

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-534253

(P2017-534253A)

(43) 公表日 平成29年11月24日(2017.11.24)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------------|-----------------|-------------|
| C12N 15/09 (2006.01) | C12N 15/00 ZNAA | 4B064 |
| C07K 16/30 (2006.01) | C07K 16/30 | 4C076 |
| C07K 16/28 (2006.01) | C07K 16/28 | 4C084 |
| C12P 21/08 (2006.01) | C12P 21/08 | 4C085 |
| A61P 35/00 (2006.01) | A61P 35/00 | 4C086 |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 210 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-513637 (P2017-513637)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月11日 (2015. 9. 11)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年3月10日 (2017. 3. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/049549
 (87) 国際公開番号 W02016/040723
 (87) 国際公開日 平成28年3月17日 (2016. 3. 17)
 (31) 優先権主張番号 62/049, 594
 (32) 優先日 平成26年9月12日 (2014. 9. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
 サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 チェン, シャオチョン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, デ
 ィーエヌエー ウェイ 1
 (72) 発明者 デニス, マーク
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, デ
 ィーエヌエー ウェイ 1
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗HER2抗体及び免疫複合体

(57) 【要約】

本開示は、抗HER2抗体及び免疫複合体、ならびにそれらの使用方法を提供する。

【選択図】 図3

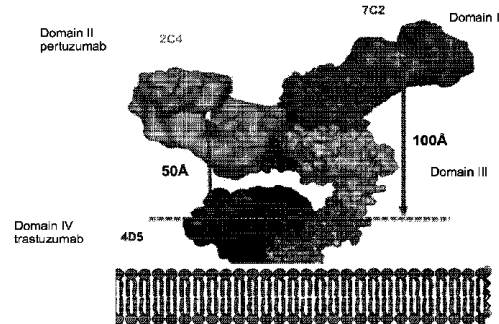


FIG. 3

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

HER2 に結合する単離抗体であって、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 と、(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 と、(c) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 と、(d) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR - L1 と、(e) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 と、(f) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 と、を含む、前記単離抗体。

【請求項 2】

配列番号 11 の配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 10 の配列を含む軽鎖可変領域と、を含む、請求項 1 に記載の抗体。

10

【請求項 3】

モノクローナル抗体である、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 4】

ヒト化またはキメラ抗体である、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

HER2 に結合する抗体断片である、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

HER2 が、配列番号 1 のアミノ酸 23 ~ 1255 を含むヒト HER2 である、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

HER2 の細胞外ドメイン I に結合する、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項 8】

HER2 の細胞外ドメイン I が、配列番号 35 の配列を有する、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

IgG1、IgG2a、または IgG2b 抗体である、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 10】

A118C 及び S400C から選択される重鎖定常領域内に少なくとも 1 つの突然変異を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体。

30

【請求項 11】

K149C 及び V205C から選択される軽鎖定常領域内に少なくとも 1 つの突然変異を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 12】

前記抗体が、

a) 配列番号 19 の配列を含む重鎖、及び配列番号 18 の配列を含む軽鎖、または

b) 配列番号 19 の配列を含む重鎖、及び配列番号 23 の配列を含む軽鎖、または

c) 配列番号 24 の配列を含む重鎖、及び配列番号 18 の配列を含む軽鎖を含む、請求

項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 13】

配列番号 28 の重鎖定常領域を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 14】

配列番号 25 の軽鎖定常領域を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 15】

HER2 に結合する単離抗体であって、配列番号 19 の配列を含む重鎖と、配列番号 23 の配列を含む軽鎖と、を含む、前記単離抗体。

【請求項 16】

HER2 に結合する単離抗体であって、配列番号 24 の配列を含む重鎖と、配列番号 18 の配列を含む軽鎖と、を含む、前記単離抗体。

【請求項 17】

50

先行請求項のいずれか一項に記載の抗体をコードする、単離核酸。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項 19】

前記抗体が産生されるように、請求項 18 に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗体の産生方法。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体と、細胞傷害性薬剤と、を含む、免疫複合体。

【請求項 21】

式 A b - (L - D) p を有し、式中、

(a) A b が、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体であり、

(b) L が、リンカーであり、

(c) D が、細胞傷害性薬剤であり、

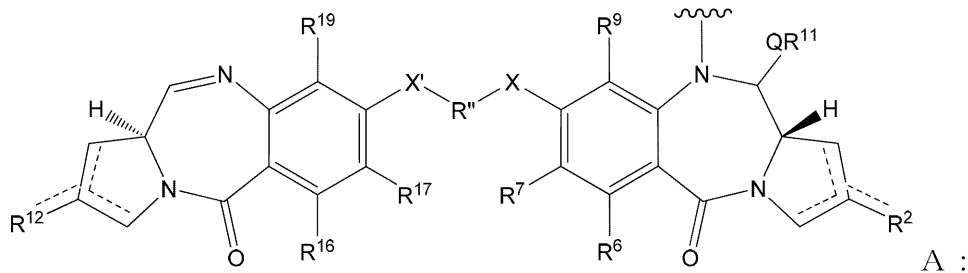
(d) p が、1 ~ 8 の範囲である、請求項 20 に記載の免疫複合体。

【請求項 22】

前記細胞傷害性薬剤が、オーリスタチン、マイタンシノイド、カリケアミシン、ピロロベンゾジアゼピン、ネモルピシン誘導体、及び 1 - (クロロメチル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - ベンゾ [e] インドール (C B I) から選択される、請求項 20 または請求項 21 に記載の免疫複合体。

【請求項 23】

前記細胞傷害性薬剤が、式 A、



A :

のピロロベンゾジアゼピンであり、式中、点線が、C1とC2またはC2とC3との間の二重結合の任意の存在を示し、

R² が独立して、H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂R、及びCORから選択され、任意に八口またはジ八口からさらに選択され、R^D が独立して、R、CO₂R、COR、CHO、CO₂H、及び八口から選択され、

R⁶ 及び R⁹ が独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR、NO₂、Me₃Sn、及び八口から選択され、

R⁷ が独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR、NO₂、Me₃Sn、及び八口から選択され、

Q が独立して、O、S、及びNHから選択され、

R¹¹ が、H若しくはRのいずれかであるが、またはQがOである場合にはSO₃Mであり、式中、Mが金属陽イオンであり、

R¹² 及び R¹⁶ がそれぞれ独立して、任意に置換される C₁ - 8 アルキル、C₃ - 8 ヘテロシクリル、及び C₅ - 20 アリール基から選択され、任意に基 NRR との関連で、R¹⁷ 及び R¹⁹ が、それらが結合する窒素原子と一緒に、任意に置換される 4 員、5 員、6 員、または 7 員の複素環式環を形成し、

R¹²、R¹⁶、R¹⁹、及び R¹⁷ が、それぞれ R²、R⁶、R⁹、及び R⁷ について定義される通りであり、

R¹¹ が、C₃ - 12 アルキレン基であり、その鎖が、任意に置換される 1 つ以上のヘテ

10

20

30

40

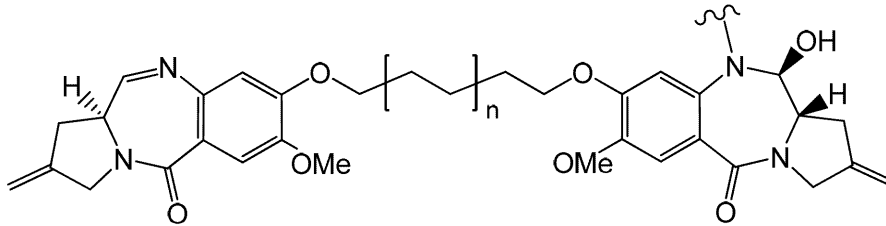
50

口原子及び / または芳香族環によって分断され得、

X 及び X が独立して、O、S、及び N (H) から選択される、請求項 20 または請求項 21 に記載の免疫複合体。

【請求項 24】

D が、構造



10

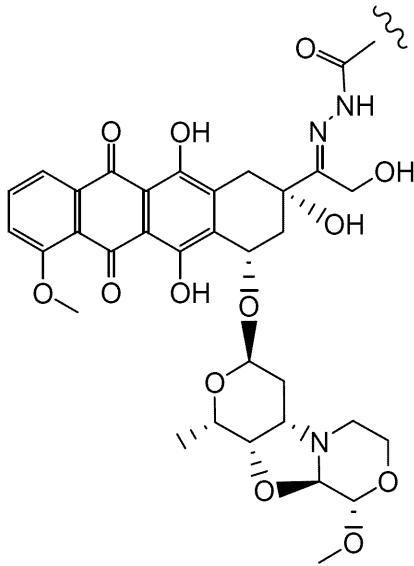
を有し、式中、n が、0 または 1 である、請求項 23 に記載の免疫複合体。

【請求項 25】

前記細胞傷害性薬剤が、ネモルピシン誘導体である、請求項 20 または請求項 21 に記載の免疫複合体。

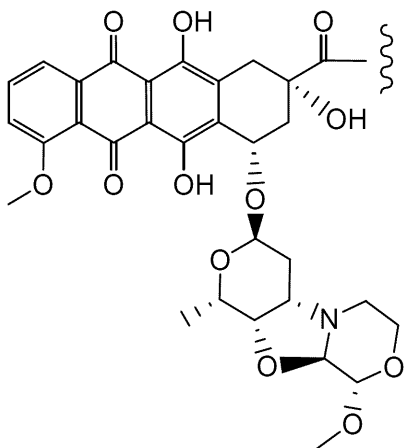
【請求項 26】

前記細胞傷害性薬剤が、



20

、及び



40

から選択される構造を有する、請求項 25 に記載の免疫複合体。

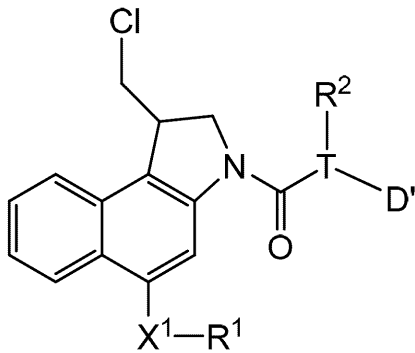
【請求項 27】

前記細胞傷害性薬剤が、1 - (クロロメチル) - 2,3 - ジヒドロ - 1 H - ベンゾ [e] インドール (CBI) を含む、請求項 20 または請求項 21 に記載の免疫複合体。

50

【請求項 28】

前記細胞傷害性薬剤が、式：



10

を有し、式中、

R^1 が、H、 $P(O)_3H_2$ 、 $C(O)NR^aR^b$ 、または L への結合から選択され、
 R^2 が、H、 $P(O)_3H_2$ 、 $C(O)NR^aR^b$ 、または L への結合から選択され、
 R^a 及び R^b が独立して、H、及び 1 つ以上の F で任意に置換される $C_1 - C_6$ アルキルから選択されるか、

または R^a 及び R^b が、5 員または 6 員の複素環式基を形成し、

T が、 $C_3 - C_{12}$ アルキレン、Y、 $(C_1 - C_6 \text{ アルキレン}) - Y - (C_1 - C_6 \text{ アルキレン})$ 、 $(C_1 - C_6 \text{ アルキレン}) - Y - (C_1 - C_6 \text{ アルキレン}) - Y - (C_1 - C_6 \text{ アルキレン})$ 、 $(C_2 - C_6 \text{ アルケニレン}) - Y - (C_2 - C_6 \text{ アルケニレン})$ 、及び $(C_2 - C_6 \text{ アルキニレン}) - Y - (C_2 - C_6 \text{ アルキニレン})$ から選択されるテザー基であり、

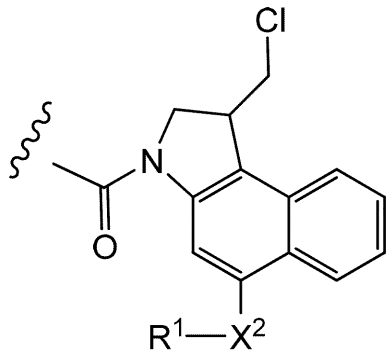
20

式中、Y が独立して、O、S、 NR^1 、アリーール、及びヘテロアリーールから選択され、アルキレン、アルケニレン、アリーール、及びヘテロアリーールが独立してかつ任意に、F、OH、 $O(C_1 - C_6 \text{ アルキル})$ 、 NH_2 、 $NHCH_3$ 、 $N(CH_3)_2$ 、 $OP(O)_3H_2$ 、及び $C_1 - C_6$ アルキルで置換され、式中、アルキルが、1 つ以上の F で任意に置換されるか、

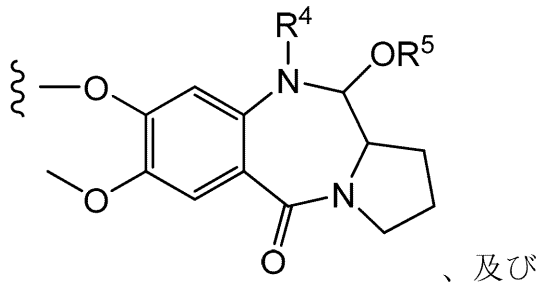
またはアルキレン、アルケニレン、アリーール、及びヘテロアリーールが独立してかつ任意に、L への結合で置換され、

30

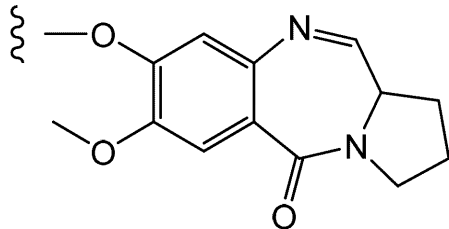
D が、



10



、及び



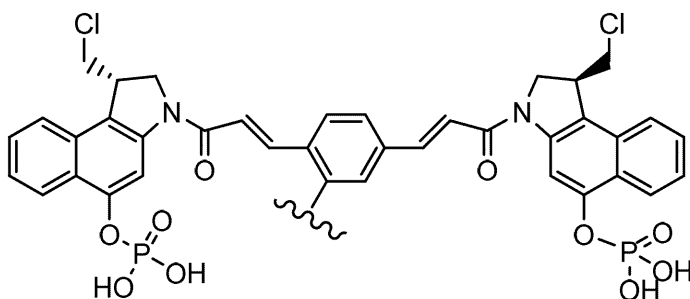
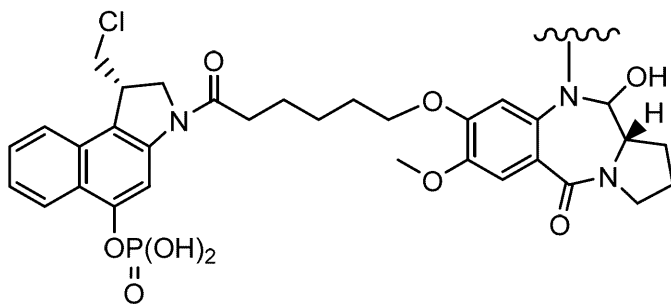
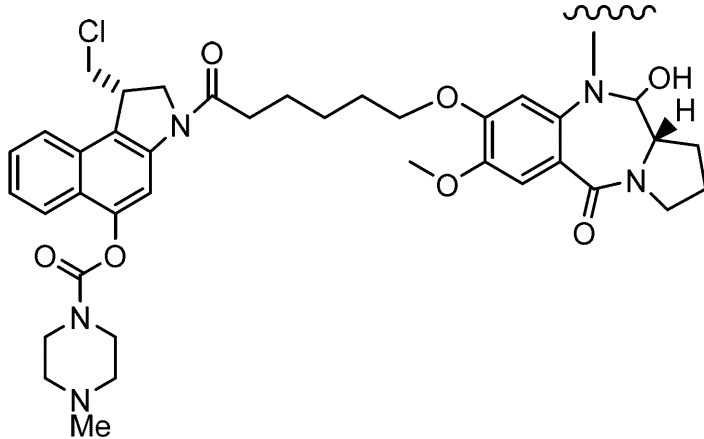
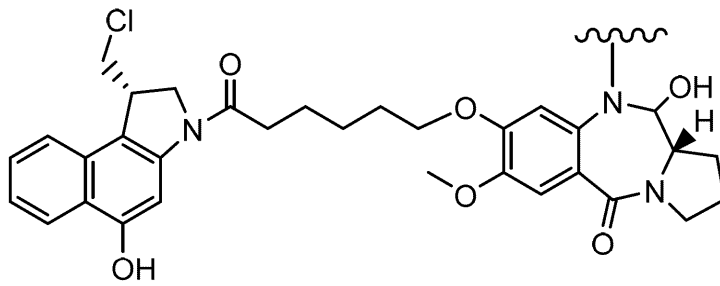
20

から選択される薬物部分であり、式中、波線が、Tへの結合部位を示し、
 X^1 及び X^2 が独立して、O 及び NR^3 から選択され、式中、 R^3 が、H、及び1つ以上のFで任意に置換される $C_1 - C_6$ アルキルから選択され、
 R^4 が、H、 CO_2R 、またはリンカー(L)への結合であり、式中、Rが、 $C_1 - C_6$ アルキル、またはベンジルであり、
 R^5 が、H、または $C_1 - C_6$ アルキルである、請求項27に記載の免疫複合体。

30

【請求項29】

前記細胞傷害性薬剤が、



から選択される構造を有する、請求項 28 に記載の免疫複合体。

【請求項 30】

前記リンカーが、プロテアーゼによって切断可能である、請求項 21 ~ 29 のいずれか一項に記載の免疫複合体。

【請求項 31】

前記リンカーが、酸不安定性である、請求項 21 ~ 29 のいずれか一項に記載の免疫複合体。

【請求項 32】

前記リンカーが、ヒドラゾンを含む、請求項 31 に記載の免疫複合体。

【請求項 33】

前記リンカーが、ジスルフィドを含む、請求項 21 ~ 29 のいずれか一項に記載の免疫複合体。

【請求項 34】

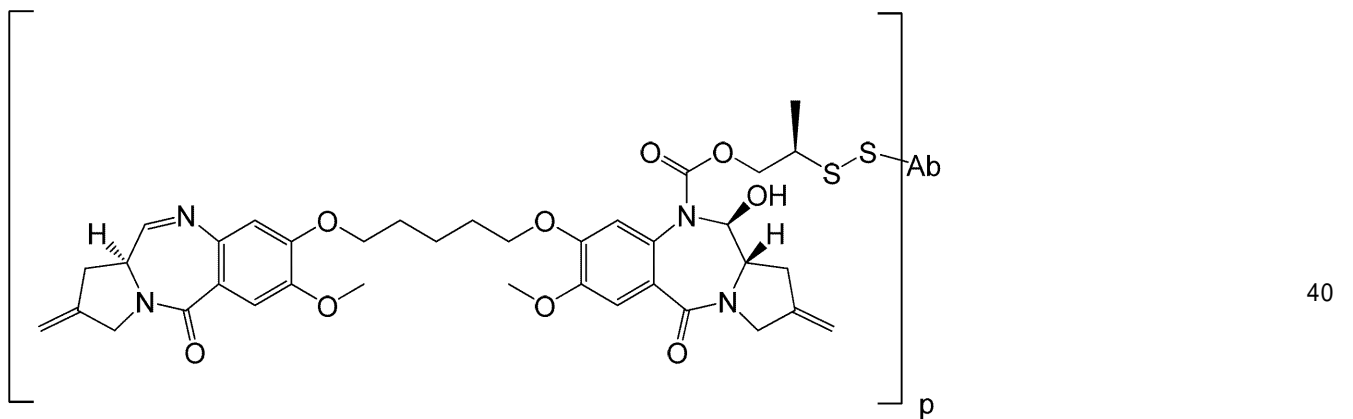
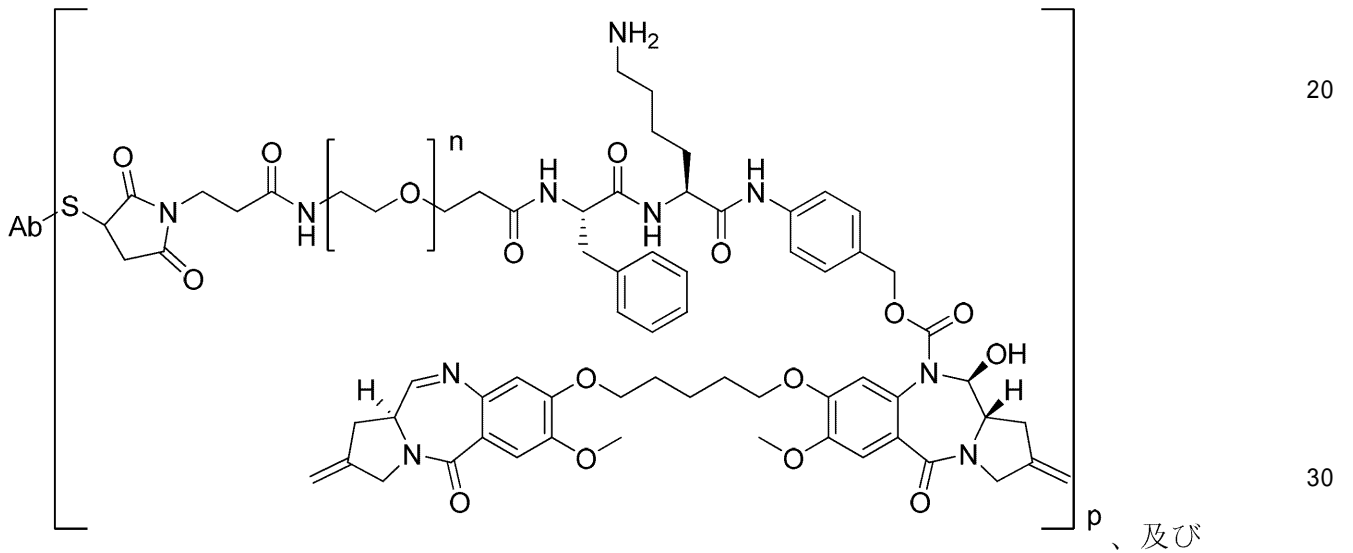
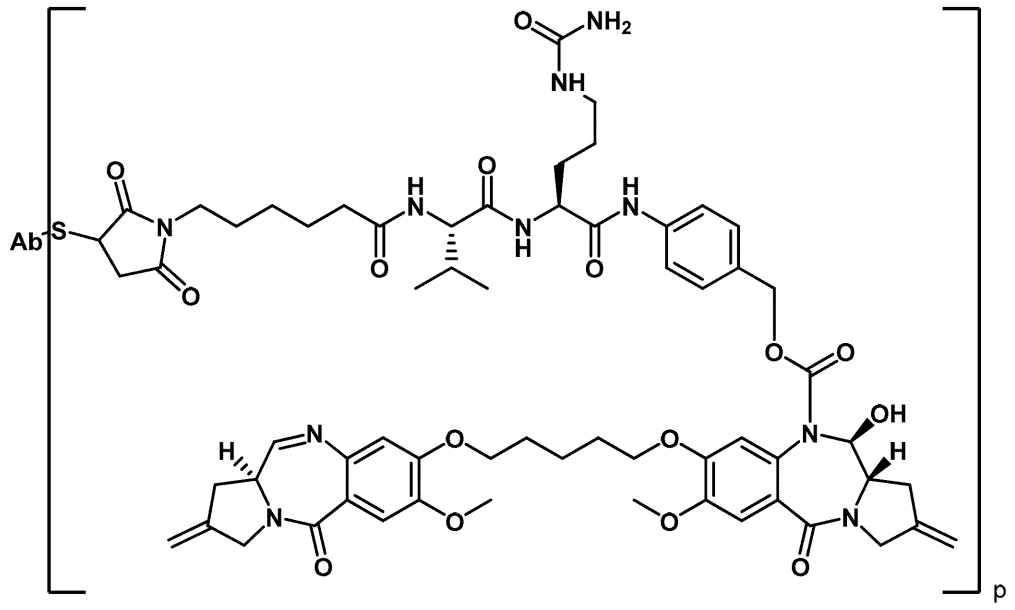
10

20

、及び

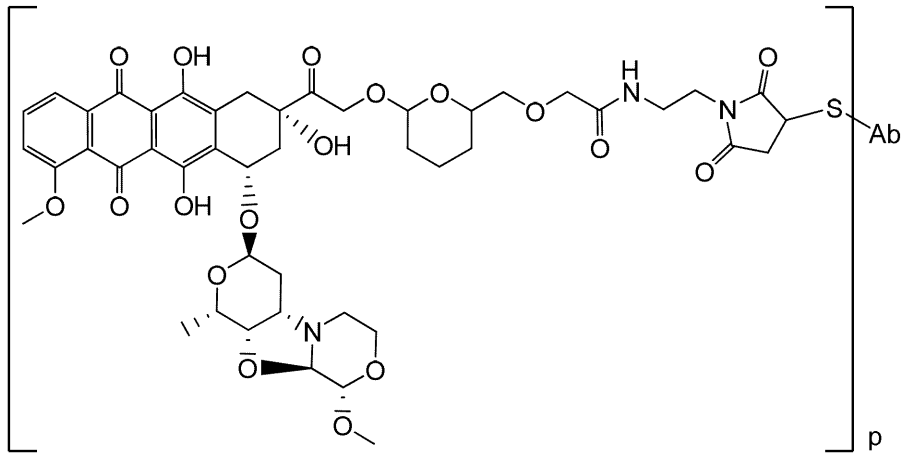
30

50

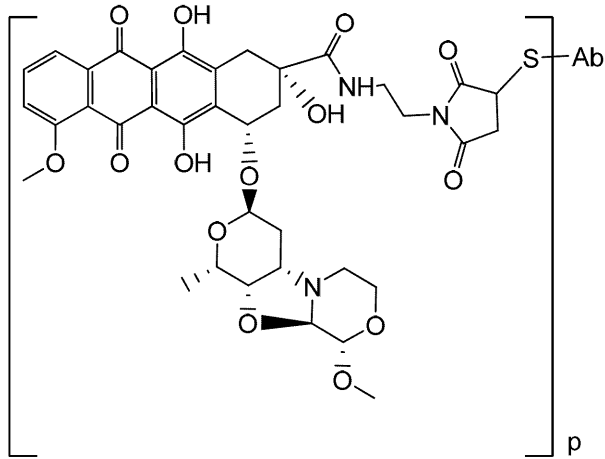


から選択される構造を有する、請求項 2 1 または請求項 2 4 に記載の免疫複合体。

【請求項 3 5】

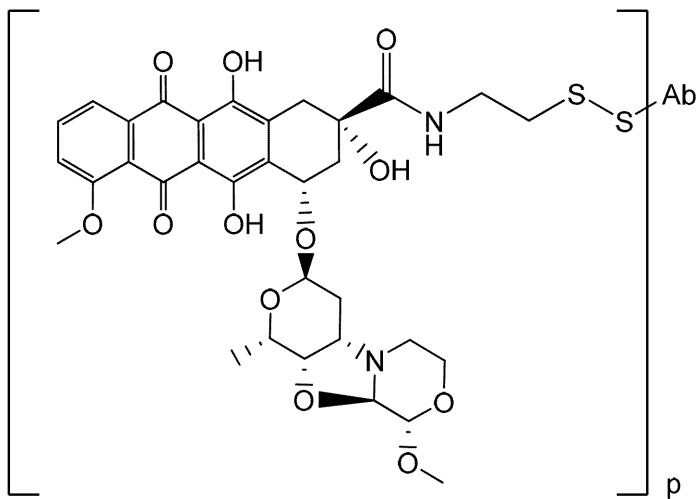


10



20

、及び

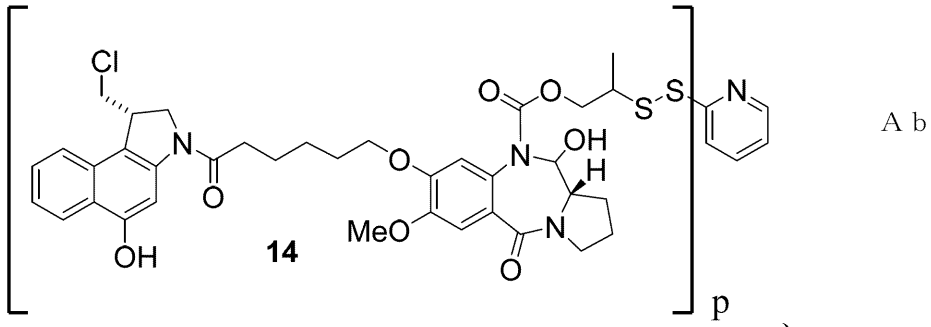


30

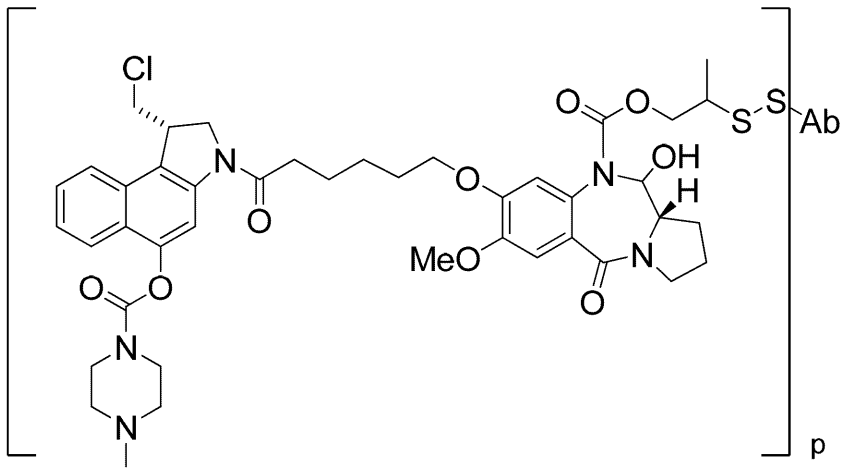
40

から選択される構造を有する、請求項 2 1 または請求項 2 6 に記載の免疫複合体。

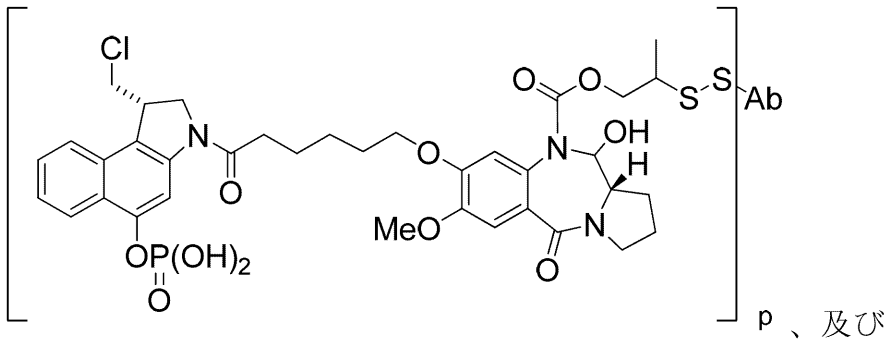
【請求項 3 6】



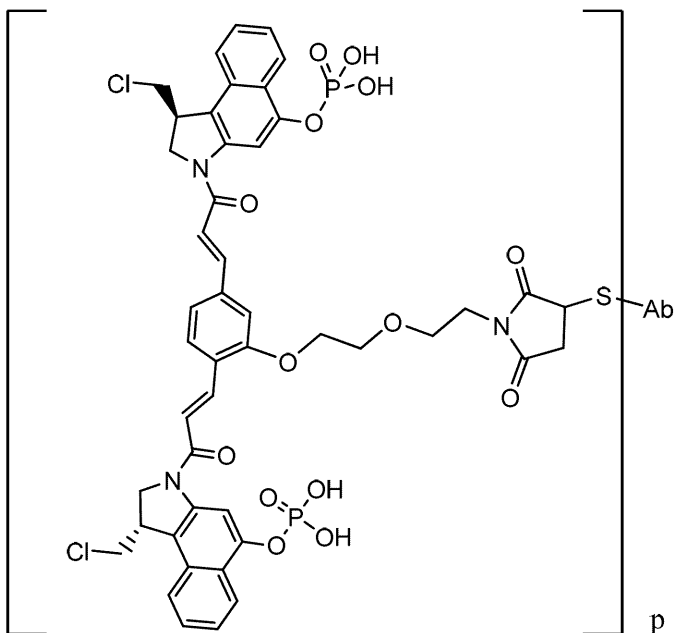
10



20



30



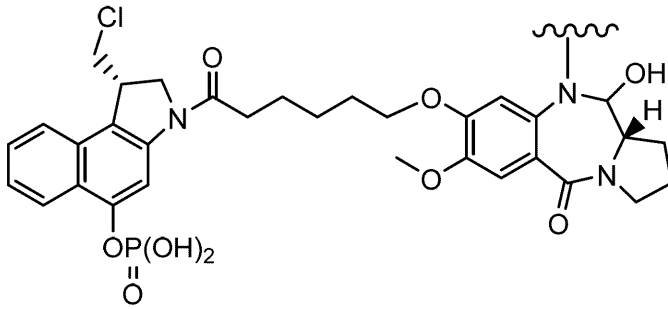
40

から選択される構造を有する、請求項 2 1 または請求項 2 9 に記載の免疫複合体。

50

【請求項 37】

前記細胞傷害性薬剤が、構造：



10

を含む、請求項 20 または請求項 21 に記載の免疫複合体。

【請求項 38】

p が、1.3 ~ 2 または 2 ~ 5 の範囲である、請求項 21 ~ 37 のいずれか一項に記載の免疫複合体。

【請求項 39】

請求項 20 ~ 38 のいずれか一項に記載の免疫複合体と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的製剤。

【請求項 40】

追加の治療剤をさらに含む、請求項 39 に記載の薬学的製剤。

20

【請求項 41】

前記追加の治療剤が、HER2 に結合する抗体または免疫複合体である、請求項 40 に記載の薬学的製剤。

【請求項 42】

前記追加の治療剤が、(i) HER2 のドメイン II に結合する抗体若しくは免疫複合体、及び/または (ii) ドメイン IV 若しくは HER2 に結合する抗体若しくは免疫複合体である、請求項 41 に記載の薬学的製剤。

【請求項 43】

前記追加の治療剤が、(i) エピトープ 2C4 に結合する抗体若しくは免疫複合体、及び/または (ii) エピトープ 4D5 に結合する抗体若しくは免疫複合体である、請求項 41 に記載の薬学的製剤。

30

【請求項 44】

前記追加の治療剤が、トラスツズマブ、トラスツズマブ - MCC - DM1 (T - DM1)、及びペルツズマブから選択される、請求項 40 に記載の薬学的製剤。

【請求項 45】

(1) トラスツズマブまたは T - DM1、及び (2) ペルツズマブをさらに含む、請求項 40 に記載の薬学的製剤。

【請求項 46】

HER2 陽性癌を有する個体の治療方法であって、有効量の、請求項 20 ~ 38 のいずれか一項に記載の免疫複合体、または請求項 39 ~ 45 のいずれか一項に記載の薬学的製剤を前記個体に投与することを含む、前記方法。

40

【請求項 47】

前記 HER2 陽性癌が、乳癌または胃癌である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記 HER2 陽性乳癌が、早期乳癌である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記 HER2 陽性乳癌が、転移性乳癌である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 50】

追加の治療剤を前記個体に投与することをさらに含む、請求項 46 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

50

- 【請求項 5 1】
HER2 陽性癌を有する個体の治療方法であって、有効量の、請求項 2 0 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の免疫複合体、及び少なくとも 1 つの追加の治療剤を前記個体に投与することを含む、前記方法。
- 【請求項 5 2】
前記追加の治療剤が、HER2 に結合する抗体または免疫複合体である、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 5 3】
前記追加の治療剤が、(i) HER2 のドメイン I I に結合する抗体若しくは免疫複合体、及び / または (i i) ドメイン I V 若しくは HER2 に結合する抗体若しくは免疫複合体である、請求項 5 2 に記載の方法。 10
- 【請求項 5 4】
前記追加の治療剤が、(i) エピトープ 2 C 4 に結合する抗体若しくは免疫複合体、及び / または (i i) エピトープ 4 D 5 に結合する抗体若しくは免疫複合体である、請求項 5 2 に記載の方法。
- 【請求項 5 5】
前記追加の治療剤が、トラスツズマブ、トラスツズマブ - M C C - D M 1 (T - D M 1)、及びペルツズマブから選択される、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 5 6】
前記追加の治療剤が、(1) トラスツズマブまたは T - D M 1、及び (2) ペルツズマブである、請求項 5 1 に記載の方法。 20
- 【請求項 5 7】
前記 HER2 陽性癌が、乳癌または胃癌である、請求項 5 1 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 5 8】
前記 HER2 陽性乳癌が、転移性乳癌である、請求項 5 7 に記載の方法。
- 【請求項 5 9】
前記 HER2 陽性乳癌が、早期乳癌である、請求項 5 7 に記載の方法。
- 【請求項 6 0】
前記 HER2 陽性癌が、再発癌である、請求項 4 6 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の方法 30
- 【請求項 6 1】
前記再発癌が、局所性再発癌である、請求項 6 0 に記載の方法。
- 【請求項 6 2】
前記 HER2 陽性癌が、進行癌である、請求項 4 6 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 6 3】
前記 HER2 陽性癌が、切除不可能である、請求項 4 6 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 6 4】 40
HER2 陽性癌を有する個体の治療方法であって、
a) 前記個体に対して、請求項 2 0 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の免疫複合体、または請求項 3 9 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の薬学的製剤を用いるネオアジュバント治療を行うことと、
b) 前記癌を根治手術によって除去することと、
c) 前記個体に対して、請求項 2 0 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の免疫複合体、または請求項 3 9 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の薬学的製剤を用いるアジュバント治療を行うことと、を含む、前記方法。
- 【請求項 6 5】
前記 HER2 陽性癌が、乳癌または胃癌である、請求項 6 4 に記載の方法。 50

【請求項 66】

前記 H E R 2 陽性癌が、乳癌である、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

H E R 2 陽性細胞の増殖の阻害方法であって、前記細胞を、請求項 20 ~ 38 のいずれか一項に記載の免疫複合体に、前記細胞の表面上の H E R 2 に前記免疫複合体が結合することを許容する条件下で曝露し、それによって前記細胞の増殖を阻害することを含む、前記方法。

【請求項 68】

前記細胞が、乳癌細胞または胃癌細胞である、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

標識にコンジュゲートされる、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 70】

前記標識が、陽電子放出体である、請求項 69 に記載の抗体。

【請求項 71】

前記陽電子放出体が、 ^{89}Zr である、請求項 70 に記載の抗体。

【請求項 72】

生体試料中のヒト H E R 2 の検出方法であって、前記生体試料を、請求項 1 ~ 16 及び 69 のいずれか一項に記載の抗 H E R 2 抗体と、天然に存在するヒト H E R 2 に前記抗 H E R 2 抗体が結合することを許容する条件下で接触させることと、前記生体試料中で、前記抗 H E R 2 抗体と天然に存在するヒト H E R 2 との間の複合体が形成されるかどうかを検出することと、を含む、前記方法。

【請求項 73】

前記生体試料が、乳癌または胃癌試料である、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

H E R 2 陽性癌の検出方法であって、(i) 標識された抗 H E R 2 抗体を、H E R 2 陽性癌を有するか、またはそれを有することが疑われる対象に投与することであって、前記標識された抗 H E R 2 抗体が、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗 H E R 2 抗体を含む、前記投与することと、(i i) 前記対象において前記標識された抗 H E R 2 抗体を検出することであって、前記対象における H E R 2 陽性癌を示す、前記検出することと、を含む、前記方法。

【請求項 75】

前記標識された抗 H E R 2 抗体が、陽電子放出体にコンジュゲートされた抗 H E R 2 抗体を含む、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 76】

前記陽電子放出体が、 ^{89}Zr である、請求項 75 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年9月12日出願の米国特許仮出願第62/049,594号の優先権の利益を主張し、参照によりその全体があらゆる目的で本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、電子形式の配列表と共に出願される。配列表は、2015年9月8日に作成された「2015-09-11__01146-0037-00PCT__Sequence__Listing__ST25.txt」と題されるファイル(サイズ:76,207バイト)として提供される。配列表の電子形式の情報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0003】

本発明は、抗 H E R 2 抗体及び免疫複合体ならびにそれらを使用する方法に関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0004】

乳癌は、世界中で罹患率及び死亡率の非常に大きな原因となっている。毎年、世界中で130万症例を超える乳癌が診断され、その疾患に関連する死亡は450,000件を超える(Jemal A, Bray F, Center M, et al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin, 2011; 61(2): 69-90)。

【0005】

HER2 (ErbB2) 受容体チロシンキナーゼは、膜貫通受容体の上皮成長因子受容体(EGFR)ファミリーのメンバーである。HER2の過剰発現は、ヒト乳癌のおよそ20%に観察され、これらの腫瘍に関連する侵襲性の成長及び臨床転帰不良に関連付けられている(Slamon et al (1987) Science 235: 177-182)。HER2タンパク質過剰発現は、固定腫瘍ブロックの免疫組織化学に基づく評価を使用して決定され得る(Press MF, et al (1993) Cancer Res 53: 4960-70)。

10

【0006】

トラスツズマブ(CAS 180288-69-1、HERCEPTIN(登録商標)、huMAb4D5-8、rhMAb HER2、Genentech)は、細胞ベースのアッセイにおいて、HER2の細胞外ドメインに高親和性で選択的に結合する(Kd = 5 nM)マウス抗HER2抗体(4D5)のヒト化バージョンである、組み換えDNA由来のIgG1、モノクローナル抗体である(米国特許第5677171号、同第5821337号、同第6054297号、同第6165464号、同第6339142号、同第6407213号、同第6639055号、同第6719971号、同第6800738号、同第7074404号、Cousens et al (1985) Science 230: 1132-9、Slamon et al (1989) Science 244: 707-12、Slamon et al (2001) New Engl. J. Med. 344: 783-792)。トラスツズマブは、in vitroアッセイ及び動物の両方において、HER2を過剰発現するヒト腫瘍細胞の増殖を阻害することが示された(Hudziak et al (1989) Mol Cell Biol 9: 1165-72、Lewis et al (1993) Cancer Immunol Immunother; 37: 255-63、Baselga et al (1998) Cancer Res. 58: 2825-2831)。トラスツズマブは、抗体依存的細胞性細胞傷害性、ADCCの媒介因子である(Lewis et al (1993) Cancer Immunol Immunother 37(4): 255-263、Hotelling et al (1996) [abstract]. Proc. Annual Meeting Am Assoc Cancer Res; 37: 471、Pegram MD, et al (1997) [abstract]. Proc Am Assoc Cancer Res; 38: 602、Sliwkowski et al (1999) Seminars in Oncology 26(4), Suppl 12: 60-70、Yarden Y. and Sliwkowski, M. (2001) Nature Reviews: Molecular Cell Biology, Macmillan Magazines, Ltd., Vol. 2: 127-137)。

20

30

40

【0007】

HERCEPTIN(登録商標)は、HER2を過剰発現する転移性乳癌を有する、広範な前抗癌療法を受けた患者の治療のために1998年に承認され(Baselga et al, (1996) J. Clin. Oncol. 14: 737-744)、それ以来300,000名を超える患者において使用されてきた(Slamon DJ, et al. N Engl J Med 2001; 344: 783-92、Vogel CL, et al. J Clin Oncol 2002; 20: 719-26、Marty M, et al. J Clin Oncol 2005; 23: 4265-74、Rom

50

ond EH, et al. *T N Engl J Med* 2005; 353: 1673-84、Piccart-Gebhart MJ, et al. *N Engl J Med* 2005; 353: 1659-72、Slamon D, et al. [abstract]. *Breast Cancer Res Treat* 2006, 100 (Suppl 1): 52)。2006年にFDAは、HERCEPTIN (登録商標) (トラスツズマブ、Genentech Inc.) を、HER2 陽性、リンパ節転移陽性乳癌を有する患者のアジュバント治療のためのドキソルビシン、シクロホスファミド、及びパクリタキセルを含む治療レジメンの一部として承認した。

【0008】

HER2 陽性乳癌の治療のための新規の抗体-薬物複合体 (ADC) である、トラスツズマブ-MCC-DM1 (T-DM1、トラスツズマブエムタンシン、アド-トラスツズマブエムタンシン、KADCYLA (登録商標)) は、MCCリンカーを介してリシン側鎖においてトラスツズマブにコンジュゲートされた細胞傷害性薬剤DM1 (チオール含有マイタンシノイド抗微小管剤) で構成され、約3.5の平均薬物負荷 (薬物対抗体比) を有する。腫瘍細胞上で発現したHER2に結合した後、T-DM1は、受容体媒介性内部移行を経て、DM1を含有する細胞傷害性カタボライトの細胞内放出、及びその後細胞死がもたらされる。

10

【0009】

米国食品医薬品局は、2013年2月22日、トラスツズマブ及びタキサンによる治療を以前に受けたHER2 陽性転移性乳癌を有する患者の治療のために、商品名KADCYLA (登録商標) で市販されるアドトラスツズマブエムタンシンを承認した。

20

【0010】

ペルツズマブ (組み換えヒト化モノクローナル抗体2C4、rhumaB 2C4、PERJETA (登録商標)、Genentech, Inc、South San Francisco) としても知られる) は、HER二量体化阻害剤 (HDI) として知られる薬剤の新たなクラスの筆頭であり、HER2が、他のHER受容体 (例えば、EGFR/HER1、HER2、HER3、及びHER4) との活性ヘテロ二量体またはホモ二量体を形成する能力を阻害するように機能する。例えば、Harari and Yarden *Oncogene* 19: 6102-14 (2000)、Yarden and Sliwkowski. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127-37 (2001)、Sliwkowski *Nat Struct Biol* 10: 158-9 (2003)、Cho et al. *Nature* 421: 756-60 (2003)、及びMalik et al. *Pro Am Soc Cancer Res* 44: 176-7 (2003) を参照されたい。

30

【0011】

腫瘍細胞内のHER2-HER3ヘテロ二量体の形成がペルツズマブにより遮断されることがで、重大な細胞シグナル伝達が阻害され、腫瘍増殖が低下して生存がもたらされることが実証された (Agus et al. *Cancer Cell* 2: 127-37 (2002))。

【0012】

ペルツズマブは、第II相試験において、転移性疾患のためにトラスツズマブを以前に受けたHER2 陽性転移性乳癌を有する患者において、トラスツズマブと併せて評価された。国立癌研究所 (NCI) によって行われた、ある研究は、以前に治療された、HER2 陽性転移性乳癌を有する11名の患者を登録した。11名の患者のうちの2名は、部分奏功 (PR) を示した (Baselga et al., *J Clin Oncol* 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings; 25: 18S (June 20 Supplement): 1004。CTRC- AACR San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS), Dec. 8-12, 2010において提示される、早期HER2 陽性乳癌を有する女性におけるペルツズマブ及びトラスツズマブ+化学療法 (ドセタキセル) の新規併用レジ

40

50

メンの効果の評価する第 I I 相ネオアジュバント試験の結果は、手術前のネオアジュバント設定において付与された 2 つの H E R 2 抗体 + ドセタキセルが、乳房における完全腫瘍消失率（病理学的完全奏功率（p C R）45.8%）を、トラスツズマブ + ドセタキセル（p C R、29.0%）と比較して半数超で有意に改善したことを示した。p = 0.014。

【0013】

商品名 P E R J E T A（登録商標）で市販されるペルツズマブは、2012年、進行性または後期（転移性）H E R 2 陽性乳癌を有する患者の治療のために承認された。H E R 2 陽性乳癌では、癌細胞成長及び生存に寄与する H E R 2 タンパク質の量が増加している。

10

【0014】

2013年9月30日に、米国食品医薬品局は、早期乳癌（E B C）を有する患者のための、手術前（ネオアジュバント設定）の完全治療レジメンの一部として、P E R J E T A（登録商標）（ペルツズマブ）に対して迅速承認を付与した。P E R J E T A（登録商標）は、乳癌のネオアジュバント治療のための最初の F D A 承認薬である。

【0015】

当該技術分野において、単独療法及び併用療法において使用するための、乳癌等の H E R 2 関連病態の治療用の、H E R 2 を標的とする安全で有効な追加の薬剤が必要とされている。本発明はその必要性を満たし、また他の便益を提供する。

20

【発明の概要】

【0016】

本発明は、抗 H E R 2 抗体及び免疫複合体ならびにそれらを使用する方法を提供する。

【0017】

いくつかの実施形態において、H E R 2 に結合する単離抗体が提供され、該抗体は、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 と、(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 と、(c) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 と、(d) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 と、(e) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 と、(f) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 と、を含む。いくつかの実施形態において、該抗体は、配列番号 11 の配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 10 の配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、ヒト化またはキメラ抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、H E R 2 に結合する抗体断片である。

30

【0018】

いくつかの実施形態において、H E R 2 は、配列番号 1 のアミノ酸 23 ~ 1255 を含むヒト H E R 2 である。いくつかの実施形態において、抗体は、H E R 2 の細胞外ドメイン I に結合する。いくつかの実施形態において、H E R 2 の細胞外ドメイン I は、配列番号 35 の配列を有する。いくつかの実施形態において、抗体は、細胞外ドメイン I のループ 163 ~ 189 及びループ 185 ~ 189 に結合する（例えば、細胞外ドメイン I の、アミノ酸 163 ~ 189 によって定義される第 1 のループ及びアミノ酸 185 ~ 189 によって定義される第 2 のループ）。いくつかの実施形態において、抗体は、細胞外ドメイン I の H i s 171、S e r 186、S e r 187、及び G l u 188 に接触する。

40

【0019】

いくつかの実施形態において、本抗体は、I g G 1、I g G 2 a、または I g G 2 b 抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、A 118C 及び S 400C から選択される重鎖定常領域内に少なくとも 1 つの突然変異を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、K 149C 及び V 205C から選択される軽鎖定常領域内に少なくとも 1 つの突然変異を含む。

【0020】

いくつかの実施形態において、抗体は、

50

- a) 配列番号 19 の配列を含む重鎖、及び配列番号 18 の配列を含む軽鎖、または
 b) 配列番号 19 の配列を含む重鎖、及び配列番号 23 の配列を含む軽鎖、または
 c) 配列番号 24 の配列を含む重鎖、及び配列番号 18 の配列を含む軽鎖を含む。

いくつかの実施形態において、抗体は、配列番号 28 の重鎖定常領域を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、配列番号 25 の軽鎖定常領域を含む。

【0021】

いくつかの実施形態において、HER2 に結合する単離抗体が提供され、該抗体は、配列番号 19 の配列を含む重鎖と、配列番号 23 の配列を含む軽鎖と、を含む。いくつかの実施形態において、HER2 に結合する単離抗体が提供され、該抗体は、配列番号 24 の配列を含む重鎖と、配列番号 18 の配列を含む軽鎖と、を含む。

10

【0022】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体をコードする単離核酸が提供される。いくつかの実施形態において、核酸を含む宿主細胞が提供される。いくつかの実施形態において、抗体が産生されるように、宿主細胞を培養することを含む、抗体の産生方法が提供される。

【0023】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体と、細胞傷害性薬剤と、を含む、免疫複合体が提供される。いくつかの実施形態において、免疫複合体は、式 Ab - (L - D) p を有し、式中、

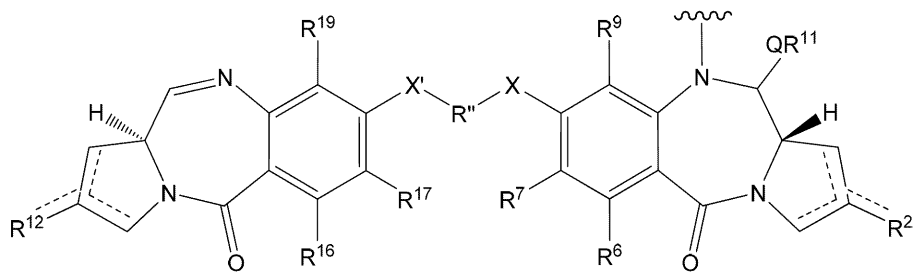
- (a) Ab が、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体であり、
 (b) L が、リンカーであり、
 (c) D が、細胞傷害性薬剤であり、
 (d) p が、1 ~ 8 の範囲である。

20

いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、オーリスタチン、マイタンシノイド、カリケアミシン、ピロロベンゾジアゼピン、ネモルピシン誘導体、及び 1 - (クロロメチル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1H - ベンゾ[e]インドール(CBI)から選択される。

【0024】

いくつかの実施形態において、免疫複合体が提供され、式中、D は、式



30

のピロロベンゾジアゼピンであり、式中、点線が、C1 と C2 または C2 と C3 との間の二重結合の任意の存在を示し、

R² が独立して、H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂R、及びCORから選択され、任意に八口またはジ八口からさらに選択され、R^D が独立して、R、CO₂R、COR、CHO、CO₂H、及び八口から選択され、

40

R⁶ 及び R⁹ が独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR、NO₂、Me₃Sn、及び八口から選択され、

R⁷ が独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR、NO₂、Me₃Sn、及び八口から選択され、

Q が独立して、O、S、及びNHから選択され、

R¹¹ が、H若しくはRのいずれかであるか、またはQがOである場合にはSO₃Mであり、式中、Mが金属陽イオンであり、

R¹ 及び R² がそれぞれ独立して、任意に置換されるC₁ - 8 アルキル、C₃ - 8 ヘテロ

50

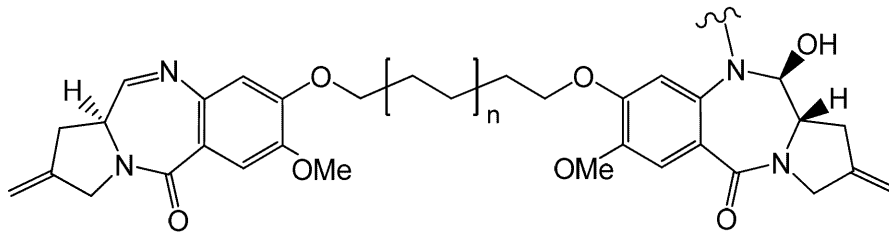
シクリル、及び C_{5-20} アリール基から選択され、任意に基 NRR との関連で、 R 及び R' が、それらが結合する窒素原子と一緒に、任意に置換される 4 員、5 員、6 員、または 7 員の複素環式環を形成し、

R^{12} 、 R^{16} 、 R^{19} 、及び R^{17} が、それぞれ R^2 、 R^6 、 R^9 、及び R^7 について定義される通りであり、

R が、 C_{3-12} アルキレン基であり、その鎖が、任意に置換される 1 つ以上のヘテロ原子及び/または芳香族環によって分断され得、

X 及び X' が独立して、 O 、 S 、及び $N(H)$ から選択される。

いくつかの実施形態において、 D は、構造



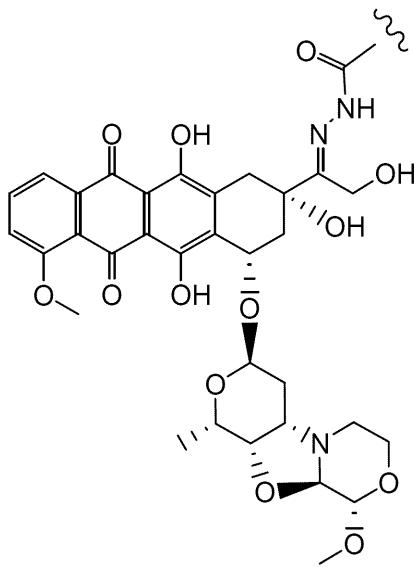
10

を有し、式中、 n が、0 または 1 である。

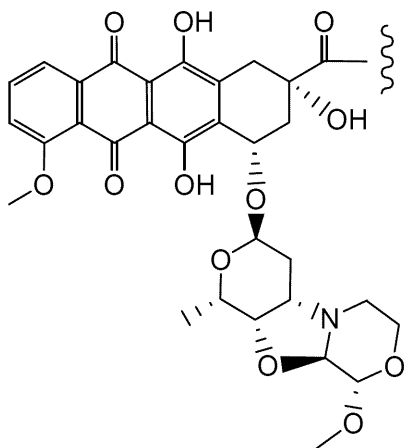
【0025】

いくつかの実施形態において、 D は、ネモルピシン誘導体である免疫複合体が提供される。いくつかの実施形態において、 D は、

20



30



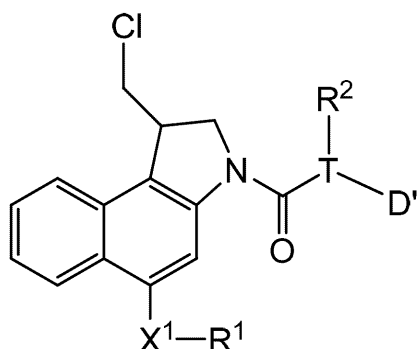
40

から選択される構造を有する。

【0026】

50

いくつかの実施形態において、Dが、1-(クロロメチル)-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドール(CBI)を含む、免疫複合体が提供される。いくつかの実施形態において、Dは、式：



10

を有し、式中、

R^1 が、H、 $P(O)_3H_2$ 、 $C(O)NR^aR^b$ 、またはLへの結合から選択され、
 R^2 が、H、 $P(O)_3H_2$ 、 $C(O)NR^aR^b$ 、またはLへの結合から選択され、
 R^a 及び R^b が独立して、H、及び1つ以上のFで任意に置換される $C_1 - C_6$ アルキルから選択されるか、

または R^a 及び R^b が、5員または6員の複素環式基を形成し、

Tが、 $C_3 - C_{12}$ アルキレン、Y、 $(C_1 - C_6 \text{ アルキレン}) - Y - (C_1 - C_6 \text{ アルキレン})$ 、
 $(C_1 - C_6 \text{ アルキレン}) - Y - (C_1 - C_6 \text{ アルキレン}) - Y - (C_1 - C_6 \text{ アルキレン})$ 、
 $(C_2 - C_6 \text{ アルケニレン}) - Y - (C_2 - C_6 \text{ アルケニレン})$ 、及び
 $(C_2 - C_6 \text{ アルキニレン}) - Y - (C_2 - C_6 \text{ アルキニレン})$ から選択されるテザー基であり、

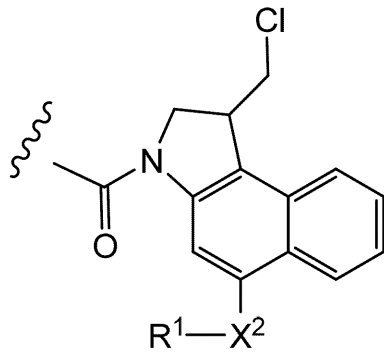
20

式中、Yが独立して、O、S、 NR^1 、アリール、及びヘテロアリールから選択され、
 アルキレン、アルケニレン、アリール、及びヘテロアリールが独立してかつ任意に、F、
 OH、 $O(C_1 - C_6 \text{ アルキル})$ 、 NH_2 、 $NHCH_3$ 、 $N(CH_3)_2$ 、 $OP(O)_3H_2$ 、
 及び $C_1 - C_6$ アルキルで置換され、式中、アルキルが、1つ以上のFで任意に置換されるか、

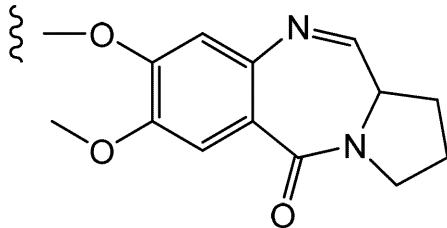
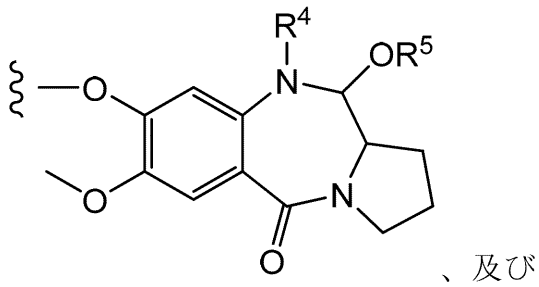
またはアルキレン、アルケニレン、アリール、及びヘテロアリールが独立してかつ任意に、
 Lへの結合で置換され、

30

D が、



10



20

から選択される薬物部分であり、式中、波線が、Tへの結合部位を示し、

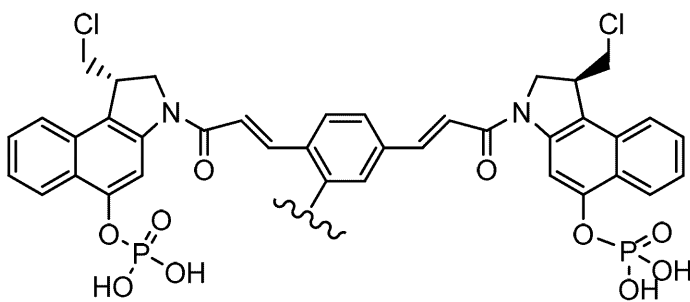
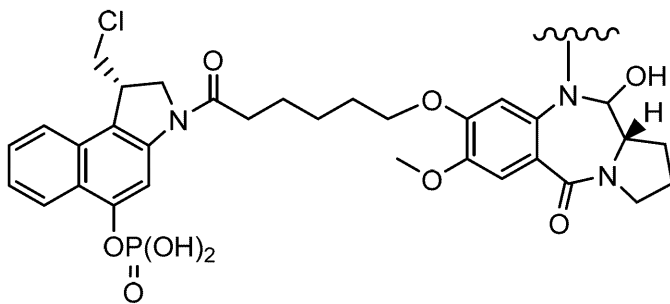
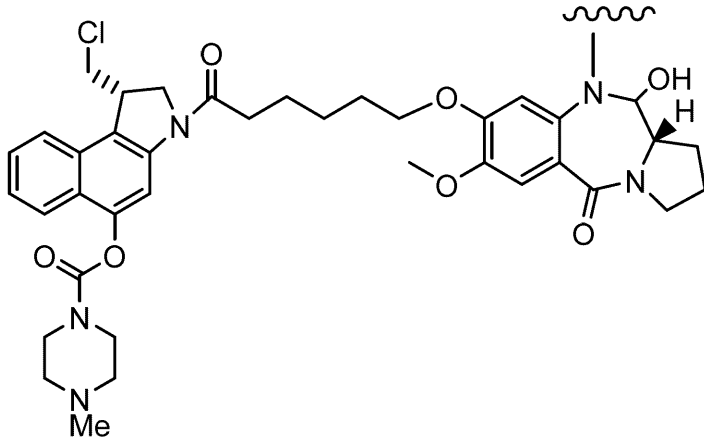
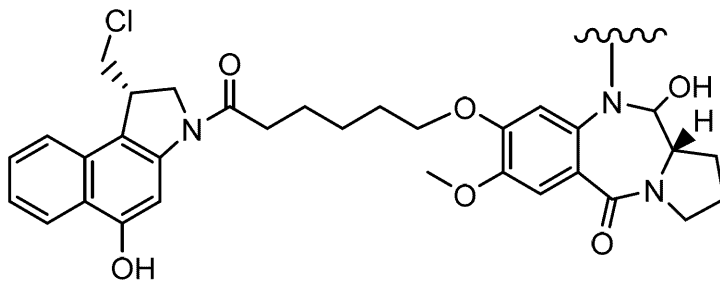
X^1 及び X^2 が独立して、O 及び NR^3 から選択され、式中、 R^3 が、H、及び1つ以上のFで任意に置換される $C_1 - C_6$ アルキルから選択され、

R^4 が、H、 CO_2R 、またはリンカー(L)への結合であり、式中、Rが、 $C_1 - C_6$ アルキル、またはベンジルであり、

R^5 が、H、または $C_1 - C_6$ アルキルである。

30

いくつかの実施形態において、Dは、



10

20

、及び

30

から選択される構造を有する。

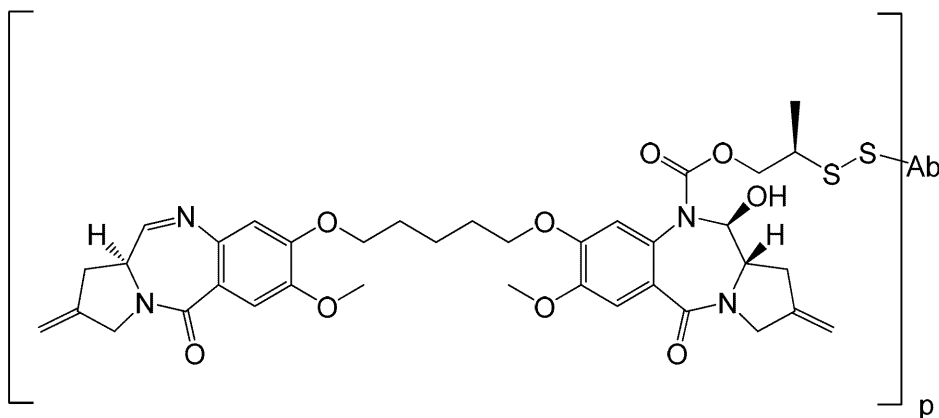
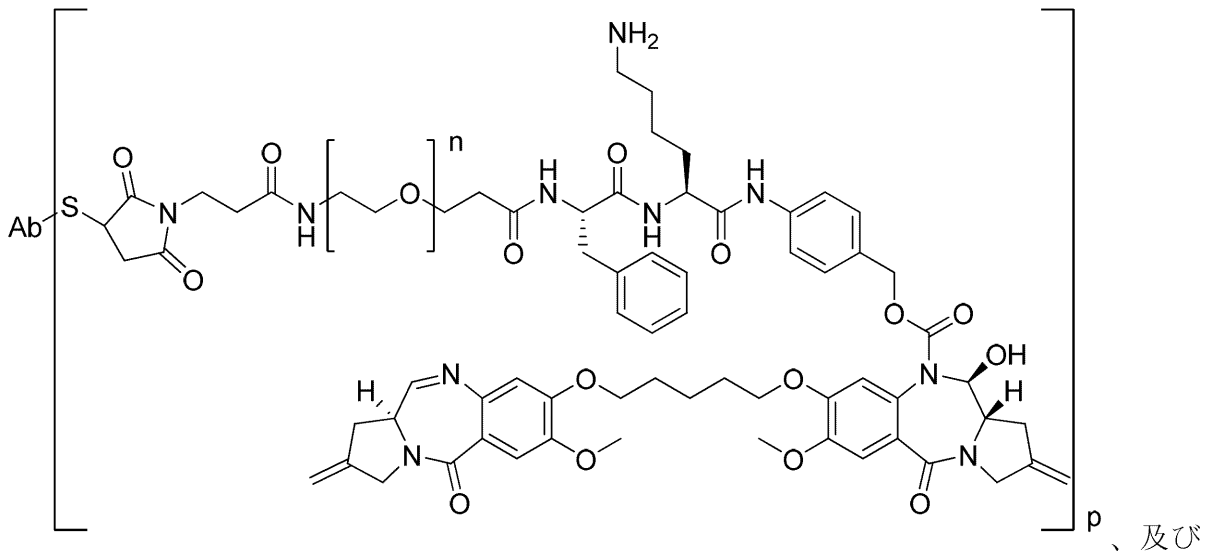
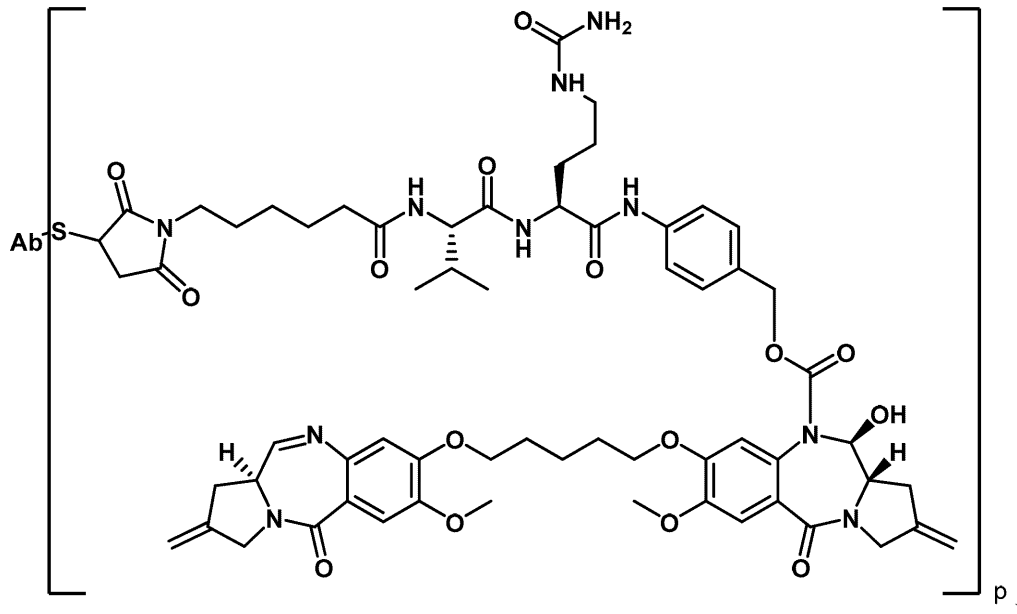
【0027】

いくつかの実施形態において、免疫複合体が提供され、リンカーは、プロテアーゼによって切断可能である。いくつかの実施形態において、リンカーは、酸不安定性である。いくつかの実施形態において、リンカーは、ヒドラゾンを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、ジスルフィドを含む。

40

【0028】

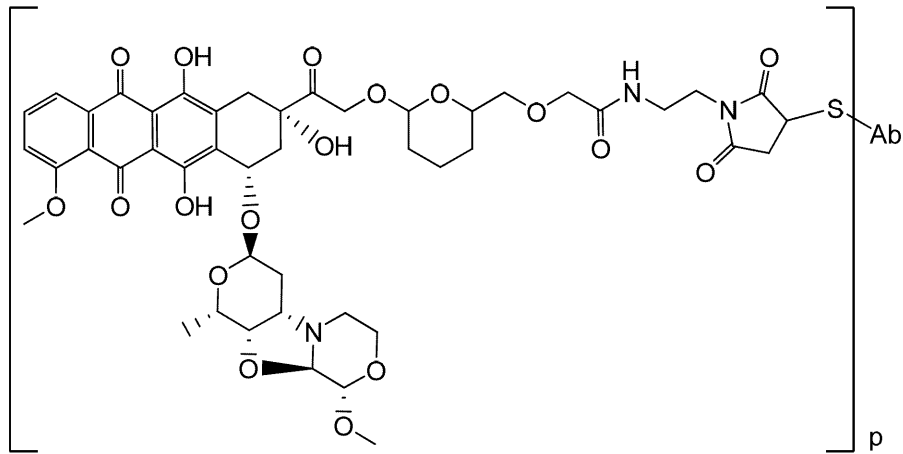
いくつかの実施形態において、免疫複合体が提供され、該免疫複合体は、



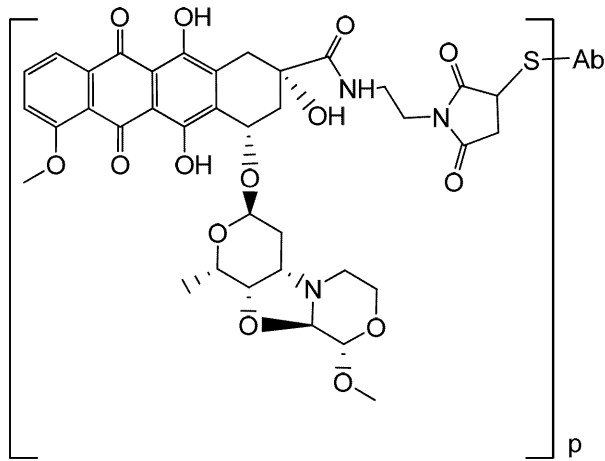
から選択される構造を含み、式中、A bは、本明細書に記載される抗体である。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態において、免疫複合体が提供され、該免疫複合体は、

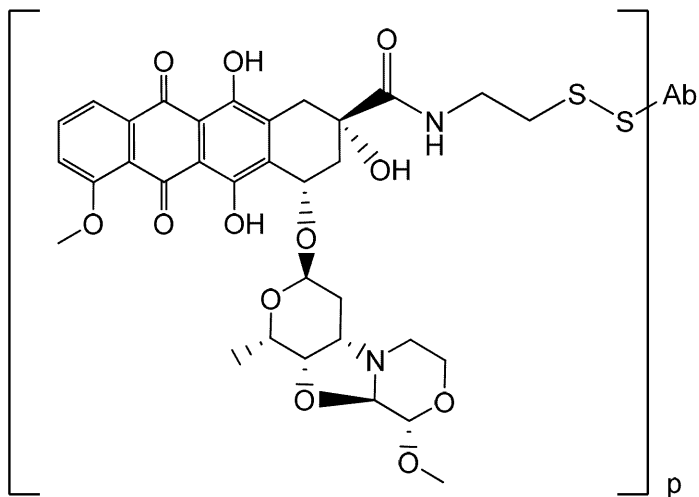


10



20

、及び



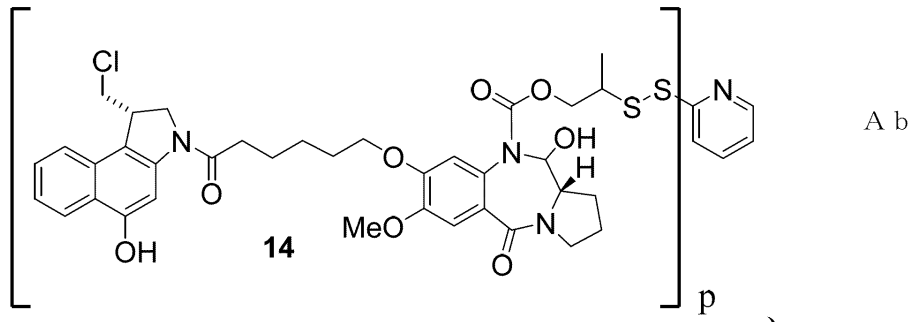
30

40

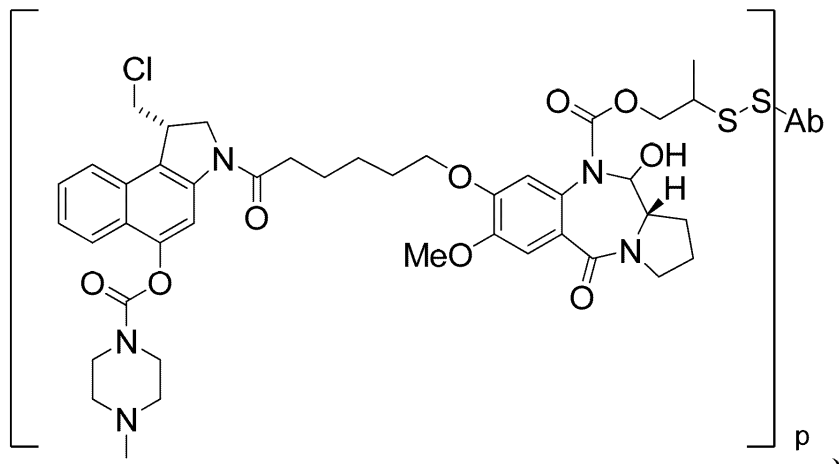
から選択される構造を含み、式中、A bは、本明細書に記載される抗体である。

【 0 0 3 0 】

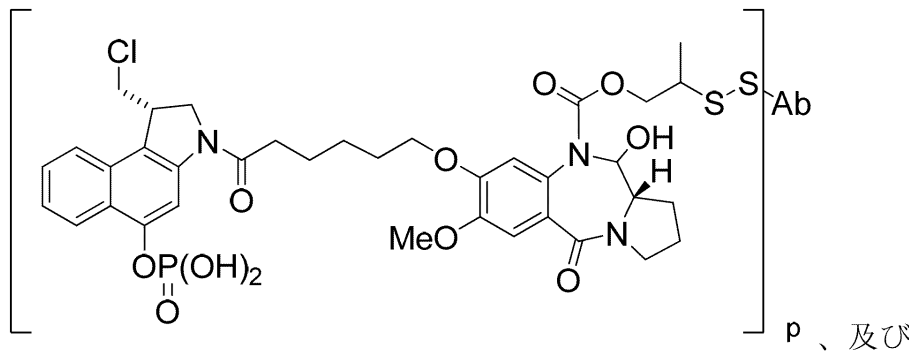
いくつかの実施形態において、免疫複合体が提供され、該免疫複合体は、



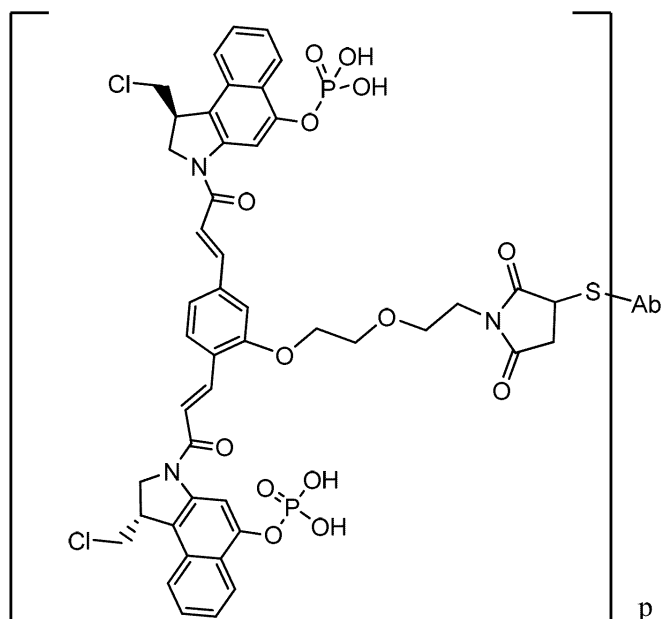
10



20



30



40

から選択される構造を含み、式中、Abは、本明細書に記載される抗体である。

50

【 0 0 3 1 】

本明細書に記載される免疫複合体のいずれかにおいて、pは、1.3~2、1.4~2、1.5~2、または2~5の範囲であり得る。

【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される免疫複合体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的製剤が提供される。いくつかの実施形態において、薬学的製剤は、追加の治療剤をさらに含む。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、HER2に結合する抗体または免疫複合体である。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、(i)HER2のドメインIIに結合する抗体若しくは免疫複合体、及び/または(ii)ドメインIV若しくはHER2に結合する抗体若しくは免疫複合体である。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、(i)エピトープ2C4に結合する抗体若しくは免疫複合体、及び/または(ii)エピトープ4D5に結合する抗体若しくは免疫複合体である。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、トラスツマブ、トラスツマブ-MCC-DM1(T-DM1)、及びペルツマブから選択される。いくつかの実施形態において、薬学的製剤は、(1)トラスツマブまたはT-DM1、及び(2)ペルツマブをさらに含む。

10

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態において、HER2陽性癌を有する個体の治療方法が提供される。いくつかの実施形態において、方法は、有効量の、本明細書に記載される免疫複合体、または本明細書に記載される薬学的組成物を個体に投与することを含む。いくつかの実施形態において、HER2陽性癌は、乳癌または胃癌である。いくつかの実施形態において、HER2陽性乳癌は、早期乳癌である。いくつかの実施形態において、HER2陽性乳癌は、転移性乳癌である。いくつかの実施形態において、HER2陽性癌は、再発癌である。いくつかの実施形態において、再発癌は、局所再発癌である。いくつかの実施形態において、HER2陽性癌は、進行癌である。いくつかの実施形態において、HER2陽性癌は、切除不可能である。いくつかの実施形態において、本方法は、追加の治療剤を個体に投与することをさらに含む。

20

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態において、HER2陽性癌を有する個体の治療方法は、有効量の、本明細書に記載される免疫複合体、及び少なくとも1つの追加の治療剤を個体に投与することを含む。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、HER2に結合する抗体または免疫複合体である。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、(i)HER2のドメインIIに結合する抗体若しくは免疫複合体、及び/または(ii)ドメインIV若しくはHER2に結合する抗体若しくは免疫複合体である。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、(i)エピトープ2C4に結合する抗体若しくは免疫複合体、及び/または(ii)エピトープ4D5に結合する抗体若しくは免疫複合体である。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、トラスツマブ、トラスツマブ-MCC-DM1(T-DM1)、及びペルツマブから選択される。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、(1)トラスツマブまたはT-DM1、及び(2)ペルツマブである。いくつかの実施形態において、HER2陽性癌は、乳癌または胃癌である。いくつかの実施形態において、HER2陽性乳癌は、早期乳癌である。いくつかの実施形態において、HER2陽性乳癌は、転移性乳癌である。いくつかの実施形態において、HER2陽性癌は、再発癌である。いくつかの実施形態において、再発癌は、局所再発癌である。いくつかの実施形態において、HER2陽性癌は、進行癌である。いくつかの実施形態において、HER2陽性癌は、切除不可能である。

30

40

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態において、HER2陽性癌を有する個体の治療方法は、

a) 個体に対して、本明細書に記載される免疫複合体、または本明細書に記載される薬学的製剤を用いるネオアジュバント治療を行うことと、

b) 癌を根治手術によって除去することと、

50

c) 個体に対して、本明細書に記載される免疫複合体、または本明細書に記載される薬学的製剤を用いるアジュバント治療を行うことと、を含む。

いくつかの実施形態において、HER2陽性癌は、乳癌または胃癌である。

【0036】

いくつかの実施形態において、HER2陽性細胞の増殖の阻害方法が提供される。いくつかの実施形態において、方法は、細胞を、本明細書に記載される免疫複合体に、細胞の表面上のHER2に免疫複合体が結合することを許容する条件下で曝露し、それによって細胞の増殖を阻害することを含む。いくつかの実施形態において、細胞は、乳癌細胞または胃癌細胞である。

