



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109789211 A

(43)申请公布日 2019.05.21

(21)申请号 201780062054.2

远藤圣子 藤崎良彦

(22)申请日 2017.10.05

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

(30)优先权数据

代理人 牛蔚然 周莎

2016-199341 2016.10.07 JP

(51)Int.Cl.

2017-097589 2017.05.16 JP

A61K 39/395(2006.01)

2017-172814 2017.09.08 JP

A61K 47/68(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 35/00(2006.01)

2019.04.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/036215 2017.10.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/066626 JA 2018.04.12

(71)申请人 第一三共株式会社

地址 日本东京都

权利要求书5页 说明书52页

(72)发明人 慈幸贵洋 扇谷祐辅 吉原一孝

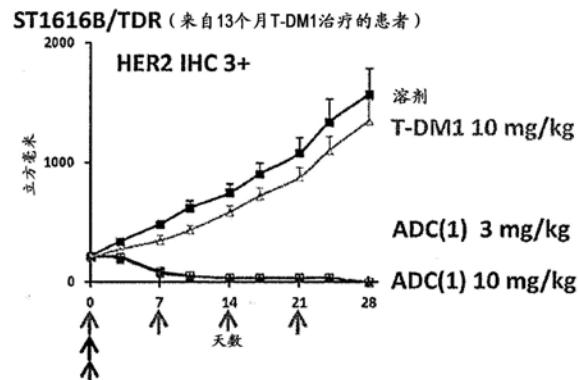
序列表8页 附图7页

(54)发明名称

基于抗HER2抗体-药物偶联物施予的耐性癌的治疗

(57)摘要

作为对于现有的抗HER2药呈耐性或难治性的HER2表达癌的有效治疗,本发明提供使用了式:-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)表示的接头及药物与抗HER2抗体连接而成的抗体-药物偶联物的、对于现有的抗HER2药呈耐性或难治性的HER2表达癌的治疗剂及治疗方法。



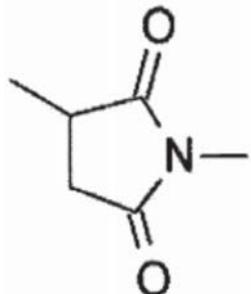
1. 对于现有的抗HER2药呈耐性或难治性的HER2表达癌的治疗剂,其特征在于,所述治疗剂含有下式表示的接头及药物与抗HER2抗体连接而成的抗体-药物偶联物,

- (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

式中,

- (琥珀酰亚胺-3-基-N) -为下式表示的结构,

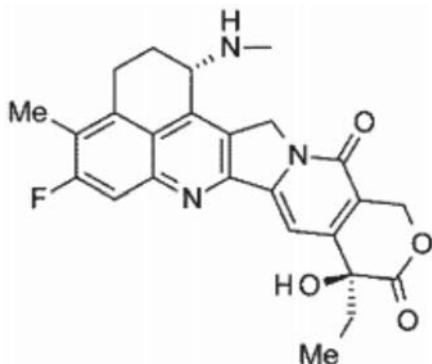
[化学式1]



在该结构的3位通过硫醚键与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接,

- (NH-DX) 表示下式所示的、1位的氨基的氮原子成为连接部位的基团,

[化学式2]



-GGFG-表示-Gly-Gly-Phe-Gly-的四肽残基。

2. 如权利要求1所述的治疗剂,其中,耐性或难治性为由于基于现有的抗HER2药的治疗而获得的耐性或难治性。

3. 如权利要求1所述的治疗剂,其中,耐性或难治性并非来自基于现有的抗HER2药的治疗,而是原本具有的耐性或难治性。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的治疗剂,其中,现有的抗HER2药为选自由曲妥珠单抗-美坦新偶联物、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、及拉帕替尼组成的组中的至少一种。

5. 如权利要求1~3中任一项所述的治疗剂,其中,现有的抗HER2药为曲妥珠单抗-美坦新偶联物。

6. 如权利要求1~3中任一项所述的治疗剂,其中,现有的抗HER2药为曲妥珠单抗。

7. 如权利要求1~6中任一项所述的治疗剂,其用于施予至具有基于现有的抗癌药的治疗史的患者。

8. 如权利要求7所述的治疗剂,其中,现有的抗癌药包含选自由曲妥珠单抗-美坦新偶

联物、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、拉帕替尼、伊立替康、顺铂、卡铂、奥沙利铂、氟尿嘧啶、吉西他滨、卡培他滨、紫杉醇、多西他赛、多柔比星、表柔比星、环磷酰胺、丝裂霉素C、替加氟·吉美嘧啶·奥替拉西复方制剂、西妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、雷莫芦单抗、瑞戈非尼、屈氟尿苷·替吡嘧啶复方制剂、吉非替尼、厄洛替尼、阿法替尼、甲氨蝶呤、及培美曲塞组成的组中的至少一种。

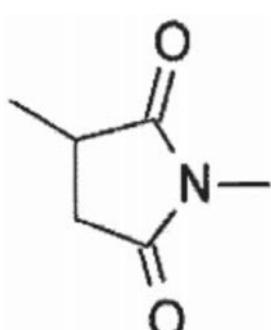
9. 如权利要求7所述的治疗剂,其中,现有的抗癌药包含曲妥珠单抗-美坦新偶联物。
10. 如权利要求7所述的治疗剂,其中,现有的抗癌药包含曲妥珠单抗。
11. 如权利要求7所述的治疗剂,其中,现有的抗癌药包含伊立替康。
12. 如权利要求1~11中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7~8个的范围。
13. 如权利要求1~11中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7.5~8个的范围。
14. 如权利要求1~13中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物中的抗HER2抗体为包含重链及轻链而成的抗体,所述重链包含序列号1中氨基酸编号1~449中记载的氨基酸序列,所述轻链包含序列号2中氨基酸编号1~214中记载的氨基酸序列。
15. 如权利要求1~13中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物中的抗HER2抗体为包含重链及轻链而成的抗体,所述重链包含序列号1中记载的氨基酸序列,所述轻链包含序列号2中记载的氨基酸序列。
16. 如权利要求1~15中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg~8mg/kg的范围。
17. 如权利要求1~15中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg。
18. 如权利要求1~15中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为6.4mg/kg。
19. 如权利要求1~15中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为7.4mg/kg。
20. 如权利要求1~15中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为8mg/kg。
21. 如权利要求1~20中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物以每3周1次的间隔施予。
22. 如权利要求1~21中任一项所述的治疗剂,其用于治疗选自由乳腺癌、胃癌、大肠癌、非小细胞肺癌、食道癌、唾液腺癌、食管胃结合部腺癌、胆管癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、及子宫癌肉瘤组成的组中的至少一种癌。
23. 如权利要求1~21中任一项所述的治疗剂,其用于治疗乳腺癌。
24. 如权利要求1~21中任一项所述的治疗剂,其用于治疗胃癌。
25. 如权利要求1~21中任一项所述的治疗剂,其用于治疗胃癌及食管胃结合部腺癌。
26. 如权利要求1~21中任一项所述的治疗剂,其用于治疗大肠癌。
27. 如权利要求1~21中任一项所述的治疗剂,其用于治疗非小细胞肺癌。
28. 如权利要求1~21中任一项所述的治疗剂,其用于治疗唾液腺癌。

29. 如权利要求1~28中任一项所述的治疗剂,其中,HER2表达癌为HER2过量表达的癌。
30. 如权利要求29所述的治疗剂,其中,HER2过量表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为3+的癌。
31. 如权利要求29所述的治疗剂,其中,HER2过量表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为2+、且通过原位杂交法判定HER2的表达为阳性的癌。
32. 如权利要求1~28中任一项所述的治疗剂,其中,HER2表达癌为HER2低表达的癌。
33. 如权利要求32所述的治疗剂,其中,HER2低表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为2+、且通过原位杂交法判定HER2的表达为阴性的癌。
34. 如权利要求32所述的治疗剂,其中,HER2低表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为1+的癌。
35. 如权利要求1~34所述的治疗剂,其用于治疗无法进行手术或复发的癌。
36. 如权利要求1~35所述的治疗剂,其含有药学上允许的制剂成分。
37. 治疗对于现有的抗HER2药呈耐性或难治性的HER2表达癌的方法,其中,将下式表示的接头及药物与抗HER2抗体连接而成的抗体-药物偶联物施予至需要治疗对于现有的抗HER2药呈耐性或难治性的HER2表达癌的患者,
- (琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

式中,

-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-为下式表示的结构,

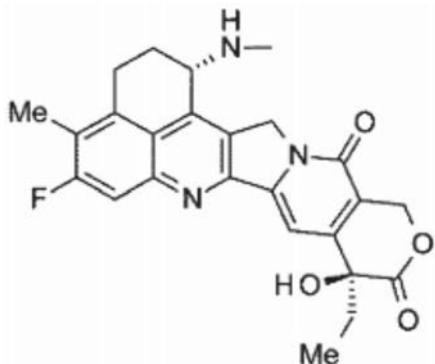
[化学式3]



在该结构的3位通过硫醚键与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接,

-(NH-DX)表示下式所示的、1位的氨基的氮原子成为连接部位的基团,

[化学式4]



-GGFG-表示-Gly-Gly-Phe-Gly-的四肽残基。

38. 如权利要求37所述的方法,其中,耐性或难治性为由于基于现有的抗HER2药的治疗而获得的耐性或难治性。

39. 如权利要求37所述的方法,其中,耐性或难治性并非来自基于现有的抗HER2药的治疗,而是原本具有的耐性或难治性。

40. 如权利要求37~39中任一项所述的方法,其中,现有的抗HER2药为选自由曲妥珠单抗-美坦新偶联物、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、及拉帕替尼组成的组中的至少一种。

41. 如权利要求37~39中任一项所述的方法,其中,现有的抗HER2药为曲妥珠单抗-美坦新偶联物。

42. 如权利要求37~39中任一项所述的方法,其中,现有的抗HER2药为曲妥珠单抗。

43. 如权利要求37~42中任一项所述的方法,其用于对具有基于现有的抗癌药的治疗史的患者施行。

44. 如权利要求43所述的方法,其中,现有的抗癌药包含选自由曲妥珠单抗-美坦新偶联物、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、拉帕替尼、伊立替康、顺铂、卡铂、奥沙利铂、氟尿嘧啶、吉西他滨、卡培他滨、紫杉醇、多西他赛、多柔比星、表柔比星、环磷酰胺、丝裂霉素C、替加氟·吉美嘧啶·奥替拉西复方制剂、西妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、雷莫芦单抗、瑞戈非尼、屈氟尿苷·替吡嘧啶复方制剂、吉非替尼、厄洛替尼、阿法替尼、甲氨蝶呤、及培美曲塞组成的组中的至少一种。

45. 如权利要求43所述的方法,其中,现有的抗癌药包含曲妥珠单抗-美坦新偶联物。

46. 如权利要求43所述的方法,其中,现有的抗癌药包含曲妥珠单抗。

47. 如权利要求43所述的方法,其中,现有的抗癌药包含伊立替康。

48. 如权利要求37~47中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7~8个的范围。

49. 如权利要求37~47中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7.5~8个的范围。

50. 如权利要求37~49中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物中的抗HER2抗体为包含重链及轻链而成的抗体,所述重链包含序列号1中氨基酸编号1~449中记载的氨基酸序列,所述轻链包含序列号2中氨基酸编号1~214中记载的氨基酸序列。

51. 如权利要求37~49中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物中的抗HER2抗体为包含重链及轻链而成的抗体,所述重链包含序列号1中记载的氨基酸序列,所述轻链包含序列号2中记载的氨基酸序列。

52. 如权利要求37~51中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg~8mg/kg的范围。

53. 如权利要求37~51中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg。

54. 如权利要求37~51中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为6.4mg/kg。

55. 如权利要求37~51中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为7.4mg/kg。

56. 如权利要求37～51中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为8mg/kg。

57. 如权利要求37～56中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物以每3周1次的间隔施予。

58. 如权利要求37～57中任一项所述的方法,其用于治疗选自由乳腺癌、胃癌、大肠癌、非小细胞肺癌、食道癌、唾液腺癌、食管胃结合部腺癌、胆管癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、及子宫癌肉瘤组成的组中的至少一种癌。

59. 如权利要求37～57中任一项所述的方法,其用于治疗乳腺癌。

60. 如权利要求37～57中任一项所述的方法,其用于治疗胃癌。

61. 如权利要求37～57中任一项所述的方法,其用于治疗胃癌及食管胃结合部腺癌。

62. 如权利要求37～57中任一项所述的方法,其用于治疗大肠癌。

63. 如权利要求37～57中任一项所述的方法,其用于治疗非小细胞肺癌。

64. 如权利要求37～57中任一项所述的方法,其用于治疗唾液腺癌。

65. 如权利要求37～64中任一项所述的方法,其中,HER2表达癌为HER2过量表达的癌。

66. 如权利要求65所述的方法,其中,HER2过量表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为3+的癌。

67. 如权利要求65所述的方法,其中,HER2过量表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为2+、且通过原位杂交法判定HER2的表达为阳性的癌。

68. 如权利要求37～64中任一项所述的方法,其中,HER2表达癌为HER2低表达的癌。

69. 如权利要求68所述的方法,其中,HER2低表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为2+、且通过原位杂交法判定HER2的表达为阴性的癌。

70. 如权利要求68所述的方法,其中,HER2低表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为1+的癌。

71. 如权利要求37～70所述的方法,其用于治疗无法进行手术或复发的癌。

72. 如权利要求37～71所述的方法,其中,将抗体-药物偶联物与药学上允许的制剂成分一同施予。

基于抗HER2抗体-药物偶联物施予的耐性癌的治疗

技术领域

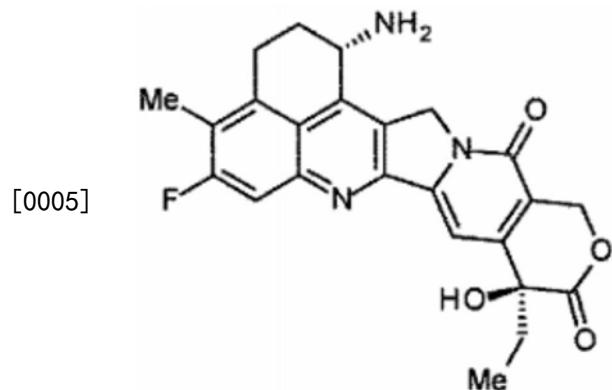
[0001] 本发明涉及耐药性癌症(以下,仅记载为“耐性癌”)、尤其是获得性耐性癌的治疗,所述治疗基于介由接头结构使抗HER2抗体与依沙替康连接而成的抗体-药物偶联物。

背景技术

[0002] 使具有细胞毒性的药物连接至与在癌细胞表面表达、并且能内化至细胞的抗原结合的抗体而成的抗体-药物偶联物(Antibody-Drug Conjugate; ADC)能够选择性地向癌细胞输送药物,由此可期待其使药物在癌细胞内蓄积,从而杀死癌细胞(非专利文献1~3)。作为ADC,例如,使卡奇霉素(calicheamicin)与抗CD33抗体连接而成的Mylotarg(注册商标;INN:吉妥单抗)已作为急性髓细胞性白血病的治疗药获得承认。另外,使耳他汀E与抗CD30抗体连接而成的Adcetris(注册商标;INN:Brentuximab vedotin)已作为霍奇金淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤(anaplastic large cell lymphoma)的治疗药获得承认(非专利文献4)。此外,将作为抗肿瘤性药物的Maytansinoid(DM1)介由接头结构与作为抗HER2抗体的曲妥珠单抗连接而成的Kadcyla(注册商标;T-DM1;INN:曲妥珠单抗-美坦新偶联物(trastuzumab emtansine);非专利文献34)也已获得承认。迄今为止被承认的ADC中含有的药物以DNA或微管蛋白为靶标。

[0003] 作为抗肿瘤性的低分子化合物,已知有作为抑制拓扑异构酶I而呈现抗肿瘤作用的化合物的喜树碱衍生物。其中,下式:

[0004] [化学式1]



[0006] 表示的抗肿瘤性化合物(依沙替康,IUPAC名:(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-1,2,3,9,12,15-六氢-9-羟基-4-甲基-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮,化学名:(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-2,3-二氢-9-羟基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮))是水溶性的喜树碱衍生物(专利文献1、2)。该化合物与目前临床中使用的伊立替康不同,其呈现抗肿瘤效果无需酶的活化。另外,观察到比作为伊立替康的药效主体的SN-38、同样在临床中使用的拓扑替康更强的拓扑异构酶I抑制活性,在体外确认了针对多种癌细胞的更强的细胞杀伤活性。尤其针对基于P-糖蛋白的表达而对SN-38等呈现耐性的癌细胞也确认了效果。另外,在小鼠的人肿瘤皮下移植模型中,也显示出强抗肿瘤效果,虽然进行了临床试验,但仍

未上市(非专利文献5~10)。尚不清楚依沙替康是否作为ADC的药物有效地发挥作用。

[0007] DE-310是将依沙替康介由GGFG肽间隔物(spacer)与生物分解性的羧甲基葡聚糖多元醇聚合物连接而成的复合体(专利文献3)。通过将依沙替康制成高分子前药,从而保持较高血中滞留性,进而利用肿瘤新生血管的透过性的亢进和肿瘤组织滞留性来被动性地提高朝向肿瘤部位的指向性。通过利用酶对DE-310的肽间隔物进行切割,使得作为活性主体的依沙替康、及在氨基连接有甘氨酸的依沙替康持续地游离,结果,药物动力学得以改善。在非临床试验中的各种肿瘤的评价模型中,对于DE-310而言,尽管其中包含的依沙替康的总量少于施予依沙替康单一药剂时的量,仍显示出比施予单一药剂时更高的有效性。已对DE-310实施了临床试验并确认到有效例,有报道称确认到活性主体相较于正常组织而言更多地蓄积于肿瘤。另一方面,也有报道称DE-310及活性主体在肿瘤中的蓄积与在正常组织中的蓄积并无较大差异,并未在人中观察到被动靶向(非专利文献11~14)。结果,DE-310也未能上市,尚不清楚依沙替康作为这种指向靶标的药物是否能有效发挥功能。

[0008] 作为DE-310的相关化合物,还已知将-NH- $(\text{CH}_2)_4\text{C}(=\text{O})-$ 表示的结构部分插入-GGFG-间隔物与依沙替康之间、以-GGFG-NH- $(\text{CH}_2)_4\text{C}(=\text{O})-$ 作为间隔物结构的复合体(专利文献4),但完全不清楚该复合体的抗肿瘤效果。

[0009] HER2是被鉴定为人表皮生长因子受体2型相关癌基因的代表性生长因子受体型的癌基因产物之一,是分子量为185kDa的具有酪氨酸激酶结构域的跨膜受体蛋白(非专利文献15)。HER2的DNA序列及氨基酸序列已在公共数据库上公开,例如,可参考M11730(Genbank)、NP_004439.2(NCBI)等登录号。

[0010] 已知HER2(neu,ErbB-2)是EGFR(epidermal growth factor receptor:表皮生长因子受体)家族中一员,通过形成同源二聚体或与作为其他EGFR受体的HER1(EGFR,ErbB-1)、HER3(ErbB-3)、HER4(ErbB-4)形成异源二聚体(非专利文献16~18),使细胞内酪氨酸残基发生自磷酸化从而活化,由此,在正常细胞及癌细胞中对细胞的增殖·分化·存活发挥重要的作用(非专利文献19、20)。报道了HER2在乳腺癌、胃癌、卵巢癌等多种癌症中过量表达(非专利文献21~26),在乳腺癌中是消极的预后因素(非专利文献27、28)。

[0011] 曲妥珠单抗是被称为重组人源化抗HER2单克隆抗体(huMAb4D5-8,rhuMAb HER2,赫赛汀(注册商标))的、小鼠抗HER2抗体4D5(非专利文献29、专利文献5)的人源化抗体(专利文献6)。曲妥珠单抗与HER2的胞外结构域IV特异性结合,介由诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抑制基于HER2的信号传导而发挥抗癌效果(非专利文献30、31)。曲妥珠单抗对于过量表达HER2的肿瘤显示高的效果(非专利文献32),因此,已作为过量表达HER2的转移性乳腺癌患者的治疗药在美国于1999年上市,在日本于2001年上市。

[0012] 曲妥珠单抗对乳腺癌的治疗效果已得到充分证明(非专利文献33),另一方面,据报道,在接受了大范围的现有抗癌治疗的过量表达HER2的乳腺癌患者中,约15%对于曲妥珠单抗有应答,该群体中约85%的患者对于曲妥珠单抗处置无应答或仅有微弱应答。

[0013] 因此,用于对于曲妥珠单抗无应答或应答微弱、罹患过量表达HER2的肿瘤或与HER2表达相关的障碍的患者的、以与HER2表达相关的疾病作为靶标的治疗药的必需性已得到了认知,并开发了将抗肿瘤性药物介由接头结构与曲妥珠单抗连接而成的T-DM1;以HER2的胞外结构域II为靶标、为了抑制异源二聚体形成而设计的帕妥珠单抗(PERJETA(注册商标);非专利文献35、专利文献7)。然而,应答性、活性的强度、以及适应范围仍不充分,以

HER2为靶标需求尚未被满足。

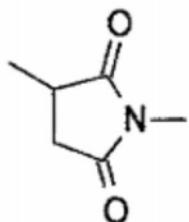
[0014] 作为抗体-药物偶联物,已知有以抗HER2抗体和依沙替康作为构成要素的抗体-药物偶联物,尤其明确了以下结构的抗体-药物偶联物具有优异的特性(专利文献8)。即,为下式表示的接头及药物与抗HER2抗体连接而成的抗体-药物偶联物。

[0015] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

[0016] (式中,

[0017] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-为下式表示的结构,

[0018] [化学式2]

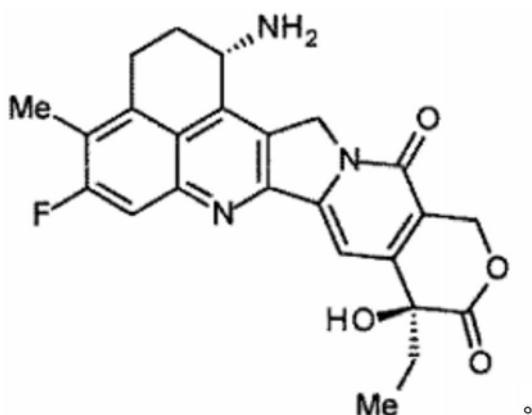


[0019] 在该结构的3位通过硫醚键与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接,

[0020] -(NH-DX)表示下式所示的、1位的氨基的氮原子成为连接部位的基团,

[0021] [化学式3]

[0022]



[0023] 上述的抗HER2抗体-药物偶联物相对于抗HER2抗体1分子而言连接有下式表示的药物-接头结构:

[0024] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)。就该药物-接头结构而言,在抗体的链间的二硫键部位(2处重链-重链间、及2处重链-轻链间)介由硫醚键可最多连接8个。已获得了连接有接近该最大数、约8个药物-接头结构的抗HER2抗体-药物偶联物。表明这样的每1分子抗体的药物连接数多的抗体-药物偶联物可发挥非常优异的抗癌作用。例如,在使用荷瘤小鼠的临床前研究中,确认了即使癌细胞中HER2的表达为低表达,仍然具有细胞杀伤活性(专利文献8、非专利文献36)。这样一来,上述的抗HER2抗体-药物偶联物有望成为优异的抗癌药,正在开展临床试验。

[0025] 现有技术文献

[0026] 专利文献

[0027] 专利文献1:日本特开平5-59061号公报

[0028] 专利文献2:日本特开平8-337584号公报

- [0029] 专利文献3:国际公开第1997/46260号公报
- [0030] 专利文献4:国际公开第2000/25825号公报
- [0031] 专利文献5:美国专利第5677171号说明书
- [0032] 专利文献6:美国专利第5821337号说明书
- [0033] 专利文献7:国际公开第01/00244号公报
- [0034] 专利文献8:国际公开第2015/115091号公报
- [0035] 非专利文献
- [0036] 非专利文献1:Ducry,L.等,Bioconjugate Chem. (2010) 21,5-13.
- [0037] 非专利文献2:Alley,S.C.等,Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.
- [0038] 非专利文献3:Damle N.K.Expert Opin.Biol.Ther. (2004) 4,1445-1452.
- [0039] 非专利文献4:Senter P.D.等,Nature Biotechnology (2012) 30,631-637.
- [0040] 非专利文献5:Kumazawa,E.,Tohgo,A.,Exp.Opin.Invest.Drugs (1998) 7,625-632.
- [0041] 非专利文献6:Mitsui,I.等,Jpn J.Cancer Res. (1995) 86,776-786.
- [0042] 非专利文献7:Takiguchi,S.等,Jpn J.Cancer Res. (1997) 88,760-769.
- [0043] 非专利文献8:Joto,N.等,Int J Cancer (1997) 72,680-686.
- [0044] 非专利文献9:Kumazawa,E.等,Cancer Chemother.Pharmacol. (1998) 42,210-220.
- [0045] 非专利文献10:De Jager,R.等,Ann N Y Acad Sci (2000) 922,260-273.
- [0046] 非专利文献11:Inoue,K.等,Polymer Drugs in the Clinical Stage,Edited by Maeda et al. (2003) 145-153.
- [0047] 非专利文献12:Kumazawa,E.等,Cancer Sci (2004) 95,168-175.
- [0048] 非专利文献13:Soopenberg,O.等,Clinical Cancer Research, (2005) 11,703-711.
- [0049] 非专利文献14:Wente M.N.等,Investigational New Drugs (2005) 23,339-347.
- [0050] 非专利文献15:Coussens L等,Science.1985;230 (4730) :1132-1139.
- [0051] 非专利文献16:Graus-Porta G等,EMBO J.1997;16:1647-1655.
- [0052] 非专利文献17:Karnagaran D等,EMBO J.1996;15:254-264.
- [0053] 非专利文献18:Sliwkowski MX等,J Biom Chem.1994;269:14661-14665.
- [0054] 非专利文献19:Di Fore PP等,Science.1987;237:178-182.
- [0055] 非专利文献20:Hudziak RM等,Proc Natl Acad Sci U S A.1987;84:7159-7163.
- [0056] 非专利文献21:Hardwick R等,Eur.J Surg Oncol.1997 (23) :30-35.
- [0057] 非专利文献22:Korkaya H等,Oncogene.2008;27 (47) :6120-6130.
- [0058] 非专利文献23:Yano T等,Oncol Rep.2006;15 (1) :65-71.
- [0059] 非专利文献24:Slamon DJ等,Science.1987;235:177-182.
- [0060] 非专利文献25:Gravalos C等,Ann Oncol 19:1523-1529,2008.
- [0061] 非专利文献26:Fukushige S等,Mol Cell Biol 6:955-958,1986.
- [0062] 非专利文献27:Slamon DJ等,Science.1989;244:707-712.

