

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-504869

(P2015-504869A)

(43) 公表日 平成27年2月16日 (2015. 2. 16)

|                                  |                  |             |
|----------------------------------|------------------|-------------|
| (51) Int. Cl.                    | F I              | テーマコード (参考) |
| <b>A 6 1 K 39/395 (2006. 01)</b> | A 6 1 K 39/395 L | 4 C 0 7 6   |
| <b>A 6 1 K 47/42 (2006. 01)</b>  | A 6 1 K 47/42    | 4 C 0 8 5   |
| <b>A 6 1 K 47/48 (2006. 01)</b>  | A 6 1 K 47/48    | 4 C 0 8 6   |
| <b>A 6 1 K 31/537 (2006. 01)</b> | A 6 1 K 31/537   |             |
| <b>A 6 1 P 35/00 (2006. 01)</b>  | A 6 1 P 35/00    |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 57 頁) 最終頁に続く

|               |                              |          |                        |
|---------------|------------------------------|----------|------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2014-547433 (P2014-547433) | (71) 出願人 | 504039155              |
| (86) (22) 出願日 | 平成24年12月13日 (2012. 12. 13)   |          | イミュノジェン・インコーポレーテッド     |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成26年7月25日 (2014. 7. 25)     |          | アメリカ合衆国マサチューセッツ州〇2 4   |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2012/069527            |          | 5 1, ウォルサム, ウィンター・ストリー |
| (87) 国際公開番号   | W02013/090590                |          | ト 8 3 〇                |
| (87) 国際公開日    | 平成25年6月20日 (2013. 6. 20)     | (74) 代理人 | 100140109              |
| (31) 優先権主張番号  | 61/570, 139                  |          | 弁理士 小野 新次郎             |
| (32) 優先日      | 平成23年12月13日 (2011. 12. 13)   | (74) 代理人 | 100075270              |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 弁理士 小林 泰               |
|               |                              | (74) 代理人 | 100101373              |
|               |                              |          | 弁理士 竹内 茂雄              |
|               |                              | (74) 代理人 | 100118902              |
|               |                              |          | 弁理士 山本 修               |
|               |                              | (74) 代理人 | 100128750              |
|               |                              |          | 弁理士 廣瀬 しのぶ             |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複合体安定性を改善するためのN-ヒドロキシスクシンイミドの使用

## (57) 【要約】

本発明は、外因性NH<sub>2</sub>Sの存在下で改善された安定性を有する細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を製造するためのプロセスを提供する。いくつかの実施形態において、本発明のプロセスは、二官能性リンカーの加水分解 / アミノ分解の結果として修飾反応中に生成するNH<sub>2</sub>Sの量に対してあるモル比の外因性NH<sub>2</sub>Sを添加することを含む。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

リンカーが結合した細胞結合剤を調製するためのプロセスであって、細胞結合剤を二官能性架橋剤と外因性 N - ヒドロキシスクシンイミド ( N H S ) の存在下で接触させて、リンカーを前記細胞結合剤と共有結合させ、それによってリンカーが結合した細胞結合剤を含む混合物を調製することを含む、プロセス。

**【請求項 2】**

リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスであって：

( a ) 細胞結合剤を二官能性架橋剤と接触させて、リンカーを前記細胞結合剤と共有結合させ、それによって、リンカーが結合した細胞結合剤を含む第 1 混合物を調製し、

( b ) 前記第 1 混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供し、それによってリンカーが結合した細胞結合剤の精製された第 1 混合物を調製し、

( c ) リンカーが結合した前記細胞結合剤を細胞傷害剤と反応させることによって、精製された前記第 1 混合物中のリンカーが結合した前記細胞結合剤に細胞傷害剤を複合させて、( i ) 前記リンカーによって前記細胞傷害剤に化学的にカップリングした前記細胞結合剤を含む前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体、( i i ) 遊離細胞傷害剤、および ( i i i ) 反応副生成物を含む第 2 混合物を調製し、そして

( d ) 前記第 2 混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を前記第 2 混合物の他の成分から精製し、それによって前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体の精製された第 2 混合物を調製することを含み、外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドをステップ ( a ) 中またはステップ ( a ) 後、およびステップ ( c ) 前に添加する、プロセス。

**【請求項 3】**

ステップ ( a ) における接触を外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下で実施する、請求項 2 記載のプロセス。

**【請求項 4】**

ステップ ( a ) 後の第 1 混合物を外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下で保持することをさらに含む、請求項 2 記載のプロセス。

**【請求項 5】**

保持が約 4 . 0 から約 9 . 0 の p H を有する溶液中で実施される、請求項 4 記載のプロセス。

**【請求項 6】**

p H が約 5 . 0 から約 8 . 0 である、請求項 5 記載のプロセス。

**【請求項 7】**

外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドをステップ ( b ) で添加する、請求項 2 記載のプロセス。

**【請求項 8】**

ステップ ( b ) 後の精製された第 1 混合物を外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下で保持することをさらに含む、請求項 2 記載のプロセス。

**【請求項 9】**

保持を、約 4 . 0 から約 9 . 0 の p H を有する溶液中で実施する、請求項 8 記載のプロセス。

**【請求項 10】**

p H が約 5 . 0 から約 8 . 0 である、請求項 9 記載のプロセス。

**【請求項 11】**

タンジェンシャルフローろ過をステップ ( b ) および ( d ) で利用する、請求項 2 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

10

20

30

40

50

## 【請求項 12】

吸着クロマトグラフィーをステップ (b) および (d) で利用する、請求項 2 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

## 【請求項 13】

吸着クロマトグラフィーをステップ (b) で利用し、タンジェンシャルフローろ過をステップ (d) で利用する、請求項 2 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

## 【請求項 14】

非吸着クロマトグラフィーをステップ (b) および (d) で利用する、請求項 2 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

## 【請求項 15】

タンジェンシャルフローろ過をステップ (b) で利用し、吸着クロマトグラフィーをステップ (d) で利用する、請求項 2 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

## 【請求項 16】

ステップ (a) における接触が約 4.0 から約 9.0 の pH を有する溶液中で起こる、請求項 2 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

## 【請求項 17】

pH が約 6.0 から約 8.0 である、請求項 16 記載のプロセス。

## 【請求項 18】

pH が約 6.5 から約 7.5 である、請求項 16 記載のプロセス。

## 【請求項 19】

ステップ (c) における複合が約 4.0 から約 9.0 の pH を有する溶液中で起こる、請求項 2 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

## 【請求項 20】

pH が約 5.0 から約 8.0 である、請求項 19 記載のプロセス。

## 【請求項 21】

pH が約 6.5 から約 7.5 である、請求項 19 記載のプロセス。

## 【請求項 22】

リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスであって：

(a) 細胞結合剤を二官能性架橋剤と接触させて、リンカーを前記細胞結合剤と共有結合させ、それによって、リンカーが結合した細胞結合剤を含む第 1 混合物を調製し、

(b) リンカーが結合した前記細胞結合剤を細胞傷害剤と反応させて、細胞傷害剤を前記第 1 混合物中のリンカーが結合した前記細胞結合剤と複合させることによって、(i) 前記リンカーによって前記細胞傷害剤にカップリングした前記細胞結合剤を含む前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体、(ii) 遊離細胞傷害剤、および (iii) 反応副生成物を含む第 2 混合物を調製し、そして

(c) 前記第 2 混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を前記第 2 混合物の他の成分から精製し、それによって前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体の精製された第 2 混合物を調製することを含み、  
外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドをステップ (a) 中またはステップ (a) 後およびステップ (b) 前に添加する、プロセス。

## 【請求項 23】

ステップ (a) における接触を外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下で実施する、請求項 22 記載のプロセス。

## 【請求項 24】

ステップ (a) 後の第 1 混合物を外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下で保持することをさらに含む、請求項 22 記載のプロセス。

## 【請求項 25】

保持を約 4.0 から約 9.0 の pH を有する溶液中で実施する、請求項 24 記載のプロ

10

20

30

40

50

セス。

【請求項 26】

pH が約 6.0 から約 8.0 である、請求項 25 記載のプロセス。

【請求項 27】

タンジェンシャルフローろ過をステップ (c) で利用する、請求項 22 ~ 26 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 28】

吸着クロマトグラフィーをステップ (c) で利用する、請求項 22 ~ 26 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 29】

非吸着クロマトグラフィーをステップ (c) で利用する、請求項 22 ~ 26 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 30】

ステップ (a) における接触が約 4.0 から約 9.0 の pH を有する溶液中で起こる、請求項 22 ~ 29 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 31】

pH が約 6.0 から約 8.0 である、請求項 30 記載のプロセス。

【請求項 32】

pH が約 6.5 から約 7.5 である、請求項 30 記載のプロセス。

【請求項 33】

ステップ (b) における複合が約 4.0 から約 9.0 の pH を有する溶液中で起こる、請求項 22 ~ 32 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 34】

pH が約 5.0 から約 8.0 である、請求項 33 記載のプロセス。

【請求項 35】

pH が約 6.5 から約 7.5 である、請求項 33 記載のプロセス。

【請求項 36】

リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスであって：

(a) 細胞結合剤を、リンカーに化学的にカップリングした細胞傷害剤を含む細胞傷害剤 - リンカー化合物と接触させて、前記細胞傷害剤 - リンカー化合物を前記細胞結合剤と共有結合させ、それにより前記リンカーによって前記細胞傷害剤と化学的にカップリングした前記細胞結合剤を含む前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を含む混合物を調製し、そして

(b) 前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を含む前記混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィーまたはそれらの組み合わせに供して、前記複合体を精製することを含み、  
外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドをステップ (a) 中またはステップ (a) 後およびステップ (b) 前に添加する、プロセス。

【請求項 37】

ステップ (a) における接触を外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下で実施する、請求項 36 記載のプロセス。

【請求項 38】

ステップ (a) 後の混合物を外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下で保持することをさらに含む、請求項 36 記載のプロセス。

【請求項 39】

保持が約 4.0 から約 9.0 の pH を有する溶液中で実施される、請求項 38 記載のプロセス。

【請求項 40】

pH が約 6.0 から約 8.0 である、請求項 39 記載のプロセス。

10

20

30

40

50

## 【請求項 4 1】

細胞傷害剤をリンカーを含む二官能性架橋剤と接触させて、細胞傷害剤をリンカーと共有結合させ、それによって細胞傷害剤 - リンカー化合物を含む混合物を調製することによって、細胞傷害剤 - リンカー化合物を調製する、請求項 3 6 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

## 【請求項 4 2】

細胞傷害剤 - リンカー化合物を細胞結合剤と接触させる前に精製する、請求項 3 6 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

## 【請求項 4 3】

細胞傷害剤 - リンカー化合物を細胞結合剤と接触させる前に精製しない、請求項 3 6 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

## 【請求項 4 4】

ステップ ( a ) における接触が約 4 . 0 から約 9 . 0 の p H を有する溶液中で起こる、請求項 3 6 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

## 【請求項 4 5】

p H が約 6 . 0 から約 8 . 0 である、請求項 4 4 記載のプロセス。

## 【請求項 4 6】

p H が約 6 . 5 から約 7 . 5 である、請求項 4 4 記載のプロセス。

## 【請求項 4 7】

リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスであって：

( a ) 細胞結合剤を二官能性架橋剤と接触させて、リンカーを前記細胞結合剤と共有結合させ、それによって、リンカーが結合した細胞結合剤を含む第 1 混合物を調製し、

( b ) 前記第 1 混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供し、それによってリンカーが結合した細胞結合剤の精製された第 1 混合物を調製し、

( c ) リンカーが結合した細胞結合剤を細胞傷害剤と外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下で反応させることによって、細胞傷害剤を前記精製された第 1 混合物中のリンカーが結合した前記細胞結合剤と複合させて、( i ) リンカーによって細胞傷害剤にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体、( i i ) 遊離細胞傷害剤、および ( i i i ) 反応副生成物を含む第 2 混合物を調製し、そして

( d ) 前記第 2 混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を前記第 2 混合物の他の成分から精製し、それによって前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体の精製された第 2 混合物を調製することを含む、プロセス。

## 【請求項 4 8】

タンジェンシャルフローろ過をステップ ( b ) および ( d ) で利用する、請求項 4 7 記載のプロセス。

## 【請求項 4 9】

吸着クロマトグラフィーをステップ ( b ) および ( d ) で利用する、請求項 4 7 記載のプロセス。

## 【請求項 5 0】

非吸着クロマトグラフィーをステップ ( b ) および ( d ) で利用する、請求項 4 7 記載のプロセス。

## 【請求項 5 1】

吸着クロマトグラフィーをステップ ( b ) で利用し、タンジェンシャルフローろ過をステップ ( d ) で利用する、請求項 4 7 記載のプロセス。

## 【請求項 5 2】

タンジェンシャルフローろ過をステップ ( b ) で利用し、吸着クロマトグラフィーをス

10

20

30

40

50

ステップ ( d ) で利用する、請求項 4 7 記載のプロセス。

【請求項 5 3】

ステップ ( a ) における接触が約 4 . 0 から約 9 . 0 の p H を有する溶液中で起こる、請求項 4 7 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 5 4】

p H が約 6 . 0 から約 8 . 0 である、請求項 5 3 記載のプロセス。

【請求項 5 5】

p H が約 6 . 5 から約 7 . 5 である、請求項 5 3 記載のプロセス。

【請求項 5 6】

ステップ ( c ) における複合が約 4 . 0 から約 9 . 0 の p H を有する溶液中で起こる、請求項 4 7 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 5 7】

p H が約 5 . 0 から約 8 . 0 である、請求項 5 6 記載のプロセス。

【請求項 5 8】

p H が約 6 . 5 から約 7 . 5 である、請求項 5 6 記載のプロセス。

【請求項 5 9】

リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスであって：

( a ) 細胞結合剤を二官能性架橋剤と接触させて、リンカーを前記細胞結合剤と共有結合させ、それによって、リンカーが結合した細胞結合剤を含む第 1 混合物を調製し、

( b ) リンカーが結合した細胞結合剤を、外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下で細胞傷害剤と反応させることによって、前記第 1 混合物中のリンカーが結合した前記細胞結合剤に細胞傷害剤を複合させて、( i ) リンカーによって細胞傷害剤に化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体、( i i ) 遊離細胞傷害剤、および ( i i i ) 反応副生成物を含む第 2 混合物を調製し、そして

( c ) 第 2 混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を前記第 2 混合物の他の成分から精製し、それによって前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体の精製された第 2 混合物を調製することを含む、プロセス。

【請求項 6 0】

タンジェンシャルフローろ過をステップ ( c ) で利用する、請求項 5 9 記載のプロセス。

【請求項 6 1】

吸着クロマトグラフィーをステップ ( c ) で利用する、請求項 5 9 記載のプロセス。

【請求項 6 2】

非吸着クロマトグラフィーをステップ ( c ) で利用する、請求項 5 9 記載のプロセス。

【請求項 6 3】

ステップ ( a ) における接触が約 4 . 0 から約 9 . 0 の p H を有する溶液中で起こる、請求項 5 9 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 6 4】

p H が約 6 . 0 から約 8 . 0 である、請求項 6 3 記載のプロセス。

【請求項 6 5】

p H が約 6 . 5 から約 7 . 5 である、請求項 6 3 記載のプロセス。

【請求項 6 6】

ステップ ( c ) における複合が約 4 . 0 から約 9 . 0 の p H を有する溶液中で起こる、請求項 5 9 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 6 7】

p H が約 5 . 0 から約 8 . 0 である、請求項 6 6 記載のプロセス。

【請求項 6 8】

10

20

30

40

50

pHが約6.5から約7.5である、請求項66記載のプロセス。

【請求項69】

リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスであって：

(a) 細胞結合剤を二官能性架橋剤と接触させて、リンカーを前記細胞結合剤と共有結合させ、それによって、リンカーが結合した細胞結合剤を含む第1混合物を調製し、

(b) 第1混合物をタンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供し、それによってリンカーが結合した細胞結合剤の精製された第1混合物を調製し、

(c) リンカーが結合した前記細胞結合剤を細胞傷害剤と反応させることによって、細胞傷害剤を前記精製された第1混合物中のリンカーが結合した前記細胞結合剤と複合させて、(i) リンカーによって前記細胞傷害剤に化学的にカップリングした前記細胞結合剤を含む前記細胞結合剤-細胞傷害剤複合体、(ii) 遊離細胞傷害剤、および(iii) 反応副生成物を含む第2混合物を調製し、

(d) 第2混合物を外因性N-ヒドロキシスクシンイミドの存在下でインキュベートし；そして

(e) ステップ(d)の後、前記第2混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、前記細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を前記第2混合物の他の成分から精製し、それにより前記リンカーによって前記細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤の精製された第2混合物を調製することを含む、プロセス。

【請求項70】

ステップ(d)でのインキュベートが約4.0から約9.0のpHを有する溶液中で起こる、請求項69記載のプロセス。

【請求項71】

pHが約5.0から約8.0である、請求項70記載のプロセス。

【請求項72】

pHが約6.5から約7.5である、請求項70記載のプロセス。

【請求項73】

ステップ(a)における接触が約4.0から約9.0のpHを有する溶液中で起こる、請求項69～72のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項74】

pHが約6.0から約8.0である、請求項73記載のプロセス。

【請求項75】

pHが約6.5から約7.5である、請求項73記載のプロセス。

【請求項76】

ステップ(c)における複合が約4.0から約9.0のpHを有する溶液中で起こる、請求項69～75のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項77】

pHが約5.0から約8.0である、請求項76記載のプロセス。

【請求項78】

pHが約6.5から約7.5である、請求項76記載のプロセス。

【請求項79】

第2混合物を、ステップ(c)～(d)間でタンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を第2混合物の他の成分から精製し、それによってステップ(d)前に前記細胞結合剤-細胞傷害剤複合体の精製された第2混合物を調製することをさらに含む、請求項69～78のいずれか1項に記載のプロセス

【請求項80】

精製が外因性N-ヒドロキシスクシンイミドの存在下で実施される、請求項79記載の

10

20

30

40

50

プロセス。

【請求項 8 1】

第 2 混合物をステップ (c) ~ (d) 間でタンジェンシャルフローろ過に供する、請求項 7 9 または 8 0 記載のプロセス。

【請求項 8 2】

タンジェンシャルフローろ過をステップ (e) で利用する、請求項 6 9 ~ 8 1 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 8 3】

吸着クロマトグラフィーをステップ (e) で利用する、請求項 6 9 ~ 8 1 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 8 4】

非吸着クロマトグラフィーをステップ (e) で利用する、請求項 6 9 ~ 8 1 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 8 5】

タンジェンシャルフローろ過をステップ (b) で利用する、請求項 6 9 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 8 6】

吸着クロマトグラフィーをステップ (b) で利用する、請求項 6 9 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 8 7】

非吸着クロマトグラフィーをステップ (b) で利用する、請求項 6 9 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 8 8】

リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む複合体を調製するためのプロセスであって：

(a) 細胞結合剤を二官能性架橋剤と接触させて、リンカーを前記細胞結合剤と共有結合させ、それによって、リンカーが結合した細胞結合剤を含む第 1 混合物を調製し、

(b) リンカーが結合した前記細胞結合剤を細胞傷害剤と反応させることによって、細胞傷害剤を第 1 混合物中のリンカーが結合した前記細胞結合剤と複合させて、(i) 前記リンカーによって前記細胞傷害剤に化学的にカップリングした前記細胞結合剤を含む前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体、(ii) 遊離細胞傷害剤、および (iii) 反応副生成物を含む第 2 混合物を調製し、

(c) 前記第 2 混合物を外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下でインキュベートし；そして

(d) ステップ (c) の後、前記第 2 混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を前記第 2 混合物の他の成分から精製し、それによって前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体の精製された第 2 混合物を調製することを含む、プロセス。

【請求項 8 9】

ステップ (c) でのインキュベートが約 4 . 0 から 9 . 0 の pH を有する溶液中で起こる、請求項 8 8 記載のプロセス。

【請求項 9 0】

pH が約 5 . 0 から約 8 . 0 である、請求項 8 9 記載のプロセス。

【請求項 9 1】

pH が約 6 . 5 から約 7 . 5 である、請求項 8 9 記載のプロセス。

【請求項 9 2】

ステップ (a) における接触が約 4 . 0 から約 9 . 0 の pH を有する溶液中で起こる、請求項 8 8 ~ 9 1 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 9 3】



pHが約6.0から約8.0である、請求項92記載のプロセス。

【請求項94】

pHが約6.5から約7.5である、請求項92記載のプロセス。

【請求項95】

ステップ(b)における複合が約4.0から約9.0のpHを有する溶液で起こる、請求項88～94のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項96】

pHが約5.0から約8.0である、請求項95記載のプロセス。

【請求項97】

pHが約6.5から約7.5である、請求項95記載のプロセス。

10

【請求項98】

第2混合物を、ステップ(b)～(c)間でタンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を第2混合物の他の成分から精製し、それによってステップ(c)前に前記細胞結合剤-細胞傷害剤複合体の精製された第2混合物を調製することをさらに含む、請求項88～97のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項99】

ステップ(b)～(c)間の第2混合物の精製を外因性N-ヒドロキシスクシンイミドの存在下で実施する、請求項98記載のプロセス。

【請求項100】

20

第2混合物をステップ(b)～(c)間でタンジェンシャルフローろ過に供する、請求項98または99記載のプロセス。

【請求項101】

タンジェンシャルフローろ過がステップ(d)で利用される、請求項88～100のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項102】

吸着クロマトグラフィーがステップ(d)で利用される、請求項88～100のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項103】

非吸着クロマトグラフィーがステップ(d)で利用される、請求項88～100のいずれか1項に記載のプロセス。

30

【請求項104】

リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスであって：

(a)細胞結合剤を細胞傷害剤と接触させて、前記細胞結合剤および前記細胞傷害剤を含む第1混合物を形成し、次いで前記第1混合物を、リンカーを含む二官能性架橋剤と、約4から約9のpHを有する溶液中で接触させて、(i)前記リンカーによって前記細胞傷害剤に化学的にカップリングした前記細胞結合剤を含む前記細胞結合剤-細胞傷害剤複合体、(ii)遊離細胞傷害剤、および(iii)反応副生成物を含む第2混合物を提供し；

40

(b)前記第2混合物を外因性N-ヒドロキシスクシンイミドの存在下でインキュベートし；そして

(c)前記第2混合物をステップ(b)の後、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、前記細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を前記第2混合物の他の成分から精製し、それによって前記細胞結合剤-細胞傷害剤複合体の精製された第2混合物を調製することを含む、プロセス。