【0037】

いくつかの実施形態において、標識にコンジュゲートされた本明細書に記載される抗体が提供される。いくつかの実施形態において、標識は、陽電子放出体である。いくつかの実施形態において、陽電子放出体は、 ^{89}Zr である。

【0038】

いくつかの実施形態において、生体試料中のヒトHER2の検出方法が提供される。いくつかの実施形態において、方法は、生体試料を、本明細書に記載される抗HER2抗体と、天然に存在するヒトHER2に抗HER2抗体が結合することを許容する条件下で接触させることと、生体試料中で、抗HER2抗体と天然に存在するヒトHER2との間の複合体が形成されるかどうかを検出することと、を含む。いくつかの実施形態において、生体試料は、乳癌または胃癌試料である。

【0039】

いくつかの実施形態において、対象におけるHER2陽性癌の検出方法が提供される。いくつかの実施形態において、方法は、(i) 標識された抗HER2抗体を、HER2陽性癌を有するか、またはそれを有することが疑われる対象に投与することであって、標識された抗HER2抗体が、本明細書に記載される抗HER2抗体を含む、投与することと、(ii) 対象において標識された抗HER2抗体を検出することであって、対象におけるHER2陽性癌を示す、検出することと、を含む。いくつかの実施形態において、標識された抗HER2抗体は、陽電子放出体にコンジュゲートされた抗HER2抗体を含む。いくつかの実施形態において、陽電子放出体は、 ^{89}Zr である。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】実施例1に記載される、ヒトVH下位集団I (VH_I) コンセンサス配列、ならびにマウス7C2・B9 (「7C2」) 及びヒト化7C2・v2・2・LAの重鎖可変領域配列のアラインメントを示す。

【図2】実施例1に記載される、ヒトVL I V (VL_{K I V}) コンセンサス配列、ならびにマウス7C2・B9 (「7C2」) 及びヒト化7C2・v2・2・LAの軽鎖可変領域配列のアラインメントを示す。

【図3】ドメインI~IVが示されるHer2細胞外ドメイン構造を示す。これらのドメインに、抗Her2抗体トラスツマブ、ペルツマブ、及び7C2が結合する。

【図4】実施例3に記載される、hu7C2・v2・2・LA抗体-薬物複合体(ADC)での治療時の、経時的な腫瘍体積(mm³)の変化を示す。

【図5】実施例4に記載される、hu7C2・v2・2・LA抗体-薬物複合体(ADC)での治療時の、経時的な腫瘍体積(mm³)の変化を示す。

【図6】実施例5に記載される、hu7C2・v2・2・LA抗体-薬物複合体(ADC)での治療時の、経時的な腫瘍体積(mm³)の変化を示す。

【図7】実施例6に記載される、hu7C2・v2・2・LA抗体-薬物複合体(ADC)での治療時の、経時的な腫瘍体積(mm³)の変化を示す。

【図8】実施例7に記載される、hu7C2・v2・2・LA抗体-薬物複合体(ADC)での治療時の、経時的な腫瘍体積(mm³)の変化を示す。

【図9】実施例3に記載される、ある特定のCB-PBDリンカー-薬物中間体を作製する

10

20

30

40

50

ための例示的な合成方法を示す。

【図10】実施例3に記載される、ある特定のCB-PBDリンカー-薬物中間体を作製するための例示的な合成方法を示す。

【図11】実施例3に記載される、ある特定のCBI-CBIリンカー-薬物中間体を作製するための例示的な合成方法を示す。

【図12A】本明細書における実施例で使用される、ある特定の抗体-薬物複合体の構造を示す。

【図12B】本明細書における実施例で使用される、ある特定の抗体-薬物複合体の構造を示す。

【図12C】本明細書における実施例で使用される、ある特定の抗体-薬物複合体の構造を示す。

【図12D】本明細書における実施例で使用される、ある特定の抗体-薬物複合体の構造を示す。

【図12E】本明細書における実施例で使用される、ある特定の抗体-薬物複合体の構造を示す。

【図12F】本明細書における実施例で使用される、ある特定の抗体-薬物複合体の構造を示す。

【図13A】ペルツズマブ主要種抗体軽鎖(A)及び重鎖(B)アミノ酸配列を示す。

【図13B】ペルツズマブ主要種抗体軽鎖(A)及び重鎖(B)アミノ酸配列を示す。

【図14A】例示的なペルツズマブ変異種抗体軽鎖(A)及び重鎖(B)アミノ酸配列を示す。

【図14B】例示的なペルツズマブ変異種抗体軽鎖(A)及び重鎖(B)アミノ酸配列を示す。

【図15A】トラスツズマブ抗体軽鎖(A)及び重鎖(B)アミノ酸配列を示す。

【図15B】トラスツズマブ抗体軽鎖(A)及び重鎖(B)アミノ酸配列を示す。

【図16】ドメインI~IVのHer2受容体及び配列の概略図を示す。

【図17】実施例8に記載される、hu7C2.v2.2.LA抗体-薬物複合体(ADC)での治療時の、経時的な腫瘍体積(mm³)の変化を示す。

【図18】実施例9に記載される、hu7C2.v2.2.LA抗体-薬物複合体(ADC)での治療時の、経時的な腫瘍体積(mm³)の変化を示す。

【図19A】(A)HER2 ECD(ドメインによって陰影付けられ、空間充填モデルとして示される表面)と、7C2 Fabとの間の複合体の結晶構造を示す。7C2 Fabは、トラスツズマブFab(Tmab、PDBコード:1N8Z)及びペルツズマブFab(Pmab、PDBコード:1S78)の結合エピトープとは異なる、HER2のドメインIに結合する。(B)トラスツズマブ/HER2複合体、ペルツズマブ/HER2複合体、及び7C2/HER2複体内のHER2 ECDの構造の重ね合わせ。(C)7C2/HER2複合体界面。7C2/HER2相互作用に關与する残基の側鎖は、棒として示される。潜在的な分子間水素結合の一部は、点線として示される。(D)7C2結合エピトープは、chA21単鎖Fv(scFv)と部分的に重なっている。chA21 scFv/HER2複合体(PDBコード:3H3B)と7C2/HER2との構造の重ね合わせ。

【図19B】(A)HER2 ECD(ドメインによって陰影付けられ、空間充填モデルとして示される表面)と、7C2 Fabとの間の複合体の結晶構造を示す。7C2 Fabは、トラスツズマブFab(Tmab、PDBコード:1N8Z)及びペルツズマブFab(Pmab、PDBコード:1S78)の結合エピトープとは異なる、HER2のドメインIに結合する。(B)トラスツズマブ/HER2複合体、ペルツズマブ/HER2複合体、及び7C2/HER2複体内のHER2 ECDの構造の重ね合わせ。(C)7C2/HER2複合体界面。7C2/HER2相互作用に關与する残基の側鎖は、棒として示される。潜在的な分子間水素結合の一部は、点線として示される。(D)7C2結合エピトープは、chA21単鎖Fv(scFv)と部分的に重なっている。chA2

10

20

30

40

50

1 scFv / HER2 複合体 (PDBコード: 3H3B) と 7C2 / HER2 との構造の重ね合わせ。

【図19C】(A) HER2 ECD (ドメインによって陰影付けられ、空間充填モデルとして示される表面) と、7C2 Fab との間の複合体の結晶構造を示す。7C2 Fab は、トラスツズマブ Fab (Tmab、PDBコード: 1N8Z) 及びペルツズマブ Fab (Pmab、PDBコード: 1S78) の結合エピトープとは異なる、HER2 のドメイン I に結合する。(B) トラスツズマブ / HER2 複合体、ペルツズマブ / HER2 複合体、及び 7C2 / HER2 複体内の HER2 ECD の構造の重ね合わせ。(C) 7C2 / HER2 複合体界面。7C2 / HER2 相互作用に關与する残基の側鎖は、棒として示される。潜在的な分子間水素結合の一部は、点線として示される。(D) 7C2 結合エピトープは、chA21 単鎖 Fv (scFv) と部分的に重なっている。chA21 scFv / HER2 複合体 (PDBコード: 3H3B) と 7C2 / HER2 との構造の重ね合わせ。

10

【図19D】(A) HER2 ECD (ドメインによって陰影付けられ、空間充填モデルとして示される表面) と、7C2 Fab との間の複合体の結晶構造を示す。7C2 Fab は、トラスツズマブ Fab (Tmab、PDBコード: 1N8Z) 及びペルツズマブ Fab (Pmab、PDBコード: 1S78) の結合エピトープとは異なる、HER2 のドメイン I に結合する。(B) トラスツズマブ / HER2 複合体、ペルツズマブ / HER2 複合体、及び 7C2 / HER2 複体内の HER2 ECD の構造の重ね合わせ。(C) 7C2 / HER2 複合体界面。7C2 / HER2 相互作用に關与する残基の側鎖は、棒として示される。潜在的な分子間水素結合の一部は、点線として示される。(D) 7C2 結合エピトープは、chA21 単鎖 Fv (scFv) と部分的に重なっている。chA21 scFv / HER2 複合体 (PDBコード: 3H3B) と 7C2 / HER2 との構造の重ね合わせ。

20

【発明を実施するための形態】

【0041】

ここで本発明のある特定の実施形態について詳細に言及され、それらの実施例は、付随する構造及び式で例証される。本発明は、列挙される実施形態と併せて記載されるが、本発明をそれらの実施形態に限定することを意図するものではないことを理解されたい。反対に、本発明は、特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内に含まれ得る、全ての代替例、修正、及び均等物を網羅することを意図するものである。当業者であれば、本発明の実施において使用され得る、本明細書に記載されるものと同様または同等の多くの方法及び材料を認識するであろう。本発明は、記載される方法及び材料に決して限定されない。

30

【0042】

本開示全体で引用される全ての参照文献は、参照によりそれら全体が本明細書に明示的に組み込まれる。組み込まれる文献、特許、及び同様の資料のうちの一つ以上が、本出願 (定義される用語、用語の用法、記載される技法等を含むがそれらに限定されない) と異なるか、または矛盾する場合は、本出願が優先される。

40

【0043】

I. 定義

「comprise (含む)」、「comprising (含むこと)」、「include (含む)」、「including (含むこと)」、及び「includes (含む)」という語は、本明細書及び特許請求の範囲内で使用される場合、述べられる特徴、整数、成分、または工程の存在を特定することを意図するものであるが、それらは、一つ以上の他の特徴、整数、成分、工程、またはそれらの群の存在または追加を排除するものではない。

【0044】

本明細書では、「アクセプターヒトフレームワーク」は、以下に定義される、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する、軽鎖可変

50

ドメイン (V L) フレームワークまたは重鎖可変ドメイン (V H) フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含んでもよく、またはそれは、アミノ酸配列変化を含有し得る。いくつかの実施形態において、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、または2以下である。いくつかの実施形態において、V Lアクセプターヒトフレームワークの配列は、V Lヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と同一である。

【0045】

「親和性」は、分子 (例えば、抗体) の単一の結合部位とその結合パートナー (例えば、抗原) との間の、非共有性相互作用の合計の強度を指す。別途指定されない限り、本明細書で使用される時、「結合親和性」は、結合対のメンバー (例えば、抗体及び抗原) 間の1:1の相互作用を反映する、本来の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数 (K_d) によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当該技術分野で既知の一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な例証的説明及び例示的な実施形態が、以下に記載される。

10

【0046】

「親和性成熟」抗体は、変化を有しない親抗体と比較して、1つ以上の超可変領域 (HVR) において1つ以上の変化を有し、かかる変化によって抗原に対する抗体の親和性を改善する、抗体を指す。

20

【0047】

「抗HER2抗体」及び「HER2に結合する抗体」という用語は、抗体が、HER2を標的とする際に診断剤及び/または治療剤として有用となるように、HER2に十分な親和性で結合可能である抗体を指す。一実施形態において、無関係の非HER2タンパク質に抗HER2抗体が結合する程度は、例えば、放射免疫測定法 (RIA) によって測定されうように、HER2に抗体が結合する程度の約10%未満である。ある特定の実施形態において、HER2に結合する抗体は、1µM以下、100nM以下、10nM以下、5nM以下、4nM以下、3nM以下、2nM以下、1nM以下、0.1nM以下、0.01nM以下、または0.001nM以下 (例えば、10⁻⁸M以下、例えば10⁻⁸M~10⁻¹³M、例えば10⁻⁹M~10⁻¹³M) の解離定数 (K_d) を有する。ある特定の実施形態において、抗HER2抗体は、異なる種由来のHER2の間で保存されるHER2のエピトープに結合する。

30

【0048】

「抗体」という用語は、本明細書で最も広義に使用され、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体)、及び抗体断片を含むが、これらに限定されない、種々の抗体構造を包含する。

【0049】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部を含み、インタクトな抗体が結合する抗原に結合する、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、F_v、F_{ab}、F_{ab}'、F_{ab}'-SH、F (a b')₂、二重特異性抗体、線状抗体、単鎖抗体分子 (例えば、scF_v)、及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0050】

参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」は、競合アッセイにおいて、参照抗体がその抗原に結合するのを50%以上遮断する抗体、及び逆に、競合アッセイにおいて、抗体がその抗原に結合するのを50%以上遮断する参照抗体を指す。例示的な競合アッセイが本明細書に提供される。

【0051】

50

「癌」及び「癌性」という用語は、細胞成長/増殖の未制御によって典型的に特徴付けられる、哺乳動物における生理的状态を指すか、または説明する。癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、癌は、乳癌または胃癌である。いくつかの実施形態において、癌は、任意のHER2陽性癌である。

【0052】

「HER2陽性」癌は、正常レベルよりも高いHER2を有する癌細胞を含む。HER2陽性癌の例としては、HER2陽性乳癌及びHER2陽性胃癌が挙げられる。任意に、HER2陽性癌は、2+若しくは3+の免疫組織化学(IHC)スコア、及び/または2.0以上のin situハイブリダイゼーション(ISH)増幅率を有する。

10

【0053】

「早期乳癌(IBC)」または「早期乳癌」という用語は、本明細書において、乳房または腋窩リンパ節を越えて拡散していない乳癌を指すように使用される。これは、上皮内腺管癌、I期、IIA期、IIB期、及びIIIA期の乳癌を含む。

【0054】

「0期」、「I期」、「II期」、「III期」、または「IV期」、及びこの分類内の様々な亜期の腫瘍または癌への言及は、当該技術分野において既知の全ステージグループ分けまたはローマ数字ステージング方法を使用する腫瘍または癌の分類を示す。一般に癌の実際の病期は癌の種類によって決定されるが、0期癌は上皮病変であり、I期癌は、小さい局在化腫瘍であり、II期及びIII期癌は、局所リンパ節の関与を示す局所進行腫瘍であり、IV期癌は、転移性癌を表す。各種の腫瘍に特異的な病期は、熟練した臨床医に既知である。

20

【0055】

「転移性乳癌」という用語は、癌細胞が、血管またはリンパ腺によって元の部位から体内の1つ以上の他の部位に伝播し、乳房以外の1つ以上の臓器内で1つ以上の二次腫瘍を形成する乳癌の状態を意味する。

【0056】

「進行」癌は、局所浸潤または転移のいずれかによって元の部位または臓器の外側に拡散しているものである。したがって、「進行」癌という用語は、局所的に進行した疾患及び転移性疾患の両方を含む。

30

【0057】

「再発」癌は、手術等の初期療法への応答後に、初期部位または遠位部位のいずれかにおいて再成長したものである。

【0058】

「局所的再発」癌は、治療後に以前に治療された癌と同じ場所で再発する癌である。

【0059】

「手術可能な」または「切除可能な」癌は、主要臓器に限定され、手術(切除)に適した癌である。

【0060】

「non-resectable(切除不可能な)」または「unresectable(切除不可能な)」癌は、手術によって除去(切除)することができない。

40

【0061】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び/または軽鎖の一部が特定の源または種に由来し、重鎖及び/または軽鎖の残りの部分が異なる源または種に由来する抗体を指す。

【0062】

抗体の「クラス」は、その重鎖によって保有される定常ドメインまたは定常領域の型を指す。5つの主要な抗体クラスIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが存在し、これらのうちの数個は、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂にさらに分類され得る。免役グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 α 、 β 、 γ 、 δ 、及び μ と呼ばれ

50

る。

【0063】

本明細書で使用される「細胞傷害性薬剤」という用語は、細胞機能を阻害する若しくは阻止する、かつ/または細胞死若しくは破壊を引き起こす、物質を指す。細胞傷害性薬剤には、放射性同位体（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、及びLuの放射性同位体）、化学療法剤若しくは化学療法薬（例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカルカロイド（ピンクリスチン、ピンプラスチン、エトポシド）、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピシン、または他のインターカレート剤）、成長阻害剤、核酸分解酵素等の酵素及びそれらの断片、抗生物質、細菌、真菌、植物、または動物起源の小分子毒素または酵素活性毒素（それらの断片及び/または変異形を含む）等の毒素、ならびに以下に記載される種々の抗腫瘍または抗癌薬剤が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0064】

「エフェクター機能」は、抗体アイソタイプにより異なる抗体のFc領域に起因し得る生物活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合及び補体依存性細胞傷害作用(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用(ADCC)、食作用、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御、ならびにB細胞活性化が挙げられる。

20

【0065】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」は、所望の治療的または予防的結果を達成するために必要である、一定期間にわたって投与する投薬量の有効な量を指す。癌を治療するための有効量の薬物によって、癌細胞の数が低減し、腫瘍サイズが縮小し、抹消臓器への癌細胞浸潤が阻害され（すなわち、ある程度遅れる、好ましくは止まる）、腫瘍転移が阻害され（すなわち、ある程度遅れる、好ましくは止まる）、腫瘍成長がある程度阻害され、かつ/または癌と関連付けられる症状のうちの一つ以上がある程度緩和され得る。薬物が成長を防止する、かつ/または既存の癌細胞を死滅させることができる範囲で、それは細胞増殖抑制性及び/または細胞傷害性であり得る。有効量によって、無進行生存率が上昇し（例えば、固体腫瘍の奏功評価基準(RECIST)若しくはCA-125変化によって測定される）、客観的奏功がもたらされ（部分奏功(PR)若しくは完全奏功(CR)）、全生存期間が延長し、かつ/または癌の一つ以上の症状が改善される（例えば、FOSIによって評価される）。

30

【0066】

「エピトープ」という用語は、抗体が結合する抗原分子上の特定の部位を指す。

【0067】

「エピトープ4D5」または「4D5エピトープ」または「4D5」は、抗体4D5(ATCC CRL 10463)及びトラスツズマブが結合するHER2の細胞外ドメイン内の領域である。このエピトープは、HER2の膜貫通ドメインに近くにあり、HER2のドメインIV内にある。4D5エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988)に記載されるもの等のルーチンクロスブロッキングアッセイを行うことができる。代替として、エピトープマッピングを行い、抗体がHER2の4D5エピトープ（例えば、HER2を含む約残基550～約残基610に由来する領域内の任意の一つ以上の残基（配列番号39））に結合するかどうかを評価することができる。

40

【0068】

「エピトープ2C4」または「2C4エピトープ」は、抗体2C4が結合するHER2の細胞外ドメイン内の領域である。2C4エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and

50

david Lane (1988)に記載されるもの等のルーチンクロスブロッキングアッセイを行うことができる。代替として、エピトープマッピングを行い、抗体がHER2の2C4エピトープに結合するかどうかを評価することができる。エピトープ2C4は、HER2の細胞外ドメイン内のドメインIIからの残基を含む。2C4抗体及びペルツズマブは、ドメインI、II、及びIIIの接合部でHER2の細胞外ドメインに結合する(Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328(2004))。

【0069】

本明細書における「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部分を含有する、免役グロブリン重鎖のC末端領域を定義するように使用される。この用語は、天然配列Fc領域及び変異形Fc領域を含む。一実施形態において、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226から、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端までに及ぶ。しかしながら、Fc領域のC末端リジン(Lys447)は、存在する場合もあれば、しない場合もある。本明細書で別途明記されない限り、Fc領域または定常領域におけるアミノ酸残基の付番は、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載される、EUインデックスとも呼ばれる、EU付番方式に従う。

10

【0070】

「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般に、4つのFRドメインFR1、FR2、FR3、及びFR4からなる。したがって、HVR及びFR配列は、一般に、VH(またはVL)において次の配列、FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4で出現する。

20

【0071】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書で、天然抗体構造と実質的に同様の構造を有するか、または本明細書に定義されるFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指すように互換的に使用される。

【0072】

「HER2のグリコシル化型」という用語は、炭水化物残基の付加によって翻訳後修飾されている、HER2の自然発生型を指す。

30

【0073】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」という用語は、互換的に使用され、外因性核酸が導入された細胞を指し、かかる細胞の子孫を含む。宿主細胞には、初代形質転換細胞及び継代の数に関わらずそれに由来する子孫を含む、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が含まれる。子孫の核酸含量は親細胞と完全に同一でない場合があるが、突然変異を含有し得る。元々形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物活性を有する突然変異体子孫が、本明細書に含まれる。

【0074】

「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞によって産生された、またはヒト抗体レポーターを利用する非ヒト源に由来する、抗体のアミノ酸配列、または他のヒト抗体コード配列に対応する、アミノ酸配列を保有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的に除外する。

40

【0075】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免役グロブリンVLまたはVHフレームワーク配列の選択において最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免役グロブリンVLまたはVH配列の選択は、可変ドメイン配列の下位集団から行われる。一般に、配列の下位集団は、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest

50

t, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3にあるような下位集団である。一実施形態において、VLについて、下位集団は、上記のKabatらにあるような下位集団I I Iである。一実施形態において、VHについて、下位集団は、上記のKabatらにあるような下位集団I I Iである。

【0076】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基及びヒトFR由来のアミノ酸残基を含む、キメラ抗体を指す。ある特定の実施形態において、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むことになり、そのHVR（例えば、CDR）の全てまたは実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、そのFRの全てまたは実質的に全てがヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は任意に、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含んでもよい。抗体、例えば非ヒト抗体の、「ヒト化型」は、ヒト化を経た抗体を指す。

10

【0077】

本明細書で使用される「超可変領域」または「HVR」という用語は、配列が高度に変化する、かつ/または構造的に規定されたループ（「超可変ループ」）を形成する、抗体可変ドメインの領域のそれぞれを指す。一般に、天然4本鎖抗体は、6つのHVRを含み、このうち3つがVH（H1、H2、H3）にあり、3つがVL（L1、L2、L3）にある。HVRは一般に、超可変ループに由来するかつ/または「相補性決定領域」（CDR）に由来するアミノ酸残基を含み、後者は、配列可変性が最も高く、及び/または抗原認識に關与する。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基26~32（L1）、50~52（L2）、91~96（L3）、26~32（H1）、53~55（H2）、及び96~101（H3）において生じる（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917（1987））。例示的なCDR（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3）は、アミノ酸残基L1の24~34、L2の50~56、L3の89~97、H1の31~35B、H2の50~65、及びH3の95~102において生じる。（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)）。VHにおけるCDR1を除いて、CDRは一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRはまた、抗原に接触する残基である、「特異性決定残基」または「SDR」も含む。SDRは、短縮型（abbreviated）CDR、またはa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に含有される。例示的なa-CDR（a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、及びa-CDR-H3）は、アミノ酸残基L1の31~34、L2の50~55、L3の89~96、H1の31~35B、H2の50~58、及びH3の95~102において生じる。（See Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633（2008）を参照されたい）。別途指定されない限り、可変ドメインにおけるHVR残基及び他の残基（例えば、FR残基）は、本明細書において上記のKabatらに従って付番される。

20

30

40

【0078】

「免疫複合体」は、細胞傷害性薬剤を含むが、これらに限定されない1個以上の異種性分子（複数可）にコンジュゲートされる抗体である。

【0079】

「患者」または「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物には、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト、及びサル等の非ヒト霊長類）、ウサギ、及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、患者、個体、または対象は、ヒトである。いくつかの実施形態において、患者は「癌患者」、すなわち、癌、特に胃癌または乳癌

50

の1つ以上の症状を罹患しているか、または罹患する危険性がある者であり得る。

【0080】

「患者集団」は、癌患者の群を指す。そのような集団を使用して、薬物の統計的に有意な有効性及び/または安全性を実証することができる。

【0081】

「再発」患者は、寛解後に癌の兆候または症状を有する者である。任意に、患者は、アジュバントまたはネオアジュバント療法後に再発した。

【0082】

「HER発現、増幅、または活性化を示す」癌または生体試料は、診断試験において、HER受容体を発現する（過剰発現を含む）、HER遺伝子が増幅する、かつ/またはさもなければHER受容体の活性化若しくはホスホリル化を実証するものである。

10

【0083】

「ネオアジュバント療法」または「術前療法」は、本明細書において、手術前に付与される療法を指す。ネオアジュバント療法の目標は、即時の全身治療を提供することであり、潜在的に、手術、それに続く全身療法の標準シーケンスに従った場合にさもなくば増殖するであろう微小転移を根絶する。ネオアジュバント療法はまた、腫瘍サイズを低減し、それにより最初に切除不可能であった腫瘍を完全に切除するか、または臓器及びその機能の一部を保存するのに役立つ場合がある。さらに、ネオアジュバント療法は、薬効の*in vivo*評価を可能にし、これによって後続の治療の選択を導かれ得る。

【0084】

「アジュバント療法」は、本明細書において、疾患再発の危険性を低減するために、残留疾患の証拠を検出することができない根治手術後に付与される療法を指す。アジュバント療法の目標は、癌の再発を防止すること、したがって癌関連死の可能性を低減することである。アジュバント療法は、本明細書において、ネオアジュバント療法を具体的に除外する。

20

【0085】

「根治手術」は、その用語が医学コミュニティ内で使用されるように使用される。根治手術としては、例えば、腫瘍の除去または切除をもたらす手順、手術、またはさもなければ、腫瘍の除去または切除をもたらすもの、例えば、全ての肉眼視可能な腫瘍の除去または切除をもたらすものを含む。根治手術としては、例えば、腫瘍の完全若しくは治癒的切除、または肉眼的完全切除が挙げられる。根治手術は、1つ以上の段階で起こる手順を含み、例えば、腫瘍の切除前に1つ以上の手術または他の手順が行われる複数段階手術手順を含む。根治手術は、関与する臓器、臓器及び組織の一部、ならびに周囲臓器、例えば、リンパ節、臓器の一部、または組織を含む腫瘍を除去する、または切除する手順を含む。除去は不完全であり得るため、腫瘍細胞は検出されないまま残留する場合がある。

30

【0086】

「生存（率）」は、患者が依然として生存していることを指し、無疾患生存（DFS）、無進行生存（PFS）、及び全生存（OS）を含む。生存率は、カプラン-マイヤー方法によって推定することができ、生存率のいかなる相違も、層別ロジック検定を使用して計算される。

40

【0087】

「無進行生存」（PFS）は、治療の初日から、どちらが最初に起こるかに関わらず、記録された疾患進行（単離されたCNS進行を含む）または研究上のあらゆる原因による死亡までの期間である。

【0088】

「無疾患生存（DFS）」は、癌を再起することなく、治療の開始から、または最初の診断から例えば、約1年、約2年、約3年、約4年、約5年、約10年の定義された期間にわたってなおも患者が生存していることを指す。本発明の一態様において、DFSは、ITT（*intent-to-treat*）原則に従って解析される。すなわち、患者は、割り付けられた療法に基づいて評価される。DFSの解析で使用される事象は、癌の局

50

所的再発、局所再発、及び遠隔再発、二次癌の発生、及び先行事象（例えば、乳癌再発または第2の原発癌）のない患者の任意の原因による死亡を含み得る。

【0089】

「全生存」は、患者が、治療の開始から、または最初の診断から約1年、約2年、約3年、約4年、約5年、約10年等の定義された期間にわたってもなお生存していることを指す。本発明の根拠をなす試験において、生存分析に使用される事象は、任意の原因による死亡であった。

【0090】

「生存を延長させる」とは、未治療の患者と比較して、または対照治療プロトコルと比較して、治療された患者におけるDFS及び/またはOSを増加させることを意味する。生存は、治療の開始の後、または最初の診断の後、少なくとも約6ヶ月、または少なくとも約1年、または少なくとも約2年、または少なくとも約3年、または少なくとも約4年、または少なくとも約5年、または少なくとも約10年等にわたって監視される。

10

【0091】

「単剤療法」とは、一連の治療期間中に、癌または腫瘍の治療のために単一治療剤のみを含む治療レジメンを意味する。

【0092】

「維持療法」とは、疾患再発または進行の可能性を低減するために付与される治療レジメンを意味する。維持療法は、対象の寿命までの長期間を含む、任意の期間にわたって提供され得る。維持療法は、初期療法後に提供されるか、または初期療法若しくは追加療法と併せて提供され得る。維持療法に使用される投薬量は異なる場合があり、他の種類の療法に使用される投薬量と比較して低減した投薬量を含み得る。

20

【0093】

本明細書で定義される場合、「トラスツズマブ」、「HERCEPTIN（登録商標）」、及び「hUMA b 4 D 5 - 8」という用語は、互換的に使用される。かかる抗体は、好ましくは、配列番号30及び配列番号29にそれぞれ示される軽鎖アミノ酸配列及び重鎖アミノ酸配列を含む。

【0094】

本明細書では、「ペルツズマブ」、「PERJETA（登録商標）」、及び「rhUMA b 2 C 4」は、互換的に使用される。かかる抗体は、配列番号32及び31それぞれの軽鎖アミノ酸配列及び重鎖アミノ酸配列を有する主要種抗体を含む（図13A及びB）。いくつかの実施形態において、ペルツズマブは、アミノ末端リーダー伸長を有する変異種抗体を含み、例えば、配列番号34の軽鎖アミノ酸配列、及び配列番号33の重鎖アミノ酸配列を含む。抗体は、組み換えチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞によって任意に産生される。

30

【0095】

本明細書で定義されるように、「T-DM1」、「トラスツズマブ-MCC-DM1」、「アド-トラスツズマブエムタンシン」、「トラスツズマブエムタンシン」、及び「KADCYLA（登録商標）」という用語は、互換的に使用され、リンカー部分MCCによってマイタンシノイド薬物部分DM1に結合されたトラスツズマブを指し、1、2、3、4、5、6、7、及び8つの薬物部分が抗体トラスツズマブに共有結合される、様々に負荷及び結合された抗体-薬物複合体の全ての混合物を含む（US7097840、US8337856、US2005/0276812、US2005/0166993）。

40

【0096】

「単離抗体」は、その天然環境の構成成分から分離された抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、例えば、電気泳動法（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフ法（例えば、イオン交換または逆相HPLC）によって決定される、95%超または99%超の純度まで精製される。抗体の純度の評価のための方法の概説については、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848: 79-87 (2007)を参照されたい

50

。

【0097】

「単離核酸」は、その天然環境の構成成分から分離された核酸分子を指す。単離核酸には、核酸分子を通常含有する細胞内に含有される核酸分子が含まれるが、その核酸分子は、染色体外に、またはその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0098】

「抗HER2抗体をコードする単離核酸」は、抗体の重鎖及び軽鎖（またはそれらの断片）をコードする1個以上の核酸分子を指し、それには単一のベクターまたは別個のベクターにおけるかかる核酸分子（複数可）が含まれ、かかる核酸分子（複数可）は、宿主細胞内の1つ以上の場所に存在する。

10

【0099】

本明細書で使用される「HER2」という用語は、細胞内のHER2前駆体タンパク質の処理からもたらされる任意の天然の成熟HER2を指す。この用語には、別途指定されない限り、霊長類（例えば、ヒト及びカニクイザル）及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含む、任意の脊椎動物源由来のHER2が含まれる。この用語はまた、HER2の自然発生変異形、例えば、スプライス変異形または対立遺伝子変異形を包含する。シグナル配列を含む（シグナル配列であるアミノ酸1～22を含む）、例示的なヒトHER2前駆体タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号10に示される。例示的な成熟ヒトHER2のアミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸23～1255である。

【0100】

「HER2陽性細胞」という用語は、その表面上でHER2を発現する細胞を指す。

20

【0101】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指す。すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、同一であり、かつ/または同じエピトープに結合するが、例えば、自然発生突然変異を含有する、またはモノクローナル抗体調製物の産生中に発生する、想定される変異形抗体は例外であり、かかる変異形は一般に少量で存在する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対象とする。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組み換えDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含むが、これらに限定されない、多様な技法によって作製されてもよく、モノクローナル抗体を作製するためのかかる方法及び他の例示的な方法が、本明細書に記載されている。

30

【0102】

「裸の抗体」は、異種性部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。裸の抗体は、薬学的製剤中に存在してもよい。

【0103】

「天然抗体」は、様々な構造を有する、自然発生免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合されている2つの同一の軽鎖及び2つの同一の重鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端まで、各重鎖は、可変重ドメイン（variable heavy domain）または重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）、続いて3つの定常ドメイン（CH1、CH2、及びCH3）を有する。同様に、N末端からC末端まで、各軽鎖は、可変軽ドメイン（variable light domain）または軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）、続いて定常軽（CL）ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ κ ）及びラムダ（ λ ）と呼ばれる2つの型うちの1つに割り付けられ得る。

40

50

【0104】

「バイアル」は、液体または凍結乾燥調製物を保有するのに好適な容器である。一実施形態において、バイアルは、単回使用バイアル、例えば、栓を有する20ccの単回使用バイアルである

【0105】

「添付文書」という用語は、かかる治療薬の適応症、使用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌症についての情報、及び/またはその使用に関する警告を含有する、治療剤製品のパッケージに通例含まれる指示書を指すように使用される。

【0106】

参照ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、配列をアライメントし、配列同一性最大パーセントを得るのに必要な場合はギャップを導入した後に、いかなる保存的置換も配列同一性の部分として考慮せずに、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基の割合として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、当該技術分野における技術の範囲内の種々の方式で、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェア等の、公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、達成することができる。当業者は、比較されている配列の完全長にわたる最大のアライメントを得るために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、配列をアライメントするために適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書では、アミノ酸配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.によって記述され、ソースコードは、ユーザ文書と共に米国著作権庁(U.S. Copyright Office)、Washington D.C., 20559に提出されており、米国著作権番号TXU510087の下に登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公的に利用可能であるか、またはソースコードから編集されてもよい。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステムで使用するために編集すべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され、変更されない。

10

20

30

【0107】

アミノ酸配列比較のためにALIGN-2が用いられる場合、所与のアミノ酸配列Bに対する、それとの、またはそれと対比した、所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性%(代替的に、所与のアミノ酸配列Bに対する、それとの、またはそれと対比したある特定のアミノ酸配列同一性%を有する、またはそれを含む、所与のアミノ酸配列Aと表現され得る)は、次のように算出される。

$$100 \times \text{分数 } X / Y$$

式中、Xは、配列アライメントプログラムALIGN-2によって、そのプログラムのA及びBのアライメントにおいて完全な一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Yは、B中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、Bに対するAのアミノ酸配列同一性%は、Aに対するBのアミノ酸配列同一性%と等しくはならないことが理解されよう。特に別途定めのない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性%値は、直前の段落に記載されるように、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用して得られる。

40

【0108】

「薬学的製剤」という用語は、調製物の中に含有される活性成分の生物活性が有効になるような形態であり、かつ製剤が投与される対象にとって許容できないほど有毒である追加の構成成分を何ら含有しない調製物を指す。

【0109】

「薬学的に許容される担体」は、対象にとって無毒である、活性成分以外の薬学的製剤

50

中の成分を指す。薬学的に許容される担体には、緩衝液、賦形剤、安定剤、または防腐剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0110】

本明細書で使用されるとき、「治療」（及び「治療する」または「治療すること」等のその文法上の変形形態）は、治療されている個体の自然経過を変えることを目的とした臨床介入を指し、予防のために、または臨床病理過程に行うことができる。治療の望ましい効果には、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の予防、疾患進行速度の低減、病状の寛解または緩和、及緩解または予後の改善が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本発明の抗体を使用して、疾患の発達を遅らせるか、または疾患の進行を減速させる。

10

【0111】

「共投与」とは、2つの薬物の連続点滴ではなく、同一投与中に2つ（以上）の薬物を静脈内投与することを意味する。一般に、これは、2つ（以上）の薬物を、その共投与前に同じIVバッグ内に合わせることを必要とする。

【0112】

1つ以上の他の薬物と「同時に」投与される薬物は、同一治療サイクル中、1つ以上の他の薬物と同じ治療日に、任意に1つ以上の他の薬物と同じ時間に投与される。例えば、3週間毎に付与される癌療法の場合、同時に投与される薬物はそれぞれ、3週間のサイクルの1日目に投与される。

20

【0113】

「化学療法」は、癌の治療に有用な化学療法剤の使用である。

【0114】

「化学療法剤」は、作用の機序に関わらず、癌の治療に有用な化学化合物である。化学療法剤のクラスとしては、アルキル化剤、抗代謝物質、紡錘体毒植物アルカロイド、細胞傷害性/抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、抗体、感光剤、及びキナーゼ阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。化学療法剤の例としては、アントラシクリン、例えば、エピルピシンまたはドキシソルピシン（ADRIAMYCIN（登録商標））、シクロホスファミド（CYTOXAN（登録商標）、NEOSAR（登録商標））、アントラシクリン及びシクロホスファミドの組み合わせ（「AC」）、タキサン、例えば、ドセタキセル（TAXOTERE（登録商標））またはパクリタキセル（TAXOL（登録商標））、5-FU（フルオロウラシル、5-フルオロウラシル、CAS番号51-21-8）、ラパチニブ（TYKERB（登録商標））、カペシタピン（XELODA（登録商標））、ゲムシタピン（GEMZAR（登録商標）、Lilly）、PD-0325901（CAS番号391210-10-9、Pfizer）、シスプラチン（シス-ジアミン、ジクロロプラチナ（II）、CAS番号15663-27-1）、カルボプラチン（CAS番号41575-94-4）、テモゾロミド（4-メチル-5-オキソ-2,3,4,6,8-ペンタアザピシクロ[4.3.0]ノナ-2,7,9-トリエン-9-カルボキシアミド、CAS番号85622-93-1、TEMODAR（登録商標）、TEMODAL（登録商標）、Schering Plough）、タモキシフェン（（Z）-2-[4-（1,2-ジフェニルプロ-1-エニル）フェノキシ]-N,N-ジメチル-エタンアミン、NOLVADEX（登録商標）、ISTUBAL（登録商標）、VALODEX（登録商標））が挙げられる。

30

40

【0115】

化学療法剤のさらなる例としては、オキサリプラチン（ELOXATIN（登録商標）、Sanofi）、ボルテゾミブ（VELCADE（登録商標）、Millennium Pharm.）、ステント（SUNITINIB（登録商標）、SU11248、Pfizer）、レトロゾール（FEMARA（登録商標）、Novartis）、イマチニブメシラート（GLEEVEC（登録商標）、Novartis）、XL-518（MEK阻害剤、Exelixis、WO2007/044515号）、ARRY-886（M

50

ek阻害剤、AZD6244、Array BioPharma、Astra Zene
 ca)、SF-1126 (PI3K阻害剤、Semafore Pharmaceuti
 cals)、BEZ-235 (PI3K阻害剤、Novartis)、XL-147 (P
 I3K阻害剤、Exelixis)、PTK787/ZK 222584 (Novart
 is)、フルベストラント (FASLODEX (登録商標)、AstraZeneca)
 、ロイコボリン (ホリニン酸)、ラパマイシン (シロリムス、RAPAMUNE (登録商
 標)、Wyeth)、ロナファルニブ (SARASAR (商標)、SCH 66336、
 Schering Plough)、ソラフェニブ (NEXAVAR (登録商標)、BA
 Y43-9006、Bayer Labs)、ゲフィチニブ (IRESSA (登録商標)
 、AstraZeneca)、イリノテカン (CAMPTOSAR (登録商標)、CPT
 -11、Pfizer)、チピファルニブ (ZARNESTRA (商標)、Johnso
 n & Johnson)、ABRAXANE (商標) (Cremophor 不含)、バクリ
 タキセルのアルブミン操作されたナノ粒子製剤 (American Pharmaceu
 tical Partners、Schamberger, Il)、バンダタニブ (rINN
 N、ZD6474、ZACTIMA (登録商標)、AstraZeneca)、クロラン
 ブシル、AG1478、AG1571 (SU 5271; Sugen)、テムシロリムス
 (TORISEL (登録商標)、Wyeth)、バゾパニブ (GlaxoSmithKl
 ine)、カンフォスファミド (TELCYTA (登録商標)、Telik)、チオテバ
 及びシクロスホスファミド (CYTOXAN (登録商標)、NEOSAR (登録商標))
 、ブスルファン、イムプロスルファン、及びピボスルファン等のアルキルスルホン酸塩、
 ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、及びウレドーパ等のアジリジン、エチレンイ
 ミン及びメチルアメラミン (アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホス
 ホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、及びトリメチロメラミンを含む)、アセ
 トゲニン (特にプラタシン及びプラタシノン)、カンプトテシン (合成類似体トボテカン
 を含む)、プリオスタチン、カリスタチン、CC-1065 (そのアドゼレシン、カルゼ
 レシン、及びビゼレシン合成類似体を含む)、クリプトフィシン (特にクリプトフィシン
 -1及びクリプトフィシン-8)、ドラスタチン、デュオカルマイシン (合成類似体、K
 W-2189及びCB1-TM1を含む)、エリユテロピン、パンクラチスタチン、サル
 コジクチン、スポンジスタチン、クロランブシル、クロルナファジン、クロロホスファミ
 ド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミン、メクロレ
 タミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムピシン、フェネステリン、ブレドニムスチ
 ン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード、カルムス
 チン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムスチン等
 のニトロソウレア、エネジイン抗生物質等の抗生物質 (例えば、カリケアミシン、カリケ
 アミシン II、カリケアミシン II (Angew Chem. Intl. Ed. En
 gl. (1994) 33: 183-186)、ダイネマイシン、ダイネマイシンA、クロ
 ドロネート等のピスホスホネート、エスペラミシン、ならびにネオカルジノスタチン発色
 団及び関連色素タンパクエンジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン、アクチノマ
 イシン、オースラマイシン (authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、
 カクチノマイシン、カラビシン (carabycin)、カルミノマイシン (carmi
 nomycin)、カルジノフィリン、クロモマイシン (chromomycinis)
 、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノ
 ルロイシン、ドキシソルピシン、モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシ
 ソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン、及びデオキシドキシソルピシン)、エピルピシ
 ン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン (marcellomycin)、
 マイトマイシンC等のマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイ
 シン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン (que
 lamycin)、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジ
 ン (tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン、メトトレキサ
 ート及び5-フルオロウラシル (5-FU) 等の代謝拮抗物質、デノブテリン (deno

10

20

30

40

50

pterin)、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート等の葉酸類似体、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン等のプリン類似体、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン等のピリミジン類似体、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン等のアンドロゲン、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン等の抗副腎剤(anti-adrenal)、葉酸等の葉酸補充剤、アセグラトン、アルドホスファミド(aldophosphamide)グリコシド、アミノレプリン酸、エニルウラシル(eniluracil)、アムサクリン、ベストラブシル(bestrabucil)、ピサントレン、エダトレキサート(edatraxate)、デフォファミン(defofamine)、デメコルチン、ジアジコン(diaziquone)、エルフォルニチン、酢酸エリプチニウム、エポチロン(epothilone)、エトグルシド、硝酸ガリウム、ヒドロキシ尿素、レンチナン、ロニダミン(lonidainine)、メイタンシン(maytansine)及びアンサミトシン(ansamitocin)等のメイタンシノイド、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダモール(mopidanmol)、ニトラエリン(nitraerine)、ペントスタチン、フェナメト(phenamet)、ピラルピシン、ロソキサントロン(losoxantrone)、ポドフィリン酸、2-エチルヒドラジン、プロカルバジン、PSK(登録商標)多糖類複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)、ラゾキサソ、リゾキシソ(rhizoxin)、シゾフィラン、スピロゲルマニウム、テヌアゾン酸、トリアジコン、2,2',2"-トリクロロトリエチルアミン、トリコテセン(trichothecene)(T-2トキシソ、ベラクリンA(verracurin A)、ロリジンA(roridin A)、及びアングイジン(anguidine))、ウレタン、ピンデシン、ダカルバジン、マンノムスチン、ミトブロニトール、ミトラクトール、ピボプロマン、ガシトシン(gacytosine)、アラビノシド(Ara-C)、クロホスファミド、チオテバ、6-チオグアニン、メルカプトプリン、メトトレキサート、シスプラチン及びカルボプラチン等の白金類似体、ピンプラスチン、エトボシド(VP-16)、イフォスファミド、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ピノレルピン(NAVELBINE(登録商標))、ノバントロン、テニボシド、エダトレキサート、ダウノマイシン、アミノプテリン、イバンドロネート、CPT-11、トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000、ジフルオロメチルオルニチン(DMFO)、レチノイン酸等のレチノイド、ならびに上記のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、及び誘導体が挙げられる。

【0116】

本明細書における治療剤の「固定」または「一定」用量は、患者の体重(WT)または体表面積(BSA)に関係なくヒト患者に投与される用量を指す。したがって、この固定用量または一定用量は、mg/kg用量またはmg/m²用量として提供されないが、むしろ治療剤の絶対量として提供される。

【0117】

本明細書における「負荷」用量は一般に、患者に投与される治療剤の初期用量を含み、その1つ以上の維持用量(複数可)が続く。一般に、単一負荷用量が投与されるが、本明細書において複数の負荷用量が企図される。通常、維持用量(複数可)で達成され得るより早く治療剤の所望の安定状態濃度を達成するように、投与される負荷用量(複数可)の量は、投与される維持用量(複数可)の量を超え、かつ/または負荷用量(複数可)は、維持用量(複数可)より頻繁に投与される。

【0118】

本明細書における「維持」用量は、治療期間にわたって患者に投与される治療剤の1つ以上の用量を指す。通常、維持用量は、ほぼ毎週、約2週間毎、約3週間毎、または約4週間毎の治療間隔で投与されるが、3週間毎等の治療間隔で投与されることが好ましい。

【0119】

10

20

30

40

50

「点滴」または「点滴する」は、治療と目的として、静脈から体内に薬物含有溶液を導入することを指す。一般に、これは、点滴（IV）バッグを介して達成される。

【0120】

「点滴バッグ」または「IVバッグ」は、患者の静脈を介して投与され得る溶液を保持することができるバッグである。一実施形態において、溶液は、生理食塩液である（例えば、約0.9%または約0.45% NaCl）。任意に、IVバッグは、ポリオレフィンまたはポリ塩化ビニルから形成される。

【0121】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体を抗原に結合することに関与する、抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、VH及びVL）は一般に、同様の構造を有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）及び3つの超可変領域（HVR）を含む。（例えば、Kindt et al., *Immunology*, 6th ed., W. H. Freeman and Co., page 91 (2007)を参照されたい。）抗原結合特異性を付与するためには、単一のVHまたはVLドメインで十分であり得る。さらに、抗原に結合する抗体のVHまたはVLドメインを使用して、それぞれ、相補的VLまたはVHドメインのライブラリをスクリーニングして、特定の抗原に結合する抗体を単離してもよい。例えば、Portolano et al., *J. Immunol.* 150: 880-887 (1993)、Clarkson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991)を参照されたい。

10

20

【0122】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、連結している別の核酸を増殖することが可能な核酸分子を指す。この用語には、自己複製核酸構造としてのベクター及び導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターが含まれる。ある特定のベクターは、作動的に連結された核酸の発現を導くことが可能である。かかるベクターは、本明細書で「発現ベクター」と称される。

【0123】

「アルキル」は、ノルマル、第二級、第三級、または環式炭素原子を含有するC₁~C₁₈炭化水素である。例として、メチル（Me、-CH₃）、エチル（Et、-CH₂CH₃）、1-プロピル（n-Pr、n-プロピル、-CH₂CH₂CH₃）、2-プロピル（i-Pr、i-プロピル、-CH（CH₃）₂）、1-ブチル（n-Bu、n-ブチル、-CH₂CH₂CH₂CH₃）、2-メチル-1-プロピル（i-Bu、i-ブチル、-CH₂CH（CH₃）₂）、2-ブチル（s-Bu、s-ブチル、-CH（CH₃）CH₂CH₃）、2-メチル-2-プロピル（t-Bu、t-ブチル、-C（CH₃）₃）、1-ペンチル（n-ペンチル、-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃）、2-ペンチル（-CH（CH₃）CH₂CH₂CH₃）、3-ペンチル（-CH（CH₂CH₃）₂）、2-メチル-2-ブチル（-C（CH₃）₂CH₂CH₃）、3-メチル-2-ブチル（-CH（CH₃）CH（CH₃）₂）、3-メチル-1-ブチル（-CH₂CH₂CH（CH₃）₂）、2-メチル-1-ブチル（-CH₂CH（CH₃）CH₂CH₃）、1-ヘキシル（-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃）、2-ヘキシル（-CH（CH₃）CH₂CH₂CH₂CH₃）、3-ヘキシル（-CH（CH₂CH₃）（CH₂CH₂CH₃））、2-メチル-2-ペンチル（-C（CH₃）₂CH₂CH₂CH₃）、3-メチル-2-ペンチル（-CH（CH₃）CH（CH₃）CH₂CH₃）、4-メチル-2-ペンチル（-CH（CH₃）CH₂CH（CH₃）₂）、3-メチル-3-ペンチル（-C（CH₃）（CH₂CH₃）₂）、2-メチル-3-ペンチル（-CH（CH₂CH₃）CH（CH₃）₂）、2,3-ジメチル-2-ブチル（-C（CH₃）₂CH（CH₃）₂）、3,3-ジメチル-2-ブチル（-CH（CH₃）C（CH₃）₃がある。

30

40

【0124】

本明細書で使用される「C₁~C₈アルキル」という用語は、1~8個の炭素原子を有

50

する直鎖または分岐、飽和または不飽和炭化水素を指す。代表的な「 $C_1 \sim C_8$ アルキル」基としては、-メチル、-エチル、- n -プロピル、- n -ブチル、- n -ペンチル、- n -ヘキシル、- n -ヘプチル、- n -オクチル、- n -ノニル、及び- n -デシルが含まれるが、これらに限定されず、分岐 $C_1 \sim C_8$ アルキルとしては、-イソプロピル、-*sec*-ブチル、-イソブチル、-*tert*-ブチル、-イソペンチル、2-メチルブチルが含まれるが、これらに限定されず、不飽和 $C_1 \sim C_8$ アルキルとしては、-ビニル、-アリル、-1-ブテニル、-2-ブテニル、-イソブチレニル、-1-ペンテニル、-2-ペンテニル、-3-メチル-1-ブテニル、-2-メチル-2-ブテニル、-2,3-ジメチル-2-ブテニル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、-アセチレニル、-プロピニル、-1-ブチニル、-2-ブチニル、-1-ペンチニル、-2-ペンチニル、-3-メチル-1-ブチニルが含まれるが、これらに限定されない。 $C_1 \sim C_8$ アルキル基は、非置換であり得るか、または- $C_1 \sim C_8$ アルキル、-O-($C_1 \sim C_8$ アルキル)、-アリール、-C(O)R、-OC(O)R、-C(O)OR、-C(O)NH₂、-C(O)NHR、-C(O)N(R)₂-NHC(O)R、-SO₃R、-S(O)₂R、-S(O)R、-OH、-ハロゲン、-N₃、-NH₂、-NH(R)、-N(R)₂、及び-CNを含むが、これらに限定されない1つ以上の基で置換され得、式中、各Rは独立して、H、- $C_1 \sim C_8$ アルキル、及びアリールから選択される。

10

【0125】

本明細書で使用される「 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル」という用語は、1~12個の炭素原子を有する直鎖または分岐、飽和または不飽和炭化水素を指す。 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル基は、非置換であり得るか、または- $C_1 \sim C_8$ アルキル、-O-($C_1 \sim C_8$ アルキル)、-アリール、-C(O)R、-OC(O)R、-C(O)OR、-C(O)NH₂、-C(O)NHR、-C(O)N(R)₂-NHC(O)R、-SO₃R、-S(O)₂R、-S(O)R、-OH、-ハロゲン、-N₃、-NH₂、-NH(R)、-N(R)₂、及び-CNを含むが、これらに限定されない1つ以上の基で置換され得、式中、各Rは独立して、H、- $C_1 \sim C_8$ アルキル、及びアリールから選択される。

20

【0126】

本明細書で使用される「 $C_1 \sim C_6$ アルキル」という用語は、1~6個の炭素原子を有する直鎖または分岐、飽和または不飽和炭化水素を指す。代表的な「 $C_1 \sim C_6$ アルキル」基としては、-メチル、-エチル、- n -プロピル、- n -ブチル、- n -ペンチル、及び- n -ヘキシルが含まれるが、これらに限定されず、分岐 $C_1 \sim C_6$ アルキルとしては、-イソプロピル、-*sec*-ブチル、-イソブチル、-*tert*-ブチル、-イソペンチル、及び2-メチルブチルが含まれるが、これらに限定されず、不飽和 $C_1 \sim C_6$ アルキルとしては、-ビニル、-アリル、-1-ブテニル、-2-ブテニル、及び-イソブチレニル、-1-ペンテニル、-2-ペンテニル、-3-メチル-1-ブテニル、-2-メチル-2-ブテニル、-2,3-ジメチル-2-ブテニル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、及び3-ヘキシルが含まれるが、これらに限定されない。 $C_1 \sim C_6$ アルキル基は、非置換であり得るか、または $C_1 \sim C_8$ アルキル基について上述されるように、1つ以上の基で置換され得る。

30

40

【0127】

本明細書で使用される「 $C_1 \sim C_4$ アルキル」という用語は、1~4個の炭素原子を有する直鎖または分岐、飽和または不飽和炭化水素を指す。代表的な「 $C_1 \sim C_4$ アルキル」基としては、-メチル、-エチル、- n -プロピル、- n -ブチルが含まれるが、これらに限定されず、分岐 $C_1 \sim C_4$ アルキルとしては、-イソプロピル、-*sec*-ブチル、-イソブチル、-*tert*-ブチルが含まれるが、これらに限定されず、不飽和 $C_1 \sim C_4$ アルキルとしては、-ビニル、-アリル、-1-ブテニル、-2-ブテニル、及び-イソブチレニルが含まれるが、これらに限定されない。 $C_1 \sim C_4$ アルキル基は、非置換であり得るか、または $C_1 \sim C_8$ アルキル基について上述されるように、1つ以上の基で

50

置換され得る。

【0128】

「アルコキシ」は、酸素に単一結合されたアルキル基である。例示的なアルコキシ基としては、メトキシ(-OCH₃)及びエトキシ(-OCH₂CH₃)が含まれるが、これらに限定されない。「C₁~C₅アルコキシ」は、1~5個の炭素原子を有するアルコキシ基である。アルコキシ基は、非置換であり得るか、またはアルキル基について上述されるように、1つ以上の基で置換され得る。

【0129】

「アルケニル」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち、炭素-炭素、sp²二重結合を有するノルマル、第二級、第三級、または環式炭素原子を含有するC₂~C₁₈炭化水素である。例としては、エチレンまたはビニル(-CH=CH₂)、アリル(-CH₂CH=CH₂)、シクロペンテニル(-C₅H₇)、及び5-ヘキセニル(-CH₂CH₂CH₂CH=CH₂)が含まれるが、これらに限定されない。「C₂~C₈アルケニル」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち、炭素-炭素、sp²二重結合を有する2~8個のノルマル、第二級、第三級、または環式炭素原子を含有する炭化水素である。

10

【0130】

「アルキニル」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち、炭素-炭素、sp三重結合を有するノルマル、第二級、第三級、または環式炭素原子を含有するC₂~C₁₈炭化水素である。例としては、アセチレン(-C≡CH)及びプロパルギル(-CH₂C≡CH)が含まれるが、これらに限定されない。「C₂~C₈アルキニル」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち、炭素-炭素、sp三重結合を有する2~8個のノルマル、第二級、第三級、または環式炭素原子を含有する炭化水素である。

20

【0131】

「アルキレン」は、1~18個の炭素原子の飽和、分岐若しくは直鎖、または環式炭化水素ラジカルを指し、親アルカンの同じ、または2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を除去することによって得られる2つの一価ラジカル中心を有する。典型的なアルキレンラジカルとしては、メチレン(-CH₂.)、1,2-エチル(-CH₂CH₂.)、1,3-プロピル(-CH₂CH₂CH₂.)、1,4-ブチル(-CH₂CH₂CH₂CH₂.)等が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0132】

「アルケニレン」は、2~18個の炭素原子の不飽和、分岐若しくは直鎖、または環式炭化水素ラジカルを指し、親アルケンの同じ、または2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を除去することによって得られる2つの一価ラジカル中心を有する。典型的なアルケニレンラジカルとしては、1,2-エチレン(-CH=CH-)が含まれるが、これに限定されない。

【0133】

「アルキニレン」は、2~18個の炭素原子の不飽和、分岐若しくは直鎖、または環式炭化水素ラジカルを指し、親アルキンの同じ、または2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を除去することによって得られる2つの一価ラジカル中心を有する。典型的なアルキニレンラジカルとしては、アセチレン(-C≡C-)、プロパルギル(-CH₂C≡C-)、及び4-ペンチニル(-CH₂CH₂CH₂C≡C-)が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0134】

「アリール」は、炭素環式芳香族基を指す。アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、及びアントラセニルが含まれるが、これらに限定されない。炭素環式芳香族基または複素環式芳香族基は、非置換であり得るが、-C₁~C₈アルキル、-O-(C₁~C₈アルキル)、-アリール、-C(O)R、-OC(O)R、-C(O)OR、-C(O)NH₂、-C(O)NHR、-C(O)N(R)₂、-NHC(O)R、-S(O)₂R、-S(O)R、-OH、-ハロゲン、-N₃、-NH₂、-NH(R)

50

)、 $-N(R)_2$ 、及び $-CN$ を含むが、これらに限定されない1つ以上の基で置換され得、式中、各 R は独立して、 H 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、及びアリールから選択される。

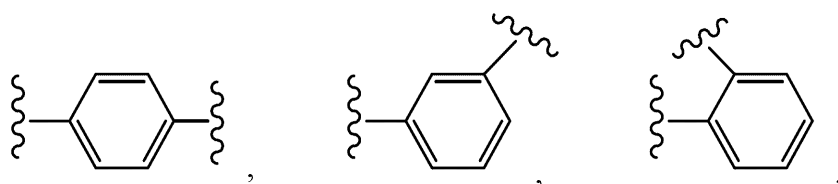
【0135】

「 $C_5 \sim C_{20}$ アリール」は、炭素環式芳香族環内に5～20個の炭素原子を有するアリール基である。 $C_5 \sim C_{20}$ アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、及びアントラセニルが含まれるが、これらに限定されない。 $C_5 \sim C_{20}$ アリール基は、アリール基について上述されるように置換され得るか、または非置換であり得る。「 $C_5 \sim C_{14}$ アリール」は、炭素環式芳香族環内に5～14個の炭素原子を有するアリール基である。 $C_5 \sim C_{14}$ アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、及びアントラセニルが含まれるが、これらに限定されない。 $C_5 \sim C_{14}$ アリール基は、アリール基について上述されるように置換され得るか、または非置換であり得る。

10

【0136】

「アリーレン」は、2つの共有結合を有し、以下の構造に示されるように、オルト、メタ、またはパラ構成であり得るアリール基であり、



20

フェニル基が、非置換であり得るか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-$ アリール、 $-C(O)R$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)R$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)R$ 、 $-OH$ 、 $-$ ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R)$ 、 $-N(R)_2$ 、及び $-CN$ を含むが、これらに限定されない最大4つの基で置換され得、式中、各 R は独立して、 H 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、及びアリールから選択される。

【0137】

「アリールアルキル」は、炭素原子に結合された水素原子のうちの1個、典型的には末端または sp^3 炭素原子がアリールラジカルで置換される、非環式アルキルラジカルを指す。典型的なアリールアルキル基としては、ベンジル、2-フェニルエタン-1-イル、2-フェニルエタン-1-イル、ナフチルメチル、2-ナフチルエタン-1-イル、2-ナフチルエタン-1-イル、ナフトベンジル、2-ナフトフェニルエタン-1-イル等が含まれるが、これらに限定されない。アリールアルキル基は、6～20個の炭素原子を含み、例えば、アリールアルキル基のアルカニル、アルケニル、またはアルキニル基を含むアルキル部分は、1～6個の炭素原子であり、アリール部分は、5～14個の炭素原子である。

30

【0138】

「ヘテロアリールアルキル」は、炭素原子に結合された水素原子のうちの1個、典型的には末端または sp^3 炭素原子がヘテロアリールラジカルで置換される、非環式アルキルラジカルを指す。典型的なヘテロアリールアルキル基としては、2-ベンズイミダゾリルメチル、2-フリルエチル等が含まれるが、これらに限定されない。ヘテロアリールアルキル基は、6～20個の炭素原子を含み、例えば、ヘテロアリールアルキル基のアルカニル、アルケニル、またはアルキニル基を含むアルキル部分は、1～6個の炭素原子である、ヘテロアリール部分が、5～14個の炭素原子、ならびに N 、 O 、 P 、及び S から選択される1～3個のヘテロ原子である。ヘテロアリールアルキル基のヘテロアリール部分は、3～7環員(2～6個の炭素原子)を有する単環、または7～10環員(4～9個の炭素原子、ならびに N 、 O 、 P 、及び S から選択される1～3個のヘテロ原子)を有する二環、例えば、ピシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]、または[6,6]系であり

40

50

得る。

【0139】

「置換アルキル」、「置換アリール」、及び「置換アリールアルキル」は、それぞれアルキル、アリール、及びアリールアルキルを意味し、1つ以上の水素原子は、それぞれ独立して置換基で置換される。典型的な置換基としては、 $-X$ 、 $-R$ 、 $-O^-$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-S^-$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR_3$ 、 $=NR$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-N=C=O$ 、 $-NCS$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $=N_2$ 、 $-N_3$ 、 $NC(=O)R$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)NR_2$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_3H$ 、 $-S(=O)_2R$ 、 $-OS(=O)_2OR$ 、 $-S(=O)_2NR$ 、 $-S(=O)R$ 、 $-OP(=O)(OR)_2$ 、 $-P(=O)(OR)_2$ 、 $-PO_3^-$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)X$ 、 $-C(=S)R$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CO_2^-$ 、 $-C(=S)OR$ 、 $-C(=O)SR$ 、 $-C(=S)SR$ 、 $-C(=O)NR_2$ 、 $-C(=S)NR_2$ 、 $-C(=NR)NR_2$ が含まれるが、これらに限定されず、式中、各Xは独立して、ハロゲン、F、Cl、Br、またはIであり、各Rは独立して、 $-H$ 、 $C_2 - C_{18}$ アルキル、 $C_6 - C_{20}$ アリール、 $C_3 - C_{14}$ 複素環、保護基、またはプロドラッグ部分である。上述のアルキレン、アルケニレン、及びアルキニレン基もまた、同様に置換され得る。

10

【0140】

「ヘテロアリール」及び「複素環」は、1個以上の環原子がヘテロ原子、例えば、窒素、酸素、及び硫黄である環系を指す。複素環ラジカルは、3~20個の炭素原子、ならびにN、O、P、及びSから選択される1~3個のヘテロ原子を含む。複素環は、3~7環員(2~6個の炭素原子、ならびにN、O、P、及びSから選択される1~3個のヘテロ原子)を有する単環、または7~10環員(4~9個の炭素原子、ならびにN、O、P、及びSから選択される1~3個のヘテロ原子)を有する二環、例えば、ピシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]、または[6,6]系であり得る。

20

【0141】

例示的な複素環は、例えば、Paquette, Leo A., Principle of Modern Heterocyclic Chemistry (W. A. Benjamin, New York, 1968)の特に第1章、第3章、第4章、第6章、第7章、及び第9章、The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs (John Wiley & Sons, New York, 1950~現在)の特に第13巻、第14巻、第16巻、第19巻、及び第28巻、ならびにJ. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566に記載されている。

30

【0142】

例示的な複素環には、例として、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル(ピペリジル)、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、酸化硫黄テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス-テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス-テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾシニル、トリアジニル、6H-1,2,5-チアアジアジニル、2H,6H-1,5,2-ジチアジニル、チエニル、チアントレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサンテニル、フェノキサンチニル、2H-ピロリル、イソチアゾリル、イソキゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、1H-イミダゾリル、プリニル、4H-キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、プテリジニル、4aH-カルバゾリル、カルバゾリル、 β -カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル

40

50

、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシンドリル、ベンゾキサゾリニル、及びイサチノイルが含まれるが、これらに限定されない。

【0143】

例えば、限定されないが、炭素結合した複素環は、ピリジンの2、3、4、5、若しくは6位、ピリダジンの3、4、5、若しくは6位、ピリミジンの2、4、5、若しくは6位、ピラジンの2、3、5、若しくは6位、フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフエン、ピロール、若しくはテトラヒドロピロールの2、3、4、若しくは5位、オキサゾール、イミダゾール、若しくはチアゾールの2、4、若しくは5位、イソキサゾール、ピラゾール、若しくはイソチアゾールの3、4、若しくは5位、アジリジンの2若しくは3位、アゼチジンの2、3、若しくは4位、キノリンの2、3、4、5、6、7、若しくは8位、またはイソキノリンの1、3、4、5、6、7、若しくは8位で結合される。さらにより典型的には、炭素結合した複素環としては、2 - ピリジル、3 - ピリジル、4 - ピリジル、5 - ピリジル、6 - ピリジル、3 - ピリダジニル、4 - ピリダジニル、5 - ピリダジニル、6 - ピリダジニル、2 - ピリミジニル、4 - ピリミジニル、5 - ピリミジニル、6 - ピリミジニル、2 - ピラジニル、3 - ピラジニル、5 - ピラジニル、6 - ピラジニル、2 - チアゾリル、4 - チアゾリル、または5 - チアゾリルが挙げられる。

10

【0144】

例えば、限定されないが、窒素結合した複素環は、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、2 - ピロリン、3 - ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、2 - イミダゾリン、3 - イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、2 - ピラゾリン、3 - ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、1H - インダゾールの1位、イソインドールまたはイソインドリンの2位、モルホリンの4位、及びカルバゾールまたはカルボリンの9位で結合される。さらにより典型的には、窒素結合した複素環としては、1 - アジリジル、1 - アゼチジル、1 - ピロリル、1 - イミダゾリル、1 - ピラゾリル、及び1 - ピペリジニルが挙げられる。

20

【0145】

「 $C_3 \sim C_8$ 複素環」は、芳香族または非芳香族 $C_3 \sim C_8$ 炭素環を指し、環炭素原子のうち1～4個が独立して、O、S、及びNからなる群からのヘテロ原子で置換される。 $C_3 \sim C_8$ 複素環の代表例としては、ベンゾフラニル、ベンゾチオフエン、インドリル、ベンゾピラゾリル、クマリニル、イソキノリニル、ピロリル、チオフエニル、フラニル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、キノリニル、ピリミジニル、ピリジニル、ピリドニル、ピラジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、及びテトラゾリルが含まれるが、これらに限定されない。 $C_3 \sim C_8$ 複素環は、非置換であり得るか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-アリアル$ 、 $-C(O)R$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)R$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)R$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $NH(R)$ 、 $-N(R)_2$ 、及び $-CN$ を含むが、これらに限定されない最大7つの基で置換され得、式中、各Rは独立して、H、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、及びアリアルから選択される。

30

40

【0146】

「 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ」は、上で定義される $C_3 \sim C_8$ 複素環基を指し、この複素環基の水素原子のうち1個が結合で置換される。 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロは、非置換であり得るか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-アリアル$ 、 $-C(O)R$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)R$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)R$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $NH(R)$ 、 $-N(R)_2$ 、及び $-CN$ を含むが、これらに限定されない最大6つの基で置換され得、式中、各Rは独立して、H、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、及びアリアルから選択される。

50

【0147】

「 $C_3 \sim C_{20}$ 複素環」は、芳香族または非芳香族 $C_3 \sim C_8$ 炭素環を指し、環炭素原子のうち1～4個独立して、O、S、及びNからなる群からのヘテロ原子で置換される。 $C_3 \sim C_{20}$ 複素環は、非置換であり得るか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-$ ($C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-$ アリアル、 $-C(O)R$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)R$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)R$ 、 $-OH$ 、 $-$ ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R)$ 、 $-N(R)_2$ 、及び $-CN$ を含むが、これらに限定されない最大7つの基で置換され得、式中、各Rが独立して、H、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、及びアリアルから選択される。

10

【0148】

「 $C_3 \sim C_{20}$ ヘテロシクロ」は、上で定義される $C_3 \sim C_{20}$ 複素環基を指し、この複素環基の水素原子のうち1個が結合で置換される。

【0149】

「炭素環」は、単環として3～7個の炭素原子、または二環として7～12個の炭素原子を有する飽和または不飽和環を意味する。単環式炭素環は、3～6個の環原子、さらにより典型的には5または6個の環原子を有する。二環式炭素環は、例えば、ビシクロ[4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、若しくは[6, 6]系として配列された7～12個の環原子、またはビシクロ[5, 6]または[6, 6]系として配列された9または10個の環原子を有する。単環式炭素環の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1-シクロペンチル-1-エニル、1-シクロペンチル-2-エニル、1-シクロペンチル-3-エニル、シクロヘキシル、1-シクロヘキシル-1-エニル、1-シクロヘキシル-2-エニル、1-シクロヘキシル-3-エニル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが挙げられる。

20

【0150】

「 $C_3 \sim C_8$ 炭素環」は、3員、4員、5員、6員、7員、または8員の飽和または不飽和非芳香族炭素環式環である。代表的な $C_3 \sim C_8$ 炭素環としては、 $-$ シクロプロピル、 $-$ シクロブチル、 $-$ シクロペンチル、 $-$ シクロペンタジエニル、 $-$ シクロヘキシル、 $-$ シクロヘキセニル、 $-1, 3-$ シクロヘキサジエニル、 $-1, 4-$ シクロヘキサジエニル、 $-$ シクロヘプチル、 $-1, 3-$ シクロヘプタジエニル、 $-1, 3, 5-$ シクロヘプタトリエニル、 $-$ シクロオクチル、及び $-$ シクロオクタジエニルが含まれるが、これらに限定されない。 $C_3 \sim C_8$ 炭素環基は、非置換であり得るか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-$ ($C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-$ アリアル、 $-C(O)R$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)R$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)R$ 、 $-OH$ 、 $-$ ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R)$ 、 $-N(R)_2$ 、及び $-CN$ を含むが、これらに限定されない1つ以上の基で置換され得、式中、各Rは独立して、H、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、及びアリアルから選択される。

30

【0151】

「 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ」は、上で定義される $C_3 \sim C_8$ 炭素環基を指し、この炭素環基の水素原子のうち1個が結合で置換される。

40

【0152】

「リンカー」は、共有結合、または抗体を薬物部分に共有結合させる原子の鎖を含む、化学部分を指す。様々な実施形態において、リンカーは、二価ラジカル、例えば、アルキルジイル、アリアルジイル、ヘテロアリアルジイル、 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ 、アルキルオキシ(例えば、ポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ)、及びアルキルアミン(例えば、ポリエチレンアミノ、Jeffamine(商標))の反復単位、ならびにコハク酸塩、スクシンアミド、ジグリコール酸塩、マロン酸塩、及びカプロアミドを含む二酸エステル及びアミド等の部分を含む。様々な実施形態において、リンカーは、1つ以上のアミノ酸残基、例えば、バリン、フェニルアラニン、リシン、及びホモリ

50

シンを含み得る。

【0153】

「キラル」という用語は、鏡像パートナーの重ね合せできない (*non-superimposability*) 特性を有する分子を指し、一方で「アキラル」という用語は、それらの鏡像パートナーと重ね合せできる (*superimposability*) 分子を指す。

【0154】

「立体異性体」という用語は、同一の化学構成を有するが、空間内の原子または基の配置に関して異なる、化合物を指す。

【0155】

「ジアステレオマー」は、2つ以上のキラル性の中心を有し、それらの分子が互いの鏡像でない、立体異性体を指す。ジアステレオマーは、異なる物理特性、例えば、融点、沸点、スペクトル特性、及び反応性を有する。ジアステレオマーの混合物は、電気泳動法及びクロマトグラフィー等の高分解能分析手順の下で分離されてもよい。

【0156】

「鏡像異性体」は、互いに重ね合せできない鏡像である、化合物の2つの立体異性体を指す。

【0157】

本明細書で使用される立体化学的な定義及び慣例は、一般に、S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York、及び Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York に従う。多くの有機化合物は、光学活性形態で存在し、すなわち、それらは、平面偏光の平面を回転させる能力を有する。光学活性化合物を説明する際、接頭辞 D 及び L、または R 及び S は、そのキラル中心 (複数可) の周りの分子の絶対配置を表すように使用される。接頭辞 d 及び l または (+) 及び (-) は、化合物による平面偏光の回転の徴候を表記するために用いられ、このうち (-) または l は、化合物が左旋性であることを意味する。(+) または d の接頭辞を有する化合物は、右旋性である。所与の化学構造について、これらの立体異性体は、それらが互いの鏡像であることを除いて同一である。特定の立体異性体はまた、鏡像異性体とも称され得、かかる異性体の混合物は、しばしば鏡像異性体混合物と呼ばれる。鏡像異性体の 50 : 50 混合物は、ラセミ混合物またはラセミ体と称され、それらは、化学反応またはプロセスにおいて立体選択または立体特異性が存在していない場合に生じ得る。「ラセミ混合物」及び「ラセミ体」という用語は、光学活性を欠く2つの鏡像異性体種の等モル混合物を指す。

【0158】

「脱離基」は、別の官能基によって置換され得る官能基を指す。ある特定の脱離基は、当該技術分野で周知であり、例としては、ハロゲン化物 (例えば、塩化物、臭化物、ヨウ化物)、メタンスルホニル (メシル)、p-トルエンスルホニル (トシル)、トリフルオロメチルスルホニル (トリフル酸塩)、及びトリフルオロメチルスルホン酸塩が含まれるが、これらに限定されない。

【0159】

「保護基」という用語は、特定の官能性を、化合物上の他の官能基を反応させながら、ブロックするまたは保護するために一般的に用いられる置換基を指す。例えば、「アミノ保護基」は、化合物中のアミノ官能性をブロックするまたは保護する、アミノ基に結合した置換基である。好適なアミノ保護基には、アセチル、トリフルオロアセチル、t-ブトキシカルボニル (BOC)、ベンジルオキシカルボニル (CBZ)、及び 9-フルオレニルメチレンオキシカルボニル (fluorenylmethylenoxycarbonyl) (Fmoc) が含まれるが、これらに限定されない。保護基の一般的な説

10

20

30

40

50

明及びそれらの使用については、T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991、またはより新しい版を参照されたい。

【0160】

II. 組成物及び方法

一態様において、本発明は、部分的に、HER2に結合する抗体及びかかる抗体を含む免疫複合体に基づく。本発明の抗体及び免疫複合体は、例えば、HER2陽性癌の診断または治療に有用である。

【0161】

A. 例示的な抗HER2抗体

本明細書において、HER2のドメインIに結合する単離抗体が提供される。いくつかの実施形態において、抗体は、HER2へのトラスツマブ及び/またはペルツマブ結合を干渉しない。いくつかの実施形態において、抗体は、HER2へのトラスツマブ結合を干渉せず、かつ/またはHER2へのペルツマブ結合を干渉しない。本明細書に記載される実施形態のいずれかにおいて、抗体は、モノクローナル抗体であってもよい。いくつかの実施形態において、抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体であってもよい。

【0162】

例示的な天然に存在するヒトHER2前駆体タンパク質配列は、シグナル配列(アミノ酸1~22)と共に、配列番号1に提供され、対応する成熟HER2タンパク質配列は、配列番号1のアミノ酸23~1255に対応する。いくつかの実施形態において、HER2のドメインIは、配列番号35のアミノ酸配列を有し、ドメインIIは、配列番号36のアミノ酸配列を有し、ドメインIIIは、配列番号37のアミノ酸配列を有し、ドメインIVは、配列番号38のアミノ酸配列を有する(図16を参照されたい)。

【0163】

抗体hu7C2及び他の実施形態

いくつかの実施形態において、本発明は、(a)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1、2、3、4、5、または6つのHVRを含む、抗HER2抗体を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む抗HER2抗体と、(a)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(c)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(d)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(e)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1、2、3、4、または5つのHVRを含む、抗HER2抗体と、を提供する。

【0164】

一態様において、本発明は、(a)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのHVR配列を含む抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。一実施形態において、本抗体は、配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。別の実施形態において、本抗体は、配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H3及び配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、(a)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号16のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0165】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、(a)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

10

【0166】

別の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号17から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または全ての3つのVH HVR配列を含むVHドメイン、ならびに(b)(i)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L2から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または全ての3つのVL HVR配列を含むVLドメイン、ならびに(c)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

20

【0167】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0168】

上の実施形態のいずれにおいても、抗HER2抗体は、ヒト化されている。一実施形態において、抗HER2抗体は、上の実施形態のいずれかにあるようなHVRを含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免役グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、ヒトVLカッパIVコンセンサス(VL_{KIV})フレームワーク及び/またはVHフレームワークVH₁である。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、本明細書に記載される突然変異のうちいずれか1つを含む、ヒトVLカッパIVコンセンサス(VL_{KIV})フレームワーク及び/またはVHフレームワークVH₁である。

30

【0169】

別の態様において、抗HER2抗体は、配列番号11のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。ある特定の実施形態において、配列番号11のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するVH配列は、参照配列と比較して、置換(例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗HER2抗体は、HER2に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、合計1~10個のアミノ酸が、配列番号11内で置換、挿入、及び/または欠失された。ある特定の実施形態において、合計1~5個のアミノ酸が、配列番号11内で置換、挿入、及び/または欠失された。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域で(すなわち、FRにおいて)生じる。任意に、抗HER2抗体は、配列番号11のVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、VHは、(a)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番

40

50

号 17 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される 1、2、または 3 つの H V R を含む。

【 0 1 7 0 】

別の態様において、抗 H E R 2 抗体が提供され、該抗体は、配列番号 10 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。ある特定の実施形態において、配列番号 10 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する V L 配列は、参照配列と比較して、置換 (例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗 H E R 2 抗体は、H E R 2 に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、合計 1 ~ 10 個のアミノ酸が、配列番号 10 内で置換、挿入、及び / または欠失された。ある特定の実施形態において、合計 1 ~ 5 個のアミノ酸が、配列番号 10 内で置換、挿入、及び / または欠失された。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、H V R の外側の領域で (すなわち、F R において) 生じる。任意に、抗 H E R 2 抗体は、配列番号 10 の V L 配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、V L は、(a) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (c) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される 1 つ、2 つ、または 3 つの H V R を含む。

10

【 0 1 7 1 】

別の態様において、抗 H E R 2 抗体が提供され、この抗体は、上述の実施形態のいずれかにあるような V H、及び上述の実施形態のいずれかにあるような V L を含む。

20

【 0 1 7 2 】

一実施形態において、本抗体は、配列番号 11 及び配列番号 10 それぞれの V H 及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【 0 1 7 3 】

さらなる態様において、本明細書において、本明細書に提供される抗 H E R 2 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。例えば、ある特定の実施形態において、配列番号 11 の V H 配列及び配列番号 10 の V L 配列をそれぞれ含む抗 H E R 2 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。

30

【 0 1 7 4 】

別の態様において、抗 H E R 2 抗体は、配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する重鎖配列を含む。ある特定の実施形態において、配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する重鎖配列は、参照配列と比較して、置換 (例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗 H E R 2 抗体は、H E R 2 に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、合計 1 ~ 10 個のアミノ酸が、配列番号 19 内で置換、挿入、及び / または欠失された。ある特定の実施形態において、合計 1 ~ 5 個のアミノ酸が、配列番号 19 内で置換、挿入、及び / または欠失された。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、H V R の外側の領域で (すなわち、F R において) 生じる。任意に、抗 H E R 2 抗体は、配列番号 19 の重鎖配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、重鎖は、(a) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (c) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される、1、2、または 3 つの H V R を含む。

40

【 0 1 7 5 】

別の態様において、抗 H E R 2 抗体はが提供され、この抗体は、配列番号 18 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する軽鎖配列を含む。ある特

50

定の実施形態において、配列番号18のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する軽鎖配列は、参照配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗HER2抗体は、HER2に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、合計1~10個のアミノ酸が、配列番号18内で置換、挿入、及び/または欠失された。ある特定の実施形態において、合計1~5個のアミノ酸が、配列番号18内で置換、挿入、及び/または欠失された。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域で（すなわち、FRにおいて）生じる。任意に、抗HER2抗体は、配列番号18の軽鎖配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、軽鎖は、（a）配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（b）配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（c）配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される1、2、または3つのHVRを含む。

10

【0176】

別の態様において、抗HER2抗体が提供され、この抗体は、上述の実施形態のいずれかにあるような重鎖、及び上述の実施形態のいずれかにあるような軽鎖を含む。

【0177】

一実施形態において、本抗体は、配列番号19及び配列番号18それぞれの重鎖及び軽鎖配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【0178】

さらなる態様において、本明細書において、本明細書に提供される抗HER2抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。例えば、ある特定の実施形態において、配列番号19の重鎖配列及び配列番号18の軽鎖配列をそれぞれ含む抗HER2抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。

