(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6947630号
(P6947630)

(45)発行日　令和3年10月13日(2021.10.13)　(24)登録日　令和3年9月21日(2021.9.21)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18	ZNA
A61K 47/68	(2017.01)	A61K	47/68	
A61K 47/66	(2017.01)	A61K	47/66	
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	C
A61K 49/00	(2006.01)	A61K	39/395	L

請求項の数 15　(全 260 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-516780(P2017-516780)
(86)(22)出願日　平成27年9月25日(2015.9.25)
(65)公表番号　特表2018-502047(P2018-502047A)
(43)公表日　平成30年1月25日(2018.1.25)
(86)国際出願番号　PCT/GB2015/052800
(87)国際公開番号　WO2016/046574
(87)国際公開日　平成28年3月31日(2016.3.31)
審査請求日　平成30年9月21日(2018.9.21)
(31)優先権主張番号　1416960.1
(32)優先日　平成26年9月25日(2014.9.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

前置審査

(73)特許権者　517100967
アンティコア　バイオファーマ　リミテッド
イギリス，エスジー１　２エフエックス　ハートフォードシャー，スティーブニッジ，ガネルズ　ウッド　ロード，スティーブニッジ　バイオサイエンス　カタリスト
(74)代理人　110000338
特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK
(72)発明者　デオナライン，マヘンドラ　ペルサウド
イギリス，エスエム６　８ピーティー　サレー，ウォリントン，バンドン　ライズ　４７

最終頁に続く

(54)【発明の名称】生物学的物質及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

５：１の最低カップリング比で担体分子とカップリングされた治療剤を含む化合物であって、前記担体分子は、ｓｃＦｖ、ｂｓ－ｓｃＦｖ、ｄｉ－ｓｃＦｖおよびダイアボディから選択される抗体断片であり、前記治療剤は、リジンアミノ酸残基上にカップリングされ、さらに、前記治療剤は、光感作剤ではない、ＤＮＡ結合薬物、微小管不安定化剤、トポイソメラーゼ阻害剤から選択される、化合物。

【請求項２】

カップリングされていない形態のときと比較して、カップリング形態で前記治療剤が前記治療剤の機能を維持しており、かつ前記担体分子が同じ標的に結合しているか、および／または、

前記化合物は、１００ｎＭ以下のＩＣ５０を有するか、および／または、

前記化合物は、複合化されていないときの前記治療剤よりも少なくとも１０倍低いＩＣ５０を有するか、および／または、

前記化合物は、少なくとも２時間の血清半減期を有し、および／または、

前記化合物は、カップリングされていない抗体断片の血清半減期の少なくとも５０％の血清半減期を有するか、および／または、

前記化合物は、室温のリン酸緩衝食塩水中、少なくとも１ｍｇ／ｍｌの溶解度を有するか、および／または、

前記化合物は、賦形剤の存在下で、室温のリン酸緩衝食塩水中、少なくとも１ｍｇ／ｍ

１の溶解度を有し、前記賦形剤は、最大０．５％のポリソルベート、１％のグリセロール、０．５％のグリシン、０．１％のヒスチジン、０．５％のクロロブタノール、５％のプロピレングリコール、２％のベンジルアルコール、０．０５％のオクタン酸、及び／または０．１％のＮ－アセチルトリプトファンである、請求項１に記載の化合物。

【請求項３】

前記治療剤は、前記担体分子とカップリングされたとき、少なくとも２つのアミノ酸の距離（３．５～７．５オングストローム）を隔てられる、請求項１または２に記載の化合物。

【請求項４】

前記治療剤は、リジンアミノ酸で前記担体分子と直接的にカップリングされる、請求項１～３のいずれかに記載の化合物。

【請求項５】

前記治療剤は、リジンアミノ酸で前記担体分子と間接的にカップリングされる、請求項１～４のいずれかに記載の化合物。

【請求項６】

前記担体分子は、標的に選択的に結合する、請求項１～５のいずれかに記載の化合物。

【請求項７】

前記担体分子は、標的細胞に結合すると、前記細胞内へ内在化される、請求項６に記載の化合物。

【請求項８】

前記担体分子は、前記標的の結合後に、前記治療剤から分離される、請求項６または７に記載の化合物。

【請求項９】

前記担体分子は、ヒト化されているか、またはヒト由来であるか、および／または、

前記担体分子は、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ３、ＭＵＣ１、ＥｐＣＡＭ、ＣＥＡ、フィブロネクチン－ＥＤＢ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＬｅＹ、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ７９ｂ、ＧＰＮＭＢ、ＰＳＭＡ、ＣＤ５６、ＣＤ３７、葉酸受容体、ＣＡ６、ＣＤ２７Ｌ、ＭＵＣ１６、ＣＤ６６ｅ、ＣＤ７４、Ｔｒｏｐ－２、またはグアニル酸シクラーゼに特異的に結合する、請求項１～８のいずれかに記載の化合物。

【請求項１０】

前記治療剤は、セマドチン、Ｐ５、Ｐ５－Ｃ５、ドキソルビシン、エリプチシン、ＭＭＡＥ、オーリスタチン、マイタンシン、ドラスタチン、カンプトテシン、ＳＮ－３８、ならびにＭＭＡＦから選択される、請求項１～９のいずれかに記載の化合物。

【請求項１１】

前記担体分子は、ｓｃＦｖであり、前記治療剤は、セマドチン、ドキソルビシン、エリプチシン、ＭＭＡＥ、Ｐ５－Ｃ５、マイタンシンおよびＭＭＡＦからなる群から選択される、である、請求項１～１０のいずれかに記載の化合物。

【請求項１２】

前記ｓｃＦｖは、ＨＥＲ２に特異的に結合する、請求項１１に記載の化合物。

【請求項１３】

請求項１～１２のいずれかに記載の化合物、及び薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤を含む、薬学的組成物。

【請求項１４】

疾患の診断、治療、及び／または予防において使用するための、請求項１～１３のいずれかに記載される化合物または組成物。

【請求項１５】

（ｉ）治療剤を提供するステップと、

（ｉｉ）担体分子を提供するステップと、

（ｉｉｉ）少なくとも１つの極性非プロトン性溶媒及び水性緩衝液の存在下で、前記治療剤及び前記担体分子を複合化させるステップと、を含み；および／または、

前記治療剤及び前記担体分子を複合化させる前記ステップは、０℃～３７℃の温度で行なわれるか、および／または、
前記治療剤及び前記担体分子を複合化させる前記ステップは、６．０～１０．０のｐＨで行なわれるか、および／または、
前記治療剤及び前記担体分子を複合化させる前記ステップは、０．１時間～４８時間行なわれるか、および／または、
（ｉｖ）前記化合物を薬学的に許容される担体と合わせて、薬学的組成物を形成するステップをさらに含む、請求項１～１２のいずれかに記載の化合物、または請求項１３に記載の組成物を作製する方法。
【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】
【０００１】
本発明は、担体分子及び活性治療剤を含み、それにより標的化した治療作用を必要とする様々な疾患のための、より有効な臨床治療を提供する、最適化された標的化治療化合物に関する。
【０００２】
疾患の現在の治療は、主に標的化ではない。薬物は、多くの他の組織及び罹患した組織が暴露される、全身または経口で投与される。例えば、癌療法において、化学療法薬物は、癌細胞（一般にＤＮＡまたは細胞複製関連）において特に重要である機構に作用する。しかしながら、他の非癌細胞も、化学療法薬物を吸収し、骨髄幹細胞を急速に分裂させ、免疫抑制及び病的状態を引き起こす（化学療法治療の一般的な副作用）等、影響を受け得る。感染病において、抗細菌薬物は、（経口または注射によって）血液中に導入され、典型的に特定の細菌代謝経路を妨害する。他の組織の薬物への暴露は、副作用及び薬物耐性の重要な問題を引き起こし得る。ウイルスに感染した細胞も、ウイルスの代謝が概して非感染ヒト細胞と実際に類似しているため、治療が困難である。
【０００３】
医学における将来の進歩は、恐らく、疾患に対する薬物の適合になることが広く仮定されている。これは、今日使用されている従来の薬物の大部分の非選択的な行き当たりばったりの手法よりもむしろ、正しい標的組織または微生物に治療を送達することを意味する。これは、投与されるより少ない用量、より軽減された副作用及び毒性、ならびに患者の全体的なより良好な臨床反応をもたらすであろう。
【０００４】
薬物が正しい組織内に蓄積したら、特定の疾患の治療に非常に長けた、今日臨床的に使用されている多くの薬物が存在する。したがって、問題は、薬物の作用の機構よりもむしろ、薬物の特異的標的化である。所望の細胞への薬物または他の作動体の標的化は、確立した領域である。標的化への主な手法のうちの１つは、多官能分子の標的要素としての、抗体または細胞特異的リガンドの使用である（例えば、Ｈｕｄｓｏｎ　ＰＪ．Ｅｘｐｅｒｔ　Ｏｐｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇ　Ｄｒｕｇｓ　２０００，９：１２３１－４２；Ｂｏｒｓｉ　Ｌ，ｅｔ　ａｌ．Ｂｌｏｏｄ　２００３，１０２：４３８４－９２）。
【０００５】
抗体は、哺乳類の免疫系において、防御の第一線として作用するように、自然に進化した。抗体は、絶妙な特異性及び途方もない多様性を有する複合糖タンパク質である。この多様性は、プログラムされた遺伝子シャフリング及び標的化された変異誘発から生じ、膨大な数の異なる抗体配列をもたらす。この多様性は、抗体が通常、実際に本質的にタンパク質であるあらゆる標的分子に結合し得ることを意味する。現在、抗体選択を模倣し、インビトロで産生し、実質上あらゆる所望の標的に対する組換え型ヒト抗体のために選択することが可能である（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ　ＨＲ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２００５，２３：１１０５－１６）。
【０００６】
抗体は、高度の特異性で、適切な受容体を産生する標的細胞に結合することができる。

抗体の親和度は、抗体がどれだけ良好に標的（抗原）に結合するかの尺度である。抗体の親和度は、通常、平衡解離定数（K_d）によって説明される。内在化される必要がある抗体について、抗体が細胞内へ取り込まれる場合、解離速度はより重要ではないため、会合速度がより重要である。所望の構造及び結合特性を有する抗体を選択及び操作するための様々な技法が存在する（Ｗｕ ＡＭ ａｎｄ Ｓｅｎｔｅｒ ＰＤ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２００５，２３：１１３７－４６）。

【０００７】

すべての生体分子と同様に、抗体の大きさは、インビボでのその薬物動態に影響を与える（Ｄｅｏｎａｒａｉｎ，ＭＰ ｅｔ ａｌ．１９９７，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．１０，８９－９８；Ｂａｔｒａ ＳＫ ｅｔ ａｌ．Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００２，１３：６０３－８．）。より大きい分子は、緩徐なクリアランスに起因して、循環内でより長く持続する（大きい糖タンパク質は、肝臓による特異的取り込みにより除去される）。実験的マウスモデル系における癌細胞抗原を認識する全抗体（分子量１５０ＫＤａ）の場合、３０～４０％が腫瘍によって取り込まれ得るが、これらは循環内でより長く持続するため、１超の腫瘍：血液比が達成されるのに１～２日かかる。典型的には、腫瘍：血液比は、約３日目までに５～１０である（Ｂｏｘｅｒ ＧＭ ｅｔ ａｌ．Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ １９９４，６９：３０７－１４．）。全抗体の臨床試験から、腫瘍に実際に送達される量は、マウスモデル内に見られる量の約１％であるが、腫瘍：臓器比は類似する（Ｅｐｅｎｅｔｏｓ ＡＡ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１９８６，４６：３１８３－９１）。別の分子が抗体と結合した場合には、新しい大きさ及び化学物理的特性が、変えられた薬物動態を決定する。さらに、正味荷電及び親水性等の特性は、標的動態に影響を与え得る（Ｇａｎｇｏｐａｄｈｙａｙ，Ａ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ １９９６，２３：２５７－６１）。

【０００８】

一部の細胞表面抗原は、抗体等のリガンドによって結合されたとき、静態的または非常に緩徐に内在化する。細胞シグナル伝達または金属及び脂質の取り込み等の、内在化を必要とする機能を有するものもいくつか存在する。抗体は、そのような抗原をとおして細胞内に作用剤を送達するために使用され得る。

【０００９】

モノクローナル抗体（ＭＡｂ）は、ここ数年、疾患と関連付けられた生物学的マーカーを特異的向けることができる薬物の開発を促進することにより、医学の様相を変えた［Ｃａｒｔｅｒ ＰＪ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００６，６：３４３－５７］。これは、癌におけるＶＥＧＦまたは炎症性疾患におけるＴＮＦ等の疾患関連因子の抑制から、癌における腫瘍破壊まで、多くの用途を有する。増殖性疾患において、冒された細胞は、多くの場合、その細胞型（例えば、癌において突然変異した正常細胞［Ｓｃｏｔｔ ＡＭ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃａｎｃｅｒ．２０１２，１２：２７８－８７］、または自己免疫疾患において過剰に刺激された免疫細胞［Ｃｈａｎ ＡＣ＆Ｃａｒｔｅｒ ＰＪ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１０，１０：３０１－１６］）に関連付けられたか、またはその細胞型上で過剰発現した細胞表面受容体を有する。腫瘍関連受容体の多くは、腫瘍形成へとつながる非制御のシグナル伝達を引き起こす成長因子の役割を果たす。そのような受容体の例には、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）ファミリー（ＥＧＦＲ／ｅｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２／ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、及びＨＥＲ４）のメンバー、肝細胞増殖因子受容体、インスリン様成長因子－１受容体及びＮｏｔｃｈ受容体が含まれる［Ｆａｕｖｅｌ Ｂ＆Ｙａｓｒｉ Ａ．ＭＡｂｓ．２０１４，６：８３８－５１；Ｍｅｎａｒｄ Ｓ ｅｔ ａｌ．Ｏｎｃｏｇｅｎｅ．２００３，２２，６５７０－８；Ｒａｎｇａｎａｔｈａｎ Ｐ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃａｎｃｅｒ．２０１１，１１：３３８－５１；Ｐａｒｉｋｈ ＲＡ ｅｔ ａｌ．ＯｎｃｏＴａｒｇｅｔｓ Ｔｈｅｒ．２０１４，７：９６９－８３；Ｗｅｒｏｈａ ＳＪ＆Ｈａｌｕｓｋａ Ｐ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ Ｍｅｔａｂ Ｃｌｉｎ Ｎｏｒｔｈ Ａｍ．２０１２，４１：３３５－５０］。

【００１０】

ＭＡｂは、腫瘍関連受容体と結合し、発癌のシグナル伝達を抑制し得、腫瘍退縮または除去をもたらす［Ｓｃｏｔｔ ＡＭ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃａｎｃｅｒ．２０１２，１２：２７８－８７，４；Ｆａｕｖｅｌ Ｂ＆Ｙａｓｒｉ Ａ．ＭＡｂｓ．２０１４，６：８３８－５１］。様々な免疫グロブリンのサブクラス全ＭＡｂも、腫瘍根絶につながる免疫反応を引き起こし得る［Ｖａｎｎｅｍａｎ Ｍ＆Ｄｒａｎｏｆｆ Ｇ．Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ ２０１２，１２：２３７－２５１］。

【００１１】

腫瘍は、受容体発現を増加させる［Ｎａｈｔａ Ｒ ｅｔ ａｌ Ｎａｔｕｒｅ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｒａｃｔｉｃｅ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２００６，３，２６９－２８０］、シグナル伝達経路タンパク質における代替の発癌シグナル伝達経路または突然変異を上方制御する［Ｎａｈｔａ Ｒ ｅｔ ａｌ Ｎａｔｕｒｅ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｒａｃｔｉｃｅ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２００６，３，２６９－２８０，Ｇａｌｌａｒｄｏ Ａ，ｅｔ ａｌ Ｂｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ．２０１２，１０６：１３６７－７３］、及び免疫反応を弱める［Ｐａｒｄｏｌｌ ＤＭ．ＮａｔＲｅｖ Ｃａｎｃｅｒ．２０１２，１２：２５２－６４］等の、ＭＡｂ介入を克服するための機構を進化させ得る。トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））、セツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標））、及びパンニツムマブ（ｐａｎｎｉｔｕｍｕｍａｂ）（Ｖｅｃｔａｂｉｘ（登録商標））等の商業的に認可されたＭＡｂは、数ヶ月間生存を長くすることができるが、多くの場合、大幅な治癒には十分に効き目がないと見なされている［Ｓｃｏｔｔ ＡＭ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃａｎｃｅｒ．２０１２，１２：２７８－８７，Ｓｌｉｗｋｏｗｓｋｉ ＭＸ＆Ｍｅｌｌｍａｎ Ｉ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１３，３４１：１１９２－８］。さらに、患者は、ＭＡｂ療法に耐性を示すようになる場合があり、再発、より少ない治療選択肢、及び生存の減少につながる［Ｎａｈｔａ Ｒ ｅｔ ａｌ Ｎａｔｕｒｅ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｒａｃｔｉｃｅ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２００６，３，２６９－２８０；Ｂｒａｎｄ ＴＭ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１１ １１：７７７－９２］。

【００１２】

薬物送達の分野における１つの望ましい目標は、正常な細胞に影響を与えるか、または望ましくない、もしくは有害な副作用を引き起こすことなく罹患した細胞が根絶されるように、ヒトの身体内の疾患に冒された領域に、細胞毒性部分を特異的に送達することである。細胞毒性ペイロードを、損傷を受けていないＭＡｂに結合させることは、これらの細胞致死効力を上昇させ、作用の細胞毒性機構を免疫媒介効果及びシグナル媒介効果から離れて、より直接的な腫瘍細胞破壊に切り替えることができる［Ｆｌｙｇａｒｅ ＪＡ ｅｔ ａｌ．Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．２０１３，８１：１１３－２１；Ｓｉｅｖｅｒｓ ＥＬ＆Ｓｅｎｔｅｒ ＰＤ．Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｍｅｄ．２０１３；６４：１５－２９；Ｃｈａｒｉ ＲＶ ｅｔ ａｌ．Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ Ｉｎｔ Ｅｄ Ｅｎｇｌ．２０１４，５３，３７９６－８２７；Ｔｅｉｃｈｅｒ ＢＡ＆Ｃｈａｒｉ ＲＶ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１１，１７：６３８９－９７］。これは、「遊離」抗体及び好結果の成果を妨げるあらゆる免疫関連状態に対する薬物耐性を克服する潜在力を、有している［Ｂａｒｏｋ Ｍ ｅｔ ａｌ．Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１１，１３：Ｒ４６；Ｂａｒｏｎ ＪＭ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｏｎｃｏｌ Ｐｈａｒｍ Ｐｒａｃｔ．２０１４．［Ｅｐｕｂが印刷物に先立つ］。これらのいわゆる抗体薬物複合体（ＡＤＣ）は、当分野で周知であり、効き目があり、特異的、安全、かつ安定したＡＤＣの生成に関する多数の研究の対象となっている［Ｆｌｙｇａｒｅ ＪＡ ｅｔ ａｌ．Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．２０１３，８１：１１３－２１；Ｓｉｅｖｅｒｓ ＥＬ＆Ｓｅｎｔｅｒ ＰＤ．．Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｍｅｄ．２０１３；６４：１５－２９；Ｃｈａｒｉ ＲＶ ｅｔ ａｌ．Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ Ｉｎｔ Ｅｄ Ｅｎｇｌ．２０１４，５３，３７９６－８２７；Ｔｅｉｃｈｅｒ ＢＡ＆Ｃｈａｒｉ ＲＶ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１１，１７：６３８９－９７；Ａｄａｉｒ ＪＲ ｅｔ ａｌ．Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１２，１２：１

１９１－２０６；ＬｏＲｕｓｓｏ ＰＭ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１１，１７：６４３７－４７］。

【００１３】

最近の研究動向は、特徴がはっきりした／検証されたヒトまたはヒト化抗体が、微小管機能を破壊する極めて効き目のある薬物（例えばオーリスタチン及びマイタンシノイド［Ａｌｌｅｙ ＳＣ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｅｘｐ Ｔｈｅｒ．２００９，３３０：９３２－８；Ｅｒｉｃｋｓｏｎ ＨＫ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００６，６６：４４２６－３３］）、ならびにＤＮＡ損傷剤（例えば、カリチアマイシン（ｃａｌｉｃｈｅａｍｙｃｉｎ）及びＰＢＤ［Ｋｕｎｇ Ｓｕｔｈｅｒｌａｎｄ ＭＳ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ ２０１３，１２２：１４５５－６３；ｄｅ Ｖｒｉｅｓ ＪＦ ｅｔ ａｌ．Ｌｅｕｋｅｍｉａ．２０１２，２６：２５５－６４］）と安定して結合することに起因して、明るい見通しを示し始めている。トラスツズマブ－エムタンシン（Ｋａｄｃｙｌａ（登録商標））等のＡＤＣは、遊離化学療法薬物を加えた同じ非複合抗体よりも優れた臨床有効性（生存の上昇及びより少ない副作用）を示す［Ａｍｉｒｉ－Ｋｏｒｄｅｓｔａｎｉ Ｌ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１４，２０：４４３６－４１］。ドキソルビシン等のより効き目の低い細胞毒性薬物が、さらにＡＤＣとして開発されているが、不十分な薬物が標的ＭＡｂによって送達されることに起因して制限が生じる［Ｇｏｖｉｎｄａｎ ＳＶ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒ ２０１３，１２：９６８－７８］。ＡＤＣの改善及び薬物の担体分子への複合化に関する研究は、担体及び薬物を結合させるためにポリマーをリンカーとして使用することに焦点を合わせている［Ｃａｒｌｓｏｎ Ｂ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ ２０１２，９：２８－３１、米国第８８０８６７９Ｂ２号］。この手法は、２つの分子を結合させるのに有効であるが、複合体の大きさ及び合成の複雑さを増加させる。ＡＤＣの高分子の大きさの増大は、血液半減期の増大等の薬物動態［Ｄｅｏｎａｒａｉｎ ＭＰ ｅｔ ａｌ（２０１５）Ｅｘｐ．Ｏｐｉｎ．Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ １０；４６３－８１；Ｃｏｎｓｔａｎｔｉｎｏｕ Ａ，ｅｔ ａｌ（２０１０）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｌｅｔｔ ３２：６０９－２２］、及び腫瘍浸潤の減少等の薬力学における変化をもたらす［Ｄｅｎｎｉｓ ＭＳ ｅｔ ａｌ（２００７）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ６７：２５４－６１］）。ＡＤＣ有効性を改善するための直接的手法は、低（典型的に２－４）ＤＡＲ（薬物抗体比）のより均一な複合体をもたらす部位特異的複合化であり、より高いペイロードの暴露からの毒性の増加、及び最適化されていない高ＤＡＲ種の凝集に対する有害反応のせいで、高ＤＡＲが有効な手法ではないことを意味する［Ｈａｍｂｌｅｔｔ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２００４，１０：７０６３－７０７０］。

【００１４】

多くの臨床経験が、ＡＤＣで得られているが［Ａｍｉｒｉ－Ｋｏｒｄｅｓｔａｎｉ Ｌ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１４，２０：４４３６－４１］、かなりの制限が依然として存在する［Ｌｕ Ｄ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２０１４，７４：３９９－４１０；Ｍｏｎｊａｎｅｌ Ｈ ｅｔ ａｌ．Ｂｒ Ｊ Ｈａｅｍａｔｏｌ．２０１４，１６６：３０６－８；Ｒｏｂａｋ Ｔ＆Ｒｏｂａｋ Ｅ．Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇ Ｄｒｕｇｓ．２０１４，２３：９１１－２４．］。当分野で記載される複合化手法を使用した抗体上への薬物負荷の高さは、長期の治癒をもたらすか［Ｔｅｉｃｈｅｒ ＢＡ＆Ｃｈａｒｉ ＲＶ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１１，１７：６３８９－９７］、または標的が低レベルで発現する著しい反応を生成する［Ｗａｎｇ Ｘ Ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒ．２０１１，１０：１７２８－３９］のに十分な薬物の濃度を標的組織に送達するのに、十分ではない。低薬物負荷もまた、より多くのこれら薬物が必要な治療効果を達成するために必要とされるため、薬物を比較的低毒性の、例えばドキソルビシン、タキサン、及びメトトレキサートと一緒に使用するとき、不利益になる。しかしながら、より高く負荷されたＡＤＣの使用の試みは、典型的に、ＡＤＣの結合機能の低減［Ｃ

hari RV et al. Angew Chem Int Ed Engl. 2014, 53, 3796－827；Burke, PJ et al. Bioconjugate Chem. 2009, 20, 1242－1250］、溶解度の低減［Chari RV et al. Angew Chem Int Ed Engl. 2014, 53, 3796－827；Hollander, I et al. Bioconjugate Chem. 2008, 19, 358－361；Burke, PJ et al. Bioconjugate Chem. 2009, 20, 1242－1250；Zhao RY et al. J Med Chem. 2011, 54：3606－23］、及び凝集する傾向［Chari RV et al. Angew Chem Int Ed Engl. 2014, 53, 3796－827；Hollander, I et al. Bioconjugate Chem. 2008, 19, 358－361；Burke, PJ et al. Bioconjugate Chem. 2009, 20, 1242－1250；Zhao RY et al. J Med Chem. 2011, 54：3606－23；King, H et al. Bioconjugate Chem. 1999, 10, 279－288］、（これらの3つすべてが、劣った薬物動態特性をもたらす）［Hamblett, KJ et al. Clin. Cancer Res. 2004, 10, 7063－7070；Shen BQ. Nat Biotechnol. 2012, 30：184－9.］、薬物送達の減少、より低い治療有効性、副作用の増加、ならびに肝臓系及び腎臓系等の薬物代謝及びクリアランスに関与する組織への望ましくない毒性［Litvak－Greenfeld D&Benhar I. Adv Drug Deliv Rev. 2012, 64：1782－99］をもたらす。

【0015】

現在の抗体及びＡＤＣでのさらなる制限は、長い血清半減期（１～３週間）の望ましくない副作用であり［Litvak－Greenfeld D&Benhar I. Adv Drug Deliv Rev. 2012, 64：1782－99；E. L. Sievers, et al. J. Clin. Oncol. 2001, 19, 3244－3254］、これは、胃腸の損傷、末梢神経障害、免疫抑制を引き起こし得る［J. J. Lee&S. M. Swain. J. Clin. Oncol. 2006, 24：1633－1642；M. A. Jordan&L. Wilson, Nat. Rev. Cancer 2004, 4, 253－265］。さらに、現在の全抗体系療法及びＡＤＣは、劣った拡散特性及びより低い組織潅流特性を呈し［Teicher BA&Chari RV. Clin Cancer Res. 2011, 17：6389－97；Jain RK. Adv Drug Deliv Rev. 2012, 64：353－365；Dennis MS et al. Cancer Res. 2007, 67：254－61］、これらはより低い濃度が固形腫瘍のコアまたは最低血管が新生された領域に届くという結果をもたらす［Teicher BA&Chari RV. Clin Cancer Res. 2011, 17：6389－97；Dennis MS et al. Cancer Res. 2007, 67：254－61.］。したがって、現在のＡＤＣは、より大きい固形腫瘍［Teicher BA&Chari RV. Clin Cancer Res. 2011, 17：6389－97］、不十分に血管が新生された腫瘍、または密な間質が伴った腫瘍に対しては、より有効ではない。

【0016】

Hamblett et al. Clin Cancer Res 2004, 10：7063－7070は、抗ＣＤ30モノクローナル抗体上へのモノメチルオーリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）の薬物負荷を詳細に調査した。かれらは、その複合体のＩＣ５０有効性測定が、カップリングされた薬物分子の数と共に上昇した一方で、１つの抗体当たり４つの薬物から、１つの抗体当たり８つの薬物に増加したとき、インビボでの抗腫瘍活性は、上昇しなかったことを見出した。さらに、８つの薬物が負荷された複合体は、インビボで不十分に耐容性を示し、投与され得た複合体の数は、４つの薬物負荷から８つの薬物負荷へと半分になった。さらに、８つの薬物負荷複合体は、４つの薬物負荷複合体の２倍早く身

体から除去された。Ｈａｍｂｌｅｔｔは、抗体の４つの薬物負荷が、（腫瘍活性、耐容性、及びクリアランスのバランスをとることによって）最良の臨床効果を達成するために、最大限に妥当であることを確認した。この所見は、多くの他の人々［例えば、Ｃｈａｒｉ　ＲＶ　ｅｔ　ａｌ．Ａｎｇｅｗ　Ｃｈｅｍ　Ｉｎｔ　Ｅｄ　Ｅｎｇｌ．２０１４，５３，３７９６－８２７］によって支持されている。

【００１７】

さらに、Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒ　２００８，７：２４８６－２４９７から、カップリングのためにポリマーを使用する等の代替の戦略に頼る必要がある前に、抗体断片が最大４つの薬物分子とカップリングすることができることが知られている［米国第２０１３／０１０１５４６号］。

【００１８】

国際公開第２０１４／０６８４４３　Ａ１号、同第２０１４／１３４４５７　Ａ２号、同第２０１３／０８２２５４　Ａ１号、同第２０１２／１０４３４４　Ａ１号、及び米国第２０１０／０１３６０３３　Ａ１号が各々、抗体断片に複合化した薬物を説明している。しかしながら、これらの文書のうちのいずれも、全ＩｇＧよりも小さいタンパク質中の高ＤＡＲ比のために必要である、抗体断片中の凝集に打ち勝つための手段を提案していない。

【００１９】

例えば、国際公開第２０１４／０６８４４３号（Ｐｆｉｚｅｒ）が、リジン残基及び特異的Ｖ－カッパリジン－１８８残基上への複合化を説明している。これらは、全ＩｇＧ（１５０ｋＤａ）上の約２～４の平均ＤＡＲを示し、一部のペイロードに関して７．８の最大ＤＡＲを示す。この研究は、３０ｋＤａ（１／５の大きさ）のｓｃＦｖ断片について、当業者は、２以下のＤＡＲを合理的に予期するであろうことを示唆する。

【００２０】

国際公開第２０１４／１３４４５７号（Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎ）は、約４～５のＤＡＲのＩｇＧ系ＡＤＣを作製するための、直接的リジン複合化及び間接的リジン複合化を説明する。最大２０のＤＡＲが、完全抗体に対して提案されているが、これは、１／５の大きさのｓｃＦｖの場合、約４のＤＡＲに相当する。

【００２１】

国際公開第２０１２／１０４３４４号（ＧｅｎＭａｂ）は、様々なペイロードを用いた直接的リジン手法及び間接的リジン手法を使用した、抗ＣＤ７４全抗体（ＨｕＭａｂ－ＣＤ７４）及び複合体を説明する。開示されるＤＡＲは、３．７～４．１の範囲にわたり、これらは、１／５の大きさである抗体断片の場合、せいぜい１のＤＡＲに相当し得る。

【００２２】

ＡＤＣ療法の分野の最近の再考察（Ｃｈａｒｉ　ｅｔ　ａｌ．Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ　２０１４，５３：３７９６－３８２７）は、現在のＡＤＣは、臨床背景で日常的に使用されるのに十分に有効ではないことを強調する。ＦＤＡによる２つのＡＤＣ分子の最近の販売承認は、ＡＤＣの原理が機能し得るが、この治療領域での３０余年の研究で２つの薬物だけが臨床に承認され、ＡＤＣを効果的に機能させることの困難さに起因して、規則よりもむしろこれらが例外であることを証明することを示す。

【００２３】

したがって、現在のＡＤＣ手法の重大な制限を減少または取り除く、改善されたＡＤＣを生成する必要性が存在する。

【００２４】

本発明は、これより現在のＡＤＣ療法の制限を減少させるように最適化されたそのような改善されたＡＤＣ、ならびにこれらの使用及びこれらの製造のためのプロセスを提供する。

【００２５】

本発明の第１の態様において、５：１の最低カップリング比で担体分子とカップリングされた治療薬を含む化合物が提供され、担体分子は、（ｉ）抗体断片もしくはその誘導体

、または（ｉｉ）抗体模倣物もしくはその誘導体であり、治療剤は、リジンアミノ酸残基上にカップリングされ、さらに、治療剤は、光感作剤ではない。

【００２６】

用語「担体分子」は、治療剤がカップリングされる任意の作用剤の意味を含む。担体分子は、アミノ酸を含み、ペプチド、ポリペプチド、及びタンパク質を含む。具体的には、担体分子は、抗体断片または抗体模倣物であることが意図される。

【００２７】

用語「カップリング比」は、１つの担体分子にカップリングされる治療剤の分子の数を意味する。

【００２８】

用語「光感作剤」（光増感剤、光増感薬物は、同じ意味で使用される）は、その細胞毒性特性を活性化させるために、二次的な物理的介入を必要とする薬物のクラスに属する化合物を指すと見なされるものとする。化合物は、その一重項状態で、特定の波長の光の光子を吸収する。これは、短命な励起一重項状態を引き起こす。これは、項間交差により、より長命の三重項状態に変換され得る。この三重項状態光増感剤は、ラジカルによる光酸化、一重項酸素、及び酸素を伴わない光化学反応に起因して、細胞毒性特性を有し得る。光増感剤の光依存の有効性は、Ｓａｖｅｌｌａｎｏ ＭＤ＆Ｈａｓａｎ Ｔ［Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００５．１１：１６５８－５８］によって記載されるもの等の方法を使用して、少なくとも０．１ジュールの光源で照らされたとき、少なくとも１μＭでなければならない。光増感剤は、その細胞毒性特性を活性化させるために、二次的な物理的介入を必要とする薬物のクラスであるとも見なされ得、これらの前記特性は、細胞致死の主な機構である。

【００２９】

光感作剤ではない治療剤とは、我々は、光感作剤を除く任意の治療剤を指して言う。そのような治療剤は、光増感剤の光物理特性のいずれも有さない、すなわち、そのような治療剤は、励起状態に入るために光の光子を吸収しない。非光増感剤の光依存の有効性は、少なくとも０．１ジュールの光源で照らされたとき、１μＭ以下でなければならず、好ましくは０μＭである［Ｋｏｓｔｒｏｎ ｅｔ ａｌ（２００３）ｉｎ Ｐｈｏｔｏｄｙｎａｍｉｃ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，（Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｓｅｒｉｅｓ ｉｎ Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍｉｃａｌ＆Ｐｈｏｔｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｒｏｙａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ）。

【００３０】

担体分子とカップリングされた光増感剤を含む化合物は、他の治療剤複合体と同様に、以前に説明されているが（例えば、国際公開第２００７／０４２７７５号及び同第２０１０／１０６３４１号）、そのような複合体は、非光増感剤薬物複合体とはかなりの違いを呈する。例えば、クエンチングを低減及び／または回避するための、光増感剤の空間分離の明瞭な論理的根拠が存在する。非光増感剤薬物の空間分離は、従来、治療機能を考慮するとき、非光増感剤薬物が、（純粋に光関連現象である）クエンチング、またはあらゆる空間的相互作用の自己抑制特性をする能力がないため、不適切であると考えられていたため、今、非光増感剤を最適に離間することによって、改善されたＡＤＣ分子が生成され得ることを見出したことは、極めて驚きである。

【００３１】

光増感剤は、血液タンパク質結合を引き起こすこれらの平坦な疎水性構造に起因して、長い血清半減期を有することでよく知られており、これは、光増感剤の皮膚光線過敏症の一因となる［Ｈｏｐｐｅｒ Ｃ．Ｌａｎｃｅｔ Ｏｎｃｏｌ．２０００；１ ２１２－９；Ｋｏｒｂｅｌｉｋ Ｍ．Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍ Ｐｈｏｔｏｂｉｏｌ．１９９３；５７：８４６－５０］。光増感剤の親水性抗体上への複合化は、血中クリアランスを迅速化し、これらの副作用を軽減する［Ｂｈａｔｔｉ Ｍ，Ｐ ｅｔ ａｌ．Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ．２００８，１２２：１１５５－６３；Ｐａｌｕｍｂｏ Ａ ｅｔ ａｌ．Ｂｒ Ｊ

Ｃａｎｃｅｒ．２０１１，１０４：１１０６－１５］。逆に、小分子非光増感剤薬物の複合化は、小分子非光増感剤薬物が循環から迅速に自然に消失するため、小分子非光増感剤薬物のクリアランスを減速させる［Ｐｉｍｍ ＭＶ ｅｔ ａｌ．Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ．１９８８，４１：８８６－９１］。

【００３２】

用語「ヌクレオチド配列」もしくは「核酸」、または「ポリヌクレオチド」もしくは「オリゴヌクレオチド」は、同じ意味で使用され、ヌクレオチドのヘテロポリマー、またはこれらのヌクレオチドの配列を指す。これらの語句は、一本鎖または二本鎖であり得、センス鎖またはアンチセンス鎖を表し得るゲノム起源または合成起源のＤＮＡまたはＲＮＡ、及びペプチド核酸（ＰＮＡ）またはあらゆるＤＮＡ様物質もしくはＲＮＡ様物質も指す。本明細書の配列中、Ａはアデニンであり、Ｃはシトシンであり、Ｔはチミンであり、Ｇはグアニンであり、ＮはＡ、Ｃ、Ｇ、またはＴ（Ｕ）である。ポリヌクレオチドがＲＮＡである場合、本明細書に提供される配列中のＴ（チミン）は、Ｕ（ウラシル）で置換されることが企図される。一般に、本発明によって提供される核酸セグメントは、微生物オペロンもしくはウイルスオペロン、または真核生物遺伝子から誘導される調節要素を含む組換え型転写単位中で発現され得る合成核酸を提供するために、ゲノム及び短オリゴヌクレオチドリンカーの断片から、または一連のオリゴヌクレオチドから、または個々のヌクレオチドから構築され得る。

【００３３】

用語「ポリペプチド」もしくは「ペプチド」、または「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列もしくはその断片、及び天然型または合成分子を指す。ポリペプチド「断片」、「部分」、または「セグメント」は、少なくとも約５個のアミノ酸、好ましくは少なくとも約７個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも約９個のアミノ酸、最も好ましくは少なくとも約１７個以上のアミノ酸のアミノ酸残基のひと続きである。活性になるために、いずれのポリペプチドも、生物学的活性及び／または免疫学的活性を示すのに十分な長さを有さなければならない。

【００３４】

本明細書において使用する場合、用語「精製された」または「実質的に精製された」は、示される核酸またはポリペプチドが他の生物学的巨大分子、例えば、ポリヌクレオチド、及びタンパク質等の実質的非存在下で存在することを意味する。一実施形態において、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、それが、存在する示される生物学的巨大分子の少なくとも９５重量％、より好ましくは少なくとも９９重量％構成するように精製される（しかしながら、水、緩衝液、及び他の小分子、特に、１ｋＤａ未満の分子量を有する分子は存在し得る）。

【００３５】

本明細書において使用する場合、用語「単離された」は、その天然源中に核酸またはポリペプチドと一緒に存在する少なくとも１つの他の構成成分（例えば、核酸またはポリペプチド）から分離された核酸またはポリペプチドを指す。一実施形態において、核酸またはポリペプチドは、（存在する場合）溶媒、緩衝液、鉄、または通常それの溶液中に存在する他の構成成分のみの存在下で認められる。用語「単離された」及び「精製された」は、これら天然源中に存在する核酸またはポリペプチドを包含しない。

【００３６】

用語「組換え型」は本明細書でポリペプチドまたはタンパク質を指すために使用されるとき、ポリペプチドまたはタンパク質が組換え型（例えば、微生物、昆虫、または哺乳類の）発現系から誘導されることを意味する。「微生物」は、細菌または真菌（例えば、イースト）発現系で作製された組換え型ポリペプチドまたはタンパク質を指す。産物として、「組換え型微生物」は、原則的生来の内因性物質を含まず、関連した生来のグリコシル化を伴わないポリペプチドまたはタンパク質を定義する。大部分の細菌培養、例えば、大腸菌において発現したポリペプチドまたはタンパク質は、グリコシル化修飾を含まず、イースト中に発現したポリペプチドまたはタンパク質は、哺乳類の細胞内で発現するものと

は異なる、概してグリコシル化パターンを有する。

【００３７】

本明細書で使用される用語「オプティリンク（ＯｐｔｉＬｉｎｋ）」または「オプティリンク化された（ＯｐｔｉＬｉｎｋｅｄ）」は、抗体結合機能を保持しながら、インビトロまたはインビボでの複合体凝集を最小化する一方で、ペイロード複合化負荷を最大化するための、本発明に従った抗体断片の最適化を指す。

【００３８】

担体分子上に治療剤のより高い負荷を提供するための代替の最低カップリング比には、少なくとも６：１、少なくとも７：１、及び少なくとも８：１以上が含まれる。

【００３９】

アミノ酸残基への薬物分子のカップリングは、いくつかの異なるアミノ酸で起こり得る。表１は、リジン残基に向けられた複合化戦略を列挙し、このカップリング法で使用され得るカップリング化学を示す。

【００４０】

【表１】

表１リジンアミノ酸上への薬物のカップリングのための官能基

残基（複数可）	官能基	カップリング化学	結果として生じる結合
リジン	アミン	活性エステル	アミド
		イソチオシアネート	イソチオ尿素
		イソシアン酸	イソ尿素
		アシルアジド	アミド
		スルホニルクロリド	スルホンアミド
		カルボニル、還元する。	シッフ塩基、２級アミン
		エポキシド	２級アミン
		炭酸塩	カルバメート
		フルオロベンゼン誘導体	アリールアミン
		イミドエステル	アミジン
		カルボジイミド	アミド
		無水物	アミド

【００４１】

抗体断片及び模倣物は、アミノ酸配列、ならびに薬物をカップリングさせる官能基の数及び間隔が異なる。複合化のために最も一般的に頻繁に使用される官能基は、Ｎ末端及びリジン残基上に認められる一級アミンである。特異的治療抗体断片複合体の有効性の主な決定要因は、治療剤分子が結合する残基の空間分離である。これらの残基は、有効なカップリング及び得られる複合体の最適な薬物動態のために、異なり、かつ抗体の表面上で形態的に分離されていなければならない。

【００４２】

複合可能な残基は、好ましくは、不安定になるか、または凝集しやすくなることなく、化学修飾に耐えられ得る場所にある。

【００４３】

一般に、タンパク質は、折り重なり、生理学的溶媒中での可溶性を可能にするための親水性表面を有する分子の中心に、疎水性コアを形成する。リジン及びアルギニン等の塩基

性残基、グルタミン酸及びアスパラギン酸等の酸性残基、セリン（及び時折チロシン）、システイン、グルタミン及びアスパラギン等の極性残基はすべて、タンパク質の表面上に一般的に認められる。多くの例において、これらの残基は、そのタンパク質の構造及び機能の維持に関与する。リジン残基は、最も一般的に起こる表面アミノ酸であり［Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，ＧＴ，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ｃｈａｐｔｅｒ １，ｐｇ ３０，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（２００８）］、アルカリのｐＨでＮＨＳ－エステルと優先的に反応する。

【００４４】

単鎖のＦｖ等の抗体断片の例において、各ドメインは、可変重（ＶＨ）ドメイン及び可変軽（ＶＬ）ドメインでできている。これらは、ＶＨドメイン及びＶＬドメインのいずれかのファミリーのうちの１つであり得る。抗原結合ループ（相補性決定領域、すなわちＣＤＲ）の場合、これらの配列は、その同種抗原を認識するための抗体の能力に特有である。これらは、抗体の特異性または親和度を変えるためだけの理由で、操作され得る。ドメイン配列の主な部分は、フレームワーク領域である。（Ｋｎａｐｐｉｋ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２０００，２９６：５７－８６から改良した）図１は、ヒト可変ドメイン内のどの残基が抗体の表面に存在する傾向があり、どの領域がコアの一部として内部にある傾向があるかを示す。抗体間の高度の構造的及び配列相同性を前提として、これらの領域は、概して、すべての抗体配列に適用され得る。表面フレームワーク領域は、荷電残基または極性残基を含む傾向がある。

【００４５】

治療剤及び担体分子の機能特性及び物理特性は、カップリングされていない形態のときの特性と比較して、カップリング形態で定性的に、実質的に変更されない場合、有利である。

【００４６】

定性的に実質的に変更されないとは、我々は、治療剤はその治療機能を保持するが、これは、複合化されたとき定量的に異なり得（例えば、治療機能が、複合化されていない薬物と比較して強化され得る）、担体分子が、複合化されたとき、複合化されていないときと同じ標的（複数可）と結合するが、これは定量的に異なり得る（例えば結合親和度は、より高くあり得る）ことを意味する。

【００４７】

用語「結合親和度」は、（限定されないが、抗体断片と抗原との間等の）担体分子とその標的との間の結合の強度の意味を含む。

【００４８】

本発明の化合物は、１００ｎＭ未満、好ましくは１ｎＭ未満、より好ましくは１０ｐＭ未満、及びさらにより好ましくは０．１ｐＭ未満のＩＣ５０を有するべきである。

【００４９】

化合物が複合化されていないとき、治療剤よりも最大１０倍低いＩＣ５０（すなわち１０倍より効き目がある）を有するのが好ましい。ＩＣ５０は、少なくとも１０倍より低くてもよく（これは、元のＩＣ５０の１０％と同じである）、好ましくは、効力は、複合化されていないＩＣ５０の１００％まで上昇する。さらにより好ましくは、効力は、より高いため、パーセンテージは、好ましくは２００％、５００％、１０００％（すなわち１０倍より効き目がある）、またはそれ以上である。薬物は、それ自体では十分に効き目がない場合がある（例えば、細胞膜を通過することができない）が、ＡＤＣとしては、非常に効き目があり得る（したがって１０００％以上）。

【００５０】

半最大阻害濃度（ＩＣ５０）は、特定の生物学的または生化学的機能の抑制における物質の有効性の尺度である。この尺度は、どれくらいの特定の薬物または他の物質（阻害剤）が、所与の生物学的プロセス（またはそれらの構成成分）を半分にまで抑制するのに必要とされるかを示す。所与の化合物のＩＣ５０の決定は、型どおりの事柄であり、典型的には、用量反応曲線を構築し、逆アゴニスト活性に関する拮抗薬の異なる濃度の影響を調

べることによって決定される。ＩＣ５０値は、アゴニストの最大生物学的反応の半分を抑制するのに必要な濃度を決定することにより、計算される。

【００５１】

化合物は、少なくとも２時間、好ましくは４時間、あるいは、８、１６、３２、６４、または１２８時間のマウス血清半減期を有するべきである。血清半減期は、マウス、またはヒトにおいても測定され得る。化合物は、好ましくは、複合化されていないとき、担体分子よりも最大５倍、好ましくは最大１０倍高い血清半減期を有する。化合物は、複合化されていない形態と比較して、低減された半減期を有し得る。半減期における５０％の降下、例えば、４時間から２時間への降下は、低凝集または低減された凝集等の他の好都合の特徴と関連する場合、薬理学的に許容できる。凝集は、ｓｃＦｖまたはより小さい大きさの断片の１時間未満の急速なクリアランスをもたらし、生物学的利用能を低減させ、また、可能性として有害な免疫反応を誘発する。担体分子の半減期が、複合化されていない担体分子の半減期と近いように維持されると好ましく、小さい降下は許容される。最大１０倍増加の半減期の増加（例えば、マウスにおける４時間から２０時間への増加）が望ましい。

【００５２】

血清半減期は、その初期値の半分に低減される化合物の血清レベルの時間の算出された持続時間である。所与の化合物の血清半減期の決定は、型どおりの事柄であり、典型的に、微生物への化合物投与後の、経時的な血清中の薬物の量を測定することによって決定される。血清半減期は、臨床的有効範囲内の薬物の血清レベルを一貫して達成するために必要な投与体制を決定するため、臨床的に重要である。

【００５３】

本発明の化合物は、室温（例えば２０℃）の生理学的に適合性の緩衝液（例えば、リン酸緩衝食塩水、または生理的食塩水）に、少なくとも１ｍｇ／ｍｌの溶解度を有するべきである。より好ましくは、２ｍｇ／ｍｌ、４ｍｇ／ｍｌ、８ｍｇ／ｍｌ、１０ｍｇ／ｍｌ、１５ｍｇ／ｍｌ、または２０ｍｇ／ｍｌ。一実施形態において、本発明の化合物は、添加剤または賦形剤の非存在下で前記溶解度を有する。代替実施形態において、本発明の化合物は、（例えば、規制機関にとって許容できる賦形剤である残存量または除去不可能な量として存在するとき）１つ以上の添加剤または賦形剤の存在下で、前記溶解度を有する。

【００５４】

本発明の化合物をもたらす複合化支配は、反応及び化合物可溶性を促進するために、添加剤または賦形剤も有し得る。例は、ｐｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ－２０、ｔｗｅｅｎ－８０、グリシン、マルトース、ヒスチジン、ｐｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ－６８、オクタン酸、Ｎ－アセチルトリプトファン、ベンジルアルコール、安息香酸、プロピレングリコール、（クロロ）ブタノール、イソプロパノール、及びグリセロールである［Ｈｏｌｌａｎｄｅｒ　Ｉ．ｅｔ　ａｌ　Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．２００８，１９：３５８－３６１；Ｐａｔａｐｏｆｆ　ＴＷ＆Ｅｓｕｅ　Ｏ．Ｐｈａｒｍ　Ｄｅｖ　Ｔｅｃｈｎｏｌ．２００９，１４：６５９－６４］。これらは通常、処理の間に除去されるが、時折、規制機関にとって許容できる賦形剤である残存量または除去不可能な量として存在する［ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ａｃｃｅｓｓｄａｔａ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ｓｃｒｉｐｔｓ／ｃｄｅｒ／ｉｉｇ／ｉｎｄｅｘ．Ｃｆｍ］。

【００５５】

本発明の化合物は、好ましくは、最大０．５％のポリソルベート、１％のグリセロール、０．５％のグリシン、０．１％のヒスチジン、０．５％のクロロブタノール、５％のプロピレングリコール、２％のベンジルアルコール、０．０５％のオクタン酸、及び／または０．１％のＮ－アセチルトリプトファンの存在下で、上述の溶解度を有する。

【００５６】

本発明の化合物は、室温（例えば２０℃）の生理学的に適合性の緩衝液（例えば、リン酸緩衝食塩水、または生理的食塩水）中で、５％未満、好ましくは１％未満の凝集レベル

を呈するべきである。凝集は、単量体複合体の保持時間特性で溶出する複合体と比較して、高分子量物質のパーセンテージを測定する分析的サイズ排除ＨＰＬＣによって試験され得る。

【００５７】

本発明の化合物は、薬物が細胞の内部または外部の酵素機構、物理機構、または化学機構を介して放出するのに有利にアクセス可能であるという追加の利益がある、類似した質量のタンパク質に関して達成されたものよりも高い薬物：抗体比を有するべきである。

【００５８】

リジン残基は、一般的に、抗体ドメインの表面上に認められる。生殖細胞系ヒトＶＨ１ファミリーのメンバーの場合、５～６個のリジン残基が存在し、これらのうちの１つまたは２つのみが互い対して近い。残基が互いに対して近いという定義は、一次配列において隣接している、したがって、３次元構造で隣接しているものであり得る。あるいは、残基は、一次配列によると離れているが、抗体ドメインの層の構造に起因して、空間中で隣接している場合がある。直接的に隣接したアミノ酸残基は、空間で３～４オングストローム離れていると定義され得る。

【００５９】

直接的に隣接したリジン残基上への治療薬のカップリングは、（凝集の増加及びより劣った可溶性等の）より劣った薬物動態及び治療効果につながる。カップリングは、リジン残基が、好ましくは２つのアミノ酸（３．５～７．５オングストローム）、より好ましくは３つのアミノ酸（７～１２オングストローム）、より好ましくは４つのアミノ酸（１０～１５オングストローム）、さらにより好ましくは５つのアミノ酸（１５～２０オングストローム）、さらにより好ましくは６つのアミノ酸（２０～２５オングストローム）、またはそれ以上さらに離されたとき、より有効である。担体分子は、これらの特性を有するように選ばれるか、選択されるか、または操作されるべきである。担体分子がより最適な分離でより多くのリジン残基を有すれば有するほど、その担体分子が、有効かつ効き目がある複合体をうまく形成できるようになる。

【００６０】

治療薬カップリングのためのアミノ酸残基が互いに対して近いかまたは隣接しているかどうかを決定する方法は、当分野で周知である。（Ｅｕｒｏｐｅａｎ ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ製のｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｍｓａ／等のウェブリソースを使用する）Ｃｌｕｓｔａｌ配列アラインメントは、一次アミノ酸配列を比較するため定評のあるツールである。さらに、担体分子の完全３次元構造データがない場合、既知の構造（例えば、マウスｓｃＦｖの構造）を使用して、担体分子の可能性が高い構造を推定し、それによりカップリングのための残基が空間で近いかまたは隣接しているかどうかを特定する相同性モデリング等の、確立した技法を使用することが可能である。例えば、抗体及び抗体断片によって呈された高度の相同性は、これらの技法が高い確信度で適用され得ることを意味する。無料のデスクトップモデリングプログラムであるＳｗｉｓｓＰＤＢ Ｖｉｅｗｅｒも提供する、Ｓｗｉｓｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ（ｈｔｔｐ：／／ｅｘｐａｓｙ．ｏｒｇ）製のＥｘｐｅｒｔ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ 分析 Ｓｙｓｔｅｍ等の、相同性モデリングのためのウェブリソースが利用可能である。またインペリアルカレッジのＰｈｙｒｅサーバは、相同性モデルを生成することができる（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｓｂｇ．ｂｉｏ．ｉｃ．ａｃ．ｕｋ／約ｐｈｙｒｅ２／ｈｔｍｌ／ｐａｇｅ．ｃｇｉ？ｉｄ＝ｉｎｄｅｘ）［Ｋｅｌｌｅｙ ＬＡ＆Ｓｔｅｒｎｂｅｒｇ ＭＪ．Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２００９；４：３６３－７１］。

【００６１】

リジン残基の分配が複合化及び最適な薬物動態に好ましくない場合、担体分子は、拙劣に離間された（例えば、位置付けが近すぎる）残基を除去するか、またはよく離間された残基を導入するための部位特異的な変異誘発等の、標準の分子的生物学的技法を使用して変えられ得る。

【００６２】
治療剤は、アミノ酸で担体分子と直接カップリングされ得る。あるいは、治療剤は、担体分子と間接的にカップリングされ得る。
【００６３】
細胞毒性薬物を抗体及び抗体断片に複合化させる、多くの手段がある［Ｄｕｃｒｙ，Ｌ，（Ｅｄ）（２０１３），Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｄｒｕｇ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｂｏｏｋ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｖｏｌｕｍｅ １０４５，Ｃｈａｐｔｅｒｓ ９－１２，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ；Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇ（２０１３）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｂｏｏｋ，Ｃｈａｐｔｅｒｓ ２－６，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ］。これを、表２に要約する。リジン残基は、望ましくない架橋等の有害効果を引き起こすことなく、抗体の表面上に複合的に存在し得るため、複合化に好ましい。例えば、リジン上への複合化は、有し、Ｎ－ヒドロキシ－スクシンアミドエステルまたはイソチオシアネート反応基である薬物または薬物－リンカーを使用して、直接的であり得る（表２）。リジン複合化のための間接的な方法には、（Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ｔｈｅｒｍｏ）及びＱｕａｎｔａ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅから入手可能なもの等の）二官能性リンカーを用いてアミノ基の誘導体化して、２－イミノチオラン等の二次反応基を生成して、チオールまたはマレイミド反応基を用いて薬物または薬物－リンカーに複合化するための反応性チオールを生成することをすることが含まれる。一部のリジン残基は、その残基周囲の微小環境に起因した改善された求核性のために、特に複合化しやすい場合がある［Ｄｏｐｐａｌａｐｕｄｉ ＶＲ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２０１０，１０７：２２６１１－６．］。天然型化学的ライゲーション等のさらなる複合化の方法は、既知であり［Ｈａｃｋｅｎｂｅｒｇｅｒ ＣＰ，＆Ｓｃｈｗａｒｚｅｒ Ｄ．Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ Ｉｎｔ Ｅｄ Ｅｎｇｌ．２００８；４７：１００３０－７４．］、部位特異的複合化は、酵素の使用［Ｂｅｈｒｅｎｓ ＣＲ＆Ｌｉｕ Ｂ．ＭＡｂｓ．２０１４，６：４６－５３］、及びジスルフィド架橋技法を含む［Ｃａｓｔａｎｅｄａ，Ｌ ｅｔ ａｌ．Ｃｈｅｍ Ｃｏｍｍ，２０１３，４９，８１８７－８１８９；Ｂａｄｅｓｃｕ Ｇ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ Ｃｈｅｍ．２０１４，２５：１１２４－３６．］。最近の複合化方法には、メチルスルホニルフェニルオキサジアゾール反応性リンカーを使用したチオエーテルの形成と［Ｂａｒｂａｓ Ｃ Ｆ Ｂ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２０１４，２５，１４０２－１４０７］、チロシンクリック反応の使用を介したチロシン選択的標識化と［Ｂａｒｂａｓ Ｃ Ｆ Ｂ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２０１３，２４，５２０－５３２、テトラジンと歪んだアルキンとの間の逆電子要請型ディールス・アルダー（ＩｅＤＤＡ）反応と、が含まれる［Ｆｏｘ，Ｊ Ｍ．２００８，１３０，１３５１８－１３５１９］，［Ｃｈｉｎ Ｊ Ｗ ａｎｄ Ｌａｎｇ Ｋ Ｃｈｅｍｉｃａｌ ｒｅｖｉｅｗｓ，２０１４，１１４，４７６４－４８０６］。
【００６４】

【表２】

表２：結合基の結合－直接的複合化		
タンパク質上の反応基	薬物上の相補基	得られる結合基
アミン／アニリン	活性化エステル	アミド
アミン／アニリン	シアン酸	尿素
アミン／アニリン	イソチオシアネート	チオ尿素
アミン／アニリン	イミドエステル	アミジン
アミン／アニリン	活性化カルボン酸	アミド
アミン／アニリン	アシルアジド	アミド
アミン／アニリン	ハロゲン化アシル	アミド
アミン／アニリン	アシルニトリル	アミド
アミン／アニリン	ハロゲン化アリール	アリールアミン
アミン／アニリン	ハロゲン化アルキル	アルキルアミン
アミン／アニリン	無水物	アミド／イミド
アミン／アニリン	アルデヒド	イミン
アミン／アニリン	ハロゲン化スルホニル	スルホンアミド
アミン／アニリン	スルホン酸エステル	アルキルアミン
アミン／アニリン	ハロトリアジン	アミノトリアジン
アミン	エポキシド	アルキルアミン
チオール	マレイミド	チオエーテル
チオール	ハロアセトアミド	チオエーテル
チオール	ハロゲン化アルキル	チオエーテル
チオール	ハロゲン化アリール	アリールチオエーテル
チオール	アクリルアミド	チオエーテル
チオール	アジリジン	チオエーテル
チオール	エポキシド	チオエーテル
チオール	ジスルフィド	ジスルフィド
チオール	ビニルスルホン	チオエーテル
アルコール／フェノール	ハロゲン化アシル	エステル
アルコール／フェノール	アシルニトリル	エステル
アルコール／フェノール	ハロゲン化アルキル	エーテル
アルコール／フェノール	無水物	エステル
アルコール／フェノール	ハロトリアジン	トリアジニルエーテル
アルコール／フェノール	イソシアン酸	ウレタン／カルバメート
アルコール	活性化カルボン酸	エステル
アルコール	ホスホラミダイト	亜リン酸エステル
アルコール	ハロゲン化シリル	シリルエステル
アルコール	エポキシド	エーテル
カルボン酸	ハロゲン化アルキル	エステル
カルボン酸	エポキシド	エステル
カルボン酸	ジアゾアルカン	エステル
活性化カルボン酸	アミン／アニリン	アミド
活性化カルボン酸	アルコール	エステル

活性化カルボン酸	ヒドラジン	ヒドラジド
アルデヒド／ケトン	ヒドラジン	ヒドラゾン
アルデヒド／ケトン	ヒドロキシアミン	オキシム
アルデヒド／ケトン	アミン	イミン
ケトン（非天然アミノ酸））	ヒドロキシルアミン	オキシム
アジド（非天然アミノ酸）	アルキン	１，２，３－トリアゾール
アジド（非天然アミノ酸）	歪んだアルキン	１，２，３－トリアゾール
アルデヒド（ホルミルグリシン）	ヒドラジン	アザカルボリン

【００６５】
本発明の一実施形態は、複数の（ｎ個の）リジン残基へのＮ－ヒドロキシ－スクシンイミドエステルを有する薬物の直接的複合化であり、ｎ＞４である。本発明の別の実施形態は、架橋剤であるＳＭＣＣを使用して、表面リジン残基を修飾し、チオールまたはマレイミド基を有する薬物または薬物リンカーに複合化させるための還元できるチオールを生成する、リジン残基への間接的複合化である。
【００６６】
薬物と同じ反応基との混合物は、２つ以上の細胞毒性治療薬物の種類、または治療薬物と蛍光色素等の診断剤との組み合わせとの複合体を生成する、化学複合化反応で使用され得る［Ｆｅｒｎａｎｄｅｚ－Ｆｅｒｎａｎｄｅｚ Ａ ｅｔ ａｌ．Ａｐｐｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１，１６５：１６２８－５１．］。そのような複合体は、薬物耐性を克服するか、または組み合わせた撮像及び治療（セラノスティック）を可能にするのに、潜在的に有用であり得る。
【００６７】
「小分子」とは、我々は、天然型かまたは（例えば、化学合成を介して）人工的に作製されたかに関わらず、比較的低い分子量を有する分子を意味する。好ましい小分子は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトにおいて、局部的または全身的効果を生成する生物学的に活性である。ある特定の好ましい例において、小分子は、薬物であり、小分子は、「薬物分子」もしくは「薬物」、または「治療剤」と称される。ある特定の実施形態において、薬物分子は、約５ｋＤａ以下の分子量（ＭＷ）を有する。他の実施形態において、薬物分子は、約１．５ｋＤａ以下のＭＷを有する。他の実施形態において、薬物分子は、ビンカアルカロイド、ドロスタチン、オーリスタチン、チューブリシン（ｔｕｂｕｌｙｓｉｎ）、デュオカルマイシン、キナーゼ阻害剤、エリプチシン、ＭＥＫ阻害剤、ＫＳＰ阻害剤、ＤＮＡアルキル化剤、ＤＮＡ干渉物質、及びトポイソメラーゼ阻害剤、ならびにそれらの類似体から選択される［Ｃａｒｍｅｎ Ａｖｅｎｄａｎｏ ａｎｄ Ｊ．Ｃａｒｌｏｓ Ｍｅｎｅｎｄｅｚ（２００８）．Ｔｈｅ ｍｅｄｉｃｉｎａｌ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ ａｎｔｉ－ｃａｎｃｅｒ ｄｒｕｇｓ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｐｒｅｓｓ；Ｃｒａｇｇ ＧＭ ｅｔ ａｌ （２０１２）．Ａｎｔｉ－ｃａｎｃｅｒ ａｇｅｎｔｓ ｆｒｏｍ ｎａｔｕｒａｌ ｐｒｏｄｕｃｔｓ，２ｎｄ ｅｄ，ＣＲＣ ｐｒｅｓｓ］。好ましくは、必ずしもそうではないが、薬物は、適切な政府機関または行政体、例えば、ＦＤＡによって、使用のために安全かつ有効であると既に見なされているものである。例えば、ＦＤＡによって一覧表にされているヒトの使用のための薬物はすべて、この技法を用いる使用に好適であると見なされる。
【００６８】
実践で使用され得る薬物分子の種類には、抗癌物質、放射性核種、ビタミン、抗ＡＩＤＳ物質、抗生物質、免疫抑制剤、抗ウイルス物質、酵素阻害剤、神経毒、オピオイド、睡眠薬、抗ヒスタミン剤、潤滑剤、精神安定薬、抗痙攣薬、筋弛緩剤及び抗パーキンソン物

質、チャネル遮断薬を含む抗痙攣薬及び筋肉収縮薬（ｍｕｓｃｌｅｃｏｎｔｒａｃｔａｎｔ）、縮瞳薬及び抗コリン作動薬、抗緑内障化合物、抗寄生虫及び／または抗原生動物化合物、細胞成長阻害剤及び抗接着性分子を含む細胞－細胞外マトリックス相互作用の調節剤、血管拡張剤、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはタンパク質合成の阻害剤、抗高血圧、鎮痛薬、解熱薬、ステロイド及び非ステロイド抗炎症剤、抗血管新生抑制因子、抗分泌性因子、抗凝固薬及び／または抗血栓剤、局所麻酔、点眼薬（ｏｐｈｔｈａｌｍｉｃｓ）、プロスタグランジン、抗うつ剤、抗精神病薬物質、制吐薬、造影剤が含まれるが、これらに限定されない。

【００６９】

担体分子が標的に選択的に結合することが好ましい。標的は、標的細胞または細胞外標的分子であり得る。標的細胞は、治療剤が送達されるものであるか、または治療剤が速達される組織内に配置される。

【００７０】

用語「選択的結合」及び「結合選択性」は、本発明の抗体の可変領域が本発明のポリペプチドを認識し、排他的に結合する（すなわち、ポリペプチドのファミリー内に認められる配列相同性、相同性、または類似点にもかかわらず、本発明のポリペプチドを他の類似したポリペプチドと区別することができる）が、抗体の可変領域外、具体的には、分子の定常領域内の配列との相互作用によって、他のタンパク質（例えば、ＥＬＩＳＡ技法におけるＳ．ａｕｒｅｕｓタンパク質Ａまたは他の抗体）とも相互作用し得ることを指す。本発明の抗体の結合選択性を決定するためのスクリーニングアッセイは、当分野で周知であり、日常的に実施されている。そのようなアッセイの包括的な考察については、Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．（Ｅｄｓ），Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８８），Ｃｈａｐｔｅｒ ６を参照されたい。

【００７１】

担体分子は、標的細胞と結合すると、細胞内部の作用部位に治療剤を運ぶために、細胞内へと内在化し得る。代替的には、担体分子は、標的または標的細胞と結合すると、細胞内へと内在化されず、かわりに治療剤が細胞の外側で作用する。さらなる代替手段は、担体分子が、標的の結合後に治療剤から分離するものである。換言すると、治療剤は、担体から放出されて、遊離分子になる。次いで、これらの遊離分子は、細胞の外側で作用し得るか、または非抗体依存経路によって細胞内へ取り込まれ得る。

【００７２】

一実施形態において、担体分子は、抗体断片であり得る。用語「抗体断片」は、全抗体のドメインのすべてを含まない任意の抗体系分子を指すと見なされるものとする。野生型抗体、合成抗体、組換え型抗体、または抗体ハイブリッドの断片を包含することが意図される。

【００７３】

抗体断片が全抗体のＦｃ領域を含まない場合、好ましい。具体的には、抗体断片が全抗体のＣＨ２及びＣＨ３領域を含まない場合、好ましい。

【００７４】

本発明において使用するのに好適な抗体断片は、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ－ＳＨ、ｄｓＦｖ、ｂｃ－ｓｃＦｖ、ｓｄＡｂ、ｄｉ－ｓｃＦｖ（別名ｂｉ－ｓｃＦｖ）、Ｆｃａｂ、ドメイン抗体、ナノボディ、ＶＨＨドメイン、二重特異性Ｔ細胞エンゲイジャー、ダイアボティ、及びタンダブ等の二重特異性形態から選択される。

【００７５】

抗体断片は、または固形腫瘍内へのより早い浸潤、正常組織との交差反応性の低減、及び循環からのより迅速なクリアランス等の、完全抗体よりも有利な特性を有し、したがって全体の正常組織暴露を低減させる全免疫グロブリンの機能部分である。抗体断片がより早い薬物動態を示し、組織内へ分散し、より迅速に排出することは、当分野で周知である

（ＡＤＭＥ吸着、分配、代謝、及び排泄特性）。抗体断片はまた、微生物発現系等のより費用対効果の高い系で産生することがより容易である［ｄｅ Ｍａｒｃｏ Ａ．Ｍｉｃｒｏｂ Ｃｅｌｌ Ｆａｃｔ．２００９，８：２６；Ｓｐａｄｉｕｔ Ｏ ｅｔ ａｌ．Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１４，３２：５４－６０］。

【００７６】

抗体断片は、化学的開裂または酵素的開裂によって生成され得るが、より好ましくは、組換え型ＤＮＡ技法を使用して生成される。後者は、原核細胞株または真核細胞株における不確定のタンパク質発現、及び改善されたかまたは付加的特性を有する断片をもたらす遺伝子改変を可能にする。抗体断片は、通常、Ｖ－ドメインが抗原結合のための相補性決定領域（ＣＤＲ）またはループを含むため、少なくとも１つの可変（Ｖ－）ドメインを有する［Ｃａｒｔｅｒ ＰＪ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００６，６：３４３－５７］。最近になって、ＣＤＲ様ループが非可変ドメイン内へと挿入され（例えば、定常重３、ＣＨ３ドメイン）、これらのドメインが有用または所定の標的に結合することを可能にしている［Ｗｏｚｎｉａｋ－Ｋｎｏｐｐ，Ｇ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．Ｄｅｓ．Ｓｅｌ．２０１０，２３，２８９－２９７］。

【００７７】

細胞毒性薬物のための担体ビヒクルとして効果的に使用される抗体断片の場合、抗体断片は、タンパク質安定性、抗体抗原結合、ならびに可溶性、凝集、及び免疫原性等の薬物の好ましい特性に有害に影響を与えずに、化学複合化（または強力かつ特異的非共有相互作用）を介した高薬物負荷を可能にする生物物理特性を有さなければならない。極稀に、これらの特徴は、抗体断片固有であり［Ｗｏｒｎ Ａ＆Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ Ａ．Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２００１，３０５：９８９－１０１０］、そのため、これらの付加的な利点は、これらを実際に有用にするために、抗体断片へと操作されなければならない［Ｓｃｈａｅｆｅｒ ＪＶ＆Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ Ａ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ Ｄｅｓ Ｓｅｌ．２０１２，２５：４８５－５０６］。そのような特徴の一例は、抗体断片上への付加的またはより最適に分布した表面リジン残基の組み込み、したがって、アミン特異的化学を使用した薬物複合化のその能力を上昇させることである。最適に分布したシステイン、チロシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、アスパラギン、ヒスチジン、及びセリン等の他のアミノ酸が使用され得るが、リジンが、複合化のための、確立されかつ好結果の化学手法、及び特異的活性化基のない複合化に対する相対的不活性さのために、より好ましい［Ｄｕｃｒｙ，Ｌ，（Ｅｄ）（２０１３），Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｄｒｕｇ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｂｏｏｋ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｖｏｌｕｍｅ １０４５，Ｃｈａｐｔｅｒ １０，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ］。ｐ－アセチルフェニルアラニン及びホルミル－グリシン等の非天然型アミノ酸も、使用され得る［Ｂｅｈｒｅｎｓ ＣＲ＆Ｌｉｕ Ｂ．ＭＡｂｓ．２０１４，６：４６－５３］。抗体断片修飾の位置の識別は、利用可能であれば抗体断片（または親全抗体）の３次元構造の直接的分析により得るか、またはＰｈｙｒｅ等のいくつかのソフトウェアリソースを使った相同性モデリングにより得る［Ｋｅｌｌｅｙ ＬＡ＆Ｓｔｅｒｎｂｅｒｇ ＭＪ．Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２００９；４：３６３－７１］。位置選択のための基準には、（１）（ＩＭＧＴまたはＫａｂａｔ等のデータベースから識別されたその位置で既に好ましいか、もしくはその位置に保存されたアミノ酸の使用［Ｐａｔｒｉｃｋ Ｃｈａｍｅｓ（ｅｄ．），Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．９０７，Ｃｈａｐｔｅｒ １］）、または抗体断片変異体を作製もしくは試験することによる実践的実証をとおして、（２）抗原結合に干渉するであろう位置から離れた残基の分布、及び、（３）複合残基が化学反応または薬物放出反応の間、互いを立体的に邪魔しない（または邪魔しないと予測される）か、または凝集をもたらす極めて疎水的なパッチを形成するような複合残基の分離が含まれる。

【００７８】

タンパク質表面リジン残基の最適化は、抗原結合、タンパク質安定性、可溶性、または

凝集特性に有害に影響を与えないと同時に、タンパク質表面リジン残基が生物複合化によりアクセス可能であり、より完全、したがってより均質な複合化反応を可能にするように、（例えば、部位特異的変異誘発によって）増加、減少、または再離間により達成され得る。残基は、個々に、段階的に、または複合的に操作され得る。

【００７９】

発現させる抗体断片または最適化された抗体断片をコードするヌクレオチド配列は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ によって記載されるもの等の確立された分子生物学的方法を使用して、既存の遺伝子配列の変異誘発によって、または遺伝子合成によって作製され、配列／構造確認のためのクローニングベクター内へ挿入され、タンパク質発現のための適切な調節要素を有するベクター内へと再クローンされ得る［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ ｂｏｏｋ（２０００），３ｒｄ Ｅｄ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｕｒ］ または［Ｐａｔｒｉｃｋ Ｃｈａｍｅｓ（ｅｄ．），Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．９０７，Ｃｈａｐｔｅｒ １８－２３］。これらの要素には、プロモーター、エンハンサー、停止剤、翻訳調節配列、及びクローン選択のためのマーカー遺伝子（例えば、大腸菌に対するカルベニシリン、哺乳類の細胞のためのネオマイシン）が含まれる。

【００８０】

抑圧可能、恒常的、または誘導性の原核発現系が、使用され得る。適切な大腸菌プロモーターには、Ｌａｃ、Ｔａｃ、Ｔ７、Ｔ４、ＳＰ６、Ｔ３、ラムダＰＲ／ＰＬ、Ｔｒｐ、ＲｅｃＡ、及び熱ショックプロモーターが含まれる。代替の原核宿主には、対応するプロモーターを有する桿菌及び他の細菌が含まれる。

【００８１】

大腸菌が宿主として使用され得［ｄｅ Ｍａｒｃｏ Ａ．Ｍｉｃｒｏｂ Ｃｅｌｌ Ｆａｃｔ．２００９，８：２６；Ｓｐａｄｉｕｔ Ｏ ｅｔ ａｌ．Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１４，３２：５４－６０］、適切な株には、ＪＭ１０９、ＴＧ１、ＨＢ２１５１、ＸＬ１、ＢＬ２１、ＢＬ２１（ＤＥ３）、Ｅ．Ｃｏｌｉ ＳＨＵＦＦＬＥ（登録商標）、Ｅ．Ｃｏｌｉ Ｏｒｉｇａｍｉ（登録商標）、Ｒｏｓｅｔｔａ（登録商標）、及びＮｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏｌａｂｓまたはＭｅｒｃｋ等の供給会社製の他の株等のＫ１２またはＢ誘導体が含まれる。

【００８２】

ベクター発現系には、ジスルフィド結合形成を可能にするための（抗体断片遺伝子（複数可）に付加されたｐｅｌＢまたはｏｍｐＡリーダー配列を使用して、周辺質分泌を可能にするもの［ｄｅ Ｍａｒｃｏ Ａ．Ｍｉｃｒｏｂ Ｃｅｌｌ Ｆａｃｔ．２００９，８：２６］、またはジスルフィド結合形成を可能にするために酸化還元修飾された宿主におけるサイトゾル発現が含まれる［Ｓｏｎｏｄａ Ｈ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ Ｐｕｒｉｆ．２０１０，７０：２４８－５３］。チオレドキシン還元酵素（ｔｒｘ）等の付加的融合タンパク質は、折り畳み及び精製を支援するために付加され得［Ｓｏｎｏｄａ Ｈ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ Ｐｕｒｉｆ．２０１０，７０：２４８－５３］、これらは、その後、Ｐｒｏｍｅｇａ等の供給会社から市販されている（ＴＥＶまたはｆａｃｔｏｒ－Ｘａ等の）特異的に導入されたペプチド開裂タグをとおして、タンパク質分解によって除去される。本発明の特定の実施形態には、大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）中でｐＥＴ２０ｂ等のベクターを使用した周辺質発現、及びＥ．ｃｏｌｉ ＳＨＵＦＦＬＥ（登録商標）中でベクターｐＥＴ３２Ｘａ／ＬＩＣを使用したサイトゾル発現が含まれる［Ｌｏｂｓｔｅｉｎ Ｊ ｅｔ ａｌ Ｍｉｃｒｏｂ Ｃｅｌｌ Ｆａｃｔ．２０１２，１１：５６］。鎖内のジスルフィドを必要としない操作された抗体は、細胞周辺腔内へ分泌される必要はない。

【００８３】

核酸は、イースト、昆虫、及び哺乳類の細胞等の真核宿主内でも発現し得る［Ｐａｔｒｉｃｋ Ｃｈａｍｅｓ（ｅｄ．），Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ｍｅｔ

hods and Protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology, vol. 907, Chapter 18－23］］。イースト細胞には、ピキア・パストリス及びサッカロマイセス・セレビシエが含まれ、昆虫細胞には、ショウジョウバエが含まれ、哺乳類の細胞には、齧歯類（CHO、ATCC－CCL61、SP2／0）、非ヒト霊長類（COS－7、ATCC CRL1651）、及びヒト細胞（HEK ATCC 85257）が含まれる。ピキア発現のために使用されるpPIC系のベクター、昆虫細胞発現のために使用されるpBLUEBAC、及び哺乳類細胞発現のために使用されるpCDNA1／2／3／4において見出されるもの等の適切なプロモーター及び調節要素が使用されるべきである。哺乳類の細胞発現プロモーターの例には、SV40エンハンサー、IgH、またはカッパエンハンサー等の適切なエンハンサーを有するSV40、CMV、IgHが含まれる。真核発現の場合、適切な分泌シグナルが、タンパク質折り畳み、（必要な場合）グリコシル化、ジスルフィド結合形成、及び細胞外転位を可能にするために、分泌系の通過のために遺伝子に付加されなければならない。哺乳類の分泌シグナル配列の一例は、免疫グロブリンシグナル配列である。

【0084】

異種性宿主内で発現したタンパク質は、いくつかの異なる手法を使用して単離及び精製され得る［Scopes（1993）Protein 精製：Principles and Practice（Springer Advanced Texts in Chemistry）］。培養液上清は、遠心分離によって採取され得、細胞は、溶解され得る（例えば化学洗浄剤）か、または物理的破壊され（例えば、加圧型細胞破壊装置、超音波処理）、可溶性または不溶性画分が保持される。タンパク質が可溶性である場合、イオン交換、（ポリHIS、FLAG、cMyc等の事前に操作されたタグを使用した）親和力、及びサイズ排除クロマトグラフィーが、自然な条件下で使用され得る。タンパク質が不溶性である場合、（例えば、尿素による）化学変性、続いて再折り畳み［Deonarain MP&Epenetos AA. Br J Cancer. 1998, 77：537－46］、または変性条件下での精製（例えば、ポリHIS固定化金属親和性クロマトグラフィー、IMAC）が使用され得る。最終タンパク質純度を、SDS－PAGE、SEC、アミノ酸分析、または質量分析法等の分析ツールを使用して評価し、最終タンパク質機能は、ELISA、流動細胞計測法、免疫組織化学的もしくは細胞生物学的アッセイ［Harlow&Lane（1998）Using antibodies, Cold Spring Harbour］、またはBiacore－SPR［Van Regenmortel MH et al. J. Mol Recognit. 1998、11：163－7］を使用して評価する。

【0085】

一実施形態において、担体分子は、抗体模倣物でもよい。用語「抗体模倣物」は、抗体のように、抗原と特異的に結合し得るが、抗体と構造的に関連していない有機化合物を指すと見なされるものとする。これらは通常、約3～20kDaのモル質量を有する人工ペプチドまたはタンパク質である。核酸及び小分子は、抗体模倣物と見なされ得るが、抗体模倣物には、これらから構成された人工抗体、抗体断片、及び融合タンパク質は含まれない。一部の種類の抗体模倣物は、ベータシート等の抗体様ペプチド高次構造を有する。

【0086】

本発明において使用するのに好適な抗体模倣物［Wurch T et al. Trends Biotechnol. 2012, 30：575－82］は、DARPin、アフィボディ、アフィチン、アンチカリン、アビマー、クニッツドメインペプチド、アドネクチン、センチリン、Fynomers、IgNAR、及びモノボディである。

【0087】

担体分子は、ヒト化されているか、またはヒトであってもよい。

【0088】

ヒト化抗体は、投与された免疫グロブリンに対するそのヒトによる免疫反応を引き起こ

さずに、ヒトに投与するのに好適である。抗体のヒト化形態は、ヒト免疫グロブリンの配列を主に含み、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小配列を含む、損傷を受けていない免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、または（抗体のＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２または他の抗原結合部分配列等の）それらの断片である。ヒト化は、Ｗｉｎｔｅｒ及びその同僚の方法に従って行なわれ得る（Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３－３２７（１９８８）；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３９：１５３４－１５３６（１９８８））。一部の事例において、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体は、受容者抗体内または移入されたＣＤＲまたはフレームワーク配列内のいずれにも認められない残基も含み得る。一般に、ヒト化抗体は、ＣＤＲ領域のすべて、または実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものと対応し、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも１つ、典型的に２つの可変領域の実質的にすべてを含む。ヒト化抗体は、好ましくは、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンの一部分も含む（Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９８６；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８；ａｎｄ　Ｐｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．，２：５９３－５９６（１９９２））。

【００８９】

本発明の化合物の担体分子の好ましい標的は、５Ｔ４、ＡＯＣ３、Ｃ２４２、ＣＡ－１２５、ＣＣＬ１１、ＣＣＲ５、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ１５、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ３１、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ３８、ＣＤ４０、ＣＤ４１、ＣＤ４４、ＣＤ５１、ＣＤ５２、ＣＤ５４、ＣＤ５６、ＣＤ６２Ｅ、ＣＤ６２Ｐ、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ７０、ＣＤ７４、ＣＤ８０、ＣＤ１２５、ＣＤ１３８、ＣＤ１４１、ＣＤ１４７、ＣＤ１５２、ＣＤ１５４、ＣＤ３２６、ＣＥＡ、ＣＴＬＡ－４、ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＥｐＣＡＭ、葉酸受容体、ＦＡＰ、フィブロネクチンスプライスバリアント（ＥＤＡ、ＥＤＢ、ＣＳＩＩＩ）、ＧＤ２、ＧＤ３、ＧＰＮＭＢ、ＨＧＦ、ＨＥＲ２、ＩＣＡＭ、ＩＧＦ－１受容体、ＶＥＧＦＲ１、ＥｐｈＡ２、ＴＲＰＶ１、ＣＦＴＲ、ｇｐＮＭＢ、ＣＡ９、Ｃｒｉｐｔｏ、ＡＣＥ、ＡＰＰ、アドレナリン受容体－ベータ２、クローディン３、メソセリン、ラクトアドヘリン、ＩＬ－２受容体、ＩＬ－４受容体、ＩＬ－１３受容体、（α４、αｖβ３、αｖβ５、αｖβ６、α１β４、α４β１、α４β７、α５β１、α６β４、αＩＩｂβ３インテグリンを含む）インテグリン、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－γ、ＩｇＥ、ＩｇＥ、ＩＧＦ－１受容体、ＩＬ－１、ＩＬ－１２、ＩＬ－２３、ＩＬ－１３、ＩＬ－２２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、インターフェロン受容体、ＩＴＧＢ２（ＣＤ１８）、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ）、Ｌ－セレクチン（ＣＤ６２Ｌ）、ムチン、ＭＵＣ１、ミオスタチン、ＮＣＡ－９０、ＮＧＦ、ＰＤＧＦＲα、ホスファチジルセリン、前立腺癌腫細胞、緑膿菌、狂犬病、ＲＡＮＫＬ、呼吸器合胞体ウイルス、Ｒｈ因子、ＳＬＡＭＦ７、スフィンゴシン－１－ホスフェート、ＴＡＧ－７２、Ｔ細胞受容体、テネイシンＣ、ＴＧＦ－１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β、ＴＮＦ－α、ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、腫瘍抗原ＣＴＡＡ１６．８８、ＶＥＧＦ－Ａ、ＶＥＧＦＲ２、ビメンチン、マトリックス受容体及び類似した標的、ホスホコリン等のアポトーシスマーカーを含む細胞表面または腫瘍マーカーであるが、それらに限定されない。

【００９０】

具体的には、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ３、ＭＵＣ１、ＥｐＣＡＭ、ＣＥＡ、フィブロネクチン－ＥＤＢ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＬｅＹ、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ７９ｂ、ＧＰＮＭＢ、ＰＳＭＡ、ＣＤ５６、ＣＤ３７、葉酸受容体、ＣＡ６、ＣＤ２７Ｌ、ＭＵＣ１６、ＣＤ６６ｅ、ＣＤ７４、Ｔｒｏｐ－２、またはグアニル酸シクラーゼと特異的に結合すると好適である。

【００９１】

本発明の担体分子は、次の全抗体：３Ｆ８、アバゴボマブ、アブシキシマブ（ＲＥＯＰＲＯ）、アダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ）、アデカツムマブ、アフェリモマブ、アフツズマブ、アラシズマブ、ＡＬＤ５１８、アレムツズマブ（ＣＡＭＰＡＴＨ）、アルツモマブ、アマツキシマブ、アナツモマブ、アンルキンズマブ、アポリズマブ、アルシツモマブ（ＣＥＡ－ＳＣＡＮ）、アセリズマブ、アトリズマブ（トシリズマブ、Ａｃｔｅｍｒａ、ＲｏＡｃｔｅｍｒａ）、アトロリムマブ、バピネオズマブ、バシリキシマブ（Ｓｉｍｕｌｅｃｔ）、バビツキシマブ、ベクツモマブ（ＬＹＭＰＨＯＳＣＡＮ）、ベリムマブ（ＢＥＮＬＹＳＴＡ）、ベンラリズマブ、ベルチリムマブ、ベシレソマブ（ＳＣＩＮＩＴＩＭＵＮ）、ベバシズマブ（ＡＶＡＳＴＩＮ）、ビシロマブ（ＦＩＢＲＩＳＣＩＮＴ）、ビバツズマブ、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブ、ブリアキヌマブ、カナキヌマブ（ＩＬＡＲＩＳ）、カンツズマブ、カプロマブ、カツマキソマブ（ＲＥＭＯＶＡＢ）、ＣＣ４９、セデリズマブ、セルトリズマブ、セツキシマブ（ＥＲＢＩＴＵＸ）、シタツズマブ、シクスツムマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブ、コナツムマブ、ＣＲ６２６１、ダセツズマブ、ダクリズマブ（ＺＥＮＡＰＡＸ）、ダラツムマブ、デノスマブ（ＰＲＯＬＩＡ）、デツモマブ、ドルリモマブ、ドルリキシズマブ、エクロメキシマブ、エクリズマブ（ＳＯＬＩＲＩＳ）、エドバコマブ、エドレコロマブ（ＰＡＮＯＲＥＸ）、エファリズマブ（ＲＡＰＴＩＶＡ）、エフングマブ（ＭＹＣＯＧＲＡＢ）、エロツズマブ、エルシリモマブ、エンリモマブ、エピツモマブ、エプラツズマブ、エルリズマブ、エルツマキソマブ（ＲＥＸＯＭＵＮ）、エタラシズマブ（ＡＢＥＧＲＩＮ）、エキスビビルマブ、ファノレソマブ（ＮＥＵＴＲＯＳＰＥＣ）、ファラリモマブ、ファーレツズマブ、フェルビズマブ、フェザキヌマブ、フィギツムマブ、フォントリズマブ（ＨｕＺＡＦ）、フォラビルマブ、フレソリムマブ、ガリキシマブ、ガンテネルマブ、ガビリモマブ、ゲムツズマブ、ギレンツキシマブ、グレムバツムマブ、ゴリムマブ（ＳＩＭＰＯＮＩ）、ゴミリキシマブ、イバリズマブ、イブリツモマブ、イゴボマブ（ＩＮＤＩＭＡＣＩＳ－１２５）、イムシロマブ（ＭＹＯＳＣＩＮＴ）、インフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ）、インテツムマブ、イノリモマブ、イノツズマブ、イピリムマブ、イラツムマブ、ケリキシマブ、ラベツズマブ（ＣＥＡ－ＣＩＤＥ）、レブリキズマブ、レマレソマブ、レルデリムマブ、レクサツムマブ、リビビルマブ、リンツズマブ、ルカツムマブ、ルミリキシマブ、マパツズマブ、マスリモマブ、マツズマブ、メポリズマブ（ＢＯＳＡＴＲＩＡ）、メテリムマブ、ミラツズマブ、ミンレツモマブ、ミツモマブ、モロリムマブ、モタビズマブ（ＮＵＭＡＸ）、ムロモナブ－ＣＤ３（ＯＲＴＨＯＣＬＯＮＥ　ＯＫＴ３）、ナコロマブ、ナプツモマブ、ナタリズマブ（ＴＹＳＡＢＲＩ）、ネバクマブ、ネシツムマブ、ネレリモマブ、ニモツズマブ（ＴＨＥＲＡＣＩＭ）、ノフェツモマブ、オクレリズマブ、オデュリモマブ、オファツムマブ（ＡＲＺＥＲＲＡ）、ｏｌａｒａｔｕｍａｂ、オマリズマブ（ＸＯＬＡＩＲ）、オンテシズマブ、オポルツズマブ、オレゴボマブ（ＯＶＡＲＥＸ）、オテリキシズマブ、パギバキシマブ、パリビズマブ（ＳＹＮＡＧＩＳ）、パニツムマブ（ＶＥＣＴＩＢＩＸ）、パノバクマブ、パスコリズマブ、ペムツモマブ（ＴＨＥＲＡＧＹＮ）、ペルツズマブ（ＯＭＮＩＴＡＲＧ）、パキセリズマブ、ピンツモマブ、プリリキシマブ、プリツムマブ、ＰＲＯ１４０、ラフィビルマブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ（ＬＵＣＥＮＴＩＳ）、ラキシバクマブ、レガビルマブ、レスリズマブ、リロツムマブ、リツキシマブ（ＲＩＴＵＸＡＮ）、ロバツムマブ、ロンタリズマブ、ロベリズマブ（ＬＥＵＫＡＲＲＥＳＴ）、ルプリズマブ（ＡＮＴＯＶＡ）、サツモマブペンデチド、セビルマブ、シブロツズマブ、シファリムマブ、シルツキシマブ、シプリズマブ、ソラネズマブ、ソネプシズマブ、ソンツズマブ、スタムルマブ、スレソマブ（ＬＥＵＫＯＳＣＡＮ）、タカツズマブ（ＡＦＰ－ＣＩＤＥ）、テトラキセタン、タドシズマブ、タリズマブ、タネズマブ、タプリツモマブパプトックス、テフィバズマブ（ＡＵＲＥＸＩＳ）、テリモマブ、テナツモマブ、テネリキシマブ、テプリズマブ、ＴＧＮ１４１２、チシリムマブ（トレメリムマブ）、ティガツズマブ、ＴＮＸ－６５０、トシリズマブ（アトリズマブ、ＡＣＴＥＭＲＡ）、トラリズマブ、トシツモマブ（ＢＥＸＸＡＲ）、トラスツズマブ（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ）、トレメリムマブ、ツコツズマブ、ツビルマブ、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ（ＳＴＥＬＥＲＡ）、バパリキシマブ

、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ベパリモマブ、ビジリズマブ（ＮＵＶＩＯＮ）、ボロシキシマブ（ＨＵＭＡＳＰＥＣＴ）、ボツムマブ、ザルツムマブ（ＨｕＭＥＸ－ＥＧＦｒ）、ザノリムマブ（ＨｕＭＡＸ－ＣＤ４）、ジラリムマブ、及びゾリモマブのうちのいずれかから誘導されたか、またはそれと同等の結合特異性を有する抗体断片であり得る。

【００９２】

治療剤は、好ましくは、細胞毒性剤または細胞分裂阻害剤である。

【００９３】

細胞毒性剤とは、我々は、典型的には細胞を殺すことによって、細胞に対して有毒である作用剤を意味する。毒性は、ネクローシスまたはアポトーシスにより細胞死をもたらし得る。

【００９４】

細胞分裂阻害剤とは、我々は、細胞成長及び／または増殖を抑制するか停止させる作用剤を意味する。

【００９５】

好ましくは、治療剤は、治療剤の次のクラス：細胞周期進行阻害剤、血管新生阻害剤、ＭＡＰＫシグナル伝達経路阻害剤、ＰＩ３Ｋ／ｍ－ＴＯＲ／ＡＫＴ経路阻害剤、キナーゼ阻害剤、ＲＴＫ阻害剤、ＨＤＡＣ阻害剤、タンパク質シャペロン阻害剤、ＰＡＲＰ阻害剤、Ｗｎｔ／ヘッジホッグ／ノッチシグナル伝達経路阻害剤、ＲＮＡポリメラーゼ阻害剤から選択される。ＤＮＡ結合薬物、ＤＮＡ損傷薬物、ＤＮＡアルキル化薬物、微小管安定化剤、微小管不安定化剤、白金化合物、キナーゼ阻害剤、ピリドカルバゾール、及びその誘導体、ならびにトポイソメラーゼＩ及びＩＩ阻害剤。

【００９６】

ＤＮＡ結合またはアルキル化薬物の例には、ＣＣ－１０６５及びその類似体、アントラシクリン（例えば、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ダウノルビシン）及びその類似体、エリプチシン及びその誘導体、アルキル化剤、例えば、カリケアマイシン、ダクチノマイシン、ミトロマイシン（ｍｉｔｒｏｍｙｃｉｎｅ）、ピロロベンゾジアゼピン、及び誘導体が含まれる。

【００９７】

ＣＣ－１０６５類似体の例には、デュオカルマイシンＳＡ、デュオカルマイシンＣ１、デュオカルマイシンＣ２、デュオカルマイシンＢ２、ＤＵ－８６、ＫＷ－２１８９、ビゼレシン、ｓｅｃｏ－アドゼレシン、及びその誘導体が含まれる。

【００９８】

微小管安定化剤及び不安定化剤の例には、パクリタキセル、ドセタキセル等のタキサン化合物；マイタンシノイド、ドロスタチン、セマドチン、オーリスタチン、及びその類似体、チューブリシンＡ及びＢ誘導体、ビンカアルカロイド誘導体、エポチロン、及びクリプトフィシンが含まれる。

【００９９】

マイタンシノイドまたはマイタンシノイド類似体の例には、マイタンシノール及びマイタンシノール類似体、マイタンシンまたはＤＭ－１及びＤＭ－４が含まれる。オーリスタチンの例には、オーリスタチンＥ（ドラスタチン－１０の誘導体）、オーリスタチンＥＢ、オーリスタチンＥＦＰ、モノメチルオーリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）、モノメチルオーリスタチンＦ（ＭＭＡＦ）、オーリスタチンＦ、及びドラスタチンが含まれる。ビンカアルカロイドの例には、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、及びナベルビン（ビノレルビン）が含まれる。エポチロン化合物の例には、エポチロンＡ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、及びＦ、及びそれらの誘導体が含まれる。白金化合物の例には、シスプラチン（ＰＬＡＴＩＮＯＬ（登録商標））、カルボプラチン（ＰＡＲＡＰＬＡＴＩＮ（登録商標））、オキサリプラチン（ＥＬＯＸＡＴＩＮＥ（登録商標））、イプロプラチン、オンナプラチン、及びテトラプラチンが含まれる。トポイソメラーゼＩ阻害剤の例には、カンプトテシン、カンプトテシン、誘導体、カンプトテシン類似体及び非天然カンプトテシン、例えば、ＣＰＴ－１１（イリノテカン）、ＳＮ－３８、トポテカン、９－アミノカンプトテシン、９

－ブロモカンプトテシン、ジフロモテカン、ルビテカン、シラテカン、ラルトテカン、エクサテカン、ベロテカン、ジャイマテカン、カレニテシン、ラルトテカン、及びＳ３９６２５が含まれる。

【０１００】

血管新生阻害剤の例には、ＶＥＧＦ阻害剤、ＭｅｔＡＰ２阻害剤、Ｐ１ＧＦ阻害剤、ＶＧＦＲ阻害剤、ＰＤＧＦＲ阻害剤が含まれる。ＶＧＦＲ及びＰＤＧＦＲ阻害剤の例には、ソラフェニブ（Ｎｅｘａｖａｒ（登録商標））、スニチニブ（Ｓｕｔｅｎｔ（登録商標））、及びバタラニブが含まれる。細胞周期進行阻害剤の例には、例えば、ＢＭＳ－３８７０３２及びＰＤ０３３２９９１等のＣＤＫ阻害剤；Ｒｈｏ－キナーゼ阻害剤、例えばＧＳＫ４２９２８６；例えば、ＡＺＤ７７６２等のチェックポイントキナーゼ阻害剤；例えば、ＡＺＤ１１５２、ＭＬＮ８０５４、及びＭＬＮ８２３７等のオーロラキナーゼ阻害剤；ＰＬＫ阻害剤、例えば、ＢＩ２５３６、ＢＩ６７２７（ボラセルチブ）、ＧＳＫ４６１３６４、ＯＮ－０１９１０（Ｅｓｔｙｂｏｎ）；ならびに、例えば、ＳＢ７４３９２１、ＳＢ７１５９９２（イスピネシブ）、ＭＫ－０７３１、ＡＺＤ８４７７、ＡＺ３１４６、及びＡＲＲＹ－５２０等のＫＳＰ阻害剤が含まれる。ＰＩ３Ｋ／ｍ－ＴＯＲ／ＡＫＴシグナル伝達経路阻害剤の例には、ホスホイノシチド３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）阻害剤、ＧＳＫ－３阻害剤、ＡＴＭ阻害剤、ＤＮＡ－ＰＫ阻害剤、及びＰＤＫ－１阻害剤が含まれる。

【０１０１】

ＰＩ３キナーゼの例には、ＢＥＺ２３５、ＢＧＴ２２６、ＢＫＭ１２０、ＣＡＬ１０１、ＣＡＬ２６３、デメトキシビリジン、ＧＤＣ－０９４１、ＧＳＫ６１５、ＩＣ８７１１４、ＬＹ２９４００２、パロミド５２９、ペリホシン、ＰＦ－０４６９１５０２、ＰＸ－８６６、ＳＡＲ２４５４０８、ＳＡＲ２４５４０９、ＳＦ１１２６、ウォルトマンニン、ＸＬ１４７、及びＸＬ７６５が含まれる。ＡＫＴ阻害剤の例には、ＡＴ７８６７が含まれる。ＭＡＰＫシグナル伝達経路阻害剤の例には、ＭＥＫ、Ｒａｓ、ＪＮＫ、Ｂ－Ｒａｆ、及びｐ３８　ＭＡＰＫ阻害剤が含まれる。ＭＥＫ阻害剤の例には、ＧＤＣ－０９７３、ＧＳＫ１１２０２１２、ＭＳＣ１９３６３６９Ｂ、ＡＳ７０３０２６、ＲＯ５１２６７６６及びＲ０４９８７６５５、ＰＤ０３２５９０１、ＡＺＤ６２４４、ＡＺＤ８３３０、ならびにＧＤＣ－０９７３が含まれる。Ｂ－ｒａｆ阻害剤の例には、ＣＤＣ－０８７９、ＰＬＸ－４０３２、及びＳＢ５９０８８５が含まれる。

【０１０２】

ｐ３８　ＭＡＰＫ阻害剤の例には、ＢＩＲＢ７９６、ＬＹ２２２８８２０、及びＳＢ２０２１９０が含まれる。

【０１０３】

受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）調節剤／阻害剤の例には、ＡＥＥ７８８（ＮＶＰ－ＡＥＥ７８８）、ＢＩＢＷ２９９２、（アファチニブ）、ラパチニブ、エルロチニブ（Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標））、及びゲフィチニブ（Ｉｒｅｓｓａ（登録商標））等の抗ＥｒｂＢ２受容体薬物が含まれる。

【０１０４】

多特異性ＲＴＫ阻害剤の例には、ＦＧＦＲ、ＦＬＴ－３、ＶＥＧＦＲ－ＰＤＧＦＲ、及びＢｃｒ－Ａｂｌ受容体を標的とするＡＰ２４５３４（ポナチニブ）；ＦＬＴ－３及びＶＥＧＦＲ－ＰＤＧＦＲ受容体を標的とするＡＢＴ－８６９（リニファニブ）；ＶＥＧＦＲ－ＰＤＧＦＲ、Ｆｌｔ－１、及びＶＥＧＦ受容体を標的とするＡＺＤ２１７１；ＶＥＧＦＲ－ＰＤＧＦＲ、ＦＧＦＲ、Ｆｌｔ－３、及びｃ－Ｋｉｔ受容体を標的とするＣＨＲ－２５８（ドビチニブ）；ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ、ＫＩＴ、ＦＬＴ－３、及びＣＳＦ－ＩＲを標的とするスニチニブ（Ｓｕｔｅｎｔ）；ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ、Ｒａｆ／Ｍｅｋ／Ｅｒｋ経路のセリン／トレオニンキナーゼを標的とするソラフェニブ（Ｎｅｘａｖａｒ（登録商標））及びバタラニブ、ならびにエリプチシンが含まれる。

【０１０５】

タンパク質シャペロン阻害剤の例には、１７ＡＡＧ誘導体、ＢＩＩＢ０２１、ＢＩＩＢ０２８、ＳＮＸ－５４２２、ＮＶＰ－ＡＵＹ－９２２、及びＫＷ－２４７８等のＨＳＰ９

０阻害剤が含まれる。ＨＤＡＣ阻害剤の例には、ベリノスタット（ＰＸＤ１０１）、ＣＵＤＣ－１０１、ドロキシノスタット、ＩＴＦ２３５７（ギビノスタット、ガビノスタット）、ＪＮＪ－２６４８１５８５、ＬＡＱ８２４（ＮＶＰ－ＬＡＱ８２４、ダシノスタット）、ＬＢＨ－５８９（パノビノスタット）、ＭＣ１５６８、ＭＧＣＤ０１０３（モセチノスタット）、ＭＳ－２７５（エンチノスタット）、ＰＣＩ－２４７８１、ピロキサミド（ＮＳＣ　６９６０８５）、ＳＢ９３９、トリコスタチンＡ、及びボリノスタット（ＳＡＨＡ）が含まれる。ＰＡＲＰ阻害剤の例には、イニパリブ（ＢＳＩ２０１）、オラパリブ（ＡＺＤ－２２８１）、ＡＢＴ－８８８（ベリパリブ）、ＡＧ０１４６９９、ＣＥＰ９７２２、ＭＫ４８２７、ＫＵ－００５９４３６（ＡＺＤ２２８１）、ＬＴ－６７３、３－アミノベンズアミド、Ａ－９６６４９２、及びＡＺＤ２４６１が含まれる。Ｗｎｔ／ヘッジホッグシグナル伝達経路阻害剤の例には、ビスモデギブ（ＲＧ３６１６／ＧＤＣ－０４４９）、シクロパミン（１１－デオキシジェルビン）（ヘッジホッグ経路阻害剤）、及びＸＡＶ－９３９（Ｗｎｔ経路阻害剤）が含まれる。ノッチ経路阻害剤の例には、ガンマセクレターゼ阻害薬ＭＫ０７５２、ＲＯ４９２９０９７、ＰＦ－０３０８４，０１４、ＬＹ４５０１３９、ＢＭＳ－７０８１６３、ガンマセクレターゼ修飾剤ＭＰＣ－７８６９、及びドミナントネガティブｍａｓｔｅｒｍｉｎｄ／ＣＳＬ／ノッチ化合物が含まれる。

【０１０６】

ＲＮＡポリメラーゼ阻害剤の例には、α－アマニチン、β－アマニチン、γ－アマニチン、ε－アマニチン、アマヌリン、アマヌリン酸、アマニンアミド、アマニン、及びプロアマヌリン等のアマトキシンが含まれる。

【０１０７】

薬物ペイロードは、様々な手法（表２）を使用して、薬物ペイロードを抗体等の生体分子と複合可能にするように、合成的に化学修飾され得る。そのような化学修飾は、［Ｃｈａｒｉ　ＲＶ　ｅｔ　ａｌ．Ａｎｇｅｗ　Ｃｈｅｍ　Ｉｎｔ　Ｅｄ　Ｅｎｇｌ．２０１４，５３，３７９６－８２７］に記載されている。例には、マイタンシン、ＭＭＡＥ及びＭＭＡＦ、ドキソルビシン、セマドチン、ＳＮ３８、及びドロスタチン－１５及びピロロベンゾジアゼピン二量体（ＰＢＤ）中に存在するＰ５ペンタペプチドの誘導が含まれる。

【０１０８】

マイタンシノイドは、当分野で周知であり、細胞結合剤上への複合化に好適な誘導体は、米国特許第５，２０８０２０号、同第５，４１６０６４号、同第７，２７６４９７号、ならびに［Ｃｈａｒｉ　ＲＶ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２００６，４９，４３９２］及び［Ｃｈａｒｉ　ＲＶ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２０１１，２２，７１７］に完全に開示されている既知の方法に従って、合成的に調製され得る。チオール末端マイタンシノイドでのヘテロ二官能性リンカーとの反応は、国際公開第２０１０／１４１５６６号及び［Ｃｈａｒｉ　ＲＶ　ｅｔ　ａｌ．］　Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２０１１，５４，３６０６に開示される細胞結合剤上への直接的複合化のための、反応性ＮＨＳエステルで終端された還元できない安定した連結を生じさせる。ヘテロ二官能性リンカーは、アミン－反応性Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドＮＨＳ－エステル及びスルフヒドリル反応性末端に加えて、負に荷電したスルホン酸基または親水性非荷電ＰＥＧ基のいずれかを含む。

【０１０９】

モノメチルオーリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）を含むオーリスタチンは、米国特許第２００６００７４００８号及び［Ｓｅｎｔｅｒ　ＰＤ　ｅｔ　ａｌ．］　Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２００３，２１，７７８に開示され、これらは、カテプシンＢの開裂部位としてプロテアーゼ感応バリン－シトルリンジペプチド、及び自壊性ｐ－アミノベンジルカルバメートを有するリンカーを開示する。非開裂可能リンカーを用いたモノメチルオーリスタチンＦ（ＭＭＡＦ）複合体は、米国特許第２０１１００７０４２８号に記載される。

【０１１０】

ＣＣ－１０６５及びシクロプロピルインドールＤＮＡアルキル化剤のデュオカルマイシ

ンファミリーの類似体は、［Ｇｏｌｄｍａｃｈｅｒ ＶＳ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９９５，５５，４０７９］及び米国特許第８６８０２９３号に開示される。

【０１１１】

ピロベンゾジアゼピン（ｐｙｒｒｏｂｅｎｚｏｄｉａｚｅｐｉｎｅ）二量体（ＰＢＤの）及び複合体は、［Ｓｅｎｔｅｒ ＰＤ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２０１３，２４：１２５６；ＭｃＥａｒｃｈｅｒｎ ＪＡ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ，２０１３，１２２：１４５５］、ならびに米国特許第２０１４２３４３４６号及び国際公開第２０１４ ０３１５６６号に記載される。

【０１１２】

ダウノルビシン／ドキソルビシン類似体も、好適なペイロードであり、マレイミド末端薬物として［Ｆｉｒｅｓｔｏｎｅ ＲＡ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，１９９６，３９：２５１］及び国際公開第２０１２０２４２２３号に開示される。カテプシンＢ放出可能ドキソルビシンは、［Ｄｕｂｏｗｃｈｉｋ Ｇ Ｍ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２００２，１３，８５５］に開示される。より効き目がある誘導体、ドキソルビシン－２－ピロリノ、及びモルホリノ－ドキソルビシンは、［Ｓｅｎｔｅｒ ＰＤ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ ２００６，１６：３５８］及び国際公開第２０１４１２４２２７号に開示される。反応性エステル基とのネモルビシン（ドキソルビシンの代謝産物）誘導体及び複合体は、米国特許第２０１４２２７２９９号に開示される。

【０１１３】

使用され得るタキサンは、［Ｏｊｉｍａ Ｉ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２００２，４５，５６２０］及び［Ｏｊｉｍａ Ｉ Ａｃｃ．Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ ２００８，４１，１０８］、ならびに米国特許第７２７６６４９９号に開示される。

【０１１４】

トポイソメラーゼ阻害剤イリノテカンの活性代謝産物であるＳＮ－３８（カンプトテシン（ｃａｍｐｔｈｏｔｈｅｃｉｎ）誘導体）は、好適なペイロードであり、開裂可能、かつＰＥＧ組み込みリンカーとの複合体は、［Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇ ＤＭ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２００８，５１：６９１６］及び国際公開第２０１０／０９３３９５号に開示される。

【０１１５】

クリプトフィシンは、数ある中でも最も効き目がある抗有糸分裂剤であり、マレイミド及び反応性エステルを介して形成された複合体は、国際公開第２０１１／００１０５２号に開示される。

【０１１６】

チューブリシンは、ドラスタチン－１０と構造的類似性を有し、チューブリン修飾薬として高効力を示す。これら及びより単純なプレチューブリシン変異体は、国際公開第２０１４／０２２７２９５号及び［Ｋａｚｍａｉｅｒ Ｕ ｅｔ ａｌ．Ｅｕｒ．Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．２０１１，３０５０］に開示される。

【０１１７】

ペイロードとして使用するための最近調査された効き目がある薬物のクラスは、アマトキシンの二環性オクタペプチド構成成分であるアルファ－アマニチン等のＲＮＡポリメラーゼＩＩ阻害剤である。リジン残基上の複合体は、国際公開第２０１２／０４１５０４号に開示されるように、アミン末端アマニチンを一晩、ジスクシンイミジル炭酸塩で活性化させ、続いて、細胞結合剤との反応によって形成される。

【０１１８】

好ましい治療剤は、セマドチン、Ｐ５（セマトジン（ｃｅｍａｔｏｄｉｎ）の初期前駆体）、Ｐ５－$Ｃ_5$（５つの炭素スペーサーを有するＰ５）、ドキソルビシン、エリプチシン、ＭＭＡＥ、ＭＭＡＦ、パクリタキセル、オーリスタチン、マイタンシン、ドロスタチン、カンプトテシン、ＳＮ－３８及びピロロベンゾジアゼピン二量体（ＰＢＤ）、ＰＮＵ

－１５９８６２、ならびにインドリノ－ベンゾジアゼピン二量体（ＩＧＮ）から選択される。

【０１１９】

本発明に従った化合物の特定の例には、以下が含まれるが、これらに限定されない。

（ｉ）担体分子はｓｃＦｖであり、治療剤はセマドチンである。

（ｉｉ）担体分子はｓｃＦｖであり、治療剤はドキソルビシンである。

（ｉｉｉ）担体分子はｓｃＦｖであり、治療剤はエリプチシンである。

（ｉｖ）担体分子はｓｃＦｖであり、治療剤はＭＭＡＥである。

（ｖ）担体分子はｓｃＦｖであり、治療剤は（Ｐ５）－Ｃ$_5$。

（ｖｉ）担体分子はｓｃＦｖであり、治療剤はマイタンシンである。

（ｖｉｉ）担体分子はｓｃＦｖであり、治療剤はピロロベンゾジアゼピン二量体（ＰＢＤ）であり。

（ｖｉｉｉ）担体分子はｓｃＦｖであり、治療剤はＭＭＡＦである。

【０１２０】

これらの特定の例は、担体分子として任意のｓｃＦｖを使用し得るが、ｓｃＦｖの好ましい例は、ＨＥＲ２と結合するもの、例えば、ｓｃＦｖ（Ｃ６．５）またはその修飾された形態、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）である（配列番号２、実施例２７を参照されたい）。ｓｃＦｖの代替の好ましい例は、配列番号４または配列番号５のアミノ酸配列を有するものである。

【０１２１】

本発明の第２の態様において、本発明の第１の態様の化合物、及び薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤を含む薬学的組成物が提供される。

【０１２２】

本発明の第３の態様において、疾患の診断、治療、及び／または予防において使用するための第１の態様または第２の態様の化合物または組成物が提供される。

【０１２３】

本発明の第４の態様において、癌、良性腫瘍、細菌、ウイルス、真菌、トリパノソーマ、線虫、及びプリオン感染症を含む感染病、循環器疾患、ならびに自己免疫性疾患から選択される疾患の診断、治療、及び／または予防において使用するための、第１の態様または第２の態様の化合物または組成物が提供される。

【０１２４】

本発明の第５の態様において、癌、良性腫瘍、細菌、ウイルス、真菌、トリパノソーマ、線虫、及びプリオン感染症を含む感染病、循環器疾患、ならびに自己免疫性疾患から選択される疾患の治療及び／または予防のための薬剤の製造において使用するための、第１の態様及び第２の態様のいずれかに記載の化合物または組成物が提供される。

【０１２５】

本発明の第６の態様において、癌、良性腫瘍、細菌、ウイルス、真菌、トリパノソーマ、線虫、及びプリオン感染症を含む感染病、循環器疾患、ならびに自己免疫性疾患から選択される疾患を治療または予防する方法が提供される。

【０１２６】

本発明の第３、第４、第５、及び第６の態様において、疾患は、
限定されないが、肉腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、絨毛腫、脊索腫、血管肉腫、甲状腺、内皮肉腫（ｅｎｄｏｔｈｅｌｉｏｓａｒｃｏｍａ）、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫（ｌｙｍｐｈａｎｇｉｏｅｎｄｏｔｈｅｌｉｏｓａｒｃｏｍａ）、滑膜腫、中皮腫、ユーイング肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、結腸直腸癌、腎臓癌、膵臓癌、骨癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、食道癌、胃癌（例えば、消化管癌）、口腔癌、鼻腔癌、咽喉癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、腹膜癌、肝細胞癌、肝臓癌、唾液腺癌、外陰部癌、陰茎癌、肛門癌、頭頸部癌、腎細胞癌、急性未分化大細胞癌、皮膚未分化大細胞癌（Ｃｕｔａｎｅｏｕｓ

