

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6828056号  
(P6828056)

(45) 発行日 令和3年2月10日(2021.2.10)

(24) 登録日 令和3年1月22日(2021.1.22)

|                          |                     |
|--------------------------|---------------------|
| (51) Int.Cl.             | F I                 |
| A 6 1 K 47/68 (2017.01)  | A 6 1 K 47/68       |
| C 0 7 K 16/28 (2006.01)  | C 0 7 K 16/28 Z N A |
| A 6 1 K 47/65 (2017.01)  | A 6 1 K 47/65       |
| A 6 1 K 31/40 (2006.01)  | A 6 1 K 31/40       |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 L    |
| 請求項の数 10 (全 35 頁) 最終頁に続く |                     |

|                    |                               |           |                                |
|--------------------|-------------------------------|-----------|--------------------------------|
| (21) 出願番号          | 特願2018-560708 (P2018-560708)  | (73) 特許権者 | 518277549                      |
| (86) (22) 出願日      | 平成29年2月4日(2017.2.4)           |           | 浙江昭華生物医薬有限公司                   |
| (65) 公表番号          | 特表2019-508495 (P2019-508495A) |           | 中国浙江省杭州市富陽区富閑路9号銀湖創<br>新中心15号楼 |
| (43) 公表日           | 平成31年3月28日(2019.3.28)         | (74) 代理人  | 110000796                      |
| (86) 国際出願番号        | PCT/CN2017/072888             |           | 特許業務法人三枝国際特許事務所                |
| (87) 国際公開番号        | W02017/133682                 | (72) 発明者  | 苗振偉                            |
| (87) 国際公開日         | 平成29年8月10日(2017.8.10)         |           | 中国浙江省杭州市富陽区富閑路9号銀湖創<br>新中心15号楼 |
| 審査請求日              | 平成30年10月3日(2018.10.3)         | (72) 発明者  | 朱同                             |
| (31) 優先権主張番号       | 201610079677.8                |           | 中国浙江省杭州市富陽区富閑路9号銀湖創<br>新中心15号楼 |
| (32) 優先日           | 平成28年2月4日(2016.2.4)           | (72) 発明者  | アリシエル ビー. カサノフ                 |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 中国 (CN)                       |           | 中国浙江省杭州市富陽区富閑路9号銀湖創<br>新中心15号楼 |
|                    |                               | 最終頁に続く    |                                |

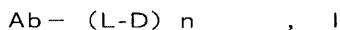
(54) 【発明の名称】 抗HER2抗体-薬物抱合体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

構造がIで表されることを特徴とする抗体-薬物抱合体またはその薬学的に許容される塩

【化1】



(ここで、Abは前記抗体である。

Lは、なし又は前記抗体と後記薬物とを連結するリンカーである。

Dは、腫瘍細胞を抑制する小分子薬物である。

nは、前記抗体-薬物抱合体における前記薬物の平均抱合数で、かつ1.8 ≤ n ≤ 2である。

「-」は結合である。)

であって、

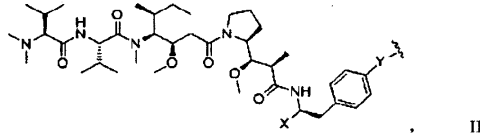
前記抗体-薬物抱合体の軽鎖定常領域にEKHモチーフが含まれ、かつ前記薬物分子が前記モチーフのリシン(K)部位に連結し、

前記抗体は、ペルツズマブまたはそのバイオシミラーであることを特徴とする、抗体-薬物抱合体又はその塩。

【請求項2】

Dの構造が、下記式IIで表されることを特徴とする、請求項1に記載の抗体-薬物抱合体又はその塩；

## 【化2】

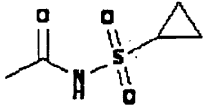


(式IIにおいて、YはO、またはNHである。

波線はLとの連結部位を表す。

XはCH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>または

## 【化3】



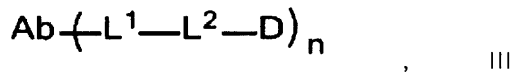
10

である。 )。

## 【請求項3】

構造が、式IIIで表されることを特徴とする請求項1に記載の抗体-薬物抱合体又はその塩；

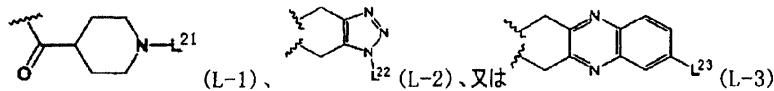
## 【化4】



20

(式IIIにおいて、前記L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>の構造はL-1、L-2、およびL-3からなる群から選ばれる。

## 【化5】



ここで、L<sup>21</sup>、L<sup>22</sup>、L<sup>23</sup>は独立にVal-Cit、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-、Ala-Ala-Asn、またはこれらの組み合わせからなる群から選ばれるリンカーである。

Ab、D、nは前記の通りである。

波線は抗体との連結部位を表す。 )。

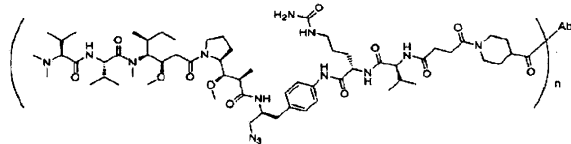
## 【請求項4】

30

ZV0201、ZV0202、ZV0203、ZV0204、ZV0205、ZV0230、ZV0207、ZV0231、ZV0232からなる群から選ばれることを特徴とする、請求項1に記載の抗体-薬物抱合体又はその塩；

(ここで、抱合体ZV0203の構造は以下に示す。

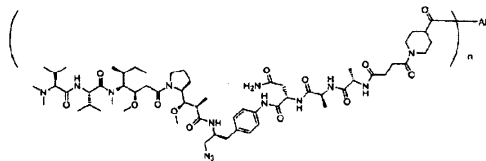
## 【化6】



抱合体ZV0230の構造は以下に示す。

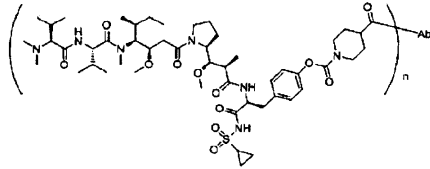
## 【化7】

40



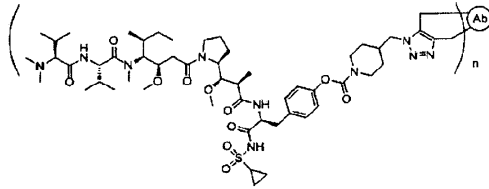
抱合体ZV0201の構造は以下に示す。

【化 8】



抱合体ZV0207の構造は以下に示す。

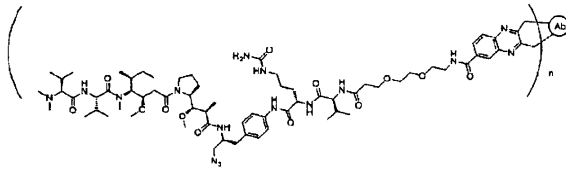
【化 9】



10

抱合体ZV0231の構造は以下に示す。

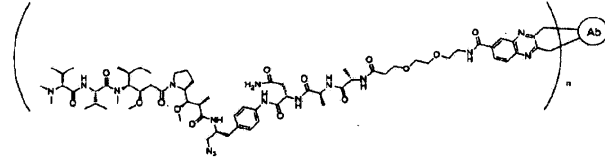
【化 1 0】



20

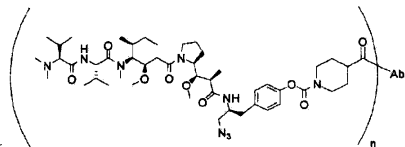
抱合体ZV0232の構造は以下に示す。

【化 1 1】



抱合体ZV0202の構造は以下に示す。

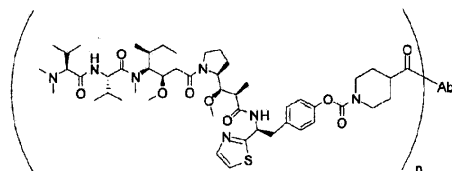
【化 1 2】



30

抱合体ZV0204の構造は以下に示す。

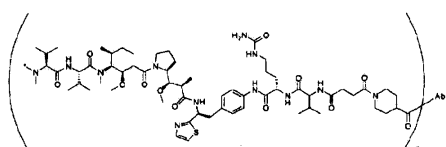
【化 1 3】



40

抱合体ZV0205の構造は以下に示す。

【化 1 4】



【請求項 5】

50

前記抗体の重鎖可変領域の配列は配列番号30～57から選ばれ、及び/または、前記抗体の軽鎖可変領域の配列は配列番号1～28からなる群から選ばれる、ことを特徴とする請求項1に記載の抗体-薬物抱合体又はその塩。

【請求項6】

請求項1に記載の抗体-薬物抱合体又はその塩と、薬学的に許容される担体とを含むことを特徴とする薬物組成物。

【請求項7】

抗腫瘍の薬物の製造に用いられることを特徴とする、請求項1に記載の抗体-薬物抱合体又はその塩の使用。

【請求項8】

請求項1に記載の抗体-薬物抱合体又はその塩を製造する方法であって、抗体および遊離のリンカーを含む薬物分子を含む反応系を調製した後、抱合反応を行うことによって、前記抗体-薬物抱合体を得る工程を含み、

前記反応系のpHは、6.5～8.0であることを特徴とする、製造方法。

【請求項9】

前記反応系のpHは、6.8～7.8であることを特徴とする、請求項8に記載の製造方法。

【請求項10】

前記反応系のpHは、6.8～7.2であることを特徴とする、請求項8に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物医薬の分野に関し、具体的に、抗HER2抗体-薬物抱合体に関する。

【背景技術】

【0002】

受容体チロシンキナーゼのHERファミリーは細胞の生長、分化および生存における重要な媒介である。当該受容体ファミリーは、HER1 (EGFRまたはErbB1)、HER2 (ErbB2またはp185neu)、HER3 (ErbB3) およびHER4 (ErbB4またはtyro2) といった4つの異なるメンバーを含む。

【0003】

HER2自身以外、特異的配位子がEGFR、HER3およびHER4の外部機能領域に結合すると、同種二量体または異種二量体のキナーゼ活性を有する抱合体を形成させ、この抱合体においてHER2は主要な一部である。HER2は直接HER活性化配位子と相互作用しないが、そのキナーゼはHER2を含む異種二量体にシグナルを伝達させ、かつ配位子のEGFRまたはHER3への結合の親和性を増加させる。HER2二量体の形成は一連の細胞における過程を引き起こし、最終的に細胞の移動、細胞の生存率と増殖、および抗アポトーシス活性の増加につながる。

【0004】

癌標的治療の発展の過程において、一つの成功した戦略は、モノクローナル抗体 (monoclonal antibodies, mAb) を利用して腫瘍細胞の表面の抗原決定基を標的とすることによって、癌細胞を殺滅するものである。この原理によって、抗体を利用して腫瘍細胞の表面のHER2抗原を標的として癌細胞を殺滅することができる。トラスツズマブ (Trastuzumab、Herceptin) は一つのヒト化の抗HER2モノクローナル抗体で、HER2細胞の表面のIV領域に結合し、化学療法の薬物と併用してHER2陽性の乳癌の治療に使用される。しかし、臨床ではトラスツズマブを含む治療方法は、特にHER2陽性の癌細胞がトラスツズマブに応答しなくなるか、または応答が劣る場合、非常に限られている。よって、HER2陽性の悪性腫瘍に対する新しい治療法を探し始めた。

【0005】

癌細胞抗原に対する新しい特異的治療方法は抗体を媒体とし、毒性小分子を担持して癌細胞に入った後、解離した小分子で癌細胞を殺滅するものである。T-DM1 (Trastuzumab-MCC-DM1) は初めて固形腫瘍に使用された抗体-薬物抱合体 (Antibody-drug conjugates、ADC) で、HER2陽性の転移性乳癌に対する新しい治療方法でもある。T-DM1は抗チューブリン

10

20

30

40

50

ン機能を有するメイタンシノイド (maytansinoid、DM1) が小さいリンカーであるMCCを通してトラスツズマブに抱合したものである。T-DM1はトラスツズマブに敏感および不敏感のHER2陽性腫瘍を抑制することができ、かつ臨床前の毒性学実験で優れた安全性を示した。

【0006】

トラスツズマブ以外、ペルツズマブ (Pertuzumab、Perjeta) もヒト化のHER2特異性のモノクローナル抗体である。トラスツズマブとの違いは、ペルツズマブがHER2細胞の表面のII領域に結合することによって、HER2とHERファミリーのほかのメンバーの結合を阻止することである。ペルツズマブは単独で使用する薬物として、そして化学療法、トラスツズマブおよびT-DM1の併用は、いずれも臨床で抗卵巣癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、乳癌および胃癌の作用を示す。

10

【0007】

従来の抗体のジスルフィド結合の還元またはリシン側鎖アミン基によって薬物モジュールを抗体に連結させると、一般的に、薬物モジュールが抗体における多くの部位に連結するため、不均一な抗体薬物混合物が生じる。たとえば、上記のT-DM1では、一つの抗体は通常0~8個の異なる数の薬物モジュールに連結する。また、抱合数が同様の抱合体でも、各セブ成分が不均一な混合物になることがあり、ここで、薬物モジュールが抗体における様々な部位に連結する。分析および製造方法は、抱合反応による不均一な抗体-薬物抱合体の混合物を分離または特徴付けすることが困難である。