20

【0179】

本明細書において、図1に示されるKabatt付番に従うHVR1-LC、HVR2-LC、及びHVR3-LC配列を含む軽鎖可変ドメインと、図2に示されるKabatt付番に従うHVR1-HC、HVR2-HC、及びHVR3-HC配列を含む重鎖可変ドメインと、を含む抗体が提供される。いくつかの実施形態において、本抗体は、図1に示されるHVR1-LC、HVR2-LC、及び/またはHVR3-LC配列、ならびにFR1-LC、FR2-LC、FR3-LC、及び/またはFR4-LC配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、図2に示されるHVR1-HC、HVR2-HC、及び/またはHVR3-HC配列、ならびにFR1-HC、FR2-HC、FR3-HC、及び/またはFR4-HC配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

30

【0180】

本発明のさらなる態様において、上記実施形態のいずれかによる抗HER2抗体は、ヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一実施形態において、抗HER2抗体は、抗体断片、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、またはF(ab')₂断片である。別の実施形態において、本抗体は、実質的に完全長の抗体、例えば、本明細書に定義されるIgG1抗体、IgG2a抗体、または他の抗体クラス若しくはアイソタイプである。

40

【0181】

さらなる態様において、上記実施形態のいずれかによる抗HER2抗体は、以下に記載される特長のうちのいずれかを、単独でまたは組み合わせて組み込むことができる。

【0182】**1. 抗体親和性**

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、1µM以下、100nM以下、50nM以下、10nM以下、5nm以下、1nM以下、0.1nM以下、0.01nM以下、または0.001nM以下の解離定数(K_d)を有し、任意選択で10⁻¹³M以下である（例えば10⁻⁸M以下、例えば10⁻⁸M~10⁻¹³M、例えば10⁻

50

$10^{-9} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$)。

【0183】

一実施形態において、 K_d は、目的の抗体のFabバージョン及びその抗原と共に行われる、放射標識抗原結合アッセイ(RIA)によって、次のアッセイで説明されるように測定される。抗原に対するFabの溶液結合親和性は、Fabを、未標識抗原の一連の滴定の存在下で、最小濃度の(10^{-25} I)標識抗原と平衡化し、次いで抗Fab抗体コーティングプレートと結合した抗原を捕捉することによって、測定される(例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999)を参照されたい)。アッセイのための条件を確立するために、MICROTITER(登録商標)マルチウェルプレート(Thermo Scientific)を、 $5 \mu\text{g/mL}$ の捕捉抗Fab抗体(Cappel Labs)含有50mMの炭酸ナトリウム(pH 9.6)で一晩コーティングし、その後、2%(w/v)ウシ血清アルブミン含有PBSにより、室温(およそ23°C)で2~5時間ブロックする。非吸着性のプレート(Nunc 番号269620)中で、 100 pM または 26 pM [10^{-25} I]-抗原を、目的のFabの段階希釈液と混合する(例えば、Presta et al., Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)におけ抗VEGF抗体Fab-12の評価と一貫する)。目的のFabを次いで一晩インキュベートするが、確実に平衡に到達するように、インキュベーションはより長い期間(例えば、約65時間)継続してもよい。その後、混合物を、室温での(例えば、1時間にわたる)インキュベーションのために、捕捉プレートに移す。次いで溶液を除去し、プレートを、0.1%ポリソルベート20(TWEEN-20(登録商標))含有PBSで8回洗浄する。プレートが乾燥したとき、 $150 \mu\text{L}$ /ウェルのシンチラント(scintillant)(MICROSCINT-20(商標)、Packard)を添加し、プレートをTOPCOUNT(商標)計数器(Packard)により10分間計数する。最大結合の20%以下をもたらす各Fabの濃度を、競合結合アッセイにおいて使用するために選定する。

【0184】

別の実施形態によれば、 K_d は、BIACORE(登録商標)-2000またはBIACORE(登録商標)-3000(BIACORE, Inc., Piscataway, NJ)を使用した表面プラズモン共鳴アッセイを使用して、25°Cで、約10応答単位(RU)で固定化された抗原CM5チップを用いて測定される。簡潔に述べると、供給業者の指示に従って、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ(CM5、BIACORE, Inc.)を、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)により活性化する。抗原を10mMの酢酸ナトリウム(pH 4.8)で $5 \mu\text{g/mL}$ (約 $0.2 \mu\text{M}$)まで希釈した後、 $5 \mu\text{L}$ /分の流速で注入して、カップリングされたタンパク質のおよそ10応答単位(RU)を達成する。抗原の注入後、1Mのエタノールアミンを注入して、未反応の基をブロックする。動態測定のために、Fabの2倍段階希釈液($0.78 \text{ nM} \sim 500 \text{ nM}$)を、0.05%ポリソルベート20(TWEEN-20(商標))界面活性剤を含むPBS(PBST)中に、25°Cで、およそ $25 \mu\text{L}$ /分の流速で注入する。会合速度(k_{on})及び解離速度(k_{off})を、単純な1対1Langmuir結合モデル(BIACORE(登録商標)Evaluation Software第3.2版)を使用して、会合センサグラム及び解離センサグラムを同時に適合することによって、算出する。平衡解離定数(K_d)は、比率 k_{off}/k_{on} として算出する。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999)を参照されたい。オン速度が、上記表面プラズモン共鳴アッセイによって、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ を超える場合、オン速度は、攪拌キュベットを備えるストップフロー装着分光光度計(Aviv Instruments)または8000-シリーズSLM-AM INCO(商標)分光光度計(Thermo Spectronic)等の分光計において測定される、漸増濃度の抗原の存在下で、25°Cで、PBS(pH 7.2)中20nM抗-抗原抗体(Fab型)の蛍光発光強度(励起=295nm、発光=340nm、16n

m帯域通過)の増加または減少を測定する、蛍光消光技法を使用することによって、決定することができる。

【0185】

2. 抗体断片

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片には、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、及びscFv断片、ならびに以下に記載される他の断片が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の抗体断片の概説については、Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003)を参照されたい。scFv断片の概説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)を参照されたい、また、WO93/16185号、ならびに米国特許第5,571,894号及び同第5,587,458号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、in vivo半減期が増加した、Fab及びF(ab')₂断片の考察については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。

10

【0186】

ダイアボディは、二価性または二重特異性であり得る、2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第404,097号、WO1993/01161号、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)、及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)を参照されたい。トリアボディ(Triabodies)及びテトラボディ(tetrabodies)もまた、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)に記載される。

20

【0187】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て若しくは一部分、または軽鎖可変ドメインの全て若しくは一部分を含む、抗体断片である。ある特定の実施形態において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA、例えば、米国特許第6,248,516B1号を参照されたい)。

30

【0188】

抗体断片は、本明細書に記載される、インタクトな抗体のタンパク質分解消化、及び組み換え宿主細胞(例えば、大腸菌またはファージ)による産生を含むが、これらに限定されない、種々の技法によって作製することができる。

【0189】

3. キメラ及びヒト化抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、キメラ抗体である。ある特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号、及びMorrisson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)に記載される。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサル等の非ヒト霊長類に由来する可変領域)、及びヒト定常領域を含む。さらなる実施例において、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のものから変更された、「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体には、それらの抗原結合断片が含まれる。

40

【0190】

ある特定の実施形態において、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的に、非ヒト抗体は、親の非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低減するためにヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR(またはそれらの部分)が非ヒト抗体に由来し、かつFR(またはそれらの部分)がヒト抗体配列に由来する、1つ以上の可変ドメインを含む。また、ヒト化抗体は任意に、ヒト定常領域の少なくとも一部分も含む。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体におけるいくつかのF

50

R 残基は、例えば、抗体特異性または親和性を復元するまたは改善するために、非ヒト抗体（例えば、HVR 残基が由来する抗体）由来の対応する残基で置換される。

【0191】

ヒト化抗体及びそれらを作製する方法は、例えば、Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) に概説され、また例えば、Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988)、Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989)、米国特許第5,821,337号、同第7,527,791号、同第6,982,321号、及び同第7,087,409号、Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (SDR (a-CDR) 移植について説明する)、Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (「リサーフェシング (resurfacing)」について説明する)、Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (「FRシャフリング」について説明する)、ならびに Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005)、及び Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (FRシャフリングへの「誘導選択 (guided selection)」アプローチについて説明する) についてさらに概説される。

10

【0192】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、「最良適合 (best-fit)」法を使用して選択されるフレームワーク領域（例えば、Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296 (1993) を参照されたい）、軽鎖または重鎖可変領域の特定の下位集団のヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)、及び Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993) を参照されたい）、ヒト成熟（体細胞突然変異した）フレームワーク領域またはヒト生殖細胞株フレームワーク領域（例えば、Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) を参照されたい）、ならびにFRライブラリのスクリーニングに由来するフレームワーク領域（例えば、Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 及び Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996) を参照されたい）が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0193】

4. ヒト抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野において既知の種々の技法を使用して生成され得る。ヒト抗体は、一般に、van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001) 及び Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008) に記載される。

40

【0194】

ヒト抗体は、免疫原を、抗原投与に応答してインタクトなヒト抗体またはヒト可変領域を含むインタクトな抗体を産生するように修飾されたトランスジェニック動物に投与することによって、調製されてもよい。かかる動物は典型的に、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置き換えるか、または染色体外に存在するか、または動物の染色体中に無作為に組み込まれる、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部分を含有する。かかるトランスジェニックマウスにおいて、内因性免疫グロブリン遺伝子座は一般に、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005) を参照されたい。また、米国特許第6,075,181号及び同第6,150,584号 (XENOM

50

OUSE (商標) 技術について説明する)、米国特許第5,770,429号(HuMab (登録商標) 技術について説明する)、米国特許第7,041,870号(K-M MOUSE (登録商標) 技術について説明する)、ならびに米国特許出願公開第2007/0061900号(VelociMouse (登録商標) 技術について説明する)を参照されたい。かかる動物によって生成されるインタクティブな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによって、さらに修飾されてもよい。

【0195】

ヒト抗体はまた、ハイブリドーマベースの方法によって作製することもできる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫細胞株及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株が記載されている。(例えば、Kozbor J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)、及びBoerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991)を参照されたい)。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術によって生成されるヒト抗体もまた、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)に記載される。Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)に記載される。追加の方法には、例えば、米国特許第7,189,826号(ハイブリドーマ細胞株由来のモノクローナルヒトIgM抗体の産生について説明する)、及びNi, Xiandai Mianyixue, 26 (4):265-268 (2006) (ヒト-ヒトハイブリドーマについて説明する)に記載されるものが含まれる。ヒトハイブリドーマ技術(トリオマ(Trioma)技術)はまた、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937-2005及びVollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185:91-2005にも記載される。

【0196】

ヒト抗体はまた、ヒト由来ファージディスプレイライブラリから選択されるFvクローン可変ドメイン配列を単離することによって生成されてもよい。かかる可変ドメイン配列は、所望のヒト定常ドメインと組み合わされてもよい。抗体ライブラリからヒト抗体を選択するための技法が、以下に記載される。

【0197】

5. ライブラリ由来抗体

本発明の抗体は、コンビナトリアルライブラリを、所望の活性(単数または複数)を有する抗体についてスクリーニングすることによって、単離されてもよい。例えば、ファージディスプレイライブラリを生成し、かかるライブラリを、所望の結合特性を保有する抗体についてスクリーニングするための、多様な方法が当該技術分野で知られている。かかる方法は、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)に概説され、またさらに、例えば、McCafferty et al., Nature 348:552-554、Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)、Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992)、Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)、Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004)、Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004)、Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):124

67-12472(2004)、及びLee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132(2004)に記載される。

【0198】

ある特定のファージディスプレイ法において、VH及びVL遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって別個にクローニングされ、ファージライブラリ中で無作為に組み換えられ、それを次いで、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12:433-455(1994)に記載されるように、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは典型的に、単鎖Fv(scFv)断片としてまたはFab断片としてのいずれかで、抗体断片を提示する。免疫された源のライブラリは、ハイブリドーマを構築する必要なしに、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。代替的に、Griffiths et al., EMBO J, 12:725-734(1993)によって記載されるように、ナイーブレパートリーをクローニングして(例えば、ヒトから)、いかなる免疫化も伴わずに、広範な非自己抗原または自己抗原に対する抗体の単一の源を提供することができる。最後に、ナイーブライブラリはまた、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388(1992)に記載されるように、幹細胞からの再配列されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、無作為配列を含有するPCRプライマーを使用して高度可変CDR3領域をコードし、かつin vitroで再配列を達成することによって、合成的に作製することができる。ヒト抗体ファージライブラリについて説明する特許公開には、例えば、米国特許第5,750,373号、ならびに米国特許第2005/0079574号、同第2005/0119455号、同第2005/0266000号、同第2007/0117126号、同第2007/0160598号、同第2007/0237764号、同第2007/0292936号、及び同第2009/0002360号が含まれる。

10

20

【0199】

ヒト抗体ライブラリから単離された抗体または抗体断片は、本明細書でヒト抗体またはヒト抗体断片と見なされる。

【0200】

6. 多重特異性抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有する、モノクローナル抗体である。ある特定の実施形態において、結合特異性のうちの一方は、HER2に対するものであり、他方は、任意の他の抗原に対するものである。ある特定の実施形態において、結合特異性のうちの一方は、HER2に対するものであり、他方は、CD3に対するものである。例えば、米国特許第5,821,337号を参照されたい。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、HER2の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体をまた使用して、細胞傷害性薬剤を、HER2を発現する細胞に局限させてもよい。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製することができる。

30

【0201】

多重特異性抗体を作製するための技法には、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組み換え共発現(Milstein and Cuello, Nature 305:537(1983))、WO93/08829、及びTraunecker et al., EMBO J, 10:3655(1991)を参照されたい)、及び「ノブ・イン・ホール(knob-in-hole)」操作(例えば、米国特許第5,731,168号を参照されたい)が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で使用される「ノブ・イン・ホール」または「KnH」技術という用語は、突起(ノブ)を1つのポリペプチドに、かつ空洞(ホール)を他のポリペプチドに、それらが相互作用する界面で導入することによって、2つのポリペプチドをin vitroまたはin vivoで一緒に対合することを導く技術を指す。例えば、KnHは、抗体のFc:Fc結合

40

50

界面、CL:CH1界面、またはVH/VL界面に導入されている(例えば、US2011/0287009、US2007/0178552、WO96/027011、WO98/050431、Zhu et al., 1997, Protein Science 6:781-788、及びWO2012/106587を参照されたい)。いくつかの実施形態において、KnHは、多重特異性抗体の製造中に2つの異なる重鎖を一緒に対合させる。例えば、Fc領域内にKnHを有する多重特異性抗体は、各Fc領域に結合された単一可変ドメインをさらに含み得るか、または同様の若しくは異なる軽鎖可変ドメインと対合する異なる重鎖可変ドメインをさらに含み得る。KnH技術を使用して、2つの異なる受容体細胞外ドメインを一緒に、または異なる標的認識配列を含む(例えば、アフィボディ(affibody)、ペプチボディ(peptibody)、及び他のFc融合を含む)、任意の他のポリペプチド配列を対合することもできる。

10

【0202】

本明細書で使用される「ノブ突然変異」という用語は、ポリペプチドが別のポリペプチドと相互作用する界面において、突起(ノブ)をポリペプチドに導入する突然変異を指す。いくつかの実施形態において、他のポリペプチドには、ホール突然変異を有する。

【0203】

本明細書で使用される「ホール突然変異」という用語は、ポリペプチドが別のポリペプチドと相互作用する界面において、空洞(ホール)をポリペプチドに導入する突然変異を指す。いくつかの実施形態において、他のポリペプチドは、ノブ突然変異を有する。

【0204】

簡単な非限定的論考が以下に提供される。

20

【0205】

「突起」は、第1のポリペプチドの界面からから突出し、したがってヘテロ多量体を安定化させるように、隣接した界面(すなわち、第2のポリペプチドの界面)における代償性空洞内に位置付け可能であり、それにより例えば、ホモ多量体形成よりもヘテロ多量体形成が有利になる、少なくとも1つのアミノ酸側鎖を指す。突起は、元の界面に存在し得るか、または合成的に(例えば、界面をコードする核酸を変更することによって)導入され得る。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチドの界面をコードする核酸は、突起をコードするように変更される。これを達成するために、第1のポリペプチドの界面内の少なくとも1つの「元の」アミノ酸残基をコードする核酸は、元のアミノ酸残基よりも大きい側鎖体積を有する少なくとも1つの「インポート」アミノ酸残基をコードする核酸で置換される。複数の元の残基及び対応するインポート残基が存在し得ることが理解されるであろう。様々なアミノ残基の側鎖体積は、例えば、US2011/0287009の表1に示される。「突起」を導入する突然変異は、「ノブ突然変異」と称され得る。

30

【0206】

いくつかの実施形態において、突起の形成のためのインポート残基は、アルギニン(R)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、及びトリプトファン(W)から選択される、天然に存在するアミノ酸残基である。いくつかの実施形態において、インポート残基は、トリプトファンまたはチロシンである。いくつかの実施形態において、突起の形成のための元の残基は、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、セリン、トレオニン、またはバリン等の小さい側鎖体積を有する。

40

【0207】

「空洞」は、第2のポリペプチドの界面から陥没する少なくとも1つのアミノ酸側鎖を指し、したがって、第1のポリペプチドの隣接界面上の対応する突起を収容する。空洞は、元の界面に存在し得るか、または合成的に(例えば、界面をコードする核酸を変更することによって)導入され得る。いくつかの実施形態において、第2のポリペプチドの界面をコードする核酸は、空洞をコードするように変更される。これを達成するために、第2のポリペプチドの界面内の少なくとも1つの「元の」アミノ酸残基をコードする核酸は、元のアミノ酸残基よりも小さい側鎖体積を有する少なくとも1つの「インポート」アミノ酸残基をコードするDNAで置換される。複数の元の残基及び対応するインポート残基が

50

存在し得ることが理解されるであろう。いくつかの実施形態において、空洞の形成のためのインポート残基は、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、及びバリン（V）から選択される、天然に存在するアミノ酸残基である。いくつかの実施形態において、インポート残基は、セリン、アラニン、またはトレオニンである。いくつかの実施形態において、空洞の形成のための元の残基は、チロシン、アルギニン、フェニルアラニン、またはトリプトファン等の大きい側鎖体積を有する。「空洞」を導入する突然変異は、「ホール突然変異」と称され得る。

【0208】

突起が空洞内で「位置付け可能」であることは、第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドそれぞれの界面上の突起及び空洞の空間位置、ならびに突起及び空洞のサイズが、界面における第1及び第2のポリペプチドの正常な会合を著しく妨害することなく突起が空洞内に位置し得るようなものであることを意味する。Tyr、Phe、及びTrp等の突起は、典型的に界面の軸から垂直に延出せず、好ましい構造を有さず、対応する空洞を有する突起のアラインメントは、場合によっては、X線結晶学または核磁気共鳴（NMR）によって得られるもの等の3次元構造に基づいて、突起/空洞の対をモデル化することに依存する。これは、当該技術分野において広く許容される技法を使用して達成され得る。

10

【0209】

いくつかの実施形態において、IgG1定常領域内のノブ突然変異は、T366W（EU付番）である。いくつかの実施形態において、IgG1定常領域内のホール突然変異は、T366S、L368A、及びY407V（EU付番）から選択される1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、IgG1定常領域内のホール突然変異は、T366S、L368A、及びY407V（EU付番）を含む。

20

【0210】

いくつかの実施形態において、IgG4定常領域内のノブ突然変異は、T366W（EU付番）である。いくつかの実施形態において、IgG4定常領域内のホール突然変異は、T366S、L368A、及びY407V（EU付番）から選択される1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、IgG4定常領域内のホール突然変異は、T366S、L368A、及びY407V（EU付番）を含む。

30

【0211】

多重特異性抗体はまた、静電的ステアリング（electrostatic steering）効果を操作して抗体Fc-ヘテロ二量体分子を作製すること（WO2009/089004A1）、2つ以上の抗体または断片を架橋すること（例えば、米国特許第4,676,980号、及びBrennan et al., Science, 229:81（1985）を参照されたい）、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体を産生すること（例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148（5）:1547-1553（1992）を参照されたい）、「ダイアボディ」技術を使用して二重特異性抗体断片を作製すること（例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448（1993）を参照されたい）、及び単鎖Fv（sFv）二量体を使用すること（例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368（1994）を参照されたい）、ならびに例えば、Tutt et al., J. Immunol., 147:60（1991）に記載される三重特異性抗体を調製することによって、作製されてもよい。

40

【0212】

「オクトパス（Octopus）抗体」を含む、3つ以上の機能的抗原結合部位を有する操作された抗体もまた、本明細書に含まれる（例えば、US2006/0025576A1を参照されたい）。

【0213】

本明細書における抗体または断片にはまた、HER2及び別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む、「二重作用（Dual Acting）FAb」または「DAF」が

50

含まれる（例えば、US 2008/0069820を参照されたい）。

【0214】

7. 抗体変異形

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体のアミノ酸配列変異形が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び/または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異形は、適切な修飾を、抗体をコードするヌクレオチド配列中に導入することによって、またはペプチド合成によって、調製されてもよい。かかる修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列からの残基の欠失、及び/またはそこへの残基の挿入、及び/または抗体のアミノ酸配列内での残基の置換が含まれる。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせを作製して、最終構築物に到達することができるが、但し、その最終構築物が、所望の特性、例えば、抗原結合性を保有することを条件とする。

10

【0215】

a) 置換、挿入、及び欠失変異形

ある特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異形が提供される。置換型突然変異生成に対する目的の部位には、HVR及びFRが含まれる。保存的置換は、表1において、「好ましい置換」の見出しの下に示される。より実質的な変化は、表1において、「例示的な置換」の見出しの下に提供され、またアミノ酸側鎖クラスを参照して以下でさらに説明される。アミノ酸置換が目的の抗体中に導入され、生成物が、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の低下、またはADCC若しくはCDCの改善についてスクリーニングされてもよい。

20

表1

| 元の 残基 | 例示的な 置換 | 好ましい 置換 |
|-----------|--|------------|
| A l a (A) | V a l、L e u、I l e | V a l |
| A r g (R) | L y s、G l n、A s n | L y s |
| A s n (N) | G l n、H i s、A s p、L y s、A r g | G l n |
| A s p (D) | G l u、A s n | G l u |
| C y s (C) | S e r、A l a | S e r |
| G l n (Q) | A s n、G l u | A s n |
| G l u (E) | A s p、G l n | A s p |
| G l y (G) | A l a | A l a |
| H i s (H) | A s n、G l n、L y s、A r g | A r g |
| I l e (I) | L e u、V a l、M e t、A l a、P h e、ノルロイシン | L e u |
| L e u (L) | ノルロイシン、I l e、V a l、 M e t、A l a、P h e | I l e |
| L y s (K) | A r g、G l n、A s n | A r g |
| M e t (M) | L e u、P h e、I l e | L e u |
| P h e (F) | T r p、L e u、V a l、I l e、A l a、T y r | T y r |
| P r o (P) | A l a | A l a |
| S e r (S) | T h r | T h r |
| T h r (T) | V a l、S e r | S e r |
| T r p (W) | T y r、P h e | T y r |
| T y r (Y) | T r p、P h e、T h r、S e r | P h e |
| V a l (V) | I l e、L e u、M e t、P h e、A l a、ノルロイシン | L e u |

10

20

30

40

アミノ酸は、次の一般的な側鎖特性に従って分類されてもよい。

- (1) 疎水性：ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e、
- (2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n、
- (3) 酸性：A s p、G l u、
- (4) 塩基性：H i s、L y s、A r g、
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：G l y、P r o、
- (6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

50

【0216】

非保存的置換には、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴うことになる。

【0217】

置換型変異形の1つの種類は、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の1個以上の超可変領域残基を置換することを伴う。一般に、さらなる研究のために選択される、結果として生じる変異形（複数可）は、親抗体と比較して、ある特定の生物学的特性の修飾（例えば、改善）（例えば、改善された親和性の改善、低下した免疫原性）を有することになり、かつ/または親抗体のある特定の生物学的特性を実質的に保持することになる。例示的な置換型変異形は、例えば、本明細書に記載されるもの等のファージディスプレイベースの親和性成熟技法を使用して、好都合に生成され得る、親和性成熟抗体である。簡潔に述べると、1個以上のHVR残基が突然変異させられ、変異形抗体がファージ上で提示されて、特定の生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

10

【0218】

変化（例えば、置換）をHVRにおいて行って、例えば、抗体親和性を改善してもよい。かかる変化は、HVR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で突然変異を経るコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207: 179-196 (2008)を参照されたい）、及び/またはSDR(a-CDR)において行われてもよく、結果として生じる変異形VHまたはVLが、結合親和性について試験される。二次ライブラリを構築し、かつそこから再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))に記載されている。親和性成熟のいくつかの実施形態において、多様性が、多様な方法（例えば、エラープロードPCR、鎖シャフリング、またはオリゴヌクレオチド指定突然変異生成）のうちのいずれかによって、成熟のために選定された可変遺伝子中に導入される。次いで、二次ライブラリが作成される。次いで、ライブラリは、所望の親和性を有する任意の抗体変異形を特定するために、スクリーニングされる。多様性を導入するための別の方法は、数個のHVR残基（例えば、1回に4~6個の残基）が無作為化される、HVR指向性アプローチを伴う。抗原結合に関与するHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング突然変異生成またはモデリングを使用して、具体的に特定されてもよい。特にCDR-H3及びCDR-L3が、標的とされることが多い。

20

30

【0219】

ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、かかる変化が、抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限り、1つ以上のHVR内で生じてもよい。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的変化（例えば、本明細書に提供される保存的置換）が、HVRにおいて行われてもよい。かかる変化は、HVR「ホットスポット」またはSDRの外側のものであってもよい。以上に提供される変異形VH及びVL配列のある特定の実施形態において、各HVRは、不変であるか、または1つ以下、2つ以下、若しくは3つ以下のアミノ酸置換を含有するかのいずれかである。

40

【0220】

突然変異生成のための標的とされ得る、抗体の残基または領域の特定のための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081-1085によって説明される「アラニンスキャニング変異生成」と呼ばれるものである。この方法において、標的残基（例えば、arg、asp、his、lys、及びglu等の荷電残基）のうちのある残基または基が特定され、中性または負荷電アミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）によって置き換えられて、抗体と抗原との相互作用が影響を受けるかどうかを決定する。さらなる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸の場所に導入されてもよい。代替的に、または追加的に、抗原-抗体複合体の結晶構造を使用して、抗体と抗原との間の接触点が特定される。かかる接触

50

残基及び隣接する残基は、置換の候補として標的とされるか、または排除されてもよい。変異形をスクリーニングして、それらが所望の特性を含有するかどうかを決定してもよい。

【0221】

アミノ酸配列挿入には、1個の残基～100個以上の残基を含有するポリペプチドの範囲の長さである、アミノ末端及び/またはカルボキシル末端融合、ならびに単一のまたは多数のアミノ酸残基の配列内 (i n t r a s e q u e n c e) 挿入が含まれる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入型変異形には、抗体の血清半減期を増加させる酵素 (例えば、A D E P Tのための) またはポリペプチドに対する抗体のN末端若しくはC末端への融合が含まれる。

10

【0222】

b) グリコシル化変異形

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体を、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少させるように変化させる。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つ以上のグリコシル化部位が作成されるか、または除去されるように、アミノ酸配列を変化させることによって、好都合に行われてもよい。

【0223】

抗体がFc領域を含む場合、そこに結合した炭水化物が変化し得る。哺乳類細胞によって産生される天然抗体は、典型的に、一般にN-結合によって、Fc領域のCH2ドメインのAsn297に結合される、分岐した二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wright et al. TIBTECH 15: 26-32 (1997) を参照されたい。オリゴ糖類には、種々の炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、及びシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖類構造の「ステム」においてGlcNAcに結合したフコースが含まれ得る。いくつかの実施形態において、本発明の抗体におけるオリゴ糖の修飾は、ある特定の特性が改善された抗体変異形を作成するために行われてもよい。

20

【0224】

一実施形態において、Fc領域に (直接的にまたは間接的に) 結合されるフコースを欠いた炭水化物構造を有する、抗体変異形が提供される。例えば、かかる抗体におけるフコースの量は、1%～80%、1%～65%、5%～65%、または20%～40%であってもよい。フコースの量は、例えば、WO2008/077546に記載されるように、MALDI-TOF質量分析法によって測定される、Asn297に結合した全ての糖鎖構造 (例えば、複合体、ハイブリッド、及び高マンノース構造) の合計と比較した、Asn297における糖鎖内のフコースの平均量を算出することによって決定される。Asn297は、Fc領域における約297位 (Fc領域残基のEu付番) に位置するアスパラギン残基を指すが、Asn297はまた、抗体での配列変異が小規模であることに起因して、297位から約±3アミノ酸上流または下流、すなわち、294位～300位の間にも位置する場合がある。かかるフコシル化変異形では、ADC機能改善され得る。例えば、米国特許公開第2003/0157108 (Presta, L.)、同第2004/0093621号 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) を参照されたい。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体変異形に関連する刊行物の例としては、US2003/0157108、WO2000/61739、WO2001/29246、US2003/0115614、US2002/0164328、US2004/0093621、US2004/0132140、US2004/0110704、US2004/0110282、US2004/0109865、WO2003/085119、WO2003/084570、WO2005/035586、WO2005/035778、WO2005/053742、WO2002/031140号、Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004)、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. 87: 614 (2004) が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生することが可能な細胞株の例としては、タンパク

30

40

50

質フコシル化が欠損した Lec13 CHO細胞 (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986)、米国特許出願第2003/0157108A1号 (Presta, L)、及びWO2004/056312A1 (Adamsら) (特に実施例11))、及び -1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞等のノックアウト細胞株 (例えば、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)、Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4): 680-688 (2006)、及びWO2003/085107を参照されたい)が挙げられる。

【0225】

例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖類がGlcNAcによって二分される、二分されたオリゴ糖類を有する抗体変異形がさらに提供される。かかる抗体変異形では、フコシル化が低減され、かつ/またはADCC機能が改善され得る。かかる抗体変異形の例は、例えば、WO2003/011878 (Jean-Mairetら)、米国特許第6,602,684号 (Umanaら)、及びUS2005/0123546 (Umanaら)に記載される。Fc領域に結合したオリゴ糖類において少なくとも1個のガラクトース残基を有する、抗体変異形もまた提供される。かかる抗体変異形では、CDC機能が改善され得る。かかる抗体変異形は、例えば、WO1997/30087 (Patelら)、WO1998/58964 (Raju, S.)、及びWO1999/22764 (Raju, S.)に記載される。

【0226】

c) Fc領域変異形

ある特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸修飾が、本明細書に提供される抗体のFc領域に導入され、それによってFc領域変異形を生成してもよい。Fc領域変異形は、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾 (例えば、置換)を含む、ヒトFc領域配列 (例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fc領域)を含んでもよい。

【0227】

ある特定の実施形態において、本発明は、いくつかのエフェクター機能を保有するが、全てのエフェクター機能は保有するわけではなく、それにより、in vivoの抗体の半減期が重要であるが、なおもある特定のエフェクター機能 (補体及びADCC等)が不必要であるかまたは有害である場合の適用に対する望ましい候補となる、抗体変異形を企図する。in vitro及び/またはin vivoの細胞傷害性アッセイを実行して、CDC及び/またはADCC活性の低減/枯渇を確認することができる。例えば、抗体が確実に、FcR結合を欠く (よって、ADCC活性を欠いている可能性が高い)がFcRn結合能力を保持するように、Fc受容体 (FcR)結合アッセイを実行することができる。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞は、Fc (RIIIのみを発現するが、一方で単球は、Fc (RI、Fc (RII及びFc (RIIIを発現する。造血細胞上でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991)の464ページ、表3に要約される。目的の分子のADCC活性を評価するためのin vitroアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号 (例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 7059-7063 (1986)を参照されたい)及びHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 1499-1502 (1985)、同第5,821,337号 (Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166: 1351-1361 (1987)を参照されたい)に記載される。代替的に、非放射性アッセイ法が用いられてもよい (例えば、フローサイトメトリーのためのACTI (商標)非放射性細胞傷害性アッセイ (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA、及びCytotox 96 (登録商標)非放射性細胞傷害性アッ

10

20

30

40

50

セイ (Promega, Madison, WI) を参照されたい。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞 (PBMC) 及びナチュラルキラー (NK) 細胞が含まれる。代替的に、または追加的に、目的の分子のADCC活性は、*in vivo* で、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652 - 656 (1998) に開示されるもの等の動物モデルにおいて、評価されてもよい。また、C1q結合アッセイをまた行って、抗体がC1qに結合不可能であり、したがってCDC活性を欠いていることを確認してもよい。例えば、WO2006/02987及びWO2005/100402におけるC1q及びC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行ってもよい(例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)、Cragg, M.S. et al., Blood 101: 1045 - 1052 (2003)、及びCragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103: 2738 - 2743 (2004)を参照されたい)。FcRn結合及び*in vivo* クリアランス/半減期決定もまた、当該技術分野で既知の方法を使用して行うことができる(例えば、Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12): 1759 - 1769 (2006)を参照されたい)。

10

【0228】

いくつかの実施形態において、新生児Fc受容体へのIgG結合を増加させるために、1つ以上のアミノ酸修飾が、本明細書に提供される抗体のFc部分に導入されてもよい。ある特定の実施形態において、本抗体は、EU付番に従う以下の3つの突然変異、すなわちM252Y、S254T、及びT256E(「YTE突然変異」を含む(米国特許第8,697,650号、Dall'Acqua et al., Journal of Biological Chemistry 281(33): 23514 - 23524 (2006)も参照されたい)。ある特定の実施形態において、YTE突然変異は、抗体がその同族抗原に結合する能力に影響を及ぼさない。ある特定の実施形態において、YTE突然変異は、抗体の血清半減期を、天然(すなわち、非YTE突然変異体)抗体と比較して増加させる。いくつかの実施形態において、YTE突然変異は、抗体の血清半減期を、天然(すなわち、非YTE突然変異体)抗体と比較して3倍増加させる。いくつかの実施形態において、YTE突然変異は、抗体の血清半減期を、天然(すなわち、非YTE突然変異体)抗体と比較して2倍増加させる。いくつかの実施形態において、YTE突然変異は、抗体の血清半減期を、天然(すなわち、非YTE突然変異体)抗体と比較して少なくとも5倍増加させる。いくつかの実施形態において、YTE突然変異は、抗体の血清半減期を、天然(すなわち、非YTE突然変異体)抗体と比較して少なくとも10倍増加させる。例えば、米国特許第8,697,650号を参照されたい。またDall'Acqua et al., Journal of Biological Chemistry 281(33): 23514 - 23524 (2006)も参照されたい。

20

30

【0229】

ある特定の実施形態において、YTE突然変異体は、抗体の抗体依存的細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)活性を調節する手段を提供する。ある特定の実施形態において、YTE突然変異体は、ヒト抗原を対象とするヒト化IgG抗体のADCC活性を調節する手段を提供する。例えば、米国特許第8,697,650号を参照されたい。またDall'Acqua et al., Journal of Biological Chemistry 281(33): 23514 - 23524 (2006)も参照されたい。

40

【0230】

ある特定の実施形態において、YTE突然変異体は、血清半減期、組織分布、及び抗体活性(例えば、IgG抗体のADCC活性)の同時調節を可能にする。例えば、米国特許第8,697,650号を参照されたい。またDall'Acqua et al., J

50

ournal of Biological Chemistry 281(33):23514-23524(2006)も参照されたい。

【0231】

エフェクター機能が低下した抗体には、Fc領域残基238、265、269、270、297、327、及び329のうちの1つ以上の置換を有するものが含まれる(米国特許第6,737,056号)。かかるFc突然変異体には、アラニンへの残基265及び297の置換を有するいわゆる「DANA」Fc突然変異体を含む(米国特許第7,332,581号)、アミノ酸265、269、270、297、及び327位のうちの2つ以上において置換を有するFc突然変異体が含まれる。

【0232】

ある特定の実施形態において、野生型ヒトFc領域の329位(EU付番)(P329)におけるプロリンは、グリシン若しくはアルギニン、またはFcのP329とFcγRIIIのトリプトファン残基W87及びW110との間に形成されるFc/Fc受容体界面内でプロリンサンドイッチを破壊するのに十分に大きいアミノ酸残基で置換される(Sondermann et al.: Nature 406, 267-273(20 July 2000))。さらなる実施形態において、Fc変異形内の少なくとも1つのさらなるアミノ酸置換は、S228P、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D、またはP331Sであり、さらに別の実施形態において、該少なくとも1つのさらなるアミノ酸置換は、ヒトIgG1 Fc領域のL234A及びL235A、またはヒトIgG4 Fc領域のS228P及びL235Eである。これらは全て、EU付番に従うものである(米国特許第8,969,526号、参照によりその全体が組み込まれる)。

【0233】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、野生型ヒトIgG Fc領域のFc変異形を含み、このポリペプチドは、グリシンで置換されたヒトIgG Fc領域のP329を有し、Fc変異形は、ヒトIgG1 Fc領域のL234A及びL235A、またはヒトIgG4 Fc領域のS228P及びL235Eにおいて少なくとも2つのさらなるアミノ酸置換を含み、残基は、EU付番に従って付番される(米国特許第8,969,526号、参照によりその全体が組み込まれる)。ある特定の実施形態において、P329G、L234A、及びL235A(EU付番)置換を含むポリペプチドでは、野生型ヒトIgG Fc領域を含むポリペプチドによりADCCが少なくともその20%に下方調節される場合、及び/またはADCPが下方調節される場合は、ヒトFcγRIIIA及びFcγRIIAに対する親和性の低下が示される(米国特許第8,969,526号、参照によりその全体が組み込まれる)。

【0234】

特定の実施形態において、野生型ヒトFcポリペプチドのFc変異形を含むポリペプチドは、三重突然変異、EU付番(P329/LALA)に従いPro329、L234A、及びL235A位にアミノ酸置換を含む(米国特許第8,969,526号、参照によりその全体が組み込まれる)。特定の実施形態において、ポリペプチドは、以下のアミノ酸置換、すなわち、EU付番に従いP329G、L234A、及びL235Aを含む。

【0235】

FcRへ結合が改善されたまたは減少したある特定の抗体変異形が記載される。(例えば、米国特許第6,737,056号、WO2004/056312号、及びShields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001)を参照されたい。)

【0236】

ある特定の実施形態において、抗体変異形は、ADCCを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298、333、及び/または334位(残基のEU付番)における置換を有するFc領域を含む。

【0237】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、例えば、米国特許第 6,194,551号、国際公開第 99/51642号、及び *Idusogie et al., J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000) に記載されるように、C1q 結合及び/または補体依存性細胞傷害性 (CDC) の改変 (改善または減少のいずれか) をもたらず改変が、Fc 領域においてなされる。

【0238】

母体 IgG の胎児への移入に関与する、半減期が増加しかつ新生児型 Fc 受容体 (FcRn) への結合が改善された抗体 (*Guyer et al., J. Immunol.* 117:587 (1976) 及び *Kim et al., J. Immunol.* 24:249 (1994)) が、US2005/0014934A1 (*Hinton*ら) に記載される。それらの抗体は、FcRn への Fc 領域の結合を改善する、1つ以上の置換を内部に有する Fc 領域を含む。かかる Fc 変異形には、Fc 領域残基 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、または 434 のうちの 1つ以上における置換、例えば、Fc 領域残基 434 の置換 (米国特許第 7,371,826号) を有するものが含まれる。

10

【0239】

また、Fc 領域変異形の他の例に関して、*Duncan & Winter, Nature* 322:738-40 (1988)、米国特許第 5,648,260号、米国特許第 5,624,821号、及び WO94/29351 も参照されたい。

20

【0240】

d) システイン操作された抗体変異形

ある特定の実施形態において、抗体の 1 個以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン操作された抗体、例えば、「THIOMAB (商標)」を作成することが望ましい場合がある。特定の実施形態において、置換残基は、コンジュゲートに利用可能な抗体の部位において生じる。それらの残基をシステインで置換することによって、反応性のチオール基は、抗体の利用可能な部位に位置付けられ、それを使用して、抗体を、薬物部分またはリンカー - 薬物部分等の他の部分にコンジュゲートして、本明細書にさらに記載される、免疫複合体を作成してもよい。ある特定の実施形態において、次の残基、すなわち軽鎖の K149 (*Kabat* 付番)、軽鎖の V205 (*Kabat* 付番)、重鎖の A118 (EU 付番)、重鎖の A140 (EU 付番)、重鎖の L174 (EU 付番)、重鎖の Y373 (EU 付番)、及び重鎖 Fc 領域の S400 (EU 付番) のうちの任意の 1 個以上が、システインで置換されてもよい。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、HC-A140C (EU 付番) システイン置換を含む。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、LC-K149C (*Kabat* 付番) システイン置換を含む。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、HC-A118C (EU 付番) システイン置換を含む。システイン操作された抗体は、例えば、米国特許第 7,521,541号に記載されるように生成されてもよい。

30

【0241】

ある特定の実施形態において、本抗体は、以下の重鎖システイン置換のうちの 1つを含む。

40

| 鎖 (H C / L C) | 残基 | EU突然変異部 位番号 | K a b a t突然変 異部位番号 |
|---------------------|----|----------------|-----------------------|
| HC | T | 1 1 4 | 1 1 0 |
| HC | A | 1 4 0 | 1 3 6 |
| HC | L | 1 7 4 | 1 7 0 |
| HC | L | 1 7 9 | 1 7 5 |
| HC | T | 1 8 7 | 1 8 3 |
| HC | T | 2 0 9 | 2 0 5 |
| HC | V | 2 6 2 | 2 5 8 |
| HC | G | 3 7 1 | 3 6 7 |
| HC | Y | 3 7 3 | 3 6 9 |
| HC | E | 3 8 2 | 3 7 8 |
| HC | S | 4 2 4 | 4 2 0 |
| HC | N | 4 3 4 | 4 3 0 |
| HC | Q | 4 3 8 | 4 3 4 |

10

20

【 0 2 4 2 】

ある特定の実施形態において、抗体は、以下の軽鎖システイン置換のうちの1つを含む。

。

| 鎖 (HC/ LC) | 残基 | EU突然変異部 位番号 | K a b a t突然 変異部位番号 |
|---------------|----|----------------|-----------------------|
| LC | I | 1 0 6 | 1 0 6 |
| LC | R | 1 0 8 | 1 0 8 |
| LC | R | 1 4 2 | 1 4 2 |
| LC | K | 1 4 9 | 1 4 9 |
| LC | V | 2 0 5 | 2 0 5 |

30

40

【 0 2 4 3 】

非限定の例示的な h u 7 C 2 . v 2 . 2 . L A 軽鎖 (L C) K 1 4 9 C T H I O M A B (商標) は、それぞれ配列番号 1 9 及び 2 3 の重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を有する。非限定の例示的な h u 7 C 2 . v 2 . 2 . L A 重鎖 (H C) A 1 1 8 C T H I O M A B (商標) は、それぞれ配列番号 2 4 及び 1 8 の重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を有する。

【 0 2 4 4 】

例示的な S 4 0 0 C システイン操作された重鎖定常領域は、配列番号 2 8 に示される。S 4 0 0 C システイン操作された重鎖定常領域は、配列番号 1 1 に示される h u 7 C 2 . v 2 . 2 . L A 重鎖可変領域の C 末端に融合され得る。結果として得られる h u 7 C 2 .

50

v 2 . 2 . L A H C S 4 0 0 C 重鎖は、h u 7 C 2 . v 2 . 2 . L A 軽鎖、例えば配列番号 1 8 に示される軽鎖と対合され得る。

【 0 2 4 5 】

例示的な V 2 0 5 C システイン操作された軽鎖定常領域は、配列番号 2 5 に示される。V 2 0 5 C システイン操作された軽鎖定常領域は、配列番号 1 0 に示される h u 7 C 2 . v 2 . 2 . L A 軽鎖可変領域の C 末端に融合され得る。結果として得られる h u 7 C 2 . v 2 . 2 . L A L C V 2 0 5 C 軽鎖は、h u 7 C 2 . v 2 . 2 . L A I g G 重鎖、例えば配列番号 1 9 に示される重鎖と対合され得る。

【 0 2 4 6 】

e) 抗体誘導体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、当該技術分野で既知であり、かつ容易に入手可能な、追加の非タンパク質性部分を含有するようにさらに修飾されてもよい。抗体の誘導体化に好適な部分には、水溶性ポリマーが含まれるが、これらに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール (P E G)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ - 1 , 3 - ジオキソラン、ポリ - 1 , 3 , 6 - トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸 (ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)、及びデキストランまたはポリ (n - ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、プロプロピレン (p r o p r o p y l e n e) グリコールホモポリマー、プロリプロピレン (p r o l y p r o p y l e n e) オキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール (例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、ならびにそれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性に起因して、製造における利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量のものであってもよく、分岐していても非分岐であっててもよい。抗体に結合したポリマーの数は、様々であっててもよく、1つを超えるポリマーが結合される場合、それらは、同じ分子または異なる分子であり得る。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/または種類は、改善対象の抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が規定の条件下で療法において使用されるかどうか等を含むが、これらに限定されない考慮に基づいて決定することができる。

【 0 2 4 7 】

別の実施形態において、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る、抗体及び非タンパク質性部分の複合体が提供される。一実施形態において、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブ (K a m e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 1 0 2 : 1 1 6 0 0 - 1 1 6 0 5 (2 0 0 5)) である。放射線は、任意の波長のものであってもよく、通常の細胞を害さないが、非タンパク質性部分を、抗体 - 非タンパク質性部分に近位の細胞が死滅させる温度まで加熱する波長が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 2 4 8 】

B. 組み換え法及び組成物

抗体は、例えば、米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号に記載される組み換え法及び組成物を使用して産生されてもよい。一実施形態において、本明細書に記載される抗 H E R 2 抗体をコードする単離核酸が提供される。かかる核酸は、抗体の V L を含むアミノ酸配列及び/または V H を含むアミノ酸配列 (例えば、抗体の軽鎖及び/または重鎖) をコードし得る。さらなる実施形態において、かかる核酸を含む 1 つ以上のベクター (例えば、発現ベクター) が提供される。さらなる実施形態において、かかる核酸を含む宿主細胞が提供される。1つのかかる実施形態において、宿主細胞は、(1) 抗体の V L を含むアミノ酸配列及び抗体の V H を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または (2) 抗体の V L を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第 1 のベクター、及び抗体の V H を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第 2 のベクターを含む (例えば、それらで形

10

20

30

40

50

質転換されている)。一実施形態において、宿主細胞は、真核性、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞またはリンパ系細胞 (例えば、Y0、NS0、Sp20細胞) である。一実施形態において、抗HER2抗体を作製する方法が提供され、本方法は、上記抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に好適な条件下で培養することと、任意選択で、抗体を宿主細胞 (または宿主細胞培養培地) から回収することを含む。

【0249】

抗HER2抗体の組み換え産生のために、例えば、上述のものなどの、抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞内でのさらなるクローニング及び/または発現のために、1つ以上のベクター中に挿入される。かかる核酸は、従来の手順を使用して (例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能である、オリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)、容易に単離されて配列決定され得る。

10

【0250】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞には、本明細書に記載される原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、抗体は、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が必要とされない場合に、細菌において産生されてもよい。細菌における抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、同第5,789,199号、及び同第5,840,523号を参照されたい (また、大腸菌における抗体断片の発現について説明するCharlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254も参照されたい)。発現後、抗体は、可溶性画分において細菌細胞ペーストから単離されてもよく、またさらに精製されてもよい。

20

【0251】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母等の真核微生物は、抗体をコードするベクターに好適なクローニングまたは発現宿主であり、それには、グリコシル化経路が「ヒト化」されており、それによって部分的または完全ヒトグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす、真菌及び酵母株が含まれる。Gerngross, Nat. Biotech. 22: 1409-1414 (2004)、及びLi et al., Nat. Biotech. 24: 210-215 (2006)を参照されたい。

30

【0252】

グリコシル化抗体の発現に好適な宿主細胞はまた、多細胞生物 (無脊椎動物及び脊椎動物) にも由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。昆虫細胞と併せて、特にヨトウガ細胞のトランスフェクションのために使用され得る、多数のパキユロウイルス株が特定されている。

【0253】

植物細胞培養物もまた、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号、及び同第6,417,429号 (トランスジェニック植物において抗体を産生するためのPLANTIBODIES (商標) 技術について説明している) を参照されたい。

40

【0254】

脊椎動物細胞もまた、宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中で成長するように適合される哺乳類細胞株が、有用であり得る。有用な哺乳類宿主細胞株の他の例としては、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株 (COS-7)、ヒト胚性腎臓株 (例えば、Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977) に記載される293または293細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK)、マウスセルトリ細胞 (例えば、Mather, Biol. Error! Bookmark not defined. Reprod. 23: 243-251 (1980) Error! Bookmark not defined. に記載されるTM4細胞)、サル腎臓細胞 (CV1)、アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76

50

)、ヒト子宮頸癌細胞 (HELA)、イヌ腎臓細胞 (MDCK、バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A)、ヒト肺細胞 (W138)、ヒト肝癌細胞 (Hep G2)、マウス乳腺腫瘍 (MMT 060562)、例えば、Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982) に記載される TRI 細胞、MRC 5 細胞、及び FS4 細胞がある。他の有用な哺乳類宿主細胞株には、DHF-CHO 細胞 (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980) を含む、チャニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ならびに Y0、NS0、及び Sp2/0 等の骨髓腫細胞株が含まれる。抗体産生に好適なある特定の哺乳類宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003) を参照されたい。

【0255】

C. アッセイ

本明細書に提供される抗HER2抗体は、それらの物理/化学特性及び/または生物活性について、当該技術分野で既知の種々のアッセイによって、特定され、スクリーニングされ、または特徴付けられてもよい。

【0256】

一態様において、本発明の抗体は、その抗原結合活性について、例えば、ELISA、BIACore (登録商標)、FACS、またはウェスタンブロット等の既知の方法によって試験される。

【0257】

別の態様において、競合アッセイを使用して、HER2への結合について本明細書に記載される抗体のいずれかと競合する抗体を特定してもよい。ある特定の実施形態において、かかる競合抗体は、本明細書に記載される抗体によって結合される、同じエピトープ (例えば、直線状または立体配座エピトープ) に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的方法は、Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ) に提供される。

【0258】

例示的な競合アッセイにおいて、固定化されたHER2は、HER2に結合する第1の標識抗体 (例えば、本明細書に記載される抗体のいずれか)、及びHER2への結合について第1の抗体と競合するその能力について試験されている第2の未標識抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在してもよい。対照として、固定化されたHER2が、第1の標識抗体を含むが、第2の未標識抗体を含まない溶液中でインキュベートされる。HER2に第1の抗体が結合することを許容する条件下でのインキュベーション後、過剰な非結合抗体が除去され、固定化されたHER2に関連する標識の量が測定される。固定化されたHER2に関連する標識の量が、対照試料と比較して試験試料中で実質的に低減される場合、それは、第2の抗体がHER2への結合について第1の抗体と競合していることを示す。Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照されたい。

【0259】

D. 免疫複合体

本発明はまた、化学療法剤若しくは化学療法薬、成長阻害性薬剤、毒素 (例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、若しくは動物起源の酵素活性毒素、またはそれらの断片)、または放射性同位体 (すなわち、放射性物質複合体 (radioconjugate)) 等の、1つ以上の細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる、本明細書中に記載の抗H

10

20

30

40

50

ER2抗体を含む免疫複合体も提供する。

【0260】

免疫複合体によって、腫瘍への薬物部分の送達を標的とすることが可能となり、いくつかの実施形態においては、コンジュゲートされていない薬物を全身投与することにより、正常な細胞にとって許容できないレベルの毒性もたされ得る場合に、その中の細胞内蓄積が可能となる (Polakis P. (2005) Current Opinion in Pharmacology 5:382-387)。

【0261】

抗体-薬物複合体(ADC)は、強力な細胞傷害性薬物の標的を抗原発現腫瘍細胞にして (Teicher, B. A. (2009) Current Cancer Drug Targets 9:982-1004)、それによって、有効性を最大化してオフターゲット毒性を最小化することにより治療指数を増強することで、抗体及び細胞傷害性薬物の両方の特性を併せ持つ標的薬学療法分子である (Carter, P. J. and Senter P. D. (2008) The Cancer Jour. 14(3):154-169、Chari, R. V. (2008) Acc. Chem. Res. 41:98-107)。

10

【0262】

本発明のADC化合物には、抗癌活性を有するものが含まれる。いくつかの実施形態において、ADC化合物には、薬物部分にコンジュゲートされた、すなわち、共有結合された抗体が含まれる。いくつかの実施形態において、本抗体は、リンカーによって薬物部分に共有結合される。本発明の抗体-薬物複合体(ADC)は、有効用量の薬物を腫瘍組織に選択的に送達し、それによって、治療指数(「治療濃度域」)を増加させながら、より高い選択性、すなわちより低い効果的用量が、達成され得る。

20

【0263】

抗体-薬物複合体(ADC)の薬物部分(D)は、細胞傷害性効果または細胞静止効果を有する任意の化合物、部分、または基を含んでもよい。薬物部分は、チューブリン結合、DNA結合またはインターカレーション、ならびにRNAポリメラーゼ、タンパク質合成、及び/またはトポイソメラーゼの阻害を含むが、これらに限定されない機序によって、それらの細胞傷害性効果及び細胞静止効果を付与し得る。例示的な薬物部分には、メイタンシノイド、ドラスタチン、オーリスタチン、カリケアマイシン、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)、ネモルピシン及びその誘導体、PNU-159682、アントラサイクリン、デュオカルマイシン、ピンカルカロイド、タキサン、トリコテセン、CC1065、カンプトテシン、エリナフィド、ならびに細胞傷害活性を有するそれらの立体異性体、イソスター(isosteres)、類似体、及び誘導体が含まれるが、これらに限定されない。かかる免疫複合体の非限定的な例が、以下でさらに詳細に考察される。

30

【0264】

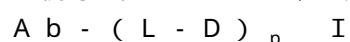
1. 例示的な抗体-薬物複合体

抗体-薬物複合体(ADC)化合物の例示的な実施形態は、腫瘍細胞を標的とする抗体(Ab)、薬物部分(D)、及びAbをDに結合させるリンカー部分(L)を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、リジン及び/またはシステイン等の1個以上のアミノ酸残基によって、リンカー部分(L)に結合される。

40

【0265】

例示的なADCは、式I:



を有し、式中、pは、1~約20である。いくつかの実施形態において、抗体にコンジュゲートされ得る薬物部分の数は、遊離システイン残基の数によって限定される。いくつかの実施形態において、遊離システイン残基は、本明細書に記載される方法によって抗体アミノ酸配列中に導入される。式Iの例示的なADCには、1、2、3、または4個の操作されたシステインアミノ酸を有する抗体が含まれるが、これらに限定されない (Lyons, R. et al (2012) Methods in Enzym. 502:123-1

50

38)。いくつかの実施形態において、1個以上の遊離システイン残基が、操作を使用することなく、抗体においてすでに存在しており、その場合、既存の遊離システイン残基を使用して、抗体を薬物にコンジュゲートしてもよい。いくつかの実施形態において、抗体は、1個以上の遊離システイン残基を生成するために、抗体のコンジュゲート前に還元条件に曝露される。

【0266】

a) 例示的なリンカー

「リンカー」(L)は、1個以上の薬物部分(D)を抗体(Ab)に連結させて、式Iの抗体-薬物複合体(ADC)を形成させるために使用することができる、二機能性または多機能性部分である。いくつかの実施形態において、抗体-薬物複合体(ADC)は、薬物に及び抗体に共有結合するための反応性官能基を有するリンカーを使用して調製することができる。例えば、いくつかの実施形態において、抗体の(Ab)システインチオールは、リンカーの反応性官能基または薬物-リンカー中間体との結合を形成して、ADCを作製することができる。

【0267】

一態様において、リンカーは、抗体上に存在する遊離システインと反応して共有結合を形成することが可能である官能性を有する。かかる反応性官能基の非限定的な例には、マレイミド、ハロアセトアミド、 α -ハロアセチル、コハク酸イミドエステル、4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル等の活性化エステル、無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアン酸塩、及びイソチオシアン酸塩が含まれる。例えば、Kl us s m a n , e t a l (2 0 0 4) , B i o c o n j u g a t e C h e m i s t r y 1 5 (4) : 7 6 5 - 7 7 3 の 7 6 6 ページにおけるコンジュゲート方法、及びその中の実施例を参照されたい。

【0268】

いくつかの実施形態において、リンカーは、抗体上に存在する求電子基と反応することが可能である官能性を有する。かかる求電子基の例には、アルデヒド基及びケトンカルボニル基が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、リンカーの反応性官能基のヘテロ原子が、抗体上の求電子基と反応して抗体単位との共有結合を形成することができる。かかる反応性官能基の非限定的な例には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸塩、及びアリアルヒドラジドが含まれるが、これらに限定されない。

【0269】

リンカーは、1つ以上のリンカー構成要素を含んでもよい。例示的なリンカー構成要素には、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」または「vc」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-コハク酸イミジル4-(4-ピリジルチオ)ペンタン酸塩(「SPP」)、及び2-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボン酸塩(「MCC」)が含まれる。種々のリンカー構成要素が当該技術分野で知られており、このうちのいくつかは以下に記載される。

【0270】

リンカーは、薬物の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であってもよい。切断可能なリンカーの非限定的な例には、酸不安定性リンカー(例えば、ヒドラゾンを含む)、プロテアーゼ感受性(例えば、ペプチダーゼ感受性)リンカー、感光性リンカー、またはジスルフィド含有リンカー(Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)、米国公開特許第5208020号)が含まれる。

【0271】

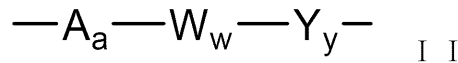
ある特定の実施形態において、リンカーは、次の式II:

10

20

30

40

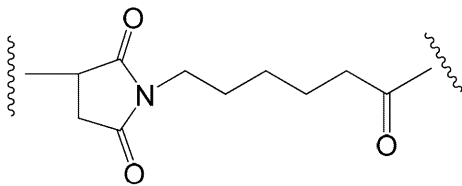


を有し、式中、Aは、「ストレッチャー (s t r e t c h e r) 単位」であり、aは、0 ~ 1の整数であり、Wは、「アミノ酸単位」であり、wは、0 ~ 12の整数であり、Yは「スペーサ単位」であり、yは、0、1、または2であり、Ab、D、及びpは上記式Iで定義されるものである。かかるリンカーの例示的な実施形態は、米国特許第7,498,298号に記載され、それは参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

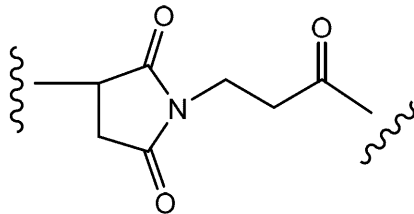
【0272】

いくつかの実施形態において、リンカー構成要素は、抗体を別のリンカー構成要素にまたは薬物部分に連結させる「ストレッチャー単位」を含む。ストレッチャー単位の比限定的な例が以下に示される（ここで波線は、抗体、薬物、または追加のリンカー構成要素への共有結合の部位を示す）。

10

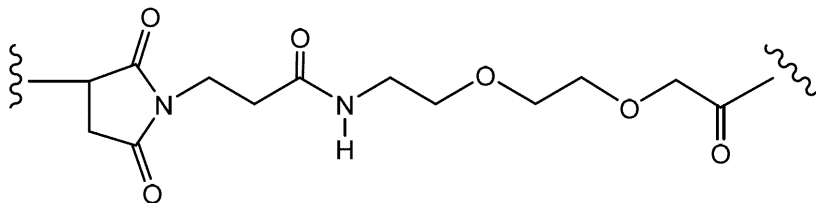


MC



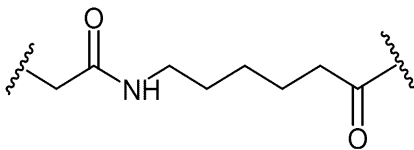
MP

20



mPEG

30



【0273】

いくつかの実施形態において、リンカー構成要素は、「アミノ酸単位」を含む。いくつかのかかる実施形態において、アミノ酸単位は、プロテアーゼによるリンカーの切断を可能にし、それによって、リソソーム酵素等の細胞内プロテアーゼへの曝露時に免疫複合体から薬物が容易に放出される (Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21: 778 - 784)。例示的なアミノ酸単位には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、及びペンタペプチドが含まれるが、これらに限定されない。例示的なジペプチドには、バリン - シトルリン (v c または v a l - c i t)、アラニン - フェニルアラニン (a f または a l a - p h e)、フェニルアラニン - リジン (f k または p h e - l y s)、フェニルアラニン - ホモリジン (p h e - h o m o l y s)、及び N - メチル - バリン - シトルリン (M e - v a l - c i t) が含まれるが、これらに限定されない。例示的なトリペプチドには、グリシン - バリン - シトルリン (g l y - v a l - c i t) 及びグリシン - グリシン - グリシン (g l y - g l y - g l y) が含まれるが、これらに限定されない。アミノ酸単位は、自然発生アミノ酸残基、及び/または微量アミノ酸、及び/またはシトルリン等の非自然発生アミノ酸類似体を含んでもよい

40

50

。アミノ酸単位は、特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C、及びD、またはプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断のために設計して最適化することができる。

【0274】

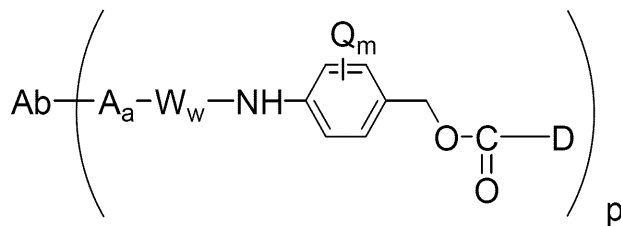
いくつかの実施形態において、リンカー構成要素は、直接、またはストレッチャー単位及び/若しくはアミノ酸単位によって、抗体を薬物部分に連結する、「スペーサ」単位を含む。スペーサ単位は、「自己犠牲型 (self-immolative)」または「非自己犠牲型」であり得る。「非自己犠牲型」スペーサ単位は、ADCの切断時にスペーサ単位の一部または全てが薬物部分に結合した状態に保持されているものである。非自己犠牲型スペーサ単位の例としては、グリシンスペーサ単位及びグリシン-グリシンスペーサ単位が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、腫瘍細胞関連プロテアーゼによる、グリシン-グリシンスペーサ単位を含有するADCの酵素的切断によって、ADCの残りの部分からグリシン-グリシン-薬物部分が放出する。いくつかのかかる実施形態において、グリシン-グリシン-薬物部分に対して、腫瘍細胞内で加水分解ステップを行い、その結果グリシン-グリシンスペーサ単位を薬物部分から切断する。

10

【0275】

「自己犠牲型」スペーサ単位は、薬物部分の放出を可能にする。ある特定の実施形態において、リンカーのスペーサ単位は、p-アミノベンジル単位を含む。いくつかのかかる実施形態において、p-アミノベンジルアルコールは、アミド結合によってアミノ酸単位に結合し、カルバミン酸塩、メチルカルバミン酸塩、または炭酸塩が、ベンジルアルコールと薬物との間に作製される (Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15: 1087-1103)。いくつかの実施形態において、スペーサ単位は、p-アミノベンジロキシカルボニル (PAB) である。いくつかの実施形態において、自己犠牲型リンカーを含むADCは、構造：

20



30

を有し、式中、Qは、-C₁-C₈アルキル、-O-(C₁-C₈アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、または-シアノであり、mは、0~4範囲の整数であり、pは、1~約20の範囲である。いくつかの実施形態において、pは、1~10、1~7、1~5、または1~4の範囲である。

【0276】

自己犠牲型スペーサの他の例としては、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体等の、PAB基と電子的に同様である芳香族化合物 (米国特許第7,375,078号、Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9: 2237) 及びオルト-またはパラ-アミノベンジルアセタールが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、置換及び非置換4-アミノ酪酸アミド (Rodrigues et al (1995) Chemistry Biology 2: 223)、適切に置換されたピシクロ[2.2.1]及びピシクロ[2.2.2]環系 (Storm et al (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94: 5815)、ならびに2-アミノフェニルプロピオン酸アミド (Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55: 5867) 等の、アミド結合加水分解時に環化を経るスペーサを使用することができる。グリシン残基の-炭素への薬物の結合は、ADCにおいて有用であり得る自己犠牲型スペーサの別の例である (Kingsbury et al (1984) J. Med. Chem. 27: 1447)。

40

【0277】

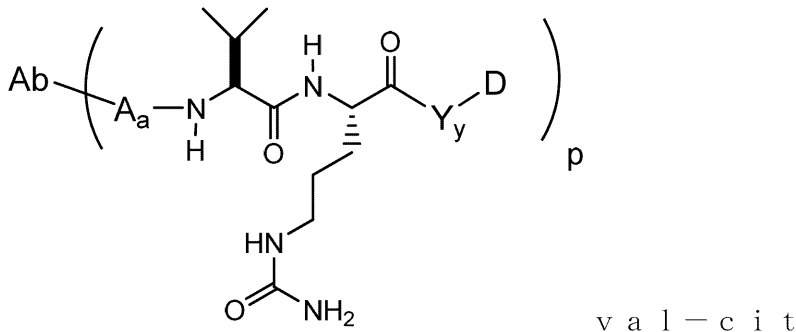
50

いくつかの実施形態において、リンカー-Lは、分岐する多機能性リンカー部分を介して1超の薬物部分が抗体に共有結合するための樹状型リンカーであり得る(Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215、Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。樹状リンカーは、ADCの効力に関連する、薬物対抗体のモル比、すなわち、負荷を増加させることができる。したがって、抗体が1個のみの反応性システインチオール基を有する場合、多数の薬物部分が、樹状リンカーを介して結合され得る。

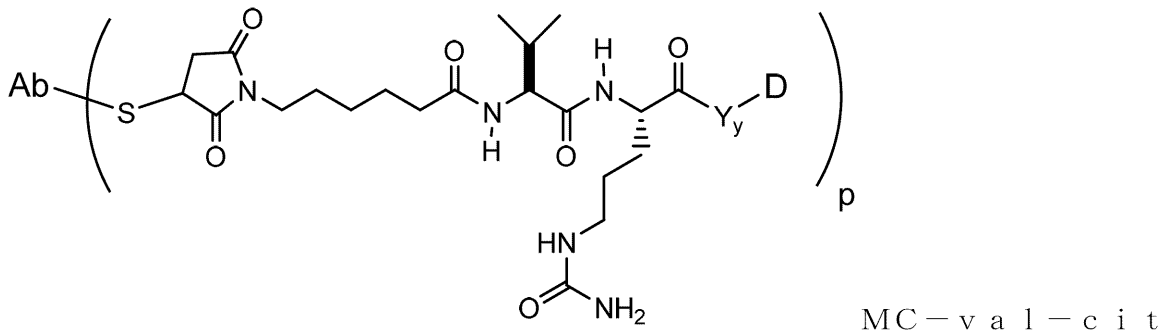
【0278】

リンカーの非限定的な例は、式IのADCの関連において以下に示される。

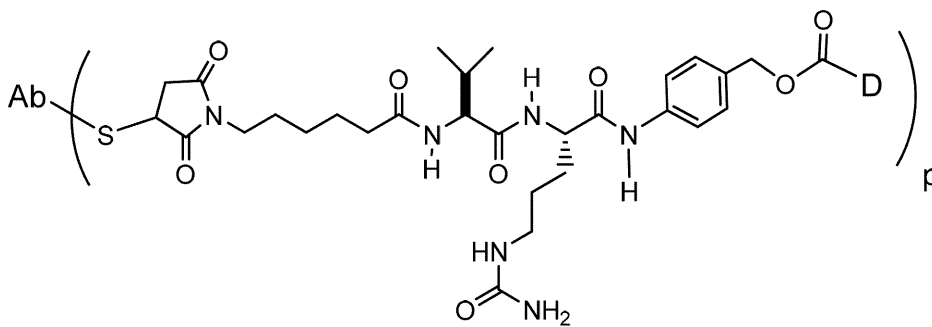
10



20



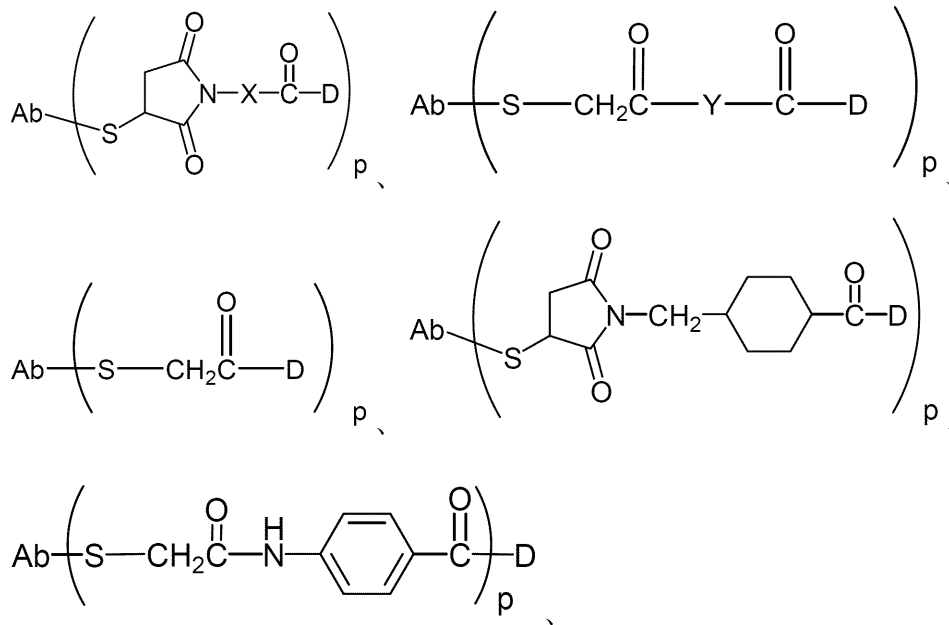
30



40

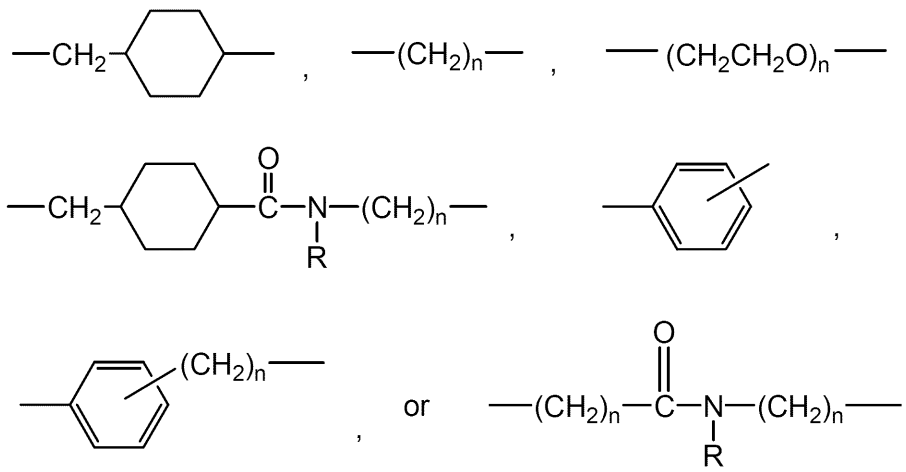
【0279】

ADCのさらなる非限定的例には、次の構造：



10

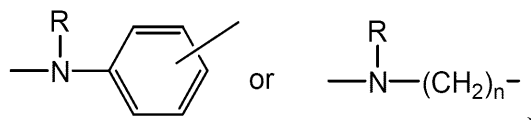
(式中、Xは、



20

30

であり、Yは、



各 R は独立して、H または C₁-C₆ アルキルであり、n は、1 ~ 12 である) が含まれる。

40

【0280】

典型的に、ペプチド型リンカーは、2つ以上のアミノ酸及び/またはペプチド断片の間にペプチド結合を形成することによって調製することができる。かかるペプチド結合は、例えば、液相合成法に従って調製することができる(例えば、E. Schroder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press)。

【0281】

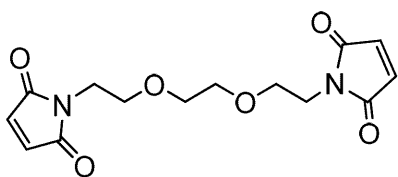
いくつかの実施形態において、リンカーは、溶解性及び/または反応性を調節する基で置換される。非限定的な例として、スルホン酸塩(-SO₃⁻)またはアンモニウム等の荷電置換基は、リンカー試薬の水溶性を増加させ、抗体及び/若しくは薬物部分とのリンカー試薬のカップリング反応を促進し得るか、またはADCを調製するために用いられる

50

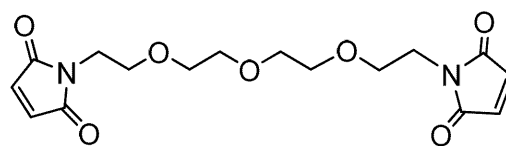
合成経路に応じて、DとのAb-L（抗体-リンカー-中間体）とのカップリング反応、若しくはAbとのD-L（薬物-リンカー-中間体）とのカップリング反応を促進し得る。いくつかの実施形態において、リンカーの一部が抗体にカップリングされ、リンカーの一部が薬物にカップリングされ、次いでAb-（リンカー部分）^aが薬物-（リンカー部分）^bにカップリングされて、式IのADCが形成される。いくつかのかかる実施形態において、本抗体は、1つを超える薬物が式IのADCにおいて抗体にカップリングされるように、1つを超える（リンカー部分）^a置換基を含む。

【0282】

本発明の化合物は、次のリンカー試薬、すなわちビス-マレイミド-トリオキシエチレングリコール（BMPEO）、N-（-マレイミドプロピルオキシ）-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル（BMPS）、N-（-マレイミドカプロイルオキシ）コハク酸イミドエステル（EMCS）、N-[-マレイミドブチリルオキシ]コハク酸イミドエステル（GMBS）、1,6-ヘキサン-ビス-ビニルスルホン（HBVS）、コハク酸イミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシ-（6-アミドカプロン酸塩）（LC-SMCC）、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル（MBS）、4-（4-N-マレイミドフェニル）酪酸ヒドラジド（MPBH）、コハク酸イミジル3-（プロモアセトアミド）プロピオン酸塩（SBAP）、コハク酸イミジルヨード酢酸塩（SIA）、コハク酸イミジル（4-ヨードアセチル）アミノ安息香酸塩（SIAB）、N-コハク酸イミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオン酸塩（SPDP）、N-コハク酸イミジル-4-（2-ピリジルチオ）ペンタン酸塩（SPP）、コハク酸イミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸塩（SMCC）、コハク酸イミジル4-（p-マレイミドフェニル）酪酸塩（SMPB）、コハク酸イミジル6-[（-マレイミドプロピオンアミド）ヘキサン酸塩]（SMPH）、イミノチオラン（IT）、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、ならびにコハク酸イミジル-（4-ビニルスルホン）安息香酸塩（SVSB）で、また次のビス-マレイミド試薬、すなわちジチオビスマレイミドエタン（DTME）、1,4-ビスマレイミドブタン（BMB）、1,4-ビスマレイミジル-2,3-ジヒドロキシブタン（BMDB）、ビスマレイミドヘキサン（BMH）、ビスマレイミドエタン（BMOE）、BM(PEG)₂（以下に示される）、及びBM(PEG)₃（以下に示される）、イミドエステルの二機能性誘導体（アジブイミド酸ジメチルHCl等）、活性エステル（スベリン酸ジスクシンイミジル等）、アルデヒド（グルタルアルデヒド等）、ビス-アジド化合物（ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン等）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス-（p-ジアゾニウムンゾイル等）-エチレンジアミン）、ジイソシアン酸塩（トルエン2,6-ジイソシアン酸塩等）、及びビス活性フッ素化合物（1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等）で調製されるADCを明示的に企図するが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ビス-マレイミド試薬は、抗体におけるシステインのチオール基がチオール含有薬物部分、リンカー、またはリンカー-薬物中間体に結合するのを可能にする。チオール基と反応性である他の官能基には、ヨードアセトアミド、プロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアン酸塩、及びイソチオシアン酸塩が含まれるが、これらに限定されない。



BM(PEG)₂



BM(PEG)₃

【0283】

10

20

30

40

50

ある特定の有用なリンカー試薬は、Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL), Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO)等の、種々の商業的供給源から得るか、または当該技術分野において、例えば、Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67: 1866 - 1872、Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38: 5257 - 60、Walker, M. A. (1995) J. Org. Chem. 60: 5352 - 5355、Frisch et al (1996) Bioconjugate Chem. 7: 180 - 186、US 6214345、WO 02/088172、US 2003130189、US 2003096743、WO 03/026577、WO 03/043583、及びWO 04/032828に記載される手順に従って合成することができる。

10

【0284】

炭素 - 14 標識 1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸 (MX-DTPA) は、放射性ヌクレオチドを抗体にコンジュゲートさせるための、例示的なキレート剤である。例えば、WO 94/11026を参照されたい。

【0285】

b) 例示的な薬物部分

(1) マイタンシン及びマイタンシノイド

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、1つ以上のマイタンシノイド分子にコンジュゲートされた抗体を含む。マイタンシノイドは、マイタンシンの誘導体であり、チューブリン重合化を阻害することによって作用する有糸分裂阻害剤である。マイタンシンは、東アフリカ低木メイテナス・セラタ (east African shrub Maytenus serrata) から最初に単離された (米国特許第 3896111号)。その後、ある特定のマイクロブもまた、マイタンシノール及びC-3マイタンシノールエステル等のマイタンシノイドを産生することが発見された (米国特許第 4,151,042号)。合成マイタンシノイドは、例えば、米国特許第 4,137,230号、同第 4,248,870号、同第 4,256,746号、同第 4,260,608号、同第 4,265,814号、同第 4,294,757号、同第 4,307,016号、同第 4,308,268号、同第 4,308,269号、同第 4,309,428号、同第 4,313,946号、同第 4,315,929号、同第 4,317,821号、同第 4,322,348号、同第 4,331,598号、同第 4,361,650号、同第 4,364,866号、同第 4,424,219号、同第 4,450,254号、同第 4,362,663号、及び同第 4,371,533号に開示されている。

20

30

【0286】

マイタンシノイド薬物部分は、(i) 発酵または化学修飾または発酵生成物の誘導体化による調製に比較的利用しやすく、(ii) 非ジスルフィドリンカーによる抗体へのコンジュゲートに好適な官能基との誘導体化に適しており、(iii) 血漿中で安定しており、かつ(iv) 様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体 - 薬物複合体中の魅力的な薬物部分である。

【0287】

マイタンシノイド薬物部分としての使用に好適なある特定のマイタンシノイドは、当該技術分野において既知であり、既知の方法に従って天然源から単離され得るか、または遺伝子操作技法を使用して産生され得る (例えば、Yu et al (2002) PNAS 99: 7968 - 7973を参照されたい)。マイタンシノイドは、既知の方法に従って合成的に調製されてもよい。

40

【0288】

例示的なマイタンシノイド薬物部分としては、C-19-デクロロ (米国特許第 4256746号) (例えば、アンサマイトシンP2の水素化リチウムアルミニウム還元によって調製されるもの)、C-20-ヒドロキシ (またはC-20-デメチル) + / - C-19-デクロロ (米国特許第 4361650号及び同第 4307016号) (例えば、スト

50

レプトミセス若しくはアクチノミセスを使用する脱メチル化、またはL A Hを使用する脱塩素化によって調製されるもの)、及びC - 20 - デメトキシ、C - 20 - アシルオキシ(-O C O R)、+/- - デクロロ(米国特許第4, 294, 757号)(例えば、塩化アシルを使用するアシル化によって調製されるもの)等の修飾された芳香族環を有するもの、ならびに芳香族環の他の位置に修飾を有するものが含まれるが、これらに限定されない。

【0289】

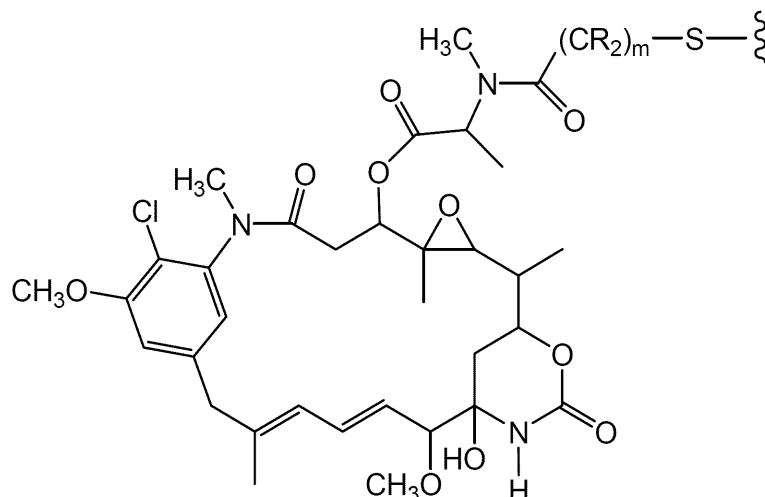
例示的なマイタンシノイド薬物部分としてはまた、C - 9 - S H (米国特許第4424219)(例えば、マイタンシノールと、H₂S若しくはP₂S₅との反応によって調製されるもの)、C - 14 - アルコキシメチル(デメトキシ/CH₂OR)(米国特許第4331598号)、C - 14 - ヒドロキシメチル若しくはアシルオキシメチル(CH₂OH若しくはCH₂OAc)(米国特許第4450254号)(例えば、ノカルディア(Nocardia)から調製されるもの)、C - 15 - ヒドロキシ/アシルオキシ(米国特許第4364866号)(例えば、ストレプトミセスによるマイタンシノールの変換によって調製されるもの)、C - 15 - メトキシ(米国特許第4313946号及び同第4315929号)(例えば、トレウィア・ヌドロフローラ(Trewia nudiflora)から単離されるもの)、C - 18 - N - ジメチル(米国特許第4362663号及び同第4322348号)(例えば、ストレプトミセスによるマイタンシノールの脱メチル化によって調製されるもの)、ならびに4, 5 - デオキシ(米国特許第4371533号)(例えば、マイタンシノールの三塩化チタン/L A H還元によって調製されるもの)等の修飾を有するものが挙げられる。

