

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-200934

(P2017-200934A)

(43) 公開日 平成29年11月9日 (2017.11.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/537 (2006.01)	A 6 1 K 31/537	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 7 2
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	4 C 0 7 6
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	4 C 0 8 6
審査請求 有 請求項の数 35 O L (全 104 頁) 最終頁に続く		

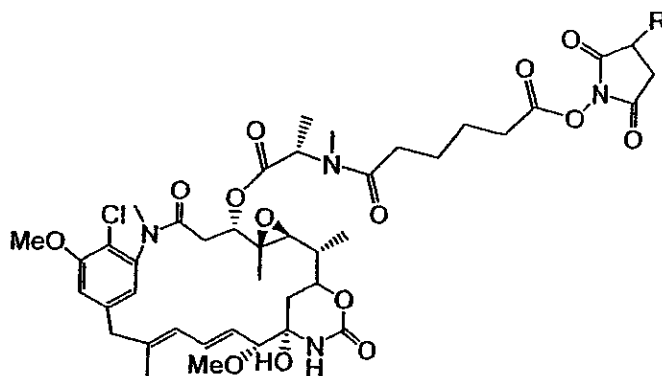
(21) 出願番号	特願2017-114877 (P2017-114877)	(71) 出願人	504039155
(22) 出願日	平成29年6月12日 (2017. 6. 12)		イミュノジェン・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願2016-21695 (P2016-21695)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州024
原出願日	平成16年10月12日 (2004. 10. 12)		51, ウォルサム, ウィンター・ストリー
(31) 優先権主張番号	60/509, 901	(74) 代理人	100140109
(32) 優先日	平成15年10月10日 (2003. 10. 10)		弁理士 小野 新次郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118902
(31) 優先権主張番号	10/960, 602		弁理士 山本 修
(32) 優先日	平成16年10月8日 (2004. 10. 8)	(74) 代理人	100106208
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 宮前 徹
		(74) 代理人	100120112
			弁理士 中西 基晴
		(74) 代理人	100107386
			弁理士 泉谷 玲子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 非開裂リンカーを介して連結した細胞結合物質メイタンシノイド複合体を用いて特定の細胞集団を標的とする方法、前記複合体、および前記複合体の製造法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 高い細胞毒性のあるメイタンシノイドを、腫瘍細胞等の標的細胞集団に送達する方法の提供。

【解決手段】 式7に代表される硫黄を含有しない非開裂リンカーで修飾したメイタンシノイド誘導体と細胞結合物質とを共有結合させた、癌治療に有効な細胞結合物質-メイタンシノイド複合体、及び該複合体を用いるメイタンシノイドの標的細胞集団への送達方法。



7

(R は H 又は SO_3Na^+)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

選択された細胞集団を標的としてメイタンシノイドを向かわせるための方法であって、当該方法は選択された細胞集団を含有すると推測される細胞集団または組織を、細胞結合物質メイタンシノイド複合体と接触させることを包含し、ここで1つまたはそれより多くのメイタンシノイドは、非開裂リンカーを介して細胞結合物質に共有結合で連結され、そして当該細胞結合物質が選択された細胞集団の細胞に結合する、前記方法。

【請求項 2】

非開裂リンカーが、酸に誘発される開裂、光に誘発される開裂、ペプチダーゼに誘発される開裂、エステラーゼに誘発される開裂、またはジスルフィド結合の開裂に対して実質的に耐性がある、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

非開裂リンカーがイオウ原子を有していない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

リンカーがジカルボン酸を基本とする部分から誘導される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

リンカーが α 、 ω -ジカルボン酸を基本とする部分から誘導され、ここで当該 α 、 ω -ジカルボン酸は一般式 $\text{HOO}C-X_1-Y_n-Z_m-\text{COOH}$ を有しており、式中 X は、2 から 20 の炭素原子を持つ直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、 Y は 3 から 10 の炭素原子を持つシクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、 Z は 6 から 10 の炭素原子を持つ置換されたもしくは置換されていない芳香族の基、またはヘテロ原子が N 、 O もしくは S より選択される置換されたもしくは置換されていない複素環式の基であり、そして l 、 m および n は各々 0 または 1 であるが、ただしそれらすべてが同時に 0 ではない、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

α 、 ω -ジカルボン酸が、アジピン酸、グルタル酸、ピメリン酸、ヘキセン-1, 6-二酸、ペンテン-1, 5-二酸、シクロヘキサン-二酸、またはシクロヘキセン-二酸である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

非開裂リンカーがイオウ原子を有する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

非開裂リンカーがマレイミドを基本とする部分から誘導される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

非開裂リンカーが、 N -スクシンイミジル 4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート (SMCC)、 N -スクシンイミジル-4-(N -マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシ-(6-アミドカプロエート) (LC-SMCC)、 κ -マレイミドウンデカン酸 N -スクシンイミジルエステル (KMUA)、 γ -マレイミド酪酸 N -スクシンイミジルエステル (GMB S)、 ϵ -マレイミドカプロン酸 N -ヒドロキシスクシンイミドエステル (EMCS)、 m -マレイミドベンゾイル- N -ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS)、 N -(α -マレイミドアセトキシ)-スクシンイミドエステル (AMAS)、スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート (SMPH)、 N -スクシンイミジル 4-(p -マレイミドフェニル)-ブチレート (SMPB)、および N -(p -マレイミドフェニル)イソシアネート (PMP I) から成る群より選択される、マレイミドを基本とする部分から誘導される、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 10】

非開裂リンカーが SMCC から誘導される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

非開裂リンカーがハロアセチルを基本とする部分から誘導される、請求項 7 に記載の方法。

50

法。

【請求項 12】

非開裂リンカーが、N-スクシンイミジル-4-(ヨードアセチル)-アミノベンゾエート (S I A B)、N-スクシンイミジルヨードアセテート (S I A)、N-スクシンイミジルプロモアセテート (S B A)、およびN-スクシンイミジル3-(プロモアセトアミド)プロピオネート (S B A P) から成る群より選択される、ハロアセチルを基本とする部分から誘導される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

非開裂リンカーが S I A B から誘導される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

リンカーが、少なくとも1つのメイタンシノイドのC-3ヒドロキシル、C-14ヒドロキシメチル、C-15ヒドロキシルまたはC-20デスメチルの基のいずれか1つにある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

少なくとも1つのメイタンシノイドが、メイタンシノールのN-メチル-アラニンを含むエステルである、請求項 1 に記載の方法。

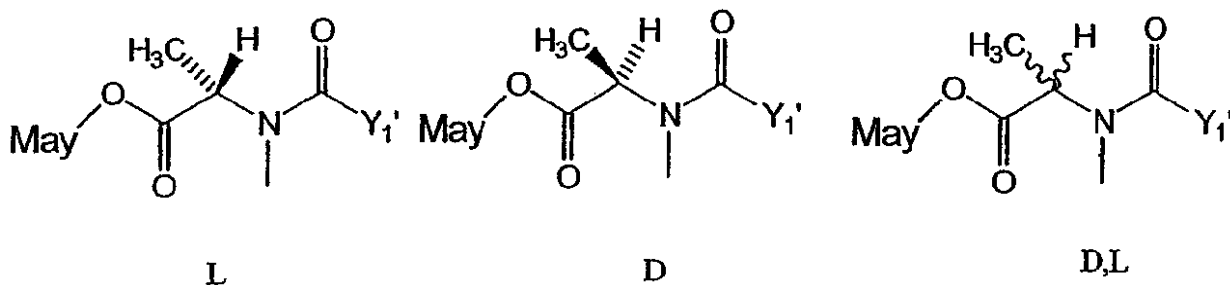
【請求項 16】

少なくとも1つのメイタンシノイドが、メイタンシノールのN-メチル-システインを含むエステルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

少なくとも1つのメイタンシノイドが、式 (I I' - L)、(I I' - D) または (I I' - D, L) :

【化 1】



(II')

[式中:

Y_1' は

【化 2】



を表し、

式中:

R_1 から R_{12} は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_{12} は H であることができる;

A、B、および D は各々独立して、3 から 10 の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルなアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである;

l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u は各々独立して、0 または 1 から 5 の

整数である、ただし l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 、および u の少なくとも 2 つが双方ともゼロではない；そして

May は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]

により表される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

R_1 がメチルであり R_2 が H である、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項 17 に記載の方法。

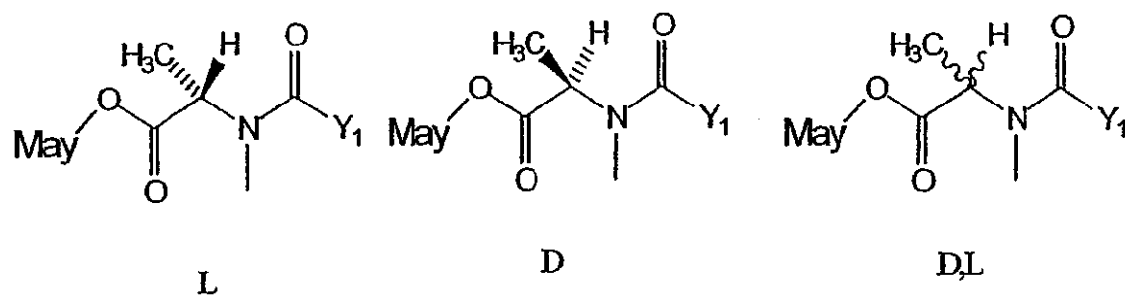
【請求項 19】

R_1 がメチルであり、 R_2 が H であり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、 l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R_1 および R_2 がメチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、 l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、式 (II-L)、(II-D)、または (II-D, L)：

【化 3】

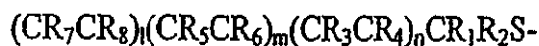


(II)

[式中：

Y_1 は

【化 4】



を表し、式中：

R_1 から R_8 は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_8 は H であることができる；

l 、 m 、および n は各々独立して、1 から 5 の整数であり、そして加えて n はゼロであることができる；そして

May は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]

により表される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

R_1 がメチルであり R_2 が H である、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

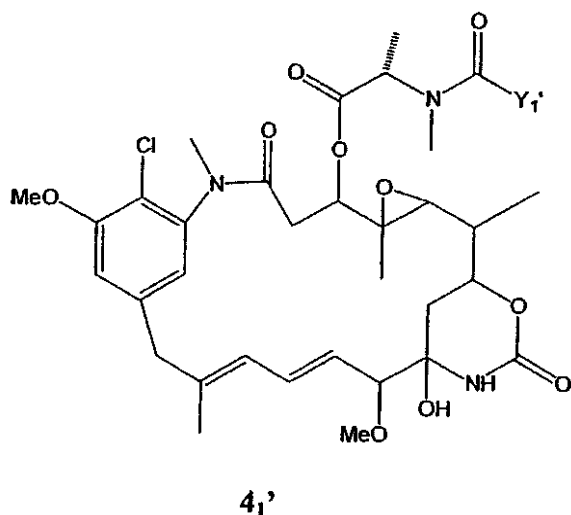
R_1 がメチルであり、 R_2 が H であり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、 l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R_1 および R_2 がメチルであり

、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、 l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが式 4₁' :

【化 5】



10

[式中:

Y_1' は

20

【化 6】



を表し、

式中:

R_1 から R_{12} は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_{12} は H であることができる；

30

A、B、および D は各々独立して、3 から 10 の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルなアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである；そして

l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 、および u は各々独立して、0 または 1 から 5 の整数である、ただし l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 、および u の少なくとも 2 つが双方ともゼロではない]

により表わされる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

R_1 がメチルであり R_2 が H である、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項 23 に記載の方法。

40

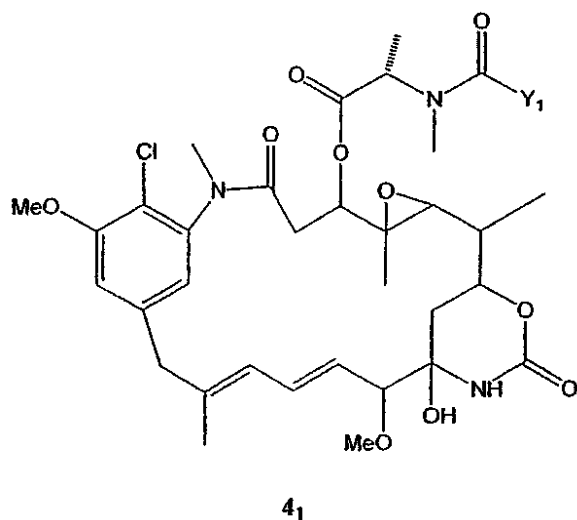
【請求項 25】

R_1 がメチルであり、 R_2 が H であり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、 l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R_1 および R_2 がメチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、 l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが式 4₁ :

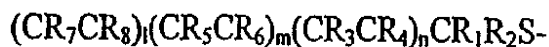
【化 7】



〔式中：

 Y_1 は

【化 8】



10

20

を表し、式中：

R_1 から R_8 は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルまたはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_8 は H であることができる；そして

1、m、および n は各々独立して、1 から 5 の整数であり、そして加えて n はゼロであることができる]

により表される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

R_1 がメチルであり R_2 が H である、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項 26 に記載の方法。

30

【請求項 28】

R_1 がメチルであり、 R_2 が H であり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、1 および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R_1 および R_2 がメチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、1 および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが DM1 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが DM3 である、請求項 1 に記載の方法。

40

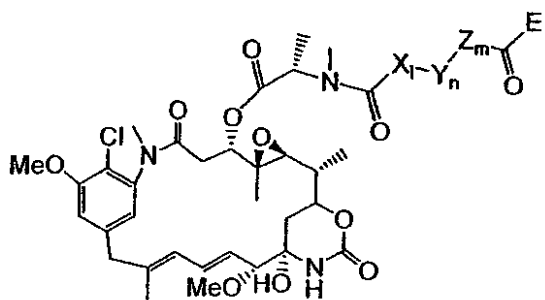
【請求項 31】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが DM4 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式 5 の化合物：

【化 9】



5

10

〔式中 X は、2 から 20 の炭素原子を持つ直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、Y は 3 から 10 の炭素原子を持つシクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、Z は 6 から 10 の炭素原子を持つ置換されたもしくは置換されていない芳香族の基、またはヘテロ原子が N、O もしくは S より選択される置換されたもしくは置換されていない複素環式の基であり、そして l、m および n は各々 0 または 1 であるが、ただしそれらすべてが同時に 0 ではない、そして E はカルボニル基と共に活性なエステル、例えば N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよびスルホスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ならびにスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する〕

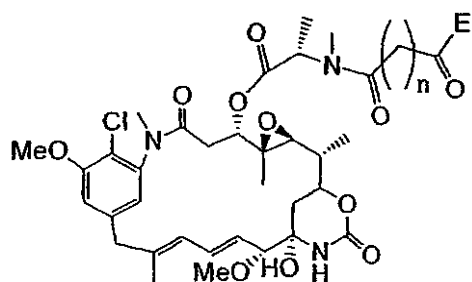
20

を与える、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式 6 の化合物：

【化 10】



6

30

〔式中、n は 3 から 24 の整数を表し、そして E はカルボニル基と共に活性なエステル、例えば N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよびスルホスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ならびにスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する〕

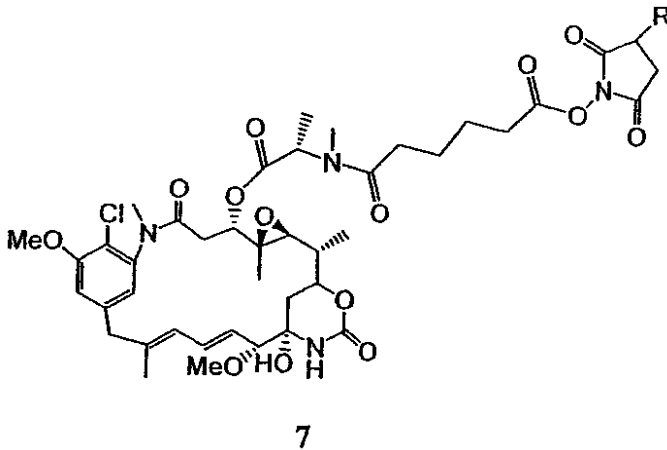
40

を与える、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式 7 の化合物：

【化 1 1】



10

〔式中、RはHまたは SO_3Na^+ である〕

を与える、請求項1に記載の方法。

【請求項35】

細胞結合物質が、腫瘍細胞；ウイルスに感染した細胞、微生物に感染した細胞、寄生体に感染した細胞、自己免疫細胞、活性化細胞、骨髄細胞、活性化T細胞、B細胞、もしくはメラノサイト；CD33、CD19、CanAg、CALLA、もしくはHer-2抗原を発現する細胞；またはインスリン増殖因子受容体、表皮増殖因子受容体、もしくは葉酸受容体を発現する細胞に結合する、請求項1に記載の方法。

20

【請求項36】

細胞結合物質が、乳癌細胞、前立腺癌細胞、卵巣癌細胞、結腸直腸癌細胞、胃癌細胞、扁平上皮癌細胞、小細胞肺癌細胞、精巣癌細胞、および神経芽腫細胞から成る群より選択される細胞に結合する、請求項1に記載の方法。

【請求項37】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する抗体、単鎖抗体、抗体フラグメント、標的細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、もしくはモノクローナル抗体フラグメント、標的細胞に特異的に結合するキメラ抗体、キメラ抗体フラグメント、標的細胞に特異的に結合するドメイン抗体、ドメイン抗体フラグメント、リンホカイン、ホルモン、ビタミン、増殖因子、コロニー刺激因子、または栄養素を輸送する分子である、請求項1に記載の方法。

30

【請求項38】

細胞結合物質が、インターフェロン、IL2、IL3、IL4、IL6、インスリン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、メラノサイト刺激ホルモン、ステロイドホルモン、ソマトスタチン、EGF、TGF- α 、FGF、G-CSF、VEGF、M-CSF、GM-CSF、葉酸、トランスフェリン、エストロゲン、エストロゲン類似体、アンドロゲン、またはアンドロゲン類似体である、請求項1に記載の方法。

【請求項39】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する抗体、単鎖抗体、または抗体フラグメントである、請求項1に記載の方法。

40

【請求項40】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する表面再修飾した（resurfaced）抗体、表面再修飾した単鎖抗体、または表面再修飾した抗体フラグメントである、請求項1に記載の方法。

【請求項41】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するヒト化抗体、ヒト化単鎖抗体、またはヒト化抗体フラグメントである、請求項1に記載の方法。

【請求項42】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナ

50

ル抗体、またはモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するキメラ抗体、キメラ抗体フラグメント、ドメイン抗体、またはドメイン抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 6】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 7】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 8】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 9】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合するキメラ抗体、キメラ抗体フラグメント、ドメイン抗体、またはドメイン抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 0】

細胞結合物質が、結腸直腸癌細胞または乳癌細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 1】

細胞結合物質が、結腸直腸癌細胞または乳癌細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 2】

細胞結合物質が、結腸直腸癌細胞または乳癌細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

細胞結合物質が、乳癌細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

細胞結合物質が、乳癌細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 5】

細胞結合物質が、抗 C a n A g 抗体、抗 C D 1 9 抗体、抗 C D 3 3 抗体、抗 C A L L A 抗体、抗 E G F R 抗体、抗 C D 5 6 抗体、抗 I G F - I R 抗体、または抗 H e r 2 抗体である、請求項 1 から 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 56】

細胞結合物質が、表面再修飾した抗体である M y 9-6、K S 77、または N 901 である、請求項 1 から 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 57】

細胞結合物質が、トラスツツマブ抗体、B4 抗体、h u C 242 抗体である、請求項 1 から 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 58】

細胞結合物質が h u C 242 抗体である、請求項 1 から 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 59】

細胞結合物質がトラスツツマブ抗体である、請求項 1 から 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 60】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体より毒性が低い、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 61】

細胞結合物質メイタンシノイド複合体が、抗体単独の血漿クリアランスとほぼ等しい値を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 62】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の最大耐薬用量が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の値より大きい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 63】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の生物学的活性の持続性が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の値より大きい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 64】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の抗原陰性細胞に対する活性が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の値より低い、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 65】

細胞結合物質メイタンシノイド複合体が最小のバイスタンダー活性を示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 66】

細胞を排除する方法であって、当該方法は細胞を、細胞結合物質メイタンシノイド複合体と接触させることを包含し、ここで、1 つまたはそれより多くのメイタンシノイドは非開裂リンカーを介して細胞結合物質に共有結合で連結され、そして当該細胞結合物質が細胞に結合する、前記方法。

【請求項 67】

非開裂リンカーが、酸に誘発される開裂、光に誘発される開裂、ペプチダーゼに誘発される開裂、エステラーゼに誘発される開裂、またはジスルフィド結合の開裂に対して実質的に耐性がある、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

非開裂リンカーがイオウ原子を有していない、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 69】

リンカーがジカルボン酸を基本とする部分から誘導される、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 70】

10

20

30

40

50

リンカーが α 、 ω -ジカルボン酸を基本とする部分から誘導され、ここで当該 α 、 ω -ジカルボン酸は一般式 $\text{HOO C} - \text{X}_1 - \text{Y}_n - \text{Z}_m - \text{COOH}$ を有しており、式中 X は、2 から 20 の炭素原子を持つ直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、 Y は 3 から 10 の炭素原子を持つシクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、 Z は 6 から 10 の炭素原子を持つ置換されたもしくは置換されていない芳香族の基、またはヘテロ原子が N 、 O もしくは S より選択される置換されたもしくは置換されていない複素環式の基であり、そして l 、 m および n は各々 0 または 1 であるが、ただしそれらすべてが同時に 0 ではない、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

α 、 ω -ジカルボン酸が、アジピン酸、グルタル酸、ピメリン酸、ヘキセン-1, 6-二酸、ペンテン-1, 5-二酸、シクロヘキサン-二酸、またはシクロヘキセン-二酸である、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 72】

非開裂リンカーがイオウ原子を有する、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 73】

非開裂リンカーがマレイミドを基本とする部分から誘導される、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

非開裂リンカーが、 N -スクシンイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート (SMCC)、 N -スクシンイミジル-4-(N -マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシ-(6-アミドカプロエート) (LC-SMCC)、 κ -マレイミドウンデカン酸 N -スクシンイミジルエステル (KMUA)、 γ -マレイミド酪酸 N -スクシンイミジルエステル (GMB S)、 ϵ -マレイミドカプロン酸 N -ヒドロキシスクシンイミドエステル (EMC S)、 m -マレイミドベンゾイル- N -ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS)、 N -(α -マレイミドアセトキシ)-スクシンイミドエステル (AMAS)、スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート (SMPH)、 N -スクシンイミジル-4-(p -マレイミドフェニル)-ブチレート (SMPB)、および N -(p -マレイミドフェニル)イソシアネート (PMP I) から成る群より選択される、マレイミドを基本とする部分から誘導される、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 75】

非開裂リンカーが SMCC から誘導される、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 76】

非開裂リンカーがハロアセチルを基本とする部分から誘導される、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 77】

非開裂リンカーが、 N -スクシンイミジル-4-(ヨードアセチル)-アミノベンゾエート (SIAB)、 N -スクシンイミジルヨードアセテート (SIA)、 N -スクシンイミジルプロモアセテート (SBA)、および N -スクシンイミジル-3-(プロモアセトアミド)プロピオネート (SBAP) から成る群より選択される、ハロアセチルを基本とする部分から誘導される、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

非開裂リンカーが SIAB から誘導される、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 79】

リンカーが、少なくとも 1 つのメイタンシノイドの $\text{C}-3$ ヒドロキシル、 $\text{C}-14$ ヒドロキシメチル、 $\text{C}-15$ ヒドロキシルまたは $\text{C}-20$ デスメチルの基のいずれか 1 つにある、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 80】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、メイタンシノールの N -メチル-アラニンを含む有するエステルである、請求項 66 に記載の方法。

10

20

30

40

50

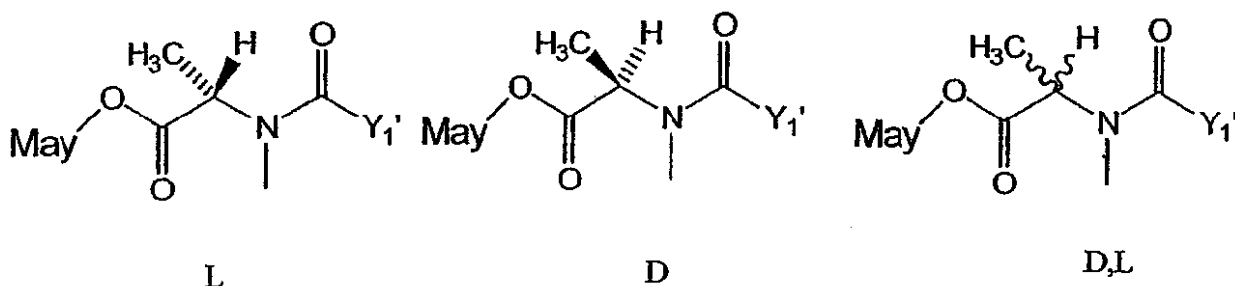
【請求項 8 1】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、メイタンシノールの N-メチルーシステインを含有するエステルである、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 8 2】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、式 (I I'-L)、(I I'-D) または (I I'-D, L) :

【化 1 2】



10

(II')

[式中:

Y_1' は

【化 1 3】



20

を表し、

式中:

R_1 から R_{12} は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_{12} は H であることができる;

30

A、B、および D は各々独立して、3 から 10 の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルなアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである;

l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u は各々独立して、0 または 1 から 5 の整数である、ただし l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u の少なくとも 2 つが双方ともゼロではない;そして

May は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]

により表される、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 8 3】

R_1 がメチルであり R_2 が H である、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項 8 2 に記載の方法。

40

【請求項 8 4】

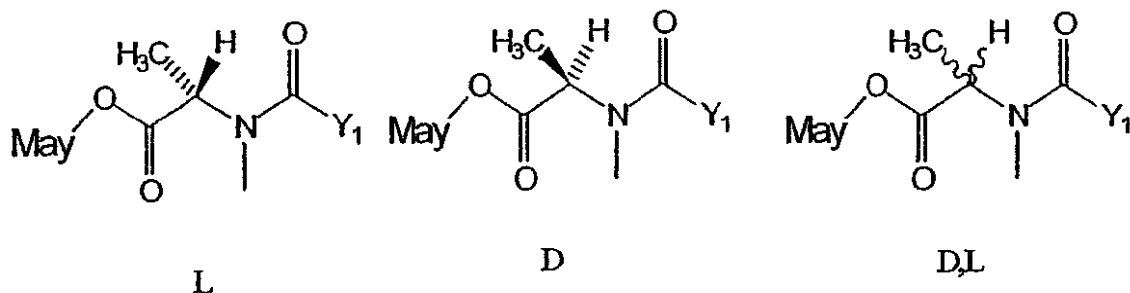
R_1 がメチルであり、 R_2 が H であり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である;または R_1 および R_2 がメチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 5】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、式 (I I-L)、(I I-D)、または (I I-D, L) :

50

【化 1 4】



10

(II)

〔式中：

Y₁ は

【化 1 5】



を表し、式中：

R₁ から R₈ は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R₂ から R₈ は H であることができる；

l、m、および n は各々独立して、1 から 5 の整数であり、そして加えて n はゼロであることができる；そして

May は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]

により表される、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 86】

R₁ がメチルであり R₂ が H である、または R₁ および R₂ がメチルである、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 87】

R₁ がメチルであり、R₂ が H であり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R₁ および R₂ がメチルであり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 85 に記載の方法。

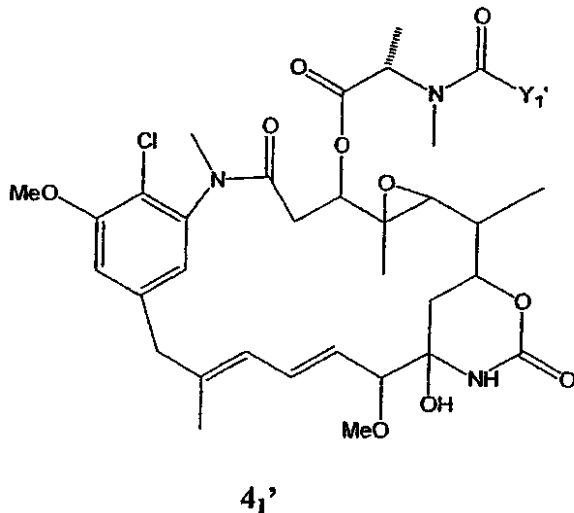
【請求項 88】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが式 4₁'：

20

30

【化 1 6】



10

〔式中：

 Y_1' は

【化 1 7】



20

を表し、

式中：

R_1 から R_{12} は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_{12} は H であることができる；

A、B、および D は各々独立して、3 から 10 の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルなアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである；そして

l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u は各々独立して、0 または 1 から 5 の整数である、ただし l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u の少なくとも 2 つが双方ともゼロではない]

30

により表される、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 8 9】

R_1 がメチルであり R_2 が H である、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 9 0】

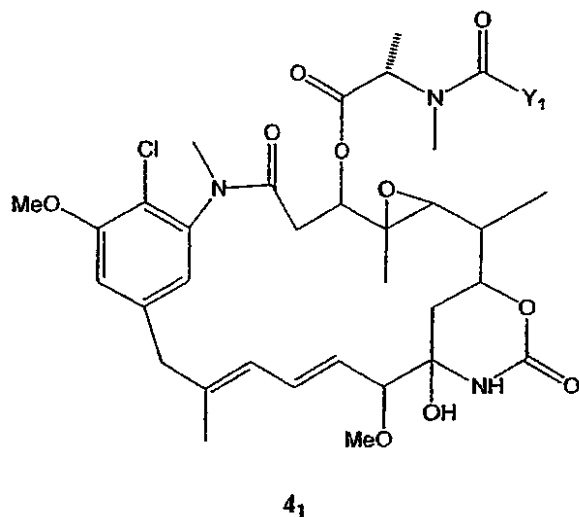
R_1 がメチルであり、 R_2 が H であり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R_1 および R_2 がメチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 8 9 に記載の方法。

40

【請求項 9 1】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが式 4_1 ：

【化 18】



10

〔式中：

 Y_1 は

【化 19】



20

を表し、式中：

R_1 から R_8 は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルまたはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_8 は H であることができる；そして

1、m、および n は各々独立して、1 から 5 の整数であり、そして加えて n はゼロであることができる]

により表される、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 92】

R_1 がメチルであり R_2 が H である、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項 91 に記載の方法。

30

【請求項 93】

R_1 がメチルであり、 R_2 が H であり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、1 および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R_1 および R_2 がメチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、1 および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 94】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが DM1 である、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 95】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが DM3 である、請求項 66 に記載の方法。

40

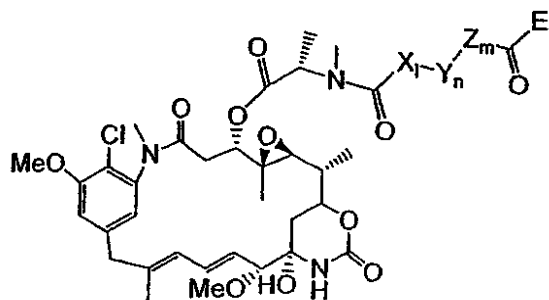
【請求項 96】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが DM4 である、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 97】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式 5 の化合物：

【化 20】



5

10

〔式中Xは、2から20の炭素原子を持つ直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、Yは3から10の炭素原子を持つシクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、Zは6から10の炭素原子を持つ置換されたもしくは置換されていない芳香族の基、またはヘテロ原子がN、OもしくはSより選択される置換されたもしくは置換されていない複素環式の基であり、そしてl、mおよびnは各々0または1であるが、ただしそれらすべてが同時に0ではない、そしてEはカルボニル基と共に活性なエステル、例えばN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよびスルホスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ならびにスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する〕

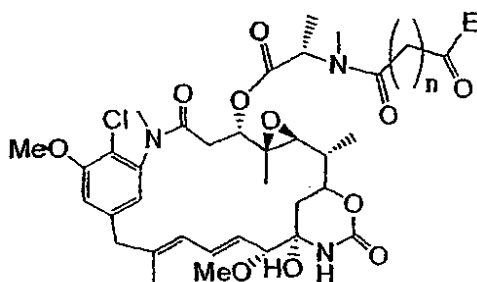
20

を与える、請求項66に記載の方法。

【請求項98】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式6の化合物：

【化 21】



6

30

〔式中、nは3から24の整数を表し、そしてEはカルボニル基と共に活性なエステル、例えばN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよびスルホスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ならびにスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する〕

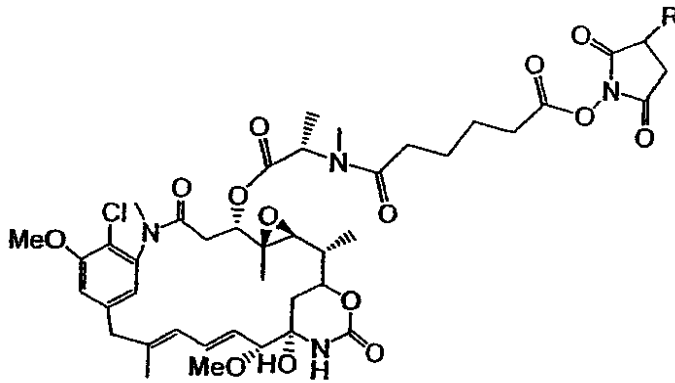
40

を与える、請求項66に記載の方法。

【請求項99】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式7の化合物：

【化 2 2】



7

〔式中、RはHまたは SO_3Na^+ である〕を与える、請求項66に記載の方法。細胞結合物質が、腫瘍細胞；ウイルスに感染した細胞、微生物に感染した細胞、寄生体に感染した細胞、自己免疫細胞、活性化細胞、骨髄細胞、活性化T細胞、B細胞、もしくはメラノサイト；CD33、CD19、CanAg、CALLA、もしくはHer-2抗原を発現する細胞；またはインスリン増殖因子受容体、表皮増殖因子受容体、もしくは葉酸受容体を発現する細胞に結合する、請求項63に記載の方法。

【請求項100】

細胞結合物質が、乳癌細胞、前立腺癌細胞、卵巢癌細胞、結腸直腸癌細胞、胃癌細胞、扁平上皮癌細胞、小細胞肺癌細胞、精巣癌細胞、および神経芽腫細胞から成る群より選択される細胞に結合する、請求項66に記載の方法。

【請求項101】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する抗体、単鎖抗体、抗体フラグメント、標的細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、モノクローナル抗体フラグメント、標的細胞に特異的に結合するキメラ抗体、キメラ抗体フラグメント、標的細胞に特異的に結合するドメイン抗体、もしくはドメイン抗体フラグメント、リンホカイン、ホルモン、ビタミン、増殖因子、コロニー刺激因子、または栄養素を輸送する分子である、請求項66に記載の方法。