【0008】

当業者はより有効な、新しい抗体-薬物抱合体の開発に取り組んでいる。

20

【発明の概要】

【0009】

本発明の目的は、抗HER2抗体-薬物抱合体およびその使用を提供することにある。

【0010】

本発明の第一の側面では、式Iで表される構造の抗体-薬物抱合体またはその薬学的に許容される塩を提供する。

【0011】

【化1】

Ab-(L-D)<sub>n</sub> , I

30

【0012】

(ここで、Abは前記抗体である。

Lはなしか、前記抗体と前記薬物を連結するリンカーである。

Dは腫瘍細胞を抑制する小分子薬物である。

nは前記抗体に抱合した前記薬物の数である。

「-」は結合またはリンカーである。)

【0013】

もう一つの好適な例において、前記抗体-薬物抱合体の軽鎖定常領域に少なくとも1つの薬物分子(好ましくは各軽鎖定常領域に1つの薬物分子)が抱合し、かつ前記薬物分子が前記軽鎖定常領域のリシン部位に連結している。

40

【0014】

もう一つの好適な例において、前記抗体の軽鎖定常領域がEKHモチーフを含み、かつ前記薬物分子が前記モチーフのリシン(K)部位に連結している。

【0015】

もう一つの好適な例において、前記抗体の軽鎖定常領域がYEKHKモチーフを含み、かつ前記薬物分子が前記モチーフの1番目のリシン(K)部位に連結している。

【0016】

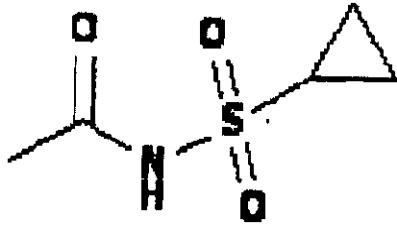
もう一つの好適な例において、前記抗体の軽鎖定常領域がADYEKHKモチーフを含み、かつ前記薬物分子が前記モチーフの1番目のリシン(K)部位に連結している。

【0017】

50



【化3】



【0032】

である。)

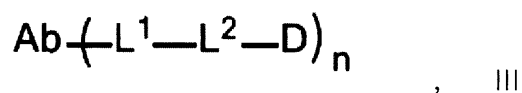
10

【0033】

もう一つの好適な例において、前記抗体-薬物抱合体の構造は式IIIで表される。

【0034】

【化4】



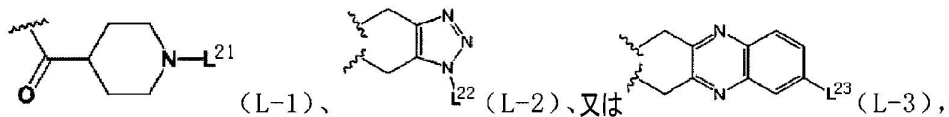
【0035】

(式IIIにおいて、前記L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>の構造はL-1、L-2、およびL-3からなる群から選ばれる。

【0036】

20

【化5】



【0037】

ここで、L<sup>21</sup>、L<sup>22</sup>、L<sup>23</sup>は独立に-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-、Val-Cit、Ala-Ala-Asn、またはこれらの組み合わせからなる群から選ばれるリンカーである。

Ab、D、nは前記の通りである。

波線は抗体との連結部位を表す。)

【0038】

30

もう一つの好適な例において、前記抗体-薬物抱合体は、

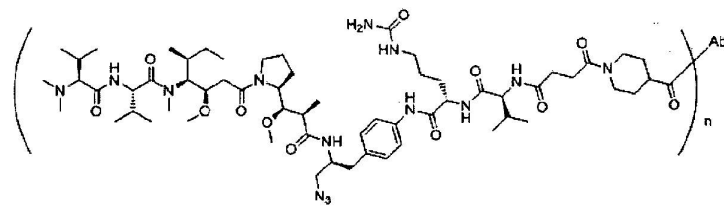
ZV0201、ZV0202、ZV0203、ZV0204、ZV0205、ZV0230、ZV0207、ZV0231、ZV0232からなる群から選ばれる。

【0039】

ここで、抱合体ZV0203の構造は以下に示す。

【0040】

【化6】



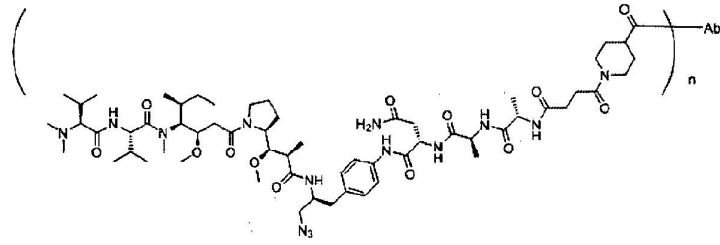
40

【0041】

抱合体ZV0230の構造は以下に示す。

【0042】

【化7】



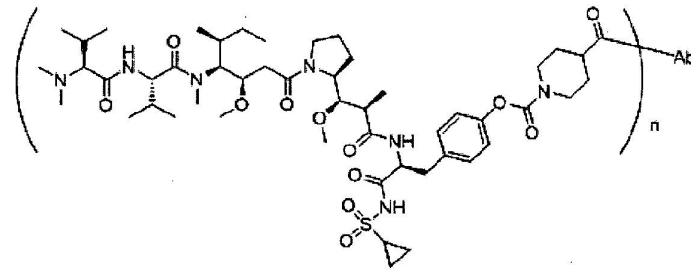
【0043】

抱合体ZV0201の構造は以下に示す。

10

【0044】

【化8】



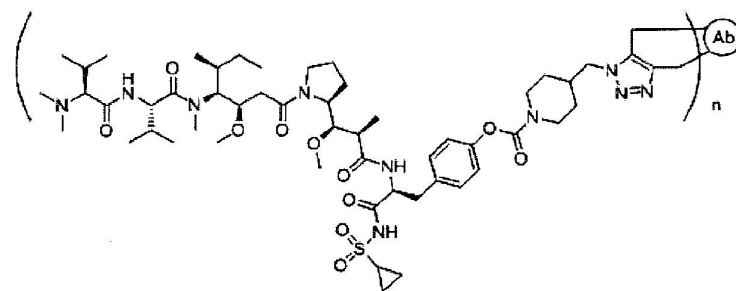
【0045】

抱合体ZV0207の構造は以下に示す。

20

【0046】

【化9】



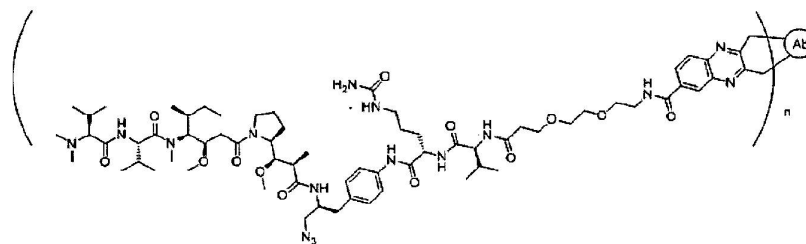
30

【0047】

抱合体ZV0231の構造は以下に示す。

【0048】

【化10】



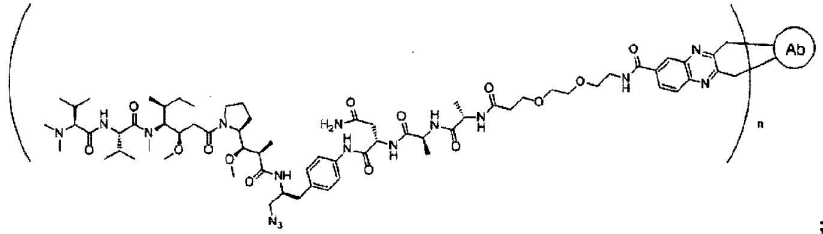
40

【0049】

抱合体ZV0232の構造は以下に示す。

【0050】

【化11】



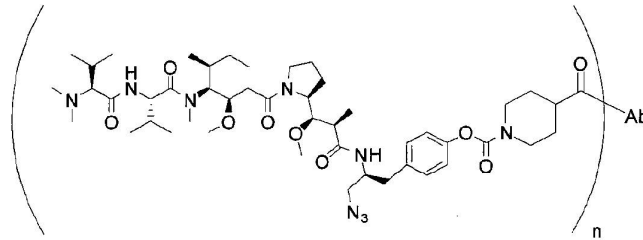
【0051】

抱合体ZV0202の構造は以下に示す。

10

【0052】

【化12】



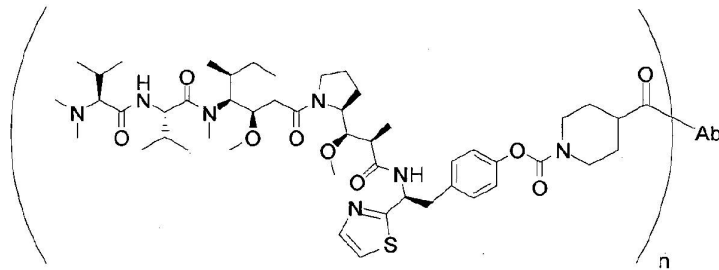
【0053】

抱合体ZV0204の構造は以下に示す。

20

【0054】

【化13】



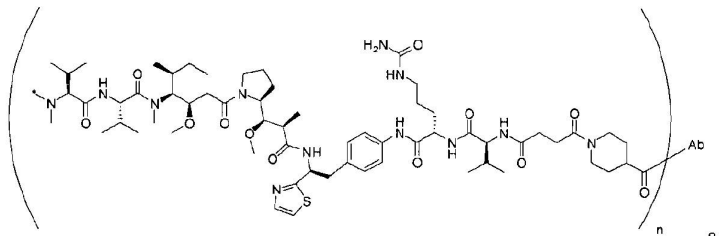
【0055】

抱合体ZV0205の構造は以下に示す。

30

【0056】

【化14】



【0057】

本発明の第二の側面では、本発明の第一の側面に記載の抗体-薬物抱合体と、薬学的に許容される担体とを含む薬物組成物を提供する。

【0058】

本発明の第三の側面では、抗腫瘍の薬物の製造における、本発明の第一の側面に記載の抗体-薬物抱合体の使用を提供する。

【0059】

もう一つの好適な例において、前記腫瘍は、乳癌、胃癌、卵巣癌、肺癌などの癌の種類を含む。

40

50

## 【0060】

本発明の第四の側面では、腫瘍を治療または予防する方法であって、必要な対象に本発明の第一の側面に記載の抗体-薬物抱合体、または本発明の第二の側面に記載の組成物を施用することを含む方法を提供する。

## 【0061】

もう一つの好適な例において、前記対象は哺乳動物で、ヒトを含む。

## 【0062】

本発明の第五の側面では、本発明の第一に記載の抗体-薬物抱合体を製造する方法であって、を含む方法を提供する。

## 【0063】

抗体および遊離のリンカーを含む薬物分子を含む反応系を調製した後、抱合反応を行うことによって、前記抗体-薬物抱合体を得る工程。

## 【0064】

もう一つの好適な例において、前記反応系のpHは、6.5~8.0、好ましくは6.8~7.8、より好ましくは7.0~7.5、たとえば7.1、7.2、7.3、7.4である。

## 【0065】

もう一つの好適な例において、前記薬物分子が前記抗体の軽鎖定常領域のリシン部位に連結している。

## 【0066】

もう一つの好適な例において、反応時間は3 h~16 hである。

## 【0067】

もう一つの好適な例において、前記抗体と薬物分子のモル比は、1~2:3~20、好ましくは、1:6~10である。

## 【0068】

もちろん、本発明の範囲内において、本発明の上記の各技術特徴および下記（たとえば実施例）の具体的に記述された各技術特徴は互いに組合せ、新しい、または好適な技術方案を構成できることが理解される。紙数に限りがあるため、ここで逐一説明しない。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0069】

【図1】本発明の抗体-薬物抱合体の分析結果を示す。図1Aは抱合していない抗体のHIC分析結果を、図1BはZV0201のHIC分析結果を、図1CはZV0223のHIC分析結果を、図1DはZV0201のペプチドマッピング結果を示す。

【図2】親和性検出結果を示す。

【図3】細胞周期抑制実験の結果を示す。

【図4】ADCでマウス体内におけるN87胃癌移植腫瘍を治療する場合の治療効果を示す。

【図5】ADCでマウス体内におけるOE19胃癌移植腫瘍を治療する場合の治療効果を示す。

【図6】ADCでマウス体内におけるSKOV-3卵巣癌移植腫瘍を治療する場合の治療効果を示す。

【図7】ADCでマウス体内におけるBT474乳癌移植腫瘍を治療する場合の治療効果を示す。

【図8】ADCでマウス体内におけるCaLu-3肺癌移植腫瘍を治療する場合の治療効果を示す。

【図9】本発明のADCの腫瘍体積に対する抑制効果を示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0070】

本発明者は幅広く深く研究したところ、抗HER2抗体-薬物抱合体を得たが、実験結果から、前記抗体-薬物抱合体が顕著な抗腫瘍効果を有することが示された。また、本発明は薬物の製造における前記抗HER2抗体-薬物抱合体の使用、および腫瘍の抑制または予防におけるその作用を提供する。

## 【0071】

本発明は、一般的に、抗体-薬物抱合体に関し、より具体的に、治療への使用を有する

10

20

30

40

50

抗体-薬物抱合体に関する。リンカーによって抗HER2抗体と化学療法の薬物または毒素を抱合させることができる。また、本発明は、抗HER2抗体-薬物抱合体によって哺乳動物の細胞または関連する病理的状況を治療する方法に関する。