- [0063] 非专利文献28:Kaptain S等,Diagn Mol Pathol 10:139-152,2001.
- [0064] 非专利文献29:Fendly.等,Cancer Research 1990 (50) :1550-1558.
- [0065] 非专利文献30:Sliwkowski MX等,Semin Oncol.1999;26 (4, Suppl 12) :60-70.
- [0066] 非专利文献31:Hudis CA等,N Engl J Med.357:39-51,2007.
- [0067] 非专利文献32:Vogel CL等,J Clin Oncol.2002;20 (3) :719-726.
- [0068] 非专利文献33:Baselga等,J.Clin.Oncol.14:737-744 (1996) .
- [0069] 非专利文献34:Howard A.等,J Clin Oncol 29:398-405.
- [0070] 非专利文献35:Adams CW等,Cancer Immunol Immunother.2006;6:717-727.
- [0071] 非专利文献36:Ogitani Y.等,Clinical Cancer Research,2016,Oct15;22 (20) :5097-5108, Epub 2016Mar 29.

发明内容

[0072] 发明要解决的课题

[0073] 在为了治疗而持续施予抗癌药时,即使暂时确认到效果、也会由于癌细胞的获得性耐药(以下,在本发明中也称为“继发性耐药(secondary tolerance)”)而失去治疗效果的情况是已知的。例如,已知在HER2表达癌中,使用曲妥珠单抗-美坦新偶联物进行治疗,结果新发生了对于曲妥珠单抗-美坦新偶联物的耐性或难治性的癌。因此,期望能够提供对于这样的获得耐性的癌(以下,在本发明中也称为“继发性耐药癌”)而言有效的新型治疗方法的药剂。本发明的主要课题在于提供即使是由于基于现有的抗HER2药的治疗而获得了耐性或难治性的HER2表达癌、仍然能确认到充分的治疗效果的治疗剂及治疗方法。

[0074] 另外,无论HER2是否表达、最初起即未确认到现有抗HER2药的治疗效果的癌症(换言之,并非起因于基于现有抗HER2药的治疗、而是原本就对于现有抗HER2药具有耐性或难治性的HER2表达癌)是已知的。作为这样的HER2表达癌,可列举HER2低表达的癌、除乳腺癌及胃癌以外的实体癌(例如,大肠癌、非小细胞肺癌等)。本发明的主要课题还在于提供即使是这样的HER2表达癌、仍然能确认到充分的治疗效果的治疗剂及治疗方法。

[0075] 用于解决课题的手段

[0076] 本发明者在临床前试验及临床试验中发现,下式表示的接头及药物与抗HER2抗体连接而成的抗体-药物偶联物:-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)针对对于现有的抗HER2药呈耐性或难治性的HER2表达癌显示出优异的抗肿瘤效果,且安全性也优异。利用该抗体-药物偶联物,即使是继发性耐药癌也可期待有效的治疗。

[0077] 即,本发明提供以下的[1]~[144]。

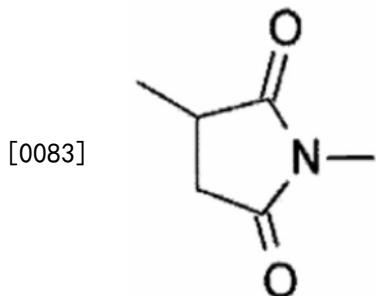
[0078] [1]对于现有的抗HER2药呈耐性或难治性的HER2表达癌的治疗剂,其特征在于,所述治疗剂含有下式表示的接头及药物与抗HER2抗体连接的抗体-药物偶联物,

[0079] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)。

[0080] (式中,

[0081] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-为下式表示的结构,

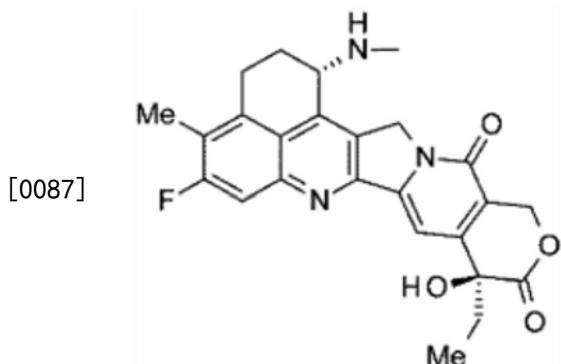
[0082] [化学式4]



[0084] 在该结构的3位通过硫醚键与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接,

[0085] - (NH-DX) 表示下式所示的、1位的氨基的氮原子成为连接部位的基团,

[0086] [化学式5]



[0088] -GGFG-表示-Gly-Gly-Phe-Gly-的四肽残基。)

[0089] [2]如[1]所述的治疗剂,其中,耐性或难治性为由于基于现有的抗HER2药的治疗而获得的耐性或难治性。

[0090] [3]如[1]所述的治疗剂,其中,耐性或难治性并非来自基于现有的抗HER2药的治疗,而是原本具有的耐性或难治性。

[0091] [4]如[1]～[3]中任一项所述的治疗剂,其中,现有的抗HER2药为选自由曲妥珠单抗-美坦新偶联物、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、及拉帕替尼组成的组中的至少一种。

[0092] [5]如[1]～[3]中任一项所述的治疗剂,其中,现有的抗HER2药为曲妥珠单抗-美坦新偶联物。

[0093] [6]如[1]～[3]中任一项所述的治疗剂,其中,现有的抗HER2药为曲妥珠单抗。

[0094] [7]如[1]～[6]中任一项所述的治疗剂,其用于施予至具有基于现有的抗癌药的治疗史的患者。

[0095] [8]如[7]所述的治疗剂,其中,现有的抗癌药包含选自由曲妥珠单抗-美坦新偶联物、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、拉帕替尼、伊立替康、顺铂、卡铂、奥沙利铂、氟尿嘧啶、吉西他滨、卡培他滨、紫杉醇、多西他赛、多柔比星、表柔比星、环磷酰胺、丝裂霉素C、替加氟・吉美嘧啶・奥替拉西复方制剂、西妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、雷莫芦单抗、瑞戈非尼、屈氟尿苷・替吡嘧啶复方制剂、吉非替尼、厄洛替尼、阿法替尼、甲氨蝶呤、及培美曲塞组成的组中的至少一种。

[0096] [9]如[7]所述的治疗剂,其中,现有的抗癌药包含曲妥珠单抗-美坦新偶联物。

[0097] [10]如[7]所述的治疗剂,其中,现有的抗癌药包含曲妥珠单抗。

- [0098] [11]如[7]所述的治疗剂,其中,现有的抗癌药包含伊立替康。
- [0099] [12]如[1]～[11]中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7～8个的范围。
- [0100] [13]如[1]～[11]中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7.5～8个的范围。
- [0101] [14]如[1]～[13]中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物中的抗HER2抗体为包含重链及轻链而成的抗体,所述重链包含序列号1中氨基酸编号1～449中记载的氨基酸序列,所述轻链包含序列号2中氨基酸编号1～214中记载的氨基酸序列。
- [0102] [15]如[1]～[13]中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物中的抗HER2抗体为包含重链及轻链而成的抗体,所述重链包含序列号1中记载的氨基酸序列,所述轻链包含序列号2中记载的氨基酸序列。
- [0103] [16]如[1]～[15]中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg～8mg/kg的范围。
- [0104] [17]如[1]～[15]中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg。
- [0105] [18]如[1]～[15]中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为6.4mg/kg。
- [0106] [19]如[1]～[15]中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为7.4mg/kg。
- [0107] [20]如[1]～[15]中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为8mg/kg。
- [0108] [21]如[1]～[20]中任一项所述的治疗剂,其中,抗体-药物偶联物以每3周1次的间隔施予。
- [0109] [22]如[1]～[21]中任一项所述的治疗剂,其中,用于治疗选自由乳腺癌、胃癌、大肠癌、非小细胞肺癌、食道癌、唾液腺癌、食管胃结合部腺癌、胆管癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、及子宫癌肉瘤组成的组中的至少一种癌。
- [0110] [23]如[1]～[21]中任一项所述的治疗剂,其用于治疗乳腺癌。
- [0111] [24]如[1]～[21]中任一项所述的治疗剂,其用于治疗胃癌。
- [0112] [25]如[1]～[21]中任一项所述的治疗剂,其用于治疗胃癌及食管胃结合部腺癌。
- [0113] [26]如[1]～[21]中任一项所述的治疗剂,其用于治疗大肠癌。
- [0114] [27]如[1]～[21]中任一项所述的治疗剂,其用于治疗非小细胞肺癌。
- [0115] [28]如[1]～[21]中任一项所述的治疗剂,其用于治疗唾液腺癌。
- [0116] [29]如[1]～[28]中任一项所述的治疗剂,其中,HER2表达癌为HER2过量表达的癌。
- [0117] [30]如[29]所述的治疗剂,其中,HER2过量表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为3+的癌。
- [0118] [31]如[29]所述的治疗剂,其中,HER2过量表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为2+、且通过原位(*in situ*)杂交法判定HER2的表达为阳性的癌。
- [0119] [32]如[1]～[28]中任一项所述的治疗剂,其中,HER2表达癌为HER2低表达的癌。

[0120] [33]如[32]所述的治疗剂,其中,HER2低表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为2+、且通过原位杂交法判定HER2的表达为阴性的癌。

[0121] [34]如[32]所述的治疗剂,其中,HER2低表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为1+的癌。

[0122] [35]如[1]~[34]所述的治疗剂,其用于治疗无法进行手术或复发的癌。

[0123] [36]如[1]~[35]所述的治疗剂,其含有药学上允许的制剂成分。

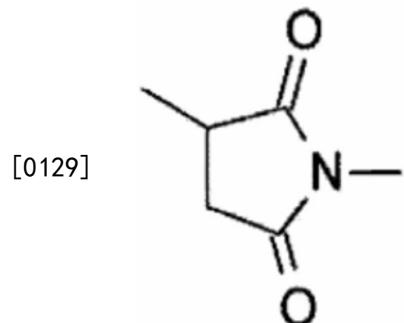
[0124] [37]治疗对于现有的抗HER2药呈耐性或难治性的HER2表达癌的方法,其中,将下式表示的接头及药物与抗HER2抗体连接而成的抗体-药物偶联物施予至需要治疗对于现有的抗HER2药呈耐性或难治性的HER2表达癌的患者,

[0125] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)。

[0126] (式中,

[0127] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-为下式表示的结构,

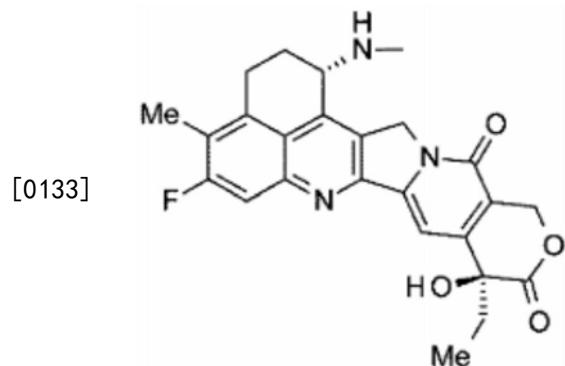
[0128] [化学式6]



[0130] 在该结构的3位通过硫醚键与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接,

[0131] -(NH-DX)表示下式所示的、1位的氨基的氮原子成为连接部位的基团,

[0132] [化学式7]



[0134] -GGFG-表示-Gly-Gly-Phe-Gly-的四肽残基。)

[0135] [38]如[37]所述的方法,其中,耐性或难治性为基于现有的抗HER2药的治疗所获得的耐性或难治性。

[0136] [39]如[37]所述的方法,其中,耐性或难治性并非来自基于现有的抗HER2药的治疗,而是原本具有的耐性或难治性。

[0137] [40]如[37]~[39]中任一项所述的方法,其中,现有的抗HER2药为选自由曲妥珠

单抗-美坦新偶联物、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、及拉帕替尼组成的组中的至少一种。

[0138] [41]如[37]～[39]中任一项所述的方法,其中,现有的抗HER2药为曲妥珠单抗-美坦新偶联物。

[0139] [42]如[37]～[39]中任一项所述的方法,其中,现有的抗HER2药为曲妥珠单抗。

[0140] [43]如[37]～[42]中任一项所述的方法,其用于对具有基于现有的抗癌药的治疗史的患者施行。

[0141] [44]如[43]所述的方法,其中,现有的抗癌药包含选自由曲妥珠单抗-美坦新偶联物、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、拉帕替尼、伊立替康、顺铂、卡铂、奥沙利铂、氟尿嘧啶、吉西他滨、卡培他滨、紫杉醇、多西他赛、多柔比星、表柔比星、环磷酰胺、丝裂霉素C、替加氟·吉美嘧啶·奥替拉西复方制剂、西妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、雷莫芦单抗、瑞戈非尼、屈氟尿苷·替吡嘧啶复方制剂、吉非替尼、厄洛替尼、阿法替尼、甲氨蝶呤、及培美曲塞组成的组中的至少一种。

[0142] [45]如[43]所述的方法,其中,现有的抗癌药包含曲妥珠单抗-美坦新偶联物。

[0143] [46]如[43]所述的方法,其中,现有的抗癌药包含曲妥珠单抗。

[0144] [47]如[43]所述的方法,其中,现有的抗癌药包含伊立替康。

[0145] [48]如[37]～[47]中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7～8个的范围。

[0146] [49]如[37]～[47]中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7.5～8个的范围。

[0147] [50]如[37]～[49]中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物中的抗HER2抗体为包含重链及轻链而成的抗体,所述重链包含序列号1中氨基酸编号1～449中记载的氨基酸序列,所述轻链包含序列号2中氨基酸编号1～214中记载的氨基酸序列。

[0148] [51]如[37]～[49]中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物中的抗HER2抗体为包含重链及轻链而成的抗体,所述重链包含序列号1中记载的氨基酸序列,所述轻链包含序列号2中记载的氨基酸序列。

[0149] [52]如[37]～[51]中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg～8mg/kg的范围。

[0150] [53]如[37]～[51]中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg。

[0151] [54]如[37]～[51]中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为6.4mg/kg。

[0152] [55]如[37]～[51]中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为7.4mg/kg。

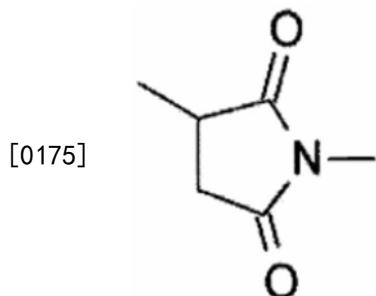
[0153] [56]如[37]～[51]中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为8mg/kg。

[0154] [57]如[37]～[56]中任一项所述的方法,其中,抗体-药物偶联物以每3周1次的间隔施予。

[0155] [58]如[37]～[57]中任一项所述的方法,其用于治疗选自由乳腺癌、胃癌、大肠癌、非小细胞肺癌、食道癌、唾液腺癌、食管胃结合部腺癌、胆管癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢

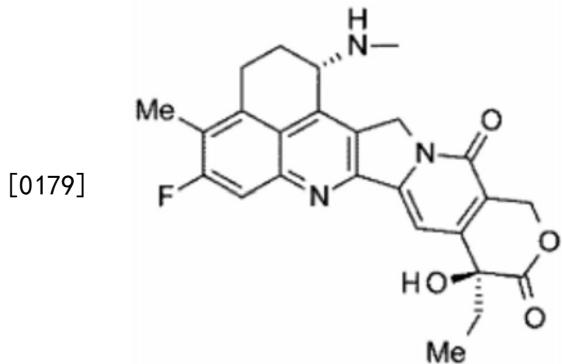
癌、及子宫癌肉瘤组成的组中的至少一种癌。

- [0156] [59]如[37]～[57]中任一项所述的方法,其用于治疗乳腺癌。
- [0157] [60]如[37]～[57]中任一项所述的方法,其用于治疗胃癌。
- [0158] [61]如[37]～[57]中任一项所述的方法,其用于治疗胃癌及食管胃结合部腺癌。
- [0159] [62]如[37]～[57]中任一项所述的方法,其用于治疗大肠癌。
- [0160] [63]如[37]～[57]中任一项所述的方法,其用于治疗非小细胞肺癌。
- [0161] [64]如[37]～[57]中任一项所述的方法,其用于治疗唾液腺癌。
- [0162] [65]如[37]～[64]中任一项所述的方法,其中,HER2表达癌为HER2过量表达的癌。
- [0163] [66]如权利要求65所述的方法,其中,HER2过量表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为3+的癌。
- [0164] [67]如权利要求65所述的方法,其中,HER2过量表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为2+、且通过原位杂交法判定HER2的表达为阳性的癌。
- [0165] [68]如[37]～[64]中任一项所述的方法,其中,HER2表达癌为HER2低表达的癌。
- [0166] [69]如权利要求68所述的方法,其中,HER2低表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为2+、且通过原位杂交法判定HER2的表达为阴性的癌。
- [0167] [70]如权利要求68所述的方法,其中,HER2低表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为1+的癌。
- [0168] [71]如[37]～[70]所述的方法,其用于治疗无法进行手术或复发的癌。
- [0169] [72]如[37]～[71]所述的方法,其中,将抗体-药物偶联物与药学上允许的制剂成分一同施予。
- [0170] [73]下式表示的接头及药物与抗HER2抗体连接而成的抗体-药物偶联物,其用于作为对于现有的抗HER2药呈耐性或难治性的HER2表达癌的治疗剂的用途,
- [0171] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)。
- [0172] (式中,
- [0173] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-为下式表示的结构,
- [0174] [化学式8]



[0176] 在该结构的3位通过硫醚键与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接,

- [0177] -(NH-DX)表示下式所示的、1位的氨基的氮原子成为连接部位的基团,
- [0178] [化学式9]



[0180] -GGFG-表示-Gly-Gly-Phe-Gly-的四肽残基。)

[0181] [74]如[73]所述的抗体-药物偶联物,其中,耐性或难治性为由于基于现有的抗HER2药的治疗而获得的耐性或难治性。

[0182] [75]如[73]所述的抗体-药物偶联物,其中,耐性或难治性并非来自基于现有的抗HER2药的治疗,而是原本具有的耐性或难治性。

[0183] [76]如[73]～[75]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,现有的抗HER2药为选自由曲妥珠单抗-美坦新偶联物、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、及拉帕替尼组成的组中的至少一种。

[0184] [77]如[73]～[75]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,现有的抗HER2药为曲妥珠单抗-美坦新偶联物。

[0185] [78]如[73]～[75]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,现有的抗HER2药为曲妥珠单抗。

[0186] [79]如[73]～[78]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其用于施予至具有基于现有的抗癌药的治疗史的患者。

[0187] [80]如[79]所述的抗体-药物偶联物,其中,现有的抗癌药包含选自由曲妥珠单抗-美坦新偶联物、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、拉帕替尼、伊立替康、顺铂、卡铂、奥沙利铂、氟尿嘧啶、吉西他滨、卡培他滨、紫杉醇、多西他赛、多柔比星、表柔比星、环磷酰胺、丝裂霉素C、替加氟·吉美嘧啶·奥替拉西复方制剂、西妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、雷莫芦单抗、瑞戈非尼、屈氟尿苷·替吡嘧啶复方制剂、吉非替尼、厄洛替尼、阿法替尼、甲氨蝶呤、及培美曲塞组成的组中的至少一种。

[0188] [81]如[79]所述的抗体-药物偶联物,其中,现有的抗癌药包含曲妥珠单抗-美坦新偶联物。

[0189] [82]如[79]所述的抗体-药物偶联物,其中,现有的抗癌药包含曲妥珠单抗。

[0190] [83]如[79]所述的抗体-药物偶联物,其中,现有的抗癌药包含伊立替康。

[0191] [84]如[73]～[83]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7～8个的范围。

[0192] [85]如[73]～[83]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7.5～8个的范围。

[0193] [86]如[73]～[85]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,抗体-药物偶联物中的抗HER2抗体为包含重链及轻链而成的抗体,所述重链包含序列号1中氨基酸编号1～449中记载的氨基酸序列,所述轻链包含序列号2中氨基酸编号1～214中记载的氨基酸序列。

[0194] [87]如[73]～[85]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,抗体-药物偶联物中的抗HER2抗体为包含重链及轻链而成的抗体,所述重链包含序列号1中记载的氨基酸序列,所述轻链包含序列号2中记载的氨基酸序列。

[0195] [88]如[73]～[87]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg～8mg/kg的范围。

[0196] [89]如[73]～[87]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg。

[0197] [90]如[73]～[87]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为6.4mg/kg。

[0198] [91]如[73]～[87]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为7.4mg/kg。

[0199] [92]如[73]～[87]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为8mg/kg。

[0200] [93]如[73]～[92]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,抗体-药物偶联物以每3周1次的间隔施予。

[0201] [94]如[73]～[93]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其用于治疗选自由乳腺癌、胃癌、大肠癌、非小细胞肺癌、食道癌、唾液腺癌、食管胃结合部腺癌、胆管癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、及子宫癌肉瘤组成的组中的至少一种癌。

[0202] [95]如[73]～[93]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其用于治疗乳腺癌。

[0203] [96]如[73]～[93]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其用于治疗胃癌。

[0204] [97]如[73]～[93]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其用于治疗胃癌及食管胃结合部腺癌。

[0205] [98]如[73]～[93]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其用于治疗大肠癌。

[0206] [99]如[73]～[93]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其用于治疗非小细胞肺癌。

[0207] [100]如[73]～[93]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其用于治疗唾液腺癌。

[0208] [101]如[73]～[100]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,HER2表达癌为HER2过量表达的癌。

[0209] [102]如[101]所述的抗体-药物偶联物,其中,HER2过量表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为3+的癌。

[0210] [103]如[101]所述的抗体-药物偶联物,其中,HER2过量表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为2+、且通过原位杂交法判定HER2的表达为阳性的癌。

[0211] [104]如[73]～[100]中任一项所述的治疗剂,其中,HER2表达癌为HER2低表达的癌。

[0212] [105]如[104]所述的抗体-药物偶联物,其中,HER2低表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为2+、且通过原位杂交法判定HER2的表达为阴性的癌。

[0213] [106]如[104]所述的抗体-药物偶联物,其中,HER2低表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为1+的癌。

[0214] [107]如[73]～[106]所述的抗体-药物偶联物,其用于治疗无法进行手术或复发的癌。

[0215] [108]如[73]～[107]所述的抗体-药物偶联物,其含有药学上允许的制剂成分。

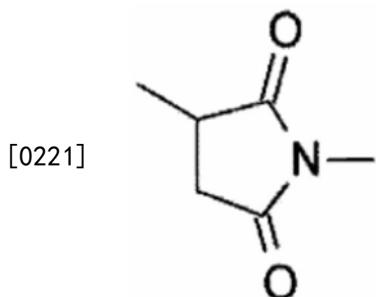
[0216] [109]下式表示的接头及药物与抗HER2抗体连接而成的抗体-药物偶联物的、在制造用于治疗对于现有的抗HER2药呈耐性或难治性的HER2表达癌的医药中的用途,

[0217] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)。

[0218] (式中,

[0219] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-为下式表示的结构,

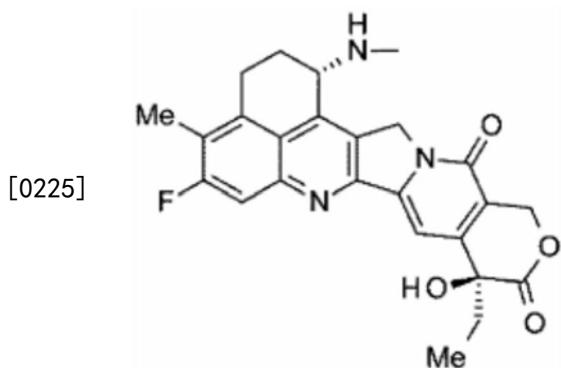
[0220] [化学式10]



