

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5889912号
(P5889912)

(45) 発行日 平成28年3月22日(2016.3.22)

(24) 登録日 平成28年2月26日(2016.2.26)

(51) Int.Cl.

F 1

C07D 498/18	(2006.01)	C07D 498/18	3 1 1
C07K 16/00	(2006.01)	C07D 498/18	C S P
C07K 16/28	(2006.01)	C07K 16/00	Z N A
A61P 35/00	(2006.01)	C07K 16/28	
A61P 43/00	(2006.01)	A61P 35/00	

請求項の数 25 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-539981 (P2013-539981)
 (86) (22) 出願日 平成23年11月16日 (2011.11.16)
 (65) 公表番号 特表2013-544253 (P2013-544253A)
 (43) 公表日 平成25年12月12日 (2013.12.12)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2011/061031
 (87) 國際公開番号 WO2012/074757
 (87) 國際公開日 平成24年6月7日 (2012.6.7)
 審査請求日 平成26年11月10日 (2014.11.10)
 (31) 優先権主張番号 61/414,535
 (32) 優先日 平成22年11月17日 (2010.11.17)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウエイ 1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 フライゲア, ジョン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウエイ 1, シー/オージェネンテック, インコーポレイテッド

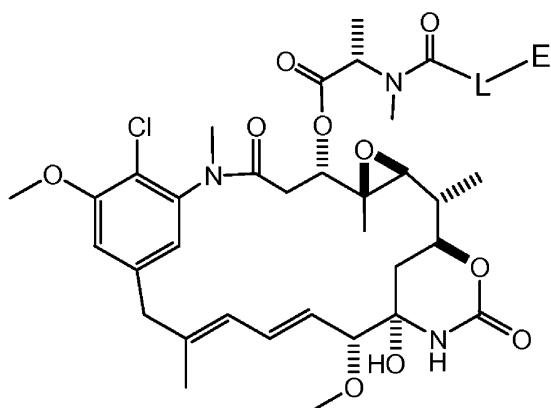
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アラニニルメイタンシノール抗体コンジュゲート

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

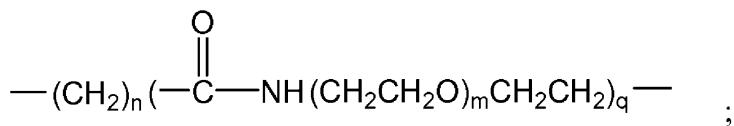
式 I :



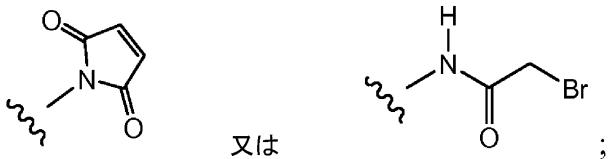
10

I

から選択される化合物であって、
 L は、



E は、



10

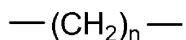
n は 2、3、4、5、又は 6 であり；

m は 2、3、又は 4 であり；及び

q は 0 又は 1 である化合物。

【請求項 2】

L が、



である請求項 1 の化合物。

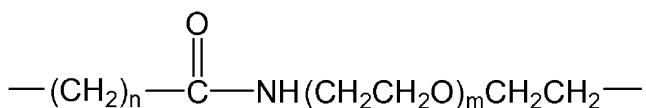
20

【請求項 3】

n が 5 である、請求項 2 の化合物。

【請求項 4】

L が、



である請求項 1 の化合物。

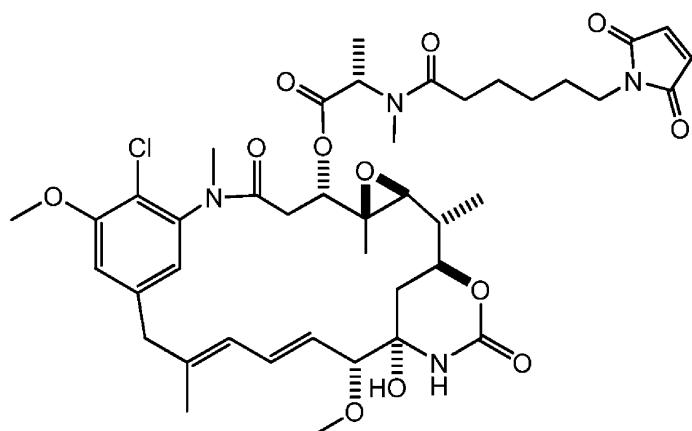
30

【請求項 5】

n が 4 及び m が 3 である、請求項 4 の化合物。

【請求項 6】

構造、



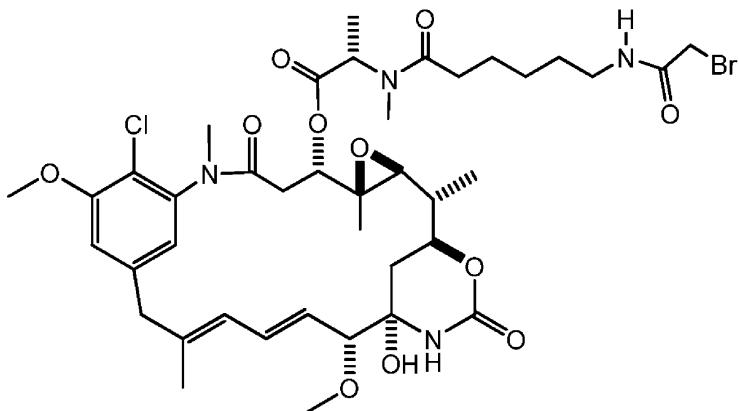
40

を有する請求項 1 の化合物。

【請求項 7】

構造、

50

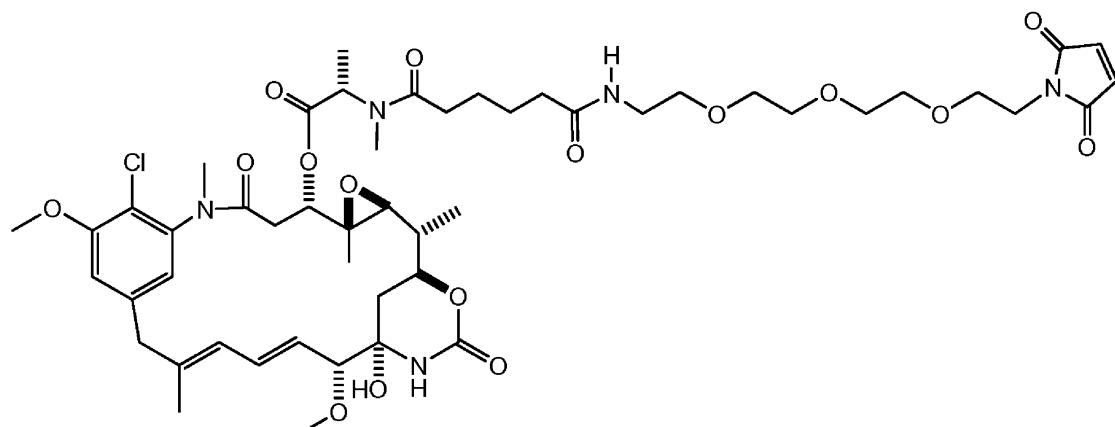


10

を有する請求項 1 の化合物。

【請求項 8】

構造、

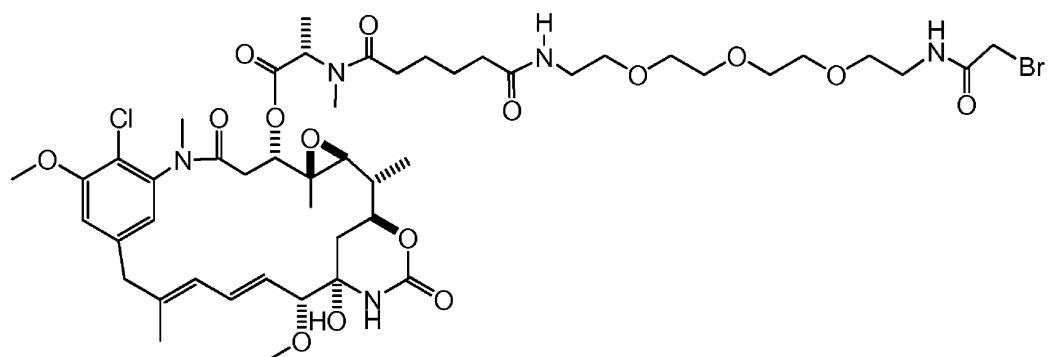


20

を有する請求項 1 の化合物。

【請求項 9】

構造、



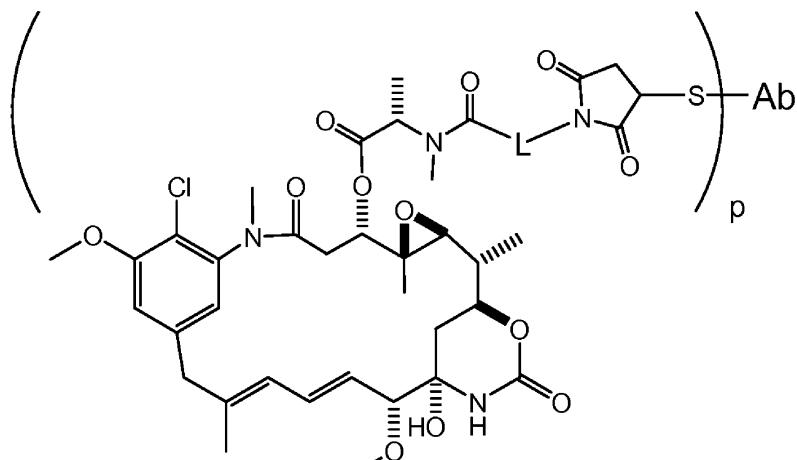
30

を有する請求項 1 の化合物。

【請求項 10】

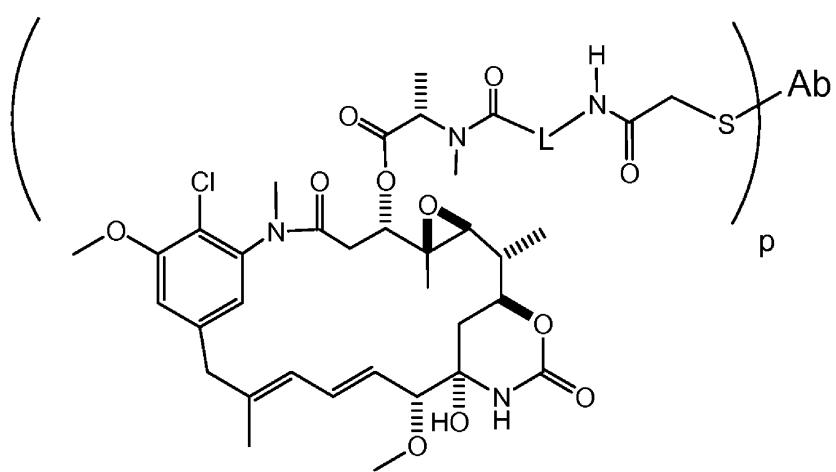
式 I a 又は I b

40



10

Ja



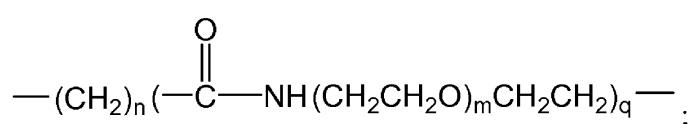
20

Th

から選択される抗体・薬剤コンジュゲートであって：

上は、

30



n は 2、3、4、5、又は 6 であり；

m は 2、3、又は 4 であり；

q は 0 又は 1 であり；

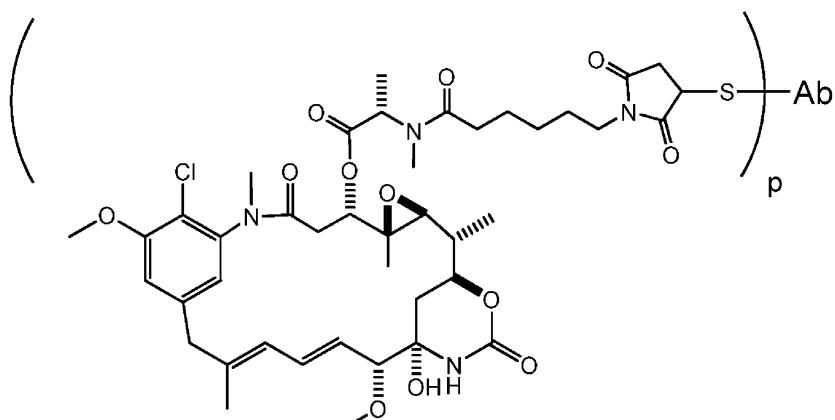
ρは1から4であり；及び

A b は抗体である抗体 - 薬剤コンジュゲート。

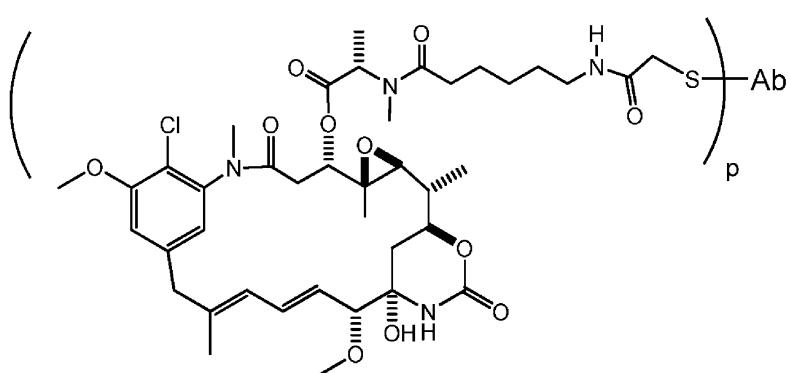
【請求項 11】

· 附录

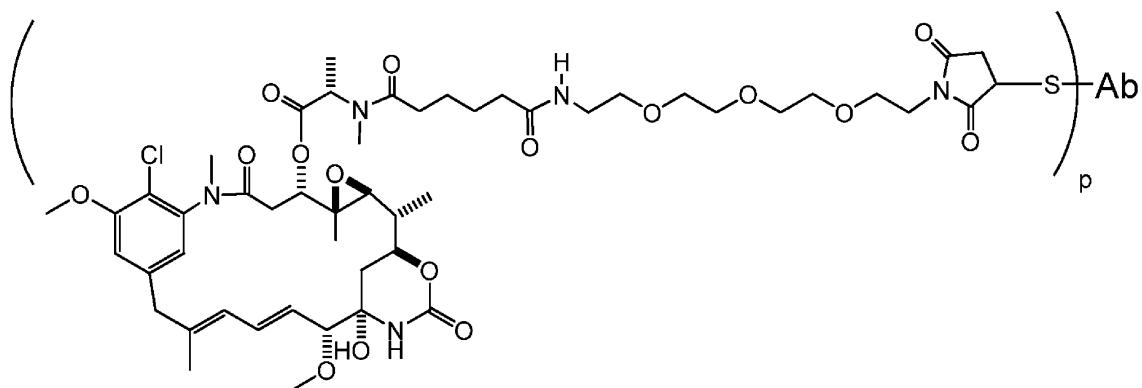
40



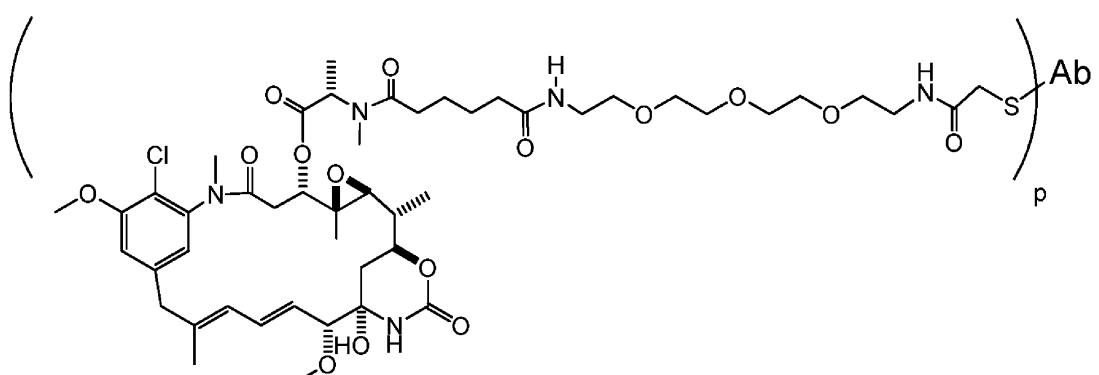
10



20



30



40

から選択される、請求項 10 の抗体 - 薬剤コンジュゲート。

【請求項 1 2】

抗体が、遊離システィンアミノ酸を通してリンカー（L）にコンジュゲートしたシスティン操作抗体（Ab）である、請求項10の抗体・薬剤コンジュゲート。

【請求項 13】

システイン操作抗体の遊離システインアミノ酸が重鎖の A 1 1 8 C (E U 番号付け) である、請求項 1 2 の抗体 - 薬剤コンジュゲート。

【請求項 1 4】

システイン操作抗体の遊離システインアミノ酸が軽鎖の V 2 0 5 C (K a b a t の番号付け) である、請求項 1 2 の抗体 - 薬剤コンジュゲート。

【請求項 1 5】

システイン操作抗体が遊離のシステインアミノ酸及び配列番号 1 - 4 9 から選択される重鎖の配列又は配列番号 5 0 - 9 8 から選択される軽鎖の配列を含み、該配列中のシステインが遊離のシステインアミノ酸である、請求項 1 2 の抗体 - 薬剤コンジュゲート。

【請求項 1 6】

10

システイン操作抗体が

- (i) システイン操作抗体をコードする核酸配列を変異誘発し；
- (i i) システイン操作抗体を発現し；及び
- (i i i) システイン操作抗体を単離し精製すること

を含む工程により調製される請求項 1 2 に記載の抗体 - 薬剤コンジュゲート。

【請求項 1 7】

システイン操作抗体が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、及び F a b 断片から選択される、請求項 1 2 に記載の抗体 - 薬剤コンジュゲート。

【請求項 1 8】

20

システイン操作抗体が親抗体の一以上のアミノ酸残基を一以上の遊離システインアミノ酸と置換することを含む工程により調製され、親抗体が抗原に選択的に結合し、かつシステイン操作抗体が親抗体と同じ抗原に選択的に結合する、請求項 1 2 に記載の抗体 - 薬剤コンジュゲート。

【請求項 1 9】

抗体がレセプター (1) - (5 1) :

(1) B M P R 1 B (骨形成タンパク質レセプタータイプ I B 型) ；

(2) E 1 6 (L A T 1 , S L C 7 A 5) ；

(3) S T E A P 1 (前立腺の 6 回膜貫通型上皮抗原) ；

(4) 0 7 7 2 P (C A 1 2 5 , M U C 1 6) ；

30

(5) M P F (M P F , M S L N , S M R , 巨核球増強因子、メソテリン) ；

(6) N a p i 3 b (N A P I - 3 B , N P T I I b , S L C 3 4 A 2 , 溶質輸送体ファミリー 3 4 (リン酸ナトリウム) , メンバー 2 , I I 型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター 3 b) ；

(7) S e m a 5 b (F L J 1 0 3 7 2 , K I A A 1 4 4 5 , M m . 4 2 0 1 5 , S E M A 5 B , S E M A G , セマフォリン 5 b H 1 o g , セマドメイン (s e m a d o m a i n) , 7 回トロンボスボンジン反復 (1 型及び 1 型様) , 膜貫通ドメイン (T M) および短い細胞質ドメイン , (セマフォリン) 5 B) ；

(8) P S C A h 1 g (2 7 0 0 0 5 0 C 1 2 R i k , C 5 3 0 0 0 8 0 1 6 R i k , R I K E N c D N A 2 7 0 0 0 5 0 C 1 2 , R I K E N c D N A 2 7 0 0 0 5 0 C 1 2 遺伝子) ；

40

(9) E T B R (エンドセリンタイプ B レセプター) ；

(1 0) M S G 7 8 3 (R N F 1 2 4 , 仮想タンパク質 F L J 2 0 3 1 5) ；

(1 1) S T E A P 2 (H G N C _ 8 6 3 9 , I P C A - 1 , P C A N A P 1 , S T A M P 1 , S T E A P 2 , S T M P , 前立腺癌関連遺伝子 1 , 前立腺癌関連タンパク質 1 , 前立腺の 6 回膜貫通型上皮抗原 2 , 6 回膜貫通型前立腺タンパク質) ；

(1 2) T r p M 4 (B R 2 2 4 5 0 , F L J 2 0 0 4 1 , T R P M 4 , T R P M 4 B , 一過性レセプター電位カチオンチャネル , サブファミリー M , メンバー 4) ；

(1 3) C R I P T O (C R , C R 1 , C R G F , C R I P T O , T D G F 1 , 奇形癌腫由来増殖因子) ；

50

- (14) C D 2 1 (C R 2 (補体レセプター 2) 又は C 3 D R (C 3 d / エプスタイン
バーウイルスレセプター) 又は H s . 7 3 7 9 2) ;
- (15) C D 7 9 b (C D 7 9 B , C D 7 9 , I G b (免疫グロブリン関連) , B
2 9) ;
- (16) F c R H 2 (I F G P 4 , I R T A 4 , S P A P 1 A (S H 2 ドメイン含有ホ
スファターゼアンカータンパク質 1 a) , S P A P 1 B , S P A P 1 C) ;
- (17) H E R 2 ;
- (18) N C A ;
- (19) M D P ;
- (20) I L 2 0 R 10
- (21) ブレビカン
- (22) E p h B 2 R ;
- (23) A S L G 6 5 9 ;
- (24) P S C A ;
- (25) G E D A ;
- (26) B A F F - R (B 細胞活性化因子レセプター , B L y S レセプター 3 , B R 3
);
- (27) C D 2 2 (B 細胞レセプター C D 2 2 - B アイソフォーム) ;
- (28) C D 7 9 a (C D 7 9 A , C D 7 9 , 免疫グロブリン関連) ;
- (29) C X C R 5 (バーキットリンパ腫レセプター 1) ; 20
- (30) H L A - D O B (M H C クラス I I 分子のベータサブユニット) ;
- (31) P 2 X 5 (プリンレセプター P 2 X リガンド開口型イオンチャネル 5) ;
- (32) C D 7 2 (B 細胞分化抗原 C D 7 2 , L y b - 2) ;
- (33) L Y 6 4 (リンパ球抗原 6 4 (R P 1 0 5) , ロイシンリッチリピート (L R
R) ファミリーの I 型膜タンパク質) ;
- (34) F c R H 1 (F c レセプター様タンパク質 1) ;
- (35) I R T A 2 (免疫グロブリンスーパーファミリーレセプタートランスロケーシ
ョン関連 2) ;
- (36) T E N B 2 (推定上の膜貫通型プロテオグリカン) ;
- (37) P M E L 1 7 (シルバーホモログ ; S I L V ; D 1 2 S 5 3 E ; P M E L 1 7
; (S I) ; (S I L) ; M E 2 0 ; g p 1 0 0) ; 30
- (38) T M E F F 1 (E G F 様及び 2 つのフォリスタチン様ドメインを有する膜貫通
型タンパク質 1 ; T o m o r e g u l i n - 1 ; H 7 3 6 5 ; C 9 o r f 2 ; C 9 O R F
2 ; U 1 9 8 7 8 ; X 8 3 9 6 1) ;
- (39) G D N F - R a 1 (G D N F ファミリーレセプターアルファ 1 ; G F R A 1 ;
G D N F R ; G D N F R A ; R E T L 1 ; T R N R 1 ; R E T 1 L ; G D N F R - アルフ
ア 1 ; G F R - A L P H A - 1 ; U 9 5 8 4 7 ; B C 0 1 4 9 6 2) ;
- (40) L y 6 E (リンパ球抗原 6 複合体、遺伝子座 E ; L y 6 7 , R I G - E , S C
A - 2 , T S A - 1) ;
- (41) T M E M 4 6 (シサホモログ 2 (アフリカツメガエル) ; S H I S A 2) ; 40
- (42) L y 6 G 6 D (リンパ球抗原 6 複合体、遺伝子座 G 6 D ; L y 6 - D , M E G
T 1) ;
- (43) L G R 5 (ロイシンリッチリピート含有 G タンパク質共役型受容体 5 ; G P R
4 9 , G P R 6 7) ;
- (44) R E T (r e t プロトオンコジーン ; M E N 2 A ; H S C R 1 ; M E N 2 B ;
M T C 1 ; (P T C) ; C D H F 1 2 ; H s . 1 6 8 1 1 4 ; R E T 5 1 ; R E T - E L
E 1) ;
- (45) L Y 6 K (リンパ球抗原 6 複合体、遺伝子座 K ; L Y 6 K ; H S J 0 0 1 3 4
8 ; F L J 3 5 2 2 6) ;
- (46) G P R 1 9 (G タンパク質共役型受容体 1 9 ; M m . 4 7 8 7) ; 50

(47) G P R 54 (K I S S 1 レセプター ; K I S S 1 R ; G P R 54 ; H O T 7 T
175 ; A X O R 12) ;

(48) A S P H D 1 (アスパラギン酸 - ヒドロキシラーゼドメイン含有 1 ; L O C
253982) ;

