

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第5020636号
(P5020636)

(45) 発行日 平成24年9月5日 (2012.9.5)

(24) 登録日 平成24年6月22日 (2012.6.22)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 5/062 (2006.01)	C O 7 K 5/062 Z N A
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 G
請求項の数 128 (全 243 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2006-538564 (P2006-538564)	(73) 特許権者	505314468
(86) (22) 出願日	平成16年11月5日 (2004.11.5)		シアトル ジェネティックス, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2007-514652 (P2007-514652A)		アメリカ合衆国 ワシントン 98021
(43) 公表日	平成19年6月7日 (2007.6.7)		, ボセル, エス. イー., 30ティ
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/038392		ーエイチ ドライブ - 21823
(87) 国際公開番号	W02005/081711	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成17年9月9日 (2005.9.9)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成19年10月29日 (2007.10.29)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/518,534		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成15年11月6日 (2003.11.6)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/557,116		
(32) 優先日	平成16年3月26日 (2004.3.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

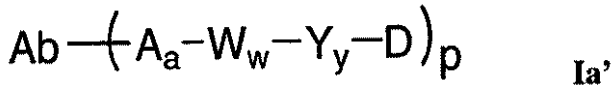
(54) 【発明の名称】 リガンドに結合体化可能なモノメチルバリン化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式 I a' :

【化3】



[式中、

A bは抗体であり、

—A_a—W_w—Y_yはリンカーユニットであり、

Aはストレッチャーユニットであり、

aは1であり、

各Wは、独立して、アミノ酸ユニットであり、

wは0～12の範囲の整数であり、

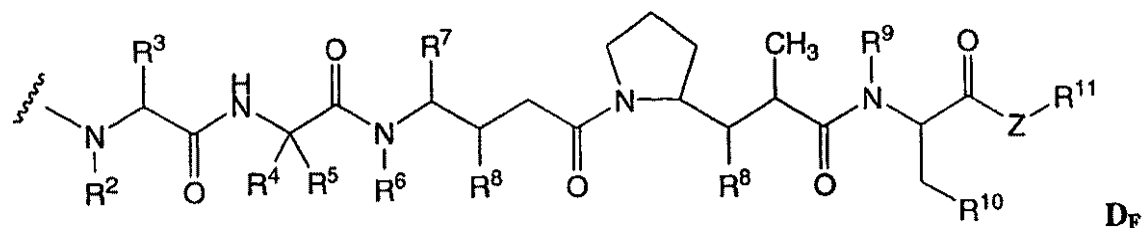
Yはスペーサーユニットであり、および

yは0、1、または2であり、

pは1～20の範囲であり、および

Dは式D_Fの薬物部分であり：

【化 5】



ここで、D_Fの波線はA、WまたはYに対する共有結合部位を示し、および独立して、各位置において：

R²はHおよびC₁ - C₈ アルキルよりなる群から選択され；

R³はHおよびC₁ - C₈ アルキルよりなる群から選択され；

R⁴はHおよびC₁ - C₈ アルキルよりなる群から選択され；

R⁵はHおよびメチルよりなる群から選択され；

R⁶はHおよびC₁ - C₈ アルキルよりなる群から選択され；

R⁷はHおよびC₁ - C₈ アルキルよりなる群から選択され；

各R⁸は、O - (C₁ - C₈ アルキル)であり；

R⁹はHおよびC₁ - C₈ アルキルよりなる群から選択され；

R¹⁰はフェニルであり；

ZはOであり；および

R¹¹はHである]

を有する抗体-薬物結合体、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 2】

前記抗体が前記抗体のシステイン残基を介して前記薬物部分に結合した請求項 1 記載の抗体-薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

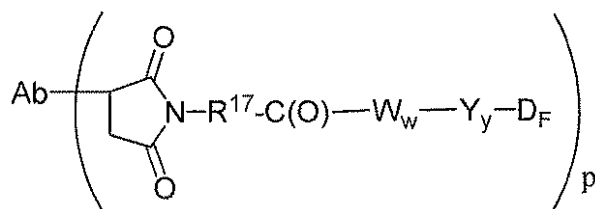
【請求項 3】

p が 2 ~ 5 である請求項 2 記載の抗体-薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 4】

式：

【化 8】



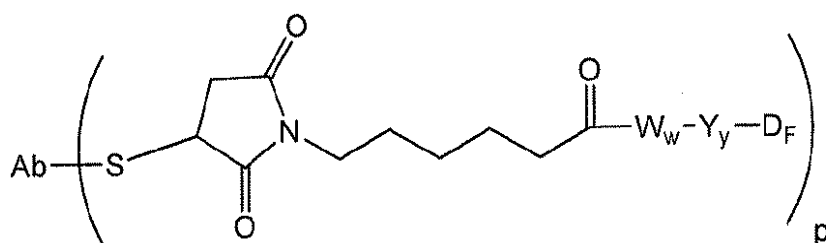
[式中、R¹⁷はC₁ - C₁₀ アルキレンーである]

を有する請求項 1 記載の抗体-薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 5】

式：

【化 9】



10

20

30

40

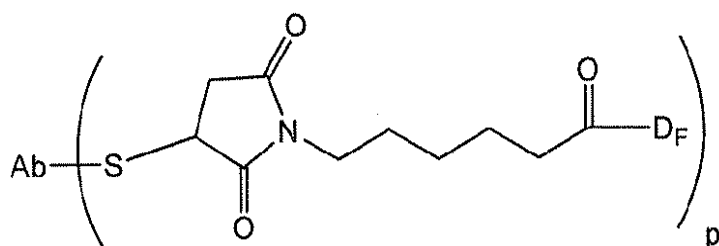
50

を有する請求項 4 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 6】

式：

【化 10】



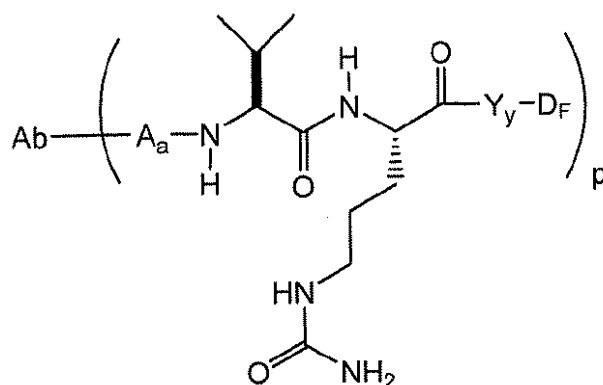
10

を有する請求項 4 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 7】

式：

【化 13】



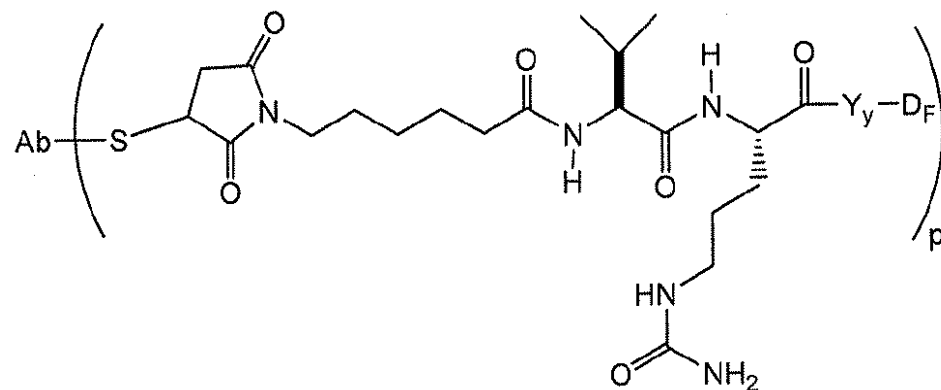
20

を有する請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 8】

式：

【化 14】



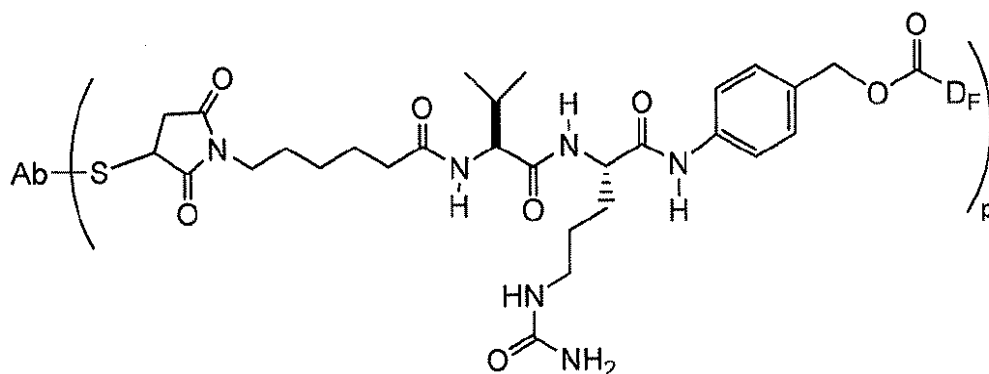
40

を有する請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 9】

式：

【化 1 5】



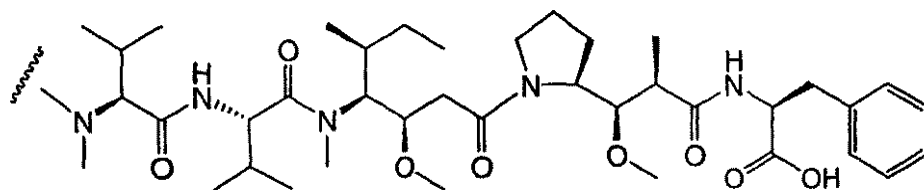
10

を有する請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 10】

式 D_F が式 :

【化 1 7】



20

を有する請求項 1、3、4、6、7 および 8 のいずれか 1 項に記載の抗体-薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 1 1】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 1 2】

前記抗体が二重特異性抗体である請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

30

【請求項 13】

前記抗体がキメラ抗体である請求項 1 記載の抗体-薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 14】

前記抗体がヒト化抗体である請求項1記載の抗体-薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 15】

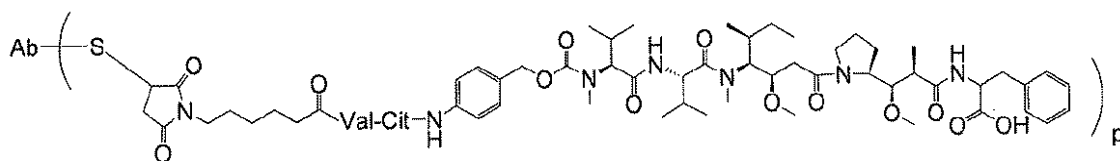
前記抗体が抗体フラグメントである請求項 1 記載の抗体-薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 16】

40

式：

【化 3 0】



Ab-MC-vc-PAB-MMAF

[式中、A bは抗体であり、pは1～20の範囲であり、V a lはバリンであって、C i

50

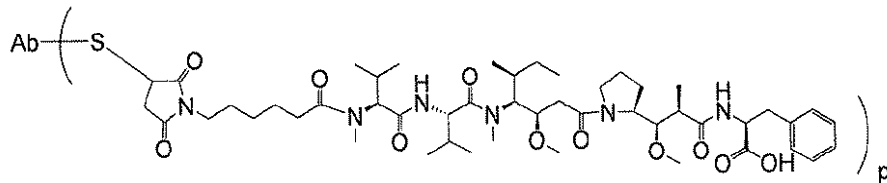
t はシトルリンである]

を有する抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 17】

式：

【化 30A】



10

Ab-MC-MMAF

[式中、Ab は抗体であり、p は 1 ～ 20 の範囲である]

を有する抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 18】

前記抗体が CD20、CD30、CD40、または Lewis Y 抗原の少なくとも 1 つに結合する抗体である請求項 16 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 19】

前記抗体が CD20、CD30、CD40、または Lewis Y 抗原の少なくとも 1 つに結合する抗体である請求項 17 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 20】

有効量の請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物、および薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたは賦形剤を含む薬学的組成物。

【請求項 21】

さらに、治療有効量の、チューブリン形成阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、および DNA 結合剤から選択される化学療法剤を含む請求項 20 記載の薬学的組成物。

【請求項 22】

腫瘍細胞または癌細胞を殺傷し、またはその増殖を阻害するための組成物であって、該組成物は、腫瘍細胞または癌細胞を殺傷し、またはその増殖を阻害するのに効果的である、一定量の請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を含む、組成物。

【請求項 23】

癌を処置するための組成物であって、該組成物は、一定量の請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を含み、ここで、該量は癌を処置するのに効果的である、組成物。

【請求項 24】

さらに、有効量のさらなる抗癌剤、免疫抑制剤、または抗感染剤を含む、請求項 23 記載の組成物。

【請求項 25】

自己免疫疾患を処置するための組成物であって、該組成物は、一定量の請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を含み、ここで、該量は該自己免疫疾患を処置するのに効果的である、組成物。

【請求項 26】

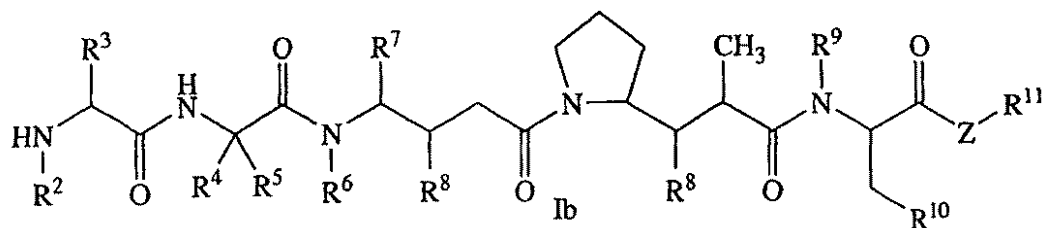
感染症を処置するための組成物であって、該組成物は、一定量の請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を含み、ここで、該量は感染症を処置するのに効果的である、組成物。

50

【請求項 27】

式：

【化 45】



10

〔式中：

R² は -C₁-C₈ アルキルであり；R³ は -H および -C₁-C₈ アルキルよりなる群から選択され；R⁴ は -H および -C₁-C₈ アルキルよりなる群から選択され；R⁵ は -H およびメチルよりなる群から選択され；R⁶ は -H および -C₁-C₈ アルキルよりなる群から選択され；R⁷ は -H および -C₁-C₈ アルキルよりなる群から選択され；各 R⁸ は、-O- (C₁-C₈ アルキル) であり；R⁹ は -H および -C₁-C₈ アルキルよりなる群から選択され；R¹⁰ はフェニルであり；

Z は -O- であり；および

R¹¹ は H である〕

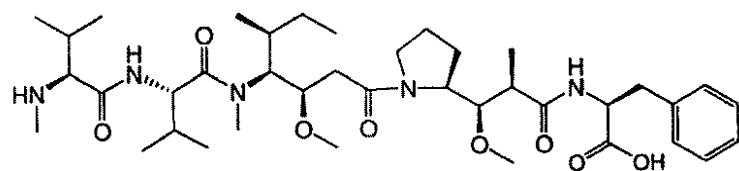
20

を有する化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 28】

式：

【化 47】



30

を有する請求項 27 記載の化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

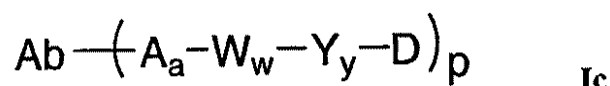
【請求項 29】

単離され、精製された形態である請求項 1 または 27 のいずれか 1 項に記載の化合物、または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 30】

1 以上の薬物部分に共有結合した抗体を含む抗体-薬物結合体化合物であって、該化合物が式 Ic：

【化 56】



40

〔式中：

A b が 1 以上の腫瘍-関連抗原 (1) ~ (35)：

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

(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 回膜貫通上皮抗原)；

(4) O 7 7 2 P (C A 1 2 5, M U C 1 6)；

(5) M P F (M P F, M S L N, S M R, 巨核細胞増強因子, 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, 溶質キャリア

50

ーファミリー34（リン酸ナトリウム），メンバー2，タイプI I ナトリウムー依存性リン酸トランスポーター3b）；

（7）Sema 5b（FLJ10372，KIAA1445，Mm. 42015，SEMA5B，SEMA G，セマフォリン5b Hlog，semaドメイン，7回トロンボスポンジンリピート（タイプIおよびタイプIー様），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）；

（8）PSCA hlg（2700050C12Rik，C530008O16Rik，RIKEN cDNA 2700050C12，RIKEN cDNA 2700050C12遺伝子）；

（9）ETBR（エンドセリンタイプBレセプター）；

10

（10）MSG783（RNF124，仮想タンパク質FLJ20315）；

（11）STEAP2（HGNC_8639，IPCA-1，PCANAP1，STAMP1，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回膜貫通上皮抗原2，6回膜貫通前立腺タンパク質）；

（12）TrpM4（BR22450，FLJ20041，TRPM4，TRPM4B，一過性レセプター潜在的カチオンチャネル，サブファミリーM，メンバー4）；

（13）CRIPTO（CR，CR1，CRGF，CRIPTO，TDGF1，テラトカルシノーマー由来成長因子）；

（14）CD21（CR2（補体レセプター2）またはC3DR（C3d／エプスタインバーウイルスレセプター）またはHs. 73792）；

20

（15）CD79b（IGb（免疫グロブリンー関連β），B29）；

（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）；

（17）HER2；

（18）NCA；

（19）MDP；

（20）IL20Rα；

（21）Brevican；

（22）Ephb2R；

（23）ASLG659；

30

（24）PSCA；

（25）GEDA；

（26）BAFF-R；

（27）CD22；

（28）CD79a（CD79A，CD79α，免疫グロブリンー関連α）；

（29）CXCR5（バーキットリンパ腫レセプター1）；

（30）HLA-DOB（ペプチドに結合し、それらをCD4＋Tリンパ球に提示するMHCクラスII分子（Ia抗原）のβサブユニット）；

（31）P2X5（プリン作動性レセプターP2Xリガンド型イオンチャネル5）；

（32）CD72（Bー細胞分化抗原CD72，Lyb-2）；

40

（33）LY64（リンパ球抗原64（RP105）、ロイシンリッチリピート（LR R）ファミリーのタイプI膜タンパク質）；

（34）FcRH1（Fcレセプターー様タンパク質1）；および

（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ーケーション関連2）

に結合する抗体であり、

Aはストレッチャーユニットであり、

aは0または1であり、

各Wは独立してアミノ酸ユニットであり、

wは0～12の範囲の整数であり、

50

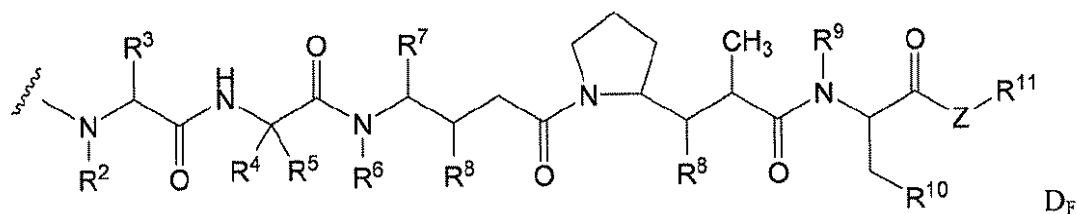
Yはスペーサーユニットであり、および

yは0、1または2であり、

pは1～20の範囲であり、および

Dは式D_Fを有する薬物部分であり：

【化57】



10

ここで、D_Fの波線はA、WまたはYに対する共有結合部位を示し、および独立して、各位置において、

R²はC₁－C₈アルキルであり；

R³はHおよびC₁－C₈アルキルよりなる群から選択され；

R⁴はHおよびC₁－C₈アルキルよりなる群から選択され；

R⁵はHおよびメチルよりなる群から選択され；

R⁶はHおよびC₁－C₈アルキルよりなる群から選択され；

R⁷はHおよびC₁－C₈アルキルよりなる群から選択され；

各R⁸は、独立して、O－(C₁－C₈アルキル)であり；

R⁹はHおよびC₁－C₈アルキルよりなる群から選択され；

R¹⁰はフェニルであり；

ZはOであり；および

R¹¹はHである]

20

を有する化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項31】

前記抗体が該抗体のシステイン残基を介して薬物部分に結合した請求項30記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項32】

30

pが1～4である請求項31記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項33】

pが2～8である請求項30記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項34】

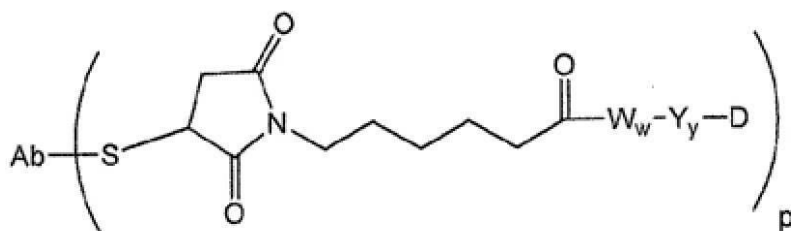
pが2～5である請求項30記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項35】

式：

40

【化60】



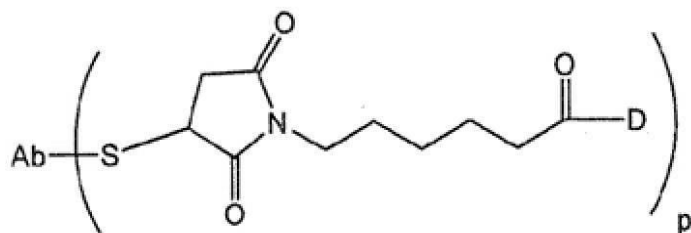
を有する請求項31記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

50

【請求項 3 6】

式：

【化 6 1】



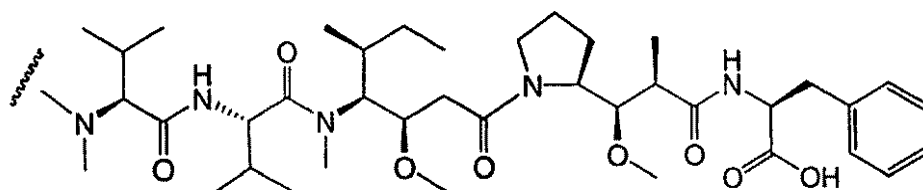
10

を有する請求項 3 5 記載の抗体-薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 3 7】

式 D_F が式：

【化 6 3】



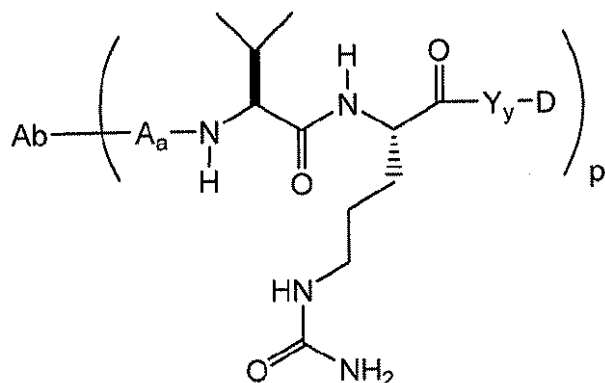
20

を有する請求項 3 6 記載の抗体-薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 3 8】

式：

【化 6 4】



30

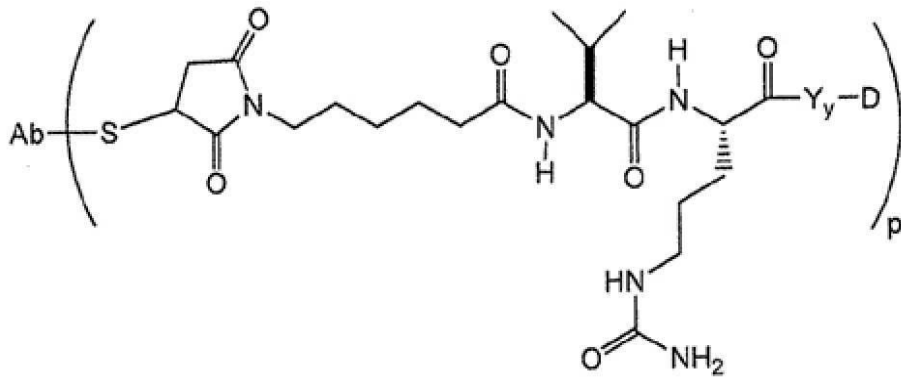
を有する請求項 3 0 記載の抗体-薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 3 9】

式：

40

【化 6 5】



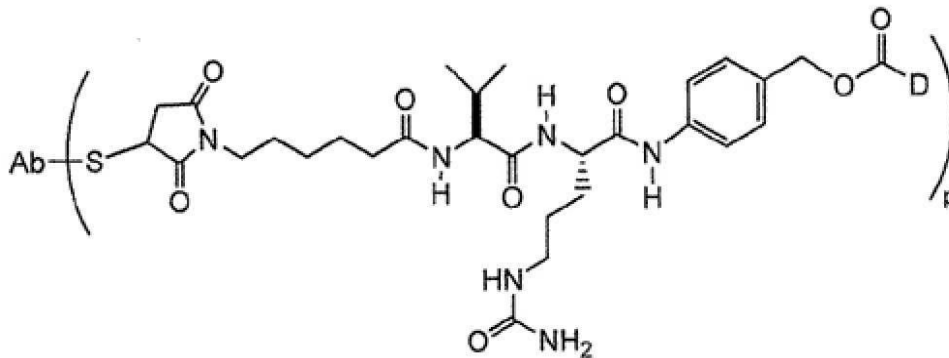
10

を有する請求項 3 8 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 4 0】

式：

【化 6 6】



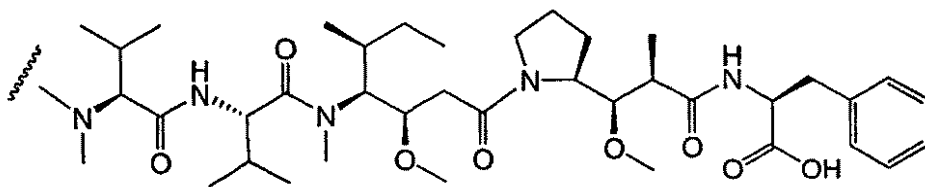
20

を有する請求項 3 9 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 4 1】

式 D_F が式：

【化 6 8】



30

を有する請求項 3 9 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 4 2】

w が 2 ～ 1 2 の範囲の整数である請求項 3 0 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 4 3】

w が 2 である請求項 3 0 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 4 4】

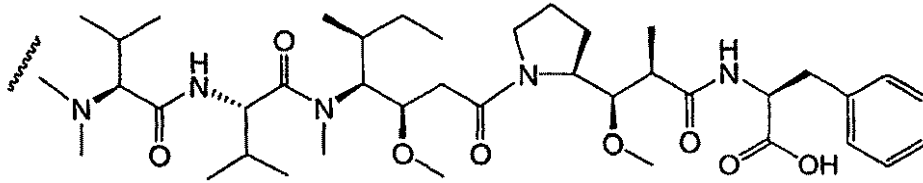
W_w がーバリニンシトルリンである請求項 4 3 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 4 5】

D が式：

50

【化 7 1】



を有する請求項 30 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 46】

10

前記抗体が H E R 2 レセプターに特異的に結合する請求項 30 記載の抗体－結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 47】

前記 H E R 2 レセプターの細胞外ドメインに特異的に結合し、かつ H E R 2 レセプターを過剰発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する請求項 46 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 48】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項 30 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 49】

20

前記抗体が二重特異性抗体である請求項 30 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 50】

前記抗体がキメラ抗体である請求項 30 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 51】

前記抗体がヒト化抗体である請求項 30 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 52】

前記ヒト化抗体が h u M A b 4 D 5 - 1、h u M A b 4 D 5 - 2、h u M A b 4 D 5 - 3、h u M A b 4 D 5 - 4、h u M A b 4 D 5 - 5、h u M A b 4 D 5 - 6、h u M A b 4 D 5 - 7 および h u M A b 4 D 5 - 8 (トラスツズマブ) から選択される請求項 51 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

30

【請求項 53】

前記抗体が抗体フラグメントである請求項 30 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 54】

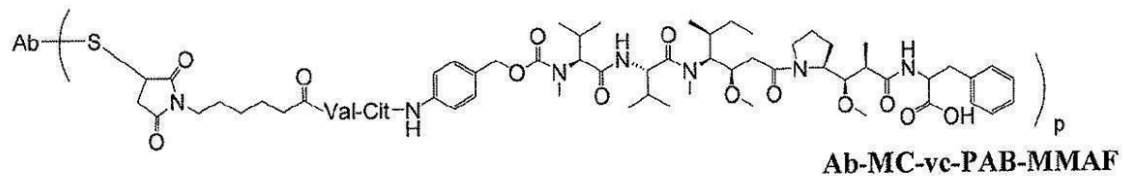
前記抗体フラグメントが F a b フラグメントである請求項 53 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 55】

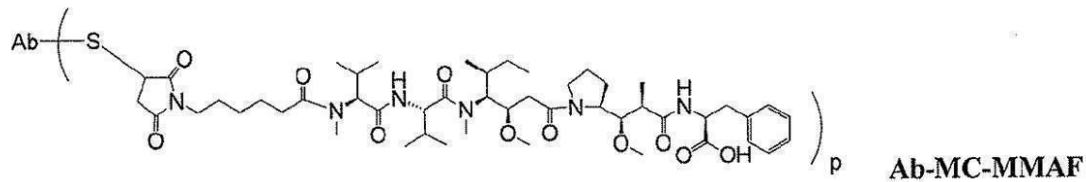
40

式：

【化 8 1】



および



10

〔式中、V a l はバリンであって、C i t はシトルリンである〕

よりなる群から選択される請求項 3 0 記載の抗体－薬物結合体化合物。

【請求項 5 6】

前記抗体が h u M A b 4 D 5－8（トラスツズマブ）である請求項 5 5 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 5 7】

有効量の請求項 3 0 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩、および薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたは賦形剤を含む薬学的組成物。

20

【請求項 5 8】

さらに、治療有効量の、チューブリン－形成阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、および D N A 結合剤から選択される化学療法剤を含む請求項 5 7 記載の薬学的組成物。

【請求項 5 9】

腫瘍細胞または癌細胞を殺傷し、またはその増殖を阻害するための医薬の製造における、請求項 3 0 記載の抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の使用。

【請求項 6 0】

癌を処置するための組成物であって、該組成物は、一定量の請求項 3 0 記載の抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を含み、該組成物は、過剰増殖障害を持つ患者に投与するのに適しており、該量は癌を処置するのに効果的である、組成物。

30

【請求項 6 1】

さらに、有効量のさらなる抗癌剤を含む、請求項 6 0 記載の組成物。

【請求項 6 2】

さらに、有効量の免疫抑制剤を含む、請求項 6 0 記載の組成物。

【請求項 6 3】

さらに、有効量の抗感染症剤を含む、請求項 6 0 記載の組成物。

【請求項 6 4】

感染症を処置するための組成物であって、該組成物は、一定量の請求項 3 0 記載の抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を含み、該量が感染症を処置するのに効果的である、組成物。

40

【請求項 6 5】

細胞増殖を阻害するためのインビトロ方法であって、該方法は、

細胞培養基中の哺乳動物細胞を請求項 3 0 記載の抗体－薬物結合体化合物に曝露する工程、および

該抗体－薬物結合体化合物の細胞傷害性活性を測定する工程を包含し、それにより、該細胞の増殖が阻害される、方法。

【請求項 6 6】

癌を処置するための組成物であって、該組成物は、請求項 3 0 記載の抗体－薬物結合体化

50

合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物および薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたは賦形剤の処方物を含む、組成物。

【請求項 6 7】

前記抗体－薬物結合体化合物が E r b B 2 遺伝子によってコードされるレセプターに特異的に結合する請求項 6 6 記載の組成物。

【請求項 6 8】

前記抗体－薬物結合体化合物の量が 0 . 1 ～ 1 0 m g / k g 患者体重の範囲である請求項 6 6 記載の組成物。

【請求項 6 9】

前記抗体－薬物結合体が 3 週間間隔で投与される請求項 6 6 記載の組成物。

10

【請求項 7 0】

前記抗体－薬物結合体化合物が非経口投与される請求項 6 6 記載の組成物。

【請求項 7 1】

前記抗体－薬物結合体化合物が薬学的に受容可能な非経口ビヒクルと共に処方される請求項 7 0 記載の組成物。

【請求項 7 2】

前記抗体－薬物結合体化合物が単位投与注射形態に処方される請求項 7 1 記載の組成物。

【請求項 7 3】

前記抗体－薬物結合体化合物が静脈内投与される請求項 7 1 記載の組成物。

20

【請求項 7 4】

さらに、(1) ～ (3 5) から選択される腫瘍－関連抗原に結合する第二の抗体を含む、請求項 7 1 記載の組成物。

【請求項 7 5】

前記第二の抗体が細胞傷害性剤と結合体化される請求項 7 4 記載の組成物。

【請求項 7 6】

腫瘍－関連抗原を過剰発現する腫瘍細胞の増殖を阻害するための組成物であって、該組成物は、該腫瘍－関連抗原に特異的に結合する請求項 3 0 記載の抗体薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物、および化学療法剤を含み、ここで、該抗体薬物結合体および該化学療法剤は、各々、患者において腫瘍細胞の増殖を阻害するのに効果的な量である、組成物。

30

【請求項 7 7】

前記抗体－薬物結合体化合物が前記腫瘍細胞を前記化学療法剤に対して感作させる請求項 7 6 記載の組成物。

【請求項 7 8】

E r b B 2 レセプターの過剰発現によって特徴付けられる障害に罹りやすい、または該障害と判断されたヒト患者を処置するための組成物であって、該組成物は、有効量の請求項 4 6 記載の抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物、および化学療法剤の組合せを含む、組成物。

【請求項 7 9】

癌細胞を検出するためのアッセイであって、該アッセイは、

40

請求項 3 0 記載の抗体－薬物結合体化合物に細胞を曝露する工程、および

該抗体－薬物結合体化合物の該細胞への結合の程度を測定する工程；

を包含する、アッセイ。

【請求項 8 0】

前記細胞が乳癌細胞である請求項 7 9 記載のアッセイ。

【請求項 8 1】

前記結合の程度が、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (F I S H) によって腫瘍－関連抗原－コーディング核酸のレベルを測定する工程によって決定される請求項 7 9 記載のアッセイ。

【請求項 8 2】

50

前記結合の程度が免疫組織化学（IHC）によって決定される請求項79記載のアッセイ。

【請求項83】

製品であって、該製品は、

請求項46記載の抗体－薬物結合体化合物；

容器；および

該化合物がErbB2レセプターの過剰発現によって特徴付けられる癌を処置するために使用され得ることを示すパッケージインサートまたはラベル；を含む、製品。

【請求項84】

前記パッケージインサートまたはラベルが、前記化合物がErbB2レセプターの過剰発現によって特徴付けられる癌を処置するために使用され得ることを示す請求項83記載の製品。

【請求項85】

前記癌が乳癌である請求項83記載の製品。

【請求項86】

前記癌が2+レベルまたはそれを上回るレベルにおいてErbB2レセプターの過剰発現によって特徴付けられる請求項85記載の製品。

【請求項87】

哺乳動物において癌を処置するための組成物であって、ここで、該癌はErbB2（HER2）レセプターの過剰発現によって特徴付けられ、かつ抗-ErbB2抗体での処置に対して応答しないか、または貧弱にしか応答せず、該組成物は、治療有効量の請求項30記載の抗体薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を含む、組成物。

【請求項88】

前記哺乳動物がヒトである請求項87記載の組成物。

【請求項89】

前記抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の抗体が増殖阻害抗体である請求項87記載の組成物。

【請求項90】

前記抗体－薬物結合体化合物が細胞死を誘導する請求項87記載の組成物。

【請求項91】

前記抗体－薬物結合体化合物がアポトーシスを誘導する請求項87記載の組成物。

【請求項92】

前記癌が乳癌、卵巣癌、胃癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、肺癌、腎臓癌、結腸癌、結直腸癌、甲状腺癌、膵臓癌、前立腺癌および膀胱癌よりなる群から選択される請求項87記載の組成物。

【請求項93】

前記癌が乳癌であって、該乳癌が2+レベルまたはそれを上回るレベルにてErbB2を過剰発現する請求項87記載の組成物。

【請求項94】

R²およびR⁶が各々メチルであり、そしてR⁹が-Hである、請求項1に記載の結合体またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項95】

R²およびR⁶が各々メチルであり、R⁵が-Hであり、R⁷がsec-ブチルであり、R⁸が-OC₂H₅であり、そしてR⁹が-Hである、請求項1に記載の結合体またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項96】

腫瘍細胞または癌細胞を殺傷し、またはその増殖を阻害するための医薬の製造における、請求項1記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒

10

20

30

40

50

和物の使用。

【請求項 97】

癌を処置するための医薬の製造における、請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の使用。

【請求項 98】

さらに、有効量のさらなる抗癌剤、免疫抑制剤、または抗感染剤の使用を含む、請求項 97 記載の使用。

【請求項 99】

自己免疫疾患を処置するための医薬の製造における、請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の使用。

10

【請求項 100】

感染症を処置するための医薬の製造における、請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の使用。

【請求項 101】

過剰増殖障害を持つ患者を処置するための医薬の製造における、請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の使用。

【請求項 102】

さらに、有効量のさらなる抗癌剤の使用を含む、請求項 101 記載の使用。

【請求項 103】

さらに、有効量の免疫抑制剤の使用を含む、請求項 101 記載の使用。

20

【請求項 104】

さらに、有効量の抗感染症剤の使用を含む、請求項 101 記載の使用。

【請求項 105】

感染症を処置するための医薬の製造における、請求項 30 記載の抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の使用。

【請求項 106】

癌を処置するための医薬の製造における、請求項 30 記載の抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物、および薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたは賦形剤の使用。

【請求項 107】

前記抗体－薬物結合体化合物が E r b B 2 遺伝子によってコードされるレセプターに特異的に結合する請求項 106 記載の使用。

30

【請求項 108】

前記抗体－薬物結合体化合物の量が 0.1 ～ 10 mg / kg 患者体重の範囲である請求項 106 記載の使用。

【請求項 109】

前記抗体－薬物結合体が 3 週間間隔での投与のものである請求項 106 記載の使用。

【請求項 110】

前記抗体－薬物結合体化合物が非経口投与のためのものである請求項 106 記載の使用。

【請求項 111】

前記抗体－薬物結合体化合物が薬学的に受容可能な非経口ビヒクルと共に処方される請求項 110 記載の使用。

40

【請求項 112】

前記抗体－薬物結合体化合物が単位投与注射形態に処方される請求項 106 記載の使用。

【請求項 113】

前記抗体－薬物結合体化合物が静脈内投与のためのものである請求項 106 記載の使用。

【請求項 114】

さらに、(1) ～ (35) から選択される腫瘍－関連抗原に結合する第二の抗体を含む、請求項 106 記載の使用。

【請求項 115】

50

前記第二の抗体が細胞傷害性剤と結合体化される請求項 1 1 4 記載の使用。

【請求項 1 1 6】

腫瘍－関連抗原を過剰発現する腫瘍細胞の増殖を阻害するための医薬の製造における、（a）腫瘍－関連抗原に特異的に結合する請求項 3 0 記載の抗体薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物、および（b）化学療法剤の使用であって、ここで、該医薬は、（a）と（b）との別々の投与、連続的な投与、または同時の投与のために処方される、使用。

【請求項 1 1 7】

前記抗体－薬物結合体化合物が前記腫瘍細胞を前記化学療法剤に対して感作させる請求項 1 1 6 記載の使用。

10

【請求項 1 1 8】

E r b B 2 レセプターの過剰発現によって特徴付けられる障害に罹りやすい、または該障害と判断されたヒト患者を処置するための医薬の製造における、請求項 4 6 記載の抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物、および化学療法剤の組合せの使用。

【請求項 1 1 9】

哺乳動物において癌を処置するための医薬の製造における、請求項 3 0 記載の抗体薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の使用であって、ここで、該癌は E r b B 2（H E R 2）レセプターの過剰発現によって特徴付けられ、かつ抗－E r b B 2 抗体での処置に対して応答しないか、または貧弱にしか応答しない、使用。

20

【請求項 1 2 0】

前記哺乳動物がヒトである請求項 1 1 9 記載の使用。

【請求項 1 2 1】

前記癌が造血癌である、請求項 9 7 記載の使用。

【請求項 1 2 2】

前記造血癌が非ホジキンリンパ腫である請求項 1 2 1 記載の使用。

【請求項 1 2 3】

前記抗体が C D 7 0 に結合する請求項 9 7 記載の使用。

【請求項 1 2 4】

前記癌が乳癌、卵巣癌、前立腺癌および肝臓癌よりなる群から選択される請求項 1 1 9 記載の使用。

30

【請求項 1 2 5】

前記癌が非ホジキンリンパ腫またはホジキンリンパ腫である請求項 9 7 記載の使用。

【請求項 1 2 6】

a、w、および y が各々 1 である、請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 1 2 7】

a が 1 でありかつ w および y が各々 0 である、請求項 1 記載の抗体－薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項 1 2 8】

40

Y が存在する、請求項 3 0 記載の抗体－薬物結合体化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

（継続性）

本願は、米国仮特許出願番号第 6 0 / 5 1 8, 5 3 4 号（2 0 0 3 年 1 1 月 6 日出願）；米国仮特許出願番号第 6 0 / 5 5 7, 1 1 6 号（2 0 0 4 年 3 月 2 6 日出願）；米国仮特許出願番号第 6 0 / 5 9 8, 8 9 9 号（2 0 0 4 年 8 月 4 日出願）；および米国仮特許出願番号第 6 0 / 6 2 2, 4 5 5 号（2 0 0 4 年 1 0 月 2 7 日出願）の優先権を主張し、これらの開示は、本明細書中に参考として援用される。

50

【0002】

(1. 発明の分野)

本発明は薬物化合物、より詳しくは、薬物ーリンカーーリガンド結合体、薬物ーリンカー化合物、および薬物ーリガンド結合体、それを含む組成物、およびそれを用いて癌、自己免疫疾患、または感染病を治療する方法に指向される。また、本発明は、抗体ー薬物結合体、それを含む組成物、およびそれを用いて癌、自己免疫疾患または感染病を治療する方法に指向される。また、本発明は、哺乳動物細胞、または関連病理学的状態のインビトロ、インサイチュおよびインビボ診断または治療用の抗体ー薬物結合体化合物を用いる方法に関する。

【背景技術】

10

【0003】

(2. 発明の背景)

最大効率および最小毒性を達成するための薬物および他の剤の標的細胞、組織および腫瘍への送達の改善は、長年、かなりの研究の焦点であった。インビボおよびインビトロ双方において生物学的活性な分子を細胞に取り込むための効果的な方法を開発しようとする多くの試みがなされてきたが、完全に満足すべきことが判明したものはなかった。薬物の、例えば、隣接細胞への細胞間再分布を最小化しつつ、薬物とその細胞内標的との会合の最適化は、しばしば、困難であるかまたは非効率的である。

【0004】

現在患者に非経口投与されるほとんどの剤は標的されておらず、その結果、剤は体の細胞および組織へ全身送達され、そこでは、それは不必要であり、しばしば望ましくない。この結果有害な薬物副作用をもたらしかねず、しばしば、投与することができる薬物（例えば、化学療法（抗癌）、細胞傷害性、酵素阻害剤および抗ウイルスまたは抗微生物薬物）の用量をしばしば制限する。比較すると、薬物の経口投与は便宜かつ経済的な投与態様であると考えられるが、それは、一旦薬物が全身循環に吸収されると非患部細胞に対する非特異的細胞傷害性の同一の関心を共に有する。さらに合併症は、薬物への腸のさらなる曝露および、従って、腸傷害性の危険性に導く腸での薬物の経口生物学的利用能および滞留に伴う問題を含む。従って、主な目標は、剤を細胞および組織へ特異的に標的化する方法を開発することであった。そのような治療の利点は、未感染細胞のような他の細胞および組織へのそのような剤の不適切な送達の一般的生理学的効果を回避することを含む。細胞内標的化は生物学的に活性な剤、すなわち、活性な代謝産物の細胞内での蓄積または滞留を可能とする方法、化合物および処方によって達成することができる。

20

30

【0005】

モノクローナル抗体療法が、癌、免疫学的小および脈管疾患を持つ患者の標的化治療のために確立されている。

【0006】

細胞傷害性または細胞静止剤の局所的送達用の抗体ー薬物結合体の使用、例えば癌の治療において腫瘍細胞を殺すまたは阻害する薬剤（非特許文献1；非特許文献2；特許文献1）は、理論的には、薬物部分の腫瘍への標的化送達およびその中への細胞内蓄積を可能とし、他方、これらの未結合体化薬剤の全身投与の結果、正常な細胞ならびに排除することが求められる腫瘍細胞に対する許容できないレベルの細胞傷害性をもたらされ得る（非特許文献3；非特許文献4；非特許文献5）。最小細胞傷害性での最大効率がそれにより求められる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体双方はこれらの戦略で有用なものとして報告されている（非特許文献6）。これらの方法で用いる薬物はダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキセート、およびビンデシンを含む（非特許文献6，前掲）。抗体ートキシン結合体で用いるトキシンはジフテリャトキシンのような細菌トキシン、リシンのような植物トキシン、ゲルダナマイシンのような小分子トキシン（非特許文献7；非特許文献8；非特許文献9；非特許文献10）、メイタンシノイド（特許文献2；非特許文献11）、およびカリケアミシン（非特許文献12；非特許文献13）を含む。トキシンはチューブリン結合、DNA結合、またはトポイソメラーゼ阻害を含めた機序に

40

50

よってそれらの細胞傷害性および細胞静止効果に影響し得る（非特許文献14）。いくつかの細胞傷害性薬物は、大きな抗体またはタンパク質レセプターリガンドに結合体した場合には不活性またはより低い活性となる傾向がある。

【0007】

Z E V A L I N（登録商標）（イブリツモマブチウキセタン，Biogen/Idec）は、正常および悪性Bリンパ腫の表面で見出されるCD20抗原に対して向けられたネズミIgG1カップモノクローナル抗体、およびチオ尿素リンカーキレータによって結合された¹¹¹Inまたは⁹⁰Y放射性同位体からなる抗体-放射性同位体結合体である（非特許文献15；非特許文献16；非特許文献17；非特許文献18）。Z E V A L I NはB-細胞非-ホジキンリンパ腫（NHL）に対する活性を有するが、投与の結果、ほとんどの患者において、重度のかつ持続的な血球減少症をもたらす。MYLOTARGTM（ゲムツツマブオゾガミシン，Wyeth Pharmaceuticals）、カリケアミシンに連結されたhuCD33抗体よりなる抗体薬物結合体は、注射による急性骨髄性白血病の治療用に2000年に認可された（非特許文献19；特許文献3；特許文献4；特許文献5；特許文献6；特許文献7；特許文献8；特許文献9；10）。カンツヅマブメルタンシン（Immunogen, Inc.）、メイタンシノイド薬物部分DM1ヘジスルフィドリンカーSPPを介して連結されたhuCD242抗体よりなる抗生物質薬物結合体は、結腸、膵臓、胃その他のような、CanAgを発現する癌の治療用にII相試験に進んでいる。MLN-2704（Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.）、マイタンシノイド薬物部分DM1に連結された抗-前立腺特異的膜抗原（PSMA）モノクローナル抗体よりなる抗体薬物結合体は、前立腺腫瘍の潜在的治療のために開発中である。同一マイタンシノイド薬物部分DM1は非-ジスルフィドリンカーSMCCを介してマウスネズミモノクローナル抗体、TA-1に連結された（非特許文献20）。この結合体は対応するジスルフィドリンカー結合体よりも200倍能力が少ないと報告された。SMCCリンカーはそこでは「非切断性」と考えられた。

【0008】

数個の短いペプチド化合物が海洋軟体動物Dolabella auriculariaから単離されており、生物学的活性を有することが見出されている。（非特許文献21；非特許文献22；非特許文献23）。これらの化合物のアナログも調製されており、いくつかは生物学的活性を有することが判明している（レビューについては、非特許文献24参照）。例えば、オーリスタチンE（特許文献11）は海洋天然産物ドラスタチン10、抗癌薬物ピンクリスチンとしてのチューブリンへの同一ドメインに結合することによってチューブリン重合を阻害する剤の合成アナログである（非特許文献25）。ドラスタチン10、オーリスタチンPE、およびオーリスタチンEは、そのうち3つが化合物のドラスタチンクラスに対してユニークである4つのアミノ酸、およびC-末端アミドを有する線状ペプチドである。

【0009】

オーリスタチンペプチド、オーリスタチンE（AE）およびモノメチルオーリスタチン（MMAE）、ドラスタチンの合成アナログは：（i）（癌腫上のLewis Yに対して特異的な）キメラモノクローナル抗体cBR96；（ii）血液学的悪性疾患でのCD30に対して特異的なcAC10（非特許文献26；非特許文献27；"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"；非特許文献28；特許文献12）；（iii）CD20-発現癌および免疫疾患の治療用のRITUXAN（登録商標）（特許文献13）のような抗-CD20抗体；（iv）結直腸癌の治療用の抗-EpH2抗体2H9および抗-IL-8（非特許文献29）；（v）E-セレクトイン抗体（非特許文献30）；および（vi）他の抗-CD30抗体（特許文献14）に結合体化された。

【0010】

モノクローナル抗体に結合体化されたオーリスタチンEは非特許文献31に開示されて

いる。

【0011】

ドラスタチンクラスおよびそのアナログの化合物についてのインビトロデータにもかかわらず、治療効果を達成するのに必要な用量における有意な一般的毒性は臨床的実験におけるそれらの効果を危うくする。従って、有意により低い毒性を有し、なお有用な治療的效果を有するドラスタチン／オーリスタチン誘導体に対する当該分野における明確な必要性がある。これらおよび他の制限および過去の問題は本発明によって取り組まれる。

【0012】

レセプターチロシンキナーゼのE r b Bファミリーは細胞の増殖、分化および生存の重要なメディエーターである。レセプターファミリーは上皮成長因子レセプター（E G F R、E r b B 1、H E R 1）、H E R 2（E r b B 2またはb 1 8 5^{n e u}）、H E R 3（E r b B 3）およびH E R 4（E r b B 4またはt y r o 2）を含めた4つの区別されるメンバーを含む。抗-E r b B 2抗体のパネルは、ヒト乳房腫瘍細胞系S K B R 3を用いて特徴付けられている（非特許文献32）。最大障害が、56%だけ細胞増殖を阻害した4 D 5と呼ばれる抗体で得られた。パネルにおける他の抗体はこのアッセイにおいて細胞増殖を低い程度まで低下させた。抗体4 D 5は、さらに、T N F- α の細胞傷害性効果に対してE r b B 2-過剰発現乳房腫瘍細胞系を感作させることが見出された（特許文献15）。非特許文献32に議論された抗-E r b B 2抗体は非特許文献33；非特許文献34；非特許文献35；非特許文献36；非特許文献37；非特許文献38；非特許文献39；非特許文献40；非特許文献41；非特許文献42；非特許文献43；非特許文献44；および非特許文献45においてさらに特徴付けられている。

【0013】

種々の特性を持つ他の抗-E r b B 2抗体が非特許文献46；非特許文献47；非特許文献48；非特許文献49；非特許文献50；非特許文献51；非特許文献52；特許文献16；非特許文献53；非特許文献54；非特許文献55；非特許文献56；非特許文献57；特許文献17；および非特許文献58に記載されている。

【0014】

相同スクリーニングの結果、他の2つのE r b Bレセプターファミリーメンバーの同定がなされた；E r b B 3（特許文献18；特許文献19；非特許文献59）およびE r b B 4（特許文献20；非特許文献60；および非特許文献61）。これらのレセプターディスプレイの双方は少なくともいくつかの乳癌細胞系での発現を増加させた。

【0015】

H E R C E P T I N（登録商標）（T r a s t u z u m a b）は、ヒト上皮成長因子レセプター2タンパク質、H E R 2（E r b B 2）の細胞外ドメインへ、細胞ベースアッセイにおいて高い親和性をもって（K d = 5 n M）選択的に結合する組換えDNA-由来ヒト化モノクローナル抗体である（特許文献21；特許文献22；特許文献23；特許文献24；非特許文献62；非特許文献63）。トラスツズマブは、H E R 2に結合するネズミ抗体（4 D 5）の相補性決定領域と共にヒトフレームワーク領域を含有するI g G 1カッパ抗体である。トラスツズマブはH E R 2抗原に結合し、かくして、癌細胞の増殖を阻害する。トラスツズマブはヒト化抗体であるため、それは患者においていずれのH A M A応答も最小化する。H E R 2に対するヒト化抗体は、哺乳動物細胞（チャイニーズハムスター卵巣、C H O）浮遊培養によって生産される。H E R 2（またはc-e r b B 2）プロトオンコジーンは、上皮成長因子レセプターに構造的に関連する185 k D aの膜貫通レセプタータンパク質をコードする。H E R 2タンパク質過剰発現は原発性乳癌の25%~30%で観察され、これは、固定された腫瘍ブロックの免疫組織化学ベースの評価を用いて測定することができる（非特許文献64）。トラスツズマブは、インビトロアッセイおよび動物の双方において、H E R 2を過剰発現するヒト腫瘍細胞の増殖を阻害することが示されている（非特許文献65；非特許文献66；非特許文献67）。トラスツズマブは抗体-依存性細胞傷害性、A D C Cのメディエーターである。（非特許文献68；非特許文献69）。インビトロでは、トラスツズマブ媒介A D C Cは、H E R 2を過剰

発現しない癌細胞と比較して癌細胞を過剰発現するHER2に優先的に作用することが示されている。単一の剤としてのHERCEPTIN（登録商標）は、その腫瘍がHER2タンパク質を過剰発現する転移性乳癌を持ち、かつその転移性疾患に対する1以上の化学療法レジメンを受けた患者の治療のために示されている。パクリタキセルと組み合わせたHERCEPTIN（登録商標）は、その腫瘍がHER2タンパク質を過剰発現させる転移性乳癌を持ち、かつその転移性疾患に対する化学療法を受けたことがない患者の治療のために示されている。HERCEPTIN（登録商標）は、広範な抗癌療法を受けたことがあるErbB2-過剰発現転移性乳癌を持つ患者において臨床的に活性である（非特許文献70）。

【0016】

10

ネズミモノクローナル抗HER2抗体は、2+および3+（細胞当たり1～2×10⁶HER2レセプター）レベルでHER2を過剰発現する乳癌細胞系の増殖を阻害するが、より低いレベルのHER2を発現する細胞に対して活性を有しない（非特許文献71）。この観察に基づき、抗体4D5がヒト化され（huMAb4D5-8, rhuMAbHER2, 特許文献25；非特許文献72）、その腫瘍がHER2を過剰発現するが、慣用的な化学療法の後に進行した乳癌患者でテストされた（非特許文献73）。

【0017】

HERCEPTINは広範な先行抗癌療法を受けたErbB2-過剰発現乳癌を持つ患者を治療するにおいて顕著な進歩であるが、この集団における幾人かの患者はHERCEPTIN治療に応答しないか、または応答しにくいに過ぎない。

20

【0018】

従って、HER2-過剰発現腫瘍、またはHERCEPTIN治療に応答しないが、または応答しにくいHER2発現に関連する他の疾患を持つ患者に対してさらなるHER2-指向性癌療法を開発するかなりの臨床的要望が存在する。

【0019】

本出願におけるいずれの文献への引用も、本出願に対して該文献が先行技術であることを自認するものではない。

【特許文献1】米国特許第4975278号明細書

【特許文献2】欧州特許第1391213号明細書

【特許文献3】米国特許第4970198号明細書

30

【特許文献4】米国特許第5079233号明細書

【特許文献5】米国特許第5585089号明細書

【特許文献6】米国特許第5606040号明細書

【特許文献7】米国特許第5693762号明細書

【特許文献8】米国特許第5739116号明細書

【特許文献9】米国特許第5767285号明細書

【特許文献10】米国特許第5773001号明細書

【特許文献11】米国特許第5635483号明細書

【特許文献12】米国特許出願公開第2004/0018194号明細書

【特許文献13】国際公開第04/032828号パンフレット

40

【特許文献14】国際公開第03/043583号パンフレット

【特許文献15】米国特許第5677171号明細書

【特許文献16】国際公開第94/00136号パンフレット

【特許文献17】米国特許第5783186号明細書

【特許文献18】米国特許第5,183,884号明細書

【特許文献19】米国特許第5,480,968号明細書

【特許文献20】欧州特許第599274号明細書

【特許文献21】米国特許第5821337号明細書

【特許文献22】米国特許第6054297号明細書

【特許文献23】米国特許第6407213号明細書

50

- 【特許文献24】米国特許第6639055号明細書
- 【特許文献25】米国特許第5821337号明細書
- 【非特許文献1】SyrigosおよびEpenetos Anticancer Research (1999年) 19:605-614
- 【非特許文献2】Niculescu-DuvazおよびSpringer Adv. Drg. Del. Rev. (1997年) 26:151-172
- 【非特許文献3】Baldwinら 1986, Lancet (1986年3月15日) ; pp. 603-05
- 【非特許文献4】Thorpe, 1985, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84年 10
- 【非特許文献5】Biological And Clinical Applications, A. Pincheraら (編)、pp. 475-506
- 【非特許文献6】Rowlandら、Cancer Immunol. Immunother. 1986年, 21:183-87
- 【非特許文献7】Kerrら Bioconjugate Chem. 1997年, 8 (6) : 781-784
- 【非特許文献8】Mandlerら Jour. of the Nat. Cancer Inst. (2000年) 92 (19) : 1573-1581
- 【非特許文献9】Mandlerら Bioorganic & Med. Chem. Letters (2000年) 10:1025-1028 20
- 【非特許文献10】Mandlerら Bioconjugate Chem. (2002年) 13:786-791
- 【非特許文献11】Liuら Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996年) 93:8618-8623
- 【非特許文献12】Lodeら Cancer Res. (1998年) 58:2928
- 【非特許文献13】Hinmanら Cancer Res. (1993年) 53:3336-3342
- 【非特許文献14】Meyer, D. L. および Senter, P. D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" in Annual Reports in Medicinal Chemistry, Vol 38 (2003年) Chapter 23, 229-237 30
- 【非特許文献15】Wisemanら Eur. Jour. Nucl. Med. (2000年) 27 (7) : 766-77
- 【非特許文献16】Wisemanら Blood (2002年) 99 (12) : 4336-42
- 【非特許文献17】Witzigら、J. Clin. Oncol. (2002年) 20 (10) : 2453-63
- 【非特許文献18】Witzigら、J. Clin. Oncol. (2002年) 20 (15) : 3262-69 40
- 【非特許文献19】Drugs of the Future (2000年) 25 (7) : 686
- 【非特許文献20】Chariら、Cancer Research (1992年) 52:127-131
- 【非特許文献21】Pettitら Tetrahedron (1993年) 49:9151
- 【非特許文献22】Nakamuraら Tetrahedron Letters (1995年) 36:5059-5062
- 【非特許文献23】Soneら Jour. Org Chem. (1995年) 60:4 50

474

【非特許文献24】Pettitら、Anti-Cancer Drug Design (1998年) 13:243-277

【非特許文献25】G. R. Pettit, Prog. Chem. Org. Nat. Prod. (1997年) 70:1-79

【非特許文献26】KlussmaalらBioconjugate Chemistry (2004年), 15(4):765-773

【非特許文献27】Doroninaら、Nature Biotechnology (2003年) 21(7):778-784

【非特許文献28】FranciscoらBlood (2003年) 102(4):1458-1465 10

【非特許文献29】Maoら Cancer Research (2004年) 64(3):781-788

【非特許文献30】Bhaskarら、Cancer Res. (2003年) 63:6387-6394

【非特許文献31】Senterら、2004年3月28日に発表されたProceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623

【非特許文献32】Hudziakら Mol. Cell. Biol. (1989年) 9(3):1165-1172 20

【非特許文献33】Fendlyら Cancer Research (1990年) 50:1550-1558

【非特許文献34】Kottisら In vitro (1990年) 26(3):59A

【非特許文献35】Sarupら Growth Regulation (1991年) 1:72-82

【非特許文献36】Shepardら、J. Clin. Immunol. (1991年) 11(3):117-127

【非特許文献37】Kumarら、Mol. Cell. Biol. (1991年) 11(2):979-986 30

【非特許文献38】Lewisら、Cancer Immunol. Immunother. (1993年) 37:255-263

【非特許文献39】Pietrasら、Oncogene (1994年) 9:1829-1838

【非特許文献40】Vitettaら Cancer Research (1994年) 54:5301-5309

【非特許文献41】Sliwowskiら、J. Biol. Chem. (1994年) 269(20):14661-14665

【非特許文献42】Scottら、J. Biol. Chem. (1991年) 266:14300-5 40

【非特許文献43】D'souzaら、Proc. Natl. Acad. Sci. (1994年) 91:7202-7206

【非特許文献44】Lewisら、Cancer Research (1996年) 56:1457-1465

【非特許文献45】Schaeferら、Oncogene (1997年) 15:1385-139

【非特許文献46】Tagliabueら、Int. J. Cancer (1991年) 47:933-937

【非特許文献47】McKenzieら、Oncogene (1989年) 4:543 50

－ 5 4 8

【非特許文献48】Maierら、Cancer Res. (1991年) 51:5361－5369

【非特許文献49】Bacusら Molecular Carcinogenesis (1990年) 3:350－362

【非特許文献50】Stancovskiら Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991年) 88:8691－8695

【非特許文献51】Bacusら、Cancer Research (1992年) 52:2580－2589

【非特許文献52】Xuら、Int. J. Cancer (1993年) 53:401－408 10

【非特許文献53】Kasprzykら Cancer Research (1992年) 52:2771－2776

【非特許文献54】Hancockら Cancer Res. (1991年) 51:4575－4580

【非特許文献55】Shawverら Cancer Res. (1994年) 54:1367－1373

【非特許文献56】Arteagaら Cancer Res. (1994年) 54:3758－3765

【非特許文献57】Harwerthら J. Biol. Chem. (1992年) 267:15160－15167 20

【非特許文献58】Klapperら (1997年) Oncogene 14:2099－2109

【非特許文献59】Krausら Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989年) 86:9193－9197

【非特許文献60】Plowmanら Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993年) 90:1746－1750

【非特許文献61】Plowmanら Nature (1993年) 366:473－475

【非特許文献62】Coussens Lら Science (1985年) 230:1132－9 30

【非特許文献63】Slamon DJら Science (1989年) 244:702－12

【非特許文献64】Press MFら Cancer Res (1993年) 53:4960－70

【非特許文献65】Hudziak RMら Mol Cell Biol (1989年) 9:1165－72

【非特許文献66】Lewis GDら (1993年) Cancer Immunol Immunother; 37:255－63

【非特許文献67】Baselga Jら Cancer Res. (1998年) 58:2825－2831 40

【非特許文献68】Hotelling TEら Proc. Annual Meeting Am Assoc Cancer Res (1996年); 37:471 [要約]

【非特許文献69】Pegram MDら Proc. Am Assoc Cancer Res (1997年); 38:602 [要約]

【非特許文献70】Baselgaら J. Clin. Oncol. (1996年) 14:737－744

【非特許文献71】Lewisら Cancer Immunol. Immunother. (1993年) 37:255－263

【非特許文献72】Carterら Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50

(1992年) 89:4285-4289

【非特許文献73】Cobleighら J. Clin. Oncol. (1999年) 17:2639-2648

【発明の開示】

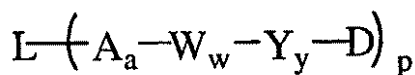
【課題を解決するための手段】

【0020】

1つの態様において、本発明は、式Ia:

【0021】

【化82】



Ia

[式中、

L-はリガンドユニットであり;

-A_a-W_w-Y_y-はリンカーユニット(LU)であり、ここで、該リンカーユニットは、以下のものを含む:

-A-はストレッチャー(Stretcher)ユニットであり、

aは0または1であり、

各-W-は独立してアミノ酸ユニットであり、

wは0~12の範囲の整数であり、

-Y-はスペーサーユニットであり、および

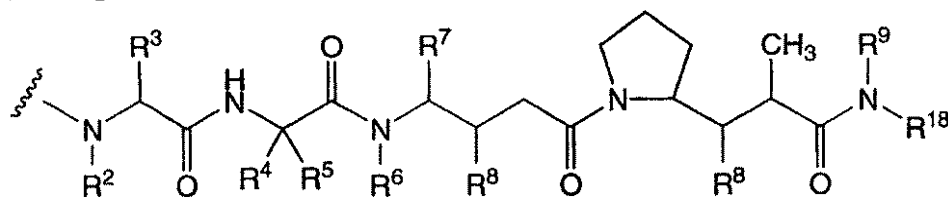
yは0、1または2であり;

pは1~約20の範囲であり;および

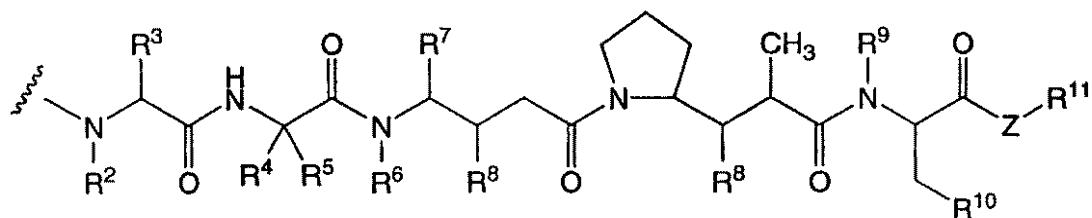
-Dは式D_EおよびD_Fを有する薬物ユニットであり:

【0022】

【化83】



D_E



D_F

ここで、独立して、各位置において:

R²はHおよびC₁-C₈アルキルから選択され;

R³はH、C₁-C₈アルキル、C₃-C₈炭素環、アリール、C₁-C₈アルキル-アリール、C₁-C₈アルキル-(C₃-C₈炭素環)、C₃-C₈複素環およびC₁-C₈アルキル-(C₃-C₈複素環)から選択され;

R⁴はH、C₁-C₈アルキル、C₃-C₈炭素環、アリール、C₁-C₈アルキル-アリール、C₁-C₈アルキル-(C₃-C₈炭素環)、C₃-C₈複素環およびC₁-

10

20

30

40

50

C₈ アルキルー (C₃ - C₈ 複素環) から選択され;

R⁵ はHおよびメチルから選択され;

あるいはR⁴ およびR⁵ は一緒になって炭素環を形成し、式 - (C R^a R^b)_n - を有し、ここで、R^a およびR^b は、独立して、H、C₁ - C₈ アルキルおよびC₃ - C₈ 炭素環から選択され、nは2、3、4、5および6から選択され;

R⁶ はHおよびC₁ - C₈ アルキルから選択され;]

R⁷ はH、C₁ - C₈ アルキル、C₃ - C₈ 炭素環、アリール、C₁ - C₈ アルキルーアリール、C₁ - C₈ アルキルー (C₃ - C₈ 炭素環)、C₃ - C₈ 複素環およびC₁ - C₈ アルキルー (C₃ - C₈ 複素環) から選択され;

各R⁸ は、独立して、H、OH、C₁ - C₈ アルキル、C₃ - C₈ 炭素環およびO - (C₁ - C₈ アルキル) から選択され;

R⁹ はHおよびC₁ - C₈ アルキルから選択され;

R¹⁰ はアリールまたはC₃ - C₈ 複素環から選択され;

ZはO、S、NHまたはNR¹²であり、ここで、R¹²はC₁ - C₈ アルキルであり;

R¹¹はH、C₁ - C₂₀ アルキル、アリール、C₃ - C₈ 複素環、- (R¹³ O)_m - R¹⁴、または- (R¹³ O)_m - CH (R¹⁵)₂ から選択され;

mは1 ~ 1000の範囲の整数であり;

R¹³はC₂ - C₈ アルキルであり;

R¹⁴はHまたはC₁ - C₈ アルキルであり;

R¹⁵の各出現は、独立して、H、COOH、- (CH₂)_n - N (R¹⁶)₂、- (CH₂)_n - SO₃ H、または- (CH₂)_n - SO₃ - C₁ - C₈ アルキルであり;

R¹⁶の各出現は、独立して、H、C₁ - C₈ アルキル、または- (CH₂)_n - COOHであり;ここで、nは0 ~ 6の範囲の整数であり;

R¹⁸は-C (R⁸)₂ - C (R⁸)₂ - アリール、- C (R⁸)₂ - C (R⁸)₂ - (C₃ - C₈ 複素環)、および- C (R⁸)₂ - C (R⁸)₂ - (C₃ - C₈ 炭素環) から選択される]

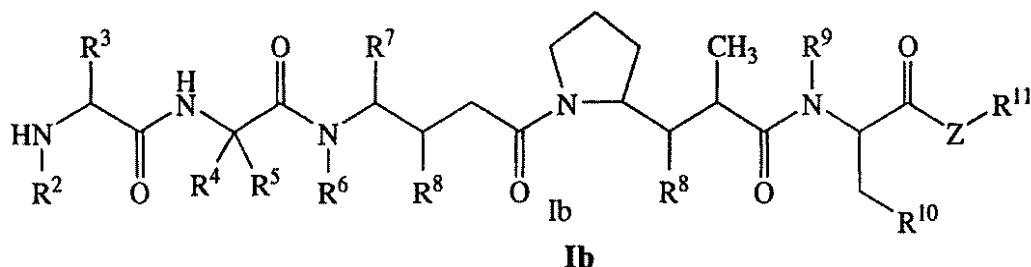
を有する薬物-リンカー-リガンド化合物、またはその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物を提供する。

【0023】

もう1つの態様において、式Ib:

【0024】

【化84】



[式中:

R²は水素および-C₁ - C₈ アルキルから選択され;

R³は水素、-C₁ - C₈ アルキル、-C₃ - C₈ 炭素環、アリール、-C₁ - C₈ アルキルーアリール、-C₁ - C₈ アルキルー (C₃ - C₈ 炭素環)、-C₃ - C₈ 複素環および-C₁ - C₈ アルキルー (C₃ - C₈ 複素環) から選択され;

R⁴は水素、-C₁ - C₈ アルキル、-C₃ - C₈ 炭素環、-アリール、-C₁ - C₈ アルキルーアリール、-C₁ - C₈ アルキルー (C₃ - C₈ 炭素環)、-C₃ - C₈ 複素環および-C₁ - C₈ アルキルー (C₃ - C₈ 複素環) から選択され、ここで、R⁵は-Hおよび-メチルから選択され;あるいはR⁴およびR⁵は一緒になって式 - (C R^a R

^b) n を有し、ここで、 R^a および R^b は、独立して、 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ アルキルおよび $-C_3-C_8$ 炭素環から選択され； n は 2、3、4、5 および 6 から選択されかつそれらが結合した炭素分子と共に環を形成し；

R^6 は H および $-C_1-C_8$ アルキルから選択され；

R^7 は H 、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_3-C_8$ 炭素環、アリール、 $-C_1-C_8$ アルキル-アリール、 $-C_1-C_8$ アルキル- (C_3-C_8) 炭素環、 $-C_3-C_8$ 複素環および $-C_1-C_8$ アルキル- (C_3-C_8) 複素環から選択され；

各 R^8 は、独立して、 H 、 $-OH$ 、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_3-C_8$ 炭素環および $-O-(C_1-C_8)$ アルキルから選択され；

R^9 は H および $-C_1-C_8$ アルキルから選択され；

R^{10} はアリール基または $-C_3-C_8$ 複素環から選択され；

Z は $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、または $-NR^{12}-$ であり、ここで、 R^{12} は C_1-C_8 アルキルであり；

R^{11} は H 、 C_1-C_{20} アルキル、アリール、 $-C_3-C_8$ 複素環、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 、または $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ から選択され；

m は 1～1000 の範囲の整数であり；

R^{13} は $-C_2-C_8$ アルキルであり；

R^{14} は H または $-C_1-C_8$ アルキルであり；

R^{15} の各出現は、独立して、 H 、 $-COOH$ 、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、または $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$ アルキルであり；

R^{16} の各出現は、独立して、 H 、 $-C_1-C_8$ アルキル、または $-(CH_2)_n-COOH$ であり；および

n は 0～6 の範囲の整数である]

を有する薬物化合物、またはその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物が提供される。

【0025】

式 (Ib) の化合物は患者において癌、自己免疫疾患または感染症を治療するのに有用であるか、あるいは切断可能薬物ユニットを有する薬物-リンカー、薬物-リンカー-リガンド結合体、および薬物-リガンド結合体の合成用の中間体として有用である。

【0026】

もう 1 つの態様において、有効量の薬物-リンカー-リガンド結合体および薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤を含む組成物が提供される。

【0027】

なおもう 1 つの態様において、本発明は、有効量の薬物-リンカー化合物および薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤を含む薬学的組成物を提供する。

【0028】

なおもう 1 つの態様において、本発明は、薬物-リガンド結合体からの切断可能な薬物を有する有効量の薬物-リガンド結合体、および薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤を含む組成物を提供する。

【0029】

さらにもう 1 つの態様において、本発明は、有効量の薬物-リンカー化合物をそれを必要とする患者に投与することを含む、腫瘍細胞または癌細胞を殺し、またはその増殖を阻害する方法を提供する。

【0030】

もう 1 つの態様において、本発明は、有効量の薬物-リンカー-リガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、腫瘍細胞または癌細胞を殺し、またはその増殖を阻害する方法を提供する。

【0031】

もう 1 つの態様において、本発明は、薬物-リガンド結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物-リガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、腫瘍細胞または癌細胞を殺し、またはその増殖を阻害する方法を提供する。

【0032】

なおもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリガンド化合物をそれを必要とする患者に投与することを含む、癌を治療する方法を提供する。

【0033】

さらにもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカーーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、癌を治療する方法を提供する。

【0034】

さらにもう1つの態様において、本発明は、薬物ーリガンド結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物ーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、癌を治療する方法を提供する。

10

【0035】

なおもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカー化合物をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫抗体を発現する細胞を殺し、またはその複製を阻害する方法を提供する。

【0036】

もう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカーーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫抗体を発現する細胞を殺し、またはその複製を阻害する方法を提供する。

【0037】

もう1つの態様において、本発明は、薬物ーリガンド結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物ーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫抗体を発現する細胞を殺し、またはその複製を阻害する方法を提供する。

20

【0038】

さらにもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカー化合物をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫疾患を治療する方法を提供する。

【0039】

さらにもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカーーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫疾患を治療する方法を提供する。

【0040】

さらにもう1つの態様において、本発明は、薬物ーリガンド結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物ーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫疾患を治療する方法を提供する。

30

【0041】

なおもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカー化合物をそれを必要とする患者に投与することを含む、感染症を治療する方法を提供する。

【0042】

なおもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカーーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、感染症を治療する方法を提供する。

【0043】

なおもう1つの態様において、本発明は、薬物ーリガンド結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物ーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、感染症を治療する方法を提供する。

40

【0044】

さらにもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカー化合物をそれを必要とする患者に投与することを含む、腫瘍細胞または癌細胞の増殖を予防する方法を提供する。

【0045】

もう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカーーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、腫瘍細胞または癌細胞の増殖を予防する方法を

50

提供する。

【0046】

もう1つの態様において、本発明は、薬物ーリガンド結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物ーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、腫瘍細胞または癌細胞の増殖を予防する方法を提供する。

【0047】

なおもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカー化合物をそれを必要とする患者に投与することを含む、癌を予防する方法を提供する。

【0048】

さらにもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカーーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、癌を予防する方法を提供する。 10

【0049】

さらにもう1つの態様において、本発明は、薬物ーリガンド結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物ーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、癌を予防する方法を提供する。

【0050】

なおもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカー化合物をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫抗体を発現する細胞の増殖を予防する方法を提供する。

【0051】

もう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカーーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫抗体を発現する細胞の増殖を予防する方法を提供する。 20

【0052】

もう1つの態様において、本発明は、薬物ーリガンド結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物ーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫抗体を発現する細胞の増殖を予防する方法を提供する。

【0053】

さらにもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカー化合物をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫疾患を予防する方法を提供する。 30

【0054】

さらにもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカーーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫疾患を予防する方法を提供する。

【0055】

さらにもう1つの態様において、本発明は、薬物ーリガンド結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物ーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫疾患を予防する方法を提供する。

【0056】

なおもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカー化合物をそれを必要とする患者に投与することを含む、感染症を予防する方法を提供する。 40

【0057】

なおもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物ーリンカーーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、感染症を予防する方法を提供する。

【0058】

なおもう1つの態様において、本発明は、薬物ーリガンド結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物ーリガンド結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、感染症を予防する方法を提供する。

【0059】

もう1つの態様において、本発明は、薬物ーリガンド結合体からの切断可能な薬物ユニ 50

ットを有する薬物—リンカー化合物の合成用の中間体として用いることができる薬物化合物が提供される。

【0060】

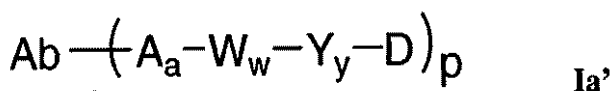
もう1つの態様において、薬物—リンカー—リガンド結合体の合成用の中間体として用いることができる薬物—リンカー化合物が提供される。

【0061】

もう1つの態様において、式 I a' :

【0062】

【化85】



[式中:]

A bはCD30、CD40、CD70、およびLewis Y抗原に結合するものを含めた抗体を含み、

Aはストレッチャー (Stretcher) ユニットであり、

aは0または1であり、

各Wは独立してアミノ酸ユニットであり、

wは0~12の範囲の整数であり、

Yはスペーサーユニットであり、および

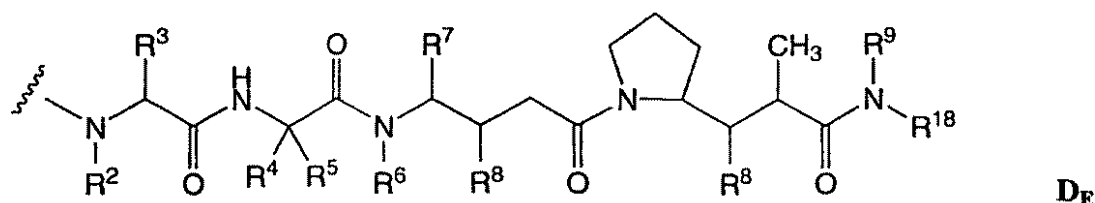
yは0、1または2であり、

pは1~約20の範囲であり、および

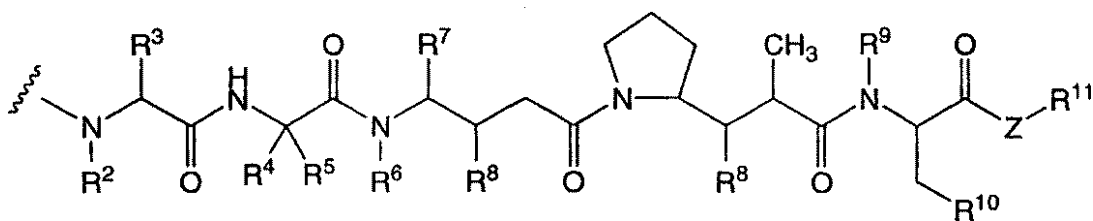
Dは式D_EおよびD_Fから選択される薬物ユニットであり:

【0063】

【化86】



D_E



D_F

ここで、独立して、各位置において:

R²はHおよびC₁—C₈アルキルから選択され;

R³はH, C₁—C₈アルキル、C₃—C₈炭素環、アリール、C₁—C₈アルキル—アリール、C₁—C₈アルキル—(C₃—C₈炭素環)、C₃—C₈複素環およびC₁—C₈アルキル—(C₃—C₈複素環)から選択され;

R⁴はH、C₁—C₈アルキル、C₃—C₈炭素環、アリール、C₁—C₈アルキル—アリール、C₁—C₈アルキル—(C₃—C₈炭素環)、C₃—C₈複素環およびC₁—C₈アルキル—(C₃—C₈複素環)から選択され;

R⁵はHおよびメチルから選択され;

10

20

30

40

50

あるいは R^4 および R^5 は一緒になって炭素環を形成し、式 $-(CR^aR^b)_n-$ を有し、ここで、 R^a および R^b は、独立して、 H 、 C_1-C_8 アルキルおよび C_3-C_8 炭素環から選択され、 n は、2、3、4、5および6から選択され；

R^6 は H および C_1-C_8 アルキルから選択され；

R^7 は H 、 C_1-C_8 アルキル、 C_3-C_8 炭素環、アリール、 C_1-C_8 アルキルアリール、 C_1-C_8 アルキル $-(C_3-C_8$ 炭素環)、 C_3-C_8 複素環および C_1-C_8 アルキル $-(C_3-C_8$ 複素環)から選択され；

各 R^8 は、独立して、 H 、 OH 、 C_1-C_8 アルキル、 C_3-C_8 炭素環および $O-(C_1-C_8$ アルキル)から選択され；

R^9 は H および C_1-C_8 アルキルから選択され；

R^{10} はアリールまたは C_3-C_8 複素環から選択され；

Z は O 、 S 、 NH または NR_{12} であり、ここで、 R^{12} は C_1-C_8 アルキルであり；

R^{11} は H 、 C_1-C_{20} アルキル、アリール、 C_3-C_8 複素環、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 、または $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ から選択され；

m は1～1000の範囲の整数であり；

R^{13} は C_2-C_8 アルキルであり；

R^{14} は H または C_1-C_8 アルキルであり；

R^{15} の各出現は、独立して、 H 、 $COOH$ 、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、または $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$ アルキルであり；

R^{16} の各出現は、独立して、 H 、 C_1-C_8 アルキル、または $-(CH_2)_n-COOH$ であり；

R^{18} は $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -アリール、 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ 複素環)、および $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ 炭素環)から選択され；

n は0～6の範囲の整数であり]

を有する化合物またはその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物が提供される。

【0064】

1つの実施形態において、 Ab は、 $ErbB$ レセプターに結合する、またはレセプター(1)～(35)の1以上に結合する抗体ではない；

(1) $BMPRII$ (骨形態形成タンパク質レセプタータイプII, Genbankアクセッション番号NM_001203)；

(2) $ELF1$ (LAT1, SLC7A5, Genbankアクセッション番号NM_03486)；

(3) $STEAP1$ (前立腺の6回膜貫通上皮抗原, Genbankアクセッション番号NM_012449)；

(4) $OR72P$ (CA125, MUC16, Genbankアクセッション番号AF361486)；

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, 巨核細胞増強因子, メソテリン, Genbankアクセッション番号NM_005823)；

(6) $Napi3b$ (NAPI-3B, NPTIIB, SLC34A2, 溶質キャリアーファミリー34 (リン酸ナトリウム), メンバー2, タイプIIナトリウム依存性リン酸トランスポーター3b, Genbankアクセッション番号NM_006424)；

(7) $Sema5b$ (FLJ10372, KIAA1445, Mm. 42015, SEMA5B, SEMAG, セマフォリン5b Hlog, semaドメイン, 7回トロンボスポンジンリピート (タイプIおよびタイプI-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アクセッション番号AB040878)；

(8) $PSCA$ hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 270005

10

20

30

40

50

OC12遺伝子, Genbankアクセッション番号AY358628);

(9) ETBR (エンドセリンタイプBレセプター, Genbankアクセッション番号AY275463);

(10) MSG783 (RNF124, 仮想タンパク質FLJ20315, Genbankアクセッション番号NM_017763);

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, 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2の6回膜貫通上皮抗原, 6回膜貫通前立腺タンパク質, Genbankアクセッション番号AF455138);

(12) TRPM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, 一過性レセプター潜在的カチオンチャネル, サブファミリーM, メンバー4, Genbankアクセッション番号NM_017636);

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, テラトカルシノーマ由来成長因子, Genbankアクセッション番号NP_003203またはNM_003212);

(14) CD21 (CR2 (補体レセプター2) またはC3DR (C3d/エプスタインバールウイルスレセプター) またはHs. 73792, Genbankアクセッション番号M26004);

(15) CD79b (IGb (免疫グロブリン-関連β), B29, Genbankアクセッション番号NM_000626);

(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アクセッション番号NM_030764);

(17) HER2 (Genbankアクセッション番号M11730);

(18) NCA (Genbankアクセッション番号M18728);

(19) MDP (Genbankアクセッション番号BC017023);

(20) IL20Rα (Genbankアクセッション番号AF184971);

(21) Brevicin (Genbankアクセッション番号AF229053);

(22) Ephb2R (Genbankアクセッション番号NM_004442);

(23) ASLG659 (Genbankアクセッション番号AX092328);

(24) PSCA (Genbankアクセッション番号AJ2974236);

(25) GEDA (Genbankアクセッション番号AY260763);

(26) BAFR (Genbankアクセッション番号NP_443177.1);

;

(27) CD22 (Genbankアクセッション番号NP_001762.1);

(28) CD79a (CD79A, CD79α, 免疫グロブリン-関連α, Igβ (CD79B) と共有結合相互作用し、かつIgM分子とで表面上に複合体を形成し、B細胞分化に関与するシグナルを変換するB細胞-特異的タンパク質, Genbankアクセッション番号NP_001774.1);

(29) CXCR5 (パーキットリンパ腫レセプター1, CXCL13ケモカインによって活性化され、リンパ球移動および液性防御で機能し、HIV-2感染および、恐らくは、AIDS、リンパ腫、骨髄腫および白血病も発生において役割を演じるGプロテイン-結合レセプター, Genbankアクセッション番号NP_001707.1);

(30) HLA-DOB (ペプチドに結合し、それらをCD4+Tリンパ球に提示するMHCクラスII分子 (Ia抗原) のβサブユニット, Genbankアクセッション番号NP_002111.1);

(31) P2X5 (プリン作動性レセプターP2Xリガンド型イオンチャネル5, 細胞外ATPによってゲートが開閉されるイオンチャネルはシナプス伝達および神経形成に関与し得、欠陥は特発性排尿筋不安定の病態生理学に寄与し得る, Genbankアクセッション番号NP_002552.2);

10

20

30

40

50

(32) CD72 (B-細胞分化抗原CD72, Lyb-2、Genbankアクセッション番号NP_001773.1) ;

(33) LY64 (リンパ球抗原64 (RP105)、ロイシンリッチリピート (LRR) ファミリーのタイプI膜タンパク質はB-細胞の活性化およびアポトーシスを調節し、機能の喪失は全身エリテマトーデスに罹った患者における増大した病気活性に関連する、Genbankアクセッション番号NP_005573.1) ;

(34) FCRH1 (Fcレセプター様タンパク質1、C2タイプIg-様およびITAMドメインを含有する免疫グロブリンFcドメインに対する推定レセプターはB-リンパ球分化において役割を有するであろう、Genbankアクセッション番号NP_443170.1) ; または

(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、B細胞発生およびリンパ腫形成における可能な役割を持つ推定免疫レセプター; トランスロケーションによる遺伝子の脱調節はいくつかのB細胞悪性疾患で起こる、Genbankアクセッション番号NP_112571.1) 。

【0065】

なおもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物-リンカー-抗体結合体および薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤を含む薬学的組成物を提供する。

【0066】

なおもう1つの態様において、本発明は、薬物-抗体結合体からの切断可能な薬物ユニット(部位)を有する有効量の薬物-抗体結合体および薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤を含む組成物を提供する。

【0067】

もう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物-リンカー-抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、腫瘍細胞または癌細胞を殺し、またはその増殖を阻害する方法を提供する。

【0068】

もう1つの態様において、本発明は、薬物-抗体結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物-抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、腫瘍細胞または癌細胞を殺し、またはその増殖を阻害する方法を提供する。

【0069】

さらにもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物-リンカー-抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、癌を治療する方法を提供する。

【0070】

さらにもう1つの態様において、本発明は、薬物-抗体結合体からの切断可能な薬物を有する有効量の薬物-抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む癌を治療する方法を提供する。

【0071】

もう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物-リンカー-抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫抗体を発現する細胞を殺し、またはその増殖を阻害する方法を提供する。

【0072】

もう1つの態様において、本発明は、薬物-抗体結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物-抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫抗体を発現する細胞を殺し、またはその複製を阻害する方法を提供する。

【0073】

さらにもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物-リンカー-抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫疾患を治療する方法を提供する。

【0074】

さらにもう1つの態様において、本発明は、薬物-抗体結合体からの切断可能な薬物を有する有効量の薬物-抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免

10

20

30

40

50

疫疾患を治療する方法を提供する。

【0075】

なおもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物－リンカー－抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、感染症を治療する方法を提供する。

【0076】

なおもう1つの態様において、本発明は、薬物－抗体結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物－抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、感染症を治療する方法を提供する。

【0077】

もう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物－リンカー－抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、腫瘍細胞または癌細胞の増殖を予防する方法を提供する。

10

【0078】

もう1つの態様において、本発明は、薬物－抗体結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物－抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、腫瘍細胞または癌細胞の増殖を予防する方法を提供する。

【0079】

さらにもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物－リンカー－抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、癌を予防する方法を提供する。

【0080】

20

さらにもう1つの態様において、本発明は、薬物－抗体結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物－抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、癌を予防する方法を提供する。

【0081】

もう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物－リンカー－抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫抗体を発現する細胞の増殖を予防する方法を提供する。

【0082】

もう1つの態様において、本発明は、薬物－抗体結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物－抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫抗体を発現する細胞の増殖を予防する方法を提供する。

30

【0083】

さらにもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物－リンカー－抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫疾患を予防する方法を提供する。

【0084】

さらにもう1つの態様において、本発明は、薬物－抗体結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物－抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、自己免疫疾患を予防する方法を提供する。

【0085】

さらにもう1つの態様において、本発明は、有効量の薬物－リンカー－抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、感染症を予防する方法を提供する。

40

【0086】

なおもう1つの態様において、本発明は、薬物－抗体結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する有効量の薬物－抗体結合体をそれを必要とする患者に投与することを含む、感染症を予防する方法を提供する。

【0087】

もう1つの態様において、薬物－抗体結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する薬物－リンカー化合物の合成用の中間体として用いることができる薬物化合物が提供される。

【0088】

50

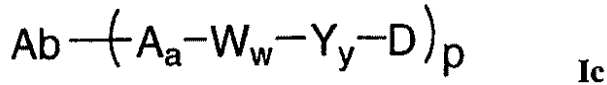
もう1つの態様において、薬物－リンカー－抗体結合体の合成用の中間体として用いることができる薬物－リンカー化合物が提供される。

【0089】

1つの態様において、本発明は、式Ic：

【0090】

【化87】



[式中：

Abは抗原(1)～(35)の1以上に結合する抗体であり：

(1) BMPRII (骨髄形成タンパク質レセプタータイプII, Genbank
アクセッション番号NM_001203)；

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, Genbankアクセッション番号NM_03486)；

(3) STEAP1 (前立腺の6回膜貫通上皮抗原, Genbankアクセッション番号NM_012449)；

(4) O772P (CA125, MUC16, Genbankアクセッション番号AF361486)；

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, 巨核細胞増強因子, メソテリン, Genbank
アクセッション番号NM_005823)；

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPT1b, SLC34A2, 溶質キャリアーファミリー34 (リン酸ナトリウム), メンバー2, タイプIIナトリウム-依存性リン酸トランスポーター3b, Genbankアクセッション番号NM_006424)；

(7) Sema5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm. 42015, SEMA5B, SEMAG, セマフォリン5b Hlog, semaドメイン, 7回トロンボスポンジンリピート (タイプIおよびタイプI-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アクセッション番号AB040878)；

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 遺伝子, Genbankアクセッション番号AY358628)；

(9) ETBR (エンドセリンタイプBレセプター, Genbankアクセッション番号AY275463)；

(10) MSG783 (RNF124, 仮想タンパク質FLJ20315, Genbank
アクセッション番号NM_017763)；

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, 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2の6回膜貫通上皮抗原. 6回膜貫通前立腺タンパク質, Genbank
アクセッション番号AF455138)；

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, 一過性レセプター潜在的カチオンチャネル, サブファミリーM, メンバー4, Genbank
アクセッション番号NM_017636)；

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, テラトカルシノーマ由来成長因子, Genbankアクセッション番号NP_003203またはNM_003212)；

(14) CD21 (CR2 (補体レセプター2) またはC3DR (C3d/エプスタインバールウイルスレセプター) またはHs. 73792, Genbankアクセッション
番号M26004)；

(15) CD79b (IGb (免疫グロブリン-関連β), B29, Genbankア 50

10

20

30

40

クセッション番号NM__000626) ;

(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 アクセッション番号NM__030764) ;

(17) HER2 (Genbank アクセッション番号M11730) ;

(18) NCA (Genbank アクセッション番号M18728) ;

(19) MDP (Genbank アクセッション番号BC017023) ;

(20) IL20Rα (Genbank アクセッション番号AF184971) ;

(21) Brevicin (Genbank アクセッション番号AF229053) ;

(22) Ephb2R (Genbank アクセッション番号NM__004442) ;

(23) ASLG659 (Genbank アクセッション番号AX092328) ;

(24) PSCA (Genbank アクセッション番号AJ297436) ;

(25) GEDA (Genbank アクセッション番号AY260763) ;

(26) BAFR (Genbank アクセッション番号NP__443177.1) ;

(27) CD22 (Genbank アクセッション番号NP-001762.1) ;

(28) CD79a (CD79A, CD79α, 免疫グロブリン-関連α, Igβ (CD79B) と共有結合相互作用し、かつIgM分子とで表面上に複合体を形成し、B細胞分化に参与するシグナルを変換するB細胞-特異的タンパク質, Genbank アクセッション番号NP__001774.1) ;

