

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6956630号
(P6956630)

(45) 発行日 令和3年11月2日(2021.11.2)

(24) 登録日 令和3年10月7日(2021.10.7)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 1/113 (2006.01)	C O 7 K 1/113
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 C
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 39/395 L
C O 7 K 16/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/68
	C O 7 K 16/00

請求項の数 114 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2017-503957 (P2017-503957)	(73) 特許権者	509012625
(86) (22) 出願日	平成27年7月17日 (2015. 7. 17)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2017-526652 (P2017-526652A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(43) 公表日	平成29年9月14日 (2017. 9. 14)	(74) 代理人	110000796
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/040931		特許業務法人三枝国際特許事務所
(87) 国際公開番号	W02016/014360	(72) 発明者	フランクリン ジェイミー
(87) 国際公開日	平成28年1月28日 (2016. 1. 28)		アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア サウス サン フランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
審査請求日	平成30年7月17日 (2018. 7. 17)	(72) 発明者	リン シン シン
(31) 優先権主張番号	62/028, 679		アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア サウス サン フランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(32) 優先日	平成26年7月24日 (2014. 7. 24)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 薬剤の少なくとも1つのトリルスフィド結合を含むタンパク質中のチオール部分へのコンジュゲーション方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

薬剤の、少なくとも1つのジルスフィド結合及び少なくとも1つのトリルスフィド結合を含む単離されたタンパク質中のチオール部分へのコンジュゲーション方法であって、

(a) 前記単離されたタンパク質中の少なくとも1つのスルフィド結合を、pH 5.0 ~ 6.0の弱酸性pH、及び0.1 mM ~ 8 mMのトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)を含む反応で還元して、反応性スルフィド及び少なくとも1つのチオール基を含む還元されたタンパク質を含む組成物を形成するステップと、

(b) 前記組成物中の前記反応性スルフィドの含有量を減少させるステップであって、前記減少ステップが前記組成物を窒素源と接触させることを含み、前記接触が、前記還元ステップ中に、前記還元ステップを行う時間未満の時間にわたって窒素ガスを前記組成物に導入することを含むステップと、

(c) 薬剤を前記還元されたタンパク質の前記少なくとも1つのチオール基にコンジュゲートして、タンパク質-薬剤コンジュゲートを形成するステップと、を含む、前記方法。

【請求項2】

前記還元ステップが、前記少なくとも1つのスルフィド結合の少なくとも部分的な還元を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記単離されたタンパク質が少なくとも4つのジルスフィド結合を含む、請求項1に記載

載の方法。

【請求項 4】

前記単離されたタンパク質が少なくとも 2 つのトリスルフィド結合を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記還元ステップ前に、前記単離されたタンパク質中の前記スルフィド結合の約 1 % ~ 約 20 % がトリスルフィド結合である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記還元ステップ前に、前記単離されたタンパク質中の前記スルフィド結合の約 5 % ~ 約 7 % がトリスルフィド結合である、請求項 5 に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記還元ステップが非変性条件下で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記還元ステップが、約 5.5 の pH で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記還元ステップが、約 6.0 の pH で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記還元ステップ前に、前記単離されたタンパク質の pH が、約 pH 5.0 ~ 約 pH 8.0 の pH に調整される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記タンパク質中の前記トリスルフィド結合の約 100 % が還元される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 12】

前記還元ステップ後に、単離されたタンパク質 1 モル還元につき約 4 ~ 約 8 モルのチオール部分が、前記薬剤とのコンジュゲーションに利用可能である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記減少ステップが、前記組成物の pH を約 5.0 ~ 約 6.0 の pH に調整することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記組成物の pH が約 pH 5.5 に調整される、請求項 13 に記載の方法。

30

【請求項 15】

前記減少ステップが、前記組成物から液体媒体を除去することと、前記液体媒体を代替液体媒体と置き換えることと、を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記液体媒体が緩衝液を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記減少ステップが、

(a) 前記組成物中の前記還元されたタンパク質を固体支持体と会合させることと、

(b) 前記組成物の少なくとも 90 % を、前記反応性スルフィドを欠く代替溶液と置

き換えることと、

を含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 18】

前記固体支持体が、濾過膜、選択性透過膜、及びクロマトグラフィー樹脂のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記減少ステップが、前記組成物中の前記反応性スルフィドの含有量を低減するのに十分な速度で、前記還元ステップにおける前記組成物を混合することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

50

前記混合が、前記単離されたタンパク質中のスルフィド結合（複数可）の還元にとっての最適混合速度を超える増大した速度で前記組成物を攪拌することを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

増大した速度での前記混合が、前記還元ステップの全反応時間未満の期間にわたって前記還元ステップにおける前記混合速度を増大させることを含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記接触が、窒素ガスを前記組成物に通気させることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

前記接触が、約 1 分間～約 240 分間の期間行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

前記接触が、約 1 分間～約 30 分間の期間行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

前記接触が、約 10 立法センチメートル/分～約 60 立法センチメートル/分の速度で、前記組成物を窒素ガスでスパージすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

前記接触が、前記還元ステップにとっての最適混合速度を少なくとも 200% 超える速度で、窒素ガスの存在下で前記組成物を混合することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

前記接触が、約 5.0～約 8.0 の pH で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

前記接触が、約 4 ～約 40 の温度で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

前記接触が、約 15 ～約 40 の温度で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

前記接触が、約 20 の温度で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】

前記接触が、約 30 の温度で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

前記組成物の体積に対する表面積の比率が約 2 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 33】

前記接触が、前記組成物を含有する反応容器の側面に対して窒素ガスをパイプ供給することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 34】

前記接触が、前記組成物中にスパージストーンを浸すことを含み、前記スパージストーンが、約 1 cm～約 1メートルの直径を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 35】

前記接触が閉鎖反応容器内で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 36】

前記接触が開放反応容器内で行われ、反応性スルフィドが前記組成物から放出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 37】

前記接触が、tween 及び消泡剤のうちの少なくとも一方の存在下で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 38】

前記 tween が、Tween - 20 及び Tween - 80 のうちの少なくとも一方である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記消泡剤が、Antifoam - A、Antifoam - C、及びポロキサマーのう

10

20

30

40

50

ちの少なくとも1つである、請求項37に記載の方法。

【請求項40】

前記単離されたタンパク質が抗体または抗体断片である、請求項1に記載の方法。

【請求項41】

前記抗体断片が抗原結合抗体断片である、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

前記抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab)₂、Fv断片、ダイアボディ、一本鎖抗体、scFv断片、またはscFv-Fcである、請求項40に記載の方法。

【請求項43】

前記抗体または前記抗体断片がIgG抗体である、請求項40に記載の方法。

10

【請求項44】

前記抗体または前記抗体断片がヒトモノクローナル抗体である、請求項40に記載の方法。

【請求項45】

前記抗体または前記抗体断片がヒト免疫グロブリン定常領域を含む、請求項40に記載の方法。

【請求項46】

前記抗体または前記抗体断片がヒトIgG定常領域を含む、請求項40に記載の方法。

【請求項47】

前記IgG定常領域のアイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4である、請求項46に記載の方法。

20

【請求項48】

前記IgG定常領域の前記アイソタイプがIgG1である、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記抗体または前記抗体断片中のスルフィド結合が、抗体重鎖と抗体軽鎖との間、または抗体重鎖間、または抗体重鎖と抗体軽鎖との間及び抗体重鎖間の両方に存在する、請求項40に記載の方法。

【請求項50】

前記抗体または前記抗体断片が軽鎖定常ドメインを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項51】

前記軽鎖定常ドメインがカッパ定常ドメインである、請求項50に記載の方法。

30

【請求項52】

前記抗体が、重鎖を連結するヒンジ領域内に2つのスルフィド結合、ならびに軽鎖と重鎖との間に各々1つのスルフィド結合を含む4つの鎖間スルフィド結合を有するIgG1モノクローナル抗体である、請求項40に記載の方法。

【請求項53】

前記単離されたタンパク質が抗体であり、前記還元ステップが鎖間ジスルフィド結合のみの還元をもたらし、鎖内結合の還元はもたらさない、請求項1に記載の方法。

【請求項54】

前記薬剤が、化学療法剤、核酸、サイトカイン、免疫抑制剤、放射性同位体、抗生物質、及び治療抗体から選択される少なくとも1つの治療薬である、請求項1に記載の方法。

40

【請求項55】

前記治療薬が化学療法剤である、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

前記化学療法剤が、オーリスタチン、ピンカアルカロイド、ポドフィロトキシン、タキサン、パッカチン誘導体、クリプトフィシン、メイタンシノイド、コンプレタスタチン、及びドラスタチンから選択される少なくとも1つの抗チューブリン剤である、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

前記化学療法剤が、オーリスタチン、DNA副溝結合剤、DNA副溝アルキル化剤、エ

50

ンジイン、レキシトロブシン、デュオカルマイシン、タキサン、ピューロマイシン、ドラスタチン、メイタンシノイド、及びピンカアルカロイドのうちの少なくとも1つである、請求項55に記載の方法。

【請求項58】

前記化学療法剤がドラスタチンである、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

前記ドラスタチンがオーリスタチンである、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

前記オーリスタチンがMMAEまたはMMAFである、請求項59に記載の方法。

【請求項61】

前記薬剤が、前記還元されたタンパク質の前記少なくとも1つのチオール基を前記薬剤に連結するように適合されたリンカー部分を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項62】

前記リンカー部分が、切断可能なリンカーである、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

前記リンカー部分が、切断不可能なリンカーである、請求項61に記載の方法。

【請求項64】

前記リンカー部分が、細胞内条件下で切断されやすいリンカーである、請求項61に記載の方法。

【請求項65】

前記リンカー部分が、細胞内プロテアーゼによって切断可能なペプチドリinkerである、請求項61に記載の方法。

【請求項66】

前記細胞内プロテアーゼが、リソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼである、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

前記リンカー部分が、ジペプチドリinkerである、請求項61に記載の方法。

【請求項68】

前記ジペプチドリinkerが、バリン-シトルリン(val-cit)またはフェニルアラニン-リジン(phen-lys)リンカーである、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

前記ジペプチドリinkerが、遊離チオールと反応して共有結合を形成するマレイミド官能基である、請求項67に記載の方法。

【請求項70】

前記タンパク質-薬剤コンジュゲートが、aCD22-val-cit-MMAE、aCD22-val-cit-MMAF、aLy6E-val-cit-MMAE、aLy6E-val-cit-MMAF、aCD79b-val-cit-MMAE、aCD79b-val-cit-MMAF、aNAPi2b-val-cit-MMAE、aNAPi2b-val-cit-MMAF、aMUC16-val-cit-MMAE、aMUC16-val-cit-MMAF、aSTEAP1、及びaETBRのうちの1つである、請求項1に記載の方法。

【請求項71】

単離された抗体中のトリスルフィド結合のジスルフィド結合への変換方法であって、

(a) 溶液中で、少なくとも1つのトリスルフィド結合を含む前記単離された抗体を、pH5.0~pH6.0のpHで0.1mM~8mMのTCEPにより還元し、還元された抗体を含む組成物を形成するステップと、

(b) 前記組成物を窒素ガスと接触させるステップであって、前記接触が、前記還元ステップ中に、前記還元ステップを行う時間未満の時間にわたって窒素ガスを前記組成物に導入することを含むステップと、

(c) オーリスタチンまたはその誘導体を前記還元された抗体にコンジュゲートして

10

20

30

40

50

、抗体 - 薬物コンジュゲート (ADC) を形成するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 7 2】

前記接触が、窒素ガスを前記組成物に通気させることを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記接触が、少なくとも約 30 分間行われる、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記接触が、約 50 立法センチメートル / 分の速度で、前記組成物を窒素ガスでスパージすることを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

10

【請求項 7 5】

前記接触が、前記還元ステップにとっての最適混合速度を約 300% 超える速度で、前記組成物を窒素ガスの存在下で混合することを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記接触が、約 5.5 ~ 約 7.5 の pH で行われる、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記接触が、約 20 ~ 約 30 の温度で行われる、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記組成物の体積に対する表面積の比率が約 2 である、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記接触が、前記組成物を含有する反応容器の側面に対して窒素ガスをパイプ供給することを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

20

【請求項 8 0】

前記接触が、前記組成物中にスパージストーンを浸すことを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記接触が、窒素ガスを前記組成物に約 30 分間導入することを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記接触が、窒素ガスを前記組成物に約 1 分間 ~ 約 30 分間導入することを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