【請求項102】

細胞結合物質が、インターフェロン、IL2、IL3、IL4、IL6、インスリン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、メラノサイト刺激ホルモン、ステロイドホルモン、ソマトスタチン、EGF、TGF- α 、FGF、G-CSF、VEGF、M-CSF、GM-CSF、葉酸、トランスフェリン、エストロゲン、エストロゲン類似体、アンドロゲン、またはアンドロゲン類似体である、請求項66に記載の方法。

【請求項103】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する抗体、単鎖抗体、または抗体フラグメントである、請求項66に記載の方法。

【請求項104】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する表面再修飾した抗体、表面再修飾した単鎖抗体、または表面再修飾した抗体フラグメントである、請求項66に記載の方法。

【請求項105】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するヒト化抗体、ヒト化単鎖抗体、またはヒト化抗体フラグメントである、請求項66に記載の方法。

【請求項106】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体フラグメントである、請求項66に記載の方法。

【請求項107】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表

10

20

30

40

50

面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 108】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 109】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するキメラ抗体、キメラ抗体フラグメント、ドメイン抗体、またはドメイン抗体フラグメントである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 110】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 111】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 112】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 113】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合するキメラ抗体、キメラ抗体フラグメント、ドメイン抗体、またはドメイン抗体フラグメントである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 114】

細胞結合物質が、結腸直腸癌細胞または乳癌細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 115】

細胞結合物質が、結腸直腸癌細胞または乳癌細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 116】

細胞結合物質が、結腸直腸癌細胞または乳癌細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 117】

細胞結合物質が、乳癌細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 118】

細胞結合物質が、乳癌細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 119】

細胞結合物質が、抗 Can Ag 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CALLA 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 CD56 抗体、抗 IGFB-IR 抗体、または抗 Her2 抗体である、請求項 66 から 99 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 120】

細胞結合物質が、表面再修飾した抗体である My9-6、KS77、または N901 である、請求項 66 から 99 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2 1】

細胞結合物質が、トラスツツマブ抗体、B 4 抗体、h u C 2 4 2 抗体である、請求項 6 から 9 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

細胞結合物質が h u C 2 4 2 抗体である、請求項 6 6 から 9 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

細胞結合物質が表面再修飾した C 2 4 2 抗体である、請求項 6 6 から 9 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体より毒性が低い、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

細胞結合物質メイタンシノイド複合体が、抗体単独の血漿クリアランスとほぼ等しい値を有する、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の最大耐薬用量が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の値より大きい、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の生物学的活性の持続性が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の値より大きい、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の抗原陰性細胞に対する活性が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の値より低い、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

細胞結合物質メイタンシノイド複合体が最小のバイスタンダー活性を示す、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

腫瘍、自己免疫疾患、移植片拒絶、移植片対宿主病、ウイルス感染、および寄生体感染から成る群より選択される病気の治療法であって、当該方法は細胞結合物質メイタンシノイド複合体の有効量を、治療を必要とする被験者に投与することを包含し、ここで 1 つまたはそれより多くのメイタンシノイドは非開裂リンカーを介して細胞結合物質に共有結合で連結され、そして当該細胞結合物質が病気の罹患した細胞または感染した細胞に結合する、前記方法。

【請求項 1 3 1】

腫瘍が、肺、乳房、結腸、前立腺、腎臓、膵臓、卵巣、およびリンパ系器官の癌から成る群より選択される、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

自己免疫疾患が、全身性狼瘡、慢性関節リウマチ、および多発性硬化症から成る群より選択される、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

移植片拒絶が、腎移植拒絶、心移植拒絶、および骨髄移植拒絶から成る群より選択される、請求項 1 3 0 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3 4】

ウイルス感染が、CMV、HIV、AIDSから成る群より選択される、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

寄生体感染が、ランブル鞭毛虫症、アメーバ症、住血吸虫症から成る群より選択される、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

非開裂リンカーが、酸に誘発される開裂、光に誘発される開裂、ペプチダーゼに誘発される開裂、エステラーゼに誘発される開裂、またはジスルフィド結合の開裂に対して実質的に耐性がある、請求項 1 3 0 から 1 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 3 7】

非開裂リンカーがイオウ原子を有していない、請求項 1 3 0 から 1 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

リンカーがジカルボン酸を基本とする部分から誘導される、請求項 1 3 7 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

リンカーが α 、 ω -ジカルボン酸を基本とする部分から誘導され、ここで当該 α 、 ω -ジカルボン酸は一般式 $\text{HOOC}-\text{X}_1-\text{Y}_n-\text{Z}_m-\text{COOH}$ を有しており、式中Xは、2から20の炭素原子を持つ直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、Yは3から10の炭素原子を持つシクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、Zは6から10の炭素原子を持つ置換されたもしくは置換されていない芳香族の基、またはヘテロ原子がN、OもしくはSより選択される置換されたもしくは置換されていない複素環式の基であり、そしてl、mおよびnは各々0または1であるが、ただしそれらすべてが同時に0ではない、請求項 1 3 8 に記載の方法。

20

【請求項 1 4 0】

α 、 ω -ジカルボン酸が、アジピン酸、グルタル酸、ピメリン酸、ヘキセン-1, 6-二酸、ペンテン-1, 5-二酸、シクロヘキサン-二酸、またはシクロヘキセン-二酸である、請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

非開裂リンカーがイオウ原子を有する、請求項 1 3 0 から 1 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 1 4 2】

非開裂リンカーがマレイミドを基本とする部分から誘導される、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

非開裂リンカーが、N-スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート(SMCC)、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシ-(6-アミドカプロエート)(LC-SMCC)、 κ -マレイミドウンデカン酸N-スクシンイミジルエステル(KMUA)、 γ -マレイミド酪酸N-スクシンイミジルエステル(GMBS)、 ϵ -マレイミドカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(EMCS)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、N-(α -マレイミドアセトキシ)-スクシンイミドエステル(AMAS)、スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート(SMPH)、N-スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート(SMPB)、およびN-(p-マレイミドフェニル)イソシアネート(PMPI)から成る群より選択される、マレイミドを基本とする部分から誘導される、請求項 1 4 2 に記載の方法。

40

【請求項 1 4 4】

非開裂リンカーがSMCCから誘導される、請求項 1 4 3 に記載の方法。

50

【請求項 1 4 5】

非開裂リンカーがハロアセチルを基本とする部分から誘導される、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

非開裂リンカーが、N-スクシンイミジル-4-(ヨードアセチル)-アミノベンゾエート (S I A B)、N-スクシンイミジルヨードアセテート (S I A)、N-スクシンイミジルプロモアセテート (S B A)、およびN-スクシンイミジル3-(プロモアセトアミド)プロピオネート (S B A P) から成る群より選択される、ハロアセチルを基本とする部分から誘導される、請求項 1 4 5 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

非開裂リンカーが S I A B から誘導される、請求項 1 4 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

リンカーが、少なくとも1つのメイタンシノイドのC-3ヒドロキシル、C-14ヒドロキシメチル、C-15ヒドロキシルまたはC-20デスメチルの基のいずれか1つにある、請求項 1 3 0 から 1 3 5 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

少なくとも1つのメイタンシノイドが、メイタンシノールのN-メチル-アラニンを含むエステルである、請求項 1 3 0 から 1 3 5 のいずれか1項に記載の方法。

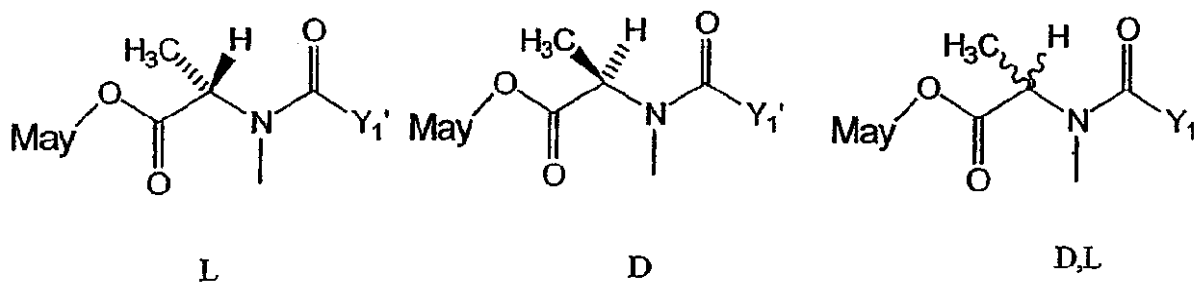
【請求項 1 5 0】

少なくとも1つのメイタンシノイドが、メイタンシノールのN-メチル-システインを含むエステルである、請求項 1 3 0 から 1 3 5 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

少なくとも1つのメイタンシノイドが、式 (I I' - L)、(I I' - D) または (I I' - D, L) :

【化 2 3】



(II')

[式中:]

$Y_{1'}$ は

【化 2 4】



を表し、

式中:

R_1 から R_{12} は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_{12} は H であることができる;

A、B、および D は各々独立して、3 から 10 の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルなアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである;

l、m、n、o、p、q、r、s、t、およびuは各々独立して、0または1から5の整数である、ただしl、m、n、o、p、q、r、s、t、およびuの少なくとも2つが双方ともゼロではない；そして

MayはC-3ヒドロキシル、C-14ヒドロキシメチル、C-15ヒドロキシルまたはC-20デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]

により表される、請求項130から135のいずれか1項に記載の方法。

【請求項152】

R₁がメチルでありR₂がHである、またはR₁およびR₂がメチルである、請求項151に記載の方法。

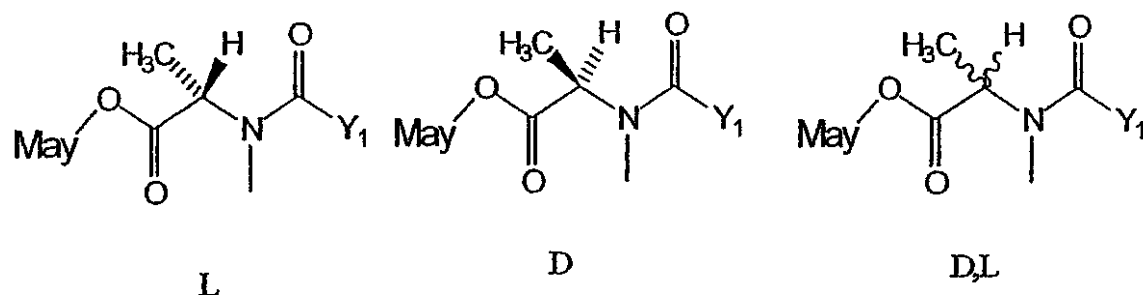
【請求項153】

R₁がメチルであり、R₂がHであり、R₅、R₆、R₇およびR₈が各々Hであり、lおよびmが各々1であり、そしてnが0である；またはR₁およびR₂がメチルであり、R₅、R₆、R₇およびR₈が各々Hであり、lおよびmが1であり、そしてnが0である、請求項151に記載の方法。

【請求項154】

少なくとも1つのメイタンシノイドが、式(I I-L)、(I I-D)、または(I I-D, L)：

【化25】

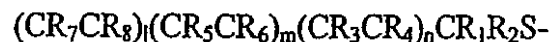


(II)

[式中：

Y₁は

【化26】



を表し、式中：

R₁からR₈は各々独立して、1から10の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3から10の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えてR₂からR₈はHであることができる；

l、m、およびnは各々独立して、1から5の整数であり、そして加えてnはゼロであることができる；そして

MayはC-3ヒドロキシル、C-14ヒドロキシメチル、C-15ヒドロキシルまたはC-20デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]

により表される、請求項130から135のいずれか1項に記載の方法。

【請求項155】

R₁がメチルでありR₂がHである、またはR₁およびR₂がメチルである、請求項154に記載の方法。

【請求項156】

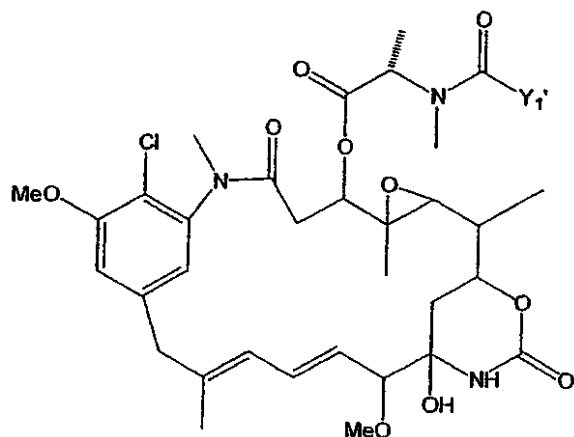
R₁がメチルであり、R₂がHであり、R₅、R₆、R₇およびR₈が各々Hであり、

l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R₁ および R₂ がメチルであり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 154 に記載の方法。

【請求項 157】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが式 4₁' :

【化 27】



4₁'

[式中：

Y₁' は

【化 28】



を表し、

式中：

R₁ から R₁₂ は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R₂ から R₁₂ は H であることができる；

A、B、および D は各々独立して、3 から 10 の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルなアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである；そして

l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u は各々独立して、0 または 1 から 5 の整数である、ただし l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u の少なくとも 2 つが双方ともゼロではない]

により表される、請求項 130 から 135 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 158】

R₁ がメチルであり R₂ が H である、または R₁ および R₂ がメチルである、請求項 157 に記載の方法。

【請求項 159】

R₁ がメチルであり、R₂ が H であり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R₁ および R₂ がメチルであり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 157 に記載の方法。

【請求項 160】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが式 4₁ :

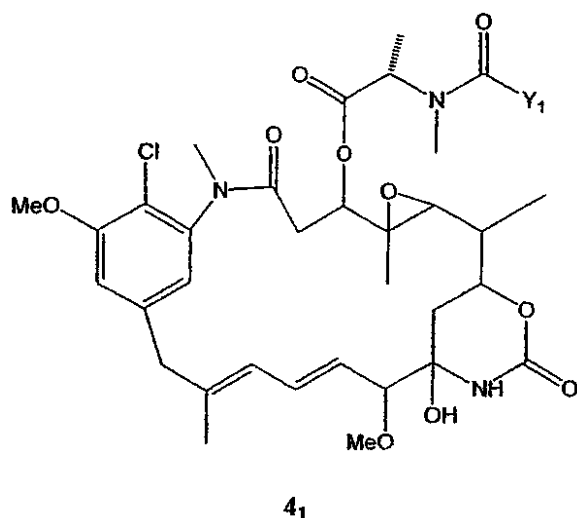
10

20

30

40

【化 2 9】



〔式中：

 Y_1 は

【化 3 0】



10

20

を表し、式中：

R_1 から R_8 は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルまたはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_8 は H であることができる；そして

1、m、および n は各々独立して、1 から 5 の整数であり、そして加えて n は 0 であることができる]

により表される、請求項 130 から 135 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 161】

R_1 がメチルであり R_2 が H である、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項 160 に記載の方法。

30

【請求項 162】

R_1 がメチルであり、 R_2 が H であり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、1 および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R_1 および R_2 がメチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、1 および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 160 に記載の方法。

【請求項 163】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが DM1 である、請求項 130 から 135 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 164】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが DM3 である、請求項 130 から 135 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

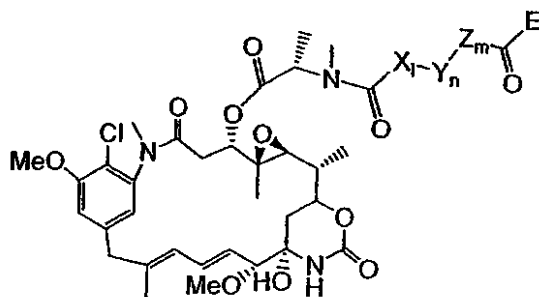
【請求項 165】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが DM4 である請求項 130 から 135 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 166】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式 5 の化合物：

【化 3 1】



5

10

〔式中 X は、2 から 20 の炭素原子を持つ直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、Y は 3 から 10 の炭素原子を持つシクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、Z は 6 から 10 の炭素原子を持つ置換されたもしくは置換されていない芳香族の基、またはヘテロ原子が N、O もしくは S より選択される置換されたもしくは置換されていない複素環式の基であり、そして l、m および n は各々 0 または 1 であるが、ただしそれらすべてが同時に 0 ではない、そして E はカルボニル基と共に活性なエステル、例えば N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよびスルホスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ならびにスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する〕

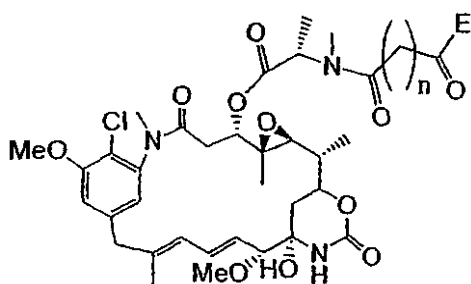
20

を与える、請求項 130 から 135 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 167】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式 6 の化合物：

【化 3 2】



6

30

〔式中、n は 3 から 24 の整数を表し、そして E はカルボニル基と共に活性なエステル、例えば N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよびスルホスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ならびにスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する〕

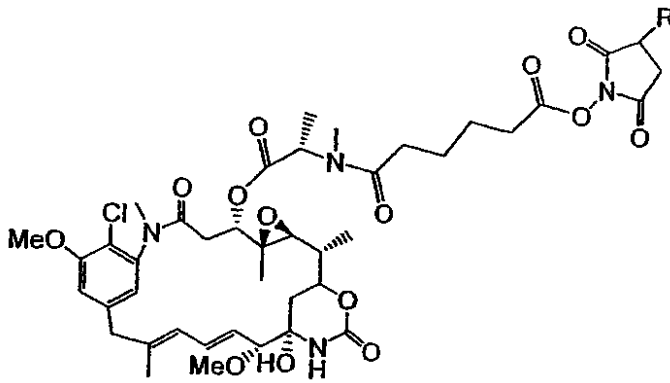
40

を与える、請求項 130 から 135 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 168】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式 7 の化合物：

【化 3 3】



7

〔式中、RはHまたは SO_3Na^+ である〕

を与える、請求項130から135のいずれか1項に記載の方法。

【請求項169】

細胞結合物質が、罹患したまたは感染した病気の細胞に特異的に結合する抗体、単鎖抗体、または抗体フラグメントである、請求項130から135のいずれか1項に記載の方法。

【請求項170】

細胞結合物質が、罹患したまたは感染した病気の細胞に特異的に結合する表面再修飾した抗体、表面再修飾した単鎖抗体、または表面再修飾した抗体フラグメントである、請求項130から135のいずれか1項に記載の方法。

【請求項171】

細胞結合物質が、罹患したまたは感染した病気の細胞に特異的に結合するヒト化抗体、ヒト化単鎖抗体、またはヒト化抗体フラグメントである、請求項130から135のいずれか1項に記載の方法。

【請求項172】

細胞結合物質が、罹患したまたは感染した病気の細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体フラグメントである、請求項130から135のいずれか1項に記載の方法。

【請求項173】

細胞結合物質が、罹患したまたは感染した病気の細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項130から135のいずれか1項に記載の方法。

【請求項174】

細胞結合物質が、罹患したまたは感染した病気の細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項130から135のいずれか1項に記載の方法。

【請求項175】

細胞結合物質が、抗CanAg抗体、抗CD19抗体、抗CD33抗体、抗CALLA抗体、抗EGFR抗体、抗CD56抗体、抗IGF-IR抗体、または抗Her2抗体である、請求項130に記載の方法。

【請求項176】

細胞結合物質が、表面再修飾した抗体であるMy9-6、KS77、またはN901である、請求項130に記載の方法。

【請求項177】

細胞結合物質が、トラスツツマブ抗体、B4抗体、huC242抗体である、請求項130に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 178】

細胞結合物質が h u C 2 4 2 抗体である、請求項 130 に記載の方法。

【請求項 179】

細胞結合物質が表面再修飾した h u C 2 4 2 抗体である、請求項 130 に記載の方法。

【請求項 180】

自己由来骨髓細胞を同一患者への移植前に、罹患した細胞もしくは腫瘍細胞を排除する目的で処理する；骨髓細胞を移植前に、コンピテント T 細胞を排除し、そして移植片対宿主病（GVHD）を予防する目的で処理する；標的抗原を発現しない所望のバリエーション以外のすべての細胞を排除する目的で細胞培養物を処理する；または所望でない抗原を発現するバリエーションの細胞を排除する目的で細胞培養物を処理する；ための in vitro で使用する 10
方法であって、当該方法は細胞結合物質メイタンシノイド複合体の有効量で細胞を処理することを包含し、ここで 1 つまたはそれより多くのメイタンシノイドは、非開裂リンカーを介して細胞結合物質に共有結合で連結され、そして当該細胞結合物質が排除すべき細胞に結合する、前記方法。

【請求項 181】

非開裂リンカーが、酸に誘発される開裂、光に誘発される開裂、ペプチダーゼに誘発される開裂、エステラーゼに誘発される開裂、またはジスルフィド結合の開裂に対して実質的に耐性がある、請求項 180 に記載の方法。

【請求項 182】

非開裂リンカーがイオウ原子を有していない、請求項 180 に記載の方法。

20

【請求項 183】

リンカーがジカルボン酸を基本とする部分から誘導される、請求項 182 に記載の方法。

【請求項 184】

リンカーが α 、 ω -ジカルボン酸を基本とする部分から誘導され、ここで当該 α 、 ω -ジカルボン酸が一般式 $\text{HOOC}-\text{X}_1-\text{Y}_n-\text{Z}_m-\text{COOH}$ を有しており、式中 X は、2 から 20 の炭素原子を持つ直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、Y は 3 から 10 の炭素原子を持つシクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、Z は 6 から 10 の炭素原子を持つ置換されたもしくは置換されていない芳香族の基、またはヘテロ原子が N、O もしくは S より選択される置換されたもしくは置換されていない複素環式の基であり、そして l、m および n は各々 0 または 1 であるが、ただしそれらすべてが同時に 0 ではない、請求項 183 に記載の方法。

30

【請求項 185】

α 、 ω -ジカルボン酸が、アジピン酸、ピメリックグルタル酸(pimelicglutaric acid)、ピメリン酸、ヘキセン-1, 6-二酸、ペンテン-1, 5-二酸、シクロヘキサン-二酸、またはシクロヘキセン-二酸である、請求項 184 に記載の方法。

【請求項 186】

非開裂リンカーがイオウ原子を有する、請求項 180 に記載の方法。

【請求項 187】

非開裂リンカーがマレイミドを基本とする部分から誘導される、請求項 186 に記載の方法。

40

【請求項 188】

非開裂リンカーが、N-スクシンイミジル 4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート (SMCC)、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシ-(6-アミドカプロエート) (LC-SMCC)、 κ -マレイミドウンデカン酸 N-スクシンイミジルエステル (KMUA)、 γ -マレイミド酪酸 N-スクシンイミジルエステル (GMB S)、 ϵ -マレイミドカプロン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (EMCS)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS)、N-(α -マレイミドアセトキシ)-スクシンイミドエステル (AMAS)、スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノ

50

エート (SMPH)、N-スクシンイミジル 4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート (SMPB)、および N-(p-マレイミドフェニル)イソシアネート (PMP I) から成る群より選択される、マレイミドを基本とする部分から誘導される、請求項 187 に記載の方法。

【請求項 189】

非開裂リンカーが SMC C から誘導される、請求項 180 に記載の方法。

【請求項 190】

非開裂リンカーがハロアセチルを基本とする部分から誘導される、請求項 186 に記載の方法。

【請求項 191】

非開裂リンカーが、N-スクシンイミジル-4-(ヨードアセチル)-アミノベンゾエート (S I A B)、N-スクシンイミジルヨードアセテート (S I A)、N-スクシンイミジルプロモアセテート (S B A)、および N-スクシンイミジル 3-(プロモアセトアミド)プロピオネート (S B A P) から成る群より選択される、ハロアセチルを基本とする部分から誘導される、請求項 190 に記載の方法。

【請求項 192】

非開裂リンカーが S I A B から誘導される、請求項 191 に記載の方法。

【請求項 193】

リンカーが、少なくとも 1 つのメイタンシノイドの C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルの基のいずれか 1 つにある、請求項 180 に記載の方法。

【請求項 194】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、メイタンシノールの N-メチル-アラニンを含むエステルである、請求項 180 に記載の方法。

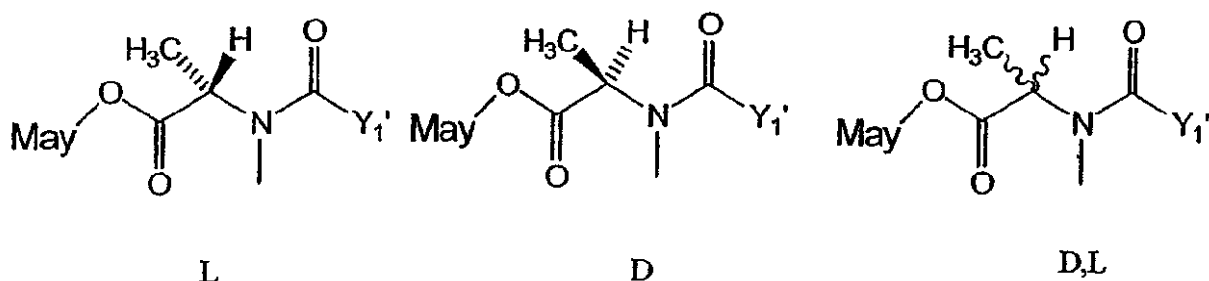
【請求項 195】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、メイタンシノールの N-メチル-システインを含むエステルである、請求項 180 に記載の方法。

【請求項 196】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、式 (I I' - L)、(I I' - D) または (I I' - D, L) :

【化 34】



(II')

[式中:]

Y_1' は

【化 35】

$(CR_7CR_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_0(CR_5CR_6)_mD_0(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_l(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$

を表し、

式中:

R_1 から R_{12} は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_{12} は H であることができる；

A、B、および D は各々独立して、3 から 10 の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルなアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである；

l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u は各々独立して、0 または 1 から 5 の整数である、ただし l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u の少なくとも 2 つが双方ともゼロではない；そして

May は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]

により表される、請求項 180 に記載の方法。

【請求項 197】

R_1 がメチルであり R_2 が H である、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項 196 に記載の方法。

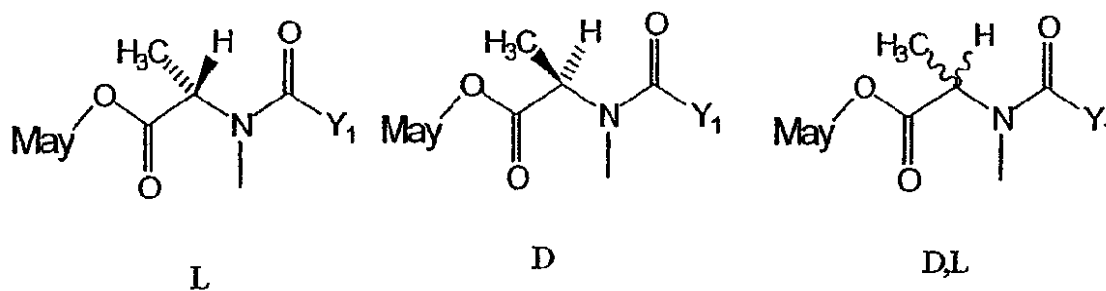
【請求項 198】

R_1 がメチルであり、 R_2 が H であり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R_1 および R_2 がメチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 196 に記載の方法。

【請求項 199】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、式 (II-L)、(II-D)、または (II-D, L)：

【化 36】



(III)

[式中：

Y_1 は

【化 37】



を表し、式中：

R_1 から R_8 は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_8 は H であることができる；

l、m、および n は各々独立して、1 から 5 の整数であり、そして加えて n は 0 であることができる；そして

May は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]

により表される、請求項 180 に記載の方法。

【請求項 200】

R_1 がメチルであり R_2 が H である、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項 199 に記載の方法。

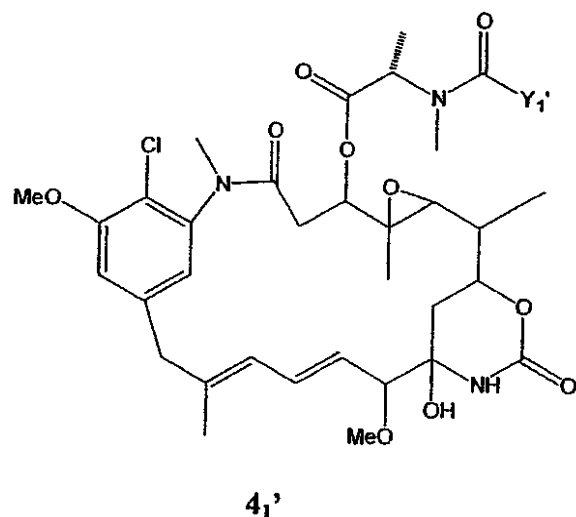
【請求項 201】

R_1 がメチルであり、 R_2 が H であり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、 l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R_1 および R_2 がメチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、 l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 199 に記載の方法。

【請求項 202】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが式 4₁' :

【化 38】



[式中：

Y_1' は

【化 39】



を表し、

式中：

R_1 から R_{12} は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_{12} は H であることができる；

A、B、および D は各々独立して、3 から 10 の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルなアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである；そして

l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 、および u は各々独立して、0 または 1 から 5 の整数である、ただし l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 、および u の少なくとも 2 つが双方ともゼロではない]

により表される、請求項 180 に記載の方法。

【請求項 203】

R_1 がメチルであり R_2 が H である、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項 202 に記載の方法。

【請求項 204】

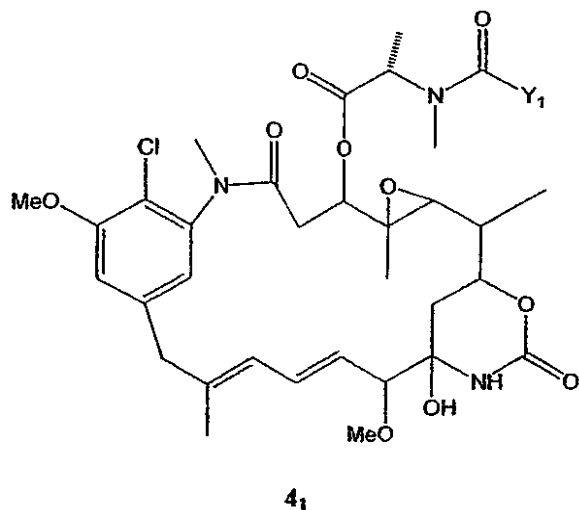
R_1 がメチルであり、 R_2 が H であり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、 l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R_1 および R_2 がメチルであり

、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々Hであり、 l および m が1であり、そして n が0である、請求項202に記載の方法。

【請求項205】

少なくとも1つのメイタンシノイドが式4₁：

【化40】



10

[式中：

Y_1 は

【化41】



20

を表し、式中：

R_1 から R_8 は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルまたはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_8 はHであることができる；

l 、 m 、および n は各々独立して、1 から 5 の整数であり、そして加えて n は0であることができる；そして

30

May は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]

により表される、請求項180に記載の方法。

【請求項206】

R_1 がメチルであり R_2 がHである、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項205に記載の方法。

【請求項207】

R_1 がメチルであり、 R_2 がHであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々Hであり、 l および m が各々1であり、そして n が0である；または R_1 および R_2 がメチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々Hであり、 l および m が1であり、そして n が0である、請求項205に記載の方法。

40

【請求項208】

少なくとも1つのメイタンシノイドがDM1である、請求項180に記載の方法。

【請求項209】

少なくとも1つのメイタンシノイドがDM3である、請求項180に記載の方法。

【請求項210】

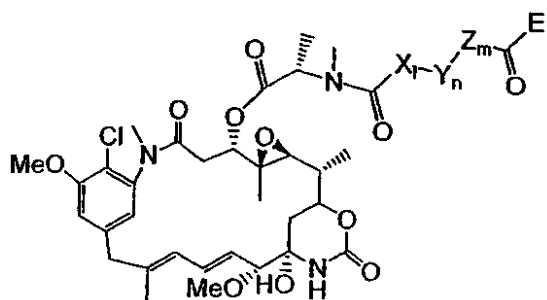
少なくとも1つのメイタンシノイドがDM4である、請求項180に記載の方法。

【請求項211】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式5の化合物：

50

【化 4 2】



5

10

〔式中 X は、2 から 20 の炭素原子を持つ直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、Y は 3 から 10 の炭素原子を持つシクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、Z は 6 から 10 の炭素原子を持つ置換されたもしくは置換されていない芳香族の基、またはヘテロ原子が N、O もしくは S より選択される置換されたもしくは置換されていない複素環式の基であり、そして l、m および n は各々 0 または 1 であるが、ただしそれらすべてが同時に 0 ではない、そして E はカルボニル基と共に活性なエステル、例えば N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよびスルホスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ならびにスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する〕

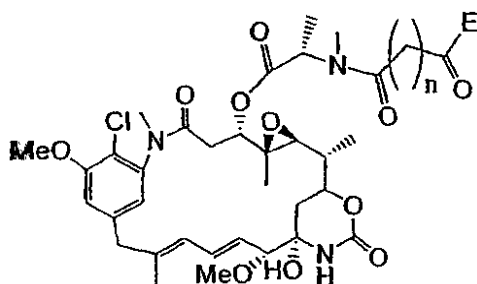
20

を与える、請求項 180 に記載の方法。

【請求項 212】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式 6 の化合物：

【化 4 3】



6

30

〔式中、n は 3 から 24 の整数を表し、そして E はカルボニル基と共に活性なエステル、例えば N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよびスルホスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ならびにスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する〕

40

を与える、請求項 180 に記載の方法。

【請求項 213】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式 7 の化合物：

10



30

40

50

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の生物学的活性の持続性が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも1つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の値より大きい、請求項180に記載の方法。

【請求項224】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の抗原陰性細胞に対する活性が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも1つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の値より低い、請求項180に記載の方法。

【請求項225】

細胞結合物質メイタンシノイド複合体が最小のバースタンダー活性を示す、請求項180に記載の方法。

【請求項226】

非開裂リンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも1つのメイタンシノイドを有する細胞結合物質メイタンシノイド複合体、ただし細胞結合物質が抗体である場合、リンカーは以下から成る群：スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサ-1-カルボキシレート(SMCC)、スルホ-SMCC、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、スルホ-MBS、およびN-スクシンイミジル-γ-ブチロアセテート(SIA)より選択される架橋物質からは誘導されない、前記複合体。

【請求項227】

非開裂リンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも1つのメイタンシノイドを有する細胞結合物質メイタンシノイド複合体、ただし細胞結合物質が抗体ではない、前記複合体。

