m / z 3 8 5 (M + H) ⁺ 。

【0 0 5 8】

化合物9 . 5 0 m L フラスコに、化合物7（2 6 8 m g、0 . 6 9 7 m m o l ）、化合物8（T C I、3 5 5 m g、1 . 0 4 6 m m o l ）、およびE D C (A C T、2 0 0 m g、1 . 0 4 6 m m o l ）を充填した。フラスコを窒素でバージし、D C M (5 m L) 、次

10

20

30

40

50

いで、D M F (1 m L) を加えた。室温で1時間攪拌した後、反応を完了し、反応混合物を凝固させた。反応混合物を濃縮して、D C Mを除去し、酢酸エチルで希釈し、飽和重炭酸ナトリウム水溶液、10%塩化リチウム水溶液、および、次いで、再び飽和重炭酸ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を次いで濾過して、沈殿した粗製の化合物9 (4 4 3 m g、0.628 mmol、収率90%) を、白色の固体として得た。M S (E S I) m / z 7 0 6 (M + H) ⁺。

【 0 0 5 9 】

実施例10. 化合物9 (0 . 4 4 g、0 . 6 2 3 mmol) のT H F (5 m L) 中の溶液に、室温で、ピペリジン (A l d r i c h、0 . 3 0 9 m L、3 . 1 2 mmol) を加えた。室温で60分間攪拌した後、反応混合物を凝固させ、さらに5mLのT H Eを加えた。室温でさらに2時間攪拌した後、反応液を真空で濃縮した。残留物を10%メタノール / D C M中に懸濁させ、濾過し、粗製の化合物10 (2 4 5 m g、0 . 5 0 7 mmol 、収率81%)を得た。濾液を真空で濃縮し、残留物をI s c o 4 0 gカラムを用いてフラッシュクロマトグラフィーで精製し、0 - 2 0 %メタノール / D C Mで溶出して、化合物10 (6 4 m g、0 . 1 3 2 mmol 、収率21%)を白色の固体として得た。¹ H N M R (D M S O) 7 . 7 - 8 . 1 (m , 5 H)、7 . 3 0 - 7 . 4 9 (m , 5 H)、5 . 5 8 (s , 1 H)、5 . 3 4 (s , 2 H)、4 . 3 2 (t , 1 H)、3 . 6 1 (s , 1 H)、2 . 9 8 (m , 2 H)、1 . 6 2 - 1 . 9 3 (m , 3 H)、1 . 4 3 (m , 2 H)、0 . 9 2 (d d , 6 H) ; M S (E S I) m / z 4 8 4 (M + H) ⁺。

【 0 0 6 0 】

化合物12. 化合物11 (A l d r i c h、1 . 5 g、5 . 4 1 mmol) のD C M (2 0 m L) 中の溶液に、0 で、D I P E A (A l d r i c h、1 . 8 8 9 m L、1 0 . 8 2 mmol) および、次いで、2 - プロモアセチルクロライド (A l d r i c h、0 . 4 9 5 m L、5 . 9 5 mmol) を加えた。0 で10分間攪拌した後、冷却槽を除去して、攪拌を室温で1時間継続した。反応混合物を飽和重炭酸ナトリウム水溶液で反応を停止させ、D C Mで抽出した。回収した有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、真空で濃縮した。残留物をI s c o 4 0 gカラムを用いて、フラッシュクロマトグラフィーで精製し、0 - 7 0 %酢酸エチル / ヘキサンで溶出して、化合物12 (1 . 1 5 g、2 . 8 9 m mol 、収率53.4%)を橙色の油状物として得た。¹ H N M R (C D C l ₃) 7 . 0 0 (b , 1 H)、3 . 9 1 (s , 2 H)、3 . 5 0 - 3 . 7 1 (m , 1 4 H)、2 . 5 4 (t , 2 H)、1 . 4 6 (s , 9 H)。

【 0 0 6 1 】

化合物13. 化合物10 (3 0 0 m g、0 . 6 2 0 mmol)、化合物12 (2 9 7 m g、0 . 7 4 4 mmol)、ヨウ化カリウム (A l d r i c h、1 0 3 m g、0 . 6 2 0 mmol)、およびD I P E A (A l d r i c h、0 . 2 1 7 m L、1 . 2 4 1 mmol)の、D M F (3 m L) 中の混合物を、4 0 で6時間攪拌した。室温まで冷却した後、反応液を酢酸エチルで希釈し、順次、飽和重炭酸ナトリウム水溶液、10%塩化リチウム溶液、およびブラインで洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、真空で濃縮した。残留物をI s c o r 4 0 gカラムを用いてフラッシュクロマトグラフィーで精製し、0 - 1 0 %メタノール / D C Mで溶出して、化合物13 (3 3 6 m g、0 . 4 2 0 mmol 、収率67.6%)を黄色の油状物として得た。M S (E S I) m / z 8 0 1 (M + H) ⁺。