(29) CXCR5 (パーキットリンパ腫レセプター1, CXCL13ケモカインによって活性化され、リンパ球移動および液性防御で機能し、HIV-2感染および、恐らくは、AIDS、リンパ腫、骨髄腫および白血病も発生において役割を演じるGプロテイン-結合レセプター, Genbank アクセッション番号NP__001707.1) ;

(30) HLA-DOB (ペプチドに結合し、それらをCD4+Tリンパ球に提示するMHCクラスII分子 (Ia抗原) のβサブユニット, Genbank アクセッション番号NP__002111.1) ;

(31) P2X5 (プリン作動性レセプターP2Xリガンド型イオンチャネル5, 細胞外ATPによってゲートが開閉されるイオンチャネルはシナプス伝達および神経形成に参与し得、欠陥は特発性排尿筋不安定の病態生理学に寄与し得る, Genbank アクセッション番号NP__002552.2) ;

(32) CD72 (B細胞分化抗原CD72, Lyb-2, Genbank アクセッション番号NP__001773.1) ;

(33) LY64 (リンパ球抗原64 (RP105)、ロイシンリッチリピート (LRR) ファミリーのタイプI膜タンパク質はB細胞の活性化およびアポトーシスを調節し、機能の喪失は全身エリテマトーデスに罹った患者における増大した病気活性に関連する, Genbank アクセッション番号NP__005573.1) ;

(34) FCRH1 (Fcレセプター様タンパク質1, C2タイプIg-様およびITAMドメインを含有する免疫グロブリンFcドメインに対する推定レセプターはBリンパ球分化において役割を有するであろう, Genbank アクセッション番号NP__443170.1) ; または

(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、B細胞発生およびリンパ腫形成における可能な役割を持つ推定免疫レセプター；トランスロケーションによる遺伝子の脱調節はいくつかのB細胞悪性疾患で起こる, Genbank アクセッション番号NP__112571.1) ;

Aはストレッチャー (Stretcher) ユニットであり、

aは0または1であり、

各Wは独立してアミノ酸ユニットであり、

wは0~12の範囲の整数であり、

Yはスペーサーユニットであり、および

10

20

30

40

50

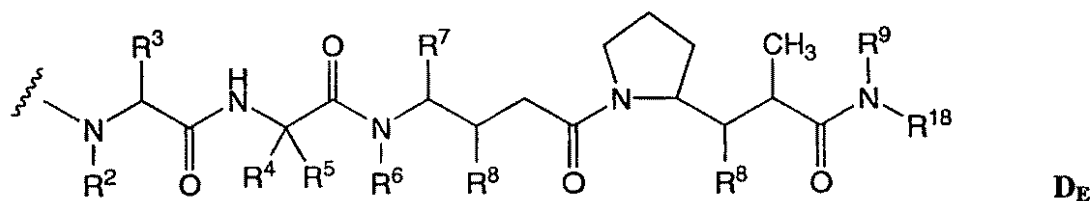
y は 0、1 または 2 であり、

p は 1 ～ 約 20 の範囲であり、および

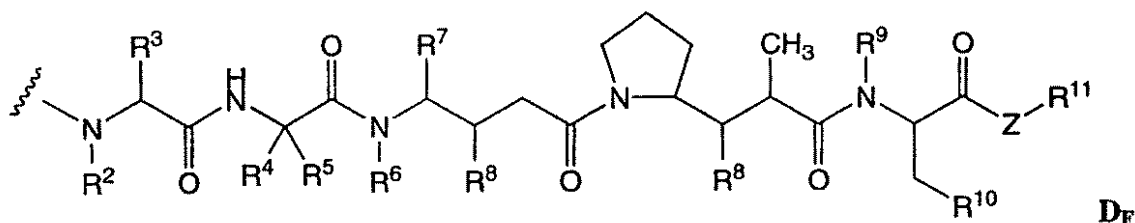
D は式 D_E および D_F から選択される薬物部分であり：

【0091】

【化88】



10



20

ここで、D_E および D_F の波線は A、W または Y への共有結合付着部位を示し、独立して各位置において：

R² は H および C₁ - C₈ アルキルから選択され；

R³ は H、C₁ - C₈ アルキル、C₃ - C₈ 炭素環、アリール、C₁ - C₈ アルキル-アリール、C₁ - C₈ アルキル- (C₃ - C₈ 炭素環)、C₃ - C₈ 複素環および C₁ - C₈ アルキル- (C₃ - C₈ 複素環) から選択され；

R⁴ は H、C₁ - C₈ アルキル、C₃ - C₈ 炭素環、アリール、C₁ - C₈ アルキル-アリール、C₁ - C₈ アルキル- (C₃ - C₈ 炭素環)、C₃ - C₈ 複素環および C₁ - C₈ アルキル- (C₃ - C₈ 複素環) から選択され；

R⁵ は H およびメチルから選択され；

30

あるいは R⁴ および R⁵ は一緒になって炭素環を形成し、式 - (C R^a R^b)_n - を有し、ここで、R^a および R^b は、独立して、H、C₁ - C₈ アルキルおよび C₃ - C₈ 炭素環から選択され、n は 2、3、4、5 および 6 から選択され；

R⁶ は H および C₁ - C₈ アルキルから選択され；

R⁷ は H、C₁ - C₈ アルキル、C₃ - C₈ 炭素環、アリール、C₁ - C₈ アルキル-アリール、C₁ - C₈ アルキル- (C₃ - C₈ 炭素環)、C₃ - C₈ 複素環および C₁ - C₈ アルキル- (C₃ - C₈ 複素環) から選択され；

各 R⁸ は、独立して、H、OH、C₁ - C₈ アルキル、C₃ - C₈ 炭素環および O - (C₁ - C₈ アルキル) から選択され；

R⁹ は H および C₁ - C₈ アルキルから選択され；

40

R¹⁰ はアリールまたは C₃ - C₈ 複素環から選択され；

Z は O、S、NH または NR¹² であり、ここで、R¹² は C₁ - C₈ アルキルであり；

R¹¹ は H、C₁ - C₂₀ アルキル、アリール、C₃ - C₈ 複素環、- (R¹³ O)_m - R¹⁴、または - (R¹³ O)_m - CH (R¹⁵)₂ から選択され；

m は 1 ～ 1000 の範囲の整数であり；

R¹³ は C₂ - C₈ アルキルであり；

R¹⁴ は H または C₁ - C₈ アルキルであり；

R¹⁵ の各出現は、独立して、H、COOH、- (CH₂)_n - N (R¹⁶)₂、- (CH₂)_n - SO₃ H、または - (CH₂)_n - SO₃ - C₁ - C₈ アルキルであり；

50

R^{16} の各出現は、独立して、H、 C_1-C_8 アルキル、または $-(CH_2)_n-COOH$ であり；

R^{18} は $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -アリール、 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ 複素環)、および $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ 炭素環)から選択され；および

n は0～6の範囲の整数である]

を有する（抗体－薬物結合体ともいう）薬物－リンカー－抗体結合体、またはその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物を提供する。

【0092】

もう1つの態様において、本発明の抗体－薬物結合体（ADC）の抗体はErbB2遺伝子によってコードされるレセプターに特異的に結合する。

10

【0093】

もう1つの態様において、抗体－薬物結合体の抗体はhMAb4D5-1、hMAb4D5-2、hMAb4D5-3、hMAb4D5-4、hMAb4D5-5、hMAb4D5-6、hMAb4D5-7およびhMAb4D5-8（トラスツマブ）から選択されるヒト化抗体である。

【0094】

もう1つの態様において、本発明は、本発明の抗体－薬物結合体化合物；容器；およびErbB2レセプターの過剰発現によって特徴付けられる癌を治療するのに当該化合物を用いることができることを示すパッケージインサートまたはラベルを含む製品を含む。

20

【0095】

もう1つの態様において、本発明は、治療有効量の本発明の抗体－薬物結合体化合物を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物において癌を治療する方法を含み、ここで、該癌はErbB2レセプターの過剰発現によって特徴付けられ、抗-ErbB2抗体での治療に応答せず、または応答しにくい。

【0096】

もう1つの態様において、薬物部分の相当量は、抗体－薬物化合物が抗体－薬物結合体の抗体に対して特異的な細胞－表面レセプターを持つ細胞に進入するまで抗体から切断されず、抗体－薬物結合体が細胞に進入する場合には、薬物部分は抗体から切断される。

【0097】

30

もう1つの態様において、抗体－薬物結合体化合物の生物学的利用能または哺乳動物における該化合物の細胞内代謝産物は、抗体－薬物結合体化合物の薬物部分を含む薬物化合物と比較した場合に、または薬物部分を有しない化合物のアナログと比較した場合に改善されている。

【0098】

もう1つの態様において、薬物部分は化合物の抗体から、または化合物の細胞内代謝産物から哺乳動物において細胞内で切断される。

【0099】

もう1つの態様において、本発明は、有効量の本発明の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩、および薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたは賦形剤を含む薬学的組成物を含む。該組成物は、さらに、治療有効量のチューブリン形成阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、およびDNA結合剤のような化学治療剤を含むことができる。

40

【0100】

もう1つの態様において、本発明は、腫瘍細胞または癌細胞を殺し、またはその増殖を阻害するのに有効な、一定量の本発明の抗体－薬物結合体化合物、またはその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物で腫瘍細胞または癌細胞を処理することを含む、腫瘍細胞または癌細胞を殺し、またはその増殖を阻害する方法を含む。

【0101】

もう1つの態様において、本発明は、細胞培養基中の哺乳動物細胞を本発明の抗体薬物

50

結合体化合物に曝露することを含む細胞増殖を阻害する方法を含み、ここで、該抗体薬物結合体化合物は細胞に進入し、薬物は抗体薬物結合体化合物の残りから切断され；それにより、細胞の増殖は阻害される。

【0102】

もう1つの態様において、本発明は、本発明の抗体-薬物結合体化合物、および薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたは賦形剤の処方患者に投与することを含み、癌を治療する方法を含む。

【0103】

もう1つの態様において、本発明は：

(a) 細胞を本発明の抗体-薬物結合体化合物に曝露し；次いで、

(b) 抗体-薬物結合体化合物の細胞への結合の度合いを測定する；

ことを含む、癌細胞を検出するアッセイを含む。

【0104】

添付の図面、図およびスキームと合わせて、例示的实施形態の以下の詳細な記載を参照することによって本発明は最良に理解されるであろう。以下の議論は記述的であり、説明的かつ例示的であって、いずれかの添付の請求の範囲によって定義される範囲を限定するものと取られるべきではない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0105】

(4. 例示的な実施形態の詳細な説明)

(4. 1 定義および略語)

特記しない限り、本明細書中で用いる以下の用語およびフレーズは以下の意味を有することを意図する：

商品名を本明細書中で用いる場合、出願人が独立して、商品名の製品処方、ジェネリック医薬品、および商品名製品の活性な医薬成分を含めることを意図する。

【0106】

本明細書中における用語「抗体」は最も広い意味で用い、所望の生物学的活性を呈する限り、無傷なモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷の抗体から形成された多価抗体（例えば、二重特異性抗体）および抗体フラグメントを具体的にカバーする。抗体は、特異的抗原を認識し、それに結合することができる免疫系によって生じるタンパク質である。その構造の点で記載すると、抗体は、典型的には、4つのアミノ酸鎖、2つの重鎖および2つの軽鎖よりなるY形状のタンパク質を有する。各抗体は主に2つの領域：可変領域、および定常領域を有する。Yのアームの端部に位置した可変領域は標的抗原に結合し、それと相互作用する。この可変領域は、特定の抗原上の特異的結合部位を認識し、それに結合する相補性決定領域(CDR)を含む。Yのテイルに位置した定常領域は免疫系によって認識され、それと相互作用する(Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunology, 第5版, Garland Publishing, New York)。標的抗原は、一般的には、複数抗体上のCDRによって認識される、エピトープとも呼ばれる多数の結合部位を有する。異なるエピトープに特異的に結合する各抗体は異なる構造を有する。かくして、1つの抗原は1を超える対応する抗体を有する。

【0107】

本明細書中で用いる用語「抗体」とは、全長免疫グロブリン分子または全長免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な、すなわち、癌細胞、限定されるものではないが、自己免疫疾患に関連する自己免疫抗体を生産する細胞を含めた標的のような、注目する標的の抗原またはその部分に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子という。本明細書中に開示された免疫グロブリンは、免疫グロブリン分子のいずれかのタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、およびIgA）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスのものであり得る。免疫グロブリンはいずれかの種に由来するものであり得るものである。しかしながら、一つの態

様においては、免疫グロブリンは、ヒト、ネズミまたはウサギ起源のものである。もう一つの態様において、抗体はポリクローナル、モノクローナル、二特異的、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、一本鎖抗体、Fv、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab発現ライブラリーによって生産されたフラグメント、抗-イディオタイプ（抗-Id）抗体、CDR、および癌細胞抗原、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前記のいずれかのエピドープ結合フラグメントである。

【0108】

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いい、すなわち、該集団を含む個々の抗体は微量に存在し得る可能な天然に生じ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り、単一の抗原性部位に対して向けられる。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対して向けられた異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一決定基に対して向けられる。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらが他の抗体によって汚染せずに合成できる点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体の特徴を示し、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、本発明に従って使用す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できるか、あるいは組換えDNA方法によって作成することができる（米国特許第4816567号参照）。また、「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson et al. (1991) Nature, 352: 624-628およびMarks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581-597に記載された技術を用いてファジー抗体ライブラリーから単離することもできる。

【0109】

本明細書中におけるモノクローナル抗体が、具体的には、重鎖および／軽鎖の一部が、特定の種に由来するか、または特定の抗体に属する抗体における対応する配列と同一またはそれに相同あり、他方、鎖の残りはもう一つの種に由来するか、あるいはもう一つの抗体クラスまた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であるか、またはそれと相同である「キメラ」抗体、ならびにそのような抗体のフラグメントを、それらが所望の生物学的活性を呈する限り含む（米国特許第mp-4816567号；およびMorrisson et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855）。

【0110】

モノクローナル抗体（MAbs）を生産するのに種々の方法が使用されてきた。単一タイプの抗体を生産するクローン化された細胞系をいうハイブリドーマ技術はマウス（ネズミ）、ハムスター、ラットおよびヒトを含めた種々の種の細胞を用いる。MAbsを調製するためのもう1つの方法は、組換えDNA技術を含めた遺伝子工学を用いる。これらの技術から作成されたモノクローナル抗体は、とりわけ、キメラ抗体およびヒト化抗体を含む。キメラ抗体は1を超えるタイプの種からのDNAコーディング領域を組み合わせる。例えば、キメラ抗体はマウスからの可変領域およびヒトからの定常領域を誘導し得る。ヒト化抗体は、非ヒト部分を含むが、圧倒的に、ヒトに由来する。キメラ抗体のように、ヒト化抗体は完全にヒトの定常領域を含むことができる。しかしながら、キメラ抗体とは異なり、可変領域は部分的にヒトに由来し得る。ヒト化抗体の非ヒト、合成部分は、しばしば、ネズミ抗体におけるCDRに由来する。いずれの場合においても、これらの領域は、抗体が特異的抗原を認識しそれに結合するのを可能とするのに非常に重要である。

【0111】

記載したように、ネズミ抗体を用いることができる。診断および短期間療法で有用であるが、ネズミ抗体は、有害な免疫原性の応答の危険性を増加させることなく、ヒトに長期間投与することができない。ヒト抗マウス抗体（HAMA）と呼ばれるこの応答は、ヒト

免疫系がネズミ抗体を外來性のものとして認識し、それを攻撃する場合に起こる。H A M A 応答は毒性ショックまたは死滅さえ引き起こしかねない。

【0112】

キメラおよびヒト化抗体は、投与された抗体の非ヒト部分を最小化することによって、H A M A 応答の尤度を低下させる。さらに、キメラおよびヒト化抗体は、抗体依存性細胞の細胞傷害性のような二次的ヒト免疫応答を活性化する追加の利点を有する。

【0113】

「抗体フラグメント」は、好ましくは、その抗原-結合または可変領域を含む無傷抗体の部分を含む。抗体フラグメントの例はF a b、F a b'、F (a b')₂、およびF v フラグメント；二重特異性抗体；線状抗体；単鎖抗体分子；および抗体フラグメントから形成された多特異的抗体を含む。

10

【0114】

「無傷」抗体は、抗原-結合可変領域ならびに軽鎖定常ドメイン (C L) および重鎖定常ドメイン、C H 1、C H 2 および C H 3 を含むものである。定常ドメインは天然配列ドメイン (例えば、ヒト天然配列定常ドメイン) またはそのアミノ酸配列変種であり得る。

【0115】

無傷抗体は、抗体のF c 領域 (天然配列F c 領域またはアミノ酸配列変種F c 領域) に帰することができる生物学的活性をいう1以上の「エフェクター機能」を有することができる。抗体エフェクター機能の例はC 1 q 結合；補体依存性細胞傷害性；F c レセプター結合；抗体-依存性細胞-媒介細胞傷害性 (A D C C) ；ファゴサイトーシス；細胞表面レセプター (例えば、B 細胞レセプター；B C R) などのダウンレギュレーションを含む。

20

【0116】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、無傷抗体は異なる「クラス」に帰属させることができる。無傷抗体の五つの主なクラス：I g A、I g D、I g E、I g G および I g M があり、これらのいくつかはさらに「サブクラス」 (イソタイプ)、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A および I g A 2 に分けることができる。異なるクラスの抗体に対応する重鎖定常ドメインは、各々、α、δ、ε、γ および μ と呼ばれる。サブユニットの構造および異なるクラスの免疫グロブリンの三次元立体配置はよく知られている。

【0117】

表現「E r b B 2」および「H E R 2」は本明細書中においては相互交換的に使用され、例えば、S e m b a e t a l. , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 2 ; 6 4 9 7 - 6 5 0 1 (1 9 8 5) および Y a m a m o t o e t a l. , (1 9 8 6) N a t u r e , 3 1 9 : 2 3 0 - 2 3 4 (G e n b a n k アクセッション番号 X 0 3 3 6 3) に記載されたヒト H E R 2 タンパク質をいう。用語「E r b B 2」とはヒト E r b B 2 をコードする遺伝子をいい、「n e u」とはネズミ p 1 8 5 n e u をコードする遺伝子をいう。好ましい E r b B 2 は天然配列ヒト E r b B 2 である。

30

【0118】

E r b B レセプターに対する抗体は、例えば、S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y , I n c . C a l i f o r n i a , U S A を含めた多数の源から商業的に入手可能である。

40

【0119】

「E r b B リガンド」は、E r b B レセプターに結合しおよび／またはそれを活性化するポリペプチドを意味する。E r b B リガンドは上皮成長因子 (E G F) (S a v a g e e t a l. (1 9 7 2) J . B i o l . C h e m . , 2 4 7 : 7 6 1 2 - 7 6 2 1) ；形質転換成長因子 α (T G F - α) (M a r q u a r d t e t a l. (1 9 8 4) S c i e n c e 2 2 3 : 1 0 7 9 - 1 0 8 2) ；神経線維腫またはケラチノサイトオートクリン成長因子としても知られたアムフィレグリン (S h o y a b e t a l. (1 9 8 9) S c i e n c e 2 4 3 : 1 0 7 4 - 1 0 7 6 ; K i m u r a e t a l. , N a t u r e , 3 4 8 : 2 5 7 - 2 6 0 (1 9 9 0) および C o o k e t a l. ,

50

Mol. Cell. Biol., 11:2547-2557 (1991)); β セルリン (Shing et al., Science, 259:1604-1607 (1993)) および Sasada et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 190:1173 (1993)); ヘパリン結合上皮成長因子 (HB-EGF) (Higashiyama et al., Science, 251:936-939 (1991)); エピレグリン (Toyoda et al., J. Biol. Chem., 270:7495-7500 (1995)); および Komurasaki et al., Oncogene, 15:2841-2848 (1997)); ヘレグリン (後記参照); ニューグリン-2 (NRG-2) (Carraway et al., Nature, 387:512-516 (1997)); ニューレグリン-3 (NRG-3) (Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:9562-9567 (1997)); ニューレグリン-4 (NRG-4) (Harari et al., Oncogene, 18:2681-89 (1999)) または クリプト (CR-1) (Kannan et al., J. Biol. Chem., 272(6):3330-3335 (1997)) のような天然配列ヒト ErbB リガンドであり得る。EGFR に結合する ErbB リガンドは EGF、TGF- α 、アムフィレグリン、 β セルリン、HB-EGF および エピレグリンを含む。ErbB3 に結合する ErbB リガンドは ヘレグリンを含む。ErbB4 に結合することができる RbB リガンドは ベタセグリン、エピレグリン、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4 および ヘレグリンを含む。ErbB リガンドは合成 ErbB リガンドであってもよい。合成リガンドは特定の ErbB レセプターに特異的であり得るか、または特定の ErbB レセプター複合体を認識することができる。合成リガンドの例は、合成ヘレグリン/EGF キメラブレグリンである (例えば、ここに引用して援用する Jones et al., (1999) F EBS Letters, 447:227-231 参照)。

【0120】

「ヘレグリン」(HRG) は米国特許第 5641869 号または Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993) に開示されたヘレグリン遺伝子産物によってコードされたポリペプチドをいう。ヘレグリンの例はヘレグリン- α 、ヘレグリン- β 1、ヘレグリン- β 2、およびヘレグリン- β 3 (Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992)); および米国特許第 5641869 号; neu 分化因子 (NDF) (Peles et al., Cell 69:205-216 (1992)); アセチルコリンレセプター誘導活性 (ARIA) (Falls et al., (1993) Cell 72:801-815); 神経膠成長因子 (GGF) (Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993)); 感覚および運動ニューロン由来因子 (SDF) (Ho et al., J. Biol. Chem., 270:14523-14532 (1995)); γ -ヘレグリン Schaefer et al., Oncogene, 15:1385-1394 (1997)) を含む。該用語は、その EGF-様ドメインフラグメント (例えば、HRG β 1177-244) のような、天然配列 HRG ポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントおよび/またはアミノ酸配列変種を含む。

【0121】

「ErbB ヘテロオリゴマー」は、少なくとも二つの異なる ErbB レセプターを含む非共有結合的に会合したオリゴマーである。「ErbB ダイマー」は、二つの異なる ErbB レセプターを含む非共有結合的に会合したオリゴマーである。そのような複合体は、二以上の ErbB レセプターを発現する細胞が ErbB リガンドに曝露されると形成できる。ErbB ダイマーのような ErbB オリゴマーは免疫沈澱によって単離することができ、例えば、Soliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20), 14661-14665 (1994) に記載された SDS-PAGE によって分析される。そのような ErbB ヘテロオリゴマーの例は (HER1/HER2 ともいう) EGFR-ErbB2、ErbB2-ErbB3 (HER2/HER3) およ

10

20

30

40

50

び E r b B 3 - E r b B 4 (H E R 3 / H E R 4) 複合体を含む。さらに、E r b B ヘテロオリゴマーは、E r b B 3、E r b B 4 または E G F R (E r b B 1) のような異なる E r b B レセプターと組み合わせられた 2 以上の E r b B 2 のレセプターを含むことができる。サイトカインレセプターサブユニット (例えば、g p 1 3 0) のような他のタンパク質をヘテロオリゴマーに含むことができる。

【0122】

「天然配列」ポリペプチドは、天然に由来する、ポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するもの、例えば腫瘍一会合抗原レセプターである。そのような天然配列ポリペプチドは天然から単離することができるか、あるいは組換えまたは合成手段によって生産することができる。かくして、天然配列ポリペプチドは天然に生じるヒトポリペプチド、ネズミポリペプチド、またはいずれかの他の哺乳動物種からのポリペプチドのアミノ酸配列を有することができる。

10

【0123】

用語「アミノ酸配列変種」とは、天然配列ポリペプチドはある程度異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。通常、アミノ酸配列変種は天然リガンドの少なくとも一つのレセプター結合ドメインと、または腫瘍一会合抗原のような天然レセプターの少なくとも一つのリガンド結合ドメインと少なくとも約 70 % 相同性を保有し、好ましくは、それらはそのようなレセプターまたはリガンド結合ドメインと少なくとも約 80 %、より好ましくは少なくとも約 90 % 相同であろう。アミノ酸配列変種は天然アミノ酸配列のアミノ酸配列内のある位置において置換、欠失および／または挿入を保有する。

20

【0124】

「配列同一性」は、配列を整列させ、ギャップを導入して、必要であれば、最大のパーセント配列同一性を達した後に、同一であるアミノ酸配列変種における残基のパーセンテージと定義される。整列のための方法およびコンピュータプログラムは当該分野でよく知られている。一つのそのようなコンピュータプログラムは、1991 年 12 月 10 日に、合衆国著作権局、Washington, DC 20559 におけるユーザー文書提示に申請された Genentech, Inc. によって著作された「Align 2」である。

【0125】

「抗体-依存性細胞-媒介細胞傷害性」および「ADCC」とは、Fc レセプター (FcR) を発現する非特異的細胞傷害性細胞 (例えば、ナチュラルキラー (NK) 細胞、好中球、およびマクロファージ) が標的細胞上の結合した抗体を認識し、引き続いて、標的細胞の溶解を引き起こす細胞-媒介反応をいう。ADCC を媒介する一次細胞である NK 細胞は Fc γ R I I I のみを発現し、他方、単球は Fc γ R I、Fc γ R I I および Fc γ R I I I を発現する。造血系細胞上での FcR 発現は Ravetch and Kinet, (1991) Annu. Rev. Immunol., 9: 457-92 の 464 頁の表 3 にまとめられる。注目する分子の ADCC 活性を評価するためには、米国特許第 5500362 号または第 5821337 号に記載されたもののようなインビトロ ADCC アッセイを行うことができる。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞は末梢血液単核細胞 (PBMC) およびナチュラルキラー (NK) 細胞を含む。別法として、加えて、注目する分子の ADCC 活性は、例えば、Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 652-656 (1998) に開示されたもののような動物モデルにおいてインビボにて評価することができる。

30

40

【0126】

用語「Fc レセプター」または「FcR」は、抗体の Fc 領域に結合するレセプターを記載するために用いられる。好ましい FcR は天然配列ヒト FcR である。さらに、好ましい FcR は、IgG 抗体に結合するもの (ガンマレセプター) であり、これらのレセプターの対立遺伝子変種および、別法として、スプライスされた形態を含めた Fc γ R I、Fc γ R I I、および Fc γ R I I I サブクラスのレセプターを含む。Fc γ R I I レセプターはその細胞質ドメインにおいて種として異なる同様なアミノ酸配列を有する Fc γ R I I A (「活性化レセプター」) および Fc γ R I I B (「阻害レセプター」) を含む

50

。活性化レセプターFcγRIIAはその細胞質ドメインに免疫レセプターチロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)を含む。阻害レセプターFcγRIIBはその細胞質ドメインにおける免疫レセプターチロシンベースの阻害モチーフ(ITIM)を含む(Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)におけるreview M. 参照)。FcRはRavetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991); Capelle et al., Immunomethods, 4:25-34 (1994); およびde Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995)にレビューされている。将来同定されるべきものを含めた他のFcRは本明細書中においては用語「FcR」に含まれる。また、該用語は、胎児への母性IgGの移動を担う新生児レセプターFcRnも含む(Guyer et al., J. Immunol., 117:587 (1976) およびKim et al., J. Immunol., 24:249 (1994))。

10

【0127】

「補体依存性細胞疾患性」または「CDC」とは、補体の存在下で標的を溶解させる分子能力をいう。補体活性化経路は、同属抗原と複合体化した分子(例えば、抗体)への補体系の第一の成分(C1q)の結合によって開始される。補体活性化を評価するためには、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996)に記載されたCDCアッセイを行うことができる。

20

【0128】

用語「可変」は、可変ドメインのある部分が抗体の中で配列においてかなり異なり、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合および特異性において用いられる。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメイン全体に均一には分布していない。それは軽鎖および重鎖可変ドメインにおける共に超可変領域と呼ばれる三つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保存された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然重鎖および軽鎖の可変ドメインは、各々、β-シート構造に結合するループを形成し、ある場合には、該構造の部分を形成する三つの超可変領域によって結合された、大いにβ-シート立体配置を採用する四つのFRを含む。各鎖における超可変領域はFRによって近接して一緒に保持され、他の鎖からの超可変領域と共に、抗体の抗原-結合部位の形成に寄与する(Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD参照)。定常ドメインは抗原への抗体の結合に直接的に関与しないが、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)における抗体の参画のような種々のエフェクター機能を呈する。

30

【0129】

用語「超可変領域」は、本明細書中で用いる場合、抗原-結合を担う抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は一般には、「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインにおける残基24-34(L1)、50-56(L2) および89-97(L3)、および重鎖可変ドメインにおける31-35(H1)、50-65(H2) および95-102(H3); Kabat et al.、前掲) および/または「超可変ループ」からの残基(例えば、軽鎖可変ドメインにおける残基26-32(L1)、50-52(L2) および91-96(L3)、および重鎖可変ドメインにおける26-32(H1)、53-55(H2) および96-101(H3); Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol., 196:901-917)からのアミノ酸残基を含む。「フレームワーク領域」または「FR」残基は、本明細書中で定義された超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

40

【0130】

抗体のパイン消化は、各々が単一抗原-結合部位を持つ「Fab」フラグメントと呼

50

ばれる二つの同一の抗原－結合フラグメントおよびその名称が容易に結晶化するその能力を反映する残存「Fc」フラグメントを生じる。ペプシンショインは、二つの抗原－結合部位を有し、依然として抗原を架橋することができるF(ab')₂フラグメントを生じる。

【0131】

Fvは、完全な抗原－認識および抗原－結合部位を含有する最小抗体フラグメントである。この領域は、密に非共有結合会合した1つの重鎖および1つの軽鎖可変ドメインのダイマーよりなる。それは、各可変ドメインの3つの超可変領域が相互作用して、VH－VLダイマーの表面の抗原－結合部位を規定するこの立体配置にある。集合的に、6つの超可変領域は抗体に対する抗原－結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（または抗原に対して特異的な3つの超可変領域のみを含むFvの半分）でさえ、抗原を認識し結合する能力を有するが、全結合部位よりも低い親和性においてである。

10

【0132】

Fabフラグメントもまた軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第一の定常ドメイン（CH1）を含有する。Fab'フラグメントは、抗体ヒンジ領域からの1以上のシステインを含めた、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端における少数の残基の付加によってFabフラグメントとは異なる。Fab'－SHは、定常ドメインのシステイン残基が少なくとも1つの遊離チオール基を担うFab'についての本明細書中における命名である。F(ab')₂抗体フラグメントは、元来、それらの間にヒンジシステインを有するFab'フラグメントの対として生産された。抗体フラグメントの他の化学的カップリングも知られている。

20

【0133】

いずれかの脊椎動物種からの抗体の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ（κ）およびラムダ（λ）と呼ばれる2つの明瞭に区別されるタイプの1つに帰属させることができる。

【0134】

「単鎖Fv」または「scFv」抗体フラグメントは抗体のVHおよびVLドメインを含み、ここで、これらのドメインは単一ポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは、さらに、scFvが抗原結合のための所望の構造を形成するのを可能とするVHおよびVLドメインの間にポリペプチドリンカーを含む。scFvのレビューについては、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269－315（1994）におけるPluckthun参照。

30

【0135】

用語「二重特異性抗体（diabody）」とは、2つの抗原－結合部位を持つ小さな抗体フラグメントをいい、そのフラグメントは同一ポリペプチド鎖（VH－VL）における可変軽鎖ドメイン（VL）に連結された可変重鎖ドメイン（VH）を含む。同一鎖上の2つのドメインの間の対合を可能とするにはあまりにも短いリンカーを用いることによって、ドメインはもう1つの鎖の相補的ドメインと対合し、2つの抗原－結合部位を作り出すことを強いられる。二重特異性抗体は、例えば、EP 404,097；WO 93/11161；およびHollinger et al.（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90：6444－6448により十分に記載されている。

40

【0136】

非ヒト（例えば、げっ歯類）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、受容者の超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性および容量を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類のような非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域に由来する残基によって置き換えられたヒト免疫グロブリン（受容者抗体である）。いくつかの場合には

50

、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は受容者抗体またはドナー抗体に見出されない残基を含むことができる。これらの修飾は抗体の性能をさらに精錬するためになされる。一般に、ヒト化抗体は少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ここで、超可変ループの全てまたは実質的に全ては非ヒト免疫グロブリンのそれに対応し、FRの全てまたは実質的に全てはヒト免疫グロブリン配列のそれである。ヒト化抗体は、所望により、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的には、ヒト免疫グロブリンのそれを含むであろう。さらなる詳細については、Jones et al. (1986) Nature, 321: 522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-329; および Presta, (1992) Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 参照。

10

【0137】

ヒト化抗-ErbB2抗体は、ここに引用して明示的に援用する米国特許第5821337号の表3に記載されたhUMA b4D5-1、hUMA b4D5-2、hUMA b4D5-3、hUMA b4D5-4、hUMA b4D5-5、hUMA b4D5-6、hUMA b4D5-7およびhUMA b4D5-8（HERCEPTIN（登録商標））；ヒト化520C9（WO 93/21319）および本明細書中にて後に記載するヒト化2C4抗体を含む。

【0138】

20

「単離された」抗体は、同定され、かつその天然環境の成分から分離されおよび／または回収されたものである。その天然環境の汚染成分は抗体についての診断または治療用途に干渉する物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含むことができる。好ましい実施形態において、抗体は（1）Lowry方法によって測定して抗体の95重量%以上、最も好ましくは99重量%以上、（2）スピニングカップシクエネーターの使用によってN-末端または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、または（3）クーマシーブルーまたは、好ましくは、銀染色を用いて還元または非還元条件下でSDS-PAGEによって均一なまで精製されるであろう。単離された抗体は、組換え細胞内のインサイチュでの抗体を含む。というのは、抗体の天然環境の少なくとも1つの成分は存在しないからである。しかしながら、通常、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程によって調製される。

30

【0139】

注目する抗原に「結合する」抗体は、該抗体が抗原を発現する細胞を標的とするのに有用であるように、十分な親和性でもってその抗原に結合することができるものである。

【0140】

「アポトーシスを誘導する」抗体は、アネキシンVの結合、DNAのフラグメント化、細胞の収縮、小胞体の膨張、細胞フラグメント化、および／または（アポトーシスボディと呼ばれる）膜小胞の形成によって判断してプログラムされた細胞死を誘導するものである。細胞は腫瘍細胞、例えば、乳房細胞、卵巣細胞、胃細胞、子宮内膜細胞、唾液腺細胞、肺細胞、腎臓細胞、結腸細胞、甲状腺細胞、膵臓細胞または膀胱細胞である。アポトーシスに関連した細胞事象を評価するために種々の方法が入手可能である。例えば、ホスファチジルセリン（PS）トランスロケーションはアネキシン結合によって測定することができ；DNAフラグメント化はDNAラダリングを通じて評価することができ；およびDNAフラグメント化に伴う核／クロマチン凝縮は低ジプロイド細胞のいずれかの増加によって評価することができる。

40

【0141】

「疾患」は本発明の治療から利益を受けるであろういずれもの症状である。これは、哺乳動物にとって問題とする疾患の素因となる病理学的疾患を含めた慢性および急性疾患または疾病を含む。ここに治療すべき疾患の非限定的例は良性および悪性腫瘍；白血病およびリンパ性悪性疾患、特に、乳癌、卵巣癌、胃癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、肺癌、腎臓癌

50

、結腸癌、甲状腺癌、膵臓癌、前立腺癌または膀胱癌；ニューロン、神経膠、神経膠星状細胞、視床下部および他の腺、マクロファージ、上皮、間質および胞胚腔疾患；および炎症、脈管および免疫学的疾患を含む。

【0142】

用語「治療有効量」とは、哺乳動物において疾病または疾患を治療するのに効果的な薬物の量をいう。癌の場合には、薬物の治療有効量は癌細胞の数を減少させ；腫瘍サイズを減少させ；末梢器官への癌細胞の浸潤を阻害し（すなわち、幾分遅くし、好ましくは停止させる）；腫瘍転移を阻害し（すなわち、幾分遅くし、好ましくは停止させ）；腫瘍成長を幾分阻害し；および／または癌に関連する兆候の1以上を幾分軽減することができる。薬物が存在する癌細胞の成長を予防しおよび／またはそれを殺すことができる程度まで、それは細胞静止性および／または細胞傷害性であり得る。癌療法では、効率は、例えば、病気の進行に対する時間（TTP）を評価しおよび／または応答速度（RR）を決定することによって測定することができる。

10

【0143】

用語「実質量」とは、収集または試料の集団の大部分、すなわち>50%をいう。

【0144】

用語「細胞内代謝産物」とは、抗体薬物結合体（ADC）上の細胞内部の代謝プロセスまたは反応に由来する化合物をいう。代謝プロセスまたは反応はADCのペプチドリンカーのタンパク質分解切断のような酵素プロセス、またはヒドラゾン、エステルまたはアミドのような官能基の加水分解であり得る。細胞内代謝産物は、限定されるものではないが、細胞への進入、拡散、摂取または輸送後に細胞内切断を受けた抗体および遊離薬物を含む。

20

【0145】

用語「細胞内で切断された」および「細胞内切断」とは、それにより、共有結合、例えば、薬物部分（D）および抗体（Ab）の間のリンカーが破壊され、その結果、抗体から解離された遊離薬物が細胞内に入る、薬物ーリガンド結合体、薬物ーリンカーーリガンド結合体、抗体薬物結合体（ADC）上の細胞内の代謝プロセスまたは反応をいう。薬物ーリガンド結合体、薬物ーリンカーーリガンド結合体またはADCの切断された部位は、かくして、細胞内代謝産物である。

【0146】

用語「生物学的利用能」とは、患者に投与された薬物の与えられた量の前身利用性（すなわち、血液／血漿レベル）をいう。生物学的利用能は、投与された投与形態から一般的循環に到達する薬物の時間（速度）および合計量（程度）双方の測定を示す絶対的用語である。

30

【0147】

用語「細胞傷害性活性」とは、抗体薬物結合体化合物または抗体薬物結合体化合物の細胞内代謝産物の細胞殺傷、細胞静止または抗増殖効果をいう。細胞傷害性活性は、細胞の半分が生き残る単位容量当たりの濃度（モラーまたは質量）であるIC₅₀値として表すことができる。

【0148】

用語「癌」および「癌性」は、未調節細胞増殖によって典型的には特徴付けられる哺乳動物における生理学的状態をいい、それを記載する。「腫瘍」は1以上の癌性細胞を含む。癌の例は、限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病またはリンパ性悪性疾患を含む。そのような癌のより特別な例は扁平細胞癌（例えば、上皮扁平細胞癌）、小細胞肺癌を含めた肺癌、非小細胞肺癌（「NSCLC」）、肺の腺癌および肺の扁平癌腫、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌を含めた胃癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結直腸癌、子宮内膜または子宮癌腫、唾液腺癌腫、腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、陰茎癌腫ならびに頭部および頸部癌を含む。

40

【0149】

50

「E r b B 2－発現癌」は、抗－E r b B 2抗体がそれに結合することができ、癌に関して治療効果を有するように、その細胞の表面において十分なレベルのE r b B 2を生産するものである。

【0150】

E r b B 2レセプターの「過剰な活性化によって特徴付けられる」癌は、癌細胞中のE r b B 2レセプター活性化の程度が同一組織タイプの非－癌性細胞におけるそのレセプターの活性化のレベルを有意に超えるものである。そのような過剰な活性化はE r b B 2レセプターの過剰発現に由来し得るか、および／または癌細胞におけるE r b B 2レセプターを活性化させるのに利用できるE r b B 2リガンドの正常なレベルよりも大であり得る。そのような過剰な活性化は癌細胞の悪性状態を引き起こしかねず、および／またはそれによって引き起こされ得る。いくつかの実施形態において、癌を診断または予後アッセイに付して、E r b B 2レセプターの増幅および／または過剰発現が起こり、その結果、E r b B 2レセプターのそのような過剰な活性化がもたらされるか否かを判断する。別法として、あるいは加えて、癌を診断または予後アッセイに付して、E r b B 2リガンドの増幅および／または過剰発現が癌で起こりつつあり、それがレセプターの過剰な活性化に帰せられるか否かを判断することができる。そのような癌のサブセットにおいて、レセプターの過剰な活性化はオートクリン刺激経路に由来し得る。

【0151】

E r b B 2レセプターを「過剰発現」する癌は、同一組織タイプの非癌性細胞と比較して、その細胞表面において有意に高いレベルのE r b B 2レセプターを有するものである。そのような過剰発現は遺伝子増幅によって、または増大した転写または翻訳によって引き起こされ得る。E r b B 2レセプター過剰発現は、（例えば、免疫組織化学アッセイ；IHCを介して）細胞の表面に存在するE r b B 2タンパク質の増大したレベルを評価することによって診断または予後アッセイで決定することができる。別法として、あるいは加えて、例えば、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH；WO 98/45479参照）、サザンブロッティング、リアルタイム定量PCR（RT-PCR）のようなポリメラーゼ鎖反応（PCR）技術を介して細胞におけるE r b B 2－コーディング核酸のレベルを測定することができる。E r b B 2リガンドの過剰発現は、例えば、腫瘍バイオプシにおいて、または前記したIHC、FISH、サザンブロッティング、PCRまたはインビボアッセイのような種々の診断アッセイによって患者におけるリガンド（またはそれをコードする核酸）のレベルを評価することによって診断的に決定することができる。また、血清のような生物学的流体中の放出された抗原（例えば、E r b B 2細胞外ドメイン）を測定することによってE r b B 2レセプター過剰発現を研究することができる（例えば、米国特許第4933294号；WO 91/05264；米国特許第5401638号；およびSias et al., (1990) J. Immunol. Methods, 132:73-80参照）。前記アッセイとは別に、種々の他のインビボアッセイが当業者に利用できる。例えば、患者の体内の細胞を、検出可能な標識、例えば、放射性同位体で所望により標識されていてもよい抗体へ曝露することができ、患者における細胞への抗体の結合は、例えば、放射能についての外部スキニングによって、または抗体に従前に曝露された患者から採取したバイオプシを分析することによって評価することができる。

【0152】

HER2を過剰発現する腫瘍は細胞当たりの発現されたHER2分子のコピーの数に対応する免疫組織化学スコアによってランク付けされ、生化学的に決定することができる：0=0～10，000コピー／細胞、1+=少なくとも約200，000コピー／細胞、2+=少なくとも約500，000コピー／細胞、3+=約1～2×10⁶コピー／細胞。チロシンキナーゼのリガンド－独立性活性化に導く3+レベルにおけるHER2の過剰発現（Hudziak et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7159-7163）は、乳癌のほぼ30%で起こり、これらの患者においては、再発－フリー生存および総じての生存は減少する（Slamon et

10

20

30

40

50

al., (1989) Science, 244:707-712; Slamon et al., (1987) Science, 235:177-182)。

【0153】

逆に、「Er b B 2 レセプターの過剰発現によって特徴付けられない」癌は、診断アッセイにおいて、同一組織タイプの非癌性細胞と比較してEr b B 2 レセプターの正常なレベルよりも高く発現しないものである。

【0154】

本明細書中で用いる用語「細胞傷害性剤」とは、細胞の機能を阻害し、または妨げ、および／または細胞の破壊を引き起こす物質をいう。該用語は放射性同位体（例えば、 ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{60}Co 、およびLuの放射性同位体）、化学療法剤、およびその合成アナログおよび誘導体を含めた、細菌、真菌、植物または動物起源の小分子とキシンまたは酵素的に活性なトキシンのようなトキシンを含むことを意図する。1つの態様において、該用語は放射性同位体を含めることを意図しない。

【0155】

「化学療法剤」は、癌の治療で有用な化学化合物である。化学療法剤の例はチオテパおよびCYTOSOXAN（登録商標）シクロホスファミドのようなアルキル化剤；ブスルファン、イムブスルファンおよびピボスルファンのようなアルキルスルホネート；ベンゾドパ、カルボクソメ、メツレドパ、およびウレドパのようなアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロールメラミンを含めたエチレンイミドおよびメチルアメルアミン；TLK 286（TELCYTAMTM）；アセトゲミン（特にブラタシンおよびブラタシノン）；デルター9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARINOL（登録商標））；β-ラパシオール；ラパシオール；コルヒチン；ブテリン酸；（合成アナログトポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT-11（イリノテカン、CAMPTOSAR（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン、および9-アミノカンプトテシンを含めた）カンプトテシン；プリオスタチン；カリスタチン；（そのアデゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成アナログを含めた）CC-1065；ホドフィロトキシシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；（合成アナログ、KW-2189およびCB1-TM1を含めた）ドゥオカルマイシン；エレウテロピン；パンクラチスタチン；サルポディクチン；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミノキサイド塩酸塩、メルファラン、ノベムピシン、フェネステリン、プレドミムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタードのようなナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロドトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムヌスチンのようなニトロソ尿素；クロドロネートのようなビスホスホネート；エネジイン抗生物質（例えば、カリケアミシン、特にカリケアミシガンマ1 Iおよびカリケアミシンオメガ1 I（例えば、Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186（1994）参照）、およびアンナマイシンのようなアントラサイクリン、AD32、アルカルピシン、ダウノルビシン、ドキシラゾキサン、DX-52-1、エピルビシン、GPX-100、イダルビシン、KRN5500、メノガリル、ダイネミシンAを含めたダイネミシン、エスペラミシン、ネオカルジノスタチンフロモフォアおよび関連するクロモプロテインエンジイン抗生物質クロモフォア、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オートラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシニス、ダクチノマイシン、デトルビシン、6-ジアザ-5-オクソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN（登録商標）ドキソルビシン（モルフォリノードキソルビシン、シアノモルフォリノードキソルビシン、2-ピロリノードキソルビシン、リポソームドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む）、エソルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシンCのようなマイトマイシ

ン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトミブリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、およびゾルピシンのような抗生物質；デノプテリン、プテロプテリン、およびトリメトトレキセートのような葉酸アナログ；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリンおよびチオグアニンのようなプリンアナログ；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビンおよびフロキウリジンのようなピリミジンアナログ；カルステロン、ドロモスタノロンプロピオン酸、エピチオスタノール、メピチオスタンおよびテストラクチンのようなアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタンおよびトリロスタンのような抗-アドレナル；フォリン酸（ロイコボリン）のような葉酸補充物；アセグラトン；ALIMTA（登録商標）、LY231514プレメトレキセド、メトトレキセートのようなジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤、5-フルオロウラシル（5-FU）のような抗-代謝産物、およびUFT、S-1およびカペシタビンのようなそのプロドラッグ、およびラルチトレキセド（TOMUDEX^{RM}、TDX）のようなチミジレートシンターゼ阻害剤およびグリシンアミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ阻害剤のような抗-葉酸抗-新形成剤；エニルラシルのようなジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼのような阻害剤；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトラキセート；デフォファミン；デメコルシン；チアジクオン；エルフォールニチン；エリプチニウム酢酸；エボチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン；マイタンシンおよびアンサミトシンのようなマイタンシノイド；マイトグアゾン；マイトアントレン；モピダンモール；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）多糖複合体（JHS Natural Products, Eugene, OR）；ラゾキサラン；リゾキシシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾニン酸；トリアジクオン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にT-2トキシシン、ベルラクリンA、ロリジンAおよびアンギジン）；ウレタン；ビンデシン（ELDISINE（登録商標）、FILDESIN（登録商標））；ダカルバジン；マンノムスチン；マイトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイドおよびタキセン、例えば、TAXOL（登録商標）パクリタキセル（Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.）、ABRAXANETMクレモフォールフリー、パクリタキセルのアルブミン-作成ナノ粒子処方（American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois）、およびTAXOTERE（登録商標）ドキセタキセル（Rhone-Poulenc Rorer, Antony, フランス）；クロランブシル；ゲムシタビン（GEMZAR（登録商標））；6-チオグアニン；メルカプトプリン；白金；シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチンのような白金アナログまたは白金-ベースのアナログ；ビンブラスチン（VELBAN（登録商標））；エトポシド（VP-16）；イフォスファミド；マイトキサントロン；ピンクリスチン（ONCOVIN（登録商標））；ピンカアルカロイド；ビノレルビン（NAVELBINE（登録商標））；ノバントロン；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；キセロータ；イバンドロメート；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸のようなレチノイド；前記のいずれかの薬学的に受容可能な塩、酸または誘導体；並びにCHOPのような前記の2以上の組合せ、シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチンおよびプレドニゾロンの組合せ療法のための省略、およびFOLFOX、5-FUおよびロイコボリンと組み合わせたオキサリプラチン（ELOXATINTM）との治療レジメン用の省略を含む。

【0156】

また、この定義には、例えば、タモキシフェン（NOLVADEX（登録商標）タモキ

10

20

30

40

50

シフェンを含む)、ラロキシフェン、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタムキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストロンおよびFARESTON(登録商標)、トレミフェンを含めた、抗-エストロゲン、および選択的エストロゲンレセプターモジュレーター(SERM)のような腫瘍に対するホルモン作用を調節またはそれを阻害するように作用する抗-ホルモン剤;例えば、4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE(登録商標)メグステロール酢酸、AROMASIN(登録商標)エキセメスタン、フォルメスタニウム、ファドロゾール、RIVISOR(登録商標)ボロゾール、FEMARA(登録商標)レトロゾール、およびARIMIDEX(登録商標)アナストロゾールのような副腎におけるエストロゲン産生を調節する、酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤;およびフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリドおよびゴセレリンのような抗-アンドロゲン;ならびにトロキサシタピン(1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ);アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、例えば、PKC- α 、Raf、H-Ras、および上皮成長因子レセプター(EGFR)のような、アプフェラント細胞増殖に参与するシグナリング経路において遺伝子の発現を阻害するもの;遺伝子療法ワクチン、例えば、ALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチンおよびVAXID(登録商標)ワクチンのようなワクチン;PROLEUKIN(登録商標)rIL-2;LURTOTECAN(登録商標)トポイソメラーゼ1阻害剤;ABARELIX(登録商標)rmRH;および前記のいずれかの薬学的に受容可能な塩、酸または誘導体が含まれる。

10

20

【0157】

本明細書中で用いるように、用語「EGFR-標的化薬物」とは、EGFRに結合し、所望により、EGFR活性化を阻害する治療剤をいう。そのような剤の例はEGFRに結合する抗体および小分子を含む。EGFRに結合する抗体の例はMAb579(ATCC CRL HB 8506)、MAb 455(ATCC CRL HB8507)、MAb 225(ATCC CRL 8508)、MAb 528(ATCC CRL 8509)(米国特許第4943533号、Mendelsohn et al. 参照)、およびキメラ化225(C225またはセツキシマブ;ERBITUX(登録商標))および再形成ヒト225(H225)のようなその変種(WO 96/40210, Imclone Systems Inc. 参照);タイプII突然変異体EGFRに結合する抗生物質(米国特許第5,212,290号);米国特許第5891996号に記載された、EGFRに結合するヒト化およびキメラ抗体;およびABX-EGFのような、EGFRに結合するヒト抗生物質(WO 98/50433, Abgenix参照)を含む。該抗-EGFR抗体は細胞傷害性剤と組み合わせることができ、かくして、免疫結合体を生じる(例えば、EP 659,439A2, Merck Patent GmbH参照)。EGFRに結合する小分子の例はZD1839またはゲフィチニブ(IRESSATM;AstraZeneca)、エルロチニブHCl(CP-358774, TARCEVATM;Genentech/OSI)およびAG1478、AG1571(SU5271;Sugen)を含む。

30

【0158】

「チロシンキナーゼ阻害剤」は、ErbBレセプターのようなチロシンキナーゼのチロシンキナーゼ活性をある程度阻害する分子である。そのような阻害剤の例は先行するパラグラフで述べたEGFR-標的化薬物ならびにPD153035、4-(3-クロロアニリノ)キナゾリンのようなキナゾリン、ピリドピリミジン、ピリミドピリミジン、CGP 59326、CGP 60261およびCGP 62706のようなピロロピリミジン、およびピラゾロピリミジン、4-(フェニルアミノ)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン、クルコミン(ジフェルロイルメタン)、4,5-ビス(4-フルオロアニリノ)フタルイミド)、ニトロチオフエン部位を含有するチルフォスチン;PD-0183805(Warner-Lambert);アンチセンス分子(例えば、ErbB-コーディング核酸に結合するもの);キノキサリン(米国特許第5,806,396号);トリ

40

50

フォスチン（米国特許第5804396号）；ZD6474（AstraZeneca）；PTK-787（Novartis/Schering AG）；CI-1033（Pfizer）のような汎-ErbB阻害剤；アフィニタック（ISIS 3521；ISIS/Lilly）；イミアチニブメシレート（Gleevec；Novartis）；PKI 166（Novartis）；GW2016（Glaxo SmithKline）；CI-1033（Pfizer）；EKB-569（Wyeth）；セマキサニブ（Sugen）；ZD6474（AstraZeneca）；PTK-787（Novartis/Schering AG）；INC-1C11（Imclone）；または以下の特許出願のいずれかに記載されたもの：米国特許第5804396号；WO 99/09016（American Cyanamid）；WO 98/43960（American Cyanamid）；WO 97/38983（Warner Lambert）；WO 99/06378（Warner Lambert）；WO 99/06396（Warner Lambert）；WO 96/30347（Pfizer, Inc）；WO 96/33978（Zeneca）；WO 96/3397（Zeneca）；およびWO 96/33980（Zeneca）を含む。

10

【0159】

「抗-脈管剤」は、血管の発達をある程度ブロックし、またはそれに干渉する化合物をいう。抗-脈管因子は、例えば、脈管形成を促進するのに慣用する成長因子または成長因子レセプターに結合する小分子または抗体であり得る。1つの実施形態において、抗-脈管形成因子は血管内皮成長因子（VEGF）に結合する抗体である。

20

【0160】

用語「サイトカイン」は、細胞間メディエーターとしてもう1つの細胞に作用する1つの細胞集団によって放出されたタンパク質についての上位概念的用語である。そのようなサイトカインの例はリンホカイン、モノカインおよび伝統的なポリペプチドホルモンである。該サイトカインの中には、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンのような成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、および黄体ホルモン（LH）のような糖タンパク質ホルモン；肝成長因子；線維芽成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子- α および- β ；ムレリアン-阻害物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒリン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF- β のような神経成長因子；血小板-成長因子；TGF- α およびTGF- β のような形質転換成長因子（TGF）；インスリン様成長因子-Iおよび-II；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子；インターフェロン- α 、- β および- γ のようなインターフェロン；マクロファージ-CSF（M-CSF）のようなコロニー刺激因子（CSF）；顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）；および顆粒球-CSF（G-CSF）；IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12のようなインターロイキン（IL）；TNF- α またはTNF- β のような腫瘍壊死因子；およびLIFおよびキトリガンド（KL）を含めた他のポリペプチド因子が含まれる。本明細書中で用いるように、用語サイトカインは天然源からの、または組換え細胞培養からのタンパク質、および天然配列サイトカインの生物学的な活性な同等体を含む。

30

40

【0161】

本出願で用いる用語「プロドラッグ」とは、親薬物と比較して腫瘍細胞に対して細胞傷害性が低く、かつより活性な親形態で酵素的にまたは加水分解的に活性化されまたは変換されることができる薬学的に活性な物質の前駆体または誘導形態をいう。例えば、Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」 Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfvst (1986) および Stella et al., 「Prodrugs: A Chemical Approach t

50

o Targeted Drug Delivery」、Directed Drug Delivery, Borchardt et al. (編) (pp. 247-267, Humana Press (1985) 参照。本出願のプロドラッグは、限定されるものではないが、ホスフェート含有プロドラッグ、チオホスフェート含有プロドラッグ、スルフェート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸修飾プロドラッグ、グルコシル化プロドラッグ、 β -ラクタム含有プロドラッグ、所望により置換されていてもよいフェノキシアセタミド含有プロドラッグ、または所望により置換されていてもよいフェニールアセタミド含有プロドラッグ、5-フルオロシトシン、およびより活性な細胞傷害性遊離薬物へ変換できる他の5-フルオロウリジンオプロドラッグを含む。本発明で用いるためのプロドラッグ継体へ誘導体化することができる細胞傷害性薬物の例は、限定されるものではないが、前記した化学療法剤を含む。

10

【0162】

「リポソーム」は、(抗-CD30、CD40、CD70またはLewis Y抗体および、所望により、化学療法剤を含めた)薬物の哺乳動物への送達に有用な種々のタイプの脂質、リン脂質および/または界面活性剤から構成された小さな小胞である。リポソームの成分は生体膜の脂質配置に似た、二相形成にて通常は配置される。用語「パッケージインサート」は、そのような治療製品の使用に関連する適応症、用法、投与量、投与、禁忌および/または警告についての情報を含む治療製品の商業的パッケージに慣用的に含まれる指令書をいうように用いられる。

20

【0163】

「単離された」核酸分子は、それが通常は抗体核酸の天然源に会合する少なくとも1つの汚染核酸分子から同定され、それから分離された核酸分子である。単離された核酸分子はそれが天然で見出される形態または状況以外である。単離された核酸分子は、従って、それが天然細胞に存在する核酸分子から区別される。しかしながら、単離された核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のそれとは異なる染色体位置にある抗体を通常は発現する細胞に含まれる核酸分子を含む。

【0164】

表現「制御配列」とは、特定の宿主生物において操作可能に連結したコーディング配列の発現に必要なDNA配列をいう。原核生物に適した制御配列は、例えば、プロモーター、所望により、オペレーター配列、およびリポソーム結合部位を含む。真核生物細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することが知られている。

30

【0165】

核酸は、それがもう1つの核酸配列と機能的に関係となっている場合に「操作可能に連結」されている。例えば、プレ配列または分泌リーダー用のDNAは、もしそれがポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されるならば、該ポリペプチド用のDNAに操作可能に連結される；プロモーターまたはエンハンサーは、それが配列の転写に影響するならば、コーディング配列に操作可能に連結されている；あるいはリポソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易とするように位置していれば、コーディング配列に操作可能に連結されている。一般には、「操作可能に連結している」は、連結されたDNA配列が隣接しており、分泌リーダーの場合には、隣接し、かつリーディング相にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは隣接している必要がない。連結は便宜な制限部位における連結によって達成することができる。もしそのような部位が存在しなければ、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを慣用的プラクティスに従って用いることができる。

40

【0166】

本明細書中で用いるように、表現「細胞」、「細胞系」、および「細胞培養」は相互交換的に使用され、全てのそのような表示は子孫を含む。かくして、単語「形質転換体」および「形質転換した細胞」は一次対象細胞および導入の数に関することなくそれに由来する培養を含む。また、全ての子孫は、慎重なまたは不注意の突然変異のため、DNA含有

50

量において正確には同一ではないであろうことは理解される。元来形質転換された細胞に付きスクリーニングされるのと同じの機能または生物学的活性を有する突然変異体子孫は含まれる。区別される表示該とされる場合、それは文脈から明瞭であろう。

【0167】

ここで、「自己免疫疾患」は、個体自体の組織またはその共一分離または発現または結果としてのそれからの状態から生起する、およびそれに向けられた疾病または疾患である。自己免疫疾患または疾病の例は、限定されるものではないが、関節炎（慢性関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチ、骨関節炎、乾癬性関節炎、および剛直性脊椎炎）、乾癬、アトピー性皮膚炎を含めた皮膚炎；慢性自己免疫蕁麻疹を含めた慢性特発性蕁麻疹、原発性筋炎／皮膚筋炎、毒性上皮壊死症、全身強皮症、および硬化症、炎症性腸疾患（IBD）（クローン病、潰瘍性結腸炎）に関連する応答、および壊疽性膿皮症の同時分離を伴うIBD（炎症性腸疾患）、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、および／または上強膜炎、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）などの呼吸窮迫症候群、髄膜炎、アナフィラキシーおよびアレルギー性鼻炎などIgEが介在する疾患、ラスムッセン脳炎などの脳炎、ブドウ膜炎、顕微鏡的大腸炎および膠原性大腸炎などの大腸炎、膜性糸球体腎炎、特発性膜性糸球体腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎（MPGN；1型と2型など）、および急速進行性糸球体腎炎などの糸球体腎炎（GN）、アレルギー性疾患、湿疹、喘息、T細胞浸潤および慢性炎症反応に関与する疾患、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性心筋炎、白血球接着不全症、皮膚の全身性エリテマトーデスなどの全身性エリテマトーデス（SLE）、腎炎、脳炎、小児期、非腎性、円板状、脱毛症などのループス、若年発症糖尿病、脊髄多発性硬化症などの多発性硬化症（MS）、アレルギー性脳脊髄炎、サイトカインおよびTリンパ球が介在する急性過敏症および遅延型過敏症関連の免疫反応、結核、サルコイドーシス、ヴェゲナー肉芽腫症などの肉芽腫症、無顆粒球症、血管炎（大血管の血管炎（リウマチ性多発筋痛および巨細胞性（高安）動脈炎など）、中血管の血管炎（川崎病および結節性多発動脈炎など）、CNS（中枢神経系）脈管炎、ならびにチャグ・ストラウス血管炎すなわちチャグ・ストラウス症候群（CSS）などANCA（抗好中球細胞質抗体）に関連する血管炎など）、再生不良性貧血、クームス試験陽性貧血、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、自己免疫性溶血性貧血（AIHA）などの免疫性溶血性貧血、悪性貧血、赤芽球癆（PRCA）、第V因子欠乏症、血友病A、自己免疫性好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球の血管外遊出に関与する疾患、CNS炎症性疾患、多臓器障害症候群、重症筋無力症、抗原抗体複合体が介在する疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット病、キャッスルマン病、グッドパスチャー症候群、ランバート・イートン筋無力症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンス・ジョンソン症候群、臓器移植拒絶反応（パネル反応性抗体価高値に対する前治療、組織内のIgA沈着、および腎移植、肝移植、腸管移植、心臓移植などが原因の拒絶反応など）、移植片対宿主病（GVHD）、水疱性類天疱瘡、天疱瘡（尋常性、落葉状、および天疱瘡粘膜類天疱瘡など）、自己免疫性多内分泌腺症、ライター病、全身強直症候群、免疫複合体腎炎、IgM多発ニューロパシーまたはIgM介在性ニューロパシー、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、自己免疫性血小板減少症などの血小板減少症（例えば、心筋梗塞患者が発症するものなど）、自己免疫性の精巣炎と卵巣炎など精巣および卵巣の自己免疫性疾患、原発性甲状腺機能低下症；自己免疫性甲状腺炎、慢性甲状腺炎（橋本病）、亜急性甲状腺炎、特発性甲状腺機能低下症、アジソン病、グレーブス病、自己免疫性多腺性症候群（または多腺性内分泌障害症候群）、インスリン依存性小児糖尿病などの1型糖尿病（インスリン依存性糖尿病（IDDM）とも呼ぶ）、ならびにシーハン症候群などの自己免疫性内分泌疾患；自己免疫性肝炎、リンパ肺臓性間質性炎（HIV）、NSIP（非特異的間質性肺炎）に対する閉塞性細気管支炎（非移植）、ギラン・バレー症候群、ベルジェ病（IgA腎症）、原発性胆汁性肝硬変、セリアックスプルー（グルテン腸症）、同時分離した疱瘡状皮膚炎を伴う治療抵抗性スプルー、クリオグロブリン血症、筋萎縮性側索硬化症（ALS；ルー・ゲーリッグ病）、冠動脈疾患、自己免疫性内耳疾患（AIED）自己免疫性難聴、眼球

10

20

30

40

50

クローンスミオクローンス症候群 (OMS)、治療抵抗性多発性軟骨炎などの多発性軟骨炎、肺胞蛋白症、アミロイドーシス、巨細胞性肝炎、強膜炎、重症度不明の単クローン性免疫グロブリン血症 (MGUS)、末梢性ニューロパシー、腫瘍随伴症候群、てんかん、片頭痛、不整脈、筋障害、ろう、盲、周期性麻痺、および CNS チャネロパシーなどのチャネロパシー；自閉症、炎症性ミオパシー、ならびに巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS)。

【0168】

「アルキル」はノルマル、第二級、第三級、または環状炭素原子を含有する $C_1 - C_{18}$ 炭化水素である。その例はメチル (Me 、 $-CH_3$)、エチル (Et 、 $-CH_2CH_3$)、1-プロピル ($n-Pr$ 、 $-n$ -プロピル、 $-CH_2CH_2CH_3$)、2-プロピル ($i-Pr$ 、 i -プロピル、 $-CH(CH_3)_2$)、1-ブチル ($n-Bu$ 、 n -ブチル、 $-CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-メチル-1-プロピル ($i-Bu$ 、 i -ブチル、 $-CH_2CH(CH_3)_2$)、2-ブチル ($s-Bu$ 、 s -ブチル、 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$)、2-メチル-2-プロピル ($t-Bu$ 、 t -ブチル、 $-C(CH_3)_3$)、1-ペンチル (n -ペンチル、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-ペンチル ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$)、3-ペンチル ($-CH(CH_2CH_3)_2$)、2-メチル-2-ブチル ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$)、3-メチル-2-ブチル ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$)、3-メチル-1-ブチル ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$)、2-メチル-1-ブチル ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$)、1-ヘキシル ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-ヘキシル ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$)、3-ヘキシル ($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$)、2-メチル-2-ペンチル ($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$)、3-メチル-2-ペンチル ($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$)、4-メチル-2-ペンチル ($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$)、3-メチル-3-ペンチル ($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$)、2-メチル-3-ペンチル ($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$)、2, 3-ジメチル-2-ブチル ($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$)、3, 3-ジメチル-2-ブチル ($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$) である。

【0169】

「アルケニル」は不飽和の少なくとも1つの部位、すなわち、炭素-炭素、 sp^2 二重結合をもつノルマル、第二級、第三級、または環状炭素原子を含有する $C_2 - C_{18}$ 炭化水素である。その例は、限定されるものではないが：エチレンまたはビニル ($-CH=CH_2$)、アリル ($-CH_2CH=CH_2$)、シクロペンテニル ($-C_5H_7$)、および5-ヘキセニル ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH=CH_2$) を含む。

【0170】

「アルキニル」は不飽和の少なくとも1つの部位、すなわち、炭素-炭素、 sp 三重結合を持つノルマル、第二級、第三級、または環状炭素原子を含有する $C_2 - C_{18}$ 炭化水素である。その例は、限定されるものではないが、アセチレン ($-C \equiv CH$) およびプロパルギル ($-CH_2C \equiv CH$) を含む。

【0171】

「アルキレン」とは、1~18の炭素原子の、かつ親アルカンの同一または2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を除くことによって誘導される2つの一価基中心を有する飽和した分岐鎖または直鎖または環状炭化水素基をいう。典型的なアルキレン基は、限定されるものではないが、メチレン ($-CH_2-$)、1, 2-エチル ($-CH_2CH_2-$)、1, 3-プロピル ($-CH_2CH_2CH_2-$)、1, 4-ブチル ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$) 等を含む。

【0172】

「アルケニレン」とは、2~18の炭素原子の、かつ親アルケンの同一または2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を除くことによって誘導された2つの一価基中心を有する不飽和の分岐鎖または直鎖または環状炭化水素基をいう。典型的なアルケニレン基は、

10

20

30

40

50

限定されるものではないが、1, 2-エチレン ($-\text{CH}=\text{CH}-$) を含む。

【0173】

「アルキニレン」とは、2～18の炭素原子の、かつ親アルキンの同一または2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を除くことによって誘導された2つの一価基中心を有する不飽和の分岐鎖または直鎖または環状炭化水素基をいう。典型的なアルキニレン基は、限定されるものではないが、アセチレン ($-\text{C}\equiv\text{C}-$)、プロパルギル ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$)、および4-ペンチニル ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-$) を含む。

【0174】

「アリール」は、親芳香族環系の単一炭素原子から1つの水素原子を除くことによって誘導された6～20の炭素原子の一価芳香族炭化水素を意味する。いくつかのアリール基は「Ar」として例示的構造で示される。典型的なアリール基は、限定されるものではないが、ベンゼン、置換されたベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニル等から誘導された基を含む。

10

【0175】

「アリールアルキル」とは、炭素原子、典型的には末端または sp^3 炭素原子に結合した水素原子の1つがアリール基で置き換えられた非環状アルキル基をいう。典型的なアリールアルキル基は、限定されるものではないが、ベンジル、2-フェニルエタン-1-イル、2-フェニルエテン-1-イル、ナフチルメチル、2-ナフチルエタン-1-イル、2-ナフチルエテン-1-イル、ナフトベンジル、2-ナフトフェニルエタン-1-イル等を含む。該アリールアルキル基は、6～20の炭素原子を含み、例えば、該アリールアルキル基のアルカニル、アルケニルまたはアルキニル基を含めたアルキル部位は1～6の炭素原子であって、アリール部位は5～14の炭素原子である。

20

【0176】

「ヘテロアリールアルキル」は、炭素原子、典型的には末端または sp^3 炭素原子に結合した水素原子の1つがヘテロアリール基で置き換えられた非環状アルキル基をいう。典型的なヘテロアリールアルキル基は、限定されるものではないが、2-ベンズイミダゾリルメチル、2-フリルエチル等を含む。該ヘテロアリールアルキル基は6～20の炭素原子を含み、例えば、ヘテロアリールアルキル基のアルカニル、アルケニルまたはアルキニル基を含めたアルキル部位は1～6の炭素原子であって、ヘテロアリール部位は5～14の炭素原子およびN、O、PおよびSから選択される1～3のヘテロ原子である。ヘテロアリールアルキル基のヘテロアリール部位は3～7環員を有する単環であり得る（2～6の炭素原子、または7～10の環員（4～9の炭素原子およびN、O、PおよびSから選択される1～3のヘテロ原子）を有する二環、例えば：ビシクロ[4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、または[6, 6]系。

30

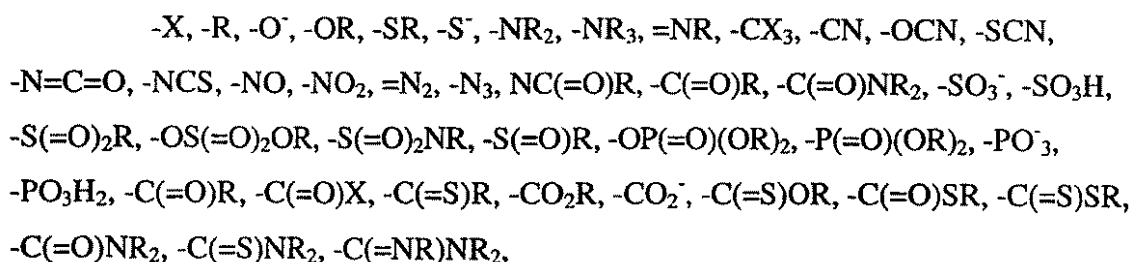
【0177】

「置換されたアルキル」、「置換されたアリール」および「置換されたアリールアルキル」は、1以上の水素原子が各々独立して置換基で置換された、各々、アルキル、アリール、およびアリールアルキルを意味する。典型的な置換基は、限定されるものではないが、

40

【0178】

【化89】



を含み、ここで、各Xは独立してハロゲン：F、Cl、BrまたはIであり；および各R

50

は独立して-H、 C_2-C_{18} アルキル、 C_6-C_{20} アリール、 C_3-C_{14} 複素環、保護基またはプロドラッグ部位である。前記したアルキレン、アルケニレン、およびアルキニレン基もまた同様に置換されていてもよい。

【0179】

「ヘテロアリール」および「複素環」とは、1以上の環原子がヘテロ原子、例えば、窒素、酸素および硫黄である環系をいう。複素環基は1～20の炭素原子、およびN、O、PおよびSから選択され他1～3のヘテロ原子を含む。複素環は3～7の環員（2～6の炭素原子、およびN、O、PおよびSから選択される1～3のヘテロ原子）を有する単環、または7～10の環員（4～9の炭素原子、およびN、O、PおよびSから選択される1～3のヘテロ原子）を有する二環、例えば、ビシクロ[4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、または[6, 6]系であってよい。

10

【0180】

複素環はPaquette, Leo A.; 「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」(W. A. Benjamin, New York, 1968)、特に1、3、4、6、7および9章; 「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A Series of Monographs」(John Wiley & Sons, New York, 1950～現在)、特に13、14、16、19および28章; およびJ. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566に記載されている。

【0181】

20

複素環の例は、その例として、限定されるものではないが、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル（ピペリジル）、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、硫黄酸化テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス-テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス-テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾシニル、トリアジニル、6H-1, 2, 5-チアアジアジニル、2H, 6H-1, 5, 2-ジチアジニル、チエニル、チアントレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサントニル、フェノキサチニル、2H-ピロリル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、1H-インダゾリル、プリニル、4H-キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、プテリジニル、4aH-カルバゾリル、カルバゾリル、 β -カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾボリアゾリル、ベンズイソオキサゾリル、オキシインドリル、ベンズオキサゾリルおよびイサチノイルを含む。

30

40

【0182】

例としてかつ限定されるものではないが、炭素結合複素環はピリジンの位置2、3、4、5または6、ピリダジンの位置3、4、5または6、ピリミジンの位置2、4、5または6、ピラジンの位置2、3、5または6、フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフェン、ピロールまたはテトラヒドロピロールの位置2、3、4または5、オキサゾール、イミダゾールまたはチアゾールの位置2、4または5、イソオキサゾール、ピラゾールまたはイソチアゾールの位置3、4または5、アジリジンの位置2または3、アゼチジンの位置2、3または4、キノリンの位置2、3、4、5、6、7または8、またはイソキノリンの位置1、3、4、5、6、7または8で結合される。なおより典型的には、炭素結合複素環は2-ピイジル、3-ピリジル、4-ピリジル、5-ピリジル、6-ピリ

50

ジル、3-ピリダジニル、4-ピリダジニル、5-ピリダジニル、6-ピリダジニル、2-ピリミジニル、4-ピリミジニル、5-ピリミジニル、6-ピリミジニル、2-ピラジニル、3-ピラジニル、5-ピラジニル、6-ピラジニル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、または5-チアゾリルを含む。

【0183】

その例として、かつ限定されるものではないが、窒素結合複素環はアジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、2-ピロリン、3-ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、2-イミダゾリン、3-イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、2-ピラゾリン、3-ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、1H-インダゾールの位置1、イソインドールまたはイソインドリンの位置2、モルホリンの位置4、およびカルバゾールまたはβ-カルボリンの位置9で結合している。なおより典型的には、窒素結合複素環は1-アジリジル、1-アゼテジル、1-ピロリル、1-イミダゾリル、1-ピラゾリル、および1-ピペリジニルを含む。

10

【0184】

「炭素環」は、単環としての3～7の炭素原子、または二環としての7～12の炭素原子を有する飽和または不飽和環を意味する。単環炭素原子は3～6の環原子、なおより典型的には5または6の環原子を有する。二環炭素環は、例えば、ビスクロ[4, 5]、[5, 5]、[5, 6]または[6, 6]系として配置された7～12の環原子、またはビスクロ[5, 6]または[6, 6]系として配置された9または10の環原子を有する。単環炭素環の例はシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1-シクロペンター1-エニル、1-シクロペンター2-エニル、1-シクロペンター3-エニル、シクロヘキシル、1-シクロヘキサ-1-エニル、1-シクロヘキサ-2-エニル、1-シクロヘキサ-3-エニル、シクロヘプチルおよびシクロオクチルを含む。

20

【0185】

「リンカー」、「リンカーユニット」または「リンク」は、薬物部分へ抗体を共有結合付着させる共有結合または炭素の鎖を含む化学部位を意味する。種々の実施形態において、リンカーはLUとして特定される。リンカーはアルキルジイル、アリールジイル、ヘテロアリールジイルのような二価基、 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ 、アルキルオキシの反復ユニット（例えば、ポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ）およびアルキルアミノの反復ユニット（例えば、ポリエチレンアミノ、JeffamineTM）のような部位；およびスクシネート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロネートおよびカプロアミドを含めた二酸エステルおよびアミドを含む。

30

【0186】

用語「キラル」とは、鏡像パートナーの非一重ね性の特性を有する分子をいい、他方、用語「アキラル」とは、それらの鏡像パートナー上に重ねることができる分子をいう。

【0187】

用語「立体異性体」とは、同一の化学構成を有するが、空間における原子または基の配置に関して異なる化合物をいう。

【0188】

「ジアステレオマー」はキラリティーの2以上の中心を持ち、その分子が相互の鏡像ではない立体異性体をいう。ジアステレオマーは異なる物理的特性、例えば、融解点、沸点、スペクトロ特性および反応性をいう。ジアステレオマーの混合物は電気泳動およびクロマトグラフィーのような高分解能分析手法下で分離することができる。

40

【0189】

「エナンチオマー」とは、相互に重ね合わせることのできない鏡像である化合物の2つの立体異性体をいう。

【0190】

本明細書中で用いる立体化学の定義および約束は、一般には、S. P. Parker編, McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York

50

k; および Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York に従う。多くの有機化合物は光学的に活性な形態で存在し、すなわち、それらは面一偏光した光の面を回転させる能力を有する。光学的な活性な化合物を記載するにおいて、接頭辞 D および L、または R および S を用いて、そのキラル中心の周りの分子の絶対立体配置を示す。接頭辞 d および l または (+) および (-) を使用して、化合物による面一偏光された光の回転の符号を示し、(-) または l は化合物が左旋性であることを意味する。(+) または d の接頭辞を持つ化合物は右旋性である。与えられた化学構造に対しては、これらの立体異性体は、それらは相互に鏡像である以外は同一である。具体的立体異性体はエナンチオマーということもでき、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またはラセミ体といい、これは、化学反応またはプロセスにおいて立体選択または立体特異性がない場合に起こり得る。用語「ラセミ混合物」および「ラセミ体」は光学活性を欠く、2つのエナンチオマー種の等モル混合物をいう。

【0191】

「患者」の例は、限定されるものではないが、ヒト、ラット、マウス、モルモット、サル、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、鳥類および家禽を含む。例示的な実施形態において、患者はヒトである。

【0192】

「アリール」とは、炭素環芳香族基をいう。アリール基の例は、限定されるものではないが、フェニル、ナフチルおよびアントラセニルを含む。炭素環芳香族基または複素環芳香族基は置換されていないか、または、限定されるものではないが、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-O-(C_1-C_8 \text{ アルキル})$ 、 $-アリール$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ および $-CN$ を含めた 1 以上の基で置換することができ；ここで、該 R' は独立して H 、 $-C_1-C_8$ アルキルおよびアリールから選択される。

【0193】

本明細書中で用いる用語「 C_1-C_8 アルキル」とは、1~8の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖の、飽和または不飽和炭化水素をいう。代表的な「 C_1-C_8 アルキル」基は、限定されるものではないが、 $-メチル$ 、 $-エチル$ 、 $-n$ -プロピル、 $-n$ -ブチル、 $-n$ -ペンチル、 $-n$ -ヘキシル、 $-n$ -ヘプチル、 $-n$ -オクチル、 $-n$ -ノニルおよび $-n$ -デシルを含み；他方、分岐した C_1-C_8 アルキルは、限定されるものではないが、 $-イソプロピル$ 、 $-sec$ -ブチル、 $-イソブチル$ 、 $-tert$ -ブチル、 $-イソペンチル$ 、 2 -メチルブチルを含み、不飽和の C_1-C_8 アルキルは、限定されるものではないが、 $-ビニル$ 、 $-アリル$ 、 -1 -ブテニル、 -2 -ブテニル、 $-イソブチレニル$ 、 -1 -ペンテニル、 -2 -ペンテニル、 -3 -メチル- 1 -ブテニル、 -2 -メチル- 2 -ブテニル、 $-2,3$ -ジメチル- 2 -ブテニル、 1 -ヘキシル、 2 -ヘキシル、 3 -ヘキシル、 $-アセチレニル$ 、 $-プロピニル$ 、 -1 -ブチニル、 -2 -ブチニル、 -1 -ペンチニル、 -2 -ペンチニル、 -3 -メチル- 1 -ブチニル、 $メチル$ 、 $エチル$ 、 $プロピル$ 、 $イソプロピル$ 、 n -ブチル、 $イソブチル$ 、 sec -ブチル、 $tert$ -ブチル、 n -ペンチル、 $イソペンテニル$ 、 $ネオペンチル$ 、 n -ヘキシル、 $イソヘキシル$ 、 2 -メチルペンチル、 3 -メチルペンチル、 $2,2$ -ジメチルブチル、 $2,3$ -ジメチルブチル、 $2,2$ -ジメチルペンチル、 $2,3$ -ジメチルペンチル、 $3,3$ -ジメチルペンチル、 $2,3,4$ -トリメチルペンチル、 3 -メチルヘキシル、 $2,2$ -ジメチルヘキシル、 $2,4$ -ジメチルヘキシル、 $2,5$ -ジメチルヘキシル、 $3,5$ -ジメチルヘキシル、 $2,4$ -ジメチルペンチル、 2 -メチルヘプチル、 3 -メチルヘプチル、 n -ヘプチル、 $イソヘプチル$ 、 n -オクチル、および $イソオクチル$ を含む。 C_1-C_8 アルキル基は置換されていないか、あるいは限定されるものではないが、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-O-(C_1-C_8 \text{ アルキル})$

10

20

30

40

50

ル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-ハロゲン、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂および-CNを含めた1以上の基で置換することができ；ここで、各R'は独立して、H、-C₁-C₈アルキルおよびアリールから選択される。

【0194】

「C₃-C₈炭素環」は3-、4-、5-、6-、7-または8-員の飽和または不飽和の非-芳香族炭素環である。代表的なC₃-C₈炭素環は、限定されるものではないが、-シクロプロピル、-シクロブチル、-シクロペンチル、-シクロペンタジエニル、-シクロヘキシル、-シクロヘキセニル、-1,3-シクロヘキサジエニル、-1,4-シクロヘキサジエニル、-シクロヘプチル、-1,3-シクロヘプタジエニル、-1,3,5-シクロヘプタトリエニル、-シクロオクチルおよび-シクロオクタジエニルを含む。C₃-C₈炭素環は置換されていないか、または限定されるものではないが、-C₁-C₈アルキル、-O-(C₁-C₈アルキル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-ハロゲン、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂および-CNを含めた1以上の基で置換することができ；ここで、各R'は独立して、H、-C₁-C₈アルキルおよびアリールから選択される。

【0195】

「C₃-C₈カルボシクロ」とは、炭素環基の水素原子の1つが結合で置き換えられた前記定義のC₃-C₈炭素環基をいう。

【0196】

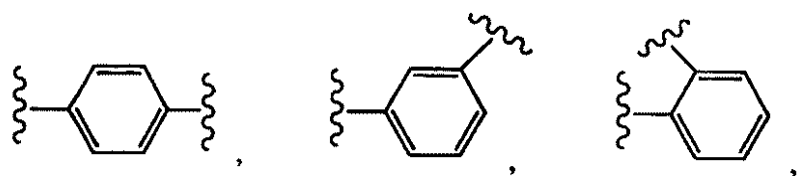
「C₁-C₁₀アルキレン」は式-(CH₂)₁₋₁₀の直鎖の飽和炭化水素基である。C₁-C₁₀アルキレンの例はメチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン、ノニレンおよびデカレンを含む。

【0197】

「アリーレン」は、2つの共有結合を有し、以下の構造式に示されたオルト、メタまたはパラ立体配置であり得る：

【0198】

【化90】



[式中、該フェニル基は置換されていないか、または限定されるものではないが、-C₁-C₈アルキル、-O-(C₁-C₈アルキル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-ハロゲン、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂および-CNを含めた4つまでの基で置換することができ；ここで、各R'は独立して、H、-C₁-C₈アルキルおよびアリールから選択される。]

「C₃-C₈複素環」とは、環炭素原子の1~4が独立してO、SおよびNよりなる群から選択されるヘテロ原子で置換された芳香族または非-芳香族C₃-C₈炭素環をいう。C₃-C₈複素環の代表的な例は、限定されるものではないが、ベンゾフラニル、ベンゾチオフェン、インドリル、ベンゾピラゾリル、クマリニル、イソキノリニル、ピロリル、チオフェニル、プラニル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、キノリニル、ピロリジニル、ピリジニル、ピリドニル、ピラジニル、ピリダジニル、イソチ

アゾリル、イソオキサゾリルおよびテトラゾリルを含む。 C_3-C_8 複素環は、置換されていないか、または限定されるものではないが、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-アリール$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ および $-CN$ を含めた7つまでの基で置換することができ；ここで、各 R' は独立して、 H 、 $-C_1-C_8$ アルキルおよびアリールから選択される。

【0199】

「 C_3-C_8 ヘテロシクロ」とは、炭素環基の水素原子の1つが結合で置き換えられた前記定義の C_3-C_8 複素環基をいう。 C_3-C_8 複素環は置換されていないか、あるいは限定されるものではないが、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-アリール$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ および $-CN$ を含めた6つまでの基で置換することができ；ここで、各 R' は独立して、 H 、 $-C_1-C_8$ アルキルおよびアリールから選択される。

10

【0200】

「例示的な化合物」は薬物化合物または薬物—リンカー化合物である。

【0201】

「例示的結合体」は、薬物—リガンド結合体または薬物—リンカー—リガンド結合体からの切断可能な薬物ユニットを有する薬物—リガンド結合体である。

20

【0202】

いくつかの実施形態において、例示的化合物および例示的結合体は単離されたまたは精製された形態におけるものである。本明細書中で用いるように、「単離された」は (a) 植物または動物細胞または細胞培養のような天然源または (b) 合成有機化学反応混合物の他の成分から分離されたを意味する。本明細書中で用いるように、「精製された」は、単離された場合に、該単離体が該単離体の重量の少なくとも95%、もう1つの態様においては、少なくとも98%の例示的化合物または例示的結合体を含有することを意味する。

【0203】

「ヒドロキシル保護基」の例は、限定されるものではないが、メトキシメチルエーテル、2-メチルエトキシメチルエーテル、テトラヒドロピラニルエーテル、ベンジルエーテル、p-メトキシベンジルエーテル、トリメチルシリルエーテル、トリエチルシリルエーテル、トリイソプロピルシリルエーテル、t-ブチルジメチルシリルエーテル、トリフェニルメチルシリルエーテル、アセテートエステル、置換されたアセテートエステル、ピバロレート、ベンゾエート、メタンスルホネートおよびp-トルエンスルホネートを含む。

30

【0204】

「脱離基」とは、もう1つの官能基によって置換することができる官能基をいう。そのような脱離基は当該分野でよく知られており、その例は、限定されるものではないが、ハライド（例えば、クロライド、ブロマイド、イオダイド）、メタンスルホニル（メチル）、p-トルエンスルホニル（トシル）、トリフルオロメチルスルホニル（トリフレート）、およびトリフルオロメチルスルホネートを含む。

40

【0205】

本明細書中で用いるように、フレーズ「薬学的に受容可能な塩」とは、例示的化合物または例示的結合体の薬学的に受容可能な有機または無機塩をいう。該例示的化合物および例示的結合体は少なくとも1つのアミノ基を含有し、従って、酸付加塩はこのアミノ基とで形成することができる。例示的な塩は、限定されるものではないが、スルフェート、シトレート、アセテート、オキサレート、クロライド、ブロマイド、イオダイド、ニトレート、ビスルフェート、ホスフェート、酸ホスフェート、イソニコチネート、ラクテート、サリシレート、酸シトレート、タルトレート、オレエート、タンネート、パントテネート

50

、ピタルトレート、アスコレート、スクシネート、マレエート、ゲンチシネート、フマレート、グルコネート、グルクロネート、サッカレート、ホルメート、ベンゾエート、グルタメート、メタンスルホネート、エタンスルホネート、ベンゼンスルホネート、p-トルエンスルホネート、およびパモエート（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)）塩を含む。薬学的に受容可能な塩はアセテートイオン、スクシネートイオンまたは他の対イオンのようなもう1つの分子を含めることができる。該対イオンは親化合物上の電荷を安定化させるいずれの有機または無機部位であってもよい。さらに、薬学的に受容可能な塩はその構造において1を超える荷電した電子を有することができる。複数の荷電した電子が薬学的に受容可能な塩である場合は複数の対イオンを有することができる。よって、薬学的に受容可能な塩は1以上の荷電した電子および1以上の対イオンを有することができる。

10

【0206】

「薬学的に受容可能な溶媒和物」または「溶媒和物」とは、1以上の溶媒分子および本発明の化合物、例えば、例示的化合物または例示的結合体の会合をいう。薬学的に受容可能な溶媒和物を形成する溶媒の例は、限定されるものではないが、水、イソプロパノール、エタノール、メタノール、DMSO、酢酸エチル、酢酸およびエタノールアミンを含む。

【0207】

以下の略語を本明細書中で用い、示された定義を有する：A EはオーリスタチンEであり、B o cはN-(4-tert-ブトキシカルボニル)であり、c i tはシトルリンであり、d a pはドラプロインであり、D C Cは1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミドであり、D C Mはジクロロメタンであり、D E Aはジエチルアミンであり、D E A Dはジエチルアゾジカルボキシレートであり、D E P Cはジエチルホスホリルシアニデートであり、D I A Dはジイソプロピルアゾジカルボキシレートであり、D I E AはN,N-ジイソプロピルエチルアミンであり、d i lはドライソロイシンであり、D M A Pは4-ジメチルアミノピリジンであり、D M Eはエチレングリコールジメチルエーテル（または1, 2-ジメトキシエタン）であり、D M FはN,N-ジメチルホルムアミドであり、D M S Oはジメチルスルホキシドであり、d o eはドラフェニンであり、d o vはN,N-ジメチルバリンであり、D T N Bは5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)であり、D T P Aはジエチレントリアミンペンタ酢酸であり、D T Tはジチオスレイトールであり、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であり、E E D Qは2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1, 2-ジヒドロキノリンであり、E S-M Sは電子スプレー質量分析であり、E t O A cは酢酸エチルであり、F m o cはN-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)であり、g l yはグリシンであり、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であり、H O B tは1-ヒドロキシベンゾトリアゾールであり、H P L Cは高圧液体クロマトグラフィーであり、i l eはイソロイシンであり、l y sはリシンであり、M e C N (C H₃ C N)はアセトニトリルであり、M e O Hはメタノールであり、M t rは4-アニシルジフェニルメチル（または4-メトキシトリチル）であり、n o rは(1S, 2R)-(+)-ノルエフェロリンであり、P A Bはp-アミノベンジルであり、P B Sはリン酸-緩衝化生理食塩水(pH 7.4)であり、P E Gはポリエチレングリコールであり、P hはフェニルであり、P n pはp-ニトロフェニルであり、M Cは6-マレイミドカプロイルであり、p h eはL-フェニルアミンであり、P y B r o pはブロモトリス-ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェートであり、S E Cはサイズ-排除クロマトグラフィーであり、S uはスクシンイミドであり、T B T UはO-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テトラフルオロボレートであり、T F Aはトリフルオロ酢酸であり、T L Cは薄層クロマトグラフィーであり、U Vは紫外線であり、およびv a lはバリンである。

20

30

40

【0208】

以下のリンカー略語を本明細書中で用い、示された定義を有する：V a l C i tはバ

50

リンーシトルリン、プロテアーゼ切断可能リンカーにおけるジペプチド部位であり；P A Bはp-アミノベンジルカルバモイルであり；(Me) v cはN-メチルバリンシトルリンであり、ここで、該リンカーペプチド結合はカテプシンBによるその切断を妨げるように修飾されている；MC (PEG) 6-OHはマレイミドカプロイル-ポリエチレングリコールであり；S P Pは4-(2-ピリジルチオ)ペンタン酸N-スクシンイミジルであり；およびS M C Cは4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸N-スクシンイミジルである。

【0209】

用語「治療する」または「治療」は、文脈により他のことが示されない限り、治療的処置および予防的または防止的手段を共にいい、ここで、目的は癌の発生または拡大のような望まない生理学的変化または疾患を妨げまたは遅らせる（少なくする）ことである。本発明の目的では、利益になるまたは望まれる臨床的結果は、限定されるものではないが、検出可能または検出不可能を問わず、兆候の軽減、病気の程度の低下、病気の安定化された（すなわち、悪くならない）状態、病気進行の遅延または遅れ、病気状態の緩和または軽減、および緩解（部分的または全体を問わない）を含む。「治療」は、また、もし治療を受けなければ予測される生存と比較して延長される生存も意味することができる。治療を必要とするものは、疾患または疾病をすでに持つもの、ならびに疾患または疾病を有する傾向があるもの、または疾患または疾病を予防すべきものを含む。

10

【0210】

癌の文脈において、用語「治療する」は：腫瘍細胞、癌細胞の増殖の予防、または腫瘍の予防；腫瘍細胞または癌細胞の複製の予防、総じての腫瘍負荷の低下、または癌性細胞の数の減少、および病気に関連する1以上の兆候の軽減のいずれかまたは全てを含む。

20

【0211】

自己免疫疾患の文脈においては、用語「治療する」は：限定されるものではないが、自己免疫抗体を生産する細胞を含めた自己免疫疾患状態に関連する細胞の複製の予防、自己免疫-抗体負荷の低下および自己免疫疾患の1以上の兆候の軽減のいずれかまたは全てを含む。

