

(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2018-505128

(P2018-505128A)

(43) 公表日 平成30年2月22日(2018.2.22)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)	
A61K 47/68 (2017.01)	A 61 K 47/68	Z N A	4 B 0 6 4
C07K 16/00 (2006.01)	C 07 K 16/00		4 C 0 7 6
C07K 16/46 (2006.01)	C 07 K 16/46		4 C 0 8 4
C12P 21/08 (2006.01)	C 12 P 21/08		4 C 0 8 5
A61K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00		4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 34 頁)	最終頁に続く

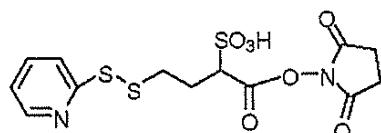
(21) 出願番号	特願2017-525940 (P2017-525940)	(71) 出願人	504039155
(86) (22) 出願日	平成27年11月18日 (2015.11.18)		イミュノジエン・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成29年5月12日 (2017.5.12)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州024
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/061310		51, ウォルサム, ウィンター・ストリー
(87) 國際公開番号	W02016/081584		ト 830
(87) 國際公開日	平成28年5月26日 (2016.5.26)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	62/081, 914		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成26年11月19日 (2014.11.19)	(74) 代理人	100118902
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100106208
			弁理士 宮前 勲
		(74) 代理人	100120112
			弁理士 中西 基晴
		(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】細胞結合剤-細胞毒性剤コンジュゲートを調製するためのプロセス

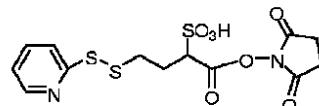
(57) 【要約】

本発明は、細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートを調製するための新規プロセスを提供する。プロセスは、(a) 緩衝剤を含む緩衝溶液中で細胞毒性剤を以下の構造式(I)によって表される二官能性架橋試薬：

【化1】



(I)



(II)

またはその塩と反応させて、細胞毒性剤-リンカー化合物を含む第1の混合物を得るステップと、緩衝溶液は、高緩衝能を有し；(b)ステップ(a)からの細胞毒性剤-リンカー化合物を含む第1の混合物を、4~9のpHを有する溶液中の細胞結合剤と反応させて、細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートを含む第2の混合物を得るステップとを含む。本明細書に記載のプロセスに従って

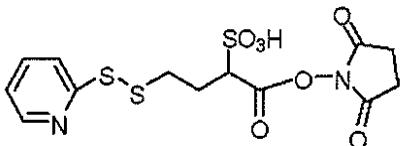
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のステップ：

(a) 緩衝剤を含む緩衝溶液中で細胞毒性剤を以下の構造式によって表される二官能性架橋試薬：

【化 1】



10

またはその塩と反応させて、細胞毒性剤・リンカー化合物を含む第1の混合物を得ること、前記緩衝溶液は、高緩衝能を有し；

(b) ステップ(a)から得られた前記第1の混合物中の前記細胞毒性剤・リンカー化合物を、4～9のpHを有する溶液中の細胞結合剤と反応させて、前記細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートを含む第2の混合物を得ること

を含む、細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートを調製するためのプロセス。

【請求項 2】

前記細胞結合剤が、断片化される傾向がある、請求項1に記載のプロセス。

20

【請求項 3】

前記細胞毒性剤が、マイタンシノイドである、請求項1または2に記載のプロセス。

【請求項 4】

前記細胞毒性剤が、DM4である、請求項3に記載のプロセス。

【請求項 5】

前記緩衝剤対前記二官能性架橋試薬のモル比が、1.5：1～12.5：1である、請求項1～4のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項 6】

前記緩衝剤対前記二官能性架橋試薬のモル比が、2：1～8：1である、請求項5に記載のプロセス。

【請求項 7】

前記緩衝剤対前記二官能性架橋試薬のモル比が、4：1～6：1である、請求項5に記載のプロセス。

30

【請求項 8】

前記緩衝剤対前記二官能性架橋試薬のモル比が、5：1である、請求項5に記載のプロセス。

【請求項 9】

前記緩衝溶液が、4～9のpHを有する、請求項1～8のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項 10】

前記緩衝溶液が、7.5～8.5のpHを有する、請求項9に記載のプロセス。

40

【請求項 11】

前記緩衝溶液が、7.9～8.5、8.0～8.4、または8.1～8.3のpHを有する、請求項10に記載のプロセス。

【請求項 12】

前記緩衝溶液が、8.2のpHを有する、請求項9に記載のプロセス。

【請求項 13】

前記緩衝剤が、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、コハク酸緩衝液、及びリン酸緩衝液からなる群から選択される、請求項1～12のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項 14】

前記緩衝剤が、HEPPSO(N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'--(2-

50

- ヒドロキシプロパンスルホン酸)) 、 P O P S O (ピペラジン - 1 , 4 - ビス - (2 - ヒドロキシ - プロパン - スルホン酸) 無水物) 、 H E P E S (4 - (2 - ヒドロキシエチル) ピペラジン - 1 - エタンスルホン酸) 、 E P P S (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) 、 T E S (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) 、 M E S (2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸) 、 及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 2 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 15】

前記緩衝剤が、 E P P S である、請求項 1 4 に記載のプロセス。

【請求項 16】

前記緩衝溶液が、塩化ナトリウムをさらに含む、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 17】

前記緩衝溶液が、有機溶媒をさらに含む、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 18】

前記有機溶媒が、 D M A である、請求項 1 7 に記載のプロセス。

【請求項 19】

前記有機溶媒が、前記緩衝溶液の容量で、 1 ~ 9 9 % 、 5 0 % ~ 9 9 % 、 6 0 % ~ 9 9 % 、または 7 0 % ~ 9 9 % の量で存在する、請求項 1 7 または 1 8 に記載のプロセス。

【請求項 20】

前記有機溶媒が、前記緩衝溶液の容量で、 5 0 % ~ 9 0 % 、 5 5 % ~ 8 5 % 、 6 0 % ~ 8 0 % 、または 6 5 % ~ 7 5 % の量で存在する、請求項 1 9 に記載のプロセス。

【請求項 21】

前記有機溶媒が、前記緩衝溶液の容量で、 7 0 % の量で存在する、請求項 1 9 に記載のプロセス。

【請求項 22】

前記二官能性架橋試薬に対してモル過剰量の前記細胞毒性剤をステップ (a) の前記反応で使用する、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 23】

前記細胞毒性剤対前記二官能性架橋試薬のモル比が、 1 . 1 : 1 ~ 2 0 : 1 、 1 . 1 : 1 ~ 1 0 : 1 、 1 . 1 : 1 ~ 5 : 1 、または 1 . 1 : 1 ~ 2 : 1 である、請求項 2 2 に記載のプロセス。

【請求項 24】

前記細胞毒性剤対前記二官能性架橋試薬のモル比が、 1 : 1 : 1 ~ 1 . 3 : 1 である、請求項 2 3 に記載のプロセス。

【請求項 25】

前記細胞毒性剤対前記二官能性架橋試薬のモル比が、 1 . 2 : 1 である、請求項 2 3 に記載のプロセス。

【請求項 26】

ステップ (a) の前記反応を 1 時間 ~ 2 時間実施する、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 27】

ステップ (a) の前記反応を 2 時間 ~ 5 時間実施する、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 28】

ステップ (a) の前記反応を 5 時間 ~ 2 0 時間実施する、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 29】

ステップ (a) の前記反応を 5 時間 ~ 1 5 時間実施する、請求項 2 8 に記載のプロセス

10

20

30

40

50

。

【請求項 3 0】

ステップ(a)の前記反応を 4 時間～8 時間、または 5 時間～7 時間実施する、請求項 2 8 に記載のプロセス。

【請求項 3 1】

ステップ(a)の前記反応を 6 時間実施する、請求項 2 8 に記載のプロセス。

【請求項 3 2】

ステップ(a)の前記反応を 15 ～ 25 の温度で実施する、請求項 1 ～ 3 1 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 3 3】

ステップ(a)の前記反応を 17 ～ 23 、 18 ～ 22 、または 19 ～ 21 の温度で実施する、請求項 3 2 に記載のプロセス。

【請求項 3 4】

ステップ(a)の前記反応を 20 の温度で実施する、請求項 3 2 に記載のプロセス。

【請求項 3 5】

ステップ(b)の前記溶液が、 5.0 ～ 9.0 、 5.5 ～ 9.0 、 6.0 ～ 9.0 、または 6.5 ～ 9.0 の pH を有する、請求項 1 ～ 3 2 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 3 6】

ステップ(b)の前記溶液が、 7.5 ～ 8.5 の pH を有する、請求項 3 5 に記載のプロセス。

【請求項 3 7】

ステップ(b)の前記溶液が、 8.0 ～ 8.4 、または 8.1 ～ 8.3 の pH を有する、請求項 3 5 に記載のプロセス。

【請求項 3 8】

ステップ(b)の前記溶液が、 8.2 の pH を有する、請求項 3 5 に記載のプロセス。

【請求項 3 9】

ステップ(b)の前記溶液が、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、コハク酸緩衝液、及びリン酸緩衝液からなる群から選択される緩衝剤を含む、請求項 1 ～ 3 8 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 4 0】

ステップ(b)の前記溶液が、 H E P P S O (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)) 、 P O P S O (ピペラジン - 1,4 - ビス - (2 - ヒドロキシ - プロパン - スルホン酸) 無水物) 、 H E P E S (4 - (2 - ヒドロキシエチル) ピペラジン - 1 - エタンスルホン酸) 、 E P P S (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) 、 T E S (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) 、 M E S (2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸) 、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される緩衝剤を含む、請求項 1 ～ 3 8 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 4 1】

前記緩衝剤が、 E P P S である、請求項 4 0 に記載のプロセス。

【請求項 4 2】

ステップ(b)の前記溶液が、有機溶媒をさらに含む、請求項 1 ～ 4 1 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 4 3】

前記有機溶媒が、 D M A である、請求項 4 2 に記載のプロセス。

【請求項 4 4】

前記有機溶媒が、前記溶液の容量で、 1 ～ 25 % 、 2 ～ 20 % 、 2 ～ 15 % 、または 2 ～ 10 % の量で存在する、請求項 4 2 または 4 3 に記載のプロセス。

【請求項 4 5】

前記有機溶媒が、前記溶液の容量で、 2.5 ～ 7.5 % 、 3 ～ 7 % 、 4 ～ 6 % 、または

10

20

30

40

50

4 . 5 ~ 5 . 5 % の量で存在する、請求項 4 4 に記載のプロセス。

【請求項 4 6】

前記有機溶媒が、前記溶液の容量で、5 % の量で存在する、請求項 4 5 に記載のプロセス。

【請求項 4 7】

ステップ (b) の前記溶液中の前記細胞結合剤の濃度が、5 g / L ~ 100 g / L である、請求項 1 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 4 8】

前記細胞結合剤の濃度が、5 g / L ~ 50 g / L である、請求項 4 7 に記載のプロセス。

10

【請求項 4 9】

前記細胞結合剤の濃度が、10 g / L ~ 40 g / L である、請求項 4 7 に記載のプロセス。

【請求項 5 0】

前記細胞結合剤の濃度が、15 g / L ~ 25 g / L、18 g / L ~ 22 g / L、または 19 g / L ~ 21 g / L である、請求項 4 7 に記載のプロセス。

【請求項 5 1】

前記細胞結合剤の濃度が、20 g / L である、請求項 5 0 に記載のプロセス。

【請求項 5 2】

ステップ (b) の前記反応を 10 時間 ~ 30 時間実施する、請求項 1 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

20

【請求項 5 3】

ステップ (b) の前記反応を 15 時間 ~ 25 時間実施する、請求項 5 2 に記載のプロセス。

【請求項 5 4】

ステップ (b) の前記反応を 8 時間 ~ 24 時間、12 時間 ~ 20 時間、14 時間 ~ 18 時間、または 15 時間 ~ 17 時間実施する、請求項 5 2 に記載のプロセス。

【請求項 5 5】

ステップ (b) の前記反応を 16 時間実施する、請求項 5 4 に記載のプロセス。

【請求項 5 6】

ステップ (b) の前記反応を 18 時間 ~ 26 時間、20 時間 ~ 24 時間、または 19 時間 ~ 23 時間実施する、請求項 5 2 に記載のプロセス。

30

【請求項 5 7】

ステップ (b) の前記反応を 22 時間実施する、請求項 5 2 に記載のプロセス。

【請求項 5 8】

ステップ (b) の前記反応を 15 ~ 25 の温度で実施する、請求項 1 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 5 9】