【 0 0 6 2 】

化合物14. 化合物13 (0 . 3 3 g、0 . 4 1 2 mmol) のジオキサン (5 m L) 中の溶液に、ジオキサン (1 0 m L) 中の4 N H C lを加えた。室温で1時間攪拌した後、反応混合物を真空で濃縮し、粗製の化合物14を無色の粘着性の油状物として得、これをさらに精製を行うことなく、直接用いた。M S (E S I) m / z 7 4 5 (M + H) ⁺。

【 0 0 6 3 】

化合物15 . 5 0 m L フラスコに、化合物14 (3 0 7 m g、0 . 4 1 2 mmol) 、

10

20

30

40

50

tert - ブチル (5 - アミノペンチル) カルバメート (Chem - Impex、100 mg、0.494 mmol) 、および BOP (Chem - Impex、237 mg、0.536 mmol) を加えた。フラスコを窒素でバージして、DMF (2 mL) および DIPSEA (0.180 mL、1.030 mmol) を加えた。室温で 1 時間攪拌した後、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、順次、飽和重炭酸ナトリウム水溶液、10% 塩化リチウム水溶液、および再び、飽和重炭酸ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、真空で濃縮した。残留物を Isco 40 g カラムを用いて、フラッシュクロマトグラフィーで精製し、0 - 10% メタノール / DCM で溶出して、化合物 15 (261 mg、0.281 mmol 、収率 68.2%) を無色の泡状物として得た。MS (ESI) m/z 929 (M + H)⁺。

10

【0064】

化合物 16 . 化合物 15 (261 mg、0.281 mmol) および 10% Pd / C (Aldrich、1.495 mg、0.014 mmol) のメタノール (3 mL) 中の溶液を、水素 (バルーン) 雰囲気下で、2 時間攪拌した。反応容器に窒素を通気し、セライトTM 濾過担体を加えた。混合物をセライトTM 濾過担体の薄いパッドを介して濾過し、メタノールで洗浄した。濾液を濃縮して、粗製の生成物を、Isco 40 g カラムを用いてフラッシュクロマトグラフィーで精製し、0 - 20% メタノール / DCM で溶出した。得られた油状物をアセトニトリル / 水で凍結乾燥し、化合物 16 (206 mg、0.238 mmol 、収率 85%) を白色の固体として得た。¹H NMR (DMSO) δ 8.21 (t , 1H) 、 7.92 (d , 2H) 、 7.80 (t , 1H) 、 7.75 (d , 2H) 、 6.75 (t , 1H) 、 6.03 (t , 1H) 、 5.45 (s , 2H) 、 4.51 (t , 1H) 、 2.81 - 3.65 (m , 25H) 、 2.30 (t , 2H) 、 1.62 - 1.89 (m , 8H) 、 1.35 (s , 9H) 、 1.24 (t , 2H) 、 0.92 (dd , 6H) ; MS (ESI) m/z 839 (M + H)⁺。

20

【0065】

化合物 18 . 化合物 16 (35 mg、0.042 mmol) 、 2 - (3H - [1 , 2 , 3] トリアゾロ [4 , 5 - b] ピリジン - 3 - イル) - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルイソウロニウムヘキサフルオロホスフェート (V) (HATU、Oakwood、12.69 mg、0.033 mmol) の、DMF (1 mL) 中の溶液に、DIPSEA を加えて、pH を 8 以上に調整した。反応混合物を室温で 15 分間攪拌した。これに、化合物 17 (US8,852,599; 19.68 mg、0.042 mmol) を加えた。さらに DIPSEA を加えて、反応混合物の pH を 8 以上に調整した。反応混合物を室温で 30 分間攪拌した。HPLC 解析によって、反応が完了したことが示された。反応混合物を分取 HPLC によって、10 - 65% アセトニトリル / 水 (0.1% TFA を含む、20 mL / 分) を用いて、Phenomenex Gemini 5 μ、C18 150 × 21.2 mm カラムで精製した。目的の生成物を含む画分を合わせて、凍結乾燥して、化合物 18 (21 mg、0.016 mmol 、49.34%) を得た。MS (ESI) m/z 1292 (M + H)⁺。

