

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7254861号
(P7254861)

(45)発行日 令和5年4月10日(2023.4.10)

(24)登録日 令和5年3月31日(2023.3.31)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 31/357 (2006.01)	A 6 1 K 31/357	Z N A
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
請求項の数 5 外国語出願 (全213頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-137504(P2021-137504)	(73)特許権者	506137147 エーザイ・アール・アンド・ディー・マ ネジメント株式会社 東京都文京区小石川四丁目6番10号
(22)出願日	令和3年8月25日(2021.8.25)	(74)代理人	100088155 弁理士 長谷川 芳樹
(62)分割の表示	特願2020-84451(P2020-84451)の 分割	(74)代理人	100128381 弁理士 清水 義憲
原出願日	平成29年3月2日(2017.3.2)	(74)代理人	100126653 弁理士 木元 克輔
(65)公開番号	特開2021-185176(P2021-185176 A)	(72)発明者	アルボン, アール, エフ. アメリカ合衆国, ペンシルベニア州, ブルー ベル, ホウイットパン ヒルズ 2105
(43)公開日	令和3年12月9日(2021.12.9)	(72)発明者	チェン, シン
審査請求日	令和3年8月26日(2021.8.26)		
(31)優先権主張番号	62/302,562		
(32)優先日	平成28年3月2日(2016.3.2)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エリブリンをベースとする抗体 - 薬物コンジュゲート及び使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

- L - Dを含み、Dが、エリブリンであり；Lが、Dに共有結合している切断可能なリンカーである、組成物であって、

前記切断可能なリンカーが $M a 1 - (P E G)_m - V a 1 - C i t - p A B$ を含み、mが1～6の整数であり、

前記 $M a 1$ (マレイミド)が、抗体又は抗原結合性断片に結合し、前記 $M a 1$ 中の窒素原子が $P E G$ に結合しており、前記 $p A B$ (p - アミノベンジルオキシカルボニル)が、C - 3 5アミンを介してエリブリンに共有結合し、前記 $p A B$ 中のアミノ基が $C i t$ に結合している、組成物。

【請求項2】

mが2～5の整数である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

mが2、3又は4である、請求項1または請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

前記切断可能なリンカーが $M a 1 - (P E G)_2 - V a 1 - C i t - p A B$ を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項5】

前記 $M a 1$ が抗体又は抗原結合性断片の上のシステイン残基に結合している、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる2016年3月2日出願の米国特許仮特許出願第62/302,562号に対する優先権の利益を主張する。

【0002】

本開示は、葉酸受容体アルファなどのヒト腫瘍抗原標的に結合し、及び/または抗チューブリン薬物活性をもたらす抗体薬物コンジュゲート(ADC)に関する。本開示はさらに、葉酸受容体アルファを発現し、及び/またはチューブリンの破壊による処置に適しているがんの処置及び診断において有用な方法及び組成物に関する。

10

【背景技術】

【0003】

がんは世界的に、罹患及び死亡の主な原因のうちの1つであり、2012年には約1400万の新たな症例及び820万のがん関連死があった。がんによる死亡の最も共通する原因は、肺癌(159万人の死亡);肝臓癌(745,000人の死亡);胃癌(723,000人の死亡);結腸直腸癌(694,000人の死亡);乳癌(521,000人の死亡);及び食道癌(400,000人の死亡)である。新たながんの症例数は、来る20年で約70%、1年当たり約2200万の新たながん症例へと増加すると予測されている(World Cancer Report 2014)。

【0004】

微小管は、細胞内移行及び輸送、細胞シグナル伝達、ならびに細胞形状の維持を含む様々な細胞機能に関係する動的な線維状の細胞骨格タンパク質である。微小管はまた、染色体を2つの娘細胞に分離するために必要な有糸分裂紡錘体を形成することにより、有糸分裂細胞分裂において重要な役割を果たす。すべての細胞における微小管の生物学的機能は大部分、それらの重合ダイナミクスにより調節され、これは、微小管の両端での及びチューブリン二量体の可逆的な非共有結合性の付加により生じる。この動的挙動及びその結果生じる微小管の長さに対する制御は、紡錘体の適正な機能に非常に重要である。微小管ダイナミクスのわずかな変化でさえ、紡錘体チェックポイントに連動し、有糸分裂における細胞周期の進行を停止させ、続いて、細胞死をもたらす得る(Mukhtar et al. (2014) Mol. Cancer Ther. 13: 275-84)。それらの急速な細胞分裂により、がん細胞は一般に、チューブリンに結合し、その正常な機能を破壊する化合物に対して、正常な細胞よりも感受性がある。この理由で、チューブリン阻害薬及び他の微小管標的薬は、がんを処置するための有望な薬物群となっている(Dumontet and Jordan (2010) Nat. Rev. Drug Discov. 9: 790-803)。

20

30

【0005】

葉酸受容体アルファ(FRA)は、葉酸に結合するグリコホスファチジルイノシトール(GPI)結合膜タンパク質である。正常組織及びがん性組織の生物学におけるFRAの役割は、完全には理解されていないが、上皮由来の卵巣癌の高いパーセンテージで(O'Shannessy et al. (2013) Int. J. Gynecol. Pathol. 32(3): 258-68)、さらには、非小細胞肺癌のあるパーセンテージでは高度に過剰に発現される(Christoph et al. (2014) Clin. Lung Cancer 15(5): 320-30)。FRAはまた、正常な組織では発現を制限している。これらの特性により、FRAは、がん免疫療法のための魅力的な標的となっている。

40

【0006】

がん原遺伝子ヒト上皮成長因子受容体2(HER2)は、ヒト上皮成長因子受容体(EGFR)ファミリーに属する膜貫通チロシンキナーゼ受容体をコードする(King et al. (1985) Science 229: 974-6)。HER2の過剰発現は、PI3K-AKT-mTOR経路などの成長因子シグナル伝達経路の構成的活性化を可能に

50

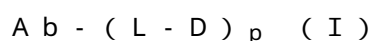
し、それにより、侵襲性乳癌の約20%を含む数種のがんにおいて発がんドライバー (oncogenic driver) として役立つ (Slamon et al. (1989) Science 244:707-12; Gajria and Chandarlapaty (2011) Expert Rev. Anticancer Ther. 11:263-75)。HER2増幅が形質転換表現型を媒介するということから、HER2は、がん処置のための別の有望な標的である。

【0007】

本開示は一部では、腫瘍細胞に対して生物学的活性を有する新規化合物を提供する。その化合物は、哺乳類において腫瘍増殖を阻害することができ、ヒトがん患者を処置するために有用であり得る。

【0008】

本開示はより具体的には、腫瘍細胞 (例えば、FRA発現性腫瘍細胞) と結合し、それに内在化し、それを死滅させることができる抗体-薬物コンジュゲート化合物に関する。薬物部分を抗体部分に結合するリンカーを含む抗体-薬物コンジュゲート化合物を開示する。抗体-薬物コンジュゲート (ADC) 化合物は、式Iにより表され得る：



[式中、Abは、腫瘍細胞を標的とする内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片であり；

Dは、エリブリンであり；

Lは、AbをDに共有結合する切断可能なリンカーであり；

pは、1~20の整数である]。

【0009】

一部の実施形態では、ADCが、細胞外条件に存在する場合にはインタクトなままであるが、細胞、例えば、がん細胞内に内在化されると切断され得るように、リンカーは、細胞外では安定的である。一部の実施形態では、エリブリン薬物部分は、ADCが、ADCの抗体部分に特異的な抗原を発現する細胞に進入すると、抗体部分から切断され、切断により、エリブリンの未修飾形態が放出される。一部の実施形態では、リンカーは、切断された際に、エリブリン薬物部分に結合したままになっているリンカーの部分または抗体部分がないように配置されている切断可能な部分を含む。

【0010】

一部の実施形態では、リンカー内の切断可能な部分は、切断可能なペプチド部分である。一部の実施形態では、切断可能なペプチド部分を含むADCは、代替の切断可能な部分を含むADCに対して、低い凝集レベル、抗体：薬物比の改善、がん細胞のオンターゲット死滅の増加、非がん細胞のオフターゲット死滅の減少、及び/または高い薬物負荷 (p) を実証する。一部の実施形態では、切断可能な部分の付加は、切断不可能なリンカーに対して、細胞傷害性及び/または効力を上昇させる。一部の実施形態では、効力及び/または細胞傷害性の上昇は、ADCの抗体部分により標的とされる抗原を中等度のレベルで発現するがん (例えば、中等度のFRA発現) においてである。一部の実施形態では、切断可能なペプチド部分は、酵素により切断可能であり、リンカーは、酵素切断可能なリンカーである。一部の実施形態では、酵素は、カテプシンであり、リンカーは、カテプシン切断可能なリンカーである。特定の実施形態では、酵素切断可能なリンカー (例えば、カテプシン切断可能なリンカー) は、代替の切断機構と比較すると、上述の改善される特性の1つまたは複数を示す。

【0011】

一部の実施形態では、リンカー内の切断可能なペプチド部分は、アミノ酸ユニットを含む。一部の実施形態では、アミノ酸ユニットは、バリン-シトルリン (Val-Cit) を含む。一部の実施形態では、Val-Citを含むADCは、代替のアミノ酸ユニットまたは代替の切断可能な部分を含むADCに対して、安定性の上昇、オンターゲットな細胞死滅の減少、標的上の細胞死滅の増加、低い凝集レベル、及び/または高い薬物負荷を実証する。

10

20

30

40

50

【0012】

一部の実施形態では、リンカーは、抗体部分を切断可能な部分に接続する少なくとも1個のスペーサーユニットを含む。一部の実施形態では、リンカー内のスペーサーユニットは、少なくとも1個のポリエチレングリコール(PEG)部分を含んでよい。PEG部分は、例えば、 $-(PEG)_m-$ を含んでよく、ここで、 m は、 $1 \sim 10$ の整数である。一部の実施形態では、リンカー内のスペーサーユニットは、 $(PEG)_2$ を含む。一部の実施形態では、より短いリンカー長さにも関わらず、長いスペーサーユニット(例えば、 $(PEG)_8$)を含むADCに対して、短いスペーサーユニット(例えば、 $(PEG)_2$)を含むADCは、低い凝集レベル及び/または高い薬物負荷を実証する。

【0013】

一部の実施形態では、リンカー内のスペーサーユニットは、マレイミド部分(Mal)を介してADCの抗体部分に結合する。一部の実施形態では、Malを介して抗体部分に結合しているリンカーを含むADCは、代替の部分を通じて抗体部分に結合しているリンカーを含むADCに対して、高い薬物負荷を実証する。一部の実施形態では、リンカー内のMalは、抗体部分の上のシステイン残基と反応性である。一部の実施形態では、リンカー内のMalは、システイン残基を介して抗体部分に接続されている。一部の実施形態では、Mal-スペーサーユニットは、PEG部分を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $Mal-(PEG)_m$ 、例えば、 $Mal-(PEG)_2$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $Mal-(PEG)_2$ を含む。一部の実施形態では、Mal-スペーサーユニットは、抗体部分を、リンカー内の切断可能な部分に結合する。一部の実施形態では、リンカー内の切断可能な部分は、切断可能なペプチド部分、例えば、アミノ酸ユニットである。一部の実施形態では、リンカーは、 $Mal-(PEG)_2-Val-Cit$ を含む。

【0014】

一部の実施形態では、リンカー内の切断可能な部分は、ADCのエリブリン薬物部分に直接接続しており、切断可能な部分は、抗体部分に直接接続しているか、またはスペーサーユニットを介して接続している。一部の実施形態では、スペーサーユニットはまた、リンカー内の切断可能な部分をエリブリン薬物部分に結合する。一部の実施形態では、リンカー内の切断可能な部分をエリブリン薬物部分に結合するスペーサーユニットは、自壊性(self-immolative)である。一部の実施形態では、自壊性スペーサーは、標的細胞内で非修飾エリブリンを放出することができる。一部の実施形態では、自壊性スペーサーユニットは、 p -アミノベンジルアルコールを含む。一部の実施形態では、自壊性スペーサーユニットは、 p -アミノベンジルオキシカルボニル(pAB)を含む。リンカー内のpABは、一部の実施形態では、切断可能な部分をエリブリン薬物部分に結合する。一部の実施形態では、切断可能な部分は、切断可能なペプチド部分、例えば、アミノ酸ユニットである。一部の実施形態では、リンカーは、 $Val-Cit-pAB$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $Val-Cit-pAB$ 、及びMalを介してリンカーを抗体部分に接続するスペーサーユニットを含む。

【0015】

一部の実施形態では、 p は、 $1 \sim 6$ 、 $2 \sim 5$ 、または好ましくは、 $3 \sim 4$ の整数である。一部の実施形態では、 p は、 4 である。一部の実施形態では、一群のADCを提供し、その群における平均 p は、約 4 (例えば、 $3.5 \sim 4.5$ 、例えば、約 3.8)である。一部の実施形態では、リンカーは、 $Mal-(PEG)_2-Val-Cit-pAB$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $Mal-(PEG)_2-Val-Cit-pAB$ を含み、 p は、 4 である。一部の実施形態では、一群のADCを提供し、ここで、各ADCは $Mal-(PEG)_2-Val-Cit-pAB$ リンカーを含み、その群における平均 p は、約 4 (例えば、 $3.5 \sim 4.5$ 、例えば、約 3.8)である。

【0016】

一部の実施形態では、ADCの内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片(AbまたはAb部分)は、抗葉酸受容体アルファ(FRA)抗体または内在化型抗体断片であり、

10

20

30

40

50

F R A 発現性腫瘍細胞に結合することができる（すなわち、A D C は、F R A 発現性細胞を標的とする）。一部の実施形態では、抗 F R A A b 部分及び切断可能なペプチド部分を含む A D C は、切断不可能なリンカーまたは代替の切断機構に対して、低い凝集レベル、抗体：薬物比の改善、がん細胞のオンターゲット死滅の増加、非がん細胞のオフターゲット死滅の減少、高い薬物負荷（p）、細胞傷害性及び/または効力の上昇を実証する。一部の実施形態では、効力及び/または細胞傷害性の上昇は、A D C の抗体部分により標的とされる抗原を中等度のレベルで発現するがん（例えば、中等度の F R A 発現）においてである。一部の実施形態では、切断可能なペプチド部分は、酵素により切断可能であり、リンカーは、酵素切断可能なリンカーである。一部の実施形態では、酵素は、カテプシンであり、リンカーは、カテプシン切断可能なリンカーである。特定の実施形態では、酵素切断可能なリンカー（例えば、カテプシン切断可能なリンカー）は、代替の切断機構と比較すると、上述の改善された特性のうちの1つまたは複数を示す。一部の実施形態では、リンカーは、M a l - (P E G) m - V a l - C i t - p A B である。

10

【0017】

一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、葉酸受容体アルファ（F R A）に結合し、F R A 発現性腫瘍細胞を標的とする。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、3つの重鎖相補性決定領域（C D R）及び3つの軽鎖 C D R を含み、その際、重鎖 C D R は、K a b a t ナンバリングシステムにより定義すると、配列番号2からなる重鎖 C D R 1、配列番号3からなる重鎖 C D R 2、及び配列番号4からなる重鎖 C D R 3 を含み；3つの軽鎖 C D R は、配列番号7からなる軽鎖 C D R 1、配列番号8からなる軽鎖 C D R 2、及び配列番号9からなる軽鎖 C D R 3 を含むか；または重鎖 C D R は、I M G T ナンバリングシステムにより定義すると、配列番号13からなる重鎖 C D R 1、配列番号14からなる重鎖 C D R 2、及び配列番号15からなる重鎖 C D R 3 を含み；軽鎖 C D R は、配列番号16からなる軽鎖 C D R 1、配列番号17からなる軽鎖 C D R 2、及び配列番号18からなる軽鎖 C D R 3 を含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、ヒトフレームワーク配列を含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、配列番号23の重鎖可変ドメイン及び配列番号24の軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、ヒト I g G 1 重鎖定常ドメイン及び I g カッパ軽鎖定常ドメインを含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性は、配列番号23の重鎖可変ドメイン及び配列番号24の軽鎖可変ドメインを含む抗体と同じエピトープへの結合について競合し、及び/または、それに結合する。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、アラニン - ヒスタジン - リシン - アスパラギン酸（A H K D）を含むエピトープ（配列番号365）に結合する（O' S h a n n e s s y e t a l . , (2 0 1 1) O n c o t a r g e t 2 : 1 2 2 7 - 4 3）。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、N T S Q E A H K D V S Y L を含むエピトープ（配列番号366）に結合する。

20

30

【0018】

一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、内在化型抗 F R A 抗体または内在化型抗原結合性断片である。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、3つの重鎖 C D R 及び3つの軽鎖 C D R を含み、その際、K a b a t ナンバリングシステムにより定義すると、重鎖 C D R は、配列番号2からなる重鎖 C D R 1、配列番号3からなる重鎖 C D R 2、及び配列番号4からなる重鎖 C D R 3 を含み；3つの軽鎖 C D R は、配列番号7からなる軽鎖 C D R 1、配列番号8からなる軽鎖 C D R 2、及び配列番号9からなる軽鎖 C D R 3 を含むか；または I M G T ナンバリングシステムにより定義すると、重鎖 C D R は、配列番号13からなる重鎖 C D R 1、配列番号14からなる重鎖 C D R 2、及び配列番号15からなる重鎖 C D R 3 を含み；軽鎖 C D R は、配列番号16からなる軽鎖 C D R 1、配列番号17からなる軽鎖 C D R 2、及び配列番号18からなる軽鎖 C D R 3 を含み；リンカーは、M a l - (P E G) 2 - V a l - C i t - p A B を含み；p は、4 である。一部の実施形態では、一群のそのような A D C

40

50

を提供し、pは、約4（例えば、約3.8）である。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、配列番号23の重鎖可変ドメイン及び配列番号24の軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、ヒトIgG1重鎖定常ドメイン及びIgカッパ軽鎖定常ドメインを含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性は、配列番号23の重鎖可変ドメイン及び配列番号24の軽鎖可変ドメインを含む抗体と同じエピトープへの結合について競合し、及び/またはそれに結合する。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、配列番号365を含むエピトープに結合する。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、配列番号366を含むエピトープに結合する。

10

【0019】

一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、ヒト上皮成長因子受容体2（her2）に結合し、her2発現性腫瘍細胞を標的とする。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、3つの重鎖相補性決定領域（CDR）及び3つの軽鎖CDRを含み、その際、Kabataナンバリングシステムにより定義すると、重鎖CDRは、配列番号71からなる重鎖CDR1、配列番号72からなる重鎖CDR2、及び配列番号73からなる重鎖CDR3を含み；3つの軽鎖CDRは、配列番号74からなる軽鎖CDR1、配列番号75からなる軽鎖CDR2、及び配列番号76からなる軽鎖CDR3を含むか；またはIMGTナンバリングシステムにより定義すると、重鎖CDRは、配列番号191からなる重鎖CDR1、配列番号192からなる重鎖CDR2、及び配列番号193からなる重鎖CDR3を含み；軽鎖CDRは、配列番号194からなる軽鎖CDR1、配列番号195からなる軽鎖CDR2、及び配列番号196からなる軽鎖CDR3を含む。一部の実施形態では、抗体または内在化型抗原結合性断片は、ヒトフレームワーク配列を含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、配列番号27の重鎖可変ドメイン及び配列番号28の軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、ヒトIgG1重鎖定常ドメイン及びIgカッパ軽鎖定常ドメインを含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性は、配列番号27の重鎖可変ドメイン及び配列番号28の軽鎖可変ドメインを含む抗体と同じエピトープへの結合について競合し、及び/またはそれに結合する。

20

30

【0020】

一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、内在化型抗her2抗体または内在化型抗原結合性断片である。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを含み、その際、Kabataナンバリングシステムにより定義すると、重鎖CDRは、配列番号71からなる重鎖CDR1、配列番号72からなる重鎖CDR2、及び配列番号73からなる重鎖CDR3を含み；3つの軽鎖CDRは、配列番号74からなる軽鎖CDR1、配列番号75からなる軽鎖CDR2、及び配列番号76からなる軽鎖CDR3を含むか；またはIMGTナンバリングシステムにより定義すると、重鎖CDRは、配列番号191からなる重鎖CDR1、配列番号192からなる重鎖CDR2、及び配列番号193からなる重鎖CDR3を含み；軽鎖CDRは、配列番号194からなる軽鎖CDR1、配列番号195からなる軽鎖CDR2、及び配列番号196からなる軽鎖CDR3を含み；リンカーは、Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pABを含み；pは、4である。一部の実施形態では、一群のそのようなADCを提供し、pは約4（例えば、約3.8）である。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、配列番号27の重鎖可変ドメイン及び配列番号28の軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、ヒトIgG1重鎖定常ドメイン及びIgカッパ軽鎖定常ドメインを含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性は、配列番号27の重鎖可変ドメイン及び配列番号28の軽鎖可変ドメインを含む抗体と同じエピトープへの結合について競合し、及び/またはそれに結合する。

40

50

【 0 0 2 1 】

一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、メソテリン (M S L N) に結合し、 M S L N 発現性腫瘍細胞を標的とする。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、3つの重鎖相補性決定領域 (C D R) 及び3つの軽鎖 C D R を含み、その際、 K a b a t ナンバリングシステムにより定義すると、重鎖 C D R は、配列番号 6 5 からなる重鎖 C D R 1、配列番号 6 6 からなる重鎖 C D R 2、及び配列番号 6 7 からなる重鎖 C D R 3 を含み；3つの軽鎖 C D R は、配列番号 6 8 からなる軽鎖 C D R 1、配列番号 6 9 からなる軽鎖 C D R 2、及び配列番号 7 0 からなる軽鎖 C D R 3 を含むか；または I M G T ナンバリングシステムにより定義すると、重鎖 C D R は、配列番号 1 8 5 からなる重鎖 C D R 1、配列番号 1 8 6 からなる重鎖 C D R 2、及び配列番号 1 8 7 からなる重鎖 C D R 3 を含み；軽鎖 C D R は、配列番号 1 8 8 からなる軽鎖 C D R 1、配列番号 1 8 9 からなる軽鎖 C D R 2、及び配列番号 1 9 0 からなる軽鎖 C D R 3 を含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、配列番号 2 5 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 2 6 の軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、ヒト I g G 1 重鎖定常ドメイン及び I g カッパ軽鎖定常ドメインを含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性は、配列番号 2 5 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 2 6 の軽鎖可変ドメインを含む抗体と同じエピトープへの結合について競合し、及び/またはそれに結合する。

10

【 0 0 2 2 】

一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、内在化型抗 M S L N 抗体または内在化型抗原結合性断片である。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、3つの重鎖 C D R 及び3つの軽鎖 C D R を含み、その際、 K a b a t ナンバリングシステムにより定義すると、重鎖 C D R は、配列番号 6 5 からなる重鎖 C D R 1、配列番号 6 6 からなる重鎖 C D R 2、及び配列番号 6 7 からなる重鎖 C D R 3 を含み；3つの軽鎖 C D R は、配列番号 6 8 からなる軽鎖 C D R 1、配列番号 6 9 からなる軽鎖 C D R 2、及び配列番号 7 0 からなる軽鎖 C D R 3 を含むか；または I M G T ナンバリングシステムにより定義すると、重鎖 C D R は、配列番号 1 8 5 からなる重鎖 C D R 1、配列番号 1 8 6 からなる重鎖 C D R 2、及び配列番号 1 8 7 からなる重鎖 C D R 3 を含み；軽鎖 C D R は、配列番号 1 8 8 からなる軽鎖 C D R 1、配列番号 1 8 9 からなる軽鎖 C D R 2、及び配列番号 1 9 0 からなる軽鎖 C D R 3 を含む；リンカーは、 M a l - (P E G)₂ - V a l - C i t - p A B を含み；p は、4 である。一部の実施形態では、一群のそのような A D C を提供し、p は約 4 (例えば、約 3 . 8) である。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、配列番号 2 5 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 2 6 の軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性断片は、ヒト I g G 1 重鎖定常ドメイン及び I g カッパ軽鎖定常ドメインを含む。一部の実施形態では、内在化型抗体または内在化型抗原結合性は、配列番号 2 5 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 2 6 の軽鎖可変ドメインを含む抗体と同じエピトープへの結合について競合し、及び/またはそれに結合する。

20

30

【 0 0 2 3 】

記載の A D C のいずれかの多数のコピーを含む組成物も、本明細書では提供し、その際、組成物中の A D C の平均薬物負荷 (平均 p) は、約 3 ~ 4、または約 3 . 5 ~ 約 4 . 5、または約 4 である。一部の実施形態では、平均 p は、約 3 . 2 ~ 3 . 8 である。一部の実施形態では、平均 p は、約 3 . 6 ~ 4 . 4 である。

40

【 0 0 2 4 】

- L - D を含み、D が、エリブリンであり；L が、D に共有結合している切断可能なリンカーである組成物も、本明細書では提供する。一部の実施形態では、切断可能なリンカーは、エリブリンの上の C - 3 5 アミンに共有結合している。一部の実施形態では、切断可能なリンカーは、V a l - C i t を含む。一部の実施形態では、切断可能なリンカーは、P E G スペーサーユニットを含む。一部の実施形態では、切断可能なリンカーは、M a l - (P E G)₂ - V a l - C i t - p A B を含む。

50

【 0 0 2 5 】

さらに、ADCと、薬学的に許容される希釈剤、担体、及び/または添加剤とを含む医薬組成物を本明細書では提供する。

【 0 0 2 6 】

本開示の別の態様は、例えば、がんの処置における記載のADC化合物及び組成物の治療上及び診断上の使用を含む。別の態様は、FRAなどの、ADCの抗体部分により標的とされる抗原を発現するがんを処置する方法を含む。さまざまな実施形態で、記載のADCのいずれか1つの治療有効量及び/またはレジメンを投与することにより、腫瘍細胞またはがん細胞を死滅させる、またはその増殖を阻害する方法を提供する。別の態様は、開示のADCを使用して、FRAを発現する腫瘍細胞またはがん細胞を検出する方法、及び記載のADCでの処置に応答するであろうがん患者をスクリーニングする方法を含む。一部の実施形態では、がんは、胃癌、漿液性卵巣癌、明細胞卵巣癌、非小細胞肺癌、結腸直腸癌、三重陰性乳癌、子宮内膜癌、漿液性子宮内膜癌、肺類癌、または骨肉腫である。記載のADCを生成する方法も開示する。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 7 】

【図1】特定の実施形態で開示されているとおりに、MORAb-003ADCを調製するために使用される方法の1つを示している。このアプローチでは、非対合システインを、限定モル当量の非チオール還元剤TCEPで部分的に還元することにより生成する。このアプローチは、鎖内ジスルフィド結合をインタクトなままにしながら、軽鎖及び重鎖を連結する鎖間ジスルフィド結合(1つのH-L対合1つ当たり1対)及びヒンジ領域の2つの重鎖(ヒトIgG1の場合は1つのH-H対合1つ当たり2対)を優先的に還元させる。

20

【図2】特定の実施形態で開示されているとおりに、マレイミド-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-エリブリン(mal-(PEG)₂-VCP-エリブリン)を合成する方法を示している。

【図3】MORAb-003での還元状態のSDS-PAGE分析を示している。レーンは、図の右側に示されている。レーンMは、タンパク質標準に対応し;レーン1は、未処理MORAb-003に対応し;レーン2は、70.6µM TCEPで還元させた5.3mg/mLに対応し;レーン3は、141.2µM TCEPで還元させたMORAb-003 5.3mg/mLに対応し;レーン4は、20µM TCEPで還元させたMORAb-003 1.5mg/mLに対応し;レーン5は、40µM TCEPで還元させたMORAb-003 1.5mg/mLに対応する。各バンドのアイデンティティは、右下のゲル上に示されている。「H」は、重鎖を示す。「L」は、軽鎖を示す。

30

【図4】MORAb-003での還元状態のSDS-PAGE分析を示している。レーン1は、タンパク質標準に対応し;レーン2は、未処理MORAb-003に対応し;レーン3は、1:1のMORAb-003:TCEPの比で処理されたMORAb-003に対応し;レーン4は、1:2のMORAb-003:TCEPの比で処理されたMORAb-003に対応し;レーン5は、1:3のMORAb-003:TCEPの比で処理されたMORAb-003に対応し;レーン6は、1:4のMORAb-003:TCEPの比で処理されたMORAb-003に対応する。

40

【図5】M-MMAE(レーン2)、M-DM1(レーン3)、M-0026(レーン4)、M-0260(レーン5)、M-0267(レーン6)、M-0272(レーン7)、M-0285(レーン8)、M-0292(レーン9)、M-027-0381(レーン10)、及びM-0284(レーン11)を含む、選択されたMORAb-003ADCの非還元型SDS-PAGE分析を示している。

【図6】図6Aは、MORAb-003-マレイミド-PEG₂-Val-Cit-pAB-エリブリン(M3-VCP-エリブリン、または「MORAb-202」)のバスター細胞傷害性アッセイの結果を示している。図6Bは、MORAb-003-マレイミド-(CH₂)₅-Val-Cit-pAB-ER-001150828(M3-E

50

R - 6 1 3 1 8) のバイスタンダー細胞傷害性アッセイの結果を示している。図 6 C は、MORAb - 0 0 3 - PEG - pAB - デュオスタチン (duostatin) 3 (M3 - 0 2 7 - 0 2 8 5) のバイスタンダー細胞傷害性アッセイの結果を示している。それぞれの図の説明に示されている情報は、細胞系：試験した薬剤 (培養した細胞系 (複数可) 、 $1^{st} / 2^{nd}$ 細胞系の播種密度) を示している。

【図 7】図 7 A 及び 7 B は、特定の実施形態で開示されているとおり、非コンジュゲート MORAb - 0 0 3 に対する、ADC の MORAb - 0 0 3 - VCP - エリブリン (図 7 A) 及び MORAb - 0 0 3 - 0 2 8 5 (図 7 B) の薬物 - 対 - 抗体比 (DAR) 分布を示している。各ピークの上の数値は、個々の種の DAR を示している。

【図 8】細胞傷害性分析の結果、すなわち、IGROV1 または SJSA - 1 細胞における MORAb - 0 0 3 - VCP - エリブリンと非コンジュゲート MORAb - 0 0 3 (2 μ M) との競合を示している。

10

【図 9】ビヒクル (PBS)、または 1 0、2 0、4 0、もしくは 8 0 mg / kg の MORAb - 2 0 2 の単回静脈内投与で処置された CD - 1 マウス (群平均及び SEM) の各群での体重動態を示している。

【図 1 0】q 4 d \times 3 投与計画 (用量を 4 日ごとに 1 回、合計 3 用量で投与) に従って、PBS で、または 0 . 4、0 . 8、1 . 6、もしくは 3 . 2 mg / kg のエリブリンで静脈内処置された CD - 1 マウス (群平均及び SEM) の各群での体重動態を示している。

【図 1 1】hNSCLC NCI - H 2 1 1 0 細胞 (群平均及び SEM) を移植され、かつ PBS、1、2 . 5、もしくは 5 mg / kg の MORAb - 0 0 3 - VCP - エリブリン (MORAb - 2 0 2)、または 5 mg / kg の MORAb - 0 0 3 - 0 2 8 5 の単回静脈内投与で処置された CB 1 7 - SCID マウスの各群での腫瘍増殖動態を示している。

20

【図 1 2】hNSCLC NCI - H 2 1 1 0 細胞を移植された個々の CB 1 7 - SCID マウスの、1 7 日目での腫瘍体積、さらには群平均及び SEM を示している。群を、PBS、1、2 . 5、もしくは 5 mg / kg の MORAb - 0 0 3 - VCP - エリブリン (MORAb - 2 0 2)、または 5 mg / kg の MORAb - 0 0 3 - 0 2 8 5 の単回静脈内投与で処置した。

【図 1 3】PBS、1、2 . 5、もしくは 5 mg / kg の MORAb - 0 0 3 - VCP - エリブリン (MORAb - 2 0 2)、または 5 mg / kg の MORAb - 0 0 3 - 0 2 8 5 の単回静脈内投与で処置された NCI - H 2 1 1 0 - 移植された CB 1 7 - SCID マウスの各群の体重動態 (群平均及び SEM) を示している。

30

【図 1 4】q 4 d \times 3 投与計画に従って、ビヒクル (PBS)、または 0 . 5、0 . 2、0 . 8、もしくは 1 . 6 mg / kg のエリブリンで静脈内処置された、NCI - H 2 1 1 0 移植された CB 1 7 - SCID マウス (群平均及び SEM) の各群での腫瘍増殖動態を示している。

【図 1 5】個々の NCI - H 2 1 1 0 移植された CB 1 7 - SCID マウスの、2 4 日目での腫瘍体積、さらには群平均及び SEM を示している。群を、q 4 d \times 3 投与計画に従ってビヒクル (PBS)、または 0 . 5、0 . 2、0 . 8、もしくは 1 . 6 mg / kg のエリブリンで静脈内処置した。

【図 1 6】q 4 d \times 3 投与計画に従って、ビヒクル (PBS)、または 0 . 5、0 . 2、0 . 8、もしくは 1 . 6 mg / kg のエリブリンで静脈内処置された、NCI - H 2 1 1 0 移植された CB 1 7 - SCID マウス (群平均及び SEM) の各群での体重変化動態を示している。

40

【図 1 7】Crystal Violet 細胞傷害性アッセイにより測定した場合の、IGROV1、OVCAR3、NCI - H 2 1 1 0、A 4 3 1 - A 3、及び SJSA - 1 細胞に対する MORAb - 0 0 3 - VCP - エリブリン (MORAb - 2 0 2) の効力を示している。

【図 1 8】PBS、または 1、2 . 5、もしくは 5 mg / kg の MORAb - 0 0 3 - VCP - エリブリン (MORAb - 2 0 2) の単回静脈内投与で処置された、NCI - H 2 1 1 0 移植された CB 1 7 - SCID マウス (群平均及び SEM) の各群での腫瘍増殖動

50

態を示している。

【図19】図19A及び19Bは、ピヒクル(PBS)、5mg/kgのMORAb-003、または5mg/kgのMORAb-003-VCP-エリブリン(MORAb-202)の単回静脈内投与で処置されたNSCLC PDx(LXFA-737)腫瘍担持マウス(群平均及びSEM)の各群での腫瘍増殖動態(図19A)及び体重変化動態(図19B)を示している。

【図20】図20A及び20Bは、PBS、0.1もしくは3.2mg/kgのエリブリン、または5mg/kgのMORAb-003-VCP-エリブリン(MORAb-202)の単回静脈内投与で処置された子宮内膜癌PDx(Endo-12961)腫瘍担持マウス(群平均及びSEM)の各群での個々の腫瘍体積比(図20A)及び体重変化動態(図20B)を示している。図20C及び20Dは、PBS、0.1もしくは3.2mg/kgのエリブリン、または5mg/kgのMORAb-003-VCP-エリブリン(MORAb-202)の単回静脈内投与で処置された子宮内膜癌PDx(Endo-10590)腫瘍担持マウス(群平均及びSEM)の各群での腫瘍増殖動態(図20C)及び体重変化動態(図20D)を示している。

【図21A】抗ヒトIgG抗体での、TNBC PDx(OD-BRE-0631)腫瘍担持マウスにおける腫瘍組織の免疫組織化学的(IHC)染色を示している。ピヒクル(右側)、または5mg/kgのMORAb-003-VCP-エリブリン(MORAb-202)(左側)の単回静脈内投与で処置されたマウスからの腫瘍組織を、処置から5日後に収集及び染色した。