ａｎａｐｌａｓｔｉｃ ｌａｒｇｅ ｃｅｌｌ ｃａｒｃｉｎｏｍａ）、子宮癌、精巣癌、小細胞肺癌、膀胱癌、肺癌、非小細胞肺癌、上皮性癌、神経膠腫、多形性膠芽腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫、皮膚癌、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫を含む固形腫瘍、限定されないが、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性リンパ芽球性Ｂ－細胞白血病、急性リンパ芽球性Ｔ細胞白血病、急性骨髄芽球性白血病（ＡＭＬ）、急性前骨髄球性白血病（ＡＰＬ）、急性単芽球性白血病、急性赤血白血病（ａｃｕｔｅ ｅｒｙｔｈｒｏｌｅｕｋｅｍｉｃ ｌｅｕｋｅｍｉａ）、急性巨核芽球性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性非リンパ性白血病、急性未分化白血病、慢性骨髄球性白血病（ＣＭＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、有毛細胞性白血病、多発性骨髄腫、急性及び慢性白血病、リンパ腫、例えば、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、真性赤血球増加症を含む血液癌等の癌でもよい。

【０１２７】

あるいは、疾患は、

活動性慢性肝炎、アディソン病、アレルギー性肺胞炎、アレルギー反応、アレルギー性鼻炎、アルポート症候群、アナフィラキシー、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、関節炎、回虫症、アスペルギルス症、萎縮性アレルギー（ａｔｒｏｐｈｉｃ ａｌｌｅｒｇｙ）、萎縮性皮膚炎（ａｔｒｏｐｈｉｃ ｄｅｒｍａｔｉｔｉｓ）、萎縮性鼻炎、ベーチェット病、気管支喘息、カプラン症候群、心筋症、セリアック病、シャーガス病、慢性糸球体腎炎、コーガン症候群、寒冷凝集素症、先天性風疹感染症、クレスト症候群、クローン病、クリオグロブリン血症、クッシング症候群、皮膚筋炎、円板状ループス、ドレスラー症候群、イートン・ランバート症候群、エコーウイルス感染症、脳脊髄炎、内分泌性眼障害、エプスタイン・バーウイルス感染症、ウマ細胞性肺気腫、エリテマトーデス、エヴァンズ症候群、フェルティ症候群、線維筋痛症、フックス毛様体炎（Ｆｕｃｈ’ｓ Ｃｙｃｌｉｔｉｓ）、胃萎縮、消化管アレルギー、巨細胞性動脈炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、移植片対宿主病、グレーブス病、ギラン・バレー病、橋本甲状腺炎、溶血性貧血、ヘーノホ‐シェーンライン紫斑病、特発性副腎萎縮、特発性肺線維症、ＩｇＡ腎症、炎症性腸疾患、インスリン依存型真性糖尿病、若年性関節炎、若年性真性糖尿病（Ｉ型）、ランバート・イートン症候群、蹄葉炎、扁平苔癬、ルポイド肝炎、リンパ球減少症、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、悪性貧血、多腺性症候群、初老期認知症、発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、反復流産、ライター症候群、リウマチ熱、リウマチ性関節炎、サンプター症候群、住血吸虫症、シュミット症候群、強皮症、シュルマン症候群、シェーグレン症候群、交感性眼炎、全身性エリテマトーデス、側頭動脈炎、甲状腺炎、血小板減少症、甲状腺中毒症、中毒性表皮剥離症、Ｂ型インスリン耐性、Ｉ型糖尿病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、白斑症、ウェゲナー肉芽腫症等の自己免疫性疾患でもよい。

【０１２８】

好ましくは、疾患は、結腸、肺、乳、頭頸部、前立腺、皮膚、胃／胃腸、膀胱、神経膠腫、腎臓、卵巣、甲状腺、及び骨の癌から選択される。

【０１２９】

本発明の第７の態様において、第１の態様または第２の態様で定義される化合物を作製するプロセスが提供され、プロセスは、

（ｉ）治療剤を提供するステップと、

（ｉｉ）担体分子を提供するステップと、

（ｉｉｉ）少なくとも１つの極性非プロトン性溶媒及び水性緩衝液の存在下で、治療剤及び担体分子を複合化させるステップと、を含む。

【０１３０】

用語「非プロトン性溶媒」は、ＯＨ基を有さず、したがって、水素結合を提供できない溶媒を意味する。

【０１３１】

適切な極性非プロトン性溶媒は、（限定されないが）ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、アセトニトリル、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）、ＨＭＰＡ、ジオキサン、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）、二硫化炭素、グリム及びジグリム、２－ブタノン（ＭＥＫ）、スルホラン、ニトロメタン、Ｎ－メチルピロリドン、ピリジン、ならびにアセトンからなる群である。使用され得る他の極性非プロトン性溶媒は、当業者に周知である。

【０１３２】

このプロセスの一部として治療剤及び担体分子を複合化するステップは、好ましくは、以下のパラメータのうちのいずれか１つまたはそれらの組み合わせを使用して行なわれる。

・約０℃～約３７℃、好ましくは約１０～約３０℃の温度。
・約６．０～約１０．０、好ましくは約７．５～約９のｐＨ。
・０．１時間～４８時間。

【０１３３】

本発明のプロセスは、以下から選択される１つ以上のさらなるステップも含み得る。
（ｉｖ）反応を促進するための賦形剤を使用するステップ。
（ｖ）有害な混合の影響を最小化するために、溶媒及び緩衝液構成成分をプレインキュベーションするステップ。
（ｖｉ）反応構成成分の時間的に制御された添加を行うステップ。
（ｖｉｉ）化合物を薬学的に許容される担体と合わせて、薬学的組成物を形成するステップ。

【０１３４】

実施例

本発明の態様を具現化する実施例を、これより、以下の図を参照して記載する。

【０１３５】

〔図１〕ヒト可変ドメイン内のアミノ酸残基の表面／溶媒露出度

Ｋｎａｐｐｉｋ ｅｔ ａｌ（２０００）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ ２９６，５７－８６から変更。灰色の目盛りは、濃（＝高）から淡（＝低）へと表面／溶媒露出度パーセンテージを示す。命番方式は、Ｈｏｎｅｇｇｅｒ Ａ＆Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ Ａ［Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２００１，３０９：６５７－７０］に従う。約７０％が主に溶媒曝露であると考えられる。

【０１３６】

〔図２〕ｓｃＦｖ－ＴＣＴの精製
レーン１：分子マーカー
レーン２：２回目のＮｉ－ＮＴＡ樹脂の通過後の澄んだ可溶化液
レーン３：洗浄緩衝液１での最終洗浄
レーン４：洗浄緩衝液２での第１回目の洗浄
レーン５：溶出画分
レーン６：ＴＥＶ開裂緩衝液中での透析後の貯えた溶出画分長方形は、融合ＴＣＴを示す。
レーン７：ＴＥＶ開裂開始後１６時間。上方の四角は、開裂したｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を示す。下方の四角は、開裂したチオレドキシン融合パートナーを示す。
レーン８：分子マーカー
レーン９：開裂したＴＣＴ
レーン１０：Ｎｉ－ＮＴＡと結合したタンパク質の残り
レーン１１～１８：図２０のサイズ排除カラム（３５ｋＤａ）からの断片

〔図３〕ＰＢＳ緩衝液中でｓｕｐｅｒｄｅｘ－７５カラム上でのサイズ排除クロマトグラフィーによるｓｃＦｖ－ＴＣＴの精製
ピーク１－希薄すぎてクーマシー染色ＰＡＧＥゲル上に現れない、高分子量汚染物質
ピーク２－ｓｃＦｖ ＴＣＴの高分子量凝集物。

ピーク３－純粋単量体ｓｃＦｖ　ＴＣＴ、ゲル上のレーン１１～１８に対応（図１９）。
【０１３７】
〔図４〕ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－エリプチシン複合体のＳＤＳ－ＰＡＧＥ
エリプチシン（化合物２１）複合体１＝３２当量、１４％のＤＭＳＯ；２＝１６当量、１４％のＤＭＳＯ；３＝１６当量、６％のＤＭＳＯ；Ｄ＝透析済み、Ｚ＝Ｚｅｂａカラム脱塩済み；ＣＳ＝可溶性粗反応；Ｐ＝不溶性／析出された粗反応。試料負荷＝２．４μｇ（ＡＤＣ）、１．９μｇ（ｓｃＦｖ）。
ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０。
【０１３８】
〔図５〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－エリプチシン複合体のＵＶ－Ｖｉｓ。
【０１３９】
〔図６〕エリプチシンとＰＥＧ－エリプチシンｓｃＦｖ複合体と比較したＳＤＳ－ＰＡＧＥ
エリプチシン（化合物２１）及びＰＥＧ－エリプチシン（化合物２３）複合体。１＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＰＥＧ－エリプチシン、２０当量；２＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－エリプチシン、２０当量；３＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＰＥＧ－エリプチシン、３２当量；４＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＰＥＧ－エリプチシン、６４当量；Ｚ＝Ｚｅｂａカラム脱塩済み；ＣＳ＝可溶性粗反応；Ｐ＝不溶性／析出された粗反応。試料負荷＝１．８μｇ。
ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０。
【０１４０】
〔図７〕試料２のＳＤＳ－ＰＡＧＥ：ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－エリプチシン複合体
Ｄ＝透析済み；Ｚ＝Ｚｅｂａカラム脱塩済み；Ｃ＝可溶性粗反応；Ｐ＝不溶性／析出された粗反応。Ｅｌｌ＝エリプチシン試料負荷＝２．５μｇ。
ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０。
【０１４１】
〔図８〕試料４のＳＤＳ－ＰＡＧＥ：全ＩｇＧ－エリプチシン複合体
Ｄ＝透析済み；Ｚ＝Ｚｅｂａカラム脱塩済み；Ｃ＝可溶性粗反応；Ｐ＝不溶性／析出された粗反応、Ｅｌｌ＝エリプチシン。試料負荷＝２．５μｇ。
ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０。
【０１４２】
〔図９〕ドキソルビシン誘導体のＣ６．５ｓｃＦｖへの２ステップ複合化のＳＤＳ－ＰＡＧＥ
上方パネル、ＨＭＦＧ１　ＩｇＧ複合体、下方パネルＣ６．５　ｓｃＦｖ複合体。
ＨＭＦＧ１／Ｃ６＝遊離抗体、Ｓ＝可溶性画分、Ｐ＝析出物、Ａ＝ドキソルビシン－マレイミド（化合物１２）複合体、Ｂ＝ドキソルビシン－ＰＥＧ－マレイミド（化合物４８）複合体。
ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０。
【０１４３】
〔図１０〕ＳＰＤＰリンカーに複合化されたＣ６．５　ｓｃＦｖのＨＥＲ２抗原のＥＬＩＳＡ。
【０１４４】
〔図１１〕ＨＰＬＣ－ＳＥＣ精製後のＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣのＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル
ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０。

セマドチン（化合物２）複合体（化合物６９）．１＝１６薬物当量；２＝４８薬物当量；３＝１１２薬物当量；Ｓ＝ＨＰＬＣ－ＳＥＣ精製；Ｚ＝さらなるＺｅｂａ緩衝液交換。

【０１４５】

〔図１２〕ＨＰＬＣ－ＳＥＣによって分析したｓｃＦｖ及びｓｃＦｖ－セマドチンＡＤＣ

ａ）溶出タンパク質及び複合体の大きさを確認するためのＧ２０００ＳＷｘｌ　ＳＥＣカラムの較正マーカー。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、１ｍｌ／分で運転した。値は以下のとおりであった。

【０１４６】

【表３】

室温（分）	分子量（ｋＤａ）	試料
６．４３	８０	アルコール脱水素酵素
８．４８	３０	炭酸脱水酵素
１１．２５	１３	リゾチーム
１０．９	＜１	セマドチン

【０１４７】

ｂ）ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって分析する、上方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）、下方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料－１、カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。

【０１４８】

ｃ）ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって分析する、上方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料－２、中央の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料－３、タンパク質／ペプチド含有力を確認する下方の出力記録－ＵＶ－Ｖｉｓスペクトル。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。

【０１４９】

〔図１３〕ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料２の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ。

【０１５０】

〔図１４〕ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料１の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ。

【０１５１】

〔図１５〕ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料３の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ。

【０１５２】

〔図１６〕ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ。

【０１５３】

〔図１７〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）のＭＡＬＤＩ－ＭＳ。

【０１５４】

〔図１８〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料１のＭＡＬＤＩ－ＭＳ。

【０１５５】

〔図１９〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料２のＭＡＬＤＩ－ＭＳ。

【０１５６】

〔図２０〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料３のＭＡＬＤＩ－ＭＳ。

【０１５７】

〔図２１〕ＨＥＲ２上のｓｃＦｖ（ＴＣＴ）セマドチンＡＤＣのＥＬＩＳＡ。

【０１５８】
〔図２２〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣのＳＤＳ－ＰＡＧＥ
Ｐ５Ｃ５薬物（化合物６）及び複合体（化合物７１）。１＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、３０当量；２＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、１１２当量；Ｃ＝粗反応混合物；Ｓ＝ＳＥＣ精製及び濃縮後の試料；Ｆ＝ＳＥＣ精製、濃縮、及び緩衝液交換後の最終試料。試料負荷＝２μｇ。
ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０。
【０１５９】
〔図２３〕２８０ｎｍで監視したＳＥＣ精製後の試料の分析ＨＰＬＣ出力記録
ａ）上方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）、中央の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣ（３０当量）、下方の出力記録ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣ（１１２当量）。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。
【０１６０】
ｂ）左の出力記録、ほんの非凝集単量体ピークだけの、薬物負荷に起因するより早い保持（１６．９分のｓｃＦｖ溶出と比較して１５．７及び１５．９分）を示す（ａ）からのｓｃＦｖとｓｃＦｖ－ＡＤＣとの比較、右の出力記録－タンパク質／ペプチドスペクトルを示すＡＤＣのうちの１つのＵＶ－Ｖｉｓ出力記録。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。
【０１６１】
〔図２４〕様々なＡＤＣのＳＤＳ－ＰＡＧＥ
Ｐ５Ｃ５薬物（化合物６）、セマドチンＣ５薬物（化合物４）、及び複合体（化合物７１）。１＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、１６当量；２＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、３０当量；３＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、１１２当量；４＝トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５、１６当量；５＝トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５、３２当量；６～７＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン－Ｃ５；８＝トラスツズマブ－セマドチン－Ｃ５；Ｚ＝最終Ｚｅｂａ脱塩済み試料；Ｓｃ＝ＨＰＬＣ－ＳＥＣ及び濃縮後の試料；Ｃ＝粗反応混合物。試料負荷＝１．９μｇ。
ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０。
【０１６２】
〔図２５〕トラスツズマブ複合体（Ａ２８０ｎｍ）のＨＰＬＣ精製出力記録。
上方の出力記録は、遊離トラスツズマブＩｇＧを示し、下方の３つの出力記録は、異なる複合化反応当量での様々なＡＤＣを示す。試料を、マーカーを用いて較正したＧ３０００ＳＷｘｌカラム上で行った。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。マーカーは以下のとおり溶出した。
【０１６３】
【表４】

分子量（ｋＤａ）	保持時間（分）	試料
２２３．８	１８．１	ベータアミラーゼ
１４６．８	１８．９	アルコール脱水素酵素
６６．５	２１．２	ＢＳＡ
２９	２３．７	炭酸脱水酵素
１４．５	２９．７	リゾチーム

【０１６４】
ＩｇＧ（保持時間＝１１．７分）及びＩｇＧ－ＡＤＣ（保持時間＝１０．９～１１．４分）はすべて、約１５０ｋＤａで溶出し、凝集をほとんど示さなかったか、全く示さなかっ

た。
【０１６５】
〔図２６〕比較のために上に重ねた図２５からのトラスツズマブ複合体（Ａ２８０ｎｍ）のＨＰＬＣ精製出力記録
ピーク１＝トラスツズマブ、２＝トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５（１６当量複合化反応）、３＝２＝トラスツズマブ－セマドチン（１６当量複合化反応）、２＝トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５（３２当量複合化反応）。
【０１６６】
〔図２７〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５複合体（Ａ２８０ｎｍ）のＨＰＬＣ精製出力記録
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣは、遊離ｓｃＦｖ（保持時間＝１６．９分）よりも早い保持時間（増加する複合化当量、したがってＤＡＲを伴った１５．７分、１５．６分、及び１５．４）を有した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン保持時間は、増加するＤＡＲを伴った、１６．１分及び１５．７であった）。すべては、依然として、凝集をほとんど伴わないか、またはまったく伴わないで、単量体ｓｃＦｖの範囲内に留まった。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。
【０１６７】
〔図２８〕ＰＢＳ中のトラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５のＵＶ／Ｖｉｓ吸収スペクトル。
【０１６８】
〔図２９〕ＰＢＳ中のｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５複合体のＵＶ／Ｖｉｓ吸収スペクトル。
【０１６９】
〔図３０〕ＨＥＲ２上のｓｃＦｖ（ＴＣＴ）Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣのＥＬＩＳＡ。
【０１７０】
〔図３１〕ＨＥＲ２発現ＳＫＢｒ３細胞上のＰ５Ｃ５系ＡＤＣの用量反応の細胞致死活性。
【０１７１】
〔図３２〕ＨＥＲ２発現ＳＫＢｒ３細胞及びＨＥＲ２陰性Ｕ８７細胞上の遊離Ｐ５Ｃ５薬物の用量反応の細胞致死活性。
【０１７２】
〔図３３〕ＨＥＲ２陰性Ｕ８７細胞上のＰ５Ｃ５系ＡＤＣの用量反応の細胞致死活性。
【０１７３】
〔図３４〕ｓｃＦｖ－セマドチンＡＤＣで免疫化した候補マウス血清のＥＬＩＳＡ試験。
【０１７４】
〔図３５〕抗ｓｃＦｖ－セマドチンＭＡｂの候補雑種細胞クローンのＥＬＩＳＡ。
【０１７５】
〔図３６〕抗マウスペルオキシダーゼ二次抗体を使用した、ウエスタンブロットによるマウスＭａｂの候補雑種細胞培地の上清検出。
【０１７６】
〔図３７〕ウエスタンブロットによってｓｃＦｖ－セマドチンＡＤＣを検出するために使用した候補雑種細胞馴化培地。
ブロット１～３、及び５～７、１０、及び１１を、次のように負荷させた。マーカー、ＡＤＣ、ＴＣＴ、及び遊離セマドチン。
ブロット４及び８を、次のように負荷させた。マーカー、ＡＤＣ、及び遊離セマドチン。
【０１７７】
〔図３８〕放射標識ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン複合体の血中クリアランス。
セマドチン複合体（化合物６９）。
【０１７８】
〔図３９〕放射標識ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン複合体の脾臓取り込み。

セマドチン複合体（化合物６９）。
【０１７９】
〔図４０〕総抗体ＥＬＩＳＡによって測定したｓｃＦｖ－ＴＣＴ及びｓｃＦｖ－ＴＣＴ－ＡＤＣの血中クリアランスを示す薬物動態プロファイル。
セマドチン複合体（化合物６９）。
【０１８０】
〔図４１〕総ＡＤＣ　ＥＬＩＳＡによって測定したｓｃＦｖ－ＴＣＴ－ＡＤＣの血中クリアランスを示す薬物動態プロファイル。
セマドチン複合体（化合物６９）。
【０１８１】
〔図４２〕図４０及び４１で使用した両方のアッセイを測定したｓｃＦｖ－ＴＣＴ及びｓｃＦｖ－ＴＣＴ－ＡＤＣの血中クリアランスにおける類似性を示す比較薬物動態プロファイル。
【０１８２】
〔図４３〕２つのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣ　ＤＡＲで治療した、ＳＫＢｒ３腫瘍異種移植片を有するヌードマウスにおける腫瘍退縮研究。
Ｐ５Ｃ５複合体（化合物７１）。
【０１８３】
〔図４４〕０．５ｍｌ／分で運転し、それぞれの複合化されていない抗体と比較した、（Ａ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－アセテート及び（Ｂ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－アセテート精製複合体のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。
【０１８４】
〔図４５〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－アセテート複合体のＬＣＭＳデータ。
（Ａ）は、ＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は、１０分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。
【０１８５】
〔図４６〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－アセテート複合体のＬＣＭＳデータ。
（Ａ）は、ＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は、１０．３分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。
【０１８６】
〔図４７〕１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、（Ａ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１及び（Ｂ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　２精製複合体のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。
【０１８７】
〔図４８〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　２を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（１２％）。
使用されるサイズマーカーを、示す。
【０１８８】
〔図４９〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１のＬＣＭＳデータ。
（Ａ）は、ＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は、１０．２分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。
【０１８９】
〔図５０〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　２のＬＣＭＳデータ。
（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ～Ｅ）は、主ピーク１０～１２分のデコンボリューションされた質量を示す。
【０１９０】
〔図５１〕１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、（Ａ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１及び（Ｂ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　２精製複合体のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。
【０１９１】

〔図５２〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１及びＡＤＣ　２のＬＣＭＳデータ。
（Ａ）及び（Ｂ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ１のＬＣＭＳデータであり、（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は９．３～１０．６分の主ピークのデコンボリューションされた質量である。（Ｃ）及び（Ｄ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ２のＬＣＭＳデータであり、（Ｃ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｄ）は９．９～１２分の主ピークのデコンボリューションされた質量である。

【０１９２】

〔図５３〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１及び２を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（１２％）である。
図４８に示されるサイズマーカー。

【０１９３】

〔図５４〕１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較したｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣ　１のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。

【０１９４】

〔図５５〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣ　１を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（１２％）。
図４８に示されるサイズマーカー。

【０１９５】

〔図５６〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣ　１のＬＣＭＳデータ。
（Ａ）は、ＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は、８．２分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。

【０１９６】

〔図５７〕０．５ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。

【０１９７】

〔図５８〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１のＬＣＭＳデータ。
（Ａ）は、ＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は、９．５分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。

【０１９８】

〔図５９〕１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１、２、及び３のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。

【０１９９】

〔図６０〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１、２、及び３のＬＣＭＳデータ。
（Ａ）及び（Ｂ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）ＡＤＣ　１のＬＣＭＳデータであり、（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は８．１分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。（Ｃ）及び（Ｄ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　２のＬＣＭＳデータであり、（Ｃ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｄ）は９．４分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。（Ｅ）及び（Ｆ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　３のＬＣＭＳデータであり、（Ｅ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｆ）は９．９分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。

【０２００】

〔図６１〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ　ＴＣＴ－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１、２、及び３を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（１２％）。
図４８に示されるサイズマーカー。

【０２０１】

〔図６２〕１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ９　ＡＤＣ　１のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。

【０２０２】

〔図６３〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ９　ＡＤＣ１のＬＣＭＳデータ。

（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ～Ｅ）は、主ピークのデコンボリューションされた質量を示す。

【０２０３】

〔図６４〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ９　ＡＤＣ　１を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（１２％）。

図４８に示されるサイズマーカー。

【０２０４】

〔図６５〕１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣ　１のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。

【０２０５】

〔図６６〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣ　１のＬＣＭＳデータ。

（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ～Ｆ）は、主ピークのデコンボリューションされた質量を示す。

【０２０６】

〔図６７〕１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－マイタンシン－ＰＥＧ（１２）ＤＭ１　ＡＤＣ　１及び２のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。

【０２０７】

〔図６８〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７－マイタンシン－ＰＥＧ（１２）ＤＭ１　ＡＤＣ　１及び２のＬＣＭＳデータ。

（Ａ）及び（Ｂ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－マイタンシン－（ＰＥＧ１２）ＤＭ１　ＡＤＣ　１のＬＣＭＳデータであり、（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は主ピークのデコンボリューションされた質量を示す。（Ｃ）及び（Ｄ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７－マイタンシン－ＰＥＧ（１２）ＤＭ１　ＡＤＣ　２のＬＣＭＳデータであり、（Ｃ）はＵＶ　ＬＣＭＳ出力記録であり、（Ｄ）はその種のＤＡＲが試料中に存在することを示すＴＩＣ　ＬＣＭＳ出力記録である。

【０２０８】

〔図６９〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）非複合抗体と比較したｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－マイタンシン－ＰＥＧ（１２）ＤＭ１　ＡＤＣ　１及び２を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（１２％）。

サイズマーカーは、（Ａ）に示す。

【０２０９】

〔図７０〕表４５に記載される反応１、２、４、５、及び６のクーマシー染色ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。反応３は、可溶性タンパク質を生じなかった。

Ｍ＝分子量マーカー。

Ｐ＝非複合ｓｃＦｖ（パニツムマブ）、

Ｔ＝非複合ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）。

より高いＤＡＲ種は、分子量の増加に起因してより緩徐に移動し、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）複合体は、増加するＤＡＲを示す。図６８に示されるサイズマーカー。

【０２１０】

〔図７１〕１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、（Ａ）ｓｃＦｖ（パニツムマ

ブ）－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ及び（Ｂ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。

【０２１１】

〔図７２〕ｓｃＦｖ（パニツムマブ－ＡＦ－Ｃ５）ＡＤＣ　１、２、及び４～６のＬＣＭＳデータ。

（Ａ）及び（Ｂ）はｓｃＦｖ（パニツムマブ－ＡＦ－Ｃ５）ＡＤＣ　１のＬＣＭＳデータであり、（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は試料１の主ピークのデコンボリューションされた質量を示す。（Ｃ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｄ）は、試料２の主ピークのデコンボリューションされた質量を示す。（Ｅ）～（Ｈ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７－ＡＦ－Ｃ５）ＡＤＣ　４～６のＬＣＭＳデータであり、（Ｅ）は試料４のＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｆ）は、試料４の主ピークのデコンボリューションされた質量を示し、（Ｇ）は、試料５のデコンボリューションされた質量を示し、（Ｈ）は、試料６のデコンボリューションされた質量を示す。

【０２１２】

〔図７３〕遊離ＭＭＡＦのインビトロ細胞毒性プロット。

（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞、（Ｃ）ＢＴ４７４細胞上の遊離ＭＭＡＦ細胞毒の、細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２１３】

〔図７４〕非複合抗体のインビトロ細胞毒性プロット。

（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の非複合ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）及びトラスツズマブの細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２１４】

〔図７５〕非複合抗体のインビトロ細胞毒性プロット。

ＢＴ４７４細胞上の複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）の細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２１５】

〔図７６〕ＭＭＡＦ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。

（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　６．６、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ０１６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　６．４、非複合トラスツズマブ、及びトラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５の細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２１６】

〔図７７〕ＭＭＡＦ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。

（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片複合体であるｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　８、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ０１６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　８．７、及びトラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５の細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２１７】

〔図７８〕Ｐ５－Ｃ５系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。

Ｕ８７細胞上の（Ａ）遊離Ｐ５－Ｃ５薬物、ならびに（Ｂ）抗体断片複合体ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＤＡＲ　１０．６（Ｈ１）及びＤＡＲ　１２．５（Ｈ２）の細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２１８】

〔図７９〕Ｐ５－Ｃ５系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。

ＳＫＢｒ３細胞上の（Ａ）遊離Ｐ５－Ｃ５薬物、ならびに（Ｂ）抗体断片複合体ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＤＡＲ　１０．６（Ｈ１）及びＤＡＲ　１２．５（Ｈ２）の細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２１９】

〔図８０〕Ｐ５－Ｃ５系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。

ＢＴ４７４細胞上の（Ａ）遊離Ｐ５－Ｃ５薬物、ならびに（Ｂ）抗体複合体ｓｃＦｖ（Ｔ

ＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＤＡＲ　１０．６（Ｈ１）及びトラスツズマブＤＡＲ６の細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２２０】

〔図８１〕遊離オーリスタチンＦのインビトロ細胞毒性プロット。

（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞、（Ｃ）ＢＴ４７４細胞上の、遊離オーリスタチン細胞毒の細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２２１】

〔図８２〕オーリスタチンＦ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。

（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞、（Ｄ）ＮＣＩ－Ｎ８７細胞上の、抗体断片であるＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　２．７（Ｌ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　６．２（Ｍ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　１１．８（Ｈ）、及びトラスツズマブ－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　４．８の細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２２２】

〔図８３〕遊離ＤＭ１薬物のインビトロ細胞毒性プロット。

（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞上の、遊離ＤＭ１－ＰＥＧ９細胞毒の細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２２３】

〔図８４〕ＤＭ１－（ｄＰＥＧ１２）系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。

（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片であるＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－（ｄＰＥＧ１２）、ＤＡＲ　３．５（Ｌ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－（ｄＰＥＧ１２）ＤＡＲ　５．５（Ｍ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－（ｄＰＥＧ１２）、ＤＡＲ　８（Ｈ）の細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２２４】

〔図８５〕遊離ＭＭＡＥ薬物のインビトロ細胞毒性プロット。

（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞上の、遊離ＭＭＡＥ細胞毒の細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２２５】

〔図８６〕ＭＭＡＥ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。

（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片であるＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ９、ＤＡＲ９、及びトラスツズマブ－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ９、ＤＡＲ４の細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２２６】

〔図８７〕４及び９６時間の遊離オーリスタチン薬物のインビトロ細胞毒性プロット。

（Ａ）４時間及び（Ｂ）９６時間のインキュベーションの、ＳＫＢｒ３細胞上の遊離オーリスタチン細胞毒の細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２２７】

〔図８８〕４及び９６時間のトラスツズマブ及びｓｃＦｖ（１０６７）－オーリスタチン－Ｃ５複合体のインビトロ細胞毒性プロット。

（Ａ）４時間及び（Ｂ）９６時間のインキュベーションの、ＳＫＢｒ３細胞上のトラスツズマブ－オーリスタチン－Ｃ５及びｓｃＦｖ（１０６７）－オーリスタチン－Ｃ５の細胞致死用量反応のプロファイル。

【０２２８】

〔図８９〕ｓｃＦｖ及びＩｇＧ－ＡＤＣの２時間の投与後の、ＢＴ４７４腫瘍切片からの蛍光画像。

（Ａ）高親和度ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５複合体、（Ｂ）中親和度ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５複合体、（Ｃ）トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５複合体、（Ｄ）生理的食塩水が制御された対照。

【０２２９】

〔図９０〕マウスモデルにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５及び対照群（化合物１１８）の薬物動態クリアランス分析。
単回静注用量を、５ｍｇ／ｋｇでメスのＢＡＬＢ／ｃマウス内に注射した。血漿試料を、指示された時点で採取し、抗タンパク質検出（総タンパク質量、実線によって示される、塗りつぶされた印）、及び関連する場合、抗薬物検出（総ＡＤＣ、破線によって示される、塗りつぶされていない印）を使用してＥＬＩＳＡによって分析した。各群及び実験の３とおりの平均のＳＥを示す。ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５（丸）（ｎ＝３）、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５（三角）（ｎ＝３）、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ）（四角）（ｎ＝４）。対照ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）値は、別個のＰＫ研究から提供された。

【０２３０】

〔図９１〕マウスモデルにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５及び対照（化合物１１８）の薬物動態クリアランス分析。
単回静注用量を、５ｍｇ／ｋｇでメスのＢＡＬＢ／ｃマウス内に注射した。血漿試料を、指示された時点で採取し、抗タンパク質検出（総タンパク質量、実線によって示される、塗りつぶされた印）、及び関連する場合、抗薬物検出（総ＡＤＣ、破線によって示される、塗りつぶされていない印）を使用してＥＬＩＳＡによって分析した。各群及び実験の３とおりの平均のＳＥを示す。ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５（丸）（ｎ＝３）、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５（三角）（ｎ＝３）、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）（四角）（ｎ＝３）。

【０２３１】

〔図９２〕マウスモデルにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５及び対照群（化合物７１）の薬物動態クリアランス分析。
単回静注用量を、５ｍｇ／ｋｇでメスのＢＡＬＢ／ｃマウス内に注射した。血漿試料を、指示された時点で採取し、抗タンパク質検出（総タンパク質量、実線によって示される、塗りつぶされた印）、及び関連する場合、抗薬物検出（総ＡＤＣ、破線によって示される、塗りつぶされていない印）を使用してＥＬＩＳＡによって分析した。各群及び実験の３とおりの平均のＳＥを示す。ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５（丸）（ｎ＝３）、トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５（三角）（ｎ＝３）、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ）（四角）（ｎ＝４）。対照ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及びトラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５値は、別個のＰＫ研究から提供された。

【０２３２】

〔図９３〕マウスモデルにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５及び対照（化合物１２２）の薬物動態クリアランス分析。
単回静注用量を、２ｍｇ／ｋｇでメスのＢＡＬＢ／ｃマウス内に注射した。血漿試料を、指示された時点で採取し、抗タンパク質検出（総タンパク質量、実線によって示される、塗りつぶされた印）、及び関連する場合、抗薬物検出（総ＡＤＣ、破線によって示される、塗りつぶされていない印）を使用してＥＬＩＳＡによって分析した。各群及び実験の３とおりの平均のＳＥを示す。ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５（丸）（ｎ＝３）、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）（四角）（ｎ＝３）。

【０２３３】

〔図９４〕マウスモデルにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）及び対照（化合物１２４）の薬物動態クリアランス分析。
単回静注用量を、２ｍｇ／ｋｇでメスのＢＡＬＢ／ｃマウス内に注射した。血漿試料を、指示された時点で採取し、抗タンパク質検出（総タンパク質量、実線によって示される、塗りつぶされた印）、及び関連する場合、抗薬物検出（総ＡＤＣ、破線によって示される、塗りつぶされていない印）を使用してＥＬＩＳＡによって分析した。各群及び実験の３とおりの平均のＳＥを示す。ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）（丸）（ｎ＝３）、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）（四角）（ｎ＝３）。

【０２３４】

〔図９５〕ラットモデルにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５、及び対照

（化合物１２４）の薬物動態クリアランス分析。
（Ａ）単回静注用量を、４ｍｇ／ｋｇでオスのスプラーグドーリーラット内に注射した。血漿試料を、指示された時点で採取し、抗タンパク質検出（総タンパク質量、実線によって示される、塗りつぶされた印）、及び関連する場合、抗薬物検出（総ＡＤＣ、破線によって示される、塗りつぶされていない印）を使用してＥＬＩＳＡによって分析した。各群及び実験の３とおりの平均のＳＥを示す。ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５（丸）（ｎ＝３）、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）（四角）（ｎ＝３）。（Ｂ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）を注射したラットの、２４時間超採取し、ＨＥＲ２－Ｂｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲチップ上で分析した１０倍に濃縮された尿、３匹の動物の試料。ｓｃＦｖの参照を示す。尿試料における容積変化は、尿構成成分の濃度によるものである。（Ｃ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５複合体を注射したラットの、２４時間超採取し、ＨＥＲ２－Ｂｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲチップ上で分析した１０倍に濃縮された尿、３匹の動物の試料。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５の参照を示す。尿試料における容積変化は、尿構成成分の濃度によるものである。

【０２３５】

〔図９６〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（化合物１１８）、及び遊離ＭＭＡＦ治療剤を用いた、ＢＴ４７４異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶。
（Ａ）時間（日）に対する腫瘍体積は、３回用量のｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ（丸）、２回用量のトラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（三角）、及び対照群（四角）でプロットされる。各群は、６匹の動物からなり、平均のＳＥを示す。挿入図は、最初の３０日の拡大表示である）．第２のプロットは、（囲まれた領域によって示される）第１のプロットの一部分の拡大である。（Ｂ）（Ａ）の同じ群の治療の開始からの、体重における変化のパーセンテージ。

【０２３６】

〔図９７〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（化合物１１８）、及び遊離ＭＭＡＦ治療剤を用いた、ＢＴ４７４異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶。
（Ａ）時間（日）に対する腫瘍体積は、２回用量のｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ（丸）、２回用量のｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ（バツ）、２回用量のトラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（三角）、及び対照群（四角）でプロットされる。各群は、６匹の動物からなり、平均のＳＥを示す。（Ｂ）（Ａ）の同じ群の治療の開始からの、体重における変化のパーセンテージ。

【０２３７】

〔図９８〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５及びトラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５複合体（化合物７１）を用いた、ＢＴ４７４異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶。
（Ａ）時間（日）に対する腫瘍体積は、単回投与処方のｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣ（ひし形）、単回投与処方のｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ（丸）、単回投与処方のトラスツズマブ－ＭＭＡＦ複合体（三角）、単回投与処方のトラスツズマブ－Ｐ５－Ｃ５複合体（ひし形）、及び対照群（四角）でプロットされる。各群は、６匹の動物からなり、平均のＳＥを示す。（Ｂ）（Ａ）の同じ群の治療の開始からの、体重における変化のパーセンテージ。

【０２３８】

〔図９９〕２つの異なるＤＡＲのｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体（１２１）を用いた、ＢＴ４７４ヒト乳癌異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶。
（Ａ）時間（日）に対する腫瘍体積は、２つの治療剤、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ（Ｌ）低ＤＡＲ、２．７、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ（Ｍ）中ＤＡＲ、５．７、ならびにビヒクル対照について、プロットされる。各群は、６匹の動物からなり、平均のＳＥを示す。（Ｂ）（Ａ）の同じ群の治療の開始からの

、体重における変化のパーセンテージ。
【０２３９】
〔図１００〕３つの異なるＤＡＲのｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体（１２１）を用いた、ＢＴ４７４ヒト乳癌異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶。
時間（日）に対する腫瘍体積は、２つの治療剤、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ（Ｌ）低ＤＡＲ、２．７、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ（Ｍ）中ＤＡＲ、５．７、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ（Ｈ）高ＤＡＲ、１１、ならびにビヒクル対照に関してプロットされる。各群は、６匹の動物からなり、平均のＳＥを示す。
【０２４０】
〔図１０１〕ＴＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳとのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）複合体のＳＤＳ　ＰＡＧＥ。
レーン２～４は、精製された抗体断片（ｓｃＦｖ）複合体である。
１＝未修飾ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）ストック；
２＝４薬物当量でのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）複合体；
３＝６薬物当量でのＴＣＴ複合体；
４＝１６薬物当量でのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）複合体。
レーン６～８は、精製前の抗体断片複合体である。
６＝４薬物でのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）複合体；
７＝６薬物当量でのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）複合体；
８＝１６薬物当量でのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）複合体。
使用されるサイズマーカーを、示す。
【０２４１】
〔図１０２〕ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＴＣＯ－ＰＥＧ４のＬＣＭＳデータ。
（Ａ）は、ＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は、１０．７６分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。
【０２４２】
〔図１０３〕１ｍｌ／分で運転し、非複合ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ－１０６７）－ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_5$ＡＤＣ１、２、３、４のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録。（Ａ）２８０ｎｍでの吸光度のプロファイル、（Ｂ）３６０ｎｍでの吸光度のプロファイル
〔図１０４〕非複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_5$複合体１及び２を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（４～２０％）。
【０２４３】
〔図１０５〕二重特異性抗体（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５複合体のそれぞれの非複合抗体、ダイアボディ（ＴＣＴ）、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に対する、ダイアボディ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５複合体を示す、ＳＤＳ　ＰＡＧＥ還元性ゲル（４～２０％）。
すべての例に対する共通因子
すべてのＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルは、還元性である。
【０２４４】

【表５】

表３。例で使用されるモル吸光係数

項目	モル吸光係数
Ｃ６．５ ａｎｄｓｃＦｖ（ＴＣＴ）の場合ε２８０ｎｍ	６５４２２
ＨＭＦＧ１ ＩｇＧの場合ε２８０ｎｍ	２１００００
ε３４３ｎｍチオン	８０８０
ε２８０ｎｍチオン	５１００
εドキソルビシン４８８ｎｍ	１１２９４
εドキソルビシン２８０ｎｍ	８４８７
εドキソルビシン－ＰＥＧ４８８ｎｍ	１０２１８
εドキソルビシン－ＰＥＧ２８０ｎｍ	１４０２１
εエリプチシン４２９ｎｍ	３６０３
εエリプチシン２８０ｎｍ	２２９９０
εエリプチシン－ＰＥＧ４２９ｎｍ	１８１０
εエリプチシン－ＰＥＧ２８０ｎｍ	８８３８

【０２４５】

合成実験手順

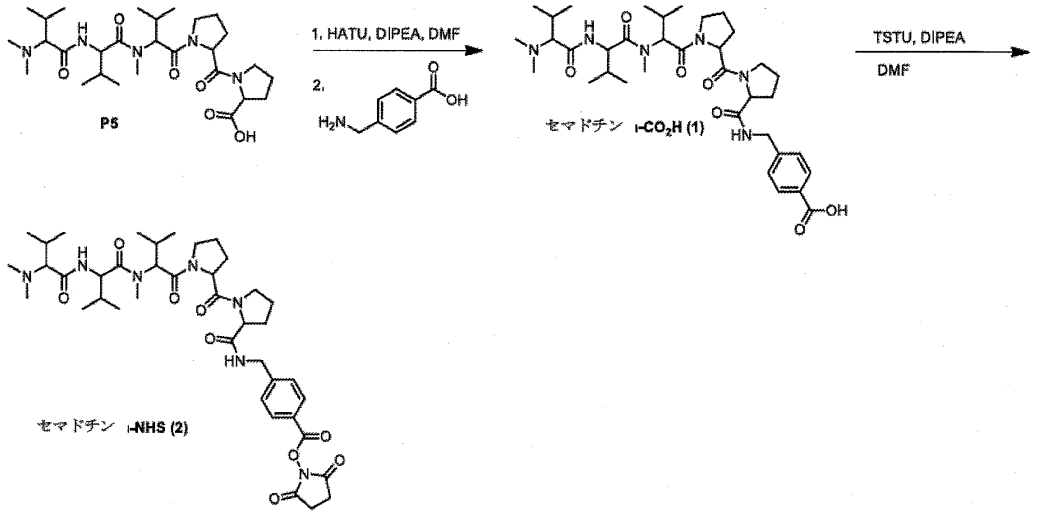
実験は、概して、特に指定のない限り、特に酸素感受性試薬または感湿試薬もしくは中間体が使用される場合、不活性雰囲気（窒素）下で実施される。商業的溶媒及び試薬は、入手できる最高等級のものであり、さらに精製せずに使用した。無水溶媒を、ＡｃｒｏｓまたはＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈのいずれかから入手した。反応の後に、薄層クロマトグラフ（ｔｌｃ）、ＬＣＭＳ、またはＨＰＬＣ、及び順相または逆相支持体を使用したＢｉｏｔａｇｅの自動クロマトグラフィーによって、または逆相ＨＰＬＣによってのいずれかで行なわれる精製が続いた。ＢｉｏｔａｇｅまたはＨＰＬＣのいずれかからの逆相画分を、凍結乾燥（ｌｙｏｐｈｉｌｉｓａｔｉｏｎ）／凍結乾燥（ｆｒｅｅｚｅ－ｄｒｙｉｎｇ）を介して濃縮した。質量分析データは、特に指定のない限り、ＬＣＭＳから、またはイオン化モードでエレクトロスプレー（ＥＳ）を使用した直接注射によって報告される。陽子及び炭素の両方の核磁気共鳴（ＮＭＲ）の化学シフトを、内部基準として重水素化溶媒を用いて、１００万分の１（ｐｐｍ）で表現する。

【０２４６】

実施例１－セマドチン－ＮＨＳ（２）の精製

【０２４７】

【化１】



【０２４８】

ＤＭＦ（５ｍＬ）中のＰ５（１００ｍｇ、０．１８ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、ＨＡＴＵ（６２ｍｇ、０．１６ｍｍｏｌ）、続いてＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ）（６３μＬ、０．３６ｍｍｏｌ）を添加し、得られた混合物を室温で３０分間撹拌した。次いで、この反応混合物をＤＭＦ（５ｍＬ）中の４－（アミノメチル）安息香酸（３０ｍｇ、０．２０ｍｍｏｌ）のスラリーに１０分にわたって滴下し、室温で３０分間、窒素下で撹拌し、減圧下で濃縮させ、調製用のＨＰＬＣによって精製し（H_2O中のＭｅＣＮ［０．１％のＴＦＡ］；４ｍＬ／分；４分で２０％のＭｅＣＮ、２分にわたり２０～２３％、１４分にわたり２３～２５％、２分にわたり２５～３０％、３分にわたり３０～８０％、５分で８０％のＭｅＣＮ）、t_R＝９．９６分を採取し、白い固形物としての表題の生成物１８５ｍｇ、（６９％）を得た。$C_{36}H_{57}N_6O$ ６８５．４２８９［Ｍ＋Ｈ］について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）は、６８５．４３０７を見出した。^1H ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－d_6）δ１２．８６（ｂｒ．ｓ、１Ｈ）、９．６２（ｂｒ．ｓ、１Ｈ）、８．９２（ｂｒ．ｓ、１Ｈ）、８．４０（ｔ、Ｊ＝６．０Ｈｚ、１Ｈ）、７．８７（ｄ、Ｊ＝８．０Ｈｚ、２Ｈ）、７．３６（ｄ、Ｊ＝８．２Ｈｚ、２Ｈ）、６．５５（ｂｒ．ｓ、１Ｈ）、４．９９（ｄ、Ｊ＝１１．０Ｈｚ、１Ｈ）、４．６１～４．５１（ｍ、２Ｈ）、４．４２～４．２４（ｍ、３Ｈ）、３．７７～３．６３（ｍ、３Ｈ）、３．６０～３．５１（ｍ、２Ｈ）、３．０９（ｓ、３Ｈ）、２．７８（ｓ、３Ｈ）、２．７５（ｓ、３Ｈ）、２．３２～２．２２（ｍ、１Ｈ）、２．２０～１．８７（ｍ、８Ｈ）、１．８６～１．６９（ｍ、３Ｈ）、１．００～０．９３（ｍ、６Ｈ）、０．８８（ｄｄ、Ｊ＝１１．８、６．６Ｈｚ、６Ｈ）、０．７１（ｄ、Ｊ＝６．７Ｈｚ、３Ｈ）ｐｐｍ。

【０２４９】

ＤＭＦ（２ｍＬ）中のセマドチン酸１（１５ｍｇ、０．０２ｍｍｏｌ）及びＤＩＰＥＡ（１６μＬ、０．０９ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、ＴＳＴＵ（１２ｍｇ、０．０４ｍｍｏｌ）を添加し室温で１時間、窒素下で撹拌し、減圧下で濃縮させ、調製用のＨＰＬＣによって精製し（H_2O中のＭｅＣＮ［０．１％のＴＦＡ］；４ｍＬ／分；２０分にわたり２５～３５％のＭｅＣＮ、５分にわたり３５～８０％、８０％のＭｅＣＮで２分）t_R＝１２．２９分を採取して、表題の生成物２、１３ｍｇ、（７６％）を得た。$C_{40}H_{60}N_7O_9$［Ｍ＋Ｈ］７８２．４４５３について計算したＨＲＭＳ（ＥＳ）（ｍ／ｚ）は、７８４．４４４９を見出した。^1H ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－d_6）δ９．６４（ｂｒ．ｓ、１Ｈ）、９．１８～９．１３（ｍ、１Ｈ）、８．９３（ｂｒ．ｓ、１Ｈ）、８．３９（ｔ、Ｊ＝６．３Ｈｚ、１Ｈ）、８．０７（ｄ、Ｊ＝８．２Ｈｚ、２Ｈ）、７．８５（ｄ、Ｊ＝８．１Ｈｚ、２Ｈ）、７．５８（ｄ、Ｊ＝８．１Ｈｚ、２Ｈ）、７．３５（

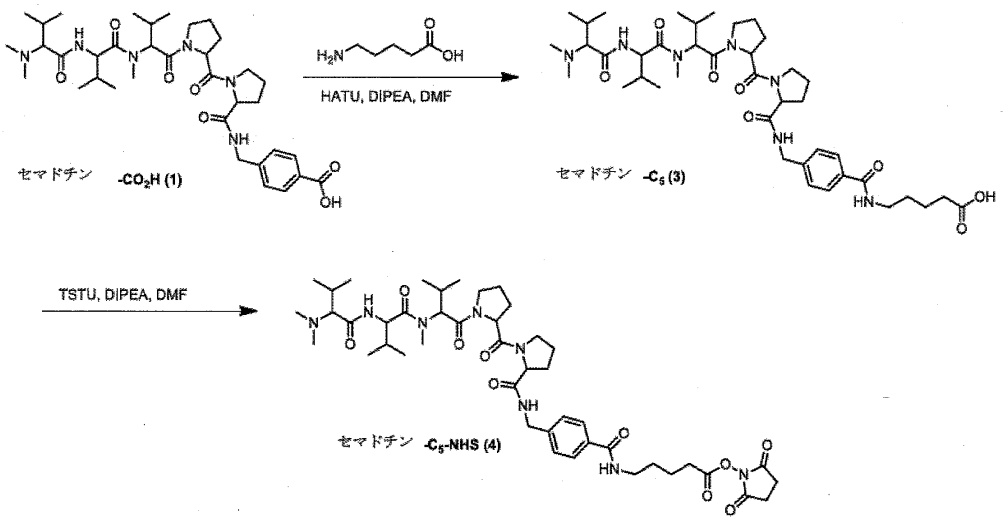
ｄ、Ｊ＝８．０Ｈｚ、２Ｈ）、６．５５（ｂｒ．ｓ、４Ｈ）、４．９９（ｄ、Ｊ＝１０．９Ｈｚ、１Ｈ）、４．６１（ｄ、Ｊ＝５．９Ｈｚ、２Ｈ）、４．５８～４．５２（ｍ、２Ｈ）、４．４２～４．２２（ｍ、３Ｈ）、３．７７～３．６３（ｍ、３Ｈ）、３．６０～３．５１（ｍ、２Ｈ）、３．０８（ｓ、３Ｈ）、２．８９（ｓ、３Ｈ）、２．８１～２．７２（ｂｒ．ｄ、５Ｈ）、２．６９～２．６６（ｍ、１Ｈ）、２．３２～２．２２（ｍ、１Ｈ）、２．２０～２．０５（ｍ、３Ｈ）、２．００～１．８７（ｍ、３Ｈ）、１．８５～１．６９（ｍ、３Ｈ）、１．００～０．９３（ｍ、６Ｈ）、０．９１～０．８１（ｍ、６Ｈ）、０．７１（ｄ、Ｊ＝６．７Ｈｚ、３Ｈ）ｐｐｍ。

【０２５０】

実施例２－セマドチンC_5－ＮＨＳ（４）の調製

【０２５１】

【化２】



【０２５２】

乾燥ＤＭＦ（１．５ｍＬ）中のセマドチン酸１（２０ｍｇ、０．０３ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、ＨＡＴＵ（１０ｍｇ、０．０３ｍｍｏｌ）、続いて、ＤＩＰＥＡ（１０μＬ、０．０６ｍｍｏｌ）を添加し、得られた混合物を室温で３０分間、窒素下で撹拌した。次いで、反応混合物を乾燥ＤＭＦ（１．５ｍＬ）中の５－アミノ吉草酸（３．８ｍｇ、０．０３ｍｍｏｌ）のスラリーに１０分にわたり滴下し、室温で３０分間撹拌し、減圧下で濃縮させ、調製用のＨＰＬＣによって精製し（H_2O中のＭｅＣＮ［０．１％のＴＦＡ］；４ｍＬ／分；４分２０％のＭｅＣＮ、２分にわたり２０～２３％、１４分２３～２５％、２分にわたり２５～３０％、３分にわたり３０～８０％、５分で８０％のＭｅＣＮ）、t_R＝１２．１８分を採取して、白い固形物としての表題の生成物３、２０ｍｇ、（８８％）を得た。$C_{41}H_{66}N_7O_8$［Ｍ＋Ｈ］７８４．４９７３について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）は、７８４．４９２１を見出した。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－d_6）δ９．６４（ｂｒ．ｓ、１Ｈ）、８．９３（ｂｒ．ｓ、１Ｈ）、８．４５（ｔ、Ｊ＝５．８Ｈｚ、１Ｈ）、８．３６（ｔ、Ｊ＝６．１Ｈｚ、１Ｈ）、７．７７（ｄ、Ｊ＝７．８Ｈｚ、２Ｈ）、７．３０（ｄ、Ｊ＝８．０Ｈｚ、２Ｈ）、６．５６（ｂｒ．ｓ、２Ｈ）、４．９９（ｄ、Ｊ＝１０．９Ｈｚ、１Ｈ）、４．６０～４．５１（ｍ、２Ｈ）、４．４２～４．３０（ｍ、２Ｈ）、４．２８～４．２０（ｍ、１Ｈ）、３．７７～３．６２（ｍ、３Ｈ）、３．６０～３．５２（ｍ、２Ｈ）、３．２８（ｑ、Ｊ＝６．４Ｈｚ、３Ｈ）、３．０９（ｓ、３Ｈ）、２．８１（ｓ、３Ｈ）、２．８０～２．７０（ｍ、３Ｈ）、２．３５～２．２２（ｍ、２Ｈ）、２．１８～１．８８（ｍ、７Ｈ）、１．８５～１．５８（ｍ、７Ｈ）、１．２９～１．２２（ｍ、２Ｈ）、０．９９～０．９３（ｍ、５Ｈ）、０．

９０～０．８１（ｍ、８Ｈ）、０．７１（ｄ、Ｊ＝６．９Ｈｚ、２Ｈ）ｐｐｍ。

【０２５３】

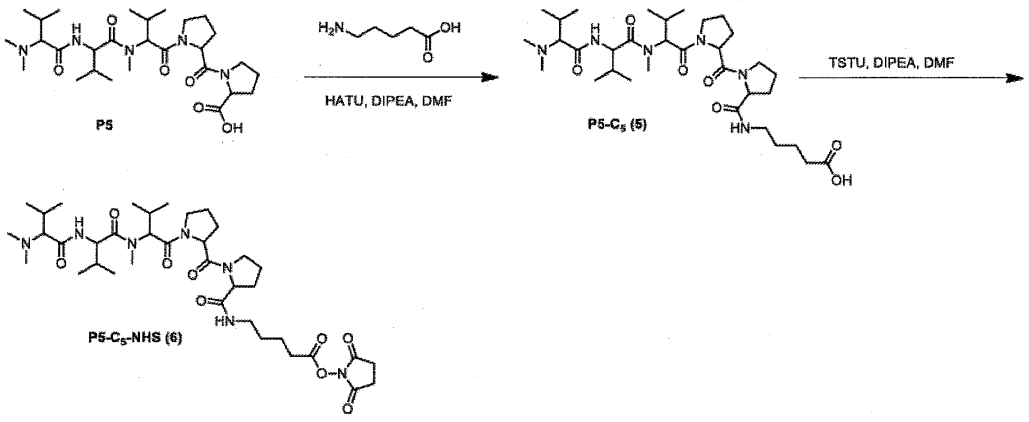
乾燥ＤＭＦ（２ｍＬ）中のセマドチンＣ５　３（２０ｍｇ、０．０３ｍｍｏｌ）及びＤＩＰＥＡ（１０μＬ、０．０６ｍｍｏｌ）の撹拌溶液にＴＳＴＵ（１４ｍｇ、０．０５ｍｍｏｌ）を添加し、得られた混合物を室温で１時間、窒素下で撹拌し、減圧下で濃縮させ、調製用のＨＰＬＣによって精製し（H_2O中のＭｅＣＮ［０．１％のＴＦＡ］；３ｍＬ／分；２０分にわたり２５～３５％のＭｅＣＮ、５分にわたり３５～８０％、８０％のＭｅＣＮで８分）、t_R＝１２．１３分を採取して、白い固形物としての表題の生成物４、１５ｍｇ、（６５％）を得た。ＭＳ（ｍ／ｚ）８８１．５［Ｍ＋Ｈ］；^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－d_6）δ９．６４（ｂｒ．ｓ、１Ｈ）、８．９３（ｂｒ．ｓ、１Ｈ）、８．４５（ｔ、Ｊ＝５．８Ｈｚ、１Ｈ）、８．３６（ｔ、Ｊ＝６．１Ｈｚ、１Ｈ）、７．７７（ｄ、Ｊ＝７．８Ｈｚ、２Ｈ）、７．３０（ｄ、Ｊ＝８．０Ｈｚ、２Ｈ）、６．５６（ｂｒ．ｓ、２Ｈ）、４．９９（ｄ、Ｊ＝１０．９Ｈｚ、１Ｈ）、４．６０～４．５１（ｍ、２Ｈ）、４．４２～４．３０（ｍ、２Ｈ）、４．２８～４．２０（ｍ、１Ｈ）、３．７７～３．６２（ｍ、３Ｈ）、３．６０～３．５２（ｍ、２Ｈ）、３．２８（ｑ、Ｊ＝６．４Ｈｚ、３Ｈ）、３．０９（ｓ、３Ｈ）、２．８１（ｓ、３Ｈ）、２．８０～２．７０（ｍ、７Ｈ）、２．３５～２．２２（ｍ、２Ｈ）、２．１８～１．８８（ｍ、７Ｈ）、１．８５～１．５８（ｍ、７Ｈ）、１．２９～１．２２（ｍ、２Ｈ）、０．９９～０．９３（ｍ、５Ｈ）、０．９０～０．８１（ｍ、８Ｈ）、０．７１（ｄ、Ｊ＝６．９Ｈｚ、２Ｈ）ｐｐｍ。

【０２５４】

実施例３－Ｐ５－C_5－ＮＨＳ（６）の調製

【０２５５】

【化３】



【０２５６】

乾燥ＤＭＦ（５ｍＬ）中のＰ５（１００ｍｇ、０．１８ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、ＨＡＴＵ（６２ｍｇ、０．１６ｍｍｏｌ）、続いてＤＩＰＥＡ（６３μＬ、０．３６ｍｍｏｌ）を添加し、得られた混合物を室温で３０分間、窒素下で撹拌した。次いで、反応混合物を、乾燥ＤＭＦ（５ｍＬ）中の５－アミノ吉草酸（２３ｍｇ、０．２０ｍｍｏｌ）のスラリーに１０分にわたって滴下し、室温で３０分間撹拌し、減圧下で濃縮させ、調製用のＨＰＬＣにより精製し（H_2O中のＭｅＣＮ［０．１％のＴＦＡ］；４ｍＬ／分；４分１０％のＭｅＣＮ、４分にわたり１０～２０％、８分にわたり２０～３０％、２分で３０％のＭｅＣＮ）、t_R＝１３．５８分を採取して、白い固形物としての表題の生成物５、９３ｍｇ、（７９％）を得た。ＭＳ（ｍ／ｚ）６５１．４［Ｍ＋Ｈ］；^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－d_6）δ９．５９（ｂｒ．ｓ、１Ｈ）、８．９２（ｄ、Ｊ＝７．７Ｈｚ、１Ｈ）、７．７８（ｔ、Ｊ＝５．８ＨＺ、０．６Ｈ）、７．７３（ｔ、Ｊ＝５．８Ｈｚ

、０．４Ｈ）、４．９７（ｄ、Ｊ＝１１．０Ｈｚ、１Ｈ）、４．５７（ｔ、Ｊ＝８．２Ｈｚ、１Ｈ）、４．５１（ｄｄ、Ｊ＝８．４、５．２Ｈｚ、１Ｈ）、４．２３（ｄｄ、Ｊ＝８．４、３．７Ｈｚ、１Ｈ）、３．７５～３．６８（ｍ、３Ｈ）、３．６６～３．５９（ｍ、１Ｈ）、３．５７～３．５０（ｍ、２Ｈ）、３．２５～３．１１（ｍ、１Ｈ）、３．０８（ｓ、３Ｈ）、３．０１～２．８９（ｍ、１Ｈ）、２．７７（ｄｄ、Ｊ＝１４．２、４．２Ｈｚ、６Ｈ）、２．６７（ｔ、Ｊ＝７．３Ｈｚ、１Ｈ）、２．６０（ｓ、１Ｈ）、２．３２～２．２４（ｍ、１Ｈ）、２．２２～２．０９（ｍ、３Ｈ）、２．０６～１．９９（ｍ、２Ｈ）、１．９６～１．８６（ｍ、３Ｈ）、１．８４～１．６８（ｍ、３Ｈ）、１．６４～１．５６（ｍ、２Ｈ）、１．５０～１．４３（ｍ、２Ｈ）、０．９６（ｄｄ、Ｊ＝９．４、６．６Ｈｚ、６Ｈ）、０．８８～０．８２（ｍ、９Ｈ）、０．７１（ｄ、Ｊ＝６．６Ｈｚ、３Ｈ）ｐｐｍ。

【０２５７】

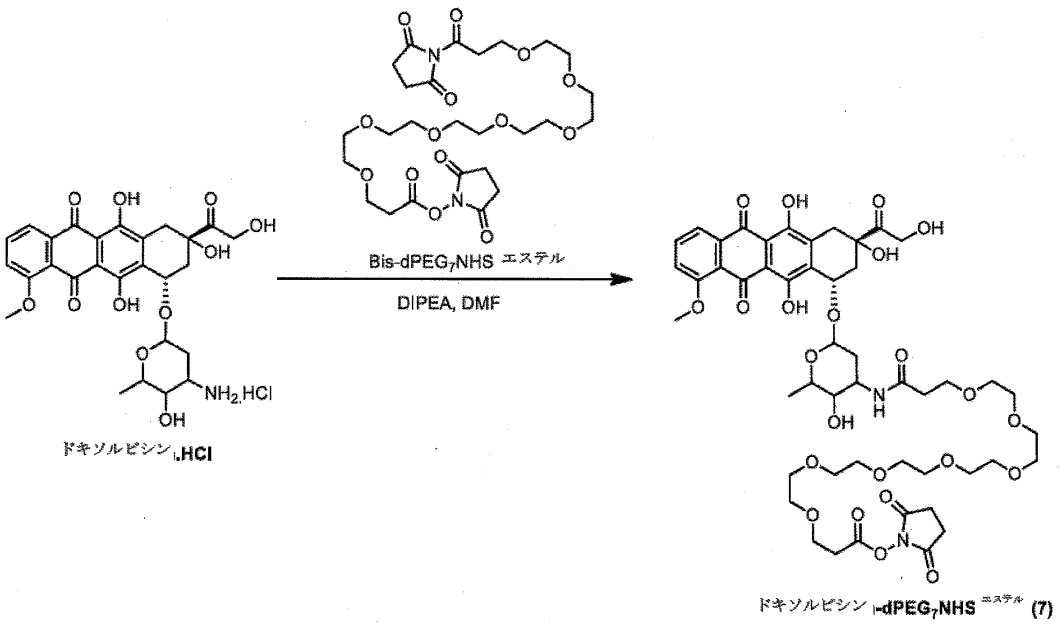
乾燥ＤＭＦ（１０ｍＬ）中のＰ５Ｃ５　５（９３ｍｇ、０．１４ｍｍｏｌ）及びＤＩＰＥＡ（５８μＬ、０．３３ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、ＴＳＴＵ（７６ｍｇ、０．２５ｍｍｏｌ）を添加し、得られた混合物を室温で１時間、窒素下で撹拌し、減圧下で濃縮させ、調製用のＨＰＬＣにより精製し（H_2O中のＭｅＣＮ［０．１％のＴＦＡ］；４ｍＬ／分；４分で１５％のＭｅＣＮ、８分にわたり１５～３０％、３０％で５分、２分にわたり３０～４０％、４０％のＭｅＣＮで３分）、t_R＝１３．２９分を採取して、白い固形物としての表題の生成物６、７８ｍｇ、（７３％）を得た。ＭＳ（ｍ／ｚ）７４８．４［Ｍ＋Ｈ］；^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－d_6）δ９．５９（ｂｒ．ｓ、１Ｈ）、８．９２（ｄ、Ｊ＝７．７Ｈｚ、１Ｈ）、７．７８（ｔ、Ｊ＝５．８ＨＺ、０．６Ｈ）、７．７３（ｔ、Ｊ＝５．８Ｈｚ、０．４Ｈ）、４．９７（ｄ、Ｊ＝１１．０Ｈｚ、１Ｈ）、４．５７（ｔ、Ｊ＝８．２Ｈｚ、１Ｈ）、４．５１（ｄｄ、Ｊ＝８．４、５．２Ｈｚ、１Ｈ）、４．２３（ｄｄ、Ｊ＝８．４、３．７Ｈｚ、１Ｈ）、３．７５～３．６８（ｍ、３Ｈ）、３．６６～３．５９（ｍ、１Ｈ）、３．５７～３．５０（ｍ、２Ｈ）、３．２５～３．１１（ｍ、１Ｈ）、３．０８（ｓ、３Ｈ）、３．０１～２．８９（ｍ、１Ｈ）、２．８２（ｓ、３Ｈ）、２．７７（ｄｄ、Ｊ＝１４．２、４．２Ｈｚ、６Ｈ）、２．６７（ｔ、Ｊ＝７．３Ｈｚ、１Ｈ）、２．６０（ｓ、１Ｈ）、２．３２～２．２４（ｍ、１Ｈ）、２．２２～２．０９（ｍ、３Ｈ）、２．０６～１．９９（ｍ、２Ｈ）、１．９６～１．８６（ｍ、３Ｈ）、１．８４～１．６８（ｍ、３Ｈ）、１．６４～１．５６（ｍ、２Ｈ）、１．５０～１．４３（ｍ、２Ｈ）、０．９６（ｄｄ、Ｊ＝９．４、６．６Ｈｚ、６Ｈ）、０．８８～０．８２（ｍ、９Ｈ）、０．７１（ｄ、Ｊ＝６．６Ｈｚ、３Ｈ）ｐｐｍ。

【０２５８】

実施例４－ドキソルビシン－ｄＰＥＧ$_{(7)}$－ＮＨＳの調製：（７）

【０２５９】

【化４】



【０２６０】

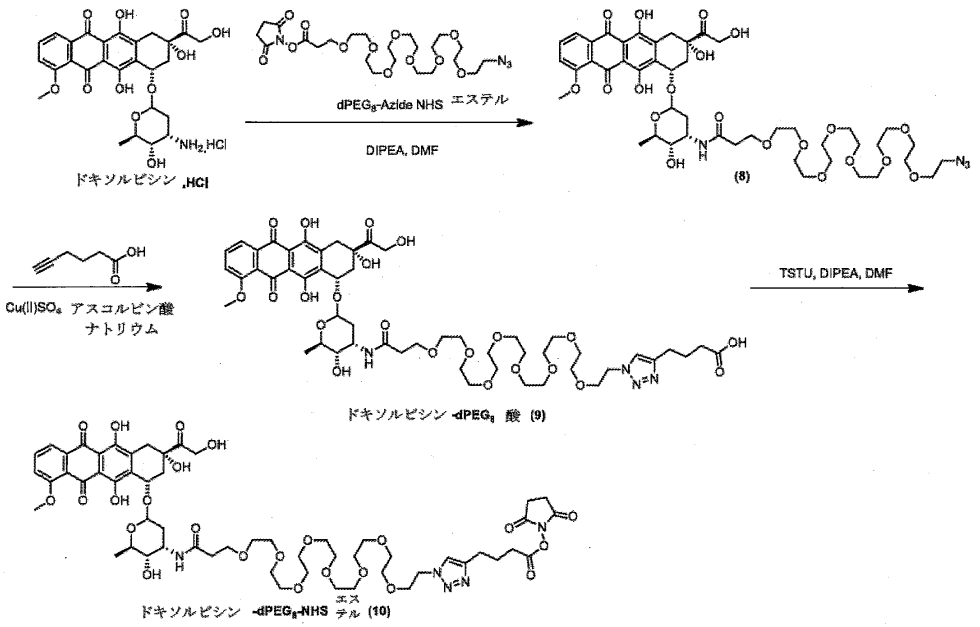
乾燥ＤＭＦ（２ｍｌ）中のドキソルビシン．ＨＣｌ（１５ｍｇ、０．０２６ｍｍｏｌ）の撹拌懸濁液に、ＤＩＰＥＡ（２２．５μｌ、０．０１３ｍｍｏｌ）を添加し、窒素下で３０分間撹拌し、明澄な暗赤色の溶液を生じさせた。これを、５ｍｌシリンジ中に吸い上げ、乾燥ＤＭＦ（２ｍｌ）中のビス－ｄＰＥＧ$_{7}$－ＮＨＳ（２４．１ｍｇ、０．０３９ｍｍｏｌ）及びＤＩＰＥＡ（２２．５μｌ、０．１３ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に２０分にわたり滴下した。次いで、得られた溶液を室温で３時間、窒素下で撹拌し、高真空下で蒸発させて、暗い赤みがかった橙色の油を得た。これを、フラッシュクロマトグラフィー［シリカゲル：１０％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ］によって精製し、適切な画分（Ｒ$_{f}$０．３８）を採取し、合わせ、乾燥させて、赤みがかった橙色の粘性の油としての表題の生成物７、１０．４ｍｇ（３９％）を得た。Ｃ$_{4\,9}$Ｈ$_{6\,4}$Ｎ$_{2}$Ｏ$_{2\,3}$Ｎａ　１０７１．３７９８（Ｍ＋Ｎａ）について計算したＭＳ（ｍ／ｚ）は、１０７１．３８０５を見出した。

【０２６１】

実施例５－ドキソルビシン－ｄＰＥＧ$_{8}$－ＮＨＳエステル（１０）の調製

【０２６２】

【化５】



【０２６３】

ドキソルビシン塩酸塩（９４ｍｇ、０．１６１ｍｍｏｌ）を無水ＤＭＦ（１０ｍＬ）に溶解し、ＤＩＰＥＡ（８９μｌ、０．４８３ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を１０分間撹拌し、これの後に、ＮＨＳ－ＰＥＧ$_8$－Ｎ$_3$（１００ｍｇ、０．１７７ｍｍｏｌ）を添加し、続いて、室温で、窒素下で１８時間、暗中で撹拌した。反応混合物を、真空下で蒸発させ、フラッシュクロマトグラフィー［シルカ（ｓｉｌｃａ）ゲル：５％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ］により精製し、赤い油としての所望のＤｏｘ－ｄＰＥＧ$_8$－アジド８、１２１ｍｇ、（７６％）を得た。（Ｒ$_f$０．３９５、５％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ）；ＭＳ（ｍ／ｚ）：１０１０．４４［Ｍ$^+$＋ＮＨ４］、１０１５．３９［Ｍ$^+$＋Ｎａ］、１０３１．３７［Ｍ$^+$＋Ｋ］、^{1}Ｈ ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_3$）：δ１４．００（１Ｈ、ｓ、６－ＯＨ）、１３．３１（１Ｈ、ｓ、１１－ＯＨ）、８．０８（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝８Ｈｚ、３－Ｈ）、７．８４（１Ｈ、ｔ、Ｊ＝８Ｈｚ、２－Ｈ）、７．４３（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝８Ｈｚ、１－Ｈ）、５．５３（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝４Ｈｚ、ｃ－ＯＨ）、５．３３（１Ｈ、ｓ、１’－ＯＨ）、４．７９（２Ｈ、ｓ、１４－Ｈ）、４．１９～４．１１（５Ｈ、ｍ、ＣＨ３－Ｏ－、５’－Ｈ、７－Ｈ）、３．７１～３．６４（３３Ｈ、ｍ、３’－Ｈ、－ＣＨ$_2$－Ｏ－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）$_7$－ＣＨ$_2$－）、３．４２（２Ｈ、ｔ、Ｊ＝８Ｈｚ、－ＣＨ$_2$－Ｎ$_3$）、３．３４～３．０５（２Ｈ、ｑ、Ｊ＝２０Ｈｚ、１０－Ｈ）、２．４６～２．１６（３Ｈ、ｍ、４’－Ｈ、ｂ－Ｈ、ｄ－Ｈ）、１．９４～１．７７（４Ｈ、ｍ、２’－Ｈ、８’－Ｈ）、１．３１（３Ｈ、ｄ、Ｊ＝８Ｈｚ、６’－Ｈ）。

【０２６４】

２．５ｍＬのｔｅｒｔ－ブタノール／水（１：１ｖ：ｖ）中のＤｏｘ－ｄＰＥＧ$_8$－アジド８（１２０ｍｇ、０．１２１ｍｍｏｌ）の溶液に、２．５ｍＬのｔｅｒｔ－ブタノール／水（１：１）中の５－ヘキシン酸（１４ｍｇ、０．１２１ｍｍｏｌ）の溶液を添加した。反応を、室温で３０分間撹拌し、続いて、硫酸銅（ＩＩ）（２ｍｇ、０．０１２ｍｍｏｌ）及び（＋）－ナトリウムＬ－アスコルビン酸（５ｍｇ、０．０２４ｍｍｏｌ）を添加した。反応を４０℃に温め、２４時間撹拌した。次いで、反応混合物をＤＣＭ（１５ｍＬ）で希釈し、ｐＨ４が達成されるまでクエン酸の溶液を添加した。次いで、有機層をブライン（２×１０ｍＬ）で洗浄し、水層をＤＣＭ（４×１０ｍＬ）と合わせ、逆抽出した。有機画分を合わせ、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮させて、暗赤色の残渣

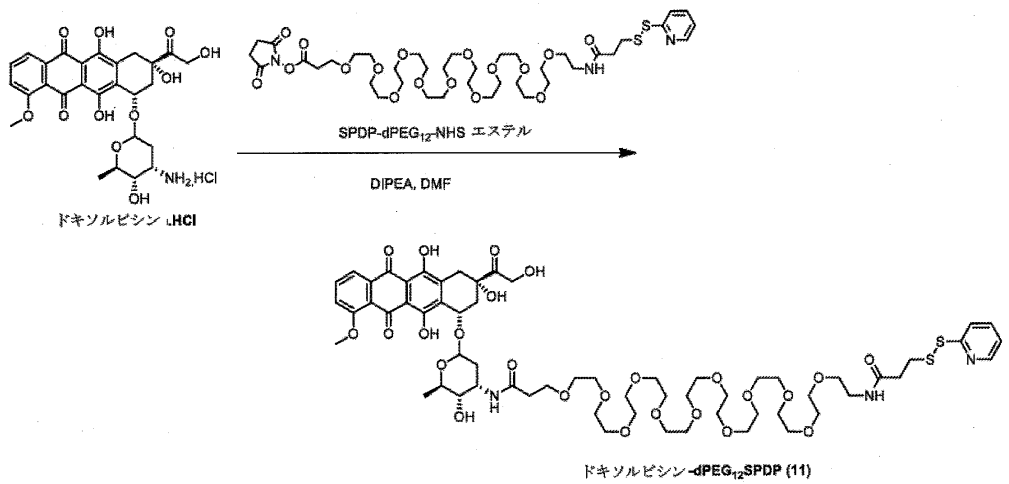
を得た。これは、精製されたフラッシュクロマトグラフィー［シリカゲル：２０％のＭｅＯＨ／ＤＣＭに至るまでのＤＣＭ増加）であり、赤い固形物としての生成物９、５３．４ｍｇ、（４０％）を得た。（R_f０．２０、１０％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ）；ＭＳ（ｍ／ｚ）：１１０６．０５［M^+＋Ｈ］、１１２８．００［M^+＋Ｎａ^{1}ＨＮＭＲ（$CDCl_3$）：δ１４．０１（１Ｈ、ｓ、６－ＯＨ）、１３．３３（１Ｈ、ｓ、１１－ＯＨ）、８．０８（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝８Ｈｚ、３－Ｈ）、７．８２（１Ｈ、ｔ、Ｊ＝８Ｈｚ、２－Ｈ）、７．６４（１Ｈ、ｓ、－Ｎ－ＣＨ＝ＣＮ－）、７．４４（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝８Ｈｚ、１－Ｈ）、５．５５（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝４Ｈｚ、ｃ－ＯＨ）、５．３３（１Ｈ、ｓ、１’－ＯＨ）、４．８１（２Ｈ、ｓ、１４－Ｈ）、４．５５（２Ｈ、ｔ、Ｊ＝４Ｈｚ、－ＣＨ＝ＣＮ－CH_2－）、４．１６～４．１１（５Ｈ、ｍ、CH_3－Ｏ－、５’－Ｈ、７－Ｈ）、３．８６（２Ｈ、ｔ、Ｊ＝８Ｈｚ、－Ｏ－CH_2－CH_2－ＣＮ－）、３．７０～３．６２（３３Ｈ、ｍ、３’－Ｈ、－（CH_2－CH_2－Ｏ）$_5$－CH_2－）、３．３５～３．０６（２Ｈ、ｑ、Ｊ＝２０Ｈｚ、１０－Ｈ）、２．８３（２Ｈ、ｔ、Ｊ＝４Ｈｚ、－CH_2－ＣＯＯＨ）、２．４７～２．１６（２Ｈ、ｍ、ｂ－Ｈ、ｄ－Ｈ）、２．０７～２．０２（３Ｈ、ｍ、２’－Ｈ、４’－Ｈ）、１．８３～１．７９（２Ｈ、ｍ、８－Ｈ）、１．３６～１．２８（５Ｈ、ｍ、６’－Ｈ、－CH_2－CH_2－CH_2－ＣＯＯＨ）．］。Ｄｏｘ－ｄＰＥＧ$_8$酸の溶液を、乾燥ＤＭＦ中でＴＳＴＵ及びＤＩＰＥＡと一緒に１時間撹拌する。この溶媒を、高真空を使用して取り除き、残渣を逆相ＨＰＬＣによって精製して、ＮＨＳエステル誘導体１０を得た。

【０２６５】

実施例６－ドキソルビシン－ｄＰＥＧ$_{12}$－ＳＰＤＰ（１１）の調製

【０２６６】

【化６】



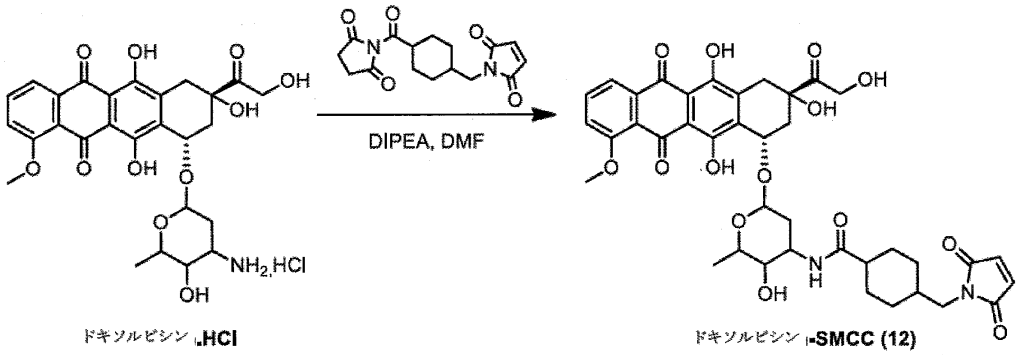
【０２６７】

乾燥ＤＭＦ（２ｍｌ）中のＤｏｘ．ＨＣｌ（１０ｍｇ、０．０１７２ｍｍｏｌ）の撹拌懸濁液に、ＤＩＰＥＡ（７．７μｌ）を添加し、反応混合物を窒素下で１０分間撹拌して、明澄な赤い溶液を得た。これに、乾燥ＤＭＦ（１ｍｌ）中に溶解したＳＰＤＰ－ｄＰＥＧ$_{12}$－ＮＨＳエステル（１７．３ｍｇ、０．０４４ｍｍｏｌ）を添加し、反応を室温で、窒素下で撹拌し、一晩光から保護した。ＤＭＦを高真空によって除去し、暗赤色の油をフラッシュクロマトグラフィー［シリカゲル：１０％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ　R_f０．３６］によって精製して、赤い粘性の油としての所望の生成物１１、１６．２ｍｇ（７０％）を得た。$C_{62}H_{85}N_8O_{21}S_2$［Ｍ＋Ｈ］１３４１．５２７１について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）は、１３４１．５３８０を見出した。

【０２６８】

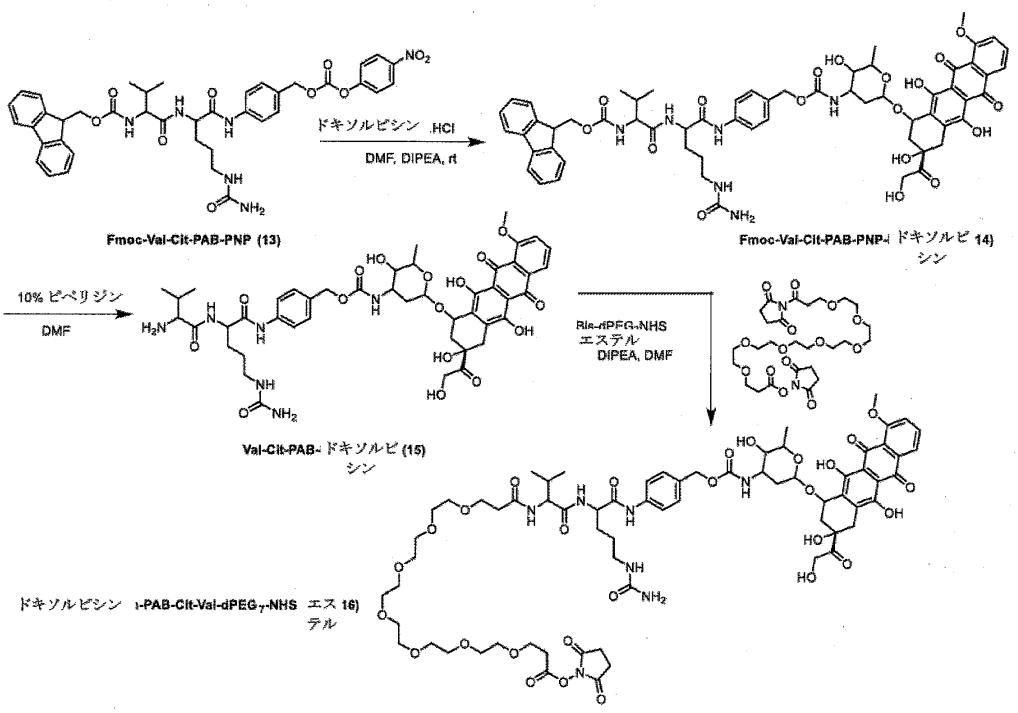
実施例７－ドキソルビシン－ＳＭＣＣ（１２）の調製

【０２６９】
【化７】



ドキソルビシン .HCl　　ドキソルビシン -SMCC (12)

【０２７０】
乾燥ＤＭＦ（１０ｍｌ）中のＤｏｘ．ＨＣｌ（０．０５ｇ、０．０８６ｍｍｏｌ）の懸濁液に、ＳＭＣＣ架橋剤（０．０３４６ｇ、０．１０４ｍｍｏｌ）及びＤＩＰＥＡ（２２．５μｌ、０．１２９ｍｍｏｌ）を添加し、反応を室温で１２時間、窒素下で撹拌し、光から遮蔽した。懸濁液は、１時間以内に溶液中に投入される。溶媒を高真空下、３５℃で取り除き、暗赤色の残渣を得た。これをＤＣＭ（５０ｍｌ）に取り込み、ブラインで洗浄し、$MgSO_4$上で乾燥させ濾過し、乾燥させて暗赤色の固形物を得た。これをフラッシュカラムクロマトグラフィー［シリカゲル：１～５％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ、R_f０．２５］によって精製して、橙色がかった赤い固形物としての１２、０．０５３ｇ（７８％）を得た。$C_{39}H_{42}N_2O_{14}Na$について計算したＭＳ（ｍ／ｚ）は、７８５．２５（Ｍ＋Ｎａ）を見出した。
【０２７１】
実施例８－ドキソルビシン－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_7$－ＮＨＳエステル（１６）の調製
【０２７２】
【化８】



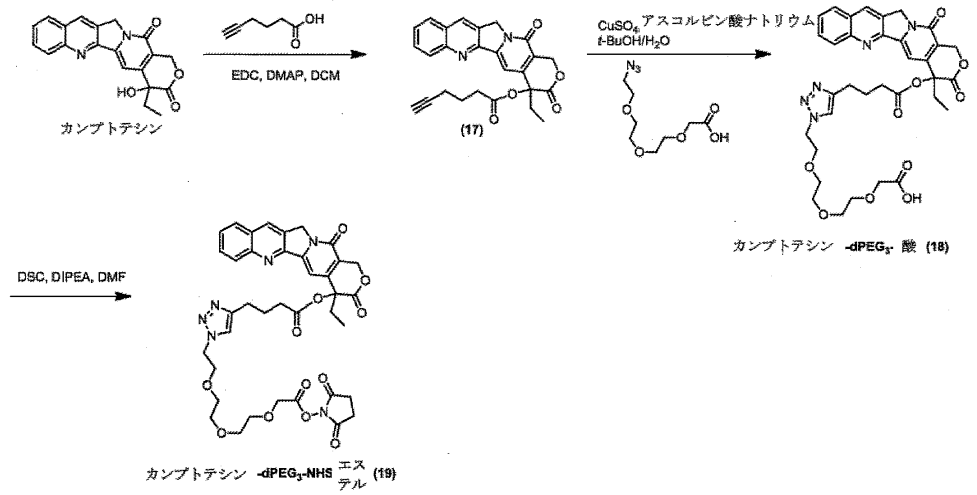
【０２７３】
乾燥ＤＭＦ（１ｍｌ）中のＤｏｘ．ＨＣｌ（２５ｍｇ、０．０４３ｍｍｏｌ）及びＦｍｏｃ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＮＰ１３（３０ｍｇ、０．０３９ｍｍｏｌ）の懸濁液に、ＤＩＰＥＡ（７．５μｌ、０．０４３ｍｍｏｌ）を添加し、暗赤色の溶液を生じさせた。これを室温で２４時間、窒素下で撹拌し、これの後に溶媒を高真空下で蒸発させ、残渣を乾燥ジエチルエーテルで粉砕して、赤い固形物R_f０．２２を得た［シリカゲル：１０％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ］。フラッシュクロマトグラフィー［シリカゲル：５％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ］による精製で、赤い固形物としての所望の生成物１４、２５．２ｍｇ（５５％）を得た。$C_{61}H_{67}N_6O_{18}$［Ｍ＋Ｈ］１１７１．４５１２について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）は、１１７１．４５３４を見出した。

【０２７４】
乾燥ＤＣＭ（５ｍｌ）中の１４（２０ｍｇ、０．０１７ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、ピペリジン（１０ｍｏｌ％）を添加した。混合物溶液中の主に鮮赤色は、直ぐに暗褐色の明澄な溶液になり、１０分間撹拌し、これの後にすべての溶媒を取り除き、赤い粘着性固形物の所望の化合物１５を得た。$C_{46}H_{57}N_6O_{16}$［Ｍ＋Ｈ］９４９．３８３１について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）は、９４９．３８７４を見出した。これを、さらに精製せずに１６の調製で使用した。

【０２７５】
乾燥ＤＭＦ中の化合物１５の溶液を、乾燥ＤＭＦ中のビス－ｄＰＥＧ$_7$－ＮＨＳ及びＤＩＰＥＡ（２２．５μｌ、０．１３ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、２０分にわたり滴下する。次いで、得られた溶液を室温で３時間、窒素下で撹拌し、高真空下で蒸発させて、暗い赤みがかった橙色の油を得る。これを、フラッシュクロマトグラフィー［シリカゲル：１０％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ］によって精製し、適切な画分を採取し、合わせ乾燥させて、赤みがかった橙色の粘性の油としての表題の生成物１６を得る。

【０２７６】
実施例９－カンプトテシン－ｄＰＥＧ$_3$－ＮＨＳエステル（１９）の調製

【０２７７】
【化９】



【０２７８】
乾燥ＤＣＭ（１００ｍｌ）中のカンプトテシン（４００．０ｍｇ、１．１ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、続いて、５－ヘキシン酸（３１９．８ｍｇ、２．９ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ（４３７．１ｍｇ、２．２８ｍｍｏｌ）、及びＤＭＡＰ（１３９．４ｍｇ、１．１４ｍｍｏｌ）を添加した。黄色い懸濁液を、室温で１６時間、N_2下、かつ暗中で撹拌させた。得られた淡褐色の溶液を、H_2O（１２０ｍｌ）で洗浄し、ＤＣＭ（１００ｍＬ）で抽出した。有機相を合わせブライン（１００ｍＬ）で洗浄し、$MgSO_4$上で乾燥させ、真空で濃

縮させた。この粗製のものをフラッシュクロマトグラフィー［シリカゲル：１～３％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ勾配を用いて］によって精製して、オフホワイト／黄色い粉末としてのカンプトテシンアルキン１７、４７１．１ｍｇ、（９１．６％）を得た。$C_{26}H_{22}N_2O_5$ ４４３．１６２３［Ｍ＋Ｈ］について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）は、４４３．１６０７を見出した。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ３）：δ＝８．４３（ｓ、１Ｈ）、８．２５（ｄ、Ｊ＝８．５Ｈｚ、１Ｈ）、７．９７（ｄ、Ｊ＝８．３Ｈｚ、１Ｈ）、７．８６（ｄｄｄ、Ｊ＝８．５、６．８、１．５Ｈｚ、１Ｈ）、７．７０（ｔ、Ｊ＝７．８Ｈｚ、１Ｈ）、７．２８（ｓ、１Ｈ）、５．７１（ｄ、Ｊ＝１７．３Ｈｚ、１Ｈ）、５．４３（ｄ、Ｊ＝１７．２Ｈｚ、１Ｈ）、５．３２（ｓ、２Ｈ）、２．７８～２．５９（ｍ、２Ｈ）、２．３５～２．２８（ｍ，３Ｈ）、２．１８（ｄｑ、Ｊ＝１３．６、７．５Ｈｚ、１Ｈ）、２．０５（ｔ、Ｊ＝２．６Ｈｚ、１Ｈ）、１．９０（ｐ、７．２Ｈｚ、２Ｈ）、１．０１（ｔ、Ｊ＝７．５Ｈｚ、３Ｈ）；^{13}Ｃ ＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ３）：δ＝１７２．１、１６７．５、１５７．４、１５２．４、１４８．９、１４６．２、１４６．０、１３１．２、１３０．７０、１２９．６、１２８．５、１２８．２、１２８．１、１２０．３、９６．０、８３．０、７５．９、６９．５、６７．１、４９．９、３２．４、３１．９、２３．２、１７．７、７．６；ＩＲλ_{max}：３３０２．５、２９８４．３、２９４３．６、１７５３．６、１７３７．３、１６６９．３、１６２４．３、１５６４．１、１４４６．８、１４０５．６、１３６５．６、１３５１．３、１２９６．６、１２３４．１、１２０５．３、１１６６．５、１１３１．８、１０８８．４、１０４５．３、１０１１．２、９７６．５、９４６．６、９０９．３、８２５．４、７８６．２、７６２．２、７２２．４、６５２．０。

【０２７９】

１５ｍｌの１：２のH_2O：ｔｅｒｔ－ブタノール中のカンプトテシンアルキン１７（６０ｍｇ、０．１３６ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、続いて６３．２ｍｇのアジド－PEG_3－酸（０．２７１ｍｍｏｌ、２当量）、２．７ｍｇのＮａアスコルビン酸（０．０１３６ｍｍｏｌ、０．１当量）、及び２．２ｍｇの$CuSO_4$（０．０１３６ｍｍｏｌ、０．１当量）を添加した。白い懸濁液を、８０℃でN_2下、かつ暗中で５時間撹拌した。明澄な溶液を室温まで冷ました後、１５ｍｌのＤＣＭ及び１５ｍｌの蒸留したH_2Oを添加し、有機層を分離した。得られた有機物を２５ｍｌの０．５ＭのＨＣｌ及び２５ｍｌの１：１の１ＭのＨＣｌ：ブラインで洗浄し（有機層は、黄色の蛍光色になる）、Na_2SO_4上で乾燥させ、真空で濃縮させた。粗製のものをフラッシュクロマトグラフィー［シリカゲル：１０～１５％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ勾配によって、続いて０．１％のギ酸、１０％のＭｅＯＨ／ＤＣＭによって精製した。適切な画分を合わせ、真空で濃縮させ、熱いエーテルで、還流下で１時間洗浄した。黄色い粘着性固形物を所望の生成物１８、７１ｍｇ（７８．４％）として得た。ＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）：６７６．２６４４［Ｍ＋Ｈ］、計算された質量６７６．２６６９。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、$CDCl_3$）：δ＝８．４４（ｓ、１Ｈ、５－ＣＨ－芳香族）、８．２８（ｄ、Ｊ＝８．６Ｈｚ、１Ｈ、４－ＣＨ－芳香族）、７．９７（ｄ、Ｊ＝８．２Ｈｚ、１Ｈ、１－ＣＨ－芳香族）、７．８７（ｔ、Ｊ＝７．７Ｈｚ、１Ｈ、３－ＣＨ－芳香族）、７．７０（ｔ、Ｊ＝７．６Ｈｚ、１Ｈ、２－ＣＨ－芳香族）、７．３０（ｓ、１Ｈ、７－ＣＨ－芳香族）、５．７１（ｄ、Ｊ＝１７．２Ｈｚ、１Ｈ、８－ＣＨ２－Ｏ）、５．４４（ｄ、Ｊ＝１７．２Ｈｚ、１Ｈ、８－ＣＨ２－Ｏ）、５．３３（ｓ、２Ｈ、６－ＣＨ２－Ｎ）、４．５２（ｔｄ、Ｊ＝４．８、１．９Ｈｚ、２Ｈ）、４．１８（ｓ、２Ｈ）、３．８６（ｔ、Ｊ＝５．２Ｈｚ、２Ｈ）、３．７５（ｄｄ、Ｊ＝５．８、３．１Ｈｚ、２Ｈ）、３．６８～３．５７（ｍ、６Ｈ）、２．８２（ｔ、Ｊ＝７．４Ｈｚ、３Ｈ）、２．６８～２．４９（ｍ、３Ｈ）、２．３１（ｄｑ、Ｊ＝１４．８、７．４Ｈｚ、１Ｈ）、２．１８（ｄｑ、Ｊ＝１４．７、７．４Ｈｚ、１Ｈ）、２．０６（ｐ、Ｊ＝７．４Ｈｚ、２Ｈ）、１．０１（ｔ、Ｊ＝７．５Ｈｚ、３Ｈ、１０－ＣＨ３）；^{13}Ｃ ＮＭＲ（１００ＭＨｚ、$CDCl_3$）：δ＝１７２．３９、１６７．７３、１５７．４０、１５２．２３、１４６．０８、１３１．５２、１３０．８６、１２９．３６、１２８．５６、１２８．２３、１２２．５７、１２０．２９、９６．３７、７５

．８２、７０．３９、６９．５０、６７．１３、５０．１２、４９．９９、３２．８４、３１．８１、２４．４３、２４．２４、７．５９；ＩＲｃｍ$^{-1}$：３４２２．２０、２９１３．２１、１７４５．９０、１６６４．８５、１６１６．４５、１５６２．８５、１５０１．８２、１４５７．０３、１４０４．６３、１３５２．０３、１２９９．２２、１２３１．８０、１１３２．９５、１０８８．０７、１０４８．２５、９９４．４１、９４７．３６、８１５．２５、７８７．３３、７６３．０６、７２４．９３。

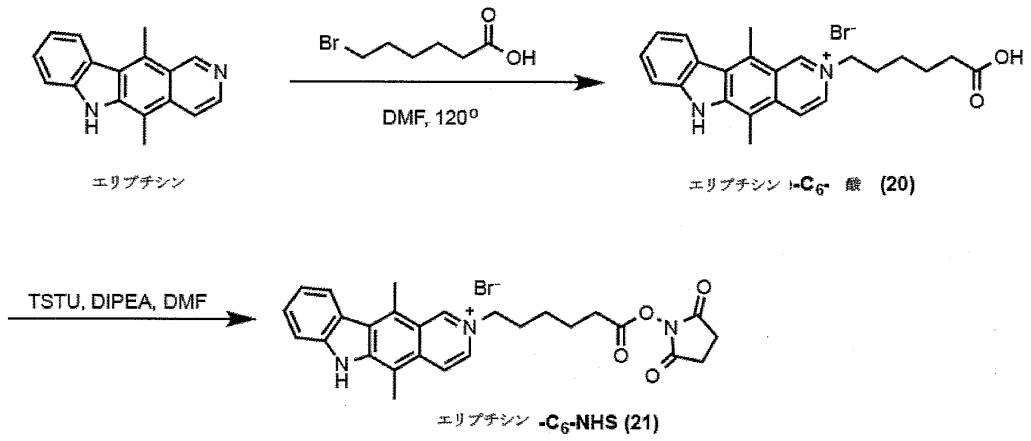
【０２８０】

カンプトテシン酸１８酸（１０ｍｇ）の撹拌溶液に、乾燥ＤＭＦ（３ｍｌ）中の１６０．３ｍｇのジスクシンイミジルカーボネート（ＤＳＣ）（０．６４ｍｍｏｌ）及び２４ｍｇのトリエチルアミン（０．２４ｍｍｏｌ）を添加した。黄色い溶液を、室温で$Ｎ_2$下、かつ暗中で撹拌させた。１６０．４ｍｇのＤＳＣ（４３当量）及び２４．１ｍｇのトリエチルアミンのさらなる添加を、１６時間後に行った。さらに6時間後、反応を停止させ、真空で濃縮させて、橙色の油を得た。これを、１５ｍｌのＤＣＭに溶解し、１５ｍｌの０．５ＭのＨＣｌ及び１５ｍｌのブラインで洗浄し、$Ｎａ_2ＳＯ_4$上で乾燥させた。このワークアップ手順を２回反復し、最後の１回の洗浄を、２ｘ５ｍｌの$Ｈ_2Ｏ$及び５ｍｌのブラインで行った。乾燥させた有機物を濾過し、真空で濃縮させ凍結乾燥させて、白い吸湿性の粉末としての所望の化合物１９、９ｍｇを得た。ＭＳ（ｍ／ｚ）７７３．２８３２（Ｍ＋１）、７９６．２６３９（Ｍ＋Ｎａ）

実施例１０－エリプチシン－$Ｃ_6$－ＮＨＳエステル（２１）の調製

【０２８１】

【化１０】



【０２８２】

乾燥ＤＭＦ（５ｍｌ）中のエリプチシン（３５ｍｇ、０．１４ｍｍｏｌ）の溶液に、６－ブロモヘキサン（５５．４ｍｇ、０．２８４ｍｍｏｌ）酸を添加し、反応混合物を１２０℃で４時間、次いで、室温でさらに１２時間撹拌して、マスタード黄色の析出物を得た。これを濾過し、冷たい無水エーテルで洗浄した。いくらかの析出も濾液中に認められ、これも採取した。化合物２０で得られた全部の合わせた収率は、４９．１ｍｇ（７８％）であった。ＴＬＣ［シリカゲル：ＭｅＣＮ：水：ＫＮＯ３（飽和）］による分析は、生成物が単一の黄色いスポット（基準０．５５、エリプチシン基準０．６７）であることを示した。$Ｃ_{23}Ｈ_{25}Ｎ_2Ｏ_2$３６１．１９１６（Ｍ＋１）について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）は、３６１．１９２４を見出した。

【０２８３】

乾燥ＤＭＦ（１．５ｍｌ）中の酸２０（１０ｍｇ、０．０２３ｍｍｏｌ）の部分的懸濁液に、ＴＳＴＵ（１２ｍｇ、０．０４ｍｍｏｌ）、続いてＤＩＰＥＡ（１６．２μｌ、０．０９３ｍｍｏｌ）を添加し、反応混合物を室温で１時間、窒素下で撹拌した。反応の間

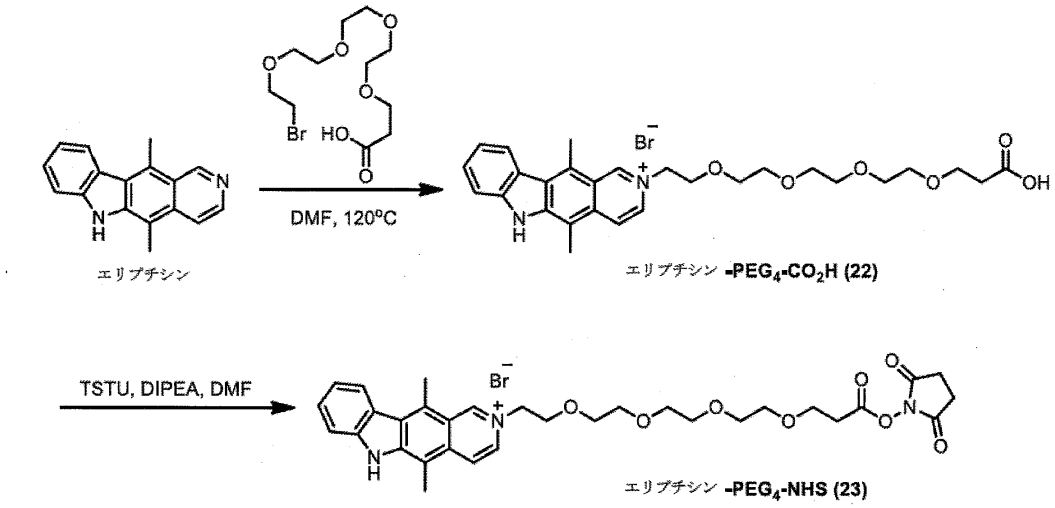
に、懸濁液は、緩徐に明澄なマスタード黄色の溶液に移行した。反応の後にＴＬＣ［シリカゲル：ＭｅＣＮ：水：ＫＮＯ３（飽和）］が続き、完了したら、ＤＭＦを、高真空を使用して取り除き、温度を３０℃未満に保った。残渣を無水エーテルで粉砕し、空気乾燥させて、マスタード黄色の固形物としてのエステル２１を得た。$C_{27}H_{28}BrN_3O_4$について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）。

【０２８４】

実施例１１－エリプチシン－PEG_4－ＮＨＳエステル（２３）の調製

【０２８５】

【化１１】



【０２８６】

乾燥ＤＭＦ（４ｍｌ）中のエリプチシン（０．０３５ｇ、０．１４２ｍｍｏｌ）の窒素下での撹拌溶液に、乾燥ＤＭＦ（１ｍｌ）に溶解したＢｒ－PEG_4－酸（０．０９３６ｇ、０．０２８４ｍｍｏｌ）を添加した。反応を１２０℃で４時間撹拌し、冷まし、室温でさらに１２時間撹拌した。ＤＭＦを、高真空を使用して取り除き、残基を調製用のＨＰＬＣ［Ｃｈｒｏｍｏｌｉｔｈ ＨｉｇｈＲｅｓｏｌｕｔｉｏｎ ＲＰ－１８ｅ １００ｘ４．６ｍｍ］１００％の１０ｍＭのNa_3PO_4／ｐＨ７によって、１００％のＭｅＣＮへ２０℃、ステップ勾配で２７分にわたって精製し、２８０及び４３５ｎｍで検出しt_R７．９分で採取して、黄色い吸湿性の固形物としての酸２２、４０．６ｍｇ（５０％）を得た。$C_{25}H_{35}N_2O_6$Ｍ－Ｂｒ）４９５．２４９５について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）は、４９５．２４９８を見出した。

【０２８７】

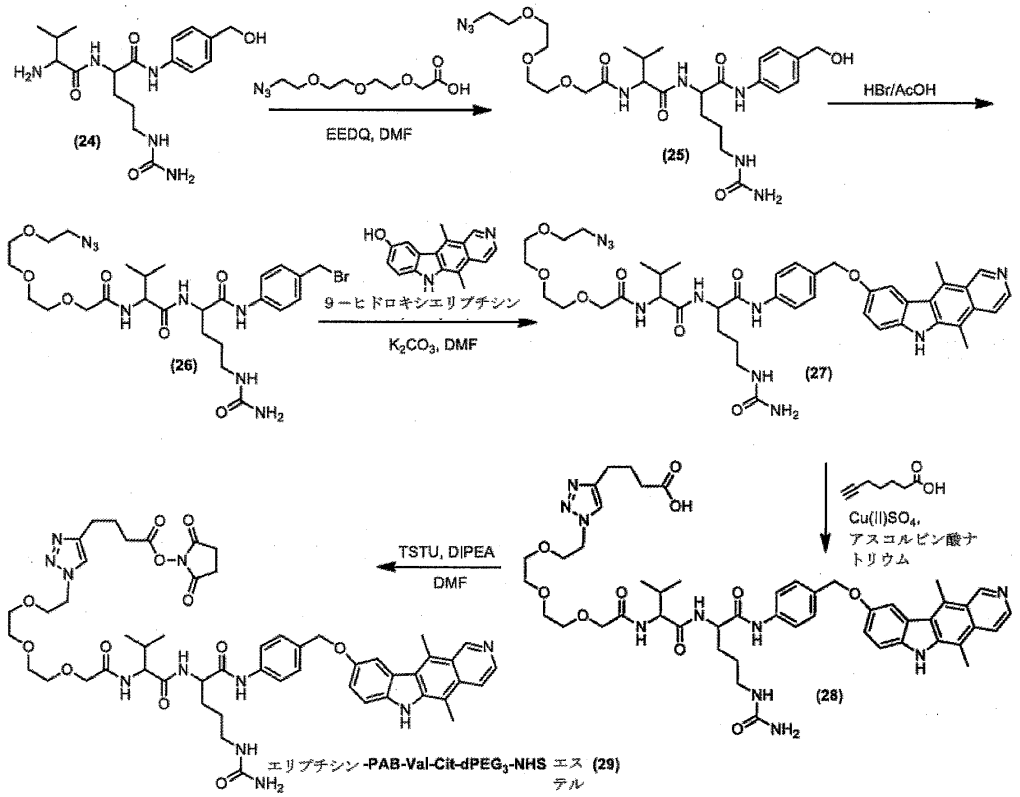
エリプチシン－PEG_4－酸２２（０．０１４３ｇ、０．００２５６ｍｍｏｌ）を、乾燥ＤＭＳＯ（１ｍｌ）に溶解し、窒素下で撹拌した。これに、ＴＳＴＵ（０．０１３６ｇ、０．００４５１ｍｍｏｌ）、続いてＤＩＰＥＡ（１８．５μｌ、０．１０５ｍｍｏｌ）を添加し、鮮黄色の溶液を室温で１時間、窒素下で撹拌した。溶媒を高真空下でとり、粘着性残渣を乾燥エーテルで粉砕し、エーテルをデカントした後、高真空下で乾燥させて、黄色い粘着性固形物としての２３、１１．４ｍｇ（６６％）を得た。$C_{32}H_{38}N_3O$（Ｍ－Ｂｒ）５９２．２６５９について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）は、５９２．２６４３を見出した。

【０２８８】

実施例１２－エリプチシン－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄPEG_3－ＮＨＳエステル（２９）の調製

【０２８９】

【化１２】



【０２９０】

乾燥ＤＭＦ（８ｍＬ）中のＣｉｔ－Ｖａｌ－ＰＡＢ－ＯＨ（２４）（０．１０ｇ、０．４３ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、乾燥ＤＭＦ（１ｍＬ）中の１１－アジド－３，６，９－トリオキサウンデカン酸（０．１６ｇ、０．４３ｍｍｏｌ）を添加した。次いで、ＥＥＤＱ（２－エトキシ－１－エトキシカルボニル－１，２－ジヒドロキノリン（１００ｍｇ、０．５ｍｍｏｌ）を添加し、溶液を室温で一晩、窒素下で撹拌した。溶媒を真空で除去し、フラッシュクロマトグラフィー［シリカゲル：１０％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ］によって精製して、白い固形物としての生成物２５（０．２１ｇ（８２％）を得た。融解点１３９℃；$C_{26}H_{42}N_8O_8$６１７．３０２３［Ｍ＋Ｎａ］について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）。６１７．２９９９を見出した、ＩＲ３２７０、２９２５、２１０３、１６２９、１５３８、１２７２、１０９４、７９９ｃｍ$^{-1}$；^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ）δ７．５４（ｍ、２Ｈ）、７．２９（ｄ、Ｊ＝８．７Ｈｚ、２Ｈ）、４．４３～４．５２（ｍ、２Ｈ）、４．３０（ｄ、Ｊ＝７．２Ｈｚ、２Ｈ）、４．０５（ｓ、２Ｈ）、３．５９～３．７７（ｍ、１０Ｈ）、３．３０（ｍ、２Ｈ）、３．０４～３．２５（ｍ、２Ｈ）、２．０４～２．１７（ｍ、１Ｈ）、１．６７～１．９５（ｍ、２Ｈ）、１．５７（ｍ，２Ｈ）、０．９７（ｍ、６Ｈ）；^{1}Ｃ ＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）δ１７．９、１９．２、２６．８、２９．３、３１．１、３９．６、４９．９、５３．２、５６．５、６２．６、６９．２、６９．６、６９．６、６９．７、６９．８、７０．３、１１８．８、１２６．９、１７．５、１５８．９、１７０．３、１７０．７。

【０２９１】

乾燥CH_2Cl_2中のPEG_3アジドリンカー２５（２ｍＬ中６０ｍｇ）の撹拌溶液に、ＨＢｒ（ＡｃＯＨ、１Ｍ、０．０４ｍＬ中３３％）を滴下した。１０分後、プラスコを氷の上に置き、$NaHCO_3$緩徐に添加よりもであり、溶液を３０分間撹拌した。撹拌後、溶液を濾過し、水及びジエチルエーテルで洗浄し真空で乾燥させて、クリーム状の固形物としてのベジルブロミド（ｂｅｚｙｌ ｂｒｏｍｉｄｅ）誘導体２６（２０ｍｇ（３３％）を得た；$C_{26}H_{42}N_8O_7Br$６５７．２３６０（Ｍ＋１）について計算したＨ

ＲＭＳ（ｍ／ｚ）。６５７．２３５７を見出した。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ）δ７．６３～７．５０（ｍ、２Ｈ）、７．４３～７．２１（ｍ、２Ｈ）、４．６０～４．４７（ｍ、２Ｈ）、４．３３～４．２４（ｍ、１Ｈ）、４．０６（ｓ、２Ｈ）、３．８８～３．６０（ｍ、１０Ｈ）、３．５２（ｓ、２Ｈ）、３．３０～３．１（ｍ、２Ｈ）、２．２０～２．０７（ｍ、１Ｈ）、２．００～１．７２（ｍ、２Ｈ）、１．７２～１．５４（ｍ、２Ｈ）、１．０９～０．９０（ｍ、６Ｈ）。

【０２９２】

９－ヒドロキシエリプチシン（１０ｍｇ、０．０４ｍｍｏｌ）及びK_2CO_3（０．１２ｇ、０．０８ｍｍｏｌ）を乾燥ＤＭＦ（４ｍＬ）に溶解し、５分間撹拌した。ブロム化リンカー２６（３０ｍｇ、０．０４ｍｍｏｌ）を乾燥ＤＭＦ中の溶液として添加し、混合物を室温で１７時間撹拌した。真空での濃縮後、黒い固形物が得られ、次いでこれを$CHCl_3$：ＭｅＯＨ９：１に溶解し、水で洗浄し乾燥させ、濃縮させて、暗褐色の固形物としてのアルキル化エリプチシン誘導体２７、２４ｍｇ（７６％）を得た。ＭＳ（ｍ／ｚ）８４０［Ｍ］＋；$C_{43}H_{55}N_{10}O_8$８３９．４２０４について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）。８３９．４２０２を見出した。ＩＲ３２７２、２９３７、２１０７、１６４６、１５２６、１４６２、１４１５、１２５４、１１０３、８０７ｃｍ－１；^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ）δ８．３８～８．１０（ｍ、１Ｈ）、８．０１（ｓ、１Ｈ）、７．９９～７．８１（ｍ、１Ｈ）、７．７５（ｄ、Ｊ＝８．０Ｈｚ、１Ｈ）、７．６８～７．４８（ｍ、２Ｈ）、７．４８～７．３２（ｍ、１Ｈ）、７．３０～６．９８（ｍ、１Ｈ）、５．８４（ｓ、０Ｈ）、４．５４（ｄｄ、Ｊ＝１．５、８．９Ｈｚ、１Ｈ）、４．３１（ｑ、Ｊ＝７．８Ｈｚ、１Ｈ）、４．０８（ｄ、Ｊ＝９．３Ｈｚ、２Ｈ）、３．９２～３．４６（ｍ、９Ｈ）、３．３５（ｄ、Ｊ＝１７．３Ｈｚ、１２Ｈ）、３．１７（ｄ、Ｊ＝１８．８Ｈｚ、３Ｈ）、３．０２（ｓ、３Ｈ）、２．８９（ｓ、３Ｈ）、２．７０（ｄ、Ｊ＝７．６Ｈｚ、２Ｈ）、１．９０（ｓ、１Ｈ）、１．７８（ｓ、１Ｈ）、１．６０（ｓ、２Ｈ）、１．０６～０．８６（ｍ、６Ｈ）。

【０２９３】

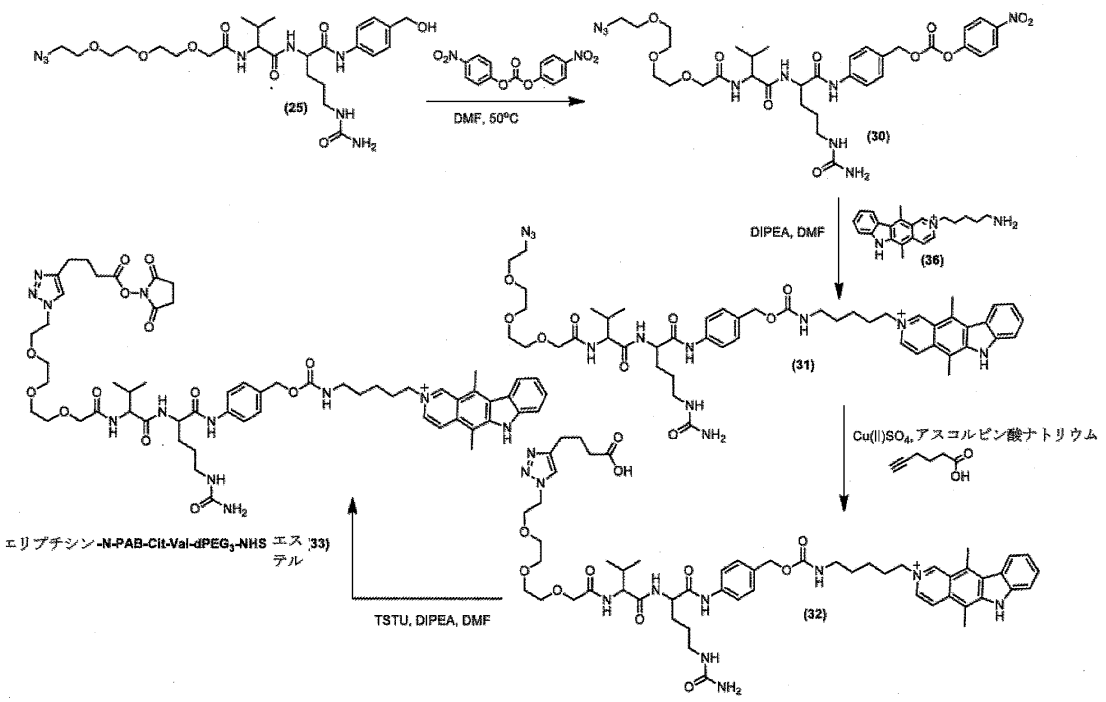
アジドエリプチシン誘導体２８は、Ｃｕ（ＩＩ）SO_4及びアスコルビン酸を使用した「クリック」条件（‘ｃｌｉｃｋ’ｃｏｎｄｉｔｉｏｎ）下で、ヘキシン酸で１，３付加環化が起き、カルボン酸２８を有する誘導体を得た。乾燥ＤＭＦ中でのＴＳＴＵ及びＤＩＰＥＡを用いた誘導体２８のこの末端カルボン酸の活性化は、活性化スクシンイミジルエステル誘導体２９を生じる。