[0222] 在该结构的3位通过硫醚键与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接,

[0223] -(NH-DX) 表示下式所示的、1位的氨基的氮原子成为连接部位的基团,

[0224] [化学式11]



[0226] -GGFG-表示-Gly-Gly-Phe-Gly-的四肽残基。)

[0227] [110]如[109]所述的用途,其中,耐性或难治性为由于基于现有的抗HER2药的治疗而获得的耐性或难治性。

[0228] [111]如[109]所述的用途,其中,耐性或难治性并非来自基于现有的抗HER2药的治疗,而是原本具有的耐性或难治性。

[0229] [112]如[109]～[111]中任一项所述的用途,其中,现有的抗HER2药为选自由曲妥珠单抗-美坦新偶联物、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、及拉帕替尼组成的组中的至少一种。

[0230] [113]如[109]～[111]中任一项所述的用途,其中,现有的抗HER2药为曲妥珠单抗-美坦新偶联物。

[0231] [114]如[109]～[111]中任一项所述的用途,其中,现有的抗HER2药为曲妥珠单抗。

[0232] [115]如[109]～[114]中任一项所述的用途,其用于施予至具有基于现有的抗癌

药的治疗史的患者。

[0233] [116]如[115]所述的用途,其中,现有的抗癌药包含选自由曲妥珠单抗-美坦新偶联物、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、拉帕替尼、伊立替康、顺铂、卡铂、奥沙利铂、氟尿嘧啶、吉西他滨、卡培他滨、紫杉醇、多西他赛、多柔比星、表柔比星、环磷酰胺、丝裂霉素C、替加氟·吉美嘧啶·奥替拉西复方制剂、西妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、雷莫芦单抗、瑞戈非尼、屈氟尿苷·替吡嘧啶复方制剂、吉非替尼、厄洛替尼、阿法替尼、甲氨蝶呤、及培美曲塞组成的组中的至少一种。

[0234] [117]如[115]所述的用途,其中,现有的抗癌药包含曲妥珠单抗-美坦新偶联物。

[0235] [118]如[115]所述的用途,其中,现有的抗癌药包含曲妥珠单抗。

[0236] [119]如[115]所述的用途,其中,现有的抗癌药包含伊立替康。

[0237] [120]如[109]~[119]中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7~8个的范围。

[0238] [121]如[109]~[119]中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7.5~8个的范围。

[0239] [122]如[109]~[121]中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物中的抗HER2抗体为包含重链及轻链而成的抗体,所述重链包含序列号1中氨基酸编号1~449中记载的氨基酸序列,所述轻链包含序列号2中氨基酸编号1~214中记载的氨基酸序列。

[0240] [123]如[109]~[121]中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物中的抗HER2抗体为包含重链及轻链而成的抗体,所述重链包含序列号1中记载的氨基酸序列,所述轻链包含序列号2中记载的氨基酸序列。

[0241] [124]如[109]~[123]中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg~8mg/kg的范围。

[0242] [125]如[109]~[123]中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg。

[0243] [126]如[109]~[123]中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为6.4mg/kg。

[0244] [127]如[109]~[123]中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为7.4mg/kg。

[0245] [128]如[109]~[123]中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物的每1次的施予量为8mg/kg。

[0246] [129]如[109]~[128]中任一项所述的应用,其中,抗体-药物偶联物以3周1次的间隔施予。

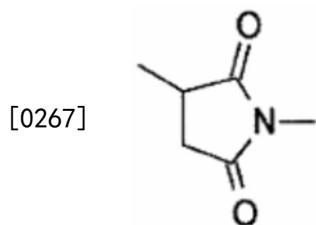
[0247] [130]如[109]~[129]中任一项所述的用途,其用于治疗选自由乳腺癌、胃癌、大肠癌、非小细胞肺癌、食道癌、唾液腺癌、食管胃结合部腺癌、胆管癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、及子宫癌肉瘤组成的组中的至少一种癌。

[0248] [131]如[109]~[129]中任一项所述的用途,其用于治疗乳腺癌。

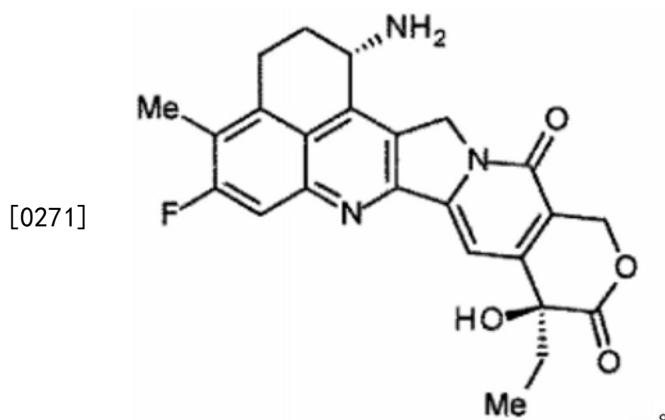
[0249] [132]如[109]~[129]中任一项所述的用途,其用于治疗胃癌。

[0250] [133]如[109]~[129]中任一项所述的用途,其用于治疗胃癌及食管胃结合部腺癌。

- [0251] [134]如[109]～[129]中任一项所述的用途,其用于治疗大肠癌。
- [0252] [135]如[109]～[129]中任一项所述的用途,其用于治疗非小细胞肺癌。
- [0253] [136]如[109]～[129]中任一项所述的用途,其用于治疗唾液腺癌。
- [0254] [137]如[109]～[136]中任一项所述的用途,其中,HER2表达癌为HER2过量表达的癌。
- [0255] [138]如[137]所述的用途,其中,HER2过量表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为3+的癌。
- [0256] [139]如[137]所述的用途,其中,HER2过量表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为2+、且通过原位杂交法判定HER2的表达为阳性的癌。
- [0257] [140]如[109]～[136]中任一项所述的用途,其中,HER2表达癌为HER2低表达的癌。
- [0258] [141]如[140]所述的用途,其中,HER2低表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为2+、且通过原位杂交法判定HER2的表达为阴性的癌。
- [0259] [142]如[140]所述的用途,其中,HER2低表达的癌为通过免疫组织化学法判定HER2的表达为1+的癌。
- [0260] [143]如[109]～[142]所述的用途,其用于治疗无法进行手术或复发的癌。
- [0261] [144]如[109]～[142]所述的用途,其中,医药含有药学上允许的制剂成分。
- [0262] 另外,本发明也可如下表述。
- [0263] (1)下式表示的接头及药物与抗HER2抗体连接而成的抗体-药物偶联物、其盐、或它们的水合物的、用于治疗耐性癌的用途。 $-(\text{琥珀酰亚胺}-3-\text{基}-\text{N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$
- [0264] (式中,
- [0265] $-(\text{琥珀酰亚胺}-3-\text{基}-\text{N})-$ 为下式表示的结构,
- [0266] [化学式12]



- [0268] 在该结构的3位通过硫醚键与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接,
- [0269] $-(\text{NH}-\text{DX})$ 表示下式所示的、1位的氨基的氮原子成为连接部位的基团,
- [0270] [化学式13]



[0272] (2)如(1)所述的用途,其中,耐性癌为继发性耐药癌。

[0273] (3)如(2)所述的用途,其中,继发性耐药性为来自包含抗HER2抗体的抗体-药物偶联物的施予的继发性耐药性。

[0274] (4)如(2)或(3)所述的用途,其中,继发性耐药性为由于基于作为抗HER2抗体-药物偶联物的T-DM1的施予而获得的继发性耐药性。

[0275] (5)如(2)所述的用途,其中,继发性耐药性为来自抗HER2抗体的施予的继发性耐药性。

[0276] (6)如(1)~(5)中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为2~8个的范围。

[0277] (7)如(1)~(5)中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为3~8个的范围。

[0278] (8)如(1)~(5)中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7~8个的范围。

[0279] (9)如(1)~(5)中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7.5~8个的范围。

[0280] (10)如(1)~(9)中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物的施予量为0.8mg/kg~8mg/kg的范围。

[0281] (11)如(1)~(10)中任一项所述的用途,其中,抗体-药物偶联物每3周施予1次。

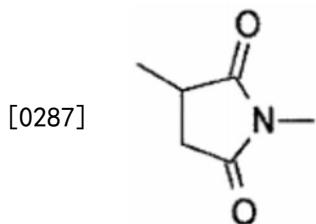
[0282] (12)如(1)~(11)中任一项所述的用途,其中,耐性癌为肺癌、尿路上皮癌、大肠癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、食道癌、鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma)、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、子宫癌、唾液腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、或肉瘤。

[0283] (13)耐性癌的治疗用医药组合物,其以下式表示的接头及药物与抗HER2抗体连接而成的抗体-药物偶联物、其盐、或它们的水合物作为活性成分,且含有药学上允许的制剂成分,-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

[0284] (式中,

[0285] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-为下式表示的结构,

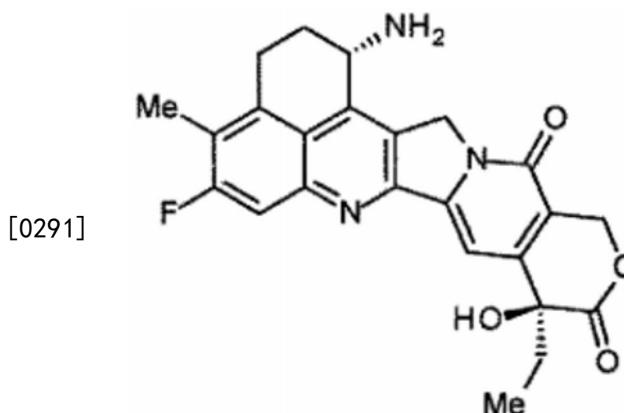
[0286] [化学式14]



[0288] 在该结构的3位通过硫醚键与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接,

[0289] - (NH-DX) 表示下式所示的、1位的氨基的氮原子成为连接部位的基团,

[0290] [化学式15]



[0292] (14)如(13)所述的治疗用医药组合物,其中,耐性癌为继发性耐药癌。

[0293] (15)如(13)所述的治疗用医药组合物,其中,继发性耐药性为来自包含抗HER2抗体的抗体-药物偶联物的施予的继发性耐药性。

[0294] (16)如(14)或(15)所述的治疗用医药组合物,其中,继发性耐药性为由于基于作为抗HER2抗体-药物偶联物的T-DM1的施予而获得的继发性耐药性。

[0295] (17)如(14)所述的治疗用医药组合物,其中,继发性耐药性为来自抗HER2抗体的施予的继发性耐药性。

[0296] (18)如(13)~(17)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为2~8个的范围。

[0297] (19)如(13)~(17)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为3~8个的范围。

[0298] (20)如(13)~(17)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7~8个的范围。

[0299] (21)如(13)~(17)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7.5~8个的范围。

[0300] (22)如(13)~(21)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,抗体-药物偶联物的施予量为0.8mg/kg~8mg/kg的范围。

[0301] (23)如(13)~(21)中任一项所述的治疗用医药组合物,所述治疗用医药组合物每3周施予1次。

[0302] (24)如(13)~(23)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,耐性癌为肺癌、尿路

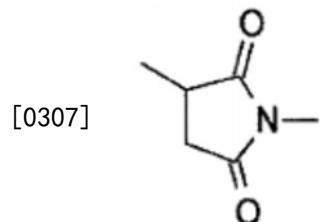
上皮癌、大肠癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、食道癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、子宫癌、唾液腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、或肉瘤。

[0303] (25)耐性癌的治疗方法,其特征在于,施予下式表示的接头及药物与抗HER2抗体连接而成的抗体-药物偶联物、其盐、或它们的水合物,-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

[0304] (式中,

[0305] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-为下式表示的结构,

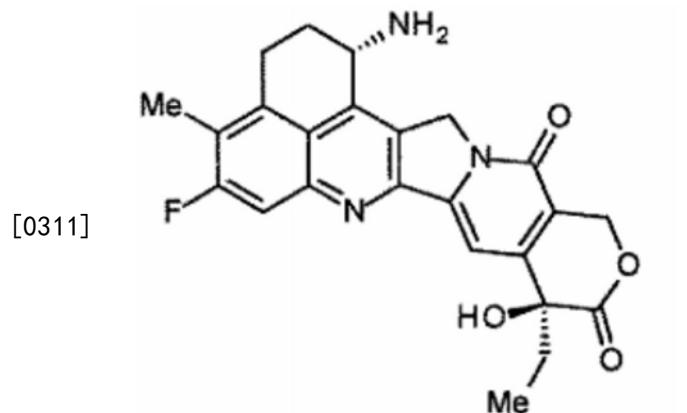
[0306] [化学式16]



[0308] 在该结构的3位通过硫醚键与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接,

[0309] -(NH-DX)表示下式所示的、1位的氨基的氮原子成为连接部位的基团,

[0310] [化学式17]



[0312] (26)如(25)所述的治疗方法,其中,耐性癌为继发性耐药癌。

[0313] (27)如(26)所述的治疗方法,其中,继发性耐药性为来自基于包含抗HER2抗体的抗体-药物偶联物的施予的继发性耐药性。

[0314] (28)如(26)或(27)所述的治疗方法,其中,继发性耐药性为由于基于作为抗HER2抗体-药物偶联物的T-DM1的施予而获得的继发性耐药性。

[0315] (29)如(14)所述的治疗方法,其中,继发性耐药性为来自抗HER2抗体的施予的继发性耐药性。

[0316] (30)如(25)~(29)中任一项所述的治疗方法,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为2~8个的范围。

[0317] (31)如(25)~(29)中任一项所述的治疗方法,其中,抗体-药物偶联物相对于1个

抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为3~8个的范围。

[0318] (32)如(25)~(29)中任一项所述的治疗方法,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7~8个的范围。

[0319] (33)如(25)~(29)中任一项所述的治疗方法,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7.5~8个的范围。

[0320] (34)如(25)~(33)中任一项所述的治疗方法,其中,抗体-药物偶联物的施予量为0.8mg/kg~8mg/kg的范围。

[0321] (35)如(25)~(34)中任一项所述的治疗方法,其中,抗体-药物偶联物每3周施予1次。

[0322] (36)如(25)~(35)中任一项所述的治疗方法,其中,耐性癌为肺癌、尿路上皮癌、大肠癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、食道癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、子宫癌、唾液腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、或肉瘤。

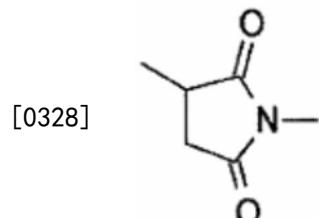
[0323] (37)治疗用医药组合物,其以下式表示的接头及药物与抗HER2抗体连接而成的抗体-药物偶联物、其盐、或它们的水合物作为活性成分,且含有药学上允许的制剂成分,所述治疗用医药组合物适用于对于抗癌药显示耐性的癌症患者。

[0324] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

[0325] (式中,

[0326] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-为下式表示的结构,

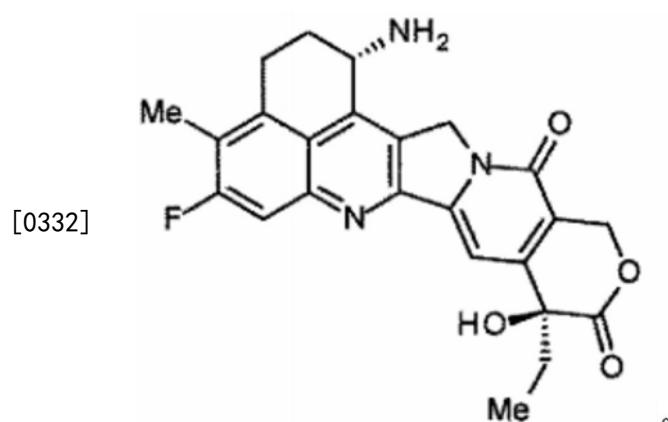
[0327] [化学式18]



[0329] 在该结构的3位通过硫醚键与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接,

[0330] -(NH-DX)表示下式所示的、1位的氨基的氮原子成为连接部位的基团,

[0331] [化学式19]



[0333] (38)如(37)所述的治疗用医药组合物,所述治疗用医药组合物适用于具有基于抗癌药的治疗史的癌症患者。

[0334] (39)如(37)或(38)所述的治疗用医药组合物,所述治疗用医药组合物代替其他抗癌药使用、或与其他抗癌药组合使用。

[0335] (40)如(37)~(39)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,对于抗癌药的耐性为继发性耐药性。

[0336] (41)如(37)~(40)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,抗癌药为包含抗HER2抗体的抗体-药物偶联物。

[0337] (42)如(41)所述的治疗用医药组合物,其中,抗癌药为曲妥珠单抗-美坦新偶联物(T-DM1)。

[0338] (43)如(37)~(40)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,抗癌药为抗HER2抗体。

[0339] (44)如(37)~(43)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为2~8个的范围。

[0340] (45)如(37)~(43)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为3~8个的范围。

[0341] (46)如(37)~(43)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7~8个的范围。

[0342] (47)如(37)~(43)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,抗体-药物偶联物相对于1个抗体而言的药物-接头结构的平均连接数为7.5~8个的范围。

[0343] (48)如(37)~(43)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,抗体-药物偶联物的施予量为0.8mg/kg~8mg/kg的范围。

[0344] (49)如(37)~(48)中任一项所述的治疗用医药组合物,所述治疗用医药组合物每3周施予1次。

[0345] (50)如(37)~(49)中任一项所述的治疗用医药组合物,其中,耐性癌为肺癌、尿路上皮癌、大肠癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、食道癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、子宫癌、唾液腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、或肉瘤。

[0346] 发明效果

[0347] 本发明中使用的含有抗体-药物偶联物的治疗剂针对对于现有的抗HER2药呈耐性或难治性的HER2表达癌显示优异的抗肿瘤效果,即使为继发性耐药癌也显示良好的抗肿瘤效果。另外,由于安全性也优异,因此可提供有效的治疗方法。

附图说明

[0348] [图1]表示人源化抗HER2单克隆抗体重链的氨基酸序列(序列号1)。

[0349] [图2]表示人源化抗HER2单克隆抗体轻链的氨基酸序列(序列号2)。

[0350] [图3]为表示抗体-药物偶联物(1)或T-DM1针对T-DM1继发性耐药化的HER2阳性人乳腺癌ST1616B/TDR肿瘤皮下移植裸鼠的抗肿瘤效果的图。图中,横轴表示自初次施予起的

天数,纵轴表示肿瘤体积。

[0351] [图4]为表示抗体-药物偶联物(1)或T-DM1针对T-DM1继发性耐药化的HER2阳性人乳腺癌ST1360B/TDR肿瘤皮下移植裸鼠的抗肿瘤效果的图。图中,横轴表示自初次施予起的天数,纵轴表示肿瘤体积。

[0352] [图5]为表示抗体-药物偶联物(1)在临床试验中的药物动力学的图。

[0353] [图6]为表示有关抗体-药物偶联物(1)在临床试验中的安全性和耐受性的图。

[0354] [图7]为针对抗体-药物偶联物(1)在临床试验中的有效性示出ORR(客观缓解率, objective response rate)及DCR(疾病控制率)的图。

[0355] [图8]为针对抗体-药物偶联物(1)在临床试验中的有效性示出最大肿瘤缩小率(%)的图。

[0356] [图9]为针对抗体-药物偶联物(1)在临床试验中的有效性示出治疗时间·效果的图。

[0357] [图10]为针对抗体-药物偶联物(1)在临床试验中的有效性示出最大肿瘤缩小率(%)的图。

[0358] [图11]为针对抗体-药物偶联物(1)在临床试验中对于乳腺癌的有效性示出肿瘤缩小率(%)的时间推移的图。

[0359] [图12]为针对抗体-药物偶联物(1)在临床试验中对于胃癌的有效性示出肿瘤缩小率(%)的时间推移的图。

[0360] [图13]为针对抗体-药物偶联物(1)在临床试验中对于HER2表达实体瘤(不包括乳腺癌及胃癌)的有效性示出最大肿瘤缩小率(%)的图。图中,“C”表示大肠癌队列(cohort),“L”表示非小细胞肺癌队列,“S”表示唾液腺癌队列,“P”表示佩吉特病队列,“Ch”表示胆管癌队列,“E”表示食道癌队列。另外,图中“※”表示正在进行治疗。

[0361] [图14]为针对抗体-药物偶联物(1)在临床试验中对于HER2表达实体瘤(不包括乳腺癌及胃癌)的有效性示出肿瘤缩小率(%)的时间推移的图。图中,“大肠癌”表示大肠癌队列,“NSCLC”表示非小细胞肺癌队列,“唾液腺癌”表示唾液腺癌队列,“其他”表示其他癌症队列。

具体实施方式

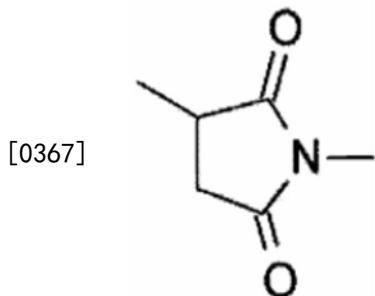
[0362] 以下,参考附图来说明用于实施本发明的优选方式。应予说明,以下说明的实施方式表示本发明的代表性实施方式的一例,不应据此狭义地解释本发明的范围。

[0363] 本发明中使用的抗体-药物偶联物为下式表示的接头及药物与抗HER2抗体连接而成的抗HER2抗体-药物偶联物。

[0364] $-\text{(琥珀酰亚胺-3-基-N)}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=0)-\text{GGFG-NH-CH}_2-\text{O-CH}_2-\text{C}(=0)-\text{(NH-DX)}$

[0365] 式中, $-\text{(琥珀酰亚胺-3-基-N)}$ 为下式表示的结构,

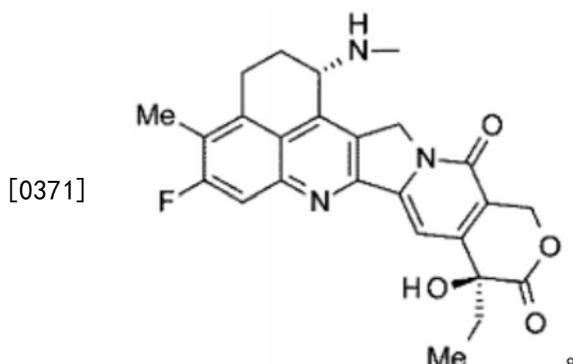
[0366] [化学式20]



[0368] 在该结构的3位通过硫醚键与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接。

[0369] - (NH-DX) 表示下式所示的、1位的氨基的氮原子成为连接部位的基团,

[0370] [化学式21]

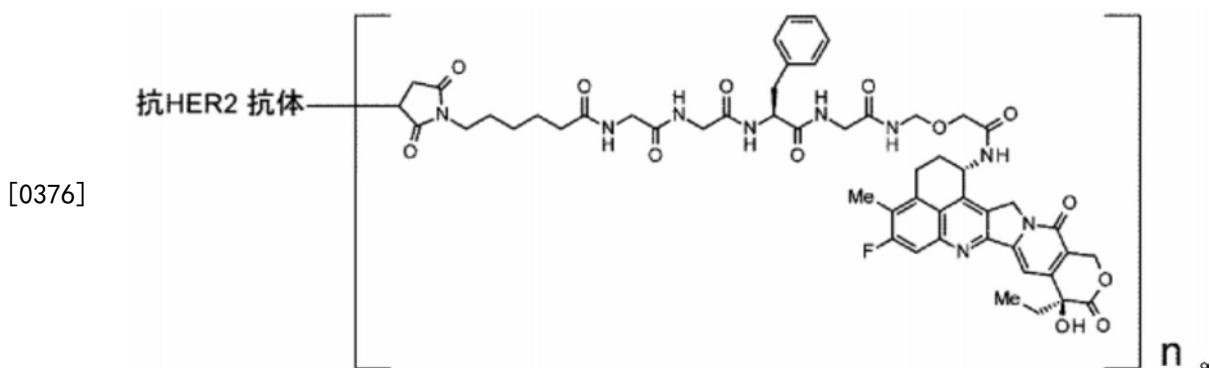


[0372] 另外,-GGFG-表示-Gly-Gly-Phe-Gly-的四肽残基。

[0373] 本说明书中,将抗体-药物偶联物中由接头及药物形成的局部结构称为“药物-接头结构”。该药物-接头结构与在抗体的链间的二硫键部位(2处重链-重链间、及2处重链-轻链间)处生成的硫醇基(换言之,半胱氨酸残基的硫原子)上连接。

[0374] 本发明中使用的抗HER2抗体-药物偶联物也可用下式表示的结构表示:

[0375] [化学式22]



[0377] 此处,药物-接头结构通过硫醚键与抗HER2抗体连接。另外,n与所谓的DAR (药物-抗体比值, Drug-to-Antibody Ratio) 意义相同,表示连接于1分子抗体的药物数量。DAR为平均值,即作为平均药物连接数所规定、记载的数值。为本发明的抗体-药物偶联物时,n为2~8即可,优选为3~8,更优选为7~8,进一步优选为7.5~8,可优选使用n为约8的抗体-药物偶联物。

[0378] 以下,对本发明中使用的抗体-药物偶联物进行详细说明。

[0379] [抗体]

[0380] 本发明中使用的抗HER2抗体-药物偶联物所使用的抗HER2抗体可来源于任何物种,可优选列举人、大鼠、小鼠、及兔。当抗体来源于人以外的物种时,优选使用公知的技术将其嵌合化或人源化。本发明的抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,优选单克隆抗体。