【図21B】 -平滑筋アクチン(SMA)-FITC抗体での、TNBC PDx(OD-BRE-0631)腫瘍担持マウスにおける腫瘍組織のIHC染色を示している。未処置マウスからの腫瘍組織を処置の2日前に収集し(左側)、5mg/kgのMORAb-003-VCP-エリブリン(MORAb-202)の単回静脈内投与で処置されたマウスからの腫瘍組織を処置の5日後に収集した(右側)。

【図21C】ピヒクル(PBS)、または5mg/kgのMORAb-003-VCP-エリブリン(MORAb-202)の単回静脈内投与で処置されたTNBC PDx(OD-BRE-0631)腫瘍担持マウス(群平均及びSEM)の各群での腫瘍増殖動態を示している。

【図22】フローサイトメトリー分析により測定した場合の、ピヒクル(PBSまたはエタノール)、エリブリン、MORAb-003、またはMORAb-003-VCP-エリブリン(MORAb-202)で処置した後のMKN-74細胞を含む培養中でのヒト骨髄間葉系幹細胞(BM-MSC)の分化を示している。Stro-1⁺/CD105⁺、CD34⁺/CD31⁻、及びNG2⁺は、それぞれMSC、脂肪細胞、及び周細胞のマーカーである。

【図23】ピヒクル(PBS)、または5mg/kgのMORAb-003-VCP-エリブリン(MORAb-202)の単回静脈内用量で処置されたNCI-H2110移植されたCB17-SCIDマウスからの、 -平滑筋アクチン(SMA)-FITC抗体で染色された腫瘍組織の時間経過分析を示している。腫瘍組織を収集し、0日目、ならびに処置後の3、5、7及び9日目に染色した。Y軸：% = [カウントされた染色細胞 / カウントされた総細胞] × 100。X軸：日(カウントされた総細胞)。

【発明を実施するための形態】

【0028】

開示の組成物及び方法は、本開示の一部を成している添付の図面と関連して次の詳細な説明を参照することにより、より容易に理解することができる。本開示の組成物及び方法は、本明細書において記載する、及び/または示す特定の組成物及び方法に限定されないこと、ならびに本明細書において使用する専門用語は、特定の実施形態を単に例示することを目的としたものであって、特許請求の範囲に記載の組成物及び方法を限定することを意図したものではないことを理解されたい。

【0029】

10

20

30

40

50

このテキストを通じて、説明は、組成物及び前記組成物を使用する方法に関する。本開示が、組成物と関連する特徴または実施形態を記載するか、または請求する場合、そのような特徴または実施形態は、前記組成物を使用する方法にも同様に適用可能である。同様に、本開示が、組成物を使用する方法と関連する特徴または実施形態を記載するか、または請求する場合、そのような特徴または実施形態は、組成物にも同様に適用可能である。

【0030】

値の範囲が示されている場合、それは、その範囲内の任意の特定の値を使用する実施形態を含む。さらに、範囲内で述べられている値に対する言及は、その範囲内のいずれもすべての値を含む。すべての範囲が、それらの終点を包括し、かつ組合せ可能である。値が、先行する「約」の使用により、近似値として示されている場合、特定の値が別の実施形態を形成していることは理解されるであろう。特定の数値に対する言及は、文脈で別段に明確に指示されていない限り、少なくともその特定の値を含む。「または」の使用は、それを使用している具体的な文脈が別段に指示していない限り、「及び/または」を意味する。本明細書において引用する参考文献はすべて、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。参考文献と本明細書とが矛盾する場合には、本明細書が優先される。

10

【0031】

明確にするために、本明細書において別々の実施形態の文脈において記載される本開示の組成物及び方法のある種の特徴を、単一の実施形態に組み合わせて提供することもできることは認められるべきである。逆に、簡潔にするために、単一の実施形態の文脈で記載されている本開示の組成物及び方法の様々な特徴を、別々に、または任意の部分的組み合わせで提供することもできる。

20

【0032】

定義

説明の態様に関連する様々な用語を、本明細書及び特許請求の範囲を通じて使用する。そのような用語は、別段に示さない限り、当技術分野におけるそれらの普通の意味を与えられているものとする。他の特別に定義する用語は、本明細書において提供する定義と整合するように、解釈されるべきである。

【0033】

本明細書で使用する場合、単数形の「a」、「an」及び「the」は、文脈が別段に指示していない限り、複数形を含む。

30

【0034】

数値及び範囲の文脈における「約」または「おおよそ」という用語は、当業者であれば本明細書に含まれる教示から分かるであろうとおり、反応混合物中で所望の量の核酸またはポリペプチドを有するなど、実施形態を意図されているとおりに行うことができるような、挙げられている値または範囲に近似している、または近い値または範囲を指す。これは、少なくとも部分的に、核酸組成、年齢、人種、性別、解剖学的及び生理学的変化ならびに生態系の不正確さの様々な特性による。したがって、これらの用語は、系統的誤差から生じる値を越える値を含む。

【0035】

「抗体-薬物コンジュゲート」、「抗体コンジュゲート」、「コンジュゲート」、「イムノコンジュゲート」、及び「ADC」という用語は、互換的に使用され、抗体（例えば、抗FRA抗体）に連結している化合物またはその誘導体を指し、一般式： $Ab - (L - D)_p$ （式I）により定義される[式中、Ab = 抗体部分（すなわち、抗体または抗原結合性断片）、L = リンカー部分、D = 薬物部分、p = 抗体部分1つ当たりの薬物部分の数]。

40

【0036】

「抗体」という用語は、最も広い意味では、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を介して、標的、例えば、タンパク質、ポリペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、または上述の組合せを認識し、それに特異的に結合する免疫グロブリン分子を指すために使用される。抗体の重鎖は、重鎖可変ドメイン（V_H）及び

50

重鎖定常領域（ C_H ）から構成される。軽鎖は、軽鎖可変ドメイン（ V_L ）及び軽鎖定常ドメイン（ C_L ）から構成される。本出願の目的では、成熟重鎖及び軽鎖可変ドメインはそれぞれ、N末端からC末端へ：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4と配置されている、4つのフレームワーク領域（FR1、FR2、FR3及びFR4）内の3つの相補性決定領域（CDR1、CDR2及びCDR3）を含む。「抗体」は、天然に存在してもよいし、または慣用のハイブリドーマ技術により生産されるモノクローナル抗体など、人工的であってもよい。「抗体」という用語には、全長モノクローナル抗体及び全長ポリクローナル抗体、さらには、抗体断片、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、及び一本鎖抗体が含まれる。抗体は、免疫グロブリンの5つの主な群：IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM、またはそのサブクラス（例えば、アイソタイプIgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のいずれか1つであってよい。この用語はさらに、所望の生物学的活性を実証する限り、抗原認識部位を含有するヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体及び任意の修飾された免疫グロブリン分子を含む。

【0037】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書で使用する場合、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る天然に存在する起こり得る変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原エピトープを指向する。対照的に、従来の（ポリクローナル）抗体調製物は典型的には、種々のエピトープを指向する（または、それらに特異的な）多数の抗体を含む。修飾語句「モノクローナル」は、抗体の実質的に均質な集団から得られるという抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法により抗体を生産することが必要であると解釈されるべきではない。例えば、本開示により使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al. (1975) Nature 256:495により最初に記載されたハイブリドーマ法により作製されてもよいし、または組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）により作製されてもよい。モノクローナル抗体はまた、例えばClackson et al. (1991) Nature 352:624-8、及びMarks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-97に記載されている技術を使用してファージ抗体ライブラリから単離することもできる。

【0038】

本明細書に記載のモノクローナル抗体には具体的には、重鎖及び/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するか、または特定の抗体群もしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一である、もしくは相同している一方で、その鎖（複数可）の残りは、別の種に由来するか、または別の抗体群もしくはサブクラスに属する抗体、さらには、それらが標的抗原と特異的に結合し、及び/または所望の生物学的活性を示す限り、そのような抗体の断片における対応する配列と同一であるか、もしくは相同している、「キメラ」抗体が含まれる。

【0039】

「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用する場合、ヒトにより産生される抗体またはヒトにより産生される抗体のアミノ酸配列を有する抗体を指す。

【0040】

「キメラ抗体」という用語は、本明細書で使用する場合、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2種以上の種に由来する抗体を指す。一部の例では、重鎖及び軽鎖の両方の可変領域は、所望の特異性、親和性、及び活性を有する、ある種に由来する抗体の可変領域に対応する一方で、定常領域は、別の種（例えば、ヒト）に由来する抗体と相同していて、後者の種における免疫応答を最小限にしている。

【0041】

本明細書で使用する場合、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト（例えば、マウス）抗体、さらにはヒト抗体からの配列を含有する抗体の形態を指す。そのような抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有するキメラ抗体である。一般に、ヒト化

10

20

30

40

50

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すべてを含み、その際、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、フレームワーク(FR)領域のすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は任意選択で、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域(Fc)の少なくとも一部も含む。ヒト化抗体は、抗体特異性、親和性、及び/または活性を精密化及び最適化するために、Fvフレームワーク領域で、及び/または置き換えられた非ヒト残基内のいずれかで、残基の置換によりさらに修飾されていてもよい。

【0042】

抗体の「抗原結合性断片」または「抗原結合性部分」という用語は、本明細書で使用する
10
場合、抗原(例えば、FRA)に特異的に結合する能力を保持している抗体の1つまたは複数の断片を指す。抗原結合性断片は好ましくは、抗原発現性細胞に内在化する能力も保持している。一部の実施形態では、抗原結合性断片は、免疫エフェクター活性も保持している。全長抗体の断片は、全長抗体の抗原結合機能を果たし得ることが判明している。

抗体の「抗原結合性断片」または「抗原結合性部分」という用語の範囲内に含まれる結合性断片の例には、(i) Fab断片、VL、VH、CL、及びCH1ドメインからなる一価断片；(ii) F(ab')₂断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結されている2つのFab断片を含む二価断片；(iii) VH及びCH1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の1本のアームのVL及びVHドメインからなるFv断片；(v) 1つの可
20
変ドメイン、例えば、VHドメインを含むdAb断片(例えば、Ward et al. (1989) Nature 341: 544-6；及びWinter et al., WO 90/05144を参照されたい)；ならびに(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメイン、VL及びVHは、別々の遺伝子によりコードされるが、組換え法を使用して、それらが、VL及びVH領域が対合して一価分子を形成している1本のタンパク質鎖(一本鎖Fv(scFv)として公知)として作製されることを可能にする合成リンカーにより、それらを接続することができる。例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423-6；及びHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83を参照されたい。そのような一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合性断片」または「抗原結合性部分」という用語の範囲内に含まれることが意図されており、結合する
30
と細胞内に内在化することができる結合性断片の例示的な種類として、当技術分野では公知である。例えば、Zhu et al. (2010) 9: 2131-41；He et al. (2010) J. Nucl. Med. 51: 427-32；及びFitting et al. (2015) MAbs 7: 390-402を参照されたい。特定の実施形態では、scFv分子を、融合タンパク質に組み込んでよい。ディアボディディアボディなどの一本鎖抗体の他の形態も含まれる。ディアボディは、VH及びVLドメインが1本のポリペプチド鎖上に発現されるが、同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用し、それにより、ドメインが、別の鎖の相補的ドメインと対合して2つの抗原結合部位を作製することを強制される二価のディアボディである(例えば、Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8；及びPoljak et al. (1994) Structure 2: 1121-3を参照されたい)。抗原結合性断片は、当業者に知られている従来の技術を使用して得られ、結合性断片は、インタクトな抗体と同じ手法で、有用性(例えば、結合親和性、内在化)についてスクリーニングされる。抗原結合性断片は、インタクトなタンパク質の切断により、例えば、プロテアーゼまたは化学的な切断により調製することもできる。

【0043】

「内在化」は、抗体または抗原結合性断片と関連して本明細書で使用する
40
場合、細胞に結合すると、細胞の脂質二層膜を通して内部コンパートメントに、好ましくは、細胞内の分解コンパートメントに取り込まれ(すなわち、「内在化」され)得る抗体または抗原結
50

合性断片を指す。例えば、内在化型抗FRA抗体は、細胞膜上のFRAに結合した後に、細胞内に取り込まれ得るものである。

【0044】

「葉酸受容体アルファ」または「FRA」という用語は、本明細書で使用する場合、ヒトFRAの任意の天然形態を指す。この用語は、全長FRA（例えば、NCBI Reference Sequence: NP_000793; 配列番号19）、さらには、細胞プロセッシングから生じるヒトFRAの任意の形態を含む。この用語はまた、これらだけに限定されないが、スプライシング変異型、対立遺伝子変異型、及びアイソフォームを含む、FRAの天然に存在するバリエーションを含む。FRAは、ヒトから単離することができるか、または組換えで、もしくは合成法により生産してもよい。

10

【0045】

「抗FRA抗体」または「FRAに特異的に結合する抗体」という用語は、FRAに特異的に結合する抗体またはその断片の任意の形態を指し、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、及びFRAに特異的に結合する限り、生物学的に機能性の抗体断片を含む。好ましくは、本明細書において開示するADCで使用する抗FRA抗体は、内在化型抗体または内在化型抗体断片である。MORAb-003は、例示的な内在化型抗ヒトFRA抗体である。本明細書で使用する場合、「特異的」、「特異的に結合する (specifically binds)」及び「特異的に結合する (binds specifically)」という用語は、標的抗原エピトープへの抗体の選択的結合を指す。抗体を、所与の条件設定下で、適切な抗原への結合と、無関係抗原または抗原混合物への結合とを比較することにより、結合の特異性について試験することができる。抗体が、無関係抗原または抗原混合物よりも、少なくとも2、5、7、及び好ましくは10倍高い親和性で、適切な抗原に結合するならば、それは、特異的であると考えられる。一実施形態では、特異的な抗体は、FRA抗原にのみ結合し、他の抗原には結合しない（または僅かな結合のみを示す）ものである。

20

【0046】

「ヒト上皮成長因子受容体2」、「her2」、または「her2/neu」という用語は、本明細書で使用する場合、ヒトher2の任意の天然形態を指す。この用語は、全長her2（例えば、NCBI Reference Sequence: NP_004439.2; 配列番号21）、さらには、細胞プロセッシングから生じるヒトher2の任意の形態を含む。この用語はまた、これらだけに限定されないが、スプライシング変異型、対立遺伝子変異型、及びアイソフォームを含むher2の天然に存在するバリエーションを含む。Her2は、ヒトから単離することができるか、または組換えで、もしくは合成法により生産してもよい。

30

【0047】

「抗her2抗体」または「her2に特異的に結合する抗体」という用語は、her2に特異的に結合する抗体またはその断片の任意の形態を指し、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、及びher2に特異的に結合する限り、生物学的に機能性の抗体断片を含む。米国特許第5,821,337号（参照により本明細書に組み込まれる）は、例示的な抗her2抗体配列を含む、例示的なher2結合性配列を提供している。好ましくは、本明細書において開示するADCにおいて使用する抗her2抗体は、内在化型抗体または内在化型抗体断片である。トラスツズマブは、例示的な内在化型抗ヒトher2抗体である。

40

【0048】

「エピトープ」という用語は、抗体が認識し、かつ特異的に結合し得る抗原の部分の部分を指す。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは、連続アミノ酸から、またはポリペプチドの三次フォールディングにより並列する非連続アミノ酸から形成され得る。抗原-抗体複合体の直接的な可視化によるエピトープ同定のためのX線結晶学、さらには、抗原の断片または変異型への抗体の結合をモニターすること、または抗体及び抗原の種々の部分の溶媒露出度をモニターすることを含む、当技術分野で公知の任意のエピトープマッピング

50

ング技術を使用して、抗体が結合するエピトープを同定することができる。抗体エピトープをマッピングするために使用される例示的な戦略には、これらだけに限定されないが、アレイベースのオリゴ-ペプチドスキャンニング、限定タンパク質分解、部位特異的突然変異誘発、ハイスループット突然変異誘発マッピング、水素-ジウテリウム交換、及び質量分析法が含まれる(例えば、Gershoni et al. (2007) 21:145-56; 及び Hager-Braun 及び Tomer (2005) Expert Rev. Proteomics 2:745-56 を参照されたい)。

【0049】

競合結合及びエピトープピニングも、同一または重複エピトープを共有する抗体を決定するために使用することができる。クロスブロッキングアッセイ、例えば、「Antibodies, A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow and Lane (1st edition 1988、2nd edition 2014)に記載のアッセイなどを使用して、競合結合を評価することができる。一部の実施形態では、試験抗体または結合性タンパク質が、標的抗原、例えば、FRAまたはher2への参照抗体または結合性タンパク質(例えば、表2、4、及び6において同定されているものから選択されるCDR及び/または可変ドメインを含む結合性タンパク質)の結合を、クロスブロッキングアッセイにおいて少なくとも約50%(例えば、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%、もしくはそれ以上、またはその間の任意のパーセンテージ)減少させる、及び/またはその逆である場合に、競合結合は同定される。一部の実施形態では、競合結合は、共用または同様の(例えば、部分的に重複する)エピトープによるか、または抗体もしくは結合性タンパク質が近接するエピトープで結合する場合の立体障害により得る。例えば、Tzartos, Methods in Molecular Biology (Morris, ed. (1998) vol. 66, pp. 55-66)を参照されたい。一部の実施形態では、競合結合は、類似のエピトープを共用する結合性タンパク質の群を分類するために使用することができ、例えば、結合について競合するものを、重複または近接エピトープを有する結合性タンパク質の群として「ピニング」することができ、競合しないものは、重複または近接エピトープを有さない結合性タンパク質の別の群に入れる。

【0050】

「 k_{on} 」または「 k_a 」という用語は、抗体と抗原とが会合して抗体/抗原複合体を形成することについての速度定数を指す。この速度は、標準的なアッセイ、例えば、BiacoreまたはELISAアッセイを使用して決定され得る。

【0051】

「 k_{off} 」または「 k_d 」という用語は、抗体/抗原複合体からの抗体の解離についてのオフ速度定数(off rate constant)を指す。この速度は、標準的なアッセイ、例えば、BiacoreまたはELISAアッセイを使用して決定され得る。

【0052】

「 K_D 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の平衡解離定数を指す。 K_D は、 k_a/k_d により計算される。この速度は、標準的なアッセイ、例えば、BiacoreまたはELISAアッセイを使用して決定され得る。

【0053】

「 p 」または「抗体:薬物比」または「薬物-対-抗体比」または「DAR」という用語は、抗体部分1つ当たりの薬物部分の数、すなわち、薬物負荷、または式IのADCでは、抗体または抗原結合性断片(Ab)1つ当たりの-L-D部分の数を指す。式IのADCの多数のコピーを含む組成物では、「 p 」は、抗体または抗原結合性断片1つ当たりの-L-D部分の平均数を指し、また、平均薬物負荷と称される。

【0054】

「リンカー」または「リンカー部分」は、化合物、通常は化学療法薬などの薬物部分を、抗体部分などの別の部分に共有結合で接続することができる任意の化学的部分である。

10

20

30

40

50

リンカーは、化合物または抗体が活性なままである条件で、酸誘発性切断、ペプチダーゼ誘発性切断、光ベースの切断、エステラーゼ誘発性切断、及び/またはジスルフィド結合切断に対して感受性があるか、または実質的に抵抗性であってよい。

【0055】

「薬剤」という用語は本明細書では、化学化合物、化学化合物の混合物、生物高分子、または生物物質から作製された抽出物を指すために使用される。「治療薬」、「薬物」、または「薬物部分」という用語は、生物学的プロセスをモジュレートすることができる、及び/または生物学的活性を有する薬剤を指す。

【0056】

「化学療法薬」または「抗がん薬」という用語は本明細書では、作用機序に関わらず、がんを処置する際に有効であるすべての化学化合物を指すために使用される。転移または血管新生の障害が多くの場合に、化学療法薬の特性である。化学療法薬の非限定的例には、アルキル化薬、例えば、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン化合物、及びアルキルスルホナート；代謝拮抗薬、例えば、葉酸、プリンまたはピリミジンアンタゴニスト；抗有糸分裂薬、例えば、エリブリンまたはエリブリンメシラート（Halaven（商標））またはその誘導体などの抗チューブリン薬、ピンカルカロイド、及びオーリスタチン；細胞傷害性抗生物質；DNA発現または複製に損傷を与える、またはそれに干渉する化合物、例えば、DNA小溝結合薬；及び成長因子受容体アンタゴニストが含まれる。加えて、化学療法薬には、抗体、生物学的分子、及び小分子が含まれる。化学療法薬は、細胞傷害薬または細胞増殖抑制薬であってよい。「細胞増殖抑制薬」という用語は、細胞成長及び/または細胞の増殖を阻害または抑制する薬剤を指す。

【0057】

「細胞傷害性薬物」という用語は、主に、細胞の発現活性及び/または機能化に干渉することにより、細胞死をもたらす物質を指す。細胞傷害性薬物の例には、これらだけに限定されないが、抗有糸分裂薬、例えば、エリブリン、オーリスタチン（例えば、モノメチルオーリスタチンE（MMAE）、モノメチルオーリスタチンF（MMAF））、マイタンシノイド（例えば、メイタンシン）、ドラスタチン、デュオスタチン、クリプトフィシン、ピンカルカロイド（例えば、ピンクリスチン、ピンプラスチン）、タキサン、タキソール、及びコルヒチン；アンスラサイクリン（例えば、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ジヒドロキシアンスラシンジオン）；細胞傷害性抗生物質（例えば、マイトマイシン、アクチノマイシン、デュオカルマイシン（例えば、CC-1065）、オーロマイシン、デュオマイシン（duomycin）、カリケアマイシン、エンドマイシン（endomycin）、フェノマイシン）；アルキル化薬（例えば、シスプラチン）；挿入薬（例えば、臭化エチジウム）；トポイソメラーゼ阻害薬（例えば、エトポシド、テノポシド（tenoposide））；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} または Bi^{213} 、 P^{32} 、及びルテチウムの放射性同位体（例えば、 Lu^{177} ）；ならびに細菌、真菌、植物または動物由来の毒素（例えば、リシン（例えば、リシンA-鎖）、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素A（例えば、PE40）、内毒素、マイトゲリン（mitogellin）、コンプレスタチン、レストリクトシン、ゲロニン、アルファ-サルシン、アプリン（例えば、アプリンA-鎖）、モデシン（例えば、モデシンA-鎖）、クリシン（curicin）、クロチン、Sapaonaria officinalis阻害薬、グルココルチコイド）が含まれる。

【0058】

「エリブリン」という用語は、本明細書で使用する場合、ハリコンドリノンBという、海綿Halichondria okadaeisから元々は単離された大環状化合物の合成類似体を指す。「エリブリン薬物部分」という用語は、エリブリンの構造を有し、そのC-35アミンを介してADCのリンカーに結合しているADCの構成成分を指す。エリブリンは、微小管ダイナミクス阻害薬であり、これは、チューブリンに結合し、有糸分裂紡錘体の構築を阻害することによりG2/M期での細胞周期の停止を誘導すると考えられる

10

20

30

40

50

。「エリブリンメシル酸塩」という用語は、エリブリンのメシル酸塩を指し、これは、商品名 Halaven (商標) で販売されている。

【0059】

「相同体」という用語は、例えば、対応する位置で同じか、または相似している化学的残基の配列を有することにより、別の分子に対して相同性を示す分子を指す。

【0060】

「～を阻害する」または「～の阻害」という用語は、本明細書で使用する場合、測定可能な量で減少させることを意味し、完全な防止または阻害を含み得るが、それを必要としない。

【0061】

「標的陰性」または「標的抗原陰性」という用語は、細胞または組織による標的抗原の発現が存在しないことを指す。「標的陽性」または「標的抗原陽性」という用語は、標的抗原の発現が存在することを指す。例えば、標的抗原を発現しない細胞または細胞系は、標的陰性と記載され得る一方で、標的抗原を発現する細胞または細胞系は、標的陽性と記載され得る。

【0062】

「バスタンダー死滅」または「バスタンダー効果」という用語は、標的陽性細胞の存在下での標的陰性細胞の死滅を指し、標的陰性細胞の死滅は、標的陽性細胞の非存在下では観察されない。細胞 - 対 - 細胞接触、または少なくとも標的陽性と標的陰性細胞との間の近接が、バスタンダー死滅を可能にする。この種の死滅は、標的陰性細胞の無差別の死滅を指す「オフターゲット死滅」とは識別される。「オフターゲット死滅」は、標的陽性細胞の非存在下でも観察され得る。

【0063】

「がん」という用語は、細胞集団が未制御の細胞成長により特徴づけられる、哺乳類における生理学的状態を指す。がんの例には、これらだけに限定されないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれる。そのようながんのより特定の例には、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌（例えば、三重陰性乳癌）、骨肉腫、黒色腫、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜（例えば、漿液性）または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、及び様々な種類の頭頸部癌が含まれる。三重陰性乳癌は、エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）、または Her2/neu のための遺伝子の発現について陰性である乳癌を指す。

【0064】

「腫瘍」及び「新生物」という用語は、前がん性病変を含む、良性または悪性のいずれかの過剰な細胞成長または増殖から生じる組織の任意の塊を指す。

【0065】

「がん細胞」及び「腫瘍細胞」という用語は、非腫瘍発生性細胞及びがん幹細胞の両方を含めて、腫瘍に由来する個々の細胞または細胞の全集団を指す。本明細書で使用する場合、「腫瘍細胞」という用語は、がん幹細胞からそれらの腫瘍細胞を識別するために、再生及び分化する能力を欠いた腫瘍細胞のみを指す場合には、「非腫瘍発生性」という用語により修飾される。

【0066】

「対象」及び「患者」という用語は、これらだけに限定されないが、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類などを含む任意の哺乳類などの任意の動物を指すために、本明細書において互換的に使用される。一部の実施形態では、哺乳類は、マウスである。一部の実施形態では、哺乳類は、ヒトである。

【0067】

1種または複数の治療薬との「同時投与」またはそれ「と組み合わせた」投与という用語は、同時及び任意の順序での連続投与を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 8 】

「医薬組成物」は、投与を可能にし、続いて、活性成分（複数可）の意図された生物学的活性をもたらす、及び/または治療効果を達成するような形態であり、製剤を投与されるであろう対象に対して、許容できないほど毒性である追加の構成成分を含有しない調製物を指す。医薬組成物は、無菌であり得る。

【 0 0 6 9 】

「医薬品添加剤」は、アジュバント、担体、pH調節及び緩衝剤、張性調節剤、湿潤剤、防腐剤などの物質を含む。

【 0 0 7 0 】

「薬学的に許容される」は、連邦または州政府の規制当局により承認されているか、もしくは承認され得ること、または動物、より詳細にはヒトにおける使用について、米国薬局方または他の一般に認められる薬局方に列挙されていることを意味する。

10

【 0 0 7 1 】

本明細書に開示のとおりADCの「有効量」は、具体的に述べられる目的を果たすために、例えば、腫瘍増殖速度または腫瘍体積の減少、がんの症候の減少、または処置有効性の多少の他の徴候など、投与後に治療効果を生じさせるために十分な量である。有効量は、述べられている目的に関連して日常的な手法で決定することができる。「治療有効量」という用語は、対象において疾患または障害を処置するために有効なADCの量を指す。がんの場合、ADCの治療有効量は、がん細胞の数を減少させる、腫瘍サイズを減少させる、腫瘍転位を阻害する（例えば、減速させる、または停止させる）、腫瘍増殖を阻害する（例えば、減速させる、または停止させる）、及び/または1つもしくは複数の症状を軽減することができる。「予防有効量」は、必要な投薬量で、必要な期間にわたって、所望の予防結果を達成するために有効な量を指す。典型的には、予防用量を対象において疾患前に、または疾患の早期段階で使用するので、予防有効量は、治療有効量未満となる。

20

【 0 0 7 2 】

本明細書で使用する場合、「処置するために」または「治療上の」及び文法的に関連する用語は、生存の持続、より低い罹患率、及び/または代替の治療モダリティの副産物である副作用の緩和など、疾患の何らかの予後の何らかの改善を指す。当技術分野では容易に分かるとおり、疾患の完全な根絶が好ましいが、処置作用の要件ではない。「処置」または「処置する」は、本明細書で使用する場合、対象、例えば、患者への記載のADCの投与を指す。処置は、障害、障害の症状または障害、例えば、がんに対する素因を治療する、治癒させる、和らげる、軽減する、変更する、矯正する、向上する、緩和する、改善する、またはそれに影響を及ぼすためであってよい。

30

【 0 0 7 3 】

一部の実施形態では、標識ADCを使用する。適切な「標識」には、放射性核種、酵素、基質、補因子、阻害薬、蛍光部分、化学発光部分、磁気粒子などが含まれる。

【 0 0 7 4 】

「タンパク質」とは、本明細書で使用する場合、少なくとも2個の共有結合したアミノ酸を意味する。この用語は、ポリペプチド、オリゴペプチド、及びペプチドを含む。一部の実施形態では、2個またはそれ以上の共有結合したアミノ酸は、ペプチド結合により結合している。例えば、タンパク質が発現系及び宿主細胞を使用して組換えで作製されている場合、タンパク質は、天然に存在するアミノ酸及びペプチド結合から構成されてもよい。別法では、タンパク質には、合成アミノ酸（例えば、ホモフェニルアラニン、シトルリン、オルニチン、及びノルロイシン）、またはペプチド模倣構造、すなわち、「ペプチドまたはタンパク質類似体」、例えば、ペプトイドが含まれ得る。ペプトイドは、その側鎖が、（アミノ酸においてのとおり） - 炭素ではなく、ペプチド主鎖の窒素原子に付いていて、かつペプチドと比較して異なる水素結合及び配座異性特徴を有する、ペプチド模倣物質の例示的な群である（例えば、Simon et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9367を参照されたい）。したがって、ペプトイドは、タンパク質分解または他の生理学的または貯蔵条件に対して抵抗性であり得、

40

50

かつ細胞膜を透過するという点では有効であり得る。特に、抗体が当技術分野で周知の慣用の方法により、インビトロで合成される場合に、そのような合成アミノ酸を組み込むことができる。加えて、ペプチド模倣物質、合成及び天然に存在する残基/構造のいずれの組合せも使用することができる。「アミノ酸」には、イミノ酸残基、例えば、プロリン及びヒドロキシプロリンも含まれる。アミノ酸「R基」または「側鎖」は、(L)-または(S)-配置のいずれであってもよい。具体的な一実施形態では、アミノ酸は、(L)-または(S)-配置である。

【0075】

「組換えタンパク質」は、当技術分野で公知の任意の技術及び方法を使用する組換え技術を使用して、すなわち、組換え核酸の発現により作製されたタンパク質である。組換えタンパク質を生成するための方法及び技術は、当技術分野で周知である。

10

【0076】

「単離された」タンパク質は、例えば、所与のサンプル中の全タンパク質の少なくとも約5重量%、または少なくとも約50重量%を構成する、その天然状態で通常は付随する物質の少なくとも一部を随伴しない。単離されたタンパク質が、状況に応じて、全タンパク質含分の5~99.9重量%を構成することがあることは理解される。例えば、タンパク質は、タンパク質が高い濃度レベルで作製されるように、誘導性プロモーターまたは高発現プロモーターの使用により、かなり高い濃度で作製され得る。この定義は、当技術分野で公知である広範囲の様々な生体及び/または宿主細胞における抗体の生産を含む。

【0077】

アミノ酸配列では、配列同一性及び/または類似性は、これらだけに限定されないが、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482の局所配列同一性アルゴリズム、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443の配列同一性アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 2444の類似性検索の方法、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実装 (Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.におけるGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA)、Devereux et al. (1984) Nucl. Acid Res. 12: 387-95により記載されたBest Fit配列プログラムを含む、当技術分野で公知の標準的な技術を使用して、好ましくは、デフォルト設定を使用するか、または検査により、決定することができる。好ましくは、同一性パーセントを、FastDBにより次のパラメータに基づき計算する: 1のミスマッチペナルティ; 1のギャップペナルティ; 0.33のギャップサイズペナルティ; 及び30の接続ペナルティ ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp. 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc)。

20

30

【0078】

有用なアルゴリズムの例は、PILEUPである。PILEUPは、プログレッシブペアワイズアラインメント (progressive pairwise alignment) を使用して、関連する配列の群から複数の配列アラインメントを作製する。これは、アラインメントを作製するために使用されるクラスタリング関係を示す系統樹もプロットすることができる。PILEUPは、Feng & Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35: 351-60のプログレッシブアラインメント法の単純化を使用し; この方法は、Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5: 151-3により記載された方法と類似している。有用なPILEUPパラメータは、3.00のデフォルトギャップ重量、0.10のデフォルトギャップ長重量、及び重量末端ギャップを含む。

40

50

【0079】

有用なアルゴリズムの別の例は、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402; 及び Karin et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-87 に記載されているBLASTアルゴリズムである。特に有用なBLASTプログラムは、Altschul et al. (1996) Methods in Enzymology 266: 460-80 から得られたWU-BLAST-2プログラムである。WU-BLAST-2は、複数の検索パラメーターを使用し、その多くはデフォルト値に設定されている。調節可能なパラメーターは、次の値で設定される：オーバーラップスパン= 1、オーバーラップフラクション= 0.125、ワード閾値(T)= II。HSP S及びHSP S2パラメーターは、動的な値であり、目的の配列が検索されている特定の配列の組成及び特定データベースの組成にそれ自身が依存するプログラムにより確立されるが；しかしながら、その値を、感度を増加させるために調節してもよい。

10

【0080】

追加の有用なアルゴリズムは、Altschul et al. (1993) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402により報告されているとおりのギャップBLASTである。ギャップBLASTは、BLOSUM-62置換スコア；9に設定された閾値Tパラメーター；ギャップなしの伸長を開始させるための2ヒット法、ギャップ長kにコスト10+kを負荷；16に設定されたXu、ならびにアルゴリズムのデータベース検索段階で40に、及び出力段階で67に設定されたXgを使用する。ギャップアライメントは、約22ビットに対応するスコアにより開始される。

20

【0081】

一般に、FRAのバリエーション、her2のバリエーション、チューブリン配列のバリエーション、及び抗体可変ドメインのバリエーション(個々のバリエーションCDRを含む)を含む本明細書において開示するタンパク質及びそのバリエーション間のアミノ酸相同性、類似性、または同一性は、本明細書に示す配列に対して少なくとも80%であり、より典型的には、少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、及びほぼ100%または100%と、相同性または同一性が上昇することが好ましい。

30

【0082】

同様に、本明細書で特定される抗体及び他のタンパク質の核酸配列に関する「核酸配列同一性パーセント(%)」は、抗原結合性タンパク質中のコード配列のヌクレオチド残基と同一である、候補配列中のヌクレオチド残基のパーセンテージとして定義される。特定の方法は、それぞれ1及び0.125に設定されたオーバーラップスパン及びオーバーラップフラクションで、デフォルトパラメーターに設定されたWU-BLAST-2のBLASTNモジュールを利用する。

【0083】

アミノ酸配列変化を導入するための部位または領域が予め決定されていても、変異自体は、予め決定されている必要はない。例えば、所与の部位での変異の性能を最適化するために、標的コドンまたは領域でランダム変異誘発を行って、発現された抗原結合性タンパク質CDRバリエーションを所望の活性の最適な組み合わせについてスクリーニングしてもよい。既知の配列を有するDNAの所定の部位で置換変異を作製するための技術、例えば、MI3プライマー変異誘発及びPCR変異誘発が周知である。