【０２９４】

実施例１３－エリプチシン－Ｎ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－$dPEG_3$－ＮＨＳエステル（３３）の調製

【０２９５】

【化１３】

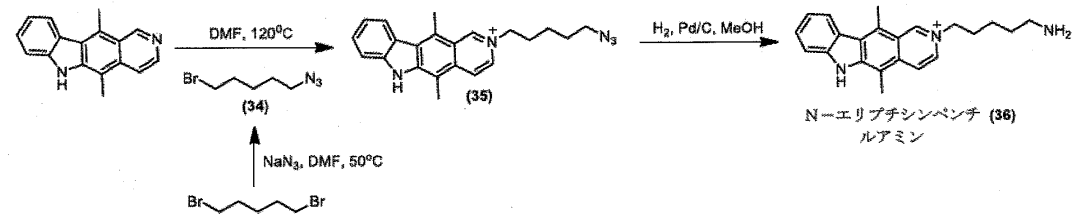


【０２９６】

実施例１４－Ｎ－エリプチシンペンチルアミン（３６）の調製

【０２９７】

【化１４】



【０２９８】

アジ化ナトリウム（０．６ｇ、９．６ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（２０ｍＬ）に溶解し、１，５－ジブロモペンタン（１．２ｍＬ、８．７ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を、適所のブラストシールドを用いて５０℃に一晩加熱した。溶液を０℃に冷却し、水（２０ｍＬ）を添加した。次いで、混合物をＥｔＯＡｃ（３×２０ｍＬ）で抽出し、水（２０ｍＬ）及びブライン（２０ｍＬ）で洗浄し、Na_2SO_4上で乾燥させ、濃縮させて油を形成し、これを、ｎ－ヘキサンを用いてカラムクロマトグラフィーによって精製して、明澄な油としての３４（１．５ｇ、９０％）を得た。アジド染色試薬を使用して、アジドを観察し、ヨウ素可視化を使用して、カラムからの最初の化合物である開始ジブロモペンタンを染色した。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ３）δ３．４４（ｔ、Ｊ＝６．７Ｈｚ、２Ｈ）、３．３２（ｔ、Ｊ＝６．７Ｈｚ、２Ｈ）、１．９２（ｐ、Ｊ＝７．０Ｈｚ、２Ｈ）、１．６９～１．６１（ｍ、２Ｈ）、１．６１～１．５１（ｍ、２Ｈ）。

【０２９９】

エリプチシン（５０ｍｇ　ｇ、０．２ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（１０ｍＬ）中の１－アジド－５－ブロモペンタン３４（８０ｍｇ、０．４ｍｍｏｌ）に添加し、１２０℃に４時間加熱し、続いて、室温で３日間撹拌した。橙色の懸濁液をエーテル（１０ｍＬ）で処理し、濾過して、黄色い固形物としての四級化されたエリプチシン誘導体３５、６４ｍｇ（９０

%）を得た。溶解せずに分解した融解点＞１５０℃　ＩＲ３０６５、２０８８、１５９８、１５７８、１４６３、１４２０、１４０１、１１５４、７４４、７１６、６０６ｃｍ$^{-1}$；^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）δ１２．１６（ｓ、１Ｈ）、１０．０９（ｓ、１Ｈ）、８．６２～８．５２（ｍ、１Ｈ）、８．４４（ｄｄ、Ｊ＝１１．７、７．６Ｈｚ、２Ｈ）、７．７１～７．５７（ｍ、２Ｈ）、７．３７（ｓ、１Ｈ）、４．７２（ｔ、Ｊ＝７．５Ｈｚ、２Ｈ）、３．３７（ｍ、４Ｈ）、３．３０（ｓ、３Ｈ）、２．８４（ｓ、３Ｈ）、１．６２（ｐ、Ｊ＝７．０Ｈｚ、２Ｈ）、１．５１～１．２８（ｍ、２Ｈ）；^{1}Ｃ　ＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）δ２０６．５、１４６．５、１４４．３、１４２．６、１３．３、１２．５、１０．８、１２８．７、１２５．６、１２４．４、１２２．１、１２０．８、１２０．２、１１１．６、１１０．４５、５９．２、５０．４、３０．４、２７．７、２２．９、１５．１、１２．１；ＭＳ（ＥＳ＋）ｍ／ｚ　３５８［Ｍ］$^{+}$；$C_{22}H_{24}N_5$３５８．２０３２について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）質量。３５８．２０３６を見出した。

【０３００】

エリプチシンアジド３５（１０ｍｇ、０．０３６ｍｍｏｌ）をメタノール（２ｍＬ）に溶解した。Ｐｄ／Ｃを添加し、水素風船を撹拌溶液に取り付けた。６．５時間後、反応混合物を、セライトをとおして濾過し、真空で濃縮させて、鮮橙色の結晶としてのエリプチシンアミン３６（７．０ｍｇ、５８％）を得た。重要なことには、ピリジン環の還元は、ＴＬＣ（ＭｅＣＮ：H_2O：$KNO_3$８：１：１）による監視が必要であるように、一晩水素化に置かれたままにされたとき、起こり得る。溶解せずに分解した融解点＞１５０℃　ＩＲ２９３４、１５９８、１５７８、１４１９、１２４４、１１７６、７４７、６２８ｃｍ$^{-1}$；^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ）δ９．８６（ｄ、Ｊ＝１．１Ｈｚ、１Ｈ）、８．３８～８．２７（ｍ、３Ｈ）、７．６４～７．５４（ｍ、２Ｈ）、７．３６（ｄｄｄ、Ｊ＝８．０、６．５、１．７Ｈｚ、１Ｈ）、４．８１～４．７１（ｍ、２Ｈ）、３．２５（ｓ、３Ｈ）、３．００～２．９２（ｍ、２Ｈ）、２．７８（ｓ、３Ｈ）、２．１８（ｄｄｄ、Ｊ＝１２．２、１０．２、６．８Ｈｚ、２Ｈ）、１．８３～１．７２（ｍ、２Ｈ）、１．５９（ｍ、２Ｈ）；^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ）δ１４６．５、１４４．３、１４２．６、１３３．３、１３２．５、１３０．８、１２８．７、１２５．９、１２４．４、１２２．１、１２０．８、１２０．５、１２０．１、１１１．６、１１０．４、５９．２、４８．５、４０．１、３９．９、３９．７、３９．４、３９．２、３９．０、３８．８、３０．３、２６．９、２２．６、１５．２、１５．１、１２．０；ＭＳ（ｍ／ｚ）３３２［Ｍ］$^{+}$；$C_{22}H_{26}N_3$３２２．２１２７について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）。３３２．２１２３を見出した。

【０３０１】

ＰＥＧ$_3$アジドリンカー２５（２０ｍｇ、０．０３ｍｍｏｌ）及びビスニトロフェニルカーボネート（３０ｍｇ、０．１０ｍｍｏｌ）を、ＤＭＦ（２ｍＬ）に溶解した。ＤＩＰＥＡ（０．１ｍＬ、０．０７ｍｍｏｌ）を添加し、溶液を５０℃に３時間加熱した。ＤＭＦを真空で除去し、水を添加し、生成物をCH_2Cl_2：ＭｅＯＨ９：１で抽出した後に、乾燥及び濃縮させて、暗黄色の油としての活性化ｐ－ニトロフェニル誘導体３０、２０ｍｇ（７４％）を得た。ＩＲ１６５２、１５９０、１５１６、１４９８、１３４、１２８８、１２１６、１１０９、８５０、７５３、６２９ｃｍ$^{-1}$；^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ）８．３０～８．３９（ｍ、２Ｈ）、７．６１～７．７１（ｍ、２Ｈ）、７．４０～７．５３（ｍ、４Ｈ）、５．２８（ｓ、２Ｈ）、４．５０～４．６１（ｍ、１Ｈ）、４．３３（ｄ、Ｊ＝７．１Ｈｚ、１Ｈ）、４．０９（ｓ、２Ｈ）、３．６４～３．７９（ｍ、１０Ｈ）、３．２２～３．１４（ｍ、１Ｈ）、２．１６（ｈ、Ｊ＝６．９Ｈｚ、１Ｈ）、１．７９～１．９２（ｍ、２Ｈ）、８．６Ｈｚ、２Ｈ）、１．６０（ｍ、６Ｈ）；ＭＳ（ＥＳ＋）７８２［Ｍ＋Ｎａ］；^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ）δ１７２．０、１７１．３、１７１．０、１６３．８、１６３．８、１６１．１、１５５．８、１５２．６、１４５．３、１４０．４、１３０．６、１２９．２、１２５．７、１２１．９、１１９．８、１１５．１、７０．８、７０．３、７０．２、７０．１、６９．７、

５０．４、４８．３、４８．１、４７．８、４７．６、４７．４、４７．２、４７．１、３０．９、１８．４、１７．４；$C_{33}H_{45}N_9O_{12}$　７８２．３１７０［M＋Na］$^+$について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）。７８２．３１７３を見出した。

【０３０２】

エリプチシンアミン３６（１１ｍｇ、０．０３ｍｍｏｌ）及び活性化リンカー３０（２４ｍｇ、０．０３ｍｍｏｌ）を乾燥ＤＭＦに溶解した。ＤＩＰＥＡ（６μＬ、Ｇｉｌｓｏｎピペットを介して添加した、０．０３５ｍｍｏｌ）を添加し、反応混合物を暗中で２４時間、室温で撹拌した。生成物をジエチルエーテルの添加により析出し、遠心分離した。上清を除去し、得られた固形物をジエチルエーテルで洗浄し乾燥させて、黄色い固形物としてのエリプチシンリンカー誘導体３１、１０ｍｇ（３６％）を得た。ＭＳ（ＥＳ＋）ｍ／ｚ９５２［Ｍ］$^+$；$C_{49}H_{66}N_{11}$　９５２．５０４５について計算したＨＲＭＳ。９５２．４９９３を見出した。

【０３０３】

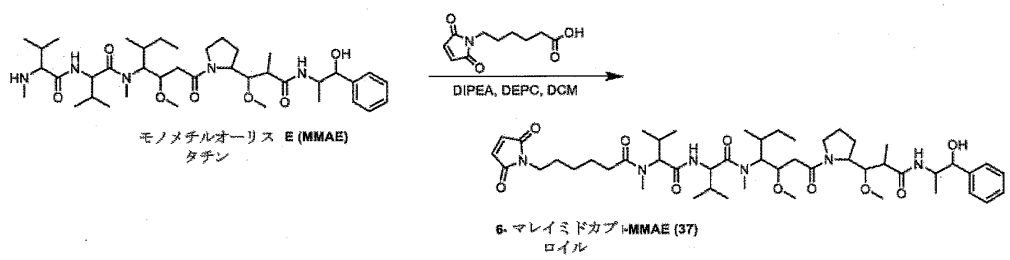
アジドエリプチシン誘導体３１は、Ｃｕ（ＩＩ）SO_4及びアスコルビン酸を使用した「クリック」条件下で、ヘキシン酸で１，３付加環化が起き、誘導体３２を得た。乾燥ＤＭＦ中でのＴＳＴＵ及びＤＩＰＥＡを用いた誘導体３２の末端カルボン酸の活性化は、スクシンイミジルエステル誘導体３３を生じる。

【０３０４】

実施例１５－６－マレイミドカプロイル－ＭＭＡＥ（３７）の調製

【０３０５】

【化１５】



【０３０６】

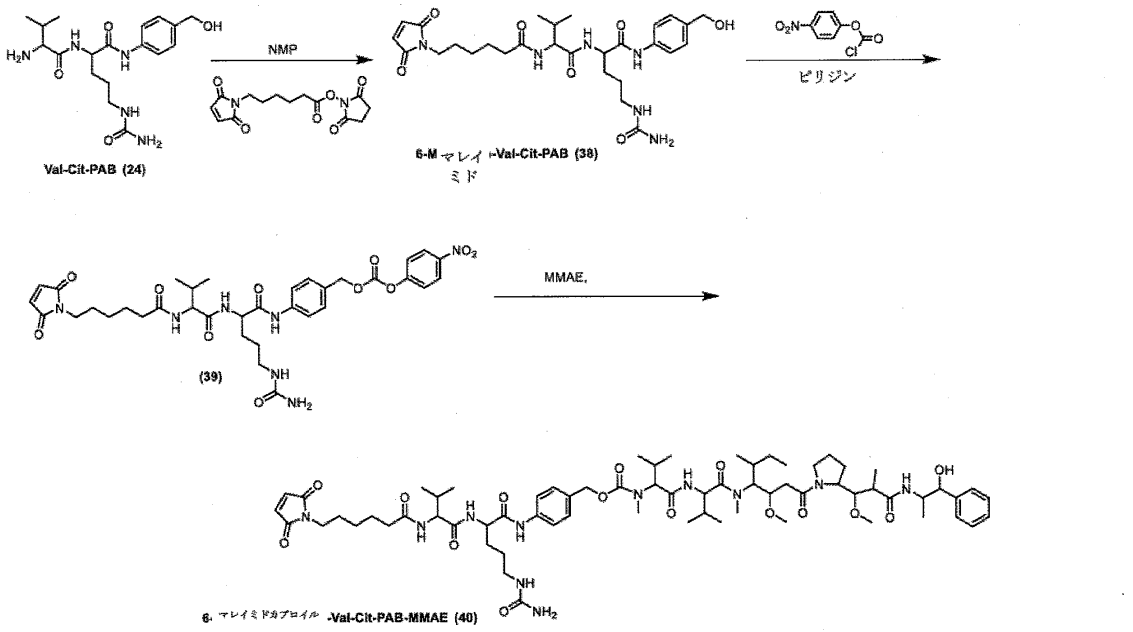
新しく蒸留した乾燥ＤＣＭ（２ｍｌ）中のＭＭＡＥ（０．０５ｇ、０．０６９４ｍｍｏｌ）の懸濁液に、６－マレイミドカプロン酸（０．０２２１ｇ、０．１０４ｍｍｏｌ）、続いてジエチルシアノホスホネート（２１μｌ、０．１３９ｍｍｏｌ）及びＤＩＰＥＡ（３７μｌ、０．２０８ｍｍｏｌ）を添加した。ＤＩＰＥＡを添加したら、反応混合物は、明澄になり、室温で１２時間、窒素下で撹拌し、ＴＬＣ［シリカゲル：５％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ、基準０．３１］。反応混合物をＤＣＭ（３０ｍｌ）で希釈し、１０％のクエン酸（２Ｘ２０ｍｌ）、水（２０ｍｌ）、ブライン（２０ｍｌ）で洗浄し、乾燥状態まで濃縮した。粗製のものをフラッシュカラムクロマトグラフィー［シリカゲル：５％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ］によって精製して、白い固形物としての６－マレイミドカプロイル－ＭＭＡＥ３７、０．０２３ｇ（３６％）を得た。$C_{49}H_{79}N_6O_{10}$について計算したＭＳ（ｍ／ｚ）は、９１１．５８（Ｍ＋１）を見出した。

【０３０７】

実施例１６－６－マレイミドカプロイル－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ（４０）の調製

【０３０８】

【化１６】



【０３０９】

乾燥Ｎ－メチルピロリジノン、ＮＭＰ（５ｍｌ）中のｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢ２４（０．１１ｇ、０．２９ｍｍｏｌ）の窒素下での撹拌溶液に、Ｎ－スクシンイミジル－６－マレイミドヘキサン酸（０．０９８３ｇ、０．３１８ｍｍｏｌ）を添加し、得られた淡褐色の溶液を室温で１６時間撹拌した。ＮＭＰを、４０℃未満で高真空によって除去した。得られた粘土が高い油状の残渣を乾燥エーテル（２０ｍｌ）で粉砕し、固形物を濾過によって採取し、乾燥エーテルで数回洗浄し、空気乾燥させて、オフホワイト粉末である所望の生成物３８、０．１６ｇ（９８％）を得た。ＴＬＣ［シリカゲル：１０％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ　R_f０．２１。$C_{28}H_{41}N_6O_7$について計算したＭＳ（ｍ／ｚ）５７２．６５３（Ｍ＋１）。

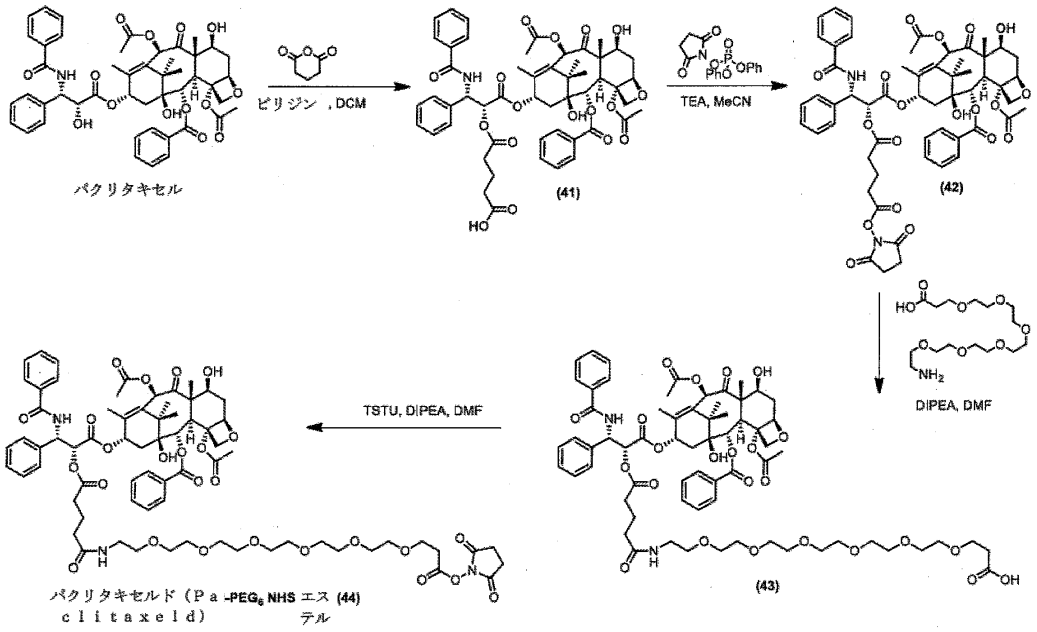
【０３１０】

乾燥ＤＭＦ中の６－マレイミドカプロイル－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢ　３８の窒素下での撹拌溶液に、ビス－（ｐ－ニトロフェニル）カーボネート、続いてＤＩＰＥＡを添加し、無色から鮮黄色への色の変化を引き起こした。溶液を室温で１時間、窒素下で撹拌し、これの後にＤＭＦを高真空によって除去して、油状の残渣を得た。これをエチルアセテートで１５分間粉砕し、析出を引き起こし、これをエーテルの添加によって完了させた。固形物を採取してエーテルでよく洗浄し、空気乾燥させて、オフホワイトの固形物を得た。ＴＬＣ［シリカゲル：１０％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ　R_f０．４６］。これをクロマトグラフィー［シリカゲル：５～１０％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ勾配溶出］によって精製して、白い固形物としての活性化リンカー３９、０．００６ｇ、（４６％）を得た。ＭＳ（ｍ／ｚ）７３８．．３０９１（Ｍ＋Ｈ）、$C_{35}H_{43}N_7O_{11}Na$　Ｍ＋Ｎａ　７６０．２９１８について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）は、７６０．２９２２を見出した。

【０３１１】

活性化リンカー３９（５０ｍｇ、０．０６８ｍｍｏｌ）、ＭＭＡＥ（３２．６ｍｇ、０．０４５ｍｍｏｌ）、及びＮ－ヒドロキシベンゾトリアゾール（１．４ｍｇ、０．００９１ｍｍｏｌ）を、乾燥ＤＭＦ（１ｍｌ）に入れて２分間撹拌し、これの後に１滴のピリジンを添加し、反応を２４時間撹拌する。次いで、溶媒を高真空によって除去し、残渣を逆相の調製用ＨＰＬＣによって精製し冷凍凍結後に白い粉末としての所望の生成物４０を得た。ＭＳ（ｍ／ｚ）１３１６．７（Ｍ＋Ｈ）。

【０３１２】
実施例１７－パクリタキセル－ｄＰＥＧ$_6$－ＮＨＳエステル（４４）の調製
【０３１３】
【化１７】



【０３１４】
パクリタキセル（１００ｍｇ、０．１２ｍｍｏｌ）及びグルタル酸無水物（１７ｍｇ、０．１４ｍｍｏｌ）を乾燥ＤＣＭ（１０ｍｌ）に溶解し、１０分間撹拌し、次いで、乾燥ピリジン（１００μｌ、０．００１３ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を３日間室温で撹拌し、真空下で蒸発させた。得られた残渣をＤＣＭから再結晶化させて、白い固形物としてのパクリタキセル酸４１、６０．７ｍｇ（５２．３％）を得た。（R_f ０．２６、３％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_3$）：δ８．１６（２Ｈ、ｄ、Ｊ＝４Ｈｚ、２３－Ｈ、２７－Ｈ）、７．７８（２Ｈ、ｄ、Ｊ＝４Ｈｚ、３９－Ｈ、４３－Ｈ）、７．６６－７．３６（１１Ｈ、ＣＨ、Ａｒ）、６．２８（２Ｈ、ｍ、１０－Ｈ、１３－Ｈ）、６．０１（１Ｈ、ｑ、Ｊ＝４Ｈｚ、３’－Ｈ）、５．７１（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝７．２Ｈｚ、２－Ｈ）、５．５２（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝３．２Ｈｚ、２’－Ｈ）、５．００（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝８Ｈｚ、５－Ｈ）、４．４７（１Ｈ、ｑ、Ｊ＝６．４Ｈｚ、７－Ｈ）、４．２９（２Ｈ、ｄ、Ｊ＝８．４Ｈｚ、２０－Ｈ）、３．８３（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝６．８Ｈｚ、３－Ｈ）、２．５３～２．１６（１５Ｈ、ｍ、７－ＯＨ、６－Ｈ、１４－Ｈ、ｇ２－Ｈ、ｇ４－Ｈ、２９－Ｈ、３１－Ｈ）、２．０６－１．７０（７Ｈ、ｍ、１－ＯＨ、ｇ３－Ｈ、６－Ｈ、１８－Ｈ、１９－Ｈ）、１．２８～１．１６（６Ｈ、ｍ、１６－Ｈ、１７－Ｈ）。ＭＳ（ｍ／ｚ）：９６８．３６［M^+］、９８５．３９［M^+＋NH_4］、９９０．３５［M^+＋Ｎａ］。（理論：$C_{52}H_{57}NO_{17}$　９６８．０１）。
【０３１５】
乾燥アセトニトリル（５ｍｌ）中のパクリタキセル酸４１（２６ｍｇ、０．０２７ｍｍｏｌ）及びＳＤＰＰ（２０ｍｇ、０．０５８ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、ＴＥＡ（２０μｌ、０．１４３ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温で一晩、窒素下で撹拌し、続いて蒸発させ、シリカゲルクロマトグラフィー（ＭｅＯＨ／ＤＣＭ＝３：９７）によって精製し、白い固形物としてのパクリタキセルＮＨＳエステル４２、３８ｍｇ（７６％）を得た。（R_f　０．４８）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_3$）：δ８．１５（２Ｈ、ｄ、Ｊ＝７．６Ｈｚ、２３－Ｈ、２７－Ｈ）、７．７２（２Ｈ、ｄ、Ｊ＝７．６Ｈｚ、３９－Ｈ、４３－Ｈ）、７．６４－７．３７（１１Ｈ、ＣＨ、Ａｒ）、６．２８（２Ｈ、ｍ、１０－Ｈ、

１３－Ｈ）、６．０１（１Ｈ、ｑ、Ｊ＝４Ｈｚ、３’－Ｈ）、５．７１（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝７．２Ｈｚ、２－Ｈ）、５．５２（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝３．２Ｈｚ、２’－Ｈ）、５．００（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝８Ｈｚ、５－Ｈ）、４．４７（１Ｈ、ｑ、Ｊ＝６．４Ｈｚ、７－Ｈ）、４．２９（２Ｈ、ｄ、Ｊ＝８．４Ｈｚ、２０－Ｈ）、３．８３（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝６．８Ｈｚ、３－Ｈ）、２．９９～２．３６（１５Ｈ、ｍ、７－ＯＨ、６－Ｈ、１４－Ｈ、ｇ２－Ｈ、ｇ４－Ｈ、２９－Ｈ、３１－Ｈ）、２．２９～１．８２（１５Ｈ、ｍ、１－ＯＨ、ｇ３－Ｈ、６－Ｈ、１８－Ｈ、１９－Ｈ、ｎ３－Ｈ、ｎ４－Ｈ）、１．２８～１．１６（６Ｈ、ｍ、１６－Ｈ、１７－Ｈ）。ＭＳ（ｍ／ｚ）：１０６５．３８［M^+］、１０８７．３６［M^+＋Ｎａ］。（理論：$C_{56}H_{60}N_2O_{19}$　１０６５．０８）。

【０３１６】

乾燥ＤＣＭ（５ｍＬ）中のパクリタキセルＮＨＳエステル４２（３２ｍｇ、０．０３ｍｍｏｌ）の溶液に、H_2N－ＰＥＧ$_6$－ＣＯＯＨ（１０．６ｍｇ、０．０３ｍｍｏｌ）及びＴＥＡ（５μｌ、０．０３ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を窒素下で一晩撹拌し、続いてＨＣｌ（２×１０ｍＬ、０．１Ｍ）及びブライン（２×１０ｍＬ）で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮させて明澄な油としての４３、２５ｍｇ（６４％）を得た。［シリカゲル：５％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ　R_f　０．１６］。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（$CDCl_3$）：δ８．１６（２Ｈ、ｄ、Ｊ＝７．６Ｈｚ、２３－Ｈ、２７－Ｈ）、７．８６（２Ｈ、ｄ、Ｊ＝７．６Ｈｚ、３９－Ｈ、４３－Ｈ）、７．６５～７．３０（１１Ｈ、ＣＨ、Ａｒ）、６．２８（２Ｈ、ｍ、１０－Ｈ、１３－Ｈ）、６．０１（１Ｈ、ｑ、Ｊ＝４Ｈｚ、３’－Ｈ）、５．７１（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝７．２Ｈｚ、２－Ｈ）、５．５０（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝３．２Ｈｚ、２’－Ｈ）、５．００（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝８Ｈｚ、５－Ｈ）、４．４７（１Ｈ、ｑ、Ｊ＝６．４Ｈｚ、７－Ｈ）、４．２９（２Ｈ、ｄ、Ｊ＝８．４Ｈｚ、２０－Ｈ）、３．８３（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝６．８Ｈｚ、３－Ｈ）、３．７３～３．４７（２４Ｈ、ｍ、－ＣＯ－ＮＨ－（CH_2－CH_2－Ｏ）$_6$－CH_2－）、２．６２～１．８７（２４Ｈ、ｍ、７－ＯＨ、６－Ｈ、１４－Ｈ、１８－Ｈ、ｇ２－Ｈ、ｇ４－Ｈ、２９－Ｈ、３１－Ｈ、１－ＯＨ、ｇ３－Ｈ、６－Ｈ、１９－Ｈ）、１．２８～１．１６（６Ｈ、ｍ、１６－Ｈ、１７－Ｈ）。ＭＳ（ｍ／ｚ）：１３０３．５６［M^+］、１３２５．５６［M^+＋Ｎａ］、１３４１．５５［M^+＋Ｋ］。（理論：$C_{67}H_{86}N_2O_{23}$　１３０３．４０）。

【０３１７】

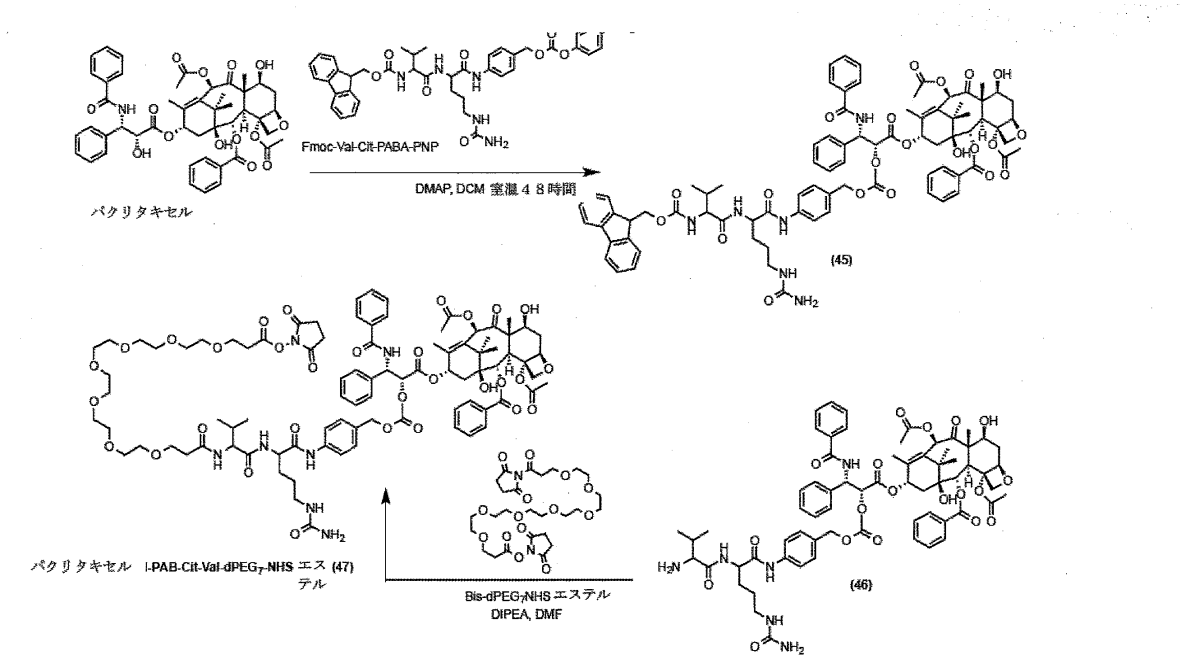
無水ＤＭＦ（２ｍＬ）中のパクリタキセル－ＰＥＧ$_6$－酸４３（２２ｍｇ、０．０１７ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、ＴＳＴＵ（１１ｍｇ、０．０３４ｍｍｏｌ）及びＤＩＰＥＡ（１５μｌ、０．０８５ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を、室温で２時間、窒素下で撹拌し、続いて濃縮させることにより黄色い油としての粗生成物を得た。これを、フラッシュクロマトグラフィー［シリカゲル、３～５％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ］によって精製して、ＮＨＳエステル４４、１５．２ｍｇ（６４％）を得た。［シリカゲル３％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ　R_f０．１８］。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（$CDCl_3$）：δ８．１６（２Ｈ、ｄ、Ｊ＝７．６Ｈｚ、２３－Ｈ、２７－Ｈ）、７．８６（２Ｈ、ｄ、Ｊ＝７．６Ｈｚ、３９－Ｈ、４３－Ｈ）、７．６５～７．３０（１１Ｈ、ＣＨ、Ａｒ）、６．２８（２Ｈ、ｍ、１０－Ｈ、１３－Ｈ）、６．０１（１Ｈ、ｑ、Ｊ＝４Ｈｚ、３’－Ｈ）、５．７１（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝７．２Ｈｚ、２－Ｈ）、５．５０（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝３．２Ｈｚ、２’－Ｈ）、５．００（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝８Ｈｚ、５－Ｈ）、４．４７（１Ｈ、ｑ、Ｊ＝６．４Ｈｚ、７－Ｈ）、４．２９（２Ｈ、ｄ、Ｊ＝８．４Ｈｚ、２０－Ｈ）、３．８３（１Ｈ、ｄ、Ｊ＝６．８Ｈｚ、３－Ｈ）、３．７３～３．４７（２４Ｈ、ｍ、－ＣＯ－ＮＨ－（CH_2－CH_2－Ｏ）$_6$－CH_2－）、２．６２～１．８７（２８Ｈ、ｍ、７－ＯＨ、６－Ｈ、１４－Ｈ、１８－Ｈ、ｇ２－Ｈ、ｇ４－Ｈ、２９－Ｈ、３１－Ｈ、１－ＯＨ、ｇ３－Ｈ、６－Ｈ、１９－Ｈ、ｎ３－Ｈ、ｎ４－Ｈ）、１．２８～１．１６（６Ｈ、ｍ、１６－Ｈ、１７－Ｈ）。ＭＳ（ｍ／ｚ）：１４００．６０［M^+］、１４１７．６２［M^+＋ＮＨ４］、１４２２．５８［M^+＋Ｎａ］、１３３８．６０［M^+＋Ｋ］。（理論：$C_{71}H_{89}N_3O_{26}$　１４００．４７）。

【０３１８】

実施例１８－パクリタキセル－ＰＡＢ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ｄＰＥＧ$_7$ＮＨＳエステル（４７）の調製

【０３１９】

【化１８】



【０３２０】

乾燥ＤＣＭ（１０ｍｌ）中のパクリタキセル（１００ｍｇ、０．１１７ｍｍｏｌ）及びＦｍｏｃ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ（７４．８ｍｇ、０．００９７６ｍｍｏｌ）の撹拌混合物に、ＤＭＡＰ（１４．３ｍｇ、０．１１７ｍｍｏｌ）を添加し、室温で４８時間、窒素下で撹拌した。溶媒を蒸発させて、淡い黄色い結晶性固形物を得、これをフラッシュカラムクロマトグラフィー［シリカゲル：３～５％のＭｅＯＨ／クロロホルム］によって精製して、所望の化合物４５を得た。

【０３２１】

乾燥ＴＨＦ中の４５の撹拌溶液に、ＤＢＵを添加し１０分間撹拌し、これの後に溶媒を除去して、脱保護誘導体４６を得、これをさらに生成せずに使用する。

【０３２２】

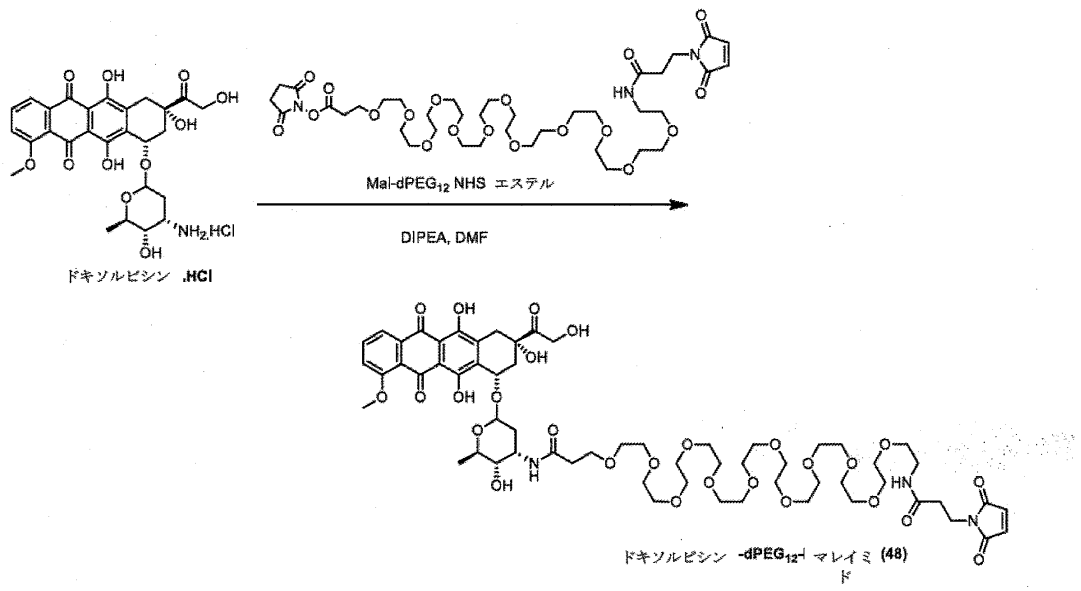
乾燥ＤＣＭ中の４６の溶液を乾燥ＤＣＭ中のビス－ｄＰＥＧ$_7$　ＮＨＳエステルの撹拌溶液に、窒素下で２０～３０分にわたって滴下し、これの後に、これを２時間撹拌し、水の添加によって反応を停止させＤＣＭで逆抽出し、有機抽出物を合わせ乾燥させ、蒸発させて粗４７を得る。

【０３２３】

実施例１９－ドキソルビシン－ｄＰＥＧ$_{12}$－マレイミド（４８）の調製

【０３２４】

【化１９】



【０３２５】

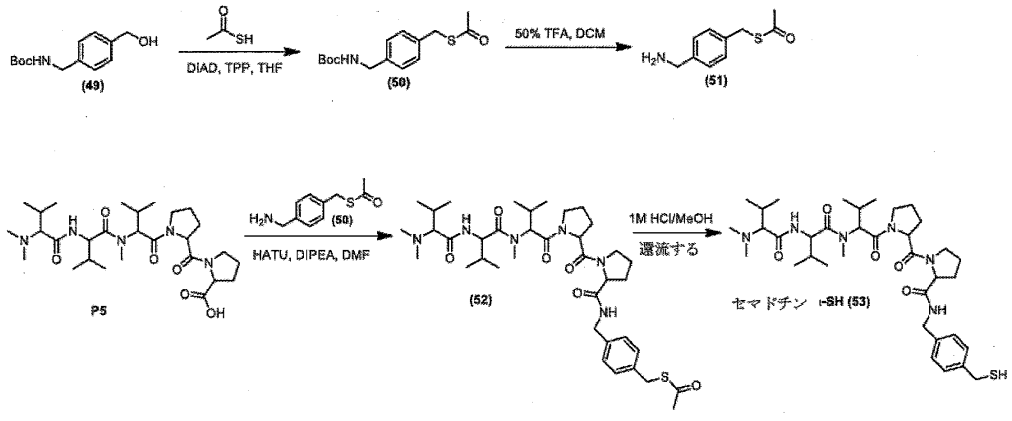
乾燥ＤＭＦ（２ｍｌ）中のＤｏｘ．ＨＣｌ（１０ｍｇ、０．０１７ｍｍｏｌ）の撹拌懸濁液に、ＤＩＰＥＡ（７．７μｌ）を添加し、反応混合物を窒素下で１０分間撹拌して、明澄な赤い溶液を得た。これに、乾燥ＤＭＦ（１ｍｌ）中に溶解したマレイミド－ｄＰＥＧ$_{12}$　ＮＨＳエステル（１６．４ｍｇ、０．０１９ｍｍｏｌ）を添加し、反応を室温で、窒素下で撹拌し、一晩光から保護した。ＤＭＦを高真空によって除去し、暗赤色の油をフラッシュクロマトグラフィー［シリカゲル：１０％のＭｅＯＨ／ＤＣＭ　Ｒ$_{f}$０．５］によって精製して、赤い粘性の油としての所望の生成物４８、１７．８ｍｇ（８０％）を得た。Ｃ$_{61}$Ｈ$_{87}$Ｎ$_{3}$Ｏ$_{27}$Ｎａ［Ｍ＋Ｎａ］１３１６．５４２４について計算したＨＲＭＳ（ｍ／ｚ）は、１３１６．５６０１を見出した。

【０３２６】

実施例２０－セマドチン－ＳＨ（５３）の調製

【０３２７】

【化２０】

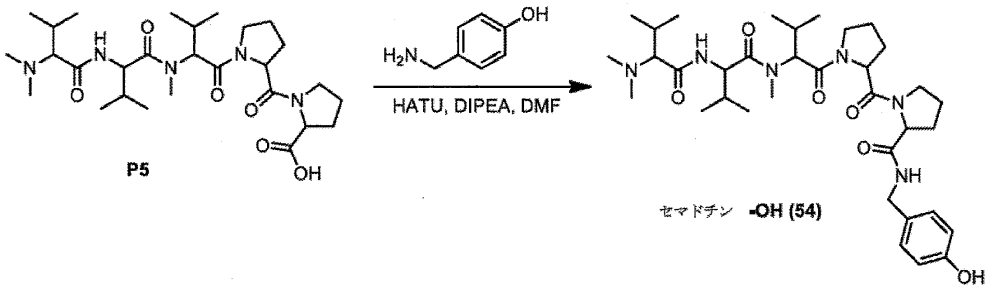


【０３２８】

実施例２１－セマドチン－ＯＨ（５４）の調製

【０３２９】

【化２１】

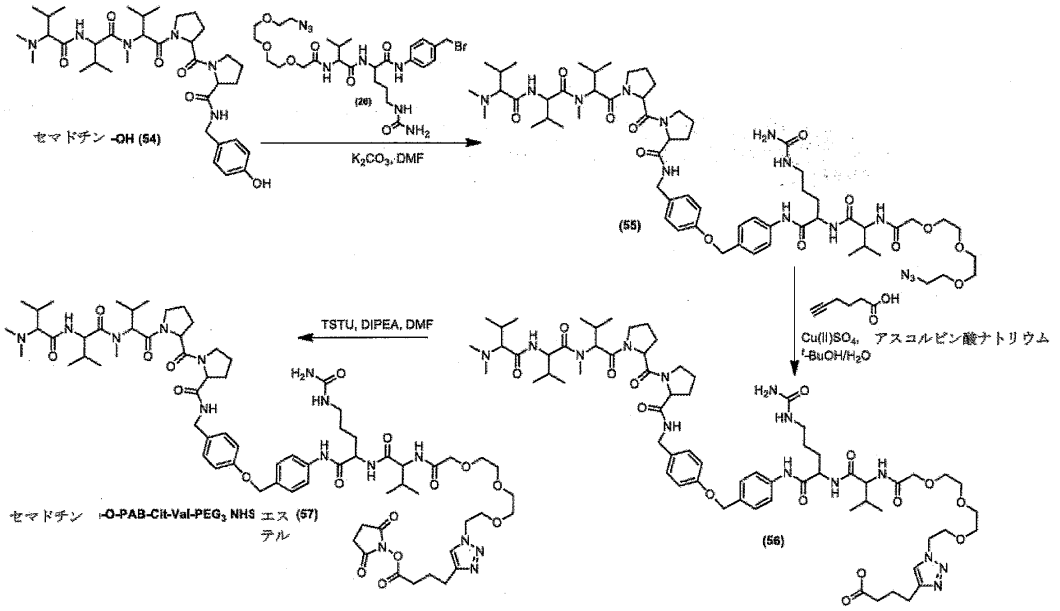


【０３３０】

実施例２２－セマドチン－Ｏ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ＰＥＧ$_3$－ＮＨＳエステル（５７）の調製

【０３３１】

【化２２】

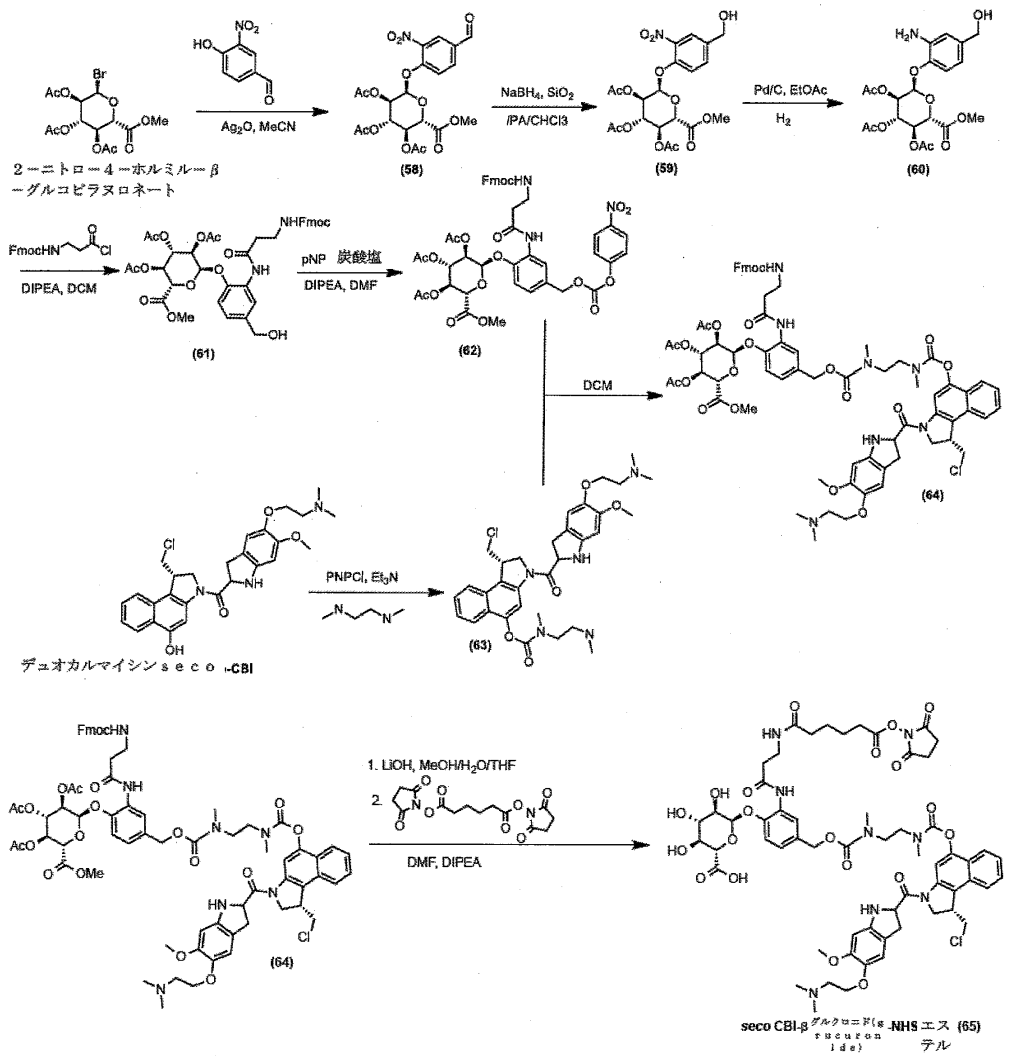


【０３３２】

実施例２３－ｓｅｃｏ　ＣＢＩ－β－グルクロニド－ＮＨＳエステル（６５）の調製

【０３３３】

【化２３】

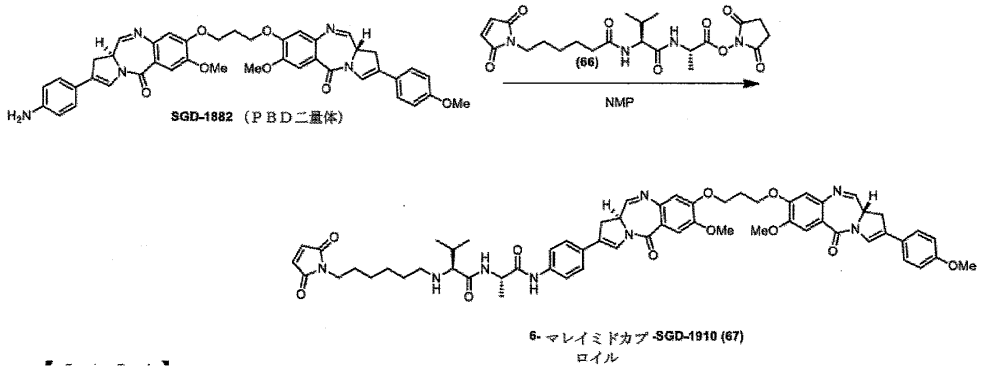


【０３３４】

実施例２４－６－マレイミドカプロイル－ＳＧＤ－１９１０（６７）の調製

【０３３５】

【化２４】



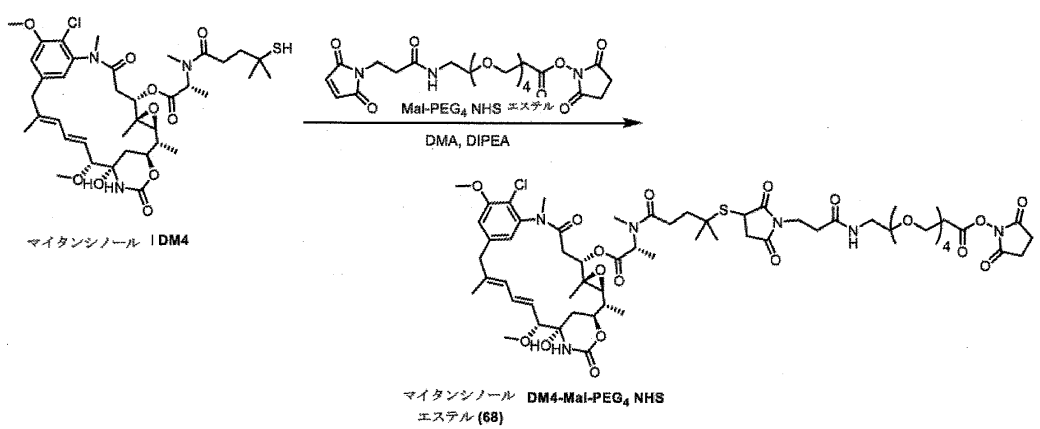
【０３３６】

実施例２５－マイタンシノールＤＭ４　Ｍａｌ－ＰＥＧ$_4$－ＮＨＳエステル（６８）の

調製

【０３３７】

【化２５】

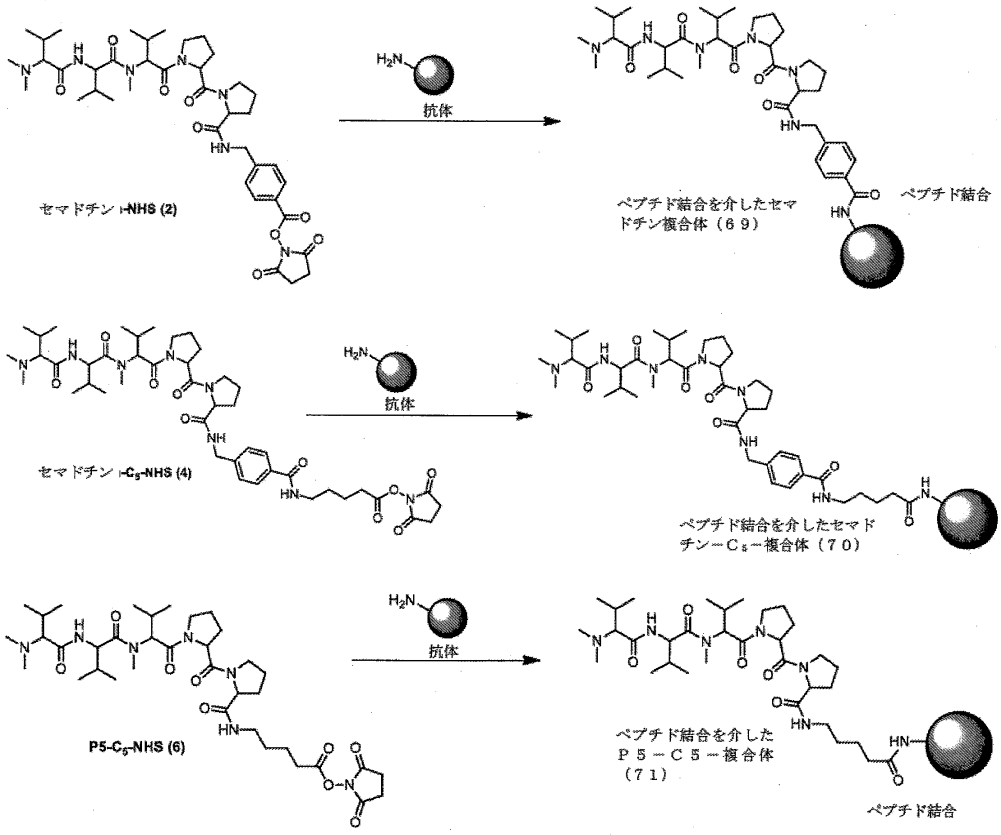


【０３３８】

実施例２６－複合体の合成のためのスキーム

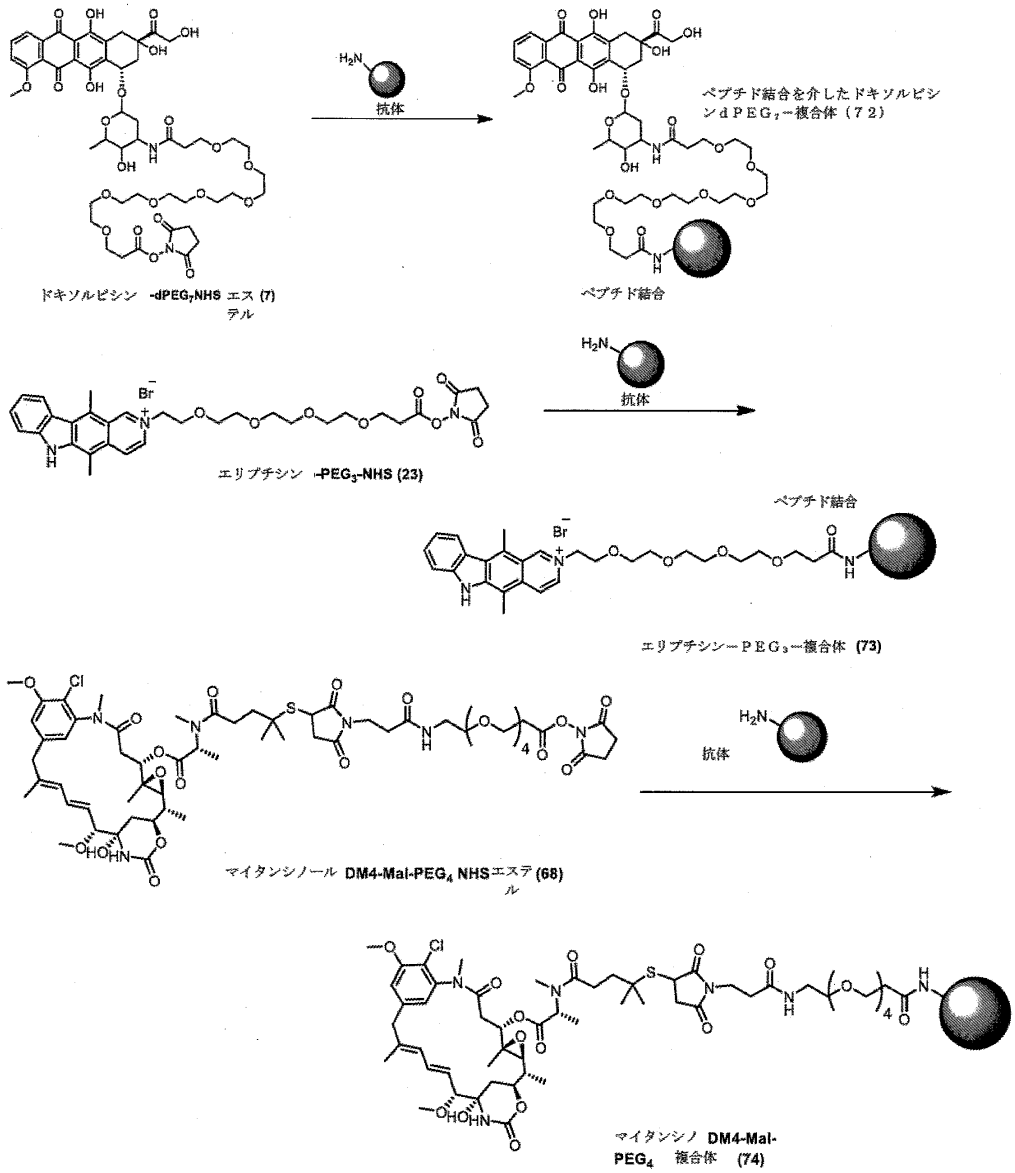
【０３３９】

【化２６】



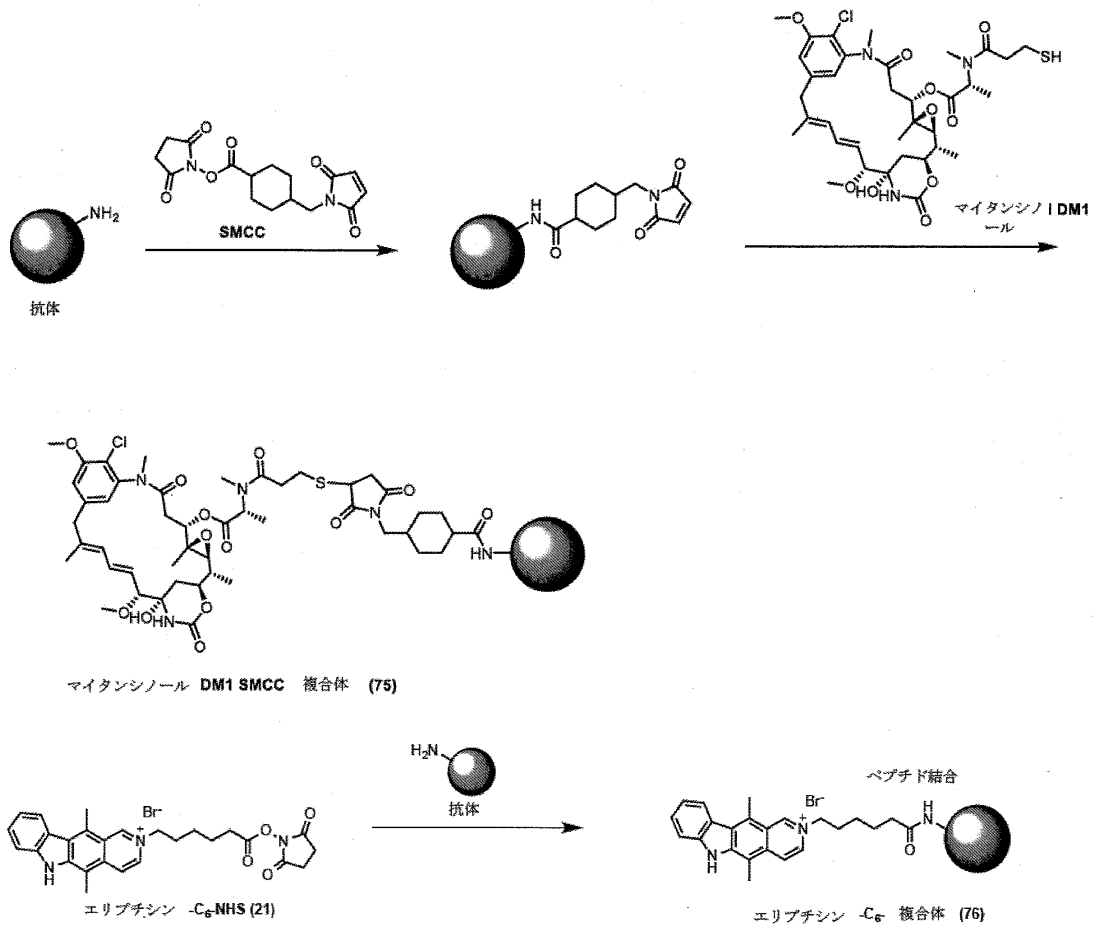
【０３４０】

【化２７】


抗体
ペプチド結合を介したドキソルビシンｄＰＥＧ₇ー複合体（７２）
ドキソルビシン -dPEG7NHS エステル (7)
ペプチド結合
抗体
エリブリン -PEG3-NHS (23)
ペプチド結合
エリブリンーＰＥＧ₃ー複合体 (73)
抗体
マイタンシノール DM4-Mal-PEG4 NHSエステル (68)
マイタンシノ DM4-Mal-PEG4 複合体 (74)

【０３４１】

【化２８】



【０３４２】

実施例２７－複数のよく分散した表面リジン残基を有する単鎖Ｆｖ抗体断片の発現及び精製

抗ＨＥＲ２細胞質発現ｓｃＦｖクローン、ＴＣＴの構築

複数のよく離間された表面リジン残基を有することで知られているｓｃＦｖ　Ｃ６．５［Ａｄａｍｓ　ＧＰ　ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ，２００１，６１：４７５０－５５］の翻訳領域（ＯＲＦ）を、タンパク質の細胞質発現を可能にするための融合タグとしてチオレドキシンのＯＲＦを有する発現ベクターｐＥＴ３２　Ｘａ／ＬＩＣ（Ｎｏｖａｇｅｎ）へとクローン化した。低コストでの融合タグの開裂、及び得られたｓｃＦｖの効果的な検出及び監視を促進するために、以下の特徴をベクター内へと操作した。

ａ）ＴＥＶプロテアーゼ開裂部位、活性化第Ｘ因子開裂部位の下流

ｂ）ＴＥＶプロテアーゼ開裂部位とＣ６．５ＯＲＦとの間のリンカー領域。これがないと、恐らくｓｃＦｖ　Ｃ６．５の構造がその開裂部位へのアクセスを立体的に妨害するという事実に起因して、ＴＥＶプロテアーゼは開裂に失敗する。

ｃ）Ｃ６．５のＣ末端のＴ７タグ配列。このタグは、リジン残基を有しないため、これを選択した。

【０３４３】

得られたタンパク質は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）（Ｔｅｖ開裂部位、Ｃ６．５、Ｔ７タグ）と呼ばれる。ＤＮＡ配列は、以下に見出される。
キー：
肉太活字＝ＴＥＶ開裂後に残る残基Ｓｅｒ
下線＝リンカー領域（ＧＳＧＧＳＧ）
書式なし＝Ｃ６配列
肉太活字斜体＝Ｔ７タグ配列。
【０３４４】
開裂ＴＣＴのＤＮＡ配列
【０３４５】
【化２９】

AGCGGTAGCGGAGGTAGCGGACAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGA
GGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATA
CAGCTTTACCAGCTACTGGATCGCCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAG
GCCTGGAGTACATGGGGCTCATCTATCCTGGTGACTCTGACACCAAATACA
GCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGTCGACAAGTCCGTCAGCA
CTGCCTACTTGCAATGGAGCAGTCTGAAGCCCTCGGACAGCGCCGTGTATT
TTTGTGCGAGACATGACGTGGGATATTGCAGTAGTTCCAACTGCGCAGCGT
GGCCTGAATACTTCCAGCATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCT
CAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCA
GTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGG
TCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATC
CTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATCTATGGTCA
CACCAATCGGCCCGCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG
CACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGTTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGA
TTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGTGTTCGGCGG
AGGGACCAAGCTGACCGTCCTA***ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAA***
TGGGT ［配列番号１］

【０３４６】
開裂ＴＣＴのアミノ酸配列
【０３４７】

【化３０】

SGSGGSGQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS
YWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGDSDTKYSPSFQGQVT
ISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHDVGYCSSS
NCAAWPEYFQHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG
SQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWY
QQLPGTAPKLLIYGHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAI
SGFRSEDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKLTVL*MAS*
MTGGQQMG [配列番号２]

【０３４８】
アミノ酸の数：２７２
分子量：２８、１６０Ｄａ
理論ＰＩ：７．５４
吸光係数：６５　２３５。
【０３４９】
抗ＨＥＲ２細胞質発現ｓｃＦｖクローン、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）の１５Ｌバイオリアクターにおける細菌発現。
【０３５０】
ＴＣＴをＳＨＵＦＦＬＥ（登録商標）Ｔ７コンピテントな大腸菌（ＮＥＢ）において産生した。選択的寒天プレート上で一晩成長させたトランスフォーム細胞の４～５つの単一コロニーを、まず、５ｍＬの選択的２ＴＹ培地＋１％のグルコース内に植え付けた。より早く成長するであろうことが認められた培養液から１μｌを、２ＹＴ＋１％グルコースの新しい選択的な５ｍｌの培養液に移して、３０℃で約１０時間成長させた。これらのステップは、細胞成長が遅滞期にあまりにも長い間入ること確実にし、したがって成長している細胞内のプラスミド安定性を確実にするためにとられる。
【０３５１】
次の日、選択的Ｏ．５Ｌ＋１％グルコース前培養物を、２つの５ｍｌの培養液のうちの１つに植え付けた。使用した培地、Ｓｕｐｅｒｃｈａｒｇｅｄ　Ｔｅｒｒｉｆｉｃ　Ｂｒｏｔｈ［１２ｇ／ｌのトリプトン、２４ｇ／ｌのイースト抽出物、９ｇ／ｌのNa_2HPO_4、２．２ｇ／ｌのKH_2PO_4、２．６ｇ／ｌのNH_4Cl、０．７ｇ／ｌの$Na_2SO_4$１ｇ／ｌのＮａＣｌ、５ｇ／ｌのグリセロール］。ｐＨを７．４に調節し、オートクレーブにかけ、２ｍＭの$MgSO_4$を添加する。
【０３５２】
３．５時間後、前培養物（OD_{600}０．８～１．２）を、１４．５Ｌの選択的（カルベニシリン１００ｕｇ／Ｌ）Ｓｕｐｅｒｃｈａｒｇｅｄ　Ｔｅｒｒｉｆｉｃ　Ｂｒｏｔｈ＋０．５％のグルコース及び０．０５ｍｌ／Ｌの消泡剤ＰＰＧ　２０２５を含む１５Ｌの発酵槽（Ａｐｐｌｉｋｏｎ　Ｐ１０００）に移した。撹拌翼の速度を２００～５００ＲＰＭに調節して、培地への酸素の適切な溶解を確実にする。典型的には、最初に２００ＲＰＭ、及び誘導後には４００～５００。最初の温度は、培養物の倍加時間に応じて３７℃または３０℃のいずれかであった（典型的な培養物倍加時間（Ｔｄ）３５～５５分）。
【０３５３】
培養物OD_{600}が約１．０のとき、培養液温度制御装置を２６℃に調節し、約３０分安定化させた。誘導を１５ｍＬの５０ｍＭのＩＰＴＧを用いた植え付けから典型的に３．

５～５時間後に行った。最終ＩＰＴＧ培養液の濃度　５０ｕＭ。細胞を低濃度のＩＰＴＧでの誘導前に２６℃によく調節することが非常に重要であり、さもなければ、産生される可溶性タンパク質の量が大幅に減少する。発酵槽を自動消泡剤分注機と連結し、自動消泡剤分注機は、気泡が蓄積したときに動作させる。

【０３５４】

培養物を約１６時間成長させ、５０００ＲＰＭで１５分間、Ｂｅｃｋｍａｎ　ＪＬＡ８．１０００を使用して収穫した。最終OD_{600}＝３５．７。

【０３５５】

３）タンパク質精製

細胞を溶解緩衝液（４０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ　８、７５０ｍＭのＮａＣｌ、２ｍＭのイミダゾール）中で再懸濁し、液体窒素中で凍結した。溶解の日に、凍結細胞を完全に解凍し、２Ｍの尿素の最終濃度を有するように溶解緩衝液を調節した。尿素及び高濃度のＮａＣｌを使用して、より良好なＩＭＡＣ精製を確実にした。２Ｍの尿素で処理したｓｃＦｖを１Ｄ　ＮＭＲで探り、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）の構造が影響を受けていないことを確実にした。

【０３５６】

完全なＥＤＴＡ不含錠剤（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、１／１００ｍｌの溶解溶液）及びＢｅｎｚｏｎａｓｅ（Ｎｏｖａｇｅｎ、９９超の純度、５ｕｌ／１００ｍｌの溶解溶液）を添加した。溶解を、細胞破壊チャンバを４℃に維持する冷却器と連結した定常的な細胞破壊システム（モデルＴＳ５）を用いて行った。細胞破壊を、２７ｋｐｓｉの圧力で３回達成した。可溶化液の総量は、合計２Ｌにのぼった。

【０３５７】

可溶化液を初めに、４０００ｒｐｍで４０分間Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ遠心分離機５８１０Ｒを使用して回転させて、細胞片のバルクを除去し、次いで１７　０００ｒｐｍで４０分間、Ｓｏｒｖａｌｌ　ＲＣ　６＋、ローターＦ２１－８ｘ５０を使用して２回、細胞片のバルクを除去した。次いで澄んだ上清を、真空下で０．２２ｕｍのＰＥＳフィルタ（Ｃｏｒｎｉｎｇ）をとおして濾過した。

【０３５８】

次いで、ＩＭＡＣをカラム内で、重力流下でＴｈｅｒｍｏ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ製のＨｉｓＰｕｒ　Ｎｉ－ＮＴＡ樹脂を使用して行った。カラムを、２Ｍの尿素を含む溶解緩衝液で平衡化した。澄んだ上清を、カラムを２回通過させ、続いて溶解緩衝液での１０総容積洗浄を行った。次いで、樹脂を１０総容積の洗浄緩衝液１（４０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８、７５０ｍＭのＮａＣｌ、２Ｍの尿素、１０ｍＭのイミダゾール）、次いで、ＯＤ　２８０ｎｍで著しい吸光度が存在しなくなるまで、洗浄緩衝液２（４０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８、７５０ｍＭのＮａＣｌ、２Ｍの尿素、３０ｍＭイミダゾール）でさらに洗浄した。

【０３５９】

次いで、ＯＤ　２８０ｎｍで測定値がなくなるまで、タンパク質を溶出させた（（４０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８、７５０ｍＭのＮａＣｌ、２５０ｍＭのイミダゾール）。次いで、ＴＥＶ開裂緩衝液（５０ｍＭのトリス－ＨＣｌ　ｐＨ８、１５０ｍＭのＮａＣｌ）中で溶出物を広範に透析した。次いで、タンパク質溶液を約２ｍｇ／ｍｌの濃度に調節し、還元グルタチオンを３ｍＭの最終濃度に添加した。ポリヒスチジンタグを融合させた自家産生ＴＥＶプロテアーゼを、０．１５ｍｇ／１００ｍｇの融合ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）（ｆＴＣＴ）で添加し、開裂を回転インキュベータ上で１４～１８時間、４℃で進ませた。

【０３６０】

開裂タンパク質溶液を、Ｎｉ－ＮＴＡ樹脂に３回通過させた。開裂ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）が、貫流した一方で、チオレドキシン融合タグ、ＴＥＶプロテアーゼ、及び他のタンパク質は樹脂に結合されたままである。精製の要約ＳＤＳ－ＰＡＧＥを、図２に示す。

【０３６１】

ＴＣＴ ｓｃＦｖを貯蔵緩衝液（２０ｍＭの酢酸ナトリウム、ｐＨ５、１５０ｍＭのＮａＣｌ）内へと透析し、次いで高分子量汚染物質ａｎｄｓｃＦｖ（ＴＣＴ）可溶性凝集物（図３）を排除するために、ＳＥＣを行った。この緩衝液を、複数回の凍結解凍サイクルに供された後に、ｂｅｃａｕｓｅｓｃＦｖ（ＴＣＴ）がそれの中で安定することを示したアミノ基を含有しない他の緩衝液よりも選択した。

【０３６２】

実施例２８－複数のよく分散した表面リジン残基を有するための単鎖Ｆｖ抗体断片のタンパク質操作、発現、及び精製

十分なよく離間されたリジン残基を有さず、劣った複合化特性（典型的なＤＡＲ＜５）を示す抗体断片は、ｔｈｅｓｃＦｖ（ＴＣＴ）と類似した構成を有するように、標的化した変異誘発によって修飾され得る。文献［Ａｌｚａｒｉ ＰＭ ｅｔ ａｌ Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９８８．６：５５５－８０；Ｄａｖｉｅｓ ＤＲ&Ｍｅｔｚｇｅｒ Ｈ．Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏ．１９８３．１：８７－１１７；Ｍａｒｉｕｚｚａ ＲＡ ｅｔ ａｌ．Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖｉｅｗ Ｂｉｏｐｈｙｓ．&Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｃｈｅｍ，１９８７，１６：１３９－５９］からの一般的かつ認められている抗体及びタンパク質構造概念を、三次元分子モデリングソフトウェア（例えば、ＰｙＭＯＬ、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｐｙｍｏｌ．ｏｒｇ Ｓｃｈｒｏｄｉｎｇｅｒ ＫＫ、Ｊａｐａｎ）及びＣｌｕｓｔａｌ等の位置合わせツールと組み合わせて使用して、リジン残基へと突然変異し得るタンパク質一次配列内の位置を識別することができ、リジン残基は、（ＩＭＧＴまたはＫａｂａｔ等のデータベースを使用して）その位置で良好な忍容性を示すことで知られているか、またはタンパク質表面にあることが（解決された３Ｄ構造から）知られているか、もしくは（Ｐｈｙｒｅ等のソフトウェアを使用して）予測されている（図１）。免疫グロブリンフォールドのよく保存された構造は、抗体及び抗体様ドメインに適用され得る。新しく導入、除去、または置き換えられたリジン残基を有する修飾抗体断片は、実施例２７に記載されるように発現及び精製され得、修飾が成功したと認める前に、耐熱性及び化学安定性、ならびに結合機能を試験され得る。

【０３６３】

実施例２９－複数のよく分散した表面リジン残基を有する単鎖Ｆｖ抗体断片上へのエリプチシン誘導体の生体複合化

エリプチシン

エリプチシン－C_6－ＮＨＳ（化合物２１）を、２つの異なる組の過剰薬物当量で、異なる量のＤＭＳＯ（１４％または６％のいずれか）と６％のＭｅＣＮ中のｐＨ８．０のＰＢＳ中で、ｓｃＦｖ－ＴＣＴに複合化した。ＮＨＳを、反応１に関しては５当量部分、及び反応２及び３に関しては２．７当量部分で添加した。より詳細には、エリプチシン－ＮＨＳを無水ＤＭＳＯに溶解して、明澄な黄色い／橙色の５０ｍＭの保存溶液を得た。４℃で保管したＰＢＳ ｐＨ８．０のｓｃＦｖ（ＴＣＴ）保存溶液を、６％のＭｅＣＮ及び１４％または６％のいずれかのＤＭＳＯで事前に平衡化した脱気済みＰＢＳ ｐＨ８．０で希釈した。ＮＨＳを、室温で、ボルテックス上で混合しながら、７５分毎に５または２．７当量のいずれかの部分を添加した。添加の完了から４時間、試料を遠心分離（２．５分、１１ｋｒｐｍ）によって回収した。上清を回収し、各試料の反応混合物と同じ緩衝液で事前に平衡化したｚｅｂａカラム（Ｐｉｅｒｃｅ）によって精製した。次いで、試料を６％のＭｅＣＮ／ＰＢＳ ｐＨ７．３中で、一晩４℃で４０００回超、次いで８０００回透析した。試料を回収し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（図４）、ＵＶ／Ｖｉｓ分光法（図５）、及びデンシトメトリーによって分析した。

【０３６４】

複合体は、ある特定のＤＡＲが得られたら、不溶性になり、溶液から析出された。例として、上記の試料１は、遠心分離後に少量のタンパク質／複合体、及びｚｅｂａカラムを介して精製を試みたら、さらにより少ないタンパク質／複合体を含有し、残留可溶性複合体が極めて疎水性であり、カラムに付着することを示す。主に蛍光ゲルに見られるように、この反応のペレット試料中にかなりの量のタンパク質／複合体が存在し、すなわち可溶

性複合体の回収率は低かった。これは、ＵＶ／Ｖｉｓデータによっても裏付けられる。析出は、３２当量の反応１と比較して、１６当量の薬物を有した試料２及び３ではるかに顕著ではなかった。ペレット試料は、より強くなく、可溶性物質はクーマシー及び蛍光検出の両方でより顕著であった。試料２が試料３よりもゲル上にはるかに少なく移動するという兆候が存在し、ＤＭＳＯの増量が、薬物の可溶性の上昇につながり得、それによって反応の効率を上昇させ、より高いＤＡＲにつながるという論理的根拠を裏付ける。全体的に見て、反応２は１よりも少ないＮＨＳ当量を有し、より低いＤＡＲにつながり、これはより可溶性なようであるが、同時に３と同じ数の当量を有し、それによって有機溶媒論拠を裏付ける。

【０３６５】

ＤＡＲを、緩衝液中のこれらのＵＶ／ｖｉｓ吸収スペクトルを使用してこれらの反応に関して計算し（図５）、エリプチシン酸の吸光係数を実験的に得た。分光測定で得た比率を、蛍光ゲルのデンシトメトリーデータを使用して補正した（複合化薬物％対未反応／非共有結合薬物％、表４）。６つ以上の薬物：抗体比を、薬物の劣った可溶性にも関わらず、最良の反応条件下で得た。全体的なタンパク質回収率は、許容できた。

【０３６６】

ｓｃＦｖ－エリプチシン複合体の抗体負荷に対する薬物の定量化

【０３６７】

【表６】

番号	反応	最終ＤＡＲ
１	３２当量、１４％のＤＭＳＯ	５．４
２	１６当量、１４％のＤＭＳＯ	５．１
３	１６当量、６％のＤＭＳＯ	３．９

表４。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－エリプチシンＡＤＣの最終ＤＡＲ。

【０３６８】

ＰＥＧ－エリプチシン

ＳｃＦｖ－ＴＣＴを、水溶性を上昇させるために、短ＰＥＧ鎖を有する別のエリプチシン－ＮＨＳ誘導体に複合化した（化合物２３）。複合化を可溶性相で得られた最大量であった、ＤＡＲ５を得るためのエリプチシンのための最良条件を使用して、対照としてのエリプチシン－ＮＨＳと並行して行った。反応を、９９％の純粋ｓｃＦｖを使用して、先に記載されるように設置した。ＰＢＳ　ｐＨ８．０中のＳｃＦｖを、ＤＭＳＯ（１４％）及びＭｅＣＮ（６％）で事前に平衡化したＰＢＳ　ｐＨ８．０中で希釈し、次いでボルテックス上で５分間インキュベートし、室温で優しく振った。粗ＮＨＳ薬物を無水ＤＭＳＯに溶解し５０ｍＭの保存溶液に１５分にわたり２回に分けて添加し、室温でさらに２時間インキュベートした。試料を遠心分離によって回収し、４℃で保管した後に、１４％のＤＭＳＯ／６％のＭｅＣＮ／ＰＢＳ　ｐＨ７．３で事前に平衡化したｚｅｂａカラムを使用して精製した。ペレットを緩衝液中で再懸濁させ、ゲル負荷緩衝液及びすべての試料をＳＤＳ－ＰＡＧＥ（クーマシー及び蛍光、図６）及びＵＶ／Ｖｉｓ分光法によって分析した。２のペレットは、再溶解できなかった。

【０３６９】

エリプチシンをＰＥＧ－エリプチシンと比較して、同じ反応条件（１及び２）下で、ＰＥＧ誘導体が、可溶性複合体／タンパク質（化合物７３）のより高い回収率をもたらすことは明らかである。２のバンドは、クーマシー及び蛍光検出の両方で、１と比較して極めて弱い。当量の数がＤＡＲを上昇させるために調査された３つの反応条件と比較して、ことによると４が３及び１よりも高いＤＡＲを有することを示すゲルのシフトが存在した。タンパク質回収率は、４Ｚに関して他の２つよりも低く、重ねて、より多くのＤＡＲ複合体が溶液から析出する最大負荷に達したことを示す。

【０３７０】

ＵＶ／Ｖｉｓを（非共有結合％を計算するための）デンシトメトリーデータと組み合わせて使用して、ＤＡＲ値を次のように計算した。（１）：４．１（２）：２．０（３）：５．１及び（４）：４．３（表５）。これは、ＰＥＧエリプチシンが、エリプチシンと比較して、２倍高いタンパク質回収率及び最大２倍高いＤＡＲをもたらしたことを確認した。複合体析出は、改善されたようである。

【０３７１】

【表７】

番号	反応	最終ＤＡＲ
１	２０当量、１４％のＤＭＳＯ、６％のＭｅＣＮ	４．１
２	２０当量、１４％のＤＭＳＯ、６％のＭｅＣＮ	２．０
３	３２当量、１４％のＤＭＳＯ、６％のＭｅＣＮ	５．１
４	６４当量、１４％のＤＭＳＯ、６％のＭｅＣＮ	４．３

表５。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＰＥＧ－エリプチシンＡＤＣ（化合物７３）の最終ＤＡＲ

【０３７２】

エリプチシンとの複合化を、類似した条件下で、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に対する比較として全ＩｇＧに行った。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルは、少なくとも同等の複合化蛍光発光（図７及び８）、したがって類似したＤＡＲを示す。

【０３７３】

リソソーム放出可能エリプチシン

開裂可能なジペプチドエリプチシン－ＮＨＳ薬物（化合物２９）を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体を得た。反応を、低、中、及び高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御した。最初に、純粋な単離された開裂可能なジペプチドエリプチシン－ＮＨＳの加水分解速度を、様々な緩衝液条件で決定した。適切な加水分解速度を提供した条件、すなわちＮＨＳがリジンと反応する前にＮＨＳが酸へと加水分解するように早すぎず、反応が完了するまでに時間がかかりすぎるように緩徐すぎない。考慮に入れた他の要因は、緩衝液／ｐＨ／有機溶媒中での抗体の安定性、緩衝液中での薬物の安定性及び薬物の濃度であった。後者は、重要なパラメータであり、溶液中の薬物が濃縮されればされる程、加水分解速度がどんどん減少する。したがって、濃度は、加水分解の効率的な速度のために制御される必要がある。確認及び進められた条件は、以下であった。

【０３７４】

・緩衝液－ｐＨ８．８のＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液と、２０％のＤＭＳＯ及び３０％グリセロール、

・温度－２５℃、

・混合条件－Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ、

・１ｍｇ／ｍｌでの抗体、

・開裂可能なジペプチドエリプチシン－ＮＨＳ－８当量の添加部分、及び

・ＮＨＳ薬物添加速度（７０～９０分に１回）。

【０３７５】

典型的に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで解凍し、次いでアリコートの温度を緩徐に２０℃に上昇させた。あらゆる析出物を使用前に沈降させた。

【０３７６】

開裂可能なジペプチドエリプチシン－ＮＨＳ（化合物２９）の１００ｍＭの保存溶液を、無水の濾過済みＤＭＳＯ中で調合した。あらゆる析出物を遠心分離によって回収した。

重炭酸塩緩衝液ｐＨ８．８を、エッペンドルフマイクロチューブ中で濾過済みＤＭＳＯ及びグリセロールと合わせ、緩衝液を４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで平衡化し、次いで、１０００ｒｐｍで混合しながら、アリコートの温度を２０℃に上昇させた。抗体を添加し、さらに１０分間平衡化（２０℃、１０００ｒｐｍ）した後で、開裂可能なジペプチドエリプチシン－ＮＨＳの添加を開始した。これは、８当量のＮＨＳ薬物ＤＭＳＯストックを添加し、７０分毎に反転させて混合した後で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に戻し、２５℃、１０００ｒｐｍで混合することによって行った。使用される当量の総数は、必要なＤＡＲに左右された。試料を、最後の添加後、さらに2時間ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に置いたままにした。次いで、試料を遠心分離（２．５分、１１ｋｒｐｍ）によって回収した。唯一の目に見える析出は、最高数の薬物当量を有する試料中であり、それは、非常に少なかった。

【０３７７】

すべての試料を最初に、１０％のＩＰＡ／ＰＢＳで事前に平衡化したＺｅｂａカラム（Ｐｉｅｒｃｅ）を通過させた後で、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ上で２０％のＩＰＡ／ＰＢＳ　ｐＨ７、２５℃でさらに精製し、上述のＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ、ＵＶ／Ｖｉｓ分光法、及び質量分析法によって分析した。

【０３７８】

複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、ＴｏｓｏｈＴＳＫＧｅｌ　Ｇ２０００Ｗｘｌカラムを使用して、ＨＰＬＣ－サイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。ＳｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある保持時間を有する。複合体はすべて、より早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量だが、主に単量体ピークとして示し、凝集をほとんど示さないか、または全く示さなかった。

【０３７９】

質量分光分析を、ＳＧＳ　Ｍ－Ｓｃａｎによって行った。複合体、及びＳｃＦｖ－ＴＣＴ（対照）を両方のＭＡＬＤＩ－ＭＳによって分析し、次いでＬＣ－ＭＳによってさらに分析した。すべての試料が、よく分解されたピークを生じさせた。

【０３８０】

実施例３０－複数のよく分散した表面リジン残基を有する単鎖Ｆｖ抗体断片上へのドキソルビシン誘導体の生体複合化

（ａ）ドキソルビシン－ＮＨＳ誘導体を用いた１工程複合化

ＮＨＳ反応基を有するドキソルビシン誘導体（化合物７、１０、１６）をｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体を得た。反応を、低、中、及び高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御した。最初に、純粋な単離されたドキソルビシン－ＮＨＳ誘導体の加水分解速度を、様々な緩衝液条件で決定した。適切な加水分解速度を提供した条件、すなわちＮＨＳがリジンと反応する前にＮＨＳが酸へと加水分解するように早すぎず、反応が完了するまでに時間がかかりすぎるように緩徐すぎない。考慮に入れた他の要因は、緩衝液／ｐＨ／有機溶媒中での抗体の安定性、緩衝液中での薬物の安定性及び薬物の濃度であった。後者は、重要なパラメータであり、溶液中の薬物が濃縮されればされる程、加水分解速度がどんどん減少する。したがって、濃度は、加水分解の効率的な速度のために制御される必要がある。確認及び進められた条件は、以下であった。

【０３８１】

・緩衝液－ｐＨ７．８のＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液と、２０％のＤＭＳＯ及び３０％グリセロール及び１％のＴｗｅｅｎ、
・温度－２５℃、
・混合条件－Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ、
・１ｍｇ／ｍｌでの抗体、
・ドキソルビシン－ＮＨＳ誘導体－２当量の添加部分、
・ＮＨＳ薬物添加速度－７０～９０分に１回。

【０３８２】

典型的に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで解凍し、次いで抗体アリコートの温度を緩徐に２０℃に上昇させた。アリコートを沈降させて、あらゆる析出物を回収した後で使用した。

【０３８３】

ドキソルビシン－ＮＨＳ誘導体１００ｍＭの保存溶液を、無水の濾過済みＤＭＳＯ中で調合した。あらゆる析出物を遠心分離によって回収した。重炭酸塩緩衝液ｐＨ８．８を、エッペンドルフマイクロチューブ中で濾過済みＤＭＳＯ及びグリセロールと合わせ、緩衝液を４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで平衡化し、次いで、１０００ｒｐｍで混合しながら、アリコートの温度を２０℃に上昇させた。抗体を添加し、さらに１０分間平衡化（２０℃、１０００ｒｐｍ）した後で、ドキソルビシン－ＮＨＳ誘導体の添加を開始した。

【０３８４】

これは、４当量のＮＨＳ薬物ＤＭＳＯストックを添加し、７０分毎に反転させて混合した後で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に戻し、２５℃、１０００ｒｐｍで混合することによって行った。使用される当量の総数は、必要なＤＡＲに左右された。試料を、最後の添加後、さらに2時間ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に置いたままにした。次いで、試料を遠心分離（２．５分、１１ｋｒｐｍ）によって回収した。唯一の目に見える析出は、最高数の薬物当量を有する試料中であり、それは、非常に少なかった。

【０３８５】

すべての試料を最初に、１０％のＩＰＡ／ＰＢＳで事前に平衡化したＺｅｂａカラム（Ｐｉｅｒｃｅ）を通過させた後で、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ上で２０％のＩＰＡ／ＰＢＳ　ｐＨ７、２５℃でさらに精製し、次いで上述のＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ、ＵＶ／Ｖｉｓ分光法、及び質量分析法によって分析した。

【０３８６】

複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、ＴｏｓｏｈＴＳＫＧｅｌ　Ｇ２０００　Ｗｘｌカラムを使用して、ＨＰＬＣ－サイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。ＳｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある保持時間を有する。複合体はすべて、より早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量を示すが、主に単量体ピークとしてであり、凝集をほとんど示さないか、または全くを示さない。

【０３８７】

質量分光分析を、ＳＧＳ　Ｍ－Ｓｃａｎによって行った。複合体、及びＳｃＦｖ－ＴＣＴ（対照）を両方のＭＡＬＤＩ－ＭＳによって分析し、次いでＬＣ－ＭＳによってさらに分析した。すべての試料が、よく分解されたピークを生じさせた。ＤＡＲを、ドキソルビシン薬物及び抗体に対する吸光係数を使用して決定した。

【０３８８】

（ｂ）ドキソルビシン－マレイミド誘導体への２工程複合化

ドキソルビシンマレイミド誘導体（化合物４８、１２）を抗体上の複合化するために、最初に抗体の天然リジンを保護されたチオールに化学的に変換し、続いてこれを還元して、遊離チオールを得た。次いで、遊離チオールをドキソルビシンのマレイミド誘導体と反応させて、チオエーテル結合を含む複合体を得ることができた。

【０３８９】

抗体上にチオールを導入する第１の工程を最適化した。これは、抗体上にＳＰＤＰリンカーを複合化して、結合基と抗体の間にアミド結合を形成することを伴った。リジンが最適化されたｓｃＦｖは、マレイミド由来の薬物の部分配列複合化のための高ＳＰＤＰ置換複合体の生成を促進した。

【０３９０】

全体的に見て、ＳＰＤＰは、より低いｐＨ（７または８）ですらよく複合化した。十分なＴＣＥＰ（１１５モル過剰）で還元されたとき、最大１２のＳＨ：ｓｃＦｖ比を生じさせる。ＳＰＤＰ複合化を、１つの抗体当たりのＳＰＤＰリンカーの様々な比率のを導入するために実施した。

【０３９１】
抗体Ｃ６．５及びＨＭＦＧ１を、共に１ｍｇ／ｍｌで、１ｍＭのＥＤＴＡ、３％のＤＭＳＯ、及び６％のＭｅＣＮを含有する脱気したＰＢＳ　ｐＨ８内へと希釈した。ＳＰＤＰの新しい無色の溶液を、無水ＤＭＳＯ中で調製し、必要な量を抗体溶液に添加した。試料を、室温で３時間、及び４℃で一晩、ローラによってインキュベートした。試料を、最小の析出が認められたとき、遠心分離によって回収した。過剰／複合化されていないＳＰＤＰリンカーをＺｅｂａスピンカラム（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して除去し、緩衝液を、１ｍＭのＥＤＴＡを有する脱気したＰＢＳ　ｐＨ８へと交換した。試料のＵＶ／ｖｉｓスペクトルを記録した。

【０３９２】
抗体上に遊離チオール、及び同時にピリジン－２－チオンを放出するためのリンカーの還元のために、以下を行った。ＴＣＥＰをまず、水に溶解して（新しい）、５００ｍＭの保存溶液を調合した。ＳＰＤＰ結合試料を、１１５当量のＴＣＥＰを用いて、２０分間３７℃でインキュベートした。試料を遠心分離によって回収し、直ぐに氷上で冷やした。粗試料のＵＶ／ｖｉｓスペクトルを記録した後で、溶離剤として１ｍＭのＥＤＴＡを有する脱気したＰＢＳ　ｐＨ７中の３％のＤＭＳＯ／６％のＭｅＣＮを使用したｚｅｂａ脱塩カラムを使用して、過剰ＴＣＥＰ及びピリジン－２－チオンを除去した。

【０３９３】
この時点で、ＳＰＤＰ複合化の効率を決定した。粗還元試料中に放出されたピリジン－２－チオンの量を、分光光度的データを使用して決定した。ピリジン－２－チオンのλｍａｘは、３４３ｎｍ、及び吸光係数８０８０$M^{-1}cm^{-1}$であった。５１００$M^{-1}cm^{-1}$である２８０ｎｍでの吸光係数を使用して、２８０ｎｍでの吸収を補正した。粗還元溶液中のチオンの濃度を、Ａ３４３ｎｍを使用して計算し、この濃度を使用して、２８０ｎｍでの吸収を補正して、チオン吸収を説明する。抗体濃度を計算し、ＳＰＤＰ：抗体の比率を決定した。同じプロセスを前還元試料に対して反復し、このＤＡＲを還元試料ＤＡＲから減じて、実際のＳＰＤＰ：抗体比を得た。

【０３９４】
還元試料の精製後、以下の複合体を得（表６）、最大９つのリンカーがｓｃＦｖ（ＴＣＴ）と複合化できたことを示す。

【０３９５】
【表８】

	Ｃ６．５　ｓｃＦｖ		ＨＭＦＧ１　ＩｇＧ	
ＳＰＤＰリンカー反応比	リンカー対抗体比	抗体回収率	リンカー対抗体比	抗体回収率
５	０．９	７１％	４．４	９３％
８	１．８	７１％	６．３	８１％
１６	４	６５％	８．２	８０％
３２	９	３８％	１３	４４％

表６。ＳＰＤＰリンカー複合化対リジンで最適化されたｓｃＦｖ及び対照ＩｇＧの比率

【０３９６】
別の実施例において、同様に３２当量のＳＰＤＰを使用して、続いて１１５当量のＴＣＥＰで試料を還元して上記の手順を行った。この事例における抗体回収率は、はるかにより多かった（９２％）。次いで、還元、精製、及び定量化した試料をドキソルビシンに複合化した。ドキソルビシンマレイミド及びドキソルビシン－ＰＥＧ－マレイミドを、各々２当量で（脱気したＰＢＳ　ｐＨ７／１ｍＭのＥＤＴＡ／３％のＤＭＳＯ／６％のＭｅＣＮ中の）抗体試料に添加した。試料を、室温で３時間、続いて４℃で一晩、ローラによってインキュベートした。試料を遠心分離によって回収し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル（図９）

及びＵＶ／Ｖｉｓ分光法によって分析した。

【０３９７】

Ｄｏｘ複合体のＤＡＲを、ＵＶ／Ｖｉｓ分光法及びゲルデンシトメトリーを使用して粗試料から計算した。分光学的データから、ＤＡＲを、４８８ｎｍ及び２８０ｎｍでのドキソルビシンε、及び２８０ｎｍでの抗体のεを使用して計算した（表７）。

【０３９８】

【表９】

	Ｃ６．５　ｓｃＦｖ				ＨＭＦＧ１　ＩｇＧ			
ＳＰＤＰリンカー反応比	リンカー対抗体比	抗体回収率	Ｄｏｘ：抗体ＤＡＲ	Ｄｏｘ－ＰＥＧ：抗体ＤＡＲ	リンカー対抗体比	抗体回収率	Ｄｏｘ：抗体ＤＡＲ	Ｄｏｘ－ＰＥＧ：抗体ＤＡＲ
３２	７．５	９２％	３．５	１．６	６．５	５０％	不適用	２．５

表７．ＳＰＤＰリンカー複合化対リジンで最適化されたｓｃＦｖ及び対照ＩｇＧの比率、続いてドキソルビシン誘導体の複合化

【０３９９】

ＤＡＲを、ドキソルビシン薬物（表７）及び抗体の実験的に決定したモル吸光係数を使用して決定し、上記のように質量分析によって確認した。

【０４００】

高比率ＳＰＤＰ　ｓｃＦｖ複合体の結合

Ｃ６．５　ｓｃＦｖを、１６当量過剰試薬を用いて実施例３０（ｂ）においてみられるようにＳＰＤＰに複合化し、続いて１１５モル当量のＴＣＥＰと反応させて、５．４のリンカー対抗体比（ＳＰＤＰ：ｓｃＦｖ）を得た。この試料、ならびに未修飾対照、及び非ＳＰＤＰ修飾だが還元した対照を使用した。

【０４０１】

９６個のウェルのＩｍｍｕｎｏｓｏｒｂ　ＥＬＩＳＡプレート、続いて試験試料、抗ｍｙｃ　ＩｇＧ（Ｓｉｇｍａ）、及び抗マウスペルオキシダーゼ複合体（Ｓｉｇｍａ）をＰＢＳ中の１０μｇ／ｍｌのＨＥＲ２－Ｆｃでコーティングした。広範囲にわたるＰＢＳ洗浄は、各層間にあり、検出は、ＢＭ－Ｂｌｕｅ基質を用いてであった。プロット（図１０）は、２５ｎＭのK_dを有する未修飾抗体が換言すると、４２ｎＭでのＨＥＲ２に対して親和度の若干の減少を示したが、これは、抗体がまずより多くのチオールを導入するためにＳＰＤＰと複合化され、次いで還元されたときに、回復したことを示し、K_d＝２４．９ｎＭである。

【０４０２】

実施例３１－複数のよく分散した表面リジン残基を有する単鎖Ｆｖ抗体断片上へのＰ５及びセマドチン誘導体の生体複合化

（Ａ）．ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン

セマドチン－ＮＨＳ（化合物２）を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体（化合物６９）を得た。反応を、低、中、及び高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御した。最初に、純粋な単離されたセマドチン－ＮＨＳの加水分解速度を、様々な緩衝液条件で決定した。適切な加水分解速度を提供した条件、すなわちＮＨＳがリジンと反応する前にＮＨＳが酸へと加水分解するように早すぎず、反応が完了するまでに時間がかかりすぎるように緩徐すぎない。考慮に入れた他の要因は、緩衝液／ｐＨ／有機溶媒中での抗体の安定性、緩衝液中での薬物の安定性及び薬物の濃度であった。後者は、重要なパラメータであり、溶液中の薬物が濃縮されればされる程、加水分解速度がどん

どん減少する。したがって、濃度は、加水分解の効率的な速度のために制御される必要がある。確認及び進められた条件は、以下であった。

【０４０３】

・緩衝液－ｐＨ８．８のＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液と、２０％のＤＭＳＯ及び３０％グリセロール、

・温度：２０℃、

・混合条件－Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ、

・１ｍｇ／ｍｌでの抗体、

・セマドチン／セマドチン－Ｃ５及びＰ５Ｃ５、すべてＮＨＳ（１６当量添加部分）、及び

・ＮＨＳ薬物添加速度（７０～９０分に１回）。

【０４０４】

典型的に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで解凍し、次いでアリコートの温度を緩徐に２０℃に上昇させた。アリコートを沈降させて、あらゆる析出物を回収した後で使用した。

【０４０５】

セマドチン－ＮＨＳの１００ｍＭの保存溶液を無水の濾過済みＤＭＳＯ中で調合した。あらゆる析出物を遠心分離によって回収した。重炭酸塩緩衝液ｐＨ８．８をエッペンドルフマイクロチューブ中で濾過済みＤＭＳＯと合わせて、緩衝液を（温度を４℃～２０℃に上昇させて、１０００ｒｐｍで混合しながら）ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで平衡化した。抗体を添加し、１０分間さらに平衡化した（２０℃、１０００ｒｐｍ）後で、セマドチン－ＮＨＳを添加した。これは、１６当量のＮＨＳ薬物ＤＭＳＯストックを添加し、７０分毎に反転させて混合した後で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に戻し、２０℃、１０００ｒｐｍで混合することによって行った。使用される当量の総数は、必要なＤＡＲに左右された。試料を、最後の添加後、さらに2時間Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に置いたままにした。次いで、試料を遠心分離（２．５分、１１ｋｒｐｍ）によって回収した。唯一の目に見える析出は、最高数の薬物当量を有する試料中であり、非常に少なかった。

【０４０６】

すべての試料を、２０℃の１０％のＩＰＡ／ＰＢＳ　ｐＨ７を用いてＨＰＬＣ－ＳＥＣ上で粗のものから精製し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（図１１）、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ（図１２）、アミノ酸分析（表８Ａ～８Ｃ）、質量分析（図１３Ａ～Ｃ、１４Ａ～Ｃ、１５Ａ～Ｃ、１６Ａ～Ｃ、１７、１８、１９、２０、表９及び１０）、ならびに結合ＥＬＩＳＡによって分析した（図２１）。この実施例で、構成は、以下のとおりであった。

【０４０７】

反応１－ｓｃＦｖ－ＴＣＴ－セマドチン１６当量、

反応２－ｓｃＦｖ－ＴＣＴ－セマドチン４８当量、及び

反応３－ｓｃＦｖ－ＴＣＴ－セマドチン１１２当量。

【０４０８】

複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、ＴｏｓｏｈＴＳＫＧｅｌ　Ｇ２０００Ｗｘｌカラムを使用して、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。ＳｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある１５．５～１６分の保持時間を有した。３つの複合体はすべて、若干かつ次第により早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量だが、単一の鋭い単量体ピークとして示し、凝集を示さなかった（図１２Ａ～Ｃ）。

【０４０９】

ＤＡＲを、ケンブリッジ大学のタンパク質及び核酸化学施設でアミノ酸分析（ＡＡＡ）によって正確に決定した。ＡＡＡ（表７Ａ～Ｃ）から、（４－アミノメチル安息香酸の薬物のフィンガープリント放出に起因する）タンパク質及び薬物両方のモルでの量を、導き出すことができ、ＤＡＲが計算される（薬物のモル数／タンパク質のモル数）。溶液中のタンパク質の濃度は、まずＤＡＲに基づいて複合体分子量を計算し、続いて、ＡＡＡから

得られた濃度をｍｇ／ｍＬのタンパク質に変換することによって計算することができる。例えば、試料１において、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）は、２８１６２（ＭＳ）であり、ＤＡＲは、３．９であり、各セマドチン分子が抗体上に６６７個付加する。したがって、複合体ＭＷ＝２８１６２＋（３．９ｘ６６７）＝３０７６３である。濃度は、９．０２ｎｍｏｌ／ｍｌであり、これは、２７７μｇ／ｍＬのタンパク質に相当する。

【０４１０】

【表１０】

試料：　１　表８Ａ 予想された値に対する測定されたモル比の整数適応			
アミノ酸	予測された値	観測値	適応の近さ 予測された値に対する
Ｃｙｓ	６	除外	－
Ａｓｐ	１５	１５．３５	５％以上
Ｔｈｒ	１４	１３．６７	５％以上
Ｓｅｒ	４６	４４．４８	５％以上
Ｇｌｕ	２２	２１．７２	５％以上
Ｇｌｙ	４４	４３．９７	５％以上
Ａｌａ	１７	１７．２１	５％以上
Ｖａｌ	１８	１９．７４	５～１０％以内
Ｍｅｔ	５	除外	－
Ｉｌｅ	８	７．８７	５％以上
Ｌｅｕ	１５	１４．８４	５％以上
Ｎｏｒｌｅｕ 標準品			－
Ｔｙｒ	１４	１３．４２	５％以上
Ｐｈｅ	７	６．８６	５％以上
Ｈｉｓ	３	２．９８	５％以上
Ｌｙｓ	１２	１２．７２	５～１０％以内
Ａｒｇ	５	５．１７	５％以上
Ｐｒｏ	０	除外	－
Ｔｒｐ	８	８．００	（未決定）
合計	２５９	残基	
			２回実行の平均
全試料	０．７２６	ナノモル	０．７２
	２０．４３	ｕｇ	２０．３２
濃度	９．０７	ナノモル／ｍｌ	９．０２
	２５５．４２	ｕｇ／ｍｌ	２５４．００
セマドチン ナノモル	２．８２	２．８１	２．８１
ＤＡＲ＝	３．９０		

【０４１１】

【表１１】

試料： 2 表８Ｂ 予想された値に対する測定されたモル比の整数適応			
アミノ酸	予測された値	観測値	予測された値に対する適応の近さ
Ｃｙｓ	６	除外	－
Ａｓｐ	１５	１５．３８	５％以上
Ｔｈｒ	１４	１３．６９	５％以上
Ｓｅｒ	４６	４４．１７	５％以上
Ｇｌｕ	２２	２１．６１	５％以上
Ｇｌｙ	４４	４４．２５	５％以上
Ａｌａ	１７	１６．９１	５％以上
Ｖａｌ	１８	２０．００	５～１０％以内
Ｍｅｔ	５	除外	－
Ｉｌｅ	８	８．０４	５％以上
Ｌｅｕ	１５	１４．９３	５％以上
Ｎｏｒｌｅｕ標準品			－
Ｔｙｒ	１４	１３．２４	５～１０％以内
Ｐｈｅ	７	７．０７	５％以上
Ｈｉｓ	３	３．０３	５％以上
Ｌｙｓ	１２	１２．６２	５％以上
Ａｒｇ	５	５．０５	５％以上
Ｐｒｏ	０	０．００	－
Ｔｒｐ	８	８．００	（未決定）
合計	２５９	残基	
			２回実行の平均
全試料	０．８０６	ナノモル	０．８０
	２２．６９	ｕｇ	２２．６４
濃度	６．２０	ナノモル／ｍｌ	６．１８
	１７４．５４	ｕｇ／ｍｌ	１７４．１９
セマドチンナノモル	６．６６	６．５４	６．６０
ＤＡＲ＝	８．２１		

【０４１２】

【表１２】

試料：	３		表８Ｃ
予想された値に対する測定されたモル比の整数適応			
アミノ酸	予測された値	観測値	予測された値に対する適応の近さ
Ｃｙｓ	６	除外	－
Ａｓｐ	１５	１５．７６	５％以上
Ｔｈｒ	１４	１３．７８	５％以上
Ｓｅｒ	４６	４４．４７	５％以上
Ｇｌｕ	２２	２１．９２	５％以上
Ｇｌｙ	４４	４４．５９	５％以上
Ａｌａ	１７	１７．２０	５％以上
Ｖａｌ	１８	除外	－
Ｍｅｔ	５	除外	－
Ｉｌｅ	８	７．６６	５％以上
Ｌｅｕ	１５	１５．０９	５％以上
Ｎｏｒｌｅｕ標準品			－
Ｔｙｒ	１４	１３．７１	５％以上
Ｐｈｅ	７	６．８１	５％以上
Ｈｉｓ	３	３．０６	５％以上
Ｌｙｓ	１２	１２．８１	５～１０％以内
Ａｒｇ	５	５．１４	５％以上
Ｐｒｏ	０	０．００	－
Ｔｒｐ	８	８．００	（未決定）
合計	２５９	残基	
			２回実行の平均
全試料	０．７９６	ナノモル	０．７９
	２２．４２	ｕｇ	２２．２１
濃度	７．２４	ナノモル／ｍｌ	７．１７
	２０３．７８	ｕｇ／ｍｌ	２０１．８８
セマドチンナノモル	８．８３	８．４６	８．６５
ＤＡＲ＝	１０．９６		

表８Ａ～Ｃ。３つの複合化反応１～３からの３．９、８．２、及び１１のＤＡＲを示すＡＡＡの結果の要約

【０４１３】

質量分光分析を、ＳＧＳ　Ｍ－Ｓｃａｎによって行った。試料１～３、及びＳｃＦｖ－ＴＣＴ（対照）をＭＡＬＤＩ－ＭＳによって分析し、次いで、ＬＣ－ＭＳによってさらに分析した。すべての試料が、よく分解されたピークを生じさせ、これらは、以下に要約される。

【０４１４】

エレクトロスプレーイオン化、質量分析（ＥＳＩ－ＭＳ）

装置：分析を、Ｄｉｏｎｅｘ　Ｕｌｔｉｍａｔｅ　３０００　ＭＤＬＣシステム（ＳＯ

Ｐ　ＭＳ９００～ＭＳ９０５、ならびにＨＰＬＣ０１２及びＨＰＬＣ０１９）と連結したＷａｔｅｒｓ　Ｘｅｖｏ　Ｑ－ＴＯＦ（四重極－飛行時間（Ｑ－ＴＯＦ））質量分析計を使用して行った。

【０４１５】

緩衝液交換：試料を、０．０５％（ｖ／ｖ）のギ酸内へＭｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ａｍｉｃｏｎ　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌフィルタユニット（１０ｋＤａのＭＷＣＯ）を使用して緩衝液交換及び濃縮した。

【０４１６】

オンラインＥＳＩ－ＭＳ分析：ＴＣＴ－セマドチン試料のアリコートを、オンラインＨＰＬＣ／ＥＳ－ＭＳ分析を使用して分析して、以下のように成分の完全な質量（ｉｎｔａｃｔ　ｍａｓｓ）と関連したデータをもたらした。

【０４１７】

器具：Ｄｉｏｎｅｘ　Ｕｌｔｉｍａｔｅ　３０００　ＭＤＬＣシステムを装備したＷａｔｅｒｓ　Ｘｅｖｏ　Ｑ－ＴｏＦ（四重極－飛行時間）Ｇ１質量分析計。カラム：ＰＬＲＰ－Ｓカラム、温度：６０℃、流量：０．２ｍＬ／分、ＵＶ検出：２１４ｎｍ及び２８０ｎｍ、溶媒Ａ：０．０５％（ｖ／ｖ）のギ酸、溶媒Ｂ：０．０５％（ｖ／ｖ）のギ酸を含有する９０％（水溶液）のアセトニトリル。

【０４１８】

勾配：

【０４１９】

【表１３】

時間（分）	％Ｂ
０	２０
５	５５
６５	７５
７３	７５
７３．１	９８
８３	９８
８３．１	２０
１１１	２０

【０４２０】

質量分析計を、ｌｏｃｋスプレー内部構成物としても利用されたＧｌｕ－Ｆｉｂｒｉｎｏペプチド Ｂを使用して外部から較正した。質量分析計をｍ／ｚ２００～４０００に走査した。

【０４２１】

ＴＣＴ－セマドチン２試料のＥＳＩ－ＭＳ

ＴＣＴ－セマドチン２試料のアリコートを、オンラインＨＰＬＣ／ＥＳ－ＭＳ分析を使用して分析して、成分の完全な質量と関連したデータをもたらした。総イオン電流（ＴＩＣ）クロマトグラム、スペクトル、及び変換データ試料ＴＣＴ－セマドチン２を、以下に示す（図１３Ａ～Ｃ）。

【０４２２】

主なピークを、溶出しているＴＣＴ－セマドチン２試料のＴＩＣにおいて３５．９分の時点で認めた。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ３２，１６４、３２，８３１、及び３３，４９８に一連の主なピークを生成し、これは、セマドチン分子の６～８個の付加と共に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）分子の提供された理論質量と一致した。これは、８．２１のＤＡＲのＡＡＡ決定とよく相関する。

【０４２３】

試料１、３、及びＴＣＴのＥＳＩ－ＭＳ

試料ＴＣＴ－セマドチン１、ＴＣＴ－セマドチン３、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ）対照のアリコートを、オンラインＨＰＬＣ／ＥＳ－ＭＳ分析を使用して分析して、成分の完全な質量と関連したデータをもたらした。総イオン電流（ＴＩＣ）クロマトグラム、スペクトル、及び変換データ試料を、以下に示す（図１４＆１５）。

【０４２４】

主なピークを、溶出しているｓｃＦｖ（ＴＣＴ）対照試料のＴＩＣにおいて３３．２分の時点で認めた。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ２８１６２に単一の主構成成分を生成し、これは、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）分子の理論質量と一致した（図１６Ａ～Ｃ）。

【０４２５】

主なピークを、溶出しているＴＣＴ－セマドチン１のＴＩＣにおいて３３．５分の時点で認めた。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ２９４９５、３０１６２、及び３０８２９に一連の主なピークを生成し、これは、セマドチン分子の２～４個の付加と共に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）分子の提供された理論質量と一致する（図１４Ａ～Ｃ、表９）。

【０４２６】

主なピークを、溶出しているＴＣＴ－セマドチン３試料のＴＩＣにおいて３７．１分の時点で認めた。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ３３４９６、３４１６３、及び３４８３０に一連の主なピークを生成し、これは、セマドチン分子の８～１０個の付加と共に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）分子の提供された理論質量と一致する（図１５Ａ～Ｃ、表９）。

【０４２７】

【表１４】

表９　ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣのＥＳＩ－ＭＳ分析の要約

試料	観察されたピーク質量（ｍ／ｚ）	付加された質量（ｍ／ｚ）	計算されたＤＡＲ
ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）	２８１６２	０	０
ＴＣＴ－セマドチン　ＡＤＣ１	２９４９５	１３３５	２
	３０１６２	２００２	３
	３０８２９	２６６９	４
ＴＣＴ－セマドチン　ＡＤＣ２	３２１６４	４００４	６
	３２８３１	４６７１	７
	３３４９８	５３３８	８
ＴＣＴ－セマドチン　ＡＤＣ３	３３４９６	５３３６	８
	３４１６３	６３０３	９
	３４８３０	６６７０	１０
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）分子量＝２８１６０（タンパク質配列）Ｄａ			
セマドチン薬物分子量＝６６７Ｄａ			

【０４２８】

ＭＡＬＤＩ－質量分析

装置：分析を次の装置：Ｓｈｉｍａｄｚｕ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　ＡＸＩＭＡ　Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ　ＭＡＬＤＩ　ＴＯＦ－ＴＯＦ質量分析計を使用して行った。

【０４２９】

線形ＭＡＬＤＩ　ＭＳ分析：ミオグロビンの試料を使用して、正イオン及び負イオン両

方の高質量線形モードで外部から器具を較正した。ＴＣＴ－セマドチン複合体３、ＴＣＴ－セマドチン複合体１、ＴＣＴ－セマドチン複合体２、ＴＣＴ－対照の試料を５０％（水溶液）アセトニトリル中に１：１（ｖ／ｖ）で希釈し、スチール３８４スポット非コーティングＭＡＬＤＩプレート上に１μｌのアリコートで斑点をつけた。複製スポットを、各ＭＡＬＤＩマトリックスに対して作製した：ノルハルマン、２’，４’，６’－トリヒドロキシアセトフェノン一水和物（ＴＨＡＰ）、ノルハルマン：ＴＨＡＰ（４：１、ｖ／ｖ）、及びシナピン酸マトリックス溶液。スポットを、シナピン酸に関しては、未希釈試料を使用しても作製した。各スポットを対応するＭＡＬＤＩマトリックスの１μＬのアリコートで重ね、共結晶化させ、空気の優しい流れの下で乾燥させた。シナピン酸を、１：１（ｖ／ｖ）の０．１％水溶液中の飽和溶液として調製した。トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）：アセトニトリル。ノルハルマンを、１：１（ｖ／ｖ）の０．１％水溶液中の１０ｍｇ／ｍＬの溶液として調製した。トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）：アセトニトリル。