【請求項105】

ステップ(b)のインキュベートが、第1混合物を二官能性架橋剤と接触させた直後に実施される、請求項104記載のプロセス。

50

## 【請求項 106】

ステップ (b) のインキュベートが約 4.0 から 9.0 の pH を有する溶液中で起こる、請求項 104 または 105 記載のプロセス。

## 【請求項 107】

pH が約 5.0 から約 8.0 である、請求項 106 記載のプロセス。

## 【請求項 108】

pH が約 6.5 から約 7.5 である、請求項 106 記載のプロセス。

## 【請求項 109】

ステップ (a) における接触が pH 約 4.0 から約 9.0 を有する溶液中で起こる、請求項 104 ~ 108 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

10

## 【請求項 110】

pH が約 6.0 から 8.0 である、請求項 109 記載のプロセス。

## 【請求項 111】

第 2 混合物をステップ (a) ~ (b) 間でタンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を第 2 混合物の他の成分から精製し、それによってステップ (b) 前に前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体の精製された第 2 混合物を調製することをさらに含む、請求項 104 ~ 110 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

## 【請求項 112】

ステップ (a) ~ (b) 間の第 2 混合物の精製が外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下で実施される、請求項 111 記載のプロセス。

20

## 【請求項 113】

第 2 混合物をステップ (a) ~ (b) 間でタンジェンシャルフローろ過に供する、請求項 111 または 112 記載のプロセス。

## 【請求項 114】

タンジェンシャルフローろ過がステップ (c) で利用される、請求項 104 ~ 113 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

## 【請求項 115】

吸着クロマトグラフィーがステップ (c) で利用される、請求項 104 ~ 113 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

30

## 【請求項 116】

非吸着クロマトグラフィーがステップ (c) で利用される、請求項 104 ~ 113 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

## 【請求項 117】

リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスであって：

(a) 細胞結合剤を細胞傷害剤と外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下で接触させて、前記細胞結合剤および前記細胞傷害剤を含む第 1 混合物を形成し、次いで前記第 1 混合物を、リンカーを含む二官能性架橋剤と約 4 ~ 約 9 の pH を有する溶液中で接触させて、(i) 前記リンカーによって前記細胞傷害剤に化学的にカップリングした前記細胞結合剤を含む前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体、(ii) 遊離細胞傷害剤、および (iii) 反応副生成物を含む第 2 混合物を提供し；そして

40

(b) 前記第 2 混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を前記第 2 混合物の他の成分から精製し、それによって前記細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体の精製された第 2 混合物を調製することを含む、プロセス。

## 【請求項 118】

リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスであって：

50

(a) 細胞結合剤を細胞傷害剤と接触させて、前記細胞結合剤および前記細胞傷害剤を含む第1混合物を形成し、次いで、約4から約9のpHを有する溶液中で、前記第1混合物を、リンカーを含む二官能性架橋剤と外因性N-ヒドロキシスクシンイミドの存在下で接触させて、(i) 前記リンカーによって前記細胞傷害剤に化学的にカップリングした前記細胞結合剤を含む細胞結合剤-細胞傷害剤複合体、(ii) 遊離細胞傷害剤、および(iii) 反応副生成物を含む第2混合物を提供し；

(b) 前記第2混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、前記細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を前記第2混合物の他の成分から精製し、それによって前記細胞結合剤-細胞傷害剤複合体の精製された第2混合物を調製することを含む、プロセス。

【請求項119】

ステップ(a)における接触がpH約4.0から約9.0を有する溶液中で起こる、請求項117または118記載のプロセス。

【請求項120】

pHが約6.0から8.0である、請求項119記載のプロセス。

【請求項121】

タンジェンシャルフローろ過がステップ(b)で利用される、請求項117から120のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項122】

吸着クロマトグラフィーがステップ(b)で利用される、請求項117～120のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項123】

非吸着クロマトグラフィーがステップ(b)で利用される、請求項117～120のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項124】

リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスであって；

(a) 細胞結合剤を、リンカーに化学的にカップリングした細胞傷害剤を含む細胞傷害剤-リンカー化合物と接触させて、細胞傷害剤-リンカー化合物を細胞結合剤と共有結合させ、それによってリンカーによって前記細胞傷害剤に化学的にカップリングした前記細胞結合剤を含む前記細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を含む混合物を調製し；

(b) ステップ(a)の前記混合物を外因性N-ヒドロキシスクシンイミドの存在下でインキュベートし；そして

(c) 前記混合物をステップ(b)後にタンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、前記細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を前記混合物の他の成分から精製し、それによって前記細胞結合剤-細胞傷害剤複合体の精製された混合物を調製することを含む、プロセス。

【請求項125】

細胞傷害剤を、リンカーを含む二官能性架橋剤と接触させて前記細胞傷害剤を前記リンカーと共有結合させることによって前記細胞傷害剤-リンカー化合物を調製する、請求項124記載のプロセス。

【請求項126】

細胞傷害剤-リンカー化合物を細胞結合剤と接触させる前に精製する、請求項124または125記載のプロセス。

【請求項127】

細胞傷害剤-リンカー化合物を細胞結合剤と接触させる前に精製しない、請求項124または125記載のプロセス。

【請求項128】

10

20

30

40

50

ステップ ( b ) におけるインキュベートが約 4 . 0 から 9 . 0 の p H を有する溶液中で起こる、請求項 1 2 4 ~ 1 2 7 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 2 9】

p H が約 5 . 0 から約 8 . 0 である、請求項 1 2 8 記載のプロセス。

【請求項 1 3 0】

p H が約 6 . 5 から約 7 . 5 である、請求項 1 2 8 記載のプロセス。

【請求項 1 3 1】

ステップ ( a ) における接触が約 4 . 0 から約 9 . 0 の p H を有する溶液中で起こる、請求項 1 2 4 ~ 1 3 0 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 3 2】

p H が約 6 . 0 から約 8 . 0 である、請求項 1 3 1 記載のプロセス。

【請求項 1 3 3】

p H が約 6 . 5 から約 7 . 5 である、請求項 1 3 1 記載のプロセス。

【請求項 1 3 4】

ステップ ( a ) の混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせの組み合わせにステップ ( a ) ~ ( b ) 間で供して、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を混合物の他の成分から精製し、それによってステップ ( b ) 前に細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体の精製された混合物を調製することをさらに含む、請求項 1 2 4 ~ 1 3 3 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 3 5】

ステップ ( a ) ~ ( b ) 間の混合物の精製を外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下で実施する、請求項 1 3 4 記載のプロセス。

【請求項 1 3 6】

ステップ ( a ) の混合物をステップ ( a ) ~ ( b ) 間でタンジェンシャルフローろ過に供する、請求項 1 3 4 または 1 3 5 記載のプロセス。

【請求項 1 3 7】

タンジェンシャルフローろ過をステップ ( c ) で利用する、請求項 1 2 4 ~ 1 3 6 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 3 8】

吸着クロマトグラフィーをステップ ( c ) で利用する、請求項 1 2 4 ~ 1 3 6 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 3 9】

非吸着クロマトグラフィーをステップ ( c ) で利用する、請求項 1 2 4 ~ 1 3 6 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 4 0】

非吸着クロマトグラフィーが、SEPHADEX ( 商標 ) 樹脂、SEPHACRYL ( 商標 ) 樹脂、SUPERDEX ( 商標 ) 樹脂、および BIO - GEL ( 登録商標 ) 樹脂からなる群から選択される、請求項 2 ~ 1 3 9 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 4 1】

吸着クロマトグラフィーが、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 ( H C I C )、疎水性相互作用クロマトグラフィー ( H I C )、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 ( I M A C )、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、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 4 0 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 4 2】

細胞結合剤が、抗体、インターフェロン、インターロイキン 2 ( I L - 2 )、インターロイキン 3 ( I L - 3 )、インターロイキン 4 ( I L - 4 )、インターロイキン 6 ( I L - 6 )、インスリン、E G F、T G F - 、F G F、G - C S F、V E G F、M C S F、

10

20

30

40

50

G M - C S F、およびトランスフェリンからなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 4 1 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 4 3】

細胞結合剤が抗体である、請求項 1 4 2 記載のプロセス。

【請求項 1 4 4】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 4 3 記載のプロセス。

【請求項 1 4 5】

抗体がヒト化モノクローナル抗体である、請求項 1 4 3 記載のプロセス。

【請求項 1 4 6】

抗体が、h u N 9 0 1、h u M y 9 - 6、h u B 4、h u C 2 4 2、トラスツズマブ、  
ビバツズマブ、シブロッツズマブ、C N T O 9 5、h u D S 6、リツキシマブ、抗 C D 2 7  
L 抗体、抗 E G F R v I I I 抗体、抗クリプト抗体、抗 C D 1 3 8 抗体、抗 C D 3 8 抗体  
、抗 E p h A 2 抗体、インテグリンを標的とする抗体、抗 C D 3 7 抗体、葉酸代謝拮抗剤  
受容体抗体、抗 H e r 3 抗体、および抗 I G F I R 抗体からなる群から選択される、請求  
項 1 4 3 記載のプロセス。

10

【請求項 1 4 7】

細胞傷害剤が、メイタンシノイド、タキサン、C C 1 0 6 5、および前記のものの類似  
体からなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 4 6 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 4 8】

細胞傷害剤がメイタンシノイドである、請求項 1 4 7 記載のプロセス。

20

【請求項 1 4 9】

メイタンシノイドがチオール基を含む、請求項 1 4 8 記載のプロセス。

【請求項 1 5 0】

メイタンシノイドが D M 1 である、請求項 1 4 8 記載のプロセス。

【請求項 1 5 1】

メイタンシノイドが D M 4 である、請求項 1 4 8 記載のプロセス。

【請求項 1 5 2】

細胞結合剤が、ジスルフィド結合、酸不安定性結合、感光性結合、ペプチダーゼ不安定  
性結合、チオエーテル結合、およびエステラーゼ不安定性結合からなる群から選択される  
化学結合により細胞傷害剤と化学的にカップリングされる、請求項 1 ~ 1 5 1 のいずれか  
1 項に記載のプロセス。

30

【請求項 1 5 3】

二官能性架橋剤が、細胞結合剤のリジン残基とアミド結合を形成することができる反応  
性部分を含む、請求項 1 ~ 1 5 2 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 5 4】

反応性部分がカルボン酸部分または反応性エステル部分である、請求項 1 5 3 記載のプ  
ロセス。

【請求項 1 5 5】

二官能性架橋剤が N - スクシンイミジルエステル部分または N - スルホスクシンイミジ  
ルエステル部分を含む、請求項 1 5 3 記載のプロセス。

40

【請求項 1 5 6】

二官能性架橋剤がマレイミド系部分をさらに含む、請求項 1 5 5 記載のプロセス。

【請求項 1 5 7】

二官能性架橋剤が、N - スクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル)シクロヘキサンカ  
ルボン酸 ( S M C C )、N - スクシンイミジル - 4 - ( N - マレイミドメチル ) - シクロ  
ヘキサン - 1 - カルボキシ - ( 6 - アミドカブロン酸 ) ( L C - S M C C )、 - マレイ  
ミドウンデカン酸 N - スクシンイミジルエステル ( K M U A )、 - マレイミドブタン酸  
N - スクシンイミジルエステル ( G M B S )、N - ( - マレイミドプロピルオキシ ) ス  
クシンイミドエステル ( B M P S )、 - マレイミドカブロン酸 N - ヒドロキシスクシン  
イミドエステル ( E M C S )、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミ

50

ドエステル (MBS)、N - ( - マレイミドアセトキシ) - スクシンイミドエステル (AMAS)、スクシンイミジル - 6 - ( - マレイミドプロピオンアミド) ヘキサン酸 (SMPH)、N - スクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) - ブタン酸 (SMPB)、スルホ - Mal、PEG<sub>4</sub> - Mal、CX1 - 1、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ブタン酸 (SPDB)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ペンタン酸 (SPP)、および N - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルジチオ) 2 - スルホブタン酸 (スルホ - SPDB) からなる群から選択される、請求項 155 記載のプロセス。

【請求項 158】

二官能性架橋剤が、N - スクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボン酸 (SMCC)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ペンタン酸 (SPP)、または N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ブタン酸 (SPDB) である、請求項 157 記載のプロセス。

10

【請求項 159】

外因性 N - ヒドロキシスクシンイミドの二官能性架橋剤に対するモル比が約 0.5 から約 1000 である、請求項 1 ~ 158 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

20

本特許出願は、2011 年 12 月 13 日付で出願された米国特許仮出願第 61 / 570,139 号の有益性を請求し、当該出願は参照によって本明細書中に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

ガンおよび他の疾患の治療に有用な抗体 - 薬物複合体は、通常、3 つの異なる要素、すなわち細胞結合剤；リンカー；および細胞傷害剤から構成される。通常用いられる製造プロセスのうちの 1 つは、細胞結合剤を二官能性リンカーと反応させて、反応性基を有するリンカーに共有結合した細胞結合剤を形成する修飾ステップ；修飾抗体を修飾反応の他の成分から精製する精製ステップ；修飾された細胞結合剤を細胞傷害剤と反応させて、細胞傷害剤に対するリンカーから共有化学結合を形成する複合ステップ（反応性基を使用）；および複合体を複合反応の他の成分から精製する第 2 の精製ステップを含む。

30

【0003】

抗体 - 薬物複合体調製の進歩にもかかわらず、現在のプロセスはいくつかの因子によって制限される。例えば、二官能性架橋剤の抗体に対する結合は、当該技術分野で現在用いられる条件下で不均一であり、その結果、安定なアミド結合と不安定なエステル結合とを含む複合体が得られる。複合体中に不安定なエステル結合が存在すると、複合体からの薬物の緩慢な放出および複合体不安定性をもたらすと考えられている。

【0004】

最近の臨床試験は、多くの異なる種類のガンの治療における抗体 - 薬物複合体の有望な役割を示す。したがって、現行の方法によって産生される抗体 - 薬物複合体よりも安定で高純度を有するものである抗体 - 薬物複合体を調製する改善されたプロセスが依然として必要とされる。本発明はそのようなプロセスを提供する。本発明のこれらや他の利点、ならびにさらなる本発明の特徴は、本明細書中で提供される本発明の説明から明らかになるであろう。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、外因性 N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) の存在下で改善された安定性を有する細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を製造するプロセスを提供する。

【課題を解決するための手段】

50

## 【 0 0 0 6 】

細胞傷害剤と化学的にカップリングした抗体を含む複合体（「抗体 - 細胞傷害剤複合体」）が典型的には抗体を二官能性架橋剤で修飾することによって、多くの場合は、架橋剤上の N - ヒドロキシスクシンイミド（NHS）反応性基を利用し、リンカーが結合した抗体を精製し、リンカーが結合した抗体に細胞傷害剤を複合させ、そして抗体 - 細胞傷害剤複合体を精製することによって調製されることを当業者は理解するであろう。本発明は、細胞結合剤に安定して結合するリンカーの量を最大にし、複合体不安定性の原因となる望ましくない副反応を最小限に抑えることによって、そのような方法を改善する。

## 【 0 0 0 7 】

二官能性リンカー（例えば、SPP、SPDB、SMCC）の加水分解 / アミノ分解の結果として修飾反応の間に少量の NHS が生じる。NHS は現在、当業者によって修飾反応の望ましくない（またはよくても中立の）副生成物とみなされている。したがって、現在の方法は、典型的には細胞傷害剤の添加前に修飾抗体の精製を含み、その結果、複合反応の前に NHS が除去される。

## 【 0 0 0 8 】

外因性 NHS の存在下で抗体 - 細胞傷害剤複合体を調製すると、遊離メイタンシノイドの放出によって測定して、複合体の安定性が有意に増加することが意外にも見いだされた。したがって、本発明は、外因性 NHS の存在下で改善された安定性を有する細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を製造するためのプロセスを提供する。

## 【 0 0 0 9 】

本発明は、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは外因性 NHS の添加を含む。「外因性 NHS」は、本明細書中で用いられる場合、外部供給源からのプロセスの間に添加される NHS を指し、二官能性リンカーの加水分解 / アミノ分解の結果として修飾反応中に発生する NHS を指すものではない。

## 【 0 0 1 0 】

1つの実施形態において、本発明は、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは約 0.1 mM から約 300 mM の外因性 NHS の添加を含む。例えば、本発明のプロセスは、約 0.1 mM、約 0.2 mM、約 0.3 mM、約 0.4 mM、約 0.5 mM、約 0.6 mM、約 0.7 mM、約 0.8 mM、約 0.9 mM、約 1.0 mM、約 1.1 mM、約 1.3 mM、約 1.5 mM、約 1.7 mM、約 1.9 mM、約 2.0 mM、約 2.1 mM、約 2.3 mM、約 2.5 mM、約 2.7 mM、約 2.9 mM、約 3.0 mM、約 3.1 mM、約 3.3 mM、約 3.5 mM、約 3.7 mM、約 3.9 mM、約 4.0 mM、約 4.1 mM、約 4.3 mM、約 4.5 mM、約 4.7 mM、約 4.9 mM、約 5.0 mM、約 5.1 mM、約 5.3 mM、約 5.5 mM、約 5.7 mM、約 5.9 mM、約 6.0 mM、約 6.1 mM、約 6.3 mM、約 6.5 mM、約 6.7 mM、約 6.9 mM、約 7.0 mM、約 7.1 mM、約 7.3 mM、約 7.5 mM、約 7.7 mM、約 7.9 mM、約 8.0 mM、約 8.1 mM、約 8.3 mM、約 8.5 mM、約 8.7 mM、約 8.9 mM、約 9.0 mM、約 9.1 mM、約 9.3 mM、約 9.5 mM、約 9.7 mM、約 9.9 mM、約 10 mM、約 11 mM、約 12 mM、約 13 mM、約 14 mM、約 15 mM、約 16 mM、約 17 mM、約 18 mM、約 19 mM、約 20 mM、約 25 mM、約 30 mM、約 35 mM、約 40 mM、約 45 mM、約 50 mM、約 55 mM、約 60 mM、約 65 mM、約 70 mM、約 75 mM、約 80 mM、約 85 mM、約 90 mM、約 95 mM、約 100 mM、約 110 mM、約 120 mM、約 130 mM、約 140 mM、約 150 mM、約 160 mM、約 170 mM、約 180 mM、約 190 mM、約 200 mM、約 210 mM、約 220 mM、約 230 mM、約 240 mM、約 250 mM、約 260 mM、約 270 mM、約 280 mM、約 290 mM、または約 300 mM の外因性 NHS の添加を含む。1つの実施形態において、本発明のプロセスは、約 0.1 mM から約 5 mM、約 0.1 mM から約 10 mM、約 1.0 mM から約 5 mM、約 1.0 mM から約 10 mM、約 5.0 mM から約 10 mM、約 10 mM から約 20 mM、約 20 mM から約 30 mM、約 30 mM から約 40 mM、約 40 mM から約 50 mM、

10

20

30

40

50

約 50 mM から約 60 mM、約 60 mM から約 70 mM、約 70 mM から約 80 mM、約 80 mM から約 90 mM、約 90 mM から約 100 mM、約 100 mM から約 110 mM、約 110 mM から約 120 mM、約 120 mM から約 130 mM、約 130 mM から約 140 mM、約 140 mM から約 150 mM、約 150 mM から約 160 mM、約 160 mM から約 170 mM、約 170 mM から約 180 mM、約 180 mM から約 190 mM、約 190 mM から約 200 mM、約 200 mM から約 220 mM、約 220 mM から約 240 mM、約 240 mM から約 260 mM、約 260 mM から約 280 mM、または約 280 mM から約 300 mM の外因性 NH<sub>2</sub>S の添加を含む。別の実施形態において、本発明のプロセスは約 10 mM から約 200 mM、約 20 から約 150 mM、約 50 から約 150 mM、または約 20 から約 100 mM の外因性 NH<sub>2</sub>S の添加を含む。

10

#### 【0011】

いくつかの実施形態において、本発明のプロセスは、二官能性リンカーの加水分解 / アミノ分解の結果として修飾反応の間に発生する NH<sub>2</sub>S の量に対してあるモル比の外因性 NH<sub>2</sub>S の添加を含む。発生する NH<sub>2</sub>S の量は使用される二官能性リンカーの量と本質的に同じであるので、当業者は特定の修飾の間に発生する NH<sub>2</sub>S の量を決定することができる。当業者は次いで修飾反応の間に発生する NH<sub>2</sub>S の量に対してあるモル比の外因性対反応混合物を添加することができる。1つの実施形態において、修飾反応の間に発生する NH<sub>2</sub>S の量に対して約 2 から約 200 倍の外因性 NH<sub>2</sub>S を添加する。例えば、本発明のプロセスは、修飾反応の間に発生する NH<sub>2</sub>S の量に対して約 2、約 5、約 10、約 15、約 20、約 25、約 50、約 100、または約 200 倍の外因性 NH<sub>2</sub>S を添加することを含む。

20

#### 【0012】

いくつかの実施形態において、本発明のプロセスは、二官能性リンカーの量に対してあるモル比の外因性 NH<sub>2</sub>S の添加を含む。1つの実施形態において、二官能性架橋剤に対する外因性 NH<sub>2</sub>S のモル比は、約 0.5 から約 1000 (例えば、約 1 から約 900、約 5 から約 750、約 50 から約 500、約 100 から約 500、約 0.5 から約 500、または約 100 から約 1000) である。例えば、本発明のプロセスは、二官能性リンカーの量に対して約 0.5、約 1、約 2、約 5、約 10、約 15、約 20、約 25、約 50、約 100、約 200、約 300、約 400、約 500、約 600、約 700、約 800、約 900、または約 1000 倍の NH<sub>2</sub>S を含む。

#### 【0013】

細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するための多くのプロセスが記載されている (例えば、米国特許仮出願第 61/468,997 号、米国特許第 5,208,020 号、米国特許第 6,441,163 号、米国特許第 7,811,572 号、米国特許出願公開第 2006/0182750 号、米国特許出願公開第 2008/0145374 号、米国特許出願公開第 2011/0003969 号、および米国特許出願公開第 2012/0253021 号を参照のこと)。出願者らは驚くべきことに、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセス中に任意の点で外因性 NH<sub>2</sub>S を添加することは複合体安定性に対して有益な効果を及ぼすことを見出した。したがって、本発明のプロセスは、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセス中の任意の点で外因性 NH<sub>2</sub>S の添加することを含む。例えば、本発明のプロセスは、修飾ステップ (すなわち、細胞結合剤を二官能性リンカーと反応させるステップ)、複合ステップ (すなわち、修飾された細胞結合剤を細胞傷害剤と反応させるステップ)、精製ステップ、または、前記ステップのいずれかの間での保持ステップに外因性 NH<sub>2</sub>S を添加することを含む。1つの実施形態において、本発明のプロセスは、修飾ステップ (すなわち、NH<sub>2</sub>S を修飾反応に添加する)、修飾ステップと精製ステップとの間の保持ステップ、修飾ステップと複合ステップとの間の保持ステップ、精製ステップ、複合ステップ、複合ステップと精製ステップとの間の保持ステップ、および / または 2 つの精製ステップ間の保持ステップに、外因性 NH<sub>2</sub>S を添加することを含む。