40

【0084】

抗体-薬物コンジュゲート

本開示の化合物には、抗がん活性を有するものが含まれる。特に、化合物は、薬物部分にコンジュゲートしている(すなわち、リンカーにより共有結合している)抗体部分(その抗原結合性断片を含む)を含み、その際、薬物部分は、抗体部分にコンジュゲートしていない場合、細胞傷害または細胞増殖抑制効果を有する。様々な実施形態で、薬物部分は

50

、コンジュゲート内で結合している場合には、細胞傷害性の低下を示すか、または細胞傷害性を示さないが、リンカー及び抗体部分から切断された後に、細胞傷害性を回復する。様々な実施形態で、薬物部分は、(例えば、切断不可能なリンカーを使用して)コンジュゲート内で結合している場合には、バスタンダー死滅の低下を示すか、またはバスタンダー死滅を示さないが、コンジュゲートから切断された後に、バスタンダー死滅の増加を示す(例えば、切断可能なVal-Cit切断可能な部分を有するコンジュゲート)。

【0085】

ヒト治療薬として、例えば、腫瘍薬(oncologic agent)として使用するためのADCの開発及び生産は、所望の1つまたは複数の標的に結合し、がんを処置するために単独で使用される薬物に結合することができる抗体を同定する以上のことを必要とすることがある。薬物への抗体の結合は、抗体及び薬物の一方または両方の活性に対して有意で、予測不可能な効果、選択されたリンカー及び/または薬物の種類に応じて変動する効果を有し得る。したがって、一部の実施形態では、ADCの構成成分は、(i)単独での抗体及び薬物部分により示される1つまたは複数の治療特性を保持する、(ii)抗体部分の特異的な結合特性を維持する；(iii)薬物負荷及び薬物-対-抗体比を最適化する；(iv)抗体部分への安定した結合による薬物部分の送達、例えば、細胞内送達を可能にする；(v)標的部位への輸送または送達まで、インタクトなコンジュゲートとしてADC安定性を保持する；(vi)投与前またはその後のADCの凝集を最小化する；(vii)細胞環境内での切断後の薬物部分の治療効果、例えば、細胞傷害性効果を可能にする；(viii)単独での抗体及び薬物部分のインビボ抗がん処置有効性に匹敵するか、またはそれよりも優れたインビボ抗がん処置有効性を示す；(ix)薬物部分によるオフターゲット死滅を最小限にする；及び/または(x)望ましい薬物動態及び薬力学特性、製剤化適性(formulatability)、及び毒物学的/免疫学的プロファイルを示すように選択される。これらの特性のそれぞれのスクリーニングが、治療的使用のために改善されたADCを同定するために、必要とされることがある(Abet al.(2015)Mol.Cancer Ther.14:1605-13)。

【0086】

様々な実施形態で、本明細書において開示するADCは、上記で列挙したカテゴリーの一部またはそれぞれで、予想外に好ましい特性を示す。例えば、一部の実施形態では、抗体へのMal結合、PEGスペーサーユニット(好ましくは、短いPEGスペーサーユニット)、及び/またはペプチド切断可能なリンカー(例えば、Val-Citリンカー)を含むADCコンストラクトは、他の切断可能なまたは切断不可能なリンカー構造を使用するADCと比較すると、オフターゲット死滅を減少させながら、驚くべき好ましい薬物負荷、凝集、及び/または安定性プロファイルを示し、及び/または抗体結合機能、薬物活性、及び/またはバスタンダー死滅の改善を維持する。

【0087】

一部の実施形態では、エリブリンを抗体(例えば、MORAb-003などの抗FRA抗体)に接続するMal-(PEG)₂-Val-Cit-pABリンカーを含むADCは、エリブリンを抗体部分に接続する他の切断可能な、または切断不可能なリンカーと比較すると、列挙したカテゴリーに全体にわたって特に好ましい特性を示す。一部の実施形態では、エリブリンを抗体(例えば、MORAb-003などの抗FRA抗体)に接続するMal-(PEG)₂-Val-Cit-pABリンカーを含むADCは、切断不可能なADCと比較すると、特に好ましいバスタンダー死滅特性を示す。一部の実施形態では、エリブリンを抗体(例えば、MORAb-003などの抗FRA抗体)に接続するMal-(PEG)₂-Val-Cit-pABリンカーを含むADCは、代替の切断可能なリンカー構造を使用するADCと比較すると、特に好ましいバスタンダー死滅特性を示す。

【0088】

一部の実施形態では、エリブリンをMORAb-003に接続するMal-(PEG)₂-Val-Cit-pABリンカーを含むADCは、例えば、代替の部分(例えば、ス

10

20

30

40

50

クシンイミド部分)により抗体に結合しているリンカーを含むADCに対して、高く、かつ望ましい薬物：抗体比(すなわち、約3~4)の比を示す。一部の実施形態では、エリブリンをMORAb-003に接続するMal-(PEG)₂-Val-Cit-pABリンカーを含むADCは、例えば、より長い Spacer ユニット(例えば、(PEG)₈)を含むADCに対して、高く、かつ望ましい薬物：抗体比、及び/または低い凝集レベルを示す。一部の実施形態では、エリブリンをMORAb-003に接続するMal-(PEG)₂-Val-Cit-pABリンカーを含むADCは、例えば、代替の切断可能な部分(すなわち、非ペプチド切断可能な部分、例えば、切断可能なジスルフィドまたはスルホンアミド)を含むADCに対して、高く、かつ望ましい薬物：抗体比、より低い凝集レベル、オンターゲット死滅の増加、及び/またはオフターゲット死滅の減少を実証する。一部の実施形態では、エリブリンをMORAb-003に接続するMal-(PEG)₂-Val-Cit-pABリンカーを含むADCは、例えば、代替のアミノ酸ユニット(例えば、Ala-Ala-Asn)または代替の切断可能な部分(例えば、切断可能なジスルフィドまたはスルホンアミド)を含むADCに対して、安定性の上昇、オンターゲット死滅の増加、オフターゲット死滅の減少、低い凝集レベル、及び/または高く、かつ望ましい薬物：抗体比を実証する。

10

【0089】

一部の実施形態では、エリブリンをMORAb-003に接続するMal-(PEG)₂-Val-Cit-pABリンカーを含むADCについての上記の望ましい特徴の一部または全部が、トラスツズマブ、または抗メソテリン抗体などの抗her2抗体にコンジュゲートしているMal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-エリブリンリンカー-毒素を含むADCで観察され得る。

20

【0090】

本開示のADC化合物は、細胞傷害性または細胞増殖抑制薬剤の有効な用量をがん細胞または腫瘍組織に選択的に送達することができる。本開示のADCがそれぞれの標的抗原(例えば、FRAまたはher2)を発現する細胞に対して強力な細胞傷害性及び/または細胞増殖抑制活性を有することが発見されている。一部の実施形態では、ADCの細胞傷害性及び/または細胞増殖抑制活性は、細胞における標的抗原発現レベルに依存する。一部の実施形態では、本開示のADCは、同じ抗原を低レベルで発現するがん細胞と比較すると、高レベルの標的抗原を発現するがん細胞を死滅させるのに特に有効である。一部の実施形態では、本開示のADCは、同じ抗原を低レベルで発現するがん細胞と比較すると、標的抗原を中等度のレベルで発現するがん細胞を死滅させるのに特に有効である。例示的な高FRA発現性がんには、これらだけに限定されないが、卵巣癌(例えば、漿液性卵巣癌、明細胞卵巣癌)、肺類癌、三重陰性乳癌、子宮内膜がん、及び非小細胞肺癌(例えば、腺癌)が含まれる。例示的な中等度FRA発現性がんには、これらだけに限定されないが、胃癌及び結腸直腸癌が含まれる。例示的な低FRA発現性がんには、これらだけに限定されないが、黒色腫及びリンパ腫が含まれる。例示的な高her2発現性がんには、これらだけに限定されないが、乳癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、及び子宮内膜癌が含まれる。例示的な中等度her2発現性がんには、これらだけに限定されないが、肺癌及び膀胱癌が含まれる。

30

40

【0091】

一部の実施形態では、ADCの切断により、エリブリンが抗体部分及びリンカーから放出される。一部の実施形態では、切断及びエリブリンの放出により、ADCの細胞傷害性が改善される。一部の実施形態では、切断可能なリンカーを含むADCは、切断不可能なリンカーを含むADCでの比較可能な処置と比較すると、バスタンダー死滅を含めて、がん細胞を死滅させるのに特に有効である。一部の実施形態では、特に、ADCで処置される細胞及び/またはがんが、高レベルの標的抗原を発現しない場合には、切断可能なリンカー(例えば、Val-Citリンカー)を含むADCは、切断不可能なリンカー(例えば、切断不可能な(PEG)₂または(PEG)₄リンカー)を含むADCに対して、オンターゲット細胞死滅の増加及び/またはオフターゲット細胞死滅の低下を実証する。

50

【 0 0 9 2 】

一部の実施形態では、本開示のADCはまた、バスタンダー死滅活性を、ただし、低いオフターゲット細胞傷害性を実証する。理論に束縛されることはないが、充実性腫瘍へのその透過が限定され、及び/または腫瘍細胞内での標的抗原の発現が不均一である場合に、ADCのバスタンダー死滅活性は、特に有利であり得る。一部の実施形態では、切断可能なリンカーを含むADCは、切断不可能なリンカーを含むADCでの比較可能な処置と比較すると、バスタンダー死滅に特に有効であり、及び/またはバスタンダー死滅活性の改善を実証する。

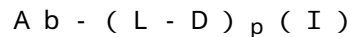
【 0 0 9 3 】

腫瘍細胞を標的とする抗体またはその抗原結合性断片(Ab)と、薬物部分(D)と、AbをDに共有結合するリンカー部分(L)とを含むADC化合物を本明細書では提供する。ある種の態様では、抗体または抗原結合性断片は、高い特異性及び高い親和性で、腫瘍関連抗原(例えば、FRAまたはher2)に結合することができる。特定の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、結合すると、標的細胞に、例えば、細胞内の分解コンパートメントに内在化する。したがって、好ましいADCは、標的細胞に結合すると内在化し、分解を受け、かつがん細胞を死滅させる薬物部分を放出するものである。薬物部分は、酵素作用、加水分解、酸化、またはいずれかの他の機構により、ADCの抗体及び/またはリンカー部分から放出され得る。

10

【 0 0 9 4 】

例示的なADCは、式I:



を有する[式中、Ab = 抗体部分(すなわち、抗体または抗原結合性断片)、L = リンカー部分、D = 薬物部分、及びp = 抗体部分1つ当たりの薬物部分の数]。

20

【 0 0 9 5 】

抗体

式Iの抗体部分(Ab)は、その範囲内に、がん細胞上の標的抗原に特異的に結合する任意の抗体または抗原結合性断片を含む。抗体または抗原結合性断片は、例えば、BIAcore(登録商標)分析により測定すると、1mM、100nMまたは10nMの解離定数(K_D)で、またはその間の任意の量で、標的抗原に結合し得る。特定の実施形態では、K_Dは、1pM~500pMである。一部の実施形態では、K_Dは、500pM~1μM、1μM~100nM、または100mM~10nMである。

30

【 0 0 9 6 】

一部の実施形態では、抗体部分は、2本の重鎖及び2本の軽鎖を含む4本鎖抗体(免疫グロブリンとも称される)である。一部の実施形態では、抗体部分は、免疫グロブリンの2本鎖ハーフボディ(half body)(1本の軽鎖及び1本の重鎖)、または抗原結合性断片である。

【 0 0 9 7 】

一部の実施形態では、抗体部分は、内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片である。一部の実施形態では、内在化型抗体は、細胞の表面上に発現される標的がん抗原に結合し、結合すると、細胞に進入する。一部の実施形態では、ADCの薬物部分は、ADCが標的がん抗原を発現する細胞に進入し、その中に存在した後に(すなわち、ADCが内在化された後に)、ADCの抗体部分から放出される。

40

【 0 0 9 8 】

本開示の例示的な抗体のアミノ酸及び核酸配列を表1~9に明記する。

【 0 0 9 9 】

【表 1】

表 1. 抗体

mAb	群/アイソタイプ	標的
MORAb-003	ヒト化	ヒト葉酸受容体アルファ
MORAb-009	マウス-ヒトキメラ	ヒトメソテリン
トラスツズマブ	ヒト化	ヒトher2/neu
33011-xi	ウサギ-ヒトキメラ	ヒトメソテリン
33011-zu	ヒト化	ヒトメソテリン
111B10-xi	ウサギ-ヒトキメラ	ヒトメソテリン
111B10-zu	ヒト化	ヒトメソテリン
201C15-xi	ウサギ-ヒトキメラ	ヒトメソテリン
201C15-zu	ヒト化	ヒトメソテリン
346C6-xi	ウサギ-ヒトキメラ	ヒトメソテリン
346C6-zu	ヒト化	ヒトメソテリン

略語：xi = キメラ；zu = ヒト化。

【0100】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. mAb 可変領域のアミノ酸配列

	mAb	IgG鎖	配列番号	アミノ酸配列
1	MORAb-003	重鎖	23	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFTFSG YGLSWVRQAPGKGLEWVAMISSGGSYTYAD SVKGRFAISRDNKNTLFLQMSLRPEDTGV YFCARHGDDPAWFAYWGQGPVTVSS
2	MORAb-003	軽鎖	24	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSVSSSISS NNLHWYQQKPKGKAPKRWIYGTSNLASGVPSR FSGSGSDTYFTISSLQPEDIATYYCQQWS SYPYMYTFGQGTKVEIK
3	MORAb-009	重鎖	25	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTG YTMNWVKQSHGKSLWIGLITPYNGASSYNQ KFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAV YFCARGGYDGRGFDYWGSGTPVTVSS
4	MORAb-009	軽鎖	26	DIELTQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVSY MHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPSRF GSGSGNSYSLTISSEAEEDATYYCQQWSKH PLTFGSGTKVEIK
5	トラスツズマブ	重鎖	27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
6	トラスツズマブ	軽鎖	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNT AVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYT TPPTFGQGTKVEIK
7	33011-xi	重鎖	29	QSVEESGGRVTPGTPLTLCTVSGISLSSD AISWVRQAPGKLEYIGIINGGNTYYASWA KGRFTISKSTTVDLKITSPTTEDTATYFCA RGIQHGGGNSDYIYYGMDLWGPGLTVTVSS
8	33011-xi	軽鎖	30	EVLMTQTPSSVSAVGDVTITKQASQSISS VLSWYQQKPKGPPKLLIYLASTLASGVPSRF SGSRSGTEFTLTISSLQEDDAATYYCQTNYG TSSSNYGFAGGGTEVVVK
9	33011-zu	重鎖	31	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGISLSS DAISWVRQAPGKLEYIGIINGGNTYYASW AKGRFTISRHNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGIQHGGGNSDYIYYGMDLWGGGLVTV SS
10	33011-zu	軽鎖	32	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSISS VLSWYQQKPKGKAPKLLIYLASTLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQCEDIATYYCQTNYG TSSSNYGFAGGGTKVEIK
11	111B10-xi	重鎖	33	QSVEESGGRVTPGTPLTLCTVSGFSLNNY AMSWVRQAPGKLEWIGSISTGGLAFYANWA KGRFTISRSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCG RNGGGSYIFYYFDLWGGGLVTVSS

10

20

30

40

50

1 2	1 1 1 B 1 0 - x i	軽鎖	3 4	AFELTQTPSSVEAAVGGTITIKCQASQSISS YLSWYQQKPGQPPLLIYSASTLASGVSSRF KSGSGTEYTLTISDLECAATAFYCQSYD IGTSTFGGGTEVVVK	
1 3	1 1 1 B 1 0 - z u	重鎖	3 5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNN YAMSWVRQAPGKGLEWIGSISTGGLAFYANW AKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARNGGGSYIFYYFDLWGQGLTVTVSS	
1 4	1 1 1 B 1 0 - z u	軽鎖	3 6	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCQASQSISS YLSWYQQKPGKAPKLLIYSASTLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQCEDAATYYCQSYD IGTSTFGGGTKVEIK	10
1 5	2 0 1 C 1 5 - x i	重鎖	3 7	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSY AMGWFRQAPGKLEYIGTINIGGRVYASWA KGRFTISRSTSTVDLKAPSLTAEDTATYFCA RYYNGGSYDIWGPGLTVTVSL	
1 6	2 0 1 C 1 5 - x i	軽鎖	3 8	DVVMTPASASEPVGTVTKQASESIYR VLAWYQQKPGQPPLLIYDTSTLASGAPSRF KSGGYGTEFTLTISGVQCEDAATYYCQGGYY ADSYGIAFGGGTEVVVK	
1 7	2 0 1 C 1 5 - z u	重鎖	3 9	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGIDLSS YAMGWVRQAPGKLEYIGTINIGGRVYASW AKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARYYNGGSYDIWGPGLTVTVSS	20
1 8	2 0 1 C 1 5 - z u	軽鎖	4 0	DIQMTQSPSTLSASVGDRTTTCQASESIYR VLAWYQQKPGKAPKLLIYDTSTLASGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQCDAAATYYCQGGYY ADSYGIAFGGGTKVEIK	
1 9	3 4 6 C 6 - x i	重鎖	4 1	QSVEESGGRLVKPDESLTLTCTASGFSLSY AMIWVRQAPGEGLEWIGTISTGGITYASWA KGRFTISKSTSTVDLKITSPTTEDTATYFCA RGGYAASSAYLPPYYFDLWGQGLTVTVSS	
2 0	3 4 6 C 6 - x i	軽鎖	4 2	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSQSVYN NNNLAWFQQKPGQPPLLIYLASTLASGVPS RFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCLGG CDDADTFAFGGGTEVVVK	30
2 1	3 4 6 C 6 - z u	重鎖	4 3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLS YAMIWVRQAPGKLEWIGTISTGGITYASW AKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGGYAASSAYLPPYYFDLWGQGLTVTVS S	
2 2	3 4 6 C 6 - z u	軽鎖	4 4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCQSSQSVYN NNNLAWYQQKPGKVPKLLIYLASTLASGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQCEDAATYYCLGG CDDADTFAFGGGTKVEIK	40

【 0 1 0 1 】

【表 3】

表 3. mAb 可変領域をコードする核酸配列

	mAb	I g G鎖	配列番号	核酸配列
1	MORAb-003	重鎖	45	GAGGTCCAACCTGGTGGAGAGCGGTGGAGG TGTGTGCAACCTGGCCGGTCCCTGCGCC TGCCTGCTCCGCATCTGGCTCACCTTC AGCGGCTATGGGTTGTCTTGGGTGAGACA GGCACCTGGAAAAGGTCTTGAGTGGGTTG CAATGATTAGTAGTGGTGGTAGTTATACC TACTATGCAGACAGTGTGAAGGGTAGATT TGCAATATCGCGAGACAACGCCAAGAACA CATTGTTCCCTGCAAATGGACAGCCTGAGA CCCGAAGACACCGGGTCTATTTTGTGC AAGACATGGGGACGATCCCGCCTGGTTCG CTTATTGGGGCCAAGGGACCCCGGTACC GTCTCTCA
2	MORAb-003	軽鎖	46	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCAAGCAG CCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGA CCATCACCTGTAGTGTGACGCTCAAGTATA AGTTCCAACAACCTGCACTGGTACCAGCA GAAGCCAGGTAAGGCTCAAAGCCATGGA TCTACGGCACATCCAACCTGGCTTCTGGT GTGCCAAGCAGATTGAGCGGTAGCGGTAG CGGTACCGACTACACCTTCACCATCAGCA GCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTAC TACTGCCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTA CATGTACACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGG TGAAATCAAA
3	MORAb-009	重鎖	47	CAGGTACAACCTGCAGCAGTCTGGGCCTGA GCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTTC ACTGGCTACACCATGAACTGGGTGAAGCA GAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTG GACTTATTACTCCTTACAATGGTGCTTCT AGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGCAAGGC CACATTAACCTGTAGACAAGTCATCCAGCA CAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACA TCTGAAGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGC AAGGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTG ACTACTGGGGATCCGGGACCCCGGTACC GTCTCTCA

10

20

30

40

50

8	33011-z u	軽鎖	5 2	GACATTCAGATGACCCAGTCCCAAGCTC GCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCGCGTGA CCATCACGTGCCAGGCGTCCCAGTCAATT AGCAGCGTGCTCTCCTGGTACCAACAGAA GCCGGGAAAGCACCCAAAGTCTGATCT ACTTGGCCTCCACTCTGGCCTCGGGAGTG CCTTCACGGTTCTCCGGATCGGGATCTGG TACTGATTTACCCTCACCATCTCGAGCC TTCAGTGCAGGACATCGCTACTTACTAT TGTCAAACCAACTACGGAACCTCCAGCTC CAACTACGGCTTTGCCTTCGGTGGCGGGA CCAAGTCCGAAATCAAA	10
9	111B10- xi	重鎖	5 3	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGTCCGCT GGTCACGCCTGGGACACCCCTGACTCA CCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAAT AACTATGCAATGAGCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAT CCATTAGTACTGGTGTCTCGCATTCTAC GCGAACTGGGCAAAAGGCGGATCACCAT CTCCAGAACCTCGACCACGGTGGATCTGA AAATGACCAGTCTGACAACCGAGGACAG GCCACCTATTTCTGTGGCAGAAATGGTGG TGGTAGTTATATTTTCTATTATTTTGA TGTGGGGCCAAGGCACCCCTCGTCACTGTC TCTTCA	20
10	111B10- xi	軽鎖	5 4	GCATTGCAATTGACCCAGACTCCATCCTC CGTGGAGGCAGCTGTGGGAGGCACAATCA CCATCAAGTGCCAGGCCAGTCCAGAGCATT AGTAGTACTTATCCTGGTATCAGCAGAA ACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCT ATTCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGT TCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGG GACAGAGTACACTCTCACCATCAGCGACC TGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTTC TGTCAAAGCTATTATGATATTGGTACTAG TACTTTCGGCGGAGGACCGAGGTGGTCG TCAAA	30
11	111B10- zu	重鎖	5 5	GAAGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCG ACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGAC TGTCTTGTGCCGCTCCGGCTTCTCCCTG AACAACTACGCCATGTCCTGGGTGCGACA GGCCCCTGGCAAAGGCTGGAATGGATCG GCTCCATCAGCACAGGCGCCTGGCCTTC TACGCCAATTGGGCCAAGGGCCGGTTCAC CATCAGCCGGACAACCTCCAAGAACACCC TGTACCTCCAGATGAACTCCCTGCGGGCC GAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCAG AAACGGCGGAGGCTCCTACATCTTCTACT ACTTCGACCTGTGGGGCCAGGGCACCCCTC GTGACAGTGCATCT	40

1 2	111B10- zu	軽鎖	56	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCTCCAG CCTGTCCGCTTCTGTGGGGACAGAGTGA CCATCACCTGTGAGGCCTCCAGTCCATC TCCTCCTACCTGTCTGGTATCAGCAGAA GCCCCGCAAGGCCCAAGCTGTGATCT ACTCTGCCACACTGGCCTCCGGCGTG CCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGG CACCGACTTTACCCTGACCATCAGTCCC TCCAGTGGGAGGATGCCGCCACTACTAC TGCCAGTCTACTACGACATCGGCACCTC CACCTTCGGCGAGGCACCAAGGTGGAAA TCAA	10
1 3	201C15- xi	重鎖	57	CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGTCCGCT GGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCA CCTGCACAGTCTCTGGAATCGACCTCAGT AGCTATGCAATGGGCTGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGAA CCATTAATATTGGTGGTCCGCTATATTAC GCGAGCTGGGAAAAGGCCGATTACCAT CTCCAGAACCCTGACCACGGTGGATCTGA AAGCGCCAGTCTGACAGCCGAGGACACG GCCACCTATTTCTGTGCCAGATATTATAA TGGTGGTAGTTATGACATCTGGGGCCAG GCACCCTGGTCACCGTCTCTTTA	20
1 4	201C15- xi	軽鎖	58	GATGTGTGATGACCCAGACTCCAGCCTC CGGCTCTGAACCTGTGGGAGGCACAGTCA CCATCAAGTGCCAGGCCAGTGAGAGCATT TATCGCGTATTGGCTGGTATCAGCAGAA ACCAGGGCAGCCTCCAAGCTCCTGATCT ATGATACATCCACTCTGGCATCTGGGGCC CCATCGCGTTCAAAGGCAGTGGATATGG GACAGAGTCACTCTCACCATCAGCGGCG TGCAGTGTGAAGATGCTGCCACTACTAC TGCAAGGCGTTATTATGCTGATAGTTA TGGTATTGCTTTCCGGCGAGGGACCGAGG TGGTGGTCAA	30
1 5	201C15- zu	重鎖	59	CAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGAGG ACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGAC TGTCTGTTCGCCCTCCGGAATCGACCTG TCCTCCTACGCTATGGGCTGGGTGCGACA GGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTACATCG GCACCATCAACATCGGCGGAGAGTGTAC TACGCTCCTGGGCAAGGGCCGGTTAC CATCTCCAGAGAACTCCAAGAACACCC TGTACCTCCAGATGAACCTCCGCGGGCC GAGGACACCGCGTACTACTGCGCCCG GTACTACAACGGCGGCTCCTACGATATCT GGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCC TCT	40

10

20

30

40

50

1 6	2 0 1 C 1 5 - z u	軽鎖	6 0	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCTCCAC CCTGTCTGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGA CCATCACCTGTGAGGCTCCGAGTCCATC TACCGGGTGTGGCTGGTATCAGCAGAA GCCTGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCT ACGACACCAGCACACTGGCCTCCGGCGTG CCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGG CACCGAGTTTACCCTGACCATCTCCAGCC TCCAGTGCGACGACGCCGCCACTACTAT TGTCAGGGCGGCTACTACGCCGACTCCTA CGGAATCGCTTTCGGCGGAGGCACCAAGG TGGAATCAAA	10
1 7	3 4 6 C 6 - x i	重鎖	6 1	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGCGGTGCGCT GGTAAAGCCTGACGAATCCCTGACACTCA CCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGT AGTTATGCAATGATCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGGAGGGGCTGGAATGGATCGGAA CCATTAGTACTGGTGTATCACATACTAC GCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCAT CTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGA AAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACAG GCCACCTATTTCTGTGCCAGAGGGGATA TGCTGCTAGTAGTCTTATTATCTCCCGT ACTACTTTGACTTGTGGGGCCAAGGGACC CTGGTCACCGTCTCCTCA	20
1 8	3 4 6 C 6 - x i	軽鎖	6 2	GCAGCCGTGCTGACCAGACCATCACC CGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCA CCATCAGTTGCCAGTCCAGTCAGAGTGT TATAATAATAACAACCTAGCCTGGTTCA GCAGAAACCCGGGCGAGCCTCCCAAGCTTC TGATCTATCTGGCATCCACTCTGGCATCT GGGTCCCATCACGGTTCAGCGGCAGTGG ATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCA GCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACT TATTACTGTCTAGGTGGTGTGATGATGA TGCTGATACTTTGCTTTCGGCGGAGGGA CTGAGGTGGTGGTCAAA	30
1 9	3 4 6 C 6 - z u	重鎖	6 3	GAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGG ACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGAC TGTCTTGTGCCGCTCCGGCTTCTCCCTG TCCTCTACGCTATGATCTGGGTGCGACA GGCCCCTGGCAAGGGCTGGAATGGATCG GCACCATCTTACCGCGGAATTACCTAC TACGCCTCCTGGGCAAGGGCCGGTTCAC CATCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACCCC TGTACCTCCAGATGAACTCCCTGCGGGCC GAGGACACCGCGTGTACTATTGTGCTAG AGGGGCTACGCCGCCAGCTCCGCTTACT ACCTGCCCTACTACTCGACCTGTGGGGC CAGGGCACCCCTCGTGACAGTGCATCT	40

2 0	3 4 6 C 6 - z u	輕鎖	6 4	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAG CCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGAGTGA CCATCACCTGTCAGTCCTCCCAGTCCGTG TATAACAACAACAACCTGGCCTGGTATCA GCAGAAACCCGGCAAGGTGCCAAGCTGC TGATCTACCTGGCCTCCACACTGGCCTCT GGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGG CTCTGGCACC GACTTTACCCTGACCATCA GCTCCCTCCAGTGGGAGGATGCCGCCACC TACTATTGCCTGGGCGGCTGCGACGACGA CGCCGATACCTTTGCTTTTGGCGGAGGCA CCAAGGTGGAATCAAA
--------	--------------------	----	-----	---

10

【 0 1 0 2 】

20

30

40

50

【表 4】

表 4. mAb Kabat CDRのアミノ酸配列

	mAb	I g G鎖	配列番号	アミノ酸配列
1	MORAb-003	HC CDR1	2	GYGLS
2	MORAb-003	HC CDR2	3	MISSGGSYTYADSVKG
3	MORAb-003	HC CDR3	4	HGDDPAWFAY
4	MORAb-003	LC CDR1	7	SVSSSISSNLH
5	MORAb-003	LC CDR2	8	GTSNLAS
6	MORAb-003	LC CDR3	9	QQWSSYPMYT
7	MORAb-009	HC CDR1	65	GYTMN
8	MORAb-009	HC CDR2	66	LITPYNGASSYNQKFRG
9	MORAb-009	HC CDR3	67	GGYDGRGFDY
10	MORAb-009	LC CDR1	68	SASSSVSYM
11	MORAb-009	LC CDR2	69	DTSKLAS
12	MORAb-009	LC CDR3	70	QQWSKHPLT
13	トラスツズマブ	HC CDR1	71	DTYIH
14	トラスツズマブ	HC CDR2	72	RTYPTNGYTRYADSVKG
15	トラスツズマブ	HC CDR3	73	WGGDGFYAMDY
16	トラスツズマブ	LC CDR1	74	RASQDVNTAVA
17	トラスツズマブ	LC CDR2	75	SASFLYS
18	トラスツズマブ	LC CDR3	76	QQHYTPPT
19	33011-xi	HC CDR1	77	SDAIS
20	33011-xi	HC CDR2	78	IINGGGNTYYASWAKG
21	33011-xi	HC CDR3	79	GIQHGGNSDYGGMDL
22	33011-xi	LC CDR1	80	QASQSISSVLS
23	33011-xi	LC CDR2	81	LASTLAS

10

20

30

40

50

2 4	33011-x i	LC CDR3	82	QTNVGTSSSNYGFA
2 5	33011-z u	HC CDR1	83	SDAIS
2 6	33011-z u	HC CDR2	84	IINGGGNTYYASWAKG
2 7	33011-z u	HC CDR3	85	GIQHGGGNSDYIYYGMDL
2 8	33011-z u	LC CDR1	86	QASQSISSVLS
2 9	33011-z u	LC CDR2	87	LASTLAS
3 0	33011-z u	LC CDR3	88	QTNVGTSSSNYGFA
3 1	111B10- xi	HC CDR1	89	NYAMS
3 2	111B10- xi	HC CDR2	90	SISTGGLAFYANWAKG
3 3	111B10- xi	HC CDR3	91	NNGGSYIFYFDL
3 4	111B10- xi	LC CDR1	92	QASQSISSYLS
3 5	111B10- xi	LC CDR2	93	SASTLAS
3 6	111B10- xi	LC CDR3	94	QSYDIGTST
3 7	111B10- zu	HC CDR1	95	NYAMS
3 8	111B10- zu	HC CDR2	96	SISTGGLAFYANWAKG
3 9	111B10- zu	HC CDR3	97	NNGGSYIFYFDL
4 0	111B10- zu	LC CDR1	98	QASQSISSYLS
4 1	111B10- zu	LC CDR2	99	SASTLAS
4 2	111B10- zu	LC CDR3	100	QSYDIGTST
4 3	201C15 xi	IIC CDR1	101	SYAMG
4 4	201C15- xi	HC CDR2	102	TINIGGRVYASWAKG
4 5	201C15- xi	HC CDR3	103	YNGGSYDI
4 6	201C15- xi	LC CDR1	104	QASEIYRVL
4 7	201C15- xi	LC CDR2	105	DTSTLAS
4 8	201C15- xi	LC CDR3	106	QGGYADSYGIA

10

20

30

40

50

4 9	201C15- z u	HC CDR 1	107	SYAMG
5 0	201C15- z u	HC CDR 2	108	TINIGGRVYYASWAKG
5 1	201C15- z u	HC CDR 3	109	YYNGGSYDI
5 2	201C15- z u	LC CDR 1	110	QASESIYRVLA
5 3	201C15- z u	LC CDR 2	111	DTSTLAS
5 4	201C15- z u	LC CDR 3	112	QGGYYADSYGIA
5 5	346C6-x i	HC CDR 1	113	SYAMI
5 6	346C6-x i	HC CDR 2	114	TISTGGITYYASWAKG
5 7	346C6-x i	HC CDR 3	115	GGYAASSAYYLPYYFDL
5 8	346C6-x i	LC CDR 1	116	QSSQSVYNNNLA
5 9	346C6-x i	LC CDR 2	117	LASTLAS
6 0	346C6-x i	LC CDR 3	118	LGGCDDDADTFA
6 1	346C6-z u	HC CDR 1	119	SYAMI
6 2	346C6-z u	HC CDR 2	120	TISTGGITYYASWAKG
6 3	346C6-z u	HC CDR 3	121	GGYAASSAYYLPYYFDL
6 4	346C6-z u	LC CDR 1	122	QSSQSVYNNNLA
6 5	346C6-z u	LC CDR 2	123	LASTLAS
6 6	346C6-z u	LC CDR 3	124	LGGCDDDADTFA

【 0 1 0 3 】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5. mAb K a b a t CDRをコードする核酸配列

	mAb	I g G鎖	配列番号	核酸配列
1	MORAb-003	HC CD R1	125	GGCTATGGGTTGTCT
2	MORAb-003	HC CD R2	126	ATGATTAGTAGTGGTGGTAGTTATACCTACTATG CAGACAGTGTGAAGGGT
3	MORAb-003	HC CD R3	127	CATGGGGACGATCCCGCCTGGTTCGCTTAT
4	MORAb-003	LC CD R1	128	AGTGTCACTCAAGTATAAGTTCCAACAACCTTGC AC
5	MORAb-003	LC CD R2	129	GGCACATCCAACCTGGCTTCT
6	MORAb-003	LC CD R3	130	CAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACATGTACACG
7	MORAb-009	HC CD R1	131	GGCTACACCATGAAC
8	MORAb-009	HC CD R2	132	CTTATTACTCCTTACAATGGTGTCTTAGCTACA ACCAGAAGTTCAGGGC
9	MORAb-009	HC CD R3	133	GGGGTTACGACGGGAGGGTTTTGACTAC
10	MORAb-009	LC CD R1	134	AGTGCCAGCTCAAGTGAAGTTACATGCAC
11	MORAb-009	LC CD R2	135	GACACATCCAACTGGCTTCT
12	MORAb-009	LC CD R3	136	CAGCAGTGGAGTAAGCACCTCTCAG
13	33011-x i	HC CD R1	137	AGCGATGCAATAAGC
14	33011-x i	HC CD R2	138	ATCATTAAATGGTGGTGGTAACACATACTACGCGA GCTGGGCGAAAGGC
15	33011-x i	HC CD R3	139	GGCATTCAACATGGTGGTGGTAATAGTATTATT ATTATTACGGCATGGACCTC
16	33011-x i	LC CD R1	140	CAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAGTGTCTTGTC
17	33011-x i	LC CD R2	141	CTGGCATCCACTCTGGCATCT
18	33011-x i	LC CD R3	142	CAAACCAATTATGGTACTAGTAGTAGTAATTATG GTTTTGCT
19	33011-z u	HC CD R1	143	TCCGACGCGATTAGC
20	33011-z u	HC CD R2	144	ATCATCAACGGCGCGGAAACACCTACTACGCCT CCTGGGCCAAGGGC
21	33011-z u	HC CD R3	145	GGCATCCAGCACGGTGGTGGAAACAGCGACTACT ACTACTATGGGATGGATCTG
22	33011-z u	LC CD R1	146	CAGGCGTCCCAGTCAATTAGCAGCGTGTCTCC
23	33011-z u	LC CD R2	147	TTGGCTCCACTCTGGCCTCG