【0290】

マイタンシノイド化合物上の多くの位置は、結合位置として有用である。例えば、エステル結合は、従来のカップリング技法を使用するヒドロキシル基との反応によって形成され得る。いくつかの実施形態において、この反応は、ヒドロキシル基を有するC - 3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC - 14位、ヒドロキシル基で修飾されたC - 15位、及びヒドロキシル基を有するC - 20位で起こり得る。いくつかの実施形態において、結合は、マイタンシノールまたはマイタンシノール類似体のC - 3位で形成される。

【0291】

マイタンシノイド薬物部分としては、構造：

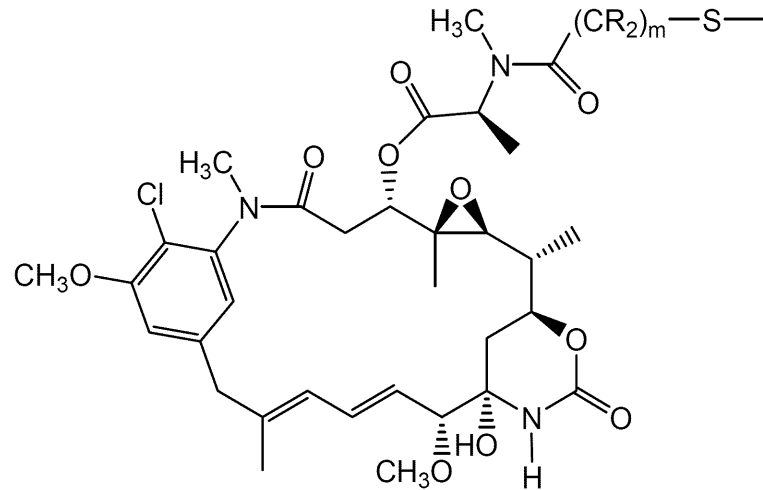


を有するものが挙げられ、式中、波線は、マイタンシノイド薬物部分の硫黄原子がA D Cのリンカーに対する共有結合を示す。各Rは独立して、HまたはC₁ - C₆アルキルであり得る。アミド基を硫黄原子に結合させるアルキレン鎖は、メタニル、エタニル、またはプロピルであり得、すなわち、mは、1、2、または3である(US 633410、US 5208020、Chariet al (1992) Cancer Res. 52: 127-131、Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci

USA 93:8618-8623)。

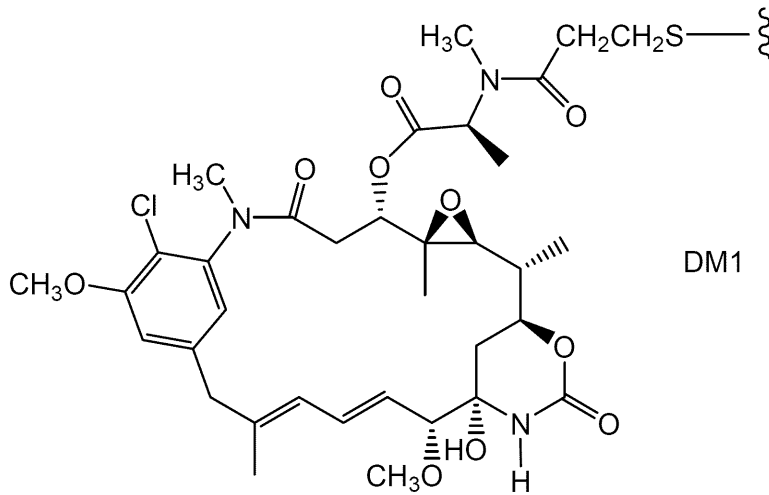
【0292】

マイタンシノイド薬物部分の全ての立体異性体は、本発明のADC、すなわち、キラル炭素におけるR及びS構成の任意の組み合わせに対して企図される(US7276497、US6913748、US6441163、US633410(RE39151)、US5208020、Widdison et al(2006)J.Med.Chem.49:4392-4408、これは参照により全体が組み込まれる)。いくつかの実施形態において、マイタンシノイド薬物部分は、以下の立体化学を有する。

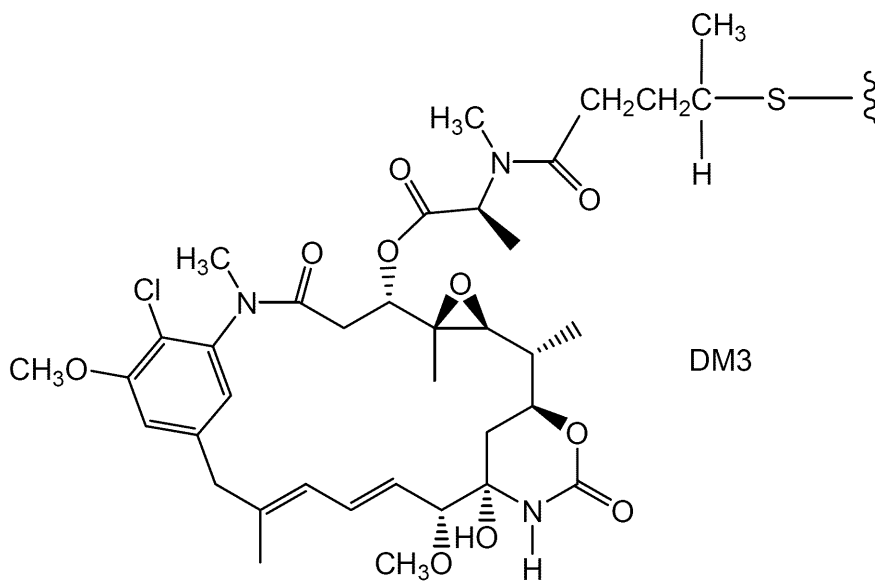


【0293】

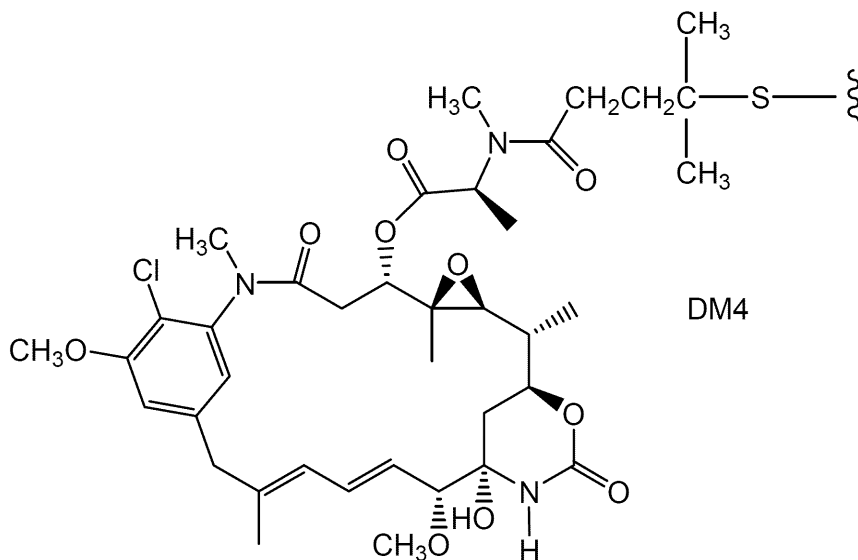
マイタンシノイド薬物部分の例示的な実施形態としては、構造：



10



20



30

40

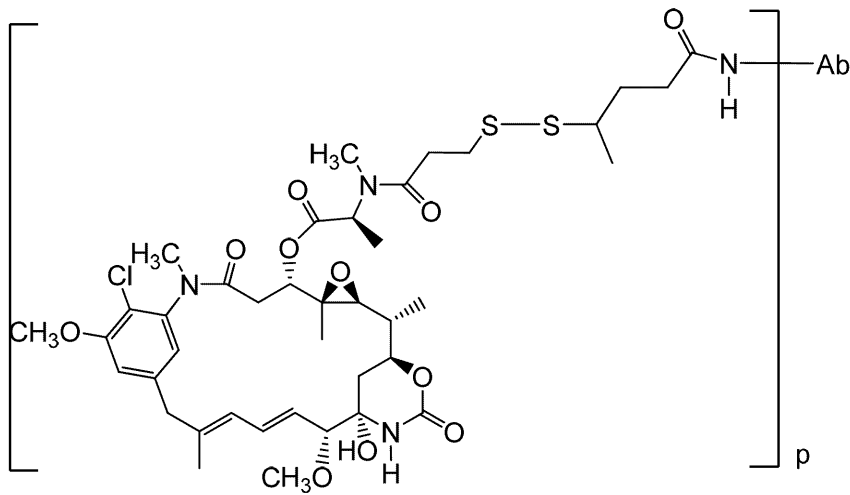
を有する DM 1、DM 3、及び DM 4 が含まれるが、これらに限定されず、式中、波線は、薬物の硫黄原子の、抗体 - 薬物複合体のリンカー (L) への共有結合を示す。

【 0 2 9 4 】

他の例示的なマイタンスノイド抗体 - 薬物複合体は、以下の構造及び省略形を有する (式中、Ab は抗体であり、p は 1 ~ 約 20 である。いくつかの実施形態において、p は 1

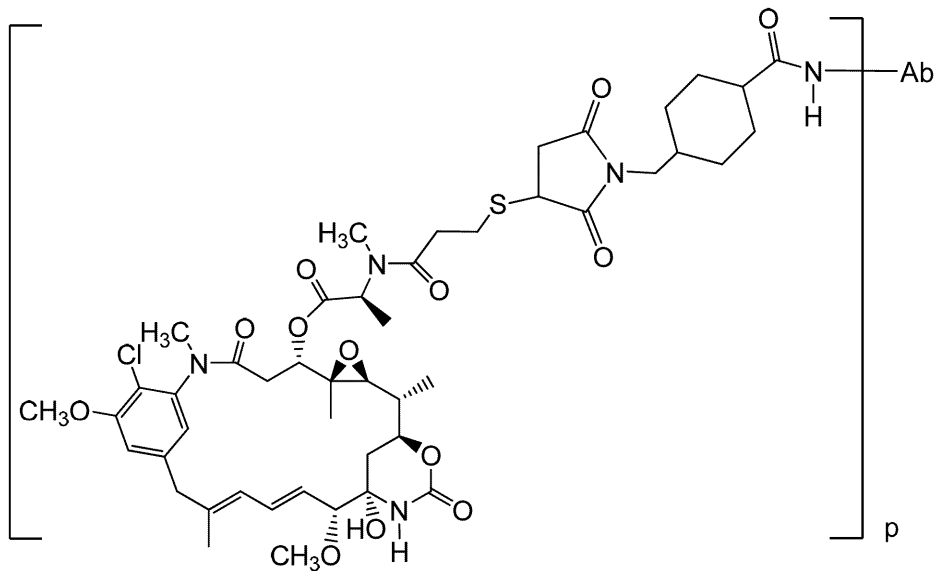
50

~ 10であるか、pは1~7であるか、pは1~5であるか、またはpは1~4である)。



10

Ab-SPP-DM1



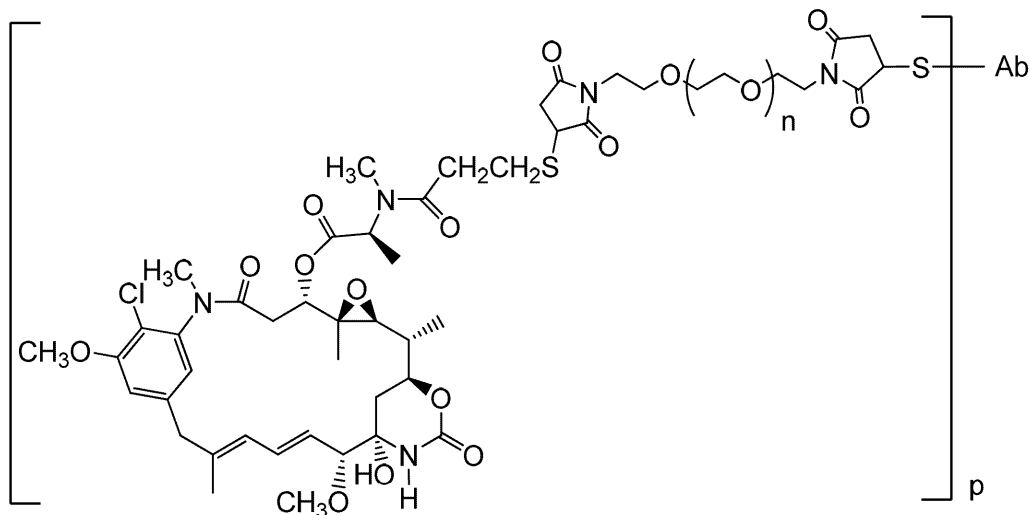
20

30

Ab-SMCC-DM1

【0295】

DM1がBMPEOリンカーを介して抗体のチオール基に結合される例示的な抗体-薬物複合体は、構造及び省略形：



40

を有し、式中、Abは抗体であり、nは0、1、または2であり、pは1~約20である

50

。いくつかの実施形態において、 p は1～10であるか、 p は1～7であるか、 p は1～5であるか、または p は1～4である。

【0296】

マイタンシノイドを含有する免疫複合体、その作製方法、及びそれらの治療的使用は、例えば、米国特許第5,208,020号及び同第5,416,064号、US2005/0276812A1、ならびに欧州特許第0425235B1号に開示され、それらの開示は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)、及びChari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992)も参照されたい。

10

【0297】

いくつかの実施形態において、抗体-マイタンシノイド複合体は、抗体またはマイタンシノイド分子のいずれかの生物活性を著しく減少させることなく、抗体をマイタンシノイド分子に化学的に結合させることによって調製されてもよい。例えば、米国特許第5,208,020号を参照されたい(その開示は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる)。いくつかの実施形態において、抗体分子1個当たり平均3～4個のマイタンシノイド分子がコンジュゲートされたADCは、抗体の機能または可溶性に悪影響を及ぼすことなく、標的細胞の細胞傷害性を増強することにおいて有効性を示した。場合によっては、毒素/抗体の1つの分子でさえも、裸の抗体を使用するより細胞傷害性を増強することが予想される。

20

【0298】

抗体-マイタンシノイド複合体を作製するための例示的な結合基としては、例えば、本明細書に記載されるもの、及び米国特許第5208020号、欧州特許第0425235B1号、Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992)、US2005/0276812A1、及びUS2005/016993A1に開示されるものが挙げられ、それらの開示は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【0299】

(2) オーリスタチン及びドラスタチン

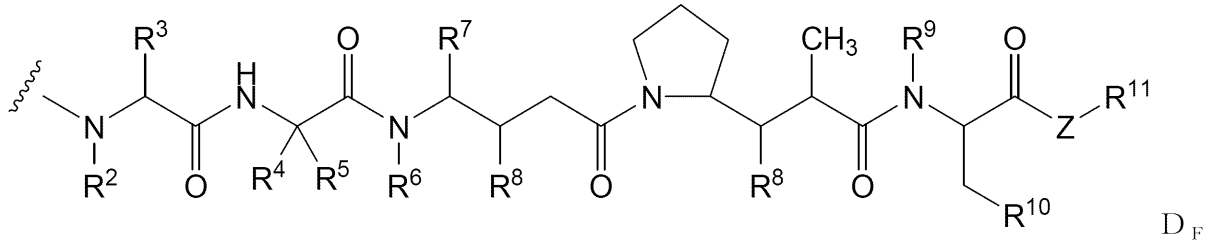
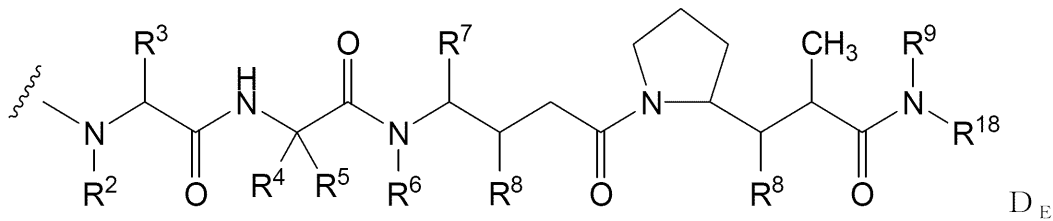
薬物部分は、ドラスタチン、オーリスタチン、ならびにそれらの類似体及び誘導体を含む(US5635483、US5780588、US5767237、US6124431)。オーリスタチンは、海生軟体動物化合物ドラスタチン-10の誘導体である。いかなる特定の理論によっても拘束されることを意図しないが、ドラスタチン及びオーリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解、ならびに核分裂及び細胞分裂を干渉し(Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)、抗癌活性(米国特許第5663149)及び抗菌活性(Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)を有する。ドラスタチン/オーリスタチン薬物部分は、ペプチド薬物部分のN(アミノ)末端またはC(カルボキシル)末端を介して抗体に結合され得る(WO02/088172、Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784、Francisco et al (2003) Blood 102(4):1458-1465)。

30

40

【0300】

例示的なオーリスタチン実施形態としては、US7498298及びUS7659241に開示されるN末端結合されたモノメチルオーリスタチン薬物部分D_E及びD_Fが挙げられ、それらの開示は、参照にその全体が明示的に組み込まれ、



10

20

30

40

50

式中、 D_E 及び D_F の破線は、抗体または抗体 - リンカー成分への共有結合部位を示し、独立して各位置において、

R^2 が、H 及び $C_1 \sim C_8$ アルキルから選択され、

R^3 が、H、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_3 \sim C_8$ 炭素環、アリール、 $C_1 \sim C_8$ アルキル - アリール、 $C_1 \sim C_8$ アルキル - ($C_3 \sim C_8$ 炭素環)、 $C_3 \sim C_8$ 複素環、及び $C_1 \sim C_8$ アルキル - ($C_3 \sim C_8$ 複素環) から選択され、

R^4 が、H、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_3 \sim C_8$ 炭素環、アリール、 $C_1 \sim C_8$ アルキル - アリール、 $C_1 \sim C_8$ アルキル - ($C_3 \sim C_8$ 炭素環)、 $C_3 \sim C_8$ 複素環、及び $C_1 \sim C_8$ アルキル - ($C_3 \sim C_8$ 複素環) から選択され、

R^5 が、H 及びメチルから選択されるか、

または R^4 及び R^5 が結合して炭素環を形成し、式 - (CR^aR^b)_n を有し、式中、 R^a 及び R^b が独立して、H、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、及び $C_3 \sim C_8$ 炭素環から選択され、 n が、2、3、4、5、及び 6 から選択され、

R^6 が、H 及び $C_1 \sim C_8$ アルキルから選択され、

R^7 が、H、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_3 \sim C_8$ 炭素環、アリール、 $C_1 \sim C_8$ アルキル - アリール、 $C_1 \sim C_8$ アルキル - ($C_3 \sim C_8$ 炭素環)、 $C_3 \sim C_8$ 複素環、及び $C_1 \sim C_8$ アルキル - ($C_3 \sim C_8$ 複素環) から選択され、

各 R^8 が独立して、H、OH、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_3 \sim C_8$ 炭素環、及び O - ($C_1 \sim C_8$ アルキル) から選択され、

R^9 が、H 及び $C_1 \sim C_8$ アルキルから選択され、

R^{10} が、アリールまたは $C_3 \sim C_8$ 複素環から選択され、

Z が、O、S、NH、または NR^{12} であり、式中、 R^{12} が、 $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、

R^{11} が、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、アリール、 $C_3 \sim C_8$ 複素環、- ($R^{13}O$)_m - R^{14} 、または - ($R^{13}O$)_m - $CH(R^{15})_2$ から選択され、

m が、1 ~ 1000 の範囲の整数であり、

R^{13} が、 $C_2 \sim C_8$ アルキルであり、

R^{14} が、H または $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、

それぞれ存在する R^{15} が独立して、H、COOH、- (CH_2)_n - $N(R^{16})_2$ 、- (CH_2)_n - SO_3H 、または - (CH_2)_n - SO_3 - $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、

それぞれ存在する R^{16} が独立して、H、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、または - (CH_2)_n - COOH であり、

R^{18} が、- $C(R^8)_2$ - $C(R^8)_2$ - アリール、- $C(R^8)_2$ - $C(R^8)_2$ - ($C_3 \sim C_8$ 複素環)、及び - $C(R^8)_2$ - $C(R^8)_2$ - ($C_3 \sim C_8$ 炭素環) から選択され、

n が、0 ~ 6 の範囲の整数である。

【0301】

一実施形態において、 R^3 、 R^4 、及び R^7 は独立して、イソプロピルまたはsec-ブチルであり、 R^5 は、-Hまたはメチルである。例示的な実施形態において、 R^3 及び R^4 は、それぞれイソプロピルであり、 R^5 は、-Hであり、 R^7 は、sec-ブチルである。

【0302】

さらに別の実施形態において、 R^2 及び R^6 は、それぞれメチルであり、 R^9 は、-Hである。

【0303】

さらに別の実施形態において、それぞれ存在する R^8 は、-OCH₃である。

【0304】

例示的な実施形態において、 R^3 及び R^4 は、それぞれイソプロピルであり、 R^2 及び R^6 は、それぞれメチルであり、 R^5 は、-Hであり、 R^7 は、sec-ブチルであり、それぞれ存在する R^8 は、-OCH₃であり、 R^9 は、-Hである。

【0305】

一実施形態において、Zは、-O-または-NH-である。

【0306】

一実施形態において、 R^{10} は、アリールである。

【0307】

例示的な実施形態において、 R^{10} は、-フェニルである。

【0308】

例示的な実施形態において、Zが-O-である場合、 R^{11} は、-H、メチル、またはt-ブチルである。

【0309】

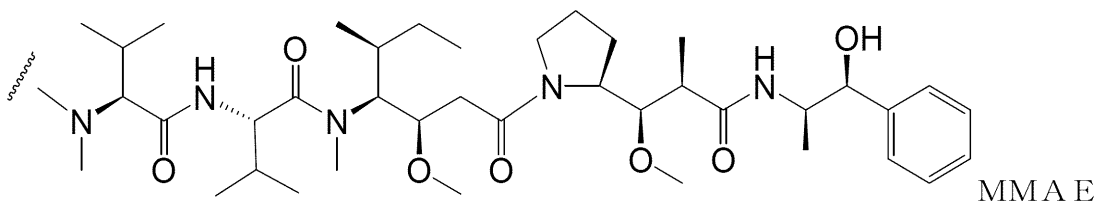
一実施形態において、Zが-NHである場合、 R^{11} は、-CH(R^{15})₂であり、式中、 R^{15} が、-(CH₂)_n-N(R^{16})₂であり、 R^{16} が、-C₁~C₈アルキルまたは-(CH₂)_n-COOHである。

【0310】

別の実施形態において、Zが-NHである場合、 R^{11} は、-CH(R^{15})₂であり、式中、 R^{15} は、-(CH₂)_n-SO₃Hである。

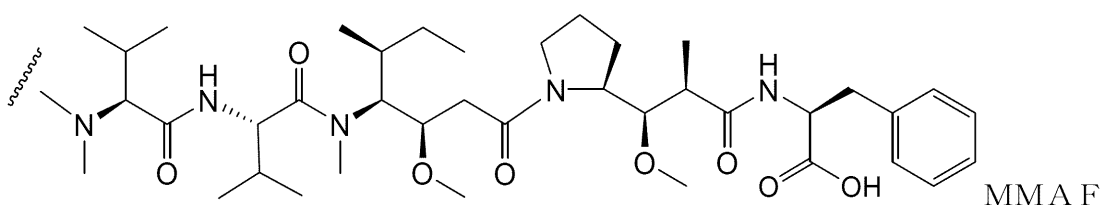
【0311】

式D_Eの例示的なオーリスタチン実施形態は、MMAEであり、式中、波線は、抗体-薬物複合体のリンカー(L)への共有結合を示す。



【0312】

式D_Fの例示的なオーリスタチン実施形態は、MMAFであり、式中、波線は、抗体-薬物複合体のリンカー(L)への共有結合を示す。



【0313】

10

20

30

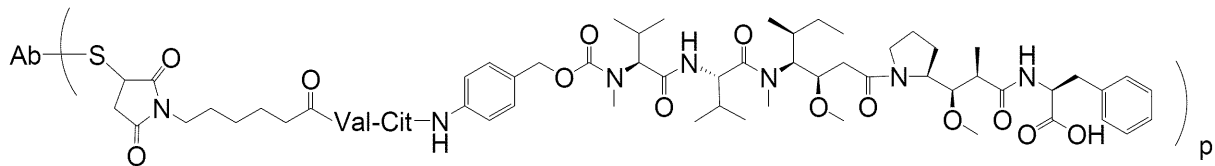
40

50

他の例示的な実施形態としては、ペントペプチドオーリスタチン薬物部分のC末端にフェニルアラニンカルボキシ修飾を有するモノメチルバリン化合物 (WO 2007/008848) 及びペントペプチド薬物部分のC末端にフェニルアラニン側鎖修飾を有するモノメチルバリン化合物 (WO 2007/008603号) が挙げられる。

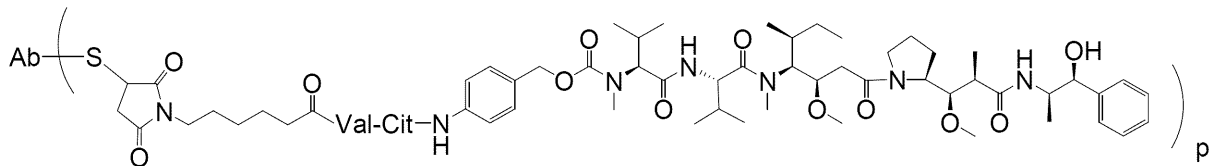
【0314】

MMAEまたはMMAF及び様々なリンカー成分を含む式IのADCの実施形態の非限定的な例は、以下の構造及び省略形を有する(式中、「Ab」は、抗体であり、pは、1~約8であり、「Val-Cit」は、バリン-シトルリンジペプチドであり、「S」は、硫黄原子である。



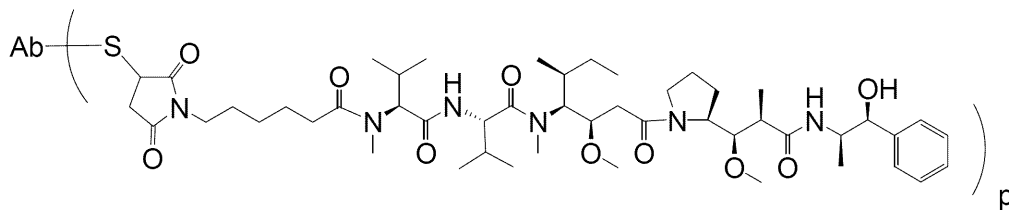
10

Ab-MC-vc-PAB-MMAF



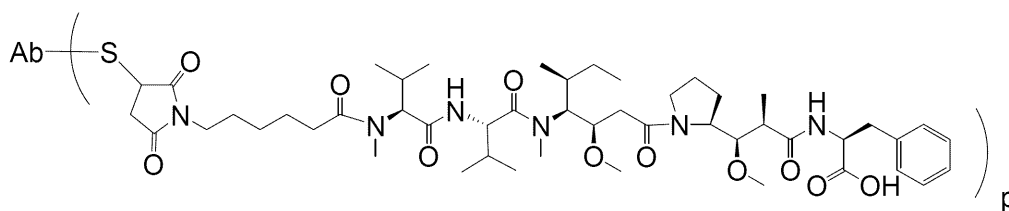
20

Ab-MC-vc-PAB-MMAE



30

Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

【0315】

40

MMAF及び様々なリンカー成分を含む式IのADCの実施形態の非限定的な例としては、さらにAb-MC-PAB-MMAF及びAb-PAB-MMAFが挙げられる。タンパク質分解的に切断可能でないリンカーによって抗体に結合されたMMAFを含む免疫複合体は、タンパク質的に切断可能なリンカーによって抗体に結合されたMMAFを含む免疫複合体に相当する活性を有することが示された(Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124)。いくつかのかかる実施形態において、薬物放出は、細胞内の抗体分解によって引き起こされると考えられる。

【0316】

典型的に、ペプチド型薬物部分は、2つ以上のアミノ酸及び/またはペプチド断片の間

50

にペプチド結合を形成することによって調製することができる。かかるペプチド結合は、例えば、液相合成法に従って調製することができる（例えば、E. Schröder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76 - 136, Academic Press）。オーリスタチン/ドラスタチン薬物部分は、いくつかの実施形態において、US 7498298、US 5635483、US 5780588、Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463 - 5465、Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243 - 277、Pettit, G. R., et al. Synthesis, 1996, 719 - 725、Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5: 859 - 863、及びDoronina (2003) Nat. Biotechnol. 21 (7) : 778 - 784の方法に従って調製されてもよい。

10

【0317】

いくつかの実施形態において、MMAE等の式D_E、及びMMAF等の式D_Fのオーリスタチン/ドラスタチン薬物部分、薬物-リンカー中間体、ならびにそれらの誘導体、例えば、MC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF、及びMC-vc-PAB-MMAE等は、US 7498298、Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114 - 124、及びDoronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21: 778 - 784に記載される方法を使用して調製され得、次に対象の抗体にコンジュゲートされ得る。

20

【0318】

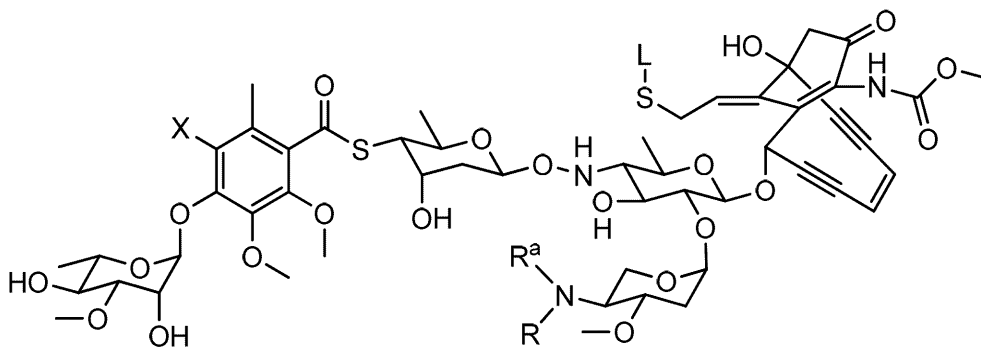
(3) カリケアミシン

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、1つ以上のカリケアミシン分子にコンジュゲートされた抗体を含む。カリケアミシンファミリーの抗生物質、及びそれらの類似体は、ピコモル以下の濃度で二重鎖DNA切断を生成することができる（Hinman et al., (1993) Cancer Research 53: 3336 - 3342、Lode et al., (1998) Cancer Research 58: 2925 - 2928）。カリケアミシンは、細胞内作用部位を有するが、ある特定の例では、血漿膜を容易に横断しない。したがって、いくつかの実施形態において、抗体媒介性内在化によるこれらの薬剤の細胞取り込みによって、それらの細胞傷害性効果を大幅に増強され得る。カリケアミシン薬物部分を有する抗体-薬物複合体を調製する方法の非限定的な例は、例えば、US 5712374、US 5714586、US 5739116、及びUS 5767285に記載されている。

30

【0319】

いくつかの実施形態において、抗体にコンジュゲートされるカリケアミシン薬物部分は、式：



40

を有する化合物であり、式中、Xが、BrまたはIであり、

Lが、リンカーであり、Rが、水素、C₁-6アルキル、または-C(=O)C₁-6アルキルであり、R^aが、水素またはC₁-6アルキルである。

【0320】

50

いくつかの実施形態において、Xは、Brであり、R^aは、水素であり、Rは、イソプロピルである。

【0321】

他の実施形態において、Xは、Brであり、R^aは、水素であり、Rは、エチルである。

【0322】

他の実施形態において、Xは、Iであり、R^aは、水素であり、Rは、イソプロピルである。

【0323】

他の実施形態において、Xは、Iであり、R^aは、水素であり、Rは、エチルである。

10

【0324】

いくつかの実施形態において、Xは、Brであり、R^aは、水素であり、Rは、-C(=O)CH₃である。

【0325】

他の実施形態において、Xは、Iであり、R^aは、水素であり、Rは、-C(=O)CH₃である。

【0326】

他の実施形態において、Xは、Iであり、R^aは、エチルであり、Rは、-C(=O)CH₃である。

【0327】

他の実施形態において、Xは、Brであり、R^aは、エチルであり、Rは、-C(=O)CH₃である。

20

【0328】

(4) ピロロベンゾジアゼピン

いくつかの実施形態において、ADCは、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)を含む。いくつかの実施形態において、PBD二量体は、特異的なDNA配列を認識し、それに結合する。天然生成物アントラマイシンであるPBDは、1965年に最初に報告された(Leimgruber, et al., (1965) J. Am. Chem. Soc., 87: 5793-5795、Leimgruber, et al., (1965) J. Am. Chem. Soc., 87: 5791-5793)。それ以来、三環式PBD足場の二量体を含む、自然発生及び類似体の両方のいくつかのPBDが、報告されてきている(Thurston, et al., (1994) Chem. Rev. 1994, 433-465 (US 6884799、US 7049311、US 7067511、US 7265105、US 7511032、US 7528126、US 7557099)。いかなる特定の理論にも拘束されることを意図せずに、二量体構造が、B型DNAの副溝との等螺旋性(isohelicity)に適切な三次元形状を付与し、それによって結合部位において滑り嵌めがもたらされると考えられている(Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975)、Hurley and Needham-VanDevanter, (1986) Acc. Chem. Res., 19: 230-237)。C2アリアル置換基を有する二量体PBD化合物は、細胞傷害性薬剤として有用であることが示されてきた(Hartley et al (2010) Cancer Res. 70(17): 6849-6858、Antonow (2010) J. Med. Chem. 53(7): 2927-2941、Howard et al (2009) Bioorganic and Med. Chem. Letters 19(22): 6463-6466)。

30

40

【0329】

いくつかの実施形態において、PBD化合物は、それらをN10位において、in vivoで除去可能である窒素保護基で保護することによって、プロドラッグとして用いることができる(WO 00/12507、WO 2005/023814号)。

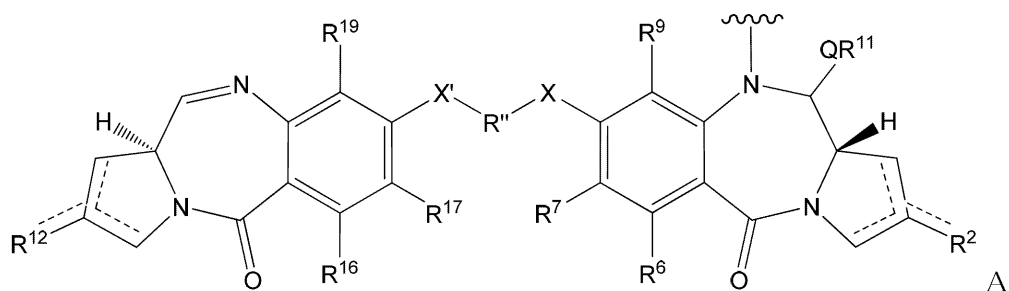
【0330】

50

PBD二量体は、抗体にコンジュゲートされており、結果として生じるADCは、抗癌特性を有することが示されてきた(US 2010/0203007)。PBD二量体上の結合部位の非限定的な例には、5員のピロロ環、PBD単位の間テザー、及びN10-C11イミン基が含まれる(WO 2009/016516、US 2009/304710、US 2010/047257、US 2009/036431、US 2011/0256157、WO 2011/130598)。

【0331】

ADCのPBD二量体構成要素の非限定的な例は、式A：



10

のもの、ならびにその塩及び溶媒和物であり、式中、

波線は、リンカーへの共有結合部位を示し、

点線は、C1とC2との間またはC2とC3の間の二重結合の任意の存在を示し、

R²が独立して、H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂R、及びCORから選択され、任意に八口またはジ八口からさらに選択され、R^Dが独立して、R、CO₂R、COR、CHO、CO₂H、及び八口から選択され、

20

R⁶及びR⁹が独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR、NO₂、Me₃Sn、及び八口から選択され、

R⁷が独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR、NO₂、Me₃Sn、及び八口から選択され、

Qが独立して、O、S、及びNHから選択され、

R¹¹が、H若しくはRのいずれかであるか、またはQがOである場合にはSO₃Mであり、式中、Mが金属陽イオンであり、

30

R及びR⁹がそれぞれ独立して、任意に置換されるC₁₋₈アルキル、C₁₋₁₂アルキル、C₃₋₈ヘテロシクリル、C₃₋₂₀ヘテロシクリル、及びC₅₋₂₀アリール基から選択され、任意に基NRRとの関連で、R及びR⁹が、それらが結合する窒素原子と一緒に、任意に置換される4員、5員、6員、または7員の複素環式環を形成し、

R¹²、R¹⁶、R¹⁹、及びR¹⁷が、それぞれR²、R⁶、R⁹、及びR⁷について定義される通りであり、

R¹⁰は、C₃₋₁₂アルキレン基であり、その鎖は、1個以上のヘテロ原子、例えば、O、S、N(H)、NMe、及び/または芳香族環、例えば、ベンゼンまたはピリジンによって分断され得、それらの環は、任意に置換されており、

40

X及びX¹が独立して、O、S、及びN(H)から選択される。

【0332】

いくつかの実施形態において、R及びR⁹はそれぞれ独立して、任意に置換されるC₁₋₁₂アルキル、C₃₋₂₀複素環、及びC₅₋₂₀アリール基から選択され、任意に基NRRとの関連で、R及びR⁹は、それらが結合する窒素原子と一緒に、任意に置換される4員、5員、6員、または7員の複素環式環を形成する。

【0333】

いくつかの実施形態において、R⁹及びR¹⁹は、Hである。

【0334】

いくつかの実施形態において、R⁶及びR¹⁶は、Hである。

50

【0335】

いくつかの実施形態において、 R^7 及び R^{17} は両方とも、 OR^{7A} であり、式中、 R^{7A} は、任意に置換される C_{1-4} アルキルである。いくつかの実施形態において、 R^{7A} は、Me である。いくつかの実施形態において、 R^{7A} は、 CH_2Ph であり、式中、Ph は、フェニル基である。

【0336】

いくつかの実施形態において、X は、O である。

【0337】

いくつかの実施形態において、 R^{11} は、H である。

【0338】

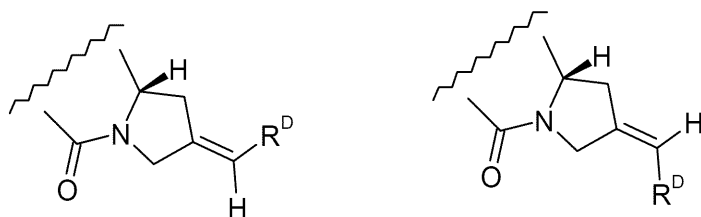
いくつかの実施形態において、各単量体単位において C_2 と C_3 との間に二重結合が存在する。

【0339】

いくつかの実施形態において、 R^2 及び R^{12} は独立して、H 及び R から選択される。いくつかの実施形態において、 R^2 及び R^{12} は独立して、R である。いくつかの実施形態において、 R^2 及び R^{12} は独立して、任意に置換される C_{5-20} アリールまたは C_{5-7} アリールまたは C_{8-10} アリールである。いくつかの実施形態において、 R^2 及び R^{12} は独立して、任意に置換されるフェニル、チエニル、ナプチル (naphthyl)、ピリジル、キノリニル、またはイソキノリニルである。いくつかの実施形態において、 R^2 及び R^{12} は独立して、 $=O$ 、 $=CH_2$ 、 $=CH-R^D$ 、及び $=C(R^D)_2$ から選択される。いくつかの実施形態において、 R^2 及び R^{12} はそれぞれ、 $=CH_2$ である。いくつかの実施形態において、 R^2 及び R^{12} はそれぞれ H である。いくつかの実施形態において、 R^2 及び R^{12} はそれぞれ $=O$ である。いくつかの実施形態において、 R^2 及び R^{12} はそれぞれ $=CF_2$ である。いくつかの実施形態において、 R^2 及び / または R^{12} は独立して、 $=C(R^D)_2$ である。いくつかの実施形態において、 R^2 及び / または R^{12} は独立して、 $=CH-R^D$ である。

【0340】

いくつかの実施形態において、 R^2 及び / または R^{12} が $=CH-R^D$ であるとき、各基は独立して、以下に示される立体配置のいずれかを有し得る。



(I)

(II)

いくつかの実施形態において、 $=CH-R^D$ は、立体配置 (I) にある。

【0341】

いくつかの実施形態において、R は、 C_3 アルキレン基または C_5 アルキレン基である。

【0342】

いくつかの実施形態において、ADC の例示的な PBD 二量体構成要素は、式 A (I)

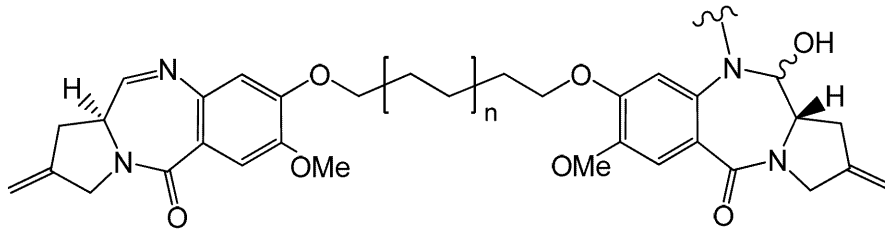
:

10

20

30

40

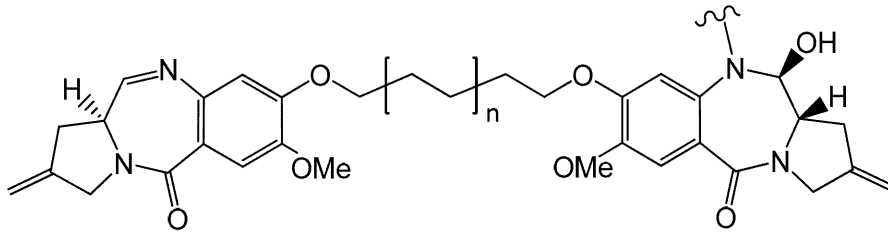


A (I)、

の構造を有し、式中、 n が、0または1である。

【0343】

いくつかの実施形態において、ADCの例示的なPBD二量体構成要素は、式A (I I) 10
):

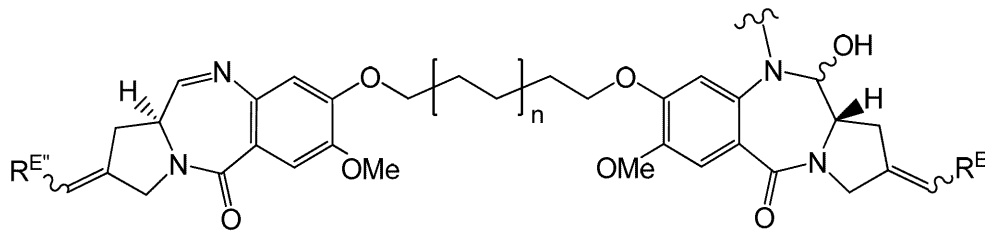


A (II)、

の構造を有し、式中、 n が、0または1である。

【0344】

いくつかの実施形態において、ADCの例示的なPBD二量体構成要素は、式A (I I I) 20
I) :



A (III)、

の構造を有し、式中、 R^E 及び $R^{E''}$ はそれぞれ独立して、Hまたは R^D から選択され、 30
式中、 R^D は、上記のように定義され、

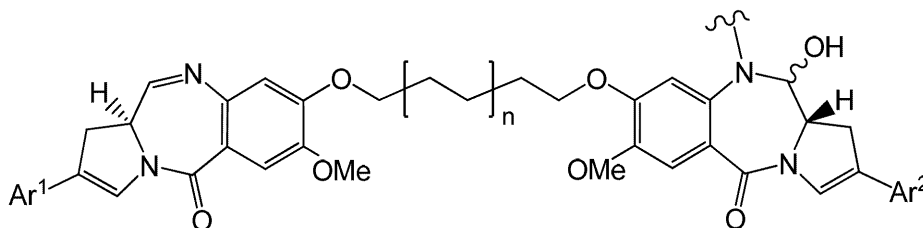
式中、 n が、0または1である。

【0345】

いくつかの実施形態において、 n は、0である。いくつかの実施形態において、 n は、
1である。いくつかの実施形態において、 R^E 及び/または $R^{E''}$ はHである。いくつか
の実施形態において、 R^E 及び $R^{E''}$ はHである。いくつかの実施形態において、 R^E 及
び/または $R^{E''}$ は R^D であり、式中、 R^D は、任意に置換される C_{1-12} アルキルで
ある。いくつかの実施形態において、 R^E 及び/または $R^{E''}$ は、 R^D であり、式中、 R^D
は、メチルである。

【0346】

いくつかの実施形態において、ADCの例示的なPBD二量体構成要素は、式A (I V) 40
):



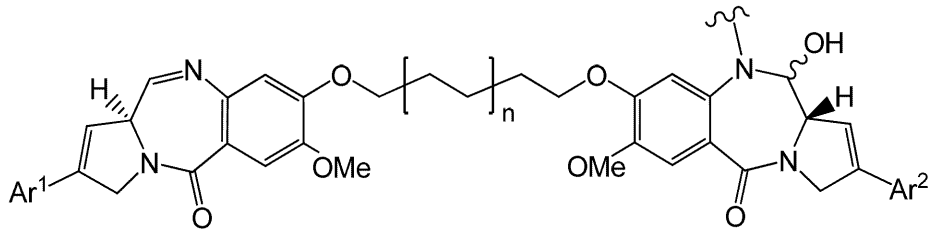
A (IV)、

の構造を有し、式中、 Ar^1 及び Ar^2 はそれぞれ独立して、任意に置換される C_{5-2} 50

アリールであり、 Ar^1 及び Ar^2 は、同じであっても異なってもよく、
式中、 n が、0 または 1 である。

【0347】

いくつかの実施形態において、ADC の例示的な PBD 二量体構成要素は、式 A (V) :



A (V) 、

10

の構造を有し、式中、 Ar^1 及び Ar^2 はそれぞれ独立して、任意に置換される C_{5-2}

アリールであり、 Ar^1 及び Ar^2 は、同じであっても異なってもよく、
式中、 n が、0 または 1 である。

【0348】

いくつかの実施形態において、 Ar^1 及び Ar^2 はそれぞれ独立して、任意に置換されるフェニル、フラニル、チオフェニル、及びピリジルから選択される。いくつかの実施形態において、 Ar^1 及び Ar^2 はそれぞれ独立して、任意に置換されるフェニルである。

いくつかの実施形態において、 Ar^1 及び Ar^2 はそれぞれ独立して、任意に置換される

チエン-2-イルまたはチエン-3-イルである。いくつかの実施形態において、 Ar^1

及び Ar^2 はそれぞれ独立して、任意に置換されるキノリニルまたはイソキノリニルである。

キノリニルまたはイソキノリニル基は、任意の利用可能な環の位置を介して、PBD

コアに結合されてもよい。例えば、キノリニルは、キノリン-2-イル、キノリン-3-

イル、キノリン-4イル、キノリン-5-イル、キノリン-6-イル、キノリン-7-イル、及びキノリン-8-イルであり得る。いくつかの実施形態において、キノリニルは、

キノリン-3-イル及びキノリン-6-イルから選択される。イソキノリニルは、イソキノ

ノリン-1-イル、イソキノリン-3-イル、イソキノリン-4イル、イソキノリン-5-

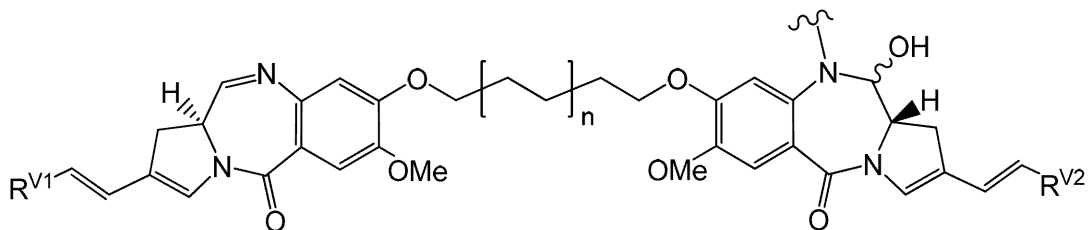
イル、イソキノリン-6-イル、イソキノリン-7-イル、及びイソキノリン-8-イル

であり得る。いくつかの実施形態において、イソキノリニルは、イソキノリン-3-イル

及びイソキノリン-6-イルから選択される。

【0349】

ADC の PBD 二量体構成要素のさらなる非限定的な例は、式 B :



B

40

のもの、ならびにその塩及び溶媒和物であり、式中、

波線は、リンカーへの共有結合部位を示し、

OH に接続された波線は、S または R 配置を示し、

R^{V1} 及び R^{V2} は独立して、H、メチル、エチル、及びフェニル（このフェニルは、特に 4 位において、フルオロで任意に置換されてもよい）、 C_{5-6} ヘテロシクリルから選択され、式中、 R^{V1} 及び R^{V2} は、同じであっても異なってもよく、

n は、0 または 1 である。

【0350】

いくつかの実施形態において、 R^{V1} 及び R^{V2} は独立して、H、フェニル、及び 4-フルオロフェニルから選択される。

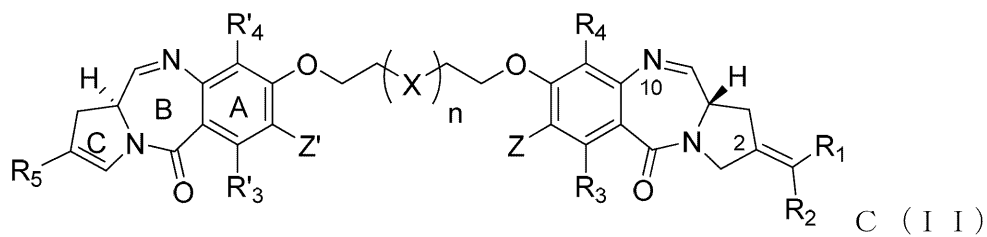
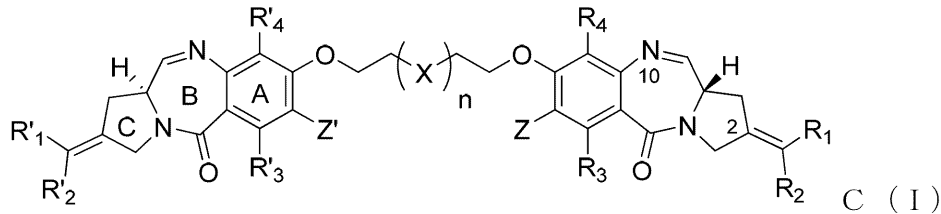
50

【0351】

いくつかの実施形態において、リンカーは、B環のN10イミン、C環のC-2エンド/エキソ位、またはA環を連結するテザー単位を含む、PBD二量体薬物部分の種々の部位のうちの一つにおいて結合されてもよい(下の構造C(I)及びC(II)を参照されたい)。

【0352】

ADCのPBD二量体構成要素の非限定的な例には、次の式C(I)及びC(II)が含まれる。



【0353】

式C(I)及びC(II)は、それらのN10-C11イミン型で示される。例示的なPBD薬物部分にはまた、以下の表に示される、カルビノールアミン及び保護されたカルビノールアミン型も含まれる。

| | | |
|---------|---------------|--------------------|
| イミン | カルビノールアミン | 保護されたカルビノールアミン |
|---------|---------------|--------------------|

30

(式中、

Xは、CH₂ (n = 1 ~ 5)、N、またはOであり、

Z及びZ'は独立して、OR及びNR₂から選択され、式中、Rは、1 ~ 5個の炭素原子を含有する第一級、第二級、または第三級アルキル鎖であり、

R₁、R'₁、R₂及びR'₂はそれぞれ独立して、H、C₁-C₈アルキル、C₂-C₈アルケニル、C₂-C₈アルキニル、C₅-₂₀アリール(置換アリールを含む)、C₅-₂₀ヘテロアリール基、-NH₂、-NHMe、-OH、及び-SHから選択され、いくつかの実施形態において、アルキル、アルケニル、及びアルキニル鎖は、最大5個の炭素原子を含み、

40

R₃及びR'₃は独立して、H、OR、NHR、及びNR₂から選択され、式中、Rは、1 ~ 5個の炭素原子を含有する第一級、第二級、または第三級アルキル鎖であり、

R₄及びR'₄は独立して、H、Me、及びOMeから選択され、

R₅は、C₁-C₈アルキル、C₂-C₈アルケニル、C₂-C₈アルキニル、C₅-₂₀アリール(ハロ、ニトロ、シアノ、アルコキシ、アルキル、ヘテロシクリルによって置換されたアリールを含む)、及びC₅-₂₀ヘテロアリール基から選択され、いくつかの実施形態において、アルキル、アルケニル、及びアルキニル鎖は、最大5個の炭素原子を含み、

50

R_{11} は、H、 $C_1 - C_8$ アルキル、または保護基（アセチル、トリフルオロアセチル、*t*-ブトキシカルボニル（BOC）、ベンジルオキシカルボニル（CBZ）、9-フルオレニルメチレンオキシカルボニル（Fmoc）、またはバリン-シトルリン-PAB等の自己犠牲単位を含む部分等）であり、

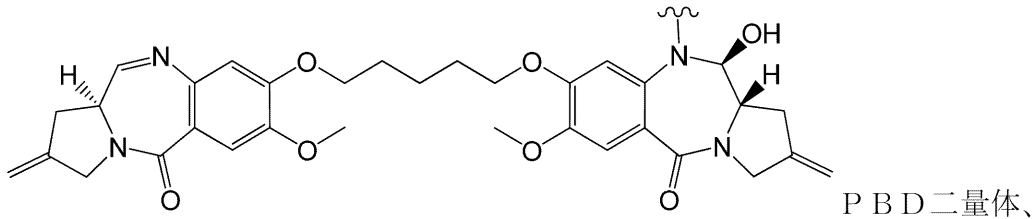
R_{12} は、H、 $C_1 - C_8$ アルキル、または保護基であり、

R_1 、 R'_1 、 R_2 、 R'_2 、 R_5 、または R_{12} のうちの1つの水素、またはA環の間の $-OCH_2CH_2(X)_nCH_2CH_2O-$ スペーサの水素は、ADCのリンカーに接続された結合と置き換えられている）。

【0354】

ADCの例示的なPBD二量体部分には、以下のものが含まれるが、これらに限定されない（波線は、リンカーへの共有結合の部位を示す）。

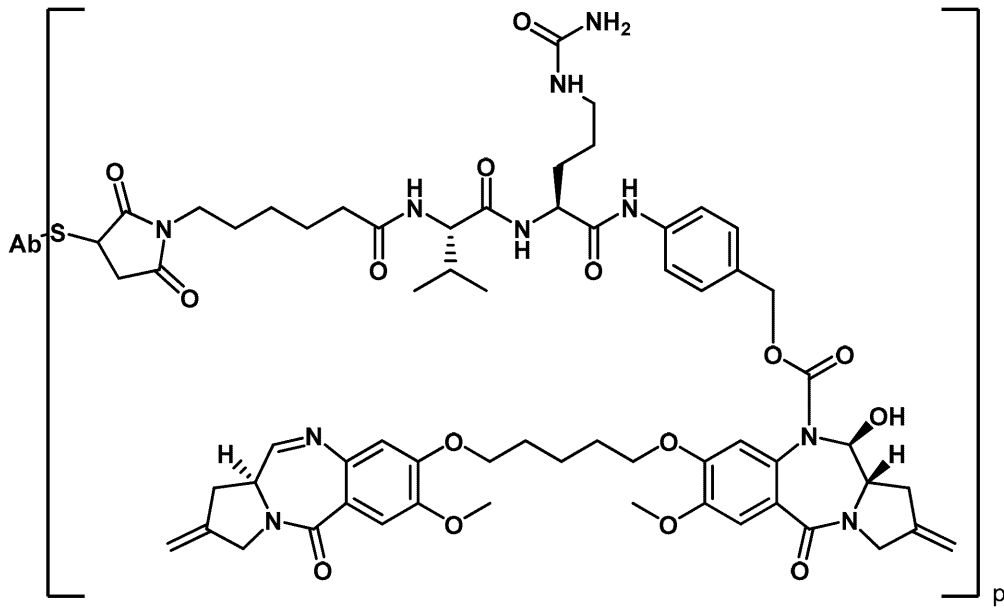
10



【0355】

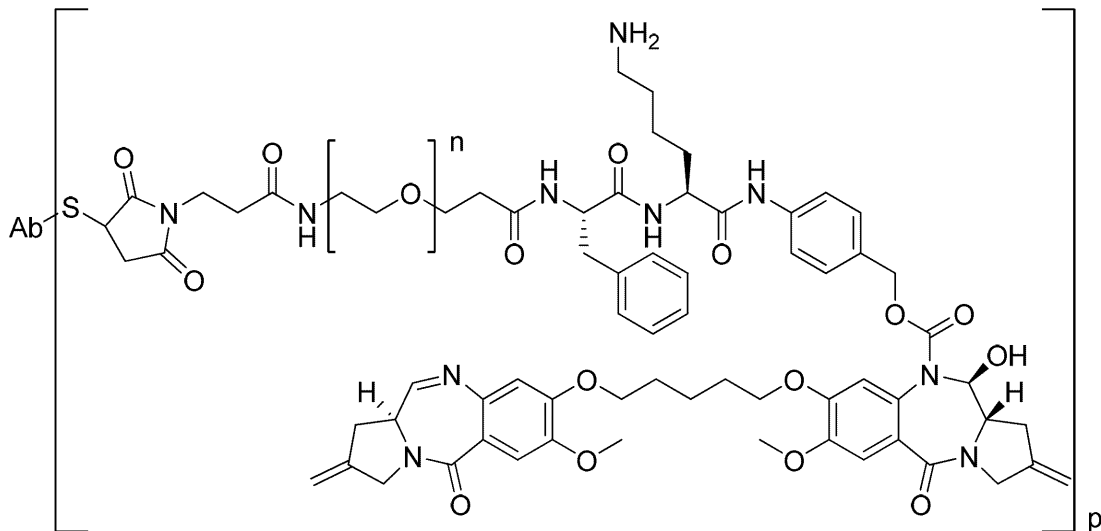
PBD二量体を含むADCの実施形態の非限定的な例は、次の構造を有する。

20



10

PBD二量体-Val-Cit-PAB-Ab、



20

30

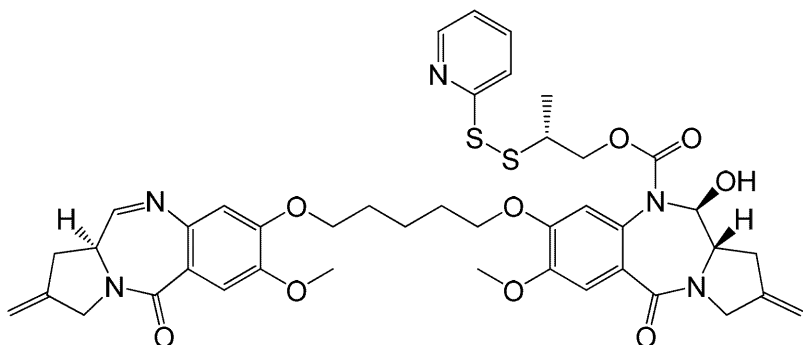
PBD二量体-Phe-Lys-PAB-Ab、式中、

n は、 $0 \sim 12$ である。いくつかの実施形態において、 n は、 $2 \sim 10$ である。いくつかの実施形態において、 n は、 $4 \sim 8$ である。いくつかの実施形態において、 n は、 4 、 5 、 6 、 7 、及び 8 から選択される。

【0356】

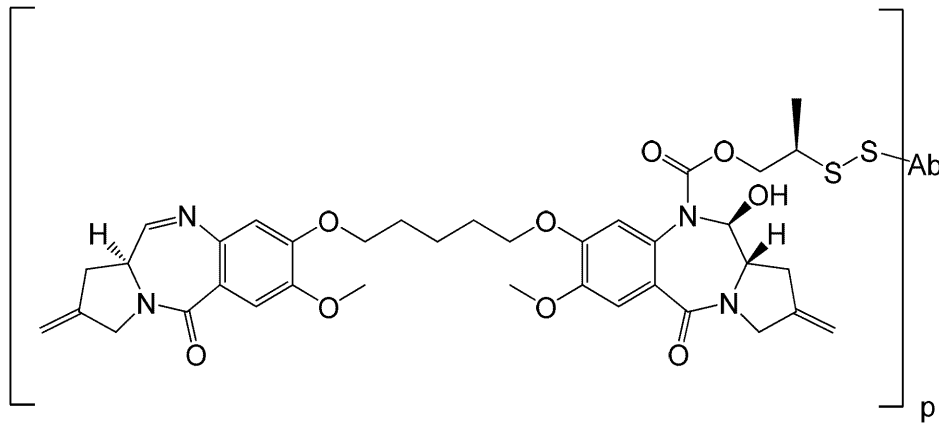
PBD二量体を含むADCのさらなる非限定的な例は、モノメチルジスルフィドN10結合されたPBD（以下に示される）を抗体：

40



50

にコンジュゲートすることによって作製され、それによってモノメチルジスルフィド N 10 結合された P B D 抗体 - 薬物複合体 :



10

を産生することができる。例えば、P C T 公開第 2 0 1 3 / 0 5 5 9 8 7 号を参照されたい。

【 0 3 5 7 】

P B D 二量体 - v a l - c i t - P A B - A b 及び P B D 二量体 - P h e - ホモ L y s - P A B - A b のリンカーは、プロテアーゼ切断可能であるのに対して、P B D 二量体 - マレイミド - アセタールのリンカーは、酸不安定性である。

20

【 0 3 5 8 】

P B D 二量体及び A D C を含む P B D 二量体は、当該技術分野で既知の方法に従って調製されてもよい。例えば、W O 2 0 0 9 / 0 1 6 5 1 6 、 U S 2 0 0 9 / 3 0 4 7 1 0 、 U S 2 0 1 0 / 0 4 7 2 5 7 、 U S 2 0 0 9 / 0 3 6 4 3 1 、 U S 2 0 1 1 / 0 2 5 6 1 5 7 、 W O 2 0 1 1 / 1 3 0 5 9 8 、 W O 2 0 1 3 / 0 5 5 9 8 7 を参照されたい。

【 0 3 5 9 】

(5) アントラシクリン

いくつかの実施形態において、A D C は、アントラシクリンを含む。アントラシクリンは、細胞傷害性活性を示す抗生物質化合物である。いかなる特定の理論によっても拘束されることを意図しないが、試験では、アントラシクリンが、1) 薬物分子の、細胞の D N A へのインターカレーションによって D N A 依存的核酸合成を阻害すること、2) 次に細胞巨大分子と反応して細胞への損傷を引き起こすフリーラジカルの薬物による産生、及び/または 3) 薬物分子と細胞膜との相互作用を含む、多くの異なる機序によって、細胞を死滅させるように動作し得ることを示した(例えば、C . P e t e r s o n e t a l . , T r a n s p o r t A n d S t o r a g e O f A n t h r a c y c l i n e I n E x p e r i m e n t a l S y s t e m s A n d H u m a n L e u k e m i a I n A n t h r a c y c l i n e A n t i b i o t i c s I n C a n c e r T h e r a p y , N . R . B a c h u r , F r e e R a d i c a l D a m a g e i d . a t p p . 9 7 - 1 0 2 を参照されたい)。それらは細胞傷害性であるため、潜在的アントラシクリンは、白血病、乳癌、肺癌、卵巣腺癌、及び肉腫等の多くの癌の治療に使用されてきた(例えば、P . H - W i e r n i k , I n A n t h r a c y c l i n e : C u r r e n t S t a t u s A n d N e w D e v e l o p m e n t s p 1 1 を参照されたい)。

30

40

【 0 3 6 0 】

アントラシクリンの非限定的な例としては、ドキソルピシン、エピルピシン、イダルピシン、ダウノマイシン、ネモルピシン、及びそれらの誘導体が挙げられる。ダウノルピシン及びドキソルピシンの免疫複合体及びプロドラッグが調製され、試験されてきた(K r a t z e t a l (2 0 0 6) C u r r e n t M e d . C h e m . 1 3 : 4 7 7 - 5 2 3 、 J e f f r e y e t a l (2 0 0 6) B i o o r g a n i c & M e d . C h e m . L e t t e r s 1 6 : 3 5 8 - 3 6 2 、 T o r g o v e t a l (2 0 0 5) B

50

ioconj. Chem. 16: 717-721, Nagy et al (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 829-834, Dubowchik et al (2002) Bioorg. & Med. Chem. Letters 12: 1529-1532, King et al (2002) J. Med. Chem. 45: 4336-4343, EP0328147, US6630579)。抗体-薬物複合体BR96-ドキソルピシンは、腫瘍関連抗原ルイス-Yと特異的に反応し、I相及びII相試験において評価された (Saleh et al (2000) J. Clin. Oncology 18: 2282-2292, Ajani et al (2000) Cancer Jour. 6: 78-81, Tolcher et al (1999) J. Clin. Oncology 17: 478-484)。

10

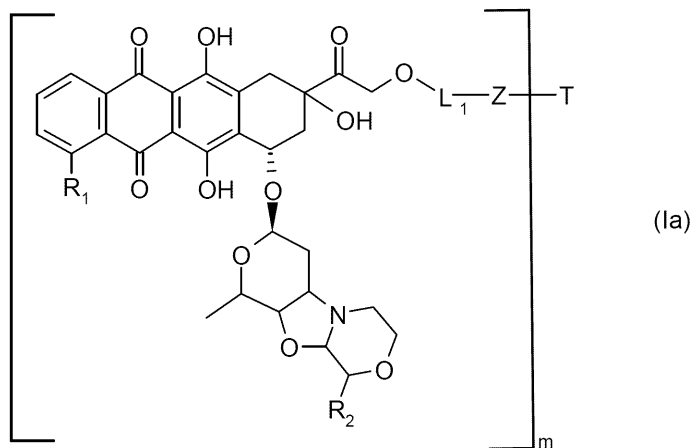
【0361】

PNU-159682は、ネモルピシンの有力な代謝物(または誘導体)である (Quintieri, et al. (2005) Clinical Cancer Research 11(4): 1608-1617)。ネモルピシンは、ドキソルピシンのグリコシドアミノ上に2-メトキシモルホリノ基を有するドキソルピシンの半合成類似体であり、臨床評価中であり (Grandi et al (1990) Cancer Treat. Rev. 17: 133, Ripamonti et al (1992) Brit. J. Cancer 65: 703) (肝細胞癌についてのII相/III相試験を含む (Sun et al (2003)), Proceedings of the American Society for Clinical Oncology 22, Abs 1448, Quintieri (2003) Proceedings of the American Association of Cancer Research, 44: 1st Ed, Abs 4649, Pacciarini et al (2006) Jour. Clin. Oncology 24: 14116)。

20

【0362】

ネモルピシンまたはネモルピシン誘導体を含むADCの非限定的な例は、式Ia:



30

に示され、式中、 R_1 は、水素原子、ヒドロキシ、またはメトキシ基であり、 R_2 は、 $C_1 \sim C_5$ アルコキシ基、またはその薬学的に許容される塩であり、 L_1 及びZは一緒に、本明細書に記載されるリンカー(L)であり、Tは、本明細書に記載される抗体(Ab)であり、mは、1~約20である。いくつかの実施形態において、mは、1~10、1~7、1~5、または1~4である。

40

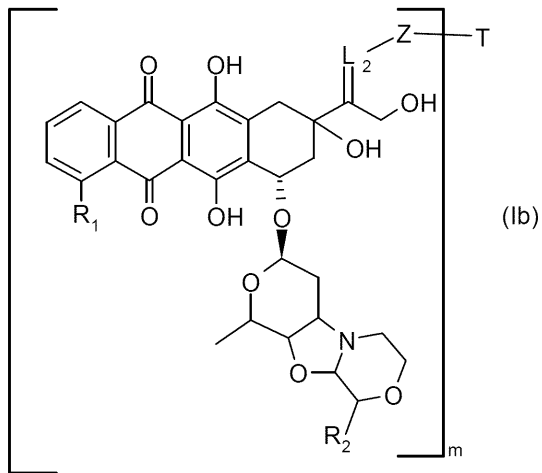
【0363】

いくつかの実施形態において、 R_1 及び R_2 の両方がメトキシ(-OMe)である。

【0364】

ネモルピシンまたはネモルピシン誘導体を含むADCのさらに非限定的な例は、式Ib:

50



10

に示され、式中、 R_1 は、水素原子、ヒドロキシ、またはメトキシ基であり、 R_2 は、 $C_1 \sim C_5$ アルコキシ基、またはその薬学的に許容される塩であり、 L_2 及び Z は一緒に、本明細書に記載されるリンカー (L) であり、 T は、本明細書に記載される抗体 (Ab) であり、 m は、1 ~ 約 20 である。いくつかの実施形態において、 m は、1 ~ 10、1 ~ 7、1 ~ 5、または 1 ~ 4 である。

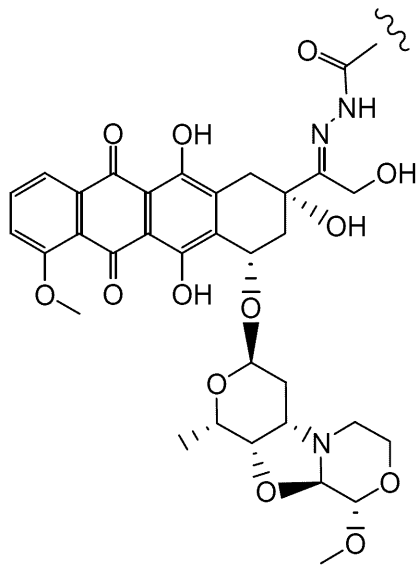
【0365】

20

いくつかの実施形態において、 R_1 及び R_2 の両方がメトキシ (-OMe) である。

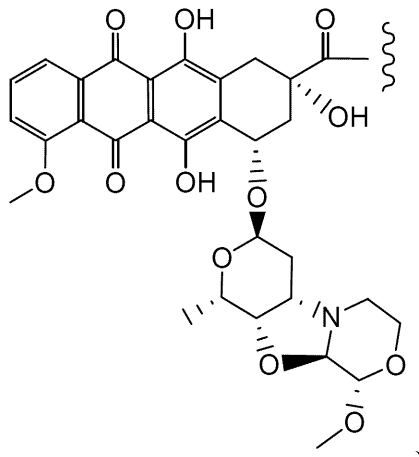
【0366】

いくつかの実施形態において、ネモルピシン含有ADCのネモルピシン成分は、PNU-159682である。いくつかのそのような実施形態において、ADCの薬物部分は、以下の構造：



10

、または



20

のうちの1つを有し得、式中、波線は、リンカー（L）への結合を示す。

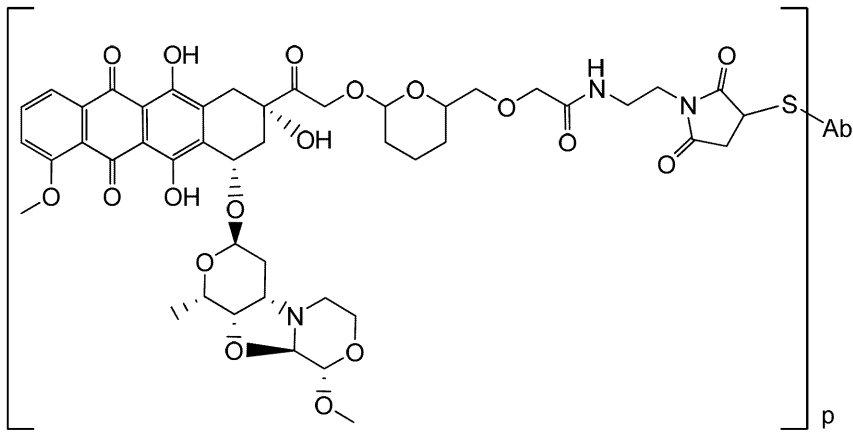
30

【0367】

PNU-159682を含むアントラシクリンは、いくつかの結合部位及び本明細書に記載されるリンカーを含む種々のリンカー（US第2011/0076287、WO2009/099741、US2010/0034837、WO2010/009124）を介して抗体にコンジュゲートされ得る。

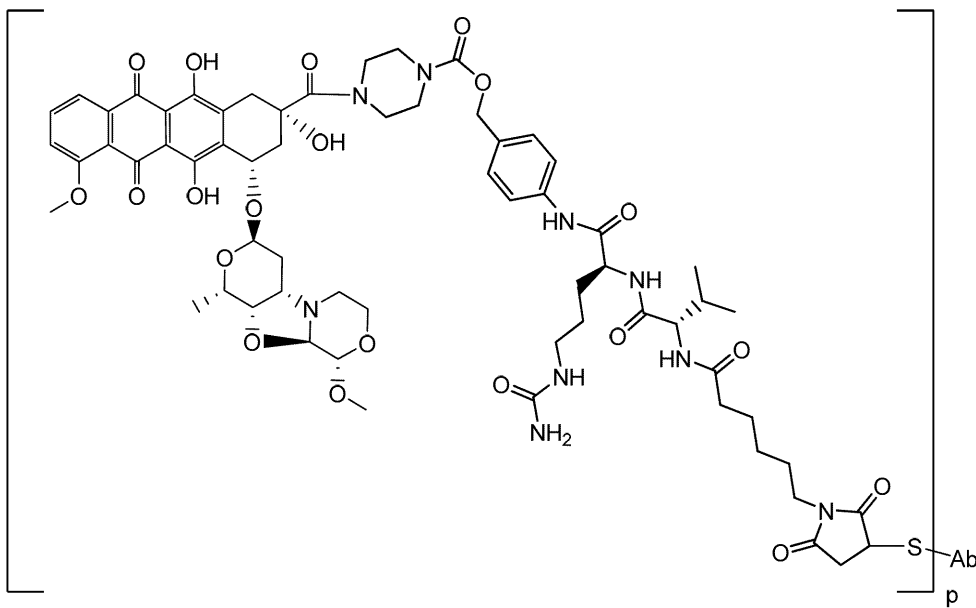
【0368】

ネモルピシン及びリンカーを含む例示的なADCとしては、



10

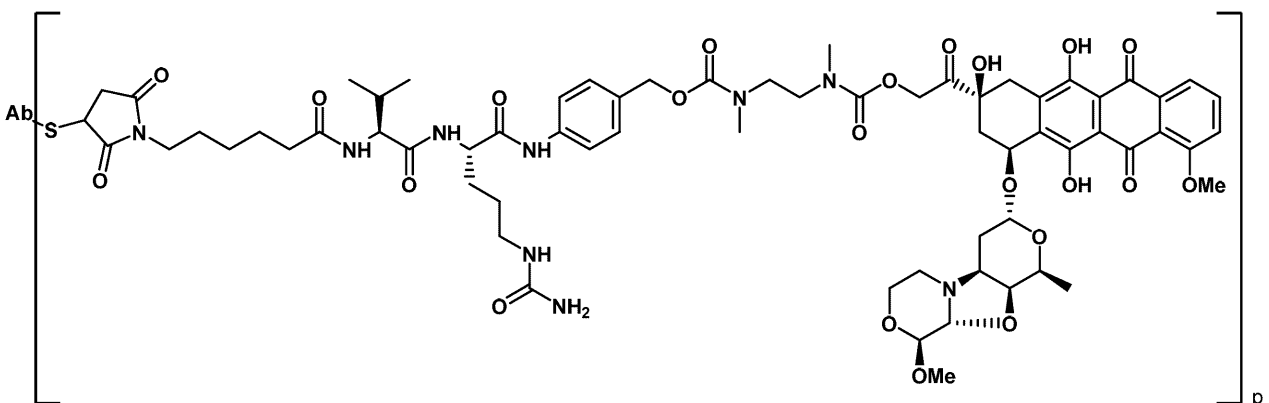
PNU-159682-maleimide ester-Ab、



20

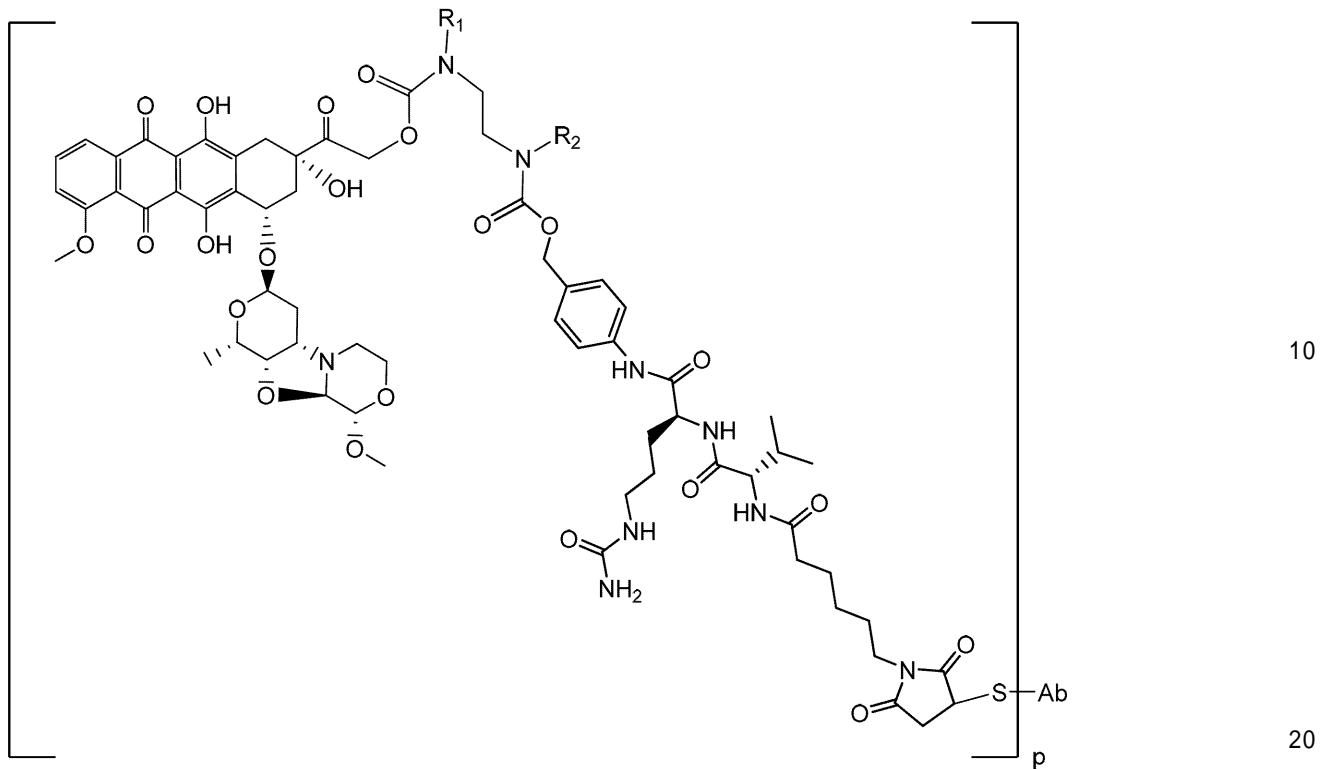
30

PNU-159682-val-cit-PAB-Ab、

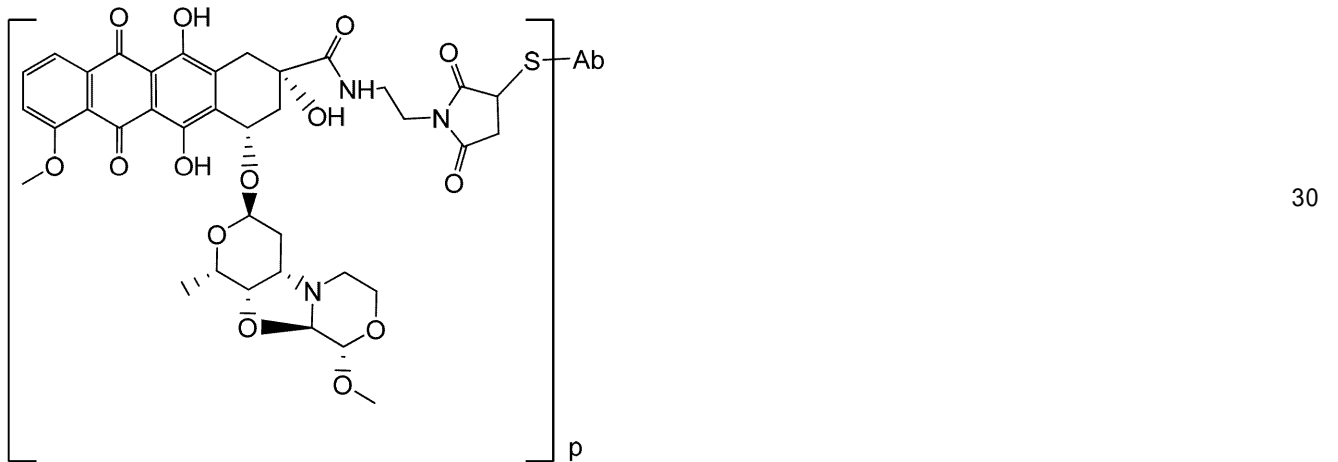


40

PNU-159682-val-cit-PAB-spacer-Ab、



PNU-159682-val-cit-PAB-スパーサ(R¹R²)-Abが含まれるが、これらに限定されず、式中、
R₁及びR₂は独立して、H及びC₁~C₆アルキル、及び