30

40

#### 【0014】

1つの実施形態において、本発明は、リンカーが結合した細胞結合剤を調製するための

50



プロセスを提供し、このプロセスは、細胞結合剤を二官能性架橋剤と外因性 N H S の存在下で接触させて、リンカーを細胞結合剤と共有結合させて、それによってリンカーが結合した細胞結合剤を含む混合物を調製することを含む。

【 0 0 1 5 】

本発明のプロセスによると、細胞結合剤を二官能性架橋剤と接触させること（すなわち、修飾反応）によって、リンカーが結合した細胞結合剤、ならびに反応物質および他の副生成物を含む第 1 混合物が産生される。本発明のいくつかの実施形態において、第 1 混合物は、それに安定に結合したリンカーおよび不安定に結合したリンカーを有する細胞結合剤、ならびに反応物質および他の副生成物を含む。リンカーと細胞結合剤との間の共有結合が、数か月から数年におよび得る長時間にわたって通常の保存条件下で実質的に弱体化または切断されない場合に、リンカーは細胞結合剤と「安定して」結合している。対照的に、リンカーと細胞結合剤との間の共有結合が数か月から数年におよび得る長時間にわたって通常の保存条件下で実質的に弱体化または切断される場合に、リンカーは細胞結合剤と「不安定に」結合している。

10

【 0 0 1 6 】

修飾反応は好ましくは約 4 から約 p H 9 の p H（例えば、約 4 . 5 から約 8 . 5、約 5 から約 8、約 5 . 5 から約 7 . 5、約 6 から約 7、約 6 から約 8、約 6 から約 9、または約 6 . 5 から約 7 . 5 の p H）で実施される。いくつかの実施形態において、修飾反応は約 6 から約 8 の p H（例えば、約 6、約 6 . 5、約 7、約 7 . 5、または約 8 の p H）で実施される。

20

【 0 0 1 7 】

本発明の 1 つの実施形態において、反応物質および副生成物からの修飾された細胞結合剤の精製を、第 1 混合物を精製プロセスに供することによって実施する。この点に関して、第 1 混合物は、タンジェンシャルフローろ過（T F F）、例えば膜ベースのタンジェンシャルフローろ過プロセス、非吸着クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、もしくは選択的沈殿、または任意の他の好適な精製プロセス、ならびにそれらの組み合わせを用いて精製することができる。この第 1 精製ステップは、精製された第 1 混合物を提供する、すなわち、本発明にしたがった精製前の第 1 混合物と比較して、リンカーが結合した細胞結合剤の濃度が増加し、非結合二官能性架橋剤の量が減少する。好ましくは、タンジェンシャルフローろ過を使用して第 1 混合物を精製する。

30

【 0 0 1 8 】

第 1 混合物を精製して、リンカーが結合した細胞結合剤の精製された第 1 混合物を得た後、リンカーが結合した細胞結合剤と細胞傷害剤とを、約 4 ~ 約 9 の p H を有する溶液中で反応させて第 2 混合物を形成することによって、第 1 の精製された混合物中のリンカーが結合した細胞結合剤に細胞傷害剤を複合させ、この場合、（ i ）リンカーによって細胞傷害剤に化学的にカップリングした細胞結合剤、（ i i ）遊離細胞傷害剤、および（ i i i ）反応副生成物を含む第 2 混合物を製造する。

【 0 0 1 9 】

場合によって、修飾された細胞結合剤の精製を省略してもよい。したがって、本発明の 1 つの実施形態において、リンカーが結合した細胞結合剤を含む第 1 混合物、ならびに反応物質および他の副生成物は、精製プロセスに供されない。そのような状況では、細胞傷害剤を架橋剤と同時に、または後のある時点で、例えば架橋剤を細胞結合剤に添加した後 1、2、3 時間またはそれ以上で添加してもよい。修飾された細胞結合剤を細胞傷害剤と、約 4 から約 9 の p H を有する溶液中で反応させることによって、修飾された細胞結合剤を細胞傷害剤（例えば、メイタンシノイド）と複合させ、この場合、複合ステップの結果、安定な細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体、不安定な細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体、非複合細胞傷害剤（すなわち、「遊離」細胞傷害剤）、反応物質、および副生成物の混合物が形成される。

40

【 0 0 2 0 】

複合反応を、好ましくは約 4 から約 p H 9 の p H（例えば、約 4 . 5 から約 8 . 5、約

50

5 から約 8、約 5.5 から約 7.5、約 6.0 から約 7、または約 6.5 から約 7.5 の pH) で実施する。いくつかの実施形態において、複合反応を約 6 から約 6.5 の pH (例えば、5.5 から 7 の pH、5.7 から 6.8 の pH、5.8 から 6.7 の pH、5.9 から 6.6 の pH、または 6 から 6.5 の pH)、約 6 以下の pH (例えば、約 4 から 6、約 4 から約 5.5、約 5 から 6 の pH) または約 6.5 以上の pH (例えば、6.5 から約 9、約 6.5 から約 7、約 7 から約 9、約 7.5 から約 9、または 6.5 から約 8 の pH) で実施する。1 つの実施形態において、複合反応を約 4 の pH から 6 未満の pH または 6.5 超から 9 の pH で実施する。複合ステップを約 6.5 以上の pH で実施する場合、いくつかの種類のスルフヒドリル含有細胞傷害剤は、ジスルフィド結合形成によって二量体化する傾向があり得る。1 つの実施形態において、微量金属および/または酸素を反応混合物から除去すること、ならびに抗酸化剤の任意の添加もしくはより反応性の高い脱離基を有するリンカーの使用、または 1 より多いアリコートでの細胞傷害剤の添加が、そのような状況における効率的な反応を可能にするために必要とされ得る。

#### 【0021】

本発明のプロセスは、場合によって、本発明のプロセスで使用される複合ステップにスクロースを添加して、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体の溶解度および回収を増加させることができる。望ましくは、スクロースを約 0.1% (w/v) から約 20% (w/v) (例えば、約 0.1% (w/v)、1% (w/v)、5% (w/v)、10% (w/v)、15% (w/v)、または 20% (w/v)) の濃度で添加する。好ましくは、スクロースを、約 1% (w/v) から 10% (w/v) (例えば、(例えば、約 0.5% (w/v)、約 1% (w/v)、約 1.5% (w/v)、約 2% (w/v)、約 3% (w/v)、約 4% (w/v)、約 5% (w/v)、約 6% (w/v)、約 7% (w/v)、約 8% (w/v)、約 9% (w/v)、約 10% (w/v)、または約 11% (w/v)) の濃度で添加する。加えて、複合反応はさらに、緩衝剤の添加も含み得る。当該技術分野で公知の任意の好適な緩衝剤を使用することができる。好適な緩衝剤は、例えば、クエン酸塩緩衝液、酢酸塩緩衝液、コハク酸塩緩衝液、およびリン酸塩緩衝液を含む。好ましい実施形態において、緩衝剤は、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))、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) 脱水物)、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)、HEPPS (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)、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)、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。

#### 【0022】

複合ステップ後、複合体を精製ステップに供する。この点に関して、タンジェンシャルフローろ過 (TFF)、例えば膜ベースのタンジェンシャルフローろ過プロセス、非吸着クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、もしくは選択的沈殿、または任意の他の好適な精製プロセスをそれらの組み合わせと同様に使用して、複合混合物を精製することができる。複合ステップ後の精製によって、細胞傷害剤に化学的にカップリングした細胞結合剤を含む安定な複合体の単離が可能になることは、当業者には理解されるであろう。

#### 【0023】

1 つの実施形態において、本発明は、細胞傷害剤に化学的にカップリングした細胞結合剤を含む複合体を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、修飾ステップ後の第 1 精製ステップと、複合ステップ後の第 2 精製ステップとを含み、このプロセスは外因性 N H S を含む。外因性 N H S は、本発明のプロセス中の任意の時点 (すなわち、修飾ステップ、複合ステップ、精製ステップ (複数可)、または前述のステップのうちの任意のもの) の間の保持ステップ (複数可)) で添加することができる。例えば、1 つの実施形態において、本発明は、リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスを提供し、このプロセ

スは、(a)細胞結合剤を二官能性架橋剤と接触させて、リンカーを細胞結合剤と共有結合させ、それによって、リンカーが結合した細胞結合剤を含む第1混合物を調製し、(b)第1混合物をタンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供し、それによってリンカーが結合した細胞結合剤の精製された第1混合物を調製し、(c)リンカーが結合した細胞結合剤を細胞傷害剤と反応させることによって、細胞傷害剤を精製された第1混合物中のリンカーが結合した細胞結合剤と複合させて、(i)リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤-細胞傷害剤複合体、(ii)遊離細胞傷害剤、および(iii)反応副生成物を含む第2混合物を調製し、そして(d)第2混合物をタンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を第2混合物の他の成分から精製し、それによって細胞結合剤-細胞傷害剤複合体の精製された第2混合物を調製することを含み、外因性NH<sub>2</sub>Sは、ステップ(a)中またはステップ(a)後およびステップ(c)前に添加する(すなわち、ステップ(a)における接触は外因性NH<sub>2</sub>Sの存在下で実施し、プロセスはステップ(a)後に外因性NH<sub>2</sub>Sの存在下で第1混合物を保持することを含む、外因性NH<sub>2</sub>Sをステップ(b)で添加する、および/またはプロセスはステップ(b)後の第1混合物を外因性NH<sub>2</sub>Sの存在下で保持することを含む)の存在下で第1混合物を保持することを含む。別の実施形態において、本発明はリンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、(a)細胞結合剤を二官能性架橋剤と接触させて、リンカーを細胞結合剤と共有結合させ、それによって、リンカーが結合した細胞結合剤を含む第1混合物を調製し、(b)第1混合物をタンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供し、それによって、リンカーが結合した細胞結合剤の精製された第1混合物を調製し、(c)リンカーが結合した細胞結合剤を細胞傷害剤と外因性N-ヒドロキシスクシンイミドの存在下で反応させることによって、精製された第1混合物中のリンカーが結合した細胞結合剤に複合させて、(i)リンカーによって細胞傷害剤にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤-細胞傷害剤複合体、(ii)遊離細胞傷害剤、および(iii)反応副生成物を含む第2混合物を調製し、そして(d)第2混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を第2混合物の他の成分から精製し、それによって細胞結合剤-細胞傷害剤複合体の精製された第2混合物を調製することを含む。さらに別の実施形態において、本発明は、リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、(a)細胞結合剤を二官能性架橋剤と接触させて、リンカーを細胞結合剤と共有結合させ、それによって、リンカーが結合した細胞結合剤を含む第1混合物を調製し、(b)第1混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供し、それによって、リンカーが結合した細胞結合剤の精製された第1混合物を調製し、(c)リンカーが結合した細胞結合剤を細胞傷害剤と反応させることによって、細胞傷害剤を第1混合物中のリンカーが結合した細胞結合剤に複合させて、(i)リンカーによって細胞傷害剤に化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤-細胞傷害剤複合体、(ii)遊離細胞傷害剤、および(iii)反応副生成物を含む第2混合物を調製し、(d)第2混合物を外因性N-ヒドロキシスクシンイミドの存在下でインキュベートし；そして(e)ステップ(d)後の第2混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を第2混合物の他の成分から精製し、それによってリンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤の精製された第2混合物を調製することを含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 4 】

本明細書中で記載される任意の精製プロセスを本発明のプロセスで利用することができる。本発明の1つの実施形態において、タンジェンシャルフローろ過（TFF、クロスフローろ過、限界ろ過および血液透析ろ過としても知られる）および/または吸着クロマトグラフィー樹脂を精製ステップで利用する。例えば、本発明のプロセスは、修飾ステップ後にTFFを使用する第1精製ステップと、複合ステップ後にTFFを使用する第2精製ステップとを含み得る。あるいは、本発明のプロセスは、修飾ステップ後に吸着クロマトグラフィーを使用する第1精製ステップと、複合ステップ後に吸着クロマトグラフィーを使用する第2精製ステップとを含み得る。本発明のプロセスはさらに、修飾ステップ後に吸着クロマトグラフィーを使用する第1精製ステップと、複合ステップ後にTFFを使用する第2精製ステップと、または修飾ステップ後にTFFを使用する第1精製ステップと、複合ステップ後に吸着クロマトグラフィーを使用する第2精製ステップとを含み得る。

10

## 【 0 0 2 5 】

本発明の1つの実施形態では、非吸着クロマトグラフィーを精製ステップとして利用する。例えば、本発明のプロセスは、修飾ステップ後に非吸着クロマトグラフィーを使用する第1精製ステップと、複合ステップ後に非吸着クロマトグラフィーを使用する第2精製ステップとを含み得る。

## 【 0 0 2 6 】

別の実施形態において、本発明は、細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む複合体を調製するためのプロセスを提供し、ここで、リンカーが結合した細胞結合剤を含む第1混合物を、修飾反応後かつ複合反応前に精製に供さず、プロセスは外因性NHSを含む。外因性NHSを、本発明のプロセス中の任意の点（すなわち、修飾ステップ、複合ステップ、精製ステップ（複数可）、または前述のステップのいずれか1つの間の保持ステップ（複数可））で添加してもよい。したがって、1つの実施形態において、本発明は、リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、（a）細胞結合剤を二官能性架橋剤と接触させて、リンカーを細胞結合剤と共有結合させ、それによって、リンカーが結合した細胞結合剤を含む第1混合物を調製し、（b）リンカーが結合した細胞結合剤を細胞傷害剤と反応させて、（i）リンカーによって細胞傷害剤にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体、（ii）遊離細胞傷害剤、および（iii）反応副生成物を含む第2混合物を調製することによって、細胞傷害剤を第1混合物中のリンカーが結合した細胞結合剤と複合させ、そして（c）第2混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を第2混合物の他の成分から精製し、それによって細胞結合剤 - 細胞傷害剤の複合体の精製された第2混合物を調製し、外因性N - ヒドロキシスクシンイミドをステップ（a）中またはステップ（a）後およびステップ（b）前に添加する（すなわち、ステップ（a）における接触を、外因性NHSの存在下で実施する、および/またはプロセスはステップ（a）後に外因性NHSの存在下で第1混合物を保持することを含む）。別の実施形態において、本発明は、リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、（a）細胞結合剤を二官能性架橋剤と接触させて、リンカーを細胞結合剤と共有結合させ、それによって、リンカーが結合した細胞結合剤を含む第1混合物を調製し、（b）リンカーが結合した細胞結合剤を細胞傷害剤と外因性N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下で反応させることによって、第1混合物中のリンカーが結合した細胞結合剤と細胞傷害剤を複合させて、（i）リンカーによって細胞傷害剤に化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体、（ii）遊離細胞傷害剤、および（iii）反応副生成物を含む第2混合物を調製し、そして（c）第2混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を第2

20

30

40

50

混合物の他の成分から精製し、それによって細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体の精製された第2混合物を調製することを含む。さらに別の実施形態において、本発明は、リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む複合体を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、(a)細胞結合剤を二官能性架橋剤と接触させて、リンカーを細胞結合剤と共有結合させ、それによって、リンカーが結合した細胞結合剤を含む第1混合物を調製し、(b)リンカーが結合した細胞結合剤を細胞傷害剤と反応させることによって、第1混合物中のリンカーが結合した細胞結合剤と細胞傷害剤を複合させて、(i)リンカーによって細胞傷害剤に化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体、(ii)遊離細胞傷害剤、および(iii)反応副生成物を含む第2混合物を調製し、(c)第2混合物を外因性N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下でインキュベートし；そして(d)ステップ(c)後の第2混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を第2混合物の他の成分から精製し、それによって細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体の精製された第2混合物を調製することを含む。本明細書中で記載される任意の精製プロセスを複合反応後の精製ステップとして使用することができる。好ましい実施形態において、タンジェンシャルフローろ過、吸着クロマトグラフィー、または非吸着クロマトグラフィーを複合反応後の精製ステップとして利用する。

#### 【0027】

別の実施形態において、本発明は、細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む複合体を調製するためのプロセスを提供し、ここで、修飾反応および複合反応を組み合わせて1つのステップにし、続いて精製ステップ(米国特許仮出願第61/468,997号および米国特許出願公開第2012/0253021号に記載されているとおり)を行い、プロセスは外因性NHSを含む。外因性NHSを本発明のプロセス中に任意の点で(すなわち、組み合わせた修飾/複合ステップ、精製ステップ、または前述のステップ間の保持ステップに)添加することができる。したがって、1つの実施形態において、本発明は、リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、(a)細胞結合剤を細胞傷害剤と外因性N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下で接触させて、細胞結合剤および細胞傷害剤を含む第1混合物を形成し、次いでリンカーを含む二官能性架橋剤と第1混合物を、約4から約9のpHを有する溶液中で接触させて、(i)リンカーによって細胞傷害剤に化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体、(ii)遊離細胞傷害剤、および(iii)反応副生成物を含む第2混合物を提供し；そして(b)第2混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を第2混合物の他の成分から精製し、それによって細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体の精製された第2混合物を調製することを含む。別の実施形態において、本発明は、リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、(a)細胞結合剤を細胞傷害剤と接触させて、細胞結合剤および細胞傷害剤を含む第1混合物を形成し、次いで、リンカーを含む二官能性架橋剤と第1混合物を外因性N - ヒドロキシスクシンイミドの存在下、約4から約9のpHを有する溶液中で接触させて、(i)リンカーによって細胞傷害剤に化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体、(ii)遊離細胞傷害剤、および(iii)反応副生成物を含む第2混合物を提供し；そして(b)第2混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を第2混合物の他の成分から精製し、それによって細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体の精製された第2混合物を調製することを含む。別の実施形態において、本発明は、リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するため

10

20

30

40

50

のプロセスを提供し、このプロセスは、(a)細胞結合剤を細胞傷害剤と接触させて、細胞結合剤および細胞傷害剤を含む第1混合物を形成し、次いで第1混合物を、リンカーを含む二官能性架橋剤と、約4から約9のpHを有する溶液中で接触させて、(i)リンカーによって細胞傷害剤に化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤-細胞傷害剤複合体、(ii)遊離細胞傷害剤、および(iii)反応副生成物を含む第2混合物を提供し；(b)第2混合物を外因性N-ヒドロキシスクシンイミドの存在下でインキュベートし；そして(c)ステップ(b)後の第2混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を第2混合物の他の成分から精製し、それによって細胞結合剤-細胞傷害剤複合体の精製された第2混合物を調製することを含む。1つの実施形態において、ステップ(b)のインキュベート(すなわち、組み合わせた修飾/複合ステップ後の保持ステップ)を、第1混合物を二官能性架橋剤と接触させた直後に実施する。1つの実施形態において、プロセスは、第2混合物をステップ(a)~(b)間で精製に供して、細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を第2混合物の他の成分から精製し、それによって保持ステップ前(すなわち、ステップ(b)前)に細胞結合剤-細胞傷害剤複合体の精製された第2混合物を調製することを含む。本明細書中で記載される任意の精製プロセスを本発明のプロセスで 사용할 ことができる。好ましい実施形態では、タンジェンシャルフローろ過、吸着クロマトグラフィー、または非吸着クロマトグラフィーを精製ステップとして利用する。

10

20

30

40

50

#### 【0028】

1つの実施形態において、本発明は、細胞傷害剤に化学的にカップリングした細胞結合剤を含む複合体を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、米国特許第6,441,163号および米国特許出願公開第2011/0003969号および同第2008/0145374号に記載されるように、あらかじめ形成された細胞傷害剤-リンカー化合物を細胞結合剤に複合させることを含み、このプロセスは外因性NHSを含む。外因性NHSを本発明のプロセス中の任意の時点で(すなわち、複合ステップ、精製ステップ、または前述のステップ間の保持ステップに)添加することができる。例えば、1つの実施形態において、本発明は、リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、(a)細胞結合剤を、リンカーに化学的にカップリングした細胞傷害剤を含む細胞傷害剤-リンカー化合物と接触させて、細胞傷害剤-リンカー化合物を細胞結合剤と共有結合させ、それによって、リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を含む混合物を調製し、そして(b)細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を含む混合物を、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィーまたはそれらの組み合わせに供して、複合体を精製し、ここで、外因性N-ヒドロキシスクシンイミドをステップ(a)中またはステップ(a)後およびステップ(b)前に添加する(すなわち、ステップ(a)における接触を外因性NHSの存在下で実施するか、またはプロセスは混合物を(a)後に外因性NHSの存在下で保持することを含む)。別の実施形態において、本発明は、リンカーによって細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、(a)細胞結合剤を、リンカーと化学的にカップリングした細胞傷害剤を含む細胞傷害剤-リンカー化合物と接触させて、細胞傷害剤-リンカー化合物を細胞結合剤と共有結合させ、それによってリンカーによって細胞傷害剤に化学的にカップリングした細胞結合剤を含む細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を含む混合物を調製し；(b)ステップ(a)の混合物を外因性N-ヒドロキシスクシンイミドの存在下でインキュベートし；そして(c)混合物をステップ(b)後に、タンジェンシャルフローろ過、選択的沈殿、非吸着クロマトグラフィー、吸着ろ過、吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせに供して、細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を混合物の他の成分から精製し、それによって細胞結合剤-細胞傷害剤複合体の精製された混合物を調製することを含む。プロセスは場合によって、ステ

ップ(a)の混合物をステップ(a)~(b)間で精製に供して、細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を混合物の他の成分から精製し、それによって保持ステップ(ステップ(b))前に細胞結合剤-細胞傷害剤複合体の精製された混合物を調製することを含む。ステップ(a)~(b)の間の精製ステップは、場合によって外因性NH<sub>2</sub>Sの存在下で実施する。本明細書中で記載される任意の精製プロセスを本発明のプロセスで 사용할 ことができる。好ましい実施形態では、タンジェンシャルフローろ過、吸着クロマトグラフィー、または非吸着クロマトグラフィーを精製ステップとして利用する。

#### 【0029】

1つの実施形態において、細胞傷害剤を、リンカーを含む二官能性架橋剤と接触させて、細胞傷害剤をリンカーと共有結合させることによって、細胞傷害剤-リンカー化合物を調製する。細胞傷害剤-リンカー化合物を細胞結合剤と接触させる前に細胞傷害剤-リンカー化合物を場合によって精製に供する。

10

#### 【0030】

本発明の1つの実施形態において、本発明のプロセスは複合ステップ後に2つの別の精製ステップを含む。複合反応後の精製ステップを外因性NH<sub>2</sub>Sの存在下で実施することができる。例えば、本発明のプロセスは複合ステップを含み得、続いて精製ステップ(外因性NH<sub>2</sub>Sの非存在下または存在下)、続いて外因性NH<sub>2</sub>Sの存在下での保持ステップ、続いて別の精製ステップを含み得る。本明細書中で記載される任意の精製プロセスを複合反応後の精製ステップとして使用することができる。好ましい実施形態において、タンジェンシャルフローろ過、吸着クロマトグラフィー、非吸着クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせを複合反応後の精製ステップとして利用する。