【0072】

本発明は、リンカー(L)部分によって、抗体の定常領域の特定のリシンの部位、またはジスルフィド結合の還元によるシステインに抱合させ、さらに疎水性精製(HIC)によって所定部位に所定量で抱合した抗体-薬物抱合体を得る。

【0073】

抗体(Ab)はジスルフィド結合の還元によるシステインまたは定常領域の1つの活性化リシンによってリンカー(L、L1またはL2を含む)を介して薬物モジュール(D)に抱合することによって抗体-薬物抱合体: Ab-(L-D)<sub>n</sub>(ここで、nは1~4である)を形成する。本発明は、抗体-薬物抱合体の抱合方法および治療における使用を公開する。

【0074】

本発明を説明する前、方法および条件は変更することができるため、本発明は記載される具体的な方法および実験条件に限定されないと理解される。また、本明細書で用いられる用語は具体的な実施形態の説明だけを目的とし、かつその意図は限定性のものではなく、本発明の範囲は添付の請求の範囲だけに限定されると理解される。

【0075】

別途に定義しない限り、本明細書で用いられるすべての技術と科学の用語はいずれも本発明が属する分野の当業者が通常理解する意味と同様である。本明細書で用いられるように、具体的に例示される数値で使用される場合、用語「約」とは当該値が例示される数値から1%以内で変わってもよい。たとえば、本明細書で用いられるように、「約100」という記述は99と101およびその間の全部の値(たとえば、99.1、99.2、99.3、99.4など)を含む。

【0076】

本発明の実施またはテストにおいて本発明における記載と類似または等価の任意の方法と材料を使用することができるが、本明細書で好適な方法と材料が挙げられた。

【0077】

本発明は2種類の抱合方法を提供し、毒素小分子を特定のリンカーを介して抗体に抱合させ、抗体の親和性を変えずに大幅に腫瘍細胞に対する殺傷力を向上させる。

【0078】

本明細書で用いられるように、用語「抗体」または「免疫グロブリン」は同様な構造特徴を持つ、約150000ダルトンのヘテロテトラマーの糖タンパク質で、2つの同じ軽鎖(L)と2つの同じ重鎖(H)からなるものである。各軽鎖は、重鎖に1つの共有ジスルフィド結合によって結合しているが、重鎖間のジスルフィド結合の数は、免疫グロブリンのアイソタイプによるものである。各重鎖および軽鎖も、それぞれ一定の間隔の鎖内ジスルフィド結合を有する。各重鎖は、1つの末端に可変領域(VH)を有し、その先に多数の定常領域を有する。各軽鎖は、一方の末端に可変領域(VL)を有し、他方の末端に定常領域を有する。軽鎖の定常領域は重鎖の一つ目の定常領域と、軽鎖の可変領域は重鎖の可変領域と対向している。特殊なアミノ酸残基が軽鎖と重鎖の可変領域の間に界面を形成している。

【0079】

本明細書で用いられるように、用語の「可変」とは、抗体において可変領域のある部分が配列で異なっており、これによって各特定の抗体のその特定の抗原に対する結合および特異性が構成されることを指す。しかし、可変性は、均一に抗体の可変領域全体に分布しているわけではない。軽鎖と重鎖の可変領域における相補性決定領域(CDR)または超可変領域と呼ばれる3つの断片に集中している。可変領域において、比較的保存的な部分は、フレームワーク領域(FR)FRと呼ばれる。天然の重鎖および軽鎖の可変領域に、それぞれ、基本的にシート構造となっており、連結ループを形成する3つのCDRで連結され、場合によって部分シート構造となる4つのFR領域が含まれる。各鎖におけるCDRは、FR領域で密接し、かつ他方の鎖のCDRと一緒に抗体の抗原結合部位(Kabatら、NIH Publ. No. 91-

10

20

30

40

50

3242, 巻I, 647-669頁(1991)を参照する)を形成している。定常領域は、抗体と抗原との結合には直接関与しないが、たとえば抗体の抗体依存細胞毒性に参与するなどの異なるエフェクター機能を示す。

【0080】

脊椎動物の抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」は、その定常領域のアミノ酸配列に基づき、明らかに異なる二種類(kとlと呼ばれる)のいずれかに分類することができる。免疫グロブリンは、重鎖の定常領域のアミノ酸配列に基づき、異なるクラスに分類することができる。免疫グロブリンには、主として5つのクラス、すなわち、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがあり、そのうちのいくつかは、さらに、サブクラス(アイソタイプ)、たとえば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAおよびIgA2に分類することができる。異なるクラスの免疫グロブリンの重鎖の定常領域に応じて、それぞれa、d、e、g、およびmと呼ばれる。各クラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元構造は本分野の技術者熟知である。

10

【0081】

一般的に、抗体の抗原結合特性は、重鎖および軽鎖の可変領域に位置する3つの特定の領域によって特徴付けられ、可変領域(CDR)と呼ばれ、4つのフレームワーク領域(FR)に分かれ、4つのFRのアミノ酸配列が比較的保存され、直接結合反応に関与しない。これらのCDRは環状構造を形成し、その中のFRで形成されるシートによって空間構造上で近づき、重鎖におけるCDRおよび相応の軽鎖におけるCDRが抗体の抗原結合部位を構成する。同類の抗体のアミノ酸配列の比較によってどのアミノ酸がFRあるいはCDR領域を構成するか確認することができる。

20

【0082】

本発明は、完全の抗体だけではなく、免疫活性を有する抗体の断片または抗体とほかの配列からなる融合タンパク質も含む。そのため、本発明は、さらに、前記抗体の断片、誘導体および類似体を含む。

【0083】

本明細書で用いられるように、用語「断片」、「誘導体」および「類似体」とは、基本的に本発明の抗体と同じ生物学的機能または活性を維持するポリペプチドをいう。本発明のポリペプチドの断片、誘導体や類似体は、(i)1個または複数個の保存的または非保存的なアミノ酸残基(好ましくは保存的なアミノ酸残基)が置換されたポリペプチドでもよく、このような置換されたアミノ酸残基が遺伝コードでコードされてもされていなくてもよく、あるいは(ii)1個または複数個のアミノ酸残基に置換基があるポリペプチドでもよく、あるいは(iii)成熟のポリペプチドと別の化合物(たとえば、ポリエチレングリコールのようなポリペプチドの半減期を延ばす化合物)と融合したポリペプチドでもよく、あるいは(iv)付加のアミノ酸配列がこのポリペプチドに融合したポリペプチド(たとえばリーダー配列または分泌配列またはこのポリペプチドを精製するための配列または蛋白質前駆体配列、あるいは6Hisタグと形成した融合蛋白質)でもよい。本明細書の開示に基づき、これらの断片、誘導体および類似体は当業者に公知の範囲に入っている。

30

【0084】

本発明において、本発明の抗体は、さらにその保存的変異体を含み、本発明の抗体のアミノ酸配列と比較すると、10個以下、好ましくは8個以下、より好ましくは5個以下、最も好ましくは3個以下のアミノ酸が類似または近い性質を持つアミノ酸で置換されてなるポリペプチドをいう。これらの保存的突然変異のポリペプチドは、表Aのようにアミノ酸の置換を行って生成することが好ましい。

40

【0085】

## 【表 A】

表 A

| 元の残基    | 代表的な置換                  | 好適な置換 |
|---------|-------------------------|-------|
| Ala (A) | Val; Leu; Ile           | Val   |
| Arg (R) | Lys; Gln; Asn           | Lys   |
| Asn (N) | Gln; His; Lys; Arg      | Gln   |
| Asp (D) | Glu                     | Glu   |
| Cys (C) | Ser                     | Ser   |
| Gln (Q) | Asn                     | Asn   |
| Glu (E) | Asp                     | Asp   |
| Gly (G) | Pro; Ala                | Ala   |
| His (H) | Asn; Gln; Lys; Arg      | Arg   |
| Ile (I) | Leu; Val; Met; Ala; Phe | Leu   |
| Leu (L) | Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile   |
| Lys (K) | Arg; Gln; Asn           | Arg   |
| Met (M) | Leu; Phe; Ile           | Leu   |
| Phe (F) | Leu; Val; Ile; Ala; Tyr | Leu   |
| Pro (P) | Ala                     | Ala   |
| Ser (S) | Thr                     | Thr   |
| Thr (T) | Ser                     | Ser   |
| Trp (W) | Tyr; Phe                | Tyr   |
| Tyr (Y) | Trp; Phe; Thr; Ser      | Phe   |
| Val (V) | Ile; Leu; Met; Phe; Ala | Leu   |

10

20

## 【0086】

本発明の抗体またはその断片のDNA分子の配列は、通常の技術で、たとえば、PCR増幅あるいはゲノムライブラリースクリーニングなどの方法によって得ることができる。また、軽鎖および重鎖のコード配列を一体に融合し、一本鎖抗体を形成してもよい。

30

## 【0087】

関連の配列を獲得すれば、組換え法で大量に関連配列を獲得することができる。この場合、通常、その配列をベクターにクローンした後、細胞に導入し、さらに通常の方法で増殖させた宿主細胞から関連配列を単離して得る。

## 【0088】

また、特に断片の長さが短い場合、人工合成の方法で関連配列を合成してもよい。通常、まず多数の小さい断片を合成し、そして接続させることにより、配列の長い断片を得ることができる。

## 【0089】

現在、前記の本発明の抗体（またはその断片、あるいはその誘導体）をコードするDNA配列を全部化学合成で得ることがすでに可能である。さらに、このDNA配列を本分野で周知の各種の既知のDNA分子（あるいはベクターなど）や細胞に導入してもよい。また、化学合成で本発明のタンパク質配列に変異を導入することもできる。

40

## 【0090】

さらに、本発明は、上記の適当なDNA配列および適当なプロモーターあるいは制御配列を含むベクターに関する。これらのベクターは、タンパク質を発現するように、適当な宿主細胞の形質転換に用いることができる。

## 【0091】

宿主細胞は、原核細胞、たとえば細菌細胞、あるいは、低等真核細胞、たとえば酵母細

50

胞、あるいは、高等真核細胞、たとえば哺乳動物細胞でもよい。

【0092】

たとえば、本発明の抗体は以下の方法によって製造することができる。

【0093】

まず、本発明の抗体をコードするヌクレチオド配列およびその配列と作用可能に連結した発現調節配列を含有する発現ベクターを提供する。

【0094】

ここで用いられる用語の「発現調節配列」とは、通常、ヌクレチオド配列の発現を制御する配列のことを指す。発現調節配列は、目的ヌクレチオド配列と作用可能に連結したプロモーターおよび終結シグナルを含む。通常、さらに、ヌクレチオド配列の適当な翻訳に必要な配列を含む。「作用可能に連結した」とは、直鎖状DNA配列のある部分が同直鎖状DNA配列のほかの部分の活性に影響できることをいう。たとえば、プロモーターまたはエンハンサーは、コード配列の転写を増加させる場合、コード配列とは作用可能に連結した。

【0095】

本発明のモノクローナル抗体をコードするDNA配列は、本分野の技術者に熟知の通常的手段で得られる。たとえば、本発明に公開された配列に基づき、人工合成またはPCR法による増幅でそのモノクローナル抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域をコードするヌクレチオド配列を得ることができる。その後、本分野で熟知の各種の方法で、好適な制限酵素切断部位の選択によって、それぞれ発現ベクターが有する重鎖定常領域のコード配列と軽鎖定常領域のコード配列の前に位置し、且つ同一のリーディングフレームにあるように、これらのヌクレチオド配列を好適な発現ベクターに挿入する。本発明で用いられる発現ベクターは、本分野の技術者に既知の各種の市販の発現ベクター、たとえばpPIC9Kである。

【0096】

そして、上記で得られた発現ベクターで好適な宿主細胞を形質転換する。「宿主細胞」は、一般的に原核細胞と真核細胞とを含む。常用の原核宿主細胞の例として、大腸菌、枯草菌などを含む。常用の真核宿主細胞として、酵母細胞、昆虫細胞や、哺乳動物細胞を含む。本発明において、哺乳動物細胞が好ましい。通常、哺乳動物細胞系が真核細胞由来のポリペプチドを発現する宿主細胞として用いられる。哺乳動物細胞の培養物における増殖は、本分野で熟知である。「組織培養」, Academic Press, Kruse及びPatterson編(1973)を参照し、ここに参考として取り入れる。好ましい哺乳動物細胞は、多くの入手可能な無限増殖性細胞系である。これらの無限増殖性細胞系は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、Vero細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎臓細胞(COS)、ヒト肝臓癌細胞(たとえばHep G2)やほかの多くの細胞系を含むが、これらに限定されない。これらの細胞は、タンパク質分子に正確な折り畳み、正確なジスルフィド結合の形成および正確な部位のグリコシル化を含む翻訳後の修飾を提供する。下記の実施例において、本発明では、CHO細胞を宿主細胞とする例だけが挙げられたが、当業者は本発明の詳細および具体的な実施例を読めば、本発明に上記のこれらの細胞系も使用できることがわかる。

【0097】

発現ベクターで宿主細胞を形質転換する方法はたくさんあるが、用いられる形質転換のプロトコールが形質転換しようとする宿主にもよる。異質ポリヌクレチオドを哺乳動物細胞に導入する方法は、本分野で知られているが、デキストランによるトランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、プリブレン(1,5-ジメチル-1,5-ジアザウンデカメチレンポリメトプロミド)によるトランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポフェクション及びDNAの細胞核への直接のマイクロインジェクションを含む。本発明において、好ましい方法は、エレクトロポレーション法やリポフェクション法等である。例えば、Invitrogen社のリポフェクション法キットでCHO細胞などの宿主細胞へのトランスフェクションを行うことができる。