30

【請求項 8 3】

前記接触が閉鎖反応容器内で行われる、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記接触が開放反応容器内で行われ、硫化水素が前記組成物から放出される、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記接触が、前記組成物を含有する容器を前記窒素ガスでスパージすることを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記接触が、tween 及び消泡剤のうちの少なくとも一方の存在下で行われる、請求項 7 1 に記載の方法。

40

【請求項 8 7】

前記 tween が、Tween - 20 及び Tween - 80 のうちの少なくとも一方である、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記消泡剤が、Antifoam - A、Antifoam - C、及びポロキサマーのうちの少なくとも 1 つである、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記抗体が抗体断片である、請求項 7 1 に記載の方法。

50

【請求項 90】

前記抗体断片が抗原結合抗体断片である、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

前記抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab)₂、Fv断片、ダイアボディ、一本鎖抗体、scFv断片、またはscFv-Fcである、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 92】

前記抗体がIgG抗体である、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 93】

前記抗体がヒトモノクローナル抗体である、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 94】

前記抗体がヒト免疫グロブリン定常領域を含む、請求項 71 に記載の方法。

10

【請求項 95】

前記抗体がヒトIgG定常領域を含む、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 96】

前記IgG定常領域のアイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4である、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

前記IgG定常領域の前記アイソタイプがIgG1である、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 98】

前記抗体中のスルフィド結合が、抗体重鎖と抗体軽鎖との間、または抗体重鎖間、または抗体重鎖と軽鎖抗体との間及び抗体重鎖間の両方に存在する、請求項 71 に記載の方法。

20

【請求項 99】

前記抗体が軽鎖定常ドメインを含む、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 100】

前記軽鎖定常ドメインがカッパ定常ドメインである、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

前記抗体が、重鎖を連結するヒンジ領域内に2つのスルフィド結合、ならびに軽鎖と重鎖との間に各々1つのスルフィド結合を含む4つの鎖間スルフィド結合を有するIgG1モノクローナル抗体である、請求項 71 に記載の方法。

30

【請求項 102】

前記還元ステップが鎖間ジスルフィド結合のみを還元し、鎖内結合は還元しない、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 103】

前記オースタチンがMMAEまたはMMAFである、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 104】

前記抗体-薬物コンジュゲートが、前記抗体の少なくとも1つのチオール基をオースタチンまたはその誘導体に連結するように適合されたリンカー部分を含む、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 105】

前記リンカー部分が、切断可能なリンカーである、請求項 104 に記載の方法。

40

【請求項 106】

前記リンカー部分が、切断不可能なリンカーである、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 107】

前記リンカー部分が、細胞内条件下で切断されやすいリンカーである、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 108】

前記リンカー部分が、細胞内プロテアーゼによって切断可能なペプチドリinkerである、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 109】

50

前記細胞内プロテアーゼが、リソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼである、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

前記リンカー部分が、ジペプチドリinkerである、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 111】

前記ジペプチドリinkerが、バリン - シトルリン (val - cit) またはフェニルアラニン - リジン (phe - lys) リinkerである、請求項 110 に記載の方法。

【請求項 112】

前記ジペプチドリinkerが、遊離チオールと反応して共有結合を形成するマレイミド官能基である、請求項 110 に記載の方法。

10

【請求項 113】

前記オーリスタチンの二量体またはその誘導体が、前記コンジュゲートステップで形成され、前記方法が、前記ADCを前記二量体から分離して、精製されたADCを形成することをさらに含む、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 114】

前記抗体 - 薬物コンジュゲートが、aCD22 - val - cit - MMAE、aCD22 - val - cit - MMAF、aLy6E - val - cit - MMAE、aLy6E - val - cit - MMAF、aCD79b - val - cit - MMAE、aCD79b - val - cit - MMAF、aNaPi2b - val - cit - MMAE、aNaPi2b - val - cit - MMAF、aMUC16 - val - cit - MMAE、aMUC16 - val - cit - MMAF、aSTEAP1、及びaETBRのうちの1つである、請求項 71 に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願データ

本出願は、参照により本明細書に組み込まれる、2014年7月24日出願の米国仮特許出願第62/028,679号に対する優先権の利益を主張するものである。本開示で言及される出願及び特許の各々、ならびにそれらの出願及び特許の各々で引用される各文献または参考文献（各発行された特許の遂行中を含む、「出願引用文献」）、ならびにこれらの出願及び特許のうちのいずれかに対応し、かつ/またはその優先権を特許請求するPCT及び外国出願または特許の各々、及びそれらの出願引用文献の各々で引用または参照される文献の各々は、参照により明示的に本明細書に組み込まれ、本発明の実施において用いられ得る。より一般的には、文献または参考文献は、特許請求の範囲の前の参考文献一覧表または本文自体のいずれかにおいて本文で引用され、これらの文献または参考文献（「本明細書引用文献」）の各々、ならびにこれらの本明細書引用文献の各々で引用される各文献または参考文献（任意の製造業者の説明書、指示等を含む）は、参照により明示的に本明細書に組み込まれる。

30

【背景技術】

【0002】

組換えタンパク質は、様々な疾患の治療に用いられる治療的化合物の重要な部類になっている。バイオテクノロジーの分野における近年の成功により、大量のかかるタンパク質を産生する能力が改善されている。しかしながら、これらの産物の広範囲に及ぶ特徴付けにより、これらのタンパク質がかなりの不均一性を伴うことが実証されている。例えば、分子の不均一性は、酸化、脱アミド化、及び糖化等の化学的に誘導された修飾、ならびにタンパク質分解成熟、タンパク質折り畳み、グリコシル化、リン酸化、及びジスルフィド結合形成等の翻訳後修飾に起因し得る。分子の不均一性は、治療薬が一連の洗練された分析技法によって広範囲にわたって特徴付けられなければならない、かつ製品の品質及び一貫性を確実にする許容基準を満たさなければならないため、望ましくない。

40

【0003】

50

抗体（または免疫グロブリン）は、それらが巨大な多鎖分子であるという事実により、かかる構造的不均一性を特に伴いやすい。例えば、IgG抗体は、4つのポリペプチド鎖：2つの軽鎖ポリペプチド（L）及び2つの重鎖ポリペプチド（H）から成る。これらの4つの鎖は、典型的には、これらの重鎖及び軽鎖に存在するシステイン残基間に生じるジスルフィド結合によって連結されている。これらのジスルフィド連結が天然H₂L₂四量体の全体構造を支配している。全体として、IgG1抗体は、H鎖を連結する2つのヒンジ領域ジスルフィド、ならびに重鎖H鎖とL鎖との間の各々1つのジスルフィド結合を含む4つの鎖間ジスルフィド結合を含む。

【0004】

抗体-薬物コンジュゲート（ADC）は、抗体の生物学的特異性を強力な特定の治療的化合物と組み合わせる、強力な薬物分子に結合したモノクローナル抗体（mAb）である。リジンまたはシステイン指向性リンカー化学を使用して、薬物化合物を抗体に結合することができる（Wu, A.M., Nat. Biotechnol. 23: 1137-46 (2005)）。システイン指向性化学を使用して、薬物は、鎖間ジスルフィド結合の還元によって得られた天然システインまたは特異的に操作されたシステインのいずれかに連結し得る。化学量論的に、1つの還元されたジスルフィド結合が、薬物コンジュゲーションのために2つの遊離チオールを曝露すべきである。コンジュゲーションがIgG1分子の鎖間システインに対する場合、結果として生じるコンジュゲートは、1抗体分子当たり0、2、4、6、または8つの薬物を有する種を主に含有する混合物から成る。1抗体当たりコンジュゲートされる薬物分子の平均数（薬物抗体比、「DAR」）は、平均DARが1用量当たり送達される薬物の量を反映するため、ADC産物の重要な品質属性であり、それ故に、ADCの安全性のみならず有効性にも影響を及ぼし得る。不完全なジスルフィド結合形成、または酸化若しくはペータ排除による結合破損に続くジスルフィドスクランプリングはすべて、抗体の不均一性の発生源である可能性がある。さらに、ヒトIgG2抗体の鎖間ヒンジ領域結合内でのトリスルフィド結合形成が報告されている（Prisnitsky et al, Anal. Chem. 81: 6148 (2009)、Guet al, Anal. Biochem. 400: 89-98 (2010)）。トリスルフィド結合は、余分な硫黄原子がその分子内に「トリスルフィド架橋」（-CH₂-S-S-S-CH₂-）を形成したときに生じ、ADC産生中にさらなる一貫性及び汚染問題を引き起こし得る。

【0005】

トリスルフィド連結は、スーパーオキシドジスムターゼ（Okado-Matsumoto et al., Free Radical Bio. Med. 41: 1837 (2006)）、インターロイキン-6の切断形態（Breton et al., J. Chromatog. 709: 135 (1995)）、及び細菌で発現されたヒト成長ホルモン（hGH）（Canova-Davis et al., Anal. Chem. 68: 4044 (1996)）で以前に検出されている。ジスルフィド結合を含む他のポリペプチド、例えば、インスリン、インターロイキン、及びある特定の凝固因子（第VII因子等）も、トリスルフィド誘導体を形成する可能性があり得る。

【0006】

hGHの場合、トリスルフィド形成が発酵プロセス中に放出されたH₂Sによって促進され（PCT特許出願第WO96/02570号）、hGHのトリスルフィド含有量が溶液中でのH₂Sへの曝露によって増加した（米国特許第7,232,894号）ことが推測された。hGHのトリスルフィド誘導体も、大腸菌での発現中に形成された組換えhGHにおいて説明されている（Andersson et al., Int. J. Peptide Protein Res. 47: 311-321 (1996)、A. Jespersen et al., Eur. J. Biochem. 219: 365-373 (1994)）。

【0007】

PCT公開第WO96/02570号は、hGHトリスルフィド誘導体を、亜硫酸塩化

10

20

30

40

50

合物、例えば、亜硫酸ナトリウム、亜硫酸カリウム、若しくは亜硫酸アンモニウム、またはアルカリ土類金属亜硫酸塩、例えば、亜硫酸マグネシウム若しくは亜硫酸カルシウムで処理することによって、hGHトリスルフィド誘導体をhGHの天然形態に戻し変換するための別の方法を記載している。

【0008】

PCT公開第WO00/02900号は、発酵ステップ中または発酵ステップ後の金属塩（例えば、カリウム塩またはナトリウム塩）の添加を特徴とする、少量のトリスルフィドを用いて組換えペプチドを産生するための方法を記載している。

【0009】

PCT公開第WO04/31213号は、遺伝子改変された宿主細胞における「成長ホルモンアンタゴニストポリペプチド」の組換え産生において産生されたトリスルフィドアイソフォーム不純物の量を減少させるための方法を開示しており、この不純物を、「メルカプト化合物」（亜硫酸塩、グルタチオン、 γ -メルカプト-エタノール、ジチオスレイトール、システイン等）と接触させる。この出願は、形成されたトリスルフィドの量の低減を達成するためにキレート剤または金属塩の使用も開示している。

【0010】

残念ながら、溶液中での、または発酵プロセス中の、システイン、メルカプト化合物、亜硫酸塩化合物、金属塩等への曝露によるトリスルフィド結合の除去は、特に大規模処理においていくつかの不利点を有する。例えば、これらの化合物が大量に必要とされる。さらに、これらの化学物質の多くが既知の毒性を有するため、かかる方法は、トリスルフィド結合が除去された後にタンパク質から化学物質を除去するさらなる処理ステップ（複数可）も必要とし、別の潜在的な不純物源及びプロセス変動性を導入する。加えて、溶液中でのかかる化学物質への曝露によるトリスルフィド結合の除去は、望ましくないジスルフィド連結の形成による凝集を促進し得る。

【0011】

したがって、組換えタンパク質の製造（抗体及びADCの産生を含む）において使用される産生及び精製手順中にトリスルフィド結合の存在によって引き起こされる変動性及び汚染に対処するために、かかる変動性及び/または不純物を低減または排除するための効果的かつ改善された手段が、本明細書に開示される方法によって提供される。