ステップ (b) の前記反応を 20 の温度で実施する、請求項 5 8 に記載のプロセス。

【請求項 6 0】

前記二官能性架橋試薬対前記細胞結合剤のモル比が、2 ~ 10 である、請求項 1 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

40

【請求項 6 1】

前記二官能性架橋試薬対前記細胞結合剤のモル比が、3 ~ 6 である、請求項 6 0 に記載のプロセス。

【請求項 6 2】

前記二官能性架橋試薬対前記細胞結合剤のモル比が、3 . 5 ~ 5 である、請求項 6 1 に記載のプロセス。

【請求項 6 3】

前記二官能性架橋試薬対前記細胞結合剤のモル比が、4 . 0 である、請求項 6 2 に記載

50

のプロセス。

【請求項 6 4】

前記プロセスが、前記溶液の pH を 5 以下に調整することによって、ステップ (b) の前記反応を反応停止するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 6 5】

前記プロセスが、前記第 2 の混合物を精製して、精製された細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートを得ることをさらに含む、請求項 1 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 6 6】

前記第 2 の混合物にタンジェント流濾過、選択的析出、吸着濾過、吸着クロマトグラフイー、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施すことによって、前記混合物を精製する、請求項 6 5 に記載のプロセス。

【請求項 6 7】

前記第 2 の混合物にタンジェント流濾過を施すことによって、前記混合物を精製する、請求項 6 6 に記載のプロセス。

【請求項 6 8】

前記細胞結合剤が、抗体である、請求項 1 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 6 9】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 6 7 に記載のプロセス。

【請求項 7 0】

前記抗体が、ヒト化モノクローナル抗体である、請求項 6 9 に記載のプロセス。

【請求項 7 1】

前記抗体が、huN901、huMy9-6、huB4、huC242、トラスツズマブ、ビバツズマブ、シブロツズマブ、CNT095、huDS6、リツキシマブ、抗Her2抗体、抗EGFR抗体、抗CD27L抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Crip1o抗体、抗CD138抗体、抗CD38抗体、抗EpHA2抗体、インテグリン標的化抗体、抗CD37抗体、抗葉酸受容体抗体、抗Her3抗体、及び抗IGFIR抗体から選択される、請求項 7 0 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

本出願は、35U.S.C. § 119 (e) に基づき、2014年11月19日に出願された米国仮特許出願第 62/081,914 号の出願日の利益を主張し、全ての図面、式、明細書、特許請求の範囲、及び配列表を含むその内容全体を参照によって本願明細書に引用したものとする。

【背景技術】

【0002】

癌及び他の疾患の治療に有用である抗体 - 薬物コンジュゲート (ADC) は、一般的に 3 つの別個の要素 : 細胞結合剤、リンカー、及び細胞毒性剤からなる。抗体などの細胞結合剤を細胞毒性剤にコンジュゲートする従来の方法は、2 つの別個の反応ステップを採用する。第 1 の反応ステップでは、抗体を二官能性架橋試薬と反応させて、リンカー修飾抗体を生成する。次いで、過剰リンカーまたは加水分解リンカー試薬から修飾抗体生成物を必要に応じて精製する。第 2 の反応ステップでは、リンカー修飾抗体を、チオールなどの反応性基を含有する細胞毒性剤と反応させて、抗体 - 細胞毒性剤コンジュゲートを生成し、これをさらなる精製ステップにおいて再精製する。この従来の方法は、2 つの精製ステップが必要な場合があり、これは、全体の収率を低下させ、プロセスを煩雑にし、ADC の大規模製造では非経済的である。

【0003】

あるいは、細胞毒性剤を二官能性架橋試薬と最初に反応させて、細胞毒性剤 - リンカー

10

20

30

40

50

化合物を形成することができ、次いで、細胞結合剤と反応させて、細胞結合剤・細胞毒性剤コンジュゲートを形成する（コンジュゲーション反応）。細胞毒性剤、二官能性架橋試薬、及び得られた細胞毒性剤・リンカー化合物は一般的に、疎水性化合物であり、水中の溶解度が低い。したがって、細胞毒性剤・リンカー化合物を可溶化するために、ある一定量の有機溶媒がコンジュゲーション反応中に存在する必要がある。一方、多量の有機溶媒の存在は、抗体安定性に悪影響を及ぼし得る。したがって、当該技術のプロセスは、低濃度の細胞結合剤、細胞毒性剤、及び／または二官能性架橋試薬を使用する場合、細胞結合剤・細胞毒性剤コンジュゲートの小規模調製に限定され得る。

〔 0 0 0 4 〕

前述に鑑みて、高い抗体安定性を有する細胞結合剤・細胞毒性剤コンジュゲートを調製し、大規模生産に適している改善されたプロセスを開発する必要が存在する。

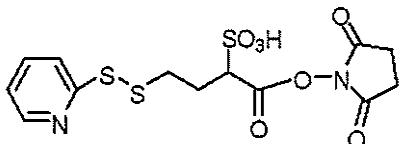
【発明の概要】

〔 0 0 0 5 〕

本発明は、抗体 - 薬物 - コンジュゲート (ADC) の大規模生産に適している新規プロセスを提供する。プロセスは、

(a) 緩衝剤を含む緩衝溶液中で細胞毒性剤を以下の構造式によって表される二官能性架橋試薬：

【化 1】



またはその塩と反応させて、細胞毒性剤 - リンカー化合物を含む第1の混合物を得るステップと、緩衝溶液は、高緩衝能を有し；

(b) ステップ(a)からの第1の混合物中の細胞毒性剤-リンカー化合物を、4~9のpHを有する溶液中の細胞結合剤と反応させて、細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートを含む第2の混合物を得るステップとを含む。

〔 0 0 0 6 〕

驚くべきことに、高緩衝能の緩衝溶液をステップ(a)の反応で使用する場合、得られた細胞結合剤コンジュゲートは、ステップ(a)の反応において低緩衝能の緩衝溶液を用いて調製したコンジュゲートと比較して、抗体断片化が著しく低いことが分かった。それに加えて、高濃度の細胞結合剤(例えば、抗体)をコンジュゲーション反応(すなわち、本プロセスのステップ(b))で使用することができ、プロセスを大規模生産において経済的にさせる。さらに、当該技術のプロセスと比較して、少量の有機溶媒(例えば、ジメチルアセトアミド(DMA))がコンジュゲーション溶液中に必要であり、抗体及び得られたコンジュゲートの安定性を増加させ得る。

【 0 0 0 7 】

本発明のプロセスは、高純度及び／または安定性を有する細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートを提供する。具体的には、本発明のプロセスは、従来技術で説明されているプロセスと比較して抗体断片化を減少させる。

〔 0 0 0 8 〕

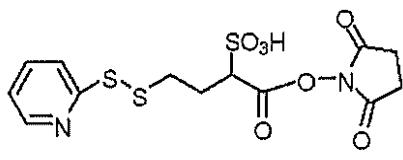
本発明は、本明細書に記載のプロセスを用いて調製された細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートにも関する。

【発明を実施するための形態】

[0 0 0 9]

本発明は、細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートを調製するための新規プロセスを提供する。プロセスは、(a)緩衝剤を含む緩衝溶液中で細胞毒性剤を以下の構造式によって表される二官能性架橋試薬：

【化 2】



(S S P D B)

またはその塩と反応させて、細胞毒性剤 - リンカー化合物を含む第1の混合物を得るステップと、緩衝溶液は、高緩衝能を有し；

(b) ステップ (a) からの細胞毒性剤 - リンカー化合物を含む第 1 の混合物を、 4 ~ 9 の pH を有する溶液中の細胞結合剤と反応させて、細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートを含む第 2 の混合物を得るステップとを含む。

[0 0 1 0]

本明細書で使用する場合、「塩」は、本明細書に記載の化合物の誘導体を指し、親化合物は、それを酸または塩基塩にすることによって修飾される。より具体的には、塩は、誘導体を指し、親化合物は、親化合物をアルカリ性水酸化物またはアルキルアミンなどの無機または有機塩基と反応させることによって修飾される。一実施形態では、塩は、ナトリウム塩である。あるいは、塩は、トリアルキルアンモニウム塩、例えば、N,N-ジイソプロピルエチルアンモニウム塩である。

【 0 0 1 1 】

一実施形態では、細胞結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合断片）は、断片化される傾向がある。本明細書で使用する場合、「断片化」は、タンパク質（例えば、抗体）における共有結合の破壊を指す。一実施形態では、断片化は、遊離チオールの存在下における鎖間ジスルフィド結合の減少を指す。断片化はまた、タンパク質主鎖の開裂、及び側鎖の断片化または修飾を含み得る（例えば、Vlasak, J. and Ionescu, R. Fragmentation of monoclonal antibody disulfonated mAbs 3:3, 253-263, May / June 2011を参照されたい）。断片化される傾向がある抗体または抗原結合断片の例としては、IgG4、軽鎖を含む抗体、FabまたはF(ab')₂が挙げられるが、これらに限定されない。断片化は、分子のサイズに基づいた分離技術、またはアミノ酸側鎖の化学に関連する分離技術を用いて同定することができる。分子のサイズに基づいた分離技術としては、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）、及びキャピラリーSDS電気泳動（CE-SDS）が挙げられるが、これらに限定されない。アミノ酸側鎖の化学に関連する分離技術としては、逆相HPLC、疎水性相互作用HPLC、陽イオン交換HPLC、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（FPLC）、超高速液体クロマトグラフィー（UPLC）などの液体クロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 1 2 】

ある実施形態では、本プロセスのステップ(a)で使用した緩衝溶液は、高緩衝能を有する。本明細書で使用する場合、「緩衝能」は、緩衝溶液が、付加酸または塩基の存在下における反応混合物の pH の著しい変化を防ぐ能力を指す。

【 0 0 1 3 】

一実施形態では、緩衝溶液が、二官能性架橋試薬に対してモル過剰の緩衝剤を含む。別の実施形態では、緩衝溶液中の緩衝剤対二官能性架橋試薬のモル比は、1.1:1~5.0:1; 1.2:1~3.0:1; 1.3:1~2.5:1; または1.5:1~1.2.5:1である。より具体的には、緩衝剤対二官能性架橋試薬のモル比は、2:1~8:1である。さらにより具体的には、緩衝剤対二官能性架橋試薬のモル比は、4:1~6:1である。別のさらに具体的な実施形態では、緩衝剤対二官能性架橋試薬のモル比は、5:1である。

[0 0 1 4]

ある実施形態では、本プロセスのステップ(a)における緩衝溶液は、4~9のpHを有する。より具体的には、pHは、4.5~8.5、5.0~8.5、5.5~8.5、6.0~8.5、6.5~8.5、7.0~8.5、7.1~8.5、7.2~8.5、7.3~8.5、7.4~8.5、7.5~8.5、7.5~8.4、7.5~8.3、5.0~6.5、5.0~6.0、または5.5~6.5である。具体的な一実施形態では、pHは、7.5~8.5(例えば、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、または8.5)である。具体的な別の実施形態では、pHは、7.9~8.5、8.0~8.4、または8.1~8.3である。さらにより具体的には、pHは、8.2である。あるいは、pHは、4.5~5.5(例えば、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、または5.5)である。さらに別の実施形態では、pHは、4.7~5.3、4.8~5.2、または4.9~5.1である。さらにより具体的には、pHは、5.0である。

10

【0015】

当該技術分野において既知である任意の適当な緩衝剤を使用することができる。適当な緩衝剤としては、例えば、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、コハク酸緩衝液、及びリン酸緩衝液が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、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)無水物)、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)、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)、MES(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。より具体的には、緩衝剤は、EPPSである。

20

【0016】

ある実施形態では、緩衝溶液は、緩衝液のイオン強度を維持するために不活性塩をさらに含んでもよい。一実施形態では、緩衝溶液は、塩化ナトリウムをさらに含む。

【0017】

ある実施形態では、ステップ(a)の緩衝溶液は、有機溶媒を含む。より具体的には、有機溶媒は、ジメチルアセトアミド(DMA)である。一実施形態では、ステップ(a)の緩衝溶液は、水と有機溶媒の混合物を含む。より具体的には、ステップ(a)の緩衝溶液は、水とDMAの混合物を含む。有機溶媒(例えば、DMA)は、緩衝溶液の容量で、1%~99%、5%~99%、10%~99%、20%~99%、30%~99%、40%~99%、50%~99%、60%~99%、70%~99%、80%~99%、90%~99%の量で存在することができる。一実施形態では、有機溶媒(例えば、DMA)は、緩衝溶液の容量で、50%~90%、55%~85%、60%~80%、または65%~75%の量で存在する。より具体的な実施形態では、有機溶媒(例えば、DMA)は、緩衝溶液の容量で、70%の量で存在する。