10

20

30

40

50

24	33011-z u	LC CD R 3	148	CAAACCAACTACGGAACTCCAGCTCCAACACTACG GCTTTGCC
25	111B10- xi	HC CD R 1	149	AACTATGCAATGAGC
26	111B10- xi	HC CD R 2	150	TCCATTAGTACTGGTGGTCTCGCATTCTACGCGA ACTGGGCAAAAGGC
27	111B10- xi	HC CD R 3	151	AATGGTGGTGGTAGTTATATTTTCTATTATTTTG ACTTG
28	111B10- xi	LC CD R 1	152	CAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAGTTACTTATCC
29	111B10- xi	LC CD R 2	153	TCTGCATCCACTCTGGCATCT
30	111B10- xi	LC CD R 3	154	CAAAGCTATTATGATATTGGTACTAGTACT
31	111B10- zu	HC CD R 1	155	AACTACGCCATGTCC
32	111B10- zu	HC CD R 2	156	TCCATCAGCACAGGCGGCTGGCCTTCTACGCCA ATTGGGCAAGGGC
33	111B10- zu	HC CD R 3	157	AACGGCGGAGGCTCCTACATCTTCTACTACTTCG ACCTG
34	111B10- zu	LC CD R 1	158	CAGGCCTCCCAGTCCATCTCCTCTACCTGTCC
35	111B10- zu	LC CD R 2	159	TCTGCCTCCACACTGGCCTCC
36	111B10- zu	LC CD R 3	160	CAGTCTACTACGACATCGGCACCTCCACC
37	201C15- xi	HC CD R 1	161	AGCTATGCAATGGGC
38	201C15- xi	HC CD R 2	162	ACCATTAATATTGGTGGTCCGCTATATTACGCGA GCTGGGCAAAAGGC
39	201C15- xi	HC CD R 3	163	TATTATAATGGTGGTAGTTATGACATC
40	201C15- xi	LC CD R 1	164	CAGGCCAGTGAGAGCATTATCGCGTATTGGCC
41	201C15- xi	LC CD R 2	165	GATACATCCACTCTGGCATCT
42	201C15- xi	LC CD R 3	166	CAAGGCGGTTATTATGCTGATAGTTATGGTATTG CT
43	201C15- zu	HC CD R 1	167	TCCTACGCTATGGGC
44	201C15- zu	HC CD R 2	168	ACCATCAACATCGGCGGCAGAGTGTACTACGCCT CCTGGGCAAGGGC
45	201C15- zu	HC CD R 3	169	TACTACAACGGCGGCTCCTACGATATC
46	201C15- zu	LC CD R 1	170	CAGGCCTCCGAGTCCATCTACCGGTGCTGGCC
47	201C15- zu	LC CD R 2	171	GACACCAGCACACTGGCCTCC
48	201C15- zu	LC CD R 3	172	CAGGGCGGCTACTACGCGACTCCTACGGAATCG CT

10

20

30

40

50

4 9	3 4 6 C 6 - x i	HC CD R 1	1 7 3	AGTTATGCAATGATC
5 0	3 4 6 C 6 - x i	HC CD R 2	1 7 4	ACCATTAGTACTGGTGGTATCACATACTACGCCA GCTGGGCGAAAGGC
5 1	3 4 6 C 6 - x i	HC CD R 3	1 7 5	GGGGGATATGCTGCTAGTAGTGCTTATTATCTCC CGTACTACTTTGACTTG
5 2	3 4 6 C 6 - x i	LC CD R 1	1 7 6	CAGTCCTCCCAGTCCGTGTATAACAACAACAACC TGCC
5 3	3 4 6 C 6 - x i	LC CD R 2	1 7 7	CTGGCATCCACTCTGGCATCT
5 4	3 4 6 C 6 - x i	LC CD R 3	1 7 8	CTAGGTGGTTGTGATGATGATGCTGATACTTTG CT
5 5	3 4 6 C 6 - z u	HC CD R 1	1 7 9	TCCTACGCTATGATC
5 6	3 4 6 C 6 - z u	HC CD R 2	1 8 0	ACCATCTCTACCGCGGAATTACCTACTACGCCT CCTGGGCCAAGGGC
5 7	3 4 6 C 6 - z u	HC CD R 3	1 8 1	GGCGGCTACGCCGCCAGCTCCGTTACTACCTGC CCTACTACTTCGACCTG
5 8	3 4 6 C 6 - z u	LC CD R 1	1 8 2	CAGTCCTCCCAGTCCGTGTATAACAACAACAACC TGCC
5 9	3 4 6 C 6 - z u	LC CD R 2	1 8 3	CTGGCCTCCACACTGGCCTCT
6 0	3 4 6 C 6 - z u	LC CD R 3	1 8 4	CTGGGCGGCTGCGACGACGACGCCGATACCTTTG CT

10

20

【 0 1 0 4 】

30

40

50

【表 6】

表 6. mAb I M G T CDRのアミノ酸配列

	mAb	I g G鎖	配列番号	アミノ酸配列
1	MORAb-003	HC CD R1	13	GFTPSGYG
2	MORAb-003	HC CD R2	14	ISSGGSYT
3	MORAb-003	HC CD R3	15	ARHGDDPAWFAY
4	MORAb-003	LC CD R1	16	SSISSNN
5	MORAb-003	LC CD R2	17	GTS
6	MORAb-003	LC CD R3	18	QQWSSYPMYT
7	MORAb-009	HC CD R1	185	GYSFTGYT
8	MORAb-009	HC CD R2	186	ITPYNGAS
9	MORAb-009	HC CD R3	187	ARGGYDGRGFDY
10	MORAb-009	LC CD R1	188	SSVSY
11	MORAb-009	LC CD R2	189	DTS
12	MORAb-009	LC CD R3	190	QQWSKHPLT
13	トラスツズマブ	HC CD R1	191	GFNIKDTY
14	トラスツズマブ	HC CD R2	192	IYPTNGYT
15	トラスツズマブ	HC CD R3	193	SRWGGDGFYAMDY
16	トラスツズマブ	LC CD R1	194	QDVNTA
17	トラスツズマブ	LC CD R2	195	SAS
18	トラスツズマブ	LC CD R3	196	QQHYTTPPT
19	33011-x i	HC CD R1	197	GISLSSDA
20	33011-x i	HC CD R2	198	INGGGNT
21	33011-x i	HC CD R3	199	ARGIQHGGGNSDYIYYGMDL
22	33011-x i	LC CD R1	200	QSISSV
23	33011-x i	LC CD R2	201	LAS

10

20

30

40

50

2 4	3 3 0 1 1 - x i	LC CD R 3	2 0 2	QTNYGTSSSNYGFA
2 5	3 3 0 1 1 - z u	HC CD R 1	2 0 3	GISLSSDA
2 6	3 3 0 1 1 - z u	HC CD R 2	2 0 4	INGGGNT
2 7	3 3 0 1 1 - z u	HC CD R 3	2 0 5	ARGIQHGGGNSDYYYYYGMDL
2 8	3 3 0 1 1 - z u	LC CD R 1	2 0 6	QSISSV
2 9	3 3 0 1 1 - z u	LC CD R 2	2 0 7	LAS
3 0	3 3 0 1 1 - z u	LC CD R 3	2 0 8	QTNYGTSSSNYGFA
3 1	1 1 1 B 1 0 - x i	HC CD R 1	2 0 9	GFSLNNYA
3 2	1 1 1 B 1 0 - x i	HC CD R 2	2 1 0	ISTGGLA
3 3	1 1 1 B 1 0 - x i	HC CD R 3	2 1 1	GRNGGGSYIFYFDL
3 4	1 1 1 B 1 0 - x i	LC CD R 1	2 1 2	QSISSY
3 5	1 1 1 B 1 0 - x i	LC CD R 2	2 1 3	SAS
3 6	1 1 1 B 1 0 - x i	LC CD R 3	2 1 4	QSYDIGTST
3 7	1 1 1 B 1 0 - z u	HC CD R 1	2 1 5	GFSLNNYA
3 8	1 1 1 B 1 0 - z u	HC CD R 2	2 1 6	ISTGGLA
3 9	1 1 1 B 1 0 - z u	HC CD R 3	2 1 7	ARNGGGSYIFYFDL
4 0	1 1 1 B 1 0 - z u	LC CD R 1	2 1 8	QSISSY
4 1	1 1 1 B 1 0 - z u	LC CD R 2	2 1 9	SAS
4 2	1 1 1 B 1 0 - z u	LC CD R 3	2 2 0	QSYDIGTST
4 3	2 0 1 C 1 5 - x i	HC CD R 1	2 2 1	GIDLSSYA
4 4	2 0 1 C 1 5 - x i	HC CD R 2	2 2 2	INIGGRV
4 5	2 0 1 C 1 5 - x i	HC CD R 3	2 2 3	ARYYNGGSYDI
4 6	2 0 1 C 1 5 - x i	LC CD R 1	2 2 4	ESIYRV
4 7	2 0 1 C 1 5 - x i	LC CD R 2	2 2 5	DTS
4 8	2 0 1 C 1 5 - x i	LC CD R 3	2 2 6	QGGYADSYGIA

10

20

30

40

50

4 9	2 0 1 C 1 5 - z u	HC CD R 1	2 2 7	GIDLSSYA
5 0	2 0 1 C 1 5 - z u	HC CD R 2	2 2 8	INIGGRV
5 1	2 0 1 C 1 5 - z u	HC CD R 3	2 2 9	ARYYNGGSYDI
5 2	2 0 1 C 1 5 - z u	LC CD R 1	2 3 0	ESIYRV
5 3	2 0 1 C 1 5 - z u	LC CD R 2	2 3 1	DTS
5 4	2 0 1 C 1 5 - z u	LC CD R 3	2 3 2	QGGYADSYGIA
5 5	3 4 6 C 6 - x i	HC CD R 1	2 3 3	GFSLSSYA
5 6	3 4 6 C 6 - x i	HC CD R 2	2 3 4	ISTGGIT
5 7	3 4 6 C 6 - x i	HC CD R 3	2 3 5	ARGGYAASSAYLPYYFDL
5 8	3 4 6 C 6 - x i	LC CD R 1	2 3 6	QSVYNNNN
5 9	3 4 6 C 6 - x i	LC CD R 2	2 3 7	LAS
6 0	3 4 6 C 6 - x i	LC CD R 3	2 3 8	LGGCDDDADTFA
6 1	3 4 6 C 6 - z u	HC CD R 1	2 3 9	GFSLSSYA
6 2	3 4 6 C 6 - z u	HC CD R 2	2 4 0	ISTGGIT
6 3	3 4 6 C 6 - z u	HC CD R 3	2 4 1	ARGGYAASSAYLPYYFDL
6 4	3 4 6 C 6 - z u	LC CD R 1	2 4 2	QSVYNNNN
6 5	3 4 6 C 6 - z u	LC CD R 2	2 4 3	LAS
6 6	3 4 6 C 6 - z u	LC CD R 3	2 4 4	LGGCDDDADTFA

【 0 1 0 5 】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 7. mAb IMGT CDRをコードする核酸配列

	mAb	Ig鎖	配列番号	核酸配列
1	MORAb-0 03	HC CD R1	245	GGCTTCACCTCAGCGGTATGGG
2	MORAb-0 03	HC CD R2	246	ATTAGTAGTGGTGGTAGTATACC
3	MORAb-0 03	HC CD R3	247	GCAAGACATGGGACGATCCCGCCTGGTTCGCTT AT
4	MORAb-0 03	LC CD R1	248	TCAAGTATAAGTCCAACAAC
5	MORAb-0 03	LC CD R2	249	GGCACATCC
6	MORAb-0 03	LC CD R3	250	CAACAGTGGAGTAGTACCCGTACATGTACACG
7	MORAb-0 09	HC CD R1	251	GGTACTCATTCACTGGCTACACC
8	MORAb-0 09	HC CD R2	252	ATTACTCCTTACAATGGTGCTTCT
9	MORAb-0 09	HC CD R3	253	GCAAGGGGGGTTACGACGGGAGGGTTTTGACT AC
10	MORAb-0 09	LC CD R1	254	TCAAGTGAAGTTAC
11	MORAb-0 09	LC CD R2	255	GACACATCC
12	MORAb-0 09	LC CD R3	256	CAGCAGTGGAGTAAGCACCCCTCTCACG
13	33011-x i	HC CD R1	257	GGAATCTCCCTCAGTAGCGATGCA
14	33011-x i	HC CD R2	258	ATTAATGGTGGTGGTAACACA
15	33011-x i	HC CD R3	259	GCCAGAGCATTCAACATGGTGGTGGTAATAGTG ATTATTATTATTACGGCATGGACCTC
16	33011-x i	LC CD R1	260	CAGAGCATTAGTAGTGTC
17	33011-x i	LC CD R2	261	CTGGCATCT
18	33011-x i	LC CD R3	262	CAAACCAATTATGGTACTAGTAGTAGTAATTATG GTTTTGCT
19	33011-z u	HC CD R1	263	GGAATTCCTCTCCTCCGACGCG
20	33011-z u	HC CD R2	264	ATCAACGGCGGGAAACACC

10

20

30

40

50

2 1	3 3 0 1 1 - z u	HC CD R 3	2 6 5	GCGCGCGCATCCAGCACGGTGGTGGAAACAGCG ACTACTACTACTATGGGATGGATCTG
2 2	3 3 0 1 1 - z u	LC CD R 1	2 6 6	CAGTCAATTAGCAGCGTG
2 3	3 3 0 1 1 - z u	LC CD R 2	2 6 7	TTGGCCTCC
2 4	3 3 0 1 1 - z u	LC CD R 3	2 6 8	CAAACCAACTACGGAACTCCAGCTCCAACACTACG GCTTTGCC
2 5	1 1 1 B 1 0 - x i	HC CD R 1	2 6 9	GGATTCTCCCTCAATAACTATGCA
2 6	1 1 1 B 1 0 - x i	HC CD R 2	2 7 0	ATTAGTACTGGTGGTCTCGCA
2 7	1 1 1 B 1 0 - x i	HC CD R 3	2 7 1	GGCAGAAATGGTGGTGGTAGTTATATTTTCTATT ATTTGACTTG
2 8	1 1 1 B 1 0 - x i	LC CD R 1	2 7 2	CAGAGCATTAGTAGTTAC
2 9	1 1 1 B 1 0 - x i	LC CD R 2	2 7 3	TCTGCATCC
3 0	1 1 1 B 1 0 - x i	LC CD R 3	2 7 4	CAAAGCTATTATGATATTGGTACTAGTACT
3 1	1 1 1 B 1 0 - z u	HC CD R 1	2 7 5	GGCTTCTCCCTGAACAACTACGCC
3 2	1 1 1 B 1 0 - z u	HC CD R 2	2 7 6	ATCAGCACAGCGGCTGGCC
3 3	1 1 1 B 1 0 - z u	HC CD R 3	2 7 7	GCCAGAAACGGCGGAGGCTCCTACATCTTCTACT ACTTCGACCTG
3 4	1 1 1 B 1 0 - z u	LC CD R 1	2 7 8	CAGTCCATCTCCTCTAC
3 5	1 1 1 B 1 0 - z u	LC CD R 2	2 7 9	TCTGCCTCC
3 6	1 1 1 B 1 0 - z u	LC CD R 3	3 0 0	CAGTCTACTACGACATCGGCACCTCCACC
3 7	2 0 1 C 1 5 - x i	HC CD R 1	3 0 1	GGAATCGACCTCAGTAGCTATGCA
3 8	2 0 1 C 1 5 - x i	HC CD R 2	3 0 2	ATTAATATTGGTGGTCGCGTA
3 9	2 0 1 C 1 5 - x i	HC CD R 3	3 0 3	GCCAGATATTATAATGGTGGTAGTTATGACATC
4 0	2 0 1 C 1 5 - x i	LC CD R 1	3 0 4	GAGAGCATTATCGCGTA
4 1	2 0 1 C 1 5 - x i	LC CD R 2	3 0 5	GATACATCC
4 2	2 0 1 C 1 5 - x i	LC CD R 3	3 0 6	CAAGGCGGTTATTATGCTGATAGTTATGGTATTG CT

10

20

30

40

50

4 3	2 0 1 C 1 5 - z u	H C C D R 1	3 0 7	GGAATCGACCTGTCCTCCTACGCT	
4 4	2 0 1 C 1 5 - z u	H C C D R 2	3 0 8	ATCAACATCGGCGGCAGAGTG	
4 5	2 0 1 C 1 5 - z u	H C C D R 3	3 0 9	GCCCGGTACTACAACGGCGGCTCCTACGATATC	
4 6	2 0 1 C 1 5 - z u	L C C D R 1	3 1 0	GAGTCCATCTACCGGGTG	
4 7	2 0 1 C 1 5 - z u	L C C D R 2	3 1 1	GACACCAGC	10
4 8	2 0 1 C 1 5 - z u	L C C D R 3	3 1 2	CAGGGCGGCTACTACGCCGACTCCTACGGAATCG CT	
4 9	3 4 6 C 6 - x i	H C C D R 1	3 1 3	GGATTCTCCCTCAGTAGTTATGCA	
5 0	3 4 6 C 6 - x i	H C C D R 2	3 1 4	ATTAGTACTGGTGGTATCACA	
5 1	3 4 6 C 6 - x i	H C C D R 3	3 1 5	GCCAGAGGGGATATGCTGCTAGTAGTGCTTATT ATCTCCCGTACTACTTTGACTTG	20
5 2	3 4 6 C 6 - x i	L C C D R 1	3 1 6	CAGAGTGTTATAATAATAACAAC	
5 3	3 4 6 C 6 - x i	L C C D R 2	3 1 7	CTGGCATCC	
5 4	3 4 6 C 6 - x i	L C C D R 3	3 1 8	CTAGGTGGTTGTGATGATGATGCTGATACTTTG CT	
5 5	3 4 6 C 6 - z u	H C C D R 1	3 1 9	GGCTTCTCCCTGTCCTCCTACGCT	
5 6	3 4 6 C 6 - z u	H C C D R 2	3 2 0	ATCTCTACCGGCGGAATTACC	30
5 7	3 4 6 C 6 - z u	H C C D R 3	3 2 1	GCTAGAGGCGGCTACGCCGAGCTCCGCTTACT ACCTGCCCTACTACTTCGACCTG	
5 8	3 4 6 C 6 - z u	L C C D R 1	3 2 2	CAGTCCGTGTATAACAACAACAAC	
5 9	3 4 6 C 6 - z u	L C C D R 2	3 2 3	CTGGCCTCC	
6 0	3 4 6 C 6 - z u	L C C D R 3	3 2 4	CTGGGCGGCTGCGACGACGACGCCGATACCTTTG CT	40

【 0 1 0 6 】

【表 8】

表 8. 全長mAb Ig鎖のアミノ酸配列

	mAb	Ig鎖	配列番号	アミノ酸配列	
1	MORAb-003	重鎖	1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFTFSGYGL SWVRQAPGKGLEWVAMISSGGSYTYADSVKGRF AISRDNKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARHGDD PAWFAYWGQGPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	10
2	MORAb-003	軽鎖	6	DIQLTQSPSSLSASVGRVITITCSVSSSISNNL HWYQQKPKGKAPKRWIYGTSNLAGVPSRFSGSGS GTDYFTFTISLQPEDIAITYCQQWSSYPMYTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	20
3	MORAb-009	重鎖	325	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTM NWKQSHGKSLIEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKA TLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYD GRGFDYWGGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	40

4	MORA b - 0 09	軽鎖	326	DIELTQSPAIMASPGKVTMTCSASSSVSYMHW YQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPGRFSGSGGN SYSLTISSVEAEDDATYYCQWSKHPLTFGSGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
5	トラスツズマブ	重鎖	327	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARITYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD GFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
6	トラスツズマブ	軽鎖	328	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFVLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYTPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
7	33011-x i	重鎖	329	QSVESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGISLSSDAIS WVRQAPGKLEYIGIINGGNTYYASWAKGRFTI SKTSTTVDLKITSPTTEDATYFCARGIQHGGGN SDYYYYGMDL WPGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKEPKKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

10

20

30

40

8	3 3 0 1 1 - x i	軽鎖	3 3 0	EVLMQTTPSSVSAVGDVTIKCQASQSISSVLS WYQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSRSG TEFTLTISDLECDAAATYYCQTNYGTSSSNYGFA FGGGTEVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
9	3 3 0 1 1 - z u	重鎖	3 3 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGISLSSDAI SWVRQAPGKGLYIGIINGGGNTYYASWAKGRFT ISRHNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIQHG GGNSDYIYGMDLWGQGLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALH NHYTQKSLSLSPGK
1 0	3 3 0 1 1 - z u	軽鎖	3 3 2	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQSISSVLS WYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSG TDFLTISLQCEDIATYYCQTNYGTSSSNYGFA FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
1 1	1 1 1 B 1 0 - x i	重鎖	3 3 3	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNNYAMS WVRQAPGKGLEWIGSISTGGLAFYANWAKGRFTI SRTSTVDLKMSTLTEDTATYFCGRNGGGSYIF YYFDLWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVIINAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGIFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSL SLSPGK

10

20

30

40

1 2	1 1 1 B 1 0 - x i	軽鎖	3 3 4	AFELTQTPSSVEAAVGGTITIKCQASQSISSYLS WYQQKPGQPPKLLIYASTLASGVSSRFKSGSGG TEYTLTISDLECAATAFYCQSYDIGTSTFGGG TEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
1 3	1 1 1 B 1 0 - z u	重鎖	3 3 5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNYYAM SWVRQAPGKGLEWIGSISTGGLAFYANWAKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNGGGS YIFYYFDLWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
1 4	1 1 1 B 1 0 - z u	軽鎖	3 3 6	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQSISSYLS WYQQKPGKAPKLLIYASTLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQCEDAATYYCQSYDIGTSTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
1 5	2 0 1 C 1 5 - x i	重鎖	3 3 7	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSYAMG WFRQAPGKLEYIGTINIGGRVYASWAKGRFTI SRTSTTVDLKAPSLTAEDTATYFCARYYNGGSYD IWGPGTLVTVSLASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NYYVDGVEVINAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK

10

20

30

40

1 6	201C15-x i	軽鎖	338	DVVMQTPASASEPVGGVTIKCQASESIYRVLA WYQQKPGQPPKLLIYDTSTLASGAPSRFKGSGYG TEFTLTISGVQCEDAATYYCQGGYYADSYGIAFG GGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
1 7	201C15-z u	重鎖	339	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGIDLSSYAM GWVRQAPGKLEYIGTINIGGRVYYASWAKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYNGG SYDIWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
1 8	201C15-z u	軽鎖	340	DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCQASESIYRVLA WYQQKPGKAPKLLIYDTSTLASGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLQCDDAATYYCQGGYYADSYGIAFG GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
1 9	346C6-x i	重鎖	341	QSVEESGGRLVKPDESLTCTASGFSLSSYAMI WVRQAPGEGLEWIGTISTGGITYYASWAKGRFTI SKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARGGYAASSA YYLPYFDLWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS IIEDPEVKFNWYVDGVEVINAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

10

20

30

40

2 0	3 4 6 C 6 - x i	輕鎖	3 4 2	AAVLTQTPSPVSAAVGGTIVTISCQSSQSVYNNNN LAWFQQKPGQPPELLIYLASTLASGVPSRFSGSG SGTQFTLTISGVQCDDAATYCLGGCDDADTFA FGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
2 1	3 4 6 C 6 - z u	重鎖	3 4 3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYAM IWVRRQAPGKLEWIGTISTGGITYYASWAKGRFT ISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGGYAA SSAYYLPYYFDLWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSIEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMSHEALHN HYTQKSLSLSPGK
2 2	3 4 6 C 6 - z u	輕鎖	3 4 4	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQSSQSVYNNNN LAWYQQKPGKVPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQCEDAATYCLGGCDDADTFA FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

【 0 1 0 7 】

40

50

【表 9】

表 9. 全長MAB I G鎖⁺をコードする核酸配列

	m A b	I g G鎖	配列番号	核酸配列
1	MORAb-03	重鎖	345	GAGGTCCAAGTGGTGGAGAGCGGTGGAGGTGTTG TGCAACCTGGCCGGTCCCTGCGCCTGTCTGCTC CGCATCTGGCTTACCTTCAGCGGCTATGGGTG TCTGGGTGAGACAGGCACCTGAAAAGGTCTTG AGTGGTGAATGATTAGTAGTGGTGGTAGTTA TACCTACTATGCAGACAGTGTGAAGGGTAGATT GCAATATCGCGAGACAACGCCAAGAACACATTGT TCCTGCAAATGGACAGCCTGAGACCCGAAGACAC CGGGTCTATTTTGTGCAAGACATGGGGACGAT CCCGCTGGTTCGCTTATTGGGGCAAGGGACCC CGGTACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTG GTGGAACAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCAC ACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACACAC ATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA CCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCC TCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTA TATTCAAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGAAATGA

10

20

30

40

50

2	MORAb-03	軽鎖	346	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCACCTG TAGTGTCAGCTCAAGTATAAGTTCCAACAACCTG CACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAA AGCCATGGATCTACGGCACATCCAACCTGGCTTC TGGTGTGCCAAGCAGATTAGCGGTAGCGGTAGC GGTACCGACTACACCTTCACCATCAGCAGCCTCC AGCCAGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAACA GTGGAGTAGTTACCCGTACATGTACACGTTCCGGC CAAGGGACCAAGGTGAAAATCAAACGAACTGTGG CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTG TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG AGTGTTAA
---	----------	----	-----	--

10

20

30

40

50

3	MORAb-0 09	重鎖	347	<p>CAGGTACAACCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGG AGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAA GGCTTCTGGTACTCATTCACTGGCTACACCATG AACTGGGTGAAGCAGAGCCATGAAAGAGCCTTG AGTGGATTGGACTTATTACTCCTTACAATGGTGC TTCTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGCAAGGCC ACATTAACCTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCT ACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAAGACTC TGCAGTCTATTTCTGTGCAAGGGGGGTTACGAC GGGAGGGGTTTTGACTACTGGGGATCCGGGACCC CGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCTGGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTG GTGGAACCTCAGGGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACCCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACAC ATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA CCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCC TCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC TACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCCGGAAATGA</p>
---	---------------	----	-----	---

10

20

30

40

50

4	MORAb-09	軽鎖	348	GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGT CTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTG CAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGG TACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGAT GGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGT CCCAGGTCGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAAAC TCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCGTGGAGGCTG AAGATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAG TAAGCACCTCTCACGTTCCGGATCCGGGACCAAG GTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTG TCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGA AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCA GGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA AAGCAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA
---	----------	----	-----	--

10

20

30

40

50

5	3 3 0 1 1 - x i	重鎖	3 4 9	<p>CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCTGGTCA CGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACCGT CTCTGGAATCTCCCTCAGTAGCGATGCAATAAGC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTCGAAT ACATCGGAATCATTAAATGGTGGTGGTAACACATA CTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATC TCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATCA CCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTT CTGTGCCAGAGGCATTCAACATGGTGGTGGTAAT AGTGATTATTATTATTACGGCATGGACCTCTGGG GCCAGGCACCCCTGGTCACTGTCTCTCAGCATC CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGGCACCC TCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGA CAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCAAGGACACCCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAA ACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTG GTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTA CAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC TCCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAAT GA</p>
---	--------------------	----	-------	--

10

20

30

40

50

6	3 3 0 1 1 - x i	軽鎖	3 5 0	GAAGTGTGATGACCCAGACTCCATCCTCCGTGT CTGCAGCTGTGGGAGACACAGTCACCATCAAGTG CCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAGTGCTTTGTCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGC TCCTGATCTATCTGGCATCCACTCTGGCATCTGG GGTCCCATCGCGGTTACAGCGGCAGTAGATCTGGG ACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGT GTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAACCAA TTATGGTACTAGTAGTAGTAATTATGGTTTTGCT TTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTCGTCAAACGAA CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGCACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCA GCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA GGGGAGAGTGTGA
---	--------------------	----	-------	--

10

20

30

40

50

7	3 3 0 1 1 - z u	重鎖	3 5 1	<p>GAAGTCCAACGGTGGAAAGCGGGGAGGACTGG TGCAGCCGGGCGGATCCCTCCGGCTGCATGTGC TGCATCGGAATTTCCCTCTCCTCCGACGCGATT AGCTGGGTGAGACAGGCCCGGAAAGGGGCTGG AGTACATCGGTATCATCAACGGCGGGGAAACAC CTACTACGCCTCCTGGGCCAAGGGCCGCTTACC ATCTCGCGGCATAATTCCAAGAACACTCTGTACT TGCAAATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGCGCGCGGGCATCCAGCACGGT GGTGGAAACAGCGACTACTACTACTATGGGATGG ATCTGTGGGGCCAGGGAACCTTTGTGACCGTGTG GTCAGCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC CTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGC GCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGCTG TCCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA ATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCTCAT GATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATC CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGA GAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGAC TCGACGGCTCCTTCTTATATTCAAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CCGGGAAATGA</p>
---	--------------------	----	-------	--

10

20

30

40

50

8	3 3 0 1 1 - z u	軽鎖	3 5 2	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCGCTGT CCGCCTCCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACGTG CCAGGCGTCCCAGTCAATTAGCAGCGTGCTCTCC TGGTACCAACAGAAGCCGGGAAAGCACCCAAGC TGCTGATCTACTTGGCCTCCACTCTGGCCTCGGG AGTGCCTTCACGGTTCTCCGGATCGGGATCTGGT ACTGATTCACCCTCACCATCTCGAGCCTTCAGT GCGAGGACATCGCTACTTACTATTGTCAAACCAA CTACGGAACCTCCAGCTCCAACCTACGGCTTTGCC TTCGGTGGCGGGACCAAGGTCGAAATCAAACGAA CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT CCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGCACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCA GCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA GGGGAGAGTGTGA
---	--------------------	----	-------	--

10

20

30

40

50

9	1 1 1 B 1 0 - x i	重鎖	3 5 3	<p>CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCCTGGTCA CGCCTGGGACACCCTGACACTCACCTGCACAGT CTCTGGATTCTCCCTCAATAACTATGCAATGAGC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAAT GGATCGGATCCATTAGTACTGGTGGTCTCGCATT CTACGCGAACTGGGCAAAAGGCCGATTACCCATC TCCAGAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATGA CCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTT CTGTGGCAGAAATGGTGGTGGTAGTTATATTTTC TATTATTTGACTTGTGGGGCCAAGGCACCCTCG TCACTGTCTCTTCCAGCATCCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACC TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT CACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG TTGAGCCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATG CCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGA CCGTCACTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CCCAGCCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC TGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTTATAT TCAAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCGGGAAATGA</p>
---	----------------------	----	-------	--

10

20

30

40

50

1 0	1 1 1 B 1 0 - x i	軽鎖	3 5 4	GCATTCGAATTGACCCAGACTCCATCCTCCGTGG AGGCAGCTGTGGGAGGCACAATCACCATCAAGTG CCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAGTTACTTATCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCACTCTGGCATCTGG GGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGG ACAGAGTACACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGT GTGCCGATGCTGCCACTTACTTCTGTCAAAGCTA TTATGATATTGGTACTAGTACTTTCGGCGGAGGG ACCGAGGTGGTCGTCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA CTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTT GA
--------	----------------------	----	-------	---

10

20

30

40

50

1 1	1 1 1 B 1 0 - z u	重鎖	3 5 5	GAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGG TGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGC CGCCTCCGGCTTCTCCCTGAACAACACTAGCCATG TCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTGG AATGGATCGGCTCCATCAGCACAGGCGGCTGGC CTTCTACGCCAATTGGGCCAAGGGCCGGTTCACC ATCAGCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACC TCCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGAAACGGCGGAGGCTCC TACATCTTCTACTACTTCGACCTGTGGGGCCAGG GCACCCTCGTGACAGTGTATCTGCATCCACCAA GGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAG GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTC CTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAA AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCCTACCGTCCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG TGTACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC CACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCTTATATTCAAAGCTACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAATGA
--------	----------------------	----	-------	---

10

20

30

40

50

1	1 1 1 B 1 0 -	軽鎖	3 5 6	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCTCCAGCCTGT
2	z u			CCGCTTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTG
				TCAGGCCTCCCAGTCCATCTCCTCCTACCTGTCC
				TGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCAAGC
				TGCTGATCTACTCTGCCTCCACTGGCCTCCGG
				CGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGC
				ACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTCCAGT
				GCGAGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGTCCTA
				CTACGACATCGGCACCTCCACCTTCGGCGGAGGC
				ACCAAGGTGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCAC
				CATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCA
				GTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG
				CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC
				AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA
				CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
				GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC
				TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA
				CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG
				CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTT
				GA

10

20

30

40

50

1 3	201C15- xi	重鎖	357	<p>CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCA CGCCTGGGACACCCTGACACTCACCTGCACAGT CTCTGGAATCGACCTCAGTAGCTATGCAATGGGC TGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAAT ACATCGGAACCATTAATATTGGTGGTCGCGTATA TTACGCGAGCTGGGCAAAAGGCCGATTCACCATC TCCAGAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAGCGC CCAGTCTGACAGCCGAGGACACGGCCACCTATTT CTGTGCCAGATATTATAATGGTGGTAGTTATGAC ATCTGGGGCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCTT TAGCATCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCT GGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGC CCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTC CTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG TGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAT CTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCC AGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGA TCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCAT CGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGA ACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTATATTCAAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC GGGAAATGA</p>
--------	---------------	----	-----	---

10

20

30

40

50

1 4	201C15- xi	軽鎖	358	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCAGCCTCCGCGT CTGAACCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTG CCAGGCCAGTGAGAGCATTATCGCGTATTGGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGC TCCTGATCTATGATACATCCACTCTGGCATCTGG GGCCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGATATGGG ACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGGCGTGCAGT GTGAAGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAGGCGG TTATTATGCTGATAGTTATGGTATTGCTTTCGGC GGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAACGAACTGTGG CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTG TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG AGTGTGA
--------	---------------	----	-----	---

10

20

30

40

50

1 5	2 0 1 C 1 5 - z u	重鎖	3 5 9	<p>CAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGAGGACTGG TGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTGTTC CGCCTCCGGAATCGACCTGTCTCTACGCTATG GGCTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGG AGTACATCGGCACCATCAACATCGGCGGCAGAGT GTACTACGCCTCCTGGGCCAAGGGCCGGTTCACC ATCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACCCTGTACC TCCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTAATACTGCGCCCGTACTACAACGGCGGC TCCTACGATATCTGGGGCCAGGGCACACTCGTGA CCGTGTCTCTGCATCCACCAAGGGCCATCGGT CTTCCCCCTGGACCCTCCTCCAAGAGCACCTCT GGGGCCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAA CTCAGGGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTC CCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC ACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCG TCAGTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG GTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACCGTCTC ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTATATTCA AAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGGAAATGA</p>
--------	----------------------	----	-------	---