【発明の概要】

【0012】

全鎖間ジスルフィド結合の画分を還元することによって、鎖間システイン連結を伴う抗体-薬物コンジュゲート（ADC）が生成される。その後、新たに利用可能になった遊離チオールが、薬物分子とコンジュゲートされる（この分子は、多くの場合、すでにより大きいリンカー-薬物中間体の一部である）。部分的還元が非変性条件下で行われると、鎖内ジスルフィド結合に關与するシステインへの連結は、典型的には観察されない。チオール反応性部分（マレイミド等）を含有するリンカー-薬物が過剰に添加されて、すべての利用可能な遊離チオールのコンジュゲーションを確実にする。トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）は、その好ましい反応速度、反応前の溶液安定性により、及びそれが抗体チオールと混合ジスルフィドを形成することができないという理由により、これらのプロセスにおいて好ましい還元剤である。TCEPの1つの分子が1つのジスルフィド結合を還元すると予想されており、薬物コンジュゲーションのために2つの遊離チオールを曝露する。1モル当量のTCEP（ $1.0 \times \text{TCEP} : \text{mAb}$ ）での還元後、予想される平均DAR値は2.0である。同様に、目標とする平均DAR値4.0を達成するために、2モル当量（ $2.0 \times \text{TCEP} : \text{mAb}$ ）の予測TCEP添加が必要であろう。実際には、この還元ステップは、所定のTCEP：抗体（TCEP：mAb）モル比を使用して行われる。

【0013】

複数のシステイン指向性ADC産物の開発中に、平均DAR値の理論的予測からの偏差が観察され、報告されている（Cumnock, et al. Bioc conjugate

10

20

30

40

50

Chem. 24 : 1154 - 60 (2013))。これらの場合、還元剤と抗体の必要な比率は、所与のロットの抗体では再生可能であるが、抗体間、ならびに同じ抗体の異なるロット間で異なった。いくつかの抗体ロットは理論的予測に非常に近い量のTCPEPを必要としたが、ほとんどのロットは、目標とする平均DAR値を達成するために増大したTCPEP : mAbモル比を必要とした。トリスルフィド結合の存在が、ADCの製造中に観察されたこの変動性の潜在的な源として特定された。トリスルフィドが、これらのADCの製造中に観察されたTCPEP : mAb比変動性源である可能性があると特定された。

【0014】

さらに、逆相HPLC分析により、コンジュゲートされたADCを含有するいくつかの組成物中で予想外の不純物が特定された。ADC及び不純物の調査により、それらの抗体中に存在するトリスルフィド結合の還元の結果として抗体と薬物分子との間のコンジュゲーション反応に存在する反応性スルフィド部分が、これらの組成物中の不純物であると判明した遊離薬物二量体の形成に参与したことが示された。

10

【0015】

これらの抗体を産生するために使用される確立及び認定された組換え技法を修正するのではなく、本発明者らは、還元及び/またはコンジュゲーション反応中にこれらの組成物から反応性スルフィド種を低減または排除することによって、トリスルフィド結合を含む組換えタンパク質の還元において生じる遊離薬物二量体（及び他の不純物）の形成を低減する方法を開発した。

【0016】

20

したがって、一態様では、本発明は、単離されたタンパク質中の少なくとも1つのスルフィド結合を還元して、反応性スルフィド及び少なくとも1つのチオール基を含有する還元されたタンパク質を含む組成物を形成することと、結果として生じる組成物中の反応性スルフィドの含有量を減少させることと、を含む、薬剤の、少なくとも1つのジスルフィド結合及び少なくとも1つのトリスルフィド結合を含むタンパク質中のチオール部分へのコンジュゲーション方法を提供する。その後、薬剤が、還元されたタンパク質の少なくとも1つのチオール基にコンジュゲートされて、タンパク質 - 薬剤コンジュゲートを形成する。

【0017】

少なくとも1つのスルフィド結合を還元するステップは、単離されたタンパク質の還元剤との接触による少なくとも1つのスルフィド結合の少なくとも部分的な還元を含み得る。

30

【0018】

単離されたタンパク質は、少なくとも4つのジスルフィド結合を含み得る。

【0019】

単離されたタンパク質は、少なくとも2つのトリスルフィド結合も含み得る。

【0020】

還元ステップ前に、単離されたタンパク質中のスルフィド結合の約1%～約20%がトリスルフィド結合である。還元ステップ前に、単離されたタンパク質中のスルフィド結合の約5%～約7%がトリスルフィド結合であり得る。

40

【0021】

この還元ステップは、非変性条件下で行われ得る。これらの反応において、還元剤は、ジチオスレイトール(DTT)、ベータ-メルカプトエタノール(ME)、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、システイン、L-システイン、還元グルタチオン(GSH)、及びL-GSHのうち少なくとも1つであり得る。この還元剤はTCEPであり得、TCEPは、単離されたタンパク質に対するTCEPの所定のモル比で単離されたタンパク質と混合され得る。単離されたタンパク質に対するTCEPの所定のモル比は、TCEPのモル過剰であり得る。

【0022】

タンパク質中の少なくとも1つのスルフィド結合を還元するステップは、単離されたタ

50

ンパク質を、約 0.1 ~ 約 8 mM、約 0.1 ~ 約 5 mM、約 0.1 ~ 約 3 mM、約 0.1 ~ 約 1 mM、約 8 mM、約 5 mM、約 3 mM、約 1 mM、及び約 0.5 mM の濃度の化学的還元剤と接触させることを含む。

【 0 0 2 3 】

タンパク質中の少なくとも 1 つのスルフィド結合を還元するステップは、約 5.0 ~ 約 8.0、約 5.5 ~ 約 7.5、約 5.5、または約 6.5 の pH で行われ得る。

【 0 0 2 4 】

還元ステップ前に、単離されたタンパク質の pH が約 5.0 ~ 約 8.0 の pH に調整され得る。

【 0 0 2 5 】

好ましくは、タンパク質中のトリスルフィド結合の約 100% が還元される。

【 0 0 2 6 】

還元ステップ後に、単離されたタンパク質 1 モル還元につき約 4 ~ 約 8 モルのチオール部分が、薬剤とのコンジュゲーションに利用可能であり得る。

【 0 0 2 7 】

組成物中の反応性スルフィドを減少させるステップは、組成物の pH を約 5.0 ~ 約 6.0 の pH に調整することを含み得、これは、組成物の pH を約 5.5 の pH に低減することを含み得る。

【 0 0 2 8 】

組成物中の反応性スルフィドを減少させるステップは、組成物から液体媒体を除去することと、液体媒体を代替液体媒体と置き換えることとを含み得る。液体媒体は、緩衝液を含み得る。

【 0 0 2 9 】

組成物中の反応性スルフィドを減少させるステップは、組成物の少なくとも 90% を、反応性スルフィドを欠く代替溶液と置き換える前に、組成物中の還元されたタンパク質を固体支持体と会合させることを含み得る。固体支持体は、濾過膜、選択性透過膜、及びクロマトグラフィー樹脂のうちの少なくとも 1 つを含み得る。

【 0 0 3 0 】

組成物中の反応性スルフィドを減少させるステップは、組成物中の反応性スルフィドの含有量を低減するのに十分な速度で、還元ステップにおける組成物を混合することを含み得る。この混合は、単離されたタンパク質中のスルフィド結合（複数可）の還元にとっての最適混合速度を超える増大した速度で組成物を攪拌することを含み得る。増大した速度でのこの混合は、還元ステップの全反応時間未満の期間にわたって、還元ステップにおける混合速度を増大させることを含み得る。

【 0 0 3 1 】

組成物中の反応性スルフィドを減少させるステップは、溶液を窒素源と接触させることを含み得る。窒素源は、組成物に通気し得る窒素ガスを含み得る。この接触は、組成物を窒素ガス、空気、及びアルゴンガスのうちの少なくとも 1 つでスパージすることも含み得る。この接触は、約 1 分間 ~ 約 240 分間の期間行われ得る。この接触は、約 10 立法センチメートル / 分 ~ 約 60 立法センチメートル / 分の速度で、組成物を窒素ガスでスパージすることも含み得る。この接触は、還元ステップにとっての最適混合速度を少なくとも 200% 超える速度で、組成物を窒素ガスの存在下で混合することも含み得る。

【 0 0 3 2 】

接触ステップは、約 5.0 ~ 約 8.0 の pH で行われ得る。この接触は、約 4 ~ 約 40 の温度で行われ得る。この接触は、約 15 ~ 約 40 の温度でも行われ得る。この接触は、約 20 の温度でも行われ得る。この接触は、約 30 の温度でも行われ得る。組成物の体積に対する表面積の比率は、約 2 であり得る。この接触は、組成物を含有する反応容器の側面に対して窒素ガスをパイプ供給することを含み得る。この接触は、組成物中にスパージストーンを浸すことを含み得、このスパージストーンは、約 1 cm ~ 約 1メートルの直径を有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 3 】

この接触は、還元ステップ中に、還元ステップを行う時間未満の時間にわたって窒素ガスを組成物に導入することを含み得る。この接触ステップは、閉鎖反応容器内で行われ得る。この接触は、反応性スルフィド（複数可）が組成物から放出されるように、開放反応容器内で行われ得る。

【 0 0 3 4 】

この接触は、t w e e n 及び消泡剤のうちの少なくとも一方の存在下で行われる。t w e e n は、T w e e n 2 0 及びT w e e n - 8 0 のうちの少なくとも一方であり得る。消泡剤は、A n t i f o a m - A、A n t i f o a m - C、及びポリエチレンオキシド等のポロキサマーのうちの少なくとも1つであり得る。

10

【 0 0 3 5 】

単離されたタンパク質は、抗体または抗体断片であり得る。この抗体断片は、例えば、F a b、F a b'、F (a b)₂、F v断片、ダイアボディ、一本鎖抗体、s c F v断片、またはs c F v - F c等の抗原結合抗体断片であり得る。

【 0 0 3 6 】

この抗体または抗体断片は、I g G抗体であり得る。この抗体または抗体断片は、ヒトモノクローナル抗体でもあり得る。

【 0 0 3 7 】

この抗体または抗体断片は、ヒト免疫グロブリン定常領域を含み得る。この定常領域は、ヒトI g G定常領域であり得る。特定の実施形態では、I g G定常領域のアイソタイプは、I g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4である。

20

【 0 0 3 8 】

抗体または抗体断片中のスルフィド結合は、抗体重鎖と抗体軽鎖との間、または抗体重鎖間、または抗体重鎖と抗体軽鎖との間及び抗体重鎖間の両方に存在する。この抗体または抗体断片は、軽鎖定常ドメインを含み得る。この軽鎖定常ドメインは、カッパ定常ドメインであり得る。この抗体は、重鎖を連結するヒンジ領域内に2つのスルフィド結合、ならびに軽鎖と重鎖との間に各々1つのスルフィド結合を含む4つの鎖間スルフィド結合を有するI g G 1モノクローナル抗体でもあり得る。

【 0 0 3 9 】

単離されたタンパク質は、抗体であり得、還元ステップは、鎖間ジスルフィド結合のみの還元をもたらし得、鎖内結合の還元はもたらさない。

30

【 0 0 4 0 】

薬剤は、化学療法剤、核酸、サイトカイン、免疫抑制剤、放射性同位体、抗生物質、及び治療抗体から選択される少なくとも1つの治療薬であり得る。薬剤は、オーリスタチン、ピンカルカロイド、ポドフィロトキシン、タキサン、バッカチン誘導体、クリプトフィシン、メイタンシノイド、コンプレタスタチン、及びドラスタチンから選択される少なくとも1つの抗チューブリン剤であり得る。ドラスタチンは、オーリスタチンであり得る。オーリスタチンは、モノメチルオーリスタチンE (M M A E) またはモノメチルオーリスタチンF (M M A F) でもあり得る。

【 0 0 4 1 】

薬剤は、DNA副溝結合剤、DNA副溝アルキル化剤、エンジイン、レキシトロブシン、デュオカルマイシン、タキサン、ピューロマイシン、ドラスタチン、メイタンシノイド、及びピンカルカロイドのうちの少なくとも1つであり得る。

40

【 0 0 4 2 】

薬剤は、還元されたタンパク質の少なくとも1つのチオール基をその薬剤に連結するように適合されたリンカー部分であり得る。このリンカー部分は、切断可能なリンカーまたは切断不可能なリンカーであり得る。このリンカー部分は、細胞内条件下で切断されやすいリンカーであり得る。このリンカー部分は、細胞内プロテアーゼによって切断可能なペプチドリンカーであり得る。このリンカー部分は、ジペプチドリンカーであり得る。ジペプチドリンカーは、バリン - シトルリン (v a l - c i t) またはフェニルアラニン - リ