30

【0018】

ある実施形態では、モル等量の細胞毒性剤と二官能性架橋試薬をステップ(a)の反応で使用する。ある実施形態では、二官能性架橋試薬に対してモル過剰の細胞毒性剤をステップ(a)の反応で使用する。一実施形態では、細胞毒性剤対二官能性架橋試薬のモル比は、1.01:1~20:1、1.1:1~20:1、1.1:1~10:1、1.1:1~5:1、1.1:1~4:1、1.1:1~3:1、1.1:1~2:1、1.1:1~1.5:1、1.1:1~1.4:1、または1.1:1~1.3:1である。より具体的には、細胞毒性剤対二官能性架橋試薬のモル比は、1.2:1である。

40

【0019】

ある実施形態では、細胞毒性剤に対してモル過剰の二官能性架橋試薬をステップ(a)の反応で使用する。一実施形態では、二官能性架橋試薬対細胞毒性剤のモル比は、1.01:1、1.1:1~20:1、1.1:1~10:1、1.1:1~5:1、1.1:1~4:1、1.1:1~3:1、1.1:1~2:1、1.1:1~1.5:1、1.1:1~1.4:1、または1.1:1~1.3:1である。

50

1 : 1 ~ 1 . 4 : 1 、または 1 . 1 : 1 ~ 1 . 3 : 1 である。

【0020】

ある実施形態では、本プロセスのステップ(a)の反応は、上述の緩衝溶液中で細胞毒性剤を二官能性架橋試薬SSPDBと混合することによって実施する。反応を2分~1週、1時間~48時間、1時間~36時間、1時間~24時間、5時間~20時間、5時間~15時間、6時間~14時間、4時間~8時間、5時間~7時間、1時間~5時間、1時間~4時間、1時間~2時間、または2時間~5時間進行させる。一実施形態では、反応を1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間など進行させる。

【0021】

ステップ(a)の反応は、任意の適当な温度で実施することができる。一実施形態では、反応は、10~50、10~40、または10~30の温度で実施することができる。別の実施形態では、反応は、15~25、16~24、17~23、18~22、または19~21の温度で実施することができる。さらに別の実施形態では、反応は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25で実施することができる。あるいは、反応は、10未満または0未満などの低温で実施することができる(但し、溶液は、例えば、細胞毒性剤及び/または二官能性架橋試薬を溶解するのに使用した有機溶媒の存在によって凍結するのを防止する)。一実施形態では、反応は、-10~0、0~10、または0~5の温度で実施することができる。

【0022】

ある実施形態では、本プロセスのステップ(a)において細胞毒性剤と二官能性架橋試薬を反応させることから得られた第1の混合物は、細胞結合剤と反応させる前に、長期間(例えば、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、1週、2週、3週、1カ月間、2カ月間、3カ月間、4カ月間、5カ月間、6カ月間、1年間、2年間、または5年間)保存することができる。第1の混合物は、低温(例えば、10以下、5以下または0以下、または-10~0、0~10、または0~5の温度で)にて、凍結状態で保存することができる。あるいは、第1の混合物は、ステップ(a)の反応の完了時に、室温または10~25、15~25、または20~25の温度で保存することができる。

【0023】

ある実施形態では、第1の混合物は、細胞毒性剤-リンカー化合物、未反応の細胞毒性剤、未反応の二官能性架橋試薬などの不純物、及び加水分解二官能性架橋試薬及び/または細胞毒性剤の二量体などの反応副生成物を含む。

【0024】

ある実施形態では、第1の反応混合物は、本プロセスのステップ(b)において第1の混合物中の細胞毒性剤-リンカー化合物を細胞結合剤と反応させる前に実質的に精製されない。本明細書で使用する場合、用語「実質的に精製された」は、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、9%未満、8%未満、7%未満、6%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、または1%未満の不純物(例えば、未反応の細胞毒性剤、未反応の二官能性架橋試薬、及び加水分解二官能性架橋試薬及び/または細胞毒性剤の二量体などの反応副生成物)を、本プロセスのステップ(b)において第1の反応混合物中の細胞毒性剤-リンカー化合物を細胞結合剤と反応させる前に除去することを意味する。

【0025】

ある実施形態では、本プロセスのステップ(a)から得られた第1の混合物を、4~9、5~9、5.5~9、6~9、6.3~9、または6.3~8.7、6.4~8.6、6.5~8.5、7.3~8.7、または7.4~8.6のpHを有する溶液(例えば、コンジュゲーション緩衝溶液)中の細胞結合剤と反応させて、細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートを含む第2の混合物を得る。より具体的には、溶液は、7.5~8.5(例え

10

20

30

40

50

ば、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、または8.5)のpHを有する。別のさらに具体的な実施形態では、溶液は、7.9~8.5、8.0~8.4、または8.1~8.3のpHを有する。さらにより具体的な実施形態では、溶液は、8.2のpHを有する。具体的な別の実施形態では、溶液は、6.5~7.5(例えば、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、または7.5)のpHを有する。

【0026】

ある実施形態では、ステップ(b)の溶液は、緩衝剤を含む。当該技術分野において既知である任意の適当な緩衝剤を使用することができる。適当な緩衝剤としては、例えば、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、コハク酸緩衝液、及びリン酸緩衝液が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、緩衝剤が、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)無水物)、HEPE(4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-エタンスルホン酸)、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)、MES(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。より具体的には、緩衝剤は、EPPSである。溶液は、緩衝液のイオン強度を維持するために不活性塩をさらに含んでもよい。一実施形態では、緩衝溶液は、塩化ナトリウムをさらに含む。

10

【0027】

ある実施形態では、本プロセスのステップ(b)の溶液は、有機溶媒をさらに含む。より具体的には、有機溶媒は、ジメチルアセトアミド(DMA)である。一実施形態では、ステップ(b)の溶液は、水と有機溶媒の混合物を含む。より具体的には、ステップ(b)の溶液は、水とDMAの混合物を含む。有機溶媒(例えば、DMA)は、溶液の容量で、1%~99%、1%~90%、1%~80%、1%~70%、1%~60%、1%~50%、1%~40%、1%~30%、1%~25%、2%~20%、2%~15%、2%~10%、2.5%~7.5%、3%~7%、4%~6%、または4.5%~5.5%の量で存在することができる。より具体的には、有機溶媒(例えば、DMA)は、溶液の容量で、5%の量で存在する。

20

【0028】

ある実施形態では、本プロセスのステップ(b)において、細胞結合剤を含む水溶液を本プロセスのステップ(a)から得られた第1の混合物に添加することによって、第1の混合物を細胞結合剤と反応させる。あるいは、ステップ(a)から得られた第1の混合物を、細胞結合剤を含む水溶液に添加する。ある実施形態では、ステップ(a)から得られた第1の混合物は、細胞結合剤と反応させる前にpH調整される。一実施形態では、第1の混合物は、細胞結合剤と反応させる前に細胞結合剤を含む水溶液のpHに等しいpHを有するようにpH調整される。

30

【0029】

ある実施形態では、ステップ(b)の反応を高濃度の細胞結合剤で実施する。一実施形態では、ステップ(b)の溶液中の細胞結合剤の濃度は、5g/L~100g/Lである。より具体的には、濃度は、5g/L~50g/L、5g/L~40g/L、10g/L~40g/L、10g/L~30g/L、または15g/L~25g/Lである。より具体的な実施形態では、濃度は、15g/L~25g/L、18g/L~22g/L、または19g/L~21g/Lである。さらにより具体的な実施形態では、濃度は、20g/Lである。

40

【0030】

ある実施形態では、細胞結合剤に対して過剰量の二官能性架橋試薬を本発明のプロセスで使用する。一実施形態では、二官能性架橋試薬対細胞結合剤のモル比は、1~20、2~10、3~8、または3~6の範囲である。別の実施形態では、二官能性架橋試薬対細

50

胞結合剤のモル比は、3.5～5、例えば、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、または5.0である。

【0031】

ある実施形態では、ステップ(b)の反応を5時間～48時間、10時間～48時間、10時間～30時間、15時間～25時間進行させる。具体的な実施形態では、ステップ(b)の反応を8時間～24時間、12時間～20時間、14時間～18時間、または15時間～17時間進行させる。より具体的な実施形態では、ステップ(b)の反応を16時間進行させる。別の実施形態では、ステップ(b)の反応を14時間～30時間、18時間～26時間、20時間～24時間、または19時間～23時間進行させる。より具体的な実施形態では、ステップ(b)の反応を22時間進行させる。

10

【0032】

ステップ(b)の反応は、任意の適当な温度で実施することができる。一実施形態では、反応は、10～50、10～40、または10～30の温度で実施することができる。別の実施形態では、反応は、15～25、16～24、17～23、18～22、または19～21の温度で実施することができる。さらに別の実施形態では、反応は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25で実施することができる。あるいは、反応は、10未満または0未満などの低温で実施することができる(但し、溶液は、例えば、細胞毒性剤及び/または二官能性架橋試薬を溶解するのに使用した有機溶媒の存在によって凍結するのを防止する)。一実施形態では、反応は、-10～0、0～10、または0～5の温度で実施することができる。

20

【0033】

ある実施形態では、本発明のプロセスは、ステップ(b)後に反応停止ステップをさらに含む。一実施形態では、反応停止ステップは、ステップ(b)から得られた第2の混合物のpHを低pH(例えば、6.5以下、6.0以下、5.5以下、5.4以下、5.3以下、5.2以下、5.1以下、5.0以下のpH)に迅速に調整することによって達成される。一実施形態では、第2の混合物のpHは、4.0～6.5、4.5～6.0、4.5～5.5、4.6～5.4、4.7～5.3、4.8～5.2または4.9～5.1のpHに調整される。より具体的な実施形態では、第2の混合物のpHは、5.0のpHに調整される。第2の混合物のpHは、酸を第2の混合物に添加することによって調整することができる。より具体的には、第2の混合物のpHは、酢酸を第2の混合物に添加することによって調整することができる。

30

【0034】

別の実施形態では、反応停止ステップは、1つ以上の反応停止剤を第2の混合物に添加して、任意の未反応の細胞毒性剤及び/または未反応の二官能性架橋試薬を反応停止することによって達成される。本明細書で使用する場合、用語「反応停止剤」は、遊離細胞毒性剤及び/または二官能性架橋試薬と反応する試薬を指す。

【0035】

一実施形態では、4-マレイミド酪酸、3-マレイミドプロピオン酸、N-エチルマレイミド、ヨードアセトアミド、またはヨードアセトアミドプロピオン酸などのマレイミドまたはハロアセトアミド反応停止試薬は、細胞毒性剤中の任意の未反応の基(チオールなど)が、反応停止されるのを確実にするために使用することができる。反応停止ステップは、細胞毒性剤、特に、未反応のチオール基を有する細胞毒性剤(DM1など)のダイマー化を防止するのに役立つことができる。ダイマー化された細胞毒性剤は、除去することが困難であり得る。反応停止ステップは、天然の抗体ジスルフィド基との任意の不要なチオール-ジスルフィド交換反応を最小化することもできる。極性の荷電チオール-反応停止試薬(4-マレイミド酪酸または3-マレイミドプロピオン酸など)で反応停止すると、過剰の未反応の細胞毒性剤は、精製ステップ中に共有的に連結されたコンジュゲートから容易に分離することができる極性の荷電水溶性付加物へと変換される。非極性の中性チ

40

50

オール - 反応停止試薬を用いた反応停止も使用することができる。

【 0 0 3 6 】

一実施形態では、混合物は、混合物を未反応の二官能性架橋試薬と反応する反応停止試薬と接触させることによって反応停止される。例えば、任意の未反応の二官能性架橋試薬を反応停止するために、求核試薬を混合物に添加することができる。求核試薬は好ましくは、リジン、タウリン、及びヒドロキシルアミンなどの、アミノ基を含有する求核試薬である。

【 0 0 3 7 】

ある実施形態では、ステップ (b) の反応は、反応停止ステップ前に、すなわち、pHを調整する前に、及び / または、第 2 の混合物を上述の反応停止剤と接触させる前に、完了まで進行される。