(49) チロシナーゼ (T Y R ; O C A I A ; O C A 1 A ; チロシナーゼ ; S H E P 3
) ;

(50) T M E M 118 (リングフィンガータンパク質 , 膜貫通型 2 ; R N F T 2 ; F
L J 14627) ; 及び

(51) G P R 172A (G タンパク質共役型受容体 172A ; G P C R 41 ; F L J
11856 ; D 15 E r t d 747e)

の一以上に結合する、請求項 10 に記載の抗体 - 薬剤コンジュゲート。

【請求項 20】

請求項 10 ~ 19 の何れか一項に記載の抗体 - 薬剤コンジュゲート化合物と薬学的に許容される希釈剤、担体又は賦形剤を含む薬学的組成物。

【請求項 21】

化学療法剤の治療的有効量を更に含む、請求項 20 の薬学的組成物。

【請求項 22】

請求項 10 ~ 19 の何れか一項に記載の抗体 - 薬剤コンジュゲート化合物又は請求項 20 の薬学的組成物を含む、癌治療のための医薬。

【請求項 23】

抗体 - 薬剤コンジュゲート化合物と併用して、患者に化学療法剤が投与される、請求項 22 の医薬。

【請求項 24】

哺乳動物の癌の治療のための医薬の製造における、請求項 10 ~ 19 の何れか一項に記載の抗体 - 薬剤コンジュゲート化合物の使用。

【請求項 25】

請求項 10 ~ 19 の何れか一項に記載の抗体 - 薬剤コンジュゲート化合物 ;
容器 ; 及び

パッケージ挿入物又は化合物が癌を治療するために使用することができることを示すラベルを含む製造品。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

関連出願

本出願は、2010年11月17日に出願された米国仮出願第 61 / 414,535 号の利益を主張し、それは参照によりその全体が援用される。

【技術分野】

【0002】

発明の分野

本発明は一般的に、治療又は診断の用途による抗体 - 薬剤コンジュゲートを形成するための、メイタンシノイド薬剤部分にコンジュゲートした抗体に関する。抗体はアラニニルメイタンシノイド薬剤リンカー試薬との結合のための反応性の遊離システインアミノ酸で操作することができる。本発明はまた、哺乳動物細胞、又は関連する病理学的状態のインビトロ、インサイツ、及びインビボでの診断または治療において、アラニニルメイタンシノイド抗体 - 薬剤コンジュゲート化合物を使用する方法にも関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

抗体薬剤複合体 (ADC) は、抗原発現腫瘍細胞に対して強力な細胞傷害性薬剤を標的とし、内部移行、そして薬剤の放出、及びそれによってそれらの抗腫瘍活性を増強するこ

10

20

30

40

50

とにより抗体と細胞傷害性薬剤の両方の理想的な特性を組み合わせた目的とされる化学療法分子である。所与の標的抗原に対するADCの開発の成功は、抗体の選択、リンカーの設計及び安定性、細胞毒性薬の効能及び抗体に対する薬とリンカーの結合様式の最適化に依存する。pHと酸化還元感度およびプロテアーゼ感受性についてのリンカーの特性は、内部移行と細胞毒性薬剤部分の放出に影響を与える。ADCのジスルフィド含有リンカーの細胞内の切断は、エンドソームとリソソームの酸化電位によって制限され、恐らくはエンドサイトシス経路内の還元的開裂によっては放出されない(Austin et al (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(50):17987-17992)。還元開裂は、細胞膜で起こり得、遊離薬剤により腫瘍と影響を受けやすい正常細胞のバイスタンダー殺傷効果を付与する。薬剤の不適切な放出は毒性に寄与する可能性がある。ひとたび内在化すると、ADCの効力は、薬剤活性においてタンパク質分解消化に依存する。リンカーの安定性は、ADCの有効性及び毒性の両方で重要な役割を果たしている(Alley et al (2008) Bioconjugate Chem. 19:759-765)。mccなどの安定したリンカーは、不安定な、ジスルフィドリンカーよりも有効かつ安全であり、治療のウインドウを拡大している。

【0004】

システイン置換(チオMabsとチオFab's)を有する抗体は、システインがコンジュゲーションのために利用可能であるが、免疫グロブリンのフォールディングと会合を乱さないか又はその抗原結合及びエフェクター機能を変化させない部位で操作することができる(Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; 米国特許第7521541号; 米国特許第7723485号; 国際公開第2009/052249号)。これらのチオMabsはその後操作されたシステインチオール基を通して細胞傷害性薬剤に結合させることができ、均一な化学量論(抗体あたり約2薬剤)でチオFab薬剤複合体(TDC)を得る。異なる抗原に対する複数の抗体を用いた研究は、TDCは異種移植モデルにおいて、従来のADCと同じくらい有効であり、関連する前臨床モデルにおいて高用量で許容されることを示している。チオFab薬剤コンジュゲートは、抗体の異なる部分に(軽鎖-Fab、重鎖-Fab及び重鎖-Fc)結合した薬剤により操作されている。TDCのインビトロとインビボの安定性、有効性及びPK特性は、その均質性および細胞毒性薬に対する部位特異的結合に起因して、従来のADCを上回るユニークな利点を提供する。

【0005】

メイタンシノイド、DM1からなり、トラスツズマブに結合した抗体-薬剤複合体(ADCは)、HER2過剰発現トラスツズマブ感受性及び耐性腫瘍細胞株及びヒト癌の異種移植モデルにおいて強力な抗腫瘍活性を示す。トラスツズマブ-mcc-DM1(T-DM1)は、現在、疾患がHER2指向療法に抵抗性である患者における第I相臨床試験で評価を受けている(Beeram et al (2007) "Trastuzumab-mcc-DM1 (T-DM1)の第I試験、HER2+転移性乳癌(BC)の患者におけるファーストインクラスHER2抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)(A phase I study of trastuzumab-mcc-DM1 (T-DM1), a first-in-class HER2 antibody-drug conjugate (ADC), in patients (pts) with HER2+ metastatic breast cancer (BC))", 第43回米国臨床腫瘍学会6月1日(Abs 1042; Kropら, 欧州癌会議ECCO、ポスター2118, 9月23-27日, 2007, バルセロナ; 米国特許第7097840号米国特許第2005/0276812号; 米国特許第2005/0166993号)。

【0006】

メイタンシノイド、有糸分裂阻害薬メイタンシンの誘導体は、ピンカアルカロイド薬と同様に微小管に結合する(Issell BF et al (1978) Cancer Treat. Rev. 5:199-207; Cabanillas F et al. (1979) Cancer Treat Rep, 63:507-9)。メイタンシノイド、DM1からなり、トラスツズマブに結合した抗体-薬剤複合体(ADCは)、HER2過剰発現トラスツズマブ感受性及びトラスツズマブ耐性腫瘍細胞株及びヒト乳癌の異種移植モデルにおいて強力な抗腫瘍活性を示す。mccリンカーを介して抗HER2マウス乳癌抗体TA.1に結合したメイタンシノイドのコンジュゲートは、ジスルフィドリンカーを有する対応

10

20

30

40

50

するコンジュゲートより200倍弱かった(Chari et al (1992) *Cancer Res.* 127-133)。メイタンシノイド、DM1からなり、トラスツズマブに結合した抗体-薬剤複合体(ADCは)、HER2過剰発現トラスツズマブ感受性及び耐性腫瘍細胞株及びヒト癌の異種移植モデルにおいて強力な抗腫瘍活性を示す。

【0007】

トラスツズマブ-mcc-DM1(トラスツズマブエムタンシン(emtansine)、トラスツズマブ-DM1; T-DM1; PRO132365)は、特にHER2陽性乳癌の治療のために設計された新規な抗体-薬剤複合体(ADC)であり、薬剤対抗体の比が約3.4:1で、リジン側鎖を介してトラスツズマブに結合した(米国特許第6407213号)、細胞傷害性薬剤DM1(チオール含有メイタンシノイド微小管阻害薬剤)からなる。T-DM1は、HER2+転移性乳癌の治療のために開発されている(Beeram M, Burris H, Modi S et al. (2008) *J Clin Oncol* 26: May 20 付録; 要旨 1028)。T-DM1は、トラスツズマブと同様の親和性でHER2と結合する。そのような結合は、T-DM1抗腫瘍活性に必要である(ハーセプチニ(HERCEPTIN)(登録商標)治験薬概要書、ジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニア州、2007年7月)。HER2に結合した後、T-DM1は、レセプター媒介性の内部移行を受け、DM1の細胞内放出およびその後の細胞死をもたらすと仮説がたてられている(Austin CD, De Maziere AM, Pisacane PI, et al. (2004) *Mol Biol Cell* 15(12):5268-5282)。

【0008】

様々なリンカーを持つトラスツズマブ-メイタンシノイドADCを、インビトロとインビオでの有効性、薬物動態および前臨床試験における毒性について試験した(Phillips et al (2008) *Cancer Res.* 68(22):9280-9290)。非還元チオエーテル結合(mcc)を通してDM1に結合したトラスツズマブは、非結合トラスツズマブ又はジスルフィドリンカーを通して他のメイタンシノイドに結合したトラスツズマブに比べて優れた活性を示した。非還元性リンカーを通してDM1に結合したトラスツズマブは、評価された還元ジスルフィドリンカー以上に有効性と薬物動態の改善及び毒性の減少を提示するため、トラスツズマブ-mcc-DM1が臨床開発のために選択された。

【0009】

DM1は、天然に存在するエステルアンサマイトシンP3から派生したチオール含有メイタンシノイドである(Remillard S, Rebhun LI, Howie GA, et al. (1975) *Science* 189(4207):1002-1005.3; Cassady JM, Chan KK, Floss HG. (2004) *Chem Pharm Bull* 52(1):1-26.4)。関連する植物エステル、メイタンシンは、約800人の患者において、3週間ごとに、単一用量として又は3日間連続して2.0mg/m²の用量で投与され、化学療法剤として研究されてきた(Issell BF, Crooke ST. (1978) *Cancer Treat Rev* 5:199-207)。非臨床的活性にもかかわらず、クリニックにおけるメイタンシンの活性は安全に送達される用量で控えめであった。用量制限毒性(DLT)は、吐き気、嘔吐、下痢(しばしば便秘が続く)からなる消化管のものだった。これらの毒性は用量依存性であってスケジュール依存性ではなかった。末梢神経障害(主に感覚)が報告され、既存の神経障害を持つ患者で最も顕著であった。肝トランスマニナーゼ、アルカリフィオスファターゼ、総ビリルビンの無症状の一時的な上昇が報告された。脱力感、倦怠感、不快、及び不眠を含む体質的な毒性が一般的であった。あまり一般的でない毒性として注入部位の静脈炎と軽度の骨髄抑制を含んでいた。薬剤の更なる開発は、狭い治療濃度域のために、1980年代に放棄された。

【0010】

これまでの臨床結果は、T-DM1は、HER2指向療法を受けながらも進行したHER2陽性MBC患者に利益をもたらすことを示唆している。トラスツズマブ-mcc-DM1(T-DM1)は、疾患がHER2指向療法に抵抗性である患者での第II相臨床試験において現在評価を受けている(Beeram et al (2007) “トラスツズマブ-MCC-DM1(T-DM1)の第I試験、HER2+転移性乳癌(BC)の患者におけるファーストインクラスHER2抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)(A phase I study of trastuzumab-mcc-DM1 in HER2+ metastatic breast cancer)”。)

zumab-mcc-DM1 (T-DM1), a first-in-class HER2 antibody-drug conjugate (ADC), in patients (pts) with HER2+ metastatic breast cancer (BC))” , 第43回米国臨床腫瘍学会6月1日(Abs 1042; Kropら, 欧州癌会議ECCO、ポスター2118, 9月23-27日, 2007, バルセロナ; 米国特許第7097840号; 米国特許第2005/0276812号; 米国特許第2005/0166993号)。

【0011】

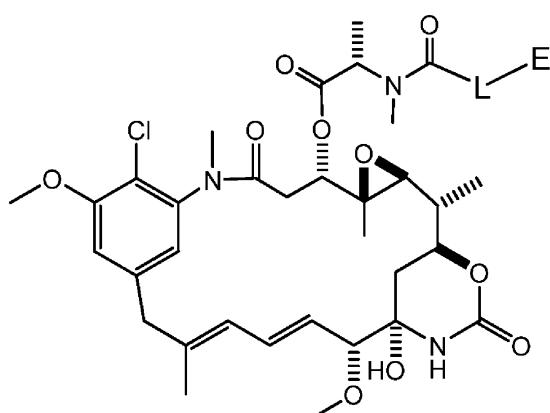
抗体-薬剤コンジュゲートの最適なリンカー部分は全身循環において安定であるが標的部位での効率的な薬剤放出を可能にする(Alley et al (2008) *Bioconjugate Chem.* 19:759-765; Christie et al (2010) *Bioconjugate Chem.* 21:1779-1787; 米国特許出願公開第2008/0299668号)。マレイミド結合ADCは、チオールの逆マイケル付加を受けて、標的レセプター結合の前に薬剤を放出することができる(Alley et al (2008) *Bioconjugate Chem.* 19:759-765)。TMAb-mcc-DM1及びチオ-TMAb-mpeo-DM1抗体コンジュゲートは両方とも、mcc-マレイミド又はmpro-マレイミドにDM1のチオール基を結合するリンカー中にマレイミドを有する米国特許第7097840号; 米国特許出願公開第2005/0276812号; 米国特許出願公開第2005/0166993号)。抗体のシステインチオールがラット及びマウス血漿とマレイミド基を通して連結されている抗体-薬剤コンジュゲートのインキュベーションにより、アルブミン-薬剤コンジュゲートを形成し、マレイミド薬剤コンジュゲートを放出するチオールの逆マイケル付加及びアルブミンシステインチオールによる付加と一致する(Alley et al (2008) *Bioconjugate Chem.* 19:759-765)。類似した方法で、ADCの薬剤部分DM1のチオールの逆マイケル付加は、抗体からの薬剤の消失、及びアルブミン抗体、システイン抗体又はグルタチオン-抗体付加体の形成をもたらすことができる。チオマレイミド結合のこの切断の不安定性は、投与したADCの効力を低下させる。メイタンシンに結合したマレイミド基を持たない新しいリンカーは、標的と結合する前の血漿中において、逆マイケル付加又は他のメカニズムによって非特異的メイタンシン薬剤の喪失を防ぎ得る。

【発明の概要】

【0012】

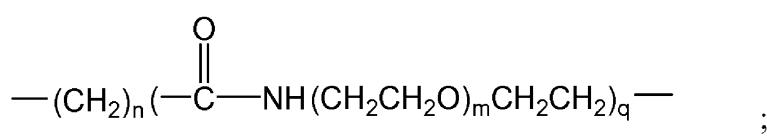
概要

本発明の一態様は、抗体-薬剤コンジュゲートを形成するために、抗体へのコンジュゲーション用に式Iの新規リンカ-薬剤化合物を提供することである。



ここで：

Lは、



10

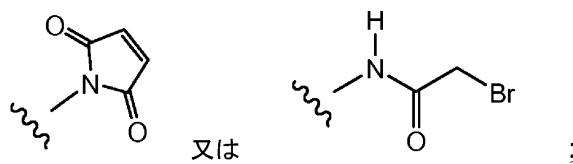
20

30

40

50

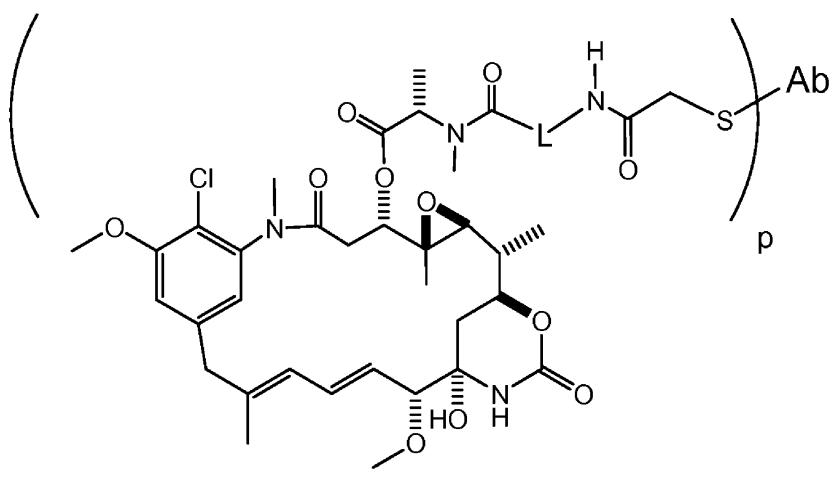
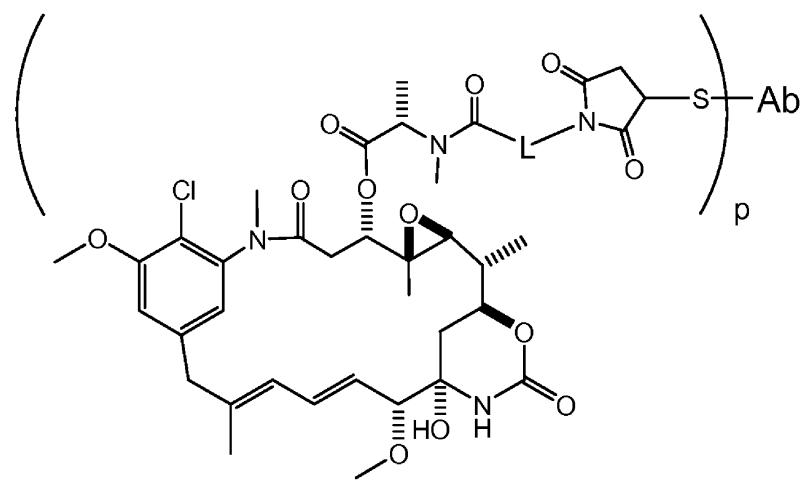
E は、



【 0 0 1 3 】

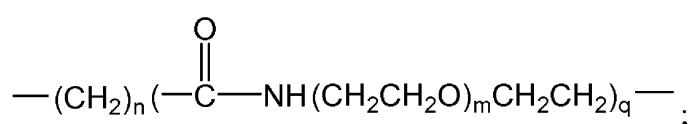
n は 2、3、4、5、又は 6；m は 2、3 又は 4；および q は 0 又は 1。

本発明の一態様は、式 I のリンカー-薬剤化合物から調製された式 I a 及び I b の新規抗体 - 薬剤コンジュゲートを提供することである。 10



ここで：

L は、



m は 2、3、4、5 または 6；m は 2、3、又は 4；q は 0 又は 1；p は 1 から 4 であり、Ab は抗体である。 50

【0014】

抗体は、遊離システインアミノ酸を通してリンカーレジオヌクレオチドにコンジュゲートしたシステイン操作抗体（Ab）であってもよい。

【0015】

本発明の一態様は、式Ia又はIbの抗体-薬剤コンジュゲート及び薬学的に許容される希釈剤、担体又は賦形剤を含む薬学的組成物である。

【0016】

本発明の一態様は、患者に対して、式Ia又はIbの抗体-薬剤コンジュゲートを含む薬学的組成物を含む、癌の治療方法である。

【0017】

本発明の一態様は、哺乳動物における、癌の治療のための医薬の製造における、式Ia又はIbの抗体-薬剤コンジュゲートの使用である。

10

【0018】

本発明の一態様は、式Ia又はIbの抗体-薬剤コンジュゲート；容器；パッケージ挿入物又は化合物が癌を治療するために使用することができることを示すラベルを含む製造品である。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1a】図1aは、薬剤-リンカーレジオヌクレオチド、mal-hex-alanine-May 5の合成を示す。

20

【図1b】図1bは、薬剤中間体、3-(S-(N-メチルアラニニル)メイタンシノール4aの合成を示す。

【図2】図2は、薬剤-リンカーレジオヌクレオチド、bra-hex-alanine-May 8の合成を示す。

【図3】図3は、薬剤-リンカーレジオヌクレオチド、mal-PEG3-alanine-May 14の合成を示す。

【図4】図4は、薬剤-リンカーレジオヌクレオチド、bra-PEG3-alanine-May 18の合成を示す。

【図5】図5aおよび図5bは、(1)ビヒクル(ADCバッファー)，(2)LC-V205C-チオ-TMAb-mpeo-DM1，(3)LC-V205C-チオ-TMAb-mal-PEG3-alanine-May，(4)HC-A118C-チオ-TMAb-mal-PEG3-alanine-May，(5)LC-V205Cチオ-TMAb-mal-hex-alanine-May，(6)TMAb-mcc-DM1(trastuzumab-mcc-DM1，T-DM1)，(7)LC-V205C-チオ抗gD5B6-mal-PEG3-alanine-May，(8)LC-V205C-チオ抗gD5B6-mal-hex-alanine-May(実施例6、8)を投与後に、CRLのnu/nuマウスの乳腺脂肪体に播種したMMTV-HER2 F05トランスジェニック乳腺腫瘍において、時間に對してフィットさせた腫瘍体積変化のプロットを示す。全ての抗体-薬剤コンジュゲート(単一用量)を10mg/kgで静脈内投与した。抗gD5B6はコントロール抗体であり、それに対応する抗原はF05腫瘍組織では発現しない。

30

【図6】図6は、(1)ビヒクル：ヒスチジンバッファー#8:20mMのヒスチジン酢酸，pH5.5，240mMスクロース，0.02%PS20，(4)HC-A118C-チオ-TMAb-mal-PEG3-alanine-May，5mg/kg，(4)HC-A118C-チオ-TMAb-mal-PEG3-alanine-May，10mg/kg，(10)HC-A118Cチオ抗gD5B6-bra-PEG3-alanine-May，5mg/kg，(10)HC-A118Cチオ抗gD5B6-bra-PEG3-alanine-May，10mg/kg，(11)HC-A118Cチオ抗gD5B6-bra-PEG3-alanine-May，5mg/kg，(11)HC-A118Cチオ抗gD5B6-bra-PEG3-alanine-May，10mg/kg，(12)HC-A118C，LC-V205Cチオ-TMAb-mal-PEG3-alanine-May，5gm/kg，(12)H

40

50

C - A 1 1 8 C , L C - V 2 0 5 C チオ - T M A b - m a l - P E G 3 - a l a - M a y , 1 0 g m / k g を投与後に、C R L の n u / n u マウスの乳腺脂肪体に播種した M M T V - H E R 2 F o 5 トランスジェニック乳腺腫瘍において、時間に対してフィットさせた腫瘍体積変化のプロットを示す。全ての抗体 - 薬剤コンジュゲート（単一用量）は、研究の開始時に 1 回静脈内投与された。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 0 】

典型的実施態様の詳細な説明

本発明の特定の実施態様に対して詳細に述べ、その例は、付随する構造と式に示される。本発明は説明される実施態様と併せて説明されるが、それらの実施態様に本発明を限定するものではないことが理解されるであろう。一方、本発明は、特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内に含まれ得る全ての代替、改変、および均等物を包含することを意図している。

10

【 0 0 2 1 】

当業者は、本発明の実施において使用され得る本明細書に記載のものに類似するか又は等価な多くの方法および材料を認識するであろう。本発明は、説明される方法と材料に決して限定されない。

【 0 0 2 2 】

別に規定されない限り、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるように、本明細書で使用される技術用語および科学用語は同じ意味を持ち、Singleton et al (1994) *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, NY; and Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York と一致する。

20

【 0 0 2 3 】

定義

特に明記しない限り、本明細書で使用する以下の用語と語句は、以下の意味を有することが意図される。

【 0 0 2 4 】

商品名が本明細書で使用されるとき、出願人は、商品名製品の製剤、ジェネリック医薬品、及び商品名製品の活性薬学的成分を独立に包含することを意図する。

30

【 0 0 2 5 】

用語「抗体」は本明細書において最も広範な意味で使用され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二量体、多量体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、およびそれらが所望の生物学的活性を示すものであれば、抗体断片を特に網羅する。抗体は、マウス、ヒト、ヒト、キメラ、又は他の種に由来し得る。抗体は、特異的抗原を認識し結合することができる免疫系によって産生されるタンパク質である。（Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York）。標的抗原は、複数の抗体の C D R によって認識され、エピトープとも呼ばれる多数の結合部位を一般的に有している。異なるエピトープに特異的に結合する抗体の各々は異なる構造を有している。従って、一つの抗原は、複数の対応する抗体を有し得る。抗体は、完全長の免疫グロブリン分子又は完全長免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、即ち、目的の標的の抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子又はその部分を含み、そのような標的は、限定されないが、癌細胞又は自己免疫疾患に関連する自己免疫抗体を産生する細胞を含む。本明細書に開示される免疫グロブリンは、任意のタイプ（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D 及び I g A）、クラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I G A 1 及び I g A 2）又は免疫グロブリン分子のサブクラスとすることができます。免疫グロブリンは任意の種に由来することができる。しかしながら、一態様では、免疫グロブリンは、ヒト、マウス、又はウサギ起源のものである。

40

【 0 0 2 6 】

50

「抗体断片」は、完全長抗体の一部、一般にはその抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、F_ab、F_ab'、F(a b')2、及びF_v断片；ダイアボディ、線形抗体；ミニボディー(Olafsen et al (2004) *Protein Eng. Design & Sel.* 17(4):315-323)、F_ab発現ライプラリーによって生成された断片、抗イディオタイプ(抗IgD)抗体、CDR(相補性決定領域)、及び癌細胞抗原、ウイルス抗原または微生物抗原に免疫特異的に結合する上記の何れかのエピトープ結合断片、单鎖抗体分子；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体を含む。