50

ジン (p h e - l y s) リンカーであり得る。ジペプチドリリンカーは、遊離チオールと反応して共有結合を形成するマレイミド官能基であり得る。

【 0 0 4 3 】

タンパク質 - 薬剤コンジュゲートは、 a C D 2 2 - v a l - c i t - M M A E、 a C D 2 2 - v a l - c i t - M M A F、 a L y 6 E - v a l - c i t - M M A E、 a L y 6 E - v a l - c i t - M M A F、 a C D 7 9 b - v a l - c i t - M M A E、 a C D 7 9 b - v a l - c i t - M M A F、 a N a P i 2 b - v a l - c i t - M M A E、 a N a P i 2 b - v a l - c i t - M M A F、 a M U C 1 6 - v a l - c i t - M M A E、 a M U C 1 6 - v a l - c i t - M M A F、 a S T E A P 1、及び a E T B R のうちの 1 つであり得る。

10

【 0 0 4 4 】

本発明の別の態様は、溶液中で、少なくとも 1 つのトリスルフィド結合を含む少なくとも 1 つの単離された抗体を、約 5 . 5 ~ 約 7 . 5 の pH の T C E P と接触させることと、その溶液を窒素ガスと接触させることとを含む、単離された抗体中のトリスルフィド結合のジスルフィド結合への変換方法を提供する。その後、単離された抗体はオーリスタチンまたはその誘導体にコンジュゲートされて、抗体 - 薬物コンジュゲート (A D C) を形成する。

【 0 0 4 5 】

本開示の方法及び組成物のさらなる実施形態は、少なくとも部分的に以下に続く記述に記載されているか、その記述から理解され得るか、または本開示の方法及び組成物を実施することによって習得され得る。前述の簡単な説明及び以下の発明を実施するための形態は、例示及び説明するためのものであり、特許請求されるように本発明を限定するものではない。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 6 】

【 図 1 】異なる割合のトリスルフィドを含有する m A b 中間体を使用して部分的還元反応及びその後のコンジュゲーション反応を行った後の R P - H P L C による遊離薬物二量体の測定結果を示す。図 1 A は、出発 m A b 中間体中にトリスルフィドを含有しない a C D 7 9 b - v c M M A E (対照) についてのインプロセスコンジュゲーションプールの遊離薬物分析を示し、図 1 B は、出発 m A b 中間体中に約 5 ~ 6 % の測定されたトリスルフィドを含有する a C D 2 2 - v c M M A E についての同じ分析を示す。

30

【 図 2 】薬物コンジュゲーション前の、異なる割合のトリスルフィドを含有する部分的に還元された m A b 中間体の緩衝液交換後の R P - H P L C による遊離薬物二量体の測定結果を示す。図 1 A は、出発 m A b 中間体中にトリスルフィドを含有しない a C D 7 9 b - v c M M A E (対照) についてのインプロセスコンジュゲーションプールの遊離薬物分析を示し、図 1 B は、出発 m A b 中間体中に約 5 ~ 6 % の測定されたトリスルフィドを含有する a C D 2 2 - v c M M A E についての同じ分析を示す。

【 図 3 】異なる割合のトリスルフィドを含有する m A b 中間体の部分的還元中の加速された混合の影響を示す。上の線は、還元中に 7 5 R P M の混合速度を使用した a M U C 1 6 - v c M M A E のインプロセスコンジュゲーションプールの遊離薬物分析を示す (標的混合対照) 。 3 つ目の線は、全還元反応を通して 4 0 0 R P M の混合速度を使用したときの遊離薬物二量体の同じ分析を示す (拘束混合) 。 中間の線は、還元反応の 8 5 分間にわたって 7 5 R P M を使用し、かつ還元反応の最後の 5 分間にわたって 4 0 0 R P M の混合速度を使用した混合速度プロトコルの遊離薬物分析を示す (5 分間の高速混合、合計還元時間 : 9 0 分間) 。 バックグラウンド対照を、製剤緩衝液ブランクの遊離薬物分析である別個の一番下の線に示す。

40

【 図 4 】異なる割合のトリスルフィドを含有する m A b 中間体の部分的還元中の N 2 ガススパーズの影響を示す。部分的還元反応中、窒素ガスを下流コンジュゲーション反応の直前に還元プールに通気させた。図 4 A は、部分的還元反応の最後の 5 分間の N 2 スパーズを伴う (下の線) 及び伴わない (上の線) a C D 2 2 - v c M M A E のインプロセスコン

50

ジュゲーションプールにおける遊離薬物を示す。図4Bは、TCEP部分的還元反応の最後の5分間のN2スパージを伴う(下の線)及び伴わない(上の線)aly6E-vcMMAEのコンジュゲーションプールの遊離薬物分析を示す。

【発明を実施するための形態】

【0047】

本発明の代表的な実施形態についてこれから詳細に言及する。本発明が列举される実施形態とともに説明されているが、本発明がそれらの実施形態に限定されるようには意図されていないことが理解されよう。それとは逆に、本発明は、特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内に包含され得るすべての代替案、修正、及び等価物を網羅するよう意図されている。

10

【0048】

当業者であれば、本発明の実施に使用することができ、かつその範囲内である本明細書に記載のものと同様または同等の多くの方法及び材料を認識するであろう。本発明は、記載の方法及び材料に決して限定されない。

【0049】

定義

【0050】

別途定義されない限り、本明細書で使用される専門用語及び科学用語は、本発明が属する当業者が一般に理解する意味と同じ意味を有するものとする。本明細書に記載のものと同様または同等のいずれの方法、デバイス、及び材料も本発明の実施または試験に使用

20

【0051】

添付の特許請求の範囲を含む本出願で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、別途文脈が明確に指示しない限り、複数参照を含み、「少なくとも1つ」及び「1つ以上」と同義に使用される。したがって、「ポリヌクレオチド(poly nucleotide)」という言及は、複数のポリヌクレオチドまたは遺伝子を含むといった具合である。

【0052】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、数値が関連する品目の基本的な機能が変化しないような数値のわずかな変更または変動を表す。

30

【0053】

本明細書で使用される場合、「comprises」、「comprising」、「includes」、「including」、「contains」、「containing」、及びそれらの任意の変形は、ある要素または要素の一覧を備える、含む、または含有するプロセス、方法、プロセスによる産物、または組成物が、それらの要素のみならず、明確に列記されていないか、またはかかるプロセス、方法、プロセスによる産物、若しくは組成物に内在する他の要素も含み得るように、非排他的な包含を網羅するよう意図されている。

【0054】

本明細書における任意の数値範囲(例えば、投薬量範囲)への言及は、その範囲に包含される各数値(分数及び整数を含む)を明確に含む。例えば、本明細書における「x未満」の範囲への言及(ここで、xは特定の数である)は、整数x-1、x-2、x-3、x-4、x-5、x-6等、及び分数x-0.1、x-0.2、x-0.3、x-0.4、x-0.5、x-0.6等を含む。さらに別の实例では、本明細書における「x~y」の範囲への言及(ここで、xは特定の数であり、yは特定の数である)は、各整数x、x+1、x+2...~y-2、y-1、y、ならびにx+0.1、x+0.2、x+0.3...~y-0.2、y-0.1等の各分数を含む。別の例では、「少なくとも95%」という用語は、例えば、95%、96%、97%、98%、99%、及び100%等を含む、95%~100%の各数値(分数及び整数を含む)を含む。

40

【0055】

50

「治療」薬とは、個体における所望の治療応答をもたらすのに有効な化合物または組成物を意味する。

【0056】

本発明の方法における使用に好適なタンパク質には、天然または合成（すなわち、組換え）起源のタンパク質が含まれ、本発明による方法は、任意の源、例えば、植物または動物から抽出されたタンパク質に適用され得る。これらのタンパク質は、上で定義される治療用タンパク質であり得、通常、1つ以上のジスルフィド結合及び1つ以上のトリスルフィド結合を含む。例示のタンパク質は、スーパーオキシドジスムターゼ、インターロイキン、成長ホルモン、及び抗体または抗体断片を含む。

【0057】

反応性スルフィドは、硫化水素（ H_2S ）ならびに/またはその脱プロトン化形態（すなわち、 HS^- 及び/若しくは S_2^{2-} ）を含み得る。

【0058】

「トリスルフィド結合」は、さらなる硫黄原子のジスルフィド結合への挿入によって生成され、それにより3つの連続した硫黄原子の共有結合がもたらされる。トリスルフィド結合は、タンパク質中のシステイン残基間に生じ得、分子内（すなわち、同じタンパク質中の2つのシステイン間）または分子間（すなわち、別個のタンパク質中の2つのシステイン間）に生じ得る。IgG1抗体等の抗体の場合、2つの分子間ジスルフィド結合が重鎖を一緒に連結し、1つの分子間ジスルフィド結合が重鎖及び軽鎖も各々連結する。同様に、IgG2分子は、重鎖を連結する3つの分子間ジスルフィド結合を含み、IgG3分子は、重鎖を連結する6～16個の分子間ジスルフィド結合を含む。トリスルフィド修飾は、これらのジスルフィド連結のいずれかで生じ得るが、重鎖-重鎖（HH）連結よりも重鎖-軽鎖（HL）連結でより頻繁に生じる。

【0059】

タンパク質中のトリスルフィド結合の化学的還元が反応性スルフィド種を放出し、これにより薬物及びタンパク質二量体または他の望ましくない潜在的に危険な誘導体の形成が誘導され得ると考えられている。多くの場合、トリスルフィド結合の形成を阻止することも、タンパク質中に存在するすべてのトリスルフィド結合を排除することも実現可能ではないが、本発明者らは、コンジュゲーション反応におけるタンパク質還元中に薬物及び/またはタンパク質不純物（すなわち、望ましくない化学反応生成物）の形成を低減または排除することが可能であることを見出した。これらの望ましくない化学反応生成物を低減または排除する方法は、化学反応の液体媒体からの反応性スルフィド種の除去を含む。

【0060】

単離されたタンパク質の還元

【0061】

本発明の方法に有用なジスルフィド結合及びトリスルフィド結合を含むタンパク質は、天然源からの単離（天然に存在するタンパク質の場合）、ポリペプチドをコードする、以前に調製されたDNAの部位特異的（またはオリゴヌクレオチド媒介）変異生成及びカセット変異生成を含み得る組換えタンパク質産生方法を含むが、これらに限定されない様々な方法によって得ることができる。変異生成プロトコル、キット、及び試薬、例えば、QuickChange（商標）Multi Site-Direct Mutagenesis Kit（Stratagene, La Jolla, Calif.）は、市販のものである。

【0062】

これらの単離されたタンパク質は、既知のオリゴペプチド合成方法を使用して化学的に合成され得るか、または組換え技術を使用して調製及び精製され得る。適切なアミノ酸配列またはその部分は、固相技法を使用する直接ペプチド合成によって産生され得る（Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, Calif., Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85

10

20

30

40

50

: 2149 - 2154)。インビトロタンパク質合成は、手動技法を使用して、または自動で行われ得る。自動固相合成は、例えば、t-BOCまたはFmoc保護アミノ酸を用いて、かつ製造業者の指示を使用したApplied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, Calif.)を使用して達成され得る。単離されたタンパク質の様々な部分が別個に化学的に合成され、化学的または酵素的な方法を使用して組み合わせられて、本発明の方法における使用のための所望の単離されたタンパク質を産生することができる。

【0063】

さらに、抗体断片を含むタンパク質断片が、本発明の方法において単離されたタンパク質として使用され得る。従来、抗体断片は、インタクトな抗体のタンパク質分解消化により得られていた (Morimoto et al (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117、及びBrennan et al (1985) Science, 229:81) か、または組換え宿主細胞によって直接産生されていた。Fab、Fab'、(Fab)₂、Fv断片、ダイアボディ、一本鎖抗体、scFv断片、またはscFv-Fc抗体断片はすべて、大腸菌で発現し、それから分泌され、それ故に、大量のこれらの断片の容易な産生を可能にし得る。抗体断片は、抗体ファージライブラリから単離され得る。あるいは、Fab'-SH断片は、大腸菌から直接回収され、化学的に結合されて、(Fab')₂断片を形成することができる (Carter et al (1992) Bio/Technology 10:163-167) か、または組換え宿主細胞培養から直接単離され得る。この抗体は、一本鎖Fv断片 (scFv) であり得る。この抗体断片は、「直鎖抗体」でもあり得る (米国特許第5,641,870号)。かかる直鎖抗体断片は、単一特異的または二重特異的であり得る。この抗体または抗体断片は、IgG抗体であり得る。この抗体は、ヒトモノクローナル抗体であり得る。