【0212】

感染症の文脈においては、用語「治療する」は：感染症を引き起こす病原体の成長、増殖または複製の予防、および感染症の1以上の兆候の軽減のいずれかまたは全てを含む。

30

【0213】

以下の細胞傷害性薬物の略語が本明細書中で用いられ、示された定義を有する：MMA EはモノメチルオーリスタチンE (MW 718) であり；MMA FはN-メチルバリン-バリン-ドライソロイシン-ドラプロイン-フェニルアラニン (MW 731.5) であり；MMA F-DMA EAはC-末端フェニルアラニンへのアミド結合におけるDMA EA (ジメチルアミノエチルアミン) を持つMMA F (MW 801.5) であり；MMA F-TEGはフェニルアラニンにエステル化したテトラエチレングリコールを持つMMA Fであり；MMA F-Nt BuはMMA FのC-末端ヘアミドとして結合されたN-tert-ブチルであり；AEVBはオーリスタチンEバレリルベンジルヒドラゾン、AEのC-末端を介する酸不安定リンカー (MW 732) であり；およびAFPはオーリスタチンFのC-末端フェニルアラニン (MW 732) を持つp-フェニレンジアミンのモノアミドである。

40

【0214】

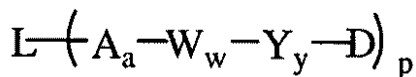
(4.2 本発明の化合物)

(4.2.1 式(Ia)の化合物)

1つの態様において、本発明は式Ia：

【0215】

【化 9 1】



Ia

〔式中、

L—はリガンドユニットであり；

—A_a—W_w—Y_y—はリンカーユニット（LU）であり、ここで、該リンカーユニットは以下のものを含む：

—A—はストレッチャー（Stretcher）ユニットであり、

aは0または1であり、

各—W—は独立してアミノ酸ユニットであり、

wは0～12の範囲の整数であり、

—Y—はスペーサーユニットであり、および

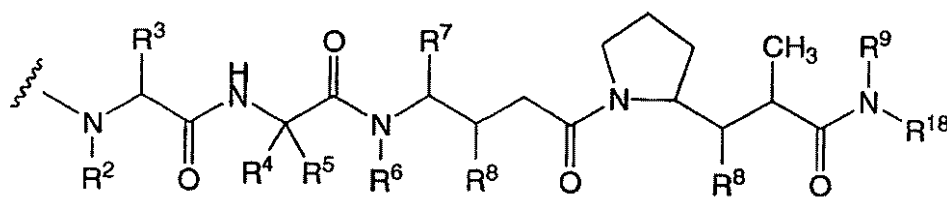
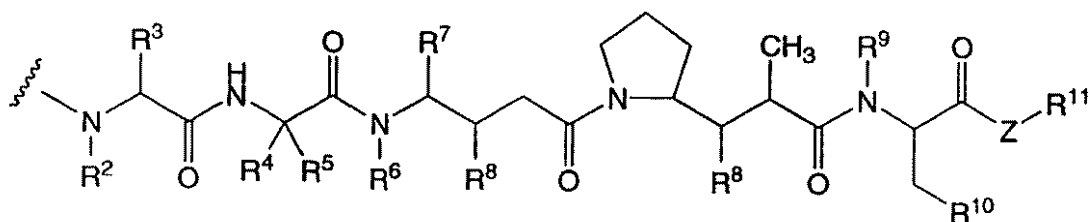
yは0、1または2であり；

pは1～約20の範囲であり；および

—Dは式D_EおよびD_F：

【0 2 1 6】

【化 9 2】

D_ED_F

を有する薬物ユニットであり、

ここで、独立して、各位置において：

R²はHおよびC₁—C₈アルキルから選択され；R³はH、C₁—C₈アルキル、C₃—C₈炭素環、アリール、C₁—C₈アルキル—アリール、C₁—C₈アルキル—（C₃—C₈炭素環）、C₃—C₈複素環およびC₁—C₈アルキル—（C₃—C₈複素環）から選択され；R⁴はH、C₁—C₈アルキル、C₃—C₈炭素環、アリール、C₁—C₈アルキル—アリール、C₁—C₈アルキル—（C₃—C₈炭素環）、C₃—C₈複素環およびC₁—C₈アルキル—（C₃—C₈複素環）から選択され；R⁵はHおよびメチルから選択され；あるいはR⁴およびR⁵は一緒になって炭素環を形成し、式—（CR^aR^b）_n—を有し、ここで、R^aおよびR^bは、独立して、H、C₁—C₈アルキルおよびC₃—C₈炭素環から選択され、nは2、3、4、5および6から選択され；R⁶はHおよびC₁—C₈アルキルから選択され；R⁷はH、C₁—C₈アルキル、C₃—C₈炭素環、アリール、C₁—C₈アルキル—

10

20

30

40

50

アリール、 C_1-C_8 アルキル- (C_3-C_8 炭素環)、 C_3-C_8 複素環および C_1-C_8 アルキル- (C_3-C_8 複素環) から選択され；

各 R^8 は、独立して、H、OH、 C_1-C_8 アルキル、 C_3-C_8 炭素環および O- (C_1-C_8 アルキル) から選択され；

R^9 は H および C_1-C_8 アルキル から選択され；

R^{10} はアリールまたは C_3-C_8 複素環から選択され；

Z は O、S、NH または NR^{12} であり、ここで、 R^{12} は C_1-C_8 アルキル であり；

R^{11} は H、 C_1-C_{20} アルキル、アリール、 C_3-C_8 複素環、 $-(R^{13}O)_m$ $-R^{14}$ 、または $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ から選択され；

m は 1~1000 の範囲の整数であり、

R^{13} は C_2-C_8 アルキル であり；

R^{14} は H または C_1-C_8 アルキル であり；

R^{15} の各出現は、独立して、H、COOH、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、または $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$ アルキル であり；

R^{16} の各出現は、独立して、H、 C_1-C_8 アルキル、または $-(CH_2)_n-COOH$ であり；

R^{18} は $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -アリール、 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-$ (C_3-C_8 複素環)、および $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-$ (C_3-C_8 炭素環) から選択され、および

n は 0~6 の範囲の整数である]

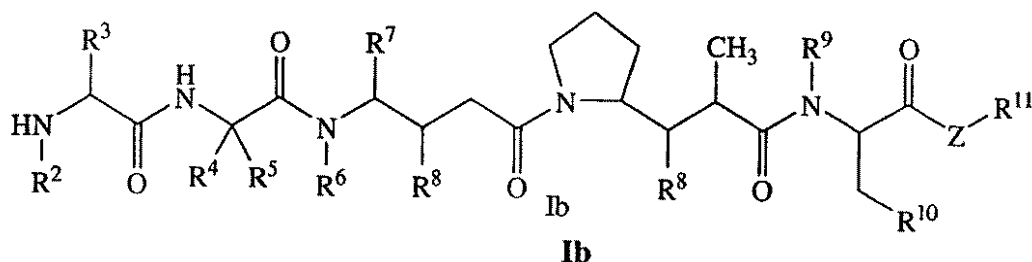
を有する薬物-リンカー-リガンド結合体、またはその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物を提供する。

【0217】

もう1つの実施形態において、本発明は、式 Ib：

【0218】

【化93】



[式中：

R^2 は水素および C_1-C_8 アルキル から選択され；

R^3 は水素、 C_1-C_8 アルキル、 C_3-C_8 炭素環、アリール、 C_1-C_8 アルキル-アリール、 C_1-C_8 アルキル- (C_3-C_8 炭素環)、 C_3-C_8 複素環 および C_1-C_8 アルキル- (C_3-C_8 複素環) から選択され；

R^4 は水素、 C_1-C_8 アルキル、 C_3-C_8 炭素環、アリール、 C_1-C_8 アルキル-アリール、 C_1-C_8 アルキル- (C_3-C_8 炭素環)、 C_3-C_8 複素環 および C_1-C_8 アルキル- (C_3-C_8 複素環) から選択され、ここで、 R^5 は H およびメチルから選択され；あるいは R^4 および R^5 は一緒になって式 $-(CR^aR^b)_n-$ を有し、ここで、 R^a および R^b は、独立して、H、 C_1-C_8 アルキル および C_3-C_8 炭素環から選択され、および n は 2、3、4、5 および 6 から選択され、それらが結合する炭素原子とで環を形成し；

R^6 は H および C_1-C_8 アルキル から選択され；

R^7 は H、 C_1-C_8 アルキル、 C_3-C_8 炭素環、アリール、 C_1-C_8 アルキル-アリール、 C_1-C_8 アルキル- (C_3-C_8 炭素環)、 C_3-C_8 複素環 および C_1-C_8 アルキル- (C_3-C_8 炭素環) から選択され；

各 R^8 は独立して、 H 、 $-OH$ 、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_3-C_8$ 炭素環および $-O-(C_1-C_8 \text{ アルキル})$ から選択され；

R^9 は H および $-C_1-C_8$ アルキルから選択され；

R^{10} はアリール基または $-C_3-C_8$ 複素環から選択され；

Z は $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ または $-NR^{12}-$ であり、ここで、 R^{12} は C_1-C_8 アルキルであり；

R^{11} は H 、 C_1-C_{20} アルキル、アリール、 $-C_3-C_8$ 複素環、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 、または $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ から選択され；

m は $1 \sim 1000$ の範囲の整数であり；

R^{13} は $-C_2-C_8$ アルキルであり；

10

R^{14} は H または $-C_1-C_8$ アルキルであり；

R^{15} の各出現は、独立して、 H 、 $-COOH$ 、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、または $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$ アルキルであり；

R^{16} の各出現は、独立して、 H 、 $-C_1-C_8$ アルキル、または $-(CH_2)_n-COOH$ であり；および

n は $0 \sim 6$ の範囲の整数である]

を有する薬物化合物、またはその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物を提供する。

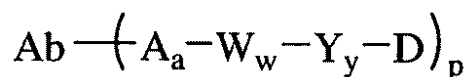
【0219】

なおもう1つの実施形態において、本発明は式 Ia'：

【0220】

20

【化94】



(式 Ia')

[式中：

Ab は抗体であり、

A はストレッチャー (Stretcher) ユニットであり、

a は 0 または 1 であり、

各 W は独立してアミノ酸ユニットであり、

30

w は $0 \sim 12$ の範囲の整数であり、

Y はスペーサーユニットであり、および

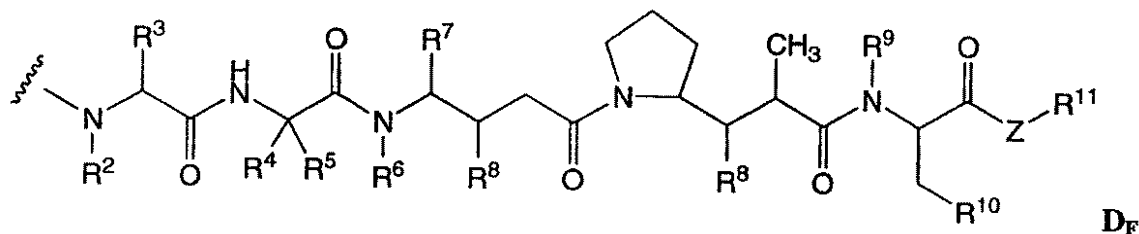
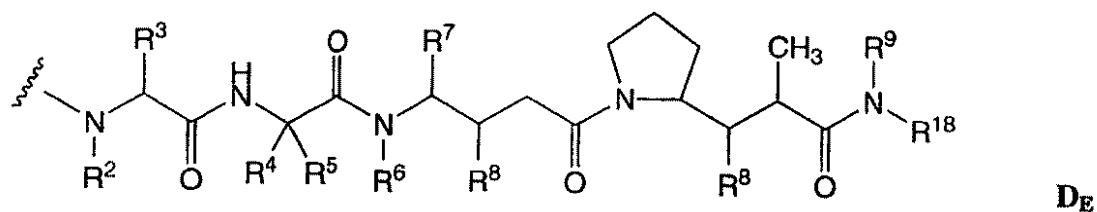
y は 0 、 1 または 2 であり、

p は $1 \sim$ 約 20 の範囲であり、および

D は式 D_E および D_F ：

【0221】

【化 9 5】



10

から選択される薬物部分であり、

ここで、独立して、各位置において：

R^2 はHおよび $C_1 - C_8$ アルキルから選択され；

R^3 はH、 $C_1 - C_8$ アルキル、 $C_3 - C_8$ 炭素環、アリール、 $C_1 - C_8$ アルキル-
アリール、 $C_1 - C_8$ アルキル- ($C_3 - C_8$ 炭素環)、 $C_3 - C_8$ 複素環および $C_1 -$ 20
 C_8 アルキル- ($C_3 - C_8$ 複素環) から選択され；

R^4 はH、 $C_1 - C_8$ アルキル、 $C_3 - C_8$ 炭素環、アリール、 $C_1 - C_8$ アルキル-
アリール、 $C_1 - C_8$ アルキル- ($C_3 - C_8$ 炭素環)、 $C_3 - C_8$ 複素環および $C_1 -$
 C_8 アルキル- ($C_3 - C_8$ 複素環) から選択され；

R^5 はHおよびメチルから選択され；

あるいは R^4 および R^5 は一緒になって炭素環を形成し、式 $-(CR^aR^b)_n-$ を有
し、ここで、 R^a および R^b は、独立して、H、 $C_1 - C_8$ アルキルおよび $C_3 - C_8$ 炭
素環から選択され、 n は2、3、4、5および6から選択され；

R^6 はHおよび $C_1 - C_8$ アルキルから選択され；

30

R^7 はH、 $C_1 - C_8$ アルキル、 $C_3 - C_8$ 炭素環、アリール、 $C_1 - C_8$ アルキル-
アリール、 $C_1 - C_8$ アルキル- ($C_3 - C_8$ 炭素環)、 $C_3 - C_8$ 複素環および $C_1 -$
 C_8 アルキル- ($C_3 - C_8$ 複素環) から選択され；

各 R^8 は独立して、H、OH、 $C_1 - C_8$ アルキル、 $C_3 - C_8$ および $O - (C_1 - C_8$
アルキル) から選択され；

R^9 はHおよび $C_1 - C_8$ アルキルから選択され；

R^{10} はアリールまたは $C_3 - C_8$ 複素環から選択され；

ZはO、S、NH、または NR^{12} であり、ここで、 R^{12} は $C_1 - C_8$ アルキルであ
り；

R^{11} はH、 $C_1 - C_{20}$ アルキル、アリール、 $C_3 - C_8$ 複素環、 $-(R^{13}O)_m$ 40
 $-R^{14}$ 、または $-(R^{13}O)_m - CH(R^{15})_2$ から選択され；

m は1～1000の範囲の整数であり；

R^{13} は $C_2 - C_8$ アルキルであり；

R^{14} はHまたは $C_1 - C_8$ アルキルであり；

R^{15} の各出現は、独立して、H、COOH、 $-(CH_2)_n - N(R^{16})_2$ 、 $-($
 $CH_2)_n - SO_3H$ 、または $-(CH_2)_n - SO_3 - C_1 - C_8$ アルキルであり；

R^{16} の各出現は、独立して、H、 $C_1 - C_8$ アルキル、または $-(CH_2)_n - CO$
OHであり；

R^{18} は $-C(R^8)_2 - C(R^8)_2 -$ アリール、 $-C(R^8)_2 - C(R^8)_2 -$
($C_3 - C_8$ 複素環)、および $-C(R^8)_2 - C(R^8)_2 - (C_3 - C_8$ 炭素環) か 50

ら選択され；および

nは0～6の範囲の整数である]

を有する薬物－リンカー－リガンド結合体、またはその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物を提供する。

【0222】

Abは1以上の薬物ユニットに共有結合したいずれかの抗体である。AbはCD30、CD40、CD70、Lewis Y抗原に結合する抗体を含む。もう1つの実施形態において、AbはErbbレセプターに、または1以上のレセプター(1)～(35)に結合する抗体を含まない：

(1) BMPRII (骨形態形成タンパク質レセプタータイプII, Genbank アクセッション番号NM_001203)； 10

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, Genbank アクセッション番号NM_003486)；

(3) STEAP1 (前立腺の6回膜貫通上皮抗原, Genbank アクセッション番号NM_012449)；

(4) O772P (CA125, MUC16, Genbank アクセッション番号AF361486)；

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, 巨核細胞増強因子, メソテリン, Genbank アクセッション番号NM_005823)；

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPT11b, SLC34A2, 溶質キャリアーファミリー34 (リン酸ナトリウム), メンバー2, タイプIIナトリウム依存性リン酸トランスポーター3b, Genbank アクセッション番号NM_006424)； 20

(7) Sema5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm. 42015, SEMA5B, SEMAG, セマフォリン5b Hlog, semaドメイン, 7回トロンボスポンジンリピート (タイプIおよびタイプI-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 アクセッション番号AB040878)；

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12遺伝子, Genbank アクセッション番号AY358628)； 30

(9) ETBR (エンドセリンタイプBレセプター, Genbank アクセッション番号AY275463)；

(10) MSG783 (RNF124, 仮想タンパク質FLJ20315, Genbank アクセッション番号NM_017763)；

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, 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2の6回膜貫通上皮抗原, 6回膜貫通前立腺タンパク質, Genbank アクセッション番号AF455138)；

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, 一過性レセプター潜在のカチオンチャネル, サブファミリーM, メンバー4, Genbank アクセッション番号NM_017636)； 40

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, テラトカルシノーマ由来成長因子, Genbank アクセッション番号NP_003203またはNM_003212)；

(14) CD21 (CR2 (補体レセプター2) またはC3DR (C3d/エプスタインバールウイルスレセプター) またはHs. 73792, Genbank アクセッション番号M26004)；

(15) CD79b (IgB (免疫グロブリン-関連β), B29, Genbank アクセッション番号NM_000626)；

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (SH2ドメイン含有ホ 50

スファターゼアンカータンパク質1a), SPAP1B, SPAP1C, Genbank
アクセッション番号NM_030764);

(17) HER2 (Genbankアクセッション番号M11730);

(18) NCA (Genbankアクセッション番号M18728);

(19) MDP (Genbankアクセッション番号BC017023);

(20) IL20Rα (Genbankアクセッション番号AF184971);

(21) Brevican (Genbankアクセッション番号AF229053);

(22) Ephb2R (Genbankアクセッション番号NM_004442);

(23) ASLG659 (Genbankアクセッション番号AX092328);

(24) PSCA (Genbankアクセッション番号AJ297436);

(25) GEDA (Genbankアクセッション番号AY260763);

(26) BAFR (Genbankアクセッション番号NP_443177.1);

;

(27) CD22 (Genbankアクセッション番号NP_001762.1);

(28) CD79a (CD79A, CD79α, 免疫グロブリン-関連α, Igβ (CD79B) と共有結合相互作用し、かつIgM分子とで表面上に複合体を形成し、B細胞分化に参与するシグナルを変換するB細胞-特異的タンパク質, Genbankアクセッション番号NP_001774.1);

(29) CXCR5 (バーキットリンパ腫レセプター1, CXCL13ケモカインによって活性化され、リンパ球移動および液性防御で機能し、HIV-2感染および、恐らくは、AIDS、リンパ腫、骨髄腫および白血病も発生において役割を演じるGプロテイン-結合レセプター, Genbankアクセッション番号NP_001707.1);

(30) HLA-DOB (ペプチドに結合し、それらをCD4+Tリンパ球に提示するMHCクラスII分子(Ia抗原)のβサブユニット, Genbankアクセッション番号NP_002111.1);

(31) P2X5 (プリン作動性レセプターP2Xリガンド型イオンチャネル5, 細胞外ATPによってゲートが開閉されるイオンチャネルはシナプス伝達および神経形成に参与し得、欠陥は特発性排尿筋不安定の病態生理学に寄与し得る, Genbankアクセッション番号NP_002552.2);

(32) CD72 (B細胞分化抗原CD72, Lyb-2, Genbankアクセッション番号NP_001773.1);

(33) LY64 (リンパ球抗原64 (RP105)、ロイシンリッチリピート(LRR)ファミリーのタイプI膜タンパク質はB細胞の活性化およびアポトーシスを調節し、機能の喪失は全身エリテマトーデスに罹った患者における増大した病気活性に関連する, Genbankアクセッション番号NP_005573.1);

(34) FCRH1 (Fcレセプター様タンパク質1、C2タイプIg-様およびITAMドメインを含有する免疫グロブリンFcドメインに対する推定レセプターはBリンパ球分化において役割を有するであろう, Genbankアクセッション番号NP_443170.1); または

(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、B細胞発生およびリンパ腫形成における可能な役割を持つ推定免疫レセプター; トランスロケーションによる遺伝子の脱調節はいくつかのB細胞悪性疾患で起こる, Genbankアクセッション番号NP_112571.1)。

1つの実施形態において、-Ww-は-Val-Cit-である。

【0223】

もう1つの実施形態において、R³、R⁴およびR⁷は、独立して、イソプロピルまたはsec-ブチルであって、R⁵は-Hである。例示的实施形態において、R³およびR⁴は各々イソプロピルであり、R⁵は-Hであって、R⁷はsec-ブチルである。さらにもう1つの実施形態において、R²およびR⁶は各々メチルであって、R⁹は-Hである。

10

20

30

40

50

【0224】

なおもう1つの実施形態において、 R^8 の各出現は $-OCH_3$ である。

【0225】

例示的实施形態において、 R^3 および R^4 は各々イソプロピルであり、 R^2 および R^6 は各々メチルであり、 R^5 は $-H$ であり、 R^7 はsec-ブチルであり、 R^8 の各出現は $-OCH_3$ であって、 R^9 は $-H$ である。

【0226】

1つの実施形態において、 Z は $-O-$ または $-NH-$ である。

【0227】

1つの実施形態において、 R^{10} はアリールである。

10

【0228】

例示的实施形態において、 R^{10} はフェニルである。

【0229】

例示的实施形態において、 Z が $-O-$ である場合、 R^{11} は $-H$ 、メチルまたはt-ブチルである。

【0230】

1つの実施形態において、 Z が $-NH$ である場合、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ であり、ここで、 R^{15} は $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ であり、および R^{16} は $-C_1-C_8$ アルキルまたは $-(CH_2)_n-COOH$ である。

【0231】

20

もう1つの実施形態において、 Z が $-NH$ である場合、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ であり、ここで、 R^{15} は $-(CH_2)_n-SO_3H$ である。

【0232】

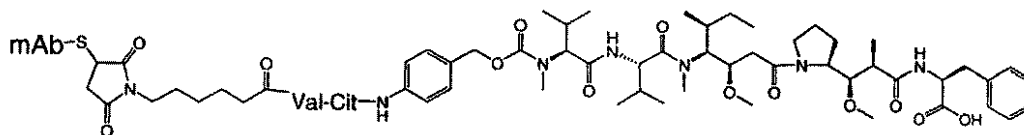
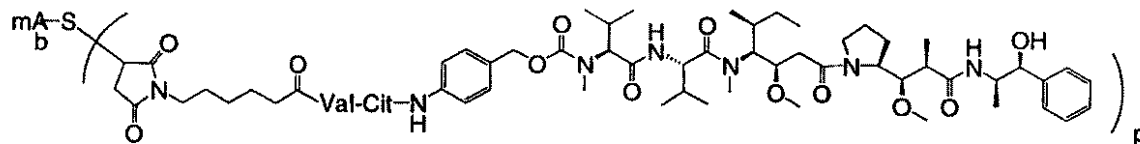
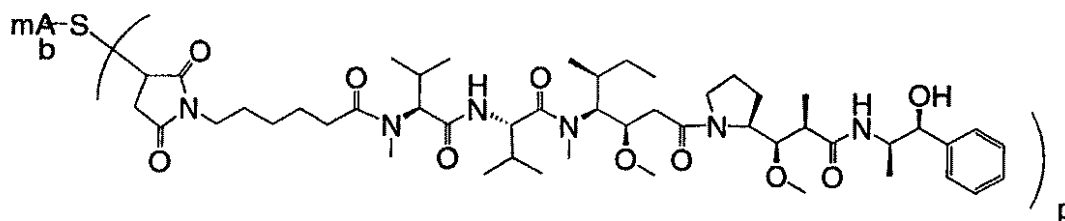
1つの態様において、 Ab はcAC10、cBR96、cS2C6、c1F6、c2F2、hAC10、hBR96、hS2C6、h1F6、およびh2F2である。

【0233】

式Iaの例示的实施形態は以下の構造を有する：

【0234】

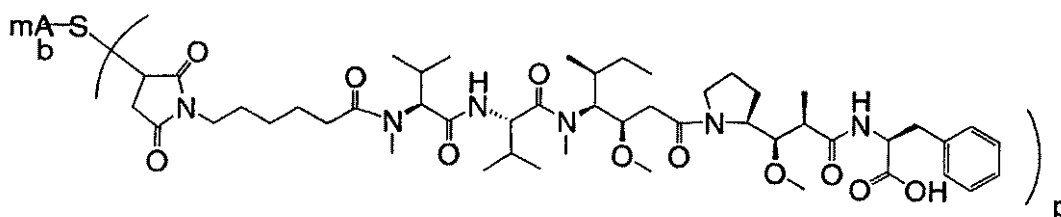
【化 9 6】

**L-MC-vc-PAB-MMAF****L-MC-vc-PAB-MMAE****L-MC-MMAE**

or

【 0 2 3 5】

【化 9 7】

**L-MC-MMAF**

〔式中、Lは抗体であり、Valはバリンであって、Citはシトルリンである〕。

【 0 2 3 6】

薬物負荷はp、(例えば、式Ia、Ia'およびIcの)分子中の抗体当たりの薬物分子の平均数によって表される。薬物負荷はリガンド(例えば、AbまたはmAb)当たり1~20薬物(D)の範囲であり得る。式Iaおよび式Ia'の組成物は1~20の薬物の範囲と結合した抗体のコレクションを含む。結合体化反応の調製における抗体当たりの薬物の平均数は質量分析、ELISAアッセイおよびHPLCのような慣用的な手段によって特徴付けることができる。pの換算でリガンドー薬物ー結合体の定量的分布も決定することができる。いくつかの例において、pが他の薬物負荷を持つリガンドー薬物ー結合体からのある値である均一なリガンドー薬物ー結合体の分離、精製および特徴付けは逆相HPLCまたは電気泳動のような手段によって達成することができる。

【 0 2 3 7】

(4.2.2 式(Ib)の薬物化合物)

もう1つの態様において、本発明は式(Ib)：

【 0 2 3 8】

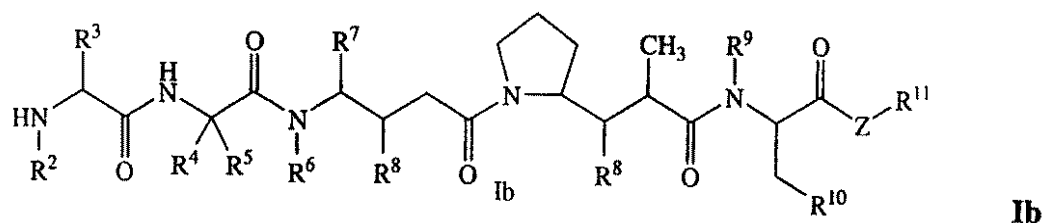
10

20

30

40

【化 9 8】



〔式中：

R^2 は－水素および－ $C_1 - C_8$ アルキルから選択され；

R^3 は－水素、－ $C_1 - C_8$ アルキル、－ $C_3 - C_8$ 炭素環、アリール、－ $C_1 - C_8$ アルキル－アリール、－ $C_1 - C_8$ アルキル－($C_3 - C_8$ 炭素環)、－ $C_3 - C_8$ 複素環および－ $C_1 - C_8$ アルキル－($C_3 - C_8$ 複素環)から選択され；

R^4 は－水素、－ $C_1 - C_8$ アルキル、－ $C_3 - C_8$ 炭素環、－アリール、－ $C_1 - C_8$ アルキル－アリール、－ $C_1 - C_8$ アルキル－($C_3 - C_8$ 炭素環)、－ $C_3 - C_8$ 複素環および－ $C_1 - C_8$ アルキル－($C_3 - C_8$ 複素環)から選択され、ここで、 R^5 は－Hおよび－メチルから選択され；あるいは R^4 および R^5 は一緒になって式－($CR^a R^b$) $_n$ －を有し、ここで、 R^a および R^b は、独立して、－H、－ $C_1 - C_8$ アルキルおよび－ $C_3 - C_8$ 炭素環から選択され、 n は 2、3、4、5 および 6 から選択され、それらが結合している炭素原子とで環を形成し；

R^6 は－Hおよび－ $C_1 - C_8$ アルキルから選択され；

R^7 は－H、－ $C_1 - C_8$ アルキル、－ $C_3 - C_8$ 炭素環、アリール、－ $C_1 - C_8$ アルキル－アリール、－ $C_1 - C_8$ アルキル－($C_3 - C_8$ 炭素環)、－ $C_3 - C_8$ 複素環および－ $C_1 - C_8$ アルキル－($C_3 - C_8$ 複素環)から選択され；

各 R^8 は、独立して、－H、－OH、－ $C_1 - C_8$ アルキル、－ $C_3 - C_8$ 炭素環および－O－($C_1 - C_8$ アルキル)から選択され；

R^9 は－Hおよび－ $C_1 - C_8$ アルキルから選択され；

R^{10} はアリール基または－ $C_3 - C_8$ 複素環から選択され；

Z は－O－、－S－、－NH－または－ NR^{12} －であり、ここで、 R^{12} は $C_1 - C_8$ アルキルであり；

R^{11} は－H、 $C_1 - C_{20}$ アルキル、アリール、－ $C_3 - C_8$ 複素環、－($R^{13}O$) $_m$ － R^{14} 、または－($R^{13}O$) $_m$ －CH(R^{15}) $_2$ から選択され；

m は 1～1000 の範囲の整数であり；

R^{13} は－ $C_2 - C_8$ アルキルであり；

R^{14} は－Hまたは－ $C_1 - C_8$ アルキルであり；

R^{15} の各出現は、独立して、－H、－COOH、－(CH_2) $_n$ －N(R^{16}) $_2$ 、－(CH_2) $_n$ －SO $_3$ H、または－(CH_2) $_n$ －SO $_3$ － $C_1 - C_8$ アルキルであり；

R^{16} の各出現は、独立して、－H、－ $C_1 - C_8$ アルキル、または－(CH_2) $_n$ －COOHであり；および

n は 0～6 の範囲の整数である]

を有する薬物化合物、またはその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物を提供する。

【0239】

1つの実施形態において、 R^3 、 R^4 および R^7 は、独立して、イソプロピルまたは sec-ブチルであって、 R^5 は－Hである。例示的实施形態において、 R^3 および R^4 は各々イソプロピルであり、 R^5 は－Hであって、 R^7 は sec-ブチルである。

【0240】

もう1つの実施形態において、 R^2 および R^6 は各々メチルであって、 R^9 は－Hである。

【0241】

10

20

30

40

50

なおもう1つの実施形態において、 R^8 の各出現は $-OCH_3$ である。

【0242】

例示的实施形態において、 R^3 および R^4 は各々イソプロピルであり、 R^2 および R^6 は各々メチルであり、 R^5 は $-H$ であり、 R^7 はsec-ブチルであり、 R^8 の各出現は $-OCH_3$ であって、 R^9 は $-H$ である。

【0243】

1つの実施形態において、Zは $-O-$ または $-NH-$ である。

【0244】

1つの実施形態において、 R^{10} はアリールである。

【0245】

例示的实施形態において、 R^{10} はフェニルである。

【0246】

例示的实施形態において、Zが $-O-$ である場合、 R^{11} は $-H$ 、メチルまたはt-ブチルである。

【0247】

1つの実施形態において、Zが $-NH$ である場合、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ であり、ここで、 R^{15} は $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ であり、および R^{16} は $-C_1-C_8$ アルキルまたは $-(CH_2)_n-COOH$ である。

【0248】

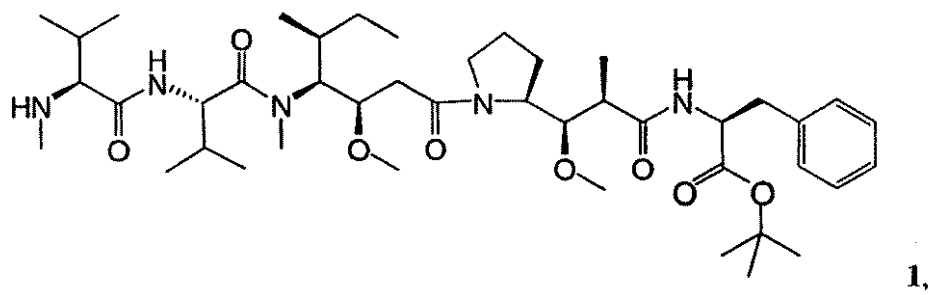
もう1つの実施形態において、Zが $-NH$ である場合、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ であり、ここで、 R^{15} は $-(CH_2)_n-SO_3H$ である。 20

【0249】

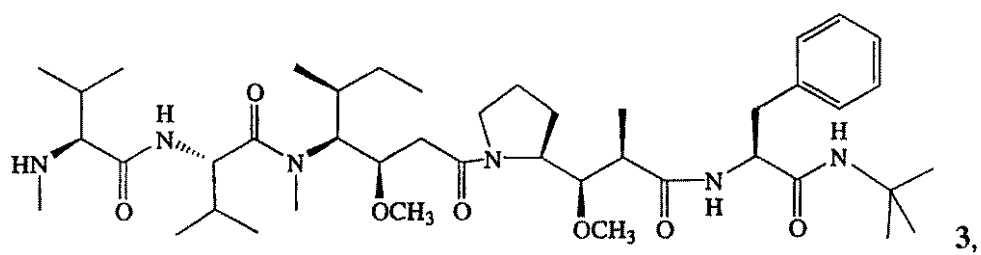
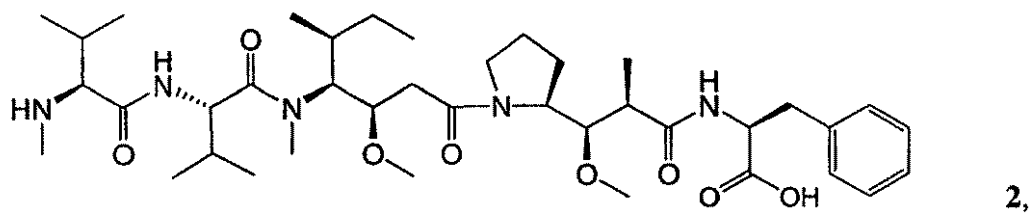
その各々がADCにおける薬物部分(D)として用いることができる式(Ib)の例示的化合物は以下の構造：

【0250】

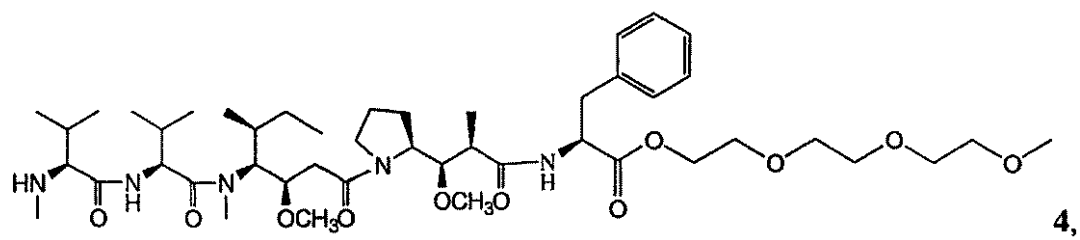
【化 9 9】



10



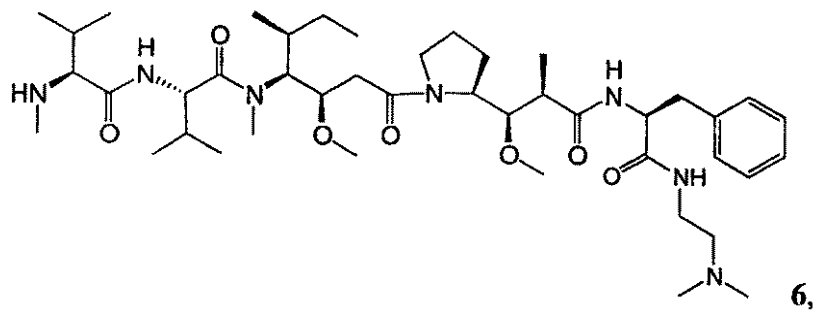
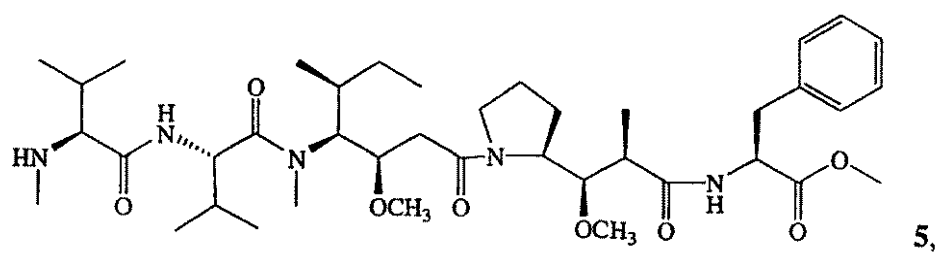
20



30

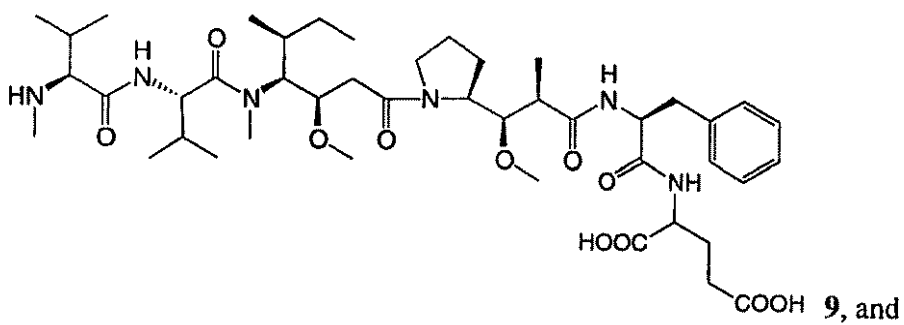
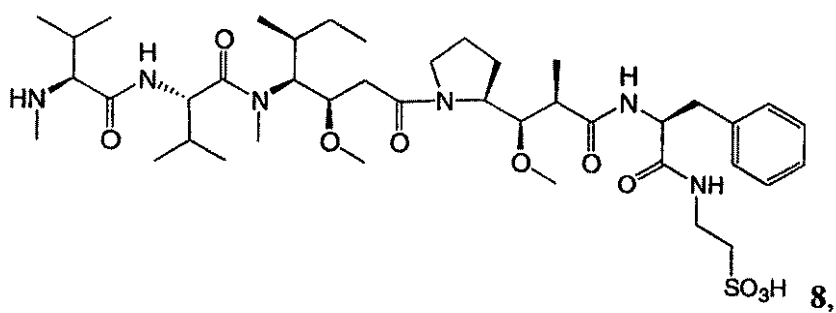
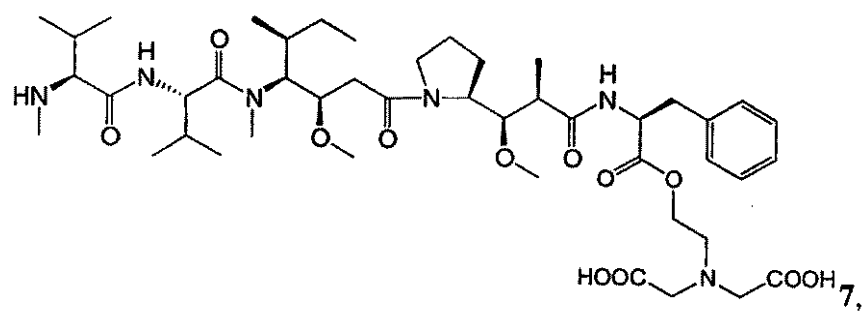
【 0 2 5 1 】

【化 1 0 0】



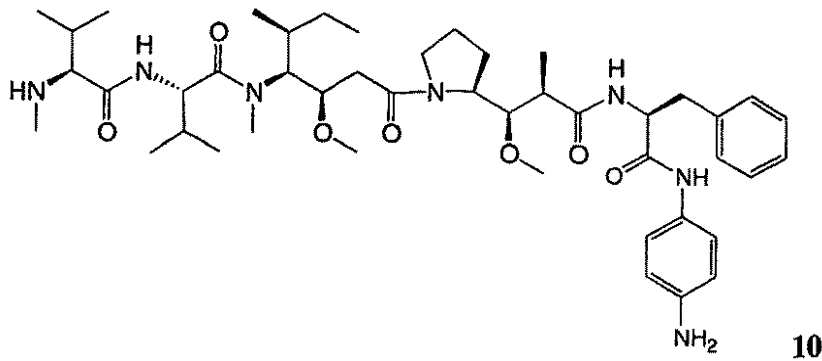
【 0 2 5 2】

【化 1 0 1】



【 0 2 5 3】

【化 1 0 2】



10

を有する化合物、およびその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物を含む。

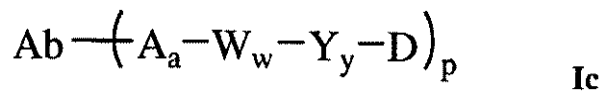
【0 2 5 4】

(式 (I c) の化合物)

もう1つの態様において、本発明は、1以上の薬物ユニット(部位)に共有結合した抗体を含む式 I c :

【0 2 5 5】

【化 1 0 3】



20

を有する抗体-薬物結合体化合物(ADC)を提供する。抗体-薬物結合体化合物はその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物を含む。

【0 2 5 6】

式 I c 化合物は以下のように定義される:

A b は 1 以上の腫瘍-関連抗原レセプター (1) ~ (35) に結合する抗体である:

(1) B M P R 1 B (骨形態形成タンパク質レセプター-タイプ I B, G e n b a n k アクセッション番号 N M _ 0 0 1 2 0 3);

(2) E 1 6 (L A T 1, S L C 7 A 5, G e n b a n k アクセッション番号 N M _ 0 0 3 4 8 6);

30

(3) S T E A P 1 (前立腺の6回膜貫通上皮抗原, G e n b a n k アクセッション番号 N M _ 0 1 2 4 4 9);

(4) O 7 7 2 P (C A 1 2 5, M U C 1 6, G e n b a n k アクセッション番号 A F 3 6 1 4 8 6);

(5) M P F (M P F, M S L N, S M R, 巨核細胞増強因子, メソテリン, G e n b a n k アクセッション番号 N M _ 0 0 5 8 2 3);

(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, 溶質キャリアーファミリー34 (リン酸ナトリウム), メンバー2, タイプ I I ナトリウム-依存性リン酸トランスポーター3b, G e n b a n k アクセッション番号 N M _ 0 0 6 4 2 4);

(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5b H l o g, s e m a ドメイン, 7回トロンボスポンジンリピート (タイプ I およびタイプ I - 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, G e n b a n k アクセッション番号 A B 0 4 0 8 7 8);

40

(8) P S C A h l 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, G e n b a n k アクセッション番号 A Y 3 5 8 6 2 8);

(9) E T B R (エンドセリンタイプ B レセプター, G e n b a n k アクセッション番号 A Y 2 7 5 4 6 3);

(10) 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, G e n b a

50

nkアクセッション番号NM__017763) ;

(11) STEAP2 (HGNC__8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, 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2の6回膜貫通上皮抗原, 6回膜貫通前立腺タンパク質, Genbankアクセッション番号AF455138) ;

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, 一過性レセプター潜在のカチオンチャネル, サブファミリーM, メンバー4, Genbankアクセッション番号NM__017636) ;

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, テラトカルシノーマ由来成長因子, Genbankアクセッション番号NP__003203またはNM__003212) ;

10

(14) CD21 (CR2 (補体レセプター2) またはC3DR (C3d/エプスタインバールウイルスレセプター) またはHs. 73792, Genbankアクセッション番号M26004) ;

(15) CD79b (CD79B, CD79β, Ig b (免疫グロブリン-関連β), B29, Genbankアクセッション番号NM__000626) ;

(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アクセッション番号NM__030764) ;

(17) HER2 (Genbankアクセッション番号M11730) ;

20

(18) NCA (Genbankアクセッション番号M18728) ;

(19) MDP (Genbankアクセッション番号BC017023) ;

(20) IL20Rα (Genbankアクセッション番号AF184971) ;

(21) Brevicin (Genbankアクセッション番号AF229053) ;

(22) Ephb2R (Genbankアクセッション番号NM__004442) ;

(23) ASLG659 (Genbankアクセッション番号AX092328) ;

(24) PSCA (Genbankアクセッション番号AJ297436) ;

(25) GEDA (Genbankアクセッション番号AY260763) ;

(26) BAFR (B細胞-活性化因子レセプター、BLySレセプター3, BR3, NP__443177. 1) ;

30

(27) CD22 (B細胞レセプター CD22-Bイソ型, NP-001762. 1) ;

(28) CD79a (CD79A, CD79α, 免疫グロブリン-関連α, Igβ (CD79B) と共有結合相互作用し、かつIgM分子とで表面上に複合体を形成し、B細胞分化に参与するシグナルを変換するB細胞-特異的タンパク質, Genbankアクセッション番号NP__001774. 1) ;

(29) CXCR5 (パーキットリンパ腫レセプター1, CXCL13ケモカインによって活性化され、リンパ球移動および液性防御で機能し、HIV-2感染および、恐らくは、AIDS、リンパ腫、骨髄腫および白血病も発生において役割を演じるGプロテイン-結合レセプター, Genbankアクセッション番号NP__001707. 1) ;

40

(30) HLA-DOB (ペプチドに結合し、それらをCD4+Tリンパ球に提示するMHCクラスII分子 (Ia抗原) のβサブユニット, Genbankアクセッション番号NP__002111. 1) ;

(31) P2X5 (プリン作動性レセプターP2Xリガンド型イオンチャネル5, 細胞外ATPによってゲートが開閉されるイオンチャネルはシナプス伝達および神経形成に参与し得、欠陥は特発性排尿筋不安定の病態生理学に寄与し得る, Genbankアクセッション番号NP__002552. 2) ;

(32) CD72 (B細胞分化抗原CD72, Lyb-2, Genbankアクセッション番号NP__001773. 1) ;

(33) LY64 (リンパ球抗原64 (RP105)、ロイシンリッチリピート (LR

50

R) ファミリーのタイプ I 膜タンパク質は B-細胞の活性化およびアポトーシスを調節し、機能の喪失は全身エリテマトーデスに罹った患者における増大した病気活性に関連する、Genbank アクセッション番号 NP_005573.1) ;

(34) FCRH1 (Fc レセプター様タンパク質 1、C2 タイプ Ig-様および ITAM ドメインを含有する免疫グロブリン Fc ドメインに対する推定レセプターは B-リンパ球分化において役割を有するであろう、Genbank アクセッション番号 NP_443170.1) ; または

(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、B 細胞発生およびリンパ腫形成における可能な役割を持つ推定免疫レセプター; トランスロケーションによる遺伝子の脱調節はいくつかの B 細胞悪性疾患で起こる、Genbank アクセッション番号 NP_112571.1) 。

10

【0257】

A はストレッチャー (Stretcher) ユニットであり、

a は 0 または 1 であり、

各 W は独立してアミノ酸ユニットであり、

w は 0 ~ 12 の範囲の整数であり、

Y はスペーサーユニットであり、および

y は 0、1 または 2 であり、

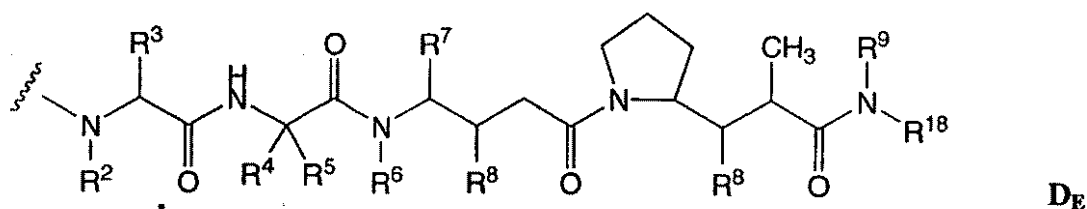
p は 1 ~ 約 8 の範囲であり、および

D は式 D_E および D_F から選択される薬物部分であり；

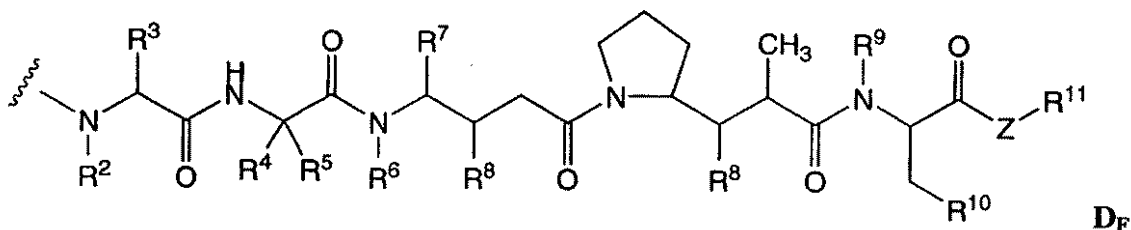
20

【0258】

【化104】



30



ここで、D_E および D_F の波線は A、W または Y への共有結合部位を示し、独立して、各一において：

R² は H、および C₁ - C₈ アルキルから選択され；

40

R³ は H、C₁ - C₈ アルキル、C₃ - C₈ 炭素環、アリール、C₁ - C₈ アルキル-アリール、C₁ - C₈ アルキル- (C₃ - C₈ 炭素環)、C₃ - C₈ 複素環および C₁ - C₈ アルキル- (C₃ - C₈ 複素環) から選択され；

R⁴ は H、C₁ - C₈ アルキル、C₃ - C₈ 炭素環、アリール、C₁ - C₈ アルキル-アリール、C₁ - C₈ アルキル- (C₃ - C₈ 炭素環)、C₃ - C₈ 複素環および C₁ - C₈ アルキル- (C₃ - C₈ 複素環) から選択され；

R⁵ は H およびメチルから選択され；

あるいは R⁴ および R⁵ は一緒になって炭素環を形成し、かつ式 - (C R^a R^b)_n - を有し、ここで、R^a および R^b は、独立して、H、C₁ - C₈ アルキルおよび C₃ - C₈ 炭素環から選択され、n は 2、3、4、5 および 6 から選択され；

50

R^6 はHおよび $C_1 - C_8$ アルキルから選択され；

R^7 はH、 $C_1 - C_8$ アルキル、 $C_3 - C_8$ 炭素環、アリール、 $C_1 - C_8$ アルキル-アリール、 $C_1 - C_8$ アルキル- ($C_3 - C_8$ 炭素環)、 $C_3 - C_8$ 複素環および $C_1 - C_8$ アルキル- ($C_3 - C_8$ 複素環) から選択され；

各 R^8 は、独立して、H、OH、 $C_1 - C_8$ アルキル、 $C_3 - C_8$ 炭素環および $O - (C_1 - C_8$ アルキル) から選択され；

R^9 はHおよび $C_1 - C_8$ アルキルから選択され；

R^{10} はアリールまたは $C_3 - C_8$ 複素環から選択され；

ZはO、S、NHまたは NR^{12} であり、ここで、 R^{12} は $C_1 - C_8$ アルキルであり；

10

R^{11} はH、 $C_1 - C_{20}$ アルキル、アリール、 $C_3 - C_8$ 複素環、 $-(R^{13}O)_m - R^{14}$ 、または $-(R^{13}O)_m - CH(R^{15})_2$ から選択され；

mは1～1000の範囲の整数であり；

R^{13} は $C_2 - C_8$ アルキルであり；

R^{14} はHまたは $C_1 - C_8$ アルキルであり；

R^{15} の各出現は、独立して、H、 $COOH$ 、 $-(CH_2)_n - N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n - SO_3H$ 、または $-(CH_2)_n - SO_3 - C_1 - C_8$ アルキルであり；

R^{16} の各出現は、独立して、H、 $C_1 - C_8$ アルキル、または $-(CH_2)_n - COOH$ であり；

R^{18} は $-C(R^8)_2 - C(R^8)_2$ -アリール、 $-C(R^8)_2 - C(R^8)_2 - (C_3 - C_8$ 複素環)、および $-C(R^8)_2 - C(R^8)_2 - (C_3 - C_8$ 炭素環) から選択され；および

20

nは0～6の範囲の整数である。

【0259】

1つの実施形態において、 $-Ww-$ は $-Val-Cit-$ である。

【0260】

もう1つの実施形態において、 R^3 、 R^4 および R^7 は、独立して、イソプロピルまたはsec-ブチルであって、 R^5 は $-H$ である。例示的实施形態において、 R^3 および R^4 は各々イソプロピルであり、 R^5 は $-H$ であって、 R^7 はsec-ブチルである。

【0261】

30

さらにもう1つの実施形態において、 R^2 および R^6 は各々メチルであって、 R^9 は $-H$ である。

【0262】

なおもう1つの実施形態において R^8 の各出現は $-OCH_3$ である。

【0263】

例示的实施形態において、 R^3 および R^4 は各々イソプロピルであり、 R^2 および R^6 は各々メチルであり、 R^5 は $-H$ であり、 R^7 はsec-ブチルであり、 R^8 の各出現は $-OCH_3$ であって、 R^9 は $-H$ である。

【0264】

1つの実施形態において、Zは $-O-$ または $-NH-$ である。

40

【0265】

1つの実施形態において、 R^{10} はアリールである。

【0266】

例示的实施形態において、 R^{10} はフェニルである。

【0267】

例示的实施形態において、Zが $-O-$ である場合、 R^{11} は $-H$ 、メチルまたはt-ブチルである。

【0268】

1つの実施形態において、Zが $-NH$ である場合、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ であり、ここで、 R^{15} は $-(CH_2)_n - N(R^{16})_2$ であり、および R^{16} は $-C_1 - C$

50

₈ アルキルまたは $-(CH_2)_n-COOH$ である。

【0269】

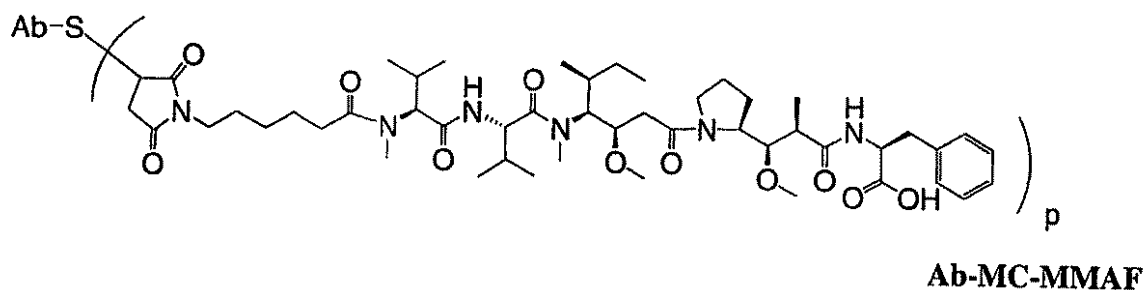
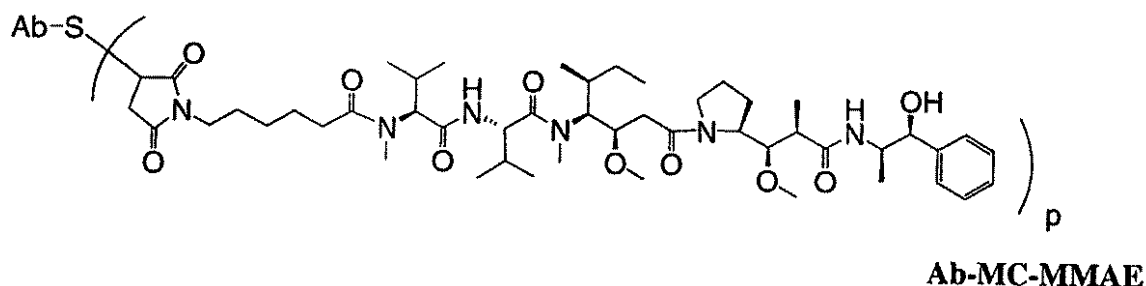
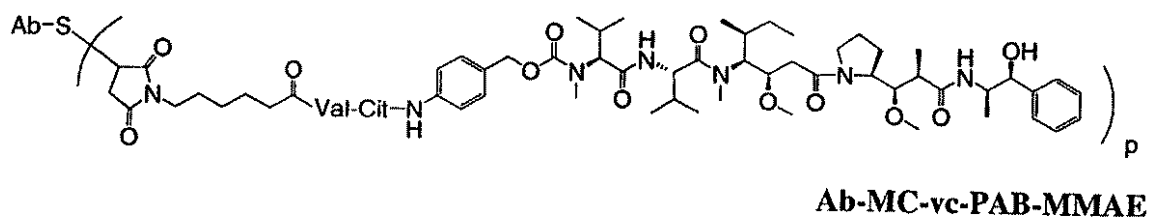
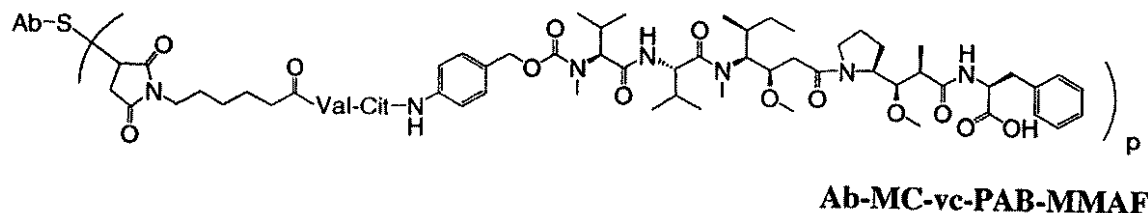
もう1つの実施形態において、Zが $-NH$ である場合、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ であり、ここで、 R^{15} は $-(CH_2)_n-SO_3H$ である。

【0270】

式I c ADCの例示的实施形態は以下の構造：

【0271】

【化105】



[式中、Abは1以上の腫瘍一関連抗原レセプター(1)～(35)に結合する抗体であり；Valはバリンであり；Citはシトルリンである]
を有する。

【0272】

薬物負荷はp、式Iの分子中の抗体当たりの薬物の平均数によって表される。薬物負荷は抗体(AbまたはmAb)当たり1～20薬物(D)の範囲であり得る。式IのADCの組成物は1～20のある範囲の薬物と結合体した抗体のコレクションを含む。結合体化反応からのADCの調製における抗体当たりの薬物の平均数は、UV/可視分光分析、質量分析、ELISAアッセイ、およびHPLCのような慣用的手段によって特徴付けることができる。pの換算でのADCの定量的分布もまた決定することができる。いくつかの

50

例において、 p が他の薬物負荷でのADCからのある値である均一なADCの分離、精製および特徴付けは逆相HPLCまたは電気泳動のような手段によって達成することができる。

【0273】

いくつかの抗体薬物結合体では、 p は抗体上の付着部位の数によって限定することができる。例えば、該付着がシステインチオールである場合、前記した例示的实施形態におけるように、抗体はただ1つまたは数個のシステインチオール基を有することができるか、あるいはそれを介してリンカーが結合することができるただ1つのまたは数個の十分に反応性のチオール基を有することができる。

【0274】

典型的には、薬物部分の理論的最大値よりも少数が結合体化反応の間に抗体に結合体化する。抗体は、例えば、薬物-リンカー中間体またはリンカー試薬と反応しない多くのリシン残基を含むことができる。最も反応性のリシン残基のみがアミン-反応性リンカー試薬と反応することができる。一般に、抗体は、もしあれば、薬物部分に連結させることができる多くの遊離かつ反応性のシステインチオール基を含有することができない。本発明の化合物の抗体中のほとんどのシステインチオール残基はジスルフィドブリッジとして存在し、ジチオスレイトール(DTT)のような還元剤で還元しなければならない。加えて、抗体は変性条件に付して、リシンまたはシステインのような反応性求核性基を明らかにしなければならない。ADCの負荷(薬物/抗体比率)は：(i)抗体に対するモル過剰の薬物-リンカー中間体またはリンカー試薬の限定、(ii)結合体化反応時間または温度の限定、および(iii)システインチオール修飾のための部分的または限定された還元条件を含めたいくつかの異なる方法で制御することができる。

【0275】

1を超える求核性基が薬物-リンカー中間体、リンカー試薬、続いて薬物部分試薬と反応する場合、得られる生成物は抗体に結合した1以上の薬物部分が分布したADC化合物の混合物である。抗体当たりの薬物の平均数は、抗体に特異的であって、該薬物に特異的なデュアルELISA抗体アッセイによって混合物から計算することができる。個々のADC分子は質量分析によって混合物中で同定することができ、HPLC、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって分離することができる(「Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate」, Hamblett, K. J., et al., Abstract No. 624, American Association for Cancer Research: 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; 「Controlling the Location of Drug Attachment in Antibody-Drug Conjugates」, Alley S. C., et al., Abstract No. 627, American Association for Cancer Research: 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004)。かくして、単一の負荷値を持つ均一なADCは電気泳動またはクロマトグラフィーによって結合体化混合物から単離することができる。

【0276】

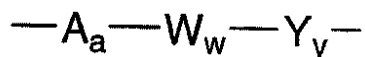
(4.3 リンカーユニット)

「リンカーユニット」(LU)は、薬物ユニットおよびリガンドユニットを連結させて薬物-リンカー-リガンド結合体を形成するのに用いることができるか、あるいは腫瘍関連抗原に対して向けられた免疫結合体の形成で有用な二官能性化合物である。そのような免疫結合体は毒性薬物の腫瘍細胞への選択的送達を可能とする。1つの実施形態において、薬物-リンカー化合物および薬物-リンカー-リガンド結合体のリンカーユニットは式

:

【0277】

【化106】



[式中:]

-A-はストレッチャー (Stretcher) ユニットであり;

aは0または1であり;

各-W-は独立してアミノ酸ユニットであり;

wは独立して0~12の範囲の整数であり;

-Y-はスペーサーユニットであり;および

yは0、1または2である]

を有する。

【0278】

薬物-リンカー-リガンド結合体において、該リンカーは薬物部分およびリガンドユニットを連結することができる。

【0279】

(4.3.1 ストレッチャー (Stretcher) ユニット)

ストレッチャーユニット (-A-) は、存在する場合、リガンドユニットをアミノ酸ユニット (-W-) に連結することができる。この点において、リガンド (L) はストレッチャーの官能基とで結合を形成することができる官能基を有する。天然で、または化学的操作を介してリガンド上に存在させることができる有用な官能基は、限定されるものではないが、スルフヒドリル (-SH)、アミノ、ヒドロキシル、カルボキシ、炭化水素のアノマーヒドロキシル基、およびカルボキシルを含む。1つの態様において、リガンド官能基はスルフヒドリルおよびアミノである。スルフヒドリル基はリガンドの分子内ジスルフィド結合の還元によって生じさせることができる。別法として、スルフヒドリル基は、2-イミノチオラン (Traut 試薬) またはもう1つのスルフヒドリル生成試薬を用いる、リガンドのリシン部位のアミノ基の反応によって生じさせることができる。

【0280】

1つの実施形態において、ストレッチャーユニットはリガンドユニットの硫黄原子との結合を形成する。硫黄原子はリガンドのスルフヒドリル基から由来することができる。この実施形態の代表的なストレッチャーユニットは式 I I I a および I I I b の四角ブラケット内に描かれ、ここで、L-、-W-、-Y-、-D、w および y は前記定義の通りであり、R¹⁻⁷ は -C₁-C₁₀ アルキレン-、-C₃-C₈ カルボシクロ-、-O- (C₁-C₈ アルキル)-、-アリーレン-、-C₁-C₁₀ アルキレン-アリーレン-、-アリーレン-C₁-C₁₀ アルキレン-、-C₁-C₁₀ アルキレン- (C₃-C₈ カルボシクロ)-、- (C₃-C₈ カルボシクロ)-C₁-C₁₀ アルキレン-、-C₃-C₈ ヘテロシクロ-、-C₁-C₁₀ アルキレン- (C₃-C₈ ヘテロシクロ)-、- (C₃-C₈ ヘテロシクロ)-C₁-C₁₀ アルキレン-、- (CH₂CH₂O)_r-、および - (CH₂CH₂O)_r-CH₂- から選択され; および r は 1~10 の範囲の整数である。I I I -V I のような式 I a の全ての例示的实施形態から、明示的に示されていなくても、1~20の薬物部分がリガンドに連結される (p = 1~20)。

【0281】

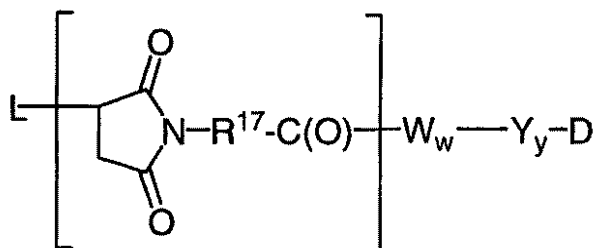
10

20

30

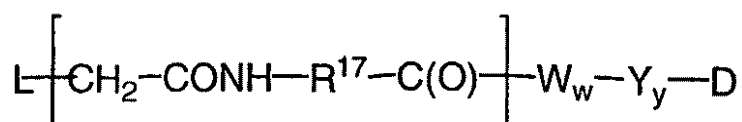
40

【化 1 0 7】



IIIa

10

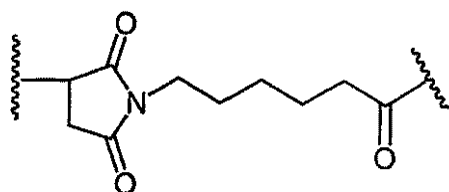


IIIb

例示的なストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(\text{CH}_2)_5-$ である式 III a のものである：

【0 2 8 2】

【化 1 0 8】

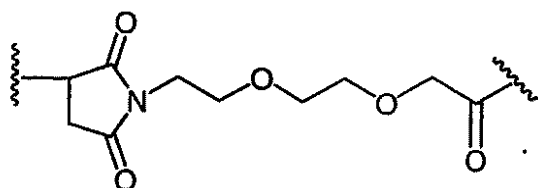


20

もう1つの例示的なストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ であって；および r が 2 である式 III a のそれである：

【0 2 8 3】

【化 1 0 9】

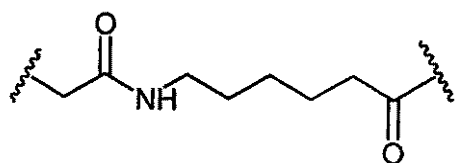


30

なおもう1つの例示的なストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(\text{CH}_2)_5-$ である式 III b のそれである：

【0 2 8 4】

【化 1 1 0】

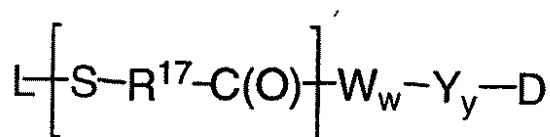


40

もう1つの実施形態において、ストレッチャーユニットは、リガンドユニットの硫黄原子およびストレッチャーユニットの硫黄原子の間のジスルフィド結合を介してリガンドユニットに連結される。この実施形態の代表的なストレッチャーユニットは式 IV の四角ブラケット内に描かれ、ここで、 R^{17} 、 $\text{L}-$ 、 $-\text{W}-$ 、 $-\text{Y}-$ 、 $-\text{D}$ 、 w および y は前記定義の通りである。

【0 2 8 5】

【化 1 1 1】



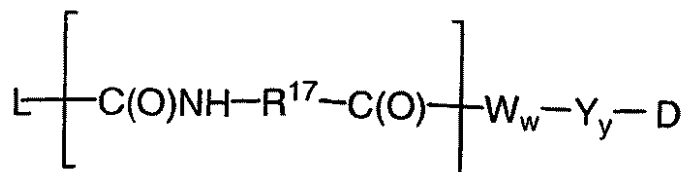
IV

さらにもう 1 つの実施形態において、ストレッチャーの反応性基はリガンドの第一級または第二級アミノ基とで結合形成できる反応性部位を含有する。これらの反応性部位の例は、限定されるものではないが、スクシンイミドエステル、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、アンヒドライド、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアネートおよびイソチオシアネートのような活性化されたエステルを含む。この実施形態の代表的なストレッチャーユニットは式 V a および V b の四角ブラケット内に描かれ、ここで、 $-R^{17}-$ 、 $L-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 w および y は前記定義の通りである；

10

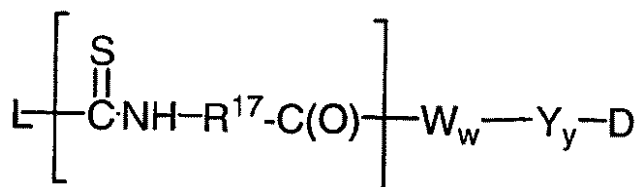
【0 2 8 6】

【化 1 1 2】



V a

20



V b

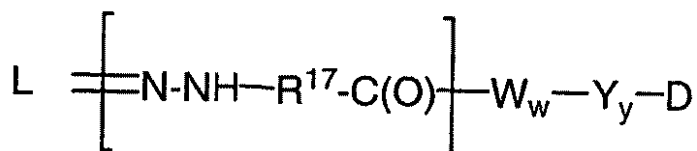
さらにもう 1 つの態様において、ストレッチャーの反応性基は、リガンド上に存在することができる修飾された炭水化物の $(-CHO)$ 基に対して反応性である反応性部位を含む。例えば、炭水化物は過ヨウ素酸ナトリウムのような試薬を用いて穏和に酸化することができ、酸化された炭水化物の得られた $(-CHO)$ ユニットは、ヒドラジド、オキシム、第一級または第二級アミン、ヒドラジン、チオセニカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、および Kaneko, T. et al. (1991) Bioconjugate Chem 2: 133-41 によって記載されたもののようなアリールヒドラジドのような官能性を含むストレッチャーと縮合させることができる。この実施形態の代表的なストレッチャーユニットは式 V I a、V I b および V I c の四角ブラケット内に描かれ、ここで、 $-R^{17}-$ 、 $L-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 w および y は前記定義の通りである。

30

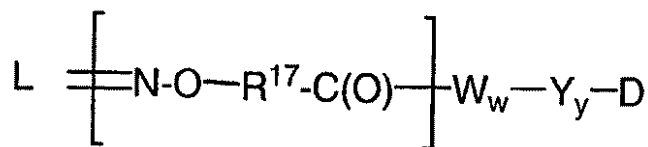
【0 2 8 7】

40

【化 1 1 3】



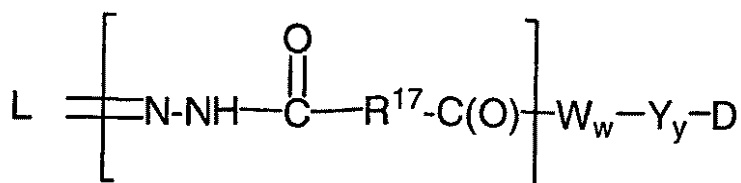
VIa



VIb

【0 2 8 8】

【化 1 1 4】



VIc

(4. 3. 2 アミノ酸ユニット)

アミノ酸ユニット(−W−)は、存在する場合、もしスペーサーユニットが存在すればストレッチャーユニットをスペーサーユニットに連結させ、もしスペーサーユニットが存在でなければ、スペーサーユニットを薬物部分に連結させ、もしストレッチャーユニットおよびスペーサーユニットが存在でなければ、リガンドユニットを薬物にユニットに連結させる。

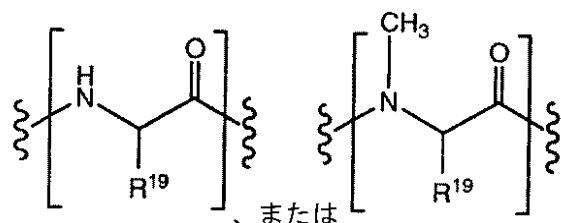
【0 2 8 9】

W_w−はジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチドまたはドデカペプチドユニットである。各−W−ユニットは独立して四角ブラケット中の

以下に示す式を有し、およびwは0～12の範囲の整数であり：

【0 2 9 0】

【化 1 1 5】



〔式中、R¹⁹は水素、メチル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、ベンジル、p-ヒドロキシベンジル、−CH₂OH、−CH(OH)CH₃、−CH₂CH₂SC₂H₅、−CH₂CONH₂、−CH₂COOH、−CH₂CH₂CONH₂、−CH₂CH₂COOH、−(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂、−(CH₂)₃NH₂、−(CH₂)₃NHCOCH₃、−(CH₂)₃NHCHO、−(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂、−(CH₂)₄NH₂、−(CH₂)₄NHCOCH₃、−(CH₂)₄NHCHO、−(CH₂)₃NHCONH₂、−(CH₂)₄NHCONH₂、−CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂、2-ピリジルメチル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル、フェニル、シクロヘキシル、

【0 2 9 1】

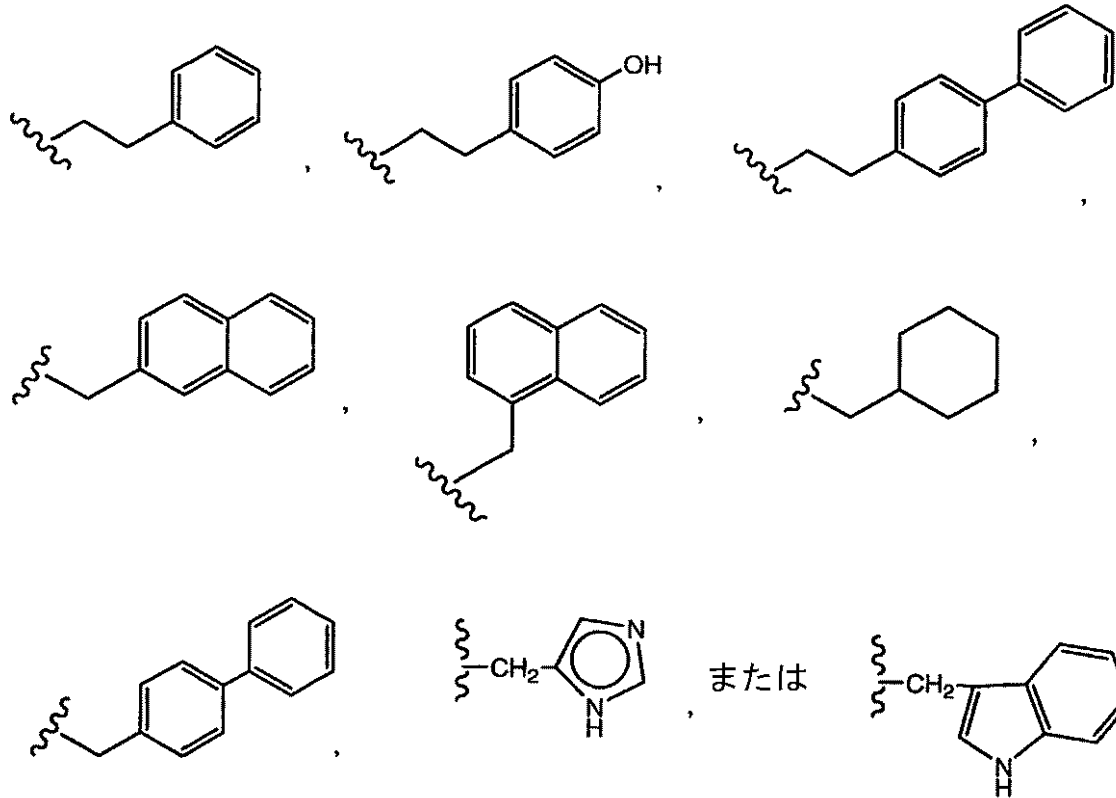
10

20

30

40

【化 1 1 6】



10

20

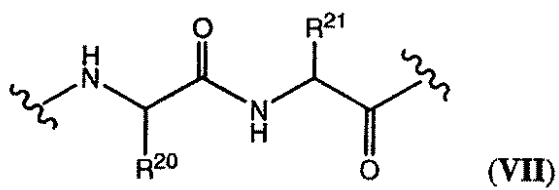
である】。

【0292】

アミノ酸ユニットは腫瘍－関連プロテアーゼを含めた1以上の酵素によって酵素的に切断して、薬物ユニット（－D）を遊離させることができ、これは、1つの実施形態において、インビボで放出に際してプロトン化されて薬物（D）を供する。例示的なW_wユニットは式（VII）－（IX）：

【0293】

【化 1 1 7】



〔式中、R²⁰ および R²¹ は以下の通りである：

【0294】

30

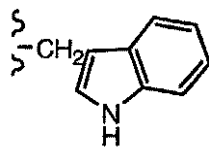
【化 1 1 8】

$\underline{R^{20}}$	$\underline{R^{21}}$
ベンジル	$(CH_2)_4NH_2$;
メチル	$(CH_2)_4NH_2$;
イソプロピル	$(CH_2)_4NH_2$;
イソプロピル	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
ベンジル	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
イソブチル	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
sec-ブチル	$(CH_2)_3NHCONH_2$;

10

【 0 2 9 5】

【化 1 1 9】

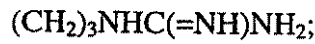


ベンジル

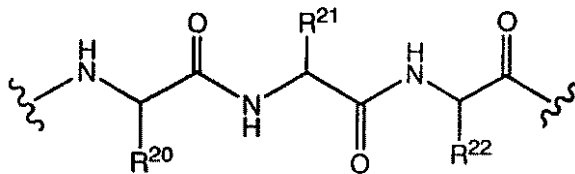
ベンジル



メチル ; および



20



(VIII)

30

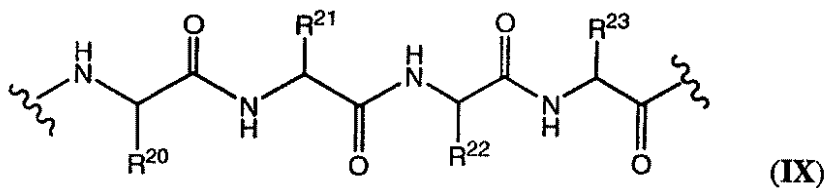
[式中、 R^{20} 、 R^{21} および R^{22} は以下の通りである :

【 0 2 9 6】

【化 1 2 0】

$\underline{R^{20}}$	$\underline{R^{21}}$	$\underline{R^{22}}$
ベンジル	ベンジル	$(CH_2)_4NH_2$;
イソプロピル	ベンジル	$(CH_2)_4NH_2$; および
H	ベンジル	$(CH_2)_4NH_2$;

40



(IX)

[式中、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} および R^{23} 以下の通りである :

【 0 2 9 7】

【化 1 2 1】

R^{20}	R^{21}	R^{22}	R^{23}
H	ベンジル	イソブチル	H; および
メチル	イソブチル	メチル	イソブチル

。

【0 2 9 8】

例示的なアミノ酸ユニットは、限定されるものではないが、 R^{20} がベンジルであって、 R^{21} が $-(CH_2)_4NH_2$ である； R^{20} がイソプロピルであって、 R^{21} が $-(CH_2)_4NH_2$ である； R^{20} がイソプロピルであって、 R^{21} が $-(CH_2)_3NHCONH_2$ である式 (V I I) のユニットを含む。もう1つの例示的なアミノ酸ユニットは、 R^{20} がベンジルであり、 R^{21} がベンジルであって、 R^{22} が $-(CH_2)_4NH_2$ である式 (V I I I) のユニットである。

10

【0 2 9 9】

有用な $-W_w-$ ユニットを設計することができ、特定の酵素、例えば、腫瘍-関連プロテアーゼによる酵素切断につきそれらの選択性を最適化することができる。1つの実施形態において、 $-W_w-$ ユニットは、その切断がカテプシン B、C および D、またはプラスミンプロテアーゼによって触媒されるものである。

20

【0 3 0 0】

1つの実施形態において、 $-W_w-$ はジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペンタペプチドである。

【0 3 0 1】

R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} または R^{23} が水素以外である場合、 R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} または R^{23} が結合される炭素原子はキラルである。

【0 3 0 2】

R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} または R^{23} が結合する各炭素原子は、独立して、(S) または (R) 立体配置におけるものである。

【0 3 0 3】

アミノ酸ユニットの1つの態様において、アミノ酸ユニットはバリン-シトルリンである。もう1つの態様において、アミノ酸ユニットはフェニルアラニン-リシン (すなわち、f k) である。アミノ酸ユニットのさらにもう1つの態様において、アミノ酸ユニットはN-メチルバリン-シトルリンである。さらにもう1つの態様において、アミノ酸ユニットは5-アミノ吉草酸、ホモフェニルアラニン-リシン、テトライソキノリンカルボキシレートリシン、シクロヘキシルアラニン-リシン、イソネペコチン酸リシン、 β -アラニン-リシン、グリシンセリンバリングルタミン酸およびイソネペコチン酸である。

30

【0 3 0 4】

ある実施形態において、アミノ酸ユニットは天然アミノ酸を含むことができる。他の実施形態において、アミノ酸ユニットは非-天然アミノ酸を含むことができる。

【0 3 0 5】

(4. 3. 3 スペーサーユニット)

スペーサーユニット ($-Y-$) は、存在する場合、アミノ酸ユニットが存在するときにはアミノ酸ユニットを薬物部分に連結させる。別法として、スペーサーユニットは、アミノ酸ユニットが存在しない場合には、ストレッチャーユニットを薬物ユニットに連結させる。スペーサーユニットもまた、アミノ酸ユニットおよびストレッチャーユニット双方が存在しない場合には、薬物部分をリガンドユニットに連結させる。

40

【0 3 0 6】

スペーサーユニットは2つの一般的タイプ：自己-犠牲的および非自己-犠牲的のものである。非自己-犠牲的スペーサーユニットは、スペーサーユニットの一部または全てが、薬物-リンカー-リガンド結合体または薬物-リンカー化合物からのアミノ酸の、特に

50

酵素的な切断後に薬物部分に結合したままであるものである。非自己犠牲的スペーサーユニットの場合は、限定されるものではないが、(グリシン-グリシン)スペーサーユニットおよびグリシンスペーサーユニット(共にスキーム1に示す)(後記)を含む。グリシン-グリシンユニットまたはグリシンスペーサーユニットを含有する例示的化合物が腫瘍-細胞関連プロテアーゼ、癌-細胞-関連プロテアーゼまたはリンパ球-関連プロテアーゼを介する酵素切断を受ける場合、グリシン-グリシン-薬物部分またはグリシン-薬物部分は $L-A_a-W_w$ から切断される。1つの実施形態において、独立した加水分解反応が標的細胞内で起こり、グリシン-薬物部分結合を切断し、薬物を遊離させる。

【0307】

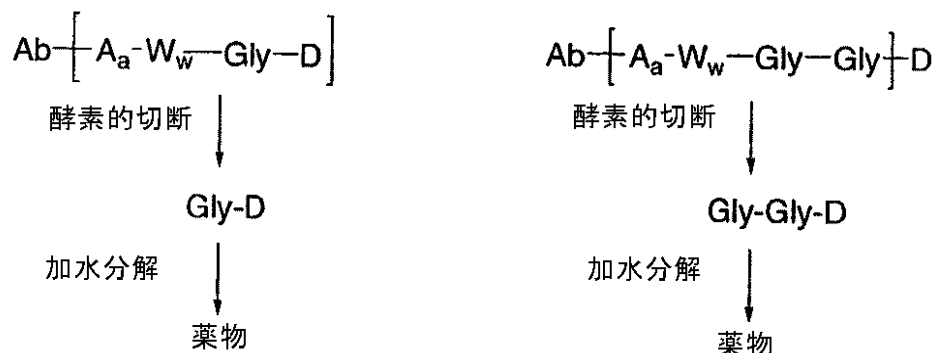
もう1つの実施形態において、 $-Y_y-$ は、そのフェニレン部分が、 Q が $-C_1-C_8$ アルキル、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-ハロゲン$ 、 $-ニトロ$ または $-シアノ$ であって； m が0~4の範囲の整数である Q_m で置き換えられた p -アミノベンジルアルコール(PAB)ユニット(スキーム2および3参照)である。

【0308】

(スキーム1)

【0309】

【化122】



1つの実施形態において、非自己犠牲的スペーサーユニット($-Y-$)が $-Gly-Gly-$ である。もう1つの実施形態において、非自己犠牲的スペーサーユニット($-Y-$)は $-Gly-$ である。

【0310】

1つの実施形態において、スペーサーユニットが存在しない($y=0$)、薬物-リンカー化合物または薬物-リンカーリガンド結合体、またはその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物が提供される。

【0311】

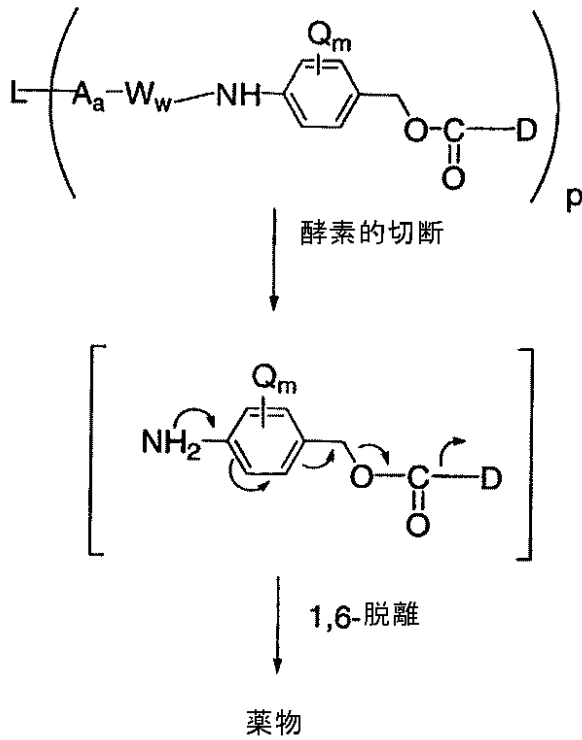
別法として、自己犠牲的スペーサーユニットを含有する例示的化合物は別の加水分解工程に対する必要性無くして $-D$ を放出することができる。この実施形態において、 $-Y-$ はPAB基のアミノ窒素原子を介して $-W_w-$ に連結され、かつカルボネート、カルバメートまたは他の基を介して直接的に $-D$ に連結されたPAB基である。いずれかの特定の理論またはメカニズムに拘束されるつもりはないが、スキーム2は、Tokiet al. (2002) J Org. Chem. 67:1866-1872によって支持されるカルバメートまたはカルボネート基を介して直接的に $-D$ に結合されたPAB基の薬物放出の可能なメカニズムを示す。

【0312】

(スキーム2)

【0313】

【化 1 2 3】



10

20

[式中、Qは $-C_1-C_8$ アルキル、 $-O-(C_1-C_8)$ アルキル)、 $-ハロゲン$ 、 $-ニトロ$ または $-シアノ$ であり；mは0～4の範囲の整数であり；およびpは1～約20の範囲である。]

いずれかの特定の理論またはメカニズムに拘束されるつもりはないが、スキーム3は、エーテルまたはアミン結合を介して直接的に $-D$ に結合したPAB基の薬物放出の可能なメカニズムを示す。

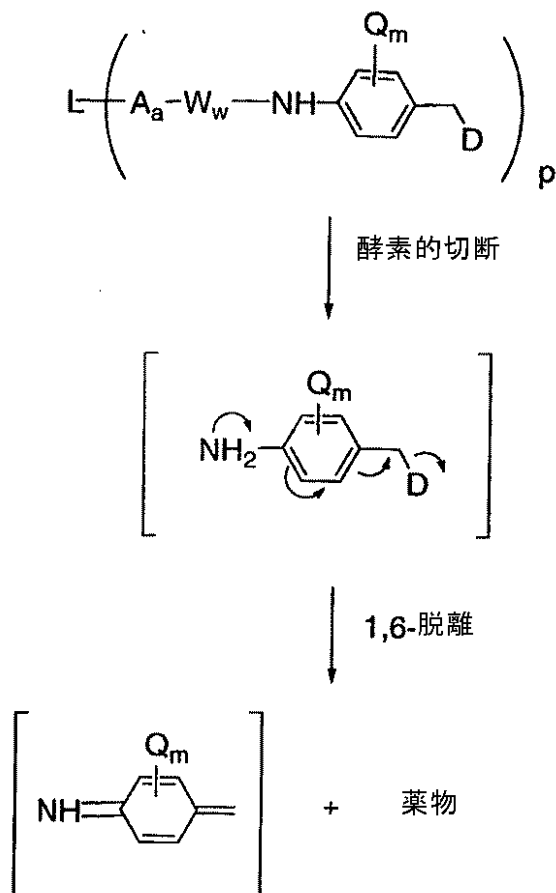
【0314】

(スキーム3)

【0315】

30

【化 1 2 4】



10

20

[式中、Qは $-C_1-C_8$ アルキル、 $-O-$ (C_1-C_8 アルキル)、 $-ハロゲン$ 、 $-ニトロ$ または $-シアノ$ であり；mは0～4の範囲の整数であり；およびpは1～約20の範囲である。]

自己犠牲的スペーサーの他の例は、限定されるものではないが、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体 (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) およびオルトまたはパラ-アミノベンジルアセタールのような、PAB基に電子的に同様である芳香族化合物を含む。置換されたおよび置換されていない4-アミノ酪酸アミド (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223)、適当に置換されたビシクロ [2. 2. 1] およびビシクロ [2. 2. 2] 環系 (Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815) および2-アミノフェニルプロピオン酸アミド (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867) のような、アミド結合の加水分解に際して環化を受けるスペーサーを用いることができる。グリシンの α -位置において置換されたアミン含有薬物の脱離 (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447) もまた例示的化合物で有用な自己犠牲的スペーサーの例である。

30

40

【0316】

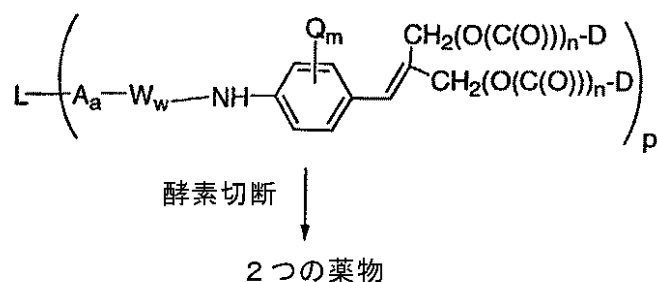
1つの実施形態において、スペーサーユニットはスキーム4に示された分岐ビス(ヒドロキシメチル)スチレン(BHMS)ユニットであり、これは、複数の薬物を取り込み、放出するのに用いることができる。

【0317】

(スキーム4)

【0318】

【化 1 2 5】



10

[式中、Qは $-C_1-C_8$ アルキル、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-ハロゲン$ 、 $-ニトロ$ または $-シアノ$ であり；mは0～4の範囲の整数であり；nは0または1であり；およびpは1～約20の範囲である。]

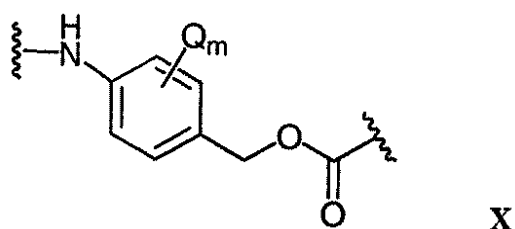
もう1つの実施形態において、該-D部位は同一である。さらにもう1つの実施形態において、該-D部位は異なる。

【0 3 1 9】

1つの態様において、スペーサーユニット $(-Y_y-)$ は式(X)～(X I I)：

【0 3 2 0】

【化 1 2 6】

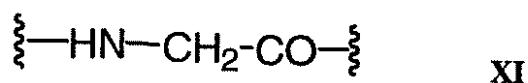


20

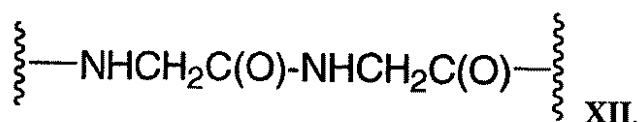
[式中、Qは $-C_1-C_8$ アルキル、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-ハロゲン$ 、 $-ニトロ$ または $-シアノ$ であり；およびmは0～4の範囲の整数である]；