[0381] 抗HER2抗体为能将肿瘤细胞作为靶标的抗体,即,具有能识别肿瘤细胞的特性、能与肿瘤细胞结合的特性、能被摄入至肿瘤细胞内而内化的特性、以及针对肿瘤细胞的细胞杀伤活性等,可介由接头与具有抗肿瘤活性的化合物连接而形成抗体-药物偶联物。

[0382] 抗体与肿瘤细胞的结合性可利用流式细胞仪确认。抗体进入到肿瘤细胞内可利用以下方法确认:(1)使用与治疗抗体结合的二抗(荧光标记)、利用荧光显微镜使已被摄入至细胞内的抗体可见的检验(Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761);(2)使用与治疗抗体结合的二抗(荧光标记)、测定已被摄入至细胞内的荧光量的检验(Molecular Biology of the Cell Vol.15, 5268-5282, December 2004);或者,(3)Mab-ZAP检验,使用与治疗抗体结合的免疫毒素,毒素在被摄入至细胞内后释放,从而抑制细胞增殖(BioTechniques 28:162-165, January 2000)。作为免疫毒素,也可使用白喉毒素的催化区与G蛋白形成的重组复合蛋白质。

[0383] 对于抗体的抗肿瘤活性而言,在体外可以通过测定抑制细胞增殖的活性而确认。例如,可培养过量表达抗体的靶蛋白的癌细胞株,向培养体系中以各种浓度添加抗体,测定针对病灶形成(focus formation)、集落(colony)形成及细胞球增殖的抑制活性。在体内,可通过例如向移植了高表达靶蛋白的肿瘤细胞株的裸鼠施予抗体、测定癌细胞的变化,由此确认抗肿瘤活性。

[0384] 由于抗体-药物偶联物连接有发挥抗肿瘤效果的化合物,所以抗体自身并不必须具有抗肿瘤效果,但优选具有抗肿瘤效果。为了在肿瘤细胞中特异性·选择性地发挥抗肿瘤性化合物的细胞毒性,优选抗体具有内化而转移到肿瘤细胞内的性质,这尤为重要。

[0385] 抗HER2抗体可通过已知的手段而获取。例如,可通过利用本领域中通常实施的方法,用作为抗原的多肽免疫动物,采集在生物体内产生的抗体,并将其纯化而得到抗体。抗原的来源不限于人,也可用来源于小鼠、大鼠等人以外的动物的抗原免疫动物。这种情况下,通过针对获得的与异种抗原结合的抗体与人抗原之间的交叉性进行试验,可筛选适用于人的疾病的抗体。

[0386] 另外,也可按照已知的方法(例如,Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497; Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)),通过将产生针对抗原的抗体的抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合,从而建立杂交瘤,获得单克隆抗体。

[0387] 应予说明,抗原可通过利用基因操作使宿主细胞产生编码抗原蛋白的基因而得到。具体而言,制备能表达抗原基因的载体,将其导入至宿主细胞,使该基因表达,将表达的抗原纯化即可。也可通过使用对动物用基于上述基因操作的抗原表达细胞、或表达抗原的细胞株进行免疫的方法来获得抗体。

[0388] 本发明中可使用的抗HER2抗体没有特别限制,例如,优选具有以下特性的抗体。

[0389] (1) 抗HER2抗体,其特征在于,具有以下特性:

- [0390] (a) 与HER2特异性地结合。
- [0391] (b) 具有通过与HER2结合而内化至HER2表达细胞中的活性。
- [0392] (2) 上述(1)所述的抗体,其与HER2的胞外结构域结合。
- [0393] (3) 上述(1)或(2)所述的抗体,所述抗体为单克隆抗体。
- [0394] (4) 上述(1)~(3)中任一项所述的抗体,其具有抗体依赖性细胞毒性(ADCC)及/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。
- [0395] (5) 上述(1)~(4)中任一项所述的抗体,所述抗体为小鼠单克隆抗体、嵌合单克隆抗体、或人源化单克隆抗体。
- [0396] (6) 上述(1)~(5)中任一项所述的抗体,所述抗体为人源化单克隆抗体,所述人源化单克隆抗体包含:包含序列号1中记载的氨基酸序列的重链;及包含序列号2中记载的氨基酸序列的轻链。
- [0397] (7) 上述(1)~(6)中任一项所述的抗体,其中,重链羧基末端的赖氨酸残基缺失。
- [0398] (8) 上述(7)所述的抗体,所述抗体包含:包含序列号1中氨基酸编号1~449中记载的氨基酸序列的重链;及包含序列号2中氨基酸编号1~214中记载的氨基酸序列的轻链。
- [0399] (9) 抗体,其是利用包括以下步骤的制造抗体的方法而得到的:培养利用表达载体转化得到宿主细胞的步骤,所述表达载体含有编码上述(1)~(8)中任一项所述的抗体的多核苷酸;以及从在该步骤中得到的培养物中采集目标抗体的步骤。
- [0400] 以下,对本发明中使用的抗HER2抗体进行说明。
- [0401] 本说明书中,“癌”与“肿瘤”以相同含义使用。
- [0402] 本说明书中,术语“基因”不仅包括DNA,还包括其mRNA、cDNA及其cRNA。
- [0403] 本说明书中,术语“多核苷酸”以与核酸相同的含义使用,也包括DNA、RNA、探针、寡核苷酸、及引物。
- [0404] 本说明书中,“多肽”“蛋白质”“蛋白”以无区别的方式使用。
- [0405] 本说明书中,“细胞”也包括动物个体内的细胞、培养细胞。
- [0406] 本说明书中,术语“HER2”以与HER2蛋白相同的含义使用。
- [0407] 本说明书中,抗HER2抗体没有特别限制,可列举帕妥珠单抗(国际公开01/00245号)、曲妥珠单抗(美国专利第5821337号)等,优选曲妥珠单抗。但只要是特异性地与HER2结合、更优选具有通过与HER2结合而内化至HER2表达细胞中的活性的抗HER2抗体即可,不限于上述抗体。
- [0408] 本说明书中,有时也将“曲妥珠单抗”称为赫赛汀(HERCEPTIN)(注册商标)、huMAb4D5-8、rhuMAb4D5-8,其为包含重链及轻链而成的人源化抗体,所述重链包含序列号1(图1)中氨基酸编号1~449中记载的氨基酸序列,所述轻链包含序列号2(图2)中氨基酸编号1~214中记载的氨基酸序列。
- [0409] 本说明书中,术语“特异性结合”是指不是非特异性吸附的结合。作为结合是否为特异性的判定基准,例如,可列举解离常数(以下称为“Kd”)。抗体对于HER2蛋白的Kd值优选为 1×10^{-5} M以下、 5×10^{-6} M以下、 2×10^{-6} M以下、或 1×10^{-6} M以下;更优选为 5×10^{-7} M以下、 2×10^{-7} M以下、或 1×10^{-7} M以下;更进一步优选为 5×10^{-8} M以下、 2×10^{-8} M以下、或 1×10^{-8} M以下;最优选为 5×10^{-9} M以下、 2×10^{-9} M以下、或 1×10^{-9} M以下。HER2蛋白与抗体的结合可利用表面等离子共振(Surface Plasmon Resonance)法、ELISA法、RIA法等已知的方法测定。

[0410] 本说明书中的“CDR”是指互补性决定区(CDR:Complementarity determining region)。已知在抗体分子的重链及轻链中分别具有3个CDR。CDR也被称为超变区(hypervariable domain),是位于抗体的重链及轻链的可变区内、且一级结构的变异性特别高的部位,在重链及轻链的多肽链的一级结构上,CDR各自分离而位于3处。本说明书中,关于抗体的CDR,将重链的CDR自重链氨基酸序列的氨基末端侧起记为CDRH1、CDRH2、CDRH3,将轻链的CDR自轻链氨基酸序列的氨基末端侧起记为CDRL1、CDRL2、CDRL3。这些部位在立体结构上彼此接近,决定对于所结合的抗原的特异性。

[0411] 本发明中,所谓“在严格条件下进行杂交”是指在下述条件下或与其同等的条件下进行杂交,在所述条件下,可通过下述操作而进行鉴定:在市售的杂交溶液ExpressHyb Hybridization Solution(Clontech公司制)中,于68℃进行杂交,或者,使用固定有DNA的滤膜,在0.7-1.0M的NaCl存在下,于68℃进行杂交,然后使用0.1-2倍浓度的SSC溶液(所谓1倍浓度SSC含有150mM NaCl、15mM柠檬酸钠),于68℃进行洗涤。

[0412] 1. HER2

[0413] HER2是被鉴定为人表皮生长因子受体2型相关癌基因的代表性生长因子受体型的癌基因产物之一,是分子量为185kDa的具有酪氨酸激酶结构域的跨膜受体蛋白。已知其是由HER1(EGFR,ErbB-1)、HER2(neu,ErbB-2)、HER3(ErbB-3)、HER4(ErbB-4)组成的EGFR家族中一员,通过形成同源二聚体或与作为其他EGFR的HER1、HER3、或HER4形成异源二聚体,而使细胞内酪氨酸残基发生自磷酸化从而活化,由此,在正常细胞及肿瘤细胞中对细胞的增殖·分化·存活发挥重要的作用。

[0414] 本发明中使用的HER2蛋白可从人、非人哺乳动物(大鼠、小鼠等)的HER2表达细胞中直接纯化而使用,或者可制备该细胞的细胞膜组分而使用,另外,可通过在体外合成HER2、或通过基因操作而使宿主细胞产生HER2而得到。基因操作中,具体而言,在将HER2cDNA整合至可进行表达的载体中后,在包含转录和翻译所需要的酶、底物及能源物质的溶液中进行合成,或者将其他原核生物或真核生物的宿主细胞转化而使其表达HER2,从而可得到该蛋白质。另外,也可将基于前述的基因操作而得到的HER2表达细胞、或表达HER2的细胞株作为HER2蛋白而使用。

[0415] HER2的DNA序列及氨基酸序列已在公共数据库上公开,例如,可参考M11730(Genbank)、NP_004439.2(NCBI)等登录号。

[0416] 另外,包含在上述HER2的氨基酸序列中取代、缺失及/或添加1个或数个氨基酸得到的氨基酸序列、具有与该蛋白质同等的生物活性的蛋白质也包含于HER2。

[0417] 人HER2蛋白由包含N末端22个氨基酸残基的信号序列、包含630个氨基酸残基的胞外结构域、包含23个氨基酸残基的跨细胞膜结构域、包含580个氨基酸残基的胞内结构域构成。

[0418] 2. 抗HER2抗体的制造

[0419] 本发明的针对HER2的抗体例如可通过以下方式得到:按照本领域中通常实施的方法,用HER2或选自HER2的氨基酸序列中的任意多肽对动物进行免疫,采集在生物体内产生的抗体并进行纯化。作为抗原的HER2的生物种类不限于人,也可使用来源于小鼠、大鼠等人以外的动物的HER2、大鼠p185neu等对动物进行免疫。这种情况下,通过对获得的与异种HER2结合的抗体与人HER2的交叉性进行试验,可筛选能够适用于人的疾病的抗体。

[0420] 另外,也可通过按照已知的方法(例如,Kohler and Milstein,Nature (1975) 256, p.495-497;Kennet,R.ed.,Monoclonal Antibodies,p.365-367,Plenum Press,N.Y. (1980)),将产生针对HER2的抗体的抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合而建立杂交瘤,得到单克隆抗体。

[0421] 应予说明,作为抗原的HER2可通过利用基因操作使HER2在宿主细胞中表达而得到。

[0422] 具体而言,只要制作能表达HER2基因的载体,将其导入至宿主细胞使该基因表达,将表达的HER2纯化即可。

[0423] 另外,也可将基于上述基因操作的HER2表达细胞、或表达HER2的细胞株作为HER2蛋白使用。抗HER2抗体可利用已知的手段获得。以下,具体说明针对HER2的抗体的获得方法。

[0424] (1) 抗原的制备

[0425] 作为用于制作抗HER2抗体的抗原,可列举HER2或包含其中至少连续6个氨基酸的部分氨基酸序列的多肽、或向它们添加任意的氨基酸序列、载体而得到的衍生物。

[0426] HER2可从人的肿瘤组织或肿瘤细胞中直接纯化而使用,另外,可通过在体外合成HER2、或通过基因操作而使宿主细胞中产生HER2来得到。

[0427] 基因操作中,具体而言,通过在将HER2的cDNA整合至可表达的载体中后,在包含转录和翻译所需要的酶、底物及能源物质的溶液中进行合成,或将其他原核生物或真核生物的宿主细胞转化而使其表达HER2,可得到抗原。

[0428] 另外,也可通过使将作为膜蛋白质的HER2的胞外区与抗体的恒定区连接而成的融合蛋白质在适当的宿主·载体系统中表达,从而以分泌蛋白质的形式得到抗原。

[0429] HER2的cDNA可通过例如所谓PCR法、即、以表达HER2的cDNA的cDNA文库作为模板、使用特异性扩增HER2cDNA的引物进行聚合酶链反应(PCR;参见Saiki,R.K.,等,Science (1988) 239,p.487-489)来获得。

[0430] 作为多肽的体外合成,例如可列举Roche Diagnostics, Inc. 制的Rapid Translation System(RTS),但不限于此。

[0431] 作为原核细胞的宿主,例如,可列举大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等。为了将目标基因在这些宿主细胞内转化,使用包含来源于能与宿主匹配的物种的复制子即复制起点、和调控序列的质粒载体来转化宿主细胞。另外,作为载体,优选具有能向转化细胞赋予表型性状(表型)筛选性的序列的载体。

[0432] 真核细胞的宿主细胞包括脊椎动物、昆虫、酵母等的细胞,作为脊椎动物细胞,例如,常使用作为猴的细胞的COS细胞(Gluzman,Y.Cell (1981) 23,p.175-182、ATCC CRL-1650;ATCC:American Type Culture Collection)、小鼠成纤维细胞NIH3T3(ATCC No.CRL-1658)、中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞、ATCC CCL-61)的二氢叶酸还原酶缺陷株(Urlaub, G. and Chasin,L.A.Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1980) 77,p.4126-4220)等,但不限于这些。

[0433] 可按照本领域中通常实施的方法培养如上所述地得到的转化体,通过该培养可在胞内或胞外产生目标多肽。

[0434] 作为该培养中使用的培养基,可根据采用的宿主细胞而适当选择惯用的各种培养基,如果是大肠杆菌,例如,根据需要可向LB培养基中添加氨苄西林等抗生素、IPMG来使用。

[0435] 对于通过上述培养而在转化体的胞内或胞外产生的重组蛋白,可通过利用该蛋白的物理性质、化学性质等的各种已知的分离操作方法进行分离·纯化。

[0436] 作为该方法,具体而言,例如,可列举基于通常的蛋白质沉淀剂的处理、超滤、分子筛色谱法(凝胶过滤)、吸附色谱法、离子交换色谱法、亲和色谱法等各种液相色谱法、透析法、它们的组合等。

[0437] 另外,通过在表达的重组蛋白上连接包含6个残基的组氨酸标签,从而能使用镍亲和柱高效地纯化。或者,通过在表达的重组蛋白上连接IgG的Fc段,从而能用蛋白A柱高效地纯化。

[0438] 通过组合上述方法,能容易地以高收率、高纯度大量制造目标多肽。

[0439] 也可将上文所述的转化体自身作为抗原使用。另外,也可将表达HER2的细胞株作为抗原使用。作为这样的细胞株,可列举人乳腺癌细胞株SK-BR-3、BT-474、KPL-4、或JIMT-1、人胃癌细胞株NCI-N87、及人卵巢细胞癌株SK-OV-3,但不限于这些细胞株,只要能表达HER2即可。

[0440] (2) 抗HER2单克隆抗体的制造

[0441] 作为与HER2特异性结合的抗体的例子,可列举与HER2特异性结合的单克隆抗体,其获得方法如下所述。

[0442] 在制造单克隆抗体时,通常需要下述这样的操作步骤。

[0443] 即,

[0444] 步骤(a)纯化作为抗原使用的生物高分子,或制备抗原表达细胞;

[0445] 步骤(b)通过向动物注射抗原而将动物免疫,然后采集血液并检测其抗体效价,确定摘取脾脏的时机,然后制备产抗体细胞;

[0446] 步骤(c)制备骨髓瘤细胞(以下称为“骨髓瘤”);

[0447] 步骤(d)抗体产生细胞与骨髓瘤的细胞融合;

[0448] 步骤(e)筛选产生目标抗体的杂交瘤组;

[0449] 步骤(f)分割成单细胞克隆(克隆);

[0450] 步骤(g)根据情况,培养用于大量制造单克隆抗体的杂交瘤,或饲养移植了杂交瘤的动物;及

[0451] 步骤(h)对如上所述地制造的单克隆抗体的生理活性、及其结合特异性进行研究,或检测作为标记试剂的特性,等等。

[0452] 以下,按照上述步骤详细说明单克隆抗体的制作方法,该抗体的制作方法不限于此,例如也可使用脾细胞以外的抗体产生细胞及骨髓瘤。

[0453] (a) 抗原的纯化

[0454] 作为抗原,可使用通过上述那样的方法制备的HER2或其一部分。

[0455] 另外,也可将利用HER2表达重组体细胞制备的膜组分、或HER2表达重组体细胞自身、以及利用本领域技术人员公知的方法进行化学合成得到的本发明相关蛋白质的部分肽作为抗原使用。

[0456] 此外,也可将HER2表达细胞株作为抗原使用。

[0457] (b) 产抗体细胞的制备

[0458] 将步骤(a)中得到的抗原、与弗式完全佐剂或弗式不完全佐剂、或硫酸铝钾之类的

助剂混合,作为免疫原而对实验动物进行免疫。此外,还有将抗原表达细胞作为免疫原而对实验动物进行免疫的方法。作为实验动物,可不受阻碍地使用已知的杂交瘤制作方法中所用的动物。具体而言,例如,可使用小鼠、大鼠、山羊、绵羊、牛、马等。但是,从获得与摘取的抗体产生细胞融合的骨髓瘤细胞的容易程度等观点考虑,优选将小鼠或大鼠作为被免疫动物。

[0459] 另外,对于实际使用的小鼠及大鼠的品系没有特别限制,在小鼠的情况下,例如可使用各品系A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BL、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、R III、SJL、SWR、WB、129等,另外,在大鼠的情况下,例如可使用Wistar、Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer等。

[0460] 这些小鼠及大鼠可从例如CLEA Japan, Inc.、Charles River Laboratories Japan, Inc.等实验动物饲养销售商获得。

[0461] 考虑到与后述的骨髓瘤细胞的融合适应性,作为被免疫动物,小鼠中特别优选BALB/c系,大鼠中特别优选Wistar及Low系。

[0462] 另外,考虑人与小鼠中的抗原同源性,还优选使用除去了自身抗体的降低了生物体机能的小鼠,即自身免疫疾病小鼠。

[0463] 应予说明,这些小鼠或大鼠在免疫时的周龄优选为5~12周龄,进一步优选为6~8周龄。

[0464] 为了通过HER2或其重组体而将动物免疫可使用例如Weir, D.M., *Handbook of Experimental Immunology* Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E.A. and Mayer, M.M., *Experimental Immunoochemistry*, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 等中详细记载的已知的方法。

[0465] 这些免疫方法中,例如,本发明中的优选方法具体所示如下。

[0466] 即,首先,向动物的皮内或腹腔内施予作为抗原的膜蛋白质组分、或已使抗原表达的细胞。但是,为了提高免疫效率,优选并用两者,前半段进行皮内施予,后半段或仅最后一次进行腹腔内施予时,尤其能够提高免疫效率。

[0467] 抗原的施予时间表根据被免疫动物的种类、个体差异等的不同而不同,通常优选抗原施予次数为3~6次、施予间隔为2~6周,进一步优选施予次数为3~4次、施予间隔为2~4周。

[0468] 另外,抗原的施予量根据动物的种类、个体差异等的不同而不同,通常为0.05~5mg,优选为0.1~0.5mg左右。

[0469] 加强免疫在如上所述的抗原施予的1~6周后、优选1~4周后、进一步优选1~3周后进行。免疫原为细胞的情况下,使用 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞。

[0470] 应予说明,进行加强免疫时的抗原施予量根据动物的种类、大小等的不同而不同,通常,例如小鼠的情况下,设定为0.05~5mg、优选为0.1~0.5mg、进一步优选为0.1~0.2mg左右。免疫原为细胞的情况下,使用 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞。

[0471] 自上述加强免疫起1~10天后、优选2~5天后、进一步优选2~3天后,无菌地从被免疫动物取出包含抗体产生细胞的脾细胞或淋巴细胞。此时,测定抗体效价,若将抗体效价足够高的动物作为抗体产生细胞的供给源,则可提高后续操作的效率。

[0472] 作为此处使用的抗体效价的测定方法,例如,可列举RIA法或ELISA法,但不限于这

些方法。本发明中的抗体效价的测定利用例如ELISA法时,按照以下记载的步骤进行。

[0473] 首先,将纯化或部分纯化的抗原吸附于ELISA用96孔板等的固相表面,进而利用与抗原无关的蛋白质、例如牛血清白蛋白(BSA)包被未吸附抗原的固相表面,将该表面洗涤后,与作为一抗的分级稀释的试样(例如小鼠血清)接触,使上述抗原与试样中的抗体结合。

[0474] 进而,作为二抗,添加经酶标记的针对小鼠抗体的抗体,使其与小鼠抗体结合,洗涤后添加该酶的底物,测定因基于底物分解的显色而导致的吸光度的变化等,由此计算抗体效价。

[0475] 可按照已知的方法(例如,Kohler等,Nature(1975)256,p.495;Kohler等,Eur.J.Immunol.(1977)6,p.511;Milstein等,Nature(1977),266,p.550;Walsh,Nature,(1977)266,p.495)从被免疫动物的脾细胞或淋巴细胞中分离抗体产生细胞。例如,在脾细胞的情况下,可采用常规方法:将脾脏切碎,用不锈钢网过滤后,悬浮于伊格尔最小必需培养基(MEM,Eagle's minimum essential medium),分离抗体产生细胞。

[0476] (c)骨髓瘤细胞(以下称为“骨髓瘤”)的制备

[0477] 对于用于细胞融合的骨髓瘤细胞没有特别限制,可从已知的细胞株中适当选择使用。但是,考虑到从融合细胞筛选杂交瘤时的便利性,优选使用已确立其筛选流程的HGPRT(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶,Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase)缺陷株。

[0478] 即,为来自小鼠的X63-Ag8(X63)、NS1-ANS/1(NS1)、P3X63-Ag8.U1(P3U1)、X63-Ag8.653(X63.653)、SP2/0-Ag14(SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7(45.6TG)、F0、S149/5XX0、BU.1等,来源于大鼠的210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3)等,来自人的U266AR(SKO-007)、GM1500・GTG-A12(GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2(HMy2)、8226AR/NIP4-1(NP41)等。这些HGPRT缺陷株例如可从ATCC等获得。

[0479] 对这些细胞株使用合适的培养基、例如8-氮鸟嘌呤培养基(在RPMI-1640培养基中添加谷氨酰胺、2-巯基乙醇、庆大霉素、及胎牛血清(以下称为“FBS”)、进一步添加8-氮鸟嘌呤得到的培养基)、Iscove改良Dulbecco培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium;以下称为“IMDM”)、或Dulbecco改良Eagle培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium;以下称为“DMEM”)进行传代培养,在细胞融合的3~4天前,使用正常培养基(例如,含有10%FCS的ASF104培养基(味之素株式会社制))进行传代培养,在融合当天预先确保 2×10^7 以上的细胞数量。

[0480] (d)细胞融合

[0481] 抗体产生细胞与骨髓瘤细胞的融合可按照已知的方法(Weir,D.M.,Handbook of Experimental Immunology Vol.I.II.III.,Blackwell Scientific Publications, Oxford(1987);Kabat,E.A. and Mayer,M.M.,Experimental Immunochemistry,Charles C Thomas Publisher Springfield,Illinois(1964)等)、在不极度降低细胞的存活率的水平的条件下适当实施。

[0482] 作为这样的方法,例如,可使用在聚乙二醇等高浓度聚合物溶液中将抗体产生细胞和骨髓瘤细胞混合的化学方法、利用电刺激的物理方法等。其中,上述化学方法的具体例如下所示。

[0483] 即,当使用聚乙二醇作为高浓度聚合物溶液时,在分子量为1500~6000、优选为

2000~4000的聚乙二醇溶液中,于30~40℃、优选35~38℃的温度,将抗体产生细胞与骨髓瘤细胞混合1~10分钟、优选5~8分钟。

[0484] (e) 杂交瘤组的选择

[0485] 对于通过上述细胞融合而得到的杂交瘤的筛选方法没有特别限制,通常可使用HAT(次黄嘌呤·氨基喋呤·胸嘧啶核苷,hypoxanthine,aminopterin,thymidine)筛选法(Kohler等,Nature (1975) 256,p.495;Milstein等,Nature (1977) 266,p.550)。

[0486] 该方法在使用无法在氨基喋呤中存活的HGPRT缺陷株的骨髓瘤细胞得到杂交瘤的情况下是有效的。即,通过在HAT培养基中培养未融合细胞及杂交瘤,从而选择性地仅残留具有针对氨基喋呤的耐性的杂交瘤,并且使其增殖。