【0064】

単離された抗体は、指定され、設計された選択的部位で、抗体が抗体-薬物コンジュゲート (ADC) 化合物等の化合物を薬物分子とコンジュゲートすることを可能にするシステム操作抗体でもあり得る。抗体表面上の反応性システイン残基は、マレイミドまたはハロアセチル等のチオール反応基による薬物部分の特異的コンジュゲーションを可能にする。Cys残基のマレイミド基に対するチオール官能基の求核反応性は、リジン残基のアミノ基またはN末端アミノ基等のタンパク質中のいずれの他のアミノ酸官能基と比較して、約1000倍高い。ヨードアセチル及びマレイミド試薬中のチオール特異的官能基は、アミン基と反応することができるが、典型的には、より高いpH (9.0超) 及びより長い反応時間が必要である (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。

【0065】

ジスルフィド結合及びトリスルフィド結合を含む抗体が使用される実施形態では、抗体は、薬物がコンジュゲートされ得る十分に反応性があるチオール基を形成するために還元され得るスルフィド結合を1つのみまたはいくつかが有し得る。このタンパク質は、重鎖を連結するヒンジ領域内に2つ、ならびにFab領域付近の軽鎖と重鎖との間に各々1つの合計4つの鎖間ジスルフィドを有するIgG1モノクローナル抗体であり得る。各還元された鎖間ジスルフィド結合は、2つの遊離チオールをもたらし、各々薬物とのコンジュゲーションに利用可能である。非変性条件下でのかかる抗体中間体の還元は、典型的には、鎖間ジスルフィド結合のみを還元し、鎖内結合は還元しない。したがって、鎖間ジスルフィド結合の完全な還元により、IgG1抗体中間体1モルにつき合計8モルの遊離チオールがもたらされる。

【0066】

この抗体は、ヒト免疫グロブリン定常領域を有し得る。この抗体または抗体断片は、ヒトIgG定常領域を含み得、IgG定常領域のアイソタイプは、IgG1、IgG2、I

10

20

30

40

50

g G 3、または I g G 4 であり得る。特定の実施形態では、I g G 定常領域のアイソタイプは、I g G 1 である。

【 0 0 6 7 】

この抗体または抗体断片中に存在するスルフィド結合は、抗体重鎖と抗体軽鎖との間、または抗体重鎖間、または抗体重鎖と抗体軽鎖との間及び抗体重鎖間の両方に存在する。この抗体または抗体断片は、軽鎖定常ドメインを含み得る。この軽鎖定常ドメインは、カッパ定常ドメインであり得る。この抗体は、重鎖を連結するヒンジ領域内に2つのスルフィド結合、ならびに軽鎖と重鎖との間に各々1つのスルフィド結合を含む4つの鎖間スルフィド結合を有する I g G 1 モノクローナル抗体であり得る。

【 0 0 6 8 】

典型的には、タンパク質中のスルフィド結合のサブセットのみがトリスルフィド結合として存在する。単離されたタンパク質中のスルフィド結合の約1%~約20%がトリスルフィド結合であり得るか、あるいは、単離されたタンパク質中のスルフィド結合の約1%~約18%、約2%~約16%、約3%~約12%、約4%~約10%、または約5%~約7%がトリスルフィド結合である。単離されたタンパク質中のトリスルフィド結合の少なくとも約80%が還元ステップで還元され得るか、あるいは、単離されたタンパク質中のトリスルフィド結合の少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%が還元ステップで還元される。

【 0 0 6 9 】

抗体を含む単離されたタンパク質は、部分的または完全還元条件下で還元されて、反応性システインチオール基を生成する。還元剤としては、ジチオスレイトール(DTT)、ベータ-メルカプトエタノール(ME)、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、システイン、L-システイン、還元グルタチオン(GSH)、及びL-GSHのうち少なくとも1つが挙げられ得る。抗体がこれらの方法で使用される場合、還元剤は、好ましくは、ジチオスレイトール(DTT)及びトリカルボニルエチルホスフィン(TCEP)のうち的一方または両方であり、還元反応は、非変性条件下で実行される。TCEPは、典型的には、単離されたタンパク質に対するTCEPの所定のモル比で還元反応において使用される。典型的には、TCEPは、単離されたタンパク質に対してモル過剰でこの反応に添加される。TCEPは、約0.1~約8mM、約0.1~約5mM、約0.1~約3mM、約0.1~約1mM、約8mM、約5mM、約3mM、約1mM、または約0.5mMの濃度で還元反応に添加される。単離された抗体の使用時、還元ステップ後に、典型的には、単離されたタンパク質1モル還元につき約4~約8モルのチオール部分が、薬剤とのコンジュゲーションに利用可能である。

【 0 0 7 0 】

還元反応は、約pH5~約pH8、または約pH5.5~約pH7.5、または約pH6~約pH7のpH、または約pH5.5、または約pH6.5を含み得る、pH7未満のpHで実行され得る。

【 0 0 7 1 】

還元反応は、少なくとも約5分間、約10分間、約20分間、約30分間、約40分間、約50分間、約60分間、約90分間、約2時間、約3時間、約4時間、または約5時間の期間にわたって行われ得る。還元反応の期間は、約24時間未満、約20時間未満、約12時間未満、または約6時間未満であり得る。還元反応は、約1時間行われる場合もある。

【 0 0 7 2 】

還元反応は、薬剤が連結し得る少なくとも1つのチオール基を有する還元されたタンパク質を含有する組成物の産生をもたらす。さらに、トリスルフィド結合が単離されたタンパク質中に存在した場合、還元ステップ前に、結果として生じる組成物は、反応性スルフィド(複数可)も含有する。

【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

50

還元反応によって產生された組成物中の反応性スルフィドの含有量は、組成物の pH を約 5.0 ~ 約 6.0 の pH 若しくは約 5.2 ~ 約 5.8 の pH に調整することによって、または組成物の pH を約 pH 5.5 の pH に調整することによって減少させることができる。還元反応を弱酸性 pH で行うことにより、還元反応の全体的有効性が低減し得るが、これらの弱酸性反応条件は、組成物中の反応性スルフィドの含有量も低減する。あるいは、組成物の pH は、還元反応が完了した後に、約 7.0 の中性 pH から約 5.0 ~ 約 6.0 の弱酸性 pH に調整され得る。

【0074】

還元反応における pH の選択は、単離されたタンパク質の他の望ましくないその誘導体（例えば、その二量体またはより高位のオリゴマー、その脱アミド化形態、そのスルホキシド化形態等）の形成に対する安定性、沈殿回避等の他の要因にも影響される一方で、組成物中の反応性スルフィドの含有量の産生を最小限に抑えるよう努める。

【0075】

還元反応によって產生された組成物中の反応性スルフィドの含有量は、組成物中の液体のある特定の一部を、実質的に低減した反応性スルフィド含有量を有するか、または反応性スルフィド含有量を有しない新鮮なまたは新たな液体と置き換え、それにより全組成物中の反応性スルフィドの含有量を減らすことによって減少し得る。これは、組成物中の還元されたタンパク質を固体支持体と会合させ、その後、還元されたタンパク質を 1 つ以上の洗浄ステップで洗浄することによって達成され得る。固体支持体と会合した組成物中の還元されたタンパク質は、緩衝液、安定剤、pH 調整剤、タンパク質変性剤等のうちの 1 つ以上を含み得る水性媒体で洗浄され得る。例えば、還元されたタンパク質が固体支持体と会合した後に PBS 洗浄が適用され、それにより還元反応後に組成物中に存在する反応性スルフィド種のいくらかまたはすべてを洗い流すことができる。この洗浄を使用して、例えば、他の不純物を取り除くこともできる。例えば、還元されたタンパク質を含む組成物が固体支持体と会合した後に、高塩濃度緩衝溶液での洗浄を使用して、不純物を取り除くことを促進することもできる。各々異なる液体を含むいくつかの洗浄液を使用することも可能である。例えば、薬物を還元されたタンパク質にコンジュゲートするステップの前に、高塩濃度洗浄を、組成物中に存在する緩衝液を置き換えるか、または組成物の pH を調整するように設計された洗浄と組み合わせることができる。さらにまたはあるいは、還元されたタンパク質が固体支持体と会合した後に洗浄が適用されて、還元反応が完了したと見なされたときに、タンパク質から還元剤を除去することができる。さらにまたはあるいは、別の洗浄、例えば、低塩濃度洗浄を適用して、固体支持体からの還元されたタンパク質の効率的な解離、例えば、溶出を促進することができる。還元されたタンパク質を含有する組成物の少なくとも 90% が、反応性スルフィドを欠く代替溶液と置き換えられ得る。

【0076】

固体支持体は、濾過膜、選択性透過膜、及びクロマトグラフィー樹脂のうちの少なくとも 1 つを含み得る。例示の濾過膜としては、交差流濾過（別名、接線流濾過、TFF）膜または全量濾過膜が挙げられ得る。例示の選択性透過膜としては、透析膜、脱塩膜、及び緩衝液交換膜が挙げられ得る。

【0077】

還元反応によって產生された組成物中の反応性スルフィドの含有量は、還元反応の成分の混合速度を増大させることによって減少する。この増大した混合速度により、ガスが開放反応器ポートを通して放出されるときに反応性スルフィド種が反応から逃げる 것이可能になり得る。

【0078】

これらの還元反応のために、最適混合速度が典型的には確立され、単離されたタンパク質中に存在するトリスルフィド結合及びジスルフィド結合の完全または部分的還元が、薬物分子へのその後のコンジュゲーションに利用可能なチオール部分の平均目標レベルまで経済的かつ効率的に低減される。還元反応中に形成された組成物からの反応性スルフィド

10

20

30

40

50

種の排除を強化するために、混合速度が、還元反応時間のすべてまたは少なくとも一部にわたって増大し得る。例えば、混合速度は、還元反応のために確立された最適混合速度を少なくとも10%、20%、40%、80%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、または550%を超えて増大し得る。別の例として、混合速度は、還元反応のために確立された最適混合速度を2倍、3倍、4倍、または5倍を超えて増大し得る。混合速度は、還元反応が行われる全時間未満にわたって、還元反応のために確立された最適な混合速度を超えて増大し得る。混合速度は、還元反応が行われる時間の後半部分中にのみ増大し得る。例えば、混合速度は、還元反応が行われる時間の後半中にのみ増大し得る。あるいは、混合速度は、還元反応が行われる時間の最後の40%、30%、20%、10%、または5%中にのみ増大し得る。特定の例では、還元反応が90分間行われ、混合速度は、還元反応の最後の5分間にわたって約200%~約500%に増大する。混合速度は、還元反応が行われる最初の時間中にのみ増大する場合もある。例えば、混合速度は、還元反応が行われる時間の前半中にのみ増大し得る。例えば、混合速度は、還元反応が行われる時間の最初の40%、30%、20%、10%、または5%中にのみ増大し得る。特定の例では、還元反応が90分間行われ、混合速度は、還元反応の最初の5分間にわたって約200%~約500%に増大する。

10

【0079】

還元反応によって産生された組成物中の反応性スルフィドの含有量は、窒素源との還元反応中に形成された組成物と接触させることによって減少し得る。

【0080】

窒素源としては、窒素ガス、ならびに空気及び/またはアルゴンガスが挙げられ得る。窒素源としては、「希ガス」(ヘリウム(He)、ネオン(Ne)、アルゴン(Ar)、クリプトン(Kr)、及びキセノン(Xe)等)、とりわけ、ヘリウム及びアルゴンも挙げられ得る。

20

【0081】

還元反応で形成された組成物を窒素源と接触させる方法は、例えば、攪拌若しくは他の混合手段を用いてまたは用いずに、窒素含有ガスを液体組成物に通す(例えば、ガス泡流を媒体に送る)ことによって、または相間のガス拡散が生じ得る大きい液相/ガス相界面を作り出す他の手段によって行われ得る。