【 0 0 3 8 】

反応ステップ (b) の後、細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートは、精製ステップに供される。この点に関して、細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートは、タンジェントフロー濾過 (T F F) 、例えば、膜ベースタンジェント流濾過プロセス、非吸着クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、吸着濾過、または選択的析出、または任意の他の適当な精製プロセス、及びこれらの組み合わせを使用して、混合物の他の成分 (例えば、遊離二官能性架橋剤、遊離細胞毒性剤、及び反応副生成物) から精製することができる。

【 0 0 3 9 】

本発明の一実施形態では、細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートは、単一精製ステップ (例えば、T F F) を用いて精製される。好ましくは、コンジュゲートは、単一精製ステップ (例えば、T F F) を用いて、精製され、適切な製剤に交換される。本発明の別の実施形態では、細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートは、2 つの連続精製ステップを用いて精製される。例えば、コンジュゲートは、選択的析出、吸着濾過、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で最初に精製された後に、T F F で精製することができる。当業者であれば、細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートの精製により、細胞毒性剤に化学的に連結した細胞結合剤を含む安定的なコンジュゲートを単離することができることが理解されるであろう。

【 0 0 4 0 】

ペリコン (P e l l i c o n) 型システム (M i l l i p o r e , B i l l e r i c a , M a s s .) 、ザルトコンカセット (S a r t o c o n C a s s e t t e) システム (S a r t o r i u s A G , E d g e w o o d , N . Y .) 、及びセントラセット (C e n t r a s e t t e) 型システム (P a l l C o r p . , E a s t H i l l s , N . Y .) を含む任意の適当な T F F システムが、精製のために利用されてもよい。

【 0 0 4 1 】

任意の適当な吸着クロマトグラフィー樹脂が、精製のために利用されてもよい。好ましい吸着クロマトグラフィー樹脂としては、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 (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、アフィニティクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、及びこれらの組み合わせが挙げられる。適当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 (C H T I 型及び I I 型、 B i o - R a d L a b o r a t o r i e s , H e r c u l e s , C . A .) 、 H A U l t r o g e l ヒドロキシアパタイト (P a l l C o r p . , E a s t H i l l s , N . Y .) 、及びセラミックフルオロアパタイト (C F T I 型及び I I 型、 B i o - R a d L a b o r a t o r i e s , H e r c u l e s , C a l i f .) が挙げられる。適当な H C I C 樹脂の例は、 M E P H y p e r c e l 樹脂 (P a l l C o r p . , E a s t H i l l s , N . Y .) である。適当な H I C 樹脂の例としては、ブチル - セファロース、ヘキシル - セファロース、フェニル - セファロース、及びオクチルセファロース樹脂 (全て G E H e a l t h c a r e , P i s 50

10

20

30

40

50

cataway, N. J. より)、並びにMacro-prepメチル及びMacro-Prep t-ブチル樹脂(Biorad Laboratories, Hercules, Calif.)が挙げられる。適当なイオン交換樹脂の例としては、SP-セファロース、CM-セファロース、及びQ-セファロース樹脂(全てGE Healthcare, Piscataway, N. J. より)、及びUnosphere S樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)が挙げられる。適当な混合モードイオン交換器の例としては、Bakerbond ABX樹脂(JT Baker, Phillipsburg N. J.)が挙げられる。適当なIMAC樹脂の例としては、キレート化セファロース樹脂(GE Healthcare, Piscataway, N. J.)及びProfinity IMAC樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)が挙げられる。適当な色素リガンド樹脂の例としては、ブルーセファロース樹脂(GE Healthcare, Piscataway, N. J.)及びAffigel Blue樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)が挙げられる。適当なアフィニティ樹脂の例としては、細胞結合剤が抗体である場合、プロテインAセファロース樹脂(例えば、MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, N. J.)、また細胞結合剤が適切なレクチン結合部位を有する場合、レクチニアフィニティ樹脂、例えば、レンチルレクチンセファロース樹脂(GE Healthcare, Piscataway, N. J.)が挙げられる。あるいは、細胞結合剤に特異的な抗体が、使用されてもよい。かかる抗体は、例えば、セファロース4 Fast Flow樹脂(GE Healthcare, Piscataway, N. J.)に固定化され得る。適当な逆相樹脂の例としては、C4、C8、及びC18樹脂(Grace Vydac, Hesperia, Calif.)が挙げられる。

【0042】

任意の適当な非吸着クロマトグラフィー樹脂が、精製のために利用されてよい。適当な非吸着クロマトグラフィー樹脂の例としては、SEPHADEX(商標)G-25、G-50、G-100、SEPHACRYL(商標)樹脂(例えば、S-200及びS-300)、SUPERDEX(商標)樹脂(例えば、SUPERDEX(商標)75及びSUPERDEX(商標)200)、BIO-GEL(登録商標)樹脂(例えば、P-6、P-10、P-30、P-60、及びP-100)、及び当業者に既知の他のものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0043】

本発明のプロセスによって調製された細胞結合剤-細胞毒性剤コンジュゲートは、実質的に高純度及び安定性を有する。本発明の一態様では、実質的に高純度の細胞結合剤-細胞毒性剤コンジュゲートは、次の特徴のうちの1つ以上を有する:(a)25%未満、20%未満、15%未満(例えば、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%以下)の抗体断片化、(b)コンジュゲート種の約90%超(例えば、約91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%以上)、好ましくは95%超が、モノマーである、(c)コンジュゲート調製物中の非結合リンカーレベルが、(総リンカーレベル)約10%未満(例えば、約9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%以下、または0%)である、(d)コンジュゲート種の10%未満が、架橋されている(例えば、約9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%以下、または0%)、(e)コンジュゲート調製物中の遊離細胞毒性剤レベルが、(総細胞毒性剤に対するmol/mol)約2%未満(例えば、約1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1.0%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%以下、または0%)である、及び/または(f)保管(例えば、約1週、約2週、約3週、約1カ月、約2カ月、約3カ月、約4カ月、約5カ月、約6カ月、約1年、約2年、または約5年後)に際し、遊離細胞毒性剤のレベルにおける実質的な増加が無い。遊離細胞毒性剤のレベルにおける「実質的な増加」は、ある特定

10

20

30

30

40

50

の保管時間（例えば、約1週、約2週、約3週、約1カ月、約2カ月、約3カ月、約4カ月、約5カ月、約6カ月、約1年、約2年、約3年、約4年、または約5年）の後に、遊離細胞毒性剤のレベルにおける増加が、約0.1%、約0.2%、約0.3%、約0.4%、約0.5%、約0.6%、約0.7%、約0.8%、約0.9%、約1.0%、約1.1%、約1.2%、約1.3%、約1.4%、約1.5%、約1.6%、約1.7%、約1.8%、約1.9%、約2.0%、約2.2%、約2.5%、約2.7%、約3.0%、約3.2%、約3.5%、約3.7%、または約4.0%未満であることを意味する。

【0044】

本明細書で使用する場合、用語「非コンジュゲート合リンクー」は、二官能性架橋試薬に共有的に連結された細胞結合剤であって、該細胞結合剤は、二官能性架橋試薬のリンカーを介して細胞毒性剤に共有的に結合されていない、細胞結合剤を指す（すなわち、「非コンジュゲートリンクー」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、二官能性架橋試薬を表す。対照的に、細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートは、CBA-L-Dによって表すことができ、ここで、Dは細胞毒性剤を表す）。

10

【0045】

一実施形態では、細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲート中の細胞毒性剤対細胞結合剤（すなわち、DAR）の平均モル比は、約1～約10、約2～約7、約3～約5、約2.5～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～約4.0、約3.2～約4.2、または約4.5～5.5（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、または約5.5）である。

20

【0046】

細胞結合剤

本発明のプロセスで使用するために、細胞結合剤は、細胞、典型的に及び好ましくは、動物細胞（例えば、ヒト細胞）に結合する、任意の適当な薬剤であり得る。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。適当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及びその断片）、インターフェロン（例えば、）、リソホカイン（例えば、IL-2、IL-3、IL-4、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）、アンドロゲン及びエストロゲンなどのステロイドホルモン）、EGF、TGF-、FGF、VEGF、G-CSF、M-CSF、及びGM-CSF（Burgess, Immunology Today 5:155-158 (1984)）などの増殖因子及びコロニー刺激因子、栄養輸送分子（例えば、トランスフェリン）、ビタミン（例えば、葉酸）、及び細胞の表面で標的分子に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。

30

【0047】

細胞結合剤が抗体である場合、それは、ポリペプチドまたはグリコトープであり、膜貫通分子（例えば、受容体）または増殖因子などのリガンドであってもよい抗原に結合する。例示的な抗原としては、レニンなどの分子；ヒト成長ホルモン及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；-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；v m c因子（factor v m c）、第IX因子、組織因子（TF）、及びフォンヴィルブランド因子などの凝固因子；プロテインCなどの抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿性因子；肺表面活性物質；ウロキナーゼまたはヒト尿もしくは組織型プラスミノーゲン活性化因子（t-PA）などのプラスミノーゲン活性化因子；ボンベシン；トロンビン；造血増殖因子；

40

50

腫瘍壞死因子 - 及び - ; エンケファリナーゼ ; R A N T E S (活性化で調節され、通常はT細胞で発現され、分泌される) ; ヒトマクロファージ炎症性タンパク質 (M I P - 1 -) ; ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン ; ミュラー管阻害物質 ; リラキシンA鎖 ; リラキシンB鎖 ; プロリラキシン ; マウスゴナドトロビン関連ペプチド ; - ラクタマーゼなどの微生物タンパク質 ; D N a s e ; I g E ; C T L A - 4 などの細胞毒性Tリンパ球関連抗原 (C T L A) ; インヒビン ; アクチビン ; 血管内皮増殖因子 (V E G F) ; ホルモンまたは増殖因子のための受容体 ; タンパク質AまたはD ; リウマチ因子 ; 骨由来神経栄養因子 (B D N F) 、ニュートロフィン - 3 、 - 4 、 - 5 、または - 6 (N T - 3 、N T 4 、N T - 5 、またはN T - 6) などの神経栄養因子、またはN G F - などの神経成長因子 ; 血小板由来増殖因子 (P D G F) ; a F G F 及びb F G F などの線維芽細胞増殖因子 ; 表皮増殖因子 (E G F) ; T G F - 、及びT G F - 1 、T G F - 2 、T G F - 3 、T G F - 4 、またはT G F - 5 を含むT G F - などの形質転換増殖因子 (T G F) ; インスリン様増殖因子 - I 及び - I I (I G F - I 及びI G F - I I) ; d e s (1 - 3) - I G F - I (脳I G F - I) ; インスリン様増殖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 ; 葉酸受容体 ; F O L R 1 ; メソテリン ; クリプト ; v 6 ; インテグリン ; V E G F 、V E G F R ; E G F R ; 線維芽細胞増殖因子受容体 (F G F R) (例えば、F G F R 1 、F G F R 2 、F G F R 3 、F G F R 4) ; 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 2 、C D 3 、C D 4 、C D 5 、C D 6 、C D 8 、C D 1 1 、C D 1 4 、C D 1 9 、C D 2 0 、C D 2 1 、C D 2 2 、C D 2 5 、C D 2 6 、C D 2 8 、C D 3 0 、C D 3 3 、C D 3 6 、C D 3 7 、C D 3 8 、C D 4 0 、C D 4 4 、C D 5 2 、C D 5 5 、C D 5 6 、C D 5 9 、C D 7 0 、C D 7 9 、C D 8 0 、C D 8 1 、C D 1 0 3 、C D 1 0 5 、C D 1 3 4 、C D 1 3 7 、C D 1 3 8 、C D 1 5 2 などのC D タンパク質、または米国特許出願公開第2 0 0 8 / 0 1 7 1 0 4 0 号または米国特許出願公開第2 0 0 8 / 0 3 0 5 0 4 4 号に開示され、参照によりその全体が組み込まれる、1つ以上の腫瘍関連抗原または細胞表面受容体に結合する抗体 ; 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 - 、 - 、及び - などのインターフェロン ; コロニー刺激因子 (C S F) 、例えば、M - C S F 、G M - C S F 、及びG - C S F ; インターロイキン (I L) 、例えば、I L - 1 ~ I L - 1 0 ; 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 ; 例えば、H I V エンベロープの一部などのウイルス性抗原 ; 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 ; C D 1 1 a 、C D 1 1 b 、C D 1 1 c 、C D 1 8 、I C A M 、V L A - 4 、及びV C A M などのインテグリン ; H E R 2 、H E R 3 、またはH E R 4 受容体などの腫瘍関連抗原 ; エンドグリン ; c - M e t ; I G F 1 R ; 例えば、P C A 3 、P S A 、P S G R 、N G E P 、P S M A 、P S C A 、T M E F F 2 、及びS T E A P 1 などの前立腺抗原 ; L G R 5 ；B 7 H 4 ；及び上に列挙されるポリペプチドのいずれかの断片が挙げられる。