20

#### 【0031】

Pellicon型システム(Millipore, Billerica, MA)、Sartocan Cassetteシステム(Sartorius AG, Edgewood, NY)、およびCentrasette型システム(Pall Corp., East Hills, NY)をはじめとする任意の好適なTFFシステムを精製のために利用することができる。

#### 【0032】

任意の好適な吸着クロマトグラフィー樹脂を精製のために利用することができる。好ましい吸着クロマトグラフィー樹脂は、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、およびそれらの組み合わせを含む。好適なヒドロキシアパタイト樹脂の例としては、セラミックヒドロキシアパタイト(ChT Type IおよびType II、Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)、HA Ultrogelヒドロキシアパタイト(Pall Corp., East Hills, NY)、およびセラミックフルオロアパタイト(CFT Type IおよびType II、Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)が挙げられる。好適なHCIC樹脂の一例はMEP Hypercel樹脂(Pall Corp., East Hills, NY)である。好適なHIC樹脂の例としては、Butyl-Sepharose、Hexyl-Sepharose、Phenyl-Sepharose、およびOctyl-Sepharose樹脂(すべてGE Healthcare, Piscataway, NJ製)、ならびにMacro-prep MethylおよびMacro-Prep T-Butyl樹脂(Biorad Laboratories, Hercules, CA)が挙げられる。好適なイオン交換樹脂の例としては、SP-Sepharose、CM-Sepharose、およびQ-Sepharose樹脂(すべてGE Healthcare, Piscataway, NJ製)、ならびにUnosphere S樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)が挙げられる。好適な

30

40

50

混合モードイオン交換体の例としては、Bakerbond ABx樹脂(JT Baker, Phillipsburg NJ)が挙げられる。好適なIMAC樹脂の例としては、Chelating Sepharose樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)およびProfinity IMAC樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)が挙げられる。好適な色素リガンド樹脂の例としては、Blue Sepharose樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)およびAffi-gel Blue樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)が挙げられる。好適なアフィニティー樹脂の例としては、Protein A Sepharose樹脂(例えば、MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ)が挙げられ、ここで、細胞結合剤は抗体、およびレクチンアフィニティー樹脂、例えばLentil Lectin Sepharose樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)であり、細胞結合剤は適切なレクチン結合部位を有する。あるいは、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, NJ)に固定化することができる。好適な逆相樹脂の例としては、C4、C8、およびC18樹脂(Grace Vydac, Hesperia, CA)が挙げられる。

10

#### 【0033】

任意の好適な非吸着クロマトグラフィー樹脂を精製のために利用することができる。好適な非吸着クロマトグラフィー樹脂の例としては、限定されないが、SEPHADEX(商標)G-25、G-50、G-100、SEPHACRYL(商標)樹脂(例えば、S-200およびS-300)、SUPERDEX(商標)樹脂(例えば、SUPERDEX(商標)75およびSUPERDEX(商標)200)、BIO-GEL(登録商標)樹脂(例えば、P-6、P-10、P-30、P-60、およびP-100)、ならびに当業者に公知の他のものが挙げられる。

20

#### 【0034】

1つの実施形態において、本発明のプロセスは、1以上(例えば、1、2、または3)の外因性NH<sub>2</sub>の存在下での保持ステップ(すなわち、外因性NH<sub>2</sub>を保持ステップに添加する)をさらに含んで、不安定に結合したリンカーを細胞結合剤から放出させる。保持ステップは、細胞結合剤を二官能性架橋剤で修飾した後、細胞傷害剤をリンカーが結合した細胞結合剤に複合させた後および/または精製ステップ後に混合物を保持することを含む。

30

#### 【0035】

保持ステップは、溶液を好適な温度(例えば、約2 から約37 )で好適な時間(例えば、約1時間から約1週間)維持して、安定に結合したリンカーを細胞結合剤から実質的に放出しないようにしながら、不安定に結合したリンカーを細胞結合剤から放出させることを含む。1つの実施形態において、保持ステップは、溶液を低温(例えば、約2 から約10 もしくは約4 )、室温(例えば、約20 から約30 もしくは約20 から約25 )、または高温(例えば、約30 から約37 )で維持することを含む。

40

#### 【0036】

保持ステップの期間は、保持ステップが実施される温度に依存する。例えば、保持ステップの期間は、保持ステップを高温で実施することによって大幅に減少させることができ、最高温度は細胞結合剤-細胞傷害剤複合体の安定性によって制限される。保持ステップは溶液を約1時間から約1日(例えば、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約12時間、約14時間、約16時間、約18時間、約20時間、約22時間、もしくは約24時間)、約5時間から約1週間、約12時間から約1週間(例えば、約12時間、約16時間、約20時間、約24時間、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、もしくは約7日)、約12時間から約1週間(例えば、約12時間、約16時間、約20時間、約24時間、約2日、

50



約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、もしくは約 7 日)、または約 1 日から約 1 週間維持することを含み得る。

【0037】

1 つの実施形態において、保持ステップは、溶液を約 2 から約 8 の温度で少なくとも約 12 時間、最高 1 日までの期間維持することを含む。

【0038】

保持ステップの pH 値は、好ましくは約 4 から約 9 (例えば、約 4.5 から約 8.5 または約 5 から約 8) である。1 つの実施形態において、保持ステップの pH 値は、約 5 から約 7.5 (例えば、約 5.5 から約 7.5、約 6 から約 7.5、約 6.5 から約 7.5、約 7 から約 7.5、約 5 から約 7、約 5 から約 6.5、約 5 から約 5.5、約 5.5 から約 7、約 6 から約 6.5、または約 6 から約 7) の範囲である。例えば、保持ステップの pH 値は約 4、約 4.5、約 5、約 5.5、約 6、約 6.5、約 7、約 7.5、約 8、約 8.5、または約 9 であり得る。

10

【0039】

保持ステップは、細胞結合剤を細胞傷害剤に複合させる前または後で実施することができる。1 つの実施形態において、保持ステップを、細胞結合剤の二官能性架橋剤での修飾直後に実施する。例えば、本発明のプロセスは、細胞結合剤を二官能性架橋剤で修飾した後および複合前に保持ステップを含む。細胞結合剤の修飾後、精製ステップを保持ステップ前および/または保持ステップ後であるが、複合ステップ前に実施してもよい。別の実施形態において、保持ステップは、リンカーが結合した細胞結合剤に細胞傷害剤を複合させた直後で、精製ステップ前に実施する。別の実施形態において、保持ステップを複合および精製ステップ後に実施し、続いてさらなる精製ステップを実施する。

20

【0040】

具体的な実施形態において、保持ステップは混合物を約 5 ~ 7.5 または約 6.5 ~ 7.5 の pH で約 1 時間 ~ 約 1 週間、約 2 からほぼ室温にてインキュベートすることを含み得る。

【0041】

本発明は、細胞傷害剤と化学的にカップリングした細胞結合剤を含む安定な複合体の組成物を調製するためのプロセスを提供し、この組成物は不安定な複合体を実質的に含まない。この点において、本発明は、実質的に高い純度および安定性を有する細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するためのプロセスを提供する。そのような組成物は、複合体の高い純度および安定性により疾患を治療するために使用することができる。メイタンシノイドなどの細胞傷害剤と化学的にカップリングした抗体などの細胞結合剤を含む組成物は、例えば、米国特許第 7,374,762 号および米国特許出願公開第 2007/0031402 号で記載されている。本発明の 1 つの態様において、実質的に高い純度を有する細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体は、1 以上の以下の特徴を有する：(a) 約 90% 超 (例えば約 91% 以上、92% 以上、93% 以上、94% 以上、95% 以上、96% 以上、97% 以上、98% 以上、99% 以上、または 100% 以上)、好ましくは約 95% 超の複合体種はモノマーである、(b) 複合体調製物中の非複合リンカーレベルは約 10% 未満 (例えば、約 9% 以下、8% 以下、7% 以下、6% 以下、5% 以下、4% 以下、3% 以下、2% 以下、1% 以下、または 0% 以下) (全リンカーに対して) である、(c) 複合体種の 10% 未満は架橋している (例えば、約 9% 以下、8% 以下、7% 以下、6% 以下、5% 以下、4% 以下、3% 以下、2% 以下、1% 以下、または 0% 以下)、(d) 複合体調製物中の遊離細胞傷害剤レベルは約 2% 未満である (例えば、約 1.9% 以下、1.8% 以下、1.7% 以下、1.6% 以下、1.5% 以下、1.4% 以下、1.3% 以下、1.2% 以下、1.1% 以下、1.0% 以下、0.9% 以下、0.8% 以下、0.7% 以下、0.6% 以下、0.5% 以下、0.4% 以下、0.3% 以下、0.2% 以下、0.1% 以下、または 0% 以下) (全細胞傷害剤に対して)、および/または (e) 貯蔵で遊離細胞傷害剤レベルの実質的な増加はない (例えば、約 1 週間、約 2 週間、約 3 週間、約 1 ヶ月、約 2 ヶ月、約 3 ヶ月、約 4 ヶ月、約 5 ヶ月、約 6 ヶ月、約 1 年、約 2 年、または約

30

40

50

5年後)。遊離細胞傷害剤レベルの「実質的な増加」とは、ある貯蔵時間後に、遊離細胞傷害剤のレベルの増加が、約0.1%未満、約0.2%未満、約0.3%未満、約0.4%未満、約0.5%未満、約0.6%未満、約0.7%未満、約0.8%未満、約0.9%未満、約1.0%未満、約1.1%未満、約1.2%未満、約1.3%未満、約1.4%未満、約1.5%未満、約1.6%未満、約1.7%未満、約1.8%未満、約1.9%未満、約2.0%未満、約2.2%未満、約2.5%未満、約2.7%未満、約3.0%未満、約3.2%未満、約3.5%未満、約3.7%未満、または約4.0%未満であることを意味する。

#### 【0042】

本明細書中で用いられる場合、「非複合リンカー」という用語は、二官能性架橋剤と共有結合している細胞結合剤を指し、細胞結合剤は、二官能性架橋剤のリンカーによって細胞傷害剤と共有結合しない（すなわち、「非複合リンカー」はCBA-Lによって表すことができ、ここで、CBAは細胞結合剤を表し、Lは二官能性架橋剤を表す。対照的に、細胞結合剤-細胞傷害剤複合体はCBA-L-Dによって表すことができ、式中、Dは細胞傷害剤を表す）。

#### 【0043】

1つの実施形態において、細胞結合剤-細胞傷害剤複合体中の細胞結合剤に対する細胞傷害剤の平均モル比は、約1から約10、約2から約7、約3から約5、約2.5から約4.5（例えば、約2.5、約2.6、約2.7、約2.8、約2.9、約3.0、約3.1、約3.3、約3.4、約3.5、約3.6、約3.7、約3.8、約3.9、約4.0、約4.1、約4.2、約4.3、約4.4、約4.5）、約3.0から約4.0、約3.2から約4.2、約4.5から5.5（例えば、約4.5、約4.6、約4.7、約4.8、約4.9、約5.0、約5.1、約5.2、約5.3、約5.4、約5.5）である。

#### 【0044】

細胞結合剤は、細胞と、典型的に、そして好ましくは動物細胞（例えば、ヒト細胞）と結合する任意の好適な薬剤であり得る。細胞結合剤は、好ましくはペプチドまたはポリペプチドである。好適な細胞結合剤としては、例えば、抗体（例えば、モノクローナル抗体およびそれらの断片）、インターフェロン（例えば、アルファ、ベータ、ガンマ）、リンホカイン（例えば、インターロイキン2（IL-2）、インターロイキン3（IL-3）、インターロイキン4（IL-4）、インターロイキン6（IL-6）、ホルモン（例えば、インスリン、TRH（甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン）、MSH（メラニン細胞刺激ホルモン）、ステロイドホルモン、例えばアンドロゲンおよびエストロゲン）、成長因子およびコロニー刺激因子、例えば上皮成長因子（EGF）、形質転換成長因子アルファ（TGF-α）、線維芽細胞成長因子（FGF）、血管内皮成長因子（VEGF）、コロニー刺激因子（CSF）、例えばG-CSF、M-CSFおよびGM-CSF（Burgess, Immunology Today 5:155-158 (1984)）、栄養素輸送分子（例えば、トランスフェリン）、ビタミン（例えば、葉酸塩）および細胞の表面上の標的分子と特異的に結合する任意の他の薬剤または分子が挙げられる。

#### 【0045】

細胞結合剤が抗体である場合、それは、ポリペプチドであり、膜貫通分子（例えば受容体）またはリガンド、例えば成長因子であり得る抗原と結合する。例示的抗原としては、分子、例えばレニン；ヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモンを含む成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リボタンパク質；アルファ-1-抗トリプシン；インスリンA鎖；インスリンB鎖；プロインスリン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；凝固因子、例えば第vmc因子、第IX因子、組織因子（TF）、およびフォンウィルブランズ；抗凝固因子、例えばタンパク質C；心房性ナトリウム利尿因子；肺表面活性剤；プラスミノゲンアクチベータ、例えばウロキナーゼまたはヒト尿もしくは組織型プラスミノゲンアクチベータ（t-PA）；ボンベシン；トロニン；造血成長因子；腫瘍壊死因子アルファおよび腫瘍壊死

10

20

30

40

50

因子ベータ；エンケファリナーゼ；ランテス（R A N T E S : r e g u l a t e d o n a c t i v a t i o n n o r m a l l y T - c e l l e x p r e s s e d a n d s e c r e t e d ）；ヒトマクロファージ炎症タンパク質（M I P - 1 - アルファ）；血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミン；ミューラー管抑制因子；リラキシンA鎖；リラキシンB鎖；プロリラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；微生物タンパク質、例えばベータ-ラクタマーゼ；D N a s e ；I g E ；細胞毒性T-リンパ球関連抗原（C T L A ）、例えばC T L A - 4 ；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子（V E G F ）；ホルモンもしくは成長因子の受容体；タンパク質AもしくはD ；リウマチ因子；神経栄養因子、例えば骨由来神経栄養因子（B D N F ）、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、ニューロトロフィン-5、もしくはニューロトロフィン-6（N T - 3、N T 4、N T - 5、もしくはN T - 6 ）、または神経成長因子、例えばN G F - ；血小板由来成長因子（P D G F ）；線維芽細胞成長因子、例えばa F G F およびb F G F ；上皮成長因子（E G F ）；形質転換成長因子（T G F ）、例えばT G F - アルファおよびT G F - 1、T G F - 2、T G F - 3、T G F - 4、もしくはT G F - 5をはじめとするT G F - ベータ；インスリン様成長因子-Iおよびインスリン様成長因子-II（I G F - I およびI G F - II ）；d e s （1-3）- I G F - I （脳I G F - I ）、インスリン様成長因子結合タンパク質、E p C A M、G D 3、F L T 3、P S M A、P S C A、M U C 1、M U C 1 6、S T E A P、C E A、T E N B 2、E p h A 受容体、E p h B 受容体、葉酸塩受容体、F O L R 1、メソテリン、クリプト、アルファ、ベータ、インテグリン、V E G F、V E G F R、E G F R、トランスフェリン受容体、I R T A 1、I R T A 2、I R T A 3、I R T A 4、I R T A 5；C Dタンパク質、例えばC D 2、C D 3、C D 4、C D 5、C D 6、C D 8、C D 11、C D 14、C D 19、C D 20、C D 21、C D 22、C D 25、C D 26、C D 28、C D 30、C D 33、C D 36、C D 37、C D 38、C D 40、C D 44、C D 52、C D 55、C D 56、C D 59、C D 70、C D 79、C D 80、C D 81、C D 103、C D 105、C D 134、C D 137、C D 138、C D 152、あるいは1以上の腫瘍関連抗原またはそれらの全体が参照によって本明細書中に組み込まれる米国特許出願公開第2008/0171040号もしくは米国特許出願公開第2008/0305044号で開示されている細胞-表面受容体と結合する抗体；エリスロポエチン；骨誘導因子；免疫毒素；骨形成タンパク質（B M P ）；インターフェロン、例えばインターフェロン-アルファ、インターフェロン-ベータ、およびインターフェロン-ガンマ；コロニー刺激因子（C S F ）、例えばM - C S F、G M - C S F、およびG - C S F；インターロイキン（I L ）、例えば、I L - 1 ~ I L - 10；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞受容体；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；ウイルス抗原、例えばH I Vエンベロープの一部；輸送タンパク質；ホーミング受容体；アドレシン；調節タンパク質；インテグリン、例えばC D 11a、C D 11b、C D 11c、C D 18、I C A M、V L A - 4およびV C A M；腫瘍関連抗原、例えばH E R 2、H E R 3またはH E R 4受容体；エンドグリン、c - M e t、1 G F 1 R、P S G R、N G E P、P S M A、P S C A、L G R 5、B 7 H 4、および前記ポリペプチドのいずれかの断片が挙げられる。

#### 【0046】

さらに、骨髓系細胞と結合するG M - C S Fを急性骨髓性白血病からの異常細胞に対する細胞結合剤として使用することができる。活性化T細胞と結合するI L - 2を、移植片拒絶の予防のため、移植片対宿主疾患の治療および予防のため、そして急性T細胞白血病の治療のために使用することができる。メラニン細胞と結合するM S Hを、黒色腫の治療のために使用することができ、黒色腫に対する抗体も同様に使用できる。葉酸を使用して、卵巣および他の腫瘍上で発現された葉酸塩受容体を標的とすることができる。上皮成長因子を使用して、肺および頭頸部などの扁平上皮癌を標的とすることができる。ソマトスタチンを使用して、神経芽細胞腫および他の腫瘍型を標的とすることができる。

#### 【0047】

乳ガンおよび精巣ガンは、それぞれ細胞結合剤としてのエストロゲン（もしくはエスト

10

20

30

40

50

ロゲン類似体)またはアンドロゲン(もしくはアンドロゲン類似体)でうまく標的とすることができる。

【0048】

「抗体」という用語は、本明細書中で用いられる場合、任意のイムノグロブリン、任意のイムノグロブリン断片、例えばFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、dsFv、sFv、ミニボディ、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、ナノボディ、プロボディ、ドメインボディ、ユニボディ(Parham, J. Immunol. 131: 2895-2902 (1983); Spring et al., J. Immunol. 113: 470-478 (1974); Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89: 230-244 (1960); Kim et al., Mol. Cancer Ther., 7: 2486-2497 (2008); Carter, Nature Revs., 6: 343-357 (2006))などを指すか、または細胞の表面上の抗原と結合することができる(例えば、相補性決定領域(CDR)を含有する)イムノグロブリンキメラを指す。任意の好適な抗体を細胞結合剤として使用することができる。当業者は、適切な抗体の選択が標的とされる細胞集団に依存することを理解するであろう。この点に関して、特定の細胞集団(典型的かつ好ましくは異常細胞集団)で選択的に発現される細胞表面分子(すなわち、抗原)の種類および数は、本発明の組成物での使用に適切な抗体の選択を左右する。細胞表面発現プロフィールは、腫瘍細胞型をはじめとする多種多様な細胞型について知られているか、または知られていなくても、日常的分子生物学および組織化学技術を使用して決定することができる。抗体は二重特異性抗体であり得る(Morrison, S.L., Nature biotechnology, 25(11): 1233-4 (2007))。

【0049】

抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであり得るが、最も好ましくはモノクローナル抗体である。本明細書中で用いられる場合、「ポリクローナル」抗体とは、典型的には免疫動物の血清中に含まれる抗体分子の不均一集団を指す。「モノクローナル」抗体は特定の抗原に対して特異的な抗体分子の均一集団を指す。モノクローナル抗体は典型的にはBリンパ球(「B細胞」)の単クローンによって産生される。モノクローナル抗体は、標準的ハイブリドーマテクノロジーをはじめとする当業者に公知の様々な技術を用いて得ることができる(例えば、Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 5: 511-519 (1976); Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988); and C.A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5<sup>th</sup> Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)を参照のこと)。手短に述べると、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ法は、典型的には、任意の好適な動物、典型的かつ好ましくはマウスに抗原(すなわち、「免疫原」)を注射することを含む。動物をその後屠殺し、そしてその脾臓から単離されたB細胞をヒト骨髓腫細胞と融合させる。ハイブリッド細胞を産生し(すなわち、「ハイブリドーマ」)、これは無制限に増殖し、インビトロで所望の特異性を有する高力価抗体を連続して分泌する。当該技術分野で公知の任意の適切なプロセスを用いて、所望の特異性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を特定することができる。そのようなプロセスとしては、例えば、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ウェスタンブロット分析、およびラジオイムノアッセイが挙げられる。ハイブリドーマの集団をスクリーニングして個々のクローンを単離し、そのそれぞれは抗原に対する単一抗体種を分泌する。各ハイブリドーマは単一B細胞との融合物由来のクローンであるので、ハイブリドーマが産生する全ての抗体分子は、それらの抗原結合部位およびアイソタイプを含む構造が同じである。モノクローナル抗体はさらに、EBV-ハイブリドーマテクノロジー(例えば、Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2): 361-67 (1984)、およびRoder et al., Methods Enzymol., 121: 140-67 (1986))

を参照のこと)、バクテリオファージベクター発現系(例えば、Huse et al., Science, 246: 1275-81 (1989))を参照のこと)、またはFabおよびscFv(単鎖可変領域)などの抗体断片を含むファージディスプレイライブラリー(例えば、米国特許第5,885,793号および同第5,969,108号、ならびに国際特許出願公開第92/01047号および同第99/06587号を参照のこと)をはじめとする他の好適な技術を用いて生成させることもできる。

#### 【0050】

モノクローナル抗体は、任意の好適な動物から単離することができるか、または産生することができるが、好ましくはほ乳類で、さらに好ましくはマウスまたはヒトで、そして最も好ましくはヒトで産生される。マウスで抗体を産生するためのプロセスは当業者に周知であり、本明細書中で記載されている。ヒト抗体に関して、ポリクローナル抗体を、適切な抗原で予防接種または免疫化されたヒト対象の血清から単離することができることを当業者は理解するであろう。あるいは、ヒト抗体は、マウスなどのヒト以外の動物でヒト抗体を産生するための公知技術を適応させることによって生成させることができる(例えば、米国特許第5,545,806号;同第5,569,825号;および同第5,714,352号、ならびに米国特許出願公開第2002/0197266A1号を参照のこと)。

#### 【0051】

ヒトにおける治療への応用のために理想的な選択であるが、ヒト抗体、特にヒトモノクローナル抗体は、典型的にはマウスモノクローナル抗体よりも生成させるのが困難である。しかしながら、マウスモノクローナル抗体はヒトに投与された場合に迅速な宿主抗体反応を誘発し、これは抗体-細胞傷害剤複合体の治療または診断可能性を低下させ得る。これらの複雑な事態を回避するためには、モノクローナル抗体は、好ましくはヒト免疫系によって「異物」として認識されない。

#### 【0052】

この目的を達成するために、ファージディスプレイを使用して抗体を生成させることができる。この点に関して、抗体の抗原結合可変(V)ドメインをコード化するファージライブラリーは、標準的分子生物学および組換えDNA技術を使用して生成させることができる(例えば、Sambrook et al. (eds.), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001))を参照のこと)。所望の特異性を有する可変領域をコード化するファージは、所望の抗原に対する特異結合について選択され、選択された可変ドメインを含む完全ヒト抗体が再構成される。モノクローナル抗体の特徴を有するヒト抗体が細胞によって分泌されるように、再構成された抗体をコード化する核酸配列を、好適な細胞系、例えばハイブリドーマ産生のために使用される骨髓腫細胞に導入する(例えば、Janeway et al. 上記、Huse et al. 上記、および米国特許第6,265,150号を参照のこと)。あるいは、モノクローナル抗体を特異的ヒト重鎖および軽鎖イムノグロブリン遺伝子についてトランスジェニックなマウスから生成させることができる。そのようなプロセスは当該技術分野で公知であり、例えば、米国特許第5,545,806号および同第5,569,825号、ならびにJaneway et al. 上記で記載されている。

#### 【0053】

最も好ましくは、抗体はヒト化抗体である。本明細書中で用いられる場合、「ヒト化」抗体は、抗体の抗原結合ループを形成するマウスモノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)がヒト抗体分子のフレームワーク上にグラフトされているものである。マウスおよびヒト抗体のフレームワークの類似性のために、このアプローチによってヒト抗体と抗原的に同一であるが、CDR配列が由来するマウスモノクローナル抗体と同じ抗原と結合するモノクローナル抗体が産生されると一般的に認められている。ヒト化抗体を生成させるためのプロセスは当該技術分野で周知であり、例えば、Janeway et al.