【0098】

その後、本発明の抗体の発現に適切な条件で、形質転換で得られた宿主細胞を培養する。そして、通常のプロテインの精製工程、例えばプロテインA-Sepharose、ヒドロキシア

10

20

30

40

50

パタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、分子篩クロマトグラフィーやアフィニティークロマトグラフィーなどの本分野の技術者に熟知の通常分離精製手段で精製し、本発明の抗体を得る。

【0099】

得られたモノクローナル抗体は、通常的手段で同定することができる。たとえば、モノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降、あるいは体外結合試験（たとえば放射免疫測定（RIA）または酵素結合免疫吸着測定（ELISA））で測定することができる。モノクローナル抗体の結合親和力は、例えばMunson等, Anal. Biochem., 107:220(1980)のScatchard分析で測定することができる。

【0100】

本発明の抗体は、細胞内又は細胞膜において発現し、或いは細胞外に分泌することができる。必要であれば、その物理・化学的特性およびほかの特性を利用して各種の分離方法で組換えタンパク質を分離・精製することができる。これらの方法は、本分野の技術者に熟知である。これらの方法の例として、通用の再生処理、タンパク質沈殿剤による処理（塩析法）、遠心、浸透圧ショック、超音波処理、超遠心、分子篩クロマトグラフィー（ゲルろ過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）及びほかの各種の液体クロマトグラフィー技術、並びにこれらの方法の組合せを含むが、これらに限定されない。

【0101】

本発明の一つの好適な実施形態において、本発明による抗体-薬物抱合体における抗体は抗HER2抗体である。

【0102】

本発明の一つの好適な実施の形態において、前記抗HER2抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、からなる群から選ばれる。

【0103】

DIQMTQSPSSLSASVGRVITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIPYTFGGGTKVEIK(配列番号1)、

DIQMTQSPSSLSASVGRVITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQYYIPYTFGGGTKLEIKRT(配列番号2)、

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCASQDVSIGVAWYQQKPGQAPRLLIYSASYRYTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYYIPYTFGGGTKLEIKRT(配列番号3)、

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQDVSIGVAWYQQKPGQAPRLLIYSASYRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSPEDFAVYYCQQYYIPYTFGGGTKLEIKRT(配列番号4)、

EIVMTQSPPTLSLSPGERVTLSCASQDVSIGVAWYQQKPGQAPRLLIYSASYRYTSPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYYIPYTFGGGTKLEIKRT(配列番号5)、

AIRMTQSPSSFSASTGDRVITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISCLQSPEDFATYYCQQYYIPYTFGGGTKLEIKRT(配列番号6)、

DIQMTQSPSSLSASVGRVITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYCQQYYIPYTFGGGTKLEIKRT(配列番号7)、

DIQMTQSPSSLSASVGRVITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQYYIPYTFGGGTKLEIKRT(配列番号8)、

AIQLTQSPSSLSASVGRVITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIPYTFGGGTKLEIKRT(配列番号9)、

DIQMTQSPSTLSASVGRVITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDDFATYYCQQYYIPYTFGGGTKLEIKRT(配列番号10)、

DIQMTQSPSSLSASVGRVITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIPYTFGGGTKVEIK(配列番号11)、

DIQMTQSPSSLSASVGRVITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIPYTFGGGTKVEIK(配列番号12)、

DIQMTQSPSSLSASVGRVITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIPYTFGGGTKVEIK(配列番号12)

10

20

30

40

50

EDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号13)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号14)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号15)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号16)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号17)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号18)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号19)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号20)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号21)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号22)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号23)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号24)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号25)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号26)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号27)、  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (配列番号28)、

【0104】

本発明の一つの好適な実施の形態において、前記抗HER2抗体の軽鎖定常領域のアミノ酸配列は、

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号29)である。

【0105】

ここで、下線のKは本発明において薬物分子に連結する、好適なリシン残基である。

【0106】

本発明の一つの好適な実施の形態において、前記抗HER2抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、からなる群から選ばれる。

【0107】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWRQAPGKLEWVADVNPNSGGSINYQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS(配列番号30)、  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWRQAPGKLEWVADVNPNSGGSINYQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS(配列番号31)、  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWRQAPGKLEWVADVNPNSGGSINYQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS(配列番号32)、  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWRQAPGKLEWVADVNPNSGGSINYQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS(配列番号33)、

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号34)、  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号35)、  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号36)、  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号37)、  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号38)、  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号39)、  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCAKNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号40)、  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMSWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCAKNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号41)、  
 QVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 LQISLKAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号42)、  
 QVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGFTFTDYTEMHWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 LQISLKAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号43)、  
 QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSKASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 MELSSLRSEDVAVYYCAANLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号44)、  
 QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSKASGFTFTDYTEMQWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 MELSSLRSEDVAVYYCAANLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号45)、  
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 MELSSLRSEDVAVYYCATNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号46)、  
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGFTFTDYTEMHWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 MELSSLRSEDVAVYYCATNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号47)、  
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 MELSSLRSEDVAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号48)、  
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFTDYTEMHWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 MELSSLRSEDVAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号49)、  
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 AYMELSSLRSEDVAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号50)、  
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTDYTEMHWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 AYMELSSLRSEDVAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号51)、  
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 MELSSLRSDDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号52)、  
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTDYTEMHWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 MELSSLRSDDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号53)、  
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTDYTEMDWVRQATGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 MELSSLRSEDVAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号54)、  
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTDYTEMHWVRQATGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 MELSSLRSEDVAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号55)、  
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 MELSSLRSEDVAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号56)、  
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTDYTEMHWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY  
 MELSSLRSEDVAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号57)、

10

20

30

40

【 0 1 0 8 】

本発明の一つの好適な実施の形態において、前記抗HER2抗体の重鎖定常領域のアミノ酸

50

配列は、

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT  
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW  
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNHYT  
QKSLSLSPG(配列番号58)である。

【0109】

本発明のもう一つの好適な実施形態において、前記抗体-薬物抱合体の構造は式IIで表される。

【0110】

【化15】

Ab- (L-D)<sup>n</sup>, II

【0111】

(ここで、Abは抗体である。

Dは腫瘍細胞を抑制する小分子薬物である。

Lは前記抗体と前記薬物を連結するリンカーである。)

【0112】

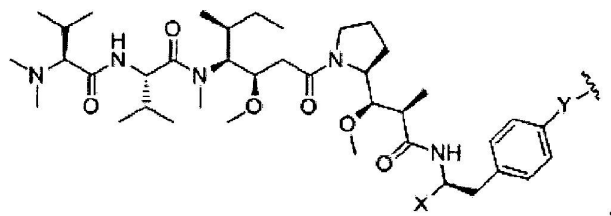
もう一つの好適な例において、nは1~8で、好ましくは整数である。

【0113】

もう一つの好適な例において、Dの構造は式IIIで表される。

【0114】

【化16】



III

【0115】

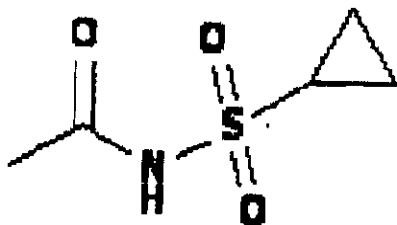
(式IIIにおいて、YはO、またはNHである。

波線はLとの連結部位を表す。

XはCH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>または

【0116】

【化17】



【0117】

である。)

【0118】

本発明のもう一つの好適な実施形態において、前記抗体-薬物抱合体の構造は式IVで表される(すなわち、LはL<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>を含む)。

【0119】

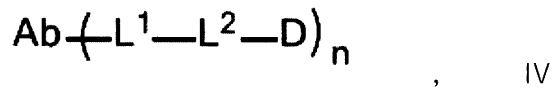
10

20

30

40

【化18】

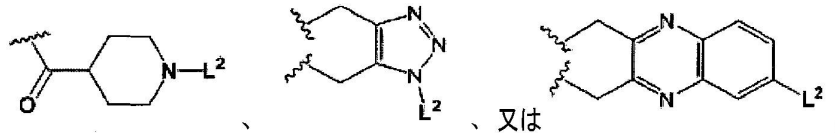


【0120】

(式IVにおいて、前記 $\text{L}^1$ - $\text{L}^2$ の構造は、からなる群から選ばれる。

【0121】

【化19】



10

【0122】

ここで、 $\text{L}^2$ は $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 、Val-Cit、Ala-Ala-Asn、またはこれらの組み合わせからなる群から選ばれるリンカーである。

Ab、D、nは前記の通りである。

(波線は抗体との連結部位を表す。)