【０４３０】

２’，４’，６’－トリヒドロキシアセトフェノン一水和物（ＴＨＡＰ）を、１：１（ｖ／ｖ）の０．１％水溶液中の飽和溶液として調製した。トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）：アセトニトリル。ノルハルマン、２’，４’，６’－トリヒドロキシアセトフェノン一水和物（ＴＨＡＰ）及びノルハルマン：ＴＨＡＰ（４：１、ｖ／ｖ）を含むスポットを、高質量線形モード負イオンで分析し、シナピン酸を含むスポットを、高質量線形モード正イオンで分析した。質量スペクトルを、適切な質量範囲にわたって回収し、最適な結果を達成するようにレーザーパワーを変えた。

【０４３１】

シナピン酸中のｓｃＦｖ（ＴＣＴ）（対照試料）のＭＡＬＤＩ－ＭＳ

未希釈ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）の線形モード正イオン分析から得たＭＡＬＤＩ－ＭＳデータ。シナピン酸マトリックスにおける対照を、図１７に示す。有意なピークをｍ／ｚ２８２５１で認め、これは、器具と関連した誤差内のｓｃＦｖ（ＴＣＴ）の予測された質量と一致する（２８１６０Ｄａ）。

【０４３２】

シナピン酸中のＴＣＴ－セマドチン複合体１のＭＡＬＤＩ－ＭＳ

シナピン酸マトリックスにおけるＴＣＴ－セマドチン複合体１の線形モード正イオン分析から得られたＭＡＬＤＩ－ＭＳデータを、図１８に示す。（６６７Ｄａの与えられた増加的質量を使用して）おおよそ２、３、４、及び５個のセマドチン分子それぞれの付加的複合化質量を有する与えられたｓｃＦｖ（ＴＣＴ）対照に適切に一致して、分解されたピークを、ｍ／ｚ２９５５９、３０２２３、３０８８４、及び３１５３１で認めた。表１０。

シナピン酸中のＴＣＴ－セマドチン複合体２のＭＡＬＤＩ－ＭＳ

シナピン酸マトリックスにおけるＴＣＴ－セマドチン複合体２の線形モード正イオン分析から得たＭＡＬＤＩ－ＭＳデータを、図１９に示す。（６６７Ｄａの与えられた増加的質量を使用して）おおよそ６、７、及び８個のセマドチン分子それぞれの付加的複合化質量を有する与えられたｓｃＦｖ（ＴＣＴ）対照に適切に一致して、分解されたピークを、ｍ／ｚ３２２９３、３２９４８、及び３３５８８で認めた。表１０。

【０４３３】

シナピン酸中のＴＣＴ－セマドチン複合体３のＭＡＬＤＩ－ＭＳ

シナピン酸マトリックスにおけるＴＣＴ－セマドチン複合体３の線形モード正イオン分析から得られたＭＡＬＤＩ－ＭＳデータを、図２０に示す。（６６７Ｄａの与えられた増加的質量を使用して）おおよそ８、９、及び１０個のセマドチン分子それぞれの付加的複合化質量を有する与えられたｓｃＦｖ（ＴＣＴ）対照に適切に一致して、分解されたピークを、ｍ／ｚ３３８０９、３４４１５、及び３５０５７で認めた。表１０。

【０４３４】

【表１５】

試料	観察されたピーク質量（ｍ／ｚ）	付加された質量（ｍ／ｚ）	計算されたＤＡＲ
ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）	２８２５１	０	０
ＴＣＴ－セマドチン　ＡＤＣ１	２９５５９	１３０８	２
	３０２２３	１９７２	３
	３０８８４	２６３３	３．９
	３１５３１	３２８０	４．９
ＴＣＴ－セマドチン　ＡＤＣ２	３２２９３	４０４２	６．１
	３２９４８	４６９７	７
	３３５８８	５３３７	８
ＴＣＴ－セマドチン　ＡＤＣ３	３３８０９	５５５８	８．３
	３４４１５	６１６４	９．２
	３５０５７	６８０６	１０．２
セマドチン薬物分子量＝６６７Ｄａ			

表１０。ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣのＭＡＬＤＩ分析の要約

【０４３５】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン複合体の結合ＥＬＩＳＡ

ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ（化合物６９）を作製し、上述のように特徴付けた。固定化ＨＥＲ２標的抗原に対するこれらの結合親和度を、ＥＬＩＳＡによって決定し、未修飾ｓｃＦｖと比較した（図２１）。すべてのタンパク質を、化学修飾されないはずであるＣ末端Ｔ７タグを使用して検出した（リジンは存在しなかった）。９６個のウェルのＩｍｍｕｎｏｓｏｒｂ　ＥＬＩＳＡプレート、続いて試験試料、抗Ｔ７ペルオキシダーゼ複合体を、ＰＢＳ中の１０μｇ／ｍｌのＨＥＲ２－Ｆｃでコーティングした。広範囲にわたるＰＢＳ洗浄は、各層間にあり、検出は、ＢＭ－Ｂｌｕｅ基質を用いてであった。プロット（図２１）は、３．９個の薬物（平均ＤＡＲ）を負荷したＡＤＣが、実質的にその結合親和度を維持し（K_dは、２．５ｎＭから３．３ｎＭにわずかに減少する、８．２個の薬物が付加されたＡＤＣが、実質的にその結合親和度を維持した（K_dは、２．５ｎＭから１５．５ｎＭにわずかに減少する）ことを示す。複合化反応がさらに推し進められた場合、表面リジン残基のうちの１つを除くすべて（１１／１２）に複合化し、ｓｃＦｖ結合は減少するが、失われない（K_d＝２７．５ｎＭ）。これは、最適化されたｓｃＦｖが高薬物負荷を有し得る一方で、結合機能を維持することを示す。

【０４３６】

全体的なＴＣＴ－セマドチンの結論、生物物理学的データ

複合化条件を、上に詳述するように最適化した。この最適化は、低、中、及び高ＤＡＲ複合体の極めて高い収率を伴う、制御された複合化反応を可能にした。複合体のいずれにおいても抗体／複合体の析出は認められず、したがって、回収率は非常に高かった。ＳＥＣ　ＨＰＬＣ精製の後に、得られた複合体を約５００μｇ／ｍｌに濃縮し、これは、緩衝液中で数週間安定していた。インビトロまたはインビボ試験のためにこれらを使用する前に、これらの複合体をＰＢＳへと緩衝液交換し、細菌濾過した。再び、回収率は、非常に高かった。

【０４３７】

生成物を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＡＡＡ、ＭＳ、及びＥＬＩＳＡを還元することによって広範に分析した。

【０４３８】

分析のために使用した技法は、ＴＣＴによって例示される最適化されたｓｃＦｖ構造が、リジン残基を使用して複数の薬物を抗体上に負荷され得、複合化は、結合親和性を維持しながら、所望のＤＡＲを有する（ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって示されるような）単量体複合体を得るように制御され得るということと一致し、この議論を裏付ける。低ＤＡＲを有する精製複合体（試料１）は、ゲル上を対照ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）とより類似して流れ、わずかにより高く流れより多分散性であった中ＤＡＲ（試料２）よりも多分散性ではなく、高ＤＡＲ（試料３）に関しては、ゲル上での明らかな移動シフトが存在し、試料は、対照である未修飾ＴＣＴよりも明らかにサイズが大きかった。これらの観察は、ＨＰＬＣによってさらに裏付けられ、ここで、試料は、ＴＣＴよりも次第に短い保持時間を有し、これらの増加するサイズに起因して、ＳＥＣカラムからより早く溶出した。アミノ酸分析は、さらなる定量分析に極めて有用なツールであり、ＭＳデータを補って完全にした。質量分析は、同じ試料内の高及び低ＤＡＲの両方を明らかにし、ＡＡＡは、平均を提供した。

【０４３９】

試料１に関して、ＤＡＲは、ＡＡＡによって３．９であり、ＭＳ（ＥＳ及びＭＡＬＤＩ）によって３．４及び３であった

試料２に関して、ＤＡＲは、ＡＡＡによって８．２であり、ＭＳ（ＥＳ及びＭＡＬＤＩ）によって７及び７であった

試料３に関して、ＤＡＲは、ＡＡＡによって１０．９であり、ＭＳ（ＥＳ及びＭＡＬＤＩ）によって９．２及び９であった。

【０４４０】

（Ｂ）ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５

ＳｃＦｖ－ＴＣＴを、セマドチン－ＮＨＳのために使用したのと同じ方法を使用して、Ｐ５Ｃ５－ＮＨＳ（化合物６）に複合化させた。ＨＰＬＣ精製Ｐ５Ｃ５－ＮＨＳを濾過した無水ＤＭＳＯに溶解して、１００ｍＭの保存溶液を調合し、沈降させた。これを、使用しないとき、－２０℃で保管した。この実施例で、構成は、以下のとおりであった。

【０４４１】

反応１－ｓｃＦｖ－ＴＣＴ－Ｐ５Ｃ５　３０当量

反応２－ｓｃＦｖ－ＴＣＴ－Ｐ５Ｃ５　１１２当量。

【０４４２】

抗体を４℃で解凍し、抗体の温度を、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで２０℃に緩徐に上昇させた。あらゆる析出物を遠心分離によって回収した。重炭酸塩緩衝液ｐＨ８．８を、１または５ｍｌのｅｐｐｅｎｄｏｒｆ内で無水の濾過済みＤＭＳＯと合わせ、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで１０分間、２０℃、１０００ｒｐｍで平衡化させた後で抗体を添加し、さらに１０分間平衡化させた。Ｐ５Ｃ５－ＮＨＳを、溶液を添加することによって、反応２に関しては１６当量を、反応１に関しては１０当量を分けて添加し、反転させて混合し、Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に戻した。

【０４４３】

添加は、９０分毎に行い、この段階の後に、試料をＴｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に、４℃、１０００ｒｐｍで一晩そのままにした。試料を遠心分離（２．５分、１０ｋｒｐｍ）によって回収して、明澄な溶液を得た。最小の析出を、試料２に認めた。

【０４４４】

試料を、Ｔｏｓｏｈ　ＴＳＫＧｅｌ　Ｇ２０００を使用して、ＳＥＣによるＨＰＬＣによって粗のものから精製し、２０℃の１０％のＩＰＡ／ＰＢＳ　ｐＨ７．３を用いて溶出させ（前と同じ方法、１回の注射実行当たり約３００μｇの負荷）、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（図２２）、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ（図２３）、及びＡＡＡ（表１１）によって分析した。試料を回収し、合わせ、ｖｉｖａｓｐｉｎ２０、１０，０００のＭＷＣＯ（ＶＳ２００２、１０℃、４０００ｒｐｍ）によって濃縮させた。試料を１時間沈降させた後で、エッペンドルフマイクロチューブに移し、濃縮器を２００ｕｌのＰＢＳですすいだ。試料を、Ｚｅｂａカラムを使用してＰＢＳ　ｐＨ７．３へと緩衝液交換し、Ｎａｎｏｄｒｏｐ分光計を使用して再び定量化した。表示数値は、以下のとおりであった。

【０４４５】
　試料１Ａ２８０＝１．４６（３つの平均）、６５０μｇ／ｍｌ
　試料２Ａ２８０＝１．３２（３つの平均）、５９０μｇ／ｍｌ。
【０４４６】
ＡＤＣ（化合物７１）は、より高い分子量を示す、未修飾抗体よりも早い保持時間で溶出したが、　可溶性　単量体複合体として、目に見える凝集はなかった。
【０４４７】
（Ｃ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン－Ｃ５、トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５、及びトラスツズマブ－セマドチン－Ｃ５
以下の反応を、セマドチン（４）及びＰ５Ｃ５（６）薬物に関して先に記載したのと同じプロセスに従って、行った。手短に言えば、２０℃／１０００ｒｐｍでのインキュベーションによって抗体を緩衝液／ＤＭＳＯ中で平衡化し、薬物９０分毎に１回、１６当量部分で添加した。試料を遠心分離によって回収し、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ（ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に対してはＧ２０００ＳＷｘｌ、及びトラスツズマブに対してはＧ３０００ＳＷｘｌ）（１０％のＩＰＡ／ＰＢＳアイソクラチック）によって精製した。次いで精製した画分を、ｖｉｖａｓｐｉｎ２０スピン濃縮器を使用して５倍に濃縮し、ｚｅｂａスピンカラム（Ｐｉｅｒｃｅ）を使用してＰＢＳへと緩衝液交換した。試料をＳＤＳ－ＰＡＧＥ（図２４）、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ（図２５～２７）、及びＵＶ／Ｖｉｓ分光法（図２８＆２９）によって分析した。
【０４４８】
これらの複合体の合成後、３つのＰ５系誘導体はセマドチン－ＮＨＳ誘導体（７０）と非常に類似して振る舞い、極めて可溶性の単量体高負荷複合体（化合物７１）をもたらしたことは明らかであった。これらは、ＤＡＲに関して定量化していないが、（ＡＡＡ及びＭＳによって定量化した）前の試料とＳＤＳ－ＰＡＧＥによって比較したとき、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ）対照と比較したとき、低、中、及び高ＤＡＲが、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及びセマドチン、Ｐ５Ｃ５、ならびにセマドチン－Ｃ５を用いて形成され得ることは明らかである。トラスツズマブＩｇＧも、Ｐ５Ｃ５及びセマドチン－Ｃ５に複合化し、（ＴＣＴよりも小さいにもかかわらず）シフトがゲル上で認められた。これらの観察は、試料がセマドチン、Ｐ５Ｃ５、及びセマドチン－Ｃ５で低、中、及び高ＤＡＲ複合体に関して類似した保持時間を提供した、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ出力記録によって裏付けられた。
【０４４９】
（Ｄ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５ＡＤＣの結合親和度
ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣを作製し、上の実施例で記載されるように特徴付けた。Ｐ５系薬物を識別し定量化するために、今回は、ジプロリン断片の放出に続いて、前と同じように、ＡＡＡによってＤＡＲを決定した（表１１Ａ＆Ｂ）。固定化ＨＥＲ２標的抗原に対するこれらの結合親和度を、ＥＬＩＳＡによって決定し、未修飾ｓｃＦｖと比較した。すべてのタンパク質を、化学修飾されないはずであるＣ末端Ｔ７タグを使用して検出した（リジンは存在しなかった）。９６個のウェルのＩｍｍｕｎｏｓｏｒｂ　ＥＬＩＳＡプレート、続いて試験試料、抗Ｔ７－ペルオキシダーゼ複合体を、ＰＢＳ中の１０μｇ／ｍｌのＨＥＲ２－Ｆｃでコーティングした。広範囲にわたるＰＢＳ／ｔｗｅｅｎ－２０及びＰＢＳ洗浄は、各層間にあり、検出は、ＢＭ－Ｂｌｕｅ基質を用いてであった。プロット（図３０）は、８個の薬物を負荷したＡＤＣ（ｓｃＦｖ　ＴＣＴ－Ｐ５Ｃ５（１））が、実質的に結合親和度を維持した（Ｋｄは、７ｎＭから１３ｎＭにわずかに減少する）ことを示す。複合化反応が、完全な限界まで推し進められた場合（ｓｃＦｖ　ＴＣＴ－Ｐ５Ｃ５（２））、すべての表面リジン残基（１２）に実際に複合化し、ｓｃＦｖ結合は、結合部位内に埋められた重要なリジン残基に起因して大幅に失われ、薬物が修飾される。ＤＡＲを、ＡＡＡ（表１１Ａ及び１１Ｂ）によって確認した。これは、最適化されたｓｃＦｖが高薬物負荷を有し得る一方で、結合機能を維持することを示す。
【０４５０】

【表１６】

試料：	ＴＣＴ－Ｐ５Ｃ５（１）	表１１Ａ	
予想された値に対する測定されたモル比の整数適応			
	予測された		適応の近さ
アミノ酸	値	観測値	予測された値に対する
Ｃｙｓ	６	除外	－
Ａｓｐ	１５	１５．７６	５％以上
Ｔｈｒ	１４	１３．９０	５％以上
Ｓｅｒ	４６	４３．５１	５～１０％以内
Ｇｌｕ	２２	２１．８７	５％以上
Ｇｌｙ	４４	４５．３２	５％以上
Ａｌａ	１７	１６．４６	５％以上
Ｖａｌ	１８	除外	－
Ｍｅｔ	５	４．６９	５～１０％以内
Ｉｌｅ	８	８．２２	５％以上
Ｌｅｕ	１５	１５．７９	５～１０％以内
Ｎｏｒｌｅｕ標準品	０		－
Ｔｙｒ	１４	１４．６４	５％以上
Ｐｈｅ	７	６．８９	５％以上
Ｈｉｓ	３	３．０７	５％以上
Ｌｙｓ	１２	１２．００	５％以上
Ａｒｇ	５	４．８９	５％以上
Ｐｒｏ	０	除外	－
Ｔｒｐ	８	８	（未決定）
合計	２５９	残基	
			２回実行の平均
全試料	０．２７１	ナノモル	０．２７
	７．６５	ｕｇ	７．６２
濃度	１８．１０	ナノモル／ｍｌ	１８．０３
	５０９．６９	ｕｇ／ｍｌ	５０７．７０
Ｐ５Ｃ５			
ナノモル	２．１９８０	２．２２１１	２．２１
ＤＡＲ	８．１７		

【０４５１】

【表１７】

試料：	ＴＣＴ－Ｐ５Ｃ５（２）	表１１Ｂ	
予想された値に対する測定されたモル比の整数適応			
	予測された		適応の近さ
アミノ酸	値	観測値	予測された値に対する
Ｃｙｓ	６	除外	－
Ａｓｐ	１５	１５．９９	５～１０％以内
Ｔｈｒ	１４	１４．２０	５％以上
Ｓｅｒ	４６	４３．５５	５～１０％以内
Ｇｌｕ	２２	２１．７９	５％以上
Ｇｌｙ	４４	４５．１１	５％以上
Ａｌａ	１７	１６．５８	５％以上
Ｖａｌ	１８	除外	－
Ｍｅｔ	５	除外	－
Ｉｌｅ	８	８．１５	５％以上
Ｌｅｕ	１５	１５．７４	５％以上
Ｎｏｒｌｅｕ標準品	０		－
Ｔｙｒ	１４	１４．１６	５％以上
Ｐｈｅ	７	６．７４	５％以上
Ｈｉｓ	３	３．２０	５～１０％以内
Ｌｙｓ	１２	１１．９１	５％以上
Ａｒｇ	５	４．８８	５％以上
Ｐｒｏ	０	０．００	－
Ｔｒｐ	８	８	（未決定）
合計	２５９	残基	
			２回実行の平均
全試料	０．２２５	ナノモル	０．２３
	６．３３	ｕｇ	６．５４
濃度	１４．９８	ナノモル／ｍｌ	１５．４９
	４２１．８２	ｕｇ／ｍｌ	４３６．１４
Ｐ５Ｃ５			
ナノモル	２．７７４２	２．６５３４	２．７１
ＤＡＲ	１１．６８		

表１１Ａ＆Ｂ．実施例３１Ｄで使用したｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５（化合物７１）のＡＡＡによるＤＡＲ

【０４５２】

（Ｅ）ＩｇＧ系ＡＤＣと比較したｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣの細胞致死効力

ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５及びトラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣを作製し、上に記載されるように特徴付け（実施例３１Ｂ＆３１Ｃ）、これらは前と類似したＤＡＲを有した。ＳＫＢｒ３、ヒト乳癌細胞株、高ＨＥＲ２発現レベル、１つの細胞当たり最大１，０００，０００個の受容体［Ｌａｚａｒ　ＧＡ，ｅｔ　ａｌ　Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ．２００６，１０３：４００５－１０］を、加湿雰囲気下、３７℃、５％のCO_2で、ＤＭＥＭ中で成長させた。培養密度が７０～８０％のとき、細胞をＰＢＳで洗浄し（２ｘ１０ｍｌ）、トリプシンで５～７分間インキュベートした。完全培地を添加し、細胞をピペット操作によって再懸濁させた。細胞を遠心分離によって回収し（２ｍｉｎ、２０００ｒｐｍ）、上清を廃棄し、細胞を完全ＤＭＥＭ（５ｍｌ）中で再懸濁させた。次いで、細胞を、血球計算器を使用して計数し、適切に希釈した。これらを、接合因子を使用して４５００個の細胞／ウェル（２００μｌ）でプレーティングし、加湿雰囲気下、３７℃、５％のCO_2で一晩インキュベートした。Ｕ８７は、非ＨＥＲ２発現膠芽腫細胞株であり、類似した手段で成長させ、１０００個細胞／ウェルでプレーティングした。

【０４５３】

細胞を、完全培地中で希釈した様々なＡＤＣに、加湿雰囲気下、３７℃、５％のCO_2で９６時間、暴露させた。細胞生存率を、製造業者の使用説明書に従って、Ｐｒｏｍｅｇａ　Ａｑｕｅｏｕｓ　Ｃｅｌｌ－ｔｉｔｒｅ－９６（登録商標）ａｑｕｅｏｕｓ　ｏｎｅ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ細胞増殖キットを使用して測定した。簡潔に、この培地を除去し、ＭＴＳ試薬と事前に合わせた１００μｌの完全フェノールレッド不含の培地を細胞に添加した（１００μｌの培地当たり２０μｌの試薬）。プレートを、暗中（５％のCO_2、３７℃）での２時間のインキュベーションの後、４９０ｎｍでＥＬＩＳＡプレートリーダーによって読み取った。

【０４５４】

データ（吸収単位）を、１００％の細胞生存として非治療対照を、及び１００％の細胞死としてＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００対照を使用することによって、細胞生存％に変換した。後者の平均吸収値を、好適な基準値を得るために、すべての残りのデータから減じた。平均を生存に変換し、標準誤差値を（細胞生存％として）各ｎ値について得た。データをプロットし、ＳｉｇｍａＰｌｏｔ　１１．０を使用して、等式$y = y_0 + a/(1 + (x/x_0)b)$を使用した用量反応シグモイドロジスティック３－パラメータ曲線に適合させ、式中、$x_0 = IC50$、及び$x_0 > 0$、及び$a = 100$である。実験を、試験した各化合物に対して少なくとも３回反復し、一組のデータまたはデータの平均をプロットし、適合させて、用量反応曲線を得た。

【０４５５】

データ（図３１～３３、表１２）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＤＣが中程度のｎＭ効力でＨＥＲ２発現細胞に対して特異的に細胞毒性であることを示す。遊離薬物及びは、劣った細胞浸透性に起因して、そのままでは低効力を有する。より高いＤＡＲ　ＡＤＣは、結合活性が失われる点まで、より効き目がある。

【０４５６】

【表１８】

表１２、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）＆トラスツズマブＰ５Ｃ５　ＡＤＣ（化合物５及び７１）の細胞致死効力の要約

試料	ＳＫＢｒ３細胞（ＨＥＲ２＋＋＋）		Ｕ８７細胞（ＨＥＲ２－）	
	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｎＭ	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｎＭ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、ＤＡＲ＝５	１．３３±０．１	４７．５±０．３６	－	－
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、ＤＡＲ＝８	０．８±０．１	２８±０．３６	－	－
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、ＤＡＲ＝１２	５．０１±１．９	１７８．６±６８	１００	３５７０
トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５、ＤＡＲ＝５	０．０７±０．０１	２．５±０．４	－	－
トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５、ＤＡＲ＝６	０．０２±０．００４	０．７±０．１４	－	－
遊離Ｐ５Ｃ５（酸）薬物	不適用	２２００±４００	不適用	７３００±９００

【０４５７】

実施例３２－複数のよく分散した表面リジン残基を有する単鎖Ｆｖ抗体断片上への、他のペイロード（カンプトテシン、パクリタキセル、ＭＭＡＥ、マイタンシン）誘導体の生体複合化

カンプトテシン

カンプトテシン－ＮＨＳエステル（化合物１９）の水溶性誘導体をｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体を得た。反応を、低、中、及び高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御した。最初に、純粋な単離されたカンプトテシン－ＮＨＳの加水分解速度を、様々な緩衝液条件で決定した。適切な加水分解速度を提供した条件、すなわちＮＨＳがリジンと反応する前にＮＨＳが酸へと加水分解するように早すぎず、反応が完了するまでに時間がかかりすぎるように緩徐すぎない。考慮に入れた他の要因は、緩衝液／ｐＨ／有機溶媒中での抗体の安定性、緩衝液中での薬物の安定性及び薬物の濃度であった。後者は、重要なパラメータであり、溶液中の薬物が濃縮されればされる程、加水分解速度がどんどん減少する。したがって、濃度は、加水分解の効率的な速度のために制御される必要がある。確認及び進められた条件は、以下であった。

【０４５８】

・緩衝液－ｐＨ８．８のＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液と、２０％のＤＭＳＯ及び３０％グリセロール、
・温度－２５℃）
・混合条件－Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ、
・１ｍｇ／ｍｌでの抗体、
・カンプトテシン－ＮＨＳ－８当量の添加部分、及び
・ＮＨＳ薬物添加速度－７０～９０分に１回。

【０４５９】

典型的に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで解凍し、次いで抗体アリコートの温度を緩徐に２０℃に上昇させた。アリコートを沈降させて、あらゆる析出物を回収した後で使用した。

【０４６０】
カンプトテシン－ＮＨＳ（化合物１９）の１００ｍＭの保存溶液を、無水の濾過済みＤＭＳＯ中で調合した。あらゆる析出物を遠心分離によって回収した。重炭酸塩緩衝液ｐＨ８．８を、エッペンドルフマイクロチューブ中で濾過済みＤＭＳＯ及びグリセロールと合わせ、緩衝液を４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで平衡化し、次いで、１０００ｒｐｍで混合しながら、温度を２０℃に上昇させた。抗体を添加し、１０分間さらに平衡化した（２０℃、１０００ｒｐｍ）後で、カンプトテシン－ＮＨＳの添加を開始した。
【０４６１】
これは、８当量のＮＨＳ薬物ＤＭＳＯストックを添加し、７０分毎に反転させて混合した後で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に戻し、２５℃、１０００ｒｐｍで混合することによって行った。使用される当量の総数は、必要なＤＡＲに左右された。試料を、最後の添加後、さらに2時間ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に置いたままにした。次いで、試料を遠心分離（２．５分、１１ｋｒｐｍ）によって回収した。唯一の目に見える析出は、最高数の薬物当量を有する試料中であり、非常に少なかった。
【０４６２】
すべての試料を最初に、１０％のＩＰＡ／ＰＢＳで事前に平衡化したＺｅｂａカラム（Ｐｉｅｒｃｅ）を通過させた後で、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ上で２０％のＩＰＡ／ＰＢＳ　ｐＨ７、２５℃でさらに精製し、上述のＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ、ＵＶ／Ｖｉｓ分光法、及び質量分析法によって分析した。
【０４６３】
複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、ＴｏｓｏｈＴＳＫＧｅｌ　Ｇ２０００Ｗｘｌカラムを使用して、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。ＳｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある保持時間を有する。複合体はすべて、より早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量を示すが、主に単量体ピークとしてであり、凝集をほとんど示さないか、または全くを示さない。
【０４６４】
質量分光分析を、ＳＧＳ　Ｍ－Ｓｃａｎによって行った。複合体、及びＳｃＦｖ－ＴＣＴ（対照）を両方のＭＡＬＤＩ－ＭＳによって分析し、次いでＬＣ－ＭＳによってさらに分析した。すべての試料が、よく分解されたピークを生じさせた。
【０４６５】
パクリタキセル
パクリタキセル－ＮＨＳエステル（化合物４４）の水溶性誘導体を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化して、様々なＤＡＲを有する複合体を得た。反応を、低、中、及び高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御した。最初に、純粋な単離されたパクリタキセル－ＮＨＳの加水分解速度を、様々な緩衝液条件で決定した。適切な加水分解速度を提供した条件、すなわちＮＨＳがリジンと反応する前にＮＨＳが酸へと加水分解するように早すぎず、反応が完了するまでに時間がかかりすぎるように緩徐すぎない。考慮に入れた他の要因は、緩衝液／ｐＨ／有機溶媒中での抗体の安定性、緩衝液中での薬物の安定性及び薬物の濃度であった。後者は、重要なパラメータであり、溶液中の薬物が濃縮されればされる程、加水分解速度がどんどん減少する。したがって、濃度は、加水分解の効率的な速度のために制御される必要がある。確認及び進められた条件は、以下であった。
【０４６６】
・緩衝液－ｐＨ８．８のＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液と、２０％のＤＭＳＯ及び３０％グリセロール、
・温度－２５℃、
・混合条件－Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ、
・１ｍｇ／ｍｌでの抗体、
・パクリタキセル－ＮＨＳ－８当量の添加部分、
・ＮＨＳ薬物添加速度－７０～９０分に１回。

【０４６７】
典型的に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで解凍し、次いで抗体アリコートの温度を緩徐に２０℃に上昇させた。アリコートを沈降させて、あらゆる析出物を回収した後で使用した。
【０４６８】
パクリタキセル－ＮＨＳの１００ｍＭの保存溶液を、無水の濾過済みＤＭＳＯ中で調合した。あらゆる析出物を遠心分離によって回収した。重炭酸塩緩衝液ｐＨ８．８を、エッペンドルフマイクロチューブ中で濾過済みＤＭＳＯ及びグリセロールと合わせ、緩衝液を４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで平衡化し、次いで、１０００ｒｐｍで混合しながら、温度を２０℃に上昇させた。抗体を添加し、１０分間さらに平衡化した（２０℃、１０００ｒｐｍ）後で、パクリタキセル－ＮＨＳの添加を開始した。
【０４６９】
これは、８当量のＮＨＳ薬物ＤＭＳＯストックを添加し、７０分毎に反転させて混合した後で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に戻し、２５℃、１０００ｒｐｍで混合することによって行った。使用される当量の総数は、必要なＤＡＲに左右された。試料を、最後の添加後、さらに2時間ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に置いたままにした。次いで、試料を遠心分離（２．５分、１１ｋｒｐｍ）によって回収した。唯一の目に見える析出は、最高数の薬物当量を有する試料中であり、非常に少なかった。
【０４７０】
すべての試料を最初に、１０％のＩＰＡ／ＰＢＳで事前に平衡化したＺｅｂａカラム（Ｐｉｅｒｃｅ）を通過させた後で、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ上で２０％のＩＰＡ／ＰＢＳ　ｐＨ７、２５℃でさらに精製し、上述のＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ、ＵＶ／Ｖｉｓ分光法、及び質量分析法によって分析した。
【０４７１】
複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、Ｔｏｓｏｈ　ＴＳＫＧｅｌ　Ｇ２０００Ｗｘｌカラムを使用して、ＨＰＬＣ－サイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。ＳｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある保持時間を有する。複合体はすべて、より早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量を示すが、主に単量体ピークとしてであり、凝集をほとんど示さないか、または全くを示さない。
【０４７２】
質量分光分析を、ＳＧＳ　Ｍ－Ｓｃａｎによって行った。複合体、及びＳｃＦｖ－ＴＣＴ（対照）を両方のＭＡＬＤＩ－ＭＳによって分析し、次いでＬＣ－ＭＳによってさらに分析した。すべての試料が、よく分解されたピークを生じさせた。
【０４７３】
ＭＭＡＥ
ＭＭＡＥ－ＮＨＳエステルの水溶性誘導体をｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体を得た。反応を、低、中、及び高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御する。最初に、純粋な単離されたＭＭＡＥ－ＮＨＳの加水分解速度を、様々な緩衝液条件で決定した。適切な加水分解速度を提供した条件、すなわちＮＨＳがリジンと反応する前にＮＨＳが酸へと加水分解するように早すぎず、反応が完了するまでに時間がかかりすぎるように緩徐すぎない。考慮に入れた他の要因は、緩衝液／ｐＨ／有機溶媒中での抗体の安定性、緩衝液中での薬物の安定性及び薬物の濃度であった。後者は、重要なパラメータであり、溶液中の薬物が濃縮されればされる程、加水分解速度がどんどん減少する。したがって、濃度は、加水分解の効率的な速度のために制御される必要がある。確認及び進められた条件は、以下であった。
【０４７４】
・緩衝液－ｐＨ８．８のＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液と、２０％のＤＭＳＯ及び３０％グリセロール、
・温度－２５℃、

・混合条件－Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ、
・１ｍｇ／ｍｌでの抗体、
・ＭＭＡＥ－ＮＨＳ－８当量の添加部分、及び
・ＮＨＳ薬物添加速度－７０～９０分に１回。

【０４７５】

典型的に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで解凍し、次いで抗体アリコートの温度を緩徐に２０℃に上昇させた。アリコートを沈降させて、あらゆる析出物を回収した後で使用する。

【０４７６】

ＭＭＡＥ－ＮＨＳの１００ｍＭの保存溶液を、無水の濾過済みＤＭＳＯ中で調合した。あらゆる析出物を遠心分離によって回収した。重炭酸塩緩衝液ｐＨ８．８を、エッペンドルフマイクロチューブ中で濾過済みＤＭＳＯ及びグリセロールと合わせ、緩衝液を４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで平衡化し、次いで、１０００ｒｐｍで混合しながら、温度を２０℃に上昇させる）。抗体を添加し、１０分間さらに平衡化した（２０℃、１０００ｒｐｍ）後で、ＭＭＡＥ－ＮＨＳの添加を開始する。

【０４７７】

これは、８当量のＮＨＳ薬物ＤＭＳＯストックを添加し、７０分毎に反転させて混合した後で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に戻し、２５℃、１０００ｒｐｍで混合することによって行う。使用される当量の総数は、必要なＤＡＲに左右された。試料を、最後の添加後、さらに2時間ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に置いたままにする。次いで、試料を遠心分離によって回収する（２．５分、１１ｋｒｐｍ）。唯一の目に見える析出は、最高数の薬物当量を有する試料中であり、それは、非常に少なかった。

【０４７８】

すべての試料を最初に、１０％のＩＰＡ／ＰＢＳで事前に平衡化したＺｅｂａカラム（Ｐｉｅｒｃｅ）を通過させた後で、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ上で２０％のＩＰＡ／ＰＢＳ　ｐＨ７、２５℃でさらに精製し、上述のＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ、ＵＶ／Ｖｉｓ分光法、及び質量分析法によって分析する。

【０４７９】

複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、ＴｏｓｏｈＴＳＫＧｅｌ　Ｇ２０００Ｗｘｌカラムを使用して、ＨＰＬＣ－サイズ排除クロマトグラフィーによって分析する。ＳｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある保持時間を有する。複合体はすべて、より早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量だが、主に単量体ピークとして示し、凝集をほとんど示さないか、または全く示さない。

【０４８０】

質量分光分析を、ＳＧＳ　Ｍ－Ｓｃａｎによって行う。複合体、及びＳｃＦｖ－ＴＣＴ（対照）を両方のＭＡＬＤＩ－ＭＳによって分析し、次いでＬＣ－ＭＳによってさらに分析する。すべての試料が、よく分解されたピークを生じさせる。

【０４８１】

マイタンシン（ＤＭ４）

マイタンシンＤＭ４－ＮＨＳエステル（化合物６８）水溶性誘導体をｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体を得た（化合物７４）。反応を、低、中、及び高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御する。最初に、純粋な単離されたマイタンシンＤＭ４－ＮＨＳの加水分解速度を、様々な緩衝液条件で決定した。適切な加水分解速度を提供した条件、すなわちＮＨＳがリジンと反応する前にＮＨＳが酸へと加水分解するように早すぎず、反応が完了するまでに時間がかかりすぎるように緩徐すぎない。考慮に入れた他の要因は、緩衝液／ｐＨ／有機溶媒中での抗体の安定性、緩衝液中での薬物の安定性及び薬物の濃度であった。後者は、重要なパラメータであり、溶液中の薬物が濃縮されればされる程、加水分解速度がどんどん減少する。したがって、濃度は、加水分解の効率的な速度のために制御される必要がある。確認及び進められた条件は、以下であった

。

【０４８２】

緩衝液（ｐＨ８．８のＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液と、２０％のＤＭＳＯ及び３０％グリセロール）、温度（２５℃）、混合条件（Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ）、１ｍｇ／ｍｌでの抗体、マイタンシンＤＭ４－ＮＨＳ（８当量の添加部分）、ＮＨＳ薬物添加速度（７０～９０分毎に１回）。

【０４８３】

典型的に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで解凍し、次いで抗体アリコートの温度を緩徐に２０℃に上昇させる。沈降させて、あらゆる析出物を回収した後で使用する。

【０４８４】

マイタンシンＤＭ４－ＮＨＳの１００ｍＭの保存溶液を、無水の濾過済みＤＭＳＯ中で調合した。あらゆる析出物を遠心分離によって回収した。重炭酸塩緩衝液ｐＨ８．８を、エッペンドルフマイクロチューブ内へと濾過済みＤＭＳＯ及びグリセロールと合わせ、緩衝液を４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで平衡化し、次いで、１０００ｒｐｍで混合しながら、温度を２０℃に上昇させる。抗体を添加し、１０分間さらに平衡化した（２０℃、１０００ｒｐｍ）後で、マイタンシンＤＭ４－ＮＨＳの添加を開始した。

【０４８５】

これは、８当量のＮＨＳ薬物ＤＭＳＯストックを添加し、７０分毎に反転させて混合した後で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に戻し、２５℃、１０００ｒｐｍで混合することによって行う。使用される当量の総数は、必要なＤＡＲに左右された。試料を、最後の添加後、さらに2時間ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に置いたままにする。次いで、試料を遠心分離によって回収する（２．５分、１１ｋｒｐｍ）。唯一の目に見える析出は、最高数の薬物当量を有する試料中であり、それは、非常に少なかった。

【０４８６】

すべての試料を最初に、１０％のＩＰＡ／ＰＢＳで事前に平衡化したＺｅｂａカラム（Ｐｉｅｒｃｅ）を通過させた後で、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ上で２０％のＩＰＡ／ＰＢＳ　ｐＨ７、２５℃でさらに精製し、上述のＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ、ＵＶ／Ｖｉｓ分光法、及び質量分析法によって分析する。

【０４８７】

複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、ＴｏｓｏｈＴＳＫＧｅｌ　Ｇ２０００Ｗｘｌカラムを使用して、ＨＰＬＣ－サイズ排除クロマトグラフィーによって分析する。ＳｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある保持時間を有する。複合体はすべて、より早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量だが、主に単量体ピークとして示し、凝集をほとんど示さないか、または全く示さない。

【０４８８】

質量分光分析を、ＳＧＳ　Ｍ－Ｓｃａｎによって行う。複合体、及びＳｃＦｖ－ＴＣＴ（対照）を両方のＭＡＬＤＩ－ＭＳによって分析し、次いでＬＣ－ＭＳによってさらに分析する。すべての試料が、よく分解されたピークを生じさせる。

【０４８９】

マイタンシン（ＤＭ１）、２工程法

ＤＭ１薬物を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体を得た（化合物７５）。反応を、低、中、及び高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御した。この手順を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を３２当量のＳＰＤＰで処理して、その後、１１５当量のＴＣＥＰで試料を還元して行う。次いで、還元、精製、及び定量化した試料をＤＭ１に複合化する。ＤＭ１を、（脱気したＰＢＳ　ｐＨ７／１ｍＭのＥＤＴＡ／２０％のＤＭＳＯ／１０％のプロピレングリコール中の）抗体試料に、各々２当量で添加した。試料を、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで（２５℃、１０００ｒｐｍ）、続いて４℃（１０００ｒｐｍ）で一晩、インキュベートした。遠心分離によって試料を回収し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル

及びＵＶ／Ｖｉｓ分光法によって分析した。

【０４９０】

すべての試料を最初に、１０％のＩＰＡ／ＰＢＳで事前に平衡化したＺｅｂａカラム（Ｐｉｅｒｃｅ）を通過させた後で、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ上で２０％のＩＰＡ／ＰＢＳ　ｐＨ７、２５℃でさらに精製し、上述のＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ、ＵＶ／Ｖｉｓ分光法、及び質量分析法によって分析した。

【０４９１】

複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、ＴｏｓｏｈＴＳＫＧｅｌ　Ｇ２０００Ｗｘｌカラムを使用して、ＨＰＬＣ－サイズ排除クロマトグラフィーによって分析する。ＳｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある保持時間を有する。複合体はすべて、より早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量だが、主に単量体ピークとして示し、凝集をほとんど示さないか、または全く示さない。

【０４９２】

ピロロベンゾジアゼピン複合化、２工程法

ＰＢＤ誘導体である６－マレイミドカプロイル－ＳＧＤ－１９１０（化合物６７）をｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体を得た。反応を、低、中、及び高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御する。この手順を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を３２当量のＳＰＤＰで処理して、その後、１１５当量のＴＣＥＰで試料を還元して行う。次いで、還元、精製、及び定量化した試料を、６－マレイミドカプロイル－ＳＧＤ－１９１０に複合化する。６－マレイミドカプロイル－ＳＧＤ－１９１０を、（脱気したＰＢＳ　ｐＨ７／１ｍＭのＥＤＴＡ／２０％のＤＭＳＯ／２０％のプロピレングリコール中の）抗体試料に、各々２当量で添加した。試料を、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで３時間（２５℃、１０００ｒｐｍ）、続いて４℃（１０００ｒｐｍ）で一晩インキュベートした。遠心分離によって試料を回収し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル及びＵＶ／Ｖｉｓ分光法によって分析した。

【０４９３】

すべての試料を最初に、１０％のＩＰＡ／ＰＢＳで事前に平衡化したＺｅｂａカラム（Ｐｉｅｒｃｅ）を通過させた後で、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ上で２０％のＩＰＡ／ＰＢＳ　ｐＨ７、２５℃でさらに精製し、上述のＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ、ＵＶ／Ｖｉｓ分光法、及び質量分析法によって分析した。

【０４９４】

複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、ＴｏｓｏｈＴＳＫＧｅｌ　Ｇ２０００Ｗｘｌカラムを使用して、ＨＰＬＣ－サイズ排除クロマトグラフィーによって分析する。ＳｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある保持時間を有する。複合体はすべて、より早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量だが、主に単量体ピークとして示し、凝集をほとんど示さないか、または全く示さない。

【０４９５】

ＭＭＡＥ複合化、２工程法

ＭＭＡＥ誘導体である６－マレイミドカプロイル－ＭＭＡＥ（化合物３７）をｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体を得た。反応を、低、中、及び高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御する。この手順を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を３２当量のＳＰＤＰで処理して、その後、１１５当量のＴＣＥＰで試料を還元して行った。次いで、還元、精製、及び定量化した試料を、６－マレイミドカプロイル－ＭＭＡＥに複合化した。６－マレイミドカプロイル－ＭＭＡＥを、（脱気したＰＢＳ　ｐＨ７／１ｍＭのＥＤＴＡ／２０％のＤＭＳＯ中の）抗体試料に、各々２当量で添加した。試料を、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで３時間（２５℃、１０００ｒｐｍ）、続いて４℃（１０００ｒｐｍ）で一晩インキュベートする。遠心分離によって試料を回収し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル及びＵＶ／Ｖｉｓ分光法によって分析した。

【０４９６】
すべての試料を最初に、１０％のＩＰＡ／ＰＢＳで事前に平衡化したＺｅｂａカラム（Ｐｉｅｒｃｅ）を通過させた後で、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ上で２０％のＩＰＡ／ＰＢＳ　ｐＨ７、２５℃でさらに精製し、上述のＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ、ＵＶ／Ｖｉｓ分光法、及び質量分析法によって分析する。
【０４９７】
複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、ＴｏｓｏｈＴＳＫＧｅｌ　Ｇ２０００Ｗｘｌカラムを使用して、ＨＰＬＣ－サイズ排除クロマトグラフィーによって分析する。ＳｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある保持時間を有する。複合体はすべて、より早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量だが、主に単量体ピークとして示し、凝集をほとんど示さないか、または全く示さなかった。
【０４９８】
デュオカルマイシン複合体
ｓｅｃｏ　ＣＢＩ－β－グルクロニド－ＮＨＳエステル（化合物６５）の水溶性誘導体をｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体を得た。反応を、低、中、及び高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御する。最初に、純粋な単離されたｓｅｃｏ　ＣＢＩ－β－Ｇｌｕｃｕｎｏｒｉｄｅ－ＮＨＳエステルの加水分解速度を、様々な緩衝液条件で決定した。適切な加水分解速度を提供した条件、すなわちＮＨＳがリジンと反応する前にＮＨＳが酸へと加水分解するように早すぎず、反応が完了するまでに時間がかかりすぎるように緩徐すぎない。考慮に入れた他の要因は、緩衝液／ｐＨ／有機溶媒中での抗体の安定性、緩衝液中での薬物の安定性及び薬物の濃度であった。後者は、重要なパラメータであり、溶液中の薬物が濃縮されればされる程、加水分解速度がどんどん減少する。したがって、濃度は、加水分解の効率的な速度のために制御される必要がある。確認及び進められた条件は、以下であった。
【０４９９】
緩衝液（ｐＨ８．８のＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液と、２０％のＤＭＳＯ及び３０％グリセロール）、温度（２５℃）、混合条件（Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ１０００ｒｐｍ）、１ｍｇ／ｍｌでの抗体、ｓｅｃｏ　ＣＢＩ－β－グルクロニド－ＮＨＳエステル（８当量の添加部分）、ＮＨＳ薬物添加速度（７０～９０分毎に１回）。
【０５００】
典型的に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで解凍し、次いで抗体アリコートの温度を緩徐に２０℃に上昇させる。沈降させて、あらゆる析出物を回収した後で使用する。
【０５０１】
ｓｅｃｏ　ＣＢＩ－β－グルクロニド－ＮＨＳエステルの１００ｍＭの保存溶液を、無水の濾過済みＤＭＳＯ中で調合した。あらゆる析出物を遠心分離によって回収した。重炭酸塩緩衝液ｐＨ８．８を、エッペンドルフマイクロチューブ内へと濾過済みＤＭＳＯ及びグリセロールと合わせ、緩衝液を４℃で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで平衡化し、次いで、１０００ｒｐｍで混合しながら、温度を２０℃に上昇させた。抗体を添加し、１０分間さらに平衡化した（２０℃、１０００ｒｐｍ）後で、ｓｅｃｏ　ＣＢＩ－β－グルクロニド－ＮＨＳエステルの添加を開始する。
【０５０２】
これは、８当量のＮＨＳ薬物ＤＭＳＯストックを添加し、７０分毎に反転させて混合した後で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に戻し、２５℃、１０００ｒｐｍで混合することによって行う。使用される当量の総数は、必要なＤＡＲに左右された。試料を、最後の添加後、さらに2時間ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に置いたままにする。次いで、試料を遠心分離（２．５分、１１ｋｒｐｍ）によって回収した。唯一の目に見える析出は、最高数の薬物当量を有する試料中であり、非常に少なかった。
【０５０３】

すべての試料を最初に、１０％のＩＰＡ／ＰＢＳで事前に平衡化したＺｅｂａカラム（Ｐｉｅｒｃｅ）を通過させた後で、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ上で２０％のＩＰＡ／ＰＢＳ　ｐＨ７、２５℃でさらに精製し、上述のＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ、ＵＶ／Ｖｉｓ分光法、及び質量分析法によって分析する。

【０５０４】

複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、ＴｏｓｏｈＴＳＫＧｅｌ　Ｇ２０００Ｗｘｌカラムを使用して、ＨＰＬＣ－サイズ排除クロマトグラフィーによって分析する。ＳｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある保持時間を有する。複合体はすべて、より早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量だが、主に単量体ピークとして示し、凝集をほとんど示さないか、または全く示さなかった。

【０５０５】

実施例３３－抗セマドチン薬物モノクローナル抗体を産生させ、ｓｃＦｖ－セマドチンＡＤＣの検出で使用する

キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）－セマドチン複合体を、モル過剰でセマドチン－ＮＨＳ（化合物２）を１ｍｇ／ｍｌのＫＬＨに複合化することによって生成し、脱塩によって精製した。

【０５０６】

４匹のマウスを、開発業務受託機関であるＧｅｎｅｒｏｎ　Ｌｔｄによる標準日程［Ｒｅｆ：Ｌａｎｅ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　ｂｏｏｋ］を使用して、免疫化した。抗血清を、ＥＬＩＳＡによってｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン及び複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を試験し、４匹すべてが、同じように反応した（図３４）。

【０５０７】

マウス４を使用して、雑種細胞のパネルを作製し、これらのうち１１個のクローンが強力なバインダーであると識別された。これらの１１個のクローンを、ＥＬＩＳＡによって順位付けをし、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン複合体に結合するが、遊離構成成分には結合しない能力に関しても、ウエスタンブロットによって試験した。

【０５０８】

ＥＬＩＳＡによって、クローン１１（ＧＡ６）が、最良のバインダーのようである一方で、クローン９（１Ｅ１１）も強く遂行した。クローン５、３、及び６も、検出可能だが、より弱い活性を示した。クローン７及び８は、非常に弱く、クローン１、２、４、及び１０は、非反応性のようであった（図３５）。

【０５０９】

雑種細胞の条件培地を、ウエスタンブロットによって、発現レベル（図３６）及びｓｃＦｖ－セマドチン（図３７）に対する免疫反応性について試験した。クローン３、９、１１が、すべて良好な発現物であるのに対し、クローン２、４、５、６、７、１０は、低／弱い発現物であった。

【０５１０】

強力な結合がクローン５、９、及び１１に見られ、目で見ることができないより高いＭＷ種を認めた。クローン３及び６は次に最も強力であり、可能性のある分解生成物を認め、クローン７＆８は、より弱かった。非常に弱い結合／結合なしは、クローン１、２、４及び１０に認められた。

【０５１１】

クローン９（１Ｅ１１）を選択した。雑種細胞を、増やし、培養し、純粋Ｍａｂを、タンパク質Ａクロマトグラフィーによって調製した。

【０５１２】

実施例３４－ｓｃＦｖ－セマドチン複合体の薬物動態プロファイル及び血中クリアランスの測定

（Ａ）放射アッセイ

リジン複合化のために最適化されたｓｃＦｖを、実施例２７または２８に記載されるよ

うに調製し、（実施例３１に記載されるように）ＮＨＳ由来のセマドチン薬物（化合物２）に複合化した。平均ＤＡＲは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びＩＥＦゲルで決定して、ｓｃＦｖ－ＴＣＴ－セマドチン－１について５であり、ｓｃＦｖ－ＴＣＴ－セマドチン－２について４であった。これを、製造業者の使用説明書に従って、ナトリウム－１２５－ヨウ化物（ＭＰ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）及びＩｏｄｏｇｅｎ（登録商標）チューブ（Ｔｈｅｒｍｏ）を使用して、ヨウ素－１２５で放射標識した。

【０５１３】

１０マイクログラムの放射標識したｓｃＦｖまたは複合体を、１時点当たり４匹のＢＡＬＢ／ｃメスマウス（Ｈａｒｌａｎ　ＵＫ）の群の尾静脈内へ、静脈内注射した。各時点で、血液を４マウスから末端麻酔下で心臓穿刺によって採取して、脾臓を解剖によって取り除いた。血液及び脾臓組織からの放射能を、ガンマ計数器を使用して測定し、注射した用量と比較し、組織重量に対して補正した。１グラムの組織当たりの注射した用量のパーセンテージを、経時的にプロットし、薬物動態パラメータを双指数関数クリアランスモデルに適合させることによって決定した。インビボ血中クリアランス薬物動態を研究するために、データ値を、ＳｉｇｍａＰｌｏｔを使用してクリアランスの２コンパートメントの静脈内モデルに一致する等式に適合させ、これは、単回静脈内投与の双指数関数クリアランス相、分布相、及び排出相を考慮に入れる。これは、指数関数形崩壊の二重４パラメータ等式ｙ＝ａｅ－ｂｘ＋ｃｅ－ｄｘによって説明され、分布相クリアランス率（ｔ１／２アルファ）は、ｌｎ　２／ｂによって決定され、排出クリアランス率（ｔ１／２ベータ）は、ｌｎ　２／ｄによって決定される。

【０５１４】

ｓｃＦｖ薬物複合体の血中クリアランス（図３８）は、未修飾ｓｃＦｖ（表１３）の血中クリアランスと類似していた。ｓｃＦｖ薬物複合体の脾臓取り込みは、未修飾ｓｃＦｖ（図３９）の脾臓取り込みと大幅に異ならなかった。これらのデータは、両方共に、本明細書に記載される複合化技法が、あらゆる有害な凝集を引き起こさないことを示す。

【０５１５】

【表１９】

表１３	１２５－Ｉ標識化による総タンパク質レベル	
	$t_{1/2}$（アルファ）時間	$t_{1/2}$（ベータ）時間
ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）	０．４	４．３
ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン１（高ＤＡＲ）	０．３	６．６
ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン２（中ＤＡＲ）	０．３	５．５

表１３．セマドチン系複合体（化合物６９）のマウスにおける薬物動態パラメータ、血中クリアランス。

【０５１６】

（Ｂ）直接的ＡＤＣ／ｓｃＦｖ検出アッセイ

抗セマドチンＭＡｂを産生させ（実施例３３）、マウス血液中のＡＤＣを観察し、薬物動態特性を決定するために使用した。６～８週齢の正常ＢＡＬＢ／ｃマウスを、使用するまでフィルターがかかったケージ内で給養した。単一バッチの材料（ｓｃＦｖ－ＴＣＴ、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン、ＤＡＲ＝５、または８）を、上述（実施例３１）のように調製し、０．１ｍｇを２０匹のマウスの群内へ注射し、これらのマウスを４時点で屠殺した（１時点当たり５匹のマウスを分析した）。訳０．５ｍＬの全血を心臓穿刺によってＥＤＴＡチューブ内へと除去し、血清を遠心分離によって回収した。血清をＰＢＳ中で適切に希釈し、ＨＥＲ２でコーティングしたマイクロタイタープレート上でＥＬＩＳＡによって分析し（実施例１１Ｄ）、抗Ｔ７タグ（総抗体）または抗セマドチン（全ＡＤＣ）

のいずれかによって検出した。非注射基準試料を使用して、ＡＤＣ／ＳｃＦｖ血液濃度の直接読み出しのための較正曲線を作製した。

【０５１７】

その結果を、総機能的ｓｃＦｖ（図４０）及び総機能的ＡＤＣ（図４１）に関して示す。比較プロットを図４２に示す。

【０５１８】

直接測定したとき、遊離ｓｃＦｖは、小さいサイズに起因する急速な血中クリアランスであった、双指数関数血中クリアランスの典型的なアルファ（分布）及びベータ（排出）相を示した（表１４；Ｃｏｎｓｔａｎｔｉｎｏｕ Ａ，ｅｔ ａｌ （２００９）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ ２０：９２４－３１）。中ＤＡＲ ＡＤＣ（５個の結合した薬物ペイロード）は、組織分布及び排出の両方に関してより緩徐な血中クリアランスを有した。これは、わずかにより大きい分子質量が、細網内皮系を介して急速なクリアランスを引き起こすいずれかの凝集よりもむしろ、より緩徐なクリアランスを引き起こしたことを示唆した。この効果は、より高いＤＡＲ複合体（８個の薬物ペイロード）でさらにより顕著であった。

【０５１９】

全ＡＤＣを測定したとき、類似したパターンが類似した薬物動態パラメータで見られた（表１４）。比較プロットは、これを示す（図４２）。これらのデータは、高負荷でのｓｃＦｖ系ＡＤＣが、低凝集／凝集なし、かつ好ましい可溶性を示す、維持されたか、またはさらにより緩徐な血中クリアランスを有することを示唆する。血液中の滞留は、治療効果を可能にするほど十分に長い。また、総ｓｃＦｖと全ＡＤＣ含有量との間の類似性は、ＡＤＣが安定しており、ｓｃＦｖ構成成分よりも早く分解しないことを示唆する［Ｌｉｎ＆Ｔｉｂｂｉｔｔｓ．Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ（２０１２）２９：２３５４－６６；Ｋａｕｒ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏａｎａｌｙｓｉｓ（２０１３）５：２０１－２２６］。

【０５２０】

【表２０】

	抗ＨＥＲ２結合によって測定した総抗体		抗セマドチン薬物ＥＬＩＳＡによって測定したＡＤＣレベル	
	$t_{1/2}$（アルファ）時間	$t_{1/2}$（ベータ）時間	$t_{1/2}$（アルファ）時間	$t_{1/2}$（ベータ）時間
ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）	０．４	５．２５	不適用	不適用
ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン（高ＤＡＲ＝８）	０．９６	６．８７	０．５３	５．４３
ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン（中ＤＡＲ＝５）	０．５５	６．６５	０．５１	３．９１

表１４．薬物動態データの要約

【０５２１】

実施例３５－ｓｃＦｖ－エリプチシン複合体の薬物動態プロファイル及び血中クリアランスの測定

抗エリプチシンＭＡｂを、上記（たとえば、実施例３３）のように産生させ、マウス血液中のＡＤＣを観察し、薬物動態特性を決定するために使用する。６～８週齢の正常ＢＡＬＢ／ｃマウスを、使用するまでフィルターがかかったケージ内で給養した。単一バッチ

の材料（ｓｃＦｖ－ＴＣＴ、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－エリプチシン、ＤＡＲ＝５、または８）を、上述（化合物２１、実施例２９）のように調製し、０．１ｍｇを２０匹のマウスの群内へ注射し、これらのマウスを４時点で屠殺する（１時点当たり５匹のマウスを分析する）。訳０．５ｍＬの全血を心臓穿刺によってＥＤＴＡチューブ内へと除去し、血清を遠心分離によって回収する。血清をＰＢＳ中で適切に希釈し、ＨＥＲ２でコーティングしたマイクロタイタープレート上でＥＬＩＳＡによって分析し（実施例３１Ｄ）、抗Ｔ７タグ（総抗体）または抗エリプチシン（全ＡＤＣ）のいずれかによって検出する。非注射基準試料を使用して、ＡＤＣ／ＳｃＦｖ血液濃度の直接読み出しのための較正曲線を作製した。

【０５２２】

直接測定したとき、遊離ｓｃＦｖは、小さいサイズに起因する急速な血中クリアランスである、双指数関数血中クリアランスの典型的なアルファ（分布）及びベータ（排出）相を示す（Ｃｏｎｓｔａｎｔｉｎｏｕ Ａ，ｅｔ ａｌ（２００９）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ ２０：９２４－３１）。中ＤＡＲ ＡＤＣ（５個の結合した薬物ペイロード）は、組織分布及び排出の両方に関してより緩徐な血中クリアランスを有する。これは、わずかにより大きい分子質量が、細網内皮系を介して急速なクリアランスを引き起こすいずれかの凝集よりもむしろ、より緩徐なクリアランスを引き起こしたことを示唆した。この効果は、より高いＤＡＲ複合体（８個の薬物ペイロード）でさらにより顕著である。

【０５２３】

実施例３６－ｓｃＦｖ－ドキソルビシン複合体の薬物動態プロファイル及び血中クリアランスの測定

抗ドキソルビシンＭＡｂは、市販されており、マウス血液中のＡＤＣを観察し、薬物動態特性を決定するために使用される。６～８週齢の正常ＢＡＬＢ／ｃマウスを、使用するまでフィルターがかかったケージ内で給養した。単一バッチの材料（ｓｃＦｖ－ＴＣＴ、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ドキソルビシン、ＤＡＲ＝５、または８）を、上述（化合物７２）のように調製し、０．１ｍｇを２０匹のマウスの群内へ注射し、これらのマウスを４時点で屠殺する（１時点当たり５匹のマウスを分析する）。訳０．５ｍＬの全血を心臓穿刺によってＥＤＴＡチューブ内へと除去し、血清を遠心分離によって回収する。血清をＰＢＳ中で適切に希釈し、ＨＥＲ２でコーティングしたマイクロタイタープレート上でＥＬＩＳＡによって分析し（実施例３１Ｄ）、抗Ｔ７タグ（総抗体）または抗ドキソルビシン（全ＡＤＣ）のいずれかによって検出する。非注射基準試料を使用して、ＡＤＣ／ＳｃＦｖ血液濃度の直接読み出しのための較正曲線を作製した。

【０５２４】

直接測定したとき、遊離ｓｃＦｖは、小さいサイズに起因する急速な血中クリアランスである、双指数関数血中クリアランスの典型的なアルファ（分布）及びベータ（排出）相を示す（Ｃｏｎｓｔａｎｔｉｎｏｕ Ａ，ｅｔ ａｌ（２００９）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ ２０：９２４－３１）。中ＤＡＲ ＡＤＣ（５個の結合した薬物ペイロード）は、組織分布及び排出の両方に関してより緩徐な血中クリアランスを有する。これは、わずかにより大きい分子質量が、細網内皮系を介して急速なクリアランスを引き起こすいずれかの凝集よりもむしろ、より緩徐なクリアランスを引き起こしたことを示唆した。この効果は、より高いＤＡＲ複合体（８個の薬物ペイロード）でさらにより顕著である。

【０５２５】

実施例３７－ｓｃＦｖ－ＭＭＡＥ複合体の薬物動態プロファイル及び血中クリアランスの測定

抗ＭＭＡＥ ＭＡｂは、市販されており、マウス血液中のＡＤＣを観察し、薬物動態特性を決定するために使用される。６～８週齢の正常ＢＡＬＢ／ｃマウスを、使用するまでフィルターがかかったケージ内で給養した。単一バッチの材料（ｓｃＦｖ－ＴＣＴ、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＥ、ＤＡＲ＝５、または８）を、上述（実施例３２）のように調

製し、０．１ｍｇを２０匹のマウスの群内へ注射し、これらのマウスを４時点で屠殺する（１時点当たり５匹のマウスを分析する）。訳０．５ｍＬの全血を心臓穿刺によってＥＤＴＡチューブ内へと除去し、血清を遠心分離によって回収する。血清をＰＢＳ中で適切に希釈し、ＨＥＲ２でコーティングしたマイクロタイタープレート上でＥＬＩＳＡによって分析し（実施例３１Ｄ）、抗Ｔ７タグ（総抗体）または抗ＭＭＡＥ（全ＡＤＣ）のいずれかによって検出する。非注射基準試料を使用して、ＡＤＣ／ＳｃＦｖ血液濃度の直接読み出しのための較正曲線を作製した。

【０５２６】

直接測定したとき、遊離ｓｃＦｖは、小さいサイズに起因する急速な血中クリアランスである、双指数関数血中クリアランスの典型的なアルファ（分布）及びベータ（排出）相を示す（Ｃｏｎｓｔａｎｔｉｎｏｕ Ａ，ｅｔ ａｌ（２００９）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ ２０：９２４－３１）。中ＤＡＲ ＡＤＣ（５個の結合した薬物ペイロード）は、組織分布及び排出の両方に関してより緩徐な血中クリアランスを有する。これは、わずかにより大きい分子質量が、細網内皮系を介して急速なクリアランスを引き起こすいずれかの凝集よりもむしろ、より緩徐なクリアランスを引き起こしたことを示唆した。この効果は、より高いＤＡＲ複合体（８個の薬物ペイロード）でさらにより顕著である。

【０５２７】

実施例３８－ｓｃＦｖ－セマドチン複合体の腫瘍取り込み、及び腫瘍対正常細胞の比率の測定

リジン複合化のために最適化されたｓｃＦｖを、実施例２７または２８に記載されるように調製し、（実施例３１に記載されるように）ＮＨＳ由来のセマドチン薬物（化合物２、６９）に複合化する。平均ＤＡＲは、６～１０である。これを、製造業者の使用説明書に従って、ナトリウム－１２５－ヨウ化物（ＭＰ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）及びＩｏｄｏｇｅｎ（登録商標）チューブ（Ｔｈｅｒｍｏ）を使用して、ヨウ素－１２５で放射標識した。

【０５２８】

１０マイクログラムの放射標識したｓｃＦｖまたは複合体を、１時点当たり、適切な標的発現（例えば、ＨＥＲ２発現に対するＳＫＯＶ３）の皮下腫瘍が成長している４匹のＢＡＬＢ／ｃヌードメスマウス（Ｈａｒｌａｎ ＵＫ）の群の尾静脈内へ、静脈内注射した。各時点で、血液を４マウスから末端麻酔下で心臓穿刺によって採取して、腫瘍及び正常臓器を解剖によって取り除く。血液及び組織からの放射能を、ガンマ計数器を使用して測定し、注射した用量と比較し、組織重量に対して補正する。１グラムの組織当たりの注射した用量のパーセンテージを、経時的にプロットする。

【０５２９】

実施例３９－ｓｃＦｖ－エリプチシン複合体の腫瘍取り込み、及び腫瘍対正常細胞の比率の測定

リジン複合化のために最適化されたｓｃＦｖを、実施例２７または２８に記載されるように調製し、（実施例２９に記載されるように）ＮＨＳ由来のエリプチシン薬物（化合物２３、７３）に複合化する。平均ＤＡＲは、６～１０である。これを、製造業者の使用説明書に従って、ナトリウム－１２５－ヨウ化物（ＭＰ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）及びＩｏｄｏｇｅｎ（登録商標）チューブ（Ｔｈｅｒｍｏ）を使用して、ヨウ素－１２５で放射標識した。

【０５３０】

１０マイクログラムの放射標識したｓｃＦｖまたは複合体を、１時点当たり、適切な標的発現（例えば、ＨＥＲ２発現に対するＳＫＯＶ３）の皮下腫瘍が成長している４匹のＢＡＬＢ／ｃヌードメスマウス（Ｈａｒｌａｎ ＵＫ）の群の尾静脈内へ、静脈内注射した。各時点で、血液を４マウスから末端麻酔下で心臓穿刺によって採取して、腫瘍及び正常臓器を解剖によって取り除く。血液及び組織からの放射能を、ガンマ計数器を使用して測定し、注射した用量と比較し、組織重量に対して補正する。１グラムの組織当たりの注射

した用量のパーセンテージを、経時的にプロットする。

【０５３１】

実施例４０－ｓｃＦｖ－ドキソルビシン複合体の腫瘍取り込み、及び腫瘍対正常細胞の比率の測定

リジン複合化のために最適化されたｓｃＦｖを、実施例２７または２８に記載されるように調製し、（実施例３０に記載されるように）ＮＨＳ由来のドキソルビシン薬物（化合物７、７２）に複合化する。平均ＤＡＲは、６～８である。これを、製造業者の使用説明書に従って、ナトリウム－１２５－ヨウ化物（ＭＰ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）及びＩｏｄｏｇｅｎ（登録商標）チューブ（Ｔｈｅｒｍｏ）を使用して、ヨウ素－１２５で放射標識した。

【０５３２】

１０マイクログラムの放射標識したｓｃＦｖまたは複合体を、１時点当たり、適切な標的発現（例えば、ＨＥＲ２発現に対するＳＫＯＶ３）の皮下腫瘍が成長している４匹のＢＡＬＢ／ｃヌードメスマウス（Ｈａｒｌａｎ　ＵＫ）の群の尾静脈内へ、静脈内注射した。各時点で、血液を４マウスから末端麻酔下で心臓穿刺によって採取して、腫瘍及び正常臓器を解剖によって取り除く。血液及び組織からの放射能を、ガンマ計数器を使用して測定し、注射した用量と比較し、組織重量に対して補正する。１グラムの組織当たりの注射した用量のパーセンテージを、経時的にプロットする。

【０５３３】

実施例４１－ｓｃＦｖ－ＭＭＡＥ複合体の腫瘍取り込み、及び腫瘍対正常細胞の比率の測定

リジン複合化のために最適化されたｓｃＦｖを、実施例２７または２８に記載されるように調製し、（実施例３２に記載されるように）ＮＨＳ由来のＭＭＡＥ薬物に複合化する。平均ＤＡＲは、６～１０である。これを、製造業者の使用説明書に従って、ナトリウム－１２５－ヨウ化物（ＭＰ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）及びＩｏｄｏｇｅｎ（登録商標）チューブ（Ｔｈｅｒｍｏ）を使用して、ヨウ素－１２５で放射標識した。

【０５３４】

１０マイクログラムの放射標識したｓｃＦｖまたは複合体を、１時点当たり、適切な標的発現（例えば、ＨＥＲ２発現に対するＳＫＯＶ３）の皮下腫瘍が成長している４匹のＢＡＬＢ／ｃヌードメスマウス（Ｈａｒｌａｎ　ＵＫ）の群の尾静脈内へ、静脈内注射した。各時点で、血液を４マウスから末端麻酔下で心臓穿刺によって採取して、腫瘍及び正常臓器を解剖によって取り除く。血液及び組織からの放射能を、ガンマ計数器を使用して測定し、注射した用量と比較し、組織重量に対して補正する。１グラムの組織当たりの注射した用量のパーセンテージを、経時的にプロットする。

【０５３５】

実施例４２－２つのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣ　ＤＡＲで治療した、ＳＫＢｒ３腫瘍異種移植片を有するヌードマウスにおける腫瘍退縮研究。

【０５３６】

６～８週齢のメスヌードＢＡＬＢ／ｃマウス（Ｈａｒｌａｎ　ＵＫ）を、インビボ研究のために使用した。すべてのインビボ研究を、英国内務省のプロジェクトライセンスＰＰＬ　７０／５８３３下で行った。ヒト腫瘍異種移植を、マウスに５０％のマトリゲル中に最大５００万個のＳＫＢｒ３細胞を含む０．１ｍＬを、左側腹部内へと皮下注射することによって準備した。腫瘍成長を監視し、後続の試験のために必要な３～５ｍｍの直径に達するのに、２～３週間かかった。腫瘍が約１００mm^3のとき、１０ｍｇ／ｋｇ（０．２５ｍｇの総用量）を、５日連続で（実施例３１で調製した化合物７１）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５複合体をＩＶに注射した（総ＡＤＣ用量＝１匹の動物当たり１．２５ｍｇであり、腫瘍の大きさを監視した。腫瘍体積をプロットして、開始体積と比較し（図４３）、腫瘍が再び成長し始めるまで、約１０日の退縮を示す。これは、約１ヶ月の腫瘍成長遅延に相当し、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＤＣが前臨床動物モデルにおいて治療機能を有することを裏付ける。

【０５３７】
実施例４３－ｓｃＦｖ－ＭＭＡＥ複合体の腫瘍治療
６～８週齢のメスヌードＢＡＬＢ／ｃマウス（Ｈａｒｌａｎ　ＵＫ）を、インビボ研究のために使用する。すべてのインビボ研究を、英国内務省のプロジェクトライセンス下で行う。ヒト腫瘍異種移植を、マウスに５０％のマトリゲル中に最大５００万個のＳＫＯＶ３細胞を含む０．１ｍＬを、左側腹部内へと皮下注射することによって準備する。腫瘍成長を監視し、後続の試験のために必要な３～５ｍｍの直径に達するのに、２～３週間かかる。腫瘍が約１００ｍｍ^{3}のとき、１０ｍｇ／ｋｇ（０．２５ｍｇの総用量）を、５日連続で（実施例３２で調製した）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＥ複合体をＩＶに注射する（総ＡＤＣ用量＝１匹の動物当たり１．２５ｍｇであり、腫瘍の大きさを監視した。腫瘍体積をプロットして、開始体積と比較する。
【０５３８】
実施例４４－医薬製剤及び投与。
【０５３９】
本発明のさらなる態様は、薬学的または獣医学的に許容されるアジュバント、希釈剤、または担体を有する混合物中に、本発明の第１の態様に従った化合物を含む医薬製剤を提供する。
【０５４０】
好ましくは、本製剤は、活性成分の１日用量もしくは単位、１日副用量、またはそれらの適切な画分を含む単位投与量である。
【０５４１】
本発明の化合物は、通常、活性成分を含む医薬製剤の形態で、任意選択的に非毒性の有機、もしくは無機、酸、または塩基、付加塩の形態で、薬学的に許容される投薬形態で、経口でまたは任意の非経口経路によって投与される。治療される障害及び患者、ならびに投与の経路に応じて、組成物は、異なる用量で投与され得る。
【０５４２】
ヒト治療において、本発明の化合物は、単独で投与され得るが、一般的に、意図される投与の経路及び標準的薬務に関して選択される好適な薬学的賦形剤、希釈剤、または担体を有する混合物で投与される。
【０５４３】
例えば、本発明の化合物は、即時、遅延、または制御された放出用途のために、香味剤または着色剤を含有してもよい錠剤、カプセル、腔坐剤、エリキシル剤、溶液、または懸濁液の形態で、経口、口腔、または舌下に投与され得る。本発明の化合物は、陰茎海綿体内注射を介して投与されてもよい。
【０５４４】
そのような錠剤は、結晶セルロース、ラクトース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素カルシウム及びグリシン等の賦形剤、デンプン（好ましくは、トウモロコシ、ジャガイモ、またはタピオカデンプン）、デンプングリコール酸ナトリウム、クロスカルメロースナトリウム、及びある特定の複雑ケイ酸塩等の崩壊剤、ならびにポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、ヒドロキシ－プロピルセルロース（ＨＰＣ）、スクロース、ゼラチン、及びアカシア等の造粒バインダーを含んでもよい。さらに、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ベヘン酸グリセリル、及びタルク等の潤滑剤が含まれてもよい。
【０５４５】
同じ種類の固形物組成物も、ゼラチンカプセル中の充填剤として使用されてもよい。この点について好ましい賦形剤には、ラクトース、デンプン、セルロース、乳糖、または高分子量ポリエチレングリコールが含まれる。水性懸濁液及び／またはエリキシル剤に関しては、本発明の化合物は、乳化剤及び／または懸濁化剤と一緒に、ならびに水、エタノール、プロピレングリコール、及びグリセリン等の希釈剤、ならびにそれらの組み合わせと一緒に、様々な甘味剤もしくは香味剤、着色料、または染料と組み合わされてもよい。

【０５４６】
本発明の化合物は、非経口で、例えば、静脈内、動脈内、腹腔内、髄腔内、脳室内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内、または皮下でも投与され得るか、または本発明の化合物は、注入技法によって投与されてもよい。これらは、他の物質、例えば、血液と等張にさせるための十分な塩またはグルコースを含有してもよい無菌水溶液の形態での使用に最も適している。この水溶液は、必要ならば、（好ましくは、３～９のｐＨに）好適に緩衝化されるべきである。無菌状態の中での好適な非経口製剤の調製は、当業者に周知の標準的な薬学的技法によって、容易に達成される。
【０５４７】
非経口投与に好適な製剤には、製剤を意図される受容者の血液と等張の状態にする抗酸化剤、緩衝液、静菌薬、及び溶質を含み得る水性及び非水性無菌注射液、ならびに懸濁化剤及び増粘剤を含み得る水性及び非水性無菌懸濁液が含まれる。本製剤は、単位用量または多用量容器、例えば、封止されたアンプル及びバイアル内で提供されてもよく、使用直前に無菌の液体担体、例えば、注射の場合水の添加のみを必要とする凍結乾燥（ｆｒｅｅｚｅ－ｄｒｉｅｄ）（凍結乾燥（ｌｙｏｐｈｉｌｉｓｅｄ））状態で保管されてもよい。即座の注射液及び懸濁液が、先に記載した種類の無菌粉末、顆粒、及び錠剤から調製され得る。
【０５４８】
ヒト患者への経口及び非経口投与に関して、本発明の化合物の１日投与量レベルは、通常、１ｍｇ／ｋｇ～３０ｍｇ／ｋｇである。したがって、例えば、本発明の化合物の錠剤またはカプセルは、必要に応じて、１回に１つずつまたは２つ以上での投与のための活性化合物の用量を含んでもよい。いずれにしても医師は、任意の個々の患者にとって最も好適な実際の投与量を決定し、実際の投与量は、年齢、体重、及び特定の患者の反応と共に変化する。上述の投与量は、平均的な事例の模範的なものである。当然ながら、より高いかまたはより低い投与量範囲が値する個々の事例が存在し、そのようなものは、本発明の範囲内である。
【０５４９】
本発明の化合物は、鼻腔内または吸入によっても投与することができ、好適な推進剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロジクロロテトラフルオロ－エタン、１，１，１，２－テトラフルオロエタン（ＨＦＡ１３４Ａ３もしくは１，１，１，２，３，３，３－ヘプタフルオロプロパン（ＨＦＡ　２２７ＥＡ３）等のヒドロフルオロアルカン、二酸化炭素、または他の好適な気体の使用を伴う、乾燥粉末インヘラーもしくは加圧式容器からのエアゾールスプレー提示、ポンプ、スプレー、または噴霧器の形態で便利に送達される。加圧式エアゾールの場合、投与量単位は、計量された量を送達するための弁を提供することによって決定され得る。加圧式容器、ポンプ、スプレー、または噴霧器は、例えば、潤滑剤、例えば、ソルビタンモノオレートを付加的に含んでもよい溶媒として、エタノールと推進剤との混合物を使用して、活性化合物の溶液または懸濁液を含んでもよい。インヘラーまたは注入器において使用するための（例えば、ゼラチンからできている）カプセル及びカートリッジは、本発明の化合物の粉末混合物、及びラクトースまたはデンプン等の好適な粉末ベースを含むように製剤化されてもよい。
【０５５０】
エアゾールまたは乾燥粉末製剤は、好ましくは、患者への送達のために、各々の計量された用量または「ひと吹き」が適切な用量の本発明の化合物を送達するように準備される。彼はエアゾールを用いた総合の１日用量は、患者間で変わり、１回用量で、またはより一般的には、分けられた用量で終日投与されてもよいことが理解されよう。
【０５５１】
あるいは、本発明の化合物は、坐薬またはペッサリーの形態で投与することができるか、または本発明の化合物は、ローション、クリーム、軟膏、または粉剤の形態で局所的に適用されてもよい。本発明の化合物は、例えば、皮膚パッチの使用によって経皮的にも投

与されてもよい。本発明の化合物は、特に目の疾患を治療するために、眼の経路によっても投与されてもよい。

【０５５２】

眼科の使用の場合、本発明の化合物は、等張のｐＨ調節済み無菌生理的食塩水中の微粒子化した懸濁液として、または、好ましくは、等張のｐＨ調節済み無菌生理的食塩水中の溶液として、任意選択的に、ベンジラルコニウムクリロド（ｂｅｎｚｙｌａｌｋｏｎｉｕｍ　ｃｈｌｏｒｉｄｅ）等の保存剤と組み合わせて製剤化され得る。あるいは、本発明の化合物は、ワセリン等の軟膏中に製剤化されてもよい。

【０５５３】

皮膚への局所的適用の場合、本発明の化合物は、例えば、鉱物油、流動ワセリン、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン化合物、乳化ワックス、及び水のうちの１つ以上を有する混合物中に懸濁または溶解した活性化合物を含有する好適な軟膏として製剤化することができる。あるいは、本発明の化合物は、鉱物油、モノステアリン酸ソルビタン、ポリエチレングリコール、流動パラフィン、ポリソルベート６０、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、２－オクチルドデカノール、ベンジルアルコール、及び水のうちの１つ以上の混合物中に懸濁または溶解した好適なローションまたはクリームとして製剤化することができる。

【０５５４】

口内の局所的投与に好適な製剤には、風味付けされた主成分、通常スクロース及びアカシアまたはトラガント中に活性成分を含むロゼンジと、ゼラチン及びグリセリン、またはスクロース及びアカシア等の不活性主成分中に活性成分を含むトローチと、好適な液体担体中に活性成分を含むマウスウォッシュと、が含まれる。

【０５５５】

一般に、ヒトにおいて、本発明の化合物の経口または局所的投与は、最も簡便であるため、好ましい経路である。受容者が嚥下障害、または経口投与後の薬物吸収障害を患う状況において、薬物は、非経口的に、例えば舌下または口腔投与されてもよい。

【０５５６】

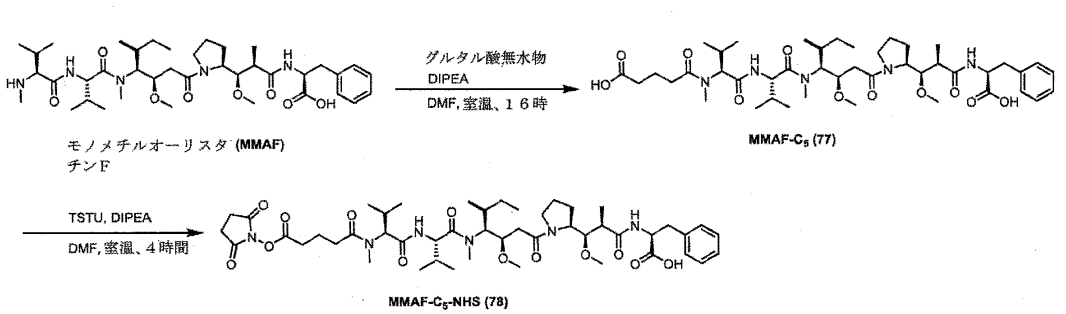
獣医学的使用の場合、本発明の化合物は、通常の獣医学診療に従って、好適に許容できる製剤として投与され、獣医は、特定の動物に対して最も適切であろう投与処方及び投与の経路を決定する。

【０５５７】

実施例４５－ＭＭＡＦ－Ｃ$_5$－ＮＨＳエステル（７８）の調製

【０５５８】

【化３１】



【０５５９】

ＤＭＦ（４ｍｌ）中のＭＭＡＦ（０．１ｇ、０．１７７ｍｍｏｌ）の溶液に、室温でＤＩＰＥＡ（０．１２ｍｌ）及びグルタル酸無水物（５０．５ｍｇ、０．４４ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を、Ｎ$_2$雰囲気下で１６時間撹拌した。溶媒を真空で蒸発させ、得られた粗化合物をＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｓｙｎｅｒｇｉ　Ｐｏｌａｒ－ＲＰカラムを使用してＰｒｅｐ　ＨＰＬＣによって精製した（溶離剤：Ａ＝水中の０．１％のＴＦＡ、Ｂ

＝ＭｅＣＮ）勾配－０～１１分：１５～４０％Ｂ、１１～２４分：４０～５５％Ｂ、２４～３５分：５５～８５％Ｂ。化合物は、ｔＲ１６．４分の時点で回収し、凍結乾燥し、白い固形物（８１％）を得た。ＨＲＭＳ：ＥＳＩ　ｍ／ｚは、$C_{44}H_{72}N_5O_{11}$について、８４６．５２００［Ｍ＋Ｈ］$^+$計算された８４６．５２２８を見出した。

【０５６０】

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）δ１２．２２（ｓ、１Ｈ）、７．４６～６．９８（ｍ、５Ｈ）、４．９３～４．３８（ｍ、３Ｈ）、４．０４（ｄｄ、Ｊ＝１３．７、９．９Ｈｚ、２Ｈ）、３．６６（ｄｑ、Ｊ＝１２．８、６．４Ｈｚ、４Ｈ）、３．５０～３．３７（ｍ、６Ｈ）、３．２９～３．１５（ｍ、９Ｈ）、３．１５～３．００（ｍ、４Ｈ）、２．９４～２．６５（ｍ、１２Ｈ）、２．３０（ｔ、Ｊ＝７．４Ｈｚ、１２Ｈ）、１．９４（ｐ、Ｊ＝６．６Ｈｚ、３Ｈ）、１．７６（ｐ、Ｊ＝７．４Ｈｚ、９Ｈ）、１．５１～１．２２（ｍ、２８Ｈ）、１．１３（ｄｔ、Ｊ＝１９．１、６．８Ｈｚ、６Ｈ）、１．０４～０．６９（ｍ、２０Ｈ）。

【０５６１】

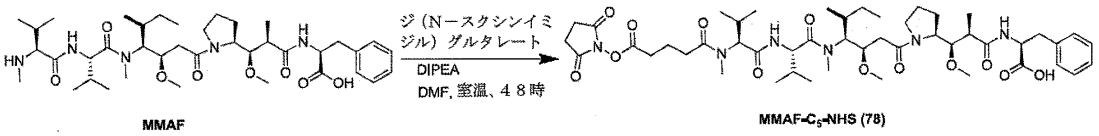
ＤＭＦ（１ｍｌ）中のＭＭＡＦ－C_5（５０ｍｇ、０．０５ｍｍｏｌ）の溶液に、室温でＤＩＰＥＡ（１５μｌ）及びＴＳＴＵ（１８ｍｇ、０．０５ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を、N_2雰囲気下で４時間撹拌した。溶媒を真空で蒸発させ、得られた粗化合物をＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｓｙｎｅｒｇｉ　Ｐｏｌａｒ－ＲＰカラムを使用してＰｒｅｐ　ＨＰＬＣによって精製した（溶離剤：Ａ＝水中の０．１％のＴＦＡ、Ｂ＝ＭｅＣＮ）勾配－０～１１分：１５～４０％Ｂ、１１～２４分：４０～５５％Ｂ、２４～３５分：５５～８５％Ｂ。所望の化合物をｔＲ２０．４分の時点で回収し、凍結乾燥させて、白い固形物（２２ｍｇ、４０％）を得た。ＨＲＭＳ：ＥＳＩ　ｍ／ｚは、$C_{48}H_{75}N_6O_{13}$について、９４３．５４１６［Ｍ＋Ｈ］$^+$計算された９４３．５３９２を見出した。

【０５６２】

実施例４６－直接的活性化によるＭＭＡＦ－C_5－ＮＨＳエステルの調製

【０５６３】

【化３２】



【０５６４】

アセトニトリル（５ｍｌ）中のＭＭＡＦ（５０ｍｇ、０．０６ｍｍｏｌ）の溶液に、室温でＤＩＰＥＡ（０．１ｍｌ）及びジ（Ｎ－スクシンイミジル）グルタレート（１９３ｍｇ、０．６ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を、N_2雰囲気下で７２時間撹拌した。溶媒を真空で蒸発させ、得られた粗化合物をＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｓｙｎｅｒｇｉ　Ｐｏｌａｒ－ＲＰカラムを使用してＰｒｅｐ　ＨＰＬＣによって精製した（溶離剤：Ａ＝水中の０．１％のＴＦＡ、Ｂ＝ＭｅＣＮ）勾配－０～１１分：１５～４０％Ｂ、１１～２４分：４０～５５％Ｂ、２４～３５分：５５～８５％Ｂ。所望の化合物をｔＲ２０．４分の時点で回収し、凍結乾燥させて、白い固形物（１０ｍｇ、１８％）を得た。

【０５６５】

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）δ８．３４（ｔ、Ｊ＝７．６Ｈｚ、１Ｈ）、７．１４～６．９０（ｍ、５Ｈ）、４．４１（ｄｔ、Ｊ＝１１．３、４．８Ｈｚ、１Ｈ）、４．２２（ｔ、Ｊ＝８．１Ｈｚ、１Ｈ）、３．７４（ｄｄ、Ｊ＝１０．０、４．４Ｈｚ、１Ｈ）、３．１０～２．９０（ｍ、８Ｈ）、２．８８～２．６６（ｍ、６Ｈ）、２．５４～２．４１（ｍ、２Ｈ）、２．２８（ｐ、Ｊ＝１．８Ｈｚ、３８Ｈ）、２．０７～１．９０（ｍ、３Ｈ）、１．７４～１．３１（ｍ、５Ｈ）、１．１４（ｄ、Ｊ＝４８．５Ｈｚ、３Ｈ）、０．８８～０．７７（ｍ、３Ｈ）、０．７７～０．４７（ｍ、２０Ｈ）

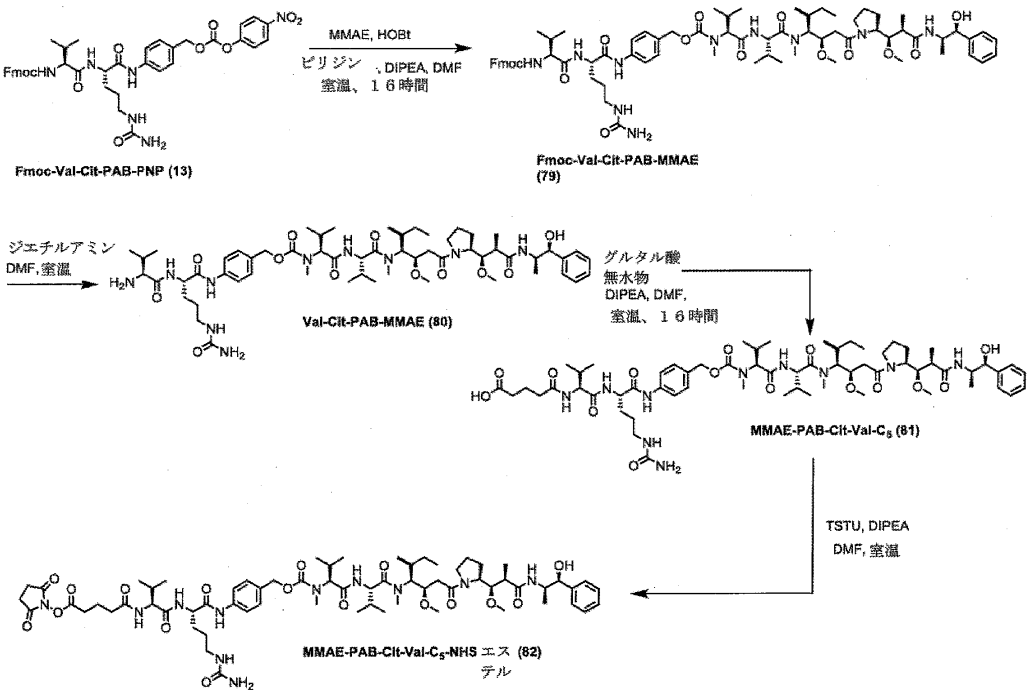
。

【０５６６】

実施例４７－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－Ｃ$_5$－ＮＨＳ（８２）の調製

【０５６７】

【化３３】



【０５６８】

ＤＭＦ（１．５ｍｌ）中のＭＭＡＥ（０．１５ｇ、０．１８ｍｍｏｌ）及びＦｍｏｃ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＰＮＰ　１３（０．１５２ｇ、０．１９ｍｍｏｌ）の溶液に、ＨＯＢｔ（５８ｍｇ、０．３６ｍｍｏｌ）、ピリジン（０．１２ｍｌ）。及びＤＩＰＥＡ（３１μｌ）を添加した。反応混合物を、Ｎ$_2$雰囲気下で２４時間、室温で撹拌した。溶媒を真空で蒸発させ、残渣をエチルアセテートで粉砕した。得られた固形物を濾過し、エチルアセテートで洗浄し、乾燥させて７９を得た。ＬＣ－ＭＳ　ＥＳＩ　ｍ／ｚ１３６７．７［Ｍ＋Ｎａ］$^+$。これをさらに精製せずに直接使用した。

【０５６９】

ＤＭＦ（１．５ｍｌ）中の溶液Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ　７９（０．３ｇ、０．２２ｍｍｏｌ）及びジエチルアミン（１．１２ｍｌ）を、室温で３時間撹拌した。次いで、反応混合物を真空で濃縮させた。生成物をジエチルエーテル中で析出させ、濾過し、オフホワイトの粉末としての０．１５ｇの８０を得、これをさらに精製せずに使用した。ＬＣ－ＭＳ　ＥＳＩ　ｍ／ｚ１１４５．６［Ｍ＋Ｎａ］$^+$

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）δ１０．２０（ｄ、Ｊ＝６．５Ｈｚ、１Ｈ）、８．７０（ｄ、Ｊ＝７．６Ｈｚ、１Ｈ）、８．０７（ｄ、Ｊ＝４．９Ｈｚ、４Ｈ）、７．６１（ｄｄ、Ｊ＝２６．０、８．３Ｈｚ、２Ｈ）、７．４５～７．２１（ｍ、７Ｈ）、７．１８（ｄｄ、Ｊ＝８．９、６．３Ｈｚ、１Ｈ）、６．０４（ｓ、１Ｈ）、５．４８（ｓ、２Ｈ）、５．２１～４．８８（ｍ、２Ｈ）、４．６３～４．３７（ｍ、４Ｈ）、４．２６（ｔ、Ｊ＝１１．７Ｈｚ、１Ｈ）、３．９８（ｍ、３Ｈ）、３．３３～３．０８（ｍ、１２Ｈ）、３．１０～２．６９（ｍ、８Ｈ）、２．２７～１．８８（ｍ、５Ｈ）、１．９０～１．６６（ｍ、５Ｈ）、１．６４～１．１９（ｍ、７Ｈ）、１．１５～０．５２（ｍ、３６Ｈ）。

【０５７０】

ＤＭＦ（４ｍｌ）中の化合物Ｈ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ　８０（０．１ｇ

、０．１７７ｍｍｏｌ）の溶液に、室温でＤＩＰＥＡ（０．１２ｍｌ）及びグルタル酸無水物（５０．５ｍｇ、０．４４ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を、$Ｎ_{2}$雰囲気下で１６時間撹拌した。溶媒を真空で蒸発させ、得られた粗化合物８１をジエチルエーテルで洗浄し、次の工程のために直接使用した。ＨＲＭＳ：ＥＳＩ　ｍ／ｚは、$Ｃ_{63}Ｈ_{101}Ｎ_{10}Ｏ_{15}$について、１２３７．７５２６［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$計算された１２３７．７４４８を見出した。

【０５７１】

ＤＭＦ（２ｍｌ）中のＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－$Ｃ_{5}$８１（０．１ｇ、０．０８ｍｍｏｌ）の溶液に、室温でＤＩＰＥＡ（２９μｌ）及びＴＳＴＵ（３８ｍｇ、０．１２ｍｍｏｌ）を添加し、反応混合物を、$Ｎ_{2}$雰囲気下で３時間撹拌した。溶媒を真空で蒸発させ、得られた生成物をＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｓｙｎｅｒｇｉ　Ｐｏｌａｒ－ＲＰカラムを使用してＰｒｅｐ　ＨＰＬＣによって精製し（溶離剤：Ａ＝水中の０．１％のＴＦＡ、Ｂ＝ＭｅＣＮ）勾配－０～１４分：１５～８５％Ｂ、所望の化合物を、ｔＲ１０．１分の時点で回収し、凍結乾燥させ、白い粉末（４０％）を得た。ＨＲＭＳ：ＥＳＩ　ｍ／ｚは、$Ｃ_{67}Ｈ_{103}Ｎ_{11}Ｏ_{17}$Ｎａについて、１３５６．７６２３［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$計算された１３５６．７４３１を見出した。

【０５７２】

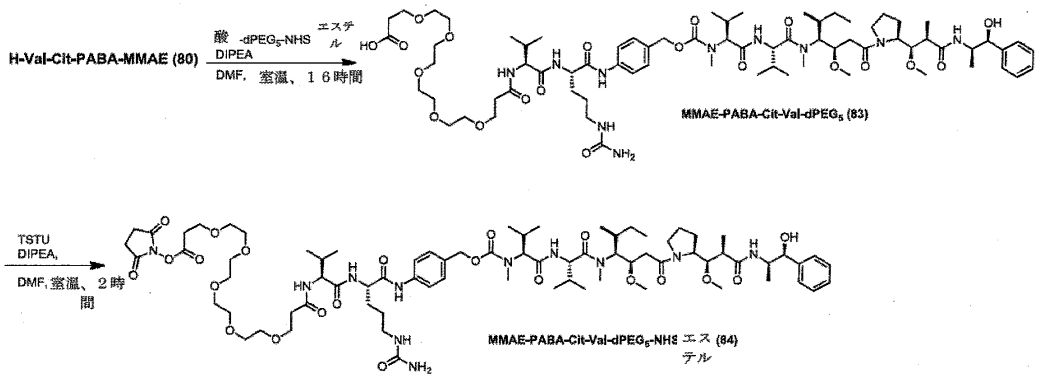
^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）δ９．７９（ｓ、１Ｈ）、８．０５～７．７９（ｍ、２Ｈ）、７．６８（ｄ、Ｊ＝８．６Ｈｚ、２Ｈ）、７．３７（ｄ、Ｊ＝８．０Ｈｚ、３Ｈ）、７．２５～７．００（ｍ、７Ｈ）、６．９６（ｔ、Ｊ＝７．２Ｈｚ、１Ｈ）、４．８５（ｄ、Ｊ＝１５．３Ｈｚ、４Ｈ）、４．５５～４．０９（ｍ、１０Ｈ）、４．００～３．５６（ｍ、１２Ｈ）、３．１３～２．８５（ｍ、１２Ｈ）、２．７５（ｓ、５Ｈ）、２．６７～２．５８（ｍ、７Ｈ）、２．５４～２．３６（ｍ、４Ｈ）、２．２８（ｐ、Ｊ＝１．８Ｈｚ、８８Ｈ）、２．１４～１．９９（ｍ、４Ｈ）、１．９５～１．６７（ｍ、５Ｈ）、１．６８～１．４０（ｍ、８Ｈ）、１．３９～０．９３（ｍ、７Ｈ）、０．９０～０．３１（ｍ、４０Ｈ）。

【０５７３】

実施例４８－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_{5}$－ＮＨＳエステル（８４）の調製

【０５７４】

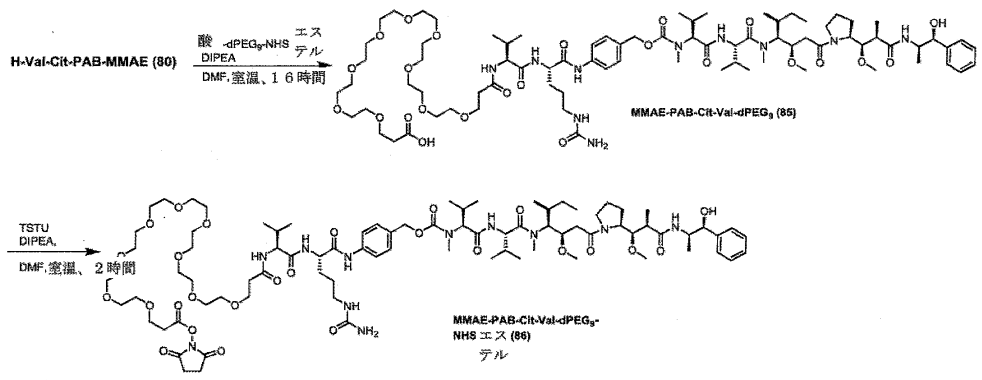
【化３４】



【０５７５】

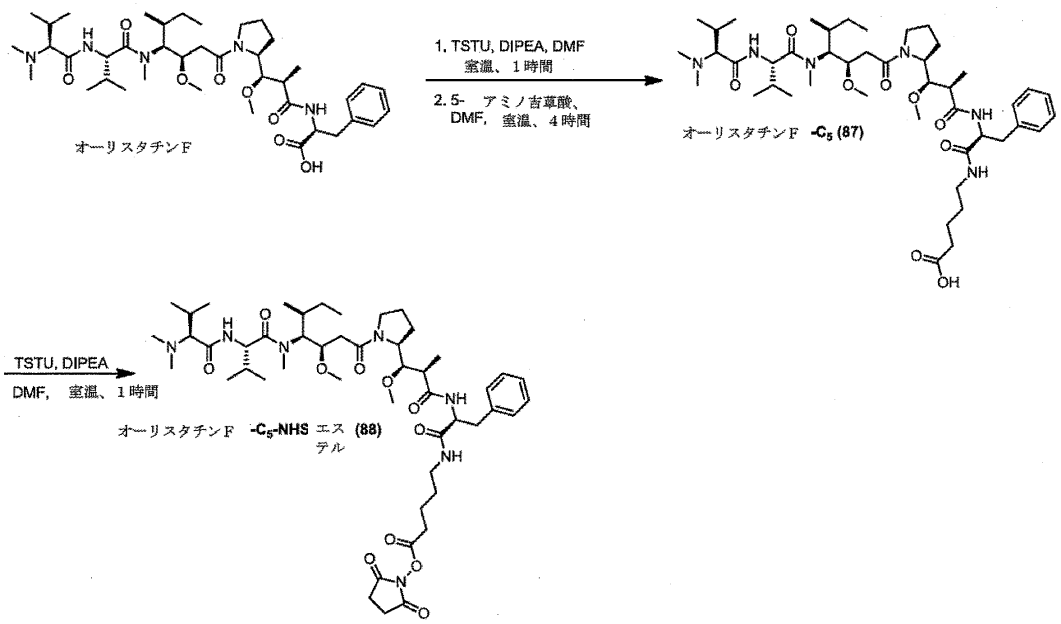
ＤＭＦ（７ｍｌ）中の化合物Ｈ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ　８０（０．２ｇ、０．１７７ｍｍｏｌ）の溶液に、室温でＤＩＰＥＡ（０．１ｍｌ）及び酸－ｄＰＥＧ$_{5}$－ＮＨＳ（５０．５ｍｇ、０．２１ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を、$Ｎ_{2}$雰囲気下で１６時間撹拌した。溶媒を真空で蒸発させ、得られた粗化合物８３をジエチルエーテルで洗浄し、次の工程のために直接使用した。ＬＣ－ＭＳ　ＥＳＩ　ｍ／ｚ１４６６．６［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$。

【０５７６】
ＤＭＦ（７ｍｌ）中の酸－ｄＰＥＧ$_5$－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ　８３（０．２５ｇ、０．１７ｍｍｏｌ）の溶液に、室温でＤＩＰＥＡ（０．１５ｍｌ）及びＴＳＴＵ（１２０ｍｇ、０．３９ｍｍｏｌ）を添加し、反応混合物を、Ｎ$_2$雰囲気下で３時間撹拌した。溶媒を真空で蒸発させ、粗生成物Ｃ１８カラムを使用してＢｉｏｔａｇｅフラッシュ精製システムにより精製して、凍結乾燥後に白い固形物としての化合物ＮＨＳ－ＰＥＧ$_5$－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ　８４を得た。ＭＳ：ＥＳＩ　ｍ／ｚ　１５６２．９［Ｍ＋Ｎａ］$^+$
^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）δ１０．０３～９．９６（ｍ、１Ｈ）、８．１２（ｄｄ、Ｊ＝１９．３、７．８Ｈｚ、１Ｈ）、７．９０（ｔ、Ｊ＝８．９Ｈｚ、１Ｈ）、７．６９～７．５５（ｍ、２Ｈ）、７．３８～７．２３（ｍ、５Ｈ）、７．２３～７．１３（ｍ、１Ｈ）、５．１１～４．９３（ｍ、２Ｈ）、４．５２～４．３３（ｍ、３Ｈ）、４．３２～４．１９（ｍ、２Ｈ）、３．９９（ｍ、２Ｈ）、３．８３～３．６８（ｍ、２Ｈ）、３．６５～３．４１（ｍ、１７Ｈ）、３．２２（ｄｄ、Ｊ＝１９．９、８．６Ｈｚ、６Ｈ）、３．１２（ｓ、１Ｈ）、３．１０～２．７４（ｍ、１２Ｈ）、２．４２（ｍ、１２Ｈ）、２．２６（ｄｄ、Ｊ＝１５．９、９．２Ｈｚ、１Ｈ）、２．１９～１．９０（ｍ、４Ｈ）、１．７９～１．６５（ｍ、３Ｈ）、１．６５～１．５２（ｍ、２Ｈ）、１．５２～１．３１（ｍ、３Ｈ）、１．０８～０．９６（ｍ、６Ｈ）、０．９６～０．７１（ｍ、２３Ｈ）。
【０５７７】
実施例４９－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$－ＮＨＳエステル（８６）の調製
【０５７８】
【化３５】



【０５７９】
ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$－ＮＨＳエステル８６を、Ｈ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ　８０を酸－ｄＰＥＧ$_9$－ＮＨＳと反応させ、続いてＴＳＴＵで活性化させることにより、実施例４７のように調製した。蒸発後に得た粗のものを、Ｃ１８カラムを使用してＢｉｏｔａｇｅフラッシュ精製システムにより精製して、凍結乾燥後に白い固形物としての化合物ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$－ＮＨＳ　８６を得た。ＭＳ：ＥＳＩ　ｍ／ｚ　１７１８．３０９３［Ｍ＋Ｈ］$^+$。
【０５８０】
実施例５０－オーリスタチンＦ－Ｃ$_5$－ＮＨＳエステル（８８）の調製
【０５８１】

【化３６】



【０５８２】

オーリスタチンＦ（０．１ｇ、０．１１６ｍｍｏｌ）及びＨＡＴＵ（４０ｍｇ、０．１０４ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（３ｍｌ）に溶解し、それにＤＩＰＥＡ（４０μｌ）を添加した。反応混合物を室温で４０分間撹拌し、次いで、ＤＭＦ（２ｍｌ）中の５－アミノ吉草酸（１５ｍｇ、０．１２７ｍｍｏｌ）の溶液に滴下した。反応混合物を室温で４時間撹拌し、真空で蒸発させた。粗生成物を、Ｃ１８カラムを使用してＢｉｏｔａｇｅフラッシュ精製システムにより精製して、白い固形物としての化合物オーリスタチンＦ－C_5酸８７（８５ｍｇ、８４％）を得た。ＬＣ－ＭＳ　ＥＳＩ　ｍ／ｚ　８６７．５［Ｍ＋Ｎａ］$^+$。

【０５８３】

ＤＩＰＥＡ（７２μｌ）及びＤＭＦ（３ｍｌ）中のオーリスタチンＦ－C_5酸８７（７０ｍｇ、０．０８ｍｍｏｌ）の溶液に、ＴＳＴＵ（５７ｍｇ、０．１９ｍｍｏｌ）を添加し、反応混合物を室温で１時間撹拌した。溶媒を真空で蒸発させ、粗化合物を、Ｃ１８カラムを使用してＢｉｏｔａｇｅフラッシュ精製システムにより精製して、凍結乾燥後に白い固形物としての化合物オーリスタチンＦ－C_5－ＮＨＳエステル８８（４６ｍｇ、５９％）を得た。ＬＣ－ＭＳ　ＥＳＩ　ｍ／ｚ　９６４．５［Ｍ＋Ｎａ］$^+$

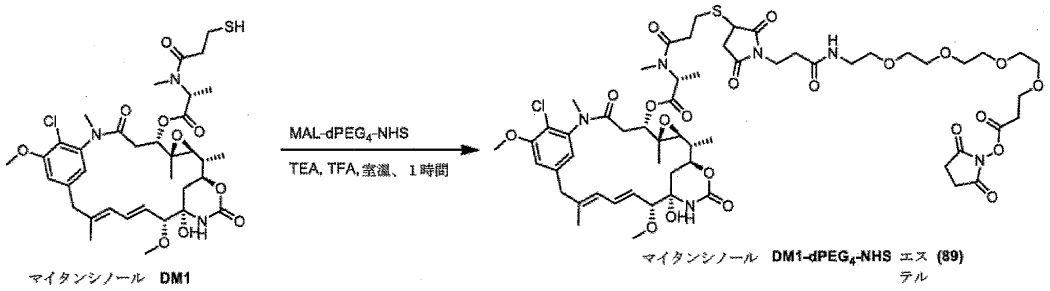
^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）δ９．５７（ｓ、１Ｈ）、８．９４（ｑ、Ｊ＝７．９、７．２Ｈｚ、１Ｈ）、８．０５～７．８４（ｍ、１Ｈ）、７．３１～７．１０（ｍ、５Ｈ）、４．６０（ｍ、２Ｈ）、３．９９（ｄ、Ｊ＝７．５Ｈｚ、１Ｈ）、３．８４～３．７３（ｍ、２Ｈ）、３．７０（ｄ、Ｊ＝７．６Ｈｚ、１Ｈ）、３．５０（ｔｄ、Ｊ＝１４．０、７．５Ｈｚ、１Ｈ）、３．３２～３．１０（ｍ、９Ｈ）、２．９９（ｍ、６Ｈ）、２．８４～２．５８（ｍ、１４Ｈ）、２．４５（ｄｄ、Ｊ＝１４．９、５．０Ｈｚ、４Ｈ）、２．３７～２．２２（ｍ、３Ｈ）、２．０１（ｄｄ、Ｊ＝１２．８、５．７Ｈｚ、１Ｈ）、１．９４～１．７３（ｍ、３Ｈ）、１．５９～１．３６（ｍ、５Ｈ）、１．０８～０．７１（ｍ、２５Ｈ）。

【０５８４】

実施例５１－マイタンシノールＤＭ１－ｄＰＥＧ$_4$－ＮＨＳエステル（８９）の調製

【０５８５】

【化３７】



マイタンシノール DM1　　マイタンシノール DM1-dPEG4-NHS エステル (89)

【０５８６】

ＴＨＦ中のＤＭ１（０．１ｇ、０．１３５ｍｍｏｌ）の溶液に、Ｅｔ３Ｎ（１８．９μｌ）を添加し、続いてＭａｌ－ｄＰＥＧ４－ＮＨＳ（７７ｍｇ、０．１５ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温で１時間、Ｎ２雰囲気下で撹拌し、溶媒を真空で除去した。粗生成物を、Ｃ１８カラムを使用してＢｉｏｔａｇｅフラッシュ精製システムにより精製して、凍結乾燥後に白い固形物としての化合物ＤＭ１－ｄＰＥＧ５－ＮＨＳ（１０５ｍｇ、７５％）を得た。ＬＣ－ＭＳ　ＥＳＩ　ｍ／ｚ　１２７４．６０［Ｍ＋Ｎａ］＋

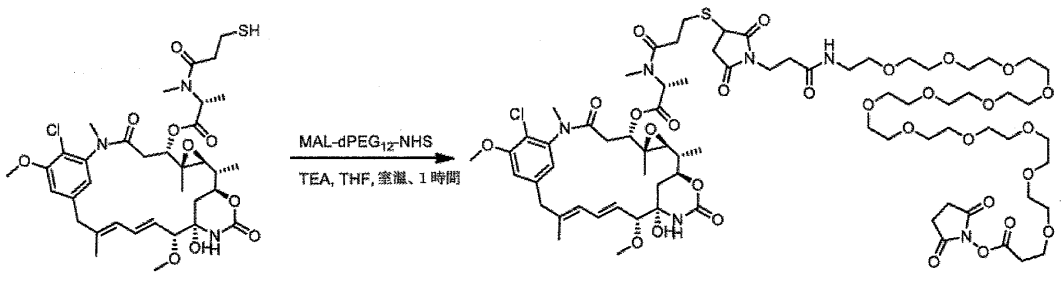
^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）δ８．０１（ｑ、Ｊ＝５．６Ｈｚ、１Ｈ）、７．１７（ｄｄ、Ｊ＝８．１、１．８Ｈｚ、１Ｈ）、６．９０（ｓ、１Ｈ）、６．６８～６．４６（ｍ、３Ｈ）、５．５５（ｄｄ、Ｊ＝１２．８、８．９Ｈｚ、１Ｈ）、５．３１（ｑ、Ｊ＝６．７Ｈｚ、１Ｈ）、４．５２（ｄｄ、Ｊ＝１２．１、２．９Ｈｚ、１Ｈ）、４．０７（ｔ、Ｊ＝１０．８Ｈｚ、２Ｈ）、３．９３（ｄ、Ｊ＝１．５Ｈｚ、４Ｈ）、３．８５（ｄｄ、Ｊ＝９．０、４．０Ｈｚ、１Ｈ）、３．７１（ｔ、Ｊ＝６．０Ｈｚ、２Ｈ）、３．６３～３．４１（ｍ、１８Ｈ）、３．３７（ｔ、Ｊ＝５．９Ｈｚ、３Ｈ）、３．３２～３．０７（ｍ、１１Ｈ）、３．０７～２．８６（ｍ、６Ｈ）、２．７９（ｄ、Ｊ＝１１．６Ｈｚ、７Ｈ）、２．７１（ｓ、４Ｈ）、２．２５（ｍ、４Ｈ）、２．０４（ｄ、Ｊ＝１４．４Ｈｚ、１Ｈ）、１．５９（ｓ、４Ｈ）、１．５５～１．３４（ｍ、３Ｈ）、１．３３～１．０３（ｍ、８Ｈ）、０．７８（ｄ、Ｊ＝２．１Ｈｚ、３Ｈ）。

【０５８７】

実施例５２－マイタンシノールＤＭ１－ｄＰＥＧ１２－ＮＨＳエステル（９０）の調製

【０５８８】

【化３８】



マイタンシノール DM1　　マイタンシノール DM1-dPEG12-NHS エステル (90)

【０５８９】

ＴＨＦ（３ｍｌ）中のＤＭ１（０．０５ｇ、０．１６７８ｍｍｏｌ）の撹拌し脱気した溶液にＥｔ３Ｎ（９．４５μｌ）を添加し、続いてＴＨＦ（４ｍｌ）に溶解したＭａｌ－ｄＰＥＧ９－ＮＨＳ（５８．７ｍｇ、０．１６７８ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温で３時間、Ｎ２雰囲気下で撹拌し、溶媒を真空で除去した。粗生成物を、Ｃ１８カラムを使用してＢｉｏｔａｇｅフラッシュ精製システムにより精製して、凍結乾燥後に白い固形物としての化合物ＤＭ１－ｄＰＥＧ１２－ＮＨＳ９０（３１ｍｇ、２８％）を得た。