10

20

30

40

50

1 6	201C15- zu	軽鎖	360	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCTCCACCCTGT CTGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTG TCAGGCCTCCGAGTCCATCTACCGGGTGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAGC TGCTGATCTACGACACCAGCACACTGGCCTCCGG CGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGC ACCGAGTTTACCCTGACCATCTCCAGCCTCCAGT GCGACGACGCCACCTACTATTGTCAGGGCGG CTACTACGCCGACTCCTACGGAATCGCTTTCGGC GGAGGCACCAAGGTGAAAATCAAACGAACTGTGG CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTG TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG AGTGTGA
--------	---------------	----	-----	---

10

20

30

40

50

1 7	3 4 6 C 6 - x i	重鎖	3 6 1	<p>CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGCGGTGCGCTGGTAA AGCCTGACGAATCCCTGACACTCACCTGCACAGC CTCTGGATTCTCCCTCAGTAGTTATGCAATGATC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAAT GGATCGGAACCATTAGTACTGGTGGTATCACATA CTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATC TCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATCA CCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTT CTGTGCCAGAGGGGATATGCTGCTAGTAGTGCT TATTATCTCCCGTACTACTTTGACTTGTGGGGCC AAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCATCCAC CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGT GACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCT CAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGT GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTGTGACAA AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA CTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC CAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACC ATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCT GACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGAGCCGAGGAGCAACTACAA GACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCTATATTCAAAGCTACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAATGA</p>
--------	--------------------	----	-------	---

10

20

30

40

50

1 8	3 4 6 C 6 - x i	軽鎖	3 6 2	GCAGCCGTGCTGACCCAGACACCATCACCCGTGT CTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAGTTG CCAGTCCAGTCAGAGTGTTATAATAATAACAAC TTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCCGGGCAGCCTC CCAAGCTTCTGATCTATCTGGCATCCACTCTGGC ATCTGGGGTCCCATCACGGTTCAGCGGCAGTGGA TCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGCGGCG TGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTATTACTGTCT AGGTGGTTGTGATGATGATGCTGATACTTTTGCT TTCGGCGGAGGGACTGAGGTGGTGGTCAAACGAA CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGCACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCA GCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA GGGGAGAGTGTGA
--------	--------------------	----	-------	---

10

20

30

40

50

1 9	3 4 6 C 6 - z u	重鎖	3 6 3	<p>GAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGACTGG TGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGC CGCCTCCGGCTTCTCCCTGTCTCCTACGCTATG ATCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGCCTGG AATGGATCGGCACCATCTCTACCGCGGAATTAC CTACTACGCCTCCTGGGCCAAGGGCCGGTTCACC ATCTCCAGAGACAACTCCAAGAACACCCTGTACC TCCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTAATAATTGTGCTAGAGGCGGCTACGCCGCC AGCTCCGCTTACTACCTGCCCTACTACTTCGACC TGTGGGGCCAGGGCACCTCGTGACAGTGTCAATC TGCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCC GGCTGTCC TACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCG GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCCTGACC TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACTGTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCG GGAAATGA</p>
--------	--------------------	----	-------	---

10

20

30

40

50

2 0	3 4 6 C 6 - z u	軽鎖	3 6 4	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCTCCAGCCTGT CCGCTTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTG TCAGTCCCTCCAGTCCGTGTATAACAACAACAAC CTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAGGTGC CCAAGCTGCTGATCTACCTGGCCTCCACTGGC CTCTGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGC TCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGTCCC TCCAGTGCAGGATGCCGCCACTACTATTGCCT GGGCGGCTGCGACGACGACGCCGATACTTTGCT TTTGGCGGAGGCCCAAGGTGAAATCAAACGAA CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCA GCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA GGGAGAGTGTTGA
--------	--------------------	----	-------	---

10

20

+ 列挙した核酸配列は、リーダー配列を含まない。

【0108】

様々な実施形態で、本明細書において開示するADCは、上の表に列挙した重鎖及び軽鎖可変ドメインの任意のセット（例えば、MORAb-003重鎖及び軽鎖可変ドメイン、またはトラスツズマブ重鎖及び軽鎖可変ドメイン）、または重鎖及び軽鎖セットからの6つのCDR配列のセットを含んでよい。一部の実施形態では、ADCはさらに、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインまたはその断片を含む。例えば、ADCは、ヒトIgG重鎖定常ドメイン（IgG1など）及びヒトカッパまたはラムダ軽鎖定常ドメインを含んでよい。様々な実施形態で、記載のADCの抗体部分は、ヒト免疫グロブリンGサブタイプ1（IgG1）重鎖定常ドメインをヒトIgカッパ軽鎖定常ドメインと共に含む。

30

【0109】

様々な実施形態で、ADCのための標的がん抗原は、葉酸受容体アルファ（「FRA」）である。

【0110】

様々な実施形態で、抗FRA抗体またはその抗原結合性断片は、Kabatsナンバリングシステム（Kabats, Sequences of Proteins of Immunological Interest（米国国立衛生研究所、Bethesda、Md.（1987及び1991）））により定義すると、次のとおりの3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを含む：配列番号2からなる重鎖CDR1（HCDR1）、配列番号3からなる重鎖CDR2（HCDR2）、配列番号4からなる重鎖CDR3（HCDR3）；配列番号7からなる軽鎖CDR1（LCDR1）、配列番号8からなる軽鎖CDR2（LCDR2）、及び配列番号9からなる軽鎖CDR3（LCDR3）。

40

【0111】

一部の実施形態では、抗FRA抗体またはその抗原結合性断片は、IMGTナンバリングシステム（International Immunogenetics Information System（IMGT（登録商標）））により定義すると、次のとおりの3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを含む：配列番号13からなる重鎖CDR1、配列番号14からなる重鎖CDR2、配列番号15からなる重鎖CDR3；配列番号16からなる軽鎖CDR1、配列番号17からなる軽鎖CDR2、及び配列番号18からなる軽鎖CDR3。

50

【0112】

様々な実施形態で、抗FRA抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号23のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号24のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗FRA抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号23の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号24の軽鎖可変領域アミノ酸配列、または上述の配列に対して少なくとも95%同一である配列を含む。一部の実施形態では、抗FRA抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号23に対して少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である重鎖可変領域アミノ酸配列、及び配列番号24に対して少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する。

10

【0113】

様々な実施形態で、抗FRA抗体は、ヒトIgG1重鎖定常ドメインをヒトIgCα軽鎖定常ドメインと共に含む。

【0114】

様々な実施形態で、抗FRA抗体は、配列番号1の重鎖アミノ酸配列または配列番号1に対して少なくとも95%同一である配列、及び配列番号6の軽鎖アミノ酸配列または配列番号6に対して少なくとも95%同一である配列を含む。特定の実施形態では、抗体は、配列番号1の重鎖アミノ酸配列及び配列番号6の軽鎖アミノ酸配列、または上述の配列に対して少なくとも95%同一である配列を含む。一部の実施形態では、抗FRA抗体は、配列番号1に対して少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である重鎖アミノ酸配列及び/または配列番号6に対して少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である軽鎖アミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、抗FRA抗体は、配列番号11（リーダー配列をコードするヌクレオチドを含む）、または配列番号345（リーダー配列をコードするヌクレオチドを含まない）のヌクレオチド配列によりコードされる重鎖；及び配列番号12（リーダー配列をコードするヌクレオチドを含む）、または配列番号346（リーダー配列をコードするヌクレオチドを含まない）のヌクレオチドによりコードされる軽鎖を含む。一部の実施形態では、重鎖アミノ酸配列は、C末端リシンを欠失している。様々な実施形態で、抗FRA抗体は、ブダペスト条約に従った条項下で、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（ATCC、10801 University Blvd.、Manassas、Va. 20110-2209）に2006年4月24日に受託番号PTA-7552で寄託された細胞系により産生される抗体のアミノ酸配列、または重鎖C末端リシンを欠失したそのような配列を有する。様々な実施形態で、抗FRA抗体は、MORAb-003（USAN名：ファルレツズマブ）（Ebel et al. (2007) Cancer Immunity 7:6）、またはその抗原結合性断片である。

20

30

【0115】

様々な他の実施形態では、ADCのための標的がん抗原は、ヒト上皮成長因子受容体2（「her2」）である。

【0116】

様々な実施形態で、抗her2抗体またはその抗原結合性断片は、Kabataナンバリングシステムにより定義すると、次のとおりの3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを含む：配列番号71からなる重鎖CDR1（HCDR1）、配列番号72からなる重鎖CDR2（HCDR2）、配列番号73からなる重鎖CDR3（HCDR3）；配列番号74からなる軽鎖CDR1（LCDR1）、配列番号75からなる軽鎖CDR2（LCDR2）、及び配列番号76からなる軽鎖CDR3（LCDR3）。

40

【0117】

一部の実施形態では、抗her2抗体またはその抗原結合性断片は、IMGTナンバリングシステムにより定義すると、次のとおりの3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを含む：配列番号191からなる重鎖CDR1、配列番号192からなる重鎖CDR2、配列番号193からなる重鎖CDR3；配列番号194からなる軽鎖CDR1、配列番号1

50

95からなる軽鎖CDR2、及び配列番号196からなる軽鎖CDR3。

【0118】

様々な実施形態で、抗her2抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号27のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗her2抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号27の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号28の軽鎖可変領域アミノ酸配列、または上述の配列に対して少なくとも95%同一である配列を含む。一部の実施形態では、抗her2抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号27に対して少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である重鎖可変領域アミノ酸配列及び/または配列番号28に対して少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する。

10

【0119】

様々な実施形態で、抗her2抗体は、ヒトIgG1重鎖定常ドメイン及びヒトIgC₁軽鎖定常ドメインを含む。

【0120】

様々な実施形態で、抗her2抗体は、配列番号327の重鎖アミノ酸配列または配列番号327に対して少なくとも95%同一である配列、及び配列番号328の軽鎖アミノ酸配列または配列番号328に対して少なくとも95%同一である配列を含む。特定の実施形態では、抗体は、配列番号327の重鎖アミノ酸配列及び配列番号328の軽鎖アミノ酸配列、または上述の配列に対して少なくとも95%同一である配列を含む。一部の実施形態では、抗her2抗体は、配列番号327に対して少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である重鎖アミノ酸配列、及び配列番号328に対して少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である軽鎖アミノ酸配列を有する。様々な実施形態で、抗her2抗体は、トラスツズマブ、またはその抗原結合性断片である。

20

【0121】

様々な実施形態で、抗FRA抗体またはその抗原結合性断片は、MORAb-003の3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを含むか、またはそれらのCDRは、HCDR1(Kabatによる配列番号2、またはIMGTによる配列番号13)、HCDR2(Kabatによる配列番号3、またはIMGTによる配列番号14)、HCDR3(Kabatによる配列番号4、またはIMGTによる配列番号15);LCDR1(Kabatによる配列番号7、またはIMGTによる配列番号16)、LCDR2(Kabatによる配列番号8、またはIMGTによる配列番号17)、及びLCDR3(Kabatによる配列番号9、またはIMGTによる配列番号18)の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ以下のアミノ酸付加、欠失または置換を含む。

30

【0122】

様々な他の実施形態では、抗her2抗体またはその抗原結合性断片は、トラスツズマブの3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを含むか、またはそれらのCDRは、HCDR1(Kabatによる配列番号71、またはIMGTによる配列番号191)、HCDR2(Kabatによる配列番号72、またはIMGTによる配列番号192)、HCDR3(Kabatによる配列番号73、またはIMGTによる配列番号193);LCDR1(Kabatによる配列番号74、またはIMGTによる配列番号194)、LCDR2(Kabatによる配列番号75、またはIMGTによる配列番号195)、及びLCDR3(Kabatによる配列番号76、またはIMGTによる配列番号196)の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ以下のアミノ酸付加、欠失または置換を含む。

40

【0123】

様々な実施形態で、アミノ酸置換は、単一の残基の置換である。挿入は通常、約1~約20アミノ酸残基ほどであるが、生物学的機能(例えば、FRAまたはher2への結合)が維持される限り、かなりより大きな挿入も許容され得る。欠失は通常、約1~約20アミノ酸残基の範囲であるが、場合によっては、欠失は、もっと大きくてもよい。置換、

50

欠失、挿入、またはその任意の組合せを、最終誘導体またはパリアントに到達するために使用してもよい。一般に、これらの変化は、分子、特に、免疫原性及び抗原結合性タンパク質の特異性の改変を最小化するために、僅かなアミノ酸で行われる。しかしながら、より大きな変化が、ある種の状況では許容され得る。保存的置換は一般に、表 10 のとおり示される次のチャートに従って成される。

【0124】

【表 10】

表 10

元の残基 例示的な置換

Ala	Ser	10
Arg	Lys	
Asn	Gln、His	
Asp	Glu	
Cys	Ser	
Gln	Asn	
Glu	Asp	
Gly	Pro	20
His	Asn、Gln	
Ile	Leu、Val	
Leu	Ile、Val	
Lys	Arg、Gln、Glu	
Met	Leu、Ile	
Phe	Met、Leu、Tyr	
Ser	Thr	
Thr	Ser	30
Trp	Tyr	
Tyr	Trp、Phe	
Val	Ile、Leu	

【0125】

表 10 に示されているものよりも保存性が低い置換を選択することにより、機能または免疫同一性を実質的に変化させる。例えば、変化領域でのポリペプチド主鎖の構造、例えば、アルファ - ヘリックスまたはベータ - シート構造；標的部位での分子の電荷もしくは疎水性；または側鎖の嵩に、より著しい影響を及ぼす置換を行ってよい。一般に、ポリペプチドの特性に最大の変化をもたらすと予測される置換は、(a) 親水性残基、例えば、セリルまたはトレオニルが、疎水性残基、例えば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリルまたはアラニルで（またはそれにより）置換される；(b) システインまたはプロリンが、任意の他の残基で（またはそれにより）置換される；(c) 電気陽性の側鎖を有する残基、例えば、リシル、アルギニル、またはヒスチジルが、電気陰性の残基、例えば、グルタミルまたはアスパルチルで（またはそれにより）置換される；または(d) 嵩高な側鎖を有する残基、例えば、フェニルアラニンが、側鎖を有さないもの、例えば、グリシンで（またはそれにより）置換される置換である。

【0126】

様々な実施形態で、バリエーション抗体配列がADCで使用されている場合、そのバリエーションは典型的には、同じ定性生物学的活性を示し、同じ免疫応答を誘導するが、必要な場合には、抗原結合性タンパク質の特徴を変更するように、バリエーションを選択することもできる。別法では、抗原結合性タンパク質の生物学的活性を変更するように、バリエーションを設計してもよい。例えば、グリコシル化部位を、本明細書において検討したとおり、変更または除去してもよい。

【0127】

がん細胞を標的とするために、本明細書において使用されるADCで、様々な抗体を使用してもよい。下記に示すとおり、本明細書において開示するADC中のリンカー-毒素は、種々の腫瘍抗原標的化抗体で、意外にも有効である。抗体が指向し、健康な細胞上ではなく、腫瘍細胞上に発現されるか、または健康な細胞上においてよりも高いレベルで腫瘍細胞上に発現される適切な抗原は、当技術分野で公知である。これらの抗体を、本明細書において開示するリンカー及び毒素（例えば、エリブリン）と共に使用することができる。一部の実施形態では、抗体部分は、FRAを標的とする。一部の実施形態では、FRA標的化抗体部分は、MORA b - 003である。一部の実施形態では、本開示のリンカー及び毒素（エリブリン）は、複数の異なる腫瘍標的化抗体で意外にも有効であり、MORA b - 003などのFRA標的化抗体部分は、薬物：抗体比、腫瘍標的化、パイスタンダー死滅、処置有効性の具体的な改善、及びオフターゲット死滅の減少をもたらした。処置有効性の改善は、インビトロまたはインビボで測定することができ、腫瘍増殖速度の減少及び/または腫瘍体積の減少を含み得る。

【0128】

特定の実施形態では、他の抗原標的に対する抗体を使用し、それは、MORA b - 003などのFRA標的化抗体部分を含むADCの好ましい機能特性の少なくとも一部（例えば、薬物：抗体比の改善、処置有効性の改善、オフターゲット死滅の減少など）を提供する。一部の実施形態では、本開示のリンカー及び毒素（エリブリン）をトラスツズマブなどのher2標的化抗体部分にコンジュゲートした場合に、これらの好ましい機能特性の一部または全部が観察される。一部の実施形態では、抗体部分は、her2を標的とする。一部の実施形態では、her2標的化抗体部分は、トラスツズマブである。一部の実施形態では、本開示のリンカー及び毒素（エリブリン）をMORA b - 009などのMSLN標的化抗体部分にコンジュゲートした場合に、これらの好ましい機能特性の一部または全部が観察される。一部の実施形態では、抗体部分は、MSLNを標的とする。一部の実施形態では、MSLN標的化抗体部分は、MORA b - 009である。

【0129】

リンカー

様々な実施形態で、ADC中のリンカーは、十分に治療上有効であるように、細胞外で安定している。一部の実施形態では、リンカーは、細胞外で安定しているため、ADCは、細胞外条件で存在する場合（例えば、細胞への輸送または送達前）にはインタクトなままである。ADCの文脈で使用される「インタクト」という用語は、抗体部分が薬物部分に結合したままであることを意味する。本明細書で使用する場合、リンカーまたはリンカーを含むADCの文脈での「安定な」は、ADCが細胞外条件下に存在する場合に、ADCのサンプル中の20%以下、約15%以下、約10%以下、約5%以下、約3%以下、または約1%以下のリンカー（またはその間の任意のパーセンテージ）が切断されていること（または、全ADCが別段にインタクトではないケース）を意味する。

【0130】

リンカーが細胞外で安定であるかどうかは、例えば、ADCを血漿中に所定の期間（例えば、2、4、6、8、16、または24時間）にわたって入れ、次いで、血漿中に存在する遊離の薬物部分の量を定量化することにより決定することができる。安定性は、ADC期間が標的腫瘍細胞に局在化することを可能にし、正常及び腫瘍組織の両方に無差別に損傷を与えることによりADCの治療指数を低下させるであろう薬物の早期放出を防ぐことができる。一部の実施形態では、リンカーは、標的細胞の外側では安定しているが、細

胞の内側では、ADCから薬物部分を放出するので、薬物部分は、その標的に（例えば、微小管に）に結合することができる。したがって、有効なリンカーは：（i）抗体部分の特異的結合特性を維持する；（ii）抗体部分への安定な結合を介して薬物部分の送達、例えば、細胞内送達を可能にする；（iii）ADCがその標的部位に輸送または送達されるまで、安定していて、かつインタクトなままである；及び（iv）切断後の薬物部分の治療効果、例えば、細胞傷害効果を可能にする。

【0131】

リンカーは、ADCの物理化学的特性に影響を及ぼし得る。多くの細胞傷害性薬物が本来は疎水性であるので、それらを、追加の疎水性部分を有する抗体と結合することは、凝集をもたらす。ADC凝集物は不溶性であり、多くの場合に、抗体上で達成可能な薬物負荷を制限し、このことは、ADCの効力にマイナスの影響を及ぼし得る。生物製剤のタンパク質凝集は一般に、免疫原性の上昇にもつながっている。下に示すとおり、本明細書において開示するリンカーは、低い凝集レベル及び望ましいレベルの薬物負荷を有するADCをもたらす。

10

【0132】

リンカーは、「切断可能」または「切断不可能」であってよい（Ducry and Stump, *Bioconjugate Chem.* (2010) 21:5-13）。切断可能なリンカーは、特定の環境因子に曝露されると、例えば、標的細胞内に内在化されると、薬物を放出するように設計され、切断不可能なリンカーは一般に、抗体部分自体の分解に依存する。

20

【0133】

一部の実施形態では、リンカーは、切断不可能なリンカーである。一部の実施形態では、ADCの薬物部分は、抗体部分の分解により放出される。切断不可能なリンカーは、標的細胞による内在化及びその内部での分解で、抗体の少なくとも1個のアミノ酸及び薬物と共有結合で会合したままになる傾向がある。切断不可能なリンカーは一般に、それぞれ、薬物または抗体上のチオール基と、抗体または薬物上のマレイミドまたはハロアセトアミド基とのコンジュゲーションにより調製されるチオエーテル結合を含む（Goldmacher et al., *In Cancer Drug Discovery and Development: Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins* (G.L. Phillips ed., Springer, 2013)）。例示的な切断不可能なリンカーは、チオエーテル、シクロヘキシル、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(SMCC)、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、または1種もしくは複数のポリエチレングリコール(PEG)部分、例えば、1、2、3、4、5、または6つのPEG部分を含む。一部の実施形態では、切断不可能なリンカーは、(PEG)₂を含む。他の実施形態では、切断不可能なリンカーは、(PEG)₄を含む。

30

【0134】

一部の実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカーである。切断可能なリンカーは、切断可能な部分を含む任意のリンカーを指す。本明細書で使用する場合、「切断可能な部分」という用語は、切断され得る任意の化学結合を指す。適切な切断可能な化学結合は、当技術分野で周知であり、それらには、これらだけに限定されないが、酸不安定結合、プロテアーゼ/ペプチダーゼ不安定結合、光不安定結合、ジスルフィド結合、及びエステラーゼ不安定結合が含まれる。切断可能な部分を含むリンカーは、リンカー内の特定部分での切断により、ADCからの薬物部分の放出を可能にし得る。様々な実施形態で、結合した毒素からの抗体の切断が、毒素の活性を活性化または増加させる。一部の実施形態では、切断可能なリンカー（例えば、Val-Citリンカー）を含むADCは、切断不可能なリンカー（例えば、切断不可能な(PEG)₂または(PEG)₄リンカー）を含むADCと比較すると、オンターゲット細胞死滅の増加及び/またはオフターゲット細胞死滅の減少を実証する。一部の実施形態では、ADCで処置される細胞及び/またはがんが高レベルの標的抗原（例えば、FRAまたはher2）を発現しない場合に、切断可能な

40

50

リンカーを含むADCは、切断不可能なリンカーを含むADCに対して、処置有効性の改善を示す。一部の実施形態では、結合した毒素からの抗体の切断は、インビトロ及び/またはインビボで測定すると、ADCの処置有効性の改善を達成するために必要である。

【0135】

一部の実施形態では、リンカーの切断が、細胞内環境で抗体部分から薬物部分を十分に放出して、薬物を活性化し、かつ/または薬物を治療上有効にするように、リンカーは、細胞内条件下で切断可能である。一部の実施形態では、薬物部分は、ADCがADCの抗体部分に特異的な抗原を発現する細胞に進入するまで、抗体部分から切断されず、薬物部分は、細胞に進入すると、抗体部分から切断される。一部の実施形態では、リンカーは、切断されると、薬物部分に結合したままになっているリンカーの一部または抗体部分がないように配置されている切断可能な部分を含む。例示的な切断可能なリンカーには、酸不安定リンカー、プロテアーゼ/ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定リンカー、ジメチル-、ジスルフィド-、またはスルホンアミド含有リンカーが含まれる。

10

【0136】

一部の実施形態では、リンカーは、pH感受性リンカーであり、特定のpH値での加水分解に対して感受性がある。典型的には、pH感受性リンカーは、酸性条件下で切断可能である。この切断戦略は一般に、リンカー内の酸不安定基、例えば、ヒドラゾンの加水分解を開始させるために、サイトゾル(pH約7.4)と比較すると、エンドソーム(pH約5~6)及びリソソーム(pH約4.8)細胞内コンパートメントでの低いpHを利用する(Jain et al. (2015) Pharm Res 32:3526-40)。

一部の実施形態では、リンカーは、酸不安定及び/または加水分解不安定リンカーである。例えば、リソソームで加水分解可能であり、酸不安定基(例えば、ヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、シス-アコニット酸アミド、オルトエステル、アセタール、ケタールなど)を含有する酸不安定リンカーを使用することができる。例えば、米国特許第5,122,368号;同第5,824,805号;同第5,622,929号;Dubowchik and Walker (1999) Pharm. Therapeutics 83:67-123;Neville et al. (1989) Biol. Chem. 264:14653-61を参照されたい。そのようなリンカーは、血液中の条件などの中性pH条件下では、比較的安定しているが、リソソームのおおよそのpHであるpH5.5または5.0未満では不安定である。特定の実施形態では、加水分解可能なリンカーは、チオエーテルリンカー(例えば、アシルヒドラゾン結合を介して治療薬に結合しているチオエーテルなど)である。例えば、米国特許第5,622,929号を参照されたい。

20

30

【0137】

一部の実施形態では、リンカーは、還元条件下で切断可能である。一部の実施形態では、リンカーは、グルタチオンまたはジチオスレイトールなどの還元剤の存在下で、切断可能である。一部の実施形態では、リンカーは、切断可能なジスルフィドリンカーまたは切断可能なスルホンアミドリンカーである。

【0138】

一部の実施形態では、リンカーは、切断可能なジスルフィドリンカーである。様々なジスルフィドリンカーは、当技術分野で公知であり、それには、例えば、SATA(N-スクシンイミジル-5-アセチルチオアセタート)、SPDP(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート)、SPDB(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)ブチラート)及びSMPT(N-スクシンイミジロキシカルボニル-アルファ-メチル-アルファ-(2-ピリジル-ジチオ)トルエン)、SPDB及びSMPTを使用して形成され得るものが含まれる。例えば、Thorpe et al. (1987) Cancer Res. 47:5924-31; Wawrzynczak et al., In Immunconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (C.W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987)を参照され

40

50

たい。米国特許第4,880,935号も参照されたい。ジスルフィドリンカーを典型的には使用して、それらのジスルフィド結合の切断を促進し得る豊富な細胞内チオールを利用する。最も豊富な細胞内チオール、還元型グルタチオンの細胞内濃度は一般に、1~10nMの範囲であり、これは、約5 μ Mである血液中で最も豊富な低分子チオール(すなわち、システイン)の濃度よりも約1,000倍高い(Goldmacher et al., In Cancer Drug Discovery and Development: Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins (G.L. Phillips ed., Springer, 2013))。タンパク質ジスルフィドイソメラーゼファミリーの細胞内酵素も、ジスルフィドリンカーの細胞内切断に寄与し得る。本明細書で使用する場合、切断可能なジスルフィドリンカーは、切断可能なジスルフィド部分を含む任意のリンカーを指す。「切断可能なジスルフィド部分」という用語は、例えば、チオールまたは酵素により切断及び/または還元することができるジスルフィド結合を指す。一部の実施形態では、切断可能なジスルフィド部分は、ジスルフィジル-ジメチルである。

【0139】

一部の実施形態では、リンカーは、切断可能なスルホンアミドリンカーである。本明細書で使用する場合、切断可能なスルホンアミドリンカーは、切断可能なスルホンアミド部分を含む任意のリンカーを指す。「切断可能なスルホンアミド部分」という用語は、スルホンアミド基、すなわち、アミン基に結合しているスルホニル基を指し、この場合、硫黄-窒素結合が切断され得る。

【0140】

一部の実施形態では、リンカーは、分枝多官能性リンカー部分を介して、1つよりも多い薬物部分を抗体部分に共有結合するための樹状型のリンカーであってもよい。例えば、Sun et al. (2002) Bioorg. Med. Chem. Lett. 12: 2213-5; Sun et al. (2003) Bioorg. Med. Chem. 11: 1761-8を参照されたい。樹状リンカーは、ADCの効力に関連する、抗体に対する薬物のモル比、すなわち、薬物負荷を増加させ得る。したがって、抗体部分が反応性システインチオール基を1個しか持たない場合に、例えば、多数の薬物部分を、樹状リンカーを介して結合することができる。一部の実施形態では、リンカー部分またはリンカー-薬物部分は、還元型ジスルフィド架橋ケミストリーまたは限定的リシン利用技術により、抗体に結合することができる。例えば、国際公開番号WO2013173391及びWO2013173393を参照されたい。

【0141】

一部の実施形態では、リンカーは、細胞内環境(例えば、リソソームまたはエンドソームまたはカベオラ内)に存在する切断作用物質、例えば、酵素により切断可能である。リンカーは、例えば、これらだけに限定されないが、リソソームまたはエンドソームのプロテアーゼを含む、細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素により切断されるペプチドリンカーであってもよい。一部の実施形態では、リンカーは、切断可能なペプチドリンカーである。本明細書で使用する場合、切断可能なペプチドリンカーは、切断可能なペプチド部分を含む任意のリンカーを指す。「切断可能なペプチド部分」という用語は、細胞内環境に存在する作用物質により切断され得る任意の化学結合架橋性アミノ酸(天然または合成アミノ酸誘導体)を指す。例えば、リンカーは、カテプシン、例えば、カテプシンBなどのペプチダーゼにより切断可能であるアラニン-アラニン-アスパラギン(Ala-Ala-Asn)配列またはバリン-シトルリン(Val-Cit)配列を含み得る。

【0142】

一部の実施形態では、リンカーは、酵素切断可能なリンカーであり、リンカー内の切断可能なペプチド部分は、酵素により切断可能である。一部の実施形態では、切断可能なペプチド部分は、リソソームの酵素、例えば、カテプシンにより切断可能である。一部の実施形態では、リンカーは、カテプシン切断可能なリンカーである。一部の実施形態では、リンカー内の切断可能なペプチド部分は、リソソームのシステインカテプシン、例えば、

10

20

30

40

50

カテプシン B、C、F、H、K、L、O、S、V、X、またはWにより切断可能である。一部の実施形態では、切断可能なペプチド部分は、カテプシン B により切断可能である。カテプシン B により切断され得る例示的なジペプチドは、バリン - シトルリン (Val - Cit) (Dubowchik et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13: 855 - 69) である。一部の実施形態では、切断可能なペプチド部分を含む ADC は、代替の切断可能な部分 (例えば、切断可能なジスルフィド部分または切断可能なスルホンアミド部分) を含む ADC に対して、低い凝集レベル及び/または高い薬物負荷 (p) を実証する。

【0143】

一部の実施形態では、リンカーまたはリンカー内の切断可能なペプチド部分は、アミノ酸ユニットを含む。一部の実施形態では、アミノ酸ユニットは、1種または複数の細胞内プロテアーゼ、例えば、1種または複数のリソソームの酵素に曝露されると、プロテアーゼによるリンカーの切断を可能にし、それにより、ADC からの薬物部分の放出を促進する (Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21: 778 - 84; Dubowchik and Walker (1999) Pharm. Therapeutics 83: 67 - 123)。例示的なアミノ酸ユニットには、これらだけに限定されないが、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。例示的なジペプチドには、これらだけに限定されないが、バリン - シトルリン (Val - Cit)、アラニン - アスパラギン (Ala - Asn)、アラニン - フェニルアラニン (Ala - Phe)、フェニルアラニン - リシン (Phe - Lys)、アラニン - リシン (Ala - Lys)、アラニン - バリン (Ala - Val)、バリン - アラニン (Val - Ala)、バリン - リシン (Val - Lys)、リシン - リシン (Lys - Lys)、フェニルアラニン - シトルリン (Phe - Cit)、ロイシン - シトルリン (Leu - Cit)、イソロイシン - シトルリン (Ile - Cit)、トリプトファン - シトルリン (Trp - Cit)、及びフェニルアラニン - アラニン (Phe - Ala) が含まれる。例示的なトリペプチドには、これらだけに限定されないが、アラニン - アラニン - アスパラギン (Ala - Ala - Asn)、グリシン - バリン - シトルリン (Gly - Val - Cit)、グリシン - グリシン - グリシン (Gly - Gly - Gly)、フェニルアラニン - フェニルアラニン - リシン (Phe - Phe - Lys)、及びグリシン - フェニルアラニン - リシン (Gly - Phe - Lys) が含まれる。他の例示的なアミノ酸ユニットには、これらだけに限定されないが、例えば、米国特許第 6, 214, 345 号に記載されているとおりの Gly - Phe - Leu - Gly、Ala - Leu - Ala - Leu、Phe - N⁹ - tosyl - Arg、及び Phe - N⁹ - ニトロ - Arg が含まれる。一部の実施形態では、リンカー内のアミノ酸ユニットは、Val - Cit を含む。一部の実施形態では、リンカー内のアミノ酸ユニットは、Ala - Ala - Asn を含む。一部の実施形態では、Val - Cit を含む ADC は、代替のアミノ酸ユニットまたは代替の切断可能な部分を含む ADC に対して、オフターゲット細胞死滅の減少、オンターゲット細胞死滅の増加、低い凝集レベル、及び/または高い薬物負荷 (p) を実証する。アミノ酸ユニットは、天然に存在するアミノ酸残基及び/または微量アミノ酸及び/または天然に存在しないアミノ酸類似体、例えば、シトルリンを含んでよい。アミノ酸ユニットは、特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、リソソームのプロテアーゼ、例えば、カテプシン B、C、D、または S、またはプラスミンプロテアーゼによる酵素的開裂のために設計及び最適化され得る。

【0144】

一部の実施形態では、本明細書において開示する ADC のいずれかにおけるリンカーは、抗体部分を薬物部分に接続する少なくとも 1 個のスペーサーユニットを含んでよい。一部の実施形態では、スペーサーユニットは、リンカー内の切断部位 (例えば、切断可能なペプチド部分) を抗体部分に接続する。一部の実施形態では、リンカー、及び/またはリンカー内のスペーサーユニットは、実質的に親水性である。親水性リンカーを使用すると、薬物が多剤耐性 (MDR) または機能的に同様の輸送体により抵抗性がん細胞から排出

10

20

30

40

50

される程度を低下させることができる。一部の態様では、リンカーは、1つまたは複数のポリエチレングリコール (P E G) 部分、例えば、1、2、3、4、5、または6つの P E G 部分を含む。一部の実施形態では、リンカーは、短い P E G リンカーであり、長い P E G リンカーよりも、安定性の改善及び凝集の減少をもたらす。

【 0 1 4 5 】

一部の実施形態では、リンカー内のスペーサーユニットは、1つまたは複数の P E G 部分を含む。一部の実施形態では、スペーサーユニットは、 $-(P E G)_m-$ を含み、 m は、1 ~ 10の整数である。一部の実施形態では、 m は、1 ~ 10 ; 2 ~ 8 ; 2 ~ 6 ; 2 ~ 5 ; 2 ~ 4 ; または2 ~ 3の範囲である。一部の実施形態では、 m は、8である。一部の実施形態では、 m は、4である。一部の実施形態では、 m は、3である。一部の実施形態では、 m は、2である。一部の実施形態では、スペーサーユニットは、 $(P E G)_2$ 、 $(P E G)_4$ 、 $(P E G)_8$ 、 $(P E G)_9$ 、 $(P E G)_3$ -トリアゾール- $(P E G)_3$ 、 $(P E G)_4$ -トリアゾール- $(P E G)_3$ 、またはジベンジルシクロオクテン-トリアゾール- $(P E G)_3$ を含む。一部の好ましい実施形態では、スペーサーユニットは、 $(P E G)_2$ を含む。一部の実施形態では、短いスペーサーユニット (例えば、 $(P E G)_2$) を含む A D C は、長いスペーサーユニット (例えば、 $(P E G)_8$) を含む A D C に対して、低い凝集レベル及び/または高い薬物負荷 (p) を実証する。