【0027】

本明細書中で用いる用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわちこの集団を含む個々の抗体は、微量で存在し得る天然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であって、単一の抗原部位に対するものである。更に、典型的には、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含む、ポリクローナル抗体製剤とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して指向される。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらが、他の免疫グロブリンにより汚染されずに合成される点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られる抗体の特徴を示し、いずれかの特定の方法による抗体の生産を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って用いるべきモノクローナル抗体は、Kohler et al (1975) *Nature*, 256:495によって最初に記載されたハイブリドーマ方法によって作成されてもよく、あるいは組換えDNA方法によって作成されてもよい(例えば、米国特許第4816567号；米国特許第5807715号を参照)。「モ「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson et al (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks et al (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597記載された技術を用いてファージ抗体ライプラリーから単離してもよい。

【0028】

本明細書中のモノクローナル抗体は、具体的には、重鎖及び/又は軽鎖の一部分が特定の種に由来する又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一又は相同であるが、その(それらの)鎖の残部は別の種に由来する又は別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一又は相同である「キメラ」抗体、並びにそのような抗体の断片を、それらが望ましい生物学的活性を示す限り、包含し得る(米国特許第4816567号；及びMorrison et al (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855)。本明細書における対象のキメラ抗体には、非ヒト靈長類(例えば旧世界ザル、類人猿など)及びヒト定常領域配列に由来する可変ドメイン抗原結合配列を含む靈長類化抗体が含まれる。

【0029】

本明細書において「インタクトな抗体」とは、VL及びVHドメイン、並びに軽鎖定常ドメイン(CL)及び重鎖定常ドメイン、CH1、CH2、及びCH3を含む、抗体である。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそのアミノ酸配列変異体であり得る。インタクトな抗体は、抗体のFc定常領域(天然型配列Fc領域またはアミノ酸配列変異体Fc領域)に起因し得る生物学的活性を指す、1つ以上の「エフェクター機能」を有し得る。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合；補体依存性細胞傷害；Fcレセプター結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)；ファゴサイトーシス；及び細胞表面レセプター、例えば、B細胞レセプター及びBCRなどのダウンレギュレーションが挙げられる。

【0030】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、インタクトな抗体は、異なる「クラス」に割り当てることができる。インタクトな免疫グロブリン抗体の5つの主要なクラスがあり：IgA, IgD, IgE, IgG, 及びIgM；これらのうちのいくつかは、「サブクラス」(アイソタイプ)(例えば、IgG1, IgG2, IgG3, IgG4、IgA、及びIgA2)へとさらに分割され得る。種々のクラスの抗体に対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 及び μ と呼ばれる。種々のクラスの免疫グ

10

20

30

40

50

ロブリンのサブユニット構造及び3次元構造は、周知である。Ig形態はヒンジの修飾又はヒンジ欠損形態を含む(Roux et al (1998) J. Immunol. 161:4083-4090; Lund et al (2000) Eur. J. Biochem. 267:7246-7256; 米国特許出願公開第2005/0048572号; 米国特許出願公開第2004/0229310号)。

【0031】

「遊離システインアミノ酸」は、親抗体で操作され、チオール官能基(-SH)を有し、分子内または分子間ジスルフィド架橋として対応されないシステインアミノ酸残基を指す。

【0032】

「チオール反応性値」という用語は、遊離システインアミノ酸の反応性の定量的特性評価である。チオール反応性値は、チオール反応性試薬と反応するシステイン操作された抗体中の遊離システインアミノ酸のパーセンテージであり、最大値1に換算される。例えば、チオール反応性試薬、例えばビオチン-マレイミド試薬と収率100%で反応してビオチン標識化抗体を生成するシステイン操作された抗体上の遊離システインアミノ酸は、1.0というチオール反応性値を有する。チオール反応性試薬と収率80%で反応する同一の又は異なる親抗体にて操作される別のシステインアミノ酸は、0.8のチオール反応性値を有する。チオール反応性試薬と全く反応できない同一の又は異なる親抗体にて操作される別のシステインアミノ酸は、チオール反応性値は0である。特定のシステインのチオール反応性値の決定は、ELISAアッセイ、質量分析、液体クロマトグラフィー、オートラジオグラフィーまたは他の定量的分析試験により実行され得る。

10

20

【0033】

「親抗体」は、1つ以上のアミノ酸残基が1つ以上のシステイン残基に置換されるアミノ酸配列を含む抗体である。親抗体は、天然型または野生型配列を含み得る。親抗体は、他の天然型、野生型または修飾形態の抗体に比して、先在アミノ酸配列修飾(例えば、付加、欠失および/または置換)を有し得る。親抗体は、目的の標的抗原、例えば生物学的に重要なポリペプチドを指向する。非ポリペプチド抗原(例えば、腫瘍関連糖脂質抗原; 米国特許第5091178号参照)に対して向けられる抗体も意図される。

【0034】

典型的な親抗体は、細胞表面および膜貫通受容体、ならびに腫瘍関連抗原(TAA)について親和性と選択制を有する抗体を含む。

30

【0035】

「ファージディスプレイ」は、変異体ポリペプチドをファージ、例えば纖維状ファージ、粒子の表面においてコートタンパク質に対する融合タンパク質として提示する手法である。ファージディスプレイ法の一つの有用性は、ランダム化されたタンパク質変異体の大規模なライブラリーを、高親和性で標的分子に結合するそれらの配列について迅速かつ効率的にソートすることができるという事実にある。ファージ上のペプチド及びタンパク質ライブラリーの提示は、何百万ものポリペプチドから特異的結合特性を持つものをスクリーニングするために利用してきた。多価ファージディスプレイ方法は、典型的には纖維状ファージのpIII又はpVIIIとの融合体を通して小さなランダムペプチド及び小タンパク質を提示するために利用してきた(Wellis及びLowman (1992) Curr. Opin. Struct. Biol., 3: 355-362とその中の引用文献)。一価のファージディスプレイでは、タンパク質又はペプチドのライブラリーがファージコートタンパク質又はその一部に融合され、野生型タンパク質の存在下で低レベルで発現される。アビディティーエフェクトは多価のファージと比較して低下しているので、選別は内在性のリガンド親和性に基づいており、ファージミドベクターが使われるが、このベクターはDNA操作を単純化する。Lowman及びWellis (1991) Methods: A companion to Methods in Enzymology 3:205-0216。ファージディスプレイは抗体様分子を產生するための技術を含む(Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, p 627-628; Lee et al.)。

40

【0036】

50

「ファージミド」は、細菌の複製起点、例えば C o 1 E 1 及びバクテリオファージの遺伝子間領域のコピーを有するプラスミドベクターである。ファージミドは、纖維状バクテリオファージ及びラムドイルドバクテリオファージを含む、任意の既知のバクテリオファージで使用できる。プラスミドは、一般に、抗生物質耐性の選択マーカーも含む。これらのベクターにクローニングされた D N A のセグメントは、プラスミドとして増殖することができる。これらのベクターを備える細胞がファージ粒子の生産のために必要なすべての遺伝子を備えているとき、プラスミドの複製様式はローリングサークル複製に変化し、プラスミド D N A の 1 つの鎖のコピーとパッケージファージ粒子を生成する。ファージミドは感染性又は非感染性ファージ粒子を形成しうる。この用語は、異種ポリペプチドがファージ粒子の表面で提示されるように遺伝子融合体として異種ポリペプチド遺伝子と結合したファージコートタンパク質遺伝子又はその断片を含むファージミドを含む。

【 0 0 3 7 】

「リンカー」、「リンカーユニット」又は「連結 (l i n k) 」は、抗体を薬剤部分に共有結合させる原子鎖を含む。様々な実施態様において、リンカーは 2 倍のラジカルであり、L として特定される。

【 0 0 3 8 】

本明細書中で使用される立体化学的な規定および規約は、一般に、S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 及び Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York に従う。多くの有機化合物が、光学活性形態で存在し、すなわち、これらは、平面偏光の平面を回転する能力を有する。光学的に活性な化合物の記載において、接頭語の D 及び L、又は R 及び S は、そのキラル中心に関する分子の絶対配置を表示するために使用される。接頭語 d 及び l 又は (+) 及び (-) は、化合物による平面偏光の回転の符号を表し、(-) 又は l は、この化合物が左旋性であることを意味する。 (+) 又は d の接頭語を持つ化合物は、右旋性である。所定の化学構造について、これらの立体異性体は、互いに鏡像対称であることを除いて同一である。特定の立体異性体はまた、エナンチオマーと呼ばれ、そのような異性体の混合物は、しばしばエナンチオマー混合物と呼ばれる。エナンチオマーの 50 : 50 混合物は、ラセミ混合物もしくはラセミ体と呼ばれ、これは、化学反応もしくはプロセスにおいて立体選択性もしくは立体特異性が存在しない場合に生じ得る。「ラセミ混合物」および「ラセミ体」なる用語は、光学活性を有さない、2 つのエナンチオマー種の等モル濃度の混合物をいう。

【 0 0 3 9 】

「薬学的に受容可能な塩」なる語句は、本明細書中で使用される場合、抗体 - 薬剤コンジュゲート (A D C) の薬学的に受容可能な有機もしくは無機の塩をいう。典型的な塩としては、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、酸性酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチシン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、サッカリン酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩、およびパモ酸塩 (p a m o a t e) (すなわち、1 , 1 ' - メチレン - ビス - (2 - ヒドロキシ - 3 - ナフトエート)) が挙げられるが、これらに限定されない。薬学的に受容可能な塩は、酢酸イオン、コハク酸イオンもしくは他の対イオンのような別の分子の包含を含み得る。対イオンは、親化合物上の電荷を安定化させる任意の有機部分もしくは無機部分であり得る。さらに、薬学的に受容可能な塩は、1 つより多くの荷電した原子をその構造内に有し得る。多数の荷電した原子がその薬学的に受容可能な塩の一部分である場合、多数の対イオンを有し得る。したがって、薬学的に受容可能な塩は、1 以上の荷電した原子及び / 又は 1 以上の対イオンを有し得る。

【 0 0 4 0 】

以下の略称が、本明細書中で使用され、指定された定義を有する： B M E は - メルカ

10

20

30

40

50

プトエタノール、B o c はN - (t - プトキシカルボニル)、c i t はシトルリン(2 - アミノ - 5 - ウレイドペントン酸)、d a p はドラプロイン(d o l a p r o i n e)、D C C は1 , 3 - ジシクロヘキシカルボジイミド、D C M はジクロロメタン、D E A はジエチルアミン、D E A D はジエチルアゾジカルボキシレート、D E P C はジエチルホスホリルシアニデート、D I A D はジイソプロピルアゾジカルボキシレート、D I E A はN , N - デイソプロピルエチルアミン、d i l はドライソロイシン(d o l a i s o l e u c i n e)、D M A はジメチルアセトアミド、D M A P は4 - ジメチルアミノピリジン、D M E はエチレングリコールジメチルエーテル(もしくは1 , 2 - ジメトキシエタン)、D M F はN , N - ジメチルホルムアミド、D M S O はジメチルスルホキシド、d o e はドラフェニン(d o l a p h e n i n e)、d o v はN , N - ジメチルバリン、D T N B は5 , 5 ' - デチオビス(2 - ニトロ安息香酸)、D T P A はジエチレントリアミンペント酸、D T T はジチオトレイトール、E D C I は1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩、E E D Q は2 - エトキシ - 1 - エトキシカルボニル - 1 , 2 - デヒドロキノリン、E S - M S はエレクトロスプレー質量分析、E t O A c は酢酸エチル、F m o c はN - (9 - フルオレニルメトキシカルボニル)、g l y はグリシン、H A T U はO - (7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル) - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、H O B t は1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール、H P L C は高速液体クロマトグラフィー、i l e はイソロイシン、l y s はリジン、M e C N (C H 3 C N) はアセトニトリル、M e O H はメタノール、M t r は4 - アニシリジフェニルメチル(もしくは4 - メトキシトリチル)、n o r は(1 S , 2 R) - (+) - ノルエフェドリン、P A B はp - アミノベンジルカルバモイル、P B S はリン酸緩衝化生理食塩水(p H 7)、P E G はポリエチレングリコール、P h はフェニル、P n p はp - ニトロフェニル、M C は6 - マレイミドカプロイル、p h e はL - フェニルアラニン、P y B r o p はプロモトリ - ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、S E C はサイズ排除クロマトグラフィー、S u はスクシンイミド、T F A はトリフルオロ酢酸、T L C は薄層クロマトグラフィー、U V は紫外線、およびv a l はバリン。

【0041】

システィン操作抗体

本発明の化合物は、野生型抗体又は親抗体の一以上のアミノ酸が、システィンアミノ酸と置換される、システィン操作抗体を含む。抗体の任意の形態は、そのように操作、即ち変異導入されうる。例えば、親F a b 抗体断片は、システィン操作F a b を形成するように操作され得、本明細書中で「チオF a b (チオF a b)」と呼ばれる。同様に、親モノクローナル抗体は、「チオM a b (チオM a b)」を形成するように操作され得る。一部位変異は、チオF a b において1つの操作システィン残基を生じ、一方、I g G 抗体のダイマーの性質に起因して、一部位変異は、チオM a b において2つの操作システィン残基を生じる。置換された(「操作された」)システィン(C y s)残基を有する変異体は、新規に導入された操作チオール基の反応性について評価される。チオール反応性値は、0から1 . 0 の範囲の相対的な数値の項であり、任意のシスティン操作抗体について測定され得る。本発明のシスティン操作抗体のチオール反応性値は、0 . 6 ~ 1 . 0 ; 0 . 7 ~ 1 . 0 ; 又は0 . 8 ~ 1 . 0 の範囲内である。

【0042】

本発明の設計方法、選択方法および調製方法は、求電子性官能基と反応性であるシスティン操作抗体を可能とする。これらの方法は、さらに、指定され、設計された、選択的部位にジルコニウム原子を有する抗体ジルコニウムコンジュゲート(A Z C)化合物などの抗体コンジュゲート化合物を可能にする。抗体表面上の反応性システィン残基は、マレイミド又はハロアセチルなどのチオール反応性基を通してジルコニウム部分を特異的にコンジュゲートすることを可能とする。C y s 残基のチオール機能のマレイミド基に対する求核反応性は、タンパク質内の他のアミノ酸の機能性、例えばリジン残基のアミノ基又はN末端アミノ基などに比べ約1000倍高い。ヨードアセチル試薬及びマレイミド試薬のチオール固有の機能性によりアミン基と反応し得るが、より高いp H (> 9 . 0)及びより

長い反応時間を要する(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。

【0043】

本発明のシステイン操作抗体は、好ましくは、野生型、親抗体のカウンターパートの抗原結合能力を保持する。従って、システイン操作抗体は、好ましくは特異的には、抗原に結合することが可能である。そのような抗原としては、例えば、腫瘍関連抗原(TAA)、細胞表面レセプタータンパク質及び他の細胞表面分子、膜貫通タンパク質、シグナル伝達タンパク質、細胞生存調節因子、細胞増殖調節因子、組織発達又は分化関連付けられている分子(例えば、既知であるか又は機能性に寄与すると疑われるもの)、リンホカイン、サイトカイン、細胞周期の調節に関与する分子、脈管形成に関する分子、及び血管新生に関連付けられている分子(例えば、既知であるか又は機能性に寄与すると疑われるもの)を含む。腫瘍関連抗原は、クラスター分化因子(すなわちCDタンパク質)である可能性がある。システイン操作抗体が結合することができる抗原は、上記のカテゴリのいずれかのサブセットのメンバーであり得、前記カテゴリの他のサブセットは(対象の抗原に関して)異なる特性を持つ他の分子/抗原を含む。

【0044】

親抗体は、米国特許第5821337号の表3に記載されるhuMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7及びhuMAb4D5-8(トラスツズマブ、ハーセプチニン(HERCEPTIN)(登録商標))から選択されるヒト化抗体であってもよく、本明細書に記述されるヒト化520C9抗体(国際公開第93/21319号)及びヒト化2C4抗体が参照により本明細書に明確に援用される。

【0045】

本発明のシステイン操作抗体は、部位特異的かつ効率的にチオール反応性試薬と結合させることができる。チオール反応性試薬は、多機能リンカー試薬、キャプチャ、すなわち親和性、標識試薬(例えば、ビオチン-リンカー試薬)、検出標識(例えば、フルオロフオア試薬)、固相固定化試薬(例えばSEPHAROSETM、ポリスチレン、又はガラス)、又はジルコニウムリンカー中間体であり得る。チオール反応性試薬の一例はN-エチルマレイミド(NEM)である。典型的な実施態様において、チオFabのビオチンリンカー試薬との反応は、ビオチン標識化チオFabを与え、それによって操作されたシステイン残基が検出され測定され得る。チオFabの多機能性リンカー試薬との反応は多機能性リンカー付きのチオFabを与え、それにより更にジルコニウム成分又は別の標識と反応され得る。チオFabのジルコニウムリンカー中間体との反応はチオFabジルコニウムコンジュゲートを与える。

【0046】

ここで記載される典型的な方法は一般に抗体の同定及び產生に適用され得、より一般的には本明細書に記載された設計及びスクリーニング工程の適用を通じて別のタンパク質に適用され得る。

【0047】

このようなアプローチは、反応基が、例えば、マレイミド、ヨードアセトアミド、ビリジルジスルフィド、又は他のチオール反応性結合パートナーである、他のチオール反応性剤の結合に適用され得る(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671)。パートナーは、細胞毒性剤(例えば、ドキソルビシン又は百日咳毒素などの毒素)、フルオレセイン様又はローダミン様蛍光色素などのフルオロフオア、イメージング又は放射線治療の金属のためのキレート剤、ペプチジル又は非ペプチジル標識又は検出タグ、又はポリエチレングリコールの様々なアイソフォームなどのクリアランス修飾剤、第3の成分に結

10

20

30

40

50

合するペプチド、又はその他の炭水化物又は親油性剤であり得る。

【0048】

典型的な抗体断片である hu4D5Fabv8 で同定された部位は、ここでは主に抗体の定常ドメインにあり、抗体の全ての種にわたって保存されている。これらの部位は、さらに特定の抗体の構造の構造設計及び知識を必要とせずに、かつ抗体の可変ドメインに固有の抗原結合特性の干渉することなく、他の抗体に広く適用可能であるべきである。

【0049】

癌の治療に有用なシステイン操作抗体は、限定されないが、細胞表面レセプター及び腫瘍関連抗原 (TAA) に対する抗体を含む。そのような抗体は、(標識成分に結合していない) ネイキッド抗体、又は式 I の抗体 - 薬剤コンジュゲート (ADC) として使用することができる。腫瘍関連抗原は、当技術分野で知られており、当該技術分野で周知の方法及び情報を使用して、抗体を生成する際に使用するために調製することができる。癌の診断及び治療のための効果的な細胞標的を発見する試みにおいて、研究者は、一つ以上の正常な非癌細胞上に比べて癌細胞の一つ以上の特定の型の表面上に特異的に発現された膜貫通ポリペプチド又はそうでなければ腫瘍関連ポリペプチドを同定しようとしてきた。しばしば、そのような腫瘍関連ポリペプチドは、非癌細胞の表面上に比べてより豊富に癌細胞の表面に発現している。そのような腫瘍関連細胞表面の抗原ポリペプチドの同定は、抗体ベースの治療を経由して破壊するために癌細胞を特異的に標的とする能力を生じさせてきた。

【0050】

腫瘍関連抗原 TAA の例は、限定されないが、下にリストされた TAA (1) - (51) を含む。便宜上、これらの抗原に関連する情報で当該技術分野で知られているすべては以下にリストされ、国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の核酸及びタンパク質の配列同定規則に従い、名前、代替名、Genbank 受託番号及び主要参照文献を含む。TAA (1) - (51) に対応する核酸とタンパク質配列は、GenBank などの公共のデータベースで利用可能である。抗体により標的とされる腫瘍関連抗原は引用文献で同定された配列に対して少なくとも約 70%、80%、85%、90%、又は 95% の配列同一性を含むか、又は引用文献に記載の配列を有する TAA として、実質的に同一な生物学的特性又は特徴を示す全てのアミノ酸配列変異体及びアイソフォームを含む。たとえば、変異体配列を有する TAA は、一般に、リストされた対応する配列を持つ TAA に特異的に結合する抗体に特異的に結合することができる。本明細書に具体的に引用される文献中の配列及び開示は参考により明示的に援用される。

【0051】

腫瘍関連抗原 (1) - (51) :

(1) BMPR1B (骨形成タンパク質レセプタータイプ I B 型, Genbank 受託番号 NM_001203)

ten Dijke, P., et al. Science 264 (5155): 101-104 (1994), Oncogene 14 (11): 1377-1382 (1997) ; 国際公開第 2004063362 号 (請求項 2) ; 国際公開第 2003042661 号 (請求項 12) ; 米国特許出願公開第 2003134790-A1 号 (頁 38-39) ; 国際公開第 2002102235 号 (請求項 13 ; 頁 296) ; 国際公開第 2003055443 号 (頁 91-92) ; 国際公開第 200299122 号 (実施例 2 ; 頁 528-530) ; 国際公開第 2003029421 号 (請求項 6) ; 国際公開第 2003024392 号 (請求項 2 ; 図 112) ; 国際公開第 200298358 号 (請求項 1 ; 頁 183) ; 国際公開第 200254940 号 (頁 100-101) ; 国際公開第 200259377 号 (頁 349-350) ; 国際公開第 200230268 号 (請求項 27 ; 頁 376) ; 国際公開第 200148204 号 (実施例 ; 図 4)

NP_001194 骨形成タンパク質レセプター, タイプ I B / pid = NP_001194.1 -

相互参照: MIM: 603248 ; NP_001194.1 ; AY065994

10

20

30

40

50

【0052】

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, Genbank受託番号NM_003486) Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., et al (1992) J. Biol. Chem. 267 (16):11267-11273) ; 国際公開第2004048938号(実施例2) ; 国際公開第2004032842号(実施例IV) ; 国際公開第2003042661号(請求項12) ; 国際公開第2003016475号(請求項1) ; 国際公開第200278524号(実施例2) ; 国際公開第200299074号(請求項19;頁127-129) ; 国際公開第200286443号(請求項27;頁222,393) ; 国際公開第2003003906号(請求項10;頁293) ; 国際公開第200264798号(請求項33;頁93-95) ; 国際公開第200014228号(請求項5;頁133-136) ; 米国特許出願公開第2003224454号(図3) ; 国際公開第2003025138号(請求項12;頁150) ;

NP_003477 溶質担体ファミリー7(カチオン性アミノ酸輸送体, y+システム), メンバー5 / pid = NP_003477.3 - ホモサピエンス
相互参照: MIM: 600182; NP_003477.3; NM_015923; NM_003486_1

【0053】

(3) STEAP1(前立腺の6回膜貫通型上皮抗原, Genbank受託番号NM_012449) Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (25):14523-14528) ; 国際公開第2004065577号(請求項6) ; 国際公開第2004027049号(図1L) ; 欧州特許第1394274号(実施例11) ; 国際公開第2004016225号(請求項2) ; 国際公開第2003042661号(請求項12) ; 米国特許出願公開第2003157089号(実施例5) ; 米国特許出願公開第2003185830号(実施例5) ; 米国特許出願公開第2003064397号(図2) ; 国際公開第200289747号(実施例5;頁618-619) ; 国際公開第2003022995号(実施例9;図13A, 実施例53;頁173, 実施例2;図2A) ;

NP_036581 前立腺の6回膜貫通型上皮抗原
相互参照: MIM: 604415; NP_036581.1; NM_012449_1

【0054】

(4) 0772P (CA125, MUC16, Genbank受託番号AF361486)
J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)) ; 国際公開第2004045553号(請求項14) ; 国際公開第200292836号(請求項6;図12) ; 国際公開第200283866号(請求項15;頁116-121) ; 米国特許出願公開第2003124140号(実施例16) ; 相互参照: GI: 34501467; AAK74120.3; AF361486_1

【0055】

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, 巨核球増強因子、メソテリン, Genbank受託番号NM_005823) Yamaguchi, N., et al Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995)) ; 国際公開第2003101283号(請求項14) ; (国際公開第2002102235号(請求項13;頁287-288) ; 国際公開第2002101075号(請求項4;頁308-309) ; 国際公開第200271928号(頁320-321) ; 国際公開第9410312号(頁52-57) ; 相互参照: MIM: 601051; NP_005814.2; NM_005823_1

10

20

30

40

50

【0056】

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, 溶質輸送体ファミリー34(リン酸ナトリウム), メンバー2, II型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター3b, Genbank受託番号NM_006424)

J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582; 国際公開第2004022778号(請求項2); 欧州特許第1394274号(実施例11); 国際公開第2002102235号(請求項13; 頁326); 欧州特許第875569号(請求項1; 頁17-19); 国際公開第200157188号(請求項20; 頁329); 国際公開第2004032842号(実施例IV); 国際公開第200175177号(請求項24; 頁139-140); 10