【0 3 2 1】

【化 1 2 7】



および



30

によって表される。

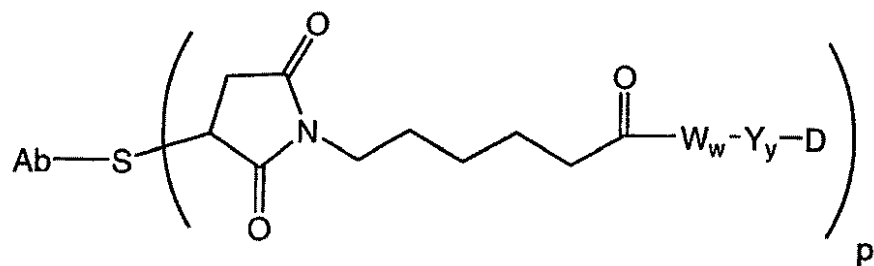
【0 3 2 2】

式 I a' および I c の抗体-薬物結合体化合物の例は：

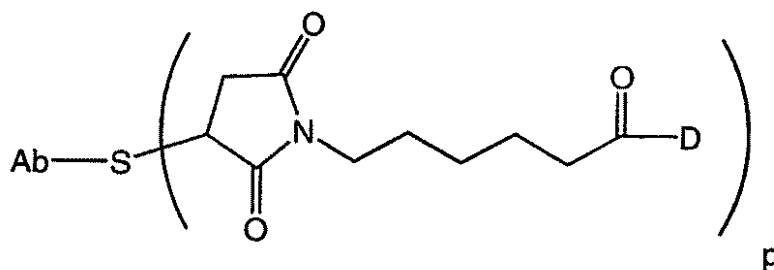
【0 3 2 3】

40

【化 1 2 8】



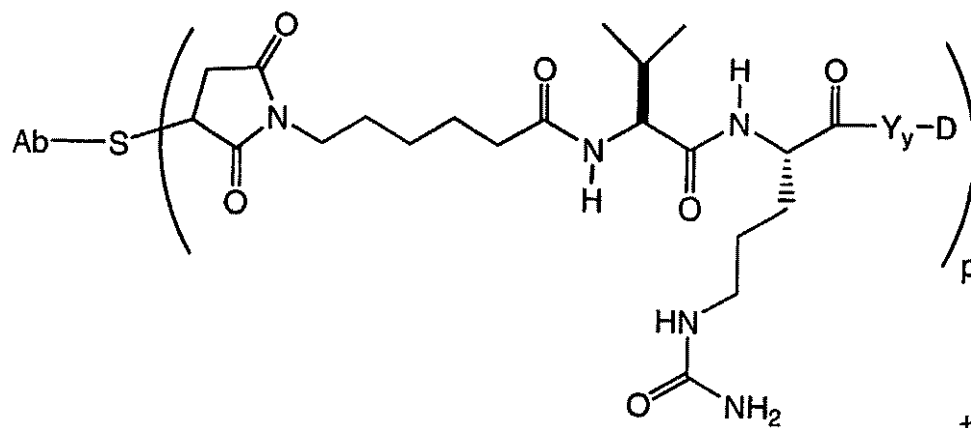
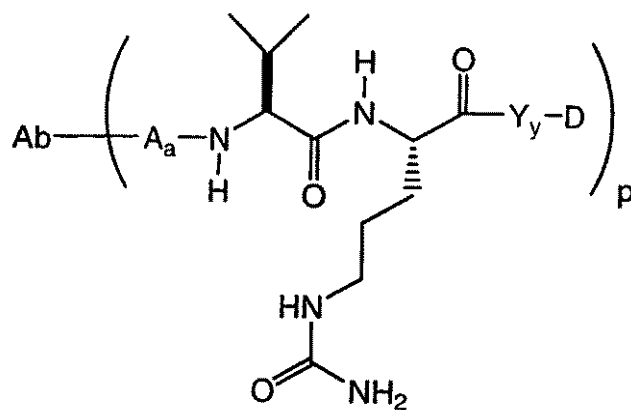
および ,



[式中、wおよびyは各々0である]、

【 0 3 2 4】

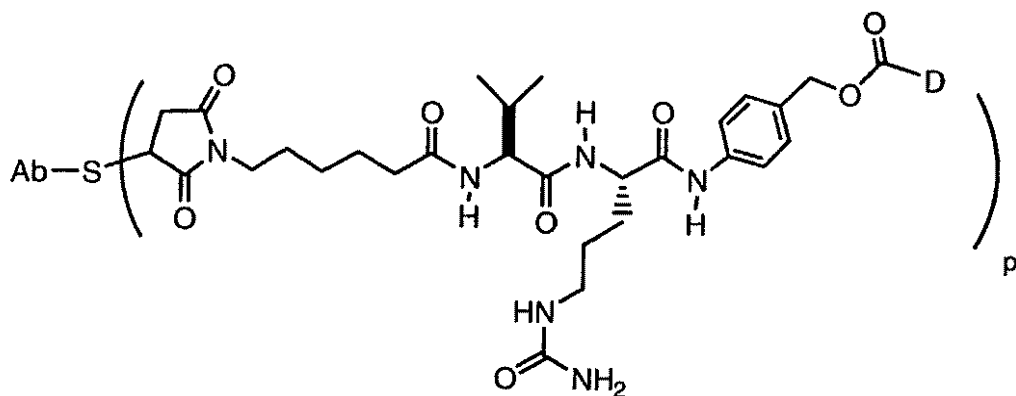
【化 1 2 9】



、および

【 0 3 2 5】

【化 1 3 0】



10

を含む。

【0 3 2 6】

(4. 4 薬物ユニット (部位))

抗体薬物結合体 (ADC) の薬物部分 (D) は、微小管ダイナミックス、GTP加水分解、および核および細胞分裂に干渉し (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45 (12) : 3580-3584)、抗癌 (米国特許第5663149号) および抗真菌活性 (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42 : 2961-2965) を有することが示されているドラスタチン/オーリスチンタイプのものである (米国特許第5635483号; 第5780588号)。

20

【0 3 2 7】

Dは、 $y = 1$ または 2 である場合はスペーサーユニットとで、 $y = 0$ である場合にはアミノ酸ユニットのC-末端カルボキシル基とで、 w および $y = 0$ の場合にはストレッチャーユニットのカルボキシル基とで、および a 、 w および $y = 0$ の場合には薬物ユニットのカルボキシル基とで結合を形成することができる窒素原子を有する薬物ユニット (部位) である。用語「薬物ユニット」および「薬物部分」は同義であって、本明細書中においては相互交換的に用いることができることが理解されるべきである。

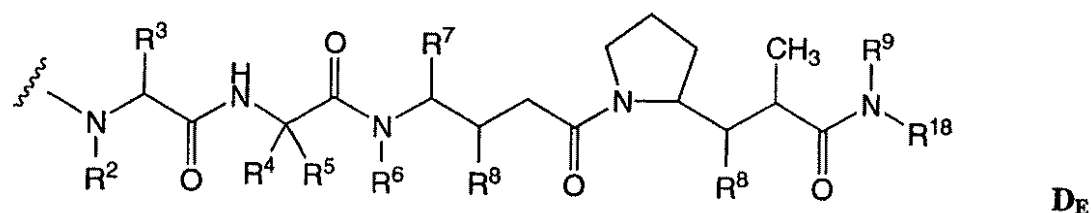
【0 3 2 8】

1つの実施形態において、 $-D$ は式 D_E または D_F いずれかである：

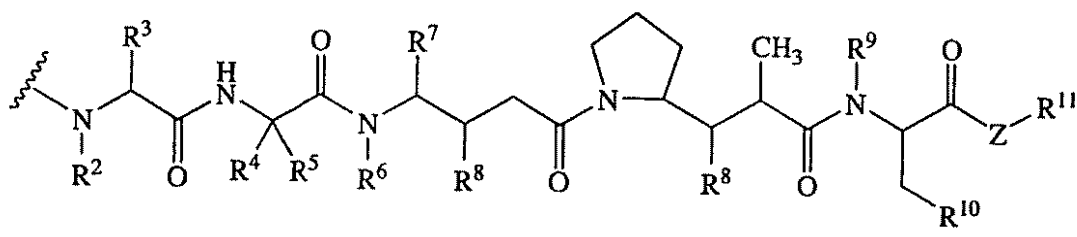
30

【0 3 2 9】

【化 1 3 1】

 D_E

40

 D_F

[式中、独立して、各位置において：

R^2 はHおよび $C_1 - C_8$ アルキルから選択され；

50

R^3 はH、 C_1-C_8 アルキル、 C_3-C_8 炭素環、アリール、 C_1-C_8 アルキル-アリール、 C_1-C_8 アルキル- (C_3-C_8 炭素環)、 C_3-C_8 複素環および C_1-C_8 アルキル- (C_3-C_8 複素環) から選択され；

R^4 はH、 C_1-C_8 アルキル、 C_3-C_8 炭素環、アリール、 C_1-C_8 アルキル-アリール、 C_1-C_8 アルキル- (C_3-C_8 炭素環)、 C_3-C_8 複素環および C_1-C_8 アルキル- (C_3-C_8 複素環) から選択され；

R^5 はHおよびメチルから選択され；

あるいは R^4 および R^5 は一緒になって炭素環を形成し、かつ式- (CR^aR^b)_n-を有し、ここで、 R^a および R^b は、独立して、H、 C_1-C_8 アルキルおよび C_3-C_8 炭素環から選択され、nは2、3、4、5および6から選択され；

10

R^6 はHおよび C_1-C_8 アルキルから選択され；

R^7 はH、 C_1-C_8 アルキル、 C_3-C_8 炭素環、アリール、 C_1-C_8 アルキル-アリール、 C_1-C_8 アルキル- (C_3-C_8 炭素環)、 C_3-C_8 複素環および C_1-C_8 アルキル- (C_3-C_8 複素環) から選択され；

各 R^8 は、独立して、H、OH、 C_1-C_8 アルキル、 C_3-C_8 炭素環および O- (C_1-C_8 アルキル) から選択され；

R^9 はHおよび C_1-C_8 アルキルから選択され；

R^{10} はアリールまたは C_3-C_8 複素環から選択され；

ZはO、S、NH、または NR^{12} であり、ここで、 R^{12} は C_1-C_8 アルキルであり；

20

R_{11} はH、 C_1-C_{20} アルキル、アリール、 C_3-C_8 複素環、- ($R^{13}O$)_m- R^{14} 、または- ($R^{13}O$)_m-CH (R^{15})₂ から選択され；

mは1~1000の範囲の整数であり；

R_{13} は C_2-C_8 アルキルであり；

R_{14} はHまたは C_1-C_8 アルキルであり；

R_{15} の各出現は、独立して、H、COOH、- (CH_2)_n-N (R^{16})₂、- (CH_2)_n-SO₃H、または- (CH_2)_n-SO₃- C_1-C_8 アルキルであり；

R^{16} の各出現は、独立して、H、 C_1-C_8 アルキル、または- (CH_2)_n-COOHであり；

R^{18} は- C (R^8)₂ - C (R^8)₂ - アリール、- C (R^8)₂ - C (R^8)₂ - (C_3-C_8 複素環)、および- C (R^8)₂ - C (R^8)₂ - (C_3-C_8 炭素環) から選択され；および

30

nは0~6の範囲の整数である]

1つの実施形態において、 R^3 、 R^4 および R^7 は、独立して、イソプロピルまたは sec-ブチルであって、 R^5 は-Hである。例示的な実施形態において、 R^3 および R^4 は各々イソプロピルであり、 R^5 はHであって、 R^7 は sec-ブチルである。

【0330】

もう1つの実施形態において、 R^2 および R^6 は各々メチルであって、 R^9 はHである。

【0331】

40

なおもう1つの実施形態において、 R^8 の各出現は-OCH₃である。

【0332】

例示的な実施形態において、 R^3 および R^4 は各々イソプロピルであり、 R^2 および R^6 は各々メチルであり、 R^5 はHであり、 R^7 は sec-ブチルであり、 R^8 の各出現は-OCH₃であって、 R^9 はHである。

【0333】

1つの実施形態において、Zは-O-または-NH-である。

【0334】

1つの実施形態において、 R^{10} はアリールである。

【0335】

50

例示の実施形態において、 R^{10} はフェニルである。

【0336】

例示的な実施形態において、Zが-O-である場合、 R^{11} はH、メチルまたはt-ブチルである。

【0337】

1つの実施形態において、Zが-NHである場合、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ であり、ここで、 R^{15} は $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ であって、 R^{16} は $-C_1-C_8$ アルキルまたは $-(CH_2)_n-COOH$ である。

【0338】

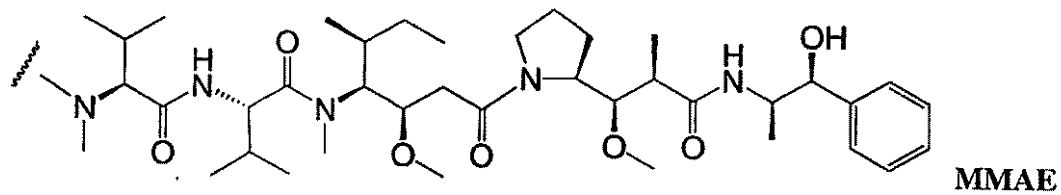
もう1つの実施形態において、Zが-NHである場合、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ であり、ここで、 R^{15} は $-(CH_2)_n-SO_3H$ である。 10

【0339】

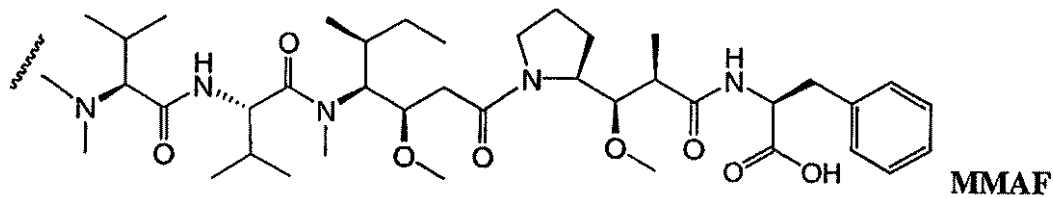
例示的な薬物ユニット(-D)は以下の構造を有する薬物ユニット：

【0340】

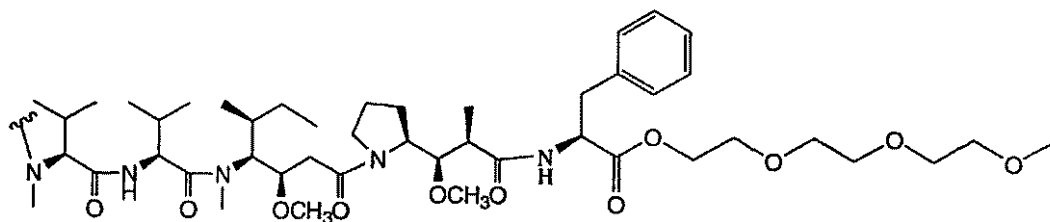
【化132】



20

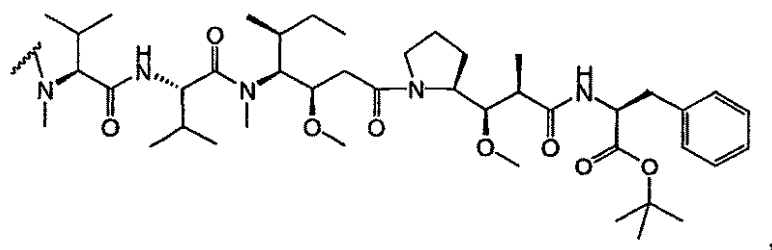


30

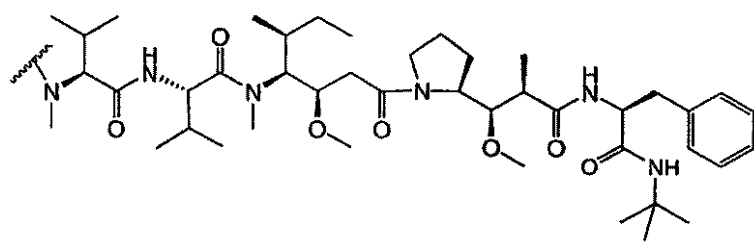


【0341】

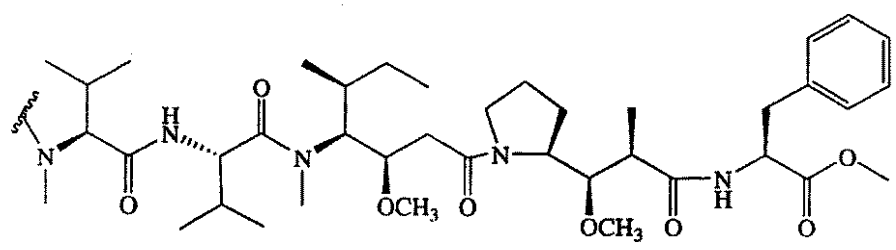
【化 1 3 3】



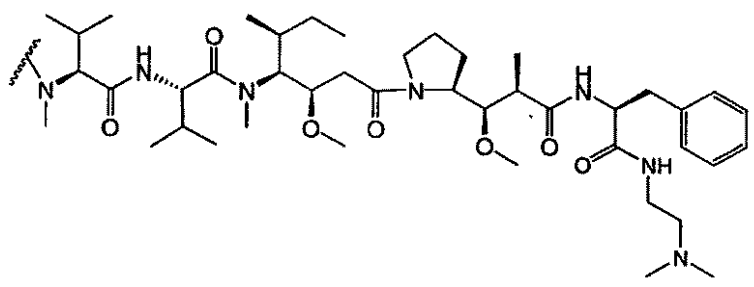
10



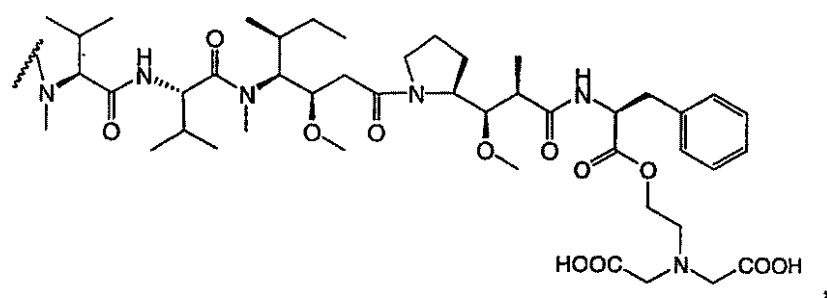
20



30

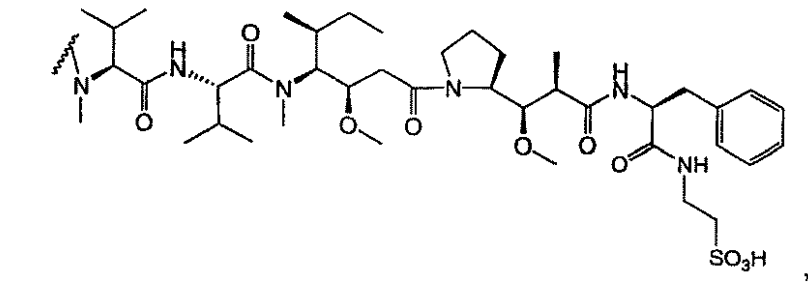


40

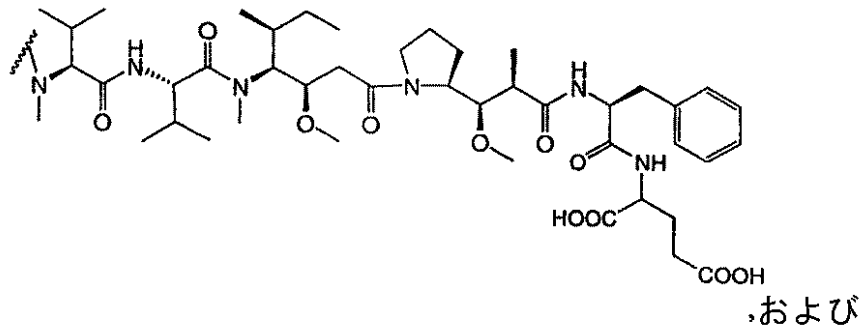


【 0 3 4 2】

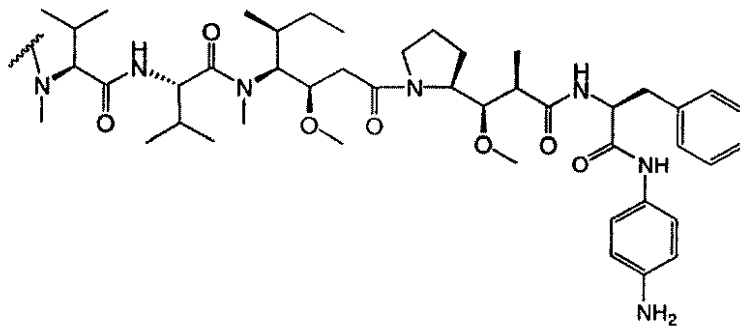
【化 1 3 4】



10



20



および

30

およびその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物を含む。

【0 3 4 3】

1つの態様において、限定されるものではないが、前記したトリエチレングリコールエステル (TEG) のような親水性基を R^{11} において薬物ユニットに結合させることができる。理論に拘束されるつもりはないが、該親水性基は薬物ユニットの内部化および非凝集を助ける。

【0 3 4 4】

(4. 5 リガンドユニット)

リガンドユニット (L-) は、その範囲内に、レセプター、抗原、または与えられた標的細胞集団と会合した他の受容性部位と結合し、または反応的に会合し、またはそれと複合体化するリガンド (L) のいずれかのユニットを含む。リガンドは、治療的にまたはそうでなければ生物学的に修飾されることが求められる細胞集団の部位に結合し、または該部位と複合体化し、または反応する分子である。1つの態様において、リガンドユニットは、薬物を、リガンドユニットがそれと反応する特定の標的細胞集団へ送達するように作用する。そのようなリガンドは、限定されるものではないが、例えば、抗体、抗体フラグメント、より小さな分子量のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチド、レクチン、糖タンパク質、非ペプチド、ビタミン、(限定されるものではないが、トランスフェリンのような) 栄養輸送分子、またはいずれかの他の細胞結合分子または物質を含む。

40

【0 3 4 5】

リガンドユニットは、ストレッチャーユニット、アミノ酸ユニット、スペーサーユニッ

50

ト、または薬物ユニットに対する結合を形成することができる。リガンドユニットは、リガンドのヘテロ原子を介してリンカーに対する結合を形成することができる。リガンドユニットに存在することができるヘテロ原子は、（１つの実施形態においては、リガンドのスルフヒドリル基からの）硫黄、（１つの実施形態においては、リガンドのカルボニル、カルボキシルまたはヒドロキシル基からの）酸素、および（１つの実施形態においては、リガンドの第一級または第二級アミノ基からの）窒素を含む。これらのヘテロ原子はリガンドの天然状態におけるリガンド、例えば、天然に生じる抗体に存在することができ、あるいは化学的修飾を介してリガンドに導入することができる。

【0346】

１つの実施形態において、リガンドはスルフヒドリル基を有し、該リガンドは、スルフヒドリル基の硫黄原子を介してリンカーユニットに結合する。

10

【0347】

さらにもう１つの態様において、リガンドは、１以上のスルフヒドリル基を導入するように化学的に修飾することができる１以上のリシン残基を有する。リガンドユニットは、スルフヒドリル基の硫黄原子を介してリンカーユニットに結合する。リシンを修飾するのに用いることができる試薬は、限定されるものではないが、S-アセチルチオ酢酸N-スクシンイミジル（SATA）および2-イミノチオラン塩酸塩（Traut試薬）を含む。

【0348】

もう１つの実施形態において、リガンドは、１以上のスルフヒドリル基を有するように化学的に修飾することができる１以上の炭水化物基を有することができる。リガンドユニットは、スルフヒドリル基の硫黄原子を介して、ストレッチャーユニットのようなリンカーユニットに結合することができる。

20

【0349】

さらにもう１つの実施形態において、リガンドは、アルデヒド（-CHO）基を供するように酸化することができる１以上の炭水化物基を有することができる（例えば、Laguzza, et al., J. Med. Chem., 1989, 32 (3), 548-55参照）。対応するアルデヒドは、ストレッチャー上の反応性部位とで結合を形成することができる。リガンド上のカルボニル基と反応することができるストレッチャー上の反応性部位は、限定されるものではないが、ヒドラジンおよびヒドロキシルアミンを含む。薬物ユニットの結合または会合のためのタンパク質の修飾用の他のプロトコルは、ここに引用して援用する、Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002)に記載されている。

30

【0350】

有用な非-免疫反応性タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドリガンドは、限定されるものではないが、トランスフェリン、上皮成長因子（「EGF」）、ボンベシン、ガストリン、ガストリン-放出ペプチド、血小板-由来成長因子、IL-2、IL-6、TGF- α およびTGF- β のようなトランスフォーミング成長因子（「TGF」）、ワクシニア成長因子（「VGF」）、インスリンおよびインスリン様成長因子IおよびII、レクチン、および低密度リボタンパク質からのアポプロテインを含む。

40

【0351】

有用なポリクローナル抗体は、免疫化動物の血清に由来する抗体分子の不均一な集団である。当該分野でよく知られた種々の手法を、注目する抗原に対するポリクローナル抗体の生産で用いることができる。例えば、ポリクローナル抗体の生産のために、限定されるものではないが、ウサギ、マウス、ラットおよびモルモットを含めた種々の宿主動物を、注目する抗原またはその誘導体での注射によって免疫化することができる。宿主種に応じて、限定されるものではないが、フロイントの（完全および不完全）アジュバント、水酸化アルミニウムのような鉱物ゲル、リソレシチンのような表面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンベッドヘモシアニ

50

ン、ジニトロフェノール、およびBCG (b a c i l l e C a l m e t t e - G u e r i n) およびCorynebacterium parvumのような潜在的に有用なヒトアジュバントを含めた種々のアジュバントを用いて、免疫学的応答を増加させることができる。そのようなアジュバントも当該分野でよく知られている。

【0352】

有用なモノクローナル抗体は、特定の抗原決定基（例えば、癌細胞抗原、ウイルス抗原、微生物抗原、タンパク質、ペプチド、炭水化物、化学物質、核酸またはそのフラグメント）に対する抗体の均一な集団である。注目する抗原に対するモノクローナル抗体 (mAb) は、培養中の連続細胞系による抗体分子の生産を供する当該分野で知られたいずれかの技術を用いることによって調製することができる。これらは、限定されるものではないが、Koehler and Milsteinによって元来記載されたハイブリドーマ技術 (1975, Nature 256, 495-497)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72)、およびEBV-ハイブリドーマ技術 (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) を含む。そのような抗体はIgG、IgM、IgE、IgAおよびIgDを含めたいずれかの免疫グロブリンクラスおよびそのいずれかのサブクラスであってもよい。本発明で用いるmAbを生産するハイブリドーマはインビトロまたはインビボで培養することができる。

10

【0353】

有用なモノクローナル抗体は、限定されるものではないが、ヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、抗体フラグメント、またはキメラヒトーマウス（または他の種）モノクローナル抗体を含む。ヒトモノクローナル抗体は当該分野で知られた多数の技術のいずれによって作成することもできる（例えば、Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4, 72-79; およびOlsson et al., 1982, Meth. Enzymol. 92, 3-16）。

20

【0354】

抗体は二特異的抗体でもあり得る。二特異的抗体を作製する方法は当該分野で知られている。全長二特異的抗体の伝統的な生産は2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現に基づき、そこでは、2つの鎖は異なる特異性を有する (Milstein et al., 1983, Nature 305:537-539)。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな分類のため、これらのハイブリドーマ (クアドローマ) は、そのうち1つのみが正しい二特異的構造を有する10の異なる抗体分子の潜在的混合物を生じる。同様な手法が国際公開番号WO 93/08829およびTraunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991) に開示されている。

30

【0355】

異なるアプローチに従い、所望の結合特異性を持つ抗体可変ドメイン（抗体-抗原組合せ部位）を免疫グロブリン定常ドメインの配列に融合させる。融合は、好ましくは、ヒンジの少なくとも一部、C_H2およびC_H3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインのものである。融合の少なくとも1つに存在する、軽鎖結合に必要な部位を含有する第一の重鎖定常領域 (C_H1) を有するのが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードする配列を持つ核酸および、所望であれば、免疫グロブリン軽鎖は別々の発現ベクターに挿入され、適当な宿主生物に共トランスフェクトされる。これは、構築で用いる3つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率を供する場合の実施形態において、3つのポリペプチドフラグメントの相互割合を調整するにおいて大きな柔軟性を提供する。しかしながら、等しい比率の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現の結果高い収率が得られる場合、または比率が特定の有意性のものでない場合、2つのまたは全ての3つのポリペプチド鎖についてのコーディング配列を1つの発現ベクターに挿入することが可能である。

40

50

【0356】

このアプローチの実施形態において、二特異的抗体は、1つのアームにおける第一の結合特異性を持つハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他のアームにおける（第二の結合特異性を供する）ハイブリッド免疫グロブリン重鎖－軽鎖対を有する。この非対称構造は、望まない免疫グロブリン鎖組合せからの所望の二特異的化合物の分離を容易とする。というのは、二特異的分子の1つの半分のみ（ここに引用して援用する国際公開番号WO 94/04690）が分離の容易な方法を提供するからである。

【0357】

二特異的抗体を生じさせるためのさらなる詳細については、Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 1986, 121:210; Rodrigues et al., 1993, *J. of Immunology* 151:6954-6961; Carter et al., 1992, *Bio/Techonology* 10:163-167; Carter et al., 1995, *J. of Hematotherapy* 4:463-470; Merchant et al., 1998, *Nature Biotechnology* 16:677-681 参照。そのような技術を用い、二特異的抗体を、本明細書中で定義した病気の治療または予防で用いるために調製することができる。

【0358】

二機能性抗体もまた欧州特許出願番号EPA 0 105 360に記載されている。この文献で開示されるように、ハイブリッドまたは二機能的抗体は生物学的に、すなわち、細胞融合技術によって、または特に架橋剤またはジスルフィドブリッジ形成試薬にて化学的に誘導することができ、それは全抗体またはそのフラグメントを含むことができる。そのようなハイブリッド抗体を得るための方法は、例えば、共にここに引用して援用する国際公開WO 83/03679および欧州特許公開番号EPA 0 215 577に開示されている。

【0359】

抗体は、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抗体の機能的に活性なフラグメント、誘導体またはアナログ、または腫瘍細胞またはマトリックスに結合した他の抗体であり得る。この点に関し、「機能的に活性な」は、該フラグメント、誘導体またはアナログが、該フラグメント、誘導体またはアナログがそれから誘導された抗体が認識したのと同じの抗原を認識する抗－抗－イディオタイプ抗体を誘導することができることを意味する。具体的には、例示的な実施形態において、免疫グロブリン分子のイディオタイプの抗原性は、フレームワーク、および該抗原を特異的に認識するCDR配列に対してC－末端側にあるCDR配列の欠失によって増強させることができる。いずれのCDR配列が抗原に結合するかを決定するために、CDR配列を含有する合成ペプチドを、当該分野で知られたいずれかの結合アッセイ方法によって抗原との結合アッセイで用いることができる（例えば、BIAコアアッセイ）（例えば、Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第15版, National Institute of Health, Bethesda, Md; Kabat et al., 1980, *J. of Immunology* 125(3):961-969 参照）。

【0360】

他の有用な抗体は、限定されるものではないが、可変領域、軽鎖定常領域を含有するF(ab')₂フラグメントのような抗体のフラグメントを含み、重鎖のCH1ドメインは、F(ab')₂フラグメントのジスルフィドブリッジを減少させることによって生じさせることができる、抗体分子およびFabフラグメントのペプシン消化によって生じさせることができる。他の有用な抗体は抗体の重鎖および軽鎖ダイマー、または（例えば、米国特許第4946778号; Bird, 1988, *Science* 242:423-42; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sc*

i. USA 85:5879-5883; および Ward et al., 1989, Nature 334:544-54に記載された) Fvs または単一鎖抗体 (SCA) のようなそのいずれかの最小フラグメント、または抗体と同一の特異性を持ついずれかの他の分子である。

【0361】

加えて、標準的な組換えDNA技術を用いて作製する、ヒトおよび非ヒト部分双方を含むキメラおよびヒト化モノクローナル抗体のような組換え抗体は有用な抗体である。キメラ抗体は、ネズミモノクローナルおよびヒト免疫グロブリン定常領域に由来する可変領域を有するもののような、異なる部分が異なる動物種に由来する分子である (例えば、ここに引用してその全体を援用する Cabilly et al., 米国特許第4816567号; および Boss et al., 米国特許第4,816397号参照)。ヒト化抗体は、非ヒト種からの1以上の相補性決定領域 (CDR)、およびヒト免疫グロブリン分子からのフレームワーク領域を有する非ヒト種からの抗体分子である (例えば、ここに引用してその全体を援用する Queen, 米国特許第5,585,089号参照)。そのようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、その各々をここに引用してその全体を援用する、例えば、国際公開番号 WO 87/02671; 欧州特許出願番号184,187; 欧州特許公開番号171496; 欧州特許公開番号173494; 国際公開番号 WO 86/01533; 米国特許第4816567号; 欧州特許公開番号12,023; Berter et al., 1988, Science 240:1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Cancer. Res. 47:999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314:446-449; および Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; 米国特許第5225539; Jones et al., 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan et al., (1988) Science 239:1534; および Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060に記載された方法を用いて、当該分野で知られた組換えDNA技術によって生産することができる。

【0362】

完全なヒト抗体は特に望ましく、内因性免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子を発現できないが、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて生産することができる。トランスジェニックマウスを選択された抗原、例えば、本発明のポリペプチドの全てまたは部分で通常の様式で免疫化する。該抗原に向けられたモノクローナル抗体は慣用的なハイブリドーマ技術を用いて得ることができる。トランスジェニックマウスによって保有されたヒト免疫グロブリン導入遺伝子はB細胞の分化の間に再変性され、引き続いて、クラススイッチングおよび体細胞突然変異を受ける。かくして、そのような技術を用い、治療的に有用な IgG、IgA、IgM および IgE 抗体を生産することが可能である。ヒト抗体を生産するためのこの技術の概観については Longberg and Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93参照)。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を生産するためのこの技術、およびそのような抗体を生産するためのプロトコルの詳細な議論については、例えば、その各々をここに引用してその全体を援用する米国特許第5625126号; 第5633425号; 第5569825号; 第5661016号; 第5545806号参照。他のヒト抗体は、例えば、Abgenix, Inc. (Freemont, CA) および Genpharm (San Jose, CA) から商業的に入手することができる。

【0363】

選択されたエピトープを認識する完全にヒトの抗体は、「ガイドされた選択」といわれる技術を用いて生じさせることができる。このアプローチにおいては、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えば、マウス抗体を用いて、同一エピトープを認識する完全にヒトの抗体の選択をガイドする (Jespersen et al. 1994) Biotechnology 12:899-903)。また、ヒト抗体はファージディスプレイライブラリーを含めた当該分野で知られた種々の技術を用いて生産することもできる (Hogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991); Quan, M. P. and Carter, P. 2002. The rise of monoclonal antibodies as therapeutics. In Anti-IgG and Allergic Disease, Jardieu, P. M. and Fick Jr., R. B編, Marcel Dekker, New York, NY, 20章, pp. 427-469)。

10

【0364】

他の実施形態において、抗体は抗体の融合タンパク質、またはその機能的に活性なフラグメントである、例えば、そこでは、抗体は共有結合（例えば、ペプチド結合）を介して、N-末端またはC-末端いずれかにおいて、抗体ではないもう1つのタンパク質のアミノ配列（好ましくはタンパク質の少なくとも10、20または50アミノ酸部分における、その部分）に融合される。好ましくは、抗体またはそのフラグメントは定常ドメインのN-末端において他のタンパク質に共有結合連結される。

20

【0365】

抗体は、共有結合が抗体がその抗原結合免疫特異性を保持するのを可能とする限り、いずれかのタイプの分子の共有結合によって修飾されるアナログおよび誘導体を含む。例えば、限定されるものではないが、抗体の誘導体およびアナログは、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペジル化、リン酸化、アミド化、公知の保護／ブロック基により誘導体化、タンパク質分解切断、細胞抗体ユニットまたは他のタンパク質への連結などによって、さらに修飾されたものを含む。限定されるものではないが、特異的化学的切断、アセチル化、ホルミル化、スナカマイシンの存在下での代謝的合成を含めた多数の化学的修飾のいずれかを、公知の技術によって行うことができる。加えて、アナログまたは誘導体は1以上の非天然アミノ酸を含有することができる。

30

【0366】

抗体は、Fcレセプターと相互作用するアミノ酸残基における修飾（例えば、置換、欠失または負荷）を有する抗体を含む。特に、抗体は、抗-FcドメインおよびFcRnレセプターの間の相互作用に参与することが同定されたアミノ酸残基における修飾を有する抗体を含む（例えば、ここに引用してその全体を援用する国際公開番号WO 97/34631参照）。癌細胞抗原に対して免疫特異的な抗体は、例えば、Genentech (San Francisco, CA) から商業的に入手することができるか、あるいは、例えば、化学合成または組換え発現技術のような当業者に知られたいずれかの方法によって生産することができる。癌細胞抗原に対して免疫特異的な抗体をコードするヌクレオチド配列は、例えば、GenBankデータベースまたはそのようなデータベース、文献刊行物から、またはルーチン的なクローニングおよび配列決定によって得ることができる。

40

【0367】

特異的な実施形態において、癌の治療または予防用の公知の抗体を用いることができる。癌細胞抗原に対して免疫特異的な抗体は商業的に入手することができるか、あるいは例えば組換え発現技術のような当業者に知られたいずれかの方法によって生産することができる。癌細胞抗原に対して免疫特異的な抗体をコードするヌクレオチド配列は、例えば、GenBankデータベースまたはそのようなデータベース、文献刊行物から、またはルーチン的なクローニングおよび配列決定によって得ることができる。癌の治療で入手可能な抗体の例は、限定されるものではないが、ヒト化抗-HER2モノクローナル抗体、転

50

移行性乳癌を持つ患者の治療のためのHERCEPTIN（登録商標）（トラスツズマブ；Genentech）；非－ホジキンリンパ腫を持つ患者の治療のためのキメラ抗－CD20モノクローナル抗体であるRITUXAN（登録商標）（リツキシマブ；Genentech）；卵巣癌の治療のためのネズミ抗体であるOvaRex（AltaRex Corporation, MA）；結直腸癌の治療のためのネズミIgG_{2a}抗体であるPanorex（Glaxo Wellcome, NC）；頭部および頸部癌のような、上皮成長因子陽性癌の治療のための抗－EGFR IgGキメラ抗体であるCetuximab Erbitux（Imclone Systems Inc., NY）；肉腫の治療のためのヒト化抗体であるVitaxin（MedImmune, Inc. MD）；慢性リンパ系白血病（CLL）の治療のためのヒト化IgG₁抗体であるCampath I/H（Leukosite, MA）；急性骨髄性白血病（AML）の治療のためのヒト化抗－CD33 IgG抗体であるSmart MI95（Protein Design Labs, Inc., CA）；非－ホジキンリンパ腫の治療のためのヒト化抗－CD22 IgG抗体であるLymphoCide（Immunomedics, Inc., NJ）；非－ホジキンリンパ腫の治療のためのヒト化抗－HLA－DR抗体であるSmart ID10（Protein Design Labs, Inc., CA）；非－ホジキンリンパ腫の治療のための放射性標識ネズミ抗－HLA－Dr10抗体であるOncolym（Techniclone, Inc., CA）；ホジキン病または非－ホジキンリンパ腫の治療のためのヒト化抗－CD2 mAbであるAllomune（BioTransplant, CA）；肺および結直腸癌の治療のための抗－VEGFヒト化抗体であるAvastin（Genentech, Inc., CA）；非－ホジキンリンパ腫の治療のための抗－CD22抗体であるEpratuzamab（Immunomedics, Inc., NJ and Amgen, CA）；および結直腸癌の治療のためのヒト化抗－CEA抗体であるCEAcide（Immunomedics, NJ）を含む。

【0368】

癌の治療で有用な他の抗体は、限定されるものではないが、以下の抗原に対する抗体を含む：CA125（卵巣）、CA15－3（癌腫）、CA19－9（癌腫）、L6（癌腫）、Lewis Y（癌腫）、Lewis X（癌腫）、αフェトプロテイン（癌腫）、CA242（結直腸）、胎盤アルカリ性ホスファターゼ（癌腫）、前立腺特異的抗原（前立腺）、前立腺酸ホスファターゼ（前立腺）、上皮成長因子（癌腫）、MAGE－1（癌腫）、MAGE－2（癌腫）、MAGE－3（癌腫）、MAGE－4（癌腫）、抗－トランスフェリンレセプター（癌腫）、p97（メラノーマ）、MUC1－KLH（乳癌）、CEA（結直腸）、gp100（メラノーマ）、MART1（メラノーマ）、PSA（前立腺）、IL－2レセプター（T－細胞白血病およびリンパ腫）、CD20（非－ホジキンリンパ腫）、CD52（白血病）、CD33（白血病）、CD22（リンパ腫）、ヒト絨毛ゴナドトロピン（癌腫）、CD38（多発性ミエローマ）、CD40（リンパ腫）、ムチン（癌腫）、P21（癌腫）、MPG（メラノーマ）、およびNeu癌遺伝子産物（癌腫）。いくつかの特異的な有用な抗体は、限定されるものではないが、BR96 mAb（Trail, P. A., Willner, D., Lasch, S. J., Henderson, A. J., Hofstead, S. J., Casazza, A. M., Firestone, R. A., Hellstroem, I., Hellstroem, K. E., 「Cure of Xenografted Human Carcinomas by BR96－Doxorubicin Immun conjugates」 Science 1993, 261, 212－215）、BR64（Trail, PA, Willner, D, Knipe, J., Henderson, A. J., Lasch, S. J., Zoekler, M. E., Trailsmith, M. D., Doyle, T. W., King, H. D., Casazza, A. M., Braslawsky, G. R., Brown, J. P., Hofstead, S. J., (Greenfield, R. S., Firestone, R. A., Mosure, K., Kadow, D. F., Yang, M. B., Hellstrom, K. E.

, and Hellstrom, I. 「Effect of Linker Variation on the Stability, Potency, and Efficacy of Carcinoma-reactive BR64-Doxorubicin Immunoconjugates」 *Cancer Research* 1997, 57, 100-105, S2C6 mAbのようなCD40抗原に対するmAb (Francisco, J. A., Donaldson, K. L., Chace, D. Siegall, C. B., and Wahl, A. F. 「Agonistic properties and in vivo antitumor activity of the anti-CD-40 antibody, SGN-14」 *Cancer Res.* 2000, 60, 3225-3231)、1F6 mAbおよび2F2 mAbのようなCD70抗原に対するmAb、およびAC10のようなCD30抗原に対するmAb (Bowen, M. A., Olsen, K. J., Cheng, L., Avila, D., and Podack, E. R. 「Functional effects of CD30 on a large granular lymphoma cell line YT」 *J. Immunol.*, 151, 5896-5906, 1993; Wahl et al., 2002 *Cancer Res.* 62 (13): 3736-42)を含む。腫瘍関連抗原に結合する多くの他の内部化抗体を用いることができ、それらはレビューされている (Franke, A. E., Sievers, E. L., and Scheinberg, D. A., 「Cell surface receptor-targeted therapy of acute myeloid leukemia: a review」 *Cancer Biother Radiopharm.* 2000, 15, 459-76; Murray, J. L., 「Monoclonal antibody treatment of solid tumors: a coming of age」 *Semin Oncol.* 2000, 27, 64-70; Breitling, F., and Dubel, S., *Recombinant Antibodies*, John Wiley, and Sons, New York, 1998)。

【0369】

ある実施形態において、抗体はトラスツズマブ (全長, ヒト化抗-HER2 (MW 145167))、Herceptin F(ab')₂ (酵素的に抗-HER2から誘導 (MW 100000))、4D5 (全長, ネズミ抗HER2ハイブリドーマから)、rh4D5 (一過的に発現された全長ヒト化抗体)、rhFab4D5 (組換えヒト化Fab (MW 47738))、4D5Fc8 (全長, ネズミ抗HER2, 突然変異したFcRn結合ドメインを持つ)、またはHg (「Hingeless」全長ヒト化4D5, セリンに突然変異した重鎖ヒンジシステインを持つ; E. coliで発現 (従って、非-グリコシル化)) ではない。

【0370】

もう1つの特別な実施形態において、自己免疫疾患の治療または予防のための公知の抗体が本発明の組成物および方法に従って用いられる。自己免疫抗体を生産するのを担う細胞の抗原に対して免疫特異的な抗体はいずれかの組織 (例えば、大学の科学者または会社) から得ることができるか、あるいは例えば、化学合成または組換え発現技術のような当業者に知られたいずれかの方法によって生産することができる。もう1つの実施形態において、有用な抗体は自己免疫疾患の治療で免疫特異的であり、限定されるものではないが、抗-核抗体; 抗-ds DNA; 抗-ss DNA、抗-カルジオリピン抗体 IgM、IgG; 抗-リン脂質抗体 IgM、IgG; 抗-SM抗体; 抗-ミトコンドリア抗体; 甲状腺抗体; ミクロソーム抗体; チログロブリン抗体; 抗-SCl-70; 抗-Jo; 抗-U₁RNP; 抗-La/SSB; 抗-SSA; 抗-SSB; 抗-ペリタル細胞抗体; 抗-ヒストン; 抗-RNP; C-ANCA; P-ANCA; 抗-動原体; 抗-フィブリリン、および抗-GBM抗体を含む。

【0371】

ある実施形態において、有用な抗体は、活性化されたリンパ球で発現されるレセプターまたはレセプター複合体双方に結合することができる。該レセプターまたはレセプター複合体は免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、TNFレセプタースーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカインレセプター、ケモカインレセプター、主要組織適合性タンパク質、レシチン、または補体制御タンパク質を含むことができる。適当な免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーの非限定的例はCD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD22、CD28、CD79、CD90、CD152/CTLA-4、PD-1およびICOSである。適当なTNFレセプタースーパーファミリーメンバーの非限定的例はCD27、CD40、CD95/Fas、CD134/OX40、CD137/4-1BB、TNF-R1、TNFR-2、RANK、TACI、BCMA、オステオプロテゲリン、Apo2/TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、TRAIL-R4およびAPO-3である。安定なインテグリンの非限定的例はCD11a、CD11b、CD11c、CD18、CD29、CD41、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD103およびCD104である。適当なレクチンの非限定的例はC-タイプ、S-タイプおよびI-タイプのレクチンである。

【0372】

1つの実施形態において、リガンドは、自己免疫疾患に関連する活性化されたリンパ球に結合する。

【0373】

もう1つの特別な実施形態において、ウイルスまたは微生物抗原に対して免疫特異的な有用なリガンドはモノクローナル抗体である。抗体はキメラ、ヒト化またはヒトモノクローナル抗体であり得る。本明細書中で用いるように、用語「ウイルス抗原」は、限定されるものではないが、免疫応答を誘導することができるいずれかのウイルスペプチド、ポリペプチドタンパク質（例えば、HIV gp120、HIV nef、RSV F糖タンパク質、インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ、インフルエンザウイルスヘマグルチミン、HTLVタックス、単純疱疹ウイルス糖タンパク質（例えば、gB、gC、gDおよびgE）およびB型肝炎表面抗原）を含む。本明細書中で用いるように、用語「微生物抗原」は、限定されるものではないが、免疫応答を誘導することができるいずれかの微生物ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖、多糖または脂質分子（例えば、LPSおよび被膜多糖5/8を含めた細菌、真菌、病原性原生動物、または酵母ポリペプチド）を含む。

【0374】

ウイルスまたは微生物抗原に対して免疫特異的な抗体は、例えば、BD Biosciences (San Francisco, CA)、Chemicon International, Inc. (Temecula, CA)、またはVector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA)から商業的に入手することができるか、あるいは例えば、化学合成または組換え発現技術のような当業者に知られたいずれかの方法によって生産することができる。ウイルスまたは微生物抗原に対して免疫特異的な抗体をコードするヌクレオチド配列は、例えば、GenBankデータバンクまたはそのようなデータバンク、文献刊行物から、またはルーチンのクローニングおよび配列決定によって得ることができる。

【0375】

特別な実施形態において、有用なリガンドは本明細書中で開示した方法に従ってウイルスまたは微生物感染の治療または予防で有用なものである。ウイルス感染または微生物感染の治療で有用な入手可能な抗体の例は、限定されるものではないが、RSV感染を持つ患者の治療で有用なヒト化抗-呼吸器系シンシチウムウイルス(RSV)モノクローナル抗体であるSYNAGIS (MedImmune, Inc., MD); HIV感染の治療で有用なCD4融合抗体であるPRO542 (Progenics); B型肝炎ウイルスの治療で有用なヒト抗体であるOSTAVIR (Protein Design Lab

s, Inc., CA) ; サイトメガロウイルス (CMV) の治療で有用なヒト化 IgG₁ 抗体である PROTOVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) ; および抗-LPS 抗体を含む。

【0376】

感染症の治療で有用な他の抗体は、限定されるものではないが、細菌の病原性株 (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter (Vibrio) fetus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Treponema caratense*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia tsutsugumushi*, *Chlamydia* spp.,) ; 病原性真菌 (*Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*) ; 原生動物 (*Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*) ; または蠕虫 (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* および鉤虫) からの抗原に対する抗体を含む。

【0377】

ウイルス病の治療のための本発明で有用な他の抗体は、限定されるものではないが、その例として：ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純疱疹ウイルス1、単純疱疹ウイルス2、アデノウイルス、パポバウイルス、エンテロウイルス、ピコルナウイルス、パル

ボウイルス、レオウイルス、レトロウイルス、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎、麻疹、呼吸器系シンチウムウイルス、風疹、アルボウイルス、ラブドウイルス、アレナウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、非-A／非-B型肝炎ウイルス、リノウイルス、コロナウイルス、ロトウイルス、およびヒト免疫不全ウイルスを含めた病原性ウイルスの抗原に対する抗体を含む。

【0378】

癌の診断およ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、1以上の正常な非-癌性細胞上と比較して、癌細胞の1以上の特別なタイプの表面に特異的に発現される膜貫通また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た。しばしば、そのような腫瘍-関連ポリペプチドは、非-癌性細胞の表面上と比較して、癌細胞の表面により豊富に発現される。そのような腫瘍-関連細胞表面抗原ポリペプチドの同定は、抗体ベースの療法を介して破壊のために標的癌細胞に特異的に結合する能力を生起させた。

【0379】

式Ic抗体薬物結合体(ADC)におけるAbを含み、癌の治療で有用であり得る抗体は、限定されるものではないが、腫瘍-関連抗原(TAA)に対する抗体を含む。そのような腫瘍-関連抗原は当該分野で知られており、当該分野でよく知られた方法および情報を用いて抗体を生じさせるのに用いるために調製することができる。TAAの例は(1)~(35)を含むが、以下にリストするTAA(1)~(35)に限定されない。便宜のために、その全てが当該分野で知られているこれらの抗原に関連する情報を以下にリストし、それは名称、別名Genbankアクセッション番号および主な文献を含む。抗体によって標的化された腫瘍-関連抗原は、リストされた対応する配列(配列番号:1~35)で同定された配列または引用された文献で同定された配列に対して少なくとも約70%、80%、85%、90%または95%配列同一性を保有する全てのアミノ酸配列変種およびイソ型を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸配列変種を有するTAAは、対応するリストした配列(配列番号:1~35)で見出された配列を有するTAAと実質的に同一の生物学的特性または特徴を呈する。例えば、変種配列を有するTAAは、一般には、対応するリストした配列を持つTAAに特異的に結合する抗体に対して特異的に結合できる。該配列および開示は、ここに明示的に引用して特に一体化させる。

【0380】

(腫瘍-関連抗原(1)~(35))

(1) BMPR1B (骨形態形成タンパク質レセプター-タイプIB, Genbankアクセッション番号NM_001203, ten Dijke, P., et al. Science 264(5155):101-104(1994), Oncogene 14(11):1377-1382(1997)); WO2004063362 (クレーム2); WO2003042661 (クレーム12); US2003134790-A1 (頁38-29); WO2002102235 (クレーム13; 頁296); WO2003055443 (頁91-92); WO200299122 (実施例2; 頁528-530); WO2003029421 (クレーム6); WO2003024392 (クレーム2; 図112); WO200298358 (クレーム1; 頁183); WO200254940 (頁100-101); WO200259377 (頁349-350); WO200230268 (クレーム27; 頁376); WO200148204 (実施例; 図4) NP_001194 骨形態形成タンパク質レセプター、タイプIB/pid=NP_001194. 1-相互参照:MIM:603248; NP_001194. 1; NM_001203_1 502aa

【0381】

【化 1 3 5】

MLLSAGKLNVTGKKEDGESTAPTPRPKVLRCCKHHHCPEDSVNNICSTDGYCFTMIEED
 DSGLPVVTSGCLGLEGSDFQCRDTPIPHQRRSIECCTERNECNKDLHPTLPPLKNRDFVD
 GPIHHRALLISVTVCSSLLVLIIILFCYFRYKRQETRPRYSIGLEQDETYIPPGESLRDLI
 EQSQSSSGSGSLPLLVRTIAKQIQMVQIGKGRYGEVWMGKWRGEKVAVKVFFTTTEAS
 WFRETEIYQTVLMRHENILGFIAADIKGTGSWTQLYLITDYHENGSLYDYLKSTTLDKAS
 MLKLAYSSVSGLCHLHTEIFSTQGKPAIAHRDLKSKNILVKKNGTCCIADLGLAVKFISD
 TNEVDIPPNTRVGTRKRYMPPEVLDESINRNHFQSYIMADMYSFGLILWEVARRCVSGGIV
 EEQQLPHYDLVPSDPSYEDMREIVCICKLRPSFPNRWSSDECLRQMGKLMTECWAHPAS
 RLTLARVKKTLAKMSESQDIKL

10

(配列番号：1)

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, Genbank アクセション番号 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; WO2004048938 (実施例 2); WO2004032842 (実施例 IV); WO2003042661 (クレーム 12); WO2003016475 (クレーム 1); WO200278524 (実施例 2); WO200299074 (クレーム 19; 頁 127-129); WO200286443 (クレーム 27; 頁 222, 393); WO2003003906 (クレーム 10; 頁 293); WO200264798 (クレーム 33; 頁 93-95); WO200014228 (クレーム 5; 頁 133-136); US2003224454 (図 3); WO2003025138 (クレーム 12; 頁 150); NP_003477 溶質キャリアファミリー 7 (カチオン性アミノ酸トランスポーター, y+システム), メンバー 5 / pid=NP_003477. 3-Homo sapiens
 相互参照: MIM: 600182; NP_003477. 3; NM_015923; NM_003486_1
 507aa

20

【0382】

30

【化 1 3 6】

MAGAGPKRRALAAPAAEEKEEAREKMLAAKSADGSAPAGEGEGVTLQRNITLLNGVAIIIV
 GTIIGSGIFVPTPTGVLKEAGSPGLALVVAACGVFSIVGALCYAELGTTISKSGGDYAYM
 LEVYGSLPAFLKLWIELLIIRPSSQYIVALVFATYLLKPLFPTCPVPEEAAKLVAACLV
 LLTAVNCYSVKAATRVQDAFAAAKLLALALIILLGFVQIGKGVVSNLDPNFSFEGTKLDV
 GNIVLALYSGLFAYGGWNYLNFVTEEMINPYRNPLAIIISLPIVTLVYVLTNLAYFTTL
 STEQMLSSEAVAVDFGNHYLGVMSWIIIPVFGVLSFCGVSNGSLFTSSRLFFVGSREGHLP
 SILSMIHPQLLTPVPSLVFTCVMTLLYAFSKDIFSVINFFSFFNWLCVALAIGMIWLRH
 RKPELERPIKVNLAIPVFFILACFLIAVSFWKTPVECGIGFTIILSGLPVYFFGVWKN
 KPKWLLQGIFSTTVLCQKLMQVVPQET

40

(配列番号：2)

(3) STEAP1 (前立腺の 6 回膜貫通上皮抗原, Genbank アクセション番号 NM_012449
 Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R. S., et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. US A. 96 (25): 14523-14528; WO2004065577 (クレーム 6); WO2004027049 (図 1L); EP1394274 (実施例 11); WO2004016225 (クレーム 2); WO2003042661 (クレーム 12); US2003157089 (実施例 5); US2003185830 (実施例 5); US20

50

03064397 (図2) ; WO200289747 (実施例5 ; 頁618-619) ;
WO2003022995 (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回膜貫通上皮抗原

相互参照 : MIM : 604415 ; NP__036581. 1 ; NM__012449__1
339aa

【0383】

【化137】

MESRKDITNQEELWKMKPRRNLEEDDYLHKDTGETSMLKRPVLLHLHQTAHADEFDCPSE
LQHTQELFPQWHLPIKIAAIIASLTFLYTLLREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLP
VSITLLALVYLPGVIAAIVQLHNGTKYKKFPHWLDKWMLTRKQFGLLSFFFVLHAIYSL
SYPMRRSYRYKLLNWAYQQVQONKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPS
VSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLGTIHALIFAWNKWIDIKQFVWYTPPTFMIAVFLPIV
VLIFKSILFLPCLRKKILKIRHGVEDVTINKTEICSQL

10

(配列番号 : 3)

(4) 0772P (CA125, MUC16, Genbankアクセッション番号AF3
61486

J. Biol. Chem. 276(29) ; 27371-27375 (2001)) ; W
O2004045553 (クレーム14) ; WO200292836 (クレーム6 ; 図1
2) ; WO200283866 (クレーム15 ; 頁116-121) ; US200312
4140 (実施例16) ; US2003091580 (クレーム6) ; WO200206
317 (クレーム6 ; 頁400-408) ;

20

相互参照 : GI : 34501647 ; AAK74120. 3 ; AF361486__1
6995aa

【0384】

【化 1 3 8】

PVTSLLTPGLVITTD RMGISREPGTSSTS NLSSTSHERLTTLED TVDTEAMQPSTHTAVT
NVRTSISGHESQSSVLSDSETPKATSPMGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRIQIEPTSSL
TSGLRETSSSERISSATEGSTVLSEVPSGATTEVSRTEVISSRGTSMSGPDQFTISPDIS
TEAITRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGATSEGTLLDSTTTTFWSGTHSTASPGFSHS
EMTTLSMRTPGDVPWPSP LPSVEEASSVSSSLSPAMTSTSFFSTLPESISSSPHPVTALL
TLGPVKTTDMLRTSSEPETSSPPNLSSTSAEILATSEVTKDREKIHPSNTPVVNVGTVI
YKHLSPSSVLADLVTTKPTSPMATTSTLGNTSVSTSTPAFPETMMTQPTSSSLTSGLREIS
TSQETSSATERSASLSGMPTGATTKVSRTEALSLGRTSTPGPAQSTISPEISTETITRIS
TPLTTTGSAEMTITPKTGHSGASSQGTFTLDTSRRASWPGTHSAATHRSPHSGMTTPMSR
GPEDVSWPSRPSVEKTSPPSSLVLSAVTSPSPLYSTPSESSHSSPLRVTSLFTPVMMKT
TMDLDTSLBPVTTSPPMNITSDESLATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTISARQEFYS
SYPGLPEPSKVTSPPVTSSTIKDIVSTTIPASSEITRIEMESTSTLTPTPRETSTSQEIH
SATKPSTVPYKALTSATIEDSMTQVMSSSRGSPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTES
TEMTITTQTGSPGATSRGTLTLDSTTFMSGTHSTASQGFSHSQMTALMSRTPGEVPWLS
HPSVEEASSASFSLSSPVMTSSSPVSSTLPDSIHSSSLPVTSLLTSGLVKTTTELLGTSSE
PETSSPPNLSSTSAEILATTEVTTDTEKLEMTNVVTSGYTHESPSSVLADSVTTKATSSM
GITYPTGDTNVLTSTPAFSDTSRIQTKSKLSLTPGLMETSISEETSSATEKSTVLSSVPT
GATTEVSRTEAIISSSRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRKESTDMAITPKTGPS
GATSQGTFTLDSSSTASWPGTHSATTQRFPRSVVTTPMRGPEDVSWPSPLSVEKNSPPS
SLVSSSSSVTSPSPLYSTPSGSSHSPVPVTSLFTSIMMKATDMLDASLEPETTSAPNMNI
TSDESLAASKATTETEAIHVFENTAASHVETTSATEELYSSSPGFSEPTKVISPVVTS
IRDNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSSLTPGLRETRTSQDITSSSTETSTVLYKMPGATPE
VSRTEVMPPSSRTSIPGPAQSTMSLDISDEVVTRLSTSPIMTESAEITITTQTGYSLATSQ
VTLPLGTSMTFLSGTHSTMSQGLSHSEMTNLMSRGPELSWTSPRFVETTRSSSSSLTSLP
LTTSLSPVSSSTLLDSSPSSPLPVTSLLPGLVKTTTEVLDTSSEPKTSSSPNLSSTSV EIP
ATSEIMTDTEKIHPSNNTAVAKVRTSSSVHESHSSVLADSETTITIPSMGITSAVEDTTV

10

20

【 0 3 8 5】

30

【化 1 3 9】

FTSNPAFSETRRIPTPTFSLTPGFRETSTSEETTSITETSAVLFGVPTSATTEVSMTEI
MSSNRTHIPDSDQSTMSPDIITEVITRLSSSSMMSESTQMTITTTQKSSPGATAQSTLTLLA
TTTAPLARHSTVPPRFLHSEMTTLMRSPPENPSWKSSPFVEKTSSSSSLLSLPVTTSPS
VSSTLPQSIPISSSFVTSLLTPGMVKTTDTSTEPGTSLSPNLSGTSVEILAASEVTTDTE
KIHPSSSMAVTNVGTTSSGHELYSSSVSIHSEPSKATYPVGTTPSSMAETSISTSMANFET
TGFEAEFPFSLTSLGLRKTNMSLDTSSVTPNTNTPSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSSPDW
PPASQYTEIPVDIITPPFNASPSITESTGITSPPESRFTMSVTESTHHLSTDLLPSAETIS
TGTVMPSLSEAMTSFATTGVPRASISGSGSPFSRTESGPGDATLSTIAESLPSSTPVFSS
STFTTTDSSTIPALHEITSSSATPYRVDTSLGTESSTTEGRLVMVSTLDTSSQPGRITSSS
PILDTRMTESVELGTVTSAYQVPSLSLTRLTRTDGIMEHITKIPNEAAHRTIRPVKGPQT
STSPASPKGLHTGGTKRMETTTTALKTTTTALKTTSRATLTTSVYTPTLGTLTPLNASMQ
MASTIPTEMMITTPYVFPDVPETTSSLATSLGAETSTALPRTTPSVFNRESETTASLVSR
SGAERSPVIQTLDVSSSEPDTTASWVIHPAETIPTVSKTTPNFFHSELDTVSSTATSHGA
DVSSAIPNTISPELDAITPLVTISGTDSTTFPTLTKSPHETETRTTWLTHPAETSSSTI
PRTIPNFHSHESDATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVTSQVTSSGTDNRMTIPT
LTLSPGEPKTIASLVTHPEAQTSIAIPTSTISPAVSRVLVSMVTSLSAAKTSTTNRALTNS
PGEPATTVSLVTHSAQTSPTVPWTTSIFFHKSDDTPSMTTSHGAESSAVPTPTVSTEV
PGVVTPLVTSSRAVISTTIPILTLSPGEPETTPSMATSHGEEASSAIPPTVSPGVPGVV
TSLVTSSRAVTSTTIPILTFSLGEPETTPSMATSHGTEAGSAVPTVLPEVPGMVTSLVAS
SRAVTSTTLPTLTLSPGEPETTPSMATSHGAEASSTVPTVSPVPGVVTSLVTSSSGVNS
TSIPTLILSPGELETPSMATSHGAEASSAVPTPTVSPGVSGVVTPLVTSSRAVTSTTIP
ILTLSSSEPETTPSMATSHGVEASSAVLTVSPEVPGMVTFVLTSSRAVTSTTIPTLTISS
DEPETTTSLVTHSEAKMISAIPTLGVSPVQGLVTSVLTSSGSETSAFNSLTVASSQPET
IDSWVAHPGTEASSVVPVTLTVSTGEPFTNISLVTHPAESSSTLPRTTSRFHSSELDTMPS
TVTSPEAESSAISTTISPGIPGLVTSVLTSSGRDISATFPTVPESPHESEATASWVTHP
AVTSTTVPRTTTPNYSHSEPDTPSIATSPGAEATSDFPTITVSPDVPMVTSQVTSSGTD
TSITIPTLTLSSGEPETTTSFITYSEHTSSAIPTLVSPDASKMLTSLVISSGTDSTTT
FPTLTETPYEPETTAIQLIHPAETNTMVPRTTPKFHSHKSDTTLPVAITSPGPEASSAVS
TTTISPDMSDLVTSVLPSSGTDSTTFPTLSETPYEPETTATWLTHPAETSTTVSGTIPN
FSHRGSDTAPSMVTSVPGVDTRSGVPTTTTIPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTPSPG
EPETTASSATHPGTQTGTFTVPIRTVPSSEPDTMASWVTHPPQTSTPVSRRTSSFSHSSPD
ATPVMATSPRTEASSAVLTTISPGAPEMVTSQITSSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALL
STHPRTESTKTFPASTVFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTSSLFTLLVTGTSRVD
LSPTASPGVSAKTAPLSTHPTGTETSTMIPTSTLSLGLLETTGLLATSSSAETSTSTLTLT
VSPAVSGLSSASITTDKPQTVTSWNTETSPSVTSVGPPEFSRVTGTMTLIPSEMPTPP
KTSHGEGVSPTTILRTTMVEATNLATTGSSPTVAKTTTTFNLAGSLFTPLTPGMSTLA
SESVTSRTSYNHRSWITSTSSYNRRYWT PATSTPVTSTFSPGISTSSIPSSAATVPFMV
PFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNATERELQGLLKPLFRNSSLEYLYSGCRLASLRPE
KDSSATAVDAICTHRPDPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHR
SSMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPPTTAGPLLMPTLNFTITNLQYEEDMRRTGSRK
FNTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLRPEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGLN
REQLYWELSKLTNDIEELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVSTTSTPGTSTVDLRTSGTPSS
LSSPTIMAAGPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMGHPGSRKFNTTERVLQGLLGPIFKNTSVG
PLYSGCRLTSLRSEKDGAATGVDAICIHHLDPKSPGLNRERLYWELSQLTNGIKELGPYT
LDRNSLYVNGFTHRTSVPTTSTPGTSTVDLGTSGTPFSLPSPATAGPLLVLFTLNFTITN

10

20

30

40

【0 3 8 6】

【化 1 4 0】

LKYEEDMHRPGSRKFNTTTERVLQTLVGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDA
ICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHWIPVPTSSTPG
TSTVDLGSGTPSSLPSPTSATAGPLLVPFTLNFTITNLKYEEDMHCPGSRKFNTTTERVLQ
SLLGPMFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDREQLYWELS
QLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHQTSAPNTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTSAGP
LLVPFTLNFTITNLQYEEDMHHPGSRKFNTTTERVLQGLLGPMPFKNTSVGLLYSGCRLTLL
RPEKNGAATGMDAICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTHGIKELGPYTLDRNSLYVNGF
THRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTTAVPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHPG
SRKFNTTTERVLQGLLGPFLFKNSSVGPLYSGCRLISLRSEKDGAATGVDAICTHHLNPQSP
GLDREQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSGLTTSTPWTSTVDLGTSGT
PSPVPSPTTAGPLLVPFTLNFTITNLQYEEDMHRPGSRKFNATERVLQGLLSPIFKNSSV
GPLYSGCRLTSLRPEKDGAATGMDAVCLYHPNPKRPGLDREQLYWELSQLTHNITELGPY
SLDRDSLYVNGFTHQNSVPTTSTPGTSTVYWATTGTPSSFPGHTEPGPLLIPTFNFTIT
NLHYEENMQHPGSRKFNTTTERVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKQEAATGVD
TICTHRVDPGPGDRERLYWELSQLTNSITELGPYTLDRDSLYVNGFNPWSSVPTTSTP
GTSTVHLATSGTPSSLPGHTAPVPLLIPTLNFTITNLHYEENMQHPGSRKFNTTTERVLQ
GLLKPLFKSTSVGPLYSGCRLTLLRPEKHGAATGVDAICTRLDPGPGDRERLYWELS
QLTNSVTELGPYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTSIPGTSVHLETSGTPASLPGHTAPGP
LLVPFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNTTTERVLQGLLKPLFKSTSVGPLYSGCRLTLL
RPEKRGAAATGVDTICTHRLDPLNPGLDREQLYWELSKLTRGIIELGPYLLDRGSLYVNGF
THRNEVPITSTPGTSTVHLGTSETPSSLRPPIVPGPLLVPFTLNFTITNLQYEEAMRHPG
SRKFNTTTERVLQGLLRPLFKNTSIGPLYSSCRLTLLRPEKDKAATRVDAICTHHDPQSP
GLNREQLYWELSQLTHGITELGPYTLDRDSLYVDGFTHWSPIPTTSTPGTISVNLGTSGI
PPSLPETTATGPLLVPFTLNFTITNLQYEENMGHPGSRKFNITESVLQGLLKPLFKSTSV
GPLYSGCRLTLLRPEKDGVAATRVDAICTHRDPKIPGLDRQQLYWELSQLTHSITELGPY
TLDRDSLYVNGFTQRSSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGPTATGPVLLPFTLNFTII
NLQYEEDMHRPGSRKFNTTTERVLQGLLMPLFKNTSVSSLYSGCRLTLLRPEKDGAATRV
AVCTHRPDPKSPGLDRERLYWKLSQLTHGITELGPYTLDRHSLYVNGFTHQSSMTTTRTP
DTSTMHLATSRTPASLSGPTASPLLVLFNTFTITNLRYEENMHHPGSRKFNTTTERVLQ
GLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPPKDGAAATKVDAICTYRPDPKSPGLDREQLYWELS
QLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTQRSSVPTTSIPGTPTVDLGTSGTPVSKPGPSAASP
LLVLFTLNFTITNLRYEENMQHPGSRKFNTTTERVLQGLLRSLFKSTSVGPLYSGCRLTLL
RPEKDGTATGVDAICTHHDPKSPRLDREQLYWELSQLTHNITELGPYALDNDLSLVNGF
THRSSVSTTSTPGTPTVYLGASKTPASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMWPGS
RKFNNTTTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGEATGVDAICTHRPDPTGPG
LDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFTI
NNLRYMADMGQPGSLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTGCRVIALRSVKNGAETRV
DLLCTYLQPLSGPGLPIKQVFHELSQLTHGITRLGPYSLDKDSLYLNGYNEPGPDEPPTT
PKPATTFLLPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNLQYSPDMGKGSATFNSTEGVLQHLLRP
LFQKSSMGPFYLGCLISLRPEKDGAATGVDTTCTYHPDPVGPGLDIQQLYWELSQLTHG
VTQLGFYVLDLDRDSLFIINGYAPQNLISIRGEYQINFHIVNWNLSNPDPTSSEYITLLRDIQD
KVTTLYKGSQHLDTFRFCLVTNLTMDSVLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFW
LGSTYQLVDIHVTEMESSVYQPTSSSSTQHLYNFTITNLPYSQDKAQPGTTNYQRNKRN
IEDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDSL CNFSPLARRVDRVAIYEEFL
RMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLFPWAVILIGLAGLLGLITCLIC

10

20

30

40

【0 3 8 7】

【化141】

GVLVTTRRRKKEGEYNVQQQCPGYQSHLDLEDLQ

(配列番号：4)

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, 巨核細胞増強因子, メソテリン, Genbank アクセション番号 NM_005823

Yamaguchi, N., et al. Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 (20) : 11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 (1) : 136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37) : 21984-21990 (1995); WO2003101283 (クレーム14) ; WO2002102235 (クレーム13; 頁287-288); WO2002101075 (クレーム4; 頁308-309); WO200271928 (頁320-321); WO9410312 (頁52-57);

相互参照 MIM: 601051; NP_005814. 2; NM_005823__1
622aa

【0388】

【化142】

MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISS
LSRQLLGFPCEVSGSLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPL
DLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEA
DVRALGGLACDLPGRFVAESA EVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGGPSTW
SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVA AWRQRSSRDPSWRQPRTILRPRFRREVEKT
ACPSGKKAREIDESLI FYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDLY
PQGYPESVIQLHGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVK
GRGQLDKDTLDTLTA FYPGYLCSLSPHEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKA
RLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQ
KLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLTGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGT
PCLLGPGPVLTVLALLLASTLA

(配列番号：5)

(6) Nap13b (NAPI-3B, NPT11b, SLC34A2, 溶質キャリアーファミリー34 (リン酸ナトリウム), メンバー2, タイプII ナトリウム-依存性リン酸トランスポーター3b, Genbank アクセション番号 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; WO2004022778 (クレーム2); EP1394274 (実施例11); WO2002102235 (クレーム13; 頁326); EP875569 (クレーム6; 頁17-19); WO200157188 (クレーム20; 頁329); WO2004032842 (実施例IV); WO200175177 (クレーム24; 頁139-140);

相互参照: MIM: 604217; NP_006415. 1; NM_006424__1
690aa

【0389】

【化 1 4 3】

MAPWPELGDAQPNPDKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTDNTEAPVTKIELLPSYSTATLI
DEPTEVDDPWNLPRTLQDSGIKWSERDTKGKILCFFQIGIRLILLGLFLYFFVCSLDILSS
AFQLVGGKMAQQFFSNSSIMSNPLLGLVIGVLVTVLVQSSSTSTSIVSMVSSSLLTVRA
AIIPIIMGANIGTSITNTIVALMQVGDRSEFRRAFAGATVHDFFNWLSVLVLLPVEVATHY
LEIITQLIVESFHFKNGEDAPDLLKVITKPFCLKLIVQLDKKVISQIAMNDEKAKNKSIVK
IWCKTFTNKQTQINVTVPSTANCTSPSLCWTGDIQNWTMKNVTYKENIAKCQHIFVNFHLP
DLAVGTILLILSLLLVLCGLIMIVKILGSVLKGQVATVIKKTINTDFPFPFAWLTGYLAI
LVGAGMTFIVQSSSVFTSALTPLIGIGVITIERAYPLTLGSNIGTTTTAILAALASPGNA
LRSSLQIALCHFFFNISGILLWYPIPFTRLPIRMAKGLGNISAKYRWFVAVFYLIIFFFLI
PLTVFGLSLAGWRVLVGVGVVVFIIILVLCRLQLSRCPRVLPKKLQNWNLPLWMRSL
KPWDAVSVSKFTGCFQMRCCYCCRVCCRACLLCGCPKCCRCCKCEDLEEAQEGQDVPVK
APETFDNITISREAQGEVPASDSKTECTAL

10

(配列番号：6)

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm. 42015, SEMA5B, SEMAG, Semaphorin 5b Hlog, semaドメイン, 7
回トロンボスポンジンリピート(タイプ1およびタイプ1-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アクセッション番
号AB040878,

20

Nagase T., et al. (2000) DNA Res. 7 (2): 143-150; WO2004000997 (クレーム1); WO2003003984 (クレ
ーム1); WO200206339 (クレーム1; 頁50); WO200188133 (ク
レーム1; 頁41-43, 48-58); WO2003054152 (クレーム20);
WO2003101400 (クレーム11); 受託: Q9P283; EMBL; AB04
0878; BAA95969. 1. Genew; HGNC: 10737;
1093aa

【0390】

【化 1 4 4】

MVLAGPLAVSLLLPSLTLLVSHLSSSQDVSSEPSSEQQLCALSKHPTVAFEDLQPWVSNF
TYPGARDFSQLALDPSGNQLIVGARNYLFRLSLANVSLLQATEWASSEDTRRSCQSKGKT
EEECQNYVRVLIVAGRKVFMCGTNAFSPMCTSRQVGNLSTTEKINGVARCPYDPRHNST
AVISSQGELYAATVIDFSGRDPAIYRSLGSGPPLRTAQYNSKWLNEPNFVAAYDIGLFAY
FFLRENAVEHDCGRVTYSRVARVCKNDVGGRFLLEDTWTTFMKARLNCSPRGEVPFYNE
LQSAFHLPEQDLIYGVFTTNVNSIAASAVCAFNLSAISQAFNGPFRYQENPRAAWLPAN
PIPNFQCCTLPETGPNENLTERSLQDAQRLFLMSEAVQVTPPEPCVTQDSVRFSLVVDL
VQAKDTLYHVLYIGTESGTILKALSTASRSLHGCYLEELHVLPPGRREPLRLSLRILHSAR
ALFVGLRDGVLRVPLERCAAYRSQGACLGARDPYCGWDGKQQRCSLTLEDSSNMSLWTQNI
TACPVNRVTRDGGFGPWSPWQPCEHLDGDNSSGCLCRARSCDSRPRCGGLDCLGPAIHI
ANCSRNGAWTPWSSWALCSTSCGIGFQVRQRSCSNPAPRHGGRICVGKSREERFCNENTP
CPVPIFWASGWSWKSNNCGGGMQSRRRACENGNSCLGCGVEFKTCNPEGCPVRRNTP
WTPWLPVNVTVQGGARQEQRFRFTCRAPLADPHGLQFGRRTTETRTCPADGSGSCDTDALV
EDLLRSGSTSPHTVSGGWAAGPWSSCSRDCELGFRVRKRTCTNPEPRNGGLPCVGDAAE
YQDCNPQACPVRGAWSCWTSWSPCSASC GGHYQRTRSC TSPAPSPGEDI CLGLHTEEAL
CATQACPEGWSPWSEWSKCTDDGAQSRSRHCEELLPGSSACAGNSSQSRPCPYSEIPVIL
PASSMEEATGCAGFNLIHLVATGISCFLGSGLLTLAVYLSQCQCQRQSQUESTLVHPATPN

30

40

【0391】

【化145】

HLHYKGGGTPKNEKYTPMEFKTLNKNLIPDDRANFYPLQQTNVYTTTTYPSPLNKHSFR
PEASPGQRCFPNS

(配列番号：7)

(8) PSCA h1g (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12遺伝子, Genbankアクセッション番号AY358628); US2003129192 (クレーム2); US2004044180 (クレーム12); US2004044179 (クレーム11); US2003096961 (クレーム11); US2003232056 (実施例5); WO2003105758 (クレーム12); US2003206918 (実施例5); EP1347046 (クレーム1); WO2003025148 (クレーム20);

相互参照：GI：37182378；AAQ88991.1；AY358628__1
141aa

【0392】

【化146】

MWVLGIAATFCGLFLLPGFALQIQCYQCEEFQLNNDCSSPEFIVNCTVNVQDMCQKEVME
QSAGIMYRKSCASSAACLIASAGYQSFCSPGKLNSVCISCCNTPLCNGPRPKKRGSASA
LRPGLRTTILFLKIALFSAHC

(配列番号：8)

(9) ETBR (エンドセリンタイプBレセプター, Genbankアクセッション番号AY275463);

Nakamuta M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 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. USA. 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, 1997; 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., e

t a l. (2002) Hum. Genet. 111, 198-206; WO2004045516 (クレーム1); WO2004048938 (実施例2); WO2004040000 (クレーム151); WO2003087768 (クレーム1); WO2003016475 (クレーム1); WO2003016475 (クレーム1); WO200261087 (図1); WO2003016494 (図6); WO2003025138 (クレーム12; 頁144); WO200198351 (クレーム1; 頁124-125); EP522868 (クレーム8; 図2); WO200177172 (クレーム1; 頁297-299); US2003109676; US6518404 (図3); US5773223 (クレーム1a; 31-34欄); WO2004001004; 442aa

10

【0393】

【化147】

MQPPPSLCCGRALVALVLACGLSRIWGEERGFPDRATPLLQTAEIMTPPTKTLWPKGSNASLARS LAPAEV PKGDR TAGSPPTISPPPCQGP I E I K E T F K Y I N T V V S C L V F V L G I I G N S T L L R I I Y K N K M R N G P N I L I A S L A L G D L L H I V I D I P I N V Y K L L A E D W P F G A E M C K L V P F I Q K A S V G I T V L S L C A L S I D R Y R A V A S W S R I K G I G V P K W T A V E I V L I W V V S V V L A V P E A I G F D I I T M D Y K G S Y L R I C L L H P V Q K T A F M Q F Y K T A K D W W L F S F Y F C L P L A I T A F F Y T L M T C E M L R K K S G M Q I A L N D H L K Q R R E V A K T V F C L V L V F A L C W L P L H L S R I L K L T L Y N Q N D P N R C E L L S F L L V L D Y I G I N M A S L N S C I N P I A L Y L V S K R F K N C F K S C L C C W C Q S F E E K Q S L E E K Q S C L K F K A N D H G Y D N F R S S N K Y S S S

20

(配列番号: 9)

(10) MSG783 (RNF124, 仮想タンパク質FLJ20315, Genbankアクセッション番号NM_017763); WO2003104275 (クレーム1); WO2004046342 (実施例2); WO2003042661 (クレーム12); WO2003083074 (クレーム14; 頁61); WO2003018621 (クレーム1); WO2003024392 (クレーム2; 図93); WO200166689 (実施例6); 相互参照: Locus ID: 54894; NP_060233.2; NM_017763_1

30

783aa

【0394】

【化148】

MSGGHQLQALWFWLLMATLQAGFGRTGLVLAAVESERSAEQKAIIRVIPLKMDPTGKLNLTLLEGVFAGVAEITPAEGKLMQSHPLYLCNASDDDNLEPGFISIVKLESPPRAPRPCLSLASKARMAGERGASAVLFDITEDRAAAEQQLQPLGLTWVVLWGNDAEKLMEFVYKNQKAHVRIELKEPPAWPDYDVWILMTTVGTIFVIIASVLRIRCRPRHSRFDPLQQTAWAISQLATRRYQASCRQARGEWPDSGSSCSSAPVCAICLEEFSEGQELRVISCLHEFHRCVD P W L H Q H R T C P L C V F N I T E G D S F S Q S L G P S R S Y Q E P G R R L H L I R Q H P G H A H Y H L P A A Y L L G P S R S A V A R P P R P G P F L P S Q E P G M G P R H R F P R A A H P R A P G E Q Q R L A G A Q H P Y A Q G W G M S H L Q S T S Q H P A A C P V P L R R A R P P D S S G S G E S Y C T E R S G Y L A D G P A S D S S S G P C H G S S D S V V N C T D I S L Q G V H G S S S T F C S S L S S D F D P L V Y C S P K G D P Q R V D M Q P S V T S R P R S L D S V V P T G E T Q V S S H V H Y H R H R H H Y K K R F Q W H G R K P G P E T G V P Q S R P P I P R T Q P Q P E P P S P D Q Q V T G S N S A A P S G R L S N P Q C P R A L P E P A P G P V D A S S I C P S T S S L F N L Q K S S L A R H P Q R K R R G G P S E P T P G S R P Q D A T V H P A C Q I F P H Y T P S V A Y P W S P E A H P L I C G P P G L D K R L L P E T P G P C Y S N S Q P V W L C L T P R Q P L E P H P P G E G P S E W S S D T A E G R P C P Y P H C Q V L S A Q P G S E E E L E E L C E Q A V

40

(配列番号: 10)

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAM

50

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2の6回膜貫通上皮抗原, 6回膜貫通前立腺タンパク質, Genbankアクセッション番号AF455138,

Lab. Invest. 82(11):1573-1582(2002); WO2003087306; US2003064397(クレーム1; 図1); WO200272596(クレーム13; 頁54-55); WO200172962(クレーム1; 図4B); WO2003104270(クレーム11); WO2003104270(クレーム16); US2004005598(クレーム22); WO2003042661(クレーム12); US2003060612(クレーム12; 図10); WO200226822(クレーム23; 図2); WO200216429(クレーム12; 図10);

相互参照: GI: 22655488; AAN04080.1; AF455138__1
490aa

【0395】

【化149】

MESISMMGSPKSLSETVLPNGINGIKDARKVTVGVI GSGDFAKSLTIRLIRCGYHVVIGS
RNPKFASEFFPHVVDVTHHEDALTKTNIIFVAIHREHYTSLWDLRHLLVGKILIDVSNM
RINQYPESNAEYLASLFPDSLIVKGFNVVSAWALQLGPKDASRQVYICSNNIQARQQVIE
LARQLNFIPIDLGLSLSSAREIENLPLRLFTLWRGPVVVAISLATFFFLYSFVRDVIHPYA
RNQQSDFYKIPIEIVNKTLPITVAITLLSLVYLAGLLAAAYQLYYGTYRRFPFWLETWLQ
CRKQLGLLSFFFAMVHVAYSCLPMRRSERYLFLNMAYQQVHANIENSWNEEEVWRIEMY
ISFGIMSLGLLSLLAVTSIPSVSNALNWREFSFIQSTLGYVALLISTFHVLIYGWKRAFE
EEYYRFYTPPNFVLALVLPISIVILGKIILFLPCISQKLKRIKKGWEKSQFLEEGIGGTIP
HVSPERTVM

(配列番号: 11)

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, 一過性レセプター潜在的カチオンチャネル, サブファミリーM, メンバー4, Genbankアクセッション番号NM__017636

Xu, X. Z., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98(19):10692-10697(2001), Cell 109(3):397-407(2002), J. Biol. Chem. 278(33):30813-30820(2003); US2003143557(クレーム4); WO200040614(クレーム14; 頁100-103); WO200210382(クレーム1; 図9A); WO2003042661(クレーム12); WO200230268(クレーム27; 頁391); US2003219806(クレーム4); WO200162794(クレーム14; 図1A~D);

相互参照: MIM: 606936; NP__060106.2; NM__017636__1
1214aa

【0396】

【化150】

MVVPEKEQSWIPKIFKKKTCTTFIVDSTDPGGTLCQCGRPRTAHPAVAMEDAFGAAVTV
WSDAHTTEKPTDAYGELDFTGAGRKHSNFLRLSDRTDPAAVYSLVTRTWGFRAPNLVVS
VLGGSGGPVLQTLQDLLRRGLVRAAQSTGAWIVTGGLHTGIGRHVGVAVRDHQMAGTGG
TKVVAMGVAPWGVVRNRDTLINPKGSFPARYRWRGDPEDGVQFPLDYNYSAFFLVDDGTH

【0397】

【化 1 5 1】

GCLGGENRFRRLRESYISQOKTGVGGTGIDIPVLLLLIDGDEKMLTRIENATQAQLPCLL
 VAGSGGAADCLAETLEDTLAPGSGGARQGEARDRIIRFFPKGDLEVLQAQVERIMTRKEL
 LTVYSSEEDGSEEFETIVLKALVKACGSSEASAYLDELRLAVAWNRVDIAQSELFRGDIQW
 RSFHLEASLMDALLNDRPEFVRLILSHGLSLGHFLTPMRLAQLYSAAPSNSLIRNLLDQA
 SHSAGTKAPALKKGAAELRPPDVGHVLRMLLGKMCAPRYPSGGAWDPHPGQGFGESEMYLL
 SDKATSPLSLDAGLGQAPWSDLLLWALLLNRAQMAMYFWEMGSNAVSSALGACLLLRVMA
 RLEPDAEEAARRKDLAFKFEGMGVDLFGECYRSSEVRAARLLLLRRCPWGDATCLQLAMQ
 ADARAFFAQDGVQSLLTQKWWGDMASTTPIWALVLAFFCPPLIYTRLITFRKSEEEPTRE
 ELEFDMDSVINGEGPVGTADPAEKTPLGVPRQSGRPGCCGGRRCRRWFHFWGAPV
 TIFMGNVVSYLEFLLLFSRVLLVDFQPAPPGSLELLLYFWAFTLLCEELRQGLSGGGGSL
 ASGGPGPGHASLSQRLRLYLADSWNQCDLVALTCFLLGVGCRLTPGLYHLGRTVLCIDFM
 VFTVRLLLHIFTVKNQLGPKIVIVSKMMKDVFFFFLFLGVWLVAYGVALEGLLRPRDSDFP
 SILRRVFYRYPYLQIFGQIPQEDMDVALMEHSNCSSEPGFWAHPPGAQAGTCVSYANWL
 VLLLVIFLLVANILLVNLLIAMFSYTFGKVQGNSDLYWKAQRYRLIREFHSPALAPPF
 VISHLRLLLRQLCRRPRSPQPSPALEHFRVYLSKEAERKLLTWESVHKENFLARARDK
 RESDSERLKRTSQKVDLALKQLGHIREYEQRLKVLEREVQQCSRVLGWVAEALSRSALLP
 PGGPPPPDLPGSKD

10

(配列番号：12)

20

(13) 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 , テラトカ
 ルシノーマー由来成長因子, Genbankアクセッション番号NP__003203ま
 はNM__003212,

Ciccodicola, A., et al. EMBO J. 8 (7): 1987-19
 91 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3): 555-565 (19
 91); US 2003224411 (クレーム1); WO 2003083041 (実施
 例1); WO 2003034984 (クレーム12); WO 200288170 (クレ
 ム2; 頁52-53); WO 2003024392 (クレーム2; 図58); WO 200
 216413 (クレーム1; 頁94-95, 105); WO 200222808 (クレ
 ム2; 図1) (US 5854399 (実施例2; 17-18欄); US 5792616 (30
 図2);

相互参照: MIM: 187395; NP__003203. 1; NM__003212__1
 188aa

【0398】

【化 1 5 2】

MDCRKMARFSYSVIWIMAISKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDSIWPQEEPAIR
 PRSSQVRPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCLGSGFCACPPSFYGRNCEHDVRKENCSSVPH
 DTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFPLPGCDGLVMDEHLVASRTPELPPSARTTTFMLVGI
 CLSIQSY

40

(配列番号：13)

(14) C D 2 1 (C R 2 (補体レセプター2) または C 3 D R (C 3 d / エプスタイン
 バールウイルスレセプター) または H s . 7 3 7 9 2 Genbankアクセッション番
 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. USA. 84, 9194-9198, 1987; Barel. M
 ., et al. Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998; We
 is J. J., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 50

5639-5643, 1986; Sinha S. K., et al. (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320; WO2004045520 (実施例4); US2004005538 (実施例1); WO2003062401 (クレーム9); WO2004045520 (実施例4); WO9102536 (図9. 1~9. 9); WO2004020595 (クレーム1); 受託: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786. 1

1033aa

【0399】

【化153】

MGAAGLLGVFLALVAPGVLGISCGSPPPIILNGRISYYSTPIAVGTVIRYSCSGTFRLLIGE
KSLLCITKDKVDGTWDKPAKCEYFNKYSSCPEPIVPGGYKIRGSTPYRHGDSVTFACKT
NFSMNGNKSVCQANNMWGPTRLPTCVSVFPLECPALPMIHNGHHTSENVGSIAPGLSVT
YSCESGYLLVGEKIINCLSSGKWSAVPPTCEEARKSLGRFPNGKVKEPPILRVGVTANF
FCDEGYRLQGPPSSRCVIAQGVAWTKMPVCEEIFCPSPPIILNGRHIGNSLANVSYGSI
VTYTCDDPDEEGVNFILIGESTLRCTVDSQKTGTWSGPAPRCELSTSAVQCPHPQILRGR
MVSGQKDRYTYNDTVIFACMFGFTLKSGSKQIRCNAQGTWEPSPVCEKECQAPPNINLNGQ
KEDRHMVRFDPGTSIKYSCNPGYVLVGEESIQTSEGVTWPPVPQCKVAACEATGRQLLT
KPQHQFVRPDVNSSCGEGYKLSGSVYQECQGTIPWFMEIRLCKEITCPPPVIYNGAHTG
SSLEDFPYGTTVTYTCNPGPERGVEFSLIGESTIRCTSNDQERGTSWGPAPLCKLSLLAV
QCSHVHIANGYKISGKEAPYFYNDTVTFKCYSGFTLKSSQIRCKADNTWDPEIPVCEKE
TCQHVRQSLQELPAGSRVELVNTSCQDGYQLTGAYQMCQDAENGIWFKKIPLCKVIHCH
PPPVIIVNGKHTGMMANFLYGNEVSYECDQGFYLLGEKKLQCRSDSKGHGWSWSPSPQCL
RSPVTRCPNPEVKHGYKLNKTHSAYSHNDIVYVDCNPGFIMNGSRVIRCHTDNTWVPGV
PTCIKKAFIGCPPPKTPNGNHTGNGIARFSPGMSILYSCDQGYLLVGEALLLCTHEGTW
SQPAPHCKEVCNCSFPADMDGIQKGLEPRKMYQYGAVVTECEDGYMLEGSPQSQCSQSDHQ
WNPPPLAVCRSRSLAPVLCGIAAGLILLTFLIVITLYVISKHRERNYYTDTSQKEAFHLEA
REVYSVDPYNPAS

10

20

(配列番号: 14)

(15) CD79b (CD79B, CD79β, Ig b (免疫グロブリン-関連β)、B 29, Genbankアクセッション番号NM_000626または11038674, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2003) 100(7):4126-4131, Blood (2002) 100(9):3068-3076, Muller et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22(6):1621-1625); WO2004016225 (クレーム2, 図140); WO2003087768, US2004101874 (クレーム1, 頁102); WO2003062401 (クレーム9); WO200278524 (実施例2); US2002150573 (クレーム5、頁15); US5644033; WO2003048202 (クレーム1, 頁306および309); WO 99/558658、US6534482 (クレーム13, 図17A/B); WO200055351 (クレーム11, 1145-1146)

30

40

相互参照: MIN: 147245; NP_000617. 1; NM_000626_1
229aa

【0400】

【化154】

MARLALSPVPSPHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMHCYMNASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY
FCQQKCNNTSEVYQCGTEL RVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

50

(配列番号：15)

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (SH2ドメイン含有リン酸アンカータンパク質1a), SPAP1B, SPAP1C, Genbankアクセッション番号NM_030764,

Genome Res. 13 (10) : 2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2) : 87-95 (2002), Blood 99 (8) : 2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98 (17) : 9772-9777 (2001), Hu, M. J., et al. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3) : 768-775; WO2004016225 (クレーム2); WO2003077836; WO200138490 (クレーム5; 図18D-1~18D-2); WO2003097803 (クレーム12); WO2003089624 (クレーム25);

相互参照: MIM: 606509; NP_110391. 2; NM_030764_1 508aa

【0401】

【化155】

MLLWSLLVIFDAVTEQADSLTLVAPSSVFEGDSIVLKCQGEQNWKIQKMAYHKDNKELSV
FKKFSDFLIQSAVLSDSGNYFCSTKGQLFLWDKTSNIVKIKVQELFQRPVLTASSFQPIE
GGPVSLKCETRLSPQRLDVQLQFCFFRENQVLGSGWSSSPQLISAVWSEDTGSYWCKAE
TVTHRIRKQSLQSQIHVQRIPIISNVLSLEIRAPGGQVTEGQKLILLCSVAGGTGNVTFWSY
REATGTSMGKKTQSRSLSAELEIPAVKESDAGKYICRADNGHVPIQSKVVNIPVRIPVSRP
VLTLRSPGAQAAGVDLLELHCEALRGSPPILYQFYHEDVTLGNSSAPSGGGASFNLSLTA
EHSNYSCEANGLGAQCSEAVPVSISGPDGYRRDLMTAGVLWGLFGVLGFTGVALLLYA
LFHKISGESSATNEPRGASRPNPQEFTYSSPTPDMEELQPVYVNVGSVDVDVVYSQVWSM
QQPESSANIRTLLLENKDSQVIYSSVKKS

(配列番号：16)

(17) HER2 (ErbB2, Genbankアクセッション番号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. USA. 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; WO2004048938 (実施例2); WO2004027049 (図1I); WO2004009622; WO2003081210; WO2003089904 (クレーム9); WO2003016475 (クレーム1); US2003118592; WO2003008537 (クレーム1); WO2003055439 (クレーム29; 図1A~B); WO2003025228 (クレーム37; 図5C); WO200222636 (実施例13; 頁95-107); WO200212341 (クレーム68; 図7); WO200213847 (頁71-74); WO200214503 (頁114-117); WO200153463 (クレーム2; 頁41-46); WO200141787 (頁15); WO200044899 (クレーム52; 図7); WO200020579 (クレーム3; 図2) US5869445 (クレーム3; 31-38欄); WO9630514 (クレーム2; 頁56-61); EP1439393 (クレーム7); WO2004043361 (クレーム7); WO2004022709; WO200100244 (実施例3; 図4); 受託: P04626; EMBL; M11767; AAA35808. 1. EMBL; M11761; AAA35808. 1.