10

【 0 1 4 6 】

一部の実施形態では、リンカー内のスペーサーユニットは、アルキル部分を含む。一部の実施形態では、スペーサーユニットは、 $-(C H_2)_n-$ を含み、 n は、1 ~ 10の整数である (すなわち、 n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であってよい)。一部の実施形態では、 n は、5である。一部の実施形態では、短いスペーサーユニット (例えば、 $(C H_2)_5$) を含む A D C は、長いスペーサーユニット (例えば、 $(P E G)_8$) を含む A D C に対して、低い凝集レベル及び/または高い薬物負荷 (p) を実証する。

20

【 0 1 4 7 】

スペーサーユニットは、例えば、抗体部分を薬物部分に、直接的または間接的に結合するために使用することができる。一部の実施形態では、スペーサーユニットは、抗体部分を薬物部分に直接的に結合する。一部の実施形態では、抗体部分及び薬物部分は、1つまたは複数の P E G 部分 (例えば、 $(P E G)_2$ または $(P E G)_4$) を含むスペーサーユニットを介して結合する。一部の実施形態では、スペーサーユニットは、抗体部分を薬物部分に間接的に結合する。一部の実施形態では、スペーサーユニットは、抗体部分を、切断可能な部分 (例えば、切断可能なペプチド、切断可能なジスルフィド、または切断可能なスルホンアミド) 及び/またはスペーサーユニットを抗体部分に接続する結合部分、例えば、マレイミド部分を介して、薬物部分に間接的に結合する。

30

【 0 1 4 8 】

スペーサーユニットは、様々な実施形態で、マレイミド部分 (M a l) を介して抗体部分 (すなわち、抗体または抗原結合性断片) に結合する。一部の実施形態では、マレイミド部分を介して抗体部分に結合しているリンカーを含む A D C は、スクシンイミド部分などの代替の結合部分を介して、抗体部分に結合しているリンカーを含む A D C に対して、高い薬物負荷 (p) を実証する。

40

【 0 1 4 9 】

M a l を介して抗体または抗原結合性断片に結合しているスペーサーユニットは、本明細書では、「M a l - スペーサーユニット」と称される。「マレイミド部分」という用語は、本明細書で使用する場合、マレイミド基を含有し、かつスルフヒドリル基、例えば、抗体部分の上のシステイン残基のスルフヒドリル基と反応性である化合物を意味する。スルフヒドリル基 (チオール) と反応性である他の官能基には、これらだけに限定されないが、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、イソシアナート、及びイソチオシアナートが含まれる。一部の実施形態では、M a l - スペーサーユニットは、抗体または抗原結合性断片の上のシステイン残基

50

と反応性である。一部の実施形態では、M a l - スペーサーユニットは、システイン残基を介して抗体または抗原結合性断片に接続する。一部の実施形態では、M a l - スペーサーユニットは、P E G 部分を含む。一部の実施形態では、M a l - スペーサーユニットは、アルキル部分を含む。

【0150】

特定の実施形態では、リンカーは、M a l - スペーサーユニット及び切断可能なペプチド部分を含む。一部の実施形態では、切断可能なペプチド部分は、アミノ酸ユニットを含む。一部の実施形態では、アミノ酸ユニットは、V a l - C i t を含む。一部の実施形態では、アミノ酸ユニットは、A l a - A l a - A s n を含む。一部の実施形態では、リンカーは、M a l - スペーサーユニット及び V a l - C i t を含む。一部の実施形態では、リンカーは、M a l - (P E G)₂ 及び V a l - C i t を含む。一部の実施形態では、リンカーは、M a l - (P E G)_m 及び V a l - C i t を含み、m は、2 ~ 8 または 2 ~ 5、または 2、3、4、または 5 である。一部の実施形態では、リンカーは、M a l - (P E G)₈ 及び V a l - C i t を含む。特定の実施形態では、リンカーは、M a l - (C H₂)₅ 及び V a l - C i t を含む。一部の実施形態では、リンカーは、M a l - スペーサーユニット及び A l a - A l a - A s n を含む。一部の実施形態では、リンカーは、M a l - (P E G)₂ 及び A l a - A l a - A s n を含む。

10

【0151】

一部の実施形態では、リンカーは、M a l - スペーサーユニット及び切断可能なジスルフィド部分を含む。一部の実施形態では、切断可能なジスルフィド部分は、ジスルフィジル - ジメチルである。一部の実施形態では、リンカーは、M a l - スペーサーユニット及びジスルフィジル - ジメチルを含む。一部の実施形態では、リンカーは、M a l - (P E G)₄ - トリアゾール - (P E G)₃ 及びジスルフィジル - ジメチルを含む。

20

【0152】

一部の実施形態では、リンカーは、M a l - スペーサーユニット及び切断可能なスルホンアミド部分を含む。一部の実施形態では、リンカーは、M a l - (P E G)₄ - トリアゾール - (P E G)₃ 及びスルホンアミドを含む。

【0153】

様々な実施形態で、スペーサーユニットは、スクシンイミド部分 (O S u) を介して、抗体または抗原結合性断片に結合する。O S u を介して抗体または抗原結合性断片に結合するスペーサーユニットは、本明細書では、「O S u - スペーサーユニット」と称される。「スクシンイミド部分」という用語は、本明細書で使用する場合、アミン基、例えば、抗体部分の上のリシン残基のアミン基と反応性であるスクシンイミド化合物を含有する化合物を意味する。例示的なスクシンイミド部分は、N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) である。一部の実施形態では、O S u - スペーサーユニットは、抗体または抗原結合性断片の上のリシン残基と反応性である。一部の実施形態では、O S u - スペーサーユニットは、リシン残基を介して抗体または抗原結合性断片に接続する。一部の実施形態では、O S u - スペーサーユニットは、P E G 部分を含む。一部の実施形態では、O S u - スペーサーユニットは、アルキル部分を含む。

30

【0154】

特定の実施形態では、リンカーは、O S u - スペーサーユニット及び切断可能なペプチド部分を含む。一部の実施形態では、切断可能なペプチド部分は、アミノ酸ユニットを含む。一部の実施形態では、アミノ酸ユニットは、V a l - C i t を含む。一部の実施形態では、アミノ酸ユニットは、A l a - A l a - A s n を含む。一部の実施形態では、リンカーは、O S u - スペーサーユニット及び V a l - C i t を含む。一部の実施形態では、リンカーは、O S u - (P E G)₂ 及び V a l - C i t を含む。他の実施形態では、リンカーは、O S u - (P E G)₉ 及び V a l - C i t を含む。他の実施形態では、リンカーは、O S u - (C H₂)₅ 及び V a l - C i t を含む。特定の実施形態では、リンカーは、O S u - (P E G)₃ - トリアゾール - (P E G)₃ 及び V a l - C i t を含む。一部の実施形態では、リンカーは、O S u - スペーサーユニット及び A l a - A l a - A s n

40

50

を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $OSu - (PEG)_2$ 及び $Ala - Ala - Asn$ を含む。

【0155】

一部の実施形態では、リンカーは、 OSu - スペーサーユニット及び切断可能なジスルフィド部分を含む。一部の実施形態では、切断可能なジスルフィド部分は、ジスルフィジル - ジメチルである。一部の実施形態では、リンカーは、 OSu - スペーサーユニット及びジスルフィジル - ジメチルを含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $OSu - (PEG)_3$ - トリアゾール - $(PEG)_3$ 及びジスルフィジル - ジメチルを含む。他の実施形態では、リンカーは、 OSu - ジベンジルシクロオクテン - トリアゾール - $(PEG)_3$ 及びジスルフィジル - ジメチルを含む。

10

【0156】

一部の実施形態では、リンカーは、 OSu - スペーサーユニット及び切断可能なスルホンアミド部分を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $OSu - (PEG)_3$ - トリアゾール - $(PEG)_3$ 及びスルホンアミドを含む。他の実施形態では、リンカーは、 OSu - ジベンジルシクロオクテン - トリアゾール - $(PEG)_3$ 及びスルホンアミドを含む。

【0157】

一部の実施形態では、 Mal - スペーサーユニットまたは OSu - スペーサーユニットは、抗体部分（すなわち、抗体または抗原結合性断片）をリンカー内の切断可能な部分に結合する。一部の実施形態では、 Mal - スペーサーユニットまたは OSu - スペーサーユニットは、抗体または抗原結合性断片を切断可能なペプチド部分に結合する。一部の実施形態では、切断可能なペプチド部分は、アミノ酸ユニットを含む。一部の実施形態では、リンカーは、 Mal - スペーサーユニット - アミノ酸ユニットまたは OSu - スペーサーユニット - アミノ酸ユニットを含む。一部の実施形態では、 Mal - スペーサーユニットまたは OSu - スペーサーユニットは、 PEG 部分を含む。一部の実施形態では、 Mal - スペーサーユニットまたは OSu - スペーサーユニットは、アルキル部分を含む。一部の実施形態では、アミノ酸ユニットは、 $Val - Cit$ を含む。他の実施形態では、アミノ酸ユニットは、 $Ala - Ala - Asn$ を含む。

20

【0158】

一部の実施形態では、リンカーは、構造： Mal - スペーサーユニット - $Val - Cit$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、構造： $Mal - (PEG)_2 - Val - Cit$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、構造： $Mal - (PEG)_2 - Val - Cit - pAB$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $Mal - (PEG)_8 - Val - Cit$ を含む。特定の実施形態では、リンカーは、 $Mal - (CH_2)_5 - Val - Cit$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 Mal - スペーサーユニット - $Ala - Ala - Asn$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $Mal - (PEG)_2 - Ala - Ala - Asn$ を含む。

30

【0159】

一部の実施形態では、リンカーは、 OSu - スペーサーユニット - $Val - Cit$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $OSu - (PEG)_2 - Val - Cit$ を含む。他の実施形態では、リンカーは、 $OSu - (PEG)_9 - Val - Cit$ を含む。他の実施形態では、リンカーは、 $OSu - (CH_2)_5 - Val - Cit$ を含む。他の実施形態では、リンカーは、 $OSu - (PEG)_3$ - トリアゾール - $(PEG)_3 - Val - Cit$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 OSu - スペーサーユニット - $Ala - Ala - Asn$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $OSu - (PEG)_2 - Ala - Ala - Asn$ を含む。

40

【0160】

様々な実施形態で、 Mal - スペーサーユニットまたは OSu - スペーサーユニットは、抗体または抗原結合性断片を、切断可能なジスルフィド部分に結合する。一部の実施形態では、リンカーは、 Mal - スペーサーユニット - ジスルフィドまたは OSu - スペーサーユニット - ジスルフィドを含む。一部の実施形態では、ジスルフィドは、ジスルフィ

50

ジル - ジメチルである。一部の実施形態では、リンカーは、M a l - スペーサーユニット - ジスルフィジル - ジメチルを含む。一部の実施形態では、リンカーは、M a l - (P E G)₄ - トリアゾール - (P E G)₃ - ジスルフィジル - ジメチルを含む。他の実施形態では、リンカーは、O S u - スペーサーユニット - ジスルフィジル - ジメチルを含む。一部の実施形態では、リンカーは、O S u - (P E G)₃ - トリアゾール - (P E G)₃ - ジスルフィジル - ジメチルを含む。他の実施形態では、リンカーは、O S u - ジベンジルシクロオクテン - トリアゾール - (P E G)₃ - ジスルフィジル - ジメチルを含む。

【 0 1 6 1 】

特定の実施形態では、M a l - スペーサーユニットまたはO S u - スペーサーユニットは、抗体または抗原結合性断片を切断可能なスルホンアミド部分に結合する。一部の実施形態では、リンカーは、M a l - スペーサーユニット - スルホンアミドまたはO S u - スペーサーユニット - スルホンアミドを含む。一部の実施形態では、リンカーは、M a l - (P E G)₄ - トリアゾール - (P E G)₃ - スルホンアミドを含む。一部の実施形態では、リンカーは、O S u - (P E G)₃ - トリアゾール - (P E G)₃ - スルホンアミドを含む。他の実施形態では、リンカーは、O S u - ジベンジルシクロオクテン - トリアゾール - (P E G)₃ - スルホンアミドを含む。

10

【 0 1 6 2 】

様々な実施形態で、リンカー内の切断可能な部分は、薬物部分に直接的に接続する。他の実施形態では、別のスペーサーユニットを使用して、リンカー内の切断可能な部分を薬物部分に結合する。様々な実施形態で、薬物部分は、エリブリンである。様々な実施形態で、エリブリンは、スペーサーユニットにより、リンカー内の切断可能な部分に結合する。一部の実施形態では、エリブリンは、自壊性スペーサーユニットにより、リンカー内の切断可能な部分に結合する。特定の実施形態では、エリブリンは、自壊性スペーサーユニットにより、リンカー内の切断可能な部分に結合し、切断可能な部分は、V a l - C i t を含み、P E G を含むさらなるスペーサーユニットは、切断可能な部分を抗体部分に接続する。特定の実施形態では、エリブリンは、V a l - C i t 切断可能な部分及びp A B 自壊性スペーサーユニットに接続しているリンカー内のM a l - スペーサーユニットを介して、抗F R A 抗体に接続する。特定の他の実施形態では、エリブリンは、V a l - C i t 切断可能な部分及びp A B 自壊性スペーサーユニットに接続するリンカー内のM a l - スペーサーユニットを介して、抗h e r 2 抗体に接続する。

20

30

【 0 1 6 3 】

スペーサーユニットは、「自壊性」または「非自壊性」であってよい。「非自壊性」スペーサーユニットは、リンカーが切断された際に、スペーサーユニットの一部または全部が、薬物部分に結合したままであるものである。非自壊性スペーサーユニットの例には、これらだけに限定されないが、グリシンスペーサーユニット及びグリシン - グリシンスペーサーユニットが含まれる。非自壊性スペーサーユニットは最終的には経時的に分解し得るが、細胞条件下では、結合した本来の薬物を完全には容易に放出しない。「自壊性」スペーサーユニットは、細胞内条件下で、本来の薬物部分の放出を可能にする。「本来の薬物」は、スペーサーユニットまたは他の化学的修飾部分の一部が、スペーサーユニットの切断 / 分解後に残らないものである。

40

【 0 1 6 4 】

自壊ケミストリーは、当技術分野で公知であり、本開示のA D C のために容易に選択され得る。様々な実施形態で、リンカー内の切断可能な部分を薬物部分（例えば、エリブリン）に結合するスペーサーユニットは、自壊性であり、細胞内条件下での切断可能な部分の切断と同時に、またはその直前 / 直後に自壊する。

【 0 1 6 5 】

特定の実施形態では、リンカー内の自壊性スペーサーユニットは、p - アミノベンジルユニットを含む。一部の実施形態では、p - アミノベンジルアルコール（p A B O H）は、アミド結合を介して、リンカー内のアミノ酸ユニットまたは他の切断可能な部分に結合し、カルバマート、メチルカルバマート、またはカルボナートが、p A B O H と薬物部分

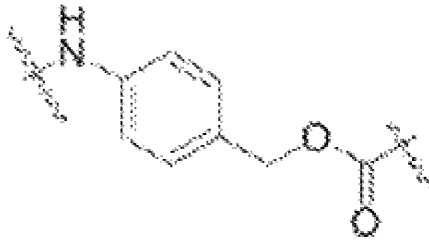
50

との間に作製される (Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents 15:1087-103)。一部の実施形態では、自壊性スパーサーユニットは、p-アミノベンジルオキシカルボニル (pAB) であるか、またはそれを含む。理論に束縛されることはないが、pABの自壊は、自発的な1,6-除去反応に関係すると考えられる (Jain et al. (2015) Pharm Res 32:3526-40)。

【0166】

様々な実施形態で、本開示のADCで使用されるp-アミノベンジルオキシカルボニル (pAB) の構造は、下式で示される：

【化1】



p-アミノ-ベンジルオキシカルボニル

10

【0167】

様々な実施形態で、自壊性スパーサーユニットは、リンカー内の切断可能な部分をエリブリンの上のC-35アミンに結合する。一部の実施形態では、自壊性スパーサーユニットは、pABである。一部の実施形態では、pABは、リンカー内の切断可能な部分を、エリブリンの上のC-35アミンに結合する。一部の実施形態では、pABは、切断可能な部分が切断されると自壊して、エリブリンが、ADCから、その本来の活性形態で放出される。一部の実施形態では、抗FRA抗体 (例えば、MORAb-003) は、Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pABを含むリンカーにより、エリブリンのC-35アミンに接続される。他の実施形態では、抗HER2抗体 (例えば、トラスツズマブ) は、Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pABを含むリンカーにより、エリブリンのC-35アミンに接続される。

20

30

【0168】

一部の実施形態では、pABは、リンカー内の切断可能なペプチド部分が切断されると、自壊する。一部の実施形態では、切断可能なペプチド部分は、アミノ酸ユニットを含む。一部の実施形態では、リンカーは、アミノ酸ユニット-pABを含む。一部の実施形態では、アミノ酸ユニットは、Val-Citである。一部の実施形態では、リンカーは、Val-Cit-pAB (VCP) を含む。特定の実施形態では、アミノ酸ユニットは、Ala-Ala-Asnである。一部の実施形態では、リンカーは、Ala-Ala-Asn-pABを含む。

【0169】

一部の実施形態では、pABは、リンカー内の切断可能なジスルフィド部分が切断されると、自壊する。一部の実施形態では、リンカーは、ジスルフィド-pABを含む。一部の実施形態では、リンカーは、ジスルフィジル-ジメチル-pABを含む。

40

【0170】

一部の実施形態では、pABは、リンカー内の切断可能なスルホンアミド部分が切断されると、自壊する。一部の実施形態では、リンカーは、スルホンアミド-pABを含む。

【0171】

様々な態様で、ADCの抗体部分は、リンカーを介して、薬物部分にコンジュゲートし、その際、リンカーは、Mal-スパーサーユニット、切断可能なアミノ酸ユニット、及びpABを含む。一部の実施形態では、スパーサーユニットは、PEG部分を含む。一部

50

の実施形態では、スペーサーユニットは、アルキル部分を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{Mal} - (\text{PEG})_2 - \text{アミノ酸ユニット} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{Mal} - (\text{PEG})_2 - \text{Val} - \text{Cit} - \text{pAB}$ を含む。他の実施形態では、リンカーは、 $\text{Mal} - (\text{PEG})_2 - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Asn} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{Mal} - (\text{PEG})_8 - \text{アミノ酸ユニット} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{Mal} - (\text{PEG})_8 - \text{Val} - \text{Cit} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{Mal} - (\text{CH}_2)_5 - \text{アミノ酸ユニット} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{Mal} - (\text{CH}_2)_5 - \text{Val} - \text{Cit} - \text{pAB}$ を含む。

【0172】

様々な実施形態で、ADCの抗体部分は、リンカーを介して薬物部分にコンジュゲートしており、その際、リンカーは、 $\text{Mal} - \text{スペーサーユニット} - \text{ジスルフィド} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、スペーサーユニットは、PEG部分を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{Mal} - (\text{PEG})_4 - \text{トリアゾール} - (\text{PEG})_3 - \text{ジスルフィド} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{Mal} - (\text{PEG})_4 - \text{トリアゾール} - (\text{PEG})_3 - \text{ジスルフィジル} - \text{ジメチル} - \text{pAB}$ を含む。

【0173】

一部の実施形態では、ADCの抗体部分は、リンカーを介して薬物部分にコンジュゲートしており、その際、リンカーは、 $\text{Mal} - \text{スペーサーユニット} - \text{スルホンアミド} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、スペーサーユニットは、PEG部分を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{Mal} - (\text{PEG})_4 - \text{トリアゾール} - (\text{PEG})_3 - \text{スルホンアミド} - \text{pAB}$ を含む。

【0174】

一部の態様では、ADCの抗体部分は、リンカーを介して薬物部分にコンジュゲートしており、リンカーは、 $\text{OSu} - \text{スペーサーユニット} - \text{アミノ酸ユニット} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、スペーサーユニットは、PEG部分を含む。一部の実施形態では、スペーサーユニットは、アルキル部分を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{OSu} - (\text{PEG})_2 - \text{アミノ酸ユニット} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{OSu} - (\text{PEG})_2 - \text{Val} - \text{Cit} - \text{pAB}$ を含む。他の実施形態では、リンカーは、 $\text{OSu} - (\text{PEG})_2 - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Asn} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{OSu} - (\text{PEG})_9 - \text{アミノ酸ユニット} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{OSu} - (\text{PEG})_9 - \text{Val} - \text{Cit} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{OSu} - (\text{CH}_2)_5 - \text{アミノ酸ユニット} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{OSu} - (\text{CH}_2)_5 - \text{Val} - \text{Cit} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{OSu} - (\text{PEG})_3 - \text{トリアゾール} - (\text{PEG})_3 - \text{アミノ酸ユニット} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{OSu} - (\text{PEG})_3 - \text{トリアゾール} - (\text{PEG})_3 - \text{Val} - \text{Cit} - \text{pAB}$ を含む。

【0175】

一部の実施形態では、ADCの抗体部分は、リンカーを介して薬物部分にコンジュゲートしており、その際、リンカーは、 $\text{OSu} - \text{スペーサーユニット} - \text{ジスルフィド} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、スペーサーユニットは、PEG部分を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{OSu} - (\text{PEG})_3 - \text{トリアゾール} - (\text{PEG})_3 - \text{ジスルフィド} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{OSu} - (\text{PEG})_3 - \text{トリアゾール} - (\text{PEG})_3 - \text{ジスルフィジル} - \text{ジメチル} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{OSu} - \text{ジベンジルシクロオクテン} - \text{トリアゾール} - (\text{PEG})_3 - \text{ジスルフィド} - \text{pAB}$ を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 $\text{OSu} - \text{ジベンジルシクロオクテン} - \text{トリアゾール} - (\text{PEG})_3 - \text{ジスルフィジル} - \text{ジメチル} - \text{pAB}$ を含む。

【0176】

一部の実施形態では、ADCの抗体部分は、リンカーを介して薬物部分にコンジュゲートしており、その際、リンカーは、 $\text{OSu} - \text{スペーサーユニット} - \text{スルホンアミド} - \text{pA}$

10

20

30

40

50

Bを含む。一部の実施形態では、スペーサーユニットは、PEG部分を含む。一部の実施形態では、リンカーは、OSu-(PEG)₃-トリアゾール-(PEG)₃-スルホンアミド-pABを含む。一部の実施形態では、リンカーは、OSu-ジベンジルシクロオクテン-トリアゾール-(PEG)₃-スルホンアミド-pABを含む。

【0177】

様々な実施形態で、リンカーは、細胞内在化の後の切断及びリンカー-薬物部分及び/または薬物部分のみの隣接細胞への拡散による、バイスタンダー死滅(隣接細胞の死滅)を促進するように設計される。一部の実施形態では、リンカーは、細胞内在化を促進する。一部の実施形態では、リンカーは、標的組織へのADC結合、及びADCの抗体部分により標的とされる抗原を発現しないが、抗原を発現する標的がん組織を囲んでいるがん性組織のバイスタンダー死滅を維持しつつ、細胞外環境での切断を最小化し、それにより、オフターゲット組織(例えば、非がん性組織)への毒性を低下させるように設計されている。一部の実施形態では、マレイミド部分(Mal)、ポリエチレングリコール(PEG)部分、バリン-シトルリン(Val-Citまたは「vc」)、及びpABを含むリンカーは、これらの機能的特徴を提供する。一部の実施形態では、Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pABを含むリンカーは、これらの機能的特徴を得る際に、例えば、MORAb-003などの抗FRA抗体部分及びエリブリンなどの薬物部分を接続する場合に、特に有効である。一部の実施形態では、これらの機能的特徴のうち少なくとも一部はまた、抗FRA抗体部分を伴わずに、及び/またはMORAb-003を伴わずに観察され得る。例えば、一部の実施形態では、Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pABを含むリンカーは、これらの機能的特徴の一部または全部を得る際に、例えば、トラスツズマブなどの抗her2抗体部分及びエリブリンなどの薬物部分を接続する場合に、有効である。

【0178】

一部の実施形態では、抗体部分は、マレイミド部分(Mal)、ポリエチレングリコール(PEG)部分、バリンシトルリン(Val-Citまたは「vc」)、及びpABを含むリンカーを介して、薬物部分にコンジュゲートしている。これらの実施形態では、マレイミド部分は、リンカー-薬物部分を抗体部分に共有結合しており、pABは、自壊性スペーサーユニットとして作用する。そのようなリンカーは、「m-vc-pAB」リンカー、「Mal-VCP」リンカー、「Mal-(PEG)₂-VCP」リンカー、または「Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB」リンカーと称され得る。一部の実施形態では、薬物部分は、エリブリンである。Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-エリブリンの構造は、表46に示されている。Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pABリンカーのpABは、エリブリンの上のC-35アミンに結合している。

【0179】

Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-エリブリンを含むADCは、特に、MORAb-003またはその抗原結合性断片などの抗FRA抗体と対合した場合に、望ましい特性の特定の組合せを実証することが発見された。これらの特性には、これらだけに限定されないが、他のリンカー-毒素及び/または抗体部分を使用するADCとすべて比較すると、薬物負荷の有効なレベル(p約4)、低い凝集レベル、貯蔵条件下または身体循環中の場合の安定性(例えば、血清安定性)、非コンジュゲート抗体と比較可能な標的発現性細胞への親和性の維持、標的発現性細胞に対する強力な細胞傷害性、低レベルのオフターゲット細胞死滅、高レベルのバイスタンダー死滅、及び/または有効なインビボ抗がん活性が含まれる。多数のリンカー選択肢ならびにスペーサー及び切断部位の組合せが当技術分野で公知であり、これらの機能性カテゴリーの1つまたは複数において特定の利益を提供し得るが、エリブリンを抗FRA抗体(例えば、MORAb-003)などの抗体部分に接続するMal-(PEG)₂-Val-Cit-pABリンカーの特定の組合せは、治療用ADCに望ましい幅広い機能特性にわたって、良好か、または優れた特性を提供し得る。一部の実施形態では、エリブリンを抗体部分に接続するMal-(PEG)₂-Val-Cit-pABリンカーの特定の組合せにより提供される良好または優れ

10

20

30

40

50

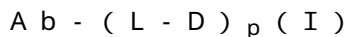
た機能特性は、例えば、トラスツズマブなどの抗 *h e r 2* 抗体にコンジュゲートしている、このリンカー - 毒素で観察され得る。

【 0 1 8 0 】

一部の実施形態では、ADCは、 $M a l - (P E G) _ 2 - V a l - C i t - p A B - E$ リブリン及び内在化型抗体、または腫瘍細胞を標的とし、それに内在化する能力を維持しているその抗原結合性断片を含む抗体部分を含む。一部の実施形態では、ADCは、 $M a l - (P E G) _ 2 - V a l - C i t - p A B - E$ リブリン及びFRA発現性腫瘍細胞を標的とする内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片を含む。一部の実施形態では、FRA発現性腫瘍細胞を標的とする内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片は、K a b a tナンバリングシステムにより定義すると、配列番号2 (H C D R 1)、配列番号3 (H C D R 2)、及び配列番号4 (H C D R 3)のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域 (H C D R) ; ならびに配列番号7 (L C D R 1)、配列番号8 (L C D R 2)、及び配列番号9 (L C D R 3)のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖相補性決定領域 (L C D R) ; またはI M G Tナンバリングシステムにより定義すると、配列番号13 (H C D R 1)、配列番号14 (H C D R 2)、及び配列番号15 (H C D R 3)のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域 (H C D R) ; ならびに配列番号16 (L C D R 1)、配列番号17 (L C D R 2)、及び配列番号18 (L C D R 3)のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖相補性決定領域 (L C D R) を含む。一部の実施形態では、FRA発現性腫瘍細胞を標的とする内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片は、配列番号23のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号24のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、FRA発現性腫瘍細胞を標的とする内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片は、ヒトI g G 1重鎖定常ドメイン及びI g カッパ軽鎖定常ドメインを含む。

【 0 1 8 1 】

一部の実施形態では、ADCは、式Iを有する：



[式中、

(i) A b は、K a b a tナンバリングシステムにより定義すると、配列番号2 (H C D R 1)、配列番号3 (H C D R 2)、及び配列番号4 (H C D R 3)のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域 (H C D R) ; ならびに配列番号7 (L C D R 1)、配列番号8 (L C D R 2)、及び配列番号9 (L C D R 3)のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖相補性決定領域 (L C D R) ; またはI M G Tナンバリングシステムにより定義すると、配列番号13 (H C D R 1)、配列番号14 (H C D R 2)、及び配列番号15 (H C D R 3)のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域 (H C D R) ; ならびに配列番号16 (L C D R 1)、配列番号17 (L C D R 2)、及び配列番号18 (L C D R 3)のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖相補性決定領域 (L C D R) を含む内在化型抗葉酸受容体アルファ (F R A) 抗体またはその内在化型抗原結合性断片であり；

(i i) D は、エリブリンであり；

(i i i) L は、 $M a l - (P E G) _ 2 - V a l - C i t - p A B$ を含む切断可能なリンカーであり；

(i v) p は、1 ~ 2 0 の整数である]。

【 0 1 8 2 】

一部の実施形態では、内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片は、配列番号23のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号24のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、内在化型抗体は、M O R A b - 0 0 3 である。一部の実施形態では、p は、1 ~ 8、または1 ~ 6 である。一部の実施形態では、p は、2 ~ 8、または2 ~ 5 である。一部の実施形態では、p は、3 ~ 4 である。一部の実施形態では、p は、4 である。

【 0 1 8 3 】

他の実施形態では、ADCは、 $M a l - (P E G) _ 2 - V a l - C i t - p A B - E$ リ

ブリン及びher2発現性腫瘍細胞を標的とする内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片を含む。一部の実施形態では、her2発現性腫瘍細胞を標的とする内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片は、Kabatナンバリングシステムにより定義すると、配列番号71(HCDR1)、配列番号72(HCDR2)、及び配列番号73(HCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域(HCDR)；ならびに配列番号74(LCDR1)、配列番号75(LCDR2)、及び配列番号76(LCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖相補性決定領域(LCDR)；またはIMGTナンバリングシステムにより定義すると、配列番号191(HCDR1)、配列番号192(HCDR2)、及び配列番号193(HCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域(HCDR)；ならびに配列番号194(LCDR1)、配列番号195(LCDR2)、及び配列番号196(LCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖相補性決定領域(LCDR)を含む。一部の実施形態では、her2発現性腫瘍細胞を標的とする内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片は、配列番号27のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、her2発現性腫瘍細胞を標的とする内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片は、ヒトIgG1重鎖定常ドメイン及びIgカッパ軽鎖定常ドメインを含む。

10

【0184】

一部の実施形態では、ADCは、式Iを有する：



[式中、

20

(i) Abは、Kabatナンバリングシステムにより定義すると、配列番号71(HCDR1)、配列番号72(HCDR2)、及び配列番号73(HCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域(HCDR)；ならびに配列番号74(LCDR1)、配列番号75(LCDR2)、及び配列番号76(LCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖相補性決定領域(LCDR)；またはIMGTナンバリングシステムにより定義すると、配列番号191(HCDR1)、配列番号192(HCDR2)、及び配列番号193(HCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域(HCDR)；ならびに配列番号194(LCDR1)、配列番号195(LCDR2)、及び配列番号196(LCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖相補性決定領域(LCDR)を含む内在化型抗ヒト上皮成長因子受容体2(her2)抗体またはその内在化型抗原結合性断片であり；

30

(ii) Dは、エリブリンであり；

(iii) Lは、Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pABを含む切断可能なリンカーであり；

(iv) pは、1~20の整数である]。

【0185】

一部の実施形態では、内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片は、配列番号27のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、内在化型抗体は、トラスツズマブである。一部の実施形態では、pは、1~8、または1~6である。一部の実施形態では、pは、2~8、または2~5である。一部の実施形態では、pは、3~4である。一部の実施形態では、pは、4である。

40

【0186】

他の実施形態では、ADCは、Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-エリブリン、及びメソテリン(MSLN)発現性腫瘍細胞を標的とする内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片を含む。一部の実施形態では、MSLN発現性腫瘍細胞を標的とする内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片は、Kabatナンバリングシステムにより定義すると、配列番号65(HCDR1)、配列番号66(HCDR2)、及び配列番号67(HCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域(HCDR)；ならびに配列番号68(LCDR1)、配列番号69(LCDR2)、及び配列番

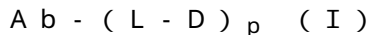
50

号70 (LCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖相補性決定領域 (LCDR) ; またはIMGTナンバリングシステムにより定義すると、配列番号185 (HCDR1)、配列番号186 (HCDR2)、及び配列番号187 (HCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域 (HCDR) ; ならびに配列番号188 (LCDR1)、配列番号189 (LCDR2)、及び配列番号190 (LCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖相補性決定領域 (LCDR) を含む。一部の実施形態では、MSLN発現性腫瘍細胞を標的とする内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片は、配列番号25のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号26のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、MSLN発現性腫瘍細胞を標的とする内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片は、ヒトIgG1重鎖定常ドメイン及びIgC α 1軽鎖定常ドメインを含む。

10

【0187】

一部の実施形態では、ADCは、式Iを有する：



[式中、

(i) Abは、Kababtナンバリングシステムにより定義すると、配列番号65 (HCDR1)、配列番号66 (HCDR2)、及び配列番号67 (HCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域 (HCDR) ; ならびに配列番号68 (LCDR1)、配列番号69 (LCDR2)、及び配列番号70 (LCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖相補性決定領域 (LCDR) ; またはIMGTナンバリングシステムにより定義すると、配列番号185 (HCDR1)、配列番号186 (HCDR2)、及び配列番号187 (HCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域 (HCDR) ; ならびに配列番号188 (LCDR1)、配列番号189 (LCDR2)、及び配列番号190 (LCDR3)のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖相補性決定領域 (LCDR) を含む内在化型抗メソテリン抗体またはその内在化型抗原結合性断片であり；

20

(ii) Dは、エリブリンであり；

(iii) Lは、Mal - (PEG)₂ - Val - Cit - pABを含む切断可能なリンカーであり；

(iv) pは、1 ~ 20の整数である]。

【0188】

30

一部の実施形態では、内在化型抗体またはその内在化型抗原結合性断片は、配列番号25のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号26のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、内在化型抗体は、MORAb - 003、MORAb - 009、またはトラスツズマブである。一部の実施形態では、pは、1 ~ 8、または1 ~ 6である。一部の実施形態では、pは、2 ~ 8、または2 ~ 5である。一部の実施形態では、pは、3 ~ 4である。一部の実施形態では、pは、4である。

【0189】

薬物部分

本明細書に記載のADCの薬物部分 (D) は、任意の化学療法薬であってよい。化学療法薬の有用な群には、例えば、抗チューブリン薬が含まれる。特定の実施形態では、薬物部分は、抗チューブリン薬である。抗チューブリン薬の例には、クリプトフィシン及びエリブリンが含まれる。記載のADCで使用するための好ましい薬物部分は、エリブリンである。