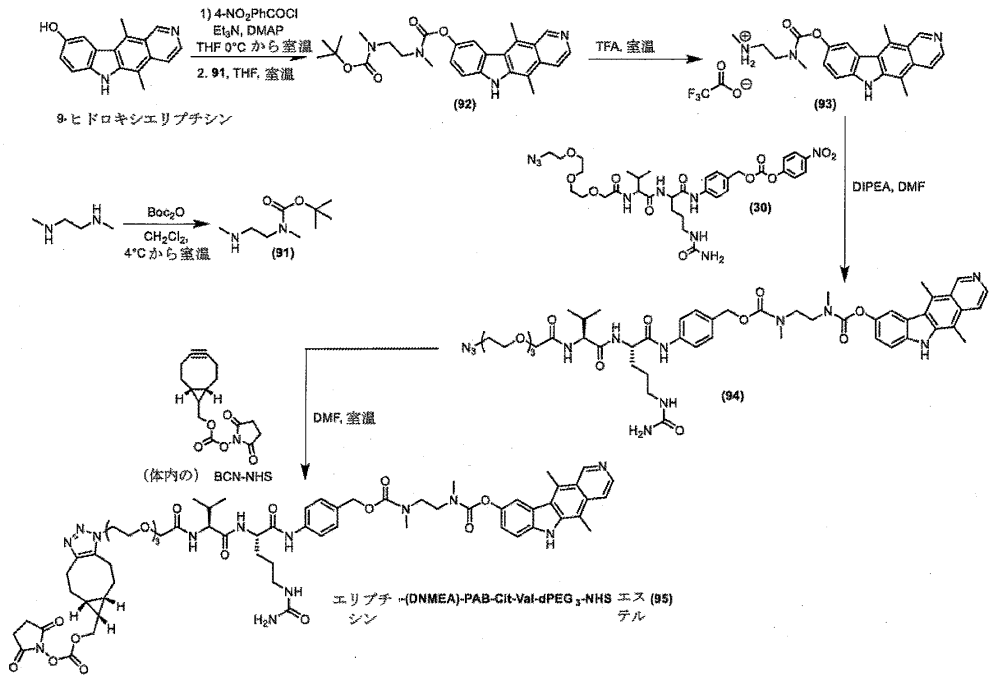
ＬＣ－ＭＳ　ＥＳＩ　ｍ／ｚ　１６２５．９［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$。

【０５９０】

実施例５３－エリプチシン－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_{3}$－ＮＨＳエステル（９５）の調製

【０５９１】

【化３９】



【０５９２】

０℃のジクロロメタン（４０ｍＬ）中のＮ，Ｎ’－ジメチルエチレンジアミン（３．６６ｍＬ、３４ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、ジクロロメタン（２０ｍＬ）中の二炭酸ジ－ｔｅｒｔ－ブチル（２．４ｇ、１１ｍｍｏｌ）の溶液を滴下し、室温に一晩温め減圧下で濃縮させ、ＥｔＯＡｃ（１００ｍＬ）で希釈し、水（２×１００ｍＬ）、ブライン（１００ｍＬ）で洗浄し乾燥させ、減圧下で濃縮させて、無色の油としての表題の生成物９１（１．５４ｇ、７４％の収率）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）δ３．２６（ｔ、Ｊ＝６．１５Ｈｚ、２Ｈ）、２．８１（ｓ、３Ｈ）、２．６６（ｔ、Ｊ＝６．５７Ｈｚ、２Ｈ）、２．３８（ｓ、３Ｈ）、９．２８（ｓ、９Ｈ）ｐｐｍ。

【０５９３】

０℃のＴＨＦ（２ｍＬ）中の９－ヒドロキシエリプチシン（８０ｍｇ、０．２７ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（３２ｍｇ、０．２７ｍｍｏｌ）、及びトリエチルアミン（２６１μＬ、１．８８ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、ＴＨＦ（１．５ｍＬ）中の４－ニトロフェニルクロロホルメート（８１ｍｇ、０．４０ｍｍｏｌ）の溶液を添加し、２時間以上室温に温め、これにＴＨＦ（０．５ｍＬ）中のＢＯＣ－ジアミン９１（１５１ｍｇ、０．８０ｍｍｏｌ）の溶液を添加し、室温で一晩撹拌し、減圧下で濃縮させ、クロマトグラフにかけ（ＣＨ$_{2}$Ｃｌ$_{2}$中に０～２０％のＭｅＯＨ）、黄色い固形物としてのＢＯＣ－アミン－エリプチシン９２を得た（９２ｍｇ、７２％の収率）。Ｒ$_{ｆ}$＝０．４７（ＣＨ$_{2}$Ｃｌ$_{2}$中１０％のＭｅＯＨ）、ＩＲ　ν$_{ｍａｘ}$３３７７、２９７６、２０８８、１７０１、１６７４、１６０１、１４６２、１３９７、１１９１、１１４４、１０３０、８１６、７９０、７２１ｃｍ

$^{-1}$；^{1}H NMR（４００MHz、DMSO－ｄ６）δ１１．７８（ｓ、１H）、９．８８～９．７５（ｄ、Ｊ＝５．４Hz、１H）、８．４８～８．３５（ｄ、Ｊ＝６．４Hz、１H）、８．１３（ｓ、１H）、８．１０（ｓ、１H）、７．６４～７．５４（ｄｄ、Ｊ＝８．７、３．９Hz、１H）、７．４２～７．２５（ｍ、１H）、３．４５（ｓ、６H）、２．８５～２．８２（ｍ、４H）、２．８４（ｓ、６H）、１．４１（ｓ、９H）ｐｐｍ；^{13}C NMR（１０１MHz、DMSO－ｄ６）δ２２６．２８、２２４．５３、２０９．３１、１６２．０６、１４２．１８、１３３．５９、１２１．５２、１１７．９０、１１６．４５、１１１．４６、１０９．６３、７９．１６、５５．１２、４６．９０、４６．１３、４６．１３、２８．５６、１４．９８、１２．４７、９．０３ｐｐｍ；ＭＳ（ＥＩ$^{+}$）ｍ／ｚ ４７７［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$；$C_{27}H_{33}N_4O_4$［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$４７７．２５０２について計算したＨＲＭＳ（ＥＩ$^{+}$）ｍ／ｚは、４７７．２５０３を見出した。

【０５９４】

トリフルオロ酢酸（２．５ｍＬ）中のＢＯＣ－アミン－エリプチシン９２（９３ｍｇ、０．１９ｍｍｏｌ）の溶液を、室温で３時間撹拌し、減圧下で濃縮させて、黄色い固形物としての所望の脱保護生成物９３（１０５ｍｇ、９０％の収率）を得た。R_f＝０．１４（CH_2Cl_2中に２０％のＭｅＯＨ）；ＩＲ ν_{max}２９９５、２８２１、１６７０、１４７３、１３９７、１１７４、１１２７、１０２１、８１３、７９５、７２１ｃｍ$^{-1}$；^{1}H NMR（４００MHz、DMSO－ｄ６）δ９．０３～８．７２（ｄ、Ｊ＝４８．５Hz、２H）、８．５８～８．３６（ｍ、２H）、８．８６～８．６９（ｍ、１H）、１２．５７～１１．９５（ｄ、Ｊ＝２．７Hz、１H）、１０．１８～９．８５（ｄ、Ｊ＝２．２Hz、１H）、８．３１～８．０８（ｄｄ、Ｊ＝１１．３、２．２Hz、１H）、７．８７～７．５８（ｄ、Ｊ＝８．６Hz、１H）、７．５４～７．３７（ｄｔ、Ｊ＝８．８、２．３Hz、１H）、３．３５～３．２６（ｄ、Ｊ＝５．１Hz、３H）、３．１７（ｓ、６H）、３．１５～３．０６（ｑｄ、Ｊ＝７．３、４．７Hz、４H）、２．８７（ｓ、３H）ｐｐｍ；^{13}C NMR（１０１MHz、DMSO－ｄ６）δ１５９．０１、１５８．６８、１５７．２６、１５５．７９、１４４．７７、１３４．４２、１３４．１４、１２８．４６、１２５．９８、１２２．６８、１２０．２９、１２０．０７、１１２．０１、１１０．９１、４９．０６、３５．１６、３４．９６、３３．１６、１５．３５、１２．４８ｐｐｍ；ＭＳ（ＥＩ$^{+}$）ｍ／ｚ ３７７［Ｍ］$^{+}$；$C_{22}H_{25}N_4O_2$［Ｍ］$^{+}$３７７．１９７８について計算したＨＲＭＳ（ＥＩ$^{+}$）ｍ／ｚは、３７７．１９７４を見出した。

【０５９５】

ＤＭＦ（３ｍｌ）中の活性化したリンカー３０（６０．７ｍｇ、０．０８ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、室温で、ＤＭＦ（１ｍＬ）中のエリプチシンアミン９３（４８ｍｇ、０．１０ｍｍｏｌ）及びＤＩＰＥＡ（４０μＬ、０．２３ｍｍｏｌ）の溶液を添加し、一晩撹拌し、減圧下で濃縮させ、クロマトグラフにかけ（CH_2Cl_2中に０～２０％のＭｅＯＨ）、表題の生成物９４（１９ｍｇ、２６％の収率）を得た。R_f＝０．３０（CH_2Cl_2中に１０％のＭｅＯＨ）；ＩＲ ν_{max}３３１０、２９３５、２１０３、１６５０、１５４１、１４６６、１４０２、１２０２、１１３０、１０２７、８２３、８００、７５６、７２０ｃｍ$^{-1}$；^{1}H NMR（４００MHz、DMSO－ｄ６）δ１１．７９（ｓ、１H）、１０．０１（ｓ、１H）、９．８２（ｓ、１H）、８．４４（ｓ、２H）８．３９～８．３０（ｄ、Ｊ＝７．２Hz、１H）、８．２３～８．１６（ｄ、Ｊ＝６．３Hz、１H）、８．１５～８．１１（ｄ、Ｊ＝６．８Hz、１H）、７．６３～７．５４（ｄ、Ｊ＝６．８Hz、２H）、２．０５～１．９６（ｍ、１H）、７．４８～７．４２（ｄ、Ｊ＝８．９Hz、１H）、７．３２～７．２７（ｄ、Ｊ＝８．１Hz、３H）、５．４２（ｓ、２H）、５．１０～５．００（ｄ、Ｊ＝９．０Hz、２H）、４．４６～４．２８（ｑ、Ｊ＝８．０、７．３Hz、１H）、３．９５（ｓ、２H）、３．６４～３．５５（ｍ、１４H）、６．０３（ｓ、１H）、３．１８～３．１１（ｄｄｄ、Ｊ＝１０．８、７．３、３．７Hz、４H）、３．０５～２．８８（ｍ、２H）、２．８５（ｓ、２H

）、２．１０～１．９１（ｄｔ、Ｊ＝１３．５、７．２Ｈｚ、１Ｈ）、１．７５～１．５３（ｍ、２Ｈ）、１．４８～１．３２（ｍ、２Ｈ）、１．２７（ｓ、６Ｈ）、０．９６～０．７２（ｄｄｄ、Ｊ＝２２．７、６．３、３．２Ｈｚ、６Ｈ）ｐｐｍ；^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１２６ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）δ１７１．２１、１７０．９５、１６９．４４、１６２．８０、１５９．３７、１５８．３６、１５８．１２、１５５．４６、１４７．７６、１４５．１５、１４３．２５、１４０．４１、１３９．０１、１３３．５８、１２９．０３、１２８．７７、１２４．６５、１２３．３３、１２２．６８、１２１．４５、１１９．４１、１１７．５９、１１１．５０、１０９．７４、７０．８７、７０．０７、６９．９０、６９．６９、５７．０３、５３．９８、５０．５１、４９．１３、４７．０１、４２．２４、３５．２４、３１．６０、２９．６５、２７．３９、１９．６４、１８．５１、１７．１８、１５．０１、１２．８８ｐｐｍ；ＭＳ（ＥＩ$^{+}$）ｍ／ｚ　１０１９［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$；$C_{49}H_{64}N_{12}O_{11}Na$［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$１０１９．４７１５について計算したＨＲＭＳ（ＥＩ$^{+}$）ｍ／ｚは、１０１９．４７２２を見出した。

【０５９６】

ＤＭＦ（１ｍＬ）中のアジド９４（２．５ｍｇ、０．００３ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、（１Ｒ，８Ｓ，９Ｓ）－ビシクロ［６．１．０］ノナ－４－イン－９－イルメチルＮ－スクシンイミジルカーボネート（０．７ｍｇ、０．００３ｍｍｏｌ）を添加し、室温で３時間撹拌し、減圧下で濃縮させて、黄色い固形物としての表題の生成物（３ｍｇ、９３％の収率）を得た。ＩＲ　ν_{max}３３２３、２９２４、１８１１、１７８６、１７４０、１６６４、１６０４、１５３７、１４０２、１１９９、１１２６、８２８、７９９、７１８ｃｍ$^{-1}$；^{1}Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）δ１２．０２（ｓ、１Ｈ）、１０．１０～９．９７（ｍ、１Ｈ）、９．９４～９．８４（ｄ、Ｊ＝８．６Ｈｚ、１Ｈ）、８．４９～８．４１（ｄ、Ｊ＝６．７Ｈｚ、２Ｈ）、８．３６～８．３０（ｄｄ、Ｊ＝７．２、３．４Ｈｚ、１Ｈ）、７．６４～７．５１（ｔｄ、Ｊ＝１２．０、９．０、４．７Ｈｚ、１Ｈ）、７．５６～７．５１（ｄ、Ｊ＝８．４Ｈｚ、２Ｈ）、７．４５～７．４０（ｄ、Ｊ＝８．６Ｈｚ、１Ｈ）、７．３８～７．２１（ｍ、３Ｈ）、６．０９～５．８９（ｑ、Ｊ＝５．５、５．０Ｈｚ、１Ｈ）、５．４２（ｓ、２Ｈ）、５．１１～４．９７（ｍ、２Ｈ）、４．５３～４．４５（ｔ、Ｊ＝８．０Ｈｚ、２Ｈ）、４．３９～４．３２（ｔ、Ｊ＝５．４Ｈｚ、２Ｈ）、３．９６～３．９１（ｄ、Ｊ＝３．８Ｈｚ、２Ｈ）、３．７１～３．６６（ｑ、Ｊ＝５．７、４．２Ｈｚ、２Ｈ）、３．６５～３．５５（ｄｔｔ、Ｊ＝２０．５、９．９、４．７Ｈｚ、１０Ｈ）、３．５１～３．４３（ｍ、４Ｈ）、３．１８～３．０８（ｑｄ、Ｊ＝７．３、４．１Ｈｚ、４Ｈ）、２．９１～２．８７（ｓ、４Ｈ）、２．８６～２．８５（ｓ、２Ｈ）、２．２９２．１８（ｍ、２Ｈ）、２．１９～２．１１（ｍ、２Ｈ）、２．００～１．９３（ｄ、Ｊ＝６．７Ｈｚ、２Ｈ）、０．９０～０．７０（ｄｄｄ、Ｊ＝２９．９、６．９、４．３Ｈｚ、６Ｈ）、２．３２～１．８９（ｍ、６Ｈ）、２．１０～２．０２（ｍ、２Ｈ）ｐｐｍ；^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１２６ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）δ１７２．７５、１７０．７３、１７０．４８、１６９．９４、１６８．９６、１６２．２９、１５８．９０、１５４．８７、１５１．３０、１４４．８５、１４３．０９、１３９．９９、１３８．６２、１３３．７２、１３３．４７、１２８．５３、１２８．３０、１２２．６１、１１８．９１、１１７．１６、１１１．２５、１０９．７２、９９．５０、９８．９０、７０．３３、７０．２９、６９．６９、６９．６５、６９．５３、６９．３１、５７．３７、５６．５５、５３．５０、５３．２０、４７．１３、４６．５４、４１．７６、４０．１５、４０．０９、４０．００、３９．９３、３９．８４、３９．７６、３９．６７、３９．６０、３９．５０、３９．３４、３９．１７、３９．００、３８．５１、３５．７７、３４．８２、３４．５１、３１．０５、３０．７６、２９．１７、２８．４１、２６．８５、２５．４９、２５．３４、２５．２９、２５．２１、２２．３３、２２．０４、２１．８０、２１．２２、２０．７４、２０．６９、２０．１９、１９．８９、１９．５４、１９．１５、１８．８５、１８．０４、１７．９０、１６．９２、１６．７１、１６．６７、１４．６８、１２．４１、１２．０３ｐｐｍ；ＭＳ（ＥＩ$^{+}$）ｍ／ｚ　１２８８［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$；$C_{64}H_{82}N_{13}O_{16}$［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$

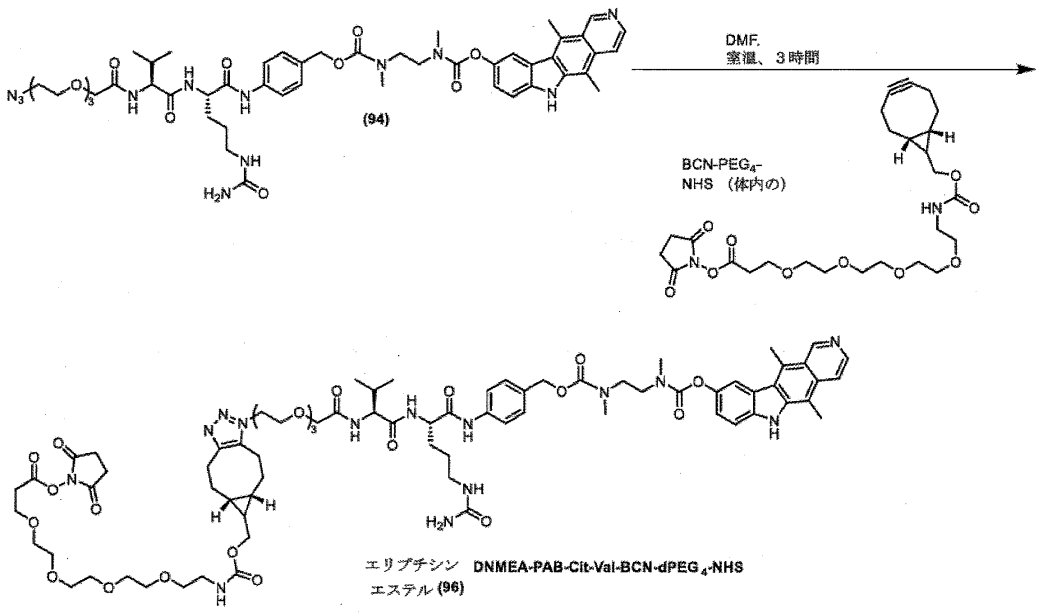
１２８８．５９９５について計算したＨＲＭＳ（ＥＩ$^{+}$）ｍ／ｚは、１２８８．５６２５を見出した。

【０５９７】

実施例５４－エリプチシン－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ＢＣＮ－ｄＰＥＧ$_4$－ＮＨＳエステル（９６）の調製

【０５９８】

【化４０】



【０５９９】

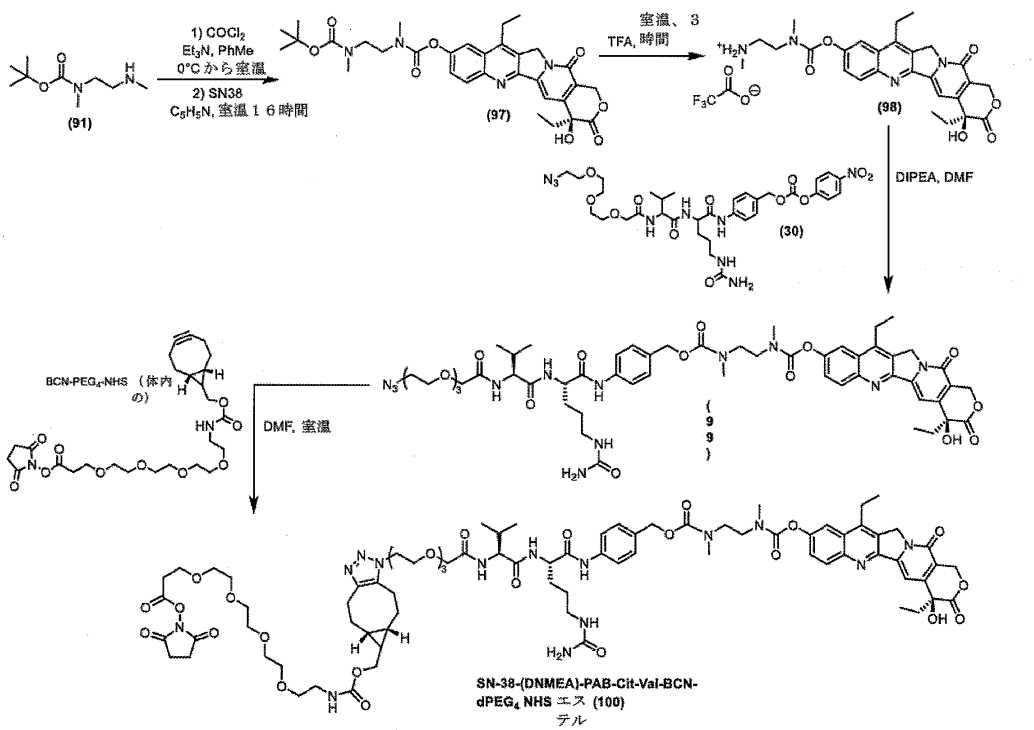
ＤＭＦ（１ｍＬ）中のアジド９４（２．５ｍｇ、０．００３ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、ＢＣＮ－ＰＥＧ$_4$－ＮＨＳ（ＣｏｎｊｕＰｒｏｂｅ）（０．７ｍｇ、０．００３ｍｍｏｌ）を添加し、室温で３時間撹拌し、減圧下で濃縮させて、黄色い固形物としての所望の生成物９６（３ｍｇ、９３％の収率）を得た。

【０６００】

実施例５５－ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ＢＣＮ－ｄＰＥＧ$_4$－ＮＨＳエステル（１００）の調製

【０６０１】

【化４１】



【０６０２】

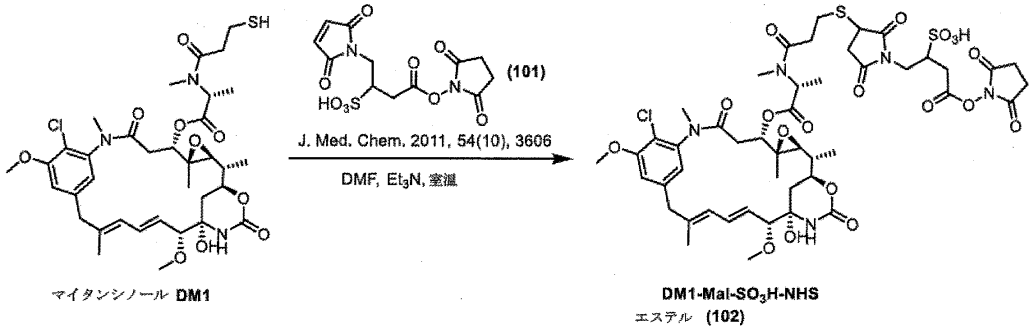
０℃のトルエン（１５重量％、０．３６ｍＬ、０．５５ｍｍｏｌ）中のホスゲンの撹拌溶液に、トルエン（１．３２ｍＬ）中のＢＯＣ－ジアミン９１（９４ｍｇ、０．５０ｍｍｏｌ）及びＥｔ$_3$Ｎ（７７μＬ、０．５５ｍｍｏｌ）の溶液を滴下し、０℃で２時間撹拌し、室温に一晩温め濾過し、トルエン（５ｍＬ）で洗浄し、減圧下で濃縮させ、ピリジン（２．２３ｍＬ、２７．６ｍｍｏｌ）に溶解し、これにＳＮ３８（１５０ｍｇ、０．３９ｍｍｏｌ）を添加し室温で一晩撹拌し、ＥｔＯＡｃ（１００ｍＬ）で希釈し、水（３×１００ｍＬ）で洗浄し乾燥させ、減圧下で濃縮させクロマトグラフにかけて（ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$中に０～１０％のＭｅＯＨ）、黄色い固形物としての表題の生成物（７２ｍｇ、３１％）を得た。Ｒ$_f$＝０．５７（ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$中に１０％のＭｅＯＨ）；^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）δ８．１５（ｄｄ、Ｊ＝９．３、５．７Ｈｚ、１Ｈ）、７．８５～７．７３（ｍ、１Ｈ）、７．６４～７．６１（ｍ、１Ｈ、７．５３～７．４８（ｍ、１Ｈ）、５．６４（ｄ、Ｊ＝１６．３Ｈｚ、１Ｈ）、５．２２（ｄ、Ｊ＝１６．３Ｈｚ、１Ｈ）、５．１８（ｓ、２Ｈ）、３．６５～２．８５（ｍ、６Ｈ）、２．８２（ｓ、６Ｈ）、１．８５（ｐ、Ｊ＝７．１Ｈｚ、２Ｈ）、１．４０（ｓ、９Ｈ）、１．３４（ｔ、Ｊ＝７．８Ｈｚ、３Ｈ）、０．９４（ｔ、Ｊ＝７．３Ｈｚ、３Ｈ）ｐｐｍ；ＬＣＭＳ ｔ$_R$＝２．１０分ｍ／ｚ ６０７．３［Ｍ＋Ｈ］$^+$。

【０６０３】

実施例５６－ＤＭ１－Ｍａｌ－ＳＯ$_3$Ｈ－ＮＨＳ（１０２）の調製

【０６０４】

【化４２】

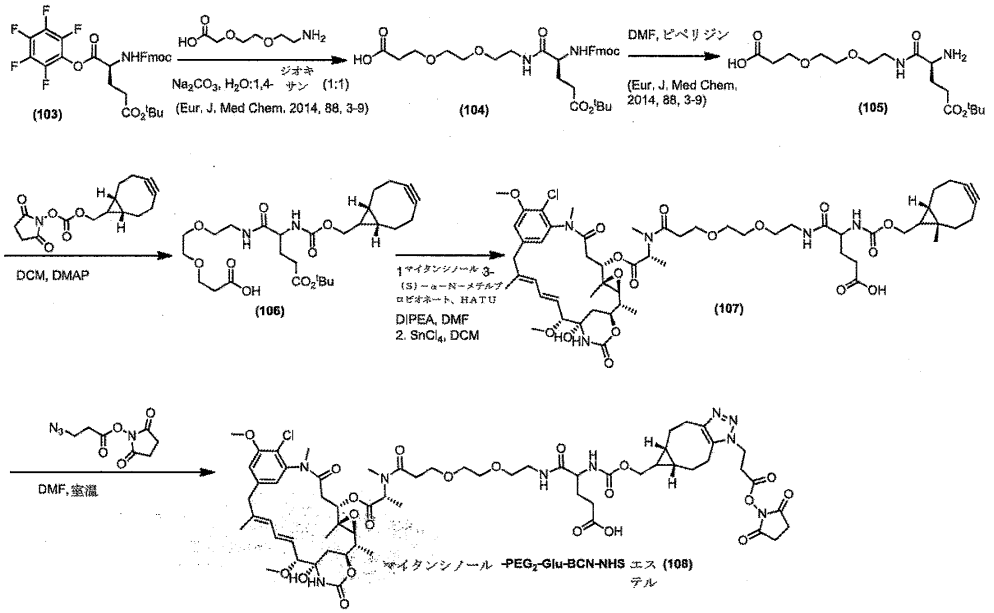


【０６０５】

実施例５７－マイタンシノール－ＰＥＧ$_2$－Ｇｌｕ－ＢＣＮ－ＮＨＳエステル（１０８）の調製

【０６０６】

【化４３】

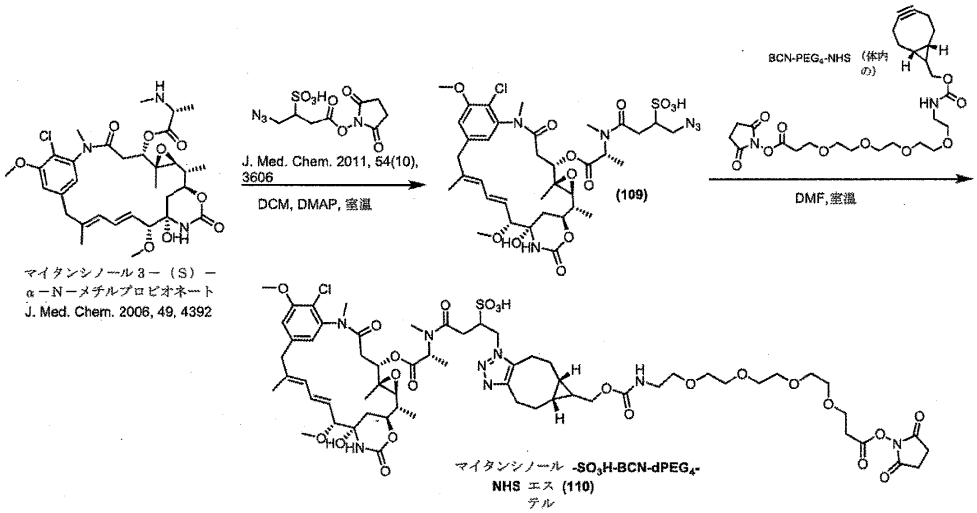


【０６０７】

実施例５８－マイタンシノール－ＳＯ$_3$Ｈ－ＢＣＮ－ｄＰＥＧ$_4$－ＮＨＳエステル（１１０）の調製

【０６０８】

【化４４】

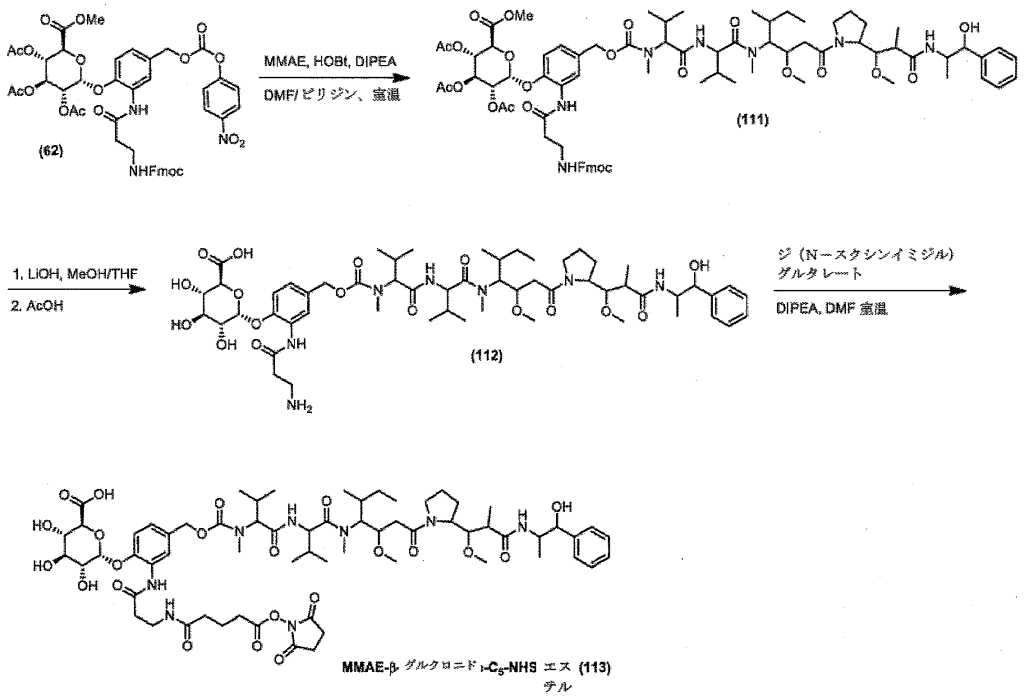


【０６０９】

実施例５９－ＭＭＡＥ－β－グルクロニド－Ｃ$_5$－ＮＨＳエステル（１１３）の調製

【０６１０】

【化４５】

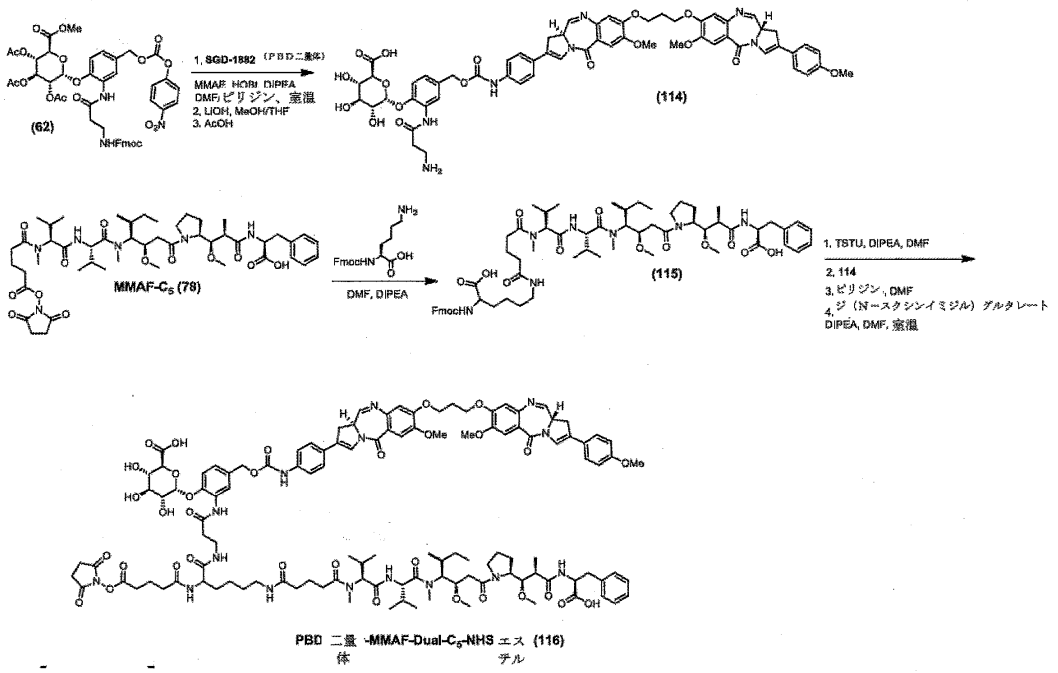


【０６１１】

実施例６０－ＰＢＤ－ＭＭＡＦ－二量体－Ｃ$_5$－ＮＨＳエステル（１１６）の調製

【０６１２】

【化４６】

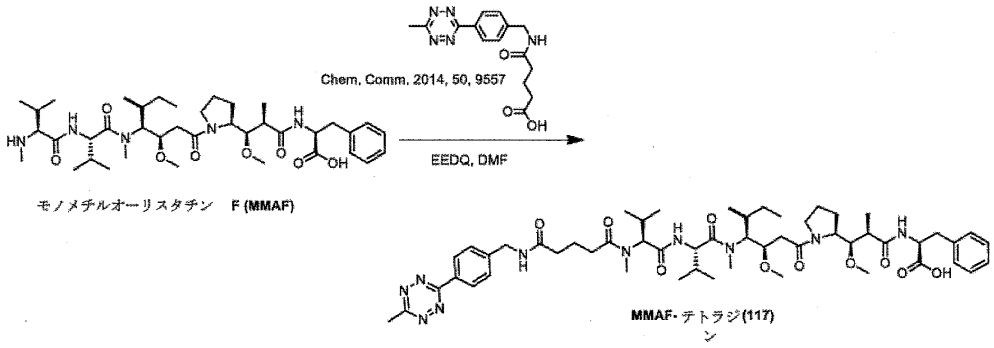


【０６１３】

実施例６１－ＭＭＡＦ－テトラジン（１１７）の調製

【０６１４】

【化４７】



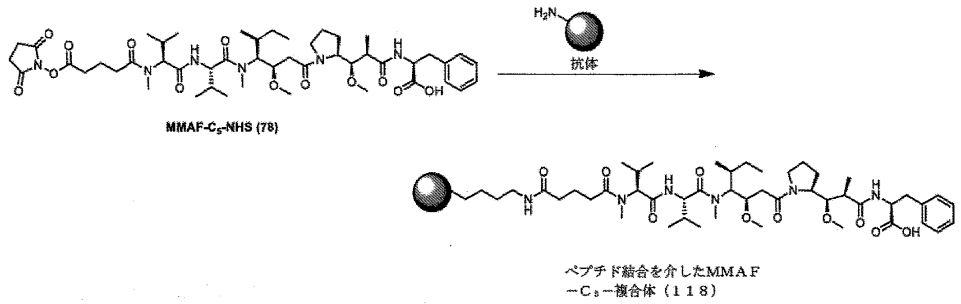
【０６１５】

実施例６２－複合体のためのスキーム

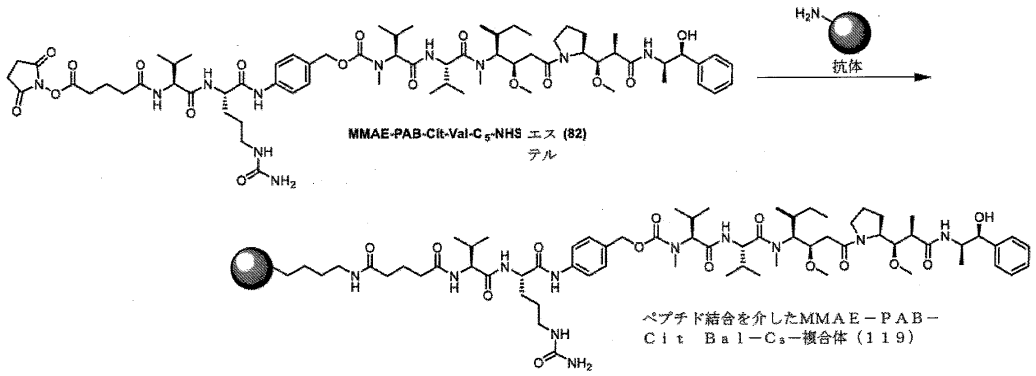
ＭＭＡＦ－Ｃ$_5$複合体（１１８）

【０６１６】

【化４８】

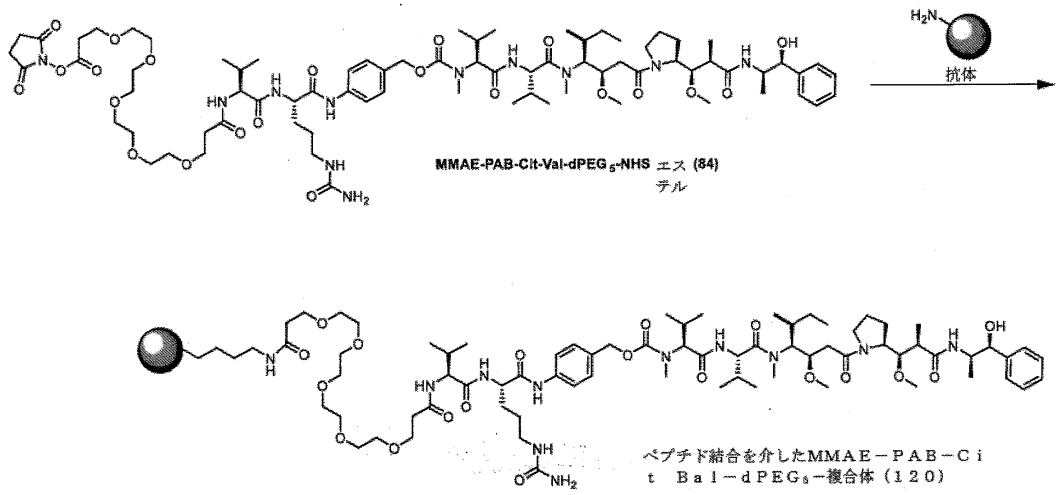


【０６１７】
ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－Ｃ$_5$複合体（１１９）
【０６１８】
【化４９】



【０６１９】
ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_5$複合体（１２０）
【０６２０】

【化５０】

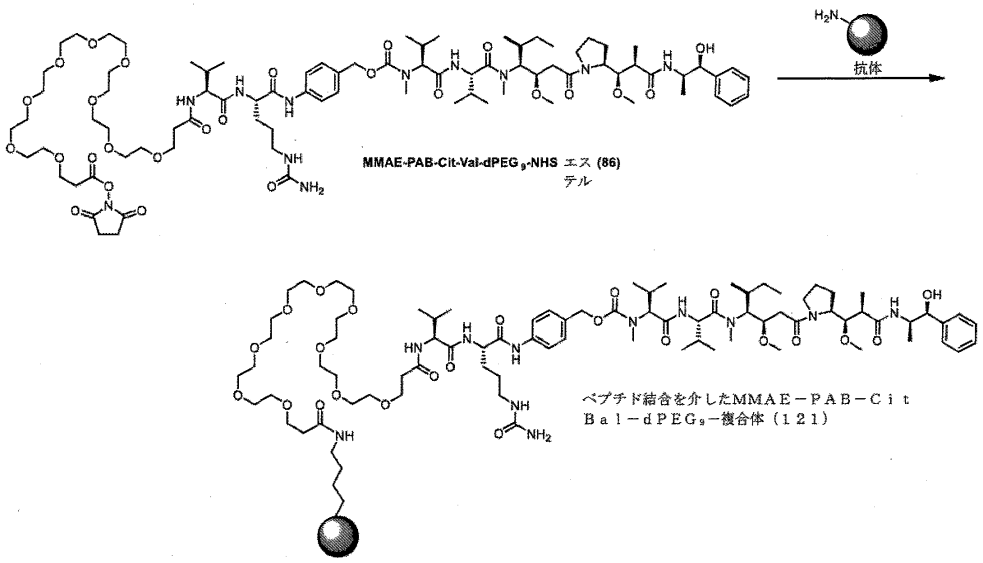


【０６２１】

ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_{9}$複合体（１２１）

【０６２２】

【化５１】

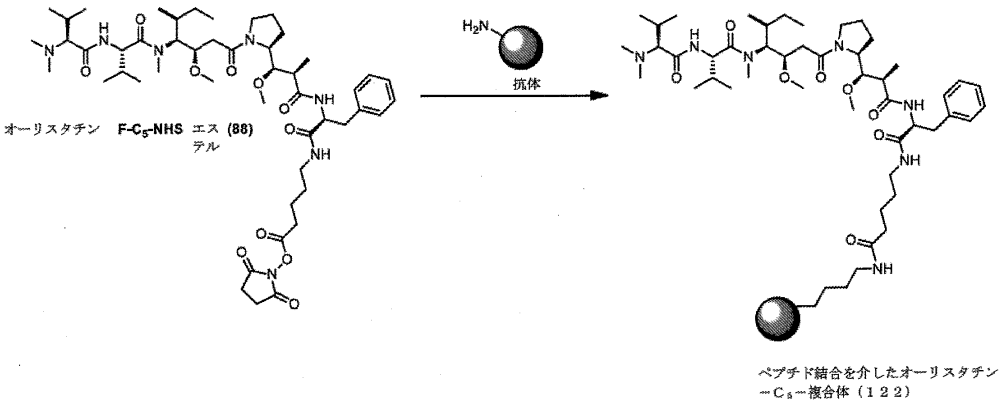


【０６２３】

オーリスタチンＦ－Ｃ$_{5}$複合体（１２２）

【０６２４】

【化５２】

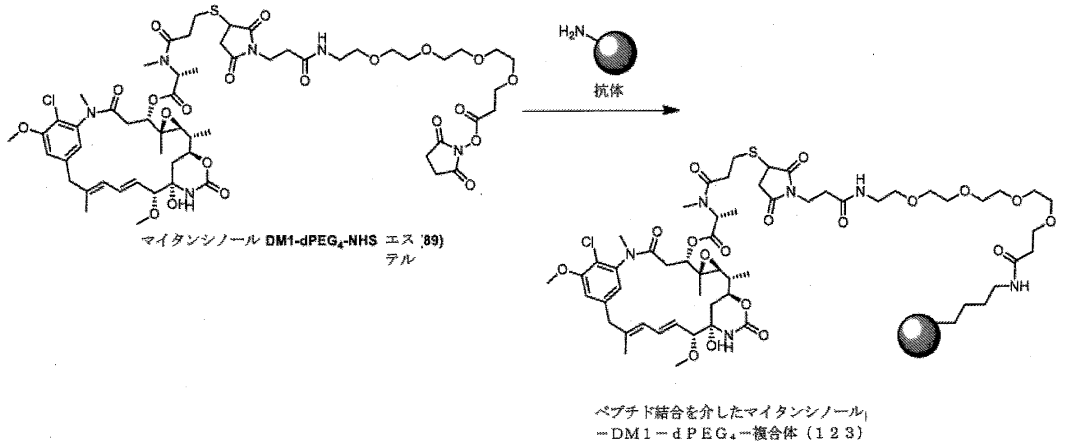


【０６２５】

マイタンシノールＤＭ１－ｄＰＥＧ$_4$複合体（１２３）

【０６２６】

【化５３】

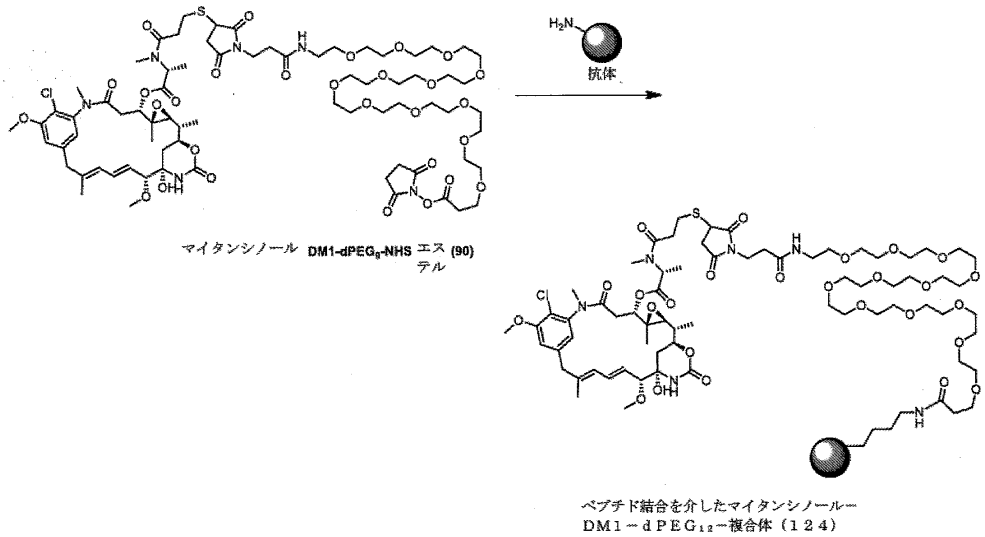


【０６２７】

マイタンシノールＤＭ１－ｄＰＥＧ$_{12}$複合体（１２４）

【０６２８】

【化５４】

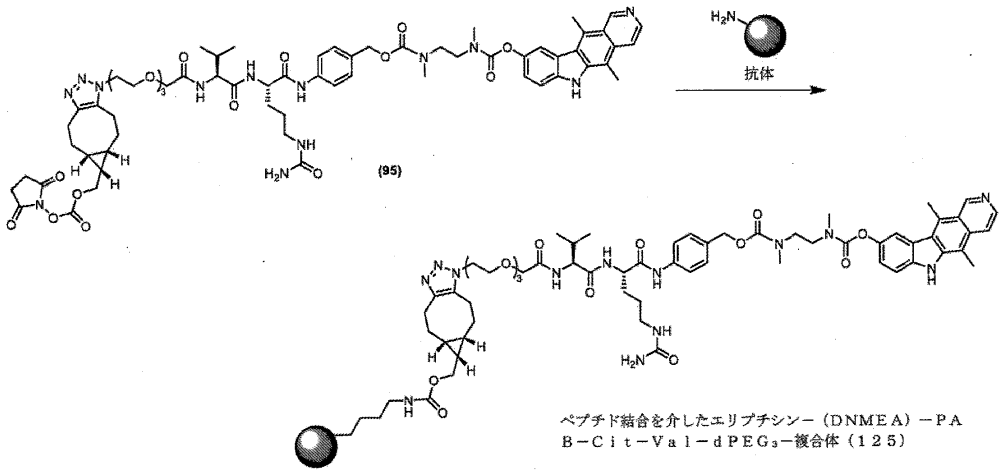


【０６２９】

エリプチシン－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_3$複合体（１２５）

【０６３０】

【化５５】

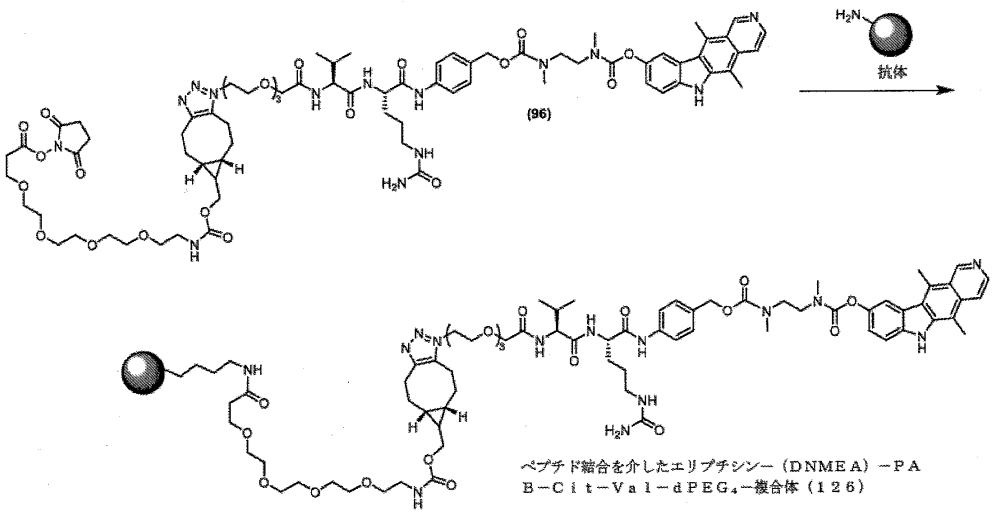


【０６３１】

エリプチシン－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ＢＣＮ－ｄＰＥＧ$_4$複合体（１２６）

【０６３２】

【化５６】

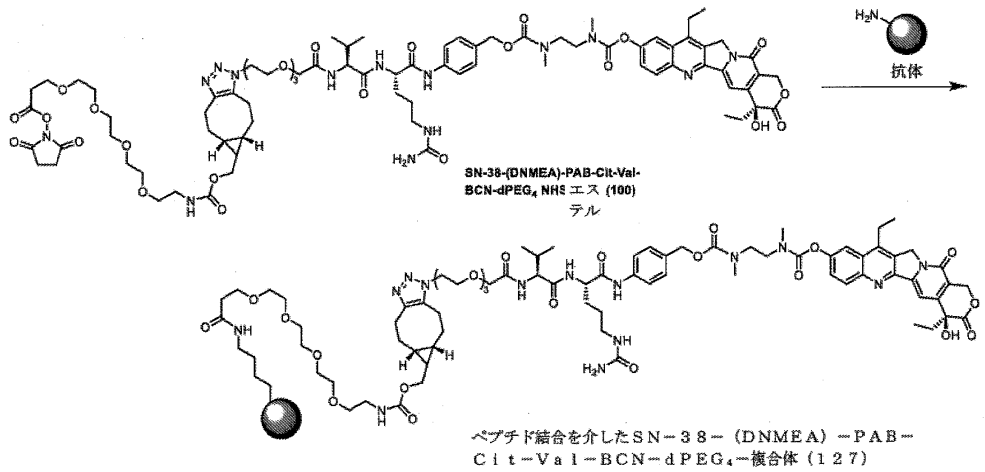


【０６３３】

ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ＢＣＮ－ｄＰＥＧ$_4$複合体（１２７）

【０６３４】

【化５７】

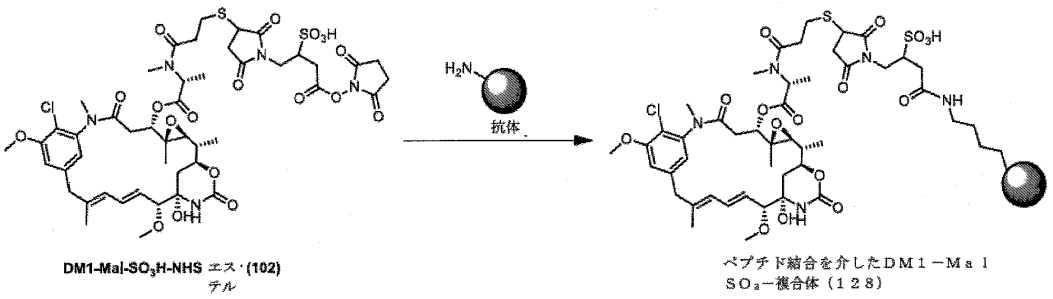


【０６３５】

ＤＭ１－Ｍａｌ－ＳＯ$_3$Ｈ複合体（１２８）

【０６３６】

【化５８】

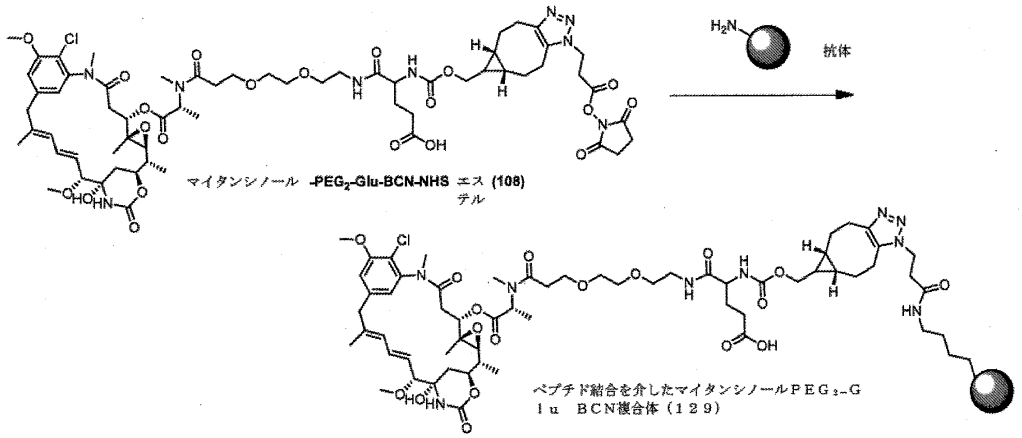


【０６３７】

マイタンシノール－ＰＥＧ$_2$－Ｇｌｕ－ＢＣＮ複合体（１２９）

【０６３８】

【化５９】

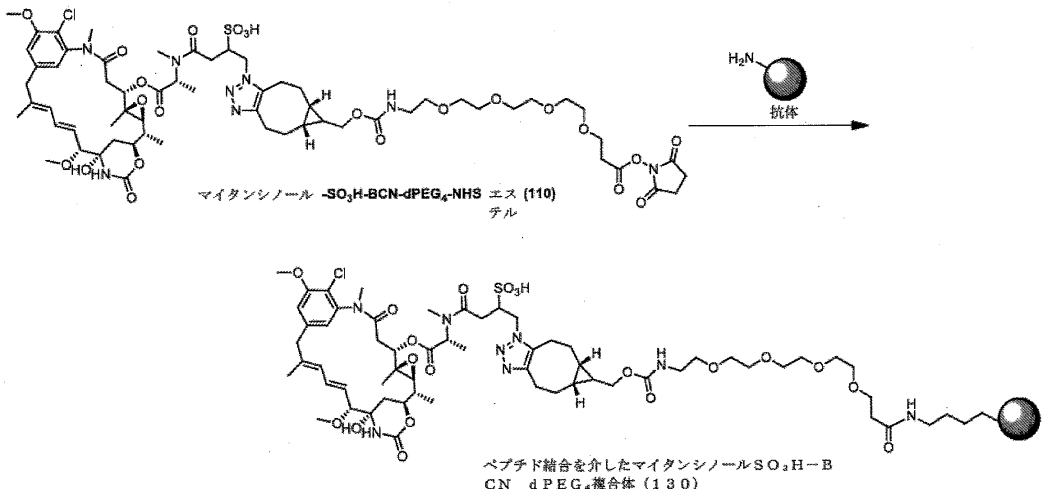


【０６３９】

マイタンシノール－ＳＯ$_3$Ｈ－ＢＣＮ－ｄＰＥＧ$_4$複合体（１３０）

【０６４０】

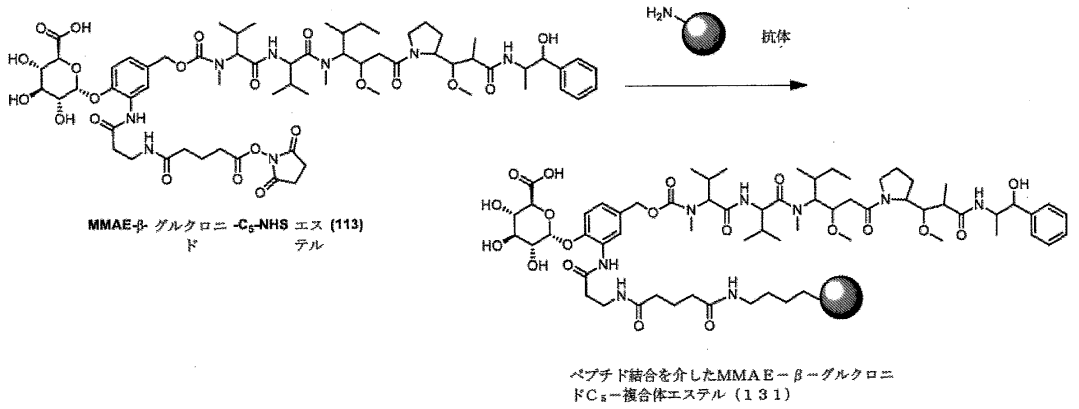
【化６０】



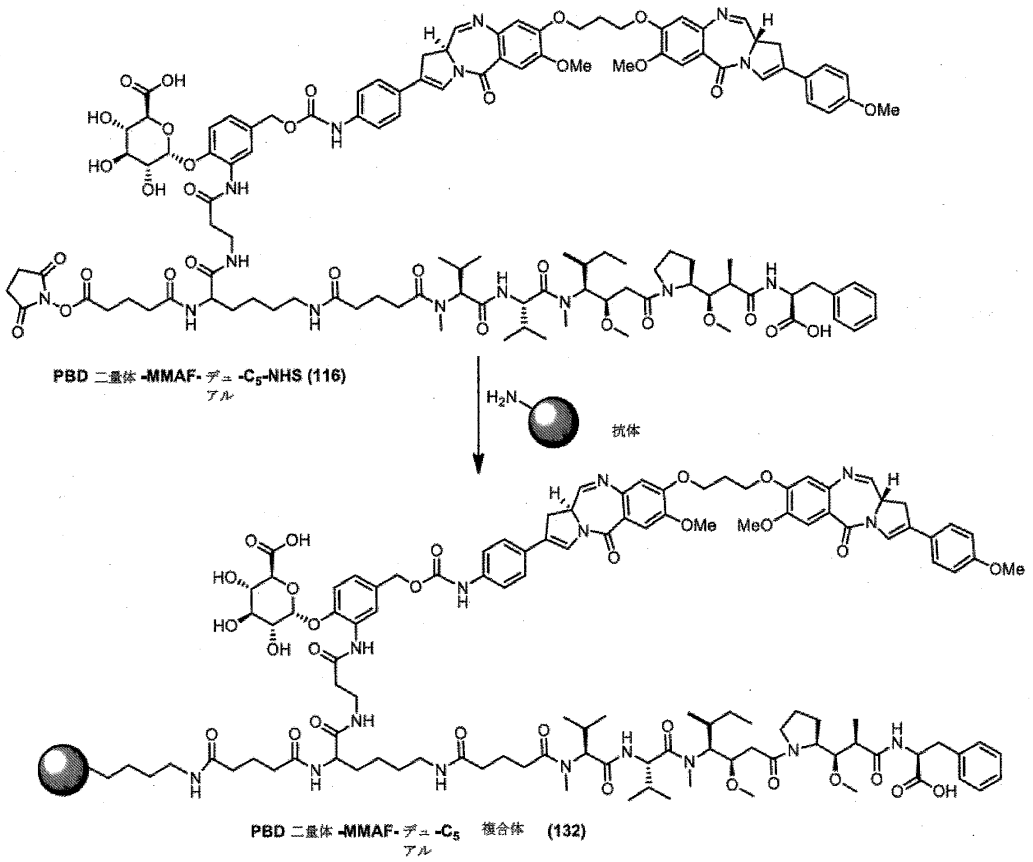
【０６４１】

ＭＭＡＥ－β－グルクロニド－Ｃ$_5$複合体（１３１）

【０６４２】
【化６１】

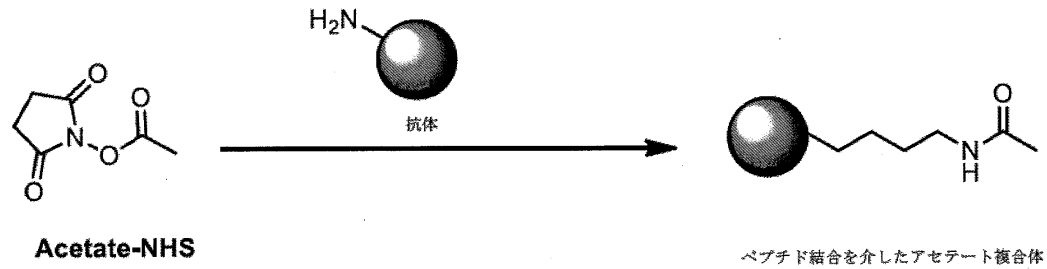


【０６４３】
ＰＢＤ二量体－ＭＭＡＦ－デュアル－Ｃ$_5$複合体（１３２）
【０６４４】
【化６２】



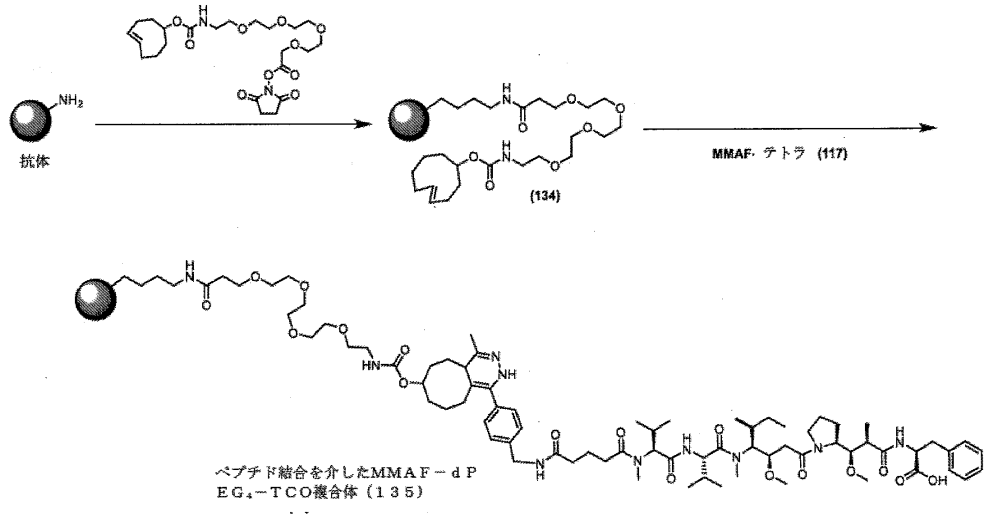
【０６４５】
アセテート複合体（１３３）
【０６４６】

【化６３】



ペプチド結合を介したアセテート複合体
（１３３）

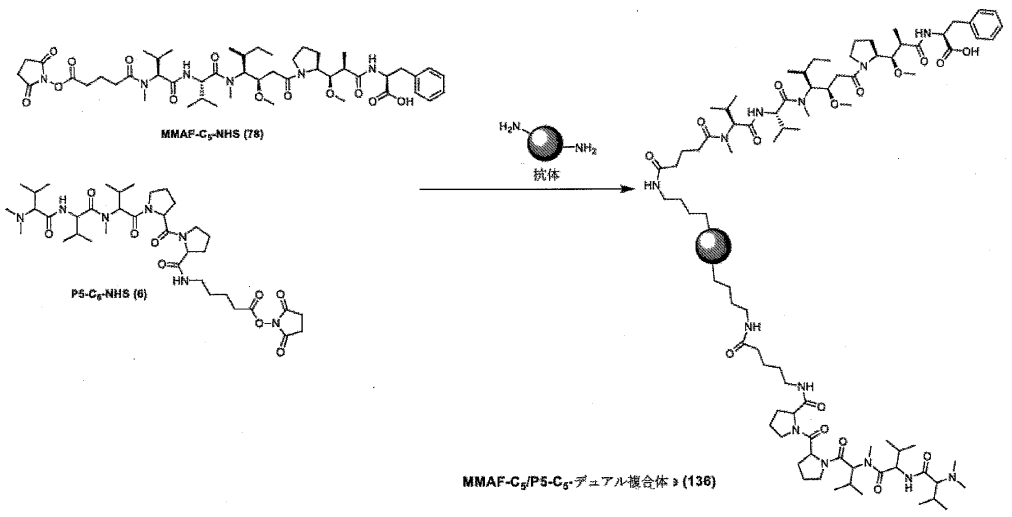
【０６４７】
ＭＭＡＦ－ｄＰＥＧ$_4$－ＴＣＯ複合体（１３５）
【０６４８】
【化６４】



ペプチド結合を介したＭＭＡＦ－ｄＰＥＧ$_4$－ＴＣＯ複合体（１３５）

【０６４９】
ＭＭＡＦ－Ｃ５／Ｐ５－Ｃ５デュアル複合体（１３６）
【０６５０】

【化６５】



【０６５１】

実施例６３。複数のよく分散した表面リジン残基を有する高親和性単鎖Ｆｖ抗体断片の発現及び精製

高親和性抗ＨＥＲ２細胞質発現ｓｃＦｖクローン、ＴＣＴ１０６７の構築

実施例２７の抗ＨＥＲ２　ｓｃＦｖを、変異誘発によって修飾して、その結合親和度を１０００倍超に上昇させた［Ｓｃｈｉｅｒ　Ｒ　ｅｔ　ａｌ　（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ　２６３，５５１－６７］。これは、複数のよく離間した、最適に位置付けられた表面リジン残基構成を維持し、実施例２７に記載されるように発現及び精製した。

【０６５２】

得られたタンパク質を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）と呼んだ。ＤＮＡ及びタンパク質配列は、以下である。

【０６５３】

開裂ＴＣＴ１０６７のＤＮＡ配列

【０６５４】

【化６６】

GCGGTAGCGGAGGTAGCGGACAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGA
GGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATA
CAGCTTTACCAGCTACTGGATCGCCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAG
GCCTGGAGTACATGGGGCTCATCTATCCTGGTGACTCTGACACCAAATACA
GCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGTCGACAAGTCCGTCAGCA
CTGCCTACTTGCAATGGAGCAGTCTGAAGCCCTCGGACAGCGCCGTGTATT
TTTGTGCGAGACATGACGTGGGATATTGCACCGATCGTACCTGCGCAGCGT
GGCCTGAATGGCTGGGCGTGTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCC
TCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCA
GTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGG
TCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATC
CTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATCTATGGTCA
CACCAATCGGCCCGCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG
CACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGTTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGA
TTATTACTGTGCAAGCTGGGATTATACCCTGAGTGGTTGGGTGTTCGGCGGA
GGGACCAAGCTGACCGTCCTAATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATG
GGTTGATGAGGCTCTAACTCTCCTCT［配列番号３］

【０６５５】

キー：

肉太活字＝ＴＥＶ開裂後に残る残基Ｓｅｒ、下線＝リンカー領域（ＧＳＧＧＳＧ）

書式なし＝ｓｃＦｖ配列、肉太活字斜体＝Ｔ７タグ配列。

【０６５６】

開裂ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）のアミノ酸配列

【０６５７】

【化６７】

SGSGGSGQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS
YWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGDSDTKYSPSFQGQVT
ISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHDVGYCTDR
TCAAWPEWLGVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG
SQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWY
QQLPGTAPKLLIYGHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAI
SGFRSEDEADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVL***MAS***
MTGGQQMG［配列番号４］

【０６５８】

アミノ酸：２７２の数、分子量：２８，２１９Ｄａ

理論ＰＩ：８．１４、吸光係数：７０　７３５。

【０６５９】

実施例６４Ａ。ＮＨＳを有する部分への複数のよく分散した表面リジン残基を有する単

鎖Ｆｖ抗体断片の生体複合化

ペイロード－ＮＨＳにｓｃＦｖを複合化するための一般的方法

最初に、純粋なペイロード－ＮＨＳの加水分解速度をその利用能を最適化するために、選択した緩衝液条件で調査した。考慮に入れた他の要因は、緩衝液／ｐＨ／有機溶媒中での抗体の安定性、薬物の安定性、及び反応への薬物添加の量および速度であった。別段の指定がない限り全体にわたって確認および使用した条件は、以下であった。

【０６６０】

【表２１】

表１５：

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．８の１５０ｍＭのＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	１ｍｇ／ｍｌ
ペイロードＮＨＳ処理	５０ｍＭまたは１００ｍＭのいずれかの濃度の１００％の無水の濾過済みＤＭＳＯに溶解した
ペイロード添加速度	７０～１２０分毎に
ペイロード添加当量	１０～１６当量

【０６６１】

ｓｃＦｖを４℃で解凍し、形成されたあらゆる析出物を遠心分離によって回収した（１０分、１０ｋｒｐｍ、４℃）。

【０６６２】

ペイロード－ＮＨＳの保存溶液を無水の濾過済みＤＭＳＯ中で調合し、あらゆる析出物を遠心分離によって回収した。重炭酸塩緩衝液ｐＨ８．８をタンパク質低結合エッペンドルフマイクロチューブ中で濾過済み無水ＤＭＳＯと合わせて、混合物を（温度を４℃～２０℃に上昇させて、１０００ｒｐｍで混合しながら）ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒで平衡化した。抗体を添加し、１０分間さらに平衡化した（２０℃、１０００ｒｐｍ）後で、ペイロード－ＮＨＳを添加した。これは、（ペイロードに応じて）ｘの数の当量のＮＨＳ薬物ＤＭＳＯストックを添加し、７０～１２０分毎に反転させて混合した後でｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に戻し、２０℃、１０００ｒｐｍで混合することによって行った。使用される当量の総数は、必要なＤＡＲに左右された。試料を、最後の添加後、さらに２～１８時間Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に置いたままにした。次いで、試料を遠心分離（２．５分、１１ｋｒｐｍ、４℃）によって回収した。

【０６６３】

すべての試料のｐＨを（０．１ＭのＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$の添加によって）中和させ、ｐＨ７、２０℃の１０％のＩＰＡ／ＰＢＳで溶出するＴｏｓｏｈ　ＴＳＫＧｅｌ　Ｇ２０００ＳＷ$_{XL}$カラムにより、ＨＰＬＣ－ＳＥＣによって精製した。試料及び画分を初めから終わりまで冷やしておき（４℃）、関連画分を合わせ、Ｖｉｖａｓｐｉｎカラム（ＨＹまたはＰＥＳ膜）（１０，０００ＭＷＣＯ）によって濃縮させた。ＩＰＡを、ＰＢＳを使用して数回スピン濃縮によって除去し（少なくとも５００倍）、０．２μｍのｓｕｐｏｒ膜をとおして濾過し、ＵＶ／Ｖｉｓ分光法及びアミノ酸分析を使用して定量化した。

【０６６４】
最終生成物を以下によって分析した。
【０６６５】
１．ＳＤＳ－ＰＡＧＥの還元
プレキャスト還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル（１２％）を、試料の分析のために常に使用し、クーマシーブルーで染色した。
【０６６６】
２．アミノ酸分析
ＤＡＲ及び試料濃度を、ケンブリッジ大学のタンパク質及び核酸化学施設で、アミノ酸分析（ＡＡＡ）によって正確に決定した。ＡＡＡから、（フィンガープリント放出に起因する（各薬物については表１６Ａを参照されたい））タンパク質及び薬物両方のモルでの量を、導き出すことができ、ＤＡＲが計算される（薬物のモル数／タンパク質のモル数）。溶液中のタンパク質の濃度は、まずＤＡＲに基づいて複合体の分子量を計算し、続いて、ＡＡＡから得られた濃度をｍｇ／ｍＬのタンパク質に変換することによって計算することができる。例えば、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）は２８１６２（ＭＳ）であり、ＤＡＲ「Ｘ」であり、各薬物分子は、抗体上に「ＸＸ」個付加する。したがって、複合体ＭＷ＝２８１６２＋（ＸｘＸ）＝Ｘである。濃度は、Ｘｎｍｏｌ／ｍｌであり、これは、Ｘμｇ／ｍＬのタンパク質に相当する。
【０６６７】
【表２２】

表１６Ａ：アミノ酸分析を使用した定量化

ペイロード	定量化のために遊離及び使用したアミノ酸
Ｐ５Ｃ５	５－アミノ吉草酸
セマドチン	４－アミノメチル安息香酸
ＭＭＡＦ	非定型のものなし、過剰フェニルアラニンの計算を使用した
ＡＦ	５－アミノ吉草酸
ＭＭＡＥ	オルニチン（シトルリンから）
ＤＭ１	同定可能な断片なし

【０６６８】
３．ＨＰＬＣ－ＳＥＣ
試料を、Ｔｏｓｏｈ　ＴＳＫＧｅｌ　Ｇ２０００ＳＷ$_{ＸＬ}$によって、またはＳｅｐａｘ　Ｚｅｎｉｘ－Ｃ　ＳＥＣ－１５０、３μｍ、７．８ｘ３００ｍｍによって分析及び／または精製し、２１４及び２８０ｎｍ、流量０．５ｍｌ／分で３０分間、２０℃、４℃の試料で監視した。典型的には、分析的運転の場合２０μｇのタンパク質、及び半調製的運転の場合３００μｇのタンパク質を注射した。
【０６６９】
４．質量分析
試料調製：遊離抗体及び複合体（ペイロードＭＭＡＦ、Ｐ５Ｃ５、ＡｕＦ、及びＭＭＡＥ）を、１０．５ｇで２分間遠心分離することによって、ＣＯＳＴＡＲ（Ｒ）ＳＰＩＮ－Ｘ（Ｒ）（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）により脱塩した。
【０６７０】
典型的には、遊離抗体、Ｐ５、ＡＦ、及びＭＭＡＥ複合体に対して、２０～３０μｇのタンパク質を使用した。ＭＭＡＦに対しては、８０μｇのタンパク質を使用した。
【０６７１】
ＤＭ１複合体を、０．５ｍＬ　ｚｅｂａカラム（ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）を使用して脱塩し、３０μｇのタンパク質を注射した。
【０６７２】
液体クロマトグラフィー実験を、ＭＳＱ　Ｐｌｕｓ　Ｓｉｎｇｌｅ　Ｑｕａｄ　Ｄｅｔ

ｅｃｔｏｒ（ＳＱＤ）と接続したＡｇｉｌｅｎｔ １１００システムによって行った。ＸＢｒｉｄｇｅカラム、ＢＥＨ３００ Ｃ４ ３．５μｍ、２．１ｘ１００ｍｍを、０．５ｍｌ／分で、９５％のＡから５０％のＢへの１０分勾配を使用し、次いで５０％のＢで５分間維持し、ここで、
Ａ：H_2O／０．１％のＦＡ
Ｂ：９０％のCH_3CN／H_2O（０．１％のＦＡ）
波長：２５４ｎｍである。

【０６７３】

器具のパラメータを、高分子量種の安定化及び透過を可能にするように、最適化した。走査範囲：ｍ／ｚ＝５００～２０００。走査時間：１．５秒。データを、連続型モードで得た。ＭＳのエレクトロスプレー源を、４．２ｋＶの細管電圧及び５０Ｖのコーン電圧で運転した。窒素を６００Ｌ／時間の合計流で、噴霧器及び脱溶媒和ガスとして使用した。イオン系列を、３．５～５．０分の範囲にわたり全イオンクロマトグラム（ＴＩＣ）の統合によって生成した。タンパク質試料の全質量スペクトルを、事前にインストールしたＰｒｏＭａｓｓソフトウェアを使用して、イオン系列から構築した。

【０６７４】

Ｂｉａｃｏｒｅ表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）による結合分析

固定化ＨＥＲ２標的抗原に対する結合親和度を、Ｂｉａｃｏｒｅ ＳＰＲによって決定し、Ｂｉａｃｏｒｅ Ｔ２００で未修飾ｓｃＦｖと比較した。標準的アミンカップリング法を使用して、すべてのＢｉａｃｏｒｅ表面（ＣＭ５またはＣＭ３）を以下のように調製した。フローセルを０．０５ＭのＮＨＳ中の０．２ＭのＥＤＣの新しく混合した溶液を３０μｌ／分で注射することによって、個々に活性化させた。１２．５μｇ／ｍＬのＨｅｒ２を、固定の所望のレベルに達するまで注射した（典型的には約１５００ＲＵ）。過剰ＮＨＳエステルを、１Ｍのエタノールアミン溶液を使用して不活性化させた。ＨＥＲ２チップ上の抗体及び複合体の動態を測定するために、３倍の系列希釈を（典型的には、遊離抗体に対しては５、２．５、１．２５、０．６μｇ／ｍｌ以下、及び複合体に対しては２０、１０、５、２．５μｇ／ｍｌで）、３０μｌ／分で１６０秒間注射し、９００秒の相分離をさせた。分離時間を、最高濃度のために３６００秒に延長した。表面を、$MgCl_2$ ８Ｍの４５秒の注射で再生した。

【０６７５】

結合能力を評価するために、$MgCl_2$ ８Ｍを使用して、３０μｌ／分での所望の化合物の６０秒の注射、続いて６０秒の待機時間、及び１０μｌ／分での４５秒の再生を用いて手動運転を行った。すべてのデータを、ソフトウェアであるＢＩＡＥｖａｌｕａｔｉｏｎを使用して分析した。

【０６７６】

インビボ試料調製のために複合化を拡大するための方法

新しく濾過した生体複合化緩衝液を、５０ｍｌ ｆａｌｃｏｎチューブ内で新しく濾過した無水ＤＭＳＯと合わせ、Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒによって平衡化した（８００ｒｐｍで、４℃で１２分、６分、２０℃、５００ｒｐｍ）。ｓｃＦｖを４℃で解凍し、形成されたあらゆる析出物を遠心分離によって回収した（１０分、１０ｋｒｐｍ、４℃）。ペイロード－ＮＨＳの保存溶液を無水の濾過済みＤＭＳＯに溶解し、形成されたあらゆる析出物を遠心分離によって回収した。抗体を緩衝液混合物に添加し、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒによって２０℃、３５０ｒｐｍで１０分間平衡化させた後で、ペイロード－ＮＨＳを添加した。これは、必要な当量のペイロード－ＮＨＳ ＤＭＳＯストックを添加した後で、ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に戻し、２０℃、３５０ｒｐｍで混合することによって行った。試料を、最後の添加後、さらに２時間／１８時間Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ上に置いたままにした。次いで、試料を、特に指定のない限り遠心分離によって回収し（２０分、４ｋｒｐｍ、４℃）、ＳＥＣによって精製し、１０％のＩＰＡ／ＰＢＳで溶出するＳｕｐｅｒｄｅｘ７５、２６／６００カラムを使用して、ＡＫＴＡ Ａｖａｎｔシステムにより精製した。カラムの最大流量を２．６ｍｌ／分で使用し、２１４及び２８０ｎｍの波長を検出した

。粗試料及び画分を、精製プロセスの間中ずっと冷やしておいた。画分を合わせ、Ｖｉｖａｃｅｌｌ　１００　１０ｋMWCO（ＰＥＳ膜）（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）を使用して濃縮させた後で、同じプロセスを使用してＰＢＳへと緩衝液交換した。濃縮し、緩衝液交換した試料を、ＵＶ／Ｖｉｓ分光法によって定量化し、無菌の０．２μｍ　ｓｕｐｏｒ膜をとおして濾過し、再定量化し、適切に希釈し、Ｂｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲによってＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ、アミノ酸分析、質量分析及び結合分析によって前と同じように分析した。

【０６７７】

トラスツズマブ－ペイロード複合体を、対照試料として合成した。これらの反応をｓｃＦｖに対して上述のように行い、タンパク質濃度及びペイロードＮＨＳ付加における変化に注目した。

【０６７８】

【表２３】

表１６Ｂ：トラスツズマブ生体複合化のための反応条件

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．８の１５０mMのＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	５ｍｇ／ｍｌ
ペイロード－ＮＨＳ処理	１００％の無水の濾過済みＤＭＳＯ中の（ｓｃＦｖのように）１００mMまたは５０mMの溶液
ペイロード－ＮＨＳ添加速度	不適用
ペイロード－ＮＨＳ添加部分	すべて一度に添加した

【０６７９】

以下のトラスツズマブ複合体を、以下の反応条件を使用して作製した。

トラスツズマブ－Ｐ５－Ｃ５；６当量、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５；７当量、トラスツズマブ－ＡＦ－Ｃ５；５．５当量、トラスツズマブ－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$；６当量。

【０６８０】

複合体を、適切なＨＰＬＣ－ＳＥＣカラム、Ｔｏｓｏｈ　ＴＳＫＧｅｌ　Ｇ３０００ＳＷ$_{XL}$を使用して、ＡＫＴＡ　Ａｖａｎｔ　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００、２６／６００によりｓｃＦｖのように処理した。

【０６８１】

実施例６４Ｂ。小さいＮＨＳを有する部分への複数のよく分散した表面リジン残基を有する単鎖Ｆｖ抗体断片の生体複合化は、完全オプティリンク化複合化能力を示す。

【０６８２】

小分子アセテート－ＮＨＳ（ＣＨ３－ＣＯ－ＮＨＳ）を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ及びＴＣＴ１０６７）に複合化させて、高ＤＡＲを有する複合体（化合物１３３）を得た（ここで、「薬物」＝小分子アセテートペイロードである）。複合化のために確認及び進められた条件は、以下であった。

【０６８３】

【表２４】

表１７：アセテートーＮＨＳ生体複合化のための反応条件

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．８の１５０ｍＭのＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	１ｍｇ／ｍｌ
アセテートーＮＨＳ処理	１００％の無水の濾過済みＤＭＳＯ中の１００ｍＭの溶液
アセテートーＮＨＳ添加速度	９０分毎に
アセテートーＮＨＳ添加部分	１６当量

【０６８４】

反応を、実施例６４Ａのように行った。

この実施例で、構成は、以下のとおりであった。

【０６８５】

反応１－ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）：Ａｃ－ＮＨＳ、１１０当量、

反応２－ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）：Ａｃ－ＮＨＳ、１１０当量。

【０６８６】

複合化されていないｓｃＦｖｓ及び複合化ｓｃＦｖｓ（ＴＣＴ及びＴＣＴ１０６７）を、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）は、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある７．５３分の保持時間を有した。その複合体は、７．２３分でより早く溶出し、より大きい分子量だが、単一の鋭い単量体ピークとして示し、凝集を示さなかった（図４４）。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）は、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある７．３６分の保持時間を有した。その複合体は、７．１５分でより早く溶出し、（異なる小分子負荷に起因して）より大きい分子量だが、単一の鋭い単量体ピークとして示し、凝集を示さなかった（図４４）。

【０６８７】

ＬＣ－ＭＳ方法及びデータ獲得（変性非共有条件）

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ及びＴＣＴ１０６７）－アセテートのＬＣＭＳ、総イオン電流（ＴＩＣ）クロマトグラム及びスペクトル、ならびにデコンボリューション済みデータを、図４５及び４６に示し、要約を表１８に示す。

【０６８８】

単一の主なピークを、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ及びＴＣＴ１０６７）－アセテート試料のＴＩＣで認めた。ＴＣＴ－アセテートは１０．１分の時点で溶出し、ＴＣＴ１０６７－アセテートは１０．３分の時点で溶出する。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ＴＣＴ－アセテートに関してはｍ／ｚ　２８７９２に、及びＴＣＴ１０６７－アセテートに関しては２８８９１に主なピークを生成し、これは、小分子それぞれの１５及び１６個の付加と共に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ及びＴＣＴ１０６７）分子の提供された理論質量と一致した。

【０６８９】

【表２５】

表１８：ｓｃＦｖ－アセテート複合体（１３３）のＬＣ－ＭＳ分析の要約

試料	保持時間（分）	認められたピーク質量（ｍ／ｚ）	添加された質量（ｍ／ｚ）	計算されたＤＡＲ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）	８．２７	２８１６０	０	０
ＴＣＴ－アセテート複合体１	１２．１	２８７９２	６３２	１５
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	８．３５	２８２１５	０	０
ＴＣＴ１０６７－アセテート複合体２	１０．７２	２８８９１	６７２	１６

【０６９０】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ及びＴＣＴ１０６７）－アセテート複合体の結合活性

ＳｃＦｖ（ＴＣＴ及びＴＣＴ１０６７）－アセテート複合体を作製し、上述のように特徴付けた。固定化ＨＥＲ２標的抗原に対するこれらの結合親和度を、Ｂｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲによって決定し、未修飾ｓｃＦｖと比較した。

【０６９１】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－アセテートＤＡＲ１５は、５．９３ｘ１０^{6}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び１．７１ｘ１０$^{-2}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有し、２．９ｎＭの総結合Ｋｄを提供した。これは、１．４９ｎＭの総結合Ｋｄで、２．８ｘ１０^{6}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び４．１７ｘ１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有した未修飾ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）とよく似ており、結合機能の喪失を示さなかった。

【０６９２】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－アセテートＤＡＲ１６は、３．６３ｘ１０^{6}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び７．６４ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有し、２１ｐＭの総結合Ｋｄを提供した。これは、９．５ｐＭの総結合Ｋｄで、３．９ｘ１０^{6}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び３．７ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有した未修飾ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）と非常に似ており、結合の喪失を示さなかった。

【０６９３】

全体的な小分子（アセテート）の結論、生物物理学的データ

複合化条件を、上に詳述するように最適化した。この最適化は、低、中、及び高ＤＡＲ複合体の極めて高い収率を伴う、制御された複合化反応を可能にした。複合体のいずれにおいても抗体／複合体の析出は認められず、回収率は全体的に非常に高かった。ＳＥＣ　ＨＰＬＣの精製後、得られた複合体を約１ｍｇ／ｍｌに濃縮した。

【０６９４】

分析のために使用した直交技法は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴまたはＴＣＴ１０６７）によって例示される最適化されたｓｃＦｖ構造が、リジン残基を使用して複数の分子を抗体上に完全に負荷され得、複合化は、結合機能及び親和性を維持しながら、所望のＤＡＲを有する（ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって示されるような）単量体複合体を得るように制御され得るということと一致し、これを裏付ける。ＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録によって裏付けられたＬＣＭＳデータは、抗体の双方共に完全リジン占有に効果的に複合化し、単量体複合体を得ることができることを示す。複合体は、両方の事例において、それぞれの抗体対照よりも短いＳＥＣ保持時間を示した。ＬＣＭＳは、両方の事例の複合体が各抗体のリジンの総数

よりも高いＤＡＲを有することを示す。小さいＮＨＳ活性化分子の大幅な過剰で、高アルカリ性ｐＨで反応を行ったとき、二級アミノ酸が複合化し始めることは可能である。この場合、我々は、１２リジン、１末端アミンが主に修飾されると推測する。

【０６９５】

実施例６５。複数のよく分散した表面リジン残基を有する２つの単鎖Ｆｖ抗体断片上への、短リンカーを用いたＭＭＡＦ誘導体の生体複合化

実施例６５Ａ。C_5リンカーを有するＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ

ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ（化合物７８）を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体（化合物１１８）を得た。反応を、中、及び高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御した。複合化のために確認及び進められた条件は、以下であった。

【０６９６】

【表２６】

表１９：ＭＭＡＦＣ５－ＮＨＳ生体複合化のための反応条件

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．８の１５０ｍＭのＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	１ｍｇ／ｍｌ
ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ処理	１００％無水の濾過済みＤＭＳＯ中の５０ｍＭの溶液
ＭＭＡＦ－Ｃ５添加速度	９０分毎に
ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ添加部分	１０当量

【０６９７】

反応を、実施例６４Ａのように行い、いくらかの若干の凝集が粗試料中に認められたことに注目し、これは、試料が精製されたら分離される。回収率は、約５０％であった。この反応は、測定可能であった。

【０６９８】

この実施例において、構成は、以下のとおりであった。

【０６９９】

反応１－ｓｃＦｖ－ＴＣＴ：ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ、６０当量及び
反応２－ｓｃＦｖ－ＴＣＴ：ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ、１００当量。

【０７００】

複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。ｓｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある１７．９分の保持時間を有した。これらの２つの複合体は、ＡＤＣ１に関しては１６．４分の時点で、及びＡＤＣ２に関しては１６．１分の時点でより早く次第に溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量だが、単一の鋭い単量体ピークとして示し、凝集を示さなかった（図４７）。複合化反応２は、１７％のいくらかの凝集を示し、これは、除去することができた。反応２のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルは、完全複合化及びより高い分子量を示した（図４８）。

【０７０１】

ＤＡＲを、ケンブリッジ大学のタンパク質及び核酸化学施設で、アミノ酸分析（ＡＡＡ

）によって決定して、表２０～２１に示す結果を得た。

【０７０２】

【表２７】

表２０．反応１の６．６のＤＡＲを示すＡＡＡの結果の要約

反応：	１	ＴＣＴ－ＭＭＡＦ－Ｃ５	
予想された値に対する測定されたモル比の整数適応			
アミノ酸	予測された値	観測値	予測された値に対する適応の近さ
Ｃｙｓ	６	未決定	－
Ａｓｐ	１５	１６．２０	５～１０％以内
Ｔｈｒ	１４	１４．１２	５％以上
Ｓｅｒ	４６	４３．９７	５％以上
Ｇｌｕ	２２	２１．５７	５％以上
Ｇｌｙ	４４	４３．１９	５％以上
Ａｌａ	１７	１６．４６	５％以上
Ｖａｌ	０	除外	－
Ｍｅｔ	５	５．１５	５％以上
Ｉｌｅ	８	８．２７	５％以上
Ｌｅｕ	１５	１５．７５	５％以上
Ｎｏｒｌｅｕ標準品			
Ｔｙｒ	１４	１４．６２	５％以上
Ｐｈｅ	０	除外	－
Ｈｉｓ	３	３．２２	５～１０％以内
Ｌｙｓ	１２	１２．６９	５～１０％以内
Ａｒｇ	５	４．７９	５％以上
Ｐｒｏ	０	除外	－
Ｔｒｐ	８		（未決定）
（使用した）合計	２２０	残基	

			平均
全試料	０．１６９	ナノモル	０．１６６
	４．７６	ｕｇ	４．６８
濃度	２７．２８	ナノモル／ｍｌ	２６．８０
	７６８．２８	ｕｇ／ｍｌ	７５４．９１
ＭＭＡＦ全試料	１．１３	ナノモル	
ＤＡＲ			６．６４

【０７０３】

【表２８】

表２１。反応２の８のＤＡＲを示すＡＡＡの結果の要約

反応：　２　ＴＣＴ－ＭＭＡＦ－Ｃ５			
予想された値に対する測定されたモル比の整数適応			
アミノ酸	予測された値	観測値	予測された値に対する適応の近さ
Ｃｙｓ	６	未決定	－
Ａｓｐ	１５	１５．３９	５％以上
Ｔｈｒ	１４	１３．５３	５％以上
Ｓｅｒ	４６	４２．７２	５～１０％以内
Ｇｌｕ	２２	２２．５６	５％以上
Ｇｌｙ	４４	４７．６９	５～１０％以内
Ａｌａ	１７	１６．６２	５％以上
Ｖａｌ	０	除外	－
Ｍｅｔ	５	４．６９	５～１０％以内
Ｉｌｅ	８	７．８９	５％以上
Ｌｅｕ	１５	１４．９６	５％以上
Ｎｏｒｌｅｕ標準品			
Ｔｙｒ	１４	１３．８７	５％以上
Ｐｈｅ	０	除外	－
Ｈｉｓ	３	３．１０	５％以上
Ｌｙｓ	１２	１２．２０	５％以上
Ａｒｇ	５	４．７８	５％以上
Ｐｒｏ	０	除外	－
Ｔｒｐ	８		（未決定）
（使用した）合計	２２０	残基	
			平均
全試料	０．０５８	ナノモル	０．０５０
	１．６４	ｕｇ	１．４０
濃度	５．２５	ナノモル／ｍｌ	４．４９
	１４７．９１	ｕｇ／ｍｌ	１２６．４２
ＭＭＡＦ全試料ＤＡＲ	０．４７６		７．９６

【０７０４】

ＬＣ－ＭＳ分析を、実施例６４Ａに記載されるように行った。

【０７０５】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｃ５－ＭＭＡＦ１及び２のＬＣＭＳ、総イオン電流（ＴＩＣ）クロマトグラム及びスペクトル、ならびにデコンボリューション済みデータを、図４９及び５０に示し、要約を表２２に示す。

【０７０６】

主なピークを、溶出しているｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｃ５－ＭＭＡＦ１試料のＴＩＣにおいて１０．２分の時点で認めた。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ３０６４５、３１４７３、３２３０１、及び３３１２９に一連の

主なピークを生成し、これは、ＭＭＡＦ－Ｃ５分子の３～６個の付加と共に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）分子の与えられた理論質量と一致した。試料２に関して、主なピークは、ＴＩＣにおいてｍ／ｚ３１４７４、３２３０２、３３１３０、及び３３９５８でゼロ電荷にデコンボリューションされた質量に対応する９．９～１１．４分の時点で認められ、これは、ＭＭＡＦ－Ｃ５の４～７個の付加と共にｓｃＦｖ（ＴＣＴ）の提供された理論質量と一致した。

【０７０７】

【表２９】

表２２　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－MMAF　Ｃ５複合体（１１８）のＬＣ－ＭＳ分析の要約

試料	保持時間（分）	観察されたピーク質量（ｍ／ｚ）	付加された質量（ｍ／ｚ）	計算されたＤＡＲ	平均ＤＡＲ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）	８．２７	２８１６０	０	０	０
ＴＣＴ－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ１	１０．２	３０６４５	２４８５	３	４．５
		３１４７３	３３１３	４	
		３２３０１	４１４１	５	
		３３１２９	４９６９	６	
ＴＣＴ－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ２	９．９	３１４７４	３３１４	４	５．５
	１０．４	３２３０２	４１４２	５	
	１０．９	３３１３０	４９７０	６	
	１１．４	３３９５８	５７９８	７	

【０７０８】

Ｔｈｅｒｅｆｏｒｅ、ｆｏｒ：

反応１、ＤＡＲはＡＡＡによって６．６４であり、ＭＳによって４．５であり、５．６の平均であった。

反応２、ＤＡＲはＡＡＡによって８．０であり、ＭＳによって５．５であり、６．８の平均であった。

【０７０９】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体の結合活性

ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５（化合物１１８）を作製し、上述のように特徴付けた。固定化ＨＥＲ２標的抗原に対するこれらの結合親和度を、Ｂｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲによって決定し、実施例６４Ａにおいて見られるように未修飾ｓｃＦｖと比較した。

【０７１０】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　１　ＤＡＲ　５．６は、７．７ｘ１０^{5}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び４．２ｘ１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有し、５．４ｎＭの総結合Ｋｄを提供した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　６．８は、１．２ｘ１０^{6}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び４．２ｘ１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有し、３．６ｎＭの総結合Ｋｄを提供した。これは、１．４９ｎＭの総結合Ｋｄで、２．８ｘ１０^{6}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び４．１７ｘ１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有した未修飾ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）と比較して、本質的に変更されておらず、結合機能の喪失を示さなかった。

【０７１１】

全体的なＴＣＴ－ＭＭＡＦ－Ｃ５の結論、生物物理学的データ

複合化条件を、上に詳述するように最適化した。この最適化は、中及び高ＤＡＲ複合体を得るための、制御された複合化反応を可能にした。合成の間に認められた抗体／複合体の最小析出が存在した。ＳＥＣ　ＨＰＬＣの精製後、得られた複合体を約１．５ｍｇ／ｍｌに濃縮し、これは緩衝液中で数カ月間安定していた。

【０７１２】
分析のために使用した直交技法は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）によって例示される最適化されたｓｃＦｖ構造が、リジン残基を使用して複数の薬物を抗体上に負荷され得、複合化は、結合機能及び親和性を維持しながら、所望のＤＡＲを有する（ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって示されるような）単量体複合体を得るように制御され得るということと一致し、これを裏付ける。ＨＰＬＣによって、試料は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）よりも次第に短い保持時間を有し、これらの増加するサイズに起因して、ＳＥＣカラムからより早く溶出した。アミノ酸分析は、さらなる定量分析に極めて有用なツールであり、ＭＳデータを補って完全にした。

【０７１３】
実施例６５Ｂ。C_5リンカーを有するＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ
ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ（化合物７８）を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体（化合物１１８）を得た。確認及び進められた条件は、以下であった。

【０７１４】
【表３０】

表２３：ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ生体複合化のための反応条件

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．８の１５０ｍＭのＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	１ｍｇ／ｍｌ
ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ処理	１００％無水の濾過済みＤＭＳＯ中の５０ｍＭの溶液
ＭＭＡＦ－Ｃ５添加速度	９０分毎に
ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ添加部分	１０当量

【０７１５】
反応を、実施例６４Ａのように行い、いくらかの若干の凝集が粗試料中に認められたことに注目し、これは、試料が精製されたら分離される。総回収率は、約５０～６０％であった。これらの反応は、測定可能であった。

【０７１６】
この実施例において、構成は、以下のとおりであった。

【０７１７】
反応１－ｓｃＦｖ－ＴＣＴ１０６７：ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ、６０当量、及び
反応２－ｓｃＦｖ－ＴＣＴ１０６７：ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ、１００当量．。

【０７１８】
複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）を、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。ＳｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある１８．１分の保持時間を有した。２つの複合体はすべて、若干かつ次第により早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量だが、単

一の鋭い単量体ピークとして示し、凝集を示さなかった（図５１）。

【０７１９】

ＤＡＲを、表２４及び２５に示すように、ケンブリッジ大学のタンパク質及び核酸化学施設でアミノ酸分析（ＡＡＡ）によって正確に決定した。

【０７２０】

【表３１】

表２４。反応１の６のＤＡＲを示すＡＡＡの結果の要約

反応：	１	ＴＣＴ１０６７－ＭＭＡＦ－Ｃ５	
予想された値に対する測定されたモル比の整数適応			
アミノ酸	予測された値	観測値	適応の近さ 予測された値に対する
Ｃｙｓ	６	未決定	－
Ａｓｐ	１４	１５．１１	５～１０％以内
Ｔｈｒ	１７	１６．７７	５％以上
Ｓｅｒ	４４	４１．０２	５～１０％以内
Ｇｌｕ	２１	２０．９９	５％以上
Ｇｌｙ	４５	４４．４４	５％以上
Ａｌａ	１６	１５．６５	５％以上
Ｖａｌ	０	除外	－
Ｍｅｔ	５	４．８４	５％以上
Ｉｌｅ	８	８．２２	５％以上
Ｌｅｕ	１６	１７．１５	５～１０％以内
Ｎｏｒｌｅｕ標準品			
Ｔｙｒ	１４	１４．４９	５％以上
Ｐｈｅ	０	除外	－
Ｈｉｓ	２	２．１１	５～１０％以内
Ｌｙｓ	１２	１２．９３	５～１０％以内
Ａｒｇ	６	６．３０	５％以上
Ｐｒｏ	０	除外	－
Ｔｒｐ	９		（未決定）
（使用した）合計	２２０	残基	
全試料	０．１７	ナノモル	平均 ０．１６
	４．８３	ｕｇ	４．４９
濃度	３８．８０	ナノモル／ｍｌ	３６．０１
	１０９８．２７３８	ｕｇ／ｍｌ	１０１９．３７３１５１
ＭＭＡＦ全試料ＤＡＲ	１．１０９		６．３６

【０７２１】

【表３２】

表２５。反応２の８．６のＤＡＲを示すＡＡＡの結果の要約

反応：　２　ＴＣＴ1.０６７－ＭＭＡＦ－Ｃ５ 予想された値に対する測定されたモル比の整数適応			
アミノ酸	予測された値	観測値	適応の近さ予測された値に対する
Ｃｙｓ	６	未決定	－
Ａｓｐ	１４	１４．８３	５～１０％以内
Ｔｈｒ	１７	１７．６２	５％以上
Ｓｅｒ	４４	４１．７７	５～１０％以内
Ｇｌｕ	２１	２０．６６	５％以上
Ｇｌｙ	４５	４８．１７	５～１０％以内
Ａｌａ	１６	１５．１１	５～１０％以内
Ｖａｌ	０	除外	－
Ｍｅｔ	５	４．９２	５％以上
Ｉｌｅ	８	８．０７	５％以上
Ｌｅｕ	１６	１４．９９	５～１０％以内
Ｎｏｒｌｅｕ標準品			
Ｔｙｒ	１４	１３．７２	５％以上
Ｐｈｅ	０	除外	－
Ｈｉｓ	２	２．０４	５％以上
Ｌｙｓ	１２	１２．０５	５％以上
Ａｒｇ	６	６．０６	５％以上
Ｐｒｏ	０	除外	－
Ｔｒｐ	９		（未決定）
（使用した）合計	２２０	残基	
			平均
全試料 濃度	０．０７１　ナノモル ２．００　ｕｇ ６．４７　ナノモル／ｍｌ １８３．２８　ｕｇ／ｍｌ		０．０７８ ２．２０ ７．１２ ２０１．４３
ＭＭＡＦ全試料　０．６３５ ＤＡＲ			 ８．６１

【０７２２】

ＬＣ－ＭＳ分析を、実施例６４Ａに記載されるように行った。

【０７２３】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｃ５－ＭＭＡＦ　１及び２のＬＣＭＳ、総イオン電流（ＴＩＣ）クロマトグラム及びスペクトル、ならびにデコンボリューション済みデータを、図５２に示し、要約を表２６に示す。

【０７２４】

主なピークを、溶出しているｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｃ５－ＭＭＡＦ１試料のＴＩＣにおいて１０．１分の時点で認めた。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ２９８７４、３０７０２、３１５３０、３２３５８、及び３３１８６に一連の主なピークを生成し、これは、ＭＭＡＦ分子の２～６個の付加と共

にｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）分子の提供された理論質量と一致した。試料２に関して、ＴＩＣは、９．３～１２分で溶出する主ピークを有した。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ３０７０３、３１５３１、３２３５８、３３１８６、３４０１５、及び３４８４３に一連の主なピークを生成し、これは、ＭＭＡＦ分子の３～８個の付加と共にｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）分子の提供された理論質量と一致した。

【０７２５】

【表３３】

表２６　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（１１８）のＬＣ－ＭＳ分析の要約

試料	保持時間（分）	認められたピーク質量（ｍ／ｚ）	添加された質量（ｍ／ｚ）	計算されたＤＡＲ	平均ＤＡＲ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	８．３５	２８２１５	０	０	０
ＴＣＴ１０６７－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１	１０．１	２９８７４	１６５９	２	４．０
		３０７０２	２４８７	３	
		３１５３０	３３１５	４	
		３２３５８	４１４３	５	
		３３１８６	４９７１	６	
ＴＣＴ１０６７－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　２	９．９－１２．０	３０７０３	２４８４	３	５．５
		３１５３１	３３１２	４	
		３２３５８	４１３９	５	
		３３１８６	４９６７	６	
		３４０１５	５７９６	７	
		３４８４３	６６２４	８	

【０７２６】

Ｔｈｅｒｅｆｏｒｅ，

試料１に関して、ＤＡＲは、ＡＡＡによって６．４であり、ＭＳによって４．０であり、５．２の平均であった。

試料２に関して、ＤＡＲは、ＡＡＡによって８．６であり、ＭＳによって５．５であり、７．１の平均であった。

【０７２７】
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体の結合活性
ＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５（化合物１１８）を作製し、上述のように特徴付けた。固定化ＨＥＲ２標的抗原に対するこれらの結合親和度を、Ｂｉａｃｏｒｅ ＳＰＲによって決定し、実施例６４Ａに記載されるように未修飾ｓｃＦｖと比較した。
【０７２８】
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５ ＤＡＲ ５．２は、１．８ｘ１０^{6}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び３．４ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有し、１９．６ｐＭの総結合Ｋｄを提供した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５ ＤＡＲ ７．１は、４．６ｘ１０^{6}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び１．７ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有し、３．８ｐＭの総結合Ｋｄを提供した。これは、９．５ｐＭの総結合Ｋｄで、３．９ｘ１０^{6}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び３．７ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有した未修飾ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）と比較して、本質的に変更されておらず、結合機能の喪失を示さなかった。
【０７２９】
全体的なｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５の結論、生物物理学的データ
複合化条件を、上に詳述するように最適化した。この最適化は、中及び高ＤＡＲ複合体を得るための、制御された複合化反応を可能にした。抗体／複合体のほんの少しの析出が高ＤＡＲ複合体中に認められ、（中ＤＡＲに関しては認められず）、これは、精製して分離された。ＳＥＣ ＨＰＬＣの精製後、得られた複合体を約１～３ｍｇ／ｍｌに濃縮し、これは緩衝液中で数カ月間安定していた。
【０７３０】
分析のために使用した直交技法は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７によって例示される最適化されたｓｃＦｖ構造が、リジン残基を使用して複数の薬物を抗体上に負荷され得、複合化は、結合機能及び親和性を維持しながら、所望のＤＡＲを有する（ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって示されるような）単量体複合体を得るように制御され得るということと一致し、これを裏付ける。ＳＤＳゲル（図５３）上で、中ＤＡＲを有する精製複合体（試料１）が、わずかにより高く流れ、より多分散性であったのに対して、高ＤＡＲ（試料２）に関しては、ゲル上での明らかな移動シフトが存在し、試料は、対照である未修飾ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）よりも明らかにサイズが大きかった。これらの観察は、ＨＰＬＣによってさらに裏付けられ、ここで、試料は、ＴＣＴ１０６７よりも次第に短い保持時間を有し、これらの増加するサイズに起因して、ＳＥＣカラムからより早く溶出した。アミノ酸分析は、さらなる定量分析に極めて有用なツールであり、ＭＳデータを補って完全にした。質量分析は、同じ試料内の高及び低ＤＡＲの両方を明らかにし、ＡＡＡは、平均を提供した。
【０７３１】
実施例６６。複数のよく分散した表面リジン残基を有する高親和性単鎖Ｆｖ抗体断片上へのＰ５－Ｃ５誘導体の生体複合化
Ｐ５－Ｃ５－ＮＨＳ（化合物６）を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体（化合物７１）を得た。反応を、高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御した。複合化のために確認及び進められた条件は、以下であった。
【０７３２】

【表３４】

表２７：Ｐ５－Ｃ５－ＮＨＳ生体複合化のための反応条件

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．８の１５０ｍＭのＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	１ｍｇ／ｍｌ
Ｐ５Ｃ５－ＮＨＳ処理	１００％の無水の濾過済みＤＭＳＯ中の１００ｍＭの溶液
Ｐ５Ｃ５－ＮＨＳ添加速度	８０分毎に
Ｐ５Ｃ５－ＮＨＳ添加部分	１０当量

【０７３３】
反応を、実施例６４Ａに詳述されるように行った。
【０７３４】
この実施例において、構成は、以下のとおりであった。
【０７３５】
反応１－ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）：Ｐ５－Ｃ５－ＮＨＳ、６０当量、。
【０７３６】
複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）を、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。ｓｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある１８．１分の保持時間を有する。複合体は、１６．５分で若干かつより早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量だが、単一の鋭い単量体ピークとして示し、凝集を示さなかった（図５４）。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル（図５５）は、低分散度のきれいな複合体及びｓｃＦｖと比較してより大きい分子量を示した。この反応は、測定可能であった。
【０７３７】
ＤＡＲを、ケンブリッジ大学のタンパク質及び核酸化学施設で、アミノ酸分析（ＡＡＡ）によっても決定し、その結果を、表２８に示す。
【０７３８】

【表３５】

表２８．１０．４のＤＡＲを示すＡＡＡの結果の要約

反応：　１　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５ 予想された値に対する測定されたモル比の整数適応			
アミノ酸	予測された値	観測値	予測された値に対する適応の近さ
Ｃｙｓ	６	未決定	－
Ａｓｐ	１４	１４．６２	５％以上
Ｔｈｒ	１７	１８．２０	５～１０％以内
Ｓｅｒ	４４	４３．２２	５％以上
Ｇｌｕ	２１	１９．７２	５～１０％以内
Ｇｌｙ	４５	４３．９５	５％以上
Ａｌａ	１６	１５．２５	５％以上
Ｖａｌ	１９	２０．２０	５～１０％以内
Ｍｅｔ	０	除外	－
Ｉｌｅ	８	８．６３	５～１０％以内
Ｌｅｕ	１６	１６．１７	５％以上
Ｎｏｒｌｅｕ標準品			
Ｔｙｒ	０	除外	－
Ｐｈｅ	０	除外	－
Ｈｉｓ	２	１．８７	５～１０％以内
Ｌｙｓ	１２	１２．６３	５～１０％以内
Ａｒｇ	６	５．５３	５～１０％以内
Ｐｒｏ	０	除外	－
Ｔｒｐ	９		（未決定）
（使用した）合計	２２０	残基	
			平均
全試料	０．２７４	ナノモル	０．２９９
	７．７７	ｕｇ	８．４７
濃度	６８．６２	ナノモル／ｍｌ	７４．８５
	１９４	ｕｇ／ｍｌ	２１１８．７０
	２．４５		
ＤＡＲ	１０．４		

【０７３９】

質量分光分析を、実施例６４Ａに記載されるように行った。

【０７４０】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５のＬＣＭＳ、総イオン電流（ＴＩＣ）クロマトグラム及びスペクトル、ならびにデコンボリューション済みデータを、図５６に示す。

【０７４１】

主なピークを、溶出しているｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５試料のＴＩＣにおいて７．８分の時点で認めた。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、表２９に示される一連の主なピークを生成し、これは、Ｐ５－Ｃ５分子の１０～１４個の付加と共に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）分子の提供された理論質量と一致し、平均ＤＡＲ１１．７を提供した。これは、１０．４のＤＡＲのＡＡＡ決定とよく

相関する。

【０７４２】

【表３６】

表２９：ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５（化合物７１）のＬＣ－ＭＳの要約

試料	保持時間（分）	認められたピーク質量（ｍ／ｚ）	添加された質量（ｍ／ｚ）	計算されたＤＡＲ	軽量した平均ＤＡＲ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	８．３５	２８２１５	０	０	０
ＴＣＴ１０６７－Ｐ５Ｃ５ ＡＤＣ　１	８．２	３４５５３	６３３４	１０	１１．７
		３５１８６	６９６７	１１	
		３５８１９	７６００	１２	
		３６４５２	８２３３	１３	
		３７０８５	８８６６	１４	

【０７４３】

全体的に見て、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５に関して、ＤＡＲは、ＡＡＡにより１０．４であり、ＭＳにより１１．７であり、全体の平均は、１０．９であった。

【０７４４】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５複合体の結合活性

ＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５（化合物７１）を作製し、上述のように特徴付けた。固定化ＨＥＲ２標的抗原に対するその結合親和度を、Ｂｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲによって決定し、実施例６４Ａに記載されるように未修飾ｓｃＦｖと比較した。

【０７４５】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＤＡＲ　１０．９は、２．３６ｘ１０^{5}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び７．１３．ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有し、３０２ｐＭの総結合Ｋｄを提供した。（多数の結合したペイロードによる抗体結合部位の可逆的立体障害に起因して）会合速度に中程度の減少が存在したが、結合したら、９．５ｐＭの総結合Ｋｄで、３．９ｘ１０^{6}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び３．７ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有した未修飾ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）と比較して、解離速度にわずかな影響があった。

【０７４６】

全体的なｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５の結論、生物物理学的データ

複合化条件を、上に詳述するように最適化した。この最適化は、高ＤＡＲ複合体の高い収率を伴う、制御された複合化反応を可能にした。複合体のいずれにおいても抗体／複合体の析出は認められず、全体的な回収率は約６０％と非常に高かった。ＳＥＣ　ＨＰＬＣの精製後、得られた複合体を約３ｍｇ／ｍｌに濃縮し、これは緩衝液中で数カ月間安定していた。

【０７４７】

分析のために使用した直交技法は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）によって例示される最適化されたｓｃＦｖ構造が、リジン残基を使用して複数の薬物を抗体上に負荷され得、複合化は、結合親和性を維持しながら、所望のＤＡＲを有する（ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって示されるような）単量体複合体を得るように制御され得るということと一致し、これを裏付ける。ＬＣＭＳ、ＳＥＣ、及びＡＡＡデータは、高ＤＡＲを有する単量体複合体が作製されたことを裏付ける。Ｂｉａｃｏｒｅデータと組み合わせて、この複合体は、ＨＥＲ２との結合を維持した。質量分析が、同じ試料内で高ＤＡＲ及びより低いＤＡＲの両方を確認したのに対して、ＡＡＡは、平均を提供した。

【０７４８】

実施例６７。複数のよく分散した表面リジン残基を有する２つの単鎖Ｆｖ抗体断片上への、短リンカーを用いたオーリスタチンＦ誘導体の生体複合化

実施例６７Ａ。C_5リンカーを有するＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－オーリスタチンＦ

オーリスタチン－Ｆ－Ｃ５－ＮＨＳ（化合物８８）を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体（化合物１２２）を得た。反応を、高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御した。確認及び進められた条件は、以下であった。

【０７４９】

【表３７】

表３０：オーリスタチンＦ－Ｃ５－ＮＨＳ生体複合化のための反応条件

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．８の１５０ｍＭのＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	１ｍｇ／ｍｌ
ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ処理	１００％無水の濾過済みＤＭＳＯ中の５０ｍＭの溶液
ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ添加速度	１２０分毎に
ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ添加部分	１０当量

【０７５０】

反応を、実施例６４Ａに詳述されるように行った。この実施例で、構成は、以下のとおりであった。

【０７５１】

反応１－ｓｃＦｖ－ＴＣＴ－オーリスタチン－Ｆ－Ｃ５－ＮＨＳ、３０当量、。

【０７５２】

複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。ｓｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある７．４分の保持時間を有した。複合体は、７．２分で若干より早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量だが、単一の鋭い単量体ピークとして示し、凝集を示さなかった（図５７）。これらの反応は、測定可能であった。

【０７５３】

ＬＣ－ＭＳ分析を、実施例６４Ａに記載されるように行った。

【０７５４】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－オーリスタチンＦ－Ｃ５のＬＣＭＳ、総イオン電流（ＴＩＣ）ク