30

【0066】

アミンドナー (A) . 化合物 18 (21 mg) の DCM (1 mL) 中の溶液に、TFA (1 mL) を加えた。反応混合物を室温で 30 分攪拌し、濃縮して、分取 HPLC によって、10 - 65% アセトニトリル / 水 (0.1% TFA を含む、20 mL / 分) を用いて、Phenomenex Gemini 5 μ、C18 150 × 21.2 mm カラムで精製した。目的の生成物を含む画分を合わせて、凍結乾燥し、アミンドナー (A) (16 mg、0.013 mmol 、81.3%) を得た、¹H NMR (DMSO) δ 11.95 (s , 1H) 、 10.54 (s , 1H) 、 10.18 (s , 1H) 、 8.85 (s , 1H) 、 8.36 (s , 1H) 、 8.31 (s , 1H) 、 7.20 - 8.31 (m , 12H) 、 6.23 (s , 1H) 、 5.48 (s , 1H) 、 3.99 - 4.95 (m , 7H) 、 2.10 - 3.99 (m , 28H) 、 1.28 - 1.85 (m , 8H) 、 0.92 (dd , 6H) ; MS (ESI) m/z 1192 (M + H)⁺。

40

50

【0067】

実施例3-1段階反応によって製造された結合体の活性

図2は、1段階結合反応によって製造された結合体の活性を示す。抗体は、E E Q Y Q S T Y (配列番号：2) C末端伸長部を有する抗体C D 7 0 - b (前記実施例1を参照されたい)であり、薬物はアミンドナーA (前記実施例3を参照されたい)であった。D A Rは3.9であった。S C I Dマウス腫瘍モデルにおける活性は、C D 7 0を発現しているヒト肝臓癌細胞株である7 8 6 - O細胞に対して試験された。線によって示されるように、結合体は腫瘍の増殖の抑制において有効であった。

【0068】

実施例4-2段階反応によって製造された結合体の活性

10

E E Q Y A S T Y (配列番号：1) C末端伸長部を有する抗体C D 7 0 - a (前記実施例1を参照されたい)を、2段階反応を用いて、薬物としてのツブリシン類似体に結合した。適切なツブリシン類似体は、Cheng et al., US 8,394,922 B2 (2013)；およびCong et al., US 2014/0227295 A1 (2014)において記述される。反応性官能基の相補対は、R¹としてアジド、およびR²としてシクロオクチンであった。D A Rは1.8であった。

【0069】

同様に、抗メソテリン抗体6 A 4 (Terrett et al. 2012)をE E Q Y A S T Y (配列番号：1) C末端伸長部によって改変し、次いで、2段階反応によって、同様のツブリシン類似体に結合させ、D A Rが1.6の結合体を得た。

20

【0070】

2つの結合体の有効性を、メソテリンを発現するが、C D 7 0を発現しない、胃癌細胞株であるN 8 7細胞に対して試験した。結果を図3に示す。C D 7 0結合体は、C D 7 0を発現していないため、予想されたように、N 8 7細胞に対する有効性は大きく低下した。

20

【0071】

前記の本発明の詳細な説明は、本発明の特定の部分または実施態様と、主に、または排他的に関係する節を含む。当然のことながら、これは、ある特徴が、開示されている節の他にも関連しうること、および、本明細書の開示が、異なる節で記載される情報の適切な組み合わせをすべて含むことの明瞭化および簡便化のためである。同様に、本明細書の様々な図および記述は、本発明の具体的な実施態様に関連するが、当然のことながら、具体的な特徴が、特定の図または実施態様の文脈において開示される時、このような特徴はまた、適切な範囲で、他の図または実施態様の文脈において、他の特徴との組み合わせにおいて、または一般に本発明においてもまた用いられる。

30

【0072】

さらに、本発明はいくつかの好ましい実施態様の観点において記述されているが、本発明はそれらの好ましい実施態様に限定されない。さらに、本発明の範囲は、付記される特許請求の範囲によって定義される。

【0073】

40

参考文献

第一著書(または発明者)によって簡潔に引用された以下の参考文献、および本明細書よりも早い日付の全ての引用が、以下に示される。これらの参考文献のそれぞれは、あらゆる目的のために参照により本明細書に援用される。