【0123】

もう一つの好適な例において、前記抗体-薬物抱合体は、

ZV0201、ZV0202、ZV0203、ZV0204、ZV0205、ZV0230、ZV0207、ZV0231、ZV0232からなる群から選ばれる。

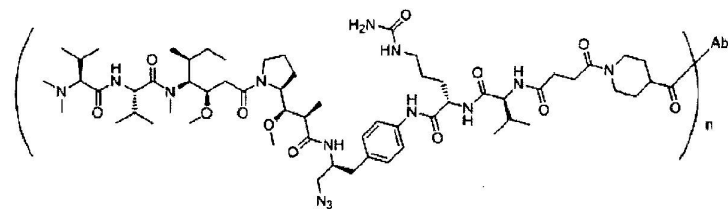
20

【0124】

ここで、抱合体ZV0203の構造は以下に示す。

【0125】

【化20】



30

【0126】

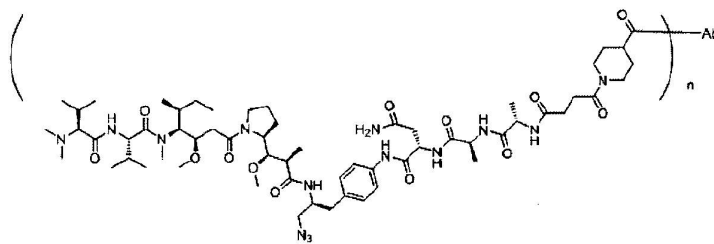
からなる群から選ばれる。

【0127】

抱合体ZV0230の構造は以下に示す。

【0128】

【化21】



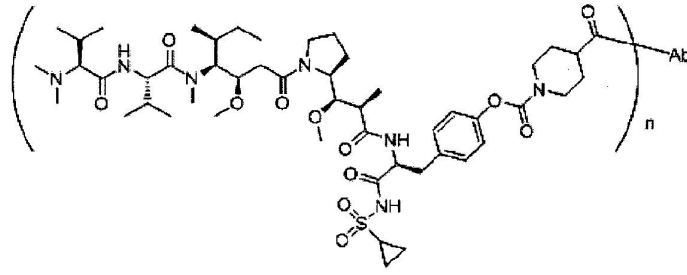
40

【0129】

抱合体ZV0201の構造は以下に示す。

【0130】

【化22】



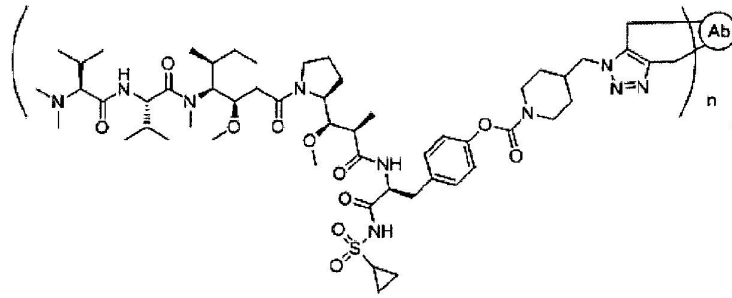
【0131】

10

抱合体ZV0207の構造は以下に示す。

【0132】

【化23】



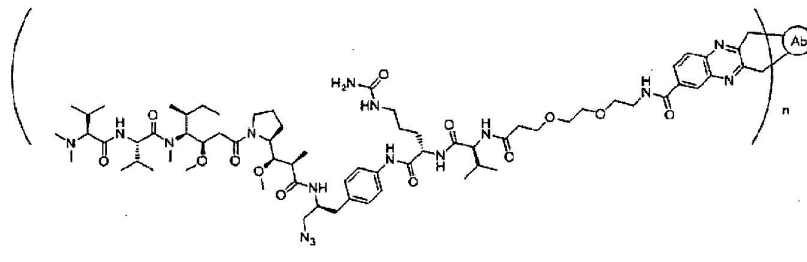
20

【0133】

抱合体ZV0231の構造は以下に示す。

【0134】

【化24】



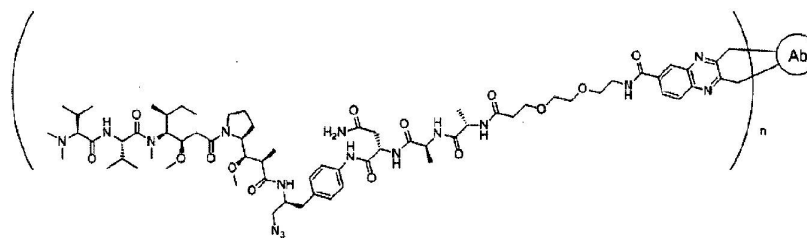
30

【0135】

抱合体ZV0232の構造は以下に示す。

【0136】

【化25】



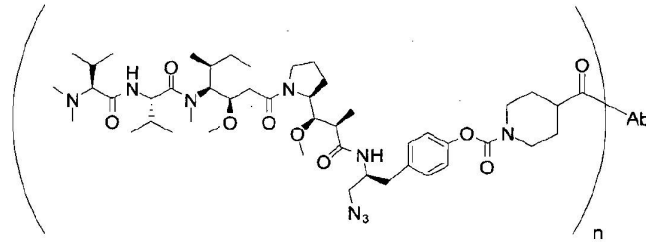
40

【0137】

抱合体ZV0202の構造は以下に示す。

【0138】

## 【化26】



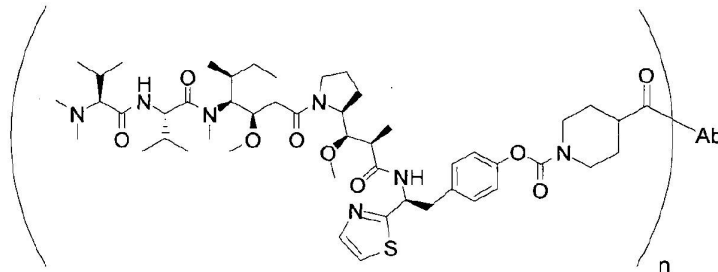
## 【0139】

抱合体ZV0204の構造は以下に示す。

10

## 【0140】

## 【化27】



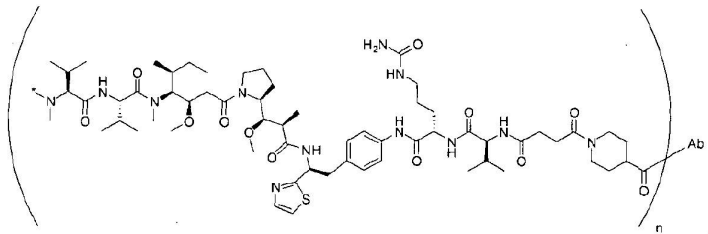
20

## 【0141】

抱合体ZV0205の構造は以下に示す。

## 【0142】

## 【化28】



30

## 【0143】

本発明の一つの好適な実施形態において、前記抗HER2抗体はペルツズマブで、前記ペルツズマブはPerjeta（商標）およびそのバイオシミラー（Biosimilar）を含む。

## 【0144】

本発明の前記抗体-薬物抱合体を製造する抱合形態は、K-LockとC-Lockの2種類の抱合形態がある。K-Lock抱合形態では、薬物分子が抗体の配列におけるリシン（K）残基に抱合し、C-Lock抱合形態では、薬物分子が抗体の配列におけるシステイン残基（C）に抱合する。以下、本発明の抗体-薬物抱合体の抱合方法を概述する。

## 【0145】

K-Lock方法：抗体は穏和な溶液系において直接L1-Dと連結してもよい。たとえば、室温で6~10倍の過剰量のL1-Dを抗体と3~16 h反応させ、限外ろ過で過剰量の小分子L1-Dを除去する。抗体-薬物抱合体を疎水性クロマトグラフィーカラム（HIC）にかけ、精製して抱合数が2の抗HER2抗体-薬物抱合体を得る。

40

## 【0146】

C-Lock方法：抗体はTCEPで還元させた後、穏和な溶液系において直接L2-Dと連結してもよい。たとえば、抗体を室温で5~10倍の過剰量のTCEPで還元させ、限外ろ過で過剰量のTCEPを除去する。5~10倍のL2-Dを還元後の抗体溶液に入れて反応させ、限外ろ過で過剰量の小分子L2-Dを除去する。抗体-薬物抱合体を疎水性クロマトグラフィーカラム（HIC）にかけ、精製して抱合数が4の抗HER2抗体-薬物抱合体を得る。

50

## 【0147】

本発明は、アプリアトキシン誘導体をK-LockまたはC-Lockで抗体に抱合させて構成した、いくつかの抗体-K-Lock-アプリアトキシン誘導体および抗体-C-Lock-アプリアトキシン誘導体の抱合体を提供する。好ましくは、前記抗体-薬物抱合体における薬物は本発明の実施例で調製された1種類または複数種類の化合物を含んでもよい。

## 【0148】

また、本発明は抗腫瘍薬物の製造における前記抗体-薬物抱合体の使用を提供する。

## 【0149】

前記抗腫瘍薬物は、有効量の本発明による抗体-薬物抱合体と、少なくとも一つの薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む。調製の際、通常、活性成分を賦形剤と混合するか、または賦形剤で希釈するか、またはカプセルがマイクロスフェアに含まれる形態で担体に存在する。賦形剤が希釈剤として作用する場合、固体、半固体または液体の材料を賦形剤、担体または活性成分の媒体として使用してもよい。そのため、組成物は錠剤、丸剤、粉剤、溶液材、シロップ材、滅菌注射溶液などでもよい。

10

## 【0150】

適切な賦形剤は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、ソルビトール、マンニトール、デンプン、微晶質セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水などを含み、製剤はさらに湿潤剤、乳化剤、防腐剤（たとえば安息香酸メチルや安息香酸プロピル）、甘味料を含んでもよい。前記抗腫瘍薬物は単一または多重剤形にしてもよく、各剤形は所期の治療効果が生じるように算出した所定量の前記抗her2抗体-アプリアトキシン抱合体、および適切な薬剤学的賦形剤を含む。

20

## 【0151】

前記抗腫瘍薬物は通常の経路で給与することができ、筋肉内、腹膜内、静脈内、皮下、皮内、局部給与などが含まれるが、これらに限られない。

## 【0152】

当該薬物を使用する際、安全有効量の前記抗体-薬物抱合体をヒトに施用するが、ここで、当該安全有効量の範囲は0.5~50mg/kg体重が好ましく、1~10mg/kg体重がより好ましい。勿論、具体的な投与量は、さらに投与の様態、患者の健康状況などの要素を考えるべきで、すべて熟練の医者 の 技能範囲以内である。

## 【0153】

また、本発明の抱合体はほかの治療薬と併用してもよく、中には、様々なサイトカイン、たとえばTNF、IFN、IL-2など、様々な腫瘍の化学療法の薬物、たとえば5-FU、メトトレキサートなどの核酸の生物合成に影響する薬物、ナイトロジェンマスタード、シクロホスファミドなどのアルキル化剤系薬物、アドリアマイシン、アクチノマイシンDなどの転写過程を干渉してRNA合成を阻止する薬物、ピンクリスチン、カンプトテシン系などのタンパク質合成に影響する薬物や一部のホルモン系薬物などが含まれるが、これらに限られない。

30

## 【0154】

既存技術と比べ、本発明の有益な効果は以下の通りである。

## 【0155】

(1) 本発明は、抗体発現細胞株を変えずに、簡単な化学的工工程および精製工工程によって抗体と薬物の所定部位で所定量の抱合を実現させることができる。

40

## 【0156】

(2) 本発明の抗体-薬物抱合体によれば、薬物が抗体の軽鎖定常領域に抱合した場合、顕著により良い活性を有し、かつ製造が容易で、収率が高く、大規模生産に適する。

## 【0157】

(3) 本発明の抱合体は、抗her2抗体とアプリアトキシンの両者の生物学的機能を有し、抗her2抗体の腫瘍細胞に対する殺傷能力だけでなく、アプリアトキシンの細胞内におけるチューブリンに対する抑制によるアポトーシスの誘導能力も持ち、両者の協同作用で、抗腫瘍効果が顕著に向上する。

50

## 【0158】

(4) 本発明の抱合体は抗her2抗体が腫瘍細胞の表面のher2受容体に特異的に結合することによって、アプリアトキシンを腫瘍細胞を標的として輸送し、そして腫瘍細胞において作用を発揮し、her2陽性腫瘍細胞を殺傷するだけでなく、毒素分子の単独投与による毒性・副作用も減少することができる。

## 【0159】

(5) 本発明の方法によって製造される抗体-薬物抱合体は、平均抱合薬物分子数は約2個で、かつプロセスが安定で、抱合される薬物の使用量が節約できることで、製造コストの削減につながる。

## 【0160】

(6) 本発明で選別された特定のリンカーで抗her2抗体と薬物を連結すると、抗体-薬物抱合体を製造しやすくさせ、高い収率を有するだけでなく、抗体の標的活性を維持する。

## 【0161】

以下、具体的な実施例によって、さらに本発明を詳述する。これらの実施例は本発明を説明するために用いられるものだけで、本発明の範囲の制限にはならないと理解されるものである。以下の実施例で詳細な条件が示されていない実験方法は、通常、たとえばSambrookら、「モレキュラー・クローニング：研究室マニュアル」(ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版社、1989)に記載の条件などの通常条件に、あるいは、メーカーのお勧めの条件に従う。特に断らない限り、%と部は、重量で計算される。以下、実施例で使用された実験材料および試薬は、特に説明しない限り、いずれも市販品として得られる。

## 【0162】

共通の合成工程 カルボキシ基を持つ化合物からその活性エステルを合成する方法(たとえばNHS)

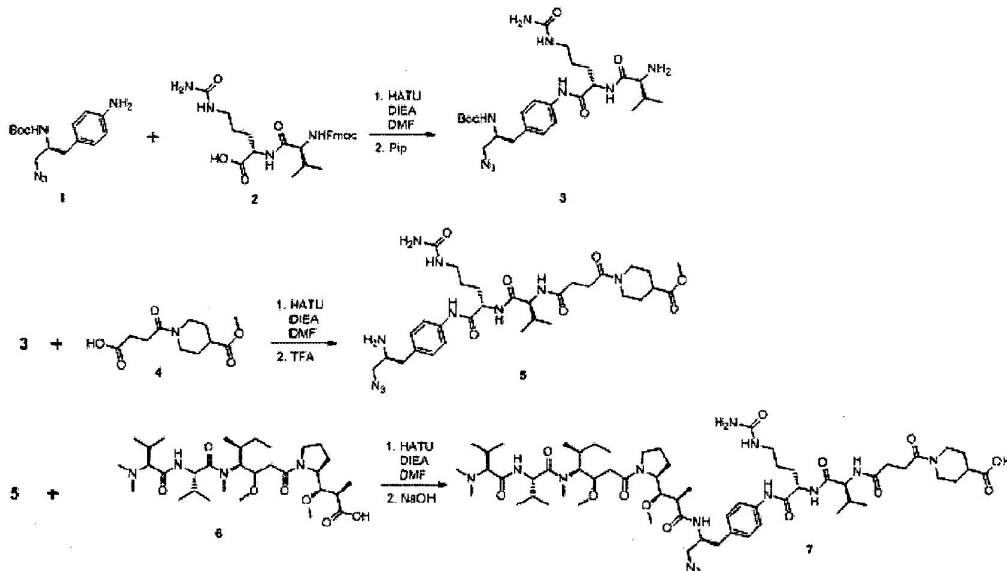
カルボキシ化合物をジクロロメタンまたはN,N-ジメチルホルムアミドに溶解させ、1.5当量のN-ヒドロキシスクシンイミド、1.5当量のEDCIを入れた。カルボキシ化合物が完全に消費されるまで、反応液を室温で1時間攪拌した。RP-HPLCで反応過程をモニタリングした。ジクロロメタンで反応液を希釈し、そしてクエン酸(10%溶液)と飽和食塩水で有機相を洗浄した。有機相を分離して乾燥し、HPLCまたは中圧順相クロマトグラフィーによって精製し、相応する活性エステルを得た。

## 【0163】

実施例1 化合物7の合成

## 【0164】

## 【化29】



## 【0165】

10

20

30

40

50

化合物3の合成：

化合物2(261 mg, 0.52 mmol)を6 mLのDMFに溶解させ、さらにHATU(217 mg, 0.57 mmol)、DIEA(362  $\mu$ L, 2.08 mmol)、およびアミノ化合物1(213 mg, 0.52 mmol)を入れた。30分間攪拌し、さらに400  $\mu$ Lのピペリジンを入れ、続いて10分間攪拌した。反応液を濃縮してそのままHPLCによって精製して化合物3(171 mg, 60%)を得た。MS m/z 548.3 (M+H)。

【0166】

化合物5：

化合物4(37 mg, 0.15 mmol)を4 mLのDMFに溶解させ、さらにHATU(59 mg, 0.15 mmol)、DIEA(108  $\mu$ L, 2, 0.6 mmol)、およびアミノ化合物3(102 mg, 0.15 mmol)を入れた。反応液を30分間攪拌した後、減圧で乾燥まで蒸発させ、さらに2 mLのジクロロメタンに溶解させ、1 mLのTFAを入れて10分間攪拌した。反応液を減圧で乾燥まで蒸発させ、そしてHPLCによって精製して化合物5(94 mg, 78%)を得た。MS m/z 673.4 (M+H)。