【0082】

組成物中の反応性スルフィド種を低減するために調整され得るパラメータは、窒素含有ガスと液体組成物との間の接触期間、窒素含有ガスの液体組成物への導入/通過速度、組成物と窒素含有ガスの混合速度、液体媒体のpH、液体組成物及び/または窒素含有ガスの温度、ガス相と液相との間の接触表面積、ならびに用いられる窒素含有ガスの体積を含む。さらに、窒素含有ガスがスパージストーンを通して導入されて液体組成物と接触し、この場合、スパージストーンの位置及び大きさも、組成物からの反応性窒素種の低減または排除において影響力のあるパラメータである。

30

【0083】

窒素含有ガスと液体組成物との間の接触期間は、好ましくは、組成物中の反応性スルフィド種の存在を低減または排除するのに十分な時間である。これは、例えば、約1分間~約240分間であり得る。窒素含有ガスは、還元反応の全期間にわたって還元反応の組成物と接触し得る。窒素含有ガスは、還元反応が行われる時間の一部にのみわたって還元反応の組成物と接触する場合もある。窒素含有ガスは、還元反応が完了したと見なされたときに、または組成物中の還元剤を除去するための緩衝液交換等の他の手段によって停止されたときに、または組成物に導入された薬剤でクエンチして還元反応を停止することによって、還元反応の組成物と接触する場合もある。窒素含有ガスは、還元反応が行われる時間の最初の部分にわたって還元反応の組成物と接触する場合もある。例えば、窒素含有ガスは、還元反応が行われる時間の最初の40%、30%、20%、10%、または5%にわたって還元反応の組成物と接触する場合もある。窒素含有ガスは、約30分間、約60分間、または約90分間の期間にわたって還元反応の組成物と接触し得る。

40

50

【 0 0 8 4 】

窒素含有ガスの液体組成物への導入または通過速度は、組成物中の反応性スルフィド種の存在を実質的に低減または排除するのに十分な、窒素含有ガスの還元反応の組成物への制御された導入速度を含み得る。窒素含有ガスは、約 1 0 立法センチメートル / 分 ~ 約 6 0 立法センチメートル / 分の速度で、組成物に導入され得る。窒素含有ガスは、約 5 リットル / 時間 ~ 約 3 0 リットル / 時間、約 1 0 L / 時間 ~ 約 2 5 L / 時間、または約 1 5 L / 時間 ~ 約 2 0 L / 時間の速度で、組成物に導入され得る。窒素含有ガスは、約 0 . 2 5 ~ 約 1 (ガス体積 / 液体体積 / 分) の速度で、組成物に導入され得る。

【 0 0 8 5 】

組成物と窒素含有ガスの混合速度は、還元反応の組成物の実質的にすべてを窒素含有ガスと接触させ、それにより組成物中に存在する反応性スルフィド種を実質的に低減または排除するのに十分な混合速度であり得る。組成物を窒素含有ガスと接触させるステップ中の還元反応の混合速度は、還元反応にとっての最適混合速度を少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、1 0 0 %、2 0 0 %、3 0 0 %、または 4 0 0 % 超え得る。組成物を窒素含有ガスと接触させるステップ中の還元反応の混合速度は、還元反応にとっての最適混合速度を約 2 0 0 % 超え得る。

【 0 0 8 6 】

窒素含有ガスが組成物と接触する期間中の還元反応の pH は、還元反応を単離されたタンパク質中に存在するスルフィド結合のいくらかの部分またはすべてを還元する所望の終点に至らせるのに最適な pH 範囲であり得る。この pH 範囲は、組成物の窒素含有ガスとの接触とともに、良好な還元反応収率を維持しながら、組成物中に存在する活性自己種を実質的に低減または排除するように調整され得る。還元反応の pH は、窒素含有ガスが還元反応の組成物と接触する間、約 pH 4 . 0 ~ 約 pH 9 . 0 の pH 範囲内に維持され得る。還元反応の pH は、窒素含有ガスが組成物と接触する間、約 pH 5 . 0 ~ 約 pH 8 . 0 の pH 範囲内に維持される場合もある。還元反応の pH は、窒素含有ガスが組成物と接触する間、約 pH 5 . 0 ~ 約 pH 6 . 0 の弱酸性 pH 範囲内に維持され得る。

【 0 0 8 7 】

還元反応液体組成物及び窒素含有ガスの温度は、還元反応に最適な温度範囲内に維持され得る。この温度範囲は、窒素含有ガスの組成物への導入とともに、還元反応にとって良好な収率を維持しながら、還元反応の組成物中の反応性スルフィド種を実質的に低減または排除するように修正され得る。還元反応の液体組成物の温度は、窒素含有ガスが組成物と接触する時間中約 4 ~ 約 4 0 の温度で維持され得る。還元反応の液体組成物の温度は、約 1 5 ~ 約 4 0 の温度で維持される場合もある。還元反応の液体組成物の温度は、約 2 0 または約 3 0 の温度で維持される場合もある。

【 0 0 8 8 】

窒素含有ガスが反応組成物と接触する時間中の還元反応の反応条件は、窒素含有ガス相と液体反応相との間の接触表面積を、反応組成物中に存在する反応性スルフィド種を実質的に低減または排除する範囲内に維持するように調整され得る。組成物の体積に対する窒素含有ガスの表面積の比率は、約 0 . 1 ~ 約 3 である。組成物の体積に対する窒素含有ガスの表面積の比率は、約 2 であり得る。還元反応の液体組成物に導入される窒素含有ガスの体積は、最適な速度及び液体反応成分の体積に対する表面積の比率を維持して、還元反応の組成物中の反応性スルフィド種を実質的に低減または排除するように制御される。

【 0 0 8 9 】

さらに、規定のサイズ of ガス泡を発生させるデバイスを通して窒素含有ガスが制御可能に導入されて還元反応の液体組成物と接触し得る。例えば、窒素含有ガスは、空気若しくは「スパージ」ストーンまたは穿孔濾過ディスクを通して導入され得る。不活性金属スパージストーンは、繰り返し使用されても良く、酸 / 塩基洗浄によって取り除かれても良く、オートクレーブによって滅菌されても良い。スパージストーンは、形成されたガス泡を反応流体上に直接浮上させるような方法で、還元反応の流体組成物中に垂直に配向される。スパージストーンは、約 2 ミクロンの穴を有するステンレス鋼スパージストーンであ

10

20

30

40

50

り得る。スパージストーンは、直径1mm未満の気泡を最大5L/分の流速で発生させる細孔を有し得る。この流速は、スパージストーンの上流に設置された質量流量コントローラによって制御され得る。

【0090】

ある特定の流速及びある特定の混合条件下での窒素含有ガスの導入により、還元反応の組成物中に泡が作り出される場合があり、これにより還元反応の効率及び/または程度が低減され得る。したがって、窒素含有ガスが還元反応に導入される場合、この反応は、tween及び/または消泡剤の存在下で行われ得る。還元反応は、Tween-20及びTween-80のうちの少なくとも一方であるtweenの存在下で行われ得る。還元反応は、Antifoam-A、Antifoam-C、及びポリエチレンオキシド等のポロキサマーのうちの少なくとも1つである消泡剤の存在下でも行われ得る。

10

【0091】

還元されたタンパク質のコンジュゲーション

【0092】

タンパク質にコンジュゲートされるべき治療薬は、リンカーを介して、還元されたタンパク質のアミノ酸側鎖、または活性化アミノ酸側鎖、またはタンパク質中の操作されたシステイン等と間接的にコンジュゲートされ得る。例えば、部分的に還元された抗体は、ビオチンとコンジュゲートされ得、薬剤は、アビジンまたはストレプトアビジンとコンジュゲートされ得るか、またはその逆も可能であり得る。ビオチンは、ストレプトアビジンに選択的に結合し、それ故に、この薬剤は、この間接的方法で、抗体とコンジュゲートされ得る。

20

【0093】

薬物リンカー部分及びコンジュゲーション法は、参照により本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2004/010957号、米国特許第7,659,241号、同第7,829,531号、及び同第7,851,437号に開示されている。

【0094】

本発明の方法によって産生された部分的に還元された抗体は、例えばポリマー等のそれらの循環半減期を延長させ得る薬剤への共有コンジュゲーションによって化学的に修飾される場合もある。例示のポリマー及びそれらをペプチドに結合させる方法は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,766,106号、同第4,179,337号、同第4,495,285号、及び同第4,609,546号で例証されている。これらのポリマーは、ポリオキシエチル化ポリオール及びポリエチレングリコール(PEG)(例えば、約2,000~約20,000等の約1,000~約40,000の分子量を有するPEG)を含み得る。

30

【0095】

薬剤は、化学療法剤、核酸、サイトカイン、免疫抑制剤、放射性同位体、抗生物質、及び治療抗体から選択される治療薬であり得る。治療薬は、化学療法剤であり得る。化学療法剤は、オーリスタチン、ピンカアルカロイド、ポドフィロトキシン、タキサン、パッカチン誘導体、クリプトフィシン、メイタンシノイド、コンプレタスタチン、及びドラスタチンから選択される少なくとも1つの抗チューブリン剤であり得る。化学療法剤は、オーリスタチン、DNA副溝結合剤、DNA副溝アルキル化剤、エンジイン、レキシトロブシン、デュオカルマイシン、タキサン、ピューロマイシン、ドラスタチン、メイタンシノイド、及びピンカアルカロイドのうちの少なくとも1つであり得る。化学療法剤は、ドラスタチン、具体的には、オーリスタチン、特定の例では、モノメチルオーリスタチンE(MMAE)またはモノメチルオーリスタチンF(MMAF)であり得る。

40

【0096】

還元されたタンパク質の少なくとも1つのチオール基にコンジュゲートされる薬剤は、抗体薬物コンジュゲート(ADC)を形成し得、それ故に、抗体及び薬物の両方を含み、これらはリンカーを介して互いにコンジュゲートされ得る。

【0097】

50

本発明の方法によるADCの形成時の薬物の還元された抗体へのコンジュゲーションにおける使用に好適なリンカーとしては、リンカーの切断により薬物単位が細胞内環境下で抗体から放出されるように細胞内条件下で切断可能なリンカーが挙げられる。あるいは、このリンカーは、切断不可能である場合があり、薬物は、例えば、抗体分解によって放出される。あるいは、このリンカーは、細胞内環境下（例えば、リソソームまたはエンドソーム内）に存在する切断剤によって切断可能である。したがって、このリンカーは、リソソームまたはエンドソームプロテアーゼを含むが、これらに限定されない細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素によって切断されるペプチジルリンカーであり得る。ペプチジルリンカーは、少なくとも2アミノ酸長または少なくとも3アミノ酸長であり得る。切断剤は、カテプシンB及びDならびにプラスミンを含み得、これらのすべてがジペプチド薬物誘導体を加水分解して、標的細胞内での活性薬物の放出をもたらすことが知られている（例えば、Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123を参照のこと）。細胞内プロテアーゼによって切断可能なペプチジルリンカーは、Val-Cit（バリン-シトルリン）リンカーまたはPhe-Lys（フェニルアラニン-リジン）リンカーであり得る（例えば、ドキシルピシンと、Val-Citリンカー及びPhe-Lysリンカーの異なる例の合成について説明する、米国特許第6,214,345号を参照のこと）。このリンカーは、遊離チオールと反応して共有結合を形成するマレイミド官能基であり得る。

10

【0098】

薬剤を還元されたタンパク質の少なくとも1つのチオール基にコンジュゲートするステップを使用して、抗癌治療薬を抗体にコンジュゲートして、aCD22-val-cit-MMAE、aCD22-val-cit-MMAF、aLy6E-val-cit-MMAE、aLy6E-val-cit-MMAF、aCD79b-val-cit-MMAE、aCD79b-val-cit-MMAF、aNaPi2b-val-cit-MMAE、aNaPi2b-val-cit-MMAF、aMUC16-val-cit-MMAE、MUC16-val-cit-MMAF、sSTEAP1、及びaETBRのうちの少なくとも1つを形成することができる。

20

【0099】

本発明の方法の例示の一実施形態は、溶液中で、少なくとも1つのトリルスフィド結合及び少なくとも1つのジルスフィド結合を含む少なくとも1つの単離された抗体を、約pH5.5～約pH7.5のpHのTCEPと接触させることと、この溶液を窒素ガスと接触させることと、オーリスタチンまたはその誘導体を還元された抗体にコンジュゲートして、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)を形成することとによる、単離された抗体中のトリルスフィド結合のジルスフィド結合への変換方法を提供する。