【0 0 4 8】

それに加えて、骨髄細胞に結合するG M - C S F は、急性骨髄性白血病を罹病した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細胞に結合するI L - 2 は、移植片拒絶の防止のため、移植片対宿主疾患の療法及び防止のため、並びに急性T細胞白血病の治療のために使用することができる。メラニン細胞に結合するM S H は、メラノーマに関する抗体が使用され得るように、メラノーマの治療のために使用することができる。葉酸は、卵巣及び他の腫瘍上に発現される葉酸受容体を標的するため使用することができる。表皮増殖因子は、肺及び頭頸部などの扁平上皮癌を標的するため使用することができる。ソマトスタチンは、神経芽細胞腫及び他の腫瘍型を標的するため使用することができる。

【0 0 4 9】

乳がん及び睪丸の癌は、細胞結合剤として、それぞれ、エストロゲン (またはエストロ

10

20

30

40

50

ゲン類似体)またはアンドロゲン(またはアンドロゲン類似体)を用いて、成功裏に標的されることができる。

【0050】

本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、任意の免疫グロブリン、任意の免疫グロブリン断片、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、dsFv、sFv、ミニボディ、ダイアボディ、トリボディ、テトラボディ(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))、または、細胞の表面上で抗原に結合することができる免疫グロブリンキメラ(例えば、相補性決定領域(CDR)を含有するもの)を指す。任意の適当な抗体が、細胞結合剤として使用することができる。当業者は、適切な抗体の選択は、標的される細胞集団に依存するであろう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(典型的に及び好ましくは、罹病細胞集団)内で選択的に発現される細胞表面分子(すなわち、抗原)の型及び数は、本発明の組成物における使用のための適切な抗体の選択に決定的な影響を及ぼすであろう。細胞表面発現プロファイルは、腫瘍細胞型を含む多様な細胞型に関して既知であり、未知である場合は、通常の分子生物学及び組織化学技術を使用して決定することができる。

【0051】

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。本明細書で使用する場合、「ポリクローナル」抗体は、典型的には免疫動物の血清中に含有される、抗体分子の不均質な集団を指す。「モノクローナル」抗体は、特定の抗原に特異的である抗体分子の均質な集団を指す。モノクローナル抗体は典型的には、Bリンパ球(「B細胞」)の單一クローニングによって生成される。モノクローナル抗体は、標準ハイブリドーマ技術を含む、当業者に既知である種々の技術を使用し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)、及びC. A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, N. Y. (2001)を参照されたい)。手短に述べると、モノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ方法は典型的には、任意の適当な動物、典型的に及び好ましくは、マウスに、抗原(すなわち、「免疫原」)を注射することを含む。その後、動物を屠殺し、その脾臓から単離したB細胞を、ヒト骨髄腫細胞と融合させる。ハイブリッド細胞が生成され(すなわち、「ハイブリドーマ」)、これは、無制限に増殖し、所望のインビトロの特異性を有する高力価の抗体を連続的に分泌する。当該技術分野において既知である任意の適切な方法が、所望の特異性を有する抗体を生成するハイブリドーマ細胞を同定するために使用することができる。かかる方法としては、例えば、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ウエスタンプロット分析、及び放射免疫測定法が挙げられる。ハイブリドーマの集団は、個々のクローニングを単離するためにスクリーニングされ、その各々は、抗原に対する単一の抗体種を分泌する。各ハイブリドーマは、単一のB細胞との融合に由来するクローニングであるため、それが生成する全ての抗体分子は、その抗原結合部位及びアイソタイプを含め、構造が同一である。モノクローナル抗体はまた、EBV-ハイブリドーマ技術(例えば、Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2): 361-67 (1984)、及びRoder et al., Methods Enzymol., 121: 140-67 (1986)を参照されたい)、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)を参照されたい)、またはFab及びscFv(一本鎖可変領域)などの抗体断片を含むファージディスプレイプラ

10

20

30

40

50

リ（例えば、米国特許第5,885,793号及び同第5,969,108号、並びに国際特許出願公開第WO92/01047号及び同第WO99/06587号を参照されたい）を含む、他の適当な技術を使用して生成されてもよい。

【0052】

モノクローナル抗体は、任意の適当な動物から単離するか、または任意の適当な動物内で產生することができるが、好ましくは、哺乳類、より好ましくは、マウスまたはヒト、また最も好ましくは、ヒト内で產生される。マウス内で抗体を產生するための方法は、当業者に周知であり、本明細書に説明される。ヒト抗体に関して、当業者は、ポリクローナル抗体は、適切な抗原を用いてワクチン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理解するであろう。あるいは、ヒト抗体は、マウスなどの非ヒト動物内でヒト抗体を產生するための既知の技術を適合す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、及び同第5,714,352号、並びに米国特許出願公開第2002/0197266A1号を参照されたい）。

10

【0053】

ヒトにおける治療的用途に理想的な選択ではあるが、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することが困難である。マウスモノクローナル抗体は、しかしながら、ヒトに投与される場合、迅速な宿主抗体応答を誘発し、これは、抗体-細胞毒性剤コンジュゲートの治療的または診断的潜在性を低減させる可能性がある。これらの厄介な問題を回避するために、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」であると認識されない。

20

【0054】

この目的を達成するために、ファージディスプレイが、抗体を生成するために使用することができる。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リは、標準的な分子生物学及び組み換えDNA技術を使用して生成することができる（例えば、Sambrook et al. (eds.), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)を参照されたい）。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、所望の抗原への特異的結合に関して選択され、選択される可変ドメインを含む完全ヒト抗体が再構成される。再構成された抗体をコード化する核酸配列は、ハイブリドーマ產生に使用される骨髓腫細胞などの適当な細胞株内に導入され、その結果、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（例えば、Janeway et al., 上記参照、Huse et al., 上記参照、及び米国特許第6,265,150号を参照されたい）。あるいは、モノクローナル抗体は、特定のヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックであるマウスから生成することができる。かかる方法は、当該技術分野において既知であり、また例えば、米国特許第5,545,806号及び同第5,569,825号、並びにJaneway et al., 上記参照に説明される。

30

【0055】

最も好ましくは、抗体は、ヒト化抗体である。本明細書で使用する場合、「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化される抗体である。マウス及びヒト抗体のフレームワークの類似性のため、このアプローチは、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一の抗原に結合するモノクローナル抗体を產生することができる、当該技術分野において一般的に受け入れられている。ヒト化抗体を生成するための方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、Janeway et al., 上記参照、米国特許第5,225,539号、同第5,585,089号、及び同第5,693,761号、欧州特許第0239400B1号、並びに英國特許第2188638号に詳細に説明される。ヒト化抗体はまた、米国特許第5,6

40

50

39, 641号及びPedersen et al., J. Mol. Biol., 235: 959-973 (1994)に説明される抗体再表面化技術を使用して生成することもできる。本発明の組成物のコンジュゲートに採用される抗体は、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及びマウスモノクローナル抗体もまた、上に説明される通り本発明の範囲内である。

【0056】

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及び結合する抗体断片もまた、本発明の範囲内である。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、抗原を認識及び結合する能力を保つ種々の抗体断片を生成することができる。例えば、プロテアーゼパパインによる抗体分子の限定消化は、典型的には3つの断片を生成し、そのうちの2つは、同一であり、親抗体分子の抗原結合活性を保つため、Fab断片と称される。酵素ペプシンによる抗体分子の切断は、通常、2つの抗体断片を生成し、そのうちの1つは、抗体分子の抗原結合アームを保ち、したがって $F(ab') 断片と称される。ジチオスレイトールまたはメルカプトエチルアミンによる $F(ab') 断片の還元は、Fab'断片と称される断片を生成する。一本鎖可変領域断片(sFv)抗体断片は、合成ペプチドを介して抗体軽鎖の可変(V)ドメインに連結された抗体重鎖のVドメインを含む切断されたFab断片からなり、通常の組み換えDNA技術を使用して生成することができる(例えば、Janeway et al., 上記を参照されたい)。同様に、ジスルフィド安定化可変領域断片(dsFv)は、組み換えDNA技術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)を参照されたい)。しかしながら、本発明の文脈における抗体断片は、これらの例示的な抗体断片の型に限定されない。所望の細胞表面受容体または抗原を認識及び結合する任意の適当な抗体断片が、採用され得る。抗体断片は、例えば、Parham, J. Immunol., 131: 2895-2902 (1983)、Spring et al., J. Immunol., 113: 470-478 (1974)、及びNisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys., 89: 230-244 (1960)にさらに説明される。抗体-抗原結合は、例えば、放射免疫測定法(RIA)、ELISA、ウエスタンプロット、免疫沈降、及び競合的阻害アッセイ(例えば、Janeway et al., 上記参照及び米国特許出願公開第2002/0197266A1号を参照されたい)などの当該技術分野において既知である任意の適当な方法を使用して分析することができる。$$

【0057】

それに加えて、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」とは、抗体が、少なくとも2つの異なる種(例えば、マウス免疫グロブリン可変領域と組み合わされたヒト免疫グロブリン定常領域などの2つの異なる免疫グロブリン)から得られた、またはそれに由来する、少なくとも2つの免疫グロブリンまたはその断片を含むことを意味する。抗体はまた、ドメイン抗体(dAb)またはその抗原結合断片であり得、例えば、ラクダ抗体(例えば、Desmyter et al., Nature Struct. Biol., 3: 752, (1996)を参照されたい)、またはサメ抗体、例えば、新規抗原受容体(IgNAR)など(例えば、Greenberg et al., Nature, 374: 168 (1995)、及びStanfield et al., Science, 305: 1770-1773 (2004)を参照されたい)である。

【0058】

任意の適当な抗体が、本発明の文脈におい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、急性リンパ芽球性白血病共通抗原(CALLA)に対して特異的であるマウスIgG2a抗体であり(Ritz et al., Nature, 283: 583-585 (1980))、CALLAを発現する細胞を標的するために使用することができる(例えば、急性リンパ芽球性白血病細胞)。モノクローナル抗体MY9は、CD3

10

20

30

40

50

3抗原に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を発現する細胞を標的するために使用することができる(例えば、急性骨髓性白血病(AML)細胞)。

【0059】

同様に、モノクローナル抗体抗B4(B4とも称される)は、B細胞上のCD19抗原に結合するマウスIgG1抗体であり(Nadler et al., J. Immunol., 131:244-250(1983))、B細胞またはCD19を発現する罹病細胞を標的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及び慢性リンパ芽球性白血病細胞)。N901は、小細胞肺癌を含む、神経内分泌起源(neuroendocrine origin)の細胞上に見出されるCD56(神経細胞接着分子)抗原に結合するマウスモノクローナル抗体であり、薬物が神経内分泌起源の細胞を標的とするようコンジュゲートにおいて使用することができる。J5、MY9、及びB4抗体は、好ましくは、コンジュゲートの一部としてのそれらの使用の前に、再表面化またはヒト化される。抗体の再表面化またはヒト化は、例えば、Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:969-73(1994)に説明される。

10

【0060】

それに加えて、モノクローナル抗体C242は、CanAg抗原に結合し(例えば、米国特許第5,552,293号を参照されたい)、コンジュゲートが、大腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、及び胃癌などの、CanAg発現腫瘍を標的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号を参照されたい)。HuC242が生成されるハイブリドーマは、ECACC識別番号90012601で寄託されている。HuC242は、CDRグラフト化手法(例えば、米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号、及び同第5,693,762号を参照されたい)または再表面化技術(例えば、米国特許第5,639,641号を参照されたい)を使用して調製することができる。HuC242は、コンジュゲートが、例えば、大腸癌細胞、膵臓癌細胞、非小細胞肺癌細胞、及び胃癌細胞などのCanAg抗原を発現する腫瘍細胞を標的するために使用することができる。