[0487] (f) 分割成单细胞克隆(克隆)

[0488] 作为杂交瘤的克隆法,例如可使用甲基纤维素法、软琼脂法、有限稀释法等已知的方法(参见例如Barbara,B.M. and Stanley,M.S.:Selected Methods in Cellular Immunology,W.H.Freeman and Company, San Francisco (1980))。这些方法中,特别优选甲基纤维素法等三维培养法。例如,将通过细胞融合而形成的杂交瘤组悬浮于ClonaCell-HY Selection Medium D(StemCell Technologies公司制#03804)等甲基纤维素培养基中而进行培养,回收形成的杂交瘤集落,由此可得到单克隆杂交瘤。培养回收的各杂交瘤集落,选择在得到的杂交瘤培养上清液中稳定地确认到抗体效价的株作为HER2单克隆抗体产生杂交瘤株。

[0489] (g) 通过培养杂交瘤而制备单克隆抗体

[0490] 对于如上所述地选出的杂交瘤而言,可通过对其进行培养而高效地得到单克隆抗体,但优选在培养之前筛选产生目标单克隆抗体的杂交瘤。

[0491] 该筛选可采用其本身已知的方法进行。

[0492] 本发明中的抗体效价的测定例如可利用上述(b)项中说明的ELISA法进行。

[0493] 通过以上的方法得到的杂交瘤可在液氮中或-80℃以下的冰箱中以冷冻状态而保存。

[0494] 对于完成了克隆的杂交瘤,将培养基从HT培养基更换为正常培养基而进行培养。

[0495] 大量培养可利用使用了大型培养瓶的旋转培养、或旋动(spinner)培养进行。从该大量培养中的上清液中,利用凝胶过滤等本领域技术人员公知的方法进行纯化,从而可得到本发明的与蛋白质特异性结合的单克隆抗体。

[0496] 另外,向同系的小鼠(例如,上述的BALB/c)、或Nu/Nu小鼠的腹腔内注射杂交瘤,使该杂交瘤增殖,由此,可得到大量含有本发明的单克隆抗体的腹水。

[0497] 在腹腔内施予时,如果事先(3~7天前)施予2,6,10,14-四甲基十五烷(2,6,10,14-tetramethyl pentadecane;姥鲛烷)等矿物油,则可得到更多量的腹水。

[0498] 例如,向与杂交瘤同系的小鼠的腹腔内预先注射免疫抑制剂,使T细胞失活后,在20天后,使 10^6 ~ 10^7 个杂交瘤·克隆细胞悬浮于不含血清的培养基(0.5ml)中并施予至腹腔内,通常,在腹部膨胀、腹水积存时,从小鼠采集腹水。通过该方法,可得到浓度与培养液中相比为约100倍以上的单克隆抗体。

[0499] 利用上述方法得到的单克隆抗体例如可利用Weir,D.M.:Handbook of Experimental Immunology,Vol.I,II,III,Blackwell Scientific Publications,Oxford

(1978) 中记载的方法纯化。

[0500] 如上所述地得到的单克隆抗体针对HER2具有高抗原特异性。作为本发明的单克隆抗体,没有特别限制,可列举小鼠单克隆抗体4D5 (ATCC CRL 10463)。

[0501] (h) 单克隆抗体的检验

[0502] 如上所述地得到的单克隆抗体的同种型及亚类可按照以下方式确定。

[0503] 首先,作为鉴定方法,可列举Ouchterlony法、ELISA法、或RIA法。

[0504] Ouchterlony法虽然简单,但在单克隆抗体的浓度低时,需要进行浓缩操作。

[0505] 另一方面,当使用ELISA法或RIA法时,使培养上清液直接与抗原吸附固相反应,然后使用与各种免疫球蛋白同种型、亚类对应的抗体作为二抗,由此,可鉴定单克隆抗体的同种型、亚类。

[0506] 另外,作为更简单的方法,也可利用市售的鉴定用的试剂盒(例如,Mouse Typer Kit;Bio-Rad Laboratories, Inc. 制)等。

[0507] 此外,蛋白质的定量可利用Folin-Lowry法、及由280nm处的吸光度(1.4 (OD280) = 免疫球蛋白1mg/ml)计算的方法进行。

[0508] 此外,在再次实施(2)的(a)~(h)的步骤、另外独立地获得单克隆抗体的情况下,也可获得具有与步骤(g)中得到的抗HER2抗体同等的细胞毒性活性的抗体。作为这样的抗体的一例,可列举与步骤(g)中得到的抗HER2抗体所结合的同一表位相结合的抗体。若新制作的单克隆抗体与前述抗HER2抗体所结合的部分肽或部分立体结构结合,则判断为该单克隆抗体与同一表位结合。另外,通过确认该单克隆抗体与前述抗HER2抗体竞争向HER2的结合(即,该单克隆抗体抑制前述抗HER2抗体与HER2的结合),即使不确定具体的表位的序列或结构,也能判断该单克隆抗体结合于与抗HER2抗体相同的表位。当确认了表位相同时,可高度期待该单克隆抗体具有与前述抗HER2抗体同等的抗原结合能力或生物活性。

[0509] (3) 其他抗体

[0510] 本发明的抗体中,除了上述针对HER2的单克隆抗体之外,还包括以降低针对人的异种抗原性等为目的而人工地进行了修饰的基因重组型抗体、例如嵌合(Chimeric)抗体、人源化(Humanized)抗体、人抗体等。这些抗体可使用已知的方法制造。

[0511] 作为嵌合抗体,可列举将抗体的可变区和恒定区彼此为不同种的抗体、例如来源于小鼠或大鼠的抗体的可变区与来源于人的恒定区接合而成的嵌合抗体(参见Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851-6855, (1984))。作为本发明的嵌合抗体,没有特别限制,可列举包含人IgG1或IgG2的重链恒定区的嵌合抗体4D5。

[0512] 作为人源化抗体,可列举:仅将异种抗体的互补性决定区(CDR; complementarity determining region)整合至人源抗体而得到的抗体(参见Nature (1986) 321, p. 522-525);利用CDR移植法,除了异种抗体的CDR序列之外,还将异种抗体的一部分框架(frame work)的氨基酸残基移植至人抗体而得到的抗体(国际公开第90/07861号);使用基因转化诱变(gene conversion mutagenesis)策略而进行了人源化的抗体(美国专利第5821337号)。

[0513] 应予说明,本说明书中的“数个”是指1~10个、1~9个、1~8个、1~7个、1~6个、1~5个、1~4个、1~3个、或者1或2个。

[0514] 另外,作为本说明书中的氨基酸的取代,优选保守性氨基酸取代。保守性氨基酸取代是在与氨基酸侧链相关的氨基酸群组内发生的取代。优选的氨基酸群组如下所述:酸性

群组=天冬氨酸、谷氨酸；碱性群组=赖氨酸、精氨酸、组氨酸；非极性群组=丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸；及极性不带电家族=甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。其他的优选氨基酸群组如下所述：脂肪族羟基群组=丝氨酸及苏氨酸；含酰胺群组=天冬酰胺及谷氨酰胺；脂肪族群组=丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸；以及芳香族群组=苯丙氨酸、色氨酸及酪氨酸。所述氨基酸取代优选在不降低具有原来的氨基酸序列的物质的特性的范围内进行。

[0515] 可通过将显示与上述的重链氨基酸序列及轻链氨基酸序列的高同源性的序列进行组合,来选择具有与上述的各抗体同等的生物活性的抗体。这样的同源性通常为80%以上的同源性,优选为90%以上的同源性,更优选为95%以上的同源性,最优选为99%以上的同源性。另外,还可通过将重链或轻链的氨基酸序列中取代、缺失或添加1个~数个氨基酸残基得到的氨基酸序列进行组合,来选择具有与上述的各抗体同等的生物活性的抗体。应予说明,本说明书中的“同源性”与“同一性”含义相同。

[0516] 两种氨基酸序列间的同源性可通过使用Blast algorithm version2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402) 的默认参数而确定。Blast algorithm也可通过互联网访问 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast 而使用。

[0517] 作为本发明的抗体,还可列举与HER2结合的人抗体。抗HER2人抗体是指仅具有人源氨基酸序列的抗HER2抗体。抗HER2人抗体可通过以下方法得到:使用了具有包含人抗体的重链和轻链的基因的人染色体片段的产生人抗体的小鼠的方法(参见Tomizuka, K. 等, Nature Genetics (1997) 16, p.133-143; Kuroiwa, Y. 等, Nucl. Acids Res. (1998) 26, p.3447-3448; Yoshida, H. 等, Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, p.69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. and Iijima, S. 编著), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p.722-727等。)。

[0518] 这样的产生人抗体的小鼠具体可按照以下方式建立,通过制作基因敲除动物及转基因动物,以及使这些动物彼此交配,制作出以下动物:将内源性免疫球蛋白重链及轻链的基因座破坏,作为代替,介由酵母人工染色体(Yeast artificial chromosome, YAC)载体等导入了人免疫球蛋白重链及轻链的基因座而得到的基因重组动物。

[0519] 另外,也可通过基因重组技术,利用编码这样的人抗体的各重链及轻链的cDNA、优选含有该cDNA的载体来转化真核细胞,培养产生基因重组人单克隆抗体的转化细胞,从而从培养上清液中得到该抗体。

[0520] 在此,作为宿主,可使用例如真核细胞,优选CHO细胞、淋巴细胞、骨髓瘤等哺乳动物细胞。

[0521] 另外,还已知获取从人抗体文库中筛选的来源于噬菌体展示的人抗体的方法(参见Wormstone, I. M. 等, Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), p. 2301-2308; Carmen, S. 等, Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), p. 189-203; Siriwardena, D. 等, Ophthalmology (2002) 109 (3), p. 427-431 等)。

[0522] 例如,可使用使人抗体的可变区以单链抗体(scFv)形式在噬菌体表面表达、选择与抗原结合的噬菌体的噬菌体展示法(Nature Biotechnology (2005), 23, (9), p.1105-1116)。

[0523] 通过对基于与抗原结合而选出的噬菌体的基因进行分析,可确定编码与抗原结合的人抗体的可变区的DNA序列。

[0524] 如果明确与抗原结合的scFv的DNA序列,则可通过制作具有该序列的表达载体、导入至合适的宿主而使其表达,从而获取人抗体(国际公开第92/01047号、国际公开92/20791号、国际公开93/06213号、国际公开93/11236号、国际公开93/19172号、国际公开95/01438号、国际公开95/15388号;Annu. Rev. Immunol (1994) 12, p.433-455;Nature Biotechnology (2005) 23 (9), p.1105-1116)。

[0525] 作为比较抗体性质时的其他指标的一例,可列举抗体的稳定性。差示扫描量热测定仪(DSC)是能快速且准确地测定作为蛋白的相对结构稳定性的好指标的热变性中点(T_m)的装置。使用DSC测定 T_m 值,比较该值,由此可比较热稳定性的不同。已知抗体的保存稳定性与抗体的热稳定性显示一定程度的相关性(Lori Burton, 等, Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, p.265-273),以热稳定性作为指标,可选出合适的抗体。作为用于选出抗体的其他指标,可列举在合适的宿主细胞中的收量高,以及在水溶液中的凝集性低。例如收量最高的抗体不一定显示最高的热稳定性,因此,有必要基于上文说明的指标综合判断,选出最合适向人施予的抗体。

[0526] 本发明中使用的抗体也包括抗体的修饰体。该修饰体是指对本发明的抗体施以化学修饰或生物修饰而成的修饰体。化学修饰体中,包括具有化学部分与氨基酸骨架的键合、化学部分与N-连接或O-连接糖链的键合的化学修饰体等。生物修饰体中,包括翻译后修饰(例如,N-连接或O-连接的糖基化、N末端或C末端的加工、脱酰胺化、天冬氨酸的异构化、甲硫氨酸的氧化)的生物修饰体,使用原核生物宿主细胞进行表达从而将甲硫氨酸残基添加至N末端而得到的生物修饰体。另外,为了能够检测或分离本发明的抗体或抗原而进行了标记的标记物例如酶标记物、荧光标记物、亲和标记物也包含于所述修饰物的含义。这样的本发明的抗体的修饰物对于改善抗体的稳定性及血中滞留性、降低抗原性、检测或分离抗体或抗原等是有用的。

[0527] 另外,通过调节连接于本发明中使用的抗体的糖链修饰(糖基化、脱岩藻糖化等),能够增强抗体依赖性细胞毒性活性。作为调节抗体的糖链修饰的技术,已知国际公开第99/54342号、国际公开00/61739号、国际公开02/31140号等,但不限于此。本发明的抗体也包括对该糖链修饰进行调节而得到的抗体。

[0528] 在将抗体基因分离、然后导入至合适的宿主来制作抗体时,可使用合适的宿主与表达载体的组合。作为抗体基因的具体例,可列举将本说明书中记载的抗体的编码重链序列的基因、及编码轻链序列的基因组合而成的抗体基因。当转化宿主细胞时,可将重链序列基因和轻链序列基因插入同一表达载体,或者也可插入不同的表达载体。

[0529] 使用真核细胞作为宿主时,可使用动物细胞、植物细胞、真核微生物。尤其是,作为动物细胞,可列举哺乳类细胞,例如,作为猴的细胞的COS细胞(Gluzman, Y. Cell (1981) 23, p.175-182、ATCC CRL-1650)、小鼠成纤维细胞NIH3T3 (ATCC No.CRL-1658)、中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞、ATCC CCL-61)的二氢叶酸还原酶缺陷株(Urlaub, G. and Chasin,

L.A.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1980) 77, p.4126-4220)。

[0530] 使用原核细胞时,例如,可列举大肠杆菌、枯草芽孢杆菌。

[0531] 通过转化而向这些细胞中导入目标抗体基因,通过在体外培养经转化的细胞,从而可得到抗体。该培养中存在收量根据抗体序列的不同而不同的情况,可使用收量作为指标而从具有同等结合活性的抗体中筛选出容易生产药物的抗体。因此,本发明的抗体中也包括通过以下制造方法得到的抗体,所述方法的特征在于,包括培养上述经转化的宿主细胞的步骤,及从在该步骤中得到的培养物中采集目标抗体或该抗体的功能性片段的步骤。

[0532] 应予说明,已知哺乳类培养细胞所生产的抗体在重链的羧基末端缺失赖氨酸残基 (Journal of Chromatography A, 705:129-134 (1995)), 另外,同样为重链羧基末端的甘氨酸、赖氨酸这2个氨基酸残基缺失,新位于羧基末端的脯氨酸残基被酰胺化 (Analytical Biochemistry, 360:75-83 (2007))。然而,这些重链序列的缺失及修饰不影响抗体的抗原结合能力及效应子功能(补体的活化、抗体依赖性细胞毒性作用等)。因此,本发明涉及的抗体中也包括经过该修饰后的抗体及该抗体的功能性片段,也包括在重链羧基末端处缺失1个或2个氨基酸的缺失体、经酰胺化的该缺失体(例如羧基末端部位的脯氨酸残基被酰胺化的重链)等。但是,只要能保持抗原结合能力及效应子功能,则本发明涉及的抗体的重链的羧基末端的缺失体不限于上述种类。构成本发明涉及的抗体的2条重链可以是选自由全长及上述缺失体组成的组中任一种重链,也可以是任意两种的组合。各缺失体的量比可能受到产生本发明涉及的抗体的哺乳类培养细胞的种类及培养条件的影响,作为本发明涉及的抗体,可优选列举2条重链均缺失羧基末端的1个氨基酸残基的抗体。

[0533] 作为本发明中使用的抗体的同种型,可列举例如IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) 等,可优选列举IgG1或IgG2。

[0534] 作为抗体的生物活性,通常可列举:抗原结合活性、通过与抗原结合而内化至表达该抗原的细胞中的活性、将抗原的活性中和的活性、增强抗原活性的活性、抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)、补体依赖性细胞毒性 (CDC) 及抗体依赖性细胞介导的吞噬作用 (ADCP), 本发明涉及的抗体所具有的生物活性为与HER2结合的活性, 优选为通过与HER2结合而内化至HER2表达细胞中的活性。此外,本发明的抗体除了具有细胞内化活性之外,也可同时具有ADCC活性、CDC活性及/或ADCP活性。

[0535] 得到的抗体可纯化至均质 (homogeneity)。抗体的分离、纯化使用通常的蛋白质所使用的分离、纯化方法即可。例如,将柱色谱法、过滤器过滤、超滤、盐析、透析、制备用聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电点电泳等适当选择、组合,即可对抗体进行分离、纯化 (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R.Marshak等编著, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), 但不限于这些。

[0536] 作为色谱法,可列举亲和色谱法、离子交换色谱法、疏水性色谱法、凝胶过滤色谱法、反相色谱法、吸附色谱法等。

[0537] 这些色谱法可利用HPLC、FPLC等液相色谱法进行。

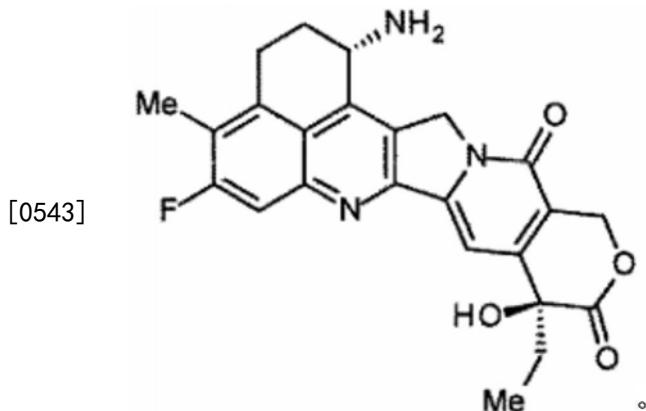
[0538] 作为亲和色谱法中使用的柱,可列举蛋白A柱、G蛋白柱。例如,作为使用了蛋白A柱的柱,可列举Hyper D、POROS、Sepharose F.F. (Pharmacia Corporation) 等。

[0539] 另外,也可使用将抗原固定化得到的载体,利用针对抗原的结合性而纯化抗体。

[0540] [抗肿瘤性化合物]

[0541] 对本发明使用的抗HER2抗体-药物偶联物中连接的抗肿瘤性化合物进行说明。该抗肿瘤性化合物为作为喜树碱衍生物的依沙替康(IUPAC名: (1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-1,2,3,9,12,15-六氢-9-羟基-4-甲基-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮, (也可表示为化学名: (1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-2,3-二氢-9-羟基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮)。依沙替康为下式表示的化合物:

[0542] [化学式23]



[0544] 依沙替康具有喜树碱结构,因此,已知在酸性水性介质中(例如pH3左右),平衡偏向形成了内酯环的结构(闭环体),另一方面,在碱性水性介质中(例如pH10左右),平衡偏向内酯环开环的结构(开环体)。不言自明,导入了对应于这样的闭环结构及开环结构的依沙替康残基的抗体-药物偶联物均包含于本发明使用的抗体-药物偶联物的范围。

[0545] [接头结构]

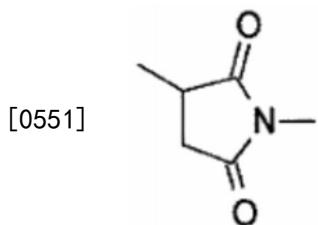
[0546] 对本发明使用的抗HER2抗体-药物偶联物中使抗肿瘤性化合物与抗HER2抗体连接的接头结构进行说明。该接头可由下式表示：

[0547] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

[0548] (式中,

[0549] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-为下式表示的结构,

[0550] [化学式24]



[0552] 在该结构的3位通过硫醚键与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接,

[0553] -GGFG-表示-Gly-Gly-Phe-Gly-的四肽残基。)

[0554] [肿瘤细胞内释放的化合物]

[0555] 就本发明中使用的抗HER2抗体-药物偶联物而言,还可在移动至肿瘤细胞内后对

接头部分进行切割,从而游离出下式表示的结构的药物衍生物,

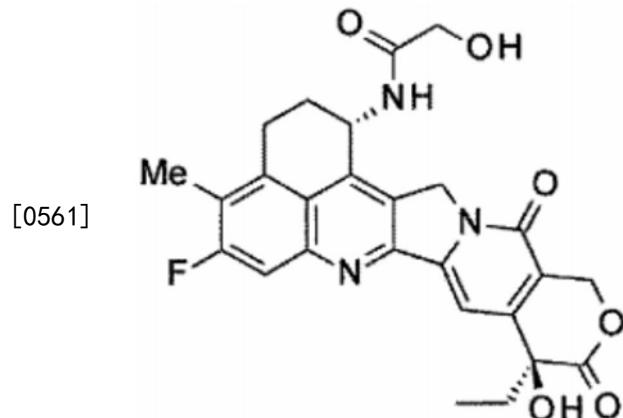
[0556] $\text{NH}_2\text{--CH}_2\text{--O--CH}_2\text{--C}(=\text{O})\text{--(NH--DX)}$ 。

[0557] 确认到了上述药物衍生物的位于同分子内的缩醛胺结构不稳定,因而进一步自分解而游离出式:

[0558] $\text{HO--CH}_2\text{--C}(=\text{O})\text{--(NH--DX)}$ 表示的化合物。

[0559] 上述化合物可由下式表示,

[0560] [化学式25]



[0562] (以下,有时在本发明中也称作“化合物1”。)。

[0563] 化合物1被认为是本发明使用的抗体-药物偶联物所具有的抗肿瘤活性的主体,已确认具有拓扑异构酶I抑制作用(Ogitani Y.等,Clinical Cancer Research,2016,Oct 15;22(20):5097-5108,Epud 2016Mar 29)。

[0564] 应予说明,还已知本发明使用的抗体-药物偶联物具有旁观者效应(Ogitani Y.等,Cancer Science (2016) 107,1039-1046)。该旁观者效应如下发挥作用:本发明使用的抗体-药物偶联物在HER2表达癌细胞中内化后,所释放的化合物1对附近未表达HER2的癌细胞也发挥抗肿瘤效果。

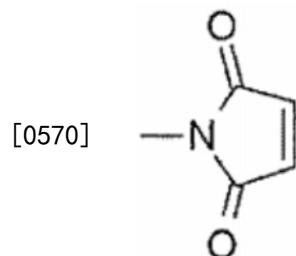
[0565] [制造方法]

[0566] 就本发明使用的抗体-药物偶联物而言,可通过使具有巯醇基(或也称作巯基)的抗HER2抗体与以下的化合物(以下,在本发明中也称作“化合物2”)反应来制造,

[0567] (马来酰亚胺-N-基) $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{--C}(=\text{O})\text{--GGFG--NH--CH}_2\text{--O--CH}_2\text{--C}(=\text{O})\text{--(NH--DX)}$

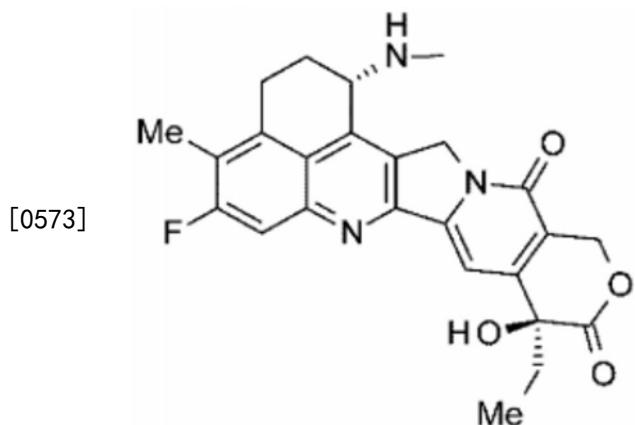
[0568] (式中,(马来酰亚胺-N-基)-为下式表示的氮原子为连接部位的基团,

[0569] [化学式26]



[0571] - (NH-DX) 为下式所示的、1位的氨基的氮原子成为连接部位的基团,

[0572] [化学式27]



[0574] -GGFG-表示-Gly-Gly-Phe-Gly-的四肽残基。)

[0575] 化合物可参考国际公开第2015/115091号的实施例26、32及33中记载的制造方法等来制造。化合物2可表示为下述的化学名:N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-(4-{{(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]噁唑-1-基}氨基}-2-氧代乙氧基)甲基]甘氨酰胺。

[0576] 具有巯基的抗HER2抗体可利用本领域技术人员公知的方法获得(Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996))。例如,可列举以下方法:使三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP)等还原剂作用于抗HER2抗体而将抗体内铰链部的二硫键还原从而产生巯基;等等,但不限于这些方法。

[0577] 具体而言,作为还原剂,相对于每1个抗体内铰链部二硫键,使用0.3~3摩尔当量TCEP,在含有螯合剂的缓冲液中,使其与抗HER2抗体反应,由此,可得到将抗体内铰链部二硫醚部分或完全地还原得到的抗HER2抗体。作为螯合剂,可列举例如乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)等。可以以1mM~20mM的浓度使用它们。作为缓冲液,可使用磷酸钠、硼酸钠、乙酸钠溶液等。具体而言,于4℃~37℃使抗HER2抗体与TCEP反应1~4小时,由此,可得到部分或完全还原的具有巯基的抗HER2抗体。