相互参照: MIM: 604217; NP_006415.1; NM_006424_1

【0057】

(7) Sema5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, セマフォリン5b Hlog, セマドメイン(sema domain), 7回トロンボスpongin反復(1型及び1型様), 膜貫通ドメイン(TM)および短い細胞質ドメイン, (セマフォリン)5B, Genbank受託番号AB040878)

Nagase T., et al (2000) DNA Res. 7 (2):143-150; 国際公開第2004000997号(請求項1); 国際公開第2003003984号(請求項1); 国際公開第200206339号(請求項1; 頁50); 国際公開第200188133号(請求項1; 頁41-43, 48-58); 国際公開第2003054152号(請求項20); 国際公開第2003101400号(請求項11); 20

受託番号: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC: 10737;

【0058】

(8) PSCA_h1g (2700050C12Rik, C530008016Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 遺伝子, Genbank受託番号AY358628); Ross et al (2002) Cancer Res. 62:2546-2553; 米国特許出願公開第2003129192号(請求項2); 米国特許出願公開第2004044180号(請求項12); 米国特許出願公開第2004044179号(請求項11); 米国特許出願公開第2003096961号(請求項11); 米国特許出願公開第2003232056号(実施例5); 国際公開第2003105758号(請求項12); 米国特許出願公開第2003206918号(実施例5); 欧州特許第1347046号(請求項1); 国際公開第2003025148号(請求項20); 30

相互参照: GI: 37182378; AAQ88991.1; AY358628_1

【0059】

(9) ETBR(エンドセリンタイプBレセプター, Genbank受託番号AY275463); 40

Nakamura M., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H., et al Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992; Arai H., et al J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A., et al J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et al J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al Gene 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., et al J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., et al Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., et al Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W., et al Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1 50

997; Puffenberger E.G., et al Cell 79, 1257-1266, 1994; Attie T., et al, Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., et al Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996; Amiel J., et al Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., et al Nat. Genet. 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., et al Hum. Genet. 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et al Mol. Med. 7, 115-124, 2001; Pingault V., et al (2002) Hum. Genet. 111, 198-206; 国際公開第2004045516号(請求項1); 国際公開第2004048938号(実施例2); 国際公開第2004040000号(請求項151); 国際公開第2003087768号(請求項1); 国際公開第2003016475号(請求項1); 国際公開第2003016475号(請求項1); 国際公開第2003016494号(図6); 国際公開第2003025138号(請求項12; 頁144); 国際公開第200198351号(請求項1; 頁124-125); 欧州特許第522868号(請求項8; 図2); 国際公開第200177172号(請求項1; 頁297-299); 米国特許出願公開第2003109676号; 米国特許第6518404号(図3); 米国特許第5773223号(請求項1a; Col 31-34); 国際公開第2004001004号;

【0060】

(10) MSG783 (RNF124, 仮想タンパク質 FLJ20315, Genbank 受託番号NM_017763);

国際公開第2003104275号(請求項1); 国際公開第2004046342号(実施例2); 国際公開第2003042661号(請求項12); 国際公開第2003083074号(請求項14; 頁61); 国際公開第2003018621号(請求項1); 国際公開第2003024392号(請求項2; 図93); 国際公開第200166689号(実施例6);

相互参照: 遺伝子座番号: 54894; NP_060233.2; NM_017763_1

【0061】

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAM P1, STEAP2, STMP, 前立腺癌関連遺伝子1, 前立腺癌関連タンパク質1, 前立腺の6回膜貫通型上皮抗原2, 6回膜貫通型前立腺タンパク質, Genbank 受託番号AF455138)

Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002); 国際公開第2003087306号; 米国特許出願公開第2003064397号(請求項1; 図1); 国際公開第200272596号(請求項13; 頁54-55); 国際公開第200172962号(請求項1; 図4B); 国際公開第2003104270号(請求項11); 国際公開第2003104270号(請求項16); 米国特許出願公開第2004005598号(請求項22); 国際公開第2003042661号(請求項12); 米国特許出願公開第2003060612号(請求項12; 図10); 国際公開第200226822号(請求項23; 図2); 国際公開第200216429号(請求項12; 図10);

相互参照: GI: 22655488; AAN04080.1; AF455138_1

【0062】

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, 一過性レセプター電位カチオンチャネル, サブファミリーM, メンバー4, Genbank 受託番号NM_017636)

Xu, X.Z., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (19):10692-10697 (2001), Cell 109 (3):397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003); 米国特許出願公開第2003143557号(請求項4); 国際公開第200040614号(請求項14; 頁100-103); 国際公開第200210382号(請求項1; 図9A); 国際公開第2003042661号(請求項12); 国際公開第200230268号(請求項27; 頁391); 米国特許出願公開第2003219806号(請求項4); 国際公開第200162794号(請求項14; 図1A-D);

10

20

30

40

50

相互参照: MIM: 606936; NP_060106.2; NM_017636_1
【0063】

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, 奇形癌腫由来増殖因子, Genbank受託番号NP_003203又はNM_003212) Ciccodicola, A., et al EMBO J. 8 (7):1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991); 米国特許出願公開第2003224411号(請求項1); 国際公開第2003083041号(実施例1); 国際公開第200303034984号(請求項12); 国際公開第200288170号(請求項2; 貞52-53); 国際公開第2003024392号(請求項2; 図58); 国際公開第200216413号(請求項1; 貞94-95, 105); 国際公開第200222808号(請求項2; 図1); 米国特許第5854399号(実施例2; Col 17-18); 米国特許第5792616号(図2); 10

相互参照: MIM: 187395; NP_003203.1; NM_003212_1
【0064】

(14) CD21 (CR2(補体レセプター2)又はC3DR (C3d / エブスタインバーウイルスレセプター)又はHs.73792 Genbank受託番号M26004) Fujisaku et al (1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-2125; Weis J.J., et al J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320; 国際公開第2004045520号(実施例4); 米国特許出願公開第2004005538号(実施例1); 国際公開第2003062401号(請求項9); 国際公開第2004045520号(実施例4); 国際公開第9102536号(図9.1-9.9); 国際公開第2004020595号(請求項1); 受託番号: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AA A35786.1. 20

【0065】

(15) CD79b (CD79B, CD79, IgB(免疫グロブリン関連 (immunoglobulin-associated beta)), B29, Genbank受託番号 NM_000626又は11038674) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7):4126-4131, Blood (2002) 100 (9):3068-3076, Muller et al (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6):1621-1625; 国際公開第2004016225号(請求項2, 図140); 国際公開第2003087768号, 米国特許出願公開第2004101874号(請求項1, 貞102); 国際公開第2003062401号(請求項9); 国際公開第200278524号(実施例2); 米国特許出願公開第2002150573号(請求項5, 貞15); 米国特許第5644033号; 国際公開第2003048202号(請求項1, 貞306及び309); 国際公開第99/558658号, 米国特許第6534482号(請求項13, 図17A/B); 国際公開第200055351号(請求項11, 貞1145-1146); 30

相互参照: MIM: 147245; NP_000617.1; NM_000626_1
【0066】 40

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (SH2ドメイン含有ホスファターゼアンカータンパク質1a), SPAP1B, SPAP1C, Genbank受託番号 NM_030764, AY358130) Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., et al (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775; 国際公開第2004016225号(請求項2); 国際公開第2003077836号; 国際公開第200138490号(請求項5; 図18D-1-18D-2); 国際公開第2003097803号(請求項12); 国際公開第2003089624号(請求項25); 50

相互参照：MIM：606509；NP_110391.2；NM_030764_1
【0067】

(17) HER2 (ErbB2, Genbank受託番号M11730)

Coussens L., et al Science (1985) 230(4730):1132-1139; Yamamoto T., et al Nature 319, 230-234, 1986; Semba K., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., et al J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., et al J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., et al Nature 421, 756-760, 2003; Ehsani A., et al (1993) Genomics 15, 426-429；国際公開第2004048938号(実施例2)；国際公開第2004027049号(図1I)；国際公開第2004009622；国際公開第2003081210；国際公開第2003089904号(請求項9)；国際公開第2003016475号(請求項1)；米国特許出願公開第2003118592号；国際公開第2003008537号(請求項1)；国際公開第2003055439号(請求項29；図1A-B)；国際公開第2003025228号(請求項37；図5C)；国際公開第200222636号(実施例13；頁95-107)；国際公開第200212341号(請求項68；図7)；国際公開第200213847号(頁71-74)；国際公開第200214503号(頁114-117)；国際公開第200153463号(請求項2；頁41-46)；国際公開第200141787号(頁15)；国際公開第200044899号(請求項52；図7)；国際公開第200020579号(請求項3；図2)；米国特許第5869445号(請求項3；Col 31-38)；国際公開第9630514号(請求項2；頁56-61)；欧州特許第1439393号(請求項7)；国際公開第2004043361号(請求項7)；国際公開第2004022709号；国際公開第200100244号(実施例3；図4)；受託番号：P04626；EMBL；M11767；AAA35808.1.EMBL；M11761；AAA35808.1.

【0068】

(18) NCA (CEACAM6, Genbank受託番号M18728)；

Barnett T., et al Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899-16903, 2002；国際公開第2004063709；欧州特許第1439393号(請求項7)；国際公開第2004044178号(実施例4)；国際公開第2004031238号；国際公開第2003042661号(請求項12)；国際公開第200278524号(実施例2)；国際公開第200286443号(請求項27；頁427)；国際公開第200260317号(請求項2)；

受託番号：P40199；Q14920；EMBL；M29541；AAA59915.1.EMBL；M18728；

【0069】

(19) MDP (DPEP1, Genbank受託番号BC017023)

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26):16899-16903 (2002))；国際公開第2003016475号(請求項1)；国際公開第200264798号(請求項33；頁85-87)；特公平5-003790号公報(図6-8)；国際公開第9946284号(図9)；

相互参照：MIM：179780；AAH17023.1；BC017023_1

【0070】

(20) IL20R (IL20Ra, ZCYT0R7, Genbank受託番号AF184971)；

Clark H.F., et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J., et al Nature 425, 805-811, 2003; Blumberg H., et al Cell 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., et al J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., et al J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., et al (2003) Biochemistry 42:12617-12624; Sheikh F., et al (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010；欧州特許第1394274号(実施例11

10

20

30

40

50

) ; 米国特許出願公開第2004005320号(実施例5) ; 国際公開第2003029262号(頁74-75) ; 国際公開第2003002717号(請求項2 ; 頁63) ; 国際公開第200222153号(頁45-47) ; 米国特許出願公開第2002042366号(頁20-21) ; 国際公開第200146261号(頁57-59) ; 国際公開第200146232号(頁63-65) ; 国際公開第9837193号(請求項1 ; 頁55-59) ;

受託番号 : Q9UHF4 ; Q6UWA9 ; Q96SH8 ; EMBL ; AF184971 ; AAF01320.1.

【0071】

(21) プレビカン (BCAN, BEHAB, Genbank受託番号AF229053)

Gary S.C., et al Gene 256, 139-147, 2000; Clark H.F., et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002 ; 米国特許出願公開第2003186372号(請求項11) ; 米国特許出願公開第2003186373号(請求項11) ; 米国特許出願公開第2003119131号(請求項1 ; 図52) ; 米国特許出願公開第2003119122号(請求項1 ; 図52) ; 米国特許出願公開第2003119126号(請求項1) ; 米国特許出願公開第2003119121号(請求項1 ; 図52) ; 米国特許出願公開第2003119129号(請求項1) ; 米国特許出願公開第2003119130号(請求項1) ; 米国特許出願公開第2003119128号(請求項1 ; 図52) ; 米国特許出願公開第2003119125号(請求項1) ; 国際公開第2003016475号(請求項1) ; 国際公開第200202634号(請求項1) ;

【0072】

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, Genbank受託番号NM_004442)

Chan, J. and Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000)) ; 国際公開第2003042661号(請求項12) ; 国際公開第200053216号(請求項1 ; 頁41) ; 国際公開第2004065576号(請求項1) ; 国際公開第2004020583号(請求項9) ; 国際公開第2003004529号(頁128-132) ; 国際公開第200053216号(請求項1 ; 頁42) ;

相互参照 : MIM : 600997 ; NP_004433.2 ; NM_004442_1

【0073】

(23) ASLG659 (B7h, Genbank受託番号AX092328)

米国特許出願公開第20040101899号(請求項2) ; 国際公開第2003104399号(請求項11) ; 国際公開第2004000221号(図3) ; 米国特許出願公開第2003165504号(請求項1) ; 米国特許出願公開第2003124140号(実施例2) ; 米国特許出願公開第2003065143号(図60) ; 国際公開第2002102235号(請求項13 ; 頁299) ; 米国特許出願公開第2003091580号(実施例2) ; 国際公開第200210187号(請求項6 ; 図10) ; 国際公開第200194641号(請求項12 ; 図7b) ; 国際公開第200202624号(請求項13 ; 図1A-1B) ; 米国特許出願公開第2002034749号(請求項54 ; 頁45-46) ; 国際公開第200206317号(実施例2 ; 頁320-321, 請求項34 ; 頁321-322) ; 国際公開第200271928号(頁468-469) ; 国際公開第200202587号(実施例1 ; 図1) ; 国際公開第200140269号(実施例3 ; 頁190-192) ; 国際公開第200036107号(実施例2 ; 頁205-207) ; 国際公開第2004053079号(請求項12) ; 国際公開第200304989号(請求項1) ; 国際公開第200271928号(頁233-234, 452-453) ; 国際公開第0116318号 ;

【0074】

10

20

30

40

50

(24) P S C A (前立腺幹細胞抗原前駆体, G e n b a n k 受託番号 A J 2 9 7 4 3 6)

Reiter R.E., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):78 3-788; 国際公開第 2 0 0 4 0 2 2 7 0 9 号; 欧州特許第 1 3 9 4 2 7 4 号(実施例 1 1); 米国特許出願公開第 2 0 0 4 0 1 8 5 5 3 号(請求項 1 7); 国際公開第 2 0 0 3 0 0 8 5 3 7 号(請求項 1); 国際公開第 2 0 0 2 8 1 6 4 6 号(請求項 1 ; 頁 1 6 4); 国際公開第 2 0 0 3 0 0 3 9 0 6 号(請求項 1 0 ; 頁 2 8 8); 国際公開第 2 0 0 1 4 0 3 0 9 号(実施例 1 ; 図 1 7); 米国特許出願公開第 2 0 0 1 0 5 5 7 5 1 号(実施例 1 ; 図 1 b); 国際公開第 2 0 0 0 3 2 7 5 2 号(請求項 1 8 ; 図 1); 国際公開第 9 8 5 1 8 0 5 号(請求項 1 7 ; 頁 9 7); 国際公開第 9 8 5 1 8 2 4 号(請求項 1 0 ; 頁 9 4); 国際公開第 9 8 4 0 4 0 3 号(請求項 2 ; 図 1 B); 受託番号: O 4 3 6 5 3 ; E M B L ; A F 0 4 3 4 9 8 ; A A C 3 9 6 0 7 . 1 .

【0075】

(25) G E D A (G e n b a n k 受託番号 A Y 2 6 0 7 6 3); A A P 1 4 9 5 4 脂肪腫 H M G I C 融合パートナー様タンパク質(f u s i o n - p a r t n e r - l i k e p r o t e i n) / p i d = A A P 1 4 9 5 4 . 1 - ホモ・サピエンス

種: ホモサピエンス(ヒト)

国際公開第 2 0 0 3 0 5 4 1 5 2 号(請求項 2 0); 国際公開第 2 0 0 3 0 0 0 8 4 2 号(請求項 1); 国際公開第 2 0 0 3 0 2 3 0 1 3 号(実施例 3 , 請求項 2 0); 米国特許出願公開第 2 0 0 3 1 9 4 7 0 4 号(請求項 4 5);

相互参照: G I : 3 0 1 0 2 4 4 9 ; A A P 1 4 9 5 4 . 1 ; A Y 2 6 0 7 6 3 _ 1

【0076】

(26) B A F F - R (B 細胞活性化因子レセプター, B L y S レセプター 3 , B R 3 , G e n b a n k 受託番号 A F 1 1 6 4 5 6); B A F F レセプター / p i d = N P _ 4 4 3 1 7 7 . 1 - ホモサピエンス

Thompson, J.S., et al Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); 国際公開第 2 0 0 4 0 5 8 3 0 9 号; 国際公開第 2 0 0 4 0 1 1 6 1 1 ; 国際公開第 2 0 0 3 0 4 5 4 2 2 号(実施例; 頁 3 2 - 3 3); 国際公開第 2 0 0 3 0 1 4 2 9 4 号(請求項 3 5 ; 図 6 B); 国際公開第 2 0 0 3 0 3 5 8 4 6 号(請求項 7 0 ; 頁 6 1 5 - 6 1 6); 国際公開第 2 0 0 2 9 4 8 5 2 号(C o l 1 1 3 6 - 1 3 7); 国際公開第 2 0 0 2 3 8 7 6 6 号(請求項 3 ; 頁 1 3 3); 国際公開第 2 0 0 2 2 4 9 0 9 号(実施例 3 ; 図 3);

相互参照: M I M : 6 0 6 2 6 9 ; N P _ 4 4 3 1 7 7 . 1 ; N M _ 0 5 2 9 4 5 _ 1 ; A F 1 3 2 6 0 0

【0077】

(27) C D 2 2 (B 細胞レセプター C D 2 2 - B アイソフォーム, B L - C A M , L y b - 8 , L y b 8 , S I G L E C - 2 , F L J 2 2 8 1 4 , G e n b a n k 受託番号 A K 0 2 6 4 6 7);

Wilson et al (1991) J. Exp. Med. 173:137-146; 国際公開第 2 0 0 3 0 7 2 0 3 6 号(請求項 1 ; 図 1);

相互参照: M I M : 1 0 7 2 6 6 ; N P _ 0 0 1 7 6 2 . 1 ; N M _ 0 0 1 7 7 1 _ 1

【0078】

(28) C D 7 9 a (C D 7 9 A , C D 7 9 , 免疫グロブリン関連(i m m u n o g l o b u l i n - a s s o c i a t e d a l p h a), 免疫グロブリンベータ(C D 7 9 B)と共有結合性に相互作用し、 I g M 分子と表面上で複合体を形成し、 B 細胞分化に関与するシグナルを伝達する B 細胞特異的タンパク質), 等電点: 4 . 8 4 , 分子量: 2 5 0 2 8 T M : 2 [P] 遺伝子染色体: 1 9 q 1 3 . 2 , G e n b a n k 受託番号 N P _ 0 0 1 7 7 4 . 1 0)

; 国際公開第 9 2 0 7 5 7 4 号(図 1); 米国特許第 5 6 4 4 0 3 3 号; Ha et al (1992) 50

) J. Immunol. 148(5):1526-1531; Mueller et al (1992) Eur. J. Biochem. 22:1621-1625; Hashimoto et al (1994) Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme et al (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146; Yu et al (1992) J. Immunol. 148(2):633-637; Sakaguchi et al (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464;

【0079】

(29) CXCR5 (バーキットリンパ腫レセプター1は、CXCL13ケモカインによって活性化され、リンパ球遊走及び体液性防御において機能し、HIV-2感染、おそらくエイズ、リンパ腫、骨髄腫、及び白血病の発症において役割を果たす、Gタンパク質共役型受容体) ; 372アミノ酸, 等電点: 8.54 分子量: 41959 TM: 7 [P] 遺伝子染色体: 11q23.3, Genbank受託番号NP_001707.1)

国際公開第2004040000号; 国際公開第2004015426号; 米国特許出願公開第2003105292号(実施例2); 米国特許第6555339号(実施例2); 国際公開第200261087号(図1); 国際公開第200157188号(請求項20, 貞269); 国際公開第200172830号(貞12-13); 国際公開第200022129号(実施例1, 貞152-153, 実施例2, 貞254-256); 国際公開第9928468号(請求項1, 貞38); 米国特許第5440021号(実施例2, col 49-52); 国際公開第9428931号(貞56-58); 国際公開第9217497号(請求項7, 図5); Dobner et al (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Barella et al (1995) Biochem. J. 309:773-779;

【0080】

(30) HLA-DQB (ペプチドを結合しそれらをCD4+Tリンパ球に提示するMH CクラスII分子(Ia抗原)のベータサブユニット); 273アミノ酸, 等電点: 6.56 分子量: 30820 TM: 1 [P] 遺伝子染色体: 6p21.3, Genbank受託番号NP_002111.1)

Tonnelle et al (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson et al (1989) Immunogenetics 29(6):411-413; Beck et al (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903; Servenius et al (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck et al (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13; Naruse et al (2002) Tissue Antigens 59:512-519; 国際公開第9958658号(請求項13, 図15); 米国特許第6153408号(Col 35-38); 米国特許第5976551号(Col 168-170); 米国特許第6011146号(Col 145-146); Kasaoka et al (1989) Immunogenetics 30(1):66-68; Larhammar et al (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119;

【0081】

(31) P2X5 (プリンレセプターP2Xリガンド開口型イオンチャネル5は、細胞外ATPにより開閉されるイオンチャネルであり、シナプス伝達及び神経発生に関与する可能性があり、欠乏は、特発性排尿筋不安定性の病態生理の一因となり得る; 422アミノ酸), 等電点: 7.63, 分子量: 47206 TM: 1 [P] 遺伝子染色体: 17p13.3, Genbank受託番号NP_002552.2)

Le et al (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199; 国際公開第2004047749号; 国際公開第2003072035号(請求項10); Touchman et al (2000) Genome Res. 10:165-173; 国際公開第200222660号(請求項20); 国際公開第2003093444号(請求項1); 国際公開第2003087768号(請求項1); 国際公開第2003029277号(貞82);

【0082】

(32) CD72 (B細胞分化抗原CD72, Lyb-2) PROTEIN SEQUENCE NCE Full maeaity...tafrfpd(1..359; 359アミノ酸), 等電点: 8.66, 分子量: 40225 TM: 1 [P] 遺伝子染色体: 9p13.3, Genbank受託番号NP_001773.1)

国際公開第2004042346号(請求項65); 国際公開第2003026493号

10

20

30

40

50

(頁51-52, 57-58) ; 國際公開第200075655号(頁105-106) ; Von Hoegen et al (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903 ;

【0083】

(33) LY64 (リンパ球抗原64 (RP105) , ロイシンリッチリピート (LRR) ファミリーのI型膜タンパク質であり、B細胞の活性化及びアポトーシスを制御し、機能喪失は全身性エリテマトーデスの患者における疾患活性の上昇に関連する) ; 661アミノ酸, 等電点: 6.20, 分子量: 74147 TM: 1 [P] 遺伝子染色体: 5q12, Genbank受託番号NP_005573.1)

米国特許出願公開第2002193567号; 國際公開第9707198号(請求項11, 頁39-42) ; Miura et al (1996) Genomics 38(3):299-304; Miura et al (1998) Blood 92:2815-2822; 國際公開第2003083047号; 國際公開第9744452号(請求項8, 頁57-61) ; 國際公開第200012130号(頁24-26) ;

【0084】

(34) FcRH1 (Fcレセプター様タンパク質1, C2タイプIg様ドメイン及びITAMドメインを含む免疫グロブリンFcドメインについての推定上のレセプターであり、B-リンパ球分化において役割を有し得る) ; 429アミノ酸, 等電点: 5.28, 分子量: 46925 TM: 1 [P] 遺伝子染色体: 1q21-1q22, Genbank受託番号NP_443170.1)

國際公開第2003077836号; 國際公開第200138490号(請求項6, 図18E-1-18-E-2) ; Davis et al (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777; 國際公開第2003089624号(請求項8) ; 歐州特許第1347046号(請求項1) ; 國際公開第2003089624号(請求項7) ;

【0085】

(35) IRTA2 免疫グロブリンスーパーファミリー レセプタートランスロケーション関連2 (Immunoglobulin superfamily receptor translocation associated 2) 、B細胞発生及びリンパ腫形成において役割を有し得る推定上の免疫レセプター ; 一部のB細胞悪性腫瘍においてトランスロケーションによる遺伝子の調節解除が発生する) ; 977アミノ酸, 等電点: 6.88 分子量: 106468 TM: 1 [P] 遺伝子染色体: 1q21, Genbank受託番号ヒト: AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085 ; マウス: AK089756, AY158090, AY506558 ; NP_112571.1,

國際公開第2003024392号(請求項2, 図97) ; Nakayama et al (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; 國際公開第2003077836号; 國際公開第200138490号(請求項3, 図18B-1-18B-2) ;

【0086】

(36) TENB2 (TMEFF2, tomoregulin, TPEF, HPP1, TR, 増殖因子のEGF / ヘレグリンファミリー及びフォリスタチンに関連する推定上の膜貫通型プロテオグリカン) ; 374アミノ酸, NCBI受託番号: AAD55776, AAFF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; NCBIGene: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; Genbank受託番号AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436

國際公開第2004074320号(配列番号810) ; 特開2004-113151号公報(配列番号2, 4, 8) ; 國際公開第2003042661号(配列番号580) ; 國際公開第2003009814号(配列番号411) ; 歐州特許第1295944号(頁69-70) ; 國際公開第200230268号(頁329) ; 國際公開第200190304号(配列番号2706) ; 米国特許出願公開第2004249130号 ; 米国特