20

【0061】

卵巣癌及び前立腺癌細胞を標的するために、抗MUC1抗体が、コンジュゲート中の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 G-2(例えば、Taylor-Papadimitriou et al., Int. J. Cancer, 28:17-21(1981)を参照されたい)、hCTMO1(例えば、van Hof et al., Cancer Res., 56:5179-5185(1996)を参照されたい)、及びDS6が挙げられる。前立腺癌細胞はまた、抗前立腺特異的膜抗原(PSMA)をJ591などの細胞結合剤として使用することによって、コンジュゲートを用いて標的することもできる(例えば、Liu et al., Cancer Res., 57:3629-3634(1997)を参照されたい)。さらに、乳癌、前立腺癌、及び卵巣癌などのHer2抗原を発現する癌細胞は、抗Her2抗体、例えば、トラスツズマブを細胞結合剤として使用することによって、コンジュゲートを用いて標的することができる。III型欠失変異体、EGFRvIIIなどの表皮増殖因子受容体(EGFR)及びその変異型を発現する細胞は、抗EGFR抗体を使用することによって、コンジュゲートを用いて標的することができる。抗EGFR抗体は、国際特許出願第PCT/US11/058385号及び同第PCT/US11/058378号に説明される。抗EGFRvIII抗体は、米国特許第7,736,644号及び同第7,628,986号、並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、及び同第2009/0155282号に説明される。米国特許第7,982,024号に説明されるものなどのインスリン様増殖因子受容体に結合する抗IGF-IR抗体も

30

40

50

また、コンジュゲートにおいて使用することができる。CD27L、クリプト(Cripo)、CD138、CD38、EphA2、インテグリン、CD37、葉酸、CD20、PSGR、NGEP、PSCA、TMEFF2、STEAP1、エンドグリン、及びHer3に結合する抗体もまた、コンジュゲートにおいて使用することができる。

【0062】

一実施形態では、抗体は、hun901、humy9-6、hub4、huc242、抗HER2抗体(例えば、トラスツズマブ)、ビバツズマブ、シブロツズマブ、リツキマブ、hudS6、国際特許出願公開第2010/124797号に説明される抗メソテリン抗体(MF-Tなど)、米国特許出願公開第2010/0093980号に説明される抗クリプト(crypto)抗体(hub3F6など)、米国特許出願公開第2007/0183971号に説明される抗CD138抗体(hub-B4など)、国際特許出願第PCT/US11/058,385号及び同第PCT/US11/058,378号に説明される抗EGFR抗体(EGFR-7など)、米国特許第7,736,644号及び同第7,628,986号並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、及び同第2009/0155282号に説明される抗EGFRvIII抗体、国際特許出願公開第WO2011/039721号及び同第WO2011/039724号に説明されるヒト化EphA2抗体(2H11R35R74など)；国際特許出願公開第WO2008/047242号に説明される抗CD38抗体(hu38SB19など)、国際特許出願公開第WO2011/106528号、及び米国特許出願公開第2012/0009181号に説明される抗葉酸抗体(例えば、humov19)；米国特許第5,958,872号、同第6,596,743号、及び同第7,982,024号に説明される抗IGF1R抗体；米国特許出願公開第2011/0256153号に説明される抗CD37抗体(例えば、hucD37-3)、米国特許出願公開第2006/0127407号に説明される抗インテグリン_{v6}抗体(例えば、CNTO95)；並びに国際特許出願公開第WO2012/019024号に説明される抗Her3抗体からなる群から選択される。一実施形態では、細胞結合剤が、FGFR2に結合する抗体またはその抗原結合断片である(例えば、US2014/030820に記載のもの、その教示全体を参照により本明細書に組み込まれる)。別の実施形態では、細胞結合剤は、FGFR2及びFGFR4に結合する抗体またはその抗原結合断片である(例えば、US2014/301946に記載のもの、その教示全体は参照により本明細書に組み込まれる)。

【0063】

さらに別の実施形態では、細胞結合剤は、ヒトFGFR3(配列番号11)に結合する。より具体的には、細胞結合剤は、ヒトFGFR3(配列番号11)に結合し、配列GYMFTSYGIS(配列番号1)を有するCDRH1、配列WVSTYNGDTNYAQKFQG(配列番号2)を有するCDRH2、配列VLGYYDSIDGYYYGMDV(配列番号3)を有するCDRH3、配列GGNNIGDKSVH(配列番号4)を有するCDRL1、配列LDTERPS(配列番号5)を有するCDRL2、及び配列QVWDSGSDHVV(配列番号6)を有するCDRL3を含む。さらにより具体的には、細胞結合剤は、

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYMFTSYGISMWVRQA
PGQGLEWMGWVSTYNGDTNYAQKFQGRVTVTTDTSTSTAY
MELRSLRSEDTAVYYCARVLGYYDSIDGYYYGMDVWGGT
TVTVSS(配列番号7)の可変重アミノ酸配列、及び
QSVLTQPPSLSVAPGKTATFTCGGNNIGDKSVHWYRQKPG
QAPVLVMYLDTERPSGIPERMSGSNFGNTATLTTITRVEAG
DEADYYCQVWDSGSDHVVFGGGTKLTVLG(配列番号8)の可変軽アミノ酸配列をさらに含む。

別のさらに具体的な実施形態では、細胞結合剤は、配列番号10のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖をさらに含む。別の実施形態では、細胞結合剤は、

10

20

30

40

50

合剤は、各々が配列番号10のアミノ酸配列を含む2つの軽鎖、及び各々が配列番号9のアミノ酸配列を含む2つの重鎖をさらに含む。

【0064】

特に好ましい抗体は、本明細書に記載のヒト化モノクローナル抗体である。例としては、huN901、huMy9-6、huB4、huC242、ヒト化モノクローナル抗Her2抗体（例えば、トラスツズマブ）、ビバツズマブ、シブロツズマブ、CNTO95、huDS6、及びリツキシマブ（例えば、米国特許第5,639,641、及び5,665,357、米国仮特許出願第60/424,332号（米国特許第7,557,189に関連する）、国際（PCT）特許出願公開第WO02/16401号、Pedersen et al.、上記参照、Roguska et al.、上記参照、Liu et al.、上記参照、Nadler et al.、上記参照、Colomer et al.、Cancer Invest. 19:49-56 (2001), Heider et al.、Eur. J. Cancer, 31A:2385-2391 (1995)、Welt et al.、J. Clin. Oncol., 12:1193-1203 (1994)、及びMaloney et al.、Blood, 90:2188-2195 (1997)を参照されたい）が挙げられるが、これらに限定されない。他のヒト化モノクローナル抗体が、当該技術分野において既知であり、本発明と組み合わせて使用することができる。

【0065】

一実施形態では、細胞結合剤は、huMy9-6または他の関連抗体であり、米国特許第7,342,110号、及び同第7,557,189号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0066】

別の実施形態では、細胞結合剤は、米国仮特許出願第61/307,797号、同第61/346,595号、同第61/413,172号、及び米国出願第13/033,723号（US2012-0009181A1として公開）に記載される抗葉酸受容体抗体である。これら全ての出願の教示は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0067】

別の実施形態では、細胞結合剤は、ヒト葉酸受容体1（FOLR1）に特異的に結合するヒト化抗葉酸抗体またはその抗原結合断片であり、抗体は、(a)GYFMNを含む重鎖CDR1；RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃を含む重鎖CDR2；及びYDGSRAMDYを含む重鎖CDR3；及び(b)KASQSVSFAGTSLMHを含む軽鎖CDR1；RASNLEAを含む軽鎖CDR2；及びQQSREYPYTを含む軽鎖CDR3を含み；Xaa₁は、K、Q、H、及びRから選択され；Xaa₂は、Q、H、N、及びRから選択され；及びXaa₃は、G、E、T、S、A、及びVから選択される。好ましくは、重鎖CDR2配列は、RIHPYDGDTFYNQKFQGを含む。

【0068】

別の実施形態では、抗葉酸抗体は、ヒト葉酸受容体1に特異的に結合するヒト化抗体またはその抗原結合断片であって、

QVQLVQSGAEVVVKPGASVKISCKASGYTF TG Y F MNWVKQS
PGQSLLEWI GRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAH
MELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSSAS
TKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKD Y F PEPVTVSWN
SGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYV
DGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWE SNGQ PENNYKTT P P VLD

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

のアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【0069】

別の実施形態では、抗葉酸抗体は、2010年4月7日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-10772及びPTA-10773または10774を有するプラスミドDNAによってコードされるヒト化抗体またはその抗原結合断片である。

【0070】

別の実施形態では、抗葉酸抗体は、

Q V Q L V Q S G A E V V K P G A S V K I S C K A S G Y T F T G Y F M N W V K Q S
P G Q S L E W I G R I H P Y D G D T F Y N Q K F Q G K A T L T V D K S S N T A H
M E L L S L T S E D F A V Y Y C T R Y D G S R A M D Y W G Q G T T V T V S S 10
に対して少なくとも約90%、95%、99%、または100%同一である重鎖可変ドメイン、及び

D I V L T Q S P L S L A V S L G Q P A I I S C K A S Q S V S F A G T S L M H W Y
H Q K P G Q Q P R L L I Y R A S N L E A G V P D R F S G S G S K T D F T L N I S
P V E A E D A A T Y Y C Q Q S R E Y P Y T F G G G T K L E I K R ; またはD I V L
T Q S P L S L A V S L G Q P A I I S C K A S Q S V S F A G T S L M H W Y H Q K P
G Q Q P R L L I Y R A S N L E A G V P D R F S G S G S K T D F T L T I S P V E A
E D A A T Y Y C Q Q S R E Y P Y T F G G G T K L E I K R 20
に対して少なくとも約90%、95%、99%、または100%同一である軽鎖可変ドメインを含むヒト化抗体またはその抗原結合断片である。

【0071】

細胞結合剤は、好ましくは抗体であるが、細胞結合剤はまた、非抗体分子であることもできる。適当な非抗体分子としては、例えば、インターフェロン（例えば、 γ 、 α 、またはインターフェロン）、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）、増殖因子（例えば、EGF、TGF- β 、FGF、及びVEGF）、コロニー刺激因子（例えば、G-CSF、M-CSF、及びGM-CSF（例えば、Burgess, Immunology Today, 5: 155-158 (1984)を参照されたい）、ソマトスタチン、及びトランスフェリン（例えば、O'Keefe et al., J. Biol. Chem., 260: 932-937 (1985)を参照されたい）が挙げられる。例えば、骨髓細胞に結合するGM-CSFは、急性骨髓性白血病細胞を標的するための細胞結合剤として使用することができる。それに加えて、活性化T細胞に結合するIL-2は、移植片拒絶の防止のため、移植片対宿主疾患の療法及び防止のため、並びに急性T細胞白血病の治療のために使用することができる。表皮増殖因子（EGF）は、肺癌及び頭頸部癌などの扁平上皮癌を標的するために使用することができる。ソマトスタチンは、神経芽腫細胞及び他の腫瘍細胞型を標的するために使用することができる。

【0072】

細胞毒性剤

本明細書で使用する場合、「細胞毒性剤」は、細胞の死をもたらす、細胞死を誘発する、または細胞生存を減少させる任意の化合物を指す。適当な細胞毒性剤としては、例えば、マイタンシノイド及びコンジュゲート可能なアンサマイトシン（例えば、2011年1月3日出願の国際特許出願公開第PCT/US11/59131号を参照されたい）、タキソイド、CC-1065及びCC-1065類似体、並びにドラスタチン及びドラスタチン類似体が挙げられる。本発明の具体的な実施形態では、細胞毒性剤は、マイタンシノール及びマイタンシノール類似体を含む、マイタンシノイドである。マイタンシノイドは、微小管形成を阻害し、哺乳類細胞に対して毒性の高い化合物である。適当なマ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の、及び他の位置に修飾を有するものが挙げられる。かかるマイタンシノイドは、例えば、米国特許第4,256,746号

10

20

30

40

50

、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、及び同第6, 333, 410号に説明される。

【 0 0 7 3 】

修飾芳香環を有するマ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)(アンサマイトシンP2のLAH還元によって調製される)、(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号及び同第4,307,016号)(ストレプトマイセスまたはアクチノミセスを用いた脱メチル化、またはLAHを用いた脱塩素処理によって調製される)、及び(3) C-20-デメトキシ、C-20-アシルオキシ(-OCOR)、+/-デクロロ(米国特許第4,294,757号)(塩化アシルを用いたアシル化によって調製される)が挙げられる。