[0578] 此处,通过实施使巯基加成至药物-接头部分的反应,可通过硫醚键来连接药物-接头部分。

[0579] 相对于每1个具有巯基的抗HER2抗体,可使用2~20摩尔当量的化合物2,制造每1个抗HER2抗体连接有2个~8个药物而成的抗体-药物偶联物(1)。具体而言,在含有具有巯基的抗HER2抗体的缓冲液中,添加溶解有化合物2的溶液并使其进行反应。此处,作为缓冲液,可使用乙酸钠溶液、磷酸钠、硼酸钠等。反应时的pH为5~9,更优选于pH7左右反应。作为溶解化合物2的溶剂,可使用二甲基亚砜(DMSO)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基乙酰胺(DMA)、N-甲基-2-吡啶酮(NMP)等有机溶剂。

[0580] 可以将溶解有化合物2的有机溶剂溶液以1~20% v/v添加至含有具有巯基的抗HER2抗体的缓冲液中并进行反应。反应温度为0至37℃、更优选为10至25℃,反应时间为0.5至2小时。可通过利用含硫醇试剂使未反应的化合物2的反应性失活而结束反应。含硫醇试剂例如为半胱氨酸或N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)。更具体而言,添加相对于使用的化合物2而言1~2摩尔当量的NAC,于室温孵育10~30分钟,由此使反应结束。

[0581] 对于制得的抗体-药物偶联物,可利用以下的共通操作,进行浓缩、缓冲液更换、纯

化、测定抗体浓度及每一分子抗体的药物平均连接数,进行抗体-药物偶联物的鉴定。

[0582] 共通操作A:抗体或抗体-药物偶联物水溶液的浓缩

[0583] 向Amicon Ultra (50,000MWC0,Millipore Co.)的容器内加入抗体或抗体-药物偶联物溶液,使用离心机(Allegra X-15R,Beckman Coulter,Inc.)进行离心操作(以2000G~3800G离心5~20分钟),将抗体或抗体-药物偶联物溶液浓缩。

[0584] 共通操作B:抗体的浓度测定

[0585] 使用UV测定器(Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.),按照制造商规定的方法,测定抗体浓度。此时,针对各抗体而采用不同的280nm吸光系数($1.3\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 至 $1.8\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

[0586] 共通操作C-1:抗体的缓冲液更换

[0587] 按照制造商规定的方法,用含有氯化钠(137mM)及乙二胺四乙酸(EDTA,5mM)的磷酸缓冲液(10mM, pH6.0;本说明书中称为PBS6.0/EDTA),将使用了Sephadex G-25载体的NAP-25柱(商品编号:17-0852-02,GE Healthcare Japan Corporation)平衡化。针对一根该NAP-25柱,装填2.5mL抗体水溶液,然后分取用3.5mL PBS6.0/EDTA洗脱的级分(3.5mL)。利用共通操作A将该级分浓缩,使用共通操作B测定抗体浓度,然后使用PBS6.0/EDTA,将抗体浓度调节为10mg/mL。

[0588] 共通操作C-2:抗体的缓冲液更换

[0589] 按照制造商规定的方法,用含有氯化钠(50mM)及EDTA(2mM)的磷酸缓冲液(50mM, pH6.5;本说明书中称为PBS6.5/EDTA)将使用了Sephadex G-25载体的NAP-25柱(商品编号:17-0852-02,GE Healthcare Japan Corporation)平衡化。针对一根该NAP-25柱,装填2.5mL抗体水溶液,然后分取用3.5mL PBS6.5/EDTA洗脱的级分(3.5mL)。利用共通操作A将该级分浓缩,利用共通操作B测定抗体浓度,然后使用PBS6.5/EDTA,将抗体浓度调节为20mg/mL。

[0590] 共通操作D:抗体-药物偶联物的纯化

[0591] 用市售的磷酸缓冲液(PBS7.4,商品编号:10010-023,Invitrogen)、含有氯化钠(137mM)的磷酸钠缓冲液(10mM, pH6.0;本说明书中称为PBS6.0)或含有山梨糖醇(5%)的乙酸缓冲液(10mM, pH5.5;本说明书中称为ABS)中的任一种缓冲液将NAP-25柱平衡化。在该NAP-25柱中装填抗体-药物偶联物反应水溶液(约1.5mL),用制造商规定的量的缓冲液洗脱,由此分取抗体级分。将该分取级分再次装填至NAP-25柱,用缓冲液洗脱,进行凝胶过滤纯化操作,反复操作计2至3次,由此,得到除去了未连接的药物接头、低分子化合物(三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP)、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)、二甲基亚砜)的抗体-药物偶联物。

[0592] 共通操作E:抗体-药物偶联物中的抗体浓度及每一分子抗体的药物平均连接数的测定(1)

[0593] 抗体-药物偶联物中的连接药物浓度可通过以下方式算出:测定抗体-药物偶联物水溶液在280nm及370nm这两种波长处的UV吸光度,然后进行下述计算,由此算出。

[0594] 由于某一波长下的总吸光度等于存在于体系内的所有吸收化学物质种类的吸光度之和(吸光度的加和性),所以,假设抗体及药物的摩尔吸光系数在抗体与药物偶联前后不发生变化时,抗体-药物偶联物中的抗体浓度及药物浓度如下述的关系式所示。

[0595] $A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280} C_D + \epsilon_{A,280} C_A$ 式(I)

[0596] $A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370} C_D + \epsilon_{A,370} C_A$ 式 (II)

[0597] 此处, A_{280} 表示280nm处的抗体-药物偶联物水溶液的吸光度, A_{370} 表示370nm处的抗体-药物偶联物水溶液的吸光度, $A_{A,280}$ 表示280nm处的抗体的吸光度, $A_{A,370}$ 表示370nm处的抗体的吸光度, $A_{D,280}$ 表示280nm处的偶联物前体的吸光度, $A_{D,370}$ 表示370nm处的偶联物前体的吸光度, $\epsilon_{A,280}$ 表示280nm处的抗体的摩尔吸光系数, $\epsilon_{A,370}$ 表示370nm处的抗体的摩尔吸光系数, $\epsilon_{D,280}$ 表示280nm处的偶联物前体的摩尔吸光系数, $\epsilon_{D,370}$ 表示370nm处的偶联物前体的摩尔吸光系数, C_A 表示抗体-药物偶联物中的抗体浓度, C_D 表示抗体-药物偶联物中的药物浓度。

[0598] 此处, $\epsilon_{A,280}$ 、 $\epsilon_{A,370}$ 、 $\epsilon_{D,280}$ 、 $\epsilon_{D,370}$ 可使用事先准备的值(计算推定值或由化合物的UV 测定得到的实测值)。例如, $\epsilon_{A,280}$ 可由抗体的氨基酸序列利用已知的计算方法(Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423)推定。 $\epsilon_{A,370}$ 通常为0。制造例中,曲妥珠单抗的摩尔吸光系数使用 $\epsilon_{A,280}=215400$ (计算推定值) 及 $\epsilon_{A,370}=0$ 。 $\epsilon_{D,280}$ 及 $\epsilon_{D,370}$ 可通过对以一定摩尔浓度溶解使用的偶联物前体得到的溶液的吸光度进行测定、并根据朗伯-比尔定律(吸光度=摩尔浓度×摩尔吸光系数×吸收池光程)而得到。对于制造例中的药物接头的摩尔吸光系数而言,只要没有特别说明,则使用 $\epsilon_{D,280}=5000$ (实测平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (实测平均值)。测定抗体-药物偶联物水溶液的 A_{280} 及 A_{370} , 将它们的值代入式(I) 及 (II), 解联立方程式, 从而可求出 C_A 及 C_D 。进而, 通过将 C_D 除以 C_A , 从而可求出每1个抗体的药物平均连接数。

[0599] 共通操作F:抗体-药物偶联物中的每一分子抗体的药物平均连接数的测定(2)

[0600] 对于抗体-药物偶联物中的每一分子抗体的药物平均连接数而言,除了前述的共通操作E之外,也可通过使用了以下的方法的高效液相色谱法(HPLC)分析求出。

[0601] [F-1.HPLC分析用样品的制备(抗体-药物偶联物的还原)]

[0602] 将抗体-药物偶联物溶液(约1mg/mL、60μL)与二硫苏糖醇(DTT)水溶液(100mM、15μL)混合。于37℃孵育混合物30分钟,由此切断抗体-药物偶联物的L链及H链间的二硫键的,将所得样品用于HPLC分析。

[0603] [F-2.HPLC分析]

[0604] 在下述的测定条件下进行HPLC分析。

[0605] HPLC系统:Agilent 1290HPLC系统(Agilent Technologies)

[0606] 检测器:紫外吸光度计(测定波长:280nm)

[0607] 柱:PLRP-S (2.1×50mm、8μm、1000Å;Agilent Technologies、P/N PL1912-1802)

[0608] 柱温:80℃

[0609] 流动相A:0.04%三氟乙酸(TFA)水溶液

[0610] 流动相B:含有0.04%TFA的乙腈溶液

[0611] 梯度程序:29%-36% (0分钟-12.5分钟)、36%-42% (12.5-15分钟)、42%-29% (15分钟-15.1分钟)、29%-29% (15.1分钟-25分钟)

[0612] 进样量:15μL

[0613] [F-3.数据分析]

[0614] (F-3-1)相对于未连接药物的抗体的L链(L_0)及H链(H_0)而言,连接有药物的L链(连接有一个药物的L链: L_1)及H链(连接有一个药物的H链: H_1 、连接有两个药物的H链: H_2 、连接有三个药物的H链: H_3)的疏水性与连接的药物的数量成比例地增高,保留时间延长,因此,

按照L₀、L₁、H₀、H₁、H₂、H₃的顺序被洗脱。通过与L₀及H₀的保留时间进行比较,可将检出峰分配给L₀、L₁、H₀、H₁、H₂、H₃中的某一个。

[0615] (F-3-2)由于药物接头存在UV吸收,因此,根据药物接头的连接数,使用L链、H链及药物接头的摩尔吸光系数,按照下式进行峰面积值的修正。

[0616] [数学式1]

[0617]

L 链峰面积修正值 (L_i)

= 峰面积

$$\times \frac{L\text{链的摩尔吸光系数}}{L\text{链的摩尔吸光系数} + \text{连接药物数} \times \text{药物接头的摩尔吸光系数}}$$

[0618] [数学式2]

[0619]

H 链峰面积修正值 (H_i)

= 峰面积

$$\times \frac{H\text{链的摩尔吸光系数}}{H\text{链的摩尔吸光系数} + \text{连接药物数} \times \text{药物接头的摩尔吸光系数}}$$

[0620] 此处,各抗体中的L链及H链的摩尔吸光系数(280nm)可使用利用已知的计算方法(Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423)由各抗体的L链及H链的氨基酸序列推定的值。在曲妥珠单抗的情况下,根据其氨基酸序列,作为推定值,使用26150作为L链的摩尔吸光系数,使用81290作为H链的摩尔吸光系数。另外,对于药物接头的摩尔吸光系数(280nm)而言,用巯基乙醇或N-乙酰半胱氨酸使各药物接头反应,使用将马来酰亚胺基转化为琥珀酰亚胺硫醚而得到的化合物的实测的摩尔吸光系数(280nm)。

[0621] (F-3-3)按照下式计算相对于峰面积修正值总和的、各链峰面积比(%)。

[0622] [数学式3]

[0623] L 链峰面积比 = $\frac{A_{L1}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$

[0624] H 链峰面积比 = $\frac{A_{H1}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$

[0625] A_{Li}、A_{Hi}:L_i、H_i各峰面积修正值

[0626] (F-3-4)按照下式计算抗体-药物偶联物中的每一分子抗体的药物平均连接数。

[0627] 药物平均连接数 = (L₀峰面积比 x 0 + L₁峰面积比 x 1 + H₀峰面积比 x 0 + H₁峰面积比 x 1 + H₂峰面积比 x 2 + H₃峰面积比 x 3) / 100 x 2

[0628] 本发明使用的抗HER2抗体-药物偶联物存在由于在大气中放置或进行重结晶、纯化操作而吸收水分或附着由吸附水等、从而形成水合物的情况,这样的含有水的化合物或盐也包含于本发明使用的抗HER2抗体-药物偶联物中。

[0629] 另外,本发明使用的抗HER2抗体-药物偶联物中也包括用各种放射性或非放射性同位素标记得到的化合物。构成本发明的抗体-药物偶联物的原子中的一种以上,可以以非天然比例含有原子同位素。作为原子同位素,可列举例如氘(²H)、氚(³H)、碘-125(¹²⁵I)或碳-

14 (¹⁴C) 等。另外,本发明化合物可以用例如氚 (³H)、碘-125 (¹²⁵I) 或碳-14 (¹⁴C) 等放射性同位素进行放射性标记。经放射性标记的化合物作为治疗或预防剂、研究试剂例如检验试剂、及诊断试剂例如体内成像诊断试剂是有用的。对于本发明使用的抗体-药物偶联物的所有同位素变体而言,无论是否具有放射性,均包含于本发明的范围。

[0630] [医药]

[0631] 本发明治疗剂的特征在于含有本发明使用的抗体-药物偶联物。另外,本发明的治疗方法的特征在于将本发明使用的抗体-药物偶联物施予至患者。它们可作为对于现有的抗HER2药呈耐性或难治性的HER2表达癌的治疗剂及治疗方法来使用。

[0632] 本发明中“耐性”或“难治性”表示对于基于抗癌剂的治疗而无应答的性质,也可表达为“无应答性”、“无反应性”,另外,因无应答从而无法防止肿瘤的增殖,因而也可表达为“不耐性”。

[0633] 本发明的“耐性或难治性”可以是“由于基于现有的抗HER2药的治疗而获得的耐性或难治性”,也可以是“并非来自基于现有的抗HER2药的治疗、而是原本具有的耐性或难治性”。

[0634] 应予说明,本发明中“HER2表达癌”表示包含在细胞表面表达HER2蛋白的癌细胞的癌及/或肿瘤。

[0635] 本发明中“现有的抗HER2药”表示除本发明的抗体-药物偶联物以外的、在临床中使用的以HER2为靶标的药剂,优选表示在标准治疗中使用的抗HER2药。“现有的抗HER2药”只要可满足上述条件即可,没有特殊限定,优选为选自由曲妥珠单抗-美坦新偶联物 (Trastuzumab-美坦新偶联物、T-DM1)、曲妥珠单抗 (Trastuzumab)、帕妥珠单抗 (Pertuzumab)、及拉帕替尼 (Lapatinib) 组成的组中的至少一种,更优选曲妥珠单抗-美坦新偶联物或曲妥珠单抗,进一步更优选曲妥珠单抗-美坦新偶联物。

[0636] 本发明的治疗剂及治疗方法可良好地用于施予至具有基于现有的抗癌药的治疗史的患者。

[0637] 本发明中“现有的抗癌药”表示除本发明使用的抗体-药物偶联物以外的、在临床中使用的抗癌药。“现有的抗癌药”只要可满足上述条件即可,没有特殊限定,优选包含选自由曲妥珠单抗-美坦新偶联物、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、拉帕替尼、伊立替康 (Irinotecan、CPT-11)、顺铂 (Cisplatin)、卡铂 (Carboplatin)、奥沙利铂 (Oxaliplatin)、氟尿嘧啶 (Fluorouracil、5-FU)、吉西他滨 (Gemcitabine)、卡培他滨 (Capecitabine)、紫杉醇 (Paclitaxel)、多西他赛 (Docetaxel)、多柔比星 (Doxorubicin)、表柔比星 (Epirubicin)、环磷酰胺 (Cyclophosphamide)、丝裂霉素C (Mitomycin C)、替加氟 (Tegafur) • 吉美嘧啶 (Gimeracil) • 奥替拉西 (Oteracil) 复方制剂、西妥昔单抗 (Cetuximab)、帕尼单抗 (Panitumumab)、贝伐单抗 (Bevacizumab)、雷莫芦单抗 (Ramucirumab)、瑞戈非尼 (Regorafenib)、屈氟尿苷 (Trifluridine) • 替吡嘧啶 (Tipiracil) 复方制剂、吉非替尼 (Gefitinib)、厄洛替尼 (Erlotinib)、阿法替尼 (Afatinib)、甲氨蝶呤 (Methotrexate)、及培美曲塞 (Pemetrexed) 组成的组中的至少一种。

[0638] 在治疗乳腺癌时,“现有的抗癌药”优选包含选自由曲妥珠单抗-美坦新偶联物、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、拉帕替尼、氟尿嘧啶、紫杉醇、多西他赛、多柔比星、表柔比星、环磷酰胺、及甲氨蝶呤组成的组中的至少一种,更优选包含曲妥珠单抗-美坦新偶联物或曲妥珠

单抗,进一步更优选包含曲妥珠单抗-美坦新偶联物。

[0639] 在治疗胃癌时,“现有的抗癌药”优选包含选自由曲妥珠单抗、伊立替康、顺铂、氟尿嘧啶、紫杉醇、多西他赛、多柔比星、表柔比星、及丝裂霉素C组成的组中的至少一种,更优选包含曲妥珠单抗及/或伊立替康,进一步更优选包含曲妥珠单抗。

[0640] 在治疗大肠癌时,“现有的抗癌药”优选包含选自由伊立替康、奥沙利铂、氟尿嘧啶、西妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、雷莫芦单抗、瑞戈非尼、及屈氟尿苷·替吡嘧啶复方制剂组成的组中的至少一种,更优选包含伊立替康。

[0641] 在治疗非小细胞肺癌时,“现有的抗癌药”优选包含选自由伊立替康、顺铂、卡铂、吉西他滨、吉非替尼、厄洛替尼、阿法替尼、及培美曲塞组成的组中的至少一种。

[0642] 对于本发明的治疗剂及治疗方法而言,优选的是,本发明使用的抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg(表示每1kg体重的施予量为5.4mg,以下相同)~8mg/kg的范围,更优选为5.4mg/kg、6.4mg/kg、7.4mg/kg或8mg/kg,进一步更优选为5.4mg/kg或6.4mg/kg。

[0643] 本发明的治疗剂及治疗方法的特征在于,优选以每3周1次的间隔施予本发明使用的抗体-药物偶联物。

[0644] 就本发明的治疗剂及治疗方法而言,可优选用于治疗选自由乳腺癌、胃癌(有时也称为胃腺癌)、大肠癌(有时也称为结肠直肠癌,包含结肠癌及直肠癌)、非小细胞肺癌、食道癌、唾液腺癌、食管胃结合部腺癌、胆管癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、及子宫癌肉瘤组成的组中的至少一种癌,可更优选用于治疗选自由乳腺癌、胃癌、大肠癌、非小细胞肺癌、食道癌、唾液腺癌、食管胃结合部腺癌、胆管癌、及佩吉特病组成的组中的至少一种癌,可进一步更优选用于治疗乳腺癌、胃癌、大肠癌、或非小细胞肺癌。

[0645] 应予说明,对于乳腺癌,基于作为现有的抗HER2药的曲妥珠单抗-美坦新偶联物及曲妥珠单抗的治疗已得到承认。另外,对于胃癌及食管胃结合部腺癌,基于作为现有的抗HER2药的曲妥单抗的治疗也已得到承认。因此,将本发明的治疗剂用于治疗选自由乳腺癌、胃癌、及食管胃结合部腺癌组成的组中的至少一种癌时,“耐性或难治性”优选为“由于基于现有的抗HER2药的治疗而获得的耐性或难治性”。

[0646] 另一方面,对于大肠癌、非小细胞肺癌、食道癌、唾液腺癌、胆管癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、及子宫癌肉瘤,基于现有的抗HER2药的有效治疗方法仍未确立。因此,将本发明的治疗剂及治疗方法用于治疗选自由大肠癌、非小细胞肺癌、食道癌、唾液腺癌、胆管癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、及子宫癌肉瘤组成的组中的至少一种癌时,“耐性或难治性”优选为“并非来自基于现有的抗HER2药的治疗、而是原本具有的耐性或难治性”。

[0647] 就本发明的治疗剂及治疗方法而言,只要为HER2表达癌,则无论对于HER2过量表达的癌还是HER2低表达的癌均可使用。

[0648] 本发明中“HER2过量表达的癌”只要是本领域技术人员认可为HER2过量表达的癌,则没有特殊限制,可优选列举通过免疫组织化学法(IHC)判定HER2的表达为3+的癌、或者、通过免疫组织化学法判定为HER2的表达为2+、且通过原位杂交法(ISH)判定HER2的表达为阳性的癌。应予说明,本发明的原位杂交法包括荧光原位杂交法(FISH)、及双色原位杂交法(DISH)。

[0649] 本发明中“HER2低表达的癌”只要是本领域技术人员认可为HER2低表达的癌,则没

有特殊限制,可优选列举通过免疫组织化学法判定HER2的表达为2+、且通过原位杂交法判定HER2的表达为阴性的癌,或通过免疫组织化学法判定HER2的表达为1+的癌。

[0650] 就通过免疫组织化学法判定HER2表达度的方法、通过原位杂交法判定HER2表达的阳性或阴性的方法而言,只要是本领域技术人员认可的判定方法,则没有特殊限制,例如,可列举HER2检查指南乳腺癌编第四版(乳腺癌HER2检查病理部会制作)。

[0651] 本发明的治疗剂及治疗方法可优先用于治疗无法进行手术或复发的癌。

[0652] 本发明的治疗剂及治疗方法可含有药学上允许的制剂成分而进行使用。

[0653] 换言之,本发明的治疗剂还可作为以本发明使用的抗体-药物偶联物、其盐、或它们的水合物作为活性成分、且含有药学上允许的制剂成分的耐性癌的治疗用医药组合物进行使用。

[0654] 本发明的治疗用医药组合物针对对于现有的抗癌药显示耐性的癌(即耐性癌)、尤其是获得了对于现有的抗癌药的耐性的癌(即继发性耐药癌)显示出优异的抗肿瘤活性。因此,本发明的治疗用医药组合物适用于癌症患者中对于现有的抗癌药显示耐性的患者组(具有基于现有的抗癌药的治疗史的患者),发挥显著的抗肿瘤效果。

[0655] “现有的抗癌药”的定义如前所述,优选曲妥珠单抗-美坦新偶联物(T-DM1)等包含抗HER2抗体的抗体-药物偶联物、或者曲妥珠单抗或帕妥珠单抗等抗HER2抗体本身。

[0656] 就本发明的治疗用医药组合物而言,通过代替上述现有的抗癌药施予至癌症患者,或者与上述现有的抗癌药组合施予至癌症患者,从而针对获得了对于上述现有的抗癌药的耐性的癌显示出好的治疗效果。

[0657] 本发明的治疗用医药组合物的特征在于,优选本发明使用的抗体-药物偶联物的每1次的施予量为0.8mg/kg~8mg/kg的范围,其特征在于,更优选本发明使用的抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg、6.4mg/kg、7.4mg/kg、或8mg/kg,其特征在于,进一步更优选本发明使用的抗体-药物偶联物的每1次的施予量为5.4mg/kg、或6.4mg/kg。

[0658] 本发明的治疗用医药组合物的施予间隔可为每1周1次(q1w)、每2周1次(q2w)、每3周1次(q3w)、或每4周1次(q4w),优选为每3周1次。

[0659] 本发明的治疗用医药组合物可优先用于耐性癌为肺癌、尿路上皮癌、大肠癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、食道癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、子宫癌、唾液腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、或肉瘤的情况,可更优先用于耐性癌为乳腺癌、胃癌、大肠癌、或非小细胞肺癌的情况,进一步更优先用于耐性癌为乳腺癌、或胃癌的情况。

[0660] 本发明的治疗剂及治疗用医药组合物能够减缓癌细胞的生长,抑制增殖,进而破坏癌细胞。通过这些作用,对于癌症患者而言,可实现从因癌而导致的症状中解脱、改善QOL,维持癌症患者的生命,达成治疗效果。即使在未达成破坏癌细胞的情况下,仍然能够通过抑制或控制癌细胞的增殖而使癌症患者达成更高的QOL,并且可实现更长时间的生存。

[0661] 除了在这样的药物疗法中单独使用药物之外,也可在辅助疗法中作为与其他疗法组合的药剂使用,也可与外科手术、放射线疗法、激素疗法等组合。此外,也可作为新辅助疗法中的药物疗法的药剂使用。

[0662] 除了用于上述这样的治疗之外,还可期待抑制微小的转移癌细胞的增殖进而将其

破坏的预防效果。尤其是,已在原发性的癌细胞中确认到HER2的表达时,通过施予本发明的抗HER2抗体-药物偶联物,可期待癌转移的抑制、预防效果。例如,可期待抑制、破坏转移过程中存在于体液中的癌细胞的效果、抑制、破坏刚着床于某种组织后的微小癌细胞等效果。因此,尤其可期待抑制、预防用外科方法除去癌组织后的癌转移的效果。

[0663] 对于本发明的抗HER2抗体-药物偶联物而言,除了以全身疗法的形式应用于患者之外,也可期待局部地应用于癌组织的治疗效果。

[0664] 本发明的治疗剂及治疗用医药组合物可合适地向哺乳动物施予,更优选为向人施予。

[0665] 本发明的治疗剂及治疗用医药组合物可包含1种以上药学上允许的制剂成分而进行施予。就药学上允许的制剂成分而言,可根据本发明使用的抗体-药物偶联物的施予量、施予浓度,从本领域中通常使用的制剂添加剂等中适当选择使用。就药学上允许的制剂成分而言,代表性地,包含1种以上药学载体(例如,经灭菌的液体)。此处,液体包含例如水及油(石油、动物来源、植物来源、或合成来源的油)。油例如可以是花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。在静脉内施予本发明的治疗剂及治疗用医药组合物的情况下,水是更有代表性的载体。食盐水溶液、以及右旋糖(dextrose)水溶液及甘油水溶液也可作为液体载体,特别是可用于注射用溶液。适当的药学的赋形剂可从本领域中已知的药学赋形剂中适当选择。根据期望,上述组合物还可以包含微量的湿润剂或乳化剂、或pH缓冲剂。适当的药学上允许的制剂成分的例子记载于E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。其配方对应于施予方式。