ロマトグラム及びスペクトル、ならびにデコンボリューション済みデータを、図５８に示し、要約を表３１に示す。

【０７５５】

主なピークを、溶出しているｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－オーリスタチンＦ－Ｃ５試料のＴＩＣにおいて９．５分の時点で認めた。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ３３１２５、３３９５３、３４７８０、３５６０７、３６４３５、及び３７２６１に一連の主なピークを生成しこれは、ＭＭＡＦ分子の６～１１個の付加と共に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）分子の与えられた理論質量と一致した。

【０７５６】

【表３８】

表３１：ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－オーリスタチン－Ｆ－Ｃ５複合体（１２２）のＬＣ－ＭＳの要約

試料	保持時間（分）	認められたピーク質量（ｍ／ｚ）	添加された質量（ｍ／ｚ）	計算されたＤＡＲ	平均ＤＡＲ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）		２８１６０	０	０	０
ＴＣＴ－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１	９．５１	３３１２５	４９６５	６	８．５
		３３９５３	５７９３	７	
		３４７８０	６６２０	８	
		３５６０７	７４４７	９	
		３６４３５	８２７５	１０	
		３７２６１	９１０１	１１	

【０７５７】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｃ５－オーリスタチン－Ｆ複合体の結合活性

ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－オーリスタチンＦ－Ｃ５（化合物１２２）を作製し、上述のように特徴付けた。固定化ＨＥＲ２標的抗原に対するこれらの結合機能を、検証して、実施例６４Ａに記載されるように未修飾ｓｃＦｖと比較した。

【０７５８】

全体的なｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－オーリスタチンＦ－Ｃ５の結論、生物物理学的データ

複合化条件を、上に詳述するように最適化した。この最適化は、高ＤＡＲ複合体の高い収率を伴う、制御された複合化反応を可能にした。ＳＥＣ　ＨＰＬＣの精製後、得られた複合体を約６００μｇ／ｍｌに濃縮し、これは緩衝液中で数週間安定していた。再び、回収率は、約５０％と高かった。

【０７５９】

分析のために使用した技法は、ＴＣＴによって例示される最適化されたｓｃＦｖ構造が、リジン残基を使用して複数の薬物を抗体上に負荷され得、複合化は、結合親和性を維持しながら、所望のＤＡＲを有する（ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって示されるような）単量体複合体を得るように制御され得るということを裏付ける。ＬＣＭＳデータは、ＨＰＬＣ－ＳＥＣによってさらに裏付けられ、ここで、試料は、ＴＣＴよりも短い保持時間を有し、そ

の増加するサイズに起因して、ＳＥＣカラムからより早く溶出した。

【０７６０】

実施例６７Ｂ。C_5リンカーを有するＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチン

オーリスタチンＦ－Ｃ５－ＮＨＳ（化合物８８）を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体（化合物１２２）を得た。反応を、中、及び高ＤＡＲを有する生成物を得るように制御した。確認及び進められた条件は、以下であった。

【０７６１】

【表３９】

表３２：オーリスタチンＦ－Ｃ５－ＮＨＳ生体複合化のための反応条件

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．８の１５０mMのＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	１ｍｇ／ｍｌ
ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ処理	１００％無水の濾過済みＤＭＳＯ中の５０mMの溶液
ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ添加速度	１２０分毎に
ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ添加部分	１ｘ５当量（反応１）；２ｘ１０当量（反応２）；３ｘ８．３当量（反応３）

【０７６２】

反応を、実施例６４Ａのように行い、ほんの微量の目に見える析出が最高数の薬物当量を有する試料中に存在したことに注目した。これを、遠心分離及びそれに続く精製で分離した。

【０７６３】

この実施例において、構成は、以下のとおりであった。

【０７６４】

反応１－ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチン－Ｆ－Ｃ５－ＮＨＳ、５当量、

反応２－ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチン－Ｆ－Ｃ５－ＮＨＳ、１０当量、

反応３－ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチン－Ｆ－Ｃ５－ＮＨＳ、２５当量。

【０７６５】

ＤＡＲを、ケンブリッジ大学のタンパク質及び核酸化学施設で、アミノ酸分析（ＡＡＡ）によっても決定し、その結果を、表３３～３５に示す。

【０７６６】

【表４０】

表３３。３．６４のＤＡＲを示すＡＡＡの結果の要約

反応：	1	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチン－Ｆ－Ｃ５	
予想された値に対する測定されたモル比の整数適応			
アミノ酸	予測された値	観測値	予測された値に対する適応の近さ
Ｃｙｓ	６	未決定	－
Ａｓｐ	１４	１４．７	５％以上
Ｔｈｒ	１７	１６．６４	５％以上
Ｓｅｒ	４４	４０．７７	５～１０％以内
Ｇｌｕ	２１	２０．８７	５％以上
Ｇｌｙ	４５	４６．３５	５％以上
Ａｌａ	１６	１６．１９	５％以上
Ｖａｌ	０	除外	－
Ｍｅｔ	５	４．７９	５％以上
Ｉｌｅ	８	８．０８	５％以上
Ｌｅｕ	１６	１６．５８	５％以上
Ｎｏｒｌｅｕ標準品			
Ｔｙｒ	１４	１４．４７	５％以上
Ｐｈｅ	０	除外	－
Ｈｉｓ	２	２．０２	５％以上
Ｌｙｓ	１２	１２．４９	５％以上
Ａｒｇ	６	６．０７	５％以上
Ｐｒｏ	０	除外	－
Ｔｒｐ	９		（未決定）
（使用した）合計	２２０	残基	
			平均
全試料	０．１５９	ナノモル	０．１６
	４．４９	ｕｇ	４．５４
濃度	２２．６６	ナノモル／ｍｌ	２２．９２
	６４１．３４	ｕｇ／ｍｌ	６４８．８８
		補正したｕｇ／ｍｌ	７０５．１６
		ＤＡＲ　ＡＡＡ	３．６４

【０７６７】

【表４１】

表３４。６．３１のＤＡＲを示すＡＡＡの結果の要約

反応：	２	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチン－Ｆ－Ｃ５	
予想された値に対する測定されたモル比の整数適応			
アミノ酸	予測された値	観測値	予測された値に対する適応の近さ
Ｃｙｓ	６	未決定	－
Ａｓｐ	１４	１４．４６	５％以上
Ｔｈｒ	１７	１６．４６	５％以上
Ｓｅｒ	４４	４１．２０	５～１０％以内
Ｇｌｕ	２１	２０．８４	５％以上
Ｇｌｙ	４５	４６．２４	５％以上
Ａｌａ	１６	１５．８９	５％以上
Ｖａｌ	０	除外	－
Ｍｅｔ	５	４．５８	５～１０％以内
Ｉｌｅ	８	７．８８	５％以上
Ｌｅｕ	１６	１７．１５	５～１０％以内
Ｎｏｒｌｅｕ標準品			
Ｔｙｒ	１４	１４．３２	５％以上
Ｐｈｅ	０	除外	－
Ｈｉｓ	２	２．１７	５～１０％以内
Ｌｙｓ	１２	１２．６３	５～１０％以内
Ａｒｇ	６	６．１９	５％以上
Ｐｒｏ	０	除外	－
Ｔｒｐ	９		（未決定）
（使用した）合計	２２０	残基	
			平均
全試料	０．１６３	ナノモル	０．１６８
	４．６０	ｕｇ	４．７４
濃度	２０．８４	ナノモル／ｍｌ	２１．４９
	５８９．７８	ｕｇ／ｍｌ	６０８．２８
		補正したｕｇ／ｍｌ	６６１．０３
		ＤＡＲ　ＡＡＡ	６．３１

【０７６８】

【表４２】

表３５。１３．４のＤＡＲを示すＡＡＡの結果の要約

試料：　３ 予想された値に対する測定されたモル比の整数適応 アミノ酸	予測された値	観測値	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチン－Ｆ－Ｃ５ 予測された値に対する適応の近さ
Ｃｙｓ	６	未決定	－
Ａｓｐ	１４	１４．６０	５％以上
Ｔｈｒ	１７	１６．６６	５％以上
Ｓｅｒ	４４	４０．５５	５～１０％以内
Ｇｌｕ	２１	２１．２３	５％以上
Ｇｌｙ	４５	４６．７４	５％以上
Ａｌａ	１６	１６．０６	５％以上
Ｖａｌ	０	除外	－
Ｍｅｔ	０	除外	－
Ｉｌｅ	８	７．７４	５％以上
Ｌｅｕ	１６	１６．２３	５％以上
Ｎｏｒｌｅｕ標準品			
Ｔｙｒ	１４	１４．３１	５％以上
Ｐｈｅ	０	除外	－
Ｈｉｓ	２	２．１７	５～１０％以内
Ｌｙｓ	１２	１２．６８	５～１０％以内
Ａｒｇ	６	６．０４	５％以上
Ｐｒｏ	０	除外	－
Ｔｒｐ	９		（未決定）
（使用した）合計	２１５	残基	
			平均
全試料	０．１６９	ナノモル	０．１７０
	４．８０	ｕｇ	４．８０
濃度	１８．８３	ナノモル／ｍｌ	１８．８４
	５３２．９４	ｕｇ／ｍｌ	５３３．２７
		補正したｕｇ／ｍｌ	５７９．５２
		ＤＡＲ　ＡＡＡ	１３．４０

【０７６９】

複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）を、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。ｓｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある１８．１分の保持時間を有する。３つの複合体はすべて、（１７．９分、１７．９２分、及び１７．８７分で）若干かつ次第により早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量だが、単一の鋭い単量体ピークとして示し、凝集を示さなかった（図５９）。

【０７７０】
ＬＣ－ＭＳ分析を、実施例６４Ａに記載されるように行った。
【０７７１】
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｃ５－オーリスタチン－ＦのＬＣＭＳ、総イオン電流（ＴＩＣ）クロマトグラム及びスペクトル、ならびにデコンボリューション済みデータを、図６０に示し、表３６に要約する。
【０７７２】
主なピークを、溶出しているｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｃ５－オーリスタチン－Ｆ反応１のＴＩＣにおいて８．１９分の時点で認めた。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ２９０３７、２９８６５、３０６９２、３１５１９、及び３２３４５に一連の主なピークを生成し、これは、２．９の平均ＤＡＲで、オーリスタチンＦ分子の１～５個の付加と共にｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）分子の提供された理論質量と一致した。
【０７７３】
主なピークを、溶出しているｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｃ５－オーリスタチン－Ｆ反応２のＴＩＣにおいて９．４７分の時点で認めた。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ２９８６６、３０６９２、３１５１９、３２３４７、３３１７４、及び３４００１に一連の主なピークを生成し、これは、４．９８の平均ＤＡＲで、オーリスタチンＦ分子の２～７個の付加と共にｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）分子の提供された理論質量と一致した。
【０７７４】
主なピークを、溶出しているｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｃ５－オーリスタチン－Ｆ反応３のＴＩＣにおいて９．９７分の時点で認めた。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ３４８２６、３５６５３、３６４８０、３７３０７、３８１３４、及び３８９６０に一連の主なピークを生成し、これは、１０．３の平均ＤＡＲで、オーリスタチンＦ分子の８～１３個の付加と共にｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）分子の提供された理論質量と一致した。
【０７７５】

【表４３】

表３６：ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ－Ｃ５（１２２）のＬＣ－ＭＳの要約

試料	保持時間（分）	認められたピーク質量（ｍ／ｚ）	添加された質量（ｍ／ｚ）	計算されたＤＡＲ	軽量した平均ＤＡＲ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	８．３５	２８２１５	０	０	０．００
ＴＣＴ１０６７－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ１	８．１１	２９０３７	８１８	１	２．９０
		２９８６５	１６４６	２	
		３０６９２	２４７３	３	
		３１５１９	３３００	４	
		３２３４５	４１２６	５	
ＴＣＴ１０６７－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ２	９．４７	２９８６６	１６４７	２	４．９８
		３０６９２	２４７３	３	
		３１５１９	３３００	４	
		３２３４７	４１２８	５	
		３３１７４	４９５５	６	
		３４００１	５７８２	７	
ＴＣＴ１０６７－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ３	９．９７	３４８２６	６６０７	８	１０．３０
		３５６５３	７４３４	９	
		３６４８０	８２６１	１０	
		３７３０７	９０８８	１１	
		３８１３４	９９１５	１２	
		３８９６０	１０７４１	１３	

【０７７６】

したがって、全体的に見て、

反応１に関して、ＤＡＲは、ＡＡＡによって３．６４であり、ＭＳによって２．９であり、３．３の平均ＤＡＲであった。

反応２に関して、ＤＡＲは、ＡＡＡによって６．３１であり、ＭＳによって４．９８であり、５．６５の平均ＤＡＲであった。
反応３に関して、ＤＡＲは、ＡＡＡによって１３．４であり、ＭＳによって１０．４であり、１１．９の平均ＤＡＲであった。
【０７７７】
ＳＤＳ－ＰＡＧＥを、行い（図６１）、これは、複合体の分子量の増加、とりわけ、反応試料３からの高ＤＡＲ種の高均質性を示す。
【０７７８】
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体の結合活性
ＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチン－Ｆ－Ｃ５複合体（化合物１２２）を作製し、上述のように特徴付けた。固定化ＨＥＲ２標的抗原に対するこれらの結合親和度を、Ｂｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲによって決定し、実施例６４Ａに記載されるように未修飾ｓｃＦｖと比較した。
【０７７９】
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチン－Ｆ－Ｃ５　ＤＡＲ　３．３は、５．５６ｘ１０^{5}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び１．８２ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有し、３２．８ｐＭの総結合Ｋｄを提供した。
【０７８０】
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチン－Ｆ－Ｃ５　ＤＡＲ　５．６５は、３．３６ｘ１０^{5}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び１．３５ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有し、４０．３ｐＭの総結合Ｋｄを提供した。
【０７８１】
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチン－Ｆ－Ｃ５　ＤＡＲ　１１．９は、２．１７ｘ１０^{4}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び１．７６ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有し、８１０ｐＭの総結合Ｋｄを提供した。
【０７８２】
低ＤＡＲ試料及び中ＤＡＲ試料は、９．５ｐＭの総結合Ｋｄで、３．９ｘ１０^{6}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び３．７ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有する未修飾ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）と極めて類似した親和度を有し、結合機能の喪失を示さなかった。高ＤＡＲ試料は、（多数の結合したペイロードによる抗体結合部位の可逆的立体障害に起因する）会合速度の中程度の減少を有したが、結合したら、未修飾ｓｃＦｖと比較して、解離速度にわずかな影響があった。
【０７８３】
全体的なｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ－Ｃ５の結論、生物物理学的データ
複合化条件を、上に詳述するように最適化した。この最適化は、低、中、及び高ＤＡＲ複合体の高い収率を伴う、制御された複合化反応を可能にした。精製及び処理後、複合体を約９ｍｇ／ｍｌに濃縮し、これは緩衝液中で数カ月間安定していた。
【０７８４】
分析のために使用した直交技法は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７によって例示される最適化されたｓｃＦｖ構造が、リジン残基を使用して複数の薬物を抗体上に負荷され得、複合化は、機能及び結合親和性を維持しながら、所望のＤＡＲを有する（ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって示されるような）単量体複合体を得るように制御され得るということと一致し、これを裏付ける。低ＤＡＲを有する精製複合体（反応１）は、ゲル上を対照ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）とより類似して流れ、わずかにより高く流れより多分散性であった中ＤＡＲ（反応２）よりも多分散性ではなく、高ＤＡＲ（反応３）に関しては、ゲル上での明らかな移動シフトが存在し、試料は、対照である未修飾ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）よりも明らかにサイズが大きかった。これらの観察は、ＨＰＬＣ　ＳＥＣによってさらに裏付けられ、ここで、試料は、ＴＣＴよりも次第に短い保持時間を有し、これらの増加するサイズに起因して、より早く溶出した。アミノ酸分析は、さらなる定量分析に極めて有用なツールであり

、ＬＣ－ＭＳデータを支援した。

【０７８５】

実施例６８。複数のよく分散した表面リジン残基を有する高親和性単鎖Ｆｖ抗体断片上への、プロテアーゼ開裂可能なリンカーを用いたＭＭＡＥ誘導体の生体複合化

細胞毒性薬物ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$　ＮＨＳ（化合物８６）を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）に複合化させて、高ＤＡＲを有する複合体（化合物１２１）を得た。確認及び進められた条件は、以下であった。

【０７８６】

【表４４】

表３７：ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$　ＮＨＳ生体複合化のための反応条件

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．８の２０ｍＭのＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	１ｍｇ／ｍｌ
ＭＭＡＥ－ＰＡＢＡ－ｖｃ－ＰＥＧ９－ＮＨＳ処理	１００％無水の濾過済みＤＭＳＯ中の５０ｍＭの溶液
ＭＭＡＥ－ＰＡＢＡ－ｖｃ－ＰＥＧ９－ＮＨＳ添加速度	１２０分毎に
ＭＭＡＥ－ＰＡＢＡ－ｖｃ－ＰＥＧ９－ＮＨＳ添加当量	１０当量

【０７８７】

反応を、実施例６４Ａに詳述されるように行い、ＭＭＡＥ－ＰＡＢＡ－ｖｃ－ＰＥＧ９－ＮＨＳがＤＭＳＯ中で完全に安定化するためには、反復したボルテックスが必要であることに注目した。反応を、低塩緩衝液中で行った。粗複合体は、目に見える析出はなく、これを、１０％のＩＰＡ／２０ｍＭのＮａＣｌリン酸緩衝液ｐＨ７で溶出するＳｕｐｅｒｄｅｘ　７５、２６／６００カラムを使用して、ＡＫＴＡ　Ａｖａｎｔシステムによりサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって精製した。画分を合わせ、Ｖｉｖａｃｅｌｌ　１００　１０ｋＭＷＣＯ（ＰＥＳ膜）（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）を使用して濃縮させた後で、同じプロセスを使用して２０ｍＭのＮａＣｌリン酸緩衝液ｐＨ７へと緩衝液交換した。ＨＰＬＣ－ＳＥＣ運転（図６２）は、極めて低い凝集と共に、単一の単量体ピークを示した。この反応は、測定可能であった。

【０７８８】

反応１－ｓｃＦｖ－ＴＣＴ１０６７：ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$　３０当量、

ＤＡＲを、ケンブリッジ大学のタンパク質及び核酸化学施設で、アミノ酸分析（ＡＡＡ）によっても決定し、その結果を、表３８に示す。

【０７８９】

【表４５】

表３８。反応１の９．６のＤＡＲを示すＡＡＡの結果の要約

反応：　1　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$			
予想された値に対する測定されたモル比の整数適応			
アミノ酸	予測された値	観測値	予測された値に対する適応の近さ
Ｃｙｓ	６	未決定	－
Ａｓｐ	１４	１３．９６	５％以上
Ｔｈｒ	１７	１７．５６	５％以上
Ｓｅｒ	４４	４０．０４	５～１０％以内
Ｇｌｕ	０	除外	－
Ｇｌｙ	４５	４５．７５	５％以上
Ａｌａ	１６	１７．４３	５～１０％以内
Ｖａｌ	０	除外	－
Ｍｅｔ	０	除外	－
Ｉｌｅ	８	８．３４	５％以上
Ｌｅｕ	１６	１６．２８	５％以上
Ｎｏｒｌｅｕ標準品			
Ｔｙｒ	０	除外	－
Ｐｈｅ	０	除外	－
Ｈｉｓ	２	２．０５	５％以上
Ｌｙｓ	１２	１２．３９	５％以上
Ａｒｇ	６	５．８６	５％以上
Ｐｒｏ	１３	１３．３５	５％以上
Ｔｒｐ	９		（未決定）
（使用した）合計	１９３	残基	
			平均
全試料 濃度	０．１４２　ナノモル ４．０１　ｕｇ ２．１８　ナノモル／ｍｌ ６１．６９　ｕｇ／ｍｌ		０．１５１ ４．２８ ２．３２ ６５．７７
全試料ｉ ｉｉ 平均	オルニチン １．５４０ １．３７０ １．４６		
ＤＡＲ	９．６		

【０７９０】

質量分光分析を、実施例６４Ａに記載されるように行った。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$のＬＣＭＳ、総イオン電流（ＴＩＣ）クロマトグラム及びスペクトル、ならびにデコンボリューション済みデータを、図６３に示し、要約を表３９に示す。

【０７９１】

様々なＤＡＲ種に対応する複数のピークを、１０～１２分の時点で溶出する試料のＵＶ／ＴＩＣで認めた。各ピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ３７８３７、３９４３９、４１０４２、及び４２６４４で一連の主なピークに対

応し、これは、ＭＭＡＥ部分の６～９個の付加と共に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）分子の提供された理論質量と一致した。

【０７９２】

【表４６】

表３９：ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$（１２１）のＬＣ－ＭＳの要約

試料	保持時間（分）	認められたピーク質量（ｍ／ｚ）	添加された質量（ｍ／ｚ）	計算されたＤＡＲ	平均ＤＡＲ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	８．３５	２８２１５	０	０	０
ＴＣＴ１０６７－ＭＭＡＥ ＡＤＣ１	１０．７	３７８３７	９６１８	６	７．５
	１１．１	３９４３９	１１２２０	７	
	１１．４	４１０４２	１２８２３	８	
	１１．９	４２６４４	１４４２５	９	

【０７９３】

したがって、全体的に見て、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$反応１に関して、ＤＡＲは、ＡＡＡによって９．６であり、ＬＣ－ＭＳによって７．５であり、８．６の平均ＤＡＲであった。

【０７９４】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥを、行い（図６４）、これは、複合体の分子量の増加、とりわけ、反応試料１からの高ＤＡＲ種の高均質性を示す。

【０７９５】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$複合体の結合活性

ＴＣＴ（１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢＡ－ｖｃ－ＰＥＧ９（化合物１２１）を作製し、上述のように特徴付けた。固定化ＨＥＲ２標的抗原に対するその結合親和度を、Ｂｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲによって決定し、実施例６４Ａに記載されるように未修飾ｓｃＦｖと比較した。

【０７９６】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$複合体、ＤＡＲ８．６は、２．２１ｘ１０^{4}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び２．２３ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有し、１ｎＭの総結合Ｋｄを提供した。（多数の結合したペイロードによる抗体結合部位の可逆的立体障害に起因して）会合速度に減少が存在したが、結合したら、９．５ｐＭの総結合Ｋｄで、３．８８ｘ１０^{6}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び３．６９ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有する未修飾ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）と比較して、解離速度にわずかな影響があった。

【０７９７】

全体的なｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$の結論

複合化条件を、上に詳述するように最適化し、高ＤＡＲを有する複合体を得た。精製、濃縮、及び濾過後、得られた複合体は、緩衝液中で数週間安定しているようであった。

【０７９８】

分析のために使用した直交技法は、ＴＣＴ（１０６７）によって例示される最適化されたｓｃＦｖ構造が、リジン残基を使用して複数の薬物を抗体上に負荷され得、複合化は、結合親和性を維持しながら、所望のＤＡＲを有する（ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって示されるような）単量体複合体を得るように制御され得るということと一致し、これを裏付ける。精製した高ＤＡＲを有する複合体（反応１）は、ゲル上での明らかな移動シフトを示し、試料は対照である未修飾ＴＣＴ１０６７よりも大きさが大きかった。これらの観察は、ＨＰＬＣ　ＳＥＣによってさらに裏付けられ、ここで、試料は、１８．１分に溶出する対照よりも、１５．１分に溶出する大幅に短い保持時間を有し、その増加するサイズに起因して、ＳＥＣカラムからより早く溶出した。アミノ酸分析は、さらなる定量分析に極めて有用なツールであり、ＬＣ－ＭＳデータを支援した。

【０７９９】

実施例６９。複数のよく分散した表面リジン残基を有するｓｃＦｖ抗体断片上への２つの異なるペイロードの種類の生体複合化

細胞毒性薬物Ｐ５－Ｃ５－ＮＨＳ（化合物６）及びＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ（化合物７８）をｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）に複合化させて、高ＤＡＲを有する複合体（化合物１３５）を得た。複合化のために確認及び進められた条件は、以下であった。

【０８００】

【表４７】

表４０：ＭＭＡＦ／Ｐ５Ｃ５デュアルペイロード生体複合化のための反応条件

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．８の１５０ｍＭのＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	１ｍｇ／ｍｌ
ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ及びＰ５－Ｃ５－ＮＨＳ処理	１００％の無水の濾過済みＤＭＳＯ中の１００ｍＭの溶液
ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ及びＰ５－Ｃ５－ＮＨＳ添加速度	９０分毎に
ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ及びＰ５－Ｃ５ＮＨＳ添加部分	１１当量

【０８０１】

反応を、実施例６４Ａのように行い、ＭＭＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳを第１の添加の間に添加し、後続の２回の添加をＰ５－Ｃ５－ＮＨＳを添加して行ったことに注目した。すべての他の処理及び精製プロセスは、実施例６４Ａのとおりであった。

【０８０２】

反応１－ｓｃＦｖ－ＴＣＴ１０６７：ＭＭＡＦ－Ｃ５－Ｐ５－Ｃ５；１１当量ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＮＨＳ及び２１当量のＰ５－Ｃ５　ＮＨＳ、

複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）を、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。ｓｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある１８．１分の保持時間を有する。複合体は、１７．８分で若干より早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量だが、単一の鋭い単量体ピークとして示し、凝集を示さなかった（図６５）。

【０８０３】

ＤＡＲを、ケンブリッジ大学のタンパク質及び核酸化学施設で、アミノ酸分析（ＡＡＡ）によっても決定し、その結果を、表４１に示す。

【０８０４】

【表４８】

表４１。デュアルペイロードＤＡＲを示すＡＡＡの結果の要約

		ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｍ	
反応：	１	ＭＡＦ－Ｃ５／Ｐ５－Ｃ５	
予想された値に対する測定されたモル比の整数適応			
アミノ酸	予測された値	観測値	予測された値に対する適応の近さ
Ｃｙｓ	６	未決定	－
Ａｓｐ	１４	１４．８０	５～１０％以内
Ｔｈｒ	１７	１７．１０	５％以上
Ｓｅｒ	４４	４１．２９	５～１０％以内
Ｇｌｕ	２１	２１．５４	５％以上
Ｇｌｙ	４５	４７．８５	５～１０％以内
Ａｌａ	１６	１６．２０	５％以上
Ｖａｌ	０	除外	－
Ｍｅｔ	５	４．９５	５％以上
Ｉｌｅ	８	７．６６	５％以上
Ｌｅｕ	１６	１５．７９	５％以上
Ｎｏｒｌｅｕ標準品			
Ｔｙｒ	１４	１３．８２	５％以上
Ｐｈｅ	０	除外	－
Ｈｉｓ	２	１．８１	５～１０％以内
Ｌｙｓ	１２	１１．４８	５％以上
Ａｒｇ	６	５．７０	５～１０％以内
Ｐｒｏ	０	除外	－
Ｔｒｐ	９		（未決定）
（使用した）合計	２２０	残基	
			平均
全試料	０．２２３	ナノモル	０．２１７
	６．３２	ｕｇ	６．１５
濃度	５５．８５	ナノモル／ｍｌ	５４．３３
	１５８０．８５	ｕｇ／ｍｌ	１５３７．７９
合計		ＤＡＲ	
ＭＭＡＦ（Ｐｈｅ）	０．１３７	０．６１	０．７
Ｐ５Ｃ５（Ａｖａ）	１．０２８	４．６０	４．６

【０８０５】
ＬＣ－ＭＳ分析を、実施例６４Ａに記載されるように行った。
【０８０６】
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５／Ｐ５－Ｃ５のＬＣＭＳ、総イオン電流（ＴＩＣ）クロマトグラム及びスペクトル、ならびにデコンボリューション済みデータを、図６６に示し、要約を表４２に示す。
【０８０７】
主なピークを、溶出しているｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５／Ｐ５－Ｃ５試料のＴＩＣにおいて８．７～１０．５分の時点で認めた。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ３１３３２、３１９６４、３２５９７、３３２３０、３３９６３、３１１３５、３１７６９、３２４９９、３０３０７、３０９４０、３１６７３、３２３０６、３０１１３、３０７４６、３１４７８、３２１０９に一連の主なピークを生成した。
【０８０８】
これらは、表４２に示されるＭＭＡＦ－Ｃ５及びＰ５－Ｃ５のいくつかの組み合わせと共に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）分子の提供された理論質量と一致した。
【０８０９】

【表４９】

表４２：ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５／Ｐ５－Ｃ５デュアルペイロード（１３５）のＬＣＭＳの要約

試料	保持時間（分）	認められたピーク質量（ｍ／ｚ）	添加された質量（ｍ／ｚ）	推定ＤＡＲ　ＭＭＡＦ－Ｃ５	推定ＤＡＲ　Ｐ５－Ｃ５
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	８．３５	２８２１５	０	０	０
ＴＣＴ１０６７－ＭＭＡＦ／Ｃ５－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣ	９．７	３１３３２	３１１３	３	１
		３１９６４	３７４５	３	２
		３２５９７	４３７８	３	３
		３３２３０	５０１１	３	４
	９．４	３１１３５	２９１６	２	２
		３１７６９	３５５０	２	３
		３２４９９	４２８０	２	４
		３３１３５	４９１６	２	５
	８．９	３０３０７	２０８８	１	２
		３０９４０	２７２１	１	３
		３１６７３	３４５４	２	３
		３２３０６	４０８７	１	５
	８．７	３０１１４	１８９５	０	３
		３０７４７	２５２８	０	４
		３１４７９	３２６０	０	５
		３２１０９	３８９０	０	６

【０８１０】

全体的なｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５／Ｐ５－Ｃ５の結論、生物物理学的データ

複合化条件を、上に詳述するように最適化した。この最適化は、高ＤＡＲ複合体の高い収率を伴う、制御された複合化反応を可能にした。得られた複合体を、約１．５ｇ／ｍｌに濃縮し、これは、緩衝液中で数週間安定していた。

【０８１１】
実施例７０。複数のよく分散した表面リジン残基を有する高親和性単鎖Ｆｖ抗体断片への、リンカーを用いたマイタンシン－ＤＭ１誘導体の生体複合化
マイタンシンＤＭ１－ｄＰＥＧ$_{12}$－ＮＨＳ（化合物９０）を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）に複合化させて、様々なＤＡＲを有する複合体（化合物１２４）を得た。確認及び進められた条件は、以下であった。
【０８１２】
【表５０】

表４３：ＤＭ１－ｄＰＥＧ$_{12}$－ＮＨＳ－生体複合化のための反応条件

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．０のＰＢＳ緩衝液及び０．１％ポリソルベート－２０
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	１ｍｇ／ｍｌ
マイタンシンＤＭ１－ＰＥＧ（１２）－ＮＨＳ処理	１００％の無水の濾過済みＤＭＳＯ中の１００ｍＭの溶液
マイタンシンＤＭ１－ＰＥＧ（１２）－ＮＨＳ添加速度	１２０分毎に
マイタンシンＤＭ１－ＰＥＧ（１２）－ＮＨＳ添加部分	８当量

【０８１３】
反応を表３７及び実施例６４Ａのように設定し、反応に薬物ストックを添加する前に、必要な総量を反応のために必要なＤＭＳＯの総量の２５％中で希釈したことに注目した。薬物添加を、この新しい保存溶液からの１６当量のＮＨＳ薬物ＤＭＳＯを添加することによって行った。析出は、反応の完了時点で目に見え、ますます多くの当量と共に増加した。
【０８１４】
この実施例において、構成は、以下のとおりであった。
反応１－ｓｃＦｖ－ＴＣＴ１０６７：ＤＭ１－ｄＰＥＧ$_{12}$　ＮＨＳ、１６当量、
反応２－ｓｃＦｖ－ＴＣＴ１０６７：ＤＭ１－ｄＰＥＧ$_{12}$　ＮＨＳ、３２当量。
【０８１５】
複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）を、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した（図６７）。ｓｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある１９分の保持時間を有した。２つの複合体はすべて、若干かつ次第により早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因して）より大きい分子量を示すがいくらかの凝集が認められ、以下のとおりであった。
【０８１６】

【表５１】

反応１	１％の凝集物
反応２	４％の凝集物

【０８１７】
ＬＣ－ＭＳ分析を、実施例６４Ａに記載されるように行った。
【０８１８】
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－ｄＰＥＧ$_{12}$のＬＣＭＳ、総イオン電流（ＴＩＣ）クロマトグラム及びスペクトル、ならびにデコンボリューション済みデータを、図６８に示し、要約を表４４に示す。
【０８１９】
試料１において、主なピークを、溶出しているｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－ｄＰＥＧ$_{12}$試料のＴＩＣにおいて、１１分の時点で認めた。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ３７１４４、３８６３１、及び４００７９に一連の主なピークを生成し、これは、マイタンシンＤＭ１分子の６、７、及び８個の付加と共に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）分子の提供された理論質量と一致した。試料２において、複合体は、１１．５分の時点で溶出し、デコンボリューションされた質量は、ｍ／ｚ４０１２３にピークを生じさせ、これは、マイタンシンＤＭ１の８個の付加と共に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）に対応する。
【０８２０】
【表５２】

表４４　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－ｄＰＥＧ$_{12}$（１２４）のＬＣ－ＭＳの要約

試料	保持時間（分）	認められたピーク質量（ｍ／ｚ）	添加された質量（ｍ／ｚ）	計算されたＤＡＲ	平均ＤＡＲ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	８．３５	２８２１５	０	０	
ＴＣＴ１０６７－マイタンシン－ＰＥＧ（１２）ＤＭ１　ＡＤＣ１	１０．６	３７１４４	９０２４	６	７
	１０．９	３８６３１	１０５２８	７	
	１１－１１．５	４００７９	１２０３２	８	
ＴＣＴ１０６７－マイタンシン－ＰＥＧ（１２）ＤＭ１　ＡＤＣ２	１１．５～１２．０	４０１２３	１２０３２	８	８

【０８２１】
ＳＤＳ－ＰＡＧＥを行い（図６９）、これは、複合体反応試料１及び２の分子量の増加

を示す。

【０８２２】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－ｄＰＥＧ$_{12}$の結合活性

ＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－ｄＰＥＧ$_{12}$（化合物１２４）を作製し、上述のように特徴付けた。固定化ＨＥＲ２標的抗原に対するこれらの結合親和度を、Ｂｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲによって決定し、実施例６４Ａに記載されるように未修飾ｓｃＦｖと比較した。

【０８２３】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－ｄＰＥＧ$_{12}$　ＤＡＲ８は、１．３２ｘ１０^{4}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び３．２８ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有し、２．４８ｎＭの総結合Ｋｄを提供した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－ｄＰＥＧ$_{12}$　ＤＡＲ７は、１．９５ｘ１０^{4}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び２．７ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有し、１．３９ｎＭの総結合Ｋｄを提供した。複合体の双方共に、（多数の結合したペイロードによる抗体結合部位の可逆的立体障害に起因して）会合速度に中程度の減少があったが、

結合したら、９．５ｐＭの総結合Ｋｄで３．９ｘ１０^{6}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$の会合速度及び３．７ｘ１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$の解離速度を有する未修飾ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）と比較して、解離速度にわずかな影響があった。

【０８２４】

全体的なｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－ｄＰＥＧ$_{12}$の結論、生物物理学的データ

複合化条件を、上に詳述するように最適化した。この最適化は、中及び高ＤＡＲを有する複合体を得るための、制御された複合化反応を可能にした。精製複合体を、緩衝液中で約５００μｇ／ｍｌに濃縮した。

【０８２５】

分析のために使用した直交技法は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）によって例示される最適化されたｓｃＦｖ構造が、リジン残基を使用して複数の薬物を抗体上に負荷され得、複合化は、結合親和性を維持しながら、所望のＤＡＲを有する（ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって示されるような）単量体複合体を得るように制御され得るということと一致し、これを裏付ける。ＳＤＳゲル上で、中ＤＡＲを有する精製複合体（試料１）が、わずかにより高く流れ、より多分散性であったのに対して、高ＤＡＲ（試料２）に関しては、ゲル上での明らかな移動シフトが存在し、試料は、対照である未修飾ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）よりも明らかにサイズが大きかった。これらの観察は、ＨＰＬＣによってさらに裏付けられ、ここで、試料は、ＴＣＴよりも次第に短い保持時間を有し、これらの増加するサイズに起因して、ＳＥＣカラムからより早く溶出した。

【０８２６】

実施例７１。最適に分散されていない（「非オプティリンク化」）高リジン含有量を有するｓｃＦｖへのオーリスタチンＦの生体複合化は、凝集につながり、所望の薬物：抗体比よりも低い。

【０８２７】

パニツムマブモノクローナル抗体［配列番号５］に基づくｓｃＦｖは、高親和度を有し［米国第８２２７５８０Ｂ２号］、表面暴露されているが、最適な離間構成ではなく、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）の例と比較して好ましい場所になく、４つの類似した位置だけを有すると予測される８個のリジン残基を有する（以下を参照されたい）。このパニツムマブｓｃＦｖ（ｓｃＦｖ（Ｐａｎ））を、確立された方法を使用して構築、発現、及び精製し［Ｂｈａｔｔｉ　Ｍ　ｅｔ　ａｌ（２００８）１２２：１１５５］、ペイロードオーリスタチンＦを使用して、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）と類似した条件下で、生体複合化反応で使用した。使用した条件は以下のとおりである。

【０８２８】

【表５３】

表４４Ａ　ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ生体複合化のための反応条件

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．８の１５０ｍＭのＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	０．８３ｍｇ／ｍｌ
ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ処理	１００％無水の濾過済みＤＭＳＯ中の５０ｍＭの溶液
ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ添加速度	１２０分毎に
ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ添加部分	５当量

【０８２９】

パニツムマブ一本鎖Ｆｖのアミノ酸配列

【０８３０】

【化６８】

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHI
YYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIW
GQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQAS
QDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQP
EDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVEIQNGSEQKLISEEDLAAA［配列番号５］

【０８３１】

ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）、ｓｃＦｖ（パニツムマブ）に対するＴ、Ｐ．リジン残基のアミノ酸配列アラインメントは、肉太活字であり、一般的に位置付けられたリジン残基には、下線が引かれている。パニツムマブは、８個のリジンを有し、これは、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）中に存在する１２個に対して大幅に異なる構成である。

【０８３２】

【化６９】

```
T    QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYS--FTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGDSDT
P    QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYYS-GNT

T    KYSPSFQGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHDVGYCTDRTCAAWPEWLGV
P    NYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVT----------GAFDI

T    WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPP-SVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY
P    WGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQASQ--DISNY

T    VSWYQQLPGTAPKLLIYGHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYCASWD
P    LNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFD

T    YTLSGWVFGGGTKLTVL
P    HLP--LAFGGGTKVEIQ
```

［Ｔ＝配列番号６、Ｐ＝配列番号７］

【０８３３】

低、中、及び高ＤＡＲ複合化反応条件を、実施例６７Ｂに記載されるように設定し、複合体をＳＤＳ－ＰＡＧＥ（図７０）、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ（図７１）、Ｂｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲ結合分析、及びＬＣ－ＭＳ（図７２）によって分析した。その結果を、表４５に要約する。各事例において、ｓｃＦｖ（Ｐａｎ）の大幅により高い画分が凝集することが見出され、析出が認められた。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）のために使用したのと同様の反応条件下で、低ＤＡＲだけがパニツムマブｓｃＦｖで認められ、９の最大ＤＡＲを得るための試みは、不溶性析出物をもたらした。可溶性複合体は、これらの結合機能を維持した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）は、オーリスタチンＦでも示されたように、その結合機能を維持した（実施例６７）。表４５は、より高い平均ＤＡＲがより高い収率と共に、類似した複合化条件下でオプティリンク化ｓｃＦｖを用いて得ることができたことを示す（ＤＡＲ３．５対ＤＡＲ５及び複合体なし対ＤＡＲ９）。非オプティリンク化ｓｃＦｖとは異なり、オプティリンク化ｓｃＦｖ複合体中に見える凝集物は存在しない（図７１、表４５）。これは、構造、最適な離間、及び好ましい場所が効果的な生体複合化のための重要な要因であり、高リジン含有量は十分ではないことを示す。

【０８３４】

【表５４】

表４５：「非オプティリンク化」ｓｃＦｖ（パニツムマブ）対「オプティリンク化ｓｃＦｖ」（ＴＣＴ１０６７）の比較

反応	ｓｃＦｖ	使用したオーリスタチンＦ－Ｃ５　ＮＨＳのモル当量	ＬＣ－ＭＳによるＤＡＲ分布及び（平均ＤＡＲ）	収率	ＨＰＬＣ－ＳＥＣによる凝集物％（図７１）
１	パニツムマブ	５	０、１、２、３、４（３）	４４％	３７％
２	パニツムマブ	１０	０、１、２、３、４、５（３．４）	２６％	４２％
３	パニツムマブ	２５	なし	０％＊	９５％
４	ＴＣＴ１０６７	５	０、１、２、３（２）	６５％	０％
５	ＴＣＴ１０６７	１０	２、３、４、５、６、７（５）	７０％	０％
６	ＴＣＴ１０６７	２５	７、８、９、１０、１１（９）	４６％	０％

＊認められた析出

【０８３５】

実施例７２。細胞致死効力及び中及び高ＤＡＲペイロードに対する中及び高親和性ｓｃＦｖ複合化の特異性

実施例７２Ａ。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、及びトラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（１１７）、ＤＡＲ６．５ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、ＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、及びトラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（１１８）を作製し、上述（前と類似したＤＡＲを有した実施例６５のように特徴付けた。ＳＫＢｒ３、ヒト乳癌細胞株、高ＨＥＲ２発現レベル、１つの細胞当たり最大１，０００，０００個の受容体［Ｌａｚａｒ　ＧＡ，ｅｔ　ａｌ　Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ．２００６，１０３：４００５－１０］を、加湿雰囲気下、３７℃、５％のCO_2で、ＭｃＣｏｙの５Ａ／１０％のＦＣＳ（完全培地）中で成長させた。培養密度が７０～８０％のとき、細胞をＰＢＳで洗浄し（２ｘ１０ｍｌ）、トリプシンで５～７分間インキュベートした。完全ＭｃＣｏｙの５Ａを添加し、細胞をピペット操作によって再懸濁させた。細胞を遠心分離によって回収し（２分、２０００ｒｐｍ）、上清を廃棄し、細胞を完全なＭｃＣｏｙの５Ａ（５ｍｌ）中で再懸濁させた。次いで、細胞を、血球計算器を使用して計数し、適切に希釈した。これらを、接合因子を使用して５０００個の細胞／ウェル（２００μｌ）でプレーティングし、加湿雰囲気下、３７℃、５％のCO_2で一晩インキュベートした。Ｕ８７は、非ＨＥＲ２発現膠芽腫細胞株［Ｚｉｔｒｏｎ　ＩＭ　ｅｔ　ａｌ　（２０１３）　ＢＭＣ　Ｃａｎｃｅｒ　１３：８３］　であり、類似した手段で成長させ、（ＤＭＥＭ培地を使用して）１０００個細胞／ウェルでプレーティングした。ＢＴ４７４は、ＨＥＲ２発現乳癌細胞株［Ｂｒｏｃｋｈｏｆｆ　Ｇ　ｅｔ　ａｌ　（２００７）　Ｃｅｌｌ　Ｐｒｏｌｉｆ　４０：４８８－５０７］であり、類似した手段で成長させ、（ＲＰＭＩ培地を使用して）７５００個細胞／ウェルでプレーティングした。ＮＣＩ－Ｎ８７は、ＨＥＲ２発現胃癌細胞株［Ｙａｍａｓｈｉｔａ－Ｋａｓｈｉｍａ　Ｙ　ｅｔ　ａｌ　（２０１３）　Ｏｎｃｏｌ．Ｒｅｐ　３０：１０８７－９３］であり、類似した手段で成長させ、（ＲＰＭＩ

培地を使用して）７５００個細胞／ウェルでプレーティングした。

【０８３６】

細胞を、完全培地中で希釈した様々なＡＤＣに、加湿雰囲気下、３７℃、５％のCO_2で９６時間、暴露させた。細胞生存率を、製造業者の使用説明書に従って、Ｐｒｏｍｅｇａ　Ａｑｕｅｏｕｓ　Ｃｅｌｌ－ｔｉｔｒｅ－９６（登録商標）ａｑｕｅｏｕｓ　ｏｎｅ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ細胞増殖キット（ＭＴＳ試薬）を使用して測定した。簡潔に、この培地を除去し、ＭＴＳ試薬と事前に合わせた１００μｌの完全フェノールレッド不含の培地を細胞に添加した（１００μｌの培地当たり２０μｌの試薬）。プレートを、暗中（５％のCO_2、３７℃）での２時間のインキュベーションの後、４９０ｎｍでＥＬＩＳＡプレートリーダーによって読み取った。

【０８３７】

データ（吸収単位）を、１００％の細胞生存として非治療対照を、及び１００％の細胞死としてＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００対照を使用することによって、細胞生存％に変換した。後者の平均吸収値を、好適な基準値を得るために、すべての残りのデータから減じた。平均を生存に変換し、標準誤差値を（細胞生存％として）各ｎ値について得た。データをプロットし、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを使用して、等式$y=y_0+a/(1+(x/x_0)b)$を使用した用量反応シグモイドロジスティック３－パラメータ曲線に適合させ、式中、$x_0=IC50$、及び$x_0>0$、及びａ＝１００である。実験を、試験した各化合物に対して少なくとも３回反復し、一組のデータまたはデータの平均をプロットし、適合させて、用量反応曲線を得た。

【０８３８】

データ（図７３～７６、表４６）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴまたはＴＣＴ１０６７）－ＡＤＣがｎＭ効力からｐＭ効力で、ＨＥＲ２発現細胞に対して特異的に細胞毒性であることを示す。高ＤＡＲは、高い細胞致死効力をもたらす。遊離薬物は、劣った細胞取り込みに起因してそのままでは低効力及び劣った特異性を有し（図７３、表４６）、非複合抗体は、そのままでは効力を有さないか低効力を有する（図７４～７５、表４６）。

【０８３９】

【表５５】

表４６：ｓｃＦｖ（ＴＣＴ&ＴＣＴ１０６７）&トラスツズマブMMAF－Ｃ５複合体（化合物１１８）の細胞致死効力の要約
ＮＣ＝細胞毒性なし

試料	ＳＫＢｒ３細胞（ＨＥＲ２＋＋＋）		ＢＴ４７４細胞（ＨＥＲ２＋＋）		Ｕ８７細胞（ＨＥＲ２－）	
	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｐＭ	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｐＭ	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｐＭ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－MMAF－Ｃ５、ＤＡＲ６．６	０．０８７	３．１	０．２	７．１４	＞５	ＮＣ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－MMAF－Ｃ５、ＤＡＲ　６．４	０．００７	２５０	０．００８	２８６	＞５	ＮＣ
トラスツズマブ－MMAF－Ｃ５、ＤＡＲ　４	０．００４	２６	０．０１	６７	＞５	ＮＣ
遊離薬物MMAF	ＮＣ	ＮＣ	－	＞１０，０００	ＮＣ	ＮＣ
複合化されていないｓｃＦｖ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ
複合化されていないトラスツズマブ	０．６	４０００	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ

【０８４０】
実施例７２Ｂ。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－MMAF－Ｃ５、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－MMAF－Ｃ５、及びトラスツズマブ－MMAF－Ｃ５複合体（１１８）、ＤＡＲ８細胞致死アッセイを、実施例７２Ａに記載されるように設定した。
【０８４１】
データ（図７３～７５&７７、表４７）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴまたはＴＣＴ１０６７）複合体がｎＭ効力からｐＭ効力で、ＨＥＲ２発現細胞に対して特異的に細胞毒性であることを示す。高ＤＡＲは、高い細胞致死効力をもたらす。遊離薬物は、劣った細胞取り込みに起因してそのままでは低効力及び劣った特異性を有し（図７３、表４７）、非複合抗体は、そのままでは効力を有さないか低効力を有する（図７４～７５、表４７）。
【０８４２】

【表５６】

表４７：ｓｃＦｖ（ＴＣＴ&ＴＣＴ１０６７）&トラスツズマブMMAF－Ｃ５複合体（化合物１１８）の細胞致死効力の要約
ＮＣ＝細胞毒性なし

試料	ＳＫＢｒ３細胞（ＨＥＲ２＋＋＋）		ＢＴ４７４細胞（ＨＥＲ２＋＋）		Ｕ８７細胞（ＨＥＲ２－）	
	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｐＭ	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｐＭ	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｐＭ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－MMAF DAR　8	０．００５３	１８９	０．０２	７１４	ＮＣ	ＮＣ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－MMAF　DAR　８．７	０．０００９１	３２．５	０．００１	３５．７	ＮＣ	ＮＣ
トラスツズマブ－MMAF、DAR　６	０．００５１	３４	０．０５	３３６	ＮＣ	ＮＣ
遊離薬物MMAF	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ
複合化されていないｓｃＦｖ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ
複合化されていないトラスツズマブ	０．６	４００００	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ

【０８４３】
実施例　７２Ｃ。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５及びトラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５複合体（７１）、ＤＡＲ１０．６及び１２．５
細胞致死アッセイを、実施例７２Ａに記載されるように設定した。
【０８４４】
データ（図７８～８０、表４８）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴまたはＴＣＴ１０６７）複合体がｎＭ効力からｐＭ効力で、ＨＥＲ２発現細胞に対して特異的に細胞毒性であることを示す。高ＤＡＲは、高い細胞致死効力をもたらす。遊離薬物は、劣った細胞取り込みに起因してそのままでは低効力及び劣った特異性を有し（図７８～８０、表４８）、非複合抗体は、そのままでは効力を有さないか低効力を有する（図７４～７５、表４８）。
【０８４５】

【表５７】

表４８：ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）＆トラスツズマブＰ５Ｃ５　ＡＤＣ（化合物７１）の細胞致死効力の要約
ＮＣ＝細胞毒性なし、ＮＤ＝未決定

試料	ＳＫＢｒ３細胞（ＨＥＲ２＋＋＋）		ＢＴ４７４細胞（ＨＥＲ２＋＋）		Ｕ８７細胞（ＨＥＲ２－）	
	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｎＭ	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｎＭ	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｎＭ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５　ＤＡＲ　１２．５	０．０４	１．４２	０．３	１０．７	ＮＣ	ＮＣ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５　ＤＡＲ　１０．６	ＮＤ	ＮＤ	０．５	１７．８５	ＮＣ	ＮＣ
トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５、ＤＡＲ　６	ＮＤ	ＮＤ	０．２	１．３３	ＮＣ	ＮＣ
遊離薬物Ｐ５Ｃ５	－	＞３３，０００	－	＞３３００	－	１００，０００
複合化されていないｓｃＦｖ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ
複合化されていないトラスツズマブ	０．６	４	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ

【０８４６】
実施例７２Ｄ。低、中、及び高ＤＡＲでのｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ－Ｃ５、ならびにトラスツズマブ－オーリスタチンＦ－Ｃ５複合体（１２２）
細胞致死アッセイを、実施例７２Ａに記載されるように設定した。
【０８４７】
データ（図７４～７５、８１～８２、表４９）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＤＣがｎＭ効力からｐＭ効力で、ＨＥＲ２発現細胞に対して特異的に細胞毒性であったことを示す。高ＤＡＲは、高い細胞致死効力をもたらす。遊離薬物は、非特異的細胞取り込みに起因してそのままでは、かなりの効力だが劣った特異性を有し（図８１、表４９）、非複合抗体は、そのままでは効力を有さないか低効力を有する（図７４～７５、表４９）。
【０８４８】

【表５８】

表４９：ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ－Ｃ５＆トラスツズマブオーリスタチンＦ－Ｃ５　ＡＤＣ（化合物１２２）の細胞致死効力の要約
ＮＣ＝細胞毒性なし、ＮＤ＝未決定

試料	ＳＫＢｒ３細胞（ＨＥＲ２＋＋＋）		ＢＴ４７４細胞（ＨＥＲ２＋＋）		ＮＣＩ－Ｎ８７４細胞（ＨＥＲ２＋＋）		Ｕ８７細胞（ＨＥＲ２－）	
	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｐＭ	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｐＭ	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｐＭ	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｐＭ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ－Ｃ５、ＤＡＲ２．７	０．０００８９	３１．７	０．０００１１５	３９．２	０．０００８７	３１．０５	ＮＣ	ＮＣ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ－Ｃ５、ＤＡＲ６．２	０．０００１０１	３６．１	０．０００１１２	３９．９	０．０００３６	１２．８５	ＮＣ	ＮＣ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ－Ｃ５、ＤＡＲ１１．８	０．０００８４４	２９９	０．００１０８２	３８６	０．０００８７	３１０	ＮＣ	ＮＣ
トラスツズマブ－オーリスタチンＦ－Ｃ５、ＤＡＲ４．８	０．０００３１７１	２１	０．０００８１９３	５４．６	０．０００１８	６．７	ＮＣ	ＮＣ
遊離薬物オーリスタチンＦ		＞５５００		＞２５００		ＮＤ		＞１２，５００
複合化されていないｓｃＦｖ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ
複合化されていないトラスツズマブ	０．６	４０００	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ

【０８４９】

実施例７２Ｅ。ＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－（ｄＰＥＧ$_{12}$）及びトラスツズマブ－ＤＭ１－（ｄＰＥＧ$_{12}$）複合体（１２４）、低、中、及び高ＤＡＲ

細胞致死アッセイを、実施例７２Ａに記載されるように設定した。

【０８５０】

データ（図７４～７５、８３～８４、表５０）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴまたはＴＣＴ１０６７）複合体がｎＭ効力からｐＭ効力で、ＨＥＲ２発現細胞に対して特異的に細胞毒性であることを示す。高ＤＡＲは、高い細胞致死効力をもたらす。遊離薬物は、非特異的細胞取り込みに起因してそのままでは、かなりの効力だが劣った特異性を有し（図８３、表５０）、非複合抗体は、そのままでは効力を有さないか低効力を有する（図７４～７５、表５０）。

【０８５１】

【表５９】

表５０：ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－（ｄＰＥＧ$_{12}$）＆トラスツズマブ－ＤＭ１９（ｄＰＥＧ$_{12}$）ＡＤＣ（化合物１２４）の細胞致死効力の要約
ＮＣ＝細胞毒性なし

試料	ＳＫＢｒ３細胞（ＨＥＲ２＋＋＋）		Ｕ８７細胞（ＨＥＲ２－）	
	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｎＭ	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｎＭ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１　ＤＡＲ　３．５	０．０４１７	１．４９	０．６４１	２２．９
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１　ＤＡＲ　５．５	０．００７８	０．０２７８	０．４１９	１４．９４
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１　ＤＡＲ　８	０．０７６０６	２．７	０．３５５	１２．６６
遊離薬物ＤＭ１	－	４７．６３	－	５０．７
複合化されていないｓｃＦｖ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ

【０８５２】

実施例７２Ｆ。ＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$及びトラスツズマブ－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$複合体、ＤＡＲ９（１２１）

細胞致死アッセイを、実施例７２Ａに記載されるように設定した。

【０８５３】

データ（図７４～７５、８５～８６、表５１）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴまたはＴＣＴ１０６７）－ＡＤＣがｎＭ効力からｐＭ効力で、ＨＥＲ２発現細胞に対して特異的に細胞毒性であることを示す。高ＤＡＲは、高い細胞致死効力をもたらす。高ＤＡＲは、高い細胞致死効力をもたらす。遊離薬物は、非特異的細胞取り込みに起因してそのままでは、低効力だが劣った特異性を有し（図８５、表５０）、非複合抗体は、そのままでは効力を有さないか低効力を有する（図７４～７５、表５１）。

【０８５４】

【表６０】

表５１、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$&トラスツズマブ－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$　ＡＤＣ（化合物１２０）の細胞致死効力の要約
ＮＣ＝細胞毒性なし

試料	ＳＫＢｒ３細胞（ＨＥＲ２＋＋＋）		Ｕ８７細胞（ＨＥＲ２－）		ＮＣＩ－Ｎ８７細胞（ＨＥＲ２＋＋）	
	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｎＭ	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｎＭ	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｎＭ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$、ＤＡＲ９	０．０４４７６	１．５９	０．１	３．５７	０．１９５	６．９４７
トラスツズマブ－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$、ＤＡＲ４	０．００５２	０．０３５	ＮＣ	ＮＣ	０．０６７	０．４５
遊離薬物ＭＭＡＥ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＤ	ＮＤ
複合化されていないｓｃＦｖ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ
複合化されていないトラスツズマブ	０．６	４	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ	ＮＣ

【０８５５】
実施例７３。抗体断片ＡＤＣがより低いインキュベーション時間で非常に効き目があるという実証
細胞致死アッセイを、実施例７２Ａに記載されるように設定したが、抗体断片系ＡＤＣのインビボで予測される暴露時間の減少を模倣するために、インキュベーション時間を４時間に短縮した。２つの類似したＤＡＲ（約５）の複合体を（１）高親和性ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体、ＤＡＲ５．３（２）トラスツズマブ－ＡＦ－Ｃ５複合体、ＤＡＲ４．８で比較した。その結果を、図８７～８８及び表５２に示す。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体の暴露時間の２４倍の減少が、２．２倍の効力の減少をもたらしたのに対し、トラスツズマブ－ＡＦ－Ｃ５複合体の暴露時間の２４倍の減少は、４．８倍のより劇的な効力の減少をもたらした。これは、より小さい大きさのタンパク質における高ＤＡＲは、より短い腫瘍細胞接触条件下でその効力を維持するＡＤＣにつながることを示唆する。
【０８５６】

【表６１】

表５２：短いインキュベーション及び長いインキュベーションのｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体、ＤＡＲ５．３（化合物１２２）の細胞致死効力 ＮＣ＝細胞毒性なし		
試料	ＳＫＢｒ３細胞（ＨＥＲ２＋＋＋）	
	ＩＣ５０μｇ／ｍｌ	ＩＣ５０ｐＭ
遊離オーリスタチン４時間	０．００１８１	＞１００，０００
遊離オーリスタチン、９６時間	０．０００８１	＞１０，０００
ＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　５．３、４時間	０．００１８１	６４．４
ＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　５．３、９６時間	０．０００８１	２８．８
トラスツズマブ－ＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ４．８、４時間	０．０１４４	９３．４
トラスツズマブ－ＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ４．８、９６時間	０．００２９	１９．３

【０８５７】

実施例７４．オプティリンク化ｓｃＦｖ薬物複合体が、同等のペイロードで全免疫グロブリン薬物複合体よりも早くヒト腫瘍異種移植片内へと浸透するという実証。

【０８５８】

マウス。メスの重症複合免疫不全マウス（Ｆｏｘ　Ｃｈａｓｅ　ＳＣＩＤ（登録商標）、ＣＢ－１７／Ｉｃｒ－　Ｐｒｋｄｃｓｃｉｄ／ＩｃｒＩｃｏＣｒｌ、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）は、研究の１日目に１５．３～１８．４グラムの体重（ＢＷ）範囲で、１２週齢であった。この動物に不断給餌で水（逆浸透、１ｐｐｍのＣｌ）、ならびに１８．０％の粗タンパク質、５．０％の粗脂肪、及び５．０％の粗繊維からなるＮＩＨ　３１　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　ａｎｄ　Ｉｒｒａｄｉａｔｅｄ　Ｌａｂ　Ｄｉｅｔ（登録商標）を与えた。これらのマウスを２０～２２℃（６８～７２°Ｆ）及び４０～６０％の湿度で、１２時間の光サイクルの静的マイクロアイソレーター内の放射線放射したＥｎｒｉｃｈ－ｏ’ｃｏｂｓ（登録商標）Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌ　Ｂｅｄｄｉｎｇ上に収容した。Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ　Ｎｏｒｔｈ　Ｃａｒｏｌｉｎａ（ＣＲ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、この請け負いの研究と開発を行った）は、拘束、飼育、外科的手技、飼料及び液体調節、ならびに獣医医療に関して、実験動物のケア及び使用のためのガイド（Ｇｕｉｄｅ　ｆｏｒ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　ｏｆ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌｓ）の提案に明確に従う。ＣＲ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓでの動物飼育及び使用プログラムは、国際実験動物ケア評価認証協会（ＡＡＡＬＡＣ）の認定を受け、これは、実験動物のケア及び使用の認められた基準の順守を保証する。

【０８５９】

インビボ移植及び腫瘍成長。異種移植を、ＳＣＩＤマウスにおける一連の皮下移植によって、ＣＲ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓで管理されたＢＴ４７４ヒト乳癌を用いて開始した。腫瘍移植の日に、各試験マウスは、右側腹部に皮下移植された１mm^3のＢＴ４７４断片を受容し、腫瘍成長を平均サイズが４００～６００mm^3の標的範囲に近づいているときに監視した。研究の１日目に指定した腫瘍移植の５０日後、動物を、各々が４０５～６００mm^3の個々の腫瘍体積、及び４６６～５０３mm^3の群平均腫瘍体

積を有する２匹のマウスからなる群に再分類した。腫瘍を、キャリパを使用して２次元で測定し、体積を以下の式を使用して計算した。
腫瘍体積（ｍｍ^3）＝ｗ^2×ｌ／２
式中、腫瘍のｍｍでのｗ＝幅、及びｌ＝長さである。腫瘍重量を、１ｍｇが腫瘍体積の１ｍｍ^{3}と同等であると仮定して、推定することができる。

【０８６０】

治療剤（試験薬）すべての試験薬を、０．６２５ｍｇ／ｍＬの濃度のそのままの状態で投与できる投与溶液として調製した。すべての投与溶液を、投与するまで４℃で保管した。すべての治療を、５ｍｇ／ｋｇの用量をもたらす、個々の動物の体重にスケーリングした８ｍＬ／ｋｇの投与量で投与した。

【０８６１】

治療。研究の１日目、確立されたＢＴ４７４異種移植片を有するメスのＳＣＩＤマウスに、表５３に要約される治療計画に従って投与した。すべての作用剤を、１日目に１回用量で尾静脈注射を介して静脈内（ｉ．ｖ．）投与した。

【０８６２】

【表６２】

表５３：ｓｃＦｖ－Ｐ５Ｃ５複合体（７１）を使用した腫瘍取り込み研究のための治療計画

群	作用剤	用量（ｍｇ／ｋｇ）	投与数	投与から腫瘍切除までの時間（時間）
１	トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５	５	１	２
２	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５	５	１	２
３	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５	５	１	２

【０８６３】

終了点。研究終了点は、１日目の投与から２時間後に起こった。

【０８６４】

治療関連副作用。試験動物を１日目に計量した。動物を、あらゆる有害な治療関連副作用の明白な兆候について頻繁に観察した。個々の体重減少を１日おきに観察し、体重が許容できる体重減少の限界を越えたあらゆる動物を安楽死した。群平均体重減少も、パープロトコルとして監視した。最大耐量（ＭＴＤ）の許容できる毒性を、試験の間の２０％未満の群平均体重減少と定義した。

【０８６５】

サンプリング。試料を、さらなる分析のために、研究において投与から２時間後に採取した。血液（全血液量）を、イソフルラン麻酔下で末端心臓穿刺を介してすべての動物から採取した。採取したら、血液試料を抗凝固薬としてリチウムヘパリンを使用して、血漿のために処理した。次いで、各血漿試料を分析のために凍結し、－８０℃で保管した。血液採取の直後に、腫瘍を採取した。腫瘍を、室温でおおよそ２４時間ホルマリン中に入れ、次いで、７０％のエタノールに移した。次いで、腫瘍をパラフィンワックスブロック中に包埋し、各腫瘍の一連の切片の複数のスライドを作製した。

【０８６６】

免疫組織化学的分析。腫瘍切片を含むスライドを、キシレン中で２ｘ５分インキュベートすることによって脱パラフィンし、１００％エタノール中で４ｘ２分、及び蒸留水中で２ｘ５分インキュベートすることによって再水和した。スライドを吸収性組織上に静置させることによって簡単に水気を切り、疎水性ペン（「ＰＡＰ」ペン）を使用して、各切片

の周囲に円を描き、切片に触れないように注意した。各切片を、１００～４００μｌのブロッキング溶液（ＴＢＳ中に１％のＢＳＡ）で覆い、加湿チャンバ内で１時間インキュベートした。ブロッキング溶液を払い、ブロッキング緩衝液中の１００～４００μｌの一次抗体（マウス抗セマドチンモノクローナル抗体、実施例３３、５μｇ／ｍｌ）を塗布し、加湿チャンバ内で一晩、４℃でインキュベートした。次に、抗体溶液を除去し、切片を各５分間、ＴＢＳ緩衝液中で３回洗浄し、次いで（ブロッキング緩衝液中の）二次抗体（ヤギ抗マウスＦＩＴＣ複合体、Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ　６２－６５１１、１：５０または抗ヒトＦＩＴＣ複合体Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ　０５４２１１、１：２０）溶液を添加し、室温６０分間、暗中でインキュベートした。抗体溶液を除去し、切片を各５分間、ＴＢＳ緩衝液中で３回洗浄した。切片を、封入剤を使用してカバーガラスと一緒に乗せた。封入剤を固化させ、スライドを蛍光顕微鏡下で見て、デジタル画像を撮った。

【０８６７】

図８９は、投与後２時間の時点での腫瘍切片の代表的な画像を示す。中親和性ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５及び高親和性ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５複合体を、高親和性試料中に明らかに、いくらかの血管周囲の染色と共に、腫瘍全体にわたって局在化するのを明白に見ることができる。ほんの少しのトラスツズマブＡＤＣが、低蛍光発光から見られるように、２時間の時点で腫瘍内に見られる。これは、ペイロード構成成分（全ＡＤＣ）を検出したとき、断片系ＡＤＣのより早い腫瘍取り込みを示す。

【０８６８】

実施例７５Ａ。オプティリンク化　ｓｃＦｖ薬物複合体が、げっ歯か動物モデルにおいて、未修飾ｓｃＦｖの血漿薬物動態プロファイルよりも遅い血漿薬物動態プロファイルを有することの実証。

【０８６９】

マウス。メスＢＡＬＢ／ｃマウス（ＢＡＬＢ／ｃＡｎＮＣｒｌ、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）は、本研究の開始時、８週齢であり、体重は１５．９～２１．９グラムの範囲にわたった。この動物に不断給餌で水（逆浸透、１ｐｐｍのＣｌ）、ならびに１８．０％の粗タンパク質、５．０％の粗脂肪、及び５．０％の粗繊維からなるＮＩＨ　３１　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　ａｎｄ　Ｉｒｒａｄｉａｔｅｄ　Ｌａｂ　Ｄｉｅｔ（登録商標）を与えた。これらのマウスを２０～２２℃（６８～７２°Ｆ）及び４０～６０％の湿度で、１２時間の光サイクルの静的マイクロアイソレーター内の放射線放射したＥｎｒｉｃｈ－ｏ’ｃｏｂｓ（登録商標）Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌ　Ｂｅｄｄｉｎｇ上に収容した。Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ　Ｎｏｒｔｈ　Ｃａｒｏｌｉｎａ（ＣＲ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、この請け負いの研究と開発を行った）は、拘束、飼育、外科的手技、飼料及び液体調節、ならびに獣医医療に関して、実験動物のケア及び使用のためのガイド（Ｇｕｉｄｅ　ｆｏｒ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　ｏｆ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌｓ）の提案に明確に従う。ＣＲ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓでの動物飼育及び使用プログラム（Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　ｐｒｏｇｒａｍ）は、国際実験動物ケア評価認証協会の認定を受け、これは、実験動物のケア及び使用の認められた基準の順守を保証する。

【０８７０】

ラット。（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ，ＵＫから供給された）オスのスプラーグドーリーラットを、温度及び光を制御した施設内に、１２時間の明暗サイクルで、不断給餌及び不断給水を用いて集団で収容した。研究組み入れのために選択したラットを、研究の完了まで個別に収容した。すべての動物は、現場の内務省公認獣医師によるガイドラインに従った健康監視を受けた。すべての動物実験は、英国動物（実験処置）法（Ａｎｉｍａｌｓ（Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ）Ａｃｔ）（１９８６）及びＥＵ指令８６／６０９／ＥＥＣが適用された。すべてのそのような作業を、現場の獣医師及び英国内務省検査官による手順及び施設の定期的な監査により監視した。研究デザインは、オスのスプラーグドーリーラットの頸部内へのカテーテルの外科的移植を必要とした。ラットに吸入麻酔イソフルランを使用して麻酔をかけ、背臥位で置いた。右頸部の静脈を露出さ

せ、結んでいない結紮糸を尾側に置き、静脈の頭側の端を結紮した。結紮糸間に小さい切り込みを入れ、これの中にカテーテル（ポリエチレン５０管材）を挿入した。カテーテルを、カテーテルを挿入した静脈の周囲に、結んでいない結紮糸を結ぶことによって、適所に固定した。カテーテルの出口部としての役割を果たすように、肩甲骨の領域に小さい切込みを入れた。カテーテルを、皮下で進ませ、肩甲骨の切開をとおして体外に出した。カテーテルの開存性を試験し、カテーテルをロック溶液（ヘパリン化生理的食塩水）で満たし、ステンレススチールピンで封止した。動物の手術後監視を、内務省の優良実践ガイドラインに従って行った。静脈内投与は、尾静脈を介してであった。

【０８７１】

治療剤（試験薬）すべての試験薬を、そのままの状態で投与できる投与溶液として供給した。すべての投与溶液を、投与するまで４℃で保管した。すべての治療を、治療表に記載される投与濃度を得るように、個々の動物の体重にスケーリングした投与量で投与した。

【０８７２】

治療（マウス）。研究の１日目に、マウスを、各々が（評価する試験薬１つ当たり）１８匹のマウスからなる群に分け、治療表に要約される治療計画に従って投与を開始した。すべての用量を、以下の表に記載されるように、尾静脈注射によって静脈内（ｉ．ｖ．）投与した。

【０８７３】

治療（ラット）。研究の１日目に、ラットを（評価する試験薬１つ当たり）３匹の動物の群に分け、以下の表に要約される治療計画に従って投与を開始した。

【０８７４】

終了点。研究終了点は、最後のサンプリング点後、典型的には２または４日目、投与から２４または７２時間後に起こった。

【０８７５】

治療関連副作用。試験動物を１日目に２回計量した。動物を、あらゆる有害な治療関連副作用の明白な兆候について頻繁に観察した。個々の体重減少を１日おきに観察し、体重が許容できる体重減少の限界を越えたあらゆる動物を安楽死した。群平均体重減少も、監視した。最大耐量（ＭＴＤ）の許容できる毒性を、試験の間の２０％未満の群平均体重減少と定義した。

【０８７６】

サンプリング（マウス）。血液（全血液量）を、１時点当たり１つの治療群当たり３匹の動物から採取した。試料をイソフルラン麻酔下で末端心臓穿刺を介してすべての動物から採取した。採取したら、血液試料を抗凝固薬としてリチウムヘパリンまたはＫ２ＥＤＴＡを含む採血管内へと採取し、各時点で血漿のために処理した。各血漿試料を、分析のために使用するまで－８０℃で保管した。

【０８７７】

サンプリング（ラット）。一連の静脈血液試料（おおよそ０．１～０．２ｍｌ）を、指定の時点（投与から０．５～７２時間）に、体外に出ている頸部静脈カテーテルを介して採取し、ヘパリン化された容器内に入れた。血液試料をとる前に、カテーテルのヘパリン化生理的食塩水を空にして、血液試料の希釈を予防した。各血液サンプリング後に、カテーテルを介して除去された血液の体積を同等の体積のヘパリン化生理的食塩水と置換し、封止する。血液試料を遠心分離して（５分、１６，１００ｇ、４℃）、血漿を分離した。血漿試料を新しい容器に移し、すぐに凍結し、分析のために使用するまで－２０℃で保管した。

【０８７８】

血漿中の試験薬の定量化ＥＬＩＳＡを実施例３１に記載されるように行った。検出抗体は、（ａ）ｓｃＦｖ（総抗体）を検出するための抗Ｔ７タグ、（ｂ）トラスツズマブ（総抗体）を検出するための抗ヒトＦａｂ特異的、（ｃ）抗ＭＭＡＦ（Ｃｏｎｃｏｒｔｉｓ）、抗ＭＭＡＥ（Ｃｏｎｃｏｒｔｉｓ）、抗ＤＭ１（Ｃｏｎｃｏｒｔｉｓ）、及び抗セマド

チン（自家マウスモノクローナル抗体、実施例３３、これらはＰ５Ｃ５及びオーリスタチンＦも認識した）、全ＡＤＣであった。基準試験薬を使用して、存在する量を定量化するために、血漿試料を比較するための較正曲線を構築した。濃度を、時間に対してプロットし（標準誤差での３匹の動物の平均）、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを使用して２相崩壊曲線に適合させて、動態パラメータを導き出した。

【０８７９】

実施例７５Ｂ。マウスにおけるＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（１１８）、及び非複合抗体の薬物動態分析

マウスを準備し、治療し、実施例７５Ａに記載されるように血漿分析を行った。投与及びサンプリング日程を、表５４に示す。

【０８８０】

【表６３】

表５４：マウスにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－MMAＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－MMAＦ－Ｃ５複合体（化合物１１８）、及び非複合抗体の薬物動態投与及び分析

試験薬	投与量	サンプリング時間（時間）	分析
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－MMAＦ－Ｃ５	１ｘ５ｍｇ／ｋｇ	０．５、１、２、４、８、２４	ＥＬＩＳＡ抗ペイロード ＥＬＩＳＡ抗Ｔ７タグ
トラスツズマブ－MMAＦ－Ｃ５	１ｘ５ｍｇ／ｋｇ	１、２、６、２４、４８、７２	ＥＬＩＳＡ抗ヒトＩｇＧ ＥＬＩＳＡ抗ペイロード
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）	１ｘ５ｍｇ／ｋｇ	２、４、６、２４	ＥＬＩＳＡ抗Ｔ７タグ

【０８８１】

薬物動態プロットを図９０に示し、導き出した薬物動態パラメータを表５５に示す。双方共に予測されたように、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）が、循環から急速に除去されたのに対し、トラスツズマブＩｇＧ　ＡＤＣは、はるかにより緩徐に除去される。予想外に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体は、高ペイロード負荷に関わらず、未修飾断片よりも緩徐に除去され、ＯｐｔｉＬｉｎｋ複合化によって可能となった高ＤＡＲが、インビボでの凝集をもたらさず、細網内皮系を介する急速なクリアランスをもたらさないことを示す。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体のより低いクリアランスは、（クリアランス曲線下面積（ＡＵＣ）によって図示されるように）著しい血液暴露につながり、これは次に、著しい、かつ効果的な腫瘍暴露へとつながる。ＭＭＡＦ複合体は、未修飾ｓｃＦｖと比較してより小さい体積の分布も有し、これは、１４倍高い生物学的利用能へとつながった。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体を、その（総抗体を検出する）Ｔ７タグ及び（全ＡＤＣを検出する）ペイロードを介して血漿中に検出した。トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体を、（総抗体を検出する）抗ヒトＦａｂを使用して、及び（全ＡＤＣを検出する）ペイロードを介して血漿中に検出した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ複合体のクリアランスラインは、非常に類似しており、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体が血漿中で安定しており、わずかな脱複合化が起こっていたことを示唆した。

【０８８２】

【表６４】

表５５：マウスにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（化合物１１７）、及び非複合抗体の薬物動態パラメータ
＊抗ペイロード及び抗タンパク質検出における平均ＡＵＣから計算された（μｇｈｒ／ｍｌ）

試験薬	排出半減期（時間）		生物学的利用能（血液暴露、ＡＵＣ、２４時間）＊
	総抗体	全ＡＤＣ	
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５	２．８４	２．７８	４０．８８
トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５	２０．１１	２４．９３	１８９０
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）	２．７８	－	２．９

【０８８３】
実施例７５Ｃ。マウスにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（１１８）、及び非複合抗体の薬物動態分析
マウスを準備し、治療し、実施例７５Ａに記載されるように血漿分析を行った。投与及びサンプリング日程を、表５６に示す。
【０８８４】
【表６５】

表５６：マウスにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（化合物１１８）、及び非複合抗体の薬物動態投与及び分析

試験薬	投与量	サンプリング時間（時間）	分析
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５	１ｘ５ｍｇ／ｋｇ	０．５、１、２、４、８、２４	ＥＬＩＳＡ抗ペイロード ＥＬＩＳＡ抗Ｔ７タグ
トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５	１ｘ５ｍｇ／ｋｇ	１、２、６、２４、４８、７２	ＥＬＩＳＡ抗ヒトＩｇＧ ＥＬＩＳＡ抗ペイロード
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	１ｘ５ｍｇ／ｋｇ	０．５、１、２、４、８、２４	ＥＬＩＳＡ抗Ｔ７タグ

【０８８５】
薬物動態プロットを図９１に示し、導き出した薬物動態パラメータを表５７に示す。双方共に予測されたように、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）が、循環から急速に除去されたのに対し、トラスツズマブＩｇＧ　ＡＤＣは、はるかにより緩徐に除去される。予想外に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体は、高ペイロード負荷に関わらず、未修飾断片よりも緩徐に除去され、ＯｐｔｉＬｉｎｋ複合化によって可能となった高ＤＡＲが、インビボでの凝集をもたらさず、細網内皮系を介する急速なクリアランスをもたらさないことを示す。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体のより低いクリアランスは、（クリアランス曲線下面積（ＡＵＣ）によって図示されるように）著しい血液暴露につながり、生物学的利用能において１５．５倍の上昇を示し、これは次に、著しい、かつ効果的な腫瘍暴露へとつながる。ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体は、未修飾ｓｃＦｖと比較してより小さい体積の分布も有し、これは、生物学的利用能へとつながった。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体を、その（総抗体を検出する）Ｔ７タグ及び（全ＡＤＣを検出する）ペイロードを介して血漿中に検出した。トラスツズマブ－ＭＭＡ

Ｆ－Ｃ５複合体を、（総抗体を検出する）抗ヒトＦａｂを使用して、及び（全ＡＤＣを検出する）ペイロードを介して血漿中に検出した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体のクリアランスラインは、非常に類似しており、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体が血漿中で安定しており、わずかな脱複合化が起こっていたことを示唆した。

【０８８６】

【表６６】

表５７：マウスにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（化合物１１８）、及び非複合抗体の薬物動態パラメータ
＊抗ペイロード及び抗タンパク質検出における平均ＡＵＣから計算された（μｇｈｒ／ｍｌ）

試験薬	排出半減期（時間）		生物学的利用能（血液暴露、ＡＵＣ、２４時間）＊
	総抗体	全ＡＤＣ	
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５	３．３４	２．６２	１２６
トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５	２０．１１	２４．９３	１８９０
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	１．０５	－	８．１２

【０８８７】

実施例７５Ｄ。マウスにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５複合体（７１）、及び非複合抗体の薬物動態分析

マウスを準備し、治療し、実施例７５Ａに記載されるように血漿分析を行った。投与及びサンプリング日程を、表５８に示す。

【０８８８】

【表６７】

表５８：マウスにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５複合体（化合物７１）、及び非複合抗体の薬物動態投与及び分析

試験薬	投与量	サンプリング時間（時間）	分析
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５	１ｘ５ｍｇ／ｋｇ	０．５、１、２、４、８、２４	ＥＬＩＳＡ抗ペイロード ＥＬＩＳＡ抗Ｔ７タグ
トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５	１ｘ５ｍｇ／ｋｇ	１、２、６、２４、４８、７２	ＥＬＩＳＡ抗ヒトＩｇＧ ＥＬＩＳＡ抗ペイロード
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）	１ｘ５ｍｇ／ｋｇ	２、４、６、２４	ＥＬＩＳＡ抗Ｔ７タグ

【０８８９】

薬物動態プロットを図９２に示し、導き出した薬物動態パラメータを表５９に示す。双方共に予測されたように、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）が、循環から急速に除去されたのに対し、トラスツズマブＩｇＧ　ＡＤＣは、はるかにより緩徐に除去される。予想外に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５複合体は、高ペイロード負荷に関わらず、未修飾断片よりも緩徐に

除去され、ＯｐｔｉＬｉｎｋ複合化によって可能となった高ＤＡＲが、インビボでの凝集をもたらさず、細網内皮系を介する急速なクリアランスをもたらさないことを示す。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５複合体のより低いクリアランスは、（クリアランス曲線下面積（ＡＵＣ）における７４倍の上昇によって図示されるように）著しい血液暴露につながり、これは次に、著しい、かつ効果的な腫瘍暴露へとつながる。Ｐ５Ｃ５複合体は、未修飾ｓｃＦｖと比較してより小さい体積の分布も有し、これは、より高い生物学的利用能へとつながった。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５複合体を、その（総抗体を検出する）Ｔ７タグ及び（全ＡＤＣを検出する）ペイロードを介して血漿中に検出した。トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５複合体を、（総抗体を検出する）抗ヒトＦａｂを使用して、及び（全ＡＤＣを検出する）ペイロードを介して血漿中に検出した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５複合体のクリアランスラインは、非常に類似しており、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５複合体が血漿中で安定しており、わずかな脱複合化が起こっていたことを示唆した。

【０８９０】

【表６８】

表５９：マウスにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５、トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５複合体（化合物７１）、及び非複合抗体の薬物動態パラメータ
＊抗ペイロード及び抗タンパク質検出における平均ＡＵＣから計算された（μｇｈｒ／ｍｌ）

試験薬	排出半減期（時間）		生物学的利用能（血液暴露、ＡＵＣ、２４時間）＊
	総抗体	全ＡＤＣ	
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５	４．６９	４．９９	２１５．３５
トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５	１７．３	ＮＤ	＞１５０
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）	２．７８		２．９１

【０８９１】

実施例７５Ｅ。マウスにおけるＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－オーリスタチンＦ－Ｃ５複合体（１２２）、及び非複合抗体

マウスを準備し、治療し、実施例７５Ａに記載されるように血漿分析を行った。投与及びサンプリング日程を、表６０に示す。

【０８９２】

【表６９】

表６０：マウスにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－ＡＦ－Ｃ５複合体（化合物１２２）、及び非複合抗体の薬物動態投与及び分析

試験薬	投与量	サンプリング時間（時間）	分析
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５	１ｘ２ｍｇ／ｋｇ	０．５、１、２、４、８、２４	ＥＬＩＳＡ抗ペイロード ＥＬＩＳＡ抗Ｔ７タグ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	１ｘ２ｍｇ／ｋｇ	０．５、１、２、４、８、２４	ＥＬＩＳＡ抗Ｔ７タグ

【０８９３】

薬物動態プロットを図９３に示し、導き出した薬物動態パラメータを表６１に示す。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）は、循環から急速に除去される。予想外に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体は、高ペイロード負荷に関わらず、未修飾断片よりも緩徐

に除去され、ＯｐｔｉＬｉｎｋ複合化によって可能となった高ＤＡＲが、インビボでの凝集をもたらさず、細網内皮系を介する急速なクリアランスをもたらさないことを示す。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体のより低いクリアランスは、（クリアランス曲線下面積（ＡＵＣ）によって図示されるように）著しい血液暴露につながり、３．５倍高い生物学的利用能を示し、これは次に、著しい、かつ効果的な腫瘍暴露へとつながる。オーリスタチンＦ複合体は、未修飾ｓｃＦｖと比較してより小さい体積の分布も有し、これは、生物学的利用能へとつながった。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体を、その（総抗体を検出する）Ｔ７タグ及び（全ＡＤＣを検出する）ペイロードを介して血漿中に検出した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体のクリアランスラインは、非常に類似しており、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体が血漿中で安定しており、わずかな脱複合化が起こっていたことを示唆した。

【０８９４】

【表７０】

表６１：マウスにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－ＡＦ－Ｃ５複合体（化合物１２２）、及び非複合抗体の薬物動態パラメータ
＊抗ペイロード及び抗タンパク質検出における平均ＡＵＣから計算された（μｇｈｒ／ｍｌ）

試験薬	排出半減期（時間）		生物学的利用能（血液暴露、ＡＵＣ、２４時間）＊
	総抗体	全ＡＤＣ	
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５	０．９２	０．８５	２７．６
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	１．０５		８．１３

ＮＤ＝未決定

【０８９５】

実施例７５Ｆ。マウスにおけるＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１（ＰＥＧ１２）、トラスツズマブ－ＤＭ１（ＰＥＧ１２）複合体（１２４）、及び非複合抗体

マウスを準備し、治療し、実施例７５Ａに記載されるように血漿分析を行った。投与及びサンプリング日程を、表６１に示す。

【０８９６】

【表７１】

表６１：マウスにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）（化合物１２４）及び複合化されていないｓｃＦｖの薬物動態及び投与分析

試験薬	投与量	サンプリング時間（時間）	分析
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）	１ｘ２ｍｇ／ｋｇ	０．５、１、２、４、８、２４	ＥＬＩＳＡ抗ペイロード ＥＬＩＳＡ抗Ｔ７タグ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	１ｘ２ｍｇ／ｋｇ	０．５、１、２、４、８、２４	ＥＬＩＳＡ抗Ｔ７タグ

【０８９７】

薬物動態プロットを図９４に示し、導き出した薬物動態パラメータを表６２に示す。ｓ

ｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）は、循環から急速に除去される。予想外に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）複合体は、高ペイロード負荷に関わらず、未修飾断片よりも緩徐に除去され、ＯｐｔｉＬｉｎｋ複合化によって可能となった高ＤＡＲが、インビボでの凝集をもたらさず、細網内皮系を介する急速なクリアランスをもたらさないことを示す。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）複合体のより低いクリアランスは、（クリアランス曲線下面積（ＡＵＣ）によって図示されるように）著しい血液暴露につながり、３倍高い生物学的利用能を示し、これは次に、著しい、かつ効果的な腫瘍暴露へとつながる。ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）複合体は、未修飾ｓｃＦｖと比較してより小さい体積の分布も有し、これは、より高い生物学的利用能へとつながった。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）複合体を、その（総抗体を検出する）Ｔ７タグ及び（全ＡＤＣを検出する）ペイロードを介して血漿中に検出した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）複合体のクリアランスラインは、非常に類似しており、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）複合体が血漿中で安定しており、わずかな脱複合化が起こっていたことを示唆した。

【０８９８】

【表７２】

表６２：マウスにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）、トラスツズマブ－ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）（化合物１２４）複合体及び非複合抗体の薬物動態パラメータ＊抗ペイロード及び抗タンパク質検出における平均ＡＵＣから計算された（μｇｈｒ／ｍｌ）

試験薬	排出半減期（時間）		生物学的利用能（血液暴露、ＡＵＣ２４時間）＊
	総抗体	全ＡＤＣ	
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）	０．９２	１．５３	２２．１５
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	１．０５	－	８．１３

【０８９９】

実施例７５Ｇ。ラットにおけるＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５複合体（７１）及び非複合抗体

ラットを準備し、治療し、実施例７５Ａに記載されるように血漿分析を行った。投与及びサンプリング日程を、表６３に示す。

【０９００】

【表７３】

表６３：ラットにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５（化合物７１）及び非複合抗体の薬物動態及び投与分析

試験薬	投与量	サンプリング時間（時間）	分析
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５	１ｘ４ｍｇ／ｋｇ	０．５、１、２、４、８、２４	ＥＬＩＳＡ抗ペイロード ＥＬＩＳＡ抗Ｔ７タグ
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	１ｘ４ｍｇ／ｋｇ	０．５、１、２、４、８、２４	ＥＬＩＳＡ抗Ｔ７タグ

【０９０１】

薬物動態プロットを図９５に示し、導き出した薬物動態パラメータを表６４に示す。双方共に予測されたように、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）が、循環から急速に除去されたの

に対し、トラスツズマブＩｇＧ　ＡＤＣは、はるかにより緩徐に除去される。予想外に、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５）複合体は、高ペイロード負荷に関わらず、未修飾断片よりも緩徐に除去され、ＯｐｔｉＬｉｎｋ複合化によって可能となった高ＤＡＲが、インビボでの凝集をもたらさず、細網内皮系を介する急速なクリアランスをもたらさないことを示す。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５複合体のより低いクリアランスは、（クリアランス曲線下面積（ＡＵＣ）によって図示されるように）著しい血液暴露につながり、４．５倍高い生物学的利用能を示し、これは次に、著しい、かつ効果的な腫瘍暴露へとつながる。Ｐ５Ｃ５複合体は、未修飾ｓｃＦｖと比較してより小さい体積の分布も有し、これは、より高い生物学的利用能へとつながった。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５複合体を、その（総抗体を検出する）Ｔ７タグ及び（全ＡＤＣを検出する）ペイロードを介して血漿中に検出した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５複合体のクリアランスラインは、非常に類似しており、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５複合体が血漿中で安定しており、わずかな脱複合化が起こっていたことを示唆した。治療した動物からの尿を、２４時間にわたり採取し、スピン濃縮器（ＭＷＣＯ－１０ｋＤａ）で１０倍に濃縮し、ＰＢＳに対して透析した。１つの群当たり３匹のラットからのこれらの試料を、Ｂｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲチップ上で分析した。データ（図９５Ｂ及びＣ）は、ｓｃＦｖ－Ｐ５Ｃ５複合体試料と比較して遊離ｓｃＦｖ試料において類似した結合活性が存在することを示し、ｓｃＦｖ及び複合体がある程度まで腎臓をとおして除去され、これは、タンパク質及びこれらの複合体を手付かずのままにすることを示唆する。

【０９０２】

【表７４】

表６４：ラットにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５複合体（化合物７１）及び非複合抗体の薬物動態パラメータ
＊抗ペイロード及び抗タンパク質検出における平均ＡＵＣから計算された（μｇｈｒ／ｍｌ）

試験薬	排出半減期（時間）		生物学的利用能（血液暴露、ＡＵＣ２４時間）＊
	総抗体	全ＡＤＣ	
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５	０．５１２	２．２０８５	９０．１
ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）	０．８		２０．４６

【０９０３】

実施例７６。同等のペイロードを有する全免疫グロブリン薬物複合体と対照とを比較した、ヒト腫瘍異種移植モデルにおけるオプティリンク化ｓｃＦｖ薬物複合体腫瘍退縮または根絶研究

マウス。メスの重症複合免疫不全マウス（Ｆｏｘ　Ｃｈａｓｅ　ＳＣＩＤ（登録商標）、ＣＢ－１７／Ｉｃｒ－　Ｐｒｋｄｃｓｃｉｄ／ＩｃｒＩｃｏＣｒｌ、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）は、研究の１日目に１５．３～１８．４グラムの体重（ＢＷ）範囲で、１２週齢であった。この動物に不断給餌で水（逆浸透、１ｐｐｍのＣｌ）、ならびに１８．０％の粗タンパク質、５．０％の粗脂肪、及び５．０％の粗繊維からなるＮＩＨ　３１　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　ａｎｄ　Ｉｒｒａｄｉａｔｅｄ　Ｌａｂ　Ｄｉｅｔ（登録商標）を与えた。これらのマウスを２０～２２℃（６８～７２°Ｆ）及び４０～６０％の湿度で、１２時間の光サイクルの静的マイクロアイソレーター内の放射線放射したＥｎｒｉｃｈ－ｏ’ｃｏｂｓ（登録商標）Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌ　Ｂｅｄｄｉｎｇ上に収容した。Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ　Ｎｏｒｔｈ　Ｃａｒｏｌｉｎａ（ＣＲ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、この請け負いの研究と開発を行った）は、拘束、飼育、外科的手技、飼料及び液体調節、ならびに獣医医療に関して、実験動物のケア及び使用のためのガイド（Ｇｕｉ

ｄｅ ｆｏｒ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌｓ）の提案に明確に従う。ＣＲ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｓｅｒｖｉｃｅｓでの動物飼育及び使用プログラム（Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ ｐｒｏｇｒａｍ）は、国際実験動物ケア評価認証協会（ＡＡＡＬＡＣ）の認定を受け、これは、実験動物のケア及び使用の認められた基準の順守を保証する。

【０９０４】

インビボ移植及び腫瘍成長。異種移植を、（ａ）ＳＣＩＤマウスにおける一連の皮下移植によって、ＣＲ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｓｅｒｖｉｃｅｓで管理されたＢＴ４７４ヒト乳癌を用いて開始した。腫瘍移植の日に、各試験マウスは、右側腹部に皮下移植された１ｍｍ３のＢＴ４７４断片を受容し、腫瘍成長を平均サイズが１１０～１４４ｍｍ^{3}の標的範囲に近づいているときに監視した。研究の１日目に指定した腫瘍移植の５０日後、動物を、各々が１１０～１４４ｍｍ^{3}の個々の腫瘍体積、及び１１５～１１８ｍｍ^{3}の群平均腫瘍体積を有する２匹のマウスからなる６つの群に再分類した。（ｂ）異種移植を、右側腹部に皮下移植されたＮＣＩ－Ｎ８７腫瘍細胞の細胞懸濁液を用いて開始し、腫瘍成長を平均サイズが１１０～１４４ｍｍ^{3}の標的範囲に近づいているときに監視した。腫瘍を、キャリパを使用して２次元で測定し、体積を以下の式を使用して計算した。

腫瘍体積（ｍｍ^3）＝幅^2×長さ／２であり、

式中、腫瘍の幅及び長さは、ｍｍでの幅及び長さであった。腫瘍重量を、１ｍｇが腫瘍体積の１ｍｍ^{3}と同等であると仮定して、推定することができる。

【０９０５】

治療剤及び治療。すべての試験薬を、そのままの状態で投与できる投与溶液として供給し、使用するまで４℃で保管した。すべての治療を、それぞれの治療表に記載される投与濃度を達成するように、個々の動物の体重にスケーリングした投与量で投与した。すべての作用剤を、尾静脈注射を介して静脈内（ｉ．ｖ．）投与した。

【０９０６】

終了点。本研究を、最大９０日間、または腫瘍が１０００ｍｍ^{3}の最大サイズに達するまで継続した。

【０９０７】

治療関連副作用。試験動物を１日目に計量した。動物を、あらゆる有害な治療関連副作用の明白な兆候について頻繁に観察した。個々の体重減少を１日おきに観察し、体重が許容できる体重減少の限界を越えたあらゆる動物を安楽死した。群平均体重減少も、パープロトコルとして監視した。最大耐量（ＭＴＤ）の許容できる毒性を、試験の間の２０％未満の群平均体重減少と定義した。

実施例７６Ａ。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（１１７）、及び遊離ＭＭＡＦ治療剤を用いた、ＢＴ４７４異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶

ＢＴ４７４腫瘍を、実施例７６に記載されるように設定した。この実験の治療計画を、表６５に記載する。

【０９０８】

【表７５】

表６５：トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５ベンチマークと比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５（化合物１１８）の治療計画

番号	治療剤または対照	投与した用量（ｍｇ／ｋｇ）	日程	投与数
１	ビヒクル（生理的食塩水）	８ｍｌの体積	２日に１回	１２
２	遊離ＭＭＡＦ	１	２日に１回	１２
３	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５	０．０５	２日に１回	１２
４	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５	０．５	２日に１回	１２
５	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５	２	２日に１回	１２
６	トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５	５	週に１回	４
７	トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５	１	週に１回	４

【０９０９】

腫瘍体積（mm^3）を時間に対してプロットし（図９６）、動物の体重変化（％）を時間に対してプロットした（図９６）。ベンチマーク対照（トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５）を、１週間間隔で５ｍｇ／ｋｇ及び１ｍｇ／ｋｇのより低い用量で投与した。極めて類似したＡＤＣは、以前に、非常に有効であることを示した［Ｚｉｍｍｅｒｍａｎ　ＥＳ　ｅｔ　ａｌ（２０１４）Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ　２５：３５１－６１］。高親和性ｓｃＦｖ（１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体を、より急速な薬物動態クリアランスを説明するために、３つの用量でより頻繁に投与した。

【０９１０】

これらの結果は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５の２ｍｇ／ｋｇ投与処方を用いたＡＤＣのすべてと明らかな用量反応の関係が存在し、３０日目までには、（ほぼ９０日耐久性のある）完全（１００％）治癒をもたらすことを示す。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５の０．５ｍｇ／ｋｇ投与処方も、（９０日までには達成された）完全（１００％）治癒をもたらした。同様の反応が、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５の５ｍｇ／ｋｇ投与処方で予測されたように見られた。しかしながら、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣを有するより多くのペイロードを提供する能力は、さらに頻繁に、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣの２倍の速さでより迅速な腫瘍縮小をもたらした。生理的食塩水（ビヒクル）及び遊離ペイロードで治療した動物群の腫瘍は、急速に成長した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５での治療は、マウスの抗体断片ＡＤＣ群での体重の増加から見られるように、より耐性が高いようであり、マウスのＩｇＧ－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ群よりも最大１５％重かった。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５の治療指数の推定は、トラスツズマブＡＤＣの約５のおおよその値と比較して、少なくとも４０である（少なくとも２ｍｇ／ｋｇ、最大耐量／０．０５ｍｇ／ｋｇの最小有効用量）。

実施例７６Ｂ。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（化合物１１８）、及び遊離ＭＭＡＦ治療剤を用いた、ＢＴ４７４異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶

ＢＴ４７４腫瘍を、実施例７６に記載されるように設定した。この実験の治療計画を、表６６に記載する。

【０９１１】

【表７６】

表６５：トラスツズマブ－MMAＦ－Ｃ５ベンチマークと比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－MMAＦ－Ｃ５（１１８）の治療計画

番号	治療剤または対照	投与した用量（ｍｇ／ｋｇ）	日程	投与数
１	ビヒクル（生理的食塩水）	８ｍｌの体積	２日に１回	１２
２	遊離MMAＦ	１	２日に１回	１２
３	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－MMAＦ－Ｃ５	０．５	２日に１回	１２
４	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－MMAＦ－Ｃ５	２	２日に１回	１２
５	トラスツズマブ－MMAＦ－Ｃ５	１	週に１回	４
６	トラスツズマブ－MMAＦ－Ｃ５	５	週に１回	４

【０９１２】

腫瘍体積（mm^3）を時間に対してプロットし（図９７）、動物の体重変化（％）を時間に対してプロットした（図９７）。ベンチマーク対照（トラスツズマブ－MMAＦ－Ｃ５）を、１週間間隔で、以前に非常に有効であることを示した５ｍｇ／ｋｇ、及び１ｍｇ／ｋｇのより低い用量で投与した。中親和性ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－MMAＦ－Ｃ５複合体を、より急速な薬物動態クリアランスを説明するために、３つのより低い用量でより頻繁に投与した。実施例７４Ａからのデータを、比較として含める。

【０９１３】

これらの結果は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－MMAＦ－Ｃ５の２ｍｇ／ｋｇ投与処方を用いたＡＤＣのすべてと明らかな用量反応の関係が存在し、３０日目までには、（ほぼ９０日耐久性のある）完全（１００％）治癒をもたらすことを示す。同様の反応が、トラスツズマブ－MMAＦ－Ｃ５の５ｍｇ／ｋｇ投与処方で予測されたように見られた。しかしながら、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－MMAＦ－Ｃ５　ＡＤＣを有するより多くのペイロードを提供する能力は、さらに頻繁に、より迅速な腫瘍縮小をもたらした。生理的食塩水（ビヒクル）及び遊離ペイロードで治療した動物群の腫瘍は、急速に成長した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－MMAＦ－Ｃ５での治療は、マウスの抗体断片ＡＤＣ群での体重の増加から見られるように、より耐性が高いようであり、マウスのトラスツズマブ－MMAＦ－Ｃ５　ＡＤＣ群よりも最大２０％重かった。２つの抗体断片ＡＤＣ間の結合親和度における１０００倍の差異（実施例６３）にも関わらず、２ｍｇ／ｋｇの投与処方は、同様の、かつ急速な反応をもたらし、（最低親和度が存在しなければならないが）結合親和度が重要な要因なのではなく、高ペイロード負荷及び急速な浸潤が高い有効性をもたらすことを示唆する。０．５ｍｇ／ｋｇのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－MMAＦ－Ｃ５のより低い用量で、反応はより高い親和性ｓｃＦｖよりも劣っており、腫瘍は、５０％の治癒速度で、４０日目に再成長し始める。

実施例７６Ｃ。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５及びトラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５複合体（化合物７１）を用いた、ＢＴ４７４異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶

ＢＴ４７４腫瘍を、実施例７６に記載されるように設定した。この実験の治療計画を、表６７に記載する。

【０９１４】

【表７７】

表６７：トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５ベンチマーク（化合物７１）と比較したｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５の治療計画

番号	治療剤または対照	投与した用量（ｍｇ／ｋｇ）	日程	投与数
１	ビヒクル（生理的食塩水）	８ｍｌの体積	２日に１回	１２
２	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５	５	２日に１回	１２
３	トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５	５	週に１回	４

【０９１５】

腫瘍体積（mm^3）を時間に対してプロットし（図９８）、動物の体重変化（％）を時間に対してプロットした（図９８）。ベンチマーク対照（トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５）を、１週間間隔で、以前に非常に有効であることを示した５ｍｇ／ｋｇ、及び１ｍｇ／ｋｇのより低い用量で投与した。高親和性ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５複合体を、より急速な薬物動態クリアランスを説明するために、３つのより低い用量でより頻繁に投与した。

【０９１６】

完全（１００％）治癒をもたらしたｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦの２ｍｇ／ｋｇ投与処方も、比較のために示す。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５の５ｍｇ／ｋｇ投与処方は、おおよそ２０日の腫瘍成長遅延をもたらしたが、トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５の５ｍｇ／ｋｇ投与処方は、取るに足らないわずかな成長遅延をもたらした。したがって、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣを有するより多くのペイロードを提供する能力は、さらに頻繁に、トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣよりも効果的に腫瘍縮小をもたらした。生理的食塩水（ビヒクル）及び遊離ペイロードで治療した動物群の腫瘍は、急速に成長した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５での治療は、マウスの抗体断片ＡＤＣ群での体重の増加から見られるように、より耐性が高いようであり、マウスのトラスツズマブ－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣ群よりも最大２０％重かった。

実施例７６Ｄ。２つの異なるＤＡＲのｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）複合体を用いた、ＢＴ４７４ヒト乳癌異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶

ＢＴ４７４腫瘍を、実施例７６に記載されるように設定した。この実験の治療計画を、表６８に記載する。

【０９１７】

【表７８】

表６８：２つのＤＡＲでのｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ－Ｃ５複合体（化合物１２２）の治療計画

番号	治療剤または対照	投与した用量（ｍｇ／ｋｇ）	日程	投与数
１	ビヒクル（生理的食塩水）	８ｍｌ	４日毎に	４
２	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５（Ｌ）	５	４日毎に	４
３	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５（Ｍ）	５	４日毎に	４

【０９１８】

腫瘍体積（mm^3）を時間に対してプロットし（図９９）、動物の体重変化（％）を時間に対してプロットした（図９９）。低（Ｌ）ＤＡＲ（２．７）及び中（Ｍ）ＤＡＲ（５．７）の高親和性ｓｃＦｖ（１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体を、４用量で与えた。ｓｃＦ

ｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦの５ｍｇ／ｋｇ投与処方は、実施例７６Ａ及び７６Ｂと比較してより頻繁が低い投与処方及びより少ない用量で、４５日までには完全（１００％）治癒をもたらした。より高いＤＡＲ複合体は、より効果的であった。生理的食塩水（ビヒクル）で治療した動物群の腫瘍は、急速に成長した。複合体の双方共に、増加する体重から見られるように、より耐性が高いようであった。

実施例７６Ｅ。３つの異なるＤＡＲのｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体を用いた、ＢＴ４７４ヒト乳癌異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶

ＢＴ４７４腫瘍を、実施例７６に記載されるように設定した。この実験の治療計画を、表６９に記載する。

【０９１９】

【表７９】

表６９：３つのＤＡＲでのｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ－Ｃ５複合体（化合物１２２）の治療計画

番号	治療剤または対照	投与した用量（ｍｇ／ｋｇ）	日程	投与数
1	ビヒクル（生理的食塩水）	８ｍｌ	４日毎に	2
2	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５（Ｌ）	5	４日毎に	2
3	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５（Ｍ）	5	４日毎に	2
3	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５（Ｈ）	5	４日毎に	2

【０９２０】

腫瘍体積（mm^3）を時間に対してプロットした（図１００）。低（Ｌ）ＤＡＲ（２．７）、中（Ｍ）ＤＡＲ（５．７）、及び高（Ｈ）ＤＡＲ（１１）の高親和性ｓｃＦｖ（１０６７）－ＡＦ複合体を、２用量で与えた。この適用の時点で、より高いＤＡＲ複合体は、腫瘍退縮を引き起こすのにより効果的であった。

実施例７６Ｆ。ＮＣＩ－Ｎ８７ヒト胃癌異種移植モデルにおける、ＳｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$、トラスツズマブ－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$複合体（１２１）、及び遊離ＭＭＡＥ

ＮＣＩ－Ｎ８７腫瘍を、実施例７６に記載されるように設定した。この実験の治療計画を、表６４に記載する。

【０９２１】

【表８０】

表７０：トラスツズマブ－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$ベンチマーク（化合物１２１）と比較したｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$の治療計画

番号	治療剤または対照	投与した用量（ｍｇ／ｋｇ）	日程	投与数
1	ビヒクル（生理的食塩水）	８ｍｌ	４日毎に	8
2	ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$	5	４日毎に	8
3	トラスツズマブ－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_9$	5	週に１回	4

【０９２２】

実施例７７　２工程テトラジンクリック反応のための複数のよく分散した表面リジン残基を有する高親和度単鎖Ｆｖ抗体断片上へのＴＣＯ誘導体の生体複合化

（Ｊｅｎａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから購入した）ＴＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳを、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、中ＤＡＲを有する１つの複合体（化合物１３４）を得た。確認及び進められた条件は、以下であった。

【０９２３】

【表８１】

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．８の１５０ｍＭのＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	１ｍｇ／ｍｌ
ＴＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ処理	１００％の無水の濾過済みＤＭＳＯ中の１００ｍＭの溶液
ＴＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ添加速度	１２０分毎に
ＴＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ添加部分	８当量

【０９２４】

反応を、実施例６４Ａのように行った。

この実施例で、構成は、以下のとおりであった。

反応１－ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）：ＴＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ、１６当量。

【０９２５】

目に見える析出物は、目につかず、試料回収率は高かった。試料を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（図１０１）及びＬＣＭＳ（図１０２）によって分析した。

【０９２６】

ＬＣＭＳ、総イオン電流（ＴＩＣ）クロマトグラム及びスペクトル、ならびにデコンボリューション済みデータを、図１０２に示す。

【０９２７】

主なピークを、溶出しているｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＴＣＯ－ＰＥＧ４試料のＴＩＣにおいて１２．３分の時点で認めた。このピークのゼロ電荷にデコンボリューションされた質量スペクトルは、ｍ／ｚ３０９５６及び３１３７２にピークを生成し、ＴＣＯ－ＰＥＧ４分子の７及び８個の付加と共にｓｃＦｖの理論質量に対応する。したがって、複合体（化合物１３４）は、７．５の平均ＤＡＲを有した。

【０９２８】

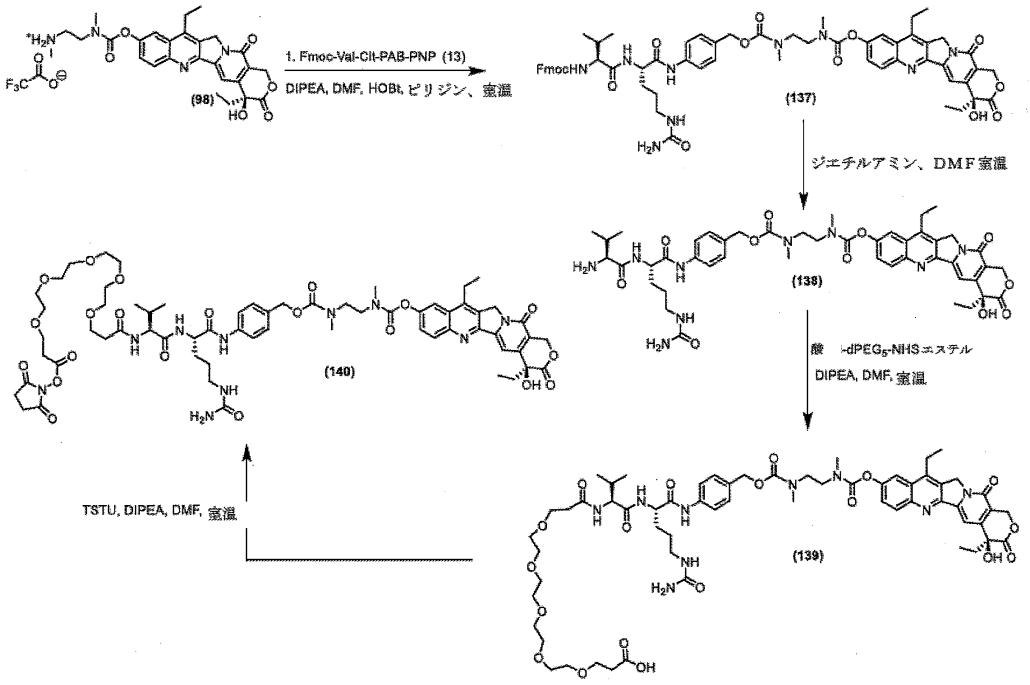
ＭＭＡＦ（１１７）等のテトラジン末端リンカーペイロードは、その後、第２の工程で複合化して、抗体薬物複合体（１３５）を形成する。

【０９２９】

実施例７８－ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_5$－ＮＨＳエステル（１４０）の調製

【０９３０】

【化７０】



【０９３１】

ＤＭＦ（２ｍｌ）中のＤＮＭＥＡ－ＳＮ３８　９８（８０ｍｇ、０．１３ｍｍｏｌ）及びＦｍｏｃ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＰＮＰ１３（０．１４ｇ、０．１９ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、ＨＯＢｔ（３４ｍｇ、０．２５ｍｍｏｌ）、ピリジン（５２μｌ）、及びＤＩＰＥＡ（２２μｌ）を添加した。反応混合物を、N_2雰囲気下で２４時間、室温で撹拌した。溶媒を真空で蒸発させ、得られた残渣を次の工程のために直接使用した。ＨＲＭＳ：ＥＳＩ　ｍ／ｚは、$C_{61}H_{68}N_9O_{13}$について、１１３５．０８０３［Ｍ＋Ｈ］$^+$計算された１１３５．２６５０を見出した。

【０９３２】

ＤＭＦ（１．５ｍｌ）及びジエチルアミン（０．４ｍｌ）中のＦｍｏｃ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＤＮＭＥＡ－ＳＮ３８　１３７（９０ｍｇ、０．０８ｍｍｏｌ）の溶液を、室温で３時間撹拌した。次いで、反応混合物を真空で濃縮させ、さらに精製せずに直接使用した。ＨＲＭＳ：ＥＳＩ　ｍ／ｚは、$C_{46}H_{58}N_9O_{11}$について、９１３．０２００［Ｍ＋Ｈ］$^+$計算された９１３．０２２０を見出した。

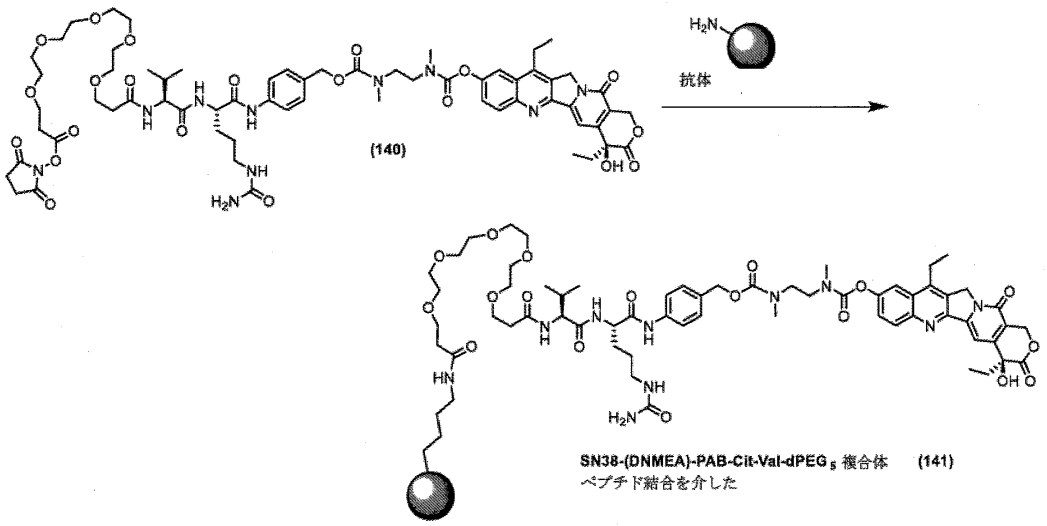
【０９３３】

ＤＭＦ（３ｍｌ）中のＨ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＤＮＭＥＡ－ＳＮ３８　１３８（７０ｍｇ、０．０８ｍｍｏｌ）の溶液に、室温でＤＩＰＥＡ（４０μｌ）及び酸－ｄＰＥＧ$_5$－ＮＨＳ（４０ｍｇ、０．０９ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を、N_2雰囲気下で１６時間撹拌した。溶媒を真空で蒸発させ、得られた粗化合物を次の工程のために直接使用した。ＨＲＭＳ：ＥＳＩ　ｍ／ｚは、$C_{60}H_{82}N_9O_{19}$について、１２３３．２５３７［Ｍ＋Ｈ］$^+$計算された１２３３．３６００を見出した。

【０９３４】

ＤＭＦ（３ｍｌ）中の酸－ｄＰＥＧ$_5$－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＤＮＭＥＡ－ＳＮ３８（９０ｍｇ、０．０７ｍｍｏｌ）の溶液に、室温でＤＩＰＥＡ（６３μｌ）及びＴＳＴＵ（４４ｍｇ、０．１４ｍｍｏｌ）を添加し、反応混合物を、N_2雰囲気下で３時間撹拌した。溶媒を真空で蒸発させ、粗生成物をＣ１８カラムを使用してＢｉｏｔａｇｅフラッシュ精製システムにより精製して、所望の化合物ＮＨＳ－ｄＰＥＧ$_5$－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＤＮＭＥＡ－ＳＮ３８　１４０を得た。ＨＲＭＳ：ＥＳＩ　ｍ／ｚは、$C_{64}H_{85}N_{10}O_{21}$について、１３３０．３４７９［Ｍ＋Ｈ］$^+$計算された１３３０．４３００を見出した。