【0074】

B regeon et al., US 2013/0189287 A1 (2013)

【0075】

B regeon, WO 2014/202773 A1 (2014)

【0076】

B regeon et al., WO 2014/202775 A1 (2014)

【0077】

50

- Chen et al., US 2005 / 0136491 A1 (2005)
【0078】
Coccia et al., US 2010 / 0150950 A1 (2010)
【0079】
Dennler et al., Bioconjug. Chem. 2014, 25, 56
9 - 578
【0080】
Fischer et al., WO 2014 / 072482 A1 (2014)
【0081】
Fontana et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 2008, 6
0, 13 - 18
【0082】
Innate Pharma, 「A New Site Specific Antibody Conjugation Using Bacterial Transglutaminase」, ADC Summitにおける発表, San Francisco, California, 2013年10月15日
【0083】
Jeger et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 9
995
【0084】
Kamiya et al., US 2011 / 0184147 A1 (2011)
【0085】
Lin et al., J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 4542 - 4
543
【0086】
Liuet al., US 8,865,875 B2 (2014)
【0087】
Mero et al., Bioconjug. Chem. 2009, 384 - 389
【0088】
Mindt et al., Bioconjug. Chem. 2008, 19, 271 -
278
【0089】
Pons et al., US 2013 / 0230543 A1 (2013)
【0090】
Sato et al., US 6,322,996 B1 (2001)
【0091】
Sato, Adv. Drug Deliv. Rev. 2002, 54, 487 - 504
【0092】
Schibl et al., US 2007 / 0184537 A1 (2007)
【0093】
Schrama et al., Nature Rev. Drug Disc. 2006,
5, 147
【0094】
Strop et al., Chemistry & Biology 2013, 20,
161 - 167
【0095】
Sugimura et al., J. Biotechnol. 2007, 131, 12
1 - 127
【0096】
Terrett et al., US 8,268,970 B2 (2012) 50

【0097】

Zhang et al., U.S. 8,52,599 B2 (2014)

【0098】

配列表

配列番号：1から配列番号：8を含む「SEQT_12452WOPCT.txt」という名前の配列表が、引用によりその全体が本明細書に援用され、これには本明細書で開示される核酸および/またはアミノ酸配列が含まれる。配列表は、EFS-Webを介してASCII-text形式で本明細書と共に提出され、その紙およびコンピューター可読形式の両方を構成する。配列表は、最初に、2015年2月25日に、PatentIn 3.5を用いて作られ、およそ20KBの大きさである。

10

【0099】

以下の表IIにおいて、本出願において開示される配列の記載がまとめられる。

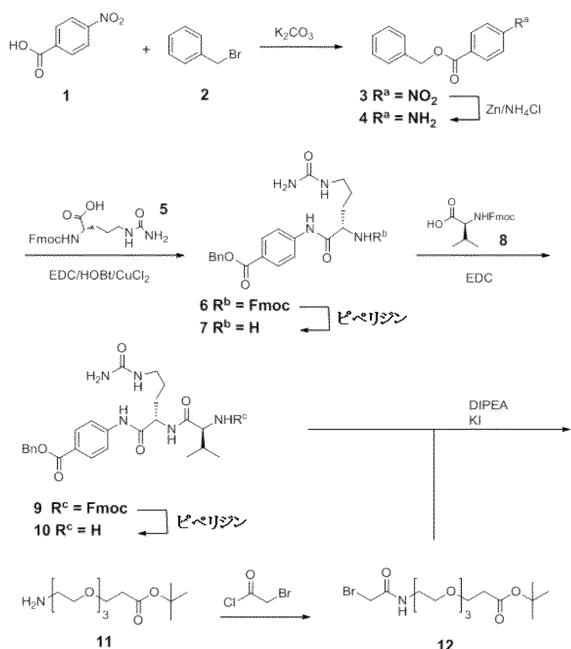
【表2】

表II-配列のまとめ	
配列番号：	配列の記載
1	アミノ酸、C末端伸長部
2	アミノ酸、C末端伸長部
3	アミノ酸、C末端伸長部
4	アミノ酸、IgG1バリアント
5	核酸、改変された重鎖の定常領域
6	アミノ酸、改変された重鎖の定常領域
7	核酸、改変された重鎖の定常領域
8	アミノ酸、改変された重鎖の定常領域