1 2 5 5 a a
 【0 4 0 2】
 【化1 5 6】

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMRLHLYQGCQVVQGNL
 ELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNVQVRQVPLQRLRIVRGTLQFEDNYALAVLDNG
 DPLNNTTPVTGASPGGLRELQRLSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLA
 LTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQC
 AAGCTGPKHSDCLACLFHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACP
 YNYLSTDVGSCTLVCPHNEQVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSAN
 IQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSL
 DLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHLCFVHTV
 PWDQLFRNPQHALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQEC
 VEECRVLQGLPREYVNAHCLPCHPECQPPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFPCVARC
 PSGVKPDLSPYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVG
 ILLVVVLGVVFGILIKRRQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETEL
 RKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLENTSPKANKEILDEAYVMAGVGS
 YVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRLGSLQDLLNWCMIKGMSTYLEDVR
 LVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEHADGGKVPIKWMALSIILRRRFT
 HQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWM
 IDSECRPRFRELVSFESRMARDPQRFVVIQNEGLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDA
 EEYLVPQQGFCDPDPAGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEG
 AGSDVFDGDLGMAAGLQSLPTHDPSPQLRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYV
 NQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLPSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPO
 GGAAPQPHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV

10

20

(配列番号：17)

(18) NCA (CEACAM6, Genbankアクセッション番号M18728);
 Barnett T., et al. Genomics 3, 59-66, 1988; T
 awaragi Y., et al. Biochem. Biophys. Res. Com
 mun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R. L., et al
 . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:16899-16903, 2
 002; WO2004063709; EP1439393 (クレーム7); WO2004
 044178 (実施例4); WO2004031238; WO2003042661 (ク
 レーム12); WO200278524 (実施例2); WO200286443 (クレ
 ム27; 頁427); WO200260317 (クレーム2);
 受託: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915. 1.
 EMBL; M18728

30

3 4 4 a a
 【0 4 0 3】
 【化1 5 7】

40

MGPPSAPPCLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTAKLTISTPFNVAEKGKVVLLAHNLPPQ
 NRIGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRETIYPNASLLIQNVTONDTGFY
 TLQVIKSDLVNEEATGQFHVPELPKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPEVQNTTYLWWV
 NGQSLPVSRLQLSNGNMTLLTLLSVKRNDAGSYECEIQNPASANRSDPVTNLNLYGPDVP
 TISPSKANYRPGENLNLSCAASNPPAQYSWFINGTFQOSTQELFIPNITVMNSGSGYMCQ
 AHNATGLNRTTVMITVSGSAPVLSAVATVGITIGVLARVALI

(配列番号：18)

(19) MDP (DPEP1, Genbankアクセッション番号BC017023,

50

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99 (26) : 16899-16903 (2002) ; WO2003016475 (クレーム1) ; WO200264798 (クレーム33 ; 頁85-87) ; JP05003790 (図6~8) ; WO9946284 (図9) ;

相互参照 : MIM : 179780 ; AAH17023. 1 ; BC017023__1
411aa

【0404】

【化158】

MWSGWLWPLVAVCTADFFRDEAERIMRDSFVIDGHNDLPWQLDMFNNRLQDERANLTT
LAGTHTNIPKLRAGFVGGQFWSVYTPCDTQNKDAVRRRTLEQMDVVHRMCRMYPETFLYVT
SSAGIRQAFREGKVASLIGVEGGHSIDSSLGVLRLALYQLGMRYLTLTTHSCNTPWADNWL
DTGDSEPPSQGLSPFGQRVVKELNRLGVLIDLAHVSVA TMKATLQLSRAPVIFSHSSAYS
VCASRRNVPPDVLRLVKQTDLSVMVNFYNNYISCTNKANLSQVADHLDDHIKEVAGARAVG
FGGDFDGVPRVPEGLEDVSKYPDLIAELLRRNWTEAEVKGALADNLLRVFEAVEQASNL
TQAPEEPIPLDQLGGSCRTHYGYSSGASSLHRHWGLLLASLAPLVLCLSLL

10

(配列番号 : 19)

(20) IL20Ra (IL20Ra, ZCYTOR7, Genbankアクセッション
番号AF184971) ;

20

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 ; EP1394274 (実施例11) ; US2004005320 (実施例5) ; WO2003029262 (頁74-75) ; WO2003002717 (クレーム2 ; 頁63) ; WO200222153 (頁45-47) ; US2002042366 (頁20-21) ; WO200146261 (頁57-59) ; WO200146232 (頁63-65) ; WO9837193 (クレーム1 ; 頁55-59) ;

30

受託 : Q9UHF4 ; Q6UWA9 ; Q96SH8 ; EMBL ; AF184971 ; AA
F01320. 1.

553aa

【0405】

【化159】

MRAPGRPALARPLPLPPLLLLLLAPWGRAVPCVSGGLPKPANITFLSINMKNVLQWTPPE
GLQGVKVITYTVQYFIYGQKKWLNKSECRNINRTYCDLSAETSDYEHQYYAKVKAIWGTC
SKWAESGRFYFPFLETQIGPPEVALTTDEKSISVVLTAPEKWKRNPEDLFVSMQQIYSNLK
YNVSVLNTKSNRTWSQCVTNHTLVLTWLEPNTLYCVHVESFVPGPPRAQPSEKQCARTL
KDQSSEFKAKIIFWYVLPISITVFLFSVMGYSIYRYIHVGKEKHPANLILYGNFEFDKRF
FVPAEKIVINFITLNISSDKISHQDMSLLGKSSDVSSLNDPQPSGNLRPPQEEEEVKHL
GYASHLMEIFCDSEENTEGTSFTQQESLSRTIPDKTVIEYEYDVRTTDCAGPEEQELS
LQEEVSTQGTLLSQAALAVLGPQTLQYSYTPQLQDLPLAQEHTDSEEGPEEPEPSTTLV
DWDPQTGRLCIPSLSSFDQDSEGCEPSEGDLGEEGLLSRLYEAPAPDRPPGENETYLMQ
FMEEWGLYVQMN

40

(配列番号 : 20)

50

(21) Brevican (BCAN, BEHAB, Genbankアクセッション番号 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. USA. 99, 16899-16903, 2002; US2003186372 (クレーム11); US2003186373 (クレーム11); US2003119131 (クレーム1; 図52); US2003119122 (クレーム1; 図52); US2003119126 (クレーム1); US2003119121 (クレーム1; 図52); US2003119129 (クレーム1); US2003119130 (クレーム1); US2003119128 (クレーム1; 図52); US2003119125 (クレーム1); WO2003016475 (クレーム1); WO200202634 (クレーム1);

911aa

【0406】

【化160】

MAQLFLPLLAALVLAQAPAAADVLEGDSSSEDRAFRVRIAGDAPLQGVLGAL TIPCHVH
YLRPPPSRRRAVLGSPRVKWTFLSRGREAEVLVARGVRVKVNEAYRFRVALPAYPASLTDV
SLALSELRPNDSGIYRCEVQHGIDSSDAVEVKVKGVVFLYREGSARYAFSFSGAQEACA
RIGAHIAITPEQLYAAYLGGYEQCDAGWLS DQTVRYPIQTPREACYGDMGFP GVRNYGVV
DPDDL YDVYCYAEDLNGELFLGDPPEKLTLEEARAYCQERGAETATTGQLYAAWDGGLDH
CSPGWLADG SVRYPIVTPSQR CGGLPGVKTLFLFPNQTFGFPNKHSR FNVYCFRDSAQPS
AIPEASNPNASPNASDGL EAI VTVTETLEELQLPQEATESESRGAIYSIPIMEDGGGGSST
PEDPAEAPRTLLEFETQSMVPPTG FSEEEGKALEEEEEKYEDEEEKEEEEEEEVEDEALW
AWPSELSSPGPEASLPTEPAAQEKSL SQAPARAVLQPGASPLPDGESEASRPPRVHGPPT
ETLPTPRERNLASPSSTLVEAREVGEATGGPELSGVPRGESEETGSSEGA PSLLPATRA
PEGTRELEAPSEDNSGR TAPAGTSVQAQPVLP TDSASRGGVAVVPASGDCVPS PCHNGGT
CLEEEEGVRCLCLPGYGGDLCDVGLR FCPNGWDAFQGACYKHFSTRRSWEEAETQCRMYG
AHLASISTPEEQDFINNRYREYQWIGLNDRTIEGDFLWSDGVPLLYENWNPGQPD SYFLS
GENCVVMVWHDQGWSDVPCNYHLSYTCMGLVSCGPPPELPLAQVFGRPRLRYEVDTVL
RYRCREGLAQRNLPLIRCQENGRWEAPQISCVPRRPARALHPEEDPEGRQGRLLGRWKAL
LIPPSSPMGP

(配列番号: 21)

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, Genbankアクセッション番号 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); WO2003042661 (クレーム12); WO200053216 (クレーム1; 頁41); WO2004065576 (クレーム1); WO2004020583 (クレーム9); WO2003004529 (頁128132); WO200053216 (クレーム1; 頁42);

相互参照: MIM: 600997; NP_004433. 2; NM_004442_1
987aa

【0407】

【化 1 6 1】

MALRR LG AALLLLPLLA AVEETLMDSTTATAELGWMVHPPSGWEEVSGYDENMNTIRTYQ
 VCNVFESSQNNWLRTKFI RRRGAHRIHVEMKFSVRDCSSIPSVP GSCKETFNLYYYEADF
 DSATKTFPNWMENPWVKVD TIAADESFSQVDLGGRVMKINTEVRSFGPVSRS GFYLAFQD
 YGGCMSLIAVRVFYRKCPRI IQNGAIFQETLSGAESTSLVAARGSCIANAEVDVPIKLY
 CNGDGEWLVP IGRMCKAGFEAVENGTVCRGCPSGTFKANQGDEACTHCPINSRTTSEGA
 TNCVCRNGYYRADLDPLDMPCTTIP SAPQAVISSVNETSLMLEWTPPRDSGGREDLVYNI
 ICKSCGSGRGACTRCGDNVQYAPRQLGLTEPRIYISDLLAHTQYTFEIQAVNGVTDQSPF
 SPQFASVNITTNQAAPS AVSIMHQVSRTVDSITLSWSQPDQPNGVILDYELQYYEKELSE
 YNATAIKSPTNTVTVQGLKAGAIYVFQVRARTVAGYGRYSGKMYFQTMTEAEYQTSIQEK
 LPLIIGSSAAGLVFLIAVVVIAIVCNRRRGFERADSEYTDKQLQHYTSGHMTPGMKIYIDP
 FTYEDPNEAVREFAKEIDISCVKIEQVIGAGEFGEVCSGHLKLP GKREIFVAIKTLKSGY
 TEKQRRDFLSEASIMQFDHPNVIHLEGVVTKSTPVM IITEFMENGSLDSFLRQNDGQFT
 VIQLVGMLRGIAAGMKYLADMNYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRFLEDDTSDPT
 YTSALGGKIPIRWTAPEAIQYRKFTSASDVWSYGI VMWEVMSYGERPYWDMTNQDVINAI
 EQDYRLPPPMDCP SALHQLMLDCWQKDRNHRPKFGQIVNTLDKMIRNPNSLKAMAPLSSG
 INLPLLDRTIPDYSFNTVDEWLEAIKMGQYKESFANAGFTSFDVVSQMMEDILRVGV
 TLAGHQKKILNSIQVMRAQMNQIQSVEV

10

(配列番号：22)

20

(23) ASLG659 (B7h, Genbank アクセション番号 AX092328)

US20040101899 (クレーム2); WO2003104399 (クレーム11)
); WO2004000221 (図3); US2003165504 (クレーム1); U
 S2003124140 (実施例2); US2003065143 (図60); WO20
 02102235 (クレーム13; 頁299); US2003091580 (実施例2)
); WO200210187 (クレーム6; 図10); WO200194641 (クレーム
 12; 図7b); WO200202624 (クレーム13; 図1A~1B); US200
 2034749 (クレーム54; 頁45-46); WO200206317 (実施例2;
 頁320-321, クレーム34; 頁321-322); WO200271928 (頁4
 68-469); WO200202587 (実施例1; 図1); WO200140269
 (実施例3; 頁190-192); WO200036107 (実施例2; 頁205-20
 7); WO2004053079 (クレーム12); WO2003004989 (クレ
 ム1); WO200271928 (頁233-234, 452-453); WO0116
 318;

30

282aa

【0408】

【化 1 6 2】

MASLGQILFWSIIISIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEP
 DIKLSDIVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNV
 QLTDAGTYKCYIITSKGKKANLEYKTGAFSMPENVVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVV
 WASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVSVLYNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKV
 TESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYMLK

40

(配列番号：23)

(24) PSCA (前立腺幹細胞抗原前駆体, Genbank アクセション番号 AJ2
 97436)

Reiter R. E., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA
 . 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al. Oncogene
 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Co

50

mmun. (2000) 275 (3) : 783-788 ; WO2004022709 ; EP1394274 (実施例11) ; US2004018553 (クレーム17) ; WO2003008537 (クレーム1) ; WO200281646 (クレーム1 ; 頁164) ; WO2003003906 (クレーム10 ; 頁288) ; WO200140309 (実施例1 ; 図17) ; US2001055751 (実施例1 ; 図1b) ; WO200032752 (クレーム18 ; 図1) ; WO9851805 (クレーム17 ; 頁97) ; WO9851824 (クレーム10 ; 頁94) ; WO9840403 (クレーム2 ; 図1B) ; 受託 : O43653 ; EMBL ; AF043498 ; AAC39607. 1.

123aa

【0409】

【化163】

10

MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNEDECLQVENCTQLGEQCWTARIRAVGLLT
VISKGCSLNCVDDSDYVVGKKNITCCDITDLCNASGAHALQPAAILALLPALGLLLWGP
GQL

(配列番号 : 24)

(25) GEDA (Genbankアクセッション番号AY260763) ;

AAP14954 脂肪腫HMGIC融合-パートナー様タンパク質 / pid = AAP14954, 1-Homo sapiens

種 : Homo sapiens (ヒト)

20

WO2003054152 (クレーム20) ; WO2003000842 (クレーム1) ; WO2003023013 (実施例3, クレーム20) ; US2003194704 (クレーム45) ;

相互参照 : GI : 30102449 ; AAP14954. 1 ; AY260763__1

236aa

【0410】

【化164】

MPGAAAAAAAAAAMLPAQEAAKLYHTNYVRNSRAIGVLWAIFTICFAIVNVVCFIQPYW
IGDGVDTPOAGYFGLFHYCIGNGFSRELTCRGSFTDFSTLPSGAFKAASFFIGLSMMLII
ACTICFTLFFFCNTATVYKICAWMQLTSAACLVLCMI FPDGWDSDVKRMCGEKTDKYT
LGACSVRWAYILAIIGILDALILSFLAFVLGNRQDSLMAEELKAENKVLLSQYSLE

30

(配列番号 : 25)

(26) BAFR (B細胞-活性化因子レセプター, Blyレセプター3, BR3, Genbankアクセッション番号NP__443177. 1) ;

NP__443177 BAFRレセプター / pid = NP__443177. 1-Homo sapiens

Thompson, J. S., et al. Science 293 (5537), 2108-2111 (2001) ; WO2004058309 ; WO2004011611 ; WO2003045422 (実施例 ; 頁32-33) ; WO2003014294 (クレーム35 ; 図6B) ; WO2003035846 (クレーム70 ; 頁615-616) ; WO200294852 (136-137欄) ; WO200238766 (クレーム3 ; 頁133) ; WO200224909 (実施例3 ; 図3) ;

40

相互参照 : MIM : 606269 ; NP__443177. 1 ; NM__052945__1

184aa

【0411】

【化 1 6 5】

MRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRKPAGASSPAPRTALQPO
 ESVGAGAGEAALFLPGLLFGAPALLGLALVLALVLVGLVSWRRRQRRRLRGASSAEAPDGD
 KDAPEPLDKVIIILSPGISDATAPAWPPPGEDPGTTPPGHVSVPVPATELGSTELVTTKTAG
 PEQQ

(配列番号：26)

(27) CD22 (B-細胞レセプターCD22-Bイソ型, Genbankアクセシ
 ョン番号NP-001762.1);

Stamenkovic, I. and Seed, B., Nature 345 (627 10
 0)、74-77 (1990); US2003157113; US2003118592
 ; WO2003062401 (クレーム9); WO2003072036 (クレーム1;
 図1); WO200278524 (実施例2);

相互参照:MIM:107266; NP__001762.1; NM__001771__1
 847aa

【0412】

【化 1 6 6】

MHLGPWLLLLLVLEYLAFSDSSKWVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFH
 NPEYNKNTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCTLSIHPVHLNDSGQLGLR
 MESKTEKWMERIHLNVSERPFPPIQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSYGYPIQLQWLLEG
 VPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSPQWSHHGKIIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKH
 TPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLREVT
 KDQSGKYCCQVSNVGPGRSEEVFLQVQYAPPEPSTVQILHSPAEGSQVEFLCMSLANPL
 PTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVHIPKILPWHAGTYSCVAENILGTGQRGPGAELDVQYPPK

20

【0413】

【化 1 6 7】

KVTTVIQNPMPIREGDTVTLSCNYNSSNPVTRYEWKPHGAWEEPGLGVLKIQNVGWDNT
 TIACARCNSWCSWASPVALNVQYAPRDVVRKIKPLSEIHSGNSVSLQCDFSSSHPKEVQ
 FFWEKNGRLLGKESQLNFDISISPEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLVYAPRRLRVSM
 SPGDQVMEGKSATLTCESDANPPVSHYTWFDDWNNQSLPHHSQKLRLPEVKVQHSGAYWCQ
 GTNSVGKGRSPLSTLTVYYSPEITIGRRVAVGLGSLAILILAICGLKLQRRWKRTQSQQG
 LQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPBSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPENIPIRTGDAES
 SEMQRPRTCDTDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENV
 DYVILKH

30

(配列番号：27)

(28) CD79a (CD79A, CD79a, 免疫グロブリン-関連α, Igβ (CD
 79B) に共有結合相互作用し、IgM分子と表面で複合体を形成し、B-細胞分化に関
 与するシグナルを変換するB細胞-特異的タンパク質) PROTEIN SEQUENC
 E Full mp g g p g v . . . d v q l e k p (1 . . 226; 226 aa),
 pI: 4.84, MW: 25028 TM: 2 [P] Gene Chromosome
 : 19q13.2, Genbankアクセシオン番号NP__001774.1;

40

WO2003088808, US20030228319; WO2003062401 (クレーム9);
 US2002150573 (クレーム4; 頁13-14); WO9958658 (クレーム13, 図16);
 WO9207574 (図1); US5644033; Ha et al. (1992) J. Immunol. 148 (5): 1526-1531;
 Mueller et al. (1992) Eur. J. Biochem. 22: 1621-1625; Hashimoto et al. (1994) Immunog
 enetics 40 (4): 287-295; Preud'homme et al.

50

(1992) Clin. Exp. Immunol. 90 (1) : 141-146; Yu
et al. (1992) J. Immunol. 148 (2) 633-637; Sa
kaguchi et al. (1988) EMBO J. 7 (11) : 3457-3
464;

226aa

【0414】

【化168】

MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSN
NANVTWWRVLHGNYTWPFELGPGEDPNGTLIIQNVNKS HGGIYVCRVQEGNESYQQSCG
TYLRVRQPPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGD
EYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRLQGTQYQDVGSLNIGDVQLEKP

10

(配列番号：28)

(29) CXCR5 (バーキットリンパ腫レセプター1, CXCL13ケモカインによっ
て活性化され、リンパ細胞の移動および液性防御で機能し、HIV-2感染および、おそ
らくは、AIDS、リンパ腫、骨髄腫、および白血病の発症で役割を演じるGプロテイン
-カップルドレセプター) PROTEIN SEQUENCE Full mnypl t
l... atslttf (1... 372; 372aa), pI: 8.54 MW: 419
59 TM: 7 [P] 遺伝子染色体: 11q23.3, Genbankアクセッション番
号NP_001707.1;

20

WO2004040000; WO2004015426; US2003105292 (実
施例2); US6555339 (実施例2); WO200261087 (図1); WO2
00157188 (クレーム20, 頁269); WO200172830 (頁12-13
); WO200022129 (実施例1, 頁152-153, 実施例2, 頁254-25
6); WO9928468 (クレーム1, 頁38); US5440021 (実施例2, 4
9-52欄); WO9428931 (頁56-58); WO9217497 (クレーム7
; 図5); Dobner et al. (1992) Eur. J. Immunol. 2
2: 2795-2799; Barella et al. (1995) Biochem
. J. 309: 773-779;

372aa

30

【0415】

【化169】

MNYPLTLEMDLENLEDLFWELDRLDNYNDTSLVENHLC PATEGPLMASFKAVFVPVAYSL
IFLLGVIGNVLVLVILERHRQTRSSTETFLFHLAVADLLLVFILPFAVAEGSVGWVLGTF
LCKTVIALHKVNFYCSSL LACIAVDRYLAIVHAVHAYRHRRLLSIHITCGTIWLVGFL
ALPEILFAKVSQGHNNSLPRCTFSQENQAETHAWFTSRFLYHVAGFLLPMLVMGWCYVG
VVHRLRQAQRPRQKAVRVAILVTSIFFLCWSPYHIVIFLDTLARLKAVDNTCKLNGSL
PVAITMCEFLGLAHCCLNPMLYTFAGVKFRSDLSRLLTCLGCTGPASLCQLFPSWRRSSL
SESENATSLTTF

40

(配列番号：29)

(30) HLA-DOB (ペプチドに結合し、それらをCD4+Tリンパ球に提示するM
HCクラスII分子 (Ia抗原) のβサブユニット) PROTEIN SEQUENCE
Full mgsgwvp... vllpqsc (1... 273; 273aa, pI:
6.56 MW: 30820 TM: 1 [P] 遺伝子染色体: 6p21.3, Genba
nkアクセッション番号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. Bi
ol. 228: 433-441; Strausberg et al. (2002) P

50

roc. Natl. Acad. Sci. USA 99:16899-16903; Ser
 venius 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; WO9958658 (クレーム13, 図15); US61534
 08 (35-38欄); US5976551 (168-170欄); US6011146
 (145-146欄); Kasahara et al. (1989) Immunog
 enetics 30(1):66-68; Larhammar et al. (198
 5) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119;
 273aa

10

【0416】
 【化170】

MGSGWVPVWVALLVNLTRLDSMTQGTDSPEDFVIQAKADCYFTNGTEKVQFVVRFIENL
 EEEYVRFDSDVGMFVALTKLGQPDAEQWNSRLDLLERSRQAVDGVCRHNYRLGAPFTVGRK
 VQPEVTVPERTPLLHQHNLHCSVTGFYPGDIKIKWFLNGQEERAGVMSTGPIRNGDWT
 FQTVVMLEMTPELGHVYTCLVDHSSLLSPVSVIEWRAQSEYSWRKMLSGIAAFLGLIFLL
 VGIVIQLRQAKGYVRTQMSGNEVSRVLLPQSC

(配列番号: 30)

(31) P2X5 (プリン作動性レセプターP2Xリガンド型イオンチャネル5, 細胞内
 ATPによってゲートが開閉されるイオンチャネルはシナプス伝達および神経形成に関与
 でき、欠乏は原発性排尿筋不安定性の病理生理学に寄与し得る) PROTEIN SEQ
 UENCE Full mgqagck... lephrst (1..422; 422a
 a), pI: 7.63, MW: 47206 TM: 1 [P] 遺伝子染色体: 17p13.
 3, Genbankアクセッション番号NP_002552.2;
 Le et al. (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-1
 99; WO2004047749; WO2003072035 (クレーム10); Tou
 chman et al. (2000) Genome Res. 10:165-173
 ; WO200222660 (クレーム20); WO2003093444 (クレーム1)
 ; WO2003087768 (クレーム1); WO2003029277 (頁82);
 422aa

20

30

【0417】
 【化171】

MGQAGCKGLCLSLFDYKTEKYVIAKNKKVGLLYRLLQASILAYLVVWVFLIKKGYQDVT
 SLQSAVITKVKGVAFTNTSDLGQRIWDVADYVIPAQGENVFFVVTNLIVTPNQRONVCAE
 NEGIPDGACSKDSDCHAGEAVTAGNGVKTRGRCLRRENLARGTCEIFAWCPLETSSRPEEP
 FLKEAEDFTIFIKNHIRFPKFNFSKSNVMDVKDRSFLKSCHFGPKNHYPICIFRLGSVIRW
 AGSDFQDIALEGGVIGINIEWNCDLKAASECHPHYSFSLDNKLSKSVSSGYNFRFARY
 YRDAAGVEFRTLKAYGIRFDVMVNGKGAFFCDLVLIYLIKKREFYRDKKYEEVRGLED
 SQEADEASGLGLSEQLTSGPGLLGMPEQQELQEPPEAKRGSSSQKNGSVCPQLLEPHR
 ST

40

(配列番号: 31)

(32) CD72 (B-細胞分化抗原CD72, Lyb-2) PROTEIN SEQU
 ENCE Full maeaity... tafrrfpd (1..359; 359aa
 a), pI: 8.66, MW: 40225 TM: 1 [P] 遺伝子染色体: 9p13.3,
 Genbankアクセッション番号NP_001773.1;
 WO2004042346 (クレーム65); WO2003026493 (頁51-52
 , 57-58); WO200075655 (頁105-106); Von Hoegen
 et al. (1990) J. Immunol. 144(12):4870-487

50

7 ; S t r a u s b e r g e t a l . (2 0 0 2) P r o c . N a t l . A c a d .
S c i U S A 9 9 : 1 6 8 9 9 - 1 6 9 0 3 ;

3 5 9 a a

【 0 4 1 8 】

【 化 1 7 2 】

MAEAITYADLRVFKAPLKKSISRLGQDPGADDDGEITYENVQVPAVLGVPSSSLASSVLG
DKAAVKSEQPTASWRAVTSFAVGRILPCRITCLRYLLGLLLTCLLLGVTALCLGVRYLQ
VSQQQLQQTNRVLEVITNSSLRQQLRLKITQLGQSAEDLQGSRRRLAQSQEALQVEQRAHQ
AEGQLQACQADRQKTKETLQSEEQRRALQKLSNMENRLKPFFTCGSADTCCPSGWIMH
QKSCFYISLTSKNWQESQKQCETLSSKLATFSEIYPQSHSYFLNSLLPNGGSGNSYWTG
LSSNKDWKLTDDTQTRTRYAQSSKCNKVHKTWSWWTLESESCRSSLPYICEMTAFRFPD

10

(配列番号：32)

(33) LY64 (リンパ球抗原64 (RP105), ロイシンリッチのリピート (LR
R) ファミリーのタイプI膜タンパク質はB-細胞の活性化およびアポトーシスを調節し
、機能の喪失は全身エリテマトーデスを持つ患者において増大した病気活性に関連する)

PROTEIN SEQUENCE Full mafdvsc...rwkyqhi (1...661; 661aa), pI: 6.20, MW: 74147 TM: 1「P」遺伝子
染色体: 5q12, Genbankアクセッション番号NP_005573.1;

US2002193567; WO9707198 (クレーム11, 頁39-42); Mi
ura et al. (1996) Genomics 38 (3) 299-304; Mi
ura et al. (1998) Blood 92: 2815-2822; WO2
003083047; WO9744452 (クレーム8, 頁57-61); WO2000
12130 (頁24-26);

20

6 6 1 a a

【 0 4 1 9 】

【 化 1 7 3 】

MAFDVSCFFVWVLFSAAGCKVITSWDQMCIEKEANKTYNCENLGLSEIPDTLPNTTEFLEF
SFNFLPTIHNRTFSRLMNLTFDLTRCQINWIHEDTFQSHHQLSTLVLTGNPLIFMAETS
LNGPKSLKHLFLIQTGISNLEFIPVHNLENLESYLGSNHISSIKFPKDFPARNLKVLDF
QNNAIHYISREDMRSLEQAINLSLNFNGMNVKGIELGAFDSTVFQSLNFGGTPNLSVIFN
GLQNSTTQSLWLGTTFEDIDDEDISSAMKGLCEMSVESLNLQEHFSDISSTTFQCFTQL
QELDLTATHLKGLPSGMKGLNLLKKLVLSVNHFQDQLCQISAANFPSLTHLYIRGNVKKLH
LGVCLEKLGNLQTLDSLHNDIEASDCCSLQLKNLSHLQTLNLSHNEPLGLQSQAFCPCP
QLELLDLAFTRLHINAPQSPFQNLHFLQVLNLTTCFLDTSNQHLLAGLPVLRHLNLKGNH
FQDGTITKTNLQTVGSLEVLISSCGLLSIDQAFHSLGKMSHVDLSHNSLTCDSDISL
SHLKGIVLNLAANSINIISPRLLPILSQOSTINLSHNPLDCTCSNIHFLTWYKENLHKLE
GSEETTCANPPSLRGVKLSVDKLSGCGITAIGIFFLIVFLLLAILLFFAVKYLLRWKYQH
I

30

(配列番号：33)

(34) FCRH1 (Fcレセプター様タンパク質1、C2タイプIg-様およびIT
AMドメインを含有する免疫グロブリンFcドメインに対する推定レセプターはB-リン
パ球の分解において役割を有し得る) PROTEIN SEQUENCE Full m
lprlll...vdyedam (1...429; 429aa), pI: 5.28, M
W: 46925 TM 1「P」遺伝子染色体: 1q21-1q22, Genbankア
クセッション番号NP_443170.1;

WO2003077836; WO200138490 (クレーム6, 図18E-1~18
-E-2); Davis et al. (2001) Proc. Natl. Acad. S
ci USA 98 (17): 9772-9777; WO2003089624 (クレ

40

50

△ 8) ; EP 1 3 4 7 0 4 7 6 (クレーム 1) ; WO 2 0 0 3 0 8 9 6 2 4 (クレーム 7) ;

4 2 9 a a

【 0 4 2 0 】

【 化 1 7 4 】

MLPRLLLLCAPLCEPAELFLIASPSHPTGSPVTLTCKMPFLQSSDAQFQFCFFRDTRA
LGPGWSSSPKLQIAAMWKEDTGSYWCEAQTMAKSVLRSSQINVHRVPVADVSLETQPP
GGQVMEGDRVLICSVAMGTGDITFLWYKGAUGLNLQSKTQRSLTAEYEIPSVRESDAEQ

【 0 4 2 1 】

【 化 1 7 5 】

YYCVAENGYGPSGLVSITVRIPVSRPILMLRAPRAQAAVEDVLELHCEALRGSPPILY
WYFHEDITLGSRSAPSGGGASFNLSLTEHSGNYSCEANGLGAQRSEAVTLNFTVPTGA
RSNHLTSGVIEGLLSTLGPATVALLFCYGLKRKIGRRSARDPLRSLPSPLPQEFTYLNSP
TPGQLQPIYENVNVVSGDEVYSLAYYNQPEQESVAAETLGMEDKVSLEIYSRLRKANI
TDVDYEDAM

(配列番号 : 3 4)

(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、B細胞の発生およびリンパ腫形成において可能な役割を持つ推定免疫レセプター ; トランスロケーションによる遺伝子の脱調節はいくつかのB細胞悪性疾患で起こる)

PROTEIN SEQUENCE Full mllwvil... assaphr (1... 977 ; 977 aa), pI : 6.88 MW : 106468 TM : 1 [P] 遺伝子染色体 : 1q21, Genbankアクセッション番号 NP_112571.1 ; WO 2 0 0 3 0 2 4 3 9 2 (クレーム 2, 図 97) ; Nakayama et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277 (1) : 124-127 ; WO 2 0 0 3 0 7 7 8 3 6 ; WO 2 0 0 1 3 8 4 9 0 (クレーム 3, 図 18B-1 ~ 18B-2) ;

9 7 7 a a

【 0 4 2 2 】

【 化 1 7 6 】

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPIIFLQPPWTTVFQGERVTLTCKGFRFYSPQKTKWYHR
YLGKEILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLDFSSASLILQAPLSVFEGDSVV
LRCRAKAEVTLNNTIYKNDNVLAFLNKRTDFH1PHACLDNGAYRCTGYKESCCPVSSNT
VKIQVQEPFTRPVLRASSFQPISGNPVTLTCTQLSLERSDVPLRFRFFRDDQTLGLGWS
LSPNFQITAMWSKDSGFYWCKAATMPHSVISDSRPSWIQVQIPASHPVLTLSPEKALNFE
GTKVTLLHCETQEDSLRTLRYFYHEGVPLRHKSVCERGASISFSLTTENSGNYYCTADNG
LGAKPSKAVSLSVTPVSHPVNLSSPEDLIFEGAKVTLHCEAQRGSLPILYQFHHEDAA
LERRSANSAGGVAISFSLTAEHSGNYYCTADNGFGPQRSKAVSLSVTPVSHPVLTLSA
EALTFEGATVTLHCEVQRGSPQILYQFYHEDMPLWSSSTPSVGRVSFSFSLTEGHSGNYY
CTADNGFGPQRSEVVSLEFVTPVSRPILTLRVPRQAQVVGDLLELHCEAPRGSPPILYWF
YHEDVTLGSSSAPSGGEASFNLSLTAHSGNYSCEANGLVAQHS DTISLSVIVPVS RPI
LTFRAPRAQAVVGDLLELHCEALRGSSPILYWFYHEDVTLGKISAPSGGGASFNLSLTE
HSGIYSCEADNGPEAQRSEMVTCLKVAVPVS R P V L T L R A P G T H A A V G D L L E L H C E A L R G S P
L I L Y R F F H E D V T L G N R S S P S G G A S L N L S L T A E H S G N Y S C E A D N G L G A Q R S E T V T L Y I T G L
T A N R S G P F A T G V A G G L L S I A G L A A G A L L L Y C W L S R K A G R K P A S D P A R S P P D S D S Q E P T Y H
N V P A W E E L Q P V Y T N A N P R G E N V V Y S E V R I I Q E K K K H A V A S D P R H L R N K G S P I I Y S E V K V A
S T P V S G S L F L A S S A P H R

(配列番号 : 3 5)

また：全て個々に引用してその全体を援用する、WO 04/045516（2004年6月3日）；WO 03/000113（2003年1月3日）；WO 02/016429（2002年2月28日）；WO 02/16581（2002年2月28日）；WO 03/024392（2003年3月27日）；WO 04/016225（2004年2月26日）；WO 01/40309（2001年6月7日）、および2003年11月17日に出願された米国仮特許出願第60/520842号 [COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF TUMOR OF HEMATOPOIETIC ORIGIN] も参照されたし。

【0423】

実施形態において、リガンドーリンカー薬物結合体は式 I I I a を有し、ここで、該リガンドは CD30、CD40、CD70、Lewis Y 抗原のうちの少なくとも1つに結合するものを含めた抗体 Ab であり、 $w=0$ 、 $y=0$ であり、D は式 I b を有する。式 I I I a の例示的結合体は R^{17} が $-(CH_2)_5-$ である場合を含む。また、D が実施例3における化合物2の構造を有する式 I I I a のそのような結合体およびそのエステルも含まれる。また、約3～約8、1つの態様においては、約3～約5の薬物部分 D を含有する式 I I I a のそのような結合体、すなわち、 p が約3～8の範囲の値、例えば、約3～5である式 I a の結合体も含まれる。このパラグラフに記載した構造的特徴の組合せを含有する結合体も本発明の化合物の範囲内として考えられる。

10

【0424】

もう1つの実施形態において、リガンドーリンカー薬物結合体は式 I I I a を有し、ここで、リガンドは CD30、CD40、CD70、Lewis Y 抗原1つに結合する抗体 Ab であり、 $w=1$ 、 $y=0$ であって、D は式 I b を有する。 R^{17} が $-(CH_2)_5-$ である式 I I I a のこのような結合体が含まれる。または、W が $-Val-Cit-$ であり、および/または D が実施例3における化合物2の構造を有する式 I I I a のそのような結合体およびそのエステルも含まれる。また、約3～約8、好ましくは約3～約5の薬物部分 D を含有する式 I I I a のそのような結合体、すなわち、 p が約3～8、好ましくは約3～5の範囲の値である式 I a の結合体も含まれる。また、このパラグラフに記載した構造的特徴の組合せを含む結合体は例示的である。

20

【0425】

実施形態において、リガンドーリンカー薬物結合体は式 I I I a を有し、ここで、該リガンドは CD30、CD40、CD70、Lewis Y 抗原の1つに結合する抗体 Ab であり、 $w=1$ 、 $y=1$ であり、および D は式 I b を有する。 R^{17} が $-(CH_2)_5-$ である式 I I I a の結合体が含まれる。また、W が $-Val-Cit-$ であり；Y が式 X を有し；D が実施例3における化合物2の構造およびそのエステルを有し； p が約3～約8、好ましくは約3～約5の薬物部分 D である式 I I I a のそのような結合体も含まれる。このパラグラフに記載された構造的特徴の組合せを含む結合体もまた本発明の化合物の範囲内で考えられる。

30

【0426】

さらなる実施形態は、Ab が前記した腫瘍関連抗原 (1) ～ (35) (「TAA 化合物」) の1つに結合する抗体である抗体薬物結合体 (ADC、またはその薬学的に受容可能なその塩または溶媒和物である)。

40

【0427】

もう1つの実施形態は単離され精製された形態である TAA 化合物またはその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物である。

【0428】

もう1つの実施形態は、一定量の TAA 化合物またはその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物を患者、例えば、過剰増殖疾患を持つヒトに投与することを含み、該量は腫瘍細胞または癌細胞を殺傷し、またはその増殖を阻害するのに効果的なものであることを特徴とする、腫瘍または癌細胞を殺傷し、またはその増殖を阻害する方法である。

【0429】

50

もう1つの実施形態は、単独、または有効量のさらなる抗癌剤と共に、一定量のTAA化合物またはその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物を患者、例えば、過剰増殖疾患を持つヒトに投与することを含み、該量は癌を治療するのに効果的であることを特徴とする、癌を治療する方法である。

【0430】

もう1つの実施形態は、一定量のTAA化合物またはその薬学的に受容可能な塩または溶媒和物を患者、例えば、過剰増殖疾患を持つヒトに投与することを含み、該量は自己免疫疾患を治療するのに効果的であることを特徴とする、自己免疫疾患を治療する方法である。

【0431】

本発明で用いるのに適した抗体は、抗体の合成につき当該分野で知られたいずれかの方法によって、特に、化学合成によって、または組換え発現によって生産することができ、好ましくは、組換え発現技術によって生産される。

【0432】

(4.5.1 組換え抗体の生産)

本発明の抗体は、抗体の合成で有用であることが当該分野で知られたいずれかの方法、特に、化学合成によって、または組換え発現によって生産することができる。

【0433】

抗体、またはそのフラグメント、誘導体またはアナログの組換え発現は、該抗体をコードする核酸の構築を必要とする。もし抗体のヌクレオチド配列が知られていれば、抗体をコードする核酸を(例えば、Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242に記載されたように)化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから組み立てることができ、これは、抗体をコードする配列の一部を含有する重複するオリゴヌクレオチドを合成し、それらのオリゴヌクレオチドをアニールし、連結し、次いで、例えば、PCRによって連結されたオリゴヌクレオチドを増幅することを含む。

【0434】

別法として、抗体をコードする核酸分子は適当な源から作成することができる。もし特定の抗体をコードする核酸を含有するクローンが入手できないが、抗体の配列が知られていれば、抗体をコードする核酸は、例えば、配列の3'および5'末端にハイブリダイズすることができる合成プライマーを用いるPCR増幅によって、または特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いるクローニングによって、適当な源(例えば、抗体cDNAライブラリー、または免疫グロブリンを発現するいずれかの組織または細胞から作成したcDNAライブラリー)から得ることができる。

【0435】

もし特定の抗原を特異的に認識する抗体が商業的に入手できないならば(またはそのような免疫グロブリンをコードする核酸をクローニングするためのcDNAライブラリー用の源)、特定の抗原に特異的な抗体は当該分野で知られたいずれかの方法によって、例えば、患者、またはウサギまたはマウスのような適当な動物モデルを免疫化して、ポリクローナル抗体を作り出すことによって、またはより好ましくは、例えば、Kohler and Milstein (1975, Nature 256:495-497)によって記載されたように、またはKozbor et al. (1983, Immunology Today 4:72)またはCole et al. (1985 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)によって記載されているように、モノクローナル抗体を作り出すことによって作成することができる。別法として、抗体の少なくともFab部分をコードするクローンは、特異的な抗原に結合するFabフラグメントのクローンにつき(例えば、Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281に記載されているように)Fab発現ライブラリーをスクリーニングすることによって、または抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって(例えば、Clackson et al., 1991, Nature 352:624; H

10

20

30

40

50

ane et al., 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937) 得ることができる。

【0436】

一旦抗体の少なくとも可変ドメインをコードする核酸配列が得られたならば、それは、抗体の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含有するベクターに導入することができる（例えば、国際公開番号WO 86/05807；WO 89/01036；および米国特許第5122464号参照）。完全な抗体分子の発現を可能とする完全な軽鎖または重鎖を含有するベクターが入手できる。次いで、抗体をコードする核酸を用いて、鎖内ジスルフィド結合に参画する1以上の可変領域システイン残基をスルフヒドリル基を含有しないアミノ酸残基で置き換える（または欠失させる）のに必要なヌクレオチド置換または欠失を導入することができる。そのような修飾は、ヌクレオチド配列への特異的な突然変異または欠失の導入用に当該分野で知られたいずれかの方法、例えば、限定されるものではないが、化学的突然変異誘発およびインビトロ部位特異的突然変異誘発（Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551）によって行うことができる。

【0437】

加えて、適当な生物学的活性のヒト抗体分子からの遺伝子と共に適当な抗原特異性のマウス抗体分子からの遺伝子をスプライシングすることによる「キメラ抗体」（Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855；Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608；Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454）の生産用に開発された技術を用いることができる。キメラ抗体は、異なる部分が、ネズミモノクローナル抗体に由来する可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するもの、例えば、ヒト化抗体のような異なる動物種に由来する分子である。

【0438】

別法として、単一鎖抗体の生産のために記載された技術（米国特許第4,694,778号；Bird, 1988, Science 242:423-42；Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883；およびWard et al., 1989, Nature 334:544-54）を、単一鎖抗体を生産するように適合させることができる。単一鎖抗体は、アミノ酸ブリッジを介してFv領域の重鎖および軽鎖フラグメントを連結させ、その結果、単一鎖ポリペプチドを得ることによって形成される。また、E. coliにおける機能的Fvフラグメントの組み立てのための技術を用いることもできる（Skerra et al., 1988, Science 242:1038-1041）。

【0439】

特異的エピトープを認識する抗体フラグメントは公知の技術によって作ることができる。例えば、そのようなフラグメントは、限定されるものではないが、抗体分子のペプシン消化によって生産することができるF(ab')₂フラグメント、およびF(ab')₂フラグメントのジスルフィドブリッジを低下させることによって作ることができるFabフラグメントを含む。

【0440】

一旦抗体をコードする核酸配列が得られたならば、抗体の生産用のベクターを、当該分野でよく知られた技術を用いて組換えDNA技術によって生産することができる。当業者によく知られた方法を用いて、抗体コーディング配列および適当な転写および翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法は、例えば、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えを含む。例えば、Sambrook et al. (1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY) および Ausubel et al., (編, 1998, Current Protocols in

Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY) に記載された技術を参照されたし。

【0441】

抗体のヌクレオチド配列を含む発現ベクターまたは抗体のヌクレオチド配列を従来技術（例えば、エレクトロポレーション、リポソームトランスフェクション、およびリン酸カルシウム沈殿）によって宿主細胞に導入することができ、次いで、従来技術によってトランスフェクトされた細胞を培養して、抗体を得る。特別な実施形態において、抗体の発現は構成的、誘導的または組織特異的プロモーターによって調製される。

【0442】

組換え抗体を発現するのに用いる宿主細胞は *Escherichia coli* のような細菌細胞、または好ましくは特に全組換え免疫グロブリン分子の発現用の真核生物細胞いずれかであり得る。特に、ヒトサイトメガロウイルスからの主要即時型遺伝子プロモーターエレメントのようなベクターと組み合わせて、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) のような哺乳動物細胞は免疫グロブリン用の効果的な発現システムである (Foecking et al., 198, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, BioTechnology 8:2)。

【0443】

種々の宿主-発現ベクターシステムを利用して、免疫グロブリン抗体を発現させることができる。そのような宿主-発現システムは、それによって抗体のコーディング配列を生産し、引き続いて精製することができるビヘクルを表すが、また、適当なヌクレオチドコーディング配列で形質転換またはトランスフェクトされた場合に、インサイチュにて抗体免疫グロブリン分子を発現することができる細胞も表す。これらは、限定されるものではないが、免疫グロブリンコーディング配列を含有する組換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA または コスミド DNA 発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、*E. coli* および *B. subtilis*）のような微生物；免疫グロブリンコーディング配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、*Saccharomyces Pichia*）；免疫グロブリンコーディング配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）で感染させた昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス（例えば、CaMV）およびタバコモザイクウイルス (TMV)）を感染させた、または免疫グロブリンコーディング配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Ti プラスミド）で形質転換した植物細胞系；または哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシミアウイルス 7.5 K プロモーター）を含有する組換え発現構築体を保有する哺乳動物細胞系（例えば、COS、CHO、BH、293、293T、3T3 細胞）を含む。

【0444】

細菌系においては、発現すべき抗体に意図された使用に応じて、多数の発現ベクターを有利には選択することができる。例えば、大量のそのようなタンパク質を生産する場合、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を指令するベクターが望ましいであろう。そのようなベクターは、限定されるものではないが、抗体コーディング配列が、融合タンパク質が生産されるように lacZ コーディング領域とインフレームにて個々にベクターに連結できる *E. coli* 発現ベクター pUR278 (Rutherford et al., 1989, EMBO, J. 2:1791)；pINベクター (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109；Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509)；等を含む。また、pGEXベクターを用いて、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として外来性ポリペプチドを発現することができる。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であって、吸着、およびマトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの結合、続いての、遊離グルタチオ

10

20

30

40

50

ンの存在下での溶出によって容易に精製することができる。pGEXベクターは、クローン化された標的遺伝子産物がGST部位から放出できるように、トロンビンまたは第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含めるように設計される。

【0445】

昆虫系においては、*Autographa californica*核ポリヘドロシウイルス(*AcNPV*)または*Drosophila melanogaster*からの同様なウイルスを、外来性遺伝子を発現させるためのベクターとして用いる。ウイルスは*Spodoptera frugiperda*細胞内で成長する。抗体コーディング配列は、ウイルスの非-必須領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)に個々にクローン化することができ、かつ*AcNPV*プロモーター(例えば、ポリヘドリンプロモーター)の制御下に置くことができる。

10

【0446】

哺乳動物宿主細胞において、多数のウイルスベースの発現系を利用することができる。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、注目する抗体コーディング配列を、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体、例えば、後期プロモーターおよび三部リーダー配列に連結させることができる。次いで、このキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビボ組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入することができる。ウイルスゲノムの非-必須領域(例えば、領域E1またはE3)への挿入の結果、生きており、かつ感染した宿主において免疫グロブリン分子を発現することができる組換えウイルスが得られる(例えば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359参照)。また、特異的な開始シグナルが挿入された抗体コーディング配列の効果的な翻訳で必要であり得る。これらのシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接する配列を含む。さらに、開始コドンは、全インサートの翻訳を確実にするために、所望のコーディング配列のリーディングフレームと相内になければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは種々の起源、天然および合成のものであり得る。発現の効率は、適当な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含めることによって増強することができる(Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544参照)。

20

【0447】

加えて、宿主細胞株は、挿入された配列の発現を変調するように選択することができ、あるいは所望の特異的様式で遺伝子産物を修飾し、プロセッシングする。タンパク質産物のそのような修飾(例えば、グリコシル化)およびプロセッシング(例えば、切断)は、タンパク質の機能で重要であり得る。異なる宿主細胞は翻訳後プロセッシングおよびタンパク質および遺伝子産物の修飾について特徴的かつ特異的なメカニズムを有する。適当な細胞系または宿主系発現すべき外来性タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするように選択することができる。この目的で、遺伝子産物の一次転写体、グリコシル化およびリン酸化の適切なプロセッシングのための細胞マシーナリーを保有する真核生物宿主細胞を用いることができる。そのような哺乳動物宿主細胞は、限定されるものではないが、CHO、VERY、BH、Hela、COS、MDCK、293、293T、3T3、WI38、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47D、CR

30

40

【0448】

組換えタンパク質の長期の高収率生産のためには、安定な発現が好ましい。例えば、抗体を安定に発現する細胞系を作製することができる。ウイルスの複製起点を含有する発現ベクターを用いるよりはむしろ、適当な発現制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)、および選択マーカーによって制御されるDNAで形質転換することができる。外来性DNAの導入に続いて、作製された細胞は、豊富化された培地中で1~2日間増殖させることができ、次いで、選択培地にスイッチする。組換えプラスミド中の選択マーカーは耐性を選択に付与し、細胞がプラスミドをその染色体に組み込み、増殖して、今度は、クローン化し、細胞系へ拡

50

大培養することができるフォーカスを形成するのを可能とする。この方法は、抗体を発現する細胞系を作製するのに有意に用いることができる。そのような作製された細胞系は、抗体と直接的にまたは間接的に相互作用する腫瘍抗原のスクリーニングおよび評価で特に有用であり得る。

【0449】

限定されるものではないが、単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ (Wigler et al., 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy et al., 1980, Cell 22:817) 遺伝子を、各々、tk⁻、hgprt⁻、またはaprt⁻細胞で使うことができる。また、抗代謝産物耐性は以下の遺伝子についての選択の基礎として用いることができる：メトトレキセートに対する耐性を付与するDHFR (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527)；ミコフェノール酸に対する耐性を付与するgpt (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072)；アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与するneo (Clinical Pharmacology 12:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; およびMorgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem, 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215) およびヒグロマイシンに対する耐性を付与するhygro (Santerre et al., 1984, Gene 30:147)。用いることができる組換えDNA技術の当該分野で通常知られている方法はAusubel et al. (編, 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; および12および13章, Dracopoli et al. (編), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1) に記載されている。

【0450】

抗体の発現レベルはベクター増幅によって増大させることができる (レビューについては、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987) 参照)。抗体を発現するベクター系におけるマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞の培養に存在する阻害剤のレベルの増大は、マーカー遺伝子のコピーの数を増大させる。増幅された領域が抗体のヌクレオチド配列に関連するので、抗体の生産も増大する (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257)。

【0451】

宿主細胞は2つの発現ベクターで共トランスフェクトすることができ、第一のベクターは重鎖由来ポリペプチドをコードし、第二のベクターは軽鎖由来ポリペプチドをコードする。2つのベクターは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの同等な発現を可能とする同一の選択マーカーを含有することができる。別法として、単一ベクターを用いて、重鎖および

10

20

30

40

50

軽鎖ポリペプチド双方をコードさせることができる。そのような状況において、軽鎖は重鎖の前において、過剰な毒性フリー重鎖を回避すべきである（Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197）。重鎖および軽鎖についてのコーディング配列はcDNAまたはゲノムDNAを含むことができる。

【0452】

一旦抗体が組換えにより発現されたならば、それは、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー、特にプロテインA後の特異的抗原に対する親和性による、およびサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心、分別溶解性によって、またはタンパク質の精製用のいずれかの他の標準技術によって、抗体の精製のための当該分野で知られたいずれかの方法を用いて精製することができる。

10

【0453】

さらにもう1つの例示的实施形態において、抗体はモノクローナル抗体である。

【0454】

いずれの場合においても、ハイブリッド抗体は、好ましくは、選択するハプテンに対して特異的な1以上の結合部位との、または標的抗原、例えば、腫瘍、自己免疫疾患、感染性生物、または他の病気状態に関連する抗原に対して特異的な1以上の結合部位とのデュアル特異性を有する。

【0455】

（4.5.2 抗体の生産）

20

抗体の生産は抗-CD30抗体を参照して説明するが、TNFレセプターファミリーの他のメンバーに対する抗体を生産することができ、同様に修飾することができるのは当業者に明らかであろう。抗体の生産のためのCD30の使用は例示的なものに過ぎず、限定する意図のものではない。

【0456】

抗体の生産で用いるべきCD30抗原は、例えば、所望のエピトープを含有する、CD30の細胞外ドメインまたはその部分の可溶性形態であり得る。別法として、それらの細胞表面においてCD30を発現する細胞（例えば、L540（T細胞表現型を持つホジキンリンパ腫由来細胞系）およびL428（B細胞表現型を持つホジキンリンパ腫由来細胞））を用いて抗体を作製することができる。抗体を作製するのに有用なCD30の他の形態は当業者に明らかであろう。

30

【0457】

もう1つの例示的实施形態において、抗体の生産で用いるべきErbb2抗原は、例えば、所望のエピトープを含有する、Erbb2の細胞外ドメインまたはその部分の可溶性形態であり得る。別法として、それらの細胞表面でErbb2を発現する細胞（例えば、Erbb2を過剰発現するように形質転換されたNIH-3T3細胞；またはSK-BR-3細胞のような癌腫細胞系、Stancovski et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8691-8695（1991）参照）を用いて抗体を作製することができる。抗体を作製するのに有用なErbb2の他の形態は当業者に明らかであろう。

40

【0458】

（i）ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連抗原およびアジュバントの複数皮下（sc）または腹腔内（ip）注射によって動物において生起させる。二機能性または誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を通じての結合体化）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リシン残基を通じる）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOCl₂、またはRおよびR¹が異なるアルキル基であるR¹N=C=N Rを用いて、関連抗原を、免疫化すべき種において免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペッドヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、またはダイズトリプシン阻害剤に結合体化するのが有用であろう。

50

【0459】

例えば、100 μ g または 5 μ g のタンパク質または結合体（各々、ウサギまたはマウス用）と3容量のフロイントの完全アジュバントを合わせ、該溶液を皮内に複数部位に注射することによって、動物を抗原、免疫原性結合体、または誘導体に対して免疫化する。1ヵ月後、複数部位における皮下注射によって、フロイントの完全アジュバント中のペプチドまたは結合体の元の量の1/5～1/10を動物にブースター注射する。7～14日後、動物から採血し、血清を抗体力価につきアッセイする。力価がプラトーとなるまで動物にブースター注射する。好ましくは、動物に、同一の抗原の結合体であるが、異なるタンパク質に結合体したおおよび／または異なる架橋剤を通じるものをブースター注射する。また、結合体は、タンパク質融合として組換え細胞培養で作製することができる。また、ミョウバンのような凝集剤を適切には用いて、免疫系を増強する。

10

【0460】

(ii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は実質的に均一な抗体の集団から得られ、すなわち、集団を含む個々の抗体は、微量に存在し得る可能な天然に生じる突然変異を除いて同一である。かくして、修飾語「モノクローナル」は、区別される抗体の混合物ではない抗体の特性を示す。

【0461】

例えば、モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975) によって最初に記載されたハイブリドーマを用いて作成することができるか、あるいは組換えDNA方法によって作製することができる（米国特許第4816567号）。

20

【0462】

ハイブリドーマ方法においては、マウス、またはハムスターのような他の適当な宿主細胞を前記したように免疫化して、免疫化で用いられるタンパク質に特異的に結合する抗体を生産する、または生産することができるリンパ球を誘導する。別法として、リンパ球はインビトロで免疫化することができる。次いで、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いてリンパ球を骨髓腫細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)）。

30

【0463】

かく調製されたハイブリドーマ細胞を、好ましくは、未融合の親骨髓腫細胞の増殖または生存を阻害する1以上の物質を含有する適当な培養基に接種し、増殖させる。例えば、もし親骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRPT）を欠くならば、ハイブリドーマのための培養基は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含み（HAT培地）、その物質はHGPRT-欠乏細胞の増殖を妨げる。

【0464】

好ましい骨髓腫細胞は、効果的に融合し、選択された抗体-生産細胞によって抗体の安定な高レベル生産を支持し、かつHAT培地のような培地に感受性であるものである。これらのうち、好ましい骨髓腫細胞系は、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USAから入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍、およびAmerican Type Culture Collection, Rockville, Maryland USAから入手可能なSP-2またはX63-Ag8-653細胞に由来するもののようなネズミ骨髓腫系である。また、ヒト骨髓腫およびマウス-ヒトヘロ骨髓腫細胞系もまた、ヒトモノクローナル抗体の生産について記載されている（Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984)；およびBrodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marc

40

50

el Dekker, Inc., New York, 1987))。

【0465】

ハイブリドーマ細胞が増殖する培養基は、抗原に対して向けられたモノクローナル抗体の生産につきアッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生産されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈澱によって、またはラジオイムノアッセイ (RIA) または酵素-結合免疫吸着検定法 (ELISA) のようなインビトロ結合アッセイによって決定される。モノクローナル抗体の結合アフィニティーは、Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980) の Scatchard 分析によって測定することができる。

【0466】

所望の特異性、アフィニティーおよび/または活性の抗体を生産するハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンは限界希釈手法によってサブクローン化し、標準的な方法によって増殖させることができる (Goding, Monoclonal Antibodies, Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。この目的での適当な培養基は、例えば、D-MEM または RPMI-1640 培地を含む。加えて、ハイブリドーマ細胞は動物において腹水液腫瘍としてインビボで増殖させることができる。

【0467】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、プロテイン A-Sepharose、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーのような慣用的な抗体精製手法によって培養基、腹水液または血清から分離する。

【0468】

モノクローナル抗体をコードする DNA は、(例えば、ネズミ抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に対して特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって) 慣用的手法を用いて容易に単離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞はそのような DNA の好ましい源として供される。一旦単離されれば、DNA は発現ベクターに入れることができ、これは、次いで、そうでなければ抗体タンパク質を生産しない、E. coli 細胞、シミアン COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、または骨髓腫細胞のような宿主細胞にトランスフェクトして、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を得る。抗体をコードする DNA の細菌における組換え発現についてのレビュー論文は Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) および Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992) を含む。

【0469】

さらなる実施形態において、モノクローナル抗体または抗体フラグメントは McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990) に記載された技術を用いて生じさせた抗体ファージライブラリーから単離することができる。Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) および Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) は、ファージライブラリーを用いる、各々、ネズミおよびヒト抗体の単離を記載する。引き続いての刊行物は、鎖シャッフリング (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992))、ならびにコンビナトリアル感染、および非常に大きなファージライブラリーを構築するための戦略としてのインビボ組換え (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)) によって、高アフィニティー (nM 範囲) ヒト抗体の生産を記載する。かくして、これらの技術はモノクローナル抗体の単離のための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に対する活力のある代替法である。

【0470】

DNA は、例えば、相同ネズミ配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインに対す

10

20

30

40

50

るコーディング配列で置き換えることによって（米国特許第4816567号；およびMorrison, et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851）、または非-免疫グロブリンポリペプチドに対するコーディング配列の全てまたは一部を免疫グロブリンコーディング配列に共有結合により連結することによって修飾することもできる。

【0471】

典型的には、そのような非-免疫グロブリンポリペプチドを、抗体の定常ドメインに代えて置換し、あるいは抗体の1つの抗原-組合せ部位の可変ドメインに代えて置換して、抗原に対する特異性を有する1つの抗原-組合せ部位、および異なる抗原に対する特異性を有するもう1つの抗原-組合せ部位を含むキメラ二重特異性抗体を作る。

10

【0472】

(iii) ヒト化抗体

ヒト化抗体は、非-ヒトである源からそれに導入された1以上のアミノ酸残基を有することができる。これらの非-ヒトアミノ酸残基は、しばしば、「輸入」残基と言われ、それは、典型的には、「輸入」可変ドメインから取られる。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列に代えて超可変領域配列で置換することによって、Winterおよび共同研究者の方法に従って実質的に行うことができる（Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)；Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)；Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)）。従って、そのような「ヒト化」抗体はキメラ抗体であり（米国特許第4,816,567号）、ここで、実質的に無傷ヒト可変ドメインよりも少ないモノが非-ヒト種からの対応する配列によって置き換えられている。現実的には、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかの超可変領域残基および、恐らくは、いくつかのFR残基がげっ歯類抗体における類似の部位からの残基によって置き換えられたヒト抗体である。

20

【0473】

ヒト化抗体を作成するにおいて用いるべきヒト可変ドメイン（軽鎖および重鎖双方）の選択は、抗原性を低下させるのに非常に重要である。いわゆる「ベストフィット方法」に従って、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列は公知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングされる。次いで、げっ歯類のそれと最も近いヒト配列はヒト化抗体についてのヒトフレームワーク領域（FR）として許容される（Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993)；Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)）。もう1つの方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワーク領域を用いる。同一のフレームワークを数個の異なるヒト化抗体で用いることができる（Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)；Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)）。

30

【0474】

もう1つの実施形態において、抗体は抗原に対する高い親和性および他の好都合な生物学的特性の保持でヒト化することができる。ヒト化抗体は、親およびヒト化配列の三次元モデルを用いる親配列および種々の概念的ヒト化産物の分析のプロセスによって調製することができる。三次元免疫グロブリンモデルは通常入手でき、当業者が精通している。選択された候補免疫グロブリン配列の可能な三次元立体配座構造を示し、提示するコンピュータプログラムが入手できる。これらの表示の精査は、候補免疫グロブリン配列の機能化における残基のありそうな役割の分析、すなわち、その抗原に結合する候補免疫グロブリンの能力に影響する残基の分析を可能とする。このようにして、FR残基が標的抗原に対する増大した親和性のような所望の抗体特徴が達成されるように、需要者および輸入配列から選択し、組み合わせることができる。一般に、超可変領域残基は抗原結合への影響に直接的にかつ最も実質的に関与する。

40

50

【0475】

種々の形態のヒト化抗体が考えられる。例えば、ヒト化抗体はFabのような抗体フラグメントであり得る。別法として、ヒト化抗体は無傷IgG1抗体のような無傷抗体であり得る。

【0476】

実施例は例示的ヒト化抗-ErbB2抗体の生産を記載する。ヒト化抗体は、例えば、ヒト可変重鎖ドメインに取りこまれた非ヒト超可変領域残基を含み、さらに、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)に記載された可変ドメインナンバリング系を利用する69H、71Hおよび73Hよりなる群から選択される位置におけるフレームワーク領域(FR)置換を含むことができる。1つの実施形態において、ヒト化抗体は位置69H、71Hおよび73Hの2つまたは全てにおいてFR置換を含む。もう1つの例は、HERCEPTIN(登録商標)処方からの精製されたトラスツズマブ抗体の調製を記載する。

【0477】

(iv) ヒト抗体

ヒト化に対する代替法として、ヒト抗体を作り出すことができる。例えば、今日、免疫化に際して、内因性免疫グロブリン生産の不存在下でヒト抗体の十分なレパートリーを生産することができるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を生産することが可能である。例えば、キメラおよび生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖連結領域(J_H)遺伝子のホモ接合性欠失の結果、内因性抗体の生産の完全な阻害がもたらされると記載されている。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子のそのような生殖系列突然変異体マウスへの導入の結果、抗原調製に際して、ヒト抗体が生産される。例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); および米国特許第5,591,669号、第5,589,369号および第5,545,807号参照。

【0478】

別法として、ファージディスプレイ技術(McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990))を用いて、未免疫化ドナーからの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーからインビトロにてヒト抗体および抗体フラグメントを生じさせることができる。この技術に従い、抗体Vドメイン遺伝子をM13またはfdのようなフィラメント状バクテリオファージの主要または従たるコートタンパク質遺伝子いずれかにインフレームをクローン化し、ファージ粒子の表面で機能的抗体フラグメントとして表示される。フィラメント状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含有するので、抗体の機能的特性に基づく選択の結果、それらの特性を呈する抗体をコードする遺伝子が選択される。かくして、ファージはB細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージディスプレイは種々のフォーマットで行うことができる;それらのレビューについては、例えば、Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993) 参照。V遺伝子セグメントの数個の源がファージディスプレイで用いることができる。Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)は、免疫化マウスの脾臓に由来するV遺伝子の小さなランダムコンビナトリアルライブラリーから抗-オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。未免疫化ヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーを構築し、(自己-抗原を含めた)抗原の多様なアレイに対する抗体をMarks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)、またはGriffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)によって記載され

た技術に実質的に従って単離することができる。また、米国特許第5565332号および第5573905号参照。先に議論したように、ヒト抗体はインビトロで活性化されたB細胞によって作り出すこともできる（米国特許第5567610号および第5229275号参照）。ヒト抗-CD30抗体は米国特許出願第10/338,366号に記載されている。

【0479】

(v) 抗体フラグメント

抗体フラグメントの生産のために種々の技術が開発されている。伝統的には、これらのフラグメントは無傷抗体のタンパク質分解消化を介して誘導された（例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); および Brennan et al., Science, 229:81 (1985) 参照）。しかしながら、これらのフラグメントは、今日、組換え宿主細胞によって直接的に生産され得る。例えば、抗体フラグメントは先に議論した抗体ファージライブラリーから単離することができる。別法として、Fab'-SHフラグメントはE. coliから直接的に回収し、化学的にカップリングさせてF(ab')₂フラグメントを形成することができる（Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)）。もう1つのアプローチに従うと、F(ab')₂フラグメントは組換え宿主細胞培養から直接的に単離することができる。抗体フラグメントの生産のための他の技術は当業者にあきらかであろう。他の実施形態において、選択された抗体は一本鎖Fvフラグメント(scFv)。WO 93/16185; 米国特許第5,571,894号; および米国特許第5,587,458号参照。抗体フラグメントは、例えば、米国特許第5,641,870号に記載されたような「線状抗体」であってもよい。そのような線状抗体フラグメントは一特異的または二特異的であってもよい。

【0480】

(vi) 二特異的抗体

二特異的抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的二特異的抗体はCD30タンパク質の2つの異なるエピトープに結合することができる。別法として抗-CD30アームを、FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)およびFcγRIII(CD16)のような、IgGに対するFcレセプター(FcγR)に結合するアームと組み合わせて、CD30-発現細胞に対する細胞防御メカニズムに焦点を当てることができる。また、二特異的抗体を用いて、CD30を発現する細胞に対して細胞傷害性剤を局所化することもできる。

【0481】

全長二特異的抗体の伝統的生産は2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の発現に基づき、ここで、2つの鎖は異なる特異性を有する(Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダム分類のため、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10の異なる抗体分子の潜在的混合物を生じ、そのうち1つのみが正しい二特異的構造を有する。通常アフィニティークロマトグラフィー工程によってなされる正しい分子の精製はかなり面倒であり、生成物の収率は低い。同様な手法がWO 93/08829、およびTraunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)に開示されている。異なるアプローチに従って、所望の結合特異性(抗体-抗原組合せ部位)を持つ抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合させる。該融合は、好ましくは、ヒンジ、CH2およびCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。融合の少なくとも1つに存在する、軽鎖結合に必要な部位を含有する第一の重鎖定常領域(CH1)を有するのが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNAおよび、所望であれば、免疫グロブリン軽鎖を別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に共トランスフェクトする。これは、構築で用いる3つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適の収率を供する場合の実施形態において3つのポリペプチドフ

ラグメントの相互の割合を調整するにおいて大きな柔軟性を提供する。しかしながら、等しい比率の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現の結果、高い収率が得られる場合、または比率が特定の重要性のものでない場合、1つの発現ベクターに2つまたは全ての3つのポリペプチド鎖に対するコーディング配列を挿入することができる。

【0482】

このアプローチの1つの実施形態において、二特異的抗体は、1つのアームにおける第一の結合特異性を持つハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他のアームにおける（第二の結合特異性を供する）ハイブリッド免疫グロブリン重鎖－軽鎖対よりなる。この非対称構造は、望まない免疫グロブリン鎖組合せからの所望の二特異的化合物の分離を容易とすることが見出された。というのは、二特異的分子の1つの半分のみににおける免疫グロブリン軽鎖の存在は分離の容易な方法を提供するからである。このアプローチはWO 94/04690に開示されている。二特異的抗体を作り出すことのさらなる詳細については、例えば、Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986) 参照。

【0483】

米国特許第5,731,168号に記載されたもう1つのアプローチによると、抗体分子の対の間の界面は、組換え細胞培養から回収されたヘテロダイマーのパーセンテージを最大化するように作成することができる。好ましい界面は、抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法においては、第一の抗体分子の界面からの1以上の小さなアミノ酸側鎖はより大きな側鎖で置き換えられる（例えば、チロシンまたはトリプトファン）。大きなアミノ酸側鎖をより小さなもの（例えば、アラニンまたはスレオニン）で置き換えることによって、大きな側鎖に対する同一または同様なサイズの保証「キャピティ」を第二の抗体分子の界面に作り出す。これは、ホモダイマーのような他の望まない最終産物よりもヘテロダイマーの収率を増加させるメカニズムを提供する。

【0484】

抗体フラグメントから二特異的抗体を作り出す技術もまた文献に記載されている。例えば、二特異的抗体は化学結合を用いて調製することができる。Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985) は、無傷抗体がタンパク質分解により切断されてF(ab')₂フラグメントを生じる手法を記載する。これらのフラグメントはジチオール複合体化剤ヒ酸ナトリウムの存在下で還元されて、隣接ジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を妨げる。ついで、生じたFab'フラグメントをチオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換する。ついで、メルカプトエチルアミンでの還元によって、Fab'-TNB誘導体の1つをFab'-チオールに再度変換し、等モル量の他のFab'-TNB誘導体と混合して、二特異的抗体を形成する。生じた二特異的抗体は、酵素の選択的固定化のための剤として用いることができる。

【0485】

最近の進歩は、E.coliからのFab'-SHフラグメントの直接的回収を容易とし、これは化学的にカップリングして二特異的抗体を形成することができる。Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992) は十分にヒト化された二特異的抗体F(ab')₂分子の生産を記載する。各Fab'フラグメントはE.coliから別々に分泌され、インビトロにて指向性化学カップリングに付され、二特異的抗体を形成した。

【0486】

組換え細胞培養から直接的に二特異的抗体フラグメントを作成し、それを単離する種々の技術も記載されている。例えば、二特異的抗体はロイシンジッパーを用いて生産されている。Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。FosおよびJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドは遺伝子誘導によって2つの異なる抗体のFab'部分に連結された。抗体ホモダイマーはヒンジ領域が還元されて、モノマーを形成し、次いで、再度酸化されて、抗体ヘテロダイマーを形成した。この方法が抗体ホモダイマーの生産にも利用することができる。

Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) によって記載された「二重特異性抗体」技術は、二特異的抗体フラグメントを作成するための代替メカニズムを提唱した。フラグメントは、同一鎖上の2つのドメインの間での対合を可能とするには余りにも短いリンカーによって、軽鎖可変ドメイン (V_L) に連結された重鎖可変ドメイン (V_H) を含む。従って、1つのフラグメントの V_H および V_L ドメインは、もう1つのフラグメントの相補的 V_L および V_H ドメインと強いて対合させ、それにより、2つの抗原-結合部位を形成する。単一鎖 Fv (sFv) ダイマーの使用によって二特異的抗体フラグメントを作成するためのもう1つの戦略も報告されている。Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994) 参照。

10

【0487】

2を超える価数を持つ抗体が考えられる。例えば、三特異的抗体を調製することができる。Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)。

【0488】

(vii) 他のアミノ酸配列の修飾

本明細書中に記載された抗体のアミノ酸配列の修飾が考えられる。例えば、抗体の結合親和性および／または他の生物学的特性を改良するのが望ましいであろう。適当なヌクレオチド変化を抗体の核酸に導入することによって、またはペプチド合成によって、抗体のアミノ酸配列変種を調製する。そのような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、および／または該残基への挿入および／または該残基の置換を含む。欠失、挿入および置換のいずれかの組合せは最終構築体に到達されるようになされ、但し、最終構築体は所望の特徴を保有するものとする。アミノ酸変化は、グリコシル化部位の数または位置の変化のような、抗体の翻訳後プロセスを改変することもできる。

20

【0489】

突然変異誘発に対して好都合な位置である抗体のある残基または領域を同定するための有用な方法は、Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989) によって記載された「アラニン走査突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的残基の残基または基が同定され（例えば、arg、asp、his、lys および glu のような荷電残基）、中性または負に荷電されたアミノ酸（最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン）によって置き換えて、アミノ酸と抗原との相互作用に影響させる。次いで、置換に対する機能的感受性を示すそれらのアミノ酸位置は、さらなるまたは他の変種を置換の部位において、または該部位のためにさらなるまたは他の変種を導入することによって精錬される。かくして、アミノ酸配列変動を導入するための部位は予め決定されているが、突然変異自体の性質は予め決定する必要がない。例えば、与えられた部位における突然変異の性能の分析するためには、ala 走査またはランダム突然変異誘発を標的コドンまたは領域で行い、発現された抗体変種は所望の活性につきスクリーニングされる。

30

【0490】

アミノ酸配列挿入は長さが1つの残基から100以上の残基を含有するポリペプチドの範囲のアミノ-および／またはカルボキシル-末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例はN-末端メチオニル残基を持つ抗体、または細胞傷害性ポリペプチドに融合した抗体を含む。抗体分子の他の挿入変種は、抗体の血清中半減期を増加させる抗体のN-またはC-末端の（例えば、ADEPTのための）酵素またはポリペプチドへの融合を含む。

40

【0491】

もう1つのタイプの変種はアミノ酸置換変種である。これらの変種は異なる残基によって置き換えられた抗体分子における少なくとも1つのアミノ酸残基を有する。置換突然変異誘発のための最も興味のある部位は超可変領域を含むが、FR改変も考えられる。

【0492】

抗体の生物学的特性における実質的修飾は、(a) 例えば、シートまたはラセン立体配

50

座としての、置換の領域におけるポリペプチド骨格の構造、(b) 標的部位における分子の電荷または疎水性、または(c) 側鎖の嵩高性を維持するに対するそれらの効果が有意に異なる置換を選択することによって達成される。天然に生じる残基は通常側鎖の特性に基づいて群に分けられる：

- 1) 疎水性：ノルロイシン、met. ala、val、leu、ile；
- 2) 中性親水性：cys、ser、thr；
- 3) 酸性：asp、glu；
- 4) 塩基性：asn、gln、his、lys、arg；
- 5) 鎖の向きに影響する残基：gly、pro；および
- 6) 芳香族：trp、tyr、phe。

10

【0493】

非一保存的置換はもう1つのクラスに代えてのこれらのクラスの1つのメンバーを交換することを含む。

【0494】

特に好ましいタイプの実質的変種は、親抗体（ヒト化またはヒト抗体）の1以上の超可変領域残基を置換することを含む。一般に、さらなる開発のために選択された得られた変種は、それからそれらが生じた親抗体に対して改良された生物学的特性を有する。そのような置換変種を生じさせるための便宜な方法は、ファージディスプレイを用いるアフィニティー突然変異を含む。簡単に述べれば、数個の超可変領域部位（例えば、6～7部位）を、各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生じさせるために突然変異させる。各生じた抗体変種を、各粒子内にパッケージされたM13の遺伝子IIIに対する融合としてのフィラメント状ファージ粒子からの一価様式で表示される。次いで、ファージ表示変種を本明細書中に開示されたそれらの生物学的活性（例えば、結合親和性）につきスクリーニングする。修飾用の候補超可変領域部位を同定するために、アラニン走査突然変異誘発を行って、抗原結合に有意に貢献する超可変領域残基を同定することができる。別法として、あるいは加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体および抗原の間の接触点を同定するのが有意であろう。そのような接触残基および隣接残基は、ここに技巧を凝らした技術に従った置換についての候補である。一旦そのような変種が生じたならば、変種のパネルを本明細書中に記載されたスクリーニングに付し、1以上の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体をさらなる開発のために選択することができる。

20

30

【0495】

エファクター機能に関して本発明の抗体を修飾して、例えば、抗原-依存性細胞-媒介細胞傷害性(ADCC)および/または抗体の補体依存性細胞傷害性(CDC)を増強するのが望ましいであろう。これは、抗体のFc領域に1以上のアミノ酸置換を導入することによって達成することができる。別法として、または加えて、システイン残基をFc領域に導入することができ、それにより、この領域における鎖間ジスルフィド結合形成を可能とする。各生じたホモダイマー抗体は改良された内部化能力および/または増大した補体-媒介細胞殺傷および抗体-依存性細胞傷害性(ADCC)を有することができよう。Caron et al. J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) および Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992) 参照。増大した抗-腫瘍活性を持つホモダイマー抗体は、Wolff et al. Cancer Research 53: 2560-2565 (1993) に記載されたように、ヘテロ二官能性架橋剤を用いて調製することもできる。別法として、デュアルFc領域を有し、それにより、増強された補体溶解およびADCC能力を有することができる抗体を作成することができる。Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989) 参照。

40

【0496】

抗体の血清中半減期を増加させるための、例えば、米国特許第5739277号に記載されているように、サルベージレセプター結合エピトープを抗体（特に、抗体フラグメント）に組み込むことができる。本明細書中に用いるように、用語「サルベージレセプター

50

結合エピトープ」とは、IgG分子のインビボ血清中半減期を増大させることを担うIgG分子のFc溶液のエピトープをいう（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃またはIgG₄）。

【0497】

(viii) グリコシル化変種

本発明のADCにおける抗体はそれらの定常領域における保存された位置でグリコシル化することができる (Jefferys and Lund, (1997) Chem. Immunol. 65:111-128; Wright and Morrison, (1997) TibTECH 15:26-32)。免疫グロブリンのオリゴ糖側鎖はタンパク質の機能 (Boyd et al., (1996) Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe and Howard, (1990) Biochem. 29:4175-4180)、および糖タンパク質の立体配座および示された三次元表面に影響し得る糖タンパク質の部分の間の分子内相互作用 (Jefferys and Lund, 前掲; Wyss and Wagner, (1996) Current Opin. Biotech. 7:409-416) に対して影響する。また、オリゴ糖は与えられた糖タンパク質を特異的認識構造に基づいてある種の分子に標的化するように働くこともできる。例えば、無ガラクトシル化IgGにおいては、オリゴ糖部位はCH₂空間間から「フリップ」アウトし、末端N-アセチルグルコサミン残基はマンノース結合タンパク質に結合するのに利用できるようになったと報告されている。 (Malhotra et al., (1995) Nature Med. 1:237-243)。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞で生じたCAMPATH-1H (ヒトリンパ球のCDw52抗原を認識する組み換えヒト化ネズミモノクローナルIgG1抗体) からのオリゴ糖のグリコペプチダーゼによる除去の結果、補体媒介溶解において完全な還元 (CMCL) が起こり (Boyd et al., (1996) Mol. Immunol. 32:1311-1318)、他方、ノイラミニダーゼを用いるシアル酸残基の選択的除去の結果、DMCLは喪失されなかった。また、抗体のグリコシル化は抗体-依存性細胞傷害 (ADCC) に影響することが報告されている。特に、β(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnTIII) のテトラサイクリン-調節発現、GlcNAcを二等分するグリコシルトランスフェラーゼ触媒形成が伴うCHO細胞は改良されたADCC発生を有すると報告された (Umana et al., (1999) Mature Biotech. 17:176-180)。

【0498】

抗体のグリコシル化は典型的にはN-結合かO-結合いずれかである。N-結合とは、炭水化物部位のアスパラギン残基の側鎖への付着をいう。Xがプロリン以外のいずれかのアミノ酸であるポリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニンは、アスパラギン側鎖への炭水化物部位酵素付着のための認識配列である。かくして、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は可能なグリコシル化部位を生じる。O-結合グリコシル化とは、糖N-アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシリソースのうちの1つのヒドロキシルアミノ酸、最も普通にはセリンまたはスレオニンへの付着をいうが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンを用いることもできる。

【0499】

抗体のグリコシル化変種は、抗体のグリコシル化パターンが改変された変種である。改変とは、抗体で見出される1以上の炭水化物部位の欠失、抗体への1以上の炭水化物部位の付加、グリコシル化の組成 (グリコシル化パターン) の変化、グリコシル化の程度等を意味する。

【0500】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、便宜には、それが (N-結合グリコシル化部位のための) 前記ポリペプチド配列の1以上を含有するようにアミノ酸配列を改変することによって達成される。改変は、1以上のセリンまたはスレオニン残基の (O-結合グリコシ

ル化部位のための) 元の抗体への付加、または該残基による置換によってなすこともできる。同様に、グリコシル化部位の除去は、抗体の天然グリコシル化部位内でのアミノ酸改変によって達成することができる。

【0501】

アミノ酸配列は、通常、基礎となる核酸配列を改変することによって改変される。これらの方法は、限定されるものではないが、天然源からの単離（天然に生じるアミノ酸配列変種の場合）または先に調製された抗体の変種または非一変種バージョンのオリゴヌクレオチド媒介（または部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、およびカセット突然変異誘発を含む。

【0502】

抗体の（グリコシル化パターンを含めた）グリコシル化は、アミノ酸配列または基礎となるヌクレオチド配列を改変することなく改変することもできる。グリコシル化は抗体を発現するのに用いる宿主細胞に大いに依存する。組換え糖タンパク質、例えば、抗体の発現で用いる潜在的療法としての細胞型はまれには天然細胞であるので、抗体のグリコシル化パターンにおける有意な変動を予測することができる。例えば、Hse et al., (1997) J. Biol. Chem. 272: 9062-9070 参照。宿主細胞の選択に加えて、抗体の組換え生産の間にグリコシル化に影響する因子は増殖の態様、培地処方、培養密度、酸素付加、pH、精製スキーム等を含む。オリゴ糖生産に関与するある種の酵素の導入または過剰発現を含めた特定の宿主生物で達成されるグリコシル化パターンを改変するために種々の方法が提唱されてきた（米国特許第5047335号；第5510261号；第5278299号）。グリコシル化、またはある種のタイプのグリコシル化は、例えば、エンドグリコシダーゼH（Endo H）を用いて糖タンパク質から酵素的に除去することができる。加えて、組換え宿主細胞を遺伝的に作成し、例えば、多糖のあるタイプをプロセッシングするにおいて欠陥を作り出すことができる。これらおよび同様な技術は当該分野でよく知られている。

【0503】

抗体のグリコシル化構造は、レクチンクロマトグラフィー、NMR、質量分析、HPLC、GPC、単糖組成分析、順次の酵素消化、および高pHアニオン交換クロマトグラフィーを用いて電荷に基づいてオリゴ糖を分離するHPAEC-PADを含めた、炭水化物分析の従来技術によって容易に分析することができる。分析目的でのオリゴ糖を放出する方法も知られており、限定されるものではないが、（ペプチド-N-グリコシダーゼF/エンド-β-ガラクトシダーゼを用いて通常行われる）酵素処理、主としてO-結合構造を放出するために相当なアルカリ性の環境を用いる脱離、およびN-およびO-結合オリゴ糖双方を放出するために無水ヒドラジンを用いる化学的方法を含む。

【0504】

(4. 5. 2a 抗体-薬物結合体(ADC)のためのスクリーニング)

トランスジェニック動物および細胞系は、Lewis Y、CD30、CD40およびCD70を含めたタンパク質の過剰発現に関与する病気または疾患の予防的または治療的処置として能力を有する抗体薬物結合体(ADC)をスクリーニングするのに特に有用である。トランスジェニック動物および細胞系は、HER2の過剰発現に関連する病気または疾患の予防的または治療的処置としての能力を有する抗体薬物結合体(ADC)をスクリーニングするのに特に有用である(US6632979)。有用なADCについてのスクリーニングはトランスジェニック動物である範囲にわたっての容量の候補ADCを投与し、次いで、評価すべき病気または疾患に対するADCの効果につき種々の時点でアッセイすることを含むことができる。別法として、あるいは加えて、もし適用可能であれば、病気のインデューサーへの曝露に先立って、またはそれと同時に薬物を投与することができる。培地下で平行して、または高スループットスクリーニングフォーマットにて、候補ADCを系列的にかつ個々にスクリーニングすることができる。ADCを病気または疾患の予防的または治療的処置についての有用性につきスクリーニングすることができる速度は、データの検出/測定/分析を含めた、合成またはスクリーニング方法の速度によって

のみ制限される。

【0505】

1つの実施形態は、(a) 安定な腎臓細胞癌細胞からの細胞を非ヒト動物に移植し、(b) ADC薬物候補を非ヒト動物に投与し、次いで、(c) 移植された細胞系からの腫瘍の形成を阻害する候補の能力を決定することを含むスクリーニング方法である。

【0506】

もう1つの実施形態は、(a) 安定なホジキン病細胞系からの細胞をADC薬物候補と接触させ、次いで、(b) CD40のリガンド活性化をブロックするADC候補の能力を評価することを含むスクリーニング方法である。

【0507】

もう1つの実施形態は、(a) 安定なホジキン病細胞系からの細胞をADC薬物候補と接触させ、次いで、(b) 細胞死滅を誘導するADC候補の能力を評価することを含むスクリーニング方法である。1つの実施形態において、アポトーシスを誘導するADC候補の能力が評価される。

【0508】

1つの実施形態は、(a) 安定な癌細胞系からの細胞を非ヒト動物に移植し、(b) ADC薬物候補を非ヒト動物に投与し、次いで、(c) 移植された細胞系からの腫瘍の形成を阻害する候補の能力を測定することを含むスクリーニング方法である。また、本発明は、(a) 安定な乳癌細胞系からの細胞を薬物候補と接触させ、次いで、(b) 安定な細胞系の増殖を阻害するADC候補の能力を評価することを含む、HER2の過剰発現によって特徴付けられる病気または疾患の治療のためのADC候補をスクリーニングする方法に関する。

【0509】

もう1つの実施形態は、(a) 安定な癌細胞系からの細胞をADC薬物候補と接触させ、次いで、(b) HER2のリガンド活性化をブロックするADC候補の能力を評価することを含むスクリーニング方法である。1つの実施形態において、ヘレブリン結合をブロックするADC候補の能力が評価される。もう1つの実施形態において、リガンドー刺激チロシンリン酸化をブロックするADC候補の能力が評価される。

【0510】

もう1つの実施形態は、(a) 安定な癌細胞系からの細胞をADC薬物候補と接触させ、次いで、(b) 細胞死滅を誘導するADC候補の能力を評価することを含むスクリーニング方法である。1つの実施形態において、アポトーシスを誘導するADC候補の能力が評価される。

【0511】

もう1つの実施形態は、(a) 天然ヒトHER2タンパク質またはそのフラグメントをその乳腺細胞において過剰発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物にADC薬物候補を投与し、ここで、そのようなトランスジェニック動物は、そのゲノムに安定に組み込まれた、その発現を該乳腺に向ける転写調節配列に操作可能に連結された、天然ヒトHER2の生物学的活性を有する天然ヒトHER2をコードする核酸配列またはそのフラグメントを有し、かつ抗HER2抗体試料に応答しない、または貧弱にしか応答しない乳房腫瘍を発症し、あるいは該ADC薬物候補を、該トランスジェニック非ヒト哺乳動物から移植された腫瘍を担う非ヒト哺乳動物に投与し；次いで、(b) 標的病気または疾患に対するADC候補の効果を評価することを含むスクリーニング方法である。限定されるものではないが、該病気または疾患は乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、膵臓および膀胱癌のようなHER2過剰発現癌であり得る。該癌は、好ましくは、細胞当たり少なくとも約500,000コピー、より好ましくは細胞当たり少なくとも約2,000,000コピーにてHER2を発現した乳癌である。ADC薬物方法は、例えば、当該分野でよく知られ、後に記載するアッセイ方法を用い、細胞死滅および/またはアポトーシスを誘導するそれらの能力につき評価することができる。

【0512】

1つの実施形態において、候補ADCは、ある範囲の用量にわたって、トランスジェニック動物に投与し、次いで、経時的に化合物に対する動物の生理学的応答を評価することによってスクリーニングされる。投与は、評価すべき化合物の化学的性質に応じて、経口であるか、または適当な注射によることができる、いくつかの場合において、化合物の効率を増強させるであろう共因子と組み合わせて化合物を投与するのが適当であろう。もし対象トランスジェニック動物から由来する細胞系を用いて、種々の疾患を治療するのに有用な化合物につきスクリーニングするならば、テスト化合物を適当な時期に細胞培養基に加え、適当な生化学および／または組織学的アッセイを用い、化合物に対する細胞応答を経時的に評価する。いくつかの場合において、化合物の効率を増強させる共因子と組み合わせて注目する化合物を培養基に適應するのが適切であろう。

10

【0513】

かくして、本明細書中において、腫瘍の発症に場合によって関連する細胞増殖および／または分化の病因において、その存在が異常な細胞機能に相関する、標的タンパク質を特異的に標的とし、それに結合するADCを同定するためのアッセイが提供される。

【0514】

Erbb (例えば、Erbb2) レセプターのリガンド活性化をブロックするADCを同定するために、(例えば、注目するErbbレセプターがそれとでErbbヘテロオリゴマーを形成するもう1つのErbbレセプターと組み合わせて) Erbb (Erbb2) レセプターを発現する細胞へのErbbリガンド結合をブロックする化合物の能力を測定することができる。例えば、HER2を過剰発現するトランスジェニック動物から単離され、かつ(それとでHER2がヘテロオリゴマーを形成する) もう1つのErbbレセプターを発現するようにトランスフェクトされた細胞をADCと共にインキュベートし、すなわち、培養し、次いで、標識されたErbbリガンドに曝露することができる。次いで、ErbbヘテロオリゴマーにおけるErbbレセプターへのリガンド結合をブロックする化合物の能力を評価することができる。

20

【0515】

例えば、候補ADCによって、HER2を過剰発現し、かつここにトランスジェニック非ヒト哺乳動物(例えば、マウス)から確立された乳癌細胞系へのヘレグリン(HRG)の阻害は、24ウェルプレート様式で氷上で単層培養を用いて行うことができる。抗-Erbb2モノクローナル抗体を各ウェルに加え、30分間インキュベートすることができる。次いで、 ^{125}I -標識rHRG $\beta_{1177-224}$ (25,000 cpm)を加えることができ、インキュベーションを4~16時間継続することができる。用量応答曲線を調製することができ、IC₅₀値(細胞傷害性活性)を注目する化合物について評価することができる。

30

【0516】

別法として、あるいは加えて、Erbbヘテロオリゴマーに存在するErbb授与体のErbbリガンド-刺激チロシンリン酸化をブロックするADCの能力を評価することができる。例えば、ここにトランスジェニック動物から確立された細胞形をテストADCと共にインキュベートすることができ、次いで、(所望により、検出可能な標識と結合体されていてよい)抗-ホスチロシンモノクローナル抗体を用い、Erbbリガンド-依存性チロシンリン酸化活性につき評価することができる。また、米国特許第5766863号に記載されたキナーゼレセプター活性化アッセイもまた、Erbbレセプター活性化、および化合物によるその活性のブロッキングを測定するのに利用できる。

40

【0517】

1つの実施形態において、実質的に後に記載するように、MCF7細胞においてp180チロシンリン酸化のHRG刺激を阻害するADCにつきスクリーニングすることができる。例えば、HER2トランスジェニック動物から確立された細胞形を24ウェルプレートで平板培養することができ、化合物を各ウェルに加え、室温にて30分間インキュベーションとすることができ、次いでrHRG $\beta_{1177-244}$ を最終濃度0.2 nMまで各ウェルに加えることができ、インキュベーションを約8分間継続することができる

50

。培地を各ウェルから吸引することができ、100 μ LのSDS試料緩衝液（5%，SDS，25mM DTT、および25mM トリス-HCl，pH 6.8）を加えることによって反応を停止させることができる。各試料（25 μ L）を4～12%グラジエントゲル（Novex）上で電気泳動に付すことができ、次いで、電気泳動によりニフッ化ポリビニリデン膜に移すことができる。（1 μ g/mL脳）抗ホスホチロシン免疫ブロットを発色させることができ、 M_r - 180,000における圧倒的な反応性バンドの強度を反射率デンストメトリーによって定量することができる。レセプターリン酸化の疎外を評価するための代替方法は、Pharm. およびBiomed. Anal. のSadick et al.（1998）Jour. のKIRA（キナーゼレセプター活性化）アッセイである。p180チロシンリン酸化のHRG刺激を阻害することが知られているHER2 10
に対するよく確立されたモノクローナル抗体のいくつかをこのアッセイにおいて陽性対照として用いることができる。反射率デンストメトリーによって測定されたp180チロシンリン酸化のHRG刺激の阻害に対する用量-応答曲線を作成することができ、注目する化合物についての IC_{50} を計算することができる。