【０９３５】
実施例７９　複数のよく分散した表面リジン残基を有する高親和性単鎖Ｆｖ抗体断片上への、プロテアーゼ開裂可能なリンカーを用いたＳＮ－３８誘導体の生体複合化
【０９３６】
【化７１】



【０９３７】
ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_5$－ＮＨＳエステル（１４０）を、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）に複合化させて、様々なＤＡＲの複合体（１４１）を得た。
【０９３８】
複合化のために使用した条件は、以下のとおりであった。
【０９３９】

【表８２】

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．８の１５０ｍＭのＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	１ｍｇ／ｍｌ
ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_5$－ＮＨＳ処理	１００％無水の濾過済みＤＭＳＯ中の５０ｍＭの溶液
ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_5$－ＮＨＳ添加速度	９０分毎に
ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_5$－ＮＨＳ添加部分	反応１に関しては５当量、反応２に関しては１０当量、反応３及び４に関しては１２．５当量

【０９４０】

反応を、実施例６４Ａに詳述されるように行った。

【０９４１】

この実施例において、構成は、以下のとおりであった。

反応１－ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）：ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_5$－ＮＨＳ、５当量

反応２－ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）：ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_5$－ＮＨＳ、１０当量

反応３－ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）：ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_5$－ＮＨＳ、２５当量

反応４－ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）：ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_5$－ＮＨＳ、３５当量。

【０９４２】

複合化されていないｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）及び複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）を、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィー（図１０３）及びＳＤＳ　ＰＡＧＥ（図１０４）によって分析した。ｓｃＦｖは、約３０ＫＤａのＭＷと相関関係がある１８．４分の保持時間を有する。複合体は、反応１に関しては１８．１分、反応２に関しては１７．８分、反応３に関しては１６．９分、及び反応４に関しては１６．８分の時点でわずかにより早く溶出し、（異なる薬物負荷に起因する）より高い分子量を示す。複合体は、複合化されていないｓｃＦｖ対照には存在しない薬物の特性吸収ピークである、（同じ保持時間での）著しい吸光も３６０ｎｍで示した。形成されたあらゆる凝集物を除去することができる。精製した試料のＤＡＲを、３７０ｎｍ（１７０００$M^{-1}cm^{-1}$）、及び２８０ｎｍ（４７００$M^{-1}cm^{-1}$）、ならびに抗体に対しては２８０ｎｍ（７０７３５$M^{-1}cm^{-1}$）での薬物の吸光係数を使用して、ＵＶ／Ｖｉｓ吸収分光法によって計算し

た。計算されたＤＡＲは、試料１、２、及び３それぞれに関して、２．９、４．６、及び６．４であった。試料１及び２に関して、ＳＤＳ　ＰＡＧＥゲルは、ｓｃＦｖに対してより高い分子量で多分散バンドを示した。

【０９４３】

実施例８０複数のよく分散した表面リジン残基を有する高親和性ダイアボディ抗体断片上へのオーリスタチン－Ｃ５－ＮＨＳの生体複合化

ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳエステル（８８）を、ダイアボディ（ＴＣＴ）及び対照としてｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に複合化させて、様々なＤＡＲの複合体（化合物１２２）を得た。

【０９４４】

使用した反応条件は、以下のとおりであった。

【０９４５】

【表８３】

種類	条件
緩衝液	ｐＨ８．８の１５０ｍＭのＮａＣｌを有する重炭酸塩緩衝液
共溶媒	最終２０％（ｖ／ｖ）濃度の無水の濾過済みＤＭＳＯ
温度	２０℃
撹拌	ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　１０００ｒｐｍ
抗体濃度	０．７１ｍｇ／ｍｌ
ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ処理	１００％無水の濾過済みＤＭＳＯ中の５０ｍＭの溶液
ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ添加速度	９０分毎に
ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ添加部分	７．５当量

【０９４６】

反応を、実施例６４Ａに詳述されるように行った。

この実施例で、構成は、以下のとおりであった。

反応１：ダイアボディ（ＴＣＴ）：ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ、３０当量、

反応２：ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）：ＡＦ－Ｃ５－ＮＨＳ、１５当量。

【０９４７】

還元条件下で流した図１０５のＳＤＳ　ＰＡＧＥゲルは、予測されたように、同じ分子量で流れる複合化されていないダイアボディ及び複合化されていないｓｃＦｖを示した。複合体１及び２は、非複合抗体よりもわずかに高く流れる。これらの２つの複合体は、同じ分子量で流れ、これらの２つの抗体が同じくらいよく複合化していることを示す。

【図面の簡単な説明】

【０９４８】

【図１】ヒト可変ドメイン内のアミノ酸残基の表面／溶媒露出度　Ｋｎａｐｐｉｋ　ｅｔ　ａｌ（２０００）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ　２９６，５７－８６から変更。灰色の目盛りは、濃（＝高）から淡（＝低）へと表面／溶媒露出度パーセンテージを示す。命番方式は、Ｈｏｎｅｇｇｅｒ　Ａ＆Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ　Ａ［Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２００１，３０９：６５７－７０］に従う。約７０％が主に溶媒曝露であると考えられる。

【図２】ｓｃＦｖ－ＴＣＴの精製レーン１：分子マーカーレーン２：２回目のＮｉ－ＮＴＡ樹脂の通過後の澄んだ可溶化液レーン３：洗浄緩衝液１での最終洗浄レーン４：洗浄緩衝液２での第１回目の洗浄レーン５：溶出画分レーン６：ＴＥＶ開裂緩衝液中での透析後の貯えた溶出画分長方形は、融合ＴＣＴを示す。レーン７：ＴＥＶ開裂開始後１６時間。

上方の四角は、開裂したｓｃＦｖ（ＴＣＴ）を示す。下方の四角は、開裂したチオレドキシン融合パートナーを示す。レーン８：分子マーカーレーン９：開裂したＴＣＴレーン１０：Ｎｉ－ＮＴＡと結合したタンパク質の残りレーン１１～１８：図２０のサイズ排除カラム（３５ｋＤａ）からの断片

【図３】ＰＢＳ緩衝液中でｓｕｐｅｒｄｅｘ－７５カラム上でのサイズ排除クロマトグラフィーによるｓｃＦｖ－ＴＣＴの精製ピーク１－希薄すぎてクーマシー染色ＰＡＧＥゲル上に現れない、高分子量汚染物質ピーク２－ｓｃＦｖ　ＴＣＴの高分子量凝集物。ピーク３－純粋単量体ｓｃＦｖ　ＴＣＴ、ゲル上のレーン１１～１８に対応（図１９）

【図４】ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－エリプチシン複合体のＳＤＳ－ＰＡＧＥエリプチシン（化合物２１）複合体１＝３２当量、１４％のＤＭＳＯ；２＝１６当量、１４％のＤＭＳＯ；３＝１６当量、６％のＤＭＳＯ；Ｄ＝透析済み、Ｚ＝Ｚｅｂａカラム脱塩済み；ＣＳ＝可溶性粗反応；Ｐ＝不溶性／析出された粗反応。試料負荷＝２．４μｇ（ＡＤＣ）、１．９μｇ（ｓｃＦｖ）。ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０

【図５】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－エリプチシン複合体のＵＶ－Ｖｉｓ

【図６】エリプチシンとＰＥＧ－エリプチシンｓｃＦｖ複合体と比較したＳＤＳ－ＰＡＧＥエリプチシン（化合物２１）及びＰＥＧ－エリプチシン（化合物２３）複合体。１＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＰＥＧ－エリプチシン、２０当量；２＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－エリプチシン、２０当量；３＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＰＥＧ－エリプチシン、３２当量；４＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＰＥＧ－エリプチシン、６４当量；Ｚ＝Ｚｅｂａカラム脱塩済み；ＣＳ＝可溶性粗反応；Ｐ＝不溶性／析出された粗反応。試料負荷＝１．８μｇ。ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０

【図７】試料２のＳＤＳ－ＰＡＧＥ：ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－エリプチシン複合体Ｄ＝透析済み；Ｚ＝Ｚｅｂａカラム脱塩済み；Ｃ＝可溶性粗反応；Ｐ＝不溶性／析出された粗反応。Ｅｌｌ＝エリプチシン試料負荷＝２．５μｇ。ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０

【図８】試料４のＳＤＳ－ＰＡＧＥ：全ＩｇＧ－エリプチシン複合体Ｄ＝透析済み；Ｚ＝Ｚｅｂａカラム脱塩済み；Ｃ＝可溶性粗反応；Ｐ＝不溶性／析出された粗反応、Ｅｌｌ＝エリプチシン。試料負荷＝２．５μｇ。ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０

【図９】ドキソルビシン誘導体のＣ６．５ｓｃＦｖへの２ステップ複合化のＳＤＳ－ＰＡＧＥ上方パネル、ＨＭＦＧ１　ＩｇＧ複合体、下方パネルＣ６．５　ｓｃＦｖ複合体。ＨＭＦＧ１／Ｃ６＝遊離抗体、Ｓ＝可溶性画分、Ｐ＝析出物、Ａ＝ドキソルビシン－マレイミド（化合物１２）複合体、Ｂ＝ドキソルビシン－ＰＥＧ－マレイミド（化合物４８）複合体。ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０

【図１０】ＳＰＤＰリンカーに複合化されたＣ６．５　ｓｃＦｖのＨＥＲ２抗原のＥＬＩＳＡ

【図１１】ＨＰＬＣ－ＳＥＣ精製後のＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣのＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル　ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０。セマドチン（化合物２）複合体（化合物６９）．１＝１６薬物当量；２＝４８薬物当量；３＝１１２薬物当量；Ｓ＝ＨＰＬＣ－ＳＥＣ精製；Ｚ＝さらなるＺｅｂａ緩衝液交換。

【図１２Ａ】ＨＰＬＣ－ＳＥＣによって分析したｓｃＦｖ及びｓｃＦｖ－セマドチンＡＤＣ　ａ）溶出タンパク質及び複合体の大きさを確認するためのＧ２０００ＳＷｘｌ　ＳＥＣカラムの較正マーカー。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、１ｍｌ／分で運転した。値は以下のとおりであった。

【０９４９】

【表８４】

室温（分）	分子量（ｋＤａ）	試料
６．４３	８０	アルコール脱水素酵素
８．４８	３０	炭酸脱水酵素
１１．２５	１３	リゾチーム
１０．９	＜１	セマドチン

【０９５０】
ｂ）ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって分析する、上方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）、下方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料－１、カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。
【０９５１】
ｃ）ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって分析する、上方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料－２、中央の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料－３、タンパク質／ペプチド含有力を確認する下方の出力記録－ＵＶ－Ｖｉｓスペクトル。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。
【図１２Ｂ】ＨＰＬＣ－ＳＥＣによって分析したｓｃＦｖ及びｓｃＦｖ－セマドチンＡＤＣ　ａ）溶出タンパク質及び複合体の大きさを確認するためのＧ２０００ＳＷｘｌ　ＳＥＣカラムの較正マーカー。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、１ｍｌ／分で運転した。値は以下のとおりであった。
【０９５２】
【表８５】

室温（分）	分子量（ｋＤａ）	試料
６．４３	８０	アルコール脱水素酵素
８．４８	３０	炭酸脱水酵素
１１．２５	１３	リゾチーム
１０．９	＜１	セマドチン

【０９５３】
ｂ）ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって分析する、上方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）、下方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料－１、カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。
【０９５４】
ｃ）ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって分析する、上方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料－２、中央の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料－３、タンパク質／ペプチド含有力を確認する下方の出力記録－ＵＶ－Ｖｉｓスペクトル。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。
【図１２Ｃ】ＨＰＬＣ－ＳＥＣによって分析したｓｃＦｖ及びｓｃＦｖ－セマドチンＡＤＣ　ａ）溶出タンパク質及び複合体の大きさを確認するためのＧ２０００ＳＷｘｌ　ＳＥＣカラムの較正マーカー。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、１ｍｌ／分で運転した。値は以下のとおりであった。
【０９５５】

【表８６】

室温（分）	分子量（ｋＤａ）	試料
６．４３	８０	アルコール脱水素酵素
８．４８	３０	炭酸脱水酵素
１１．２５	１３	リゾチーム
１０．９	＜１	セマドチン

【０９５６】
ｂ）ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって分析する、上方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）、下方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料－１、カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。
【０９５７】
ｃ）ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって分析する、上方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料－２、中央の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料－３、タンパク質／ペプチド含有力を確認する下方の出力記録－ＵＶ－Ｖｉｓスペクトル。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。
【図１３Ａ】ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料２の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ
【図１３Ｂ】ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料２の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ
【図１３Ｃ】ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料２の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ
【図１４Ａ】ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料１の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ
【図１４Ｂ】ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料１の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ
【図１４Ｃ】ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料１の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ
【図１５Ａ】ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料３の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ
【図１５Ｂ】ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料３の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ
【図１５Ｃ】ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料３の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ
【図１６Ａ】ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ
【図１６Ｂ】ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ
【図１６Ｃ】ＳｃＦｖ（ＴＣＴ）の（ａ）ＴＩＣ、（ｂ）ＥＳＩ－ＭＳ、（ｃ）デコンボリューション済み－ＭＳ、及び計算されたＤＡＲ
【図１７】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）のＭＡＬＤＩ－ＭＳ
【図１８】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料１のＭＡＬＤＩ－ＭＳ
【図１９】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料２のＭＡＬＤＩ－ＭＳ
【図２０】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチンＡＤＣ試料３のＭＡＬＤＩ－ＭＳ
【図２１】ＨＥＲ２上のｓｃＦｖ（ＴＣＴ）セマドチンＡＤＣのＥＬＩＳＡ
【図２２】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣのＳＤＳ－ＰＡＧＥＰ５Ｃ５薬物（化合物６）及び複合体（化合物７１）。１＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、３０当量；２

＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、１１２当量；Ｃ＝粗反応混合物；Ｓ＝ＳＥＣ精製及び濃縮後の試料；Ｆ＝ＳＥＣ精製、濃縮、及び緩衝液交換後の最終試料。試料負荷＝２μｇ。ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０

【図２３Ａ】２８０ｎｍで監視したＳＥＣ精製後の試料の分析ＨＰＬＣ出力記録　ａ）上方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）、中央の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣ（３０当量）、下方の出力記録ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣ（１１２当量）。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。

【０９５８】

ｂ）左の出力記録、ほんの非凝集単量体ピークだけの、薬物負荷に起因するより早い保持（１６．９分のｓｃＦｖ溶出と比較して１５．７及び１５．９分）を示す（ａ）からのｓｃＦｖとｓｃＦｖ－ＡＤＣとの比較、右の出力記録－タンパク質／ペプチドスペクトルを示すＡＤＣのうちの１つのＵＶ－Ｖｉｓ出力記録。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。

【図２３Ｂ】２８０ｎｍで監視したＳＥＣ精製後の試料の分析ＨＰＬＣ出力記録　ａ）上方の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）、中央の出力記録、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣ（３０当量）、下方の出力記録ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣ（１１２当量）。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。

【０９５９】

ｂ）左の出力記録、ほんの非凝集単量体ピークだけの、薬物負荷に起因するより早い保持（１６．９分のｓｃＦｖ溶出と比較して１５．７及び１５．９分）を示す（ａ）からのｓｃＦｖとｓｃＦｖ－ＡＤＣとの比較、右の出力記録－タンパク質／ペプチドスペクトルを示すＡＤＣのうちの１つのＵＶ－Ｖｉｓ出力記録。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。

【図２４】様々なＡＤＣのＳＤＳ－ＰＡＧＥＰ５Ｃ５薬物（化合物６）、セマドチンＣ５薬物（化合物４）、及び複合体（化合物７１）。１＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、１６当量；２＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、３０当量；３＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５、１１２当量；４＝トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５、１６当量；５＝トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５、３２当量；６～７＝ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン－Ｃ５；８＝トラスツズマブ－セマドチン－Ｃ５；Ｚ＝最終Ｚｅｂａ脱塩済み試料；Ｓｃ＝ＨＰＬＣ－ＳＥＣ及び濃縮後の試料；Ｃ＝粗反応混合物。試料負荷＝１．９μｇ。ＭＷマーカー（Ｍ）、ｋＤａ上から下に：２５０、１３０、１００、７０、５５、３５、２５、１５、１０。

【図２５】トラスツズマブ複合体（Ａ２８０ｎｍ）のＨＰＬＣ精製出力記録。上方の出力記録は、遊離トラスツズマブＩｇＧを示し、下方の３つの出力記録は、異なる複合化反応当量での様々なＡＤＣを示す。試料を、マーカーを用いて較正したＧ３０００ＳＷｘｌカラム上で行った。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。マーカーは以下のとおり溶出した。

【０９６０】

【表８７】

分子量（ｋＤａ）	保持時間（分）	試料
２２３．８	１８．１	ベータアミラーゼ
１４６．８	１８．９	アルコール脱水素酵素
６６．５	２１．２	ＢＳＡ
２９	２３．７	炭酸脱水酵素
１４．５	２９．７	リゾチーム

【０９６１】

ＩｇＧ（保持時間＝１１．７分）及びＩｇＧ－ＡＤＣ（保持時間＝１０．９～１１．４分

）はすべて、約１５０ｋＤａで溶出し、凝集をほとんど示さなかったか、全く示さなかった。
【図２６】比較のために上に重ねた図２５からのトラスツズマブ複合体（Ａ２８０ｎｍ）のＨＰＬＣ精製出力記録ピーク１＝トラスツズマブ、２＝トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５（１６当量複合化反応）、３＝２＝トラスツズマブ－セマドチン（１６当量複合化反応）、２＝トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５（３２当量複合化反応）
【図２７】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５複合体（Ａ２８０ｎｍ）のＨＰＬＣ精製出力記録ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣは、遊離ｓｃＦｖ（保持時間＝１６．９分）よりも早い保持時間（増加する複合化当量、したがってＤＡＲを伴った１５．７分、１５．６分、及び１５．４）を有した。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン保持時間は、増加するＤＡＲを伴った、１６．１分及び１５．７であった）。すべては、依然として、凝集をほとんど伴わないか、またはまったく伴わないで、単量体ｓｃＦｖの範囲内に留まった。カラムを、ＰＢＳ／２０％のイソプロパノール中、０．５ｍｌ／分で運転した。
【図２８】ＰＢＳ中のトラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５のＵＶ／Ｖｉｓ吸収スペクトル
【図２９】ＰＢＳ中のｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５複合体のＵＶ／Ｖｉｓ吸収スペクトル
【図３０】ＨＥＲ２上のｓｃＦｖ（ＴＣＴ）Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣのＥＬＩＳＡ
【図３１】ＨＥＲ２発現ＳＫＢｒ３細胞上のＰ５Ｃ５系ＡＤＣの用量反応の細胞致死活性
【図３２】ＨＥＲ２発現ＳＫＢｒ３細胞及びＨＥＲ２陰性Ｕ８７細胞上の遊離Ｐ５Ｃ５薬物の用量反応の細胞致死活性
【図３３】ＨＥＲ２陰性Ｕ８７細胞上のＰ５Ｃ５系ＡＤＣの用量反応の細胞致死活性
【図３４】ｓｃＦｖ－セマドチンＡＤＣで免疫化した候補マウス血清のＥＬＩＳＡ試験
【図３５】抗ｓｃＦｖ－セマドチンＭＡｂの候補雑種細胞クローンのＥＬＩＳＡ
【図３６】抗マウスペルオキシダーゼ二次抗体を使用した、ウエスタンブロットによるマウスＭａｂの候補雑種細胞培地の上清検出
【図３７】ウエスタンブロットによってｓｃＦｖ－セマドチンＡＤＣを検出するために使用した候補雑種細胞馴化培地ブロット１～３、及び５～７、１０、及び１１を、次のように負荷させた。マーカー、ＡＤＣ、ＴＣＴ、及び遊離セマドチン。ブロット４及び８を、次のように負荷させた。マーカー、ＡＤＣ、及び遊離セマドチン。
【図３８】放射標識ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン複合体の血中クリアランス。
【０９６２】
　セマドチン複合体（化合物６９）。
【図３９】放射標識ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－セマドチン複合体の脾臓取り込み。セマドチン複合体（化合物６９）。
【図４０】総抗体ＥＬＩＳＡによって測定したｓｃＦｖ－ＴＣＴ及びｓｃＦｖ－ＴＣＴ－ＡＤＣの血中クリアランスを示す薬物動態プロファイル。セマドチン複合体（化合物６９）。
【図４１】総ＡＤＣ　ＥＬＩＳＡによって測定したｓｃＦｖ－ＴＣＴ－ＡＤＣの血中クリアランスを示す薬物動態プロファイル。セマドチン複合体（化合物６９）。
【図４２】図４０及び４１で使用した両方のアッセイを測定したｓｃＦｖ－ＴＣＴ及びｓｃＦｖ－ＴＣＴ－ＡＤＣの血中クリアランスにおける類似性を示す比較薬物動態プロファイル。
【図４３】２つのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５　ＡＤＣ　ＤＡＲで治療した、ＳＫＢｒ３腫瘍異種移植片を有するヌードマウスにおける腫瘍退縮研究。Ｐ５Ｃ５複合体（化合物７１）。
【図４４】０．５ｍｌ／分で運転し、それぞれの複合化されていない抗体と比較した、（Ａ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－アセテート及び（Ｂ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－アセテート精製複合体のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。
【図４５】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－アセテート複合体のＬＣＭＳデータ。（Ａ）は、ＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は、１０分の時点での主ピークのデコンボ

リューションされた質量である。
【図４６】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－アセテート複合体のＬＣＭＳデータ。（Ａ）は、ＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は、１０．３分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。
【図４７】１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、（Ａ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１及び（Ｂ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　２精製複合体のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。
【図４８】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　２を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（１２％）。使用されるサイズマーカーを、示す。
【図４９】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１のＬＣＭＳデータ。（Ａ）は、ＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は、１０．２分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。
【図５０】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　２のＬＣＭＳデータ。（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ～Ｅ）は、主ピーク１０～１２分のデコンボリューションされた質量を示す。
【図５１】１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、（Ａ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１及び（Ｂ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　２精製複合体のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。
【図５２】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１及びＡＤＣ　２のＬＣＭＳデータ。（Ａ）及び（Ｂ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ１のＬＣＭＳデータであり、（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は９．３～１０．６分の主ピークのデコンボリューションされた質量である。（Ｃ）及び（Ｄ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ２のＬＣＭＳデータであり、（Ｃ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｄ）は９．９～１２分の主ピークのデコンボリューションされた質量である。
【図５３】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１及び２を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（１２％）である。図４８に示されるサイズマーカー。
【図５４】１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較したｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣ　１のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。
【図５５】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣ　１を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（１２％）。図４８に示されるサイズマーカー。
【図５６】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣ　１のＬＣＭＳデータ。（Ａ）は、ＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は、８．２分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。
【図５７】０．５ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。
【図５８】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１のＬＣＭＳデータ。（Ａ）は、ＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は、９．５分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。
【図５９】１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１、２、及び３のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。
【図６０】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１、２、及び３のＬＣＭＳデータ。（Ａ）及び（Ｂ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）ＡＤＣ　１のＬＣＭＳデータであり、（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は８．１分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。（Ｃ）及び（Ｄ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　２のＬＣＭＳデータであり、（Ｃ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｄ）は９．４分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量

である。（Ｅ）及び（Ｆ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　３のＬＣＭＳデータであり、（Ｅ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｆ）は９．９分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。

【図６１】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ　ＴＣＴ－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ　１、２、及び３を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（１２％）。図４８に示されるサイズマーカー。

【図６２】１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ９　ＡＤＣ　１のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。

【図６３】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ９　ＡＤＣ１のＬＣＭＳデータ。

【０９６３】

（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ～Ｅ）は、主ピークのデコンボリューションされた質量を示す。

【図６４】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ９　ＡＤＣ　１を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（１２％）。

【０９６４】

図４８に示されるサイズマーカー。

【図６５】１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣ　１のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。

【図６６】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣ　１のＬＣＭＳデータ。

【０９６５】

（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ～Ｆ）は、主ピークのデコンボリューションされた質量を示す。

【０９６６】

（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ～Ｆ）は、主ピークのデコンボリューションされた質量を示す。

【図６７】１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－マイタンシン－ＰＥＧ（１２）ＤＭ１　ＡＤＣ　１及び２のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。

【図６８】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７－マイタンシン－ＰＥＧ（１２）ＤＭ１　ＡＤＣ　１及び２のＬＣＭＳデータ。（Ａ）及び（Ｂ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－マイタンシン－（ＰＥＧ１２）ＤＭ１　ＡＤＣ　１のＬＣＭＳデータであり、（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は主ピークのデコンボリューションされた質量を示す。（Ｃ）及び（Ｄ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７－マイタンシン－ＰＥＧ（１２）ＤＭ１　ＡＤＣ　２のＬＣＭＳデータであり、（Ｃ）はＵＶ　ＬＣＭＳ出力記録であり、（Ｄ）はその種のＤＡＲが試料中に存在することを示すＴＩＣ　ＬＣＭＳ出力記録である。

【０９６７】

【図６９Ａ】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）非複合抗体と比較したｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－マイタンシン－ＰＥＧ（１２）ＤＭ１　ＡＤＣ　１及び２を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（１２％）。サイズマーカーは、（Ａ）に示す。

【図６９Ｂ】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）非複合抗体と比較したｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－マイタンシン－ＰＥＧ（１２）ＤＭ１　ＡＤＣ　１及び２を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（１２％）。サイズマーカーは、（Ａ）に示す。

【図７０】表４５に記載される反応１、２、４、５、及び６のクーマシー染色ＳＤＳ－Ｐ

ＡＧＥゲル。反応３は、可溶性タンパク質を生じなかった。Ｍ＝分子量マーカー。Ｐ＝非複合ｓｃＦｖ（パニツムマブ）、Ｔ＝非複合ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）。より高いＤＡＲ種は、分子量の増加に起因してより緩徐に移動し、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）複合体は、増加するＤＡＲを示す。図６８に示されるサイズマーカー。

【図７１】１ｍｌ／分で運転し、非複合抗体と比較した、（Ａ）ｓｃＦｖ（パニツムマブ）－ＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ及び（Ｂ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録（Ａ２８０ｎｍ）。

【図７２】ｓｃＦｖ（パニツムマブ－ＡＦ－Ｃ５）ＡＤＣ　１、２、及び４～６のＬＣＭＳデータ。（Ａ）及び（Ｂ）はｓｃＦｖ（パニツムマブ－ＡＦ－Ｃ５）ＡＤＣ　１のＬＣＭＳデータであり、（Ａ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は試料１の主ピークのデコンボリューションされた質量を示す。（Ｃ）はＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｄ）は、試料２の主ピークのデコンボリューションされた質量を示す。（Ｅ）～（Ｈ）は、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７－ＡＦ－Ｃ５）ＡＤＣ　４～６のＬＣＭＳデータであり、（Ｅ）は試料４のＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｆ）は、試料４の主ピークのデコンボリューションされた質量を示し、（Ｇ）は、試料５のデコンボリューションされた質量を示し、（Ｈ）は、試料６のデコンボリューションされた質量を示す。

【図７３Ａ】遊離ＭＭＡＦのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞、（Ｃ）ＢＴ４７４細胞上の遊離ＭＭＡＦ細胞毒の、細胞致死用量反応のプロファイル。

【図７３Ｂ】遊離ＭＭＡＦのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞、（Ｃ）ＢＴ４７４細胞上の遊離ＭＭＡＦ細胞毒の、細胞致死用量反応のプロファイル。

【図７３Ｃ】遊離ＭＭＡＦのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞、（Ｃ）ＢＴ４７４細胞上の遊離ＭＭＡＦ細胞毒の、細胞致死用量反応のプロファイル。

【図７４Ａ】非複合抗体のインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の非複合ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）及びトラスツズマブの細胞致死用量反応のプロファイル。

【図７４Ｂ】非複合抗体のインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の非複合ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）及びトラスツズマブの細胞致死用量反応のプロファイル。

【図７４Ｃ】非複合抗体のインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の非複合ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）及びトラスツズマブの細胞致死用量反応のプロファイル。

【図７５】非複合抗体のインビトロ細胞毒性プロット。ＢＴ４７４細胞上の複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図７６Ａ】ＭＭＡＦ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　６．６、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ０１６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　６．４、非複合トラスツズマブ、及びトラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図７６Ｂ】ＭＭＡＦ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　６．６、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ０１６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　６．４、非複合トラスツズマブ、及びトラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図７６Ｃ】ＭＭＡＦ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　６．６、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ０１６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡ

Ｒ　６．４、非複合トラスツズマブ、及びトラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５の細胞致死用量反応のプロファイル。
【図７７Ａ】ＭＭＡＦ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片複合体であるｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　８、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ０１６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　８．７、及びトラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５の細胞致死用量反応のプロファイル。
【図７７Ｂ】ＭＭＡＦ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片複合体であるｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　８、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ０１６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　８．７、及びトラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５の細胞致死用量反応のプロファイル。
【図７７Ｃ】ＭＭＡＦ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片複合体であるｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　８、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ０１６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＤＡＲ　８．７、及びトラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５の細胞致死用量反応のプロファイル。
【図７８Ａ】Ｐ５－Ｃ５系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。Ｕ８７細胞上の（Ａ）遊離Ｐ５－Ｃ５薬物、ならびに（Ｂ）抗体断片複合体ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＤＡＲ　１０．６（Ｈ１）及びＤＡＲ　１２．５（Ｈ２）の細胞致死用量反応のプロファイル。
【図７８Ｂ】Ｐ５－Ｃ５系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。Ｕ８７細胞上の（Ａ）遊離Ｐ５－Ｃ５薬物、ならびに（Ｂ）抗体断片複合体ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＤＡＲ　１０．６（Ｈ１）及びＤＡＲ　１２．５（Ｈ２）の細胞致死用量反応のプロファイル。
【図７９Ａ】Ｐ５－Ｃ５系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。ＳＫＢｒ３細胞上の（Ａ）遊離Ｐ５－Ｃ５薬物、ならびに（Ｂ）抗体断片複合体ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＤＡＲ　１０．６（Ｈ１）及びＤＡＲ　１２．５（Ｈ２）の細胞致死用量反応のプロファイル。
【図７９Ｂ】Ｐ５－Ｃ５系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。ＳＫＢｒ３細胞上の（Ａ）遊離Ｐ５－Ｃ５薬物、ならびに（Ｂ）抗体断片複合体ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＤＡＲ　１０．６（Ｈ１）及びＤＡＲ　１２．５（Ｈ２）の細胞致死用量反応のプロファイル。
【図８０Ａ】Ｐ５－Ｃ５系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。ＢＴ４７４細胞上の（Ａ）遊離Ｐ５－Ｃ５薬物、ならびに（Ｂ）抗体複合体ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＤＡＲ　１０．６（Ｈ１）及びトラスツズマブＤＡＲ６の細胞致死用量反応のプロファイル。
【図８０Ｂ】Ｐ５－Ｃ５系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。ＢＴ４７４細胞上の（Ａ）遊離Ｐ５－Ｃ５薬物、ならびに（Ｂ）抗体複合体ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＤＡＲ　１０．６（Ｈ１）及びトラスツズマブＤＡＲ６の細胞致死用量反応のプロファイル。
【図８１Ａ】遊離オーリスタチンＦのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞、（Ｃ）ＢＴ４７４細胞上の、遊離オーリスタチン細胞毒の細胞致死用量反応のプロファイル。
【図８１Ｂ】遊離オーリスタチンＦのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞、（Ｃ）ＢＴ４７４細胞上の、遊離オーリスタチン細胞毒の細胞致死用量反応のプロファイル。
【図８１Ｃ】遊離オーリスタチンＦのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞、（Ｃ）ＢＴ４７４細胞上の、遊離オーリスタチン細胞毒の細胞致死用量反応のプロファイル。
【図８２Ａ】オーリスタチンＦ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞、（Ｄ）ＮＣＩ－Ｎ８７細胞上の、抗体断片であるＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　２．７（Ｌ）

、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　６．２（Ｍ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　１１．８（Ｈ）、及びトラスツズマブ－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　４．８の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８２Ｂ】オーリスタチンＦ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞、（Ｄ）ＮＣＩ－Ｎ８７細胞上の、抗体断片であるＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　２．７（Ｌ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　６．２（Ｍ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　１１．８（Ｈ）、及びトラスツズマブ－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　４．８の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８２Ｃ】オーリスタチンＦ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞、（Ｄ）ＮＣＩ－Ｎ８７細胞上の、抗体断片であるＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　２．７（Ｌ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　６．２（Ｍ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　１１．８（Ｈ）、及びトラスツズマブ－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　４．８の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８２Ｄ】オーリスタチンＦ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞、（Ｄ）ＮＣＩ－Ｎ８７細胞上の、抗体断片であるＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　２．７（Ｌ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　６．２（Ｍ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　１１．８（Ｈ）、及びトラスツズマブ－ＡＦ－Ｃ５、ＤＡＲ　４．８の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８３Ａ】遊離ＤＭ１薬物のインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞上の、遊離ＤＭ１－ＰＥＧ９細胞毒の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８３Ｂ】遊離ＤＭ１薬物のインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞上の、遊離ＤＭ１－ＰＥＧ９細胞毒の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８４Ａ】ＤＭ１－（ｄＰＥＧ１２）系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片であるＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－（ｄＰＥＧ１２）、ＤＡＲ　３．５（Ｌ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－（ｄＰＥＧ１２）ＤＡＲ　５．５（Ｍ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－（ｄＰＥＧ１２）、ＤＡＲ　８（Ｈ）の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８４Ｂ】ＤＭ１－（ｄＰＥＧ１２）系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片であるＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－（ｄＰＥＧ１２）、ＤＡＲ　３．５（Ｌ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－（ｄＰＥＧ１２）ＤＡＲ　５．５（Ｍ）、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１－（ｄＰＥＧ１２）、ＤＡＲ　８（Ｈ）の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８５Ａ】遊離ＭＭＡＥ薬物のインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞上の、遊離ＭＭＡＥ細胞毒の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８５Ｂ】遊離ＭＭＡＥ薬物のインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＳＫＢｒ３細胞上の、遊離ＭＭＡＥ細胞毒の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８６Ａ】ＭＭＡＥ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片であるＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ９、ＤＡＲ９、及びトラスツズマブ－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ９、ＤＡＲ４の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８６Ｂ】ＭＭＡＥ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片であるＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ９、ＤＡＲ９、及びトラスツズマブ－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ９、ＤＡＲ４の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８６Ｃ】ＭＭＡＥ系ＡＤＣのインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）Ｕ８７細胞、（Ｂ

）ＢＴ４７４細胞、（Ｃ）ＳＫＢｒ３細胞上の、抗体断片であるＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ９、ＤＡＲ９、及びトラスツズマブ－ＭＭＡＥ－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ９、ＤＡＲ４の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８７Ａ】４及び９６時間の遊離オーリスタチン薬物のインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）４時間及び（Ｂ）９６時間のインキュベーションの、ＳＫＢｒ３細胞上の遊離オーリスタチン細胞毒の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８７Ｂ】４及び９６時間の遊離オーリスタチン薬物のインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）４時間及び（Ｂ）９６時間のインキュベーションの、ＳＫＢｒ３細胞上の遊離オーリスタチン細胞毒の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８８Ａ】４及び９６時間のトラスツズマブ及びｓｃＦｖ（１０６７）－オーリスタチン－Ｃ５複合体のインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）４時間及び（Ｂ）９６時間のインキュベーションの、ＳＫＢｒ３細胞上のトラスツズマブ－オーリスタチン－Ｃ５及びｓｃＦｖ（１０６７）－オーリスタチン－Ｃ５の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８８Ｂ】４及び９６時間のトラスツズマブ及びｓｃＦｖ（１０６７）－オーリスタチン－Ｃ５複合体のインビトロ細胞毒性プロット。（Ａ）４時間及び（Ｂ）９６時間のインキュベーションの、ＳＫＢｒ３細胞上のトラスツズマブ－オーリスタチン－Ｃ５及びｓｃＦｖ（１０６７）－オーリスタチン－Ｃ５の細胞致死用量反応のプロファイル。

【図８９】ｓｃＦｖ及びＩｇＧ－ＡＤＣの２時間の投与後の、ＢＴ４７４腫瘍切片からの蛍光画像。（Ａ）高親和度ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５複合体、（Ｂ）中親和度ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５複合体、（Ｃ）トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５複合体、（Ｄ）生理的食塩水が制御された対照。

【図９０】マウスモデルにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５及び対照群（化合物１１８）の薬物動態クリアランス分析。単回静注用量を、５ｍｇ／ｋｇでメスのＢＡＬＢ／ｃマウス内に注射した。血漿試料を、指示された時点で採取し、抗タンパク質検出（総タンパク質量、実線によって示される、塗りつぶされた印）、及び関連する場合、抗薬物検出（総ＡＤＣ、破線によって示される、塗りつぶされていない印）を使用してＥＬＩＳＡによって分析した。各群及び実験の３とおりの平均のＳＥを示す。ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５（丸）（ｎ＝３）、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５（三角）（ｎ＝３）、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ）（四角）（ｎ＝４）。対照ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）値は、別個のＰＫ研究から提供された。

【図９１】マウスモデルにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５及び対照（化合物１１８）の薬物動態クリアランス分析。単回静注用量を、５ｍｇ／ｋｇでメスのＢＡＬＢ／ｃマウス内に注射した。血漿試料を、指示された時点で採取し、抗タンパク質検出（総タンパク質量、実線によって示される、塗りつぶされた印）、及び関連する場合、抗薬物検出（総ＡＤＣ、破線によって示される、塗りつぶされていない印）を使用してＥＬＩＳＡによって分析した。各群及び実験の３とおりの平均のＳＥを示す。ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５（丸）（ｎ＝３）、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５（三角）（ｎ＝３）、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）（四角）（ｎ＝３）。

【図９２】マウスモデルにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５及び対照群（化合物７１）の薬物動態クリアランス分析。単回静注用量を、５ｍｇ／ｋｇでメスのＢＡＬＢ／ｃマウス内に注射した。血漿試料を、指示された時点で採取し、抗タンパク質検出（総タンパク質量、実線によって示される、塗りつぶされた印）、及び関連する場合、抗薬物検出（総ＡＤＣ、破線によって示される、塗りつぶされていない印）を使用してＥＬＩＳＡによって分析した。各群及び実験の３とおりの平均のＳＥを示す。ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－Ｐ５Ｃ５（丸）（ｎ＝３）、トラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５（三角）（ｎ＝３）、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ）（四角）（ｎ＝４）。対照ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）及びトラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５値は、別個のＰＫ研究から提供された。

【図９３】マウスモデルにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５及び対照（化合物１２２）の薬物動態クリアランス分析。単回静注用量を、２ｍｇ／ｋｇでメスのＢＡ

ＬＢ／ｃマウス内に注射した。血漿試料を、指示された時点で採取し、抗タンパク質検出（総タンパク質量、実線によって示される、塗りつぶされた印）、及び関連する場合、抗薬物検出（総ＡＤＣ、破線によって示される、塗りつぶされていない印）を使用してＥＬＩＳＡによって分析した。各群及び実験の３とおりの平均のＳＥを示す。ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５（丸）（ｎ＝３）、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）（四角）（ｎ＝３）。

【図９４】マウスモデルにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）及び対照（化合物１２４）の薬物動態クリアランス分析。単回静注用量を、２ｍｇ／ｋｇでメスのＢＡＬＢ／ｃマウス内に注射した。血漿試料を、指示された時点で採取し、抗タンパク質検出（総タンパク質量、実線によって示される、塗りつぶされた印）、及び関連する場合、抗薬物検出（総ＡＤＣ、破線によって示される、塗りつぶされていない印）を使用してＥＬＩＳＡによって分析した。各群及び実験の３とおりの平均のＳＥを示す。ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＤＭ１（ｄＰＥＧ$_{12}$）（丸）（ｎ＝３）、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）（四角）（ｎ＝３）。

【図９５】ラットモデルにおけるｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５、及び対照（化合物１２４）の薬物動態クリアランス分析。（Ａ）単回静注用量を、４ｍｇ／ｋｇでオスのスプラーグドーリーラット内に注射した。血漿試料を、指示された時点で採取し、抗タンパク質検出（総タンパク質量、実線によって示される、塗りつぶされた印）、及び関連する場合、抗薬物検出（総ＡＤＣ、破線によって示される、塗りつぶされていない印）を使用してＥＬＩＳＡによって分析した。各群及び実験の３とおりの平均のＳＥを示す。ＡＤＣ　ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５（丸）（ｎ＝３）、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）（四角）（ｎ＝３）。（Ｂ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）を注射したラットの、２４時間超採取し、ＨＥＲ２－Ｂｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲチップ上で分析した１０倍に濃縮された尿、３匹の動物の試料。ｓｃＦｖの参照を示す。尿試料における容積変化は、尿構成成分の濃度によるものである。（Ｃ）ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５複合体を注射したラットの、２４時間超採取し、ＨＥＲ２－Ｂｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲチップ上で分析した１０倍に濃縮された尿、３匹の動物の試料。ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５の参照を示す。尿試料における容積変化は、尿構成成分の濃度によるものである。

【図９６】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（化合物１１８）、及び遊離ＭＭＡＦ治療剤を用いた、ＢＴ４７４異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶。（Ａ）時間（日）に対する腫瘍体積は、３回用量のｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ（丸）、２回用量のトラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（三角）、及び対照群（四角）でプロットされる。各群は、６匹の動物からなり、平均のＳＥを示す。挿入図は、最初の３０日の拡大表示である）．第２のプロットは、（囲まれた領域によって示される）第１のプロットの一部分の拡大である。（Ｂ）（Ａ）の同じ群の治療の開始からの、体重における変化のパーセンテージ。

【図９７】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５、トラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（化合物１１８）、及び遊離ＭＭＡＦ治療剤を用いた、ＢＴ４７４異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶。（Ａ）時間（日）に対する腫瘍体積は、２回用量のｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ（丸）、２回用量のｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ（バツ）、２回用量のトラスツズマブ－ＭＭＡＦ－Ｃ５複合体（三角）、及び対照群（四角）でプロットされる。各群は、６匹の動物からなり、平均のＳＥを示す。（Ｂ）（Ａ）の同じ群の治療の開始からの、体重における変化のパーセンテージ。

【図９８】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５Ｃ５及びトラスツズマブ－Ｐ５Ｃ５複合体（化合物７１）を用いた、ＢＴ４７４異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶。（Ａ）時間（日）に対する腫瘍体積は、単回投与処方のｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－Ｐ５－Ｃ５　ＡＤＣ（ひし形）、単回投与処方のｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＭＭＡＦ－Ｃ５　ＡＤＣ（丸）、単回投与処方のトラスツズマブ－ＭＭＡＦ複合体（三角）、単回投与処方のトラスツズマブ－Ｐ５－Ｃ５複合体（ひし形）、及び対照群（四角）でプロット

される。各群は、６匹の動物からなり、平均のＳＥを示す。（Ｂ）（Ａ）の同じ群の治療の開始からの、体重における変化のパーセンテージ。

【図９９】２つの異なるＤＡＲのｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体（１２１）を用いた、ＢＴ４７４ヒト乳癌異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶。（Ａ）時間（日）に対する腫瘍体積は、２つの治療剤、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ（Ｌ）低ＤＡＲ、２．７、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ（Ｍ）中ＤＡＲ、５．７、ならびにビヒクル対照について、プロットされる。各群は、６匹の動物からなり、平均のＳＥを示す。（Ｂ）（Ａ）の同じ群の治療の開始からの、体重における変化のパーセンテージ。

【図１００】３つの異なるＤＡＲのｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＡＦ－Ｃ５複合体（１２１）を用いた、ＢＴ４７４ヒト乳癌異種移植モデルにおける腫瘍成長抑制または根絶。時間（日）に対する腫瘍体積は、２つの治療剤、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ（Ｌ）低ＤＡＲ、２．７、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ（Ｍ）中ＤＡＲ、５．７、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－オーリスタチンＦ（Ｈ）高ＤＡＲ、１１、ならびにビヒクル対照に関してプロットされる。各群は、６匹の動物からなり、平均のＳＥを示す。

【図１０１】ＴＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳとのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）複合体のＳＤＳ　ＰＡＧＥ。レーン２～４は、精製された抗体断片（ｓｃＦｖ）複合体である。１＝未修飾ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）ストック；２＝４薬物当量でのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）複合体；３＝６薬物当量でのＴＣＴ複合体；４＝１６薬物当量でのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）複合体。レーン６～８は、精製前の抗体断片複合体である。６＝４薬物でのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）複合体；７＝６薬物当量でのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）複合体；８＝１６薬物当量でのｓｃＦｖ（ＴＣＴ）複合体。使用されるサイズマーカーを、示す。

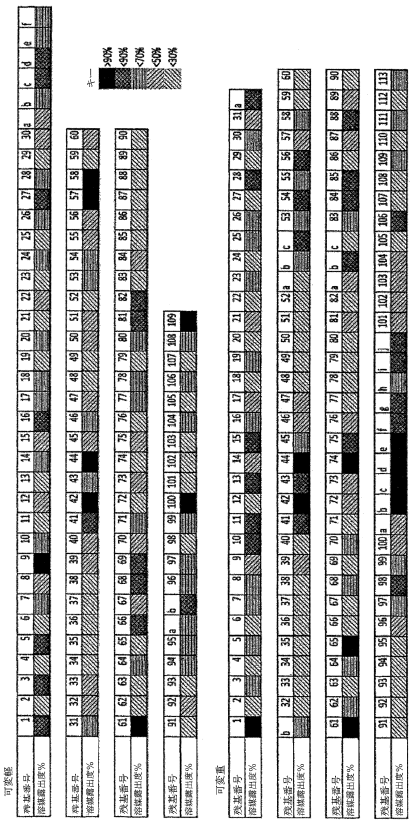
【図１０２】ｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＴＣＯ－ＰＥＧ４のＬＣＭＳデータ。（Ａ）は、ＬＣＭＳ出力記録（ＵＶ及びＴＩＣ）であり、（Ｂ）は、１０．７６分の時点での主ピークのデコンボリューションされた質量である。

【図１０３】１ｍｌ／分で運転し、非複合ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ－１０６７）－ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_5$ＡＤＣ１、２、３、４のＨＰＬＣ　ＳＥＣ出力記録。（Ａ）２８０ｎｍでの吸光度のプロファイル、（Ｂ）３６０ｎｍでの吸光度のプロファイル

【図１０４】非複合化ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）と比較した、ｓｃＦｖ（ＴＣＴ１０６７）－ＳＮ３８－（ＤＮＭＥＡ）－ＰＡＢ－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－ｄＰＥＧ$_5$複合体１及び２を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ還元性ゲル（４～２０％）。

【図１０５】二重特異性抗体（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５複合体のそれぞれの非複合抗体、ダイアボディ（ＴＣＴ）、及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ）に対する、ダイアボディ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５及びｓｃＦｖ（ＴＣＴ）－ＡＦ－Ｃ５複合体を示す、ＳＤＳ　ＰＡＧＥ還元性ゲル（４～２０％）。

【図１】



【図２】

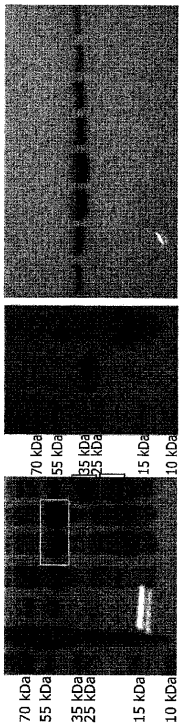
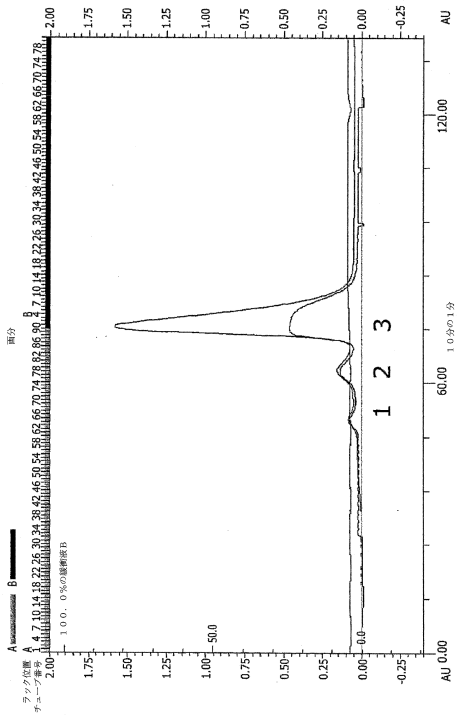
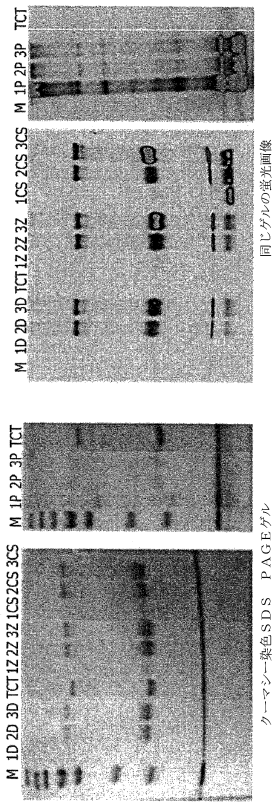


Figure 2

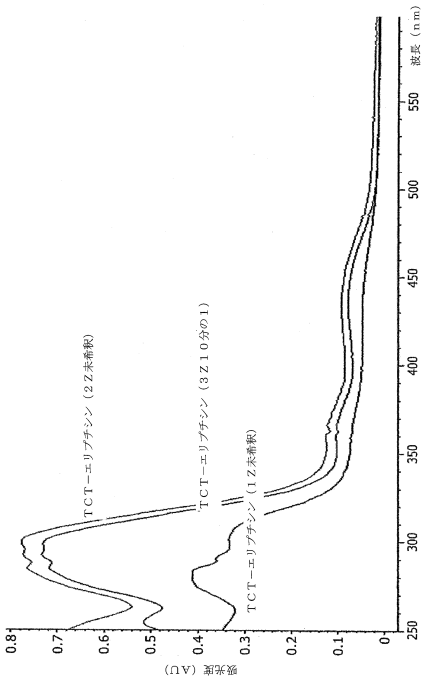
【図３】



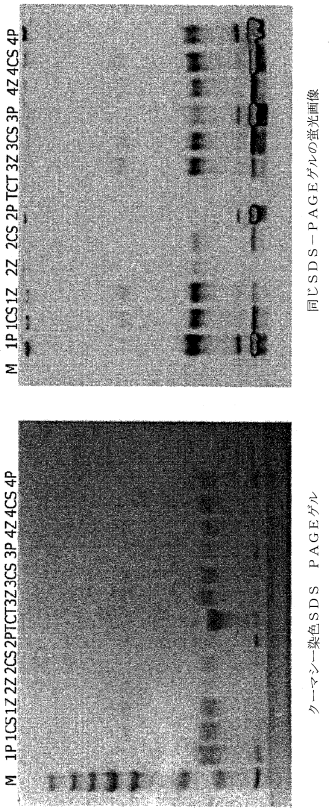
【図４】



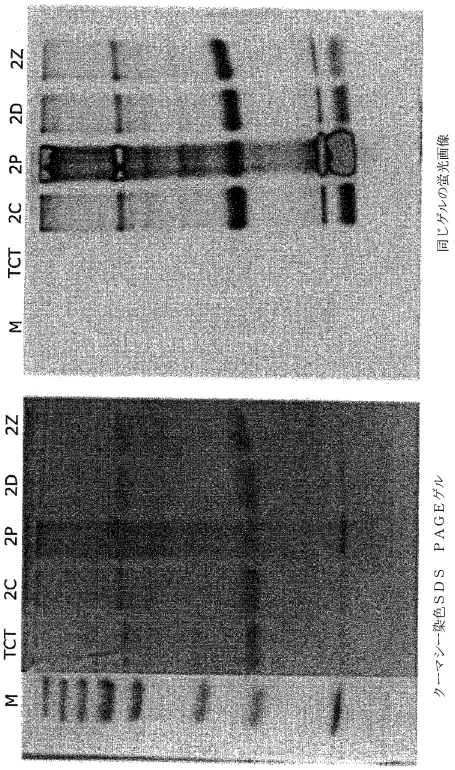
【図５】


TCT－エリプチシン（2Z未希釈）
TCT－エリプチシン（3Z10分の1）
TCT－エリプチシン（1Z未希釈）
蛍光度（ΔU）
波長（nm）

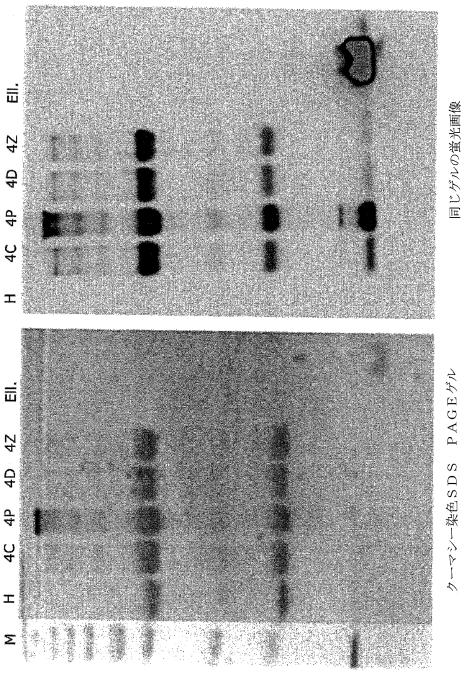
【図６】


M 1P 1CS 1Z 2Z 2CS 2P TCT 3Z 3CS 3P 4Z 4CS 4P
クーマシー染色ＳＤＳ　ＰＡＧＥゲル
同じＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの蛍光画像

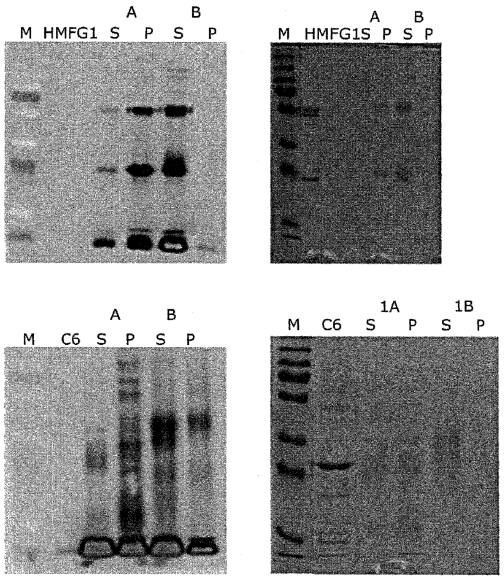
【図７】


M TCT 2C 2P 2D 2Z
クーマシー染色ＳＤＳ　ＰＡＧＥゲル
同じゲルの蛍光画像

【図８】

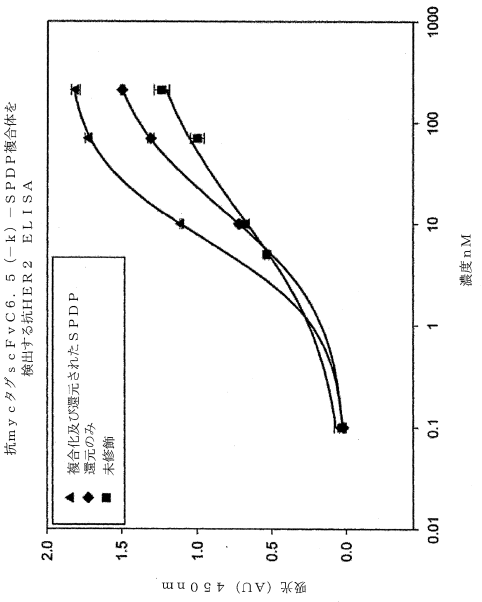

M H 4C 4P 4D 4Z EII.
クーマシー染色ＳＤＳ　ＰＡＧＥゲル
同じゲルの蛍光画像

【図９】



左：ゲルの係合画像、及び右：クーマシー染色ゲル。

【図１０】



【図１１】

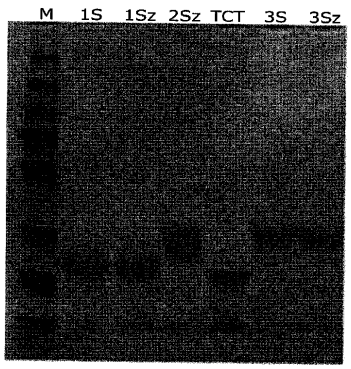
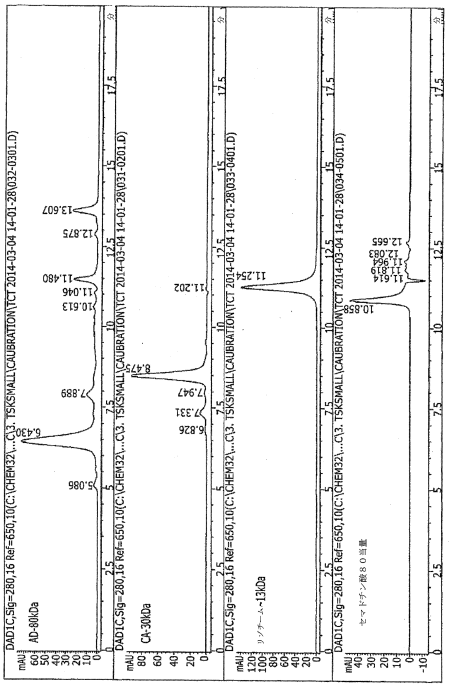
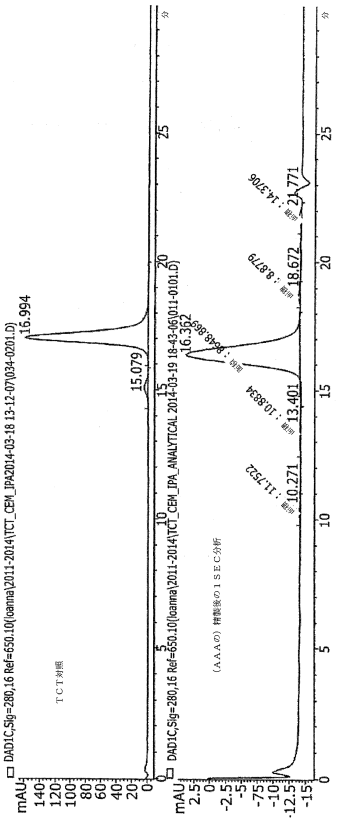


Figure 11

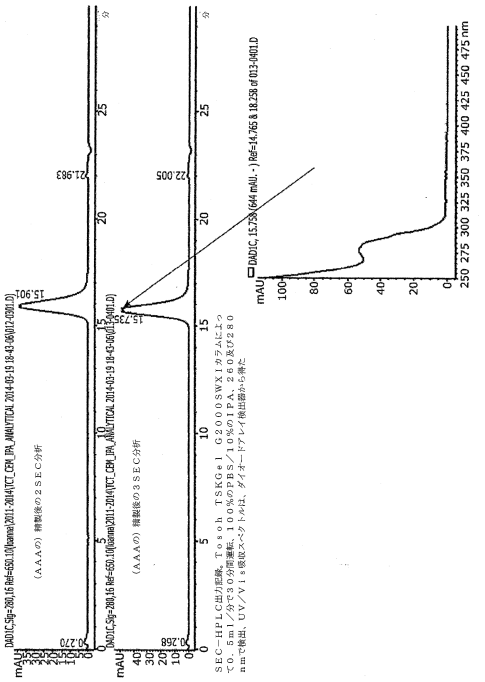
【図１２Ａ】



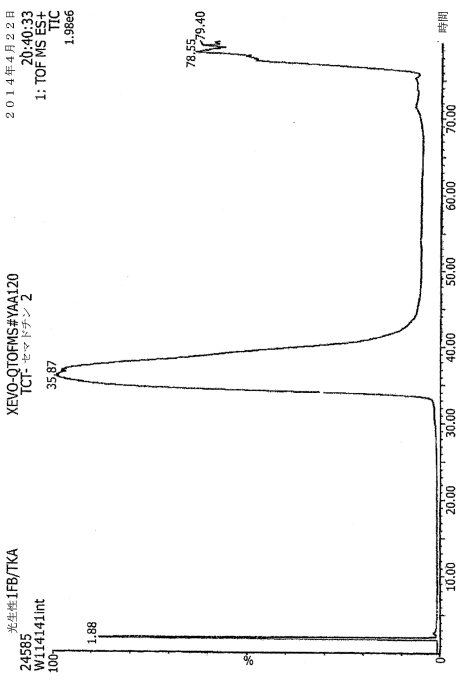
【図１２Ｂ】



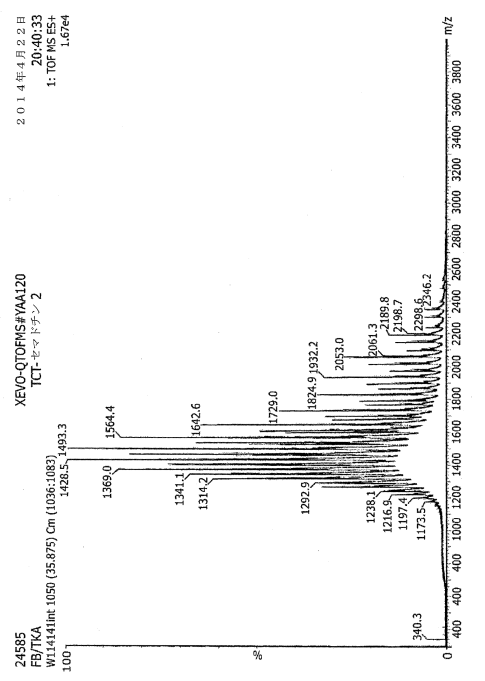
【図１２Ｃ】



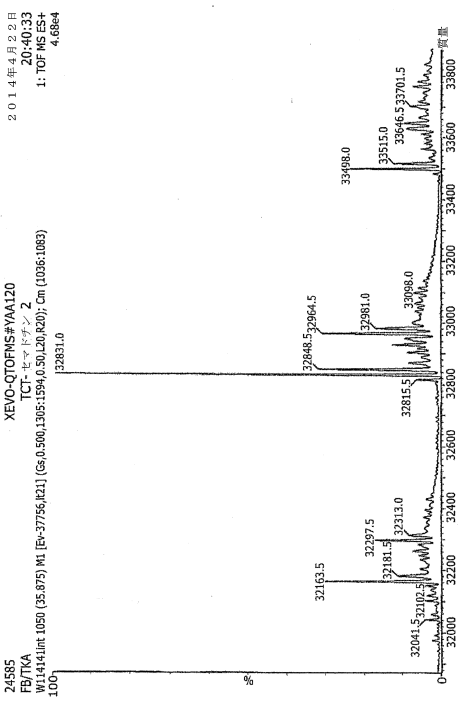
【図１３Ａ】



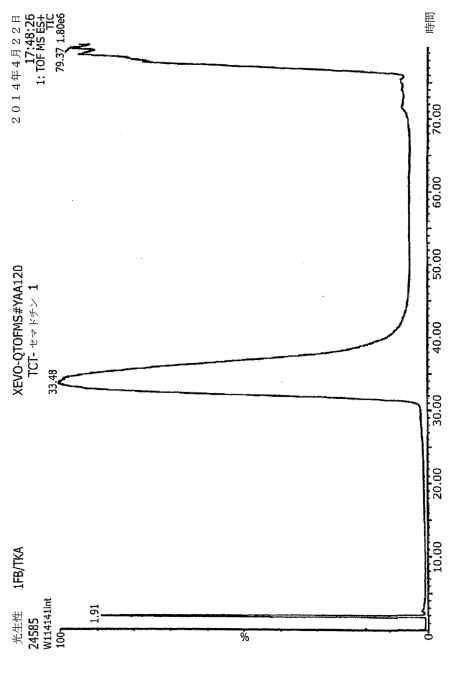
【図１３Ｂ】



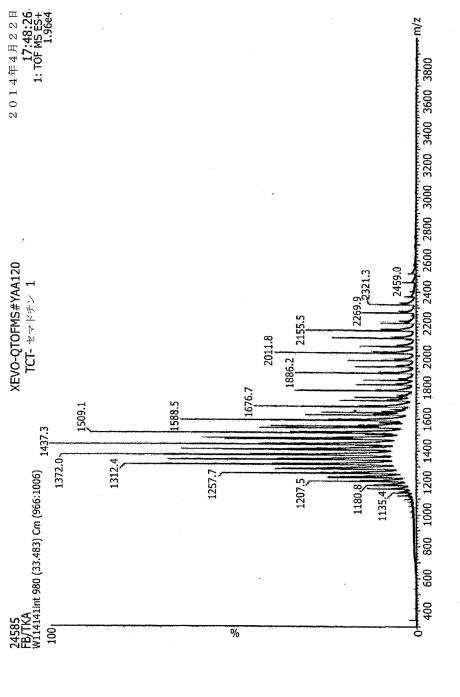
【図１３Ｃ】



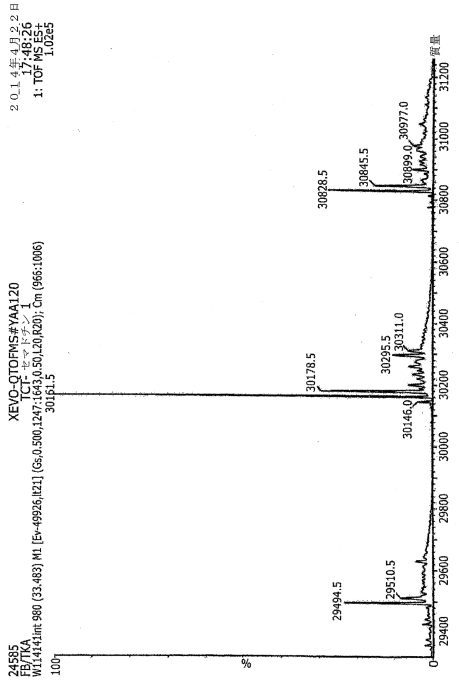
【図１４Ａ】



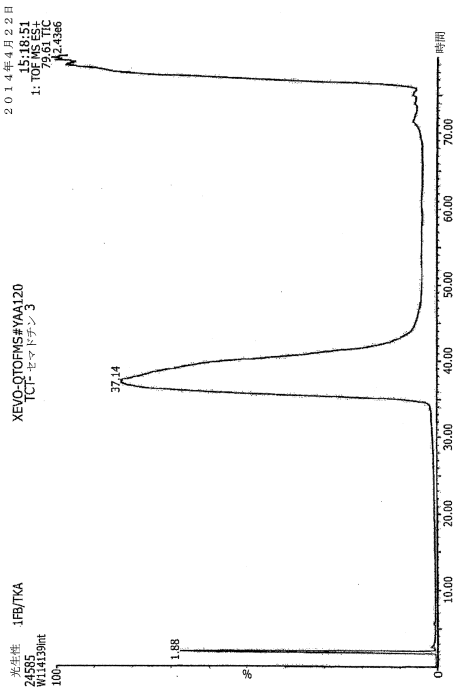
【図１４Ｂ】



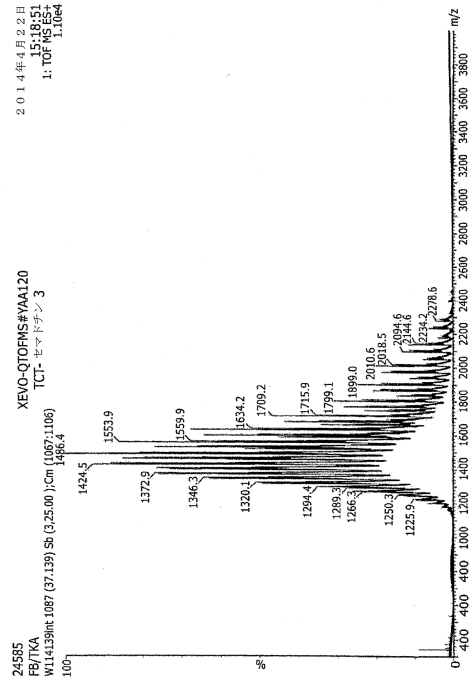
【図１４Ｃ】



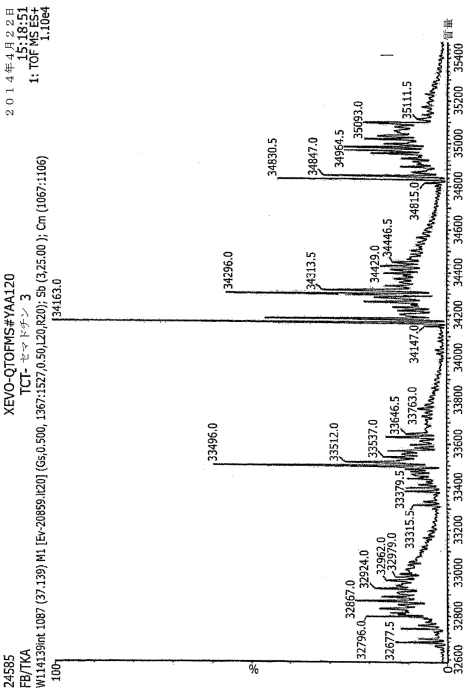
【図１５Ａ】



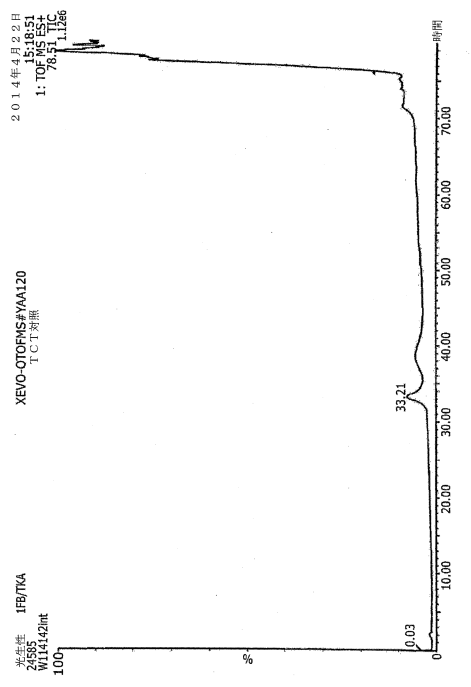
【図１５Ｂ】



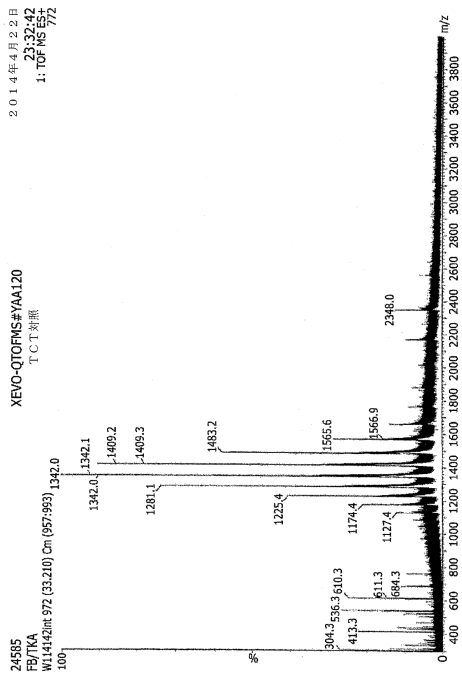
【図１５Ｃ】



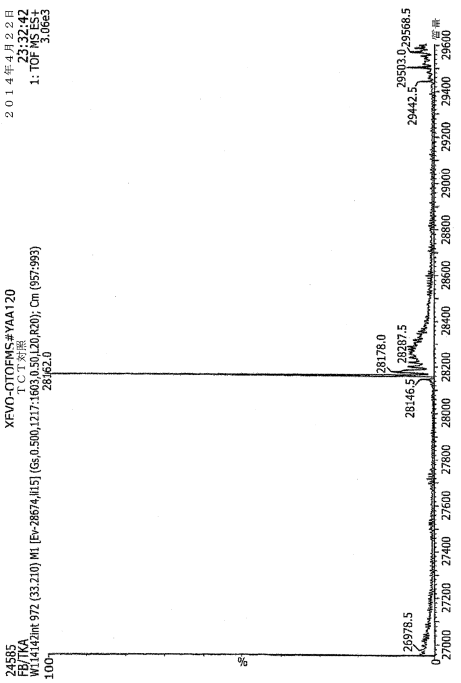
【図１６Ａ】



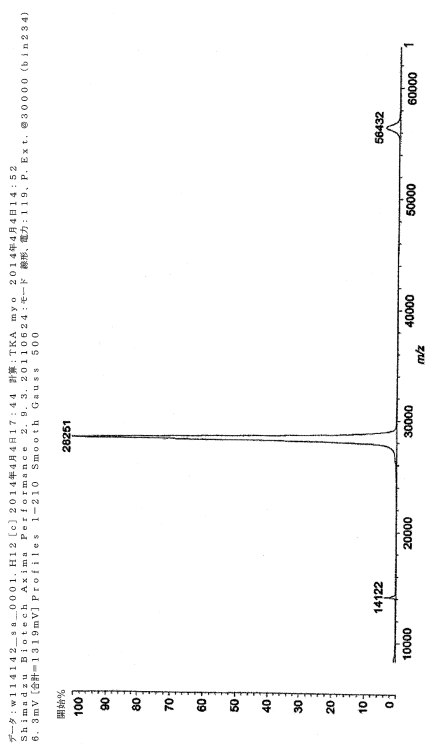
【図１６Ｂ】



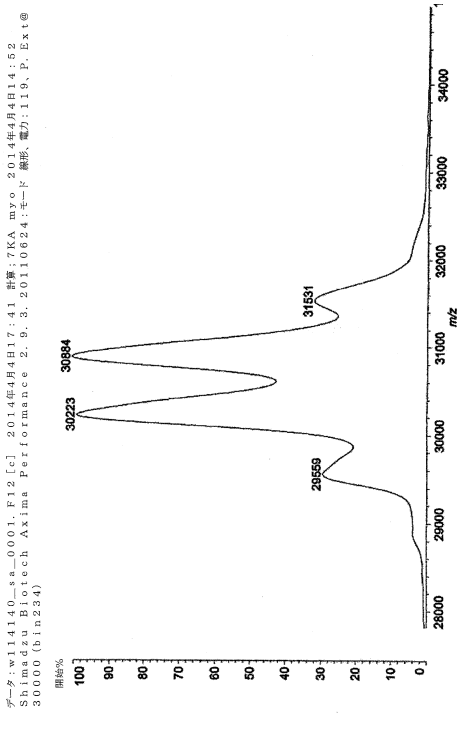
【図１６Ｃ】



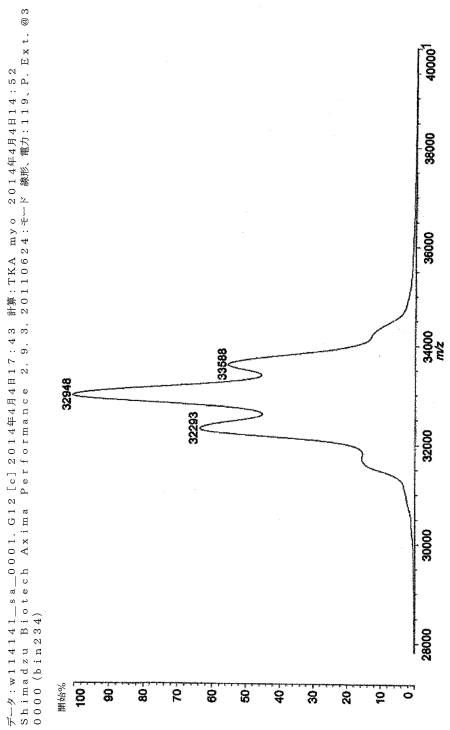
【図１７】



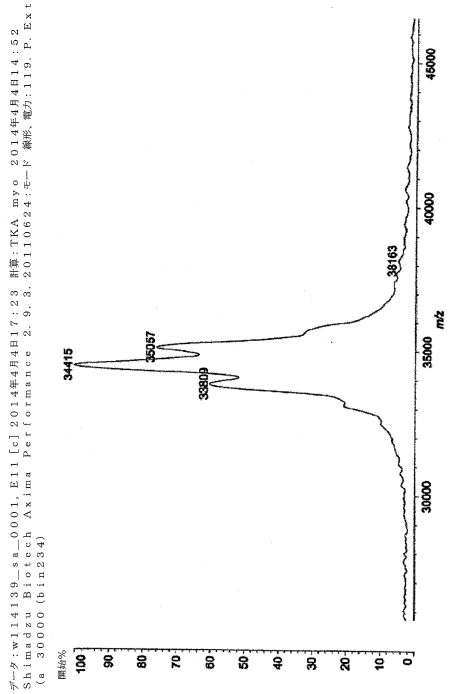
【図１８】



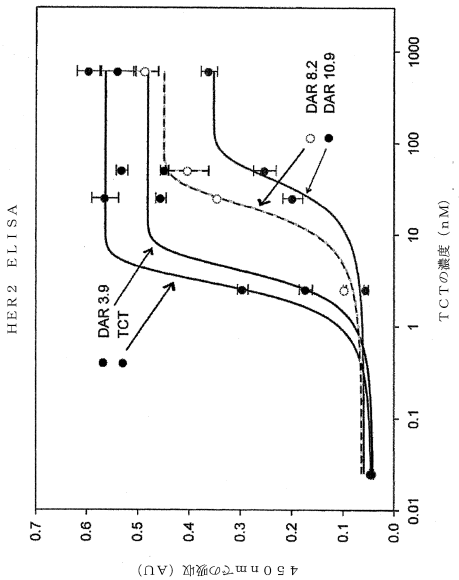
【図１９】



【図２０】



【図２１】



【図２２】

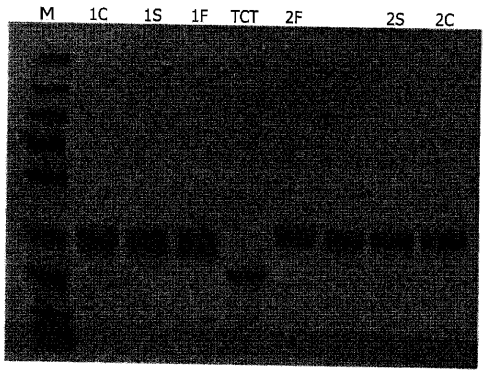
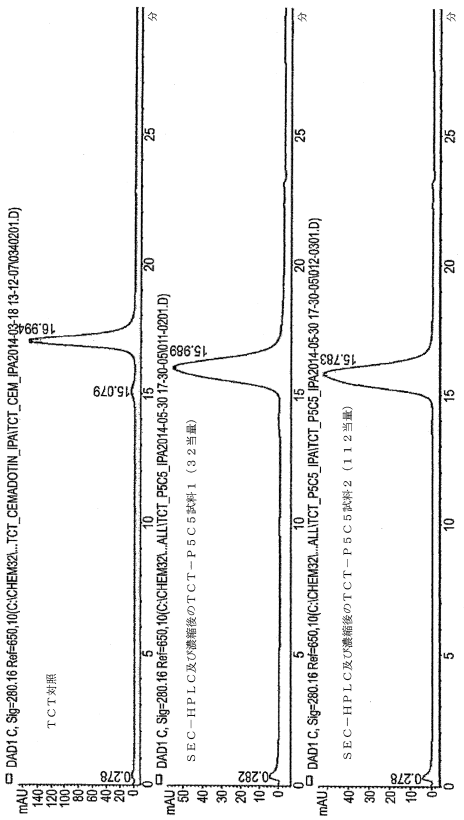
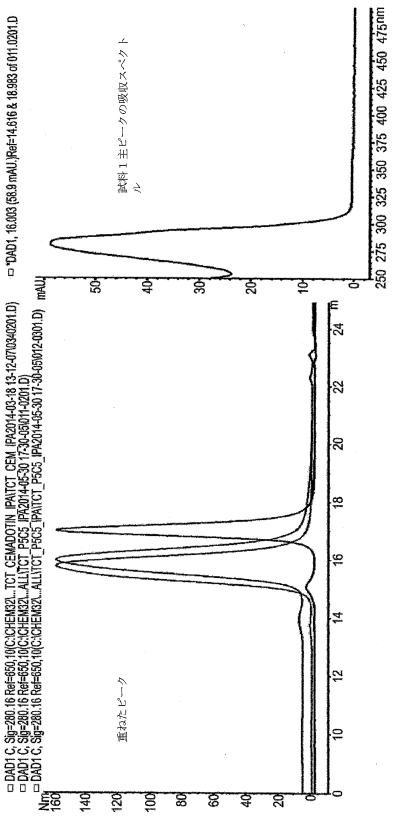


Figure 22

【図２３Ａ】



【図２３Ｂ】



【図２４】

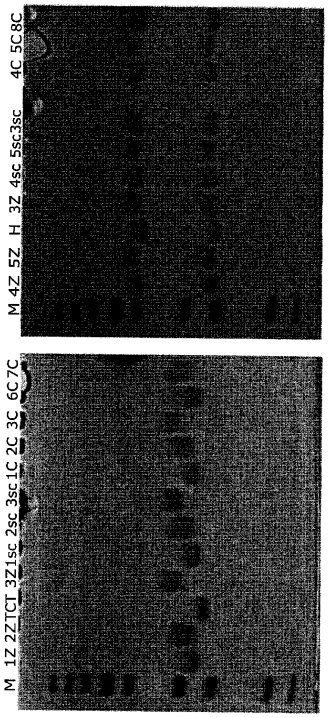
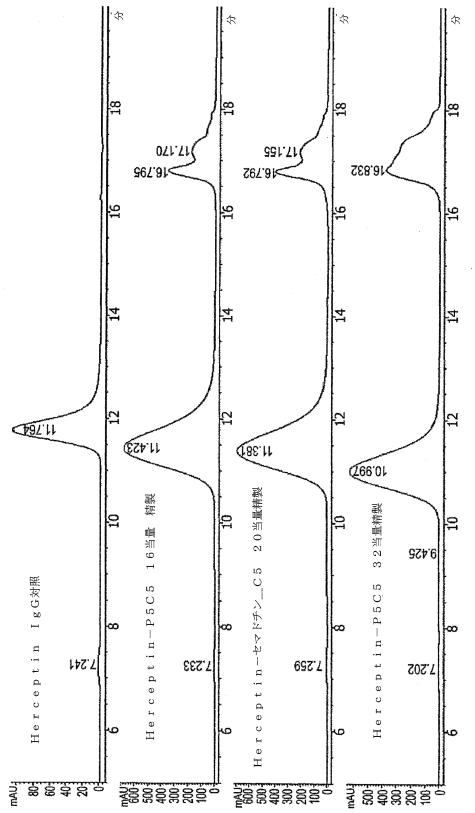
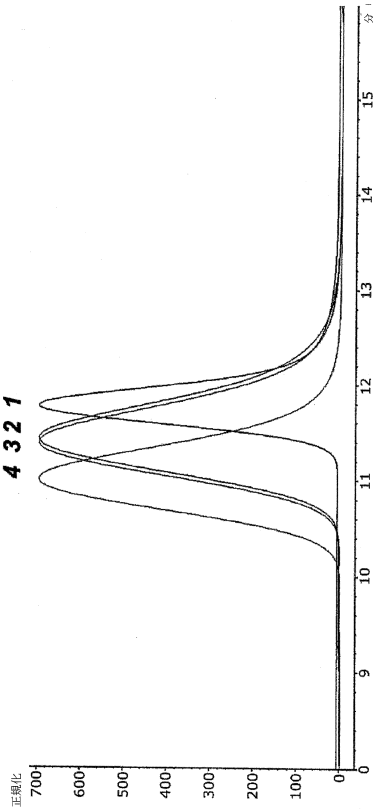


Figure 24

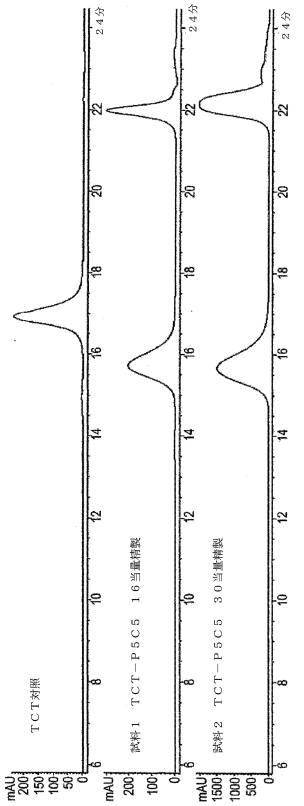
【図２５】



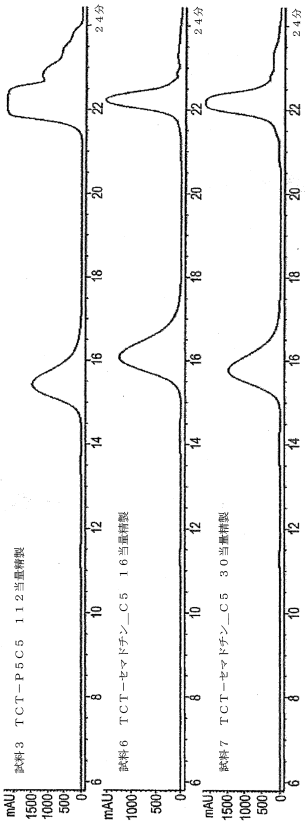
【図２６】



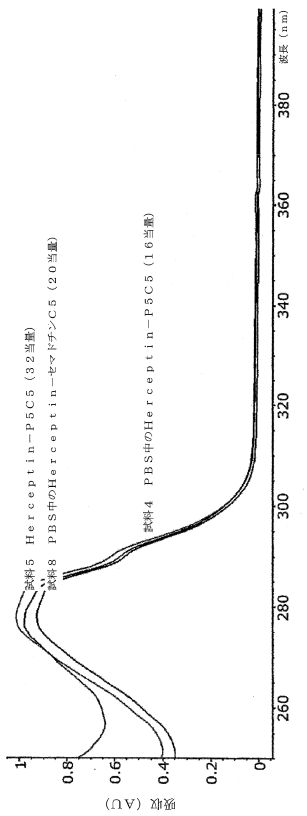
【図２７（１－２）】



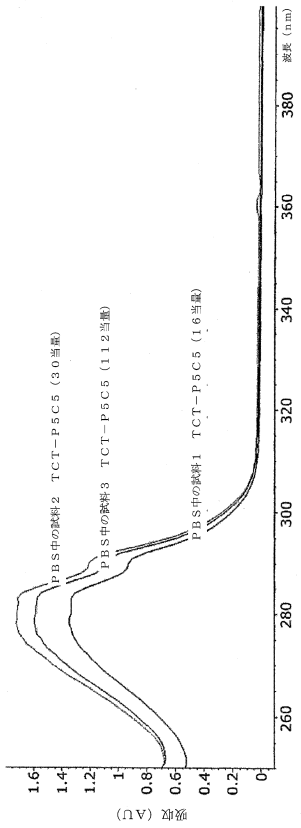
【図２７（２－２）】



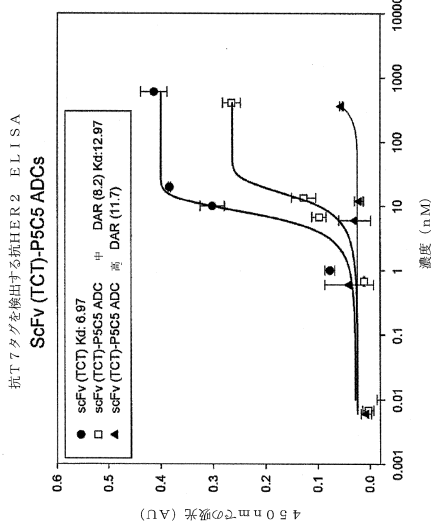
【図２８】



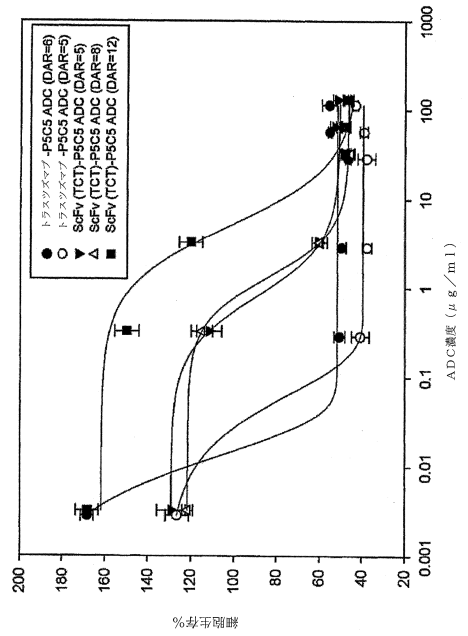
【図２９】



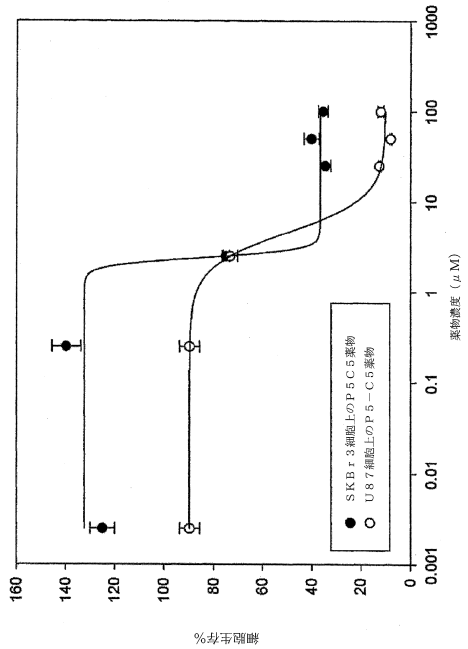
【図３０】



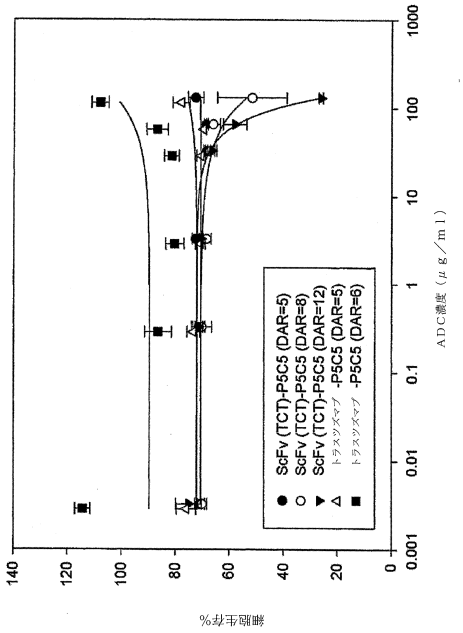
【図３１】



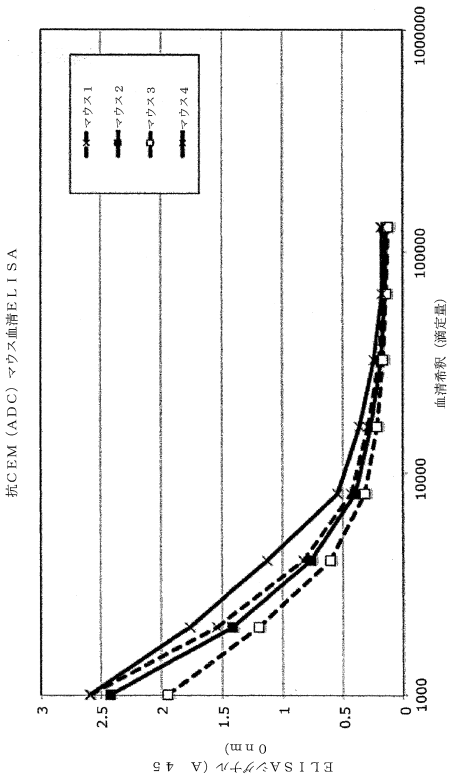
【図３２】



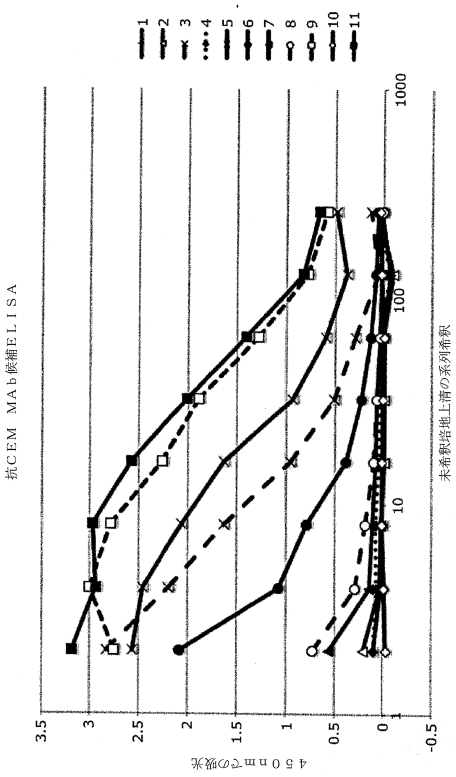
【図３３】



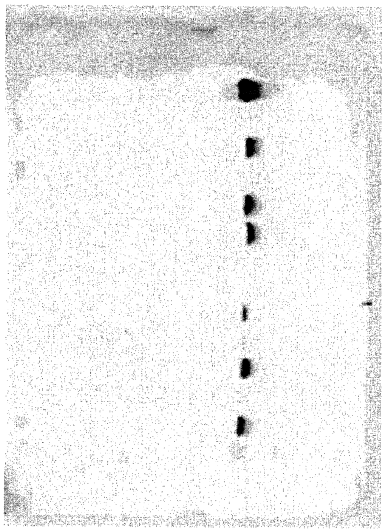
【図３４】



【図３５】

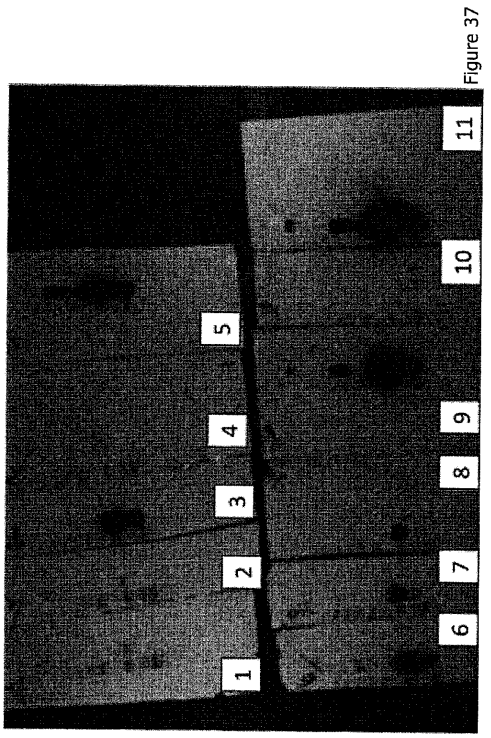


【図３６】

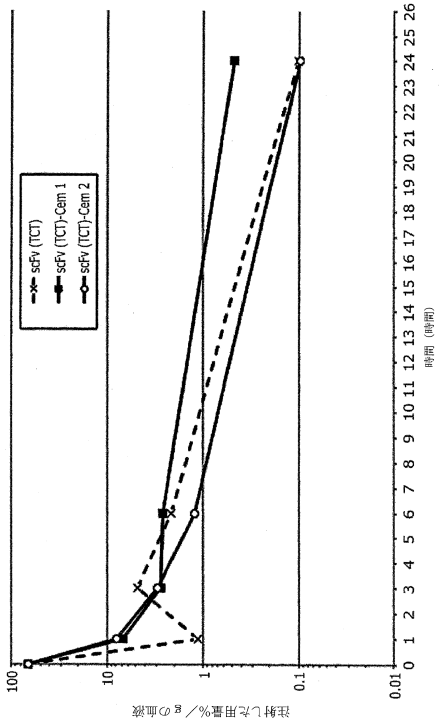


クローン番号	プレート参照
1	GC7
2	EB3
3	BH8
4	BF1
5	BD7
6	FH5
7	GD5
8	GE11
9	IE11
10	CG5
11	GA6

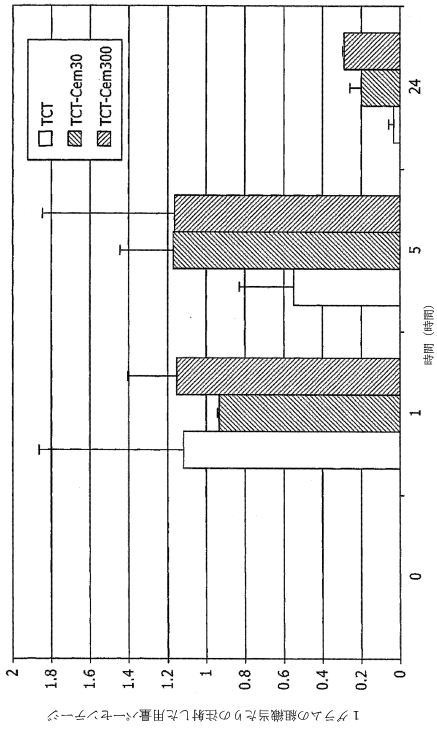
【図３７】



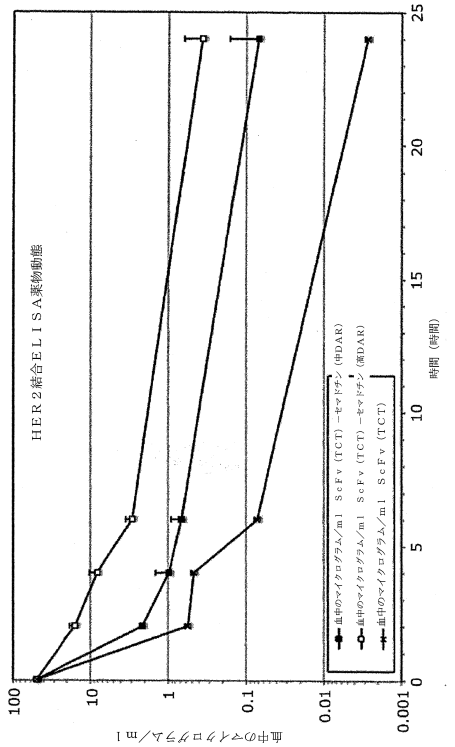
【図３８】



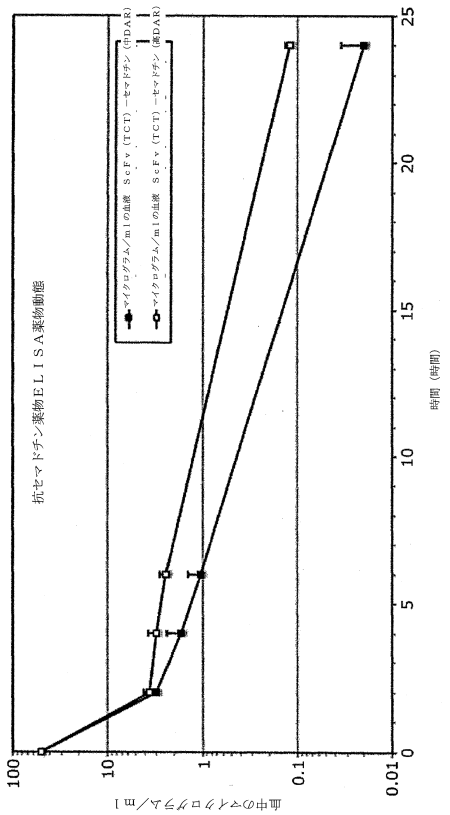
【図３９】



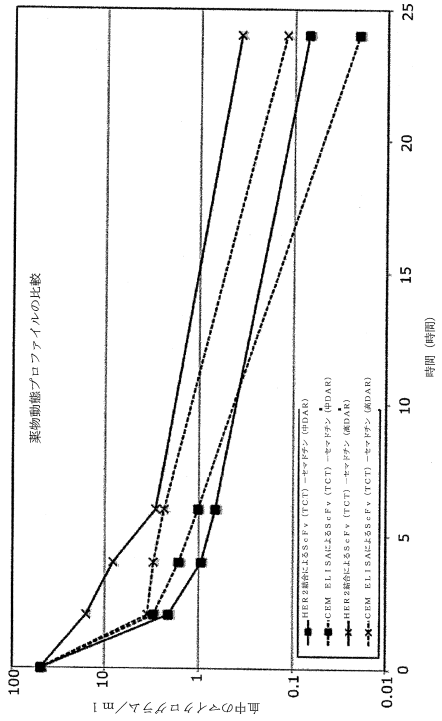
【図４０】



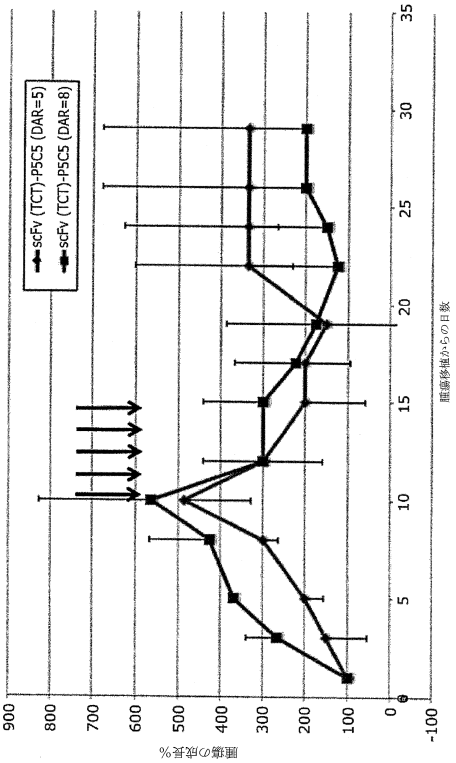
【図４１】



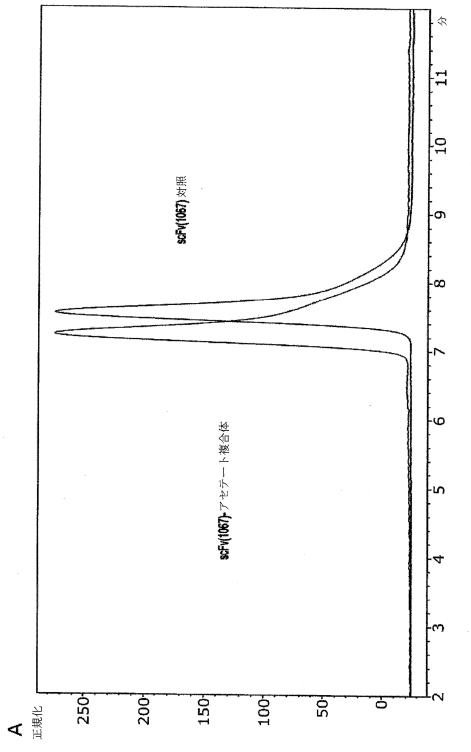
【図４２】



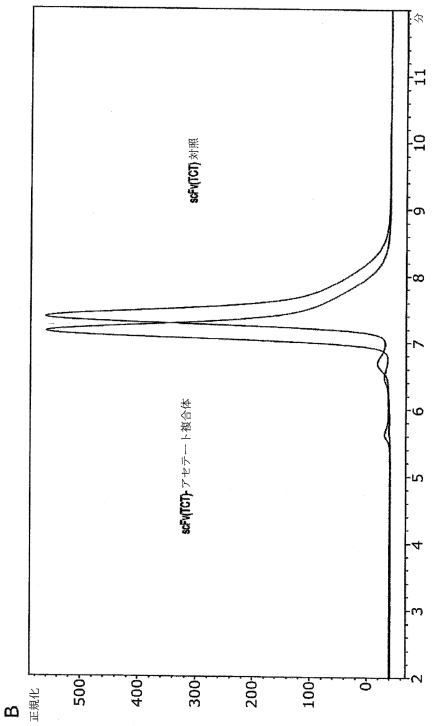
【図４３】



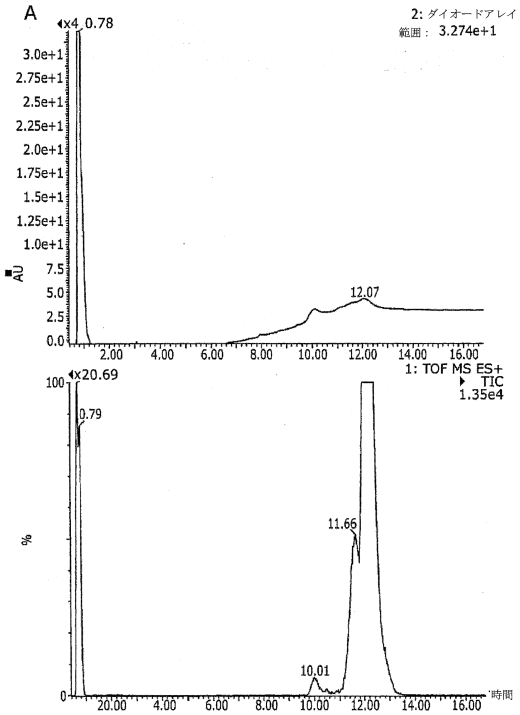
【図４４（１－２）】



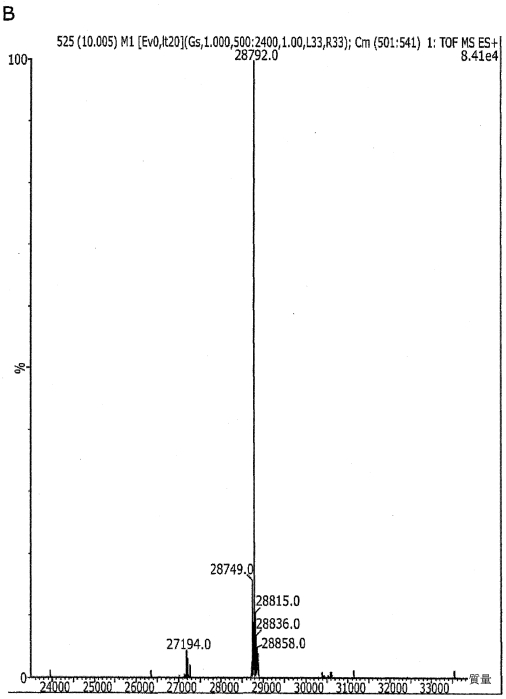
【図４４（２－２）】



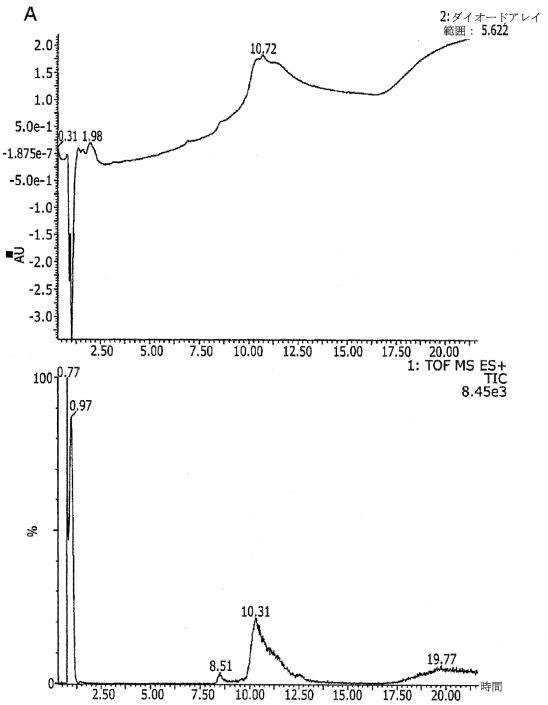
【図４５（１－２）】



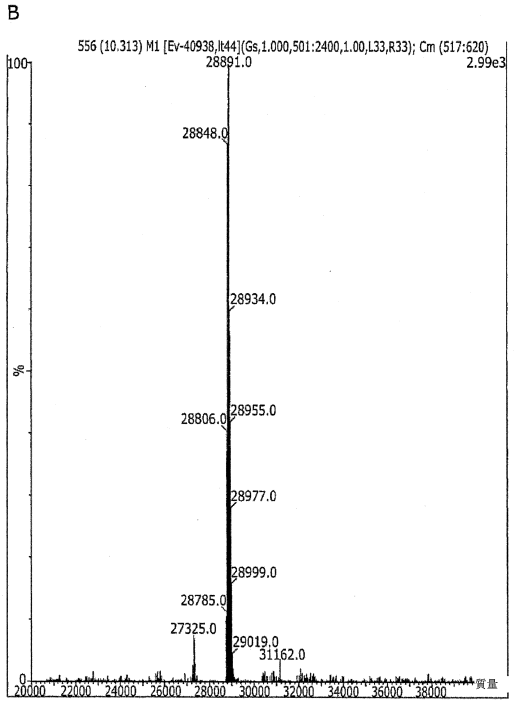
【図４５（２－２）】



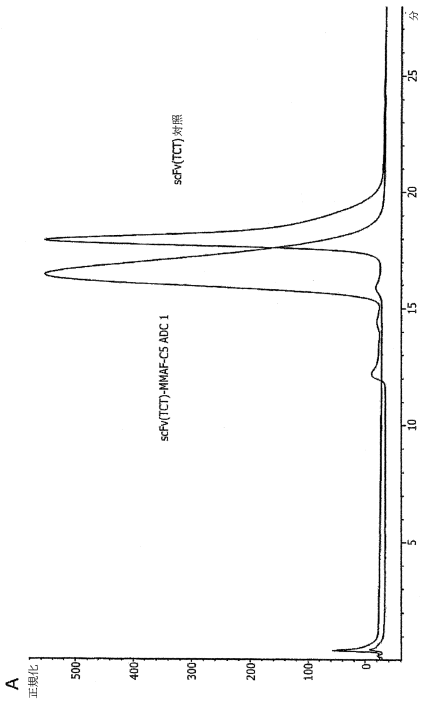
【図４６（１－２）】



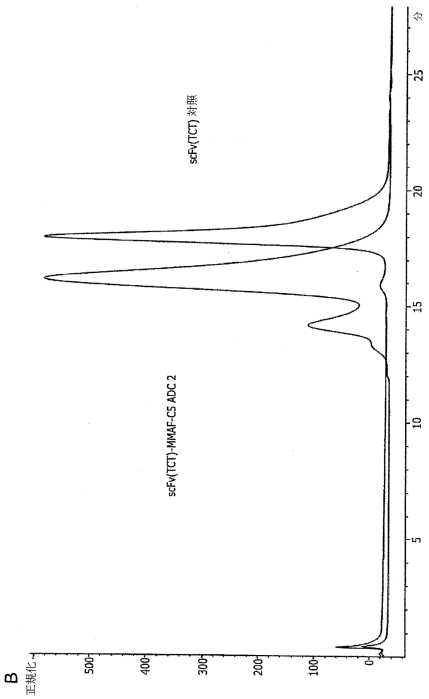
【図４６（２－２）】



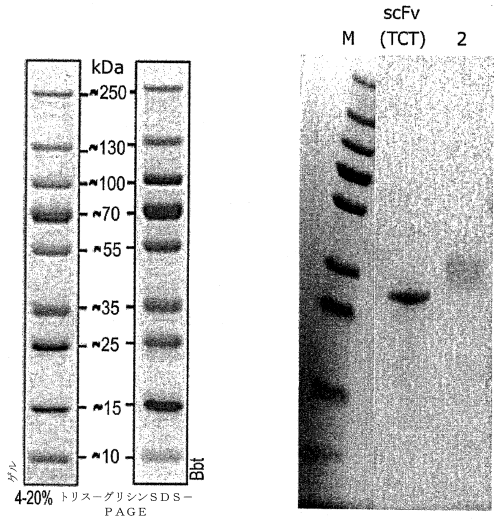
【図４７（１－２）】



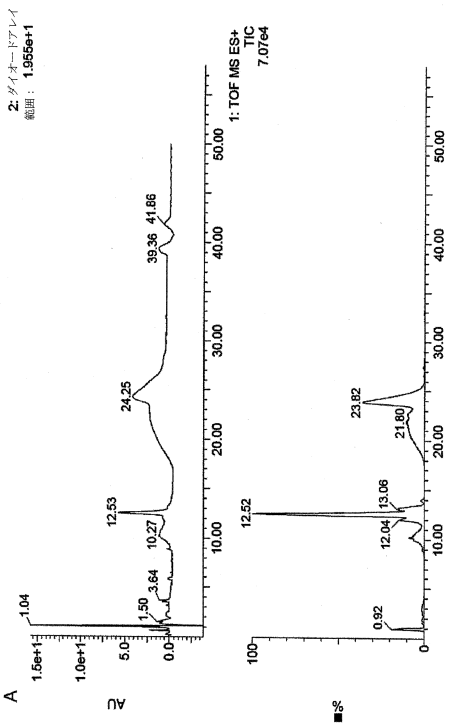
【図４７（２－２）】



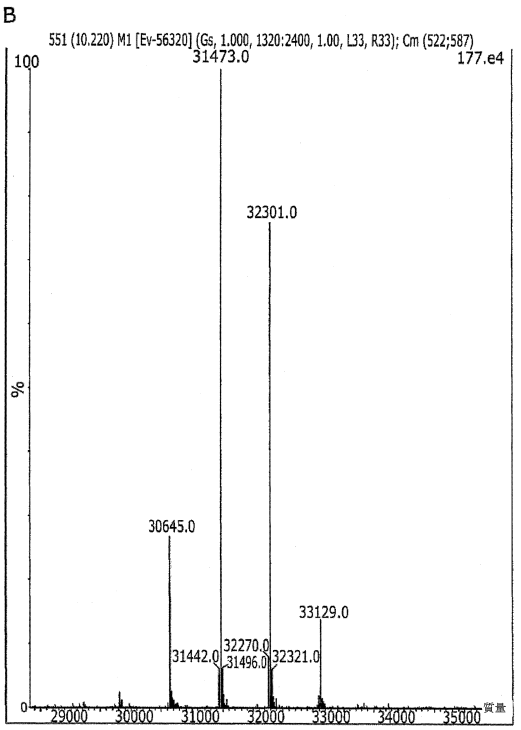
【図４８】



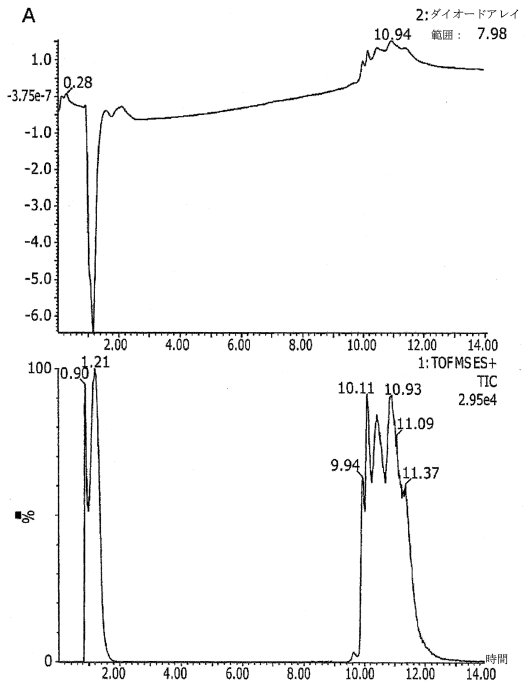
【図４９（１－２）】



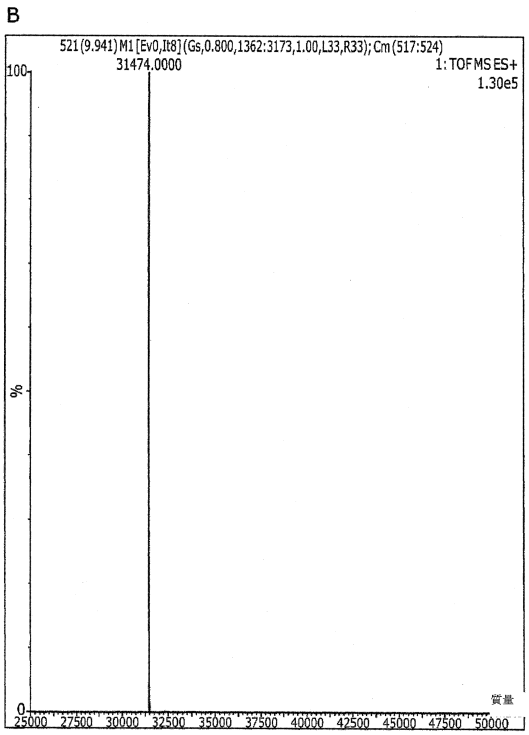
【図４９（２－２）】



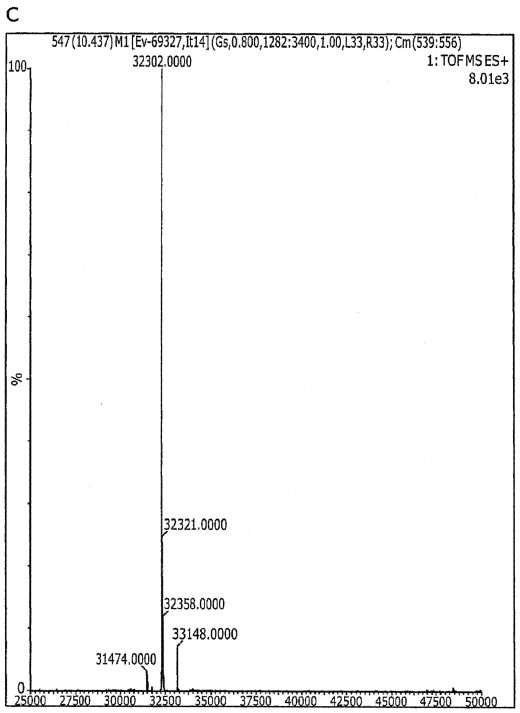
【図５０（１－５）】



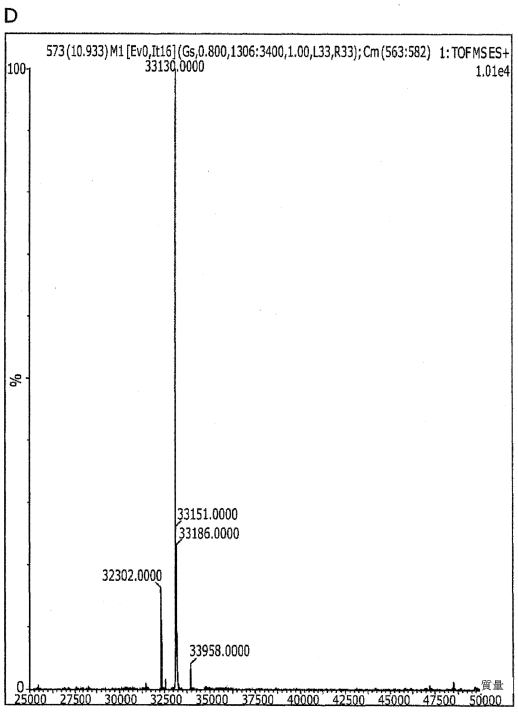
【図５０（２－５）】



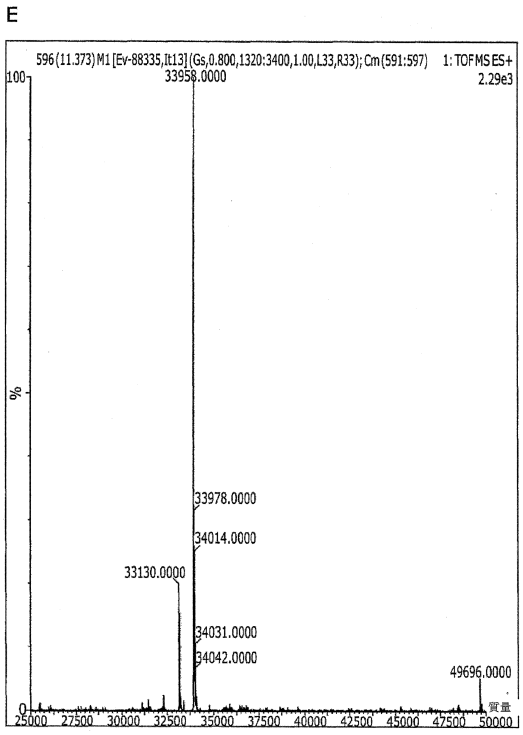
【図５０（３－５）】



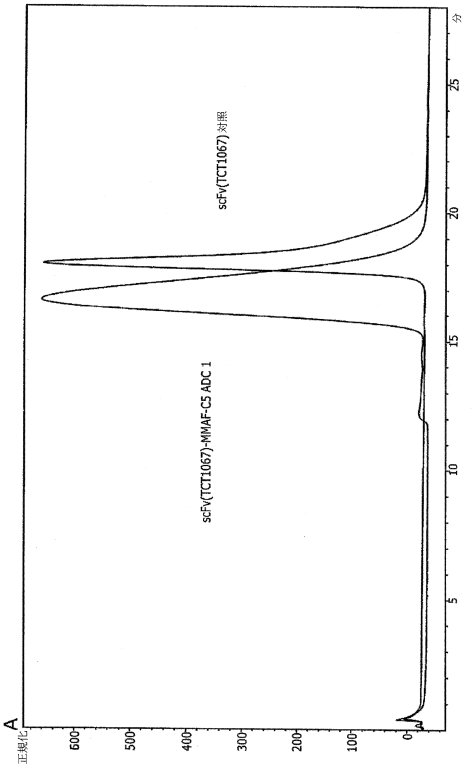
【図５０（４－５）】



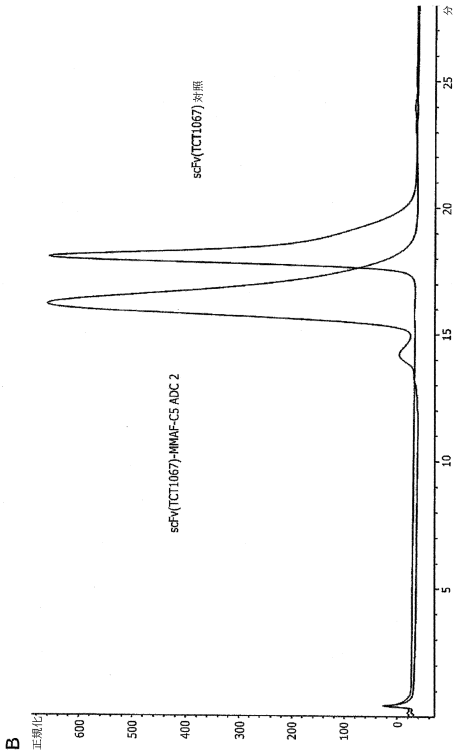
【図５０（５－５）】



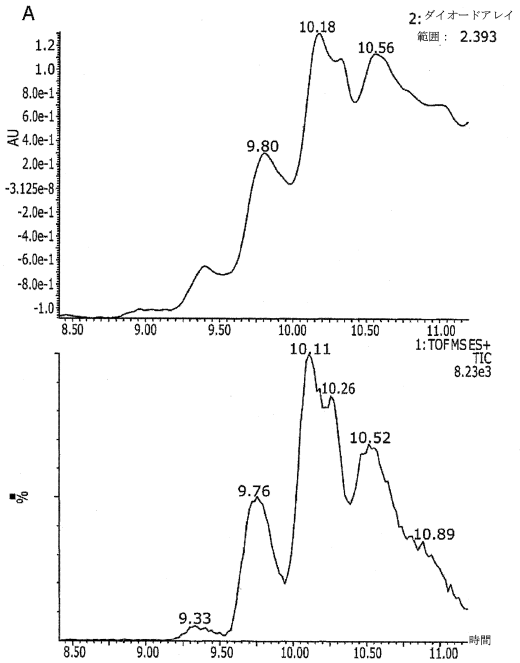
【図５１（１－２）】



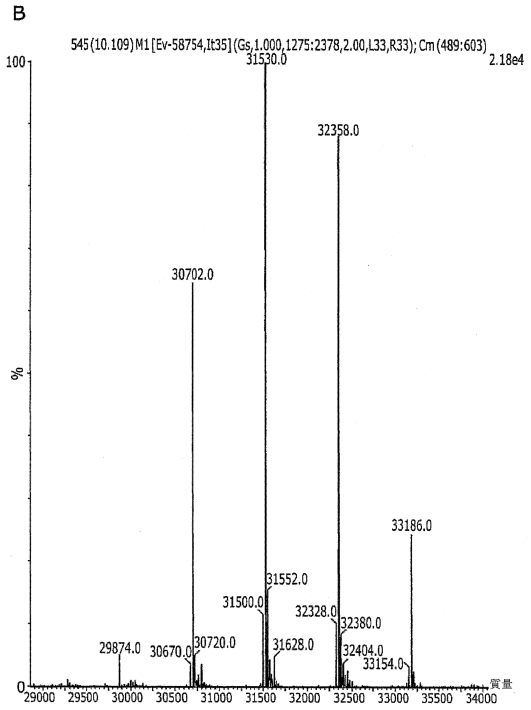
【図５１（２－２）】



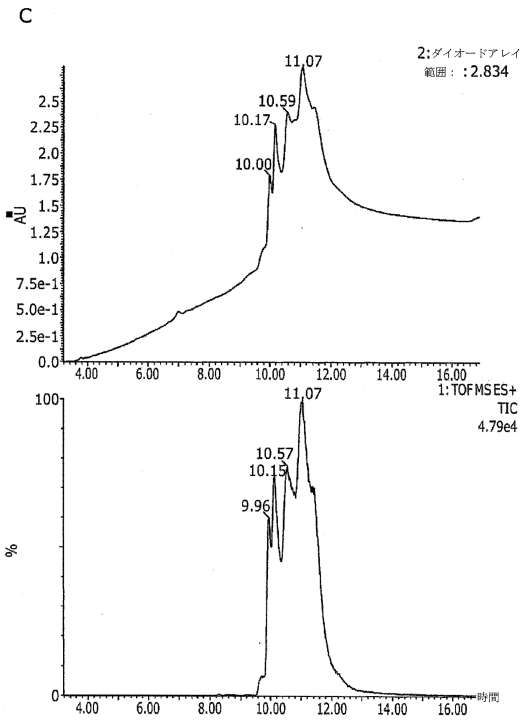
【図５２（１－４）】



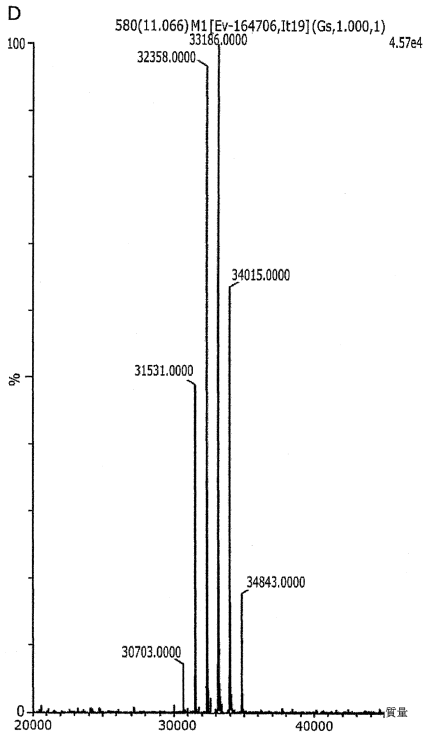
【図５２（２－４）】



【図５２（３－４）】



【図５２（４－４）】



【図５３】

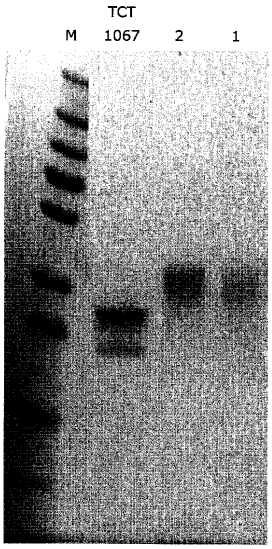
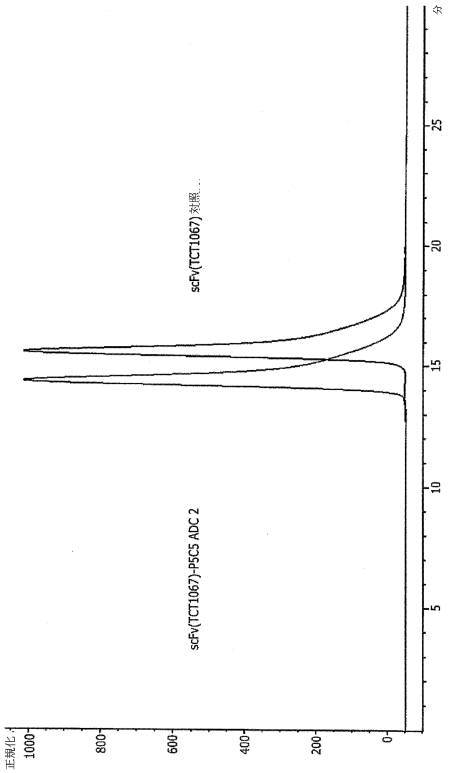