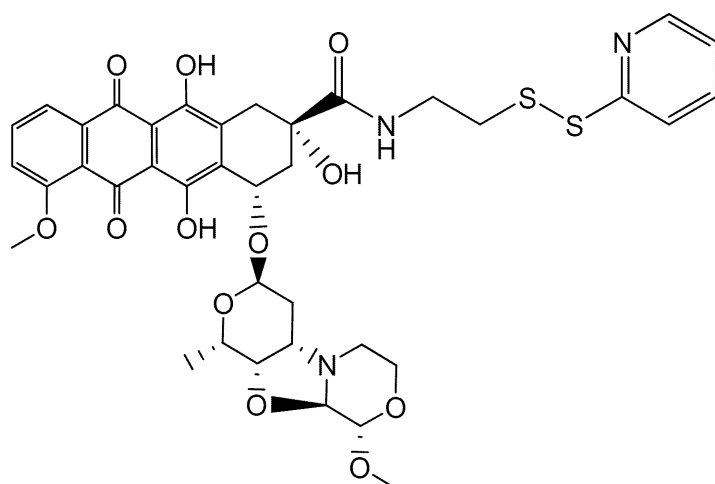


PNU-159682-マレイミド-Abから選択される。

【0369】

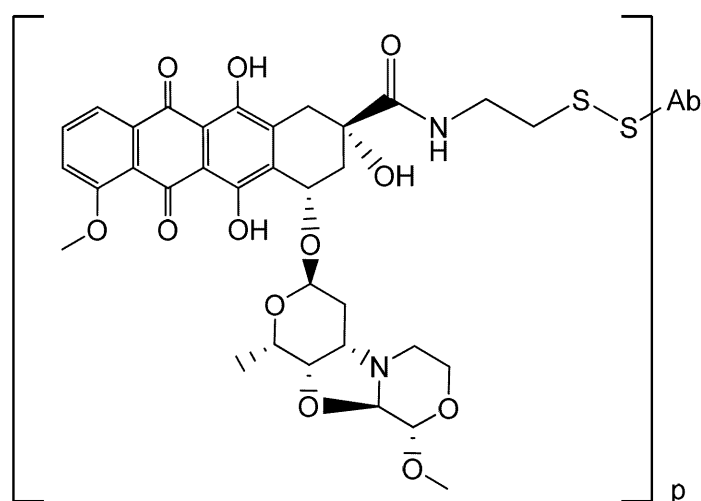
PBD二量体を含むADCのさらなる非限定的な例は、ピリジルジスルフィドPNUアミド(以下に示される)を抗体にコンジュゲートすることによって作製され、

40



10

それによってジスルフィド結合された PNU - 159682 抗体 - 薬物複合体 :



20

を産生することができる。

30

【0370】

PNU - 159682 マレイミドアセタール - Ab のリンカーは、酸不安定性である一方で、PNU - 159682 - val - cit - PAB - Ab、PNU - 159682 - val - cit - PAB - スペーサ - Ab、及び PNU - 159682 - val - cit - PAB - スペーサ (R¹ R²) - Ab のリンカーは、プロテアーゼ切断可能である。

【0371】

(6) 1 - (クロロメチル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1H - ベンゾ[e]インドール (CBI) 二量体薬物部分

いくつかの実施形態において、ADC は、1 - (クロロメチル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1H - ベンゾ[e]インドール (CBI) を含む。5 - アミノ - 1 - (クロロメチル) - 1, 2 - ジヒドロ - 3H - ベンゾ[e]インドール (アミノ CBI) クラスの DNA 小溝アルキル化剤は、有力な細胞傷害性薬剤であり (Atwell, et al (1999) J. Med. Chem., 42: 3400)、癌療法のために設計された多くのクラスのプロドラッグ中のエフェクター単位として利用されてきた。これらは、抗体複合体 (Jeffrey, et al. (2005) J. Med. Chem., 48: 1344)、ニトロベンジルカルバメートに基づく遺伝子療法のためのプロドラッグ (Hay, et al (2003) J. Med. Chem. 46: 2456)、及び低酸素活性化プロドラッグとしての対応するニトロ - CBI 誘導体 (Tercel, et al (2011) Angew. Chem., Int. Ed., 50: 2606 - 2609) を含んでいた。CBI 及びピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン (PBD) ファルマコフォアは

40

50

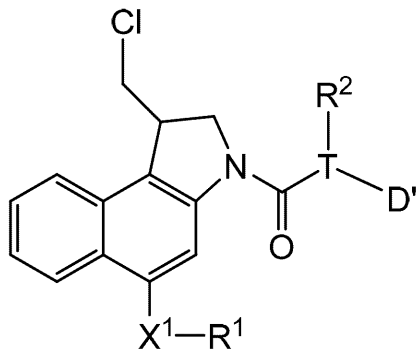
、アルキル鎖によって一緒に結合された (Tercelet et al (2003) J. Med. Chem. 46: 2132-2151)。

【0372】

いくつかの実施形態において、ADCは、1-(クロロメチル)-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドール(CBI)二量体を含む。いくつかのかかる実施形態において、二量体は、ヘテロ二量体であり、その二量体の半分がCBI部分であり、二量体のもう半分がPBD部分である。

【0373】

いくつかの実施形態において、CBI二量体は、式：



10

を含み、式中、

20

R^1 が、H、 $P(O)_3H_2$ 、 $C(O)NR^aR^b$ 、またはLへの結合から選択され、

R^2 が、H、 $P(O)_3H_2$ 、 $C(O)NR^aR^b$ 、またはLへの結合から選択され、

R^a 及び R^b が独立して、H及び1つ以上のFで任意に置換された $C_1 - C_6$ アルキルから選択されるか、または R^a 及び R^b は、5員または6員複素環基を形成し、

Tが、 $C_3 - C_{12}$ アルキレン、Y、($C_1 - C_6$ アルキレン) - Y - ($C_1 - C_6$ アルキレン)、($C_1 - C_6$ アルキレン) - Y - ($C_1 - C_6$ アルキレン) - Y - ($C_1 - C_6$ アルキレン)、($C_2 - C_6$ アルケニレン) - Y - ($C_2 - C_6$ アルケニレン)、及び($C_2 - C_6$ アルキニレン) - Y - ($C_2 - C_6$ アルキニレン)から選択されるテザー基であり、

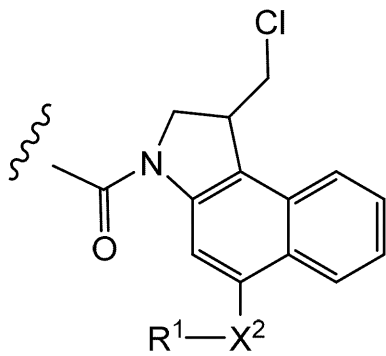
30

式中、Yが独立して、O、S、 NR^1 、アリール、及びヘテロアリールから選択され、

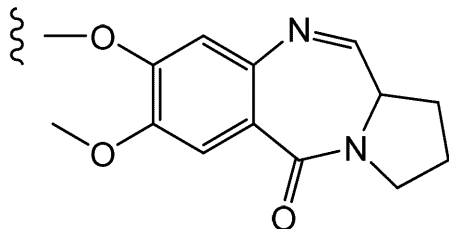
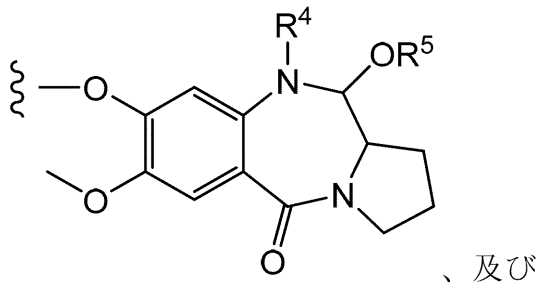
アルキレン、アルケニレン、アリール、及びヘテロアリールが独立してかつ任意に、F、OH、 $O(C_1 - C_6$ アルキル)、 NH_2 、 $NHCH_3$ 、 $N(CH_3)_2$ 、 $OP(O)_3H_2$ 、及び $C_1 - C_6$ アルキルで置換され、式中、アルキルが、1つ以上のFで任意に置換されるか、

またはアルキレン、アルケニレン、アリール、及びヘテロアリールが独立してかつ任意に、Lへの結合で置換され、

D が、



10



20

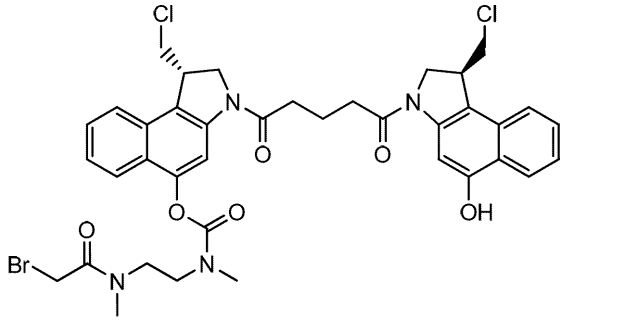
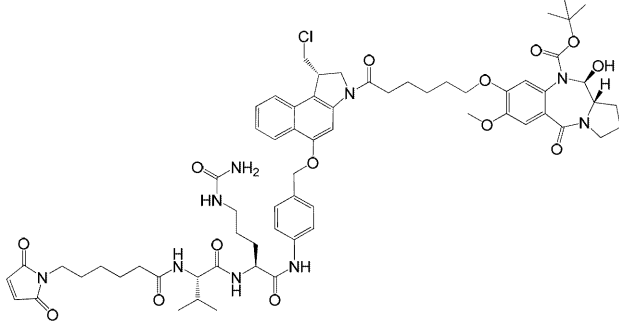
から選択される薬物部分であり、式中、波線が、Tへの結合部位を示し、
 X^1 及び X^2 が独立して、O 及び NR^3 から選択され、式中、 R^3 が、H、及び1つ以上のFで任意に置換される $C_1 - C_6$ アルキルから選択され、
 R^4 が、H、 CO_2R 、またはリンカー(L)への結合であり、式中、Rが、 $C_1 - C_6$ アルキル、またはベンジルであり、
 R^5 が、H、または $C_1 - C_6$ アルキルである。

30

【0374】

表Aのリンカー-薬物中間体51-86は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO2015/023355号の手順に従って、CBI二量体またはCBI/PBDヘテロ二量体薬物部分を、リンカー試薬とカップリングすることによって調製された。

表A リンカー-CBI二量体及びCBI/PBDヘテロ二量体薬物中間体51-86

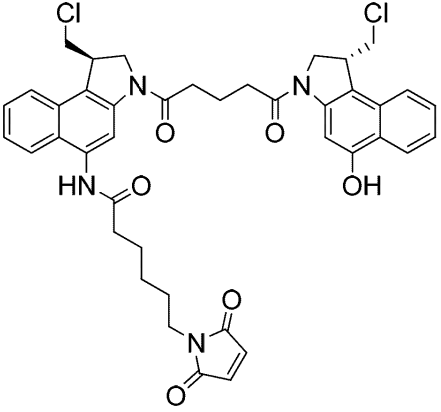
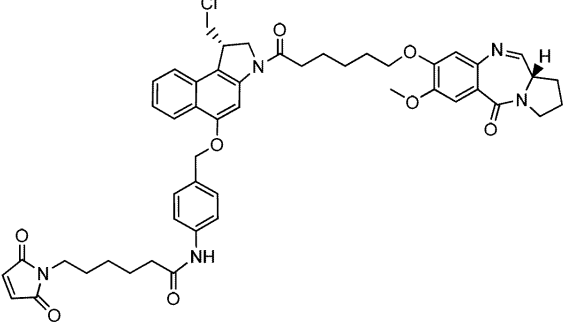
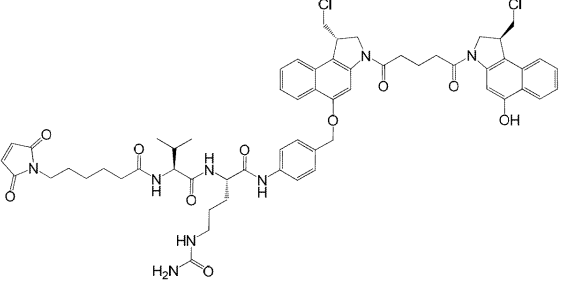
| 番号 | 構造 | 名称 |
|--------|--|--|
| 5 1 |  | <p>(S) - 1 - (クロロメチル) - 3 - (5 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - ヒドロキシ - 1H - ベンゾ [e] インドール - 3 (2H) - イル) - 5 - オキソペンタノイル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1H - ベンゾ [e] インドール - 5 - イル 2 - (2 - ブロモ - N - メチルアセトアミド) エチル (メチル) カルバメート</p> |
| 5 2 |  | <p>(11S, 11aS) - tert - ブチル 8 - (6 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - (4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) ヘキサナムイド) - 3 - メチルブタンアミド) - 5 - ウレイドペンタンアミド) ベンジルオキシ) - 1H - ベンゾ [e] インドール - 3 (2H) - イル) - 6 - オキソヘキシルオキシ) - 11 - ヒドロキシ - 7 - メトキシ - 5 - オキソ - 2, 3, 11, 11a - テトラヒドロ - 1H - ベンゾ [e] ピロロ [1, 2-a] [1, 4] ジアゼピン - 10 (5H) - カルボキシレート</p> |

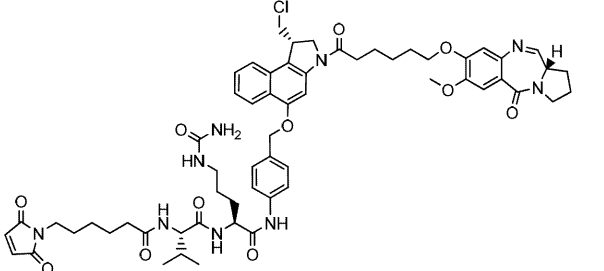
10

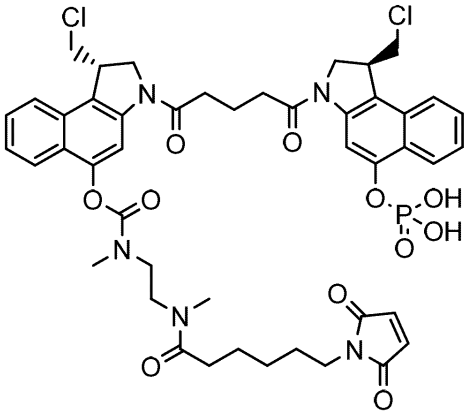
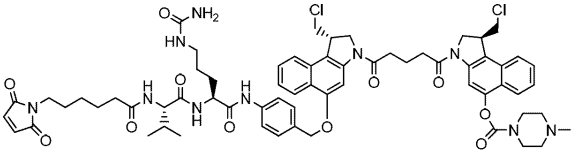
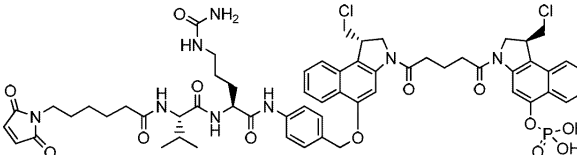
20

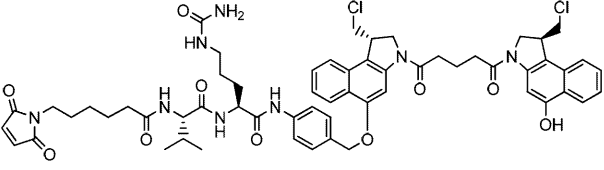
30

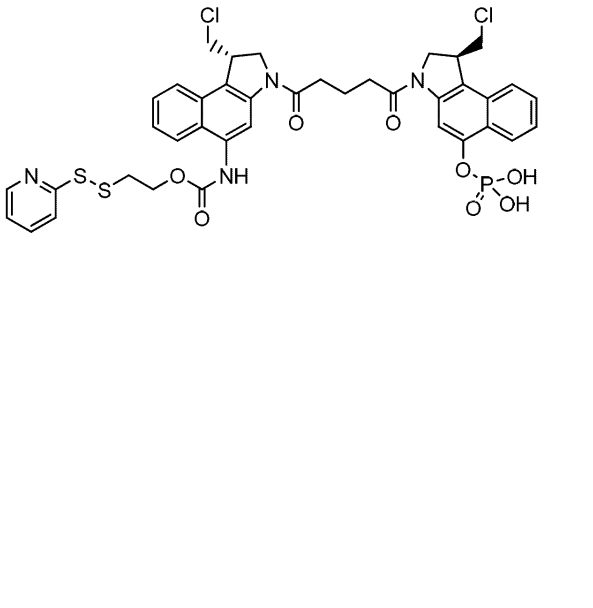
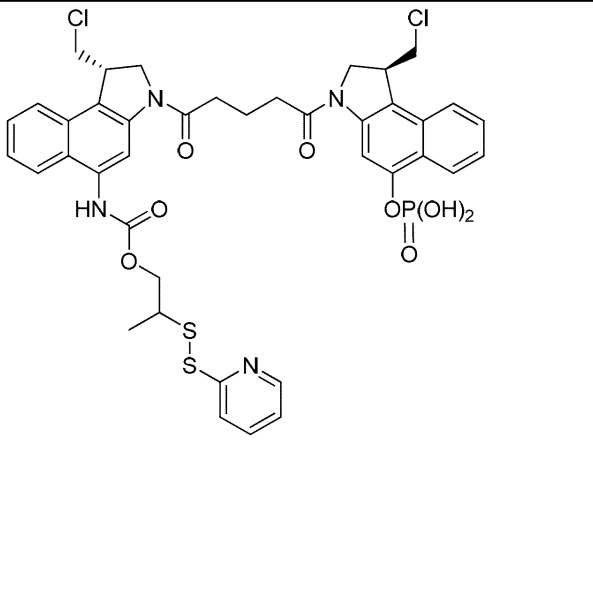
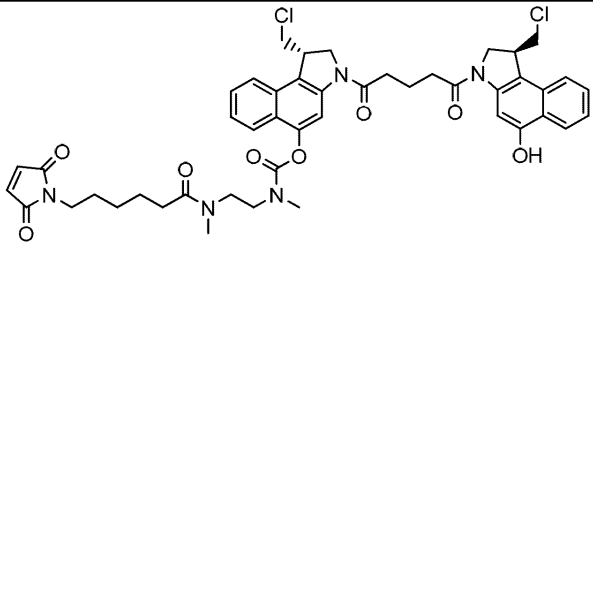
40

| | | | |
|--------|---|---|----|
| 5 3 |  | <p>N- (E-1-(クロロメチル)-3-(5-(E-1-(クロロメチル)-5-ヒドロキシ-1H-ベンゾ[e]インドール-3(2H)-イル)-5-オキソペンタノイル)-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドール-5-イル)-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサナムイド</p> | 10 |
| 5 4 |  | <p>N-(4-((S)-1-(クロロメチル)-3-(6-((S)-7-メトキシ-5-オキソ-2,3,5,11a-テトラヒドロ-1H-ベンゾ[e]ピロロ[1,2-a][1,4]ジアゼピン-8-イルオキシ)ヘキサノイル)-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドール-5-イルオキシ)メチル)フェニル)-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサナムイド</p> | 20 |
| 5 5 |  | <p>N-((S)-1-((S)-1-(4-((S)-1-(クロロメチル)-3-(5-((S)-1-(クロロメチル)-5-ヒドロキシ-1H-ベンゾ[e]インドール-3(2H)-イル)-5-オキソ</p> | 40 |

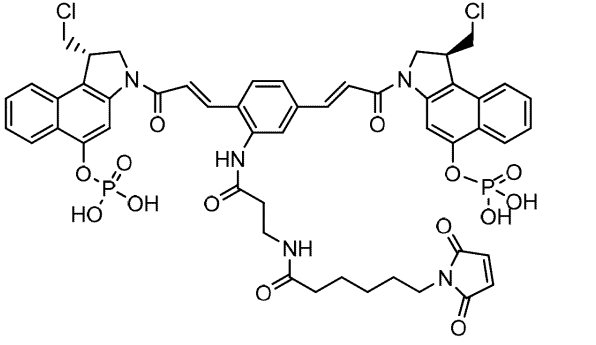
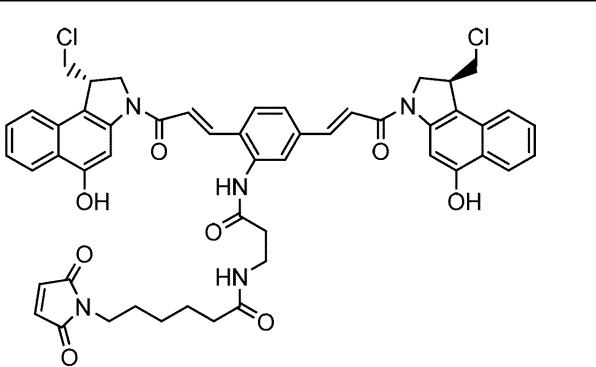
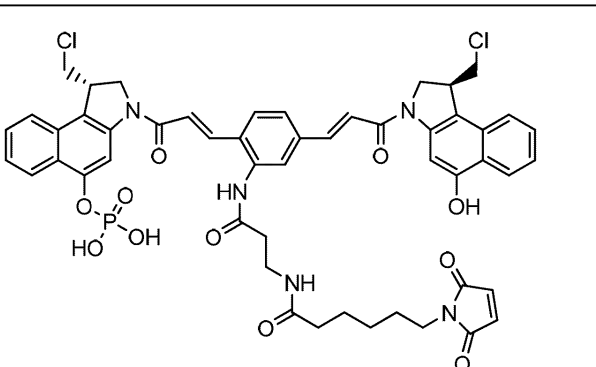
| | | | |
|--------|--|---|------------------------|
| | | <p>ペンタノイル) - 2, 3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドル-5-イルオキシ) メチル) フェニルアミノ) - 1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イルアミノ) - 3-メチル-1-オキソブタン-2-イル) - 6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) ヘキサンアミド</p> | 10 |
| 5 6 |  <p>The chemical structure shows a central core consisting of a benzene ring fused to a pyrrole ring. This core is substituted with a chlorine atom, a methoxy group, and a long chain containing a secondary amine and a primary amide. Another branch from the core is a 2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrole ring. A separate chain is attached to the secondary amine, featuring a 5-membered imidazole-like ring, a secondary amide, and a primary amide.</p> | <p>N- ((S) - 1 - ((S) - 1 - (4 - (((S) - 1 - (クロロメチル) - 3 - (6 - ((S) - 7 - メトキシ - 5 - オキソ - 2, 3, 5, 11a - テトラヒドロ - 1H - ベンゾ [e] ピロロ [1, 2 - a] [1, 4] ジアゼピン - 8 - イルオキシ) ヘキサノイル) - 2, 3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドル-5-イルオキシ) メチル) フェニルアミノ) - 1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イルアミノ) - 3-メチル-1-オキソブタン-2-イル) - 6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) ヘキサンアミド</p> | 20 30 40 |

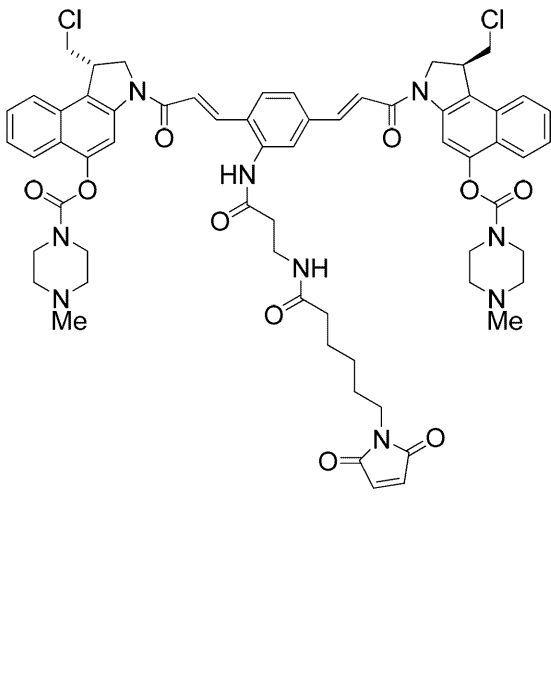
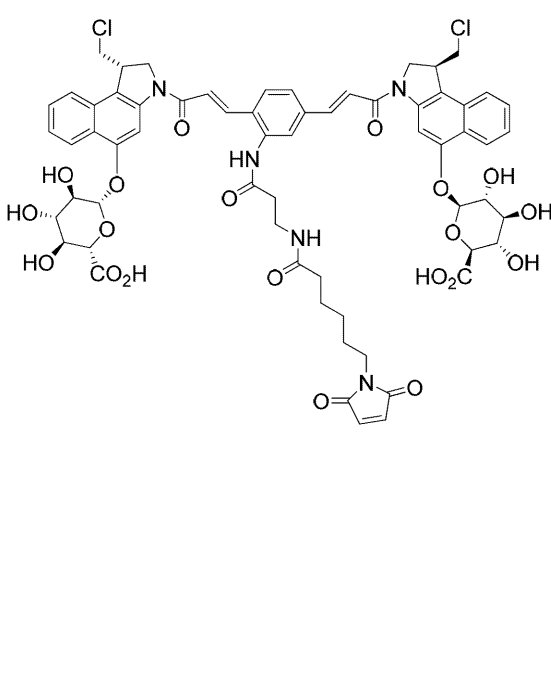
| | | | |
|--------|---|---|----|
| 5 7 |  | <p>(S) - 1 - (クロロメチル) - 3 - (5 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - (ホス ホノオキシ) - 1H-ベンゾ [e] インドール-3 (2H) -イル) - 5-オキソペンタノ イル) - 2, 3-ジヒドロ-1 H-ベンゾ [e] インドール- 5-イル2 - (6 - (2, 5- ジオキソ-2, 5-ジヒドロ- 1H-ピロール-1-イル) - N-メチルヘキサナムド) エ チル (メチル) カルバメート</p> | 10 |
| 5 8 |  | <p>(S) - 1 - (クロロメチル) - 3 - (5 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - (4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (6 - (2, 5-ジオキソ- 2, 5-ジヒドロ-1H-ピ ロール-1-イル) ヘキサニア ミド-3-メチルブタンアミ ド) - 5-ウレイドペンタンア ミド) ベンジルオキシ) - 1H -ベンゾ [e] インドール-3 (2H) -イル) - 5-オキソ ペンタノイル) - 2, 3-ジヒ ドロ-1H-ベンゾ [e] イン ドール-5-イル4-メチルピ ペラジン-1-カルボキシレー ト</p> | 20 |
| 5 9 |  | <p>(S) - 1 - (クロロメチル) - 3 - (5 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - (4 -</p> | 40 |

| | | | |
|----|--|---|----------------|
| | | <p>((S) - 2 - ((S) - 2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサナムイド - 3 - メチルブタンアミド) - 5 - ウレイドペンタンアミド) ベンジルオキシ) - 1 H - ベンゾ [e] インドール - 3 (2 H) - イル) - 5 - オキソペンタノイル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - ベンゾ [e] インドール - 5 - イルリン酸二水素</p> | 10 |
| 60 |  | <p>N - ((S) - 1 - ((S) - 1 - (4 - (((S) - 1 - (クロロメチル) - 3 - (5 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - ヒドロキシ - 1 H - ベンゾ [e] インドール - 3 (2 H) - イル) - 5 - オキソペンタノイル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - ベンゾ [e] インドール - 5 - イルオキシ) メチル) フェニルアミノ) - 1 - オキソ - 5 - ウレイドペンタン - 2 - イルアミノ) - 3 - メチル - 1 - オキソブタン - 2 - イル) - 6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサナムイド</p> | 20 30 40 |

| | | | |
|--------|---|--|----|
| 6 1 |  | <p>2- (' 97ミダゾール-2-イルジスルファニル) エチル (S) -1- (クロロメチル) -3- (5- ((S) -1- (クロロメチル) -5- (ホスホノオキシ) -1H-ベンゾ [e] インドール-3 (2H) -イル) -5-オキソペンタノイル) -2, 3-ジヒドロ-1H-ベンゾ [e] インドール-5-イルカルバメート</p> | 10 |
| 6 2 |  | <p>2- (' 97ミダゾール-2-イルジスルファニル) プロピル (S) -1- (クロロメチル) -3- (5- ((S) -1- (クロロメチル) -5- (ホスホノオキシ) -1H-ベンゾ [e] インドール-3 (2H) -イル) -5-オキソペンタノイル) -2, 3-ジヒドロ-1H-ベンゾ [e] インドール-5-イルカルバメート</p> | 20 |
| 6 3 |  | <p>(S) -1- (クロロメチル) -3- (5- ((S) -1- (クロロメチル) -5-ヒドロキシー-1H-ベンゾ [e] インドール-3 (2H) -イル) -5-オキソペンタノイル) -2, 3-ジヒドロ-1H-ベンゾ [e] インドール-5-イル 2- (6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -N-メチ</p> | 40 |

| | | | |
|--------|--|--|----------------|
| | | ルヘキサンアミド) エチル (メチル) カルバメート | |
| 6 4 | | 2 - (' 9 7 ミダゾール - 2 - イルジスルファニル) エチル (S) - 1 - (クロロメチル) - 3 - (5 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - ヒドロキシ - 1 H - ベンゾ [e] インドール - 3 (2 H) - イル) - 5 - オキソペンタノイル) - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 H - ベンゾ [e] インドール - 5 - イルカルバメート | 10 |
| 6 5 | | (11 a S) - 4 - ((S) - 6 - アミノ - 2 - ((S) - 2 - (6 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロロール - 1 - イル) ヘキサンアミド) - 3 メチルブタンアミド) ヘキサンアミド) ベンジル 8 - (6 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - (4 - メチルピペラジン - 1 - カルボニルオキシ) - 1 H - ベンゾ [e] インドール - 3 (2 H) - イル) - 6 - オキソヘキシルオキシ) - 1 1 - ヒドロキシ - 7 - メトキシ - 5 - オキソ - 2 , 3 , 1 1 , 1 1 a - テトラヒドロ - 1 H - ベンゾ [e] ピロロ [1 , 2 - a] [1 , 4] ジアゼピン - 1 0 (5 H) - カルボキシレート | 20 30 40 |

| | | | |
|--------|---|---|----|
| 6 6 |  | <p>N- (3- (2, 5-ビス (E-3- ((S)-1- (クロロメチル) -5-ホスホノオキシ-1H-ベンゾ [e] インドール-3 (2H) -イル) -3-オキソプロプ-1-エニル) フェニルアミノ) -3-オキソプロピル) -6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) ヘキサンアミド</p> | 10 |
| 6 7 |  | <p>N- (3- (2, 5-ビス (E-3- ((S)-1- (クロロメチル) -5-ヒドロキシ-1H-ベンゾ [e] インドール-3 (2H) -イル) -3-オキソプロプ-1-エニル) フェニルアミノ) -3-オキソプロピル) -6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) ヘキサンアミド</p> | 20 |
| 6 8 |  | <p>(S)-1- (クロロメチル) -3- (E-3- (4- (E-3- ((S)-1- (クロロメチル) -5-ヒドロキシ-1H-ベンゾ [e] インドール-3 (2H) -イル) -3-オキソプロプ-1-エニル) -2- (3- (6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) ヘキサンアミド) プロパンアミド) フェ</p> | 40 |

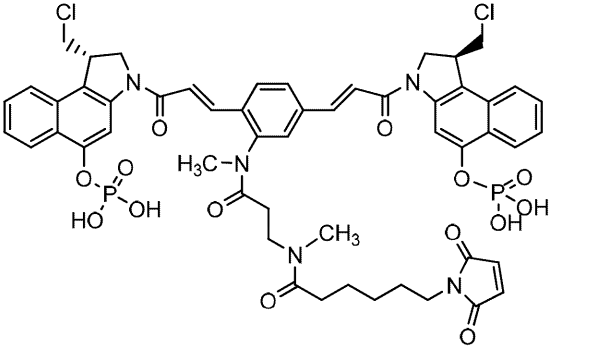
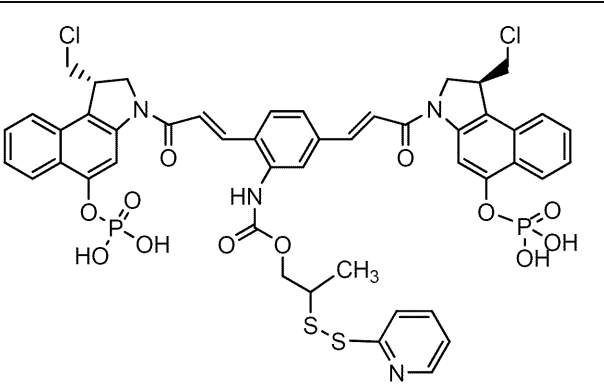
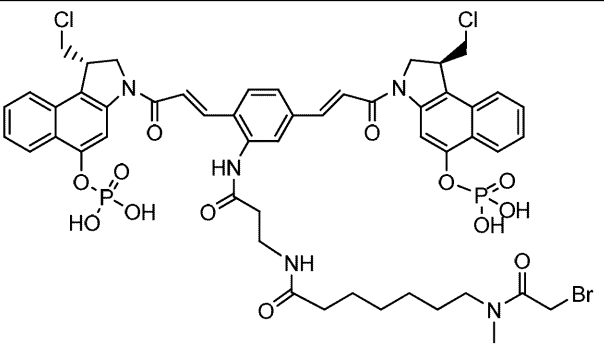
| | | |
|--------|---|---|
| | | ニル) アクリロイル) - 2, 3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドール-5-イルリン酸二水素 |
| 6 9 |  | N-(3-(2,5-ビス(E-3-(S)-1-(クロロメチル)-5-(4-メチルピペラジン-1-カルボニルオキシ)-1H-ベンゾ[e]インドール-3(2H)-イル)-3-オキソプロプ-1-エニル)フェニルアミノ)-3-オキソプロピル)-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサナムド |
| 7 0 |  | N-(3-(2,5-ビス(E-3-(S)-1-(クロロメチル)-5-(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-トリヒドロキシーテトラヒドロ-2H-ピラン-2-カルボキシル-6-オキシ)-1H-ベンゾ[e]インドール-3(2H)-イル)-3-オキソプロプ-1-エニル)フェニルアミノ)-3-オキソプロピル)-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサナムド |

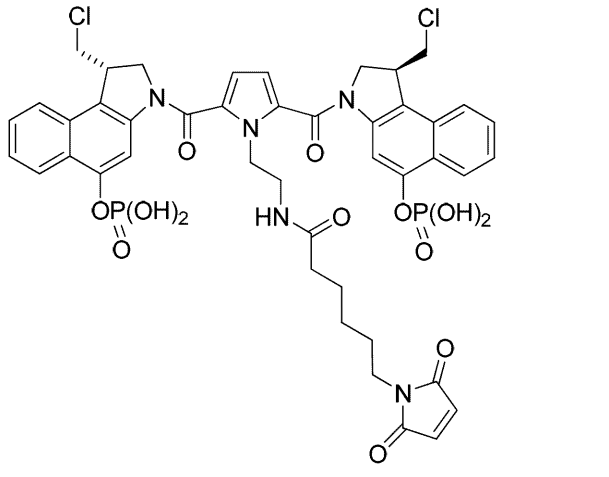
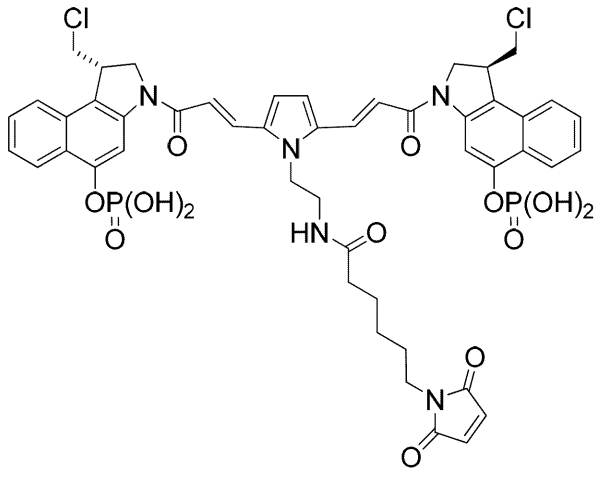
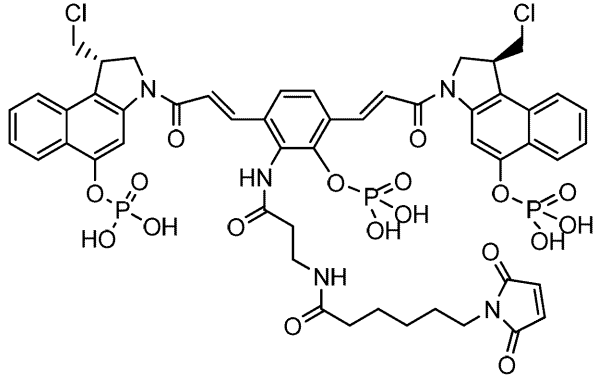
10

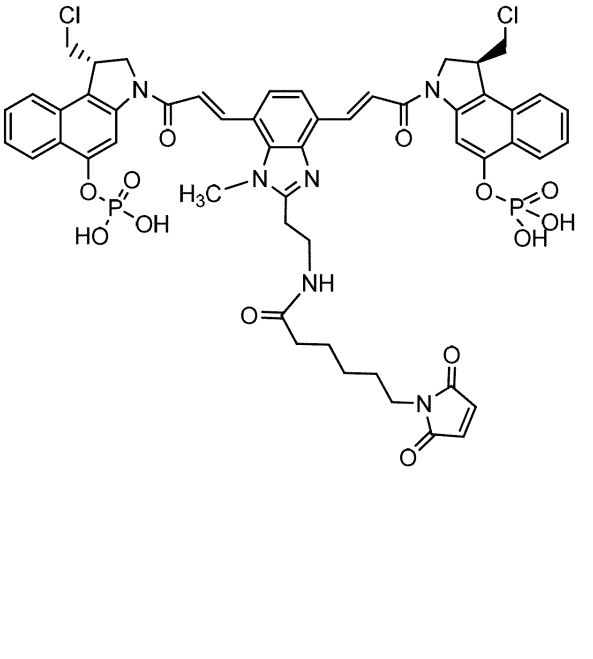
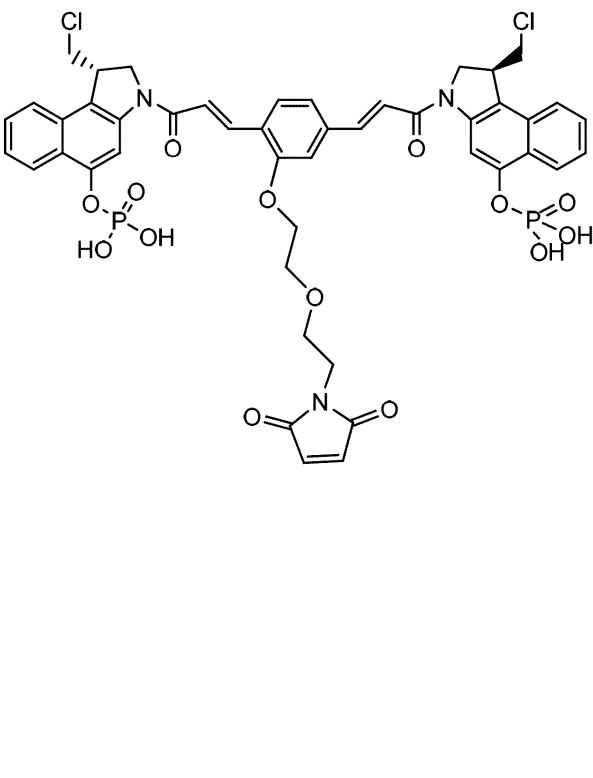
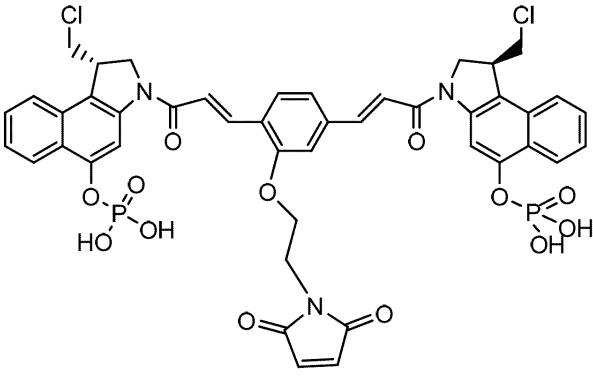
20

30

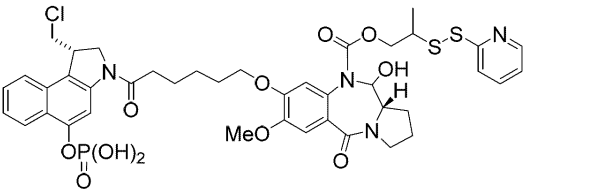
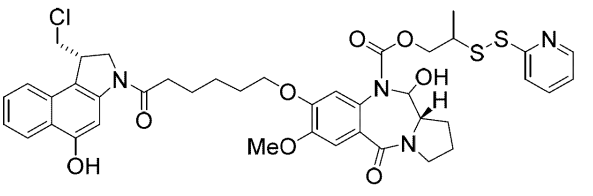
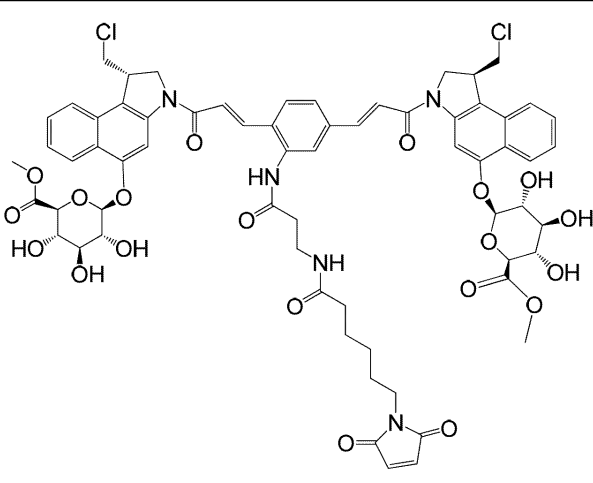
40

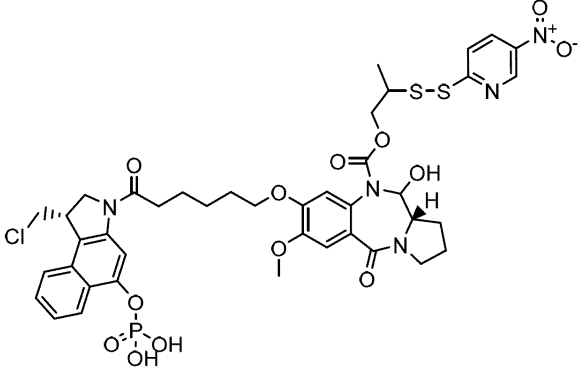
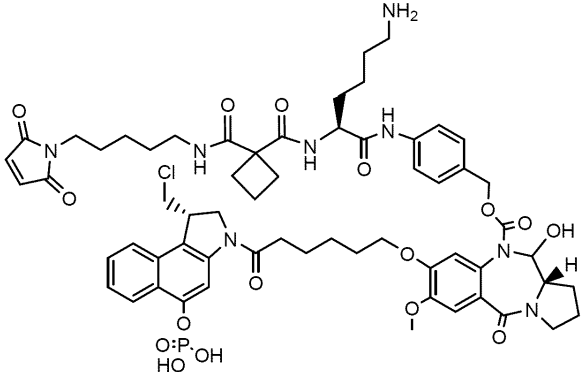
| | | | |
|--------|---|--|----|
| 7 1 |  | N- (3- (2, 5-ビス (E-3- ((S)-1- (クロロメチル) -5-ホスホノキシ-1H-ベンゾ [e] インドール-3 (2H) -イル) -3-オキソプロプ-1-エニル) フェニルアミノ) -6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -N-メチル-N- (3- (メチルアミノ) -3-オキソプロピル) ヘキサナムイド | 10 |
| 7 2 |  | 2- (' 99ミダゾール-2-イルジスルファニル) プロピル 2, 5-ビス (E-3- ((S)-1- (クロロメチル) -5- (ホスホノオキシ) -1H-ベンゾ [e] インドール-3 (2H) -イル) -3-オキソプロプ-1-エニル) フェニルカルバメート | 20 |
| 7 3 |  | N- (3- (2, 5-ビス (E-3- ((S)-1- (クロロメチル) -5-ホスホノキシ-1H-ベンゾ [e] インドール-3 (2H) -イル) -3-オキソプロプ-1-エニル) フェニルアミノ) -7- (2-ブロモ-N-メチルアセトアミド) -N- (3-オキソプロピル) ヘプタンアミド | 40 |

| | | | |
|--------|---|--|----|
| 7 4 |  | N- (2- (2, 5-ビス ((S) - 1- (クロロメチル) - 5-ホスホノオキシ- 2, 3-ジヒドロ-1H-ベンゾ [e] インドール-3-カルボニル) - 1H-ピロール-1-イル) エチル) - 6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) ヘキサンアミド | 10 |
| 7 5 |  | N- (2- (2, 5-ビス (E - 3- ((S) - 1- (クロロメチル) - 5-ホスホノオキシ- 1H-ベンゾ [e] インドール-3 (2H) -イル) - 3-オキソプロプ-1-エニル) - 1H-ピロール-1-イル) エチル) - 6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) ヘキサンアミド | 20 |
| 7 6 |  | N- (3- (2, 5-ビス (E - 3- ((S) - 1- (クロロメチル) - 5-ホスホノキシ- 1H-ベンゾ [e] インドール-3 (2H) -イル) - 3-オキソプロプ-1-エニル) フェニルアミノ, 2-ホスホノキシ) - 3-オキソプロピル) - 6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) ヘキサンアミド | 40 |

| | | | |
|--------|---|---|----|
| 7 7 |  | <p>N- (3- (2, 5-ビス (E-3- ((S) -1- (クロロメチル) -5-ホスホノオキシ-1H-ベンゾ [e] インドール-3 (2H) -イル) -3-オキソプロプ-1-エニル) -1-メチル-1H-ベンゾ [d] ' 101ミダゾール-2-イル) エチル) -6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) ヘキサンアミド</p> | 10 |
| 7 8 |  | <p>[(1S) -1- (クロロメチル) -3- [E-3- [4- [E-3- [(1S) -1- (クロロメチル) -5-ホスホノオキシ-1, 2-ジヒドロベンゾ [e] インドール-3-イル] -3-オキソプロプ-1-エニル] -2- [2- [2- (2, 5-ジオキソピロール-1-イル) エトキシ] エトキシ] フェニル] プロプ-2-エノイル] -1, 2-ジヒドロベンゾ [e] インドール-5-イル] リン酸二水素</p> | 20 |
| 7 9 |  | <p>[(1S) -1- (クロロメチル) -3- [E-3- [4- [E-3- [(1S) -1- (クロロメチル) -5-ホスホノオキシ-1, 2-ジヒドロベンゾ [e] インドール-3-イル] -3-オキソプロプ-1</p> | 40 |

| | | | |
|--------|--|---|----------|
| | | <p> -エニル] - 2 - [2 - [2 - (2, 5 -ジオキソピロール- 1 -イル) エトキシ] フェニ ル] プロプ- 2 -エノイル] - 1, 2 -ジヒドロベンゾ [e] インドール- 5 -イル] リン酸 二水素 </p> | 10 |
| 8 0 | | <p> 2 - (2 -ピリジルジスルファ ニル) プロピルN - [1 - (ク ロロメチル) - 3 - [5 - [1 - (クロロメチル) - 5 -ヒド ロキシ- 1, 2 -ジヒドロベン ズ [e] インドール- 3 -イル] - 5 -オキソ-ペンタノイ ル] - 1, 2 -ジヒドロベンゾ [e] インドール- 5 -イル] カルバメート </p> | 20 |
| 8 1 | | <p> 2 - (2 -ピリジルジスルファ ニル) プロピル 3 - [6 - [1 - (クロロメチル) - 5 - (4 -メチルピペラジン- 1 -カル ボニル) オキシ- 1, 2 -ジヒ ドロベンゾ [e] インドール- 3 -イル] - 6 -オキソ-ヘキ シオキシ] - 6 -ヒドロキシ- 2 -メトキシ- 1 1 -オキソ- 6 a, 7, 8, 9 -テトラヒド ロ- 6 H -ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピ ン- 5 -カルボキシレート </p> | 30 40 |

| | | | |
|--------|---|--|----|
| 8 2 |  | 2 - (2 - ピリジルジスルファニル) プロピル 3 - [6 - [1 - (クロロメチル) - 5 - ホスホノオキシ - 1, 2 - ジヒドロベンゾ [e] インドール - 3 - イル] - 6 - オキソ - ヘキシオキシ] - 6 - ヒドロキシ - 2 - メトキシ - 1, 1 - オキソ - 6 a, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 6 H - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン - 5 - カルボキシレート | 10 |
| 8 3 |  | 2 - (2 - ピリジルジスルファニル) プロピル 3 - [6 - [1 - (クロロメチル) - 5 - ヒドロキシ - 1, 2 - ジヒドロベンゾ [e] インドール - 3 - イル] - 6 - オキソ - ヘキシオキシ] - 6 - ヒドロキシ - 2 - メトキシ - 1, 1 - オキソ - 6 a, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 6 H - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン - 5 - カルボキシレート | 20 |
| 8 4 |  | (1 S) - 1 - (クロロメチル) - 3 - ((2 E) - 3 - {4 - ((1 E) - 3 - { (1 S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - [(6 - メチル - β - D - グルコピラヌロノシル) オキシ] - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - ベンゾ [e] インドール - 3 - イル} - 3 - オキソ - 1 - プ | 40 |

| | | | |
|--------|---|--|----------|
| | | <p>ロペニル) - 2 - [(3 - { [6 - (2, 5 - ジオオキシ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピ ロール - 1 - イル) ヘキサノイ ル] アミノ } プロパノイル) ア ミノ] フェニル } - 2 - プロペ ノイル) - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - ベンゾ [e] インドール - 5 - イルメチル β - D - グル コピラノシドウロン酸塩</p> | 10 |
| 8 5 |  | <p>2 - ((5 - ニトロピリジン - 2 - イル) ジスルファニル) プ ロピル (1 1 a S) - 8 - ((6 - ((S) - 1 - (クロ ロメチル) - 5 - (ホスホノオ キシ) - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - ベンゾ [e] インドール - 3 - イル) - 6 - オキシヘキシ ル) オキシ) - 1 1 - ヒドロキ シ - 7 - メトキシ - 5 - オキシ - 2, 3, 1 1, 1 1 a - テト ラヒドロ - 1 H - ベンゾ [e] ピロロ [1, 2 - a] [1, 4] ジアゼピン - 1 0 (5 H) - カルボキシレート</p> | 20 30 |
| 8 6 |  | <p>4 - ((S) - 6 - アミノ - 2 - (1 - ((5 - (2, 5 - ジ オキシ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ペン チル) カルバモイル) シクロブ タン - 1 - カルボキシアミド) ヘキサナムイド) ベンジル (1 1 a S) - 8 - ((6 -</p> | 40 |

| | | |
|--|--|--|
| | | ((S)-1-(クロロメチル)-5-(ホスホノオキシ)-1,2-ジヒドロ-3H-ベンゾ[e]インドール-3-イル)-6-オキソヘキシル)オキシ)-11-ヒドロキシ-7-メトキシ-5-オキソ-2,3,11,11a-テトラヒドロ-1H-ベンゾ[e]ピロロ[1,2-a][1,4]ジアゼピン-10(5H)-カルボキシレート |
|--|--|--|

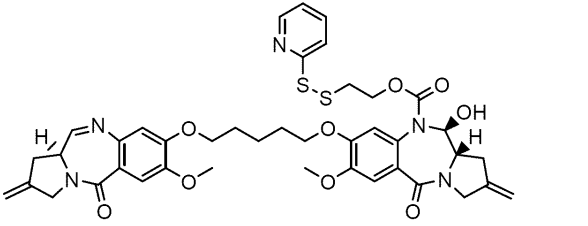
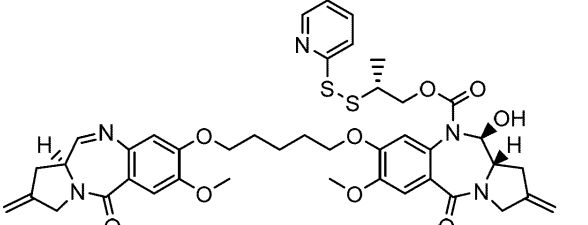
10

20

【0375】

表Bのリンカー-薬物中間体87及び88は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO2013/055987の手順に従って、PBD二量体薬物部分を、リンカー試薬とカップリングすることによって調製された。

表B PBD二量体薬物中間体87-88

| 番号 | 構造 | 名称 |
|--------|---|--|
| 8 7 |  | <p>2- (ピリジン-2-イルジスルファニル) エチル (11S, 11aS) -11-ヒドロキシ-7-メトキシ-8- ((5- ((S) -7-メトキシ-2-メチレン-5-オキソ-2, 3, 5, 11a-テトラヒドロ-1H-ベンゾ [e] ピロロ [1, 2-a] [1, 4] ジアゼピン-8-イル) オキシ) ペンチル) オキシ) -2-メチレン-5-オキソ-2, 3, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ベンゾ [e] ピロロ [1, 2-a] [1, 4] ジアゼピン-10 (5H) -カルボキシレート</p> |
| 8 8 |  | <p>(R) -2- (ピリジン-2-イルジスルファニル) プロピル (11S, 11aS) -11-ヒドロキシ-7-メトキシ-8- ((5- ((S) -7-メトキシ-2-メチレン-5-オキソ-2, 3, 5, 11a-テトラヒドロ-1H-ベンゾ [e] ピロロ [1, 2-a] [1, 4] ジアゼピン-8-イル) オキシ) ペンチル) オキシ) -2-メチレン-5-オキソ-2, 3, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ベンゾ</p> |

10

20

30

40

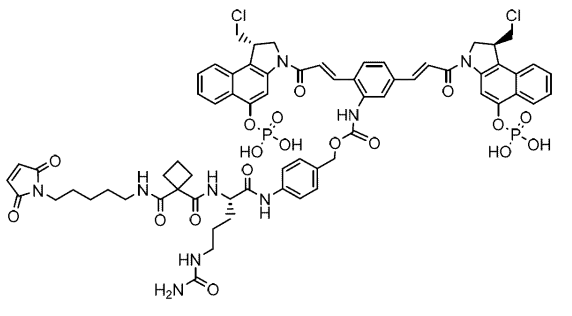
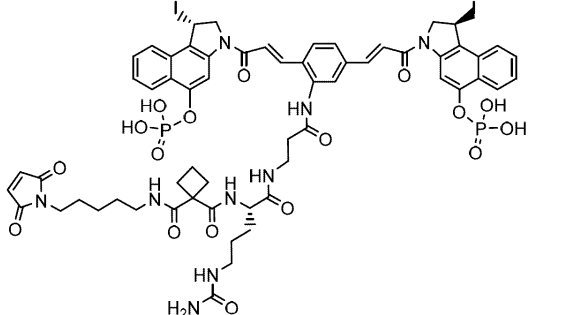
| | | |
|--|--|--|
| | | [e] ピロロ [1 , 2 - a] [1 , 4] ジアゼピン - 1 0 (5 H) - カルボキシレート |
|--|--|--|

10

【 0 3 7 6 】

表 C のリンカー - 薬物中間体 8 9 及び 9 0 は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる WO 2 0 1 5 / 0 9 5 2 2 7 の手順に従って、C B I 二量体薬物部分を、ペプチド模倣体リンカー試薬とカップリングすることによって調製された。

表 C C B I 二量体ペプチド模倣体リンカー薬物中間体 8 9 - 9 0

| 番号 | 構造 | 名称 |
|--------|---|--|
| 8 9 |  | <p>4 - ((S) - 2 - (1 - ((5 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ペンチル) カルバモイル) シクロブタン - 1 - カルボキシアミド) - 5 - ウレイドペンタンアミド) ベンジル (2, 5 - ビス ((E) - 3 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - (ホスホノオキシ) - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - ベンゾ [e] インドール - 3 - イル) - 3 - オキソプロップ - 1 - エン - 1 - イル) フェニル) カルバメート</p> |
| 9 0 |  | <p>(S) - 1 - (クロロメチル) - 3 - ((E) - 3 - (4 - ((E) - 3 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - (ホスホノオキシ) - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - ベンゾ [e] インドール - 3 - イル) - 3 - オキソプロップ - 1 - エン - 1 - イル) - 2 - (3 - ((S) - 2 - (1 - ((5 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ペンチル) カルバモイル) シクロブタン - 1 - カルボキシ</p> |

10

20

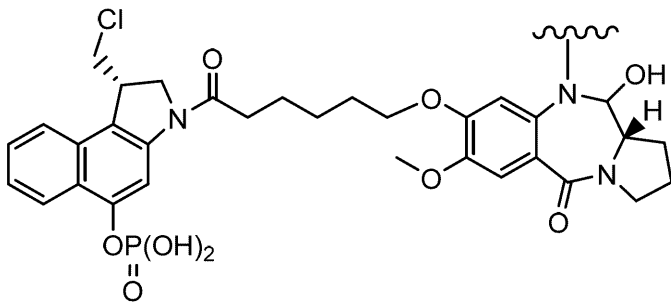
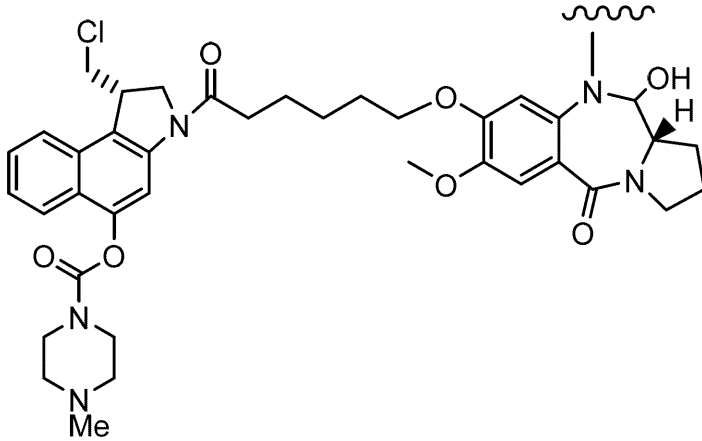
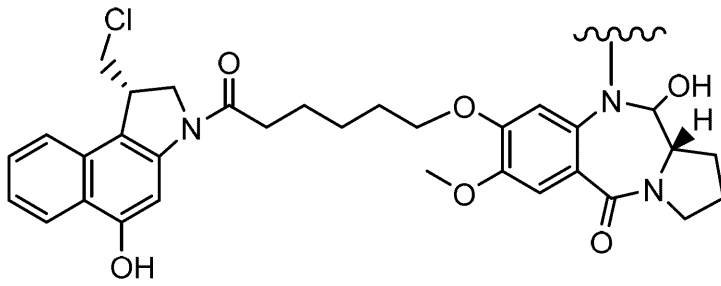
30

40

| | | |
|--|--|---|
| | | アミド) - 5 - ウレイドペン タンアミド) プロパンアミ ド) フェニル) アクリロイ ル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - ベンゾ [e] インドール - 5 - イルリン酸二水素 |
|--|--|---|

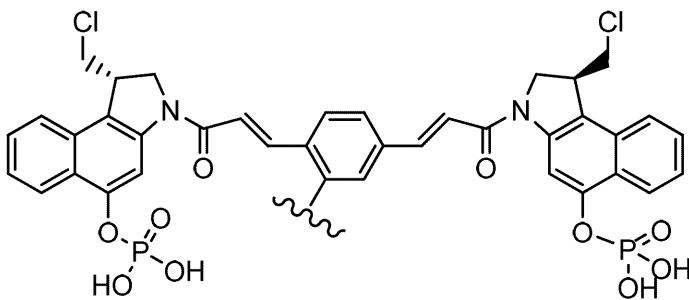
【 0 3 7 7 】

A D C の C B I 二量体部分の例としては、以下の C B I - P B D 二量体 :



、及び

以下のCBI-CBI二量体



が含まれるが、これらに限定されない（波線は、リンカーへの共有結合の部位を示す）。

【0378】

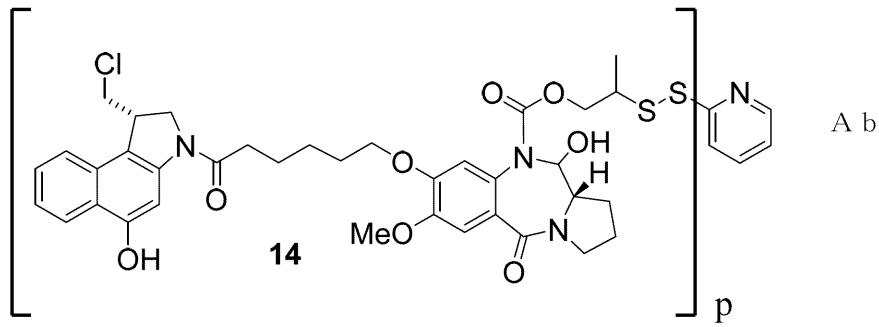
CBI二量体を含むADCの実施形態の非限定的な例は、以下の構造を有する。

10

20

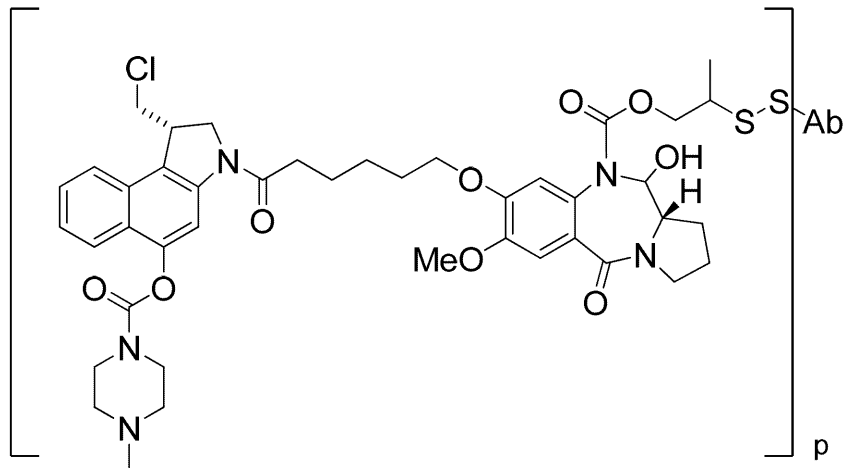
30

40



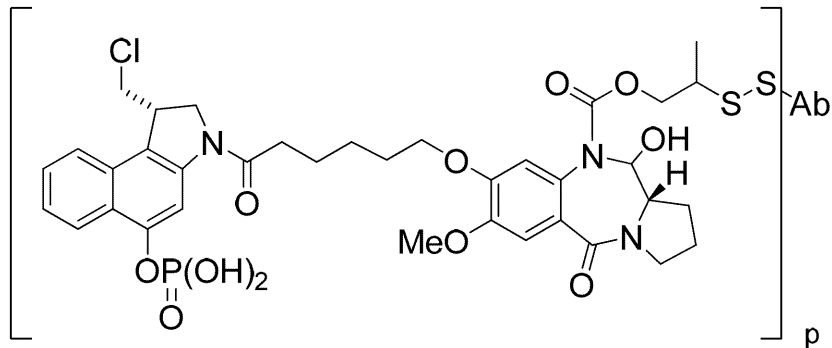
CBI-PBD-ジスルフィド-A b、または

10



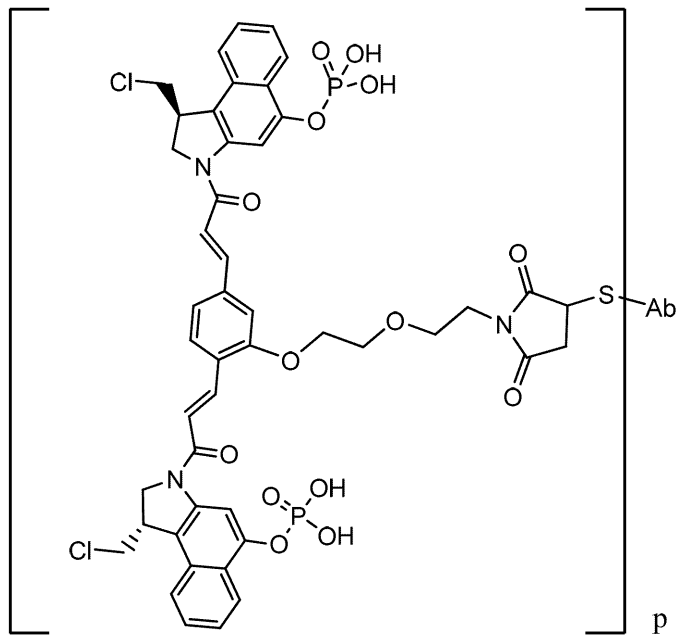
20

CBI-PBD (ピペラジーン-カルバメートプロドラッグ) -ジスルフィド-A b、



30

CBI-PBD (リン酸塩) -ジスルフィド-A b、及び



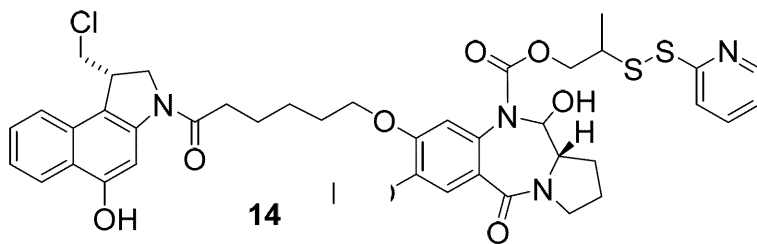
10

CBI-CBI (リン酸塩) - アセタール-マレイミド-Ab。

【0379】

20

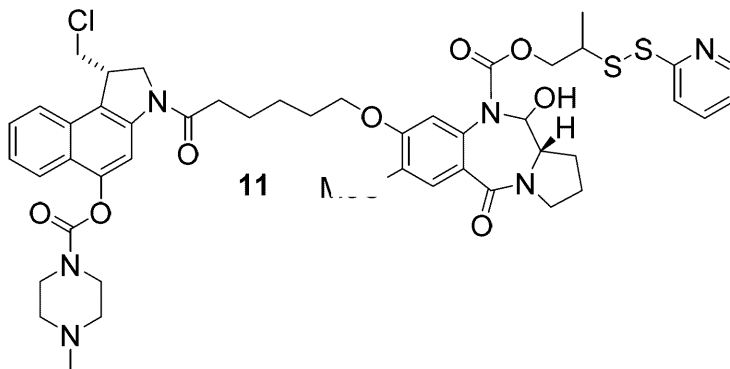
抗体にコンジュゲートされてADCを形成することができるCBI-PBDヘテロ二量体リンカー-薬物中間体の非限定的な例としては、



14

CBI-PBD-2-プロピルピリジルジスルフィド83、

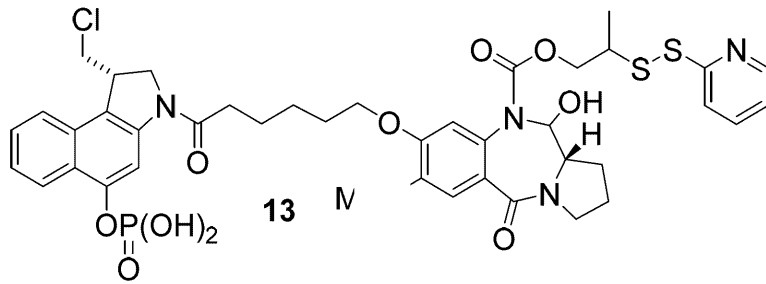
30



11

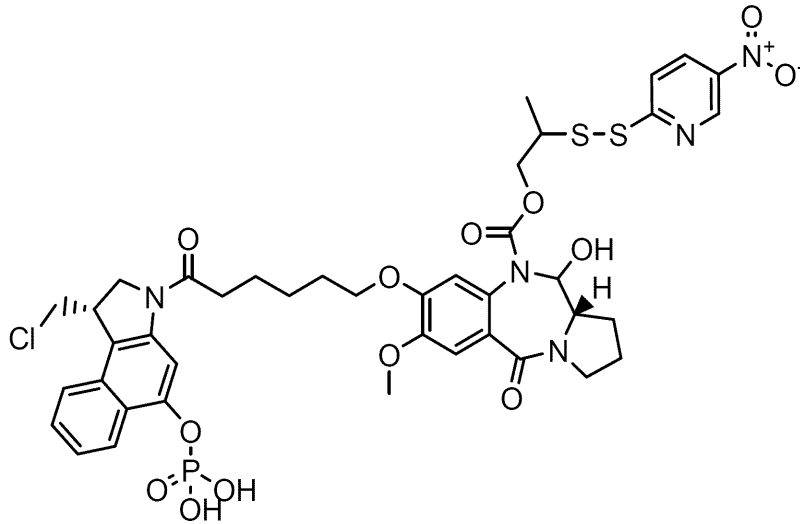
CBI-PBD (ピペラジン-カルバメートプロドラッグ) - 2-プロピルピリジルジスルフィド81、

40



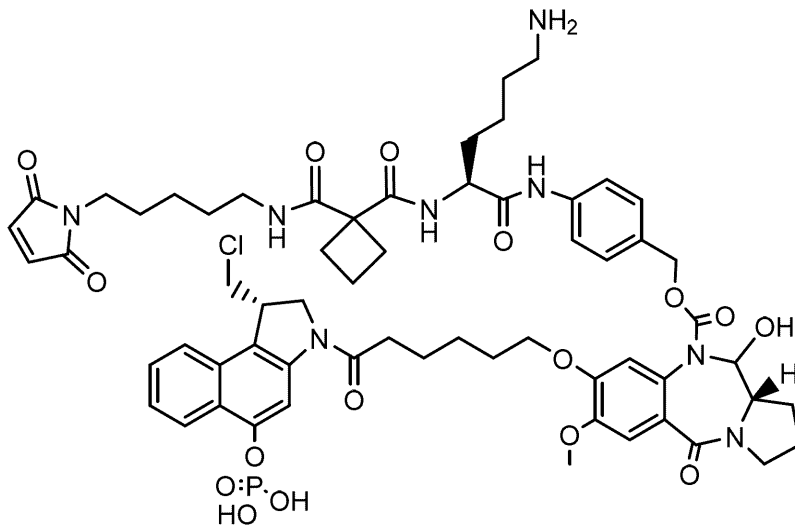
C B I - P B D - (リン酸塩) - 2 - プロピルピリジルジスルフィド 8 2、

10



20

C B I - P B D - (リン酸塩) - 2 - プロピル、ニトロピリジルジスルフィド 8 5、及び



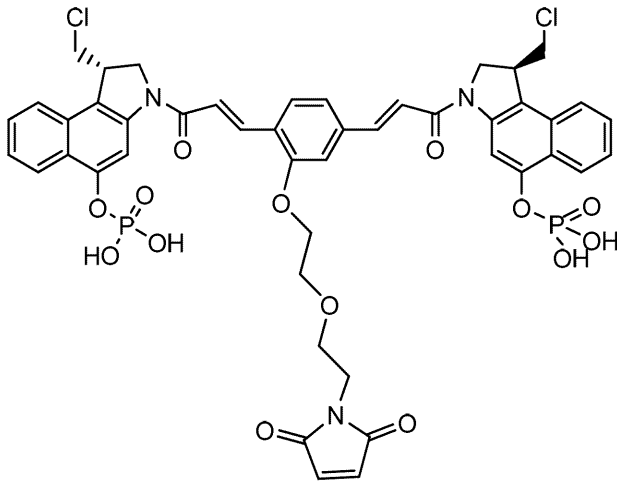
30

C B I - P B D - (リン酸塩) - ペプチド模倣体リンカー 8 6 が含まれるが、これらに限定されない。

40

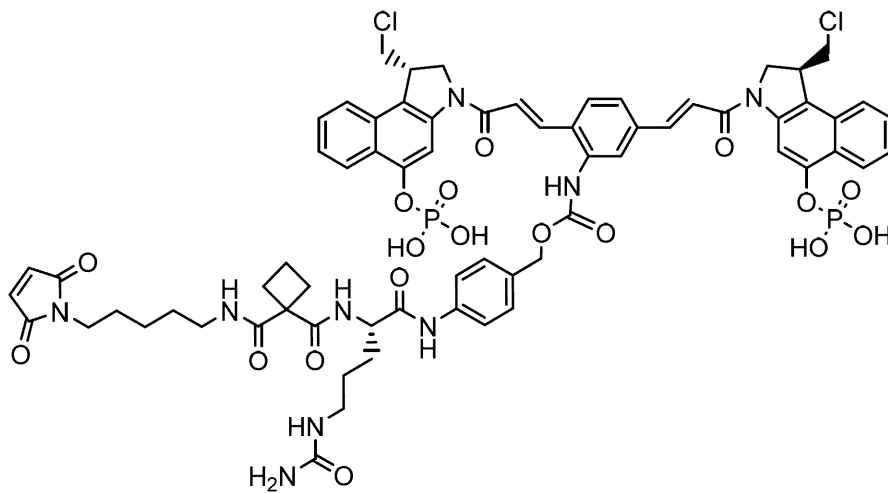
【0380】

抗体にコンジュゲートされてADCを形成することができるCBI-CBIホモ二量体リンカー-薬物中間体の非限定的な例としては、



10

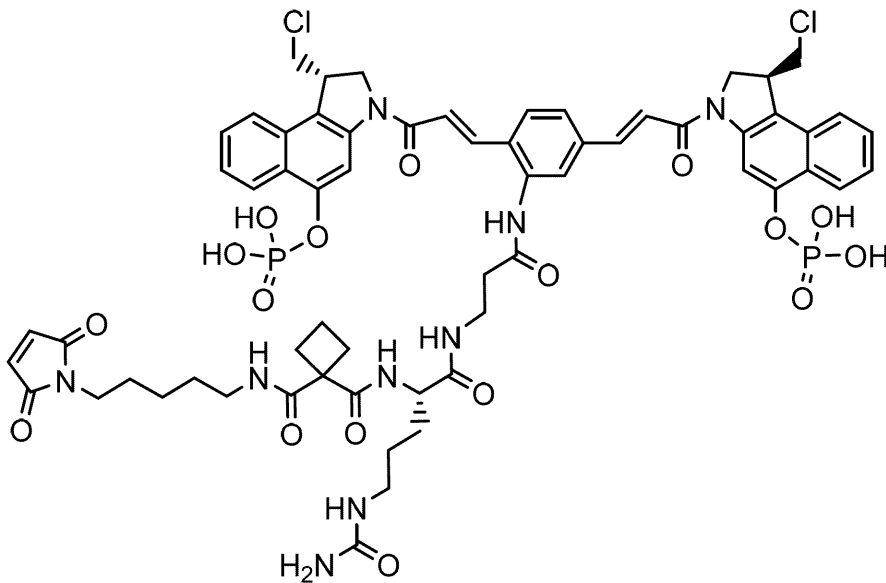
C B I - C B I (リン酸塩) - アセタール - マレイミド 78、



20

C B I - C B I (リン酸塩) - ペプチド模倣体 P A B リンカー 89、及び

30



40

C B I - C B I (リン酸塩) - ペプチド模倣体 E D A リンカー 90 が含まれるが、これらに限定されない。

【0381】

(7) アマトキシシン

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、1つ以上のアマトキシシン分子にコンジュ

50

ゲートされた抗体を含む。アマトキシンは、8個のアミノ酸からなる環状ペプチドである。それらは、タマゴテングダケ (*Amanita phalloide*) マッシュルームから単離され得るか、または合成的に調製され得る。アマトキシンは、哺乳動物細胞のDNA依存的RNAポリメラーゼIIを特異的に阻害し、それにより影響を受ける細胞の転写及びタンパク質生合成も阻害する。細胞内の転写の阻害により、成長及び増殖が停止する。例えば、Moldenhauer et al. JNCI 104:1-13 (2012)、WO2010115629、WO2012041504、WO2012119787、WO2014043403、WO2014135282、及びWO2012119787 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照されたい。いくつかの実施形態において、1つ以上のアマトキシン分子は、1つ以上の - アマニチン分子である。

10

【0382】

(8) 他の薬物部分

薬物部分は、ゲルダナマイシン (Mandler et al (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92 (19):1573-1581、Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028、Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、ならびに、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖 (緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来)、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、-サルシン、シナアブラギリ (*Aleurites fordii*) タンパク質、ジアンシンタンパク質、アメリカヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) タンパク質 (PAPI、PAPII、及びPAP-S)、ニガウリ (*Momordica charantia*) 阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ (*Saponaaria officinalis*) 阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコセセンが含まれるが、これらに限定されない酵素的活性毒素及びその断片も含む。例えば、WO93/21232を参照されたい。

20

【0383】

薬物部分は、核酸分解活性を有する化合物も含む (例えば、リボヌクレアーゼまたはDNAエンドヌクレアーゼ)。

30

【0384】

ある特定の実施形態において、免疫複合体は、放射活性原子を含み得る。種々の放射活性アイソトープは、放射性複合抗体の産生に使用可能である。例としては、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、及びLuの放射活性アイソトープが挙げられる。いくつかの実施形態において、免疫複合体が検出に使用される場合、シンチグラフィ試験のための放射活性原子、例えば、 Tc^{99} 若しくは I^{123} 、または核磁気共鳴 (NMR) 撮像 (磁気共鳴撮像 (MRI) としても知られる) のためのスピン標識、例えば、ジルコニウム - 89、ヨード - 123、ヨード - 131、インジウム - 111、フッ素 - 19、炭素 - 13、窒素 - 15、酸素 - 17、ガドリニウム、マンガン、または鉄を含み得る。ジルコニウム - 89は、様々な金属キレート剤に複合体化され得、例えば、PET撮像のために抗体にコンジュゲートされ得る (WO2011/056983号)。

40

【0385】

放射標識または他の標識が、既知の方法で免疫複合体に組み込まれてもよい。例えば、ペプチドは、例えば、1つ以上のフッ素 - 19原子を1つ以上の水素の代わりに含む好適なアミノ酸前駆体を使用して、生合成され得るか、または化学的に合成され得る。いくつかの実施形態において、 Tc^{99} 、 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、及び In^{111} 等の標識は、抗体内のシステイン残基を介して結合され得る。いくつかの実施形態において、 Y^{90} は、抗体のリシン残基を介して結合され得る。いくつかの実施形態において、IODOGEN法 (Fraker et al (1978) Biochem

50

. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 を使用して、ヨード - 123 を組み込むことができる。「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989) では、ある特定の他の方法を説明する。

【0386】

ある特定の実施形態において、免疫複合体は、プロドラッグ活性酵素にコンジュゲートされた抗体を含み得る。いくつかのかかる実施形態において、プロドラッグ活性酵素は、プロドラッグ(例えば、ペプチジル化学療法剤、WO81/01145を参照されたい)を、抗癌薬等の活性薬物に変換する。かかる免疫複合体は、いくつかの実施形態において、抗体依存的酵素媒介性プロドラッグ療法(「ADEPT」)において有用である。抗体にコンジュゲートされ得る酵素としては、リン酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用なアルカリホスファターゼ、硫酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用なアリアルスルファターゼ、非傷害性5-フルオロシトシンを抗癌薬、5-フルオロウラシルに変換するために有用なシトシンデアミナーゼ、ペプチド含有プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用なセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、及びカテプシン(例えば、カテプシンB及びL)等のプロテアーゼ、D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグを変換するために有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ、グリコシル化プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用な - ガラクトシダーゼ及びノイラミニダーゼ等の炭水化物切断酵素、 - ラクタムで誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するために有用な - ラクタマーゼ、ならびにそれらのアミン窒素において、フェノキシアセチル基またはフェニルアセチル基でそれぞれ誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するために有用なペニシリンVアミダーゼ及びペニシリンGアミダーゼ等のペニシリンアミダーゼが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、酵素は、当該技術分野において周知の組み換えDNA技法によって抗体に共有結合され得る。例えば、Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984)を参照されたい。

【0387】

c) 薬物負荷

薬物負荷は、式Iの分子における1抗体当たりの薬物部分の平均数である、pによって表される。薬物負荷は、1抗体当たり1~20個の薬物部分(D)の範囲であり得る。式IのADCは、1~20個の範囲の薬物部分とコンジュゲートされた抗体の集団を含む。複合反応からADCを調製する際の1抗体当たりの薬物部分の平均数は、質量分析法、ELISAアッセイ、及びHPLC等の従来手段によって特徴付けられてもよい。また、pの単位でのADCの定量分布が決定されてもよい。いくつかの事例において、pがある特定の値である同種のADCを、他の薬物負荷を有するADCから分離し、精製し、かつ特徴付けることは、逆相HPLCまたは電気泳動等の手段によって達成されてもよい。