【0518】

また、例えば、実質的にSchaefer et al.（1997）Oncogene 15:1385-1394に記載されているように、HER2-トランスジェニック動物に由来する細胞系に対するテストADCの増殖阻害効果を評価することもできる。このアッセイによると、細胞を種々の濃度にてテスト化合物で4日間処理し、クリスタルバイオレットまたはレドックス色素Alamar Blueで染色することができる。化合物とのインキュベーションは、MDA-MB-175細胞についてのモノクローナル抗体2C4によって表示されたものと同様なこの細胞系に対する増殖阻害効果を示すことができる（Schaefer et al.，前掲）。さらなる実施形態において、外因性HRGはこの阻害を有利には逆行させない。 20

【0519】

注目する抗原を特異的に標的とする増殖阻害効果を同定するために、トランスジェニック動物に由来する注目する抗原を過剰発現する癌細胞の増殖を阻害する化合物につきスクリーニングすることができ、米国特許第5677171号に記載されたアッセイを行うことができる。このアッセイによると、注目する抗原を過剰発現する癌細胞は、10%胎児ウシ血清、グルタミンおよびペニシリンストレプトマイシンを補足したF12およびDM 30
EM培地の1:1混合物中で増殖させる。細胞を35mm細胞培養皿中で20,000細胞で平板培養し（2mL/35mm皿）、テスト化合物を種々の濃度で加える。6日後に、電子COULTERTM細胞カウンターを用い、実処理細胞と比較した、細胞の数をカウントする。細胞の増殖を約20～100%または約50～100%だけ阻害する化合物を増殖阻害化合物として選択することができる。

【0520】

細胞死滅を誘導する化合物につき選択するために、例えば、PI、トリパンブルーまたは7AADで摂取によって示された膜一体性の喪失は対照に対して評価することができる。該PI摂取アッセイは、トランスジェニック動物の注目する腫瘍組織から単離された細胞を用いる。このアッセイによると、細胞を、10%加熱-不活化FBS（Hyclone 40
e）および2mM L-グルタミンを補足したダルベッコウの修飾イーグル培地（DMEM）：ハムのF-12（50:50）中で培養する。かくして、アッセイは補体および免疫エフェクター細胞の不存在下で行われる。細胞は100×20mm皿中にて皿当たり 3×10^6 の密度にて摂取し、一晚付着させる。次いで、培地を除去し、新鮮な培地単独、または種々の濃度の化合物を含有する培地で置き換える。細胞を3日の間インキュベートする。各処理の後、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理によって脱着させる。次いで、細胞を1200rpmにおいて4℃で5分間遠心し、ペレットを3mL冷Ca²⁺結合緩衝液（10mM HEPES，pH 7.4，140mM NaCl，2.5mM CaCl₂）、細胞クランプを除去するために、35mmストレイナーキャップを付した12×75mmチューブに小分けする（チューブ当たり1mL，処理群当たり3チューブ 50

）。次いで、チューブにPI (10 µg/mL)を受けさせる。FACSCANTMフローサイトメーターおよびFACSCONVERTTM CellQuestソフトウェア (Becton Dickinson)を用いて試料を分析することができる。PI摂取によって測定して細胞死滅の統計学的に有意なレベルを誘導する化合物を細胞死滅－誘導化合物として選択することができる。

【0521】

アポトーシスを誘導する化合物につき選択するために、トランスジェニック動物の注目する腫瘍組織から確立された細胞を用いるアネキシン結合アッセイを行う。細胞を培養し、先のパラグラフで議論したようにさらに摂取する。次いで、培地を除去し、新鮮な培地単独、または10 µg/mL抗体薬物結合体(ADC)を含有する培地で置き換える。3日のインキュベーション時間の後、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理によって脱着される。次いで、細胞を遠心し、Ca²⁺結合緩衝液に再度懸濁し、細胞死滅アッセイについて前記で議論したようにチューブに小分けする。次いで、チューブに標識したアネキシン(例えば、アネキシンV-FITC)(1 µg/mL)を受けさせる。FACSCANTMフローサイトメーターおよびFACSCONVERTTM CellQuestソフトウェア (Becton Dickinson)を用いて試料を分析することができる。対照に対して統計学的に有意なレベルのアネキシン結合を誘導する化合物をアポトーシス－誘導化合物として選択する。

【0522】

(4.5.3 インビトロ細胞増殖アッセイ)

一般に、抗体薬物結合体(ADC)の細胞傷害性または細胞静止活性は：細胞培養基中のADCの抗体に、レセプタータンパク質を有する哺乳動物細胞を曝露し；約6時間～約5日の期間、細胞を培養し、次いで、細胞生存率を測定することによって測定される。細胞－ベースのインビトロアッセイを用いて生存率(増殖)、細胞傷害性、および本発明のADCのアポトーシスの誘導(カスパーゼ活性化)を測定した。

【0523】

抗体薬物結合体のインビトロ能力は、細胞増殖アッセイ(実施例18, 図7～10)によって測定した。CellTiter-Glo(登録商標)ルミネセント細胞生存率アッセイは商業的に入手可能であり(Promega Corp., Madison, WI)、これはColelptera luciferaseの組換え発現に基づく均一アッセイ方法である(米国特許第5583024号；第5674713号および第5700670号)。この細胞増殖アッセイは、存在するATP、代謝的に活性な細胞のインジケータの定量に基づいて培養中の生きた細胞の数を測定する(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ウェルフォーマットで行い、それを自動化高スループットスクリーニング(HTS)でできるようにする(Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404)。均一なアッセイ手法は、血清－補足培地中で培養される細胞へ直接的に単一試薬(CellTiter-Glo(登録商標) Reagent)を加えることができる。細胞洗浄、培地の除去、および複数のピペッティング工程は必要とされない。該システムは、試薬の添加および混合の後に、10分以内に384ウェルフォーマットにて15細胞/ウェルと少数を検出する。細胞はADCで連続的に処理することができるか、あるいはそれらは処理し、ADCから分離することができる。一般に、簡単に、すなわち、3時間処理した細胞は連続的に処理した細胞と同一の能力効果を示した。

【0524】

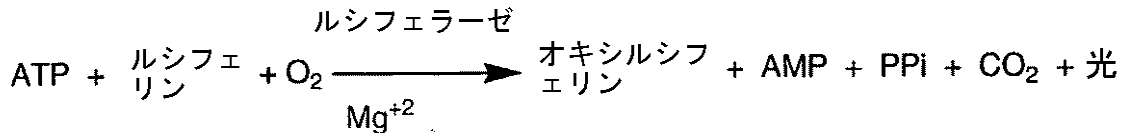
均一「添加－混合－測定」フォーマットの結果、細胞が溶解し、存在するATPの量に比例したルミネセントシグナルが発生する。ATPの量は培養に存在する細胞の数に直接的に比例する。CellTiter-Glo(登録商標)アッセイは、用いた細胞型および培地において、一般には5時間よりも大きな半減期を有する、ルシフェラーゼ反応によって生じた「グロータイプ」のルミネセントシグナルが発生する。生きた細胞は相対的

ルミネッセンス単位（RLU）で反映される。基質Beetle Luciferinは、組換えホタルルシフェラーゼによって酸化的に脱カルボキシル化され、同時にATPからAMPへの変換およびフォトンが発生が伴う。延長された半減期は、試薬インジェクターを用いる必要性を排除し、多数プレートの連続的またはバッチ様式のプロセッシングに対する柔軟性を提供する。この細胞増殖アッセイは種々のマルチウェルフォーマット、例えば、96または384ウェルフォーマットで用いることができる。データはルミノメーターまたはCCDカメライメージングデバイスによって記録することができる。ルミネッセンス出力は、経時的に測定された相対的光単位（RLU）として表される。

【0525】

【化177】

10



抗体薬物結合体の抗増殖効果は細胞増殖によって測定され、これは4つの異なる乳癌細胞系に対する前記したインビトロ細胞殺傷アッセイである（図7～10）。IC₅₀値は、HER2レセプタータンパク質を過剰発現することが知られているSK-BR-3およびBT-474につき確立された。表2aはSK-BR-3細胞に対する細胞増殖アッセイにおける例示的抗体薬物結合体の能力（IC₅₀）測定を示す。表2bは、BT-474細胞に対する細胞増殖アッセイにおける例示的抗体薬物結合体の能力（IC₅₀）測定を示す。

20

【0526】

抗体薬物結合体：トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAF、3.8 MMAF / Ab；トラスツズマブ-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF、3.9 MMAF / Ab；トラスツズマブ-MC-MMAF、4.1 MMAF / Ab；トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAE、4.1 MMAE / Ab；トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAE、3.3 MMAE / Ab；およびトラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAF、3.7 MMAF / AbはMCF-7細胞の増殖を阻害しなかった（図9）。

【0527】

抗体薬物結合体：トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAE、4.1 MMAE / Ab；トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAE、3.3 MMAE / Ab；トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAF、3.7 MMAF / Ab；トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAF、3.8 MMAF / Ab；トラスツズマブ-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF、3.9 MMAF / Ab；およびトラスツズマブ-MC-MMAF、4.1 MMAF / AbはMDA-MB-468細胞の増殖を阻害しなかった（図10）。

30

【0528】

MCF-7およびMDA-MB-468細胞はHER2レセプタータンパク質を過剰発現しない。従って、本発明の抗HER2抗体薬物結合体はHER2を発現する細胞の阻害に対して選択性を示す。

40

【0529】

【化 1 7 8】

表 2 a SK-BR-3細胞

抗体薬物結合体 H = 注記する以外はシステイン [c y s] を介して連結したトラスツズマブ	IC ₅₀ (μg ADC/ml)
H-MC-MMAF, 4.1 MMAF/Ab	0.008
H-MC-MMAF, 4.8 MMAF/Ab	0.002
H-MC-vc-PAB-MMAE,	0.007
H-MC-vc-PAB-MMAE	0.015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3.8 MMAF/Ab	0.0035 - 0.01
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4.4 MMAF/Ab	0.006 - 0.007
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4.8 MMAF/Ab	0.006
H-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3.9 MMAF/Ab	0.0035
H-MC-MMAF, 4.1 MMAF/Ab	0.0035
H-MC-vc-PAB-MMAE, 4.1 MMAE/Ab	0.010
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3.8 MMAF/Ab	0.007
H-MC-vc-PAB-MMAE, 4.1 MMAE/Ab	0.015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3.7 MMAF/Ab.	0.010
H-MC-vc-PAB-MMAE, 7.5 MMAE/Ab	0.0025
H-MC-MMAE, 8.8 MMAE/Ab	0.018
H-MC-MMAE, 4.6 MMAE/Ab	0.05
H-MC-(L)val-(L)cit-PAB-MMAE, 8.7 MMAE/Ab	0.0003
H-MC-(D)val-(D)cit-PAB-MMAE, 8.2 MMAE/Ab	0.02
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE, 8.4 MMAE/Ab	0.0015
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE, 3.2 MMAE/Ab	0.003
H-トラスツズマブ	0.083
リシン [l y s] を介して連結されたH-vc-MMAE	0.002
リシン [l y s] を介して連結された H-phe-lys-MMAE	0.0015
4D5-Fc8-MC-vc-PAB-MMAF, 4.4 MMAF/Ab	0.004
Hg-MC-vc-PAB-MMAF, 4.1 MMAF/Ab	0.01
7C2-MC-vc-PAB-MMAF, 4.0 MMAF/Ab	0.01

【 0 5 3 0 】

【化 1 7 9】

4D5 Fab-MC-vc-PAB-MMAF, 1.5 MMAF/Ab	0.02
抗 -TF Fab-MC-vc-PAB-MMAE*	-

表 2 b B T 4 7 4 細胞

抗体薬物結合体 H = システイン [cys] を介して連結されたトラスツズマブ	IC ₅₀ (μg ADC/ml)
H-MC-MMAF, 4.1 MMAF/Ab	0.008
H-MC-MMAF, 4.8 MMAF/Ab	0.002
H-MC-vc-PAB-MMAE, 4.1 MMAE/Ab	0.015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3.8 MMAF/Ab	0.02 - 0.05
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4.4 MMAF/Ab	0.01
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4.8 MMAF/Ab	0.01
H-MC-vc-PAB-MMAE, 3.3 MMAE/Ab	0.02
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3.7 MMAF/Ab.	0.02
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3.8 MMAF/Ab	0.015
H-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3.9 MMAF/Ab	0.010
H-MC-MMAF, 4.1 MMAF/Ab	0.00015
H-MC-vc-PAB-MMAE, 7.5 MMAE/Ab	0.0025
H-MC-MMAE, 8.8 MMAE/Ab	0.04
H-MC-MMAE, 4.6 MMAE/Ab	0.07
4D5-Fc8-MC-vc-PAB-MMAF, 4.4 MMAF/Ab	0.008
Hg-MC-vc-PAB-MMAF, 4.1 MMAF/Ab	0.01
7C2-MC-vc-PAB-MMAF, 4.0 MMAF/Ab	0.015
4D5 Fab-MC-vc-PAB-MMAF, 1.5 MMAF/Ab	0.04
抗 -TF Fab-MC-vc-PAB-MMAE*	-

H = トラスツズマブ

7 C 2 = トラスツズマブとは異なるエピトープに結合する抗-HER2 ネズミ抗体

F c 8 = F c R n に結合しない突然変異体

H g = 重鎖ヒンジシステインがセリンに突然変異した「ヒンジレス」全長ヒト化 4 D 5、E. coli で発現（したがって、非-グリコシル化）。

【0 5 3 1】

抗-TF Fab = 抗-組織因子抗体フラグメント

*MDA-MB-468 細胞に対する活性。

【0 5 3 2】

驚くべきかつ予期せぬ発見において、以下の表 2 a および 2 b における ADC のインビトロ細胞増殖活性の結果は、一般には、抗体当たり低い薬物部分の平均数を持つ ADC が効率、例えば、 $IC_{50} < 0.1 \mu g ADC/mL$ を示したことを示す。結果は、少なくともトラスツズマブ ADC については、抗体当たりの薬物部分の最適比率は 8 未満であ

り得、約 2 ～ 5 であり得る。

【 0 5 3 3 】

(4 . 5 . 4 インビボ血漿クリアランスおよび安定性)

A D C の薬物動態学血漿クリアランスおよび安定性をラットおよびマカクザルで調べた。血漿中濃度を経時的に測定した。表 2 c はラットにおける抗体薬物結合体および他の投与された試料の薬物動態学データを示す。ラットは E r b B レセプター抗体についての非一特異的モデルである。というのは、該ラットは H E R 2 レセプタータンパク質を発現することが知られていないためである。

【 0 5 3 4 】

(表 2 c ラットにおける薬物動態学)

H = 注記した以外はシステイン [c y s] を介して連結されたトラスツズマブ

注記した以外は 2 m g / k g 用量

【 0 5 3 5 】

【 化 1 8 0 】

試料 用量 mg/kg	AUCinf 日* μg/mL	CL mL/日 /kg	Cmax μg/mL	T ½ 期間 日数	% 結合体
H-MC-vc-PAB-MMAE (合計 Ab)	78.6	26.3	39.5	5.80	40.6
H-MC-vc-PAB-MMAE (結合体)	31.1	64.4	33.2	3.00	
H-MC-vc-PAB-MMAF (合計 Ab)	170	12.0	47.9	8.4	50.0
H-MC-vc-PAB-MMAF (結合体)	83.9	24.0	44.7	4.01	
H-MC-MMAE (合計 Ab)	279	18.9	79.6	7.65	33
H-MC-MMAE (結合体)	90.6	62.9	62.9	4.46	
5 mg/kg					
H-MC-MMAF (合計 Ab)	299	6.74	49.1	11.6	37
H-MC-MMAF	110	18.26	50.2	4.54	
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (合計 Ab)	306	6.6	78.7	11.9	19.6
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (結合体)	59.9	33.4	82.8	2.1	
H-Me-vc-PAB-MMAF (合計 Ab)	186	10.8	46.9	8.3	45.3

【 0 5 3 6 】

【化 1 8 1】

H-Me-vc-PAB-MMAF (結合体)	84.0	23.8	49.6	4.3	
H-Me-vc-PAB-MMAE (合計 Ab)	135	15.0	44.9	11.2	23.8
H-Me-vc-PAB-MMAE (結合体)	31.9	63.8	45.2	3.0	
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (合計 Ab)	306	6.6	78.7	11.9	19.6
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (結合体)	59.9	33.4	82.8	2.1	
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE (合計 Ab)	107	19.2	30.6	9.6	38.1
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE (結合体)	40	50.4	33.7	3.98	
H-MC-(Me)-vc-PAB-MMAE, 合計 Ab	135.1	15.0	44.9	11.2	23.8
H-MC-(Me)-vc-PAB-MMAE, (結合体)	31.9	63.8	45.2	2.96	
H-MC-(D)val-(D)cit-PAB-MMAE, (合計 Ab)	88.2	22.8	33.8	10.5	38.3
H-MC-(D)val-(D)cit-PAB-MMAE, (結合体)	33.6	59.8	36.0	4.43	
H-MC-vc-PAB-MMAE, 合計 Ab	78.6	26.3	39.5	5.8	40.6
H-MC-vc-PAB-MMAE, 結合体 リシン [Lys] によってMC に連結されたH	31.1	64.4	33.2	3.00	
MMAF 200 µg/kg	0.99	204	280	0.224	-
MMAE 206 µg/kg	3.71	62.6	649	0.743	-
HER F(ab') ₂ -MC-vc-MMAE, (合計 Ab)	9.3	217	34.4	0.35	95
HER F(ab') ₂ -MC-vc-MMAE, (結合体)	8.8	227	36.9	0.29	
4D5-H-Fab-MC-vc-MMAF, (合計 Ab)	43.8	46.2	38.5	1.49	68
4D5-H-Fab-MC-vc-MMAF, (結合体)	29.9	68.1	34.1	1.12	
4D5-H-Fab-MC-vc-MMAE,	71.5	70.3	108	1.18	59

【0 5 3 7】

【化 1 8 2】

合計 Ab 4D5-H-Fab-MC-vc-MMAE, 結合体	42.2	118.9	114	0.74	
4D5-H-Fab	93.4	53.9	133	1.08	-
H-MC-vc-PAB-MMAF, 合計 Ab	170	12.03	47.9	8.44	49.5
H-MC-vc-PAB-MMAF, 結合体	83.9	23.96	44.7	4.01	
H-MC-vc-PAB-MMAF- DMAEA, 合計 Ab	211	9.8	39.8	8.53	34.3
H-MC-vc-PAB-MMAF- DMAEA, 結合体	71.5	28.2	38.8	3.64	
H-MC-vc-PAB-MMAF-TEG, 合計 Ab	209	9.75	53.2	8.32	29.7
H-MC-vc-PAB-MMAF-TEG, 結合体	63.4	31.8	34.9	4.36	

AUC_{inf}は、投与の時間から無限までの血漿濃度－時間曲線下面積であり、測定されたもの（薬物、ADC）への合計曝露の尺度である。CLは単位時間における測定されたものから除去された血漿の容量と定義され、体重に対して正規化することによって表される。T_{1/2}時間はその排除相の間に測定された体中の薬物の半減期である。％結合体時間は、別のELISA免疫アフィニティーテストによって検出された全抗体と比較したADCの相対量である（「Analytical Methods for Biotechnology Products」, Ferraiolo et al., p 85-98 in Pharmacokinetics of Drugs (1994)

P. G. Welling and L. P. Balant, 編, Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 110, Springer-Verlag)。％結合体の計算は単純にADCのAUC_{inf}÷AUC_{inf}合計Abであり、リンカー安定性の一般的インジケーターであるが、他の因子およびメカニズムも有効であり得る。

【0538】

図11は抗体薬物結合体：H-MC-vc-PAB-MMAF-TEGおよびH-MC-vc-PAB-MMAFのSprague-Dawleyラットへの投与の後における血漿濃度クリアランス実験のグラフを示す。合計抗体およびADCの濃度は経時的に測定した。

【0539】

図12は2段階血漿濃度クリアランス実験のグラフを示し、ここで、ADCは異なる用量で投与され、合計抗体およびADCの濃度は経時的に測定された。

【0540】

インビボ効率

本発明のADCのインビボ効率は、高発現HER2トランスジェニック外植体マウスモデルによって測定した。同種異系移植片を、HERCEPTIN（登録商標）療法に応答しない、または貧弱にしか応答しないF05 mmtvトランスジェニックマウスから増殖させた。対象をADCで1回処理し、3～6週間にわたってモニターして、腫瘍倍化までの時間、log細胞殺傷、および腫瘍修飾を測定した。続いての用量－応答および多用量実験を行った。

【0541】

腫瘍はneu、HER2のラットホモログの突然変異的に活性化された形態を発現するトランスジェニックマウスにおいて容易に生起するが、乳癌で過剰発現されたHER2は突然変異せず、非突然変異HER2を過剰発現するトランスジェニックマウスにおいては腫瘍形成は余り頑強ではない(Weber et al. (1994) Semin. Cancer Biol. 5:69-76)。

【0542】

非突然変異HER2での腫瘍形成を改善するために、上流ATGを欠失して、そのような上流ATG：においてトランスローケーションの開始を妨げ、そうでなければ、HER2の下流真正開始コドンからの翻訳開始の頻度を低下させるHER2 cDNAプラスミドを用いてトランスジェニックマウスを生産した(例えば、Child et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:24335-24341)。加えて、キメライントロンを5'末端に加え、これは従前に報告されているように発現のレベルをやはり増強させるはずである(Neuberger & Williams (1988) Nucleic Acids Res. 16:6713; Buchman and Berg (1988) Mol. Cell. Biol. 8:4395; Brinster et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:836)。キメライントロンはPromegaベクター、pCI-neo哺乳動物発現ベクター(bp890-1022)に由来した。cDNAの3'末端には、ヒト成長ホルモンエクソン4および5およびポリアデニル化配列が近接する。さらに、FVBマウスを用いた。なぜならば、この株は腫瘍発症により感受性だからである。MMTV-LTRからのプロモーターを用いて、乳腺での組織-特異的HER2発現を確実とした。動物にAIN 76Aダイエットを与えて、腫瘍形成に対する罹患性を増大させた(Rao et al. (1997) Breast Cancer Res. and Treatment 45:149-158)。

【0543】

(表2d 異種同系移植片マウスモデル-MMTV-HER2 F05における腫瘍測定)

乳房腫瘍、無胸腺ヌードマウス

注記しない以外は日1 (T=0) において単一用量

H=注記しない以外はシステイン [cys] を介して連結されたトラスツズマブ

【0544】

10

20

30

【化 1 8 3】

試料 抗体当たりの薬物	用量	Ti	PR	CR	腫瘍倍化時間 (日)	平均 log 細胞殺傷
ビヒクル					2-5	0
H-MC-vc-PAB-MMAE 8.7 MMAE/Ab	1250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$	5/5	4/7	0/7	18	1.5
H-MC-vc-PAB-MMAF 3.8 MMAF/Ab	555 $\mu\text{g}/\text{m}^2$	2/5	2/7	5/7	69	6.6
H-MC(Me)-vc-PAB-MMAF					>50	6.4
H-MC-MMAF 4.8 MMAF/Ab	9.2 mg/kg Ab 0、7、14 および 21 日に 550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$	7/7	6/7	0/7	63	9
H-MC-MMAF 4.8 MMAF/Ab	14 mg/kg Ab 0、7、14 および 21 日に 840 $\mu\text{g}/\text{m}^2$	5/5	5/7	2/7	>63	
H-MC-vc-PAB-MMAF 5.9 MMAF/Ab	3.5 mg/kg Ab 0、21、および 42 日に 300 $\mu\text{g}/\text{m}^2$	5/6	1/7	3/7	>36	
H-MC-vc-PAB-MMAF 5.9 MMAF/Ab	4.9 mg/kg Ab 0、21 および 42 日において 425 $\mu\text{g}/\text{m}^2$	4/7	2/7	5/7	>90	
H-MC-vc-PAB-MMAF 5.9 MMAF/Ab	6.4 mg/kg Ab 0、21 および 42 日において 550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$	3/6	1/7	6/7	>90	
H-(L)val-(L)cit-MMAE 8.7 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7	1/7	0/7	15.2	1.1
H-MC-MMAE 4.6 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7	0/7	0/7	4	0.1
H-(D)val-(D)cit-MMAE 4.2 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7	0/7	0/7	3	

【0 5 4 5】

【化 1 8 4】

H-(D)val-(L)cit-MMAE 3.2 MMAE/Ab	13 mg/kg	7/7	0/7	0/7	9	0.6
H-MC(Me)-vc-MMAE 3.0 MMAE/Ab	13 mg/kg	7/7	3/7	0/7	17	1.2
H-(L)val-(D)cit-MMAE 3.5 MMAE/Ab	12 mg/kg	7/7	0/7	0/7	5	0.2
H-vc-MMAE 8.7 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7			17	
H-cys-vc-MMAF 3.8 MMAF/Ab	1 mg/kg	7/7			3	
H-cys-vc-MMAF 3.8 MMAF/Ab	3 mg/kg	7/7			>17	
H-cys-vc-MMAF 3.8 MMAF/Ab	10 mg/kg	4/7	4/7	3/7	>17	
H-MC-vc-MMAF-TEG 4 MMAF/Ab	10 mg/kg	3/6	1/7	6/7	81	7.8
H-MC-vc-MMAF-TEG 4 MMAF/Ab	10 mg/kg q3wk x 3	0/5	0/7	7/7	81	7.9
H-vc-MMAF (lot 1)	10 mg/kg	4/6	2/8	5/8		
H-vc-MMAF (lot 2)	10 mg/kg	7/8	1/8	1/8		
H-MC-MMAF	10 mg/kg 550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$	8/8	1/8	0/8	18	
H-(Me)-vc-MMAF	10 mg/kg	3/7	2/8	5/8		
H-vc-MMAE 7.5 MMAE/Ab	0、7、14、21、28日において3.7 mg/kg	6/6	0/7	1/7	17	2.3
H-vc-MMAE 7.5 MMAE/Ab	0、7、14、21、28日において7.5 mg/kg	5/7	3/7	3/7	69	10
anti IL8-vc-MMAE 7.5 MMAE/Ab	0、7、14、21、28日において7.5 mg/kg	7/7	0/7	0/7	5	0.5
抗 IL8-vc-MMAE 7.5 MMAE/Ab	0、7、14、21、28日において3.7 mg/kg	6/6	0/7	0/7	3	0.2
H-fk-MMAE 7.5 MMAE/Ab	0、7、14、21、28日において7.5 mg/kg	7/7	1/7	0/7	31	4.4
H-fk-MMAE 7.5 MMAE/Ab	0、7、14、21、28日において3.7 mg/kg	7/7	0/7	0/7	8.3	0.9
抗 IL8-fk-MMAE 7.5 MMAE/Ab	0、7、14、21、28日において7.5 mg/kg	7/7	0/7	0/7	6	0.5
抗 IL8-fk-MMAE 7.5 MMAE/Ab	0、7、14、21、28日において3.7 mg/kg	7/7	0/7	0/7	3	0.1
トラスツズマブ	0、7、14、2	7/7	0/7	0/7	5	0.4

【0 5 4 6】

【化 1 8 5】

	1、28日において7.5mg/kg					
H-vc-MMAE 8.7 MMAE/Ab	10 mg/kg 1250 µg/m ²	6/6	3/6	0/6	15	1.3
H-vc-MMAE	10 mg/kg 0、7、および 14日において 1250 µg/m ²	7/7	5/7		>19	
H-vc-MMAE	0、7、および 14日において 3 mg/kg	7/7			8	
H-vc-MMAE	0、7、および 14日において 1 mg/kg	7/7			7	
H-vc-MMAF	10 mg/kg	8/8	5/8		>21	
H-vc-MMAF	0、7、および 14日において 10 mg/kg	4/7	4/7	3/7	>21	
H-vc-MMAF	0、7、および 14日において 3 mg/kg	7/7			6	
H-vc-MMAF	0、7、および 14日において 1 mg/kg	8/8			4	
トラスツズマブ	0および7日において10 mg/kg	8/8			3	
Hg-MC-vc-PAB-MMAF 4.1 MMAF/Ab	0日において10 mg/kg	6/7	3/8	5/8	56	5.1
Fc8-MC-vc-PAB-MMAF 4.4 MMAF/Ab	0日において10 mg/kg	7/7	6/8	0/8	25	2.1
7C2-MC-vc-PAB-MMAF 4 MMAF/Ab	0日において10 mg/kg	5/6	6/8	1/8	41	3.7
H-MC-vc-PAB-MMAF 5.9 MMAF/Ab	0日において10 mg/kg	3/8	3/8	5/8	62	5.7
2H9-MC-vc-PAB-MMAE		9/9			>14日	
2H9-MC-vc-PAB-MMAF		9/9			>14日	
11D10-vc-PAB-MMAE		9/9			>14日	
11D10-vc-PAB-MMAF		9/9			11日	

7C2＝トラスツズマブとは異なるエピトープと結合する抗-HER2マウス抗体

Fc8＝FcRnに結合しない突然変異体

Hg＝重鎖ヒンジシステインがセリンに突然変異した、「ヒンジレス」全長ヒト化4D5、E.coliにおいて発現（したがって、非-グリコシル化）

2H9＝抗-EpH2R

11D10＝抗-O772P。

【0547】

用語 T_i は $T=0$ における腫瘍を持つ実験群における動物の数を群における合計動物で割ったものである。用語 PR は腫瘍の部分的緩解を獲得する動物の数を群における $T=0$ での腫瘍を持つ動物で割ったものである。用語 CR は腫瘍の完全な緩解を達成する動物の数を群における $T=0$ での腫瘍を持つ動物で割ったものである。用語 $\log$ 細胞殺傷は倍化する腫瘍容量についての日数で表した時間から倍化する対照腫瘍容量についての日数で表した時間を引いて、(賦形剤を投与した) 対照動物において倍化する腫瘍容量についての時間に 3.32 を掛けたもので割ったものである。 $\log$ -細胞-殺傷計算は、処理から得られた腫瘍成長の遅延、および対照群の腫瘍容量の倍化時間を考慮する。 ADC の抗-腫瘍発生は：

++++ > 3.4 (かなり活性)

+++ = 2.5 ~ 3.4

++ = 1.7 ~ 2.4

+ = 1.0 ~ 1.6

不活性 = 0

の $\log$ -細胞-殺傷値で分類される。

【0548】

図13は、賦形剤、トラスツズマブ- $MC-vc-PAB-MMAE$ ($1250 \mu g/m^2$) およびトラスツズマブ- $MC-vc-PAB-MMAF$ ($555 \mu g/m^2$) を日0に投与した $MMTV-HER2$ $Fo5$ 乳癌同種異系移植片を持つ無胸腺ヌードマウスにおける経時的な平均腫瘍容量変化を意味する (H =トラスツズマブ)。腫瘍の成長は、成長の対象(賦形剤)レベルと比較して ADC での処理によって遅延された。図14は $10 mg/kg$ ($660 \mu g/m^2$) のトラスツズマブ- $MC-MMAE$ および $1250 \mu g/m^2$ トラスツズマブ- $MC-vc-PAB-MMAE$ を日0に投与した $MMTV-HER2$ $Fo5$ 乳癌同種異系移植片を持つ無胸腺ヌードマウスにおける経時的平均腫瘍容量変化を示す。図15は、 $650 \mu g/m^2$ トラスツズマブ- $MC-MMAF$ を投与した $MMTV-HER2$ $Fo5$ 乳癌同種異系移植片を持つ無胸腺ヌードマウスにおける経時的平均腫瘍容量変化を示す。表2dおよび図13~15は、 ADC が、元来 $MMTV-HER2$ トランスジェニックマウスにおいて生起した $HER2$ 陽性腫瘍 ($Fo5$) の同種異系移植片において強力な抗-腫瘍発生を有することを示す。抗体単独(例えば、トラスツズマブ)はこのモデルにおいて有意な抗-腫瘍活性を有しない ($Ericsson et al.$ 、米国特許第6632979号)。図13~15に示すように、腫瘍の成長は、成長の対照(賦形剤)レベルと比較して ADC での処理によって遅延された。

【0549】

驚くべきかつ予期せぬ発見において、表2dにおける ADC のインビボ抗-腫瘍活性の結果は、一般には、抗体当たりの薬物部分の低い平均数を持つ ADC が効率、例えば、腫瘍倍化時間 > 15 日および平均 $\log$ 細胞殺傷 > 1.0 を示したことを示す。図16は、抗体薬物結合体、トラスツズマブ- $MC-vc-PAB-MMAF$ については、平均腫瘍容量が減少し、進行せず、ここで、 $MMAF$: トラスツズマブ比率は2および4であり、他方、賦形剤(緩衝液)よりも低い速度ではあるが、腫瘍は5.9および6の比率で進行したことを示す。このマウス異種移植片モデルにおける腫瘍進行の速度は賦形剤およびトラスツズマブにつきほぼ同一、すなわち、3日であった。結果は、少なくともトラスツズマブ ADC では、抗体当たりの薬物部分の最適比率は約8未満となり得、約2~約4であり得ることを示唆する。

【0550】

(4.5.5 げっ歯類毒性)

抗体薬物結合体および ADC -マイナス対照、「賦形剤」を、急性毒性ラットモデルで評価した。 ADC の毒性は ADC を持つ雄および雌の $Sprague-Dawley$ ラットの処理、種々の器官に対する効果の引き続いての精査および分析によって調べた。肉眼での観察は、体重の変化および病巣および出血の兆候を含むものであった。臨床的微生物学パラメーター(血清化学および血液学)、組織病理学、および剖検を投与した動物で行

10

20

30

40

50

った。

【0551】

A D C を投与した後のマウスにおいて、体重喪失、または賦形剤のみを投与した動物のマウス体重変化は全身または局所化毒性の肉眼でのおよび一般的インジケーターであると考えられる。図17～19は、ラット体重に対する投与後における種々のA D C および対照（賦形剤）の効果を示す。

【0552】

肝臓毒性は上昇した肝臓酵素、上昇した数の有糸分裂およびアポトーシス図の増大した数および肝細胞壊死によって測定した。血液リンパ系毒性は白血球、主として顆粒球（好中球）、および／または血小板の枯渇、およびリンパ系器官の関与、すなわち、萎縮またはアポトーシス活性によって観察した。毒性は有糸分裂およびアポトーシス図の増大した数および変性腸炎のような胃腸管病巣によっても記載した。

【0553】

調べた肝臓負傷の指標である酵素は：A S T（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）

－局所化／細胞質；肝臓、心臓、骨格筋、腎臓

－肝臓：7000：1の血漿比率

－T1／2：17時間

A L T（アラニンアミノトランスフェラーゼ）

－局所化：細胞質；肝臓、腎臓、心臓、骨格筋

－3000：1の肝臓：血漿比率

－T1／2：42時間；日周期性変動

G G T（γ-グルタミルトランスフェラーゼ）

－局所化：高い分泌または吸収能力を持つ細胞の原形質膜：肝臓、腎臓、腸

－腎臓負傷の貧弱なプレディクター；通常単管疾患で上昇を含む。

【0554】

トラスツズマブ-MC-val-cit-MMAF、トラスツズマブ-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF、トラスツズマブ-MC-MMAFおよびトラスツズマブ-MC-val-cit-PAB-MMAFの毒性プロファイルを雌Sprague-Dawleyラットで調べた（実施例19）。ヒト化トラスツズマブ抗体は認識可能にラット組織に結合せず、いずれの毒性も非特異的と考えられよう。840および2105 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ MMAFの用量レベルにおける変種を2105 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ におけるトラスツズマブ-MC-val-cit-PAB-MMAFと比較した。

【0555】

群1、2、3、4、6および7における動物（各々、賦形剤、9.94 & 24.90 mg/kg トラスツズマブ-MC-val-cit-MMAF, 10.69 mg/kg トラスツズマブ-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF、および10.17 & 25.50 mg/kg トラスツズマブ-MC-MMAF）は、実験の間に体重が増加した。

群5および8における動物（各々、26.78 mg/kg トラスツズマブ-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAFおよび21.85 mg/kg トラスツズマブ-MC-val-cit-PAB-MMAF）は実験の間に体重を喪失した。実験日5では、群2、6および7における動物の体重の変化は群1動物から有意には異ならなかった。群3、4、5および8における動物の体重の変化は群1の動物から実質的に異なった（実施例19）。

【0556】

トラスツズマブ-MC-MMAFで処理したラット（群6および7）は双方の用量レベルにおいて賦形剤-処理対照動物から区別できず；すなわち、この結合体はこのモデルにおいて優れた安全性プロファイルを示した。トラスツズマブ-MC-val-cit-MMAFで処理したラット（自己犠牲PAB部位無し；群2および3）はMMAF結合体

10

20

30

40

50

に典型的な用量－依存性変化を示し；変化の程度は全長MC－val－cit－PAB－MMAF結合体（群8）と比較して低かった。日5での血小板カウントは、群8（高用量トラスツズマブ－MC－val－cit－PAB－MMAF）の動物における15%と比較して群3（高用量トラスツズマブ－MC－val－cit－MMAF）の動物においてベースライン値のほぼ30%であった。ビリルビンの肝臓酵素ASTおよびALTの上昇、および血小板減少症の程度は用量－依存的にトラスツズマブ－MC（Me）－val－cit－PAB－MMAFで処理した動物（群4および5）において最も明らかであった；群5の動物（高用量群）は、日5において、ベースライン値のほぼ10倍のALTのレベルを示し、血小板は剖検の時点においてほぼ90%だけ低下した。

【0557】

雌Sprague Dawleyラットにも高レベルにて（実施例19、高用量実験：群2、3、4）トラスツズマブ－MC－MMAF、および賦形剤 対照（群1）を投与した。肝臓酵素ALT、ASTおよびGGTの用量－依存性上昇を含めた中程度の毒性シグナルが観察された。日5では、最高容量群における動物はALTの2倍上昇およびASTの5倍上昇を示し；GGTも上昇した（6U/L）。酵素レベルは日12に正規化に向けた傾向を示す。日5には全ての3つの用量の群において穏和な顆粒球増加症があり、血小板カウントは全ての動物において実質的に不変のままであった。形態学的変化は穏和であり；4210 μ g/m²用量レベル（群2）で処理した動物は肝臓、脾臓、胸腺、腸および骨髄の顕著ではない履歴を示した。穏和に増大したアポトーシスおよび有糸分裂活性は5500 μ g/m²用量レベルで処理した動物において、各々、胸腺および肝臓で観察された（群3）。骨髄は正常細胞であったが、顆粒球過形成の証拠を示し、これは、これらの動物における末梢血液カウントで観察された絶対的顆粒球減少症と合致する。群4における最高用量での動物は定性的に同一の特徴を示した：肝臓における有糸分裂活性は、幾分、群3における動物と比較して増大したように見える。また、骨髄外造血が脾臓および肝臓で観察された。

【0558】

EphB2Rはマウスおよびヒトの間で密接な相同性があるタイプ1のTMチロシンキナーゼレセプターであり、結直腸癌細胞で過剰発現される。2H9はEphB2Rに対する抗体である。裸の抗体は腫瘍増殖に対して効果を有さないが、2H9－val－cit－MMAEはEphB2R発現細胞を殺し、CXF1103ヒト結腸腫瘍を用いるマウス異種移植片モデルにおいて効率を示した（Mao et al. (2004) Cancer Res. 64:781－788）。2H9および7C2は共にマウスIgG1抗HER2抗体である。2H9－MC－val－cit－PAB－MMAF（3.7MMAF/A b）、7C2－MC－val－cit－PAB－MMAF（4MMAF/A b）、およびトラスツズマブ－MC－val－cit－PAB－MMAF（5.9MMAF/A b）の毒性プロファイルを比較した。各免疫結合体または免疫結合体の薬物部分の構造における差は薬物動態学および、結局は安全性プロファイルに影響し得る。ヒト化トラスツズマブ抗体はラット組織に認識可能に結合せず、いずれの特性も非特異的と考えられるであろう。

【0559】

（マカクザル毒性／安全性）

ラット毒性／安全性実験と同様に、マカクザルをADCで処理し、続いて、肝臓酵素測定、および種々の器官に対する効果の精査および分析を行った。肉眼での観察は体重の変化および病巣および出血の兆候を含んだ。臨床病理学パラメーター（血清化学および血液学）、組織病理学、および剖検を投与した動物で行った（実施例19）。

【0560】

抗体薬物結合体、H－MC－vc－PAB－MMAE（H＝システインを介して連結したトラスツズマブ連結）はテストした用量レベルのいずれにおいても肝臓毒性の証拠を示さなかった。末梢血液顆粒球は1100mg/m²の単一用量の後の枯渇を示し、投与から14日後に完全な回復を伴った。抗体薬物結合体H－MC－vc－PAB－MMAFは

550（一過性）および880mg/m²用量レベルにおける肝臓酵素の上昇を示し、顆粒球減少症の証拠を示さず、および血小板の用量一依存性一過性（群2および3）の減少を示した。

【0561】

（4.6 本発明の化合物の合成）

例示的化合物および例示的結合体はスキーム5～16にて後に概説する合成手法を用いて作成することができる。後により詳細に記載するように、例示的化合物または例示的結合体は、便利には、薬物およびリガンドへの結合用の反応性部位を有するリンカーを用いて調製することができる。1つの態様において、リンカーは、限定されるものではないが、抗体のようなリガンドに存在する求核性基に対して反応性である親電子性基を有する反応性部位を有する。抗体上の有用な求核性基は、限定されるものではないが、スルフヒドリル、ヒドロキシルおよびアミノ基を含む。抗体の求核性基のヘテロ原子はリンカー上の親電子性基に対して反応性であって、リンカーユニットに対する共有結合を訂正する。有用な親電子性基は、限定されるものではないが、マレイミドおよびハロアセトアミド基を含む。新電子性基は抗体付着用の便宜な部位を提供する。

10

【0562】

もう1つの実施形態において、リンカーは、抗体に存在する親電子性基に対して反応性である求核性基を有する反応性部位を有する。抗体上の有用な親電子性基は、限定されるものではないが、アルデヒドおよびケトンカルボニル基を含む。リンカーの親電子性基のヘテロ原子は抗体上の親電子性基と反応し、抗体ユニットに対する共有結合を形成することができる。リンカー上の有用な求核性基は、限定されるものではないが、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレートおよびアリールヒドラジドを含む。抗体上の親電子性基はリンカーに対する付着用の便宜な部位を提供する。

20

【0563】

カルボン酸官能基およびクロロホルメート官能基もまたリンカー用の有用な反応性部位である。なぜならば、それらは薬物の第二級アミノ基と反応して、アミド結合を形成できるからである。また、反応性部位として有用なのは、カルバメート結合を形成するための、限定されるものではないが、N-メチルバリンのような薬物のアミノ基と反応することができるp-ニトロフェニルカルボネートのようなリンカー上のカルボネート官能基である。典型的には、ペプチドベースの薬物は、2以上のアミノ酸および／またはペプチドフラグメントの間にペプチド結合を形成することによって調製することができる。そのようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野においてよく知られた液相合成方法（E. Schröder and K. Lubke, 「The Peptides」, volume 1, pp 76-136, 1965 Academic Press）に従って調製することができる。

30

【0564】

親電子マレイミド基を有する例示的ストレッチャーの合成はスキーム8～9において以下に示す。リンカーの合成で有用な一般的合成方法はスキーム10で記載する。スキーム11はval-cit基、親電子性マレイミド基およびPAB自己犠牲スペーサー基を有するリンカーユニットの構築を示す。スキーム12は、PAB自己犠牲スペーサー基を含むまたは含まない、phe-lys吸入基、親電子マレイミド基を有するリンカーの合成を示す。スキーム13は薬物-リンカー化合物の合成のための一般的概説を表し、他方、スキーム14は薬物-リンカー化合物を調製するための別の経路を表す。スキーム15はBHMS基を含有する分岐したリンカーの合成を示す。スキーム16は薬物-リンカー-抗体結合体を形成するための薬物-リンカー化合物への抗体の付着を概説し、スキーム14は、例えば、限定されるものではないが、抗体当たり2または4の薬物を有する薬物-リンカー-交代結合体の合成を示す。

40

【0565】

後により詳細に記載するように、例示的結合体は、薬物およびリガンドに結合するため

50

の2以上の反応性部位を有するリンカーを用いて便宜には調製される。1つの態様において、リンカーは抗体のようなリガンドに存在する求核性基に対して反応性である親電子性を有する反応性部位を有する。抗体上の有用な求核性基は、限定されるものではないが、スルフヒドリル、ヒドロキシルおよびアミノ基を含む。抗体の求核性基のヘテロ原子はリンカー上の親電子性基に対して反応性であって、リンカーユニットへの共有結合を形成する。有用な親電子性基は、限定されるものではないが、マレイミドおよびハロアセタミド基を含む。親電子性基は抗体付着のための便宜な部位を提供する。

【0566】

もう1つの実施形態において、リンカーは、抗体のようなリガンドに存在する親電子性基に対して反応性である求核性基を有する反応性部位を有する。抗体上の有用な親電子性基は、限定されるものではないが、アルデヒドおよびケトンカルボニル基を含む。リンカーの求核性基のヘテロ原子は抗体上の親電子性基と反応し、抗体ユニットへの共有結合を形成することができる。リンカー上の有用な求核性基は、限定されるものではないが、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリアルヒドラジドを含む。抗体上の親電子性基はリンカーに対する付着用の便宜な部位を提供する。

10

【0567】

(4.6.1 薬物部分の合成)

典型的には、ペプチドベースの薬物は2以上のアミノ酸および／またはペプチドフラグメントの間のペプチド結合を形成することによって調製することができる。そのようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野でよく知られた液相合成方法に従って調製することができる(E. Schroeder and K. Ludke, 「The Peptides」、volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press 参照)。

20

【0568】

オーリスタチン／ドラスタチン薬物部分は：米国特許第5635483号；米国特許第5780588号；Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465；Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243-277；およびPettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5: 859-863の一般的方法に従って調製することができる。

30

【0569】

1つの実施形態において、薬物は、適当な縮合条件下で、好ましくは、ワンポット反応において、ほぼ化学量論的当量のジペプチドおよびポリペプチドを合わせることによって調製される。このアプローチは以下のスキーム5～7で示される。

【0570】

スキーム5は式Ibの薬物化合物の合成用の有用な中間体であるN-末端ポリペプチドユニットFの合成を示す。

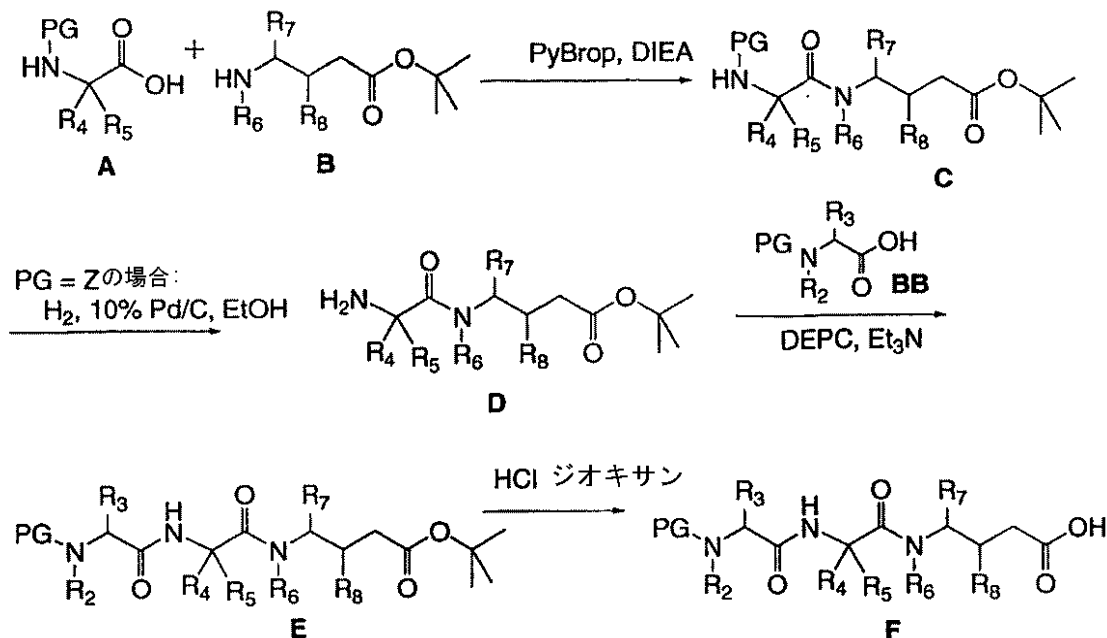
【0571】

(スキーム5)

40

【0572】

【化 1 8 6】



10

スキーム 5 に示したように、例えば、PyBrop および ジイソプロピルエチルアミンの存在下にて、または DCC を用い、安定なカップリング条件下で、保護されたアミノ酸 **A** (ここで、PG はアミン保護基を表し、R⁴ は水素、C₁ - C₈ アルキル、C₃ - C₈ 炭素環、-O- (C₁ - C₈ アルキル)、-アリール、アルキル-アリール、アルキル- (C₃ - C₈ 炭素環)、C₃ - C₈ 複素環、アルキル- (C₃ - C₈ 複素環) から選択され、ここで、R⁵ は H および メチル から選択され；あるいは R⁴ および R⁵ は一緒になって式 - (C R^a R^b)_n - を有し、ここで、R^a および R^b は、独立して、水素、C₁ - C₈ アルキル および C₃ - C₈ 炭素環 から選択され、n は 2、3、4、5 および 6 から選択され、それらが結合している炭素分子とで環を形成する) を *t*-ブチルエステル **B** (ここで、R⁶ は -H および -C₁ - C₈ アルキル から選択され；および R⁷ は水素、C₁ - C₈ アルキル、および C₃ - C₈ 炭素環、-O- (C₁ - C₈ アルキル)、-アリール、アルキル-アリール、アルキル- (C₃ - C₈ 炭素環)、C₃ - C₈ 複素環 および アルキル- (C₃ - C₈ 複素環) から選択される) とカップリングさせる (例えば、Miyazaki, K. et al. Chem. Pharm. Bull. 1995, 43 (10), 1706 - 1718 参照)。

20

30

【0573】

適当な保護基 PG、およびアミノ基を保護基で保護するための適当な合成方法は当該分野でよく知られている。例えば、Greene, T. W. and Wuts, P. G. M., Protective Groups in Organic Synthesis, 第2版, 1991, John Wiley & Sons 参照。例示的保護されたアミノ酸 **A** は PG-Ile および、特に、PG-Val であり、他方、他の適当な保護されたアミノ酸は、限定されるものではないが、PG-シクロヘキシルグリシル、PG-シクロヘキシルアラニン、PG-アミノシクロパン-1-カルボン酸、PG-アミノイソ酪酸、PG-フェニルアラニン、PG-フェニルグリシン、および PG-tert-ブチルグリシンを含む。Z は例示的な保護基である。Fmoc はもう1つの例示的保護基である。例示的 *t*-ブチルエステル **B** はドライソロイシン *t*-ブチルエステルである。

40

【0574】

ジペプチド **C** は、例えば、クロマトグラフィーを用いて精製し、引き続いて、例えば、PG がベンジルオキシカルボニルである場合にはエタノール中の H₂ および 10% Pd-C を用い、あるいは Fmoc 保護基の除去のためのジメチルアミンを用いて脱保護することができる。得られたアミン **D** はアミノ酸 **BB** とで容易にペプチド結合を形成する (ここで、R¹ は -H、-C₁ - C₈ アルキル および -C₃ - C₈ 炭素環 から選択され；およ

50

び R^2 は $-H$ および $-C_1-C_8$ アルキルから選択され；あるいは R^1 および R^2 は一緒になって、 R^a および R^b が独立して、 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ アルキルおよび $-C_3-C_8$ 炭素環から選択され、 n が 2、3、4、5 および 6 から選択される式 $-(CR^aR^b)_n-$ を有し、かつそれらが結合する窒素原子と一緒に環を形成し；および R^3 は水素、 C_1-C_8 アルキル、 C_3-C_8 炭素環、 $-O-(C_1-C_8)$ (アルキル)、 $-アリー$ ル、アルキル $-アリー$ ル、アルキル $-(C_3-C_8)$ 炭素環、 C_3-C_8 複素環、およびアルキル $-(C_3-C_8)$ 複素環から選択される)。N、N-ジアルキルアミノ酸は商業的に入手可能なN、N-ジメチルバリンのような、BBについての例示的アミノ酸である。他のN、N-ジアルキルアミノ酸は 高知の手法を用いて還元的にビス-アルキル化によって調製することができる（例えば、Bowman, R. E., Stroud, H. H. J. Chem. Soc., 1950, 1342-1340 参照）。Fmoc-Me-L-Val および Fmoc-Me-L-グリシンはN-モノアルキル誘導体の合成で有用な2つの例示的アミノ酸BBである。アミンDおよびアミノ酸BBは、塩基としてのトリエチルアミンと共にカップリング試薬DEPCを用いてポリペプチドEを供するように反応する。EのC-末端保護基は、引き続いて、HClを用いて脱保護して、式Fのポリペプチド化合物を得る。

10

【0575】

スキーム5に示された説明的DEPCカップリング方法およびPyBropカップリング方法は、各々、一般的手法Aおよび一般的手法Bに低下に概説する。接触水素化を介するZ-保護アミンの脱保護のための説明的方法は一般的手法Cにて以下に概説する。

20

【0576】

一般的手法A：DEPCを用いるペプチド合成。N-保護またはN、N-ジ置換アミノ酸またはペプチドD（1.0当量）およびアミンBB（1.1当量）はジクロロメタン（0.1~0.5M）のような非プロトン性有機溶媒で希釈する。次いで、トリエチルアミンまたはジイソプロピルエチルアミン（1.5当量）のような有機塩基、続いて、DEPC（1.1当量）を加える。HPLCまたはTLCによってモニターしつつ、得られた溶液は好ましくはアルゴン下で12時間まで攪拌する。溶媒を室温にて真空中で除去し、例えば、HPLCまたはフラッシュカラムクロマトグラフィー（シリカゲルカラム）を用いて粗生成物を精製する。関連画分を合わせ、真空中で濃縮して、ポリペプチドEが得られ、これを真空中で一晩乾燥する。

30

【0577】

一般的手法B：PyBropを用いるペプチド合成。所望によりカルボキシル保護基を有してもよいアミノ酸B（1.0当量）をジクロロメタンまたはDMEのような非プロトン性有機溶媒で希釈して、0.5および1.0mMの間の濃度の溶液が得られ、次いで、ジイソプロピルエチルアミン（1.5当量）を加える。Fmoc-またはZ-保護アミノ酸A（1.1当量）を一度に固体として加え、次いで、PyBrop（1.2当量）に得られた混合物に加える。反応をTLCまたはHPLCにてモニターし、続いて、一般的手法Aに記載されたのと同様に仕上げ処理手法を行う。

【0578】

一般的手法C：接触水素化を介するZ-除去。Z-保護アミノ酸またはペプチドCをエタノールで希釈して、厚壁丸底フラスコのような適当な容器中で0.5および1.0mMの間の溶液を得る。炭素上の10%パラジウムを加え（5~10%w/w）、反応混合物を水素雰囲気下に置く。反応の進行はHPLCを用いてモニターし、一般には1~2時間内で完了する。反応混合物を予め洗浄したセライトのパッドを通して濾過し、セライトを濾過の後にメタノールのような極性有機溶媒で再度洗浄する。溶離剤溶液を真空中で濃縮して残渣が得られ、これを有機溶媒、好ましくはトルエンで希釈する、次いで、有機溶媒を真空中で除去して、脱保護されたアミンCを得る。

40

【0579】

スキーム6は式KのC-末端ジペプチドを作成するのに有用な方法、および式Kのジペプチド結合を式Fのポリペプチドとカップリングさせて、式Ibの薬物化合物を作成する

50

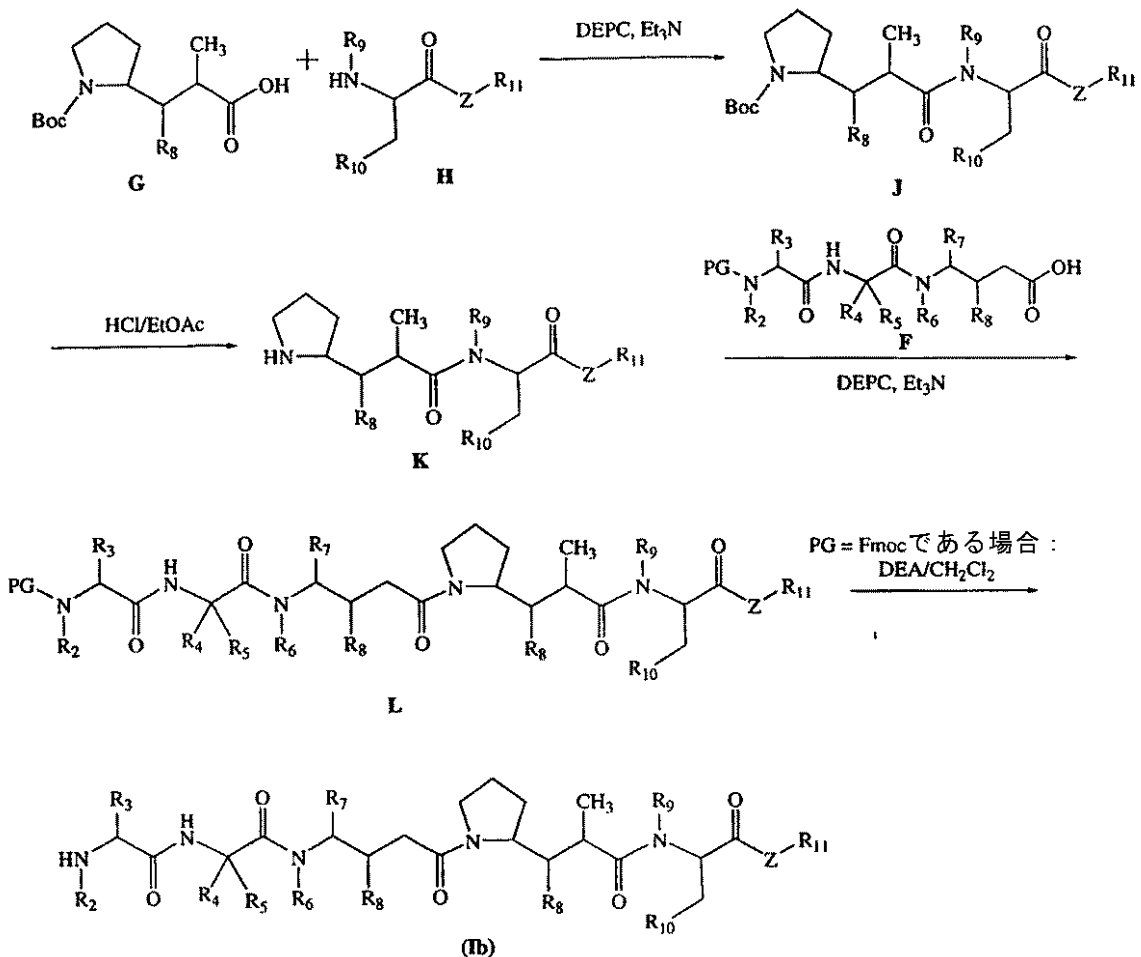
方法を示す。

【0580】

(スキーム6)

【0581】

【化187】



ジペプチドKは、スキーム5に示すように、ポリエチルアミンの存在下で、例えば、DEPCのようなペプチド化学でよく知られた縮合剤を用いて、修飾されたアミノ酸Boc-ドアラプロリンG(例えば、Pettit, G. R., et al. Synthesis, 1996, 719-725)と式Hのアミンとの縮合によって容易に調製することができる。

【0582】

次いで、式Kのジペプチドを一般的手法Dを用いて式Fのポリペプチドとカップリングさせて、式LのFmoc-保護薬物化合物が得られ、これは、引き続いて、一般的手法Eを用いて脱保護して、式(Ib)の薬物化合物を得ることができる。

【0583】

一般的手法D：薬物合成。ジペプチドK(1.0当量)およびポリペプチドF(1当量)の混合物をジクロロメタンのような非プロトン性有機溶媒で希釈して、0.1M溶液が形成され、次いで、トリフルオロ酢酸のような強酸(1/2 v/v)を加え、窒素雰囲気下で得られた混合物を0℃にて2時間攪拌する。反応をTLCまたは、好ましくはHPLCを用いてモニターすることができる。溶媒を真空中で除去し、得られた残渣を好ましくはトルエンを用いて共沸により2回乾燥する。得られた残渣を高真空下で12時間乾燥し、次いで、ジクロロメタンのような非プロトン性有機溶媒で希釈する。次いで、トリエチルアミンまたはジイソプロピルエチルアミン(1.5当量)のような有機塩基を加え、引き続いて、残渣に対する化学的官能性に応じてPyBrop(1.2当量)またはDEP

10

20

30

40

50

C (1.2 当量) いずれかを加える。反応混合物を TLC または HPLC いずれかでモニターし、完了に際して、反応を一般的手法 A に記載したのと同様または同一の仕上げ手法に付す。

【0584】

一般的手法 E: ジエチルアミンを用いる Fmoc-除去。Fmoc-保護薬物 L をジクロロメタンのような非プロトン性有機溶媒で希釈し、得られた溶液にジエチルアミン (1/2 v/v) を加える。反応の進行を TLC または HPLC によってモニターし、典型的には、2 時間以内に完了する。反応混合物を真空中で濃縮し、得られた残渣を好ましくはトルエンを用いて共沸乾燥し、次いで、高真空下で乾燥して、脱保護されたアミノ基を有する薬物 I b を得る。

【0585】

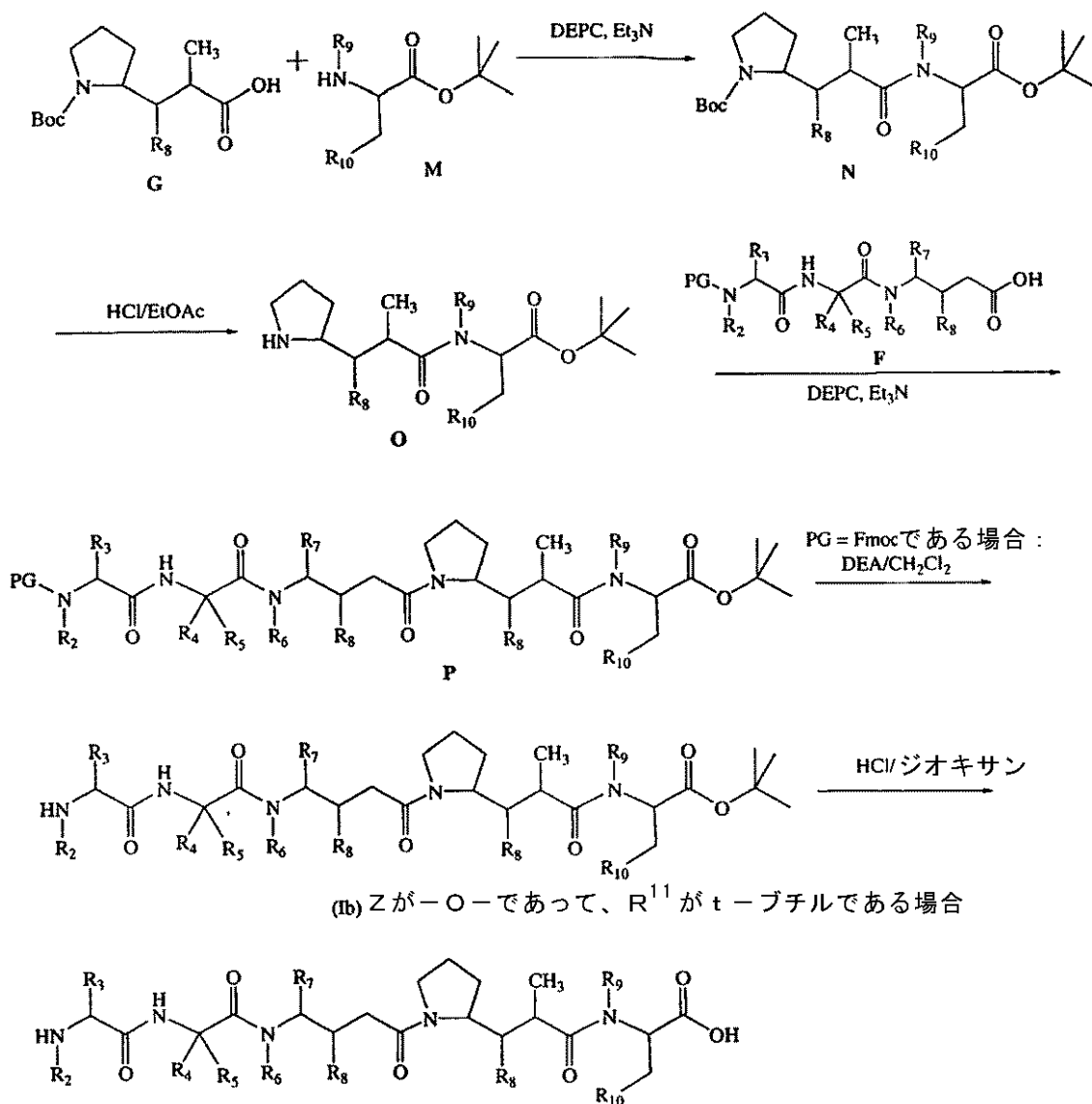
スキーム 7 は式 (I b) の MMAF 誘導体を製造するのに有用な方法を示す。

【0586】

(スキーム 7)

【0587】

【化188】



ジペプチド O は、スキーム 5 および 6 に示すように、トリエチルアミンの存在下、例えば、DEPC のようなペプチド化学でよく知られた縮合剤を用い、修飾されたアミノ酸 Boc-ドラプロイン G (例えば、Pettit, G. R., et al. Synthesis

10

20

30

40

50

is, 1996, 719-725 参照) と式Mの保護されたアミノ酸との縮合によって容易に調製することができる。

【0588】

次いで、一般的手法Dを用いて、式Oのジペプチドを式Fのポリペプチドとカップリングさせて、式PのFmoc-保護MMAF化合物を作製することができ、これは、引き続いて、一般的手法Eを用いて、式(Ib)のMMAF薬物化合物を得ることができる。

【0589】

かくして、前記方法は本発明で用いることができる薬物を製造するのに有用である。

【0590】

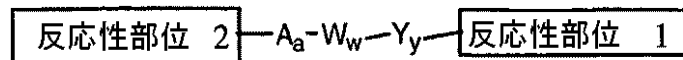
(4.6.2 薬物リンカーの合成)

10

本発明の薬物-リンカー化合物を調製するために、薬物をリンカー上の官能性部位と反応させる。一般には、スペーサーユニット(-Y-)およびストレッチャーユニット(-A-)が共に存在する場合、リンカーは構造：

【0591】

【化189】

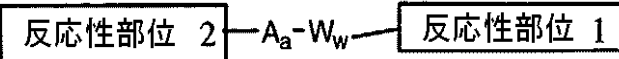


を有することができる。別法として、リンカーは、スペーサーユニット(-Y-)が存在しない場合、構造：

20

【0592】

【化190】



を有することができる。

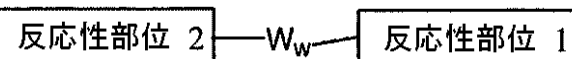
【0593】

また、リンカーは、ストレッチャーユニット(-A-)およびスペーサーユニット(-Y-)が共に存在しない場合、構造：

30

【0594】

【化191】



を有することもできる。

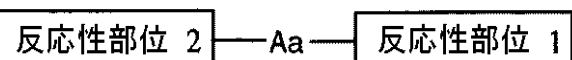
【0595】

また、リンカーは、アミノ酸ユニット(W)およびスペーサーユニット(Y)が共に存在しない場合、構造：

【0596】

【化192】

40



を有することもできる。

【0597】

一般には、適当なリンカーは、任意のストレッチャーユニットおよび任意のスペーサーユニットに連結したアミノ酸ユニットを有する。反応性部位1はスペーサーの末端に存在し、反応部位2はストレッチャーの末端に存在する。もしスペーサーユニットが存在しなければ、反応性部位1はアミノ酸ユニットのC-末端に存在する。

50

【0598】

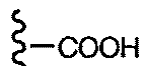
本発明の例示の実施形態において、反応性部位No. 1は薬物の窒素原子に対して反応性であって、反応性部位No. 2はリガンド上のスルフヒドリル基に対して反応性である。反応性部位1および2は異なる官能基に対して反応性であり得る。

【0599】

本発明の1つの態様において、反応性部位No. 1は

【0600】

【化193】



10

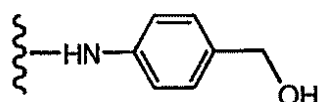
である。

【0601】

本発明のもう1つの態様において、反応性部位No. 1は

【0602】

【化194】



である。

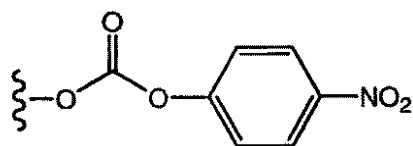
20

【0603】

本発明のさらにもう1つの態様において、反応性部位No. 1は式：

【0604】

【化195】



を有するp-ニトロフェニルカルボネートである。

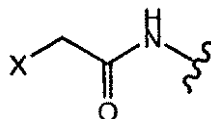
30

【0605】

本発明の1つの態様において、反応性部位No. 2はチオール許容基である。適当なチオール許容基は式：

【0606】

【化196】

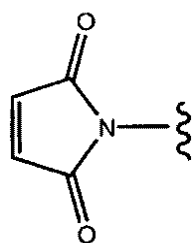


〔式中、Xは脱離基、好ましくはO-メシル、O-トシル、-Cl、-Br、または-I；あるいは式：

40

【0607】

【化197】



50

を有するマレイミド基を表す]

を有するハロアセタミド基を含む。

【0608】

有用なリンカーはMolecular Biosciences Inc. (Boulder, CO) のような商業的源を介して得ることができるか、あるいは以下のスキーム8～10にまとめたように調製することができる。

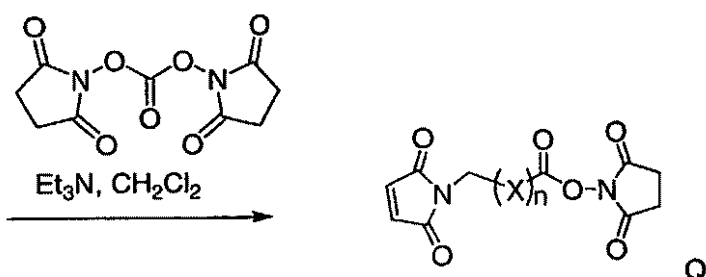
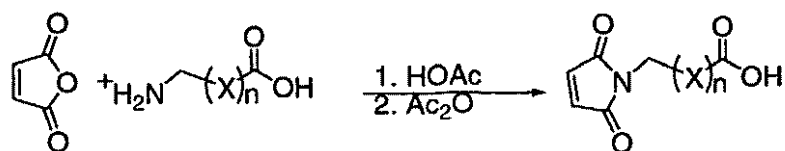
【0609】

(スキーム8)

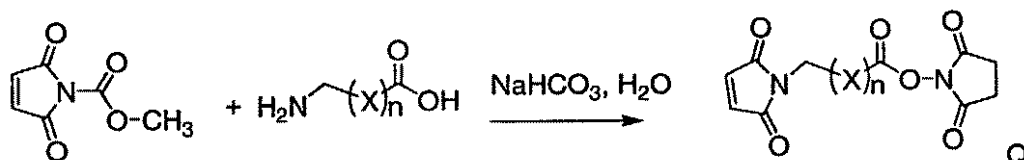
【0610】

【化198】

10



20



30

[式中、Xは $-\text{CH}_2-$ または $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ であり；Xが $-\text{CH}_2-$ である場合、nは0～10の範囲の整数であり；あるいはXが $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ である場合、1～10である。]

スキーム9に示した方法はMitsunobu条件下でマレイミドをグリコールと合わせて、ポリエチレングリコールマレイミドストレッチャー（例えば、Walker, M. A. J. Org. Chem. 1995, 60, 5352-5）が得られ、引き続いて、p-ニトロフェニルカルボネート反応部位基をインストールする。

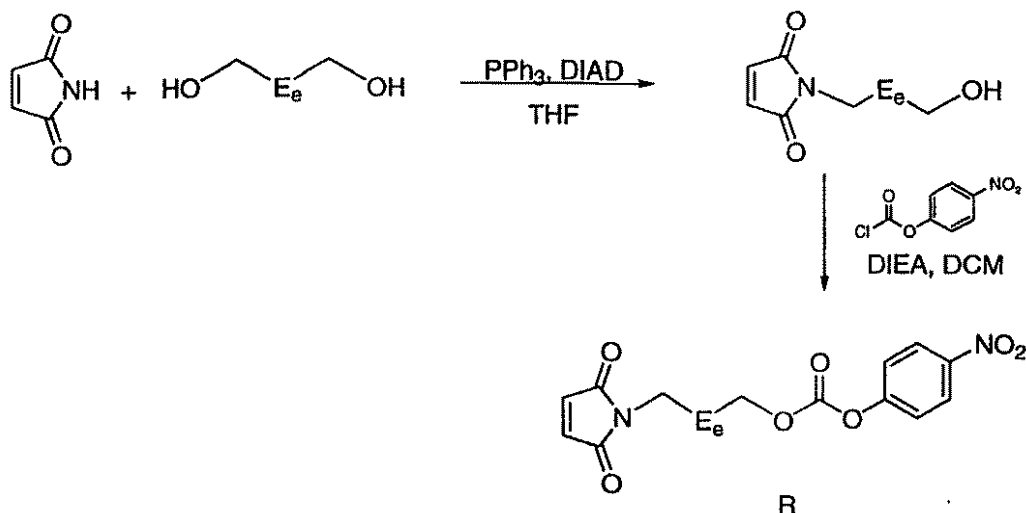
【0611】

(スキーム9)

【0612】

40

【化 1 9 9】



10

〔式中、Eは $-\text{CH}_2-$ または $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ であり；およびeは0～8の範囲の整数である。〕

別法として、PEG-マレイミドおよびPEG-ハロアセタミドストレッチャーは Frisch, et al., Bioconjugate Chem. 1996, 7, 180-186 によって記載されたように調製することができる。スキーム 10 はマレイミドストレッチャー基および、所望により、p-アミノベンジルエーテル自己犠牲スパーサーを含有する例示的リンカーユニットの一般的合成を示す。

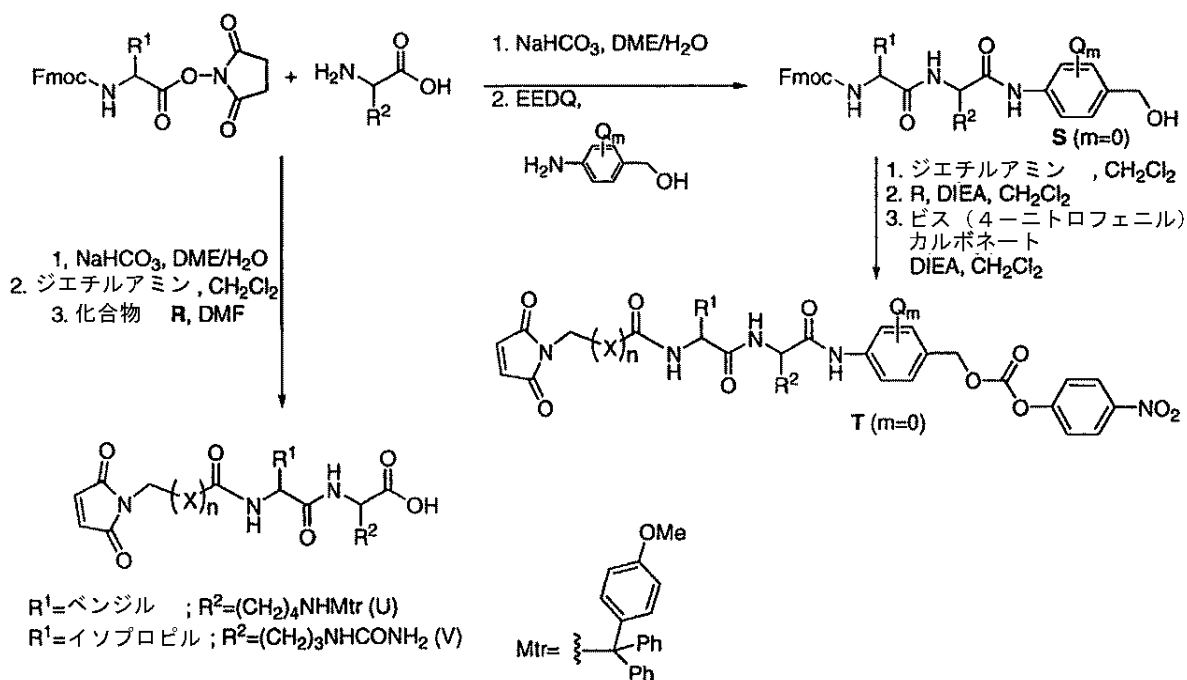
20

【0613】

(スキーム 10)

【0614】

【化 2 0 0】



30

40

〔式中、Qは $-\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $-\text{O}-$ (C_1-C_8 アルキル)、 $-\text{ハロゲン}$ 、 $-\text{ニトロ}$ または $-\text{シアノ}$ であり；mは0～4の範囲の整数であり；およびnは0～10の範囲の整数である。〕

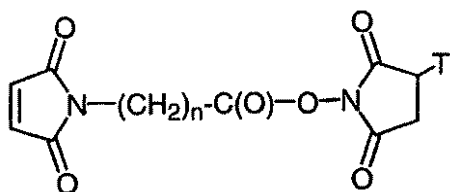
有用なストレッチャーは、有機合成の公知の技術を利用することによって、以下に記載する Molecular Biosciences (Boulder, CO) から商業的

50

に入手可能な中間体を用いてリンカーに取りこむことができる。式 (I I I a) のストレッチャーはスキーム 1 1 および 1 2 に記載したように以下の中間体とアミノ酸ユニットの N-末端と反応させることによってリンカーに導入することができる。

【0615】

【化201】

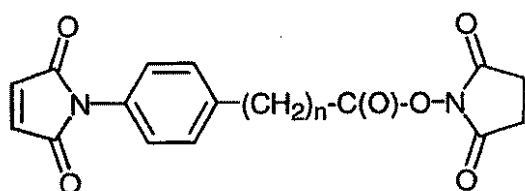


10

[式中、nは1～10の範囲の整数であって、Tは-Hまたは-SO₃Naである]

【0616】

【化202】

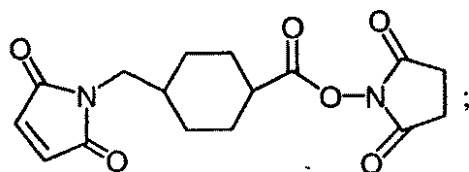


20

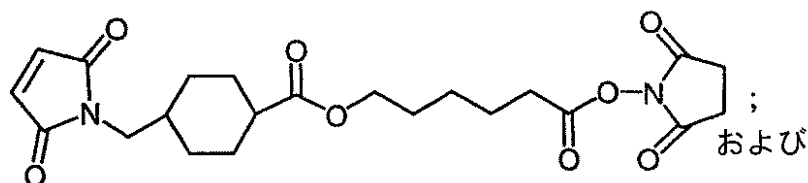
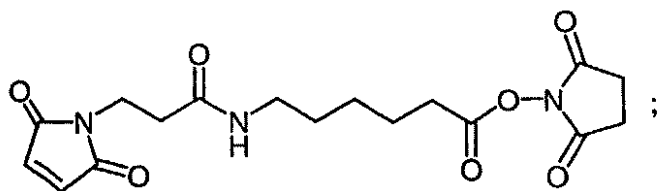
[式中、nは0～3の範囲の整数である]

【0617】

【化203】



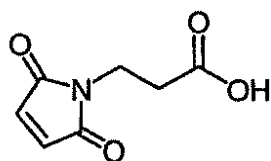
30



40

【0618】

【化204】

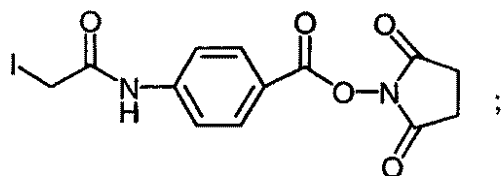
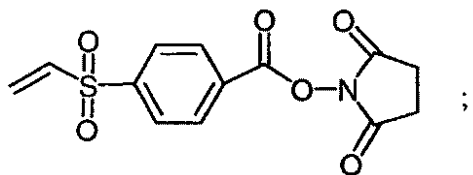


式 (I I I b) のストレッチャーユニットは、以下の中間体とアミノ酸ユニットの N-末端とを反応させることによってリンカーに取りこむことができる。

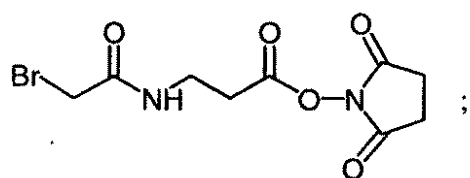
【0619】

50

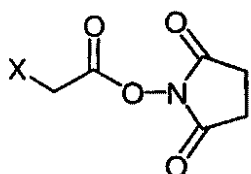
【化 2 0 5】



10



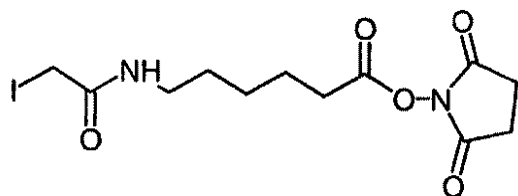
20



[式中、Xは－Brまたは－Iである]
および

【0 6 2 0】

【化 2 0 6】

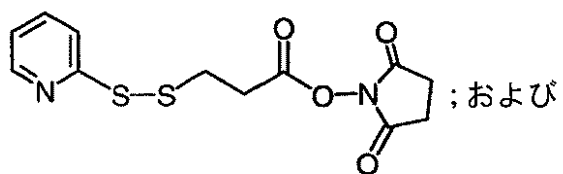


30

式（IV）のストレッチャーユニットは以下の中間体とアミノ酸ユニットのN-末端とを反応させることによってリンカーに導入することができる。

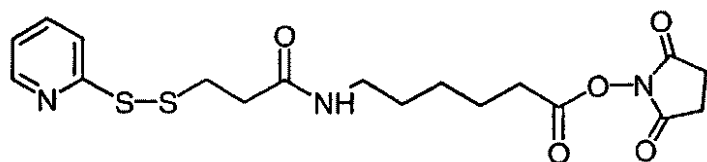
【0 6 2 1】

【化 2 0 7】



;および

40

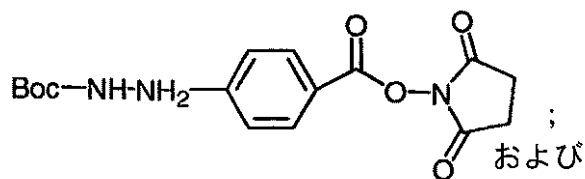


50

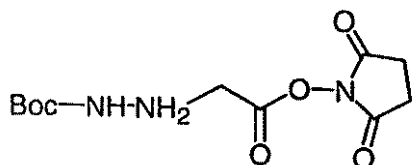
式(Va)のストレッチャーユニットは、以下の中間体とアミノ酸ユニットのN-末端とを反応させることによってリンカーに導入させることができる。

【0622】

【化208】



10

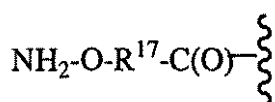


他の有用なストレッチャーは公知の手法に従って合成することができる。以下に示す式の網のオキシストレッチャーは、Jones, D. S. et al., Tetrahedron Letters, 2000, 41(10), 1531-1533; および Gilon, C. et al., Tetrahedron, 1967, 23(11), 4441-4447に記載された手法に従ってアルキルハライドとN-Boc-ヒドロキシルアミンと反応させることによって調製することができる。

20

【0623】

【化209】



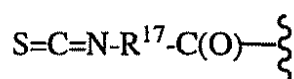
[式中、 $-R^{17}-$ は $-C_1-C_{10}$ アルキレン、 $-C_3-C_8$ カルボシクロ、 $-O-(C_1-C_8)$ アルキル、 $-$ アリーレン、 $-C_1-C_{10}$ アルキレン-アリーレン、 $-$ アリーレン- C_1-C_{10} アルキレン、 $-C_1-C_{10}$ アルキレン- (C_3-C_8) カルボシクロ、 $-$ 、 $-(C_3-C_8)$ カルボシクロ- C_1-C_{10} アルキレン、 $-C_3-C_8$ ヘテロシクロ、 $-C_1-C_{10}$ アルキレン- (C_3-C_8) ヘテロシクロ、 $-$ 、 $-(C_3-C_8)$ ヘテロシクロ- C_1-C_{10} アルキレン、 $-(CH_2CH_2O)_r$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ から選択され；およびrは1~10の範囲の整数である]

30

以下に示す式のイソチオシアネートストレッチャーは、Angew. Chem., 1975, 87(14): 517に記載されたイソチオシアナトカルボン酸塩化物から調製することができる。

【0624】

【化210】



[式中、 $-R^{17}-$ は本明細書中に記載した通りである。]

スキーム11はマレイミドストレッチャーおよび、所望により、p-アミノベンジル自己犠牲スペーサーを有するval-citジペプチドリンカーを得るための方法を示す。

40

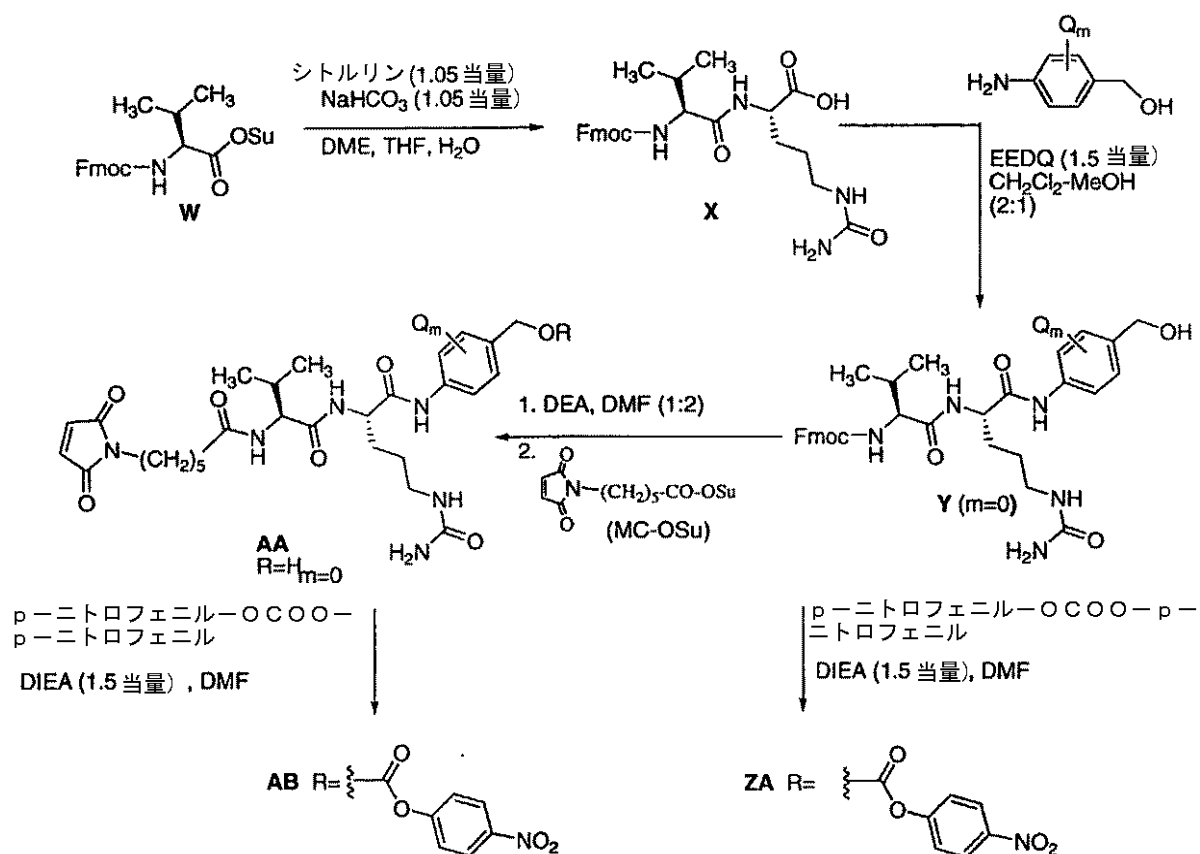
【0625】

(スキーム11)

50

【0626】

【化211】



10

20

[式中、Qは $-\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $-\text{O}-$ (C_1-C_8 アルキル)、 $-\text{ハロゲン}$ 、 $-\text{ニトロ}$ または $-\text{シアノ}$ であり；およびmは0～4の範囲の整数である。]

スキーム12はマレイミドストレッチャーユニットおよびp-アミノベンジル-犠牲スパーサーユニットを有するphe-lys(Mtr)ジペプチドリンカーユニットの合成を示す。出発物質AD(lys(Mtr))は商業的に入手可能である(Bachem, Torrance, CA)か、あるいはDubowchik, et al. Tetrahedron Letters(1997) 38:5257-60に従って調製することができる。

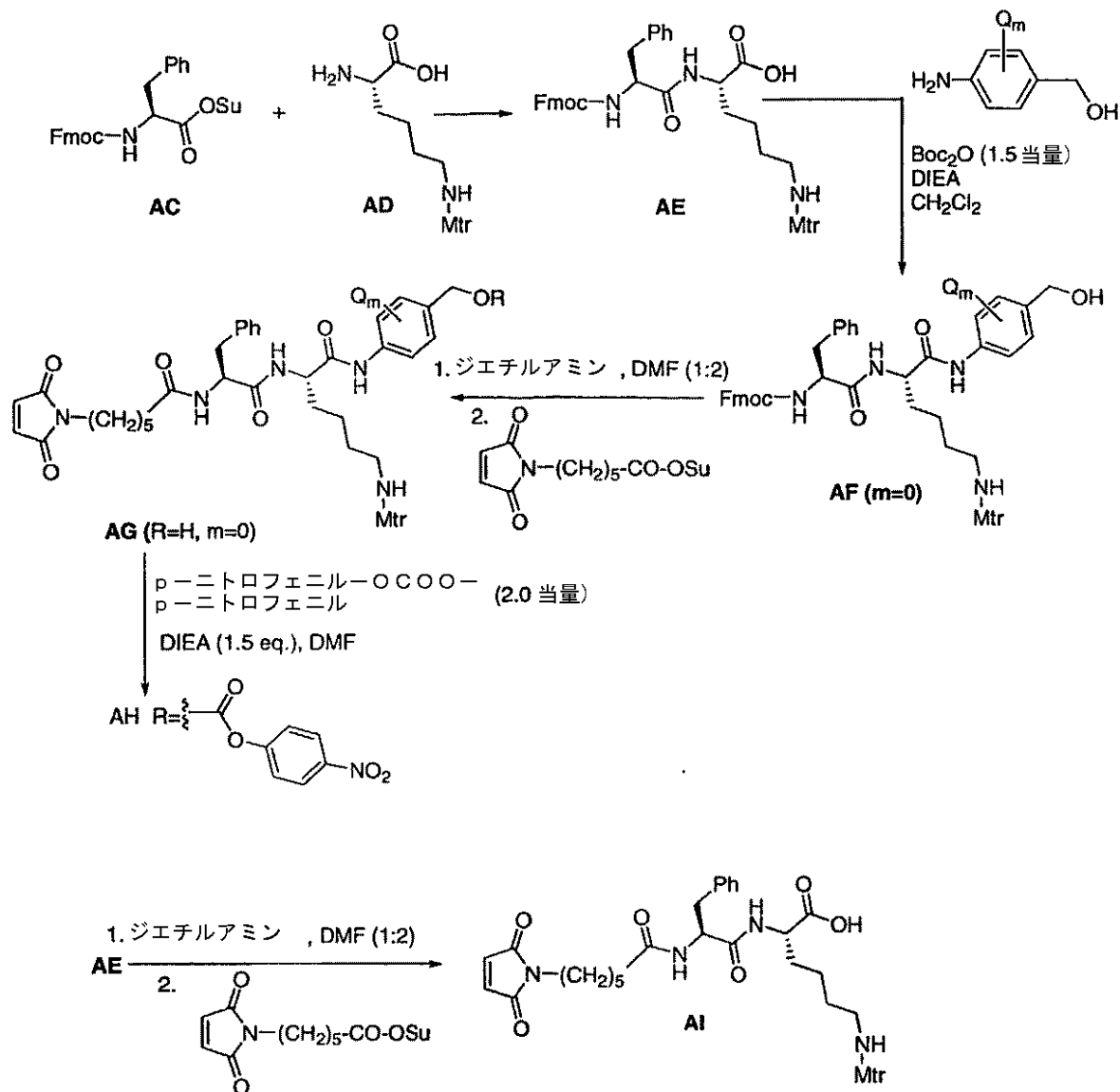
30

【0627】

(スキーム12)

【0628】

【化 2 1 2】



〔式中、Qは $-\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $-\text{O}-$ (C_1-C_8 アルキル)、 $-\text{ハロゲン}$ 、 $-\text{ニトロ}$ または $-\text{シアノ}$ であり；および m は0～4の範囲の整数である〕