Figure 53

【図５４】



【図５５】

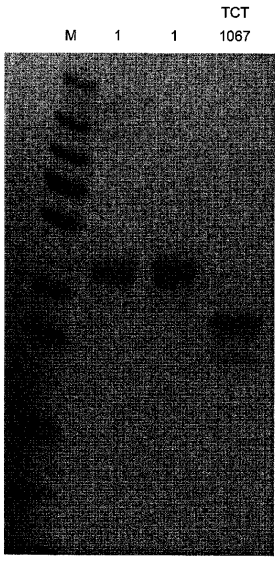
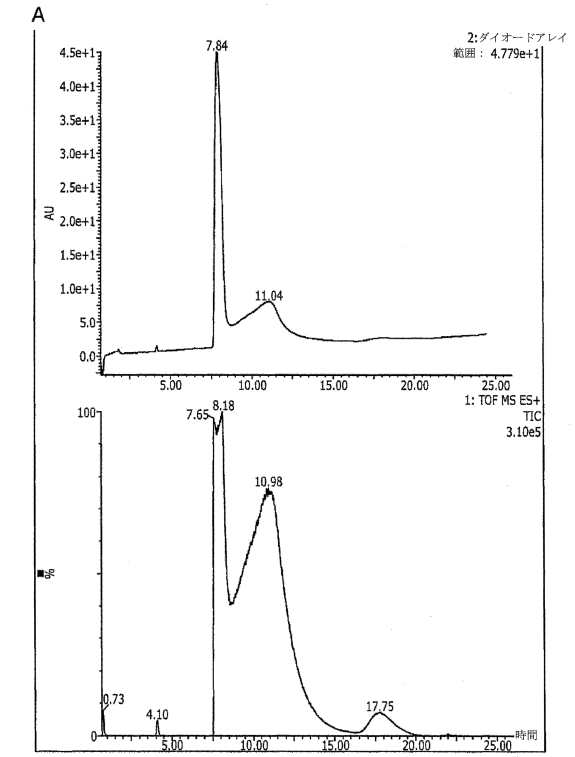
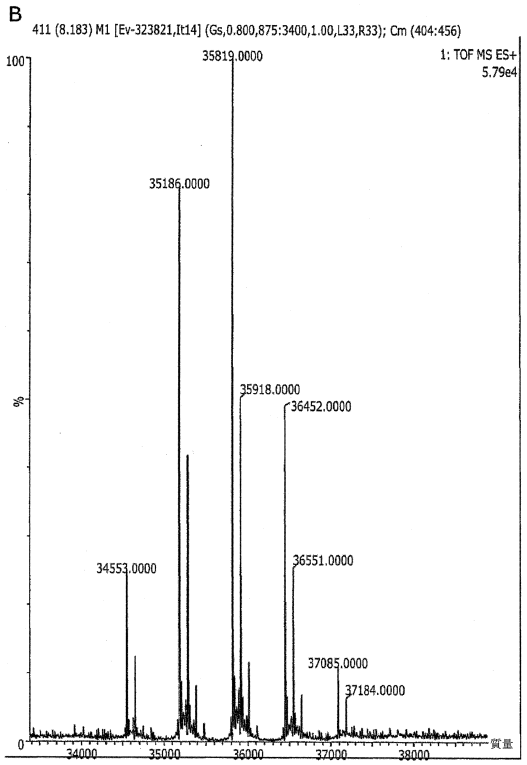


Figure 55

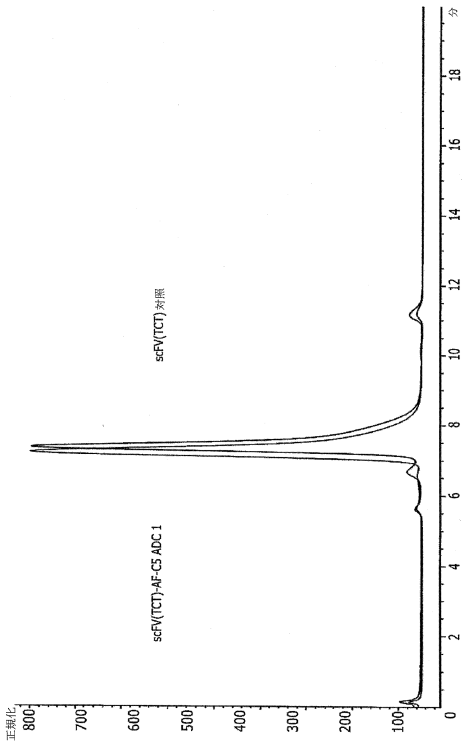
【図５６（１－２）】



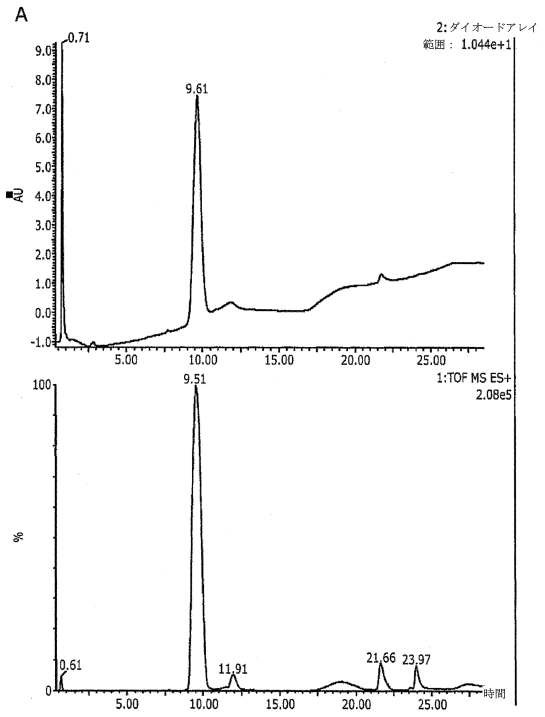
【図５６（２－２）】



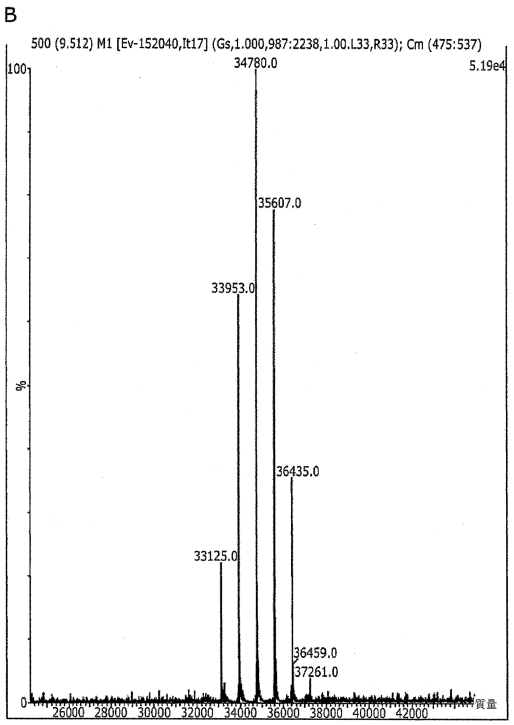
【図５７】



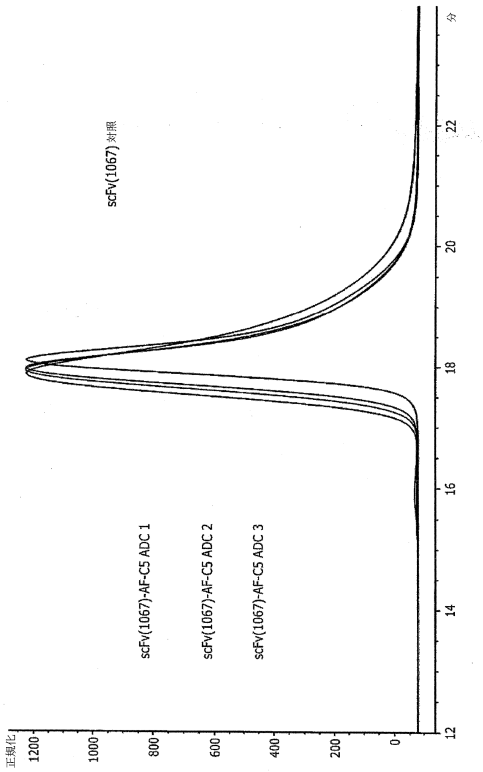
【図５８（１－２）】



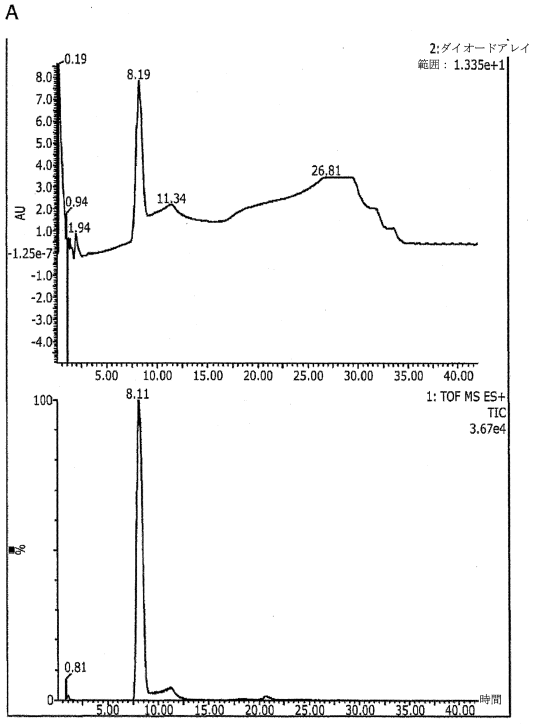
【図５８（２－２）】



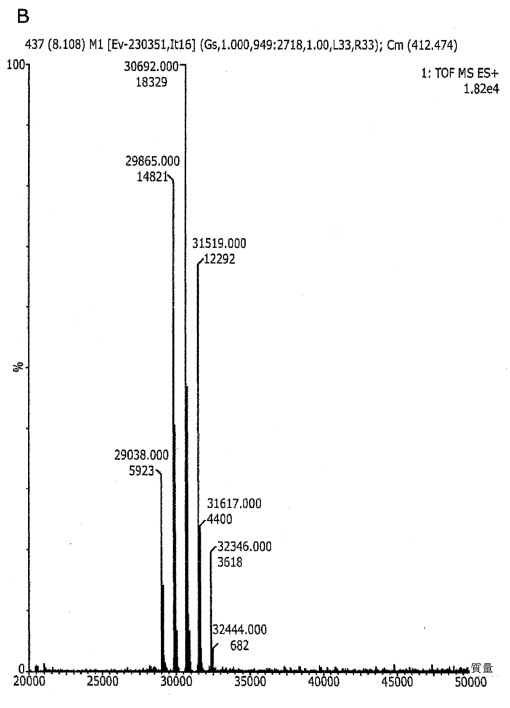
【図５９】



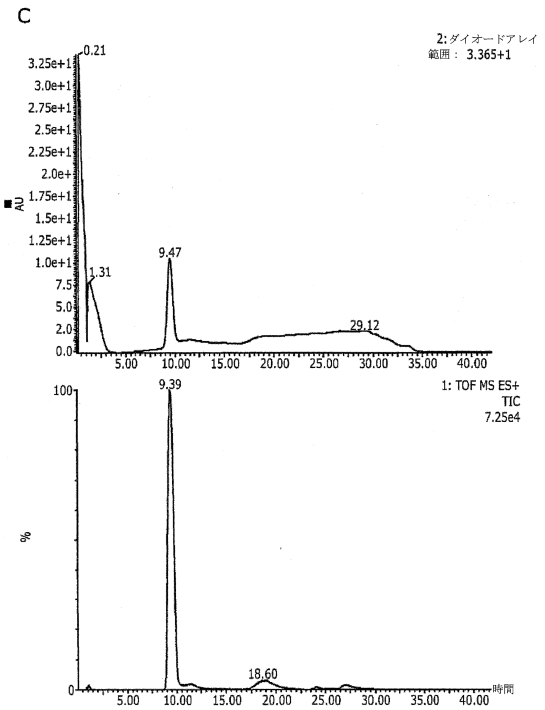
【図６０（１－６）】



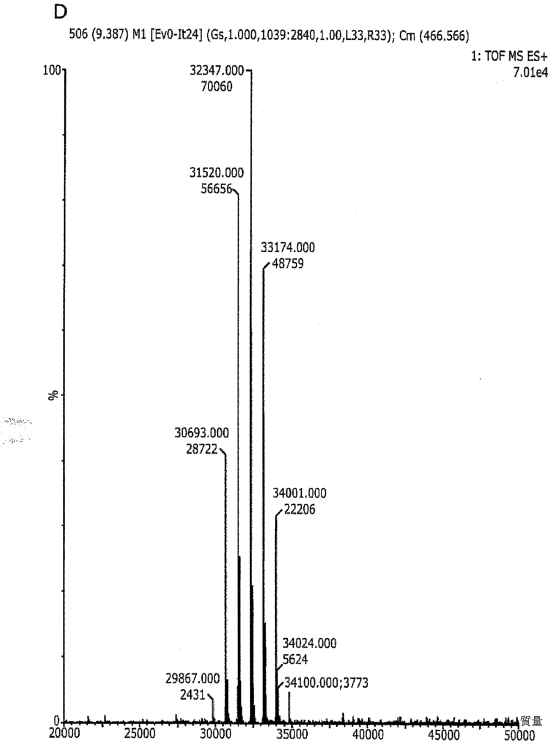
【図６０（２－６）】



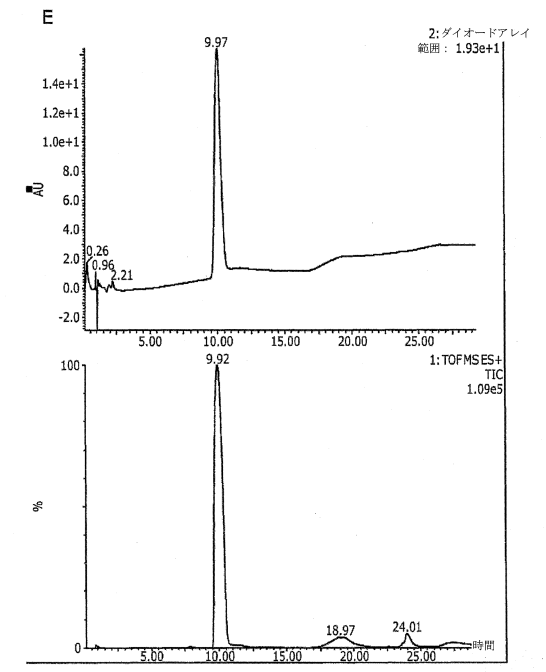
【図６０（３－６）】



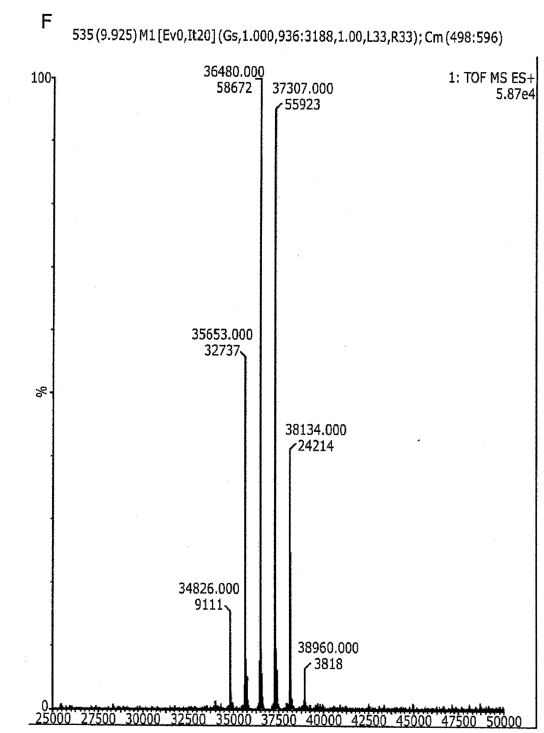
【図６０（４－６）】



【図６０（５－６）】



【図６０（６－６）】



【図６１】

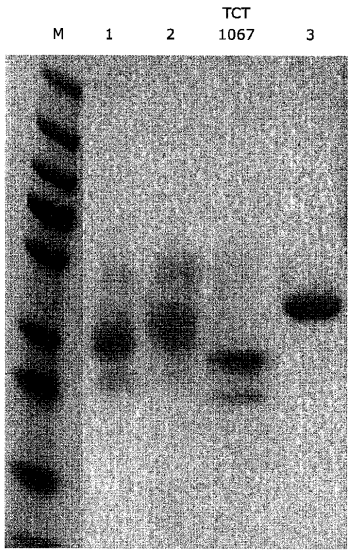
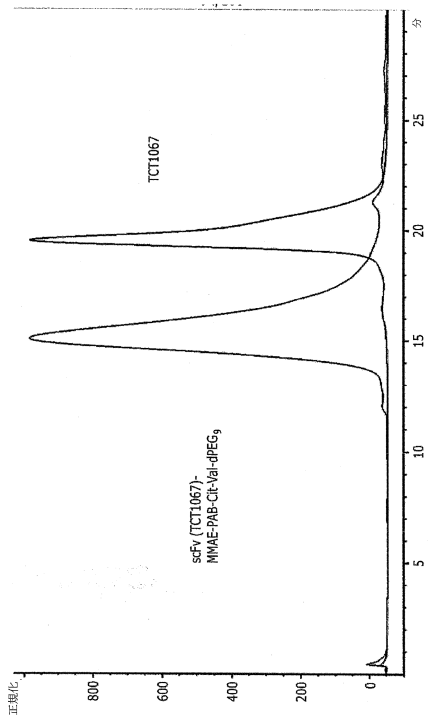
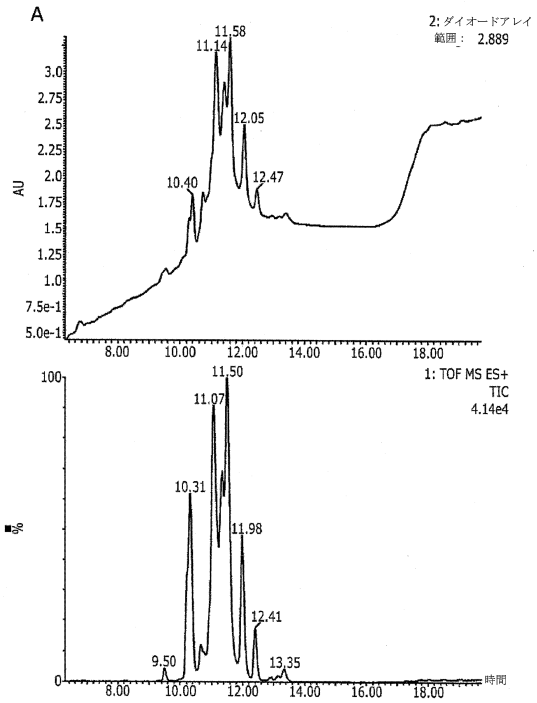


Figure 61

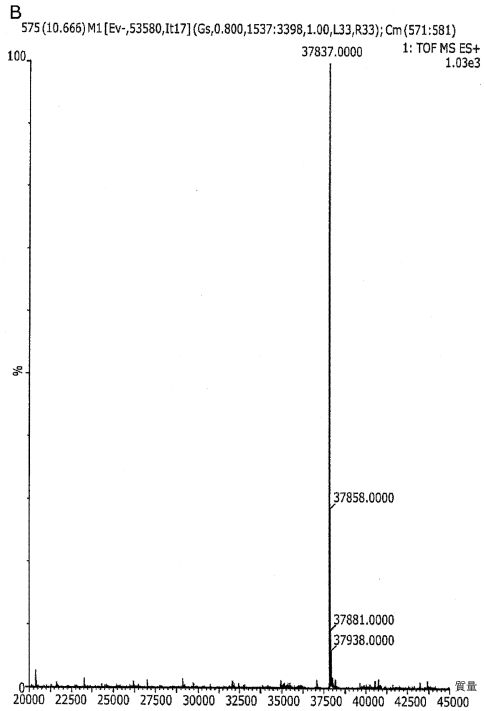
【図６２】



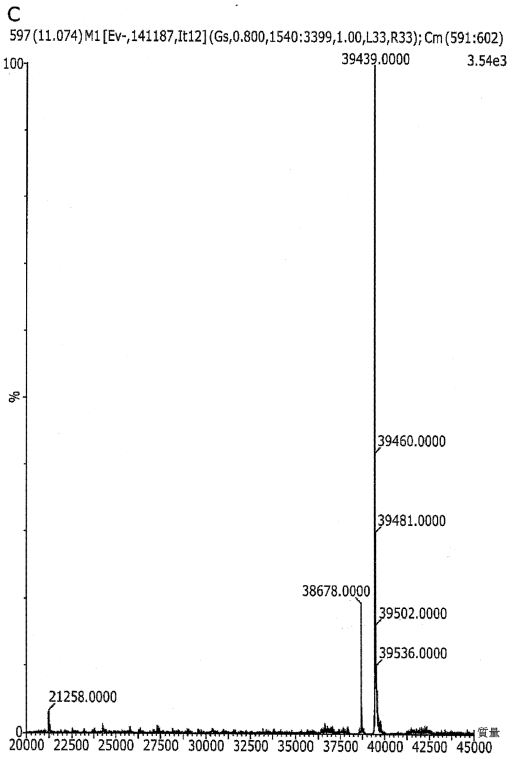
【図６３（１－５）】



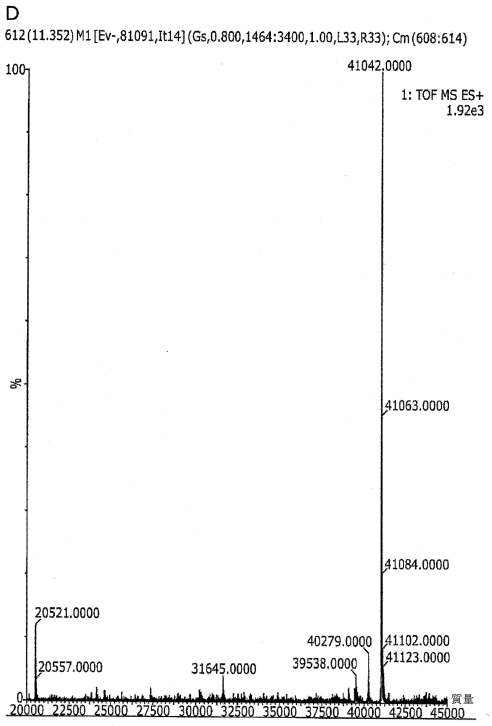
【図６３（２－５）】



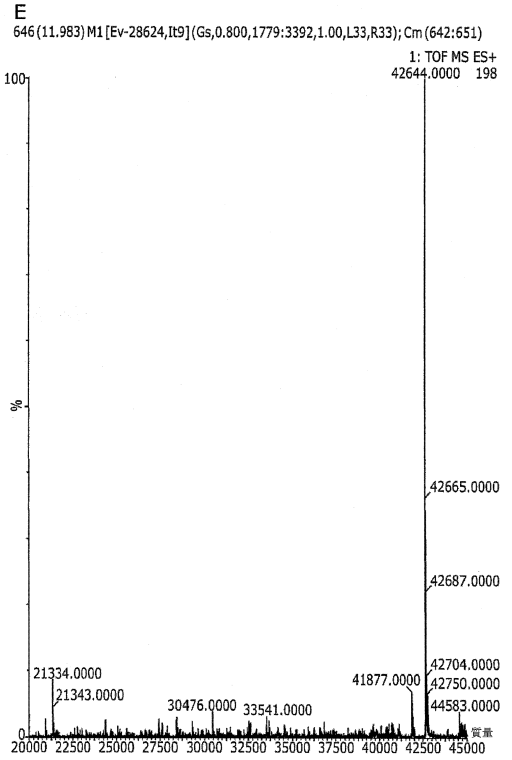
【図６３（３－５）】



【図６３（４－５）】



【図６３（５－５）】



【図６４】

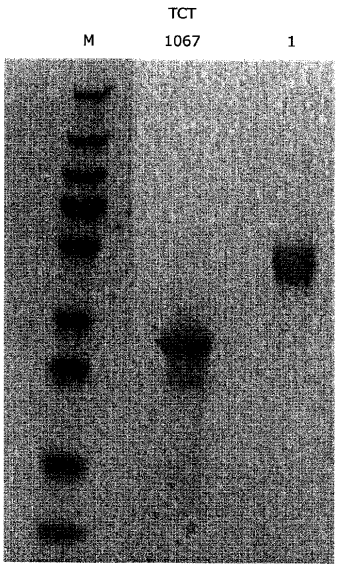
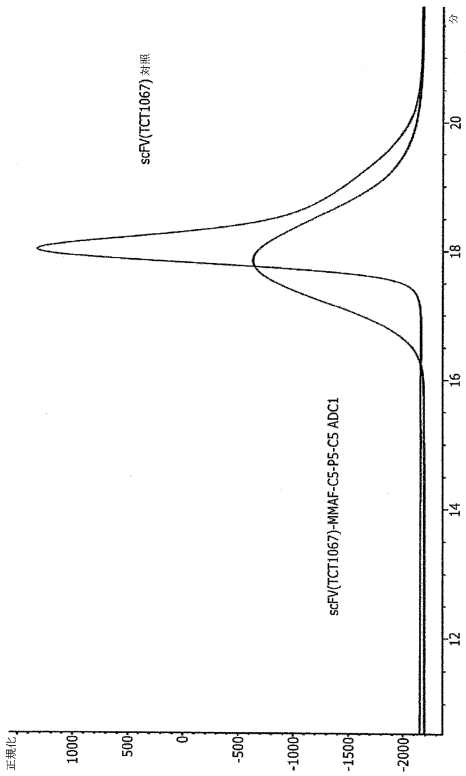
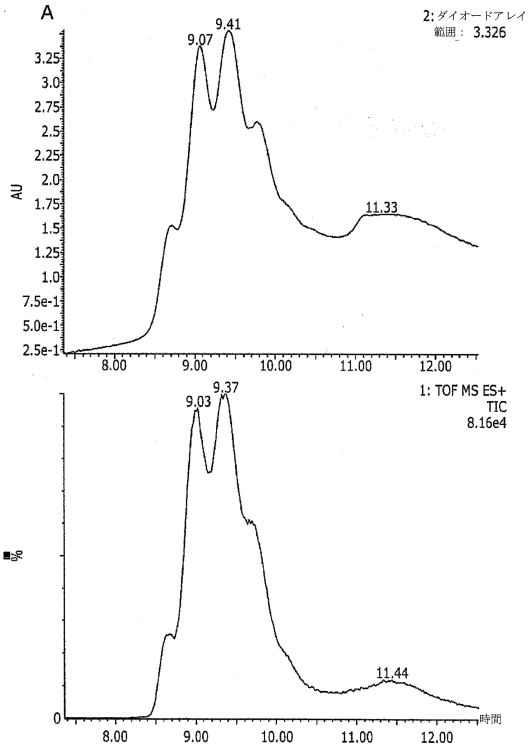


Figure 64

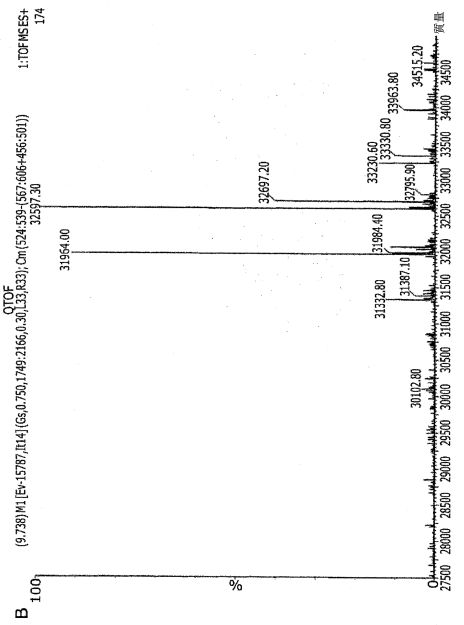
【図６５】



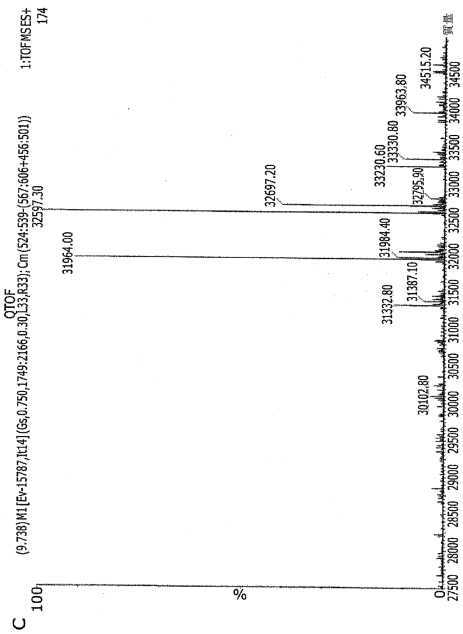
【図６６（１－６）】



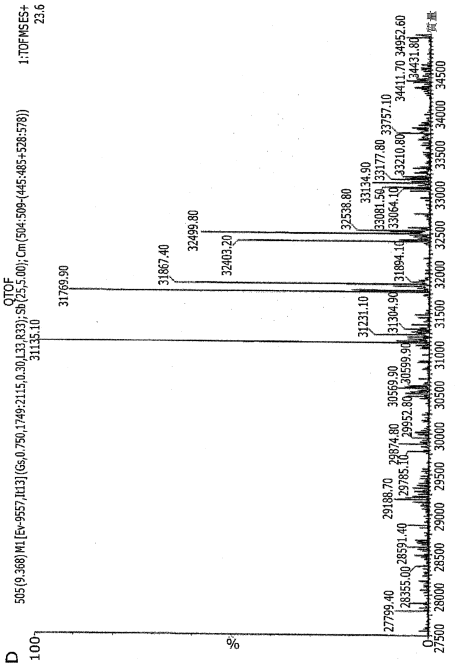
【図６６（２－６）】



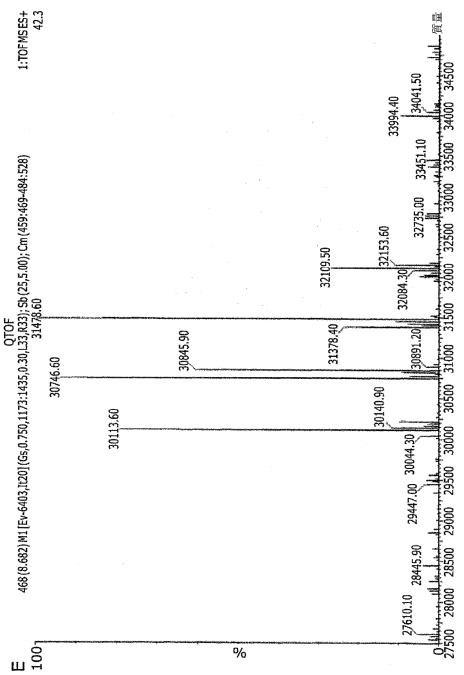
【図６６（３－６）】



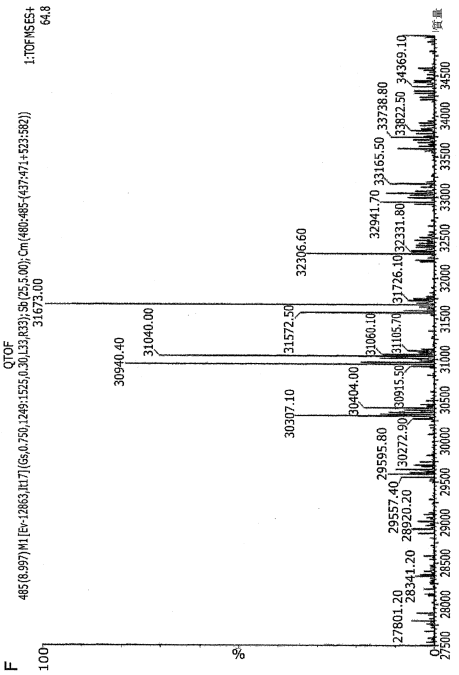
【図６６（４－６）】



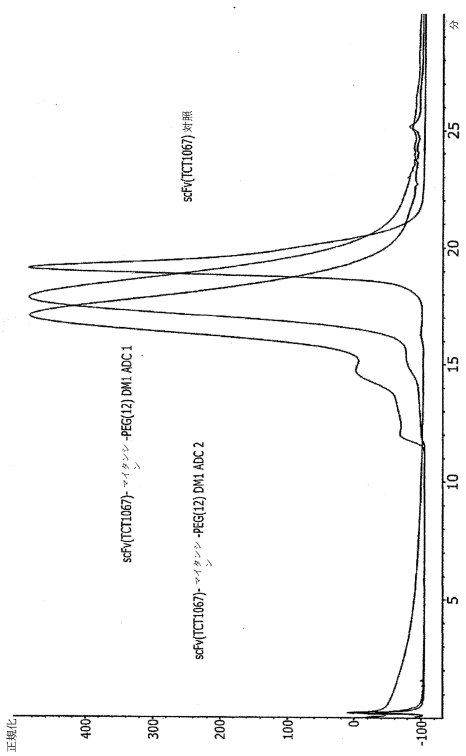
【図６６（５－６）】



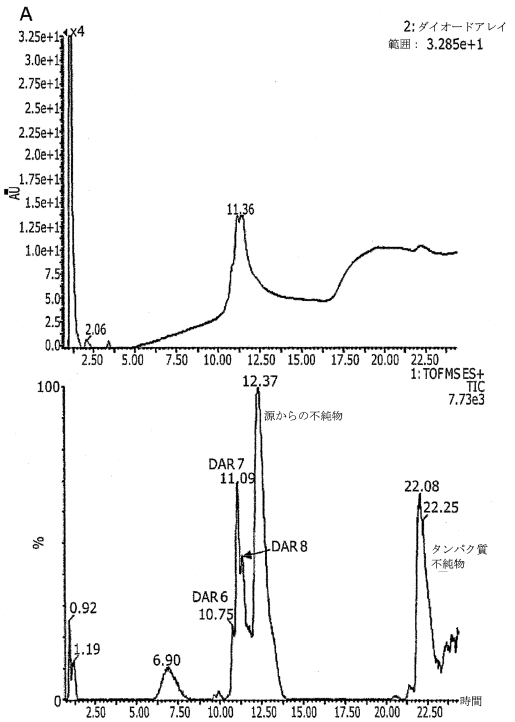
【図６６（６－６）】



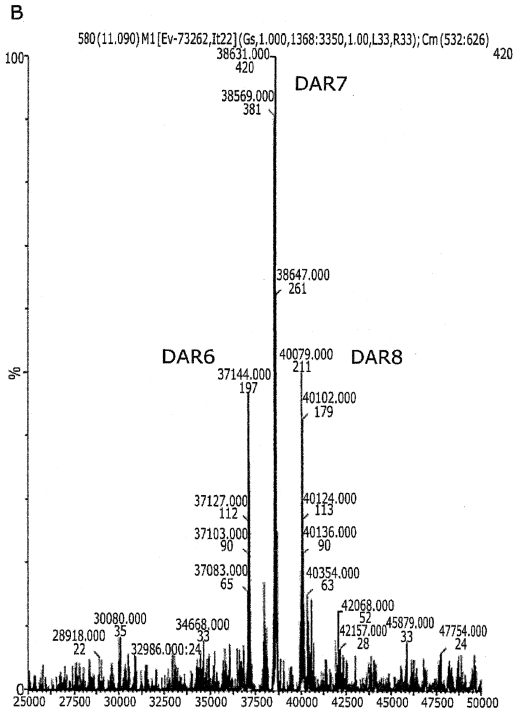
【図６７】



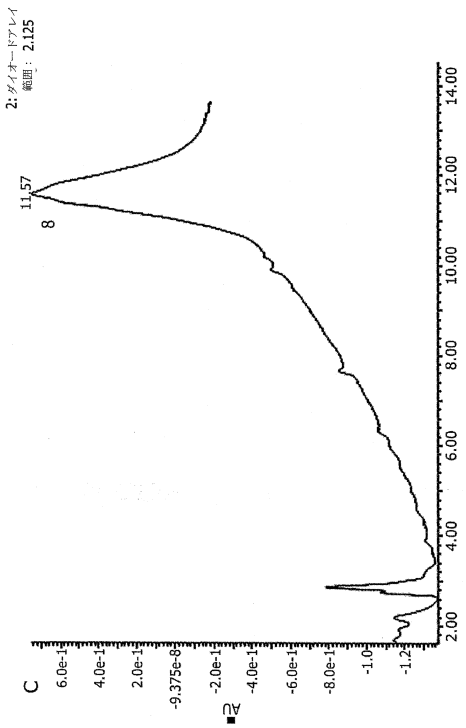
【図６８（１－４）】



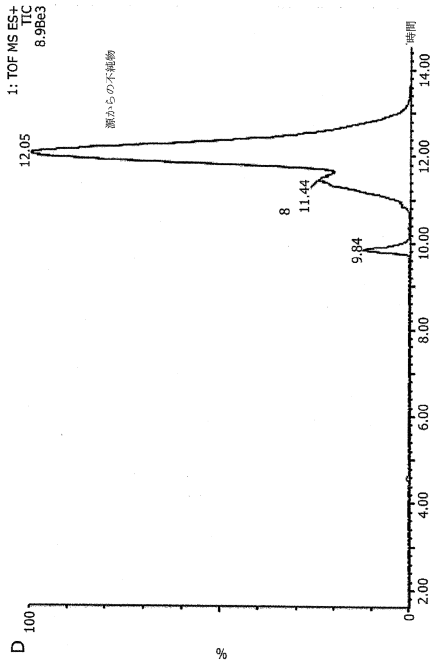
【図６８（２－４）】



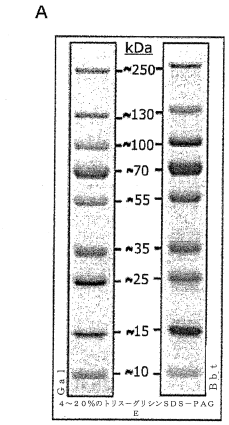
【図６８（３－４）】



【図６８（４－４）】



【図６９Ａ】

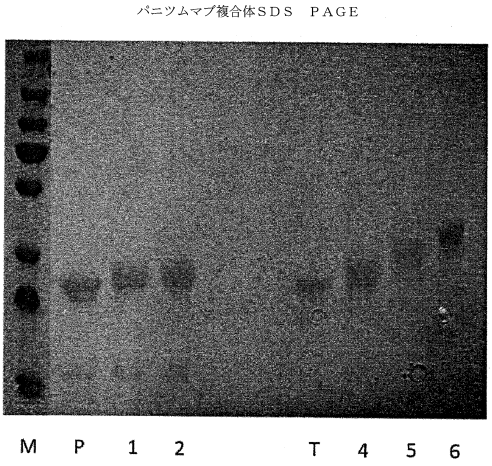


【図６９Ｂ】

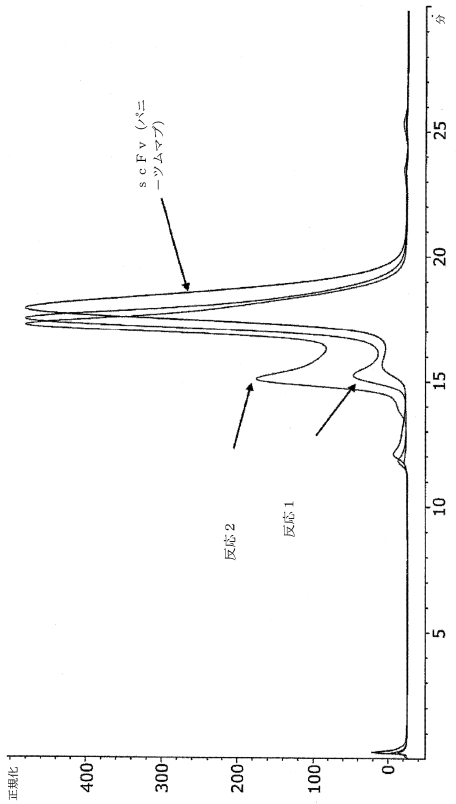


Figure 69B

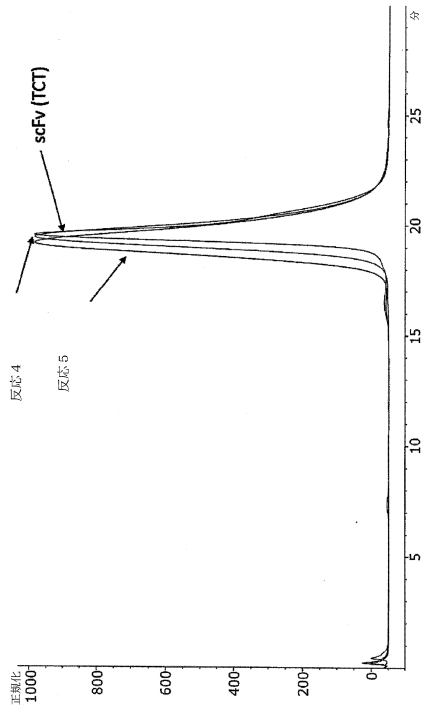
【図７０】



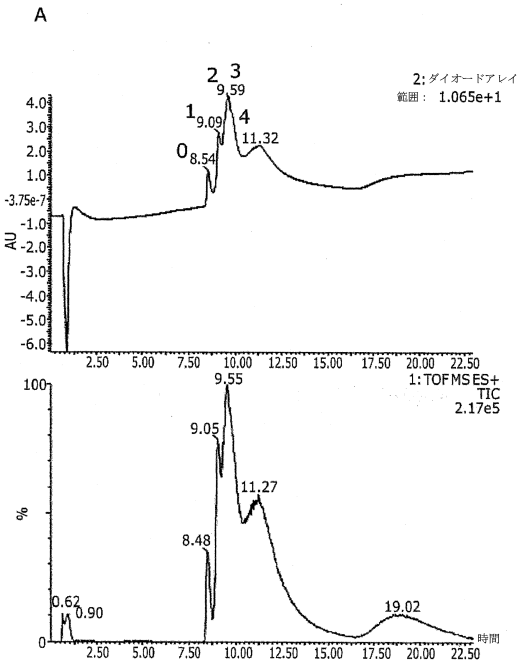
【図７１（１－２）】



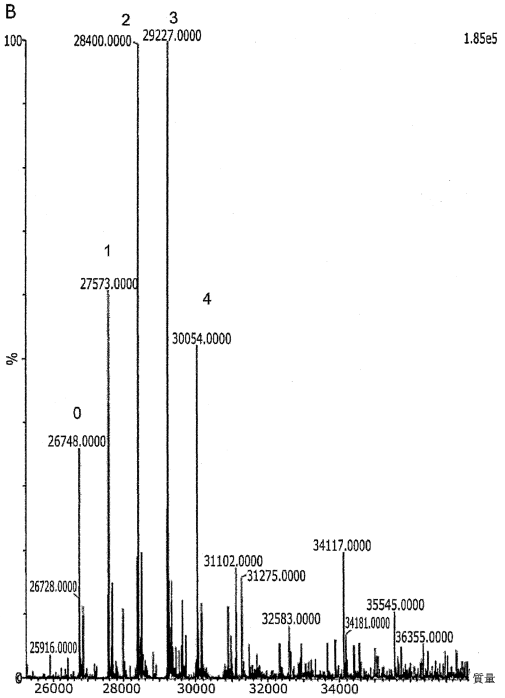
【図７１（２－２）】



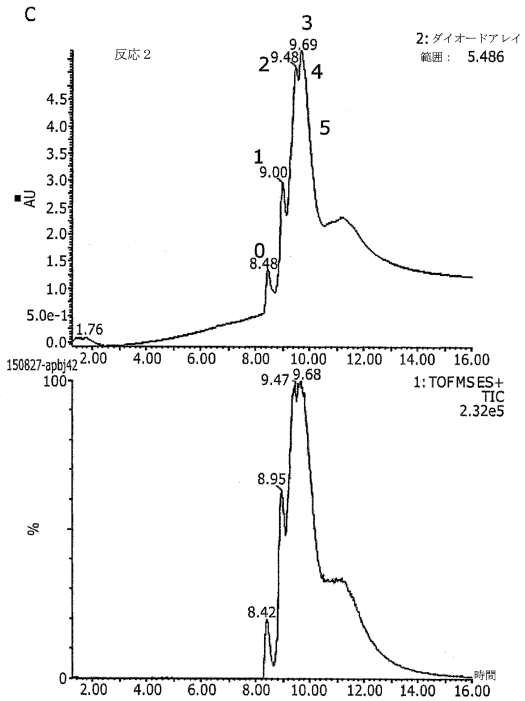
【図７２（１－８）】



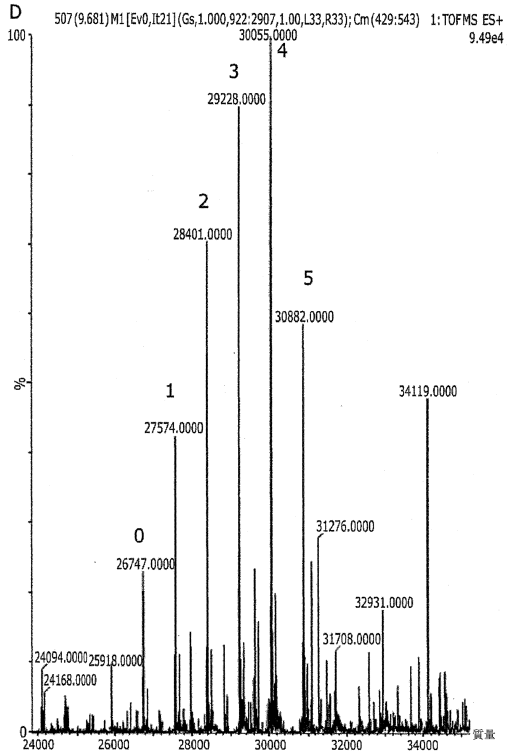
【図７２（２－８）】



【図７２（３－８）】

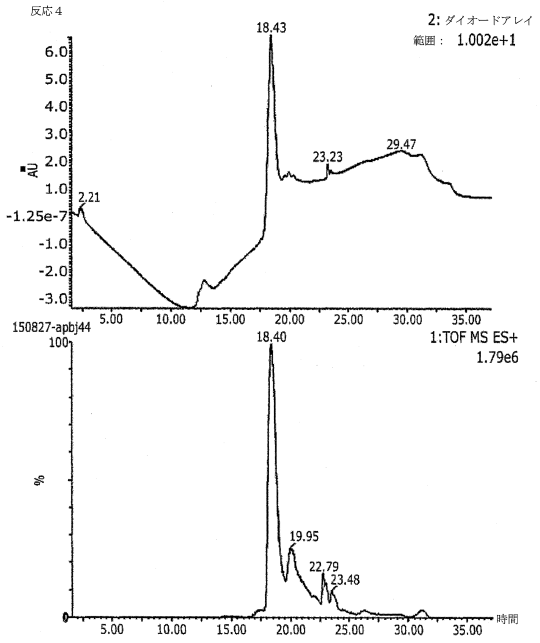


【図７２（４－８）】



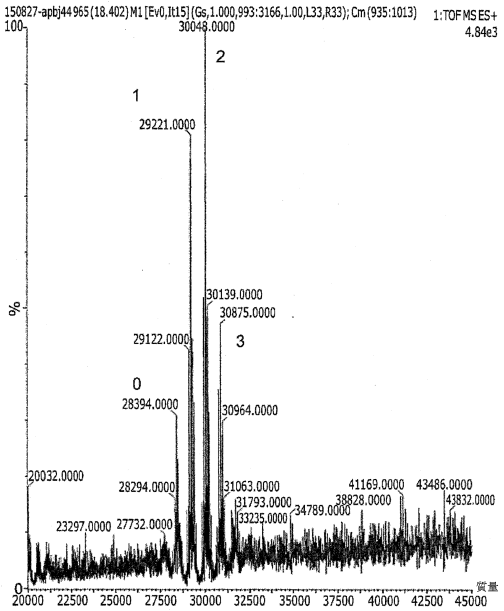
【図７２（５－８）】

E



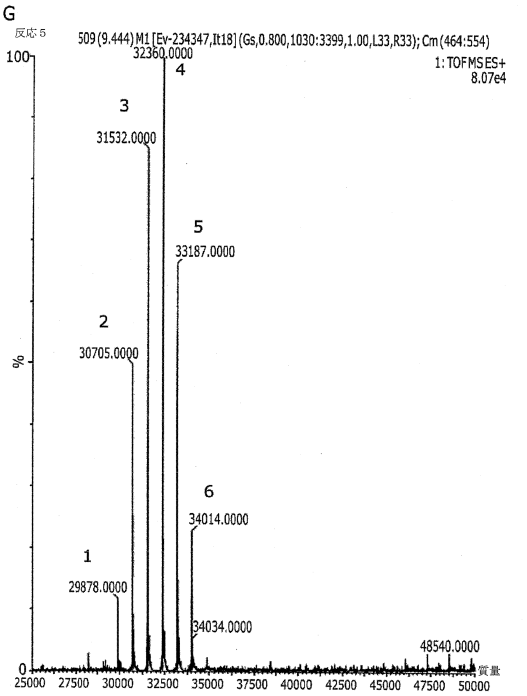
【図７２（６－８）】

F



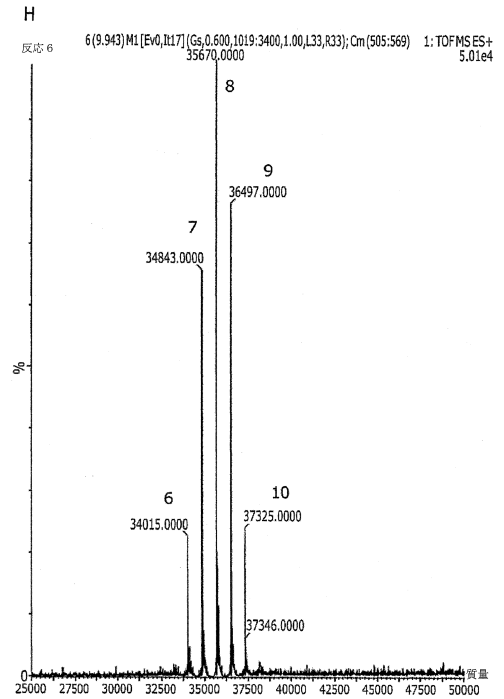
【図７２（７－８）】

G

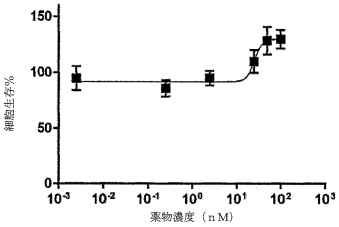


【図７２（８－８）】

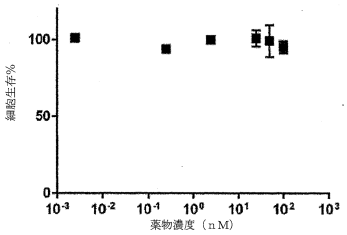
H



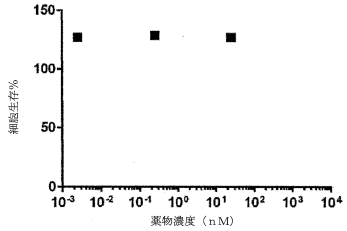
【図７３Ａ】



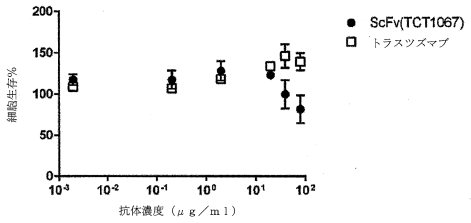
【図７３Ｂ】



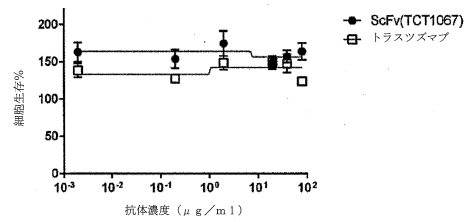
【図７３Ｃ】



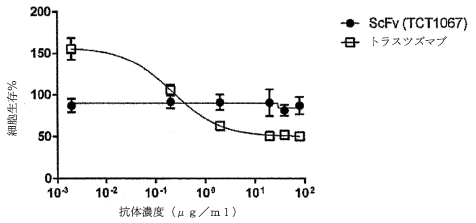
【図７４Ａ】



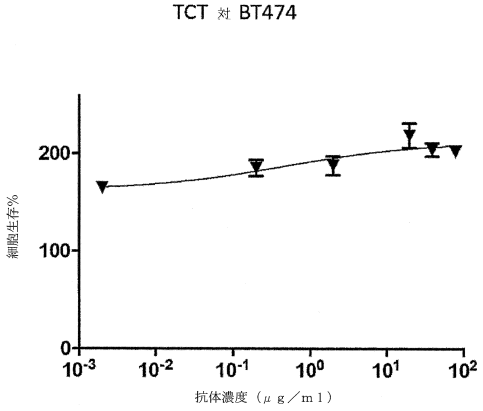
【図７４Ｂ】



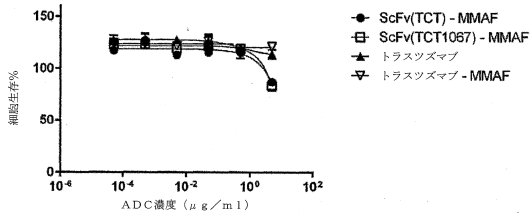
【図７４Ｃ】



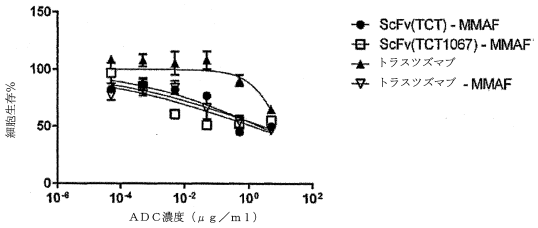
【図７５】



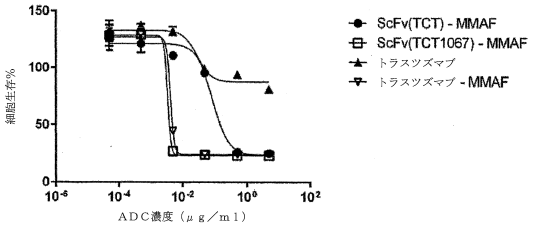
【図７６Ａ】



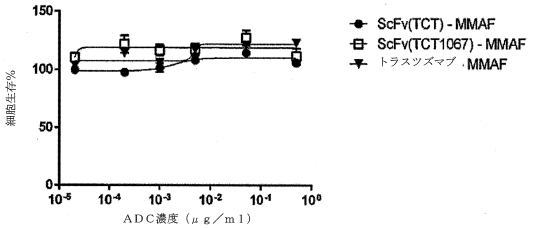
【図７６Ｂ】



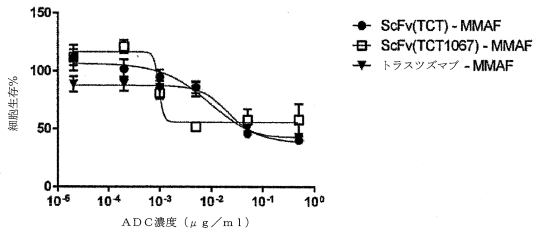
【図７６Ｃ】



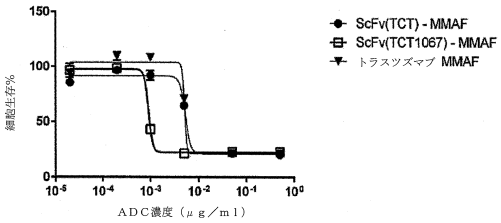
【図７７Ａ】



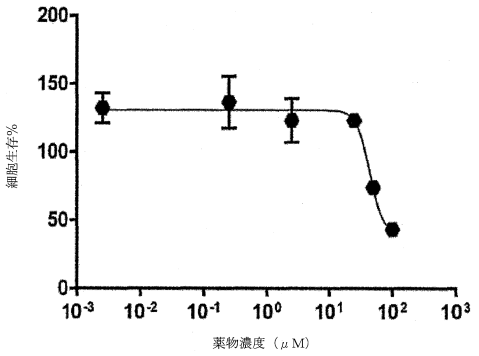
【図７７Ｂ】



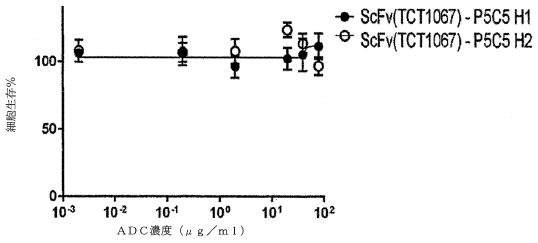
【図７７Ｃ】



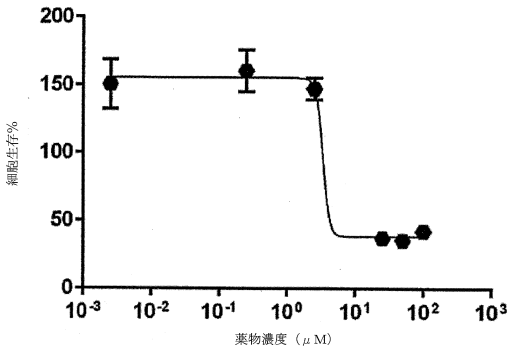
【図７８Ａ】



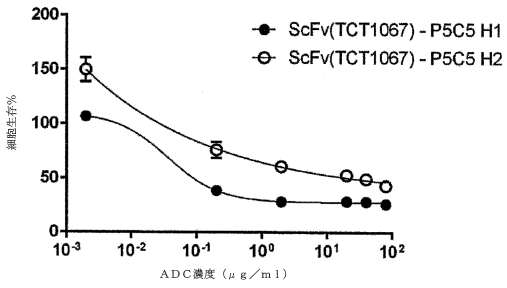
【図７８Ｂ】



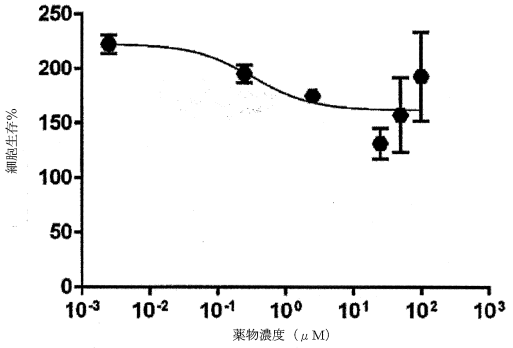
【図７９Ａ】



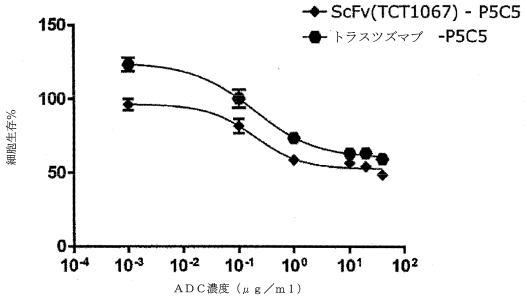
【図７９Ｂ】



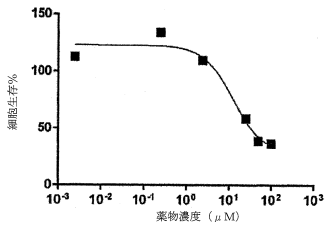
【図８０Ａ】



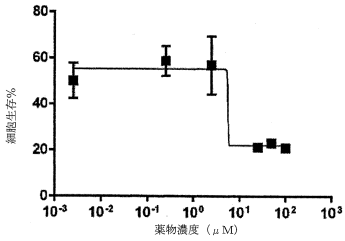
【図８０Ｂ】



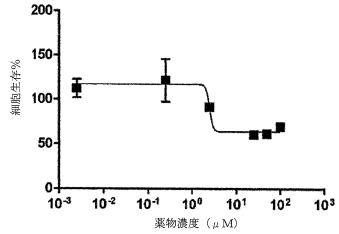
【図８１Ａ】



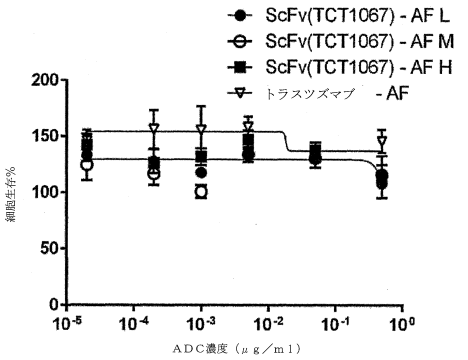
【図８１Ｂ】



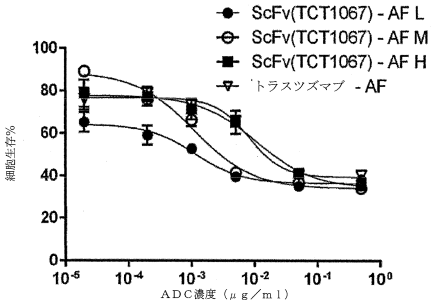
【図８１Ｃ】



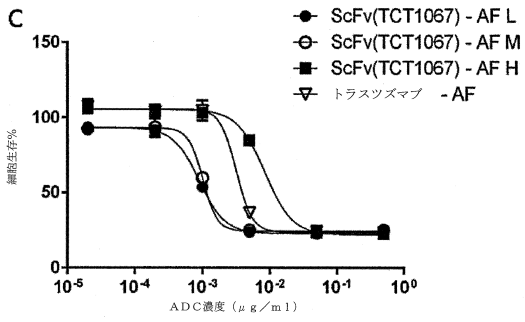
【図８２Ａ】



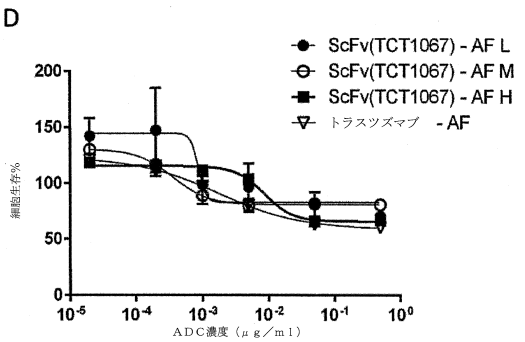
【図８２Ｂ】



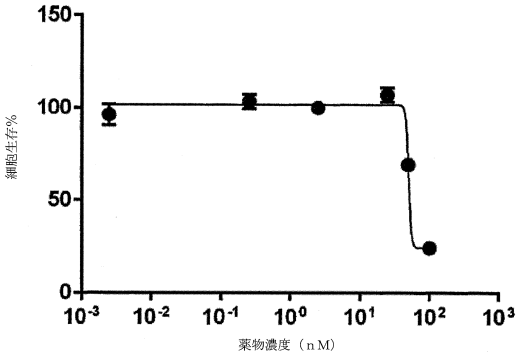
【図８２Ｃ】



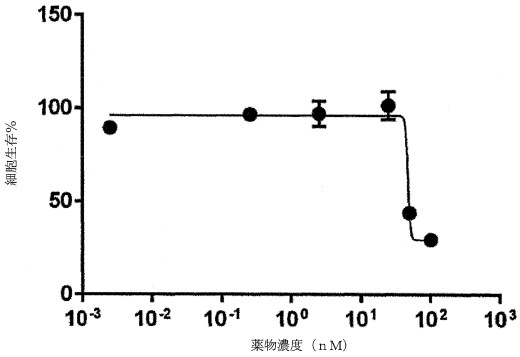
【図８２Ｄ】



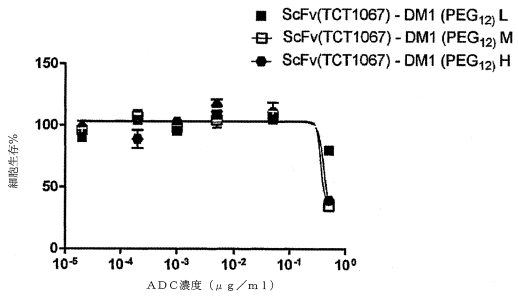
【図８３Ａ】



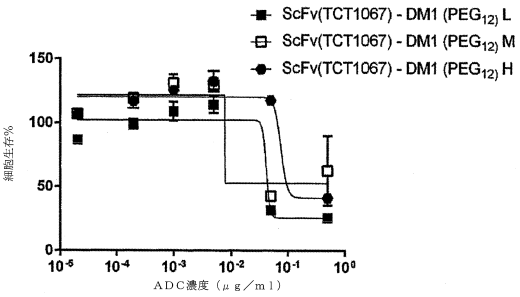
【図８３Ｂ】



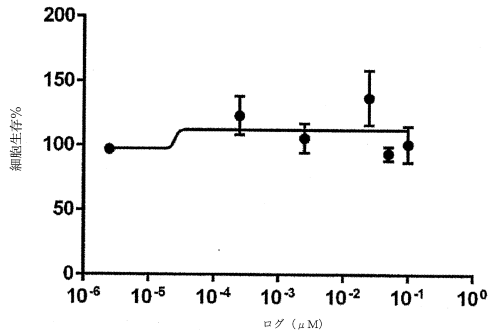
【図８４Ａ】



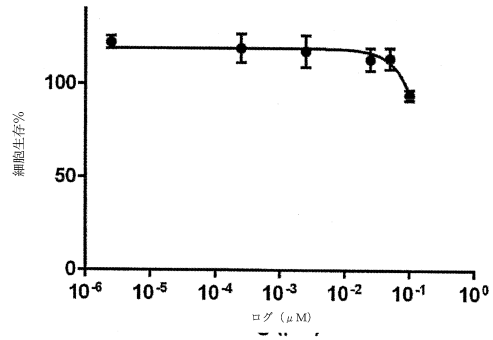
【図８４Ｂ】



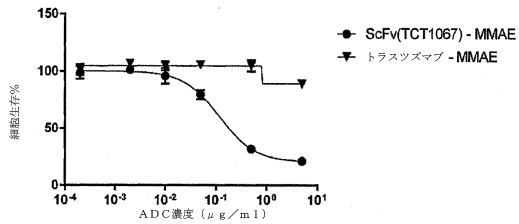
【図８５Ａ】



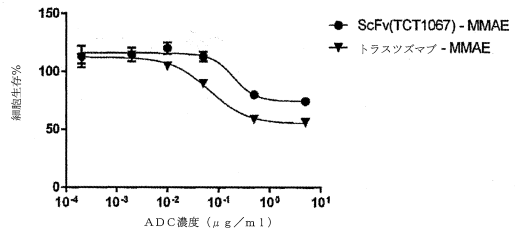
【図８５Ｂ】



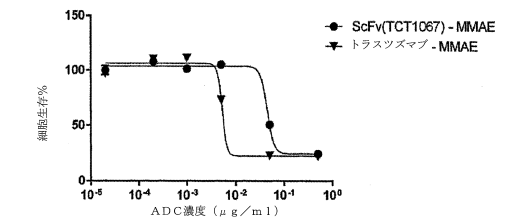
【図８６Ａ】



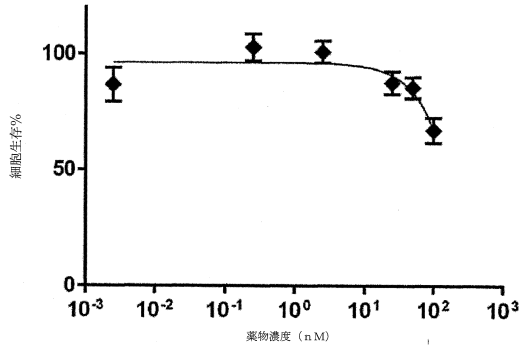
【図８６Ｂ】



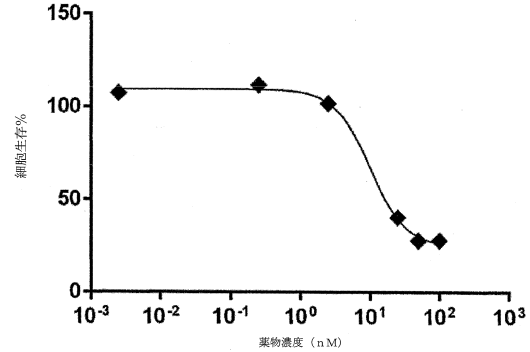
【図８６Ｃ】



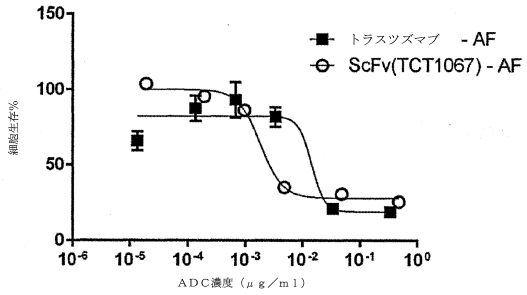
【図８７Ａ】



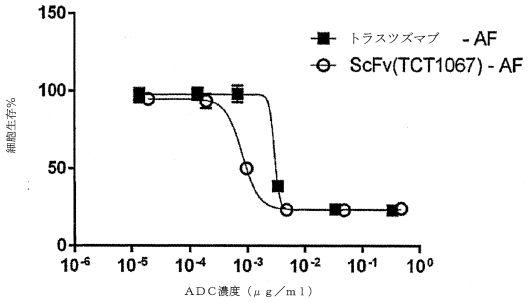
【図８７Ｂ】



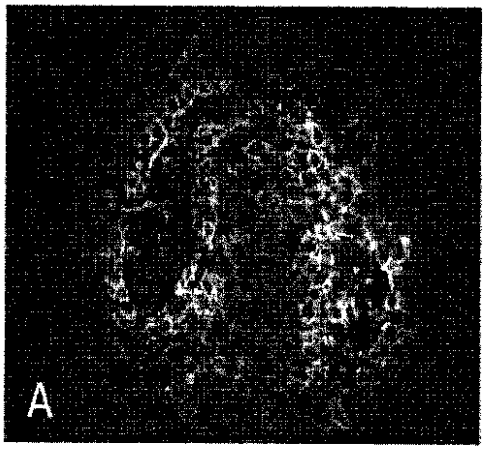
【図８８Ａ】



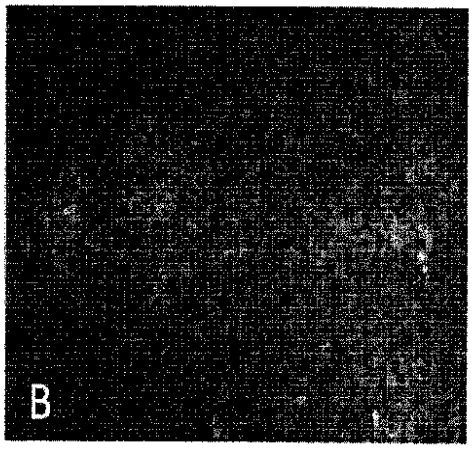
【図８８Ｂ】



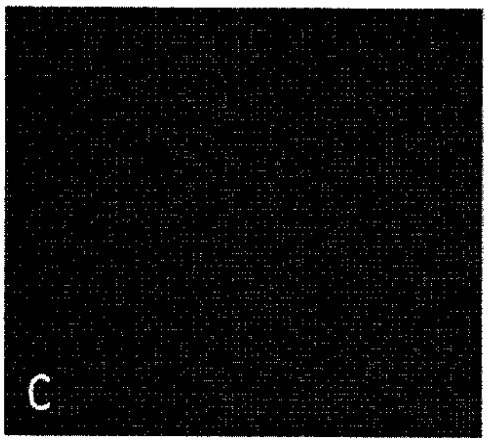
【図８９Ａ】



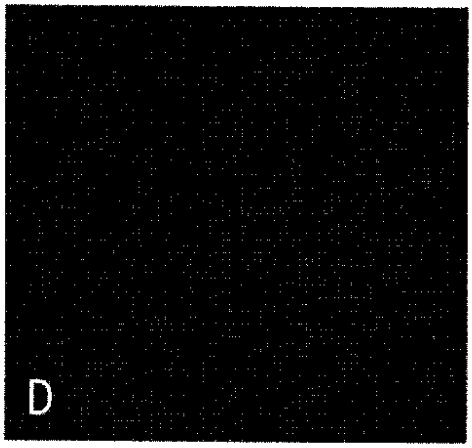
【図８９Ｂ】



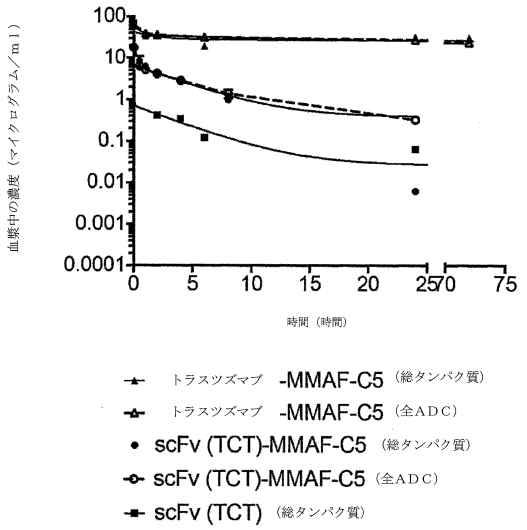
【図８９Ｃ】



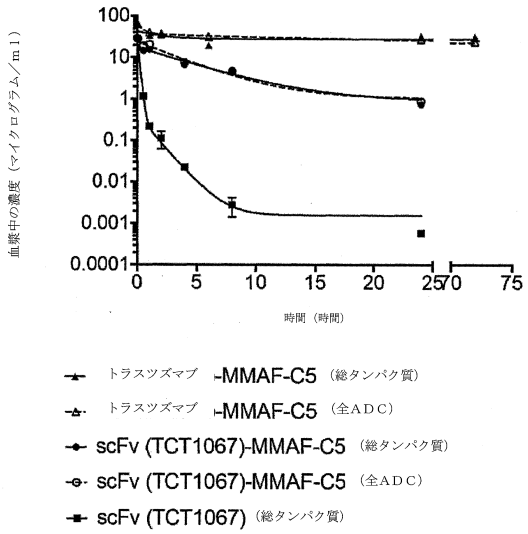
【図８９Ｄ】



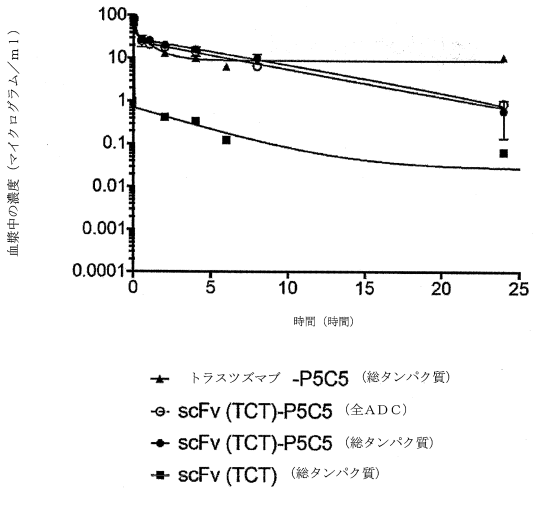
【図９０】



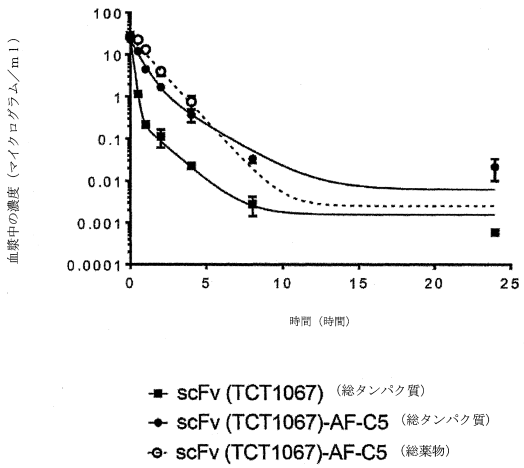
【図９１】



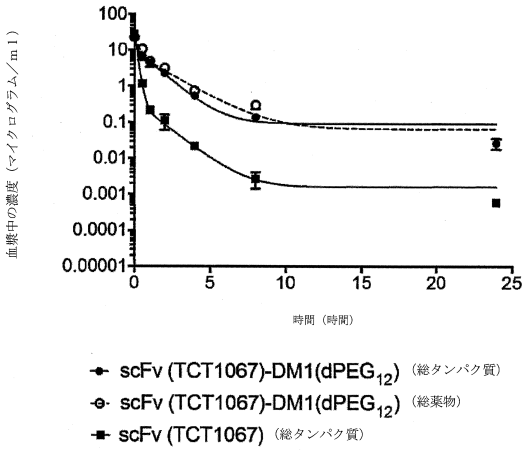
【図９２】



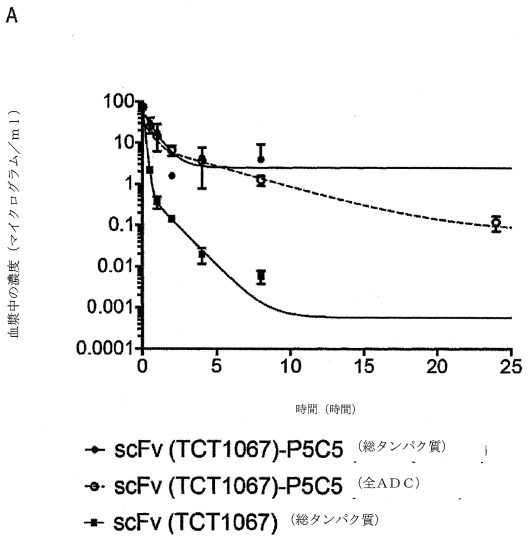
【図９３】



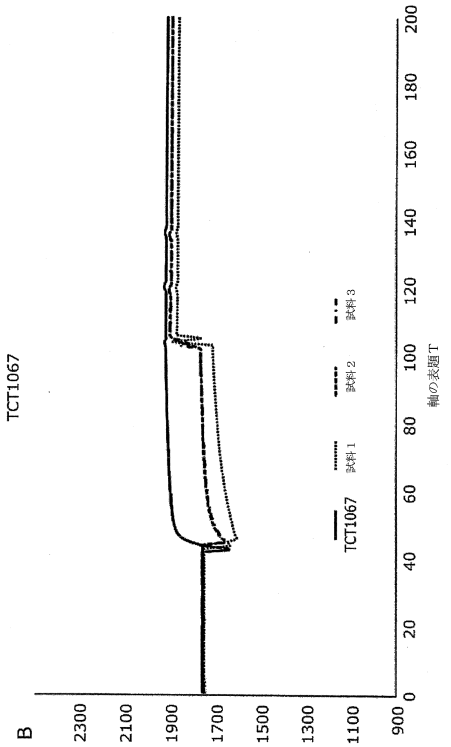
【図９４】



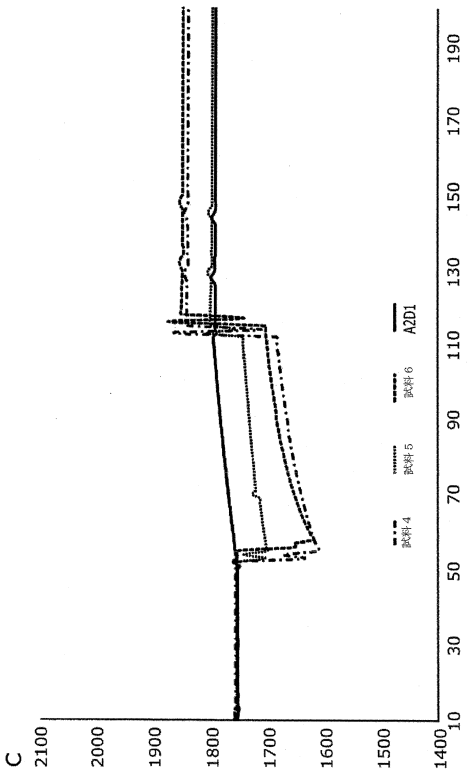
【図９５（１－３）】



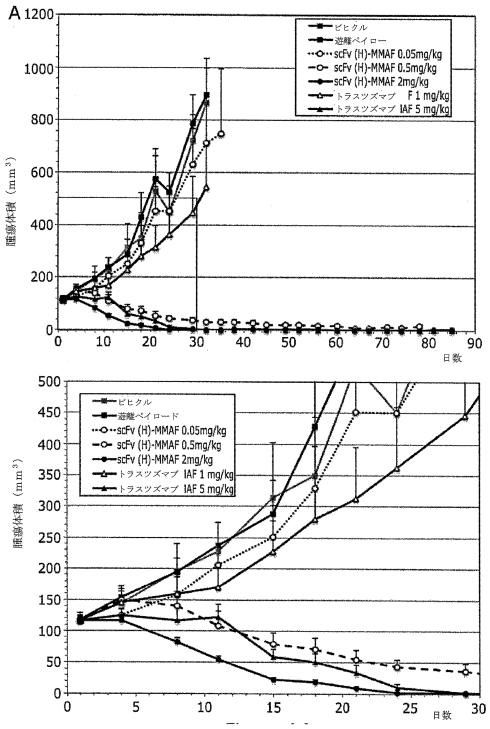
【図９５（２－３）】



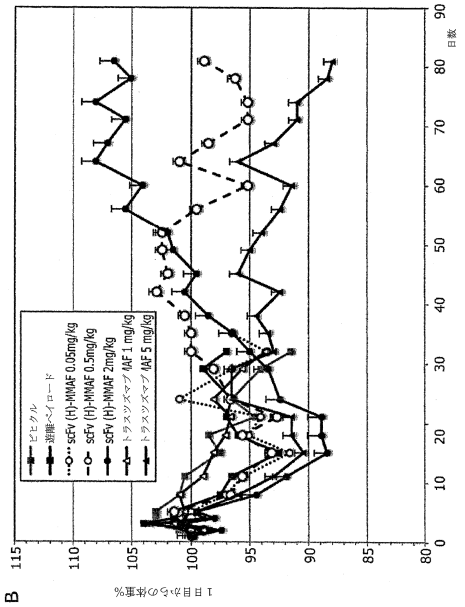
【図９５（３－３）】



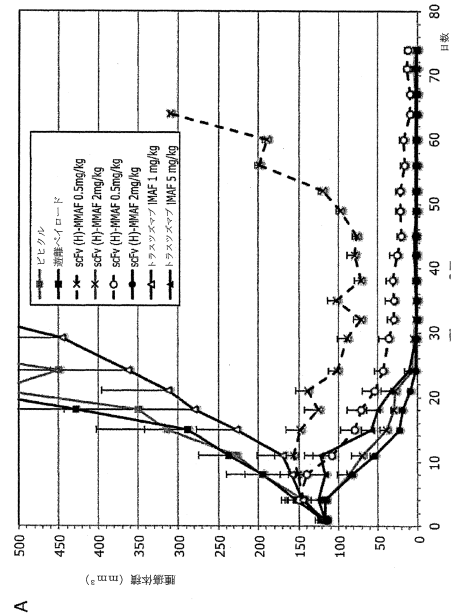
【図９６（１－２）】



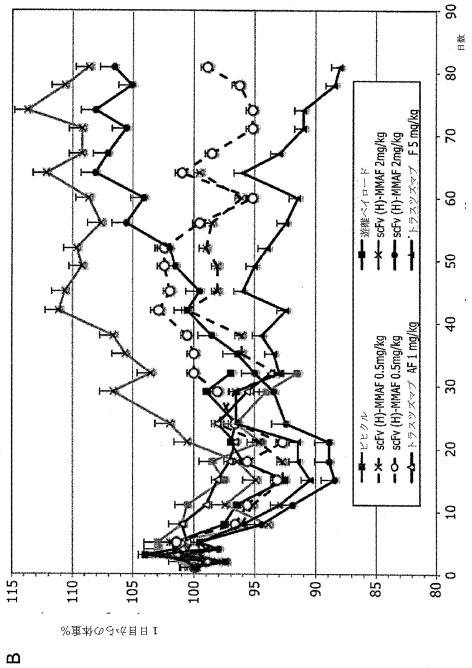
【図９６（２－２）】



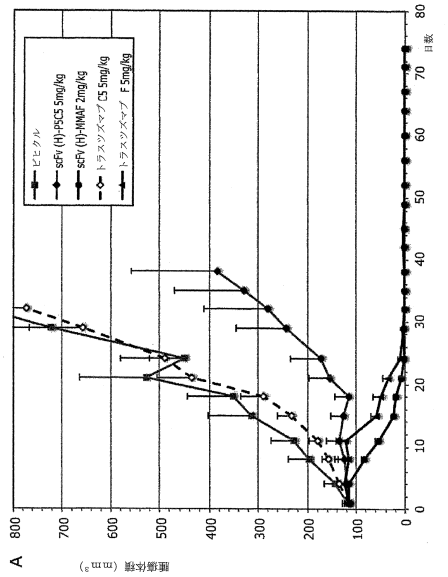
【図９７（１－２）】



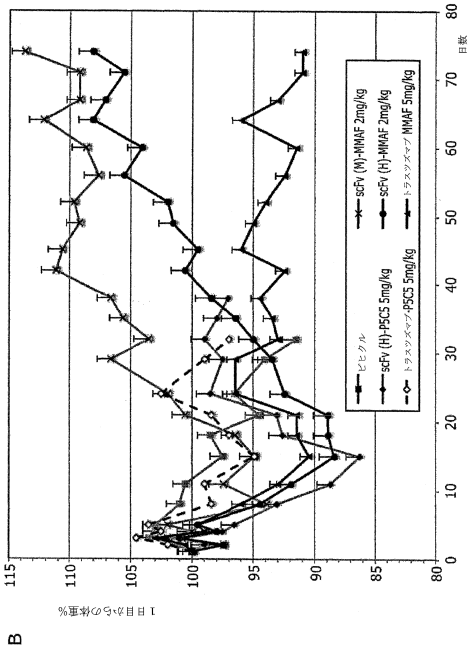
【図９７（２－２）】



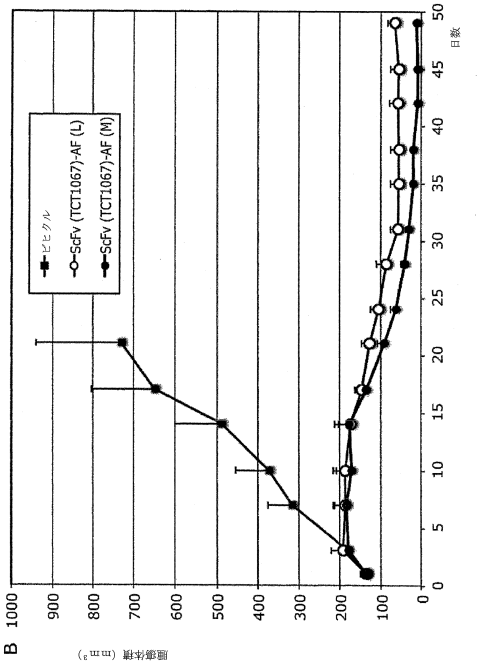
【図９８（１－２）】



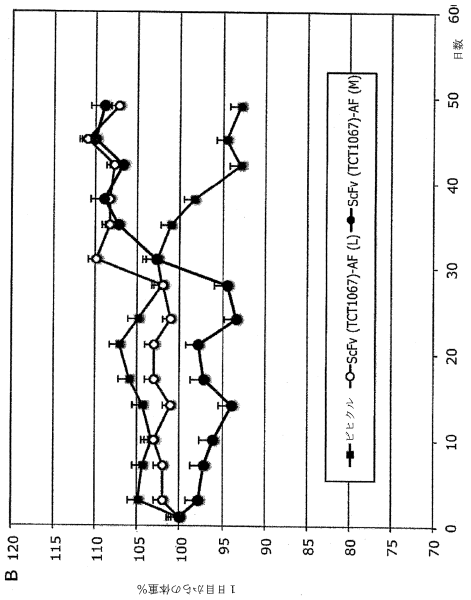
【図９８（２－２）】



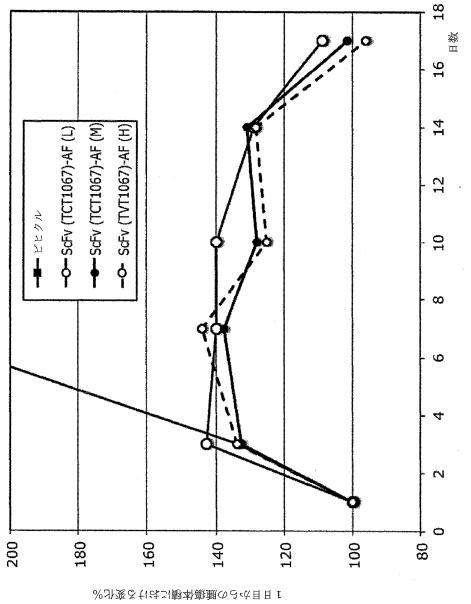
【図９９（１－２）】



【図９９（２－２）】



【図１００】



【図１０１】

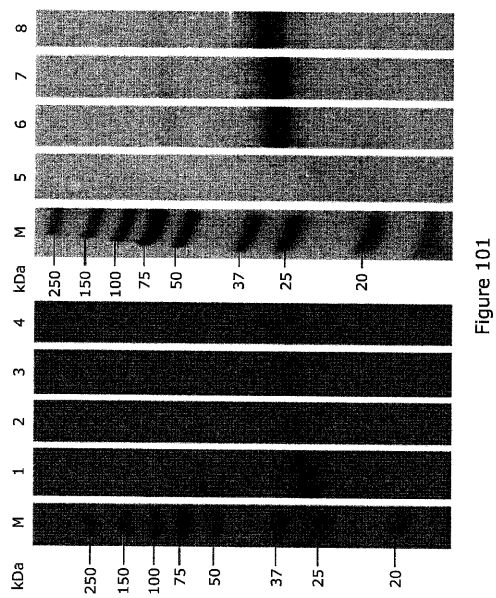
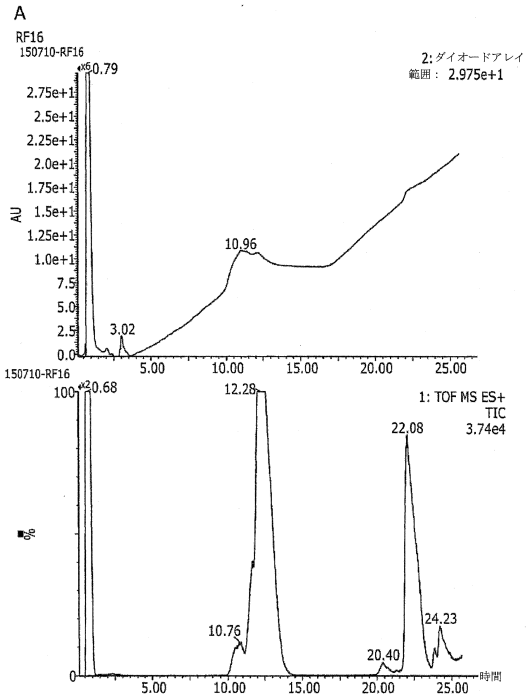
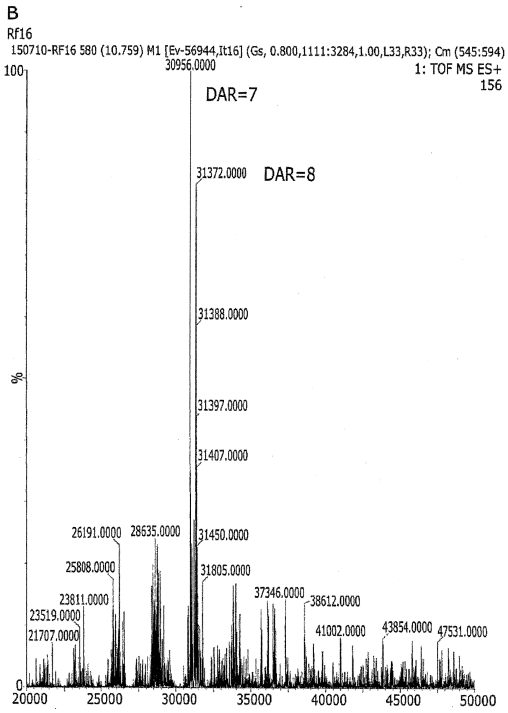


Figure 101

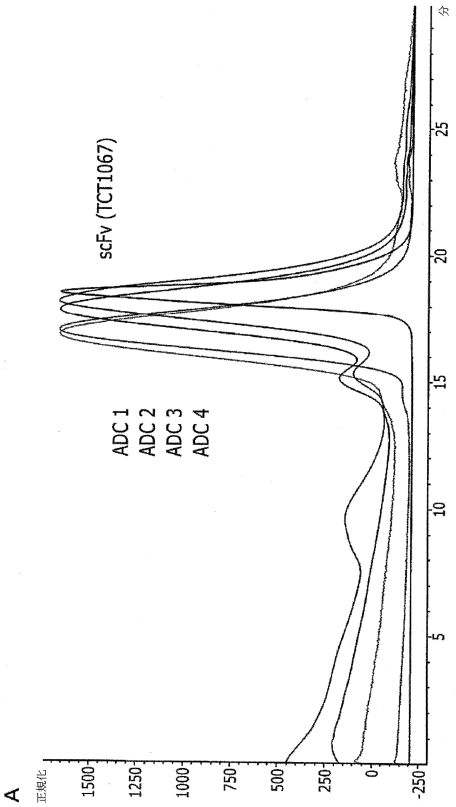
【図１０２（１－２）】



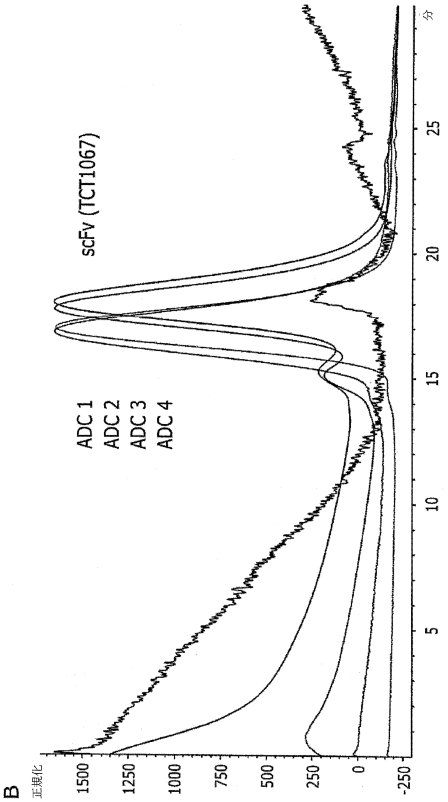
【図１０２（２－２）】



【図１０３（１－２）】



【図１０３（２－２）】



【図１０４】

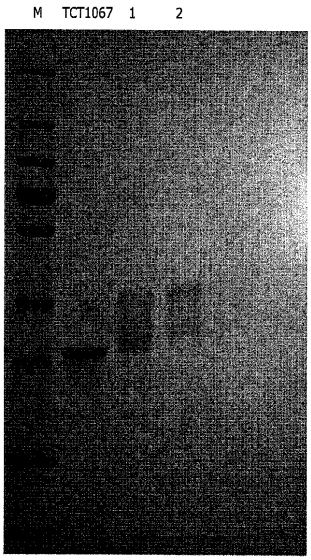
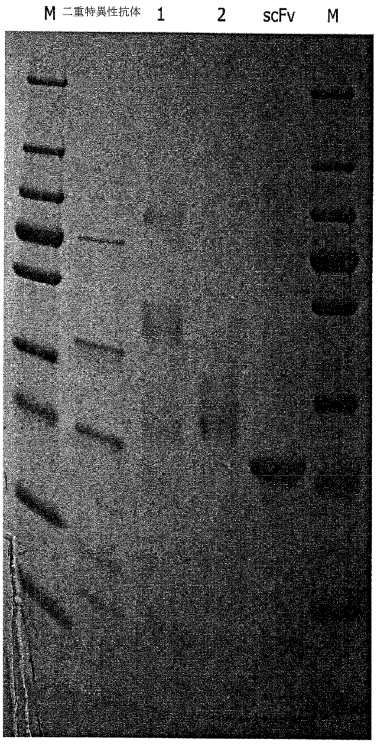


Figure 104

【図１０５】



【配列表】

0006947630000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI	
A61K 45/00	***(2006.01)***	A61K	49/00
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61K	45/00
A61P 31/00	***(2006.01)***	A61P	35/00
A61P 31/12	***(2006.01)***	A61P	31/00
A61P 31/04	***(2006.01)***	A61P	31/12
A61P 31/10	***(2006.01)***	A61P	31/04
A61P 33/00	***(2006.01)***	A61P	31/10
A61P 33/10	***(2006.01)***	A61P	33/00
A61P 33/14	***(2006.01)***	A61P	33/10
A61P 37/06	***(2006.01)***	A61P	33/14
A61P 9/00	***(2006.01)***	A61P	37/06
A61K 38/08	***(2019.01)***	A61P	9/00
A61K 31/704	***(2006.01)***	A61K	38/08
A61K 31/475	***(2006.01)***	A61K	31/704
A61K 38/05	***(2006.01)***	A61K	31/475
A61K 31/537	***(2006.01)***	A61K	38/05
A61K 31/5517	***(2006.01)***	A61K	31/537
A61K 31/4745	***(2006.01)***	A61K	31/5517
A61K 31/404	***(2006.01)***	A61K	31/4745
A61K 31/337	***(2006.01)***	A61K	31/404
		A61K	31/337

(72)発明者 ヤヒオグル，ゴクハン
イギリス，エヌ２１ １エーユー ロンドン，ウェイズ ヒル ８１
(72)発明者 スタマティ，イオアナ
イギリス，エヌダブリュー３ ６キューディー ロンドン，ラングランド ガーデンズ ５，フラット ２
(72)発明者 サオウロス，サッヴァス
イギリス，エスダブリュー７ ２ビービー ロンドン，プリンス コンソート ロード，ベイトホール，ウォーデン フラット
(72)発明者 カパドニス，プラシャント ビムラオ
イギリス，シーエム２０ ２ジェイジー ハーロウ エセックス，エディンバラ ゲート，４０マイル コート

審査官 安川 聡

(56)参考文献 特表２００９－５１１４５６（ＪＰ，Ａ）
特表２００５－５０１８５３（ＪＰ，Ａ）
RAVI V J CHARI; ET AL, ANTIBODY-DRUG CONJUGATES: AN EMERGING CONCEPT IN CANCER THERAPY, ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, VERLAG CHEMIE, 2014年04月07日, VOL:53, NR:15, PAGE(S):3796 - 3827, http://dx.doi.org/10.1002/anie.201307628

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ
Ｃ０７Ｋ
Ａ６１Ｋ
Ａ６１Ｐ

JSTPlus／JMEDPlus／JST7580（JDreamIII）
CAplus／MEDLINE／EMBASE／BIOSIS／WPIDS（STN）