【0167】

化合物7の合成：

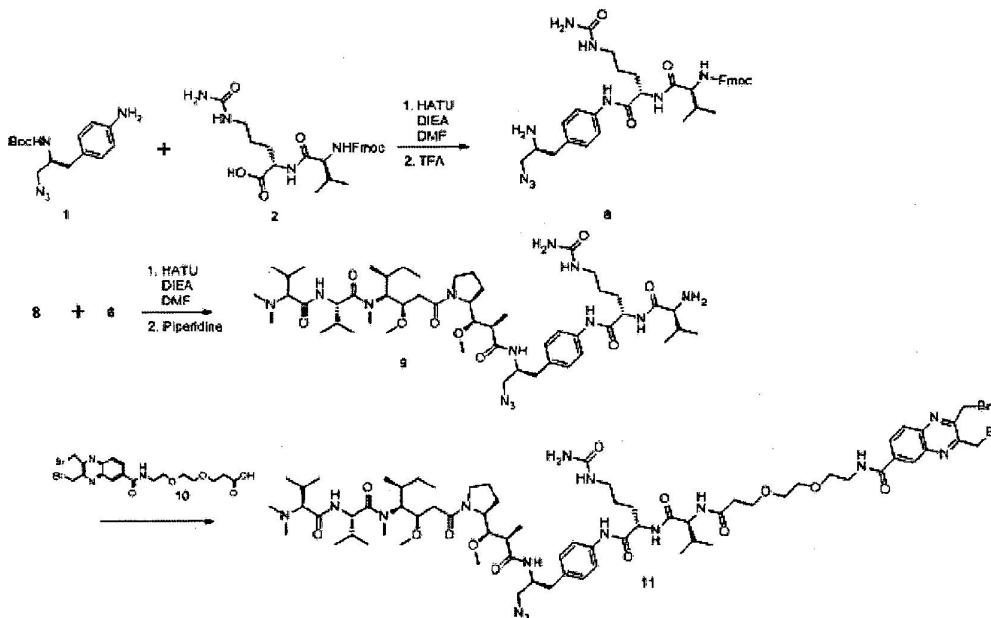
化合物6(85 mg, 0.12 mmol)を2 mLのDMFに溶解させ、さらにHATU(48 mg, 0.12 mmol)、DIEA(83  $\mu$ L, 0.48 mmol)およびアミノ化合物5(94 mg, 0.12 mmol)を入れた。反応液を続いて30分間攪拌した後、さらに90 mgのNaOHの1 mL水溶液を入れて30分間攪拌した。反応液を回転乾燥し、そのままHPLCによって精製して化合物7(86 mg, 58%)を得た。MS m/z 1239.7 (M+H)。

【0168】

実施例2 化合物11の合成

【0169】

【化30】



【0170】

化合物2(130 mg, 0.26 mmol)を3 mLのDMFに溶解させ、さらにHATU(110 mg, 0.29 mmol)、DIEA(175  $\mu$ L, 1 mmol)、およびアミノ化合物1(110 mg, 0.27 mmol)を入れた。反応液を続いて30分間攪拌し、乾燥まで回転蒸発し、残留物をTFA/ジクロロメタン(1/4, v/v, 5 mL)に溶解させて30分間攪拌した。反応液を減圧で乾燥まで蒸発させ、そしてHPLCによって精製して化合物8(108 mg, 65%)を得た。MS m/z 670.5 (M+H)。

【0171】

化合物6(85 mg, 0.12 mmol)を2 mLのDMFに溶解させ、さらにHATU(48 mg, 0.12 mmol)、DIEA(83  $\mu$ L, 0.48 mmol)、およびアミノ化合物8(94 mg, 0.12 mmol)を入れた。反応液を30分間攪拌した後、ピペリジン(0.2 mL)を入れて30分間攪拌した。反応液を濃縮してHP

10

20

30

40

50

LCによって精製して化合物9(87 mg、63%)を得た。MS m/z 1028。7 (M+H)。

【0172】

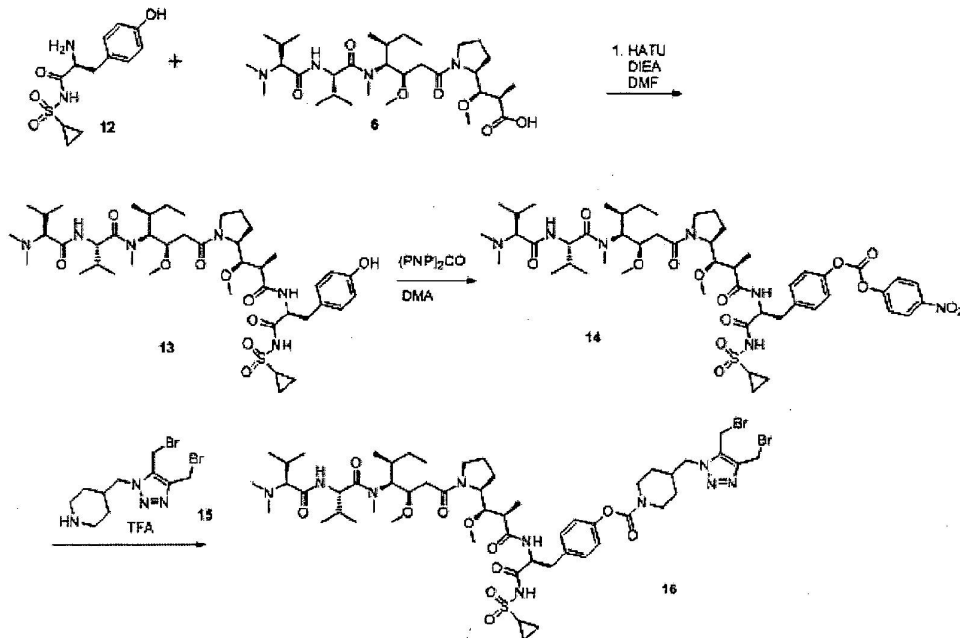
化合物9(57 mg、0.05 mmol)およびカルボキシ化合物10(27 mg)のジクロロメタン/DMF(3/1, v/v, 4 mL)溶液に、PyBrop(0.055 mmol)およびDIEA(35  $\mu$ L)を入れた。反応液を続いて30分間攪拌して濃縮し、残留物をHPLCによって精製して化合物11(41 mg)を得た。MS m/z 1529.7 (M+H)。

【0173】

実施例3 化合物16の合成

【0174】

【化31】



10

20

【0175】

化合物13:

化合物6(1000 mg、1.67 mmol)を20 mLのDMFに溶解させ、HATU(640 mg、1.68 mmol)、DIEA(870  $\mu$ L、5.00 mmol)、およびアミノ化合物12(535 mg、1.67 mmol)を入れた。反応液を30分間攪拌し、反応液を乾燥まで濃縮した後、HPLCによって精製して化合物13(1140 mg、70%)を得た。MS m/z 865.5 (M+H)。

30

【0176】

化合物14:

化合物13(500 mg、0.57 mmol)を10 mLのDMAに溶解させ、炭酸ビス(p-ニトロフェニル)(210 mg、0.69 mmol)、およびDIEA(35  $\mu$ L、0.2 mmol)を入れた。反応液を18時間攪拌し、100 mLのエチルエーテルを入れ、沈殿が析出し、沈殿を収集し、乾燥後化合物14(500 mg、85%)を得た。MS m/z 1030.6 (M+H)。

40

【0177】

化合物16:

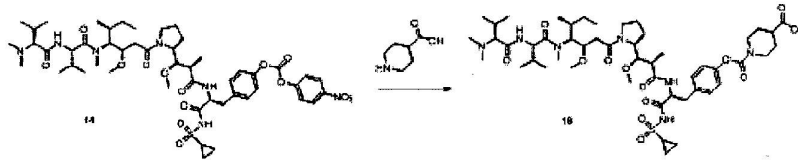
化合物14(0.1 mmol)のテトラヒドロフラン(3 mL)溶液に化合物15(0.15 mmol、67 mg)のアセトニトリル/水(1/1, v/v, 1 mL)溶液を入れ、さらにDIEA(50  $\mu$ L)を入れた。反応液を30分間攪拌した後、酸型化して濃縮し、残留物をHPLCによって精製して白色固体の化合物16(87 mg)を得た。MS m/z 1243.6 [M+H]<sup>+</sup>。

【0178】

実施例4 化合物18の合成

【0179】

## 【化32】

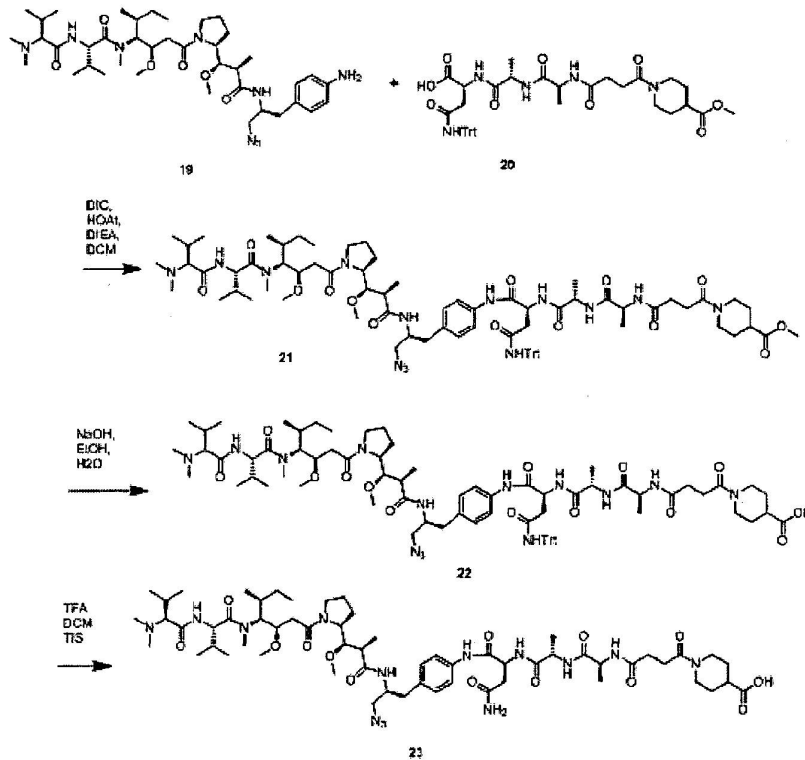


## 【0180】

化合物14(0.1 mmol)をテトラヒドロフラン(3 mL)に溶解させ、ピペリジン-4-カルボン酸(60 mg)および飽和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液(1 mL)を入れた。反応液を室温で30分間攪拌した後、1N HClで $\text{pH} = 4 \sim 5$ にした。濃縮してHPLCによって精製して化合物18(68 mg)を得た。MS  $m/z$  1020.7 (M+H)。

## 【0181】

## 【化33】



## 【0182】

実施例5 化合物23の合成

化合物21の合成：

化合物19のTFA塩(1 mmol)、化合物20(1 eq)、HOAt(3 eq)、ジクロロメタン(20 mL)、DIEA(6 eq)、およびDIC(2 eq)を丸底フラスコに入れ、16時間攪拌した後20 mLのジクロロメタンで反応液を希釈し、水で洗浄し、有機層を乾燥して回転乾燥して化合物21を得たが、次の工程にそのまま使用した。MS  $m/z$  1496.5 (M+H)。

## 【0183】

化合物22の合成：

化合物21(1 mmol)、20 mLのエタノールおよび10 mLの2M NaOH水溶液を丸底フラスコに入れ、3時間攪拌した。酢酸で中性に調整した後、HPLCによって精製して化合物22を得た。MS  $m/z$  1482.3 (M+H)。

## 【0184】

化合物23の合成：

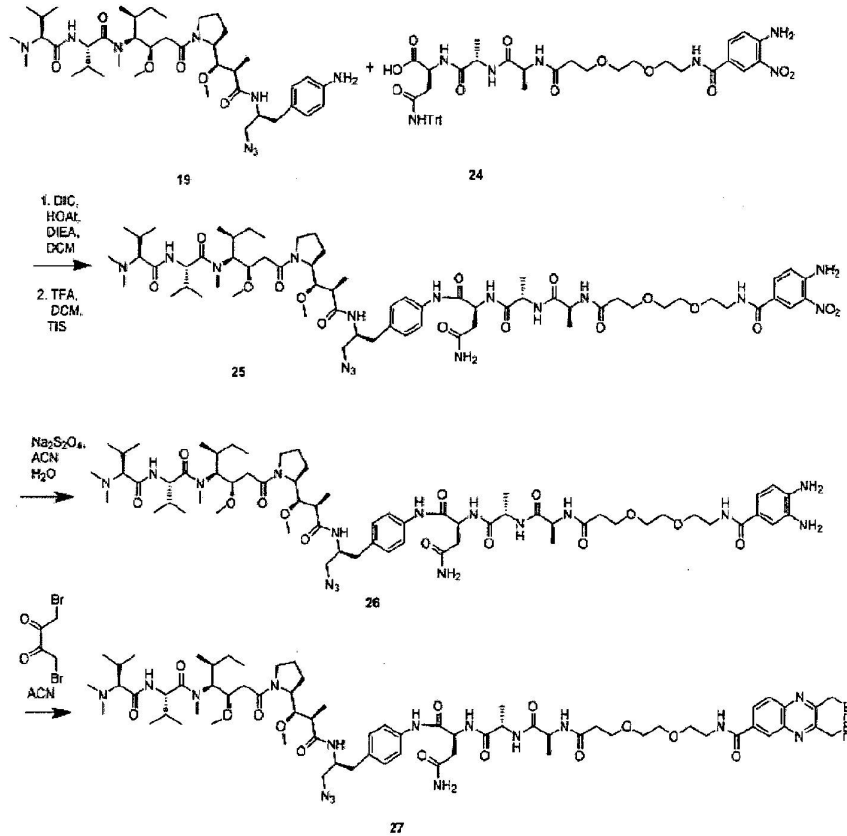
化合物22(0.5 mmol)を10 mLのジクロロメタン、10 mLのTFAおよび1 mLのトリイソプロピルシランに溶解させて1時間攪拌した。反応液を濃縮してHPLCによって精製して化合物23を得た。MS  $m/z$  1239.8 (M+H)。