10

20

30

40

50

許出願公開第 2004022727 号；国際公開第 2004063355 号；米国特許出願公開第 2004197325 号；米国特許出願公開第 2003232350 号；米国特許出願公開第 2004005563 号；米国特許出願公開第 2003124579 号；Horie et al (2000) *Genomics* 67: 146-152；Uchida et al (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:593-602；Liang et al (2000) *Cancer Res.* 60:4907-12；Glynne-Jones et al (2001) *Int J Cancer.* Oct 15;94(2):178-84；

【0087】

(37) PMEL17 (シルバーホモログ (silver homolog) ; SILV ; D12S53E ; PMEL17 ; (SIL) ; (SIL) ; ME20 ; gp100) BC 001414 ; BT007202 ; M32295 ; M77348 ; NM_006928 ; McGlinchey, R.P. et al (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (33), 13731-13736；Kummer, M.P. et al (2009) *J. Biol. Chem.* 284 (4), 2296-2306；

【0088】

(38) TMEMF1 (EGF 様及び 2 つのフォリスタチン様ドメインを有する膜貫通型タンパク質 1 ; Tomoregulin-1 ; H7365 ; C9orf2 ; C9ORF2 ; U19878 ; X83961) NM_080655 ; NM_003692 ; Harms, P.W. (2003) *Genes Dev.* 17 (21), 2624-2629；Gery, S. et al (2003) *Oncogene* 22 (18): 2723-2727；

【0089】

(39) GDNF - Ra1 (GDNF ファミリーレセプターアルファ 1 ; GFR A1 ; GDNFR ; GDNFRA ; RETL1 ; TRNR1 ; RET1L ; GDNFR - アルファ 1 ; GFR - ALPHA - 1 ; U95847 ; BC014962 ; NM_145793) NM_005264 ; Kim, M.H. et al (2009) *Mol. Cell. Biol.* 29 (8), 2264-2277；Treanor, J.J. et al (1996) *Nature* 382 (6586):80-83；

【0090】

(40) Ly6E (リンパ球抗原 6 複合体、遺伝子座 E ; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1) NP_002337.1 ; NM_002346.2 ; de Nooij-van Dijken, A.G. et al (2003) *Int. J. Cancer* 103 (6), 768-774；Zammit, D.J. et al (2002) *Mol. Cell. Biol.* 22 (3):946-952；

【0091】

(41) TMEM46 (シサホモログ (shisa homolog) 2 (アフリカツメガエル) ; SHISA2) NP_001007539.1 ; NM_001007538.1 ; Furushima, K. et al (2007) *Dev. Biol.* 306 (2), 480-492；Clark, H.F. et al (2003) *Genome Res.* 13 (10):2265-2270；

【0092】

(42) Ly6G6D (リンパ球抗原 6 複合体、遺伝子座 G6D ; Ly6-D, MEGT1) NP_067079.2 ; NM_021246.2 ; Mallya, M. et al (2002) *Genomics* 80 (1):113-123；Ribas, G. et al (1999) *J. Immunol.* 163 (1):278-287；

【0093】

(43) LGR5 (ロイシンリッチリピート含有 G タンパク質共役型受容体 5 ; GPR49, GPR67) NP_003658.1 ; NM_003667.2 ; Salanti, G. et al (2009) *Am. J. Epidemiol.* 170 (5):537-545；Yamamoto, Y. et al (2003) *Hepatology* 37 (3):528-533；

【0094】

(44) RET (ret プロトオンコジーン ; MEN2A ; HSCR1 ; MEN2B ; MTC1 ; (PTC) ; CDHF12 ; Hs.168114 ; RET51 ; RET - ELE1) NP_066124.1 ; NM_020975.4 ; Tsukamoto, H. et al (2009) *Cancer Sci.* 100 (10):1895-1901；Narita, N. et al (2009) *Oncogene* 28 (34):3058-3068；

【0095】

10

20

30

40

50

(45) LY6K (リンパ球抗原6複合体、遺伝子座K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226) NP_059997.3; NM_017527.3; Ishikawa,N. et al (2007) Cancer Res. 67 (24):11601-11611; de Nooij-van Dalen,A.G. et al (2003) Int. J. Cancer 103 (6):768-774;

【0096】

(46) GPR19 (Gタンパク質共役型受容体19; Mm.4787) NP_006134.1; NM_006143.2; Montpetit, A. and Sinnett,D. (1999) Hum. Genet. 105 (1-2):162-164; O'Dowd, B.F. et al (1996) FEBS Lett. 394 (3):325-329;

【0097】

(47) GPR54 (KISS1レセプター; KISS1R; GPR54; HOT7T1 10 75; AXOR12) NP_115940.2; NM_032551.4; Navenot, J. M. et al (2009) Mol. Pharmacol. 75 (6):1300-1306; Hata, K. et al (2009) Anticancer Res. 29 (2):617-623;

【0098】

(48) ASPHD1 (アスパラギン酸-ヒドロキシラーゼドメイン含有1; LOC253982) NP_859069.2; NM_181718.3; Gerhard, D.S. et al (2004) Genome Res. 14 (10B):2121-2127;

【0099】

(49) チロシナーゼ (TYR; OCAIA; OCA1A; チロシナーゼ; SHEP3) NP_000363.1; NM_000372.4; Bishop,D.T. et al (2009) Nat. Genet. 41 (8):920-925; Nan, H. et al (2009) Int. J. Cancer 125 (4):909-917;

【0100】

(50) TMEM118 (リングフィンガータンパク質, 膜貫通型2; RNF12; FLJ14627) NP_001103373.1; NM_001109903.1; Clark, H.F. et al (2003) Genome Res. 13 (10):2265-2270; Scherer,S.E. et al (2006) Nature 440 (7082):346-351

【0101】

(51) GPR172A (Gタンパク質共役型受容体172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e) NP_078807.1; NM_024531.3; Ericsson, T.A. et al (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (11):6759-6764; Takeda, S. et al (2002) FEBS Lett. 520 (1-3):97-101.

【0102】

親抗体はまた、アルブミン結合ペプチド (ABP) 配列を有する融合タンパク質であつてもよい (Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; 国際公開第01/45746号)。本発明の抗体は、(i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043の表I-II及びIV, 貞35038; (ii) 米国特許出願公開第20040001827号の[0076]; 及び (iii) 国際公開第01/45746号の貞12-13に記載のABP配列を有する融合タンパク質を含み、その全てが参照により本明細書に援用される。

【0103】

突然変異によるシステイン操作抗体を調製するため、出発ポリペプチドのアミノ酸配列変異体をコードするDNAが当技術分野で公知の種々の方法により調製される。これらの方法は、ポリペプチドをコードする前に調製したDNAの部位特異的(またはオリゴヌクレオチド介在性)変異誘発、PCR変異誘発、及びカセット変異誘発による調製を含むがこれらに限定されない。組換え抗体の変異体は、制限断片の操作によって、又は合成オリゴヌクレオチドとの重複伸長PCRによっても構築されうる。変異誘発プライマーは、システインのコドンの置換をコードする。標準的な変異誘発法が、そのような変異システイン操作抗体をコードするDNAを生成するために用いることができる。一般的なガイダンスはSambrook et al Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor La 40 50

boratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 及びAusubel et al Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993に見出すことができる。

【0104】

部位特異的変異誘発法は、置換変異体、すなわち変異タンパク質を作製するための一つの方法である (Carter (1985) et al Nucleic Acids Res. 13:4431-4443; Ho et al (1989) Gene (Amst.) 77:51-59; 及びKunkel et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488)。出発DNAは、望ましい変異をコードするオリゴヌクレオチドをその出発DNAの一本鎖に最初にハイブリダイズすることで改変される。ハイブリダイゼーションの後、DNAポリメラーゼは、プライマーとしてハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドを使用し、テンプレートとして出発DNAの一本鎖を使用して、第二鎖全体を合成するために使用される。従って、所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドが得られた二本鎖DNAに組み込まれる。部位特異的変異誘発法は、変異を誘発されるべきタンパク質を発現プラスミド内で発現する遺伝子内で行うことができ、得られたプラスミドは配列が決定され、望まれるシステイン置換変異生成の導入を確認する (Liu et al (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260)。部位特異的プロトコールや形式は広く入手可能なものの、例えばQuick Change (登録商標) 多重部位特異的変異生成キット (ストラタジーン、ラボーヤ、カリフォルニア州) である。

【0105】

PCR突然変異誘発はまた、出発ポリペプチドのアミノ酸配列変異体を作るのに適している。Higuchi, (1990) in PCR Protocols, pp.177-183, Academic Press; Ito et al (1991) Gene 102:67-70; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; 及びVallette et al (1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733を参照。簡単に説明すると、PCRにおける出発物質としてテンプレートDNAの少量が用いられる場合、テンプレートDNAの対応する領域とは配列が若干異なるプライマーが、プライマーがテンプレートとは異なる場所においてのみ、テンプレート配列とは異なる特異的DNA断片の比較的多量を産生するために用いることができる。

【0106】

変異体を調製するための別の方法であるカセット式変異誘発は、Wells et al (1985) Gene 34:315-323により記載される技術にもとづく。出発材料は、変異されるべき出発ポリペプチドを含むプラスミド (又は他のベクター) である。変異されるべき出発DNAのコドンが同定される。同定された変異部位のそれぞれの側にユニークな制限エンドヌクレオチドが存在する必要がある。そのような制限酵素部位が存在しない場合、それらは出発ポリペプチドDNAの適切な場所でそれらを導入するために、上記オリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発法を用いて生成される場合がある。プラスミドDNAは、それを線形化するために、これらの部位で切断される。制限部位間のDNAの配列をコードするが、望まれる変異を含む二本鎖オリゴヌクレオチドは、標準的な方法を用いて合成され、ここでオリゴヌクレオチドの二本鎖は別々に合成され、標準的な技術を用いて一緒にハイブリダイズされる。この二本鎖オリゴヌクレオチドは、カセットと呼ばれる。このカセットは、それが直接プラスミドにライゲーションすることができるよう、線状プラスミドの両端と一致する5'及び3'の両端を持つように設計されている。このプラスミドは、今や変異DNA配列を含む。コードされたシステインの置換を含む変異体DNAは、DNA配列決定により確認することができる。

【0107】

単一の変異はまた、PCRに基づく変異誘発によって、テンプレートとして二本鎖プラスミドDNAを用いたオリゴヌクレオチド指向性突然変異誘発によって生成される (Sambrook and Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; Zoller et al (1983) Methods Enzymol. 100:468-500; Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487-6500)。

【0108】

10

20

30

40

50

4 D 5 抗 H E R 2 チオ F A B の操作及びチオール反応性

システィンは抗 H E R 2 h u 4 D 5 F a b v 8 F a b 断片抗体の重鎖と軽鎖の各位置に導入された(米国特許第 5 8 2 1 3 3 7 号; Carter et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci., 89:4285-4289)。全 4 4 0 の重鎖変異と軽鎖変異は本明細書に記載の方法に従って調製された。チオール反応性は P H E S E L E C T O R アッセイに従って測定された。重鎖配列は連続番号付けシステムによって番号が付けられる。軽鎖配列は、カバット番号付けシステムに従う。軽鎖において、カバットと連続番号付けは同じ番号を表示する。

【 0 1 0 9 】

重鎖 h u 4 D 5 F a b v 8 変異体は、H E R 2 レセプタータンパク質への効率的結合及びビオチン化試薬、ビオチン - P E O - マレイミドとのチオール反応性に対して選択された(米国特許第 7 5 2 1 5 4 1 号)。ある重鎖変異体は、H E R 2 E C D への結合を制限したか又は損なっているが、その理由はこれが抗体 F a b の可変領域の C D R に位置し、抗原結合(H E R 2)に重要な残基であるからである。F a b の定常ドメインに位置する残基の幾つかも貧弱なH E R 2 結合を生じるが、その理由はこれらの残基が F a b の構造とフォールディングに寄与する場合があり、従って M 1 3 ページ (p a g e) 上で貧弱な 4 D 5 - F a b 表示を生じるからである (Junutula, J.R. et al. (2008) J. Immunol Methods, 332:41-52)。貧弱な H E R 2 E C D 結合を持つ重鎖 h u 4 D 5 F a b v 8 変異体は、位置 1, 2 1, 3 1, 3 3 - 3 6, 3 8, 4 8 - 5 0, 5 9, 8 7, 9 5, 1 0 1, 1 0 4, 1 2 9, 1 3 1, 1 3 2, 1 3 6, 1 5 3, 1 5 5, 1 5 9, 1 6 6, 1 6 9, 1 7 0, 1 7 2, 1 9 7, 1 9 8, 2 0 2, 2 1 5, 2 1 9 にシスティン変異を含んでいた。野生型システィン変異体 2 2, 9 6, 1 4 7, 2 0 3, 2 2 3 が測定された。他の重鎖変異体はビオチン化試薬とのチオール反応性を制限していた。

【 0 1 1 0 】

システィン操作法により導入された A 1 2 1 C 遊離システィンアミノ酸が本明細書で説明され、配列番号 3 2 は連続番号付けシステムにより示される。定常ドメインの先頭のこの残基は、E U 番号付けシステムにより示される A 1 1 8 C、又はカバットシステムによる A 1 1 4 C でもある。本明細書に記載される抗体 - 薬剤コンジュゲートにおいてコンジュゲートした変異体(図 5 a 及び 5 b、表 3 及び実施例 6)は、配列番号 3 2 を含む抗体の指定のために E U システムの A 1 1 8 C を用いている。

【 0 1 1 1 】

遊離のシスティンアミノ酸は表 1 の中央列の配列に隣接残基を伴って中央にある。重鎖の置換されたアミノ酸と位置が左の行に示される。重鎖 h u 4 D 5 F a b v 8 変異体、表 1 の配列番号 1 ~ 4 9 は H E R 2 結合とチオール反応性値の約 0.8 以上を保持しており、野生型システィン変異体を除外している。配列番号 1 ~ 4 9 (表 1) による抗体はチオール反応性を示しており、捕獲標識、検出標識、薬剤部分又は固体支持体との共有結合を形成するのに有用であり得る。表 1 の重鎖変異体は、チオ F a b 又はチオ M a b として、例えば抗体 - 薬剤コンジュゲートとしてコンジュゲートし得る。

【 0 1 1 2 】

表1 効率的結合, チオール反応性重鎖 hu4D5Fabv8 変異体

HC-L4C	EVQCVESGG	配列番号 1	
HC-G8C	QLVESCGGLVQ	配列番号 2	
HC-G10C	VESGGCLVQPG	配列番号 3	
HC-L20C	GGSLRCSCAAS	配列番号 4	
HC-A23C	LRLSCCASCAGFN	配列番号 5	
HC-G26C	SCAASCFCNIKD	配列番号 6	
HC-F27C	CAASGCNIKDT	配列番号 7	10
HC-T32C	FNIKDCYIHWW	配列番号 8	
HC-Q39C	IHWVRCAPGKG	配列番号 9	
HC-P41C	WVRQACGKGLE	配列番号 10	
HC-K43C	RQAPGCGLEWV	配列番号 11	
HC-G44C	QAPGKCLEWVA	配列番号 12	
HC-W47C	GKGLECVARIY	配列番号 13	
HC-S63C	TRYADCVKGKF	配列番号 14	
HC-F68C	SVKGRCTISAD	配列番号 15	20
HC-D73C	FTISACTSKNT	配列番号 16	
HC-K76C	SADTSCNTAYL	配列番号 17	
HC-T78C	DTSKNACAYLQM	配列番号 18	
HC-Y80C	SKNTACLQMNS	配列番号 19	
HC-L81C	KNTAYCQMNSL	配列番号 20	
HC-Q82C	NTAYLCMNSLR	配列番号 21	
HC-L86C	LQMNSCRAEDT	配列番号 22	
HC-A88C	MNSLRCEDTAV	配列番号 23	30
HC-D90C	SLRAECTAVYY	配列番号 24	
HC-V93C	AEDTACYYCSR	配列番号 25	
HC-Y94C	EDTAVCYCSRW	配列番号 26	
HC-R98C	VYYCSCWGGDG	配列番号 27	
HC-G100C	YCSRWCAGDFY	配列番号 28	
HC-D108C	GFYAMCYWGQG	配列番号 29	
HC-G113C	DYWGQCTLVTV	配列番号 30	
HC-T117C	QGTLVCVSSAS	配列番号 31	40
HC-A121C	VTVSSCSTKGP	配列番号 32	
HC-G125C	SASTKCPSVFP	配列番号 33	
HC-G141C	KSTSGCTAALG	配列番号 34	
HC-P154C	VKDYFCEPVTW	配列番号 35	
HC-N162C	VTVSWCSGALT	配列番号 36	

HC-S163C	TVSWNCGALTS	配列番号 37	
HC-G164C	VSWNSCALTSG	配列番号 38	
HC-S168C	SGALTCGVHTF	配列番号 39	
HC-F173C	SGVHTCPAVLQ	配列番号 40	
HC-T190C	LSSVVCVPSSS	配列番号 41	
HC-S194C	VTVPSCSLGTQ	配列番号 42	
HC-T200C	SLGTQCYICNV	配列番号 43	10
HC-V205C	TYICNCNHKPS	配列番号 44	
HC-N211C	NHKPSCTKVDK	配列番号 45	
HC-T212C	HKPSNCKVDDK	配列番号 46	
HC-V214C	PSNTKCDKKVE	配列番号 47	
HC-K217C	TKVDKCVEPKS	配列番号 48	
HC-T226C	KSCDKCH	配列番号 49	

軽鎖 h u 4 D 5 F a b v 8 変異体は、H E R 2 レセプターへの効率的結合及びビオチン化試薬、ビオチン - P E O - マレイミドとのチオール反応性に対して選択された（米国特許第 7 5 2 1 5 4 1 号）。ある軽鎖変異体は、H E R 2 への結合を制限したか又は損なっているが、その理由はこれが抗体 F a b の可変領域の C D R に位置し、抗原結合（H E R 2 ）に重要な残基であるからである。F a b の定常ドメインに位置する残基の幾つかはまた貧弱なH E R 2 結合を生じるが、その理由はこれらの残基がF a b の構造とフォールディングに寄与する場合があり、従ってM 1 3 ページ（p a g e ）上で貧弱な 4 D 5 - F a b 表示を生じるからである（Junutula, J.R. et al. (2008) J. Immunol Methods, 332:4 1-52）。H E R 2 に対する貧弱な結合を持つ軽鎖 h u 4 D 5 F a b v 8 変異体は、位置 4 , 2 9 - 3 2 , 3 5 , 3 6 , 5 0 , 8 2 , 8 6 , 8 9 - 9 1 , 1 1 3 , 1 1 5 , 1 1 7 , 1 2 0 , 1 2 6 , 1 2 8 , 1 3 9 , 1 4 1 , 1 4 6 , 1 4 8 , 1 7 9 , 1 8 6 , 1 9 2 , 2 0 2 にシステイン変異を含んでいた。野生型システイン変異体 2 3 , 1 3 4 , 1 9 4 , 2 1 4 が測定された。他の軽鎖変異体はビオチン化試薬とのチオール反応性を制限していた。

【 0 1 1 3 】

本明細書で説明され、システイン操作法により導入された V 2 0 5 C 遊離システインアミノ酸残基及び配列番号 9 6 はカバット番号付けシステム及び連続番号付けシステムにより示される。本明細書に記載される抗体 - 薬剤コンジュゲートにおいてコンジュゲートした V 2 0 5 変異体（図 5 a 及び 5 b 、表 3 及び実施例 6 ）は、配列番号 9 6 を含む。

【 0 1 1 4 】

遊離のシステインアミノ酸は表 2 の中央列の配列に隣接残基を伴って中央にある。軽鎖の置換されたアミノ酸と位置が左の行に示される。軽鎖 h u 4 D 5 F a b v 8 変異体、表 2 の配列番号 5 0 ~ 9 8 はH E R 2 結合とチオール反応性値の約 0 . 8 以上を保持しており、野生型システイン変異体を除外している。配列番号 5 0 ~ 9 8 (表 2) による抗体はチオール反応性を示しており、捕獲標識、検出標識、薬剤部分又は固体支持体との共有結合を形成するのに有用であり得る。表 2 の軽鎖変異体は、チオ F a b 又はチオ M a b として、例えば抗体 - 薬剤コンジュゲートとしてコンジュゲートし得る。

【 0 1 1 5 】

10

20

30

40

表2 効率的結合, チオール反応性軽鎖 hu4D5Fabv8 変異体

LC-S9C	MTQSPCSLSAS	配列番号 50	
LC-L46C	GKAPKCLIYSA	配列番号 51	
LC-Y49C	PKLLICSAFL	配列番号 52	
LC-F53C	IYSASCLYSGV	配列番号 53	
LC-T72C	SGTDFCLTISS	配列番号 54	
LC-L73C	GTDFCTISSL	配列番号 55	
LC-T74C	TDFTLCISSLQ	配列番号 56	10
LC-I75C	DFTLTCSSLQP	配列番号 57	
LC-S77C	TLTISCLQPED	配列番号 58	
LC-Q79C	TISSLCPEDFA	配列番号 59	
LC-P80C	ISSLQCEDFAT	配列番号 60	
LC-Y92C	YCQQHCTTPPT	配列番号 61	
LC-P95C	QHYTTCPTFGQ	配列番号 62	
LC-G99C	TPPTFCQGTVK	配列番号 63	
LC-G101C	PTFGQCTKVEI	配列番号 64	20
LC-K103C	FGQGTCVEIKR	配列番号 65	
LC-E105C	QGTVCIKRTV	配列番号 66	
LC-V110C	EIKRTCAAPSV	配列番号 67	
LC-A112C	KRTVACPSVFI	配列番号 68	
LC-S114C	TVAAPCVFIFP	配列番号 69	
LC-F116C	AAPSVCIFPPS	配列番号 70	
LC-F118C	PSVFICPPSDE	配列番号 71	
LC-S121C	FIFPPCDEQLK	配列番号 72	30
LC-L125C	PSDEQCKSGTA	配列番号 73	
LC-S127C	DEQLKCGTASV	配列番号 74	
LC-T129C	QLKSGCASFVVC	配列番号 75	
LC-A130C	LKSGTCSVVCL	配列番号 76	
LC-S131C	KSGTACVVCLL	配列番号 77	
LC-N137C	VVCLLCNFYPR	配列番号 78	
LC-N138C	VCLLNCFYPRE	配列番号 79	
LC-Y140C	LLNNFCPREAK	配列番号 80	40
LC-R142C	NNFYPCEAKVQ	配列番号 81	
LC-A144C	FYPRECKVQWK	配列番号 82	
LC-Q147C	REAKVCWKVDN	配列番号 83	
LC-K149C	AKVQWCVDNAL	配列番号 84	
LC-D151C	VQWKVCNALQS	配列番号 85	

LC-Q155C	VDNALCSGNSQ	配列番号 86	
LC-Q160C	QSGNSCESVTE	配列番号 87	
LC-A184C	LTLSKCDYEKH	配列番号 88	
LC-D185C	TLSKACYEKHK	配列番号 89	
LC-K188C	KADYECHKVYA	配列番号 90	
LC-T197C	YACEVCHQGLS	配列番号 91	
LC-G200C	EVTHQCLSSPV	配列番号 92	
LC-L201C	VTHQGCSSPVT	配列番号 93	10
LC-S203C	HQGLSCPVTKS	配列番号 94	
LC-P204C	QGLSSCVTKSF	配列番号 95	
LC-V205C	GLSSPCTKSFN	配列番号 96	
LC-T206C	LSSPVCKSFNR	配列番号 97	
LC-K207C	SSPVTCFSNRG	配列番号 98	

【 0 1 1 6 】

コンジュゲーションのためのシステイン操作抗体の調製

所定の条件下では、システイン操作抗体は、D T T (クリーランドの試薬、ジチオスレイトール)、又はT C E P (トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩; Getz et al (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) 等の還元剤で処理することにより、リンカー試薬とのコンジュゲーションのために反応性になりうる。C H O 細胞で発現される完全長システイン操作モノクローナル抗体 (チオM a b) (Gomez et al (2010) *Biotechnology and Bioeng.* 105(4):748-760; Gomez et al (2010) *Biotechnol. Prog.* 26:1438-1445) が、新たに導入されたシステイン残基と培地中に存在するシステインの存在の間に形成する可能性のあるジスルフィド結合を還元するために、室温で一晩約50倍過剰のD T T により還元された。還元されたチオM a bは10mM酢酸ナトリウムpH5で希釈され、H i T r a p S P F F カラム上にロードされ、150mM塩化ナトリウムを含む50mMのT r i s - C l , pH 7.5で溶出した。ジスルフィド結合は、50mM T r i s - C l , pH 7.5中で室温で3時間、15倍D H A Aによる再酸化を行うことにより、親モノクローナル抗体中に存在するシステイン残基との間で再形成された。当技術分野で公知の他の酸化体、すなわち、酸化剤、及び酸化条件を使用することができる。周囲の空気酸化もまた有効である。この穏やかな、部分的な再酸化工程は、高い忠実度で効率的に鎖内ジスルフィドを形成する。コンジュゲーションを生じさせてチオM a b抗体 - 薬剤コンジュゲートを形成するために、およそ1.5倍過剰の薬剤 - リンカー中間体、例えば5、8、14、18を添加し、混合し、室温で1時間放置した。コンジュゲーション混合物をH i T r a p S P F F カラムにロードして溶出し、過剰の薬剤 - リンカー中間体及び他の不純物を取り除いた。