【0388】

いくつかの抗体-薬物複合体では、pは、抗体上の結合部位の数によって限定され得る。例えば、上記のある特定の例示的な実施形態のように、結合がシステインチオールである場合、抗体は、1個のみ若しくは数個のシステインチオール基を有し得るか、または、1個のみ若しくは数個の反応性が十分なチオール基を有し得、それによって、リンカーが結合され得る。ある特定の実施形態において、薬物負荷がより高くなると、例えば、pが5超になると、ある特定の抗体-薬物複合体は凝集し、不溶性となり、毒性となるか、または細胞透過性が喪失し得る。ある特定の実施形態において、ADCの平均薬物負荷は、1~約8、すなわち約2~約6、または約3~約5の範囲である。実際、ある特定のADCでは、1抗体当たりの薬物部分の最適な比率は、8未満であり得、また約2~約5であり得ることが示されてきた(US7498298)。

【0389】

ある特定の実施形態において、理論上の最大数よりも少ない薬物部分が、複合反応中に抗体にコンジュゲートされる。抗体は、以下に考察されるように、例えば、薬物-リンカ

ー中間体またはリンカー試薬と反応しないリジン残基を含有し得る。一般に、抗体は、薬物部分に連結し得る多くの遊離及び反応性システインチオール基を含有せず、実際、抗体におけるほとんどのシステインチオール残基は、ジスルフィド架橋として存在する。ある特定の実施形態において、抗体は、ジチオスレイトール(DTT)またはトリカルボニルエチルホスフィン(TCEP)等の還元剤により、部分または完全還元条件下で還元されて、反応性システインチオール基が生成され得る。ある特定の実施形態において、本抗体は、リジンまたはシステイン等の反応性求核基を明らかにするために、変性条件に置かれる。

【0390】

ADCの負荷(薬物/抗体比)は、異なる方式で、ならびに例えば、(i)抗体と比較して比するモル過剰の薬物-リンカー中間体またはリンカー試薬を限定すること、(ii)複合反応時間または温度を限定すること、及び(iii)システインチオール修飾のための部分または限定的還元条件によって制御されてもよい。

10

【0391】

1個を超える求核基が薬物-リンカー中間体またはリンカー試薬と反応する場合、結果として生じる生成物は、抗体に結合する1個以上の薬物部分が分布するADC化合物の混合物であることを理解されたい。1抗体当たりの平均数薬物は、抗体及び薬物に特異的である二重ELISA抗体アッセイによって混合物から算出されてもよい。個々のADC分子は、質量分析法によって混合物中で特定され、HPLC、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって、分離されてもよい(例えば、McDonagh et al. (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7): 299-307、Hamblett et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10: 7063-7070、Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004、Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004を参照されたい)。ある特定の実施形態において、単一の負荷値を有する同種のADCが、電気泳動またはクロマトグラフィーによって複合混合物から単離されてもよい。

20

30

【0392】

d) 免疫複合体を調製するある特定の方法

式IのADCは、(1)抗体の求核基と二価リンカー試薬とを反応させて共有結合によってAb-Lを形成し、続いて薬物部分Dと反応させることと、(2)薬物部分の求核基と二価リンカー試薬とを反応させて、共有結合を介してD-Lを形成し、続いて抗体の求核基と反応させることとを含む、当業者に既知の有機化学反応、条件、及び試薬を用いるいくつかの経路によって調製されてもよい。後者の経路を介して式IのADCを調製するための例示的な方法は、US7498298に記載され、それは参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

40

【0393】

抗体上の求核基には、(i)N末端アミン基、(ii)側鎖アミン基、例えば、リジン、(iii)側鎖チオール基、例えば、システイン、及び(iv)抗体がグリコシル化される糖ヒドロキシルまたはアミノ基が含まれるが、これらに限定されない。アミン、チオ

50

ール、及びヒドロキシル基は、求核性であり、(i) NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート(haloformate)、及び酸ハロゲン化物等の活性エステル、(ii) ハロアセトアミド等のアルキル及びベンジルハロゲン化物、ならびに(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、及びマレイミド基を含む、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と反応して、共有結合を形成することが可能である。ある特定の抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、完全にまたは部分的に還元されるように、DTT(ジチオスレイトール)またはトリカルボニルエチルホスフィン(TCEP)等の還元剤での処理によって、リンカー試薬とのコンジュゲートに対して反応し得る。したがって、各システイン架橋は、理論上、2つの反応性のチオール求核剤を形成することになる。追加の求核基は、リジン残基の修飾によって、例えば、リジン残基と2-イミノチオラン(トラウト試薬(Traut's reagent))とを反応させて、アミンをチオールへと変換させることによって抗体中に導入することができる。反応性のチオール基もまた、1個、2個、3個、4個、またはそれ以上のシステイン残基を導入することによって(例えば、1個以上の非天然システインアミノ酸残基を含む変異形抗体を調製することによって)抗体中に導入され得る。

10

20

30

40

50

【0394】

本発明の抗体-薬物複合体はまた、アルデヒドまたはケトンカルボニル基等の抗体上の求電子基と、リンカー試薬または薬物上の求核基との間の反応によって産生されてもよい。リンカー試薬上の有用な求核基には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸塩、及びアリアルヒドラジドが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、抗体は、リンカー試薬または薬物上の求核置換基と反応することができる求電子部分を導入するように修飾される。別の実施形態において、グリコシル化抗体の糖を、例えば、過ヨウ素酸塩酸化試薬で酸化させて、リンカー試薬または薬物部分のアミン基と反応し得るアルデヒド基またはケトン基を形成してもよい。結果として生じるイミンシッフ塩基群は、安定した結合を形成し得るか、または例えば、水素化ホウ素試薬によって還元されて、安定したアミン結合を形成し得る。一実施形態において、グリコシル化された抗体の炭水化物部分と、ガラクトースオキシダーゼまたはメタ過ヨウ素酸ナトリウムのいずれかとを反応させると、抗体において、薬物上の適切な基と反応することができるカルボニル(アルデヒド及びケトン)基がもたらされ得る(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。別の実施形態において、N末端セリンまたはスレオニン残基を含有する抗体は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応し、それによって第1のアミノ酸の代わりにアルデヒドが産生され得る(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3: 138-146、米国公開特許第5362852号)。かかるアルデヒドと、薬物部分またはリンカー求核剤とを反応させることができる。

【0395】

薬物部分上の例示的な求核基には、(i) NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート、及び酸ハロゲン化物等の活性エステル、(ii) ハロアセトアミド等のアルキル及びベンジルハロゲン化物、ならびに(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、及びマレイミド基を含む、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と反応して、共有結合を形成することが可能なアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸塩、及びアリアルヒドラジド基が含まれるが、これらに限定されない。

【0396】

ADCを調製するために使用され得るクロスリンカー試薬の非限定的な例は、本明細書において、「例示的なリンカー」と題される節に記載される。かかるクロスリンカー試薬を使用して、タンパク質性部分及び化学部分を含む2つの部分を連結する方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、抗体及び細胞傷害性薬剤を含む融合タンパク質は、例えば、組み換え技法またはペプチド合成によって作製されてもよい。組み換えDNA分子は、互いに隣接しているか、または複合体の所望の特性を破壊しない

リンカーペプチドをコードする領域によって隔離されている、複合体の抗体及び細胞傷害性部分をコードする領域を含んでもよい。

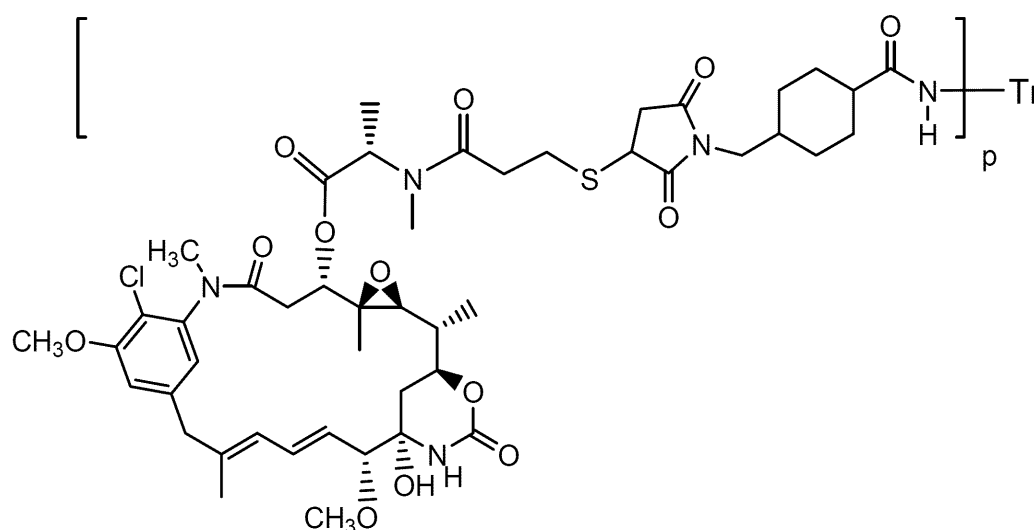
【0397】

さらに別の実施形態において、抗体は、腫瘍の事前標的化 (pre-targeting) において利用するために「受容体」(ストレプトアビジン等) にコンジュゲートされてもよく、この場合、その腫瘍の事前標的化において抗体-受容体複合体が患者に投与され、続いて除去剤を使用して血液循環から非結合複合体を除去し、次いで細胞傷害性薬剤 (例えば、薬物または放射性ヌクレオチド) にコンジュゲートされている「リガンド」(例えば、アビジン) が投与される。

【0398】

E. トラスツズマブ-MCC-DM1 及びペルツズマブ
トラスツズマブ-MCC-DM1 (T-DM1)

本発明は、トラスツズマブ-MCC-DM1 (T-DM1、トラスツズマブエムタンシンとも称される)、構造：



を有する抗体-薬物複合体 (Cas Reg. No. 139504-50-0) による治療的処置を含み、式中、Tr は、リンカー部分 MCC を介してマイタンシノイド薬物部分 DM1 に結合されたトラスツズマブである (US 5208020、US 6441163)。薬物対抗体の比または薬物負荷は、トラスツズマブ-MCC-DM1 の上記構造において p によって表され、1 ~ 約 8 の整数値の範囲である。トラスツズマブ-MCC-DM1 は、様々に負荷されかつ結合された抗体-薬物複合体の全ての混合物を含むが、この場合 1、2、3、4、5、6、7、及び 8 つの薬物部分が、抗体トラスツズマブに共有結合される (US 7097840、US 8337856、US 2005/0276812、US 2005/0166993)。

【0399】

トラスツズマブは、哺乳動物細胞 (チャイニーズハムスター卵巣、CHO) 懸濁培養によって産生され得る。HER2 (または c-erbB2) 癌原遺伝子は、上皮成長因子受容体に構造的に関連する、185 kDa の膜貫通受容体タンパク質をコードする。トラスツズマブは、マウス 4D5 抗体の、またはそれに由来する抗原結合残基を有する抗体である (ブダペスト条約下で ATCC CRL 10463、American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852) に 1990 年 5 月 24 日に寄託)。例示的なヒト化 4D5 抗体としては、US 5821337 のように、huMAb 4D5-1、huMAb 4D5-2、huMAb 4D5-3、huMAb 4D5-4、huMAb 4D5-5、huMAb 4D5-6、huMAb 4D5-7、及び huMAb 4D5-8 (トラスツズマブ、HERCEPTIN (登録商標)) が挙げられる。いくつかの実施形態において

、 T - D M 1 の抗体部分は、配列番号 3 0 及び配列番号 2 9 それぞれに示される軽鎖アミノ配列及び重鎖アミノ酸配列を含む。

【 0 4 0 0 】

トラスツズマブ - M C C - D M 1 は、例えば、米国特許出願公開第 2 0 1 1 0 1 6 5 1 5 5 号の実施例 1 に従って調製されてもよい。

【 0 4 0 1 】

一般命題として、1 用量当たり投与されるトラスツズマブ - M C C - D M 1 の最初の薬学的に有効な量は、患者の体重の約 0 . 3 ~ 1 5 m g / k g / 日の範囲内となる。

【 0 4 0 2 】

市販の T - D M 1 製剤 (K A D C Y L A (登録商標) 、アド - トラスツズマブエムタンシン) は、単回使用バイアル中の無菌の白色 ~ オフホワイトの保存剤を含まない結乾燥粉末である。各バイアルは、1 0 0 m g または 1 6 0 m g のアド - トラスツズマブエムタンシンを含有する。再構成に続いて、各単回使用バイアルは、アド - トラスツズマブエムタンシン (2 0 m g / m L) 、ポリソルベート 2 0 [0 . 0 2 % (w / v)] 、コハク酸ナトリウム (1 0 m M) 、及びスクロース [6 % (w / v)] を含有し、p H は 5 . 0 で密度は 1 . 0 2 6 g / m L である。得られる溶液は、2 0 m g / m L のアド - トラスツズマブエムタンシンを含有し、希釈後に静脈内点滴によって投与される。いくつかの実施形態において、アド - トラスツズマブエムタンシンは、3 週間毎に 3 . 6 m g / k g の用量で投与される。いくつかの実施形態において、アド - トラスツズマブエムタンシンは、毎週 2 . 4 m g / k g の用量で投与される。

【 0 4 0 3 】

ペルツズマブ組成物

ペルツズマブ組成物は、本明細書の以上で定義される主要種ペルツズマブ抗体と、その 1 つ以上の変異形との混合物を含む。ペルツズマブ主要種抗体の本明細書における好ましい実施形態は、配列番号 3 2 の軽鎖アミノ酸配列、及び配列番号 3 1 の重鎖アミノ酸配列を含むものである (それらの配列の脱アミド化変異形及び / または酸化変異形を含む) 。いくつかの実施形態において、この組成物は、主要種ペルツズマブ抗体と、アミノ末端リーダー伸長を含むそのアミノ酸配列変異形との混合物を含み、例えば、配列番号 3 4 の軽鎖アミノ酸配列、及び配列番号 3 3 の重鎖アミノ酸配列を含む。好ましくは、アミノ末端リーダー伸長は、抗体変異形の軽鎖上 (例えば、抗体変異形の 1 つまたは 2 つの軽鎖上) 30 にある。主要種 H E R 2 抗体または抗体変異形は、全長抗体または抗体断片 (例えば、F (a b) 2 断片の F a b) であり得るが、両方が全長抗体であることが好ましい。本明細書における抗体変異形は、その重鎖または軽鎖のうちの任意の 1 つ以上にアミノ末端リーダー伸長を含み得る。好ましくは、アミノ末端リーダー伸長は、抗体の 1 つまたは 2 つの軽鎖上にある。アミノ末端リーダー伸長は、好ましくは、V H S - - を含むか、またはそれからなる。組成物中のアミノ末端リーダー伸長の存在は、N 末端配列分析、電荷異質性についてのアッセイ (例えば、陽イオン交換クロマトグラフィーまたはキャピラリーゾーン電気泳動) 、質量分析等が含まれるが、これらに限定されない様々な分析技法によつて検出され得る。組成物中の抗体変異形の量は、一般に、変異形を検出するために使用される任意のアッセイ (好ましくは N 末端配列分析) の検出限界を構成する量 ~ 主要種抗体 40 の量未満の量の範囲である。一般に、組成物中の抗体分子の約 2 0 % 以下 (例えば、約 1 % ~ 約 1 5 % 、例えば、5 % ~ 約 1 5 %) が、アミノ末端リーダー伸長を含む。かかる量のパーセンテージは、好ましくは、定量的 N 末端配列分析または陽イオン交換分析を使用して (好ましくは高分解能、弱陽イオン交換カラム、例えば、P R O P A C W C X - 1 0 (商標) 陽イオン交換カラムを使用して) 決定される。アミノ末端リーダー伸長変異形とは別に、その重鎖の一方または両方に C 末端リシン残基を含む抗体、脱アミド化抗体変異形等が含まれるが、これらに限定されない主要種抗体及び / または変異形のさらなるアミノ酸配列変化が企図される。

【 0 4 0 4 】

さらに、主要種抗体または変異形は、グリコシル化変形をさらに含んでもよく、その非

10

20

30

40

50

限定的な例としては、そのFc領域に結合されるG1若しくはG2オリゴ糖を含む抗体、その軽鎖に結合される炭水化物部分を含む抗体（例えば、抗体の1つ若しくは2つの軽鎖に結合される、例えば、1つ以上のリシン残基に結合される、1つ若しくは2つの炭水化物部分、例えば、グルコース若しくはガラクトース）、1つ若しくは2つの非グリコシル化重鎖を含む抗体、またはその1つ若しくは2つの重鎖に結合されるシアリダーゼ化オリゴ糖を含む抗体が挙げられる。

【0405】

組成物は、遺伝子操作された細胞株、例えば、HER2抗体を発現するチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株から回収され得るか、またはペプチド合成によって調製され得る。

【0406】

例示的なペルツズマブ組成物に関するさらなる情報については、米国特許第7,560,111号及び同第7,879,325号、ならびにUS2009/0202546A1を参照されたい。

【0407】

ペルツズマブの市販の製剤（PERJETA（登録商標））は、IV点滴用の保存剤を含まない溶液の形態のペルツズマブ420mg/14mL（30mg/mL）を含有する。いくつかの実施形態において、ペルツズマブ療法は、初期負荷用量840mgの投与、その後の3週間毎の一定維持用量420mgの投与を含む。

【0408】

F. 診断及び検出のための方法及び組成物

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗HER2抗体のいずれも、生体試料中のHER2の存在の検出に有用である。本明細書で使用される「検出すること」という用語は、定量または定性検出を包含する。「生体試料」は、例えば、細胞または組織（例えば、癌性であるかまたは癌性である可能性がある乳組織を含む生検材料）を含む。

【0409】

一実施形態において、診断または検出方法において使用するための抗HER2抗体が提供される。さらなる態様において、生体試料中のHER2の存在を検出する方法が提供される。ある特定の実施形態において、本方法は、生体試料と、本明細書に記載される抗HER2抗体とを、HER2に抗HER2抗体が結合することを許容する条件下で接触させることと、複合体が、生体試料中で、抗HER2抗体とHER2との間で形成されるかどうかを検出することと、を含む。かかる方法は、*in vitro*方法であっても、*in vivo*方法であってもよい。一実施形態において、例えば、HER2が患者の選択のためのバイオマーカーである場合、抗HER2抗体を使用して、抗HER2抗体での治療法に適格な対象を選択する。さらなる実施形態において、生体試料は、細胞または組織である。

【0410】

さらなる実施形態において、抗HER2抗体は、例えば、癌を診断する、癌の予後を判定する若しくは癌を病期分類する、癌の適切な治療過程を決定する、または治療法に対する癌の反応を監視する目的で*in vivo*で使用されて、例えば、*in vivo*画像法によって、対象におけるHER2陽性癌を検出する。*in vivo*検出のための当該技術分野で既知の1つの方法は、例えば、van Dongen et al., The Oncologist 12:1379-1389 (2007)及びVerel et al., J. Nucl. Med. 44:1271-1281 (2003)に記載される、イムノ-陽電子放射断層撮影（イムノ-PET）である。かかる実施形態において、対象においてHER2陽性癌を検出するための方法が提供され、本方法は、標識された抗HER2抗体を、HER2陽性癌を有するかまたはそれを有することが疑われる対象に投与することと、対象において標識された抗HER2抗体を検出することと、を含み、その標識された抗HER2抗体の検出により、対象におけるHER2陽性癌を示す。かかる実施形態のある特定のものにおいて、標識された抗HER2抗体は、 ^{68}Ga , ^{18}F , 64

10

20

30

40

50

Cu, ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr 、及び ^{124}I 等の陽電子放出体にコンジュゲートされる抗HER2抗体を含む。特定の実施形態において、陽電子放出体は、 ^{89}Zr である。

【0411】

さらなる実施形態において、診断または検出方法は、基質に固定化された第1の抗HER2抗体を、HER2の存在について試験されるべき生体試料と接触させることと、その基質を第2の抗HER2抗体に曝露することと、その第2の抗HER2が、生体試料中で、第1の抗HER2抗体とHER2との間の複合体に結合されるかどうかを検出することを含む。基質は、任意の支持培地、例えば、ガラス、金属、セラミック、ポリマービーズ、スライド、チップ、及び他の基質であってもよい。ある特定の実施形態において、生体試料は、細胞または組織を含む。ある特定の実施形態において、第1または第2の抗HER2抗体は、本明細書に記載される抗体のいずれかである。

10

【0412】

以上の実施形態のいずれかにより診断または検出され得る、例示的な障害には、HER2陽性乳癌及びHER2陽性胃癌等のHER2陽性癌が含まれる。いくつかの実施形態において、HER2陽性癌は、2+若しくは3+の免疫組織化学(IHC)スコア、及び/または2.0以上のin situハイブリダイゼーション(ISH)増幅率を有する。

【0413】

ある特定の実施形態において、標識された抗HER2抗体が提供される。標識には、直接検出される標識(蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、及び放射性標識等)または部分、及び例えば、酵素反応または分子相互作用によって間接的に検出される酵素またはリガンド等の部分が含まれるが、これらに限定されない。例示的な標識には、放射性同位体 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H 、及び ^{131}I 、希土類キレートまたはフルオレセイン及びその誘導体等のフルオロフォア、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルセリフェラーゼ(Luciferases)、例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ(米国特許第4,737,456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖質オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸塩デヒドロゲナーゼ、過酸化水素を用いて色素前駆体を酸化させる酵素、例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、またはマイクロペルオキシダーゼとカップリングされた、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ等の複素環式オキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定した遊離ラジカル等が含まれるが、これらに限定されない。別の実施形態において、標識は、陽電子放出体である。陽電子放出体には、 ^{68}Ga , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr 、及び ^{124}I が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、陽電子放出体は、 ^{89}Zr である。

20

30

【0414】

G. 医薬製剤

本明細書に記載されるHER2抗体または免疫複合体の医薬製剤抗は、所望の程度の純度を有するかかる抗体または免疫複合体と、1つ以上の任意の薬学的に許容される担体(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))とを混合することによって、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で調製される。薬学的に許容される担体は、一般に、用いられる投薬量及び濃度で、レシピエントに対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸等の緩衝液、アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤、防腐剤(塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム等、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル、若しくはベンジルアルコール、メチル若しくはプロピルパラベン等のアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾール等)、低分子量(約10残

40

50

基未満)のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免役グロブリン等のタンパク質、ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、若しくはリジン等のアミノ酸、単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含む他の炭水化物、EDTA等のキレート薬剤、ショ糖、マンニトール、トレハロース、若しくはソルビトール等の糖類、ナトリウム等の塩形成対イオン、金属複合体(例えば、Zn-タンパク質複合体)、ならびに/またはポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤が含まれるが、これらに限定されない。本明細書における例示的な薬学的に許容される担体には、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質(sHASEGP)、例えば、rHuPH20(HYLENEX(登録商標)、Baxter International, Inc.)等のヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質等の、介在性(instertial)薬物分散剤がさらに含まれる。rHuPH20を含むある特定の例示的なsHASEGP及び使用方法は、米国特許公開第2005/0260186号、同第2006/0104968号に記載される。一態様において、sHASEGPは、コンドロイチナーゼ等の1つ以上の追加のグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

【0415】

例示的な凍結乾燥抗体または免疫複合体製剤は、米国特許第6,267,958号に記載される。水性抗体または免疫複合体製剤には、米国特許第6,171,586号及びWO2006/044908に記載されるものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン-酢酸緩衝液が含まれる。

【0416】

本明細書における製剤はまた、必要に応じて、治療されている特定の適応症に対する1つを超える活性成分、好ましくは相互に悪影響を及ぼさない相補的活性を有する成分を含有してもよい。

【0417】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術によって、または界面重合によって調製される、マイクロカプセル、例えば、それぞれ、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル)中またはマクロエマルジョン中のヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート(methylmethacrylate))マイクロカプセル中に封入されてもよい。かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示される。

【0418】

徐放性調製物が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例としては、抗体または免疫複合体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが挙げられ、そのマトリクスは、造形品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。

【0419】

in vivo投与のために使用されるべき製剤は、一般に滅菌されている。無菌状態は、例えば、無菌濾過膜を介する濾過によって、容易に達成され得る。

【0420】

H. 組み換え法及び組成物

本明細書に提供される抗HER2抗体または免疫複合体のいずれも、方法、例えば、治療方法において使用され得る。

【0421】

一態様において、本明細書に提供される抗HER2抗体または免疫複合体は、HER2陽性細胞の増殖を阻害する方法において使用され、本方法は、抗HER2抗体または免疫複合体が細胞の表面上のHER2に結合することを許容する条件下で、細胞を抗HER2抗体または免疫複合体に曝露し、それによって細胞の増殖を阻害することを含む。ある特定の実施形態において、本方法は、in vitro方法またはin vivo方法であ

10

20

30

40

50

る。さらなる実施形態において、細胞は、乳癌細胞または胃癌細胞である。

【0422】

*in vitro*での細胞増殖の阻害は、Promega (Madison, WI) から市販されている、CellTiter-Glo (商標) Luminescent Cell Viability アッセイを使用してアッセイされてもよい。そのアッセイは、代謝的に活性な細胞を示す、存在するATPの定量に基づいて、培養物中の生存細胞の数を決定する。Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160: 81-88、米国特許第6602677号を参照されたい。アッセイは、自動化高処理スクリーニング (HTS) に適した96ウェルまたは384ウェル形式で行われてもよい。Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6: 398-404を参照されたい。アッセイ手順には、単一の試薬 (CellTiter-Glo (登録商標) 試薬) を培養細胞に直接添加することを伴う。これにより、細胞溶解及びルシフェラーゼ反応によって生み出される発光シグナルの生成もたらされる。発光シグナルは、培養物中に存在する生存細胞の数に直接比例する、存在するATPの量に比例する。データは、ルミノメーターまたはCCDカメラ画像化デバイスによって記録することができる。発光出力は、相対発光量 (RLU) として表される。

10

【0423】

別の態様において、薬として使用するための抗HER2抗体または免疫複合体が提供される。さらなる態様において、治療方法において使用するための抗HER2抗体または免疫複合体が提供される。ある特定の実施形態において、HER2陽性癌を治療することにおいて使用するための抗HER2抗体または免疫複合体が提供される。ある特定の実施形態において、本発明は、HER2陽性癌を有する個体を治療する方法において使用するための抗HER2抗体または免疫複合体を提供し、本方法は、個体に、有効量の抗HER2抗体または免疫複合体を投与することを含む。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、例えば、以下に記載される有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。

20

【0424】

さらなる態様において、本発明は、薬の製造または調製における、抗HER2抗体または免疫複合体の使用を提供する。一実施形態において、薬は、HER2陽性癌を治療するためのものである。さらなる実施形態において、薬は、HER2陽性癌を治療する方法において使用するためのものであり、本方法は、HER2陽性癌を有する個体に、有効量の薬を投与することを含む。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、例えば、以下に記載される有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。

30

【0425】

さらなる態様において、本発明は、HER2陽性癌を治療するための方法を提供する。一実施形態において、本方法は、かかるHER2陽性癌を有する個体に、有効量の抗HER2抗体または免疫複合体を投与することを含む。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、以下に記載されるような、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。

【0426】

以上の実施形態のいずれかによるHER2陽性癌は、例えば、HER2陽性乳癌及びHER2陽性胃癌であってもよい。いくつかの実施形態において、HER2陽性癌は、2+若しくは3+の免疫組織化学 (IHC) スコア、及び/または2.0以上の*in situ*ハイブリダイゼーション (ISH) 増幅率を有する。

40

【0427】

以上の実施形態のいずれかによる「個体」、「患者」、または「対象」は、ヒトであり得る。

【0428】

さらなる態様において、本発明は、例えば、上記治療方法のいずれかにおいて使用するための、本明細書に提供される抗HER2抗体または免疫複合体のいずれかを含む医薬製

50

剤を提供する。一実施形態において、医薬製剤は、本明細書に提供される抗HER2抗体または免疫複合体のいずれかと、薬学的に許容される担体と、を含む。別の実施形態において、医薬製剤は、本明細書に提供される抗HER2抗体または免疫複合体のいずれかと、例えば、以下に記載される少なくとも1つの追加の治療剤と、を含む。

【0429】

本発明の抗体または免疫複合体は、治療法において、単独で、または他の薬剤と組み合わせて使用することができる。例えば、本発明の抗体または免疫複合体（例えば、hu7C2.v.2.2.LA抗体-薬物複合体(hu7C2 ADC)）は、少なくとも1つの追加の治療剤と共投与されてもよい。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、HER2に結合する抗体または免疫複合体でもある。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、(i)HER2のドメインIに結合する抗体若しくは免疫複合体、及び/または(ii)ドメインIV若しくはHER2に結合する抗体若しくは免疫複合体である。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、(i)エピトープ2C4に結合する抗体若しくは免疫複合体、及び/または(ii)エピトープ4D5に結合する抗体若しくは免疫複合体である。

10

【0430】

いくつかの実施形態において、hu7C2.v.2.2.LA抗体-薬物複合体(hu7C2 ADC)は、トラスツズマブ(Herceptin(登録商標))、T-DM1(Kadcyla(登録商標))、及びペルツズマブ(Perjeta(登録商標))から選択される1つ以上の追加の治療剤と共投与される。いくつかの実施形態において、hu7C2 ADCは、トラスツズマブと共投与される。いくつかの実施形態において、hu7C2 ADCは、T-DM1と共投与される。いくつかの実施形態において、hu7C2 ADCは、ペルツズマブと共投与される。いくつかの実施形態において、hu7C2 ADCは、トラスツズマブ及びペルツズマブと共投与される。いくつかの実施形態において、hu7C2 ADCは、T-DM1及びペルツズマブと共投与される。

20

【0431】

上述のかかる併用療法は、併用投与(2つ以上の治療剤が同じまたは別個の製剤中に含まれる)、及び個別投与を包含するが、この場合、本発明の抗体または免疫複合体の投与は、追加の治療剤及び/またはアジュバントの投与の前に、それと同時に、かつ/またはその後に行われ得る。本発明の抗体または免疫複合体はまた、放射線療法と組み合わせて使用することもできる。

30

【0432】

本発明の抗体または免疫複合体(及び任意の追加の治療剤)は、非経口投与、肺内投与、及び鼻腔内投与、ならびに局所治療で所望される場合、病変内投与を含む、任意の好適な手段によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。投薬は、任意の好適な経路によるもの、例えば、注射によるものであってよく、例えば、投与が短時間であるか慢性的であるかに部分的に依り、静脈内または皮下注射等によるものであってよい。単回または種々の時点にわたる複数回投与、ポーラス投与、及びパルス注入を含むが、これらに限定されない、種々の投薬スケジュールが本明細書で企図される。

40

【0433】

本発明の抗体または免疫複合体は、良好な医療行為と一致した様式で、製剤化され、投薬され、かつ投与されることになる。これに関連して考慮する要因には、治療されている特定の障害、治療されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床的病態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール管理、及び医療従事者に既知の他の要因が含まれる。必然的にではなく任意に、抗体または免疫複合体は、問題の障害を予防または治療するために現在使用される1つ以上の薬剤と共に製剤化される。かかる他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体または免疫複合体の量、障害または治療の種類、及び以上で考察された他の要因によって決定される。これらは、一般に、本明細書に記載されるものと同じ投薬量及び投与経路で、または本明細書に記載される投薬量の約1~99%で、

50

または適切であると経験的 / 臨床的に決定される任意の投薬量及び任意の経路で使用される。

【0434】

疾患の予防または治療のために、本発明の抗体または免疫複合体の適切な投薬量は（単独でまたは1つ以上の他の追加の治療剤と組み合わせて使用されるとき）、治療対象の疾患の種類、抗体または免疫複合体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体または免疫複合体が予防目的または治療目的で投与されるかどうか、以前の治療法、患者の病歴、抗体または免疫複合体への反応、ならびに主治医の裁量によって決定されることになる。抗体または免疫複合体は、患者に、1回で、または一連の治療にわたって、好適に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば、1回以上の別個の投与によるものであれ、連続注入によるものであれ、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 15 \text{mg} / \text{kg}$ （例えば、 $0.1 \text{mg} / \text{kg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ ）の抗体または免疫複合体が、患者への投与のための初期候補投薬量であり得る。1つの典型的な1日投薬量は、上述の要因に応じて、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 以上の範囲であり得る。数日間またはそれより長い日数にわたる反復投与では、病態に応じて、治療は一般に、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続される。抗体または免疫複合体の1つの例示的な投薬量は、約 $0.05 \text{mg} / \text{kg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ の範囲内となる。したがって、約 $0.5 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $2.0 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $4.0 \text{mg} / \text{kg}$ 、または $10 \text{mg} / \text{kg}$ （またはそれらの任意の組み合わせ）の1つ以上の用量が患者に投与されてもよい。かかる用量は、断続的に、例えば、毎週または3週間毎に（例えば、約2～約20回、または例えば、約6回用量の抗体を患者に投与するように）投与されてもよい。初回よりも高い負荷用量、続いて1回以上のより低い用量が投与されてもよい。しかしながら、他の投薬レジメンが有用な場合がある。この治療法の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

【0435】

上記製剤または治療方法のうちのいずれも、本発明の免疫複合体及び抗HER2抗体の両方を使用して行われ得ることが理解される。

【0436】

I. 製品

hu7C2.v.2.2.LA抗体-薬物複合体(hu7C2 ADC)ならびに本明細書における治療方法に有用なトラスツズマブ-MCC-DM1、及び/またはペルツズマブを含む製品または「キット」が提供される。いくつかの実施形態において、このキットは、hu7C2 ADCを含む容器を含む。いくつかの実施形態において、このキットは、トラスツズマブ-MCC-DM1を含む容器をさらに含む。いくつかの実施形態において、このキットは、ペルツズマブを含む容器をさらに含む。いくつかの実施形態において、キットは、トラスツズマブ-MCC-DM1を含む容器と、ペルツズマブを含む容器と、をさらに含む。いくつかの実施形態において、このキットは、hu7C2 ADC、トラスツズマブ-MCC-DM1、及びペルツズマブのうち2つ以上を同じ容器に含む。このキットは、容器上の、または容器と関連したラベルまたは添付文書をさらに含んでもよい。「添付文書」という用語は、かかる治療薬の適応症、使用法、投薬量、投与、禁忌症についての情報、及び/またはその使用に関する警告を含有する、治療薬の商用のパッケージに通例含まれる指示書を指すように使用される。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、プリスターパック等が挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチック等の多様な材料から形成され得る。容器は、hu7C2 ADC、任意にトラスツズマブ-MCC-DM1及び/若しくはペルツズマブ、または本明細書における治療方法での使用に有効なその製剤を保有し得、また無菌アクセスポートを有し得る（例えば容器は、静脈注射用溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能な栓を有するバイアルであり得る）。ラベルまたは添付文書は、組成物が本明細書に記載されて特許請求される治療方法で使用されることを表示する。製品は、薬学的に許容される緩衝剤、例えば、注入用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、及びデキストロス溶液を含む容器をさらに含んでもよい。それは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、

10

20

30

40

50

針、及びシリンジを含む、商業的な観点及びユーザの観点から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。

【0437】

キットは、h u 7 C 2 A D C、ならびに任意選択でトラスツズマブ - M C C - D M 1 及び / またはペルツズマブの投与のための指示書をさらに含んでもよい。例えば、キットが、h u 7 C 2 A D C を含む第 1 の組成物及び第 2 の薬学的製剤を含む場合、キットは、第 1 及び第 2 の薬学的組成物を、それを必要とする患者に同時に、順次に、または別個に投与するための指示書をさらに含んでもよい。

【0438】

別の実施形態において、キットは、錠剤またはカプセル等の固体経口形態の h u 7 C 2 A D C、ならびに任意選択でトラスツズマブ - M C C - D M 1 及び / またはペルツズマブの送達に好適である。かかるキットは好ましくは、いくつかの単位投薬量を含む。かかるキットは、それらの意図される使用の順序で配置された投薬量を有するカードを含む。かかるキットの例は、「プリスターバック」である。プリスターバックは、パッケージング業界において周知であり、医薬品の単位剤形のパッケージに広く使用されている。所望される場合、治療スケジュール中の投薬量が投与され得る日を指定する、例えば数字、文字、若しくは他の印の形態での、またはカレンダーインサートを用いた記憶補助機構が提供され得る。

10

【0439】

一実施形態によれば、キットは、(a) h u 7 C 2 A D C を有する第 1 の容器、ならびに任意選択で (b) トラスツズマブ - M C C - D M 1 及び / またはペルツズマブを中に含む第 2 の容器を含んでもよい。いくつかの実施形態において、キットは、(a) h u 7 C 2 A D C を有する第 1 の容器、(b) トラスツズマブ - M C C - D M 1 を中に含む第 2 の容器、及び (c) ペルツズマブを中に含む第 3 の容器を含んでもよい。いくつかの実施形態において、キットは、薬学的に許容される緩衝剤、例えば、注入用静菌水 (B W F I)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、及びデキストロス溶液を含む容器をさらに含んでもよい。それは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的な観点及びユーザの観点から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。

20

【0440】

キットが、h u 7 C 2 A D C、ならびにトラスツズマブ - M C C - D M 1 及び / またはペルツズマブの組成物を含む場合、そのキットは、分割されたボトルまたは分割されたホイルパケット等の、別個の組成物を含むための容器を含んでもよいが、別個の組成物はまた、単一の分割されていない容器内に含まれてもよい。典型的には、キットは、別個の構成成分の投与のための指示書を含む。キット形態は、別個の構成要素が好ましくは異なる剤形 (例えば、経口及び非経口) で投与される場合、異なる投薬間隔で投与される場合、または組み合わせの個々の構成成分の滴定が処方医師によって望まれる場合に、特に有利である。

30

【0441】

本明細書における製品の一実施形態は、癌患者への投与に好適な、h u 7 C 2 A D C ならびにペルツズマブ及び / または T - D M 1 の安定な混合物を含む静脈内点滴 (I V) バッグを含む。任意選択で、混合物は、例えば約 0 . 9 % N a C l または約 0 . 4 5 % N a C l を含む、生理食塩液中に存在する。例示的な I V バッグは、ポリオレフィンまたは塩化ポリビニル注入バッグ、例えば 2 5 0 m L の I V バッグである。本発明のいくつかの実施形態によれば、混合物は、約 4 2 0 m g または約 8 4 0 m g のペルツズマブ、及び約 1 0 0 m g ~ 約 1 6 0 m g の T - D M 1 を含む。

40

【0442】

任意選択で、I V バッグ中の混合物は、5 または 3 0 で最長 2 4 時間安定である。混合物の安定性は、色、外観及び透明度 (C A C)、濃度及び濁度分析、微粒子分析、サイズ排除クロマトグラフィー (S E C)、イオン交換クロマトグラフィー (I E C)、キャピラリーゾーン電気泳動 (C Z E)、イメージキャピラリー等電点電気泳動 (i m a g

50

e capillary isoelectric focusing) (iCIEF)、ならびに効力アッセイからなる群から選択される1つ以上のアッセイによって評価することができる。

【0443】

III. 実施例

以下は、本発明の方法及び組成物の実施例である。以上に提供される一般的説明を考慮すると、種々の他の実施形態が実施され得ることが理解される。

【0444】

実施例1：マウス抗体7C2のヒト化

抗HER2マウス抗体7C2は、HER2のドメインI内のエピトープに結合する。例えば、PCT公開第98/17797号を参照されたい。このエピトープは、HER2のドメインIVに結合するトラスツズマブによって結合されるエピトープ、及びHER2のドメインIIに結合するペルツズマブによって結合されるエピトープとは異なる。図3、16、及び18を参照されたい。ドメインIVを結合することによって、トラスツズマブは、リガンド独立的HER2-HER3複合体を崩壊させ、それによって下流シグナル伝達が阻害される(例えば、PI3K/AKT)。対照的に、ドメインIIへのペルツズマブ結合は、他のHERファミリーメンバー(例えば、HER3、HER1、またはHER4)とのリガンド駆動HER2相互作用を阻止し、したがって下流シグナル伝達を阻止する。ドメインIにMAb 7C2が結合しても、ドメインIV及びIIそれぞれへのトラスツズマブまたはペルツズマブ結合が干渉されず、それによりMAb 7C2 ADCとトラスツズマブ、トラスツズマブエムタンシン(T-DM-1)、及び/またはペルツズマブとを合わせる能力がもたらされる。

10

20

【0445】

マウス抗体7C2(7C2.B9、PCT公開第98/17797号を参照されたい)は、以下のようにヒト化された。

【0446】

A. 材料及び方法

残基番号は、Kabataに従う(Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。

30

【0447】

超可変領域移植片を、アクセプターヒトコンセンサスフレームワークに誘導する。7C2のヒト化中に構成された変異形を、IgGの形態で評価した。マウス7C2のVL及びVHドメインを、ヒトVL_{IV}(VL_{KIV})及びヒトVH下位集団I(VH_I)コンセンサス配列と整列させた。マウス7C2(7C2.B9)抗体の超可変領域(HVR)を、VL_{KIV}及びVH_Iアクセプターフレームワークへと操作し、CDR-移植片変異形を生成した。mu7C2 VLドメインから、24~34位(L1)、50~56位(L2)、及び89~97位(L3)を、VL_{KI}に移植した。mu7C2 VHドメインから、26~35位(H1)、50~65位(H2)、及び95~102位(H3)を、VH_Iに移植した(図1及び2)。HVR定義は、それらの配列超可変性(Wu, T. T. & Kabat, E. A. (1970))、それらの構造的位相(Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987))、及び抗原-抗体接触におけるそれらの関与(MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))によって定義される。重要であり得るフレームワークバーニア位置を評価するために、選択されたバーニア位置を変化させてマウス配列に戻した。バーニア位置は、VLにおける4位及び49位、ならびにVHにおける37位、67位、69位、71位、及び73位を含む。3つの異なるバージョンのVL配列及びVH配列を合成し(Blue Heron, Bothell, WA)、その後、哺乳動物発現ベクターへとサブクローン化した。異なるバージョンのLCとHCとを合わせることによって、合計9個の異なるhu7

40

50

C2移植片変異形(v1.1、v1.2、v1.3、v2.1、v2.2、v2.3、v3.1、v3.2、及びv3.3)が生成された。

【0448】

親和性成熟ライブラリ。単一phoAプロモータの制御下で2つのオープンリーディングフレームを有するFab-g3ディスプレイファージミドベクターを使用した。第1のオープンリーディングフレームは、アクセプター軽鎖のVL及びCH1ドメインに融合されたstIIシグナル配列からなり、第2のものは、アクセプター重鎖のVH及びCH1ドメインに融合され、続いてマイナーファージコートタンパク質P3に融合されたstIIシグナル配列からなる。HVRグラフト変異形(7C2.v2.1)は、各超可変領域に対して別個のオリゴヌクレオチドを使用するKunkel突然変異誘発によって生成され、Fabとしてファージ上に表示された。

10

【0449】

親和性を改善するために、各超可変領域の変化を含むファージライブラリが生成された。配列多様性は、Kunkel突然変異誘発を使用して、7C2.v2.1の超可変領域内の各位置で別個に導入された。7C2.v2.1の超可変領域内の位置はそれぞれ、NNSをコードするオリゴヌクレオチドを使用して、全ての可能な20個のアミノ酸に対して1つ1つ完全にランダム化された。完全にランダム化された7C2の超可変領域のうちの1つに位置する単一位置を有する、それぞれ20メンバーからなる合計68ライブラリが作製された。同じ超可変領域内に位置を有するライブラリをプールして、合計6つのライブラリを生成した。

20

【0450】

ファージライブラリの生成以上で概説されるように、各超可変領域に多様性を導入するように設計されたオリゴヌクレオチドを、660ngのオリゴヌクレオチド、50mMのTris pH7.5、10mMのMgCl₂、1mMのATP、20mMのDTT、及び5Uのポリヌクレオチドキナーゼを含有する20μLの反応液中で1時間、37で別個にリン酸化した。

【0451】

親和性成熟ライブラリを生成するために、68の個別のKunkel突然変異誘発反応を、96ウェルPCRプレートで行った。リン酸化オリゴヌクレオチド反応(上記)から、2μLを、50mMのTris pH7.5、10mMのMgCl₂中の500ng Kunkelテンプレートに添加して最終体積を25μLにした。混合物を90で1分間、50で3分間アニールした後、氷上で冷却した。次にアニールしたテンプレートを、10mMのATP0.5μL、10mMのdNTP0.5μL(各10mMのdATP、dCTP、dGTP、及びdTTP)、100mMのDTT1μL、10倍TM緩衝液1μL(0.5MのTris pH7.5、0.1MのMgCl₂)、80UのT4リガーゼ、及び4UのT7ポリメラーゼ(合計体積30μL)を2時間、室温で添加することによって充填した。次に、これらの充填及び結紮された生成物を、それぞれXL1-ブルー細胞に形質転換した。同じCDR領域内に位置を含むライブラリをプールし、10mLのSOC培地中で1時間、37で回収した。カルベナシリン(50μg/mL)及びM13/KO7ヘルパーファージ(MOI 10)を添加した。培養物をさらに30分間37でインキュベートし、50μg/mLのカルベナシリン及び50μg/mLのカナマイシンを含有する500mLの2YTに移して、20時間37で成長させた。

30

40

【0452】

ファージ選択Her2細胞外ドメイン(Her2 ECD)を、NHS-PEG4-ビオチン(Pierce)を使用し、遊離アミンによってビオチニル化した。ビオチニル化反応の場合、4倍モル過剰のビオチン試薬をPBS中で使用した。反応に続いて、PBS中で透析を行った。

【0453】

ファージを細胞培養物の上清から採取し、1%のBSAを含有するPBS中に懸濁した。ファージライブラリを、ビオチニル化Her2 ECDで室温にてインキュベートし、

50

次にビオチン - Her 2 に結合されたファージを、MaxiSorpマイクロタイタープレート (Nunc) で終夜、4 でPBS中に固定されていたneutrAvidin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 上で5分間捕捉した。マイクロタイターウェルを、0.05% Tween 20 (PBST) を含有するPBSで広範囲に洗浄し、結合されたファージは、ウェルを20mMのHCl、500mMのKClで30分間インキュベートすることによって溶出した。溶出されたファージを、1MのTris、pH7.5で中和し、XL1-Blue細胞及びM13/KO7ヘルパーファージを使用して増殖させ、2YT、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のカルベナシリン、及び50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシン中、37 で終夜成長させた。標的含有ウェルから溶出されたファージのタイターを、非標的含有ウェルから回収されたファージのタイターと比較して、富化を評価した。選択の厳密性は、結合中のビオチニル化Her 2 ECDの濃度を(5 nMから0.2 nMに)低下させること、及び溶液中の1 μM の非標識Her 2 ECDとの競合時間を(室温で0時間から60分に)増加させることの両方によって高められた。

【0454】

変異形の表面プラズモン共鳴評価7C2変異形は、293-過性形質転換によってIgGとして発現された。IgGを、タンパク質G親和性クロマトグラフィーで精製した。Her 2の各7C2 IgG変異形の親和性は、BiacoreT100を使用する表面プラズモン共鳴によって決定した。BiacoreシリーズSCM5センサーチップを、モノクローナルマウス抗ヒトIgG (Fc) 抗体で固定した(ヒト抗体捕捉キット、GE Healthcare)。各7C2変異形の連続3倍希釈溶液を、30 $\mu\text{L}/\text{分}$ の流量で注入した。各試料を、3分会合及び10分解離で分析した。各注入後、チップを3MのMgCl₂を使用して再生成した。結合応答は、RUを、同様の密度の無関連のIgGを捕捉するフローセルから控除することによって訂正した。k_{on}及びk_{off}の同時フィッティングの1:1Langmuirモデルを、動態分析に使用した。

【0455】

B. 結果及び論考

7C2のヒト化。7C2のヒト化に使用されるヒトアクセプターフレームワークは、ヒトVL_IVコンセンサス(VL_{KIV})及びヒトVH_Iコンセンサスに基づく。マウス7C2のVL及びVHドメインは、ヒトVL_{KIV}及びVH_Iドメインと整列され、超可変領域が特定され、ヒトアクセプターフレームワークに移植されて7C2.v1.1を生成した。7C2.v1.1の一価親和性は、SPRによって評価されるように、mu7C2.B9よりも2.5倍減少する(表2を参照されたい)。

表2: 7C2 CDR移植された抗体の親和性

| | | VL | | |
|----|------------------------------|--------------|--------------|----------------|
| | K _D (nM) | K4 | K4. K49 | K4. L4. K49 |
| VH | VH1 | v1.1 (20 nM) | v2.1 (16 nM) | v3.1 (15 nM) |
| | VH1. V71 | v1.2 (13 nM) | v2.2 (11 nM) | v3.2 (10 nM) |
| | VH1. L37. A67. L69. V71. K73 | v1.3 (11 nM) | v2.3 (10 nM) | v3.3 (9 nM) |

【0456】

7C2.v1.1の結合親和性を改善するために、軽鎖における4位及び49位、なら

びに重鎖における37位、67位、69位、71位、及び73位を、 $\mu 7 C 2 . B 9$ におけるこれらの位置において見出される残基に変更した。これらの変更された軽鎖及び重鎖と、 $7 C 2 . v 1 . 1$ の鎖との組み合わせを、293個の細胞に形質移入し、IgGとして発現させて精製して、SPRによるHer2 ECDへの結合について評価した(表2を参照されたい)。軽鎖に2つの変更された位置を含み、かつ重鎖に5つの変更された位置を含む変異形 $7 C 2 . v 3 . 3$ は、キメラ $\mu 7 C 2 . B 9$ に相当する一価親和性を有していた(表2を参照されたい)。

【0457】

親和性成熟ライブラリは、軽鎖に最小の変更されたバーニア位置(Y49K)を含む、 $7 C 2 . v 2 . 1$ のフレームワークを使用してさらなる改善を試みるために調査された。各超可変領域では、20個のアミノ酸全てが、Kunkle突然変異誘発を使用して個別の位置に別々に導入された(合計68ライブラリ、それぞれが20メンバーを含み、6つの親和性成熟ライブラリにプールされる)。6つの親和性成熟ライブラリを、ビオチニル化Her2 ECDを含む溶液中で4周回にわたってパンした。選択の厳密性は、ビオチン-Her2 ECDの濃度を(5nMから0.2nMへ)低下させること、及び飽和量の非標識Her2 ECDとの競合時間を(室温で0時間から1時間に)増加させることによって次第に向上した。2000倍のファージ富化が、H2ライブラリで観察された。

10

【0458】

最後の周回から合計588クローンを、DNA配列分析のために選別した。個別の配列変化は、各HVRにおいて特定した(表3を参照されたい)。最も豊富なクローンは、S53位におけるVHのMetまたはLeuへの変化を有していた。S53M及びS53L変異形は、IgGとして発現され、SPR分析により、S53M及びS53LがHer2に相当する親和性を有することを示される。S53L変異形は、メチオニンが製造過程に酸化しやすいため選択された。HVR-H2における潜在的なイソ-アスパラギン酸形成部位は、S55A突然変異により排除された(表4を参照されたい)。

20

表3：親和性が改善された変異形の動態

| 変異形 | H V R -H 1 | H V R-H 2 | H V R- H 3 | k_a (1 / M s) | k_d (1 / s) | K_D (n M) |
|--------------------------|-----------------------------------|--|---|--------------------------|---------------------|-------------------|
| v 2. 1 | G Y W M N (配列 番号 1 5) | M I H P S D S E I R A N Q K F R D (配列番号 8) | G T Y D G G F E Y (配列番 号 1 7) | 2. 6 E + 0 5 | 4. 1 E - 0 3 | 1 5. 5 |
| v 2 . 1. S 5 3 M | | M I H P M D S E I R A N Q K F R D (配列番号 2 0) | | 2. 7 E + 0 5 | 6. 7 E - 0 4 | 2. 4 |
| v 2 . 1. S 5 3 L | | M I H P L D S E I R A N Q K F R D (配列番号 2 1) | | 2. 5 E + 0 5 | 8. 5 E - 0 4 | 3. 4 |
| v 2 . 1. E 1 0 1 K | | | G T Y D G G F K Y (配列番 号 2 2) | 2. 2 E + 0 5 | 1. 5 E - 0 3 | 6. 8 |

10

20

30

表 4 : h u 7 C 2 変異形親和性の要約

| h u 7 C 2 変異形 | K_D (n M) |
|---|----------------|
| m u 7 C 2. B 9 | 8 |
| h u 7 C 2. v 2. 2 | 1 1 |
| h u 7 C 2. v 2. 2. L A (S 5 3 L, S 5 5 A)、 配列番号 1 6 の H V R-H 2 | 3 |

40

ヒトV_L_{K1V}及びV_H_Iドメイン、ならびにmu7C2.B9(「7C2」)及びhu7C2.v2.2.LA(以下の実施例において「hu7C2」と称される)の重鎖及び軽鎖可変領域のアラインメントを図1及び2に示す。

【0460】

実施例2：hu7C2抗体薬物複合体の産生

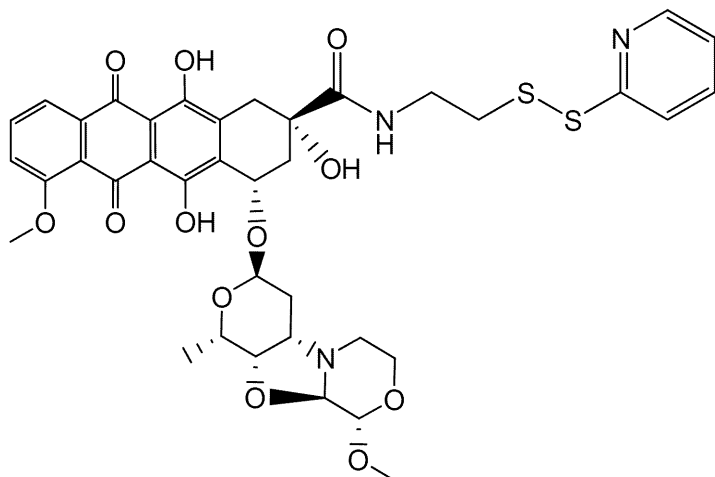
抗体を大量に産生する場合、抗体は、CHO細胞内で産生された。重鎖及び軽鎖をコードするベクターを、CHO細胞に形質移入し、IgGを、タンパク質A親和性クロマトグラフィーによって細胞培養培地から精製した。

【0461】

A.ピリジルジスルフィドPNUアミドリンカー薬物中間体の合成

10

以下の式：



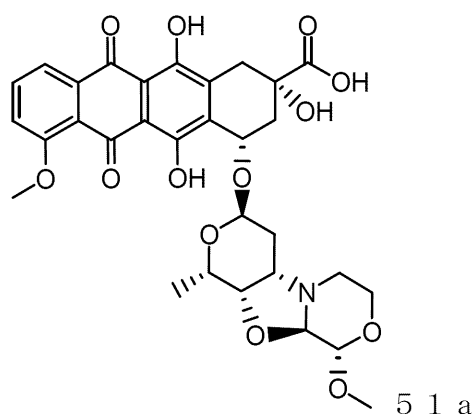
20

LD-51

を有するピリジルジスルフィドPNUアミドリンカー薬物中間体((2S, 4S)-4-[[(1S, 3R, 4aS, 9S, 9aR, 10aS)-9-メトキシ-1-メチル-3, 4, 4a, 6, 7, 9, 9a, 10a-オクタヒドロ-1H-ピラノ[1, 2]オキサゾロ[3, 4-b][1, 4]オキサジン-3-イル]オキシ]-2, 5, 12-トリヒドロキシ-7-メトキシ-6, 11-ジオキソ-N-[2-(2-ピリジルジスルファニル)エチル]-3, 4-ジヒドロ-1H-テトラセン-2-カルボキシアミド; 「LD-51」)は、次のように合成された。US8389697号の実施例3に従い、WO1998/02446、及びUS8470984の実施例1に報告されるように調製されたPNU-159682(15.3mg、0.02038mmol)を含む3mLのメタノール及び2mLのH₂Oの溶液に、NaIO₄(5.1mg、0.0238mmol)を含む1mLのH₂Oの溶液を添加した。出発物質が検出不可能になるまで、反応混合物を室温で3時間攪拌した(TLC及びHPLC分析)。溶媒を減圧下で除去し、赤色の粗固体(2S, 4S)-2, 5, 12-トリヒドロキシ-7-メトキシ-4-{[(1S, 3R, 4aS, 9S, 9aR, 10aS)-9-メトキシ-1-メチルオクタヒドロ-1H-ピラノ[4, 3:4, 5][1, 3]オキサゾロ[2, 3-c][1, 4]オキサジン-3-イル]オキシ}-6, 11-ジオキソ-1, 2, 3, 4, 6, 11-ヘキサヒドロテトラセン-2-カルボン酸51aを、さらに精製することなく次の工程で使用した。MS(ESI): 628[M+H]⁺。

30

40



10

【0462】

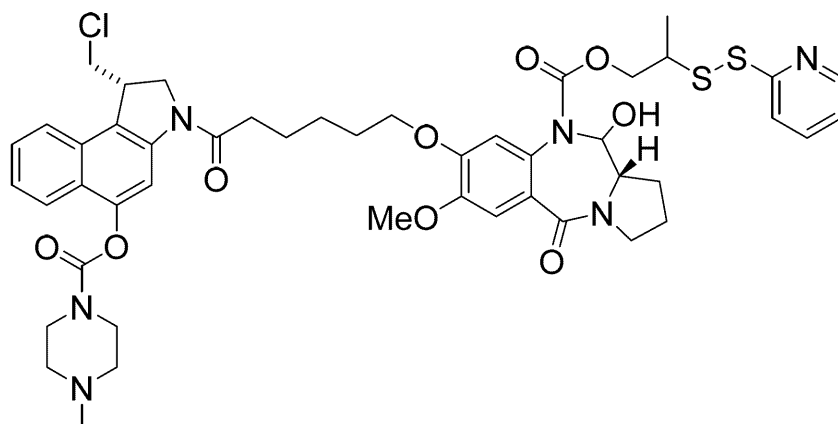
粗中間体 5 1 a を含む無水ジクロロメタンの溶液に、アルゴン雰囲気下、無水トリエチルアミン、TBTU (O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N,N-テトラメチルウロニウムテトラフルオロホウ酸塩 (N,N,N,N-テトラメチル-O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウムテトラフルオロホウ酸塩とも呼ばれる、CAS 番号 125700-67-6、Sigma-Aldrich B-2903)、及び N-ヒドロキシスクシンイミドを添加して、5 1 a の中間体 NHS エステルを形成した。代替として、DCC または EDC 等の他のカップリング試薬が使用され得る。1 時間後、2-(ピリジン-2-イルジスルファニル)エタンアミン塩酸塩 (CAS 番号 106139-15-5) を添加した。出発物質が消失するまで、反応混合物を室温で 30 分間撹拌した (HPLC-MS 分析)。溶媒を真空下で蒸発させ、次に残渣をシリカゲルでフラッシュカラムクロマトグラフィーによって精製して、LD-51 を得た。MS (ESI) : 796.88 [M+H]⁺。

20

【0463】

B. CBI-PBD リンカー薬物中間体の合成

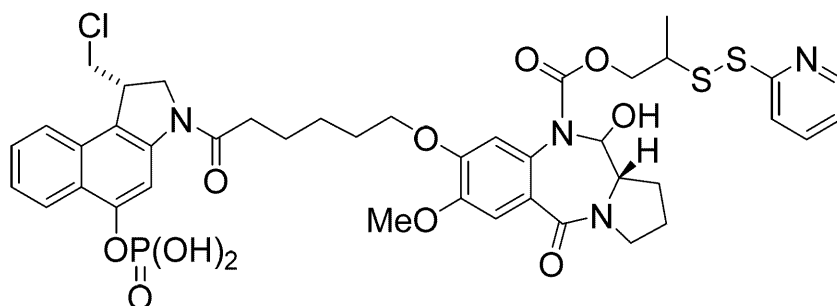
以下の式：



30

40

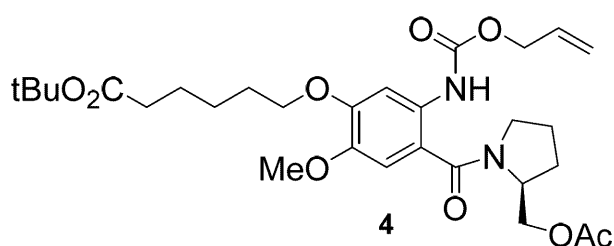
を有する CBI-PBD 二量体 (ピペラジン-カルバメートプロドラッグ) - 2-プロピルピリジジスルフィドリンカー薬物中間体 (2-(2-ピリジジスルファニル)プロピル 3-[6-[1-(クロロメチル)-5-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)オキシ-1,2-ジヒドロベンゾ[e]インドール-3-イル]-6-オキシ-ヘキソオキシ]-6-ヒドロキシ-2-メトキシ-11-オキシ-6a,7,8,9-テトラヒドロ-6H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-5-カルボキシレート、表 A の化合物 81)、及び以下の式：



を有するCBI-PBD二量体(リン酸塩)-2-プロピルピリジルジスルフィドリンカー薬物中間体(2-(2-ピリジルジスルファニル)プロピル3-[6-[1-(クロロメチル)-5-ホスホノオキシ-1,2-ジヒドロベンゾ[e]インドール-3-イル]-6-オキソ-ヘキソキシ]-6-ヒドロキシ-2-メトキシ-11-オキソ-6a,7,8,9-テトラヒドロ-6H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-5-カルボキシレート、表Aの化合物82)は、次のように合成された。試薬及び中間製剤を含む反応スキームについては、図9及び10を参照されたい。この合成はまた、2-(2-ピリジルジスルファニル)プロピル3-[6-[1-(クロロメチル)-5-ヒドロキシ-1,2-ジヒドロベンゾ[e]インドール-3-イル]-6-オキソ-ヘキソキシ]-6-ヒドロキシ-2-メトキシ-11-オキソ-6a,7,8,9-テトラヒドロ-6H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-5-カルボキシレート(「CBI-PBD-2-プロピルピリジルジスルフィド」)を産生するために好適である。

【0464】

1(1.40g、4.00mmol、文献J. Med. Chem. 2003, 46, 2132-2151の手順に従って調製した)、2(1.31g、5.22mmol、文献WO2004065491A1号の手順に従って調製した)、及び K_2CO_3 (829mg、6.00mmol)を含む乾燥DMA(15mL)の混合物を、室温で43時間撹拌した。次にその混合物を、EtOAc及び H_2O で希釈し、十分に混合して、層を分離した。有機層を、 H_2O (3回)、塩水(1回)で洗浄し、乾燥させて(Na_2SO_4)、溶媒を真空下で除去した。粗生成物を、50:50~67:33~100:0のEtOAc:Hexを使用し、シリカゲルでカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物3(1.74g、84%)を黄色油として得た。 1H NMR (400MHz、 $CDCl_3$) 8.77(br s, 1H)、7.79(s, 1H)、6.82(s, 1H)、6.02-5.92(m, 1H)、5.36(dq, $J=17.2, 1.5$ Hz, 1H)、5.26(dq, $J=10.4, 1.2$ Hz, 1H)、4.69-4.60(m, 2H)、4.47-4.39(m, 1H)、4.28(br s, 1H)、4.09-4.05(m, 2H)、3.83(s, 3H)、3.90-3.80(m, 1H)、3.74-3.70(m, 1H)、3.65-3.59(m, 1H)、3.54-3.47(m, 1H)、2.25(t, $J=7.4$ Hz, 2H)、2.20-2.15(m, 1H)、1.93-1.84(m, 3H)、1.81-1.72(m, 1H)、1.70-1.63(m, 3H)、1.53-1.47(m, 2H)、1.44(s, 9H)。HRMS m/z 543.2666 [(M+Na)⁺ $C_{27}H_{40}N_2NaO_8$ 543.2677]に対する計測値。



10

20

30

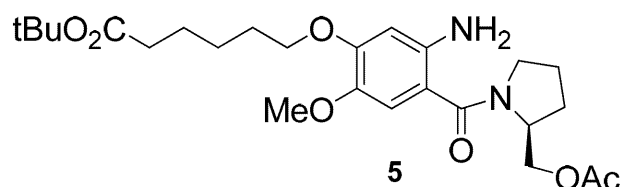
40

50

【0465】

Et₃N (1.32 mL、9.47 mmol) を、3 (821 mg、1.58 mmol) を含む乾燥 DCM (6 mL) 溶液に室温で添加した。次に酢酸無水物 (0.75 mL、7.93 mmol) を添加し、混合物を室温で 4.5 時間攪拌した。反応混合物を 0 に冷却し、乾燥 MeOH (1 mL) を添加して、混合物を 0 で 15 分間攪拌した。次に EtOAc (120 mL) を添加し、その混合物を H₂O (2 回)、塩水 (1 回) で洗浄し、乾燥させ (Na₂SO₄)、溶媒を真空下で除去して化合物 4 (891 mg、定量) を得て、これを、精製することなく、次の工程で使用した。¹H NMR (400 MHz、CDCl₃) 8.88 (br s, 1H)、7.82 (s, 1H)、6.81 (s, 1H)、6.01 - 5.91 (m, 1H)、5.36 (dq, J = 17.2, 1.5 Hz, 1H)、5.25 (dq, J = 10.4, 1.3 Hz, 1H)、4.65 - 4.62 (m, 2H)、4.61 - 4.54 (m, 1H)、4.32 - 4.22 (m, 2H)、4.09 - 4.06 (m, 2H)、3.83 (s, 3H)、3.55 - 3.47 (m, 2H)、2.26 - 2.23 (m, 2H)、2.18 - 2.12 (m, 1H)、2.07 (s, 3H)、1.97 - 1.77 (m, 5H)、1.70 - 1.63 (m, 2H)、1.54 - 1.47 (m, 2H)、1.44 (s, 9H)。HRMS m/z 585.2774 [(M+Na)⁺ C₂₉H₄₂N₂NaO₉ 585.2783] に対する計測値。

10

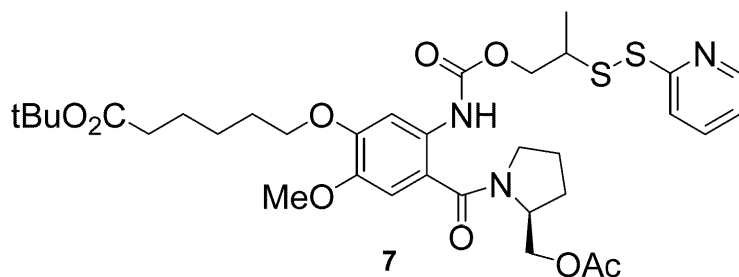


20

【0466】

ピロリジン (1.6 mL、19.2 mmol) を、4 (1.06 g、1.88 mmol) を含む乾燥 DCM (20 mL) 溶液に室温で添加した。次に Pd(PPh₃)₄ (109 mg、0.0943 mmol) を添加し、反応混合物を室温で 40 分間攪拌した。反応混合物を 0.25 M の HCl 溶液 (2 × 75 mL) で洗浄し、乾燥させて (Na₂SO₄)、溶媒を真空下で除去した。粗生成物を、50:50 ~ 100:0 の EtOAc:Hex を使用し、シリカゲルでカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物 5 (726 mg、81%) を黄色油として得た。¹H NMR (400 MHz、DMSO-d₆) 6.67 (s, 1H)、6.35 (s, 1H)、5.08 (s, 2H)、4.35 - 4.30 (m, 1H)、4.13 - 4.06 (m, 2H)、3.87 (t, J = 6.4 Hz, 2H)、3.63 (s, 3H)、3.50 - 3.44 (m, 1H)、3.42 - 3.35 (m, 1H)、2.21 (t, J = 7.2 Hz, 2H)、2.07 - 2.00 (m, 1H)、2.01 (s, 3H)、1.89 - 1.82 (m, 1H)、1.77 - 1.67 (m, 4H)、1.59 - 1.51 (m, 2H)、1.44 - 1.36 (m, 2H)、1.39 (s, 9H)。HRMS m/z 501.2573 [(M+Na)⁺ C₂₅H₃₈N₂NaO₇ 501.2571] に対する計測値。

30



40

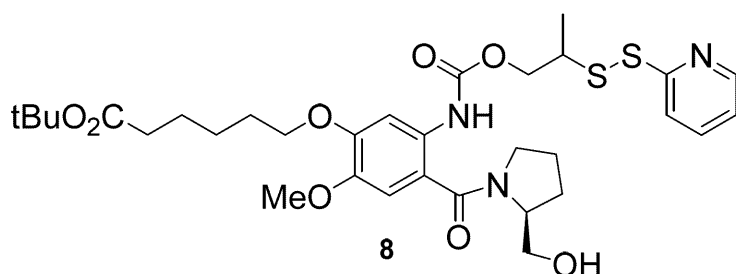
【0467】

ジホスゲン (0.22 mL、1.82 mmol) を、5 (726 mg、1.52 mmol) 及び DMA P (557 mg、4.56 mmol) を含む乾燥 DCM (25 mL) の混

50

合物に、窒素下、室温で添加した。30分後、6 (2.60 g、12.9 mmol、上述の
 手順によって新たに作製された。アルコールには以前に番号が割り当てられていない)
 を含む乾燥DCM (25 mL) 溶液を添加し、混合物を室温で終夜攪拌した。18時間後
 、反応混合物をH₂O (1回)で洗浄し、乾燥させて (Na₂SO₄)、溶媒を真空下で
 除去した。粗生成物を、過剰な6が溶出されるまで100:0~95:5~94:6のDCM:
 EtOAcを使用し、次に70:30のEtOAc:Hexを使用し、シリカゲル
 でカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物7 (920 mg、86%)を薄黄色
 油として得た。¹H NMR (400 MHz、DMSO-d₆) 9.16 (br s, 1 H)、8.45 - 8.43 (m, 1 H)、7.83 - 7.78 (m, 2 H)、7.25
 - 7.21 (m, 1 H)、7.15 (d, J = 2.8 Hz, 1 H)、6.87 (s, 1 H)、4.29 (br s, 1 H)、4.17 - 3.99 (m, 4 H)、3.92 (t, J
 = 6.4 Hz, 2 H)、3.75 (s, 3 H)、3.42 - 3.30 (m, 3 H)、2.20 (t, J = 7.2 Hz, 2 H)、2.06 - 1.95 (m, 4 H)、1.83 (br
 s, 1 H)、1.77 - 1.68 (m, 4 H)、1.58 - 1.49 (m, 2 H)、1.43 - 1.36 (m, 2 H)、1.39 (s, 9 H)、1.29 (d, J = 6.8 Hz
 , 3 H)。HRMS m/z 706.2832 [(M+H)⁺ C₃₄H₄₈N₃O₉S₂ 706.2826] に対する計測値。

10



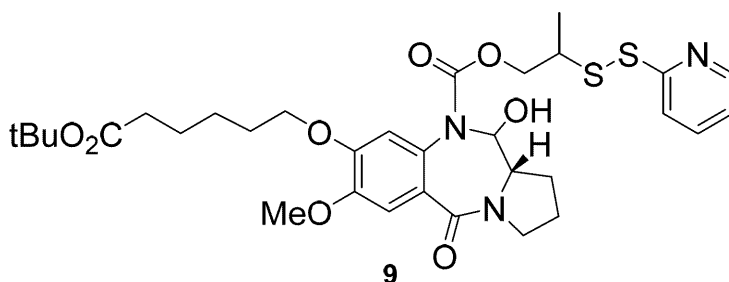
20

【0468】

7 (949 mg、1.34 mmol) 及び K₂CO₃ (1.85 g、13.4 mmol)
) を含む DCM - MeOH (34 mL / 17 mL) の混合物を、室温で45分間攪拌した
 。混合物をDCMで希釈し、冷H₂O (200 mL) に注ぎ、十分に混合した後、層を分
 離した。水性層をDCM (1回) で抽出し、合わせた有機層を乾燥させて (Na₂SO₄)
)、溶媒を真空下で除去した。粗生成物を、100:0~50:50のDCM:EtOAc
 cを使用し、シリカゲルでカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物8 (808
 mg、91%)を薄黄色油として得た。¹H NMR (400 MHz、DMSO-d₆) 9.20 (br s, 1 H)、8.44 (d, J = 4.7 Hz, 1 H)、7.81 - 7
 .80 (m, 2 H)、7.25 - 7.20 (m, 2 H)、6.94 (s, 1 H)、4.7
 5 (t, J = 5.6 Hz, 1 H)、4.17 - 3.99 (m, 3 H)、3.92 (t, J
 = 6.4 Hz, 2 H)、3.74 (s, 3 H)、3.60 - 3.46 (m, 2 H)、3.
 37 - 3.20 (m, 3 H)、2.20 (t, J = 7.2 Hz, 2 H)、1.93 - 1.
 76 (m, 3 H)、1.75 - 1.68 (m, 3 H)、1.58 - 1.51 (m, 2 H)
 、1.44 - 1.36 (m, 2 H)、1.39 (s, 9 H)、1.29 (d, J = 6.9
 Hz, 3 H)。HRMS m/z 664.2721 [(M+H)⁺ C₃₂H₄₆N₃
 O₈S₂ 664.2724] に対する計測値。

30

40



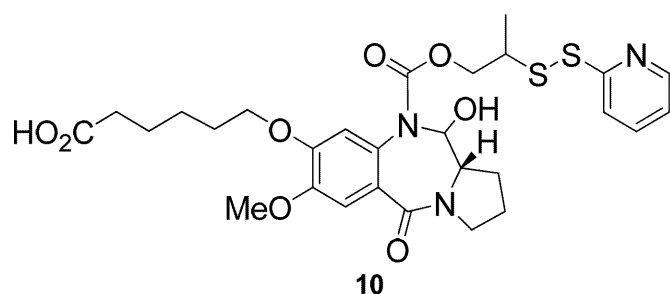
50

【0469】

(ジアセトキシノード)ベンゼン(259 mg、0.804 mmol)を8(349 mg、0.526 mmol)及びTEMPO(82.2 mg、0.526 mmol)を含む、乾燥DCM(10 mL)の混合物に室温で添加し、反応混合物を終夜撹拌した。24時間後、混合物をDCM及び飽和水性 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ で希釈し、十分に混合した。層を分離し、有機層を飽和水性 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1回)、飽和水性 NaHCO_3 (1回)で洗浄し、乾燥させて(Na_2SO_4)、溶媒を真空下で除去した。粗生成物を、70:30~100:0のEtOAc:Hexを使用し、シリカゲルでカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物9(248 mg、71%)を白色発泡体として得た。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) 8.45 - 8.43 (m, 1H)、7.79 - 7.69 (m, 1H)、7.51 - 7.48 (m, 1H)、7.24 - 7.20 (m, 1H)、7.10 (s, 1H)、6.96及び6.91 (2s, 1H)、6.55 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H)、5.46 (dd, $J = 8.9, 6.1$ Hz, 1H)、4.31 - 4.21 (m, 1H)、4.02 - 3.84 (m, 3H)、3.80及び3.79 (2s, 3H)、3.52 - 3.46 (m, 1H)、3.40 - 3.18 (m, 3H)、2.19 - 2.13 (m, 2H)、2.09 - 2.00 (m, 1H)、1.96 - 1.85 (m, 3H)、1.70 - 1.67 (m, 2H)、1.56 - 1.45 (m, 2H)、1.40 - 1.34 (m, 2H)、1.38及び1.37 (2s, 9H)、1.15 - 1.10 (m, 3H)。HRMS m/z 662.2592 [$(M+H)^+$ $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$ 662.2564]に対する計測値。

10

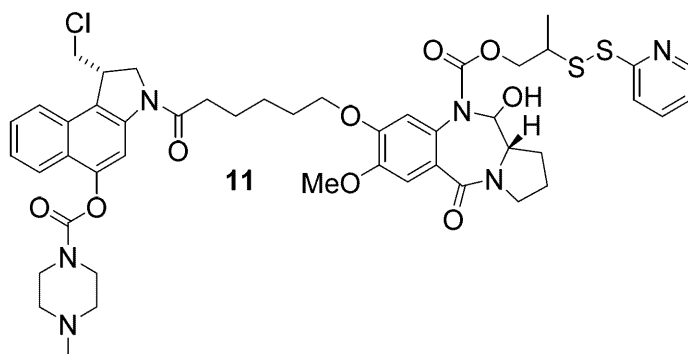
20



【0470】

9(254 mg、0.384 mmol)及び4 M HClを含むジオキサン(11 mL)の混合物を、室温で1時間15分間撹拌した。溶媒を真空下、25~30 で除去して化合物10(162 mg、70%)を得て、これを、精製することなく、次の工程で使用した。

30



40

【0471】

10(161 mg、0.266 mmol)、58b(195 mg、0.542 mmol、上述の手順によって新たに作製した)、EDCI·HCl(253 mg、1.32 mmol)、及びTsOH(19.5 mg、0.113 mmol)を含む乾燥DMA(5 mL)の混合物を、室温で終夜、窒素下で撹拌した。23時間後、反応混合物をEtOAc及び飽和水性 NaHCO_3 で希釈し、十分に混合した。層を分離し、水性層をEtOAc(1回)で抽出した。合わせた有機層を、 H_2O (1回)、塩水(1回)で洗浄し、乾燥さ

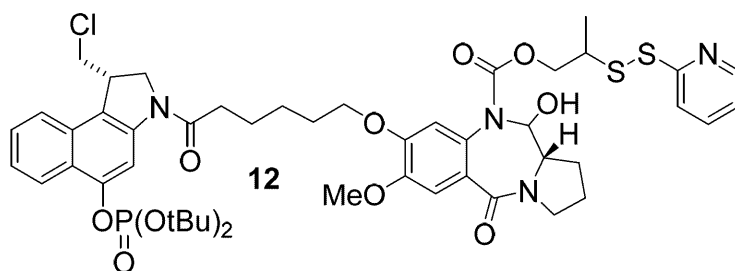
50

せて (Na₂SO₄)、溶媒を真空下で除去した。粗生成物を、100:0~93:7のDCM:MeOHを使用し、シリカゲルでカラムクロマトグラフィーにより精製し、この材料を、99:1~94:6のDCM:MeOHを使用してリカラムして、11(化合物番号81、118mg、47%、HPLC純度:98.0%)を薄黄色発泡体として得た。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) 8.43-8.41(m, 1H)、8.22(s, 1H)、7.96(d, J=8.4Hz, 1H)、7.83(d, J=8.4Hz, 1H)、7.73-7.66(m, 1H)、7.61-7.56(m, 1H)、7.51-7.45(m, 2H)、7.22-7.17(m, 1H)、7.10(s, 1H)、6.97及び6.92(2s, 1H)、6.56(t, J=6.0Hz, 1H)、5.46(dd, J=9.1, 6.2Hz, 1H)、4.42-4.20(m, 4H)、4.05-3.76(m, 7H)、3.80及び3.79(2s, 3H)、3.52-3.47(m, 1H)、3.38-3.11(m, 4H)、2.09-1.99(m, 1H)、1.94-1.88(m, 3H)、1.77-1.74(m, 2H)、1.65-1.62(m, 2H)、1.48-1.42(m, 2H)、1.35-1.23(m, 1H)、1.15-1.10(m, 3H)、DMSOにより部分的に不明瞭な9H。HRMS m/z 969.3070 [(M+Na)⁺ C₄₇H₅₅ClN₆NaO₉S₂ 969.3053]に対する計測値。

10

【0472】

化合物82は、以下のように調製された。



20

【0473】

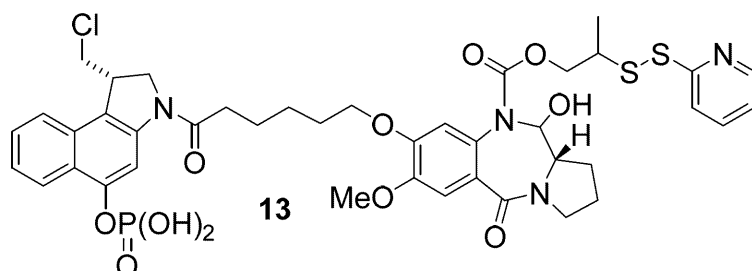
10(162mg、0.267mmol)、66d(178mg、0.418mmol、上述の手順によって新たに作製した)、EDCI·HCl(184mg、0.960mmol)、及びTsOH(11mg、0.0639mmol)を含む乾燥DMA(5mL)の混合物を、室温で終夜、窒素下で撹拌した。18.5時間後、反応混合物をEtOAc及びH₂で希釈して十分に混合した。層を分離し、有機層を飽和水性NaHCO₃(1回)、H₂O(1回)、塩水(1回)で洗浄し、乾燥させて(Na₂SO₄)、溶媒を真空下で除去した。粗生成物を、100:0~95:5のEtOAc:MeOHを使用し、シリカゲルでカラムクロマトグラフィーにより精製して、黄色残渣を得た。これを、分取HPLCによってさらに精製して(カラム:Synergi-MAX RP 4μ、21.20×250mm、流量:12mL/分、移動相:溶媒A:H₂O/ギ酸アンモニウム緩衝液pH3.45、溶媒B:MeCN/H₂O 90:10、方法:勾配、90:10~10:90~0:100の溶媒A:溶媒B、30分間)、化合物12(89.3mg、33%、HPLC純度:99.5%)を白色発泡体として得た。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) 8.56(s, 1H)、8.43-8.41(m, 1H)、8.04(d, J=8.2Hz, 1H)、7.92(d, J=8.4Hz, 1H)、7.73-7.67(m, 1H)、7.60-7.56(m, 1H)、7.51-7.45(m, 2H)、7.22-7.17(m, 1H)、7.10(s, 1H)、6.98及び6.92(2s, 1H)、6.55(t, J=5.6Hz, 1H)、5.47-5.44(m, 1H)、4.40-4.36(m, 1H)、4.30-4.19(m, 3H)、4.04-3.86(m, 4H)、3.86-3.75(m, 1H)、3.80及び3.79(2s, 3H)、3.52-3.46(m, 1H)、3.38-3.22(m, 3H)、3.21-3.15(m, 1H)、2.09-1.99(m, 1H)、1.94-1.8