【請求項228】

非開裂リンカーが、酸に誘発される開裂、光に誘発される開裂、ペプチダーゼに誘発される開裂、エステラーゼに誘発される開裂、またはジスルフィド結合の開裂に対して実質的に耐性がある、請求項226または227に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項229】

非開裂リンカーがイオウ原子を有していない、請求項226または227に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項230】

リンカーがジカルボン酸を基本とする部分から誘導される、請求項229に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項231】

リンカーが α 、 ω -ジカルボン酸を基本とする部分から誘導され、ここで当該 α 、 ω -ジカルボン酸は一般式 $\text{HOOC}-\text{X}_1-\text{Y}_n-\text{Z}_m-\text{COOH}$ を有しており、式中Xは、2から20の炭素原子を持つ直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、Yは3から10の炭素原子を持つシクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、Zは6から10の炭素原子を持つ置換されたもしくは置換されていない芳香族の基、またはヘテロ原子がN、OもしくはSより選択される置換されたもしくは置換されていない複素環式の基であり、そしてl、mおよびnは各々0または1であるが、ただしそれらすべてが同時に0ではない、請求項230に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項232】

α 、 ω -ジカルボン酸が、アジピン酸、ピメリックグルタル酸、ピメリン酸、ヘキセン-1,6-二酸、ペンテン-1,5-二酸、シクロヘキサ-1,2-二酸、またはシクロヘキサ-1,3-二酸である、請求項231に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項233】

非開裂リンカーがイオウ原子を有する、請求項 2 2 6 または 2 2 7 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 3 4】

非開裂リンカーがマレイミドを基本とする部分から誘導される、請求項 2 3 3 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 3 5】

非開裂リンカーが、N-スクシンイミジル 4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート (SMCC)、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシ-(6-アミドカプロエート) (LC-SMCC)、 κ -マレイミドウンデカン酸 N-スクシンイミジルエステル (KMUA)、 γ -マレイミド酪酸 N-スクシンイミジルエステル (GMB S)、 ϵ -マレイミドカプロン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (EMCS)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS)、N-(α -マレイミドアセトキシ)-スクシンイミドエステル (AMAS)、スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート (SMPH)、N-スクシンイミジル 4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート (SMPB)、および N-(p-マレイミドフェニル)イソシアネート (PMP I) から成る群より選択される、マレイミドを基本とする部分から誘導される、請求項 2 3 4 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 3 6】

非開裂リンカーが SMCC から誘導される、請求項 2 3 5 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 3 7】

非開裂リンカーがハロアセチルを基本とする部分から誘導される、請求項 2 3 3 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 3 8】

非開裂リンカーが、N-スクシンイミジル-4-(ヨードアセチル)-アミノベンゾエート (SIAB)、N-スクシンイミジルヨードアセテート (SIA)、N-スクシンイミジルプロモアセテート (SBA)、および N-スクシンイミジル 3-(プロモアセトアミド)プロピオネート (SBAP) から成る群より選択される、ハロアセチルを基本とする部分から誘導される、請求項 2 3 7 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 3 9】

非開裂リンカーが SIAB から誘導される、請求項 2 3 8 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 4 0】

リンカーが、少なくとも 1 つのメイタンシノイドの C-3 ヒドロキシル、C-1 4 ヒドロキシメチル、C-1 5 ヒドロキシルまたは C-2 0 デスメチルの基のいずれか 1 つにある、請求項 2 2 6 または 2 2 7 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 4 1】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、メイタンシノールの N-メチル-L-アラニンを含むエステルである、請求項 2 2 6 または 2 2 7 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 4 2】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、メイタンシノールの N-メチル-L-システインを含むエステルである、請求項 2 2 6 または 2 2 7 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 4 3】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、式 (I I'-L)、(I I'-D) または (I I'-D, L) :

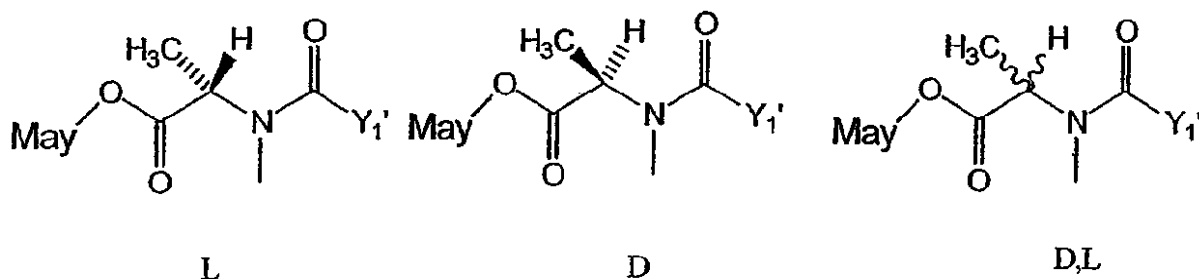
10

20

30

40

【化 4 5】



10

(II')

〔式中：

Y₁'は

【化 4 6】



を表し、

式中：

R₁からR₁₂は各々独立して、1から10の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3から10の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えてR₂からR₁₂はHであることができる；

A、B、およびDは各々独立して、3から10の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルなアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである；

l、m、n、o、p、q、r、s、t、およびuは各々独立して、0または1から5の整数である、ただしl、m、n、o、p、q、r、s、t、およびuの少なくとも2つが双方ともゼロではない；そして

MayはC-3ヒドロキシル、C-14ヒドロキシメチル、C-15ヒドロキシルまたはC-20デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]

により表される、請求項226または227に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項244】

R₁がメチルでありR₂がHである、またはR₁およびR₂がメチルである、請求項243に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項245】

R₁がメチルであり、R₂がHであり、R₅、R₆、R₇およびR₈が各々Hであり、lおよびmが各々1であり、そしてnが0である；またはR₁およびR₂がメチルであり、R₅、R₆、R₇およびR₈が各々Hであり、lおよびmが1であり、そしてnが0である、請求項243に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項246】

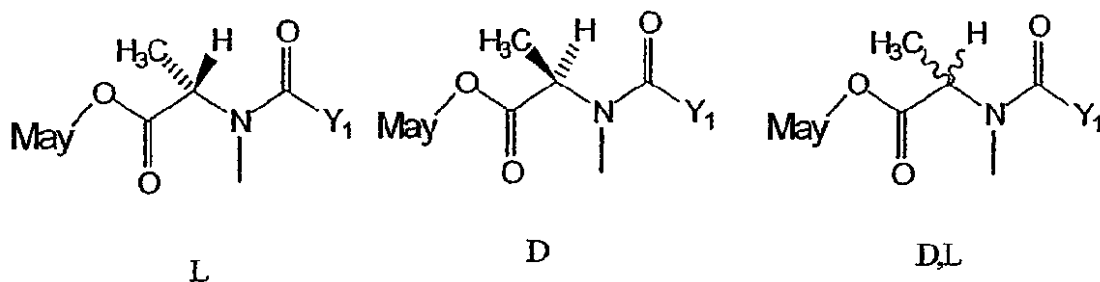
少なくとも1つのメイタンシノイドが、式(II-L)、(II-D)、または(II-D, L)：

20

30

40

【化 4 7】



10

(II)

〔式中：

Y₁ は

【化 4 8】



を表し、式中：

R₁ から R₈ は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R₂ から R₈ は H であることができる；

l、m、および n は各々独立して、1 から 5 の整数であり、そして加えて n はゼロであることができる；そして

May は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]

により表される、請求項 226 または 227 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 247】

R₁ がメチルであり R₂ が H である、または R₁ および R₂ がメチルである、請求項 246 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 248】

R₁ がメチルであり、R₂ が H であり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R₁ および R₂ がメチルであり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 246 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

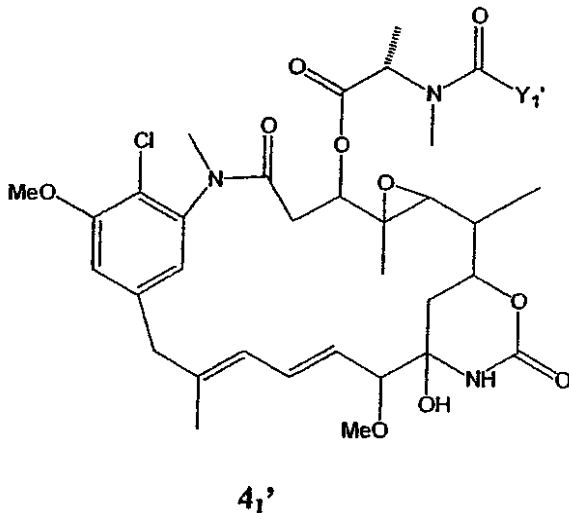
【請求項 249】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが式 4₁'：

20

30

【化 4 9】



〔式中：

 Y_1' は

【化 5 0】



を表し、

式中：

R_1 から R_{12} は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_{12} は H であることができる；

A、B、および D は各々独立して、3 から 10 の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルなアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである；

l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u は各々独立して、0 または 1 から 5 の整数である、ただし l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u の少なくとも 2 つが双方ともゼロではない；そして

M a y は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]

により表される、請求項 226 または 227 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 250】

R_1 がメチルであり R_2 が H である、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項 249 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 251】

R_1 がメチルであり、 R_2 が H であり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R_1 および R_2 がメチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 249 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 252】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが式 4_1 ：

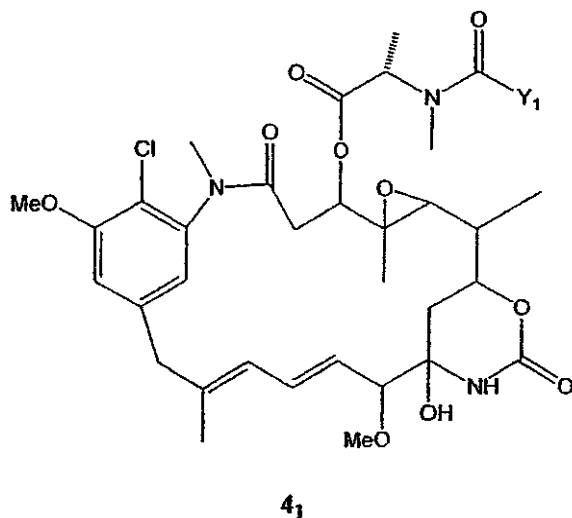
10

20

30

40

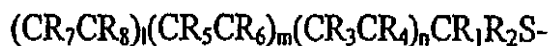
【化 5 1】



〔式中：

Y₁ は

【化 5 2】



10

20

を表し、式中：

R₁ から R₈ は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルまたはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R₂ から R₈ は H であることができる；そして

l、m、および n は各々独立して、1 から 5 の整数であり、そして加えて n は 0 であることができる]

により表される、請求項 226 または 227 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

30

【請求項 253】

R₁ がメチルであり R₂ が H である、または R₁ および R₂ がメチルである、請求項 252 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 254】

R₁ がメチルであり、R₂ が H であり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R₁ および R₂ がメチルであり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 252 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 255】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが DM1 である、請求項 226 または 227 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

40

【請求項 256】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが DM3 である、請求項 226 または 227 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

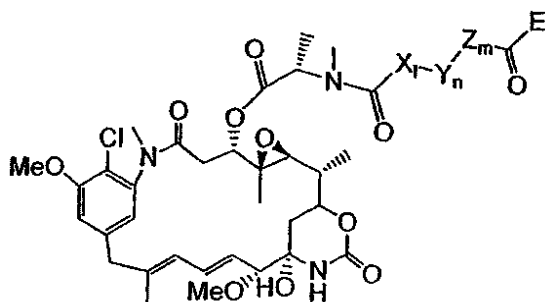
【請求項 257】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが DM4 である、請求項 226 または 227 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 258】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式 5 の化合物：

【化 5 3】



5

10

〔式中Xは、2から20の炭素原子を持つ直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、Yは3から10の炭素原子を持つシクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、Zは6から10の炭素原子を持つ置換されたもしくは置換されていない芳香族の基、またはヘテロ原子がN、OもしくはSより選択される置換されたもしくは置換されていない複素環式の基であり、そしてl、mおよびnは各々0または1であるが、ただしそれらすべてが同時に0ではない、そしてEはカルボニル基と共に活性なエステル、例えばN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよびスルホスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ならびにスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する〕

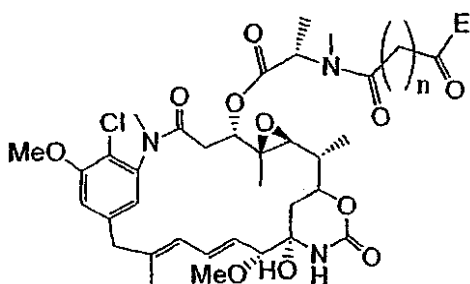
20

を与える、請求項226または227に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項259】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式6の化合物：

【化 5 4】



6

30

〔式中、nは3から24の整数を表し、そしてEはカルボニル基と共に活性なエステル、例えばN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよびスルホスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ならびにスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する〕

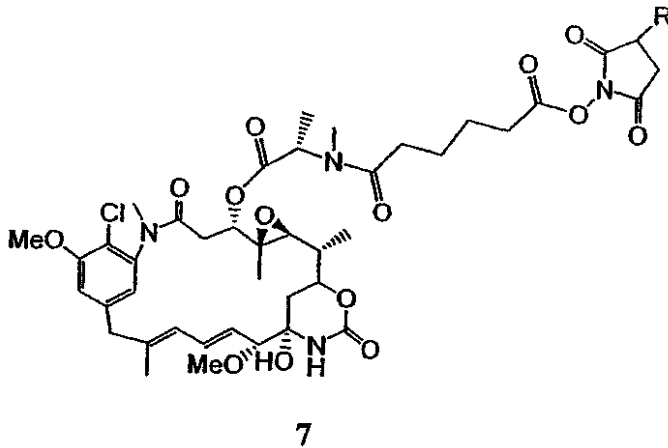
40

を与える、請求項226または227に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項260】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式7の化合物：

【化 5 5】



〔式中、RはHまたは SO_3Na^+ である〕

を与える、請求項 2 2 6 または 2 2 7 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 6 1】

細胞結合物質が、腫瘍細胞；ウイルスに感染した細胞、微生物に感染した細胞、寄生体に感染した細胞、自己免疫細胞、活性化細胞、骨髄細胞、活性化 T 細胞、B 細胞、もしくはメラノサイト；CD 3 3、CD 1 9、Can Ag、CAL LA、もしくは Her - 2 抗原を発現する細胞；またはインスリン増殖因子受容体、表皮増殖因子受容体、もしくは葉酸受容体を発現する細胞に結合する、請求項 2 2 6 または 2 2 7 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 6 2】

細胞結合物質が、乳癌細胞、前立腺癌細胞、卵巣癌細胞、結腸直腸癌細胞、胃癌細胞、扁平上皮癌細胞、小細胞肺癌細胞、精巣癌細胞、および神経芽腫細胞から成る群より選択される細胞に結合する、請求項 2 6 1 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 6 3】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する抗体、単鎖抗体、抗体フラグメント、標的細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、モノクローナル抗体フラグメント、標的細胞に特異的に結合するキメラ抗体、キメラ抗体フラグメント、標的細胞に特異的に結合するドメイン抗体、ドメイン抗体フラグメント、リンホカイン、ホルモン、ビタミン、増殖因子、コロニー刺激因子、または栄養素を輸送する分子である、請求項 2 2 6 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 6 4】

細胞結合物質が、リンホカイン、ホルモン、ビタミン、増殖因子、コロニー刺激因子、または栄養素を輸送する分子である、請求項 2 2 6 または 2 2 7 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 6 5】

細胞結合物質が、インターフェロン、IL 2、IL 3、IL 4、IL 6、インスリン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、メラノサイト刺激ホルモン、ステロイドホルモン、ソマトスタチン、EGF、TGF- α 、FGF、G-CSF、VEGF、M-CSF、GM-CSF、葉酸、トランスフェリン、エストロゲン、エストロゲン類似体、アンドロゲン、またはアンドロゲン類似体である、請求項 2 2 6 または 2 2 7 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 6 6】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する抗体、単鎖抗体、または抗体フラグメントである、請求項 2 2 6 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 6 7】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する表面再修飾した抗体、表面再修飾した単鎖抗体、または表面再修飾した抗体フラグメントである、請求項 2 2 6 に記載の細胞結合

10

20

30

40

50

物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 6 8】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するヒト化抗体、ヒト化単鎖抗体、またはヒト化抗体フラグメントである、請求項 2 2 6 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 6 9】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 2 6 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 7 0】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 2 6 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 7 1】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 2 6 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合法。

【請求項 2 7 2】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するキメラ抗体、キメラ抗体フラグメント、ドメイン抗体、またはドメイン抗体フラグメントである、請求項 2 2 6 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 7 3】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 2 6 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 7 4】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 7 5】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 2 6 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 7 6】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合するキメラ抗体、キメラ抗体フラグメント、ドメイン抗体、またはドメイン抗体フラグメントである、請求項 2 2 6 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 7 7】

細胞結合物質が、結腸直腸癌細胞または乳癌細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 2 6 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 7 8】

細胞結合物質が、結腸直腸癌細胞または乳癌細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 2 6 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 7 9】

細胞結合物質が、結腸直腸癌細胞または乳癌細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 2 6 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 280】

細胞結合物質が、結腸直腸癌細胞または乳癌細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 226 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 281】

細胞結合物質が、乳癌細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 226 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 282】

細胞結合物質が、抗 Can Ag 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CALLA 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 CD56 抗体、抗 IGF-IR 抗体、または抗 Her2 抗体である、請求項 226 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 283】

メイタンシノイドが DM1、DM2、または DM3 である、請求項 282 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 284】

細胞結合物質が、表面再修飾した抗体である My9-6、KS77、または N901 である、請求項 226 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 285】

メイタンシノイドが DM1、DM2、または DM3 である、請求項 284 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 286】

細胞結合物質が、トラスツツマブ抗体、B4 抗体、huC242 抗体である、請求項 226 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 287】

メイタンシノイドが DM1、DM2、または DM3 である、請求項 286 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 288】

細胞結合物質が huC242 抗体である、請求項 226 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 289】

細胞結合物質が表面再修飾した C242 抗体である、請求項 226 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 290】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体より毒性が低い、請求項 226 または 227 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 291】

細胞結合物質メイタンシノイド複合体が、抗体単独の血漿クリアランスとほぼ等しい値を有する、請求項 226 または 227 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 292】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の最大耐薬用量が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の値より大きい、請求項 226 または 227 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 293】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の生物学的活性の持続性が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシ

10

20

30

40

50

ノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の値より大きい、請求項 2 2 6 または 2 2 7 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 9 4】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の抗原陰性細胞に対する活性が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の値より低い、請求項 2 2 6 または 2 2 7 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 2 9 5】

細胞結合物質メイタンシノイド複合体が最小のバイスタンダー活性を示す、請求項 2 2 6 または 2 2 7 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

10

【請求項 2 9 6】

請求項 2 2 6 の細胞結合物質メイタンシノイド複合体、および担体を包含する組成物。

【請求項 2 9 7】

請求項 2 2 7 の細胞結合物質メイタンシノイド複合体、および担体を包含する組成物。

【請求項 2 9 8】

非開裂リンカーが、酸に誘発される開裂、光に誘発される開裂、ペプチダーゼに誘発される開裂、エステラーゼに誘発される開裂、またはジスルフィド結合の開裂に対して実質的に耐性がある、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載の組成物。

【請求項 2 9 9】

非開裂リンカーがイオウ原子を有していない、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載の組成物。

20

【請求項 3 0 0】

リンカーがジカルボン酸を基本とする部分から誘導される、請求項 2 9 9 に記載の組成物。

【請求項 3 0 1】

リンカーが α 、 ω -ジカルボン酸を基本とする部分から誘導され、ここで当該 α 、 ω -ジカルボン酸は一般式 $\text{HOOC}-\text{X}_1-\text{Y}_n-\text{Z}_m-\text{COOH}$ を有しており、式中 X は、2 から 20 の炭素原子を持つ直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、Y は 3 から 10 の炭素原子を持つシクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、Z は 6 から 10 の炭素原子を持つ置換されたもしくは置換されていない芳香族の基、またはヘテロ原子が N、O もしくは S より選択される置換されたもしくは置換されていない複素環式の基であり、そして l、m および n は各々 0 または 1 であるが、ただしそれらすべてが同時に 0 ではない、請求項 3 0 0 に記載の組成物。

30

【請求項 3 0 2】

α 、 ω -ジカルボン酸が、アジピン酸、ピメリックグルタル酸、ピメリン酸、ヘキセン-1，6-二酸、ペンテン-1，5-二酸、シクロヘキサ-2，5-二酸、またはシクロヘキセン-2，5-二酸である、請求項 3 0 1 に記載の組成物。

【請求項 3 0 3】

非開裂リンカーがイオウ原子を有する、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載の組成物。

【請求項 3 0 4】

非開裂リンカーがマレイミドを基本とする部分から誘導される、請求項 3 0 3 に記載の組成物。

40

【請求項 3 0 5】

非開裂リンカーが、N-スクシンイミジル 4-(マレイミドメチル)シクロヘキサカルボキシレート (SMCC)、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサ-1-カルボキシ-(6-アミドカプロエート) (LC-SMCC)、 κ -マレイミドウンデカン酸 N-スクシンイミジルエステル (KMUA)、 γ -マレイミド酪酸 N-スクシンイミジルエステル (GMB S)、 ϵ -マレイミドカプロン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (EMCS)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS)、N-(α -マレイミドアセトキシ)-スクシンイミドエス

50

テル (AMAS)、スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート (SMPH)、N-スクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート (SMPB)、およびN-(p-マレイミドフェニル)イソシアネート (PMP I) から成る群より選択される、マレイミドを基本とする部分から誘導される、請求項304に記載の組成物。

【請求項306】

非開裂リンカーがSMCCから誘導される、請求項305に記載の組成物。

【請求項307】

非開裂リンカーがハロアセチルを基本とする部分から誘導される、請求項303に記載の組成物。

【請求項308】

非開裂リンカーが、N-スクシンイミジル-4-(ヨードアセチル)-アミノベンゾエート (SIAB)、N-スクシンイミジルヨードアセテート (SIA)、N-スクシンイミジルプロモアセテート (SBA)、およびN-スクシンイミジル-3-(プロモアセトアミド)プロピオネート (SBAP) から成る群より選択される、ハロアセチルを基本とする部分から誘導される、請求項307に記載の組成物。

【請求項309】

非開裂リンカーがSIABから誘導される、請求項308に記載の組成物。

【請求項310】

リンカーが、少なくとも1つのメイタンシノイドのC-3ヒドロキシル、C-14ヒドロキシメチル、C-15ヒドロキシルまたはC-20デスメチルの基のいずれか1つにある、請求項296または297に記載の組成物。

【請求項311】

少なくとも1つのメイタンシノイドが、メイタンシノールのN-メチル-アラニンを含むエステルである、請求項296または297に記載の組成物。

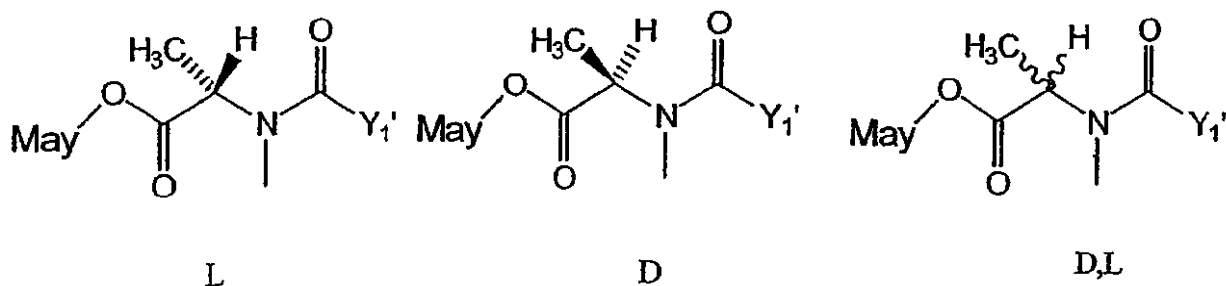
【請求項312】

少なくとも1つのメイタンシノイドが、メイタンシノールのN-メチル-システインを含むエステルである、請求項296または297に記載の組成物。

【請求項313】

少なくとも1つのメイタンシノイドが、式(I I'-L)、(I I'-D)または(I I'-D, L)：

【化56】



(II')

[式中：

Y_1' は

【化57】

$(CR_7CR_8)_i(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_0(CR_5CR_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$

を表し、

10

20

30

40

50

式中：

R_1 から R_{12} は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_{12} は H であることができる；

A、B、および D は各々独立して、3 から 10 の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルなアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである；

l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u は各々独立して、0 または 1 から 5 の整数である、ただし l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u の少なくとも 2 つが双方ともゼロではない；そして

May は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]により表される、請求項 296 または 297 に記載の組成物。

【請求項 314】

R_1 がメチルであり R_2 が H である、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項 313 に記載の組成物。

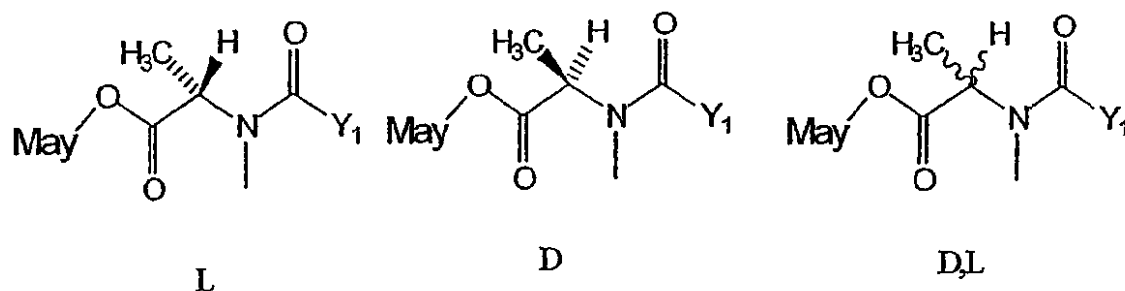
【請求項 315】

R_1 がメチルであり、 R_2 が H であり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R_1 および R_2 がメチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 313 に記載の組成物。

【請求項 316】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、式 (II-L)、(II-D)、または (II-D, L)：

【化 58】



(II)

[式中：

Y_1 は

【化 59】



を表し、式中：

R_1 から R_8 は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_8 は H であることができる；

l、m、および n は各々独立して、1 から 5 の整数であり、そして加えて n は 0 であることができる；そして

MayはC-3ヒドロキシル、C-14ヒドロキシメチル、C-15ヒドロキシルまたはC-20デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]により表される、請求項296または299に記載の組成物。

【請求項317】

R₁がメチルでありR₂がHである、またはR₁およびR₂がメチルである、請求項316に記載の組成物。

【請求項318】

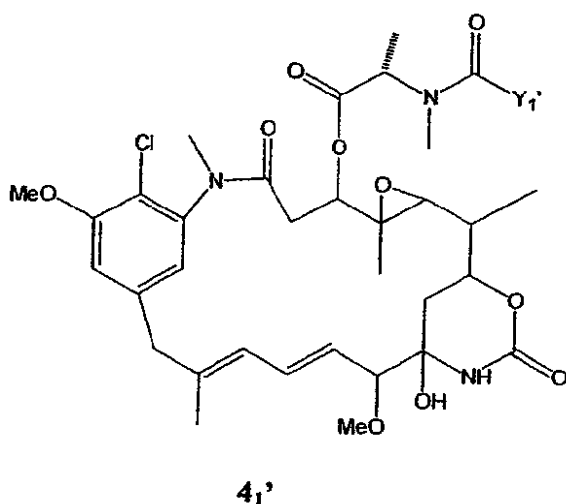
R₁がメチルであり、R₂がHであり、R₅、R₆、R₇およびR₈が各々Hであり、lおよびmが各々1であり、そしてnが0である；またはR₁およびR₂がメチルであり、R₅、R₆、R₇およびR₈が各々Hであり、lおよびmが1であり、そしてnが0である、請求項316に記載の組成物。

10

【請求項319】

少なくとも1つのメイタンシノイドが式4₁'：

【化60】



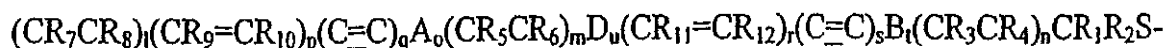
20

[式中：

Y₁'は

【化61】

30



を表し、

式中：

R₁からR₁₂は各々独立して、1から10の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3から10の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えてR₂からR₁₂はHであることができる；

A、B、およびDは各々独立して、3から10の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルナアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである；そして

40

l、m、n、o、p、q、r、s、t、およびuは各々独立して、0または1から5の整数である、ただしl、m、n、o、p、q、r、s、t、およびuの少なくとも2つが双方ともゼロではない]

により表わされる請求項296または297に記載の組成物。

【請求項320】

R₁がメチルでありR₂がHである、またはR₁およびR₂がメチルである、請求項319に記載の組成物。

【請求項321】

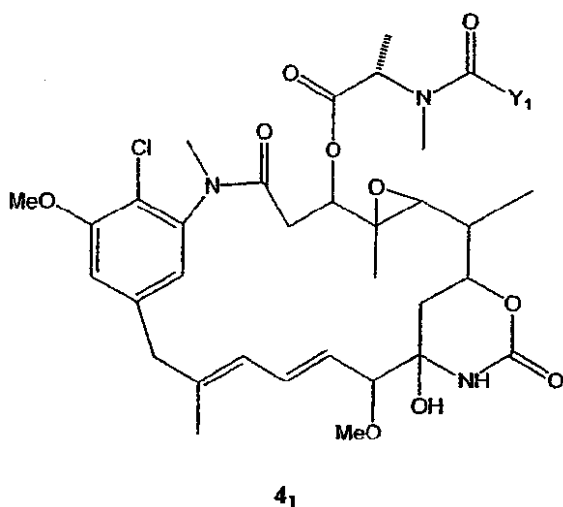
50

R₁ がメチルであり、R₂ がHであり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々Hであり、l および m が各々1であり、そして n が0である；または R₁ および R₂ がメチルであり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々Hであり、l および m が1であり、そして n が0である、請求項 3 1 9 に記載の組成物。

【請求項 3 2 2】

少なくとも1つのメイタンシノイドが式 4₁：

【化 6 2】



〔式中：

Y₁ は

【化 6 3】



を表し、式中：

R₁ から R₈ は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルまたはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R₂ から R₈ はHであることができる；そして

l、m、および n は各々独立して、1 から 5 の整数であり、そして加えて n は0であることができる]

により表される、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載の組成物。

【請求項 3 2 3】

R₁ がメチルであり R₂ がHである、または R₁ および R₂ がメチルである、請求項 3 2 3 に記載の組成物。

【請求項 3 2 4】

R₁ がメチルであり、R₂ がHであり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々Hであり、l および m が各々1であり、そして n が0である；または R₁ および R₂ がメチルであり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々Hであり、l および m が1であり、そして n が0である、請求項 3 2 3 に記載の組成物。

【請求項 3 2 5】

少なくとも1つのメイタンシノイドが DM 1 である、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載の組成物。

【請求項 3 2 6】

少なくとも1つのメイタンシノイドが DM 3 である、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載の組成物。

【請求項 3 2 7】

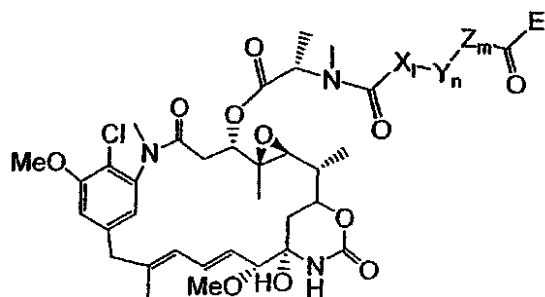
少なくとも1つのメイタンシノイドが DM 4 である、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載

の組成物。

【請求項 3 2 8】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式 5 の化合物：

【化 6 4】



5

10

20

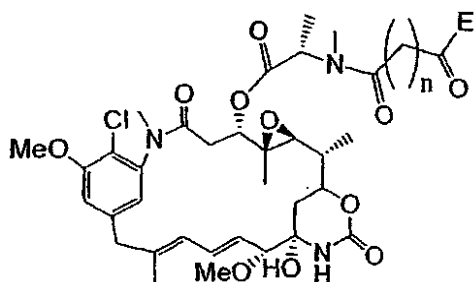
[式中 X は、2 から 20 の炭素原子を持つ直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、Y は 3 から 10 の炭素原子を持つシクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、Z は 6 から 10 の炭素原子を持つ置換されたもしくは置換されていない芳香族の基、またはヘテロ原子が N、O もしくは S より選択される置換されたもしくは置換されていない複素環式の基であり、そして l、m および n は各々 0 または 1 であるが、ただしそれらすべてが同時に 0 ではない、そして E はカルボニル基と共に活性なエステル、例えば N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよびスルホスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ならびにスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する]

を与える、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載の組成物。

【請求項 3 2 9】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式 6 の化合物：

【化 6 5】



6

30

40

[式中、n は 3 から 24 の整数を表し、そして E はカルボニル基と共に活性なエステル、例えば N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよびスルホスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ならびにスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する]

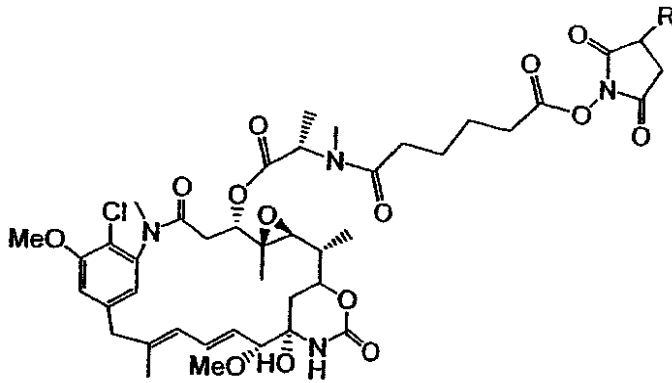
を与える、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載の組成物。

【請求項 3 3 0】

メイタンシノイドが、イオウを含有しない架橋物質で修飾され、式 7 の化合物：

50

【化 6 6】



7

〔式中、RはHまたは SO_3Na^+ である〕

を与える、請求項 296 または 297 に記載の組成物。

【請求項 331】

細胞結合物質が、腫瘍細胞；ウイルスに感染した細胞、微生物に感染した細胞、寄生体に感染した細胞、自己免疫細胞、活性化細胞、骨髄細胞、活性化T細胞、B細胞、もしくはメラノサイト；CD33、CD19、CanAg、CALLA、もしくはHer-2抗原を発現する細胞；またはインスリン増殖因子受容体、表皮増殖因子受容体、もしくは葉酸受容体を発現する細胞に結合する、請求項 296 または 297 に記載の組成物。