40

【0190】

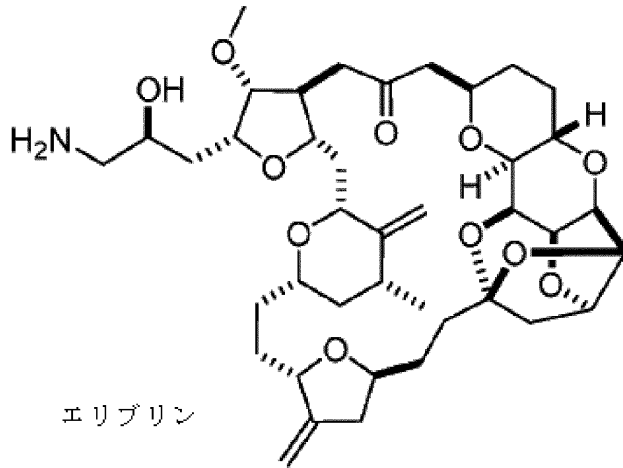
様々な実施形態で、薬物部分は、エリブリンである。これらの実施形態では、ADCのリンカーは、エリブリンの上のC - 35アミンにより結合している。

【0191】

様々な実施形態で、リンカー及び抗体部分に接続するために使用されるエリブリンの本来の形態は、以下に示される：

50

【化 2】



10

【0192】

特定の実施形態では、リンカーの前駆体である中間体を、適切な条件下で薬物部分と反応させる。特定の実施形態では、反応性基を、薬物及び/または中間体またはリンカーで使用する。薬物と中間体との間の反応の生成物、誘導体化薬物を続いて、適切な条件下で抗体または抗原結合性断片と反応させる。別法では、リンカーまたは中間体を初めに、抗体または誘導体化抗体と反応させ、次いで、薬物または誘導体化薬物と反応させてもよい。

20

【0193】

いくつかの異なる反応を、薬物及び/またはリンカーを抗体部分に共有結合するために利用することができる。これは多くの場合に、リシンのアミン基、グルタミン酸及びアスパラギン酸の遊離カルボン酸基、システインのスルフヒドリル基、及び芳香族アミノ酸の様々な部分を含む、抗体分子の1個または複数のアミノ酸残基の反応により達成される。例えば、非特異的共有結合を、化合物の上のカルボキシ（またはアミノ）基を抗体部分の上のアミノ（またはカルボキシ）基に結合するカルボジイミド反応を使用して行ってもよい。加えて、ジアルデヒドまたはイミドエステルなどの二官能性作用物質を、化合物の上のアミノ基を抗体部分の上のアミノ基に結合するために使用してもよい。薬物を結合剤に結合するために、シッフ塩基反応も利用可能である。この方法は、グリコールまたはヒドロキシ基を含有する薬物を過ヨウ素酸酸化させて、アルデヒドを形成し、次いで、これを、結合剤と反応させることを含む。結合は、結合剤のアミノ基とのシッフ塩基の形成により起こる。イソチオシアナートも、薬物を結合剤に共有結合するためのカップリング剤として使用することができる。他の技術は、当業者に公知であり、本開示の範囲内である。

30

【0194】

薬物負荷

薬物負荷は、 p により表され、本明細書では、薬物 - 対 - 抗体比 (DAR) とも称される。薬物負荷は、抗体部分1つ当たり1~20の薬物部分の範囲内であり得る。一部の実施形態では、 p は、1~20の整数である。一部の実施形態では、 p は、1~10、1~9、1~8、1~7、1~6、1~5、1~4、1~3、または1~2の整数である。一部の実施形態では、 p は、2~10、2~9、2~8、2~7、2~6、2~5、2~4、または2~3の整数である。一部の実施形態では、 p は、3~4の整数である。他の実施形態では、 p は、1、2、3、4、5、または6、好ましくは3または4である。

40

【0195】

薬物負荷は、抗体部分の上の結合部位の数により限定され得る。一部の実施形態では、ADCのリンカー部分(L)は、抗体部分の上の1個または複数個のアミノ酸残基の上の化学的に活性な基により、抗体部分に結合している。例えば、リンカーを、遊離アミノ、イミノ、ヒドロキシル、チオール、またはカルボキシル基を介して、抗体部分に(例えば、N末端もしくはC末端に、1個もしくは複数のリシン残基のイプシロンアミノ基に、1

50

個もしくは複数のグルタミン酸もしくはアスパラギン酸残基の遊離カルボン酸基に、または1個もしくは複数のシステイン残基のスルヒドリル基に)結合してよい。リンカーが結合する部位は、抗体部分のアミノ酸配列中の天然残基であってもよいし、または例えば、DNA組換え技術により(例えば、アミノ酸配列にシステイン残基を導入することにより)、またはタンパク質生化学により(例えば、還元、pH調節、もしくは加水分解により)、抗体部分に導入されていてもよい。

【0196】

一部の実施形態では、抗体部分にコンジュゲートし得る薬物部分の数は、遊離システイン残基の数により限定される。例えば、結合がシステインチオール基である場合、抗体は、1個のみ、または数個のシステインチオール基を有し得るか、またはリンカーがそれを介して結合することができる、1個のみ、または数個の十分に反応性のチオール基を有し得る。一般に、抗体は、薬物部分に結合し得る多くの遊離で反応性のシステインチオール基を含有しない。実際に、抗体中の多く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。抗体へのリンカー-毒素の過剰結合は、ジスルフィド架橋を形成するために利用可能なシステイン残基を減少させることにより、抗体を不安定化し得る。したがって、最適な薬物：抗体比は、抗体部分を不安定化させることなく、(抗体1つ当たりの結合薬物部分の数を増加させることにより)ADCの効力を上昇させるべきである。一部の実施形態では、最適な比は、約3~4であり得る。

10

【0197】

一部の実施形態では、Mal部分を介して抗体部分に結合しているリンカーは、約3~4の比を示す。一部の実施形態では、代替の部分(例えば、Osu部分)を介して抗体部分に結合しているリンカーは、より低い最適比(例えば、約0~3などの、より低い比)を示し得る。一部の実施形態では、短い Spacer ユニット(例えば、(PEG)₂もしくは(PEG)₄などの短いPEG Spacer ユニット、または(CH₂)₅などの短いアルキルSpacer ユニット)を含むリンカーは、約3~4の比を示す。一部の実施形態では、長いSpacer ユニット(例えば、(PEG)₈)を含むリンカーは、より低い最適比(例えば、約0~3などの、より低い比)を示し得る。一部の実施形態では、ペプチド切断可能な部分を含むリンカーは、約3~4の比を示す。一部の実施形態では、代替の切断可能な部分(例えば、切断可能なジスルフィドまたは切断可能なスルホンアミド)を含むリンカーは、より低い最適比(例えば、約0~3などの、より低い比)を示し得る。一部の実施形態では、抗FRA抗体(例えば、MORAb-003)などの抗体に接続しているMal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-エリブリンを含むADCは、約3~4の比を有する。一部の実施形態では、約3~4の比が、抗HER2抗体(例えば、トラストズマブ)などの異なる抗体に接続しているMal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-エリブリンを含むADCで観察される。一部の実施形態では、Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-エリブリンリンカー-毒素を含むADCで観察される最適な比は、抗体に依存していない。

20

30

【0198】

一部の実施形態では、1個または複数の遊離システイン残基を生成するために、抗体部分を、コンジュゲーションの前に還元条件に曝露する。一部の実施形態では、抗体を、部分的または全体還元条件下で、ジチオスレイトール(DTT)またはトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)などの還元剤で還元させて、反応性システインチオール基を生成することができる。非対合システインは、鎖内ジスルフィド結合をインタクトなままにしながら軽鎖及び重鎖(H-L対合1つ当たり1対)ならびにヒンジ領域の2つの重鎖(ヒトIgG1の場合にはH-H対合1つ当たり2対)を結合する鎖間ジスルフィド結合を優先的に還元する、限定モル当量のTCEPでの部分的還元により生成することができる(Stefano et al. (2013) Methods Mol. Biol. 1045:145-71)。実施形態では、抗体内のジスルフィド結合を、電気化学的に、例えば、交互の還元及び酸化電圧を印加する作用電極を使用することにより還元させる。このアプローチは、ジスルフィド結合の還元を、分析用デバイス(例えば、電気化

40

50

学的検出デバイス、NMR分光計、または質量分析計)または化学的分離デバイス(例えば、液体クロマトグラフ(例えば、HPLC)または電気泳動デバイス(例えば、米国特許出願公開第20140069822号を参照されたい)へとオンラインで連結することを可能にする。特定の実施形態では、抗体を変性条件に掛けて、アミノ酸残基の上の反応性求核基、例えば、リシンまたはシステインを露出させる。

【0199】

ADCの薬物負荷を、種々の方法で、例えば、(i)抗体に対して、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)コンジュゲーション反応時間もしくは温度を限定すること；(iii)システインチオール修飾のための還元条件を部分的に、もしくは限定すること；及び/または(iv)システイン残基の数及び位置がリンカー-薬物結合の数及び/または位置の制御のために修飾されるように、組換え技術により、抗体のアミノ酸配列を操作することにより制御することができる。

10

【0200】

一部の実施形態では、遊離システイン残基を、抗体部分のアミノ酸配列に導入する。例えば、親抗体の1個または複数のアミノ酸がシステインアミノ酸で置き換えられているシステイン操作された抗体を調製することができる。抗体の任意の形態を、そのように操作する、すなわち、変異させることができる。例えば、親Fab抗体断片を操作して、「ThioFab」と称される、システイン操作されたFabを形成することができる。同様に、親モノクローナル抗体を操作して、「ThioMab」を形成することができる。単一部分変異は、ThioFabでは単一の操作システイン残基をもたらす、単一の部位変異は、IgG抗体の二量体の性質により、ThioMabでは2個の操作システイン残基をもたらす。親ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーションをコードするDNAは、当技術分野で公知の様々な方法により調製することができる(例えば、WO2006/034488に記載の方法を参照されたい)。これらの方法には、これらだけに限定されないが、ポリペプチドをコードする当初に調製されたDNAの部位特異的(またはオリゴヌクレオチド媒介性)変異誘発、PCR変異誘発、及びカセット変異誘発による調製が含まれる。組換え抗体のバリエーションはまた、制限断片操作によっても、または合成オリゴヌクレオチドとのオーバーラップ伸長PCRによっても構築することができる。式IのADCは、これらだけに限定されないが、1、2、3、または4個の操作システインアミノ酸を有する抗体を含む(Lyon et al. (2012) Methods Enzymol. 502: 123-38)。一部の実施形態では、操作を使用しなくても、1個または複数の遊離システイン残基が抗体部分にすでに存在し、その場合、既存の遊離システイン残基を使用して、抗体部分を薬物部分にコンジュゲートすることができる。

20

30

【0201】

一部の実施形態では、高い薬物負荷(例えば、 $p > 5$)は、特定の抗体-薬物コンジュゲートの凝集、不溶性、毒性、または細胞透過性の喪失をもたらす。高い薬物負荷はまた、特定のADCの薬物動態(例えば、クリアランス)にマイナスの影響を及ぼす。一部の実施形態では、低い薬物負荷(例えば、 $p < 3$)は、標的発現性細胞及び/またはバスタンダー細胞に対する特定のADCの効力を低下させ得る。一部の実施形態では、本開示のADCでの薬物負荷は、1~約8；約2~約6；約2~約5；約3~約5；または約3~約4の範囲である。

40

【0202】

抗体部分及びリンカー部分の多数のコピーを含む反応混合物中で、1個を上回る求核基が薬物-リンカー中間体またはリンカー部分試薬、続いて薬物部分試薬と反応する場合、得られる生成物は、ADC化合物の混合物であり得、その混合物では、抗体部分の各コピーに結合している1つまたは複数の薬物部分の分布がある。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応から生じるADCの混合物における薬物負荷は、抗体部分1つ当たり1~20の結合した薬物部分の範囲である。抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数(すなわち、平均薬物負荷、または平均 p)は、当技術分野で公知の任意の従来方法により、例えば、質量分析法(例えば、逆相LC-MS)、及び/または高速液体クロマトグラフ

50

イー（例えば、H I C - H P L C）により計算することができる。一部の実施形態では、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数は、疎水性相互作用クロマトグラフィー - 高速液体クロマトグラフィー（H I C - H P L C）により決定される。一部の実施形態では、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数は、逆相液体クロマトグラフィー - 質量分析法（L C - M S）により決定される。一部の実施形態では、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数は、約3～約4；約3.1～約3.9；約3.2～約3.8；約3.2～約3.7；約3.2～約3.6；約3.3～約3.8；または約3.3～約3.7である。一部の実施形態では、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数は、約3.2～約3.8である。一部の実施形態では、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数は、約3.8である。一部の実施形態では、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数は、3～4；3.1～3.9；3.2～3.8；3.2～3.7；3.2～3.6；3.3～3.8；または3.3～3.7である。一部の実施形態では、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数は、3.2～3.8である。一部の実施形態では、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数は、3.8である。

10

【0203】

一部の実施形態では、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数は、約3.5～約4.5；約3.6～約4.4；約3.7～約4.3；約3.7～約4.2；または約3.8～約4.2である。一部の実施形態では、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数は、約3.6～約4.4である。一部の実施形態では、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数は、約4.0である。一部の実施形態では、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数は、3.5～4.5；3.6～4.4；3.7～4.3；3.7～4.2；または3.8～4.2である。一部の実施形態では、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数は、3.6～4.4である。一部の実施形態では、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数は、4.0である。

20

【0204】

様々な実施形態で、抗体部分1つ当たりの薬物部分の平均数に関して使用される場合の「約」という用語は、+/-10%を意味する。

【0205】

個々のADC化合物、または「種」を、質量分析により混合物において同定し、UPLCまたはHPLC、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィー（H I C - H P L C）により分離することができる。特定の実施形態では、単一の負荷値を有する均一か、またはほぼ均一なADCを、コンジュゲーション混合物から、例えば、電気泳動またはクロマトグラフィーにより単離することができる。

30

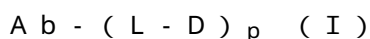
【0206】

一部の実施形態では、約4の薬物負荷及び/または平均薬物負荷は、有利な特性をもたらす。一部の実施形態では、約4未満の薬物負荷及び/または平均薬物負荷は、許容できないほど高レベルの非コンジュゲート抗体種をもたらし得、それらは、標的抗原への結合についてADCと競合し得る、及び/または処置有効性の減少をもたらし得る。一部の実施形態では、約4を上回る薬物負荷及び/または平均薬物負荷は、許容できないほど高レベルの生成物異質性及び/またはADC凝集をもたらし得る。約4を上回る薬物負荷及び/または平均薬物負荷はまた、抗体部分の安定化に必要な1つまたは複数の化学結合の喪失により、ADCの安定性に影響を及ぼし得る。

40

【0207】

一部の実施形態では、ADCは、式Iを有する：



[式中、

(i) Abは、配列番号23のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号24のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む内在化型抗薬酸受容体アルファ抗体またはその抗原結合性断片であり；

(ii) Dは、エリブリンであり；

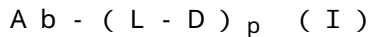
50

(i i i) L は、M a l - (P E G)₂ - V a l - C i t - p A B を含む切断可能なリンカーであり；

(i v) p は、3 ~ 4 の整数である]。

【 0 2 0 8 】

他の実施形態では、A D C は、式 I を有する：



[式中、

(i) A b は、配列番号 27 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 28 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む内在化型抗ヒト上皮成長因子受容体 2 抗体またはその抗原結合性断片であり；

(i i) D は、エリブリンであり；

(i i i) L は、M a l - (P E G)₂ - V a l - C i t - p A B を含む切断可能なリンカーであり；

(i v) p は、3 ~ 4 の整数である]。

【 0 2 0 9 】

一部の実施形態では、p は、4 である。

【 0 2 1 0 】

本開示は、記載の A D C を生産する方法を含む。簡単に述べると、A D C は、抗体部分としての抗体または抗原結合性断片、薬物部分、ならびに薬物部分及び抗体部分を接続するリンカーを含む。一部の実施形態では、A D C を、薬物部分及び抗体部分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、一部の実施形態では、抗体部分のシステインチオールは、リンカーまたは薬物 - リンカー中間体の反応性官能基（例えば、マレイミド部分）と結合を形成して、A D C を作製することができる。A D C の生成を、当業者に公知の任意の技術により達成することができる。

【 0 2 1 1 】

一部の実施形態では、A D C を、抗体部分をリンカー及び薬物部分と逐次的に接触させて、抗体部分が最初にリンカーと共有結合し、次いで、予め形成した抗体 - リンカー中間体が薬物部分と反応するようにすることにより生産する。抗体 - リンカー中間体を、薬物部分を接触させる前に、精製ステップに掛けても、または掛けなくてもよい。他の実施形態では、A D C を、抗体部分を、リンカーを薬物部分と反応させることにより予め形成したリンカー - 薬物化合物と接触させることにより生産する。予め形成したリンカー - 薬物化合物を、抗体部分を接触させる前に、精製ステップに掛けても、または掛けなくてもよい。他の実施形態では、抗体部分を、1 つの反応混合物においてリンカー及び薬物部分と接触させて、抗体部分とリンカーとの間、及びリンカーと薬物部分との間の共有結合の同時形成を可能にする。A D C を生産するこの方法は、リンカーを反応混合物に添加する前に、抗体部分を、抗体部分と接触させる反応を含んでもよく、逆も同様である。特定の実施形態では、抗体部分を、コンジュゲーションを可能にする条件下で、M a l - (P E G)₂ - V a l - C i t - p A B - エリブリンなどの薬物部分に接続したリンカーと反応させることにより、A D C を生産する。

【 0 2 1 2 】

上記の方法に従って調製した A D C を精製ステップに掛けてもよい。精製ステップは、タンパク質を精製するために当技術分野で公知の任意の生化学的方法、またはそれらの方法の任意の組合せを含んでよい。これらには、これらだけに限定されないが、タンジェント流濾過 (T F F)、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、任意の電荷または等電点をベースとするクロマトグラフィー、混合モードクロマトグラフィー、例えば、C H T (セラミックハイドロキシアパタイト)、疎水性相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、透析、濾過、選択的沈殿、またはそれらの任意の組合せが含まれる。

【 0 2 1 3 】

治療的使用及び組成物

10

20

30

40

50

障害、例えば、腫瘍障害について対象を処置する際に、本開示のADCを使用する方法を、本明細書において開示する。ADCを、単独で、または第2の治療薬と組み合わせて投与してもよく、任意の薬学的に許容される製剤、投薬量、及び投与計画で投与してもよい。ADC処置有効性を、毒性について、さらには、有効性の指標について評価し、それに応じて調節してもよい。有効性の尺度には、これらだけに限定されないが、インビトロまたはインビボで観察される細胞増殖抑制及び/または細胞傷害効果、腫瘍体積の減少、腫瘍増殖の阻害、及び/または生存の持続が含まれる。

【0214】

ADCが細胞に対して細胞増殖抑制及び/または細胞傷害効果を発揮するかどうかを決定する方法は、公知である。例えば、ADCの細胞傷害性または細胞増殖抑制活性は、ADCの標的タンパク質を発現する哺乳類細胞に、細胞培養培地中で曝露すること；約6時間から約5日間にわたって細胞を培養すること；及び細胞生存率を測定することにより測定することができる。細胞ベースのインビトロアッセイを使用して、生存率（増殖）、細胞傷害性、及びADCのアポトーシス（カスパーゼ活性化）の誘導を測定してもよい。

10

【0215】

抗体-薬物コンジュゲートが細胞増殖抑制効果を発揮するかどうかを決定するために、チミジン組込みアッセイを使用してもよい。例えば、標的抗原を発現するがん細胞を、96ウェルプレートで5,000細胞/ウェルの密度で、72時間にわたって培養し、その72時間のうちの最後の8時間の間、0.5 μ Ciの³H-チミジンに曝露することができる。培養細胞への³H-チミジンの組込みを、ADCの存在下、及び非存在下で測定する。

20

【0216】

細胞傷害性を決定するために、壊死またはアポトーシス（プログラム細胞死）を測定してもよい。壊死は典型的には、形質膜の透過性の上昇；細胞の腫脹、及び形質膜の破壊により達成される。アポトーシスは典型的には、細胞膜の小胞形成、細胞質の凝縮、及び内在性エンドヌクレアーゼの活性化により特徴づけられる。がん細胞に対するこれらの作用のいずれかの決定は、ADCががんの処置において有用であることを示す。

【0217】

細胞生存率を、例えば、細胞において、ニュートラルレッド、トリパンブルー、クリスタルバイオレット、またはALAMAR（商標）ブルーなどの色素の取込みを決定することにより測定してもよい（例えば、Page et al. (1993) *Intl. J. Oncology* 3: 473-6を参照されたい）。そのようなアッセイでは、細胞を、色素を含有する培地中でインキュベートし、細胞を洗浄し、色素の細胞取り込みを反映する残りの色素を分光測光法で測定する。特定の実施形態では、調製したADCのインビトロ効力を、クリスタルバイオレットアッセイを使用して評価する。クリスタルバイオレットは、生細胞の核に蓄積するトリアリールメタン色素である。このアッセイでは、細胞を、ADCまたは対照薬剤に規定の期間にわたって曝露し、その後、細胞をクリスタルバイオレットで染色し、水で十分に洗浄し、次いで、1% SDSで可溶化し、分光測光法で読み取る。タンパク質結合性色素スルホロダミンB（SRB）も、細胞傷害性を測定するために使用することができる（Skehan et al. (1990) *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1107-12）。

30

40

【0218】

アポトーシスは、例えば、DNA断片化を測定することにより、定量化することができる。DNA断片化を定量的にインビトロで決定するための市販の測光法が利用可能である。TUNEL（断片化DNA中の標識ヌクレオチドの組込みを検出する）及びELISAベースのアッセイを含む、そのようなアッセイの例は、*Biochemica* (1999) No. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals)に記載されている。

【0219】

アポトーシスは、細胞の形態学的変化を測定することにより決定することもできる。例

50

例えば、壊死と同様に、形質膜完全性の喪失を、ある種の色素（例えば、蛍光色素、例えば、アクリジンオレンジまたは臭化エチジウムなど）の取込みを測定することにより決定することができる。アポトーシス細胞数を測定するための方法は、Duke and Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al., eds. (1992) pp. 3.17.1 - 3.17.16)に記載されている。細胞をまた、DNA色素（例えば、アクリジンオレンジ、臭化エチジウム、またはヨウ化プロピジウム）で標識し、細胞を、クロマチン凝縮及び核内膜に沿った辺縁趨向について観察することができる。アポトーシスを決定するために測定することができる他の形態学的変化には、例えば、細胞質凝縮、細胞膜小疱形成の増加、及び細胞収縮が含まれる。

10

【0220】

本開示のADCをまた、バスタンダー死滅活性について評価してもよい。バスタンダー死滅活性は、例えば、標的抗原について1陽性である細胞系及び標的抗原について1陰性である細胞系の2つの細胞系を使用するアッセイにより決定することができる。細胞系を好ましくは、それらを識別するように標識する。例えば、Nuclight（商標）Green（NLG）で標識されたIGROV1細胞（FRA+）及びNuclight（商標）Red（NLR）で標識されたHL-60（FRA-）を同時培養し、抗FRA ADCで処理し、続いて、細胞傷害性を監視することができる。標的抗原陽性細胞と混合した場合の標的抗原陰性細胞の死滅は、バスタンダー死滅を示す一方で、標的抗原陽性細胞の非存在下での標的抗原陰性細胞の死滅は、オフターゲット死滅を示す。

20

【0221】

一部の態様では、本開示は、チューブリンを破壊することにより、がん細胞または組織を死滅させる、その成長を阻害もしくは調節する、またはその代謝を妨害する方法を特色とする。この方法は、任意の対象で、チューブリンの破壊が治療効果をもたらす場合に使用することができる。チューブリンの破壊から利益を受けることができる対象には、これらだけに限定されないが、胃癌、卵巣癌（例えば、漿液性卵巣癌）、肺癌（例えば、非小細胞肺癌）、乳癌（例えば、三重陰性乳癌）、子宮内膜癌（例えば、漿液性子宮内膜癌）、骨肉腫、カボジ肉腫、精巣生殖細胞癌、白血病、リンパ腫（例えば、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫）、骨髄腫、頭頸部癌、食道癌、膵臓癌、前立腺癌、脳癌（例えば、神経膠芽細胞腫）、甲状腺癌、結腸直腸癌、及び/または皮膚癌（例えば、黒色腫）、またはその任意の転移を有するか、またはそれらを有するリスクのある対象が含まれる（Dumontet and Jordan (2010) *Nat. Rev. Drug Discov.* 9: 790 - 803）。様々な実施形態で、本開示のADCを、FRAを発現する任意の細胞または組織、例えば、FRA発現性がん細胞または組織に投与することができる。例示的な実施形態は、FRA媒介性細胞シグナル伝達を阻害する方法または細胞を死滅させる方法を含む。この方法を、FRAを発現する任意の細胞または組織、例えば、がん性細胞または転移病変で使用することができる。FRA発現性がんの非限定的例には、胃癌、漿液性卵巣癌、明細胞卵巣癌、非小細胞肺癌、結腸直腸癌、三重陰性乳癌、子宮内膜癌、漿液性子宮内膜癌、肺類癌、及び骨肉腫が含まれる。FRA発現性細胞の非限定的例には、IGROV1及びOVCA3ヒト卵巣癌細胞、NCI-H2110ヒト非小細胞肺癌細胞、及びFRAをコードする組換え核酸またはその一部を含む細胞が含まれる。

30

40

【0222】

様々な他の実施形態では、本開示のADCを、her2を発現する任意の細胞または組織、例えば、her2発現性がん細胞または組織で投与することができる。例示的な実施形態は、her2媒介性細胞シグナル伝達を阻害する方法または細胞を死滅させる方法を含む。この方法は、her2を発現する任意の細胞または組織、例えば、がん性細胞または転移病変で使用することができる。her2発現性がんの非限定的例には、乳癌、胃癌、膀胱癌、尿路上皮細胞癌、食道癌、肺癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、及び卵巣癌が含まれる（English et al. (2013) *Mol. Diagn. Ther.* 17: 85 - 99）。her2発現性細胞の非限定的例には、NCI-N87-1ucヒト胃癌細胞

50

胞、Z R 7 5 及び B T - 4 7 4 ヒト乳房腺管癌細胞、ならびに h e r 2 をコードする組換え核酸またはその一部を含む細胞が含まれる。

【 0 2 2 3 】

様々な他の実施形態では、本開示の A D C は、メソテリン (M S L N) を発現する任意の細胞または組織、例えば、M S L N 発現性がん細胞または組織で投与することができる。例示的な実施形態は、M S L N 媒介性細胞シグナル伝達を阻害する方法または細胞を死滅させる方法を含む。この方法は、M S L N を発現する任意の細胞または組織、例えば、がん性細胞または転移病変で使用することができる。M S L N 発現性がんの非限定的例には、中皮腫、膵臓癌 (例えば、膵臓腺癌)、卵巣癌、及び肺癌 (例えば、肺腺癌) が含まれる (W a n g e t a l . (2 0 1 2) P L o S O N E 7 : e 3 3 2 1 4)。M S L N 発現性細胞の非限定的例には、O V C A R 3 ヒト卵巣癌細胞、H E C - 2 5 1 ヒト類内膜細胞、H 2 2 6 ヒト肺扁平上皮細胞中皮腫細胞、及び M S L N をコードする組換え核酸またはその一部を含む細胞が含まれる。

10

【 0 2 2 4 】

例示的な方法は、細胞を、有効量、すなわち、細胞を死滅させるために十分な量の、本明細書に記載のとおり A D C と接触させるステップを含む。この方法は、培養中の細胞で、例えば、インビトロ、インビボ、エクスピボ、またはインサイチュで使用することができる。例えば、F R A、h e r 2、及び/または M S L N を発現する細胞 (例えば、腫瘍または転移病変の生検から収集された細胞；樹立されたがん細胞系からの細胞；または組換え細胞) をインビトロで、培養培地中で培養することができ、接触ステップを、A D C を培養培地に添加することにより行うことができる。この方法は、特に、F R A、h e r 2、及び/または M S L N を発現する腫瘍細胞を含む、F R A、h e r 2、及び/または M S L N を発現する細胞の死滅をもたらす。別法では、A D C を、インビボで効果を有するように、任意の適切な投与経路 (例えば、静脈内、皮下、または腫瘍組織との直接的な接触) により、対象に投与することができる。

20

【 0 2 2 5 】

開示の A D C 治療用組成物のインビボ効果は、適切な動物モデルで評価することができる。例えば、異種がんモデルを使用することができ、その際、がん移植片または継代異種移植片組織を、免疫低下動物、例えば、ヌードまたは S C I D マウスに導入する (K l e i n e t a l . (1 9 9 7) N a t u r e M e d . 3 : 4 0 2 - 8)。腫瘍形成の阻害、腫瘍退縮または転移などを測定するアッセイを使用して、有効性を予測することができる。

30

【 0 2 2 6 】

アポトーシスの促進を評価するインビボアッセイも使用することができる。一実施形態では、治療用組成物で処置された腫瘍担持マウスからの異種移植片を、アポトーシス病巣の有無について検査し、未処置の対象異種移植片担持マウスと比較することができる。処置マウスの腫瘍でアポトーシス病巣が見い出される程度は、組成物の治療効力の示度を与える。

【 0 2 2 7 】

さらに、がんを処置する方法を本明細書において提供する。本明細書において開示する A D C は、治療目的で、非ヒト哺乳類またはヒト対象に投与することができる。治療方法は、腫瘍を有する哺乳類に、結合に利用することができる、またはがん細胞表面に局在している、発現される抗原に結合する標的化抗体に結合している選択された化学療法薬 (例えば、エリブリン) を含む A D C の生物学的有効量を投与することを必要とする。例示的な実施形態は、化学療法薬を、F R A を発現する細胞に送達する方法であって、化学療法薬を、F R A エピトープに免疫特異的に結合する抗体にコンジュゲートすること、及び細胞を A D C に曝露することを含む方法である。本開示の A D C が適応とされる、F R A を発現する例示的な腫瘍細胞には、胃癌、漿液性卵巣癌、非小細胞肺癌、結腸直腸癌、乳癌 (例えば、三重陰性乳癌)、肺類癌腫、骨肉腫、子宮内膜癌、及び漿液性組織を含む子宮内膜癌からの細胞が含まれる。

40

50

【0228】

別の例示的な実施形態は、化学療法薬を、her2を発現する細胞に送達する方法であって、化学療法薬を、her2エピトープに免疫特異的に結合する抗体にコンジュゲートすること、及び細胞をADCに曝露することを含む方法である。本開示のADCが適応とされる、her2を発現する例示的な腫瘍細胞には、乳癌、胃癌、膀胱癌、尿路上皮細胞癌、食道癌、肺癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、及び卵巣癌からの細胞が含まれる。

【0229】

別の例示的な実施形態は、化学療法薬を、MSLNを発現する細胞に送達する方法であって、化学療法薬を、MSLNエピトープに免疫特異的に結合する抗体にコンジュゲートすること、及び細胞をADCに曝露することを含む方法である。本開示のADCが適応とされる、MSLNを発現する例示的な腫瘍細胞には、中皮腫、膵臓癌（例えば、膵臓腺癌）、卵巣癌、及び肺癌（例えば、肺腺癌）からの細胞が含まれる。

10

【0230】

別の例示的な実施形態は、ADCの抗体部分のための標的抗原、例えば、FRA、her2、またはMSLNを発現するがんを有するか、または有するリスクのある患者を処置する方法であって、患者に、本開示のADCの治療有効量を投与することを含む方法である。一部の実施形態では、患者は、単独で投与される場合の抗FRA抗体での処置に対して、及び/または単独で投与される場合の薬物部分（例えば、エリブリン）での処置に対して、非応答性または不十分に応答性である。他の実施形態では、患者は、単独で投与される場合の抗her2抗体での処置に対して、及び/または単独で投与される場合の薬物部分（例えば、エリブリン）での処置に対して、非応答性または不十分に応答性である。他の実施形態では、患者は、単独で投与される場合の抗MSLN抗体での処置に対して、及び/または単独で投与される場合の薬物部分（例えば、エリブリン）での処置に対して、非応答性または不十分に応答性である。他の実施形態では、患者は、単独で投与される場合の薬物部分（例えば、エリブリン）での処置に対して非忍容性である。例えば、患者は、がんを処置するために、全身毒性をもたらす用量のエリブリンを必要とすることがあるが、これは、ADCの抗体部分のための標的抗原、例えば、FRA、her2、またはMSLNを発現するがんに標的化送達し、それにより、オフターゲット死滅を減少させることにより、克服される。

20

【0231】

別の例示的な実施形態は、標的抗原発現性腫瘍（例えば、FRA発現性腫瘍、her2発現性腫瘍、またはMSLN発現性腫瘍）の成長を減少または阻害する方法であって、治療有効量のADCを投与することを含む方法である。一部の実施形態では、処置は、患者の腫瘍の成長を減少させる、もしくは阻害する、転移病変の数もしくはサイズを減少させる、腫瘍負荷を減少させる、原発性腫瘍負荷を減少させる、侵襲性を減少させる、生存期間を延長させる、及び/または生活の質を維持する、もしくは改善することに十分である。一部の実施形態では、腫瘍は、単独で投与される場合の抗FRA抗体での処置に対して、及び/または単独で投与される場合の薬物部分（例えば、エリブリン）での処置に対して、抵抗性または難治性である。他の実施形態では、腫瘍は、単独で投与される場合の抗her2抗体での処置に対して、及び/または単独で投与される場合の薬物部分（例えば、エリブリン）での処置に対して、抵抗性または難治性である。一部の実施形態では、腫瘍は、単独で投与される場合の抗MSLN抗体での処置に対して、及び/または単独で投与される場合の薬物部分（例えば、エリブリン）での処置に対して、抵抗性または難治性である。

30

40

【0232】

さらに、本開示の抗体を、獣医学目的で、またはヒト疾患の動物モデルとして、ADCが結合することができる抗原を発現する非ヒト哺乳類に投与することができる。後者については、そのような動物モデルは、本開示のADCの治療効力を評価するために（例えば、投薬量及び投与の時間経過を試験するために）有用であり得る。

【0233】

50

さらに、本開示のADCの治療的使用を本明細書において提供する。例示的な実施形態は、標的抗原発現性がん（例えば、FRA発現性がん、her2発現性がん、またはMSLN発現性がん）の処置におけるADCの使用である。標的抗原発現性がん（例えば、FRA発現性がん、her2発現性がん、またはMSLN発現性がん）の処置において使用するためのADCも開示している。FRA、her2、及び/またはMSLNを発現するがんを有する対象を同定するための方法は、当技術分野で公知であり、開示のADCで処置するために適した患者を同定するために使用することができる。

【0234】

別の例示的な実施形態は、標的抗原発現性がん（例えば、FRA発現性がん、her2発現性がん、またはMSLN発現性がん）を処置するための医薬品を製造する方法における、ADCの使用である。

10

【0235】

上述の方法の実施において使用される治療用組成物を、所望の送達方法に適した薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に製剤化することができる。例示的な実施形態は、本開示のADC及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。適切な担体には、治療用組成物と合わせた場合に、治療用組成物の抗腫瘍機能を維持し、かつ一般に、患者の免疫系と非反応性である任意の物質が含まれる。薬学的に許容される担体には、生理学的に適合性であるあらゆるすべての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張化剤及び吸収遅延剤などが含まれる。薬学的に許容される担体の例には、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、メシル酸塩の1種または複数など、さらには、それらの組合せが含まれる。多くの場合に、組成物中に等張化剤、例えば、糖、ポリアルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。薬学的に許容される担体はさらに、ADCの貯蔵寿命または有効性を増強する、少量の補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、防腐剤または緩衝剤を含んでもよい。