【 0 1 8 5 】

実施例6 化合物27の合成

【 0 1 8 6 】

【 化 3 4 】



10

20

【 0 1 8 7 】

化合物5の合成：

丸底フラスコに化合物19のTFA塩(1 mmol)、化合物24(1 eq)、HOAt(3 eq)、ジクロロメタン(20 mL)、DIEA(6 eq)、およびDIC(2 eq)を入れた。反応液を16時間攪拌した後、20 mLのジクロロメタンで反応液を希釈し、20 mLの水で洗浄し、減圧で乾燥まで蒸発させてガラス状の固体を得たが、次の工程にそのまま使用した。得られた固体を10 mLのジクロロメタン、10 mLのTFAおよび1 mLのトリイソプロピルシランに溶解させて1時間攪拌した。反応液を減圧で乾燥まで蒸発させてHPLCによって精製して化合物6を得た。MS m/z 1351.5 (M+H)。

30

【 0 1 8 8 】

化合物26の合成：

化合物25(0.5 mmol)、20 mLのアセトニトリル、5 mLの水および10 mLの飽和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (4 eq)を入れて20分間攪拌した。反応液を濃縮してHPLCによって精製して化合物7を得た。MS m/z 1321.7 (M+H)。

40

【 0 1 8 9 】

化合物27の合成：

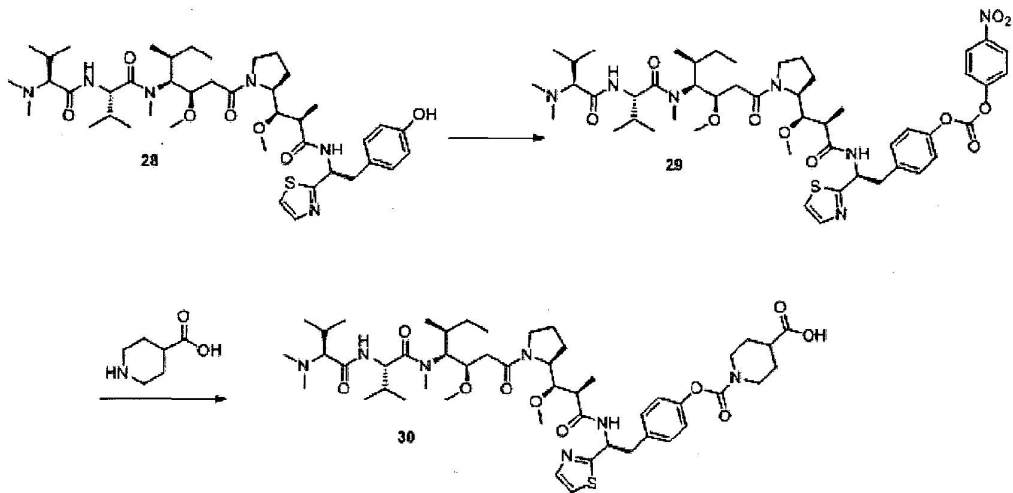
化合物26(0.4 mmol)を10 mLのアセトニトリルに溶解させて1,4-ジブプロモ-2,3-ブタンジオン(3 eq)を入れた。反応液を20分間攪拌した後、HPLCによって精製して化合物27を得た。MS m/z 1527.6 (M+H)。

【 0 1 9 0 】

実施例7 化合物30の製造

【 0 1 9 1 】

## 【化35】



10

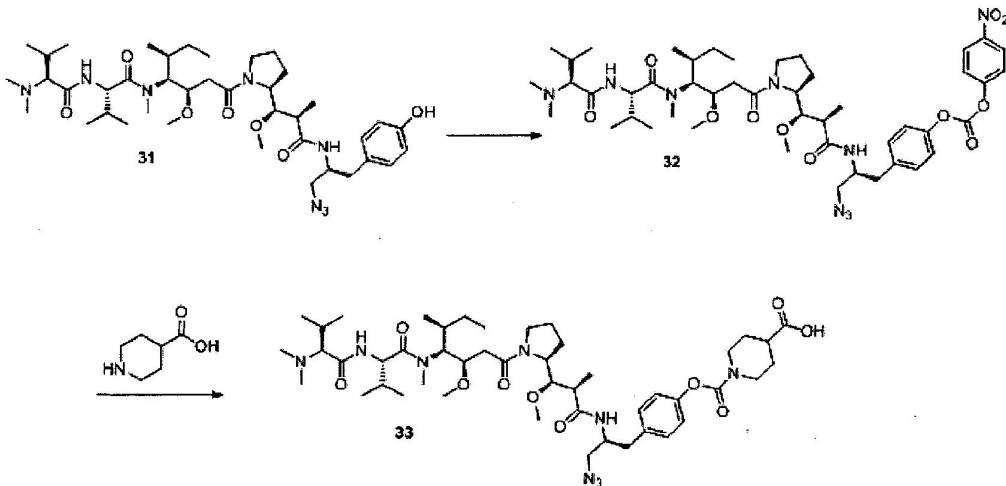
## 【0192】

式における化合物29は化合物14と同様の方法によって化合物28 (0.2 mmol) から製造した。化合物18を合成する方法によって、化合物29をピペリジン-4-カルボン酸と反応させ、HPLCによって精製して白色粉状の化合物30 (117 mg) を得た。MS  $m/z$  956.7 (M+H)。

実施例8 化合物33の製造

## 【0193】

## 【化36】



20

30

## 【0194】

式における化合物32は化合物14と同様の方法によって化合物31 (0.2 mmol) から製造した。化合物18を合成する方法によって、化合物29をピペリジン-4-カルボン酸と反応させ、HPLCによって精製して白色粉状の化合物33 (109 mg) を得た。MS  $m/z$  928.6 (M+H)。

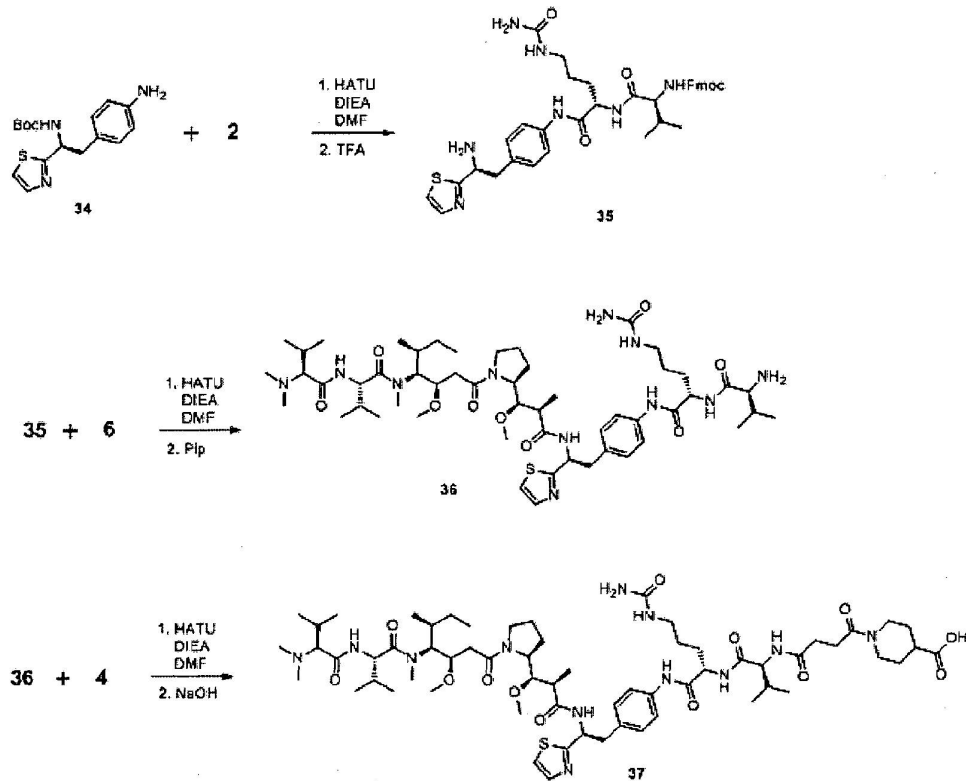
## 【0195】

実施例9 化合物37の製造

## 【0196】

40

## 【化37】



10

20

## 【0197】

## 化合物35の製造

HATU(110 mg, 0.29 mmol)、DIEA(181  $\mu$ L, 1.04 mmol)および化合物34(83 mg, 0.26 mmol)を順に化合物2(131 mg, 0.26 mmol, 4ml DMFに溶解させたもの)の溶液に入れた。30分間攪拌し、真空の条件において溶液を除去した。残留物を2 mLのDCMに溶解させた後、1 mLのTFAを入れて10分間攪拌した。真空の条件において溶液を除去した後、HPLCによって精製して化合物35(118 mg, 67%)を得た。MS m/z 698.4 (M+H)。

## 【0198】

## 化合物36の製造

HATU(68 mg, 0.17 mmol)、DIEA(118  $\mu$ L, 0.68 mmol)および化合物35(118 mg, 0.17 mmol)を順に化合物6(125 mg, 0.17 mmol, 4ml DMFに溶解させたもの)の溶液に入れた。30分間攪拌し、さらに400 のピペリジンを入れ、続いて10分間攪拌した。真空の条件において溶液を除去した後、HPLCによって精製して化合物36(196 mg, 87%)を得た。MS m/z 1056.6 (M+H)。

## 【0199】

## 化合物37の製造

HATU(27 mg, 0.072 mmol)、DIEA(50  $\mu$ L, 0.288 mmol)および化合物36(85 mg, 0.067 mmol)を順に化合物4(17 mg, 0.072 mmol, 2ml DMFに溶解させたもの)の溶液に入れた。30分間攪拌し、1 mLの水酸化ナトリウム溶液(1 M)を入れ、続いて60分間攪拌した。HPLCによって精製して化合物37(76 mg, 91%)を得た。MS m/z 1267.7 (M+H)。

## 【0200】

## 実施例10 抗HER2抗体-薬物抱合体の製造

K-Lock方法は、ZV0201を例として、抗体(たとえば配列番号1で示される軽鎖可変領域と配列番号29で示される軽鎖定常領域および配列番号58で示される重鎖可変領域と配列番号4で示される重鎖定常領域を有する抗体)は穏和な溶液系において直接L-Dと連結してもよい。室温25 (範囲は4~37 でもよい)で、10mg/mlの抗体(リン酸緩衝液PBSに濃度範囲5~30mg/mlで溶解させたもの)に抗体の6~10倍のモル量のL-D(DMAに体積がPBSの10%を超えないように溶解させたもの)を入れて3~16h反応させ、限外ろ過で過剰量の小分

50

子L-Dを除去した。抗体-薬物抱合体を疎水性クロマトグラフィーカラム（HIC）にかけ、0.75~1 Mの硫酸アンモニウム溶液で平衡化した後、さらに25 mMの硫酸アンモニウム溶液で溶離させ、抱合数が2の溶離液を合併してPBSで置換し、抱合数が2の抗HER2抗体-薬物抱合体を得た。

【0201】

本発明者は、抗体と薬物を抱合する過程において、pHが抱合反応に顕著に影響することを見出したが、好適な抱合pHは6.5~8.0で、好ましくは6.8~7.8で、より好ましくは7.0~7.5、たとえば7.1、7.2、7.3、7.4である。

【0202】

実験結果から、pH6以下では、抗体がほとんど薬物分子と抱合反応が生じず、pH7.8の場合、元の抗体が一部残留し、DAR数が1のものが大きな比率を占めたが、pHが約7.0の場合、ほとんどDAR2のものであったため、pHが約7.0の場合の反応効率が好適であることが示された。

【0203】

C-Lock方法では、抗体はTCEPで還元させた後、穏和な溶液系において直接L-Dと連結してもよい。たとえば、抗体を室温で5~10倍の過剰量のTCEPで還元させ、限外ろ過で過剰量のTCEPを除去する。5~10倍のL-Dを還元後の抗体溶液に入れて反応させ、限外ろ過で過剰量の小分子L-Dを除去する。抗体-薬物抱合体を疎水性クロマトグラフィーカラム（HIC）にかけ、精製して抱合数が4の抗HER2抗体-薬物抱合体を得る。

【0204】

本実施例で製造されたZV0201、ZV0202、ZV0203、ZV0223、ZV0230抱合体の構造は下記表に示す。

【0205】

【表1】

表1 抗体-薬物抱合体の構造

| 抱合体番号 | ZV0201    | ZV0202    | ZV0203   | ZV0204    | ZV0205    | ZV0230    |
|-------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| 抱合形態  | K-Lock    | K-Lock    | K-Lock   | K-Lock    | K-Lock    | K-Lock    |
| L-D   | 化合物<br>18 | 化合物<br>33 | 化合物<br>7 | 化合物<br>30 | 化合物<br>37 | 化合物<br>23 |
| n     | 1.8-2     | 1.8-2     | 1.8-2    | 1.8-2     | 1.8-2     | 1.8-2     |

【0206】

K-Lock形態1つおよびC-Lock形態1つの代表的な抗体-薬物抱合体を取ってHIC分析を行ったが、操作手順は以下の通りである。

【0207】

TSKゲルブチルNPRカラム(4.6 mmIDx3.5 cm, 2.5 mm, Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA)を使用し、移動相はそれぞれ1.5M 硫酸アンモニウムと0.025Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7)および75% 0.025Mリン酸ナトリウム緩衝液と25%イソプロパノール(pH7.0)で、勾配溶離は10% B~70% B、10分、70% B~100% B、5分、100% B~10% B、2分であった。