上記、米国特許第 5, 225, 539 号、同第 5, 585, 089 号および同第 5, 693, 761 号、欧州特許第 0 239 400 B 1 号、および英国特許第 2 188 638 号で詳細に記載されている。ヒト化抗体はまた、米国特許第 5, 639, 641 号および Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235: 959 - 973 (1994) で記載されている抗体リサーフェイシングテクノロジーを用いて生成させることもできる。本発明の組成物の複合体で用いられる抗体は、最も好ましくはヒト化モノクローナル抗体であるが、ヒトモノクローナル抗体およびマウスモノクローナル抗体も、前述のとおり、本発明の範囲内に含まれる。

#### 【0054】

少なくとも 1 つの抗原結合部位を有し、したがって標的細胞の表面上に存在する少なくとも 1 つの抗原または受容体を認識し、結合する抗体断片も本発明の範囲内に含まれる。この点に関して、インタクトな抗体分子のタンパク質分解的切断は、抗原を認識し、結合する能力を保持する様々な抗体断片を産生することができる。例えば、プロテアーゼパインでの抗体分子の限定消化によって、典型的には 3 つの断片が産生され、そのうちの 2 つは同一であり、それらは親抗体分子の抗原結合活性を保持するので、Fab 断片と称される。抗体分子の酵素ペプシンでの切断によって、通常 2 つの抗体断片が産生され、そのうちの 1 つは抗体分子の両抗原結合アームを保持し、F(ab')<sub>2</sub> 断片と称される。F(ab')<sub>2</sub> 断片のジチオトレイトールまたはメルカプトエチルアミンでの還元によって、Fab' 断片と称される断片が産生される。合成ペプチドによって抗体軽鎖の V ドメインに連結された抗体重鎖の可変 (V) ドメインを含むトランケートされた Fab 断片からなる単鎖可変領域断片 (sFv) 抗体断片は、通例の組換え DNA テクノロジー技術を用いて生成させることができる (例えば、Janeway et al. 上記を参照のこと)。同様に、ジスルフィド安定化可変領域断片 (dsFv) は組換え DNA テクノロジーによって調製することができる (例えば、Reiter et al., Protein Engineering, 7: 697 - 704 (1994) を参照のこと)。しかしながら、本発明に関連した抗体断片は、これらの例示的種類の抗体断片に限定されない。所望の細胞表面受容体または抗原を認識し、結合する任意の好適な抗体断片を用いることができる。抗体断片は、例えば、Parham, J. Immunol., 131: 2895 - 2902 (1983); Spring et al., J. Immunol., 113: 470 - 478 (1974); および Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys., 89: 230 - 244 (1960) でさらに記載されている。抗体 - 抗原結合は、例えば、ラジオイムノアッセイ (RIA)、ELISA、ウェスタンブロット、免疫沈降、および競合阻害アッセイなどの当該技術分野で公知の任意の好適なプロセスを用いて分析することができる (例えば、Janeway et al. 上記、および米国特許出願公開第 2002/0197266 A1 号を参照のこと)。

#### 【0055】

加えて、抗体はキメラ抗体またはその抗原結合断片であり得る。「キメラ」によって、抗体が、少なくとも 2 つの異なる種から得られるかまたは誘導される少なくとも 2 つのイムノグロブリン、またはそれらの断片 (例えば、2 つの異なるイムノグロブリン、例えばマウスイムノグロブリン可変領域と組み合わせられたヒトイムノグロブリン定常領域) を含むことを意味する。抗体はさらに、ドメイン抗体 (dAb) もしくはその抗原結合断片、例えばラクダ抗体 (例えば、Desmyter et al., Nature Struct. Biol., 3: 752, (1996) を参照のこと)、またはサメ抗体、例えば新規抗原受容体 (IgNAR) (例えば、Greenberg et al., Nature, 374: 168 (1995), and Stanfield et al., Science, 305: 1770 - 1773 (2004) を参照のこと) でもあり得る。

#### 【0056】

任意の好適な抗体を本発明に関連して使用することができる。例えば、モノクローナル抗体 J5 は、共通急性リンパ芽球性白血病抗原 (CALLA) について特異的であるマウ

10

20

30

40

50

スIgG2a抗体(Ritzi et al., Nature, 283:583-585 (1980))であり、CALLAを発現する細胞(例えば、急性リンパ芽球性白血病細胞)を標的とするために用いることができる。モノクローナル抗体MY9は、CD33抗原と特異的に結合するマウスIgG1抗体であり(Griffin et al., Leukemia Res., 8:521(1984))、CD33を発現する細胞(例えば、急性骨髄性白血病(AML)細胞)を標的とするために用いることができる。

#### 【0057】

同様に、モノクローナル抗体抗B4(B4とも称する)は、B細胞上のCD19抗原と結合するマウスIgG1抗体であり(Nadler et al., J. Immunol., 131:244-250(1983))、CD19を発現するB細胞または異常細胞を標的とするために使用することができる(例えば、非ホジキンリンパ腫細胞および慢性リンパ芽球性白血病細胞)。N901は、薬物に神経内分泌起源の細胞を標的とさせる複合体で使用することができる小細胞肺腫瘍をはじめとする神経内分泌起源の細胞上で見出されるCD56(神経細胞接着分子)抗原と結合するマウスモノクローナル抗体である。J5、MY9、およびB4抗体は、好ましくは、複合体の一部として使用される前にリサ-フェイシングまたはヒト化される。抗体のリサ-フェイシングまたはヒト化は、例えば、Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:969-73(1994)で記載されている。

#### 【0058】

加えて、モノクローナル抗体C242は、CanAg抗原と結合し(例えば、米国特許第5,552,293を参照のこと)、結腸直腸ガン、膵臓ガン、非小細胞肺ガン、および胃ガンなどの腫瘍を発現するCanAgとの複合体を標的とするために使用することができる。HuC242はモノクローナル抗体C242のヒト化形態である(例えば、米国特許第5,552,293号)。HuC242が産生されるハイブリドーマはECCAC識別番号90012601で寄託されている。HuC242は、CDRグラフト法(例えば、米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号、および同第5,693,762号を参照のこと)またはリサ-フェイシングテクノロジー(例えば、米国特許第5,639,641号を参照のこと)を用いて調製することができる。HuC242を使用して、例えば、結腸直腸ガン、膵臓ガン、非小細胞肺ガン、および胃ガン細胞などのCanAg抗原を発現する腫瘍細胞に対する複合体を標的とすることができる。

#### 【0059】

卵巣ガンおよび前立腺ガン細胞を標的とするために、抗MUC1抗体を複合体において細胞結合剤として使用することができる。抗MUC1抗体としては、例えば、抗HMF-2(例えば、Taylor-Papadimitriou et al., Int. J. Cancer, 28:17-21(1981)を参照のこと)、hCTM01(例えば、van Hof et al., Cancer Res., 56:5179-5185(1996)を参照のこと)、およびDS6が挙げられる。前立腺ガン細胞はさらに、抗前立腺特異性膜抗原(PSMA)を細胞結合剤、例えばJ591として使用することによって複合体で標的とすることもできる(例えば、Liu et al., Cancer Res., 57:3629-3634(1997)を参照のこと)。さらに、乳ガン、前立腺ガン、および卵巣ガンなどのHer2抗原を発現するガン細胞は、抗体トラスツマブを使用して標的とすることができる。インスリン様成長因子受容体と結合する抗IGF-IR抗体も複合体において使用することができる。CD27L、EGFRvIII、Cripito、CD138、CD38、EphA2、インテグリン、CD37、葉酸塩受容体、およびHer3と結合する抗体も複合体において使用することができる。

#### 【0060】

1つの実施形態において、抗体は、huN901、huMy9-6、huB4、huC242、トラスツマブ、ビバツマブ(bivatuzumab)、シプロツマブ、リツキシマブ、huDS6、国際特許出願公開第2010/124797号で記載されている抗メソテリン抗体(例えば、MF-T)、米国特許出願公開第2010/00939

10

20

30

40

50

80号で記載されている抗クリプト(c r i p t o)抗体(例えばh u B 3 F 6)、米国特許出願公開第2007/0183971号で記載されている抗CD138抗体(例えばh u B - B 4)、米国特許第7,736,644号および同第7,628,986号ならびに米国特許出願公開第2010/0111979号;同第2009/0240038号;同第2009/0175887号;同第2009/0156790号;および同第2009/0155282号で記載されている抗EGFRvIII抗体、国際特許出願公開第2011/039721号および同第2011/039724号で記載されているヒト化EphA2抗体(例えば、2H11R35R74);国際特許出願公開第2008/047242号で記載されている抗CD38抗体(例えばh u 3 8 S B 1 9)、米国特許仮出願第61/307,797号、同第61/346,595号および同第61/413,172号、ならびに米国特許出願公開第2012/0009181号で記載されている葉酸代謝拮抗剤受容体抗体(例えば、h u M o v 1 9);米国特許第5,958,872号および同第6,596,743号で記載されている抗IGF1R抗体;米国特許出願公開第2011/0256153号で記載されている抗CD37抗体(例えば、h u C D 3 7 - 3);米国特許出願公開第2006/0127407号で記載されている抗インテグリン<sub>v</sub>抗体(例えば、C N T O 9 5);ならびに国際特許出願公開第2012/019024号で記載されている抗Her3抗体からなる群から選択される。特に好ましい抗体は、本明細書中で記載されるヒト化モノクローナル抗体である。

10

#### 【0061】

細胞結合剤は好ましくは抗体であるが、細胞結合剤はさらに非抗体分子でもあり得る。好適な非抗体分子としては、例えば、アンキリン反復タンパク質(D A R P i n; Z a h n d e t a l., J. B i o l. C h e m., 281, 46, 35167-35175, (2006); B i n z e t a l., N a t u r e B i o t e c h n o l o g y, 23: 1257-1268 (2005))または、例えば、米国特許出願公開第2007/0238667号;米国特許第7,101,675号;および国際特許出願公開第2007/147213号および同第2007/062466号で記載されているアンキリン様反復タンパク質もしくは合成ペプチド、インターフェロン(例えば、アルファ、ベータ、またはガンマイインターフェロン)、リンホカイン(例えば、インターロイキン2(IL-2)、IL-3、IL-4、またはIL-6)、ホルモン(例えば、インスリン)、成長因子(例えば、EGF、TGF-アルファ、FGF、およびVEGF)、コロニー刺激因子(例えば、G-CSF、M-CSF、およびGM-CSF(例えば、B u r g e s s, I m m u n o l o g y T o d a y, 5: 155-158 (1984)を参照のこと)、ソマトスタチン、およびトランスフェリン(例えば、O' K e e f f e e t a l., J. B i o l. C h e m., 260: 932-937 (1985)を参照のこと)が挙げられる。例えば、骨髓系細胞と結合するGM-CSFを、急性骨髓性白血病細胞を標的とするための細胞結合剤として使用することができる。加えて、活性化されたT細胞と結合するIL-2を、移植片拒絶の予防のため、移植片対宿主疾患に治療および予防のため、ならびに急性T細胞白血病の治療のために使用することができる。上皮成長因子(EGF)を使用して、扁平上皮癌、例えば肺ガンおよび頭頸部ガンを標的とすることができる。ソマトスタチンを使用して、神経芽細胞腫細胞および他の腫瘍細胞タイプを標的とすることができる。

20

30

40

#### 【0062】

複合体は、任意の好適な細胞傷害剤を含み得る。「細胞傷害剤」とは、本明細書中で用いられる場合、細胞の死をもたらす、細胞死を誘導する、または細胞生存率を減少させる任意の化合物を指す。好適な細胞傷害剤としては、例えば、メイタンシノイドおよびメイタンシノイド類似体、タキソイド、CC-1065およびCC-1065類似体、ならびにドラスタチンおよびドラスタチン類似体が挙げられる。本発明の好ましい実施形態において、細胞傷害剤は、メイタンシノールおよびメイタンシノール類似体を含むメイタンシノイドである。メイタンシノイドは、微小管形成を阻害し、哺乳類細胞に対して非常に有毒な化合物である。好適なメイタンシノール類似体の例としては、修飾芳香環を有するも

50



の、および他の位置で修飾を有するものが挙げられる。そのようなメイタンシノイドは、例えば、米国特許第 4, 256, 746 号；同第 4, 294, 757 号；同第 4, 307, 016 号；同第 4, 313, 946 号；同第 4, 315, 929 号；同第 4, 322, 348 号；同第 4, 331, 598 号；同第 4, 361, 650 号；同第 4, 362, 663 号；同第 4, 364, 866 号；同第 4, 424, 219 号；同第 4, 371, 533 号；同第 4, 450, 254 号；同第 5, 475, 092 号；同第 5, 585, 499 号；同第 5, 846, 545 号；および同第 6, 333, 410 号で記載されている。

#### 【0063】

修飾芳香環を有するメイタンシノール類似体の例としては：(1) C - 19 - デクロロ (米国特許第 4, 256, 746 号) (アンサミトシン P 2 の LAH 還元によって調製)、(2) C - 20 - ヒドロキシ (または C - 20 - デメチル) + / - C - 19 - デクロロ (米国特許第 4, 361, 650 号および同第 4, 307, 016 号) (ストレプトマイセス (*Streptomyces*) もしくはアクチノマイセス (*Actinomyces*) を用いるデメチル化または LAH を用いる脱塩素化処理によって調製)、ならびに (3) C - 20 - デメトキシ、C - 20 - アシルオキシ ( - OCO R )、+ / - デクロロ (米国特許第 4, 294, 757 号) (塩化アシルを用いるアシル化によって調製) が挙げられる。

#### 【0064】

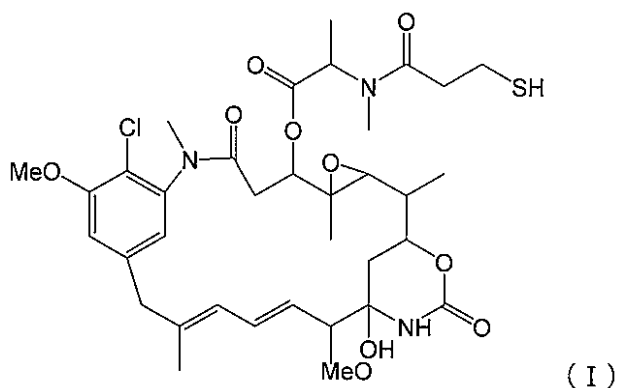
芳香環以外の位置の修飾を有するメイタンシノール類似体の例としては：(1) C - 9 - SH (米国特許第 4, 424, 219 号) (メイタンシノールと  $H_2S$  または  $P_2S_5$  との反応によって調製)、(2) C - 14 - アルコキシメチル (デメトキシ /  $CH_2OR$ ) (米国特許第 4, 331, 598 号)、(3) C - 14 - ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル ( $CH_2OH$  または  $CH_2OAc$ ) (米国特許第 4, 450, 254 号) (ノカルジア (*Nocardia*) から調製)、(4) C - 15 - ヒドロキシ / アシルオキシ (米国特許第 4, 364, 866 号) (メイタンシノールのストレプトマイセスによる変換によって調製)、(5) C - 15 - メトキシ (米国特許第 4, 313, 946 号および同第 4, 315, 929 号) (トレウィア・ヌーディフロラ (*Trewia nudiflora*) から単離)、(6) C - 18 - N - デメチル (米国特許第 4, 362, 663 号および同第 4, 322, 348 号) (メイタンシノールのストレプトマイセスによるデメチル化によって調製)、および (7) 4, 5 - デオキシ (米国特許第 4, 371, 533 号) (メイタンシノールの三塩化チタン / LAH 還元によって調製) が挙げられる。

#### 【0065】

本発明の好ましい実施形態において、複合体は、 $N^{2'}$  - デアセチル -  $N^{2'}$  - (3 - メルカプト - 1 - オキソプロピル) - メイタンシンとしても知られるチオール含有メイタンシノイド DM 1 を細胞傷害剤として利用する。DM 1 の構造は、式 (I)：

#### 【0066】

##### 【化 1】



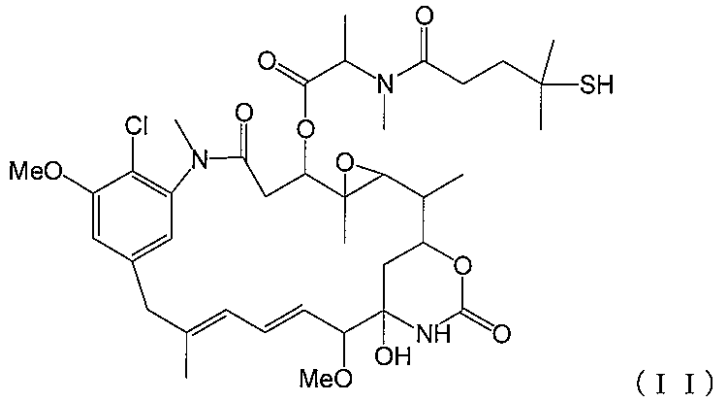
によって表される。

## 【 0 0 6 7 】

本発明の別の好ましい実施形態において、複合体は、 $N^{2'}$  - デアセチル -  $N^{2'}$  - ( 4 - メチル - 4 - メルカプト - 1 - オキソペンチル ) - メイタンシンとしても知られるチオール含有メイタンシノイドDM4を細胞傷害剤として利用する。DM4の構造は、式(II)：

## 【 0 0 6 8 】

## 【 化 2 】



10

によって表される。

## 【 0 0 6 9 】

他のメイタンシンは、例えば、硫黄原子を有する炭素原子上にモノまたはジアルキル置換を有するチオールおよびジスルフィド含有メイタンシノイドをはじめとする他のメイタンシンを本発明に関連して使用することができる。特に好ましいのはC - 3位で ( a ) C - 14ヒドロキシメチル、C - 15ヒドロキシ、またはC - 20デスメチル官能基、および ( b ) ヒンダードスルフィド基を有するアシル基を有するアシル化アミノ酸側鎖を有するメイタンシノイドであり、ここで、チオール官能基を有するアシル基の炭素原子は1または2個の置換基を有し、前記置換基は、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ 、1から10個の炭素原子を有する直鎖もしくは分枝アルキルもしくはアルケニル、3から10個の炭素原子を有する環式アルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換フェニル、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキル基であり、さらに、置換基の1つはHであり得、アシル基はカルボニル官能基と硫黄原子との間に少なくとも3個の炭素原子の直線状鎖長を有する。

20

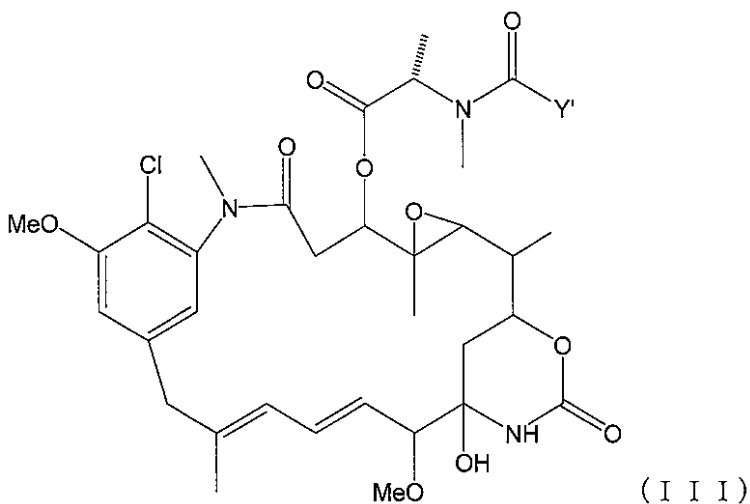
30

## 【 0 0 7 0 】

本発明の文脈で使用するさらなるメイタンシノイド類は、式(III)：

## 【 0 0 7 1 】

## 【 化 3 】



40

50

によって表される化合物を含み、式中、 $Y'$ は

$(CR_7R_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C-C)_qA_o(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C-C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$ を表し、

式中、 $R_1$ および $R_2$ はそれぞれ独立して、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ または1から10個の炭素原子を有する直鎖アルキルもしくはアルケニル、3から10個の炭素原子を有する分枝もしくは環式アルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換フェニル、または複素環芳香族またはヘテロシクロアルキル基であり、 $R_2$ はまたHであり得、

式中、A、B、Dは、3～10個の炭素原子を有するシクロアルキルもしくはシクロアルケニル、単純もしくは置換アリール、または複素環芳香族、もしくはヘテロシクロアルキル基であり、

式中、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、および $R_{12}$ はそれぞれ独立して、H、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ 、1から10個の炭素原子を有する直鎖アルキルもしくはアルケニル、3から10個の炭素原子を有する分枝もしくは環式アルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換フェニルまたは複素環芳香族、もしくはヘテロシクロアルキル基であり、