[0666] 已知多种递送系统,可用于施予本发明的治疗剂及治疗用医药组合物。作为导入方法,可列举皮内、肌内、腹腔内、静脉内、及皮下的途径,但不限于这些。施予可利用例如输注或推注(bolus injection)。特别优选的实施方式中,本发明的治疗剂及治疗用医药组合物的施予利用输注进行。肠胃外的施予是优选的施予路径。

[0667] 代表的实施方式中,将本发明的治疗剂及治疗用医药组合物制成适于向人静脉内施予的组合物,按照常规步骤而制备。代表性地,用于静脉内施予的组合物为灭菌的等渗性的水性缓冲液中的溶液。必要时,本发明的治疗剂及治疗用医药组合物还可包含增溶剂及用于缓解注射部位的疼痛的局部麻醉剂(例如,利多卡因)。通常,上述成分例如可以以下述中任一种方式供给:将上述成分密封于显示活性剂的量的安瓿或小袋(sachet)等中,制成密封容器中的干燥冻干粉末或无水的浓缩物,分别、或在单元剂型中一同混合而供给。在通过输注施予本发明的治疗剂及治疗用医药组合物的情况下,例如,可以使用入到含有灭菌的制药等级的水或盐水的注液瓶进行给药。在利用注射而施予本发明的治疗剂及治疗用医药组合物的情况下,可提供注射用灭菌水或盐水的安瓿,从而得以将上述成分在施予前进行混合。

[0668] 本发明的治疗剂及治疗用医药组合物可以是仅包含本发明使用的抗HER2抗体-药物偶联物的医药组合物,也可以是包含本发明使用的抗HER2抗体-药物偶联物及至少一种除此之外的癌症治疗剂的医药组合物。本发明使用的抗HER2抗体-药物偶联物可以与现有的抗癌药共同施予,由此可增强抗癌效果。基于上述目的使用的现有的抗癌药可以与本发明的抗体-药物偶联物同时、分别、或连续地施予至个体,也可改变各自的施予间隔而进行施予。“现有的抗癌药”的定义如前所述。

[0669] 对于本发明的治疗剂及治疗用医药组合物而言,作为具有选择的组成和必需纯度的制剂,可制成冻干制剂或液态制剂的形式。制成冻干制剂时,可以是包含本领域中使用的适当的制剂添加剂的制剂。另外,在液剂中也同样地制成包含本领域中使用的各种制剂添加剂的液态制剂。

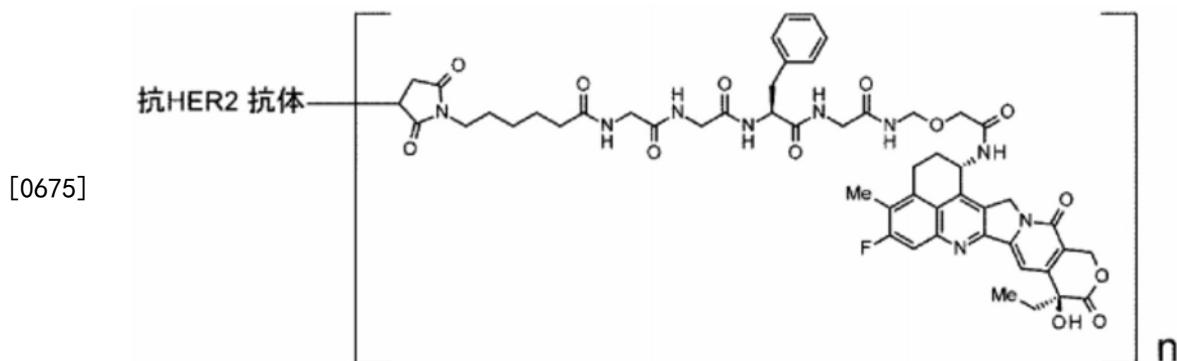
[0670] 实施例

[0671] 通过以下所示的例子具体地说明本发明,但本发明不受它们的限制。另外,不对这些例子进行任何方式的限定性解释。

[0672] [制造例:抗体-药物偶联物的制备]

[0673] 依照专利文献8(国际公开第2015/115091号)记载的制造方法来制造下式表示的抗体-药物偶联物(以下,称为“抗体-药物偶联物(1)”或“ADC(1)”)。

[0674] [化学式28]



[0676] 此处,药物-接头结构通过硫醚键与抗体连接,n为7~8的范围。

[0677] [评价例1:抗肿瘤试验]

[0678] 小鼠:将6-12周龄的雌性免疫缺陷Cr1:Nu(Ncr)-Foxn1^{Nu}小鼠(Charles River公司)供于实验。

[0679] 测定・计算式:用电子数字卡尺每周测定2次肿瘤的长径及短径,计算肿瘤体积(mm^3)。计算式如下所示。

$$[\text{肿瘤体积}(\text{mm}^3)] = 0.52 \times \text{长径}(\text{mm}) \times [\text{短径}(\text{mm})]^2$$

[0680] 抗体-药物偶联物(1):使用DAR=7.6的抗体-药物偶联物。用溶剂(10mM组氨酸,10%海藻糖,0.02%聚山梨醇酯20,pH 5.5)将抗体-药物偶联物(1)稀释。用生理盐水将曲妥珠单抗-美坦新偶联物(T-DM1)稀释。将抗体-药物偶联物(1)的稀释液或T-DM1的稀释液以10mL/kg施予至小鼠的尾静脉内。

[0681] 将从T-DM1治疗后呈耐性的HER2阳性乳腺癌症患者中摘出的肿瘤移植至雌性免疫缺陷小鼠,维持多次传代培养。然后,通过将持续向小鼠施予T-DM1,得到作为获得了高T-DM1耐性的肿瘤的ST1616B/TDR及ST1360B/TDR。ST1616B/TDR为来自持续施予13个月T-DM1的患者的肿瘤,ST1360B/TDR为来自持续施予3个月T-DM1的患者的肿瘤。上述肿瘤均为HER2过量表达(通过免疫组织化学染色(IHC)判定为3+)。

[0682] 将实体肿瘤的肿瘤片移植至雌性免疫缺陷小鼠的体侧部皮下,在肿瘤体积达到大约200 mm^3 的时间点,实施随机分组。将分组日作为第0天,在第0天以3mg/kg或10mg/kg的剂量向尾静脉内施予抗体-药物偶联物(1)。就T-DM1而言,以10mg/kg的剂量于第0、7、14、21天施予至尾静脉内。作为对照组,设置了仅施予用于稀释抗体-药物偶联物(1)的溶剂的组。

[0684] 结果如图3或图4所示。对于ST1616B/TDR肿瘤及ST1360B/TDR肿瘤, T-DM1的施予未抑制肿瘤的增殖。另一方面,就抗体-药物偶联物(1)而言,以3mg/kg及10mg/kg中的任一剂量施予,均显著抑制了肿瘤增殖。在所有的药剂施予组中均未观察到小鼠的体重减少。

[0685] 以上表明,抗体-药物偶联物(1)针对获得了对于T-DM1的耐性的肿瘤(即继发性耐药癌)具有显著的抗肿瘤活性。另外,表明安全性也优异。

[0686] [评价例2:临床试验]

[0687] 抗体-药物偶联物具有向癌基因表达肿瘤细胞高效且特异性地送达药物的效果,是备受期待的医药品。抗体-药物偶联物(1)是含有新型拓扑异构酶I抑制剂、以HER2为靶标的抗体-药物偶联物(表1)。临床试验中使用的抗体-药物偶联物(1)的DAR为7-8的范围,为接近8的值。临床前数据已证实HER2靶向特异性极高。在临床前模型中,抗体-药物偶联物(1)显示出远比曲妥珠单抗-美坦新偶联物(T-DM1)宽泛的抗肿瘤谱、和针对T-DM1耐性及HER2低表达肿瘤的效果。

[0688] 针对HER2阳性的乳腺癌、胃癌、以及与上述等不同的HER2表达实体癌,正按照下述所示的内容以I期(Phase 1)展开剂量递增部分(第1部分)试验及扩大剂量部分(第2部分)试验。

[0689] [表1]

[0690]

	ADC (1)	T-DM1
抗体	抗HER2单克隆抗体	曲妥珠单抗(Tmab)
药物	拓扑异构酶I抑制剂(Dxd)	微管蛋白抑制剂(DM1)
DAR *	7-8	3.5

[0691] * DAR: 平均药物-抗体比值

[0692] 试验计划:

[0693] 非盲(open-label)、I期剂量递增试验。

[0694] 通过依照EWOC原则的mCRM法求得最大耐受剂量(MTD)。

[0695] 就抗体-药物偶联物(1)而言,在出现无法耐受的毒性或病情恶化之前,每3周静脉内施予1次。

[0696] 剂量限制性毒性(DLT)在第1周期(第1-21天)中求得。

[0697] 第1部分试验:剂量递增试验(在日本实施)

[0698] 乳腺癌或胃腺癌/食管胃结合部腺癌

[0699] 受试者人数至少为18人,预期16%的受试者(即受试者的1/6)为HER2表达(IHC 2+、3+)。

[0700] 第2部分试验:剂量扩大试验(在日本、美国实施)

[0701] 第2a部分:受试者人数40,HER2过量表达,有T-DM1治疗史的乳腺癌。

[0702] 第2b部分:受试者人数40,HER2过量表达,有曲妥珠单抗治疗史的胃腺癌/食管胃结合部腺癌。

[0703] 第2c部分:受试者人数20,HER2低表达,乳腺癌。

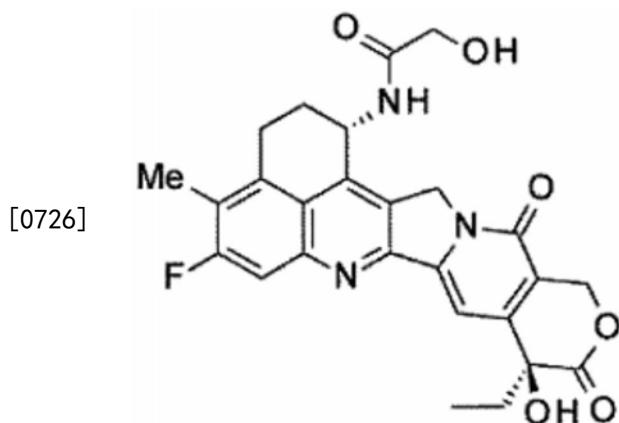
[0704] 第2d部分:受试者人数20,除乳腺癌或胃腺癌以外的HER2表达实体癌。

[0705] 主要目标:

- [0706] 抗体-药物偶联物(1)的安全性和耐受性的评价。
- [0707] 求出抗体-药物偶联物(1)的最大耐受剂量、及II期试验推荐剂量。
- [0708] 次要目标及研究目标:
- [0709] 抗体-药物偶联物(1)的药物动力学评价。
- [0710] 抗体-药物偶联物(1)的有效性评价。
- [0711] 客观缓解率(ORR;完全缓解(CR)+部分缓解(PR))。
- [0712] 疾病控制率(DCR;CR+PR+稳定(SD))。
- [0713] 缓解期、SD期、应答期、无恶化生存期。
- [0714] 对抗体-药物偶联物(1)的人抗人源化抗体的评价。
- [0715] 试验结果
- [0716] 第1部分试验:剂量递增试验(在日本实施)
- [0717] (1)受试者的分析
- [0718] 受试者的情况如表2所示。
- [0719] [表2]

受试者详情		HER2情况	
注册受试者/处置受试者		23/22	
年龄中值 (范围)		66 (38-79)	
既往化学疗法数		5 (1-11)	
肿瘤类型		FISH	
乳腺癌	16 (73%)	非扩增	2 (9%)
胃癌	5 (23%)	扩增	2 (9%)
食管胃结合部腺癌	1 (5%)	无法检测	18 (82%)
既往化学疗法		既往化学疗法	
抗HER2疗法		18 (82%)	
曲妥珠单抗		18 (82%)	
帕妥珠单抗		5 (23%)	
拉帕替尼		4 (18%)	
T-DM1		13 (59%)	

- [0720] [表2]
- [0721] (2)药物动力学
- [0722] 抗体-药物偶联物(1)以0.8mg/kg、1.6mg/kg、3.2mg/kg、5.4mg/kg、6.4mg/kg、8mg/kg中的任一施予量每3周施予1次(q3w)。由以上抗体-药物偶联物等的施予测得的抗体-药物偶联物(1)的药物动力学如图5所示。
- [0723] 就抗体-药物偶联物(1)的暴露而言,为3.2mg/kg以上的剂量时,其以施予量比以上的程度增高,为3.2mg/kg以上的剂量时,T_{1/2}延长。
- [0724] 图中记载为“化合物1”的化合物的T_{1/2}因反跳(flip-flop)现象而与抗体-药物偶联物(1)类似(未显示数据)。应予说明,化合物1具有以下的结构。
- [0725] [化学式29]



[0727] 就第1周期中的抗体-药物偶联物(1)而言,6.4mg/kg施予时的C_{min}(10700ng/mL)的中间值大于以临床前的活性成分总浓度为基础的目标暴露(4260ng/ml),与T-DM1上市剂量即3.6mg/kg基本相同。应予说明,抗体-药物偶联物(1)的目标施予量为5.0mg/kg。

[0728] (3) 安全性和耐受性

[0729] 安全性和耐受性的结果如图6所示。

[0730] 0.8mg~8mg/kg队列未达到MTD。

[0731] 在任一剂量水平下均未达到剂量限制性毒性、4级、心毒性。

[0732] 最常发现的发现不良事件(AEs)为低至中等程度的消化器官、及血液学的事件。

[0733] 22名受试者中的4名(18%)发生了7件3级不良事件(低钾血症(1)、贫血(1)、嗜中性粒细胞数减少(1)、淋巴细胞数减少(2)、碱性磷酸酶增加(1)、胆管炎(1))。

[0734] 第2周期以后,在6.4mg/kg(n=4/6)和8.0mg/kg(n=2/3)队列中,6名受试者因不良事件而减少了施予量,但未中止施予。

[0735] (4) 有效性

[0736] 有效性如图7、8、9所示。

[0737] 在包括12名T-DM1既往治疗例和5名HER2低表达受试者的20名可评价的受试者中,达成ORR 35%(7PRs)、DCR 90%(图8、9)。

[0738] 就抗体-药物偶联物(1)而言,在对于包含T-DM1的标准治疗不应答或不耐受的乳腺癌症患者中,达成ORR 42%、DCR 92%(图7)。应予说明,前治疗中的T-DM1的治疗效果为ORR 18%、DCR 64%,抗体-药物偶联物(1)以比基于T-DM1的治疗更高的比率起效。

[0739] 在达成PR(部分缓解,Partial Response)的病例中,1名在注册时为IHC1+(图8)。

[0740] 达成PR的大部分病例为5.4mg/kg以上的剂量(图8、9)。第2部分试验:剂量扩大试验(在日本、美国实施)

[0741] (1) 受试者的分析

[0742] 第2部分试验的各队列中的受试者人数、及抗体-药物偶联物(1)的施予量如表3所示。在任一队列中抗体-药物偶联物(1)均以3周1次的间隔施予。

[0743] [表3]

	受试者 人数	施予量	
[0744]	第2a部分 43/100	5.4mg/kg 6.4mg/kg	HER2过量表达 有T-DM1治疗史的乳腺癌
	第2b部分 41/40	5.4mg/kg 6.4mg/kg	HER2过量表达 有曲妥珠单抗治疗史的胃癌
	第2c部分 10/20	6.4mg/kg	HER2低表达 乳腺癌
	第2d部分 25/20	6.4mg/kg	除乳腺癌及胃癌以外的HER2表达实体癌

[0745] (2) 有效性

[0746] (2-1)

[0747] 针对第2部分试验整体的有效性,在图10中示出最大肿瘤缩小率(%)。图中,“乳腺癌HER2阳性”表示HER2过量表达的乳腺癌队列,“乳腺癌HER2低”表示HER2低表达的乳腺癌,“胃癌HER2阳性”表示HER2过量表达的胃癌队列,“胃癌HER2低”表示HER2低表达的胃癌队列,“其他”表示除乳腺癌及胃癌以外的HER2表达实体癌。判明就在任一种癌症中,并且,无论HER2是过量表达还是低表达,抗体-药物偶联物(1)均显示优异的肿瘤缩小效果。

[0748] (2-2)

[0749] 针对抗体-药物偶联物(1)对于乳腺癌的有效性,在图11中示出肿瘤缩小率(%)的时间推移。图中,“乳腺癌HER2阳性”表示HER2过量表达的乳腺癌队列,“乳腺癌HER2低”表示HER2低表达的乳腺癌队列。另外,针对抗体-药物偶联物(1)对于胃癌的有效性,在图12中示出肿瘤缩小率(%)的时间推移。图中,“胃癌HER2阳性”表示HER2过量表达的胃癌队列,“胃癌HER2低”表示HER2低表达的胃癌队列。判明在任一种癌症中,并且,无论HER2是过量表达还是低表达,抗体-药物偶联物(1)均显示优异的肿瘤缩小维持效果。

[0750] (2-3)

[0751] 针对第2部分试验中的有效性,将ORR(客观缓解率)及DCR(疾病控制率)示于表4。抗体-药物偶联物(1)在全部队列中均显示高ORR及DCR。尤其是,在具有基于曲妥珠单抗-美坦新偶联物(T-DM1)的治疗史的乳腺癌症患者、具有基于联用曲妥珠单抗-美坦新偶联物和帕妥珠单抗的治疗史的乳腺癌症患者、及具有基于伊立替康(CPT-11)的治疗史的胃癌症患者中,显示出高ORR及DCR。

[0752] [表4]

[0753]

	ORR(受试者人数)	DCR(受试者人数)
全体	40.2% (39/97)	91.8% (89/97)
乳腺癌	42.2% (19/45)	97.8% (44/45)
乳腺癌(有T-DM1治疗史)	45.7% (16/35)	100.0% (35/35)
乳腺癌(有T-DM1+帕妥珠单抗治疗史)	46.7% (14/30)	100.0% (30/30)
胃癌	44.4% (16/36)	88.9% (32/36)

胃癌(有CPT-11治疗史)	44.4% (8/18)	94.4% (17/18)
----------------	--------------	---------------

[0754] (2-4)

[0755] 第2d部分试验(除乳腺癌及胃癌以外的HER2表达实体癌)的受试者中包括大肠癌(11名)、非小细胞肺癌(5名)、唾液腺癌(4名)、佩吉特病(2名)、食道癌(1名)、及胆管癌(1名)的患者。

[0756] 在可评价的12名患者中,达成了ORR 33%、DCR 91%。大肠癌中,5名中的2名达成了PR。唾液腺癌中,4名中的2名达成了PR。

[0757] (2-5)

[0758] 第2d部分试验的结果如表5所示。就抗体-药物偶联物(1)而言,在可评价的患者22名中,在第2d部分试验总体达成了ORR 31.8%、DCR 81.8%。其中,大肠癌队列中达成了ORR 20.0%、DCR 80.0%,非小细胞肺癌队列中达成了ORR 20.0%、DCR 60.0%,唾液腺癌队列中达成了ORR 75.0%、DCR 100.0%,其他的癌症(佩吉特病、食道癌、及胆管癌)队列中达成了ORR 33.3%、DCR 100.0%。

[0759] [表5]

	ORR(受试者人数)	DCR(受试者人数)
第2d部分试验总体	31.8% (7/22)	81.8% (18/22)
大肠癌	20.0% (2/10)	80.0% (8/10)
非小细胞肺癌	20.0% (1/5)	60.0% (3/5)
唾液腺癌	75.0% (3/4)	100.0% (4/4)
其他 (佩吉特病、食道癌、及胆管癌)	33.3% (1/3)	100.0% (3/3)

[0760]

[0761] 另外,针对第2d部分试验中的抗体-药物偶联物(1)的有效性,在图13中示出最大肿瘤缩小率(%) (图中,“C”表示大肠癌队列,“L”表示非小细胞肺癌队列,“S”表示唾液腺癌队列,“P”表示佩吉特病队列,“Ch”表示胆管癌队列,“E”表示食道癌队列。图中“※”表示正在进行治疗)。

[0762] 此外,图14示出了肿瘤缩小率(%)的时间推移(图中,“大肠癌”表示大肠癌队列,“NSCLC”表示非小细胞肺癌队列,“唾液腺癌”表示唾液腺癌队列,“其他”表示其他癌症队列)。

[0763] 判明在任一癌症种类中,并且,无论HER2是过量表达还是低表达,抗体-药物偶联物(1)均显示优异的肿瘤缩小效果。

[0764] (3) 安全性和耐受性

[0765] 安全性和耐受性的结果如表6所示。最常发现的不良事件(AEs)为恶心、食欲减退、呕吐等消化系统毒性。然而,判明3级以上的不良事件较少。另外,虽然也发现了血小板数减少、嗜中性粒细胞数减少等骨髓抑制,但对于这些也判明等级3以上的不良事件较少。

[0766] [表6]

	1级 (%)	2级 (%)	3级 (%)	4级 (%)	全部 (%)	
[0767]	血小板数减少	13.5	9.0	8.3	3.8	34.6
	贫血	3.0	12.0	14.3	1.5	30.8
	嗜中性粒细胞数减少	0.8	9.8	12.0	3.0	25.6
	白细胞数减少	0.8	12.8	9.0	1.5	24.1
	恶心	51.9	13.5	1.5	0.0	66.9
	食欲减退	33.8	20.3	3.8	0.0	57.9
	呕吐	31.6	3.8	1.5	0.0	36.8
	腹泻	19.5	5.3	0.8	0.0	25.6
	便秘	18.8	3.0	0.0	0.0	21.8
	脱发	21.1	6.0	0.0	0.0	27.1
	疲倦感	18.0	4.5	0.8	0.0	24.1

[0768] 总结

[0769] 就抗体-药物偶联物(1)而言,在第1部分试验(剂量递增试验)中未达到MTD,显示出高的耐受性。

[0770] 在20名可评价的受试者中,抗体-药物偶联物(1)达成了35%的ORR和90%的DCR。

[0771] 就抗体-药物偶联物(1)而言,在T-DM1既往治疗的乳腺癌症患者中,显示出高于前治疗的T-DM1的缓解率。

[0772] 在第2部分试验(剂量扩大试验)中,以5.4mg/kg及6.4mg/kg的施予量、每3周1次的间隔施予抗体-药物偶联物(1)。判明在任一种癌症中,并且,无论HER2是过量表达还是低表达,抗体-药物偶联物(1)均显示优异的抗肿瘤效果。另外,可确认3级以上的不良事件较少,判明显示出优异的安全性。

[0773] 由以上可见,抗体-药物偶联物(1)即使对由于基于抗癌药的前治疗而获得耐性的癌症也具有优异的抗癌作用。作为这样的前治疗,可列举抗HER2疗法(基于现有的抗HER2药的治疗、或基于现有的抗HER2药和除此以外的抗癌药的组合等的治疗)。作为抗HER2疗法,可列举曲妥珠单抗、及帕妥珠单抗等抗体的施予、或者作为抗HER2抗体-药物偶联物的T-DM1的施予等。就在上述等前治疗中使用的抗HER2药而言,需要在施予前通过检查确认作为治疗对象的癌症为HER2阳性(即HER2过量表达)。因此,从识别HER2而起效的作用机制的方面出发,可期待对该种癌症的效果从而可进行施予。然而,在持续施予上述等抗HER2药后,可观察到如下情况:即使暂时确认到所期待的抗癌作用,也会由于某种机理而导致无法再确认到抗癌作用的病况。在这样的情况下,就本发明使用的抗体-药物偶联物(1)而言,即使是无法再确认到前治疗的抗HER2药施予的效果的癌症,也仍确认到优异的抗癌作用。即,就抗体-药物偶联物(1)而言,即使是作为前治疗而被施予现有的抗HER2药从而获得了耐性的癌症(继发性耐药癌),也仍显示出优异的抗癌作用。

[0774] 另外,在临床试验中已证实了抗体-药物偶联物(1)针对HER2低表达的癌、除乳腺癌及胃癌以外的实体癌(例如,大肠癌、非小细胞肺癌、唾液腺癌、佩吉特病、食道癌、及胆管癌等)也显示出优异的治疗效果。上述的癌症是虽然表达HER2、但现有的抗HER2药自最初即无法确认治疗效果的癌症(换言之,并非起因于基于现有抗HER2药的治疗、而是原本就对于

现有抗HER2药具有耐性或难治性的HER2表达癌)。

[0775] 由以上可见,以含有本发明使用的抗体-药物偶联物的治疗剂及治疗用医药组合物、以及施予本发明的抗体-药物偶联物为特征的治疗方法在针对对于现有的抗HER2药呈耐性或难治性的HER2表达癌的治疗方面是优异的。