【 0 1 1 7 】

N - メチルアラニニルメイタンシノール薬剤部分

本発明の抗体 - 薬剤コンジュゲート (A D C) 薬剤部分 (D) は、微小管阻害、有糸分裂阻害、トポイソメラーゼ阻害、又はD N A インターカレーショーンを含む任意の作用機序を通じて細胞毒性又は細胞増殖抑制作用を有するメイタンシノイド誘導体である。

【 0 1 1 8 】

メイタンシン化合物は、マイクロチューブリンタンパク質であるチューピュリンの重合阻害によって有糸分裂中の微小管の形成を阻害することによって、細胞増殖を阻害する (Remillard et al (1975) *Science* 189:1002-1005)。メイタンシン及びメイタンシノイドは非常に細胞傷害性であるが、癌治療におけるそれらの臨床用途は、それらの乏しい腫瘍選択性に主に起因するそれらの重篤な全身副作用によって非常に制限されている。メイタ

10

20

30

40

50

ンシンを用いた臨床試験は、中枢神経系および胃腸系に対する深刻な副作用に起因して中断された (Issel et al (1978) Can. Treatment. Rev. 5:199-207)。

【0119】

メイタンシノイド薬剤部分は、抗体 - 薬剤コンジュゲートにおいて魅力的な薬剤部分である。なぜなら、これらは以下であるからである：(i) 発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために比較的利用可能である、(ii) 非ジスルフィドリンカーを通しての抗体に対するコンジュゲーションに適している官能基を用いた誘導体化に適している、(iii) 血漿中で安定である、及び(iv) 様々な腫瘍細胞株に対して有効である (米国特許出願公開第2005/0169933号；国際公開第2005/037992号；米国特許第5208020号)。

10

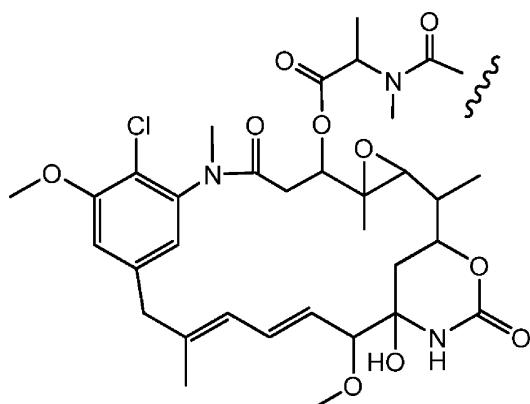
【0120】

メイタンシノイド誘導体は、公知の方法に従って、遺伝子工学技術を用いて生成される、天然起源から調製されるN-メチルアラニニルメイタンシノール化合物を含む (Yu et al (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 99:7968-7973；米国特許第6790954号；米国特許第7192750号)。最初にアフリカの低木から単離され (米国特許第3896111号)、メイタンシンは最も効率的に微生物発酵によって得られ (米国特許第4151042号；米国特許第6790954号；米国特許第7192750号；米国特許第7432088号)、C-3エステルアンサマイシン混合物を產生する。C-3エステルの還元はメイタンシノールを產生する (米国特許第7411063号；米国特許第6333410号)。メイタンシノールのC-3ヒドロキシルは、アラニニルエステルを含み (米国特許第4137230号；米国特許第4260608号；米国特許第5208020号；及びChem. Pharm. Bull. (1984) 12:3441)、選択的に誘導体化され得る (米国特許第7301019号；米国特許第7276497号；米国特許第7473796号；米国特許第7598375号)。

20

【0121】

式Iの抗体 - 薬剤コンジュゲート (ADC) のN-メチルアラニニルメイタンシノールの薬剤部分 (D) は次の構造を有する：



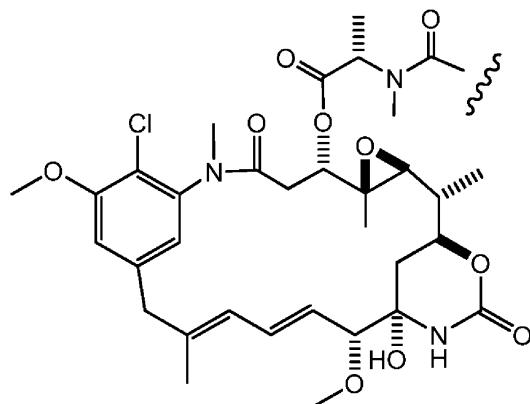
30

波線はリンカー (L) に対する結合部位を示す。

40

【0122】

メイタンシノイド薬剤部分の全ての立体異性体は、本発明の化合物、即ちD.のキラル炭素原子でのRとSコンフィギュレーションの任意の組み合わせを意図されている。一実施態様では、メイタンシノイド薬剤部分 (D) は、次の立体化学を有する。



10

【0123】

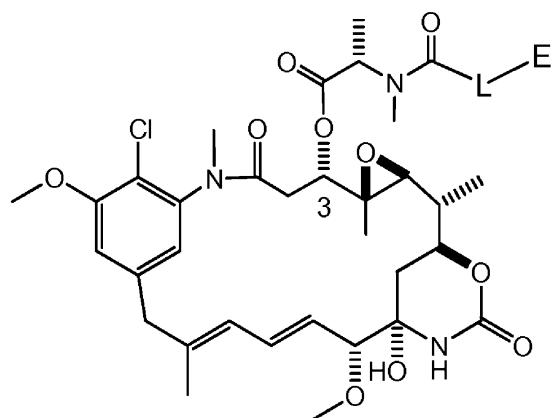
本発明の式Iの抗体-薬剤コンジュゲートのN-メチルアラニニルメイタンシノール薬剤部分(D)と薬剤-リンカー中間体は、米国特許出願公開第2005/0276812号の29頁と32頁にそれぞれ例示されたmpeo-DM1又はmcu-DM1結合など、メイタンシノイド薬剤部分のNメチルアラニニル基に結合したアルキルチオマレイミド結合でなく、Nメチルアラニニル基に対するアミドアルキル結合又はアミドエチレンオキシ結合を含む。

20

【0124】

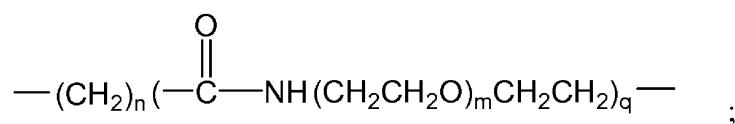
N-メチルアラニニルメイタンシノール薬剤-リンカー中間体

本発明はNメチルアラニニルメイタンシノール薬剤-リンカー中間体化合物を包含し、ここでリンカーはC-3アラニニルメイタンシノイド部分に結合し、式Iを有する：



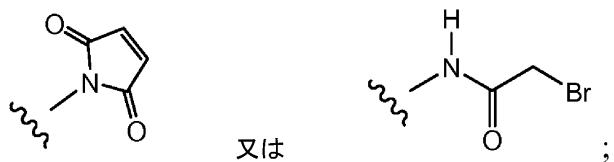
30

Lは、



40

Eは、



50

n は 2、3、4、5、又は 6 であり；

m は 2、3、又は 4 であり；及び

q は 0 又は 1 である。

【 0 1 2 5 】

リンカー (L) は、1つまたは複数のメイタンシノール薬剤部分 (D) および抗体ユニット (Ab) を連結して、式 Ia 又は Ib の抗体 - 薬剤コンジュゲート (ADC) を形成するためには用いることができる二官能性又は多官能性部分である。抗体 - 薬剤コンジュゲート (ADC) は、薬剤と抗体に結合するための反応性官能基を有するリンカーを用いて都合良く調製することができる。システイン操作抗体 (Ab) のシステインチオールは、リンカー試薬又は薬剤 - リンカー中間体の求電子性官能基 (E) との結合を形成することができる。プロモアセトアミド及びマレイミド官能基は、タンパク質のシステインチオールを含む、チオールと反応することができる (Schelte et al (2000) *Bioconjugate Chem.* 11:118-123; Alley et al (2008) *Bioconjugate Chem.* 19:759-765)。一様において、リンカーは、抗体に存在する求核システインに対して反応性である求電子基を持つ反応性部位を有する。抗体のシステインチオールは、リンカー上の求電子基と反応性であり、リンカーに共有結合を形成する。有用な求電子性基としては、限定されないが、マレイミド基及びハロアセトアミド基を含む。システイン操作抗体は、Klussman, et al (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773 の 766 頁のコンジュゲーション方法、及び実施例 6 のプロトコルに従って、例えばマレイミドまたは - ハロカルボニル等の求電子性官能基を持つリンカー試薬又は薬剤 - リンカー中間体と反応する。

10

20

【 0 1 2 6 】

チオール反応性官能基、求電子性官能基の例としては、限定されないが、マレイミド、 - ハロアセチル、スクシンイミドエステルなどの活性化エステル、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、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアネート、イソチオシアネート、ビニルスルホン、クロロトリアジン、2 - ハロピリジル、クロロピリミジン、及びエナミドが挙げられる。

【 0 1 2 7 】

薬剤 - リンカー中間体のリンカー部分は、2、3、4、5、又は 6 メチレン基のアルキルであり得、ここで L は



30

で、n は 2、3、4、5 又は 6 である。典型的な実施態様は、図 1 及び実施例 1 の mal - m c - a l a - M a y 薬剤 - リンカー中間体 5 であり、ここで E はマレイミドで n は 5 である。 (S) - 2 - (メチルアミノ) プロパン酸 (N - メチル S - アラニン) 2 による 2,5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 6 - (2,5 - ジオキソ - 2,5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) ヘキサノエート 1 のアシル化は、(S) - 2 - (2,5 - ジオキソ - 2,5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) - N - メチルヘキサンアミド) プロパン酸 3 を与える。メイタンシノール 4 の 3 ヒドロキシルでの 3 とのカップリングは mal - hex - a l a - M a y 5 を与え、抗体 - 薬剤コンジュゲートの Ab - hex - m c - a l a - M a y を与えるための抗体とのコンジュゲーションの準備ができる。

40

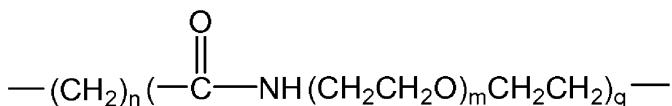
【 0 1 2 8 】

別の典型的な実施態様は、図 2 及び実施例 2 の bra - hex - a l a - M a y 8 であり、ここで E は 2 プロモアセトアミドで n は 5 である。 (S) - 2 - (メチルアミノ) プロパン酸 (N - メチル S - アラニン) 2 による 2,5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 6 - (2 プロモアセトアミド) ヘキサノエート 6 のアシル化は、(S) - 2 - (6 - (2 プロモアセトアミド) - N - メチルヘキサンアミド) プロパン酸 7 を与える。メイタンシノール 4 の 3 ヒドロキシルでの 7 とのカップリングは bra - hex - a l a - M a y 8 を与え、抗体 - 薬剤コンジュゲートの Ab - acet - hex - a l a - M a y を与えるための抗体とのコンジュゲーションの準備ができる。

50

【0129】

薬剤 - リンカー中間体のリンカー部分 L は、エチレンオキシ (PEG) ユニットを含み得、ここで L は



; n は 2、3、4、5、又は 6 であり；m は 2、3、又は 4 であり；及び q は 1 である。典型的な実施態様は、図 3 及び実施例 3 の m a l - P E G 3 - a l a - M a y 薬剤 - リンカ - 中間体 14 であり、ここで E はマレイミドで、n は 4、及び m は 3 である。アジビン酸から形成される、モノ N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステル、6 - (2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イルオキシ) - 6 - オキソヘキサン酸 9 を、2, 2' - (2, 2' - オキシビス (エタン - 2, 1 - ディル) ビス (オキシ)) デタノアミンと反応させて、1 - アミノ - 13 - オキソ - 3, 6, 9 - トリオキサ - 12 - アザオクタデカン - 18 - オイック酸 10 を与える。メチル 2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - カルボン酸により 10 のマレイミドが形成され、1 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) - 13 - オキソ - 3, 6, 9 - トリオキサ - 12 - アザオクタデカン - 18 - オイック酸 11 を与える。11 の NHS エステルが N - ヒドロキシスクシンイミドと DCC により形成され、2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル - 1 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) - 13 - オキソ - 3, 6, 9 - トリオキサ - 12 - アザオクタデカン 18 - オエート 12 を与える。(S) - 2 - (メチルアミノ) プロパン酸 (N - メチル S - アラニン) 2 による 12 のアミド化は、(S) - 1 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) - 19, 20 - ジメチル - 13, 18 - ジオキソ - 3, 6, 9 - トリオキサ - 12, 19 - ジアザヘニコサン - 21 - オイック酸 13 を与えた。メイタンシノール 4 の 3 ヒドロキシルでの 13 とのカップリングは m a l - P E G 3 - a l a - M a y 薬剤 - リンカ - 中間体 14 を与え、抗体 - 薬剤コンジュゲートの A b - m a l - P E G 3 - a l a - M a y を与えるための抗体とのコンジュゲーションの準備ができる。

【0130】

別法として、メイタンシノール 4 を、T H F / D M F 中で、N、N - ジイソプロピルエチルアミン、亜鉛トリフラート、及び (S) - 3, 4 - ジメチルオキサゾリジン - 2, 5 - ジオン 2 a と反応させて、3 - (S - (N - メチルアラニニル) メイタンシノール 4 a を与えた (図 1 b)。試薬 2 a は、D C M 中で、(S) - 2 - (メチルアミノ) プロパン酸 (N - メチル S - アラニン) 2 と三塩化リンから調製される。3 - (S - (N - メチルアラニニル) メイタンシノール 4 a を、1 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) - 13 - オキソ - 3, 6, 9 - トリオキサ - 12 - アザオクタデカン - 18 - オイック酸 11、N - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N' - エチルカルボジイミド塩酸塩、及び N、N - ジイソプロピルエチルアミンと結合させて、m a l - P E G 3 - a l a - M a y 14 を与える (図 3)。

【0131】

別の典型的な実施態様は、図 4 及び実施例 4 の b r a - P E G 3 - a l a - M a y 18 であり、ここで E は 2 プロモアセトアミドで n は 4 で、m は 3 である。1 - アミノ - 13 - オキソ - 3, 6, 9 - トリオキサ - 12 - アザオクタデカン - 18 - オイック酸 10 は、臭化プロムアセチルでアシル化され、1 - プロモ - 2, 16 - ジオキソ - 6, 9, 12 - トリオキサ - 3, 15 - ジアザヘニコサン - 21 - オイック酸 15 を与える。15 の NHS エステルが D C M 中で N - ヒドロキシスクシンイミドと DCC により形成され、2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル、1 - プロモ - 2, 16 - ジオキソ - 6, 9, 12 - トリオキサ - 3, 15 - ジアザヘニコサン - 21 - オエート 16 を与える。(S) - 2 - (メチルアミノ) プロパン酸 (N - メチル S - アラニン) 2 による 16 のアミド化は、リンカ - 試薬、(S) - 1 - プロモ - 22, 23 - ジメチル - 2, 16, 21 - トリオキ

10

20

30

40

50

ソ - 6 , 9 , 12 - トリオキサ - 3 , 15 , 22 - トリアザテトラコサン - 24 - オイック酸 17 を与えた。メイタンシノール 4 の 3 ヒドロキシルでの 17 とのカップリングは bra - PEG3 - ala - May 薬剤 - リンカー中間体 18 を与え、抗体 - 薬剤コンジュゲートの Ab - acet - PEG3 - ala - May を与えるための抗体とのコンジュゲーションの準備ができる。

【0132】

別法として、3 - (S - (N - メチルアラニニル)メイタンシノール 4a (図 1b) を、1 - ブロモ - 2 , 16 - ジオキソ - 6 , 9 , 12 - トリオキサ - 3 , 15 - ジアザヘニコサン - 21 - オイック酸 15 、N - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N' - エチルカルボジイミド塩酸塩、及びN、N - ディソプロピルエチルアミンと結合させて、bra - PEG3 - ala - May 18 を与える (図 4)。

10

【0133】

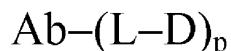
アラニニルメイタンシノイド抗体 - 薬剤コンジュゲート

本発明の抗体 - 薬剤コンジュゲートは、抗体の反応性システインチオール基へのリンカ一部を通じて共有結合したN - メチルアラニニルメイタンシノール薬剤部分からなる。

【0134】

抗体 - 薬剤コンジュゲート (ADC) の例示的実施態様は、システイン操作抗体 (Ab) 及びN - メチルアラニニルメイタンシノール薬剤部分 (D) を含み、ここでその抗体は、一以上の遊離システインアミノ酸を有し、かつその抗体はリンカ一部分 (L) により、一以上の遊離システインアミノ酸を通して D に結合され；その組成物は次の式を有する：

20

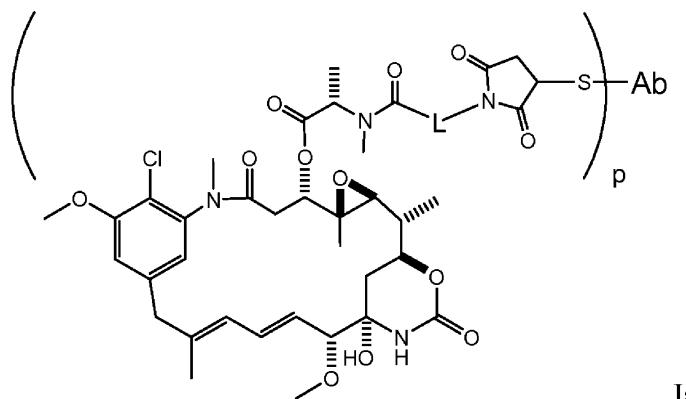


ここで p は 1 、 2 、 3 、又は 4 である。抗体分子にチオール反応性リンカ一部分を介してコンジュゲートさせることができる薬剤部分の数は、本明細書に記載の方法によって導入されたシステイン残基の数によって制限される。従って、式 I の薬剤 - リンカ中間体から調製された典型的な ADC は、1 つ、2 つ、3 つ、又は 4 つの操作されたシステインアミノ酸を有する抗体を含む。

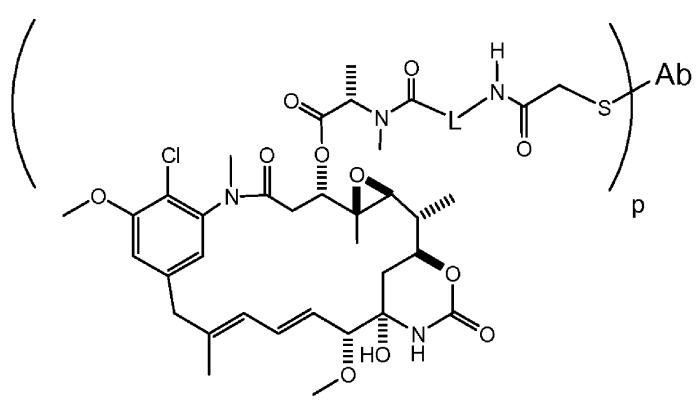
【0135】

アラニニルメイタンシノイド抗体 - 薬剤コンジュゲートの典型的な実施態様は式 Ia であり L はマレイミド部分を含み、そして式 Ib であり L はアセトアミドメチル部分を含む。

30

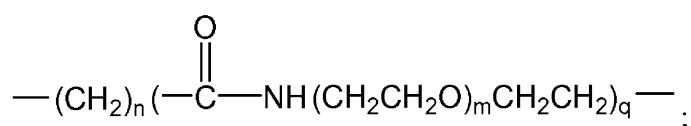


10



20

上は、



n は 2、3、4、5、又は 6 であり；

30

m は 2、3、又は 4 であり；

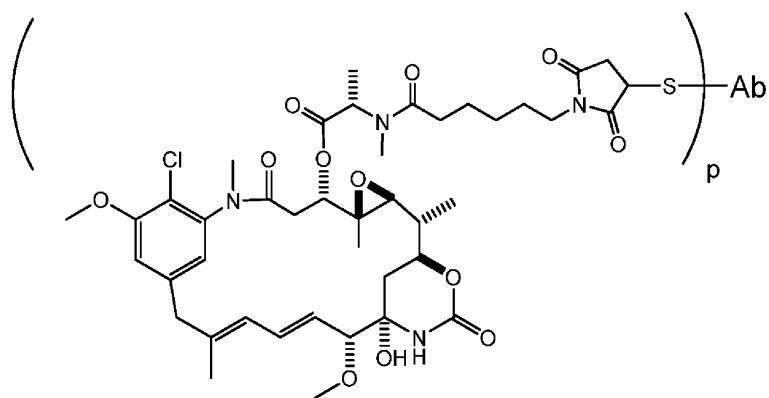
q は 0 又は 1 であり：

p は 1 から 4 であり；及び

A b は抗体である。

【 0 1 3 6 】

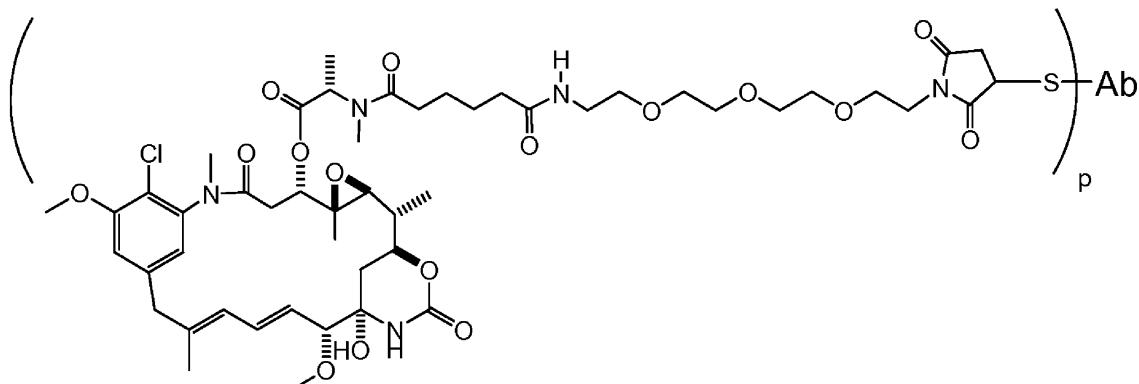
式 I a のアラニニルメイタンシノイド抗体 - 薬剤コンジュゲートの典型的実施態様は A
b - m a l - h e x - a l a - M a y :



40

及び A b - m a l - P E G 3 - a l a - M a y :

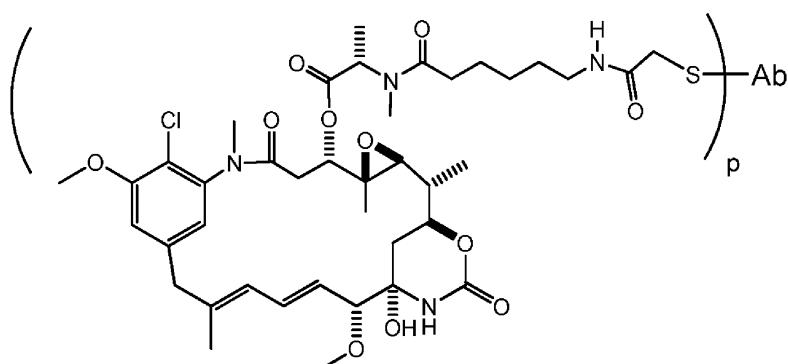
50



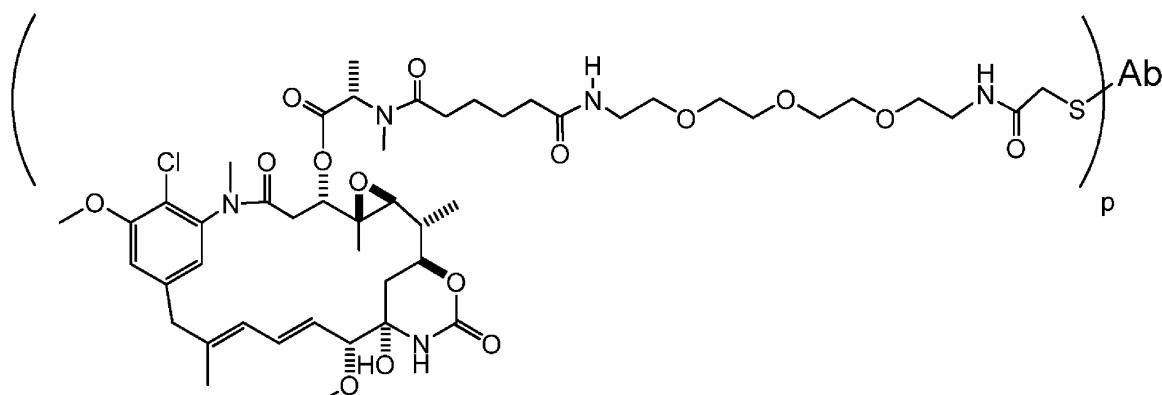
を含む。

【 0 1 3 7 】

式 I b のアラニニルメイタンシノイド抗体 - 薬剤コンジュゲートの典型的実施態様は A b - a c e t - h e x - a l a - M a y :



及び A b - a c e t - P E G 3 - a l a - M a y :