【請求項 332】

細胞結合物質が、乳癌細胞、前立腺癌細胞、卵巣癌細胞、結腸直腸癌細胞、胃癌細胞、扁平上皮癌細胞、小細胞肺癌細胞、精巣癌細胞、および神経芽腫細胞から成る群より選択される細胞に結合する、請求項 331 に記載の組成物。

【請求項 333】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する抗体、単鎖抗体、抗体フラグメント、標的細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、モノクローナル抗体フラグメント、標的細胞に特異的に結合するキメラ抗体、キメラ抗体フラグメント、標的細胞に特異的に結合するドメイン抗体、ドメイン抗体フラグメント、リンホカイン、ホルモン、ビタミン、増殖因子、コロニー刺激因子、または栄養素を輸送する分子である、請求項 296 に記載の組成物。

【請求項 334】

細胞結合物質が、リンホカイン、ホルモン、ビタミン、増殖因子、コロニー刺激因子、または栄養素を輸送する分子である、請求項 296 または 297 に記載の組成物。

【請求項 335】

細胞結合物質が、インターフェロン、IL2、IL3、IL4、IL6、インスリン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、メラノサイト刺激ホルモン、ステロイドホルモン、ソマトスタチン、EGF、TGF- α 、FGF、G-CSF、VEGF、M-CSF、GM-CSF、葉酸、トランスフェリン、エストロゲン、エストロゲン類似体、アンドロゲン、またはアンドロゲン類似体である、請求項 296 または 297 に記載の組成物。

【請求項 336】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する抗体、単鎖抗体、または抗体フラグメントである、請求項 296 に記載の組成物。

【請求項 337】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する表面再修飾した抗体、表面再修飾した単鎖抗体、または表面再修飾した抗体フラグメントである、請求項 296 に記載の組成物。

【請求項 338】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するヒト化抗体、ヒト化単鎖抗体、またはヒト化抗体フラグメントである、請求項 296 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 3 3 9】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

【請求項 3 4 0】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

【請求項 3 4 1】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

10

【請求項 3 4 2】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合するキメラ抗体、キメラ抗体フラグメント、ドメイン抗体、またはドメイン抗体フラグメントである、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

【請求項 3 4 3】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

【請求項 3 4 4】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

20

【請求項 3 4 5】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

【請求項 3 4 6】

細胞結合物質が、腫瘍細胞に特異的に結合するキメラ抗体、キメラ抗体フラグメント、ドメイン抗体、またはドメイン抗体フラグメントである、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

【請求項 3 4 7】

細胞結合物質が、結腸直腸癌細胞または乳癌細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

30

【請求項 3 4 8】

細胞結合物質が、結腸直腸癌細胞または乳癌細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

【請求項 3 4 9】

細胞結合物質が、結腸直腸癌細胞または乳癌細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

40

【請求項 3 5 0】

細胞結合物質が、乳癌細胞に特異的に結合する表面再修飾したモノクローナル抗体、表面再修飾した単鎖モノクローナル抗体、または表面再修飾したモノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

【請求項 3 5 1】

細胞結合物質が、乳癌細胞に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体、ヒト化単鎖モノクローナル抗体、またはヒト化モノクローナル抗体フラグメントである、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

【請求項 3 5 2】

細胞結合物質が、抗 C a n A g 抗体、抗 C D 1 9 抗体、抗 C D 3 3 抗体、抗 C A L L A

50

抗体、抗 E G F R 抗体、抗 C D 5 6 抗体、抗 I G F - I R 抗体、または抗 H e r 2 抗体である、請求項 2 9 6 項に記載の組成物。

【請求項 3 5 3】

メイタンシノイドが D M 1、D M 2、または D M 3 である、請求項 3 5 2 に記載の組成物。

【請求項 3 5 4】

細胞結合物質が、表面再修飾した抗体である M y 9 - 6、K S 7 7、または N 9 0 1 である、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

【請求項 3 5 5】

メイタンシノイドが D M 1、D M 2、または D M 3 である、請求項 3 5 4 に記載の組成物。

10

【請求項 3 5 6】

細胞結合物質が、トラスツツマブ抗体、B 4 抗体、h u C 2 4 2 抗体である、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

【請求項 3 5 7】

メイタンシノイドが D M 1、D M 2、または D M 3 である、請求項 3 5 6 に記載の組成物。

【請求項 3 5 8】

細胞結合物質が h u C 2 4 2 抗体である、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

【請求項 3 5 9】

細胞結合物質が表面再修飾した h u C 2 4 2 抗体である、請求項 2 9 6 に記載の組成物。

20

【請求項 3 6 0】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体より毒性が低い、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載の組成物。

【請求項 3 6 1】

細胞結合物質メイタンシノイド複合体が、抗体単独の血漿クリアランスとほぼ等しい値を有する、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載の組成物。

30

【請求項 3 6 2】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の最大耐薬用量が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の値より大きい、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載の組成物。

【請求項 3 6 3】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の生物学的活性の持続性が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の値より大きい、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載の組成物。

40

【請求項 3 6 4】

非開裂リンカーを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の抗原陰性細胞に対する活性が、開裂可能なリンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも 1 つのメイタンシノイドを包含する細胞結合物質メイタンシノイド複合体の値より低い、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載の方法。

【請求項 3 6 5】

細胞結合物質メイタンシノイド複合体が最小のバイスタンダー活性を示す、請求項 2 9 6 または 2 9 7 に記載の方法。

【請求項 3 6 6】

請求項 2 2 6 または 2 2 7 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体を製造する方

50

法であって、当該方法は以下：

(a) 細胞結合物質を提供する

(b) 細胞結合物質を架橋物質で修飾する、そして

(c) 修飾された細胞結合物質を、メイタンシノイドまたはチオールを含有するメイタンシノイドと複合体化させ、それにより細胞結合物質、およびメイタンシノイドまたはチオールを含有するメイタンシノイドの間に非開裂リンカーを提供して、複合体を生成するを包含する前記方法。

【請求項 367】

請求項 226 または 227 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体を製造する方法であって、当該方法は以下：

(a) メイタンシノイドまたはチオールを含有するメイタンシノイドを提供する

(b) メイタンシノイドまたはチオールを含有するメイタンシノイドを架橋物質で修飾し、それにより非開裂リンカーを形成する、そして

(c) 修飾されたメイタンシノイドまたはチオールを含有するメイタンシノイドを、細胞結合物質と複合体化させ、それにより細胞結合物質、およびメイタンシノイドまたはチオールを含有するメイタンシノイドの間に非開裂リンカーを提供して、複合体を生成するを包含する前記方法。

【請求項 368】

請求項 226 または 227 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体を製造する方法であって、当該方法は以下：

(a) メイタンシノイドを提供する、

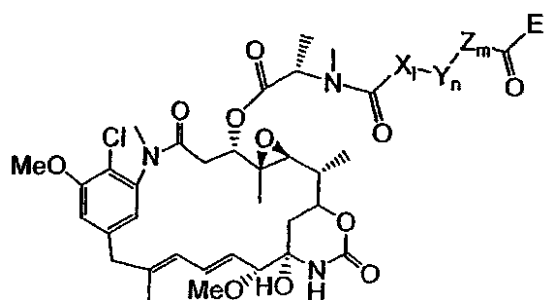
(b) メイタンシノイドを、イオウを含有しない架橋物質で修飾して、メイタンシノイドエステルを得る、そして

(c) メイタンシノイドエステルを細胞結合物質と複合体化させ、それにより細胞結合物質およびメイタンシノイド間に非開裂リンカーを提供して、複合体を生成するを包含する前記方法。

【請求項 369】

式 5：

【化 67】



5

の化合物であって、

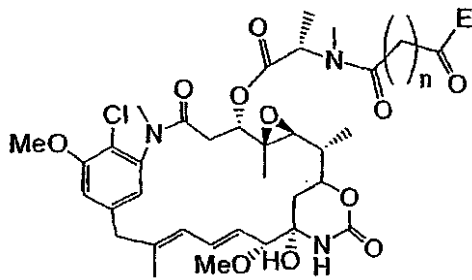
式中 X は、2 から 20 の炭素原子を持つ直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、Y は 3 から 10 の炭素原子を持つシクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、Z は 6 から 10 の炭素原子を持つ置換されたもしくは置換されていない芳香族の基、またはヘテロ原子が N、O もしくは S より選択される置換されたもしくは置換されていない複素環式の基であり、そして l、m および n は各々 0 または 1 であるが、ただしそれらすべてが同時に 0 ではない、そして E はカルボニル基と共に活性なエステル、例えば N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよびスルホスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2,4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カ

ルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ならびにスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する、前記化合物。

【請求項 370】

式 6 :

【化 68】



10

6

の化合物であって、

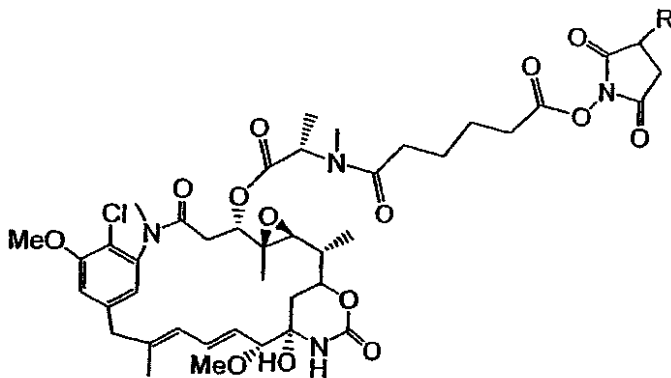
式中、 n は3から24の整数を表し、そしてEはカルボニル基と共に活性なエステル、例えばN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよびスルホスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ならびにスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する、前記化合物。

20

【請求項 371】

式 7 の化合物 :

【化 69】



30

7

式中、RはHまたは SO_3Na^+ である、前記化合物。

【請求項 372】

以下の式 :

トラスツマブ-SMCC-メイタンシノイド
の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

40

【請求項 373】

以下の式 :

トラスツマブ-SMCC-DM1
の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 374】

以下の式 :

huC242-SMCC-メイタンシノイド
の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

50

【請求項 375】

以下の式：

h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1

の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[01]本出願は、2003年10月10日に提出された米国仮特許出願第60/509,901号の利益を主張し、その全開示を参照として援用する。

【0002】

(発明の技術分野)

[02]本発明に即した方法は、非開裂(non-cleavable)リンカーを介して連結した細胞結合物質(cell-binding agent)メイタンシノイド複合体を用いて特定の細胞集団を標的とすることに関する。本発明に即したもう1つの方法は、複合体を製造する方法である。本発明に即した組成物は、メイタンシノイドが非開裂リンカーを介して細胞結合物質に連結される、新規の細胞結合物質メイタンシノイド複合体に関する。本発明に即したもう1つの組成物は、新規メイタンシノイドエステルに関する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

[03]メイタンシノイドは高い細胞毒性のある薬剤である。メイタンシンは、Kupchan により東部アフリカの低木、メイテナス セラタ(Maytenus serrata)より最初に単離され、メトトレキサート、ダウノルビシン、およびビンクリスチンのような従来の癌の化学療法薬より100倍から1000倍高い細胞毒性があることが示された(米国特許第3,869,111号)。その後、いくつかの微生物もまたメイタンシノイド、例えばメイタンシノール(maytansinol)およびメイタンシノールのC-3エステルを産生することが発見された(米国特許第4,151,042号)。メイタンシノールの合成C-3エステルおよびメイタンシノールの類似体についても報告された(Kupchan et al., 21 J. Med. Chem. 31-37 (1978); Hiashide et al. 270 Nature 721-722 (1977); Kawai et al., 32 Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (1984))。C-3エステルが調製されたメイタンシノールの類似体の例は、芳香環上(例えばデクロロ)またはC-9、C-14(例えばヒドロキシル化したメチル基)、C-15、C-18、C-20およびC-4, 5に修飾を伴うメイタンシノールを含む。

【0004】

[04]天然に生成されるC-3エステルおよび合成C-3エステルは以下の2つの群に分類することができる：

(a) シンプルなカルボン酸を用いてのC-3エステル(米国特許第4,248,870号；4,265,814号；4,308,268号；4,308,269号；4,309,428号；4,317,821号；4,322,348号；および4,331,598号)、ならびに

(b) N-メチル-L-アラニンの誘導体を用いてのC-3エステル(米国特許第4,137,230号および4,260,608号；およびKawai et al., 32 Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (1984))。

【0005】

[05](b)群のエステルは、(a)のエステルよりずっと強い細胞毒性があることが発見された。

[06]メイタンシンは有糸分裂の阻害薬である。in vivo でのL1210細胞のメイタンシンによる処置は、細胞の67%を有糸分裂状態に蓄積させることになることが報告された。未処置のコントロール細胞は3.2から5.8%の間の範囲の分裂係数を示すことが報告された(Sieber et al., 43 Bibl. Haematol. 495-500 (1976))。ウニの卵およびカ

10

20

30

40

50

イ類の卵による実験は、メイタンシンが微小管タンパク質であるチューブリンの重合を阻害することを通して微小管の形成を妨げることにより、有糸分裂を阻害することを示唆した (Remillard et al., 189 Science 1002-1005 (1975))。

【0006】

[07]in vitro では、P 3 8 8、L 1 2 1 0、およびL Y 5 1 7 8のネズミ白血病細胞の懸濁液が、最も感受性の高いP 3 8 8株にてメイタンシンにより 10^{-3} から 10^{-1} $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で阻害されることが発見された。メイタンシンはまた、ヒト鼻咽腔癌細胞のin vitroでの成長の活性な阻害薬であることも示され、またヒト急性リンパ芽球性白血病株C. E. M. が、 10^{-7} $\mu\text{g}/\text{ml}$ という低濃度により阻害されると報告された (Wolpert-DeFillippes et al., 24 Biochem. Pharmacol. 1735-1738 (1975))。

10

【0007】

[08]メイタンシンはまたin vivoで活性であることも示された。P 3 8 8リンパ性白血病系における腫瘍の成長が50から100倍の投与量の範囲にわたり阻害されることが示され、このことは高い治療係数を示唆した；また有意な阻害活性を、L 1 2 1 0マウス白血病系、ヒトルイス肺癌系、およびヒトB-16黒色癌系にて示すことができた (Kupchan, 33 Ped. Proc 2288-2295 (1974))。

【0008】

[09]メイタンシノイドは高い細胞毒性があるため、多くの疾患、例えば癌の治療における使用が期待された。この期待にはなお証明がなされなければならない。メイタンシンを用いての臨床的試みは、いくつかの副作用のために好ましいとは言えなかった (Issel et al., 5 Cancer Teat. Rev. 199-207 (1978))。中枢神経系および胃腸症状への副作用が、一部の患者のさらなる治療を断念する原因であり (Issel 204にて)、蓄積性であると思われる末梢性ニューロパチーにメイタンシンが関与するようであった (Issel 207にて)。

20

【0009】

[10]そのため標的細胞に選択的に薬剤を送達する標的技術が利用された。開裂可能なリンカーおよび非開裂リンカーの双方が、数種の薬剤について調査されたが、メイタンシノイドの場合を含むほとんどの場合、in vitroの細胞毒性検査により、抗体-薬剤複合体がフリーの複合体化していない薬剤と同程度の細胞毒性の効能をほとんど達成できないことが明らかになった。したがってメイタンシノイドの標的への送達が有効であるには、メイタンシノイドおよび細胞結合物質間の結合は開裂可能でなければならないことが、一般に受け入れられることとなった。

30

【0010】

[11]さらに免疫毒性の分野において、モノクローナル抗体および触媒的に活性なタンパク質の毒素間にジスルフィドの架橋によるリンカーを含有する複合体は、他のリンカーを含有する複合体に比してより細胞毒性があることが示された。Lambert et al., 260 J. Biol. Chem. 12035-12041 (1985); Lambert et al., Immunotoxins 175-209 (A. Frankel 編、1988)、およびGhetie et al., 48 Cancer Res. 2610-2617 (1988)を参照のこと。このことは、抗体分子および毒素間のジスルフィド結合の効率的な開裂に寄与するグルタチオンの高い細胞内濃度によるものであった。より最近、非開裂リンカーSMCCを介して抗Her2乳癌抗体T A. 1に連結したメイタンシノイドの複合体は、開裂可能なジスルフィド結合を有するリンカーを介してT A. 1を連結したメイタンシノイドの複合体に比して200分の1の効能であることが示された (Chari et al., 52 Cancer Res. 127-133 (1992))。

40

【0011】

[12]したがってジスルフィドを含有する開裂可能なリンカーを介して連結した細胞毒性の複合体が探求されてきた。Shenらは、メトキサレートのメルカプトエチルアミド誘導体への変換に続いて、ジスルフィド結合を介してのポリ-D-リジンと複合体化させることについて記載した (260 J. Biol. Chem. 10905-10908 (1985))。トリスルフィドを含有する毒性薬剤であるカリケマイシンの、抗体との複合体の調製についても記載された (Menendez et al., Fourth International Conference on Monoclonal Antibody Immunoco

50

njugates for Cancer, San Diego, Abstract 81 (1989))。

【0012】

[13]米国特許第5, 208, 020号および5, 416, 064号(その全開示を特に本明細書において参照として援用する)は、開裂可能なリンカー、例えばジスルフィド基を含有するリンカー、酸に不安定な基を含有するリンカー、光に不安定な基を含有するリンカー、ペプチダーゼに不安定な基を含有するリンカー、およびエステラーゼに不安定な基を含有するリンカーを介して特定のメイタンシノイド誘導体に連結した、細胞結合物質を包含する細胞毒性複合体を開示している。

【0013】

[14]米国特許第6, 333, 410 B1号(その全開示を特に本明細書において参照として援用する)は、細胞結合物質に連結するための、チオールを含有するメイタンシノイドを調製および精製するための方法を開示しており、米国特許第6, 441, 163 B1号(その全開示を特に本明細書において参照として援用する)は、リンカーがジスルフィドを含有する開裂可能なリンカーである、メイタンシノイドおよび細胞結合物質の細胞毒性複合体を調製するための1段階での方法を開示している。

【0014】

[15]さらに米国特許第5, 208, 020号は、リンカーがマレイミド基を包含する非開裂リンカーを用いての抗体-メイタンシノイド複合体について示している。しかし、この参考文献はそのような複合体が疾患の治療に有効であることを立証する実験データを含有していない。

【0015】

[16]今回意外にも、非開裂リンカーを介して連結したメイタンシノイドおよび細胞結合物質の細胞毒性複合体が極めて効能があり、多くの場合において、開裂可能なリンカーを用いたメイタンシノイドおよび細胞結合物質の複合体を上回る予想外の有利な点を有することを発見した。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0016】

(発明の概要)

[17]以下に記載する本発明の説明のための非限定的な態様は、上の不都合な点および上に記載していないその他の不都合な点を克服するものである。その上本発明は上に記載した不都合な点を克服する必要がなく、以下に記載する本発明の説明のための非限定的な態様は、上に記載したいずれの問題点も克服していなくてよい。

【0017】

[18]本発明の1つの側面は、選択された細胞集団由来の細胞を含有すると推測される細胞集団または組織を、細胞結合物質メイタンシノイド複合体と接触させることを包含する、前記の選択された細胞集団を標的としてメイタンシノイドを向かわせるための方法であり、その場合1つまたはそれより多くのメイタンシノイドが非開裂リンカーを介して細胞結合物質に連結されている。

【0018】

[19]本発明のもう1つの側面は、標的に向かう物質が細胞結合物質である標的療法により治療することのできる、腫瘍、自己免疫疾患、移植片拒絶、移植片対宿主病、ウイルス感染、寄生体感染、およびその他の疾患の治療のための方法であって、当該方法は1つまたはそれより多くのメイタンシノイドが細胞結合物質に連結されている細胞結合物質メイタンシノイド複合体、または医薬的に受容可能な前記複合体の製剤もしくは溶媒和物の有効量を、治療を必要とする被験者に投与することを包含する、前記方法である。

【0019】

[20]本発明のもう1つの側面は、1つまたはそれより多くのメイタンシノイドが非開裂リンカーを介して細胞結合物質に連結されている、細胞結合物質メイタンシノイド複合体である。

【0020】

[21]本発明のもう1つの側面は、上記記載の複合体を包含する組成物である。

[22]本発明のもう1つの側面は、上記記載の複合体を製造する方法である。

[23]本発明のもう1つの側面は、新規メイタンシノイドエステルである。

【0021】

(発明の例としての態様の詳細な説明)

[54]当該技術分野は、現存する薬剤をそれらの細胞毒性の効能を低下させずに修飾することが極めて困難であることを露呈している。しかし米国特許第6,441,163 B1号、6,333,410 B1号、5,416,064号および5,208,020号は、開裂可能なリンカー、特にジスルフィド基を含有する開裂可能なリンカーを介して、メイタンシノイドを適当な細胞結合物質に連結することにより、効能ある細胞毒性物質を生成することができることを立証している。細胞結合物質メイタンシノイド複合体は、望ましくない細胞のみ標的とする形で適用して、それにより標的ではない健康な細胞に損傷を与えることによる副作用を避けるための、メイタンシノイドの十分な細胞毒性の作用を可能にする。

10

【0022】

[55]本発明者らは非開裂リンカーを介して細胞結合物質に連結したメイタンシノイドが、いくつかの重要な点において開裂可能なリンカーを介して連結したメイタンシノイドより優れていることを、意外にも発見した。特に開裂可能なリンカーを含有する複合体と比較した場合、非開裂リンカーを用いた複合体は、in vitro およびin vivoの双方において等しい抗腫瘍活性を示すが、血漿クリアランスの速度および毒性においては著明な低減が立証されている。

20

【0023】

[56]このように本発明は、副作用を最小限に抑えながら、標的とする細胞、特に破壊すべき細胞、例えば腫瘍細胞（特に固形腫瘍細胞）、ウイルスに感染した細胞、微生物に感染した細胞、寄生体に感染した細胞、自己免疫細胞（自己抗体を産生する細胞）、活性化細胞（移植片拒絶または移植片対宿主病に伴うもの）、または他のあらゆるタイプの罹患した細胞または異常な細胞に関する、改善された方法を提供する。

【0024】

[57]本発明の方法において使用する複合体は、非開裂リンカーを介して細胞結合物質に連結した1つまたはそれより多くのメイタンシノイドを有する。複合体を製造する1つの方法において、細胞結合物質 例えば抗体を、細胞結合物質 例えばSMCCで初めに修飾する。第2のステップでチオール基を有する反応性のメイタンシノイド 例えばDM1を、修飾した抗体と反応させて、抗体-メイタンシノイド複合体を生成する。あるいはメイタンシノイドを架橋試薬で修飾した後、細胞結合物質と反応させることもできる。例えば米国特許第6,441,163 B1号を参照のこと。

30

【0025】

(適切なメイタンシノイド)

[58]本発明における使用に適するメイタンシノイドは当該技術分野で周知であり、公知の方法に従って天然素材から単離する、遺伝子工学技術を用いて産生する(Yu et al., 99 PNAS 7968-7973 (2002)を参照のこと)、または公知の方法に従って合成により調製することができる。

40

【0026】

[59]適切なメイタンシノイドの例は、メイタンシノールおよびメイタンシノール類似体を含む。適切なメイタンシノール類似体の例は、修飾された芳香環を有するもの、および他の位置に修飾を有するものを含む。

【0027】

[60]修飾された芳香環を有する適切なメイタンシノール類似体の具体的な例は以下を含む：

(1) C-19-デクロロ（米国特許第4,256,746号）（アンサマイトシンP

50

2 の L A H 還元により調製) ;

(2) C-20-ヒドロキシ (または C-20-デメチル) +/ - C-19-デクロロ (米国特許第 4, 361, 650 号および 4, 307, 016 号) (ストレプトマイセス (Streptomyces) もしくはアクチノマイセス (Actinomyces) を用いての脱メチル化または L A H を用いての脱クロロ化により調製) ; ならびに

(3) C-20-デメトキシ、C-20-アシルオキシ (-O C O R) 、 +/ - デクロロ (米国特許第 4, 294, 757 号) (塩化アシルを用いてのアシル化により調製) 。

【0028】

[61]他の位置の修飾を有する適切なメイタンシノール類似体の具体的な例は以下を含む :

10

(1) C-9-SH (米国特許第 4, 424, 219 号) (メイタンシノールの H_2S または P_2S_5 との反応により調製) ;

(2) C-14-アルコキシメチル (デメトキシ / CH_2OR) (米国特許第 4, 331, 598 号) ;

(3) C-14-ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル (CH_2OH または CH_2OAc) (米国特許第 4, 450, 254 号) (ノカディア (Nocardia) より調製) ;

(4) C-15-ヒドロキシ / アシルオキシ (米国特許第 4, 364, 866 号) (ストレプトマイセスによるメイタンシノールの変換により調製) ;

(5) C-15-メトキシ (米国特許第 4, 313, 946 号および 4, 315, 929 号) (トレウィアヌドルフローラ (Trewia nudiflora) より単離) ;

20

(6) C-18-N-デメチル (米国特許第 4, 362, 663 号および 4, 322, 348 号) (ストレプトマイセスによるメイタンシノールの脱メチル化により調製) ; ならびに

(7) 4, 5-デオキシ (米国特許第 4, 371, 533 号) (メイタンシノールの三塩化チタン / L A H 還元により調製) 。

【0029】

[62]連結のタイプに依存して、メイタンシノールの多くの位置が結合位置として有用であることが知られている。例えばエステル結合を形成するためには、ヒドロキシル基を有する C-3 の位置、ヒドロキシメチルで修飾された C-14 の位置、ヒドロキシル基で修飾された C-15 の位置、およびヒドロキシル基を有する C-20 の位置が、すべて適する。しかし C-3 の位置が好ましく、メイタンシノールの C-3 の位置が特に好ましい。

30

【0030】

[63]本発明に従って、好ましいメイタンシノイドはフリーのチオール基を有する。フリーのチオール基を包含する特に好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノールの C-3 エステルおよびその類似体である、メイタンシノールの N-メチル-L-アラニンを含むエステル、N-メチル-L-システインを含むエステルを含む。好ましいエステルは、メイタンシノールの N-メチル-L-アラニンを含むエステル、および N-メチル-L-システインを含むエステルを含む。フリーのチオール基を有するメイタンシノールのエステルの合成は、以前に、例えば米国特許第 5, 208, 020 号、Chari et al., 52 Cancer Res., 127-131 (1992)、および Liu et al., 93 Proc Natl. Acad. Sci., 8618-8623 (1996) に記載されている。さらに米国特許第 6, 333, 410、B1 号 (その全開示を本明細書により参照として援用する) は、細胞結合物質への連結に適するチオールを含むメイタンシノイドの調製および精製に関する改善された方法を提供している。

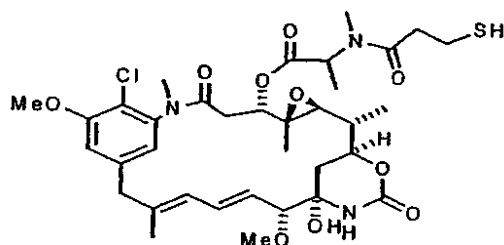
40

【0031】

[64]以下に例示する本発明の複合体の多くは、化学式では $N^{2'}-デアセチル-N^{2'}-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン$ と表す、チオールを含有するメイタンシノイド DM1 を利用する。DM1 は以下の構造式 :

【0032】

【化 1】



DM1

10

【0033】

で表される。

[65]チオールを含有するメイタンシノイドDM1の合成は以前に記載されている（米国特許第5,208,020号）。

【0034】

[66]米国特許出願10/849,136（その全開示を本明細書により参照として援用する）は、チオール官能基(functionality)を持つ α -炭素上に1つまたは2つのアルキル置換基を持つ、立体障害のチオールを含有するメイタンシノイドについて記載している。加えてスルフヒドリル基を持つメイタンシノイドのアシル化されたアミノ酸側鎖のアシル基は、アミドのカルボニル基とイオウ原子との間に少なくとも3つの炭素原子の直鎖を保有する。これらの新規メイタンシノイドは、本発明における使用に適する。

20

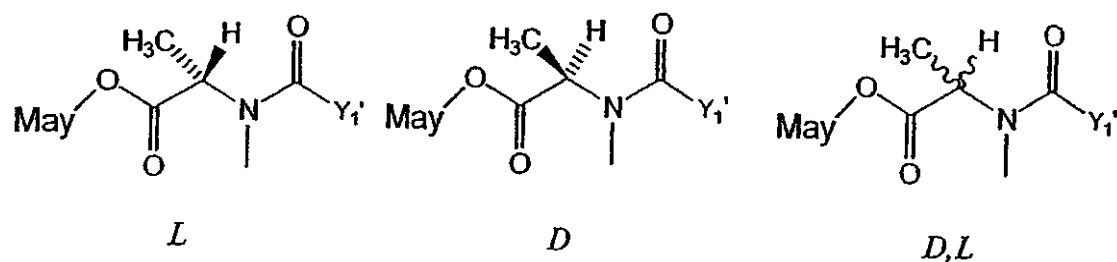
【0035】

[67]立体障害のチオール基を有するメイタンシノイドの合成は、米国特許出願10/849,136号、特に同文献の図3を参照として記載することができる。

[68]本発明の1つの側面において、メイタンシノイドは立体障害のチオール基を含有し、式(II'-L)、(II'-D)、または(II'-D,L)：

【0036】

【化 2】



30

(II')

【0037】

により表される。式(II')において、

Y_1' は

40

【0038】

【化 3】



【0039】

を表す。

A、B、およびDは各々独立して、3から10の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルなアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである。

【0040】

50

R_1 から R_{12} は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_{12} は H であることができる。

【0041】

1、m、n、o、p、q、r、s、t、および u は各々独立して、0 または 1 から 5 の整数である、ただし 1、m、n、o、p、q、r、s、t、および u の少なくとも 2 つが双方ともゼロではない。

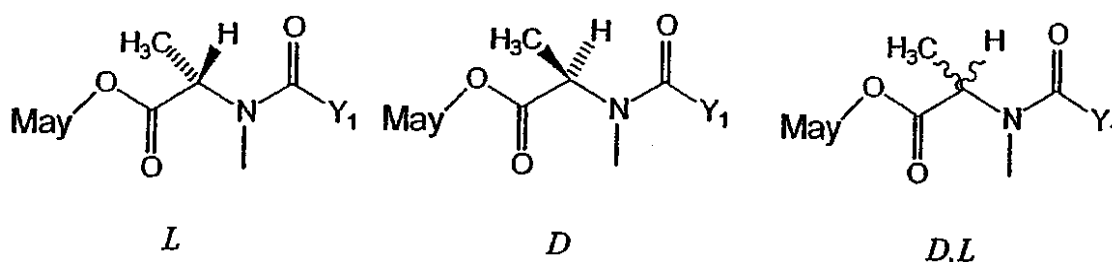
【0042】

May は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す。

[69] 本発明に有用なもう 1 つのメイタンシノイドは、式 (II-L)、(II-D)、または (II-D, L) :

【0043】

【化 4】



(II)

【0044】

により表される。式 (II) において、

Y_1 は

【0045】

【化 5】



【0046】

を表す。

R_1 から R_8 は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルまたはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖または環式のアルキルまたはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、複素環式芳香族またはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_8 は H であることができる。

【0047】

1、m、および n は各々独立して、1 から 5 の整数であり、そして加えて n は 0 であることができる。

May は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノールを表す。

【0048】

[70] もう 1 つの有用なメイタンシノイドを式 4-1' :

【0049】

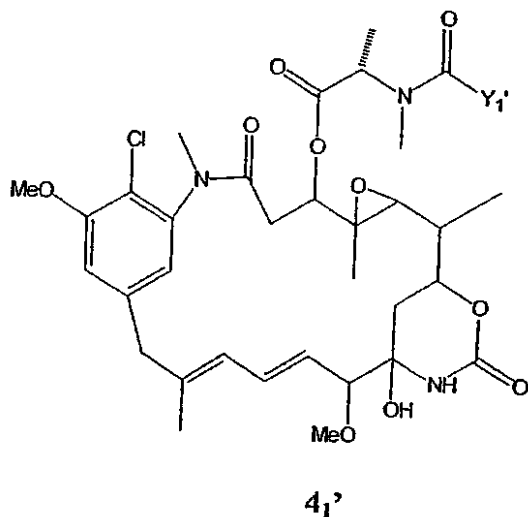
10

20

30

40

【化 6】



10

【0050】

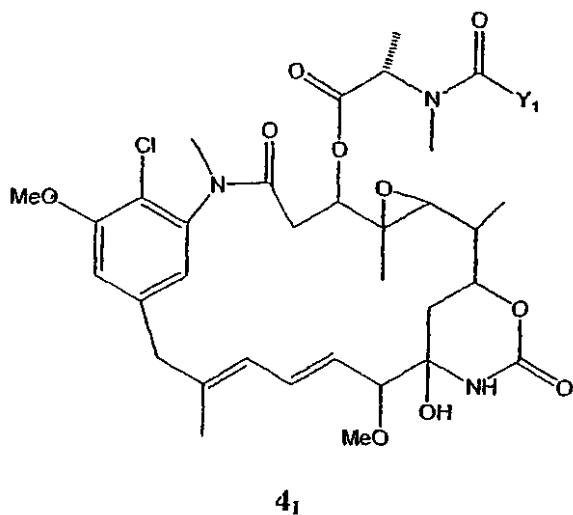
により表す。式中、置換基は上の式 (I I') について定義したとおりである。

[71]もう1つの有用なメイタンシノイドを式 4₁ :

【0051】

【化 7】

20



30

【0052】

により表す。式中、置換基は上の式 (I I) について定義したとおりである。

[72]好ましくは、式中 R₁ が H であり R₂ がメチルである、または R₁ および R₂ がメチルである、上に記載した化合物のいずれかである。

【0053】

[73]特に好ましくは、式中 R₁ が H であり、R₂ がメチルであり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；ならびに R₁ および R₂ がメチルであり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が 1 であり、そして n が 0 である、上に記載した化合物のいずれかである。

40

【0054】

[74]さらに L-アミノアシル立体異性体が好ましい。

[75]1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルまたはアルケニルの例は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、プロペニル、ブテニルおよびヘキセニルを含むがこれに限定されない。

【0055】

[76]3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖のアルキルまたはアルケニルの例は、イソブ

50

ロピル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、イソペンチル、1-エチルプロピル、イソプテニルおよびイソペンテニルを含むがこれに限定されない。

【0056】

[77] 3から10の炭素原子を有する環式のアルキルまたはアルケニルの例は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロペンテニル、およびシクロヘキセニルを含むがこれに限定されない。

【0057】

[78] シンプルなアリールは6から10の炭素原子を有するアリールを含み、置換されたアリールは、1から4の炭素原子を含有する少なくとも1つのアルキル置換基、またはアルコキシ置換基 例えばメトキシ、エトキシ、またはハロゲン置換基またはニトロ置換基を有する6から10の炭素原子を有するアリールを含む。