スキーム 13 に示すように、リンカーを式 (I b) の薬物化合物のアミノ基と反応させて、アミドまたはカルバメート基を含有する薬物-リンカー化合物を形成することができ、薬物ユニットをリンカーユニットに連結させる。反応部位 No. 1 がリンカー AJ におけるようにカルボン酸基である場合、カップリング反応を H A T U または P y B r o p および適当なアミン塩基を用いて行うことができ、その結果、薬物ユニットおよびリンカーユニットの間のアミド結合を含む薬物-リンカー化合物 AK が得られる。反応部位 No. 1 がリンカー AL におけるようにカルボネートである場合、リンカーを DMF / ピリジンの混合物中の H O B t を用いて薬物にカップリングさせて、薬物ユニットおよびリンカーユニットの間のカルバメート結合を含有する薬物-リンカー化合物 AM を得ることができる。

【0629】

別法として、反応性部位 No. 1 がリンカー AN におけるように良好な脱離基である場合、リンカーを求核性置換プロセスを介して薬物のアミノ基とカップリングさせて、薬物ユニットおよびリンカーユニットの間にアミン結合 (AO) を介する薬物-リンカー化合物を得ることができる。

【0630】

10

20

30

40

50

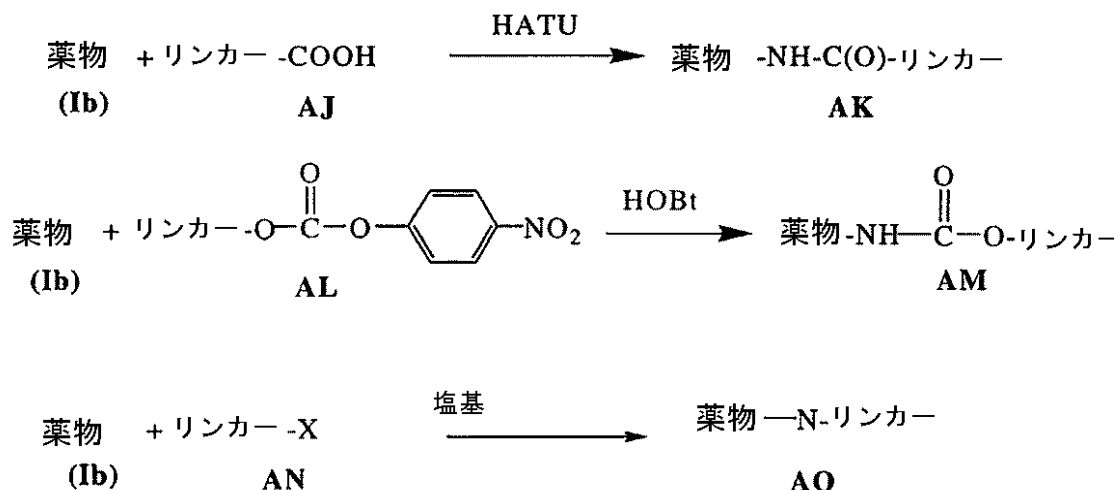
薬物-リンカー化合物を形成するための薬物をリガンドに連結させるのに有用な例示的方法はスキーム 13 に示され、一般的手法 G-H に概説する。

【0631】

(スキーム 13)

【0632】

【化213】



10

一般的手法 G：HATU を用いるアミド形成。薬物 (Ib) (1.0 当量) およびカルボン酸反応性部位 (1.0 当量) を含有する N-保護リンカーをジクロロメタンのような適当な有機溶媒で希釈し、得られた溶液を HATU (1.5 当量) および有機塩基、好ましくは、ピリジン (1.5 当量) で処理する。反応混合物を不活性雰囲気、好ましくはアルゴン下で 6 時間攪拌し、その間に、HPLC を用いて反応混合物をモニターする。反応混合物を濃縮し、得られた残渣を HPLC を用いて精製して、式 AK のアミドを得る。

【0633】

手法 H：HOBt を用いるカルバメート形成。p-ニトロフェニルカルボネート反応性部位 (1.1 当量) および薬物 (Ib) (1.0 当量) を有するリンカー AL の混合物を DMF のような非プロトン性有機溶媒で希釈して、50~100 mM の濃度を有する溶液が得られ、得られた溶液を HOBt (2.0 当量) で処理し、不活性雰囲気、好ましくはアルゴン下に置く。反応混合物を 15 分間攪拌し、次いで、ピリジン (1/4 v/v) のような有機塩基を加え、HPLC を用いて反応の進行をモニターする。リンカーは典型的には 16 時間以内で消費される。次いで、反応混合物を真空中で濃縮し、得られた残渣を、例えば、HPLC を用いて精製して、カルバメート AM を得る。

20

30

【0634】

薬物-リンカー化合物を調製する代替方法をスキーム 14 に概説する。スキーム 14 の方法を用い、薬物を、付着したストレッチャーユニットを有しない部分的リンカーユニット (例えば、ZA) に付着させる。これは Fmoc-保護 N-末端を有するアミノ酸ユニットを有する中間体 AP を供する。次いで、Fmoc 基を除去し、次いで、PyBrop または DEPc を用いて触媒されるカップリング反応を介して、得られたアミン中間体 AQ をストレッチャーユニットに付着させる。ブロモアセタミドストレッチャー AR または PEG マレイミドストレッチャー AS いずれかを含有する薬物-リンカー化合物の構築をスキーム 14 に示す。

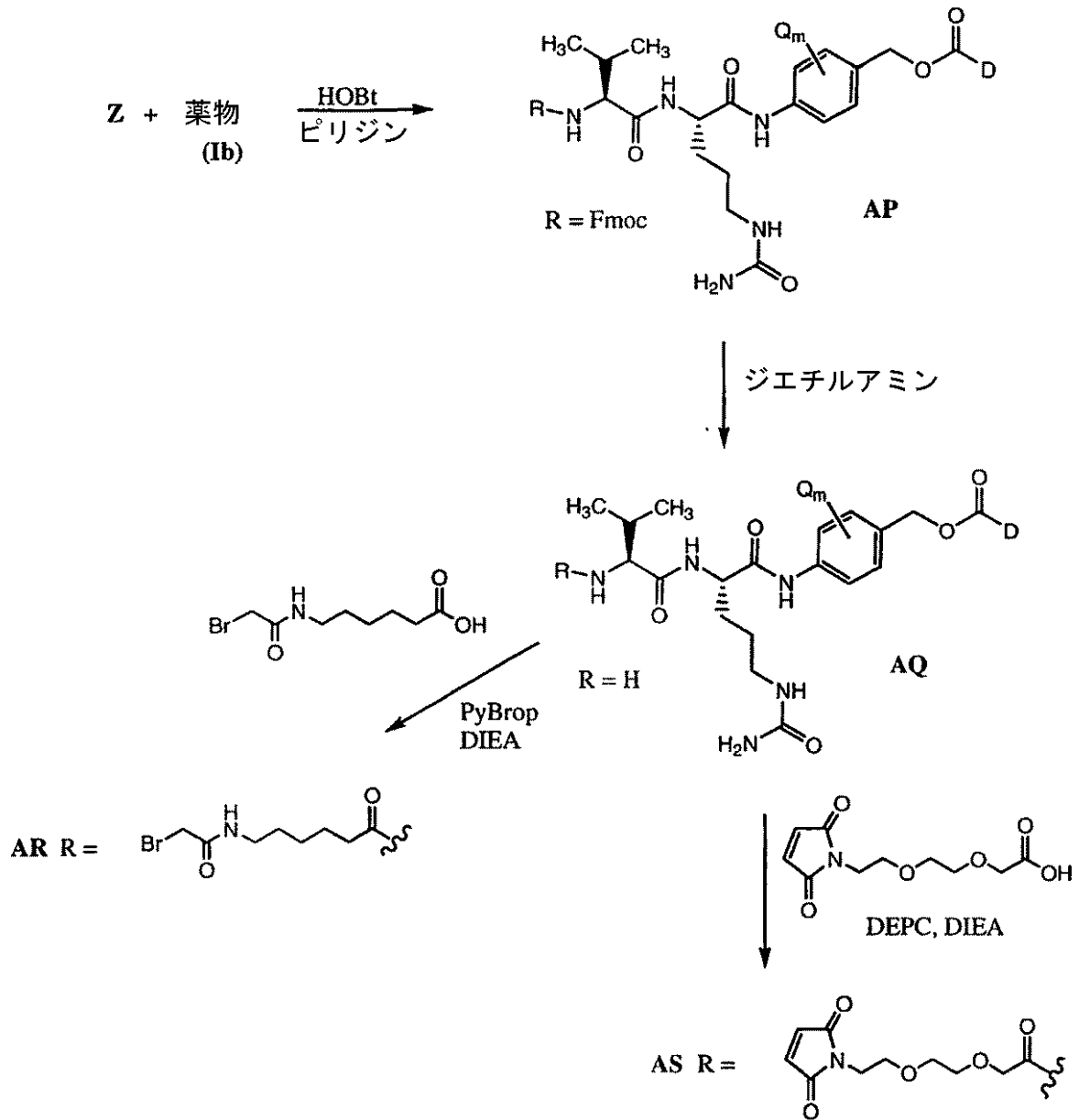
40

【0635】

(スキーム 14)

【0636】

【化 2 1 4】



[式中、Qは $-C_1-C_8$ アルキル、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-ハロゲン$ 、 $-ニトロ$ または $-シアノ$ であり；およびmは0～4の範囲の整数である。]

分岐スペーサーを含有するリンカーユニットの調製で有用な方法をスキーム15に示す。

【0637】

(スキーム15)

【0638】

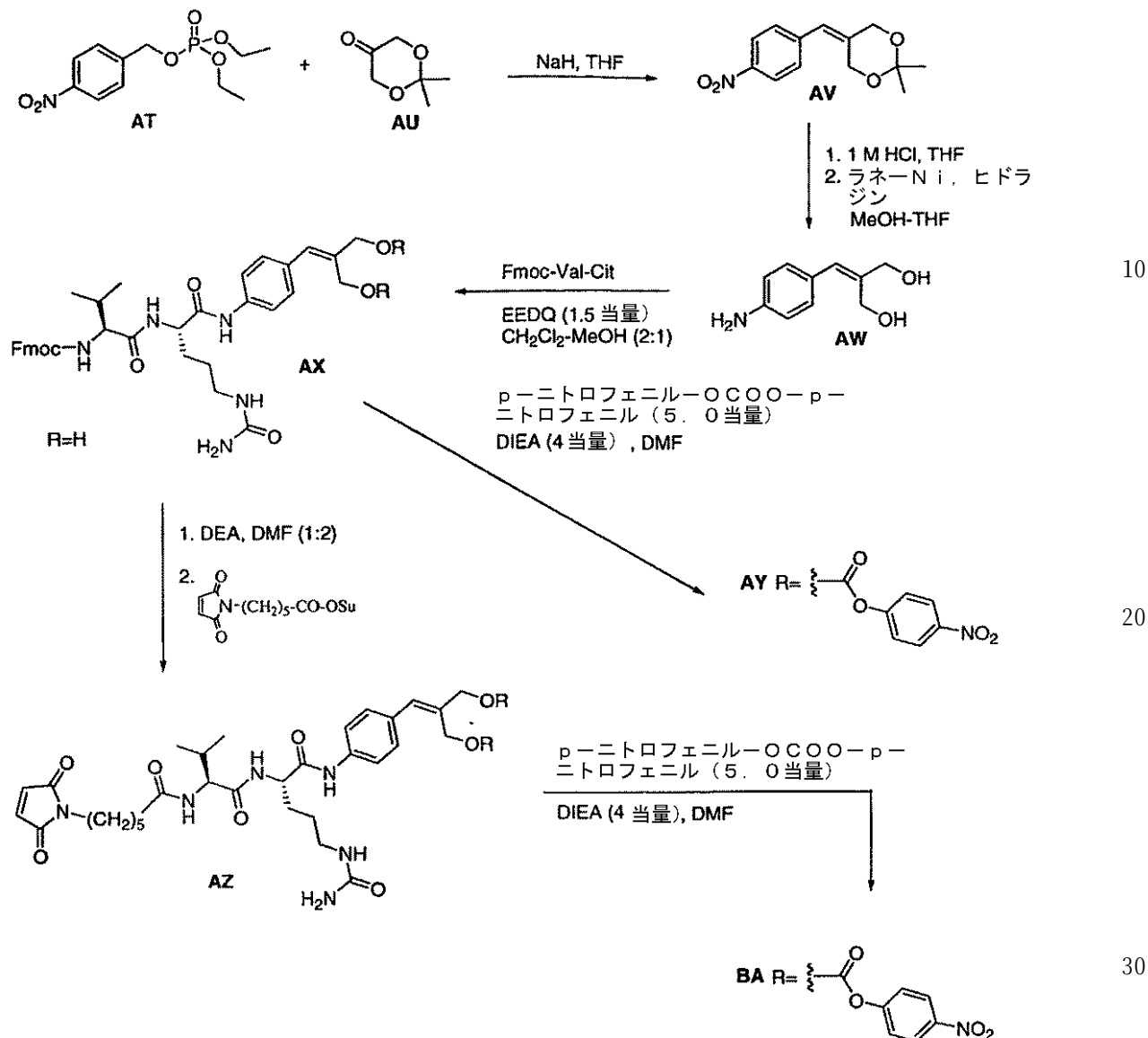
10

20

30

40

【化 2 1 5】



スキーム 15 は、マレイミドストレッチャーユニットおよびビス（４－ヒドロキシメチル）スチレン（BHMS）ユニットを有する val-cit ジペプチドリンカーの合成を示す。BHMS 中間体（AW）の合成は従前の文献の手法から改良され（Firestone et al. および Crozet, M. P. に対する国際公開番号 WO 9813059; Archaimbault, G.; Vanelle, P.; Nougier, R. Tetrahedron Lett. (1985) 26:5133-5134 参照）、出発物質として、商業的に入手可能なジエチル（４－ニトロベンジル）ホスホネート（AT）および商業的に入手可能な 2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキサン-5-オン（AU）を利用する。リンカー AY および BA はスキーム 9 に記載された方法を用いて中間体 AW から調製することができる。

【0639】

(4.6.3 樹状リンカー)

該リンカーは、限定されるものではないが、抗体のようなリガンドへの分岐多機能的リンカー部位を介して 1 を超える薬物部分の共有結合付着用の樹状タイプリンカーであり得る（Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768）。樹状リンカーは抗体に対する薬物のモル比率、すなわ

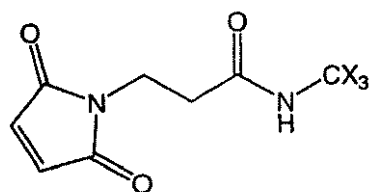
ち、薬物-リンカー-リガンド結合体の能力に関連する負荷を増加させることができる。かくして、システイン作製抗体が唯一の反応性システインチオール基を担う場合、多数の薬物部分を樹状リンカーを介して付着させることができる。

【0640】

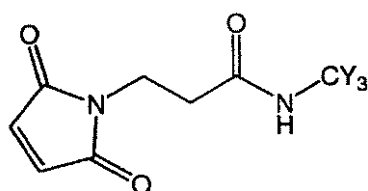
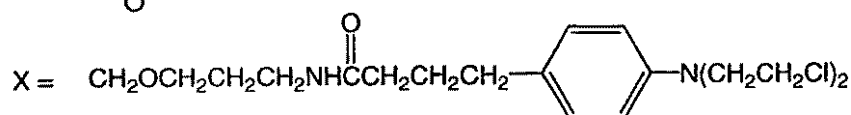
樹状リンカー試薬の以下の例示的实施形態は9つまでの求核性薬物部分試薬がクロエチルナイトロジェンマスタード官能基との反応により結合体化されるのを可能とする：

【0641】

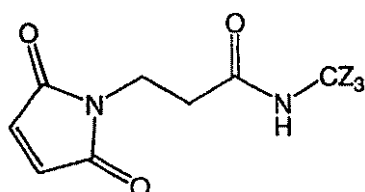
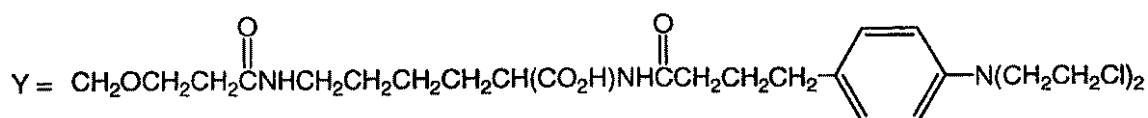
【化216】



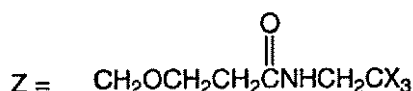
10



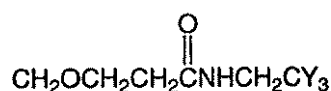
20



30



または



(4.6.4 抗体への薬物部分の結合体化)

スキーム16は、抗体当たり約2～約4の薬物を有する薬物-リンカー-リガンド結合体を作製するのに有用な方法を示す。抗体をジチオスレイトール（DTT）のような還元剤で処理して、システインジスルフィド残基のいくつかまたは全てを還元し、高度に求核性のシステインチオール基（ $-\text{CH}_2\text{SH}$ ）を形成する。かくして、Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-773の頁766の結合体化方法に従い、部分的に還元された抗体を薬物-リンカー化合物、またはリンカー試薬と、マレイミドまたは α -ハロカルボニルのような親電子性官能基と反応させる。

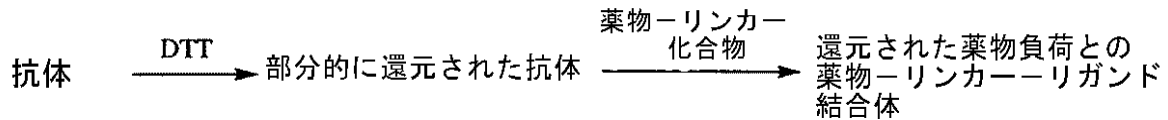
40

【0642】

(スキーム16)

【0643】

【化 2 1 7】



例えば、pH 8.0 の 500 mM ホウ酸ナトリウムおよび 500 mM 塩化ナトリウムに溶解させた抗体、例えば、AC10 を過剰の 100 mM ジチオスレイトール (DTT) で処理する。37 °C における約 30 分間のインキュベーションの後、緩衝液を Sephadex G25 樹脂での溶出によって交換し、1 mM DTPA を含む PBS で溶出させた。溶液の 280 nm における吸光度からの還元された抗体の濃度、および DTNB (Al 10
drich、Milwaukee、WI) との反応によるチオール濃度を測定し、および 4
12 nm における吸光度の測定によって、チオール / Ab 値をチェックする。PBS に溶解させた還元された抗体を氷上で冷却する。既知の濃度によってアセトニトリルおよび水に溶解させた、DMSO 中の薬物リンカー、例えば、MC-val-cit-PAB-MMAE を PBS 中の冷却された還元抗体に加える。約 1 時間後、過剰のマレイミドを加えて、反応をクエンチし、いずれの未反応抗体チオール基もキャップする。反応混合物を遠心限外濾過によって濃縮し、ADC、例えば、AC10-MC-val-cit-PAB-MMAE を、PBS 中の G25 樹脂を通す溶出によって精製し、脱塩し、滅菌条件下で 0.2 μm
フィルターを通して濾過し、貯蔵のために凍結する。

【0644】

20

種々のリンカー、および薬物部分、MMAE および MMAF にて、種々の抗体薬物結合体 (ADC) を調製した。以下の表は、実施例 27 のプロトコルによって調製し、かつ HPLC および薬物負荷アッセイによって特徴付けられた ADC の例示的部分である。

【0645】

【化 2 1 8】

標的 (抗原)	ADC	単離された量 (mg)	薬物／A b 比率	
0772P	16E12-MC-vc-PAB-MMAE	1.75	4	
0772P	11D10-MC-vc-PAB-MMAE	46.8	4.4	
0772P	11D10-MC-vc-PAB-MMAF	54.5	3.8	
ブレビカン	ブレビカン -MC-MMAF	2	6	10
ブレビカン	ブレビカン-MC-vc-MMAF	2	6	
ブレビカン	ブレビカン-MC-vc-PAB-MMAF	1.4	6	
CD21	CD21-MC-vc-PAB-MMAE	38.1	4.3	
CD21	CD21-MC-vc-PAB-MMAF	43	4.1	
CRIPTO	11F4-MC-vc-PAB-MMAF	6	4.8	20
CRIPTO	25G8-MC-vc-PAB-MMAF	7.4	4.7	
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAE	2.3	4.6	
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAE	2.9	4.6	
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAE	1.4	3.8	
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAE	5.1	4	30
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAE	3	4.6	
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAE	4.8	4.1	
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAF	24.7	4.4	
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE	29.9	7.1	
EphB2R	2H9-MC-fk-PAB-MMAE	25	7.5	40
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE	175	4.1	
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAF	150	3.8	

【 0 6 4 6 】

【化 2 1 9】

EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAF	120	3.7	
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE	10.7	4.4	
IL-20Ra	IL20Ra-fk-MMAE	26	6.7	
IL-20Ra	IL20Ra-vc-MMAE	27	7.3	
EphB2	IL8-MC-vc-PAB-MMAE	251	3.7	10
MDP	MDP-vc-MMAE	32		
MPF	19C3-vc-MMAE	1.44	6.5	
MPF	7D9-vc-MMAE	4.3	3.8	
MPF	19C3-vc-MMAE	7.9	3	
MPF	7D9-MC-vc-PAB-MMAF	5	4.3	20
Napi3b	10H1-vc-MMAE	4.5	4.6	
Napi3b	4C9-vc-MMAE	3.0	5.4	
Napi3b	10H1-vc-MMAE	4.5	4.8	
Napi3b	10H1-vc-MMAF	6.5	4	
NCA	3E6-MC-fk-PAB-MMAE	49.6	5.4	30
NCA	3E6-MC-vc-PAB-MMAE	56.2	6.4	
PSCA	PSCA-fk-MMAE	51.7	8.9	
PSCA	PSCA-vc-MMAE	61.1	8.6	
Napi3b	10H1-MC-vc-PAB-MMAE	75	4.2	
Napi3b	10H1-MC-vc-PAB-MMAF	95	4.4	40
Napi3b	10H1-MC-MMAF	92	4	
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE	79	5	
EphB2R	2H9-MC-MMAF	92	4.9	

【 0 6 4 7】

【化 2 2 0】

0772P	11D10(Fc キメラ)-MC-vc-PAB-MMAE	79	4.3	10
0772P	11D10(Fc キメラ)-MC-vc-PAB-MMAF	70	4.5	
0772P	11D10(Fc キメラ)-MC-MMAF	23	4.5	
ブレビカン	6D2-MC-vc-PAB-MMAF	0.3	4.5	
ブレビカン	6D2-MC-MMAF	0.36	4.5	20
EphB2R	2H9(Fc キメラ)-MC-vc-PAB-MMAE	1983	4.3	
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAE	14.1	4.6	
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAF	16.4	4.5	
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAE	10.5	4.1	30
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAF	10.2	3.8	
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAE	58.6	3.8	
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAF	8	3.1	
0772P	11D10(Fc キメラ)-MC-vc-PAB-MMAE	340	3.9	30
スティーブ1 (スティーブ1-92)-MC-vc-PAB-MMAE		3.5	4	40
スティーブ1 (スティーブ1-92)-MC-vc-PAB-MMAF		4.7	4	
スティーブ1 (スティーブ1-120)-MC-vc-PAB-MMAE		2	4	
スティーブ1 (スティーブ1-120)-MC-vc-PAB-MMAF		2.3	4	
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAF	52.2	4.5	

(4 . 7 組成物および投与の方法)

他の実施形態において、有効量の例示的化合物および／または例示的結合体および薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤を含む組成物を記載する。便宜のために、薬物ユニットおよび薬物－リンカー化合物を例示的化合物とすることができ、他方、薬物－リガンド結合体および薬物－リンカー－リガンド結合体を例示的結合体とすることができる。組成物は動物またはヒト投与に適している。

【0648】

本組成物は、該組成物が患者に投与されるのを可能とするいずれかの形態とすることができる。例えば、組成物は固体、液体または気体（エアロゾル）の形態とすることができる。典型的な投与の経路が、限定されるものではないが、経口、局所、非経口、舌下、直腸、膣、目、腫瘍内、および鼻腔内を含む。非経口投与は皮下注射、静脈内、筋肉内、胸骨内注射または注入技術を含む。1つの態様において、組成物は非経口投与された。さらにもう1つの態様において例示的化合物および／または例示的結合体または組成物は静脈内投与される。

【0649】

薬学的組成物は例示的化合物および／または例示的結合体が患者への組成物の投与に対して生物学的に利用できるように処方することができる。組成物は一以上の投与単位の形態をとることができ、そこでは、例えば、錠剤を単一の投与形態とすることができ、エアロゾルの形態の例示的化合物および／または例示的結合体の容器は複数の投与単位を保持することができる。

10

【0650】

薬学的組成物を調製するのに用いる物質は用いる量において非毒性であり得る。薬学的組成物上の有効成分（部位）の最適な投与量は種々の因子に依存するであろうことは当業者に明らかであろう。関連する因子、限定されるものではないが、動物（例えば、ヒト）のタイプ、例示的化合物または例示的結合体の特定の形態、投与の方法、および使用する組成物を含む。

20

【0651】

薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤は、当該組成物が、例えば、錠剤または粉末の形態であるように粒状であり得る。キャリア（部位）は液体とすることができ、当該組成物が、例えば、経口シロップまたは注射液体である。加えて、キャリア（部位）は気体状または粒状として、例えば、吸入投与で有用なエアロゾル組成物を供することができる。

【0652】

経口投与を意図した場合、組成物は好ましくは固体または液体形態であり、ここで、半固体、半液体、懸濁液およびゲル形態が、固体または液体いずれかとしてここに考えられる形態内に含まれる。

30

【0653】

経口投与用の固体組成物として、該組成物は粉末、顆粒、圧縮錠剤、丸剤、カプセル、チューインガム、ウェーハーなどの形態に処方することができる。そのような固体組成物は、典型的には、一以上の不活性希釈剤を含有する。加えて、一以上の以下のものを存在させることができる：カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、マイクロクリスタリンセルロース、またはゼラチンのような結合剤；澱粉、ラクトースまたはデキストリンのような賦形剤、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、プリモゲル、コーンスターチのような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはステロテックス（Sterotex）のような滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素のようなグライダント；スクロースまたはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、サルチル酸メチルまたはオレンジフレーバーのようなフレーバー剤、および着色剤。

40

【0654】

組成物がカプセル、例えば、ゼラチンカプセルの形態の場合、それは、前記タイプの物質に加えて、ポリエチレングリコール、シクロデキストリンまたは脂肪油のような液体キャリアを含有することができる。

【0655】

組成物は液体、例えば、エリキシル、シロップ、溶液、エマルジョンまたは懸濁液の形態とすることができる。液体は経口投与または注射による送達で有用であり得る。経口投与を意図した場合、組成物は甘味剤、保存剤、色素／着色剤およびフレーバー促進剤のうちの一以上を含むことができる。注射による投与用の組成物においては、界面活性剤、保

50

存剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、緩衝液、安定化剤および等張剤のうちの1以上を含めることもできる。

【0656】

液体組成物は、それが溶液、懸濁液または他の同様な形態であるか否かを問わず、以下のものの1以上を含めることができる：注射用水、セーライン溶液、好ましくは生理食塩水、リンゲル液、等張塩化ナトリウムのような滅菌希釈剤、溶媒または懸濁化媒体として働くことができる合成物またはジグリセリド、ポリエチレングリコール、グリセリン、シクロデキストリン、プロピレングリコールまたは他の溶媒のような不揮発性油；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような抗菌剤；アスコルビン酸または二亜硫酸ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミンテトラ酢酸のようなキレート化剤；アセテート、シトレートまたはホスフェートのような緩衝液、および塩化ナトリウムまたはデキストロースのような等張性の調製用の剤。非経口組成物は、ガラス、プラスチックまたは他の材料から作成されたアンプル、ディスポーザブルシリンジまたは多用量バイアルに封入することができる。生理食塩水が、例示的なアジュバントである。注射組成物は好ましくは滅菌されている。

10

【0657】

特定の疾患または疾患の治療で効果的な例示的化合物および／または例示的結合体の量は疾患または疾患の性質に依存し、標準的な臨床技術によって決定することができる。加えて、インビトロまたはインビボアッセイは、所望により、最適な投与量範囲を同定するのに助けるのに使用することができる。組成物で使用されるべき正確な用量もまた投与経路、および病気または疾患の重症度に依存し、実行者および各患者の状況の判断に従って決定すべきである。

20

【0658】

組成物は、適当な用量が得られるように有効量の例示的化合物および／または例示的結合体を含む。典型的には、この量は組成物の重量の少なくとも約0.01%の例示的化合物および／または例示的結合体である。経口投与が意図される場合、この量は組成物の約0.1重量%～約80重量%の範囲で変化させることができる。1つの態様において、経口組成物は該組成物の重量の約4%～約50%の例示的化合物および／または例示的結合体を含むことができる。さらにもう1つの態様において、本発明の組成物は、非経口投与単位が約0.01重量%～約2重量%の例示的化合物および／または例示的結合体を含むように調製される。

30

【0659】

非経口投与では、組成物は動物の体重kg当たり約0.01～約100mgの例示的化合物および／または例示的結合体を含むことができる。1つの態様において、組成物は動物の体重kg当たり約1～約100mgの例示的化合物および／または例示的結合体を含むことができる。もう1つの態様において、投与される量は約0.1～約25mg/kg体重の例示的化合物および／または例示的結合体の範囲であろう。

【0660】

一般に、患者に投与される例示的化合物および／または例示的結合体の用量は、典型的には、約0.01mg/kg～約2000mg/kgの動物体重である。1つの態様において、患者に投与される用量は約0.01mg/kg～約10mg/kgの動物体重であり、もう1つの態様において、患者に投与される用量は約0.1mg/kgおよび約250mg/kgの動物体重の間であり、さらにもう1つの態様において、患者に投与される用量は約0.1mg/kgおよび約20mg/kgの動物体重の間であり、さらにもう1つの態様において、投与される用量は約0.1mg/kg～約10mg/kgの動物体重の間であり、およびさらにもう1つの態様において、投与される用量は約1mg/kg～約10mg/kgの動物体重の間である。

40

【0661】

例示的化合物および／または例示的結合体または組成物はいずれかの便宜な経路によって、例えば、注入またはボーラス注射によって、上皮または粘膜皮膚ライニング（例えば

50

、口粘膜、直腸および腸粘膜等）を通じての吸収によって投与することができる。投与は全身または局所であり得る。種々の送達システムが知られており、例えば、リポソーム、ミクロ粒子、マイクロカプセル、カプセル等への封入を用いて、例示的化合物および／または例示的結合体または組成物を投与することができる。ある実施形態において、1を超える例示的化合物および／または例示的結合体または組成物を患者に投与する。

【0662】

特別な実施形態において、1以上の例示的化合物および／または例示的結合体または組成物を治療を必要とする領域に局所投与するのが望ましくあり得る。これは、例えば、限定されるものではないが、外科的処置の間における局所的注入；例えば、外科的処置後における創傷包帯と組み合わせた局所適用によって；注射によって；カテーテルによって；坐薬によって；またはインプラントによって達成することができ、インプラントはシアラストック（sialastic）膜のような膜、または線維を含めた多孔性、非多孔性またはゼラチン状物質である。1つの実施形態において、投与は癌、腫瘍または神経性またはプレー神経性組織の部位（または前者の部位）における直接的注射によることができる。もう1つの実施形態において、投与は自己免疫疾患の発現の部位（または前者の部位）における直接的注射によることができる。

【0663】

ある実施形態において、1以上の例示的化合物および／または例示的結合体または組成物を、脳室内およびクモ膜下腔内注射を含めたいずれかの適当な経路によって中枢神経系に導入するのが望ましくあり得る。脳室内注射が、例えば、Ommaya貯蔵器のような貯蔵器に付着させた脳室内カテーテルによって促進することができる。

【0664】

肺投与も、例えば、吸入器またはネブライザー、およびエアロゾル化剤での処方を用いることによって、あるいはフルオロカーボンまたは合成肺界面活性剤での灌流を介して使用することもできる。

【0665】

さらにもう1つの実施形態において、例示的化合物および／または例示的結合体または組成物は制御放出システムで送達することができ、限定されるものではないが、ポンプまたは種々のポリマー材料を用いることができる。さらにもう1つの実施形態において、制御放出システムは例示的化合物および／または例示的結合体または組成物の標的、例えば、脳近隣に置くことができ、かくして、全身用量のフラクションのみを必要とする（例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 前掲, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 参照）。Langer (Science 249: 1527-1533 (1990)) によるレビューで議論された他の制御放出システムを用いることもできる。

【0666】

用語（キャリア）とは、それと共に例示的化合物および／または例示的結合体が投与される希釈剤、補助剤または賦形剤をいう。そのような医薬キャリアは、石油、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油等のような動物、植物または合成起源のものを含めた、水および油のような液体であり得る。キャリアは生理食塩水、アカシヤガム、ゼラチン、澱粉ペースト、タルク、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素等であり得る。加えて、助剤、安定化剤、増粘剤、滑沢剤および着色剤を用いることができる。1つの実施形態において、患者に投与する場合、例示的化合物および／または例示的結合体または組成物および薬学的に受容可能なキャリアは滅菌されている。水は、例示的化合物および／または例示的結合体が静脈内投与される場合の例示的キャリアである。また、セーライン溶液および水性デキストロースおよびグリセロール溶液の、特に、注射溶液のための液体キャリアとして使用することもできる。また、適当な医薬キャリアは澱粉、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール等のような賦形剤を含むこともできる。

本発明の組成物が、所望であれば、少量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝材を含有することもできる。

【0667】

本発明の組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、ペレット、カプセル、液体含有カプセル、粉末、徐放処方、坐薬、エマルジョン、エアロゾル、スプレー、懸濁液、または使用に適したいずれかの他の形態を採ることができる。適当な医薬キャリアの他の例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」によって記載される。

【0668】

ある実施形態において、例示的化合物および／または例示的結合体は、動物、特にヒトへの静脈内投与に適した薬学的組成物としてのルーチン的手法に従って処方される。典型的には、静脈内投与用のキャリアまたは賦形剤は滅菌等張水性緩衝溶液である。必要な場合、組成物が安定化剤を含有することもできる。静脈内投与用の組成物は、所望により、注射の部位における疼痛を和らげるためにリグノカインのような局所麻酔剤を含めることもできる。一般に、成分は、例えば、活性剤の量を示すアンプルまたはサシェ剤のような気密的にシールした容器中の凍結乾燥粉または水を含まない濃縮物として別々に供給されるか、あるいは単位投与形態にて混合される。例示的化合物および／または例示的結合体を注入によって投与する場合、それは、例えば、滅菌医薬グレード水またはセーラインを含有する注入ボトルで分注することができる。例示的化合物および／または例示的結合体が注射によって投与される場合、注射用の滅菌水またはセーラインのアンプルを、成分が投与に先立って混合できるように供することができる。

【0669】

経口送達用の組成物は、例えば、錠剤、ロゼンジ、水性または油性懸濁液、顆粒、粉末、エマルジョン、カプセル、シロップまたはエリキシルの形態とすることができる。経口投与される組成物は1以上の任意の剤、例えば、フルクトース、アスパルテムまたはサッカリンのような甘味剤；ペパーミント、冬緑油、またはチェリーのようなフレーバー剤；着色剤；および保存剤を含有させて、医薬的に味の良い製剤を供することができる。さらに、錠剤または丸剤形態の場合、組成物は被覆して、胃腸管中での崩壊および吸収を遅らせ、それにより、長時間にわたる維持された作用を供することができる。浸透圧的に活性な駆動化合物を囲う選択的に透過性膜もまた経口投与される化合物に適している。これらの後のプラットフォームにおいて、カプセルの周囲の環境からの流体は、膨潤して、開口を通じて剤または剤組成物を置き換える駆動化合物によって吸収される。これらの送達プラットフォームは、中程度の放出处方のスパイクされたプロフィールとは反対に実質的に0次送達プロフィールを供することができる。グリセロールモノステアレートまたはグリセロールステアレートのような時間一遅延物質も用いることができる。

【0670】

組成物は局所投与を意図することができ、その場合、キャリアは溶液、エマルジョン、軟膏またはゲル基材の形態とすることができる。経皮投与を用いるとすれば、組成物は経皮パッチまたはイオントフォoresisデバイスの形態とすることができる。局所処方では約0.05%～約50%w/v（組成物の単位用量当たりの重量）の、もう1つの態様において、0.1%～10%w/vのある濃度の例示的化合物および／または例示的結合体を含むことができる。

【0671】

組成物は、例えば、直腸で融解し、例示的化合物および／または例示的結合体を放出する坐薬の形態で直腸投与を意図することができる。

【0672】

組成物は、固体または液体投与単位の物理的形態を修飾する種々の物質を含むことができる。例えば、組成物は有効成分の周りにコーティングシェルを形成する材料を含むことができる。コーティングシェルを形成する物質は典型的には不活性であり、例えば、糖、シェラック、および他の腸溶コーティング剤から選択することができる。別法として、有

効成分はゼラチンカプセルに封入することができる。

【0673】

組成物は気体状投与単位よりなることができ、例えば、それはエアロゾルの形態とすることができる。用語エアロゾルは、圧縮パッケージよりなるシステムに対してコロイド状性質のものの範囲の種々のシステムを命名するのに用いられる。送達は液化または圧縮ガス、或いは有効成分を分注する適当なポンプシステムによることができる。

【0674】

固体、液体または気体形態であるかを問わず、本発明の組成物は癌、自己免疫疾患または感染症の治療で用いる薬理学的剤を含むことができる。

【0675】

(4.8 例示的結合体の治療的使用)

例示的化合物および／または例示的結合体は、患者において、癌、自己免疫疾患または感染症を治療するのに有用である。

【0676】

(4.8.1 癌の治療)

例示的化合物および／または例示的結合体は、患者において、腫瘍細胞または癌細胞の増殖を阻害し、腫瘍または癌細胞においてアポトーシスを引き起こし、または癌細胞を治療するのに有用である。例示的化合物および／または例示的結合体は、それに従い、動物癌の治療のために種々の設定で用いることができる。薬物－リンカー－リガンド結合体を用いて、薬物または薬物ユニットを腫瘍細胞または癌細胞に送達することができる。理論に拘束されるつもりはないが、1つの実施形態において、例示的結合体のリガンドユニットは癌細胞または腫瘍細胞－関連抗原に結合し、またはそれと会合し、例示的結合体はレセプター－媒介エンドサイトーシスを通じて腫瘍細胞または癌細胞に摂取することができる。抗原を腫瘍細胞または癌細胞に付着させることができ、あるいは腫瘍細胞または癌細胞と会合した細胞内マトリックスタンパク質であり得る。一旦細胞内部に入れば、リンカーユニット内の1以上の特異的ペプチド配列は1以上の腫瘍細胞または癌細胞－関連プロテアーゼによって加水分解的に切断され、その結果、薬物または薬物－リンカー化合物が放出される。次いで、放出された薬物または薬物－リンカー化合物は細胞内を自由に移動し、細胞傷害性または細胞静止活性を誘導する。別の実施形態において、薬物または薬物ユニットは腫瘍細胞または癌細胞の外部で例示的結合体から切断され、薬物または薬物－リンカー化合物は引き続いて細胞に進入する。

【0677】

1つの実施形態において、リガンドユニットは腫瘍細胞または癌細胞に結合する。

【0678】

もう1つの実施形態において、リガンドユニットは、腫瘍細胞または癌細胞の表面にある腫瘍細胞または癌細胞抗原に結合する。

【0679】

もう1つの実施形態において、リガンドユニットは、腫瘍細胞または癌細胞と会合した細胞外マトリックスタンパク質である腫瘍または癌細胞抗原に結合する。

【0680】

特定の腫瘍細胞または癌細胞に対するリガンドユニットの特異性は、最も効果的に治療される腫瘍または癌を決定するのに重要であり得る。例えば、BR96リガンドユニットを有する例示的結合体は肺、乳房、結腸、卵巣および脾臓のものを含めた抗原陽性含羞を治療するのに有用であり得る。抗－CD30または抗－CD40リガンドユニットを有する例示的結合体は血液学的悪性疾患を治療するのに有用であり得る。

【0681】

例示的結合体で治療することができる他の特定のタイプの癌は、限定されるものではないが、表3に介されるものを含む。

【0682】

(表3)

10

20

30

40

50

固体腫瘍は限定されるものではないが以下のものを含む：

線維肉腫	
粘液肉腫	
脂肪肉腫	
軟骨肉腫	
骨肉腫	
脊索腫	
血管肉腫	
内皮肉腫	10
リンパ管肉腫	
リンパ管内皮肉腫	
滑膜腫	
中皮腫	
ユーイング腫瘍	
平滑筋肉腫	
横紋筋肉腫	
結腸癌	
結腸直腸癌	
腎癌	20
脾癌	
骨癌	
乳癌	
卵巣癌	
前立腺癌	
食道癌	
胃癌	
口腔癌	
鼻癌	
咽喉癌	30
扁平上皮癌	
基底細胞癌	
腺癌	
汗腺癌	
脂腺癌	
乳頭癌	
乳頭腺癌	
嚢胞腺癌	
髓様癌	
気管支原性癌	40
腎細胞癌	
肝癌	
胆管癌	
絨毛癌	
セミノーマ	
胎児性癌	
ウィルムス腫瘍	
子宮頸部癌	
子宮癌	
精巣癌	50

肺小細胞癌	
膀胱癌	
肺癌	
上皮癌	
神経膠腫	
多形性神経膠芽細胞腫	
星細胞腫	
髄芽腫	
頭蓋咽頭腫	
脳室上衣細胞腫	10
松果体腫	
血管芽腫	
聴神経腫	
希突起神経膠腫	
髄膜腫	
皮膚癌	
黒色腫	
神経芽腫	
網膜芽腫	20

以下を含む血液の癌。ただしこれらに限定されない：

急性リンパ芽球性白血病「ALL」	
B細胞性急性リンパ芽球性白血病	
T細胞性急性リンパ芽球性白血病	
急性骨髓芽球性白血病「AML」	
急性前骨髓球性白血病「APL」	
急性単芽球性白血病	
急性赤白血病	
急性巨核芽球性白血病	30
急性骨髓単球性白血病	
急性非リンパ性白血病	
急性未分化白血病	
慢性骨髓性白血病「CML」	
慢性リンパ性白血病「CLL」	
ヘアリー細胞白血病	
多発性骨髓腫	

急性白血病および慢性白血病：	40
----------------	----

リンパ芽球性
 骨髓性 (myelogenous)
 リンパ性
 骨髓性 (myelocytic) 白血病

リンパ腫：

ホジキン病
 非ホジキンリンパ腫

多発性骨髄腫

ワルデンストローム・マクログロブリン血症

重鎖病

真性多血症。

【0683】

例示的結合体は結合体化—特異的腫瘍または癌標的化を提供し、かくして、これらの化合物の一般的毒性を低下させる。リンカーユニットは血液中の例示的結合体を安定化させ、なお、細胞内で腫瘍—特異的プロテアーゼによって切断することができ、薬物を遊離する。

【0684】

10

(4.8.2 癌についての多様式療法)

限定されるものではないが、腫瘍、転移、または制御されない細胞増殖によって特徴付けられる他の病気または疾患を含めた癌は、例示的結合体および／または例示的化合物の投与によって治療し、または予防することができる。

【0685】

他の実施形態において、癌を治療または予防する方法が提供され、それは有効量の例示的結合体および化学治療剤をそれを必要とする患者に投与することを含む。1つの実施形態において、化学治療剤は、それに関して癌の治療が難治性であることが判明していないものである。もう1つの実施形態において、化学治療剤が、それに関して癌の治療が難治性であることが判明しているものである。例示的結合体は、癌に対しての治療として外科

20

【0686】

1つの実施形態において、治療のさらなる方法は放射線療法である。

【0687】

特別な実施形態において、例示的結合体は、化学治療剤と共に、または放射線療法と共に投与される。もう1つの特別な実施形態において、化学治療剤または放射線療法は例示的結合体の投与に先立って、またはそれに引き続いて投与され、1つの態様において、少なくとも1時間、5時間、12時間、1日、1週間、1ヶ月先立ってまたは引き続いて、さらなる態様において、例示的結合体の投与に数ヶ月（例えば、3ヶ月まで）先立ってまたは引き続いて投与される。

30

【0688】

化学療法剤は一連の期間にわたって投与することができる。表4にリストされた化学治療剤のいずれか1つまたは組合せを投与することができる。放射線に関しては、いずれかの放射線療法プロトコルを、治療すべき癌のタイプに応じて用いることができる。例えば、限定されるものではないが、X線放射線を投与することができ；特に、高エネルギーメガボルト（その1MeVエネルギーを超える放射線）を深い腫瘍で用いることができ、電子線および正中電圧x線放射線を皮膚癌で用いることができる。ラジウム、コバルトおよび他の元素の放射性同位体のようなガンマー線を発する放射性同位体も投与することができる。

【0689】

40

加えて、例示的化合物および／または例示的結合体での癌の治療方法が、化学療法または放射線療法があまりにも毒性であることが判明し、または判明する可能性がある場合、例えば、治療すべき対象にとって許容できないまたは我慢できない副作用をもたらす場合、化学療法または放射線療法の代替法として提供される。治療すべき動物は、所望により、いずれの治療が許容できまたは我慢できるかが判明するのに従い、外科的処置、放射線療法または化学療法のようなもう1つの癌治療で治療することもできる。

【0690】

例示的化合物および／または例示的結合体もまた、限定されるものではないが、白血病およびリンパ腫を含めたある種の癌の治療のために、インビトロまたはエクス・ビボ様式で用いることもでき、そのような治療はオートガラス幹細胞移植を含む。これは、

50

動物のオートガラス造血幹細胞が収穫され、全ての癌細胞をパージし、次いで、伴う高容量放射線療法と共に、またはそれなくして、高容量の例示的化合物および／または例示的結合体の投与を介して動物の残りの骨髓細胞集団を根絶し、幹細胞グラフトを動物に逆注入する多工程プロセスを含むことができる。次いで、骨髓の機能が回復し、動物が回復する間、サポートするケアを供する。

【0691】

(4.8.3 癌についての多薬物療法)

有効量の例示的結合体および抗癌剤であるもう1つの治療剤をそれを必要とする患者に投与することを含む癌を治療する方法が開示される。適当な抗癌剤は、限定されるものではないが、メトトレキセード、タキソール、L-アスパラギナーゼ、メルカプトプリン、チオグアニン、ヒドロキシ尿素、シタラビン、シクロホスファミド、イフォスファミド、ニトロソ尿素、シスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシン、デカルバジン、プロカルリジン、トポテカン、ナイトロジェンマスタード、サイトヒサン、エトポシド、5-フルオロウラシル、BCNU、イリノテカン、カンプトテシン、プレオマイシン、ドキソルミシン、イラルミシン、ダウノルミシン、ダクチノマイシン、プリカマイシン、マイトキサントロン、アスパラギナーゼ、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、パクリタキセルおよびドセタキセルを含む。1つの態様において、抗癌剤は、限定されるものではないが、表4にリストされた薬物を含む。

【0692】

(表4)

【0693】

【化221】

アルキル化剤	
ナイトロジェンマスタード	シクロホスファミド イフォスファミド トロフォスファミド クロラムブシル メルファラン
ニトロソ尿素	カルモスチン (BCNU) ロムスチン (CCNU)
アルキルスルホネート	ブスルファン

【0694】

【化 2 2 2】

	トレオスルファン
トリアゼン	デカルバジン
白金含有化合物	シスプラチン カルボプラチン
植物アルカロイド	
ビンカアルカロイド	ビンクリスチン ビンブラスチン ビンデシン ビノレルビン
タキソイド	パクリタキセル ドセタキセル
DNAトポイソメラーゼ阻害剤	
エポドフィリン	エトポシド テニポシド トポテカン 9-アミノカンプトテシン カンプトテシン クリスナトール
マイトマイシン	マイトマイシンC
抗一代謝産物	
抗一葉酸剤	
DHFR 阻害剤	メトトレキセート トリメトレキセート
IMP デヒドロゲナーゼ阻害剤	ミコフェノール酸 チアゾプリン リバビリン EICAR
リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤	ヒドロキシ尿素 デフェロキサミン
ピリミジンアナログ	
ウラシルアナログ	5-フルオロウラシル
	フロキシウリジン ドキシフルリジン ラチトレキセド
シトシンアナログ	シタラビン (araC) シトシンアラビノシド フルダラビン
プリンアナログ	メルカプトプリン チオグアニル
ホルモン療法	
レセプターアンタゴニスト	
抗一エストロゲン	タモキシフェン ラロキシフェン メゲストロール
LHRH アゴニスト	ゴスクレリン ロイプロリド酢酸
抗一アンドロゲン	フルタミド ビカルタミド

10

20

30

40

【0 6 9 5】

【化 2 2 3】

ベチノイド／デルトイド	
ビタミンD3アナログ	EB 1089 CB 1093 KH 1060
光力学療法	ペルトポルフィン (BPD-MA) フタロシアニン 光感作剤 Pc 4 デメトキシヒポクレリンA (2BA-2-DMHA)
サイトカイン	インターフェロン- α インターフェロン- γ 腫瘍壊死因子
その他	ゲムシタビン ベルカド レバミド タラミド
イソプレミル化阻害剤	ロバスタチン
ドーパミン作動性神経トキシン	1-メチル-4-フェニルピリジニウムイオン
細胞周期阻害剤	スタウロスポリン
アクチノマイシン	アクチノマイシンD
	ダクチノマイシン
ブレオマイシン	ブレオマイシンA2 ブレオマイシンB2 ペプロマイシン
アントラサイクリン	ダウノルビシン ドキシフビシン (アドリ アマイシン) イダルビシン エピルビシン ピラルビシン ゾルビシン ムトキサントロン
MDR 阻害剤	ベラパミル
Ca ²⁺ ATPase 阻害剤	タプシガルギン

(4. 8. 4 自己免疫疾患の治療)

例示的結合体は、自己免疫疾患を生じる細胞を殺し、またはその複製を阻害するのに、または自己免疫疾患を治療するのに有用である。例示的結合体は、それに従って、患者において自己免疫疾患の治療のために種々の設定で用いることができる。薬物-リンカー-リガンド結合体を用いて、薬物を標的細胞に送達することができる。理論に拘束されるつもりはないが、1つの実施形態において、薬物-リガンド結合体は標的細胞の表面の抗原に会合し、レセプター-媒介エンドサイトーシスを通じて例示的結合体は標的細胞内に摂取される。一旦細胞内に入れば、リンカーユニット内の1以上の特異的ペプチド配列は酵素的にまたは加水分解的に切断され、その結果、薬物は放出される。次いで、放出された薬物は自由にサイトゾル中を移動し、細胞傷害性または細胞静止活性を誘導する。別の実施形態において、薬物は標的細胞の外側で例示的結合体から切断され、薬物は引き続いて細胞に進入する。

【0696】

1つの実施形態において、リガンドユニットは自己免疫抗原に結合する。1つの態様において、抗原は、自己免疫疾患に関与する細胞の表面にある。

【0697】

10

20

30

40

50

もう1つの実施形態において、リガンドユニットは、細胞の表面にある自己免疫抗原に結合する。

【0698】

1つの実施形態において、リガンドは、自己免疫疾患状態に係る活性化された活性化されたリンパ球に結合する。

【0699】

さらなる実施形態において、例示的結合体は、特定の自己免疫疾患に係る自己免疫抗体を生じる細胞を殺し、または該細胞の増殖を阻害する。

【0700】

例示的結合体で治療できる自己免疫疾患のタイプは限定されるものではないが、Th2リンパ球関連疾患（例えば、アトピー性皮膚炎、アトピー性喘息、鼻結膜炎、アレルギー性鼻炎、オーメン症候群、全身硬化症、および移植片vs宿主病）；Th1リンパ球関連疾患（例えば、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬、シェーグレン症候群、ハシモト甲状腺炎、グラベ病、原発性胆汁性肝硬変、ヴェゲナー肉芽腫症、および結核）；活性化されたBリンパ球関連疾患（例えば、全身エリテマトーテス、グッドパスツール症候群、慢性関節リウマチ、およびI型糖尿病）；および表5に介されたものを含む。

【0701】

（表5）

慢性活動性肝炎

アジソン病

アレルギー性胞隔炎

アレルギー反応

アレルギー性鼻炎

アルポート症候群

アナフィラキシー

強直性脊椎炎

抗リン脂質抗体症候群

関節炎

回虫症

アスペルギルス症

アトピー性アレルギー

アトピー性皮膚炎

アトピー性鼻炎

ベーチェット病

愛鳥家肺

気管支喘息

カプラン症候群

心筋症

セリアック病

シャーガス病

慢性糸球体腎炎

コーガン症候群

寒冷凝集素症

先天性風疹感染

クレスト症候群

クローン病

クリオグロブリン血症

クッシング症候群

皮膚筋炎

円板状ループス

10

20

30

40

50

ドレスラー症候群	
イトン・ランバート症候群	
エコーウイルス感染	
脳脊髄炎	
内分泌性眼症	
エプスタイン・バーウイルス感染	
ウマ慢性肺気腫	
エリテマトーデス	
エヴァンズ症候群	
フェルティ症候群	10
線維筋痛	
フックス毛様体炎	
胃萎縮	
消化器アレルギー	
巨細胞性動脈炎	
糸球体腎炎	
グッドパスチャー症候群	
移植片対宿主病	
グレーブス病	
ギラン・バレー症	20
橋本病	
溶血性貧血	
ヘノッホ・シェーンライン紫斑病	
特発性副腎萎縮	
特発性肺線維症	
I g A腎症	
炎症性腸疾患	
インスリン依存性糖尿病	
若年性関節炎	
若年性糖尿病（1型）	30
ランバート・イトン症候群	
蹄葉炎	
扁平苔癬	
ルポイド肝炎	
ループス（狼瘡）	
リンパ球減少症	
メニエール病	
混合性結合組織病	
多発性硬化症	
重症筋無力症	40
悪性貧血	
多腺性症候群	
初老期認知症	
原発性無ガンマグロブリン血症	
原発性胆汁性肝硬変	
乾癬	
乾癬性関節炎	
レイノー現象	
反復流産	
ライター症候群	50

リウマチ熱	
関節リウマチ	
サンプター症候群	
住血吸虫症	
シュミット症候群	
強皮症	
シャルマン症候群	
シェーグレン症候群	
全身強直症候群	
交感性眼炎	10
全身性エリテマトーデス	
高安動脈炎	
側頭動脈炎	
甲状腺炎	
血小板減少症	
甲状腺中毒症	
中毒性表皮壊死融解症	
インスリン抵抗性B型	
1型糖尿病	
潰瘍性大腸炎	20
ブドウ膜炎	
尋常性白斑	
ワルデンストローム・マクログロブリン血症	
ヴェゲナー肉芽腫症。	
【0702】	
（4. 8. 5 自己免疫疾患の多薬物療法）	
有効量の例示的結合体および自己免疫疾患の治療で知られたもう1つの治療剤をそれを必要とする患者に投与することを含む自己免疫疾患を治療する方法も開示される。1つの実施形態において、抗自己免疫疾患剤は、限定されるものではないが、表6にリストされた剤を含む。	30
【0703】	
（表6）	
サイクロスポリン	
サイクロスポリンA	
ニコフェニレートモフェティル	
シロリムス	
タクロリムス	
エナメルセプト	
プレドニゾン	
アザチオプリン	40
メトトレキセートシクロホスファミド	
プレドニゾン	
アミノカプロン酸	
クロロキン	
ヒドロキシクロロキン	
ヒドロクロチゾン	
デキサメタゾン	
クロラムブシル	
DH E A	
ダナゾール	50

ブロモシリプチン
メレキシカム
インフリキシバム。

【0704】

(4. 8. 6 感染症の治療)

例示的結合体は感染症を生じる細胞を殺傷し、または該細胞の増殖を阻害するのに、または感染症を治療するのに有用である。例示的結合体は、それに従い、患者において感染症の治療のために種々の設定で用いることができる。薬物－リンカー－リガンド結合体は、薬物を標的細胞に送達するのに用いることができる。1つの実施形態において、リガンドユニットは感染症の細胞に結合する。

10

【0705】

1つの実施形態において、結合体は特定の感染症を生じる細胞を殺し、またはその増殖を阻害する。

【0706】

例示的結合体で治療することができる感染症の特定のタイプは、限定されるものではないが、表7で開示されたものを含む。

【0707】

(表7)

細菌性疾患：

20

ジフテリア
百日咳
潜在性菌血症
尿路感染
胃腸炎
蜂巣炎
喉頭蓋炎
気管炎
アデノイド肥大
咽後膿瘍
膿痂疹
膿瘡
肺炎
心内膜炎
化膿性関節炎
肺炎球菌
腹膜炎
菌血症
髄膜炎
急性化膿性髄膜炎
尿道炎
子宮頸管炎
直腸炎
咽頭炎
卵管炎
精巣上体炎
淋疾
梅毒
リステリア症
炭疽

30

40

50

ノカルジア症	
サルモネラ	
腸チフス熱	
赤痢	
結膜炎	
副鼻腔炎	
ブルセラ症	
野兎病	
コレラ	
腺ペスト	10
破傷風	
壊死性小腸炎	
放線菌症	
嫌気性混合感染	
梅毒	
回帰熱	
レプトスピラ症	
ライム病	
鼠咬熱	
結核	20
リンパ節炎	
ハンセン病	
クラミジア	
クラミジア肺炎	
トラコーマ	
封入体結膜炎	
全身性真菌疾患：	
ヒストプラズマ症	30
コクシジオイド症	
ブラストミセス症	
スポロトリコーシス	
クリプトコッカス症	
全身性カンジダ症	
アスペルギルス症	
ムコール症	
足菌腫	
クロモミコーシス	40
リケッチア症：	
チフス	
ロッキー山紅斑熱	
エールリッヒア症	
東半球ダニ媒介性リケッチア症	
リケッチア痘症	
Q熱	
バルトネラ症	50

寄生虫症：

マラリア	
バベシア症	
アフリカ睡眠病	
シャーガス病	
リーシュマニア症	
ダムダム熱	
トキソプラズマ症	
髄膜脳炎	10
角膜炎	
赤痢アメーバ症	
ジアルジア症	
クリプトスポリジウム症	
イソスポーラ症	
シクロスポリン症	
微孢子虫症	
回虫症	
鞭虫感染	
鉤虫感染	20
蟯虫感染	
眼球幼虫移行症	
旋毛虫症	
糸状虫症	
リンパ性糸状虫症	
ロア糸状虫症	
河川盲目症	
イヌ糸状虫感染	
住血吸虫症	
水泳者そう痒	30
ウェステルマン肺吸虫	
肝臓寄生吸虫	
肝蛭症	
肥大吸虫症	
タイ肝吸虫症	
条虫感染	
包虫症	
多包虫症	

ウイルス疾患：40

麻疹	
亜急性硬化性全脳炎	
感冒	
ムンプス	
風疹	
ばら疹	
第五病	
水痘	
R S（呼吸器合胞体）ウイルス感染	50

クループ	
細気管支炎	
伝染性単核症	
灰白髄炎	
ヘルパンギーナ	
手足口病	
ボルンホルム病	
陰部ヘルペス	
性器疣贅	
無菌性髄膜炎	10
心筋炎	
心膜炎	
胃腸炎	
後天性免疫不全症候群（A I D S）	
ヒト免疫不全ウイルス（H I V）	
ライ症候群	
川崎症候群	
インフルエンザ	
気管支炎	
ウイルス性「マイコプラズマ」肺炎	20
急性熱性呼吸器疾患	
急性咽頭結膜熱	
流行性角結膜炎	
単純ヘルペスウイルス 1 型（H S V - 1）	
単純ヘルペスウイルス 2 型（H S V - 2）	
帯状疱疹	
巨細胞封入体病	
狂犬病	
進行性多巣性白質脳症	
クーラー病	30
致死性家族性不眠症	
クロイルフェルト・ヤコブ病	
ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病	
熱帯性痙攣性不全対麻痺	
西部ウマ脳炎	
カリフォルニア脳炎	
セントルイス脳炎	
黄熱	
デング熱	
リンパ性脈絡髄膜炎	40
ラッサ熱	
出血熱	
ハンタウイルス性肺症候群	
マールブルグウイルス感染	
エボラウイルス感染	
痘瘡。	

【 0 7 0 8 】

（ 4 . 8 . 7 感染症の多薬物療法）

例示的結合体、および抗感染症剤であるもう 1 つの治療剤をそれを必要とする患者に投与することを含む感染症を治療する方法が開示される。 1 つの実施形態において、抗一感 50

染症剤は、限定されるものではないが、表 8 にリストされた剤である。

【 0 7 0 9 】

(表 8)

β-ラクタム抗生物質：

ペニシリン G

ペニシリン V

クロキサシリン

リクロキサシリン

メチシリン

ナフシリン

オキサシリン

アムピシリン

アモキシシリン

バカムピシリン

アズロシリン

カルベニシリン

メズロシリン

ピペラシリン

チカルシリン

10

20

アミノグリコシド：

アミカシン

ゲンカマイシン

カナマイシン

ネオマイシン

ネチルミシン

ストレプトマイシン

トブラマイシン

マクロライド：

アジスロマイシン

クラリスロマイシン

エリスロマイシン

リンコマイシン

クリンダマイシン

30

テトラサイクリン：

デメクロサイクリン

ドキシサイクリン

ミノサイクリン

オキシテトラサイクリン

テトラサイクリン

40

キノロン：

シノキサシン

ナリジキシニン酸

フルオロキノロン：

シプロフロキサシン

エノキサシン

50

グレパフロキサシン
レボフロキサシン
ロメフロキサシン
ノルフロキサシン
オフロキサシン
スパルフロキサシン
トロバフロキサシン

ポリペプチド：
バシドラシン
コリスチン
ポリミキシン B

10

スルホンアミド：
スルフィソオキサゾール
スルファメトキサゾール
スルファジアジン
スルファメチゾール
スルファセタミド

20

雑多な抗菌剤：
トリメトプリム
スルファメタゾール
クロラムフェニコール
バンコマイシン
メトロニダゾール
キヌプリスチン
ダルフォプリスチン
リファムピン
スペクチノマイシン
ニトロフラントイン
抗ウイルス剤：

30

一般的抗ウイルス剤：
イドキスラジン
ビダラビン
トリフルリジン
アシクリビール
ファムシシクロビール
ペンシシクロビール
バラシクロビール
ガンシシクロビール
フォスカルメット
リバビリン
アマンタジン
リマンタジン
シドフォビール
アンチセンスオリゴヌクレオチド
免疫グロブリン
インターフェロン

40

50

H I V感染のための薬剤：

テノフォビル

エムトリシタビン

ジドブジン

ジダノシン

ザルシタビン

スタブジン

ラミブジン

ネビラビン

レラビルジン

サキナビル

リトナビル

インディナビル

ネルフィナビル。

10

【実施例】

【0710】

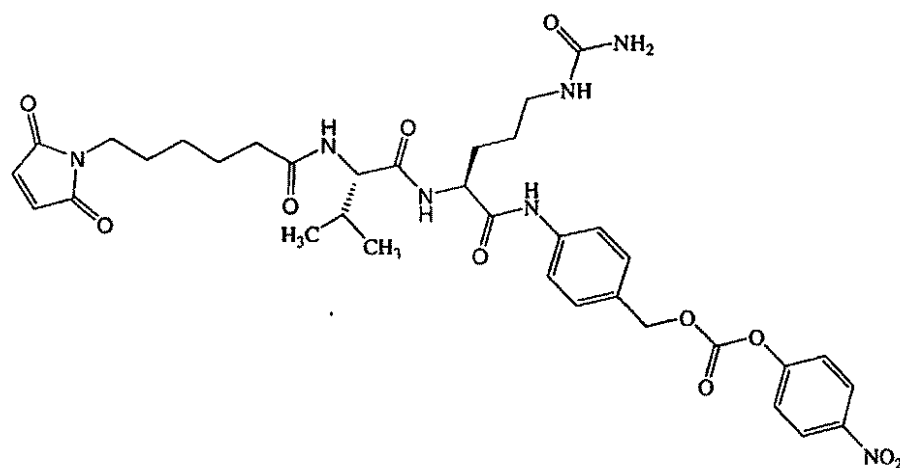
(5. 実施例)

実施例1－化合物ABの調製

【0711】

【化224】

20



30

AB

Fmoc-val-cit-PAB-OH (14.61 g, 24.3ミリモル、1.0当量、Firestone et al. に対する米国特許第6214345号) をDMF (120 mL, 0.2 M) で希釈し、この溶液にジエチルアミン (60 mL) を加えた。反応をHPLCによってモニターし、2時間以内に完了することが見出された。反応混合物を濃縮し、音波処理下で、酢酸エチル (約100 mL) を用いて得られた残渣を十分にわたって沈殿させた。エーテル (200 mL) を加え、沈殿をさらに5分間音波処理した。溶液を30分間攪拌することなく放置し、次いで、濾過し、高真空下で乾燥して、Val-cit-PAB-OHが得られ、これをさらに精製することなく次の工程で用いた。収率：8.84 g (96%)。Val-cit-PAB-OH (8.0 g, 21ミリモル) をDMF (110 mL) で希釈し、得られた溶液をMC-OSu (Willner et al., (1993) Bioconjugate Chem. 4:521; 6.5 g, 21ミリモル、1.0当量) で処理した。HPLCによると、反応は2時間後に完了した。反応混合物を濃縮し、得られた油を酢酸エチル (50 mL) を用いて沈殿させた。15分間音波処理した後、エーテル (400 mL) を加え、全ての大きな粒子が破壊されるまで混合物をさらに音波処理した。次いで、溶液を濾過し、固体を乾燥して、全

40

50

ての灰色がかった白色固体中間体を得た。収率：11.63 g (96%) ; ES-MS m/z 757.9 [M-H]。

【0712】

Fmoc-val-cit-PAB-OH (14.61 g, 24.3ミリモル、1.0当量、Firestone et al. に対する米国特許第6214345号) をDMF (120 mL, 0.2 M) で希釈し、この溶液にジエチルアミン (60 mL) を加えた。反応をHPLCによってモニターし、2時間以内に完了することが判明した。反応混合物を濃縮し、音波処理下で、酢酸エチル (約100 mL) を用いて得られた残渣を10分間にわたって沈殿させた。エーテル (200 mL) を加え、沈殿をさらに5分間音波処理した。溶液を撹拌することなく30分間放置し、次いで、濾過し、高真空下で乾燥して、Val-cit-PAB-OHが得られ、これをさらに精製することなく次の工程で用いた。収率：8.84 g (96%)。Val-cit-PAB-OH (8.0 g, 21ミリモル) をDMF (110 mL) で希釈し、得られた溶液をMC-OSu (Willner et al., (1993) Bioconjugate Chem. 4:521; 6.5 g, 21ミリモル、1.0当量) で処理した。反応はHPLCによると2時間後に完了した。反応混合物を濃縮し、得られた油を酢酸エチル (50 mL) を用いて沈殿させた。15分間の音波処理の後、エーテル (400 mL) を加え、全ての大きな粒子が破壊されるまで混合物をさらに音波処理した。次いで、溶液を濾過し、固体を乾燥して、灰色がかった白色固体中間体を得た。収率：11.63 g (96%) ; ES-MS m/z 757.9 [M-H]。

【0713】

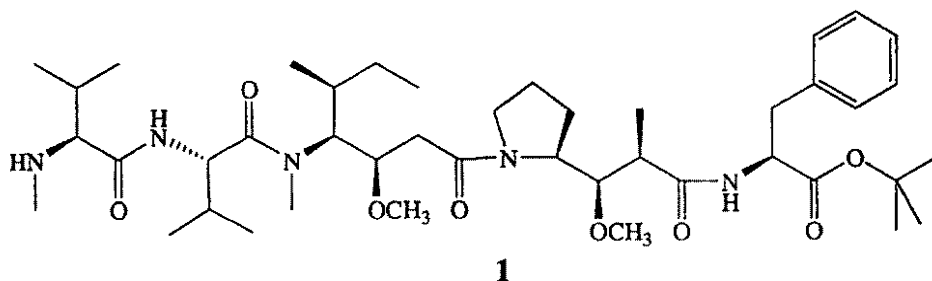
灰色がかった白色固体中間体 (8.0 g, 14.0ミリモル) をDMF (120 mL, 0.12 M) で希釈し、得られた溶液にビス (4-ニトロフェニル) カルボネート (8.5 g, 28.0ミリモル、2.0当量) およびDIEA (3.66 mL, 21.0ミリモル、1.5当量) を加えた。反応はHPLCによると1時間以内に完了した。反応混合物を濃縮して油が得られ、これをEtOAcで沈殿させ、次いで、EtOAc (約25 mL) でトリチュレートした。溶質をさらにエーテル (約200 mL) で沈殿させ、15分間でトリチュレートした。固体を濾過し、高真空下で乾燥して、化合物ABが得られ、これはHPLCによると93%の純度であり、これをさらに精製することなく次の工程で用いた。収率：9.7 g (94%)。

【0714】

実施例2-化合物1の調製

【0715】

【化225】



フェニルアラニン-tert-ブチルエステルHCl塩 (868 mg, 3ミリモル)、N-Boc-ドアラプロリン (668 mg, 1当量)、DEPC (820 μ L, 1.5当量)、およびDIEA (1.2 mL) をジクロロメタン (3 mL) で希釈した。室温 (約28度摂氏) にて二時間の後、反応混合物をジクロロメタン (20 mL) で希釈し、順次、飽和水性 (AQ)、NaHCO₃ (2 $\times$ 10 mL)、飽和aq. NaCl (2 $\times$ 10 mL) で洗浄した。有機層を分離し、濃縮した。得られた残渣を酢酸エチルに再度懸濁させ、酢酸エチルへのフラッシュクロマトグラフィーを介して精製した。関連画分を合わせ、濃縮して、白色固体としてジペプチドを得た：684 mg (46%)。ES-MS m/z 49

1. 3 [M+H]⁺

t-ブチルエステルの存在下における選択的 Boc 切断では、前記ジペプチド (500 mg、1.28 ミリモル) をジオキサン (2 mL) で希釈した。4 M HCl / ジオキサン (960 μL、3 当量) を加え、反応混合物を室温にて一晩攪拌した。ほとんど完了した Boc 脱保護は、最少量の t-ブチルエステル切断にて RP-HPLC によって観察された。混合物を氷浴で乾燥し、トリエチルアミン (500 μL) を加えた。10 分後、混合物を冷却浴から除去し、ジクロロメタン (20 mL) で希釈し、順次、飽和 aq. NaHCO₃ (2 × 10 mL)、飽和 aq. NaCl (2 × 10 mL) で洗浄した。有機層を濃縮して、黄色フォームを得た：287 mg (57%)。中間体をさらに精製することなく用いた。

10

【0716】

(「Pentapeptide Compounds and Uses Related Thereto」なる発明の名称の WO 02/088172 に記載されたように調製された；0.73 ミリモル) トリペプチド Fmoc-Meval-val-dil-O-t-Bu を室温にて TFA (3 mL)、ジクロロメタン (3 mL) で二時間処理した。混合物を濃縮乾固し、残渣をトルエン (3 × 20 mL) で共蒸発させ、真空中で一晩乾燥した。残渣をジクロロメタン (5 mL) で希釈し、脱保護されたジペプチド (287 mg、0.73 ミリモル)、続いて DIEA (550 μL、4 当量)、DEPC (201 μL、1.1 当量) に加えた。室温で 2 時間後、反応混合物を酢酸エチル (50 mL) で希釈し、順次、10% aq. クエン酸 (2 × 20 mL)、飽和 aq. NaHCO₃ (2 × 10 mL)、飽和 aq. NaCl (10 mL) で洗浄した。有機層を分離し、濃縮した。得られた残渣を酢酸エチルに再度懸濁させ、酢酸エチルにてフラッシュクロマトグラフィーを介して精製した。関連画分を合わせ、濃縮して、Fmoc-Meval-val-dil-dap-phe-O-t-Bu を白色固体として得た：533 mg (71%)。R_f 0.4 (EtOAc)。ES-MS m/z 1010.6 [M+H]⁺

20

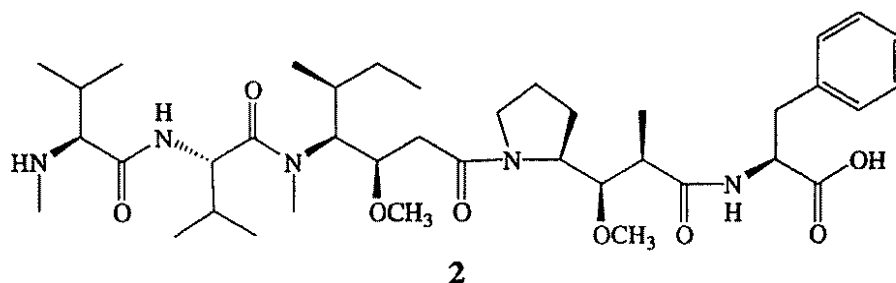
生成物 (200 mg、0.2 ミリモル) をジクロロメタン (3 mL)、ジエチルアミン (1 mL) で希釈した。反応混合物を室温にて一晩攪拌した。溶媒を除去して油が得られ、これをジクロロメタン中の段階的グラジエント 0 ~ 10% MeOH へのフラッシュシリカゲルクロマトグラフィーによって精製して、化合物 1 を白色固体として得た：137 mg (87%)。R_f 0.3 (10% MeOH / CH₂Cl₂)。ES-MS m/z 788.6 [M+H]⁺

30

実施例 3 - 化合物 2 の調製

【0717】

【化 226】



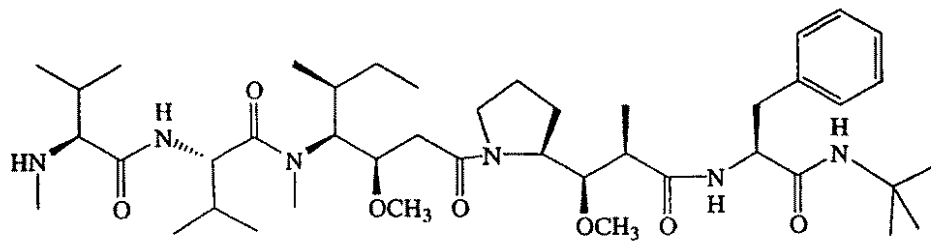
40

化合物 2 は、室温での 7 時間における 4 M HCl / ジオキサン (4 mL) での処理によって化合物 1 (30 mg、0.038 ミリモル) から調製した。溶媒を除去し、残渣を真空中で一晩乾燥して、化合物 2 を吸湿性白色固体として得た：35 mg (HCl 塩として計算して 120%)。ES-MS m/z 732.56 [M+H]⁺

実施例 4 - 化合物 3 の調製

【0718】

【化 2 2 7】



3

10

Fmoc-Mev al-val-dil-dap-phe-O-t-Bu（実施例 2、50 mg）を 4 M HCl / ジオキサン（4 mL）で室温にて 16 時間処理した。溶媒を除去し、残渣を真空中で一晩乾燥して、50 mg の吸湿性白色固体中間体を得た。

【0719】

白色固体中間体（20 mg、0.02 ミリモル、1.5 当量）をジクロロメタン（1 mL）で希釈し；DEPC（5 μ L、0.03 ミリモル、1.5 当量）を加え、続いて、DIEA（11 μ L、0.06 ミリモル、3 当量）、および *t*-ブチルアミン（3.2 μ L、0.03 ミリモル、1.5 当量）を加えた。室温での 2 時間後、反応は RP-HPLC によると不完全であることが判明した。より多くの DEPC（10 μ L）および *t*-ブチルアミン（5 μ L）を加え、反応をさらに 4 時間撹拌した。反応混合物をジクロロメタン（15 mL）で希釈し、順次、水（5 mL）、0.1 M aq. HCl（10 mL）、飽和 aq. NaCl（10 mL）で洗浄した。有機層を分離し、濃縮した。得られた残渣をジクロロメタンで希釈し、ジクロロメタン中の段階的グラジエント 0～5% MeOH でのフラッシュクロマトグラフィーを介して精製した。関連画分を合わせ、濃縮して、Fmoc 保護中間体を白色固体として得られた。7.3 mg（36%） R_f 0.75（10% MeOH / CH₂Cl₂）。

20

【0720】

Fmoc 保護中間体をジクロロメタン（0.5 mL）で希釈し、ジエチルアミン（0.5 mL）で室温にて 3 時間処理した。反応混合物を濃縮乾固した。生成物を、ジクロロメタン中の段階的グラジエント 0～10% MeOH でのフラッシュシリカゲルクロマトグラフィーによって単離して、化合物 3 を白色固体として得た：4 mg（70%）。 R_f 0.2（10% MeOH / CH₂Cl₂）。ES-MS m/z 787 [M+H]⁺、809 [M+Na]⁺。

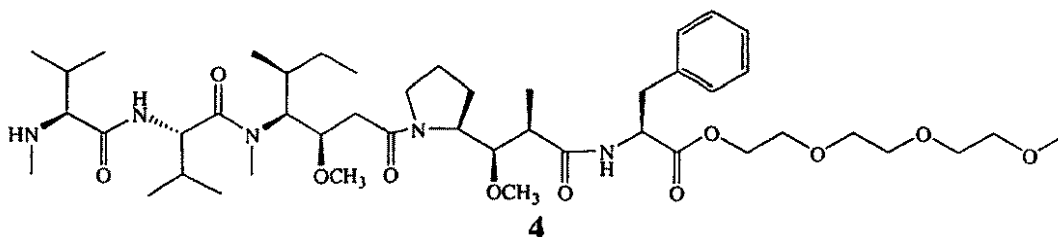
30

【0721】

実施例 5－化合物 4 の調製

【0722】

【化 2 2 8】



4

40

Boc-L-フェニルアラニン（265 mg、1 ミリモル、1 当量）およびトリエチレングリコールモノメチルエーテル（164 μ L、1 ミリモル、1 当量）をジクロロメタン（5 mL）で希釈した。次いで、DCC（412 mg、2 ミリモル、2 当量）を加え、続いて、DMA P（10 mg）を加えた。反応混合物を室温にて一晩撹拌した。沈殿を濾過した。溶媒を真空中で除去し、残渣を酢酸エチルで希釈し、酢酸エチルでのシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。生成物を含有する画分を引き出し、濃縮

50

し、真空中で乾燥して、白色固体を得た：377mg（91%）。 R_f 0.5（EtOAc）ES-MS m/z 434 [M+Na]⁺

Boc保護基の除去は、4M HCl/ジオキサン（6mL）を含むジオキサン（10mL）での前記物質の室温での六時間の処理によって行った。溶媒を真空中で除去し、残渣を真空中で乾燥して、白色固体を得た。

【0723】

フェニルアラミンートリエチレングリコールモノメチルエーテルエステルのHCl塩（236mg、0.458ミリモル、1当量）およびN-Boc-ドアラプロイン（158mg、0.55ミリモル、1.2当量）をジクロロメタン（3mL）で希釈した。DEPC（125μL、1.5当量）を混合物に加え、続いて、DIEA（250μL、3当量）を加えた。室温での2時間後、反応混合物を酢酸エチル（30mL）で希釈し、順次、飽和aq. NaHCO₃（2×10mL）、10%aq. クエン酸（2×10mL）、飽和aq. NaCl（10mL）で洗浄した。有機層を分離し、濃縮した。得られた残渣を酢酸エチルに再度懸濁させ、酢酸エチルでのシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーを介して精製した。関連画分を合わせ、濃縮して、白色フォーム中間体を得た：131mg（50%）。 R_f 0.25（EtOAc）。ES-MS m/z 581.3 [M+H]⁺。

【0724】

Boc脱保護はジクロロメタン（2mL）、TFA（0.5mL）中で室温にて2時間行った。溶媒を真空中で除去し、残渣をトルエン（3×25mL）で共蒸発させ、次いで、真空中で乾燥させ、138mgのジペプチドTFA塩を得た。

【0725】

Fmoc-Mevall-val-dil-OH（実施例2、147mg、0.23ミリモル、1当量）、およびジペプチドTFA塩（138mg）をジクロロメタン（2mL）で希釈した。混合物にDEPC（63μL、1.5当量）を加え、続いて、DIEA（160μL、4当量）を加えた。室温での2時間後に、反応混合物をジクロロメタン（30mL）で希釈し、順次、10%aq. クエン酸（2×20mL）、飽和aq. NaCl（20mL）で洗浄した。有機層を分離し、濃縮した。得られた残渣をジクロロメタンに再度懸濁し、ジクロロメタン中の段階的グラジエント0～5%MeOHでのシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーを介して精製した。関連画分を合わせ、濃縮して、白色フォームを得た：205mg（81%）。 R_f 0.4（10%MeOH/CH₂Cl₂）。ES-MS m/z 1100.6 [M+H]⁺、1122.4 [M+Na]⁺。

【0726】

Fmoc保護基をジクロロメタン（6mL）中のジエチルアミン（2mL）での処理によって除去した。室温での6時間の後、溶媒での真空を除去し、ジクロロメタン中の段階的グラジエント0～10%MeOHでのシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーによって生成物を単離した。関連画分を合わせ、濃縮した。ジクロロメタン/ヘキサン1：1からの蒸発の後、化合物4を白色フォームとして得た：133mg（80%）。 R_f 0.15（10%MeOH/CH₂Cl₂）。ES-MS m/z 878.6 [M+H]⁺。

【0727】

実施例6－化合物5の調製

【0728】

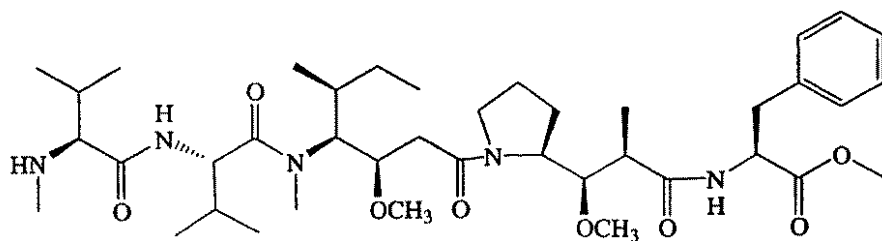
10

20

30

40

【化 2 2 9】

**5**

Fmoc-Mev al-val-dil-OH (実施例 2、0.50 g、0.78 ミリ
 モル) および dap-phe-OMe·HCl (0.3 g、0.78 ミリモル、Pett
 it、G. R.、et al. Anti-Cancer Drug Design 1
 998、13、243-277 に従って調製) を CH₂Cl₂ (10 mL) に溶解させ、
 続いて、ジイソプロピルエチルアミン (0.30 mL、1.71 ミリモル、2.2 当量)
 を加えた。DEPC (0.20 mL、1.17、1.5 当量) を加え、内容物を Ar 上で
 放置した。反応は HPLC によると 1 時間以内に完了した。混合物を濃縮して油とし、1
 00% EtOAc で溶出する SiO₂ クロマトグラフィー (300×25 mm からの) に
 よって精製した。生成物を白色フォーム状固体として単離した。収率：0.65 g (87
 %)。ES-MS m/z 968.35 [M+H]⁺、991.34 [M+Na]⁺；
 UV λ_{max} 215、265 nm。

【0729】

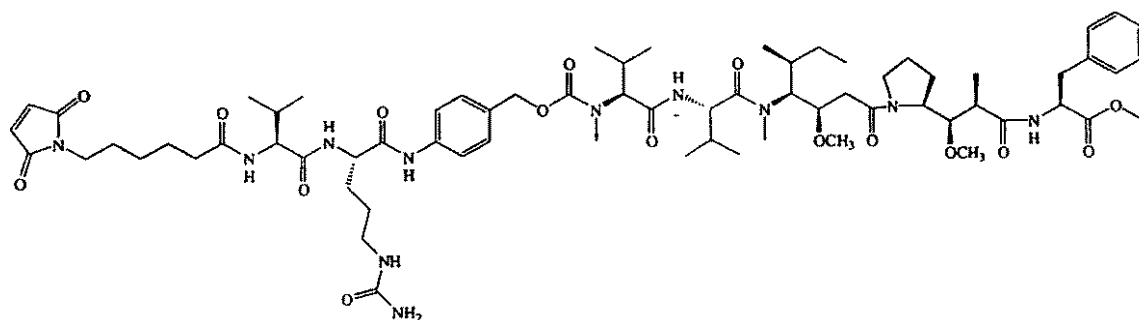
塩化メチレン (5 mL) 中の Fmoc-保護ペプチド (0.14 g、0.14 ミリモル
) をジエチルアミン (2 mL) で処理し、内容物を室温にて 2 時間放置した。HPLC に
 よると完了した反応を濃縮して油とし、2 mL の DMSO 中に取り、分取用 HPLC (C
 12-RP カラム、5 μ、100 Å、(0.1% TFA を含有する) 水中の MeCN の直
 線グラジエント、40 分での 10~100%、続いて、100% での 20 分間、25 mL
 /分の流速) に注入した。生成物を含有する画分を蒸発させ、トリフルオロアセテート塩
 についての白色粉末を得た。収率：0.126 g (98%)。R_f 0.28 (100%
 EtOAc)；ES-MS m/z 746.59 [M+H]⁺、768.51 [M+
 Na]⁺；UV λ_{max} 215 nm。

【0730】

実施例 7-化合物 6 の調製

【0731】

【化 2 3 0】

**6**

化合物 5 のトリフルオロアセテート塩 (0.11 g、0.13 ミリモル)、化合物 AB
 (0.103 g、0.14 ミリモル、1.1 当量) および HOBt (3.4 mg、26 μ
 モル、0.2 当量) を DMF/ピリジン (各々、2 mL/0.5 mL) に懸濁させた。ジ
 イソプロピルエチルアミン (22.5 μL、0.13 ミリモル、1.0 当量) を加え、黄
 色溶液をアルゴン下で攪拌した。3 時間後、さらに 1.0 当量の DIEA を加えた。24
 時間後、0.5 当量の活性化されたリンカーを反応混合物に含めた。合計 40 時間後、反

10

20

30

40

50

応を完了した。内容物を蒸発させ、DMSO中に取り、分取用HPLC（C₁₂-RPカラム、5μ、100Å、（0.1%TFAを含有する）水中のMeCNの直線グラジエント、40分の10～100%、続いて、100%における20分、50mL/分の流速）に注入した。所望の画分を蒸発させて、生成物を黄色油として得た。塩化メチレン（約2mL）および過剰のエーテルを加えて、化合物6を白色沈殿として得られ、これを濾過し、乾燥した。収率：90mg（52%）。ES-MS m/z 1344.32 [M+H]⁺、1366.29 [M+Na]⁺；UV λ_{max} 215、248nm。

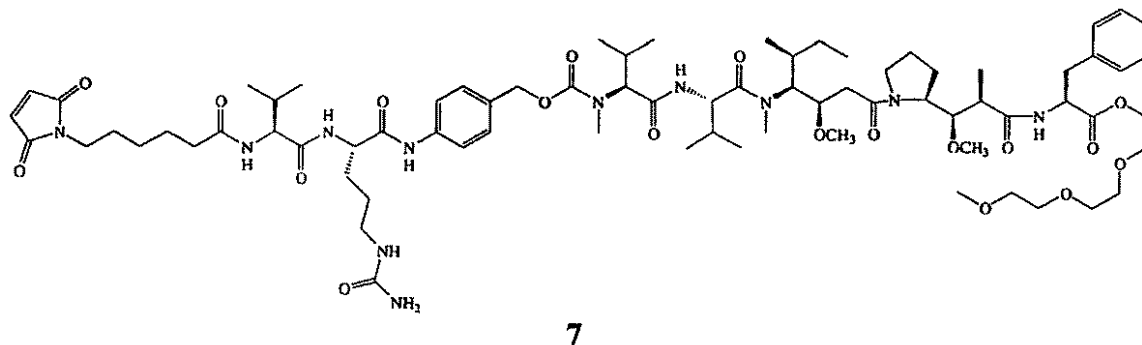
【0732】

実施例8－化合物7の調製

【0733】

10

【化231】



20

化合物4（133mg、0.15ミリモル、1当量）、化合物AB（123mg、0.167ミリモル、1.1当量）、およびHOBt（4mg、0.2当量）をDMF（1.5mL）で希釈した。2分後、ピリジン（5mL）を加え、反応をRP-HPLCを用いてモニターした。反応は18時間以内に完了したことが示された。反応混合物をジクロロメタン（20mL）で希釈し、順次、10%aq. クエン酸（2×10mL）、水（10mL）、飽和aq. NaCl（10mL）で洗浄した。有機層を分離し、濃縮した。得られた残渣をジクロロメタンに再度懸濁させ、ジクロロメタン中の段階的グラジエント0～10%MeOHでのシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーを介して精製した。関連画分を合わせ、濃縮して、化合物7を白色フォームとして得た：46mg（21%）。R_f 0.15（10%MeOH/CH₂Cl₂）。ES-MS m/z 1476.94 [M+H]⁺。

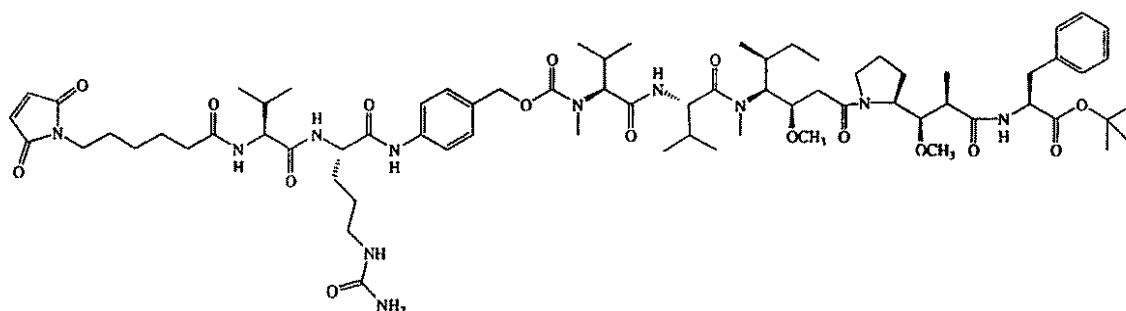
30

【0734】

実施例9－MC-Val-Cit-PAB-MMAF t-ブチルエステル8の調製

【0735】

【化232】



40

化合物1（83mg、0.11ミリモル）、化合物AB（85mg、0.12ミリモル、1.1当量）、およびHOBt（2.8mg、21μモル、0.2当量）を乾燥DMF（1.5mL）およびピリジン（0.3mL）中にアルゴン下で取った。30時間後、HPLCによると反応は実質的に完了したことが判明した。混合物を蒸発させ、最少量のD

50

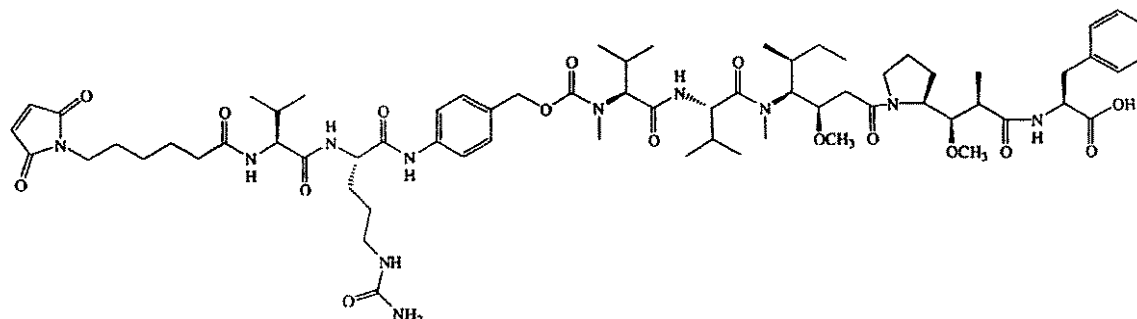
MSO中に取り、分取用HPLC (C₁₂-RPカラム、5 μ、100 Å、(0.1% TFAを含有する) 水中のMeCNの直線グラジエント、40分の10~100%、続いて、100%における20分、25 mL/分の流速) によって精製して、化合物8を白色固体として得た。収率：103 mg (71%)。ES-MS m/z 1387.06 [M+H]⁺、1409.04 [M+Na]⁺；UV λ_{max} 205、248 nm。