式中、 $l$ 、 $m$ 、 $n$ 、 $o$ 、 $p$ 、 $q$ 、 $r$ 、 $s$ 、および $t$ はそれぞれ独立して、ゼロまたは1から5の内の1つの整数であって、ただし、 $l$ 、 $m$ 、 $n$ 、 $o$ 、 $p$ 、 $q$ 、 $r$ 、 $s$ および $t$ の内少なくとも2つはいかなる時もゼロではなく、

式中、ZはH、SRまたはCORであり、式中、Rは1から10個の炭素原子を有する直鎖アルキルもしくはアルケニル、3から10個の炭素原子を有する分枝もしくは環式アルキルもしくはアルケニル、または単純もしくは置換アリールまたは複素環芳香族、もしくはヘテロシクロアルキル基である。

#### 【0072】

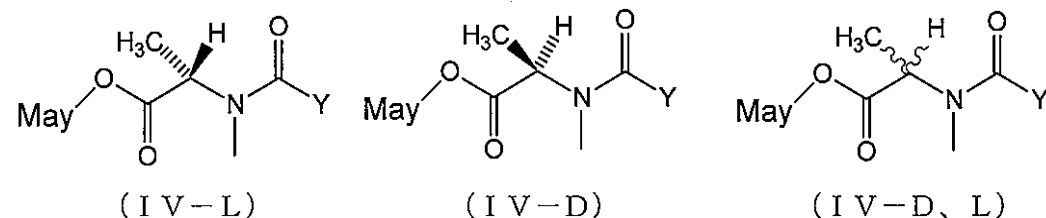
式(III)の好ましい実施形態は、式(III)の化合物を含み、式中、(a) $R_1$ はH、 $R_2$ はメチルおよびZはHであり、(b) $R_1$ および $R_2$ はメチル、ならびにZはHであり、(c) $R_1$ はH、 $R_2$ はメチル、およびZは $-SCH_3$ であり、(d) $R_1$ および $R_2$ はメチル、ならびにZは $-SCH_3$ である。

#### 【0073】

その様なさらなるメイタンシノインドはまた、式(IV-L)、(IV-D)、または(IV-D、L)：

#### 【0074】

#### 【化4】



によって表される化合物を含み、

式中、Yは $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$ を表し、式中、 $R_1$ および $R_2$ はそれぞれ独立して、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ 、直鎖アルキル、または1から10個の炭素原子を有するアルケニル、3から10個の炭素原子を有する分枝もしくは環式アルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換フェニル、または複素環芳香族またはヘテロシクロアルキル基であり、 $R_2$ はまたHであり得、

式中、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、および $R_8$ はそれぞれ独立して、H、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ 、1から10個の炭素原子を有する直鎖アルキルまたはアルケニル、3から10個の炭素原子を有する分枝もしくは環式アルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換フェニル、または複素環芳香族またはヘテロシクロアルキル基であり、

式中、 $l$ 、 $m$ 、および $n$ はそれぞれ独立して、1から5の内の1つの整数であり、その上 $n$ はゼロであってもよく、

式中 Z は H、S R、または C O R であり、R は 1 から 10 個の炭素原子を有する直鎖もしくは分枝アルキルもしくはアルケニル、3 から 10 個の炭素原子を有する環式アルキルもしくはアルケニル、または単純もしくは置換アリールまたは複素環芳香族またはヘテロシクロアルキル基であり、

式中、M a y はメイタンシノイドを表し、C - 3、C - 14 ヒドロキシメチル、C - 15 ヒドロキシ、または C - 20 デスメチルに側鎖を有している。

【0075】

式 (I V - L)、(I V - D) および (I V - D、L) の好ましい実施形態は、(a) R<sub>1</sub> が H、R<sub>2</sub> がメチル、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、および R<sub>8</sub> がそれぞれ H、l および m がそれぞれ 1、n は 0、ならびに Z が H である、(b) R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> がメチル、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub> がそれぞれ H、l および m が 1、n は 0、ならびに Z は H である、(c) R<sub>1</sub> が H、R<sub>2</sub> はメチル、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、および R<sub>8</sub> がそれぞれ H、l および m がそれぞれ 1、n は 0、ならびに Z が - S C H<sub>3</sub> であるか、または、(d) R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> がメチル、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub> がそれぞれ H、l および m が 1、n は 0、ならびに Z が - S C H<sub>3</sub> である、式 (I V - L)、(I V - D) および (I V - D、L) の化合物を含む。

10

【0076】

好適には、細胞傷害剤は式 (I V - L) で表される。

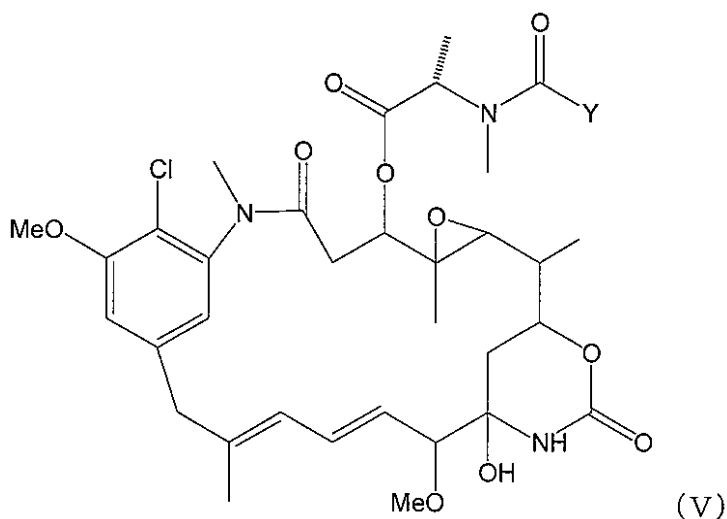
【0077】

さらなる好ましいメイタンシノイド類はまた、式 (V) :

20

【0078】

【化5】



30

によって表される化合物を含み、

式中、Y は (C R<sub>7</sub> R<sub>8</sub>)<sub>1</sub> (C R<sub>5</sub> R<sub>6</sub>)<sub>m</sub> (C R<sub>3</sub> R<sub>4</sub>)<sub>n</sub> C R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> S Z を表し、式中、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> はそれぞれ独立して、C H<sub>3</sub>、C<sub>2</sub> H<sub>5</sub>、直鎖アルキル、または 1 から 10 個の炭素原子を有するアルケニル、3 から 10 個の炭素原子を有する分枝もしくは環式アルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換フェニルまたは複素環芳香族またはヘテロシクロアルキル基であり、R<sub>2</sub> はまた H であり得、

40

式中、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、および R<sub>8</sub> はそれぞれ独立して、H、C H<sub>3</sub>、C<sub>2</sub> H<sub>5</sub>、1 から 10 個の炭素原子を有する直鎖アルキルもしくはアルケニル、3 から 10 個の炭素原子を有する分枝もしくは環式アルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換フェニル、または複素環芳香族またはヘテロシクロアルキル基であり、

式中、l、m、および n はそれぞれ独立して、1 から 5 の内の 1 つの整数であり、その上 n はゼロであってもよく、

式中、Z は H、S R または C O R であり、R は 1 から 10 個の炭素原子を有する直鎖アルキルもしくはアルケニル、3 から 10 個の炭素原子を有する分枝もしくは環式アルキルも

50

しくはアルケニル、または単純もしくは置換アリールまたは複素環芳香族またはヘテロシクロアルキル基である。

【0079】

式(V)の好ましい実施形態は、式(V)の化合物がを含み、式中、(a)  $R_1$  はH、 $R_2$  はメチル、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、および $R_8$ はそれぞれH、 $l$ および $m$ はそれぞれ1； $n$ は0；ならびにZはHであるか、(b)  $R_1$  および $R_2$  はメチル； $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ はそれぞれH、 $l$ および $m$ は1； $n$ は0；ならびにZはHであるか、(c)  $R_1$  はH、 $R_2$  はメチル、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、および $R_8$ はそれぞれH、 $l$ および $m$ はそれぞれ1、 $n$ は0、ならびにZは $-SCH_3$ であるか、または(d)  $R_1$  および $R_2$  はメチル、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ はそれぞれH、 $l$ および $m$ は1、 $n$ は0、ならびにZは $-SCH_3$ である。

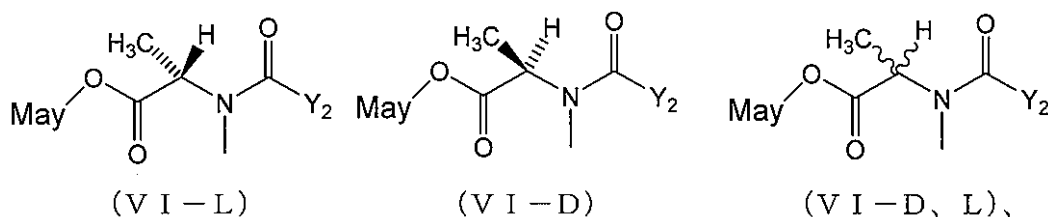
10

【0080】

さらに、より好ましいメイタンシノイド類は、式(VI-L)、(VI-D)、または(VI-D、L)：

【0081】

【化6】



20

によって表される化合物を含み、

式中、 $Y_2$  は $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$ を表し、

式中、 $R_1$  および $R_2$  はそれぞれ独立して、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ 、1から10個の炭素原子を有する直鎖アルキルもしくはアルケニル、3から10個の炭素原子を有する分枝もしくは環式アルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換フェニルまたは複素環芳香族またはヘテロシクロアルキル基であり、 $R_2$  はまたHであり得、

式中、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、および $R_8$ はそれぞれ独立して、H、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ 、1から10個の炭素原子を有する直鎖環式アルキルもしくはアルケニル、3から10個の炭素原子を有する分枝もしくは環式アルキルもしくはアルケニル、フェニル、置換フェニルまたは複素環芳香族またはヘテロシクロアルキル基であり、

30

式中、 $l$ 、 $m$ 、および $n$ はそれぞれ独立して、1から5の内の1つの整数であり、加えて $n$ はゼロであってもよく、

式中、 $Z_2$  はSRまたはCORであり、Rは1から10個の炭素原子を有する直鎖アルキルもしくはアルケニル、3から10個の炭素原子を有する分枝もしくは環式アルキルもしくはアルケニル、または単純もしくは置換アリールまたは複素環芳香族またはヘテロシクロアルキル基であり、

式中、Mayはメイタンシノイドである。

40

【0082】

メイタンシノイド類に加えて、複合体において使用する細胞傷害剤はタキサンまたはその誘導体であってもよい。タキサン類は化合物の1つの族であり、細胞毒性の天然物であるパクリタキセル(Taxol(登録商標))、および半合成誘導体であるドセタキセル(Taxotere(登録商標))を含み、これらは両方ともガンの治療において広く使用されている。タキサン類は紡錘体毒であり、チューブリンの脱重合を阻害し、細胞死を引き起こす。ドセタキセルおよびパクリタキセルは、ガンの治療において有用な医薬品であるが、これらの抗腫瘍活性は、正常細胞に対する非特異的毒性により限定される。さらに、パクリタキセルおよびドセタキセルそれら自身の様な化合物は、細胞結合剤の複合体において使用するのに十分なほど強力ではない。

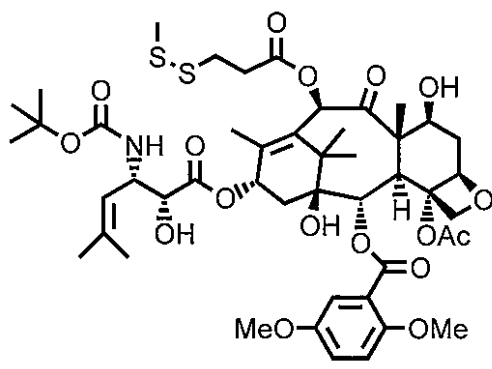
50

【 0 0 8 3 】

細胞毒性の複合体の調製において使用するのに好ましいタキサンは、式 ( V I I I ) :

【 0 0 8 4 】

【 化 7 】



10

のタキサンである。

【 0 0 8 5 】

本発明の文脈において使用得るタキサン類を合成するプロセスは、タキサン類と抗体などの細胞結合剤を結合するプロセスと共に、米国特許第 5, 416, 064 号; 同第 5, 475, 092 号; 同第 6, 340, 701 号; 同第 6, 372, 738 号; 同第 6, 436, 931 号; 同第 6, 596, 757 号; 同第 6, 706, 708 号; 同第 6, 716, 821 号; および同第 7, 390, 898 号に詳細に記載される。

20

【 0 0 8 6 】

また細胞毒性は、CC - 1065 またはその誘導体であってもよい。CC - 1065 は、ストレプトマイセスゼレンシス (*Streptomyces zelensis*) の培養ブロスから単離された、強力な制ガン抗生物質である。CC - 1065 は、ドキソルビシン、メトトレキサート、およびビンクリスチンなどの一般的に使用される抗ガン剤よりも *in vitro* において約 1000 倍以上も強力である (Bhuyan et al., Cancer Res., 42: 3532 - 3537 (1982))。CC - 1065 およびその類似体は、米国特許第 5, 585, 499 号; 同第 5, 846, 545 号; 同第 6, 340, 701 号; および同第 6, 372, 738 号に開示されている。CC - 1065 の細胞毒性の効力は、そのアルキル化活性およびその DNA 結合または DNA インターカレート活性と相関している。これら 2 つの活性は分子の別々の部分に属する。この点に関して、アルキル化活性は CC - 1065 の 2 つのピロロインドールサブユニットに属する、シクロプロパピロロインドール (CPI) サブユニットおよび DNA 結合活性に含有される。

30

【 0 0 8 7 】

いくつかの CC - 1065 類似体は当該技術分野において公知であり、また複合体において細胞傷害剤として使用され得る (例えば、Warpehoski et al., J. Med. Chem., 31: 590 - 603 (1988) を参照のこと)。一連の CC - 1065 類似体が CPI 部分をシクロプロパベンジドール (CBI) 部分に換えて開発されている (Boger et al., J. Org. Chem., 55: 5823 - 5833 (1990)、および Boger et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1: 115 - 120 (1991))。これらの CC - 1065 類似体はマウスに遅発毒性を引き起こすことなく、元の薬剤の高い *in vitro* 効力を維持する。CC - 1065 と同様に、これらの化合物はアルキル化剤であり、DNA の副溝と共有結合して細胞死を引き起こす。

40

【 0 0 8 8 】

CC - 1065 類似体の治療効果は、腫瘍部位への標的化送達を通じて *in vivo* 分布を変え、非標的組織に対するより低い毒性、ひいてはより低い全身毒性をもたらすことにより、大幅に改善し得る。この目的を達成するために、腫瘍細胞を特異的に標的とす

50

る細胞結合剤を有する類似体の複合体およびCC-1065の誘導体が、産生されている（例えば、米国特許第5,475,092号；同第5,585,499号；および同第5,846,545号を参照のこと）。これらの複合体は、典型的に*in vitro*で高い標的特異性の細胞毒性、およびマウスにおけるヒト腫瘍異種移植モデルにおける制ガン活性を示す（例えば、Charl et al., Cancer Res., 55:4079-4084 (1995)を参照のこと）。

【0089】

CC-1065類似体を合成するプロセスは、米国特許第5,475,092号；同第5,585,499号；同第5,846,545号；同第6,534,660号；同第6,586,618号；同第6,756,397号；および同第7,329,760号に詳細に記載される。

10

【0090】

メトトレキサート、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、カリチアマイシン、ツブリシンおよびツブリシン類似体、デュオカルマイシンおよびデュオカルマイシン類似体、ドラスタチンおよびドラスタチン類似体などの薬剤をまた、本発明の細胞傷害剤として使用し得る。ドキサルビシンおよびダウノルビシン化合物（例えば、米国特許第6,630,579号を参照のこと）はまた、細胞傷害剤として使用し得る。

【0091】

細胞結合剤細胞傷害剤複合体は、*in vitro*のプロセスによって調製してもよい。細胞傷害剤と抗体を連結するために、連結基を使用する。好適な連結基は当該技術分野において周知であり、ジスルフィド基、酸不安定性基、感光性基、ペプチダーゼ不安定性基、およびエラスターゼ不安定性基、ならびに開裂不可能な連結基を含む。

20

【0092】

本発明に基づき、二官能性架橋剤と細胞結合剤の反応によって細胞結合剤を修飾し、それによりリンカー分子と細胞結合剤の共有結合をもたらす。本明細書で使用される場合、「二官能性架橋剤」は2つの反応性基を有する試薬を指し；試薬のうち1つは細胞結合剤と反応することができるが、他方の1つの試薬は細胞傷害剤と反応することができ、細胞結合剤と細胞傷害剤を連結し、それにより複合体を形成する。

【0093】

リンカー試薬が治療的な、例えばそれぞれ、細胞毒性、ならびに細胞傷害剤および細胞結合剤の標的特性の維持を提供するが、容認できる毒性プロファイルを提供する限り、あらゆる好適な二官能性架橋剤を本発明に関して使用してもよい。望ましくは、リンカー分子は、細胞傷害剤および細胞結合剤が互いに化学的カップリング（例えば、共有結合）をするような化学結合（上に記載したような）を通じて、細胞傷害剤と細胞結合剤を結合する。

30

【0094】

1つの実施形態において、細胞結合剤は、ジスルフィド結合、酸不安定性結合、感光性結合、ペプチダーゼ不安定性結合、およびエラスターゼ不安定性結合からなる群から選択された化学結合を介して、化学的に細胞傷害剤とカップリングする。

40

【0095】

1つの実施形態において、二官能性架橋剤は開裂不可能なリンカーを含む。開裂不可能なリンカーは、安定した、共有結合の様式で、メイタンシノイド、タキサン、またはCC-1065類似体などの細胞傷害剤と細胞結合剤を連結することができる、任意の化学的部分である。従って、細胞傷害剤または細胞結合剤が活性を残す状況下において、酸による開裂、光による開裂、ペプチダーゼによる開裂、エラスターゼによる開裂、およびジスルフィド結合開裂に対して、開裂不可能なリンカーは実質的に抵抗性である。

【0096】

細胞傷害剤と細胞結合剤の間に開裂不可能なリンカーを形成する好適な架橋剤は、当該技術分野において周知である。1つの実施形態において、細胞傷害剤はチオエーテル結合

50

を通じて、細胞結合剤と化学的にカップリングする。開裂不可能なリンカーの例としては、細胞傷害剤と反応するためのマレイミド系部分またはハロアセチル基部分を有するリンカーが挙げられる。その様な二官能性架橋剤は当該分野において周知であり（米国特許出願公開第2010/0129314号；第2009/0274713号；第2008/0050310号；第2005/0169933号；およびPierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105、米国を参照のこと）、限定されないが、N - スクシンイミジル4 - (マレイミドメチル)シクロヘキサカルボン酸(SMCC)、SMCC(LC-SMCC)の「長鎖」類似体である、N - スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシ - (6 - アミドカブロン酸)、 - マレイミドウンデカン酸N - スクシンイミジルエステル(KMUA)、 - マレイミドブタン酸N - スクシンイミジルエステル(GMBS)、 - マレイミドカブロン酸N - ヒドロキシスクシンイミドエステル(EMCS)、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、N - ( - マレイミドアセトキシ) - サクシニミドエステル(AMAS)、スクシンイミジル - 6 - ( - マレイミドプロピオンアミド)ヘキサン酸(SMPH)、N - スクシンイミジル4 - (p - マレイミドフェニル) - ブタン酸(SMPB)、およびN - (p - マレイミドフェニル)イソシアン酸(PMPI)を含む。架橋剤は、N - スクシンイミジル - 4 - (ヨードアセチル) - アミノ安息香酸(SIAB)、N - スクシンイミジルヨード酢酸(SIA)、N - スクシンイミジルプロモ酢酸(SBA)、およびN - スクシンイミジル3 - (プロモアセトアミド)プロピオン酸(SBAP)を含むハロアセチル基部分、

ビス - マレイミドポリエチレングリコール(BMPEO)、BM(PEO)<sub>2</sub>、BM(PEO)<sub>3</sub>、N - ( - マレイミドプロピロキシ)サクシニミドエステル(BMPS)、5 - マレイミドペンタン酸NH<sub>2</sub>S、HBVS、4 - (4 - N - マレイミドフェニル) - ブタン酸ヒドラジド・HCl(MPBH)、スクシンイミジル - (4 - ビニルスルホニル)安息香酸(SVSB)、ジチオビス - マレイミドエタン(DTME)、1, 4 - ビス - マレイミドブタン(BMB)、1, 4 - ビスマレイミジル - 2, 3 - ジヒドロキシブタン(BMDB)、ビス - マレイミドヘキサン(BMH)、ビス - マレイミドエタン(BMOE)、スルホスクシンイミジル4 - (N - マレイミド - メチル)シクロヘキサン - 1 - カルボン酸(スルホ - SMCC)、スルホスクシンイミジル(4 - ヨード - アセチル)アミノ安息香酸(スルホ - SIAB)、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスルホサクシニミドエステル(スルホ - MBS)、N - ( - マレイミドブチルオキシ)スルホスクシンイミドエステル(スルホ - GMBS)、N - ( - マレイミドカプロイルオキシ)スルホスクシニミドエステル(スルホ - EMCS)、N - ( - マレイミドウンデカノイルオキシ)スルホサクシニミドエステル(スルホ - KMUS)ならびにスルホスクシンイミジル4 - (p - マレイミドフェニル)ブタン酸(スルホ - SMPB)CX1 - 1、スルホ - Mal(またはその塩)ならびにPEG<sub>n</sub> - Malを含む。望ましくは、二官能性架橋剤はSMCCである。

10

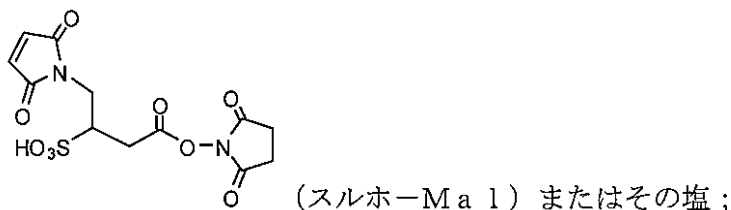
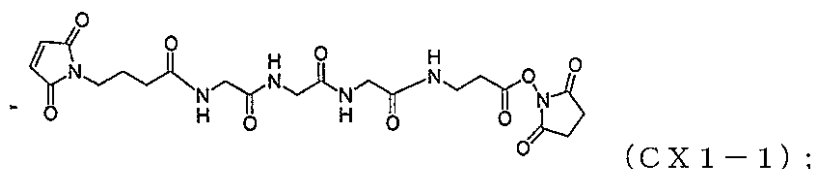
20