30

【実施例】

【0100】

以下の実施例は、例証目的のためのみに提供されており、本発明の範囲を限定するようには意図されていない。

【0101】

実施例1

40

【0102】

この実施例は、様々なトリルスフィド含有量を含む抗体（抗CD79bまたは抗CD22）の還元、及びVal-Cit（バリン-シトルリン）リンカーを介した抗癌ドラスタチン（MMAE）へのそのコンジュゲーション中の薬物二量体の形成について説明する。これらのデータは、薬物二量体形成がこのモデル系中のmAbバルク中間体のトリルスフィド含有量に関連していることを実証する。

【0103】

TCEPを使用して異なる割合のトリルスフィド結合を含むmAb中間体（抗CD79bまたは抗CD22）を部分的に還元し、その後のコンジュゲーション反応を薬物-リンカーvcMMAEで行った。

50

【0104】

コンジュゲートされていないmAb(5g/L超)をpH5.5~7.5のpHに調整した。タンパク質濃度の決定後、所定のTCEP:mAb比(水中TCEPの10mMストック溶液から)を使用して、pH調整した試料を室温で90分間の目標還元時間にわたって還元した。過剰な所望のマレイミド含有リンカー-薬物を使用して、部分的に還元されたmAbを即座にコンジュゲートした。未反応リンカー-薬物を過剰なN-アセチルシステイン(NAC):リンカー-薬物比(水中NACの10mMストック溶液から)でクエンチし、pHを製剤pH条件と一致するように調整した。必要に応じて、コンジュゲートされた試料を製剤緩衝液に緩衝液交換して、その後の試料分析を妨害する可能性のあり得る残留溶媒及び遊離薬物種を除去した。還元及びコンジュゲートされた組成物中の遊離薬物の含有量をRP-HPLCによって分析した。

10

【0105】

図1Aに示されるように、いかなる薬物二量体も、出発mAb中にトリスルフィドを含有しないバルクmAb供給原料から形成されたaCD79b-vcMMAEコンジュゲートについてのインプロセスコンジュゲーションプールのRP-HPLC分析からは検出されていない。図1Bに示されるように、出発mAb中間体中に約5~6%の測定されたトリスルフィドを含有するaCD22-vcMMAEについてのインプロセスコンジュゲーションプールの分析中に薬物二量体(vcMMAE二量体)が検出されている。

【0106】

実施例2

20

【0107】

この実施例は、その後のコンジュゲーション反応における薬物二量体の形成を低減または排除する手段として部分的に還元されたタンパク質の還元後の緩衝液交換の分析について説明する。これらのデータは、vcMMAEコンジュゲーション前の部分的に還元されたmAb中間体の緩衝液交換がこのモデル系における薬物二量体の形成を低減することを実証する。

【0108】

実施例1に記載のTCEPを使用した部分的還元後、遠心分離緩衝液交換デバイス(CENTRICON(商標))を使用して、還元されたタンパク質プールを緩衝液交換した。Centriconを使用した緩衝液交換中、水(緩衝液)及び低分子量溶質の両方を名目分子量カットオフ膜フィルターに通過させ、もう一方の側(濾液)に収集する。還元されたタンパク質が膜の試料側(保持液)に残り、ここで、膜を横断して水を反対側に移動させたときにそれをより小さい体積に濃縮する。10~30kDaの名目分子量カットオフを有するCentricon遠心分離濾過デバイスを製造業者の指示に従って使用した。実施例1に記載のTCEP(約1~3mL)で部分的に還元されたタンパク質を単一のCentriconデバイスに添加し、10mM Tris(pH7.5)で希釈して、デバイス中10mLの最終体積にした。Centriconデバイスを4500gで20分間遠心分離した。緩衝液交換されたタンパク質の回収前に、10mLの10mM Tris(pH7.5)にさらに2回通過させて、Centriconデバイスの保持液試料をさらに緩衝液交換した。緩衝液交換された部分的に還元されたタンパク質をCentriconデバイスから回収し、その後の下流コンジュゲーションで使用した。

30

40

【0109】

緩衝液交換後、部分的に還元されたmAb中間体をvcMMAEとコンジュゲートし、遊離薬物二量体の含有量を実施例1に記載されるようにRP-HPLCによって測定した。図2Aに示されるように、aCD79b-vcMMAE抗体-薬物コンジュゲート(ADC)についてのインプロセスコンジュゲーションプールのRP-HPLC分析は、遊離薬物二量体(vcMMAE二量体)の形成をもたらす。しかしながら、図2Bに示されるように、部分的に還元されたmAbタンパク質中間体の緩衝液交換後に、同じaCD22-vcMMAE ADCについてのインプロセスコンジュゲーションプールのRP-HPLC分析中に遊離薬物二量体は検出されていない。

50

【 0 1 1 0 】

実施例 3

【 0 1 1 1 】

この実施例は、その後のコンジュゲーション反応における薬物二量体の形成を低減または排除する手段としてタンパク質の部分的還元中の増大した反応混合速度の分析について説明する。これらのデータは、v c M M A E コンジュゲーション前に m A b 中間体の還元反応時間の少なくとも一部にわたって混合速度を増大させることにより、このモデル系における薬物二量体の形成を低減することができることを実証する。

【 0 1 1 2 】

実施例 1 に記載の T C E P を使用した m A b 中間体 (抗 M U C 1 6) の部分的還元中、オーバーヘッド攪拌装置の混合速度を、 a M U C 1 6 タンパク質の部分的還元最適になるように事前に決定された目標混合速度から増大させた。混合速度を、 1 0 0 m L の反応器内で磁気攪拌棒によって、または 1 0 0 m L の E A S Y M A X (商標) 反応器内でモーター式ガラス攪拌器によって制御した。磁気攪拌棒の混合速度を磁気攪拌プレート上の設定によって決定し、 r p m を手動で調整して、還元中の混合速度を変化させた。 E A S Y M A X のガラス攪拌器を器具ソフトウェアによって制御し、混合速度を添付のソフトウェア上の実験処方における器具タッチパッドまたは所定の設定を用いて手動で変化させた。

10

【 0 1 1 3 】

目標混合パラメータを使用して実施例 1 に記載されるようにコンジュゲーション反応を開始し、実施例 1 に記載されるように R P - H P L C 分析を行った。図 3 を参照して、 R P - H P L C 分析を、バックグラウンド対照 (別個の下の線) として製剤緩衝液ブランク上で行った。

20

【 0 1 1 4 】

9 0 分間の全 T C E P 還元反応 (目標混合対照) を通して 7 5 R P M の混合速度の場合、 a M U C 1 6 - v c M M A E についてのインプロセスコンジュゲーションプールの R P - H P L C 分析は、遊離薬物二量体の形成を示す。

【 0 1 1 5 】

9 0 分間の全 T C E P 還元反応を通して 4 0 0 R P M の混合速度 (高速混合) の場合、 a M U C 1 6 - v c M M A E についてのインプロセスコンジュゲーションプールの R P - H P L C 分析は、遊離薬物二量体が検出されていないことを示す。

30

【 0 1 1 6 】

7 5 R P M 還元での 8 5 分間の T C E P 還元反応の混合、その後、還元反応の最後の 5 分間にわたる混合速度の 4 0 0 R P M への増大を含む組み合わせられた混合速度の場合 (5 分間の高速混合、合計還元時間 : 9 0 分間) 、 a M U C 1 6 - v c M M A E についてのインプロセスコンジュゲーションプールの R P - H P L C 分析は、遊離薬物二量体の形成の実質的な低減を示す。

【 0 1 1 7 】

実施例 4

【 0 1 1 8 】

この実施例は、その後のコンジュゲーション反応における薬物二量体の形成を低減または排除する手段としてタンパク質の部分的還元反応を窒素ガスでスパージする分析について説明する。これらのデータは、v c M M A E コンジュゲーション前に m A b 中間体の還元反応時間の少なくとも一部にわたって反応をスパージすることにより、このモデル系における薬物二量体の形成を低減または排除することができることを実証する。

40

【 0 1 1 9 】

実施例 1 に記載されるように T C E P を使用した 2 つのモデル抗体 (抗 C D 2 2 及び抗 L y 6 E) の部分的還元を行い、 (実施例 1 に記載されるように v c M M A E 薬物を使用して) 窒素ガスを下流コンジュゲーション反応の直前に還元プールに通気させることをさらに含んだ。管類を介して窒素タップに取り付けられたポリプロピレン血清学的ピペットを通して窒素ガスを反応混合物に通気した。反応混合物をスパージする前に、ガス流量計

50

を使用して流速を測定する。流速が判明すると、窒素ガスを反応に追加し、還元中の指定された開始時間までラインをクランプする。所定の終了時間まで反応をスパージし、それらのラインを再クランプし、ピペットを反応器から除去する。実施例 1 に記載されるように、ADC の結果として生じる組成物における RP - HPLC 分析を RP - HPLC を使用して行った。

【 0 1 2 0 】

図 4 A に示されるように、TCEP 部分的還元反応の最後の 5 分間（合計還元時間：90 分間）の N₂ ガススパージを伴う（下の線）及び伴わない（上の線）aCD22 - vcMMAE ADC についてのインプロセスコンジュゲーションプールの RP - HPLC 分析は、窒素スパージにより遊離 vcMMAE 薬物二量体の形成が排除されたことを実証する。同様に、図 4 B に示されるように、TCEP 部分的還元反応の最後の 5 分間（合計還元時間：90 分間）の N₂ ガススパージを伴う（下の線）及び伴わない（上の線）aly6E - vcMMAE ADC についてのインプロセスコンジュゲーションプールの RP - HPLC 分析も、窒素スパージにより遊離 vcMMAE 薬物二量体の形成が排除されたことを実証する。

10

【 0 1 2 1 】

実施例 5

【 0 1 2 2 】

この実施例は、その後のコンジュゲーション反応における薬物二量体の形成を低減または排除する手段としてタンパク質の部分的還元反応を空気でスパージする分析について説明する。

20

【 0 1 2 3 】

約 8 ~ 12 % トリスルフィドを有し、かつ vcMMAE とコンジュゲートされたバルク中間体抗体（抗 MUC16）の 2 つの 21 mL 低減還元（reduction reduction）を、還元剤 TCEP または DTT で行った。還元後、各反応（TCEP 及び DTT）を 3 つのプール、1）窒素ガスでの 5 分間のスパージを受けたプール、2）空気での 5 分間のスパージを受けたプール、及び 3）いずれのガスでのスパージも受けなかった対照反応に分けた。具体的には、85 分間の抗体還元後、TCEP 還元及び DTT 還元抗体プールを各々、2 つの 10 mL 試料（試料 1 ~ 2）及び 1 つの 1 mL 試料（試料 3）に分けた。試料 1 を、下流コンジュゲーションのために薬物を添加する前に窒素で 5 分間スパージした。試料 2 を、下流コンジュゲーションのために薬物を添加する前に空気ですパージした。試料 3（対照）をスパージせず、下流コンジュゲーションのために薬物を添加する前に 5 分間保持した。これらの還元反応後、還元されたタンパク質を vcMMAE とコンジュゲートし、vcMMAE 遊離薬物二量体の存在について RP - HPLC によって分析した。

30

【 0 1 2 4 】

RP - HPLC アッセイを使用して、試料 1 ~ 3 の各コンジュゲーションプールを、遊離薬物二量体の存在、低減、または排除について分析した。図 5 A に示されるように、TCEP で還元した反応の場合、vcMMAE 遊離薬物二量体不純物は、いずれのガスでのスパージも受けなかった対照反応に存在し、窒素ガスでスパージした反応及び空気ですパージした反応の両方では不在であった。

40

【 0 1 2 5 】

同様に、DTT で還元した反応の場合、図 5 B に示されるように、vcMMAE 遊離薬物二量体不純物は、いずれのガスでのスパージも受けなかった対照反応に存在し、窒素ガスでスパージした反応及び空気ですパージした反応の両方では不在であった。これらの反応の曲線下面積データを表 1 に示す。下流コンジュゲーション前の 5 分間の窒素または空気でのスパージが、スパージなしの対照試料に対して、遊離薬物二量体種の形成を排除した。

【 0 1 2 6 】

【表 1】

表 1. 窒素ガスまたは空気スパージ後の遊離薬物二量体の形成

試料		v c MMA E 二量体	
還元剤	スパージ	保持時間 (分)	面積 (mAU×分)
T C E P	窒素	該当なし	0
	空気	該当なし	0
	対照	20.893	0.8947
D T T	窒素	該当なし	0
	空気	該当なし	0
	対照	20.788	5.5087