を含む。

【 0 1 3 8 】

本発明の A D C 化合物は、抗癌活性についての有用性を持つものを含む。特に、化合物は、薬剤部分、即ち毒素にコンジュゲートした、即ちリンカーにより共有結合したシステイン操作抗体が含まれる。薬剤が抗体にコンジュゲートしていないときは薬剤は細胞毒性または細胞増殖抑制効果を持つ。薬剤部分の生物学的活性は、抗体との結合によってこうして調節される。本発明の抗体 - 薬剤コンジュゲート (A D C) は、腫瘍組織への細胞毒性薬の有効用量を選択的に送達し、それによりより大きな選択性、即ちより少ない有効用量を達成することができる。

【 0 1 3 9 】

50

インピトロの細胞増殖アッセイ

一般に、抗体 - 薬剤コンジュゲート (ADC) の細胞毒性又は細胞増殖抑制効果は、細胞培養培地中で、レセプターランパク質、例えばHER2を有する哺乳動物細胞を細胞培地中でADCの抗体に曝露し；その細胞を約6時間から約5日間のある期間にわたって培養し；細胞生存率を測定することにより測定される。細胞ベースのインピトロアッセイが、本発明のADCの生存率(増殖)、細胞毒性、及びアポトーシスの誘導(カスパーゼ活性化)を測定するために用いられる。

【0140】

抗体 - 薬剤コンジュゲートのインピトロでの効力を細胞増殖アッセイにより測定した(実施例7)。CellTiter-Glo(登録商標)ルミネセンス細胞生存率アッセイは、鞘翅目ルシフェラーゼの組換え発現に基づいた市販の(Promega Corp., Madison, WI)、均質なアッセイ法である(米国特許第5583024号；5674713号及び5700670号)。この細胞増殖アッセイは、代謝的に活性な細胞の指標である存在するATPの定量に基づいて、培養中の生存細胞の数を決定する(Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88；米国特許第6602677号)。CellTiter-Glo(登録商標)アッセイは、96ウェル形式で行い、自動化ハイスクループットスクリーニング(HTS)に適応させた(Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404)。均質なアッセイ法では、血清添加培地で培養した細胞に直接単一試薬(CellTiter-Glo(登録商標)試薬)を追加することを含む。細胞の洗浄、培地の除去、及び複数のピペット操作は必要ではない。本システムは、試薬を添加して混合した後10分以内で、384ウェルフォーマットでわずか15細胞/ウェルを検出する。細胞は、ADCで連続的に処理され得るか、又はそれらはADCで処理されてADCから分離されても良い。一般に、細胞は短時間、即ち3時間処理され、連続的に処理された細胞と同様の効力の作用を示した。

【0141】

均質な「添加 - 混合 - 測定」の形式は、細胞の溶解と、存在するATPの量に比例する発光シグナルの生成とをもたらす。ATPの量は、培養物中に存在する細胞の数に直接比例する。CellTiter-Glo(登録商標)アッセイは、使用される細胞の型および培地に依存して、一般には5時間よりも長い半減期を有する、ルシフェラーゼ反応により生成される「グロー型」の発光シグナルを生成する。生存細胞は、相対発光単位(RLU)に反映される。基質のカブトムシルシフェリンは、組換えホタルルシフェラーゼによって酸化的に脱炭酸され、同時にATPのAMPへの変換を伴い光子を生成する。

【0142】

5日目のインピトロSK-BR-3細胞増殖アッセイの結果に対する試験サンプルの複数の濃度が表3に示される。

【0143】

全てのチオMab抗体 - 薬剤コンジュゲートはリンカーに関わらず類似のインピトロ効力を示し、これらのコンジュゲートはTMAb-mcc-DM1(IC₅₀: 5ng/ml)に比較して約2倍小さい効力を示した(表3)。チオMab ADCの薬剤負荷(1.8DAR)を従来のADCの薬剤負荷(3.5DAR)と比較したときに、チオMabによるインピトロでの効力の減少は、従来のADCに比例している。コントロールの非結合トラスツズマブ変異体又はチオトラスツズマブ変異体は、本アッセイで試験された最大10000ng/ml濃度で非常にわずかか或いは全く活性を示さなかった。

10

20

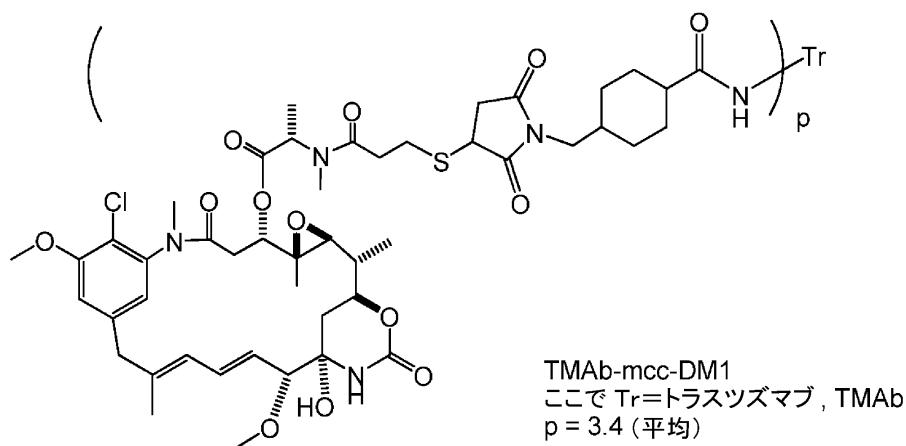
30

40

表3

試験サンプル	薬剤/抗体 (DAR)	IC ₅₀ (ng/ml)
トラスツズマブ	無し	> 10,000
チオトラスツズマブ LC V205C	無し	> 10,000
チオトラスツズマブ HC A118C	無し	> 10,000
(4) HC-A118C-チオ-TMAb-mal-PEG3-ala-May	1.8	10.7
(9) HC A118C-チオ-TMAb-mal-hex-ala-May	1.9	12.1
(6) TMAb-mcc-DM1 (T-DM1)	3.4	5.0
(5) LC-V205C-チオ-TMAb-mal-hex-ala-May	1.8	11.8
(3) LC-V205C-チオ-TMAb-mal-PEG3-ala-May	1.8	10.9

トラスツズマブ - m c c - D M 1 (トラスツズマブ エムタンシン (emtansine)、TMAb - M C C - D M 1、T - D M 1) は、抗体 - 薬剤コンジュゲート (CAS 登録番号 139504 - 50 - 0) で、次の構造を有する：



ここで、Trは、リンカー試薬スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル) (シクロヘキサン-1-カルボキシレートから形成された、マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレートリンカー部分 (mcc) を通して、メイタンシノイド薬剤部分 DM1 (米国特許第5208020号; 米国特許第6441163号) に結合したトラスツズマブである。薬剤の抗体に対する比率又は薬剤負荷は、上記のトラスツズマブ - m c c - D M 1 の構造でpにより表され、1から約8の整数値の範囲である。薬剤負荷の値は1から8である。トラスツズマブ - m c c - D M 1 は、様々に負荷され結合した抗体 - 薬剤コンジュゲートの全混合物を含み、ここでは1、2、3、4、5、6、7、及び8の薬剤

部分が抗体トラスツズマブに共有結合している（米国特許第7097840号；米国特許第2005/0276812号；米国特許第2005/0166993号）。

【0144】

インビポでの効力

TMAb-mccc-DM1(6)と、DM1に共有結合したmpeo(2)hex(5)及びPEG3(3),(4),(7),(8)リンカーを持つ様々なチオMabコンジュゲート（実施例6）がMMTV-HER2Fo5トラスツズマブ耐性乳腺腫瘍モデルで試験され、これらの結果を図5a、5b及び6に示した。MMTV-HER2Fo5腫瘍移植片が、CRLのnu/nuマウスの番号2/3乳腺脂肪パッド中に移植された。腫瘍が平均体積で180mm³に達したとき、マウスが無作為化され、次いで試験の第10日にDM1コンジュゲートの1回の静脈内投与（10g/kg）が与えられた。

【0145】

図5aおよび図5bは、(1)ビヒクル(ADCバッファー)、(2)LC-V205C-チオ-TMAb-mal-PEG3-alaa-May、(3)LC-V205C-チオ-TMAb-mal-PEG3-alaa-May、(4)HC-A118C-チオ-TMAb-mal-PEG3-alaa-May、(5)LC-V205Cチオ-TMAb-mal-hex-alaa-May、(6)TMAb-mccc-DM1(trastuzumab-mccc-DM1,T-DM1)、(7)LC-V205C-チオ抗gD5B6-mal-PEG3-alaa-May、(8)LC-V205C-チオ抗gD5B6-mal-hex-alaa-May（実施例6、8）を投与後に、CRLのnu/nuマウスの乳腺脂肪体に播種したMMTV-HER2Fo5トランスジェニック乳腺腫瘍において、時間に対してフィットさせた腫瘍体積変化のプロットを示す。全ての抗体-薬剤コンジュゲート（単一用量）は10mg/kgで静脈内投与した。抗gD5B6はコントロール抗体であり、それに対応する抗原はFo5腫瘍組織では発現しない。

【0146】

(6)TMAb-mccc-DM1は、10mg/kgで腫瘍増殖の一部の阻害を示し、それは、DM1投与量の560mg/m²と同じである、全てのチオTMAb-メイタンシノイドコンジュゲートは、より少ない薬剤負荷を有するにもかかわらず、同一の抗体濃度で、同等の活性を有していた。(3)LC-V205C-チオ-TMAb-mal-PEG3-alaa-Mayは、(2)LC-V205Cチオ-TMAb-mpeo-DM1とのmg/kg用量の比較においてわずかに改善された活性を示した（図5a）。hexとPEG3リンカーに結合するチオMabは、低い薬剤負荷に起因してインビトロで2倍小さい効力を示してはいるものの、それらはTMAb-mccc-DM1に対して同等のインビポでの有効性を示しており、hexとPEG3のアラニニルメイタンシノールリンカー薬剤部分が抗体-薬剤コンジュゲートの薬物動態特性を改善し得ることを示している。

【0147】

図6は、(1)ビヒクル：ヒスチジンバッファー#8：20mMヒスチジン酢酸、pH5.5, 240mMスクロース、0.02%PS20、(4)HC-A118C-チオ-TMAb-mal-PEG3-alaa-May、5mg/kg投与量、150μg/m²薬剤曝露、(4)HC-A118C-チオ-TMAb-mal-PEG3-alaa-May、10mg/kg投与量、300μg/m²薬剤曝露、(10)HC-A118Cチオ抗gD5B6-bra-PEG3-alaa-May、5mg/kg投与量、120μg/m²薬剤曝露、(10)HC-A118Cチオ抗gD5B6-bra-PEG3-alaa-May、10mg/kg投与量、240μg/m²薬剤曝露、(11)HC-A118CチオTMAb-bra-PEG3-alaa-May、5mg/kg投与量、115μg/m²薬剤曝露、(11)HC-A118CチオTMAb-bra-PEG3-alaa-May、10mg/kg投与量、230μg/m²薬剤曝露、(12)HC-A118C、LC-V205Cチオ-TMAb-mal-PEG3-alaa-May、5gm/kg投与量、320μg/m²薬剤曝露、(12)HC-A118C、LC-V205

10

20

30

40

50

Cチオ-TMAb-mal-PEG3-alaa-May, 10 g m / k g 投与量, 640 μ g / m² 薬剤曝露による投与後に、CRLのnu/nuマウスの乳腺脂肪体に播種したMMTV-HER2 Fo5トランスジェニック乳腺腫瘍において、時間に対してフィットさせた腫瘍体積変化のプロットを示す。全ての抗体-薬剤コンジュゲート（単一用量）は、研究の開始時に1回静脈内投与された。9匹の動物の一群に、特定の用量で抗体-薬剤コンジュゲートを投与した。

【0148】

ビヒクルと陰性コントロール（10）抗gD5B6抗体-薬剤コンジュゲートは腫瘍増殖作用を示さなかった。抗HER2抗体-薬剤コンジュゲート（4）、（11）及び（12）は用量依存性及びメイタンシノイド薬剤曝露依存性腫瘍増殖阻害を示した。（12） HC-A118C, LC-V205Cチオ-TMAb-mal-PEG3-alaa-Mayは、システインが重鎖のA118と軽鎖のV205に導入された二重変異体である。薬剤-リンカー中間体、mal-PEG3-alaa-May 14（実施例3）は、薬剤/抗体の比率が3.9でほぼ定量的に、二重変異体HC-A118C, LC-V205Cチオ-TMAbへコンジュゲートしていた。10 mg / k g のコンジュゲート（12）を投与された9匹の試験群の動物は2つの部分応答を示した。

【0149】

抗体-薬剤コンジュゲートの投与

本発明の抗体-薬剤コンジュゲートは治療されるべき疾患に適した任意の経路で投与され得る。ADCは典型的には非経口的に、すなわち点滴、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、20 髓腔内および硬膜外に投与される。

【0150】

薬学的製剤

本発明の治療用抗体-薬剤コンジュゲート（ADC）の薬学的製剤は、典型的には、非経口投与、すなわちボーラス、静脈内、腫瘍内注射用に、薬学的に許容される非経口ビヒクルとともに単位用量の注射可能形態で調製される。所望の程度の純度を有する抗体-薬剤コンジュゲート（ADC）は、任意で凍結乾燥製剤または水溶液の形態で薬学的に許容される希釈剤、担体、賦形剤または安定剤（Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition, Osol, A. Ed.）と混合される。

【0151】

抗体-薬剤コンジュゲート治療

本発明の抗体-薬剤コンジュゲートは、例えば腫瘍抗原の過剰発現によって特徴付けられる種々の疾患または障害を治療するために用いられ得る。典型的な病気または過剰増殖性疾患には、良性または悪性腫瘍、白血病及びリンパ系悪性腫瘍が含まれる。他には、神経細胞、グリア、星状、視床下部、マクロファージ、上皮性、間質性、胞胚腔（blastocoelic）、炎症性、血管新生及び自己免疫性を含む免疫に関する障害を含む。

【0152】

一般に、治療されるべき疾患又は障害は、癌などの過剰増殖性疾患である。ここで治療されるべき癌の例には、細胞腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病又は悪性リンパ腫を含むがこれらに限定されない。このような癌のより具体的な例には、扁平上皮癌（例えば上皮の扁平細胞癌）、小細胞肺癌を含む肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌及び肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞性癌、胃腸癌を含む胃（gastric, stomach）癌、肺癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、大腸癌、直腸癌、大腸直腸癌、子宮内膜ないし子宮細胞腫、唾液腺細胞腫、腎臓癌又は腎癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝細胞腫、食道細胞腫、肝細胞腫、肛門部の細胞腫、陰茎細胞腫、並びに頭部及び頸部の癌が含まれる。

【0153】

ADC化合物が治療において用いられ得る自己免疫性疾患は、リウマチ性疾患（例えば、関節リウマチ、シェーグレン症候群、強皮症、全身性エリテマトーデス（SLE）及びループス腎炎などの狼瘡、多発性筋炎/皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、抗リン脂質抗

10

20

30

40

50

体症候群、及び乾癬の関節炎など)、変形性関節症、自己免疫性胃腸及び肝臓疾患(例えば、炎症性腸疾患(例えば潰瘍性大腸炎及びクローニング)、自己免疫性胃炎及び悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆管萎縮症、原発性硬化性胆管炎、及び小児脂肪便病など)、血管炎(例えば、チャング-シュトラウス血管炎、ウェゲナー肉芽腫症及び多発性動脈炎を含むANCA-関連血管炎)、自己免疫性神経学的疾患(例えば、多発性硬化症、眼球クローヌスミオクローヌス症候群、重症筋無力症、視神経脊髄炎、パーキンソン病、アルツハイマー病、及び自己免疫性多発性神経炎など)、腎臓疾患(例えば、糸球体腎炎、グッドパスチャーリー症候群、及びベルガーリー病など)、自己免疫性皮膚科疾患(例えば、乾癬、尋常性天疱瘡、類天疱瘡、及び皮膚紅斑性狼瘡など)、血液系疾患(例えば、血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、輸血後の紫斑病、及び自己免疫溶血性貧血など)、アテローム性動脈硬化、ブドウ膜炎、自己免疫性聴覚疾患(例えば、内耳疾患及び聴力障害など)、ベーチェット病、レイノール症候群、臓器移植及び自己免疫性内分泌系疾患(例えば、インスリン依存型糖尿病(IDDM)などの糖尿病関連の自己免疫性疾患、アジソン病及び自己免疫性甲状腺疾患(例えばグレーブス病及び甲状腺炎)など)が含まれる。より好みの前記疾患には、例えば、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、ANCA関連血管炎、狼瘡、多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレーブス病、IDDM、悪性貧血、甲状腺炎及び糸球体腎炎が含まれる。

【0154】

疾患の予防又は治療のために、ADCの適量は、上記のように治療する疾患のタイプ、疾患の重症度及び過程、予防を目的としてか治療を目的として分子を投与するのか、現在の治療法、患者の病歴、及び抗体への反応、注意深い医師の判断により決定されるであろう。分子は、患者に対して、単回、又は一連の治療にわたって適切に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一回以上の別個の投与によるか、連続注入によるかに関わらず、約1μg/kgから15mg/kg(例えば0.1から20mg/kg)の分子が患者への投与のための初期候補用量となり得る。1つの典型的な一日当たりの用量は上記した要因に応じて約1μg/kgから100mg/kg又はそれ以上の範囲である。患者に投与されるべきADCの典型的な投与量は患者の体重の約0.1から約10mg/kgの範囲である。

【0155】

製造品

本発明の他の実施態様において、上述した障害の治療に有用な物質を含む製造品又は「キット」が提供される。製造品は、容器とラベルまたは容器上にあるまたは容器に付属するパッケージ挿入物を含む。好適な容器は、例としてボトル、バイアル、シリンジ、ブリスター包装等を含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な物質から形成されうる。容器は、疾患の治療のために有効である抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)及び無菌のアクセスポートを有し得る(例えば、容器は皮下注射針による穴あきストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい)。組成物中の少なくとも一の活性剤はADCである。ラベルまたはパッケージ挿入物は、組成物が選択される疾患、例えば癌の治療のために使用されることを示している。別法として、または加えて、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用静菌水(BWF)、リン酸緩衝化塩水、リンガーリー液及びデキストロース液を含む第二(または第三)の容器をさらに含んでもよい。これは、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジを含む、商業的およびユーザーの立場から望まれる他の物質をさらに含んでもよい。

【実施例】

【0156】

実施例1 mal-hex-al-a-May 5の合成

(S)-2-(メチルアミノ)プロパン酸(N-メチルS-アラニン)2による2,5-ジオキソピロリジン-1-yl 6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノエート1のアシル化は、(S)-2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-N-メチルヘキサンアミド

10

20

30

40

50

) プロパン酸 3 を与える(図1a)。メイタンシノール4の3-ヒドロキシルで3とカップリングさせてmal-hex-al-a-May 5を与える。MS [M + H]⁺ 843.5. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) : 7.11 (s, 1H), 6.76 (s, 2H), 6.72 - 6.65 (m, 2H), 6.60 (dd, J = 14.7, 11.4 Hz, 1H), 5.69 (dd, J = 14.9, 9.1 Hz, 1H), 5.49 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 4.65 (dd, J = 11.9, 2.1 Hz, 1H), 4.19 (td, J = 10.3, 4.1 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.62 - 3.55 (m, 2H), 3.41 - 3.34 (m, 5H), 3.23 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 3.20 (s, 3H), 2.94 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 2.84 (s, 3H), 2.72 - 2.62 (m, 1H), 2.56 - 2.45 (m, 1H), 2.33 - 2.23 (m, 1H), 2.14 (dd, J = 14.1, 1.8 Hz, 1H), 1.68 (s, 3H), 1.65 - 1.42 (m, 7H), 1.29 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.28 - 1.25 (m, 2H), 1.23 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.84 (s, 3H)。 10

【0157】

実施例2 bra-hex-al-a-May 8の合成

(S)-2-(メチルアミノ)プロパン酸(N-メチルS-アラニン)2による2,5-ジオキソピロリジン-1-イル6-(2プロモアセトアミド)ヘキサノエート6のアシル化は、(S)-2-(6-(2プロモアセトアミド)-N-メチルヘキサンアミド)プロパン酸7を与える(図2)。メイタンシノール4の3-ヒドロキシルで7とカップリングさせてbra-hex-al-a-May 8を与える。 20

【0158】

実施例3 mal-PEG3-al-a-May 14の合成

2,2'-(2,2'-オキシビス(エタン-2,1-ジイル)ビス(オキシ))ジエタンアミン(Chem-Impex, 5.00 g, 0.0260 mol)のTHF溶液(525 mL)に4-ジメチルアミノピリジン(320 mg, 0.0026 mol)が添加された。添加漏斗を使用して室温で、これに二炭酸ジ-tert-ブチル(5.68 g, 0.0260 mol)のTHF溶液(100 mL)が1時間にわたって添加された。(図3)。反応物は、最初は濁ったが、その後清澄となった。McReynolds K.D. et al., (2002), Bioorg Med Chem, 10: 625に従い、反応物をさらに2時間攪拌し、次いで濃縮し、ISCO(0-20% MeOH/DCM)により精製し、tert-ブチル2-(2-(2-(2-アミノエトキシ)エトキシ)エトキシ)エチルカルバメートを淡黄色油として得た(2.70 g, 36%)。MS [M + H]⁺ 293.3. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 5.79 (s, 1H), 3.69 - 3.57 (m, 8H), 3.56 - 3.47 (m, 4H), 3.32 - 3.23 (m, 2H), 2.84 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H)。 30

【0159】

tert-ブチル2-(2-(2-(2-アミノエトキシ)エトキシ)エトキシ)エチルカルバメート(1.219 g, 4.169 mmol)とヘキサン二酸(アジピン酸、3.046 g, 20.84 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(100 mL)を含有するフラスコに、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(1.23 g, 5.98 mmol)が添加された。反応物を室温で攪拌すると白濁した。2時間後、溶液を0℃に冷却し、副生成物のN,N'-ジシクロヘキシル尿素をろ過により除去した。反応物をシリカゲル上で濃縮し、ISCO(40 g column, 0-10% MeOH/DCM)により精製した。濃縮して、2,2-ジメチル-4,18-ジオキソ-3,8,11,14-テトラオキサ-5,17-ジアザトリコサン-23-オイック酸を透明油として与えた(1.28 g, 73%)。 40

MS [M + H]⁺ 421.4. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 10.55 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.27 (s, 1H), 3.67 - 3.62 (s, 1H)。 50

m, 8 H), 3.60 - 3.52 (m, 4 H), 3.48 - 3.41 (m, 2 H), 3.35 - 3.23 (m, 2 H), 2.35 (t, J = 6.3 Hz, 3 H), 2.25 (t, J = 6.5 Hz, 2 H), 1.44 (s, 9 H)。

【0160】

2,2-ジメチル-4,18-ジオキソ-3,8,11,14-テトラオキサ-5,17-ジアザトリコサン-23-オイック酸9 (682.3 mg, 0.001623 mol) を含有するバイアルに、1,4-ジオキサン中の4 M 塩化水素を4 mL 添加した。反応物を30分間攪拌し、次いで濃縮した。炭酸水素ナトリウムの飽和水溶液(5.1 mL)を加えた。溶液を0℃に冷却し、10分間攪拌した後、N-メトキシカルボニルマレイミド(251.7 mg, 1.622 mmol)を加えた。反応物を0℃で20分間、より攪拌し、次いで室温に温めた。この溶液を、DMFで希釈し、ギ酸の5滴で急冷し、濾過し、¹H NMRにより精製し、1-アミノ-13-オキソ-3,6,9-トリオキサ-12-アザオクタデカン-18-オイック酸10を透明油として与えた(297 mg, 46%)。MS [M+H]⁺ 401.3. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 8.66 (s, 1 H), 6.56 (t, J = 4.8 Hz, 1 H), 3.73 (t, J = 5.6 Hz, 2 H), 3.66 - 3.60 (m, 9 H), 3.56 (t, J = 5.0 Hz, 2 H), 3.47 - 3.41 (m, 2 H), 2.35 (t, J = 6.7 Hz, 2 H), 2.24 (t, J = 6.9 Hz, 2 H), 1.77 - 1.58 (m, 4 H)。

【0161】

メチル2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸により10のマレイミドが形成され、1-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-13-オキソ-3,6,9-トリオキサ-12-アザオクタデカン-18-オイック酸11を与える(Hermanson, G.T. "Bioconjugate Techniques", Second Edition, (2008) Academic Press, Elsevier)。11のNHSエステルがDCM中でN-ヒドロキシスクシンイミドとDCCにより形成され、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル、1-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-13-オキソ-3,6,9-トリオキサ-12-アザオクタデカン-18-オエート12を与える。(S)-2-(メチルアミノ)プロパン酸(N-メチルS-アラニン)2による12のアミド化は、(S)-1-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-19,20-ジメチル-13,18-ジオキソ-3,6,9-トリオキサ-12,19-ジアザヘニコサン-21-オイック酸13を与えた。マレイミド4の3-ヒドロキシルでの13とのカップリングは、mal-P EG3-al a-May薬剤-リンカー中間体14を与える。