30

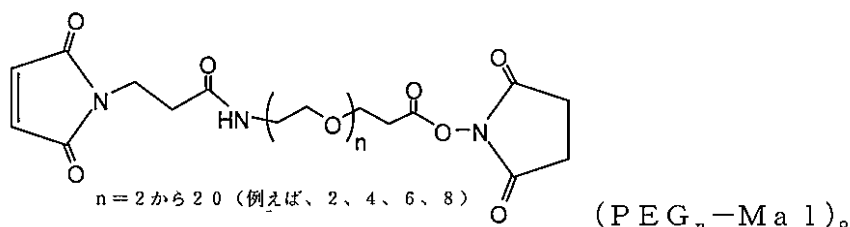
【0097】



## 【化 8】



10



## 【0098】

1つの実施形態において、連結剤は開裂可能なリンカーである。好適な開裂可能なリンカーの例としては、ジスルフィドリンカー、酸不安定性リンカー、感光性リンカー、ペプチダーゼ不安定性リンカー、およびエラスターゼ不安定性リンカーが挙げられる。リンカーを含有するジスルフィドは、ジスルフィド交換を通じて開裂可能なリンカーであり、生理的条件下で発生し得る。酸不安定性リンカーは、酸性のpHで開裂可能なリンカーである。例えば、エンドソームおよびリソソームなどのいくつかの細胞内区画は酸性pH (pH 4 ~ 5) を有し、酸不安定性リンカーの開裂に好適な状態を提供する。感光性リンカーは、光を利用可能な体表上および多くの体腔内において有用である。その上、赤外線は組織に透過し得る。ペプチダーゼ不安定性リンカーを利用して、細胞内または細胞外のいくつかのペプチドを開裂してもよい (例えば、Trouet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 626 - 629 (1982)、および Umemoto et al., Int. J. Cancer, 43: 677 - 684 (1989) を参照のこと)。1つの実施形態において、開裂可能なリンカーを緩和な状態下、すなわち、細胞傷害剤の活性が影響されない細胞内における状態下で開裂する。

20

30

## 【0099】

1つの実施形態において、細胞傷害剤をジスルフィド結合を通じて細胞結合剤と連結する。リンカー分子は、細胞結合剤と反応し得る反応化学基を含む。1つの実施形態において、二官能性架橋剤は、細胞結合剤のリジン残基とアミド結合を形成し得る、反応性部分を含む。細胞結合剤のリジン残基とアミド結合を形成し得る反応性部分の例としては、N - スクシンイミジルエステル、N - スルホスクシンイミジルエステル、ニトロフェニル (例えば、2 または 4 - ニトロフェニル) エステル、ジニトロフェニル (例えば、2, 4 - ジニトロフェニル) エステル、スルホ - テトラフルオロフェニル (例えば、4 - スルホ - 2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニル) エステル、およびペンタフルオロフェニルエステルなどの、カルボン酸部分ならびに反応性エステル部分が。

40

## 【0100】

細胞結合剤との反応に好ましい反応化学基は、N - スクシンイミジルエステルおよび N - スルホスクシンイミジルエステルである。さらなるリンカー分子は反応化学基を含み、望ましくは、細胞傷害剤と反応してジスルフィド結合を形成し得る、ジチオピリジル基を含む。細胞傷害剤とジスルフィド結合を介した細胞結合剤の連鎖を可能にする二官能性架橋剤は、当該技術分野において公知であり、例えば、N - スクシンイミジル 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオン酸 (SPDP) (例えば、Carlsson et al.,

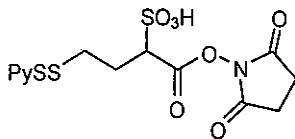
50

Biochem. J., 173:723-737 (1978)を参照のこと)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ブタン酸(SPDB)またはその塩(例えば、米国特許第4,563,304号を参照のこと)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ペンタン酸(SPP)(例えば、CAS登録番号341498-08-6を参照のこと)、およびN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)2-スルホブタン酸(スルホ-SPDB)(例えば、米国特許出願公開第2009/0274713号を参照のこと)を含む。ジスルフィド基の導入に使用し得るその他の二官能性架橋剤は当該技術分野において公知であり、米国特許第6,913,748号、同第6,716,821号および米国特許出願公開第2009/0274713号および同第2010/0129314号において記載され、その全ては参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0101】

【化9】



(スルホ-SPDB) またはその塩

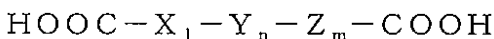
【0102】

開裂不可能なリンカーを形成する硫黄原子を欠くその他の架橋剤もまた、本発明プロセスにおいて使用してもよい。その様なリンカーは、ジカルボン酸基部分に由来し得る。好適なジカルボン酸基部分は、これに限定されないが、一般式(IX)：

20

【0103】

【化10】



(IX)

の、-ジカルボン酸を含み、

式中、Xは2から20個の炭素原子を有する直鎖または分枝アルキル、アルケニル、またはアルケニル基であり、Yは3から10個の炭素原子を有するシクロアルキルまたはシクロアルケニル基であり、Zは6から10個の炭素原子を有する置換もしくは非置換芳香族基、または置換もしくは非置換複素環基であり、ヘテロ原子はN、OまたはSから選択され、l、m、およびnはそれぞれ0または1であって、ただし、l、m、およびnは同時に全てゼロではないl、m、およびnを提供する。

30

【0104】

本明細書に開示する開裂不可能なリンカーの多くは、米国特許出願公開第2005/0169933 A1号に詳細に記載されている。

【0105】

次の実施例は本発明をさらに説明するが、言うまでもなく、その範囲を限定するあらゆるプロセスとしても解釈されるべきではない。

40

【実施例1】

【0106】

本実施例は、細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を調製するプロセスの修飾反応の間にN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)の添加による、有益な効果を示す。特に本実施例は、修飾反応へのNHSの添加が、抗体-メイタンシノイド複合体の安定性に対して有益な効果を有することを示す。

【0107】

抗体対薬物比としても知られる、抗体比に対するメイタンシノイド(MAR)が約3.0の複合体を作製するために、修飾反応へ外因性NHSを添加して、または添加せずに、前に記載されているプロセス(例えば、米国特許第5,208,020号および米国特許

50

出願公開第2006/0182750号を参照のこと)を用いて、ヒト化h u N 9 0 1抗体を、ヘテロ二機能性架橋剤S M C CおよびメイタンシノイドD M 1と反応させた。

【0108】

前に記載されたプロセスで、h u N 9 0 1 ( 1 8 m g / m L ) を初めにS M C C ( 抗体の量に対して5 . 0 倍のモル過剰 ) と反応させて、修飾抗体を形成した。修飾反応を2 1 で、5 0 m M のリン酸カリウム、5 0 m M の塩化カリウム、2 m M のE D T A 、p H 6 . 5 および1 0 % のD M A 中において1 5 0 分間実施した。総計約0 . 6 m M のN H S が、抗体へのリンカーの付着を引き起こすS M C C のアミノリシス反応の組み合わせおよびS M C C の加水分解から遊離した。修飾反応を0 . 5 M の酢酸でクエンチしてp H を5 . 0 まで調整し、2 m M のE D T A を含有する2 0 m M の酢酸ナトリウム ( p H 5 . 0 ) 中に平衡および溶出させる、セファデックスG 2 5 F 樹脂のカラムを用いて、修飾抗体を精製した。精製の後、修飾抗体 ( 4 m g / m L ) をメイタンシノイドD M 1 ( 抗体の量に対して4 . 2 倍のモル過剰 ; 抗体上のリンカーの測定量に対して1 . 3 倍の過剰 ) と反応させて、複合抗体を形成した。複合反応を2 1 で、2 m M のE D T A および5 % のD M A を含有する2 0 m M の酢酸ナトリウム緩衝液 ( p H 5 . 0 ) 中において約2 0 時間実施した。その後、1 0 m M のコハク酸ナトリウム ( p H 5 . 0 ) 中に平衡および溶出させるセファデックスG 2 5 F 樹脂のカラムを用いて、反応混合物を精製した。

10

【0109】

外因性N H S を添加したプロセスで、h u N 9 0 1 ( 1 8 m g / m L ) をS M C C と反応させて修飾抗体を形成した。修飾反応を2 1 で、5 0 m M のリン酸カリウム、5 0 m M の塩化カリウム、2 m M のE D T A 、1 0 % のD M A 中において2 0 m M 、5 0 m M 、または1 0 0 m M の外因性N H S を添加し、1 5 0 分間実施した。6 . 7 、1 0 、および1 7 . 5 倍のモル過剰 ( 抗体の量に対して ) のS M C C を、それぞれ2 0 m M 、5 0 m M 、および1 0 0 m M のN H S ( 既存のN H S に添加したN H S のモル比は約2 5 、4 2 、または4 8 倍である ) を含有する反応に対して使用した。より高い濃度のS M C C が、S M C C 取り込みにおける高濃度のN H S の阻害効果を克服するために、より高いレベルのN H S を含有する試料に対して必要であった。反応を0 . 5 M の酢酸でクエンチしてp H を5 . 0 まで調整し、2 m M のE D T A を含有する2 0 m M の酢酸ナトリウム ( p H 5 . 0 ) 中に平衡および溶出させるセファデックスG 2 5 F 樹脂のカラムを用いて、修飾抗体を精製した。精製の後、修飾抗体 ( 4 m g / m L ) をメイタンシノイドD M 1 ( 抗体の量に対して3 . 7 から4 . 2 倍のモル過剰 ; 抗体上のリンカーの測定量に対して1 . 3 倍の過剰 ) と反応させ、複合抗体を形成した。複合反応を2 1 で、2 m M のE D T A および5 % のD M A を含有する2 0 m M の酢酸ナトリウム緩衝液 ( p H 5 . 0 ) 中において約2 0 時間実施した。その後、1 0 m M のコハク酸ナトリウム ( p H 5 . 0 ) 中に平衡および溶出させるセファデックスG 2 5 F 樹脂のカラムを用いて、反応混合物を精製した。

20

30

【0110】

修飾反応において外因性N H S の存在下または非存在下におけるプロセスにより調製した複合体を、非還元性の化学種、複合単量体、および遊離メイタンシノイドについて分析した。

【0111】

複合体の非還元性の化学種レベルを還元型S D S ゲル電気泳動により分析した。より具体的には、個別の還元型複合体化学種のピーク領域 ( 還元型軽鎖、還元型重鎖、架橋軽 - 軽鎖、架橋軽 - 重鎖などを含む ) を測定し、非還元性の化学種レベルを、全ての化学種の領域の和に対する非還元性の化学種の領域の和の割合によって算出した。

40

【0112】

複合体の単量体レベルをサイズ排除H P L C で分析した。より具体的には、単量体、二量体、集合体、および低分子量の化学種のピーク領域を、2 5 2 n m または2 8 0 n m の波長に設定した吸光度検出器を用いて測定し、単量体レベルを、全体の領域に対する単量体の領域の割合によって算出した。

【0113】

50

複合体中に存在する遊離メイタンシノイドの量を二重カラム（H i S e pおよびC 1 8カラム）H P L Cにより分析した。より具体的には、総遊離メイタンシノイド化学種（勾配中に溶出し、溶出時間と既知の基準との比較により同定した）のピーク領域を、252nmの波長に設定した吸光度検出器を用いて測定し、遊離メイタンシノイドの量を、既知の基準量のピーク領域で作製した検量線を用いて算出した。

#### 【0114】

遊離メイタンシノイドの放出および単量体に関する複合体安定性を、4の10mMのコハク酸ナトリウム中における液体複合体の貯蔵を通じて、安定性試験により評価した。

#### 【0115】

下記の表1に示すように、修飾反応における外因性NHSの存在下において製作した複合体は、外因性NHSの非存在下において製作した複合体よりも、遊離メイタンシノイドに対する安定性に基づいて優れていた。単量体および非還元性の化学種に対する複合体安定性は、全ての検査をした試料において同等であった。

10

#### 【0116】

表1。修飾反応において外因性NHSの存在下または非存在下におけるプロセスにより製作した、h u N 9 0 1複合体（S M C Cリンカー、D M 1メイタンシノイド）の重要性質の比較

#### 【0117】

#### 【表1】

20

| 添加した外因性NHS                    | 0mM<br>NHS | 20mM<br>NHS | 50mM<br>NHS | 100mM<br>NHS |
|-------------------------------|------------|-------------|-------------|--------------|
| 非還元性の化学種 (%)                  | 8.8        | 7.0         | 7.2         | 7.7          |
| 複合単量体<br>(t=0の際の%)            | 96.8       | 97.1        | 97.2        | 97.1         |
| 複合単量体<br>(4℃で10ヶ月の後の%)        | 96.8       | 97.0        | 97.0        | 96.9         |
| 遊離メイタンシノイド<br>(t=0の際の%)       | 0.1        | 0.1         | 0.1         | 0.1          |
| 遊離メイタンシノイド<br>(4℃で10.5ヶ月の後の%) | 7.3        | 2.8         | 1.8         | 1.3          |

30

#### 【0118】

本実施例に提示した実験の結果は、修飾反応の間の外因性NHSの添加による、複合体安定性に対する有益な効果を示す。特にこれらの結果は、遊離メイタンシノイドの放出により測定されるh u N 9 0 1 - S M C C - D M 1複合体の安定性が、修飾反応に外因性NHSを添加する場合、有意に増加することを確認する。

40

#### 【実施例2】

#### 【0119】

本実施例は、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調整するプロセスの修飾反応の間にN - ヒドロキシスクシンイミド（NHS）の添加による、有益な効果を示す。特に本実施例は、複合反応へのNHSの添加が、抗体 - メイタンシノイド複合体の安定性に対して有益な効果を有することを示す。

#### 【0120】

抗体対薬物比としても知られる、抗体比に対するメイタンシノイド（MAR）が約3 .

50

0 の複合体を作製するために、複合反応へ外因性 N - ヒドロキシスクシンイミド ( N H S ) を添加して、または添加せずに、前に記載されているプロセス (例えば、米国特許第 5 , 2 0 8 , 0 2 0 号および米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 1 8 2 7 5 0 号を参照のこと) を用いて、ヒト化 h u N 9 0 1 抗体を、ヘテロ二機能性架橋剤 S M C C およびメイタンシノイド D M 1 と反応させた。

#### 【 0 1 2 1 】

本試験で、h u N 9 0 1 ( 1 8 m g / m L ) を S M C C ( 抗体の量に対して 5 . 0 倍のモル過剰 ) と反応させて、修飾抗体を形成した。修飾反応を 2 1 で、5 0 m M のリン酸カリウム、5 0 m M の塩化カリウム、2 m M の E D T A 、p H 6 . 5 、および 1 0 % の D M A 中において 1 5 0 分間実施した。反応を 0 . 5 M の酢酸でクエンチして p H を 5 . 0 まで調整し、2 m M の E D T A を含有する 2 0 m M の酢酸ナトリウム ( p H 5 . 0 ) 中に平衡および溶出させる、セファデックス G 2 5 F 樹脂のカラムを用いて、修飾抗体を精製した。精製の後、修飾抗体 ( 4 m g / m L ) をメイタンシノイド D M 1 ( 抗体の量に対して 4 . 2 倍のモル過剰 ; 抗体上のリンカーの測定量に対して 1 . 3 倍の過剰 ) と反応させて、複合抗体を形成した。複合反応を、2 m M の E D T A および 5 % の D M A を含有する 2 0 m M の酢酸ナトリウム緩衝液中において実施した。複合化 p H を第三リン酸ナトリウムの添加により p H 6 . 5 まで調整した。1 つの複合反応は N H S を添加せずに構成し (前に記載されているプロセス)、3 つの複合反応はさらに 2 0 m M 、5 0 m M 、または 1 0 0 m M の N H S を添加して構成した (本発明のプロセス)。複合反応を約 2 0 時間維持した。その後、1 0 m M のコハク酸ナトリウム ( p H 5 . 0 ) 中に平衡および溶出させるセファデックス G 2 5 F 樹脂のカラムを用いて、反応混合物を精製した。

10

20

#### 【 0 1 2 2 】

複合反応において外因性 N H S の存在下または非存在下におけるプロセスによって調製した複合体を実施例 1 に記載の方法を用いて、非還元性の化学種、複合単量体、および遊離メイタンシノイドについて分析した。遊離メイタンシノイド、非還元性の化学種、および単量体に対する複合体安定性を、4 の貯蔵を通じて安定性試験により評価した。

#### 【 0 1 2 3 】

下記の表 2 に示すように、複合反応における外因性 N H S の存在下において製作した複合体は、外因性 N H S の非存在下において製作した複合体よりも、遊離メイタンシノイドの安定性に基づいて優れていた。非還元性の化学種および単量体に対する複合体安定性は同等であった。

30

#### 【 0 1 2 4 】

表 2 。複合反応において外因性 N H S の存在下または非存在下におけるプロセスにより製作した、h u N 9 0 1 複合体 ( S M C C リンカー、D M 1 メイタンシノイド) の重要性質の比較

#### 【 0 1 2 5 】

【表 2】

| 添加した外因性NHS                    | 0 mM<br>NHS | 20 mM<br>NHS | 50 mM<br>NHS | 100 mM<br>NHS |
|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| 非還元性の化学種 (%)                  | 8.5         | 8.9          | 8.7          | 7.9           |
| 複合単量体<br>(t=0の際の%)            | 96.7        | 96.8         | 96.8         | 96.8          |
| 複合単量体<br>(4℃で10ヶ月の後の%)        | 96.8        | 96.8         | 96.8         | 96.9          |
| 遊離メイタンシノイド<br>(t=0の際の%)       | 0.1         | ND           | ND           | ND            |
| 遊離メイタンシノイド<br>(4℃で10.5ヶ月の後の%) | 6.7         | 3.1          | 2.8          | 2.4           |

ND－検出せず

## 【0126】

本実施例に提示した実験の結果は、複合反応の間の外因性NHSの添加による、複合体安定性に対する有益な効果を示す。特にこれらの結果は、遊離メイタンシノイドの放出により測定されるhuN901-SMCC-DM1複合体の安定性が、複合反応に外因性NHSを添加する場合、有意に増加することを確認する。

## 【実施例3】

## 【0127】

本実施例は、細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を調整するプロセスの保持ステップに、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)の添加による、有益な効果を示す。特に本実施例は、複合反応の後の外因性NHSの存在下における抗体-メイタンシノイド複合体のインキュベーションが、抗体-メイタンシノイド複合体の安定性に対して有益な効果を有することを示す。

## 【0128】

抗体対薬物比としても知られる、抗体比に対するメイタンシノイド(MAR)が約3.0の複合体を作製するために、複合反応の精製の後の保持ステップに外因性NHSを添加して、または添加せずに、前に記載されているプロセス(例えば、米国特許第5,208,020号および米国特許出願公開第2006/0182750号を参照のこと)を用いて、ヒト化huN901抗体を、ヘテロ二機能性架橋剤SMCCおよびメイタンシノイドDM1と反応させた。精製複合体を外因性NHSの非存在または存在下における異なるpH値で保持し、その後複合体安定性を測定する前に精製した。

## 【0129】

複合体生成で、huN901(18mg/mL)を初めにSMCC(抗体の量に対して5.0倍のモル過剰)と反応させて、修飾抗体を形成した。修飾反応を21で、50mMのリン酸カリウム、50mMの塩化カリウム、2mMのEDTA、pH6.5、10%のDMA中において、150分間実施した。反応を0.5Mの酢酸でクエンチしてpHを5.0まで調整し、2mMのEDTAを含有する20mMの酢酸ナトリウム(pH5.0)中に平衡および溶出させるセファデックスG25F樹脂のカラムを用いて、修飾抗体を精製した。精製の後、修飾抗体(6mg/mL)をメイタンシノイドDM1(抗体の量に対して4.2倍のモル過剰；抗体上のリンカーの測定量に対して1.3倍の過剰)と反応させて、複合抗体を形成した。複合反応を21で、2mMのEDTAおよび5%のDM

Aを含有する20 mMの酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)中において約20時間実施した。その後、3つの異なる緩衝液(pH 5.0、10 mMのコハク酸ナトリウム; pH 6.6、50 mMのリン酸ナトリウム、2 mMのEDTA; またはpH 7.5、50 mMのリン酸ナトリウム、2 mMのEDTA)中において平衡および溶出させる、セファデックスG 25 F樹脂のカラムを用いて、反応混合物を精製した。

【0130】

外因性NH<sub>2</sub>Sの存在下および非存在下における保持試験で、それぞれ異なるpH値における精製複合体を濃縮し、NH<sub>2</sub>S原液で希釈して、10 mg/mLの抗体濃度および0 mM、20 mM、50 mMまたは150 mMのNH<sub>2</sub>S濃度とした。NH<sub>2</sub>S原溶液を、精製複合体とpHが同じである1 MのNaOHを用いて事前に調整した。反応混合物を外気温で約20時間保持し、その後pH 5.0、10 mMのコハク酸ナトリウム中において平衡および溶出させるセファデックスG 25 F樹脂のカラムを用いて精製した。

10

【0131】

保持ステップにおける外因性NH<sub>2</sub>Sの存在下または非存在下におけるプロセスにより調製した複合体を、実施例1に記載の方法を用いて非還元性の化学種、複合単量体、および遊離メイタンシノイドについて分析した。遊離メイタンシノイドの放出、非還元性の化学種、および単量体に対する複合体安定性を、4の貯蔵を通じて安定性試験により評価した。

【0132】

下記の表3に示すように、検査をした3つのpH値の全てにおいて、保持ステップに添加した外因性NH<sub>2</sub>Sで調製した複合体は、外因性NH<sub>2</sub>Sを添加せずに調製した複合体よりも、遊離メイタンシノイドの安定性に基づくと、優れていた。保持ステップに対するより高いpH値(pH 6.5および7.5)で、NH<sub>2</sub>Sが保持ステップの間に存在した場合、複合体安定性をより大幅に改善した。非還元性の化学種のレベルに添加した保持pH値または外因性NH<sub>2</sub>Sの量の重大な影響はなかった。

20

【0133】

表3。複合保持ステップ後の期間に添加した外因性NH<sub>2</sub>Sの存在下または非存在下におけるプロセスにより製作した、h u N 9 0 1 複合体(SMCCリンカー、DM1メイタンシノイド)の複合体安定性の比較

【0134】

30

【表 3】

|           |                             | 0 mM<br>NH <sub>4</sub> S | 20 mM<br>NH <sub>4</sub> HS | 50 mM<br>NH <sub>4</sub> HS | 150 mM<br>NH <sub>4</sub> HS |
|-----------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| pH<br>5.0 | 非還元性の化学種 (%)                | 8.9                       | 8.3                         | 8.4                         | 8.6                          |
|           | 遊離メイタンシノイド (t = 0 の際の%)     | ND                        | ND                          | 0.1                         | ND                           |
|           | 遊離メイタンシノイド<br>(4℃で10ヶ月の後の%) | 6.1                       | 5.3                         | 4.8                         | 5.2                          |
| pH<br>6.5 | 非還元性の化学種 (%)                | 9.9                       | 10.4                        | 10.5                        | 11.2                         |
|           | 遊離メイタンシノイド (t = 0 の際の%)     | 0.1                       | ND                          | ND                          | ND                           |
|           | 遊離メイタンシノイド<br>(4℃で10ヶ月の後の%) | 5.1                       | 2.5                         | 2.0                         | 1.6                          |
| pH<br>7.5 | 非還元性の化学種 (%)                | 10.6                      | 10.9                        | 9.2                         | NT                           |
|           | 遊離メイタンシノイド (t = 0 の際の%)     | ND                        | ND                          | ND                          | ND                           |
|           | 遊離メイタンシノイド<br>(4℃で10ヶ月の後の%) | 3.8                       | 2.1                         | 1.3                         | 0.9                          |