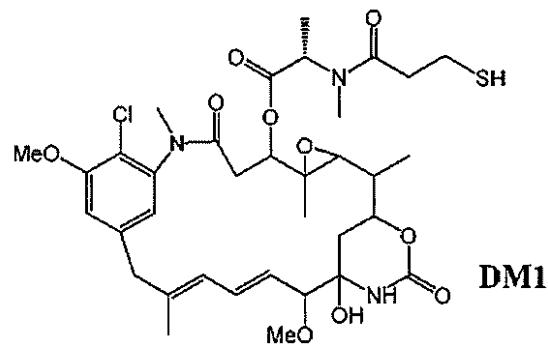
〔 0 0 7 4 〕

芳香環以外の位置に修飾を有するマ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)(マイタンシノールとH₂SまたはP₂S₅との反応によって調製される)、(2) C-14-アルコキシメチル(デメトキシ/C₂H₂OR)(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(C₂H₂OHまたはC₂H₂OAc)(米国特許第4,450,254号)(Nocardiaから調製される)、(4) C-15-ヒドロキシ/アシルオキシ(米国特許第4,364,866号)(ストレプトマイセスによるマイタンシノールの変換によって調製される)、(5) C-15-メトキシ(米国特許第4,313,946号及び同第4,315,929号)(Trewia nudifloraから単離される)、(6) C-18-N-デメチル(米国特許第4,362,663号及び同第4,322,348号)(ストレプトマイセスによるマイタンシノールの脱メチル化によって調製される)、及び(7) 4,5-デオキシ(米国特許第4,371,533号)(三塩化チタン/マイタンシノールのLAH還元によって調製される)が挙げられる。

〔 0 0 7 5 〕

本発明の具体的な実施形態では、本発明のプロセスにおいて使用することができる細胞毒性剤は、N²’-デアセチル-N²’-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-マイタシンとしても既知であるチオール含有マイタシンノイドDM1である。DM1の構造は、式(I)によって表される：

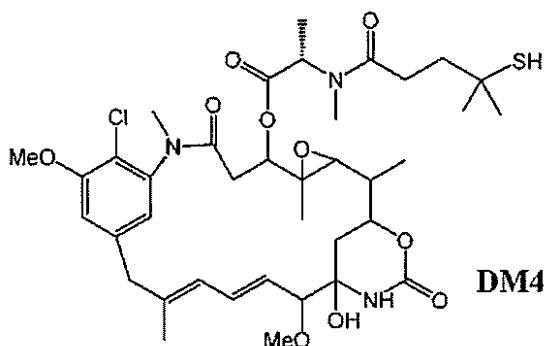
【化 3】



【 0 0 7 6 】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明のプロセスにおいて使用することができる細胞毒性剤は、N²’ - デアセチル - N²’ - (4 - メチル - 4 - メルカプト - 1 - オキソペンチル) - マイタンシンとしても既知であるチオール含有マイタンシノイドDM1である。DM4の構造は、式(I1)によって表される：

【化4】



10

【0077】

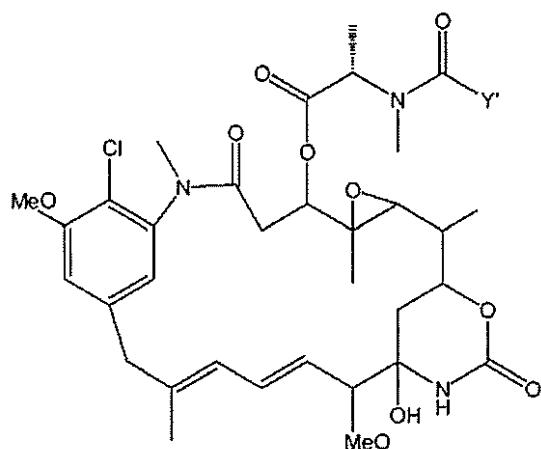
他のマイタンシノイドが、本発明の文脈において使用されてもよく、例えば、硫黄原子を担持する炭素原子上のモノアルキルまたはジアルキル置換を担持するチオール及びジスルフィド含有マイタンシノイドが挙げられる。特に好ましいのは、C-3位に、(a)C-14ヒドロキシメチル、C-15ヒドロキシ、またはC-20デスマチル官能性を有するマイタンシノイド、及び(b)ヒンダードスルフヒドリル基を担持するアシル基を有するアシル化されたアミノ酸側鎖を有するマイタンシノイドであって、チオール官能性を担持するアシル基の炭素原子が、1つまたは2つの置換基を有し、その置換基が、1~10個の炭素原子を有する直鎖もしくは分枝鎖アルキルもしくはアルケニル、3~10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ラジカルであり、さらに、置換基のうちの1つが、Hであり得、アシル基が、カルボニル官能性と硫黄原子との間に少なくとも3個の炭素原子の直鎖長を有する、マイタンシノイドである。

20

【0078】

本発明の文脈における使用のためのさらなるマイタンシノイドとしては、式(III)：

【化5】



30

によって表される化合物が挙げられ、式中、Y'は、 $(CR_7R_8)_1$ ($CR_9 = CR_1$
 $_0$)_p (CC)_q A₀ (CR_5R_6)_m D_u ($CR_{11} = CR_{12}$)_r (CC)_s B_t (CR_3R_4)_n CR₁R₂ SZを表し、R₁及びR₂は、各々独立して、1~10個の炭素原子を有する直鎖アルキルまたはアルケニル、3~10個の炭素原子を有する分枝鎖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、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルラジカルであり、R₂はまた、Hであり得、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、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルラジカルであり、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀、R₁₁、及びR₁₂は、各

40

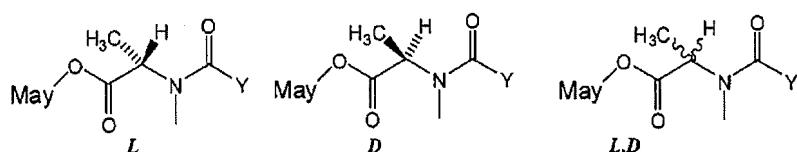
50

々独立して、H、1～10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、3～10個の炭素原子を有する分枝鎖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、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルラジカルであり、1、m、n、o、p、q、r、s、及びtは、各々独立して、0または1～5の整数であるが、但し、1、m、n、o、p、q、r、s、及びtのうちの少なくとも2つは常に0ではなく、Zは、H、S R、もしくはC O Rであり、Rは、1～10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、3～10個の炭素原子を有する分枝鎖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、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルラジカルである。式(I I I)の好ましい実施形態としては、(a) R₁は、Hであり、R₂は、メチルであり、Zは、Hである、(b) R₁及びR₂は、メチルであり、Zは、Hである、(c) R₁は、Hであり、R₂は、メチルであり、Zは、-SCH₃である、並びに(d) R₁及びR₂は、メチルであり、Zは、-SCH₃である、式(I I I)の化合物が挙げられる。

【0079】

かかるさらなるマイタンシノイドとしてはまた、式(IV-L)、(IV-D)、または(IV-D, L)：

【化6】



によって表される化合物が挙げられ、式中、Yは、(C R₇ R₈)₁ (C R₅ R₆)_m (C R₃ R₄)_n C R₁ R₂ S Zを表し、R₁及びR₂は、各々独立して、1～10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、3～10個の炭素原子を有する分枝鎖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、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルラジカルであり、R₂はまた、Hであり得、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、及びR₈は、各々独立して、H、1～10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、3～10個の炭素原子を有する分枝鎖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、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルラジカルであり、1、m、及びnは、各々独立して、1～5の整数であり、さらにnは0であり得、Zは、H、S R、またはC O Rであり、Rは、1～10個の炭素原子を有する直鎖もしくは分枝鎖アルキルもしくはアルケニル、3～10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、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルラジカルであり、Mayは、C-3、C-14ヒドロキシメチル、C-15ヒドロキシ、またはC-20デスマチルに側鎖を担持するマイタンシノイドを表す。式(IV-L)、(IV-D)、及び(IV-D, L)の好ましい実施形態としては、(a) R₁は、Hであり、R₂は、メチルであり、R₅、R₆、R₇、及びR₈は各々、Hであり、1及びmは各々、1であり、nは、0であり、Zは、Hである、(b) R₁は、Hであり、R₂は、メチルであり、R₅、R₆、R₇、R₈は各々、Hであり、1及びmは、1であり、nは、0であり、Zは、Hである、(c) R₁は、Hであり、R₂は、メチルであり、R₅、R₆、R₇、及びR₈は各々、Hであり、1及びmは各々、1であり、nは、0であり、Zは、-SCH₃である、または(d) R₁及びR₂は、メチルであり、R₅、R₆、R₇、R₈は各々、Hであり、1及びmは、1であり、nは、0であり、Zは、-SCH₃である、式(IV-L)、(IV-D)、及び(IV-D, L)の化合物が挙げられる。好ましい細胞毒性剤は、式(IV-L)によって表される。

【0080】

さらなる好ましいマイタンシノイドとしてはまた、式(V)：

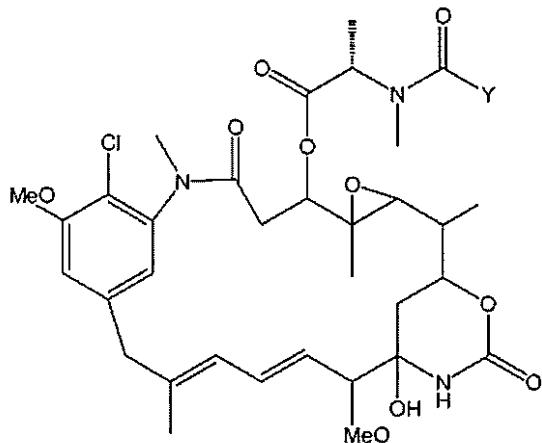
10

20

30

40

【化7】



10

20

30

40

によって表される化合物も挙げられ、式中、 $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$ を表し、ここで R_1 及び R_2 は、各々独立して、1~10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、3~10個の炭素原子を有する分枝鎖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、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルラジカルであり、 R_2 はまた、Hであり得、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 は、各々独立して、H、1~10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、3~10個の炭素原子を有する分枝鎖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、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルラジカルであり、1、 m 、及び n は、各々独立して、1~5の整数であり、さらに n は0であり得、 Z は、H、SR、またはCORであり、Rは、1~10個の炭素原子を有する直鎖もしくは分枝鎖アルキルもしくはアルケニル、3~10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、または複素環式芳香族もしくはヘテロシクロアルキルラジカルであり、Mayは、C-3、C-14ヒドロキシメチル、C-15ヒドロキシ、またはC-20デスマチルに側鎖を担持するマイタンシノイドを表す。

【0081】

式(IV-L)、(IV-D)、及び(IV-D,L)の好ましい実施形態としては、(a) R_1 は、Hであり、 R_2 は、メチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 は各々、Hであり、1及び m は各々、1であり、 n は、0であり、 Z は、Hである、(b) R_1 は、Hであり、 R_2 は、メチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 は各々、Hであり、1及び m は各々、1であり、 n は、0であり、 Z は、Hである、(c) R_1 は、Hであり、 R_2 は、メチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 は各々、Hであり、1及び m は各々、1であり、 n は、0であり、 Z は、-SCH₃である、または(d) R_1 及び R_2 は、メチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 は各々、Hであり、1及び m は、1であり、 n は、0であり、 Z は、-SCH₃である、式(IV-L)、(IV-D)、及び(IV-D,L)の化合物が挙げられる。式(V)の好ましい実施形態としては、(a) R_1 は、Hであり、 R_2 は、メチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 は各々、Hであり、1及び m は各々、1であり、 n は、0であり、 Z は、Hである、(b) R_1 及び R_2 は、メチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 は各々、Hであり、1及び m は、1であり、 n は、0であり、 Z は、Hである、(c) R_1 は、Hであり、 R_2 は、メチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 は各々、Hであり、1及び m は各々、1であり、 n は、0であり、 Z は、-SCH₃である、または(d) R_1 及び R_2 は、メチルであり、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 は各々、Hであり、1及び m は、1であり、 n は、0であり、 Z は、-SCH₃である、式(V)の化合物が挙げられる。