[0776] 序列表自由文本

[0777] 序列号1:人源化抗HER2单克隆抗体重链的氨基酸序列

[0778] 序列号2:人源化抗HER2单克隆抗体轻链的氨基酸序列

序列表

<110> 第一三共株式会社

<120> 基于抗 HER2 抗体-药物偶联物施予的耐性癌的治疗

<130> PD20-9018W0

<150> JP2016-199341

<151> 2016-10-07

<150> JP2017-097589

<151> 2017-05-16

<150> JP2017-172814

<151> 2017-09-08

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

[0001] <210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 曲妥珠单抗重链的氨基酸序列

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly

1 5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20

25

30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60
----	----	----

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
65															

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85															95

Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
100															110

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
115															125

Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
130															140

[0002]

Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145															160

Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
165															175

Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
180															190

Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
195															205

Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
210															220

Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly

225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
245	250	255	
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
260	265	270	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
275	280	285	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
290	295	300	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
[0003]			
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
325	330	335	
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
340	345	350	
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
355	360	365	
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
370	375	380	
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
385	390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			

405

410

415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 [0004] <223> amino acid sequence of the light chain of Trastuzumab
 <400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[0005] 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Lp 的氨基酸序列

<400> 3

Asp Gly Gly Phe

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Lp 的氨基酸序列

<400> 4

Glu Gly Gly Phe

1

<210> 5

[0006] <211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Lp 的氨基酸序列

<400> 5

Gly Gly Phe Gly

1

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Lp 的氨基酸序列

<400> 6

Ser Gly Gly Phe

1

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Lp 的氨基酸序列

<400> 7

Lys Gly Gly Phe

1

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

[0007] <213> 人工序列

<220>

<223> Lp 的氨基酸序列

<400> 8

Asp Gly Gly Phe Gly

1

5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Lp 的氨基酸序列

<400> 9

Gly Gly Phe Gly Gly

1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Lp 的氨基酸序列

<400> 10

Asp Asp Gly Gly Phe Gly
1 5

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

[0008]

<220>
<223> Lp 的氨基酸序列

<400> 11

Lys Asp Gly Gly Phe Gly
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Lp 的氨基酸序列

<400> 12

Gly Gly Phe Gly Gly Gly Phe
1 5

序列号1: 人源化抗HER2单克隆抗体重链的氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTIVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

图1

序列号2: 人源化抗HER2单克隆抗体轻链的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图2

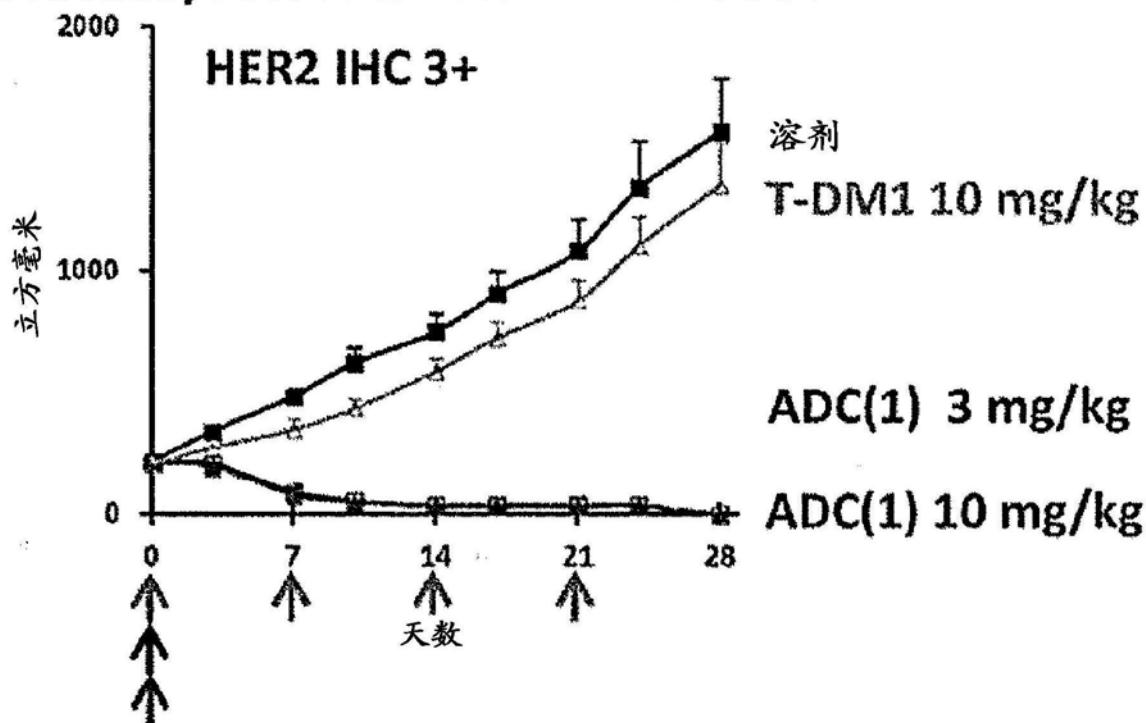
ST1616B/TDR (来自13个月T-DM1治疗的患者)

图3

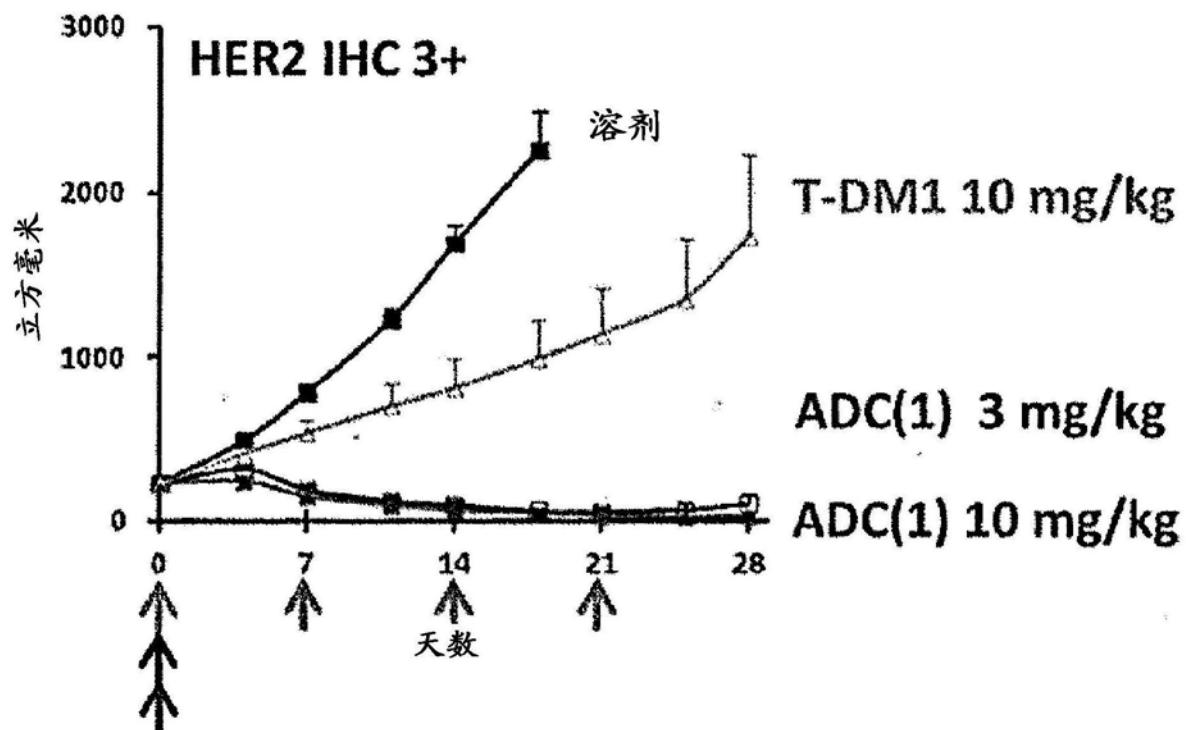
ST1360B/TDR (来自3个月T-DM1治疗的患者)

图4

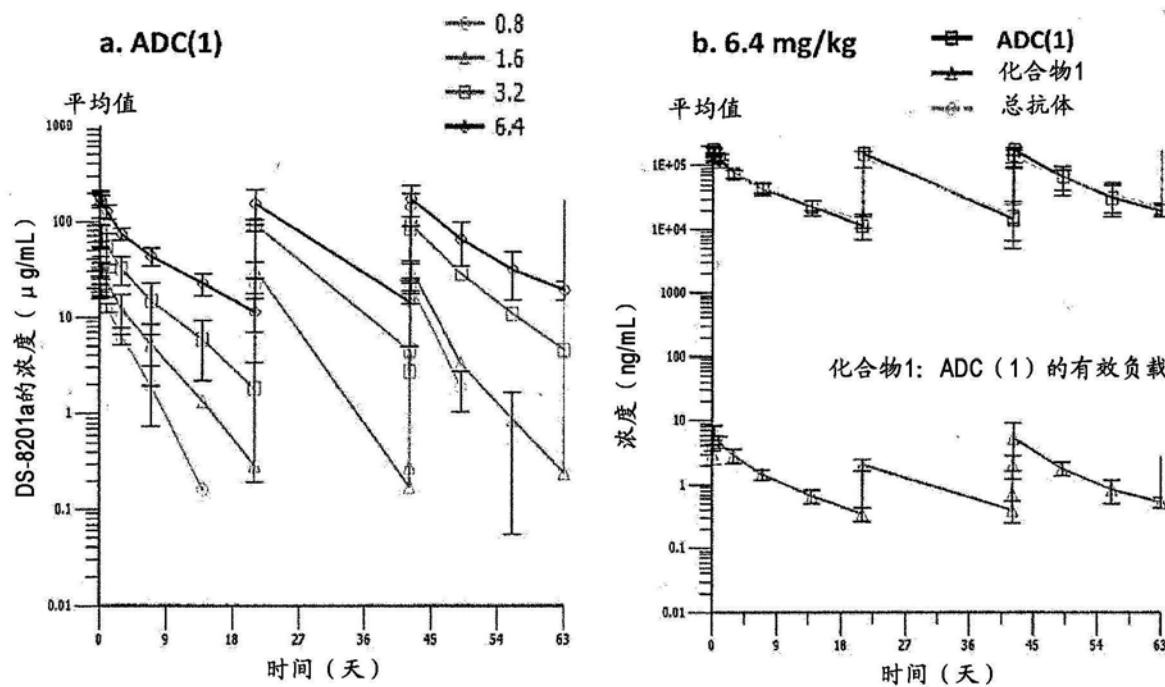


图5

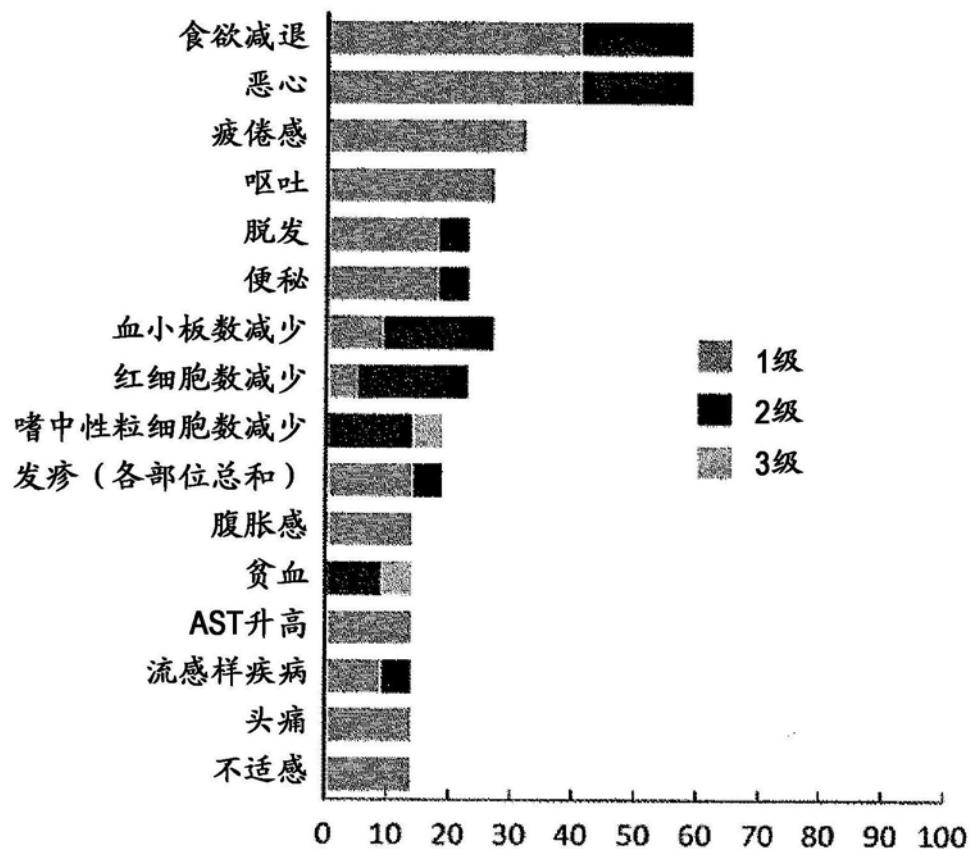


图6

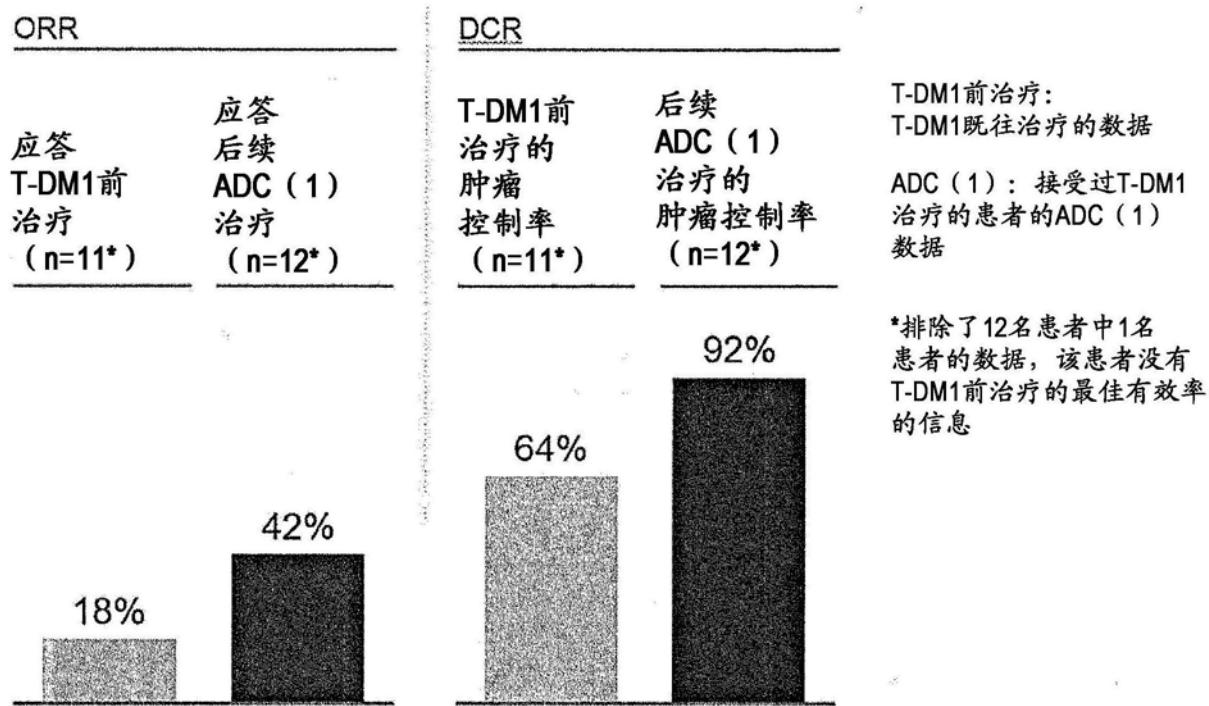


图7

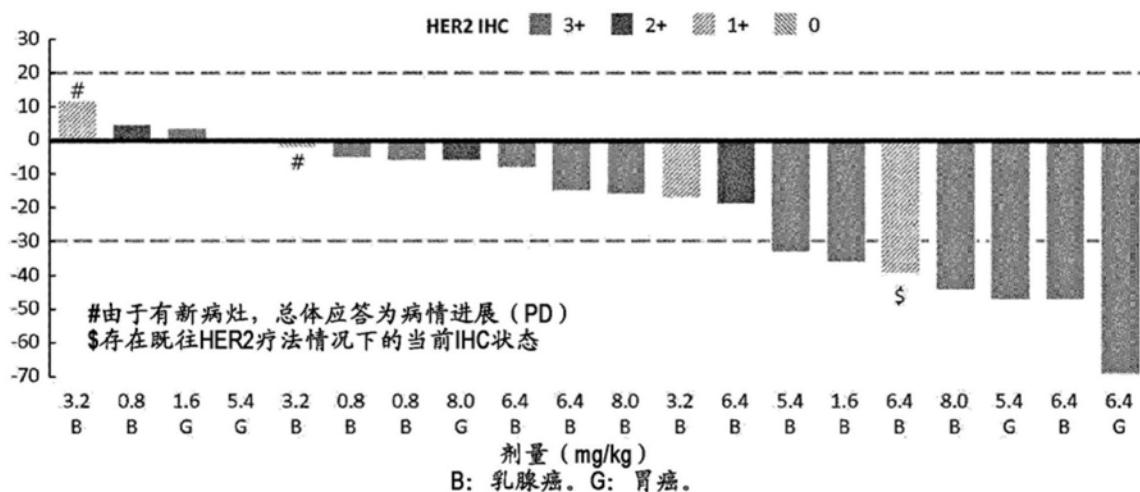


图8



图9

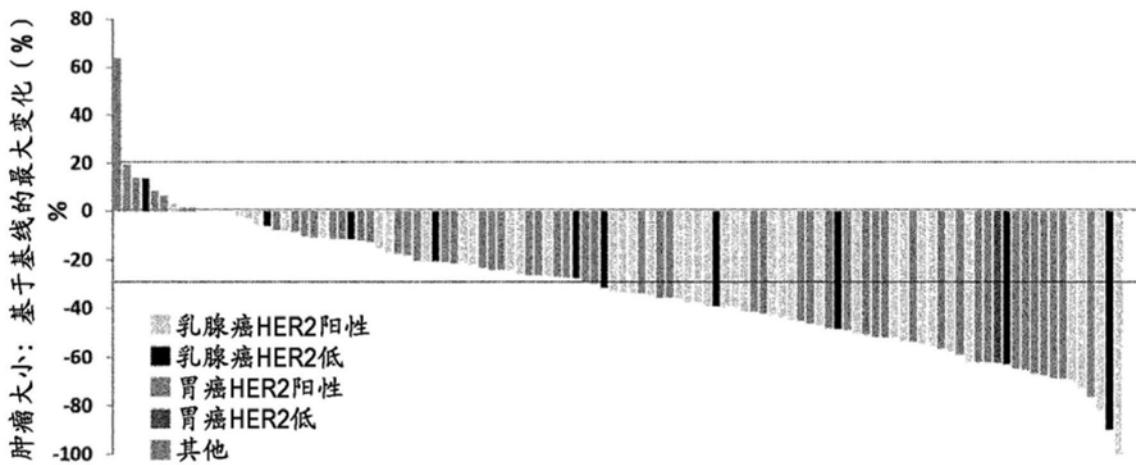


图10

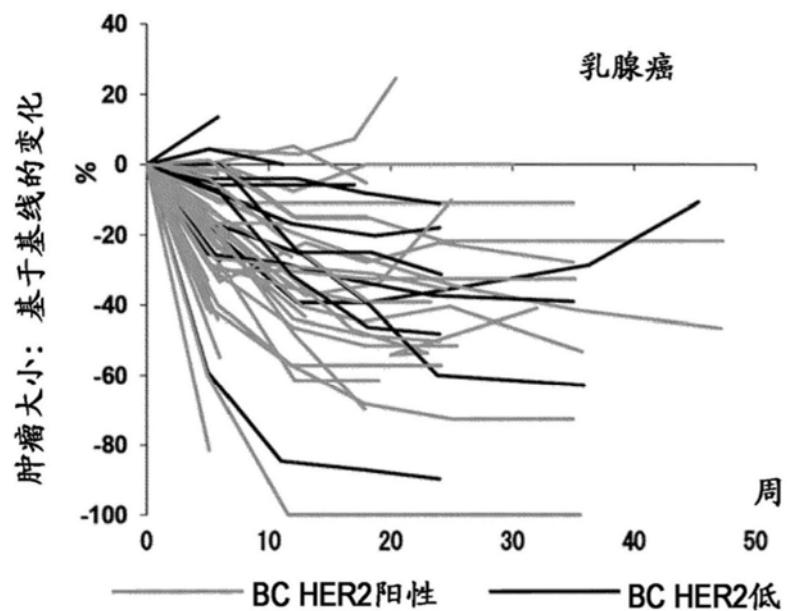


图11

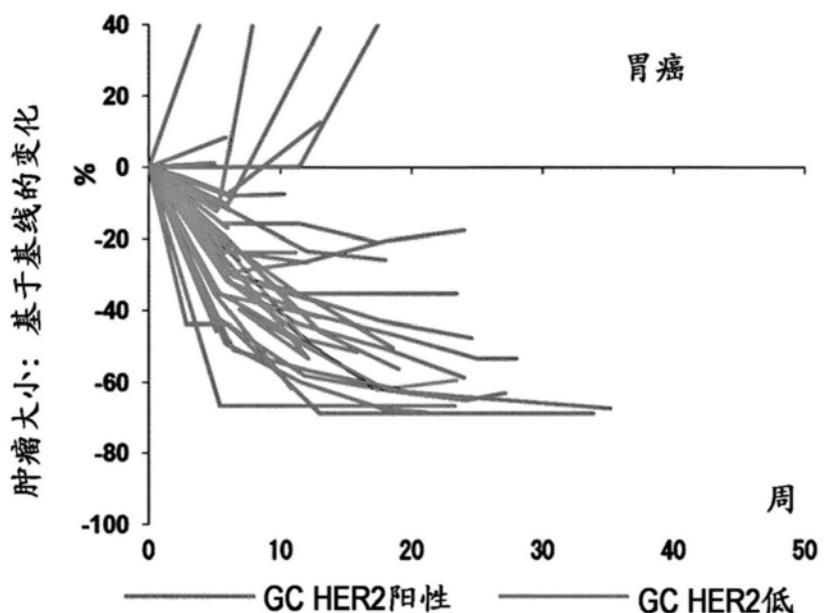


图12

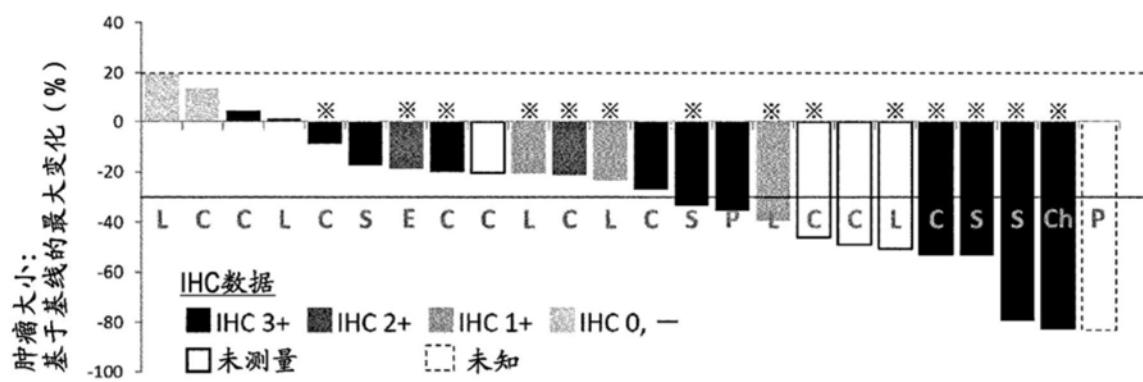


图13

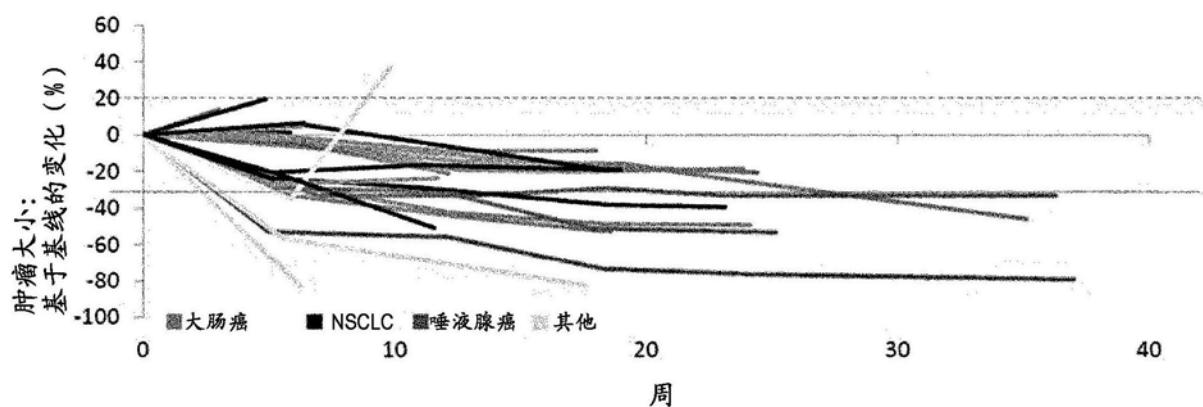


图14