ND－検出せず

NT－未検査

## 【0135】

下記の表4に示すように、保持ステップの期間に添加した外因性NH<sub>4</sub>Sの存在下または非存在下において製作した複合体に対する単量体に関して、複合体安定性は同等であった。

## 【0136】

表4。複合体保持ステップ後の期間に添加した外因性NH<sub>4</sub>Sの存在または非存在下におけるプロセスにより製作した、huN901複合体(SMCCリンカー、DM1メイタンシノイド)の単量体のパーセントの比較

## 【0137】

10

20

30

40



【表 4】

|           |                        | 0 mM<br>NHS | 20 mM<br>NHS | 50 mM<br>NHS | 150 mM<br>NHS |
|-----------|------------------------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| pH<br>5.0 | 複合単量体<br>( $t=0$ の際の%) | 96.7        | 96.8         | 96.8         | 96.9          |
|           | 複合単量体<br>(4℃で10ヶ月の後の%) | 96.9        | 96.9         | 96.8         | 96.9          |
| pH<br>6.5 | 複合単量体<br>( $t=0$ の際の%) | 96.6        | 96.7         | 96.7         | 96.7          |
|           | 複合単量体<br>(4℃で10ヶ月の後の%) | 96.8        | 96.7         | 96.7         | 96.7          |
| pH<br>7.5 | 複合単量体<br>( $t=0$ の際の%) | 96.5        | 96.6         | 96.7         | 96.6          |
|           | 複合単量体<br>(4℃で10ヶ月の後の%) | 96.7        | 96.6         | 96.5         | 96.6          |

10

20

## 【0138】

本実施例に提示した実験の結果は、外因性NHSの存在下において抗体メイタンシノイド複合体をインキュベートすること（すなわち、保持すること）の、複合体安定性に対する有益な効果を示す。特にこれらの結果は遊離メイタンシノイドの放出により測定される複合反応の精製の後に外因性NHSを保持ステップに添加する場合、有意に増加するhuN901-SMCC-DM1複合体の安定性を確認する。

30

## 【実施例 4】

## 【0139】

本実施例は、細胞結合剤-細胞傷害剤複合体を調整するプロセスの修飾反応の間にN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)の添加による、有益な効果を示す。特に本実施例は、修飾反応へのNHSの添加が、抗体-メイタンシノイド複合体の安定性に対して有益な効果を有することを示す。

## 【0140】

抗体対薬物比としても知られる、抗体比に対するメイタンシノイド(MAR)が約4.0の複合体を作製するために、修飾反応へ外因性NHSを添加して、または添加せずに、前に記載したプロセス（例えば、米国特許第7,811,572号を参照のこと）を用いて、ヒト化huC242抗体を、ヘテロ二機能性架橋剤SPDBおよびメイタンシノイドDM4と反応させた。

40

## 【0141】

前に記載されているプロセスで、huC242(8mg/mL)を初めにSPDB(抗体の量に対して5.8倍のモル過剰)と反応させて、修飾抗体を形成した。修飾反応を室温で、50mMのリン酸カリウム、50mMの塩化ナトリウム、2mMのEDTA、pH6.5、および5%のDMA中において150分間実施した。総計約0.3mMのNHSが、抗体へのリンカーの付着を引き起こすSPDBのアミノリシス反応の組み合わせおよびSPDBの加水分解から遊離した。修飾抗体は複合反応の前に精製しなかった。代わりに、未精製の修飾抗体を4.0mg/mLまで希釈し、メイタンシノイドDM4(抗体の量に対して9.8倍のモル過剰)と反応させて、複合抗体を形成した。複合反応を室温で

50

、5%のDMAを含有するpH6.5、50mMのリン酸カリウム、50mMの塩化ナトリウム、2mMのEDTA中において、約19時間実施した。その後、pH6.5のリン酸緩衝液中に平衡および溶出させる、セファデックスG25F樹脂のカラムを用いて、反応混合物を精製した。

#### 【0142】

外因性NH<sub>2</sub>Sを添加したプロセスで、huc242(8mg/mL)をSPDBと室温で、50mMのリン酸カリウム、50mMの塩化ナトリウム、2mMのEDTA、5%のDMAで、および1.6mM、3.1mM、または6.3mMの外因性NH<sub>2</sub>S(既存のNH<sub>2</sub>Sに添加したNH<sub>2</sub>Sのモル比が、それぞれ約5、10、または20である)のいずれかで、150分間反応させた。未精製の修飾抗体を4mg/mLまで希釈し、メイタンシノイドDM4(抗体の量に対して9.8倍のモル過剰)と反応させて、複合抗体を形成した。複合反応を室温で、5%のDMAを含有するpH6.5、50mMのリン酸カリウム、50mMの塩化ナトリウム、2mMのEDTA中において約19時間実施した。その後、pH6.5のリン酸緩衝液中に平衡および溶出させる、セファデックスG25F樹脂のカラムを用いて、反応混合物を精製した。

10

#### 【0143】

修飾反応において外因性NH<sub>2</sub>Sの存在下または非存在下におけるプロセスにより調製した複合体を、複合単量体および遊離メイタンシノイドについて分析した。

#### 【0144】

複合体の単量体レベルをサイズ排除HPLCにより分析した。より具体的には、単量体、二量体、集合体、および低分子量化学種のピーク領域を、280nmの波長に設定した吸光度検出器を用いて測定し、単量体レベルを、全体領域に対する単量体領域の割合によって算出した。

20

#### 【0145】

複合体中に存在する遊離メイタンシノイドの量をHiSep HPLCにより分析した。より具体的には、総遊離メイタンシノイド化学種(勾配中に溶出し、溶出時間と既知の基準の比較により同定した)のピーク領域を、252nmの波長に設定した吸光度検出器を用いて測定し、結合メイタンシノイドのピーク領域を、A252吸光度を用いた素通りピーク(flow through peak)から算出し、遊離メイタンシノイドの割合を、遊離および結合メイタンシノイドの全体ピーク領域で総遊離メイタンシノイドのピーク領域を分割することにより算出した。

30

#### 【0146】

遊離メイタンシノイドの放出に関する複合体安定性を4の貯蔵を通じて安定性試験により評価した。

#### 【0147】

下記の表5に示すように、修飾反応において添加した外因性NH<sub>2</sub>Sの存在下において製作した複合体は、外因性NH<sub>2</sub>Sの非存在下で製作した複合体よりも、と同様に、t=0、ならびに4で59週間貯蔵した後で観察した遊離メイタンシノイドのレベルに基づく、優れていた。単量体に対する複合体安定性は、全ての検査をした資料において同等であった。

40

#### 【0148】

表5。修飾反応におけるさらなるNH<sub>2</sub>Sの存在下または非存在下におけるプロセスにより製作した、huc242複合体(SPDBリンカー、DM4メイタンシノイド)の重要性質の比較

#### 【0149】

【表 5】

| 添加した外因性NH<br>S                  | 0 mM<br>NHS | 1. 6 mM<br>NHS | 3. 1 mM<br>NHS | 6. 3 mM<br>NHS |
|---------------------------------|-------------|----------------|----------------|----------------|
| 複合単量体<br>( $t=0$ の際の%)          | 95. 1       | 94. 9          | 95. 3          | 95. 7          |
| 遊離メイタンシノイ<br>ド( $t=0$ の際の%)     | 1. 1        | 0. 8           | 0. 7           | 0. 5           |
| 遊離メイタンシノイ<br>ド(4℃で59週間<br>の際の%) | 2. 8        | 2. 1           | 1. 8           | 1. 4           |

10

## 【0150】

本実施例に提示した実験の結果は、修飾反応の間の外因性NH Sの添加による、複合体安定性に対する有益な効果を示す。特にこれらの結果は、遊離メイタンシノイドの放出により測定されるh u C 2 4 2 - S P D B - D M 4複合体の安定性が、修飾反応に外因性NH Sを添加する場合、有意に増加することを確認する。

20

## 【実施例 5】

## 【0151】

本実施例は、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調製するプロセスの修飾反応の間にN - ヒドロキシスクシンイミド(NH S)の添加による、有益な効果を示す。特に本実施例は、複合反応へのNH Sの添加が、抗体 - メイタンシノイド複合体の安定性に対して有益な効果を有することを示す。

## 【0152】

抗体対薬物比としても知られる、抗体比に対するメイタンシノイド(M A R)が約3. 5の複合体を作製するために、複合反応に外因性N - ヒドロキシスクシンイミド(NH S)を添加して、または添加せずに、前に記載されているプロセス(例えば、米国特許第5, 208, 020号および米国特許出願公開第2006/0182750号を参照のこと)を用いて、ヒト化h u D S 6抗体を、ヘテロ二機能性架橋剤S P D BおよびメイタンシノイドD M 4と反応させた。

30

## 【0153】

本試験で、h u D S 6(10 mg / mL)をS P D B(抗体の量に対して4. 3倍のモル過剰)と反応させて、修飾抗体を形成した。修飾反応を室温で、pH 7. 5で50 mMのリン酸カリウム、100 mMの塩化ナトリウム、および5%のDMA中において60分間実施した。pH 7. 5、50 mMのリン酸カリウム、100 mMの塩化ナトリウム中に平衡および溶出させる、セファデックスG 25 F樹脂のカラムを用いて、修飾抗体を精製した。精製の後、修飾抗体(4 mg / mL)をメイタンシノイドD M 4(抗体の量に対して6. 8倍のモル過剰；抗体上のリンカーの測定量に対して1. 7倍の過剰)と反応させて、複合抗体を形成した。複合反応を50 mMのリン酸カリウム、100 mMの塩化ナトリウム中において、pH 7. 5で5%のDMAを用いて実施した。2つの複合反応を添加NH Sを用いずに(前に記載されているプロセス)、または0. 3 mMのNH Sを添加すること(本発明のプロセス)のいずれかにより構成した。複合反応を約21時間室温で保持した。その後、リン酸緩衝液pH 6. 5中に平衡および溶出させる、セファデックスG 25 F樹脂のカラムを用いて、反応混合物を精製した。

40

## 【0154】

複合反応において外因性NH Sの存在下または非存在下におけるプロセスにより調製した複合体を、実施例4に記載のH P L Cを用いて複合単量体および遊離メイタンシノイドについて分析した。遊離メイタンシノイドの放出に関する複合体安定性を、4の貯蔵を

50

通じて安定性試験により評価した。

【 0 1 5 5 】

下記の表 6 に示すように、複合反応に 0 . 3 m M 程度の少量の外因性 N H S を添加して製作した複合体は、外因性 N H S の非存在下において製作した複合体よりも、遊離メイタンシノイドに対する安定性に基づいて優れていた。

【 0 1 5 6 】

表 6。複合反応において外因性 N H S の存在下または非存在下におけるプロセスにより製作した、h u D S 6 - S P D B - D M 4 の重要性質の比較

【 0 1 5 7 】

【表 6】

| 添加した外因性NHS                            | 0 m M N<br>H S | 0 . 3 m M N<br>H S |
|---------------------------------------|----------------|--------------------|
| 複合単量体 ( % , 4 ° C で 1 日 )             | 9 5 . 6        | 9 5 . 3            |
| 遊離メイタンシノイド ( % , 4 ° C で 1 日 )        | 1 . 1          | 0 . 4              |
| 遊離メイタンシノイド ( % , 4 ° C で 2 4 週<br>間 ) | 2 . 8          | 1 . 0              |

【 0 1 5 8 】

本実施例に提示した実験の結果は、複合反応の間の外因性 N H S の添加による、複合体安定性に対する有益な効果を示す。特にこれらの結果は、遊離メイタンシノイドの放出により測定される h u D S 6 - S P D B - D M 4 複合体の安定性が、外因性 N H S を複合反応に添加する場合、有意に増加することを確認する。

【実施例 6】

【 0 1 5 9 】

本実施例は、細胞結合剤 - 細胞傷害剤複合体を調整するプロセスの修飾反応の間に N - ヒドロキシスクシンイミド ( N H S ) の添加による、有益な効果を示す。特に本実施例は、修飾反応への N H S の添加をが、抗体 - メイタンシノイド複合体の安定性に対して有益な効果を有することを示す。

【 0 1 6 0 】

抗体対薬物比としても知られる、抗体比に対するメイタンシノイド ( M A R ) が約 3 . 0 の複合体を作製するために、修飾反応へ外因性 N H S を添加して、または添加せずに、前に記載されているプロセス (例えば、米国特許第 5 , 2 0 8 , 0 2 0 号および米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 1 8 2 7 5 0 号) を用いて、ヒト化 h u D S 6 抗体を、ヘテロ二機能性架橋剤 S P D B およびメイタンシノイド D M 4 と反応させた。

【 0 1 6 1 】

前に記載されているプロセスで、h u D S 6 ( 1 0 m g / m L ) を初めに S P D B ( 抗体の量に対して 4 . 3 倍のモル過剰 ) と反応させて、修飾抗体を形成した。修飾反応を室温で、5 0 m M のリン酸カリウム、1 0 0 m M の塩化ナトリウム、p H 7 . 5、および 5 % の D M A 中において 1 5 分間実施した。総計約 0 . 3 m M の N H S が、抗体へのリンカーの付着を引き起こす S P D B のアミノリシス反応の組み合わせおよび S P D B の加水分解から遊離した。5 0 m M のリン酸カリウム、1 0 0 m M の塩化ナトリウム、p H 7 . 5 中に平衡および溶出させる、セファデックス G 2 5 F 樹脂のカラムを用いて、修飾抗体を精製した。精製の後、修飾抗体 ( 4 m g / m L ) メイタンシノイド D M 4 ( 抗体の量に対して 7 . 1 倍のモル過剰 ; 抗体上のリンカーの測定量に対して 1 . 7 倍の過剰 ) と反応させて、複合抗体を形成した。複合反応を室温で、5 0 m M のリン酸カリウム、1 0 0 m M の塩化ナトリウム、p H 7 . 5、および 5 % の D M A 中において約 2 0 時間実施した。その後、p H 6 . 5 のリン酸緩衝液 ( 緩衝液 B ) 中に平衡および溶出させるセファデックス G 2 5 F 樹脂のカラムを用いて、反応混合物を精製した。

## 【 0 1 6 2 】

外因性 N H S を添加したプロセスで、5 0 m M のリン酸カリウム、1 0 0 m M の塩化ナトリウム、p H 7 . 5、5 % の D M A 中において、さらなる 3 m M の N H S ( 既存の N H S に添加した N H S のモル比は約 1 0 倍である ) で、h u D S 6 ( 1 0 m g / m L ) を S P D B と室温で 1 5 分間反応させた。5 0 m M のリン酸カリウム、1 0 0 m M の塩化ナトリウム、p H 7 . 5 中に平衡および溶出させるセファデックス G 2 5 F 樹脂のカラムを用いて、修飾抗体を精製した。精製の後、修飾抗体 ( 4 m g / m L ) をメイタンシノイド D M 4 ( 抗体の量に対して 6 . 6 倍のモル過剰 ; 抗体上のリンカーの測定量に対して 1 . 7 倍の過剰 ) と反応させて、複合抗体を形成した。複合反応を室温で、5 0 m M のリン酸カリウム、1 0 0 m M の塩化ナトリウム、p H 7 . 5、および 5 % の D M A 中において約 2 0 時間実施した。その後、p H 6 . 5 のリン酸緩衝液 ( 緩衝液 B ) 中に平衡および溶出させる、セファデックス G 2 5 F 樹脂のカラムを用いて、反応混合物を精製した。

10

## 【 0 1 6 3 】

修飾反応において外因性 N H S の存在下または非存在下におけるプロセスにより調製した複合体を、実施例 4 に記載の H P L C を用いて、複合単量体および遊離メイタンシノイドについて分析した。遊離メイタンシノイドの放出に関する複合体安定性を、4 の貯蔵を通じて安定性試験により評価した。

## 【 0 1 6 4 】

下記の表 7 に示すように、修飾反応に添加した外因性 N H S を用いて作製した複合体は、外因性 N H S を用いずに作製した複合体よりも、遊離メイタンシノイドに対する安定性に基いて優れていた。

20

## 【 0 1 6 5 】

表 7。修飾反応において外因性 N H S の存在下または非存在下におけるプロセスにより作製した、h u D S 6 - S P D B - D M 4 の重要性質の比較

## 【 0 1 6 6 】

## 【表 7】

| 添加した外因性 N H S                     | 0 m M N<br>H S | 3 m M N<br>H S |
|-----------------------------------|----------------|----------------|
| 複合単量体 ( t = 0 の際の % )             | 9 5 . 7        | 9 5 . 4        |
| 遊離メイタンシノイド ( t = 0 の際の % )        | 0 . 8          | 0 . 2          |
| 遊離メイタンシノイド ( 4 ° C で 6 2 週間後の % ) | 5 . 6          | 1 . 9          |

30

## 【 0 1 6 7 】

本実施例に提示した実験の結果は、修飾反応の間の外因性 N H S の添加による、複合体安定性に対する有益な効果を示す。特にこれらの結果は、遊離メイタンシノイドの放出により測定される h u D S 6 - S P D B - D M 4 複合体の安定性が、修飾反応に外因性 N H S を添加する場合、有意に増加することを確認する。

40

## 【 0 1 6 8 】

本明細書に引用する、刊行物、特許出願、および特許を含む全ての参照は、各参照が、参照により組み込まれることが個々におよび具体的に示され、本明細書にその全体が明記されたかの様に、同様に参照により組み込まれる。

## 【 0 1 6 9 】

本発明を説明する文脈における ( 特に、下記の特許請求の範囲の文脈における ) 「 1 つの ( a ) 」 および 「 1 つの ( a n ) 」 ならびに 「 その ( t h e ) 」 という用語、ならびに同様の指示対象の使用は、本明細書に別に示されない限り、または明白に文脈と矛盾しない限り、単数および複数の両方を包含するとして解釈されたい。「 備える » ( c o m p r i s i n g ) 、 「 有する » ( h a v i n g ) 、 「 含む » ( i n c l u d i n g ) 、 および

50

「含有する」( c o n t a i n i n g )という用語は、別に指示されない限り、制限のない用語(すなわち、「含むが、限定されない」という意味)として解釈されたい。本明細書の値の範囲の記述は、本明細書で他に示されない限り、範囲内のそれぞれ別の値に対する個々の言及する簡略な方法として使用することが単に意図されるものであり、それぞれの別個の値が本明細書に個々に引用されたかの様に明細書に組み込まれる。本明細書に記載の全ての方法は、本明細書に他に示されない限り、または文脈と明白に矛盾しない限り、任意の好適な順序で実施され得る。本明細書に挙げられる、任意のおよび全ての例、または例示的な用語(例えば、「など」)の用途は、単に本発明をより明らかにすることを意図するものであって、別に主張されない限り、本発明の範囲の限定を主張するものではない。明細書におけるいかなる用語も、本発明の実施に不可欠な、あらゆるクレームされていない要素が必須的であることを示すと解釈されるべきではない。

10

【 0 1 7 0 】

本発明の好ましい実施形態が本明細書に記載されており、それらは本願発明者に公知である、本発明を実行するために最良な様式を含む。これらの好ましい実施形態の変形は、上に記載した記述を読むと、当業者にとって明らかとなり得る。本願の発明者は熟練した技術者が適切にその様な変形を使用することを予期し、そして本願発明者は本発明が、本明細書に具体的に記載される様式とは別様に実行されることを意図する。従って、本発明は準拠法により許容される、本明細書に添付の特許請求の範囲において引用される本発明の対象の全ての変形および同等物を含む。さらに、その全ての可能な変形における上に記載した要素のあらゆる組み合わせが、本明細書に別に示されない限り、または文脈と明白に矛盾しない限り、本発明によって包含される。

20

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2012/069527

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - A61K 39/395 (2013.01)<br>USPC - 530/391.9<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |  |   |
|--|--|---|
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC(8) - A61K 39/395, 47/48; C07D 487/04, 519/00; G01N 33/53 (2013.01)<br>USPC - 530/387.1, 388.2, 388.8, 391.1, 391.9<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>CPC- A61K 38/00, 47/48715, 2039/505; G01N 33/54353 (2013.01)<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>Orbit.com, Google Patents, Google Scholar, Google   |  |   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |  |   |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No.   |
| Y  | US 2007/0048314 A1 (DAI et al) 01 March 2007 (01.03.2007) entire document          | 1-15, 22-29, 36-41, 47-55, 59-65, 69-75, 88-94, 104-108, 117-120, 124-127                           |
| Y  | US 2010/0316656 A1 (BOUCHARD et al) 16 December 2010 (16.12.2010) entire document  | 1-15, 22-29, 36-41, 47-55, 59-65, 69-75, 88-94, 104-108, 117-120, 124-127                           |
| A  | US 2010/0203007 A1 (LI et al) 12 August 2010 (12.08.2010) entire document          | 1-15, 22-29, 36-41, 47-55, 59-65, 69-75, 88-94, 104-108, 117-120, 124-127                           |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>   |  |   |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |  |   |
| Date of the actual completion of the international search<br>08 February 2013  |  | Date of mailing of the international search report<br>20 FEB 2013                                   |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-3201  |  | Authorized officer:<br>Blaine R. Copenheaver<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/069527

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☒ Claims Nos.: 16-21, 30-35, 42-46, 56-58, 66-68, 76-87, 95-103, 109-116, 121-123, 128-159  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.                    | F I            | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|----------------|-------------|
| <b>A 6 1 K 31/337 (2006.01)</b> | A 6 1 K 31/337 |             |
| <b>A 6 1 K 31/404 (2006.01)</b> | A 6 1 K 31/404 |             |

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 リウ, ファング

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 4 2 1, レキシントン, エリソン・ロード 9

(72) 発明者 アンフレット, ゴッドフレー・ダブリュー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, アッシュ・ストリート・プレイス 8 1 / 2

(72) 発明者 メシュラム, デボラ・エイチ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 4 4 6, ブルックライン, ジェームズ・ストリート 3 2, ナンバー 6

F ターム(参考) 4C076 AA95 CC27 CC41 DD57 EE23 EE41 EE59 FF32 FF34

4C085 AA14 AA24 AA26 EE01

4C086 AA01 AA02 BA02 CB22 MA02 MA05 NA03 NA06 NA13 ZB26