10

【0127】

このデータは、トリスルフィド含有抗体における遊離薬物二量体を産生するためのチオール還元剤 D T T 及び T C E P の使用を実証する。さらに、このデータは、窒素等の不活性ガスを使用して得られた結果と同様に、還元反応を空気でスパージすることにより、コンジュゲーション中の遊離薬物二量体の形成が阻止されることを実証する。

【0128】

実施例 6

【0129】

この実施例は、その後のコンジュゲーション反応における遊離薬物二量体の形成の低減または阻止についてのタンパク質の還元反応中のスパージのタイミングの分析について説明する。

20

【0130】

還元反応中の窒素ガススパージのタイミングの影響を試験するために、スパージ時間を変化させ、遊離薬物二量体ピーク面積を R P - H P L C アッセイによって監視した。バルク中間体抗体 (抗 L y 6 E 抗体) で単一の 90 m L 還元を行った。開始還元反応への T C E P の添加後、このプールを全 90 分間の還元反応にわたって窒素でスパージした。還元反応生成物の試料をスパージ開始前ならびにスパージ中に採取し、次いで、各試料をスパージ後にコンジュゲートした。各コンジュゲートされた試料を R P - H P L C アッセイによって分析して、形成された遊離薬物 (v c MMA E) 二量体の量を監視した。図 6 に示され、かつ表 2 に示されるように、遊離薬物二量体ピーク面積は、スパージ時間が増加するにつれて減少する。

30

【0131】

【表 2】

表 2. 可変スパージ時間後の遊離薬物二量体の形成

スパージ時間 (分)	v c MMA E 二量体ピーク面積 (mAU×分)
0	6. 2 0 0 5
5	1. 9 5 2 4
1 0	0. 8 6 2 6
1 5	0. 3 5 0 4
2 0	0. 1 4 9 3
2 5	0. 0 7 6 9
3 0	0. 0 6 2 1
4 0	0
5 0	0
6 0	0
7 0	0
8 0	0
9 0	0

10

【 0 1 3 2 】

これらのデータは、遊離薬物二量体がスパージの30分後に排除されることを実証する。これらのデータは、還元開始時のスパージが遊離薬物二量体の形成を有効に低減し、それ故に、このスパージが、同様の結果で、還元反応の最初に、またはその終わり頃に生じ得ることも実証する。

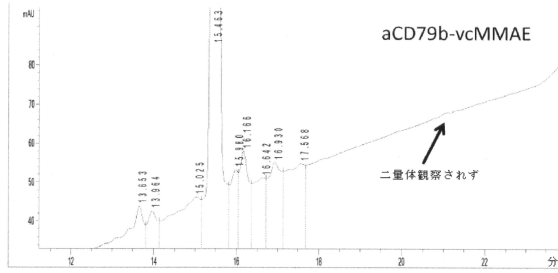
20

【 0 1 3 3 】

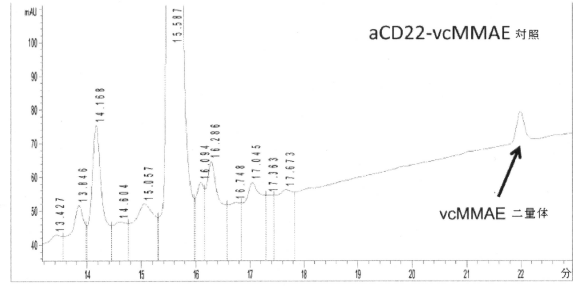
本発明の前述の実施例は、例証及び説明の目的のために提示されている。さらに、これらの実施例は、本発明を本明細書に開示される形態に限定するようには意図されていない。その結果、変形及び修正は、本発明の説明の教示に相応するものであり、関連技術の技能または知識は、本発明の範囲内である。本明細書に提供される実施例に記載の特定の実施形態は、本発明を実施するために既知の最良の形態をさらに説明するよう、かつ他の当業者が、かかるまたは他の実施形態において、本発明の特定の用途または使用に必要な様々な修正を伴って、本発明を利用することを可能にするよう意図されている。添付の特許請求の範囲が先行技術で認められている範囲内で代替の実施形態を包含するよう解釈されることが意図されている。

30

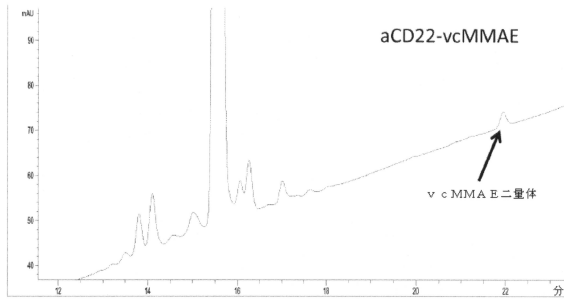
【図 1 A】



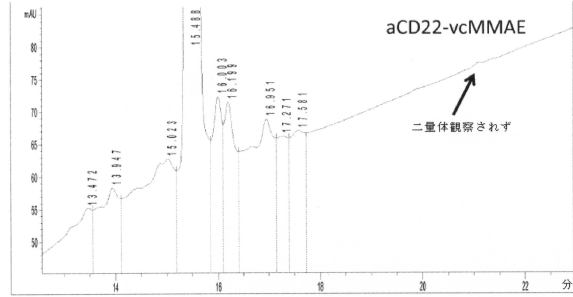
【図 2 A】



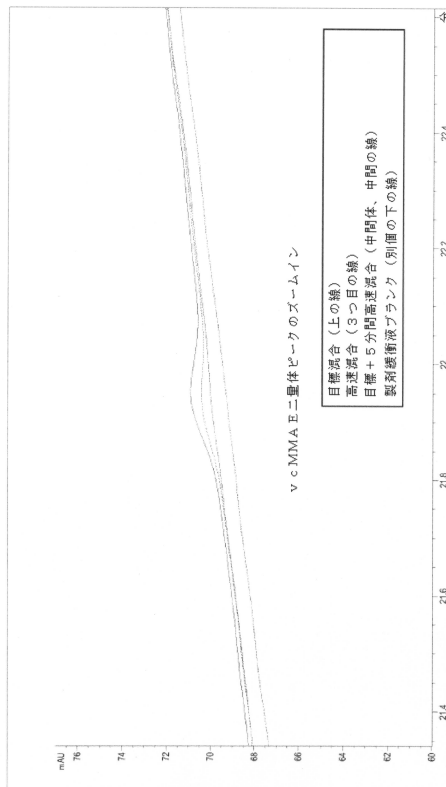
【図 1 B】



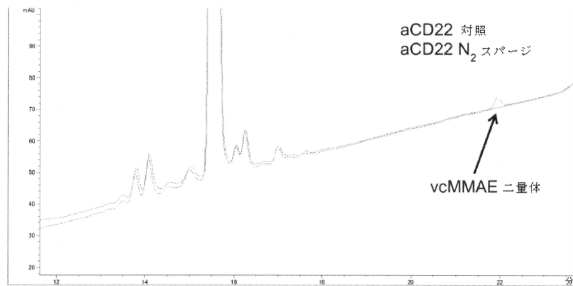
【図 2 B】



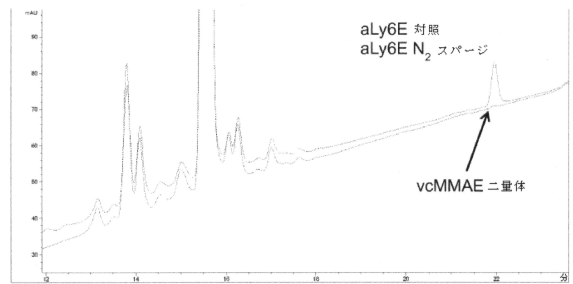
【図 3】



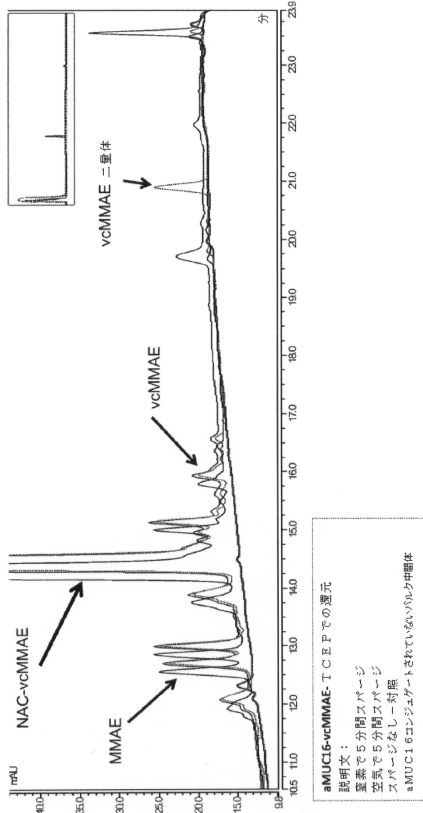
【図 4 A】



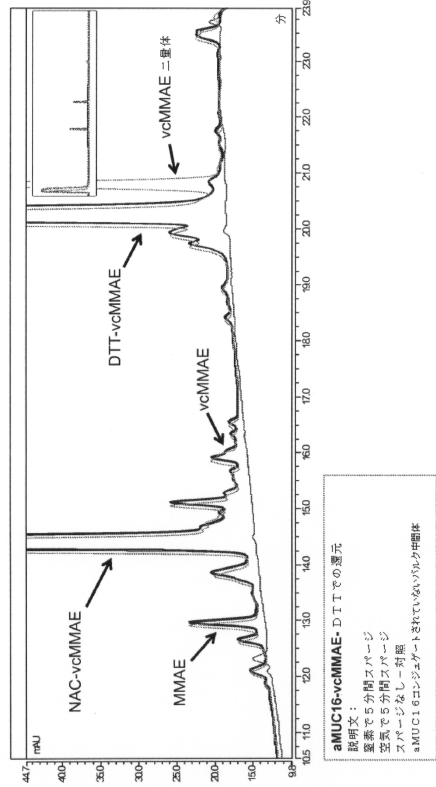
【図 4 B】



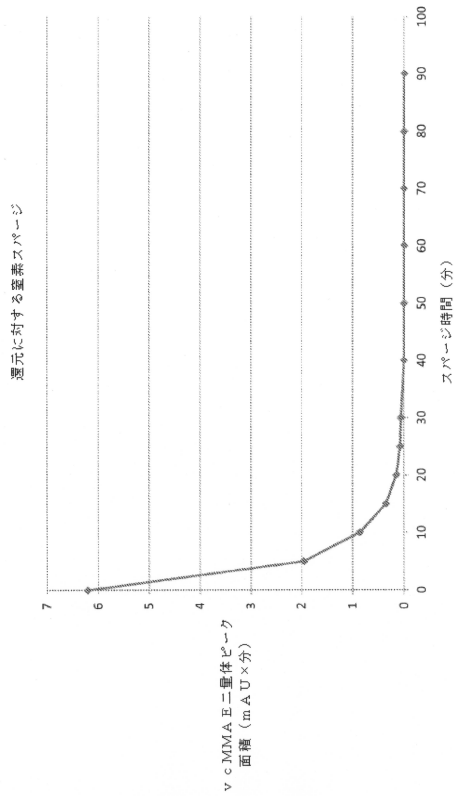
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 6 】



フロントページの続き

- (72)発明者 ゴレル ジェフリー
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア サウス サン フランシスコ ディーエヌエー
ウェイ 1
- (72)発明者 タリー ティモシー
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア サウス サン フランシスコ ディーエヌエー
ウェイ 1
- (72)発明者 ハッチンソン マシュー
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア サウス サン フランシスコ ディーエヌエー
ウェイ 1
- (72)発明者 ベクテル チャリティー タッカー
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア サウス サン フランシスコ ディーエヌエー
ウェイ 1

審査官 中山 基志

- (56)参考文献 特表2014-513543(JP,A)
米国特許出願公開第2013/0295007(US,A1)
特表2006-518753(JP,A)
国際公開第2013/093809(WO,A1)
特開平02-218700(JP,A)
特開平02-076899(JP,A)
国際公開第2011/041721(WO,A1)
特表2008-525517(JP,A)
Anal. Biochem., 2010年, 400, 89-98
Bioconjugate Chem., 2013年, 24, 1154-1160

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07K1/00-1/36
C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)