30

40

50

5 (m, 3 H)、1.78 - 1.74 (m, 2 H)、1.69 - 1.60 (m, 2 H)、1.55 - 1.40 (m, 2 H)、1.47 及び 1.47 (2 s, 18 H)、1.28 - 1.23 (m, 1 H)、1.15 - 1.10 (m, 3 H)。HRMS m/z 1035.3162 [(M + Na)⁺ C₄₉H₆₂ClIN₄NaO₁₁PS₂ 1035.3175] に対する計測値。



10

【0474】

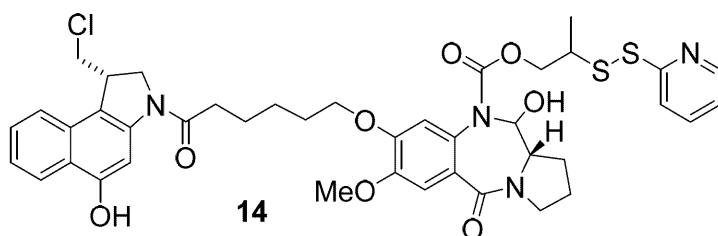
12 (84.0 mg、0.0829 mmol) 及び TFA (1 mL) を含む乾燥 DCM (2 mL) の混合物を、室温で 40 分間攪拌した。次にその溶媒を、真空下 25 で除去して緑色残渣を得た。残渣を DCM に溶解し、溶液を EtOAc で希釈し、DCM を真空下で除去して、白色固体を得て、残留溶媒をデカントした。このプロセスを繰り返し、結果として得られる固体を EtOAc で粉碎し、乾燥させて 13 (表 A の化合物 82、43.8 mg、59%、HPLC 純度: 93.8%) を白色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 8.47 (s, 1 H)、8.44 - 8.42 (m, 1 H)、8.08 (d, J = 8.3 Hz, 1 H)、7.90 (d, J = 8.3 Hz, 1 H)、7.74 - 7.68 (m, 1 H)、7.58 - 7.54 (m, 1 H)、7.51 - 7.48 (m, 1 H)、7.47 - 7.43 (m, 1 H)、7.22 - 7.18 (m, 1 H)、7.10 (s, 1 H)、6.98 及び 6.93 (2 s, 1 H)、5.46 (d, J = 9.5 Hz, 1 H)、4.39 - 4.18 (m, 4 H)、4.04 - 3.95 (m, 3 H)、3.90 - 3.85 (m, 1 H)、3.84 - 3.76 (m, 1 H)、3.80 及び 3.80 (2 s, 3 H)、3.52 - 3.47 (m, 1 H)、3.40 - 3.27 (m, 3 H)、3.21 - 3.15 (m, 1 H)、2.10 - 2.02 (m, 1 H)、1.94 - 1.88 (m, 3 H)、1.78 - 1.74 (m, 2 H)、1.69 - 1.60 (m, 2 H)、1.48 - 1.42 (m, 2 H)、1.35 - 1.23 (m, 1 H)、1.16 - 1.10 (m, 3 H)、3 H 観察されない。HRMS m/z 923.1938 [(M + Na)⁺ C₄₁H₄₆ClIN₄NaO₁₁PS₂ 923.1923] に対する計測値。

20

30

【0475】

化合物 83 は、以下のように調製された。



40

【0476】

10 (45.0 mg、0.0743 mmol)、67d (24.3 mg、0.0899 mmol、上述の手順によって新たに作製した)、EDCI·HCl (42.7 mg、0.223 mmol)、及び TsOH (3 mg、0.0174 mmol) を含む乾燥 DMA (3 mL) の混合物を、室温で 5 時間、窒素下で攪拌した。67d (24.3 mg、0.0899 mmol) 及び EDCI·HCl (16.0 mg、0.0835 mmol) の追加部分を混合物に添加し、反応物を室温で終夜攪拌した。22 時間後、反応混合物を Et

50

OAcで希釈し、H₂O(2回)、塩水(1回)で洗浄し、乾燥させて(Na₂SO₄)、溶媒を真空下で除去した。粗生成物を、EtOAcを使用し、シリカゲルでカラムクロマトグラフィーにより精製して、緑色粉末を得た。これを、EtOAcを再度使用し、シリカゲルでカラムクロマトグラフィーを実行することによってさらに精製して、14(表Aの化合物83、8.3mg、13.5%、HPLC純度:81.2%)をベージュ固体として得た。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) 10.33(s, 1H)、8.43-8.42(m, 1H)、8.07(d, J=8.1Hz, 1H)、7.98(s, 1H)、7.77(d, J=8.4Hz, 1H)、7.74-7.67(m, 1H)、7.50-7.46(m, 2H)、7.33-7.29(m, 1H)、7.24-7.18(m, 1H)、7.10(s, 1H)、6.98及び6.92(2s, 1H)、6.56(t, J=6.0Hz, 1H)、5.47-5.44(m, 1H)、4.33-4.21(m, 2H)、4.15-4.13(m, 2H)、4.05-3.93(m, 3H)、3.90-3.75(m, 2H)、3.80及び3.79(2s, 3H)、3.52-3.47(m, 1H)、3.38-3.13(m, 4H)、2.10-1.99(m, 1H)、1.94-1.89(m, 3H)、1.77-1.74(m, 2H)、1.66-1.62(m, 2H)、1.52-1.41(m, 2H)、1.32-1.24(m, 1H)、1.15-1.10(m, 3H)。HRMS m/z 843.2258 [(M+Na)⁺ C₄₁H₄₅ClN₄NaO₈S₂ 843.2260]に対する計測値。

10

【0477】

20

化合物85は、以下のように調製された。

【0478】

82(15mg、16.64µmol)を含むDMF(1.0mL)溶液に、5-ニトロピリジン-2-チオール(25.99mg、166.41µmol)の溶液を20で添加した。反応混合物を、20で1時間攪拌した。反応混合物を濾過し、分取HPLC(FA)によって精製して2-(5-ニトロピリジン-2-イル)ジスルファニル)プロピル(11aS)-8-(6-(S)-1-(クロロメチル)-5-(ホスホノオキシ)-1,2-ジヒドロ-3H-ベンゾ[e]インドール-3-イル)-6-オキソヘキシル)オキシ)-11-ヒドロキシ-7-メトキシ-5-オキソ-2,3,11,11a-テトラヒドロ-1H-ベンゾ[e]ピロロ[1,2-a][1,4]ジアゼピン-10(5H)-カルボキシレート85(7.5mg、47.62%)を灰色固体として得た。LCMS:(10-80,CD-NEG,3.0分)、1.161分、MS=944.2[M-1]⁻;¹H NMR(400MHz,CDCl₃) 9.18(s,1H)、8.41(br,1H,J=7.6Hz)、8.11(br,1H)、7.80(d,1H,J=8.0Hz)、7.67(d,1H,J=8.4Hz)、7.46(d,1H,J=7.6Hz)、7.30(s,1H)、7.07(s,1H)、6.99-6.93(m,1H)、5.52(d,1H,J=8.4Hz)、4.26-4.14(m,4H)、3.98-3.80(m,4H)、3.76(s,3H)、3.40-3.26(m,5H)、2.40-2.28(m,2H)、2.10-1.80(m,5H)、1.79-1.55(m,5H)、1.40(br,1H)、1.19(s,1H)、1.12(d,3H,J=8.8Hz)。

30

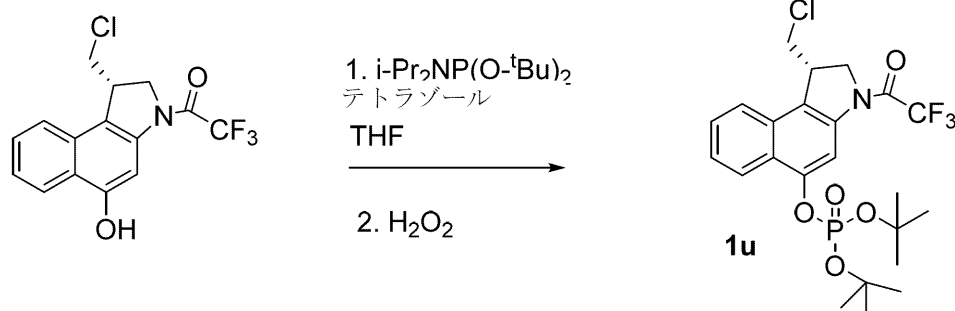
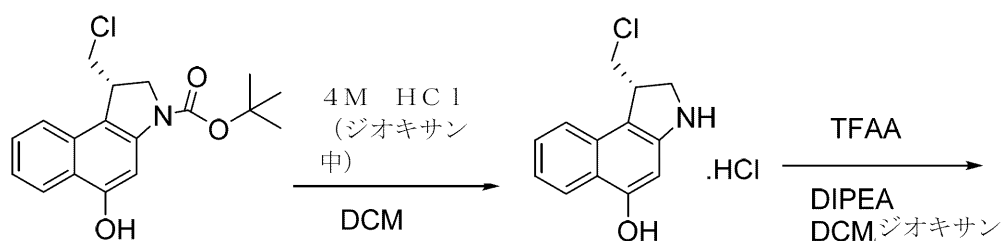
40

【0479】

化合物86は、以下のように調製された。

【0480】

工程A:(S)-ジ-tert-ブチル(1-(クロロメチル)-3-(2,2,2-トリフルオロアセチル)-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドール-5-イル)リン酸塩1uの合成



10

【0481】

tert-ブチル(S)-1-(クロロメチル)-5-ヒドロキシ-1,2-ジヒドロ-3H-ベンゾ[e]インドール-3-カルボキシレート(3.34g、10.0mmol)を含む乾燥DCM(25mL)の撹拌した均質溶液に、窒素雰囲気下、20℃で4MのHClを含むジオキサン(12.5mL、50.0mmol)を添加した。添加後、反応混合物を、窒素下、20℃でさらに20時間撹拌した。混合物を石油エーテル(250mL)で希釈し、窒素下、20℃で20分間撹拌した。溶媒をデカントし、この手順を石油エーテル(250mL)を用いてもう1回繰り返した。結果として得られる固体を、真空下、25℃で1時間乾燥させて(S)-1-(クロロメチル)-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドール-5-オール塩酸塩(2.7g、100%)を得た。¹H NMR[(CD₃)₂SO] 10.80(s, 1H)、8.15(d, J=8.3Hz, 1H)、7.87(d, J=8.2Hz, 1H)、7.58(br t, J=7.5Hz, 1H)、7.43(br t, J=7.4Hz, 1H)、6.81(s, 1H)、4.27-4.17(m, 1H)、4.01(dd, J=11.0, 3.2Hz, 1H)、3.93-3.74(m, 3H)、2プロトンは観察されない。粗生成物を、さらに精製することなく、次の工程で使用した。

20

30

【0482】

(S)-1-(クロロメチル)-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドール-5-オール塩酸塩(2.7g、10.0mmol)を含む乾燥DCM(10mL)及びジオキサン(30mL)の撹拌異質混合物に、窒素雰囲気下、0℃でトリフルオロ酢酸無水物(TFAA)(3.4mL、24.0mmol)、続いてジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)(8.71mL、50.0mmol)を添加した。添加後、反応混合物を、窒素下、0℃でさらに50分間撹拌した。酢酸エチル(400mL)を添加し、1NのHCl(200mL)を0℃で添加し、混合物を窒素下で20分間撹拌した。酢酸エチル層を分離し、1NのHCl(200mL)及び水(2×200mL)で連続的に洗浄し、次に乾燥させ(MgSO₄)、減圧下、25℃の浴槽温度で蒸発させて、(S)-1-(1-(クロロメチル)-5-ヒドロキシ-1,2-ジヒドロ-3H-ベンゾ[e]インドール-3-イル)-2,2,2-トリフルオロエタン-1-オン(3.3g、100%)を緑-灰色固体として得た。この材料を、さらに精製することなく、次の工程に使用した。

40

【0483】

(S)-1-(1-(クロロメチル)-5-ヒドロキシ-1,2-ジヒドロ-3H-ベンゾ[e]インドール-3-イル)-2,2,2-トリフルオロエタン-1-オン(3.

50

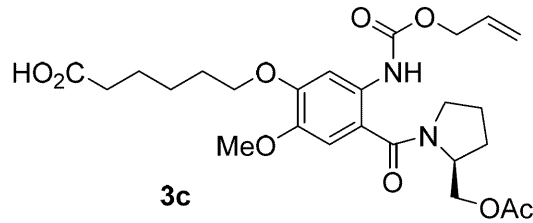
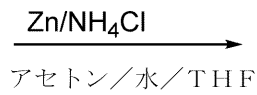
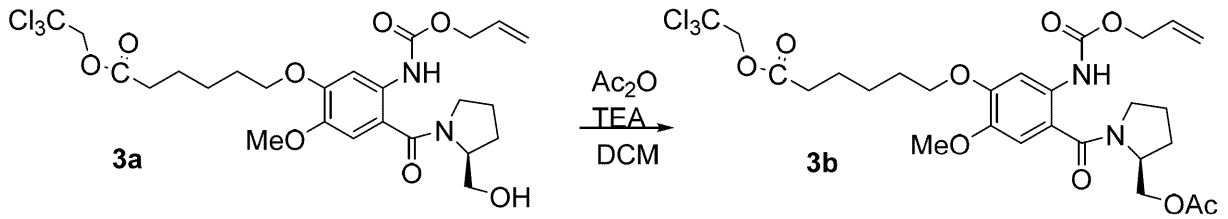
3 g、10.0 mmol)を含む乾燥THF(40 mL)の撹拌した均質溶液に、窒素雰囲気下、20 °Cで、ジ-tert-ブチル-N,N-ジイソプロピルホスホルアミダイト(4.31 mL、13.0 mmol)を添加した。添加後、反応混合物を、窒素下、20 °Cで5~10分間撹拌し、次にテトラゾール(CH₃CN中の3%溶液、38.0 mL、13.0 mmol)を17分間にわたって滴下添加した。最終反応混合物を、窒素下、20 °Cで19時間さらに撹拌した。混合物を氷浴中で冷却し、30%のH₂O₂(11.3 mL、100.0 mmol)を添加した。添加後、反応混合物を、20 °Cでさらに1時間半撹拌した。混合物を、酢酸エチル(300 mL)及び10%水性Na₂S₂O₃(500 mL)で希釈し、0 °Cで20分間撹拌した。酢酸エチル層を分離し、水(200 mL)、飽和NaHCO₃(200 mL)、及び水(200 mL)で連続的に洗浄し、次に乾燥させ(MgSO₄)、減圧下、25 °Cの浴槽温度で蒸発させてコハク色の油を得た。シリカゲルでのクロマトグラフィーによる精製(1:3の酢酸エチル:石油エーテルで溶出)により、1 u(4.7 g、90%)を無色の発泡状固体として得た。mp 39-42 °C; [α]_D²⁰ -61.8°(c 1.02, CHCl₃)。分析。(C₂₃H₂₈ClF₃NO₅P)計測値:C, 52.93; H, 5.41; N, 2.68。実測値:C, 53.05; H, 5.43; N, 2.80。

10

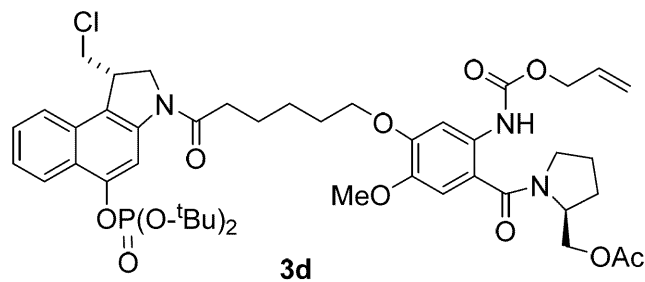
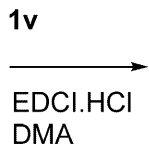
【0484】

工程B:(S)-1-(2-((4-(S)-2-((アリルオキシ)カルボニル)アミノ)-6-(tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ヘキサナムド)ベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)-4-(6-(S)-1-(クロロメチル)-5-(ジ-tert-ブトキシホスホリル)オキシ)-1,2-ジヒドロ-3H-ベンゾ[e]インドール-3-イル)-6-オキソヘキシル)オキシ)-5-メトキシベンゾイル)ピロリジン-2-イル)メチル酢酸塩3 gの合成

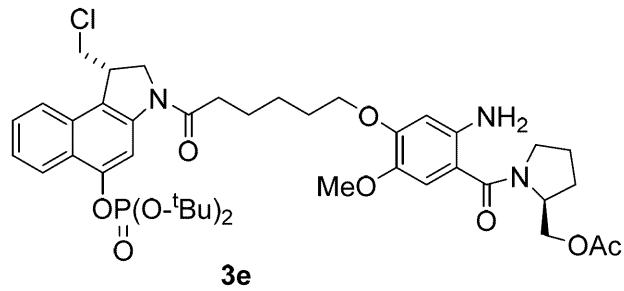
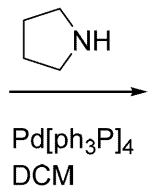
20



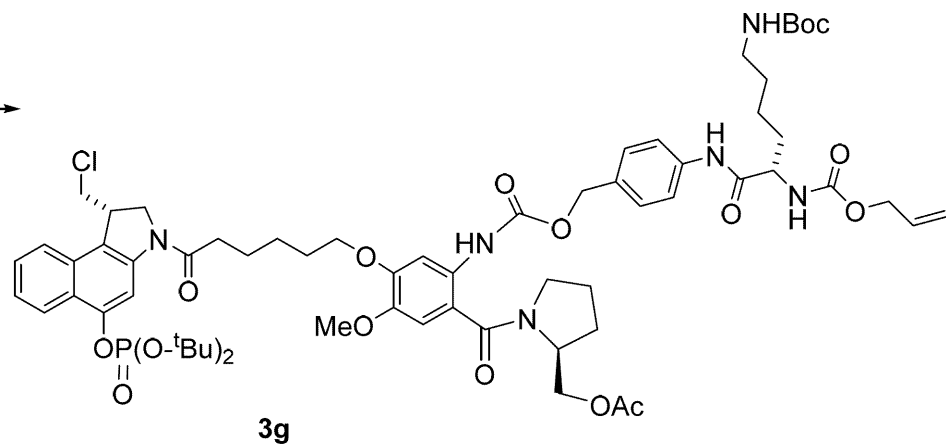
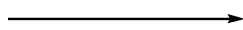
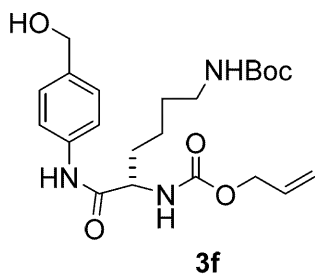
10



20



30



40

2, 2, 2 - トリクロロエチル (S) - 6 - (5 - ((アリルオキシ)カルボニル)アミノ) - 4 - (2 - (ヒドロキシメチル)ピロリジン - 1 - カルボニル) - 2 - メトキシフェノキシ)ヘキサノエート 3a (4.14 g, 6.95 mmol) (J. Med. Chem. 2003, 46, 2132 - 2151) を含む乾燥 DCM (25 mL) の攪拌溶液に、酢酸無水物 (3.30 mL, 34.8 mmol) 及びトリエチルアミン (5.81 mL, 41.7 mmol) を添加した。混合物を、20 で3時間半攪拌した。乾燥 MeOH (4.0 mL) を添加し、混合物を30分間攪拌した。混合物を、EtOAc (400 mL) と水 (400 mL) とに分割した。EtOAc 層を分離し、水 (2 × 200 mL) で洗浄し、次に乾燥させ (MgSO₄)、蒸発させて2, 2, 2 - トリクロロエチル (S) - 6 - (4 - (2 - (アセトキシメチル)ピロリジン - 1 - カルボニル) - 5 - ((アリルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - メトキシフェノキシ)ヘキサノエート 3b (4.28 g, 96%) を油として得た。[α]_D 57.4° (c 0.21, CHCl₃); ¹H NMR [(CD₃)₂SO] 9.10 (s, 1H)、7.17 (s, 1H)、6.87 (s, 1H)、6.01 - 5.87 (m, 1H)、5.32 (dd, J = 17.2、1.5 Hz, 1H)、5.21 (dd, J = 10.4, 1.4 Hz, 1H)、4.89 (s, 2H)、4.54 (d, J = 5.4 Hz, 2H)、4.39 - 4.20 (m, 3H)、3.93 (t, J = 6.4 Hz, 2H)、3.75 (s, 3H)、3.46 - 3.27 (m, 2H)、2.13 - 1.90 (m, 4H)、1.89 - 1.60 (m, 7H)、1.54 - 1.40 (m, 2H)、DMSOピークにより不明瞭な2プロトン。HRMS (ESI) m/z C₂₇H₃₆Cl₃N₂O₉ に対する計測値: 637.1481、実測値: 637.1475 [MH⁺]; C₂₇H₃₅Cl₃N₂NaO₉ に対する計測値: 659.1300、実測値: 659.1303 [MNa⁺]; C₂₇H₃₅Cl₃KN₂O₉ に対する計測値: 675.1040, 実測値: 675.1035 [MK⁺]
【0486】

10

20

3b (4.27 g, 6.69 mmol) を含むアセトン (75 mL)、水 (50 mL)、及び THF (30 mL) の攪拌溶液に、亜鉛粉末 (17.5 g, 268 mmol) 及び NH₄Cl (28.6 g, 535 mmol) を添加した。混合物を、窒素雰囲気下、20 で42時間攪拌した。アセトン (100 mL) を添加し、混合物を10分間攪拌して、上清をデカントした。この手順を2回繰り返し、合わせた上清を減圧下で蒸発させてアセトン及びTHFを除去した。残渣を水 (50 mL) で希釈し、水性1NのHClでpH ca. 1に酸性化した。酸性混合物を石油エーテル (2 × 200 mL) で洗浄し、EtOAc (400 mL) で抽出した。EtOAc抽出物を水 (200 mL) で洗浄し、乾燥させ (MgSO₄)、溶媒を蒸発させて(S) - 6 - (4 - (2 - (アセトキシメチル)ピロリジン - 1 - カルボニル) - 5 - ((アリルオキシ)カルボニル)アミノ) - 2 - メトキシフェノキシ)ヘキサノ酸 3c (2.72 g, 80%) を油として得た。[α]_D 73.5° (c 1.12, CHCl₃); ¹H NMR [(CD₃)₂SO] 11.99 (s, D₂Oと交換可能, 1H)、9.10 (s, D₂Oと交換可能, 1H)、7.17 (s, 1H)、6.87 (s, 1H)、6.00 - 5.86 (m, 1H)、5.32 (dd, J = 17.2, 1.5 Hz, 1H)、5.20 (dd, J = 10.4, 1.5 Hz, 1H)、4.57 - 4.52 (m, 2H)、4.37 - 4.03 (m, 3H)、3.93 (t, J = 6.5 Hz, 2H)、3.75 (s, 3H)、3.40 - 3.10 (m, 2H)、2.23 (t, J = 7.3 Hz, 2H)、2.07 - 1.93 (m, 4H)、1.89 - 1.66 (m, 5H)、1.62 - 1.49 (m, 2H)、1.47 - 1.34 (m, 2H)。HRMS (ESI) m/z C₂₅H₃₅N₂O₉ に対する計測値: 507.2337、実測値: 507.2340 [MH⁺]; C₂₅H₃₄KN₂O₉ に対する計測値: 545.1896、実測値: 545.1906 [MK⁺]; C₂₅H₃₄N₂NaO₉ に対する計測値: 529.2157, 実測値: 529.2169 [MNa⁺]
【0487】

30

40

(S) - ジ - tert - ブチル (1 - (クロロメチル) - 3 - (2, 2, 2 - トリフルオロアセチル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1H - ベンゾ[e]インドール - 5 - イル)リン酸

50

塩 1 u (1 . 3 8 g、 2 . 6 4 m m o l) を含む M e O H (1 0 m L) の攪拌溶液に、窒素雰囲気下、0 で C s ₂ C O ₃ (1 . 0 3 g、 3 . 1 7 m m o l) を添加した。混合物を 0 で 2 時間半攪拌し、次に E t O A c (2 0 0 m L) と水 (1 5 0 m L) とに分割した。E t O A c 層を分離し、再度水 (1 0 0 m L) で洗浄し、次に乾燥させ (M g S O ₄)、減圧下、2 5 の浴槽温度で蒸発させて (S) - ジ - t e r t - ブチル (1 - (クロロメチル) - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 H - ベンゾ [e] インドール - 5 - イル) リン酸塩 1 v (1 . 1 7 g) を薄黄色発泡状固体として得て、これを 3 c (1 . 2 4 g、 2 . 4 5 m m o l)、E D C I . H C l (1 . 4 1 g、 7 . 3 5 m m o l)、及び p - トルエンスルホン酸 (8 4 m g、 0 . 4 9 m m o l) を含む乾燥 D M A (1 4 m L) で 0 ~ 2 0 にて 2 2 時間処理した。混合物を E t O A c (4 0 0 m L) と水 (3 0 0 m L) とに分割した。E t O A c 層を分離し、水 (1 0 0 m L) で再度洗浄した後、乾燥させ (M g S O ₄)、蒸発させた。シリカゲルでのクロマトグラフィーによる精製 (2 : 1 の E t O A c : 石油エーテルで溶出) によって、((S) - 1 - (2 - ((アリルオキシ) カルボニル) アミノ) - 4 - ((6 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル) オキシ) - 1 , 2 - ジヒドロ - 3 H - ベンゾ [e] インドール - 3 - イル) - 6 - オキソヘキシル) オキシ) - 5 - メトキシベンゾイル) ピロリジン - 2 - イル) メチル酢酸塩 3 d (1 . 4 9 g、 6 6 %) を薄黄色の発泡状固体として得た。mp 5 5 - 5 9 ; [α]_D - 6 8 . 0 ° (c 1 . 0 0 , C H C l ₃) ; ¹ H N M R [(C D ₃) ₂ S O] 9 . 1 0 (s , D ₂ O と交換可能、 1 H)、 8 . 5 6 (s , 1 H)、 8 . 0 3 (d , J = 8 . 1 H z , 1 H)、 7 . 9 2 (d , J = 8 . 4 H z , 1 H)、 7 . 5 7 (t , J = 8 . 1 H z , 1 H)、 7 . 4 7 (t , J = 7 . 6 H z , 1 H)、 7 . 1 9 (s , 1 H)、 6 . 8 6 (s , 1 H)、 5 . 9 9 - 5 . 8 6 (m , 1 H)、 5 . 3 2 (d d , J = 1 7 . 2 , 1 . 6 H z , 1 H)、 5 . 2 0 (d d , J = 1 0 . 4 , 1 . 5 H z , 1 H)、 4 . 5 3 (d , J = 5 . 4 H z , 2 H)、 4 . 4 5 - 3 . 8 4 (m , 1 0 H)、 3 . 7 4 (s , 3 H)、 3 . 4 4 - 3 . 2 6 (m , 2 H)、 2 . 6 8 - 2 . 4 7 (m , 2 H)、 2 . 0 2 (b r s , 3 H)、 1 . 9 3 - 1 . 4 3 (m , 1 0 H)、 1 . 4 7 4 及び 1 . 4 6 9 (2 s , 1 8 H)。HRMS (E S I) m / z C ₄₆ H ₆₂ C I N ₃ O ₁₂ P に対する計測値 : 9 1 4 . 3 7 5 4、実測値 : 9 1 4 . 3 7 4 9 [M H ⁺] ; C ₄₆ H ₆₁ C I K N ₃ O ₁₂ P に対する計測値 : 9 5 2 . 3 3 1 3、実測値 : 9 5 2 . 3 3 8 1 [M K ⁺] ; C ₄₆ H ₆₁ C I N ₃ N a O ₁₂ P に対する計測値 : 9 3 6 . 3 5 7 4、実測値 : 9 3 6 . 3 5 8 9 [M N a ⁺]。

10

20

30

【 0 4 8 8 】

3 d (5 4 8 m g、 0 . 6 0 m m o l) を含む D C M (8 m L) の攪拌溶液に、窒素雰囲気下、2 0 で P d (P h ₃ P) ₄ (1 7 . 1 m g、 9 . 8 % P d) 及びピロリジン (0 . 4 9 m L、 6 . 0 0 m m o l) を添加した。混合物を 2 0 で 3 0 分間攪拌し、次に E t O A c (2 0 0 m L) と水 (1 5 0 m L) とに分割した。E t O A c 層を分離し、水 (5 0 m L) で再度洗浄し、次に乾燥させ (M g S O ₄)、減圧下、2 5 の浴槽温度で蒸発させた。粗生成物を、シリカゲル上のクロマトグラフィーによって精製して (5 0 : 1 の E t O A c : M e O H で溶出)、((S) - 1 - (2 - アミノ - 4 - ((6 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル) オキシ) - 1 , 2 - ジヒドロ - 3 H - ベンゾ [e] インドール - 3 - イル) - 6 - オキソヘキシル) オキシ) - 5 - メトキシベンゾイル) ピロリジン - 2 - イル) メチル酢酸塩 3 e (3 2 3 m g、 6 5 %) を薄黄色の発泡状固体として得た。mp 4 6 - 4 9 ; [α]_D - 8 5 . 2 ° (c 0 . 3 6 , C H C l ₃) ; ¹ H N M R [(C D ₃) ₂ S O] 8 . 5 6 (s , 1 H)、 8 . 0 4 (d , J = 8 . 3 H z , 1 H)、 7 . 9 3 (d , J = 8 . 4 H z , 1 H)、 7 . 5 8 (t , J = 8 . 2 H z , 1 H)、 7 . 4 7 (t , J = 8 . 1 H z , 1 H)、 6 . 6 7 (s , 1 H)、 6 . 3 7 (s , 1 H)、 5 . 0 9 (s , D ₂ O と交換可能、 2 H)、 4 . 4 6 - 3 . 8 5 (m , 1 0 H)、 3 . 6 3 (s , 3 H)、 3 . 5 2 - 3 . 3 4 (m , 2 H)、 2 . 6 9 - 2 . 5 0 (m , 2 H)、 2 . 0 8 - 1 . 9 4 (m , 1 H)、 2 . 0 1 (s , 3 H)、 1 . 9 1 - 1 . 6 1 (m , 7 H)、 1 . 5 8 - 1 . 4 4 (m ,

40

50

2 H)、1.476及び1.470(2s, 18H)。HRMS(ESI)m/z C₄H₅ClN₃O₁₀に対する計測値: 830.3522, 実測値: 830.3543 [MH⁺]

【0489】

3e(293mg, 0.35mmol)及びDMAP(202mg, 1.65mmol)を含む乾燥DCM(7mL)の攪拌溶液に、窒素雰囲気下、20℃でジホスゲンを含む乾燥DCM(0.05M, 6.7mL, 0.33mmol)溶液を添加した。混合物を25分間攪拌し、次にアリルtert-ブチル(6-((4-(ヒドロキシメチル)フェニル)アミノ)-6-オキソヘキサン-1,5-ジイル)(S)-ジカルバメート3f(1.54g, 3.54mmol)を含む乾燥DCM(20mL)溶液を添加した。その混合物を、窒素雰囲気下、20℃で68時間攪拌し、次にEtOAc(300mL)と水(200mL)とに分割した。EtOAc層を分離し、水(100mL)で再度洗浄し、次に乾燥させ(MgSO₄)、30℃の浴槽温度で蒸発させた。結果として得られる橙色油を、シリカゲルでクロマトグラフィーにより精製して(30:0.5:10のEtOAc:MeOH:石油エーテルで溶出)、((S)-1-(2-(((4-(S)-2-((アリルオキシ)カルボニル)アミノ)-6-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ヘキサンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)-4-((6-(S)-1-(クロロメチル)-5-(ジ-tert-ブトキシホスホリル)オキシ)-1,2-ジヒドロ-3H-ベンゾ[e]インドール-3-イル)-6-オキソヘキシル)オキシ)-5-メトキシベンゾイル)ピロリジン-2-イル)メチル酢酸塩3g(385mg, 84%)を発泡状固体として得た。mp 72-75℃; [α]_D²⁰ -55.2°(c 0.53, CHCl₃); ¹H NMR[(CD₃)₂SO] 10.04(s, D₂Oと交換可能、1H)、9.12(br s, D₂Oと交換可能、1H)、8.56(s, 1H)、8.03(d, J=8.3Hz, 1H)、7.92(d, J=8.4Hz, 1H)、7.65-7.52(m, 3H、D₂O後に2Hに還元)、7.46(t, J=7.8Hz, 2H)、7.31(d, J=8.5Hz, 2H)、7.20(br s, 1H)、6.86(s, 1H)、6.75(不良に溶解したt、D₂Oと交換可能、1H)、5.97-5.83(m, 1H)、5.30(br d, J=17.3Hz, 1H)、5.17(br d, J=10.6Hz, 1H)、5.18-4.97(m, 2H)、4.51-3.85(m, 13H)、3.74(s, 3H)、3.43-3.23(m, 2H、水ピークにより部分的に不明瞭)、2.94-2.83(m, 2H)、2.65-2.50(m, 2H、DMSOピークにより部分的に不明瞭)、2.07-1.91(m, 1H)、2.01(br s, 3H)、1.88-1.43(m, 11H)、1.473-1.468(2s, 18H)、1.43-1.20(m, 4H)、1.35(s, 9H)。HRMS(ESI)m/z C₆₅H₈₉ClN₆O₁₇Pに対する計測値: 1291.5665、実測値: 1291.5705 [MH⁺]; C₆₅H₈₈ClKN₆O₁₇Pに対する計測値: 1329.5262、実測値: 1329.5264 [MK⁺]; C₆₅H₈₈ClN₆NaO₁₇Pに対する計測値: 1313.5554, 実測値: 1313.5524 [MNa⁺]

10

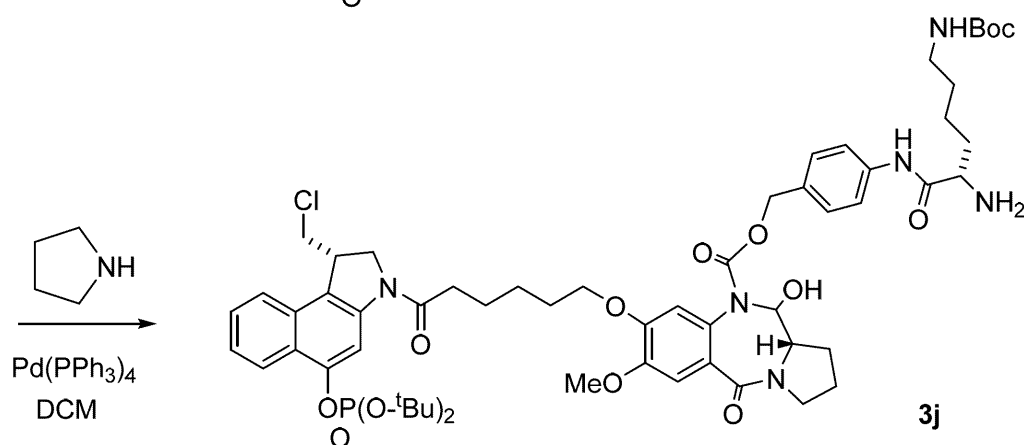
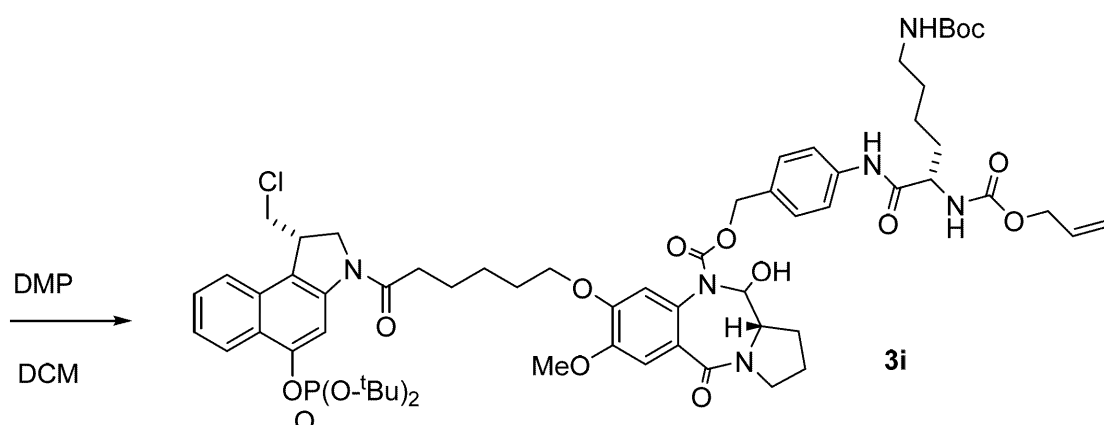
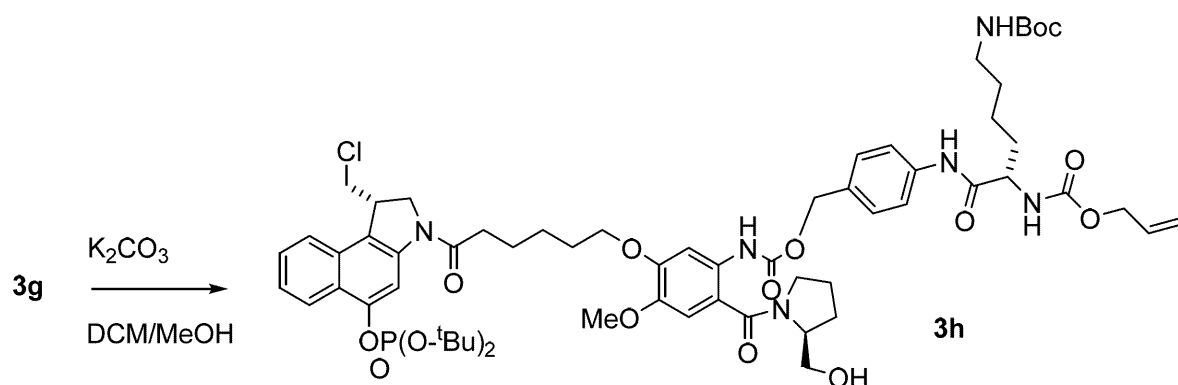
20

30

40

【0490】

工程C: 86の合成



【0491】

3g (366 mg、0.28 mmol) 及び K_2CO_3 (1.14 g、8.24 mmol) を含む DCM (9 mL) 及び MeOH (9 mL) の混合物を、0 で 3 時間半 攪拌した。混合物を、冷 EtOAc (200 mL) 及び 氷水 (150 mL) と共に 10 分間 攪拌した。EtOAc 層を分離し、水 (100 mL) で再度 洗浄し、次に 乾燥させ ($MgSO_4$)、25 の浴槽温度で 蒸発させて、アリル - tert - ブチル ((S) - 6 - ((4 - ((((5 - ((6 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - ((ジ - tert - ブトキシホスホリル) オキシ) - 1, 2 - ジヒドロ - 3H - ベンゾ [e] インドール - 3 - イル) - 6 - オキソヘキシル) オキシ) - 2 - ((S) - 2 - (ヒドロキシメチル) ピロリジン - 1 - カルボニル) - 4 - メトキシフェニル) カルバモイル) オキシ) メチル) フェニル) アミノ) - 6 - オキソヘキサン - 1, 5 - ジイル) ジカルバメート 3h (343 mg、97%) を無色の発泡状固体として得た。mp 71 - 75 ; []_D - 58.2 ° (c 0.57, $CHCl_3$) ; 1H NMR [(CD_3)₂SO] 10.04 (s, D_2O と交換可能、1H)、9.11 (br s, D_2O と交換可能、1H)、8.

40
50

5.6 (s, 1H)、8.03 (d, J = 8.3 Hz, 1H)、7.92 (d, J = 8.4 Hz, 1H)、7.65 - 7.53 (m, 3H、D₂O後に2Hに還元)、7.46 (t, J = 7.6 Hz, 2H)、7.32 (d, J = 8.6 Hz, 2H)、7.27 (br s, 1H)、6.93 (s, 1H)、6.75 (不良に溶解したt、D₂Oと交換可能、1H)、5.97 - 5.82 (m, 1H)、5.29 (br d, J = 17.2 Hz, 1H)、5.17 (br d, J = 10.5 Hz, 1H)、5.03 (br s, 2H)、4.73 (t, J = 5.8 Hz、D₂Oと交換可能、1H)、4.50 - 3.82 (m, 11H)、3.74 (s, 3H)、3.62 - 3.44 (m, 2H)、3.40 - 3.21 (m, 2H、水ピークにより部分的に不明瞭)、2.95 - 2.80 (m, 2H)、2.65 - 2.50 (m, 2H、DMSOピークにより部分的に不明瞭)、1.93 - 1.21 (m, 16H)、1.473 - 1.468 (2s, 18H)、1.35 (s, 9H)。HRMS (ESI) m/z C₆₃H₈₆ClKN₆O₁₆Pに対する計測値：1287.5158、実測値：1287.5113 [MK⁺]；C₆₃H₈₆ClN₆NaO₁₆Pに対する計測値：1271.5419、実測値：1271.5381 [MNa⁺]。【0492】

3h (322 mg、0.26 mmol)を含む乾燥DCM (14 mL)の攪拌溶液に、0 で Dess - Martinペリオジナン (DMP) (131 mg、0.31 mmol)を少量ずつ3分間にわたって添加した。反応混合物を0 でさらに2時間、次に20 で50時間攪拌した。混合物をDCM (40 mL)及び10%のNa₂S₂O₃ (40 mL)で希釈し、20 で10分間攪拌し、次にDCM (200 mL)と飽和NaHCO₃ 溶液 (150 mL)とに分割した。DCM層を分離し、水性層をDCM (2×50 mL)でさらに抽出した。合わせたDCM抽出物を、飽和NaHCO₃ 溶液 (2×100 mL)及び水 (2×100 mL)で洗浄し、次に乾燥させ (MgSO₄)、25 の浴槽温度で蒸発させた。結果として得られる橙色油を、シリカゲルでクロマトグラフィーにより精製して (40 : 1のCHCl₃ : MeOHで溶出)、4 - ((S) - 2 - ((アリルオキシ)カルボニル)アミノ) - 6 - ((tert - ブトキシカルボニル)アミノ)ヘキサンアミド)ベンジル (11aS) - 8 - ((6 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - ((ジ - tert - ブトキシホスホリル)オキシ) - 1, 2 - ジヒドロ - 3H - ベンゾ[e]インドール - 3 - イル) - 6 - オキソヘキシル)オキシ) - 11 - ヒドロキシ - 7 - メトキシ - 5 - オキソ - 2, 3, 11, 11a - テトラヒドロ - 1H - ベンゾ[e]ピロロ [1, 2 - a] [1, 4]ジアゼピン - 10 (5H) - カルボキシレート 3i (228 mg、71%)を薄茶色の発泡状固体として得た。mp 98 (分解)；[]_D + 74.5° (c 0.26, CHCl₃)；¹H NMR [(CD₃)₂SO] 10.02 (s, D₂Oと交換可能, 1H)、8.56 (s, 1H)、8.04 (d, J = 8.3 Hz, 1H)、7.92 (d, J = 8.4 Hz, 1H)、7.65 - 7.47 (m, 5H、D₂O後に4Hに還元)、7.25 - 7.12 (m, 2H, br s、及びD₂O交換上の1H)、7.03 (s, 1H)、6.83 - 6.64 (m, 2H)、6.48 (br s, D₂Oと交換可能, 1H)、5.96 - 5.80 (m, 1H)、5.52 - 5.39 (m, D₂O交換上のd、J = 9.6 Hz, 1H)、5.27 (br d, J = 16.8 Hz, 1H)、5.21 - 5.10 (m, 2H)、4.81 (br d, J = 12.3 Hz, 1H)、4.54 - 3.85 (m, 8H)、3.83 - 3.70 (m, 5H)、3.53 - 3.21 (m, 3H、水ピークにより部分的に不明瞭)、2.93 - 2.82 (m, 2H)、2.64 - 2.47 (m, 2H、DMSOピークにより部分的に不明瞭)、2.10 - 1.20 (m, 16H)、1.470及び1.464 (2s, 18H)、1.34 (s, 9H)。HRMS (ESI) m/z C₆₃H₈₄ClKN₆O₁₆Pに対する計測値：1285.5002、実測値：1285.4938 [MK⁺]；C₆₃H₈₄ClN₆NaO₁₆Pに対する計測値：1269.5262、実測値：1269.5220 [MNa⁺]。【0493】

3i (125 mg、0.10 mmol)を含むDCM (2 mL)の攪拌溶液に、窒素雰

雰囲気下、20℃でPd(PPh₃)₄(2.9mg、9.8% Pd)及びピロリジン(0.08mL、1.00mmol)を添加した。混合物を20℃で攪拌し、TLC(20:1のEtOAc:MeOH)によって監視した。40分後、さらにPd(PPh₃)₄(5.8mg、9.8% Pd)及びピロリジン(0.16mL、2.00mmol)を添加し、混合物をさらに3時間攪拌した。混合物をEtOAc(100mL)と水(100mL)とに分割した。EtOAc層を分離し、水(50mL)で再度洗浄し、次に乾燥させ(MgSO₄)、25℃の浴槽温度で蒸発させた。粗4-(6-(5-(tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ヘキサナミド)ベンジル-8-(6-(5-(tert-ブトキシホリル)オキシ)-1,2-ジヒドロ-3H-ベンゾ[e]インドール-3-イル)-6-オキソヘキシル)オキシ)-11-ヒドロキシ-7-メトキシ-5-オキソ-2,3,11,11a-テトラヒドロ-1H-ベンゾ[e]ピロロ[1,2-a][1,4]ジアゼピン-10(5H)-カルボキシレート3j(94mg、81%)を、さらに精製することなく、次の工程に使用した。HRMS(ESI)m/z C₅₉H₈₁ClN₆O₁₄Pに対する計測値:1163.5231、実測値:1163.5188[MH⁺]
【0494】

3j(91mg、0.078mmol)を含む乾燥DMA(1.0mL)溶液を、1-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)カルバモイル)シクロブタンカルボン酸1p(36mg、0.12mmol)、EDCI·HCl(34mg、0.18mmol)、及びTsOH(4.0mg、0.023mmol)を含む乾燥DMA(0.5mL)の予備形成された(20℃で10分間)混合物により、窒素雰囲気下、20℃で処理した。10分後、DIPEA(0.016mL、0.078mmol)を添加し、反応混合物を23時間攪拌した。混合物をEtOAc(100mL)と水(100mL)とに分割した。EtOAc層を分離し、飽和NaHCO₃(50mL)、水(50mL)でさらに洗浄した後、乾燥させた(MgSO₄)。25℃の浴槽温度で溶媒を蒸発させて粗生成物を得て、これをシリカゲルでクロマトグラフィーにより精製して(30:10:2のCHCl₃:EtOAc:MeOHで溶出)、4-(6-(5-(tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-2-(1-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)カルバモイル)シクロブタン-1-カルボキシアミド)ヘキサナミド)ベンジル(11aS)-8-(6-(5-(tert-ブトキシホリル)オキシ)-1,2-ジヒドロ-3H-ベンゾ[e]インドール-3-イル)-6-オキソヘキシル)オキシ)-11-ヒドロキシ-7-メトキシ-5-オキソ-2,3,11,11a-テトラヒドロ-1H-ベンゾ[e]ピロロ[1,2-a][1,4]ジアゼピン-10(5H)-カルボキシレート3k(63mg、56%)を薄茶色の発泡状固体として得た。mp 67-70℃; [α]_D+23.9°(c 2.09, CHCl₃); ¹H NMR[(CD₃)₂SO] 10.05(s, D₂Oと交換可能、1H)、8.56(s, 1H)、8.03(d, J=8.3Hz, 1H)、7.92(d, J=8.4Hz, 1H)、7.84-7.71(m, 2H, D₂Oと交換可能)、7.62-7.52(m, 3H)、7.46(t, J=7.7Hz, 1H)、7.22-7.13(m, 2H)、7.03(br s, 1H)、6.96(s, 2H)、6.71(br s, 2H, D₂O後に1Hに還元)、6.49(br s, D₂Oと交換可能、1H)、5.51-5.41(m, 但しJ=9.5HzでD₂O上のdを交換, 1H)、5.15(d, J=12.2Hz, 1H)、4.82(br d, J=12.4Hz, 1H)、4.47-3.85(m, 8H)、3.77(br s, 3H)、3.52-3.20(m, 3H, 水ピークにより部分的に不明瞭)、3.12-3.20(m, 但しJ=6.7HzでD₂O上のtを交換, 2H)、2.92-2.80(m, 2H)、2.65-2.50(m, 2H, DMSOピークにより部分的に不明瞭)、2.39(t, J=7.9Hz, 2H)、2.07-1.24(m, 28H)、1.469及び1.463(2s, 18H)、1.33(s, 9H)。HRMS(ESI)m/z C₇₄H₉₈ClN₈NaO₁₈Pに対する計測値:1475.63

10

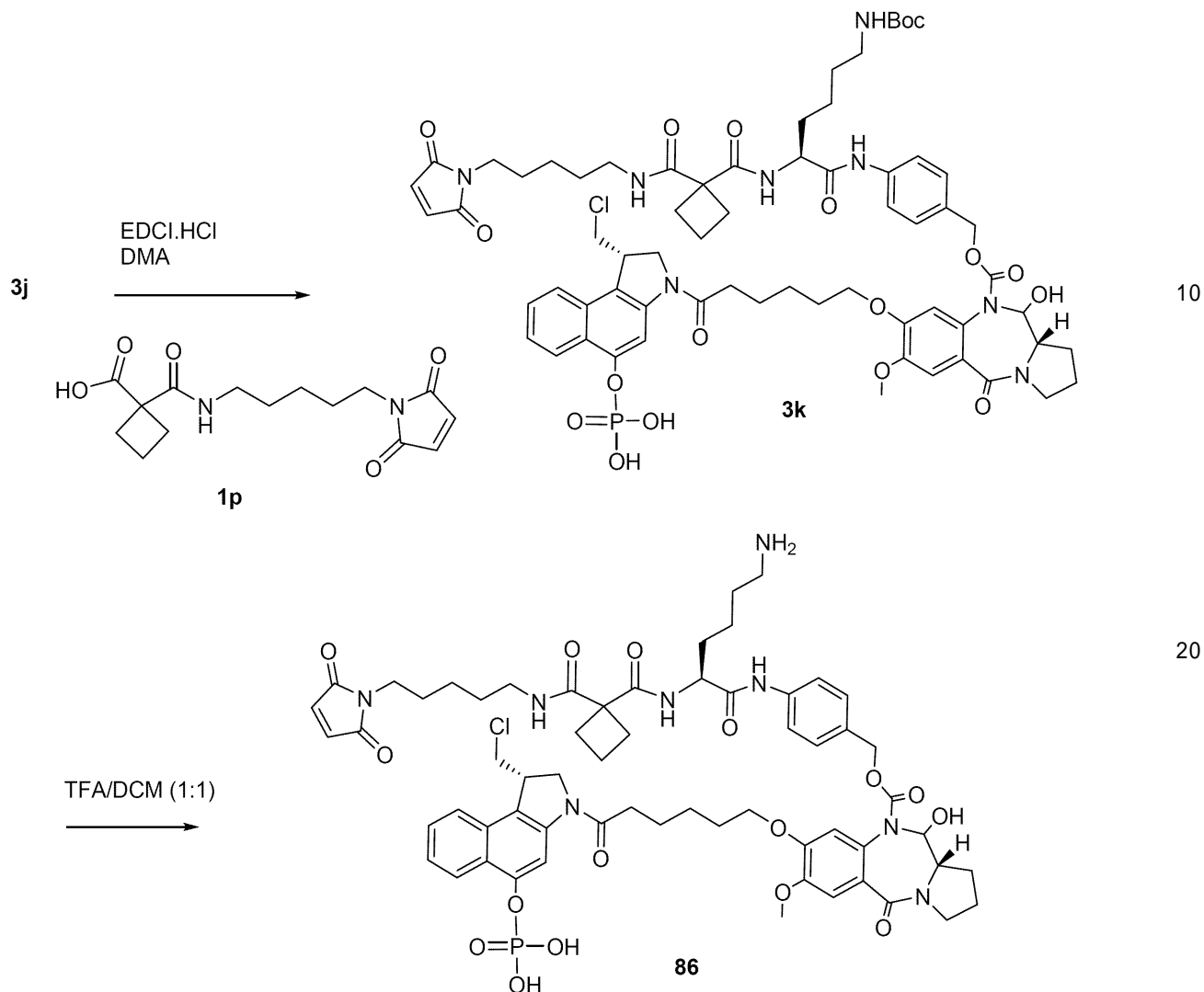
20

30

40

50

17、実測値：1475.6267 [MNa⁺]。



10

20

30

40

50

【0495】

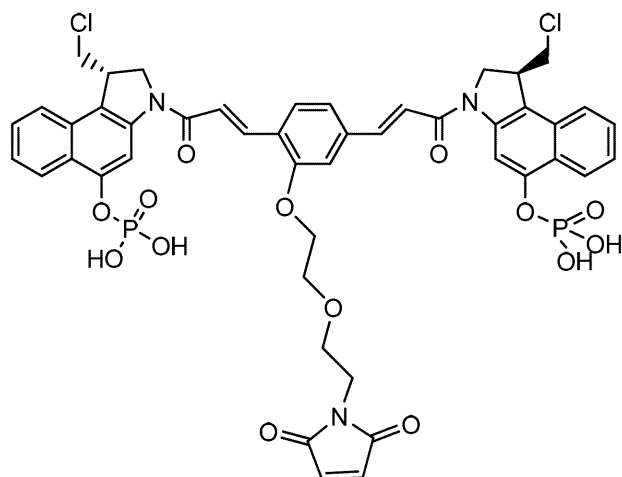
3k (45 mg、0.031 mmol) を含む DCM (1.0 mL) の攪拌溶液に、窒素下、20 °C で TFA (1.0 mL) を添加し、混合物を 15 分間攪拌した。石油エーテル (20 mL) を添加し、混合物を 30 分間攪拌した。上清をデカントし、この手順を EtOAc : 石油エーテル (1 : 5) (2 × 20 mL) を使用して繰り返した。結果として得られる固体を収集し、分取 HPLC により精製して [Synergi Polar RP カラム、CH₃CN (10% ~ 98%) 中の水性 TFA (pH = 2.56 ; 90% ~ 2%) / 10% 水、流量 1.2 mL / 分で 23 分間にわたる勾配溶出]、純粋な 86 (17.5 mg、38%) をベージュ固体として得た。純度 (HPLC) : 99.1% ; [α]_D²⁰ + 54.9° (c 0.18, MeOH) ; ¹H NMR [(CD₃)₂SO] 10.20 (s, D₂O と交換可能、1H)、8.50 (s, 1H)、8.20 - 7.78 (m, 7H、D₂O 後に 1H に還元)、8.12 (d, J = 9.1 Hz, 1H)、7.72 - 7.47 (m, 4H、D₂O 後に 3H に還元)、7.40 (t, J = 7.5 Hz, 1H)、7.17 (br d, J = 7.3 Hz, 2H)、7.03 (br s, 1H)、6.97 (s, 2H)、6.66 (br s, D₂O と交換可能、1H)、5.51 (br s, 1H)、5.48 (br d, J = 9.7 Hz, 1H)、5.32 - 5.18 (m、但し D₂O 後に d, J = 12.6 Hz, 1H)、4.75 (br d, J = 12.4 Hz, 1H)、4.44 - 3.81 (m, 8H)、3.77 (s, 3H)、3.52 - 3.21 (m, 5H、水ピークにより部分的に不明瞭)、3.04 (q、但し D₂O の t, J = 6.8 Hz, 2H)、2.80 - 2.68 (m, 2H)、2.39 (t, J = 7.7 Hz,

2 H)、2.12 - 1.08 (m, 28 H)。HRMS (ESI) m/z C₆₁H₇₅ClN₈O₁₆P に対する計測値: 1241.4722、実測値: 1241.4700 [MH⁺]; C₆₁H₇₄ClN₈NaO₁₆P に対する計測値: 1263.4541、実測値: 1263.4531 [MNa⁺]。

【0496】

C・CBI二量体リンカー-薬物中間体の合成

以下の式:



を有するを有するCBI-CBI二量体([(1S) - 1 - (クロロメチル) - 3 - [(E) - 3 - [4 - [(E) - 3 - [(1S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - ホスホノオキシ - 1, 2 - ジヒドロベンゾ[e]インドール - 3 - イル] - 3 - オキシ - プロブ - 1 - エニル] - 2 - [2 - [2 - (2, 5 - ジオキソピロール - 1 - イル) エトキシ] エトキシ] フェニル] プロブ - 2 - エノイル] - 1, 2 - ジヒドロベンゾ[e]インドール - 5 - イル] リン酸二水素、表Aの化合物78)は、以下のように合成された。試薬及び中間製剤を含む反応スキームについては、図11を参照されたい。

【0497】

室温で、(S) - tert - ブチル 1 - (クロロメチル) - 5 - ヒドロキシ - 1 H - ベンゾ[e]インドール - 3 (2 H) - カルボキシレート 51a (2.00 g、5.99 mmol) を含む DMF (5 mL) 溶液に、臭化ベンジル (7.13 mL、59.90 mmol)、ヨウ化カリウム KI (50 mg、0.30 mmol)、及び炭酸カリウム K₂CO₃ (4.14 g、30.00 mmol) を添加した。混合物を2時間攪拌し、次に酢酸エチルで希釈した。沈殿物を濾過した。濾過物を酢酸エチルと水とに再分液した。水性相を酢酸エチルで3回抽出した。合わせた有機抽出物を、水及び塩水で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥させ、セライトで濾過した。溶媒を回転蒸発器によって除去し、過剰な臭化ベンジルを圧送して除いた。結果として得られる残渣を、酢酸エチルと石油エーテルとの混合物 (1:10のv/v) を溶出剤として使用し、カラムクロマトグラフィーにより精製して (S) - tert - ブチル 5 - (ベンジルオキシ) - 1 - (クロロメチル) - 1 H - ベンゾ[e]インドール - 3 (2 H) - カルボキシレート 57a を白色固体として得た (1.97 g、78%) ; mp 186 - 188 。¹H NMR (CDCl₃) 8.29 (d, J = 8.3 Hz, 1H)、7.86 (br s, 1H)、7.65 (d, J = 8.29 Hz, 1H)、7.55 - 7.49 (m, 3H)、7.45 - 7.41 (m, 2H)、7.38 - 7.31 (m, 2H)、5.26 (s, 2H)、4.26 (br s, 1H)、4.13 (t, J = 10.8 Hz, 1H)、4.00 - 3.92 (m, 2H)、3.44 (t, J = 10.5 Hz, 1H)、1.61 (s, 9H) ppm。LRMS (APCI) 実測値 m/z 424.8 (M+H)。C₂₅H₂₇ClNO₃ は、424.2を必要とする。(Boger D., Ishizaki I., Kitos P. and Suntornwat O., (1990) J. Org. Chem., 55, 5

823 - 5832 .)

【0498】

氷浴で冷却した、(S) - tert - ブチル 5 - (ベンジルオキシ) - 1 - (クロロメチル) - 1H - ベンゾ[e]インドール - 3(2H) - カルボキシレート 57a ((S) - tert - ブチル 1 - (クロロメチル) - 5 - ヒドロキシ - 1H - ベンゾ[e]インドール - 3(2H) - カルボキシレート 51a (1.595 g、3.76 mmol) から調製) を含む DCM (15 mL) の溶液に、4 N の HCl を含む ジオキサン (40 mL) を添加した。混合物を室温に温め、2 時間攪拌した。全ての揮発性成分を圧送して除いた。結果として得られる残渣を、酢酸エチルと冷水性 5 % アンモニアとに再分液した。水性相を酢酸エチルで 3 回抽出した。合わせた有機抽出物を、水、続いて塩水で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥させ、セライトで濾過した。溶媒を除去して (S) - 5 - (ベンジルオキシ) - 1 - (クロロメチル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1H - ベンゾ[e]インドール 57b を茶色のガムとして得て、これを直接使用した。¹H NMR (DMSO) 8.04 (d, J = 8.2 Hz, 1H)、7.61 (d, J = 8.3 Hz, 1H)、7.53 (d, J = 7.2 Hz, 2H)、7.45 - 7.34 (m, 4H)、7.14 (t, J = 7.3 Hz, 1H)、6.60 (s, 1H)、5.24 (s, 2H)、3.96 - 3.92 (m, 1H)、3.84 (dd, J = 3.4, 10.7 Hz, 1H)、3.70 (t, J = 9.3 Hz, 1H)、3.60 (dd, J = 2.4, 10.0 Hz, 1H)、3.55 (t, J = 10.3 Hz, 1H) ppm。HRMS (ESI) 実測値 m/z 324.1150 (M+H)。C₂₀H₁₉ClNO は、324.1150 を必要とする。

10

20

【0499】

中間体 57b を氷浴中で冷却し、ピリジン (15 mL)、続いてトリフルオロ酢酸無水物 (3.14 mL、22.57 mmol) を添加した。結果として得られる混合物を 10 分間攪拌し、氷を添加した。混合物を酢酸エチルと水とに再分液した。水性相を酢酸エチルで 3 回抽出した。合わせた有機抽出物を、水、続いて塩水で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥させ、セライトで濾過した。溶媒を除去し、結果として得られる残渣を、酢酸エチルと石油エーテルとの混合物 (1:10 の v/v) を溶出剤として使用し、カラムクロマトグラフィーにより精製して、(S) - 1 - (5 - (ベンジルオキシ) - 1 - (クロロメチル) - 1H - ベンゾ[e]インドール - 3(2H) - イル) - 2, 2, 2 - トリフルオロエタノン 66a を白色固体として得た (1.11 g、70%)。mp 167 - 170。¹H NMR (CDCl₃) 8.37 (d, J = 8.3 Hz, 1H)、8.05 (s, 1H)、7.72 (d, J = 8.2 Hz, 1H)、7.61 - 7.54 (m, 3H)、7.49 - 7.42 (m, 3H)、7.39 - 7.35 (m, 1H)、5.30 (ABq, J = 11.7, 15.7 Hz, 2H)、4.63 - 4.59 (m, 1H)、4.43 - 4.38 (m, 1H)、4.15 - 4.09 (m, 1H)、3.97 - 3.93 (m, 1H)、3.49 (dd, J = 9.9, 11.3 Hz, 1H) ppm。HRMS (ESI) 実測値 m/z 442.0799 (M+Na)。C₂₂H₁₇ClF₃NNaO₂ は、442.0795 を必要とする。

30

【0500】

- 10 で、66a (1.10 g、2.62 mmol) を含む THF (20 mL) 溶液に、25 % 水性ギ酸アンモニウム (20 mL)、続いて Pd - C 触媒 (10%、湿性、550 mg) を添加した。その混合物を 2 時間攪拌した後、Pd - C 触媒 (550 mg) をさらに添加した。結果として得られる混合物を、- 10 で終夜攪拌し、触媒をセライトで濾過して除いた。THF を濾過物から除去し、残渣を酢酸エチルと水とに再分液した。水性相を酢酸エチルで 3 回抽出した。合わせた有機抽出物を、水、続いて塩水で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥させ、セライトで濾過した。溶媒を除去し、結果として得られる残渣を、酢酸エチルと石油エーテルとの混合物 (1:5 の v/v) を溶出剤として使用し、カラムクロマトグラフィーにより精製して、(S) - 1 - (1 - (クロロメチル) - 5 - ヒドロキシ - 1H - ベンゾ[e]インドール - 3(2H) - イル) - 2, 2, 2 - トリフルオロエタノン 66b をオフホワイト固体として得た (758 mg、88%)。mp

40

50

209 - 212。¹H NMR (CDCl₃) 8.33 (d, J = 8.2 Hz, 1H)、8.10 (s, 1H)、7.85 (s, 1H)、7.64 (d, J = 8.2 Hz, 1H)、7.60 - 7.56 (m, 1H)、7.51 - 7.47 (m, 1H)、4.60 - 4.56 (m, 1H)、4.41 - 4.36 (m, 1H)、4.00 - 3.95 (m, 1H)、3.93 - 3.90 (m, 1H)、3.44 (dd, J = 9.8、11.3 Hz、1H) ppm。HRMS (ESI) 実測値 m/z 352.0331 (M + Na)。C₁₅H₁₁ClF₃NNaO₂ は、352.0323を必要とする。

【0501】

66b (250 mg、0.76 mmol) を含む THF (15 mL) 溶液に、テトラゾール (アセトニトリル中 3%、13.5 mL、4.55 mmol)、続いてジ-tert-ブチル-N,N-ジ-イソプロピルホスホルアミダイト (1.51 mL、4.55 mmol) を添加した。この混合物を室温で終夜攪拌し、次に氷浴中で冷却して、H₂O₂ (30% 水性溶液、0.78 mL、7.58 mmol) を滴下添加した。結果として得られる混合物を室温に温め、5時間攪拌した。反応物は、10% 水性亜硫酸ナトリウムを添加し、氷浴中で冷却しながらクエンチした。有機揮発物を回転蒸発器により除去した。結果として得られる混合物を、酢酸エチルと水とに再分液した。水性相を酢酸エチルで3回抽出した。合わせた有機抽出物を、水、続いて塩水で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥させ、セライトで濾過した。溶媒を除去し、結果として得られる残渣を、酢酸エチルと石油エーテルとの勾配混合物 (1:6 ~ 1:3 の v/v) を溶出剤として使用し、Florisil (登録商標) (US Silica) カラムクロマトグラフィーにより精製して、(S)-ジ-tert-ブチル1-(クロロメチル)-3-(2,2,2-トリフルオロアセチル)-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドール-5-イルリン酸塩 66c を無色油として得た (367 mg、93%) ; ¹H NMR (DMSO) 8.44 (d, J = 1.0 Hz, 1H)、8.11 (d, J = 8.1 Hz, 1H)、8.06 (d, J = 8.2 Hz, 1H)、7.69 - 7.65 (m, 1H)、7.63 - 7.59 (m, 1H)、4.61 - 4.56 (m, 1H)、4.46 - 4.41 (m, 1H)、4.15 - 4.12 (m, 1H)、4.06 - 4.00 (m, 1H)、1.50 (s, 9H)、1.48 (s, 9H) ppm。³¹P NMR (DMSO) -15.54 ppm。HRMS (ESI) 実測値 m/z 544.1236 (M + Na)。C₂₃H₂₈ClF₃NNaO₅P は、544.1238を必要とする。

【0502】

氷浴中で冷却した、66c (239 mg、0.46 mmol) を含む MeOH (2 mL) 溶液に、CsCO₃ (298 mg、0.92 mmol) 及び数滴の水を添加した。混合物を氷浴中で1時間攪拌し、次に酢酸エチルと水とに再分液した。水性相を酢酸エチルで3回抽出した。合わせた有機抽出物を、水及び塩水で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥させ、セライトで濾過して、溶媒を除去した。結果として得られる残渣を、酢酸エチルに溶解し、Florisil (登録商標) (US Silica) カラムクロマトグラフィーのパッドで濾過して、(S)-ジ-tert-ブチル1-(クロロメチル)-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドール-5-イルリン酸塩 66d をオフホワイトガムとして得て (183 mg、94%)、これを、さらに精製することなく、次の工程に使用した。¹H NMR (DMSO) 8.08 (d, J = 8.4 Hz, 1H)、7.58 (d, J = 8.3 Hz, 1H)、7.46 - 7.42 (m, 1H)、7.25 - 7.21 (m, 1H)、7.13 (d, J = 0.8 Hz, 1H)、4.00 - 3.93 (m, 1H)、3.87 - 3.78 (m, 2H)、3.54 - 3.42 (m, 2H)、1.50 (s, 9H)、1.49 (s, 9H) ppm。³¹P NMR (DMSO) -15.58 ppm。HRMS (ESI) 実測値 m/z 426.1587 (M + H)。C₂₁H₃₀ClNO₄P は、426.1595を必要とする。

【0503】

76 mg (0.18 mmol) の 1 (66d、上述の手順によって新たに作製した) に、2 (18 mg、0.045 mmol)、EDCI 塩酸塩 (69 mg、0.36 mmol)

)、トルエンスルホン酸(0.8 mg、0.005 mmol)、及びDMA(0.25 mL)を添加した。混合物を終夜撹拌した後、DMAの大部分を真空下で除去し、残渣を酢酸エチルと水とに再分液した。水性相を酢酸エチルで3回抽出した。合わせた有機抽出物を、水、続いて塩水で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥させ、セライトのパッドで濾過した。溶媒を除去し、結果として得られる残渣を最小DCMに溶解し、ヘプタンを添加することによって沈殿させて粗生成物(54 mg)を得て、これを分取HPLCによりさらに精製して(カラム: Synergi-Max RP 4 μ、250 × 21.20 mm、移動相: A/B = 20% ~ 1% (A: ギ酸アンモニウム pH 3.45、B: 水中の90% アセトニトリル)、流量12 mL/分、勾配方法、波長: 254 nm、325 nm)、3 (17 mg、30%)を黄色固体として得た。¹H NMR(CDCl₃) 8.72 (br s, 2H)、8.23 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、7.96 (d, J = 15.2 Hz, 1H)、7.83 (d, J = 15.3 Hz, 1H)、7.71 (d, J = 8.2 Hz, 2H)、7.54 - 7.50 (m, 3H)、7.42 - 7.39 (m, 2H)、7.26 - 7.12 (m, 3H)、6.95 - 6.88 (m, 1H)、6.67 (s, 2H)、4.57 - 4.52 (m, 2H)、4.47 - 4.38 (m, 2H)、4.28 - 4.24 (m, 2H)、4.16 - 4.09 (m, 2H)、4.00 - 3.94 (m, 4H)、3.78 (見掛け上のs, 4H)、3.55 - 3.48 (m, 2H)、1.57 (s, 36H) ppm。³¹P NMR(CDCl₃) -15.64 (s) ppm。HRMS(ESI)実測値 m/z 1238.3862 (M+Na)。C₆₂H₇₃Cl₂N₃NaO₁₄P₂は、1238.3837を必要とする。

10

20

【0504】

氷浴中で冷却した、3 (16 mg、0.013 mmol)を含むDCM(1 mL)溶液に、TFA(0.5 mL、3.24 mmol)を添加した。混合物を室温に温め、3時間撹拌した。揮発性成分の全てを圧送して除き、結果として得られる残渣を酢酸エチルで粉碎して、化合物78を黄色固体として得た(13 mg、100% HPLC純度100%)。¹H NMR(DMSO) 8.60 (s, 2H)、8.12 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、7.95 - 7.87 (m, 4H)、7.72 (d, J = 15.1 Hz, 1H)、7.61 - 7.57 (m, 2H)、7.53 - 7.45 (m, 4H)、7.38 - 7.32 (m, 2H)、6.97 (s, 2H)、4.60 - 4.48 (m, 4H)、4.30 - 4.28 (m, 4H)、4.08 - 3.88 (m, 6H)、3.68 - 3.58 (m, 4H)。³¹P NMR(DMSO) -5.94 (s) ppm。HRMS(ESI)実測値 m/z 1014.1301 (M+Na)。C₄₆H₄₁Cl₂N₃NaO₁₄P₂は、1014.1333を必要とする。

30

【0505】

D. リンカー - 薬物部分の抗体へのコンジュゲート

Hu7C2抗体 - 薬物複合体(ADC)は、hu7C2.v.2.2.LAを、選択された薬物 - 部分に対して重鎖A118C突然変異(チオ - hu7C2 - HC A118C)または軽鎖K149C突然変異(チオ - hu7C2 - LC - K149C)でコンジュゲートすることによって産生される。最初に単離されるため、抗体中の操作されたシステイン残基は、細胞チオール(例えば、グルタチオン)との混合ジスルフィドとして存在し、そのためコンジュゲートには使用不可能である。これらの抗体の部分還元(例えば、DTTによる)、精製、及びデヒドロアスコルビン酸(DHAA)での再酸化により、例えば、Junutula et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26: 925 - 932及びUS 2011/0301334で以前に説明されたように、コンジュゲートに使用可能な遊離システインスルフィドリル基を有する抗体がもたらされる。簡潔に述べると、抗体を薬物 - リンカー部分と組み合わせて、抗体の遊離システイン残基に薬物 - リンカー部分をコンジュゲートさせることができる。数時間後、ADCを精製する。各ADCの薬物負荷(1抗体当たりの薬物部分の平均数)を決定した。それは1.4 ~ 2.0の範囲内であった。

40

【0506】

50

結果として得られるADC構造及び下記でそれらに使用される用語を図12に示す。

【0507】

実施例3：MMTV-Her2 Fo5トランスジェニック乳房腫瘍移植異種移植片モデルにおけるhu7C2抗体薬物複合体の有効性

CRL nu/nuマウス(Charles River Laboratory)に、MMTV-Her2 Fo5トランスジェニック乳房腫瘍の約2×2mm断片を移植した。腫瘍が100～250mm³の平均腫瘍体積に到達したとき、動物を7つの群(1群当たり各8～10匹を含む)に分けた。マウスは、静脈内尾静脈注入を介して、以下の治療薬、(1)ビヒクル(20mM L-ヒスチジン、240mMスクロース、0.02%のTween-20、pH5.5)、(2)チオ-hu7C2-HC-A118C-ジスルフィド-PBD、0.3mg/kg、(3)チオ-hu7C2-HC-A118C-ジスルフィド-PBD、1mg/kg、(4)チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-PBD、0.3mg/kg、(5)チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-PBD、1mg/kg、(6)チオ-対照Ab-HC-A118C-ジスルフィド-PBD、1mg/kg、または(7)チオ-対照Ab-LC-K149C-ジスルフィド-PBD、1mg/kgのうちの1つの単回投与を1日目に受けた。試験期間中、腫瘍及び体重の測定を1週間に少なくとも1回行った。腫瘍が1000～2000mm³に到達したとき、またはマウスがその体重の20%以上を喪失した場合、マウスを安楽死させた。腫瘍体積を、カリパスを使用して2次元(長さ及び幅)で測定し、その腫瘍体積を、式：腫瘍サイズ(mm³)=(より大きい測定値×より小さい測定値²)×0.5を使用して算出した。

10

20

【0508】

この実験の結果を表5及び図4に示す。10日目のものであるビヒクル対照群を除いて、表5のデータは21日目のものである。各群は、試験の開始時に8匹のマウス、及び21日目に8匹のマウス(またはビヒクル対照群の場合、10日目に8匹)を含んでいた。AUC/日%TGI(腫瘍成長阻害)は、以下の式、%TGI=100×(1-AUC治療/日÷AUCビヒクル/日)を使用して算出した。PR=部分奏功は、試験中の任意の日の、出発腫瘍体積と比較した腫瘍体積の50%超～100%未満の低減として定義される。どの動物も、この実験において完全奏功を示さなかった。

表5：MMTV-Her2 Fo5トランスジェニック乳房腫瘍移植異種移植片モデルにおけるhu7C2 ADCの有効性

30

| 群 | 腫瘍体積、 最終日 | AUC/日%T GI (下、上) | P R | B W 変 化%、最終 日 |
|---|--------------|---------------------|--------|---------------------|
| (1) ビヒクル | 1 2 5 8 | 0 (0, 0) | 0 | 1 2. 6 5 |
| (2) チオ-h u 7 C 2 -HC-A 1 1 8 C-ジ スルフィド-P B D、 0. 3 m g / k g | 6 0 4 | 7 2 (5 1, 8 7) | 0 | 5. 3 4 |
| (3) チオ-h u 7 C 2 -HC-A 1 1 8 C-ジ スルフィド-P B D、 1 m g / k g | 1 2 7 | 9 8 (8 9, 1 0 8) | 2 | 2. 8 1 |
| (4) チオ-h u 7 C 2 -LC-K 1 4 9 C-ジ スルフィド-P B D、 0. 3 m g / k g | 2 0 8 | 8 2 (6 7, 9 3) | 1 | 3. 8 3 |
| (5) チオ-h u 7 C 2 -LC-K 1 4 9 C-ジ スルフィド-P B D、 1 m g / k g | 7 0 | 9 9 (8 8, 1 0 7) | 8 | 1. 9 0 |
| (6) チオ-対照 A b - HC-A 1 1 8 C-ジス ルフィド-P B D、 1 m g / k g | 1 3 2 7 | 6 1 (3 5, 7 9) | 0 | 6. 4 0 |
| (7) チオ-対照 A b - LC-K 1 4 9 C-ジス ルフィド-P B D、 1 m g / k g | 7 5 7 | 6 1 (3 7, 7 9) | 0 | 2. 8 9 |

10

20

30

40

【0509】

表5に示されるように、チオ-h u 7 C 2 - L C - K 1 4 9 C - ジスルフィド - P B D は、1 m g / k g で8部分奏功及び0. 3 m g / k g で1部分奏功を示した。チオ-h u 7 C 2 - H C - A 1 1 8 C - ジスルフィド - P B D は、1 m g / k g で2部分奏功を示し、0. 3 m g / k g では部分奏功を示さなかった。

【0510】

実施例4：MMTV - H e r 2 F o 5 トランスジェニック乳房腫瘍移植異種移植片モデ

50

ルにおける hu7C2 抗体薬物複合体の有効性

CRL nu/nuマウス (Charles River Laboratory) に、MMTV-Her2 Fo5 トランスジェニック乳房腫瘍の約 $2 \times 2 \text{ mm}$ 断片を移植した。腫瘍が $100 \sim 250 \text{ mm}^3$ の平均腫瘍体積に到達したとき、動物を 9 群に分けた (各群当たり 8 ~ 10 匹の動物)。マウスは、静脈内尾静脈注入を介して、以下の治療薬、(1) ビヒクル (20 mM の L-ヒスチジン、240 mM のスクロース、0.02% の Tween-20、pH 5.5)、(2) チオ-hu7C2-LC-K149C-CBI 二量体、1 mg/kg、(3) チオ-hu7C2-LC-K149C-CBI 二量体、3 mg/kg、(4) チオ-hu7C2-LC-K149C-CBI 二量体、6 mg/kg、(5) チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、1 mg/kg、(6) チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、3 mg/kg、(7) チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、6 mg/kg、(8) チオ-対照 Ab-LC-K149C-CBI 二量体、6 mg/kg、または (9) チオ-対照 Ab-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、6 mg/kg のうちの 1 つの単回投与を 1 日目に受けた。試験期間中、腫瘍及び体重の測定を 1 週間に少なくとも 1 回行った。腫瘍が $1000 \sim 2000 \text{ mm}^3$ に到達したとき、またはマウスがその体重の 20% 以上を喪失した場合、マウスを安楽死させた。腫瘍体積を、カリパスを使用して 2 次元 (長さ及び幅) で測定し、その腫瘍体積を、式：腫瘍サイズ (mm^3) = (より大きい測定値 \times より小さい測定値²) \times 0.5 を使用して算出した。

10

20

【0511】

この実験の結果を表 6 及び図 5 に示す。14 日目のものであるビヒクル対照群を除いて、表 6 のデータは 21 日目のものである。各群は、試験の開始時に 8 匹のマウス、及び 14 日目に 7 匹のマウスを有していたビヒクル対照群を除いて、試験の開始時に 8 匹のマウス、及び 21 日目に 8 匹のマウスを含んでいた。AUC/日% TGI (腫瘍成長阻害) 及び PR を、前述の実施例に記載されるように決定した。CR = 完全奏功は、試験中の任意の日の、腫瘍体積の 100% 低減 (測定可能な腫瘍なし) として定義される。実験に使用された各抗体-薬物複合体の薬物：抗体比 (DAR) は、2 列目に示される。

表 6：MMTV-Her2 Fo5 トランスジェニック乳房腫瘍移植異種移植片モデルにおける hu7C2 ADC の有効性

30

| 群 | DAR | 腫瘍体積、 最終日 | AUC/日% TGI (下、 上) | P R | C R | B W 変 化%、最 終日 |
|---|-----|--------------|-------------------------|--------|--------|---------------------|
| (1) ビヒクル | | 1331 | 0 (0, 0) | 0 | 0 | 11.4 1 |
| (2) チオ- 7C2-LC-K 149C-CBI 二量体、1mg/ kg | 2 | 151 | 101 (9 3, 109) | 1 | 0 | 3.77 |
| (3) チオ- 7C2-LC-K 149C-CBI 二量体、3mg/ kg | 2 | 72 | 109 (10 3, 119) | 6 | 0 | 6.18 |
| (4) チオ- 7C2-LC-K 149C-CBI 二量体、6mg/ kg | 2 | 32 | 114 (10 7, 124) | 5 | 2 | 0.07 |
| (5) チオ- 7C2-LC-K 149C-ジスル フィド-CBI- PBD、1mg/ kg | 1.4 | 1095 | 69 (40, 86) | 0 | 0 | 6.84 |
| (6) チオ- 7C2-LC-K 149C-ジスル フィド-CBI- PBD、3mg/ kg | 1.4 | 314 | 94 (83, 102) | 0 | 0 | 2.48 |