10

【0058】

[79] 6から10の炭素原子を含有するシンプルなアリールの例は、フェニルおよびナフチルを含むがこれに限定されない。

[80] 置換されたアリールの例はニトロフェニル、ジニトロフェニルを含むがこれに限定されない。

【0059】

[81] 複素環式芳香族ラジカルは、N、OまたはSより選択される1つまたは2つのヘテロ原子を含有する3から10員環を有する基を含む。

[82] 複素環式芳香族ラジカルの例は、ピリジル、ニトロピリジル、ピロリル、オキサゾリル、チエニル、チアゾリル、およびフリルを含むがこれに限定されない。

20

【0060】

[83] ヘテロシクロアルキルラジカルは、N、OまたはSより選択される1つまたは2つのヘテロ原子を含有する3から10員環系を包含する環式化合物を含む。

[84] ヘテロシクロアルキルラジカルの例は、ジヒドロフリル、テトラヒドロフリル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、およびモルホリノを含むがこれに限定されない。

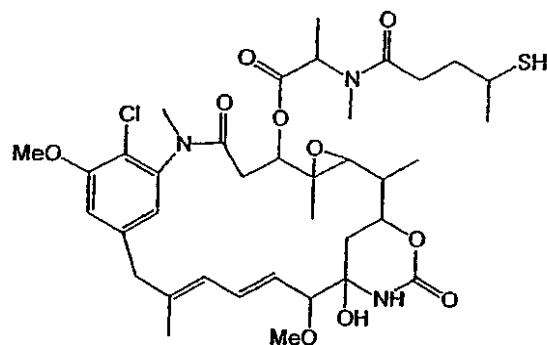
【0061】

[85] 立体障害のチオール結合を含有する側鎖を包含する特に好ましいメイタンシノイドは、以下のメイタンシノイド、すなわちN²'-デアセチル-N²'-(4-メルカプト-1-オキソペンチル)-メイタンシン(DM3と呼ぶ)およびN²'-デアセチル-N²'-(4-メチル-4-メルカプト-1-オキソペンチル)-メイタンシン(DM4と呼ぶ)である。DM3およびDM4は以下の構造式：

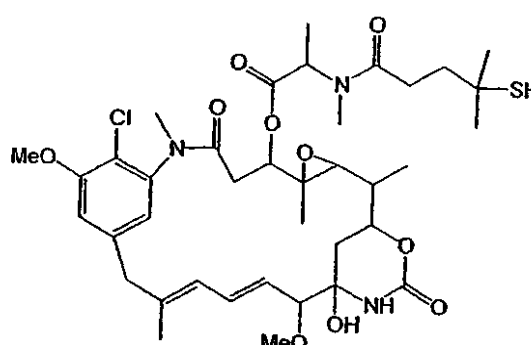
30

【0062】

【化8】



DM3



DM4

40

【0063】

により表される。

【0064】

50

(細胞結合物質)

[86]治療薬としての本発明の化合物の有効性は、適当な細胞結合物質の注意深い選択に依存する。細胞結合物質は、現在知られている、または知られるようになるあらゆる種類の物質でよく、ペプチドおよび非ペプチドを含む。一般にこれらは抗体（特にモノクローナル抗体）、リンホカイン、ホルモン、増殖因子、ビタミン、栄養素を輸送する分子（例えばトランスフェリン）、または標的に特異的に結合するあらゆるそれ以外の細胞に結合する分子もしくは物質であることができる。

【0065】

[87]使用することのできる細胞結合物質のより具体的な例は以下を含むことができる：完全なヒトの抗体を含む、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体；

10

単鎖の抗体（ポリクローナルおよびモノクローナル）；

抗体のフラグメント（ポリクローナルおよびモノクローナル）、例えばF a b、F a b'、F (a b')₂、およびF v (Parham, 131 J. Immunol. 2895-2902 (1983); Spring et al., 113 J. Immunol. 470-478 (1974); Nisonoff et al., 89 Arch. Biochem. Biophys. 230-244 (1960))；

キメラ抗体および抗原に結合するそのフラグメント；

ラクダの抗体を含む、ドメイン抗体 (d A b s) および抗原に結合するそのフラグメント (Desmyter et al., 3 Nature Struct. Biol, 752, 1996) ；

新たな抗原受容体と言われるサメの抗体 (I g N A R) (Greenberg et al., 374 Nature, 168, 1995; Stanfield et al. 305 Science 1770-1773, 2004) ；

20

インターフェロン（例えばアルファ、ベータ、ガンマ）；

リンホカイン 例例えばI L-2、I L-3、I L-4、I L-6 ；

ホルモン 例例えばインスリン、T R H（甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン）、M S H（メラノサイト刺激ホルモン）、ステロイドホルモン 例例えばアンドロゲンおよびエストロゲン；

増殖因子およびコロニー刺激因子 例例えばE G F、T G F-α、F G F、V E G F、G-C S F、M-C S FおよびG M-C S F (Burgess, 5 Immunology Today 155-158 (1984)) ；

トランスフェリン (O'Keefe et al., 260 J. Biol. Chem. 932-937 (1985)) ；およびビタミン、例えばフォレート。

30

【0066】

[88]モノクローナル抗体の技術により、特異的なモノクローナル抗体の形で極めて特異的な細胞結合物質を産生することができる。当該技術分野において特に周知なのは、対象の抗原 例例えば標的細胞そのもの、標的細胞から単離した抗原、ウイルス全体、弱毒化ウイルス全体、およびウイルスのタンパク質 例例えばウイルスのコートタンパク質を用いて、マウス、ラット、ハムスターまたはその他のあらゆる哺乳動物を免疫することにより産生されるモノクローナル抗体を作成するための技術である。感作されたヒトの細胞もまた使用することができる。モノクローナル抗体を作成するもう1つの方法は、s c F v（一本鎖可変部断片）、具体的にはヒトs c F vのファージライブラリ（例えばGriffiths et al., 米国特許第5, 885, 793号および5, 969, 108号；McCafferty et al., WO 92/01047；Liming et al., WO 99/06587を参照のこと）を使用することである。加えて、米国特許第5, 639, 641号に開示された表面再修飾した (resurfaced) 抗体もまた、ヒト化抗体として使用してよい。

40

【0067】

[89]適当な細胞結合物質の選択は、標的とすべき特定の細胞集団に依存する選択の問題であるが、一般的なヒトのモノクローナル抗体で、適当な1つが利用できれば好ましい。

[90]例えばモノクローナル抗体J 5は、共通急性リンパ芽球性白血病抗原 (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen) (C A L L A) に対して特異的であるネズミI g G 2 a抗体 (Ritz et al, 283 Nature 583-585 (1980)) であるが、標的細胞がC A L L Aを発現する場合、例えば急性リンパ芽球性白血病の疾患において使用することができる

50

。

【0068】

[91]モノクローナル抗体MY9は、CD33抗原に特異的に結合するネズミIgG₁抗体(J.D. Griffin et al 8 Leukemia Res., 521 (1984))であるが、急性骨髄性白血病(AML)の疾患におけるように標的細胞がCD33を発現する場合に使用することができる。

【0069】

[92]同様に、互換性をもってB4とも言われるモノクローナル抗体抗B4は、B細胞上のCD19抗原に結合するネズミIgG₁(Nadler et al, 131 J. Immunol. 244-250 (1983))であるが、標的細胞がB細胞、またはこの抗原を発現する罹患した細胞である場合、例えば非ホジキンリンパ腫または慢性リンパ芽球性白血病において使用することができる。

10

【0070】

[93]加えてCanAg抗原に結合するモノクローナル抗体C242(米国特許第5, 552, 293号)を使用して、CanAgを発現する腫瘍、例えば結腸直腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、および胃癌を治療することができる。huC242は、米国特許第5, 552, 293号に記載されているヒト化モノクローナル抗体C242であり、これに関してはハイブリドーマがECCAC同定番号90012601にて保管されている。ヒト化は、CDRグラフトニング法(米国特許第5, 585, 089号; 5, 693, 761号; および5, 693, 762号)、または表面再修飾する(resurfacing)方法(米国特許第5, 639, 641号)のいずれかを適用することにより調製することができる。huC242を使用してもまた、CanAgを発現する腫瘍、例えば結腸直腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、および胃癌を治療することができる。

20

【0071】

[94]さらに抗体のトラスツツマブ(trastuzumab)を使用して、乳癌ならびにHer2抗原を発現する前立腺癌および卵巣癌のようなその他の癌、を治療することができる。

[95]インスリン増殖因子受容体に結合する抗IGF-IR抗体もまた有用である。

【0072】

[96]卵巣癌および前立腺癌を、例えば各々抗MUC1抗体、例えば抗HMG-2(Taylor-Papadimitriou et al., 28. Int. J. Cancer 17-21, 1981)またはhCTMO1(56 Cancer Res. 5179-5185, 1996)、および抗PSMA(前立腺に特異的な膜抗原)、例えばJ591(Liu et al. 57 Cancer Res. 3629-3634, 1997)を用いて、それぞれうまく標的とすることができる。

30

【0073】

[97]抗体でない分子を使用してもまた特異的な細胞集団を標的とすることができる。例えば骨髄細胞に結合するGM-CSFを細胞結合物質として使用して、急性骨髄性白血病由来の罹患した細胞を標的とすることができる。加えて活性化T細胞に結合するIL-2を、移植片拒絶の予防、移植片対宿主病の治療および予防、および急性T細胞白血病の治療用を使用することができる。メラノサイトに結合するMSHは、黒色腫の治療用を使用することができる。葉酸を使用して、卵巣腫瘍およびその他の腫瘍上に発現される葉酸受容体を標的とすることができる。表皮増殖因子(EGF)を使用して、扁平上皮細胞癌、例えば肺癌ならびに頭部および頸部の癌を標的とすることができる。ソマトスタチンを使用して、神経芽腫およびその他の腫瘍のタイプを標的とすることができる。乳癌および精巣癌は、各々細胞結合物質としてエストロゲン(もしくはエストロゲン類似体)またはアンドロゲン(もしくはアンドロゲン類似体)を用いて、うまく標的とすることができる。

40

【0074】

(架橋試薬)

[98]メイタンシノイドは、反応させた時にメイタンシノイドおよび細胞結合物質の間に非開裂リンカーを形成する架橋試薬を使って、細胞結合物質に連結される。

【0075】

50

[99]本明細書において使用する場合“リンカー”は、細胞結合物質を共役結合によりメイタンシノイドに連結するあらゆる化学的部分である。一部の場合には、リンカー部分はメイタンシノイドにより提供される。例えばチオールを含有するメイタンシノイドであるDM1（図2）は、天然のメイタンシノイドであるメイタンシンの誘導体であるが、リンカー部分を提供する。メイタンシンのC-3ヒドロキシル基での側鎖は末端が $-CO-CH_3$ であり、DM1の側鎖は末端が $-CO-CH_2-CH_2-SH$ である。したがって最終的なリンカーは2つの部分、すなわち細胞結合物質に導入された架橋試薬およびDM1由来の側鎖から組み立てられる。

【0076】

[100]開裂可能なリンカーはマイルドな条件下、すなわちメイタンシノイド薬剤の活性に影響を及ぼさない条件下、で開裂することのできるリンカーである。多くの公知のリンカーがこのカテゴリーに含まれ、そしてこれらを以下に記載する。

【0077】

[101]ジスルフィドを含有するリンカーは、生理学的条件下で起こり得るジスルフィド交換を通して開裂可能なリンカーである。

[102]酸に不安定なリンカーは、酸性のpHで開裂可能なリンカーである。例えばある種の細胞内の一区画、例えばエンドソームおよびリソソームは、酸性のpH（pH4-5）を有しており、酸に不安定なリンカーを開裂するのに適する条件を提供する。

【0078】

[103]光に不安定なリンカーは、体表面でおよび光の届き得る多くの体腔において有用である。さらに赤外光は組織を透過することができる。

[104]いくつかのリンカーはペプチダーゼにより開裂することができる。ある種のペプチドのみしか細胞内部または外部で容易に開裂されない。例えばTrouet et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982)およびUmamoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989)を参照のこと。さらにペプチドは α -アミノ酸およびペプチド結合から成り、ペプチド結合は化学的には1つのアミノ酸のカルボキシレートおよび第2のアミノ酸の α -アミノ基間のアミド結合である。その他のアミド結合、例えばカルボキシレートおよびリジンの ϵ -アミノ基間の結合は、ペプチド結合ではないと理解されており、開裂可能でないと考えられている。

【0079】

[105]いくつかのリンカーはエステラーゼにより開裂することができる。やはりある種のエステルのみしか、細胞内部または外部に存在するエステラーゼにより開裂することはできない。エステルはカルボン酸およびアルコールの縮合により形成される。シンプルなエステルは、シンプルなアルコール、例えば脂肪族アルコール、ならびに小さな環式アルコールおよび小さな芳香族アルコールにより生成されるエステルである。例えば本発明では、エステルのアルコール成分であるメイタンシノールが非常に大きく複雑であるため、メイタンシンのC-3のエステルを開裂するエステラーゼを発見することはできなかった。

【0080】

[106]非開裂リンカーは、安定な共有結合の様式でメイタンシノイドを細胞結合物質に連結することができ、開裂可能なリンカーとして上に列記したカテゴリーに含まれないあらゆる化学的部分である。したがって非開裂リンカーは、酸に誘発される開裂、光に誘発される開裂、ペプチダーゼに誘発される開裂、エステラーゼに誘発される開裂、およびジスルフィド結合の開裂に対して実質的に耐性がある。

【0081】

[107]開裂に対して“実質的に耐性がある”ことは、細胞結合物質メイタンシノイド複合体母集団の少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、なおより好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも99%のリンカーの化学的結合またはリンカーに隣接する化学的結合が、酸、光感受性(photo labile)開裂物質、ペプチダーゼ、エステラーゼ、または開裂可能なリンカーの化学的結

10

20

30

40

50

合（例えばジスルフィド結合）を開裂する化学的化合物もしくは生理学的化合物によって、上に記載した物質のいずれかによる処理の数時間から数日間の範囲内で、非開裂を維持することを意味する。

【0082】

[108]さらに“非開裂”は、メイタンシノイドまたは細胞結合物質がその活性を失わない条件で、酸、光感受性開裂物質、ペプチダーゼ、エステラーゼ、またはジスルフィド結合を開裂する化学的化合物もしくは生理学的化合物により誘発される開裂に耐える、リンカーの化学的結合またはリンカーに隣接する化学的結合の能力を言う。

【0083】

[109]当業者は、開裂可能なリンカーから非開裂リンカーを容易に識別することだろう。

10

[110]リンカーが開裂に対して実質的に耐性があるかどうかを検査するための適当なコントロールの一例は、上に記載した物質のいずれかにより開裂されやすい化学的結合、例えばジスルフィド結合を含むリンカーである。リンカーが開裂に対して実質的に耐性があるかどうかは、ELISA、HPLC、またはその他の適切な手段により、数時間から数日間、典型的には4時間から5日間に及ぶ時間にわたり複合体の安定性を測定することにより、検査することができる。ELISAアッセイを使用して、血漿濃度における安定な複合体のレベルを測定することができる。

【0084】

[111]非開裂リンカーはまた、非開裂リンカーを包含する複合体のin vivoの半減期が開裂可能なリンカーを包含する複合体の値より、一般に約20%高いという特徴がある。マウスにおいて、非開裂リンカーを介して連結したIgG-メイタンシノイド複合体のin vivoの半減期は、少なくとも4日である。

20

【0085】

[112]メイタンシノイドおよび細胞結合物質の間に、非開裂リンカーを形成する適切な架橋試薬は当業界において周知であり、イオウ原子を包含する（例えばSMCC）またはイオウ原子を含まない非開裂リンカーを形成することができる。

【0086】

[113]メイタンシノイドおよび細胞結合物質の間に非開裂リンカーを形成する好ましい架橋試薬は、マレイミドまたはハロアセチルを基本とする部分を包含する。本発明に従って、そのような非開裂リンカーはマレイミドまたはハロアセチルを基本とする部分から誘導されると言う。マレイミドを基本とする部分を包含する架橋試薬は、N-スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサカルボキシレート(SMCC)、SMCCの“長鎖”類似体であるN-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキササン-1-カルボキシ-(6-アミドカプロエート)(LC-SMCC)、 κ -マレイミドウンデカン酸N-スクシンイミジルエステル(KMUA)、 γ -マレイミド酪酸N-スクシンイミジルエステル(GMBS)、 ϵ -マレイミドカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(EMCS)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、N-(α -マレイミドアセトキシ)-スクシンイミドエステル[AMAS]、スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート(SMPH)、N-スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート(SMPB)、およびN-(p-マレイミドフェニル)イソシアネート(PMPI)を含む(マレイミドを基本とする架橋試薬の代表的な構造については図15を参照のこと)。これらの架橋試薬はマレイミドを基本とする部分から誘導される非開裂リンカーを形成する。

30

40

【0087】

[114]ハロアセチルを基本とする部分を包含する架橋試薬は、N-スクシンイミジル-4-(ヨードアセチル)-アミノベンゾエート(SIAB)、N-スクシンイミジルヨードアセテート(SIA)、N-スクシンイミジルプロモアセテート(SBA)およびN-スクシンイミジル3-(プロモアセトアミド)プロピオネート(SBAP)を含む(ハロアセチルを基本とする架橋物質の代表的な構造については図16を参照のこと)。これら

50

の架橋試薬はハロアセチルを基本とする部分から誘導される非開裂リンカーを形成する。

【0088】

[115]図15および図16に記載した活性なエステルは、N-ヒドロキシスクシンイミジルおよびスルホスクシンイミジルのエステルから成るが、他の活性なエステル、例えばN-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2,4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、およびスルホニルテトラフルオロフェニルエステルもまた使用することができる。

【0089】

10

[116]特に好ましい架橋試薬は、イオウ原子を含有しない非開裂リンカーを形成する。図21は、 α 、 ω -ジカルボン酸（アルカンまたはアルケンが3-24の炭素原子を有するアルカン二酸またはアルケン二酸）から誘導される、架橋物質を用いて誘導体化したメイタンシノイド分子を示す。細胞結合物質と反応させると、架橋試薬はイオウを含まない非開裂リンカー（Sを含有しない非開裂リンカー）を形成することになる。

【0090】

[117]図21のメイタンシノイド分子は、以下のように製造する。最初にアジピン酸（ヘキサン二酸または1,6-ヘキサジカルボン酸としても知られる）のモノエステルを、ジシクロヘキシルカルボジイミドの存在下で、1当量の2-トリメチルシリルエタノールを用いて処理することにより調製する。イソブチルクロロホルメートを用いて残っているカルボン酸基を活性化し、続いてN-メチル-L-アラニンと反応させ、アシル化したN-メチル-L-アラニンを提供する。ジシクロヘキシルカルボジイミドおよび塩化亜鉛の存在下でメイタンシノールと反応させ、続いてテトラブチルアンモニウムフルオリドを用いてトリメチルシリル保護基を除去し、フリーのカルボキシ基を持つメイタンシノイドエステルを提供する。ジシクロヘキシルカルボジイミドの存在下でのスルホN-ヒドロキシスクシンイミドとの反応による、カルボキシル基のエステル化により、細胞結合物質と反応することのできるメイタンシノールの活性なエステルを提供し、イオウ原子を含有しない非開裂複合体を得る。

20

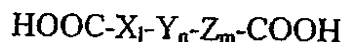
【0091】

[118]イオウ原子を含有しない非開裂リンカーはまた、上に記載した方法を用いて他のジカルボン酸を基本とする部分から誘導することもできる。他の適切なジカルボン酸を基本とする部分として、一般式(IV)の α 、 ω -ジカルボン酸：

30

【0092】

【化9】



(IV)

【0093】

を含むがこれに限定されない。

40

[119]式(IV)においてXは、2から20の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、Yは3から10の炭素原子を持つシクロアルキル基またはシクロアルケニル基であり、Zは6から10の炭素原子を持つ置換されたもしくは置換されていない芳香族の基、またはヘテロ原子がN、OもしくはSより選択される置換されたもしくは置換されていない複素環式の基であり、そして式中l、mおよびnは各々0または1であるが、ただしそれらすべてが同時に0ではない。

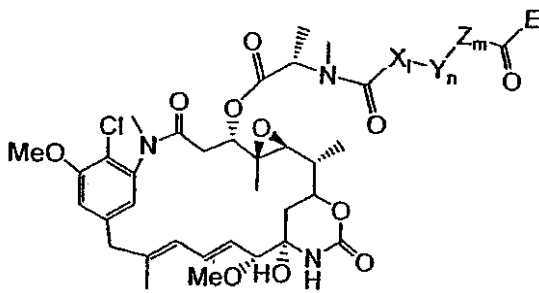
【0094】

[120]Sを含有しない非開裂リンカーを有する複合体を形成するために、細胞結合物質と直接反応させることのできる活性なエステルを含有する誘導体化したメイタンシノイドは、式5：

50

【0095】

【化10】



5

10

【0096】

により表すことができ、

式中X、Y、Z、l、mおよびnはすべて上の式（IV）について定義したとおりであり、さらに式中Eはカルボニル基と共に活性なエステル、例えばN-ヒドロキシスクシンイミジルおよびスルホスクシンイミジルのエステル、N-ヒドロキシフタルイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルト-ニトロフェニルエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、3-スルホニル-4-ニトロフェニルエステル、3-カルボキシ-4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、およびスルホニルテトラフルオロフェニルエステルを形成する。

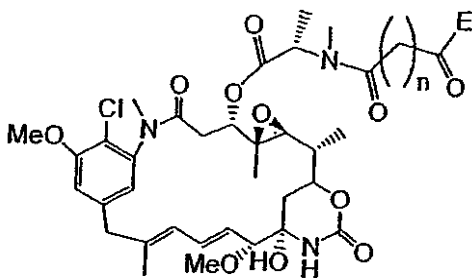
20

【0097】

[121]好ましくは式6により表される誘導体化したメイタンシノイド：

【0098】

【化11】



6

30

【0099】

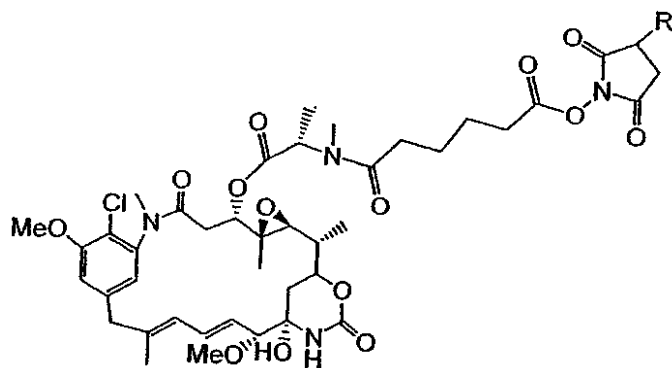
であり、式中nは3から24の整数を表し、Eは式5のメイタンシノイドについてと同様の定義を有する。

[122]より好ましい態様は、式7により表される誘導体化したメイタンシノイド：

【0100】

40

【化 1 2】



7

10

【0101】

であり、

式中RはHまたは $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ である。

[123]式5、6、および7の化合物は、新規メイタンシノイドである。

【0102】

[124] 2から20の炭素原子を有する直鎖のアルキル基、アルケニル基、またはアルキニル基の例は、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、プロペニル、ブテニルおよびヘキセニルを含むがこれに限定されない。

20

【0103】

[125] 2から20の炭素原子を有する分枝鎖のアルキル基、アルケニル基、またはアルキニル基の例は、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、イソペンチル、1-エチル-プロピル、イソブテニル、イソペンテニル、エチニル、プロピニル（プロパルギル）、1-ブチニル、2-ブチニル、および1-ヘキシニルを含むがこれに限定されない。

【0104】

[126] 3から10の炭素原子を有するシクロアルキル基またはシクロアルケニル基の例は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、およびシクロヘプタジエニルを含むがこれに限定されない。

30

【0105】

[127] 6から10の炭素原子を含有する芳香族の基の例は、フェニルおよびナフチルを含むがこれに限定されない。

[128] 置換された芳香族の基の例は、ニトロフェニルおよびジニトロフェニルを含むがこれに限定されない。

【0106】

[129] 複素環式芳香族の基は、N、OまたはSより選択される1つまたは2つのヘテロ原子を含有する、3から10員環を有する基を含むがこれに限定されない。

[130] 置換されたおよび置換されていない複素環式芳香族の基の例は、ピリジル、ニトロ-ピリジル、ピロリル、オキサゾリル、チエニル、チアゾリル、およびフリルを含むがこれに限定されない。

40

【0107】

[131] ヘテロシクロアルキルラジカルは、N、OまたはSより選択される1つまたは2つのヘテロ原子を含有する、3から10員環系を包含する環式化合物を含むがこれに限定されない。

【0108】

[132] ヘテロシクロアルキルラジカルの例は、ジヒドロフリル、テトラヒドロフリル、テトラヒドロピロリル、ピペリジニル、ピペラジニル、およびモルホリノを含むがこれに限定されない。

50

【0109】

[133]一般式 $\text{HOOC}-\text{X}_1-\text{Y}_n-\text{Z}_m-\text{COOH}$ の α 、 ω -ジカルボン酸の例は、アジピン酸、グルタル酸、ピメリン酸、ヘキセン-1, 6-二酸、ペンテン-1, 5-二酸、シクロヘキサン-二酸、およびシクロヘキセン-二酸を含むがこれに限定されない。

【0110】

(細胞毒性の複合体の合成)

[134]細胞結合物質およびメイタンシノイドの複合体は、現在公知のまたは今後開発されるあらゆる技術を用いて形成することができる。

【0111】

[135]細胞結合物質をメイタンシノイドと複合体化する方法は、一般に2段階の反応ステップを伴う。米国特許第5, 208, 020号に記載されている1つの方法において、細胞結合物質、例えば抗体を、架橋試薬を用いて修飾して、1つまたはそれより多く、通常1-10の反応基を導入することができる。次に修飾された細胞結合物質を1つまたはそれより多くのチオールを含有するメイタンシノイドと反応させて、複合体を生成する。

【0112】

[136]あるいは米国特許第6, 441, 163 B1号に開示されているように、チオールを含有するメイタンシノイドを初めに架橋試薬で修飾し、続いて修飾されたメイタンシノイドを細胞結合物質と反応させることができる。例えばチオールを含有するメイタンシノイドを、図15に記載したマレイミド化合物と、または図16に記載したハロアセチル化合物と反応させ、活性なスクシンイミジルエステルまたはスルホスクシンイミジルエステルを持つメイタンシノイドチオエーテルを得ることができる。活性化されたリンカー部分を含有するこれらのメイタンシノイドを、細胞結合物質と反応させることにより、非開裂の細胞結合物質メイタンシノイド複合体を生成するもう1つの方法を提供する。

【0113】

[137]本発明のもう1つの側面において、上に開示したように、イオウ原子を含有しないメイタンシノイドを、ジカルボン酸を基本とする架橋試薬により初めに誘導体とし、続いて細胞結合物質と反応させて、Sを含有しない非開裂リンカーを介してメイタンシノイドが細胞結合物質に連結されている複合体を形成することができる。

【0114】

[138]典型的には1抗体当たり平均して1-10のメイタンシノイドが連結される。複合体はSephadex G-25カラムを通して精製することができる。

[139]米国特許第5, 208, 020号および6, 441, 163 B1号の全開示を特に本明細書において参照として援用する。

【0115】

[140]本発明の代表的な複合体は、抗体-メイタンシノイド誘導体、抗体フラグメント-メイタンシノイド誘導体、増殖因子-メイタンシノイド複合体 例えば表皮増殖因子(EGF)-メイタンシノイド誘導体、ホルモン-メイタンシノイド複合体 例えばメラノサイト刺激ホルモン(MSH)-メイタンシノイド誘導体、甲状腺刺激ホルモン(TSH)-メイタンシノイド誘導体、エストロゲン-メイタンシノイド誘導体、エストロゲン類似体-メイタンシノイド誘導体、アンドロゲン-メイタンシノイド誘導体、アンドロゲン類似体メイタンシノイド誘導体、およびビタミン-メイタンシノイド複合体 例えば葉酸エステル(folate)メイタンシノイドである。

【0116】

[141]抗体、抗体フラグメント、タンパク質のホルモン、タンパク質の増殖因子およびその他のタンパク質のメイタンシノイド複合体も、同様の方法で作成する。例えばペプチドおよび抗体は、上述の非開裂架橋試薬で修飾することができる。文献に記載されているように、バッファー水溶液中の抗体の溶液を過剰モルの抗体を修飾する架橋試薬、例えばスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、スルホ-SMCC、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、スルホ-MBS、スクシンイミジル-ヨードアセテート、

またはN-スクシンイミジル-4-(ヨードアセチル)-アミノベンゾエート(SIAB)、SMCCの“長鎖”類似体であるN-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサノ-1-カルボキシ-(6-アミドカプロエート)(LC-SMCC)、スルホ-LC-SMCC、 κ -マレイミドウンデカン酸N-スクシンイミジルエステル(KMUA)、スルホ-KMUA、 γ -マレイミド酪酸N-スクシンイミジルエステル(GMBS)、スルホ-GMBS、 ϵ -マレイミドカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(EMCS)、スルホ-EMCS、N-(α -マレイミドアセトキシ)-スクシンイミドエステル(AMAS)、スルホ-AMAS、スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート(SMPH)、スルホ-SMPH、N-スクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート(SMPB)、スルホ-SMPH、N-(p-マレイミドフェニル)イソシアネート(PMPI)、N-スクシンイミジル-4-(ヨードアセチル)-アミノベンゾエート(SIAB)、N-スクシンイミジルヨードアセテート(SIA)、N-スクシンイミジルプロモアセテート(SBA)、およびN-スクシンイミジル-3-(プロモアセトアミド)プロピオネート(SBAP)と共にインキュベーションしてよい。Yoshitake et al., 101 Eur. J. Biochem. 395-399 (1979); Hahida et al., J. Applied Biochem. 56-63 (1984); およびLiu et al., 18 690-697 (1979); Uto et al., 138 J. Immunol. Meth. 87-94 (1991); Rich et al. 18 J. Med. Chem. 1004-1010 (1975); Kitagawa and Aikawa, 79 J. Biochem. (Tohyo) 233-236 (1976); Tanimori et al., 62 J. Immunol. Meth. 123-128 (1983); Higashida et al., 6 J. Appl. Biochem. 56-63 (1984); Thorpe et al., 140 Eur. J. Biochem. 63-71 (1984), Christy et al. 24 Nucl. Acid Res. 3031-3039 (1996), Annunziato et al., 4 Bioconjugate Chem. 212-218 (1993), Rector et al., 24 J. Immunol. Meth. 321-336 (1978)、およびInman et al. 2 Bioconjugate. Chem. 458-463 (1991)を参照のこと。

10

20

30

【0117】

[142]次に修飾された抗体を、チオールを含有するメイタンシノイド(1.25モル等量/マレイミド基またはヨードアセチル基)で処理して、複合体を生成する。混合液を一晩、約4℃でインキュベーションする。抗体-メイタンシノイド複合体を、Sephadex G-25カラムを通してのゲル濾過により精製する。1抗体分子当たり結合したメイタンシノイド分子の数は、分光光度計で252nmおよび280nmの吸光度の比率を測定することにより決定することができる。典型的には1抗体当たり平均して1-10のメイタンシノイドが連結される。

【0118】

[143]好ましい方法は、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサノ-1-カルボキシレート(SMCC)で抗体を修飾してマレイミド基を導入し、続いて修飾された抗体の、チオールを含有するメイタンシノイドとの反応により、チオエーテルで連結した複合体を得ることである。やはり1抗体分子当たり1から10の薬剤分子を伴う複合体が得られる。抗体-メイタンシノイド複合体の例を図17-20に示す。

【0119】

[144]同様に例えば、エストロゲンおよびアンドロゲンの細胞結合物質 例えばエストラジオールおよびアンドロステジオールは、適当に保護されたチオール基を含有するカルボン酸クロリド 例えば3-S-アセチルプロパノイルクロリドと反応させることにより、C-17ヒドロキシ基でエステル化することができる。エステル化のその他の方法についても、文献(Haslam, 36 Tetrahedron 2400-2433 (1980))に記載されている様に利用することができる。次に保護されたまたはフリーのチオールを含有するアンドロゲンまたはエストロゲンを、チオールを含有するメイタンシノイドと反応させて、複合体を生成することができる。複合体はシリカゲル上でのカラムクロマトグラフィーまたはHPLCにより精製することができる。

40

【0120】

[145]特定の好ましい方法は、いかなるイオウ原子も含有しない結合を結果的に得られる架橋試薬でメイタンシノールを修飾し、続いて修飾されたメイタンシノイドを抗体と反

50

応させることにより複合体を生成するものである。

【0121】

(本発明の細胞毒性複合体の治療効能)

[146]本発明の細胞結合物質メイタンシノイド複合体を、*in vitro* で多様な細胞株の増殖を抑制するそれらの能力について評価することができる。例えば、細胞株 例えばヒト結腸癌株 C O L O 2 0 5、ヒト黒色腫細胞株 A 3 7 5、ヒト骨髄性白血病細胞株 H L 6 0、ヒト乳癌株 S K B R 3、またはヒト表皮癌細胞株 K B を、これらの複合体の細胞毒性の評定のために使用することができる。評価する細胞を、24時間化合物に暴露させ、生存している細胞の分画を公知の方法による直接的なアッセイで測定することができる。(例えば、Goldmacher et al., 135 J. Immunol. 3648-3651 (1985)、およびGoldmacher et al., 102 J. Cell Biol. 1312-1319 (1986)を参照のこと。)次に I C₅₀ 値をアッセイの結果から算出することができる。

【0122】

[147]高い細胞毒性は、*in vitro*で S K B R 3 細胞を用いて薬剤への24時間暴露で測定したときに、約 10^{-8} M またはそれ未満の I C₅₀ (0.5の生存している分画が残る毒性物質の阻害濃度)を有する毒性を示すものとして定義することができる。

【0123】

[148]本発明の抗体-メイタンシノイド複合体の*in vitro*の効能および標的特異性を図4に示す。架橋試薬 S M C C を用いての h u C 2 4 2 の D M 1 との複合体は、 3.5×10^{-12} M の I C₅₀ 値を有する、抗原陽性の S K B R 3 細胞を破壊する高い効能がある。反対に抗原陰性の A 3 7 5 細胞には800分の1未満の感受性であり、本発明のメイタンシノイド複合体が高い効能および特異性があることを立証している。

【0124】

[149]h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 複合体は、クローン原性アッセイ (図6A-C) および間接的な細胞毒性アッセイ (図7) において、ジスルフィドを含有するリンカーを用いて調製した複合体と比較した場合、等しいかまたはそれより高い効能があった。S M C C を介してメイタンシノイドに複合体化した抗 H e r 2 抗体が特異的な活性を示さなかったことを立証する以前に公開されたデータ (Chari et al., 52 Cancer Res. 127-133 (1992)) に基づけば、これらの結果は予想外であった。