20

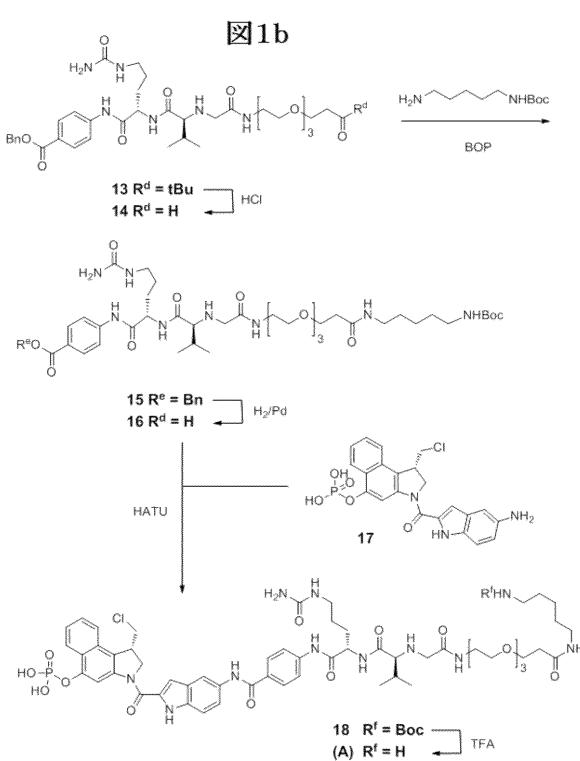
【図1a】

図1a



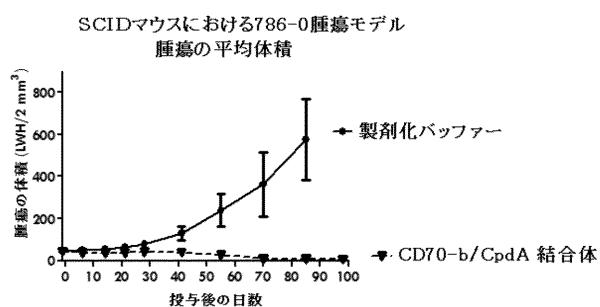
【図1b】

図1b



【図2】

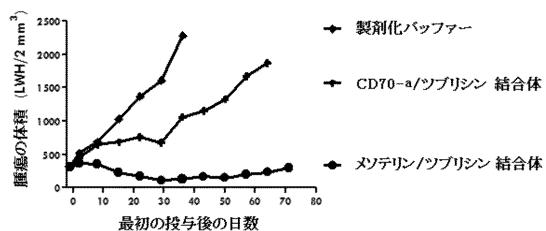
図2



【図3】

図3

N87腫瘍増殖の中央値



【配列表】

2018510864000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2016/020192

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/48 ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data
--

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012/059882 A2 (RINAT NEUROSCIENCE CORP [US]; PFIZER [US]; STROP PAVEL [US]; DORYWALSK) 10 May 2012 (2012-05-10) cited in the application Claims 1, 4 -----	1-17
A	US 2013/323204 A1 (ROSSI EDMUND A [US] ET AL) 5 December 2013 (2013-12-05) claims, figure 1 -----	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
---	--

11 May 2016	25/05/2016
-------------	------------

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer
--	--------------------

Bettio, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/020192

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2012059882	A2 10-05-2012	CA 2813411	A1 10-05-2012	
		EP 2635310	A2 11-09-2013	
		JP 2014500866	A 16-01-2014	
		US 2013230543	A1 05-09-2013	
		WO 2012059882	A2 10-05-2012	
<hr/>				
US 2013323204	A1 05-12-2013	CA 2874541	A1 05-12-2013	
		CN 104363919	A 18-02-2015	
		EP 2854845	A2 08-04-2015	
		US 2013323204	A1 05-12-2013	
		WO 2013181087	A2 05-12-2013	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 5/00 (2006.01)	C 0 7 K 5/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R 0, 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, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, 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, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100162684

弁理士 呉 英燦

(72) 発明者 チェタナ・ラオ - ナイク

アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0 番、ブリストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72) 発明者 シュリカント・デシュパンデ

アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0 番、ブリストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

F ターム(参考) 4B064 AG01 AG26 AG27 AH19 CA19 CA21 CB30 CC24 CD04 CD20
CE11 CE12 DA01
4C076 CC27 CC41 EE41 EE59
4C085 AA25 AA26 CC23 EE01 GG01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA13 BA14 BA15 BA72 CA40
DA50 DA75 DA76 EA20 FA20 FA40 FA70 FA74