【0736】

実施例10-MC-val-cit-PAB-MMAF9の調製

【0737】

【化233】



9

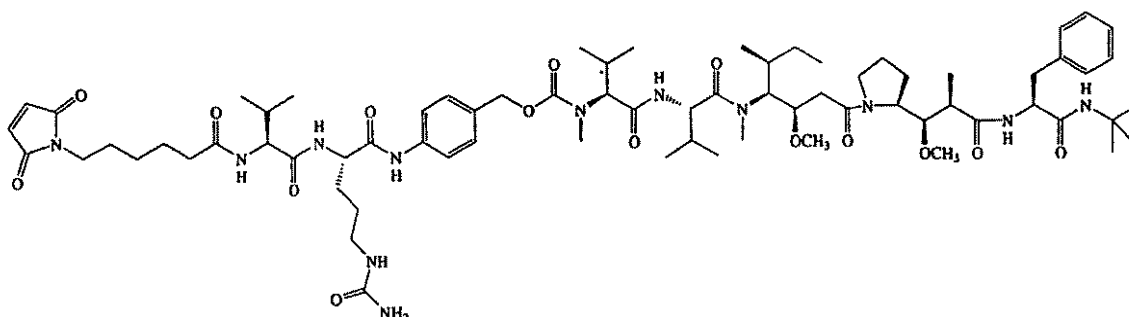
化合物8 (45 mg、32 μmol) を塩化メチレン (6 mL) に懸濁させ、続いて、TFA (3 mL) に加えた。得られた溶液を2時間放置した。反応混合物を真空中で濃縮し、分取用HPLC (C₁₂-RPカラム、5 μ、100 Å、(0.1% TFAを含有する) 水中のMeCNの直線グラジエント、40分の10~100%、続いて、100%における20分、25 mL/分の流速) によって精製した。所望の画分を濃縮して、マレイミドカプロイダーバリン-シトルリン-p-ヒドロキシメチルアミノベンゼン-MMAF (MC-val-cit-PAB-MMAF) 9を灰色がかった白色固体として得た。収率：11 mg (25%)。ES-MS m/z 1330.29 [M+H]⁺、1352.24 [M+Na]⁺；UV λ_{max} 205、248 nm。

【0738】

実施例11-MC-val-cit-PAB-MMAF tert-ブチルアミド10の調製

【0739】

【化234】



10

化合物3 (217 mg、0.276ミリモル、1.0当量)、化合物AB (204 mg、0.276ミリモル、1.0当量)、およびHOBt (11 mg、0.0828ミリモル、0.3当量) をピリジン/DMF (6 mL) で希釈した。この混合物にDIEA (0.048 mL) を加え、混合物を約16時間攪拌した。揮発性有機物を真空中で蒸発させた。粗残渣を段階的グラジエント (DCM中の0~5~10% メタノール) でのChromatotron (登録商標) (放射状薄層クロマトグラフィー) によって精製して、MC-val-cit-PAB-MMAF tert-ブチルアミド10を得た。収率：1

10

20

30

40

50

72 mg (45%) ; ES-MS m/z 1386.33 $[M+H]^+$ 、1408.36 $[M+Na]^+$; UV λ_{max} 215、248 nm。

【0740】

実施例12-AC10およびMC-MMAEの結合体化によるAC10-MC-MMAEの調製

pH8.0の500mMホウ酸ナトリウムおよび500mM塩化ナトリウムに溶解させたAC10を過剰の100mMジチオスレイトール(DTT)で処理する。37℃における30分間のインキュベーションの後、Sephadex G25樹脂での溶出によって緩衝液を交換し、1mM DTPAを含むPBSで溶出させた。溶液の280nmにおける急高度からの還元された抗体濃度、およびDTNB (Aldrich、Milwaukee、WI) との反応によるチオール濃度を測定し、次いで、412nmにおける吸光度を測定することによってチオール/Ab値をチェックする。PBSに溶解させた還元抗体を氷上で冷却する。

10

【0741】

DMSOに溶解させた薬物リンカー試薬、マレイミドカプロイドーモノメチルオーリスタチンE、すなわち、MC-MMAEをアセトニトリルおよび水に既知の濃度で希釈し、PBS中の冷却された還元抗体AC10に加える。約1時間後、過剰のマレイミドを加えて、反応をクエンチし、いずれの未反応抗体チオール基もキャップする。反応混合物を遠心限外濾過によって濃縮し、AC10-MC-MMAEを精製し、PBS中のG25樹脂を通す溶出によって脱塩し、滅菌条件下で0.2μMフィルターを解して濾過し、貯蔵のために凍結する。

20

【0742】

実施例13-AC10およびMC-MMAFの結合体化によるAC10-MC-MMAFの調製

実施例12の手法に従い、AC10およびMC-MMAFの結合体化によってAC10-MC-MMAFを調製した。

【0743】

実施例14-AC10およびMC-val-cit-PAB-MMAEの結合体化によるAC10-MC-val-cit-PAB-MMAEの調製

実施例12の手法に従って、AC10およびMC-val-cit-PAB-MMAEの結合体化によって、AC10-MC-val-cit-PAB-MMAEを調製した。

30

【0744】

実施例15-AC10およびMC-val-cit-PAB-MMAF(9)の結合体化によるAC10-MC-val-cit-PAB-MMAFの調製

実施例12の手法に従い、AC10およびMC-val-cit-PAB-MMAF(9)の結合体化によってAC10-MC-val-cit-PAB-MMAFを調製した。

【0745】

実施例16-選択された化合物の細胞傷害性の測定

MMAFおよび化合物1~5の細胞傷害性活性をLewis Y陽性細胞系OVCAR-3について評価し、H3396乳房含羞、L2987肺含羞およびLS174t結腸含羞Lewis Y陽性細胞系を細胞傷害性につきアッセイすることができる。化合物1~5の細胞傷害性を評価するために、細胞を150μLの培養基中にウェルあたりほぼ5~10、000で接種することができ、次いで、アッセイの最初に四連にて段階的用量の化合物1~5で処理した。細胞傷害性アッセイはテスト化合物の付加後通常96時間行う。50μLのレザズリン色素をインキュベーションの最後の4~6時間の間に各ウェルに加えて、培養の最後に目に見える細胞を評価することができる。色素の還元は、各々、535nmおよび590nmの励起および発光波長を用いて蛍光分光分析によって測定した。分析では、処理された細胞によるレザズリン還元の程度を未処理対照細胞のそれと比較することができる。

40

50

【0746】

1時間の曝露アッセイの間、細胞に1時間薬物をパルスし、次いで、洗浄することができる；細胞傷害性効果は96時間のインキュベーション後に測定することができる。

【0747】

実施例17－選択された化合物についてのインビトロ傷害性データ

図10は、CD30+細胞系Karpas 299についての一般的手法Iに記載されたようにアッセイした化合物7～10のcAC10結合体の細胞傷害性効果を示す。2つの別々の実験のデータを示す。化合物7および9のcAC10結合体はcAC10-val-cit-MMAEよりもわずかに活性であることが判明した。

【0748】

(表10)

【0749】

【化235】

結合体	IC ₅₀ (ng/mL)
cAC10-val-cit-MMAE	6
cAC10-7	1.0
cAC10-8	15
cAC10-9	0.5
cAC10-10	20

他の実験において、BR96-val-cit-MMAFは遊離MMAFよりも少なくとも250倍優れていた。

【0750】

一般的手法I－細胞傷害性の測定。例示的結合体7～10の細胞傷害性を評価するために、150μLの培養基中にウェル当たりほぼ5～10,000にて細胞を摂取し、次いで、アッセイの最初に四連にて段階的用量の例示的結合体7～10で処理した。細胞傷害性アッセイは、テスト化合物の添加後96時間行った。インキュベーションの最後の4～6時間の間に、50μLのレサズリン色素を各ウェルに加え、培養の最後に目に見える細胞を評価した。色素の還元は、各々、535nmおよび590nmの励起及び発光波長を用いる蛍光分光測定によって測定した。分析では、処理した細胞によるレサズリン還元の程度を未処理対照細胞のそれと比較した。

【0751】

実施例18－インビトロ細胞増殖アッセイ

ADCの効率は、以下のプロトコルを使用する細胞増殖アッセイによって測定することができる(Promega Corp. Technical Bulletin TB288;Mendoza et al. (2002) Cancer Res. 62:5485-5488)：

1. 培地中に約10⁴細胞(SKBR-3、BT474、MCF7またはMDA-MB-468)を含有する100μLの細胞培養のアリコットを96-ウェルの不透明な壁のプレートの各ウェルに沈積させた。
2. 対照細胞を培地を含有させ、かつ細胞無くして調製した。
3. ADCを実験ウェルに加え、3～5日間インキュベートした。
4. プレートをほぼ30分間で室温に平衡化させた。
5. 各ウェルに存在する細胞培養基の容量にCellTiter-Glo試薬の容量を加えた。
6. 内容物をオービタルシェーカーで2分間混合して、細胞の溶解を誘導した。
7. プレートを室温にて10分間インキュベートして、ルミネセンスシグナルを安定化させた。
8. ルミネセンスを記録し、RLU=相対的ルミネセンス単位としてグラフに報告する。

【0752】

10

20

30

40

50

実施例 19ーラットにおける血漿クリアランス

抗体薬物結合体および全抗体の血漿クリアランス薬物動態学を Sprague-Dawley ラット (Charles River Laboratories, 各々、250ー275 グラム) で調べた。動物にボーラス尾静脈注射 (IV Push) によって投与した。ほぼ 300 μ L の全血を頸静脈を介して、または尾に刺して各時点：投与後 0 (プレ用量)、10 および 30 分；1、2、4、8、24 および 36 時間；および 2、3、4、7、14、21、28 日においてリチウム／ヘパリン抗凝固剤容器に収集した。全抗体は ELISA-EC D/GxhuFc-HRP によって測定した。抗体薬物結合体は ELISA-MMA E/MMA F/EC D-Bio/SA-HRP によって測定した。

【0753】

10

実施例 20ーサルにおける血漿クリアランス

抗体薬物結合体及び全抗体の血漿クリアランス薬物動態学はマカクザルで実験することができる。図 12 は、日 1 および日 21 に投与された、異なる用量：0.5、1.5、2.5 および 3.5 mg/kg におけるマカクザルへの H-MC-vc-MMA E の投与後における 2 段階血漿濃度クリアランスを示す。全抗体および ADC の濃度は経時的に測定した cit (H=トラスツズマブ)。

【0754】

実施例 21ートランスジェニック外植体マウスにおける腫瘍容量インビボ効率

トランスジェニック実験に適した動物は Taconic (Germantown, N.Y.) のような標準的な商業的源から得ることができる。多くの株が適当であるが、腫瘍形成に対するそれらのより高い罹患性のため FVB 雌マウスが好ましい。接合では FVB 雄を用いることができ、精管切除 CD. 1 ウマを用いて偽妊娠を刺激した。精管切除マウスはいずれかの商業的供給業者から得ることができる。創始体を FVB マウスまたは 129/B L6 $\times$ FVB p53 ヘテロ接合性マウスいずれかで育種することができる。p53 対立遺伝子においてヘテロ接合性を持つマウスを用いて、腫瘍形成を潜在的に増加させることができる。いくつかの F1 腫瘍は混合株のものである。創始腫瘍は FVB のみであり得る。

20

【0755】

腫瘍 (F05 mmtv トランスジェニックマウスから調製した同種異系移植片) を有する動物を ADC の IV 注射によって単一または複数用量で処理することができる。腫瘍容量は注射後の種々の時点で評価することができる。

30

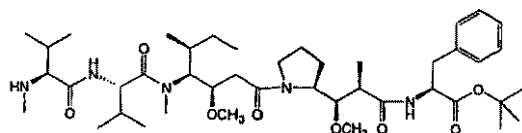
【0756】

実施例 22ー t-ブチルエステルを介する MC-MMA F の合成

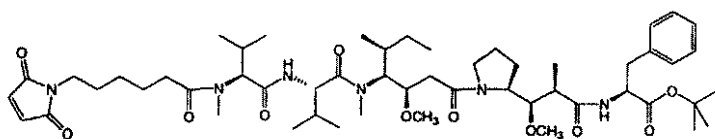
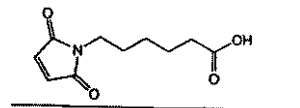
合成 1：

【0757】

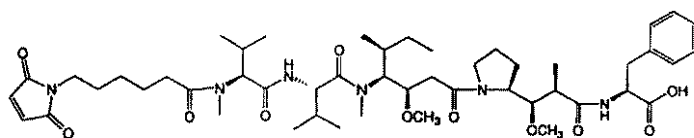
【化 2 3 6】



MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu, 1001



MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu



MC-MMAF

MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (化合物 1, 128.6 mg, 0.163 ミリモル) を CH_2Cl_2 (0.500 mL) に懸濁させた。6-マレイミドかプロン酸 (68.9 mg, 0.326 ミリモル) および 1,3-ジイソプロピルカグボジイミド (0.0505 L, 0.326 ミリモル) を加え、続いてピリジン (0.500 mL) を加えた。反応混合物を 1.0 時間攪拌した。HPLC 分析は出発化合物 1 の完全な消費を示した。減圧下で揮発性有機物を蒸発させた。 CH_2Cl_2 中の 0~5% メタノールの段階グラジエントを用い、生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィーを介して単離した。合計 96 mg の純粋な MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (12) (60% 収率) を回収した。ES-MS m/z 981.26 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 1003.47 $[\text{M}+\text{Ma}]^+$; 979.65 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。

【0758】

MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (化合物 12, 74 mg, 0.0754 ミリモル) を室温にて CH_2Cl_2 (2.0 mL) および TFA (1 mL) に懸濁させた。2.5 時間後、HPLC 分析は出発物質の完全な消費を示した。減圧下で揮発性有機物を蒸発させ、Phenomenex C_{12} Synergi Max-RP 80 Å カラム (250 × 21.20 mm) を用いて、生成物を分取用 RP-HPLC を介して単離した。溶離剤: 30 分間にわたる直線グラジエント 10%~90% MeCN/0.05% TFA (aq)、次いで、さらに 20 分間のイソクラティック 90% MeCN/0.05% TFA (aq)。ES-MS m/z 925.33 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 947.30 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 923.45 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。

【0759】

実施例 23a-ジメトキシベンジルエステルを介する MC-MMAF (11) の合成
合成 2:

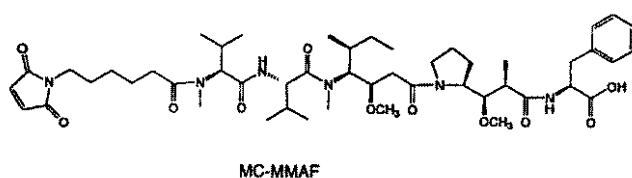
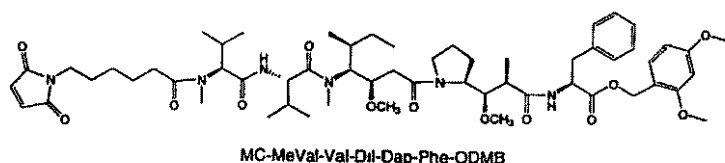
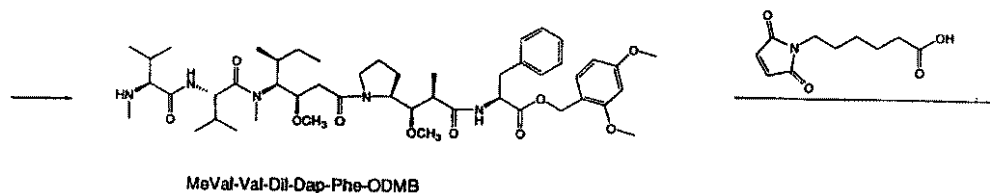
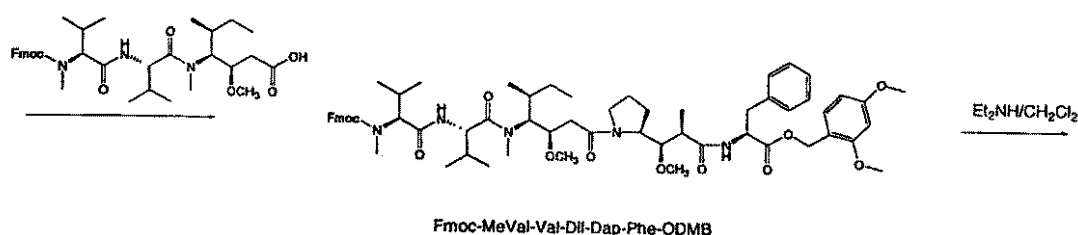
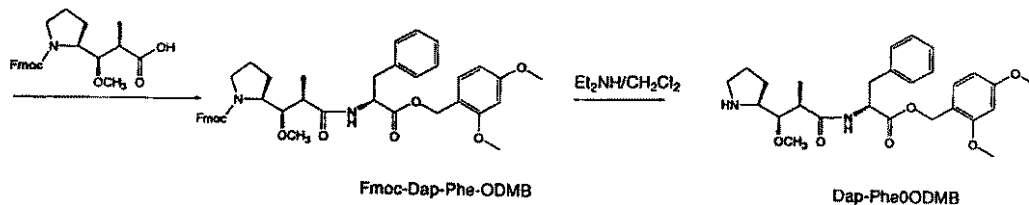
【0760】

10

20

30

40



三口5-L丸底フラスコにFmoc-L-フェニルアラニン(200g, 516ミリモルBachem)、2,4-ジメトキシベンジルアルコール(95.4g, 567ミリモル, Aldrich)、およびCH₂Cl₂(2.0L)を充填した。N,N-ジメチルホルムアミドt-ブチルアセタール(155mL, 586ミリモル, Fluka)をN₂下で20分間にわたって得られた懸濁液に加え、その結果、透明な溶液が得られた。次いで、反応を室温にて一晩攪拌し、その時点の後、TLC分析(0.42, ヘプタン/EtOAc=2:1)は、反応が完了したことを示した。反応混合物を減圧下で濃縮して、淡黄色油が得られ、これをCH₂Cl₂(200mL)に再度溶解させ、シリカゲルの短プラグ(25cm×25cm, CH₂Cl₂)を通して精製して、無色フォーム(250g)を得た。MeCN(1L)を得られたフォームに加え、それによりバッチを全体的に溶解させた。次いで、それを濃縮乾固し、MeCN(1L)に再度溶解させ、得られた懸濁

50

液を1時間攪拌し、濾過し、フィルターケーキをMeCN (2×200 mL) で濯いで、Fmoc-L-フェニルアラニン-2, 4-ジメトキシベンジルエステルを白色固体として得た (113.58 g, 41%, HPLC分析によると95.5% AUC)。データ: HPLC

L-フェニルアラニン-2, 4-ジメトキシベンジルエステル (Phe-ODMB) の調製

500 mL 丸底フラスコにFmoc-L-フェニルアラニン-2, 4-ジメトキシベンジルエステル (26.00 g, 48.3ミリモル)、CH₂Cl₂ (150 mL) およびジエチルアミン (75 mL, Acros) を充填した。混合物を室温にて攪拌し、HPLCを完了にてモニターした。4時間後、混合物を濃縮した (浴温度<30 °C)。残渣をCH₂Cl₂ (200 mL) に再度懸濁し、濃縮した。これを1回反復した。残渣にMeOH (20 mL) を加え、これはゲルの形成を引き起こした。この残渣をCH₂Cl₂ (200 mL) で希釈し、濃縮し、減圧下で曇った油が一晩で放置した。残渣をCH₂Cl₂ (100 mL) に懸濁させ、次いで、トルエン (120 mL) を加えた。混合物を濃縮し、残渣を一晩真空下に放置した。

【0761】

データ: HPLC, ¹H NMR

Fmoc-Dラプロイン (Fmoc-Dap) の調製

Boc-Dラプロイン (58.8 g, 0.205モル) を1, 4-ジオキサン (256 mL, 1.02モル, Ardrich) 中の4N HClに懸濁させた。1.5時間攪拌した後、TLC分析は反応が完了したことを示し (10% MeOH/CH₂Cl₂)、混合物をほとんど濃縮乾固した。さらなる1, 4-ジオキサンを充填し (50 mL)、混合物を濃縮乾固し、真空下で一晩乾燥した。得られた白色固体をH₂O (400 mL) に溶解させ、機械的スターラー及び温度プローブを備えた3-Lの三口丸底フラスコに移した。N, N-ジイソプロピルエチルアミン (214.3 mL, 1.23モル, Acros) を1分間にわたって加え、20.5~28.2 °C (内部) の発熱を引き起こした。混合物を氷浴中で冷却し、1, 4-ジオキサンを加えた (400 mL)。1, 4-ジオキサン (400 mL) 中のFmoc-OSu (89.90 g, 0.267モル, Advanced ChemTech) の溶液を15分間にわたって滴下漏斗から加え、反応温度を9 °C未満に維持した。混合物を室温まで温め、19時間攪拌し、その後、混合物をロータリー蒸発によって水性スラリー (390 g) まで濃縮した。懸濁液をH₂O (750 mL) およびEt₂O (750 mL) で希釈し、豊富な白色沈殿が形成された。層を分離し、固体を有機層と共に保った。濃塩酸 (30 mL) を用いて水性層を酸性化し、EtOAc (3×500 mL) で抽出した。合わせた抽出物をMgSO₄ で乾燥し、濾過し、濃縮して、59.25 gの黄色油Aを得た。Et₂O抽出物を飽和NaHCO₃ (200 mL) で1回抽出し、固体を水性層と共に保った。濃塩酸 (50 mL) を用いて水性懸濁液を酸性化し、Et₂O (50 mL) で抽出し、固体を有機層と共に保った。有機層を濾過し、濃縮して、32.33 gの黄色油Bを得た。2つの油 (AおよびB) を合わせ、CH₂Cl₂ (3.5 L)、次いで3% MeOH/CH₂Cl₂ (9 L) で溶出するシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、68.23 gのFmoc-Dラプロインを白色フォームとして得た (81%, HPLC (AUC) によると97.5% 純度)。

【0762】

Fmoc-Dap-Phe-ODMBの調製

粗製Phe-ODMB (48.3ミリモル) を5分間で無水DMF (105 mL, Acros) に懸濁し、Fmoc-Dap (19.80 g, 48.3ミリモル) を加えた。混合物を氷浴中で冷却し、TBTU (17.08 g, 53.20ミリモル, Matrix Innovations) を加えた。N, N-ジイソプロピルエチルアミン (25.3 mL, 145.0ミリモル, Acros) をシリンジを介して3分間にわたって加えた。1時間後、氷浴を取り除き、混合物を30分間にわたって温めた。混合物を水 (1 L) に注ぎ、酢酸エチル (300 mL) で抽出した。分離後、水性層を酢酸エチル (2×150 mL)

10

20

30

40

50

L)で再度抽出した。合わせた有機層をブライン(150 mL)で洗浄し、乾燥し(MgSO₄)、濾過(濾紙)して、不溶物(無機物およびいくらかのジベンゾフルベン)を除去した。濃縮後、残渣(41 g)をシリカ(41 g)に吸着させ、クロマトグラフィー(22 cm×8 cmカラム; 65%ヘプタン/EtOAc(2.5 L); 33%ヘプタン/EtOAc(3.8 L))によって精製して、29.4 gの生成物を白色フォーム(86%, HPLCによると92%純度)として得た。

【0763】

データ: HPLC, ¹H NMR, TLC(1:1 EtOAc/ヘプタン Rf=0.33, バニリン染色において赤色)

Dap-Phe-ODMBの調製

1-L丸底フラスコにFmoc-Dap-Phe-ODMB(27.66 g)、CH₂Cl₂(122 mL)およびジエチルアミン(61 mL, Acros)を充填した。溶液を室温にて攪拌し、HPLCによって完了をモニターした。7時間後、混合物を濃縮した(浴温度<30℃)。残渣をCH₂Cl₂(300 mL)に懸濁させ、濃縮した。これを2回反復した。残渣にMeOH(20 mL)およびCH₂Cl₂(300 mL)を加え、溶液を濃縮した。残渣をCH₂Cl₂(100 mL)およびトルエン(400 mL)に懸濁させ、濃縮し、残渣を真空下で放置して、クリーム様残渣を得た。

【0764】

データ: HPLC, ¹H NMR, MS。

【0765】

Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMBの調製

粗製Dap-Phe-ODMB(39.1ミリモル)を5分間で無水DMF(135 mL, Acros)に懸濁させ、Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH(24.94 g, 39.1ミリモル, 調製については実施例2を参照)を加えた。混合物を氷浴中で冷却し、TBTU(13.81 g, 43.0ミリモル, Matrix Innovations)を加えた。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(20.5 mL, 117.3ミリモル, Acros)を2分間にわたってシリンジを介して加えた。1時間後、氷浴を取り除き、混合物を30分間にわたって温めた。混合物を水(1.5 L)に注ぎ(酢酸エチル(480 mL)で希釈した。15分間放置した後、層を分離し、水性層を酢酸エチル(300 mL)で抽出した。合わせた有機層をブライン(200 mL)で洗浄し、乾燥し(MgSO₄)、濾過(濾紙)して、不溶物およびいくらかのジベンゾフルベン)を除去した。濃縮の後、残渣(49 g)をフラスコから掻き落とし、シリカ(49 g)に吸着させ、クロマトグラフィー(15 cm×10 cm diaカラム; 2:1 EtOAc/ヘプタン(3 L)、EtOAc(5 L); 250 mL画分)によって精製して、31.84 gのFmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMBを白色フォームとして得た(73%, HPLC(AUC)により93%純度)。

【0766】

データ: HPLC, TLC(2:1 EtOAc/ヘプタン, Rf=0.21, バニリン染色において赤色)

MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMBの調製

1-Lの丸底フラスコをFmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB(28.50 g)、CH₂Cl₂(80 mL)およびジエチルアミン(40 mL)を充填した。混合物を室温にて一晩攪拌し、次いで、減圧下で濃縮した。残渣をシリカ(30 g)に吸着し、フラッシュクロマトグラフィー(15 cm×8 cm diaカラム; 2%MeOH/DCM(2 L)、3%MeOH/DCM(1 L)、6%MeOH/DCM(4 L); 250 mL画分)によって精製して、15.88 gのMeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMBを白色フォームとして得た(69%, HPLC(AUC)により96%純度)。

【0767】

データ: HPLC, TLC(6%MeOH/DCM, Rf=0.24, バニリン染色に

10

20

30

40

50

において赤色)

MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMBの調製

50 mLの丸底フラスコにMeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (750 mg, 0.85ミリモル)、無水DMF (4 mL)、マレイミドカプロン酸 (180 mg, 0.85ミリモル)、およびTBTU (300 mg, 0.93ミリモル、Matrix Innovations)を室温で充填した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン (450 μ L, 2.57ミリモル)をシリンジを介して加えた。1.5時間後、混合物を水 (50 mL)に注ぎ、酢酸エチル (30 mL)で希釈した。NaClを加え、分離を改良した。層の分離の後、水性層を酢酸エチル (25 mL)で抽出した。合わせた有機層を乾燥し (MgSO₄)、濾過し、濃縮した。得られた油 (1 g)をフラッシュクロマトグラフィー [100 mLシリカ; 25%ヘプタン/EtOAc (100 mL), 10%ヘプタン/EtOAc (200 mL), EtOAc (1.5 L)]によって精製して、MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (13)を白色フォームとして得た (521 mg, 57%, HPLC (AUC)により94%純度)。

10

【0768】

データ: ¹H NMR, HPLC

MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OH (MC-MMAF) (11)の調製

50 mLの丸底フラスコにMC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (化合物13, 428 mg, 0.39ミリモル)、2.5%TFA/CH₂Cl₂ (20 mL)に溶解させた。溶液はピンク色~紫色に2分間にわたって変色した。完了はHPLCおよびTLCによってモニターした (6%MeOH/DCM, KMnO₄染色)。40分後、3滴の水を加え、曇ったピンク色~紫色混合物を濃縮して521 mgのピンク色算さを得た。クロマトグラフィー (15%IPA/DCM)による精製により、270 mgのMC-MMAF (73%, HPLCにより92%純度)を白色固体として得た。

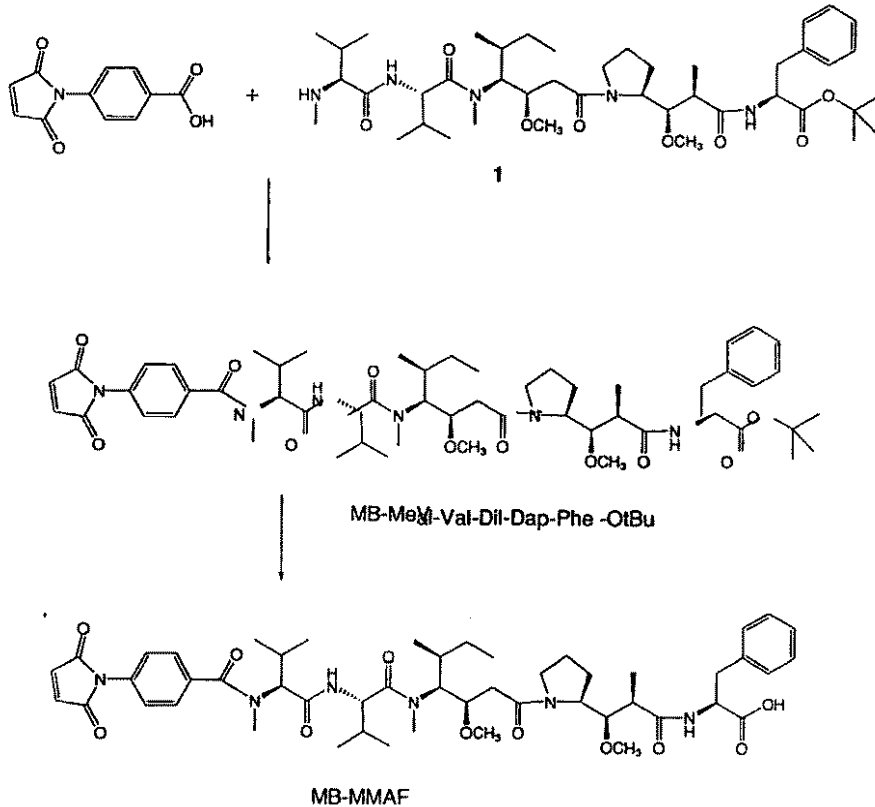
20

【0769】

実施例23b-mc-MMAFのアナログの合成

【0770】

【化 2 3 8】



MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (化合物 1, 35 mg, 0.044 ミリモル) を DMF (0.250 mL) に懸濁させた。4-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロピロール-1-イル)-安息香酸 (11 mg, 0.049 ミリモル) および HATU (17 mg, 0.044 ミリモル) を加え、続いて、DIEA (0.031 mL, 0.17 ミリモル) を加えた。反応混合物を 2.0 時間攪拌した。HPLC 分析は出発化合物 1 の完全な消費を示した。

【0771】

生成物は Phenomenex C₁₂ Synergi Max-RP 80 Å カラム (250 × 21.20 mm) を用いて、分取用 RP-HPLC を介して単離した。溶離剤; 8 分間にわたる直線グラジエント 10% ~ 80% MeCN / 0.05% TFA (aq)、次いで、さらに 12 分間のイソクラティック 80% MeCN / 0.05% TFA (aq)。合計 20 mg の純粋な生成物 (14) が単離された (0.02 ミリモル, 46% 収率)。ES-MS m/z 987.85 [M+H]⁺; 1019.41 [M+Na]⁺; 985.54 [M-H]⁻。

【0772】

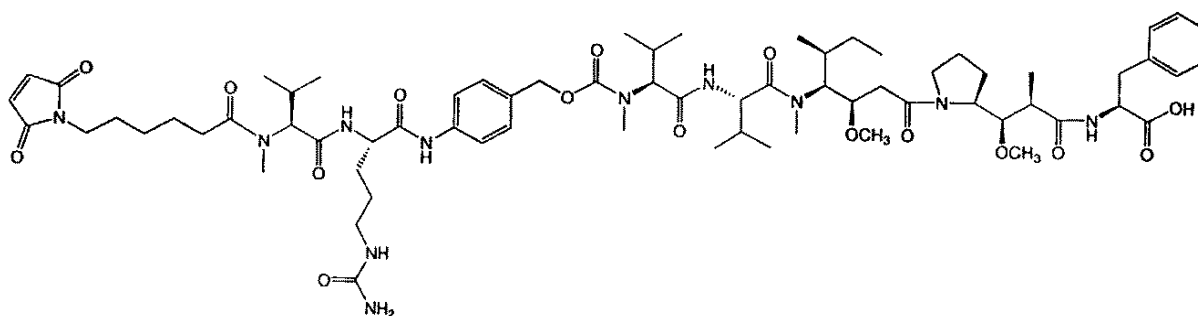
MB-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (化合物 14, 38 mg, 0.0385 ミリモル) を CH₂Cl₂ (1 mL) および TFA (1 mL) に懸濁させた。混合物を 2.0 時間攪拌し、次いで、揮発性有機物を減圧下で蒸発させた。生成物を Phenomenex C₁₂ Synergi Max-RP 80 Å カラム (250 × 21.20 mm) を用いる分取用 RP-HPLC によって精製した。溶離剤: 8 分間にわたる直線グラジエント 10% ~ 80% MeCN / 0.05% TFA (aq)、ついで、さらに 12 分間のイソクラティック 80% MeCN / 0.05% TFA (aq)。合計 14.4 mg の MB-MMAF 生成物が単離された (0.015 ミリモル, 40% 収率)。ES-MS m/z 930.96 [M+H]⁺; 952.98 [M+Na]⁺; 929.37 [M-H]⁻。

【0773】

実施例 23c-MC-MeVal-Cit-PAB-MMAF (16) の調製

【0774】

【化239】



10

CH₂Cl₂ (80 mL) 中の Fmoc-MeVal-OH (3.03 g, 8.57 ミリモル) および N, N'-ジスクシイミジルカルボネート (3.29 g, 12.86 ミリモル) の室温懸濁液に DIEA (4.48 mL, 25.71 ミリモル) を加えた。この反応混合物を 3.0 時間攪拌して、次いで、分液ロートに注ぎ、そこで、有機混合物を 0.1 M HCl (aq) で抽出した。粗製有機残渣を減圧下で濃縮し、20~100% 酢酸エチル/ヘキサン直線グラジエントを用いるシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーによって生成物を単離した。合計 2.18 g の純粋な Fmoc-MeVal-OSu (4.80 ミリモル, 56% 収率) を回収した。

【0775】

20

DME (13 mL) および THF (6.5 mL) 中の Fmoc-MeVal-OSu (2.18 g, 4.84 ミリモル) の室温懸濁液に、H₂O (13 mL) 中の L-シトルリン (0.85 g, 4.84 ミリモル) および NaHCO₃ (0.41 g, 4.84 ミリモル) の溶液を加えた。懸濁液を室温にて 16 時間攪拌し、次いで、それを tert-BuOH/CHCl₃/H₂O に抽出し、1 M HCl で pH 2~3 に酸性化した。有機相を分離し、乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をジエチルエーテルでトリチュレートし、その結果、2.01 g の Fmoc-MeVal-Cit-COOH が得られ、これをさらに精製することなく用いた。

【0776】

粗製 Fmoc-MeVal-Cit-COOH を 2:1 CH₂Cl₂/MeOH (100 mL) に懸濁し、それに p-アミノベンジルアルコール (0.97 g, 7.9 ミリモル) および EEDQ (1.95 g, 7.9 ミリモル) を加えた。この懸濁液を 125 時間攪拌し、次いで、揮発性有機物を減圧下で除去し、10% MeOH/CH₂Cl₂ を用いるシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーによって残渣を精製した。純粋な Fmoc-MeVal-Cit-PAB-OH (0.55 g, 0.896 ミリモル, 18.5% 収率) を回収した。ES-MS m/z 614.48 [M+H]⁺。

【0777】

CH₂Cl₂ (40 mL) 中の Fmoc-MeVal-Cit-PAB-OH (0.55 g, 0.896 ミリモル) の懸濁液に STRATOSPHEREStm (ピペリジン-樹脂-結合) (>5 ミリモル/g, 150 mg) を加えた。室温で 16 時間攪拌した後、混合物を (MeOH で予め洗浄した) セライトを通して濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をジエチルエーテルおよびヘキサンでトリチュレートした。得られた固体物質 MeVal-Cit-PAB-OH を CH₂Cl₂ (20 mL) に懸濁させ、それに MC-OSu (0.28 g, 0.896 ミリモル)、DIEA (0.17 mL, 0.99 ミリモル)、および DMF (15 mL) を加えた。この懸濁液を 16 時間攪拌したが、反応混合物の HPLC 分析は不完全な反応を示し、そこで、懸濁液を減圧下で 6 mL の容量まで濃縮し、次いで、10% NaHCO₃ (aq) 溶液を加え、懸濁液をさらに 16 時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、0~10% MeOH/CH₂Cl₂ グラジエントを用いるフラッシュカラムクロマトグラフィーによって残渣を精製し、その結果、42 mg (0.072 ミリモル, 8% 収率) の MC-MeVal-Cit-TAB-OH を得た。

50

【0778】

CH₂Cl₂ (10 mL) 中のMC-MeVal-Cit-PAB-OH (2.37 g, 4.04ミリモル) およびビス(ニトロフェニル)カルボネート (2.59 g, 8.52ミリモル) の懸濁液にDIEA (1.06 mL, 6.06ミリモル) を加えた。この懸濁液を5.5時間攪拌し、減圧下で濾過し、ジエチルーテルでのトリチュレーションによって精製した。MC-MeVal-Cit-PAB-OCO-pNP (147 mg, 0.196ミリモル) を1:5 ピリジン/DMF溶液 (3 mL) に懸濁させ、それにHOBt (5 mg, 0.039ミリモル)、DIEA (0.17 mL, 0.978ミリモル) およびMMAF (化合物2, 150 mg, 0.205ミリモル) を加えた。この反応混合物を室温にて16時間攪拌し、次いで、Phenomenex C₁₂ Synergi Max-RP 80 Åカラム (250×21.20 mm) を用いる分取用RP-HPLC (×3) によって精製した。溶離剤: 30分間にわたる直線グラジエント10%~90% MeCN/0.05% TFA (aq)、次いで、さらに20分間のイソクラティック90% MeCN/0.05% TFA (aq)。MC-MeVal-Cit-PAB-MMAF (16) が黄色固体として得られた (24.5 mg, 0.0182, 0.45% 収率)。ES-MS m/z 1344.95 [M+H]⁺; 1366.94; [M+Na]⁺。

10

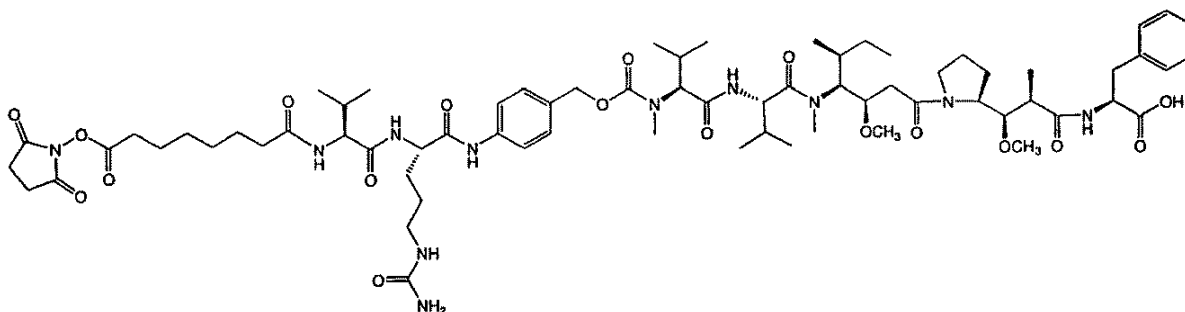
【0779】

実施例23d-スベリル-Val-Cit-PAB-MMAF (17) のスクシンイミドエステルの調製

【0780】

20

【化240】



30

(化合物17)

化合物1 (300 mg, 0.38ミリモル)、Fmoc-Val-Cit-PAB-pNP (436 mg, 0.57ミリモル, 1.5当量) を5 mLの無水ピリジンに懸濁させた。HOBt (10 mg, 0.076ミリモル, 0.2当量) を加え、続いて、DIEA (199 μL, 1.14ミリモル, 3当量) を加えた。反応混合物を10分間音波処理し、次いで、室温にて一晩攪拌した。ピリジンを減圧下で除去し、残渣をCH₂Cl₂に再度懸濁した。混合物を、CH₂Cl₂中の0~10%のMeOHの段階的グラジエントでのシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーによって分離した。生成物を含む画分を引き出し、濃縮し、真空中で一晩乾燥して、317 mg (59% 収率) のFmoc-Val-Cit-PAB-MMAF-OtBuを得た。ES-MS m/z 1415.8 [M+H]⁺。

40

【0781】

Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF-OtBu (100 mg) を20% TFA/CH₂Cl₂ (10 mL) 中で2時間攪拌した。混合物をCH₂Cl₂ (50 mL) で希釈した。有機層を、順次、水 (2×30 mL) およびブライン (1×30 mL) で洗浄した。有機相を濃縮し、10% MeOH/CH₂Cl₂でのシリカゲルのパッドに負荷した。生成物を30% MeOH/CH₂Cl₂で溶出させた。真空中で一晩乾燥した後、Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAFを白色固体として得た。38 mg, 40%。ES-MS m/z 1357.7 [M-H]⁻。

【0782】

50

Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF、67 mg を CH_2Cl_2 (2 mL)、ジエチルアミン (2 mL) および DMF (2 mL) に懸濁させた。混合物を室温にて 2 時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去した。残渣をピリジン (2 mL)、次いで、トルエン (2×5 mL) で共蒸発させ、真空中で乾燥した。Val-Cit-PAB-MMAF が茶色がかった油として得られ、さらに精製することなく用いた。

【0783】

67 mg の Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF から調製した全ての Val-Cit-PAB-MMAF をピリジン (2 mL) に懸濁させ、ピリジン (1 mL) 中のジスクシンイミジルスベレート (74 mg, 0.2 ミリモル, 4 当量) の溶液に加えた。反応混合物を室温にて攪拌した。3 時間後、エーテル (20 mL) を加えた。沈殿を収集し、さらなる量のエーテルで洗浄した。赤味がかった固体を 30% MeOH/ CH_2Cl_2 に懸濁させ、溶離剤として 30% MeOH/ CH_2Cl_2 を用いるシリカゲルのパッドを通して濾過した。化合物 17 が白色固体として得られた: 20 mg (29% 収率)。ES-MS m/z 1388.5 [M-H]⁻。

【0784】

実施例 24 - mc MMAF 抗体-薬物結合体のインビボの効率

Karpas-299 ALC L 異種移植片における cAC10-mc MMAF の効率: 抗体 (cAC10-mc F4) 当たり平均 4 つの薬物部分を持つ cAC10-mc MMAF のインビボ効率を評価するために、Karpas-299 ヒト ALC L 細胞を免疫不全 C. B-17 SCID マウスに皮下移植した (マウス当たり 5×10^6 細胞)。式 ($0.5 \times L \times W^2$) (式中、L および W は 2 つの二方向測定により長い方およびより短い方である) を用いて腫瘍容量を計算した。実験動物における平均腫瘍容量がほぼ 100 mm^3 (範囲 48 ~ 162) に到達すると、マウスを 3 つの群 (群当たり 5 匹のマウス) に分け、未処理のまま放置するか、あるいは 1 または 2 mg/kg の cAC10-mc F4 いずれかの尾静脈を介する単一静脈内注射を与えた (図 1)。未処理マウスにおける腫瘍は療法の開始から 7 日以内に迅速に $> 1,000 \text{ mm}^3$ の平均容量まで成長した。対照的に、cAC10-mc F4 処理腫瘍の全ては、1 mg/kg 群においては 3/5 および完全な腫瘍応答が得られる 2 mg/kg 群においては 5/5 の迅速な退行を示した。2 mg/kg 群における完全な応答体の 1 つにおいて腫瘍はほぼ 4 週間後に再発したが、療法から 10 週間後において、この群における残りの 4/5 応答体、および 1 mg/kg 群での 3 つの完全な応答体においては検出可能な腫瘍はなかった。

【0785】

L2987 NSCLC 異種移植片における cBR96-mc MMAF の効率: cBR96 は Le^y 抗原を認識するキメラ抗体である。抗体 (cBR96-mc F4) 当たり 4 つの薬物を持つ cBR96-mc MMAF のインビボ効率を評価するために、L2987 非-小細胞肺癌 (NSCLC) 腫瘍フラグメントを無胸腺ヌードマウスに移植した。腫瘍が平均してほぼ 100 mm^3 となれば、マウスを 3 つの群: 未処理および 2 つの療法群に分けた。療法では、図 3 a に示すように、マウスに cBR96-mc F4 を 3 または 10 mg/kg/注射にて 4 日ごとに合計 4 回の注射 (q4d x 4) を投与した。図 3 b に示すように、マウスには cBR96-mc F4 または非-結合対象結合体、cAC10-mc F4 を 10 mg/kg/注射にて 4 日ごとに合計 4 回の注射 (q4d x 4) を投与した。図 3 a および 3 b に示すように、BR96-mc F4 は対照と比較して顕著な腫瘍成長の遅延を生じた。

【0786】

図 2 は皮下 L540CY における cAC10-mc MMAF のインビボの単一容量の効率アッセイを示す。この実験では、未処理群では 4 匹のマウス、および処理群の各々では 10 匹のマウスがいた。

【0787】

実施例 25 - MC-MMAF 抗体-薬物結合体のインビトロ効率

CD30⁺ 細胞系に対する cAC10-抗体-薬物結合体の活性。図 4 a および 16 b

は代表的な実験からの用量-応答曲線を示し、そこでは、Karpas 299（退形成大細胞リンパ腫）およびL428（ホジキンリンパ腫）の培養を、系列的に希釈されたcAC10-mcMMAF（図4a）またはcAC10-vcMMAF（図4b）と共に96時間インキュベートした。培養を50 μ Mのレサズリン〔7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オン10-オキサイド〕で4時間標識し、蛍光を測定した。データは、4-パラメータ用量-応答曲線フィット手法を用いてGraphPad Prismバージョン4.00にてデータを換算した。IC₅₀値は、未処理対照培養と比較して増殖が50%低下した濃度と定義される。各濃度は四連でテストした。

【0788】

Le^y+細胞系に対するcBR96-抗体-薬物結合体の活性。図5aおよび5bは代表的な実験からの用量-応答曲線を示し、そこでは、H3396（乳房癌腫）およびL2987（非小細胞肺癌腫9）の培養を、系列的に希釈されたcBR96-mcMMAF（図5a）または-vcMMAF（図5b）と共に96時間インキュベートした。培養を50 μ Mレサズリンで4時間標識し、蛍光を測定した。4-パラメータ用量-応答曲線フィット手法を用い、GraphPad Prismバージョン4.00にてデータを換算した。IC₅₀値は、未処理対照培養と比較して増殖が50%低下した濃度と定義される。各濃度は四連でテストする。

【0789】

CD70+腎臓細胞癌種細胞系に対するc1F6-抗体-薬物結合体の活性。図6aおよび6bは代表的な実験からの用量-応答曲線を示し、そこではCaki-1および786-O細胞の培養を、系列的に希釈されたc1F6-mcMMAF（図6a）または-vcMMAF（図6b）と共に96時間インキュベートした。培養を50 μ Mレサズリンで4時間標識し、蛍光を測定した。4-パラメータ用量-応答曲線フィット手法を用い、GraphPad Prismバージョン4.00にてデータを換算した。IC₅₀値は、未処理対照培養と比較して増殖が50%低下する濃度と定義される。各濃度は四連でテストされる。

【0790】

実施例26-トラスツマブの精製

440mgのHERCEPTIN（登録商標）（huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, 米国特許第5821337号）抗体を含有する1つのバイアルを50mL MES緩衝液（25mM MES, 50mM NaCl, pH5.6）に溶解させ、同一緩衝液で平衡化してあるカチオン交換カラム（Sephacrose S. 15cm×1.7cm）に負荷した。次いで、カラムを同一緩衝液（5カラム容量）で洗浄した。トラスツマブを、緩衝液のNaCl濃度を200mMまで上昇させることによって溶出させた。抗体を含有する画分をプールし、10mg/mLまで希釈し、50mMリン酸カリウム、50mM NaCl、2mM EDTA、pH6.5を含有する緩衝液に透析した。

【0791】

実施例27-トラスツマブおよびMC-MMAEの結合体化によるトラスツマブ-MC-MMAEの調製

pH8.0の500mMホウ酸ナトリウムおよび500mM塩化ナトリウムに溶解させたトラスツマブを過剰の100mMジチオスレイトール（DTT）で処理する。37℃での約30分間のインキュベーションの後、緩衝液をSephadex G25樹脂上での溶出によって交換し、1mM DTPAを含むPBSで溶出させる。溶液の280nmにおける吸光度からの還元抗体濃度およびDTNB（Aldrich, Milwaukee, WI）との反応によるチオール濃度を測定し、および412nmにおける吸光度を測定することによって、チオール/A_b値をチェックする。PBSに溶解させた還元抗体を氷上で冷却する。

【0792】

DMSOに溶解させた薬物リンカー試薬、マレイミドカプロイルモノメチルオーリスチンE（MMAE）、すなわち、MC-MMAEを既知の濃度にてアセトニトリルおよ

10

20

30

40

50

び水に溶解させ、PBS中の冷却された還元抗体トラスツズマブに加える。約1時間後、過剰のマレイミドを加えて、反応をクエンチし、いずれの未反応抗体チオール基もキャップする。反応混合物を遠心限外濾過によって濃縮し、PBS中のG25樹脂を通す溶出によってトラスツズマブ-MC-MMAEを精製し、脱塩し、滅菌条件下で0.2 μmフィルターを通して濾過し、貯蔵のために凍結させる。

【0793】

実施例28-トラスツズマブおよびMC-MMAFの結合体化によるトラスツズマブ-MC-MMAFの調製

実施例27の手法に従い、トラスツズマブおよびMC-MMAFの結合体化によってトラスツズマブ-MC-MMAFを調製した。

10

【0794】

実施例29-トラスツズマブおよびMC-val-cit-PAB-MMAEの結合体化によるトラスツズマブ-MC-val-cit-PAB-MMAEの調製

実施例27の手法に従い、トラスツズマブおよびMC-val-cit-PAB-MMAEの結合体化によって、トラスツズマブ-MC-val-cit-PAB-MMAEを調製した。

【0795】

実施例30-トラスツズマブおよびMC-val-cit-PAB-MMAF9の結合体化によるトラスツズマブ-MC-val-cit-PAB-MMAFの調製

実施例27の手法に従い、トラスツズマブおよびMC-val-cit-PAB-MMAF9の結合体化によってトラスツズマブ-MC-val-cit-PAB-MMAFを調製した。

20

【0796】

実施例31-ラット毒性

遊離薬物およびADCの急性毒性プロファイルを、青年Sprague-Dawleyラット（各々75～125 gm, Charles River Laboratories (Hollister, CA)）で評価した。動物に日1に注射し、ベースライン、日3および日5において完全な化学および血液学的プロファイルが得られ、日5において完全な剖検が行われた。肝臓酵素測定を全ての動物について行い、以下の組織：胸骨、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、大および小腸につき各群に対して3つのランダムな動物でルーチンの組織学を行った。実験群は以下の通りであった：

30

【0797】

【化241】

群	投与	mg/kg	μg MMAF/ m ²	MMAF/ Mab	N/性別
1	賦形剤	0	0	0	2/F
2	トラスツズマブ -MC-val-cit-MMAF	9.94	840	4.2	6/F
3	トラスツズマブ -MC-val-cit-MMAF	24.90	2105	4.2	6/F
4	トラスツズマブ -MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF	10.69	840	3.9	6/F
5	トラスツズマブ -MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF	26.78	2105	3.9	6/F
6	トラスツズマブ -MC-MMAF	10.17	840	4.1	6/F
7	トラスツズマブ -MC-MMAF	25.50	2105	4.1	6/F
8	トラスツズマブ -MC-val-cit-PAB-MMAF	21.85	2105	4.8	6/F

40

50

トラスツズマブ-MC-val-cit-MMAF、トラスツズマブ-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF、トラスツズマブ-MC-MMAFおよびトラスツズマブ-MC-val-cit-PAB-MMAFについて、MMAFのMWとして731.5およびヘルセプチンのMWとして145167を用いて μg のMMAF/ m^2 を計算した。

【0798】

体表面積を以下のようにして計算した： $[\{(\text{グラムで表した体重の} 0.667 \text{ 乗}) \times 11.8\} / 10000]$ (Guidance for Industry and Reviewers, 2002)。

【0799】

10 mL/kgの用量容量にて、実験日1に、単一静脈内ボラス尾-静脈注射によって用量溶液を投与した。動物の体重を実験日1の投与後に、およびその後毎日動物の体重を測定した。血液学的分析のために、EDTAを含有する試験管に全血を収集した。臨床化学分析のために、全血を血清セパレーター試験管に収集した。血液試料を実験日4、実験日3、および実験日5に投与後に収集した。全血を剖検時にヘパリンナトリウムを含有する試験管にも収集し、可能な後の分析のために血漿を -70°C で凍結した。以下の組織を収集し、剖検時に中性緩衝化ホルマリンに入れた：肝臓、腎臓、心臓、胸腺、脾臓、脳、胸骨、および胃、大腸および小腸を含めたGI管の切片。胸骨、小腸、大腸、肝臓、胸腺、脾臓及び腎臓を調べた。

【0800】

各時点における肝臓関連血清酵素レベルを正常な雌Sprague-Dawleyラットからの範囲（第5～95番目100分位数）と比較した。各時点における白血球細胞および血小板カウントを正常な雌Sprague-Dawleyラットからの範囲（5番目および95番目100分位数）と比較した。

【0801】

正常な雌Sprague-Dawleyラットにおける高用量実験：

群1：賦形剤

群2：トラスツズマブ-MC-MMAF, 52.24 mg/kg, 4210 $\mu\text{g}/\text{m}^2$

群3：トラスツズマブ-MC-MMAF, 68.25 mg/kg, 5500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$

群4：トラスツズマブ-MC-MMAF, 86.00 mg/kg, 6930 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 。

【0802】

11匹の動物からの組織をルーチンの組織学のために提出した。これらの動物は、トラスツズマブ-MC-MMAF免疫結合体を用いる急性用量-範囲毒性実験の一部であった。動物は投与後12日間追跡した。

【0803】

実施例32-マカクザル毒性/安全性

4匹の（2雄，2雌）ナイーブなMacaca fascicularis（マカクザツ）の3つの群を、トラスツズマブ-MC-val-PAB-MMAEおよびトラスツズマブ-MC-val-PAB-MMAFにつき実験した。静脈内投与は実験の日1および22に行った。

【0804】

【化 2 4 2】

試料	群	用量
賦形剤	1	日 1
	1M/1F	日 22
H-MC-vc-PAB-MMAE	2	日 1 において $180 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (0.5 mg/kg)
	2M/2F	日 2 2 において $1100 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (3.0 mg/kg)
H-MC-vc-PAB-MMAE	3	日 8 において $550 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (1.5 mg/kg)
	2M/2F	日 2 9 において $550 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (1.5 mg/kg)
H-MC-vc-PAB-MMAE	4	日 1 5 において $880 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (2.5 mg/kg)
	2M/2F	日 3 6 において $880 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (2.5 mg/kg)

10

試料	群	用量
賦形剤	1	日 1
	1M/1F	日 22
H-MC-vc-PAB-MMAF	2	日 1 において $180 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (0.5 mg/kg)
	2M/2F	日 2 2 において $1100 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (3.0 mg/kg)

20

【0 8 0 5】

【化 2 4 3】

H-MC-vc-PAB-MMAF	3	日 1 において $550 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (1.5 mg/kg)
	2M/2F	日 2 2 において $550 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (1.5 mg/kg)
H-MC-vc-PAB-MMAF	4	日 1 において $880 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (2.5 mg/kg)
	2M/2F	日 2 2 において $880 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (2.5 mg/kg)

30

H = トラスツズマブ。

【0 8 0 6】

投与は他の種に関連するように動物の表面積で表し、すなわち、 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ における用量は種から独立しており、かくして、種の間で比較可能であるADCの処方PBS、5.4 mMリン酸ナトリウム、4.2 mMリン酸カリウム、140 mM塩化ナトリウム、pH 6.5を含有した。

【0 8 0 7】

各投与後5分、6時間、10時間、および1、3、5、7、14、21日に、血液学分析プレ用量のために血液を収集した。赤血球(RBC)および血小板(PLT)カウントは光散乱方法によって測定した。白血球(WBC)カウントはベルオキシダーゼ/高塩基球方法によって測定した。網状赤血球カウントはカチオン性色素での光散乱方法によって測定した。細胞カウントはAdvia 120装置で測定した。ALT(アラニンアミノトランスフェラーゼ)およびAST(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)はOlympus AU400装置にて、Total Ab ELISA-ECD/Gxhufc-HRP. Conj. Ab ELISA-MMAE/MMAF/ECD-Bio/SA-HRPテストを用いて、UV/NADH; IFCC方法によってU/Lで測定した。

40

【0 8 0 8】

50

実施例 33-抗-ErbB2モノクローナル抗体4D5の生産、特徴付けおよびヒト化
ErbB2の細胞外ドメインに特異的に結合するネズミモノクローナル抗体4D5はFendly et al. (1990) Cancer Research 50:1550-1558に記載したように生産した。簡単に述べれば、Hudziak et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84:7158-7163 (1987)に記載したように生産されたNIH 3T3/HER2-3400細胞(ほぼ 1×10^5 のErbB2分子/細胞を発現)を、25mM EDTAを含有するリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で収穫し、これを用いてBALB/cマウスを免疫化した。週0、2、5および7に、0.5mLのPBS中の 10^7 細胞の腹腔内注射をマウスに与えた。 ^{32}P -標識ErbB2を免疫沈澱させた抗血清を持つマウスに、週9および13に、小麦胚アグルチニン-Sepharose(WGA)で精製ErbB2膜抽出物の腹腔内注射を与えた。これに続いて、0.1mLのErbB2調製物の静脈内注射を与え、脾臓細胞をマウス骨髄腫系X63-Ag8.653と融合させた。ハイブリドーマ上清を、ELISAおよびラジオ免疫沈澱によってErbB2-結合につきスクリーニングした。
【0809】

エピトープマッピングおよび特徴付け

モノクローナル抗体4D5が結合したErbB2エピトープは競合結合分析によって測定した(Fendly et al. Cancer Research 50:1550-1558 (1990))。PANDEXTM Screen Machineを用い、交差ブロッキング実験を直接的蛍光によって無傷細胞に対して行って、蛍光を定量した。確立された手法を用い、モノクローナル抗体はフルオレセインイソチオシアネート(FITC)で結合体した(Wofsy et al. Selected Methods in Cellular Immunology, p. 287, Mishel and Schiigi (編) San Francisco: W. J. Freeman Co. (1980))。NIH 3T3/HER2-3400細胞の密集単層をトリプシン処理し、1回洗浄し、0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)および0.1%NaN₃を含有する冷PBSに 1.75×10^6 細胞/mLで再度懸濁した。最終濃度の1%ラテックス(IDC, Portland, OR)を加えて、PANDEXTMプレート膜の閉鎖を低下させた。懸濁液中の細胞、20 μL 、および20 μL の精製されたモノクローナル抗体(100 $\mu\text{g/mL}$ ~0.1 $\mu\text{g/mL}$)をPANDEXTMプレートウェルに加え、氷上で30分間インキュベートした。20 μL 中のFITC-標識モノクローナル抗体の所定の希釈を各ウェルに加え、30分間インキュベートし、洗浄し、PANDEXTMによって蛍光を定量した。モノクローナル抗体は、もし各々が無関係なモノクローナル抗体で対照と比較して50%以上だけ他の結合をブロックしたならば、エピトープを共有すると考えられた。この実験においては、モノクローナル抗体4D5にはエピトープIが割り当てられた(約529~約625のアミノ酸残基, ErbB2細胞外ドメイン内で包括的)。

【0810】

乳癌細胞系SK-BR-3を用いて、モノクローナル抗体4D5の増殖阻害特徴を評価した(Hudziak et al. (1989) Molec. Cell. Biol. 9(3):1165-1172参照)。簡単に述べれば、0.25%(vol/vol)トリプシンを用いることによってSK-BR-3細胞を脱着させ、mL当たり 4×10^5 細胞の密度にて完全な培地に懸濁させた。100 μL のアリコット(4×10^4 細胞)を96-ウェルマイクロ希釈プレートに平板培養し、細胞を接着させ、次いで、100 μL の培地単独、またはモノクローナル抗体(最終濃度5 $\mu\text{g/mL}$)を含有する培地を加えた。72時間後、プレートをPBS(pH7.5)で2回洗浄し、クリスタルバイオレット(メタノール中0.5%)で染色し、Sugarman et al. (1985) Science 230:943-945に記載されたように相対的細胞増殖につき分析した。モノクローナル抗体4D5は約56%だけSK-BR-3相対的細胞増殖を阻害した。

【0811】

また、MCF7細胞の全細胞溶解物からの M_r 180,000範囲のタンパク質のHRG-刺激チロシンリン酸化を阻害するその能力につきモノクローナル抗体4D5を評価した(Lewis et al. (1996) Cancer Research 56: 1457-1465)。MCF7細胞は相対的に低いレベルにおけるを除き、全ての公知のErbBレセプターを発現すると報告されている。ErbB2、ErbB3、およびErbB4はほとんど同一の分子サイズを有するので、全細胞溶解物をウェスタンブロット分析によって評価する場合、いずれのタンパク質がチロシンリン酸化されるようになるかを区別するのは可能ではない。しかしながら、これらの細胞はHRGチロシンリン酸化アッセイで理想的である。なぜならば、用いるアッセイ条件下では、外因的に加えられたHRGの不存在下では、それらは M_r 180,000の範囲において低レベル〜検出できないレベルのチロシンリン酸化タンパク質を呈するからである。

10

【0812】

MCF7細胞を24-ウェルプレートで平板培養し、ErbB2に対するモノクローナル抗体を各ウェルに加え、室温にて30分間インキュベートし；次いで、rHRG β 1₇₇₋₂₄₄を最終濃度0.2nMまで各ウェルに加え、インキュベーションを8分間継続した。培地を各ウェルから注意深く吸引し、100 μ LのSDS試料緩衝液(5%SDS, 25mM DTT、および25mM トリス-HCl, pH6.8)を加えることによって反応を停止させた。各試料(25 μ L)を4~12%グラジエントゲル(Novex)で電気泳動に付し、次いで、ニフッ化ポリビニリデン膜に電気泳動により移した。抗ホスチロシン(4G10, UBIから、1 μ g/mLで使用)免疫ブロットを発色させ、 M_r 180,000における圧倒的な反応性バンドの強度を従前に記載されているように反射率デンストメトリーによって定量した(Holmes et al. (1992) Science 256: 1205-1210; Sliwkowski et al. J. Biol. Chem. 269: 14661-14665 (1994))。

20

【0813】

モノクローナル抗体4D5は M_r 180,000においてHRG-誘導チロシンリン酸化シグナルの発生を阻害した。しかしながら、HRGの不存在下では、 M_r 180,000範囲ではタンパク質のチロシンリン酸化を刺激することができなかった。また、この抗体はEGFR(Fendly et al. Cancer Research 50: 1550-1558 (1990))、ErbB3、またはErbB4と交差反応しない。モノクローナル抗体4D5は50%だけチロシンリン酸化のHRG刺激をブロックできた。

30

【0814】

外因性rHRG β 1の存在下または不存在下におけるMDA-MB-175およびSK-BR-3細胞に対するモノクローナル抗体4D5の増殖阻害活性を評価した(Schaefer et al. Oncogene 15: 1385-1394 (1997))。MDA-MB-175細胞におけるErbB2レベルは正常な乳房上皮細胞で見出されたレベルよりも4~6倍高く、ErbB2-ErbB4レセプターはMDA-MB-175細胞において構成的にチロシンリン酸化される。モノクローナル抗体4D5は、外因性HRGの存在下および不存在下双方において、MDA-MB-175細胞の細胞増殖を阻害できなかった。4D5による細胞増殖の阻害はErbB2発現レベルに依存する(Lewis et al. Cancer Immunol. Immunother. 37: 255-263 (1993))。SK-BR-3細胞における66%の最大阻害は検出できた。しかしながら、この効果は外因性HRGによって克服できた。

40

【0815】

ここに引用してその全開示を援用する米国特許第5821337号に記載されているように、「遺伝子変換突然変異誘発」戦略を用い、ネズミモノクローナル抗体4D5をヒト化した。以下の実験で用いるヒト化モノクローナル抗体4D5はhuMAb4D5-8と命名する。この抗体はAgG1イソタイプのものである。

【0816】

引用した文献

50

本発明は、その範囲が、本発明の少数の態様の説明を意図する実施例に開示された特別な実施形態によって限定されず、機能的に同等であるいずれの実施形態も本発明の範囲内のものである。事実、示され、本明細書中に記載されたものに加えて本発明の種々の変形は当業者に明らかとなり、かつ添付の請求の範囲の範囲内に入ることを意図する。

【0817】

本明細書中で引用した全ての文献は、あたかも各個々の刊行物または特許または特許出願が全ての目的で引用によるその全体が特異的にかつ個々に取り込まれることが指令されるように、同一程度まで全ての目的で、引用によりその全体が援用される。

【図面の簡単な説明】

【0818】

【図1】図1は、皮下Karpas-299 ALCL異種移植片におけるcAC10-mcMMAFのインビボの、単一用量の効率アッセイを示す。

【図2】図2は、皮下L540cyにおけるcAC10-mcMMAFのインビボの、単一用量の効率アッセイを示す。この実験では、未処理群では4匹のマウス、処理群の各々では10匹のマウスがいた。

【図3A】図3aおよび3bは、皮下L2987におけるcBR96-mcMMAFのインビボ効率を示す。図3aにおけるファイルした三角形および図3bにおける矢印は療法の日数を示す。

【図3B】図3aおよび3bは、皮下L2987におけるcBR96-mcMMAFのインビボ効率を示す。図3aにおけるファイルした三角形および図3bにおける矢印は療法の日数を示す。

【図4】図4aおよび4bは、CD30⁺細胞系に対するcAC10-抗体-薬物結合体のインビトロ活性を示す。

【図5】図5aおよび5bは、Le^y⁺細胞系に対するcBR96-抗体-薬物結合体のインビトロ活性を示す。

【図6】図6aおよび6bは、CD70⁺腎臓細胞癌腫細胞系に対するc1F6-抗体-薬物結合体のインビトロ活性を示す。

【図7】図7は、抗体薬物結合体(ADC)で処理したSK-BR-3細胞でのインビトロでの細胞増殖アッセイを示す：相対的蛍光単位(RLU)-対-ADC μg/mL濃度で測定した、-黒丸-トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAF, 3.8 MMAF / Ab, -白丸-トラスツズマブ-MC-MMAF, 4.1 MMAF / Ab、および-白三角-トラスツズマブ-MC-MMAF, 4.8 MMAF / Ab。H=Hがシステイン[cys]を介して連結されたトラスツズマブ。

【図8】図8は、ADCで処理されたBT-474細胞でのインビトロでの細胞増殖アッセイを示す：-黒丸-トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAF, 3.8 MMAF / Ab, -白丸-トラスツズマブ-MC-MMAF, 4.1 MMAF / Ab、および-白三角-トラスツズマブ-MC-MMAF, 4.8 MMAF / Ab。

【図9】図9は、ADCで処理されたMCF-7細胞でのインビトロでの細胞増殖アッセイを示す：-黒丸-トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAF, 3.8 MMAF / Ab, -白丸-トラスツズマブ-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3.9 MMAF / Ab、および-白丸-トラスツズマブ-MC-MMAF, 4.1 MMAF / Ab。

【図10】図10は、ADCで処理されたMDA-MB-468細胞でのインビトロでの細胞増殖アッセイを示す：-黒丸-トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAE, 4.1 MMAE / Ab, -白丸-トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAE, 3.3 MMAE / Ab、および-白丸-トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAF, 3.7 MMAF / Ab。

【図11】図11は、H-MC-vc-PAB-MMAF-TEGおよびH-MC-vc-PAB-MMAFのSprague-Dawleyラットへの投与の後における血漿濃度クリアランス実験を示す。投与された用量はラットのkg当たり2mgのADCであっ

10

20

30

40

50

た。全抗体およびADCの濃度は経時的に測定した（H＝トラスツズマブ）。

【図12】図12は、異なる用量：日1および日21に投与された0.5、1.5、2.5および3.0mg/kgにおけるH-MC-vc-MMAEのマカクザルへの投与の後における血漿濃度クリアランス実験を示す。全抗体およびADCの濃度は経時的に測定した（H＝トラスツズマブ）。

【図13】図13は、賦形剤、トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAE（1250μg/m²）およびトラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAF（555μg/m²）を日0に投与したMMTV-HER2 F05乳癌同種異系移植片を持つ無胸腺ヌードマウスにおける経時的な平均腫瘍容量を示す（H＝トラスツズマブ）。

【図14】図14は、10mg/kg（660μg/m²）のトラスツズマブ-MC-MMAEおよび1250μg/m²のトラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAEを日0に投与したMMTV-HER2 F05乳癌同種異系片を持つ無胸腺ヌードマウスにおける経時的な平均腫瘍容量を示す。

【図15】図15は、賦形剤および650μg/m²トラスツズマブ-MC-MMAFを日0に投与したMMTV-HER2 F05乳癌同種異系片を持つ無胸腺ヌードマウスにおける経時的な平均腫瘍容量を示す。

【図16】図16は、賦形剤および350μg/m²の4つのトラスツズマブ-MC-MMAF結合体を日0に投与したMMTV-HER2 F05乳癌同種異系片を持つ無胸腺ヌードマウスにおける経時的な平均腫瘍容量を示し、ここで、MMAF/トラスツズマブ（H）比率は2、4、5.9および6である。

【図17】図17は、賦形剤、トラスツズマブ-MC-val-cit-MMAF、トラスツズマブ-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF、トラスツズマブ-MC-MMAFおよびトラスツズマブ-MC-val-cit-PAB-MMAFの投与後の動物（ラット）体重（平均±SD）における誤差バー付の群平均変化を示す。

【図18】図18は、9.94mg/kgのH-MC-vc-MMAF、24.90mg/kgのH-MC-vc-MMAF、10.69mg/kgのH-MC(Me)-vc-PAB-MMAF、26.78mg/kgのH-MC(Me)-vc-PAB-MMAF、10.17mg/kgのH-MC-MMAF、25.50mg/kgのH-MC-MMAF、および21.85mg/kgのH-MC-vc-PAB-MMAFの投与後の動物（ラット）体重（平均±SD）における群平均変化を示す。H＝トラスツズマブ。MCリンカーは各結合体につきトラスツズマブのシステインを介して付着される。

【図19】図19は、2105、3158および4210μg/m²の用量でのトラスツズマブ（H）-MC-MMAFの投与後のSprague Dawleyラット体重（平均±SD）における誤差バー付の群平均変化を示す。MCリンカーは各結合体につきトラスツズマブのシステインを介して付着される。

10

20

30

【図 1】

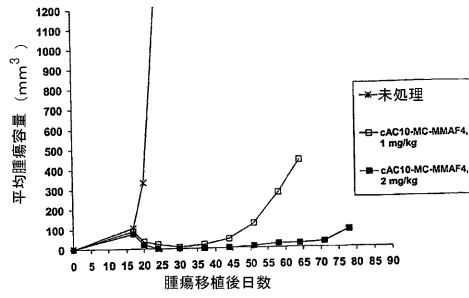


FIGURE 1

【図 3 A】

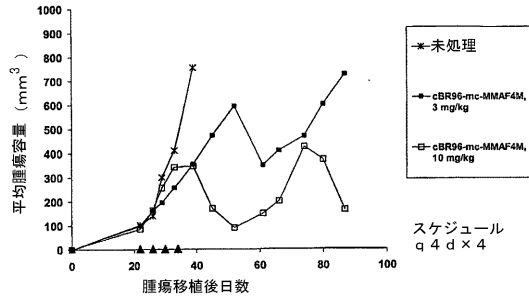


FIGURE 3a

【図 2】

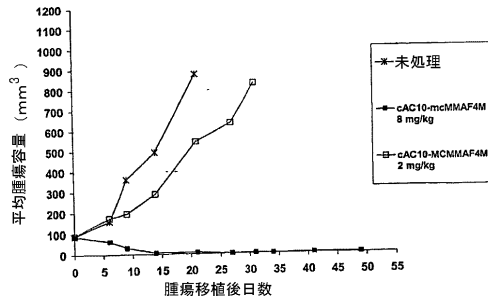
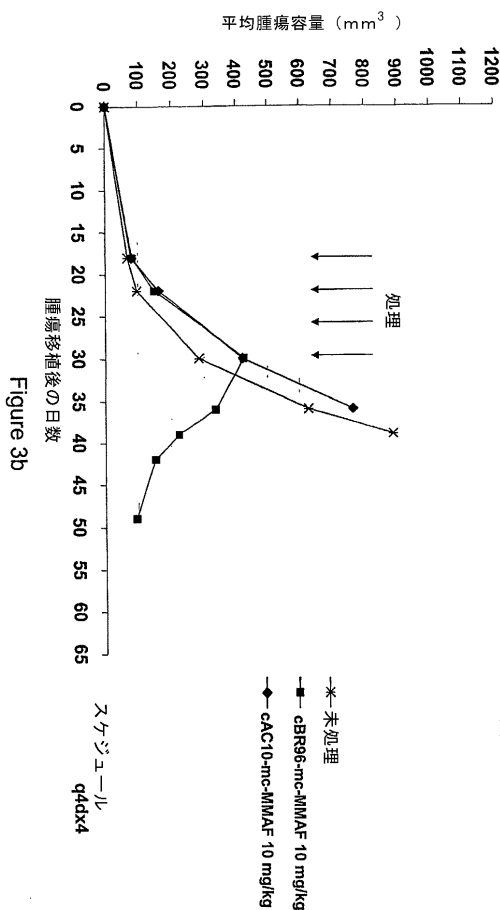


FIGURE 2

【図 3 B】



L2987-AO1

【図 4】

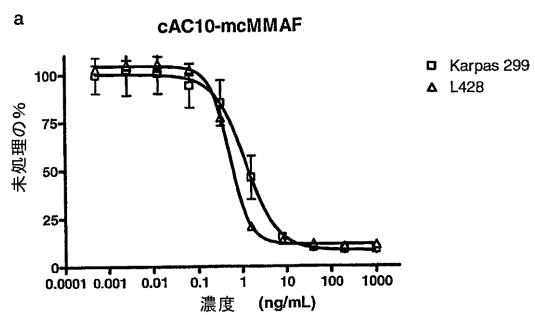


FIGURE 4a

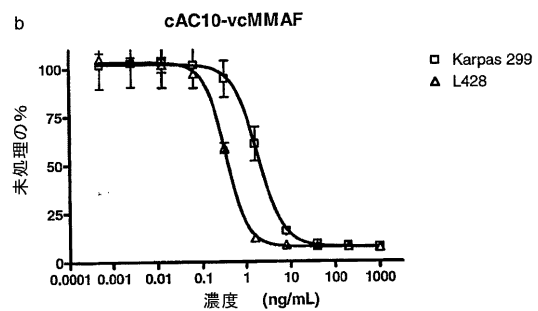


FIGURE 4b

【図 5】

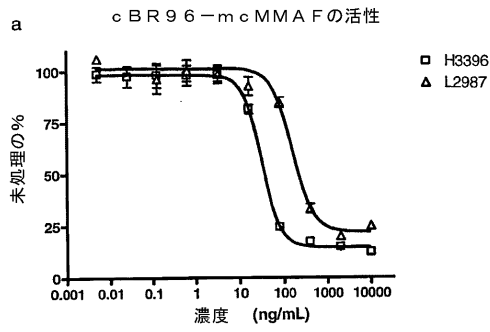


FIGURE 5a

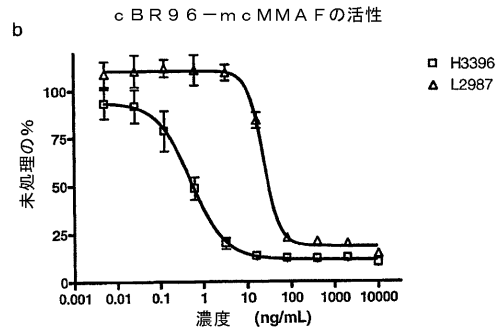


FIGURE 5b

【図 6】

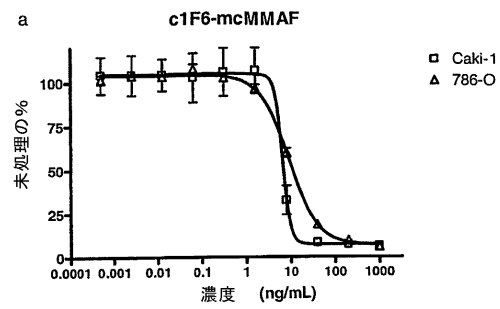


FIGURE 6a

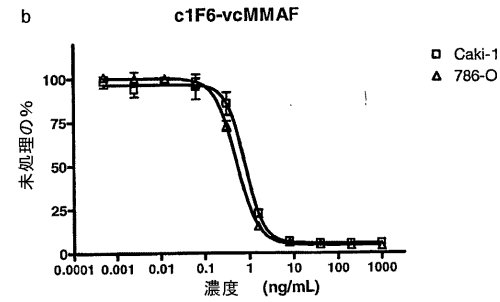


FIGURE 6b

【図 7】

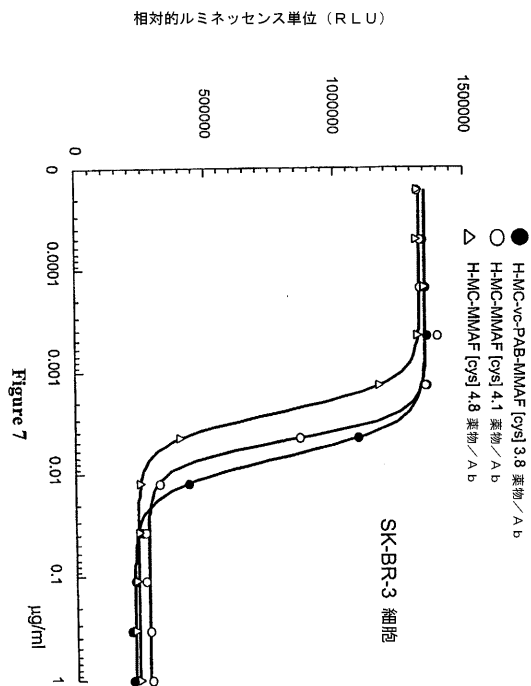


Figure 7

【図 8】

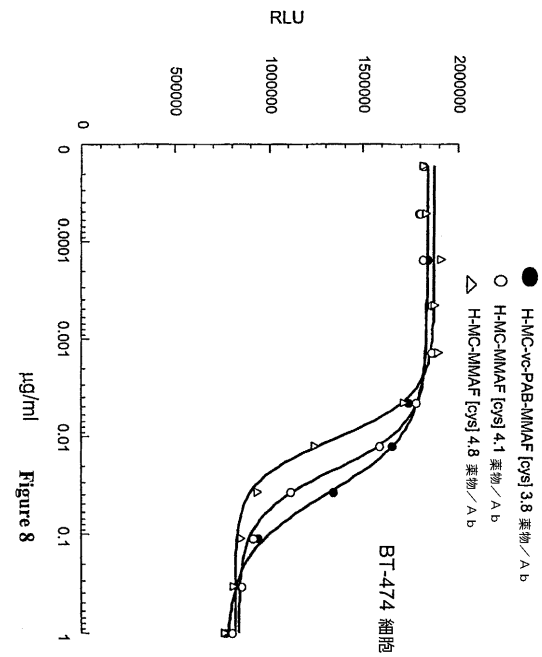


Figure 8

【図 10】

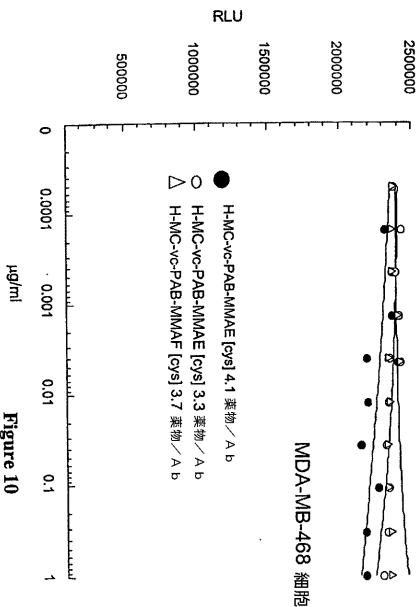


Figure 10

【図 9】

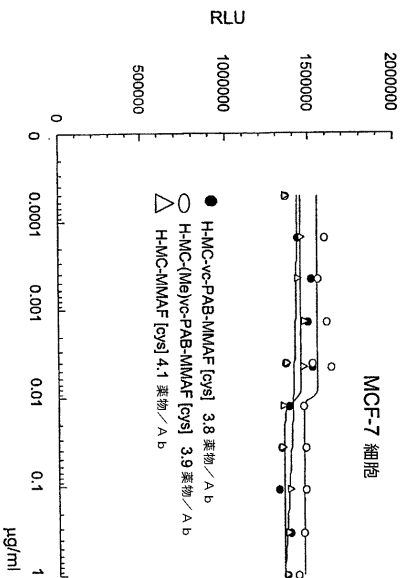


Figure 9

【図 12】

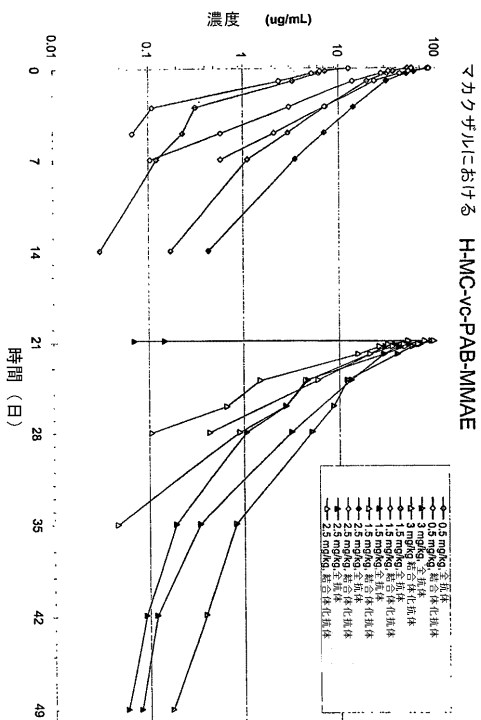


Figure 12

【図 11】

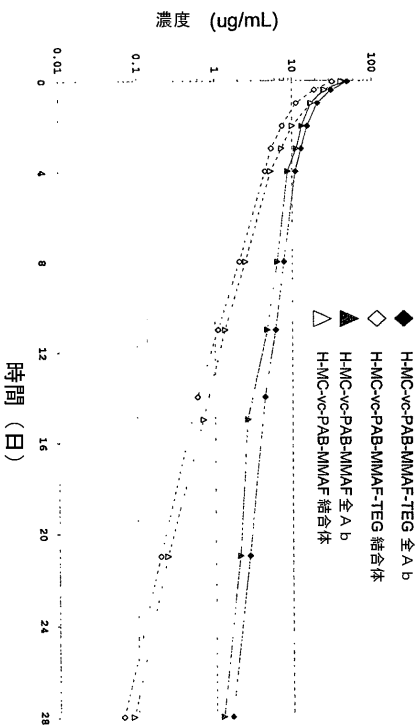
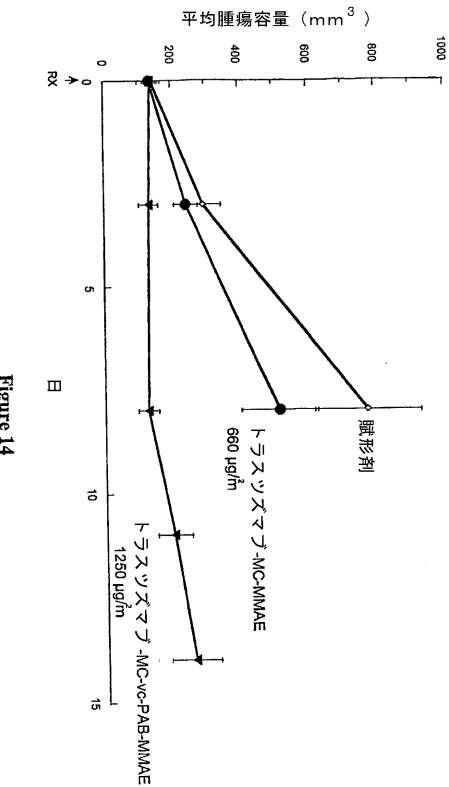
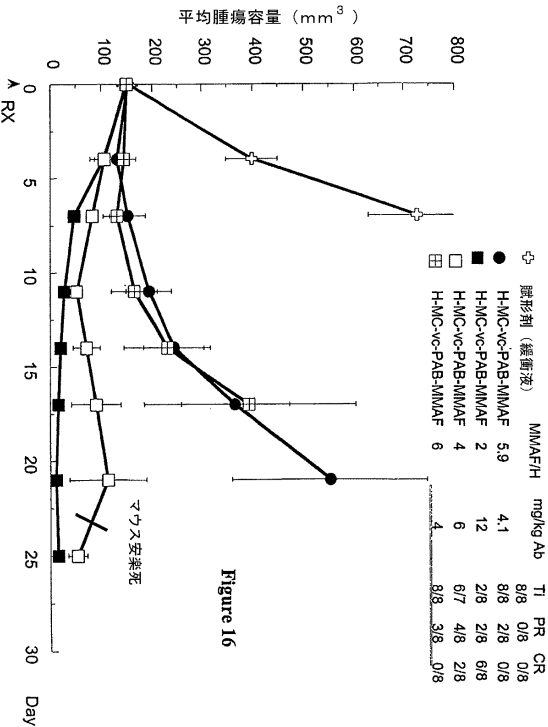


Figure 11

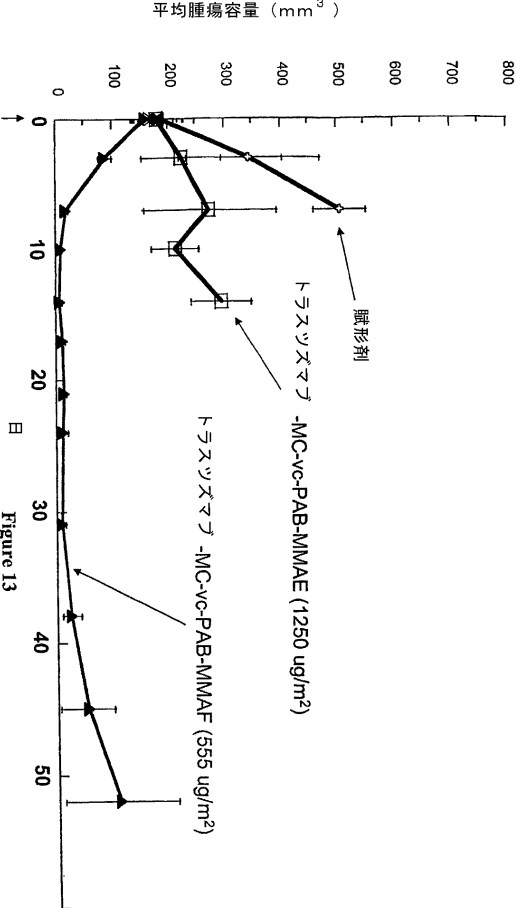
【図 14】



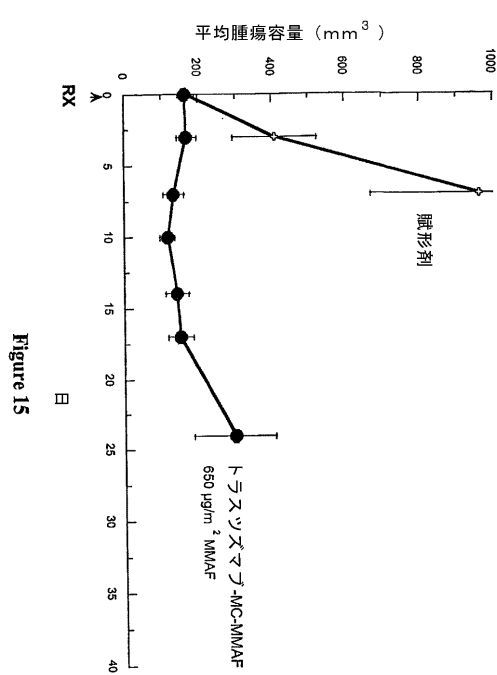
【図 16】



【図 13】



【図 15】



【図 18】

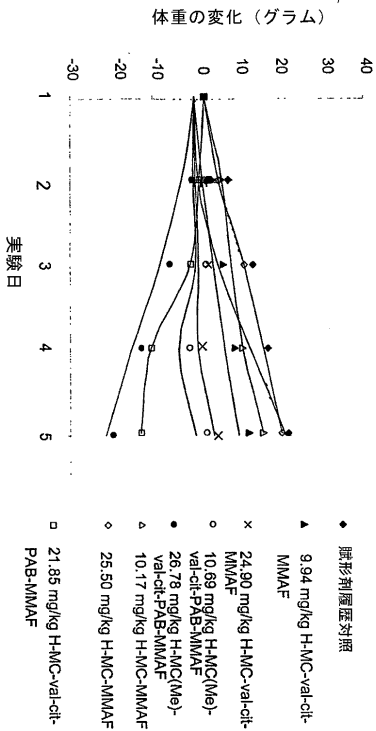


Figure 18

【図 17】

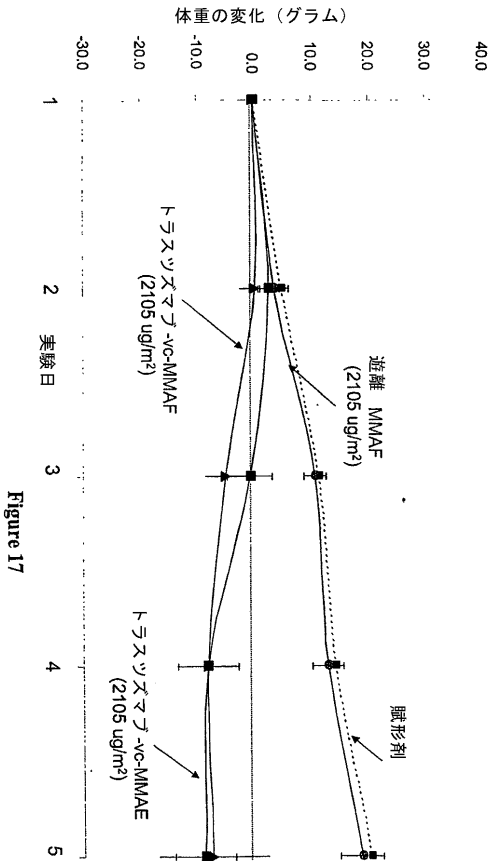


Figure 17

【図 19】

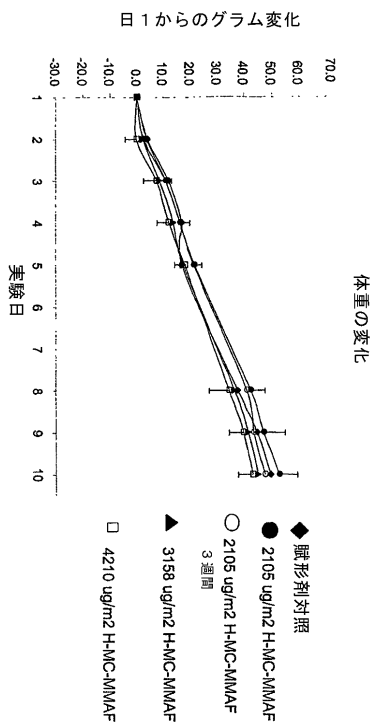


Figure 19

【配列表】

0005020636000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Q
C 0 7 K 5/065 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
	A 6 1 K 45/00	
	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 37/06	
	A 6 1 P 31/00	
	C 0 7 K 5/065	
	C 0 7 K 16/18	

(31)優先権主張番号 60/598,899

(32)優先日 平成16年8月4日(2004.8.4)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/622,455

(32)優先日 平成16年10月27日(2004.10.27)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ドロニナ, スヴェトラナ オー.

アメリカ合衆国 ワシントン 98296, スノーホームシュ, 198ティーエイチ プレイ
ス エス. イー. 10910

(72)発明者 センター, ピーター ディー.

アメリカ合衆国 ワシントン 98115, シアトル, 40ティーエイチ アベニュー エヌ
. イー. 9000

(72)発明者 トキ, ブライアン イー.

アメリカ合衆国 ワシントン 98155, ショアライン, 27ティーエイチ アベニュー
エヌイー 15841

(72)発明者 エベンス, アレン ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, アロヨ アベニュー 19
32

(72)発明者 クライン, トニ ベス

アメリカ合衆国 ワシントン 98119, シアトル, 6ティーエイチ アベニュー ウェス
ト 3629

(72)発明者 ポラキス, ポール

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリンゲーム, コーテズ アベニュー 1
449

(72)発明者 スリウコウスキー, マーク エックス.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, オーク クリーク レーン
42

(72)発明者 スペンサー, スーザン ディー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94920, ティブロン, パラダイス ドライブ 239
5

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 国際公開第01/018032 (WO, A1)

国際公開第95/009864 (WO, A1)

国際公開第2004/073656 (WO, A1)

国際公開第2004/010957 (WO, A1)

国際公開第03/043583 (WO, A1)

特開平08-059693 (JP, A)

FENNELL, B.J. et al., "Effects of the antimitotic natural product dolastatin 10, and related peptides, on the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*.", J. ANTIMICROB. CHEMOTHER., 2003年 4月, Vol.51, No.4, P.833-841

FRANCISCO, J.A. et al., "cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-, monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity.", BLOOD, 2003年 8月15日, Vol.102, No.4, P.1458-1465

DORONINA, S.O. et al., "Development of potent monoclonal antibody-auristatin conjugates for cancer therapy.", NATURE BIOTECH., 2003年 7月, Vol.21, No.7, P.778-784

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00

CA/REGISTRY(STN)

PubMed

WPI