【0125】

[150]S M C C という非開裂リンカーを用いて調製された複合体の活性は、h u C 2 4 2 の複合体に限定されない。*in vitro*の特異的な活性はまた、抗 H e r 2 抗体のトラストツマブ; 抗 C D 3 3 抗体の M y 9 - 6 ; 抗 E G F R 抗体の K S 7 7 ; および抗 C D 5 6 抗体の N 9 0 1 の、S M C C - D M 1 複合体でも観察された (図8A-Dおよび25)。

【0126】

[151]加えて*in vitro*で特異的な活性を示す非開裂リンカーを用いた複合体は、S M C C リンカーに限定されない。非開裂リンカー S I A B を用いて合成した D M 1 の h u C 2 4 2 複合体は、*in vitro*のクローン原性アッセイにおいて効能および抗原特異的な細胞毒性を示した (図9)。さらに S I A B を用いて合成した D M 1 のトラストツマブ複合体もまた、クローン原性アッセイにおいて細胞毒性があった (図28)。さらに h u C 2 4 2 - S を含有しない非開裂リンカー- D M 1 複合体もまた、*in vitro*のクローン原性アッセイにおいて効能および抗原特異的な細胞毒性が立証された (図22)。

【0127】

[152]S M C C リンカーを用いての D M 1 との抗体の複合体は、マウスにおいて、ヒト腫瘍の異種移植片に対する抗腫瘍効能を示す (図10A-C)。S N U 1 6 胃腫瘍の異種移植片の、h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 による治療での、腫瘍の成長の顕著な阻害が観察された (図10A)。この抗腫瘍活性は、薬剤の毒性の基準であるマウスの体重に影響を及ぼさない複合体の用量で観察されている。C O L O 2 0 5 結腸癌腫瘍の異種移植片を有するマウスの、h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 複合体による治療は、腫瘍の完全な緩解をもたらし、何頭かのマウスは治療後2ヶ月にわたり検出可能な腫瘍が認められない

ままであった（図10B）。やはりこの活性も、マウスの体重に影響を示さない複合体の濃度で観察された。トラスツツマブ-SMCC-DM1複合体もまた、MCF-7乳癌細胞株を用いたマウスの腫瘍異種移植片モデルにおいて、有意な腫瘍の緩解を示した（図10C）。

【0128】

[153]非開裂リンカー-SMCCを用いて合成した抗体-メイタンシノイド複合体の血漿クリアランスは非常に遅く、抗体単独のクリアランスに匹敵する。このことは、相対的に変化しやすいジスルフィド結合を用いて調製した複合体、例えばhuC242-SPP-DM1の血漿クリアランスと明確な対比をなす。例えばSMCC複合体のクリアランスの半減期はおよそ320時間であり、一方SPP複合体の半減期は40-50時間の範囲内である（図11）。しかし各タイプの複合体に関する抗体成分のクリアランスは一致しており、測定された複合体のクリアランス速度の差異が、SPP-DM1複合体の場合、抗体複合体からのメイタンシノイドの喪失によるものであることを示唆する。したがって非開裂SMCCの結合はSPP-DM1複合体に比して、*in vivo*に存在するメイタンシノイド-リンカー開裂活性に対して、はるかに大きな耐性がある。さらにSPP-DM1複合体に比してSMCCで連結した複合体の低下したクリアランス速度は、薬物濃度曲線下面積（AUC）により測定した場合、動物のメイタンシノイドへの暴露全体においてほぼ5倍の増加をもたらすことになる。この増加された暴露が、一部の場合には薬剤の効能への実質的なインパクトを有することができるだろう。

【0129】

[154]非開裂リンカー 例えばSMCCを用いて調製したメイタンシノイド複合体は、開裂可能なジスルフィドリンカーを用いて調製した複合体と比較して、マウスにおいて予想外の増加した許容性を示す。1回の静脈内投与による急性毒性検査を、メスCD-1マウスにて行った。huC242-SMCC-DM1複合体（非開裂）の、開裂可能なジスルフィド結合を含有するリンカーを用いて調製したhuC242複合体との許容性の比較を、各複合体の一連の4段階の用量増加にわたる、マウスの死亡（図12AおよびB）および毒性の兆候（図12CおよびD）をモニターすることにより行った。SMCC-DM1複合体に関する最大耐用量（MTD）は、検査した最大用量（150mg/kg）より高かったが、ジスルフィドで連結した複合体であるSPP-DM1に関するMTDは、45-90mg/kgの範囲内であった。150mg/kgでSMCC-DM1治療群のすべてのマウスは生存していたが、SPP-DM1治療群のすべてのマウスに関しては治療後96時間までに致死毒性であることが観察された。

【0130】

[155]メイタンシノイド複合体は、微小管の重合の障害を通してそれらの細胞を破壊する活性を及ぼすと考えられている。この微小管の重合の障害は、細胞周期を主としてG2/Mで停止させることになる。抗体-メイタンシノイド複合体による細胞の抗原依存性のG2/Mでの停止は、フローサイトメトリーの分析によりモニターすることができる（図13）。huC242-SPP-DM1複合体またはhuC242-SMCC-DM1複合体によるCOLO205細胞の処理は、6-10時間までにG2/Mでの完全な停止をもたらす。しかし処理後30時間までに、ジスルフィドで連結したhuC242-SPP-DM1複合体での処理により停止された細胞の一部は、細胞周期の停止から脱して細胞分裂を再開している。驚くことに非開裂複合体で処理した細胞は、この後者のタイムポイントで細胞周期の阻止から脱していない。これら2つの複合体の活性の持続性の差異はまた、トリパンブルーを用いての色素排除アッセイにより判定した場合の、30時間のタイムポイントで死滅した細胞の比率にも反映されている。これらの結果は、非開裂SMCCリンカー複合体での処理により導入される分子レベルの事象の予想外の持続性を立証している。

【0131】

[156]開裂可能なジスルフィドリンカーを有する複合体と比較しての、非開裂リンカーを用いて調製した複合体の付加的な側面は、本明細書でバイスタンダー効果と言う、抗原

陽性細胞に近接している場合に抗原陰性細胞に対する活性、を示さないことである。すなわち非開裂リンカーを用いて調製した複合体は、最小のバースタンダー活性を有する。h u C 2 4 2 - S P P - D M 1 (開裂可能) 複合体および h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 (非開裂) 複合体の双方とも、別々に培養した場合には、抗原陽性 C O L O 2 0 5 細胞株に対して効能のある細胞破壊活性を示し、抗原陰性細胞株である Namalwa に対しては活性を有していない。しかし C O L O 2 0 5 細胞および Namalwa 細胞の共培養での、h u C 2 4 2 - S P P - D M 1 による処置は、抗原陰性 Namalwa 細胞に対してさえも複合体の劇的な細胞破壊活性を現した。反対に h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 複合体は、これらの条件下でそのようないかなるバースタンダー活性も示されていない。Namalwa 細胞に対して細胞破壊活性を示さないことが、抗原陽性 C O L O 2 0 5 細胞と共培養した場合でさえも、h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 複合体で観察されている。この in vitro アッセイで測定した際の、非開裂複合体のこの最小のバースタンダー活性が、急性毒性試験で観察された非開裂リンカーを用いた複合体の増加した許容性に寄与しているのかもしれない。

10

【0132】

[157] 上の実験の結果は、本発明の非開裂リンカーを用いたメイタンシノイド複合体が、以前に記載された細胞結合物質メイタンシノイド複合体と比較して、大幅に改善された抗腫瘍活性を保有することを立証している。

【0133】

(使用方法)

[158] 上に記載した複合体は、選択された細胞集団を標的としてメイタンシノイドを向かわせるための方法であって、当該方法は選択された細胞集団を含有すると推測される細胞集団または組織を、細胞結合物質メイタンシノイド複合体と接触させることを包含し、その場合1つまたはそれより多くのメイタンシノイドは、非開裂リンカーを介して細胞結合物質に共有結合で連結され、そして当該細胞結合物質が選択された細胞集団の細胞に結合する、前記方法において使用することができる。

20

【0134】

[159] 上に記載した複合体はまた、細胞を破壊する方法であって、当該方法は細胞を、細胞結合物質メイタンシノイド複合体と接触させることを包含し、その場合1つまたはそれより多くのメイタンシノイドは、非開裂リンカーを介して細胞結合物質に共有結合で連結され、そして当該細胞結合物質が細胞に結合する、前記方法において使用することができる。

30

【0135】

[160] 上に記載した複合体はまた、悪性腫瘍、自己免疫疾患、移植片拒絶、移植片対宿主病、ウイルス感染、微生物感染、および寄生体感染を含むがこれに限定されない病気の治療法であって、当該方法は治療を必要とする被験者に、細胞結合物質メイタンシノイド複合体の有効量を投与することを包含し、その場合1つまたはそれより多くのメイタンシノイドは、非開裂リンカーを介して細胞結合物質に共有結合で連結され、そして当該細胞結合物質が病気の罹患した細胞または感染した細胞に結合する、前記方法において使用することができる。

40

【0136】

[161] 本発明の方法に従って治療することのできる医学的な状態の例は、例えば肺、乳房、結腸、前立腺、腎臓、脾臓、卵巣、およびリンパ系器官の癌；自己免疫疾患、例えば全身性狼瘡、慢性関節リウマチ、および多発性硬化症；移植片拒絶、例えば腎移植拒絶、肝移植拒絶、肺移植拒絶、心移植拒絶、および骨髄移植拒絶；移植片対宿主病；ウイルス感染、例えばCMV感染、HIV感染、AIDS等；ならびに寄生体感染、例えばランブル鞭毛虫症、アメーバ症、住血吸虫症、および当業者により決定されるようなその他の疾患を含むあらゆるタイプの悪性疾患を含むがこれに限定されない。

【0137】

[162] 本方法は、in vitro または in vivo で行うことができる。

[163] 上に記載した複合体は、例えば自己由来骨髄細胞を同一患者への移植前に、罹患

50

した細胞もしくは悪性細胞を破壊する目的で処理する；骨髓細胞もしくはその他の組織を移植前に、T細胞およびその他のリンパ細胞を破壊し、移植片対宿主病（GVHD）を予防する目的で処理する；標的抗原を発現しない、所望のバリエーション以外のすべての細胞を破壊する目的で細胞培養物を処理する；または所望でない抗原を発現するバリエーションの細胞を破壊する目的で細胞培養物を処理する；ためのin vitroで使用方法であって、当該方法は細胞結合物質メイタンシノイド複合体の有効量で細胞を処置することを包含し、その場合1つまたはそれより多くのメイタンシノイドは、非開裂リンカーを介して細胞結合物質に共有結合で連結され、そして当該細胞結合物質が破壊すべき細胞に結合する、前記方法において使用することができる。

【0138】

[164]in vitroで臨床的および非臨床的に使用する状態は、当業者により容易に決定される。

[165]例えば処置は以下のように実行することができる。骨髓を患者または他の個体から採取した後、本発明の細胞毒性物質を約10 pMから1 nMの濃度範囲で添加した血清を含有する培地中で、約30分から約48時間の間、約37℃でインキュベーションする。インキュベーションの濃度および時間の正確な条件、すなわち用量は、当業者により容易に決定することができる。インキュベーション後、骨髓細胞を血清を含有する培地で洗浄し、公知の方法に従って静脈より患者に戻すことができる。骨髓採取時および処置した細胞の再注入時の間に、患者が他の治療、例えば破壊的化学療法（ablative chemotherapy）または全身照射のコースを受ける状況では、処置した骨髓細胞を、標準的な医学装置を用いて液体窒素中に凍結保存することができる。

【0139】

[166]臨床的なin vivoの使用のため、細胞毒性物質は、無菌性およびエンドトキシンレベルについて検査された溶液または凍結乾燥粉末として提供することができる。複合体の投与の適切なプロトコルの例は以下の通りである。複合体は、毎週の静脈内への一括投与として1週1回、4週の間与えることができる。一括投与の用量は、5から10 mlのヒト血清アルブミンを添加することのできる50から500 mlの通常の生理食塩水中にて与えることができる。投与量は、静脈内への1回の投与当たり10 mgから2000 mg（1日当たり100 ngから20 mg/kg）とする。4週の治療後、患者は1週に1回を基本として治療を継続して受けることができる。

【0140】

[167]投与経路、賦形剤、希釈剤、投与量、時間などに関する具体的なin vivoの臨床プロトコルは、臨床的状況が許す範囲で当業者により決定することができる。

[168]所望であれば、他の活性物質、例えば他の抗腫瘍薬を複合体と共に併用してもよい。

【0141】

（新規複合体、組成物および複合体の製造法）

[169]非開裂リンカーにより連結された抗体およびメイタンシノイドのいくつかの複合体は公知であるが、それ以外は新規である。したがって、非開裂リンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも1つのメイタンシノイドを有する細胞結合物質メイタンシノイド複合体を提供する、ただし細胞結合物質が抗体である場合、リンカーは以下から成る群：スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサ-1-カルボキシレート（SMCC）、スルホ-SMCC、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）、スルホ-MBS、およびスクシンイミジルーヨードアセテート、より選択される架橋物質から誘導される基を包含しない。

【0142】

[170]新規複合体は上に記載したように製造、使用することができる。

[171]組成物は、細胞結合物質メイタンシノイド複合体および担体を包含する。

[172]担体は、医薬的に受容可能な担体、希釈剤または賦形剤であってよい。

【0143】

[173]適切な医薬的に受容可能な担体、希釈剤、および賦形剤は周知であり、臨床的状況が許す範囲で当業者により決定することができる。

[174]適切な担体、希釈剤および/または賦形剤の例は以下を含む：(1) 約1 mg/ml から25 mg/ml ヒト血清アルブミンを含有するまたは含有しない、ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水、pH 約7.4、(2) 0.9% 生理食塩水(0.9% w/v NaCl)、および(3) 5% (w/v) デキストロース；そしてまた抗酸化剤 例えばトリプタミン、および安定剤 例えばTween20を含有してもよい。

【0144】

[175]これらの新規複合体について、合成法もまた提供する。

[176]細胞結合物質メイタンシノイド複合体を製造する方法の1つは、以下を包含する

10

：

- (a) 細胞結合物質を提供する、
- (b) 細胞結合物質を架橋物質で修飾する、そして
- (c) 修飾された細胞結合物質を、メイタンシノイドまたはチオールを含有するメイタンシノイドと複合体化させ、それにより細胞結合物質、およびメイタンシノイドまたはチオールを含有するメイタンシノイドの間に非開裂リンカーを提供して、複合体を生成する。

【0145】

[177]細胞結合物質メイタンシノイド複合体を製造するもう1つの方法は、以下を包含する：

20

- (a) メイタンシノイドまたはチオールを含有するメイタンシノイドを提供する、
- (b) メイタンシノイドまたはチオールを含有するメイタンシノイドを架橋物質で修飾し、それにより非開裂リンカーを形成する、そして
- (c) 修飾されたメイタンシノイドまたはチオールを含有するメイタンシノイドを、細胞結合物質と複合体化させ、それにより細胞結合物質、およびメイタンシノイドまたはチオールを含有するメイタンシノイドの間に非開裂リンカーを提供して、複合体を生成する。

【0146】

[178]細胞結合物質メイタンシノイド複合体を製造する付加的な方法は、以下を包含する：

30

- (a) メイタンシノイドを提供する、
- (b) メイタンシノイドを修飾して、活性なエステルを有する、イオウを含有しないメイタンシノールを提供する、そして

[179] (c) 修飾されたメイタンシノイドを細胞結合物質と複合体化させ、それにより細胞結合物質およびメイタンシノールの間に、Sを含有しない非開裂リンカーを提供して、複合体を生成する。これらの方法は詳細に上にそして、本明細書に引用した米国特許に記載されており、同文献を特に本明細書において参照として援用する。

【実施例】

【0147】

実施例

40

[180]本発明を今度は非限定的な実施例を参照として説明することにする。他に記述がなければ、すべてのパーセント、比率、部、等は重量による。

【0148】

[181]以下の実施例で使用するバッファーは以下の通りである：50 mM リン酸カリウム (KPi) / 50 mM 塩化ナトリウム (NaCl) / 2 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、pH 6.5 (バッファーA)；1×リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS)、pH 6.5 (バッファーB)；および0.1 M KPi バッファー / 2 mM EDTA pH 7.5 (アッセイバッファー)。

【0149】

[182]SMCC (製品番号22360、M.W. 334.33 g/モル) およびSIB

50

(製品番号 2 2 3 2 9、M. W. 4 0 2. 1 5 g / モル) を Pierce より購入した。h u C 2 4 2 抗体は、米国特許第 5, 5 5 2, 2 9 3 号に記載されているヒト化モノクローナル抗体 C 2 4 2 であるが、これに関してはハイブリドーマが E C A C C 同定番号 9 0 0 1 2 6 0 1 にて保管されている。トラスツツマブ抗体は Genentech より入手した。D M 1 (フリーのチオール の形; M. W. 7 3 7. 5 g / モル) は、米国特許第 5, 2 0 8, 0 2 0 号および 6, 3 3 3, 4 1 0 B 1 号に以前に記載されたように調製した。

【0150】

[183] クロマトグラフィーは Amersham Biosciences より購入したクロマトグラフィーカラム (Sephadex G25 NAP-25 プレパックカラム (Amersham 17-0852-02)) ; HiPrep 26/10 脱塩カラム、Sephadex G25 微細樹脂 (fine rein)、3 本連結したもの (3connected in series) (Amersham 17-5087-01)) を用いて行った。TSK-GEL G3000SWXL クロマトグラフィーカラム (TOSOH Bioscience, 0 8 5 4 1) もまた、TSK Colume Guard SWx1 (TOSOH Bioscience 08543) とともに使用した。

10

【0151】

[184] 以下の実施例に使用した溶媒は、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ジメチルアセトアミド (DMA)、エタノール (EtOH)、および DMSO 中の 1 0 0 m M エルマン試薬 (DTNB、Cayman Chemical より入手可能) であった。

【0152】

実施例 1 A

(h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 複合体の調製)

20

a. h u C 2 4 2 抗体の調製および測定

[185] 抗体の濃度は、2 8 0 n m の吸光係数 1. 4 8 (m g / m L) ⁻¹ および分子量 1 4 7, 0 0 0 g / モルを用いて測定した。

【0153】

b. S M C C ストック溶液の調製および測定

[186] S M C C の 2 0 m M 溶液 (6. 6 9 m g / m L) をジメチルスルホキシド (DMSO) 中に調製した。この溶液をアッセイバッファー中に 1 / 4 0 希釈し、サンプルの吸光度を 3 0 2 n m で測定した。ストック溶液の濃度は、吸光係数 6 0 2 M ⁻¹ c m ⁻¹ を用いて算出した。

30

【0154】

c. D M 1 ストック溶液の調製および測定

[187] D M 1 (フリーのチオール の形) の 1 0 m M 溶液をジメチルアセトアミド (DMA) 中に調製した (7. 3 7 m g / m L) (図 2)。エタノール (EtOH) 中でのストック溶液の希釈溶液の吸光度を 2 8 0 n m で測定した。ストック D M 1 の濃度を、2 8 0 n m の吸光係数 5 7 0 0 M ⁻¹ を用いて算出した。ストック D M 1 調製液中のフリーのスルフヒドリル基またはチオール基 (-SH) の濃度は、エルマン試薬 (DTNB) を用いて測定した。ストック溶液の希釈液を、3 % (v / v) DMA としたアッセイバッファー中に調製した後、DMSO 中の 1 0 0 m M D T N B (1 / 1 0 0 倍の容積) を加えた。4 1 2 n m の吸光度の増加を試薬のブランクに対して測定し、吸光係数 1 4 1 5 0 M ⁻¹ c m ⁻¹ を用いて算出した。エルマンアッセイから得られる -SH の濃度を使用して、複合状態に関する計算上の D M 1 ストック濃度を表した。

40

【0155】

d. S M C C 架橋リンカーを用いての h u C 2 4 2 の修飾

[188] 抗体を 2 つのサンプルに分けた ; 一方は 7. 5 倍モルの過剰の S M C C 架橋リンカーを用いて、他方は 8. 5 倍モルの過剰の S M C C 架橋リンカーを用いて修飾した。サンプルを 8 m g / m L の抗体濃度で反応させた。反応は DMSO (5 % v / v) を含むバッファー A (9 5 % v / v) 中で、2 時間室温で攪拌しながら行った。

【0156】

e. 過剰の S M C C を除去するための G 2 5 クロマトグラフィー

[189] h u C 2 4 2 - S M C C 反応混合液を、バッファー A 中に平衡化した Sephadex G2

50

5 樹脂の 1. 5 × 4. 9 c m プレパックカラムを通してゲル濾過した。カラムにかける容量および溶出容量は、製品の説明書に従った。修飾された抗体の溶出液をアッセイして、上に記載した吸光係数を用いて抗体の濃度を決定した。修飾された抗体の収率は、7. 5 倍モルの過剰の S M C C の反応では 7 4. 6 %、そして 8. 5 倍モルの過剰の S M C C の反応では 8 1. 6 %であった。

【0157】

f. h u C 2 4 2 - S M C C の D M 1 との複合体化

[190]修飾された抗体サンプルを、リンカーに対して 1. 7 倍の過剰の D M 1 と反応させた（1 抗体当たり 5 リンカーと仮定する）。反応は、D M A （3 % v / v）を含むバッファー A （9 7 % v / v）中の 2. 5 m g / m L の抗体濃度で行った。D M 1 の添加後、反応液を室温で約 2 0 時間攪拌しながらインキュベーションした。

【0158】

g. G 2 5 クロマトグラフィーによる複合体の精製

[191]複合反応混合液を、バッファー B 中に平衡化した Sephadex G25 樹脂の 1. 5 × 4. 9 c m プレパックカラムを通してゲル濾過した。カラムにかける容量および溶出容量は、製品の説明書に従った。h u C 2 4 2 1 モル当たり連結した D M 1 分子の数を、溶出された材料の吸光度を 2 5 2 n m および 2 8 0 n m の双方で測定することにより決定した。7. 5 倍モルの過剰の S M C C サンプルの D M 1 / 抗体の比率は 3. 5 4 であることが見出され、8. 5 倍モルの過剰の S M C C サンプルの比率は 3. 6 5 であることが見出された。複合体化ステップの収率は、各々 8 3. 7 % および 7 5. 4 % であった。双方の複合体を合わせてプールし、滅菌濾過し、薬剤および抗体の濃度について再度アッセイした。プールしたサンプルは、L o t # 1 7 1 3 - 1 4 6 C と指定し、結合、細胞毒性、特異性、凝集の程度 (extent) およびフリーの薬剤の含有量について分析した。

【0159】

【表 1】

表 I. h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 の特徴

参照番号	最終的なタンパク質濃度 (m g / m l)	最終的な D M 1 濃度 (μ g / m l)	D M 1 / 抗体
1713-146C	1.77	26.96	3.05

【0160】

実施例 1 B

(h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 の in vitro の検査)

a. 結合

[192] h u C 2 4 2 抗体および h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 の結合のアフィニティを C O L O 2 0 5 細胞における間接的な方法を用いて比較した。結果を図 3 に示す。裸の抗体は K D 5. 1 × 1 0 ⁻¹⁰ M で結合し、複合体化したバージョンは K D 5. 5 2 × 1 0 ⁻¹⁰ M で結合した。したがって D M 1 との複合が、h u C 2 4 2 の結合アフィニティを変化させることはないようである。

【0161】

b. 細胞毒性および特異性

[193] h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 複合体の in vitro の細胞毒性および特異性を、継続的暴露でのクローン原性アッセイを用いて評価した。結果を図 4 に示す。h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 は、抗原陽性の S K B R 3 細胞を破壊する上で有効であった (I C ₅₀ = 3. 5 × 1 0 ⁻¹² M)。特異性は、標的の S K B R 3 細胞の I C ₅₀ 値を、抗原陰性細胞株である A 3 7 5 の値 (A 3 7 5 において複合体の I C ₅₀ 値は 3. 0 × 1 0 ⁻⁹ M より高かった) と比較することにより示した。

【0162】

c. サイズ排除カラムクロマトグラフィーの分析

[194]複合体をTSK300サイズ排除カラムを用いて分析し、96.0%がモノマーであることを見出した(図5)。

【0163】

d. フリーの薬剤

[195]フリーの薬剤の比率をELISAにより測定し、4.4%であることを見出した。

【0164】

実施例2A(トラスツマブ-SMCC-DM1複合体の調製)

[196]トラスツマブ抗体は、非開裂のヘテロの2官能基の架橋試薬SMCCを用いてDM1と複合体化させるため、Genentechより入手した。この抗体は、50mMリン酸カリウム/2mMEDTA, pH6.0から、50mMリン酸カリウム/50mM塩化ナトリウム/2mMEDTA, pH6.5(バッファーA)にバッファーを交換した。次に抗体を7.5倍モルの過剰のSMCCリンカーと反応させ、Sephadex G25樹脂により精製し、DM1と複合体化させた。最終的な複合体をSephadex G25樹脂により再度精製した。得られる複合体は、抗体1モル当たり3.1モルのDM1を含有していた。

【0165】

a. トラスツマブ抗体の調製および測定

[197]50mMリン酸カリウム/2mMEDTA, pH6.0バッファー中のトラスツマブ抗体を、バッファーAで平衡化したSephadex G25カラムに通し、バッファーA中に溶出した。この実施例で使用するすべてのバッファーは、色素生産性リムルス変形細胞溶解物(LAL)試験法(Camgrex)を用いて、エンドトキシンを含まないことを検査した。抗体の濃度は、280nmの吸光係数 $1.45\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ および分子量145.423gを用いて測定した。

【0166】

b. SMCCストック溶液の調製および測定

[198]SMCC20mM溶液(6.69mg/mL)をDMSO中に調製した。この溶液をアッセイバッファー中で1/40に希釈し、サンプルの吸光度を302nmで測定した。ストック溶液の濃度は、モル吸光係数 $602\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ を用いて算出した。

【0167】

c. DM1ストック溶液の調製および測定

[199]DM1(フリーのチオール)の10mM溶液をDMA中に調製した(7.37mg/mL)(図2)。EtOH中でのストック溶液の希釈液の吸光度を280nmで測定した。ストックDM1の濃度を、280nmのモル吸光係数 $5700\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ を用いて算出した。ストックDM1調製液中のフリーの-SHの濃度を、エルマン試薬(DTNB)を用いて測定した。ストック溶液の希釈液は、3%(v/v)DMAとしたアッセイバッファー中に調製した後、DMSO中の100mM DTNB(1/100倍の容積)を加えた。412nmの吸光度の増加を試薬のブランクに対して測定し、吸光係数 $14150\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ を用いて濃度を算出した。エルマンアッセイから得られる-SHの濃度を使用して、複合状態に関する計算上のDM1ストック濃度を表した。

【0168】

d. SMCC架橋リンカーを用いてのトラスツマブの修飾

[200]抗体を、20mg/mLの抗体濃度で7.5倍モルの過剰のSMCCを用いて修飾した。反応はDMSO(5%v/v)を含むバッファーA(95%v/v)中で、2時間室温で攪拌しながら行った。

【0169】

e. 過剰のSMCCを除去するためのG25クロマトグラフィー

[201]トラスツマブ-SMCCの反応混合液を、バッファーA中に平衡化したSephade

10

20

30

40

50

x G25 樹脂の 1.5 × 4.9 cm プレパックカラムを通してゲル濾過した。カラムにかける容量および溶出容量は、製品の説明書 (Amersham Biosciences) に従った。修飾された抗体溶液の濃度を、分光光度計の測定により上に記載した吸光係数を用いてアッセイした。修飾された抗体の収率は、タンパク質濃度に基づき 88 % であった。

【0170】

f. トラスツツマブ-SMCCのDM1との複合体化

[202] 修飾された抗体は、リンカーに対して 1.7 倍の過剰の DM1 と反応させた (1 抗体当たり 5 リンカーと仮定する)。反応は、DMA (6 % v/v) を含むバッファー A (94 % v/v) 中の 10 mg/mL の抗体濃度で行った。DM1 の添加後、反応液を室温で約 16.5 時間攪拌しながらインキュベーションした。

10

【0171】

g. G25カラムクロマトグラフィーによる複合体の精製

[203] 複合反応混合液を、バッファー B 中に平衡化した Sephadex G25 樹脂の 1.5 × 4.9 cm プレパックカラムを通してゲル濾過した。カラムにかける容量および溶出容量は、製品の説明書 (Amersham Biosciences) に従った。トラスツツマブ 1 モル当りに連結した DM1 分子の数を、溶出された材料の 252 nm および 280 nm の双方での吸光度測定することにより決定した。DM1 / 抗体の比率は 3.13 であることが見出され、複合ステップの収率は、95.7 % であった。複合体化したトラスツツマブの全体の収率は出発時の抗体に基づき 84 % であった。得られる複合体を、結合、細胞毒性、特異性、凝集の程度およびフリーの薬剤の含有量について分析した。

20

【0172】

【表 2】

表 II. トラスツツマブ-SMCC-DM1 の特徴

参照番号	最終的なタンパク質濃度 (mg/mL)	最終的な DM1 濃度 (μg/mL)	DM1 / 抗体
1762-14	6.71	106.	3.13

30

【0173】

実施例 2 B

(トラスツツマブ-SMCC-DM1 の in vitro の検査)

[204] 結合の試験は、DM1 への抗体の複合が見かけの K_D に影響を与えないことを示した；裸のトラスツツマブ抗体およびトラスツツマブ-SMCC-DM1 複合体の双方とも ECD プレートへの同じ結合アフィニティー (5.5×10^{-11} M) を有していた。サンプルの in vitro の細胞毒性の評価は、トラスツツマブ-SMCC-DM1 複合体が、毒性 (抗原陽性細胞株において $IC_{50} = 3.6 \times 10^{-12}$ M) および特異性 (抗原陰性細胞株において IC_{50} は 3.0×10^{-9} M より高い) の双方とも高いことを示した。

40

【0174】

a. 結合

[205] トラスツツマブ抗体およびトラスツツマブ-SMCC-DM1 の結合アフィニティーを、Genentech により提供された HER2 ECD プレート結合アッセイを用いて比較した。結果を図 24 に示す。裸の抗体および複合体化したバージョンの双方とも、 5.5×10^{-11} M の見かけの K_D で結合する。したがって DM1 との複合体化は、トラスツツマブの結合アフィニティーを変化させない。

【0175】

b. 細胞毒性および特異性

50

[206]トラスツツマブ-S M C C-D M 1 複合体のin vitroの細胞毒性および特異性を、継続的暴露でのクローン原性アッセイを用いて評価した。結果を図25に示す。トラスツツマブ-S M C C-D M 1 は、抗原陽性のS K B R 3 細胞を破壊する上で有効であった ($IC_{50} = 3.6 \times 10^{-12} M$)。特異性は、標的のS K B R 3 細胞の IC_{50} 値を、抗原陰性細胞株であるA 3 7 5 の値 (この複合体において IC_{50} 値は $3.0 \times 10^{-9} M$ より高かった) と比較することで示された。

【0176】

c. サイズ排除カラムクロマトグラフィーの分析

[207]複合体をT S K サイズ排除カラムを用いて分析し、95.3%がモノマーであることを見出した (図26)。

【0177】

d. フリーの薬剤の分析

[208]フリーの薬剤の比率をE L I S A により測定し、3.4%であることを見出した。

【0178】

e. エンドトキシンレベル

[209]複合体をクロマトグラフィーによるL A L 検査を用いて検査し、0.03 E U / m g を含有することを見出した。

【0179】

実施例3A

(トラスツツマブ-S I A B-D M 1 複合体の調製)

[210]トラスツツマブ抗体は、非開裂のヘテロの2官能基の架橋リンカーであるS I A Bを用いてD M 1 と複合体化させるため、Genentechより入手した。この抗体を、7.0倍モルの過剰のS I A Bリンカーとp H 6.5で反応させ、Sephadex G25 樹脂により精製した。抗体を含有する分画をプールし、D M 1 と一晩、p H 6.5の標準的な複合条件で室温で、ただし暗所で反応させた。反応容器からアリコートを取り出し、D M 1 の組み込みを決定するため分析した。N A P 5 濾過後にアリコートを測定したところ、わずか1.4 薬剤/抗体しか有していなかった。さらなる8倍の過剰のS I A Bを反応液に加えて2時間の後、p H を8に上げ、直ちにさらなる1.5倍の過剰なD M 1 / S I A Bを添加した。反応液を放置して反応を進行させ、Sephadex G25F 樹脂を用いて精製した。得られる複合体は、抗体1モル当たり3.42モルのD M 1 を含有していた。

【0180】

a. トラスツツマブ抗体の測定

[211]抗体の濃度は、280 n m の吸光係数 $1.45 m L m g^{-1} c m^{-1}$ 、および分子量145.423 gを用いて測定した。

【0181】

b. S M C C ストック溶液の調製および測定

[212]S I A B 18 m M 溶液をD M S O 中に調製した (7.2 m g / m L)。p H 4 バッファー中に希釈したこの溶液の波長スキャンを情報目的用にのみ記録した。

【0182】

c. D M 1 ストック溶液の調製および測定

[213]D M 1 (フリーのチオール) の約30 m M 溶液をD M A 中に調製した。ストックD M 1 調製液中のフリーの-S H の濃度を、エルマン試薬 (D T N B) を用いて測定した。ストック溶液の希釈液は、3% (v / v) D M A としたアッセイバッファー中に調製した後、D M S O 中の100 m M D T N B (1 / 100 倍の容積) を加えた。412 n m の吸光度の増加を試薬のブランクに対して測定し、モル吸光係数 $14150 M^{-1} c m^{-1}$ を用いて濃度を算出した。エルマンアッセイから得られる-S H の濃度を使用して、複合状態に関する計算上のD M 1 ストック濃度を表した。

【0183】

d. S I A B 架橋リンカーを用いてのトラスツツマブの修飾

[214]抗体を、20 mg/mLの抗体濃度で7.0倍モルの過剰のS I A Bを用いて修飾した。反応はDMSO（5% v/v）を含むバッファーA（95% v/v）中で、2時間室温で暗所で攪拌しながら行った。

【0184】

e. 過剰のS I A Bを除去するためのG 2 5クロマトグラフィー

[215]トラスツツマブーS I A B反応混合液を、バッファーA中に平衡化したHiPrep 26/10 脱塩カラムを通してゲル濾過した。280 nmにS I A B試薬からの干渉があるので、修飾された抗体の収率を100%であると仮定し、複合反応におけるDM 1の量の決定に関しては5リンカー/抗体の修飾と仮定した。