【0082】

マイタンシノイドに加えて、コンジュゲートにおいて使用される細胞毒性剤は、タキサ

50

ンまたはその誘導体であることができる。タキサンは、パクリタキセル (Taxol (登録商標)) (細胞毒性天然物) とドセタキセル (Taxotere (登録商標)) (半合成誘導体) とを含む化合物のファミリーであり、これらはいずれも、癌の治療において幅広く使用される。タキサンは、チューブリンの脱重合を阻害し、細胞死をもたらす有糸分裂紡錘体毒である。ドセタキセル及びパクリタキセルは、癌の治療に有用な薬剤であるが、その抗腫瘍活性は、正常な細胞に対するその非特異的毒性のため、制限される。さらに、パクリタキセル及びドセタキセルのような化合物は、それ自身、細胞結合剤のコンジュゲートとして使用するには十分な効能がない。

【0083】

本明細書に記載の本発明をより完全に理解するために、以下の実施例を示す。これらの実施例は説明の目的のみであり、いかなる様式においても本発明を限定するものとみなすべきではないことを理解すべきである。

【実施例】

【0084】

実施例 1

分析方法：

抗体及びコンジュゲートの濃度は、252 nm 及び 280 nm での抗体及び DM4 成分の経験的に決定されたまたは算出された消衰係数を用いて測定した。

【0085】

モノマー、高分子量種は、Tosoh Bioscience TSK G3000S WXL (7.8 × 300 mm)、5 μm 粒径カラムを用いて、SEC-HPLC で決定した。移動相は、15% イソプロパノールを含有する、160 mM のリン酸カリウム、212 mM の塩化カリウム pH 7.0 であり、0.5 mL / 分の流量で実施し、280 nm での吸光度で検出した。

【0086】

抗体断片は、タンパク質 230 キット (パート # 5087-1518) を用いて、2100 Expert ソフトウェアを有する Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて測定した。1.6 mM N-エチルマレイミド (NEM) を含有するよう補った変性緩衝液を添加することで変性サンプルを調製し、サンプルを 5 分間 70 に加熱する。希釀、サンプル及びラダーローディング、及び分析を含む全ての他のステップは、Agilent タンパク質 230 キット指示書に従って行う。抗体の断片化率は、全ての抗体関連のピークの合計で割った抗体モノマー種 (公知のグリコシル化アーチファクトを除く) よりも小さい全てのピークの合計によって算出する。

【0087】

In Situ 反応調製 (本プロセスのステップ (a))

細胞毒性剤 - リンカー化合物を調製するための In situ 反応は、70.0% (v/v) の DMA、及び 30% (v/v) の 4 つの試験緩衝液 (200 mM コハク酸塩、pH 5.0; 20 mM コハク酸塩、pH 5.0; 167 mM EPPS、67 mM NaCl、2 mM EDTA pH 8.2; 20 mM EPPS、pH 8.2) の 1 つの緩衝液中で、DM4 (12 mM) を SPDB またはスルホ - SPDB リンカー (10 mM) と反応させることによって実施した。混合物を渦攪拌し、20.0 で 6 時間インキュベートし、任意の精製をせずに直ちに使用した。

【0088】

コンジュゲート調製 (本プロセスのステップ (b)) :

適切な量のコンジュゲーション緩衝液 (50 mM EPPS、20 mM 塩化ナトリウム、2 mM EDTA、pH 8.2) を算出量の DMA と混合することによってコンジュゲーション混合物を調製し、最終 DMA レベルを 2.5% または 10% に到達させた。ゲル濾過クロマトグラフィーによってコンジュゲーション緩衝液に予めバッファー交換されている抗体 1、抗 FOLR1 抗体を次いでこの混合物に添加し、最終標的抗体濃度を達成した。3 ~ 4 のマイタンシノイド対抗体比 (MAR) を達成するのに必要な算出量の in

10

20

30

40

50

s i t u 反応混合物を添加し、反応物を直ちに混合した。次に、オービタルシェーカー上で 160 rpm にて混合しながら、コンジュゲーション反応を 20.0 で 22 時間インキュベートした。インキュベーション期間の終了時に、pH 8.2 の反応混合物を、6.5% (v/v) の 1M 酢酸を添加することによって pH 調整し、0.22 μm の PVDF フィルターを通して濾過した。濾過し、pH 調整した反応混合物をゲル濾過によって精製し、精製されたコンジュゲートを、UV/可視吸光分光法、高速液体クロマトグラフィー (SEC-HPLC) によるサイズ排除クロマトグラフィー、及び非還元 CE-SDS (Gel Chip) によって分析した。

【表 1】

表 1

In Situ 条件	コンジュゲーション 条件	断片 (%)		モノマー (%)		収率 (%)		マイタンシノ イド In c 効 率	
		s S P D B	S P	s S P D B	S P D B	s S P D B	S P D B	s S P D B	S P D B
167 mM EPP S, pH 8.2	40 g/L 10% D MA	1 1. 2	1 1. 3	95. 8	95. 3	8 7. 4	8 9. 5	8 7. 1	7 8. 2
	10 g/L 10% D MA	9. 5	9. 4	96. 3	95. 7	9 0. 9	8 9. 0	6 6. 9	7 4. 7
	10 g/L 2.5% DMA	1 3. 4	1 1. 9	96. 7	96. 1	9 0. 3	8 6. 7	6 7. 1	6 0. 1
	40 g/L 10% D MA	1 5. 2	1 1. 1	95. 3	95. 0	8 6. 8	8 8. 6	8 8. 4	8 2. 1
	10 g/L 10% D MA	1 3. 7	9. 3	96. 0	95. 5	9 0. 5	8 8. 5	6 7. 8	7 9. 4
	10 g/L 2.5% DMA	n/ d	n/ d	n/d	n/d	n/ d	n/ d	n/ d	n/ d

10

20

30

【表2】

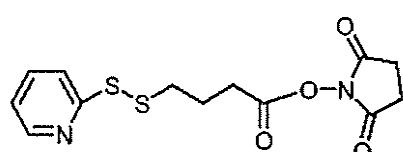
表2

In Situ u 条 件	コンジュゲー ション 条件	断片 (%)		モノマー (%)		収率 (%)		In c 効率 (rMAR/MAR, %)	
		s S P D B	S P D B	s S P D B	S P D B	s S P D B	S P D B	s S P D B	S P D B
200 mM コ ハク 酸 塩, pH 5.0	40 g / L 10 % DMA (26 / 25)	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d
	10 g / L 10 % DMA (10 / 09)	9.1	9.7	96.26	95.74	91.0	89.3	66.1	68.6
	10 g / L 2.5 % DMA	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d
10m M コハク 酸塩, pH 5.0	40 g / L 10 % DMA	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d
	10 g / L 10 % DMA (14 / 13)	1.2	10.4	96.05	95.42	89.4	87.8	67.1	80.4
	10 g / L 2.5 % DMA	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d	n / d

【0089】

表1及び2に示すように、高緩衝能を有する緩衝溶液をs S P D B及びDMAのin situ反応(すなわち、ステップ(a)の反応)に使用する場合、得られたコンジュゲートは、低緩衝能の緩衝液を使用することで調製したコンジュゲートと比較して、抗体断片化が有意に低い。対照的に、S P D Bを二官能性架橋試薬として使用する場合、緩衝能は、抗体断片化に有意な効果を有さない。S P D Bリンカー構造を以下に示す：

【化8】



【0090】

10

20

30

40

50

実施例 2

配列番号 10 のアミノ酸配列を持つ軽鎖と配列番号 9 のアミノ酸配列を持つ重鎖を有する抗体 2、抗 F G F R 3 抗体を 30 mg / mL に濃縮し、透析濾過して、10 透析容量の反応緩衝液 (50 mM E P P S、20 mM 塩化ナトリウム、2 mM E D T A、p H 8.2) にし、45 g / L にさらに濃縮した。スルホ - S P D B (10 mM) に対して 1.2 モル比の D M 4 (12 mM) は、167 mM E P P S、66.7 mM N a C 1、2 mM E D T A、p H 8.2、及び 70.0% (v / v) D M A 中の抗体に対して 4.68 モル比のスルホ - S P D B と反応させた。i n - s i t u 反応を 20 ± 3 で 10 ± 4 時間実施した後、D M A を有する抗体 2 に添加し、50 mM E P P S、20 mM N a C 1、2 mM E D T A、p H 8.2 ± 0.2、及び 5.0% D M A (v / v) 中の 20 mg / mL の最終 A b 濃度を達成した。コンジュゲーション反応は、 20.0 ± 3.0 で 16 ± 8 時間実施した。反応後、6.5% (v / v) の 1 M 酢酸を添加することによって、コンジュゲーション混合物の p H を 5.0 に迅速に調整した。p H 調整した混合物を 20 mg / mL に濃縮し、16 ダイア容量の基礎配合緩衝液 (10 mM 酢酸塩、p H 5.0 ± 0.1) に対して透析フィルター濾過した。精製されたコンジュゲートを、スクロース (45%、w / v) 及びポリソルベート - 20 (10%、w / v) の原液を用いて、10 mM 酢酸塩、9% (w / v) スクロース、0.01% (w / v) ポリソルベート - 20 (T w e e n - 20)、p H 5.0 中に 5.0 mg / mL で配合した。
10

【配列表】

2018505128000001.app

20

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/061310

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/48
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/134483 A2 (IMMUNOGEN INC [US]) 4 September 2014 (2014-09-04)	1-4,9, 17-19, 22,26, 32,42, 43, 47-49, 58,65,66 1-71
Y	Example 2 page 56 -----	1-71
Y	WO 2014/160160 A2 (NOVARTIS AG [CH]; BATT JULIE LYNN [US]; ETTENBERG SETH [US]; HAUBST NI) 2 October 2014 (2014-10-02) Paragraphs 157-171;183 -----	1-71
Y	WO 2012/112687 A1 (IMMUNOGEN INC [US]; FISHKIN NATHAN [US]; MILLER MICHAEL [US]; LI WEI []) 23 August 2012 (2012-08-23) paragraphs 364-365 -----	1-71

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

9 February 2016

16/02/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bettio, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2015/061310

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2014134483	A2	04-09-2014	EP 2961434 A2 US 2015359903 A1 WO 2014134483 A2		06-01-2016 17-12-2015 04-09-2014
WO 2014160160	A2	02-10-2014	AU 2014244060 A1 CA 2904090 A1 CN 105188763 A EP 2968592 A2 KR 20150130333 A TW 201444574 A US 2014301946 A1 UY 35399 A WO 2014160160 A2		01-10-2015 02-10-2014 23-12-2015 20-01-2016 23-11-2015 01-12-2014 09-10-2014 31-10-2014 02-10-2014
WO 2012112687	A1	23-08-2012	AU 2012217719 A1 AU 2012231640 A1 CA 2824864 A1 CA 2825919 A1 CN 103687623 A CN 103702686 A EP 2675479 A1 EP 2675480 A1 EP 2675481 A1 JP 5826863 B2 JP 2014506892 A JP 2014521591 A KR 20140010067 A KR 20140010076 A NZ 613121 A NZ 613162 A RU 2013141829 A RU 2013142179 A SG 191955 A1 SG 191965 A1 TW 201309674 A US 2012238731 A1 US 2012244171 A1 US 2013302359 A1 US 2014088089 A1 US 2015099874 A1 WO 2012112687 A1 WO 2012112708 A1 WO 2012128868 A1		18-04-2013 02-05-2013 27-09-2012 23-08-2012 26-03-2014 02-04-2014 25-12-2013 25-12-2013 25-12-2013 02-12-2015 20-03-2014 28-08-2014 23-01-2014 23-01-2014 29-05-2015 30-10-2015 27-03-2015 27-03-2015 30-08-2013 30-08-2013 01-03-2013 20-09-2012 27-09-2012 14-11-2013 27-03-2014 09-04-2015 23-08-2012 23-08-2012 27-09-2012

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 31/537 (2006.01)	A 6 1 K 31/537	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,C1,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 ハッチンス , ベンジャミン・エム

アメリカ合衆国マサチューセッツ州01719 , ボックスボロー , ストウ・ロード 329

F ターム(参考) 4B064 AE43 AG01 AG26 AG27 AH19 DA01
 4C076 AA95 CC26 CC27 CC41 EE59 EE59Q FF63
 4C084 AA17 NA03 NA13 ZB211 ZB212 ZB261
 4C085 AA23 AA26 CC23 DD11 DD52 DD53 EE01
 4C086 AA01 AA02 AA04 CB22 MA01 MA04 NA03 NA13 ZB21 ZB26
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA50 BA72 CA40 DA75 DA76
 EA20 FA10 FA72 FA74 GA21

【要約の続き】

調製された細胞結合剤細胞毒性剤コンジュゲートも本発明に含まれる。

【選択図】なし