10

20

30

40

| | | | | | | |
|---|-----|------|--------------------|---|---|-----------|
| (7) チオ- hu7C2-LC-K 149C-ジスル フィド-CBI- PBD、6mg/ kg | 1.4 | 150 | 108 (10 2, 117) | 1 | 0 | 4.01 |
| (8) チオ-対照 Ab-LC-K1 49C-CBI二 量体、6mg/ kg | 2 | 231 | 98 (87, 106) | 1 | 0 | 4.17 |
| (9) チオ-対照 Ab-LC-K1 49C-ジスル フィド-CBI- PBD、6mg/ kg | 1.4 | 1143 | 48 (8, 7 4) | 0 | 0 | 11.1 0 |

10

20

【0512】

表6に示されるように、チオ-hu7C2-LC-K149C-CBI二量体は、1mg/kgで1部分奏功、3mg/kgで6部分奏功、ならびに6mg/kgで5部分奏功及び2完全奏功を示した。チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBDは、6mg/kgで1部分奏功を示した。用量を1mg/kgに低減した第2の試験において、1mg/kgでのチオ-hu7C2-LC-K149C-CBI二量体は、腫瘍退縮をもたらしたが、1mg/kgでのチオ-対照Ab-LC-K149C-CBI二量体は、60%の%TGIをもたらした。いかなる特定の理論によっても拘束されることを意図しないが、対照の活性は、非標的活性を反映すると考えられる。

30

【0513】

実施例5：MMTV-Her2 Fo5トランスジェニック乳房腫瘍移植異種移植片モデルにおけるhu7C2抗体薬物複合体の有効性

CRL nu/nuマウス(Charles River Laboratory)に、MMTV-Her2 Fo5トランスジェニック乳房腫瘍の約2×2mm断片を移植した。腫瘍が100~250mm³の平均腫瘍体積に到達したとき、動物を7つの群(1群当たり各8~10匹を含む)に分けた。マウスは、静脈内尾静脈注入を介して、以下の治療薬、(1)ピヒクル(20mMのL-ヒスチジン、240mMのスクロース、0.02%のTween-20、pH5.5)、(2)チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-PNU、1mg/kg、(3)チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-PNU、3mg/kg、(4)チオ-対照Ab-LC-K149C-ジスルフィド-PNU、1mg/kg、(5)チオ-対照Ab-LC-K149C-ジスルフィド-PNU、3mg/kg、(6)トラスツズマブ-MCC-DM1(T-DM1、トラスツズマブエムタンシン、アド-トラスツズマブエムタンシン)、3mg/kg、または(

40

50

7) T - DM 1、10 mg / kg のうちの1つの単回投与を1日目に受けた。試験期間中、腫瘍及び体重の測定を1週間に少なくとも1回行った。腫瘍が1000 ~ 2000 mm³ に到達したとき、またはマウスがその体重の20%以上を喪失した場合、マウスを安楽死させた。腫瘍体積を、カリパスを使用して2次元(長さ及び幅)で測定し、その腫瘍体積を、式：腫瘍サイズ(mm³) = (より大きい測定値 × より小さい測定値²) × 0.5 を使用して算出した。

【0514】

この実験の結果を表7及び図6に示す。14日目のものであるビヒクル対照群、チオ - 対照 Ab - LC - K149C - ジスルフィド - PNU 1 mg / kg 群、及び T - DM 1 3 mg / kg 群を除いて、表7のデータは20日目のものである。各群は、試験の開始時に8匹のマウス、及び最後に7匹のマウスを有していたビヒクル対照群を除いて、試験の開始時に8匹のマウス、及び最後に8匹のマウスを含んでいた。AUC / 日 % TGI (腫瘍成長阻害) を、前述の実施例に記載されるように決定した。この実験において、部分奏功も完全奏功もなかった。実験に使用された各抗体 - 薬物複合体の薬物：抗体比(DAR)は、2列目に示される。

表7：MMTV - Her2 F05 トランスジェニック乳房腫瘍移植異種移植片
モデルにおける hu7C2 ADC の有効性

| 群 | DAR | 腫瘍体積、 最終日 | AUC/日% TGI (下、 上) | BW 変 化%、最終 日 |
|---|-----|--------------|-------------------------|--------------------|
| (1) ビヒクル | | 1663 | 0 (0, 0) | 8.08 |
| (2) チオ-hu7 C2-LC-K14 9C-ジスルフィド -PNU、1mg/ kg | 1.9 | 616 | 87 (72, 95) | 0.52 |
| (3) チオ-hu7 C2-LC-K14 9C-ジスルフィド -PNU、3mg/ kg | 1.9 | 162 | 104 (9 9, 110) | 3.17 |
| (4) チオ-対照A b-LC-K149 C-ジスルフィド- PNU、1mg/kg | 1.9 | 1160 | 31 (-2 1, 60) | 6.26 |
| (5) チオ-対照A b-LC-K149 C-ジスルフィド- PNU、3mg/kg | 1.9 | 607 | 81 (61, 92) | 5.48 |
| (6) T-DM1、 3mg/kg | 3.8 | 1075 | 38 (-5, 64) | 3.65 |
| (7) T-DM1、 10mg/kg | 3.8 | 734 | 86 (73, 95) | 4.24 |

10

20

30

40

【0515】

これらのデータから、チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-PNU (3mg/kg) が、このモデルにおいてT-DM1または対照免疫複合体よりも優れた有効性を有することが示唆される。

【0516】

実施例6：MMTV-Her2 Fo5トランスジェニック乳房腫瘍移植異種移植片モデ

50

ルにおける hu7C2 抗体薬物複合体の有効性

CRL nu/nu マウス (Charles River Laboratory) に、MMTV-Her2 Fo5 トランスジェニック乳房腫瘍の約 2×2 mm 断片を移植した。腫瘍が $100 \sim 250$ mm³ の平均腫瘍体積に到達したとき、動物を 9 群に分けた (各群当たり 8 ~ 10 匹の動物)。マウスは、静脈内尾静脈注入を介して、以下の治療薬、(1) ビヒクル (20 mM の L-ヒスチジン、240 mM のスクロース、0.02% の Tween-20、pH 5.5)、(2) チオ-hu7C2-HC-A118C-マレイミド-PNU、約 1 mg/kg (IV 群に一致する薬物用量)、(3) チオ-hu7C2-LC-K149C-マレイミド-PNU、0.3 mg/kg、(4) チオ-hu7C2-LC-K149C-マレイミド-PNU、1 mg/kg、(5) チオ-hu7C2-LC-K149C-マレイミド-PNU、3 mg/kg、(6) チオ-対照 Ab-LC-K149C-マレイミド-PNU、3 mg/kg、(7) チオ-hu7C2-LC-K149C-CBI二量体、0.3 mg/kg、(8) チオ-hu7C2-LC-K149C-CBI二量体、1 mg/kg、または (9) チオ-対照 Ab-LC-K149C-CBI二量体、1 mg/kg のうちの 1 つの単回投与を 1 日目に受けた。試験期間中、腫瘍及び体重の測定を 1 週間に少なくとも 1 回行った。腫瘍が $1000 \sim 2000$ mm³ に到達したとき、またはマウスがその体重の 20% 以上を喪失した場合、マウスを安楽死させた。腫瘍体積を、カリパスを使用して 2 次元 (長さ及び幅) で測定し、その腫瘍体積を、式：腫瘍サイズ (mm³) = (より大きい測定値 \times より小さい測定値²) \times 0.5 を使用して算出した。

10

20

【0517】

この実験の結果を表 8 及び図 7 に示す。表 8 のデータは、各群の試験の最終日のものであり、表の 2 列目に示される。各群は、試験の最後に 7 匹のマウスを有していた群 (9) を除いて、試験の開始時に 8 匹のマウス、及び最後に 8 匹のマウスを含んでいた。AUC/日% TGI (腫瘍成長阻害)、PR、及び CR を、前述の実施例に記載されるように決定した。実験に使用された各抗体-薬物複合体の薬物：抗体比 (DAR) は、2 列目に示される。

表 8 : MMTV-Her2 Fo5 トランスジェニック乳房腫瘍移植異種移植片モデルにおける hu7C2 ADC の有効性

| 群 | DA R | 最 終 日 | 腫瘍体 積、最 終日 | A U C / 日 % T G I (下、上) | P R | C R | B W 変 化 %、 最終日 |
|---|----------------|-------------|------------------|-------------------------------|--------|--------|----------------------|
| (1) ビヒクル | | 1 4 | 1 6 8 1 | 0 (0 , 0) | 0 | 0 | 9 . 9 8 |
| (2) チオ- h u 7 C 2 - H C - A 1 1 8 C - マレイ ミド- P N U、約 1 m g / k g | 1. 7 3 | 2 8 | 1 0 5 4 | 8 8 (6 9, 9 9) | 0 | 0 | 1 0 . 2 1 |
| (3) チオ- h u 7 C 2 - L C - K 1 4 9 C - マレイ ミド- P N U、 0. 3 m g / k g | 1. 8 | 2 0 | 1 4 6 9 | 6 2 (2 5, 8 2) | 0 | 0 | 8 . 1 1 |
| (4) チオ- h u 7 C 2 - L C - K 1 4 9 C - マレイ ミド- P N U、 1 m g / k g | 1. 8 | 3 5 | 2 8 8 | 1 0 3 (9 4 , 1 1 1) | 3 | 0 | 8 . 7 3 |
| (5) チオ- h u 7 C 2 - L C - K 1 4 9 C - マレイ ミド- P N U、 3 m g / k g | 1. 8 | 3 5 | 8 | 1 2 1 (1 1 2 , 1 3 7) | 0 | 8 | 6 . 6 5 |
| (6) チオ- 対照 A b - L C - K 1 4 9 C - マレイミ ド- P N U、 3 m g / k g | 1. 4 - 2 | 1 7 | 1 2 4 4 | 5 6 (7 , 7 9) | 0 | 0 | 5 . 4 0 |
| (7) チオ- h u 7 C 2 - L C - K 1 4 9 C - C B I | 2 | 3 5 | 8 3 3 | 9 0 (7 4 , 1 0 0) | 0 | 0 | 9 . 1 4 |

10

20

30

40

| | | | | | | | |
|--------------------------------------|---|--------|----------|-----------------------|---|---|----------|
| 二量体、0.3 mg/kg | | | | | | | |
| (8) チオ-hu7C2-LC-K149C-CBI二量体、1 mg/kg | 2 | 3 5 | 65 | 100 (9 1, 10 9) | 5 | 0 | 7.1 4 |
| (9) チオ-対照Ab-LC-K149C-CBI二量体、1 mg/kg | 2 | 2 0 | 132 8 | 59 (1 1, 80) | 0 | 0 | 9.9 2 |

10

【0518】

20

表8に示されるように、チオ-hu7C2-LC-K149C-マレイミド-PNUは、1 mg/kgで3部分奏功及び3 mg/kgで8完全奏功を示した。チオ-hu7C2-LC-K149C-CBI二量体は、1 mg/kgで5部分奏功を示した。

【0519】

実施例7：KPL4乳癌細胞株異種移植片モデルにおけるhu7C2抗体薬物複合体の有効性

SCIDベージュマウス(C.B-17 SCID.bg, Charles River Laboratories)では、HBSS/マトリゲルに懸濁した1匹当たり300万個の細胞を、0.2 mLの体積で胸部乳房脂肪体に播種した。腫瘍が100~250 mm³の平均腫瘍体積に到達したとき、動物を9群に分けた(各群当たり8~10匹の動物)。マウスは、静脈内尾静脈注入を介して、以下の治療薬、(1)ピヒクル(20 mMのL-ヒスチジン、240 mMのスクロース、0.02%のTween-20、pH5.5)、(2)チオ-hu7C2-LC-K149C-マレイミド-PNU、0.3 mg/kg、(3)チオ-hu7C2-LC-K149C-マレイミド-PNU、1 mg/kg、(4)チオ-hu7C2-LC-K149C-マレイミド-PNU、3 mg/kg、(5)チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-PNU、0.3 mg/kg、(6)チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-PNU、1 mg/kg、(7)チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-PNU、3 mg/kg、(8)チオ-対照Ab-LC-K149C-マレイミド-PNU、3 mg/kg、(9)チオ-対照Ab-LC-K149C-ジスルフィド-PNU、3 mg/kgのうちの1つの単回投与を1日目に受けた。試験期間中、腫瘍及び体重の測定を1週間に少なくとも1回行った。腫瘍が1000~2000 mm³に到達したとき、またはマウスがその体重の20%以上を喪失した場合、マウスを安楽死させた。腫瘍体積を、カリパスを使用して2次元(長さ及び幅)で測定し、その腫瘍体積を、式：腫瘍サイズ(mm³)=(より大きい測定値×より小さい測定値²)×0.5を使用して算出した。

30

40

【0520】

この実験の結果を表9及び図8に示す。18日目のものであるピヒクル対照群及びチオ-対照Ab-LC-K149C-ジスルフィド-PNU群を除いて、表9では全ての群のデータが22日目のものである。各群は、試験の最後に7匹のマウスを有していた群(6)を除いて、試験の開始時に8匹のマウス、及び最後に8匹のマウスを含んでいた。AU

50

C / 日 % T G I (腫瘍成長阻害)、P R、及びC Rを、前述の実施例に記載されるように決定した。実験に使用された各抗体 - 薬物複合体の薬物 : 抗体比 (D A R) は、2 列目に示される。

実施例 9 : K P L 4 乳癌細胞株異種移植片モデルにおける h u 7 C 2 抗体薬物複合体の有効性

| 群 | D A R | 腫瘍体 積、最 終日 | A U C / 日% T G I (下、上) | P R | C R | B W 変 化%、 最終日 |
|--|-----------------|------------------|------------------------------|--------|--------|---------------------|
| (1) ビヒクル | | 108 4 | 0 (0, 0) | 0 | 0 | -3. 73 |
| (2) チオ- h u 7 C 2 - L C - K 1 4 9 C - マレイ ミド- P N U、0. 3 m g / k g | 1 . 8 | 867 | 43 (-1 8, 75) | 0 | 0 | -3. 98 |
| (3) チオ- h u 7 C 2 - L C - K 1 4 9 C - マレイ ミド- P N U、1 m g / k g | 1 . 8 | 736 | 59 (1 1, 83) | 0 | 0 | 0. 0 1 |
| (4) チオ- h u 7 C 2 - L C - K 1 4 9 C - マレイ ミド- P N U、3 m g / k g | 1 . 8 | 51 | 127 (1 15, 15 1) | 7 | 1 | 3. 6 1 |
| (5) チオ- h u 7 C 2 - L C - K 1 4 9 C - ジスル フィド- P N U、0. 3 m g / k g | 1 . 9 | 123 7 | 21 (-5 9, 65) | 0 | 0 | -4. 67 |
| (6) チオ- h u 7 C 2 - L C - K 1 4 9 C - ジスル フィド- P N U、1 m g / k g | 1 . 9 | 752 | 48 (-1 4, 78) | 0 | 0 | -4. 65 |
| (7) チオ- h u 7 C 2 - L C - K 1 4 9 C - ジスル フィド- P N U、3 m g / k g | 1 . 9 | 60 | 130 (1 14, 15 5) | 7 | 0 | 1. 7 7 |
| (8) チオ- 対照 A b - L C - K 1 4 9 C - マレイミ ド- P N U、3 m g / k g | 1 . 4 - 2 | 831 | 30 (-4 8, 66) | 0 | 0 | -9. 49 |

10

20

30

40

| | | | | | | |
|--|----------|------------|---------------------------|---|---|--------------|
| (9) チオ-対照Ab-L C-K149C-ジスル フィド-PNU、3mg/ kg | 1 . 9 | 1 1 5 2 | - 5 (- 1 0 0 , 5 0) | 0 | 0 | - 6 . 4 6 |
|--|----------|------------|---------------------------|---|---|--------------|

【0521】

表9に示されるように、チオ-hu7C2-LC-K149C-マレイミド-PNUは、3mg/kgで1部分奏功及び1完全奏功を示した。チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-PNUは、3mg/kgで7部分奏功を示した。

10

【0522】

実施例8：MMTV-Her2 Fo5トランスジェニック乳房腫瘍移植異種移植片モデルにおけるhu7C2抗体薬物複合体の有効性

CRL nu/nuマウス(Charles River Laboratory)に、MMTV-Her2 Fo5トランスジェニック乳房腫瘍の約2×2mm断片を移植した。腫瘍が100~250mm³の平均腫瘍体積に到達したとき、動物を7つの群(1群当たり各8~10匹を含む)に分けた。マウスは、静脈内尾静脈注入を介して、以下の治療薬、(1)ピヒクル(20mMのL-ヒスチジン、240mMのスクロース、0.02%のTween-20、pH5.5)、(2)チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、2mg/kg、(3)チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、5mg/kg、(4)チオ-対照Ab-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、5mg/kg、(5)チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD(リン酸塩)、2mg/kg、(6)チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD(リン酸塩)、5mg/kg、または(7)チオ-対照Ab-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD(リン酸塩)、5mg/kgのうちの1つの単回投与を0日目に受けた。試験期間中、腫瘍及び体重の測定を1週間に少なくとも1回行った。腫瘍が1000~2000mm³に到達したとき、またはマウスがその体重の20%以上を喪失した場合、マウスを安楽死させた。腫瘍体積を、カリパスを使用して2次元(長さ及び幅)で測定し、その腫瘍体積を、式：腫瘍サイズ(mm³)=(より大きい測定値×より小さい測定値²)×0.5を使用して算出した。

20

30

【0523】

この実験の結果を表10及び図17に示す。表10のデータは、21日目のものである。各群は、試験の最後に5匹のマウスを有していた群(1)、及び試験の最後に6匹のマウスを有していた群(4)を除いて、試験の開始時に7匹のマウス、及び最後に7匹のマウスを含んでいた。AUC/日%TGI(腫瘍成長阻害)及びPRを、前述の実施例に記載されるように決定した。どのマウスも、この実験において完全奏功を示さなかった。実験に使用された各抗体-薬物複合体の薬物：抗体比(DAR)は、2列目に示される。

40

表10：MMTV-Her2 Fo5トランスジェニック乳房腫瘍移植異種移植片モデルにおけるhu7C2 ADCの有効性

| 群 | D A R | 腫瘍体 積、最終 日 | A U C / 日% T G I (下、上) | P R | B W 変 化%、最 終日 |
|--|-----------------|------------------|------------------------------|--------|---------------------|
| (1) ビヒクル | | 2109 | 0 (0, 0) | 0 | 5.36 |
| (2) チオ- h u 7 C 2-L C-K 1 4 9 C -ジスルフィド- C B I-P B D、2 m g / k g | 1 . 4 | 83 | 105 (1 00, 11 1) | 2 | 1.02 |
| (3) チオ- h u 7 C 2-L C-K 1 4 9 C -ジスルフィド- C B I-P B D、5 m g / k g | 1 . 4 | 71 | 108 (1 03, 10 6) | 4 | 0.81 |
| (4) チオ-対照 A b -L C-K 1 4 9 C- ジスルフィド- C B I -P B D、5 m g / k g | 1 . 4 | 635 | 75 (3 5, 92) | 0 | 0.82 |
| (5) チオ- h u 7 C 2-L C-K 1 4 9 C -ジスルフィド- C B I-P B D (リン酸 塩)、2 m g / k g | 1 . 4 - 2 | 161 | 98 (8 7, 10 4) | 1 | 0.66 |
| (6) チオ- h u 7 C 2-L C-K 1 4 9 C -ジスルフィド- C B I-P B D (リン酸 塩)、5 m g / k g | 1 . 4 - 2 | 61 | 108 (1 04, 11 6) | 7 | 2.55 |

10

20

30

40

| | | | | | |
|---|-----------------|-----|-----------------|---|------|
| (7) チオ-対照Ab -LC-K149C- ジスルフィド-CBI -PBD (リン酸 塩)、5mg/kg | 1 . 4 - 2 | 826 | 70 (2 9, 88) | 0 | 4.62 |
|---|-----------------|-----|-----------------|---|------|

【0524】

10

表10に示されるように、チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBDは、2mg/kgで2部分奏功及び5mg/kgで4部分奏功を示した。チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD (リン酸塩)は、2mg/kgで1部分奏功、及び5mg/kgで7部分奏功を示した。

【0525】

実施例9：HCC1569X2移植異種移植片モデルにおけるhu7C2抗体薬物複合体の有効性

HCC1569ヒト乳癌細胞株を、ATCC (American Type Culture Collection (Manassas, VA)) から入手し、下位系HCC1569X2を、マウスで最適に成長させるためにGenentechにおいて生成した。

20

【0526】

各雌C.B-17 SCID-ベージュマウス (Charles River Laboratory) では、HBSS/マトリゲル (1:1の比率) に懸濁された500万個のHCC1569X2細胞を、胸部乳房体領域に播種した。異種移植片腫瘍が100~300mm³ (0日目) の平均腫瘍体積に到達したとき、動物を1群当たり7匹のマウスを含む7群にランダム化し、その動物は、静脈内尾静脈注入を介して、以下の治療薬、(1) ピヒクル (20mMのL-ヒスチジン、240mMのスクロース、0.02%のTween-20、pH5.5)、(2) トラスツズマブ-MCC-DM1 (T-DM1、トラスツズマブエムタンシン、アド-トラスツズマブエムタンシン)、3mg/kg、(3) チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、0.5mg/kg、(4) チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、1mg/kg、(5) チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、2mg/kg、(6) T-DM1、3mg/kg、+チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、0.5mg/kg、または(7) T-DM1、3mg/kg、+チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、1mg/kgのうちの1つの単回投与を受けた。マウスの腫瘍及び体重を、試験を通して週1~2回測定した。体重喪失がそれらの出発体重の20%を超えたとき、マウスを安楽死させた。腫瘍が3000mm³に到達するか、または切迫した潰瘍化の兆候を示す前に、全ての動物を安楽死させた。腫瘍体積を、カリパスを使用して2次元 (長さ及び幅) で測定し、その腫瘍体積を、式：腫瘍サイズ (mm³) = (より大きい測定値 × より小さい測定値²) × 0.5を使用して算出した。

30

40

【0527】

この実験の結果を表11及び図18に示す。表11のデータは14日目のものであり、全ての群は7匹のマウスを有する。

実施例11：HCC1569X2移植異種移植片モデルにおけるhu7C2抗体薬物複合体の有効性

| 群 | DAR | 腫瘍体積、 最終日 | AUC/日% TGI (下、 上) | BW 変 化%、最終 日 |
|---|------------|--------------|-------------------------|--------------------|
| 01-ビヒクル | | 1200 | 0 (0, 0) | 5.15 |
| 02-T-DM1、3mg/kg | 3.8 | 506 | 84 (42, 104) | 4.91 |
| 03-チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、0.5mg/kg | 1.9 | 364 | 75 (28, 95) | 5.65 |
| 04-チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、1mg/kg | 1.9 | 212 | 87 (53, 102) | 5.21 |
| 05-チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、2mg/kg | 1.9 | 94 | 106 (91, 123) | 3.85 |
| 06-T-DM1、3mg/kg+ チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、0.5mg/kg | 3.8 1.9 | 145 | 101 (82, 118) | 4.2 |
| 07-T-DM1、3mg/kg+ チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD、1mg/kg | 3.8 1.9 | 33 | 122 (110, 146) | 4.18 |

10

20

30

40

【0528】

この試験において、チオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBDは、腫瘍成長の用量依存的阻害を明示し、2mg/kg用量で腫瘍退縮が観察された

50

。チオ - h u 7 C 2 - L C - K 1 4 9 C - ジスルフィド - C B I - P B D と T - D M 1 を組み合わせると、いずれかの薬剤単独の場合よりも有効性ははるかに優れ、ビヒクル群と比較して、動物の体重の最小変化に基づいて耐容性が十分なものとなる。

【 0 5 2 9 】

実施例 10 : H E R 2 に結合された 7 C 2 F a b の結晶構造
方法

7 C 2 / H E R 2 複合体の発現、精製、及び結晶化 - 7 C 2 F a b は、大腸菌内で発現し、タンパク質 G セファロース親和性樹脂 (G E)、S P セファロース陽イオン交換クロマトグラフィー、及びサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) を使用して精製された。H E R 2 細胞外ドメイン (E C D) は、C H O 細胞内で発現され、制御された細孔ガラスビーズに結合されたトラスツズマブ抗体を使用する親和性クロマトグラフィーに続いて、D E A E 陽イオン交換及びサイズ排除クロマトグラフィーによって精製された。

10

【 0 5 3 0 】

F a b 7 C 2 と H E R 2 E C D との間の複合体を、S E C によって精製した。この複合体を、酵素 (E n d o F 1、F 2、F 3、E n d o H、及び P N G a s e) の組み合わせを使用して脱グリコシル化し、続いて S E C によって 0 . 1 M の N a C l、2 0 m M の H E P E S p H 7 . 2、及び 2 % のグリセロールに精製した。複合体を結晶化して、1 0 m g / m L で等量のタンパク質及び貯留槽 (3 0 % の v / v の P E G 5 5 0 モノメチルエーテル、0 . 1 M のクエン酸ナトリウム三塩基性二水和物 p H 5 . 0) が使用して懸滴で 1 週間後に厚いプレートがもたらされ、貯留槽で短時間処理した後に液体窒素に浸漬させた。

20

【 0 5 3 1 】

2 . 7 分解能まで拡張する複合体の回折データを、S S R L ビームライン 1 1 - 1 で約 1 1 0 K で収集した。回折画像を統合し、プログラム H K L 2 0 0 0 及び C C P 4 スイートの要素を使用してスケールした。W i n n e t a l . , 2 0 1 1 , A c t a C r y s t a l l o g r D . B i o l . C r y s t a l l o g r . 6 7 : 2 3 5 - 4 2 を参照されたい。

【 0 5 3 2 】

構造は、プログラム P h a s e r を使用する分子置換 (M R) によって解析した。M c C o y e t a l . , 2 0 0 5 , A c t a C r y s t a l l o g r D . B i o l . C r y s t a l l o g r . 6 1 : 4 5 8 - 6 4 を参照されたい。M R サーチモデルは、H E R 2 / H e r c e p t i n F a b 複合体 (P D B コード : 1 N 8 Z)、F a b 定常ドメイン (P D B コード : 1 N 8 Z)、及びプログラム M o d e l l e r によって生成される可変ドメインの予測モデルの結晶構造に由来する H E R 2 E C D ドメインを含む。F i s e r e t a l . , 2 0 0 3 , M e t h o d s E n z y m o l . , 3 7 4 : 4 6 1 - 9 1 を参照されたい。この構造を、プログラム R E F M A C 5 (M a r s h u d o v e t a l . , 2 0 1 1 , A c t a C r y s t a l l o g r D . B i o l . C r y s t a l l o g r . 6 7 : 3 5 5 - 6 7) 及び P H E N I X . r e f i n e (A d a m s e t a l . , 2 0 1 0 , A c t a C r y s t a l l o g r D . B i o l . C r y s t a l l o g r . 6 6 (p t . 2) : 2 1 3 - 2 1) を用いて、最大尤度標的関数、異方性の個別 B 因子、及び T L S 精密化を使用して精密化した。データ及び精密化統計値を表 1 2 に要約する。

30

40

表 1 2 : x 線回折データ収集及び構造精密化の統計 (括弧内の値は、最後の分解能シエルのものである)

| | | |
|---|------------------------------------|----|
| データ収集 | SSRL11-1 | |
| 空間群 | C222 ₁ | |
| 格子パラメータ (Å) | a = 136.8, b = 171.9, c = 162.5 | |
| 分解能 (Å) | 50 - 2.75 (2.85 - 2.75) | 10 |
| Rsym | 0.112 (0.689) | |
| 観察の数 | 319169 | |
| 固有の反射 | 49078 | |
| 冗長性 | 6.5 (5.5) | |
| 完全性 (%) | 98.8 (92.2) | |
| < >/<σ > | 20 (2.2) | 20 |
| Vm (Å ³ /Da) | 4.2 | 20 |
| | | |
| 精密化 | | |
| 分解能 (Å) | 48.33 - 2.75 | |
| 反射の数 | 49053 | |
| R、Rfree | 0.23, 0.25 | |
| 残渣の数 | 1047 | 30 |
| 水の数 | 109 | |
| 原子の数 | 8039 | |
| RMSD結合 (Å) | 0.007 | |
| RMSD角 (°) | 1.2 | |
| 平均結合ΔB (Å ²) | 5.5 | |
| ラマチャンドラン分析 (%) | 93/6/1 | |
| TLS群の数 | 3 | 40 |
| ^o (Å ²) 7C2/HER2 | 88 | |

【0533】

結果

7C2 Fab/HER2 複合体の結晶構造を、2.75 分解能で決定した。各非対称単位細胞は、1つのFab/HER2 複合体を含有する。構造は、7C2 FabがHER2 ECDのドメインIに結合することを明らかにした(図19A)。結合エピトープは、以前に特徴付けられた、それぞれドメインIV及びIIに位置する治療抗体トラストズマブ(Tmab)またはベルツズマブ(Pmab)のFab断片とHER2 ECD

との複合体のものとは異なる。例えば、Cho et al., 2003, Nature, 421: 756-60、Eigenbrot et al., 2010, PNAS, 107: 15039-44、及びFranklin et al., 2004, Cancer Cell, 5: 17-28を参照されたい。実際に、7C2 Fab/HER2 ECD複合体構造と、Tmab/HER2 ECD複合体及びPmab/HER2 ECD複合体の構造とをオーバーレイすると、3つのFabが、独立した非重複エピトープを有し、互いにHER2への結合を空間的に干渉しないことが示される(図19A)。Tmab/HER2 ECD複合体、Pmab/HER2 ECD複合体、及び7C2 Fab/HER2 ECD複合体内でHER2 ECD構造を重ね合わせることにより、最小限の構造的相違が示された(図19B)。この観察によって、HER2 ECDが比較的剛性であることを示唆されたが、このことは、文献内の以前の報告と一致する。例えば、Cho et al., 2003, Nature, 421: 756-60、Eigenbrot et al., 2010, PNAS, 107: 15039-44、及びFranklin et al., 2004, Cancer Cell, 5: 17-28を参照されたい。

10

【0534】

7C2 Fabは、HER2ドメインI内のループ163~175及びループ185~189に結合する(すなわち、成熟HER2のアミノ酸163~175及び185~189、例えば、配列番号39。ドメインIは、配列番号35に示される)。この結合は、界面の各側の溶媒にアクセス可能な表面領域の約1160²を占める。疎水性、水素結合、及びイオン相互作用の複雑なネットワークが存在する。結合に関与するある特定の残基は、図19Cに標識される。His171の側鎖は、重鎖His52及びAsp55と接触する。HER2残基Ser186、Ser187、及びGlu188は、重鎖のD102及び軽鎖の2つのTyr残基(Tyr36及びTyr54)との水素結合を形成する。

20

【0535】

7C2結合エピトープは、以前に報告された抗HER2抗体、chA21のものとは部分的に重複する(図19D)。Zhou et al., 2011, JBC, 286: 31676-83を参照されたい。両方のエピトープは、ドメインI(残基163~187)にループを含む。興味深いことに、残基His171は、両方の抗体との相互作用で役割を果たす。しかしながら、chA21結合エピトープは、約1820²の溶媒アクセス可能な表面積に及び、これは7C2エピトープよりも約660²大きく、2つの追加のN末端ループ、残基100~105、及び残基135~144を含む。

30

【0536】

上述の発明は、明確な理解を目的として、例示説明及び例により、ある程度詳細に記載されたが、これらの説明及び例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書で引用される全ての特許及び科学文献の開示は、参照によりそれらの全体が明示的に組み込まれる。

配列表

| 名称 | 配列 | 配列 番号 |
|--|--|----------|
| ヒトHer2 前駆体 (UniProtKB/Swiss-Prot: P04626.1)、 a1-22シグナル配列、 a23-1255成熟Her2 | MELAALCRWG LLLALLPPGA ASTQ VCTGTD MKLRLPASPE THLDMLRH LY QGCQVVQGNL ELTYLPTNAS L SFLQDIQEV QGYVLI AHNQ VRQVP LQRLR IVRGTQLFED NYALAVLDN G DPLNNTTPVT GASPGGLREL QL RSLTEILK GGVL IQRNPQ LCYQDT ILWK DIFHKNNQLA LTLIDTNRSR ACHPCSPMCK GSRCWGESSE DCQS LTRTVC AGGCARCKGP LPTDCCHE QC AAGCTGPKHS DCLACLHFNH S GICELHCPA LVTYNTDTFE SMPNP EGRYT FGASCVTACP YNYLSTDVG S CTLVCPLHNQ EVTAEDGTQR CE KCSKPCAR VCYGLGMEHL REVRAV TSAN IQEFAGCKKI FGSLAFLPES FDGDPASNTA PLQPEQLQVF ETLE EITGYL YISAWPDSL P DLSVFQNL QV IRGRILHNGA YSLTLQGLGI S WLGLRSLRE LGSGLALIIH NTHLC FVHTV PWDQLFRNPH QALLHTANR P EDECVGEGLA CHQLCARGHC WG PGPTQCVN CSQFLRGQEC VEECRV LQGL PREYVNARHC LPCHPECQPQ NGSVTCFGPE ADQCVACAHY KDPP FCVARC PSGVKPDL SY MPIWKFPD EE GACQPCPINC THSCVDLDDK G CPAEQRASP LTSIISAVVG ILLVV VLGVV FGILIKRRQQ KIRKYTMRR L LQETELVEPL TPSGAMPNQA QM | 1 |

10

20

30

40

| | | |
|--|--|--|
| | <p>RILKETEL R KVKVLGSGA FGTVYK GIWI PDGENVKIPV AIKVLRENTS PKANKEILDE AYVMAGVGSP YVSR LLGICL TSTVQLVTQL MPYGCLLD HV RENRGR LGSQ DLLNWCMQIA K GMSYLEDVR LVHRDLAARN VLVKS PNHVK ITDFGLARLL DIDETEYHA D GGKVPIKWMA LESILRRRFT HQ SDVWSYGV TVWELMTFGA KPYDGI PARE IPDLLEKGER LPQPPICTID VYMIMVKCWM IDSECRPRFR ELVS EFSRMA RDPQRFVVIQ NEDLGPAS PL DSTFYRSLLE DDDMGDLVDA E EYLVPQQGF FCPDPAPGAG GMVHH RHRSS STRSGGGDLT LGLEPSEEE A PRSPLAPSEG AGSDVFDGDL GM GAAKGLQS LPTHDPSP LQ RYSEDP TVPL PSETDGYVAP LTCSPQPEYV NQPDVRPQPP SPREGPLPAA RPAG ATLERP KTLSPGKNGV VKDVFAFG GA VENPEYLTPQ GGAAPQPHPP P AFSPAFDNL YYWDQDPPER GAPPS TFKGT PTAENPEYLG LDVPV</p> | |
|--|--|--|

10

20

30

| | | | | | | |
|---------------|---|----|----|----|----|----|
| 成熟ヒトHE R 2 | <p>TQVCTGTD MKLRLPASPE THLDML RHLY QGCQVVQGNL ELTYLPTNAS LSFLQDIQEV QGYVLI AHNQ VRQV PLQRLR IVRGTQLFED NYALAVLD NG DPLNNTTPVT GASPGGLREL Q LRSLTEILK GGVLIQRNPQ LCYQD TILWK DIFHKNNQLA LTLIDTNRS R ACHPCSPMCK GSRCWGESSE DC QSLTRTVC AGGCARCKGP LPTDCC HEQC AAGCTGPKHS DCLACLHFNH SGICELHCPA LVTYNTDTFE SMPN PEGRYT FGASCVTACP YNYLSTDV GS CTLVCPLHNQ EVTAEDGTQR C EKCSKPCAR VCYGLGMEHL REVRA VTSAN IQEFAGCKKI FGSLAFLPE S FDGDPASNTA PLQPEQLQVF ET LEEITGYL YISAWPDSLP DLSVFAQ NLQV IRGRILHNGA YSLTLQGLGI SWLGLRSLRE LGSGLALIIH NTHL CFVHTV PWDQLFRNPH QALLHTAN RP EDECVGEGLA CHQLCARGHC W GPGPTQCVN CSQFLRGQEC VEECR VLQGL PREYVNARHC LPCHPECQP Q NGSVTCFGPE ADQCVACAHY KD PPFCVARC PSGVKPDLSY MPIWKF PDEE GACQPCPINC THSCVDLDDK GCPAEQRASP LTSIISAVVG ILLV VVLGVV FGILIKRRQQ KIRKYTMR RL LQETELVEPL TPSGAMPNQA Q MRILKETEL RKVKVLGSGA FGTVY KGIWI PDGENVKIPV AIKVLRENT S PKANKEILDE AYVMAGVGSP YV SRLLGICL TSTVQLVTQL MPYGCL</p> | 39 | 10 | 20 | 30 | 40 |
|---------------|---|----|----|----|----|----|

| | | | |
|---------------------------------------|---|---|----|
| | LDHV RENRGR LGSQ DLLNWCMQIA KGMSYLEDVR LVHRDLAARN VLVK SPNHVK ITDFGLARLL DIDETEH AD GGKVP IKWMA LESILRRRFT H QSDVWSYGV TVWELMTFGA KPYDG IPARE IPDLLEKGER LPQPPICTI D VYMIMVKCWM IDSECRPRFR EL VSEFSRMA RDPQRFVVIQ NEDLGP ASPL DSTFYRSLLE DDDMGDLVDA EEYLVPQQGF FCPDPAPGAG GMVH HRHRSS STRSGGGDLT LGLEPSEE EA PRSPLAPSEG AGSDVFDGDL G MGAACKGLQS LPTHDPSPQL RYSED PTVPL PSETDGYVAP LTCSPQPEY V NQPDVRPQPP SPREGPLPAA RP AGATLERP KTLSPGKNGV VKDVFA FGGA VENPEYLTPQ GGAAPQPHPP PAFSPAFDNL YYWDQDPPER GAPP STFKGT PTAENPEYLG LDVPV | | 10 |
| マウス7C 2. B9 (m u7C2) 軽 鎖可変領域 | DIVLTQSPAS LVVSLGQRAT ISCR ASQSVS GSRFTYMHY QKPGQPP KL LIKYASILES GVPARFSGGG S GTDFTLN IH PVEEDDTATY YCQHS WEIPP WTFGGGTKLE IK | 2 | 30 |
| Mu7C2重 鎖可変領域 | QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKA SGYSFT GYWMNWLKQR PGQGLEWI GM IHPSDSEIRA NQKFRDKATL T VDKSSTTAY MQLSSPTSSED SAVYY CARGT YDGGFEYWGQ GTTLTVSS | 3 | 40 |
| Mu7C2 HVR-L1 | RASQSVSGSRFTYMH | 4 | |
| Mu7C2 HVR-L2 | YASILES | 5 | |

| | | | |
|---|---|----|----|
| M u 7 C 2 HVR-L3 | QHSWEI PPWT | 6 | |
| M u 7 C 2 HVR-H1 | GYWMN | 7 | |
| M u 7 C 2 HVR-H2 | MIHPSDSEIRANQKFRD | 8 | |
| M u 7 C 2 HVR-H3 | GTYDGGFEY | 9 | 10 |
| ヒト化7C 2. v 2. 2. LA (「hu7C 2」) 軽鎖可 変領域 | DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCR ASQSVS GSRFTYMHY QKPGQPP KL LIKYASILES GVPDRFSGS S GTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHS WEIPP WTFGQGTKVE IK | 10 | 20 |
| Hu7C2重 鎖可変領域 | EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKA SGYSFT GYWMNWVRQA PGQGLEWI GM IHPLDAEIRA NQKFRDRVTI T VDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYY CARGT YDGGFEYWGQ GTLVTVSS | 11 | |
| H u 7 C 2 HVR-L1 | RASQSVSGSRFTYMH | 12 | 30 |
| H u 7 C 2 HVR-L2 | YASILES | 13 | |
| H u 7 C 2 HVR-L3 | QHSWEI PPWT | 14 | |
| H u 7 C 2 HVR-H1 | GYWMN | 15 | 40 |
| H u 7 C 2 HVR-H2 (H u 7 C 2. v 2. 1. S53 L, S55A | MIHPLDAEIRANQKFRD | 16 | |

| | | |
|--|--|----|
| H V R - H 2) | | |
| H u 7 C 2 HVR-H3 | GTVDGGFEY | 17 |
| ヒト化7C 2. v 2. 2. LA (h u 7 C 2) κ 軽鎖 | DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCR ASQSVS GSRFTYMHWY QQKPGQPP KL LIKYASILES GVPDRFSGSG S GTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHS WEIPP WTFGQGTKVE IKRTVAAPS V FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LN NFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQE SVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSF NRGEC | 18 |
| Hu7C2I gG1重鎖 | EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKA SGYSFT GYWMNWVRQA PGQGLEWI GM IHPLDAEIRA NQKFRDRVTI T VDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYY CARGT YDGGFEYWGQ GTLVTVSSA S TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AA LGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTS GVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDK KVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGG PS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV T CVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEV HNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTV L HQDWLNGKEY KCKVSNKALP AP IEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSR EEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGS FFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSV MH EALHNHYTQK SLSLSPGK | 19 |

10

20

30

40

| | | |
|--|--|----|
| Hu7C2. v2.1.S 53M HV R-H2 | MIHPMDSEIRANQKFRD | 20 |
| Hu7C2. v2.1.S 53L HV R-H2 | MIHPLDSEIRANQKFRD | 21 |
| Hu7C2. v2.1.E 101K H VR-H3 | GTYDGGFKY | 22 |
| ヒト化7C 2.v2. 2.LA(h u7C2)K 149C κ 軽鎖 | DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCR ASQSVS GSRFTYMHWY QQKPGQPP KL LIKYASILES GVPDRFSGSG S GTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHS WEIPP WTFGQGKVE IKRTVAAPS V FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LN NFYPREAK VQWCVDNALQ SGNSQE SVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSF NRGEC | 23 |
| Hu7C2 A118C IgG1重鎖 | EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKA SGYSFT GYWMNWVRQA PGQGLEWI GM IHPLDAEIRA NQKFRDRVTI T VDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYY CARGT YDGGFEYWGQ GTLVTVSSC S TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AA LGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTS GVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDK KVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGG PS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV T | 24 |

10

20

30

40

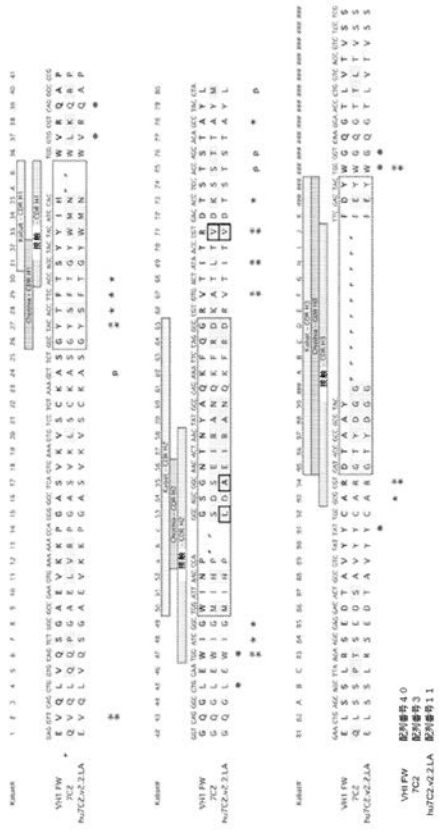
| | | | |
|---|---|----|----|
| | <p>CVVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEV HNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTV L HQDWLNGKEY KCKVSNKALP AP IEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSR EEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGS FFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSV MH EALHNHYTQK SLSLSPGK</p> | | 10 |
| V205Cシ ステイン操作 された軽鎖定 常領域 (I g κ) | <p>TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASV VCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQS GN SQESVTEQDS KDSTYSLST L TLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSS PCTKS FNRGEC</p> | 25 | 20 |
| A118Cシ ステイン操作 された重鎖定 常領域 (I g G1) | <p>CSTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAA LGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTS GV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT V PSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVD KKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLG G PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EV TCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVE VHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAP IEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSR EE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI A VEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDG SFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCS V MHEALHNHYT QKSLSLSPGK</p> | 26 | 30 |
| K149Cシ ステイン操作 された軽鎖定 常領域 (I g κ) | <p>TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASV VCLLNN FYPREAKVQW CVDNALQS GN SQESVTEQDS KDSTYSLST L TLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSS PVTKS FNRGEC</p> | 27 | 40 |

| | | |
|--|--|----|
| S400Cシ ス테인操作 された重鎖定 常領域 (I g G1) | ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAA LGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTS GV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT V PSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVD KKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLG G PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EV TCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVE VHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAP IEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSR EE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI A VEWESNGQP ENNYKTPPV LDCDG SFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCS V MHEALHNHYT QKSLSLSPGK | 28 |
|--|--|----|

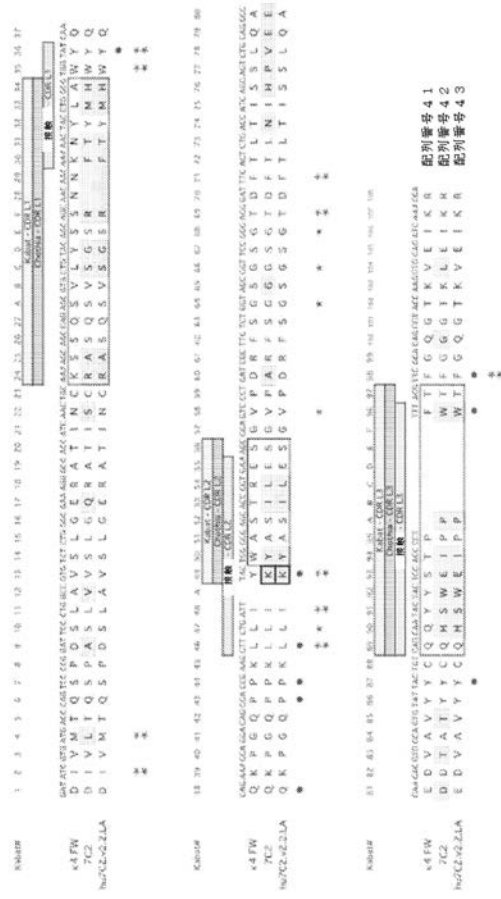
10

20

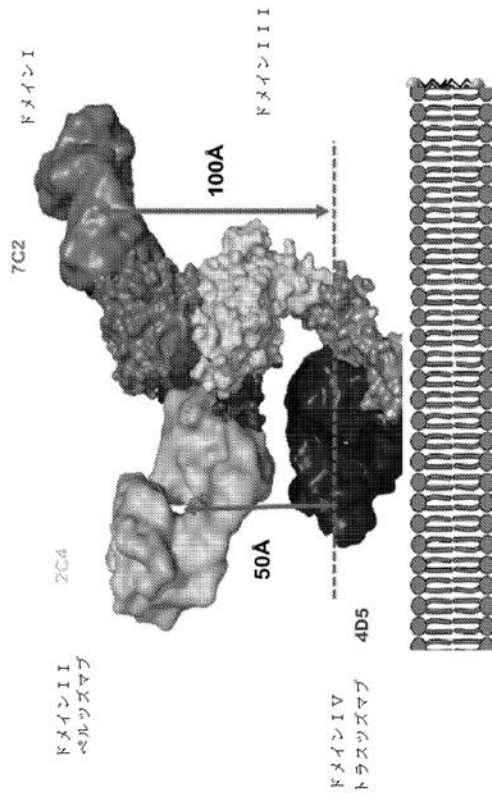
【 図 1 】



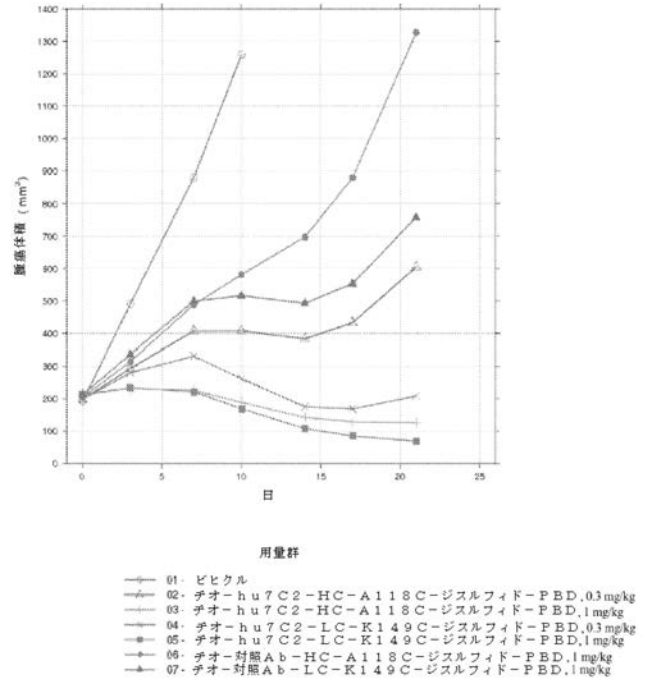
【 図 2 】



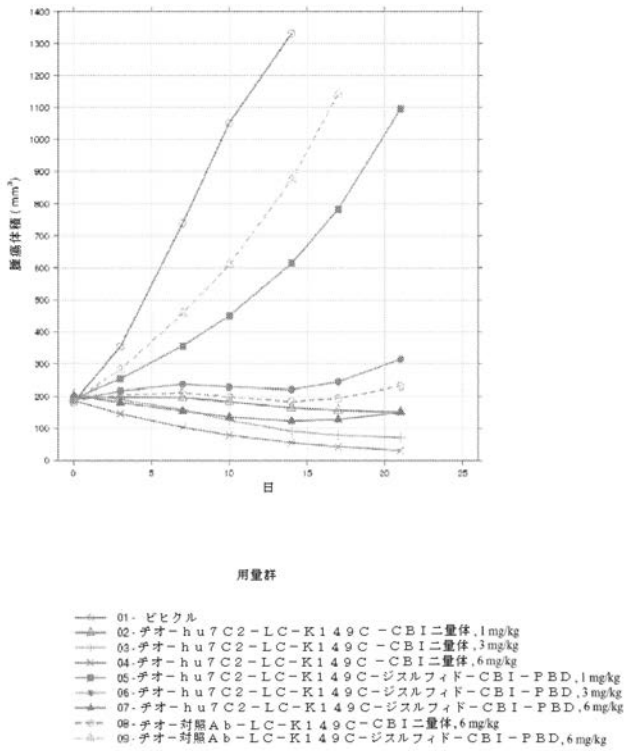
【 図 3 】



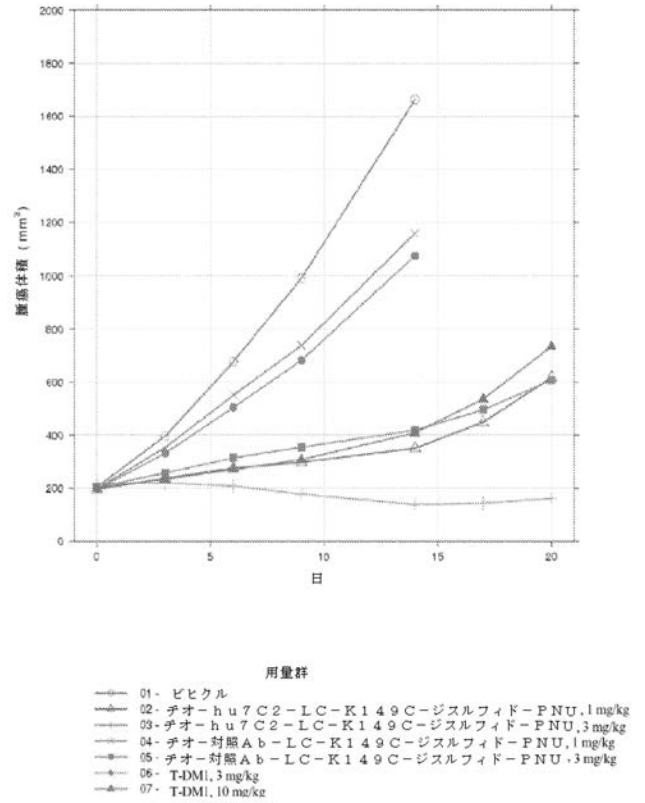
【 図 4 】



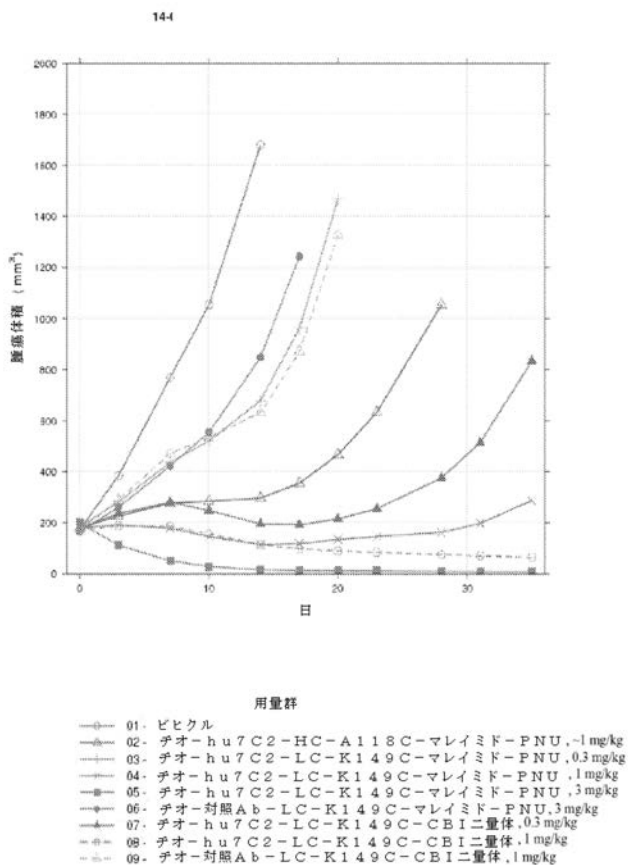
【 図 5 】



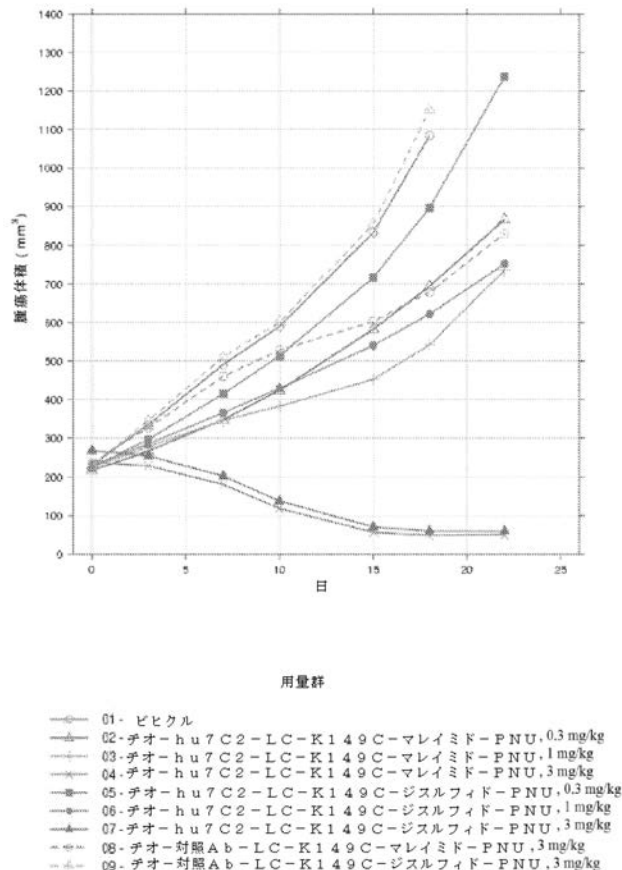
【 図 6 】



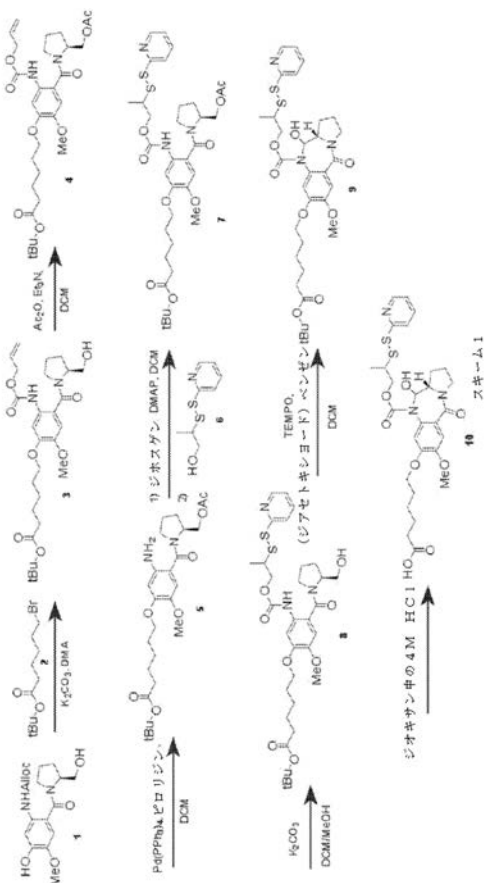
【図 7】



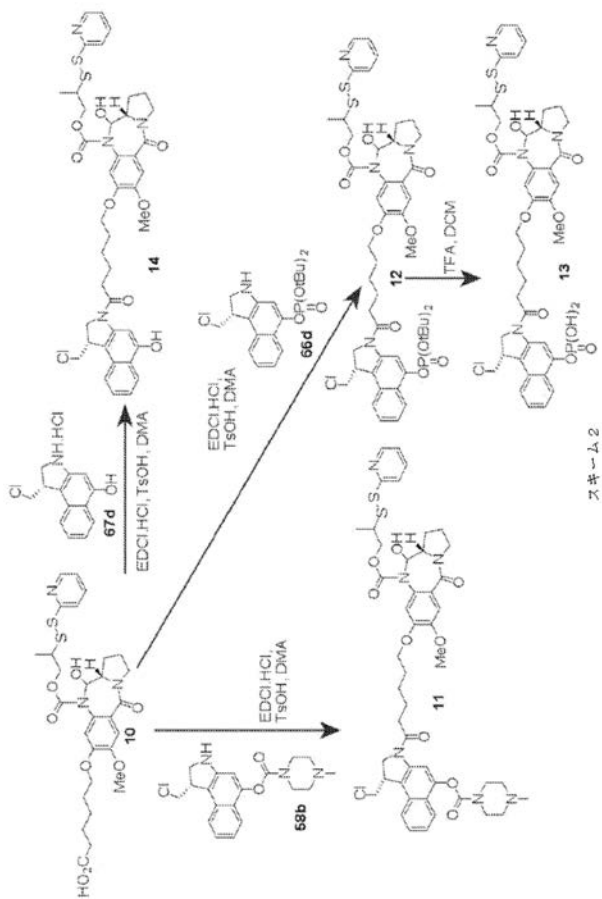
【図 8】



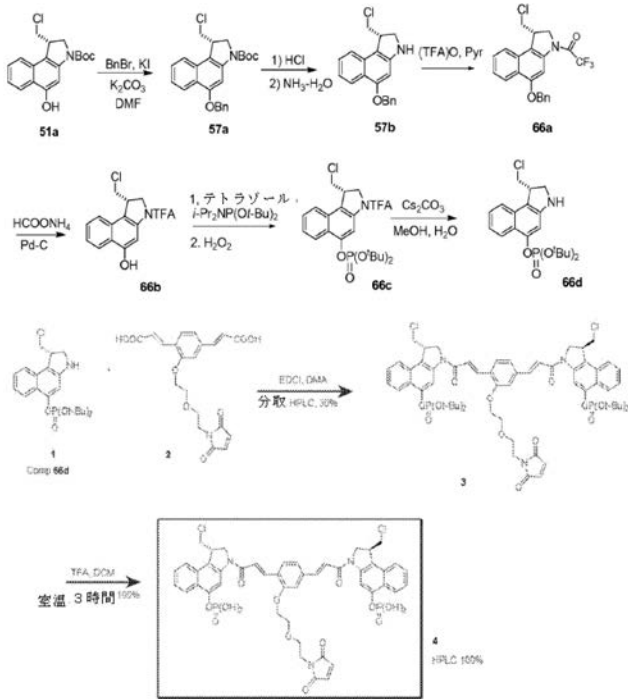
【図 9】



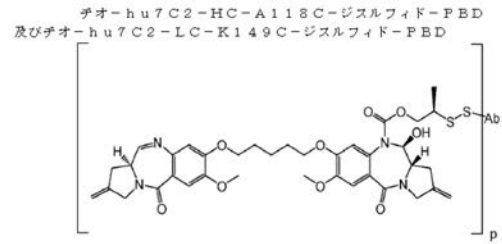
【図 10】



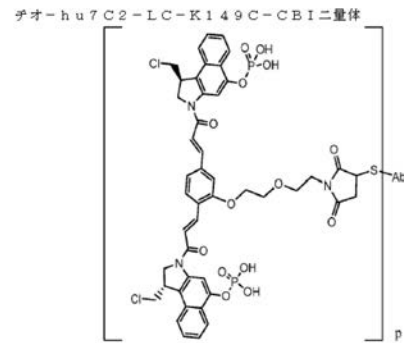
【 図 1 1 】



【 図 1 2 A 】

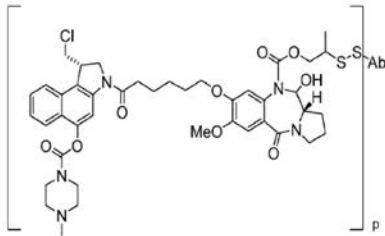


【 図 1 2 B 】



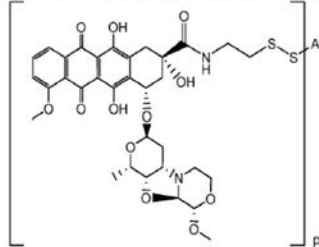
【 図 1 2 C 】

デオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD



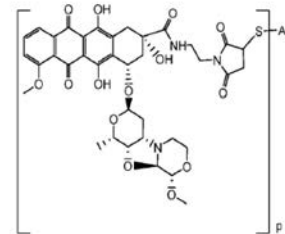
【 図 1 2 D 】

デオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-PNU



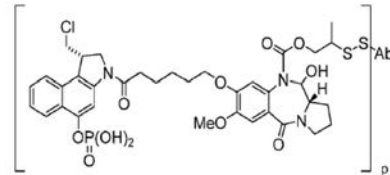
【 図 1 2 E 】

デオ-hu7C2-HC-A118C-マレイミド-PNU及びデオ-hu7C2-LC-K149C-マレイミド-PNU



【 図 1 2 F 】

デオ-hu7C2-LC-K149C-ジスルフィド-CBI-PBD (リン酸塩)



【図13A】

ペルツズマブ軽鎖のアミノ酸配列

```

1      10      20      30      40      50      60
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQKPKGKAPKLLIYSAASYRYTGVPS
70      80      90      100     110     120
RFSGSGSGTDFTLTISISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
130     140     150     160     170     180
SDEQLKSGTASVVCLLNHFYPREAKVQNKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
190     200     210
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 配列番号32

```

【図13B】

ペルツズマブ重鎖のアミノ酸配列

```

1      10      20      30      40      50      60
EVQLVESGGGLVQPQGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGKGLHWADVNPNGGGSIY
70      80      90      100     110     120
NQRPFKGRFTLSVDRSKNTLFLQMNLSRAEDTAVYICARNLGPSFIFDYWGQGLVTVSSA
130     140     150     160     170     180
STKGPSVFEFLAPSSKSTGGTAAAGCLVCKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
190     200     210     220     230     240
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKNTKVDKVEPKCDKTHCPPAPPELLGGP
250     260     270     280     290     300
SVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
310     320     330     340     350     360
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEEM
370     380     390     400     410     420
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQ
430     440     448
QGNVFSCSVNHEALHNHYTQKSLSPG 配列番号31

```

【図14B】

ペルツズマブ変異体重鎖

```

15      30      45
EVQLVESGGGLVQPQGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGKGL
46      60      75      90
ENVADEVNPNFGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNLSRAED
91      105     120     135
TAVYYCARNLQPSFTFDYWGQGLVTVSSASTKGFVFFLAFFSK
136     150     165     180
STSGGTALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLAQSSG
181     195     210     225
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKNTKVDKVEPKCDKRT
226     240     255     270
HTCPCAPPELLGGSVFLPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
271     285     300     315
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSVTVLTVLHQDW
316     330     345     360
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEEM
361     375     390     405
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
406     420     435     449
FFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVNHEALHNHYTQKSLSPGK
配列番号33

```

【図14A】

ペルツズマブ変異体軽鎖

```

15      30      45
VHSDIQHTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQKPKGK
46      60      75      90
APKLLIYSAASYRYTGVPSRPSGSGTDFLTISSLQPEDPATYY
91      105     120     135
CQQYYIYPYTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
136     150     165     180
VCLLNHFYPREAKVQNKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS
181     195     210     217
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 配列番号34

```

【図15A】

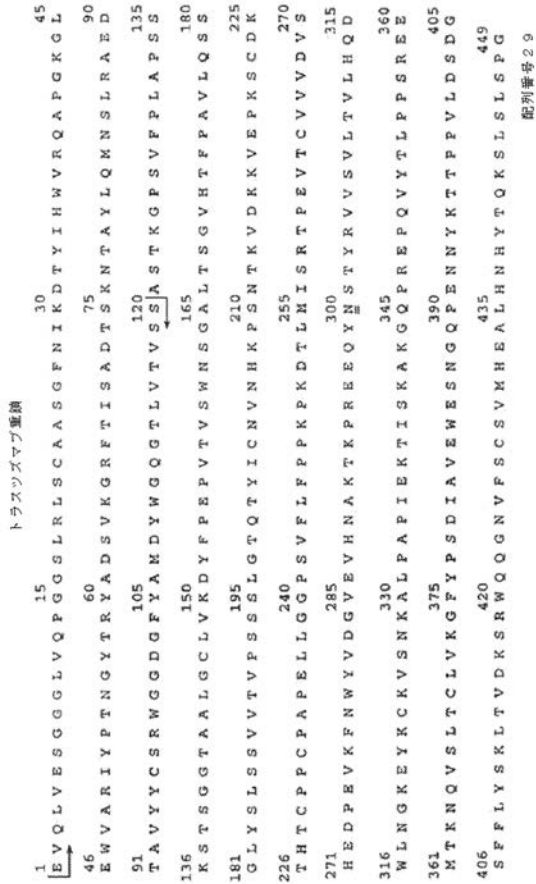
トラスズマブ軽鎖

```

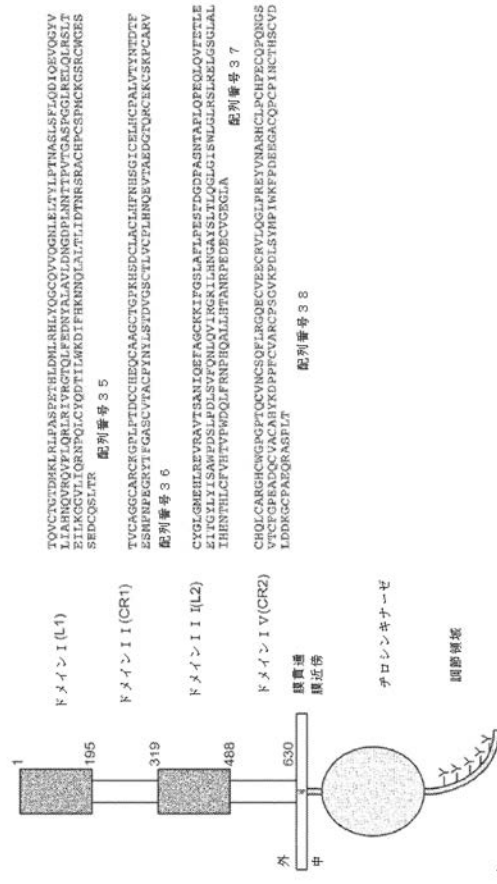
15      30      45
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQKPKGKAPK
46      60      75      90
LLIYSAFVLYSGVPSRFRSGRSGTDFLTISSLQPEDPATYYCO
91      105     120     135
HYTTPPTFGGQTKVEIKRIVAAAPSVPFIFPPSDEQLKSGTASVCL
136     150     165     180
LNPNYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
181     195     210     214
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 配列番号30

```

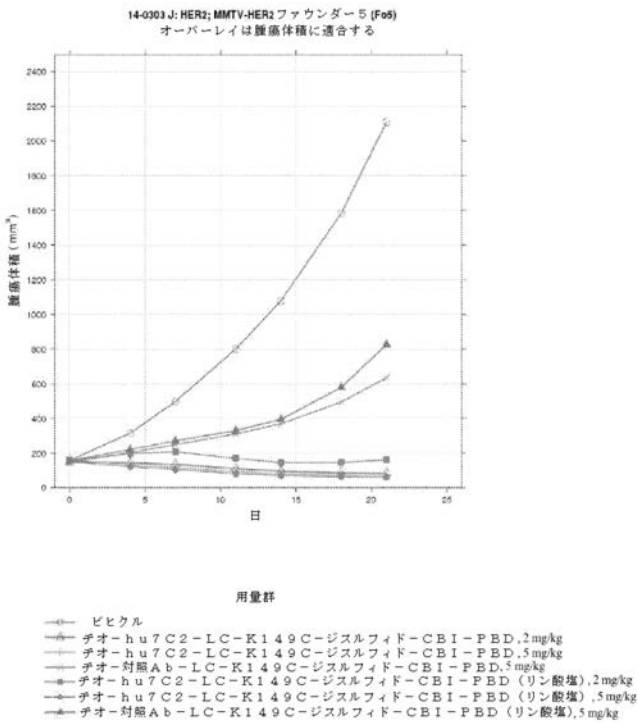
【図15B】



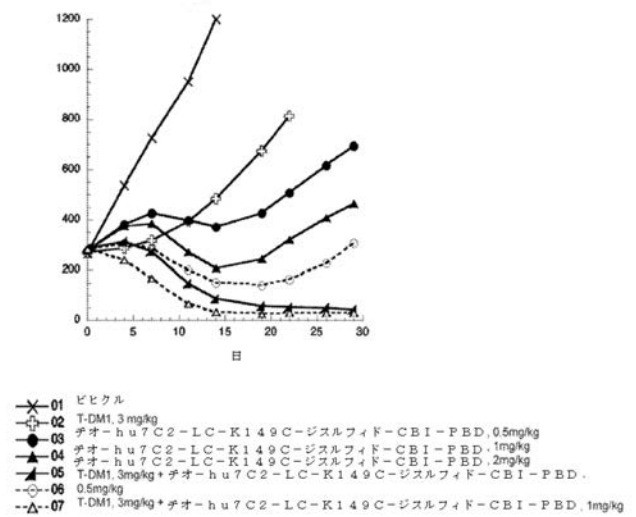
【図16】



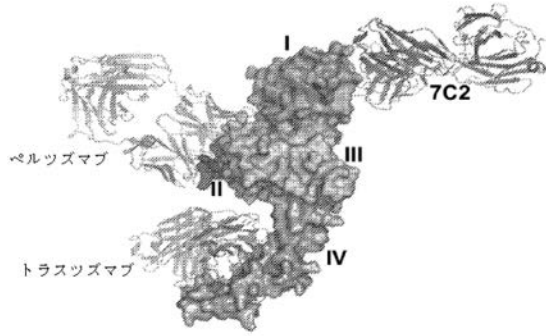
【図17】



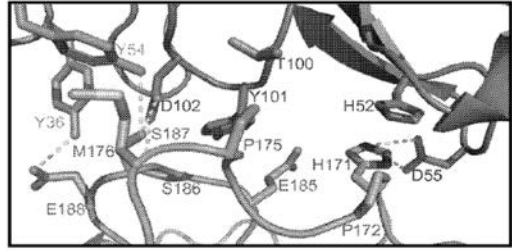
【図18】



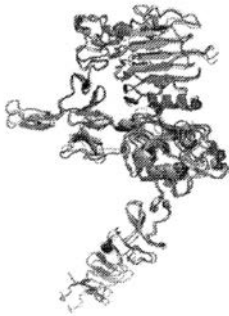
【 図 1 9 A 】



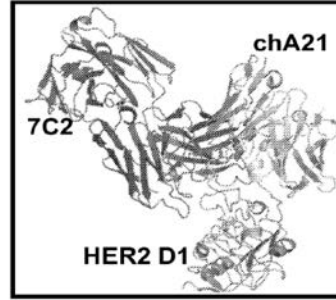
【 図 1 9 C 】



【 図 1 9 B 】



【 図 1 9 D 】



【 配 列 表 】

2017534253000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/US2015/049549 |
|---|

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
|--|---|--|
| INV. A61K47/48 C07K16/32 A61P35/00 ADD. | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 2013/195845 A1 (FENDLY BRIAN M [US] ET AL) 1 August 2013 (2013-08-01) paragraph [0134] - paragraph [0138] paragraphs [0231], [0251], [0276]; claims 42-51; examples 4,1 ----- | 1-76 |
| X | WO 98/17797 A1 (GENENTECH INC [US]; UNIV TEXAS [US]) 30 April 1998 (1998-04-30) page 37, line 30; examples 1,4 page 24, line 21 - page 25, paragraph 13 page 39, line 26 - line 29 ----- | 1-76 |
| X | US 2005/208043 A1 (ADAMS CAMELLIA W [US] ET AL) 22 September 2005 (2005-09-22) paragraph [0342]; examples 5-10; table 3 ----- -/-- | 1-76 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : | | |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search 7 December 2015 | | Date of mailing of the international search report 16/12/2015 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Siaterli, Maria |

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/049549

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | EP 2 540 745 A1 (SHANGHAI BIOMABS PHARMACEUTICALS CO LTD [CN]) 2 January 2013 (2013-01-02) paragraphs [0005], [0026], [0028] ----- | 1-76 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/049549

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| US 2013195845 A1 | 01-08-2013 | US 7371376 B1 | 13-05-2008 |
| | | US 2008112957 A1 | 15-05-2008 |
| | | US 2011033460 A1 | 10-02-2011 |
| | | US 2013195845 A1 | 01-08-2013 |
| | | US 2015252113 A1 | 10-09-2015 |
| WO 9817797 A1 | 30-04-1998 | AU 4982097 A | 15-05-1998 |
| | | BR 9712410 A | 19-10-1999 |
| | | CA 2269204 A1 | 30-04-1998 |
| | | CN 1234072 A | 03-11-1999 |
| | | CN 101412758 A | 22-04-2009 |
| | | EP 0931147 A1 | 28-07-1999 |
| | | EP 1106183 A2 | 13-06-2001 |
| | | EP 1695986 A2 | 30-08-2006 |
| | | IL 129354 A | 15-06-2009 |
| | | JP 2001302540 A | 31-10-2001 |
| | | JP 2001504326 A | 03-04-2001 |
| | | JP 2008188013 A | 21-08-2008 |
| | | JP 2009095339 A | 07-05-2009 |
| | | JP 2009189371 A | 27-08-2009 |
| | | JP 2010222375 A | 07-10-2010 |
| | | KR 20000049261 A | 25-07-2000 |
| | | KR 20060079258 A | 05-07-2006 |
| | | NZ 509480 A | 27-05-2005 |
| | | NZ 519191 A | 29-04-2005 |
| | | TR 9901615 T2 | 22-11-1999 |
| | | WO 9817797 A1 | 30-04-1998 |
| | | ZA 9709185 A | 14-04-1999 |
| | | US 2005208043 A1 | 22-09-2005 |
| US 2005208043 A1 | 22-09-2005 | | |
| US 2005238640 A1 | 27-10-2005 | | |
| US 2006034842 A1 | 16-02-2006 | | |
| US 2006073143 A1 | 06-04-2006 | | |
| US 2006193854 A1 | 31-08-2006 | | |
| US 2006198843 A1 | 07-09-2006 | | |
| US 2006216285 A1 | 28-09-2006 | | |
| US 2011129464 A1 | 02-06-2011 | | |
| EP 2540745 A1 | 02-01-2013 | CA 2790007 A1 | 01-09-2011 |
| | | CN 102167742 A | 31-08-2011 |
| | | EP 2540745 A1 | 02-01-2013 |
| | | JP 5690356 B2 | 25-03-2015 |
| | | JP 2013520180 A | 06-06-2013 |
| | | US 2012309942 A1 | 06-12-2012 |
| | | WO 2011103700 A1 | 01-09-2011 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|-----------------|------------|
| A 6 1 P 35/04 (2006.01) | A 6 1 P 35/04 | 4 H 0 4 5 |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 2 1 |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | |
| A 6 1 K 38/05 (2006.01) | A 6 1 K 38/05 | |
| A 6 1 K 31/537 (2006.01) | A 6 1 K 31/537 | |
| A 6 1 K 31/7036 (2006.01) | A 6 1 K 31/7036 | |
| A 6 1 K 31/5517 (2006.01) | A 6 1 K 31/5517 | |
| A 6 1 K 31/706 (2006.01) | A 6 1 K 31/706 | |
| A 6 1 K 31/661 (2006.01) | A 6 1 K 31/661 | |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | C |
| A 6 1 K 47/68 (2017.01) | A 6 1 K 39/395 | L |
| A 6 1 K 31/404 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | E |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | T |
| G 0 1 N 33/534 (2006.01) | A 6 1 K 47/68 | |
| G 0 1 N 33/574 (2006.01) | A 6 1 K 31/404 | |
| | G 0 1 N 33/53 | D |
| | G 0 1 N 33/534 | |
| | G 0 1 N 33/574 | A |

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . U N I X

- (72)発明者 ジャヌトウラ , ジャガス レディ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ , ディーエヌエー
 ウェイ 1
- (72)発明者 フィリップス , ゲイル ルイス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ , ディーエヌエー
 ウェイ 1
- (72)発明者 ピロー , トーマス ハーデン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ , ディーエヌエー
 ウェイ 1
- (72)発明者 スリウコフスキー , マーク , エックス .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ , ディーエヌエー
 ウェイ 1

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01 DA14
 4C076 AA95 CC27 EE41 EE59 FF68
 4C084 AA01 AA02 AA19 BA01 BA10 BA14 BA23 CA59 DA27 MA02
 NA05 NA13 ZB261 ZB262 ZC751
 4C085 AA13 AA14 AA16 AA26 BB36 CC22 CC23 EE01 EE03

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 抗HER2抗体和免疫复合物 | | |
| 公开(公告)号 | JP2017534253A | 公开(公告)日 | 2017-11-24 |
| 申请号 | JP2017513637 | 申请日 | 2015-09-11 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 健泰科生物技术公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Genentech公司 | | |
| [标]发明人 | チェンシャオチョン デニスマーク ジャヌトウラジャガスレディ フィリップスゲイルルイス ピロートーマスハーデン スリウコフスキーマークエックス | | |
| 发明人 | チェン, シャオチョン デニス, マーク ジャヌトウラ, ジャガス レディ フィリップス, ゲイル ルイス ピロー, トーマス ハーデン スリウコフスキー, マーク, エックス. | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 C07K16/30 C07K16/28 C12P21/08 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 A61K45/00 A61K38/05 A61K31/537 A61K31/7036 A61K31/5517 A61K31/706 A61K31/661 A61K39/395 A61K47/68 A61K31/404 G01N33/53 G01N33/534 G01N33/574 | | |
| CPC分类号 | A61K39/3955 C07K16/2863 C07K16/32 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/51 C07K2317/515 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/73 C07K2317/92 G01N33/57415 G01N33/57446 G01N2333/82 A61K31/5517 A61K31/675 A61K31/704 A61K47/68 A61K47/6809 A61K47/6849 A61K47/6855 A61K47/6863 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 A61K49/00 C07K16/3015 G01N33/57492 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A C07K16/30 C07K16/28 C12P21/08 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00.121 A61K45/00 A61K38/05 A61K31/537 A61K31/7036 A61K31/5517 A61K31/706 A61K31/661 A61K39/395.C A61K39/395.L A61K39/395.E A61K39/395.T A61K47/68 A61K31/404 G01N33/53.D G01N33/534 G01N33/574.A | | |
| F-TERM分类号 | 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA14 4C076/AA95 4C076/CC27 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF68 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA10 4C084/BA14 4C084/BA23 4C084/CA59 4C084/DA27 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA13 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC751 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA26 4C085/BB36 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC10 4C086/CB11 4C086/CB22 4C086/DA38 4C086/EA08 4C086/EA11 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/NA13 4C086/ZB26 4C086/ZC75 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74 4H045/GA26 | | |
| 优先权 | 62/049594 2014-09-12 US | | |
| 其他公开文献 | JP2017534253A5 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本公开内容提供了抗HER2抗体和免疫复合物，及其使用方法。点域

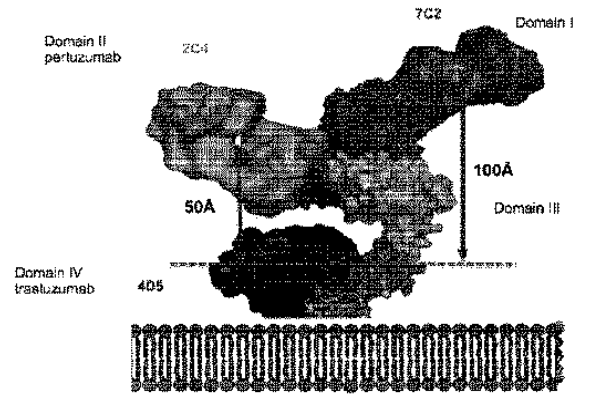


FIG. 3