【0185】

f. トラスツツマブーS I A BのDM 1との複合体化

[216]修飾された抗体を、上記のように100%収率および5架橋リンカー/抗体と仮定するリンカーに対して1.7倍の過剰のDM 1と反応させた。反応における抗体の濃度を12.5 mg/mLであると推定し、反応を、DMA（3% v/v）を含むバッファーA（97% v/v）中で行った。DM 1を添加後、反応液を室温、暗所で、約16.5時間攪拌しながらインキュベーションした。

【0186】

g. 複合反応の分析

[217]反応混合液の0.25 mLアリコートを取り出し、バッファーB中に平衡化したG 25 Sephadexのプレバックカラムでゲル濾過した。トラスツツマブ 1モル当たりに関連したDM 1分子の数は、溶出された材料の252 nmおよび280 nmの双方の吸光度を測定することにより決定した。DM 1/抗体の比率はわずか1.4であった。

【0187】

h. 付加的な修飾/複合反応

[218]さらなる8倍モルの過剰のS I A Bを加え、2時間室温で放置してインキュベーションした。S I A Bに対して1.5倍モルの過剰のDM 1を加え、1N NaOHを加えて反応液のpHを8に上げた。反応液を室温、暗所でインキュベーションし、バッファーB中に平衡化したG 25 F樹脂カラムでゲル濾過した。

【0188】

i. 複合体のプールおよび特徴づけ

[219]タンパク質を含有する分画をプールし、濾過し、252および280 nmの吸光度により測定した。複合体のサンプルを、エンドトキシンレベル、結合、特異的および非特異的な細胞毒性、モノマーの%、およびフリーの薬剤のレベルについて検査した。

【0189】

【表3】

表 III.トラスツツマブーS I A BーDM 1の特徴

参照番号	最終的なタンパク質濃度 (mg/mL)	最終的なDM 1濃度 (μg/mL)	DM 1/抗体
1806-32	5.62	97.3	3.42

【0190】

実施例 3 B

(トラスツツマブーS I A BーDM 1のin vitroの検査)

[220]結合の試験は、DM 1への抗体の複合が見かけの K_D に影響を与えないことを示した；裸のトラスツツマブ抗体およびトラスツツマブーSMCCーDM 1複合体の双方とも類似する結合アフィニティー（見かけの K_D 抗体 1.2×10^{-10} M、および複合体 1.9×10^{-10} M）を有していた。サンプルのin vitroの細胞毒性の評価は、

トラスツツマブーS I A BーDM1複合体が、毒性（抗原陽性細胞株のSKBR3において $IC_{50} = 5 \times 10^{-12} M$ ）および特異性（抗原陰性細胞株のA375において IC_{50} は $3.0 \times 10^{-9} M$ より高い）の双方とも高いことを示した。

【0191】

a. 結合

[221]トラスツツマブ抗体およびトラスツツマブーS I A BーDM1の結合のアフィニティを、Genentechにより提供されたHER2 ECDプレート結合アッセイを用いて比較した。結果を図27に示す。裸のトラスツツマブおよびトラスツツマブーS I A BーDM1は、類似する結合アフィニティ（見かけの K_D 抗体は $1.2 \times 10^{-10} M$ 、および複合体は $1.9 \times 10^{-10} M$ ）を有していた。

10

【0192】

b. 細胞毒性および特異性

[222]サンプルのin vitroの細胞毒性の評価は、トラスツツマブーS I A BーDM1複合体が、毒性（抗原陽性細胞株のSKBR3において $IC_{50} = 5 \times 10^{-12} M$ ）および特異性（抗原陰性細胞株のA375において IC_{50} は $3.0 \times 10^{-9} M$ より高い）の双方とも高いことを示した。図28を参照のこと。

【0193】

c. サイズ排除カラムクロマトグラフィーの分析

[223]複合体をTSKサイズ排除カラムを用いて分析し、96.4%がモノマーであることを見出した（図29）。

20

【0194】

d. フリーの薬剤

[224]フリーの薬剤の比率をELISAにより測定し、0.35%であることを見出した。

【0195】

e. エンドトキシンレベル

[225]複合体をクロマトグラフィーによるLAL検査を用いて検査し、 $< 0.04 EU/mg$ を含有することを見出した。

【0196】

実施例4

30

（Sを含有しない非開裂リンカーを形成する架橋試薬によるhuC242の複合体化）

a. 合成

[226]架橋試薬（構造に関しては図21を参照のこと）のストック溶液をDMA中に作成し、不溶性沈殿物を遠心して除き、残っている溶液の濃度を、280nmの波長でのDM1の吸光である吸光係数 $\epsilon^{280} = 5700 M^{-1} cm^{-1}$ を用いて決定した。この材料に関する真の吸光係数は測定されていないため、この値は濃度の推定値に過ぎない。DM1に関する $\epsilon^{252} / \epsilon^{280}$ 比が4.7（EtOH中）であるのに対して、この架橋試薬溶液（pH7.5バッファー中）に関する $\epsilon^{252} / \epsilon^{280}$ は1.42と測定され、異なる吸光または不純物のいずれかであることを示唆するたことに注目しなければならない。

40

【0197】

[227]複合体化反応は、バッファーE、pH7.5（バッファーE = 50mM リン酸ナトリウム、150mM NaCl、10mM EDTA）中の16% DMAにおける2.8mg/mlのhuC242抗体を用いて、2mgのスケールで行った。ストック溶液の推定される架橋試薬濃度に基づいて、30等量の架橋リンカー/抗体を使用した（10等量の架橋リンカー/抗体を使用した初期の実験では、わずか0.9 DM1/抗体のみを含む複合体しか生成できなかった）。反応液を放置して3時間反応を進行させた後、複合体をNap 10（G25）カラムに通すことにより精製した。濾過（Millex GV フィルター、0.2umポアサイズ）後、複合体は2.56 DM1/抗体を有していた（Lot # 1749-119A、抗体回収率 = 78%）。複合体のアリコートはHPLC（

50

HiPrep カラム) によりフリーの DM1 について調べ、かなり大きな DM1 のピークが 12.09' に観察された。そのためサンプルをバッファー B 中に透析してこのピークを除去した後、再度アッセイした。最終的な複合体サンプル (Lot # 1749-124A) は HPLC により、フリーの DM1 を含んでおらず、1.84 DM1/抗体を有していた。SEC HPLC をこの複合体について行い、97% がモノマーの抗体であることを示した。

【0198】

b. 細胞毒性および結合

[228] 本発明では、huC242-S を含有しない非開裂リンカー-DM1 複合体における細胞毒性および結合の試験を行った。この複合体は、フリーの抗体より約 2 倍高い見かけの解離定数 (図 23 を参照のこと)、および huC242-SMCC-DM1 に匹敵する in vitro の細胞毒性 (S を含有しない非開裂リンカーの複合体の $IC_{50} = 7.0 \times 10^{-12} M$) (図 22 を参照のこと) を有していた。

【0199】

[229] 本発明を、詳細にそしてその具体的な態様を参照として記載してきたが、多様な変更および修飾を、本発明の精神および領域から離れずにそれらにおいて行うことができることは、当業者には明らかであろう。

【0200】

[230] 本明細書に引用したすべての特許、公開、およびその他の参考文献を、特にそれらの全内容において参照として援用する。

【図面の簡単な説明】

【0201】

【図 1】 図 1 は、SMCC の構造を示す。

【図 2】 図 2 は、DM1 の構造を示す。

【図 3】 図 3 は、huC242 抗体を、抗体-メイタンシノイド複合体である huC242-SMCC-DM1 と比較する、FACS 結合アッセイの結果をグラフで示す。

【図 4】 図 4 は、huC242-SMCC-DM1 の細胞毒性をグラフで示す。

【図 5】 図 5 は、huC242-SMCC-DM1 のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図 6A】 図 6A-C および図 7 は、huC242-SMCC-DM1 の細胞毒性を、ジスルフィドを含有するリンカーを用いて調製した複合体と比較して、グラフで示す。

【図 6B】 図 6A-C および図 7 は、huC242-SMCC-DM1 の細胞毒性を、ジスルフィドを含有するリンカーを用いて調製した複合体と比較して、グラフで示す。

【図 6C】 図 6A-C および図 7 は、huC242-SMCC-DM1 の細胞毒性を、ジスルフィドを含有するリンカーを用いて調製した複合体と比較して、グラフで示す。

【図 7】 図 6A-C および図 7 は、huC242-SMCC-DM1 の細胞毒性を、ジスルフィドを含有するリンカーを用いて調製した複合体と比較して、グラフで示す。

【図 8A】 図 8A-D は、様々な細胞結合物質に連結した SMCC-DM1 複合体の細胞毒性をグラフで示す。

【図 8B】 図 8A-D は、様々な細胞結合物質に連結した SMCC-DM1 複合体の細胞毒性をグラフで示す。

【図 8C】 図 8A-D は、様々な細胞結合物質に連結した SMCC-DM1 複合体の細胞毒性をグラフで示す。

【図 8D】 図 8A-D は、様々な細胞結合物質に連結した SMCC-DM1 複合体の細胞毒性をグラフで示す。

【図 9】 図 9 は、抗体-メイタンシノイド複合体である huC242-SIAB-DM1 の細胞毒性をグラフで示す。

【図 10A】 図 10A は、SCID マウスにおける COLO205 ヒト結腸癌の異種移植片に対する huC242-SMCC-DM1 の抗腫瘍活性をグラフで示す。

【図 10B】 図 10B は、SCID マウスにおける SNU16 ヒト胃腫瘍の異種移植片に

10

20

30

40

50

対する h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 の抗腫瘍活性をグラフで示す。

【図 1 0 C】図 1 0 C は、S C I D マウスにおけるヒト M C F 7 腫瘍の異種移植片に対するトラスツマブ - S M C C - D M 1 の抗腫瘍活性をグラフで示す。

【図 1 1】図 1 1 は、h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 の血漿クリアランス速度を、ジスルフィドを含有するリンカーを用いて調製した複合体と比較して、グラフで示す。

【図 1 2 A】図 1 2 A - D は、h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 の急性毒性試験を、ジスルフィドを含有するリンカーを用いて調製した複合体と比較して、グラフで示す。

【図 1 2 B】図 1 2 A - D は、h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 の急性毒性試験を、ジスルフィドを含有するリンカーを用いて調製した複合体と比較して、グラフで示す。

【図 1 2 C】図 1 2 A - D は、h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 の急性毒性試験を、ジスルフィドを含有するリンカーを用いて調製した複合体と比較して、グラフで示す。

【図 1 2 D】図 1 2 A - D は、h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 の急性毒性試験を、ジスルフィドを含有するリンカーを用いて調製した複合体と比較して、グラフで示す。

【図 1 3】図 1 3 は、h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 により立証された細胞周期停止の持続性および細胞破壊活性を、ジスルフィドを含有するリンカーを用いて調製した複合体と比較して示す。

【図 1 4 A】図 1 4 A - D は、h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 の最小のバイスタンダー効果の活性を、ジスルフィドを含有するリンカーを用いて調製した複合体と比較して示す。

【図 1 4 B】図 1 4 A - D は、h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 の最小のバイスタンダー効果の活性を、ジスルフィドを含有するリンカーを用いて調製した複合体と比較して示す。

【図 1 4 C】図 1 4 A - D は、h u C 2 4 2 - S M C C - D M 1 の最小のバイスタンダー効果の活性を、ジスルフィドを含有するリンカーを用いて調製した複合体と比較して示す。

【図 1 5】図 1 5 は、マレイミドを基本とする架橋物質の代表的な構造を示す。

【図 1 6】図 1 6 は、ハロアセチルを基本とする架橋物質の代表的な構造を示す。

【図 1 7】図 1 7 は、抗体 - S M C C - D M 1 複合体の構造を示す。

【図 1 8】図 1 8 は、抗体 - S I A B - D M 1 複合体の構造を示す。

【図 1 9】図 1 9 は、抗体 - S M C C - D M 4 複合体の構造を示す。

【図 2 0】図 2 0 は、抗体 - S I A B - D M 4 複合体の構造を示す。
【図 2 1】図 2 1 は、S を含有しない非開裂リンカーを介して連結したメイタンシノイド細胞結合物質複合体の合成を示す。

【図 2 2】図 2 2 は、h u C 2 4 2 - S を含有しない非開裂リンカー - D M 1 の細胞毒性を、グラフで示す。

【図 2 3】図 2 3 は、h u C 2 4 2 - S を含有しない非開裂リンカー - D M 1 の F A C S 結合アッセイを、グラフで示す。

【図 2 4】図 2 4 は、トラスツマブ抗体を、抗体 - メイタンシノイド複合体であるトラスツマブ - S M C C - D M 1 と比較する、H E R 2 E C D プレート結合アッセイの結果をグラフで示す。

【図 2 5】図 2 5 は、トラスツマブ - S M C C - D M 1 の細胞毒性および特異性をグラフで示す。

【図 2 6】図 2 6 は、トラスツマブ - S M C C - D M 1 のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図 2 7】図 2 7 は、トラスツマブ抗体を、抗体 - メイタンシノイド複合体であるトラスツマブ - S I A B - D M 1 と比較する、H E R 2 E C D プレート結合アッセイの結果をグラフで示す。

【図 2 8】図 2 8 は、トラスツマブ - S I A B - D M 1 の細胞毒性および特異性をグラフで示す。

【図 2 9】図 2 9 は、トラスツマブ - S I A B - D M 1 のサイズ排除クロマトグラフィー

10

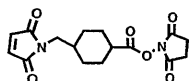
20

30

40

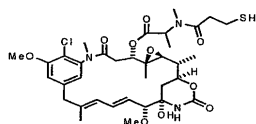
50

SMCC (スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)
シクロヘキサン-1-カルボキシレート)



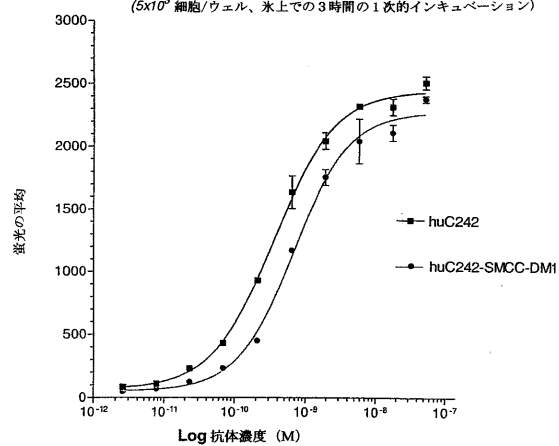
【图 2】

DM1 (チオール基を導入したメイタンシノイド)



【图 3】

h u C 2 4 2 抗体および h u C 2 4 2 複合体の
C O L O 2 0 5 細胞への F A C S 結合アッセイ
(5×10^3 細胞/ウェル、氷上での 3 時間の 1 次的インキュベーション)

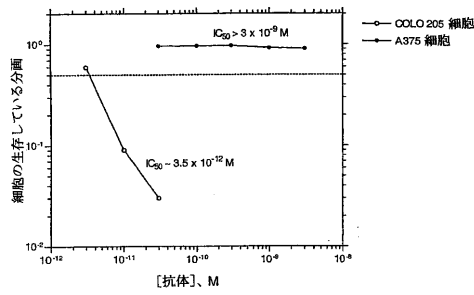


huC242 抗体 $EC_{50} = 5.1 \times 10^{-10} M$

huC242-SMCC-DM1 $EC_{50} = 5.52 \times 10^{-10} M$

【図 4】

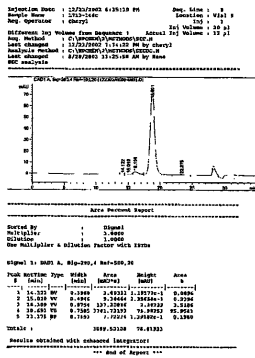
huC242-SMCC-DM1, 1713-146Cの効能の評価
継続的暴露のクローン原性アッセイにおいて



【図 5】

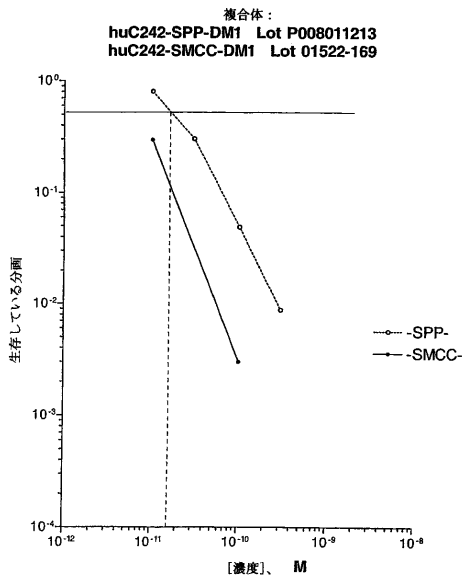
huC242-SMCC-DM1のサイズ排除クロマトグラフィー

複合体サンプルをTSK-GELサイズ排除カラムにかけた。ピーク4は複合体のモノマーの分画を表し、それより早いピークはマルチマーを表し、それ以降のピークはフラグメントを表す。各曲線下面積を総ピーク面積で割った値が、サンプルに対してピークの占める部分を表す；したがってピーク4＝モノマー＝サンプル全体の比率の95.95%。



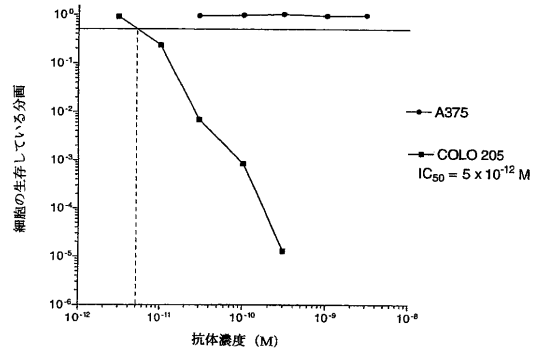
【図 6 B】

細胞毒性：クローン原性アッセイにおける
COLO205細胞へのhuC242複合体の24時間暴露



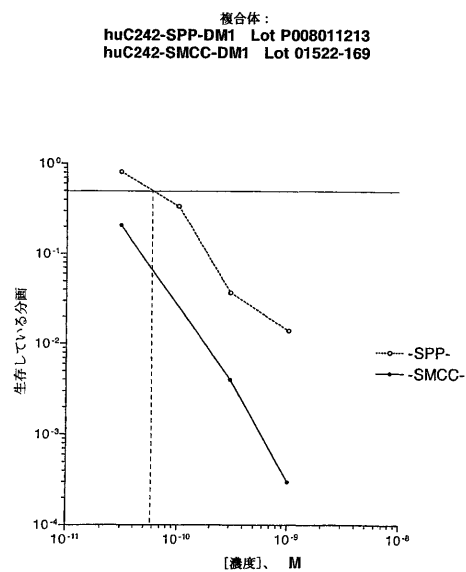
【図 6 A】

huC242-SMCC-DM1 (1710-13-C) 対
COLO205 (+)およびA375 (-)の細胞毒性
(継続的暴露のクローン原性アッセイ)



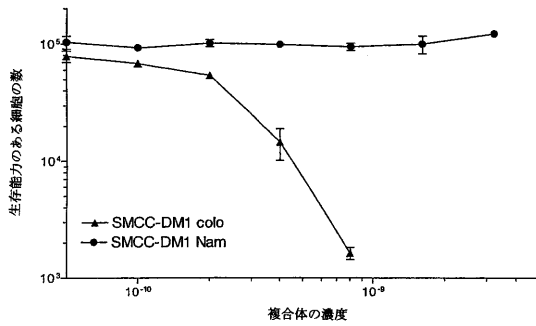
【図 6 C】

細胞毒性：クローン原性アッセイにおける
COLO205細胞へのhuC242複合体の24時間暴露



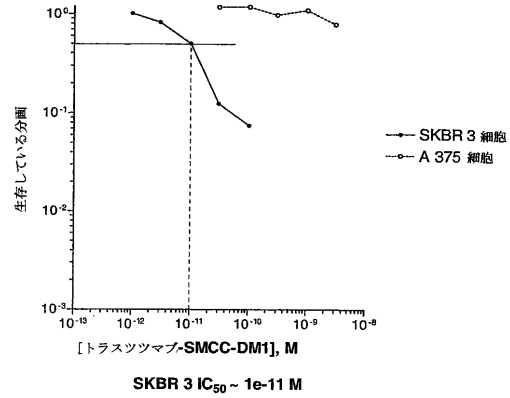
【図 7】

huc242-SMCC-DM1 (1713-146C) 複合体 対
COLO205 (+)および Namalwa (-)の
In Vitroの細胞毒性
(5日間インキュベーション、MTTアッセイ)



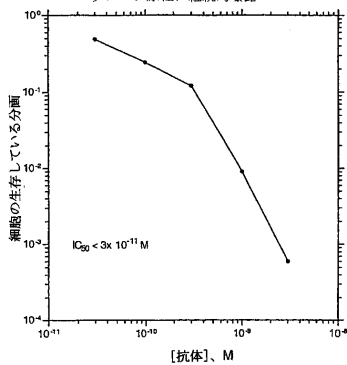
【図 8 A】

細胞毒性:
トラスツマブ-SMCC-DM1,
Lot 1713-125B 対 SKBR 3 &
A 375 細胞



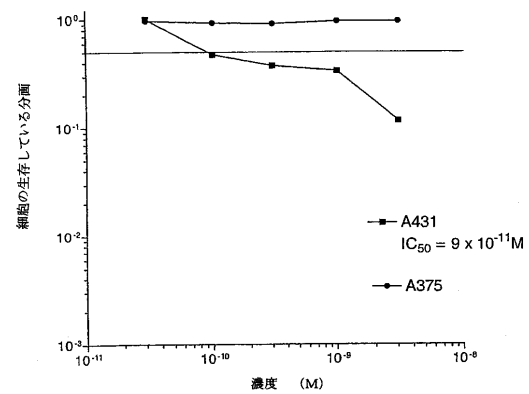
【図 8 B】

My9-6-SMCC-DM1, 1693-16M8.5x
THP-1 細胞における効能の評価
クローン原性、継続的曝露

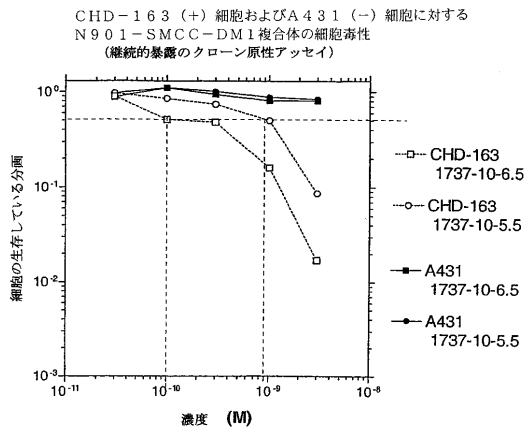


【図 8 C】

A431 (+) 細胞およびA375 (-) 細胞に対する
KS77-SMCC-DM1 (1963-16K9.5x) の細胞毒性
(継続的暴露、クローン原性アッセイ)

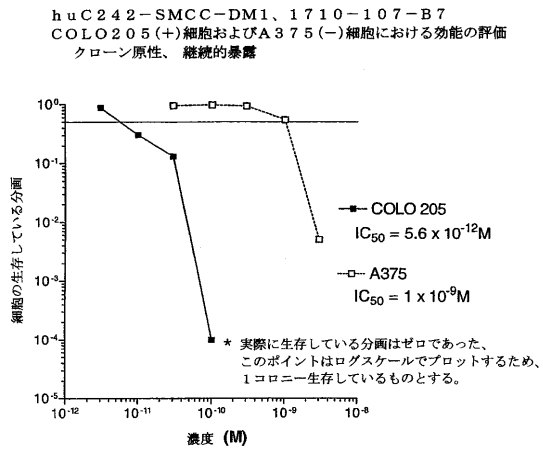


【図 8 D】

IC₅₀ 結果

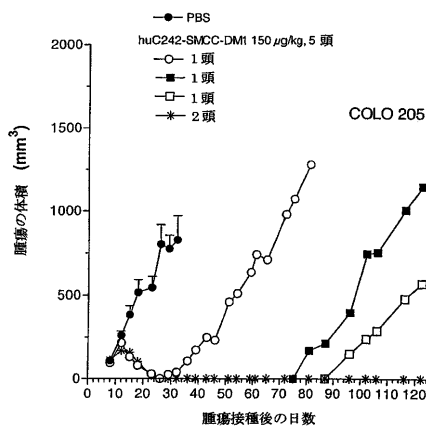
	1737-10-5.5	1737-10-6.5
CHD-163	9.00E-10	1.00E-10
A431	> 3E-9	> 3E-9

【図 9】



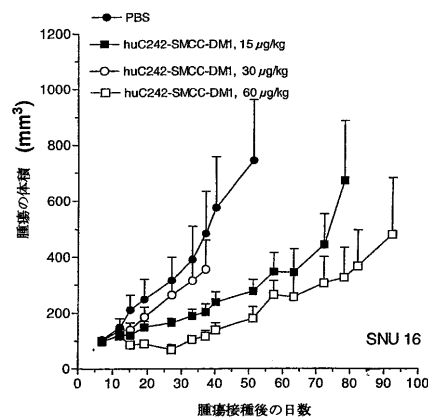
【図 10 A】

SCIDマウスにおけるColo205ヒト結腸癌の異種移植片
に対するhuC242-SMCC-DM1の抗腫瘍活性
確立された皮下腫瘍を有する5頭の1群を、huC242-SMCC-DM1にて、
複合体のDM1 150 μ g/kgの用量で治療した。腫瘍サイズを定期的に測定し、
腫瘍接種後の時間に対してグラフで表した。治療した5頭はすべて完全に緩解したが、
3頭はその後異なる時点で再発し、2頭は実験終了時まで腫瘍が認められ
ないままであった。



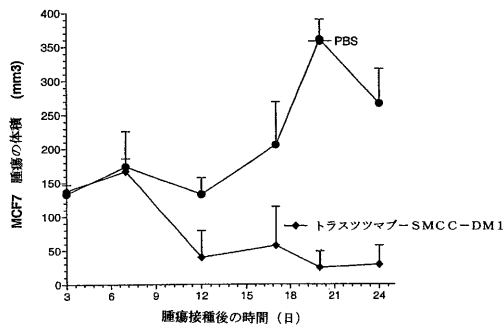
【図 10 B】

SCIDマウスにおけるSNU16ヒト胃腫瘍の異種移植片
に対するhuC242-SMCC-DM1の抗腫瘍活性
確立された皮下SNU16腫瘍を各々有する各5頭の3群を、huC242-SMCC-DM1にて、
複合体のDM1 15 μ g/kg、30 μ g/kg、および60 μ g/kgの用量で各々治療した。
腫瘍サイズを定期的に測定し、腫瘍接種後の時間に対してグラフで表した。
huC242-SMCC-DM1は用量依存性の抗腫瘍効果を示した。



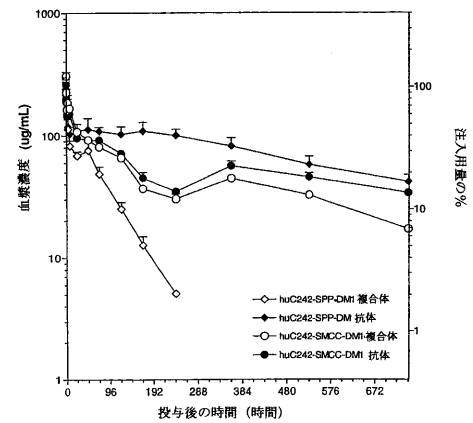
【図 10 C】

CB. 17 SCIDマウスのMCF7異種移植片における
トラスツマブ-SMCC-DM1の抗腫瘍活性



【図 11】

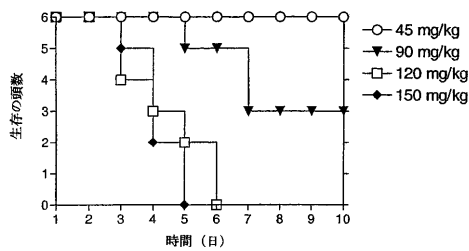
CD-1マウスの血漿クリアランス曲線におけるhuC242-SPP-DM1複合体
およびhuC242-SMCC-DM1複体の薬物動態学試験、
ならびに薬物動態学パラメータ



免疫複合体	DM1/AB	Cmax	t 1/2	AUC	CL	Vss
		ug/mL	時間	時間・ug/mL	mL/時間/kg	mL/kg
huC242-SMCC-DM1	3.17	312.2	318.3	40374.2	0.3	112.5
huC242-SMCC		262.9	533.7	65953.9	0.2	119.6
huC242-SPP-DM1	3.26	191.4	49.8	9205.7	1.1	92.6
huC242-SPP		212.5	499.2	89345.7	0.1	78.2

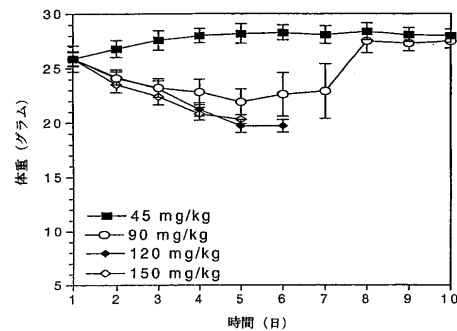
【図 12 A】

huC242-SPP-DM1で治療した
CD-1マウスの生存



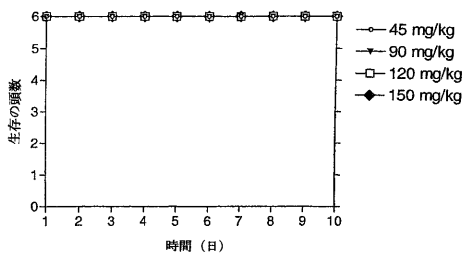
【図 12 C】

huC242-SPP-DM1で治療した
CD-1マウスの体重



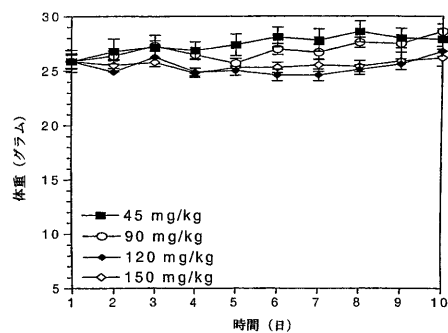
【図 12 B】

huC242-SMCC-DM1で治療した
CD-1マウスの生存



【図 12 D】

huC242-SMCC-DM1で治療した
CD-1マウスの体重



A. コントロール
B. huC242-SPP-DM1, 10^{-8} M
C. huC242-SPP-DM1, 10^{-9} M
D. huC242-SMCC-DM1, 10^{-8} M
E. huC242-SMCC-DM1, 10^{-9} M



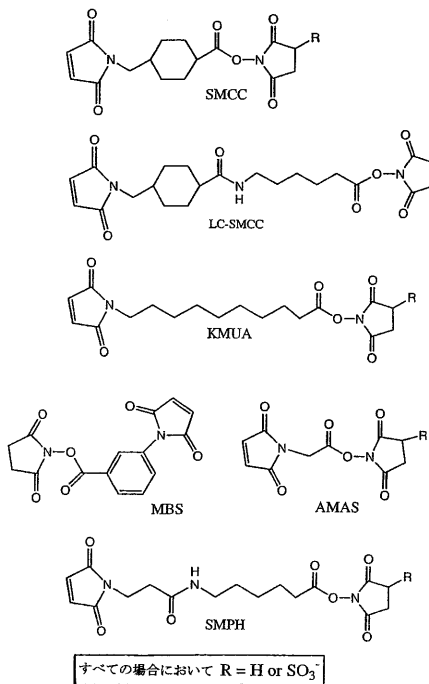
	huC242-SPP-DM1	hu-C242-SMCC-DM1
COLO 205		
Namalwa		
COLO 205 + Namalwa		

複合体の濃度 (M)	COLO 205 (生存細胞の数)	Namalwa (生存細胞の数)	COLO 205 + Namalwa (生存細胞の数)
10 ⁻¹⁰	~10 ^{4.8}	~10 ^{4.9}	~10 ^{4.8}
10 ⁻⁹	~10 ^{4.8}	~10 ^{4.9}	~10 ^{4.7}
10 ⁻⁸	~10 ^{4.5}	~10 ^{4.9}	~10 ^{4.7}
10 ⁻⁷	~10 ^{3.2}	~10 ^{4.9}	~10 ^{4.7}
10 ⁻⁶	-	~10 ^{5.0}	~10 ^{4.6}

Figure 1 is a semi-logarithmic graph showing the number of surviving cells (生存細胞の数) on the y-axis versus the concentration of the complex (複合体の濃度) on the x-axis. The y-axis is logarithmic, ranging from 10^3 to 10^5 . The x-axis is logarithmic, ranging from 10^{-10} to 10^{-8} . A horizontal dashed line at $10^{4.5}$ represents the IC50. Three data series are plotted: COLO 205 (solid line with triangles), Namalwa (solid line with circles), and COLO 205 + Namalwa (dashed line with squares). COLO 205 shows a sharp decrease in cell survival as concentration increases, crossing the IC50 at approximately $10^{-9.5}$. Namalwa and the combination show much higher cell survival, remaining above the IC50 across the tested concentration range.

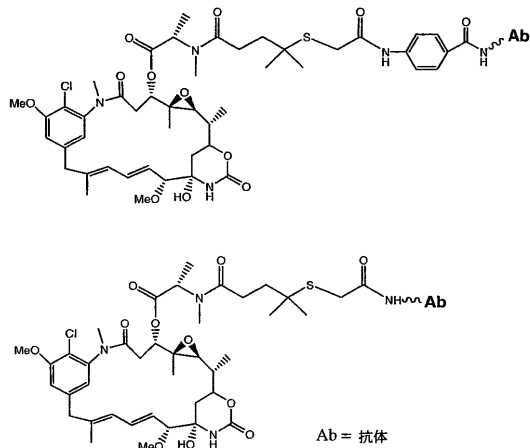
複合体の濃度	COLO 205 (生存細胞の数)	Namalwa (生存細胞の数)	COLO 205 + Namalwa (生存細胞の数)
10^{-10}	$10^{4.5}$	$10^{4.8}$	$10^{4.5}$
$10^{-9.5}$	$10^{4.5}$	$10^{4.8}$	$10^{4.5}$
10^{-9}	$10^{4.2}$	$10^{4.8}$	$10^{4.5}$
$10^{-8.5}$	$10^{3.8}$	$10^{4.8}$	$10^{4.5}$
10^{-8}	$10^{3.2}$	$10^{4.8}$	$10^{4.5}$
$10^{-7.5}$	-	$10^{4.8}$	$10^{4.5}$
10^{-7}	-	$10^{4.8}$	$10^{4.5}$

マレイミドを基本とする架橋物質の代表的な構造



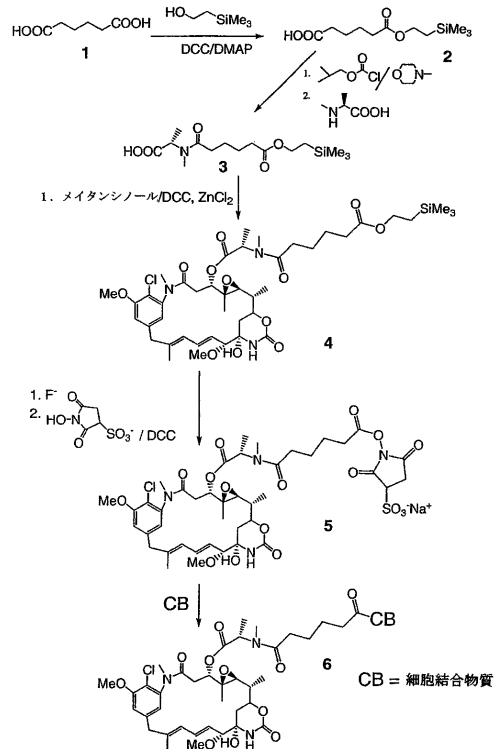
【図 20】

ハロアセチル誘導体化した抗体より製造した抗体-DM4複合体の構造。
例としてS I A B架橋試薬（上の構造）およびS I A試薬（下の構造）を使用した。



【図 21】

イオウを含有しないリンカー



【図 22】

Hu C 2 4 2-Sを含有しない非開裂リンカー-DM1の細胞毒性

細胞毒性:

h C 2 4 2-非イオウ-DM1

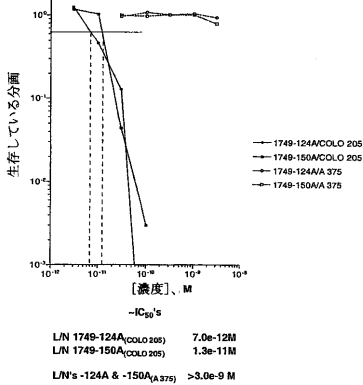
L/N1749-124A &

h C 2 4 2-SMNP-DM3

L/N1749-150A 対

COLO205細胞 & A375細胞

継続的暴露のクロン原性アッセイにおいて



【図 23】

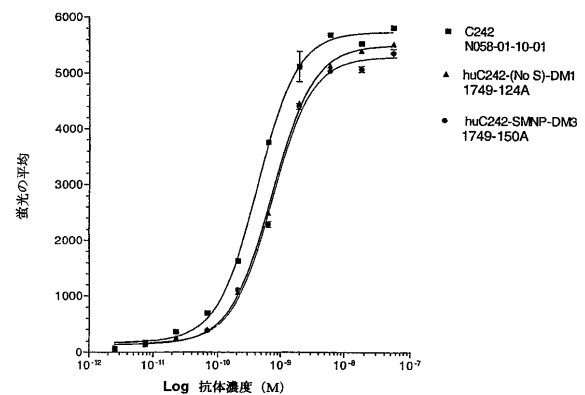
Hu C 2 4 2-Sを含有しない非開裂リンカー-DM1

h u C 2 4 2-(非イオウ)-DM1 (1749-124A)および

h u C 2 4 2-SMNP-DM3 (1749-150A)の

COLO205細胞に対するFACS結合アッセイ

(5x10³細胞/ウェル、氷上での3時間の1次的インキュベーション)

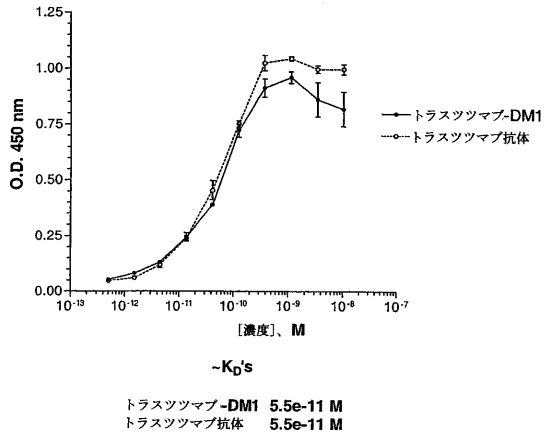


	huC242	huC242-(No S)-DM1	huC242-SMNP-DM3
EC50	4.12E-10	7.04E-10	7.08E-10
R ²	0.9972	0.9986	0.9965
複合体:抗体	0.60	1.71	1.72

【図 2 4】

ELISA:

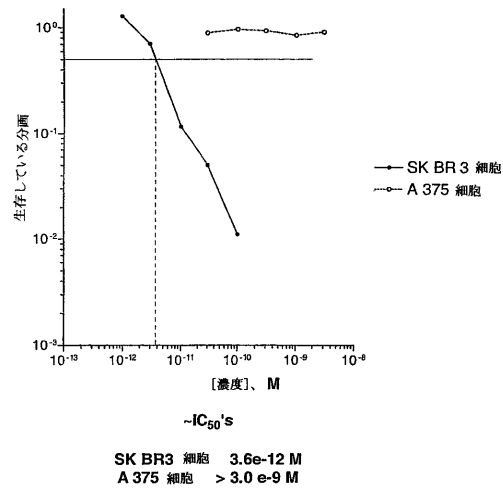
0.3 ng/ウェルでコーティングしたECDプレート
に対するトラスツマブ-SMCC-DM1および
トラスツマブ抗体の結合



【図 2 5】

細胞毒性:

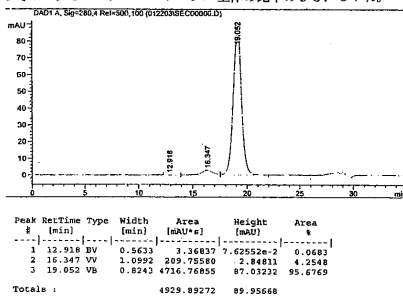
トラスツマブ-SMCC-DM1、
対 SKBR3細胞&A375細胞
継続的暴露のクローン原性アッセイにおいて



【図 2 6】

トラスツマブ-SMCC-DM1に関するサイズ排除クロマトグラフィー

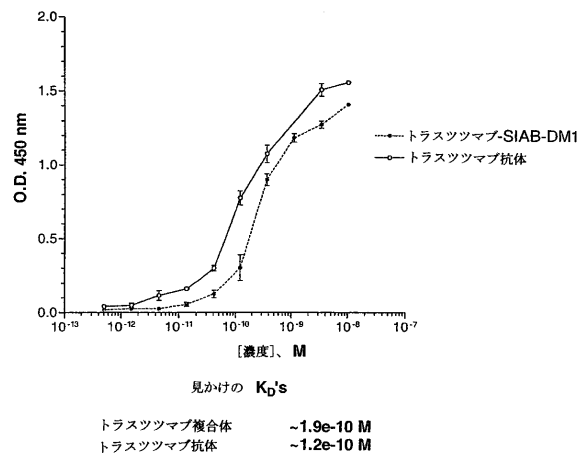
複合体サンプルをTSK-GELサイズ排除クロマトグラフィーにかけた。
ピーク1はマルチマーを表し、ピーク2はダイマーを表し、ピーク3はモノマーを表す。
曲線下面積を総ピーク面積で割った値がサンプルに対してピークの占める部分を表す；
したがってピーク3=モノマー=サンプル全体の比率の95.67%。



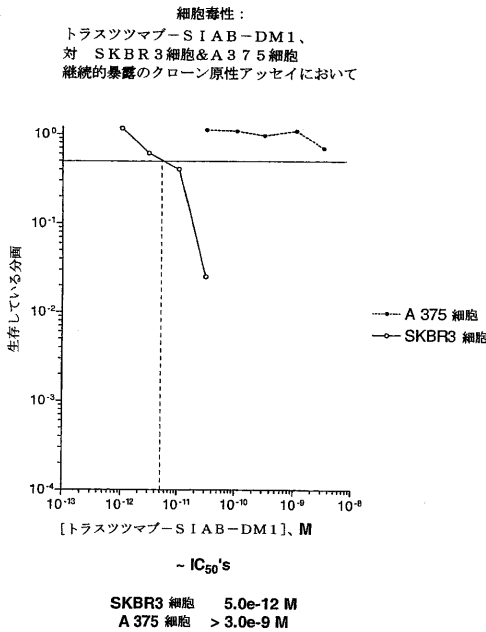
【図 2 7】

ELISA:

0.3 ng/ウェルでコーティングしたECDプレート
に対するトラスツマブ-SIAB-DM1および
トラスツマブ抗体の結合



【図 28】



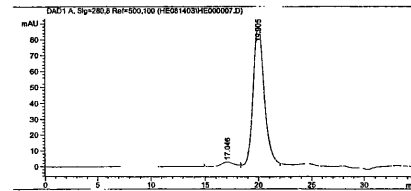
【図 29】

トラスツマブ-S I A B-DM1に関するサイズ排除クロマトグラフィー

複合体サンプルをTSK-GELサイズ排除クロマトグラフィーにかけた。
ピーク1はダイマーを表し、ピーク2はモノマーを表す。
曲線下面積を総ピーク面積で割った値がサンプルに対してピークの占める部分を表す；
したがってピーク2=モノマー=サンプル全体の比率の96.4%。

File C:\HPCHEM\2\DATA\H0801403\H08000007.D Sample Name: 1806-32
receptin-SIAB-DM1

Injection Date : 8/24/2003 7:33:54 PM Seq. Line : 7
Sample Name : 1806-32 Location : Vial 7
Q. Operator : Name Inj : 1
Inj Volume : 30 µl
Q. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\SEC.M
Meth changed : 8/24/2003 3:30:33 PM by Name
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\SEC.M
Meth changed : 9/24/2003 9:25:04 AM by Cheryl
C analysis



Area Percent Report

ated By : Signal
Multiplier : 1.0000
ution : 1.0000
e Multiplier & Dilution Factor with ISTDw

Signal 1: DAI1 A, Sig=280.8 Ref=500.100

Peak #	Retention Time (min)	Width (min)	Area (mAU*s)	Height (mAU)	Area %
1	17.046	0.2452	240.59735	2.83775	3.5965
2	19.905	1.2151	6449.17334	88.40419	96.4035

Area : 6689.77069 91.24194

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

【手続補正書】

【提出日】平成29年6月28日(2017.6.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

非開裂リンカーを介して細胞結合物質に連結した少なくとも1つのメイタンシノイドを有する細胞結合物質メイタンシノイド複合体であって、

ここにおいて、細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する抗体、単鎖抗体、または抗体フラグメントであり、

ここにおいて、抗体、単鎖抗体、または抗体フラグメントは、ヒト定常領域を含み、

ここにおいて、非開裂リンカーが、酸に誘発される開裂、光に誘発される開裂、ペプチダーゼに誘発される開裂、エステラーゼに誘発される開裂、またはジスルフィド結合の開裂に対して実質的に耐性があり、

ここにおいて、複合体が、細胞毒性が高く、そして、

ここにおいて、細胞結合物質メイタンシノイド複合体の齧歯類における最大耐用量(MTD)は、少なくとも約150mg/kgであり、

ただし、細胞結合物質は、抗-erbB抗体ではない、
前記細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項2】

非開裂リンカーがマレイミドを基本とする部分から誘導される、請求項1に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 3】

非開裂リンカーが、N-スクシンイミジル 4- (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (SMCC)、N-スクシンイミジル-4- (N-マレイミドメチル) -シクロヘキサン-1-カルボキシ- (6-アミドカプロエート) (LC-SMCC)、 κ -マレイミドウンデカン酸N-スクシンイミジルエステル (KMUA)、 γ -マレイミド酪酸N-スクシンイミジルエステル (GMB S)、 ϵ -マレイミドカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (EMCS)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS)、N- (α -マレイミドアセトキシ) -スクシンイミドエステル (AMAS)、スクシンイミジル-6- (β -マレイミドプロピオンアミド) ヘキサノエート (SMPH)、N-スクシンイミジル 4- (p-マレイミドフェニル) -ブチレート (SMPB)、およびN- (p-マレイミドフェニル) イソシアネート (PMPI)、あるいは、これらのバリエーションまたは類似体から成る群より選択される、マレイミドを基本とする部分から誘導される、請求項 2 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 4】

非開裂リンカーが SMCC から誘導される、請求項 3 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 5】

リンカーが、少なくとも 1 つのメイタンシノイドの C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルの基のいずれか 1 つにある、請求項 1 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 6】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、メイタンシノールの N-メチル-L-アラニンを含むエステルである、請求項 1 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 7】

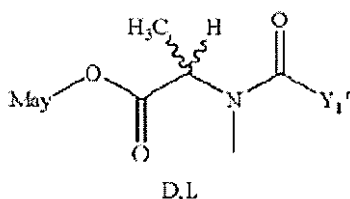
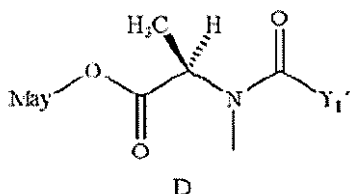
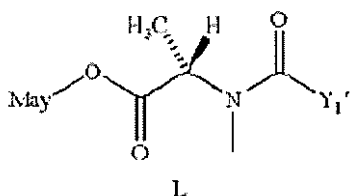
少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、メイタンシノールの N-メチル-L-システインを含むエステルである、請求項 1 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 8】

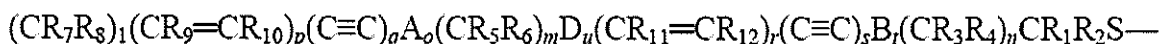
少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、式 (I I' - L)、(I I' - D) または (I I' - D, L) :

【化 1】

(II')

〔式中： Y₁' は

【化 2】



を表し、

式中：

R₁ から R₁₂ は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R₂ から R₁₂ は H であることができる；

A、B、および D は各々独立して、3 から 10 の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルなアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである；

l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u は各々独立して、0 または 1 から 5 の整数である、ただし l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u の少なくとも 2 つが双方ともゼロではない；そして

May は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す〕により表される、

請求項 1 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 9】

R₁ がメチルであり R₂ が H である、または R₁ および R₂ がメチルである、請求項 8 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 10】

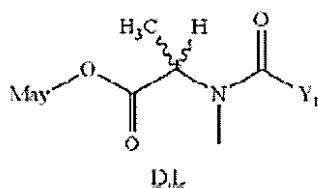
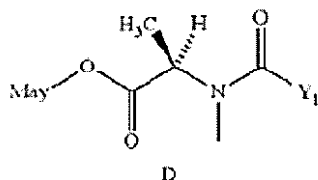
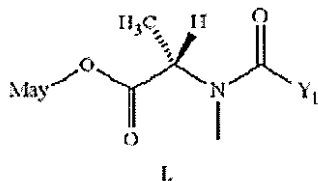
R₁ がメチルであり、R₂ が H であり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R₁ および R₂ がメチルであり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 8 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 11】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが、式 (I I - L)、(I I - D)、または (I I - D, L) :

【化 3】

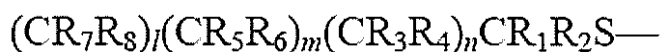
(II)



[式中:

Y_1 は

【化 4】



を表し、式中:

R_1 から R_8 は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R_2 から R_8 は H であることができる;

1、m、および n は各々独立して、1 から 5 の整数であり、そして加えて n はゼロであることができる;

そして May は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]

により表される、請求項 1 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 1 2】

R_1 がメチルであり R_2 が H である、または R_1 および R_2 がメチルである、請求項 1 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

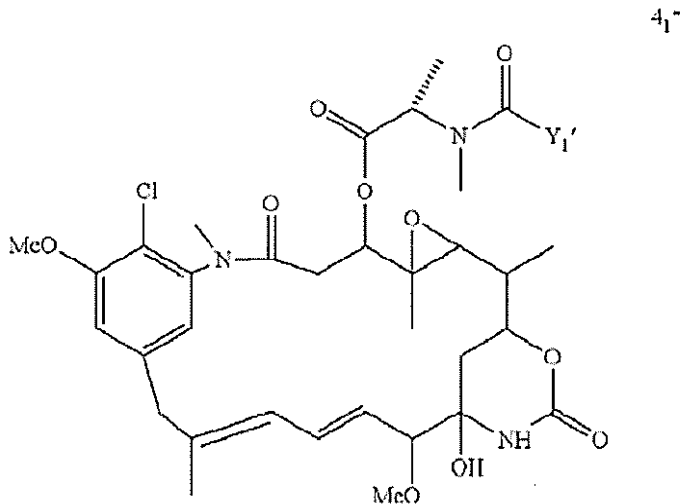
【請求項 1 3】

R_1 がメチルであり、 R_2 が H であり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、1 および m が各々 1 であり、そして n が 0 である; または R_1 および R_2 がメチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が各々 H であり、1 および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 1 1 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 1 4】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが式 4₁' :

【化 5】



〔式中：〕

Y₁' は

【化 6】



を表し、

式中：

R₁ から R₁₂ は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R₂ から R₁₂ は H であることができる；

A、B、および D は各々独立して、3 から 10 の炭素原子を有する環式アルキルもしくは環式アルケニル、シンプルなアリールもしくは置換されたアリール、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルである；

l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u は各々独立して、0 または 1 から 5 の整数である、ただし l、m、n、o、p、q、r、s、t、および u の少なくとも 2 つが双方ともゼロではない；そして

May は C-3 ヒドロキシル、C-14 ヒドロキシメチル、C-15 ヒドロキシルまたは C-20 デスメチルに側鎖を持つメイタンシノイドを表す]

により表される、請求項 1 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 15】

R₁ がメチルであり R₂ が H である、または R₁ および R₂ がメチルである、請求項 14 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

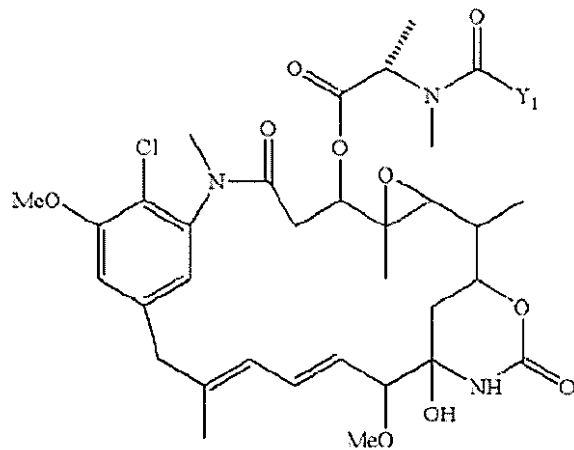
【請求項 16】

R₁ がメチルであり、R₂ が H であり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R₁ および R₂ がメチルであり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 14 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 17】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが式 4₁：

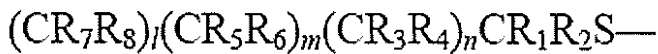
【化 7】



〔式中：

Y₁ は

【化 8】



を表し、式中：

R₁ から R₈ は各々独立して、1 から 10 の炭素原子を有する直鎖のアルキルもしくはアルケニル、3 から 10 の炭素原子を有する分枝鎖もしくは環式のアルキルまたはアルケニル、フェニル、置換されたフェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルのラジカルであり、そして加えて R₂ から R₈ は H であることができる；そして

l、m、および n は各々独立して、1 から 5 の整数であり、そして加えて n は 0 であることができる]

により表される、請求項 1 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 18】

R₁ がメチルであり R₂ が H である、または R₁ および R₂ がメチルである、請求項 17 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 19】

R₁ がメチルであり、R₂ が H であり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が各々 1 であり、そして n が 0 である；または R₁ および R₂ がメチルであり、R₅、R₆、R₇ および R₈ が各々 H であり、l および m が 1 であり、そして n が 0 である、請求項 17 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 20】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが N²'-デアセチル-N²'-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン (DM1) である、請求項 1 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 21】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが N²'-デアセチル-N²'-(4-メルカプト-1-オキソペンチル)-メイタンシン (DM3) である、請求項 1 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 22】

少なくとも 1 つのメイタンシノイドが N²'-デアセチル-N²'-(4-メチル-4-メルカプト-1-オキソペンチル)-メイタンシン (DM4) である、請求項 1 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項 23】

細胞結合物質が、腫瘍細胞；ウイルスに感染した細胞、微生物に感染した細胞、寄生体

に感染した細胞、自己免疫細胞、移植拒絶もしくは移植片対宿主病における活性化細胞、骨髄細胞、活性化T細胞、B細胞、もしくはメラノサイト；CD33、CD19、CanAg、若しくはCALLA抗原を発現する細胞；またはインスリン増殖因子受容体、もしくは葉酸受容体を発現する細胞に結合する、請求項1に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項24】

細胞結合物質が、乳癌細胞、腎臓癌細胞、肺癌細胞、前立腺癌細胞、卵巢癌細胞、結腸直腸癌細胞、胃癌細胞、扁平上皮癌細胞、小細胞肺癌細胞、非小細胞肺癌細胞、膵臓癌細胞、精巣癌細胞、神経芽腫細胞、黒色腫細胞、または、リンパ系器官の癌由来の細胞から成る群より選択される細胞に結合する、請求項23に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項25】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する、表面再修飾した抗体、表面再修飾した単鎖抗体、または表面再修飾した抗体フラグメントである、請求項1に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項26】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する、ヒト化抗体、ヒト化単鎖抗体、またはヒト化抗体フラグメントである、請求項1に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項27】

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する、ヒト抗体、ヒト単鎖抗体、またはヒト抗体フラグメントである、請求項1に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項28】

細胞結合物質が、抗PSMA抗体、抗CanAg抗体、抗CD19抗体、抗CD33抗体、抗CALLA抗体、抗CD56抗体、または抗IGF-IR抗体である、請求項1に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項29】

メイタンシノイドが、 $N^{2'}\text{-デアセチル}-N^{2'}\text{-(4-メルカプト-1-オキソペンチル)}\text{-メイタンシン(DM3)}$ または $N^{2'}\text{-デアセチル}-N^{2'}\text{-(4-メチル-4-メルカプト-1-オキソペンチル)}\text{-メイタンシン(DM4)}$ である、請求項8に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項30】

メイタンシノイドが、 $N^{2'}\text{-デアセチル}-N^{2'}\text{-(4-メルカプト-1-オキソペンチル)}\text{-メイタンシン(DM3)}$ または $N^{2'}\text{-デアセチル}-N^{2'}\text{-(4-メチル-4-メルカプト-1-オキソペンチル)}\text{-メイタンシン(DM4)}$ である、請求項11に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項31】

メイタンシノイドが、 $N^{2'}\text{-デアセチル}-N^{2'}\text{-(4-メルカプト-1-オキソペンチル)}\text{-メイタンシン(DM3)}$ または $N^{2'}\text{-デアセチル}-N^{2'}\text{-(4-メチル-4-メルカプト-1-オキソペンチル)}\text{-メイタンシン(DM4)}$ である、請求項14に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

【請求項32】

請求項1の細胞結合物質メイタンシノイド複合体、および担体を包含する組成物。

【請求項33】

下記の構造：

COC1=CC=C(C=C1C2=CC=CC=C2C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]3C[C@H](C=C[C@H]4C[C@@H](CO)C[C@H](C4)C[C@@H](CO)C(=O)NCC5=CC=CC=C5C(=O)N6C(=O)CCSC7C(=O)N(C)C(=O)C7)C3)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]8C[C@H](C=C[C@H]9C[C@@H](CO)C[C@H](C9)C[C@@H](CO)C(=O)NCC10=CC=CC=C10C(=O)N11C(=O)CCSC12C(=O)N(C)C(=O)C12)C8)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]13C[C@H](C=C[C@H]14C[C@@H](CO)C[C@H](C14)C[C@@H](CO)C(=O)NCC15=CC=CC=C15C(=O)N16C(=O)CCSC17C(=O)N(C)C(=O)C17)C13)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]18C[C@H](C=C[C@H]19C[C@@H](CO)C[C@H](C19)C[C@@H](CO)C(=O)NCC20=CC=CC=C20C(=O)N21C(=O)CCSC22C(=O)N(C)C(=O)C22)C18)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]23C[C@H](C=C[C@H]24C[C@@H](CO)C[C@H](C24)C[C@@H](CO)C(=O)NCC25=CC=CC=C25C(=O)N26C(=O)CCSC27C(=O)N(C)C(=O)C27)C23)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]28C[C@H](C=C[C@H]29C[C@@H](CO)C[C@H](C29)C[C@@H](CO)C(=O)NCC30=CC=CC=C30C(=O)N31C(=O)CCSC32C(=O)N(C)C(=O)C32)C28)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]33C[C@H](C=C[C@H]34C[C@@H](CO)C[C@H](C34)C[C@@H](CO)C(=O)NCC35=CC=CC=C35C(=O)N36C(=O)CCSC37C(=O)N(C)C(=O)C37)C33)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]38C[C@H](C=C[C@H]39C[C@@H](CO)C[C@H](C39)C[C@@H](CO)C(=O)NCC40=CC=CC=C40C(=O)N41C(=O)CCSC42C(=O)N(C)C(=O)C42)C38)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]43C[C@H](C=C[C@H]44C[C@@H](CO)C[C@H](C44)C[C@@H](CO)C(=O)NCC45=CC=CC=C45C(=O)N46C(=O)CCSC47C(=O)N(C)C(=O)C47)C43)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]48C[C@H](C=C[C@H]49C[C@@H](CO)C[C@H](C49)C[C@@H](CO)C(=O)NCC50=CC=CC=C50C(=O)N51C(=O)CCSC52C(=O)N(C)C(=O)C52)C48)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]53C[C@H](C=C[C@H]54C[C@@H](CO)C[C@H](C54)C[C@@H](CO)C(=O)NCC55=CC=CC=C55C(=O)N56C(=O)CCSC57C(=O)N(C)C(=O)C57)C53)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]58C[C@H](C=C[C@H]59C[C@@H](CO)C[C@H](C59)C[C@@H](CO)C(=O)NCC60=CC=CC=C60C(=O)N61C(=O)CCSC62C(=O)N(C)C(=O)C62)C58)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]63C[C@H](C=C[C@H]64C[C@@H](CO)C[C@H](C64)C[C@@H](CO)C(=O)NCC65=CC=CC=C65C(=O)N66C(=O)CCSC67C(=O)N(C)C(=O)C67)C63)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]68C[C@H](C=C[C@H]69C[C@@H](CO)C[C@H](C69)C[C@@H](CO)C(=O)NCC70=CC=CC=C70C(=O)N71C(=O)CCSC72C(=O)N(C)C(=O)C72)C68)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]73C[C@H](C=C[C@H]74C[C@@H](CO)C[C@H](C74)C[C@@H](CO)C(=O)NCC75=CC=CC=C75C(=O)N76C(=O)CCSC77C(=O)N(C)C(=O)C77)C73)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]78C[C@H](C=C[C@H]79C[C@@H](CO)C[C@H](C79)C[C@@H](CO)C(=O)NCC80=CC=CC=C80C(=O)N81C(=O)CCSC82C(=O)N(C)C(=O)C82)C78)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]83C[C@H](C=C[C@H]84C[C@@H](CO)C[C@H](C84)C[C@@H](CO)C(=O)NCC85=CC=CC=C85C(=O)N86C(=O)CCSC87C(=O)N(C)C(=O)C87)C83)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]88C[C@H](C=C[C@H]89C[C@@H](CO)C[C@H](C89)C[C@@H](CO)C(=O)NCC90=CC=CC=C90C(=O)N91C(=O)CCSC92C(=O)N(C)C(=O)C92)C88)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]93C[C@H](C=C[C@H]94C[C@@H](CO)C[C@H](C94)C[C@@H](CO)C(=O)NCC95=CC=CC=C95C(=O)N96C(=O)CCSC97C(=O)N(C)C(=O)C97)C93)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]98C[C@H](C=C[C@H]99C[C@@H](CO)C[C@H](C99)C[C@@H](CO)C(=O)NCC100=CC=CC=C100C(=O)N101C(=O)CCSC102C(=O)N(C)C(=O)C102)C98)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]103C[C@H](C=C[C@H]104C[C@@H](CO)C[C@H](C104)C[C@@H](CO)C(=O)NCC105=CC=CC=C105C(=O)N106C(=O)CCSC107C(=O)N(C)C(=O)C107)C103)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]108C[C@H](C=C[C@H]109C[C@@H](CO)C[C@H](C109)C[C@@H](CO)C(=O)NCC110=CC=CC=C110C(=O)N111C(=O)CCSC112C(=O)N(C)C(=O)C112)C108)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]113C[C@H](C=C[C@H]114C[C@@H](CO)C[C@H](C114)C[C@@H](CO)C(=O)NCC115=CC=CC=C115C(=O)N116C(=O)CCSC117C(=O)N(C)C(=O)C117)C113)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]118C[C@H](C=C[C@H]119C[C@@H](CO)C[C@H](C119)C[C@@H](CO)C(=O)NCC120=CC=CC=C120C(=O)N121C(=O)CCSC122C(=O)N(C)C(=O)C122)C118)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]123C[C@H](C=C[C@H]124C[C@@H](CO)C[C@H](C124)C[C@@H](CO)C(=O)NCC125=CC=CC=C125C(=O)N126C(=O)CCSC127C(=O)N(C)C(=O)C127)C123)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]128C[C@H](C=C[C@H]129C[C@@H](CO)C[C@H](C129)C[C@@H](CO)C(=O)NCC130=CC=CC=C130C(=O)N131C(=O)CCSC132C(=O)N(C)C(=O)C132)C128)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]133C[C@H](C=C[C@H]134C[C@@H](CO)C[C@H](C134)C[C@@H](CO)C(=O)NCC135=CC=CC=C135C(=O)N136C(=O)CCSC137C(=O)N(C)C(=O)C137)C133)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]138C[C@H](C=C[C@H]139C[C@@H](CO)C[C@H](C139)C[C@@H](CO)C(=O)NCC140=CC=CC=C140C(=O)N141C(=O)CCSC142C(=O)N(C)C(=O)C142)C138)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]143C[C@H](C=C[C@H]144C[C@@H](CO)C[C@H](C144)C[C@@H](CO)C(=O)NCC145=CC=CC=C145C(=O)N146C(=O)CCSC147C(=O)N(C)C(=O)C147)C143)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]148C[C@H](C=C[C@H]149C[C@@H](CO)C[C@H](C149)C[C@@H](CO)C(=O)NCC150=CC=CC=C150C(=O)N151C(=O)CCSC152C(=O)N(C)C(=O)C152)C148)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]153C[C@H](C=C[C@H]154C[C@@H](CO)C[C@H](C154)C[C@@H](CO)C(=O)NCC155=CC=CC=C155C(=O)N156C(=O)CCSC157C(=O)N(C)C(=O)C157)C153)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]158C[C@H](C=C[C@H]159C[C@@H](CO)C[C@H](C159)C[C@@H](CO)C(=O)NCC160=CC=CC=C160C(=O)N161C(=O)CCSC162C(=O)N(C)C(=O)C162)C158)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]163C[C@H](C=C[C@H]164C[C@@H](CO)C[C@H](C164)C[C@@H](CO)C(=O)NCC165=CC=CC=C165C(=O)N166C(=O)CCSC167C(=O)N(C)C(=O)C167)C163)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]168C[C@H](C=C[C@H]169C[C@@H](CO)C[C@H](C169)C[C@@H](CO)C(=O)NCC170=CC=CC=C170C(=O)N171C(=O)CCSC172C(=O)N(C)C(=O)C172)C168)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]173C[C@H](C=C[C@H]174C[C@@H](CO)C[C@H](C174)C[C@@H](CO)C(=O)NCC175=CC=CC=C175C(=O)N176C(=O)CCSC177C(=O)N(C)C(=O)C177)C173)C(=O)N(C)C(=O)CC[C@H]178C[C@H](C=C[C@H]179C[C@@H](CO)C[C@H](C179)C[C@@H](CO)C(=O)NCC180=CC=CC=C180C(=O)N181C(=O)CCSC182C(=O

またはそのフラグメントを有する、ここにおいて、 n は1から10の間である、請求項1の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

平均 1 – 約 10 のメンタンシノイドが細胞結合物質に共有結合している、請求項 1 の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

細胞結合物質が、標的細胞に特異的に結合する、表面再修飾した抗体、表面再修飾した単鎖抗体、表面再修飾した抗体フラグメント、ヒト化抗体、ヒト化単鎖抗体、またはヒト化抗体フラグメントであり、

メンタンシノイドが、 N^2 '-デアセチル- N^2 '-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン (DM1) であり、そして、

リンカーが、SMCCに由来する、

請求項 1 に記載の細胞結合物質メイタンシノイド複合体。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 33/00	(2006.01)	A 6 1 P 33/00		4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02		
A 6 1 P 7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00		
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10		
A 6 1 P 15/00	(2006.01)	A 6 1 P 15/00		
A 6 1 P 13/08	(2006.01)	A 6 1 P 13/08		
A 6 1 P 15/04	(2006.01)	A 6 1 P 15/04	1 7 1	
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04		
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00		
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00		
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00		
A 6 1 K 47/68	(2017.01)	A 6 1 K 47/68		
A 6 1 K 47/54	(2017.01)	A 6 1 K 47/54		
A 6 1 K 47/66	(2017.01)	A 6 1 K 47/66		
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	C	
C 0 7 D 498/18	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	L	
C 1 2 N 5/09	(2010.01)	C 0 7 D 498/18	3 1 1	
C 0 7 K 16/18	(2006.01)	C 0 7 D 498/18	C S P	
		C 1 2 N 5/09		
		C 0 7 K 16/18		

- (72)発明者 スティーブス, リタ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 8 0, ストーンハム, コリンコート・ストリート 6 8
- (72)発明者 ルッツ, ロバート
アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 1 7 7 8, ウェイランド, オールド・コロニー・パース 2 1 8
- (72)発明者 チャリ, ラヴィ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 6 1, ニュートン, ウィンチェスター・ストリート 1 7 4
- (72)発明者 シェ, ホンシェン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 1 7 2 0, アクトン, ファーンウッド・ロード 1 0
- (72)発明者 コフトゥン, イエレナ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 1 7 2 0, アクトン, アーリントン・ストリート 1 5 6

F ターム (参考) 4B065 AA93X AC20 BD14 BD25 BD39
4C072 AA03 AA06 BB03 BB06 CC02 CC12 DD09 EE06 FF15 GG01
GG07 HH07 UU01
4C076 AA95 CC01 CC07 CC14 CC15 CC16 CC17 CC18 CC21 CC26
CC27 CC34 CC35 CC41 DD60 DD70 EE41 EE56 EE59 FF02
4C085 AA14 AA15 AA16 AA21 AA26 CC23 EE01 GG02
4C086 AA01 AA02 AA03 CB25 GA16 MA01 MA04 NA13 ZA01 ZA51
ZA59 ZA66 ZA81 ZA89 ZB21 ZB26 ZB33 ZB35 ZB37 ZC35
4H045 AA11 AA30 BA51 BA72 DA76 EA20 FA50 FA74 GA21

【要約の続き】

【選択図】なし