【0162】

別法では、メイタンシノール4 (50.0 mg, 0.0885 mmol) のDMF (1.12 mL, 14.5 mmol) 及びTHF (380 mL, 4.6 mmol) の溶液に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (62 mL, 0.35 mmol)、亜鉛トリフラート (129 mg, 0.354 mmol)、及び(S)-3,4-ジメチルオキサゾリジン-2,5-ジオン2a (80.0 mg, 0.619 mmol) が添加された(図1b)。反応物を24時間攪拌し、酢酸エチル(2 mL)を添加し、次いで5分間かけて、飽和1:1炭酸水素ナトリウム(水溶液)/塩化ナトリウム(水溶液)の溶液2 mLを添加した。溶液を30分間攪拌した後、塩を濾過し、酢酸エチルですすいだ。二相を分離し、水相を酢酸エチル3×2 mLで抽出した。混合した有機相を0.25 mLまで濃縮した。酢酸エチル2 mLを加え、溶液を再び0.25 mLまで減少させた。この希釈と濃度をもう一回行った。最後に、酢酸エチルを約2 mL溶液となるように添加し、沈殿した塩を0.45ミクロンのシリンドリフィルターを通して濾過し、3-(S-(N-メチルアラニニル)メイタンシノール4aを与えた(図1b)。

【0163】

3-(S-(N-メチルアラニニル)メイタンシノール4aの溶液に、1-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-13-オキソ-3,6,9

10

20

30

40

50

- トリオキサ - 12 - アザオクタデカン - 18 - オイック酸 11 (65.5 mg , 0.1 64 mmol) 、 N - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N ' - エチルカルボジイミド塩酸塩 (31.4 mg , 0.164 mmol) 、 及び N , N - ジイソプロピルエチルアミン (7.71 mL , 0.0442 mmol) を添加した。反応液を 2 時間攪拌し、反応物を濾過し、 RP - HPLC で精製し、 mal - PEG 3 - ala - May 14 を透明油として与えた (48.8 mg , 53%) 。 MS [M + H] ⁺ 1032.7 . ¹ H NMR (400 MHz , CDCl₃) : 6.83 (s , 1H) , 6.71 (s , 2H) , 6.70 - 6.64 (m , 2H) , 6.47 - 6.37 (m , 2H) , 6.27 (t , J = 4.8 Hz , 1H) , 5.67 (dd , J = 15.3 , 9.1 Hz , 1H) , 5.35 (q , J = 6.7 Hz , 1H) , 4.78 (dd , J = 12.0 , 2.8 Hz , 1H) , 4.29 (t , J = 10.8 Hz , 1H) , 3.98 (s , 3H) , 3.72 (t , J = 5.7 Hz , 2H) , 3.67 - 3.56 (m , 12H) , 3.54 - 3.48 (m , 3H) , 3.44 - 3.38 (m , 2H) , 3.36 (s , 3H) , 3.19 (s , 3H) , 3.11 (d , J = 12.7 Hz , 1H) , 3.01 (d , J = 9.6 Hz , 1H) , 2.84 (s , 3H) , 2.60 (dd , J = 14.1 , 12.4 Hz , 1H) , 2.48 - 2.38 (m , 1H) , 2.30 - 2.13 (m , 4H) , 1.75 - 1.58 (m , 8H) , 1.52 - 1.40 (m , 1H) , 1.29 (t , J = 6.0 Hz , 6H) , 1.22 (d , J = 12.9 Hz , 1H) , 0.80 (s , 3H) 。

【 0164 】

実施例 4 bra - PEG 3 - ala - May 18 の合成

2,2 - ジメチル - 4,18 - ジオキソ - 3,8,11,14 - テトラオキサ - 5,17 - ジアザトリコサン - 23 - オイック酸 9 (321.8 mg , 0.7653 mmol) を含有するバイアルに、 1 mL の塩化メチレンと 1 mL のトリフルオロ酢酸を添加した。反応物を 30 分間攪拌し、濃縮し、 1 - アミノ - 13 - オキソ - 3,6,9 - トリオキサ - 12 - アザオクタデカン - 18 - オイック酸 10 を得た (図 3) 。

【 0165 】

N , N - ジメチルホルムアミド (7.65 mL) を 10 のバイアルに添加し、溶液を 0 まで冷却した (図 4) 。臭化プロモアセチル (7.3 mL , 0.842 mmol) を添加し、 続いて N , N - ジイソプロピルエチルアミン (16.0 mL , 0.918 mmol) を添加した。 45 分間攪拌した後、 0.1 % のギ酸を含む水 2 mL を溶液に添加し、生成物を RP - HPLC により精製し、 1 - プロモ - 2,16 - ジオキソ - 6,9,12 - トリオキサ - 3,15 - ジアザヘニコサン - 21 - オイック酸を透明油として与えた (89.6 mg , 27%) 。 MS [M + H] ⁺ 441.3 . ¹ H NMR (400 MHz , CDCl₃) : 7.12 (s , 1H) , 6.48 (s , 1H) , 3.89 (s , 2H) , 3.69 - 3.54 (m , 12H) , 3.53 - 3.41 (m , 4H) , 2.36 (t , J = 6.6 Hz , 2H) , 2.24 (t , J = 6.8 Hz , 2H) , 1.76 - 1.59 (m , 4H) 。

【 0166 】

15 の NHS エステルが DCM 中で N - ヒドロキシスクシンイミドと DCC により形成され、 2,5 - ジオキソビロリジン - 1 - イル、 1 - プロモ - 2,16 - ジオキソ - 6,9,12 - トリオキサ - 3,15 - ジアザヘニコサン - 21 - オエート 16 を与える。 (S) - 2 - (メチルアミノ) プロパン酸 (N - メチル S - アラニン) 2 による 16 のアミド化は、 リンカー試薬、 (S) - 1 - プロモ - 22,23 - ジメチル - 2,16,21 - トリオキソ - 6,9,12 - トリオキサ - 3,15,22 - トリアザテトラコサン - 24 - オイック酸 17 を与える。マレイミド 4 の 3 - ヒドロキシルでの 17 とのカップリングは、 bra - PEG 3 - ala - May 薬剤 - リンカー中間体 18 を与える (図 4) 。

【 0167 】

別法として、 3 - (S - (N - メチルアラニニル) メイタンシノール 4a の溶液に、 1 - プロモ - 2,16 - ジオキソ - 6,9,12 - トリオキサ - 3,15 - ジアザヘニコサン - 21 - オイック酸 15 (72.2 mg , 0.164 mmol) 、 N - (3 - ジメチル

10

20

30

40

50

アミノプロピル) - N' - エチルカルボジイミド塩酸塩 (31.4 mg, 0.164 mmol)、及びN, N - デイソプロピルエチルアミン (7.71 mL, 0.0442 mmol)を添加した。反応液を2時間攪拌し、反応物を濾過し、RP - HPLCで精製し、br a - PEG 3 - ala - May 18を透明油として与えた (53.3 mg, 56%)。MS [M + H]⁺ 1073.0. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 7.10 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.48 - 6.37 (m, 2H), 6.32 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 5.68 (dd, J = 15.3, 9.1 Hz, 1H), 5.31 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 4.79 (dd, J = 12.0, 2.8 Hz, 1H), 4.29 (t, J = 11.2 Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.87 (s, 2H), 3.65 - 3.62 (m, 9H), 3.61 - 3.58 (m, 3H), 3.54 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.50 - 3.47 (m, 3H), 3.42 (dd, J = 9.8, 4.9 Hz, 2H), 3.36 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 3.12 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 3.00 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 2.85 (s, 3H), 2.60 (dd, J = 14.1, 12.4 Hz, 1H), 2.49 - 2.12 (m, 6H), 1.69 - 1.57 (m, 7H), 1.46 (qd, J = 12.8, 6.4 Hz, 1H), 1.31 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.28 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.23 (d, J = 13.0 Hz, 1H), 0.80 (s, 3H)。 10

【0168】

実施例5 還元及び再酸化によるコンジュゲーション用システイン操作抗体の調製

20

軽鎖アミノ酸は Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, (1991) 5th Ed., US Dept of Health and Human Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)。重鎖アミノ酸は、Kabat システムと記された場合を除いて EU番号付けシステムに従って番号付けされる (Edelman et al (1969) Proc. Natl. Acad. of Sciences 63(1):78-85)。一文字アミノ酸略語が使用される。

【0169】

CHO細胞で発現された全長のシステイン操作モノクローナル抗体 (チオMab) は、細胞培養条件によって、システイン付加体 (システイン) を有するか又は操作されたシステインにグルタチオン付加される。操作されたシステインの反応性チオール基を遊離させるために、チオMabを、pHが約8.0にて、500 mMのホウ酸ナトリウム及び500 mM塩化ナトリウムに溶解させ、1 mMのTCEP (トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩の約50~100倍過剰で約1~2時間37で還元する。あるいは、DTTを還元試薬として用いることができる。鎖間ジスルフィド結合の形成は、非還元 SDS-PAGEによるか、又は逆相HPLC PLRPカラムクロマトグラフィーを変性させるのいずれかによってモニターした。還元されたチオMabは10 mM酢酸ナトリウムpH5で希釈され、HiTrap Sカラム上にロードされ、0.3 M塩化ナトリウムを含むPBSで溶出した。溶出された還元型チオMabは、3時間、pH7で、2 mMのデヒドロアスコルビン酸 (d h A A) で処理されるか、又は一晩室温で2 mMの硫酸銅 (CuSO₄) 水溶液で処理される。周囲の空気酸化もまた有効であり得る。バッファーはセファデックスG25樹脂上で溶出によって交換され、1 mMのDTPAを含むPBSで溶出される。チオール/Abの値が、溶液の280 nmでの吸光度から還元された抗体濃度を決定すること及びDTNB (Aldrich, Milwaukee, WI)との反応によるチオール濃度を決定すること、及び412 nmでの吸光度の決定によりチェックされる。 30 40

【0170】

液体クロマトグラフィー/質量分析は、拡張された質量範囲でTSQ量子トリプル四重極質量分析計で行った (Thermo Electron, San Jose California)。サンプルは75に加熱したPRLP-S1000 A、マイクロボアカラム (50 mm × 2.1 mm, Polymer Laboratories, Shrop- 50

shire, UK) でクロマトグラフィーにかけた。30 - 40 % の B の直線勾配 (溶媒 A : 0.05 % TFA 水溶液 : アセトニトリル中 0.04 % の TFA) が用いられ、溶離液は、エレクトロスプレー源を使用して直接イオン化された。データは、Xcalibur データシステムによって収集され、デコンボリューションは、ProMass (Novatia, LLC, New Jersey) を用いて行った。LC/MS 分析の前に、抗体又は薬剤コンジュゲート (50 マイクログラム) が PNGase F (2 単位 / ml; PROzyme, San Leandro, CA) により 37 °C で 2 時間処理され、N 結合型糖を除去した。

【0171】

疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) のサンプルが、ブチルHIC NPR カラム (2.5 ミクロンの粒子サイズ、4.6 mm × 3.5 cm) (東ソーバイオサイエンス) に注入され、0.8 ml / 分で 0 から 70 % の B の線形勾配で溶出した (A : 50 mM リン酸カリウム中 1.5 M の硫酸アンモニウム、pH 7、B : 50 mM のリン酸カリウム pH 7、20 % イソプロパノール)。多波長検出器と Chemstation ソフトウェアを備えた Agilent 1100 シリーズ HPLC システムが、抗体当たりの薬剤の異なる比率を有する抗体種を分離し、定量化するために使用された。

10

【0172】

実施例 6 抗体への薬剤 - リンカー中間体のコンジュゲーション

実施例 5 の還元と再酸化法の後、システイン操作抗体を PBS (リン酸緩衝生理食塩水) 緩衝液に溶解し、氷上で冷却した。マレイミド又はプロモ酢酸などのチオール反応性官能基を含む 5、8、14 及び 18 などのメイタンシノイド薬剤リンカー中間体の抗体あたりの操作されたシステインに対して約 1.5 モル当量が DMSO に溶解され、アセトニトリルと水で希釈され、PBS 中で冷却され還元され再酸化された抗体に添加された。約 1 時間後、過剰のマレイミドを添加して反応を停止させ、未反応抗体のチオール基を覆った。反応混合物を遠心限外濾過により濃縮し、システイン操作トラスツズマブ抗体 - 薬剤コンジュゲートを精製し、PBS 中での G25 樹脂を通す溶出によって脱塩し、無菌条件下で 0.2 μm のフィルターを通して濾過し、貯蔵のために凍結した。

20

上記の手順で、式 I の以下のシステイン操作型 N - メチルアラニニルメイタンシノール抗体 - 薬剤コンジュゲートが調製された：

図 5a, 5b, 6	抗体 - 薬剤コンジュゲート	薬剤/抗体 (DAR)	薬剤-リンカー 中間体
(3)	LC-V205C チオ-TMAb-mal-PEG3-ala-May	1.8	14
(4)	HC-A118C チオ-TMAb-mal-PEG3-ala-May	1.8	14
(5)	LC-V205C チオ-TMAb-mal-hex-ala-May	1.8	5
(7)	LC-V205C チオ 抗 gD5B6-mal-PEG3-ala-May	1.8	14
(8)	LC-V205C チオ 抗 gD5B6-mal-hex-ala-May	1.8	5
(9)	HC-A118C チオ TMAb-mal-hex-ala-May	1.9	5
(10)	HC-A118C チオ 抗 gD5B6-bra-PEG3-ala-May	1.5	18
(11)	HC-A118C チオ TMAb-bra-PEG3-ala-May	1.4	18
(12)	HC-A118C, LC-V205C チオ-TMAb-mal-PEG3-ala-May	3.9	14

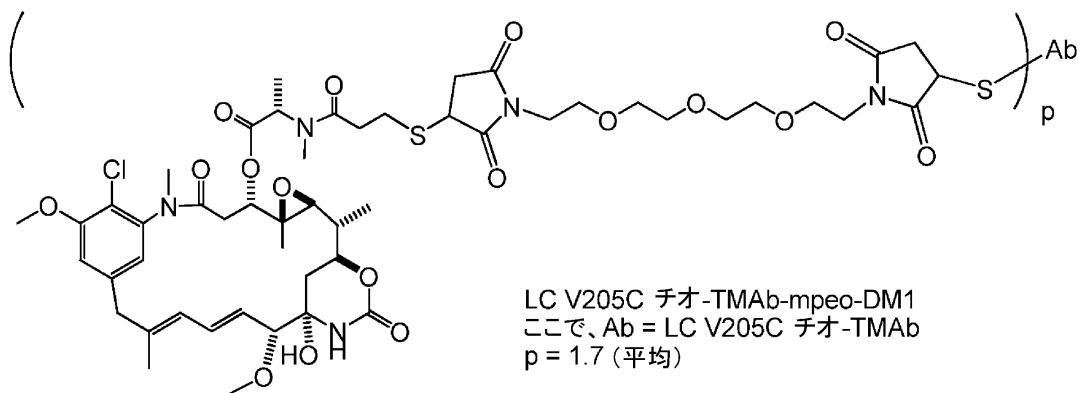
マレイミド DM 1 コンジュゲート、(2) LC V 2 0 5 C チオ - T M A b - m p e o - DM 1 , 平均薬剤付加 D A R = 1 . 7 , 及び (6) T M A b - m c c - D M 1 , 平均薬剤付加 D A R = 3 . 4 が、米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 7 6 8 1 2 号の実施例 4 の手順に従って調製され、それは参照により組み込まれる。

10

20

30

40



10

【0173】

実施例7 インビトロ細胞増殖アッセイ

ADCの有効性は、以下のプロトコルを用いて細胞増殖アッセイにより測定した (CELLTITER GLOTM Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza et al (2002) Cancer Res. 62:5485-5488) :

1. 培地に約10⁴細胞 (SKBR-3, BT474, MCF7又はMDA-MB-468) を含む細胞培養物の100μlのアリコートを、96ウェルの不透明壁のプレートの各ウェルに沈着させた。

2. コントロールウェルは細胞無しで培地を含有して調製した。

3. ADCを実験ウェルに添加し、3-5日間インキュベートした。

4. プレートを約30分間室温にて平衡化した。

5. 各ウェル中に存在する細胞培養培地の容積に等しい容積のCELLTITER GLOTM 試薬を加えた。

6. 内容物をオービタルシェーカーで2分間混合して細胞溶解を誘導した。

7. プレートは、発光シグナルを安定化させるために10分間室温でインキュベートした。

8. 発光を記録し、RLU = 相対発光単位としてグラフにて報告された。

データは、標準偏差誤差バーと共に、反復の各組について発光の平均値としてプロットされている。プロトコルはCELLTITER GLOTM 発光細胞の変形である。

培地: SK-BR-3は50/50/10% FBS/グルタミン/250μg/mL G-418で生育し、OVCA-R-3はRPMI/20% FBS/グルタミンで生育する。

【0174】

実施例8 高発現HER2トランスジェニック外植マウスにおける腫瘍増殖阻害、インビボでの有効性

F05マウス乳腺腫瘍モデルが、前述のように単一用量の静脈注射後に、(6)本発明のTMAb-mcc-DM1及び様々なチオ-TMAb-Mayのインビボ有効性を評価するために採用され (Phillips GDL, Li GM, Dugger DL, et al. Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody-Cytotoxic Drug Conjugate. (2008) Cancer Res. 68:9280-90)、参照により本明細書に組み込まれる。F05モデルは、トランスジェニックマウスマodelであり、ヒトHER2遺伝子が、マウス乳腺腫瘍ウイルスプロモーター (MMTV-HER2) の転写制御下で乳腺上皮において過剰発現される。HER2過剰発現は乳腺腫瘍の自発的な増殖を引き起す。これらの樹立動物 (樹立#5 [F05]) の一匹の乳腺腫瘍は腫瘍断片 (~2×2mmの大きさ) の連続移植によってFVBマウスの後の世代に伝播される。すべての研究は、実験動物の管理と使用に関するガイドラインに従って実施された。各抗体-薬剤コンジュゲート (単一用量は、) 研究の開始、及び移植後第14日に9匹の動物に静脈内投与した。初期腫瘍サイズは約200

30

40

50

mm³ の体積であった。本発明による抗体 - 薬剤コンジュゲートとコントロールによる時間の経過による腫瘍増殖阻害の測定は図 5 a、5 b、及び 6 に示される。

明細書全体を通して引用された全ての特許、特許出願、及び参考文献は、出典明示により援用される。

【図 1 a】

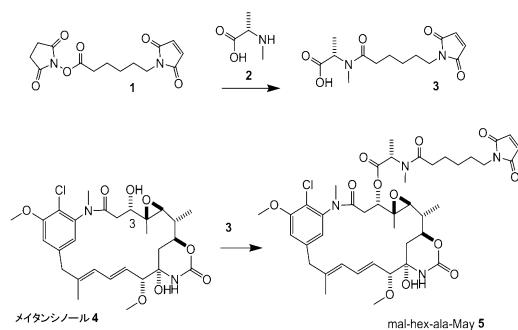


Figure 1a

【図 2】

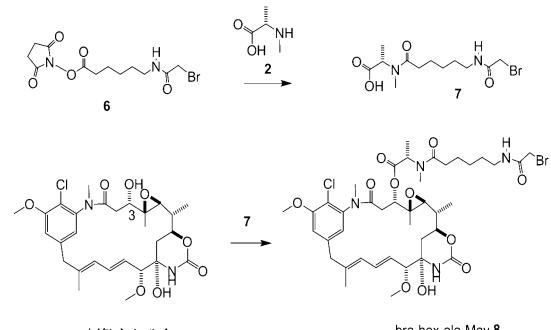


Figure 2

【図 1 b】

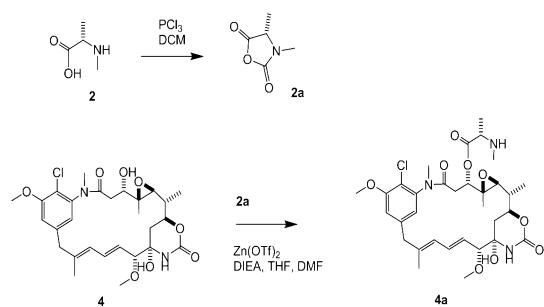


Figure 1b

【図3】

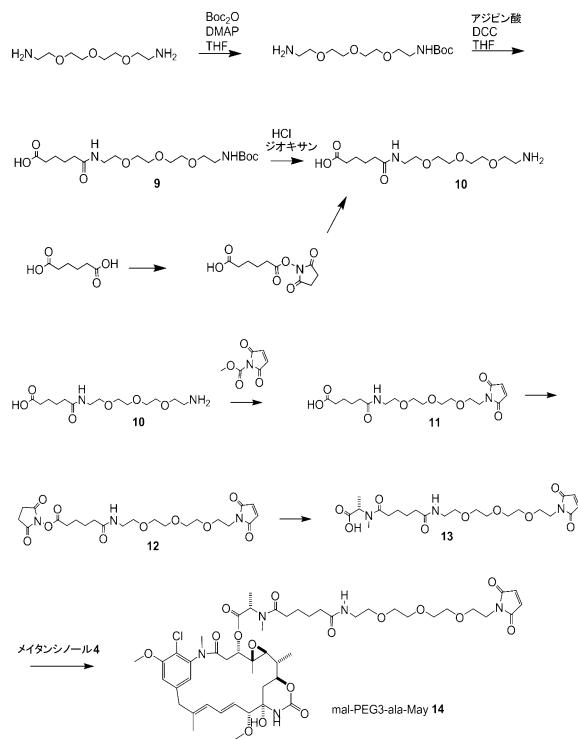


Figure 3

【図4】

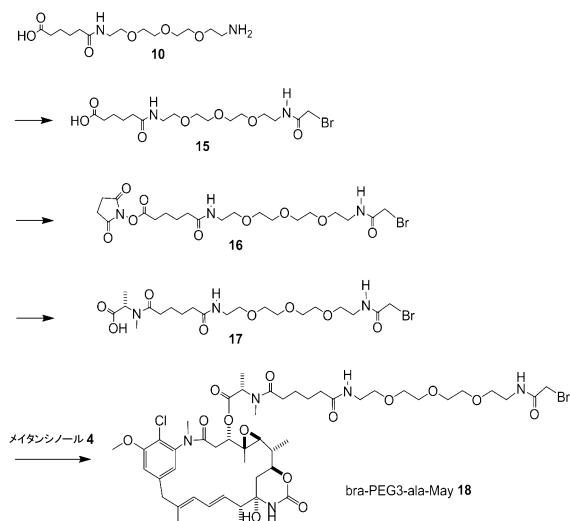


Figure 4

【図5a】

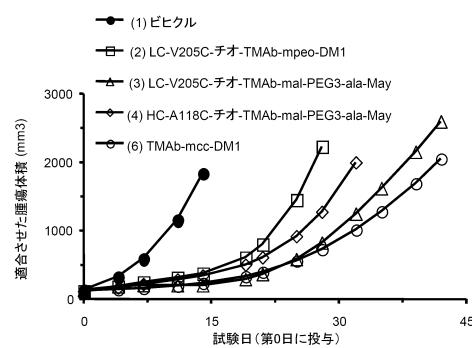


Figure 5a

【図5b】

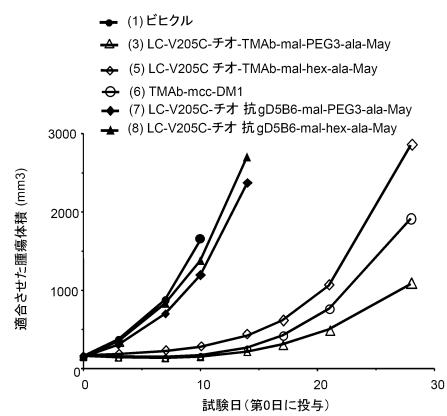


Figure 5b

【図6】

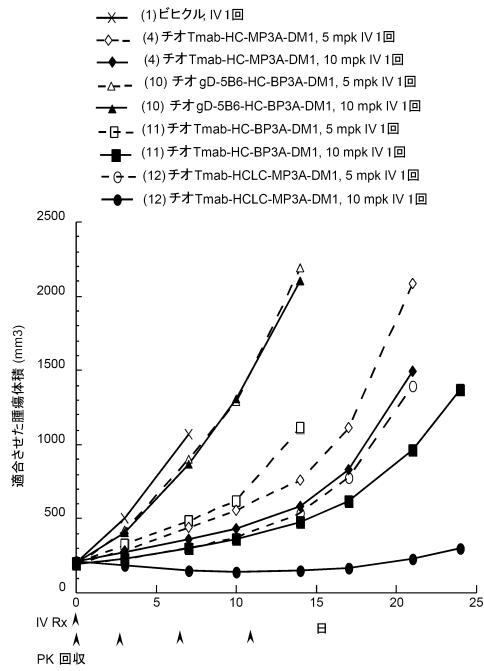


Figure 6

【配列表】

0005889912000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 K	31/537	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 31/537
			A 6 1 K 39/395 L

(72)発明者 ジャヌトウラ, ジャガス レディ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー / オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 ピロー, トーマス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー / オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

審査官 吉田 直裕

(56)参考文献 特表2008-501029 (JP, A)
特表2007-520450 (JP, A)
特表2009-504655 (JP, A)
特表2003-503365 (JP, A)
国際公開第2010/126551 (WO, A1)
米国特許出願公開第2010/0158928 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)