【0208】

図1は本発明による抗体-薬物抱合体のHIC分析結果を示す。ここで、図1Aは抱合していない抗体のHIC分析結果を、図1BはZV0201のHIC分析結果を示すが、平均抱合数(DAR)が2の抱合体の純度が90%以上で、少量の平均抱合数(DAR)が1のADCを含有したことがわかる。図1CはC-Lock(ZV0223、製造方法は上記の通りである)のHIC分析結果を示すが、平均抱合数4のADCがほとんどを占め、純度が90%超であったことがわかる。

【0209】

本発明のADC(たとえばZV0201)に対してペプチドマッピングを行ったが、分析パラメータは以下の通りである。

【0210】

サンプルをトリプターゼで酵素切断した後、液相クロマトグラフィー-質量分析(カラム型番 BEH 300 C18 1.7  $\mu\text{m}$  x 2.1 x 150mm、温度40度、移動相:0.1% ギ酸/水および0.1%ギ酸/アセトニトリル)を行った。

【0211】

結果は図1Dに示すように、分析から本発明におけるK-Lock形態で抱合したADCは、薬物が主に抗体の軽鎖定常領域の81番目のリシンに抱合したことが示された。

【0212】

実施例11 親和性検出

親和性検出の実験手順は以下の通りである。

【0213】

ZV0201およびZV0223を3.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した後、3倍の勾配で希釈し、濃度はそれぞれ3.3、1.1、0.33、0.11  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、それぞれ $3.0 \times 10^5$ 個のBT474細胞を含有するエップendorf管に入れ、4 の条件において30分間インキュベートした。沈殿細胞を遠心し、PBSを入れて1回洗浄した。さらに、600  $\mu\text{l}$ のFITCで標識された二次抗体希釈液を入れ、4 の条件において光を避けて30分間インキュベートした。沈殿細胞を遠心し、PBSで2回洗浄し、最後に500  $\mu\text{l}$ のPBSを入れて細胞を均一に懸濁させ、フローサイトメーターによって平均蛍光強度値を検出した。検出結果は以下の通りである。

【0214】

抗HER2抗体の抱合前後の親和性の比較は、K-Lockは例としてZV0201を、C-Lockは例としてZV0223を使用し、親和性の検出結果は図2に示すように、抱合前後の親和性はほぼ変わらなかったことがわかる。

【0215】

実施例12 腫瘍細胞抑制実験

本実施例において、本発明の抗体-薬物抱合体のHER2陽性細胞に対する抑制活性を検出した。本実施例における腫瘍細胞株はいずれも米国ATCCから購入された。

【0216】

実験の手順は以下の通りである。

【0217】

細胞を消化し、遠心して収集した後、計数し、そして細胞液を $0.4 \sim 2.0 \times 10^5$ 個/mlに希釈し、96ウェルプレートに当該細胞懸濁液を100  $\mu\text{l}$ /ウェルずつ入れた。37 の細胞インキュベーターで一晩培養し、翌日に相応する濃度のADC薬物を入れた。薬物の開始濃度は1~15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、3倍の等勾配で希釈し、計9つの濃度の勾配で、最後に1組のゼロ濃度の細胞対照を設けた。薬物を入れた後、3日培養し、薬物を含有する培地を全部吸い取り、10%のCCK-8溶液を100  $\mu\text{l}$ /ウェルずつ入れ、37 で1~2時間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーによって490nmにおいて各ウェルの吸光強度を検出した。データをグラフィックソフトウェアに導入し、曲線をフィッティングし、IC50値を計算した。

【0218】

実験結果は下記表に示す。本発明のADCの細胞活性は顕著に既に市販のT-DM1よりも優れた。

【0219】

10

20

30

40

## 【表 2】

表 2 抗HER2抗体-薬物抱合体のHER2発現腫瘍細胞のIC50値(nM)

|                    | ZV0201 | ZV0202 | ZV0203 | ZV0230 | T-DM1 |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|-------|
| SKBR-3<br>HER2 3+  | 0.038  | 0.162  | 0.129  | 0.0844 | 0.114 |
| NCI-N87<br>HER2 3+ | 0.243  | 1.47   | 0.621  | 3.56   | 0.548 |
| OE-19<br>HER2 3+   | 0.0586 | 0.196  | 0.296  | 0.196  | 0.099 |
| BT474<br>HER2 3+   | 0.0731 | /      | 0.112  | 0.145  | 0.622 |
| HCC1954<br>HER2 3+ | 0.033  | 0.070  | 0.214  | 0.232  | 0.159 |
| MDA453<br>HER2 2+  | 0.0633 | 0.0783 | 0.201  | /      | 0.259 |

10

## 【0220】

細胞周期の検出方法：6ウェルプレートにおいて、各ウェルにそれぞれ $3.0 \times 10^5$ 個のNCI-N87細胞および最終濃度が $5 \mu\text{l}$ になるようなZV0201を入れた。37℃で60h培養した後、ウェルにおけるすべての細胞を収集し、沈殿を遠心し、1mlの氷浴で冷やしておいた70%エタノールを入れて4℃で一晩固定させた。固定終了後、PBSを入れて1回洗浄し、PI染色液を入れ、37℃の条件において、光を避けて30分間インキュベートした後、フローサイトメーターによって検出した。

20

## 【0221】

実験結果から、薬物の作用で70%超のN87腫瘍細胞の細胞周期がG2/M期に停止したことが示され、結果は図3に示すように、図3ではZV02は抱合薬物のない抗体対照である。

## 【0222】

実施例13 体内抗腫瘍活性

抗HER2抗体-薬物抱合体の体内抗腫瘍活性の検出手順は以下の通りである。

30

## 【0223】

腫瘍細胞をヌードマウスまたはSCIDマウスの腋下に接種し、腫瘍体積が $100 \sim 300 \text{mm}^3$ に生長したら尾静脈に投与し、OE19は3回に分けて、3日に1回で投与し、ほかのモデルはしずれも単回で投与し、投与後一定の時間で腫瘍の大きさ、腫瘍塊の長径(a)、短径(b)を測定し、腫瘍体積(tumor volume, TV)の計算式は $TV = 1/2 \times a \times b^2$ である。

## 【0224】

実験結果から、本発明の抗HER2抗体-薬物抱合体は、体内における腫瘍に対して顕著な抑制作用を有し、体内における腫瘍抑制活性はT-DM1よりも3倍以上高かったことが示された。

40

## 【0225】

図4はADCでマウス体内におけるN87胃癌移植腫瘍を治療する場合の治療効果を示す。本発明のADCはいずれも有効にN87腫瘍の生長を抑制し、かつ本発明のK-Lock抱合体は腫瘍を完全に数十日再発しないように抑制することができ、治療効果が顕著に既に市販のT-DM1よりも優れたものである。

## 【0226】

図5はADCでマウス体内におけるOE19胃癌移植腫瘍を治療する場合の治療効果を示す。本発明のADCはいずれも有効にOE19腫瘍の生長を抑制し、かつ本発明のADCは腫瘍を完全に数十日再発しないように抑制することができ、治療効果が既に市販のT-DM1よりも優れたものである。

50

【 0 2 2 7 】

図6はADCでマウス体内におけるSKOV-3卵巣癌移植腫瘍を治療する場合の治療効果を示す。本発明のADCはいずれも有効にOE19腫瘍の生長を抑制し、かつ本発明のADCは治療効果が既に市販のT-DM1よりも優れたものである。

【 0 2 2 8 】

図7はADCでマウス体内におけるBT474乳癌移植腫瘍を治療する場合の治療効果を示す。本発明のADCはいずれも有効にBT474腫瘍の生長を抑制し、昭華ADCは治療効果が既に市販のT-DM1よりも優れたものである。

【 0 2 2 9 】

図8はADCでマウス体内におけるCalu-3肺癌移植腫瘍を治療する場合の治療効果を示す。本発明のADCはいずれも有効にCalu-3腫瘍の生長を抑制し、かつ本発明は治療効果が既に市販のT-DM1よりも優れたものである。

【 0 2 3 0 】

各文献がそれぞれ単独に引用されるように、本発明に係るすべての文献は本出願で参考として引用する。また、本発明の上記の内容を読み終わった後、当業者が本発明を各種の変動や修正をすることができるが、それらの等価の形態のものは本発明の請求の範囲に含まれることが理解されるはずである。

10

【 図 1 A 】

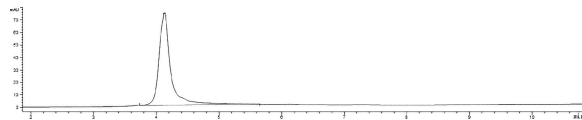


図 1 A

【 図 1 B 】

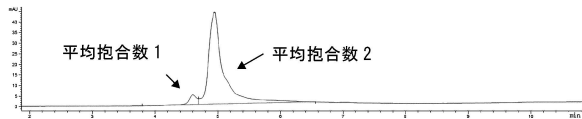


図 1 B

【 図 1 C 】

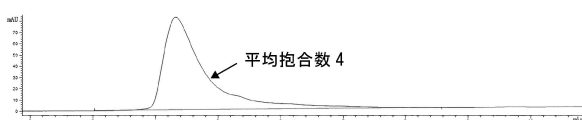


図 1 C

【 図 1 D 】

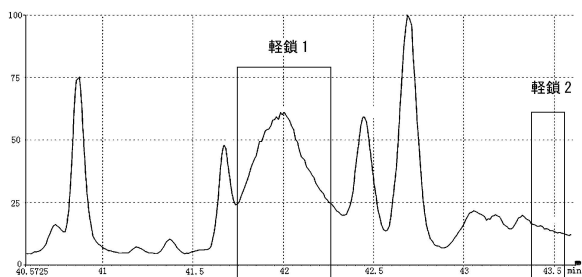


図 1 D

【 図 2 】

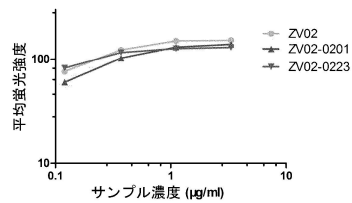


図 2

【 図 3 】

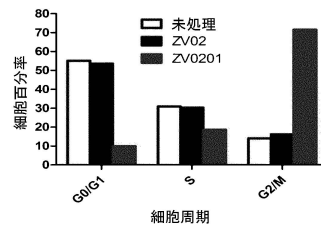


図 3

【 図 4 】

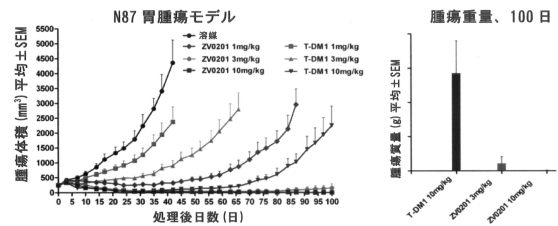
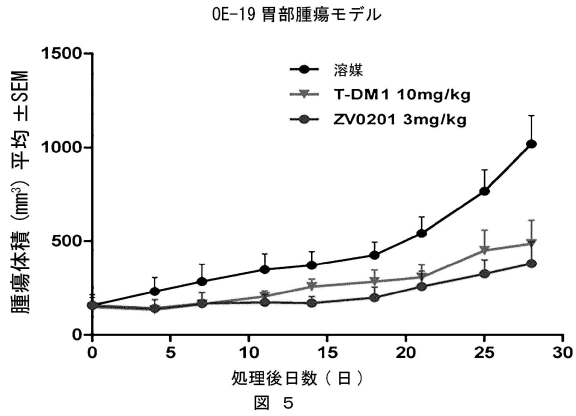
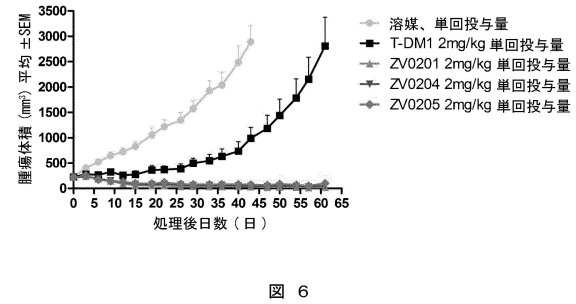


図 4

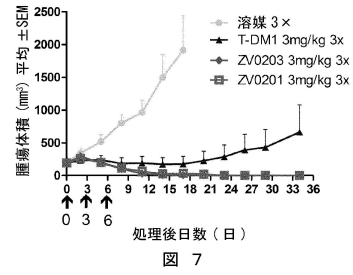
【 図 5 】



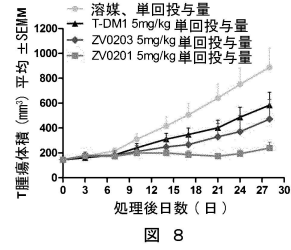
【 図 6 】



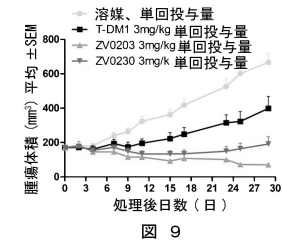
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 配列表 】

0006828056000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 K 39/395 T  
 A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00  
 A 6 1 P 43/00 1 2 1

(72)発明者 陳剛  
 中国浙江省杭州市富陽区富閑路9号銀湖創新中心15号楼  
 (72)発明者 李朝輝  
 中国浙江省杭州市富陽区富閑路9号銀湖創新中心15号楼  
 (72)発明者 曹小冬  
 中国浙江省杭州市富陽区富閑路9号銀湖創新中心15号楼

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 国際公開第2016/123412(WO, A1)  
 特表2015-518832(JP, A)  
 特表2015-518831(JP, A)  
 特表2013-534535(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2  
 A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9  
 A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4  
 A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4  
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )