(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2022-527449
(P2022-527449A)
(43)公表日　令和4年6月2日(2022.6.2)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*47/54 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/54		４Ｃ０７６
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ	*31/5517(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/5517		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*31/5513(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/5513		４Ｈ０４５

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全175頁）　最終頁に続く

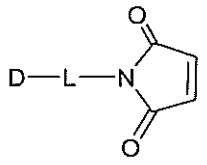
(21)出願番号　特願2021-556729(P2021-556729)
(86)(22)出願日　令和2年3月20日(2020.3.20)
(85)翻訳文提出日　令和3年11月19日(2021.11.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/023897
(87)国際公開番号　WO2020/191306
(87)国際公開日　令和2年9月24日(2020.9.24)
(31)優先権主張番号　62/856,942
(32)優先日　令和1年6月4日(2019.6.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/821,707
(32)優先日　平成31年3月21日(2019.3.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　504039155
イミュノジェン・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４５１，ウォルサム，ウィンター・ストリート　８３０
(74)代理人　100118902
弁理士　山本 修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前 徹
(74)代理人　100196508
弁理士　松尾 淳一
(74)代理人　100187540
弁理士　國枝 由紀子
(72)発明者　ヒルダブランド，スコット・エイ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細胞結合剤－薬物複合体の調製方法

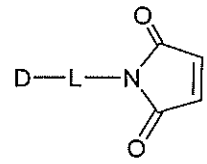
(57)【要約】
本発明は、細胞毒性剤と共有結合された、１つ以上の不対システイン残基を有する細胞結合剤（ＣｙｓＣＢＡ）を含む細胞結合剤－細胞毒性剤複合体を調製する方法を提供する。また、本明細書に記載の方法によって調製される複合体、ならびにその医薬組成物及び使用方法も提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞毒性剤と共有結合された、１つ以上の不対システイン残基を有する細胞結合剤（ＣｙｓＣＢＡ）を含む細胞結合剤－細胞毒性剤複合体を調製する方法であって、
（ａ）キャッピング剤でキャップされた１つ以上の不対システイン残基を有するキャップされた細胞結合剤（ｃＣｙｓＣＢＡ）と還元剤とを反応させて還元型細胞結合剤を形成し、前記キャッピング剤が除去されて前記還元型細胞結合剤に遊離チオール基（－ＳＨ）を形成する工程と；
（ｂ）前記不対システイン残基の前記遊離チオール基を酸化することなく、前記還元型細胞結合剤を選択的酸化剤と反応させて前記ＣｙｓＣＢＡを形成する工程と；
（ｃ）前記ＣｙｓＣＢＡを式（Ｉ）：
【化１】



（Ｉ）

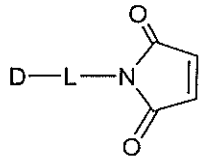
の化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより前記複合体を形成する工程とを含み、工程（ａ）の前記還元型細胞結合剤を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）の前記ＣｙｓＣＢＡを精製せずに工程（ｃ）で使用し、式中：
Ｄは細胞毒性剤であり；
Ｌはリンカーである、前記方法。
【請求項２】
細胞毒性剤と共有結合された、１つ以上の不対システイン残基を有する細胞結合剤（ＣｙｓＣＢＡ）を含む細胞結合剤－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、
（ａ）キャッピング剤でキャップされた１つ以上の不対システイン残基を有するキャップされた細胞結合剤（ｃＣｙｓＣＢＡ）と還元剤とを反応させて還元型細胞結合剤を形成し、前記キャッピング剤が除去されて前記還元型細胞結合剤に遊離チオール基（－ＳＨ）を形成する工程と；
（ｂ）前記不対システイン残基の前記遊離チオール基を酸化することなく、前記還元型細胞結合剤を選択的酸化剤と反応させて前記ＣｙｓＣＢＡを形成する工程と；
（ｃ）前記ＣｙｓＣＢＡを式（Ｉ）：
【化２】



（Ｉ）

の化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより前記複合体を形成する工程とを含み、
工程（ａ）の前記還元型細胞結合剤を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）の前記ＣｙｓＣＢＡを精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｃ）から選択されるいずれか１つ以上の工程が連続して実行され、式中：
Ｄは細胞毒性剤であり；
Ｌはリンカーである、前記方法。
【請求項３】
工程（ａ）～（ｃ）が連続して実行される、請求項２に記載の方法。

【請求項４】
細胞毒性剤と共有結合された、１つ以上の不対システイン残基を有する細胞結合剤（ＣｙｓＣＢＡ）を含む細胞結合剤－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、
（ａ）キャッピング剤でキャップされた１つ以上の不対システイン残基を有するキャップされた細胞結合剤（ｃＣｙｓＣＢＡ）と還元剤とを反応させて還元型細胞結合剤を形成し、前記キャッピング剤が除去されて前記還元型細胞結合剤に遊離チオール基（－ＳＨ）を形成する工程と；
（ｂ）不対システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、前記還元型細胞結合剤を選択的酸化剤と反応させて前記ＣｙｓＣＢＡを形成する工程と；
（ｃ）前記ＣｙｓＣＢＡを式（Ｉ）：
【化３】

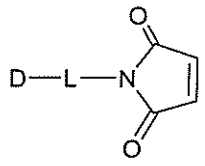


（Ｉ）

の化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより前記複合体を形成する工程と；
（ｄ）式（Ｉ）の非結合化合物を除去する工程とを含み、
工程（ａ）の前記還元型細胞結合剤を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）の前記ＣｙｓＣＢＡを精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｄ）から選択されるいずれか１つ以上の工程が連続して実行され、式中：
Ｄは細胞毒性剤であり；
Ｌはリンカーである、前記方法。
【請求項５】
工程（ａ）～（ｄ）が連続して実行される、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記方法が、前記複合体を安定緩衝液に交換する工程（ｅ）をさらに含む、請求項４または５に記載の方法。
【請求項７】
工程（ｅ）が連続して実行される、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
シングルパスタンジェンシャルフロー濾過（ＳＰＴＦＦ）及び／または向流ダイアフィルトレーションを使用して、前記式（Ｉ）の非結合化合物を除去、及び／または前記ＡＤＣを前記安定緩衝液に交換する、請求項４～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
工程（ａ）において、前記反応が進行している間、及び少なくとも１つの生成物が形成された後、前記ｃＣｙｓＣＢＡ及び／または前記還元剤を反応容器に連続して添加する、請求項２～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
前記反応混合物を連続して回収し、フローリアクターを通して供給する間、前記ｃＣｙｓＣＢＡ及び前記還元剤を前記反応容器に連続して添加する、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記反応容器から回収する前記反応混合物の体積流量が、前記反応容器に添加される前記還元剤及び前記ｃＣｙｓＣＢＡの合計流量と同じである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
工程（ｂ）において、前記反応が進行している間、及び少なくとも１つの生成物が形成された後、前記還元型細胞結合剤及び前記選択的酸化剤を反応容器に連続して添加する、請

求項２～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記反応混合物を連続して回収し、フローリアクターを通して供給する間、前記還元型細胞結合剤及び前記選択的酸化剤を前記反応容器に連続して添加する、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記反応容器から回収する前記反応混合物の体積流量が、前記反応容器に添加される前記還元型細胞結合剤及び前記選択的酸化剤の合計流量と同じである、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
工程（ｃ）において、前記反応が進行している間、及び少なくとも１つの生成物が形成された後、前記ＣｙｓＣＢＡ及び前記式（Ｉ）の化合物を反応容器に連続して添加する、請求項２～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記反応混合物を連続して回収し、フローリアクターを通して供給する間、前記ＣｙｓＣＢＡ及び前記式（Ｉ）の化合物を反応容器に連続して添加する、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記反応容器から回収する前記反応混合物の体積流量が、前記反応容器に添加される前記ＣｙｓＣＢＡ及び前記式（Ｉ）の化合物の合計流量と同じである、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記反応容器が、連続撹拌槽型反応器（ＣＳＴＲ）である、請求項９～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
前記フローリアクターが、プラグフローリアクター（ＰＦＲ）である、請求項１０、１１、１３、１４、及び１６～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
前記非結合薬物の除去にシングルパスタンジェンシャルフロー濾過（ＳＰＴＦＦ）を使用する、請求項３～１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１】
前記非結合薬物の除去に向流ダイアフィルトレーションを使用する、請求項３～１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
前記ＡＤＣの前記安定緩衝液への交換にＳＰＴＦＦ及び／または向流ダイアフィルトレーションを使用する、請求項６～２１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３】
前記ＣｙｓＣＢＡがシステイン改変抗体（ＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片であり、前記方法が、
（ａ）キャッピング剤でキャップされた１つ以上の改変システイン残基を有するキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片と還元剤とを反応させて還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、前記キャッピング剤が除去されて前記還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；
（ｂ）前記改変システイン残基の前記遊離チオール基を酸化することなく、前記還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させて前記ＣｙｓＡｂを形成する工程と；
（ｃ）前記ＣｙｓＡｂを式（Ｉ）：

【化４】



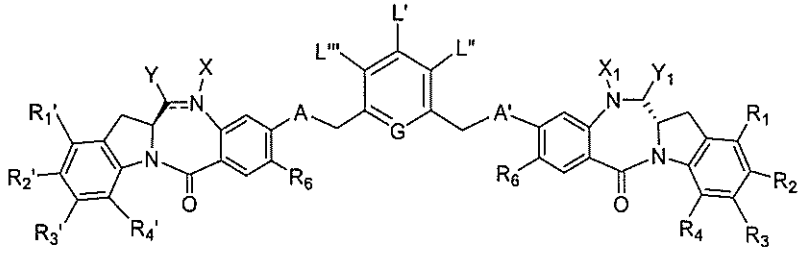
（Ｉ）

の化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより前記抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を形成する工程とを含み、工程（ａ）の前記還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）の前記ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、式中：
Ｄは細胞毒性剤であり；
Ｌはリンカーである、請求項１～２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２４】
前記工程（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）が、同一反応容器内で実施される、請求項１または２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記キャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片の１つ以上の鎖間ジスルフィド結合が、工程（ａ）で還元される、請求項１～２４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２６】
前記１つ以上の鎖間ジスルフィド結合が工程（ｂ）で再形成される、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記還元剤が、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ）、トリスヒドロキシプロピルホスフィン（ＴＨＰＰ）、トリス（２－シアノエチル）ホスフィン、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）、ジシクロヘキシルホスフィノ）ベンゼンスルホン酸、ビス（ｐ－スルホナトフェニル）フェニルホスフィン、（ジフェニルホスフィノ）ベンゼンスルホン酸、（ジフェニルホスフィノ）安息香酸、２－（ジフェニルホスフィノ）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルベンジルアンモニウムトリフラート、（ジフェニルホスフィノ）エチルアミン、２－（ジイソプロピルホスフィノ）エチルアミン、または３－（ジフェニルホスフィノ）プロピルアミン（ＤＰＰＡ）である、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２８】
前記還元剤がＴＣＥＰまたはＤＰＰＡである、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記酸化剤が、デヒドロアスコルビン酸（ＤＨＡＡ）、硫酸銅、酸素、または空気である、請求項１～２８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３０】
前記酸化剤がＤＨＡＡである、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
前記工程（ａ）の反応が、ｐＨ５．０～８．５で実施される、請求項１～３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３２】
前記工程（ａ）の反応が、ｐＨ６．０～７．５で実施される、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記工程（ｂ）の反応が、ｐＨ５．０～８．５で実施される、請求項１～３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３４】
前記工程（ｂ）の反応が、ｐＨ６．０～７．５で実施される、請求項３３に記載の方法。

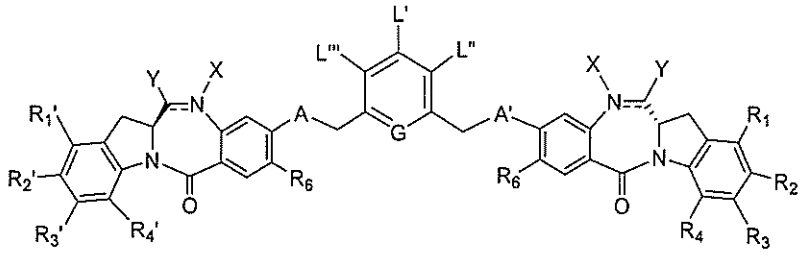
【請求項３５】
前記工程（ｃ）の反応が、ｐＨ５．０～８．５で実施される、請求項１～３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３６】
前記工程（ｃ）の反応が、ｐＨ６．０～７．５で実施される、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
前記工程（ｃ）の反応が、ｐＨ５．５～６．５で実施される、請求項１～３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３８】
前記工程（ｃ）の反応が、ｐＨ６．０で実施される、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記方法が、工程（ｂ）の後、工程（ｃ）で前記ＣｙｓＣＢＡを前記細胞毒性剤と反応させる前に、前記反応混合物のｐＨを調整することをさらに含む、請求項１～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４０】
工程（ｂ）の後、工程（ｃ）で前記ＣｙｓＣＢＡを前記細胞毒性剤と反応させる前に、前記反応混合物のｐＨを調整しない、請求項１～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
前記還元剤がＴＣＥＰであり、前記工程（ａ）の反応が、ｐＨ６．０～８．０で実施される、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４２】
前記還元剤がＴＣＥＰであり、前記工程（ａ）の反応が、ｐＨ７．５で実施される、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４３】
前記酸化剤がＤＨＡＡであり、前記工程（ｂ）の反応が、ｐＨ７．５で実施される、請求項４１または４２に記載の方法。
【請求項４４】
工程（ｂ）の後、工程（ｃ）で前記ＣｙｓＣＢＡを前記細胞毒性剤と反応させる前に、前記反応混合物のｐＨをｐＨ７．５からｐＨ６．０に調整する、請求項４１～４３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４５】
前記還元剤がＤＰＰＡであり、前記工程（ａ）の反応が、ｐＨ６．０～８．０で実施される、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４６】
前記還元剤がＤＰＰＡであり、前記工程（ａ）の反応が、ｐＨ６．５で実施される、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４７】
前記酸化剤がＤＨＡＡであり、前記工程（ｂ）の反応が、ｐＨ６．５で実施される、請求項４５または４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記複合体が、タンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）、吸着性クロマトグラフ、非吸着性クロマトグラフィー、吸着性濾過、選択的沈殿、またはそれらの組み合わせによって精製される、請求項１～４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４９】
前記複合体がタンジェンシャルフロー濾過によって精製される、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
工程（ａ）で前記ｃＣｙｓＣＢＡに対して過剰量の前記還元剤を使用する、請求項１～４９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５１】

前記還元剤と前記ｃＣｙｓＣＢＡとのモル比が、１：１～５０：１、２：１～３０：１、または５：１～２５：１である、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記還元剤とその前記ｃＣｙｓＣＢＡとのモル比が、１５：１～２０：１である、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
工程（ａ）の前記還元剤と工程（ｂ）の前記酸化剤とのモル比が、２：１～１：２である、請求項１～５２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５４】
前記還元剤と前記酸化剤とのモル比が、１．２：１～１：１．５である、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
前記還元剤と前記酸化剤とのモル比が、１：１～１：１．５である、請求項５３に記載の方法。
【請求項５６】
前記還元剤と前記酸化剤とのモル比が、１：１である、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記還元剤と前記酸化剤とのモル比が、１：１．５である、請求項５５に記載の方法。
【請求項５８】
そのＣｙｓＣＢＡに対して過剰量の前記式（Ｉ）の化合物を工程（ｃ）で使用する、請求項１～５７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５９】
２～５モル当量の前記式（Ｉ）の化合物を、各当量のＣｙｓＣＢＡに対して使用する、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
前記ＣｙｓＡｂが、前記抗体の重鎖のＥＵ／ＯＵ番号付け位置４０、４３、８４、８８、１０３、１１２、１１３、１１４、１１５、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１６１、１６８、１７２、２３４、２３５、２３６、２３７、２３８、２３９、２４４、２４５、２４８、２４９、２５０、２５１、２５２、２５３、２５４、２５５、２５６、２５７、２５８、２６０、２６２、２６５、２６７、２７０、２７２、２７４、２７９、２８０、２８２、２８３、２８４、２８５、２８６、２８８、２８９、２９３、２９５、２９７、２９８、３０３、３０５、３０７、３０８、３０９、３１１、３１２、３１３、３１４、３１５、３１６、３１７、３１８、３２５、３２６、３２７、３２８、３２９、３３０、３３２、３３４、３３８、３３９、３４０、３４１、３４３、３４５、３６０、３６１、３６２、３７５、３７６、３７７、３７８、３８０、３８２、３８４、３８５、３８６、３８７、３８９、３９０、３９１、４１３、４２２、４２３、４２４、４２７、４２８、４３０、４３１、４３３、４３４、４３５、４３６、４３７、４３８、４４０、４４２、４４３、及び４４６から選択される１つ以上の位置に改変システイン残基を有する抗体である、請求項２３～５９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６１】
前記ＣｙｓＡｂが、前記抗体の重鎖のＥＵ／ＯＵ番号付け位置４４２に改変システイン残基を有する抗体である、請求項２３～５９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６２】
前記ＣｙｓＡｂが、両方の重鎖のＥＵ／ＯＵ番号付け位置４４２に改変システイン残基を有する抗体である、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
前記キャッピング剤が、システイン、ホモシステイン、グルタチオン、またはそれらの組み合わせである、請求項１～６２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６４】

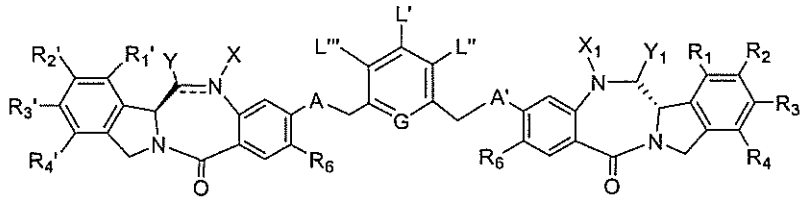
前記複合体の９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または９９．５％超が単量体である、請求項１～６３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６５】
Ｄがベンゾジアゼピン化合物である、請求項１～６４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６６】
Ｄがメイタンシノイド化合物である、請求項１～６４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６７】
Ｄが、以下の式：
【化５】



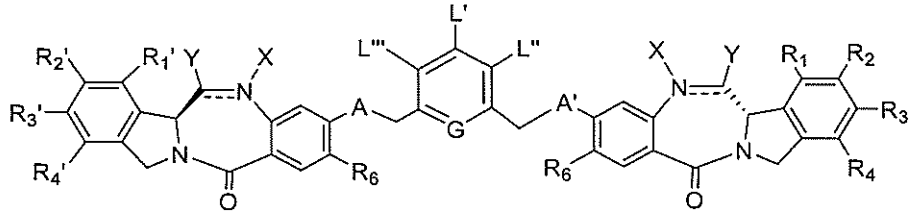
（Ｄ－ＩＡ）；



（Ｄ－ＩＢ）；



（Ｄ－ＩＣ）；もしくは



（Ｄ－ＩＤ）；

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：
ＮとＣ間の二重線
【化６】
⚌

は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは、－Ｈまたは（Ｃ１～Ｃ４）アルキルであり、単結合の場合は、Ｘが、－Ｈまたはアミン保護部分であり、Ｙは、－ＯＨもしくは－ＳＯ３Ｈまたはその薬学的に許容される塩であり；
Ｌ’、Ｌ’’、及びＬ’’’のうちの１つは、以下の式：
－Ｚ１－Ｐ１－Ｚ２－Ｒｘ１－Ｃ（＝Ｏ）－　　（Ａ’）、または
－Ｎ（Ｒｅ）－Ｒｘ１－Ｃ（＝Ｏ）－　　（Ｄ’）

によって表され、他の２つはそれぞれ独立して、－Ｈ、任意選択で置換される直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニル、ポリエチレングリコール単位－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ－Ｒｃ、ハロゲン、グアニジニウム［－ＮＨ（Ｃ＝ＮＨ）ＮＨ２］、－ＯＲ、－ＮＲ’Ｒ’’、－Ｎ２Ｏ－ＮＲ’ＣＯＲ’’、－ＳＲ、－ＳＯＲ’、－２ＳＲＯ’、－ＳＯ３Ｈ、－ＯＳＯ３Ｈ、－ＳＯ２ＮＲ’Ｒ’’、シアノ、アジド、－ＣＯＲ’、－ＯＣＯＲ’、及び－ＯＣＯＮＲ’Ｒ’’から選択され；

前記Ｚ１及びＺ２のうち一方は－Ｃ（＝Ｏ）－であり、他方は－ＮＲ５－であり；

Ｐ１は、アミノ酸残基、または２～２０個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり；

Ｒｘ１は、任意選択で置換される直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり；

Ｒｅは、－Ｈ、直鎖、分岐、もしくは環状のアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル、または－（ＣＨ２－ＣＨ２－Ｏ）ｎ－Ｒｋであり、ここで、Ｒｋは、－Ｈ、１～６個の炭素原子を有し、任意選択で第２級アミノ（例えば、－ＮＨＲ１０１）もしくは第３級アミノ（－ＮＲ１０１Ｒ１０２）基を有する直鎖、分岐、環状のアルキル、または５員もしくは６員の窒素含有複素環であり、Ｒ１０１及びＲ１０２はそれぞれ独立して、直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり；

Ｒは、各存在について、－Ｈ、任意選択で置換される直鎖、分岐、もしくは環状のアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル、ポリエチレングリコール単位－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ－Ｒｃ、６～１８個の炭素原子を有する、任意選択で置換されるアリール、窒素、酸素、及び硫黄から独立して選択される１つ以上のヘテロ原子を含有する５～１８員ヘテロアリール、またはＯ、Ｓ、Ｎ、及びＰから独立して選択される１～６個のヘテロ原子を含有する、任意選択で置換される３～１８員複素環からなる群より独立して選択され；

Ｒ’及びＲ’’はそれぞれ独立して、－Ｈ、－ＯＨ、－ＯＲ、－ＮＨＲ、－Ｎ２Ｒ－ＣＯＲ、任意選択で置換される直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニル、ポリエチレングリコール単位－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ－Ｒｃ、ならびにＯ、Ｓ、Ｎ、及びＰから独立して選択される１～６個のヘテロ原子を有する、任意選択で置換される３～１８員複素環から選択され；

Ｒｃは、－Ｈ、または１～４個の炭素原子を有する任意選択で置換される直鎖もしくは分岐アルキルであり；

ｎは、整数１～２４であり；

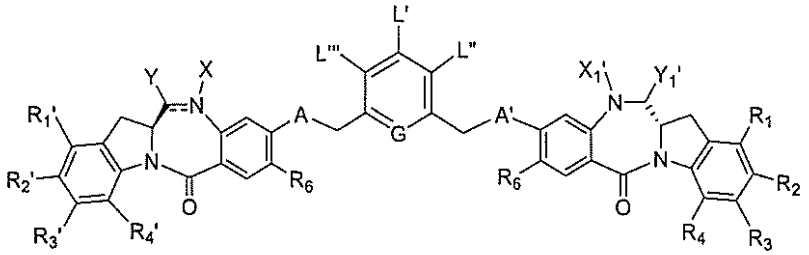
Ｘ１は、－Ｈ、アミン保護基、任意選択で置換される直鎖、分岐、もしくは環状のアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル、ポリエチレングリコール単位－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ－Ｒｃ、６～１８個の炭素原子を有する、任意選択で置換されるアリール、窒素、酸素、及び硫黄から独立して選択される１つ以上のヘテロ原子を含有する５～１８員ヘテロアリール、ならびにＯ、Ｓ、Ｎ、及びＰから独立して選択される１～６個のヘテロ原子を含有する、任意選択で置換される３～１８員複素環から選択され；

Ｙ１は、－Ｈ、オキソ基、任意選択で置換される直鎖、分岐、もしくは環状のアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル、任意選択で置換される６～１８員アリール、窒素、酸素、及び硫黄から独立して選択される１つ以上のヘテロ原子を含有する任意選択で置換される５～１８員ヘテロアリール、１～６個のヘテロ原子を有する、任意選択で置換される３～１８員複素環から選択され；

Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ１’、Ｒ２’、Ｒ３’、及びＲ４’はそれぞれ独立して、－Ｈ、任意選択で置換される直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニル、ポリエチレングリコール単位－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ－Ｒｃ、ハロゲン、グアニジニウム［－ＮＨ（Ｃ＝ＮＨ）ＮＨ２］、－ＯＲ、－ＮＲ’Ｒ’’、－Ｎ２Ｏ－ＮＣＯ、－ＮＲ’ＣＯＲ’’、－ＳＲ、－ＳＯＲ’、－２ＳＲＯ’、－ＳＯ３－Ｈ、－ＯＳＯ３Ｈ、－ＳＯ２ＮＲ’Ｒ’’、シアノ、アジド、－ＣＯＲ’、－ＯＣＯＲ’、及び－ＯＣＯＮＲ’Ｒ’’からなる群より選択され；

Ｒ６は、－Ｈ、－Ｒ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＮＲ’Ｒ’’’、－２Ｎ、Ｏまたはハロゲンであり；

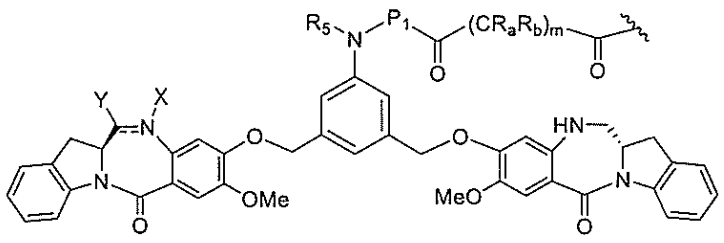
Ｇは、－ＣＨ－または－Ｎ－であり；
ＡとＡ’は同じかまたは異なっており、－Ｏ－、オキソ（－Ｃ（＝Ｏ）－）、－ＣＲＲ’Ｏ－、－ＣＲＲ’－、－Ｓ－、－ＣＲＲ’Ｓ－、－NR_5、及び－ＣＲＲ’Ｎ（R_5）－から独立して選択され；
R_5は、各存在について、独立して、－Ｈ、または任意選択で置換される直鎖もしくは分岐アルキルである、請求項１～６４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６８】
Ｄが、以下の式：
【化７】



（Ｄ－ＩＡ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
X_1が、－Ｈ、－ＯＨ、（Ｃ１～Ｃ３）アルキル、ハロ（Ｃ１～Ｃ３）アルキル、またはフェニルであり；Y_1’が、－Ｈ、オキソ基、（C_1～Ｃ３）アルキル、またはハロ（Ｃ１～Ｃ３）アルキルである、請求項６７または６８に記載の方法。
【請求項７０】
X_1が、－Ｈ、－ＯＨ、または－Ｍｅであり；Y_1が、－Ｈまたはオキソである、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
X_1が、－Ｈであり；Y_1が、－Ｈである、請求項６９に記載の方法。
【請求項７２】
ＡとＡ’が同じかまたは異なっており、－Ｏ－及び－Ｓ－から選択される、請求項６７～７１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７３】
Ａ及びＡ’が－Ｏ－である、請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
R_6が－ＯＭｅである、請求項６７～７３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７５】
R_1、R_2、R_3、R_4、R_1’、R_2’、R_3’、及びR_4’が独立して、－Ｈ、ハロゲン、－NO_2、－ＯＨ、（Ｃ１～Ｃ３）アルキル、ハロ（Ｃ１～Ｃ３）アルキル、または（Ｃ１～Ｃ３）アルコキシである、請求項６７～７４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７６】
R_1、R_2、R_3、R_4、R_1’、R_2’、R_3’、及びR_4’がすべて－Ｈである、請求項７５に記載の方法。
【請求項７７】
Ｒ、Ｒ’、Ｒ’’、及びＲ’’’がそれぞれ独立して、－Ｈまたは（Ｃ１～Ｃ３）アルキルである、請求項６７～７６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７８】
R_1、R_2、R_3、R_4、R_1’、R_2’、R_3’、及びR_4’がすべて－Ｈであり；
R_6が－ＯＭｅであり；
X_1及びY_1が、いずれも－Ｈであり；

Ａ及びＡ’が－Ｏ－である、請求項６７または６８に記載の方法。
【請求項７９】
Ｌ’、Ｌ’’、及びＬ’’’のうちの１つが、式（Ａ’）または（Ｄ’）によって表され、それ以外は、－Ｈ、１～６個の炭素原子を有する直鎖もしくは分岐アルキル、ハロゲン、－ＯＨ、（Ｃ１～Ｃ６）アルコキシ、または－ＮＯ２である、請求項６７～７８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８０】
Ｌ’が、式（Ａ’）によって表され；Ｌ’’及びＬ’’’がいずれも－Ｈである、請求項７９に記載の方法。
【請求項８１】
Ｌ’が、式（Ｄ’）によって表され；Ｌ’’及びＬ’’’がいずれも－Ｈである、請求項７９に記載の方法。
【請求項８２】
Ｒｘ１が、ハロゲン、－ＯＨ、（Ｃ１～Ｃ３）アルキル、（Ｃ１～Ｃ３）アルコキシ、ハロ（Ｃ１～Ｃ３）アルキル、または荷電置換基もしくはイオン性基Ｑにより任意選択で置換される、１～６個の炭素原子を有する直鎖、分岐、または環状のアルキルである、請求項６７～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８３】
Ｌ’が、以下の式：
－ＮＲ５－Ｐ１－Ｃ（＝Ｏ）－（ＣＲａＲｂ）ｓ－Ｃ（＝Ｏ）－　（Ｂ１’）；
－ＮＲ５－Ｐ１－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃｙ－（ＣＲａＲｂ）ｓ１’－Ｃ（＝Ｏ）－　（Ｂ２’）；
－Ｃ（＝Ｏ）－Ｐ１－ＮＲ５－（ＣＲａＲｂ）ｓ－Ｃ（＝Ｏ）－　（Ｃ１’）、または
－Ｃ（＝Ｏ）－Ｐ１－ＮＲ５－Ｃｙ－（ＣＲａＲｂ）ｓ１’－Ｃ（＝Ｏ）－　（Ｃ２’）
［式中：
Ｒａ及びＲｂは、各存在について、それぞれ独立して、－Ｈ、（Ｃ１～Ｃ３）アルキル、または荷電置換基もしくはイオン性基Ｑであり；
ｓは、整数１～６であり；
ｓ１’は、０または整数１～６であり；
Ｃｙは、ハロゲン、－ＯＨ、（Ｃ１～Ｃ３）アルキル、（Ｃ１～Ｃ３）アルコキシ、またはハロ（Ｃ１～Ｃ３）アルキルにより任意選択で置換される、５または６個の環炭素原子を有する環状アルキルである］によって表される、請求項６７～８２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８４】
式（Ｂ２’）及び（Ｃ２’）のＣｙがシクロヘキサンであり；ｓ１’が０または１である、請求項８３に記載の方法。
【請求項８５】
Ｄが、以下の式：
【化８】

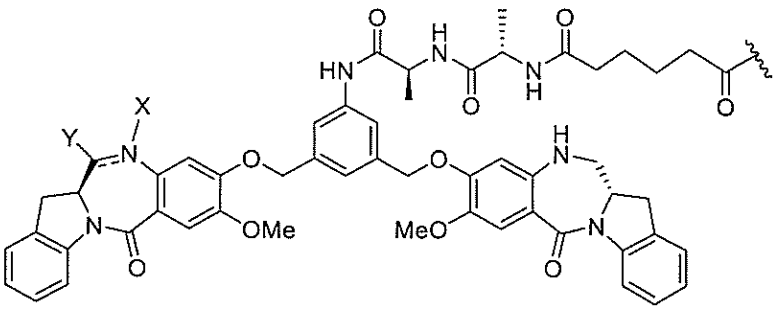


（Ｄ－ＩＥ）

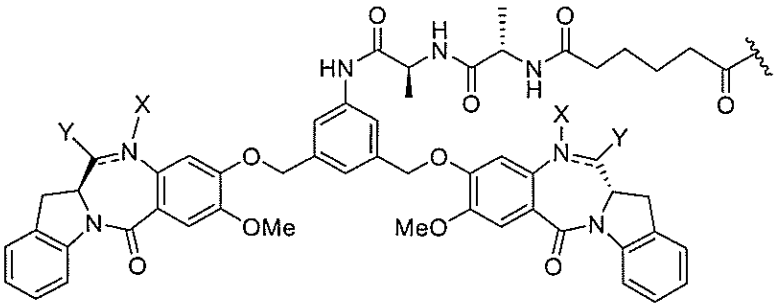
によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項８３に記載の方法。
【請求項８６】
Ｒａ及びＲｂがいずれもＨであり；Ｒ５が、ＨまたはＭｅである、請求項８３～８５のい

ずれか１項に記載の方法。
【請求項８７】
前記荷電置換基またはイオン性基Ｑが、ｉ）－ＳＯ３Ｈ、－Ｚ’－ＳＯ3Ｈ、－ＯＰＯ３Ｈ２、－Ｚ’－ＯＰＯ3Ｈ２、－ＰＯ３Ｈ２、－Ｚ’－ＰＯ3Ｈ２、－ＣＯ２Ｈ、－Ｚ’－ＣＯ２Ｈ、－ＮＲ１１Ｒ１２、もしくは－Ｚ’－ＮＲ1１１Ｒ１２、もしくはその薬学的に許容される塩；またはｉｉ）－Ｎ＋Ｒ１４Ｒ１５Ｒ１６Ｘ－もしくは－Ｚ’－Ｎ＋Ｒ１４Ｒ１５Ｒ１６Ｘ－であり；Ｚ’は、任意選択で置換されるアルキレン、任意選択で置換されるシクロアルキレン、または任意選択で置換されるフェニレンであり；Ｒ１４～Ｒ１６は、それぞれ独立して、任意選択で置換されるアルキルであり；Ｘ－は、薬学的に許容されるアニオンである、請求項６７～８５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８８】
Ｑが－ＳＯ３Ｈまたはその薬学的に許容される塩である、請求項８７に記載の方法。
【請求項８９】
Ｐ１が、２～１０個のアミノ酸残基を含有するペプチドである、請求項６７～８８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９０】
Ｐ１が、２～５個のアミノ酸残基を含有するペプチドである、請求項８９に記載の方法。
【請求項９１】
Ｐ１が、プロテアーゼによって切断可能なペプチドである、請求項８９または９０に記載の方法。
【請求項９２】
Ｐ１が、腫瘍組織に発現するプロテアーゼによって切断可能なペプチドである、請求項８９に記載の方法。
【請求項９３】
Ｐ１が、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｃｉｔ、Ｌｅｕ－Ｃｉｔ、Ｉｌｅ－Ｃｉｔ、Ｔｒｐ、Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ａｌａ、Ｐｈｅ－Ｎ9－トシル－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｎ9－ニトロ－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｖａｌ、Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号５６）、β－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号５７）、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ（配列番号５８）、Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ａｒｇ－Ａｒｇ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｍｅｔ、Ｇｌｎ－Ｖａｌ、Ａｓｎ－Ａｌａ、Ｇｌｎ－Ｐｈｅ、及びＧｌｎ－Ａｌａである、請求項６７～８８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９４】
Ｐ１が、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ａｌａ－Ｖａｌ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、またはＤ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａである、請求項９３に記載の方法。
【請求項９５】
Ｄが、以下の構造式：

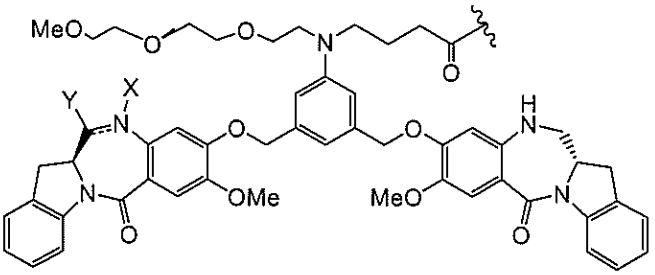
【化９】



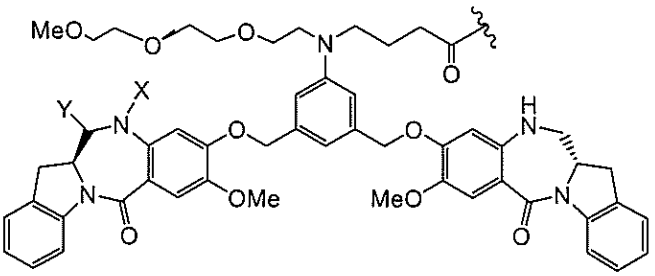
（Ｄ１）；



（Ｄ２）；



（Ｄ３）；もしくは



（Ｄ４）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であって、式中、ＮとＣ間の二重線

【化１０】

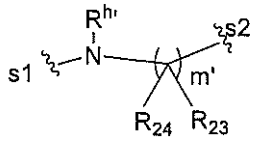
═

は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは－Ｈであり、単結合の場合は、Ｘが－Ｈであり、Ｙは－ＳＯ３Ｈまたはその薬学的に許容される塩である、請求項６７に記載の方法。

【請求項９６】

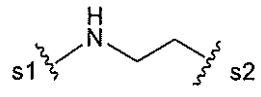
－Ｌ－が、以下の構造式：

【化１１】



（Ｌ－Ｉ）

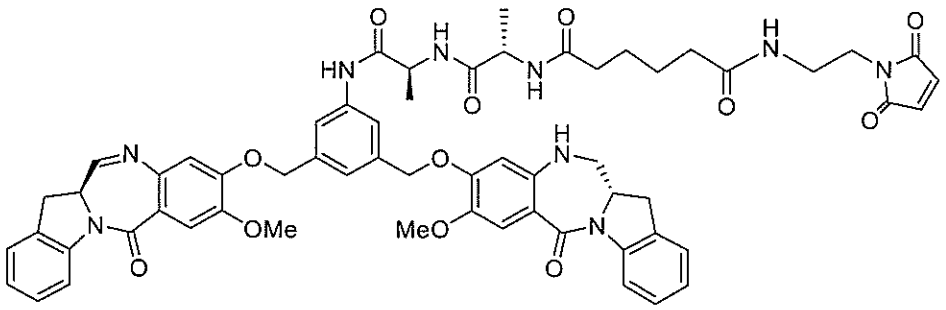
によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：
ｓ１は、Ｄに共有結合する部位であり；ｓ２は、前記マレイミド基に共有結合する部位であり；
Ｒ２３及びＲ２４は、各存在について、独立してＨまたは任意選択で置換されるアルキルであり；
ｍ’は、整数０～１０であり；
Ｒｈ’は、Ｈまたは任意選択で置換されるアルキルである、請求項６７～９５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９７】
Ｒ２３及びＲ２４がいずれもＨであり；ｍ’が、整数１～６である、請求項９６に記載の方法。
【請求項９８】
Ｒｈ’がＨである、請求項９６または９７に記載の方法。
【請求項９９】
Ｌが、以下の構造式：
【化１２】



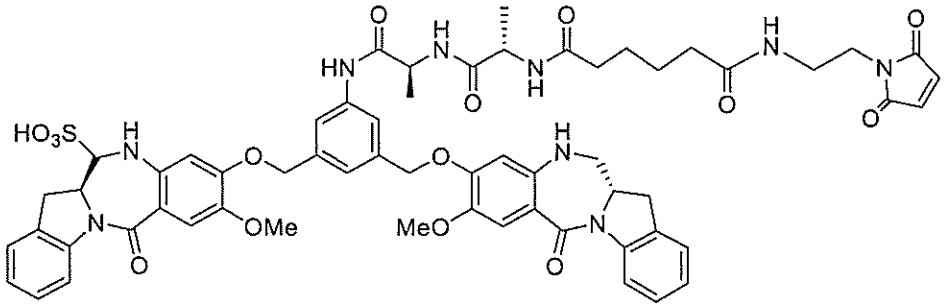
（Ｌ１）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項９６に記載の方法。
【請求項１００】
前記薬学的に許容される塩が、ナトリウム塩またはカリウム塩である、請求項６７～９９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０１】
前記化合物が、以下の式：

【化１３】



（Ｉ１）、もしくは



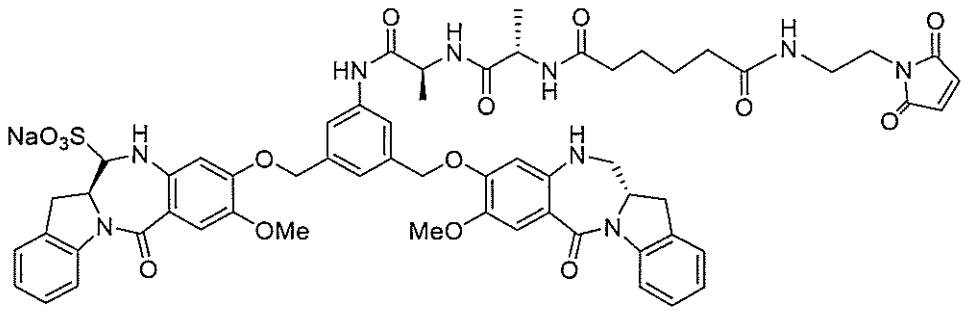
（Ｉ２）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項１～６４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１０２】

前記化合物が、以下の式：

【化１４】



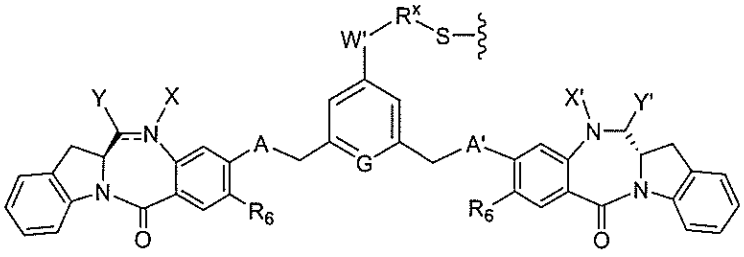
（Ｉ３）

によって表される、請求項１０１に記載の方法。

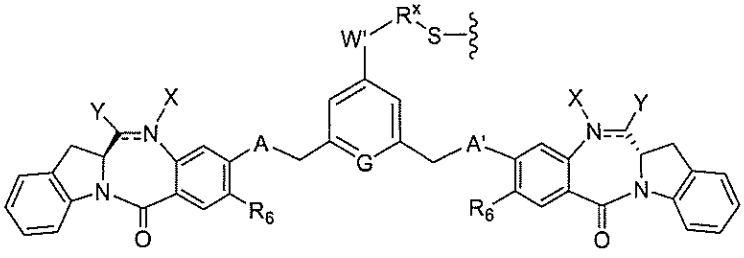
【請求項１０３】

Ｄが、以下の式：

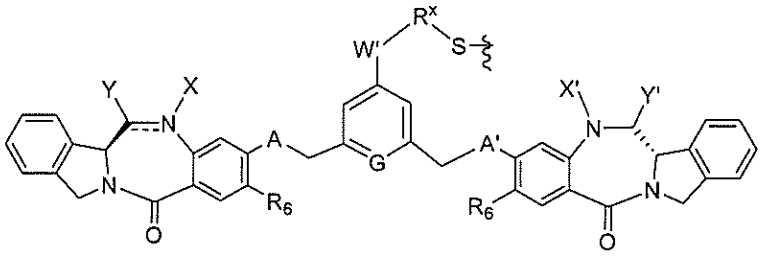
【化１５】



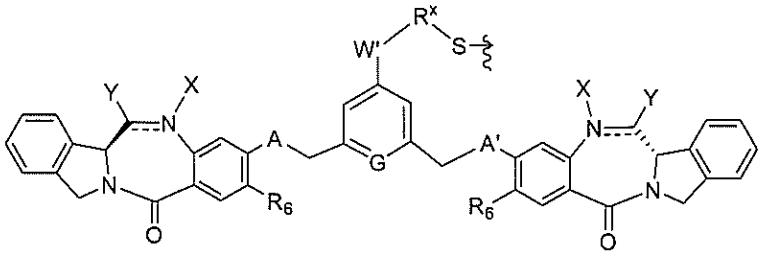
（Ｄ－ＩＩＡ）；



（Ｄ－ＩＩＢ）；



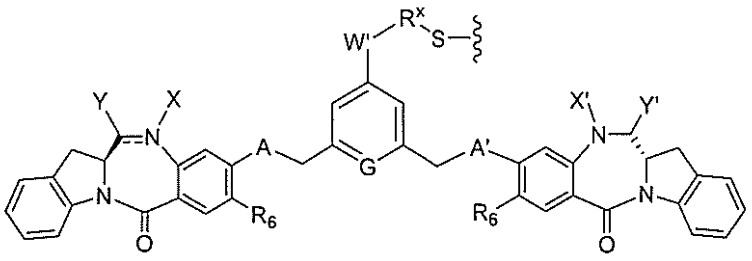
（Ｄ－ＩＩＣ）；もしくは



（Ｄ－ＩＩＤ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：
ＮとＣ間の二重線
【化１６】
==
は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは、－Ｈまたは（Ｃ１～Ｃ４）アルキルであり、単結合の場合は、Ｘが、－Ｈまたはアミン保護部分であり、Ｙは、－ＯＨもしくは－ＳＯ３Ｈまたはその薬学的に許容される塩であり；
Ｘ’は、－Ｈ、－ＯＨ、置換または非置換の直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニル、フェニル、及びアミン保護基からなる群より選択され；
Ｙ’は、－Ｈ、オキソ基、置換または非置換の直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニルからなる群より選択され；
Ａ及びＡ’は、－Ｏ－及び－Ｓ－から選択され；
Ｗ’は存在しないか、または－Ｏ－、－Ｎ（Ｒe）－、－Ｎ（Ｒｅ）－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｎ（Ｃ（＝Ｏ）Ｒｅ）－、－Ｓ－、もしくは－ＣＨ２－Ｓ－、－ＣＨ２ＮＲｅ－から選択され；
Ｒｘは存在しないか、または直鎖、分岐、もしくは環状のアルキルから選択され；
Ｒｅは、－Ｈ、直鎖、分岐、もしくは環状のアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル

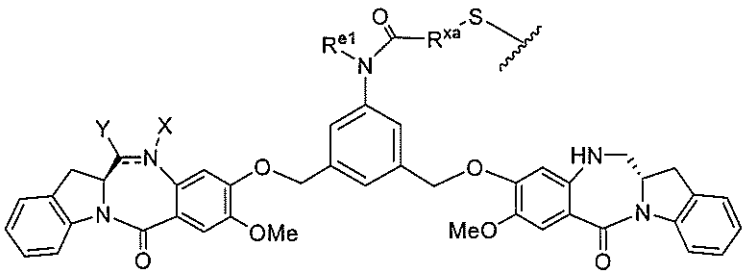
、または－（ＣＨ２－ＣＨ２－Ｏ）ｎ－Ｒｋであり、ここで、Ｒｋは、－Ｈ、１～６個の炭素原子を有し、任意選択で第２級アミノ（例えば、－ＮＨＲ１０１）もしくは第３級アミノ（－ＮＲ１０１Ｒ１０２）基を有する直鎖、分岐、環状のアルキル、または５員もしくは６員の窒素含有複素環であり、Ｒ１０１及びＲ１０２はそれぞれ独立して、直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり；
ｎは、整数１～２４であり；
Ｇは、－ＣＨ－または－Ｎ－から選択され；
Ｒ６は、－Ｈ、－Ｒ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＮＲ’Ｒ’’’、－NO_2またはハロゲンであり；
Ｒは、各存在について、－Ｈ、任意選択で置換される直鎖、分岐、もしくは環状のアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル、ポリエチレングリコール単位－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ－Ｒｃ、６～１８個の炭素原子を有する、任意選択で置換されるアリール、窒素、酸素、及び硫黄から独立して選択される１つ以上のヘテロ原子を含有する５～１８員ヘテロアリール、またはＯ、Ｓ、Ｎ、及びＰから独立して選択される１～６個のヘテロ原子を含有する、任意選択で置換される３～１８員複素環からなる群より独立して選択され；
Ｒ’及びＲ’’はそれぞれ独立して、－Ｈ、－ＯＨ、－ＯＲ、－ＮＨＲ、－NR_2、－ＣＯＲ、任意選択で置換される直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニル、ポリエチレングリコール単位－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ－Ｒｃ、ならびにＯ、Ｓ、Ｎ、及びＰから独立して選択される１～６個のヘテロ原子を有する、任意選択で置換される３～１８員複素環から選択され；
Ｒｃは、－Ｈ、または１～４個の炭素原子を有する任意選択で置換される直鎖もしくは分岐アルキルである、請求項１～６４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０４】
Ｄが、以下の構造式：
【化１７】



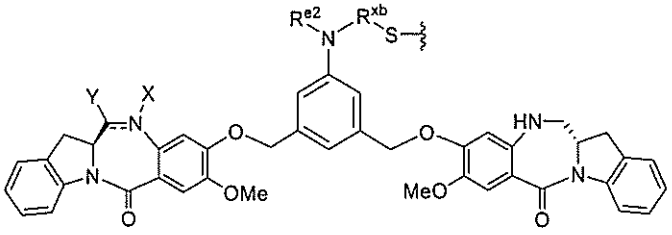
（Ｄ－ＩＩＡ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項１０３に記載の方法。
【請求項１０５】
Ｘ’及びＹ’が、いずれも－Ｈであり；
Ａ及びＡ’が、いずれも－Ｏ－であり；
Ｒ６が－ＯＭｅであり；
Ｗ’が、－Ｎ（Ｒｅ）－または－Ｎ（Ｒｅ）－Ｃ（＝Ｏ）－であり；
Ｒｅが、－Ｈ、１～４個の炭素原子を有する直鎖もしくは分岐アルキル、または－（ＣＨ２－ＣＨ２－Ｏ）ｎ－Ｒｋであり、ここで、Ｒｋは、－Ｈ、１～４個の炭素原子を有する直鎖もしくは分岐アルキルであり；
ｎが、整数２～６であり；
Ｒｘが、１～６個の炭素原子を有する直鎖もしくは分岐アルキルである、請求項１０３または１０４に記載の方法。
【請求項１０６】
Ｄが、以下の構造式：

【化１８】

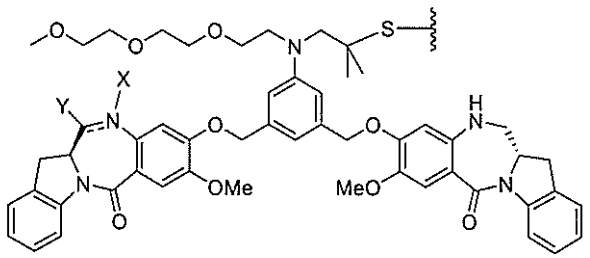


（Ｄ－ＩＩＥ）、もしくは



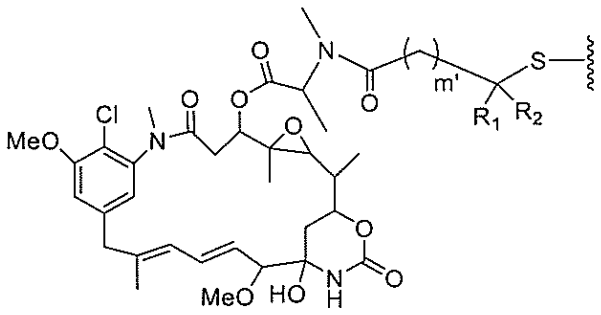
（Ｄ－ＩＩＦ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：
Ｒｅ１は、Ｈまたは（Ｃ１～Ｃ６）アルキルであり；
Ｒｘａは、（Ｃ１～Ｃ６）アルキルであり；
Ｒｅ２は、－（ＣＨ２－ＣＨ２－Ｏ）ｎ－Ｒｋであり；
ｎは、整数２～６であり；
Ｒｋは、－Ｈまたは－Ｍｅであり；
Ｒｘｂは、（Ｃ１～Ｃ６）アルキルである、請求項１０３に記載の方法。
【請求項１０７】
Ｄが、以下の式：
【化１９】



（Ｄ５）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項１０６に記載の方法。
【請求項１０８】
Ｄが、以下の式：
【化２０】



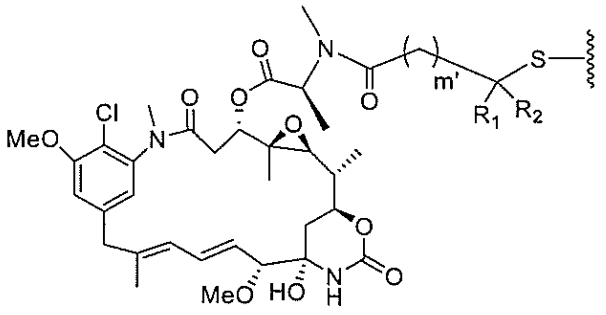
（Ｄ－ＩＩＩ）

［式中、ｍ’は１または２であり；R_1及びR_2はそれぞれ独立して、－Ｈまたは（Ｃ１～Ｃ３）アルキルである］によって表される、請求項１～６４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１０９】

Ｄが、以下の式：

【化２１】



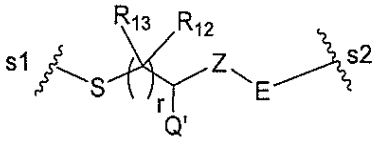
（Ｄ－ＩＩＩＡ）

によって表される、請求項１０８に記載の方法。

【請求項１１０】

Ｌが、以下の構造式：

【化２２】



（Ｌ－ＩＩ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：

ｓ１は、Ｄに共有結合する部位であり、ｓ２は、前記マレイミド基に共有結合する部位であり；

Ｅは、－（ＣＲ１０Ｒ１１）ｑ－、シクロアルキル、またはシクロアルキルアルキルであり；

Ｚは、存在しないか、－ＳＯ２ＮＲ９－、－ＮＲ９ＳＯ２－、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＲ９－、－ＮＲ９－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＲ９－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｐ－、－ＮＲ９－Ｃ（＝Ｏ－ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｐ－、－（ＯＣＨ２ＣＨ２）ｐ－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ９－、または－（ＯＣＨ２ＣＨ２）ｐ－ＮＲ９－Ｃ（＝Ｏ）－であり；

ｐは、整数１～２４であり；

Ｑは、－Ｈ、荷電置換基、またはイオン性基であり；

Ｒ９、Ｒ１０、Ｒ１１、Ｒ１２、及びＲ１３は、各存在について、独立してＨまたは任意選択で置換されるアルキルであり；

ｑ及びｒは、各存在について、独立して整数０～１０整数である、請求項１０３～１０９のいずれか１項に記載の方法。

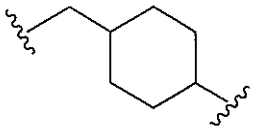
【請求項１１１】

Ｅが、－（ＣＲ１０Ｒ１１）ｑ－である、請求項１１０に記載の方法。

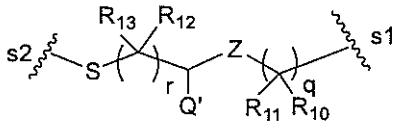
【請求項１１２】

Ｅが、

【化２３】



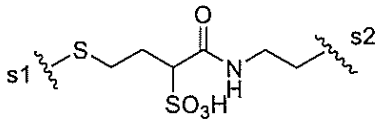
である、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１３】
Ｚが、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＲ９－または－ＮＲ９－Ｃ（＝Ｏ）－である、請求項１１０～１１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１４】
Ｌが、以下の構造式：
【化２４】



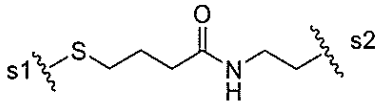
（Ｌ－ＩＩＡ）

［式中、Ｒ９、Ｒ１０、Ｒ１１、Ｒ１２、及びＲ１３は、各存在について、独立して－Ｈまたは（Ｃ１～Ｃ３）アルキルである］によって表される、請求項１１０に記載の方法。
【請求項１１５】
Ｒ９が－Ｈである、請求項１１０～１１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１６】
Ｑ’が、
ｉ）Ｈ；
ｉｉ）－ＳＯ３Ｈ、－Ｚ’－ＳＯ３Ｈ、－ＯＰＯ３Ｈ２、－Ｚ’－ＯＰＯ３Ｈ２、－ＰＯ３Ｈ２、－Ｚ’－ＰＯ３Ｈ２、－ＣＯ２Ｈ、－Ｚ’－ＣＯ２Ｈ、－ＮＲ１１Ｒ１２、もしくは－Ｚ’－ＮＲ１４Ｒ１５、もしくはその薬学的に許容される塩；または
ｉｉｉ）－Ｎ＋Ｒ１４Ｒ１５Ｒ１６Ｘ－もしくは－Ｚ’－Ｎ＋Ｒ１４Ｒ１５Ｒ１６Ｘ－であり；
Ｚ’は、任意選択で置換されるアルキレン、任意選択で置換されるシクロアルキレン、または任意選択で置換されるフェニレンであり；
Ｒ１４、Ｒ１５、及びＲ１６が、それぞれ独立して、任意選択で置換されるアルキルであり；
Ｘ－が、薬学的に許容されるアニオンである、請求項１１０～１１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１７】
Ｑ’が、Ｈもしくは－ＳＯ３Ｈ、またはその薬学的に許容される塩である、請求項１１６に記載の方法。
【請求項１１８】
Ｒ９、Ｒ１０、Ｒ１１、Ｒ１２、及びＲ１３が、いずれもＨであり；ｑ及びｒが、それぞれ独立して、整数１～６である、請求項１１０～１１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１９】
Ｒ１２及びＲ１３が、各存在について、それぞれ独立してＨまたは（Ｃ１～Ｃ３）アルキルであり；
Ｑが、Ｈもしくは－ＳＯ３Ｈ、またはその薬学的に許容される塩であり、
Ｚが、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＲ９－または－ＮＲ９－Ｃ（＝Ｏ）－であり；
Ｒ９が、Ｈまたは（Ｃ１～Ｃ３）アルキルであり；
Ｒ１０及びＲ１１が、各存在について、独立してＨまたは（Ｃ１～Ｃ３）アルキルであり；

ｑ及びｒがそれぞれ、整数１～５である、請求項１１４に記載の方法。
【請求項１２０】
Ｌが、以下の構造式：
【化２５】

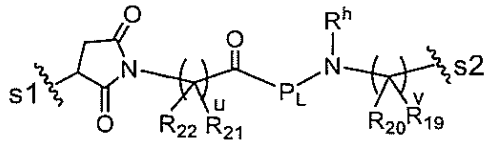


（Ｌ２）及び



（Ｌ３）

のいずれか１つによって表されるか、
またはその薬学的に許容される塩である、請求項１１９に記載の方法。
【請求項１２１】
Ｌが、以下の構造式：
【化２６】



（Ｌ－ＩＩＩ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：
ｓ１は、Ｄに共有結合する部位であり；ｓ２は、前記マレイミド基に共有結合する部位であり；
Ｒ１９、Ｒ２０、Ｒ２１、及びＲ２２は、各存在について、独立してＨまたは任意選択で置換されるアルキルであり；
ｕ及びｖは、それぞれ独立して整数０～１０であり；
Ｒｈは、Ｈまたは任意選択で置換されるアルキルであり；
ＰＬは、任意選択で置換されるアルキレン、－（ＣＨ２－ＣＨ２－Ｏ）ｊ－（式中、前記酸素原子はＰＬに結合される前記－（Ｃ＝Ｏ）－基に結合されている）、アミノ酸残基、または２～２０個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり；
ｊは、整数１～２４である、請求項１０３～１０９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２２】
Ｒ１９、Ｒ２０、Ｒ２１、及びＲ２２がそれぞれＨであり；ｕ及びｖが、それぞれ独立して、整数１～６である、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２３】
ＰＬが、アミノ酸残基、または２～１０個のアミノ酸残基を含有するペプチドである、請求項１２１または１２２に記載の方法。
【請求項１２４】
ＰＬが、２～５個のアミノ酸残基を含有するペプチドである、請求項１２３に記載の方法。
【請求項１２５】
ＰＬが、Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｃｉｔ－Ｖａｌ．Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｃｉｔ、Ｌｅｕ－Ｃｉｔ、Ｉｌｅ－Ｃｉｔ、Ｔｒｐ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ａｌａ、Ｐｈｅ－Ｎ⁹－トシル－Ａ

ｒｇ、Ｐｈｅ－Ｎ^{9}－ニトロ－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｖａｌ、Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号５５）、β－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号５６）、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ（配列番号５７）、Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ａｒｇ－Ａｒｇ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｍｅｔ、Ｍｅｔ－Ａｌａ、Ｇｌｎ－Ｖａｌ、Ａｓｎ－Ａｌａ、Ｇｌｎ－Ｐｈｅ、Ｇｌｎ－Ａｌａ、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｌａ、及びβ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ（配列番号５８）からなる群から選択される、請求項１１０に記載の方法。

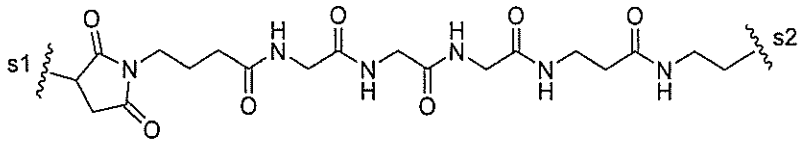
【請求項１２６】

P_Lが、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｌａ、またはβ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙである、請求項１２５に記載の方法。

【請求項１２７】

Ｌが、以下の構造式：

【化２７】



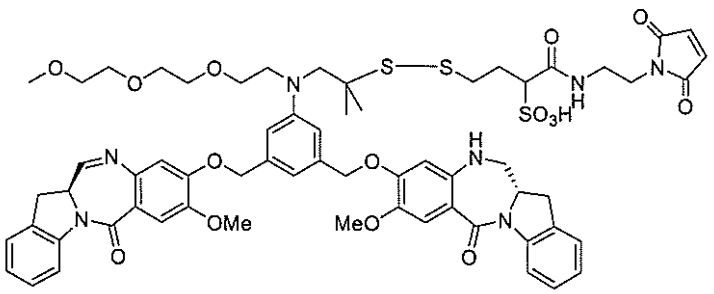
（Ｌ４）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項１２１に記載の方法。

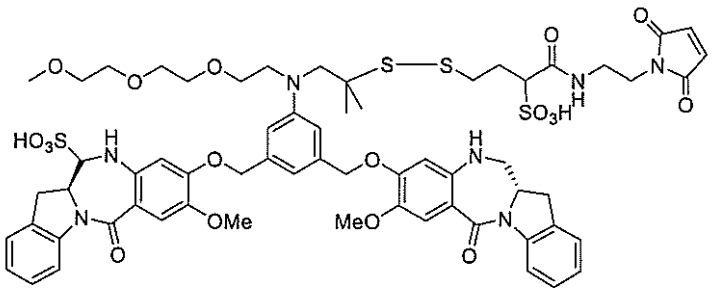
【請求項１２８】

前記式（Ｉ）の化合物が、以下の式：

【化２８】

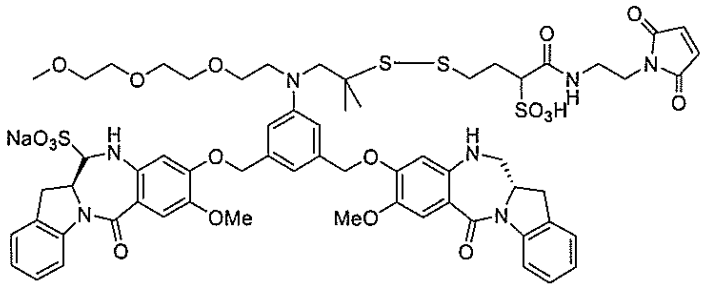


（Ｉ４）；もしくは



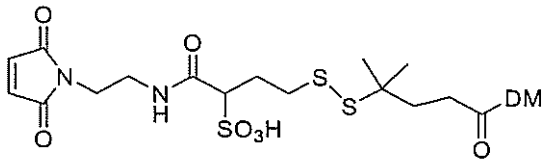
（Ｉ５）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項１～６４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２９】
前記化合物が、以下の式：
【化２９】

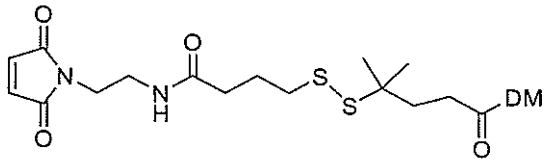


（Ｉ６）

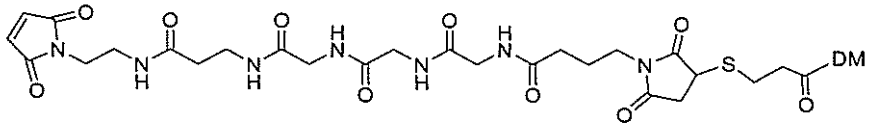
によって表される、請求項１２８に記載の方法。
【請求項１３０】
前記式（Ｉ）の化合物が、以下の式：
【化３０】



（Ｉ７）；

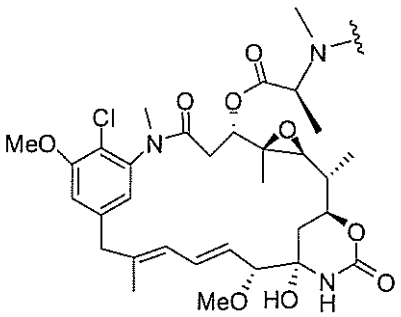


（Ｉ８）；もしくは



（Ｉ９）

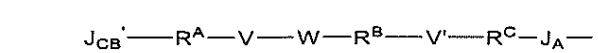
によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、ＤＭは、以下の式：
【化３１】



によって表される薬物部分である、請求項１～６４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３１】
前記式（Ｉ）の化合物が、以下の式：

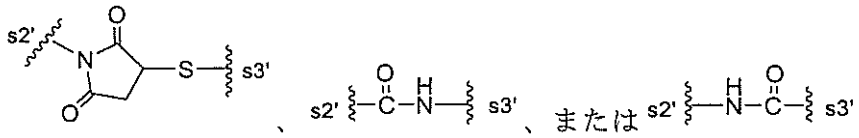
【化３２】

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：
Ｌ２’は、マレイミド部分を有するスペーサーであり；
Ａは、アミノ酸、または２～２０個のアミノ酸を含むペプチドであり；
Ｒ１Ａ及びＲ２Ａはそれぞれ独立して、ＨまたはＣ１－３アルキルであり；
Ｌ１はスペーサーであり；
Ｄ－Ｌ１－ＳＨは、細胞毒性剤である、請求項１～６４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３２】
少なくともＲ１Ａ及びＲ２ＡがＨである、請求項１３１に記載の方法。
【請求項１３３】
Ｒ１Ａ及びＲ２Ａがそれぞれ独立して、ＨまたはＭｅである、請求項１３１に記載の方法。
【請求項１３４】
Ｒ１Ａ及びＲ２Ａのうち一方がＨであり、他方がＭｅである、請求項１３１に記載の方法。
【請求項１３５】
Ｒ１Ａ及びＲ２ＡがいずれもＨである、請求項１３３に記載の方法。
【請求項１３６】
Ｌ１が、－Ｌ１’－Ｃ（＝Ｏ）－であり；Ｌ１’が、アルキレンまたはシクロアルキレンである、請求項１３１～１３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３７】
Ｌ１’がＣ１－１０アルキレンである、請求項１３６に記載の方法。
【請求項１３８】
Ｌ１が、－ＣＲ３ＡＲ４Ａ－（ＣＨ２）１－８－Ｃ（＝Ｏ）－であり；Ｒ３Ａ及びＲ４Ａがそれぞれ独立して、ＨまたはＭｅである、請求項１３７に記載の方法。
【請求項１３９】
Ｌ１が－ＣＲ３ＡＲ４Ａ－（ＣＨ２）３－５－Ｃ（＝Ｏ）－である、請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４０】
Ｒ３Ａ及びＲ４ＡがいずれもＭｅである、請求項１３８または１３９に記載の方法。
【請求項１４１】
Ｌ１が－（ＣＨ２）４－６－Ｃ（＝Ｏ）－である、請求項１３９に記載の方法。
【請求項１４２】
Ｌ２’が、以下の構造式：
【化３３】

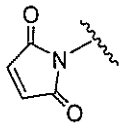


［式中：
ＲＡは、アルキレン、シクロアルキルアルキレン、またはアリーレンであり；
ＲＢ及びＲＣは、それぞれ独立して、存在しないか、アルキレン、シクロアルキレン、またはアリーレンであり；
Ｖ及びＶ’はそれぞれ独立して、－（Ｏ－ＣＨ２－ＣＨ２）ｐ１－、または－（ＣＨ２－ＣＨ２－Ｏ）ｐ１－であり；
ｐ１は、０または整数１～１０であり；
Ｗは、存在しないか、

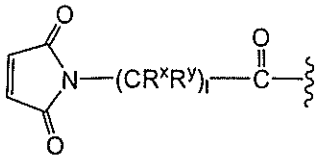
【化３４】



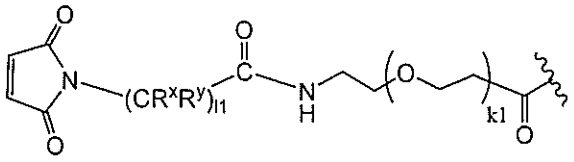
（式中、ｓ２’は、Ｖ、R^A、またはＪＣＢ’に結合される部位を示し、ｓ３’は、R^R、Ｖ’、R^C、またはＪＡに結合される部位を示す）であり；
ＪＣＢ’は、
【化３５】



であり；
ＪＡは、－Ｃ（＝Ｏ）－である］によって表される、請求項１３１～１４１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４３】
ｐ１が０であり、R^Cが存在しない、請求項１４２に記載の方法。
【請求項１４４】
Ｌ２’が、以下の構造式：
【化３６】



（Ｌ２ａ’）；または

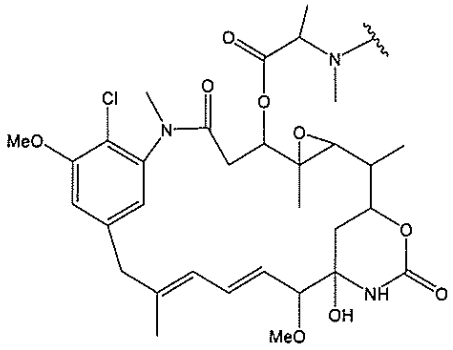


（Ｌ２ｂ’）

［式中：
R^x及びR^yは、各存在について、独立してＨ、－ＯＨ、ハロゲン、－Ｏ－（Ｃ１－４アルキル）、－ＳＯ３Ｈ、－ＮＲ４０Ｒ４１Ｒ４２$^+$、または－ＯＨ、ハロゲン、－ＳＯ３Ｈ、もしくは－ＮＲ４０Ｒ４１Ｒ４２$^+$により任意選択で置換されるＣ１－４アルキルであり、式中、Ｒ４０、Ｒ４１、及びＲ４２は、それぞれ独立して、ＨまたはＣ１－４アルキルであり；
ｌ及びｌ１は、それぞれ独立して、整数１～１０であり；
ｋ１は、整数１～１２である］によって表される、請求項１３１～１４２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４５】
R^x及びR^yがすべてＨである、請求項１４４に記載の方法。
【請求項１４６】
ｌ及びｌ１がそれぞれ、整数２～６である、請求項１４４または１４５に記載の方法。
【請求項１４７】
Ａがプロテアーゼによって切断可能なペプチドである、請求項１３１～１４６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１４８】
Ａが、腫瘍組織に発現するプロテアーゼによって切断可能なペプチドである、請求項１２６に記載の方法。
【請求項１４９】
Ａが、それぞれ独立してＬまたはＤ異性体であるＡｌａ、Ａｒｇ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、Ｃｉｔ、Ｃｙｓ、セリノ－Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、及びＶａｌからなる群より選択される、－ＮＨ－ＣＲ^{1}Ｒ^{2}－Ｓ－Ｌ$_{1}$－Ｄと共有結合されるアミノ酸を有するペプチドである、請求項１３１～１４６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５０】
－ＮＨ－ＣＲ^{1}Ｒ^{2}－Ｓ－Ｌ$_{1}$－Ｄに結合される前記アミノ酸が、Ｌアミノ酸である、請求項１３１～１４９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５１】
Ａが、２～５個のアミノ酸残基を含有するペプチドである、請求項１４７～１５０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５２】
Ａが、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｃｉｔ、Ｌｅｕ－Ｃｉｔ、Ｉｌｅ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ａｌａ、Ｐｈｅ－Ｎ^{9}－トシル－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｎ^{9}－ニトロ－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｖａｌ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号５６）、β－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号５７）、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ（配列番号５８）、Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ａｒｇ－Ａｒｇ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｍｅｔ、Ｇｌｎ－Ｖａｌ、Ａｓｎ－Ａｌａ、Ｇｌｎ－Ｐｈｅ、Ｇｌｎ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｐｒｏ、及びＤ－Ａｌａ－ｔＢｕ－Ｇｌｙからなる群より選択され、各ペプチドの最初のアミノ酸は、Ｌ$_{2}$基に結合され、各ペプチドの最後のアミノ酸は、－ＮＨ－ＣＲ^{1}Ｒ^{2}－Ｓ－Ｌ$_{1}$－Ｄに結合される、請求項１３１～１４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５３】
Ａが、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｐｒｏ、またはＤ－Ａｌａ－ｔＢｕ－Ｇｌｙである、請求項１５２に記載の方法。
【請求項１５４】
Ｄがメイタンシノイドである、請求項１３１～１５３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５５】
Ｄが、以下の式：

【化３７】

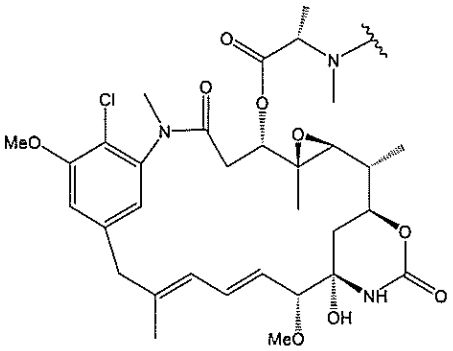


によって表される、請求項１５４に記載の方法。

【請求項１５６】

Ｄが、以下の式：

【化３８】

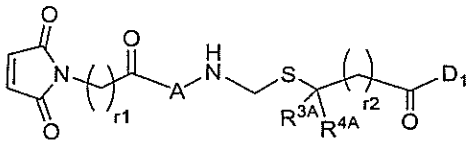


によって表される、請求項１５５に記載の方法。

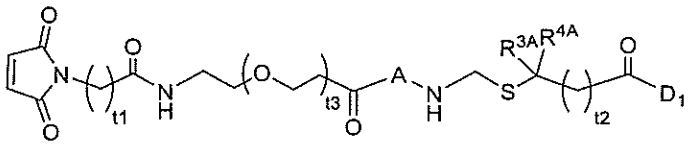
【請求項１５７】

前記式（Ｉ）の化合物が、以下の式：

【化３９】



（Ｉ－ｂ）；もしくは



（Ｉ－ｃ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：

Ｒ３Ａ及びＲ４ＡはそれぞれＨまたはＭｅであり；

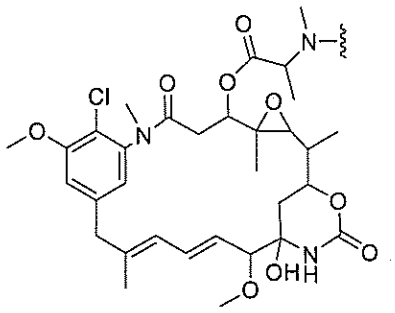
ｒ１及びｔ１は、それぞれ独立して、整数１～６であり；

ｒ２及びｔ２は、それぞれ独立して、整数１～７であり；

ｔ３は、整数１～１２であり；

Ｄ１は、以下の式：

【化４０】



によって表される、請求項１３１～１５４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１５８】

Ａが、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｐｒｏ、またはＤ－Ａｌａ－ｔＢｕ－Ｇｌｙである、請求項１５７に記載の方法。

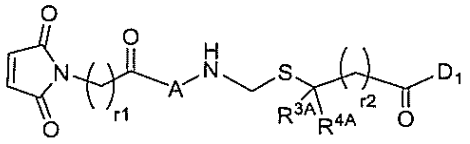
【請求項１５９】

ｒ１が、整数２～４であり；ｒ２が、整数３～５である、請求項１５７または１５８に記載の方法。

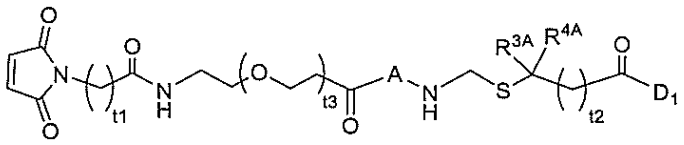
【請求項１６０】

前記式（Ｉ）の化合物が、以下の式：

【化４１】



（Ｉ－ｄ）；または



（Ｉ－ｅ）

［式中：
ｒ１及びｔ１はそれぞれ、整数２～６であり；
ｒ２及びｔ２はそれぞれ、整数２～５であり；
ｔ３は、整数１～１２である］によって表される、請求項１５９に記載の方法。

【請求項１６１】

Ｒ３Ａ及びＲ４ＡがいずれもＭｅである、請求項１５７～１６０のいずれか１項に記載の化合物。

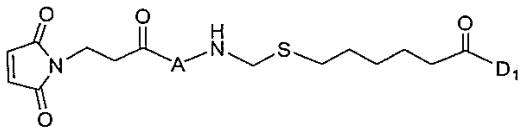
【請求項１６２】

Ｒ３Ａ及びＲ４ＡがいずれもＨである、請求項１５７～１６０のいずれか１項に記載の化合物。

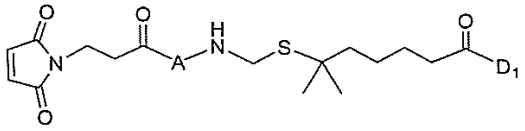
【請求項１６３】

前記化合物が、以下の式：

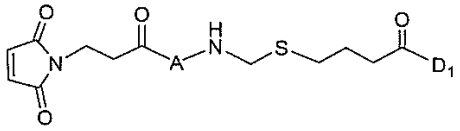
【化４２】



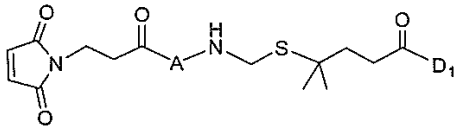
（Ｉ－ｆ）；



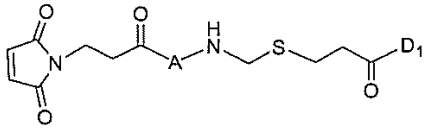
（Ｉ－ｇ）；



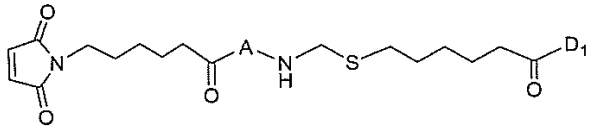
（Ｉ－ｈ）；



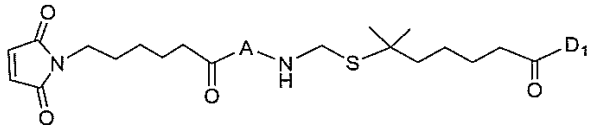
（Ｉ－ｉ）；



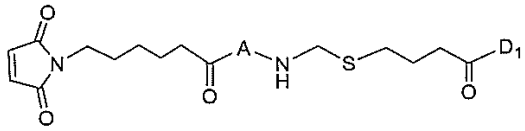
（Ｉ－ｊ）；



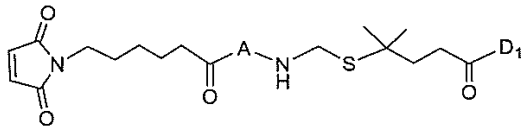
（Ｉ－ｋ）；



（Ｉ－ｌ）；

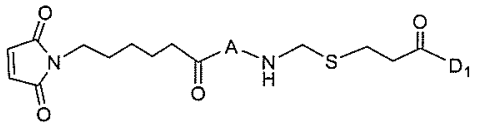


（Ｉ－ｍ）；

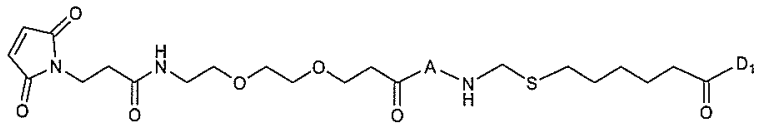


（Ｉ－ｎ）；

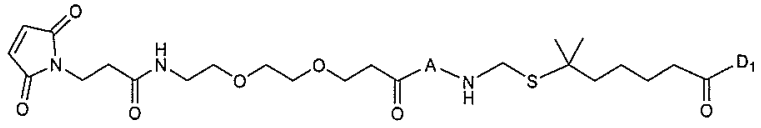
【化４３】



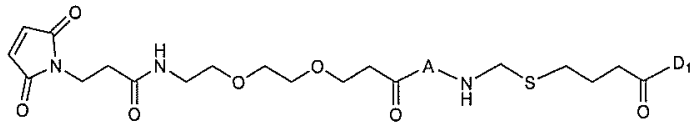
（Ｉ－ｏ）；



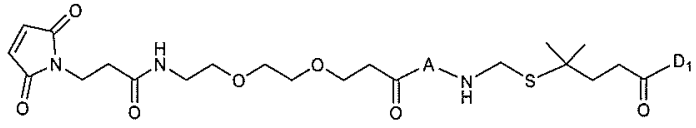
（Ｉ－ｐ）；



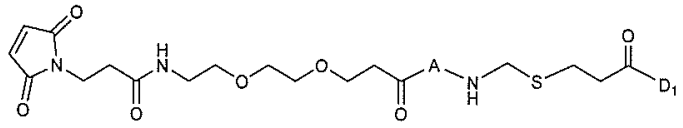
（Ｉ－ｑ）；



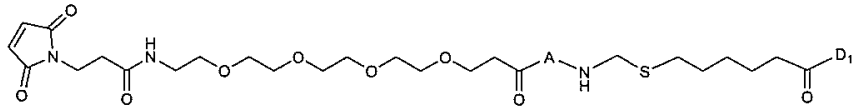
（Ｉ－ｒ）；



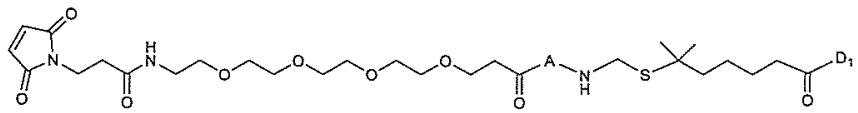
（Ｉ－ｓ）；



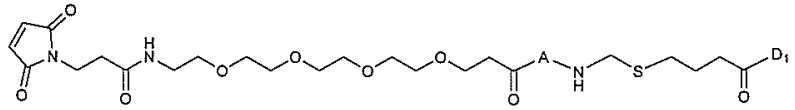
（Ｉ－ｔ）；



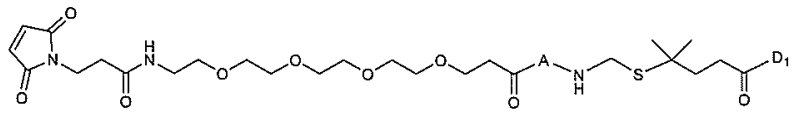
（Ｉ－ｕ）；



（Ｉ－ｖ）；

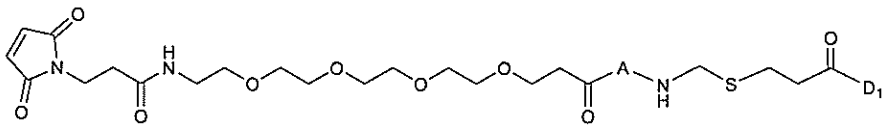


（Ｉ－ｗ）；



（Ｉ－ｘ）；もしくは

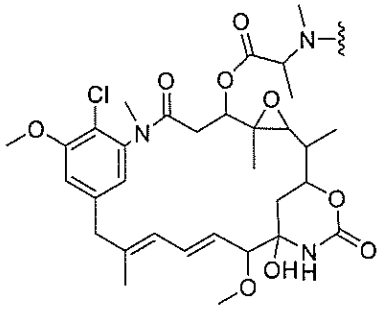
【化４４】



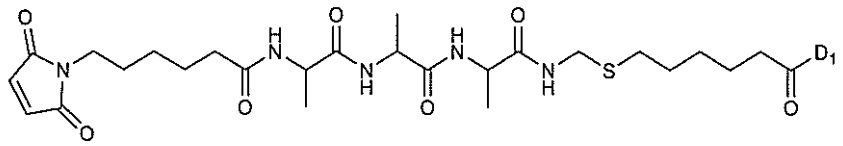
（Ｉ－ｙ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：
Ａは、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａ

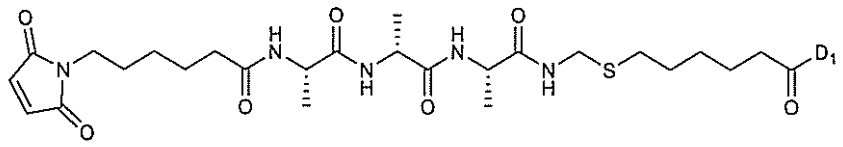
ｌａ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｐｒｏ、またはＤ－Ａｌａ－ｔＢｕ－Ｇｌｙであり；
Ｄ１は、以下の式：
【化４５】



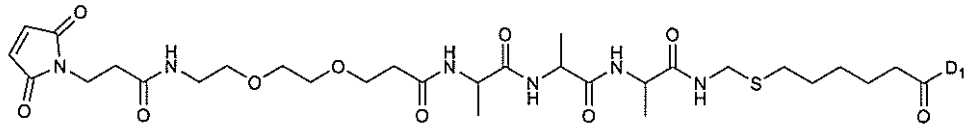
によって表される、請求項１５７の化合物。
【請求項１６４】
前記化合物が、以下の式：
【化４６】



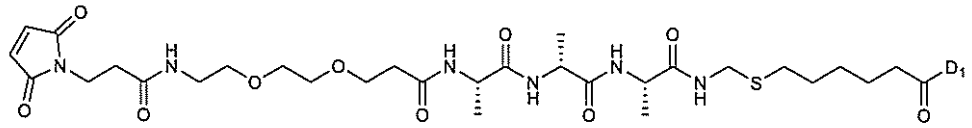
（Ｉ１０）；



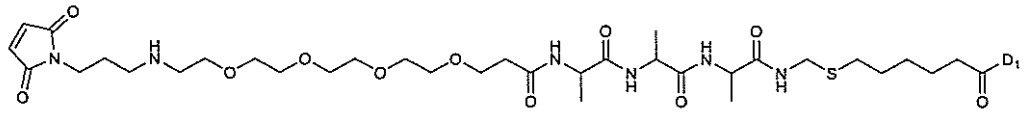
（Ｉ１１）；



（Ｉ１２）；

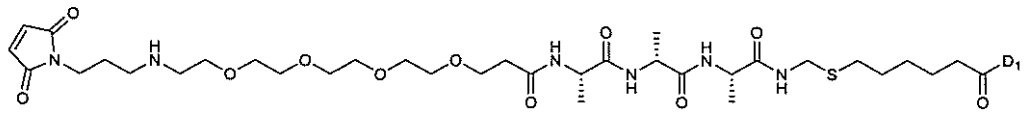


（Ｉ１３）；



（Ｉ１４）；

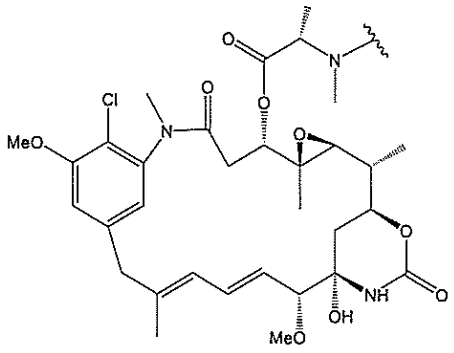
または



（Ｉ１５）

［式中、Ｄ１は、以下の式：

【化４７】

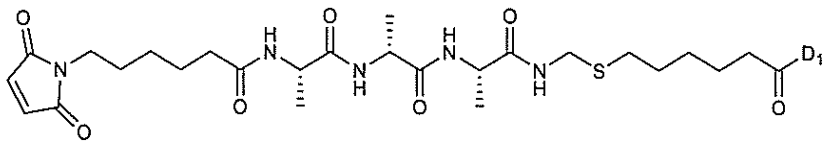


によって表される］によって表される、請求項１６３に記載の方法。

【請求項１６５】

前記式（Ｉ）の化合物が、以下の式：

【化４８】



（Ｉ１１）

によって表される、請求項１６４に記載の方法。

【請求項１６６】

前記システイン改変抗体またはその抗原結合断片が、抗葉酸受容体抗体もしくはその抗原結合断片、抗ＥＧＦＲ抗体もしくはその抗原結合断片、抗ＣＤ３３抗体もしくはその抗原結合断片、抗ＣＤ１９抗体もしくはその抗原結合断片、抗Ｍｕｃ１抗体もしくはその抗原結合断片、抗ＣＤ３７抗体もしくはその抗原結合断片、抗ｃＭｅｔ抗体もしくはその抗原結合断片、または抗ＥｐＣＡＭ抗体もしくはその抗原結合断片である、請求項２３～１６５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１６７】

前記システイン改変抗体または抗原結合断片が、抗ＣＤ１２３抗体またはその抗原結合断片である、請求項２３～１６５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１６８】

前記抗ＣＤ１２３抗体またはその抗原結合断片が、ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ$_H$１、配列番号５に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ$_H$２、及び配列番号６に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ$_H$３を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；ｂ）配列番号１に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ$_L$１、配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ$_L$２、及び配列番号３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ$_L$３を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む、請求項１６７に記載の方法。

【請求項１６９】

前記抗ＣＤ１２３抗体またはその抗原結合断片が、配列番号７のＶ$_H$配列及び配列番号９のＶ$_L$配列を含む、請求項１６７に記載の方法。

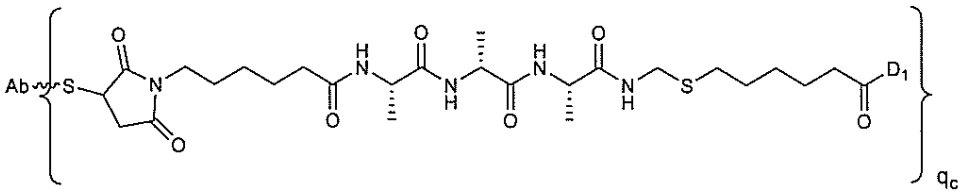
【請求項１７０】

前記抗ＣＤ１２３抗体が、ａ）配列番号８に記載の前記アミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖と；ｂ）配列番号１０に記載の前記アミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖とを含む、請求項１６７に記載の方法。

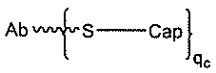
【請求項１７１】

前記システイン改変抗体またはその抗原結合断片が、抗ＡＤＡＭ９抗体またはその抗原結合断片である、請求項２３～１６５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１７２】
前記抗ＡＤＡＭ９抗体またはその抗原結合断片が、ヒトＡＤＡＭ９及びカニクイザルＡＤＡＭ９に特異的に結合するヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはその抗原結合断片である、請求項１７１に記載の方法。
【請求項１７３】
前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはその抗原結合断片が、ａ）配列番号２４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ$_H$１、配列番号２５に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ$_H$２、及び配列番号２６に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ$_H$３を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；ｂ）配列番号２１に記載のアミノ酸配列を有するＣＤ$_L$Ｒ１、配列番号２２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ$_L$２、及び配列番号２３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ$_L$３を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む、請求項１７２に記載の方法。
【請求項１７４】
前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはその抗原結合断片が、配列番号２７の重鎖可変ドメイン（Ｖ$_H$）配列及び配列番号２８の軽鎖可変ドメイン（Ｖ$_L$）配列を含む、請求項１７２または１７３に記載の方法。
【請求項１７５】
前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはその抗原結合断片が、配列番号２９に記載の前記アミノ酸配列を有する重鎖と；配列番号３０に記載の前記アミノ酸配列を有する軽鎖とを含む、請求項１７４に記載の方法。
【請求項１７６】
前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはそのＡＤＡＭ９結合断片が、カニクイザルＡＤＡＭ９への結合親和性において少なくとも１００倍の増強を有するように最適化され、キメラまたはマウスの親抗体と比較して、ヒトＡＤＡＭ９に対して高い結合親和性を保有する、請求項１７１～１７５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７７】
以下の式：
【化４９】

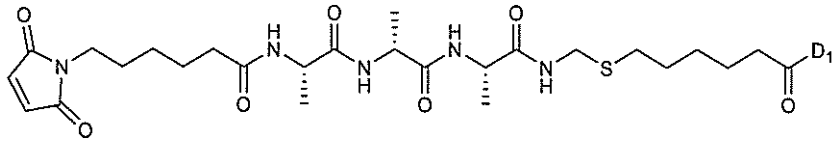


によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する方法であって、
（ａ）以下の式：
【化５０】



によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、
還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、前記キャッピング剤（Ｃａｐ）が除去されて前記還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；
（ｂ）前記改変システイン残基の前記遊離チオール基を酸化することなく、前記還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させて前記ＣｙｓＡｂを形成する工程と；
（ｃ）前記ＣｙｓＡｂを、以下の式：

【化５１】

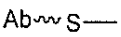


（Ｉ１１）

によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより前記ＡＤＣを形成する工程とを含み、工程（ａ）の前記還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）に使用し、工程（ｂ）の前記ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、

式中：

【化５２】

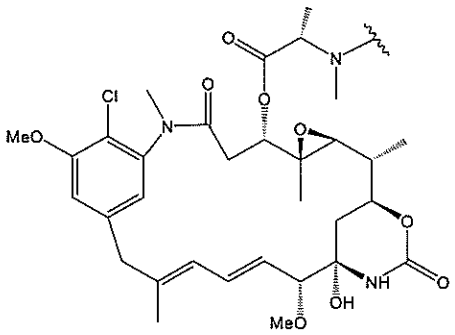


は、前記改変システイン残基に位置する前記チオール基を介して前記細胞毒性剤と共有結合されるシステイン改変抗体（ＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片であり；前記ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号２４、２５、及び２６の配列を有するＣＤＲ$_{H}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{H}$２ドメイン、及びＣＤＲ$_{H}$３ドメインと、それぞれ配列番号２１、２２、及び２３の配列を有するＣＤＲ$_{L}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{L}$２ドメイン、及びＣＤＲ$_{L}$３ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはそのＡＤＡＭ９結合断片であり；

q_cは、１または２であり；

D_1は、以下の式：

【化５３】



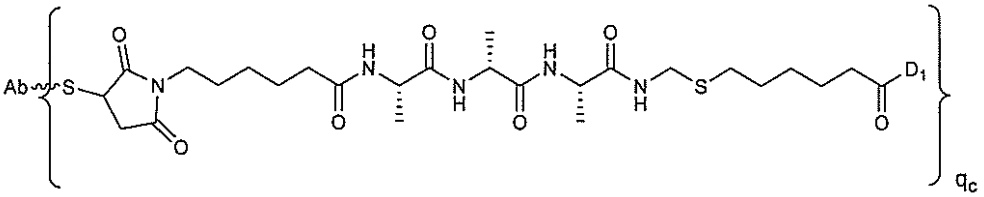
によって表され；

Ｃａｐはキャッピング剤である、前記方法。

【請求項１７８】

以下の式：

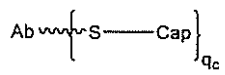
【化５４】



によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、

（ａ）以下の式：

【化５５】

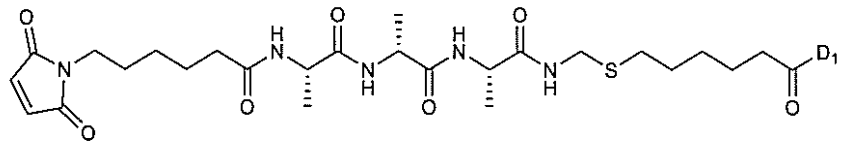


によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、前記キャッピング剤（Ｃａｐ）が除去されて前記還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；

（ｂ）前記改変システイン残基の前記遊離チオール基を酸化することなく、前記還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させて前記ＣｙｓＡｂを形成する工程と；

（ｃ）前記ＣｙｓＡｂを、以下の式：

【化５６】



（Ｉ１１）

によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより前記ＡＤＣを形成する工程とを含み、工程（ａ）の前記還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）に使用し、工程（ｂ）の前記ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｃ）が連続して実行され、

式中：

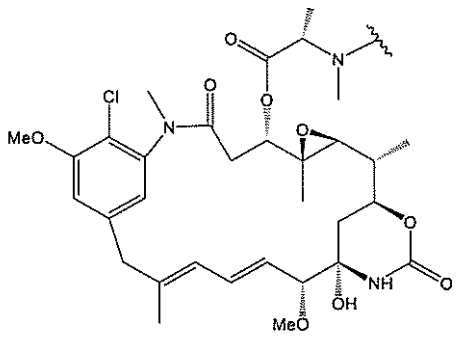
【化５７】

は、前記改変システイン残基に位置する前記チオール基を介して前記細胞毒性剤と共有結合されるシステイン改変抗体（ＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片であり；前記ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号２４、２５、及び２６の配列を有するＣＤＲ$_{H}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{H}$２ドメイン、及びＣＤＲ$_{H}$３ドメインと、それぞれ配列番号２１、２２、及び２３の配列を有するＣＤＲ$_{L}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{L}$２ドメイン、及びＣＤＲ$_{L}$３ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはそのＡＤＡＭ９結合断片であり；

ｑ$_{c}$は、１または２であり；

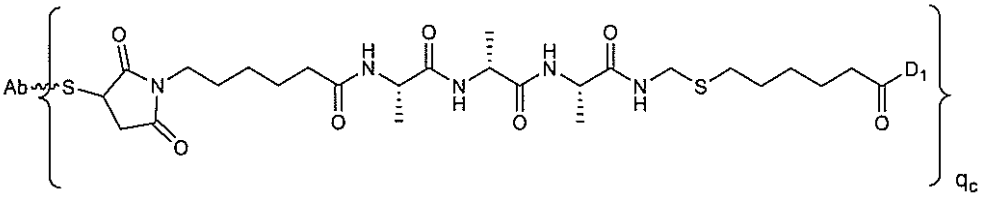
Ｄ$_{1}$は、以下の式：

【化５８】

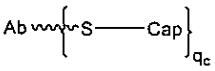


によって表され；

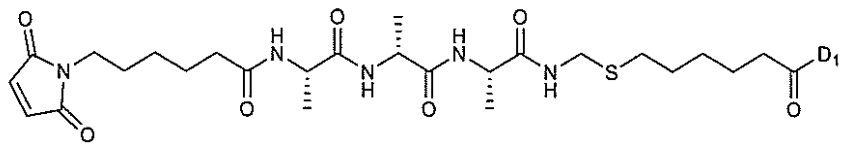
ＣａｐはキャッピングＣａｐはキャッピング剤である、前記方法。
【請求項１７９】
以下の式：
【化５９】



によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、
（ａ）以下の式：
【化６０】

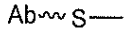


によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、前記キャッピング剤（Ｃａｐ）が除去されて前記還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；
（ｂ）前記改変システイン残基の前記遊離チオール基を酸化することなく、前記還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させて前記ＣｙｓＡｂを形成する工程と；
（ｃ）前記ＣｙｓＡｂを、以下の式：
【化６１】



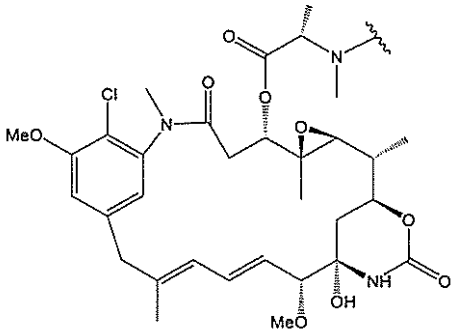
（Ｉ１１）

によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより前記ＡＤＣを形成する工程と；
（ｄ）式（Ｉ１１）の非結合化合物を除去する工程とを含み、
工程（ａ）の前記還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、
工程（ｂ）の前記ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、
工程（ａ）～（ｄ）を連続して実行し、
式中：
【化６２】



は、前記改変システイン残基に位置する前記チオール基を介して前記細胞毒性剤と共有結合されたシステイン改変抗体（ＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片であり；前記ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号２４、２５、及び２６の配列を有するＣＤＲ$_{H}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{H}$２ドメイン、及びＣＤＲ$_{H}$３ドメインと、それぞれ配列番号２１、２２、及び２３の配列を有するＣＤＲ$_{L}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{L}$２ドメイン、及びＣＤＲ$_{L}$３ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはそのＡＤＡＭ９結合断片であり；
ｑ$_{c}$は、１または２であり；

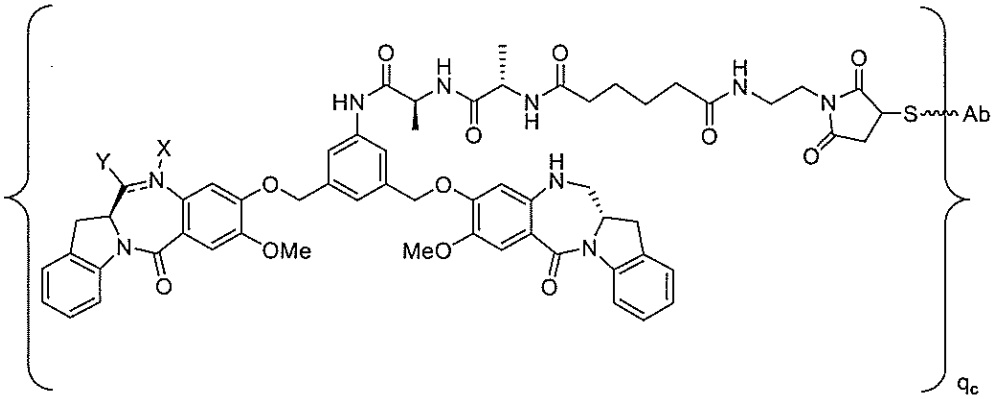
Ｄ１は、以下の式：
【化６３】



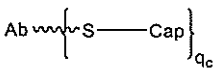
によって表され；
Ｃａｐはキャッピング剤である、前記方法。
【請求項１８０】
前記方法が、前記複合体を安定緩衝液に交換する工程（ｅ）をさらに含む、請求項１７９に記載の方法。
【請求項１８１】
工程（ｅ）が連続して実行される、請求項１８０に記載の方法。
【請求項１８２】
シングルパスタンジェンシャルフロー濾過（ＳＰＴＦＦ）及び／または向流ダイアフィルトレーションを使用して、前記式（Ｉ）の非結合化合物を除去、及び／または前記ＡＤＣを前記安定緩衝液に交換する、請求項１７９～１８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８３】
工程（ｄ）において、前記式（Ｉ）の非結合化合物の除去に向流ダイアフィルトレーションを使用する、請求項１７９～１８２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８４】
工程（ａ）において、前記反応混合物を連続して回収し、フローリアクターを通して供給する間、前記ｃＣｙｓＡｂ及び前記還元剤を前記反応容器に連続して添加する、請求項１７８～１８３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８５】
前記反応容器から回収する前記反応混合物の体積流量が、前記反応容器に添加される前記還元剤及び前記ｃＣｙｓＡｂの合計流量と同じである、請求項１８４に記載の方法。
【請求項１８６】
工程（ｂ）において、前記反応混合物を連続して回収し、フローリアクターを通して供給する間、前記還元型抗体及び前記選択的酸化剤を前記反応容器に連続して添加する、請求項１７８～１８５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８７】
前記反応容器から回収する前記反応混合物の体積流量が、前記反応容器に添加される前記還元型抗体及び前記選択的酸化剤の合計流量と同じである、請求項１８６に記載の方法。
【請求項１８８】
工程（ｃ）において、前記ＣｙｓＡｂ及び前記式（Ｉ１１）の化合物を反応容器に連続して添加し、前記反応混合物を前記反応容器から連続して回収して、フローリアクターを通して供給する、請求項１７８～１８７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８９】
前記反応容器から回収する前記反応混合物の体積流量が、前記反応容器に添加される前記ＣｙｓＡｂ及び前記式（Ｉ１１）の化合物の合計流量と同じである、請求項１８８に記載の方法。
【請求項１９０】
前記反応容器が、連続撹拌槽型反応器（ＣＳＴＲ）である、請求項１８２～１８９のいず

れか１項に記載の方法。
【請求項１９１】
前記フローリアクターが、プラグフローリアクター（ＰＦＲ）である、請求項１８２～１９０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９２】
前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはそのＡＤＡＭ９結合断片が、配列番号２７の配列を有する重鎖可変ドメイン（V_H）と、配列番号２８の配列を有する軽鎖可変ドメイン（V_L）とを含む、請求項１７７～１９１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９３】
前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体が、配列番号２９の配列を有する重鎖と、配列番号３０の配列を有する軽鎖とを含む、請求項１７７～１９１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９４】
前記還元剤がＤＰＰＡである、請求項１７７～１９３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９５】
工程（ａ）で１０～２０モル当量のＤＰＰＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用する、請求項１９４に記載の方法。
【請求項１９６】
工程（ａ）で１５～１７モル当量のＤＰＰＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用する、請求項１９４に記載の方法。
【請求項１９７】
工程（ａ）で１６モル当量のＤＰＰＡを、それぞれ１当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用する、請求項１９４に記載の方法。
【請求項１９８】
工程（ａ）の前記反応が、ｐＨ６．０～７．０またはｐＨ６．３～６．７で実施される、請求項１７７～１９７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９９】
工程（ａ）の前記反応が、ｐＨ６．５で実施される、請求項１９８に記載の方法。
【請求項２００】
前記酸化剤がＤＨＡＡである、請求項１７７～１９９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０１】
工程（ｂ）で２０～３０モル当量のＤＨＡＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用する、請求項２００に記載の方法。
【請求項２０２】
工程（ｂ）で２３～２５モル当量のＤＨＡＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用する、請求項２００に記載の方法。
【請求項２０３】
工程（ｂ）で２４モル当量のＤＨＡＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用する、請求項２００に記載の方法。
【請求項２０４】
工程（ｂ）の前記反応が、ｐＨ６．０～７．０またはｐＨ６．３～６．７で実施される、請求項１７７～２０３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０５】
工程（ｂ）の前記反応が、ｐＨ６．５で実施される、請求項２０４に記載の方法。
【請求項２０６】
工程（ｃ）の前記反応が、ｐＨ６．０～７．０またはｐＨ６．３～６．７で実施される、請求項１７７～２０５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０７】
工程（ｃ）の前記反応が、ｐＨ６．５で実施される、請求項２０６に記載の方法。
【請求項２０８】
工程（ｃ）で２～１０モル当量の前記式（Ｉ１１）の化合物を、各当量ＣｙｓＡｂに対し

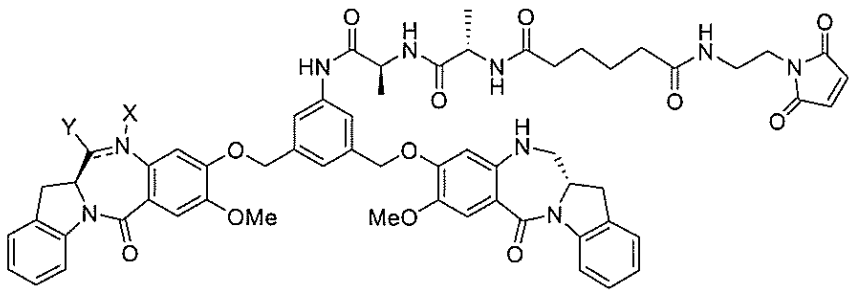
て使用する、請求項１７７～２０７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０９】
４．６モル当量の前記式（Ｉ１１）の化合物を、各当量のＣｙｓ Ａｂに対して使用する、請求項２０８に記載の方法。
【請求項２１０】
Ｃａｐが、システイン、グルタチオン、またはそれらの組み合わせである、請求項１７７～２０９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１１】
ｑｃが２である、請求項１７７～２１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１２】
以下の式：
【化６４】



によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する方法であって、
（ａ）以下の式：
【化６５】



によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓ Ａｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、前記キャッピング剤が除去されて前記還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；
（ｂ）前記改変システイン残基の前記遊離チオール基を酸化することなく、前記還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させて前記Ｃｙｓ Ａｂを形成する工程と；
（ｃ）前記Ｃｙｓ Ａｂを、以下の式：
【化６６】

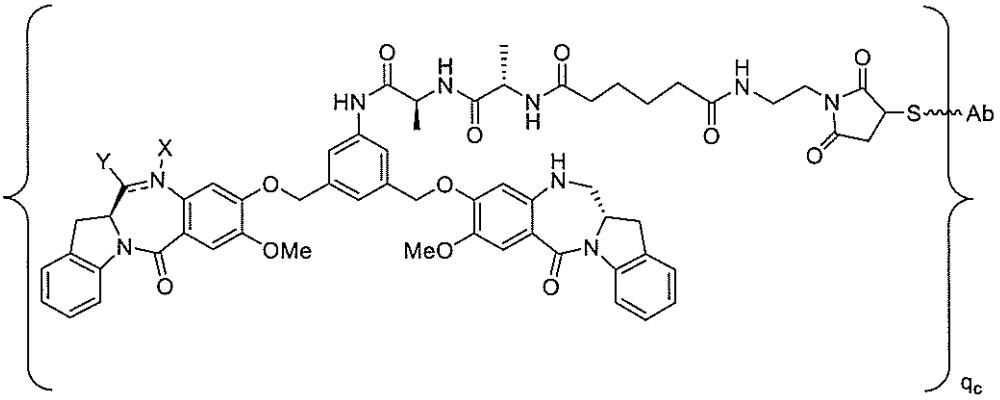


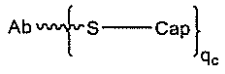
（Ｉ１ａ）

によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより前記ＡＤＣを形成する工程とを含み、工程（ａ）の前記還元型抗体またはその抗原結合断片を精

製せずに工程（ｂ）に使用し、工程（ｂ）の前記ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、式中：
ＮとＣ間の二重線
【化６７】

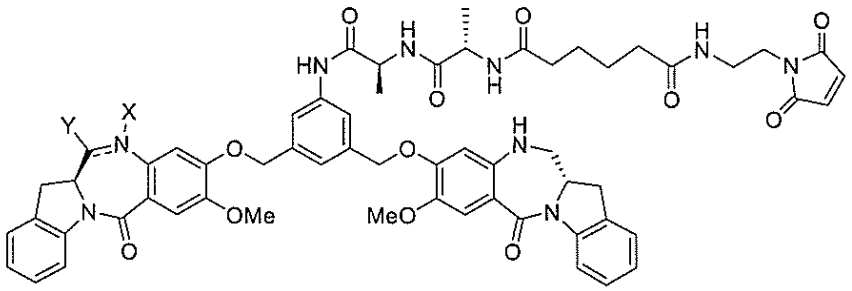
は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは－Ｈであり、単結合の場合は、Ｘが－Ｈであり、Ｙは－ＳＯ３Ｍであり；Ｍは、Ｈ＋またはカチオンであり；
【化６８】

は、前記改変システイン残基に位置する前記チオール基を介して前記細胞毒性剤と共有結合される前記システイン改変抗体またはその抗原結合断片であって、前記システイン改変抗体は、
ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号５に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２、及び配列番号６に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；
ｂ）配列番号１に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ１、配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ２、及び配列番号３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ３を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む抗ＣＤ１２３抗体または抗原結合断片であり；
ｑｃは、１または２であり；
Ｃａｐはキャッピング剤である、前記方法。
【請求項２１３】
以下の式：
【化６９】


によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、
（ａ）以下の式：
【化７０】


によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、前記キャッピング剤が除去されて前記還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；
（ｂ）前記改変システイン残基の前記遊離チオール基を酸化することなく、前記還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させて前記ＣｙｓＡｂを形成する工程と

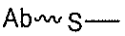
；
（ｃ）前記ＣｙｓＡｂを、以下の式：
【化７１】



（Ｉ１ａ）

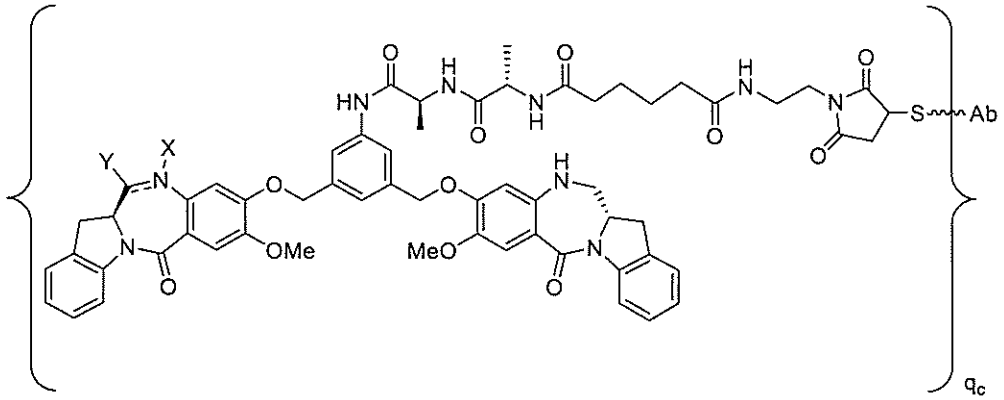
によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより前記ＡＤＣを形成する工程とを含み、工程（ａ）の前記還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）に使用し、工程（ｂ）の前記ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｃ）が連続して実行され、
式中：
ＮとＣ間の二重線
【化７２】
═

は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは－Ｈであり、単結合の場合は、Ｘが－Ｈであり、Ｙは－ＳＯ３Ｍであり；Ｍは、Ｈ＋またはカチオンであり；
【化７３】

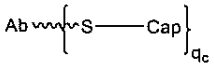


は、前記改変システイン残基に位置する前記チオール基を介して前記細胞毒性剤と共有結合される前記システイン改変抗体またはその抗原結合断片であって、前記システイン改変抗体は、
ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号５に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２、及び配列番号６に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；
ｂ）配列番号１に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ１、配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ２、及び配列番号３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ３を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む抗ＣＤ１２３抗体または抗原結合断片であり；
ｑｃは、１または２であり；
Ｃａｐはキャッピング剤である、前記方法。
【請求項２１４】
以下の式：

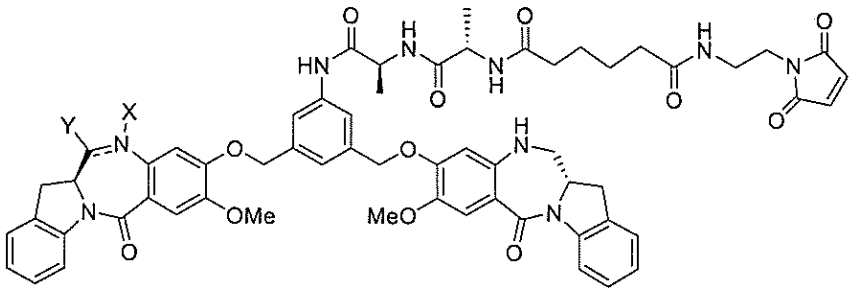
【化７４】



によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、
（ａ）以下の式：
【化７５】



によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、前記キャッピング剤が除去されて前記還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；
（ｂ）前記改変システイン残基の前記遊離チオール基を酸化することなく、前記還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させて前記ＣｙｓＡｂを形成する工程と；
（ｃ）前記ＣｙｓＡｂを、以下の式：
【化７６】



（Ｉ１ａ）

によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより前記ＡＤＣを形成する工程と；
（ｄ）式（Ｉ１ａ）の非結合化合物を除去する工程とを含み、工程（ａ）の前記還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）の前記ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｄ）を連続して実行し、
式中：
ＮとＣ間の二重線
【化７７】
==

は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは－Ｈであり、単結合の場合は、Ｘが－Ｈであり、Ｙは－ＳＯ３Ｍであり；Ｍは、Ｈ＋またはカ

チオンであり；
【化７８】

は、前記改変システイン残基に位置する前記チオール基を介して前記細胞毒性剤と共有結合された前記システイン改変抗体またはその抗原結合断片であって、前記システイン改変抗体は、
ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号５に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２、及び配列番号６に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；
ｂ）配列番号１に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ１、配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ２、及び配列番号３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ３を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む抗ＣＤ１２３抗体または抗原結合断片であり；
ｑｃは、１または２であり；
Ｃａｐはキャッピング剤である、前記方法。
【請求項２１５】
前記方法が、前記複合体を安定緩衝液に交換する工程（ｅ）をさらに含む、請求項２１４に記載の方法。
【請求項２１６】
工程（ｅ）が連続して実行される、請求項２１５に記載の方法。
【請求項２１７】
シングルパスタンジェンシャルフロー濾過（ＳＰＴＦＦ）及び／または向流ダイアフィルトレーションを使用して、前記式（Ｉ）の非結合化合物を除去、及び／または前記ＡＤＣを前記安定緩衝液に交換する、請求項２１４～２１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１８】
工程（ｄ）において、前記式（Ｉ）の非結合化合物の除去に向流ダイアフィルトレーションを使用する、請求項２１４～２１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１９】
工程（ａ）において、前記反応混合物を連続して回収し、フローリアクターを通して供給する間、前記ｃＣｙｓＡｂ及び前記還元剤を前記反応容器に連続して添加する、請求項２１３～２１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２０】
前記反応容器から回収する前記反応混合物の体積流量が、前記反応容器に添加される前記還元剤及び前記ｃＣｙｓＡｂの合計流量と同じである、請求項２１９に記載の方法。
【請求項２２１】
工程（ｂ）において、前記反応混合物を連続して回収し、フローリアクターを通して供給する間、前記還元型抗体及び前記選択的酸化剤を前記反応容器に連続して添加する、請求項２１３～２２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２２】
前記反応容器から回収する前記反応混合物の体積流量が、前記反応容器に添加される前記還元型抗体及び前記選択的酸化剤の合計流量と同じである、請求項２２１に記載の方法。
【請求項２２３】
工程（ｃ）において、前記ＣｙｓＡｂ及び前記式（Ｉ１ａ）の化合物を反応容器に連続して添加し、前記反応混合物を前記反応容器から連続して回収して、フローリアクターを通して供給する、請求項２１３～２２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２４】
前記反応容器から回収する前記反応混合物の体積流量が、前記反応容器に添加される前記ＣｙｓＡｂ及び前記式（Ｉ１ａ）の化合物の合計流量と同じである、請求項２２３に記載の方法。
【請求項２２５】

前記反応容器が、連続撹拌槽型反応器（ＣＳＴＲ）である、請求項２１９～２２４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２６】
前記フローリアクターが、プラグフローリアクター（ＰＦＲ）である、請求項２１９～２２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２７】
前記抗ＣＤ１２３抗体またはその抗原結合断片が、配列番号７のＶ$_H$配列及び配列番号９のＶ$_L$配列を含む、請求項２１２～２１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２８】
前記抗ＣＤ１２３抗体が、
ａ）配列番号８に記載の前記アミノ酸配列を有する重鎖と；
ｂ）配列番号１０に記載の前記アミノ酸配列を有する軽鎖とを含む、請求項２１２～２１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２９】
前記還元剤がＤＰＰＡまたはＴＣＥＰである、請求項２１２～２２８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３０】
前記還元剤がＴＣＥＰである、請求項２２９に記載の方法。
【請求項２３１】
工程（ａ）の前記反応が、ｐＨ５．０～８．５、７．０～８．０、または７．５～７．７で実施される、請求項２１２～２３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３２】
工程（ａ）の前記反応が、ｐＨ７．５で実施される、請求項２３１に記載の方法。
【請求項２３３】
前記酸化剤がＤＨＡＡである、請求項２１２～２３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３４】
工程（ｂ）の前記反応が、ｐＨ５．０～８．５、７．０～８．０、または７．５～７．７で実施される、請求項２１２～２３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３５】
工程（ｂ）の前記反応が、ｐＨ７．５で実施される、請求項２３３に記載の方法。
【請求項２３６】
工程（ａ）の前記反応が、ｐＨ５．０～８．５、５．５～６．５、または５．８～６．２で実施される、請求項２１２～２３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３７】
工程（ｃ）の前記反応が、ｐＨ６．０で実施される、請求項２３６に記載の方法。
【請求項２３８】
前記還元剤がＴＣＥＰであり、工程（ａ）の前記反応が、ｐＨ７．５で実施され、前記酸化剤がＤＨＡＡであり；工程（ｂ）の前記反応が、ｐＨ７．５で実施され；工程（ｂ）の後、工程（ｃ）で前記ＣｙｓＡｂを前記細胞毒性剤と反応させる前に、前記反応混合物のｐＨを、ｐＨ７．５からｐＨ６．０に調整する、請求項２１２～２３７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３９】
前記キャッピング試薬が、システイン、ホモシステイン、グルタチオン、またはそれらの組み合わせである、請求項２１２～２３８のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、２０１９年３月２１日出願の米国仮出願第６２／８２１，７０７号、及び２０１９年６月４日出願の米国仮出願第６２／８５６，９４２号に対する優先権を主張するも

のであり、それぞれの内容が全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

本発明の分野

本発明は、一般に、細胞毒性剤と共有結合された１つ以上の不対システイン残基を有する細胞結合剤を含む細胞結合剤－薬物複合体を調製する方法に関する。

【背景技術】

【０００３】

細胞結合剤－薬物複合体（抗体－薬物複合体（ＡＤＣ）など）は、広範囲のがんにわたって有効性を有する強力なクラスの抗腫瘍剤として注目を集めている。細胞結合剤－薬物複合体（ＡＤＣなど）は、一般に３つの異なった要素、すなわち細胞結合剤（例えば、抗体）、リンカー、及び細胞毒性部分から構成される。細胞毒性薬部分は、マレイミド基などのチオール反応性基を介して抗体上のシステインチオール基に共有結合して、部位特異的ＡＤＣを形成することができる。部位特異的ＡＤＣを作製するために、システイン改変抗体を用いることができる。しかしながら、抗体産生時に、改変システインは、ジスルフィドを形成するシステインまたはグルタチオンなどの他のチオール含有部分によってキャップされている場合が多い。細胞毒性剤と結合する前に、ジスルフィドを還元剤で処理して、キャップ部分を除去し、細胞毒性剤と反応するための遊離チオールを形成する必要がある。そのような処理はまた、抗体の鎖間ジスルフィド結合を減少させるため、改変システイン上の遊離チオール基を再酸化しない選択的酸化工程によってこれを再形成する必要がある。選択的酸化は、穏やかな酸化剤の使用と、還元剤及びキャッピング剤、例えばシステイン及び／またはグルタチオンの除去によって達成される。還元と選択的酸化の工程は、システイン改変抗体を用いたＡＤＣの作製プロセスに複雑さを生じさせ、多くの場合、複数の精製工程を必要とする。それにより、ＡＤＣの大規模製造では、プロセスが煩雑になり、効率が低下する。

【０００４】

したがって、大規模製造プロセスに適した改変システイン抗体のＡＤＣを調製するための新たな効率的な方法を開発する必要がある。

【発明の概要】

【０００５】

本発明は、細胞毒性剤と共有結合されたシステイン改変抗体を含むＡＤＣを、反応工程間での精製を必要としないワンポットプロセスによって高純度及び高反応収率で調製できるという驚くべき知見に基づいている。さらに、比較データによると、反応工程間での精製を必要とする多段階プロセスによって調製されたＡＤＣと比較した場合、ワンポットプロセスは、最終ＡＤＣ生成物の単量体比率を予想外に増加させることを示している（実施例５を参照）。

【０００６】

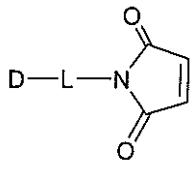
ある特定の実施形態では、本発明は、細胞毒性剤と共有結合された、１つ以上の不対システイン残基を有する細胞結合剤（ＣｙｓＣＢＡ）を含む細胞結合剤－細胞毒性剤複合体を調製する方法であって、

（ａ）キャッピング剤でキャップされた１つ以上の不対システイン残基を有するキャップされた細胞結合剤（ｃＣｙｓＣＢＡ）と還元剤とを反応させて還元型細胞結合剤を形成し、当該キャッピング剤が除去されて還元型細胞結合剤に遊離チオール基（－ＳＨ）を形成する工程と；

（ｂ）不対システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型細胞結合剤を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＣＢＡを形成する工程と；

（ｃ）ＣｙｓＣＢＡを式（Ｉ）：

【化１】



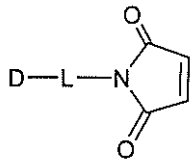
（Ｉ）

の化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより複合体を形成する工程とを含み、工程（ａ）の還元型細胞結合剤を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＣＢＡを精製せずに工程（ｃ）で使用し、式中：
Ｄは細胞毒性剤であり；
Ｌはリンカーである方法を提供する。

【０００７】

ある特定の実施形態では、本発明は、細胞毒性剤と共有結合された、１つ以上の不対システイン残基を有する細胞結合剤（ＣｙｓＣＢＡ）を含む細胞結合剤－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、
（ａ）キャッピング剤でキャップされた１つ以上の不対システイン残基を有するキャップされた細胞結合剤（ｃＣｙｓＣＢＡ）と還元剤とを反応させて還元型細胞結合剤を形成し、当該キャッピング剤が除去されて還元型細胞結合剤に遊離チオール基（－ＳＨ）を形成する工程と；
（ｂ）不対システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型細胞結合剤を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＣＢＡを形成する工程と；
（ｃ）ＣｙｓＣＢＡを式（Ｉ）：

【化２】



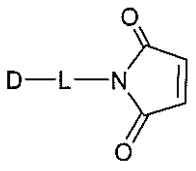
（Ｉ）

の化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより複合体を形成する工程とを含み、
工程（ａ）の還元型細胞結合剤を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＣＢＡを精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｃ）から選択されるいずれか１つ以上の工程が連続して実行され、式中：
Ｄは細胞毒性剤であり；
Ｌはリンカーである方法を提供する。

【０００８】

ある特定の実施形態では、本発明は、細胞毒性剤と共有結合された、１つ以上の不対システイン残基を有する細胞結合剤（ＣｙｓＣＢＡ）を含む細胞結合剤－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、
（ａ）キャッピング剤でキャップされた１つ以上の不対システイン残基を有するキャップされた細胞結合剤（ｃＣｙｓＣＢＡ）と還元剤とを反応させて還元型細胞結合剤を形成し、当該キャッピング剤が除去されて還元型細胞結合剤に遊離チオール基（－ＳＨ）を形成する工程と；
（ｂ）不対システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型細胞結合剤を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＣＢＡを形成する工程と；
（ｃ）ＣｙｓＣＢＡを式（Ｉ）：

【化３】



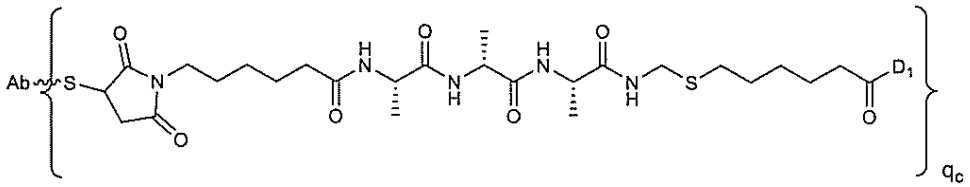
（Ｉ）

の化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより複合体を形成する工程と；
（ｄ）式（Ｉ）の非結合化合物を除去する工程とを含み、
工程（ａ）の還元型細胞結合剤を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＣＢＡを精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｄ）から選択されるいずれか１つ以上の工程が連続して実行され、式中：
Ｄは細胞毒性剤であり；
Ｌはリンカーである方法を提供する。

【０００９】

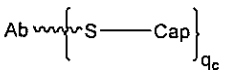
ある特定の実施形態では、本発明は、以下の式：によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する方法であって、

【化４】



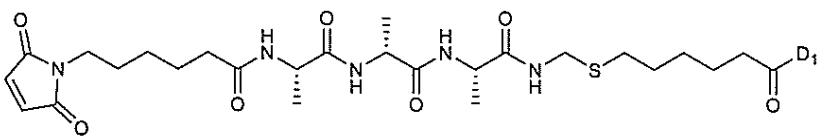
（ａ）以下の式：

【化５】



によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、当該キャッピング剤（Ｃａｐ）が除去されて還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；
（ｂ）改変システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＡｂを形成する工程と；
（ｃ）ＣｙｓＡｂを、以下の式：

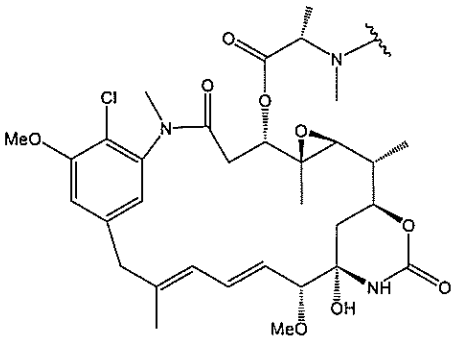
【化６】

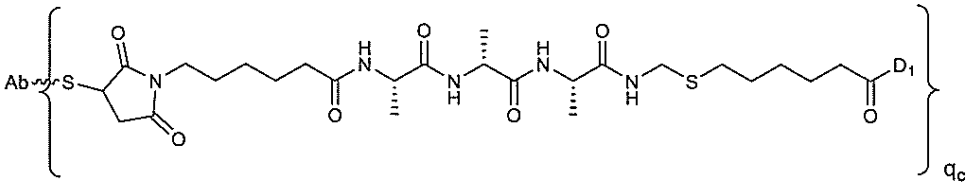


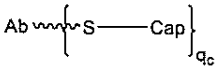
（Ｉ１１）

によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それによりＡＤＣを形成する工程とを含み、工程（ａ）の還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、

式中：
【化７】

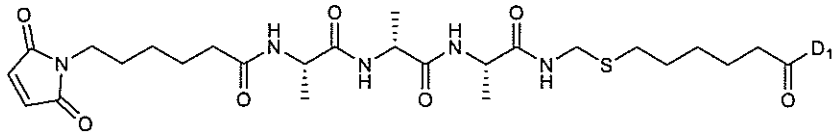
は、改変システイン残基に位置するチオール基を介して細胞毒性剤と共有結合されるシステイン改変抗体（ＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片であり；当該ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号２４、２５、及び２６の配列を有するＣＤＲＨ１ドメイン、ＣＤＲＨ２ドメイン、及びＣＤＲＨ３ドメインと、それぞれ配列番号２１、２２、及び２３の配列を有するＣＤＲＬ１ドメイン、ＣＤＲＬ２ドメイン、及びＣＤＲＬ３ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはそのＡＤＡＭ９結合断片であり；
ｑｃは、１または２であり；
Ｄ１は、以下の式：
【化８】


によって表され；
Ｃａｐはキャッピング剤である方法を提供する。
【００１０】
ある特定の実施形態では、本発明は、以下の式：
【化９】


によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、
（ａ）以下の式：
【化１０】


によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、当該キャッピング剤（Ｃａｐ）が除去されて還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；
（ｂ）改変システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＡｂを形成する工程と；
（ｃ）ＣｙｓＡｂを、以下の式：

【化１１】



（Ｉ１１）

によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それによりＡＤＣを形成する工程とを含み、工程（ａ）の還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｃ）が連続して実行され、

式中：

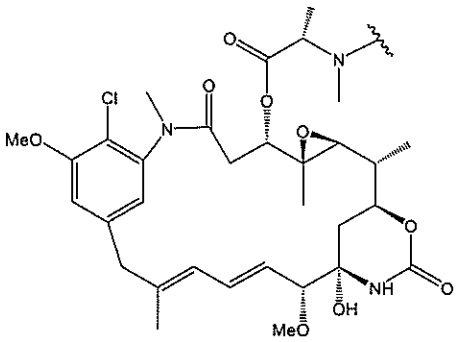
【化１２】

は、改変システイン残基に位置するチオール基を介して細胞毒性剤と共有結合されるシステイン改変抗体（ＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片であり；当該ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号２４、２５、及び２６の配列を有するＣＤＲ$_{H}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{H}$２ドメイン、及びＣＤＲ$_{H}$３ドメインと、それぞれ配列番号２１、２２、及び２３の配列を有するＣＤＲ$_{L}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{L}$２ドメイン、及びＣＤＲ$_{L}$３ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはそのＡＤＡＭ９結合断片であり；

q_cは、１または２であり；

D_1は、以下の式：

【化１３】



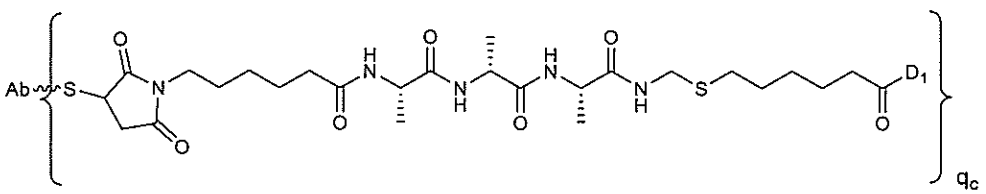
によって表され；

Ｃａｐはキャッピング剤である方法を提供する。

【００１１】

ある特定の実施形態では、本発明は、以下の式：

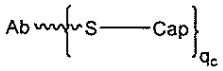
【化１４】



によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、

（ａ）以下の式：

【化１５】

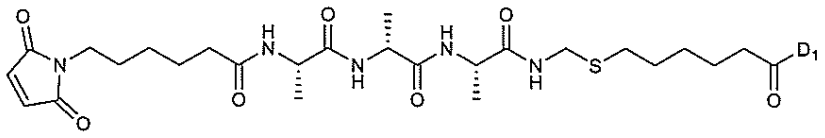


によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、当該キャッピング剤（Ｃａｐ）が除去されて還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；

（ｂ）改変システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＡｂを形成する工程と；

（ｃ）ＣｙｓＡｂを、以下の式：

【化１６】



（Ｉ１１）

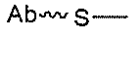
によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それによりＡＤＣを形成する工程と；

（ｄ）式（Ｉ１１）の非結合化合物を除去する工程とを含み、

工程（ａ）の還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｄ）が連続して実行され、

式中：

【化１７】

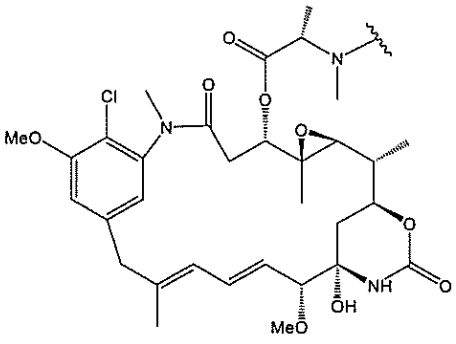


は、改変システイン残基に位置するチオール基を介して細胞毒性剤と共有結合されるシステイン改変抗体（ＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片であり；当該ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号２４、２５、及び２６の配列を有するＣＤＲ$_{H}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{H}$２ドメイン、及びＣＤＲ$_{H}$３ドメインと、それぞれ配列番号２１、２２、及び２３の配列を有するＣＤＲ$_{L}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{L}$２ドメイン、及びＣＤＲ$_{L}$３ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはそのＡＤＡＭ９結合断片であり；

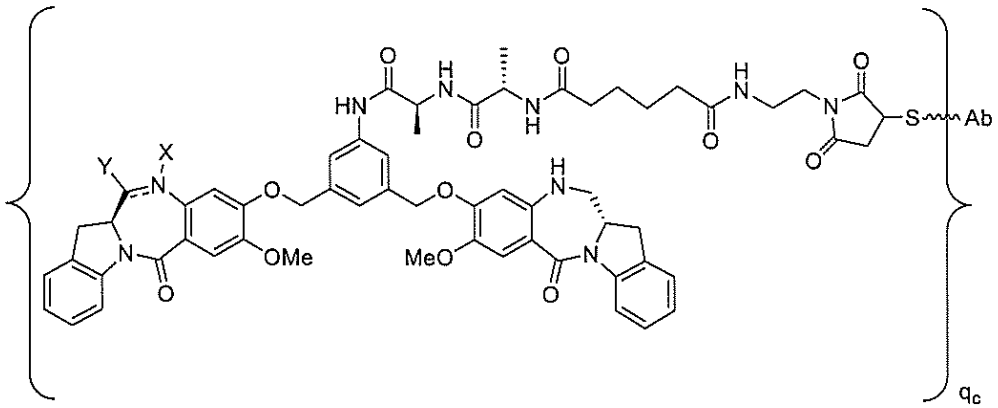
q_cは、１または２であり；

D_1は、以下の式：

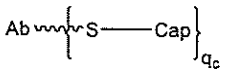
【化１８】



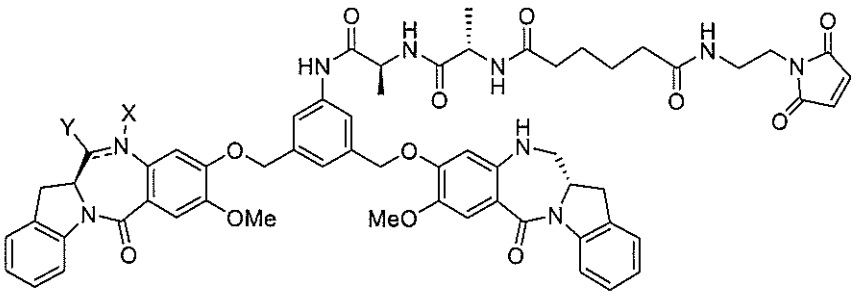
によって表され；
Ｃａｐはキャッピング剤である方法を提供する。
【００１２】
ある特定の実施形態では、本発明は、以下の式：
【化１９】



によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する方法であって、
（ａ）以下の式：
【化２０】



によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、当該キャッピング剤が除去されて還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；
（ｂ）改変システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＡｂを形成する工程と；
（ｃ）ＣｙｓＡｂを、以下の式：
【化２１】



によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それによりＡＤＣを形成する工程とを含み、工程（ａ）の還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、式中：
ＮとＣ間の二重線
【化２２】

は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは－Ｈ

であり、単結合の場合は、Ｘが－Ｈであり、Ｙは－ＳＯ３Ｍであり；Ｍは、Ｈ＋またはカチオンであり；

【化２３】

は、改変システイン残基に位置するチオール基を介して細胞毒性剤と共有結合されるシステイン改変抗体またはその抗原結合断片であって、当該システイン改変抗体は、

ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号５に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２、及び配列番号６に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；

ｂ）配列番号１に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ１、配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ２、及び配列番号３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ３を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む抗ＣＤ１２３抗体または抗原結合断片であり；

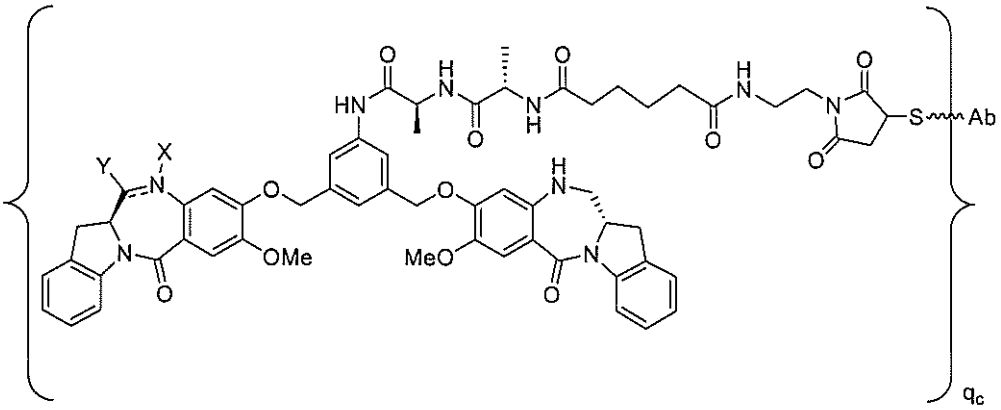
ｑｃは、１または２であり；

Ｃａｐはキャッピング剤である方法を提供する。

【００１３】

ある特定の実施形態では、本発明は、以下の式：

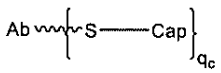
【化２４】



によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、

（ａ）以下の式：

【化２５】

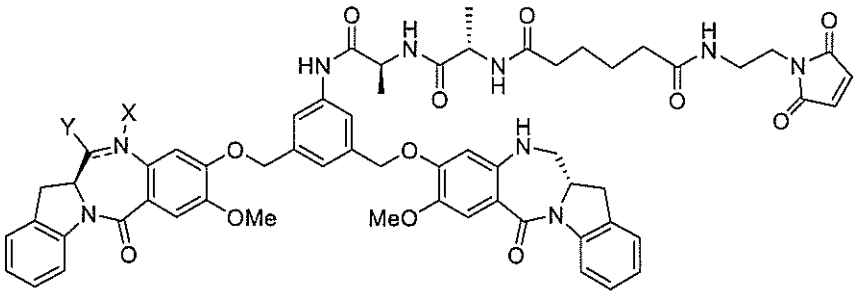


によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、当該キャッピング剤が除去されて還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；

（ｂ）改変システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＡｂを形成する工程と；

（ｃ）ＣｙｓＡｂを、以下の式：

【化２６】



（Ｉ１ａ）

によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それによりＡＤＣを形成する工程とを含み、工程（ａ）の還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｃ）が連続して実行され、

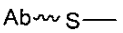
式中：

ＮとＣ間の二重線

【化２７】

は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは－Ｈであり、単結合の場合は、Ｘが－Ｈであり、Ｙは－ＳＯ３Ｈであり；Ｍは、Ｈ＋またはカチオンであり；

【化２８】



は、改変システイン残基に位置するチオール基を介して細胞毒性剤と共有結合されるシステイン改変抗体またはその抗原結合断片であって、当該システイン改変抗体は、

ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号５に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２、及び配列番号６に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；

ｂ）配列番号１に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ１、配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ２、及び配列番号３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ３を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む抗ＣＤ１２３抗体または抗原結合断片であり；

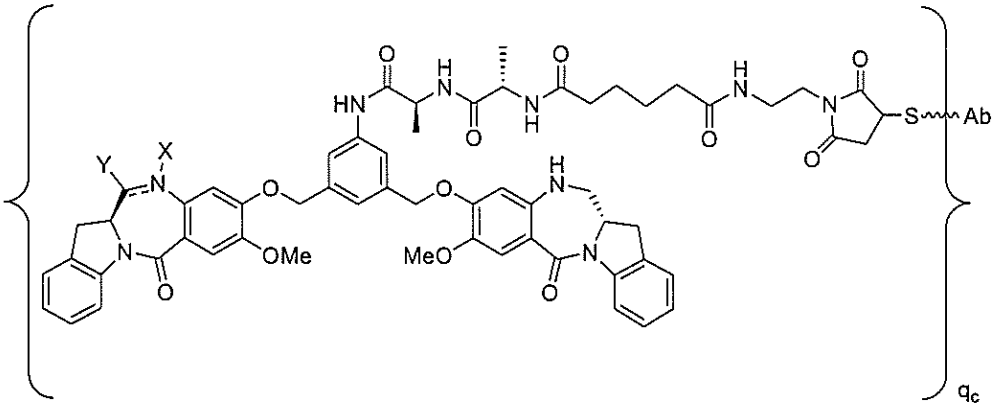
ｑｃは、１または２であり；

Ｃａｐはキャッピング剤である方法を提供する。

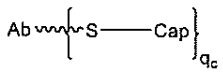
【００１４】

ある特定の実施形態では、本発明は、以下の式：

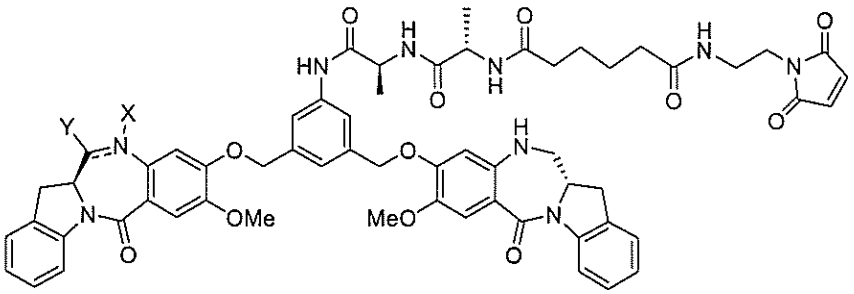
【化２９】



によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、
（ａ）以下の式：によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、
【化３０】



還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、当該キャッピング剤が除去されて還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；
（ｂ）改変システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＡｂを形成する工程と；
（ｃ）ＣｙｓＡｂを、以下の式：
【化３１】



（Ｉ１ａ）

によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それによりＡＤＣを形成する工程と；
（ｄ）式（Ｉ１ａ）の非結合化合物を除去する工程とを含み、工程（ａ）の還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｄ）が連続して実行され、
式中：
ＮとＣ間の二重線
【化３２】

は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは－Ｈであり、単結合の場合は、Ｘが－Ｈであり、Ｙは－ＳＯ３Ｍであり；Ｍは、Ｈ＋またはカ

チオンであり；
【化３３】

は、改変システイン残基に位置するチオール基を介して細胞毒性剤と共有結合されるシステイン改変抗体またはその抗原結合断片であって、当該システイン改変抗体は、
ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号５に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２、及び配列番号６に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；
ｂ）配列番号１に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ１、配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ２、及び配列番号３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ３を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む抗ＣＤ１２３抗体または抗原結合断片であり；
ｑｃは、１または２であり；
Ｃａｐはキャッピング剤である方法を提供する。
【００１５】
ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれか１つの工程を不活性雰囲気（例えば、N_2）下で実施することができる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、不活性雰囲気（例えば、N_2）下で実施される。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれか１つの工程をO_2存在下で実施することができる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、O_2存在下で実施される。
【００１６】
明示的に否定されない限り、または不適切でない限り、本発明の一態様にのみ記載されたもの（他に記載されないもの、または他に繰り返されていないもの）及び実施例にのみ記載されたものを含め、本明細書に記載のいずれか一実施形態を、本発明のいずれか１つ以上の他の実施形態と組み合わせることができると企図される。
【図面の簡単な説明】
【００１７】
【図１】使用される酸化剤ＤＨＡＡと還元剤２－ジフェニルホスフィノエチルアミンの量がＤＡＲに及ぼす影響を示す。
【図２】ＴＣＥＰ還元の反応時間及び温度がＤＡＲに及ぼす影響を示す。
【図３】ＴＣＥＰ還元の反応時間及び温度が単量体比率に及ぼす影響を示す。
【図４】還元反応に使用されるＴＣＥＰの量がＤＡＲに及ぼす影響を示す。
【図５】実施例５に記載のＣＤ１２３を標的とする抗体薬物複合体（ＡＤＣ）の一体化連続製造プロセスを示す。Ａｂは、抗ＣＤ１２３モノクローナル抗体Ｇ４７２３Ａを指す。
【図６】実施例５に記載の、ＣＤ１２３を標的とするＡＤＣの一体化製造プロセスのための向流ＴＦＦ精製を示す。
【図７】インラインプロセス自動化技術（ＰＡＴ）の使用が、制御及び検出感度をどのように向上させることができるかを示す。
【図８】昇温での結合反応をパルス化するために使用できる加熱反応器及び冷却反応器の模式図を示す。パルスリアクター（「ＰＲ」と表記）では、ジャケットの温度を上昇させ、それによりコイル内に収容された反応成分を一時的に加熱して、短時間のエクスカーションを誘発する。次に、冷却反応器（「ＣＲ」と表記）では、ジャケットの温度を低温に維持し、コイル内の反応成分を昇温から元の温度に冷却する。これにより、反応中に発生する凝集の量を減少させることができる。滞留時間反応器（ＲＴＲ）は、パルスの完了後、望ましい反応温度を維持し、その体積を望ましい反応時間に基づいたものにすることができる。
【発明を実施するための形態】
【００１８】
１．定義
本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語及び語句を以下に定義する。

【００１９】
本明細書で使用される「抗体薬物複合体」（ＡＤＣ）及び「免疫複合体」という用語は、細胞結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合断片）に連結された化合物またはその誘導体であり、一般式：Ｄ－Ｌ－Ａ（式中、Ｄ＝細胞毒性薬、Ｌ＝リンカー、Ａ＝抗体または抗体断片）で定義されるものを指す。ＡＤＣはまた、逆の順序の一般式：Ａ－Ｌ－Ｄで定義することもできる。ＡＤＣは、抗体またはその抗原結合断片ごとに複数の薬物及びリンカーを含み得る（例えば、（Ｄ－Ｌ）４－ＡまたはＡ－（Ｌ－Ｄ）２）。「抗体薬物複合体」及び「免疫複合体」という用語は、本明細書で同義に使用される。
【００２０】
本明細書で同義に使用される「（ヒト）ＩＬ－３Ｒα」、「インターロイキン－３受容体アルファ」、または「ＣＤ１２３」という用語は、特に示されない限り、任意の天然（ヒト）ＩＬ－３ＲαまたはＣＤ１２３を指す。ＣＤ１２３タンパク質は、ヘテロ二量体サイトカイン受容体（ＩＬ－３受容体、またはＩＬ－３Ｒ）のインターロイキン３特異的サブユニットである。ＩＬ－３Ｒは、リガンド特異的アルファサブユニットと、インターロイキン３（ＩＬ３）、コロニー刺激因子２（ＣＳＦ２／ＧＭ－ＣＳＦ）、及びインターロイキン５（ＩＬ５）に対する受容体が共有するシグナル伝達共通ベータサブユニット（別称ＣＤ１３１）とで構成される。ＣＤ１２３／ＩＬ－３ＲαのＩＬ３への結合は、ベータサブユニットに依存する。ベータサブユニットはリガンド結合によって活性化され、ＩＬ３の生物学的活性に必要である。
【００２１】
ＣＤ１２３に関するこれらの上記の用語はすべて、本明細書に示されるタンパク質または核酸配列のいずれかを意味し得る。「ＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒα」という用語は、「全長」の未処理のＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒα、及び細胞内でのプロセシングにより生じる任意の形態のＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒαを包含する。この用語はまた、ＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒαタンパク質または核酸の天然に存在する変異体、例えばスプライス変異体、アレル変異体、及びアイソフォームを包含する。本明細書に記載のＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒαポリペプチド及びポリヌクレオチドは、様々な供給源、例えばヒト組織型から、または別の供給源から単離することも、あるいは組換え方法または合成方法によって調製することもできる。ＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒα配列の例として、ＮＣＢＩ参照番号ＮＰ＿００２１７４とＮＭ＿００２１８３（ヒトＣＤ１２３変異体１のタンパク質及び核酸配列）、及びＮＰ＿００１２５４６４２とＮＭ＿００１２６７７１３（ヒトＣＤ１２３変異体２のタンパク質及び核酸配列）が挙げられるが、これらに限定されない。
【００２２】
「ＡＤＡＭ９」という用語は、ＡＤＡＭファミリーメンバーの分子である、ディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼドメイン含有タンパク質９を指す。これは、タンパク質分解性切断されて活性酵素を生成する不活性型として合成される。上流部位でのプロセシングは、プロ酵素の活性化にとって特に重要である。ＡＤＡＭ９は、線維芽細胞（Ｚｉｇｒｉｎｏ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．（２０１１）“Ｔｈｅ Ｄｉｓｉｎｔｅｇｒｉｎ－Ｌｉｋｅ Ａｎｄ Ｃｙｓｔｅｉｎｅ－Ｒｉｃｈ Ｄｏｍａｉｎｓ Ｏｆ ＡＤＡＭ－９ Ｍｅｄｉａｔｅ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ Ｂｅｔｗｅｅｎ Ｍｅｌａｎｏｍａ Ｃｅｌｌｓ Ａｎｄ Ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔｓ，” Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８６：６８０１－６８０７）、活性化した血管平滑筋細胞（Ｓｕｎ，Ｃ．ｅｔ ａｌ．（２０１０）“ＡＤＡＭ １５ Ｒｅｇｕｌａｔｅｓ Ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ Ｐｅｒｍｅａｂｉｌｉｔｙ Ａｎｄ Ｎｅｕｔｒｏｐｈｉｌ Ｍｉｇｒａｔｉｏｎ Ｖｉａ Ｓｒｃ／ＥＲＫ１／２ Ｓｉｇｎａｌｌｉｎｇ，” Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｒｅｓ．８７：３４８－３５５）、単球（Ｎａｍｂａ，Ｋ．ｅｔ ａｌ．（２００１）“Ｉｎｖｏｌｖｅｍｅｎｔ Ｏｆ ＡＤＡＭ９ Ｉｎ Ｍｕｌｔｉｎｕｃｌｅａｔｅｄ Ｇｉａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｏｆ Ｂｌｏｏｄ Ｍｏｎｏｃｙｔｅｓ，” Ｃｅｌｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２１３：１０４－１１３）、活性化マクロファージ（Ｏｋｓａｌａ，Ｎ．ｅｔ ａｌ．（２００９）“ＡＤＡＭ－９，ＡＤＡＭ－１５，Ａｎｄ ＡＤＡＭ－１７ Ａｒｅ Ｕｐｒｅｇｕ

lated In Macrophages In Advanced Human Atherosclerotic Plaques In Aorta And Carotid And Femoral Arteries－Tampere Vascular Study，” Ann．Med．４１：２７９－２９０）に発現する。代表的なヒトＡＤＡＭ９ポリペプチドは、ＮＣＢＩ配列ＮＰ＿００３８０７である。ＡＤＡＭ９ポリペプチドの８１９のアミノ酸残基のうち、残基１～２８はシグナル配列、残基２９～６９７は細胞外ドメイン、残基６９８～７１８は膜貫通ドメイン、及び残基７１９～８１９は細胞内ドメインである。リプロリシン（Ｍ１２Ｂ）ファミリー亜鉛メタロプロテアーゼドメイン（おおよそ残基２１２～４０６）；ディスインテグリンドメイン（おおよそ残基４２３～４９７）；及びＥＧＦ様ドメイン（おおよそ残基６４４～６９７）という３つの構造ドメインが細胞外ドメイン内に位置している。いくつかの翻訳後修飾とアイソフォームが同定されており、タンパク質はトランスゴルジ網内でタンパク質分解性切断された後、原形質膜に到達して成熟タンパク質を生成する。プロドメインの除去は、２つの異なる部位での切断により行われる。プロドメインと触媒ドメイン（Ａｒｇ－２０５／Ａｌａ－２０６）の境界にある、フューリンなどのプロタンパク質コンベルターゼによるプロセシングが最も可能性が高い。追加の上流切断プロタンパク質コンベルターゼ部位（Ａｒｇ－５６／Ｇｌｕ－５７）は、ＡＤＡＭ９の活性化に重要な役割を果たす。代表的なカニクイザルＡＤＡＭ９ポリペプチドは、ＮＣＢＩ配列ＸＭ＿００５５６３１２６．２であり、可能性のある２８アミノ酸残基のシグナル配列を含む。タンパク質のリプロリシン（Ｍ１２Ｂ）ファミリー亜鉛メタロプロテアーゼドメインは、おおよそ残基２１２～４０６であり；タンパク質のディスインテグリンドメインは、おおよそ残基４２３～４９７である。

【００２３】

「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも１つの抗原認識部位を介して、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、または前述の組み合わせなどの標的を認識し、それに特異的に結合する免疫グロブリン分子を意味する。本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、抗体が望ましい生物学的活性を示す限り、インタクトなポリクローナル抗体、インタクトなモノクローナル抗体、抗体断片（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、及びＦｖ断片など）、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）変異体、二重特異性抗体などの多重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原決定部分を含む融合タンパク質、及び抗原認識部位を含む任意の他の修飾免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、それぞれアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、及びミューと呼ばれる重鎖定常ドメインの同一性に基づいた、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭという５つの主要なクラスの免疫グロブリン、またはそれらのサブクラス（アイソタイプ）（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）のいずれでもあり得る。クラスの異なる免疫グロブリンは、異なった周知のサブユニット構造及び三次元構成を有する。抗体は、裸であっても、または毒素、放射性同位体などの他の分子と結合されていてもよい。

【００２４】

いくつかの実施形態では、抗体は、天然に存在しない抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、天然成分から精製される。いくつかの実施形態では、抗体は、組換え産生される。いくつかの実施形態では、抗体は、ハイブリドーマによって産生される。

【００２５】

「抗ＣＤ１２３抗体」、「抗ＩＬ－３Ｒα抗体」、または「ＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒαに（特異的に）結合する抗体」という用語は、抗体がＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒαを標的とする診断薬及び／または治療薬として有用であるような十分な親和性を伴って、ＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒαに結合することができる抗体を指す。特に明記しない限り、無関係な非ＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒαタンパク質への抗ＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒα抗体の結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）で測定した場合、ＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒαへの抗体の結合の約１０％未満である。ある特定の実施形態では、ＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒαに結合する抗体は、０．５ｎＭ以下、０．３ｎＭ以下、０．１ｎＭ以下、０．０５ｎ

Ｍ以下、または０．０１ｎＭ以下の解離定数（K_d）を有する。一実施形態では、抗ＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒα抗体は、共通ベータ鎖ＣＤ１３１に結合しない。一実施形態では、抗ＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒα抗体は、７Ｇ３（マウスＩｇG_{2a}）、６Ｈ６（マウスＩｇG_1）、及び９Ｆ５（マウスＩｇG_1）など、市販されている公知のＣＤ１２３抗体が結合するＣＤ１２３の同じエピトープには結合しない（Ｓｕｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　８７（１）：８３－９２，１９９６）。

【００２６】

本発明の抗ＣＤ１２３／ＩＬ－３Ｒα抗体及びその抗原結合断片の配列は、本明細書に示されている。

【００２７】

「抗体断片」という用語は、インタクトな抗体の一部分を指し、インタクトな抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体断片の例として、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、及びF_v断片、直鎖抗体、一本鎖抗体、ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。抗体の「抗原結合断片」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の１つ以上の断片を含む。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の特定の断片によって実行できることが示されている。抗体の「抗原結合断片」という用語に包含される結合断片の例（限定せず）として、（ｉ）Ｆａｂ断片、すなわちV_L、V_H、C_L、及びC_{H1}ドメインからなる一価断片（例えば、パパインで抗体を消化すると３つの断片、すなわち２つの抗原結合Ｆａｂ断片、及び抗原に結合しない１つのＦｃ断片が得られる）；（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、すなわちヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された２つのＦａｂ断片を含む二価断片（例えば、ペプシンで抗体を消化すると２つの断片、すなわち二価の抗原結合Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、及び抗原に結合しないｐＦｃ’断片が得られる）、ならびにその関連Ｆ（ａｂ’）一価単位；（ｉｉｉ）V_Hドメイン及びC_{H1}ドメインからなるF_d断片（すなわち、Ｆａｂに含まれる重鎖の部分）；（ｉｖ）抗体の単一アームのV_Lドメイン及びV_HドメインからなるF_v断片、ならびに関連するジスルフィド結合F_v；（ｖ）ｄＡｂ（ドメイン抗体）またはｓｄＡｂ（単一ドメイン抗体）断片（Ｗａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３４１：５４４－５４６，１９８９）（これは、V_Hドメインからなる）；ならびに（ｖｉ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）が挙げられる。

【００２８】

「モノクローナル抗体」とは、単一の抗原決定基、すなわちエピトープの高度に特異的な認識及び結合に関与する均一な抗体集団を指す。これは、一般的に異なる抗原決定基に対して異なる抗体を含むポリクローナル抗体とは対照的である。「モノクローナル抗体」という用語は、インタクトかつ全長のモノクローナル抗体に加え、抗体断片（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、及びF_vなど）、単鎖（ｓｃＦｖ）変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、及び抗原認識部位を含む任意の他の修飾免疫グロブリン分子を包含する。さらに、「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、及びトランスジェニック動物を含むがこれらに限定されない、任意の数の方法で作製されるような抗体を指す。

【００２９】

「ヒト化抗体」という用語は、最小限の非ヒト（例えば、マウス）配列を含有する特異的な免疫グロブリン鎖、キメラ免疫グロブリン、またはそれらの断片である非ヒト（例えば、マウス）抗体の形態を指す。一般的には、ヒト化抗体は、相補性決定領域（ＣＤＲ）由来の残基が、望ましい特異性、親和性、及び能力を有する非ヒト種（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター）のＣＤＲ由来の残基で置換されているヒト免疫グロブリンである（Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３２１：５２２－５２５，１９８６；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３－３２７，１９８８；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：１５３４－１５３６，１９８８）。

【００３０】

場合によって、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク領域（ＦＲ）残基が、望ましい特異性、親和性、及び能力を有する非ヒト種由来の抗体内の対応する残基で置換される。さらにヒト化抗体を、ＦｖフレームワークＦ領域及び／または置換された非ヒト残基内のいずれかにおいて、追加残基の置換により修飾し、抗体の特異性、親和性、及び／または能力を改良及び最適化することができる。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するＣＤＲ領域のすべてまたは実質的にすべてを含有する、少なくとも１つ、一般的には２つまたは３つの可変ドメインを実質的にすべて含み、一方、ＦＲ領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域またはドメイン（Ｆｃ）、一般的にはヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部分を含み得る。ヒト化抗体の生成に使用される方法の例は、米国特許第５，２２５，５３９号及び同第５，６３９，６４１号、Ｒｏｇｕｓｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１（３）：９６９－９７３，１９９４；ならびにＲｏｇｕｓｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．９（１０）：８９５－９０４，１９９６に記載されている（すべては参照により本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、「ヒト化抗体」は、表面改変抗体である。いくつかの実施形態では、「ヒト化抗体」は、ＣＤＲ移植抗体である。

【００３１】

抗体の「可変領域」とは、単独の、または組み合わされた、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を指す。重鎖及び軽鎖の可変領域はそれぞれ、超可変領域としても知られる３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）によって結合された４つのフレームワーク領域（ＦＲ）で構成される。各鎖のＣＤＲは、ＦＲによって近接した一団として保持されており、他鎖由来のＣＤＲと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している。ＣＤＲを決定するための技術は、少なくとも２つあり、（１）種間の配列変動性に基づく手法（すなわち、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ ｅｄ．，１９９１，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ Ｍｄ．）；及び（２）抗原－抗体複合体の結晶学的試験に基づく手法（Ａｌ－ｌａｚｉｋａｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２７３：９２７－９４８，１９９７）である。加えて、ＣＤＲを決定するために、当技術分野において、これらの２つの手法の組み合わせが使用される場合がある。

【００３２】

可変ドメイン内の残基を参照する場合（軽鎖のおおよそ１～１０７の残基及び重鎖の１～１１３の残基）、Ｋａｂａｔ番号付けシステムを一般に使用する（例えば、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．，Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１））。

【００３３】

Ｋａｂａｔに関するアミノ酸位置の番号付けは、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．，Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１）（参照により本明細書に組み込まれる）において、抗体の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインの編集に使用されている番号付けシステムを基準とする。この番号付けシステムを使用すると、可変ドメインのＦＲまたはＣＤＲの短縮または挿入に応じて、実際の線形アミノ酸配列に、より少ないまたは追加のアミノ酸が含まれる可能性がある。例えば、重鎖可変ドメインは、Ｈ２の残基５２の後ろの単一のアミノ酸挿入（Ｋａｂａｔによる残基５２ａ）及び重鎖ＦＲ残基８２の後ろの挿入残基（例えば、Ｋａｂａｔによる残基８２ａ、８２ｂ、及び８２ｃなど）を含み得る。残基のＫａｂａｔ番号付けは、所与の抗体について、抗体の配列と「標準的な」Ｋａｂａｔ番号付けされた配列とを相同領域でアラ

インメントすることにより決定することができる。代わりに、Ｃｈｏｔｈｉａは構造ループの位置を基準とする（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７，１９８７）。Ｋａｂａｔ番号付け規則を使用して番号付けした場合、Ｃｈｏｔｈｉａ ＣＤＲ－Ｈ１ループの末端は、ループの長さに応じてＨ３２とＨ３４との間で変化する。これは、Ｋａｂａｔ番号付け方式ではＨ３５Ａ及びＨ３５Ｂに挿入が配置されるためである；３５Ａも３５Ｂも存在しない場合、ループは３２で終結する；３５Ａのみが存在する場合、ループは３３で終結する；３５Ａ及び３５Ｂの両方が存在する場合、ループは３４で終結する。ＡｂＭ超可変領域は、Ｋａｂａｔ ＣＤＲとＣｈｏｔｈｉａ構造ループとの中間を表し、これはＯｘｆｏｒｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ’ｓ ＡｂＭ抗体モデリングソフトウェアで使用される。

【表１】

ループ	Ｋａｂａｔ	ＡｂＭ	Ｃｈｉｏｔｈｉａ
Ｌ１	Ｌ２４－Ｌ３４	Ｌ２４－Ｌ３４	Ｌ２４－Ｌ３４
Ｌ２	Ｌ５０－Ｌ５６	Ｌ５０－Ｌ５６	Ｌ５０－Ｌ５６
Ｌ３	Ｌ８９－Ｌ９７	Ｌ８９－Ｌ９７	Ｌ８９－Ｌ９７
Ｈ１	Ｈ３１－Ｈ３５Ｂ	Ｈ２６－Ｈ３５Ｂ（Ｋａｂａｔ番号付け）	Ｈ２６－Ｈ３２．．３４
Ｈ１	Ｈ３１－Ｈ３５	Ｈ２６－Ｈ３５（Ｃｈｏｔｈｉａ番号付け）	Ｈ２６－Ｈ３２
Ｈ２	Ｈ５０－Ｈ６５	Ｈ５０－Ｈ５８	Ｈ５２－Ｈ５６
Ｈ３	Ｈ９Ｓ－Ｈ１０２	Ｈ９５－Ｈ１０２	Ｈ９５－Ｈ１０２

【００３４】

ＥＵインデックスもしくはＫａｂａｔによる ＥＵインデックス、またはＥＵ番号付け方式は、Ｅｄｅｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９６９，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ６３：７８－８５（参照により本明細書に組み込まれる）のヒトＩｇＧ１ ＥＵ抗体に基づく番号付けシステムを基準とする。

【００３５】

「ヒト抗体」という用語は、ヒトが産生する抗体、または当技術分野において公知である任意の技術を使用して作製された、ヒトが産生する抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を意味する。ある特定の実施形態では、ヒト抗体は、非ヒト配列を有さない。ヒト抗体のこの定義には、インタクトもしくは全長の抗体、またはその抗原結合断片が包含される。

【００３６】

「キメラ抗体」という用語は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が２つ以上の種に由来する抗体を指す。一般的には、軽鎖と重鎖両方の可変領域が、望ましい特異性、親和性、及び能力を有する哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギなど）の１つの種に由来する抗体の可変領域に対応し、定常領域が、別の種（通常はヒト）に由来する抗体の配列と相同であり、その種（例えば、ヒト）で免疫応答を誘発する可能性を回避または低減する。ある特定の実施形態では、キメラ抗体は、少なくとも１つのヒト重鎖及び／または軽鎖ポリペプチドを含む抗体またはその抗原結合断片を包含してもよく、例えば、マウス軽鎖及びヒト重鎖ポリペプチドを含む抗体などである。

【００３７】

「エピトープ」または「抗原決定基」という用語は、本明細書で同義に使用され、特定の抗体によって認識され、特異的に結合され得る抗原のその部分を指す。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは、連続アミノ酸、及びタンパク質の３次折り畳みによって近接する非連続アミノ酸の両方から形成され得る。連続アミノ酸から形成されたエピトープは、一般的にタンパク質が変性しても保持されるが、３次折り畳みによって形成されたエ

ピトープは、一般的にタンパク質が変性すると失われる。エピトープは、一般的に固有の空間的コンフォメーション内に少なくとも３個、より一般的には少なくとも５個または８～１０個のアミノ酸を含む。

【００３８】

「結合親和性」とは、一般に、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合相互作用の合計強度を指す。特に明記しない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」とは、結合対のメンバー（例えば、抗体と抗原）間の１：１の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。パートナーＹに対する分子Ｘの親和性は、一般に、解離定数（Ｋｄ）または最大半数有効濃度（ＥＣ５０）で表すことができる。親和性は、本明細書に記載されているものを含め、当技術分野において公知である一般的な方法によって測定することができる。低親和性抗体は一般に抗原にゆっくり結合し、容易に解離する傾向があり、対する高親和性抗体は一般に抗原に速く結合し、結合が長時間維持される傾向がある。結合親和性を測定する様々な方法が当技術分野において公知であり、そのいずれも本発明の目的に使用することができる。特定の例示的な実施形態を本明細書に記載する。

【００３９】

「特異的に結合する」とは、一般に、抗体がその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合すること、及び結合が抗原結合ドメインとエピトープとの間にある程度の相補性を伴うことを意味する。この定義によれば、抗体が、ランダムな無関係のエピトープに結合するよりも容易に、その抗原結合ドメインを介してそのエピトープに結合するときに、抗体はエピトープに「特異的に結合する」という。「特異性」という用語は、特定の抗体が特定のエピトープに結合する相対的な親和性を限定する際に本明細書で使用される。例えば、抗体「Ａ」が、所与のエピトープに対して抗体「Ｂ」よりも高い特異性を有するとみなされ得るか、または抗体「Ａ」が、関連するエピトープ「Ｄ」に対して有するよりも高い特異性でエピトープ「Ｃ」に結合するといってもよい。

【００４０】

本明細書で使用される「免疫複合体」、「複合体」、または「ＡＤＣ」という用語は、細胞結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合断片）に連結された化合物またはその誘導体を指す。

【００４１】

「リンカー」とは、化合物、通常は本明細書に記載の細胞毒性剤（例えば、ＩＧＮ（インドリノベンゾジアゼピン）化合物）などの薬物を、抗体またはその断片などの細胞結合剤に、安定な共有結合方式で連結することができる任意の化学部分である。リンカーは、化合物または抗体が活性を維持する条件下で、酸誘導性切断、光誘導性切断、ペプチダーゼ誘導性切断、エステラーゼ誘導性切断、及びジスルフィド結合切断に対して感受性または実質的に耐性であり得る。好適なリンカーは当技術分野において周知であり、例えば、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定基、光不安定基、ペプチダーゼ不安定基、及びエステラーゼ不安定基が含まれる。リンカーはまた、本明細書に記載され、当技術分野において公知であるような荷電リンカー及びその親水性形態を含む。

【００４２】

「システイン改変抗体」という用語は、抗体の軽鎖または重鎖の所与の残基に通常は存在しない少なくとも１つのＣｙｓを有する抗体を含む。「改変Ｃｙｓ」とも称するそのようなＣｙｓは、任意の従来の分子生物学または組換えＤＮＡ技術を使用して（例えば、標的残基の非Ｃｙｓ残基のコード配列をＣｙｓのコード配列で置換することにより）改変することができる。例えば、元の残基が５′－ＵＣＵ－３′のコード配列を有するＳｅｒである場合、Ｃｙｓをコードする５′－ＵＧＵ－３′に（例えば、部位特異的変異誘発によって）コード配列を変異させることができる。ある特定の実施形態では、本発明のＣｙｓ改変抗体は、重鎖に改変Ｃｙｓを有する。ある特定の実施形態では、改変Ｃｙｓは、重鎖のＣＨ３ドメイン内またはその近傍にある。

【００４３】

「不対システイン」という用語は、細胞結合剤の別のシステイン残基とのジスルフィド結合の形成に関与しない、細胞結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合断片）上に位置するシステイン残基を指す。ある特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片の不対システインは、鎖間または鎖内ジスルフィド結合の形成に関与しないシステイン残基である。ある特定の実施形態では、不対システインは、改変システイン残基である。

【００４４】

「キャッピング剤」という用語は、ＣＢＡの不対システインとジスルフィドを形成することができるチオール－ＳＨ基を有する試薬を指す。ある特定の実施形態では、キャッピング剤は、ＣＢＡ（例えば、抗体またはその抗原結合断片）の生成または精製に使用されるチオール含有試薬であり、抗体またはその抗原結合断片を生成するために培養培地で使用される１種以上のチオール含有試薬などである。ある特定の実施形態では、キャッピング剤は、システイン、グルタチオン、ホモシステイン、またはそれらの組み合わせである。ある特定の実施形態では、キャッピング剤は、固定化されたチオール含有試薬またはチオール親和性樹脂（例えば、チオプロピルセファロース６Ｂ）である。参照により本明細書に組み込まれる、Ｇｕｏ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｐｒｏｔｏｃ．２０１４　Ｊａｎ；９（１）：６４－７５を参照のこと。

【００４５】

本明細書で使用される「連続プロセス」という用語は、反応が進行している間、及び少なくとも１つの反応生成物が形成された後、１種以上の反応試薬を反応物に添加し続けるプロセスを指す。反応が進行しているとき、反応物から反応生成物を継続して取り出すことができる。

【００４６】

本明細書で使用される「フローリアクター」という用語は、連続反応化学に使用されるあらゆる反応容器、典型的にはチューブ様のものを指す。フローリアクターは、ステンレス鋼製、ガラス製、ポリマー製などであり得る。

【００４７】

本明細書で使用される「フィルター」という用語は、流体中の種の分離を可能にする選択的バリアを指す。分離は、１つ以上の他の種の通過を妨げつつ、１つ以上の種の流体を、フィルターを通して選択的に通過させる（透過させる）ことにより達成される。

【００４８】

本明細書で使用される「供給流」という用語は、フィルターまたは膜にて成分を分離するためにフィルターまたは膜に供給される流体を指す。

【００４９】

本明細書で使用される「保持液」という用語は、フィルターを通過しない部分の供給流を指す。

【００５０】

本明細書で使用される「透過液」という用語は、フィルターを通過する部分の供給流を指す。

【００５１】

本明細書で使用される「タンジェンシャルフロー濾過」（ＴＦＦ）という用語は、供給流が膜面と平行に通過する、膜による濾過プロセスを指す。供給流の一部は膜を通過し（透過液）、残りの部分（保持液）は再循環して供給リザーバーに戻る。ＴＦＦはクロスフロー濾過とも称される。ＴＦＦを実行するためのシステムは公知であり、例えば、Ｐｅｌｌｉｃｏｎ型システム（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，ＭＡ）、Ｓａｒｔｏｃｏｎ　Ｃａｓｓｅｔｔｅシステム（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　ＡＧ、Ｅｄｇｅｗｏｏｄ，ＮＹ）、及びＣｅｎｔｒａｓｅｔｔｅ型システム（Ｐａｌｌ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｅａｓｔ　Ｈｉｌｌｓ，ＮＹ）が挙げられる。

【００５２】

本明細書で使用される「シングルパスタンジェンシャルフロー濾過」（ＳＰＴＦＦ）という用語は、供給流が濾過膜を１回だけ通過するタンジェンシャルフロー濾過プロセスを指

す。ＳＰＴＦＦを実行するためのシステムは公知であり、例えば、Ｃａｄａｎｃｅ型システム（Ｐａｌｌ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｗｅｓｔｂｏｒｏｕｇｈ，ＭＡ）が挙げられる。ＳＰＴＦＦを実行するためのシステム及び方法は、例えば、米国特許第７，３８４，５４９号、米国特許第７，５１０，６５４号、米国特許第７，６８２，５１１号、米国特許第７，９６７，９８７号、米国特許第８，１５７，９９９号、及び米国特許第８，２３１，７８７号に開示されており、これらのそれぞれが全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【００５３】

本明細書で使用される「連続ダイアフィルトレーション」という用語は、供給流を希釈剤と混合し、これをポンプ送液して膜を横断させ、透過液と保持液を除去することにより、溶質の選択的分離が連続して達成されるダイアフィルトレーションプロセスを指す。濾過の進行に応じて、生成物が容器内に形成されるのではなく、代わりに、濾過の過程でシステムから連続して回収される。「向流ダイアフィルトレーション」とは、ダイアフィルトレーション工程においてプロセス流（例えば、透過液または保持液）が再循環される連続ダイアフィルトレーションプロセスを指す。

【００５４】

「インラインモニタリング」という用語は、リアルタイムに、例えば、製造プロセス中または精製プロセス中に分析物をモニタリングすることを指す。インラインモニタリングは、リアルタイムのフィードバックを提供しないインプロセスサンプリングまたはオフライン分析とは区別される。

【００５５】

「インラインプロセス自動化技術」という用語は、プロセス中に分析物をモニターするために使用される任意のインライン測定装置を指す。

【００５６】

本明細書で使用される「分析物」という用語は広義の用語であり、分析できる流体中の物質または化学成分を限定しないことを意味する。分析物には、天然に存在する物質、人工物質、代謝物、及び／または反応生成物が含まれる場合がある。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法における測定対象の分析物は、抗体もしくはその抗原結合断片、薬物、リンカー、抗体もしくはその抗原結合断片に結合されたリンカー、薬物に結合されたリンカー、抗体薬物複合体（ＡＤＣ）、薬物対抗体比（ＤＡＲ）、及び／または不純物である。

【００５７】

本明細書で使用される「製剤化緩衝液」という用語は、活性成分の生物学的活性化を可能にし、製剤が投与される対象に対して容認できないほど毒性である追加成分を含有しない緩衝液を指す。

【００５８】

「がん」及び「がん性」という用語は、哺乳動物において、細胞集団が非制御の細胞成長を特徴とする生理状態を指すかまたは表す。「腫瘍」及び「新生物」とは、良性（非がん性）、または前がん性病変を含む悪性（がん性）のいずれかの過剰な細胞成長または細胞増殖により生じる１つ以上の細胞を指す。

【００５９】

がんの例として、肺癌（例えば、非小細胞肺癌）、大腸癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、腎細胞癌、前立腺癌、食道癌、乳癌、頭頸部癌、子宮癌、卵巣癌、肝臓癌、子宮頸癌、甲状腺癌、精巣癌、骨髄癌、黒色腫、及びリンパ系癌が挙げられる。ある特定の実施形態では、がんは、非小細胞肺癌、大腸癌、胃癌、または膵臓癌である。ある特定の実施形態では、がんは、非小細胞肺癌（扁平上皮癌、非扁平上皮細胞、腺癌、または大細胞未分化癌）、大腸癌（腺癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、原発大腸リンパ腫、平滑筋肉腫、または扁平上皮癌）、または乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ））である。ある特定の実施形態では、がんは、リンパ腫及び白血病である。ある特定の実施形態では、がんの例として、ＡＭＬ、ＣＭＬ、ＡＬＬ（例えば、Ｂ－ＡＬＬ）、ＣＬＬ、

骨髄異形成症候群、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍（ＢＰＤＣＮ）白血病、Ｂ細胞リンパ腫（非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、Ｂ前駆細胞リンパ芽球性白血病／リンパ腫及び成熟Ｂ細胞腫瘍を含む）が挙げられ、例えば、Ｂ細胞性慢性リンパ性白血病（Ｂ－ＣＬＬ）／小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）（低悪性度、中等度、及び高悪性度ＦＬを含む）、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫（ＭＡＬＴ型、リンパ節及び脾臓型）、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、バーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞性骨髄腫、移植後リンパ増殖性疾患、ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症、未分化大細胞リンパ腫（ＡＬＣＬ）、及びホジキン白血病（ＨＬ）である。ある特定の実施形態では、がんはＢＰＤＣＮ白血病である。ある特定の実施形態では、がんはＡＬＬである。他の実施形態では、がんはＡＭＬである。

【００６０】

「対象」という用語は、特定の治療のレシピエントとなる、何らかの動物（例えば、哺乳動物）を指し、ヒト、非ヒト霊長類、齧歯類などを含むがこれらに限定されない。一般的に、「対象」及び「患者」という用語は、ヒト対象に関して本明細書で同義に使用される。

【００６１】

「医薬組成物」という用語は、活性成分の生物学的活性が有効であることを可能にするような形態であり、組成物が投与される対象に対して容認できないほど毒性である追加成分を含有しない調製物を指す。そのような組成物は殺菌されていてもよい。

【００６２】

本明細書に開示される免疫複合体の「治療有効量」は、具体的に述べられた目的を成し遂げるのに十分な量である。「治療有効量」は、述べられた目的に応じて、経験的かつ日常的な方法で決定することができる。

【００６３】

「アルキル」または「直鎖または分岐アルキル」とは、飽和した直鎖または分岐の一価炭化水素ラジカルを指す。好ましい実施形態では、直鎖または分岐鎖アルキルは、３０個以下の炭素原子（例えば、直鎖アルキル基の場合はＣ１～Ｃ３０、及び分岐アルキルの場合はＣ３～Ｃ３０）、より好ましくは２０個以下の炭素原子を有する。さらにより好ましくは、直鎖または分岐鎖アルキルは、１０個以下の炭素原子（すなわち、直鎖アルキル基の場合はＣ１～Ｃ１０、分岐アルキルの場合はＣ３～Ｃ１０）を有する。他の実施形態では、直鎖または分岐鎖アルキルは、６個以下の炭素原子（すなわち、直鎖アルキル基の場合はＣ１～Ｃ６、または分岐鎖アルキルの場合はＣ３～Ｃ６）を有する。アルキルの例として、メチル、エチル、１－プロピル、２－プロピル、１－ブチル、２－メチル－１－プロピル、－ＣＨ２ＣＨ（ＣＨ３）２）、２－ブチル、２－メチル－２－プロピル、１－ペンチル、２－ペンチル、３－ペンチル、２－メチル－２－ブチル、３－メチル－２－ブチル、３－メチル－１－ブチル、２－メチル－１－ブチル、１－ヘキシル）、２－ヘキシル、３－ヘキシル、２－メチル－２－ペンチル、３－メチル－２－ペンチル、４－メチル－２－ペンチル、３－メチル－３－ペンチル、２－メチル－３－ペンチル、２，３－ジメチル－２－ブチル、３，３－ジメチル－２－ブチル、１－ヘプチル、１－オクチルなどが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、本明細書、実施例、及び特許請求の範囲を通じて使用される「アルキル」という用語は、「非置換アルキル」及び「置換アルキル」の両方を包含することを意図し、後者は、炭化水素骨格の１つ以上の炭素上の水素を置換する置換基を有するアルキル部分を指す。本明細書で使用される場合、（Ｃｘ～Ｃｘｘ）アルキルまたはＣｘ－ｘｘアルキルとは、ｘ～ｘｘ個の炭素原子を有する直鎖または分岐アルキルを意味する。

【００６４】

「アルケニル」または「直鎖または分岐アルケニル」とは、少なくとも１つの不飽和部位、すなわち炭素－炭素二重結合を有する２～２０個の炭素原子の直鎖または分岐鎖一価炭

化水素ラジカルを指し、このアルケニルラジカルは、「シス」及び「トランス」配置、あるいは「Ｅ」及び「Ｚ」配置を有するラジカルを包含する。例として、エチレニルまたはビニル（－ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、アリル（－ＣＨ$_2$ＣＨ＝ＣＨ$_2$）などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、アルケニルは２～１０個の炭素原子を有する。より好ましくは、アルキルは２～４個の炭素原子を有する。

【００６５】

「アルキニル」または「直鎖または分岐アルキニル」とは、少なくとも１つの不飽和部位、すなわち炭素－炭素三重結合を有する２～２０個の炭素原子の直鎖または分岐一価炭化水素ラジカルを指す。例として、エチニル、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－ペンチニル、ヘキシニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、アルキニルは２～１０個の炭素原子を有する。より好ましくは、アルキニルは２～４個の炭素原子を有する。

【００６６】

「環状アルキル」及び「シクロアルキル」という用語は、同義に使用することができる。本明細書で使用される場合、この用語は、飽和炭素環のラジカルを指す。好ましい実施形態では、シクロアルキルは、その環構造内に３～１０個の炭素原子、より好ましくは環構造内に５～７個の炭素原子を有する。いくつかの実施形態では、２つの環状環は、共通した２つ以上の原子を有することがあり、例えば、環は「縮合環」である。好適なシクロアルキルとして、シクロヘプチル、シクロヘキシル、シクロペンチル、シクロブチル、及びシクロプロピルが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは単環式基である。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは二環式基である。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは三環式基である。

【００６７】

「シクロアルキルアルキル」という用語は、シクロアルキル基で置換された上記のアルキル基を指す。

【００６８】

「環状アルケニル」という用語は、環構造内に少なくとも１つの二重結合を有する炭素環ラジカルを指す。

【００６９】

「環状アルキニル」という用語は、環構造内に少なくとも１つの三重結合を有する炭素環ラジカルを指す。

【００７０】

本明細書で使用される「アリール」または「芳香環」という用語は、環の各原子が炭素である置換または非置換の単一環芳香族基を包含する。好ましくは、環は５～７員環、より好ましくは６員環である。アリール基として、フェニル、フェノール、アニリンなどが挙げられるが、これらに限定されない。「アリール」という用語はまた、２つ以上の原子が２つの隣接する環に共通である２つ以上の環を有する「ポリシクリル」、「多環」、及び「多環式」環系を包含し、例えば、環は「縮合環」であり、環の少なくとも１つは芳香族であり、例えば、他の環状環は、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、または芳香環であり得る。いくつかの好ましい実施形態では、多環は２～３個の環を有する。特定の好ましい実施形態では、多環式環系は、両方の環が芳香族である２つの環式環を有する。多環の環はそれぞれ、置換または非置換であり得る。ある特定の実施形態では、多環の各環は、環内に３～１０個の炭素原子、好ましくは５～７個の炭素原子を含む。例えば、アリール基として、フェニル、トリル、アントラセニル、フルオレニル、インデニル、アズレニル、及びナフチル、ならびに５，６，７，８－テトラヒドロナフチルなどのベンゾ縮合炭素環部分などが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、アリールは、単環芳香族基である。いくつかの実施形態では、アリールは、二環芳香族基である。いくつかの実施形態では、アリールは、三環芳香族基である。

【００７１】

本明細書で使用される「複素環」、「ヘテロシクリル」、及び「複素環式環」という用語

は、その環構造が、少なくとも１つのヘテロ原子、好ましくは１～４個のヘテロ原子、より好ましくは１個または２個のヘテロ原子を含む、３～１８員環、好ましくは３～１０員環、より好ましくは３～７員環である置換または非置換の非芳香族環構造を指す。ある特定の実施形態では、環構造は、２つの環状環を有し得る。いくつかの実施形態では、２つの環状環は、共通した２つ以上の原子を有することがあり、例えば、環は「縮合環」である。ヘテロシクリル基として、例えば、ピペリジン、ピペラジン、ピロリジン、モルホリン、ラクトン、ラクタムなどが挙げられる。複素環は、Ｐａｑｕｅｔｔｅ，Ｌｅｏ Ａ．；“Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｍｏｄｅｒｎ Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ”（Ｗ．Ａ．Ｂｅｎｊａｍｉｎ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９６８）、特に第１章、第３章、第４章、第６章、第７章、及び第９章；“Ｔｈｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ，Ａ ｓｅｒｉｅｓ ｏｆ Ｍｏｎｏｇｒａｐｈｓ”（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９５０～現在）、特に第１３巻、第１４巻、第１６巻、第１９巻、及び第２８巻；ならびにＪ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（１９６０）８２：５５６６に記載されている。複素環の例として、テトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、テトラヒドロチエン、テトラヒドロピラン、ジヒドロピラン、テトラヒドロチオピラン、チオモルホリン、チオキサン、ホモピペラジン、アゼチジン、オキセタン、チエタン、ホモピペリジン、ピペリジン、ピペラジン、ピロリジン、モルホリン、オキセパン、チエパン、オキサゼピン、ジアゼピン、チアゼピン、２－ピロリン、３－ピロリン、インドリン、２Ｈ－ピラン、４Ｈ－ピラン、ジオキサン、１，３－ジオキソラン、ピラゾリン、ジチアン、ジチオラン、ジヒドロピラン、ジヒドロチエン、ジヒドロフラン、ピラゾリジニルイミダゾリン、イミダゾリジン、３－アザビシクロ［３．１．０］ヘキサン、３－アザビシクロ［４．１．０］ヘプタン、及びアザビシクロ［２．２．２］ヘキサンが挙げられるが、これらに限定されない。スピロ部分もこの定義の範囲内に包含される。環原子がオキソ（＝Ｏ）部分で置換されている複素環式基の例として、ピリミジノン及び１，１－ジオキソ－チオモルホリンである。

【００７２】

本明細書で使用される「ヘテロアリール」または「ヘテロ芳香環」という用語は、その環構造が、少なくとも１つのヘテロ原子（例えば、Ｏ、Ｎ、またはＳ）、好ましくは１～４個または１～３個のヘテロ原子、より好ましくは１個または２個のヘテロ原子を含む、好ましくは６～１８員環、好ましくは５～７員環、より好ましくは５～６員環である置換または非置換の芳香族単環構造を指す。ヘテロアリール環に２つ以上のヘテロ原子が存在する場合、それらは同じであっても異なっていてもよい。「ヘテロアリール」という用語はまた、２つ以上の環原子が２つの隣接する環に共通である２つ以上の環状環を有する「ポリシクリル」、「多環」、及び「多環式」環系を包含し、例えば、環は「縮合環」であり、環の少なくとも１つはヘテロ芳香族であり、例えば、他の環状環は、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロ芳香族、及び／またはヘテロシクリルであり得る。いくつかの好ましい実施形態では、多環式ヘテロアリールは２～３個の環を有する。ある特定の実施形態では、好ましい多環式ヘテロアリールは、両方の環が芳香族である２つの環式環を有する。ある特定の実施形態では、多環の各環は、環内に３～１０個の原子、好ましくは環内に５～７個の原子を含む。例えば、ヘテロアリール基として、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジン、キノリン、ピリミジン、インドリジン、インドール、インダゾール、ベンズイミダゾール、ベンゾチアゾール、ベンゾフラン、ベンゾチオフェン、シンノリン、フタラジン、キナゾリン、カルバゾール、フェノキサジン、キノリン、プリンなどが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ヘテロアリールは、単環芳香族基である。いくつかの実施形態では、ヘテロアリールは、二環芳香族基である。いくつかの実施形態では、ヘテロアリールは、三環芳香族基である。

【００７３】

複素環基またはヘテロアリール基は、結合が可能な、炭素（炭素結合）または窒素（窒素

結合）に結合させることができる。限定ではなく例として、炭素結合複素環またはヘテロアリールは、ピリジンの２位、３位、４位、５位、もしくは６位、ピリダジンの３位、４位、５位、もしくは６位、ピリミジンの２位、４位、５位、もしくは６位、ピラジンの２位、３位、５位、もしくは６位、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、もしくはテトラヒドロピロールの２位、３位、４位、もしくは５位、オキサゾール、イミダゾール、もしくはチアゾールの２位、４位、もしくは５位、イソオキサゾール、ピラゾール、もしくはイソチアゾールの３位、４位、もしくは５位、アジリジンの２位もしくは３位、アゼチジンの２位、３位、もしくは４位、キノリンの２位、３位、４位、５位、６位、７位、もしくは８位、またはイソキノリンの１位、３位、４位、５位、６位、７位、もしくは８位に結合している。

【００７４】

限定ではなく例として、窒素結合複素環またはヘテロアリールは、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１位、イソインドールまたはイソインドリンの２位、モルホリンの４位、及びカルバゾールまたはＯ－カルボリンの９位に結合している。

【００７５】

ヘテロアリールまたはヘテロシクリルに存在するヘテロ原子として、ＮＯ、ＳＯ、及びSO_2などの酸化形態が挙げられる。

【００７６】

いくつかの実施形態では、ヘテロ芳香環は、５～１８員の環である。

【００７７】

「ハロ」または「ハロゲン」という用語は、フッ素（Ｆ）、塩素（Ｃｌ）、臭素（Ｂｒ）、またはヨウ素（Ｉ）を指す。いくつかの実施形態では、ハロゲンはフッ素である。いくつかの実施形態では、ハロゲンは塩素である。いくつかの実施形態では、ハロゲンは臭素である。いくつかの実施形態では、ハロゲンはヨウ素である。本明細書で使用される場合、「ハロアルキル」という用語は、本明細書に定義される１つ以上のハロ基で置換された、本明細書に定義されるアルキルを指す。ハロアルキルは、モノハロアルキル、ジハロアルキル、またはポリハロアルキルであり得る。モノハロアルキルは、１つのフルオロ置換基、クロロ置換基、ブロモ置換基、またはヨード置換基を有し得る。ジハロアルキルまたはポリハロアルキルは、２つ以上の同じハロ原子または異なるハロ基の組み合わせで置換され得る。ハロアルキルの例として、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、クロロアメチル、ジクロロメチル、トリクロロメチル、ペンタフルオロエチル、ヘプタフルオロプロピル、ジフルオロクロロメチル、ジクロロフルオロメチル、ジフルオロエチル、ジフロソロプロピル、ジクロロエチル、及びジクロロプロピルが挙げられるが、これらに限定されない。

【００７８】

本明細書で使用される「アルコキシ」とは、アルキル－Ｏ－を指し、ここでアルキルは本明細書で上記に定義される。アルコキシの例として、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、２－プロポキシ、ブトキシ、ｔｅｒｔ－ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【００７９】

上記のアルキル、ハロアルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、環状アルキル、環状アルケニル、環状アルキニル、カルボシクリル、アリール、ヘテロシクリル、及びヘテロアリールは、任意選択で、１つ以上（例えば、２、３、４、５、６、またはそれ以上）の置換基で置換され得る。

【００８０】

具体的に「非置換」と記載されていない限り、本明細書の化学的部分に関する言及は、置換された変形例も含むと理解される。例えば、「アルキル」基または部分に関する言及は

、置換及び非置換両方の変形例を黙示的に含む。化学的部分の置換基の例として、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル（カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミル、またはアシルなど）、チオカルボニル（チオエステル、チオアセテート、またはチオホルメートなど）、アルコキシル、アルキルチオ、アシルオキシ、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、スルフェート、スルホネート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ヘテロシクリル、アラルキル、またはアリールもしくはヘテロアリール部分が挙げられるが、これらに限定されない。

【００８１】

「任意選択の」または「任意選択で」とは、それ以降に記載されている事象が、起こる可能性もあれば、起こらない可能性もあり、したがって本出願には事象が起こる場合の事例と起こらない場合の事例が含まれることを意味する。例えば、「任意選択で置換された」という語句は、非水素置換基が所与の原子上に存在する可能性もあれば、存在しない可能性もあり、したがって本出願には、非水素置換基が存在する構造及び非水素置換基が存在しない構造が含まれることを意味する。

【００８２】

「置換された」という用語は、１つ以上の炭素原子、窒素原子、酸素原子、または硫黄原子上の水素を置換する置換基を部分が有することを指す。「置換」または「で置換された」とは、そのような置換が置換原子及び置換基の許容される価数に従う、及び置換が安定な化合物をもたらす、例えば、転位、環化、脱離などの変換を自発的に起こさないという黙示的条件を含むと理解されよう。本明細書で使用される場合、「置換された」という用語は、すべての許容される有機化合物の置換基を含むことを企図する。広義の態様では、許容される置換基には、有機化合物の非環式及び環式、分岐及び非分岐、炭素環式及び複素環式、ならびに芳香族及び非芳香族の置換基を含む。許容される置換基は、適切な有機化合物に対して、１つ以上であり得、同じであっても異なっていてもよい。本発明の目的では、窒素などのヘテロ原子は、そのヘテロ原子の価数を満たす、水素置換基及び／または本明細書に記載の有機化合物の任意の許容される置換基を有し得る。置換基は、本明細書に記載の任意の置換基、例えば、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル（カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミル、またはアシルなど）、チオカルボニル（チオエステル、チオアセテート、またはチオホルメートなど）、アルコキシル、アルキルチオ、アシルオキシ、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、スルフェート、スルホネート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ヘテロシクリル、アラルキル、または芳香族部分もしくはヘテロ芳香族部分を含み得る。例示として、モノフルオロアルキルは、フルオロ置換基で置換されたアルキルであり、ジフルオロアルキルは、２つのフルオロ置換基で置換されたアルキルである。置換基に複数の置換がある場合、各非水素置換基は同一であっても異なっていてもよいものと認識されるべきである（特に記載のない限り）。

【００８３】

置換基の炭素が、列挙される置換基のうち１つ以上により任意選択で置換されると記載されている場合、炭素上の１つ以上の水素が（存在する範囲内で）、独立して選択される任意選択の置換基により、個別に及び／または一緒に置換され得る。置換基の窒素が置換基の列挙のうち１つ以上により任意選択で置換されると記載されている場合、窒素上の１つ以上の水素が（存在する範囲で）、独立して選択される任意選択の置換基により、それぞれ置換され得る。１つの例示的な置換基を－ＮＲ’Ｒ’’と記述でき、式中、Ｒ’及びＲ’’は、それらが結合している窒素原子と共に複素環を形成することができる。Ｒ’及びＲ’’が、それらが結合している窒素原子と共に形成する複素環は、部分的飽和でも完全飽和でもあり得る。いくつかの実施形態では、複素環は３～７個の原子からなる。他の実施形態では、複素環は、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、イソキサゾリル、ピリジル、及びチアゾリルから選択される。

【００８４】
本明細書は、「置換基」、「ラジカル」、及び「基」という用語を同義に使用する。
【００８５】
置換基の群が、置換基の列挙のうち１つ以上により任意選択で置換されるものとして集合的に記載されている場合、その群は、（１）非置換の置換基、（２）置換可能であるが任意選択の置換基により置換されていない置換基、及び／または（３）置換可能であり１つ以上の任意選択の置換基により置換されている置換基を含み得る。
【００８６】
置換基が、特定の数までの非水素置換基により任意選択で置換されていると記載されている場合、その置換基は、（１）置換されていなくても、または（２）その特定の数の非水素置換基、もしくは置換基上の最大数までの置換可能な位置のいずれか少ない方により置換されていてもよい。したがって、例えば、置換基が最大３つの非水素置換基により任意選択で置換されるヘテロアリールであると記載されている場合、３つ未満の置換可能な位置を有する任意のヘテロアリールは、ヘテロアリールが有する置換可能な位置と同数の非水素置換基により任意選択で置換されることになる。非限定的な例において、そのような置換基は、１～１０個の炭素原子を有する直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、ハロゲン、グアニジウム［－ＮＨ（Ｃ＝ＮＨ）ＮＨ$_2$］、－ＯＲ１００、ＮＲ１０１Ｒ１０２、－ＮＯ$_2$、－ＮＲ１０１ＣＯＲ１０２、－ＳＲ１００、－ＳＯＲ１０１で表されるスルホキシド、－ＳＯ$_2$Ｒ１０１で表されるスルホン、スルホネート－ＳＯ$_3$Ｍ、スルフェート－ＯＳＯ$_3$Ｍ、－ＳＯ$_2$ＮＲ１０１Ｒ１０２で表されるスルホンアミド、シアノ、アジド、－ＣＯＲ１０１、－ＯＣＯＲ１０１、－ＯＣＯＮＲ１０１Ｒ１０２、及びポリエチレングリコール単位（－ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_n$Ｒ１０１から選択することができ、式中、ＭはＨまたはカチオン（Ｎａ＋またはＫ＋など）；Ｒ１０１、Ｒ１０２、及びＲ１０３はそれぞれ独立して、Ｈ、１～１０個の炭素原子を有する直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニル、ポリエチレングリコール単位（－ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_n$Ｒ１０４（式中、ｎは、１～２４の整数である）、６～１０個の炭素原子を有するアリール、３～１０個の炭素原子を有する複素環、及び５～１０個の炭素原子を有するヘテロアリールから選択され、Ｒ１０４は、Ｈ、または１～４個の炭素原子を有する直鎖もしくは分岐アルキルであり、ここでＲ１００、Ｒ１０１、Ｒ１０２、Ｒ１０３、及びＲ１０４で表される基のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、及びヘテロシクリルは、ハロゲン、－ＯＨ、－ＣＮ、－ＮＯ$_2$、及び１～４個の炭素原子を有する非置換の直鎖または分岐アルキルから独立して選択される１つ以上（例えば、２、３、４、５、６、またはそれ以上）の置換基により任意選択で置換される。好ましくは、上記の任意選択で置換されるアルキル、アルケニル、アルキニル、環状アルキル、環状アルケニル、環状アルキニル、カルボシクリル、アリール、ヘテロシクリル、及びヘテロアリールの置換基として、ハロゲン、－ＣＮ、－ＮＲ１０２Ｒ１０３、－ＣＦ$_3$、－ＯＲ１０１、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、－ＳＲ１０１、－ＳＯＲ１０１、－ＳＯ$_2$Ｒ１０１、及び－ＳＯ$_3$Ｍが挙げられる。
【００８７】
基中の炭素原子の数は、本明細書で、接頭辞「Ｃ$_x$－$_{xx}$」または「Ｃ$_x$～Ｃ$_{xx}$」（式中、ｘ及びｘｘは整数である）によって指定される場合がある。例えば、「Ｃ$_1$－$_4$アルキル」または「Ｃ１～Ｃ４アルキル」は、１～４個の炭素原子を有するアルキル基である。
【００８８】
「化合物」、「細胞毒性剤」、または「細胞毒性化合物」という用語は、同義に使用される。これらの用語は、構造もしくは式もしくはその任意の誘導体が本発明に開示される化合物、または構造もしくは式もしくはその任意の誘導体が参照により組み込まれている化合物を含むことを意図する。この用語はまた、本発明に開示されるすべての式の化合物の立体異性体、幾何異性体、互変異性体、溶媒和物、代謝物、及び塩（例えば、薬学的に許

容される塩）を包含する。この用語はまた、前述のいずれかのものの溶媒和物、水和物、及び多形を包含する。本出願に記載される本発明のある特定の態様における「立体異性体」、「幾何異性体」、「互変異性体」、「溶媒和物」、「代謝物」、「塩」、「複合体」、「複合体塩」、「溶媒和物」、「水和物」、または「多形」の具体的な記載は、これら他の形態の記載なしに「化合物」という用語が使用されている本発明の他の態様において、これらの形態の排除を意図すると解釈されるべきではない。

【００８９】

「キラル」という用語は、鏡像パートナーと重ね合わせできないという特性を有する分子を指し、一方「アキラル」という用語は、その鏡像パートナーと重ね合わせできる分子を指す。

【００９０】

「立体異性体」という用語は、同一の化学構成及び結合性を有するが、それらの原子の空間配置が異なり、単結合を軸とする回転によって相互変換することができない化合物を指す。

【００９１】

「ジアステレオマー」とは、２つ以上のキラル中心を有し、その分子が互いの鏡像ではない立体異性体を指す。ジアステレオマーは、異なる物理的特性、例えば、融点、沸点、スペクトル特性、及び反応性を有する。ジアステレオマーの混合物は、結晶化、電気泳動、及びクロマトグラフィーなどの高分解能分析手順で分離することができる。

【００９２】

「エナンチオマー」とは、互いに重ね合わせできない鏡像である、化合物の２つの立体異性体を指す。

【００９３】

本明細書で使用される立体化学の定義及び規則は、一般に、Ｓ．Ｐ．Ｐａｒｋｅｒ，Ｅｄ．，ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｒｍｓ（１９８４）ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ Ｂｏｏｋ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；及びＥｌｉｅｌ，Ｅ．ａｎｄ Ｗｉｌｅｎ，Ｓ．，“Ｓｔｅｒｅｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ，” Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９４に準拠する。本発明の化合物は、不斉中心またはキラル中心を含有する可能性があり、したがって異なる立体異性体形態で存在する。ジアステレオマー、エナンチオマー、及びアトロプ異性体、ならびにこれらの混合物、例えばラセミ混合物を含むがこれらに限定されない、本発明の化合物の立体異性体形態はすべて本発明の一部を形成することが意図される。多くの有機化合物は、平面偏光の面を回転させる能力を有する光学活性形態で存在する。光学活性化合物を記載する際に、接頭辞Ｄ及びＬまたはＲ及びＳは、そのキラル中心（複数可）を軸とする分子の絶対配置を示すために使用される。接頭辞ｄ及びｌまたは（＋）及び（－）は、化合物による平面偏光の回転符号を示すために用いられ、（－）またはｌは、化合物が左旋性であることを意味する。接頭辞が（＋）またはｄである化合物は右旋性である。所与の化学構造に関して、このような立体異性体は、それらが互いに鏡像であることを除いて同一である。特定の立体異性体はエナンチオマーと称されることもあり、そのような異性体の混合物はエナンチオマー混合物と呼ばれることが多い。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称され、化学反応または化学処理において立体選択または立体特異性がない場合に生じる可能性がある。「ラセミ混合物」及び「ラセミ体」という用語は、光学活性がない２種のエナンチオマー種の等モル混合物を指す。

【００９４】

「互変異性体」または「互変異性体形態」という用語は、低エネルギー障壁を介して相互変換可能である、異なるエネルギーの構造異性体を指す。例えば、プロトン互変異性体（プロトトロピー互変異性体としても知られる）は、プロトン移動を介した相互変換、例えばケト－エノール及びイミン－エナミン異性体化などを包含する。原子価互変異性体は、結合電子のいくつかの再編成による相互変換を包含する。

【００９５】
本明細書で使用される「薬学的に許容される塩」という語句は、本発明の化合物の薬学的に許容される有機塩または無機塩を指す。例示的な塩として、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、重酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチジン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、糖酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩「メシル酸塩」、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩、パモ酸塩（すなわち、１，１´－メチレン－ビス－（２－ヒドロキシ－３－ナフトエ酸）塩）、アルカリ金属（例えば、ナトリウム及びカリウム）塩、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）塩、及びアンモニウム塩が挙げられるが、これらに限定されない。薬学的に許容される塩は、酢酸イオン、コハク酸イオン、または他の対イオンなどの別の分子の包含を伴い得る。対イオンは、親化合物の電荷を安定化する任意の有機部分または無機部分であり得る。さらに、薬学的に許容される塩は、その構造内に複数の荷電原子を有することができる。複数の荷電原子が薬学的に許容される塩の一部である場合、複数の対イオンを有することができる。したがって、薬学的に許容される塩は、１つ以上の荷電原子及び／または１つ以上の対イオンを有することができる。
【００９６】
本発明の化合物が塩基である場合、望ましい薬学的に許容される塩を、当技術分野において利用可能な任意の好適な方法、例えば、遊離塩基を、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、メタンスルホン酸、リン酸のような無機酸、または酢酸、マレイン酸、コハク酸、マンデル酸、フマル酸、マロン酸、ピルビン酸、シュウ酸、グリコール酸、サリチル酸、ピラノシジル酸（グルクロン酸またはガラクツロン酸など）、アルファヒドロキシ酸（クエン酸または酒石酸など）、アミノ酸（アスパラギン酸またはグルタミン酸など）、芳香族酸（安息香酸またはケイ皮酸など）、スルホン酸（ｐ－トルエンスルホン酸またはエタンスルホン酸など）のような有機酸により処理して調製することができる。
【００９７】
本発明の化合物が酸である場合、望ましい薬学的に許容される塩を、任意の好適な方法、例えば、遊離酸を、無機塩基または有機塩基、例えばアミン（第１級、第２級、または第３級）、アルカリ金属水酸化物、またはアルカリ土類金属水酸化物などにより処理して調製することができる。好適な塩の例示的な例として、アミノ酸（グリシン及びアルギニンなど）、アンモニア、第１級、第２級、及び第３級アミン、ならびに環状アミン（ピペリジン、モルホリン、及びピペラジンなど）に由来する有機塩、ならびにナトリウム、カルシウム、カリウム、マグネシウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛、アルミニウム、及びリチウムに由来する無機塩が挙げられるが、これらに限定されない。
【００９８】
本明細書で使用される場合、「溶媒和物」という用語は、非共有結合性分子間力により結合した、化学量論的量または非化学量論的量の溶媒、例えば、水、イソプロパノール、アセトン、エタノール、メタノール、ＤＭＳＯ、酢酸エチル、酢酸、及びエタノールアミン、ジクロロメタン、２－プロパノールなどをさらに含む化合物を意味する。化合物の溶媒和物または水和物は、少なくとも１モル当量のヒドロキシル溶媒、例えば、メタノール、エタノール、１－プロパノール、２－プロパノール、または水を化合物に添加して、イミン部分を溶媒和または水和させることによって容易に調製される。
【００９９】
「薬学的に許容される」という語句は、物質または組成物が、製剤に含まれる他の成分、及び／または物質もしくは組成物を用いて治療される哺乳動物と、化学的及び／または毒物学的に適合性でなければならないことを示す。
【０１００】
「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸または天然に存在しないアミノ酸を

指す。一実施形態では、アミノ酸は、ＮＨ２－Ｃ（ＲａａＲａａ）－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで表され、式中、Ｒａａ及びＲａａ’は、それぞれ独立して、Ｈ、任意選択で置換される、１～１０個の炭素原子を有する直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルであるか、あるいはＲａａ及びＮ末端窒素原子が一緒になって複素環（例えば、プロリンにおけるような）を形成することができる。「アミノ酸残基」という用語は、アミノ酸のアミン末端及び／またはカルボキシ末端から１つの水素原子が除去された場合に相当する残基、例えば、－ＮＨ－Ｃ（ＲａａＲａａ）－Ｃ（＝Ｏ）－を指す。

【０１０１】

「カチオン」という用語は、正電荷を有するイオンを指す。カチオンは、一価（例えば、Ｎａ＋、Ｋ＋、ＮＨ４＋など）、二価（例えば、Ｃａ２＋、Ｍｇ２＋など）、または多価（例えば、Ａｌ３＋など）であり得る。好ましくは、カチオンは一価である。

【０１０２】

「チオール反応性基」という用語は、チオール（－ＳＨ）基と反応して共有結合を形成することができる基を指す。例示的なチオール反応性基として、マレイミド、ハロアセチル、ハロアセトアミド、ビニルスルホン、ビニルスルホンアミド、またはビニルピリジンが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、チオール反応性基はマレイミドである。

【０１０３】

実施形態が「含む」という語とともに本明細書に記載されている場合であっても、それ以外の「からなる」及び／または「本質的にからなる」という用語で記載されている類似の実施形態も提供するものと理解される。

【０１０４】

本明細書の「Ａ及び／またはＢ」などの語句に使用される「及び／または」という用語は、「Ａ及びＢ」、「ＡまたはＢ」、「Ａ」、及び「Ｂ」のいずれをも含むことを意図している。同様に、「Ａ、Ｂ、及び／またはＣ」などの語句に使用される「及び／または」という用語は、以下の実施形態のそれぞれを包含することを意図する：Ａ、Ｂ、及びＣ；Ａ、Ｂ、またはＣ；ＡまたはＣ；ＡまたはＢ；ＢまたはＣ；Ａ及びＣ；Ａ及びＢ；Ｂ及びＣ；Ａ（単独）；Ｂ（単独）；ならびにＣ（単独）。

【０１０５】

２．免疫複合体の調製方法

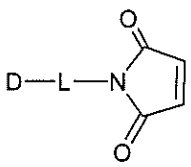
第１の態様では、本発明は、細胞毒性剤と共有結合された、１つ以上の不対システイン残基を有する細胞結合剤（ＣｙｓＣＢＡ）を含む細胞結合剤－細胞毒性剤複合体を調製する方法であって、

（ａ）キャッピング剤でキャップされた１つ以上の不対システイン残基を有するキャップされた細胞結合剤（ｃＣｙｓＣＢＡ）と還元剤とを反応させて還元型細胞結合剤を形成し、当該キャッピング剤が除去されて還元型細胞結合剤に遊離チオール基（－ＳＨ）を形成する工程と；

（ｂ）不対システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型細胞結合剤を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＣＢＡを形成する工程と；

（ｃ）ＣｙｓＣＢＡを式（Ｉ）：

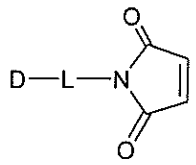
【化３４】



（Ｉ）

の化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより複合体を形成する工程とを含み、工程（ａ）の還元型細胞結合剤を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）

のＣｙｓＣＢＡを精製せずに工程（ｃ）で使用し、式中：
Ｄは細胞毒性剤であり；
Ｌはリンカーである方法を提供する。
【０１０６】
第２の態様では、本発明は、細胞毒性剤と共有結合された、１つ以上の不対システイン残基を有する細胞結合剤（ＣｙｓＣＢＡ）を含む細胞結合剤－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、
（ａ）キャッピング剤でキャップされた１つ以上の不対システイン残基を有するキャップされた細胞結合剤（ｃＣｙｓＣＢＡ）と還元剤とを反応させて還元型細胞結合剤を形成し、当該キャッピング剤が除去されて還元型細胞結合剤に遊離チオール基（－ＳＨ）を形成する工程と；
（ｂ）不対システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型細胞結合剤を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＣＢＡを形成する工程と；
（ｃ）ＣｙｓＣＢＡを式（Ｉ）：
【化３５】



（Ｉ）

の化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより複合体を形成する工程と；
工程（ａ）の還元型細胞結合剤を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＣＢＡを精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｃ）から選択されるいずれか１つ以上の工程が連続して実行され、式中：
Ｄは細胞毒性剤であり；
Ｌはリンカーである方法を提供する。
【０１０７】
いくつかの実施形態では、上記の第２の態様の方法における工程（ａ）～（ｃ）は、連続して実行される。
【０１０８】
本明細書で提供される連続的な方法では、成分が進行中のプロセスに継続して添加され、生成物をプロセスの終了時にバルクで取り出すのではなく、プロセス全体を通じて取り出すことができる。例えば、上記の連続的な方法の工程（ａ）（還元工程）において、反応が進行している間、及び少なくとも１つの生成物、すなわち還元型細胞結合剤が形成された後、還元剤及び／またはキャップされた細胞結合剤（ｃＣｙｓＣＢＡ）を還元反応に継続して添加する。上記の連続的な方法の工程（ｂ）（酸化工程）において、反応が進行している間、及び少なくとも１つの生成物、すなわちＣｙｓＣＢＡが形成された後、還元型細胞結合剤及び／または選択的酸化剤を酸化反応に継続して添加する。上記の連続的な方法の工程（ｃ）（結合工程）において、反応が進行している間、及び少なくとも１つの結合反応生成物（ＡＤＣ）が形成された後、ＣｙｓＣＢＡ及び／または式（Ｉ）の化合物を結合反応に継続して添加する。同様に、下流の連続的な濃縮、精製、及び／または緩衝液交換プロセスにおいて、これらのプロセスが進行しているとき、ＡＤＣ、緩衝液、及び／または他の成分を濃縮、精製、及び／または緩衝液交換プロセスに継続して添加し、濃縮、精製、及び緩衝液交換されたＡＤＣをこれらの進行中のプロセスから連続して取り出すことができる。したがって、ＡＤＣプロセス全体を継続することができる（例えば、図５及び６を参照）。
【０１０９】
本発明者らは、本明細書に記載のＡＤＣを調製する方法が、フローリアクターを使用して

連続して実行できることを実証した。反応が進行している間、及び少なくとも１つの反応生成物が形成された後、フローリアクターにより１種以上の試薬を反応に連続して添加することができる。連続的な方法でフローリアクターを使用すると、反応の制御及び方法の多様性（例えば、急速な温度変化／厳密な温度制御、拡散が介在する混合による均一性の向上、及び容器による制約またはスイートの制限が不要）、方法の拡張性の向上（すなわち、従来のバッチ処理のスケールアップリスクが該当せず、空時収率が最適化される（例えば、現行プロセスを長時間実行することにより疑似スケールアップ（出力の増加）を行う））が可能である。

【０１１０】

ある特定の実施形態では、プラグフローリアクター（ＰＦＲ）は、本発明の連続的な方法に使用される。

【０１１１】

ある特定の実施形態では、反応容器（例えば、連続撹拌槽型反応器（ＣＳＴＲ））を使用して、１種以上の試薬をフローリアクターに添加する前に、反応物を連続的に添加する。反応容器（例えば、ＣＳＴＲ）とフローリアクター（例えば、プラグフローリアクター）を直列に使用すると、総容量要件が緩和される、反応物流同士の混合が改善される、滞留時間分布の拡大を含め、リスク軽減機能が向上するという利点がある。

【０１１２】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の連続的な方法の還元工程（ａ）において、反応が進行している間、及び少なくとも１つの生成物、すなわち還元型細胞結合剤が形成された後、還元剤及びキャップされた細胞結合剤（ｃＣｙｓＣＢＡ）を（例えば、還元剤用に１つのフィードポンプ、ｃＣｙｓＣＢＡ用に別のフィードポンプを使用して）反応容器（例えば、ＣＳＴＲ）に連続して添加する。反応混合物は、ポンプ（例えば、蠕動ポンプ）を使用して反応容器（例えば、ＣＳＴＲ）から連続して回収し、フローリアクター（例えば、ＰＦＲ）を通して供給する。いくつかの実施形態では、反応容器（例えば、ＣＳＴＲ）から回収する材料の体積流量は、ＣＳＴＲに添加される還元剤及びｃＣｙｓＣＢＡの合計流量と同じ、すなわち、反応容器（例えば、ＣＳＴＲ）の出入り流量が同じである。

【０１１３】

同様に、本明細書に記載の連続的な方法の選択的再酸化工程（ｂ）において、反応が進行している間、及び少なくとも１つの生成物、すなわちＣｙｓＣＢＡが形成された後、還元型細胞結合剤及び選択的酸化剤を（例えば、還元型細胞結合剤用に１つのフィードポンプ、選択的酸化剤用に別のフィードポンプを使用して）反応容器（例えば、ＣＳＴＲ）に連続して添加する。反応混合物は、ポンプ（例えば、蠕動ポンプ）を使用して反応容器（例えば、ＣＳＴＲ）から連続して回収し、フローリアクター（例えば、ＰＦＲ）を通して供給する。いくつかの実施形態では、反応容器（例えば、ＣＳＴＲ）から回収する材料の体積流量は、ＣＳＴＲに添加される還元型細胞結合剤及び選択的酸化剤の合計流量と同じ、すなわち、反応容器（例えば、ＣＳＴＲ）の出入り流量が同じである。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の連続的な方法の結合工程（ｃ）において、反応が進行している間、及び少なくとも１つの生成物、すなわちＡＤＣが形成された後、ＣｙｓＣＢＡ及び式（Ｉ）の化合物を（例えば、ＣｙｓＣＢＡ用に１つのフィードポンプ、式（Ｉ）の化合物用に別のフィードポンプを使用して）反応容器（例えば、ＣＳＴＲ）に連続して添加する。反応混合物は、ポンプ（例えば、蠕動ポンプ）を使用して反応容器（例えば、ＣＳＴＲ）から連続して回収し、フローリアクター（例えば、ＰＦＲ）を通して供給する。いくつかの実施形態では、ＣＳＴＲから回収する材料の体積流量は、反応容器（例えば、ＣＳＴＲ）に添加されるＣｙｓＣＢＡ及び式（Ｉ）の化合物の合計流量と同じ、すなわち、反応容器（例えば、ＣＳＴＲ）の出入り流量が同じである。

【０１１５】

いくつかの実施形態では、各反応の速度論的データを生成し、各反応に望ましい目標転化率を指定する。この結果に基づいて、各反応のＣＳＴＲ及びＰＦＲの容量を、使用するチ

ューブ内径、及び各反応工程に望ましい滞留時間を達成するために必要とされる体積流量に基づいて指定する。

【０１１６】

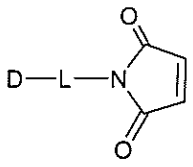
第３の態様では、本発明は、細胞毒性剤と共有結合された、１つ以上の不対システイン残基を有する細胞結合剤（ＣｙｓＣＢＡ）を含む細胞結合剤－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、

（ａ）キャッピング剤でキャップされた１つ以上の不対システイン残基を有するキャップされた細胞結合剤（ｃＣｙｓＣＢＡ）と還元剤とを反応させて還元型細胞結合剤を形成し、当該キャッピング剤が除去されて還元型細胞結合剤に遊離チオール基（－ＳＨ）を形成する工程と；

（ｂ）不対システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型細胞結合剤を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＣＢＡを形成する工程と；

（ｃ）ＣｙｓＣＢＡを式（Ｉ）：

【化３６】



（Ｉ）

の化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより複合体を形成する工程と；

（ｄ）式（Ｉ）の非結合化合物を除去する工程と；任意選択で

（ｅ）複合体を安定緩衝液に交換する工程とを含み、

工程（ａ）の還元型細胞結合剤を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＣＢＡを精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｅ）から選択されるいずれか１つ以上の工程が連続して実行され、シングルパスタンジェンシャルフロー濾過（ＳＰＴＦＦ）及び／または向流ダイアフィルトレーションを使用して、非結合薬物を除去、及び／またはＡＤＣを安定緩衝液に交換し、式中：

Ｄは細胞毒性剤であり；

Ｌはリンカーである方法を提供する。

【０１１７】

いくつかの実施形態では、第３の態様に記載の連続的な方法に関して、この方法は、工程（ａ）～（ｄ）を含む。いくつかの実施形態では、工程（ａ）～（ｄ）のすべてが連続して実行される。いくつかの実施形態では、工程（ｄ）のみ連続して実行される。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、第３の態様に記載の連続的な方法に関して、この方法は、工程（ａ）～（ｅ）を含む。いくつかの実施形態では、工程（ａ）～（ｅ）のすべてが連続して実行される。いくつかの実施形態では、工程（ｄ）及び（ｅ）のみ連続して実行される。

【０１１９】

本発明者らはまた、非結合薬物（すなわち、式（Ｉ）の化合物）をＡＤＣから問題なく分離できる、シングルパスタンジェンシャルフロー濾過（ＳＰＴＦＦ）を使用して、連続的なＡＤＣの処理を達成できることを実証した。ＡＤＣの処理は、ＡＤＣの結合（形成）（すなわち、上記の工程（ｃ））、ＡＤＣの濃縮、ＡＤＣの精製、及び／またはＡＤＣの製剤化を含み得る。ＡＤＣの結合から製剤化までのプロセス全体が連続していることが特に有用であるが、連続処理工程をバッチ処理工程と組み合わせることも可能である。加えて、上流の処理工程（例えば、抗体の調製、すなわち、本明細書に記載の方法における工程（ａ）及び（ｂ））が連続していて、ＡＤＣの結合に連続して供給することが可能である。

【０１２０】
バルク（従来式）ダイアフィルトレーションでは、タンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）システムに第１の緩衝液Ａ（生成物が最初に投入される緩衝液）を予備充填することを伴う。その後、生成物を保持液容器に添加し、そこで予備充填量と混合する。保持液容器の供給ポンプにより、ＴＦＦ膜を介して保持液から生成物がポンプ送液され、そこで保持される（保持液に戻る）か、廃棄される。別のポンプ（ダイアフィルトレーションポンプ）は、容器から保持液容器への供給ラインにより、容器から別の容器に収容された緩衝液Ｂ（生成物を交換する緩衝液）への供給を行うことになる。両方のポンプを始動すると、保持液容器内の生成物がＴＦＦ膜を通過し始める。緩衝液が廃棄流によって除去されるにつれ、緩衝液Ｂ（等量）を保持液容器に追加することにより保持液の体積を維持する。その結果、生成物はゆっくり緩衝液Ｂに交換される。

【０１２１】
ＳＰＴＦＦは、当初、緩衝液Ａ中にある生成物を緩衝液Ｂに交換するという関連概念を使用する。ただし、生成物は膜を１回通過するだけなので、完全な緩衝液交換を完了するのに適した全体積の緩衝液Ｂを完了する必要がある。これを行うには、ＳＰＴＦＦにより、階層段階にわたって緩衝液Ｂを添加することができる。したがって、生成物は膜を１回だけ通過する、すなわち、緩衝液Ａに入り、緩衝液Ｂのモジュールを出る。

【０１２２】
同様に、向流ダイアフィルトレーションを使用して、連続的なＡＤＣの処理を達成することができる。向流ダイアフィルトレーションには、２回以上のＳＰＴＦＦ（例えば、モジュール１、モジュール２など）を伴う。いくつかの実施形態では、向流ダイアフィルトレーションは、２つのモジュールのＳＰＴＦＦを伴い、その場合、モジュール１からの保持液がダイアフィルトレーション緩衝液の追加供給と合一された後、モジュール２に直接供給され、モジュール２からの透過液は再利用されて、モジュール１への供給と合一される。例示的な向流ダイアフィルトレーションを図６に示す。未精製の粗ＡＤＣ生成物は、ダイアフィルトレーション（ＤＦ）緩衝液の流れと合一された後、向流ＴＦＦ精製ユニットであるモジュール１を通して供給される。モジュール１からの透過液は廃棄流によって除去され、モジュール１からの保持液はＤＦ緩衝液の追加供給と合一された後、モジュール２を通して供給される。精製されたＡＤＣはモジュール２の保持液から回収され、モジュール２からの透過液は再利用されて、モジュール１への供給と合一される。

【０１２３】
したがって、本明細書で提供される連続的なＡＤＣの処理方法（例えば、ＳＰＴＦＦ及び／または向流ダイアフィルトレーションを使用する）は、ＡＤＣのバッチ処理と比較して、処理時間を短縮し、収率を改善し、及び／または生成物の一貫性を改善することができる。本明細書で提供される連続的なＡＤＣの処理方法（例えば、ＳＰＴＦＦ及び／または向流ダイアフィルトレーションを使用する）はまた、バッチ結合プロセスで使用される保持工程を省略することもできる。本明細書で提供される連続的なＡＤＣの処理方法（例えば、ＳＰＴＦＦ及び／または向流ダイアフィルトレーションを使用する）はまた、より小型の装置の使用を可能にすることもできる。剪断力によって引き起こされる可能性のある酸化の影響を受けやすい抗体は、ＳＰＴＦＦの方が適している場合があるという理由からも、ＳＰＴＦＦは有利である。

【０１２４】
ＳＰＴＦＦを使用すると、連続的な添加及び／または結合反応からの成分の除去を可能にすることができる。したがって、ＳＰＴＦＦを使用して、ＡＤＣの結合用試薬を調製すること、及びアセンブルしたＡＤＣを処理することができる。ＳＰＴＦＦにより、連続的なＡＤＣの処理を可能にでき、それにより特定のＡＤＣの処理工程のすべて（またはサブセット）（例えば、生成、濃縮、精製、及び／または製剤化）を同時に実行することができる。向流ダイアフィルトレーションを使用しても、ＡＤＣの結合用試薬を調製すること、及びアセンブルしたＡＤＣを処理することができる。

【０１２５】

本明細書で提供される方法によれば、ＳＰＴＦＦを使用して、ＡＤＣを濃縮すること、ＡＤＣを精製すること、及び／またはＡＤＣを製剤化すること（例えば、ＡＤＣを製剤化緩衝液に交換することによる）ができる。ＳＰＴＦＦを使用して、ＡＤＣを第１の緩衝液から第２の緩衝液に移すことができる。向流ダイアフィルトレーションを使用しても、ＡＤＣを濃縮すること、ＡＤＣを精製すること、及び／またはＡＤＣを製剤化すること（例えば、ＡＤＣを製剤化緩衝液に交換することによる）ができ、また向流ダイアフィルトレーションを使用しても、ＡＤＣを第１の緩衝液から第２の緩衝液に移すことができる。

【０１２６】

本明細書で提供されるいくつかの方法では、ＡＤＣの生成、精製、及び製剤化を通じてＳＰＴＦＦを使用し、ＡＤＣの生成から製剤化までのプロセス全体を連続的にする。本明細書で提供される。いくつかの方法では、ＡＤＣの生成、精製、及び製剤化を通じて向流ダイアフィルトレーションを使用し、ＡＤＣの生成から製剤化までのプロセス全体を連続的にする。

【０１２７】

本明細書で提供されるいくつかの方法では、プロセスのいくつかの部分は連続的であるが、他の部分はバッチで実行されるように、ＳＰＴＦＦを従来のＴＦＦと組み合わせて使用する。例えば、抗体またはその抗原結合断片を結合前に従来の（バッチ）ＴＦＦを使用して緩衝液交換した後、下流プロセスにＳＰＴＦＦを使用する連続プロセスに供給することができる。このような方法では、ＳＰＴＦＦの代わりに、またはＳＰＴＦＦと組み合わせて向流ダイアフィルトレーションを使用することができる。

【０１２８】

抗体を緩衝液に入れて結合させるプロセスがバッチ方式または連続方式のいずれで実行されるかを問わず、結合反応の下流でのＡＤＣの濃縮及び精製プロセスは、ＳＰＴＦＦを使用して連続方式で実行することも、従来のＴＦＦを使用してバッチ方式で実行することもできる。同様に、抗体を緩衝液に入れて結合させるプロセスがバッチプロセスまたは連続プロセスのいずれで実行されるかを問わず、かつＡＤＣがバッチプロセスまたは連続プロセスのいずれを使用して濃縮及び精製されるかを問わず、ＳＰＴＦＦを使用して連続方式で、または従来のＴＦＦを使用してバッチ方式でＡＤＣを製剤化することができる。このような方法では、ＳＰＴＦＦの代わりに、またはＳＰＴＦＦと組み合わせて向流ダイアフィルトレーションを使用することができる。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、ＡＤＣプロセスの少なくとも２つの工程は、ＳＰＴＦＦを使用して実行される。例えば、いくつかの実施形態において、ＳＰＴＦＦを、抗体またはその抗原結合断片を結合緩衝液に移す際に使用し、かつＡＤＣの形成後、ＡＤＣを濃縮及び精製する際に使用する一方、ＡＤＣを製剤化緩衝液に交換する際にはＳＰＴＦＦまたはＴＦＦのいずれかを使用する。いくつかの実施形態では、ＳＰＴＦＦを、抗体またはその抗原結合断片を結合緩衝液に移す際に使用し、かつ精製されたＡＤＣを製剤化緩衝液に交換する際に使用する一方、ＡＤＣの形成後、ＡＤＣを濃縮及び精製する際にはＳＰＴＦＦまたはＴＦＦのいずれかを使用する。いくつかの実施形態では、ＳＰＴＦＦを、ＡＤＣを濃縮及び精製する際に使用し、かつ濃縮及び精製されたＡＤＣを製剤化緩衝液に交換する際に使用する一方、抗体またはその抗原結合断片を結合緩衝液に移す際にはＳＰＴＦＦまたはＴＦＦのいずれかを使用する。

【０１３０】

例えば、ＡＤＣを濃縮する方法において、ＳＰＴＦＦに限外濾過膜を使用することができる。例えば、ＡＤＣを精製する方法及び／またはＡＤＣを緩衝液（例えば、製剤化緩衝液）に移す方法において、ＳＰＴＦＦにダイアフィルトレーション膜を使用することができる。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、ＡＤＣプロセスの少なくとも２つの工程は、ＳＰＴＦＦ及び／または向流ダイアフィルトレーションを使用して実行される。例えば、いくつかの実施形

態において、ＳＰＴＦＦ及び／または向流ダイアフィルトレーションを、抗体またはその抗原結合断片を結合緩衝液に移す際に使用し、かつＡＤＣの形成後、ＡＤＣを濃縮及び精製する際に使用する一方、ＡＤＣを製剤化緩衝液に交換する際にはＳＰＴＦＦ、向流ダイアフィルトレーション、及び／またはＴＦＦを使用する。いくつかの実施形態では、ＳＰＴＦＦ及び／または向流ダイアフィルトレーションを、抗体またはその抗原結合断片を結合緩衝液に移す際に使用し、かつ精製されたＡＤＣを製剤化緩衝液に交換する際に使用する一方、ＡＤＣの形成後、ＡＤＣを濃縮及び精製する際にはＳＰＴＦＦ、向流ダイアフィルトレーション、及び／またはＴＦＦを使用する。いくつかの実施形態では、ＳＰＴＦＦ及び／または向流ダイアフィルトレーションを、ＡＤＣを濃縮及び精製する際に使用し、かつ濃縮及び精製されたＡＤＣを製剤化緩衝液に交換する際に使用する一方、抗体またはその抗原結合断片を結合緩衝液に移す際にはＳＰＴＦＦ、向流ダイアフィルトレーション、及び／またはＴＦＦを使用する。

【０１３２】

本明細書で提供される連続的なＡＤＣの処理方法（例えば、ＳＰＴＦＦ及び／または向流ダイアフィルトレーションとの組み合わせ）では、フロースルーモードにカラムクロマトグラフィーを使用することもできる。例えば、結合反応物（例えば、連続的な結合の反応物）をフロースルーカラムクロマトグラフィーに供給して、結合反応物から非結合薬物を除去することができる。さらに、フロースルーカラムクロマトグラフィーによって精製したＡＤＣを、ＳＰＴＦＦプロセスに供給して、製剤化緩衝液に緩衝液交換することができる。また、フロースルーカラムクロマトグラフィーによって精製したＡＤＣを、向流ダイアフィルトレーションプロセスに供給して、製剤化緩衝液に緩衝液交換することができる。

【０１３３】

場合によっては、本明細書で提供される連続的な方法の反応パラメーターを迅速に変更または「パルス化」することができる。例えば、本明細書に記載の連続的な方法では、例えば、水浴、密閉反応器、ヒーター、熱電源を使用すること、及び／または反応物が流れる区画のコイル及び／またはチューブを絶縁することにより、温度を迅速に変更することができる。加えて、連続フロー結合では、例えば、酸または塩基の添加によりｐＨを迅速に変更することができる。状況に応じて、ある特定の事例では、パルスパラメーターを用いて連続反応を実行する。パルスパラメーターを用いると、例えば、生成物の品質を損なうことなく、反応時間を短縮する（すなわち、反応速度を上げる）こと、別の摂動（例えば、別の化学試薬の添加）が導入される前に、温度を急速に低下させることによって反応を一時的にクエンチまたは停止し、溶液中の複合体を安定化させることができるが、同じパラメーターを長時間負荷した場合、生成物の品質または生成物の安定性が大幅に低下する可能性がある。

【０１３４】

ある特定の事例では、指定された時間増分で指定された回数変化する（例えば、上昇または低下する）温度を連続反応に負荷する。例えば、一事例では、少なくとも２℃、少なくとも３℃、少なくとも４℃、または少なくとも５℃、温度を上昇させる。状況に応じて、少なくとも５℃、１０℃、１５℃、２０℃、２５℃、３０℃、または３５℃、温度を上昇または低下させることができる。例えば、５℃、１０℃、１５℃、２０℃、２５℃、３０℃、または３５℃、温度を上昇または低下させることができる。温度は、５℃～１０℃、１０℃～１５℃、１５℃～２０℃、２０℃～２５℃、２５℃～３０℃、または３０℃～３５℃、上昇または低下させることもできる。したがって、例えば、温度を（例えば、約２０℃から）２５℃、３０℃、３５℃、４０℃、４５℃、５０℃、または５５℃という昇温に上昇させることができる。温度はまた、（例えば、約２５℃から）３０℃、３５℃、４０℃、４５℃、５０℃、または５５℃といった昇温に上昇させることができる。ある特定の事例では、温度は５５℃を超えない。ある特定の事例では、温度は、（例えば、２０℃から）３５℃～５５℃の範囲の昇温、または４０℃～５０℃の範囲といった昇温に上昇させる。ある特定の事例では、（例えば、２０℃から）６０℃、７０℃、８０℃、９０℃、

または１００℃といった昇温に（例えば、１０秒などの短時間増分で）温度を上昇させる。ある特定の事例では、（例えば、２０℃から）６０℃～７０℃の範囲、７０℃～８０℃の範囲、８０℃～９０℃の範囲、または９０℃～１００℃の範囲の昇温に（例えば、１０秒などの短時間増分で）温度を上昇させる。ある特定の事例では、昇温または降温までの温度上昇または温度低下の所要時間は２分以内である。ある特定の事例では、昇温または降温までの温度上昇または温度低下の所要時間は１分以内である。

【０１３５】

ある特定の事例では、指定された時間増分で指定された回数変化する（例えば、上昇または低下する）ｐＨを連続反応に負荷する。例えば、一事例では、ｐＨは、１、２、３、４、または５増加または減少する。一事例では、ｐＨは１～２、２～３、３～４、または４～５増加する。したがって、例えば、ｐＨを（例えば、４から）５、６、７、８、または９に増加させることができる。ｐＨはまた、（例えば、５から）６、７、８、または９に増加させることもできる。ｐＨはまた、（例えば、９から）８、７、６、５、または４に減少させることもできる。

【０１３６】

ある特定の事例では、３０秒間、１分間、２分間、３分間、４分間、５分間、６分間、７分間、８分間、９分間、１０分間、１５分間、３０分間、１時間、１．５時間、または２時間でパルス（例えば、変化する温度及び／またはｐＨの負荷）が行われる。パルス（例えば、変化する温度及び／またはｐＨの負荷）はまた、例えば、３０秒間～１分間、１分間～２分間、２分間～３分間、３分間～４分間、４分間～５分間、６分間～７分間、７分間～８分間、８分間～９分間、または９分間～１０分間で行うことができる。パルス（例えば、変化する温度及び／またはｐＨの負荷）はまた、１～１０分間、１～１５分間、１～３０分間、１分間～１時間、１分間～１．５時間、または１分間～２時間で行うことができる。パルス（例えば、変化する温度及び／またはｐＨの負荷）はまた、例えば、１～５分間、５～１０分間、１０～１５分間、１５～３０分間、３０分間～１時間、１時間～１．５時間、または１．５時間～２時間で行うことができる。ある特定の事例では、パルス（例えば、変化する温度及び／またはｐＨの負荷）は、２時間、１時間、３０分間、２０分間、または１５分間を超えない。

【０１３７】

ある特定の事例では、パルス（例えば、変化する温度及び／またはｐＨの負荷）は１回行われる。ある特定の事例では、パルス（例えば、変化する温度及び／またはｐＨの負荷）は、２回、３回、４回、５回、６回、７回、８回、９回、または１０回繰り返される。ある特定の事例では、パルス（例えば、変化する温度及び／またはｐＨの負荷）は１～５回行われる。ある特定の事例では、パルス（例えば、変化する温度及び／またはｐＨの負荷）は、２～２０回または５～１０回行われる。

【０１３８】

連続的な方法（例えば、ＳＰＴＦＦ及び／または向流ダイアフィルトレーションを使用する）は、インラインモニタリングプロセス（以下で考察）の有無にかかわらず使用することができる。

【０１３９】

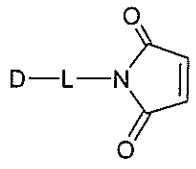
第１の実施形態では、第１、第２、もしくは第３の態様またはそこに記載される任意の実施形態におけるＣｙｓＣＢＡは、システイン改変抗体（ＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片であり、この方法は、

（ａ）キャッピング剤でキャップされた１つ以上の改変システイン残基を有するキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片と還元剤とを反応させて還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、当該キャッピング剤が除去されて還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；

（ｂ）改変システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＡｂを形成する工程と；

（ｃ）ＣｙｓＡｂを式（Ｉ）：

【化３７】



（Ｉ）

の化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を形成する工程とを含み、工程（ａ）の還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、
Ｄは細胞毒性剤であり；
Ｌはリンカーである。

【０１４０】

ある特定の実施形態では、第１の態様または第１の実施形態の方法における工程（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）は、同一反応容器内で実施される。

【０１４１】

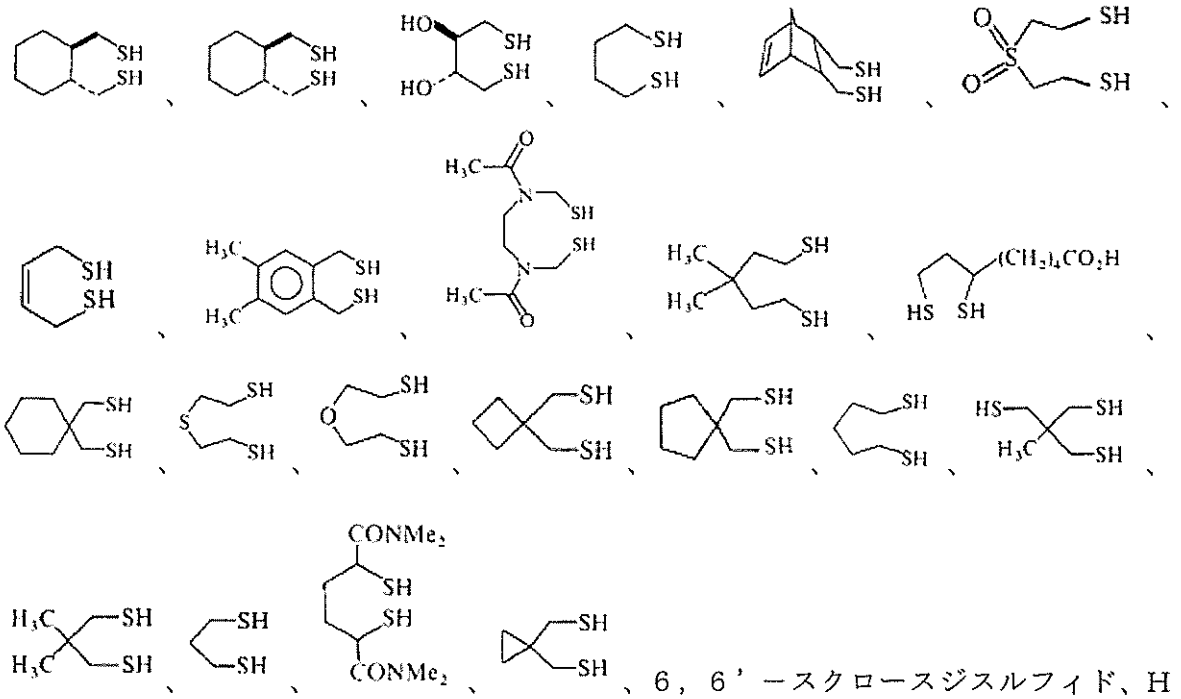
ある特定の実施形態では、第１の実施形態またはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、キャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片の１つ以上の鎖間ジスルフィド結合は、工程（ａ）で還元される。ある特定の実施形態では、１つ以上の鎖間ジスルフィド結合は、工程（ｂ）で再形成される。

【０１４２】

ある特定の実施形態では、第１、第２、もしくは第３の態様、または第１の実施形態もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、工程（ａ）の反応に任意の好適な還元剤を使用することができる。還元剤によるｃＣｙｓＣＢＡ（例えば、ｃＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片）の処理により、不対システイン残基からキャッピング剤を除去して遊離チオール（－ＳＨ）基を形成でき、また、細胞結合剤の２つのシステイン残基間に形成されるジスルフィド結合、例えば、抗体またはその抗原結合断片の鎖間及び／または鎖内ジスルフィド結合を還元することもできる。例示的な還元剤として、限定されないが、（ｉ）ホスフィン系還元剤、例えば、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ）、トリスヒドロキシプロピルホスフィン（ＴＨＰＰ）、トリス（２－シアノエチル）ホスフィン、ジシクロヘキシルホスフィノ）ベンゼンスルホン酸、ビス（ｐ－スルホナトフェニル）フェニルホスフィン、（ジフェニルホスフィノ）ベンゼンスルホン酸、（ジフェニルホスフィノ）安息香酸、２－（ジフェニルホスフィノ）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルベンジルアンモニウムトリフラート、（ジフェニルホスフィノ）エチルアミン、２－（ジイソプロピルホスフィノ）エチルアミン、３－（ジフェニルホスフィノ）プロピルアミン（ＤＰＰＡ）、３，３’，３’’－ホスフィントリイルトリベンゼンスルホン酸ナトリウム、３－（ジフェニルホスフィノ）ベンゼンスルホン酸ナトリウム、４－（ジフェニルホスフィノ）ベンゼンスルホン酸ナトリウム、ビス（ｐ－スルホナトフェニル）フェニルホスフィン二水和物二カリウム塩、ビス（ｐ－スルホナトフェニル）フェニルホスフィン二水和物二カリウム塩、プロパン酸、３，３’，３’’－ホスフィニジントリス－１，１’，１’’－トリメチルエステル（ＴｍＴＣＥＰ）、プロパンニトリル３，３’－（フェニルホスフィニデン）ビス－ベンゼンアミン（別称、Ｎ，Ｎ－ビス（シアノエチル）アニリン）、４－（ジエチルホスフィノ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－トリス（３－メトキシプロピル）ホスフィン、２－（ジフェニルホスフィノ）酢酸、（Ｓ）２－［２－（ジフェニルホスフィノ）エチル］－ピリジン、２－２－（ジフェニルホスフィノ）－１－フェニルエチルアミン、２－（ジフェニルホスフィノ）エタナミニウムテトラフルオロボラート、３－（ジフェニルホスフィノ）－プロパン酸、（酢酸、２－（ジフェニルホスフィノ）－、エチルエステル）、または４－（ジフェニルホスファニル）ブタン酸；（ｉ）チオール系還元剤、例えば、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）、１，４－ジチオエリトリトール（ＤＴＥ

）、１，４－ブタンジチオール、Ｌ－１，４－ジチオトレイトール、（Ｓ）－２－アミノブタン－１，４－ジチオール塩酸塩、（２Ｓ）－２－アミノブタン－１，４－ジチオール（ＤＴＢＡ）、２－アミノエタンチオール（ＭＥＡ）（またはその塩酸塩）、もしくは以下：

【化３８】



のいずれか１つ；（ｉｉｉ）固定化ジスルフィド還元剤、例えば、固定化ＴＣＥＰジスルフィド還元ゲルもしくは樹脂、チオール系還元剤が固定化されたビーズ樹脂を含有する固定化還元剤カラム、または（ｉｖ）セレノール、グアニジン－ＨＣｌ、もしくは尿素などの他の還元剤が挙げられる。

【０１４３】

ある特定の実施形態では、還元剤は、ＣＢＡ（例えば、抗体またはその抗原結合断片）の等電点（ｐＩ）に基づいて選択される。

【０１４４】

ある特定の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１の実施形態もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法は、ＣＢＡ（例えば、抗体また

はその抗原結合断片）のｐＩを決定すること、及びＣＢＡのｐＩに基づいて還元剤を選択することをさらに含む。ＣＢＡのｐＩは、公知である任意の好適な方法を使用して決定することができる。

【０１４５】

ある特定の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１の実施形態もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、工程（ｂ）の反応に任意の好適な酸化剤を使用することができる。酸化剤は、不対システイン残基の遊離チオールを再酸化することなく、ＣＢＡの２つのシステイン残基間に形成されたジスルフィド結合を選択的に酸化及び再形成する。ある特定の実施形態では、酸化剤は、不対システイン残基の遊離チオールを再酸化することなく、抗体またはその抗原結合断片の鎖間及び／または鎖内ジスルフィド結合を選択的に再形成する。例示的な酸化剤として、デヒドロアスコルビン酸（ＤＨＡＡ）、硫酸銅、酸素、空気、またはＣｕ（ＩＩ）－（１，１０－フェナントロリン）３、及びヨウ素溶液が挙げられるが、これらに限定されない（参照により本明細書に組み込まれる、Ｈａｍｄａｎ，Ｆ．Ｆ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２００２，４１（２４），ｐｐ７６４７－７６５８を参照）。

【０１４６】

第２の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１の実施形態もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、工程（ａ）の還元剤は、ＴＣＥＰまたはＤＰＰＡである。

【０１４７】

第３の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１の実施形態、第２の実施形態、もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、酸化剤はＤＨＡＡである。

【０１４８】

第４の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１、第２、もしくは第３の実施形態、もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、工程（ａ）の反応は、ｐＨ５．０～８．５で実施される。より具体的には、工程（ａ）の反応は、ｐＨ６．０～７．５で実施される。

【０１４９】

ある特定の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１、第２、第３、もしくは第４の実施形態、もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、工程（ｂ）の反応は、ｐＨ５．０～８．５で実施される。より具体的には、工程（ｂ）の反応は、ｐＨ６．０～７．５で実施される。

【０１５０】

ある特定の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１、第２、第３、もしくは第４の実施形態、もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、工程（ｃ）の反応は、ｐＨ５．０～８．５で実施される。より具体的には、工程（ｃ）の反応は、ｐＨ６．０～７．５で実施される。さらにより具体的には、工程（ｃ）の反応は、ｐＨ５．５～６．５で実施される。別の特定の実施形態では、工程（ｃ）の反応は、ｐＨ６．０で実施される。別の特定の実施形態では、工程（ｃ）の反応は、ｐＨ６．５で実施される。

【０１５１】

ある特定の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１、第２、第３、もしくは第４の実施形態、もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、この方法は、工程（ｂ）の後、工程（ｃ）でＣｙｓＣＢＡを細胞毒性剤と反応させる前に、反応混合物のｐＨを調整することをさらに含む。

【０１５２】

ある特定の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１、第２、第３、もしくは第４の実施形態、もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、工程（ｂ）の後、工程（ｃ）でＣｙｓＣＢＡを細胞毒性剤と反応させる前に、

反応混合物のｐＨを調整しない。

【０１５３】

第５の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１、第２、第３、もしくは第４の実施形態、もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、工程（ａ）の還元剤はＴＣＥＰであり、工程（ａ）の反応は、ｐＨ７．０～８．０、より具体的には７．３～７．７、さらにより具体的にはｐＨ７．５で実施される。

【０１５４】

ある特定の実施形態では、第５の実施形態の方法に関して、酸化剤はＤＨＡＡであり、工程（ｂ）の反応は、ｐＨ７．０～８．０、より具体的には７．３～７．７、さらにより具体的にはｐＨ７．５で実施される。

【０１５５】

ある特定の実施形態では、第５の実施形態またはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、工程（ｂ）の後、工程（ｃ）でＣｙｓＣＢＡを細胞毒性剤と反応させる前に、反応混合物のｐＨを、ｐＨ７．３～７．７（例えば、ｐＨ７．５）からｐＨ５．８～６．２（例えば、ｐＨ６．０）に調整する。

【０１５６】

第６の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１、第２、第３、もしくは第４の実施形態、もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、工程（ａ）の還元剤はＤＰＰＡであり、工程（ａ）の反応は、ｐＨ６．０～７．０、より具体的には６．３～６．７、さらにより具体的にはｐＨ６．５で実施される。

【０１５７】

ある特定の実施形態では、第６の実施形態の方法に関して、酸化剤はＤＨＡＡであり、工程（ｂ）の反応は、ｐＨ６．０～７．０、より具体的には６．３～６．７、さらにより具体的にはｐＨ６．５で実施される。

【０１５８】

ある特定の実施形態では、第６の実施形態またはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、工程（ｂ）の後、工程（ｃ）でＣｙｓＣＢＡを細胞毒性剤と反応させる前に、反応混合物のｐＨを調整せず、工程（ｃ）の反応は、ｐＨ６．０～７．０、より具体的には６．３～６．７、さらにより具体的にはｐＨ６．５で実施される。

【０１５９】

第７の実施形態では、第１もしくは第２の態様、または第１、第２、第３、第４、第５、もしくは第６の実施形態、もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、複合体は、タンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）、吸着性クロマトグラフ、非吸着性クロマトグラフィー、吸着性濾過、選択的沈殿、またはそれらの組み合わせによって精製される。より具体的には、複合体はＴＦＦによって精製される。

【０１６０】

Ｐｅｌｌｉｃｏｎ型システム（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，Ｍａｓｓ．）、Ｓａｒｔｏｃｏｎ Ｃａｓｓｅｔｔｅシステム（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ ＡＧ、Ｅｄｇｅｗｏｏｄ，Ｎ．Ｙ．）、ＴａｎｇｅｎＸカセット（ＴａｎｇｅｎＸ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｓｈｒｅｗｓｂｕｒｙ，ＭＡ）、及びＣｅｎｔｒａｓｅｔｅ型システム（Ｐａｌｌ Ｃｏｒｐ．、Ｅａｓｔ Ｈｉｌｌｓ，Ｎ．Ｙ．）を含む、任意の好適なＴＦＦシステムを精製に利用することができる。

【０１６１】

任意の好適な吸着性クロマトグラフィー樹脂を精製に利用してもよく、当該樹脂は細胞結合剤－細胞毒性剤複合体を保持して不純物の溶出を可能にすることも、または不純物を保持して細胞結合剤－細胞毒性剤複合体の溶出を可能にすることもできる。好ましい吸着性クロマトグラフィー樹脂として、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（ＨＣＩＣ）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）、イオン交換クロマトグラフィー、混合モードイオン交換クロマトグラフィー、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）、色素リガンドクロマトグラフィー、ア

フィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、及びそれらの組み合わせが挙げられる。好適なヒドロキシアパタイト樹脂の例として、セラミックヒドロキシアパタイト（ＣＨＴ　Ｔｙｐｅ　Ｉ及びＴｙｐｅ　ＩＩ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，Ｃａｌｉｆ．）、ＨＡ　Ｕｌｔｒｏｇｅｌヒドロキシアパタイト（Ｐａｌｌ　Ｃｏｒｐ．、Ｅａｓｔ　Ｈｉｌｌｓ，Ｎ．Ｙ．）、及びセラミックフルオロアパタイト（ＣＦＴ　Ｔｙｐｅ　Ｉ及びＴｙｐｅ　ＩＩ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，Ｃａｌｉｆ．）が挙げられる。好適なＨＣＩＣ樹脂の例として、ＭＥＰ　Ｈｙｐｅｒｃｅｌ樹脂（Ｐａｌｌ　Ｃｏｒｐ．、Ｅａｓｔ　Ｈｉｌｌｓ，Ｎ．Ｙ．）である。好適なＨＩＣ樹脂の例として、ブチルセファロース、ヘキシルセファロース、フェニルセファロース、及びオクチルセファロース樹脂（すべてＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．製）、ならびにＭａｃｒｏ－ｐｒｅｐメチル及びＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　ｔ－ブチル樹脂（Ｂｉｏｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，Ｃａｌｉｆ．）が挙げられる。好適なイオン交換樹脂の例として、ＳＰセファロース、ＣＭセファロース、及びＱセファロース樹脂（すべてＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．製）、ならびにＵｎｏｓｐｈｅｒｅ　Ｓ樹脂（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，Ｃａｌｉｆ．）が挙げられる。好適な混合モードイオン交換体の例として、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ　ＡＢｘ樹脂（ＪＴ　Ｂａｋｅｒ、Ｐｈｉｌｌｉｐｓｂｕｒｇ　Ｎ．Ｊ．）が挙げられる。好適なＩＭＡＣ樹脂の例として、Ｃｈｅｌａｔｉｎｇ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ樹脂（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）及びＰｒｏｆｉｎｉｔｙ　ＩＭＡＣ樹脂（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，Ｃａｌｉｆ．）が挙げられる。好適な色素リガンド樹脂の例として、Ｂｌｕｅ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ樹脂（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）及びＡｆｆｉ－ｇｅｌ　Ｂｌｕｅ樹脂（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，Ｃａｌｉｆ．）が挙げられる。好適な親和性樹脂の例として、細胞結合剤が抗体である場合、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ樹脂（例えば、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）、及び細胞結合剤が適切なレクチン結合部位を有する場合、レクチン親和性樹脂、例えば、ＬｅｎｔｉｌＬｅｃｔｉｎ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ樹脂（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）が挙げられる。代わりに、細胞結合剤に対して特異的な抗体を使用してもよい。そのような抗体は、例えば、Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ樹脂（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）に固定化することができる。好適な逆相樹脂の例として、Ｃ４、Ｃ８、及びＣ１８樹脂（Ｇｒａｃｅ　Ｖｙｄａｃ、Ｈｅｓｐｅｒｉａ，Ｃａｌｉｆ．）が挙げられる。

【０１６２】

任意の好適な非吸着性クロマトグラフィー樹脂を精製に利用してもよい。好適な非吸着性クロマトグラフィー樹脂の例として、ＳＥＰＨＡＤＥＸ（商標）Ｇ－２５、Ｇ－５０、Ｇ－１００、ＳＥＰＨＡＣＲＹＬ（商標）樹脂（例えば、Ｓ－２００及びＳ－３００）、ＳＵＰＥＲＤＥＸ（商標）樹脂（例えば、ＳＵＰＥＲＤＥＸ（商標）７５及びＳＵＰＥＲＤＥＸ（商標）２００）、ＢＩＯ－ＧＥＬ（登録商標）樹脂（例えば、Ｐ－６、Ｐ－１０、Ｐ－３０、Ｐ－６０、及びＰ－１００）、及び当業者に公知である他のものが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、複合体は、シングルパスタンジェンシャルフロー濾過（ＳＰＴＦＦ）によって精製される。いくつかの実施形態では、複合体は、向流ダイアフィルトレーションによって精製される。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、ＳＰＴＦＦを使用して、非結合薬物を除去、及び／またはＡＤＣを安定緩衝液に交換する。いくつかの実施形態では、フロースルーカラムクロマトグラフィーを使用して、非結合薬物を除去し、ＳＰＴＦＦを使用して、ＡＤＣを安定緩衝液に

交換する。
【０１６５】
いくつかの実施形態では、向流ダイアフィルトレーションを使用して、非結合薬物を除去、及び／またはＡＤＣを安定緩衝液に交換する。いくつかの実施形態では、フロースルーカラムクロマトグラフィーを使用して、非結合薬物を除去し、向流ダイアフィルトレーションを使用して、ＡＤＣを安定緩衝液に交換する。
【０１６６】
いくつかの実施形態では、ＳＰＴＦＦに限外濾過膜を使用する。いくつかの実施形態では、ＳＰＴＦＦに透析濾過膜を使用する。
【０１６７】
いくつかの実施形態では、この方法は、ＡＤＣ生成の均一性を改善する。いくつかの実施形態では、この方法は、ＡＤＣ生成の時間を短縮する。
【０１６８】
いくつかの実施形態では、ＳＰＴＦＦは、ＡＤＣ生成の均一性を改善する。いくつかの実施形態では、ＳＰＴＦＦは、ＡＤＣの濃縮、精製、または移動の時間を短縮する。いくつかの実施形態では、ＳＰＴＦＦは、緩衝液の使用量を減少させる。
【０１６９】
いくつかの実施形態では、向流ダイアフィルトレーションは、ＡＤＣ生成の均一性を改善する。いくつかの実施形態では、向流ダイアフィルトレーションは、ＡＤＣの濃縮、精製、または移動の時間を短縮する。いくつかの実施形態では、向流ダイアフィルトレーションは、緩衝液の使用量を減少させる。
【０１７０】
ある特定の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１、第２、第３、第４、第５、第６、もしくは第７の実施形態、もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、この方法は、工程（ｃ）の後、複合体を精製する前に、反応混合物のｐＨを調整することをさらに含む。いくつかの実施形態では、工程（ｃ）後に、反応混合物のｐＨを、４．０～６．０、４．０～５．５、４．０～５．０、４．５～５．０、または４．６～４．８のｐＨに調整する。特定の実施形態では、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、または５．０にｐＨを調整する。別の特定の実施形態では、４．７にｐＨを調整する。
【０１７１】
第８の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１、第２、第３、第４、第５、第６、もしくは第７の実施形態、もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、工程（ａ）でｃＣｙｓＣＢＡに対して過剰量の還元剤を使用する。より具体的には、還元剤とｃＣｙｓＣＢＡ（例えば、抗体またはその抗原結合断片）とのモル比は、１：１～５０：１、２：１～３０：１、５：１～２５：１、または１０：１～２５：１である。さらにより具体的には、モル比は１５：１～２０：１である。
【０１７２】
第９の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、もしくは第８の実施形態、もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、工程（ａ）の還元剤と工程（ｂ）の酸化剤とのモル比は、２０：１～１：２０、１０：１～１：１０、５：１～１：５、２：１～１：２、１．２：１～１：１．５、１：１～１：２０、または１：１～１：１０である。より具体的には、還元剤と酸化剤とのモル比は、１：１～１：１．５である。さらにより具体的には、還元剤と酸化剤とのモル比は、１：１である。あるいは、還元剤と酸化剤とのモル比は、１：１．５である。
【０１７３】
第１０の実施形態では、第１の態様、第２の態様、もしくは第３の態様、または第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、もしくは第９の実施形態、もしくはそこに記載される任意の実施形態の方法に関して、ＣｙｓＣＢＡ（例えば、抗体またはその抗原結

合断片）またはその抗原結合断片に対して過剰量の式（Ｉ）の化合物を工程（ｃ）で使用する。より具体的には、モル当量１．１～２０、１．５～２０、２～２０、２～１０、２～５、３．５～５、４．２～５、４．３～４．９、４．４～４．８、または４．５～４．７の式（Ｉ）の化合物を、各当量のＣｙｓＣＢＡに対して使用する。特定の実施形態では、モル当量４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、または５．０の式（Ｉ）の化合物を、各当量のＣｙｓＣＢＡに対して使用する。別の特定の実施形態では、４．６モル当量の式（Ｉ）の化合物を、各当量のＣｙｓＣＢＡに対して使用する。

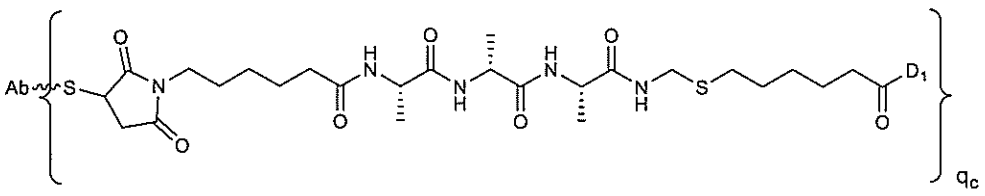
【０１７４】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）に関して、ＣｙｓＡｂは、抗体のＥＵ／ＯＵ番号付け位置４０、４３、８４、８８、１０３、１１２、１１３、１１４、１１５、１１８、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１６１、１６８、１７２、１７９、１８７、２０９、２３４、２３５、２３６、２３７、２３８、２３９、２４４、２４５、２４８、２４９、２５０、２５１、２５２、２５３、２５４、２５５、２５６、２５７、２５８、２６０、２６２、２６５、２６７、２７０、２７２、２７４、２７９、２８０、２８２、２８３、２８４、２８５、２８６、２８８、２８９、２９３、２９５、２９７、２９８、３０３、３０５、３０７、３０８、３０９、３１１、３１２、３１３、３１４、３１５、３１６、３１７、３１８、３２５、３２６、３２７、３２８、３２９、３３０、３３２、３３４、３３８、３３９、３４０、３４１、３４３、３４５、３６０、３６１、３６２、３７１、３７３、３７５、３７６、３７７、３７８、３８０、３８２、３８４、３８５、３８６、３８７、３８９、３９０、３９１、４１３、４２２、４２３、４２４、４２７、４２８、４３０、４３１、４３３、４３４、４３５、４３６、４３７、４３８、４４０、４４２、４４３、及び４４６から選択される１つ以上の位置に改変システイン残基を有する抗体である。他の実施形態では、Ｋａｂａｔ番号付け位置１５、４３、１０６、１０８、１１０、１１２、１１３、１１９、１２０、１２１、１４２、１４４、１４９、１５３、１５６、１５８、１６８、１７３、１７５、２０５、及び２０７から選択される１つ以上の位置に改変システイン残基を有する抗体である。ある特定の実施形態では、ＣｙｓＡｂは、それぞれが参照により本明細書に組み込まれる、ＷＯ２０１６／０４０８５６及び米国特許第７，５２１，５４１号に記載されている、１つ以上の位置に改変システイン残基を有する抗体である。より具体的には、ＣｙｓＡｂは、抗体の重鎖のＥＵ／ＯＵ番号付け位置４４２に改変システイン残基を有する抗体である。さらにより具体的には、ＣｙｓＡｂは、両方の重鎖のＥＵ／ＯＵ番号付け位置４４２に改変システイン残基を有する抗体である。

【０１７５】

第１１の実施形態では、本発明は、以下の式：

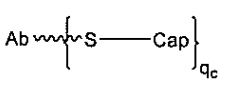
【化３９】



によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する方法であって、

（ａ）以下の式：

【化４０】

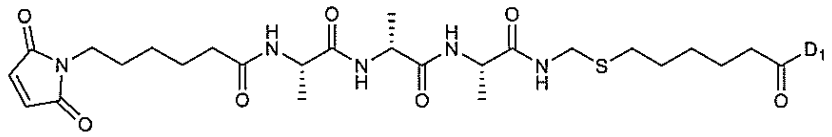


によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、当該キャッピング剤（Ｃａｐ）が除去されて還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；

（ｂ）改変システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＡｂを形成する工程と；

（ｃ）ＣｙｓＡｂを、以下の式：

【化４１】



によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それによりＡＤＣを形成する工程とを含み、工程（ａ）の還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、式中：

【化４２】

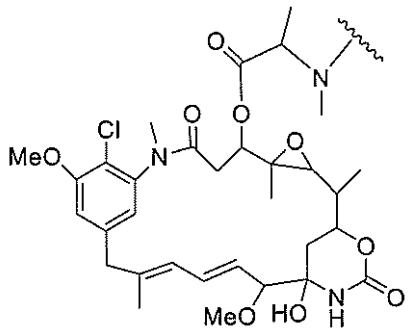
は、改変システイン残基に位置するチオール基を介して細胞毒性剤と共有結合されるシステイン改変抗体（ＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片であり；当該ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号２４、２５、及び２６の配列を有するＣＤＲ$_{H}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{H}$２ドメイン、及びＣＤＲ$_{H}$３ドメインと、それぞれ配列番号２１、２２、及び２３の配列を有するＣＤＲ$_{L}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{L}$２ドメイン、及びＣＤＲ$_{L}$３ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはそのＡＤＡＭ９結合断片であり；

ｑｃは、１または２であり；

Ｃａｐはキャッピング剤であり；

Ｄ１は、以下の式：

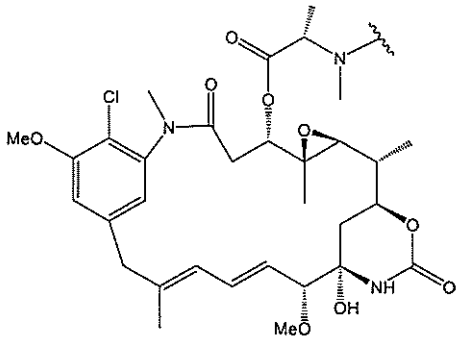
【化４３】



によって表される方法を提供する。

好ましくは、Ｄ１は、以下の式：

【化４４】

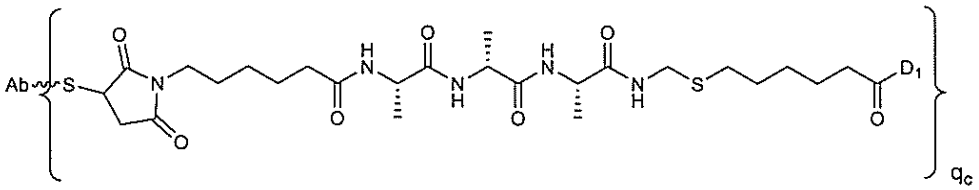


によって表される。

【０１７６】

第１２の実施形態では、本発明は、以下の式：

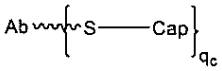
【化４５】



によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、

（ａ）以下の式：

【化４６】

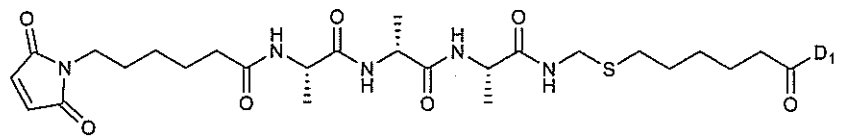


によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、当該キャッピング剤（Ｃａｐ）が除去されて還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；

（ｂ）改変システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＡｂを形成する工程と；

（ｃ）ＣｙｓＡｂを、以下の式：

【化４７】



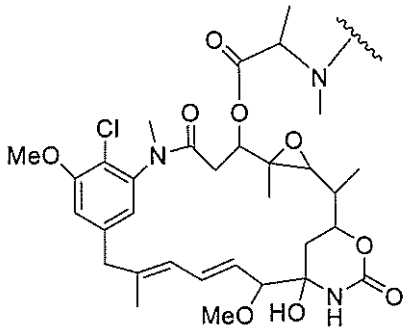
（Ｉ１１）

によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それによりＡＤＣを形成する工程と；

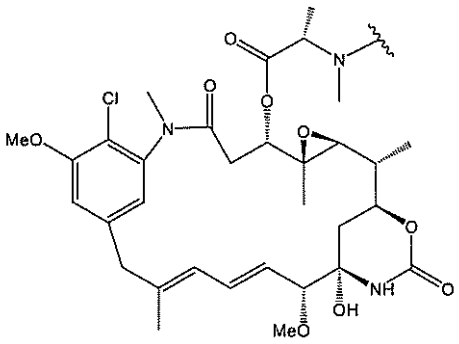
工程（ａ）の還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｃ）が連続して実行され、式中：

【化４８】

は、改変システイン残基に位置するチオール基を介して細胞毒性剤と共有結合されるシステイン改変抗体（ＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片であり；当該ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号２４、２５、及び２６の配列を有するＣＤＲＨ１ドメイン、ＣＤＲＨ２ドメイン、及びＣＤＲＨ３ドメインと、それぞれ配列番号２１、２２、及び２３の配列を有するＣＤＲＬ１ドメイン、ＣＤＲＬ２ドメイン、及びＣＤＲＬ３ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはそのＡＤＡＭ９結合断片であり；
ｑｃは、１または２であり；
Ｃａｐはキャッピング剤であり；
Ｄ１は、以下の式：
【化４９】

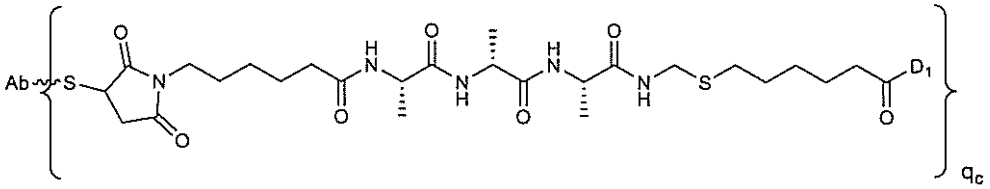


によって表される方法を提供する。
好ましくは、Ｄ１は、以下の式：
【化５０】

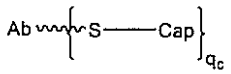


によって表される。
【０１７７】
第１３の実施形態では、本明細書に記載の第１１または第１２の実施形態の方法は、（ｄ）式（Ｉ１１）の非結合化合物を除去する工程と、任意選択で（ｅ）ＡＤＣを安定緩衝液に交換する工程とをさらに含む。
【０１７８】
いくつかの実施形態では、ＳＰＴＦＦを使用して、非結合薬物を除去、及び／またはＡＤＣを安定緩衝液に交換する。いくつかの実施形態では、向流ダイアフィルトレーションを使用して、非結合薬物を除去、及び／またはＡＤＣを安定緩衝液に交換する。
【０１７９】
ある特定の実施形態では、工程（ｄ）及び（ｅ）は連続して実行される。
【０１８０】
第１４の実施形態では、本発明は、以下の式：

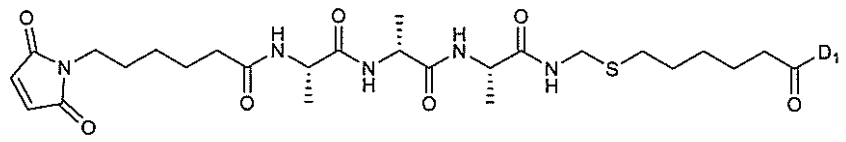
【化５１】



によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、
（ａ）以下の式：
【化５２】

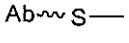


によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、当該キャッピング剤（Ｃａｐ）が除去されて還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；
（ｂ）改変システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＡｂを形成する工程と；
（ｃ）ＣｙｓＡｂを、以下の式：
【化５３】



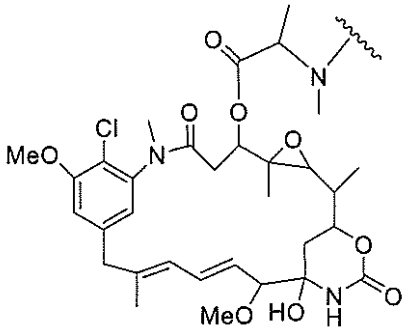
（Ｉ１１）

によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それによりＡＤＣを形成する工程と；
（ｄ）式（Ｉ１１）の非結合化合物を向流ダイアフィルトレーションにより除去する工程とを含み、
工程（ａ）の還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｄ）が連続して実行され、式中：
【化５４】

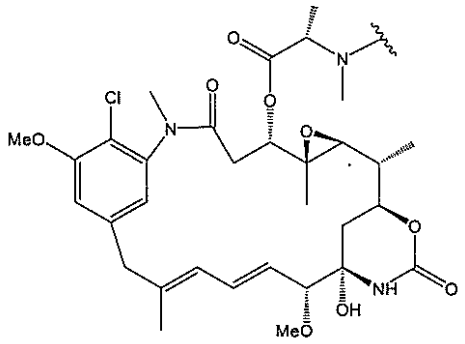


は、改変システイン残基に位置するチオール基を介して細胞毒性剤と共有結合されるシステイン改変抗体（ＣｙｓＡｂ）またはその抗原結合断片であり；当該ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号２４、２５、及び２６の配列を有するＣＤＲ$_{H}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{H}$２ドメイン、及びＣＤＲ$_{H}$３ドメインと、それぞれ配列番号２１、２２、及び２３の配列を有するＣＤＲ$_{L}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{L}$２ドメイン、及びＣＤＲ$_{L}$３ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはそのＡＤＡＭ９結合断片であり；
ｑｃは、１または２であり；
Ｃａｐはキャッピング剤であり；
Ｄ$_{1}$は、以下の式：

【化５５】



によって表される方法を提供する。
好ましくは、Ｄ１は、以下の式：
【化５６】



によって表される。
【０１８１】
ある特定の実施形態では、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の実施形態、または本明細書に記載の任意の実施形態の方法に関して、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはそのＡＤＡＭ９結合断片は、配列番号２７の配列を有する重鎖可変ドメイン（V_H）と、配列番号２８の軽鎖可変ドメイン（V_L）とを含む。
【０１８２】
ある特定の実施形態では、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の実施形態、または本明細書に記載の任意の実施形態の方法に関して、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、配列番号２９の配列を有する重鎖と、配列番号３０の及配列を有する軽鎖とを含む。
【０１８３】
ある特定の実施形態では、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の実施形態、または本明細書に記載の任意の実施形態の方法に関して、還元剤はＤＰＰＡである。ある特定の実施形態では、工程（ａ）で１０～２０モル当量のＤＰＰＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用する。より具体的には、工程（ａ）で１５～１７モル当量のＤＰＰＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用する。さらにより具体的には、工程（ａ）で１６モル当量のＤＰＰＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用する。
【０１８４】
ある特定の実施形態では、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の実施形態、または本明細書に記載の任意の実施形態の方法に関して、工程（ａ）の反応は、ｐＨ６．０～７．０またはｐＨ６．３～６．７で実施される。より具体的には、工程（ａ）の反応は、ｐＨ６．５で実施される。
【０１８５】
ある特定の実施形態では、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の実施形態、または本明細書に記載の任意の実施形態の方法に関して、酸化剤はＤＨＡＡである。ある特定の

実施形態では、工程（ｂ）で２０～３０モル当量のＤＨＡＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用する。より具体的には、工程（ｂ）で２３～２５モル当量のＤＨＡＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用する。さらにより具体的には、工程（ｂ）で２３～２５モル当量のＤＨＡＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用する。さらにより具体的には、工程（ｂ）で２４モル当量のＤＨＡＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用する。

【０１８６】

ある特定の実施形態では、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の実施形態、または本明細書に記載の任意の実施形態の方法に関して、工程（ｂ）の反応は、ｐＨ６．０～７．０またはｐＨ６．３～６．７で実施される。より具体的には、工程（ｂ）の反応は、ｐＨ６．５で実施される。

【０１８７】

ある特定の実施形態では、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の実施形態、または本明細書に記載の任意の実施形態の方法に関して、工程（ｃ）の反応は、ｐＨ６．０～７．０またはｐＨ６．３～６．７で実施される。より具体的には、工程（ｃ）の反応は、ｐＨ６．５で実施される。

【０１８８】

ある特定の実施形態では、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の実施形態、または本明細書に記載の任意の実施形態の方法に関して、ＣｙｓＡｂ（例えば、抗体またはその抗原結合断片）またはその抗原結合断片に対して過剰量の式（Ｉ１１）の化合物を工程（ｃ）で使用する。より具体的には、モル当量１．１～２０、１．５～２０、２～２０、２～１０、２～５、３．５～５、４．２～５、４．３～４．９、４．４～４．８、または４．５～４．７の式（Ｉ１１）の化合物を、各当量のＣｙｓＡｂに対して使用する。特定の実施形態では、モル当量４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９または５．０の式（Ｉ１１）の化合物を、各当量のＣｙｓＡｂに対して使用する。別の特定の実施形態では、モル当量４．６の式（Ｉ１１）の化合物を、各当量のＣｙｓＡｂに対して使用する。

【０１８９】

ある特定の実施形態では、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の実施形態、または本明細書に記載の任意の実施形態の方法に関して、工程（ａ）で１５～１７モル当量のＤＰＰＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用し；工程（ａ）の反応は、ｐＨ６．３～６．７で実施され；工程（ｂ）で２３～２５モル当量のＤＨＡＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用し；工程（ｂ）の反応は、ｐＨ６．３～６．７で実施され；工程（ｃ）の反応は、ｐＨ６．３～６．７で実施される。

【０１９０】

ある特定の実施形態では、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の実施形態、または本明細書に記載の任意の実施形態の方法に関して、工程（ａ）で１６モル当量のＤＰＰＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用し；工程（ａ）の反応は、ｐＨ６．５で実施され；工程（ｂ）で２４モル当量のＤＨＡＡを、各当量のｃＣｙｓＡｂに対して使用し；工程（ｂ）の反応は、ｐＨ６．５で実施され；工程（ｃ）の反応は、ｐＨ６．５で実施される。

【０１９１】

ある特定の実施形態では、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の実施形態、または本明細書に記載の任意の実施形態の方法に関して、この方法は、工程（ｃ）の後、複合体を精製する前（例えば、工程（ｄ）の前）に、反応混合物のｐＨを調整することをさらに含む。いくつかの実施形態では、工程（ｃ）後に、反応混合物のｐＨを、４．０～６．０、４．０～５．５、４．０～５．０、４．５～５．０、または４．６～４．８のｐＨに調整する。特定の実施形態では、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、または５．０にｐＨを調整する。別の特定の実施形態では、４．７にｐＨを調整する。

【０１９２】

ある特定の実施形態では、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の実施形態、または

本明細書に記載の任意の実施形態の方法に関して、キャッピング剤は、システイン、グルタチオン、またはそれらの組み合わせである。

【０１９３】

ある特定の実施形態では、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の実施形態、または本明細書に記載の任意の実施形態の方法に関して、ｑｃは２である。

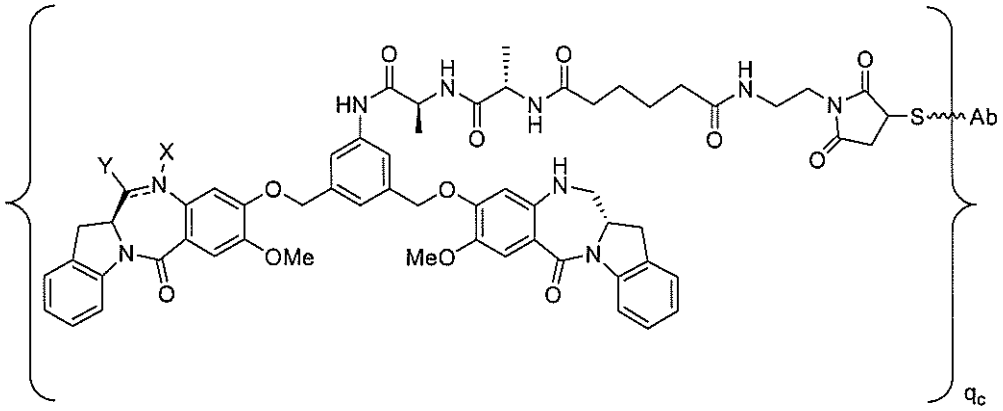
【０１９４】

ある特定の実施形態では、第１１の実施形態またはそこに記載される任意の実施形態の方法によって調製される免疫複合体を含む組成物（例えば、医薬組成物）は、１．０～２．５、１．５～２．５、１．８～２．２、または１．９～２．１の範囲内のＤＡＲ値を有する。いくつかの実施形態では、ＤＡＲは、１．８、１．９、２．０、または２．１である。

【０１９５】

第１５の実施形態では、本発明は、以下の式：

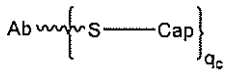
【化５７】



によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する方法であって、

（ａ）以下の式：

【化５８】

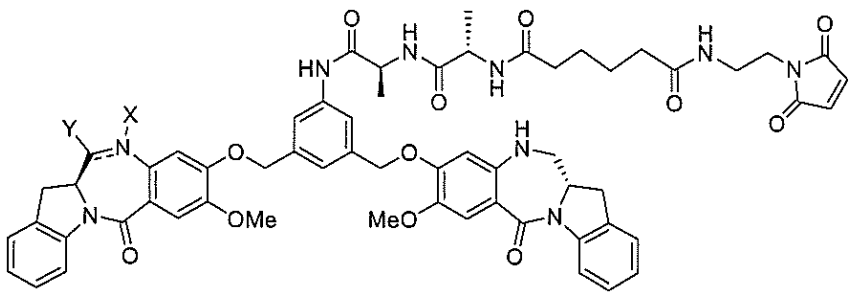


によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、当該キャッピング剤が除去されて還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；

（ｂ）改変システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＡｂを形成する工程と；

（ｃ）ＣｙｓＡｂを、以下の式：

【化５９】



（Ｉ１ａ）

によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それによりＡＤＣを形成する工程とを含み、工程（ａ）の還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、式中：

ＮとＣ間の二重線

【化６０】

は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは－Ｈであり、単結合の場合は、Ｘが－Ｈであり、Ｙは－ＳＯ３Ｍであり；Ｍは、Ｈ＋またはカチオンであり；

【化６１】

は、改変システイン残基に位置するチオール基を介して細胞毒性剤と共有結合されるシステイン改変抗体またはその抗原結合断片であって、当該システイン改変抗体は、

ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号５に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２、及び配列番号６に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；

ｂ）配列番号１に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ１、配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ２、及び配列番号３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ３を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む抗ＣＤ１２３抗体または抗原結合断片であり；

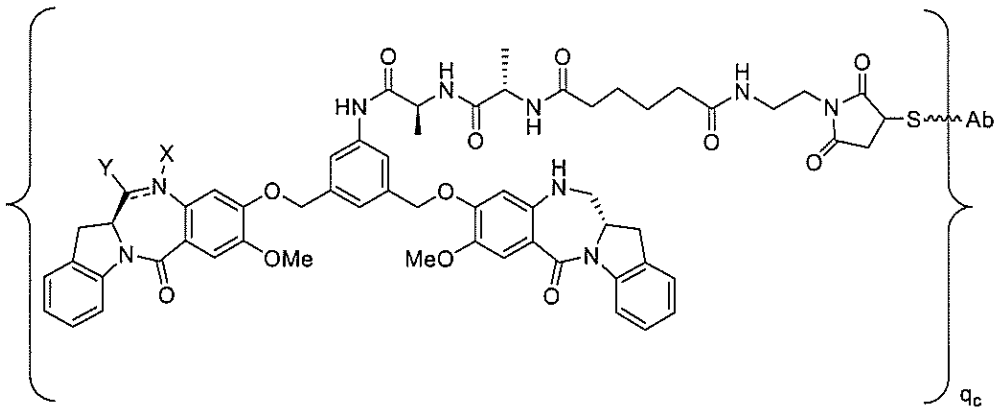
ｑｃは、１または２であり；

Ｃａｐはキャッピング剤である方法を提供する。

【０１９６】

第１６の実施形態では、本発明は、以下の式：

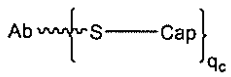
【化６２】



によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、

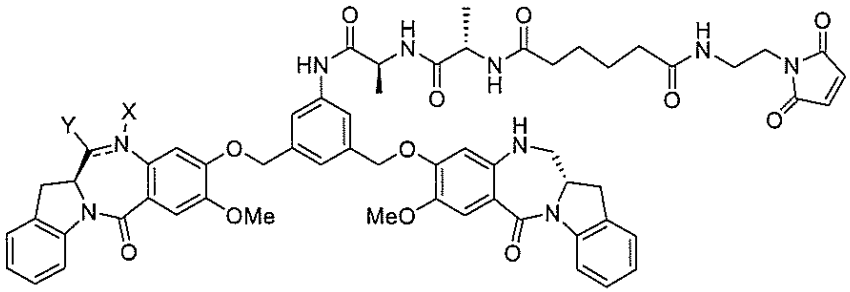
（ａ）以下の式：

【化６３】



によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、当該キャッピング剤が除去されて還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；

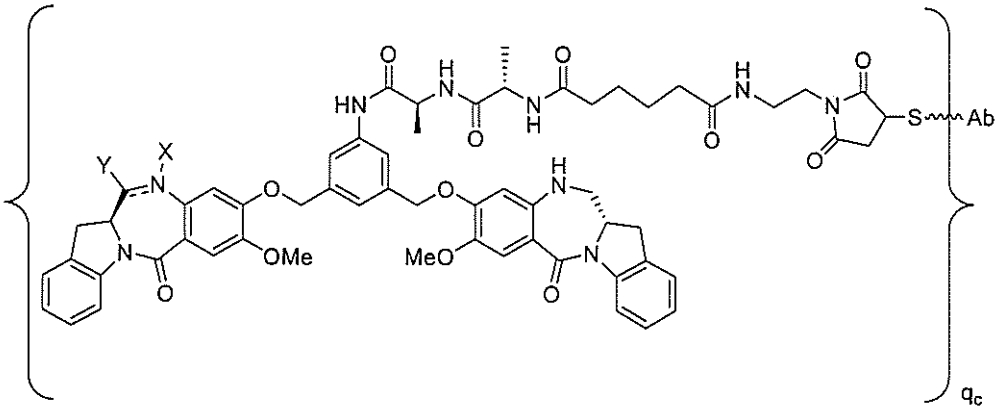
（ｂ）改変システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＡｂを形成する工程と；
（ｃ）ＣｙｓＡｂを、以下の式：
【化６４】



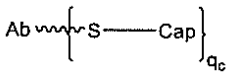
（Ｉ１ａ）

によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それによりＡＤＣを形成する工程と；
工程（ａ）の還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｃ）が連続して実行され、式中：
ＮとＣ間の二重線
【化６５】
⁼⁼
は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは－Ｈであり、単結合の場合は、Ｘが－Ｈであり、Ｙは－ＳＯ３Ｍであり；Ｍは、Ｈ＋またはカチオンであり；
【化６６】
Ab〰S—
は、改変システイン残基に位置するチオール基を介して細胞毒性剤と共有結合されるシステイン改変抗体またはその抗原結合断片であって、当該システイン改変抗体は、
ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号５に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２、及び配列番号６に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；
ｂ）配列番号１に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ１、配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ２、及び配列番号３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ３を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む抗ＣＤ１２３抗体または抗原結合断片であり；
ｑｃは、１または２であり；
Ｃａｐはキャッピング剤である方法を提供する。
【０１９７】
第１７の実施形態では、本明細書に記載の第１５または第１６の実施形態の方法は、（ｄ）式（Ｉ１ａ）の非結合化合物を除去する工程と、任意選択で（ｅ）ＡＤＣを安定緩衝液に交換する工程とをさらに含む。
【０１９８】
いくつかの実施形態では、ＳＰＴＦＦを使用して、非結合薬物を除去、及び／またはＡＤＣを安定緩衝液に交換する。いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、向流ダイアフィルトレーションを使用して、式（Ｉ１ａ）の非結合化合物を除去、及び／またはＡＤＣを安定緩衝液に交換する。
【０１９９】
ある特定の実施形態では、工程（ｄ）及び（ｅ）は連続して実行される。

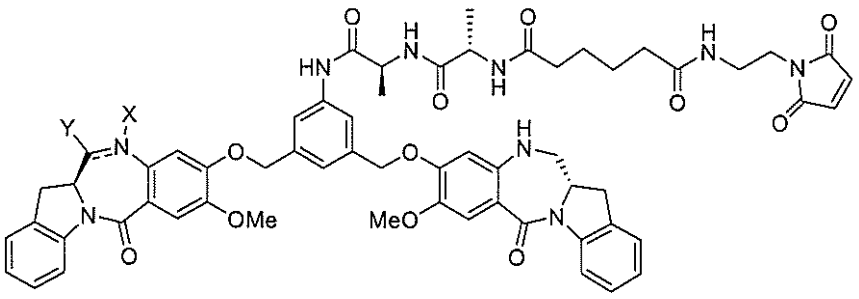
【０２００】
第１８の実施形態では、本発明は、以下の式：
【化６７】



によって表される抗体－細胞毒性剤複合体（ＡＤＣ）を調製する連続的な方法であって、
（ａ）以下の式：
【化６８】



によって表されるキャップされたシステイン改変抗体（ｃＣｙｓＡｂ）と還元剤を反応させ、還元型抗体またはその抗原結合断片を形成し、当該キャッピング剤が除去されて還元型抗体またはその抗原結合断片に遊離チオール（－ＳＨ）基を形成する工程と；
（ｂ）改変システイン残基の遊離チオール基を酸化することなく、還元型抗体またはその抗原結合断片を選択的酸化剤と反応させてＣｙｓＡｂを形成する工程と；
（ｃ）ＣｙｓＡｂを、以下の式：
【化６９】



（Ｉ１ａ）

によって表される化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それによりＡＤＣを形成する工程と；
（ｄ）式（Ｉ１ａ）の非結合化合物を向流ダイアフィルトレーションにより除去する工程とを含み、
工程（ａ）の還元型抗体またはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｂ）で使用し、工程（ｂ）のＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片を精製せずに工程（ｃ）で使用し、工程（ａ）～（ｄ）が連続して実行され、式中：
ＮとＣ間の二重線
【化７０】
=

は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは－Ｈであり、単結合の場合は、Ｘが－Ｈであり、Ｙは－ＳＯ３Ｍであり；Ｍは、Ｈ＋またはカチオンであり；

【化７１】

は、改変システイン残基に位置するチオール基を介して細胞毒性剤と共有結合されるシステイン改変抗体またはその抗原結合断片であって、当該システイン改変抗体は、

ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号５に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２、及び配列番号６に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；

ｂ）配列番号１に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ１、配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ２、及び配列番号３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲＬ３を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む抗ＣＤ１２３抗体または抗原結合断片であり；

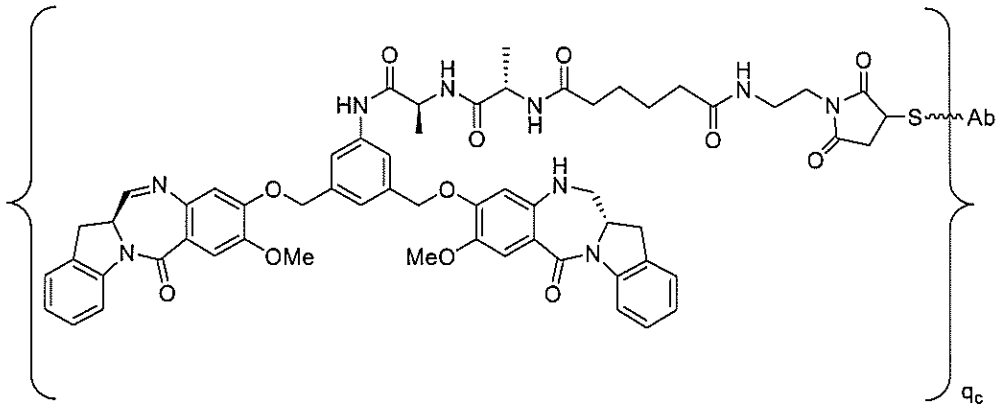
ｑｃは、１または２であり；

Ｃａｐはキャッピング剤である方法を提供する。

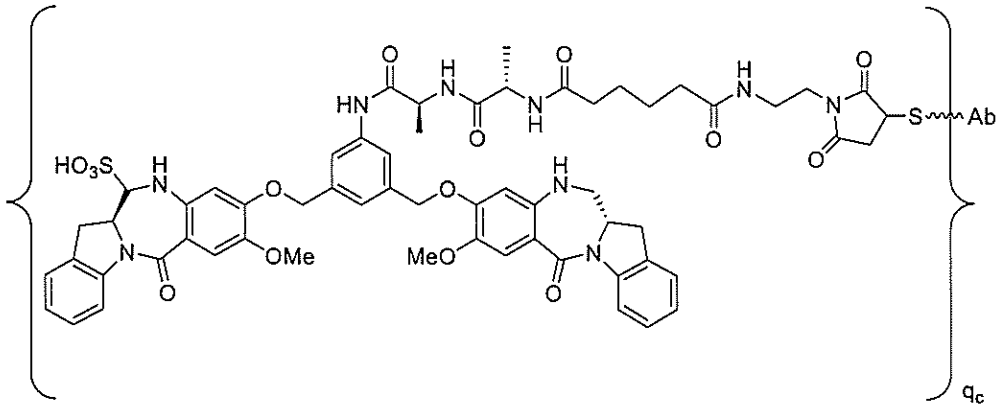
【０２０１】

ある特定の実施形態では、第１５、第１６、第１７、及び第１８の実施形態の方法によって調製される複合体は、以下の式：

【化７２】

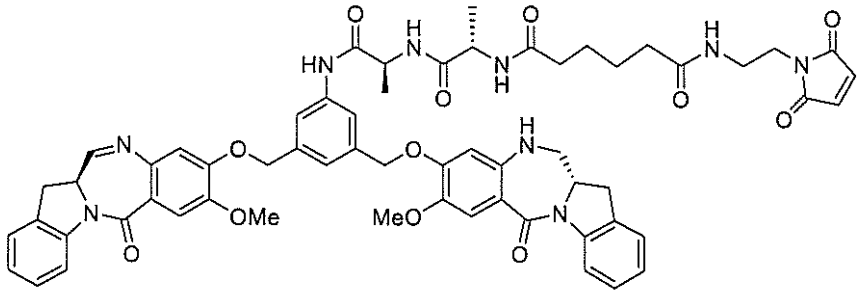


、もしくは

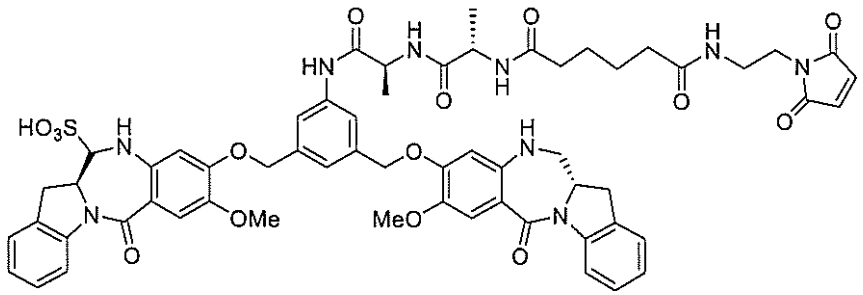


によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、当該化合物は、以下の式：

【化７３】



、もしくは



によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩である。

【０２０２】

ある特定の実施形態では、薬学的に許容される塩は、ナトリウム塩またはカリウム塩である。ある特定の実施形態では、薬学的に許容される塩は、ナトリウム塩である。

【０２０３】

ある特定の実施形態では、第１５、第１６、第１７、または第１８の実施形態の方法に関して、抗ＣＤ１２３抗体またはその抗原結合断片は、配列番号７のV_H配列及び配列番号９のV_L配列を含む。

【０２０４】

ある特定の実施形態では、第１５、第１６、第１７、または第１８の実施形態の方法に関して、抗ＣＤ１２３抗体は、

ａ）配列番号８に記載のアミノ酸配列を有する重鎖と；

ｂ）配列番号１０に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む。

【０２０５】

ある特定の実施形態では、第１５、第１６、第１７、または第１８の実施形態の方法に関して、還元剤は、ＤＰＰＡまたはＴＣＥＰである。ある特定の実施形態では、還元剤はＴＣＥＰである。

【０２０６】

ある特定の実施形態では、第１５、第１６、第１７、または第１８の実施形態の方法に関して、工程（ａ）の反応は、ｐＨ５．０～８．５、７．０～８．０、または７．３～７．７で実施される。より具体的には、工程（ａ）の反応は、ｐＨ７．５で実施される。

【０２０７】

ある特定の実施形態では、第１５、第１６、第１７、または第１８の実施形態の方法に関して、酸化剤はＤＨＡＡである。

【０２０８】

ある特定の実施形態では、第１５、第１６、第１７、または第１８の実施形態の方法に関して、工程（ｂ）の反応は、ｐＨ５．０～８．５、７．０～８．０、または７．３～７．７で実施される。より具体的には、工程（ｂ）の反応は、ｐＨ７．５で実施される。

【０２０９】

ある特定の実施形態では、第１５、第１６、第１７、または第１８の実施形態の方法に関して、工程（ｃ）の反応は、ｐＨ５．０～８．５、５．５～６．５、または５．８～６．

２で実施される。より具体的には、工程（ｃ）の反応は、ｐＨ６．０で実施される。
【０２１０】
ある特定の実施形態では、第１５、第１６、第１７、もしくは第１８の実施形態、または本明細書に記載の任意の実施形態の方法に関して、ＣｙｓＡｂ（例えば、抗体またはその抗原結合断片）またはその抗原結合断片に対して過剰量の式（Ｉ１ａ）の化合物を工程（ｃ）で使用する。より具体的には、モル当量１．１～２０、１．５～２０、２～２０、２～１０、２～５、３．５～５、４．２～５、４．３～４．９、４．４～４．８、または４．５～４．７の式（Ｉ１ａ）の化合物を、各当量のＣｙｓＡｂに対して使用する。特定の実施形態では、モル当量４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９または５．０の式（Ｉ１ａ）の化合物を、各当量のＣｙｓＡｂに対して使用する。別の特定の実施形態では、４．６モル当量の式（Ｉ１１）の化合物を、各当量のＣｙｓＡｂに対して使用する。
【０２１１】
ある特定の実施形態では、第１５、第１６、第１７、または第１８の実施形態の方法に関して、還元剤はＴＣＥＰであり；工程（ａ）の反応は、ｐＨ７．３～７．７で実施され；酸化剤はＤＨＡＡであり；工程（ｂ）の反応は、ｐＨ７．３～７．７で実施され；工程（ｂ）の後、工程（ｃ）でＣｙｓＡｂを細胞毒性剤と反応させる前に、反応混合物のｐＨを、ｐＨ７．３～７．７からｐＨ５．８～６．２に調整する。
【０２１２】
ある特定の実施形態では、第１５、第１６、第１７、または第１８の実施形態の方法に関して、還元剤はＴＣＥＰであり；工程（ａ）の反応は、ｐＨ７．５で実施され；酸化剤はＤＨＡＡであり；工程（ｂ）の反応は、ｐＨ７．５で実施され；工程（ｂ）の後、工程（ｃ）でＣｙｓＡｂを細胞毒性剤と反応させる前に、反応混合物のｐＨを、ｐＨ７．５からｐＨ６．０に調整する。
【０２１３】
ある特定の実施形態では、第１５、第１６、第１７、または第１８の実施形態の方法に関して、この方法は、工程（ｃ）の後、複合体を精製する前（例えば、工程（ｄ）の前）に、反応混合物のｐＨを調整することをさらに含む。いくつかの実施形態では、工程（ｃ）後に、反応混合物のｐＨを、４．０～６．０、４．０～５．５、４．０～５．０、４．５～５．０、または４．６～４．８のｐＨに調整する。特定の実施形態では、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、または５．０にｐＨを調整する。別の特定の実施形態では、４．７にｐＨを調整する。
【０２１４】
ある特定の実施形態では、第１５、第１６、または第１７の実施形態の方法に関して、キャッピング試薬は、システイン、グルタチオン、またはそれらの組み合わせである。
【０２１５】
ある特定の実施形態では、第１５、第１６、もしくは第１７の実施形態またはそこに記載される任意の実施形態の方法によって調製される免疫複合体を含む組成物（例えば、医薬組成物）は、１．０～２．５、１．５～２．５、１．８～２．２、または１．９～２．１の範囲内のＤＡＲ値を有する。いくつかの実施形態では、ＤＡＲは、１．８、１．９、２．０、または２．１である。
【０２１６】
本発明の方法によって調製される複合体は、実質的に高純度及び高安定性を有する。ある特定の実施形態では、本発明の方法によって調製される複合体は、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または９９．５％を超える単量体比率を有する。ある特定の実施形態では、本発明の方法によって調製される複合体は、約１０％未満、約５％未満（例えば、約４％以下、３％以下、２％以下、１％以下、または０％以下）の高分子量種を有する。本明細書で使用される場合、「高分子量種」または「ＨＭＷ」という用語は、分子量が高い抗体含有種または複合体含有種を指す。高分子量種は、抗体もしくは複合体またはそれらの組み合わせの凝集によって形成される二量体、三量体、その他のより高次

のオリゴマーであり得る。ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって、高分子量種を特定し、その量を測定することができる。

【０２１７】

ある特定の実施形態では、複合体の組成物中の細胞毒性剤とＣｙｓＣＢＡとの平均モル比（すなわち、ＤＡＲ）は、１．０～２．５、１．５～２．５、１．７～２．３、１．８～２．２、または１．９～２．１である。別の実施形態では、本発明の方法によって調製される複合体の組成物に対するＤＡＲは、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、または２．５である。一実施形態では、ＤＡＲは２．０である。ＤＡＲ値は、当技術分野において公知である任意の方法で測定することができる。一実施形態では、ＤＡＲ値は、抗体及び細胞毒性剤それぞれの波長での吸光度値を使用してＵＶ／Ｖｉｓ分光法により測定することができる。あるいは、ＤＡＲ値は質量分析法及び／またはＨＰＬＣで測定することができる。

【０２１８】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、第１０、第１１、第１２、第１３、第１４、第１５、第１６、第１７、もしくは第１８の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）に関して、工程（ａ）、工程（ｂ）、または工程（ｃ）の反応は、緩衝溶液中で実施される。本発明の方法では、任意の好適な緩衝液を使用することができる。例示的な緩衝液として、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、コハク酸緩衝液、リン酸緩衝液、ＭＥＳ（（２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸））緩衝液、ビス－トリスメタン（２－［ビス（２－ヒドロキシエチル）アミノ］－２－（ヒドロキシメチル）プロパン－１，３－ジオール）緩衝液、ＡＤＡ（Ｎ－（２－アセトアミド）イミノ二酢酸）緩衝液、ＡＣＥＳ（Ｎ－２－アミノエタンスルホン酸）緩衝液、ＰＩＰＥＳ（ピペラジン－Ｎ，Ｎ’－ビス（２－エタンスルホン酸））、ＭＯＰＳＯ（β－ヒドロキシ－４－モルホリンプロパンスルホン酸）緩衝液、ビス－トリスプロパン（１，３－ビス（トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ）プロパン）緩衝液、ＢＥＳ（Ｎ，Ｎ－ビス（２－ヒドロキシエチル）－２－アミノエタンスルホン酸）、ＴＥＳ（Ｎ－［トリス（ヒドロキシメチル）メチル］－２－アミノエタンスルホン酸）緩衝液、ＨＥＰＥＳ（４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－エタンスルホン酸）緩衝液、ＤＩＰＳＯ、（３－（Ｎ，Ｎ－ビス［２－ヒドロキシエチル］アミノ）－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸またはＮ，Ｎ－ビス（２－ヒドロキシエチル）－３－アミノ－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸）、ＭＯＢＳ（４－（Ｎ－モルホリノ）ブタンスルホン酸）緩衝液、ＴＡＰＳＯ（３－［［１，３－ジヒドロキシ－２－（ヒドロキシメチル）プロパン－２－イル］アミノ］－２－ヒドロキシプロパン－１－スルホン酸）緩衝液、トリズマ（トリスまたは２－アミノ－２－（ヒドロキシメチル）－１，３－プロパンジオール）緩衝液、ＨＥＰＰＳＯ（Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－Ｎ’－（２－ヒドロキシプロパンスルホン酸））緩衝液、ＰＯＰＳＯ（ピペラジン－１，４－ビス－（２－ヒドロキシ－プロパン－スルホン酸）二水和物）緩衝液、ＥＰＰＳ（４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－プロパンスルホン酸）緩衝液、トリシン（Ｎ－（２－ヒドロキシ－１，１－ビス（ヒドロキシメチル）エチル）グリシン）緩衝液、ｇｌｙ－ｇｌｙ、ビシン（２－（ビス（２－ヒドロキシエチル）アミノ）酢酸）緩衝液、ＨＥＰＢＳ（Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－Ｎ’－（４－ブタンスルホン酸））緩衝液、ＴＡＰＳ（３－［［１，３－ジヒドロキシ－２－（ヒドロキシメチル）プロパン－２－イル］アミノ］プロパン－１－スルホン酸）緩衝液、ＡＭＰＤ（２－アミノ－２－メチル－１，３－プロパンジオール）緩衝液、ＴＡＢＳ（Ｎ－トリス（ヒドロキシメチル）メチル－４－アミノブタンスルホン酸）緩衝液、ＡＭＰＳＯ（Ｎ－（１，１－ジメチル－２－ヒドロキシエチル）－３－アミノ－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸）緩衝液、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、緩衝液はリン酸緩衝液である。

【０２１９】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第

５、第６、第７、第８、第９、第１０、第１１、第１２、第１３、第１４、第１５、第１６、第１７、もしくは第１８の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）に関して、工程（ａ）、工程（ｂ）、または工程（ｃ）の反応は、少量の有機溶媒の存在下で実施される。より具体的には、有機溶媒はジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）である。有機溶媒（例えば、ＤＭＡ）は、反応混合物の総体積の１体積％～２０体積％、１～１５体積％、２～１５体積％、５～１５体積％、または５～１０体積％の量で存在し得る。

【０２２０】

ある特定の実施形態では、上記の本発明の方法に関して、工程（ａ）、工程（ｂ）、または工程（ｃ）の反応は、完了または実質的な完了まで、例えば、２分間～１週間、１時間～４８時間、１時間～３６時間、１時間～２４時間、１時間～１２時間、１時間～８時間、５時間～１５時間、５時間～１０時間、１時間～５時間、３０分間～２時間、または５分間～３０分間、進行することが可能である。ある特定の実施形態では、工程（ａ）の反応は、１時間～１２時間、１時間～８時間、２時間～８時間、３時間～７時間、または４時間～６時間、進行することが可能である。特定の実施形態では、工程（ａ）の反応を５時間進行することが可能である。ある特定の実施形態では、工程（ｂ）の反応は、１時間～１２時間、１時間～８時間、３時間～９時間、４時間～８時間、または５時間～７時間、進行することが可能である。特定の実施形態では、工程（ｂ）の反応を６時間進行することが可能である。ある特定の実施形態では、工程（ｃ）の反応は、１時間～２４時間、５時間～１５時間、６時間～１４時間、７時間～１３時間、８時間～１２時間、または９時間～１１時間、進行することが可能である。特定の実施形態では、工程（ｃ）の反応は１０時間進行することが可能である。

【０２２１】

ある特定の実施形態では、上記の本発明の方法に関して、工程（ａ）、工程（ｂ）、または工程（ｃ）の反応は、任意の好適な温度で実施することができる。ある特定の実施形態では、反応は、１０℃～５０℃、１０℃～４０℃、または１０℃～３０℃の温度で実施することができる。ある特定の実施形態では、反応は、１５℃～３０℃、２０℃～３０℃、１５℃～２５℃、１６℃～２４℃、１７℃～２３℃、１８℃～２２℃、または１９℃～２１℃の温度で実施することができる。ある特定の実施形態では、反応は、１５℃、１６℃、１７℃、１８℃、１９℃、２０℃、２１℃、２２℃、２３℃、２４℃、または２５℃で実施することができる。

【０２２２】

ある特定の実施形態では、上記の本発明の方法における工程（ａ）、工程（ｂ）または工程（ｃ）の反応に関して、細胞結合剤（例えば、抗体）の濃度は、１ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬ、１ｍｇ／ｍＬ～２０ｍｇ／ｍＬ、１ｍｇ／ｍＬ～１５ｍｇ／ｍＬ、１ｍｇ／ｍＬ～１０ｍｇ／ｍＬ、１ｍｇ／ｍＬ～６ｍｇ／ｍＬ、または２ｍｇ／ｍＬ～５ｍｇ／ｍＬの範囲で実施することができる。ある特定の実施形態では、細胞結合剤（例えば、抗体）の濃度は、３ｍｇ／ｍＬ～５ｍｇ／ｍＬの範囲内である。

【０２２３】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法に関して、安定緩衝液は、ＡＤＣ用の製剤化緩衝液である。

【０２２４】

３．インラインプロセス自動化技術（インラインＰＡＴ）

本明細書で提供されるのは、本明細書に記載の連続的な方法、例えば、第１、第２、もしくは第３の態様、または本明細書に記載の任意の実施形態に記載される抗体薬物複合体（ＡＤＣ）を形成及び処理するための方法に使用されるインラインプロセス自動化技術である。そのような技術は直接測定を可能することで、オフラインアッセイを不要にし、オペレーターによる材料の取り扱いを減少させることができる。インラインモニタリングを使用すると、ＡＤＣ（タンパク質）濃度に加え、遊離薬物の除去をモニタリングすることができる。これにより、プロセス（例えば、精製プロセス）に使用される比容積または透析濾過容量数に基づくのではなく、インラインの読取値から得たデータに基づいてＡＤＣ最

終濃度の目標を定めることができる。ＰＡＴを実施すると、制御及び検出感度を向上させることが可能になり（例えば、定常運転中の変化を用いて、生成物の品質に影響を及ぼす前に問題を検出することができる）、多数のＰＡＴモジュール（例えば、ＦｌｏｗＶＰＥ、ＵＶセンサー、ｐＨメーター、導電率計、圧力センサー、または流量計）の使用により、個々の単位操作全体で堅牢なプロセス性能を確保することができる。

【０２２５】

インラインモニタリングを使用すると、例えば抗体の還元及び／または酸化反応及び／またはＡＤＣ結合反応（例えば、第１、第２、もしくは第３の態様、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される方法に記載された反応）における任意のポンプ流入からの供給流の流量をモニタリングすることができる。インラインモニタリングを使用すると、例えば抗体の還元及び／または酸化反応及び／またはＡＤＣ結合反応（例えば、第１、第２、もしくは第３の態様、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される方法に記載された反応）に添加される成分濃度をモニタリングすることができる。そのようなモニタリングにより、反応の化学量論に関して適切な制御を確保することができる。インラインモニタリングは、例えば、抗体もしくはその抗原結合断片、還元剤、酸化剤、細胞毒性剤、または細胞毒性剤－リンカー化合物（例えば、式（Ｉ）によって表される化合物）、及び／または結合緩衝液の流量または濃度をモニタリングすることができる。インラインモニタリングは、抗体またはその抗原結合断片の結合反応緩衝液への流量濃度をモニタリングすることができる。

【０２２６】

インラインモニタリングはまた、例えば、結合緩衝液の添加を停止すること、結合緩衝液の循環を停止すること、及び／または結合緩衝液のすすぎまたは除去を開始することにより、例えば、結合反応をいつ停止するかを決定するために使用することができる。本明細書で提供されるいくつかの実施形態では、非結合薬物（例えば、式（Ｉ）の化合物）のインラインモニタリングを使用することができる。非結合薬物の測定値を使用して、結合反応で達成される抗体あたりの薬物の平均数（ＤＡＲ）を推測することができる。したがって、目標とするＤＡＲに達したときに結合反応を停止することができる。

【０２２７】

インラインモニタリングはまた、ＡＤＣの濃縮及び／または精製をモニターするために使用することができる。濃縮及び／または精製には、濾過（例えば、限外濾過、ダイアフィルトレーション）を使用することができる。濾過は、ＳＰＴＦＦを含むタンジェンシャルフロー濾過であり得る。濾過は向流ダイアフィルトレーションであり得る。濾過のモニタリングに使用する場合、保持液中または透過液中いずれかの分析物の測定にインラインモニタリングを使用することができる。したがって、例えば、保持液中の非結合薬物または非結合薬物－リンカー化合物のインラインモニタリングを使用して、ＡＤＣの精製度を評価することができる。非結合薬物または非結合薬物－リンカー化合物のレベルは、結合反応直後の保持液では高くなるが、精製後の保持液では低くなる可能性がある。保持液中または透過液中のＡＤＣのインラインモニタリングを使用して、濃縮プロセス中及び／または精製プロセス中のＡＤＣ損失を評価することができる。

【０２２８】

精製にはまた、クロマトグラフィー（例えば、フロースルーカラムクロマトグラフィー）を使用することができる。クロマトグラフィーカラムの終端でのインラインモニタリングは、例えば、ＡＤＣレベルを測定でき、カラムが過負荷であるとき、またはＡＤＣのブレークスルーが発生したときを判断するために使用することができる。

【０２２９】

インラインモニタリングはまた、ｐＨの測定にも使用することができ、例えば、これは緩衝液交換の完全性を判断するために使用することができる。

【０２３０】

例示的なインラインモニタリング技術として、例えば、フーリエ変換赤外（ＦＴＩＲ）フローセル、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、または超高速液体クロマトグラフ

ィー（ＵＰＬＣ）の使用が挙げられる。
【０２３１】
インラインモニタリング技術には、例えば、ＦｌｏｗＶＰＥまたはＵＶセンサーを使用することができる。いくつかの実施形態では、ＦｌｏｗＶＰＥを使用して、インラインモニタリングを実行する。ＦｌｏｗＶＰＥは連続モニタリングにフローセルを使用する。
【０２３２】
タンジェンシャルフロー濾過（例えば、シングルパスタンジェンシャルフロー濾過（ＳＰＴＦＦ）の有効性を、ＦｌｏｗＶＰＥ、ＵＶセンサー、ｐＨメーター、導電率計、圧力センサー、流量計などを使用してインラインでモニターすることができる。向流ダイアフィルトレーションの有効性も、ＦｌｏｗＶＰＥ、ＵＶセンサー、ｐＨメーター、導電率計、圧力センサー、流量計などを使用してインラインでモニターすることができる。
【０２３３】
インラインモニタリングプロセスは、本発明の連続的な方法（上記で考察）、例えば、シングルパスタンジェンシャルフロー濾過及び／または向流ダイアフィルトレーションを使用する連続的な結合プロセス、またはバッチ結合プロセス（当技術分野において公知である）と組み合わせて使用することができる。
【０２３４】
４．細胞結合剤（ＣｙｓＣＢＡ）
本発明の免疫複合体中の細胞結合剤は、ペプチド及び非ペプチドを含め、現在公知であるか、または公知となる任意の種類のものであり得る。一般に、これらは、抗体（例えば、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、特にモノクローナル抗体）、リンホカイン、ホルモン、成長因子、ビタミン（例えば、葉酸など、その細胞表面受容体、例えば葉酸受容体に結合することができるもの）、栄養輸送分子（トランスフェリンなど）、またはその他の細胞結合分子もしくは物質であり得る。
【０２３５】
ある特定の実施形態では、細胞結合剤は、抗体、一本鎖抗体、標的細胞に特異的に結合する抗体断片、モノクローナル抗体、一本鎖モノクローナル抗体、標的細胞に特異的に結合するモノクローナル抗体断片（または「抗原結合部分」もしくは「抗原結合断片」）、キメラ抗体、標的細胞に特異的に結合するキメラ抗体断片（または「抗原結合部分」または「抗原結合断片」）、ドメイン抗体（例えば、ｓｄＡｂ）、または標的細胞に特異的に結合するドメイン抗体断片である。
【０２３６】
ある特定の実施形態では、細胞結合剤は、ヒト化抗体、ヒト化一本鎖抗体、またはヒト化抗体断片（または「抗原結合部分」もしくは「抗原結合断片」）である。
【０２３７】
ある特定の実施形態では、細胞結合剤は、表面改変抗体、表面改変一本鎖抗体、または表面改変抗体断片（または「抗原結合部分」もしくは「抗原結合断片」）である。
【０２３８】
ある特定の実施形態では、細胞結合剤は、抗体またはその抗原結合部分（抗体誘導体を含む）であり、ＣＢＡは、細胞表面受容体を含め、細胞表面リガンドなどの標的細胞上のリガンドに結合することができる。
【０２３９】
ある特定の実施形態では、細胞結合剤は、システイン改変抗体またはその抗原結合断片である。ある特定の実施形態では、システイン改変抗体もしくはその抗原結合断片は、抗葉酸受容体抗体もしくはその抗原結合断片、抗ＥＧＦＲ抗体もしくはその抗原結合断片、抗ＣＤ３３抗体もしくはその抗原結合断片、抗ＣＤ１９抗体もしくはその抗原結合断片、抗Ｍｕｃ１抗体もしくはその抗原結合断片、抗ＣＤ３７抗体もしくはその抗原結合断片、抗ｃＭｅｔ抗体もしくはその抗原結合断片、または抗ＥｐＣＡＭ抗体もしくはその抗原結合断片である。
【０２４０】

ある特定の実施形態では、細胞結合剤は、（ａ）ヒトＣＤ１２３／ＩＬ３－Ｒα抗原のアミノ酸１０１～３４６の範囲内のエピトープに結合し、（ｂ）抗原陽性ＴＦ－１細胞におけるＩＬ３依存性増殖を阻害する抗体またはその抗原結合断片である（ＷＯ２０１７／００４０２６を参照。これはその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０２４１】

ある特定の実施形態では、細胞結合剤は、ＷＯ２０１７／００４０２６（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるような抗ＣＤ１２３抗体またはその抗原結合断片である。

【０２４２】

ある特定の実施形態では、抗ＣＤ１２３抗体またはその抗原結合断片は、ａ）３つの連続した相補性決定領域（ＣＤＲ）ＣＤＲ$_{L}$１、ＣＤＲ$_{L}$２、及びＣＤＲ$_{L}$３（それぞれ、ＣＤＲ$_{L}$１はアミノ酸配列ＲＡＳＱＤＩＮＳＹＬＳ（配列番号１）、ＣＤＲ$_{L}$２はアミノ酸配列ＲＶＮＲＬＶＤ（配列番号２）、及びＣＤＲ$_{L}$３はアミノ酸配列ＬＱＹＤＡＦＰＹＴ（配列番号３）を有する）を含む少なくとも１つの軽鎖可変領域またはその断片と；ｂ）３つの連続した相補性決定領域（ＣＤＲ）ＣＤＲ$_{H}$１、ＣＤＲ$_{H}$２、及びＣＤＲ$_{H}$３（それぞれ、ＣＤＲ$_{H}$１はアミノ酸配列ＳＳＩＭＨ（配列番号４）の、ＣＤＲ$_{H}$２はアミノ酸配列ＹＩＫＰＹＮＤＧＴＫＹＮＥＫＦＫＧ（配列番号５）、及びＣＤＲ$_{H}$３はアミノ酸配列ＥＧＧＮＤＹＹＤＴＭＤＹ（配列番号６）を有する）を含む少なくとも１つの重鎖可変領域またはその断片とを含み得る。

【０２４３】

ある特定の実施形態では、抗ＣＤ１２３抗体またはその抗原結合断片は、

【化７４】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFT**SSIMH**WVRQAPGQGLEWIG**YIKPYND**
GTKYNEKFKGRATLTSDRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EGGNDYYDTMDY**
WGQGTLVTVSS (配列番号7)

であるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（Ｖ$_{H}$）と、

【化７５】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDINSYLS**WFQQKPGKAPKTLIY**RVNRLVD**G
VPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYC**LQYDAFPYT**FGQGTKVEIKR(配列番号9)

であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（Ｖ$_{L}$）とを含む。

【０２４４】

ある特定の実施形態では、抗ＣＤ１２３抗体は、

【化７６】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFT**SSIMH**WVRQAPGQGLEWIG**YIKPYND**
GTKYNEKFKGRATLTSDRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EGGNDYYDTMDY**
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLCLSPG
(配列番号8)

である重鎖全長配列と、

【化７７】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDINSYLS**WFQQKPGKAPKTLIY**RVNRLVD**G
VPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYC**LQYDAFPYT**FGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号10)

である軽鎖全長配列とを有する。

【０２４５】

ある特定の実施形態では、細胞結合剤は、米国特許第７，３４２，１１０号及び同第７，５５７，１８９号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるような抗ＣＤ３３抗体またはその抗原結合断片である。

【０２４６】

ある特定の実施形態では、抗ＣＤ３３抗体またはその抗原結合断片は、ａ）３つの連続した相補性決定領域（ＣＤＲ）ＣＤＲ$_{L}$１、ＣＤＲ$_{L}$２、及びＣＤＲ$_{L}$３（それぞれ、ＣＤＲ$_{L}$１はアミノ酸配列ＫＳＳＱＳＶＦＦＳＳＳＱＫＮＹＬＡ（配列番号１１）、ＣＤＲ$_{L}$２はアミノ酸配列ＷＡＳＴＲＥＳ（配列番号１２）、及びＣＤＲ$_{L}$３はアミノ酸配列ＨＱＹＬＳＳＲＴ（配列番号１３）を有する）を含む少なくとも１つの軽鎖可変領域またはその断片と；ｂ）３つの連続した相補性決定領域（ＣＤＲ）ＣＤＲ$_{H}$１、ＣＤＲ$_{H}$２、及びＣＤＲ$_{H}$３（それぞれ、ＣＤＲ$_{H}$１はアミノ酸配列ＳＹＹＩＨ（配列番号１４）の、ＣＤＲ$_{H}$２はアミノ酸配列ＶＩＹＰＧＮＤＤＩＳＹＮＱＫＦＱＧ（配列番号１５）、及びＣＤＲ$_{H}$３はアミノ酸配列ＥＶＲＬＲＹＦＤＶ（配列番号１６）を有する）を含む少なくとも１つの重鎖可変領域またはその断片とを含み得る。

【０２４７】

ある特定の実施形態では、抗ＣＤ３３抗体またはその抗原結合断片は、

【化７８】

QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYYIH**WIKQTPGQGLEWVG**VIYPGN**
DDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**EVRLRYFDV**WGQ
GTTVTVSS (配列番号17)

であるアミノ配列を有する重鎖可変領域（Ｖ$_{H}$）と、

【化７９】

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC**KSSQSVFFSSSQKNYLA**WYQQIPGQSPRLLIY**WA**
STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYC**HQYLSSRT**FGQGTKLEIKR
(配列番号19)

であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（Ｖ$_{L}$）とを含む。

【０２４８】

ある特定の実施形態では、抗ＣＤ３３抗体は、

【化８０】

QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGN
DDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQ
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(配列番号18)

である重鎖全長配列と、

【化８１】

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWA
STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号20)

である軽鎖全長配列とを有し、配列番号１８のＸは、ＳまたはＣである。一実施形態では、ＸはＣである。

【０２４９】

ある特定の実施形態では、抗ＣＤ３３抗体は、ｈｕＭｙ９－６抗体である。

【０２５０】

ある特定の実施形態では、細胞結合剤は、ＷＯ２０１８／１１９１９６ならびに米国仮出願第６２／６９００５２号及び同第６２／６９１３４２号（それぞれが、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるような抗ＡＤＡＭ９抗体またはその抗原結合断片である。

【０２５１】

ある特定の実施形態では、抗ＡＤＡＭ９抗体またはその抗原結合断片は、ヒトＡＤＡＭ９及びカニクイザルＡＤＡＭ９に特異的に結合するヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはその抗原結合断片である。

【０２５２】

ある特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはそのＡＤＡＭ９結合断片は、カニクイザルＡＤＡＭ９への結合親和性において少なくとも１００倍の増強を有するように最適化され、キメラまたはマウスの親抗体と比較して、ヒトＡＤＡＭ９に対して高い結合親和性を保有する。

【０２５３】

ある特定の実施形態では、抗ＡＤＡＭ９抗体またはその抗原結合断片（例えば、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはその抗原結合断片）は、ａ）３つの連続した相補性決定領域（ＣＤＲ）ＣＤＲ$_{L}$１、ＣＤＲ$_{L}$２、及びＣＤＲ$_{L}$３（それぞれ、ＣＤＲ$_{L}$１はアミノ酸配列ＫＡＳＱＳＶＤＹＳＧＤＳＹＭＮ（配列番号２１）、ＣＤＲ$_{L}$２はアミノ酸配列ＡＡＳＤＬＥＳ（配列番号２２）、及びＣＤＲ$_{L}$３はアミノ酸配列ＱＱＳＨＥＤＰＦＴ（配列番号２３）を有する）を含む少なくとも１つの軽鎖可変領域またはその断片と；ｂ）３つの連続した相補性決定領域（ＣＤＲ）ＣＤＲ$_{H}$１、ＣＤＲ$_{H}$２、及びＣＤＲ$_{H}$３（それぞれ、ＣＤＲ$_{H}$１はアミノ酸配列ＳＹＷＭＨ（配列番号２４）、ＣＤＲ$_{H}$２はアミノ酸配列ＥＩＩＰＩＦＧＨＴＮＹＮＥＫＦＫＳ（配列番号２５）、及びＣＤＲ$_{H}$３はアミノ酸配列ＧＧＹＹＹＹＰＲＱＧＦＬＤＹ（配列番号２６）を有する）を含む少なくとも１つの重鎖可変領域またはその断片とを含み得る。

【０２５４】

ある特定の実施形態では、抗ＡＤＡＭ９抗体またはその抗原結合断片（例えば、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体またはその抗原結合断片）は、

【化８２】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGEL DYWGQGTTVT VSS（配列番号27）

であるアミノ配列を有する重鎖可変領域（V_H）と、

【化８３】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKASQSVDYSGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAAS
DLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATYYCQQSHEDPETFGQGTKLEI K
（配列番号28）

であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（V_L）とを含む。

【０２５５】

ある特定の実施形態では、抗ＡＤＡＭ９抗体は、

【化８４】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGEL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS PG
（配列番号29）

である重鎖全長配列と、

【化８５】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKASQSVDYSGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAAS
DLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQQSHEDPETFGQGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号30）

である軽鎖全長配列とを有する。

【０２５６】

ある特定の実施形態では、細胞結合剤は、米国仮出願第６２／７５１，５３０号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるような抗ＥｐＣＡＭ抗体またはその抗原結合断片である。

【０２５７】

ある特定の実施形態では、抗ＥｐＣＡＭ抗体またはその抗原結合断片は、ａ）３つの連続した相補性決定領域（ＣＤＲ）CDR_L1、CDR_L2、及びCDR_L3（それぞれ、CDR_L1はアミノ酸配列ＲＳＳＲＳＬＬＨＳＤＧＦＴＹＬＹ（配列番号３１）、CDR_L2はアミノ酸配列ＱＴＳＮＬＡＳ（配列番号３２）、及びCDR_L3はアミノ酸配列ＡＱＮＬＥＬＰＮＴ（配列番号３３）を有する）を含む少なくとも１つの軽鎖可変領域または

その断片と；ｂ）３つの連続した相補性決定領域（ＣＤＲ）ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、及びＣＤＲＨ３（それぞれ、ＣＤＲＨ１はアミノ酸配列ＮＹＹＩＨ（配列番号３４）、ＣＤＲＨ２はアミノ酸配列ＷＩＹＰＧＮＶＹＩＱＹＮＥＫＦＫＧ（配列番号３５）、及びＣＤＲＨ３はアミノ酸配列ＤＧＰＷＦＡＹ（配列番号３６）を有する）を含む少なくとも１つの重鎖可変領域またはその断片とを含み得る。

【０２５８】

ある特定の実施形態では、抗ＥｐＣＡＭ抗体またはその抗原結合断片は、

【化８６】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGN
VYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQG
TLVTVSS (配列番号37)

であるアミノ配列を有する重鎖可変領域（ＶＨ）と、

【化８７】

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSN
LASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFGQGTKLEIK
(配列番号38)

であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含む。

【０２５９】

ある特定の実施形態では、抗ＥｐＣＡＭ抗体は、

【化８８】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGN
VYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(配列番号
39)

である重鎖全長配列と、

【化８９】

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSN
LASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFGQGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号40)

である軽鎖全長配列とを有し、配列番号３９のＸは、ＳまたはＣである。一実施形態では、ＸはＣである。

【０２６０】

ある特定の実施形態では、細胞結合剤は、抗葉酸受容体抗体である。ある特定の実施形態では、細胞結合剤は、米国特許第８，７０９，４３２号、米国特許第８，５５７，９６６号、及びＷＯ２０１１１０６５２８（そのすべてが参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるような抗ヒト葉酸受容体１（ＦＯＬＲ１）抗体またはその抗原結合断片である。

【０２６１】
ある特定の実施形態では、抗ＦＯＬＲ１抗体またはその抗原結合断片は、ａ）３つの連続した相補性決定領域（ＣＤＲ）ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、及びＣＤＲＬ３（それぞれ、ＣＤＲＬ１はアミノ酸配列ＫＡＳＱＳＶＳＦＡＧＴＳＬＭＨ（配列番号４１）、ＣＤＲＬ２はアミノ酸配列ＲＡＳＮＬＥＡ（配列番号４２）、及びＣＤＲＬ３はアミノ酸配列ＱＱＳＲＥＹＰＹＴ（配列番号４３）を有する）を含む少なくとも１つの軽鎖可変領域またはその断片と；ｂ）３つの連続した相補性決定領域（ＣＤＲ）ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、及びＣＤＲＨ３（それぞれ、ＣＤＲＨ１はアミノ酸配列ＧＹＦＭＮ（配列番号４４）またはＧＹＴＦＴＧＹＦＭＮ（配列番号４７）、ＣＤＲＨ２はアミノ酸配列ＲＩＨＰＹＤＧＤＴＦＹＮＱＫＦＱＧ（配列番号４５）またはＲＩＨＰＹＤＧＤＴＦ（配列番号４８）、及びＣＤＲＨ３はアミノ酸配列ＹＤＧＳＲＡＭＤＹ（配列番号４６）を有する）を含む少なくとも１つの重鎖可変領域またはその断片とを含み得る。ある特定の実施形態では、抗ＦＯＬＲ１抗体またはその抗原結合断片は、ａ）配列番号４１に記載のアミノ配列を有するＣＤＲＬ１、配列番号４２に記載のアミノ配列を有するＣＤＲＬ２、及び配列番号４３に記載のアミノ配列を有するＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域と；ｂ）配列番号４４に記載のアミノ配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号４５に記載のアミノ配列を有するＣＤＲＨ２、及び配列番号４６に記載のアミノ配列を有するＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域とを含む。ある特定の実施形態では、抗ＦＯＬＲ１抗体またはその抗原結合断片は、ａ）配列番号４１に記載のアミノ配列を有するＣＤＲＬ１、配列番号４２に記載のアミノ配列を有するＣＤＲＬ２、及び配列番号４３に記載のアミノ配列を有するＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域と；ｂ）配列番号４７に記載のアミノ配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号４８に記載のアミノ配列を有するＣＤＲＨ２、及び配列番号４６に記載のアミノ配列を有するＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域とを含む。

【０２６２】
ある特定の実施形態では、抗ＦＯＬＲ１抗体またはその抗原結合断片は、
【化９０】

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKAS**GYTFTGYFMN**WVKQSPGQSLEWIG**RIHPYD**
GDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTR**YDGSRAMDY**WG
QGTTVTVSS (配列番号49)

であるアミノ配列を有する重鎖可変領域（ＶＨ）と、
【化９１】

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQPRLLIY**RASN**
LEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYC**QQSREYPYT**FGGGTKLEIKR
(配列番号50)

、または
【化９２】

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQPRLLIY**RASN**
LEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYC**QQSREYPYT**FGGGTKLEIKR
(配列番号51)

であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含む。
【０２６３】
ある特定の実施形態では、抗ＦＯＬＲ１抗体は、

【化９３】

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKAS**GYTFTGYFMN**WVKQSPGQSLEWIG**RIHPYD**
GDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTR**YDGSRAMDY**WG
QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI

SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(配列番号52)

である重鎖全長配列と、

【化９４】

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQPRLLIY**RASN**
LEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYC**QQSREYPYT**FGGGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号53)

または

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQPRLLIY**RASN**
LEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYC**QQSREYPYT**FGGGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号54)

である軽鎖全長配列とを有し、配列番号５２のＸはＣまたはＳであり、配列番号５２のＹはＫであるか、または存在しない。一実施形態では、ＸはＣである。

【０２６４】

ある特定の実施形態では、抗ＦＯＬＲ１抗体は、ｈｕＭｏｖ１９またはＭ９３４６Ａ抗体である。

【０２６５】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体は、マウス抗体、非ヒト哺乳動物抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である。例えば、ヒト化抗体は、ＣＤＲ移植抗体または表面改変抗体であり得る。ある特定の実施形態では、抗体は全長抗体である。ある特定の実施形態では、その抗原結合断片とは、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ、一本鎖ＦｖすなわちｓｃＦｖ、ジスルフィド結合されたＦ$_v$、Ｖ－ＮＡＲドメイン、ＩｇＮａｒ、イントラボディ、ＩｇＧΔＣＨ$_2$、ミニボディ、Ｆ（ａｂ’）$_3$、テトラボディ、トリアボディ、ダイアボディ、シングルドメイン抗体、ＤＶＤ－Ｉｇ、Ｆｃａｂ、ｍＡｂ$_2$、（ｓｃＦｖ）$_2$、またはｓｃＦｖ－Ｆｃである。

【０２６６】

ある特定の実施形態では、細胞結合剤は、Ｃｅｎｔｙｒｉｎ（フィブロネクチンＩＩＩ型（ＦＮ３）リピートのコンセンサス配列に基づくタンパク質足場；参照により本明細書に組み込まれる、米国特許公開第２０１０／０２５５０５６号、同第２０１０／０２１６７０８号、及び同第２０１１／０２７４６２３号を参照）、アンキリンリピートタンパク質（例えば、ＤＡＲＰｉｎとして知られる、設計されたアンキリンリピートタンパク質；参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第２００４／０１３２０２８号、同第２００９／００８２２７４号、同第２０１１／０１１８１４６号、及び同第２０１１／０２２４１００号を参照。また、参照により本明細書に組み込まれる、Ｃ．Ｚａｈｎｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．（２０１０）７０：１５９５－１６０５；Ｚａｈｎｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（２００６）２８１（４６）：３５１６７－３５１７５；及びＢｉｎｚ，Ｈ．Ｋ．，Ａｍｓｔｕｔｚ，Ｐ．＆Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．

，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５）２３：１２５７－１２６８を参照）、アンキリン様リピートタンパク質または合成ペプチド（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許公開第２００７／０２３８６６７号；米国特許第７，１０１，６７５号；ＷＯ２００７／１４７２１３；及びＷＯ２００７／０６２４６６を参照）、アドネクチン（フィブロネクチンドメイン足場タンパク質；参照により本明細書に組み込まれる、米国特許公開第２００７／００８２３６５号；同第２００８／０１３９７９１号を参照）、アビボディ（ダイアボディ、トリアボディ、及びテトラボディを含む；米国公開第２００８／０１５２５８６号及び同第２０１２／０１７１１１５号を参照）、二重受容体再標的化（ＤＡＲＴ）分子（Ｐ．Ａ．Ｍｏｏｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２０１１；１１７（１７）：４５４２－４５５１；Ｖｅｒｉ ＭＣ，ｅｔ ａｌ．，Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍ，２０１０ Ｍａｒ ３０；６２（７）：１９３３－４３；Ｊｏｈｎｓｏｎ Ｓ，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ，２０１０ Ａｐｒ ９；３９９（３）：４３６－４９）、及び細胞透過性超荷電タンパク質（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ．５０２，２９３－３１９（２０１２））などの選択的タンパク質足場である。

【０２６７】

ある特定の実施形態では、細胞結合剤は、活性化可能な抗体または活性化可能な抗原結合抗体断片（ＡＡと総称）である。いくつかの実施形態では、活性化可能な抗体または活性化可能な抗原結合抗体断片は、マスク部分（ＭＭ）に結合された標的細胞（すなわち「標的」）上のリガンドに特異的に結合する抗体または抗原結合抗体断片（例えば、本明細書に記載の抗体または抗原結合抗体断片）を含み、このＭＭの結合により、抗体または抗原結合抗体断片は標的に結合する能力が低下する。いくつかの実施形態では、ＭＭは、プロテアーゼ、例えば、病変組織において活性であるプロテアーゼ及び／または対象の治療部位に標的と共局在するプロテアーゼに対する基質を含む配列を介して結合される。活性化可能な抗体は、好ましくは循環中に安定であり、療法及び／または診断を意図した部位、ただし、例えば健常組織または治療及び／または診断の対象とならない他の組織といった正常なものではない部位で活性化され、活性化されると、対応する未修飾抗体に少なくとも匹敵する標的への結合性を示す。いくつかの実施形態では、ＡＡは、ＷＯ２００９／０２５８４６、ＷＯ２０１０／０８１１７３、ＷＯ２０１５／０４８３２９、ＷＯ２０１５／１１６９３３、及びＷＯ２０１６／１１８６２９に記載されているものであり、これらのそれぞれが全体として参照により組み込まれる。

【０２６８】

いくつかの実施形態では、活性化可能な抗体または抗体断片は、

（ａ）抗体または抗体断片（「ＡＢ」と総称）に結合された切断可能な部分（ＣＭ）であって、プロテアーゼに対する基質として機能するポリペプチドであるＣＭと；

（ｂ）抗体または抗体断片に結合されたマスク部分（ＭＭ）であって、活性化可能な抗体が未切断状態にあるとき、抗体または抗体断片のリガンドへの結合を阻害するＭＭとを含み、

未切断状態の活性化可能な抗体が、以下：（ＭＭ）－（ＣＭ）－（ＡＢ）または（ＡＢ）－（ＣＭ）－（ＭＭ）のようなＮ末端からＣ末端への構造的配置を有する。

【０２６９】

いくつかの実施形態では、マスク部分（または「マスク」）とは、抗体に結合されるか、または他の方法で付加され、かつ標的に特異的に結合する抗体の能力をマスク部分が低下させるように活性化可能な抗体構築物内に配置されるアミノ酸配列である。好適なマスク部分は、様々な公知の技術のいずれかを使用して特定される。例えば、ペプチドマスク部分は、ＷＯ２００９／０２５８４６に記載される方法を使用して特定され、その内容が全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【０２７０】

ＭＭで修飾されたＡＢの標的に対するＫｄは、ＭＭで修飾されていないＡＢまたは親ＡＢの標的に対するＫｄの、少なくとも５倍、１０倍、２５倍、５０倍、１００倍、２５０倍

、５００倍、１，０００倍、２，５００倍、５，０００倍、１０，０００倍、５０，０００倍、１００，０００倍、５００，０００倍、１，０００，０００倍、５，０００，０００倍、１０，０００，０００倍、５０，０００，０００倍超、あるいは５～１０倍、１０～１００倍、１０～１，０００倍、１０～１０，０００倍、１０～１００，０００倍、１０～１，０００，０００倍、１０～１０，０００，０００倍、１００～１，０００倍、１００～１０，０００倍、１００～１００，０００倍、１００～１，０００，０００倍、１００～１０，０００，０００倍、１，０００～１０，０００倍、１，０００～１００，０００倍、１，０００～１，０００，０００倍、１０００～１０，０００，０００倍、１０，０００～１００，０００倍、１０，０００～１，０００，０００倍、１０，０００～１０，０００，０００倍、１００，０００～１，０００，０００倍、または１００，０００～１０，０００，０００倍であり得る。逆に、ＭＭで修飾されたＡＢの標的に対する結合親和性は、ＭＭで修飾されていないＡＢまたは親ＡＢの標的に対する結合親和性の、少なくとも５分の１、１０分の１、２５分の１、５０分の１、１００分の１、２５０分の１、５００分の１、１，０００分の１、２，５００分の１、５，０００分の１、１０，０００分の１、５０，０００分の１、１００，０００分の１、５００，０００分の１、１，０００，０００分の１、５，０００，０００分の１、１０，０００，０００分の１、５０，０００，０００分の１超、５～１０分の１、１０～１００分の１、１０～１，０００分の１、１０～１０，０００分の１、１０～１００，０００分の１、１０～１，０００，０００分の１、１０～１０，０００，０００分の１、１００～１，０００分の１、１００～１０，０００分の１、１００～１００，０００分の１、１００～１，０００，０００分の１、１００～１０，０００，０００分の１、１，０００～１０，０００分の１、１，０００～１００，０００分の１、１，０００～１，０００，０００分の１、１０００～１０，０００，０００分の１、１０，０００～１００，０００分の１、１０，０００～１，０００，０００分の１、１０，０００～１０，０００，０００分の１、１００，０００～１，０００，０００分の１、または１００，０００～１０，０００，０００分の１であり得る。

【０２７１】

ＡＢに対するＭＭの解離定数（Ｋｄ）は一般に、標的に対するＡＢのＫｄよりも大きい。ＡＢに対するＭＭのＫｄは、標的に対するＡＢのＫｄの、少なくとも５倍、１０倍、２５倍、５０倍、１００倍、２５０倍、５００倍、１，０００倍、２，５００倍、５，０００倍、１０，０００倍、１００，０００倍、１，０００，０００倍、さらには１０，０００，０００倍であり得る。逆に、ＡＢに対するＭＭの結合親和性は一般に、標的に対するＡＢの結合親和性よりも小さい。ＡＢに対するＭＭの結合親和性は、標的に対するＡＢの結合親和性の、少なくとも５分の１、１０分の１、２５分の１、５０分の１、１００分の１、２５０分の１、５００分の１、１，０００分の１、２，５００分の１、５，０００分の１、１０，０００分の１、１００，０００分の１、１，０００，０００分の１、さらには１０，０００，０００分の１であり得る。

【０２７２】

ＡＢがＭＭで修飾され、標的が存在している場合、その標的へのＡＢの特異的結合は、標的に対する、ＭＭで修飾されていないＡＢの特異的結合または親ＡＢの特異的結合と比較して低減または阻害され得る。標的に対する、ＭＭで修飾されていないＡＢの結合または親ＡＢの結合と比較して、ＭＭで修飾された場合のＡＢの標的結合能力は、ＷＯ２０１０／０８１１７３に記載されるような、ｉｎ　ｖｉｖｏまたは標的置換ｉｎ　ｖｉｔｒｏ免疫吸着アッセイにて測定した場合、少なくとも、２、４、６、８、１２、２８、２４、３０、３６、４８、６０、７２、８４、９６時間、または５、１０、１５、３０、４５、６０、９０、１２０、１５０、１８０日間、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２か月以上にわたり、少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、さらには１００％低減され得る。

【０２７３】

ＭＭは、標的に対するＡＢの結合を阻害することができる。ＭＭは、ＡＢの抗原結合ドメ

インに結合し、ＡＢのその標的に対する結合を阻害することができる。ＭＭは、標的に対するＡＢの結合を立体的に阻害することができる。ＭＭは、ＡＢのその標的に対する結合をアロステリックに阻害することができる。ＡＢが修飾されているか、またはＭＭと結合されており、かつ標的が存在する場合のこれらの実施形態では、ＡＢの標的に対する結合が存在しないか、または結合が実質的に存在しない、あるいは、ＡＢの標的に対する結合が、ＭＭで修飾されていないＡＢ、親ＡＢ、またはＭＭと結合していないＡＢの、標的に対する結合と比較して、ＷＯ２０１０／０８１１７３に記載されるような、ｉｎ　ｖｉｖｏまたは標的置換ｉｎ　ｖｉｔｒｏ免疫吸着アッセイにて測定した場合、少なくとも、２、４、６、８、１２、２８、２４、３０、３６、４８、６０、７２、８４、９６時間、または５、１０、１５、３０、４５、６０、９０、１２０、１５０、１８０日間、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２か月以上にわたり、．００１％、．０１％、．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、もしくは５０％以下である。

【０２７４】

ＡＢがＭＭに結合されるか、またはＭＭで修飾されている場合、ＭＭは、ＡＢのその標的に対する特異的結合を「マスク」する、低減する、または阻害することができる。ＡＢがＭＭに結合されるか、またはＭＭで修飾されている場合、このような結合または修飾は、ＡＢがその標的に特異的に結合する能力を低減または阻害する構造変化をもたらすことができる。

【０２７５】

ＭＭに結合されるか、またはＭＭで修飾されているＡＢは、以下の式（アミノ（Ｎ）末端領域からカルボキシル（Ｃ）末端領域の順）：

（ＭＭ）－（ＡＢ）

（ＡＢ）－（ＭＭ）

（ＭＭ）－Ｌ－（ＡＢ）

（ＡＢ）－Ｌ－（ＭＭ）

［式中、ＭＭはマスク部分、Ａｂは抗体または標的結合抗原断片、及びＬはリンカーである］によって表すことができる。多くの実施形態において、可撓性を与えるために、１つ以上のリンカー、例えば、可撓性リンカーを組成物に挿入することが望ましい場合がある。

【０２７６】

ある特定の実施形態では、ＭＭは、Ａｂの天然の結合パートナーではない。いくつかの実施形態では、ＭＭは、Ａｂのいかなる天然の結合パートナーに対しても相同性を含まないか、または実質的に含まない。いくつかの実施形態では、ＭＭは、Ａｂの任意の天然の結合パートナーと５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、または８０％以下しか類似していない。いくつかの実施形態では、ＭＭは、Ａｂの任意の天然の結合パートナーと５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、または８０％以下しか同一ではない。いくつかの実施形態では、ＭＭは、Ａｂの任意の天然の結合パートナーと２５％以下しか同一ではない。いくつかの実施形態では、ＭＭは、Ａｂの任意の天然の結合パートナーと５０％以下しか同一ではない。いくつかの実施形態では、ＭＭは、Ａｂの任意の天然の結合パートナーと２０％以下しか同一ではない。いくつかの実施形態では、ＭＭは、Ａｂの任意の天然の結合パートナーと１０％以下しか同一ではない。

【０２７７】

本明細書で提供する活性化可能な抗体はまた、切断可能な部分（ＣＭ）を含み得る。そのようなＡＡは、ＡＢの標的に対して活性化可能／切替可能な結合を呈する。ＡＡには、一般に、マスク部分（ＭＭ）及び修飾可能または切断可能な部分（ＣＭ）で修飾またはそれと結合された抗体または抗体断片（ＡＢ）が含まれる。いくつかの実施形態では、ＣＭは、対象となるプロテアーゼの基質として機能するアミノ酸配列を含む。他の実施形態では

、ＣＭは、還元によって切断可能であるシステイン－システインジスルフィド結合を提供する。さらに他の実施形態では、ＣＭは、光分解によって活性化可能である光分解基質を提供する。

【０２７８】

いくつかの実施形態では、切断可能な部分（または「基質」）は、プロテアーゼ、通常は細胞外プロテアーゼに対する基質であるアミノ酸配列を含む。好適な基質は、様々な公知の技術のいずれかを使用して特定される。例えば、ペプチド基質は、米国特許第７，６６６，８１７号及同第８，５６３，２６９号；ならびにＷＯ２０１４／０２６１３６に記載される方法を使用して特定され、それぞれの内容が全体として参照により本明細書に組み込まれる。（Ｂｏｕｌｗａｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｅｎｇ．１０６（３）：３３９－３４６（２０１０）も参照）。任意選択で、ＣＭは、ジスルフィド結合を形成できるシステイン－システイン対を含み、このジスルフィド結合は、還元剤の作用によって切断することができる。ＣＭが切断剤によって切断される（例えば、ＣＭのプロテアーゼ基質がプロテアーゼによって切断される、及び／またはシステイン－システインジスルフィド結合が還元剤への曝露による還元によって破壊される）場合、標的の存在下で切断状態となり、Ａｂが標的に結合し、未切断状態では、標的の存在下で、標的に対するＡｂの結合がＭＭによって阻害されるようにＣＭが配置される。ＣＭのアミノ酸配列は、活性化可能な抗体が未切断構造である場合に、ＣＭの全部または一部がＡｂの「マスク」を容易にするように、ＭＭと重複していても、またはＭＭ内に包含されていてもよいことに留意されたい。

【０２７９】

いくつかの実施形態では、活性化可能な抗体の目標とする標的と共に組織内に共局在するプロテアーゼに基づいてＣＭを選択することができる。対象となる標的がプロテアーゼと共局在するかについて、様々な異なる条件が公知であり、そのプロテアーゼの基質は当技術分野において公知である。例えば、標的組織は、がん組織、特に固形腫瘍のがん組織であり得る。多くのがん、例えば固形腫瘍における公知の基質を有するプロテアーゼのレベルの増加に関する文献が数多く報告されている。例えば、Ｌａ Ｒｏｃｃａ ｅｔ ａｌ，（２００４）Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊ．ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ ９０（７）：１４１４－１４２１を参照のこと。

【０２８０】

例示的な基質は、限定されないが、以下の酵素：ＭＭＰ－１、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、プラスミン、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥのうちの１つ以上によって切断可能な基質が含まれ得る。

【０２８１】

いくつかの実施形態では、ＣＭは、最大１５アミノ酸長のポリペプチドである。

【０２８２】

いくつかの実施形態では、ＣＭは、少なくとも１つのマトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）の基質である第１の切断可能な部分（ＣＭ１）と、少なくとも１つのセリンプロテアーゼ（ＳＰ）の基質である第２の切断可能な部分（ＣＭ２）とを含むポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ＣＭ１－ＣＭ２基質のＣＭ１基質配列及びＣＭ２基質配列のそれぞれは、独立して、最大１５アミノ酸長のポリペプチドである。

【０２８３】

いくつかの実施形態では、ＣＭは、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡに対する基質である。

【０２８４】

ＭＭ及びＣＭで修飾されたＡｂの標的に対するＫｄは、ＭＭ及びＣＭで修飾されていないＡｂまたは親Ａｂの標的に対するＫｄの、少なくとも５倍、１０倍、２５倍、５０倍、１００倍、２５０倍、５００倍、１，０００倍、２，５００倍、５，０００倍、１０，０００倍、５０，０００倍、１００，０００倍、５００，０００倍、１，０００，０００倍、５，０００，０００倍、１０，０００，０００倍、５０，０００，０００倍超、あるいは５～１０倍、１０～１００倍、１０～１，０００倍、１０～１０，０００倍、１０～１００，０００倍、１０～１，０００，０００倍、１０～１０，０００，０００倍、１００～１，０００倍、１００～１０，０００倍、１００～１００，０００倍、１００～１，０００，０００倍、１００～１０，０００，０００倍、１，０００～１０，０００倍、１，０００～１００，０００倍、１，０００～１，０００，０００倍、１０００～１０，０００，０００倍、１０，０００～１００，０００倍、１０，０００～１，０００，０００倍、１０，０００～１０，０００，０００倍、１００，０００～１，０００，０００倍、または１００，０００～１０，０００，０００倍であり得る。逆に、ＭＭ及びＣＭで修飾されたＡｂの標的に対する結合親和性は、ＭＭ及びＣＭで修飾されていないＡｂまたは親Ａｂの標的に対する結合親和性の、少なくとも５分の１、１０分の１、２５分の１、５０分の１、１００分の１、２５０分の１、５００分の１、１，０００分の１、２，５００分の１、５，０００分の１、１０，０００分の１、５０，０００分の１、１００，０００分の１、５００，０００分の１、１，０００，０００分の１、５，０００，０００分の１、１０，０００，０００分の１、５０，０００，０００分の１超、５～１０分の１、１０～１００分の１、１０～１，０００分の１、１０～１０，０００分の１、１０～１００，０００分の１、１０～１，０００，０００分の１、１０～１０，０００，０００分の１、１００～１，０００分の１、１００～１０，０００分の１、１００～１００，０００分の１、１００～１，０００，０００分の１、１００～１０，０００，０００分の１、１，０００～１０，０００分の１、１，０００～１００，０００分の１、１，０００～１，０００，０００分の１、１０００～１０，０００，０００分の１、１０，０００～１００，０００分の１、１０，０００～１，０００，０００分の１、１０，０００～１０，０００，０００分の１、１００，０００～１，０００，０００分の１、または１００，０００～１０，０００，０００分の１であり得る。

【０２８５】

ＡｂがＭＭ及びＣＭで修飾され、標的は存在しているが、修飾剤（例えば、酵素、プロテアーゼ、還元剤、光）は存在していない場合、その標的へのＡｂの特異的結合は、ＭＭ及びＣＭで修飾されていないＡｂまたは親Ａｂの標的に対する特異的結合と比較して低減または阻害され得る。その標的に対する、親Ａｂの結合ならびにＭＭ及びＣＭで修飾されていないＡｂの結合と比較した場合、ＭＭ及びＣＭで修飾された場合のＡｂの標的結合能力は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１００８１１７に記載されるような、ｉｎ　ｖｉｖｏまたは標的置換ｉｎ　ｖｉｔｒｏ免疫吸着アッセイにて測定した場合、少なくとも、２、４、６、８、１２、２８、２４、３０、３６、４８、６０、７２、８４、９６時間、または５、１０、１５、３０、４５、６０、９０、１２０、１５０、１８０日間、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２か月以上にわたり、少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、さらには１００％低減され得る。

【０２８６】

本明細書で使用される場合、切断状態という用語は、プロテアーゼによるＣＭの修飾後、及び／またはＣＭのシステイン－システインジスルフィド結合の還元後、及び／または光活性化後のＡＡの状態を指す。本明細書で使用される未切断状態という用語は、プロテアーゼによるＣＭの切断が存在しない、及び／またはＣＭのシステイン－システインジスルフィド結合の還元が存在しない、及び／または光の存在しないＡＡの状態を指す。上記のように、ＡＡという用語は、本明細書では、未切断（自然）状態と切断状態両方のＡＡを指して使用される。いくつかの実施形態では、切断されたＡＡは、プロテアーゼによるＣＭの切断に起因して、少なくともＭＭが放出される（例えば、共有結合（例えば、システ

イン残基間のジスルフィド結合）によりＭＭがＡＡに連結されていない）結果となり、ＭＭを欠いている場合があることは当業者には明らかであろう。

【０２８７】

活性化可能または切替可能とは、ＡＡが、阻害状態、マスク状態、または未切断状態にあるときに、標的への第１のレベルの結合（すなわち、第１の構造）を示し、非阻害状態、非マスク状態、及び／または切断状態にあるときに、標的への第２のレベルの結合（すなわち、第２の構造）を示すことを意味し、その場合、第２のレベルの標的結合は、第１のレベルの結合よりも大きい。一般に、ＡＡのＡｂへの標的の接近は、ＣＭを切断できる切断剤の存在下では、そのような切断剤の非存在下よりも大きい。したがって、ＡＡが未切断状態にある場合、Ａｂは標的結合を阻害され、標的結合からマスクされ得る（すなわち、第１の構造は、Ａｂが標的に結合できないようなものである）が、切断状態では、ＡＢは阻害されないか、または標的結合に対してマスクされない。

【０２８８】

ＡＡのＣＭ及びＡＢは、ＡＢが、対象となる標的に対する結合部分に相当し、ＣＭが、対象の治療部位で標的と共局在するプロテアーゼに対する基質に相当するように選択することができる。代わりに、または加えて、ＣＭは、このジスルフィド結合の還元の結果として切断可能であるシステイン－システインジスルフィド結合である。ＡＡは、プロテアーゼ切断可能なＣＭまたはシステイン－システインジスルフィド結合のうちの少なくとも１つを含み、いくつかの実施形態では、両方の種類のＣＭを含む。ＡＡは、代わりにまたはさらに、光源によって活性化可能な光不安定性基質を含み得る。本明細書に開示されるＡＡは、例えば、ＣＭの部位を切断できるプロテアーゼが、非治療部位の組織（例えば健常組織）よりも、治療部位の標的含有組織（例えば、病変組織；例えば診療的治療または診断的治療の対象）に比較的高レベルで存在する場合に、特に用途が見出される。本明細書に開示されるＡＡはまた、例えば、ＣＭの部位を還元できる還元剤が、非治療非診断部位よりも、治療部位または診断部位の標的含有組織に比較的高レベルで存在する場合に、特に用途が見出される。本明細書に開示されるＡＡはまた、例えば、ＣＭの部位を光分解できる、レーザーなどの手段による光源が、治療部位または診断部位の標的含有組織に導入される場合に、特に用途が見出される。

【０２８９】

いくつかの実施形態では、ＡＡは、Ａｂがその標的への結合をマスクされないか、またはそれ以外の方法で阻害されない場合に、本来であれば非治療部位でのＡｂの結合から生じ得る毒性及び／または有害な副作用の低減をもたらし得る。ジスルフィド結合の還元を促進する還元剤によって切断可能であるＣＭをＡＡが含有する場合、そのようなＡＡのＡＢを選択することで、その環境が、例えば、非治療部位の環境よりも還元可能性が高いものであるような、還元剤のレベルの上昇を特徴とする目的治療部位に、対象となる標的が存在するＡｂの活性化を利用することができる。

【０２９０】

一般に、構造的に制約されると、ＭＭが、Ａｂのマスク、またはＡｂのその標的に対する結合の低減をもたらすように、対象となるＡｂを選択し、ＡＡの残りを構築することによりＡＡを設計することができる。この機能的特徴を可能にするには、構造的設計基準を考慮すべきである。

【０２９１】

阻害構造か非阻害構造かで、標的結合にとって望ましいダイナミックレンジを切替可能な表現型を示すＡＡを提供する。ダイナミックレンジとは、一般に、（ａ）第１の諸条件でのパラメーターの最大検出レベルと、（ｂ）第２の諸条件でのそのパラメーターの最小検出値との比を指す。例えば、ＡＡの文脈において、ダイナミックレンジとは、（ａ）ＡＡのＣＭを切断できるプロテアーゼの存在下でＡＡに結合する標的タンパク質の最大検出レベルと、（ｂ）プロテアーゼの非存在下でＡＡに結合する標的タンパク質の最小検出レベルとの比を指す。ＡＡのダイナミックレンジは、ＡＡ切断剤（例えば、酵素）処理の平衡解離定数と、ＡＡ切断剤処理の平衡解離定数との比として算出することができる。ＡＡの

ダイナミックレンジが大きいほど、ＡＡの切替可能な表現型が優れている。比較的高いダイナミックレンジ値（例えば、１超）を有するＡＡは、ＡＡによる標的タンパク質結合が、切断剤の非存在下よりも、ＡＡのＣＭを切断できる切断剤（例えば、酵素）の存在下でより高い程度で発生する（例えば、優勢に発生する）ような、より望ましい切替表現型を呈する。

【０２９２】

ＡＡは、様々な構造的立体配置で提供することができる。ＡＡの例示的な式を以下に示す。ＡＢ、ＭＭ、及びＣＭのＮ末端からＣ末端への順序をＡＡ内で反転できることが、具体的に企図される。ＣＭ及びＭＭは、例えば、ＣＭがＭＭ内に含まれるように、アミノ酸配列中で重複し得ることも具体的に企図される。

【０２９３】

例えば、以下の式（アミノ（Ｎ）末端領域からカルボキシル（Ｃ）末端領域の順）：

（ＭＭ）－（ＣＭ）－（ＡＢ）

（ＡＢ）－（ＣＭ）－（ＭＭ）

［式中、ＭＭはマスク部分、ＣＭは切断可能な部分、及びＡＢは抗体またはその断片である］によって表すことができる。ＭＭ及びＣＭは、上記の式において異なった成分として示されているが、本明細書に開示されるすべての例示的な実施形態（式を含む）において、ＭＭ及びＣＭのアミノ酸配列は、例えば、ＣＭが完全にまたは部分的にＭＭ内に含まれるように、重複し得ることが企図されることに留意されたい。加えて、上記の式は、ＡＡ要素に対してＮ末端側またはＣ末端側に配置できる追加のアミノ酸配列を規定する。

【０２９４】

ある特定の実施形態では、１つ以上のＭＭ－ＣＭ連結部、ＣＭ－ＡＢ連結部、または両方に可撓性を与えるために、１つ以上のリンカー、例えば、可撓性リンカーをＡＡ構築物に挿入することが望ましい場合がある。例えば、ＡＢ、ＭＭ、及び／またはＣＭは、望ましい可撓性を与えるのに十分な数の残基（例えば、Ｇｌｙ、Ｓｅｒ、Ａｓｐ、Ａｓｎ、特にＧｌｙ及びＳｅｒ、特にＧｌｙ）を含まない場合がある。したがって、そのようなＡＡ構築物の切替可能な表現型は、可撓性リンカーを規定する１つ以上のアミノ酸の導入により利点を得る場合がある。加えて、ＡＡが、構造的に制約された構築物として提供される場合、以下に記載するように、可撓性リンカーを機能的に挿入して、未切断ＡＡでの環状構造の形成及び維持を容易にすることができる。

【０２９５】

例えば、ある特定の実施形態では、ＡＡは、以下の式（ここで以下の式は、Ｎ末端からＣ末端方向またはＣ末端からＮ末端方向のいずれかのアミノ酸配列を表す）：

（ＭＭ）－Ｌ$_1$－（ＣＭ）－（ＡＢ）

（ＭＭ）－（ＣＭ）－Ｌ$_1$－（ＡＢ）

（ＭＭ）－Ｌ$_1$－（ＣＭ）－Ｌ$_2$－（ＡＢ）

シクロ［Ｌ$_1$－（ＭＭ）－Ｌ$_2$－（ＣＭ）－Ｌ$_3$－（ＡＢ）］

［式中、ＭＭ、ＣＭ、及びＡＢは上記に定義される通りであり；Ｌ$_1$、Ｌ$_2$、及びＬ$_3$は、それぞれ独立してかつ任意選択で存在するかまたは存在せず、少なくとも１つの可撓性アミノ酸（たとえばＧｌｙ）を含む、同一または異なる可撓性リンカーであり；シクロが存在する場合、ＡＡは、ＡＡ中の１対のシステイン間にジスルフィド結合が存在することに起因する環状構造の形態である］のうちの１つを含む。加えて、上記の式は、ＡＡ要素に対してＮ末端側またはＣ末端側に配置できる追加のアミノ酸配列を規定する。式シクロ［Ｌ$_1$－（ＭＭ）－Ｌ$_2$－（ＣＭ）－Ｌ$_3$－（ＡＢ）］中、ジスルフィド結合に関与するシステインがＡＡ中に配置されると、１つまたは２つの尾部が見込まれる場合があり、それによりＡＡがジスルフィド結合された構造（それによって構造的に制約された状態）にある場合に投げ縄構造またはオメガ構造が生成されるものと理解すべきである。尾部（複数可）のアミノ酸配列は、ＡＡの局在化を促進するための標的受容体への結合、ＡＡの血清半減期の増加などの追加のＡＡ機能を規定することができる。標的指向性部分（例えば、標的組織に存在する細胞の受容体に対するリガンド）及び血清半減期を延長する部分（

例えば、免疫グロブリン（例えば、ＩｇＧ）または血清アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ））などの血清タンパク質に結合するポリペプチド）。

【０２９６】

本明細書に記載のＡＡでの使用に適したリンカーは、一般に、修飾型ＡＢまたはＡＡの可撓性を提供して、ＡＢの標的への結合の阻害を促進するものである。そのようなリンカーは一般に可撓性リンカーと称される。好適なリンカーは容易に選択することができ、１アミノ酸（例えば、Ｇｌｙ）～２０アミノ酸、２アミノ酸～１５アミノ酸、３アミノ酸～１２アミノ酸（これには、４アミノ酸～１０アミノ酸、５アミノ酸～９アミノ酸、６アミノ酸～８アミノ酸、または７アミノ酸～８アミノ酸を含む）などの異なる長さの好適なもののいずれかであってよく、１、２、３、４、５、６、または７アミノ酸であり得る。

【０２９７】

例示的な可撓性リンカーとして、グリシンポリマー（Ｇ）ｎ、グリシン－セリンポリマー（例えば、（ＧＳ）ｎ、（ＧＳＧＧＳ）ｎ、及び（ＧＧＧＳ）ｎを含み、式中、ｎは少なくとも１つの整数である）、グリシン－アラニンポリマー、アラニン－セリンポリマー、及び当技術分野において公知である他の可撓性リンカーが挙げられる。グリシン及びグリシン－セリンポリマーは比較的構造化されておらず、そのため成分間の中立なテザーとして機能できる場合がある。グリシンはアラニンよりも顕著にファイ－サイ空間に接近し、長い側鎖をもつ残基よりもはるかに制限が少ない（Ｓｃｈｅｒａｇａ，Ｒｅｖ．Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ　Ｃｈｅｍ．１１１７３－１４２（１９９２）を参照）。例示的な可撓性リンカーとして、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ、Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ、Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙなどが挙げられるが、これらに限定されない。ＡＡの設計は、全体的にまたは部分的に可撓性であるリンカーを含んでもよく、したがって、目的のＡＡ構造を提供するには、可撓性リンカーに加え、可撓性の低い構造を与える１つ以上の部分がリンカーに含まれ得ることを当業者は理解されよう。

【０２９８】

上記の要素に加えて、修飾型ＡＢ及びＡＡは、例えば、ＡＡのＮ末端またはＣ末端のアミノ酸配列などの追加の要素を含み得る。例えば、ＡＡは、対象となる細胞または組織への送達を容易にするための標的指向性部分を含み得る。さらに、細胞表面上でのＡＡの発現を促進するため、足場タンパク質の状況でＡＡを提供することができる。

【０２９９】

いくつかの実施形態では、活性化可能な抗体はまた、シグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、スペーサーを介して活性化可能な抗体と結合される。いくつかの実施形態では、スペーサーは、シグナルペプチドの非存在下で、活性化可能な抗体と結合される。いくつかの実施形態では、スペーサーは、活性化可能な抗体のＭＭに直接連結されている。いくつかの実施形態では、スペーサー－ＭＭ－ＣＭ－ＡＢというＮ末端からＣ末端への構造的配置において、スペーサーは、活性化可能な抗体のＭＭに直接連結されている。

【０３００】

好適なスペーサー及びスペーサー技術は当技術分野において公知であり、提供される活性化可能な抗体のいくつかの実施形態におけるスペーサーの組み込みに慣用的に用いることができる。例えば、その内容が全体として参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１６／１７９２８５（例えば、５２～５３ページ）を参照のこと。

【０３０１】

いくつかの実施形態では、活性化可能な抗体はプロテアーゼに曝露されて切断され、その結果、活性化状態または切断状態において、活性化した抗体は、プロテアーゼがＣＭを切断した後、ＬＰ２及び／またはＣＭ配列の少なくとも一部を含む軽鎖配列を含む。

【０３０２】

ＣＭは、約０．００１～１５００×１０^{4}Ｍ$^{-1}$Ｓ$^{-1}$、または０．００１、０．００５

、０．０１、０．０５、０．１、０．５、１、２．５、５、７．５、１０、１５、２０、２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、２００、２５０、５００、７５０、１０００、１２５０、または１５００×１０^{4}Ｍ$^{-1}$Ｓ$^{-1}$の速度で少なくとも１つのプロテアーゼによって特異的に切断される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、約１００，０００Ｍ$^{-1}$Ｓ$^{-1}$の速度で特異的に切断される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、約１×１０^{2}～約１×１０^{6}Ｍ$^{-1}$Ｓ$^{-1}$（すなわち、約１×１０^{2}～約１×１０^{6}Ｍ$^{-1}$Ｓ$^{-1}$）の速度で特異的に切断される。

【０３０３】

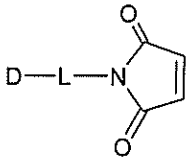
酵素による特異的切断のために、酵素とＣＭとの間の接近が起こる。ＭＭ及びＣＭと結合されたＡｂ（例えば、抗体またはＥｐＣＡＭ結合抗体断片）を含む活性化可能な抗体は、標的及び十分な酵素活性の存在下にある場合に、ＣＭが切断され得る。十分な酵素活性とは、ＣＭと接触して切断を行う酵素の能力を指す場合がある。酵素はＣＭの近傍にあるが、他の細胞因子または酵素のタンパク質修飾のために切断できない可能性があることは容易に予見することができる。

【０３０４】

５．細胞毒性剤（Ｄ）または細胞毒性剤－リンカー化合物（式（Ｉ）の化合物）

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）の工程（ｃ）に関して、ＣｙｓＣＢＡ（例えば、ＣｙｓＡｂまたはその抗原結合断片）を式（Ｉ）：

【化９５】



（Ｉ）

［式中、Ｄは細胞毒性剤であり、Ｌはリンカーである］の化合物またはその薬学的に許容される塩と反応させ、それにより複合体を形成する。

【０３０５】

ある特定の実施形態では、Ｄは、ピロロベンゾジアゼピン（ＰＢＤ）、オキサゾリジノベンゾジアゼピン（ＯＢＤ）、またはインドリノベンゾジアゼピン（ＩＧＮ）化合物などのベンゾジアゼピン化合物である。

【０３０６】

本明細書で使用される場合、「ベンゾジアゼピン」化合物は、ベンゾジアゼピンコア構造を有する化合物である。ベンゾジアゼピンコアは、置換されていても非置換でもよく、及び／または１つ以上の環構造と縮合されていてもよい。これはまた、リンカーによって連結された２つのベンゾジアゼピンコアを有する化合物を包含する。ベンゾジアゼピンコアの一部であるイミン官能基（－Ｃ＝Ｎ－）は還元することができる。

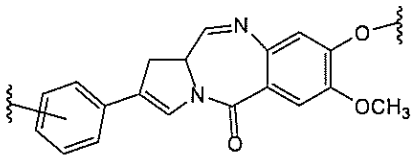
【０３０７】

本明細書で使用される場合、「ピロロベンゾジアゼピン」（ＰＢＤ）化合物は、ピロロベンゾジアゼピンコア構造を有する化合物である。ピロロベンゾジアゼピンは、置換されていても置換されていなくてもよい。これはまた、リンカーによって連結された２つのピロロベンゾジアゼピンコアを有する化合物を包含する。インドリノベンゾジアゼピンコアの一部であるイミン官能基（－Ｃ＝Ｎ－）は還元することができる。

【０３０８】

ある特定の実施形態では、ピロロベンゾジアゼピン化合物は、

【化９６】

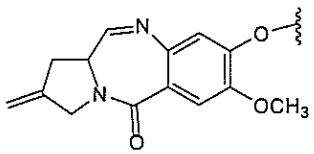


によって表されるコア構造を含み、これは任意選択で置換することができる。

【０３０９】

ある特定の実施形態では、ピロロベンゾジアゼピン化合物は、

【化９７】



によって表されるコア構造を含み、これは任意選択で置換することができる。

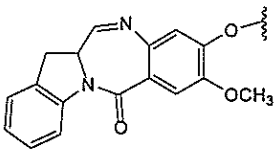
【０３１０】

本明細書で使用される場合、「インドリノベンゾジアゼピン」（ＩＧＮ）化合物は、インドリノベンゾジアゼピンコア構造を有する化合物である。インドリノベンゾジアゼピンは、置換されていても置換されていなくてもよい。これはまた、リンカーによって連結された２つのインドリノベンゾジアゼピンコアを有する化合物を包含する。インドリノベンゾジアゼピンコアの一部であるイミン官能基（－Ｃ＝Ｎ－）は還元することができる。

【０３１１】

ある特定の実施形態では、インドリノベンゾジアゼピン化合物は、

【化９８】

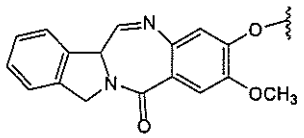


によって表されるコア構造を含み、これは任意選択で置換することができる。

【０３１２】

いくつかの実施形態では、インドリノベンゾジアゼピン化合物は、

【化９９】

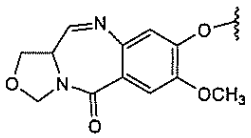


によって表されるコア構造を含み、これは任意選択で置換することができる。

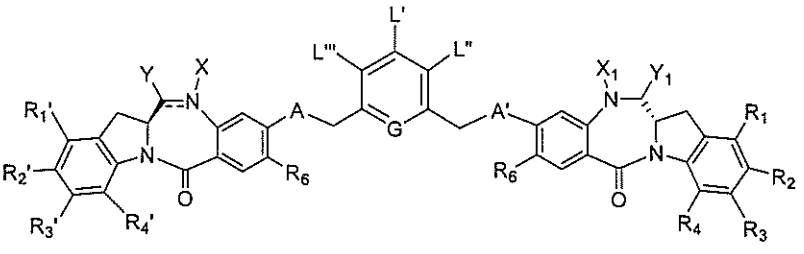
【０３１３】

本明細書で使用される場合、「オキサゾリジノベンゾジアゼピン」（ＯＢＤ）化合物は、オキサゾリジノベンゾジアゼピンコア構造を有する化合物である。オキサゾリジノベンゾジアゼピンは、置換されていても置換されていなくてもよい。これはまた、リンカーによって連結された２つのオキサゾリジノベンゾジアゼピンコアを有する化合物を包含する。オキサゾリジノベンゾジアゼピンコアの一部であるイミン官能基（－Ｃ＝Ｎ－）は還元することができる。

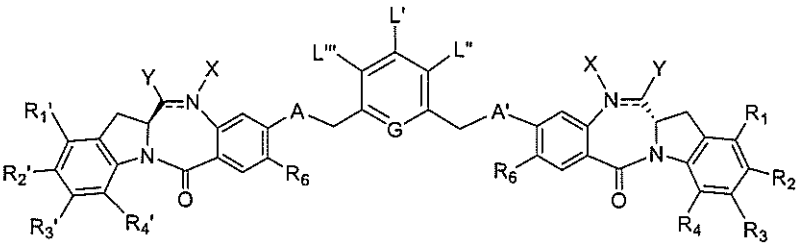
【０３１４】
いくつかの実施形態では、オキサゾリジノベンゾジアゼピン化合物は、
【化１００】



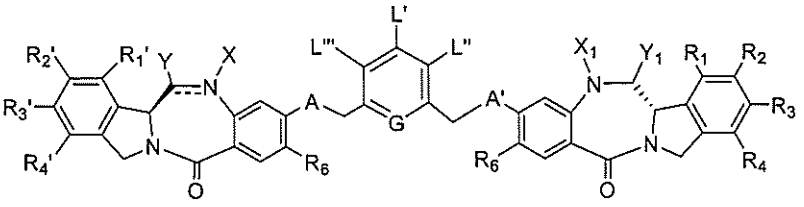
によって表されるコア構造を含み、これは任意選択で置換することができる。
【０３１５】
ある特定の実施形態では、Ｄはメイタンシノイド化合物である。
【０３１６】
第１の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）における式（Ｉ）の化合物に関して、Ｄは、以下の式：
【化１０１】



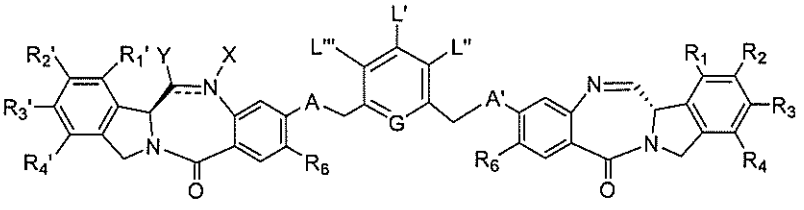
（Ｄ－ＩＡ）；



（Ｄ－ＩＢ）；



（Ｄ－ＩＣ）；もしくは



（Ｄ－ＩＤ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：
ＮとＣ間の二重線
【化１０２】

は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは、－Ｈまたは（Ｃ１～Ｃ４）アルキルであり、単結合の場合は、Ｘが、－Ｈまたはアミン保護部分であり、Ｙは、－ＯＨもしくは－ＳＯ３Ｈまたはその薬学的に許容される塩であり；

Ｌ’、Ｌ’’、及びＬ’’’のうちの１つは、以下の式：
－Ｚ$_1$－Ｐ$_1$－Ｚ$_2$－Ｒ$_{x1}$－Ｃ（＝Ｏ）－　（Ａ’）、または
－Ｎ（Ｒ^e）－Ｒ$_{x1}$－Ｃ（＝Ｏ）－　（Ｄ’）
によって表され、他の２つはそれぞれ独立して、－Ｈ、任意選択で置換される直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニル、ポリエチレングリコール単位－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_n$－Ｒ^c、ハロゲン、グアニジニウム［－ＮＨ（Ｃ＝ＮＨ）ＮＨ$_2$］、－ＯＲ、－ＮＲ’Ｒ’’、－Ｎ$_2$Ｏ－ＮＲ’ＣＯＲ’’、－ＳＲ、－ＳＯＲ’、－$_2$ＳＲＯ’、－ＳＯ$_3$Ｈ、－ＯＳＯ$_3$Ｈ、－ＳＯ$_2$ＮＲ’Ｒ’’、シアノ、アジド、－ＣＯＲ’、－ＯＣＯＲ’、及び－ＯＣＯＮＲ’Ｒ’’から選択され；
Ｚ$_1$及びＺ$_2$のうち一方は－Ｃ（＝Ｏ）－であり、他方は－ＮＲ$_5$－であり；
Ｐ$_1$は、アミノ酸残基、または２～２０個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり；
Ｒ$_{x1}$は、任意選択で置換される直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり；
Ｒ^{e}は、－Ｈ、直鎖、分岐、もしくは環状のアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル、または－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）$_n$－Ｒ^{k}であり、ここで、Ｒ^{k}は、－Ｈ、１～６個の炭素原子を有し、任意選択で第２級アミノ（例えば、－ＮＨＲ１０１）もしくは第３級アミノ（－ＮＲ１０１Ｒ１０２）基を有する直鎖、分岐、環状のアルキル、または５員もしくは６員の窒素含有複素環であり、Ｒ１０１及びＲ１０２はそれぞれ独立して、直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり；
Ｒは、各存在について、－Ｈ、任意選択で置換される直鎖、分岐、もしくは環状のアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル、ポリエチレングリコール単位－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_n$－Ｒ^c、６～１８個の炭素原子を有する、任意選択で置換されるアリール、窒素、酸素、及び硫黄から独立して選択される１つ以上のヘテロ原子を含有する５～１８員ヘテロアリール、またはＯ、Ｓ、Ｎ、及びＰから独立して選択される１～６個のヘテロ原子を含有する、任意選択で置換される３～１８員複素環からなる群より独立して選択され；
Ｒ’及びＲ’’はそれぞれ独立して、－Ｈ、－ＯＨ、－ＯＲ、－ＮＨＲ、－Ｎ$_2$Ｒ－ＣＯＲ、任意選択で置換される直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニル、ポリエチレングリコール単位－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_n$－Ｒ^c、ならびにＯ、Ｓ、Ｎ、及びＰから独立して選択される１～６個のヘテロ原子を有する、任意選択で置換される３～１８員複素環から選択され；
Ｒ^{c}は、－Ｈ、または１～４個の炭素原子を有する任意選択で置換される直鎖もしくは分岐アルキルであり；
ｎは、整数１～２４であり；
Ｘ$_1$は、－Ｈ、アミン保護基、任意選択で置換される直鎖、分岐、もしくは環状のアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル、ポリエチレングリコール単位－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_n$－Ｒ^c、６～１８個の炭素原子を有する、任意選択で置換されるアリール、窒素、酸素、及び硫黄から独立して選択される１つ以上のヘテロ原子を含有する５～１８員ヘテロアリール、ならびにＯ、Ｓ、Ｎ、及びＰから独立して選択される１～６個のヘテロ原子を含有する、任意選択で置換される３～１８員複素環から選択され；
Ｙ$_1$は、－Ｈ、オキソ基、任意選択で置換される直鎖、分岐、もしくは環状のアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル、任意選択で置換される６～１８員アリール、窒素、酸素、及び硫黄から独立して選択される１つ以上のヘテロ原子を含有する任意選択で置換される５～１８員ヘテロアリール、１～６個のヘテロ原子を有する、任意選択で置換される３～１８員複素環から選択され；
Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_1$’、Ｒ$_2$’、Ｒ$_3$’、及びＲ$_4$’はそれぞれ独立して、－Ｈ、任意選択で置換される直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニル、ポリエチレングリコール単位－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_n$－Ｒ^c、ハロゲン、グアニジニウム［－ＮＨ（Ｃ＝ＮＨ）ＮＨ$_2$］、－ＯＲ、－ＮＲ’Ｒ’’、－Ｎ$_2$Ｏ－ＮＣＯ、－ＮＲ’ＣＯＲ’’、－ＳＲ、－ＳＯＲ’、－$_2$ＳＲＯ’、－ＳＯ$_3$－Ｈ、－ＯＳＯ$_3$Ｈ、－ＳＯ$_2$ＮＲ’Ｒ’’、シアノ、アジド、－ＣＯＲ’、－ＯＣＯＲ’、及び－ＯＣＯＮＲ’Ｒ’’からなる

群より選択され；
R_6は、－Ｈ、－Ｒ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＮＲ’Ｒ’’’、$-N_3$、－ＮＯまたはハロゲンであり；
Ｇは、－ＣＨ－または－Ｎ－であり；
ＡとＡ’は同じかまたは異なっており、－Ｏ－、オキソ（－Ｃ（＝Ｏ）－）、－ＣＲＲ’Ｏ－、－ＣＲＲ’－、－Ｓ－、－ＣＲＲ’Ｓ－、$-NR_5$－、及び－ＣＲＲ’Ｎ（R_5）－から独立して選択され；
R_5は、各存在について、独立して、－Ｈ、または任意選択で置換される直鎖もしくは分岐アルキルである。

【０３１７】
ある特定の実施形態では、Ｄは、式（Ｄ－ＩＡ）よって表されるか、またはその薬学的に許容される塩である。

【０３１８】
ある特定の実施形態では、式（Ｄ－ＩＡ）、（Ｄ－ＩＢ）、（Ｄ－ＩＣ）、または（Ｄ－ＩＤ）に関して、X_1は、－Ｈ、－ＯＨ、（C_1～C_3）アルキル、ハロ（C_1～C_3）アルキル、またはフェニルであり；Y_1’は、－Ｈ、オキソ基、（C_1～C_3）アルキル、またはハロ（C_1～C_3）アルキルであり、残りの変数は、第１の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。より具体的には、X_1は、－Ｈ、－ＯＨ、または－Ｍｅであり；Y_1は、－Ｈまたはオキソである。さらにより具体的には、X_1は、－Ｈであり；Y_1は、－Ｈである。

【０３１９】
ある特定の実施形態では、式（Ｄ－ＩＡ）、（Ｄ－ＩＢ）、（Ｄ－ＩＣ）、または（Ｄ－ＩＤ）に関して、Ａ及びＡ’は同じかまたは異なっており、－Ｏ－及び－Ｓ－から選択され、残りの変数は、第１の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。より具体的には、Ａ及びＡ’は、－Ｏ－である。

【０３２０】
ある特定の実施形態では、式（Ｄ－ＩＡ）、（Ｄ－ＩＢ）、（Ｄ－ＩＣ）、または（Ｄ－ＩＤ）に関して、R_6は、－ＯＭｅであり、残りの変数は、第１の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３２１】
ある特定の実施形態では、式（Ｄ－ＩＡ）、（Ｄ－ＩＢ）、（Ｄ－ＩＣ）、または（Ｄ－ＩＤ）に関して、R_1、R_2、R_3、R_4、R_1’、R_2’、R_3’、及びR_4’は独立して、－Ｈ、ハロゲン、$-NO_2$、－ＯＨ、（C_1～C_3）アルキル、ハロ（C_1～C_3）アルキル、または（C_1～C_3）アルコキシであり、残りの変数は、第１の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。より具体的には、R_1、R_2、R_3、R_4、R_1’、R_2’、R_3’、及びR_4’はすべて－Ｈである。

【０３２２】
ある特定の実施形態では、式（Ｄ－ＩＡ）、（Ｄ－ＩＢ）、（Ｄ－ＩＣ）、または（Ｄ－ＩＤ）に関して、Ｒ、Ｒ’、Ｒ’’、及びR_3はそれぞれ独立して、－Ｈまたは（C_1～C_3）アルキルであり、残りの変数は、第１の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３２３】
ある特定の実施形態では、式（Ｄ－ＩＡ）、（Ｄ－ＩＢ）、（Ｄ－ＩＣ）、または（Ｄ－ＩＤ）に関して、Ｇは、－ＣＨ－である。

【０３２４】
ある特定の実施形態では、Ｄは、式（Ｄ－ＩＡ）、（Ｄ－ＩＢ）、（Ｄ－ＩＣ）、または（Ｄ－ＩＤ）よって表され、式中：
R_1、R_2、R_3、R_4、R_1’、R_2’、R_3’、及びR_4’はすべて－Ｈであり；
R_6は、－ＯＭｅであり；
X_1及びY_1は、いずれも－Ｈであり；

Ａ及びＡ’は、－Ｏ－であり；残りの変数は、第１の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。ある特定の実施形態では、Ｇは－ＣＨ－であり；残りの変数は上記の通りである。

【０３２５】

第２の特定の実施形態では、式（Ｄ－ＩＡ）、（Ｄ－ＩＢ）、（Ｄ－ＩＣ）、または（Ｄ－ＩＤ）に関して、Ｌ’、Ｌ’’、及びＬ’’’のうちの１つは、式（Ａ’）または（Ｄ’）によって表され、それ以外は、－Ｈ、１～６個の炭素原子を有する直鎖もしくは分岐アルキル、ハロゲン、－ＯＨ、（Ｃ１～Ｃ６）アルコキシ、または－ＮＯ２であり、残りの変数は、第１の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。ある特定の実施形態では、Ｌ’は、式（Ａ’）によって表され；Ｌ’’及びＬ’’’はいずれも－Ｈである。他の実施形態では、Ｌ’は、式（Ｄ’）によって表され；Ｌ’’及びＬ’’’はいずれも－Ｈである。

【０３２６】

ある特定の実施形態では、式（Ａ’）または（Ｄ’）のR_1は、ハロゲン、－ＯＨ、（Ｃ１～Ｃ３）アルキル、（Ｃ１～Ｃ３）アルコキシ、ハロ（Ｃ１～Ｃ３）アルキル、または荷電置換基もしくはイオン性基により任意選択で置換される、１～６個の炭素原子を有する直鎖、分岐、または環状のアルキルである。残りの変数は、第１もしくは第２の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３２７】

第３の特定の実施形態では、第１もしくは第２の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態における式（Ｄ－ＩＡ）、（Ｄ－ＩＢ）、（Ｄ－ＩＣ）、または（Ｄ－ＩＤ）に関して、Ｌ’は、以下の式：

－ＮＲ５－Ｐ１－Ｃ（＝Ｏ）－（ＣＲａＲｂ）ｓ－Ｃ（＝Ｏ）－　　（Ｂ１’）；

－ＮＲ５－Ｐ１－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃｙ－（ＣＲａＲｂ）ｓ１－Ｃ（＝Ｏ）－　　（Ｂ２’）；

－Ｃ（＝Ｏ）－Ｐ１－ＮＲ５－（ＣＲａＲｂ）ｓ－Ｃ（＝Ｏ）－　　（Ｃ１’）、または

－Ｃ（＝Ｏ）－Ｐ１－ＮＲ５－Ｃｙ－（ＣＲａＲｂ）ｓ１－Ｃ（＝Ｏ）－　　（Ｃ２’）

［式中：

Ｒａ及びＲｂは、各存在について、それぞれ独立して、－Ｈ、（Ｃ１～Ｃ３）アルキル、または荷電置換基もしくはイオン性基Ｑであり；

ｓは、整数１～６であり；

ｓ１’は、０または整数１～６であり；

Ｃｙは、ハロゲン、－ＯＨ、（Ｃ１～Ｃ３）アルキル、（Ｃ１～Ｃ３）アルコキシ、またはハロ（Ｃ１～Ｃ３）アルキルにより任意選択で置換される、５または６個の環炭素原子を有する環状アルキルであり；

残りの変数は、第１もしくは第２の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである］によって表される。

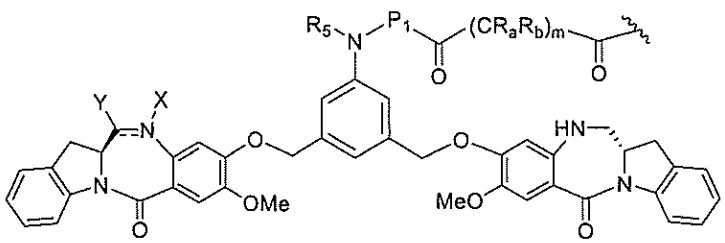
【０３２８】

ある特定の実施形態では、式（Ｂ２’）及び（Ｃ２’）のＣｙはシクロヘキサンであり；ｓ１’は、０または１である。

【０３２９】

第４の特定の実施形態では、式（Ｉ）の化合物に関して、Ｄは、以下の式：

【化１０３】



（Ｄ－ＩＥ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり；残りの変数は、第３の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３３０】

第５の特定の実施形態では、式（Ｄ－ＩＡ）、（Ｄ－ＩＢ）、（Ｄ－ＩＣ）、（Ｄ－ＩＤ）、または（Ｄ－ＩＥ）に関して、Ｒａ及びＲｂは、いずれもＨであり；Ｒ５は、ＨまたはＭｅであり、残りの変数は、第３もしくは第４の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３３１】

ある特定の実施形態では、第１、第２、第３、もしくは第４の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される化合物に関して、荷電置換基またはイオン性基Ｑは、ｉ）－ＳＯ３Ｈ、－Ｚ’－ＳＯ３Ｈ、－ＯＰＯ３Ｈ２、－Ｚ’－ＯＰＯ３Ｈ２、－ＰＯ３Ｈ２、－Ｚ’－ＰＯ３Ｈ２、－ＣＯ２Ｈ、－Ｚ’－ＣＯ２Ｈ、－ＮＲ１１Ｒ１２、もしくは－Ｚ’－ＮＲ１１Ｒ１２、もしくはその薬学的に許容される塩；またはｉｉ）－Ｎ＋Ｒ１４Ｒ１５Ｒ１６Ｘ－もしくは－Ｚ’－Ｎ＋Ｒ１４Ｒ１５Ｒ１６Ｘ－であり；Ｚ’は、任意選択で置換されるアルキレン、任意選択で置換されるシクロアルキレン、または任意選択で置換されるフェニレンであり；Ｒ１４～Ｒ１６は、それぞれ独立して、任意選択で置換されるアルキルであり；Ｘ－は、薬学的に許容されるアニオンである。より具体的には、Ｑは、－ＳＯ３ＨまたはＨその薬学的に許容される塩である。

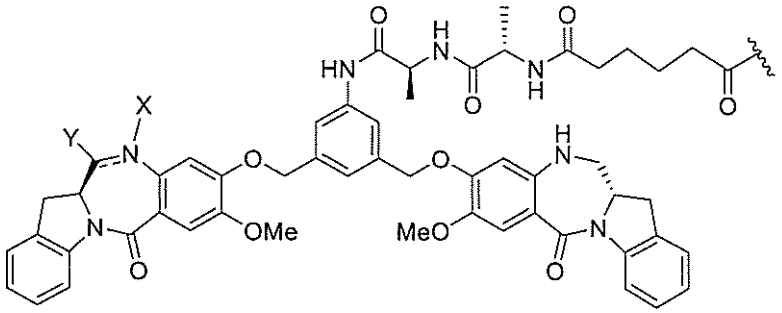
【０３３２】

第６の特定の実施形態では、式（Ｄ－ＩＡ）、（Ｄ－ＩＢ）、（Ｄ－ＩＣ）、（Ｄ－ＩＤ）、または（Ｄ－ＩＥ）に関して、Ｐ１は、２～１０個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり；残りの変数は、第１、第２、第３、第４、もしくは第５の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。ある特定の実施形態では、Ｐ１は、２～５個のアミノ酸残基を含有するペプチドである。ある特定の実施形態では、Ｐ１は、プロテアーゼによって切断可能なペプチドである。より具体的には、Ｐ１は、腫瘍組織に発現するプロテアーゼによって切断可能なペプチドである。ある特定の実施形態では、Ｐ１は、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｃｉｔ、Ｌｅｕ－Ｃｉｔ、Ｉｌｅ－Ｃｉｔ、Ｔｒｐ、Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ａｌａ、Ｐｈｅ－Ｎ９－トシル－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｎ９－ニトロ－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｖａｌ、Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号５６）、β－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号５７）、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ（配列番号５８）、Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ａｒｇ－Ａｒｇ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｍｅｔ、Ｇｌｎ－Ｖａｌ、Ａｓｎ－Ａｌａ、Ｇｌｎ－Ｐｈｅ、及びＧｌｎ－Ａｌａである。より具体的には、Ｐ１は、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ａｌａ－Ｖａｌ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、またはＤ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａである。

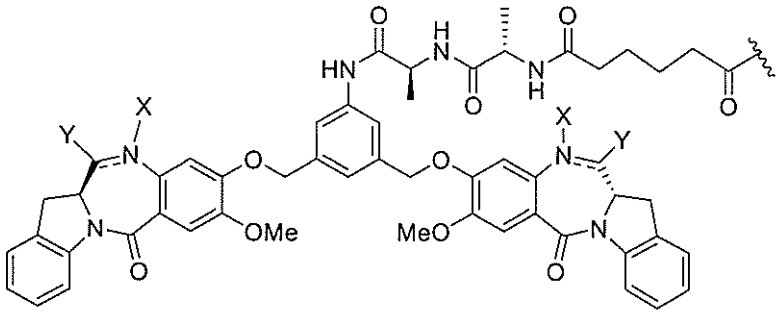
【０３３３】

第７の特定の実施形態では、式（Ｉ）の化合物に関して、Ｄは、以下の構造式：

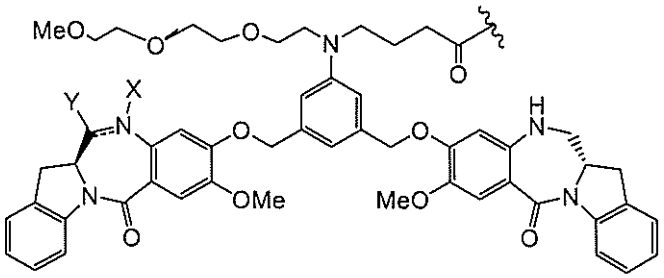
【化１０４】



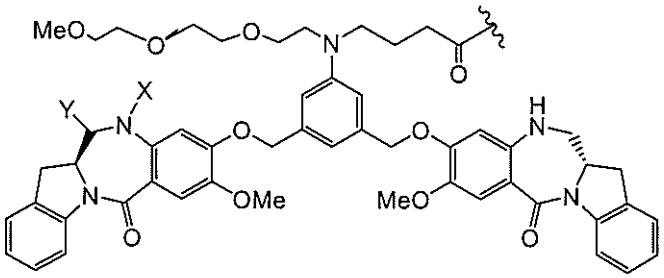
（Ｄ１）；



（Ｄ２）；



（Ｄ３）；もしくは



（Ｄ４）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中、ＮとＣ間の二重線

【化１０５】

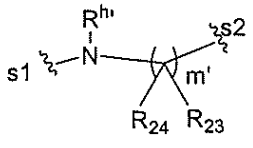
==

は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは－Ｈであり、単結合の場合は、Ｘが－Ｈであり、Ｙは－ＳＯ３Ｈまたはその薬学的に許容される塩であり；残りの変数は、第１の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３３４】

第８の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）における式（Ｉ）の化合物に関して、－Ｌは、以下の構造式：

【化１０６】



（Ｌ－Ｉ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：
ｓ１は、Ｄに共有結合する部位であり；ｓ２は、マレイミド基に共有結合する部位であり；
Ｒ２３及びＲ２４は、各存在について、独立してＨまたは任意選択で置換されるアルキルであり；
ｍ’は、整数０～１０であり；
Ｒｈ’は、Ｈまたは任意選択で置換されるアルキルであり；
残りの変数は、第１、第２、第３、第４、第５、第６、もしくは第７の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３３５】

ある特定の実施形態では、Ｒ２３及びＲ２４は、いずれもＨであり；ｍ’は、整数１～６であり；残りの変数は、第８の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

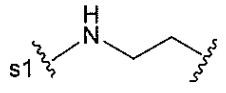
【０３３６】

ある特定の実施形態では、Ｒｈ’はＨであり、残りの変数は、第８の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３３７】

第９の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）における式（Ｉ）の化合物に関して、－Ｌは、以下の構造式：

【化１０７】



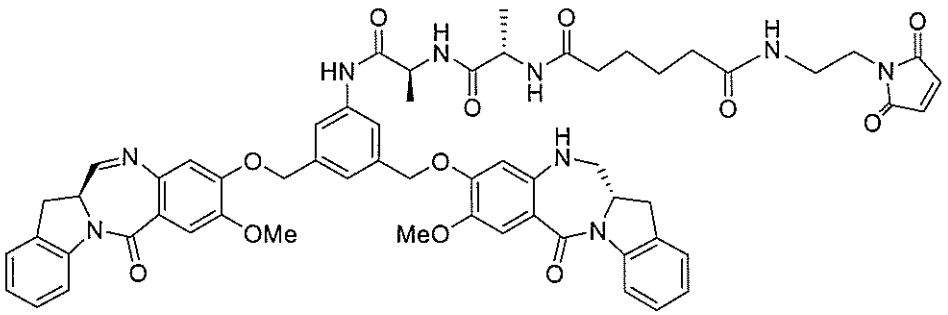
（Ｌ１）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、残りの変数は、第１、第２、第３、第４、第５、第６、もしくは第７の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

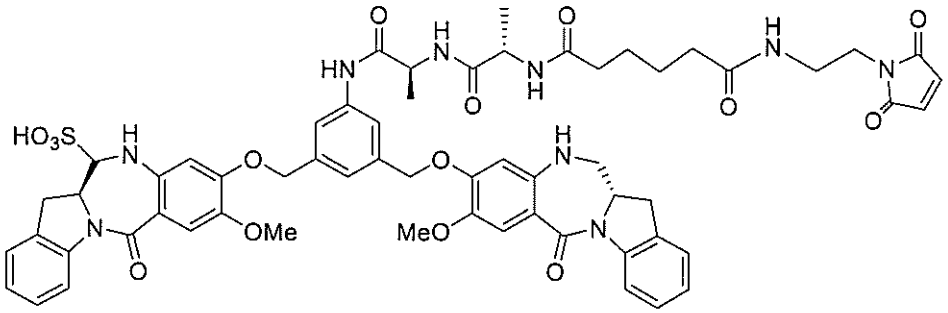
【０３３８】

第１０の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）における式（Ｉ）の化合物は、以下の式：

【化１０８】



（Ｉ１）、もしくは



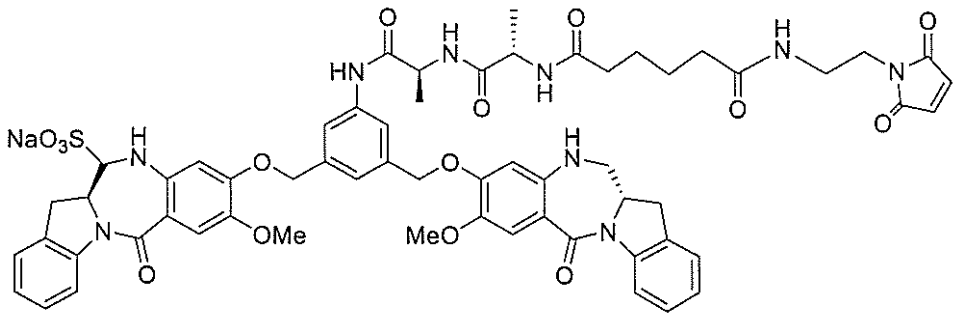
（Ｉ２）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩である。

【０３３９】

ある特定の実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、以下の式：

【化１０９】



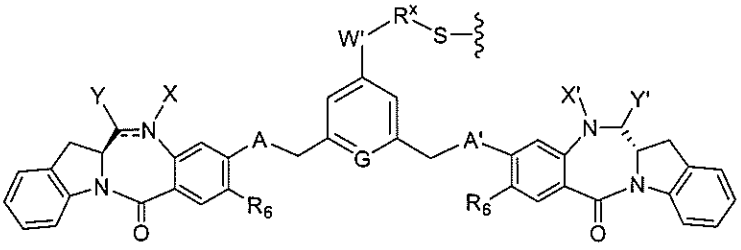
（Ｉ３）

によって表される。

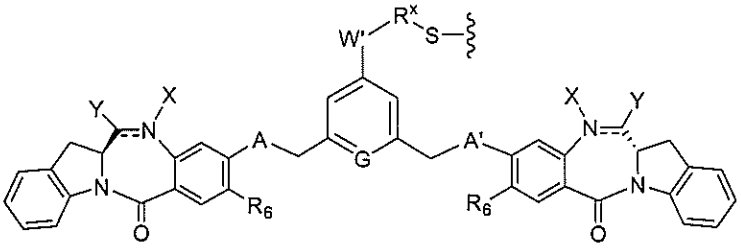
【０３４０】

第１１の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）における式（Ｉ）の化合物に関して、Ｄは、以下の式：

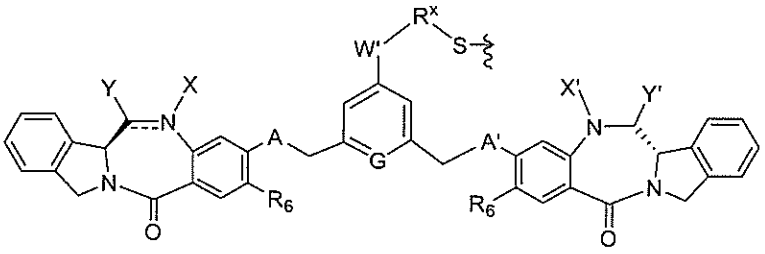
【化１１０】



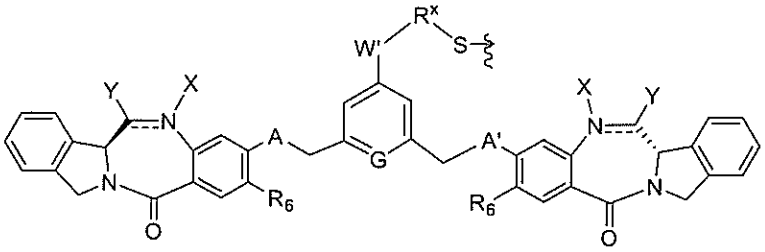
（Ｄ－ＩＩＡ）；



（Ｄ－ＩＩＢ）；



（Ｄ－ＩＩＣ）；もしくは



（Ｄ－ＩＩＤ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：
ＮとＣ間の二重線
【化１１１】
＝＝
は、単結合または二重結合を表し、ただし、二重結合の場合は、Ｘが存在せず、Ｙは、－Ｈまたは（Ｃ１～Ｃ４）アルキルであり、単結合の場合は、Ｘが、－Ｈまたはアミン保護部分であり、Ｙは、－ＯＨもしくは－ＳＯ３Ｈまたはその薬学的に許容される塩であり；
Ｘ’は、－Ｈ、－ＯＨ、置換または非置換の直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニル、フェニル、及びアミン保護基からなる群より選択され；
Ｙ’は、－Ｈ、オキソ基、置換または非置換の直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニルからなる群より選択され；
Ａ及びＡ’は、－Ｏ－及び－Ｓ－から選択され；
Ｗ’は存在しないか、または－Ｏ－、－Ｎ（Ｒe）－、－Ｎ（Ｒｅ）－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｎ（Ｃ（＝Ｏ）Ｒｅ）－、－Ｓ－、もしくは－ＣＨ２－Ｓ－、－ＣＨ２ＮＲｅ－から選択され；
Ｒｘは存在しないか、または直鎖、分岐、もしくは環状のアルキルから選択され；
Ｒｅは、－Ｈ、直鎖、分岐、もしくは環状のアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル、または－（ＣＨ２－ＣＨ２－Ｏ）ｎ－Ｒｋであり、ここで、Ｒｋは、－Ｈ、１～６個の

炭素原子を有し、任意選択で第２級アミノ（例えば、－ＮＨＲ１０１）もしくは第３級アミノ（－ＮＲ１０１Ｒ１０２）基を有する直鎖、分岐、環状のアルキル、または５員もしくは６員の窒素含有複素環であり、Ｒ１０１及びＲ１０２はそれぞれ独立して、直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり；
ｎは、整数１～２４であり；
Ｇは、－ＣＨ－または－Ｎ－から選択され；
Ｒ６は、－Ｈ、－Ｒ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＮＲ’Ｒ’’’、$-NO_2$またはハロゲンであり；
Ｒは、各存在について、－Ｈ、任意選択で置換される直鎖、分岐、もしくは環状のアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル、ポリエチレングリコール単位－（CH_2CH_2O）ｎ－Ｒｃ、６～１８個の炭素原子を有する、任意選択で置換されるアリール、窒素、酸素、及び硫黄から独立して選択される１つ以上のヘテロ原子を含有する５～１８員ヘテロアリール、またはＯ、Ｓ、Ｎ、及びＰから独立して選択される１～６個のヘテロ原子を含有する、任意選択で置換される３～１８員複素環からなる群より独立して選択され；
Ｒ’及びＲ’’はそれぞれ独立して、－Ｈ、－ＯＨ、－ＯＲ、－ＮＨＲ、－NR_2Ｒ－ＣＯＲ、任意選択で置換される直鎖、分岐、または環状のアルキル、アルケニル、またはアルキニル、ポリエチレングリコール単位－（CH_2CH_2O）ｎ－Ｒｃ、ならびにＯ、Ｓ、Ｎ、及びＰから独立して選択される１～６個のヘテロ原子を有する、任意選択で置換される３～１８員複素環から選択され；
Ｒｃは、－Ｈ、または１～４個の炭素原子を有する任意選択で置換される直鎖もしくは分岐アルキルであり；Ｌはリンカーである。

【０３４１】

ある特定の実施形態では、Ｄは、式（Ｄ－ＩＩＡ）よって表されるか、またはその薬学的に許容される塩である。

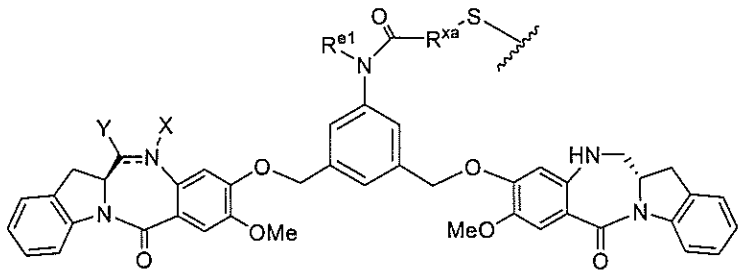
【０３４２】

ある特定の実施形態では、Ｄは、式（Ｄ－ＩＩＡ）、（Ｄ－ＩＩＢ）、（Ｄ－ＩＩＣ）、または（Ｄ－ＩＩＤ）よって表され、式中：
Ｘ’及びＹ’は、いずれも－Ｈであり；
Ａ及びＡ’は、いずれも－Ｏ－であり；
Ｒ６は、－ＯＭｅであり；
Ｗ’は、－Ｎ（Ｒｅ）－または－Ｎ（Ｒｅ）－Ｃ（＝Ｏ）－であり；
Ｒｅは、－Ｈ、１～４個の炭素原子を有する直鎖もしくは分岐アルキル、または－（ＣＨ２－ＣＨ２－Ｏ）ｎ－Ｒｋであり、ここで、Ｒｋは、－Ｈ、１～４個の炭素原子を有する直鎖または分岐アルキルであり；
ｎは、整数２～６であり；
Ｒｘは、１～６個の炭素原子を有する直鎖または分岐アルキルであり；残りの変数は、第１１の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

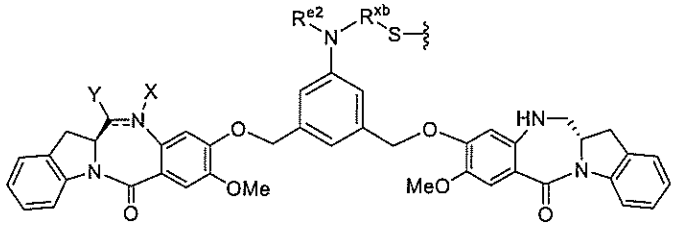
【０３４３】

第１２の特定の実施形態では、式（Ｉ）の化合物に関して、Ｄは、以下の構造式：

【化１１２】



（Ｄ－ＩＩＥ）、もしくは



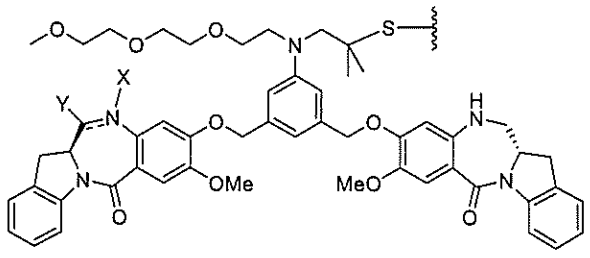
（Ｄ－ＩＩＦ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：
Ｒｅ１は、Ｈまたは（Ｃ１～Ｃ６）アルキルであり；
Ｒｘａは、（Ｃ１～Ｃ６）アルキルであり；
Ｒｅ２は、－（ＣＨ２－ＣＨ２－Ｏ）ｎ－Ｒｋであり；
ｎは、整数２～６であり；
Ｒｋは、－Ｈまたは－Ｍｅであり；
Ｒｘｂは、（Ｃ１～Ｃ６）アルキルであり；残りの変数は、第１１の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３４４】

第１３の特定の実施形態では、式（Ｉ）の化合物に関して、Ｄは、以下の式：

【化１１３】



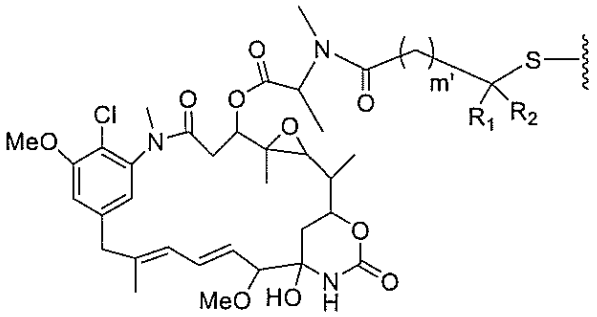
（Ｄ５）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、残りの変数は、第１１の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３４５】

第１４の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）における式（Ｉ）の化合物に関して、Ｄは、以下の式：

【化１１４】



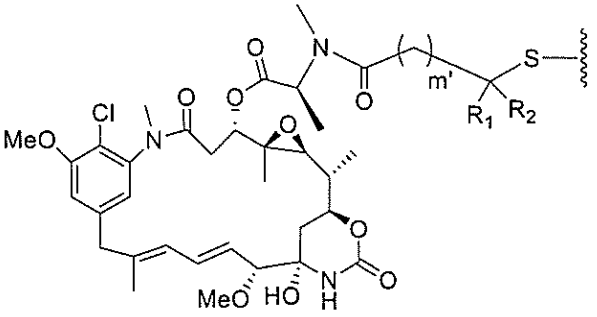
（Ｄ－ＩＩＩ）

［式中、ｍ’は１または２であり；R_1及びR_2はそれぞれ独立して、－Ｈまたは（Ｃ１～Ｃ３）アルキルであり；Ｌはリンカーである］によって表される。

【０３４６】

ある特定の実施形態では、Ｄは、以下の式：

【化１１５】



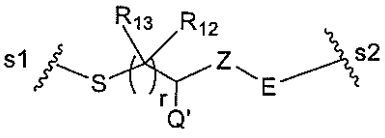
（Ｄ－ＩＩＩＡ）

によって表される。

【０３４７】

第１５の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）における式（Ｉ）の化合物に関して、Ｌは、以下の構造式：

【化１１６】



（Ｌ－ＩＩ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：

ｓ１は、Ｄに共有結合する部位であり、ｓ２は、マレイミド基に共有結合する部位であり；

Ｅは、－（ＣＲ１０Ｒ１１）ｑ－、シクロアルキル、またはシクロアルキルアルキルであり；

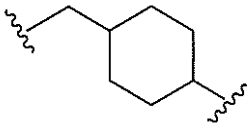
Ｚは、存在しないか、－ＳＯ２ＮＲ９－、－ＮＲ９ＳＯ２－、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＲ９－、－ＮＲ９－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＲ９－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｐ－、－ＮＲ９－Ｃ（＝Ｏ）－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｐ－、－（ＯＣＨ２ＣＨ２）ｐ－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ９－、または－（ＯＣＨ２ＣＨ２）ｐ－ＮＲ９－Ｃ（＝Ｏ）－であり；

ｐは、整数１～２４であり；

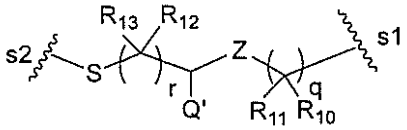
Ｑは、－Ｈ、荷電置換基、またはイオン性基であり；

Ｒ９、Ｒ１０、Ｒ１１、Ｒ１２、及びＲ１３は、各存在について、独立してＨまたは任意

選択で置換されるアルキルであり；
ｑ及びｒは、各存在について、独立して整数０～１０であり；残りの変数は、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。
【０３４８】
ある特定の実施形態では、Ｅは、－（ＣＲ１０Ｒ１１）ｑ－であり、残りの変数は、第１５の特定の実施形態に記載される通りである。
【０３４９】
ある特定の実施形態では、Ｅは
【化１１７】



であり、残りの変数は、第１５の特定の実施形態に記載される通りである。
【０３５０】
ある特定の実施形態では、Ｚは、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＲ９－または－ＮＲ９－Ｃ（＝Ｏ）－であり、残りの変数は、第１５の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。
【０３５１】
第１６の特定の実施形態では、式（Ｉ）の化合物に関して、Ｌは、以下の構造式：
【化１１８】



（Ｌ－ＩＩＡ）

［式中、Ｒ９、Ｒ１０、Ｒ１１、Ｒ１２、及びＲ１３は、各存在について、独立して－Ｈまたは（Ｃ１～Ｃ３）アルキルであり；残りの変数は、第１５の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである］によって表される。
【０３５２】
ある特定の実施形態では、Ｒ９は－Ｈであり、残りの変数は、第１６の特定の実施形態に記載される通りである。
【０３５３】
ある特定の実施形態では、Ｑ’は、
ｉ）Ｈ；
ｉｉ）－ＳＯ３Ｈ、－Ｚ’－ＳＯ３Ｈ、－ＯＰＯ３Ｈ２、－Ｚ’－ＯＰＯ３Ｈ２、－ＰＯ３Ｈ２、－Ｚ’－ＰＯ３Ｈ２、－ＣＯ２Ｈ、－Ｚ’－ＣＯ２Ｈ、－ＮＲ１１Ｒ１２、もしくはＺ’－ＮＲ１４Ｒ１５、もしくはその薬学的に許容される塩；または
ｉｉｉ）－Ｎ＋Ｒ１４Ｒ１５Ｒ１６Ｘ－もしくは－Ｚ’－Ｎ＋Ｒ１４Ｒ１５Ｒ１６Ｘ－であり；
Ｚ’は、任意選択で置換されるアルキレン、任意選択で置換されるシクロアルキレン、または任意選択で置換されるフェニレンであり；
Ｒ１４、Ｒ１５、及びＲ１６は、それぞれ独立して、任意選択で置換されるアルキルであり；
Ｘ－は、薬学的に許容されるアニオンであり；残りの変数は、第１６の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。
【０３５４】
ある特定の実施形態では、Ｑ’は、Ｈもしくは－ＳＯ３Ｈ、またはその薬学的に許容され

る塩であり、残りの変数は、第１６の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３５５】

ある特定の実施形態では、Ｒ９、Ｒ１０、Ｒ１１、Ｒ１２、及びＲ１３は、いずれもＨであり；ｑ及びｒは、それぞれ独立して、整数１～６であり；残りの変数は、第１６の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３５６】

ある特定の実施形態では、Ｌは、式（Ｌ－ＩＩＡ）によって表され、式中：

Ｒ１２及びＲ１３は、各存在について、それぞれ独立してＨまたは（Ｃ１～Ｃ３）アルキルであり；

Ｑは、Ｈもしくは－ＳＯ３Ｈ、またはその薬学的に許容される塩であり；

Ｚは、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＲ９－または－ＮＲ９－Ｃ（＝Ｏ）－であり；

Ｒ９は、Ｈまたは（Ｃ１～Ｃ３）アルキルであり；

Ｒ１０及びＲ１１は、各存在について、独立してＨまたは（Ｃ１～Ｃ３）アルキルであり；

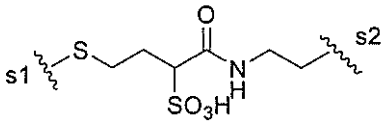
ｑ及びｒはそれぞれ、整数１～５であり；残りの変数は、第１６の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３５７】

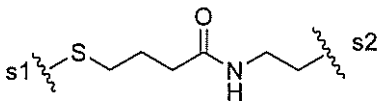
第１７の特定の実施形態では、式（Ｉ）の化合物に関して、Ｌは、

以下の構造式：

【化１１９】



（Ｌ２）及び



（Ｌ３）

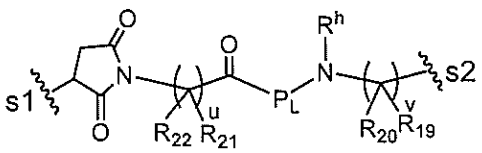
のいずれか１つによって表されるか、

またはその薬学的に許容される塩であり、残りの変数は、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３５８】

第１８の特定の実施形態では、式（Ｉ）の化合物に関して、Ｌは、以下の構造式：

【化１２０】



（Ｌ－ＩＩＩ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：

ｓ１は、Ｄに共有結合する部位であり；ｓ２は、マレイミド基に共有結合する部位であり；

Ｒ１９、Ｒ２０、Ｒ２１、及びＲ２２は、各存在について、独立してＨまたは任意選択で置換されるアルキルであり；

ｕ及びｖは、それぞれ独立して整数０～１０であり；
R^hは、Ｈまたは任意選択で置換されるアルキルであり；
P_Lは、任意選択で置換されるアルキレン、－（ＣＨ２－ＣＨ２－Ｏ）ｊ－（式中、酸素原子はP_Lに結合される－（Ｃ＝Ｏ）－基に結合されている）、アミノ酸残基、または２～２０個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり；
ｊは、整数１～２４であり；残りの変数は、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３５９】

ある特定の実施形態では、Ｒ１９、Ｒ２０、Ｒ２１、及びＲ２２はそれぞれＨであり；ｕ及びｖは、それぞれ独立して、整数１～６であり；残りの変数は、第１８の特定の実施形態に上記される通りである。

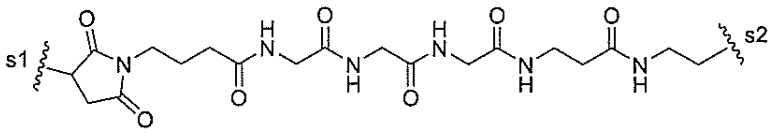
【０３６０】

ある特定の実施形態では、P_Lは、アミノ酸残基、または２～１０個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり；残りの変数は、第１８の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に上記される通りである。より具体的には、P_Lは、２～５個のアミノ酸残基を含有するペプチドである。別のより具体的な実施形態では、P_Lは、Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｃｉｔ－Ｖａｌ．Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｃｉｔ、Ｌｅｕ－Ｃｉｔ、Ｉｌｅ－Ｃｉｔ、Ｔｒｐ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ａｌａ、Ｐｈｅ－N^9－トシル－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－N^9－ニトロ－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｖａｌ、Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号５５）、β－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号５６）、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ（配列番号５７）、Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ａｒｇ－Ａｒｇ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｍｅｔ、Ｍｅｔ－Ａｌａ、Ｇｌｎ－Ｖａｌ、Ａｓｎ－Ａｌａ、Ｇｌｎ－Ｐｈｅ、Ｇｌｎ－Ａｌａ、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｌａ、及びβ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ（配列番号５８）からなる群より選択される。さらにより具体的には、P_Lは、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｌａ、またはβ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙである。

【０３６１】

第１９の特定の実施形態では、式（Ｉ）の化合物に関して、Ｌは、以下の構造式：

【化１２１】



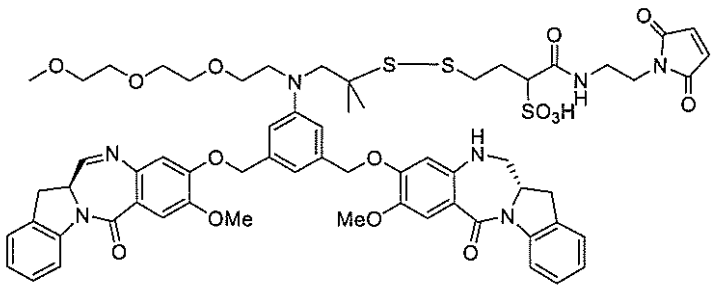
（Ｌ４）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、残りの変数は、第１１、第１２、第１３、もしくは第１４の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

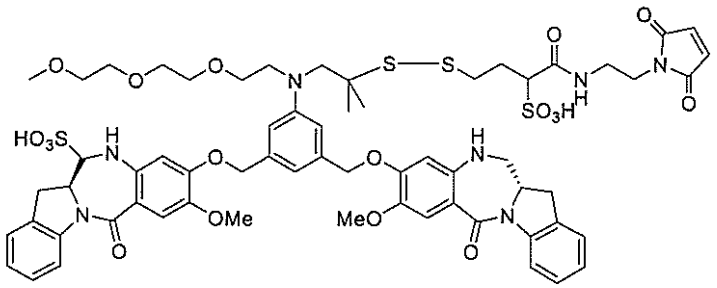
【０３６２】

第２０の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）における式（Ｉ）の化合物は、以下の式：

【化１２２】



（Ｉ４）；もしくは



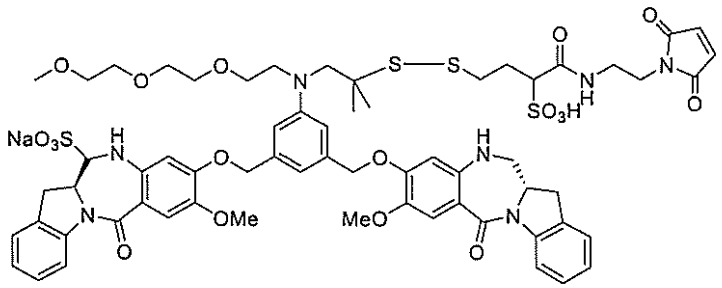
（Ｉ５）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩である。

【０３６３】

ある特定の実施形態では、第２０の特定の実施形態における式（Ｉ）の化合物は、以下の式：

【化１２３】



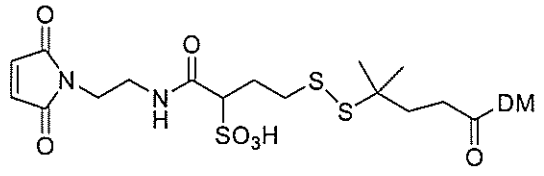
（Ｉ６）

によって表される。

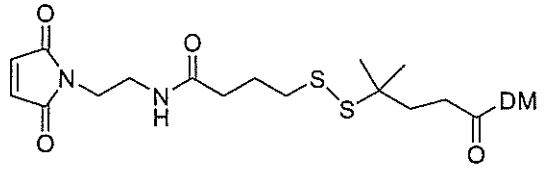
【０３６４】

第２１の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）における式（Ｉ）の化合物は、以下の式：

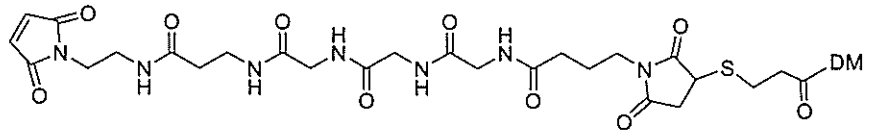
【化１２４】



（Ｉ７）；



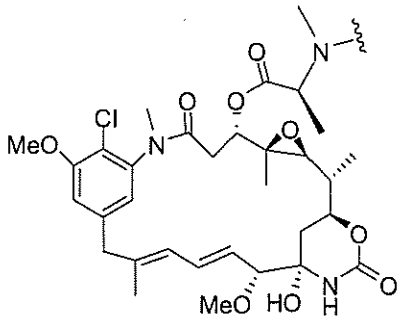
（Ｉ８）；もしくは



（Ｉ９）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中、ＤＭは、以下の式：

【化１２５】

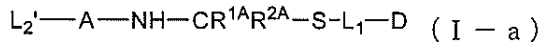


によって表される薬物部分である。

【０３６５】

第２２の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）における式（Ｉ）の化合物は、以下の式：

【化１２６】



（Ｉ－ａ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：

Ｌ２’は、マレイミド部分を有するスペーサーであり；

Ａは、アミノ酸、または２～２０個のアミノ酸を含むペプチドであり；

Ｒ１Ａ及びＲ２Ａはそれぞれ独立して、ＨまたはＣ１－３アルキルであり；

Ｌ１はスペーサーであり；

Ｄ－Ｌ１－ＳＨは、細胞毒性剤である。

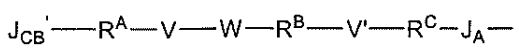
【０３６６】

ある特定の実施形態では、Ｒ１Ａ及びＲ２Ａの少なくとも１つはＨであり、残りの変数は、第２２の特定の実施形態に記載される通りである。

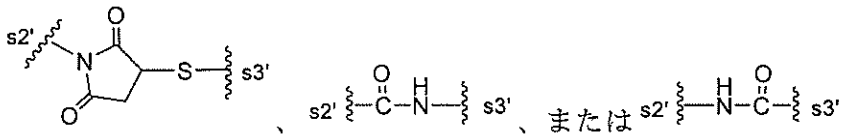
【０３６７】

ある特定の実施形態では、Ｒ１Ａ及びＲ２Ａはそれぞれ独立して、ＨまたはＭｅであり、残りの変数は、第２２の特定の実施形態に記載される通りである。

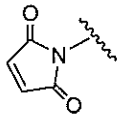
【０３６８】
ある特定の実施形態では、Ｒ１Ａ及びＲ２ＡはＨであり；他の一方がＭｅであり、残りの変数が第２２の特定の実施形態に記載される通りである。
【０３６９】
ある特定の実施形態では、Ｒ１Ａ及びＲ２Ａはいずれもであり、残りの変数は、第２２の特定の実施形態に記載される通りである。
【０３７０】
ある特定の実施形態では、Ｌ１は、－Ｌ１’－Ｃ（＝Ｏ）－であり；Ｌ１’は、アルキレンまたはシクロアルキレンであり、残りの変数は、第２２の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。より具体的には、Ｌ１’は、Ｃ１－１０アルキレンである。さらにより具体的には、Ｌ１は、－ＣＲ３ＡＲ４Ａ－（ＣＨ２）１－８－Ｃ（＝Ｏ）－であり；Ｒ３Ａ及びＲ４Ａはそれぞれ独立して、ＨまたはＭｅである。さらに別の特定の実施形態では、Ｌ１は、－ＣＲ３ＡＲ４Ａ－（ＣＨ２）３－５－Ｃ（＝Ｏ）－である。なおも特定の実施形態では、Ｒ３Ａ及びＲ４Ａは、いずれもＭｅである。
【０３７１】
ある特定の実施形態では、Ｌ１は、－（ＣＨ２）４－６－Ｃ（＝Ｏ）－であり、残りの変数は、第２２の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。
【０３７２】
第２３の特定の実施形態では、式（Ｉ－ａ）に関して、Ｌ２’は、以下の構造式：
【化１２７】



によって表され、
式中：
ＲＡは、アルキレン、シクロアルキルアルキレン、またはアリーレンであり；
ＲＢ及びＲＣは、それぞれ独立して、存在しないか、アルキレン、シクロアルキレン、またはアリーレンであり；
Ｖ及びＶ’はそれぞれ独立して、－（Ｏ－ＣＨ２－ＣＨ２）ｐ１－、または－（ＣＨ２－ＣＨ２－Ｏ）ｐ１－であり；
ｐ１は、０または整数１～１０であり；
Ｗは、存在しないか、
【化１２８】



（式中、ｓ２’は、Ｖ、ＲＡ、またはＪＣＢ’に結合される部位を示し、ｓ３’は、ＲＢ、Ｖ’、ＲＣ、またはＪＡに結合される部位を示す）であり；
ＪＣＢ’は、
【化１２９】



であり；

ＪＡは、－Ｃ（＝Ｏ）－であり；残りの変数は、第２２の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

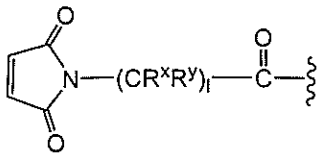
【０３７３】

ある特定の実施形態では、ｐ１は０であり、ＲＣは存在せず、残りの変数は、第２３の特定の実施形態に記載される通りである。

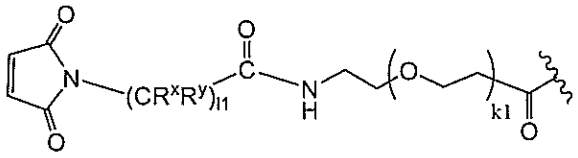
【０３７４】

第２４の特定の実施形態では、式（Ｉ－ａ）に関して、Ｌ２’は、以下の構造式：

【化１３０】



（Ｌ２ａ’）；または



（Ｌ２ｂ’）

によって表され、

式中：

ＲＸ及びＲＹは、各存在について、独立してＨ、－ＯＨ、ハロゲン、－Ｏ－（Ｃ１－４アルキル）、－ＳＯ３Ｈ、－ＮＲ４０Ｒ４１Ｒ４２＋、または－ＯＨ、ハロゲン、－ＳＯ３Ｈ、もしくは－ＮＲ４０Ｒ４１Ｒ４２＋により任意選択で置換されるＣ１－４アルキルであり、式中、Ｒ４０、Ｒ４１、及びＲ４２は、それぞれ独立して、ＨまたはＣ１－４アルキルであり；

ｌ及びｌ１は、それぞれ独立して、整数１～１０であり；

ｋ１は、整数１～１２であり；残りの変数は、第２２の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３７５】

ある特定の実施形態では、ＲＸ及びＲＹは、いずれもＨであり、残りの変数は、第２４の特定の実施形態に上記される通りである。

【０３７６】

ある特定の実施形態では、ｌ及びｌ１はそれぞれ、整数２～６であり；残りの変数は、第２４の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に上記される通りである。

【０３７７】

第２５の特定の実施形態では、式（Ｉ－ａ）に関して、Ａは、プロテアーゼによって切断可能なペプチドであり、残りの変数は、第２２、第２３、もしくは第２４の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。より具体的には、Ａは、腫瘍組織に発現するプロテアーゼによって切断可能なペプチドである。さらに別の特定の実施形態では、Ａは、それぞれ独立してＬまたはＤ異性体である、Ａｌａ、Ａｒｇ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、Ｃｉｔ、Ｃｙｓ、セリノ－Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、及びＶａｌからなる群より選択される、－ＮＨ－ＣＲ１Ｒ２－Ｓ－Ｌ１－Ｄと共有結合されるアミノ酸を有するペプチドである。より具体的には、－ＮＨ－ＣＲ１Ｒ２－Ｓ－Ｌ１－Ｄに結合されるアミノ酸は、Ｌアミノ酸である。

【０３７８】

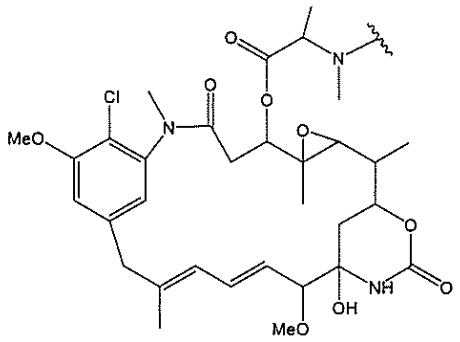
ある特定の実施形態では、Ａは、２～５個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり、残りの変数は、第２５の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。より具体的には、Ａは、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｖ

ａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｃｉｔ、Ｌｅｕ－Ｃｉｔ、Ｉｌｅ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ａｌａ、Ｐｈｅ－Ｎ^{9}－トシル－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｎ^{9}－ニトロ－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｖａｌ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号５５）、β－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号５６）、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ（配列番号５７）、Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ａｒｇ－Ａｒｇ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｍｅｔ、Ｇｌｎ－Ｖａｌ、Ａｓｎ－Ａｌａ、Ｇｌｎ－Ｐｈｅ、Ｇｌｎ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｐｒｏ、及びＤ－Ａｌａ－ｔＢｕ－Ｇｌｙからなる群より選択され、各ペプチドの最初のアミノ酸は、Ｌ$_{2}$基に結合され、各ペプチドの最後のアミノ酸は、－ＮＨ－ＣＲ^{1}Ｒ^{2}－Ｓ－Ｌ$_{1}$－Ｄに結合される。さらにより具体的には、Ａは、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｐｒｏ、またはＤ－Ａｌａ－ｔＢｕ－Ｇｌｙである。

【０３７９】

第２６の特定の実施形態では、式（Ｉ－ａ）に関して、Ｄは、メイタンシノイドであり、残りの変数は、第２２、第２３、第２４、もしくは第２５の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。より具体的には、Ｄは、以下の式：

【化１３１】

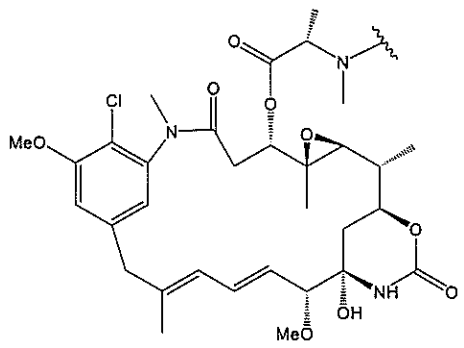


によって表される。

【０３８０】

さらにより具体的には、Ｄは、以下の式：

【化１３２】

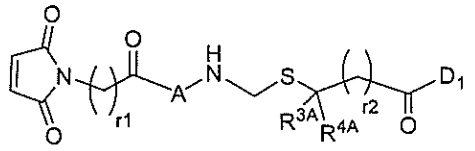


によって表される。

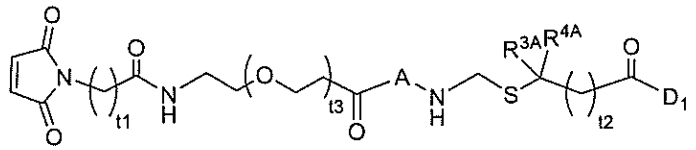
【０３８１】

第２７の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）における式（Ｉ）の化合物は、以下の式：

【化１３３】



（Ｉ－ｂ）；もしくは



（Ｉ－ｃ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：

Ｒ３Ａ及びＲ４Ａはそれぞれ独立して、ＨまたはＭｅであり；

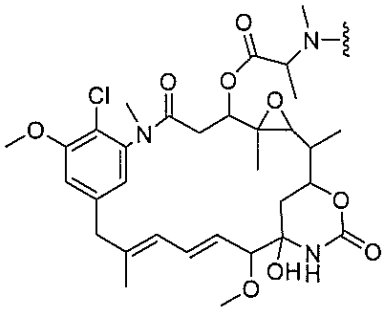
ｒ１及びｔ１は、それぞれ独立して、整数１～６であり；

ｒ２及びｔ２は、それぞれ独立して、整数１～７であり；

ｔ３は、整数１～１２であり；

Ｄ１は、以下の式：

【化１３４】



によって表され；

残りの変数は、第２５もしくは第２６の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３８２】

ある特定の実施形態では、Ａは、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｐｒｏ、またはＤ－Ａｌａ－ｔＢｕ－Ｇｌｙであり、残りの変数は、第２８の特定の実施形態に記載される通りである。

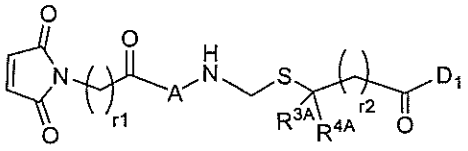
【０３８３】

ある特定の実施形態では、ｒ１は、整数２～４であり；ｒ２は、整数３～５であり；残りの変数は、第２７の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

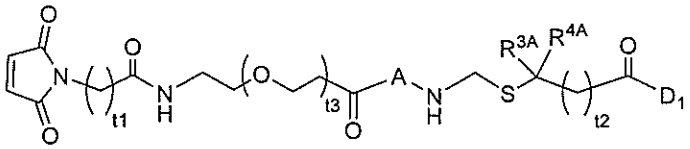
【０３８４】

第２８の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）における式（Ｉ）の化合物は、以下の式：

【化１３５】



（Ｉ－ｄ）；もしくは



（Ｉ－ｅ）

によって表され；
式中：
ｒ１及びｔ１はそれぞれ、整数２～６であり；
ｒ２及びｔ２はそれぞれ、整数２～５であり；
ｔ３は、整数２～１２であり；残りの変数は、第２７の特定の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態に記載される通りである。

【０３８５】

ある特定の実施形態では、Ｒ３Ａ及びＲ４Ａはいずれもメであり、残りの変数は、第２８の特定の実施形態に記載される通りである。

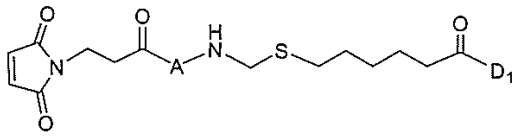
【０３８６】

ある特定の実施形態では、Ｒ３Ａ及びＲ４Ａはいずれもであり、残りの変数は、第２８の特定の実施形態に記載される通りである。

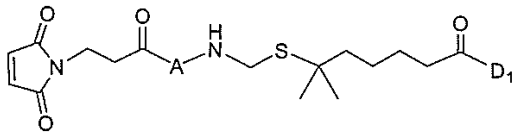
【０３８７】

第２９の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）における式（Ｉ）の化合物は、以下の式：

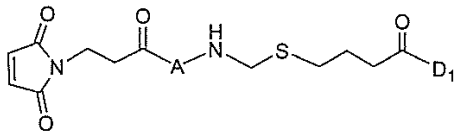
【化１３６】



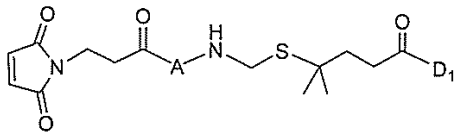
（Ｉ－ｆ）；



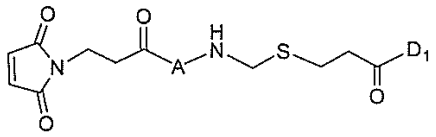
（Ｉ－ｇ）；



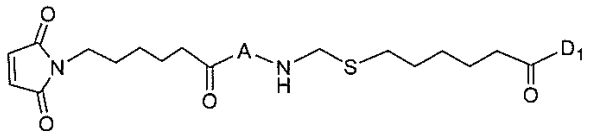
（Ｉ－ｈ）；



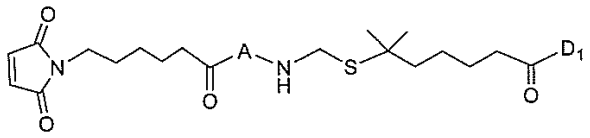
（Ｉ－ｉ）；



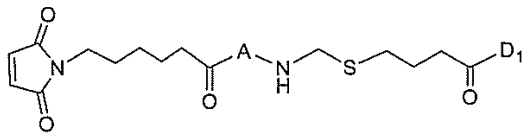
（Ｉ－ｊ）；



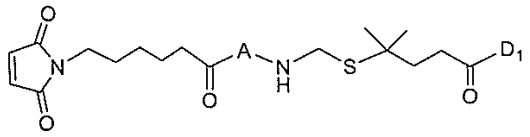
（Ｉ－ｋ）；



（Ｉ－ｌ）；

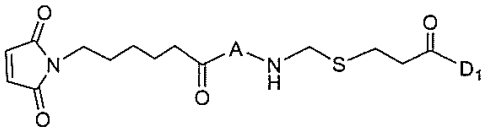


（Ｉ－ｍ）；

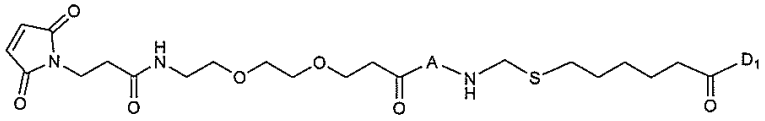


（Ｉ－ｎ）；

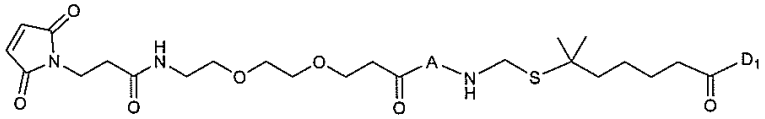
【化１３７】



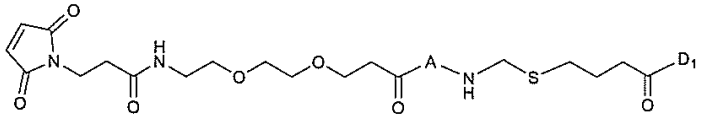
（Ｉ－ｏ）；



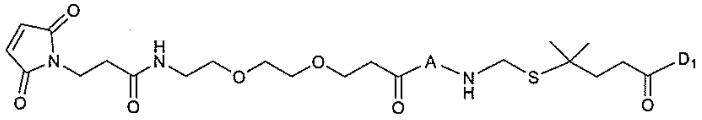
（Ｉ－ｐ）；



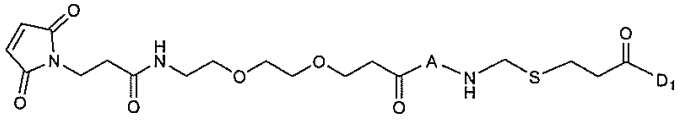
（Ｉ－ｑ）；



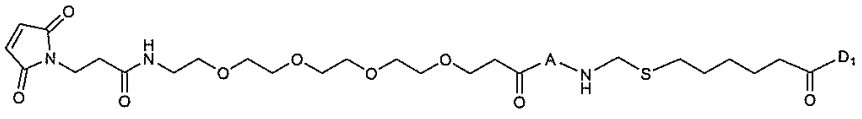
（Ｉ－ｒ）；



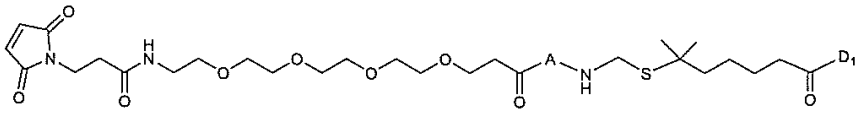
（Ｉ－ｓ）；



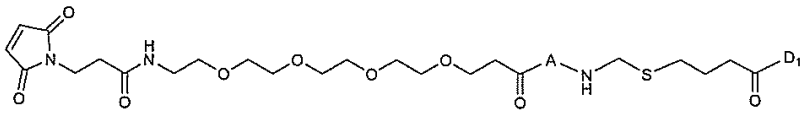
（Ｉ－ｔ）；



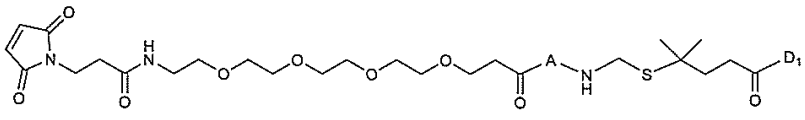
（Ｉ－ｕ）；



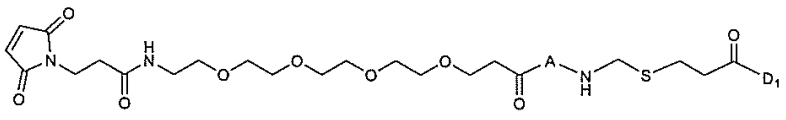
（Ｉ－ｖ）；



（Ｉ－ｗ）；



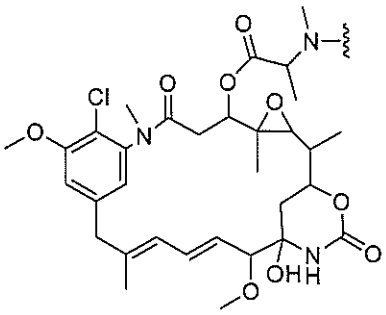
（Ｉ－ｘ）；もしくは



（Ｉ－ｙ）

によって表されるか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中：
Ａは、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｐｒｏ、またはＤ－Ａｌａ－ｔＢｕ－Ｇｌｙであり；
Ｄ１は、以下の式：

【化１３８】

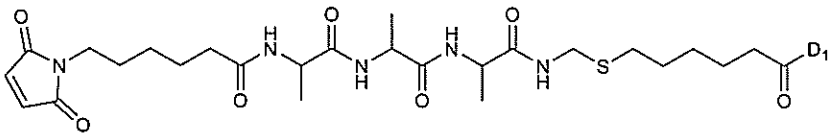


によって表される。

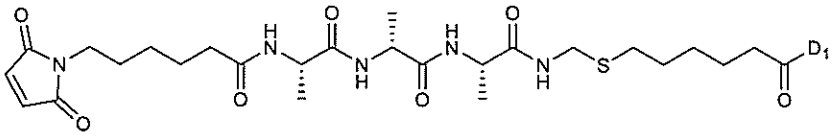
【０３８８】

第３０の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法（例えば、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、もしくは第１０の実施形態、またはそこに記載される任意の実施形態の方法）における式（Ｉ）の化合物は、以下の式：

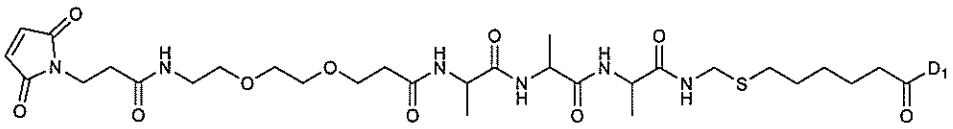
【化１３９】



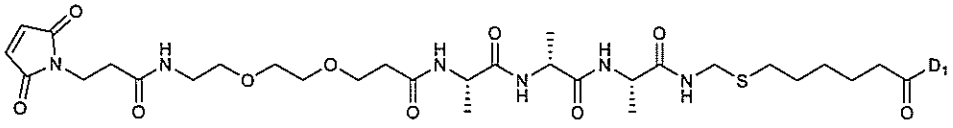
（Ｉ１０）；



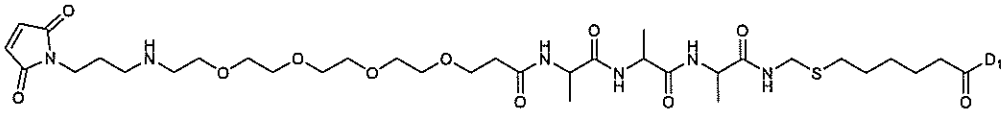
（Ｉ１１）；



（Ｉ１２）；

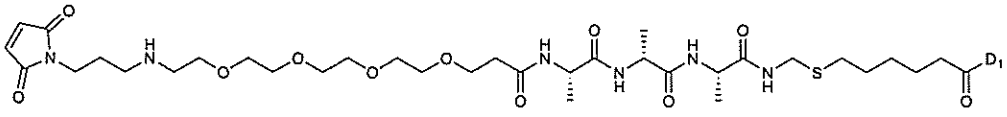


（Ｉ１３）；



（Ｉ１４）；

または

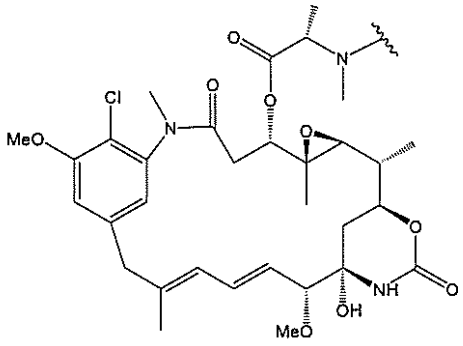


（Ｉ１５）に

によって表され、

式中、Ｄ１は、以下の式：

【化１４０】

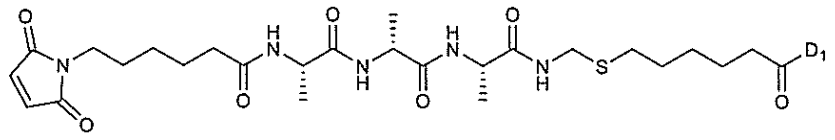


によって表される。

【０３８９】

ある特定の実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、式（Ｉ１１）：

【化１４１】



（Ｉ１１）

によって表される。

式（Ｉ１１）の化合物は、ＤＭ２１－ＣまたはＭａｌ－ＬＤＬ－ＤＭまたはＭａｌＣ５－ＬＤＬ－ＤＭとも称する。

【０３９０】

ある特定の実施形態では、上記の式（Ｉ）の化合物に関して、薬学的に許容される塩は、ナトリウム塩またはカリウム塩である。ある特定の実施形態では、上記の式（Ｉ）の化合物に関して、薬学的に許容される塩は、ナトリウム塩である。

【０３９１】

５．免疫複合体、医薬組成物、及び使用方法

本発明はまた、本発明の方法によって調製される本明細書に記載の複合体を提供する。本明細書に記載の複合体が含まれる医薬組成物も提供される。

【０３９２】

本明細書に記載の医薬組成物は、任意の数の方法で局所治療または全身治療のいずれにも投与することができる。投与は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、坐剤、スプレー、液体、及び粉末などの局所（膣及び直腸送達を含む粘膜など）；肺（例えば、ネブライザーによるものを含む、粉末またはエアロゾルの吸入または噴霧による；気管内、鼻腔内、表皮、及び経皮）；経口；または静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、または筋肉内の注射または注入；もしくは頭蓋内（例えば、髄腔内または脳室内）を含む非経口であり得る。いくつかの特定の実施形態では、投与は静脈内である。本明細書に記載の医薬組成物はまた、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏで使用することができる。

【０３９３】

本発明は、哺乳動物（例えば、ヒト）における、異常な細胞増殖の阻害方法、または増殖性障害の治療方法を含み、これには、本発明の免疫複合体または医薬組成物を治療有効量で上記哺乳動物に投与することを含む。

【０３９４】

ある特定の実施形態では、哺乳動物における異常な細胞増殖または増殖性障害は、血液癌、白血病、またはリンパ腫を含むがんである。ある特定の実施形態では、増殖性障害は、

リンパ器官のがん、または血液学的悪性腫瘍である。

【０３９５】

例えば、がんは、急性骨髄性白血病（ＣＤ３３－低ＡＭＬ、Ｐ－糖タンパク質陽性ＡＭＬ、再発ＡＭＬ、または難治性ＡＭＬを含む、ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）（ＣＭＬの急性転化及びＣＭＬ関連エーベルソンがん遺伝子（Ｂｃｒ－ＡＢＬ転座）を含む）、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）（急性Ｂリンパ芽球性白血病またはＢ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）を含むが、これに限定されない）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）（リヒター症候群またはＣＬＬのリヒター転化を含む）、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性前骨髄球性白血病（ＡＰＬ）、Ｂ細胞慢性リンパ増殖性疾患（Ｂ－ＣＬＰＤ）、非定型慢性リンパ性白血病（好ましくは顕著なＣＤ１１ｃ発現）、びまん性大細胞型Ｂ細胞性リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍（ＢＰＤＣＮ）、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）（マントル細胞白血病（ＭＣＬ）及び小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）を含む）、ホジキンリンパ腫、全身性肥満細胞症、及びバーキットリンパ腫からなる群より選択することができる。

【０３９６】

ある特定の実施形態では、がんは、少なくとも１つの負の予後因子、例えば、Ｐ糖タンパク質の過剰発現、ＥＶＩ１の過剰発現、ｐ５３改変、ＤＮＭＴ３Ａ変異、ＦＬＴ３内部タンデム重複を有する。

【０３９７】

ある特定の実施形態では、がんは、肺癌（例えば、非小細胞肺癌）、大腸癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、腎細胞癌、前立腺癌、食道癌、乳癌、頭頸部癌、子宮癌、卵巣癌、肝臓癌、子宮頸癌、甲状腺癌、精巣癌、骨髄癌、黒色腫、及びリンパ系癌からなる群より選択することができる。ある特定の実施形態では、がんは、非小細胞肺癌、大腸癌、胃癌、乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ））、または膵臓癌である。さらなる実施形態では、本発明の免疫複合体は、非小細胞肺癌（扁平上皮癌、非扁平上皮細胞、腺癌、または大細胞未分化癌）、大腸癌（腺癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、原発大腸リンパ腫、平滑筋肉腫、または扁平上皮癌）、または乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ））の治療に有用であり得る。

【実施例】

【０３９８】

実施例１．還元剤スクリーニング及び抗体前処理

還元剤スクリーニング

部位特異的結合部位を含有する抗ＣＤ１２３抗体中の改変システインを還元する能力について、様々な還元剤をスクリーニングした。すべての反応に関して、２０ｍＭヒスチジン（ｐＨ６．０）中５０ｍｇ／ｍＬの抗体ストック溶液をリン酸カリウム（ｐＨ６．０）緩衝液に希釈して、最終リン酸カリウム濃度を５０ｍＭにした。続いて、必要量のＤＭＡ及びＤＭＡに可溶性である適切なホスフィンストックを反応溶液に添加して、２．０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度、１０％（ｖ／ｖ）ＤＭＡ、及び抗体に対して指定数のホスフィン当量（ｍｏｌ：ｍｏｌ）を得た。続いて、反応混合物を２５℃で４時間反応させた。還元反応が完了したら、ＤＭＡ中１０ｍＭのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８マレイミドのストックを使用して、抗体に対して４０（ｍｏｌ：ｍｏｌ）当量のＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８－マレイミドを反応に導入した。２５℃で一晩インキュベートした後、２８０ｎｍでの抗体の公知の吸光係数、ならびに２８０ｎｍ及び４９３ｎｍでのＡＦ４８８－ｍａｌの公知の吸光係数を用いたＳＥＣクロマトグラフィーにより標識度を判定した。結果を以下の表Ａに示す。

【表２】

表Ａ

ホスフィン当量	ビス（ｐ－スルホナトフェニル）フェニルホスフィン二水和物	２－（ジフェニルホスフィノ）ベンゼンスルホン酸	２－（ジフェニルホスフィノ）安息香酸	TCEP	２－（ジフェニルホスフィノ）エチルアミン	２－（ジフェニルホスフィノ）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルベンジルアンモニウムトリフラート	２－（ジシクロヘキシルホスフィノ）ベンゼンスルホン酸
0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0 .5
2	0.835	0.78	2.08	2.41	1.97	0.514	0.69
3	0.845	0.74	2.605	3.36	2.14	0.48	0.86
5	0.88	N/A	4.5	3.94	2.62	0.51	0.63
10	1.02	0.65	7.1	7.24	5.16	0.633	0.05

これらのデータの結果は、ホスフィン２－（ジフェニルホスフィノ）安息香酸、ＴＣＥＰ、及び２－（ジフェニルホスフィノ）エチルアミンが、抗体のジスルフィドを還元でき、それがＡＦ４８８マレイミドによる後続の標識に利用されることを示している。

【０３９９】

別の実験では、部位特異的結合部位を含有する抗ＣＤ１２３抗体中の改変システインを還元する能力について、２つの特定のホスフィンをスクリーニングした。最初に抗体を５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）に希釈した。この溶液に、抗体に対して適切な当量数（ｍｏｌ：ｍｏｌ）の指定された還元剤及びＤＭＡを添加して、最終濃度５ｍｇ／ｍＬの抗体及び５％（ｖ／ｖ）ＤＭＡを得た。混合物を２５℃で４時間反応させた。この工程が完了したら、還元された抗体のアリコートを取り出し、ｐＨ６．０のリン酸カリウム緩衝液で希釈し、２．５ｍｇ／ｍＬの抗体及び１０％（ｖ／ｖ）ＤＭＡで、２０ｍｏｌ：ｍｏｌ当量のＡＦ４８８－ｍａｌ対抗体と反応させた。混合物を２５℃で１８時間反応させた後、ＳＥＣにより２８０ｎｍ及び４９３ｎｍでの標識度をモニターした。還元溶液の残部もまた、５０ｍＭの緩衝液濃度を維持してｐＨ６．０のリン酸カリウム緩衝液で希釈した。次に、ＤＭＡをストック溶液とし、ＤＨＡＡと還元剤とのモル比が１．５：１で、ＤＭＡ及びＤＨＡＡを反応物に添加した。再酸化反応混合物の最終組成は、指定数のＤＨＡＡ当量である２．５ｍｇ／ｍＬの抗体及び５％（ｖ／ｖ）ＤＭＡである。この溶液を２５℃で１８時間インキュベートした後、結合反応を開始した。５０ｍＭの緩衝液濃度を維持してｐＨ６．０のリン酸カリウムで反応混合物を希釈した。この溶液に、ＤＭＡ、及び抗体に対して１０モル当量のＡＦ４８８－ｍａｌを添加した。結合反応混合物の最終組成は、２．０ｍｇ／ｍＬの抗体、１０モル当量のＡＦ４８８－ｍａｌ、及び１０％（ｖ／ｖ）ＤＭＡであった。反応混合物を２５℃で１８時間反応させた。反応が完了したら、２８０ｎｍでの抗体の公知の吸光係数、ならびに２８０ｎｍ及び４９３ｎｍでのＡＦ４８８－ｍａｌの公知の吸光係数を用いたＳＥＣクロマトグラフィーによりＡＦ４８８－ｍａｌでの標識度を判定した。本試験の結果を以下の表Ｂに示す。

【表３】

表Ｂ

	２－（ジフェニルホスフィノ）エチルアミン		３－（ジフェニルホスフィノ）プロピルアミン	
当量数（No of Equiv.）	還元DAR（20当量Alexa）	複合体形成後DAR（1.5×DHAA;5当量Alexa）	還元DAR（20当量Alexa）	複合体形成後DAR（1.5×DHAA;5当量Alexa）
5	3.25	0.93	6.82	1.62
10	5.96	1.49	9.38	2.26
16/15	7.17	1.88	9.49	2.39

これらの試験は、２－（ジフェニルホスフィノ）エチルアミンと３－（ジフェニルホスフィノ）プロピルアミンのいずれもが、抗体の天然の鎖間ジスルフィド及び改変システインジスルフィドを還元できる有効な還元剤であることを示している。さらに、過剰のＤＨＡＡを用いてワンポット反応で再酸化すると、予測されるＤＡＲ２の複合体を得ることができる。

【０４００】

別の実験では、ホスフィン及び非ホスフィン還元剤を使用して、ｐＨ７．５で還元してプロセスを試験した。最初に抗ＣＤ１２３抗体を５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．５）に希釈した。この溶液に、抗体に対して適切な当量数（ｍｏｌ：ｍｏｌ）の指定された還元剤及びＤＭＡを添加して、最終濃度５ｍｇ／ｍＬの抗体及び５％（ｖ／ｖ）ＤＭＡを得た。混合物を２５℃で４時間反応させた。この工程が完了したら、５０ｍＭの緩衝液濃度を維持してｐＨ７．５のリン酸カリウム緩衝液で反応溶液をさらに希釈した。次に、ＤＭＡをストック溶液とし、ＤＨＡＡと還元剤とのモル比が１．５：１で、ＤＭＡ及びＤＨＡＡを反応物に添加した。再酸化反応混合物の最終組成は、２．５ｍｇ／ｍＬの抗体、指定数のＤＨＡＡ当量、及び５％（ｖ／ｖ）ＤＭＡであった。この溶液を２５℃で１８時間インキュベートした後、結合反応を開始した。５０ｍＭの緩衝液濃度を維持してｐＨ６．０のリン酸カリウムで希釈することにより、反応混合物のｐＨを低下させた。この溶液に、ＤＭＡ、及び抗体に対して１０モル当量のＡＦ４８８－ｍａｌを添加した。結合反応混合物の最終組成は、２．０ｍｇ／ｍＬの抗体、１０モル当量のＡＦ４８８－ｍａｌ、及び１０％（ｖ／ｖ）ＤＭＡであった。反応混合物を２５℃で１８時間反応させた。反応が完了したら、２８０ｎｍでの抗体の公知の吸光係数、ならびに２８０ｎｍ及び４９３ｎｍでのＡＦ４８８－ｍａｌの公知の吸光係数を用いたＳＥＣクロマトグラフィーによりＡＦ４８８－ｍａｌでの標識度を判定した。本試験の結果を以下の表Ｃに示す。

【表４】

表Ｃ

反応	還元剤	ＤＴＴ（抗体に対する当量）	ＤＨＡＡ（ＤＴＴに対する当量）	ＡＦ４８８－ｍａｌ（抗体に対する当量）	抗体あたりのＡＦ４８８標識
１	ＤＴＴ	５	１．５	１０	１．３
２	ＤＴＴ	１０	１．５	１０	１．６
３	ＤＴＴ	２０	１．５	１０	１．４
４	ＴＣＥＰ	１０	１．５	１０	１．７
５	ＴＣＥＰ	１５	１．５	１０	１．８
６	ＴＣＥＰ	２０	１．５	１０	２．０
７	２－（ジフェニルホスフィノ）エチルアミン	５	１．５	１０	１．３
８	２－（ジフェニルホスフィノ）エチルアミン	１０	１．５	１０	１．７
９	２－（ジフェニルホスフィノ）エチルアミン	１５	１．５	１０	１．８
１０	３－（ジフェニルホスフィノ）プロピルアミン	５	１．５	１０	２．０
１１	３－（ジフェニルホスフィノ）プロピルアミン	１０	１．５	１０	１．６
１２	３－（ジフェニルホスフィノ）プロピルアミン	１５	１．５	１０	２．１

【０４０１】

酸化剤及び還元剤の濃度とＤＡＲへの影響

ＤＨＡＡと２－ジフェニルホスフィノエチルアミンとの比がＤＡＲに及ぼす影響について調べた。最初に抗ＣＤ１２３抗体を５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）に希釈した。この溶液に、抗体に対して適切な当量数（ｍｏｌ：ｍｏｌ）の２－（ジフェニルホスフィノ）エチルアミン及びＤＭＡを添加して、最終濃度５ｍｇ／ｍＬの抗体及び５％（ｖ／ｖ）ＤＭＡを得た。混合物を２５℃で４時間反応させた。この工程が完了したら、還元された抗体のアリコートを取り出し、ｐＨ６．０のリン酸カリウム緩衝液で希釈し、２．５ｍｇ／ｍＬの抗体及び１０％（ｖ／ｖ）ＤＭＡで、２０ｍｏｌ：ｍｏｌ当量のＡＦ４８８－ｍａｌ対抗体と反応させた。混合物を２５℃で１８時間反応させた後、ＳＥＣにより２８０ｎｍ及び４９３ｎｍでの標識度をモニターした。還元溶液の残部もまた、５０ｍＭの緩衝液濃度を維持してｐＨ６．０のリン酸カリウム緩衝液で希釈した。次に、ＤＭＡをストック溶液とし、ＤＨＡＡ対還元剤を指定モル比で、ＤＭＡ及びＤＨＡＡを反応物に添加した。再酸化反応混合物の最終組成は、指定数のＤＨＡＡ当量である２．５ｍｇ／ｍＬの抗体及び５％（ｖ／ｖ）ＤＭＡであった。この溶液を２５℃で１８時間インキュベートした後、結合反応を開始した。５０ｍＭの緩衝液濃度を維持してｐＨ６．０のリン酸カリウムで反応混合物を希釈した。この溶液に、ＤＭＡ、及び抗体に対して１０モル当量のＡＦ４８８－ｍａｌを添加した。結合反応混合物の最終組成は、２．０ｍｇ／ｍＬの抗体、１０モル当量のＡＦ４８８－ｍａｌ、及び１０％（ｖ／ｖ）ＤＭＡであった。反応混合

物を２５℃で１８時間反応させた。反応が完了したら、２８０ｎｍでの抗体の公知の吸光係数、ならびに２８０ｎｍ及び４９３ｎｍでのＡＦ４８８－ｍａｌの公知の吸光係数を用いたＳＥＣクロマトグラフィーによりＡＦ４８８－ｍａｌでの標識度を判定した。本試験の結果を以下の表Ｄ及び図１に示す。

【表５】

表Ｄ

２－ジフェニルホスフィノエチルアミンの当量	DAR（還元後；20当量AF488-Mal）
0	0.53
5	3.25
6	4.19
8	5.51
10	5.96
12	6.44
16	7.17

これらのデータは、２－（ジフェニルホスフィノ）エチルアミンにより有効な結合が起こることを示している。特に、ホスフィンの当量が増加するにつれて、ＡＦ－４８８標識度の上昇が観察される。さらに、ホスフィンに対して１．０～２．０ｍｏｌ：ｍｏｌ過剰のＤＨＡＡでは、ＡＦ－４８８標識に有意差は観察されず、抗体の天然の鎖間ジスルフィド結合の完全な再酸化を示している。

【０４０２】

抗体濃縮試験

高抗体濃度がＤＡＲに及ぼす影響を、ワンポット結合法を使用して評価した。最初に抗ＡＤＡＭ９抗体を５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）に希釈した。この溶液に、抗体に対して２５当量（ｍｏｌ：ｍｏｌ）の指定されたホスフィン及びＤＭＡを添加して、最終濃度１０ｍｇ／ｍＬの抗体及び５％（ｖ／ｖ）ＤＭＡを得た。混合物を２５℃で４時間反応させた。この工程が完了したら、還元された抗体のアリコートを取り出し、ｐＨ６．０のリン酸カリウム緩衝液で希釈し、低濃度反応及び高濃度反応用に、それぞれ４．０または７．５ｍｇ／ｍＬの抗体及び１０％（ｖ／ｖ）ＤＭＡで、２５ｍｏｌ：ｍｏｌ当量のＡＦ４８８－ｍａｌ対抗体と反応させた。混合物を２５℃で４時間反応させた後、ＳＥＣにより２８０ｎｍ及び４９３ｎｍでの標識度をモニターした。還元溶液の残部もまた、５０ｍＭの緩衝液濃度を維持してｐＨ６．０のリン酸カリウム緩衝液で希釈した。次に、ＤＭＡをストック溶液とし、ＤＨＡＡと還元剤とのモル比が１：１で、ＤＭＡ及びＤＨＡＡを反応物に添加した。再酸化反応混合物の最終組成は、抗体に対して２５ｍｏｌ：ｍｏｌ当量のＤＨＡＡである、４または７．５ｍｇ／ｍＬの指定された抗体、及び７．５％（ｖ／ｖ）ＤＭＡであった。この溶液を２５℃で１８時間インキュベートした後、結合反応を開始した。５０ｍＭの緩衝液濃度を維持してｐＨ６．０のリン酸カリウムで反応混合物を希釈した。この溶液に、ＤＭＡ、及び抗体に対して５モル当量のＡＦ４８８－ｍａｌを添加した。結合反応混合物の最終組成は、低濃度反応及び高濃度反応用に、それぞれ３．５または７ｍｇ／ｍＬの抗体、５モル当量のＡＦ４８８－ｍａｌ、及び１０％（ｖ／ｖ）ＤＭＡであった。反応混合物を２５℃で１８時間反応させた。反応が完了したら、２８

０ｎｍでの抗体の公知の吸光係数、ならびに２８０ｎｍ及び４９３ｎｍでのＡＦ４８８－ｍａｌの公知の吸光係数を用いたＳＥＣクロマトグラフィーによりＡＦ４８８－ｍａｌでの標識度を判定した。本試験の結果を以下の表Ｅに示す。

【表６】

表Ｅ

反応	ホスフィン	還元濃度（ｍｇ／ｍＬ）	再酸化濃度（ｍｇ／ｍＬ）	結合濃度（ｍｇ／ｍＬ）	還元反応後のＡＦ４８８－ｍａｌ標識	最終複合体のＡＦ４８８－ｍａｌ標識
１	ＴＣＥＰ	１０	４	３．５	８．４５	１．５３
２	トリス（ヒドロキシプロピル）ホスフィン	１０	４	３．５	９．７２	１．８８
３	トリス（ヒドロキシプロピル）ホスフィン	１０	７．５	７	９．６３	１．９７
４	２－（ジフェニルホスフィノ）エチルアミン	１０	４	３．５	８．７６	１．９３
５	２－（ジフェニルホスフィノ）エチルアミン	１０	７．５	７	８．６７	１．８５
６	３－（ジフェニルホスフィノ）プロピルアミン	１０	４	３．５	９．３７	１．９４
７	３－（ジフェニルホスフィノ）プロピルアミン	１０	７．５	７	８．９８	２．１５
８	ビス（３－アミノプロピル）フェニルホスフィン	１０	４	３．５	９．５１	１．９１
９	ビス（３－アミノプロピル）フェニルホスフィン	１０	７．５	７	８．２８	２．０５

様々なホスフィンを用いた、還元、再酸化、及び低濃度または高濃度での結合後、すべての反応が、抗体あたり標識の目標値２．０に近接するＡＦ４８８－ｍａｌ標識を示した。

【０４０３】

時間及び温度がＴＣＥＰの還元に及ぼす影響

時間及び温度がＴＣＥＰの還元に及ぼす影響を、ワンポット結合法を使用して調べた。還元反応は、５％ＤＭＡを加えたｐＨ６．０、２５ｍＭコハク酸中１０ｍｇ／ｍＬの抗ＡＤＡＭ９抗体濃度で実施した。反応は、２５ｍｏｌ：ｍｏｌ当量のＴＣＥＰで開始し、２５

℃、３０℃、または３５℃のいずれかで２、４、６、８、または２０時間実施した。再酸化反応は、８％ＤＭＡを加えたｐＨ６．０、２５ｍＭコハク酸中７ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。反応は、ＴＣＥＰに対して１．５倍過剰のＤＨＡＡで開始し、２５℃で１６～２０時間実施した。再酸化された抗体をそのまま使用して、ＡＦ４８８－ｍａｌペイロードとの結合反応を開始した。この結合反応は、１０％ＤＭＡを加えたｐＨ６．０、２５ｍＭコハク酸中５ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。反応は、５．０ｍｏｌ：ｍｏｌ当量のＡＦ４８８－ｍａｌで開始し、２５℃で１６～２０時間実施した。各ＡＦ４８８－ｍａｌ反応の終了時、ＳＥＣにより、単量体及びＡＦ４８８－ｍａｌ標識度について試料を分析した。２８０ｎｍでの抗体の公知の吸光係数、ならびに２８０ｎｍ及び４９３ｎｍでのＡＦ４８８－ｍａｌの公知の吸光係数を用いることによりＡＦ４８８－ｍａｌでの標識度を判定した。これらの反応の詳細を表Ｆならびに図２及び３に示す。

【表７】

表Ｆ

試料	還元時間（時間）	還元温度（℃）	単量体比率（％）	ＳＥＣ ＤＡＲ
１	２	２５	９６．３０	１．５３
２	４	２５	９７．４４	１．８６
３	６	２５	９７．７４	１．９２
４	８	２５	９８．２０	２．０５
５	２０	２５	９７．１３	２．２８
６	２	３０	９７．３２	１．７５
７	４	３０	９８．１７	２．０１
８	６	３０	９８．４１	２．１３
９	８	３０	９８．４６	２．１９
１０	２０	３０	９３．３６	２．３４
１１	２	３５	９７．７９	１．９７
１２	４	３５	９８．４５	２．１８
１３	６	３５	９４．８１	２．２４
１４	８	３５	９３．５１	２．２９
１５	２０	３５	８５．９９	２．４２

本試験は、ＴＣＥＰ還元反応の時間及び温度が最終複合体の標識度に影響を及ぼすことを実証しており、還元時間が最短であると、ＡＦ４８８－ｍａｌによる標識度が最小となる。さらに昇温では複合体の安定性に対する影響が観察され、複合体の単量体比率（％）が時間に相関して減少することが見出された。

【０４０４】

ＴＣＥＰ当量のスクリーニング

ＴＣＥＰの濃度がシステイン還元に及ぼす影響をワンポット結合法及び抗ＡＤＡＭ９抗体を使用して調べた。還元反応は、５％ＤＭＡを加えたｐＨ６．０、２５ｍＭコハク酸中１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。この還元反応は、抗体に対して８、１０、１５、２０、または２５いずれかの当量のＴＣＥＰで開始し、２５℃で８時間実施した。再酸化反応は、ＴＣＥＰに対して１．５倍過剰のＤＨＡＡの存在下で、８％ＤＭＡを加えたｐＨ６．０、２５ｍＭコハク酸中７ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施し、２５℃で１６～２０時間実施した。再酸化された抗体反応混合物をそのまま使用して、ＡＦ－４８８Ｍａｌ標識との結合反応を開始した。この結合反応は、１０％ＤＭＡを加えたｐＨ６．０、２５ｍＭコハク酸中５ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。反応は、抗体に対して５モル当量のＡＦ－４８８Ｍａｌで開始し、２５℃で１６～２０時間実施した。反応が完了したら、２８０ｎｍ

での抗体の公知の吸光係数、ならびに２８０ｎｍ及び４９３ｎｍでのＡＦ４８８－ｍａｌの公知の吸光係数を用いたＳＥＣクロマトグラフィーによりＡＦ４８８－ｍａｌでの標識度を判定した。本試験の結果を以下の表Ｇ及び図４に示す。

【表８】

表Ｇ

試料	ＴＣＥＰ当量	還元時間（時間）	ＳＥＣ　ＤＡＲ
1	8	8	１．６２
2	１０	8	１．７３
3	１５	8	１．９１
4	２０	8	１．９５
5	２５	8	２．０３

これらのデータは、最終的な複合体ペイロード充填量がモル過剰のホスフィンに依存することを示している。ｐＨ６．０のＴＣＥＰで、１．９超の標識度を達成するには、１５当量以上の還元剤が必要である。

【０４０５】

実施例２：ＴＣＥＰ及び３－（ジフェニルホスフィノ）プロピルアミン（ＤＰＰＡ）を使用するワンポット結合プロセスの比較

これらの実験は、抗ＡＤＡＭ９抗体を使用したＡｂ規模２５ｍｇでの、ＴＣＥＰによるｐＨ７．５の還元及びＤＰＰＡによるｐＨ６．０の還元の有効性を確認及び比較するために設計した。

【０４０６】

ＴＣＥＰワンポットプロセスの場合、還元反応は、５％ＤＭＡを加えたｐＨ７．５、５０ｍＭ　ＫＰｉ中１２ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。この反応は、抗体に対して２７モル当量のＴＣＥＰで開始し、２５℃で４時間実施した。還元された抗体を使用して再酸化反応を開始した。これは、７．５％ＤＭＡを加えたｐＨ７．５、５０ｍＭ　ＫＰｉ中１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。この再酸化反応は、ＤＨＡＡとＴＣＥＰとのモル比１：１で開始し、２５℃で４時間実施した。再酸化された抗体は、結合前に１Ｍ酢酸でｐＨを６．０に調整した。この結合反応は、１５％ＤＭＡを含有するｐＨ６．０、５０ｍＭ　ＫＰｉ中８ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。この結合反応は、抗体に対して５．４モル当量のＤＭ２１－Ｃで開始し、２５℃で８～１２時間実施した。

【０４０７】

ＤＰＰＡワンポットプロセスの場合、還元反応は、抗体に対して１６モル当量のＤＰＰＡの存在下で、５％ＤＭＡを含有するｐＨ６．０、２５ｍＭコハク酸中１２ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施し、２５℃で４時間実施した。還元された抗体を使用して再酸化反応を開始した。これは、７．５％ＤＭＡを含有するｐＨ６．０、２５ｍＭコハク酸中１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。この再酸化反応は、ＤＨＡＡとＤＰＰＡとのモル比１：１で開始し、２５℃で１３時間実施した。この結合反応は、１５％ＤＭＡを加えたｐＨ６．０、２５ｍＭコハク酸中８ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。この結合反応は、抗体に対して５．４モル当量のＤＭ２１－Ｃで開始し、２５℃で８～１２時間実施した。ＳＥＣにより、単量体及びＤＡＲについて粗複合体を分析した。ＴＣＥＰ及びＤＰＰＡを使用したワンポット結合プロセスの結果を表Ｈに詳細に示す。

【表９】

表Ｈ

試料	還元剤	還元ｐＨ	再酸化ｐＨ	結合ｐＨ	ホスフィン当量	単量体比率（％）	ＳＥＣ ＤＡＲ
１	ＴＣＥＰ	７．５	７．５	６	２７．１７	９８．０	１．８２
２	ＤＰＰＡ	６	６	６	１６．３０	９７．７	１．９８

このデータは、以前の諸反応の知見を裏付けており、ｐＨ６．０のＤＰＰＡ還元による結合は、ｐＨ７．５のＴＣＥＰ還元を特徴とする結合よりも高いＤＡＲ値が得られることを確定している。これら２種の還元条件について単量体レベルを比較すると、ｐＨ７．５のＴＣＥＰ還元では、０．３％高い単量体レベルが得られた。

【０４０８】

実施例３：還元剤としてＴＣＥＰを使用するワンポットプロセスのための還元反応ｐＨのスクリーニング

本実験は、還元剤としてＴＣＥＰ、抗ＡＤＡＭ９抗体、及びＤＭ２１－Ｃペイロードを使用するワンポットプロセスのための還元反応ｐＨをスクリーニングするために設計した。

【０４０９】

投入する抗ＡＤＡＭ９抗体溶液（１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．０）中２５ｍｇ／ｍＬの抗体、９％スクロース）を適切なｐＨの２００ｍＭリン酸カリウム緩衝液で希釈して、リン酸カリウム最終濃度が５０ｍＭで、ｐＨ７．０、８．０、及び８．５である異なるｐＨの抗体ストック溶液を調製した。続いて、これらの抗体溶液を使用して、対応するｐＨの還元反応を開始した。還元反応は、５％ＤＭＡを加えたｐＨ７．０、８．０、または８．５の５０ｍＭリン酸カリウム中１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。反応は、抗体に対して２７モル当量のＴＣＥＰで開始し、２５℃で４時間実施した。還元された抗体溶液を、１Ｍ酢酸を使用してｐＨを６．０に調整した後、精製せずに使用して、再酸化反応を開始し、８％ＤＭＡを加えたｐＨ６．０、５０ｍＭリン酸カリウム中９ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。反応は、ＴＣＥＰに対して１．５倍モル過剰のＤＨＡＡで開始し、２５℃で１２～１６時間実施した。次に、再酸化された抗体をそのまま使用して結合反応を開始し、これは１５％ＤＭＡを含有するｐＨ６．０、５０ｍＭリン酸カリウム中８ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。反応は、５．４当量のＤＭ２１－Ｃで開始し、２５℃で８時間実施した。ＳＥＣにより、単量体比率（％）及びＤＡＲについて粗複合体を分析した。

【０４１０】

本実験の結果を以下の表Ｉに示す。特に、これらの結果は、還元反応のｐＨが７．０から８．５に上昇しても最終複合体に有意な影響は与えないことを示している。

【表１０】

表Ｉ

反応	還元ｐＨ	再酸化ｐＨ	結合ｐＨ	単量体比率（％）	ＳＥＣ ＤＡＲ
１	７．０	６．０	６．０	９７．３９	１．８１
２	８．０	６．０	６．０	９６．４２	１．７６
３	８．５	６．０	６．０	９６．００	１．７８

【０４１１】

実施例４：抗ＡＤＡＭ９薬物複合体の結合のためのワンポット結合プロセスの開発

ｐＨ調整なし、ｐＨ５．０でのワンポットプロセス

本実験は、９％スクロースを含有するｐＨ５．０、１０ｍＭ酢酸緩衝液中２５ｍｇ／ｍＬの抗ＡＤＡＭ９抗体が、ワンポットプロセスにおけるｐＨ調整しないｐＨ５．０での直接結合に適しているかどうかを決定するために設計した。

【０４１２】

還元反応は、５％ＤＭＡを加えたｐＨ５、１０ｍＭ酢酸＋９％スクロース中１２ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。反応は、抗体に対して指定モル過剰のＤＰＰＡで開始し、２５℃で１０時間実施した。還元された抗体を精製せずに使用して再酸化反応を開始した。これは、７．５％ＤＭＡを含有するｐＨ５．０、１０ｍＭ酢酸＋９％スクロース中１０ｍｇ／ｍＬで実施した。反応は、ＤＨＡＡとＤＰＰＡホスフィンとのモル比１：１で開始し、２５℃で１２時間実施した。再酸化された抗体を精製せずに使用して、ＤＭ２１－Ｃとの結合反応を開始した。これらの結合反応は、１５％ＤＭＡを含有するｐＨ５、１０ｍＭ酢酸＋９％スクロース中８ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。反応は、５．４当量のＤＭ２１－Ｃで開始し、２５℃で１２時間実施した。結合反応の終了時、ＳＥＣにより、単量体比率（％）及びＤＡＲについて試料を分析した。

【０４１３】

本実験の結果を以下の表Ｊに示す。特に、これらの結果は、ｐＨ５．０のワンポットプロセスにおいてＤＰＰＡを還元剤として使用して、ＤＡＲ２の複合体を調製できることを示している。

【表１１】

表Ｊ

反応	還元剤	ＤＰＰＡ当量	単量体比率（％）	ＳＥＣ　ＤＡＲ
１	ＤＰＰＡ	１１	９８．１２	２．１１
２	ＤＰＰＡ	１６	９７．５４	２．０７
３	ＤＰＰＡ	２２	９７．０５	２．１７
４	ＤＰＰＡ	２７	９５．７２	２．２６

【０４１４】

ＤＰＰＡを使用するワンポットプロセスのための反応温度のスクリーニング

本実験は、還元剤としてＤＰＰＡ、抗ＡＤＡＭ９抗体、及びＤＭ２１－Ｃペイロードを使用するワンポットプロセスのための反応温度をスクリーニングするために設計した。

【０４１５】

全反応に関して、投入する抗ＡＤＡＭ９抗体（１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．０）と９％スクロース中、約２５ｍｇ／ｍＬの抗体）をｐＨ６．５のリン酸カリウム緩衝液に希釈して、最終濃度５０ｍＭのリン酸カリウム緩衝液を得た。続いて、これらの抗体溶液を使用して、最終抗体濃度４．１ｍｇ／ｍＬの抗体で還元反応を開始した。抗体に対して１６モル当量のＤＰＰＡホスフィンを、ＤＭＡ共溶媒の最終濃度が５％の抗体溶液に添加した。還元反応を指定温度で４時間進行させた。ワンポットプロセスの期間、反応温度を指定値に維持した。次に、還元された抗体溶液を精製せずに使用して、再酸化反応を開始した。再酸化反応は、最終抗体濃度３．７ｍｇ／ｍＬで、ＤＰＰＡに対して１．５倍モル過剰のＤＨＡＡ酸化剤及び最終濃度７％のＤＭＡ共溶媒を用いて実施した。再酸化反応を８時間進行させた後、結合反応を開始した。５０ｍＭ、ｐＨ６．５の追加リン酸カリウムで希釈した後、濃度２．８ｍｇ／ｍＬの抗体に対して５．４モル当量のＤＭ２１－Ｃを、再酸化された抗体溶液に添加した。最終ＤＭＡ濃度１５％で８時間反応させた後、ＳＥＣにより単量体比率（％）及びＤＡＲについて粗反応混合物を分析した。本実験の結果を以下の表Ｋに示す。これらのデータに基づくと、ワンポットプロセスにおいて１８℃～２７℃の温度は、ＤＡＲ及び単量体比率（％）に影響しないことを見出した。

【表１２】

表Ｋ

反応	温度（℃）	ＤＡＲ（ＳＥＣ）	単量体比率（％）
１	２７	１．９７	９８．４６
２	２５	１．９６	９８．４７
３	２３	１．９８	９８．４６
４	２１	２．００	９８．４５
５	２２	２．０４	９８．５２
６	２０	２．０１	９８．４４
７	１８	２．０２	９８．５６

【０４１６】

ＤＰＰＡを使用するワンポットプロセスのためのｐＨのスクリーニング

本実験は、２５℃で、還元剤としてＤＰＰＡ、抗ＡＤＡＭ９抗体、及びＤＭ２１－Ｃペイロードを使用するワンポットプロセスのための反応ｐＨをスクリーニングするために設計した。

【０４１７】

全反応に関して、投入する抗ＡＤＡＭ９抗体（１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．０）と９％スクロース中、約２５ｍｇ／ｍＬの抗体）を指定ｐＨのリン酸カリウム緩衝液に希釈して、最終濃度５０ｍＭのリン酸カリウム緩衝液を得た。続いて、これらの抗体溶液を使用して、最終抗体濃度４．１ｍｇ／ｍＬの抗体で還元反応を開始した。抗体に対して１６モル当量のＤＰＰＡホスフィンを、ＤＭＡ共溶媒の最終濃度が５％の抗体溶液に添加した。還元反応を４時間進行させた。ｐＨ調整しないワンポットプロセスの期間、反応ｐＨを指定値に維持した。次に、還元された抗体溶液を精製せずに使用して、再酸化反応を開始した。再酸化反応は、最終抗体濃度３．７ｍｇ／ｍＬで、ＤＰＰＡに対して１．５倍モル過剰のＤＨＡＡ酸化剤及び最終濃度７％のＤＭＡ共溶媒を用いて実施した。適切なｐＨのリン酸カリウムストック緩衝液を反応物の希釈に使用して、標的抗体濃度を達成した。再酸化反応を８時間進行させた後、結合反応を開始した。適切なｐＨの追加リン酸カリウム緩衝液５０ｍＭで希釈した後、濃度２．８ｍｇ／ｍＬの抗体に対して５．４モル当量のＤＭ２１－Ｃを、再酸化された抗体溶液に添加した。最終ＤＭＡ濃度１５％で８時間反応させた後、ＳＥＣにより単量体比率（％）及びＤＡＲについて粗反応混合物を分析した。本実験の結果を以下の表Ｌに示す。

【表１３】

表Ｌ

反応	ｐＨ	ＤＡＲ（ＳＥＣ）	単量体比率（％）
１	６．６	１．９８	９８．４３
２	６．５	１．９６	９８．４７
３	６．４	１．９９	９８．４７
４	６．３	１．９９	９８．５３

【０４１８】

ＤＰＰＡを使用するワンポットプロセスのためのホスフィン濃度のスクリーニング

本実験は、２５℃で、還元剤としてＤＰＰＡ、抗ＡＤＡＭ９抗体、及びＤＭ２１－Ｃペイロードを使用するワンポットプロセスにおいてホスフィンの量をスクリーニングするために設計した。

【０４１９】

全反応に関して、投入する抗ＡＤＡＭ９抗体（１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．０）と

９％スクロース中、約２５ｍｇ／ｍＬの抗体）をｐＨ６．５のリン酸カリウム緩衝液に希釈して、最終濃度５０ｍＭのリン酸カリウム緩衝液を得た。続いて、これらの抗体溶液を使用して、最終抗体濃度４．１ｍｇ／ｍＬの抗体で還元反応を開始した。抗体に対して指定数モル当量のＤＰＰＡホスフィンを、ＤＭＡ共溶媒の最終濃度が５％の抗体溶液に添加した。還元反応を４時間進行させ、ｐＨ調整しないワンポットプロセスの期間、反応ｐＨを６．５に維持した。次に、還元された抗体溶液を精製せずに使用して、再酸化反応を開始した。再酸化反応は、最終抗体濃度３．７ｍｇ／ｍＬで、ＤＰＰＡに対して１．５倍モル過剰のＤＨＡＡ酸化剤及び最終濃度７％のＤＭＡ共溶媒を用いて実施した。ｐＨ６．５のリン酸カリウムストック緩衝液を反応物の希釈に使用して、標的抗体濃度を達成した。再酸化反応を８時間進行させた後、結合反応を開始した。５０ｍＭ、ｐＨ６．５の追加リン酸カリウム緩衝液で希釈した後、濃度２．８ｍｇ／ｍＬの抗体に対して５．４モル当量のＤＭ２１－Ｃを、再酸化された抗体溶液に添加した。最終ＤＭＡ濃度１５％で８時間反応させた後、ＳＥＣにより単量体比率（％）及びＤＡＲについて粗反応混合物を分析した。本実験の結果を以下の表Ｍに示す。

【表１４】

表Ｍ

反応	ＤＰＰＡ当量	ＤＡＲ（ＳＥＣ）	単量体比率（％）
１	１９	２．０３	９８．４４
２	１６	１．９６	９８．４７
３	１４	１．９５	９８．４３

【０４２０】

ＤＰＰＡを使用するワンポットプロセスのためのＤＨＡＡ酸化剤濃度のスクリーニング

本実験は、２５℃で、還元剤としてＤＰＰＡ、抗ＡＤＡＭ９抗体、及びＤＭ２１－Ｃペイロードを使用するワンポットプロセスにおいてＤＨＡＡ酸化剤の量をスクリーニングするために設計した。

【０４２１】

全反応に関して、投入する抗ＡＤＡＭ９抗体（１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．０）と９％スクロース中、約２５ｍｇ／ｍＬの抗体）をｐＨ６．５のリン酸カリウム緩衝液に希釈して、最終濃度５０ｍＭのリン酸カリウム緩衝液を得た。続いて、これらの抗体溶液を使用して、最終抗体濃度４．１ｍｇ／ｍＬの抗体で還元反応を開始した。抗体に対して１６モル当量のＤＰＰＡホスフィンを、ＤＭＡ共溶媒の最終濃度が５％の抗体溶液に添加した。還元反応を４時間進行させ、ｐＨ調整しないワンポットプロセスの期間、反応ｐＨを６．５に維持した。次に、還元された抗体溶液を精製せずに使用して、再酸化反応を開始した。再酸化反応は、最終抗体濃度３．７ｍｇ／ｍＬで、ＤＰＰＡに対して指定倍モル過剰のＤＨＡＡ酸化剤及び最終濃度７％のＤＭＡ共溶媒を用いて実施した。ｐＨ６．５のリン酸カリウムストック緩衝液を反応物の希釈に使用して、標的抗体濃度を達成した。再酸化反応を８時間進行させた後、結合反応を開始した。５０ｍＭ、ｐＨ６．５の追加リン酸カリウム緩衝液で希釈した後、濃度２．８ｍｇ／ｍＬの抗体に対して５．４モル当量のＤＭ２１－Ｃを、再酸化された抗体溶液に添加した。最終ＤＭＡ濃度１５％で８時間反応させた後、ＳＥＣにより単量体比率（％）及びＤＡＲについて粗反応混合物を分析した。本実験の結果を以下の表Ｎに示す。

【表１５】

表Ｎ

反応	ＤＨＡＡ当量（対ＤＰＰＡ）	ＤＡＲ（ＳＥＣ）	単量体比率（％）
１	１．７	１．９６	９８．４３
２	１．５	１．９６	９８．４７
３	１．４	１．９８	９８．４３

【０４２２】

ＤＰＰＡを使用するワンポットプロセスのためのペイロード濃度のスクリーニング

本実験は、２５℃で、還元剤としてＤＰＰＡ、抗ＡＤＡＭ９抗体を使用するワンポットプロセスにおいてＤＭ２１－Ｃペイロードの必要量をスクリーニングするために設計した。

【０４２３】

全反応に関して、投入する抗ＡＤＡＭ９抗体（１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．０）と９％スクロース中、約２５ｍｇ／ｍＬの抗体）をｐＨ６．５のリン酸カリウム緩衝液に希釈して、最終濃度５０ｍＭのリン酸カリウム緩衝液を得た。続いて、これらの抗体溶液を使用して、最終抗体濃度４．１ｍｇ／ｍＬの抗体で還元反応を開始した。抗体に対して１６モル当量のＤＰＰＡホスフィンを、ＤＭＡ共溶媒の最終濃度が５％の抗体溶液に添加した。還元反応を４時間進行させ、ｐＨ調整しないワンポットプロセスの期間、反応ｐＨを６．５に維持した。次に、還元された抗体溶液を精製せずに使用して、再酸化反応を開始した。再酸化反応は、最終抗体濃度３．７ｍｇ／ｍＬで、ＤＰＰＡに対して１．５倍モル過剰のＤＨＡＡ酸化剤及び最終濃度７％のＤＭＡ共溶媒を用いて実施した。ｐＨ６．５のリン酸カリウムストック緩衝液を反応物の希釈に使用して、標的抗体濃度を達成した。再酸化反応を８時間進行させた後、結合反応を開始した。５０ｍＭ、ｐＨ６．５の追加リン酸カリウム緩衝液で希釈した後、濃度２．８ｍｇ／ｍＬの抗体に対して指定モル当量のＤＭ２１－Ｃを、再酸化された抗体溶液に添加した。最終ＤＭＡ濃度１５％で８時間反応させた後、ＳＥＣにより単量体比率（％）及びＤＡＲについて粗反応混合物を分析した。本実験の結果を以下の表Ｏに示す。

【表１６】

表Ｏ

反応	ＤＭ２１－Ｃ当量（対抗体）	ＤＡＲ（ＳＥＣ）	単量体比率（％）
１	５．４	１．９６	９８．４７
２	５．２	１．９４	９８．４８
３	５．０	１．９３	９８．５０
４	４．８	１．９６	９８．４５
５	４．６	１．９３	９８．４６
６	４．３	１．９３	９８．４４
７	４．１	１．９２	９８．４０
８	３．９	２．００	９８．５２
９	３．７	２．０１	９８．４７
１０	３．５	２．０１	９８．４４

【０４２４】

ＤＰＰＡを使用するワンポットプロセスのための結合反応時間のスクリーニング

本実験は、２５℃で、還元剤としてＤＰＰＡ、抗ＡＤＡＭ９抗体を使用するワンポットプ

ロセスにおいて結合反応の所要時間をスクリーニングするために設計した。

【０４２５】

本反応に関して、投入する抗ＡＤＡＭ９抗体（１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．０）と９％スクロース中、約２５ｍｇ／ｍＬの抗体）をｐＨ６．５のリン酸カリウム緩衝液に希釈して、最終濃度５０ｍＭのリン酸カリウム緩衝液を得た。続いて、この抗体溶液を使用して、最終抗体濃度４．１ｍｇ／ｍＬの抗体で還元反応を開始した。抗体に対して１６モル当量のＤＰＰＡホスフィンを、ＤＭＡ共溶媒の最終濃度が５％の抗体溶液に添加した。還元反応を４時間進行させ、ｐＨ調整しないワンポットプロセスの期間、反応ｐＨを６．５に維持した。次に、還元された抗体溶液を精製せずに使用して、再酸化反応を開始した。この再酸化反応は、最終抗体濃度３．７ｍｇ／ｍＬで、ＤＰＰＡに対して１．５倍モル過剰のＤＨＡＡ酸化剤及び最終濃度７％のＤＭＡ共溶媒を用いて実施した。ｐＨ６．５のリン酸カリウムストック緩衝液を反応物の希釈に使用して、標的抗体濃度を達成した。再酸化反応を８時間進行させた後、結合反応を開始した。５０ｍＭ、ｐＨ６．５の追加リン酸カリウム緩衝液で希釈した後、濃度２．８ｍｇ／ｍＬの抗体に対して５．４モル当量のＤＭ２１－Ｃを、再酸化された抗体溶液に添加した。結合反応の最終ＤＭＡ濃度は１５％である。１．５～１０．５時間にわたり機器のサンプルチャンバー内で２５℃に保持された反応物の反応の進行をＳＥＣクロマトグラフィー反応の反復によりモニターした。ＳＥＣの単量体比率（％）及び複合体ＤＡＲデータを収集し、以下の表Ｐに要約する。

【表１７】

表Ｐ

反応	結合時間（時間）	ＤＡＲ　（ＳＥＣ）	単量体比率（％）
１	１．５	１．８６	９８．５８
２	２．５	１．９０	９８．５６
３	３．５	１．９３	９８．５０
４	４．５	１．９１	９８．５２
５	５．５	１．９３	９８．５１
６	６．５	１．９５	９８．５４
７	７．５	１．９７	９８．５３
８	８．５	１．９６	９８．５０
９	９．５	１．９５	９８．４７
１０	１０．５	１．９４	９８．４６

【０４２６】

ＤＰＰＡを使用するワンポットプロセスのための有機共溶媒条件のスクリーニング

本実験は、２５℃の一定温度で、還元剤としてＤＰＰＡ、抗ＡＤＡＭ９抗体、及びＤＨＡＡ酸化剤を使用するワンポットプロセスの最終結合工程期間の有機共溶媒含有率（％）をスクリーニングするために設計した。

【０４２７】

全反応に関して、投入する抗ＡＤＡＭ９抗体（１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．０）と９％スクロース中、約２５ｍｇ／ｍＬの抗体）をｐＨ６．５のリン酸カリウム緩衝液に希釈して、最終濃度５０ｍＭのリン酸カリウム緩衝液を得た。続いて、これらの抗体溶液を使用して、最終抗体濃度４．１ｍｇ／ｍＬの抗体で還元反応を開始した。抗体に対して１６モル当量のＤＰＰＡホスフィンを、ＤＭＡ共溶媒の最終濃度が５％の抗体溶液に添加した。還元反応を４時間進行させ、ｐＨ調整しないワンポットプロセスの期間、反応ｐＨを６．５に維持した。次に、還元された抗体溶液を精製せずに使用して、再酸化反応を開始した。再酸化反応は、最終抗体濃度３．７ｍｇ／ｍＬで、ＤＰＰＡに対して１．５倍モル過剰のＤＨＡＡ酸化剤及び最終濃度７％のＤＭＡ共溶媒を用いて実施した。ｐＨ６．５のリン酸カリウムストック緩衝液を反応物の希釈に使用して、標的抗体濃度を達成した。再

酸化反応を８時間進行させた後、結合反応を開始した。５０ｍＭ、ｐＨ６．５の追加リン酸カリウム緩衝液で希釈した後、濃度２．８ｍｇ／ｍＬの抗体に対して５．４モル当量のＤＭ２１－Ｃを、再酸化された抗体溶液に添加した。指定された最終ＤＭＡ濃度で８時間反応させた後、ＳＥＣにより単量体比率（％）及びＤＡＲについて粗反応混合物を分析した。本実験の結果を以下の表Ｑに示す。

【表１８】

表Ｑ

反応	結合反応のＤＭＡ含有量（％）	ＤＡＲ（ＳＥＣ）	単量体比率（％）
1	１６	１．９７	９８．４４
2	１５	１．９６	９８．４７
3	１３	１．９８	９８．４８
4	１２	１．９７	９８．４７
5	１１	１．９７	９８．４７
6	１０	１．９６	９８．４６
7	９	１．９６	９８．４６

【０４２８】

ＤＰＰＡを使用するワンポットプロセスのための還元反応時間のスクリーニング

本実験は、２３℃の一定温度で、還元剤としてＤＰＰＡ、抗ＡＤＡＭ９抗体、及びＤＨＡＡ酸化剤を使用するワンポットプロセスの還元反応工程に要する時間をスクリーニングするために設計した。

【０４２９】

全反応に関して、投入する抗ＡＤＡＭ９抗体（１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．０）と９％スクロース中、約２５ｍｇ／ｍＬの抗体）をｐＨ６．５のリン酸カリウム緩衝液に希釈して、最終濃度３０ｍＭのリン酸カリウム緩衝液を得た。続いて、これらの抗体溶液を使用して、最終抗体濃度４．５ｍｇ／ｍＬの抗体で還元反応を開始した。抗体に対して１６モル当量のＤＰＰＡホスフィンを、ＤＭＡ共溶媒の最終濃度が５％の抗体溶液に添加した。１～５時間の指定時間、還元反応を進行させ、ｐＨ調整しないワンポットプロセスの期間、反応ｐＨを６．５に維持した。次に、還元された抗体溶液を精製せずに使用して、再酸化反応を開始した。再酸化反応は、最終抗体濃度４．０ｍｇ／ｍＬで、ＤＰＰＡに対して１．５倍モル過剰のＤＨＡＡ酸化剤及び最終濃度７％のＤＭＡ共溶媒を用いて実施した。ｐＨ６．５のリン酸カリウムストック緩衝液を反応物の希釈に使用して、標的抗体濃度を達成した。再酸化反応を６時間進行させた後、結合反応を開始した。３０ｍＭ、ｐＨ６．５の追加リン酸カリウム緩衝液で希釈した後、濃度３．５ｍｇ／ｍＬの抗体に対して４．６モル当量のＤＭ２１－Ｃを、再酸化された抗体溶液に添加した。最終ＤＭＡ濃度１０％で１３時間反応させた後、ＳＥＣにより単量体比率（％）及びＤＡＲについて粗反応混合物を分析した。本実験の結果を以下の表Ｒに示す。

【表１９】

表Ｒ

反応	還元時間（時間）	ＤＡＲ（ＳＥＣ）	単量体比率（％）
1	1	１．９６	９８．７４
2	2	１．９７	９８．７３
3	3	２．００	９８．６６
4	4	２．０５	９８．７０
5	5	２．０３	９８．６５

【０４３０】

ＤＰＰＡを使用するワンポットプロセスのための再酸化反応時間のスクリーニング

本実験は、２３℃の一定温度で、還元剤としてＤＰＰＡ、抗ＡＤＡＭ９抗体、及びＤＨＡＡ酸化剤を使用するワンポットプロセスの再酸化反応工程に要する時間をスクリーニングするために設計した。

【０４３１】

全反応に関して、投入する抗ＡＤＡＭ９抗体（１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．０）と９％スクロース中、約２５ｍｇ／ｍＬの抗体）をｐＨ６．５のリン酸カリウム緩衝液に希釈して、最終濃度３０ｍＭのリン酸カリウム緩衝液を得た。続いて、これらの抗体溶液を使用して、最終抗体濃度４．５ｍｇ／ｍＬの抗体で還元反応を開始した。抗体に対して１６モル当量のＤＰＰＡホスフィンを、ＤＭＡ共溶媒の最終濃度が５％の抗体溶液に添加した。還元反応を４時間進行させ、ｐＨ調整しないワンポットプロセスの期間、反応ｐＨを６．５に維持した。次に、還元された抗体溶液を精製せずに使用して、再酸化反応を開始した。再酸化反応は、最終抗体濃度４．０ｍｇ／ｍＬで、ＤＰＰＡに対して１．５倍モル過剰のＤＨＡＡ酸化剤及び最終濃度７％のＤＭＡ共溶媒を用いて実施した。ｐＨ６．５のリン酸カリウムストック緩衝液を反応物の希釈に使用して、標的抗体濃度を達成した。１～７時間の指定時間、再酸化反応を進行させた後、結合反応を開始した。３０ｍＭ、ｐＨ６．５の追加リン酸カリウム緩衝液で希釈した後、濃度３．５ｍｇ／ｍＬの抗体に対して４．６モル当量のＤＭ２１－Ｃを、再酸化された抗体溶液に添加した。最終ＤＭＡ濃度１０％で１３時間反応させた後、ＳＥＣにより単量体比率（％）及びＤＡＲについて粗反応混合物を分析した。本実験の結果を以下の表Ｓに示す。

【表２０】

表Ｓ

反応	再酸化時間（時間）	ＤＡＲ（ＳＥＣ）	単量体比率（％）
1	1	２．０２	９８．６９
2	2	２．０５	９７．８８
3	3	２．０３	９８．６５
4	4	２．０１	９８．０８
5	5	１．９７	９８．０９
6	6	１．９８	９８．６１
7	7	１．９６	９８．６５

【０４３２】

ＤＰＰＡを使用するワンポットプロセスのためのスケールアップ条件

本実験は、２３℃の一定温度で、還元剤としてＤＰＰＡ、抗ＡＤＡＭ９抗体、及びＤＨＡＡ酸化剤を使用する、１．２ｇの抗体スケールでのワンポット反応プロセスの性能を試験

するために設計した。

【０４３３】

本反応に関して、投入する抗ＡＤＡＭ９抗体（１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．０）と９％スクロース中、約２５ｍｇ／ｍＬの抗体）をｐＨ６．５のリン酸カリウム緩衝液に希釈して、最終濃度３０ｍＭのリン酸カリウム緩衝液を得た。続いて、抗体溶液を使用して、最終抗体濃度４．５ｍｇ／ｍＬの抗体で還元反応を開始した。抗体に対して１６モル当量のＤＰＰＡホスフィンを、ＤＭＡ共溶媒の最終濃度が５％の抗体溶液に添加した。還元反応を５時間進行させ、ｐＨ調整しないワンポットプロセスの期間、反応ｐＨを６．５に維持した。次に、還元された抗体溶液を精製せずに使用して、再酸化反応を開始した。再酸化反応は、最終抗体濃度４．０ｍｇ／ｍＬで、ＤＰＰＡに対して１．５倍モル過剰のＤＨＡＡ酸化剤及び最終濃度７％のＤＭＡ共溶媒を用いて実施した。ｐＨ６．５のリン酸カリウムストック緩衝液を反応物の希釈に使用して、標的抗体濃度を達成した。再酸化反応を６時間進行させた後、結合反応を開始した。３０ｍＭ、ｐＨ６．５の追加リン酸カリウム緩衝液で希釈した後、濃度３．５ｍｇ／ｍＬの抗体に対して４．６モル当量のＤＭ２１－Ｃを、再酸化された抗体溶液に添加した。最終ＤＭＡ濃度１０％で１２時間反応させた後、粗反応混合物を精製及び製剤化した。反応が完了したら、均質な反応混合物を最初に０．５／０．２ｕｍの二層ポリエーテルスルホンフィルターで濾過した。濾過に続いて、９ｗ／ｖ％スクロースを含有する１０ｍＭコハク酸ナトリウム（ｐＨ４．７）緩衝液に対する１４透析濾過容量のＴＦＦによって反応混合物を精製した。回収後、緩衝液交換した複合体を０．５／０．２ｕｍの二層ポリエーテルスルホンフィルターで濾過し、９ｗ／ｖ％スクロース及び０．０１％ポリソルベート－２０を加えた１０ｍＭコハク酸ナトリウム（ｐＨ４．７）中、最終濃度７ｍｇ／ｍＬの複合体に製剤化した。１．２ｇスケールでのプロセスの全体収率は９３％であった。最終複合体のＳＥＣクロマトグラフィーを用いて単量体比率（％）及びＤＡＲをそれぞれ９８．７１％及び１．９９と判定した。

【０４３４】

実施例５：ＤＰＰＡを使用するワンポット結合プロセスとＴＣＥＰを使用する多段階プロセスとの比較

５００ｍｇ抗体スケールでの多段階プロセスでは、５０ｍＭ、ｐＨ７．６のリン酸カリウム還元緩衝液中、１０ｍｇ／ｍＬの抗ＡＤＡＭ９抗体及び抗体に対して２７（ｍｏｌ：ｍｏｌ）当量のＴＣＥＰでの還元を３７℃で１時間実施した。還元に続いて、５０ｍＭ、ｐＨ７．６のリン酸カリウム緩衝液に対して１０透析濾過容量で透析濾過するＴＦＦを実施し、残留ホスフィン、ホスフィンオキシド、及び小分子チオール含有キャッピング分子を除去した。この精製、還元された抗体をさらに処理せずに、選択的再酸化反応の準備に使用した。最終抗体濃度７ｍｇ／ｍＬ、抗体に対して１５（ｍｏｌ：ｍｏｌ）当量のＤＨＡＡ、及び１％（ｖ／ｖ）ＤＭＡでの再酸化を２５℃で４時間実施した。再酸化された反応溶液を一晩４℃に保持した後、再酸化された抗体溶液に何らかの追加処理をせずにＤＭ２１－Ｃとの結合反応を準備した。抗体に対して４．４（ｍｏｌ：ｍｏｌ）当量のＤＭ２１－Ｃペイロード、及び１０％（ｖ／ｖ）ＤＭＡを加えた５０ｍＭ、ｐＨ７．６のリン酸カリウム中、最終抗体濃度６ｍｇ／ｍＬでの結合を２５℃で１８時間実施した。結合に続いて、９％（ｗ／ｖ）スクロースを含有する１０ｍＭコハク酸ナトリウム（ｐＨ５．０）緩衝液に対する１２透析濾過容量のダイアフィルトレーションによるＴＦＦによって粗反応混合物を精製した。

【０４３５】

５００ｍｇ抗体スケールでのワンポットプロセスでは、２５ｍＭ、ｐＨ６．０のコハク酸ナトリウム緩衝液中、１２ｍｇ／ｍＬの抗ＡＤＡＭ９抗体と、抗体に対して１６（ｍｏｌ：ｍｏｌ）当量の３－（ジフェニルホスフィノ）プロピルアミン（ＤＰＰＡ）、及び５％（ｖ／ｖ）ＤＭＡでの還元を２５℃で４時間実施した。次に、還元された抗体の粗溶液を精製せずに、選択的再酸化反応に進んだ。１０ｍｇ／ｍＬの抗体と、抗体に対して１６（ｍｏｌ：ｍｏｌ）当量のＤＨＡＡ及び７．５％（ｖ／ｖ）ＤＭＡでの再酸化を２５℃で２３時間実施した。次に、再酸化された抗体の粗溶液を精製せずに、結合反応に進んだ。抗

体に対して５．４（ｍｏｌ：ｍｏｌ）当量のＤＭ２１－Ｃを加えた２５ｍＭ、ｐＨ６．０のコハク酸ナトリウム緩衝液中、最終抗体濃度８ｍｇ／ｍＬでの結合を２５℃で２０時間実施した。結合に続いて、９％（ｗ／ｖ）スクロースを含有する１０ｍＭコハク酸ナトリウム（ｐＨ５．０）緩衝液に対する１２透析濾過容量のダイアフィルトレーションによるＴＦＦによって粗反応混合物を精製した。

【０４３６】

両方の反応の単量体及びＤＡＲ値を、最終複合体のＳＥＣクロマトグラフィーにより判定した。ＤＡＲ値は、２８０ｎｍでの抗体の吸光係数、抗体の２５２ｎｍと２８０ｎｍとの吸光比、及び２５２ｎｍでのペイロード吸光係数を用いて算出した。本試験の結果を表Ｔに示す。

【表２１】

表Ｔ

反応	単量体比率（%）	ＳＥＣ ＤＡＲ
多段階ＴＣＥＰプロセス	８６．２	１．７
ワンポットＤＰＰＡプロセス	９８．２	１．９

【０４３７】

実施例６：連続ワンポット結合プロセス

ワンポットプロセスに関して、エンドツーエンドの一体化した連続製造操作を実証実験した。試験にはＧ４７２３Ａ抗体を使用した。ワンポット連続プロセスをスケールアップするための概念実証として、連続撹拌槽型反応器（ＣＳＴＲ）とプラグフローリアクター（ＰＦＲ）を一体化するように実証実験を設計した。

【０４３８】

ＣＳＴＲ及びＰＦＲを直列に使用する利点は、総容量要件が緩和される、反応物流同士の混合が改善される、及び滞留時間分布の拡大を含め、リスク軽減機能が向上することであった。各反応工程、すなわち還元、再酸化、及び結合でのＣＳＴＲ及びＰＦＲに対する反応容量を決定した。各反応の速度論的データを生成し、各反応に望ましい目標転化率を指定した。この結果に基づいて、各反応のＣＳＴＲ及びＰＦＲの容量を、使用するチューブ内径、及び各反応工程に望ましい滞留時間を達成するために必要とされる体積流量に基づいて指定した。連続ワンポット結合プロセスの反応模式図を図５に示す。

【０４３９】

最初に、５０ｍｇ／ｍＬで製剤化されたＧ４７２３Ａ抗体製剤を、３０ｍＭのリン酸カリウム（ｐＨ６．５）により目標還元反応濃度４ｍｇ／ｍＬに希釈する。この供給流を蠕動ポンプにより還元ＣＳＴＲに供給する。並行して、ＤＭＡ中８．７７ｍＭで調製したＤＰＰＡストック溶液をシリンジポンプにより還元ＣＳＴＲに供給する。これらの２つの供給流の体積流量を、１６倍モル過剰のＤＰＰＡ：Ａｂによる還元反応で濃度４．０ｍｇ／ｍＬを達成するように設定する。さらに、還元反応におけるＤＭＡの体積濃度は５％（ｖ／ｖ）である。

【０４４０】

蠕動ポンプを使用して、合計流量と同じ体積流量で還元反応ＣＳＴＲから材料を還元反応ＣＳＴＲ（Ａｂ及びＤＰＰＡの供給流で構成される）に回収する。ＣＳＴＲの流入流量と流出流量を一致させ、定常状態操作での還元反応ＣＳＴＲの液面と滞留時間を一定に維持した。還元反応ＣＳＴＲから回収された材料を還元ＰＦＲを通して供給した。ＰＦＲのチューブの長さは、望ましい目標反応転化率に基づいて決定した。目標転化率を用いて滞留時間を設定し、ＰＦＲを通過する総体積流量を測定してＰＦＲ反応器の固定長を設定した。全体を通して反応温度を確実に一定にするために、還元ＰＦＲを温度制御された水浴に浸漬させた。

【０４４１】

蠕動ポンプによって還元ＣＳＴＲ反応器から回収される材料と同じ体積流量で、還元ＰＦＲから再酸化ＣＳＴＲに直接供給した。この供給流を、ＤＭＡで調製したＤＨＡＡストック溶液と混合し、シリンジポンプにより再酸化ＣＳＴＲにも供給した。ＤＨＡＡストック溶液はＤＭＡ中５５ｍＭに調製し、再酸化反応の最終反応パラメーターが、３．９ｍｇ／ｍＬの抗体濃度、２４倍モル過剰のＤＨＡＡ：Ａｂ、及び６．５％ＤＭＡ（ｖ／ｖ）であるように反応器に供給した。

【０４４２】

再酸化ＣＳＴＲへの２つの供給流の合計流量を測定し、これを用いて、同じ流量で再酸化ＣＳＴＲから材料を取り出すために使用する追加の蠕動ポンプの体積流量を設定した。還元ＣＳＴＲと同様、定常状態操作時の液面と滞留時間が一定になるように、一致するＣＳＴＲの流入流量と流出流量を選択した。再酸化ＣＳＴＲからポンプによって取り出された材料を再酸化ＰＦＲに直接供給した。再酸化反応ＰＦＲの設計手法は、先に考察した還元ＰＦＲと同一であった。速度論的データに基づく望ましい反応転化率により反応滞留時間を設定する。この滞留時間と再酸化反応全体の体積流量との組み合わせを用いて、ＰＦＲ設計基準を算出した。再酸化ＰＦＲもまた（還元ＰＦＲと同様に）温度制御された水浴に浸漬させた。

【０４４３】

再酸化反応ＰＦＲの出力を結合ＣＳＴＲに直接供給した。ＤＭ２１－Ｃストック溶液をＤＭＡ中３．２０ｍＭで調製し、シリンジポンプにより結合ＣＳＴＲに添加した。２つの注入流をＣＳＴＲ内で混合し、最終反応条件を３．８ｍｇ／ｍＬの抗体濃度、４．６モル過剰のＤＭ２１：Ａｂ、及び１０％ＤＭＡ（ｖ／ｖ）にした。蠕動ポンプにより、再酸化反応物とＤＭ２１－Ｃストック溶液との合計体積流量で結合反応混合物を取り出した。この蠕動ポンプにより、容器内の液面を維持するように流量を一致させ、結合反応ＰＦＲに直接供給した。結合反応ＰＦＲでは、速度論的反応データに基づく反応転化率を目標とした。この目標転化率を用いて滞留時間を定義した。結合の滞留時間と体積流量を用いて結合ＰＦＲの条件を定義した。還元ＰＦＲ及び再酸化ＰＦＲ両方と同様に、温度制御された水浴に結合反応ＰＦＲを浸漬させた。

【０４４４】

結合反応ＰＦＲでは、未精製の結合反応混合物を溶出した。この流を向流ＴＦＦ精製ユニットに供給した。流入する粗反応物は、濃度約３．８ｍｇ／ｍＬ及び１０％ＤＭＡ（ｖ／ｖ）であった。ダイアフィルトレーション緩衝液流（１０ｍＭコハク酸ナトリウム、９％（ｗ／ｖ）スクロース、ｐＨ４．７）を、流入する未精製の結合反応混合物と合一して、流入供給流を希釈した。図６に示すように、この供給流をモジュール２からの透過流と合一し、モジュール１に供給する複合体の濃度をさらに希釈した。モジュール１及びモジュール２には、Ｐａｌｌ　Ｃａｄｅｎｃｅインライン濃縮器（ＩＬＣ）膜を使用した。

【０４４５】

モジュール１からの保持液をモジュール２に直接供給した。ＤＦ緩衝液の追加供給流をモジュール２への注入口前方でモジュール１からの保持液と合一した。モジュール１からの透過液は廃棄へ送り、処分した。精製した複合体をモジュール２の保持液から回収した。上記に示すように、モジュール２からの透過液を再利用し、モジュール１への供給と合一した（図６を参照）。この向流機構は、粗反応混合物から不純物を効果的に除去し、複合体をＤＦ緩衝液に緩衝液交換する。向流ＴＦＦ精製中にペイロード不純物を確実に除去するために、ＴＦＦ前試料及び精製試料を遊離薬物法により特性決定した。結果によると、２つのユニットを横断して流入する未精製の供給流から、不純物が極めて効果的に除去されることを示している（９９％超）。連続操作及びバッチ対照での最終精製複合体の結果を表Ｓに示す。

【表２２】

表Ｓ：一体型ＤＳ製造操作での生成物品質の概要

生成物の品質属性	連続結合（向流ＴＦＦ）	バッチ対照（精製したＮＡＰ）
ＨＭＷ（％、ＳＥＣによる）	０．３	０．３
単量体（％、ＳＥＣによる）	９９．７	９９．７
遊離薬物除去（％）	９９．８９	該当なし
精製遊離薬物（ｕｇ／ｍＬ）	定量限界未満	該当なし
ＤＡＲ（ＵＶによる）	１．９５	該当なし
ＤＡＲ（ＳＥＣ－ＭＳによる）	１．９	該当なし
粗反応物のＤＡＲ（ＳＥＣによる）	２．０	２．１
ＨＬ（％、ゲルチップによる）	３	４
Ｈ２Ｌ２（％、ゲルチップによる）	８１	８２

【０４４６】

実施例７．不活性雰囲気下でのワンポット結合プロセス

N_2パージされたシステム内でワンポット結合プロセス全体を実施することの影響を試験するため、ＧＭＰ製造時の予測条件を適切に模倣した。還元反応及び再酸化反応の性能を、N_2下及び通常の空気雰囲気下で同一の反応を比較することによって試験する。還元は、５％ＤＭＡを加えたｐＨ６．５、３０ｍＬリン酸カリウム中４．５ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。この反応は、１６当量のＤＰＰＡで開始し、２３℃で５時間実施した。再酸化は、７％ＤＭＡを加えたｐＨ６．５、３０ｍＭリン酸カリウム中４．０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。この反応は、２４当量のＤＨＡＡで開始し、２３℃で６時間実施した。結合は、１０％ＤＭＡを加えたｐＨ６．５、３０ｍＭリン酸カリウム中３．５ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で実施した。この反応は、４．６当量のＤＭ２１－Ｃで開始し、２３℃で１２時間実施した。内部温度を２３．０℃に制御し、７０ｒｐｍでオーバーヘッド混合するＥａｓｙＭａｘシステム中で、１７５ｍｇスケールで２つの反応を設定した。一方の反応のヘッドスペースは実験期間中、N_2で連続してパージした。加えて、この反応では、水及び３０ｍＭリン酸カリウム緩衝溶液を反応物に添加する前に１５～３０分間、N_2でバブリングした。

【０４４７】

表Ｔに示すように、窒素パージされたシステム内で反応を実施する場合と、結合反応容器を大気に開放したままにする場合との間に有意差はない。窒素下での反応操作に関する分析データ（ＳＥＣ単量体、ＳＥＣ　ＤＡＲ、ＨＩＣ　ＤＡＲ、ＧｅｌＣｈｉｐ）はすべて、同じ原材料を使用した対照及び前述のスケールアップ操作と一致している。

【表２３】

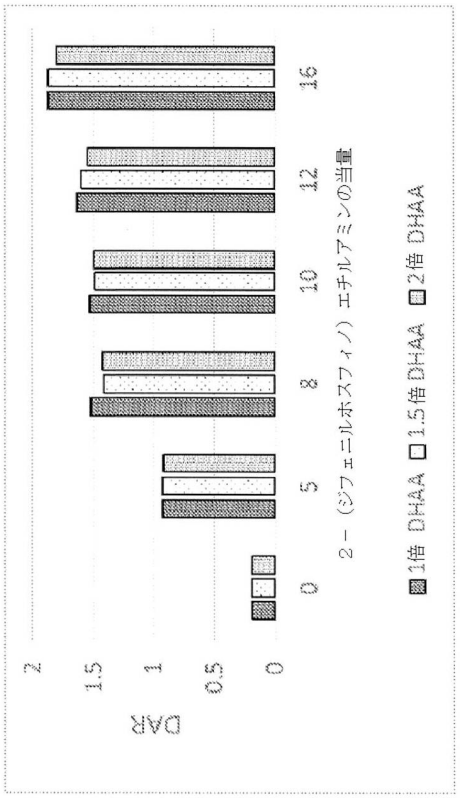
表Ｔ．生成物品質の概要

	窒素反応（粗製物）	空気反応（粗製物）	以前のスケールアップ操作＊
ＳＥＣ　ＤＡＲ	２．０４	２．０１	２．０４
ＨＩＣ　ＤＡＲ	１．９８	１．９７	１．９８
単量体比率（％）	９８．３５	９８．３５	９８．７１
ＨＭＷ比率（％）	１．４７	１．５４	１．２２
ＬＭＷ比率（％）	０．１８	０．１１	０．０７
Ｄ０比率（％）	検出せず	検出せず	０．０２
Ｄ１比率（％）	２．５６	２．９６	２．８２
Ｄ２比率（％）	９７．３２	９７．０４	９６．９０
Ｄ４比率（％）	０．１２	検出せず	０．２６
ＨＬ比率（％）	６．１８	５．１４	５．８４
Ｈ２Ｌ２比率（％）	７８．３６	８０．９２	７８．５４
全体収率（％）	該当なし	該当なし	９３．６０

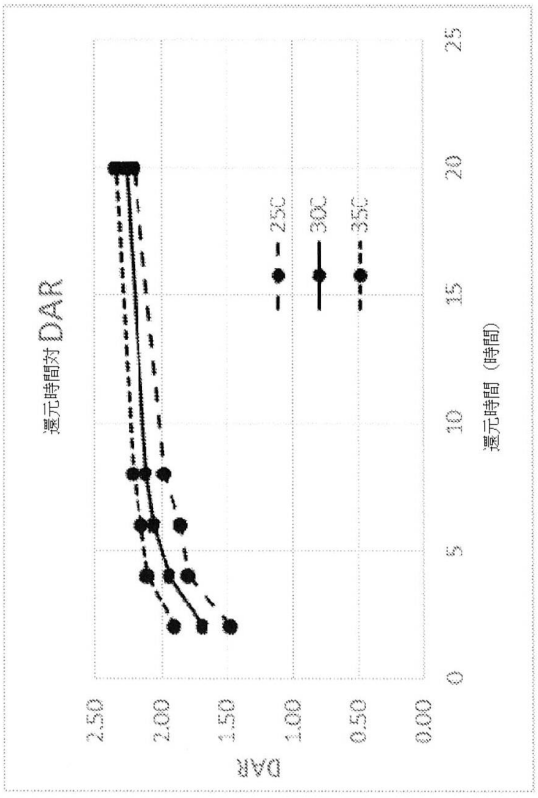
*以前のスケールアップ操作には、本明細書に記載の反応と同じ抗体ロット、ＤＰＰＡ、及びペイロードロットを使用する

【図面】

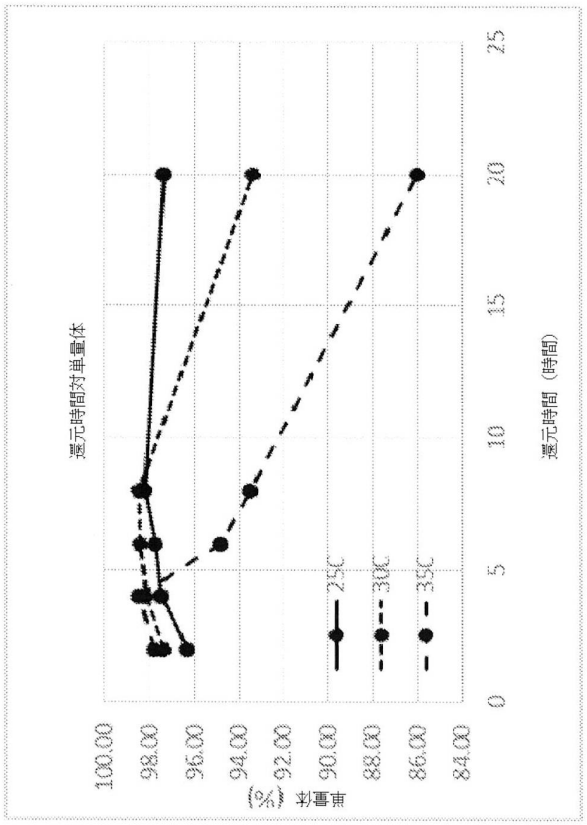
【図１】


DAR
2
1.5
1
0.5
0
0
5
8
10
12
16
2－（ジフェニルホスフィノ）エチルアミンの当量
1倍 DHAA
1.5倍 DHAA
2倍 DHAA

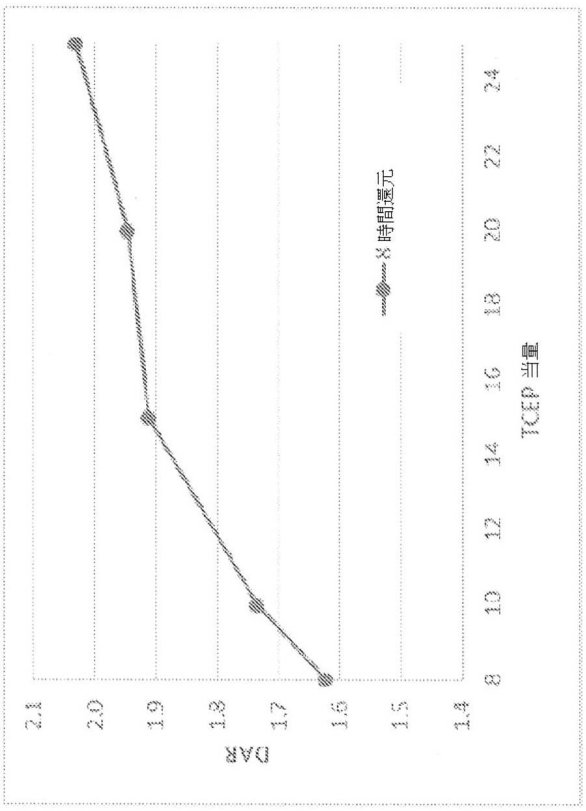
【図２】


還元時間対 DAR
DAR
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
0
5
10
15
20
25
還元時間（時間）
25C
30C
35C

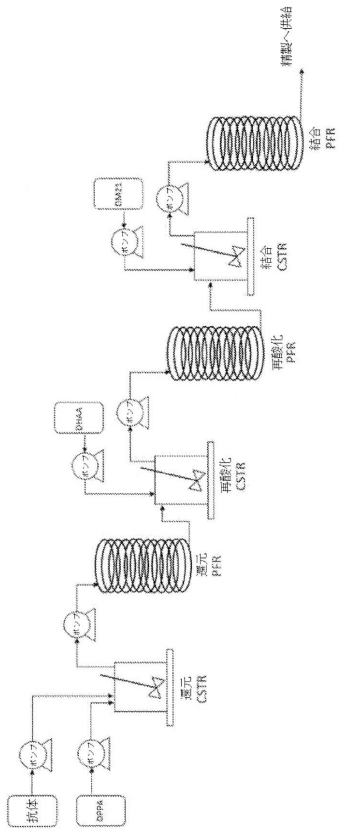
【図３】


還元時間対単量体
単量体（%）
100.00
98.00
96.00
94.00
92.00
90.00
88.00
86.00
84.00
0
5
10
15
20
25
還元時間（時間）
25C
30C
35C

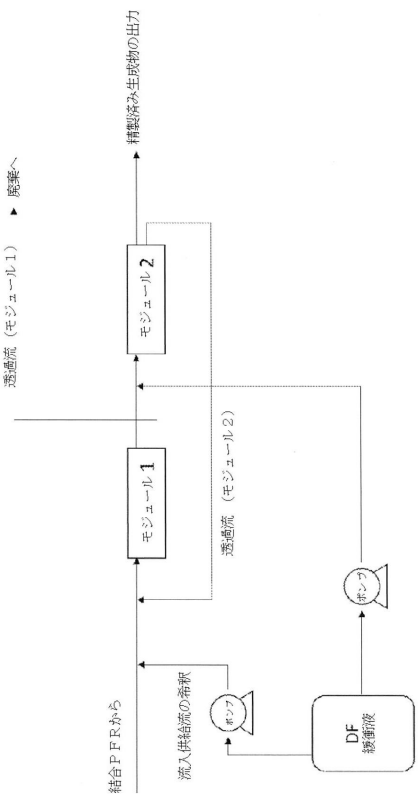
【図４】


DAR
2.1
2.0
1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
8
10
12
14
16
18
20
22
24
TCEP 当量
8 時間還元

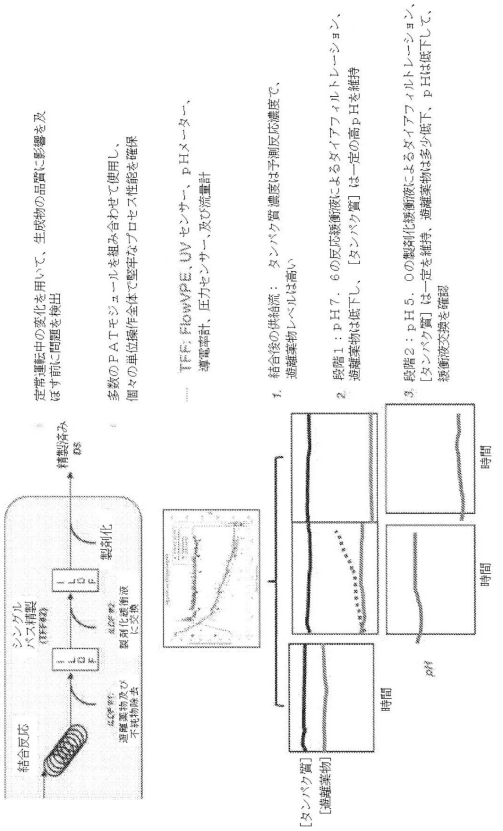
【図５】


抗体
DPPA
ポンプ
還元 CSTR
還元 PFR
再酸化 CSTR
再酸化 PFR
結合 CSTR
結合 PFR
精製へ供給

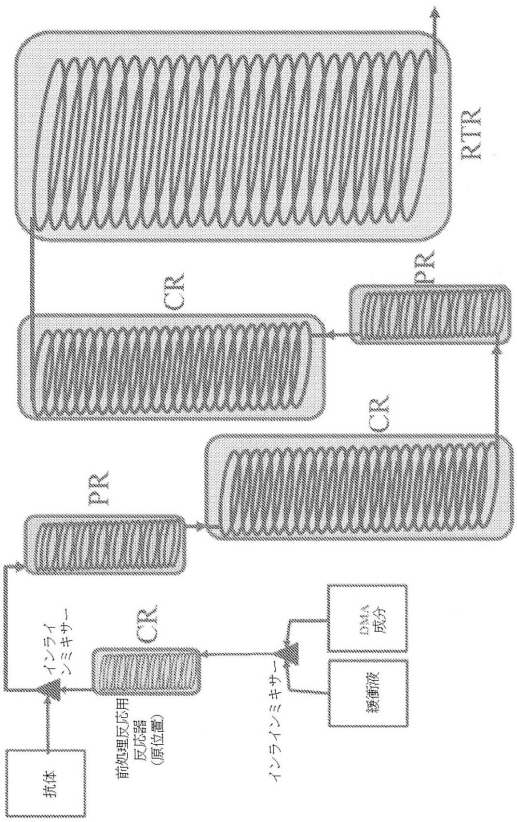
【図６】


精製済み生成物の出力
廃棄へ
透過流（モジュール１）
モジュール２
モジュール１
透過流（モジュール２）
結合ＰＦＲから
流入供給流の希釈
DF
緩衝液
ポンプ

【図７】


結合反応
シングルパス精製（ＣＰＥＰ）
精製済み生成物
製剤化
緩衝液
凝集物及び不純物除去
凝集物
断続化緩衝液による
TFF: FlowVPE, UV センサー、ｐＨメーター、導電率計、圧力センサー、及び流量計
多数のＰＡＴモジュールを組み合わせて使用し、個々の単位操作全体で堅牢なプロセス性能を確保
定常運転中の変化を用いて、生成物の品質に影響を及ぼす前に問題を検出
1. 結合後の供給流： タンパク質濃度は予測反応濃度で、凝集物レベルは高い
2. 段階１：ｐＨ７．６の反応緩衝液によるダイアフィルトレーション、凝集物は低下し、［タンパク質］は一定の高ｐＨを維持
3. 段階２：ｐＨ５．０の製剤化緩衝液によるダイアフィルトレーション、［タンパク質］は一定を維持、凝集物は多少低下、ｐＨは低下して、緩衝液交換を確認
［タンパク質］
［凝集物］
時間
ｐＨ
時間

【図８】


RTR
CR
PR
CR
PR
CR
インライン ミキサー
抗体
前処理反応用 反応器 (原位置)
インラインミキサー
緩衝液
DMA 成分

【配列表】
20225274490000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/023897

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/68
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A Y	WO 2011/130613 A1 (SEATTLE GENETICS INC [US]; SPIROGEN LTD [GB] ET AL.) 20 October 2011 (2011-10-20) example 14 scheme 1, 2, 4-7, 9-19, 21, 22 ----- WO 2018/098258 A2 (IMMUNOGEN INC [US]) 31 May 2018 (2018-05-31) compounds D1, imine-sulfo D1 example 6 ----- -/--	1-60, 63-65, 166-176 61,62, 66-165, 212-239 177-211 61,62, 66-165, 212-239

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 July 2020	31/07/2020

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

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/023897

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2017/004026 A1 (IMMUNOGEN INC [US]) 5 January 2017 (2017-01-05) cited in the application compound D5 example 15	61,62, 66-165, 212-239
Y A	WO 2018/160539 A1 (IMMUNOGEN INC [US]) 7 September 2018 (2018-09-07) examples 2, 4 compounds I-2a	61,62, 66-165 177-211
X,P	WO 2019/140141 A1 (IMMUNOGEN INC [US]) 18 July 2019 (2019-07-18) figures 10, 11 example 4	1-176, 212-239
X,P	WO 2020/005945 A1 (IMMUNOGEN INC [US]; MACROGENICS INC [US]) 2 January 2020 (2020-01-02) paragraph [0341] - paragraph [0345] page 153 - page 154	1-211

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2020/023897

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011130613 A1	20-10-2011	AU 2011239522 A1	01-11-2012
		BR 112012026801 A2	20-09-2016
		CA 2795349 A1	20-10-2011
		CN 103068405 A	24-04-2013
		CN 107019804 A	08-08-2017
		EA 201290838 A1	30-05-2013
		EP 2558127 A1	20-02-2013
		IL 222269 A	29-06-2017
		IL 252864 A	31-01-2018
		JP 5870400 B2	01-03-2016
		JP 2013523896 A	17-06-2013
		KR 20130038254 A	17-04-2013
		KR 20160128443 A	07-11-2016
		NZ 602932 A	29-08-2014
		US 2013028919 A1	31-01-2013
		US 2016129013 A1	12-05-2016
		US 2017143846 A1	25-05-2017
		US 2018228916 A1	16-08-2018
		US 2019336614 A1	07-11-2019
		WO 2011130613 A1	20-10-2011
		ZA 201207317 B	29-04-2015
WO 2018098258 A2	31-05-2018	AU 2017363237 A1	27-06-2019
		CA 3044391 A1	31-05-2018
		CN 110392685 A	29-10-2019
		EP 3544983 A2	02-10-2019
		JP 2020512276 A	23-04-2020
		KR 20190104995 A	11-09-2019
		TW 201822819 A	01-07-2018
		US 2018208562 A1	26-07-2018
		US 2019315699 A1	17-10-2019
		US 2020157056 A1	21-05-2020
		WO 2018098258 A2	31-05-2018
WO 2017004026 A1	05-01-2017	AR 105194 A1	13-09-2017
		AU 2016285552 A1	18-01-2018
		BR 112017027254 A2	14-05-2019
		CA 2989321 A1	05-01-2017
		CN 107889493 A	06-04-2018
		EP 3313884 A1	02-05-2018
		HK 1252976 A1	06-06-2019
		JP 2018524349 A	30-08-2018
		KR 20180021177 A	28-02-2018
		RU 2017146345 A	29-07-2019
		TW 201700498 A	01-01-2017
		US 2017029514 A1	02-02-2017
		US 2018079819 A1	22-03-2018
		US 2018355047 A1	13-12-2018
		WO 2017004026 A1	05-01-2017
WO 2018160539 A1	07-09-2018	AU 2018229277 A1	10-10-2019
		CA 3054608 A1	07-09-2018
		CN 110366431 A	22-10-2019
		EP 3589328 A1	08-01-2020
		JP 2020510656 A	09-04-2020
		KR 20190122766 A	30-10-2019
		SG 11201907693V A	27-09-2019
		TW 201838657 A	01-11-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2020/023897

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2018296694 A1	18-10-2018
		US 2020197531 A1	25-06-2020
		WO 2018160539 A1	07-09-2018
WO 2019140141 A1	18-07-2019	TW 201934187 A	01-09-2019
		US 2019270769 A1	05-09-2019
		WO 2019140141 A1	18-07-2019
WO 2020005945 A1	02-01-2020	NONE	

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*31/537(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/537		
Ａ６１Ｋ	*47/68 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/68		
Ａ６１Ｋ	*39/395(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*35/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ｃ０７Ｋ	*16/28 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28	ＺＮＡ	

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

９０７，スワンプスコット，ローレンス・テラス １９

(72)発明者　ミラノ，ダニエル・エフ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１８６７，レディング，スタージス・ロード ５３

Ｆターム（参考）　4C076 AA01 AA06 AA09 AA11 AA16 AA24 AA29 AA36 AA72 AA95 BB01 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 BB31 CC26 CC27 EE59 FF36 FF61 FF63 FF68
4C084 AA17 AA27 MA05 MA13 MA16 MA17 MA28 MA31 MA32 MA35 MA43 MA52 MA55 MA56 MA59 MA63 MA66 NA10 NA13 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
4C085 AA13 AA14 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10
4C086 AA01 AA02 CB11 CB22 MA02 MA05 MA13 MA16 MA17 MA28 MA31 MA32 MA35 MA43 MA52 MA55 MA56 MA59 MA63 MA66 NA10 NA13 ZB21 ZB26 ZB27
4H045 AA11 BA51 DA76 EA22 EA28 FA50