20

【0236】

治療用製剤を可溶化し、腫瘍部位に治療用組成物を送達することができる任意の経路を介して投与することができる。潜在的に有効な投与経路には、これらだけに限定されないが、静脈内、非経口、腹腔内、筋肉内、腫瘍内、皮内、内臓内、同所などが含まれる。治療用タンパク質製剤を凍結乾燥させ、無菌粉末として、好ましくは真空下で貯蔵し、次いで、注射の前に静菌水（例えば、ベンジルアルコール防腐剤を含有）または滅菌水中で再構成することができる。治療用製剤は、ADCまたは薬学的に許容されるその塩、例えば、メシル酸塩を含んでもよい。

30

【0237】

本明細書において開示するADCを、約0.2mg/kg～約10mg/kgの範囲の投薬量で、それを必要とする患者に投与することができる。一部の実施形態では、ADCを、患者に、毎日、隔月で、またはその間の任意の期間で投与する。上述の方法を使用してがんを処置するための投薬量及び投与プロトコルは、方法及び標的がん様々であり、一般に、当技術分野で認められているいくつかの他の因子に依存している。

【0238】

さまざまな送達系が公知であり、本開示の1つまたは複数のADCを投与するために使用することができる。ADCを投与する方法には、これらだけに限定されないが、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内及び皮下）、硬膜外投与、腫瘍内投与、及び粘膜投与（例えば、鼻腔内及び経口経路）が含まれる。加えて、例えば、吸入器または噴霧器、及びエアロゾル剤を含む製剤を使用することにより、肺投与を使用することができる。例えば、米国特許出願第6,019,968号、同第5,985,320号、同第5,985,309号、同第5,934,272号、同第5,874,064号、同第5,855,913号、同第5,290,540号、及び同第4,880,078号；ならびにCT公開番号WO92/19244、WO97/32572、WO97/44013、WO98/31346、及びWO99/66903に記載の肺投与のための組成物及び

40

50

方法を参照されたい。ADCを、任意の慣用の経路により、例えば、注入もしくは大量注射により、または上皮性もしくは粘膜皮膚の内層（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸管粘膜など）を介しての吸収により投与することができる。投与は、全身でも局所でもよい。

【0239】

本明細書において開示する治療用組成物は、製造及び貯蔵の条件下で無菌で、安定している。一部の実施形態では、ADCの1つもしくは複数、または医薬組成物を、無水滅菌凍結乾燥粉末または水非含有濃縮物として気密密閉容器内で供給し、（例えば、水または生理食塩水で）対象に投与するために適切な濃度に再構成することができる。好ましくは、予防薬もしくは治療薬または医薬組成物の1種または複数を、無水滅菌凍結乾燥粉末として気密密閉容器内で、少なくとも5 mg、少なくとも10 mg、少なくとも15 mg、
10
少なくとも25 mg、少なくとも35 mg、少なくとも45 mg、少なくとも50 mg、
少なくとも75 mg、または少なくとも100 mg、またはその間の任意の量の単位投薬量で供給する。一部の実施形態では、凍結乾燥ADCまたは医薬組成物を、2 ~ 8 でオリジナルの容器内で貯蔵する。一部の実施形態では、本明細書に記載のADCまたは医薬組成物の1種または複数を、液体形態で、気密密閉容器内で、例えば、薬剤の量及び濃度を示している容器内で供給する。一部の実施形態では、投与組成物の液体形態を、気密密閉容器内で、ADCを少なくとも0.25 mg/mL、少なくとも0.5 mg/mL、
20
少なくとも1 mg/mL、少なくとも2.5 mg/mL、少なくとも5 mg/mL、少なくとも8 mg/mL、少なくとも10 mg/mL、少なくとも15 mg/mL、少なくとも25 mg/mL、少なくとも50 mg/mL、少なくとも75 mg/mL、または少なくとも100 mg/mLで供給する。液体形態を、2 ~ 8 で、オリジナルの容器内で貯蔵してよい。

【0240】

一部の実施形態では、本開示のADCを、非経口投与に適した医薬組成物に組み込むことができる。注射用液剤は、フリントもしくは褐色バイアル、アンプル、またはプレフィルドシリンジ、または他の既知の送達もしくは貯蔵デバイス内の液体か、または凍結乾燥させた剤形のいずれかから構成されてよい。

【0241】

本明細書に記載の組成物は、様々な形態であってよい。これらには、例えば、液体、半固体、及び固体剤形、例えば、液体液剤（例えば、注射可能及び不融性液剤）、分散剤または懸濁剤、錠剤、丸剤、散剤、リポソーム剤、及び坐剤が含まれる。好ましい形態は、意図されている投与様式及び治療適用に依存する。

【0242】

様々な実施形態で、処置は、許容される投与経路を介してのADC製剤の単回ボラスまたは反復投与を含む。

【0243】

最も有効な投与計画の決定を援助することなどために、患者を、所与のサンプルにおける標的抗原のレベル（例えば、標的抗原発現性細胞のレベル）について評価することができる。例示的な実施形態は、患者が本開示のADCでの処置に应答するかどうかを決定する方法であって、患者から生体試料を得ること、及びその生体試料をADCと接触させることを含む方法である。例示的な生体試料には、組織または体液、例えば、炎症性浸出液、血液、血清、腸液、糞便サンプル、または腫瘍生検（例えば、標的抗原発現性がん、例えば、FRA発現性がん、her2発現性がん、またはMSLN発現性がんを有するか、そのリスクのある患者に由来する腫瘍生検）が含まれる。一部の実施形態では、サンプル（例えば、組織及び/または体液）を対象から得ることができ、適切な免疫学的方法を使用して、標的抗原（例えば、FRA、her2、またはMSLN）のタンパク質発現を検出及び/または測定することができる。そのような評価は、治療を通じて目的を監視するためにも使用され、他のパラメーターの評価と組み合わせ、治療の成功を正確に測定するために有用である。

【0244】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、ADCの有効性を、対象からの腫瘍サンプルをADCと接触させること、及び腫瘍増殖速度または体積を評価することにより評価することができる。一部の実施形態では、ADCが有効であると決定された場合に、それを、対象に投与することができる。

【0245】

上記の治療上のアプローチを、広範囲の様々な追加の外科手術、化学療法、または放射線療法レジメンのいずれか1つと組み合わせることができる。

【0246】

例えば、上記の方法に従ってがんを処置するための医薬品の製造における本開示のADCの1つまたは複数の使用も本明細書において開示する。一部の実施形態では、本明細書において開示するADCを、例えば、上記の方法に従ってがんを処置するために使用する。

【0247】

様々な実施形態で、本明細書に記載の実験室及び治療適用において使用するためのキットは、本開示の範囲内である。そのようなキットは、1つまたは複数の容器、例えば、バイアル、管などを収容するように区画化されている担体、パッケージ、または容器を含んでもよく、その際、容器（複数可）のそれぞれは、本明細書に記載の使用などの取扱説明を含むラベルまたは挿入物と共に、本明細書において開示する方法で使用される別々の要素の1つを含む。キットは、薬物部分を含む容器を含み得る。本開示はまた、薬剤の量を示す、アンプルまたはサシェなどの気密密封された容器中にパッケージングされたADCの1つもしくは複数、またはその医薬組成物を提供する。

【0248】

キットは、上記の容器及び、緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジを含めて、商業的及び使用者の観点から望ましい材料を含む、それと関連する1個または複数の他の容器；内容物及び/または取扱説明を列挙する担体、パッケージ、容器、バイアル及び/または管用ラベル、ならびに取扱説明書を含む添付文書を含んでもよい。

【0249】

ラベルは、組成物が特定の治療または非治療適用、例えば、予後判定、予防、診断、または実験室適用などのために使用されることを示すために、容器上に存在していてもよいし、または容器に付随してもよい。ラベルはまた、本明細書に記載のものなど、インピボまたはインピトロで使用するための指示を示していてもよい。指示及びまたは他の情報も、添付文書（複数可）またはラベル（複数可）の上に含まれていてもよく、それらは、キットに付随するか、またはその上に含まれる。ラベルは、容器の上に、またはそれに随伴していてもよい。ラベルを形成する文字、数字、または他の記号が容器自体に成形またはエッチングされている場合には、ラベルは、容器の上であってよい。容器も収容する入れ物または担体内に存在する場合には、ラベルは、例えば、添付文書として容器に随伴してよい。ラベルは、組成物が本明細書に記載のがんなどの状態を診断または処置するために使用されることを示し得る。

【0250】

当業者には、本明細書に記載の本発明の方法の他の適切な変更及び適応が明らかであること、及びそれらが、本発明の範囲または本明細書において開示する実施形態から逸脱することなく、適切な同等物を使用して成され得ることは、容易に分かるであろう。ここまですべて、本発明を詳細に記載してきたが、同じことが、次の実施例を参照することにより、より明確に理解されるであろうが、その実施例は、単に説明を目的として含まれるものであって、限定的であることを意図したものではない。

【実施例】

【0251】

実施例1

1. 物質及び方法

ADCを調製するために使用したMORA b - 003は、Lot # AA0312に由来した。

10

20

30

40

50

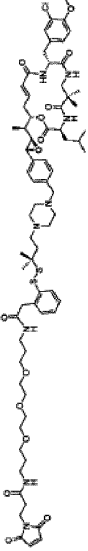
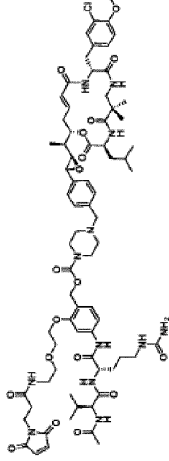
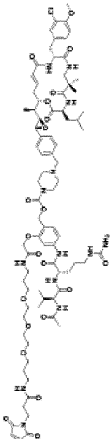
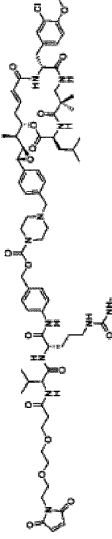
1.1 細胞毒素

コンジュゲート可能な細胞毒素の構造を表11に示す。

【0252】

【表11】

表11.1. コンジュゲート可能な細胞毒素

化合物名	リンカー	細胞毒素	切断可能性	構造
PEG3-Bz-ジスルホイジン ジメチル-クリプトトフィシン	マレイミド-PEG3- Benzyl-ジスルホイジン- ジメチル	クリプトトフィシン	あり	
LL2-クリプトトフィシン	LL2	クリプトトフィシン	あり	
LL3-クリプトトフィシン	LL3	クリプトトフィシン	あり	
VCP-クリプトトフィシン	マレイミド-PEG2- Val-Cit-pAB	クリプトトフィシン	あり	

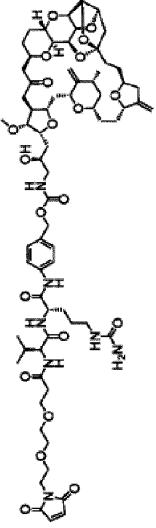
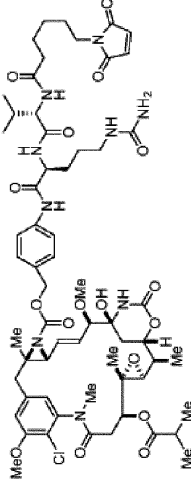
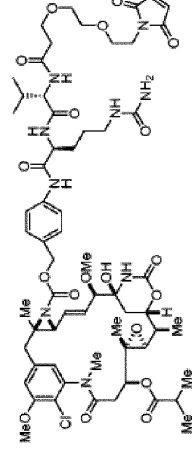
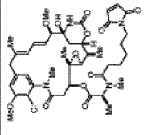
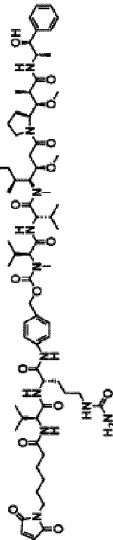
10

20

30

40

50

VCP-エリブリン (ER-001159569)	マレイミド-PEG2- Val-Cit-pAB	エリブリン	あり	
ER-001161318	マレイミド-(CH2)5- Val-Cit-pAB	ER-001150828 (アジリジン- メイタンジン-P3)	あり	
ER-001161319	マレイミド-PEG2- Val-Cit-pAB	ER-001150828 (アジリジン- メイタンジン-P3)	あり	
ER-001159200	マレイミド-(CH2)5	メイタンジンDMI	なし	
M-MMAE	マレイミド-(CH2)5- Val-Cit-pAB	モノメチル オーリスチンE	あり	

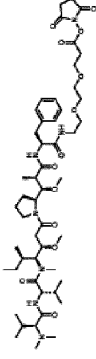
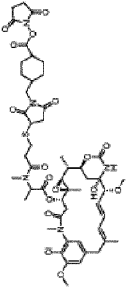
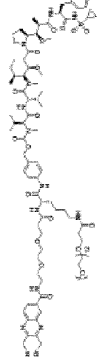
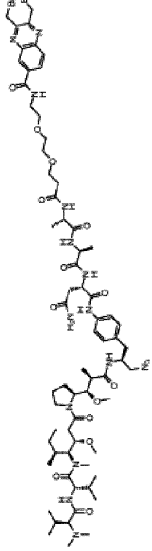
10

20

30

40

50

NHS-PEG2-AuF	NHS-PEG2	オーロスタチンF	なし	
M-DMI	SMCC	メイタシンDMI	なし	
M-0285	PEG-pAB	デュオスタチン3	あり	還元ジスルフィド架橋ケミストリー 
M-0115	Asn-Ala	デュオスタチン5	あり	
M-172	シクロヘキシル	デュオスタチン3	なし	還元ジスルフィド結合化学
M-174	シクロヘキシル	デュオスタチン3	なし	還元ジスルフィド結合化学
M-158	PEG-pAB	デュオスタチン10	あり	還元ジスルフィド結合化学
M-0384	PEG-チオエーテル	デュオスタチン14	なし	還元ジスルフィド結合化学
M-0302	PEG-Asn	デュオスタチン14	なし	還元ジスルフィド結合化学
M-292	PEG-Asn	デュオスタチン14	あり	還元ジスルフィド結合化学
M-0026	PEG	デュオスタチン14	あり	還元ジスルフィド結合化学

10

20

30

40

50

M-0267		PEG-チオエーテル	デュオマイシン7	なし	還元ジスルフィド結合化学
M-0272		Asn-Ala	デュオマイシン7	あり	還元ジスルフィド結合化学
M-0260		PEG-pAB	デュオマイシン7	あり	還元ジスルフィド結合化学
M-0276		Asn-Ala	デュオマイシン7	あり	還元ジスルフィド結合化学
M-015-0913		シクロヘキシル	デュオスタチン3	なし	限定的リシン利用
M-030-0132		PEG-pAB	デュオスタチン6	あり	限定的リシン利用
M-0161		シクロヘキシル	デュオスタチン10	なし	限定的リシン利用
M-0157		PEG-pAB	デュオスタチン10	あり	限定的リシン利用
M-027-0381		チオエーテル	デュオスタチン14	なし	限定的リシン利用
M-0025		PEG	デュオスタチン14	なし	限定的リシン利用
M-0301		PEG-Asn	デュオスタチン14	なし	限定的リシン利用
M-030-0011		PEG-pAB	デュオスタチン14	あり	限定的リシン利用
M-030-0291		PEG-Asn	デュオスタチン14	あり	限定的リシン利用
M-0114		PEG-pAB	デュオスタチン5	あり	還元ジスルフィド架橋ケミストリー

略語：Ala、アラニン；Asn、アスパラギン；Cit、シトルリン；NHS、N-ヒドロキシスクシンイミド；pAB、p-アミノベンジルオキシカルボニル；PEG、ポリエチレングリコール；SMCC、スクシンイミドメチル；シクロヘキサチン4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサチン1-カルボキシルレート；Val、バリン；VCP、Val-Cit-pAB。

【 0 2 5 3 】

1. 2 抗体 - 薬物コンジュゲーション

1. 2. 1 TCEPを使用しての部分的還元

MORAb-003のための部分的還元条件を、非チオール還元剤トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）の濃度、抗体濃度、及び還元時間を変動させることにより確立した。MORAb-003を1mMエチレンジアミン四酢酸（EDTA）を含有するダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）に緩衝液交換し、次いで、10kD分子量カットオフ（MWCO）遠心濾過器フィルターを備えた遠心濃縮を使用して、10mg/mLに濃縮した。抗体を適切な濃度に希釈し、TCEPを指示最終濃度で添加し、

10

20

30

40

50

1 時間にわたって室温で穏やかに混合した。製造者プロトコルに従って緩衝液として DPBS / 1 mM EDTA (Thermo Fisher、40 kD MWCO) を用いる 5 または 10 mL Zeba (商標) スピン脱塩カラムを使用して脱塩することにより、TCEP を除去した。製造者プロトコルに従ってチオール蛍光定量化キット (Abcam) を使用して、サンプルを遊離チオール含分について分析した。セクション 1.3.3 において記載するとおり、非還元条件下での SDS-PAGE 分析を行って、ジスルフィド結合切断の規模及び位置を決定した。場合によっては、DPBS 中で希釈することにより、脱塩 MA b を 1 ~ 2 mg / mL にし、ビオチン化に掛けて、コンジュゲート可能性及び薬物 - 対 - 抗体 (DAR) 比を決定した。ジメチルスルホキシド (DMSO) 中の 10 mM マレイミド - PEG2 - ビオチン (Thermo Fisher) を抗体 (mAb) に、10 : 1 のモル比で添加し、穏やかに攪拌しながら室温で 4 時間にわたってインキュベートした。コンジュゲーションの後に、未反応の化合物を、Zeba (商標) スピン脱塩カラム (Thermo Fisher) を使用して脱塩することにより除去した。次いで、セクション 1.3.4 に詳述するとおり、サンプルを LC-MS により分析して、DAR を決定した。

【0254】

1.2.2 細胞毒素コンジュゲーション

部分的に還元された抗体を、0.5 x DPBS、0.5 mM EDTA 中で 2.5 mg / mL にし、十分に混合した。次いで、使用する場合には、有機補助溶媒を添加し、十分に混合した。検査した補助溶媒は、プロピレングリコール (最終濃度 20% 及び 50%)、ジメチルスルホキシド (DMSO) (10%)、N, N - ジメチルホルムアミド (20%)、N, N - ジメチルアセトアミド (20%)、及び N, N - ジメチルプロピオンアミド (20%) であった。マレイミド修飾された細胞毒素 (DMSO 中 6 mM 保存溶液) を抗体に、1 : 6 (mAb : 化合物) のモル比で添加し、十分に混合した。コンジュゲーションを、穏やかに混合させながら室温で 3.5 時間にわたって進行させた。50% プロピレングリコールを 50% で、最終有機調整剤として選択し、その後のすべてのコンジュゲーション反応において使用した。

【0255】

1.2.3 精製

未反応のマレイミド - 細胞毒素及びプロピレングリコールを除去するために、高速タンパク質液体クロマトグラフィー (FPLC) (GE Healthcare) で行われるクロマトグラフィーで 26 / 10 HiTrap (登録商標) 脱塩カラム (複数可) (GE Healthcare) を使用して、コンジュゲートした抗体を精製した。MORAb - 003 - mal - VCP - エリブリン (MORAb - 202) を含む MORAb - 003 ADC を DPBS 中で製剤化した (製剤緩衝液を、FPLC クロマトグラフィー中に泳動緩衝液として使用した)。

【0256】

1.3 生物物理学的特徴づけ

1.3.1 BCA アッセイ

調製したピシンコニン酸 (BCA) 試薬 (200 µL) を、25 µL の連続希釈した ADC または ウシガンマグロブリン (Thermo Fisher) 2 mg / mL 標準に添加し、サンプルを十分に混合した。サンプルを 37 °C で 20 分間にわたってインキュベートした。プレートを 595 nm で、SpectraMax (登録商標) M5 プレートリーダー (Molecular Devices) で読み取った。データを、SoftMax (登録商標) Pro (ver 3.2) を 4 - パラメーターフィッティングモデルで使用して解析した。

【0257】

1.3.2 SEC - HPLC 分析

抗体凝集を、Agilent 1100 を使用するサイズ排除高速液体クロマトグラフィー (SEC - HPLC) により分析した。mAb を、DPBS 中で 1 mg / mL に希釈

10

20

30

40

50

した。抗体 (20 μL) を TSK gel (登録商標) Super SW ガードカラム (4.6 mm × 3.5 cm, 4 μm 空孔サイズ、Tosoh Bioscience)、続いて、TSK gel (登録商標) Super SW 3000 カラム (4.6 mm × 30 cm, 4 μm 空孔サイズ) 上に注入し、カラムから、0.15 M NaCl 及び 0.05 % NaN₃ を含有する 0.1 M リン酸ナトリウム (pH 7.4) で、0.3 mL / 分の流速で 20 分間にわたって溶離した。すべてのデータを、Agilent ChemStation ソフトウェアを使用して解析した。凝集パーセントを $[PA_{凝集} / PA_{合計}] \times 100$ として計算した [式中、PA = 積算ピーク面積]。

【0258】

1.3.3 SDS-PAGE 分析

タンパク質サンプル (0.1 ~ 10 μg) を、ドデシル硫酸リチウム (LDS) サンプル緩衝液で 1 倍にした。非還元サンプルでは、インキュベーションを電気泳動の前に、室温で 10 分間にわたって行った。還元サンプルでは、ジチオスレイトール (DTT) を 20 mM の最終濃度まで添加し、サンプルを 10 分間にわたって 95 °C に加熱し、電気泳動の前に、氷上に置いた。サンプルを、10 -、12 -、または 15 - ウェルのビス-トリス SDS-PAGE ゲル (Thermo Fisher) に、泳動緩衝液としての 1 倍 MOPS または 1 倍 MES と共に装填した。電気泳動を、185 V (定電圧) で 1 時間にわたって行った。ゲルを、Instant Blue 染色液 (Expedeon) で染色し、水中で脱染した。ドキュメンテーションを、600 nm オレンジ色フィルターを使用して Ultra Lum ゲルドキュメンテーションシステムで行った。

【0259】

1.3.4 薬物-対-抗体比 (DAR) の UPLC/ESI-MS 分析

PNGase F (New England Biolabs) を使用して、ADC を脱グリコシル化した。G7 緩衝液 (10 μL) 及び PNGase F (2 μL) を mAb (90 μL、DPBS 中 1 mg/mL) に添加した。反応物を Discover マイクロ波 (CEM) 中で 2 サイクルにわたってインキュベートした: (1) マイクロ波出力 10 W、37 °C、10 分、続いて、5 分休止; (2) マイクロ波出力 2 W、37 °C、10 分。DTT を 20 mM の最終濃度まで添加し、続いて、60 °C で 3 分間にわたってインキュベートすることにより、サンプルの一部を還元した。次いで、サンプルを、Waters Acquity Ultra Performance 液体クロマトグラフィー (UPLC) 及び四重極飛行時間型 (Q-ToF) Premier 質量分析計を使用して分析した。サンプル (それぞれ 0.5 ~ 2 μg) を Mass Prep (商標) マイクロ脱塩カラム上に 65 °C で注入し、カラムから、移動相 A 95 % 中での 5 分の平衡、10 分の勾配 (B 5 ~ 90 %)、及び移動相 A 95 % 中での 10 分の再平衡化で、0.05 mL / 分で溶離した。移動相 A は、水中 0.1 % ギ酸であった。移動相 B は、アセトニトリル中 0.1 % ギ酸であった。Q-ToF 質量分析計を陽イオン、V モードで、500 ~ 4000 m/z の範囲での検出で操作した。ソースパラメーターは、次のとおりであった: キャピラリー電圧、2.25 kV (インタクトな抗体) ~ 2.50 kV (還元抗体); サンプリングコーン電圧、65.0 V (インタクトな抗体) または 50.0 V (還元抗体); ソース温度、100 °C; 脱溶媒温度、250 °C; 脱溶媒ガスフロー、550 L / 時。タンパク質ピークを、Mass Lynx (登録商標) MaxEnt 1 関数を使用してデコンボリュートした。コンジュゲートしなかった、単一コンジュゲートした、及び多重コンジュゲートした重鎖及び軽鎖質量それぞれの相対強度を合計して、下式を使用して全体 DAR を計算した:

$$2 \left[\frac{I_{LC+1} + 2(I_{LC+2}) + 3(I_{LC+3}) + \dots + n(I_{LC+n})}{I_{LCtot}} \right] + 2 \left[\frac{I_{HC+1} + 2(I_{HC+2}) + 3(I_{HC+3}) + \dots + n(I_{HC+n})}{I_{HCtot}} \right]$$

[式中、I_{LC+1} は、1つの細胞毒素とコンジュゲートした軽鎖の質量強度であり、I_{LC+2} は、2つの細胞毒素とコンジュゲートした軽鎖の質量強度である、など。I_{HC} は、対応するコンジュゲートした重鎖からの強度であり、I_{LCtot} 及び I_{HCtot} は、それぞれ、すべてのコンジュゲートしなかった、及びコンジュゲートした軽鎖及び重鎖

10

20

30

40

50

の合計強度である。

【0260】

1.3.5 HIC-HPLC DAR分析

UPLC/エレクトロスプレーイオン化(ESI)-MS分析によるDAR分析に加えて、MORAb-003-vcp-エリブリンDAR及びMORAb-003-0285DARも、疎水性相互作用HPLC(HIC-HPLC)を使用して分析した。サンプルをTSKgel(登録商標)Ether-5PW、内径7.5mm×7.5cm、空孔サイズ10µM上に注入し、カラムから、移動相A100%中での3分間の平衡化、15分の勾配(0~100%B)、100%B中での5分の保持、100%Aへの1分での変化、及び移動相A100%中での5分の再平衡化で、0.7mL/分で溶離した。移動相Aは、25mMリン酸ナトリウム、1.5M硫酸アンモニウム、pH7.0であった。移動相Bは、25mMリン酸ナトリウム、25%イソプロパノール、pH7.0であった。検出を280nmで行った(基準320nm)。DARを下式により決定した：

$$[AUC_{+1} + 2(AUC_{+2}) + 3(AUC_{+3}) + \dots + n(AUC_{+n})] / AUC_{tot}$$

[式中、 AUC_{+1} は、1つの細胞毒素とコンジュゲートしたADCに対応するmAbピークでの曲線下面積であり、 AUC_{+2} は、2つの細胞毒素とコンジュゲートしたADCに対応するmAbピークでの曲線下面積である、など。 AUC_{tot} は、すべてのピークでの合計曲線下面積である]。

【0261】

1.4 細胞傷害性分析

1.4.1 クリスタルバイオレットアッセイ

IGROV1(FR^{hi})及びSJS A-1(FR^{neg})細胞を継代培養し、10,000細胞/ウェルで、完全成長培地中で96ウェル組織培養プレート内に播種し、37、5%CO₂で、終夜(16時間)インキュベートした。典型的には、試験試薬を1:4で、2mLディープウェル希釈プレート内で、1µMから開始して連続希釈した(合計で10の希釈)。希釈サンプル100µLを細胞プレートに添加した(500nMの試験試料濃度から開始)。プレートを37、5%CO₂でさらに48時間にわたってインキュベートした。培地を廃棄し、プレートをDPBS200µLで1回洗浄し、0.2%クリスタルバイオレット溶液50µLで、室温で15分間にわたって染色し、次いで、水道水で十分に洗浄した。プレートを風乾させ、クリスタルバイオレットを1%SDS溶液200µLで溶解させた。プレートを570nmで読み取った。データをGraphPad Prism6を使用して解析した。アッセイを、1ウェル当たり1,000細胞の播種密度を使用して行い、化合物曝露は、合計5日間にわたった。短期間曝露が望ましい場合には、細胞傷害性薬物を含有する培地を4時間後に除去し、5日間のインキュベーションの前に新たな増殖培地に置き換えた。OVCA R3、CaOV3、及びNCI-H2110では、細胞を3,000細胞/ウェルで播種し、ADCと共に5日間にわたってインキュベートした。競合実験のために、細胞と共にインキュベートする前に、用量設定したADCを、2µM(最終)の非コンジュゲートMORAb-003と共に予めインキュベートした。

【0262】

1.4.2 バイスタンダー死滅アッセイ

試験開始の前日に、NucLight(商標)Green(NLG)IGROV1細胞を5,000細胞/ウェルで、96ウェル丸底プレートに播種し、続いて、1,000rpmで3分間にわたって室温で遠心して、細胞ペレットの形成を確実にした。プレートをIncucyte Zoom(登録商標)(EssenBio science)の容器内に入れ、37/5%CO₂で終夜インキュベートした。プログラムを、細胞増殖の画像を収集し、かつ核が緑色に染色された細胞及び核が赤色に染色された細胞の合計数、さらには2時間ごとの細胞のフェーズ集密度を決定するように設定した。実験当日に、MORAb-003ADCまたは遊離薬物を完全RPMI培地中で希釈し、連続希釈し、400

10

20

30

40

50

nMで開始した。細胞毒素溶液50 μ Lを、NLG-IGROV1細胞に添加し、30分間にわたってインキュベートした。インキュベーション期間中に、Nuclight (商標) Red (NLR) HL-60 (FR^{neg})細胞を新鮮な培地で、 2×10^5 、 1×10^5 または 5×10^4 細胞/mLに希釈した。NLR-HL60細胞懸濁液または培地のみ50 μ LをNLG-IGROV1ウェルに添加し、続いて、1,000rpmで3分間にわたって室温で遠心して、細胞ペレットの再形成を確実にした。プレートをIncucyte Zoom (EssenBio science)の容器に戻し入れ、37 / 5% CO₂で最高5日間にわたってインキュベートした。NLG-IGROV1の相対細胞増殖を、緑色の細胞数を使用して、ADCがサンプルに添加されなかった、または遊離薬物のみが添加された場合と比較することにより決定した。赤色の細胞数を決定したことを除いて、HL60の相対細胞増殖は同様に行われた。NLG-IGROV1及びNLR-HL-60の両方でのIC₅₀値の決定を、Prism (GraphPad)を使用して決定した。

10

【0263】

1.4.3 血清安定性アッセイ

MORAb-003ADC20 μ Lを、DPBS、正常にプールされたヒト血清 (Bioreclamation, Lot BRH552911)、または正常にプールされたマウス血清 (Bioreclamation, Lot MSE152591)80 μ Lと十分に混合し、37 で0、4、24、及び48時間にわたってインキュベートした。インキュベーションの後に、サンプルを凍結させ、細胞傷害性及び結合アッセイでの評価まで、-20 で貯蔵した。細胞傷害性分析のために、セクション1.4.1で詳述するのとおり、サンプルをIGROV1及びSJS A-1細胞で評価した。結合評価のために、サンプルを、溶液ベースのMSD ECLアッセイを使用して評価した。サンプルをビオチン化葉酸受容体アルファ及びスルホタグ抗MORAb-003と共にインキュベートし、その後、ストレプトアビジンプレート上で捕捉し、MSD Sector Imager 2400で電気化学ルミネセンスを使用して検出した。

20

【0264】

2. 結果

2.1 MORAb-003ADCの調製

MORAb-003とコンジュゲートさせるためにリンカー及び細胞毒素の最良の組合せを選択するために、3つの方法を使用してADCを調製した。図1に示されているコンジュゲーション戦略に従って、非対合システインを、限定モル当量の非チオール還元剤TCEPでの部分的な還元により生成する。この戦略は、軽鎖及び重鎖 (H-L対合1つ当たり1対)ならびにヒンジ領域の2つの重鎖 (ヒトIgG1の場合には、H-H対合1つ当たり2対)を結合する鎖間ジスルフィド結合を優先的に還元させる一方で、鎖内ジスルフィド結合はインタクトなままにする。

30

【0265】

MORAb-003ADCを調製するための第二のコンジュゲーション戦略は、還元ジスルフィド架橋ケミストリーを利用した。還元ジスルフィド架橋ケミストリーは、部分的還元プロセス中に放出されたシステイン残基の遊離チオールを再架橋し、これは、ジスルフィド結合の役割を模倣し、したがって、ADCの安定性及び機能を維持する。

40

【0266】

MORAb-003ADCを調製するための第三のコンジュゲーション戦略は、限定的リシン利用を用いた。限定的リシン利用は、典型的なヒトIgG分子上で利用可能な推定70+の溶媒曝露リシンのうちの非常に限定的な数のコンジュゲーションをもたらす、システイン修飾を伴う戦略に対して低い均一性を有するADC生成物の混合物を潜在的にもたらし得る。

【0267】

2.1.1 MORAb-003ADCのためのVCP-エリブリンの調製

エリブリン(1)(10mg、14 μ mol)(図2)をN,N-ジメチルホルムアミ

50

ド (DMF) (1 mL) に溶解させ、十分に混合した。N, N - ジイソプロピルエチルアミン (ヒューニツヒ塩基または iPr_2NEt) (3.6 μ L、21 μ mol) 及び Fmoc - Val - Cit - パラ - アミノベンジル - パラ - ニトロフェノール (Fmoc - VCP - PNP) (2) (16 mg、21 μ mol、Concortis Biosystems、cat # VC1003) を添加した。反応混合物を室温で4 ~ 16時間にわたって攪拌し、反応が完了するまで、ニンヒドリン試験キット (Anaspec、cat # 25241) を使用して監視した。次いで、ジエチルアミン (Et_2NH) (0.014 mL、0.14 mmol) を反応混合物に添加し、2時間にわたって18 ~ 25 で攪拌して、Fmoc 保護基を除去した。反応を、ニンヒドリン試験キットを使用して監視した。完了したら、溶媒を真空下で蒸発させて、粗製の VCP - エリブリン (3) (16 mg) を得、ZOBAX SB - C18 カラム (空孔サイズ 5 μ m、9.4 x 150 mm) を Waters Alliance e2695 HPLC システム上で、0.1%ギ酸を含有する $H_2O - CH_3CN$ の移動相で、15 ~ 70% B の勾配により使用して精製した。VCP - エリブリン (3) (16 mg) を DMF (1 mL) に溶解させた。ヒューニツヒ塩基 (7.2 μ L、41 μ mol) 及びマレイミド - PEG₂ - NHS (4) (9.7 mg、27 μ mol) を添加した。反応混合物を18 ~ 25 で3時間にわたって攪拌した。反応混合物を HPLC (0.1%ギ酸を含有する $H_2O - CH_3CN$) により、15 ~ 70% B の勾配により精製した。溶媒を凍結乾燥により除去して、mal - (PEG)₂ - Val - Cit - p - アミノベンジロキシカルボニル (pAB) - エリブリン (mal - (PEG)₂ - VCP - エリブリン) (5) を得た。

10

20

【0268】

2.1.2 還元条件の最適化

限定モル当量の非チオール還元剤トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) を用いる部分的還元により非対合システインを生成することにより、MORAb - 003 ADC を調製した。当初の調査を MORAb - 003 で行い、それにより、抗体分子1個当たり平均で4つのコンジュゲーション可能部位を生成することを目的として、抗体濃度、TCEP濃度、及びインキュベーション時間を変動させた。遊離チオール部位の数は、蛍光測定チオール定量化アッセイを使用して決定した。この分析の結果は表12に示す。10分、30分、60分、または120分のインキュベーション後の H - H 及び H - L 結合の切断の規模も、SDS - PAGE (図3) により分析した。この分析のために、非還元及び還元サンプルを SDS - PAGE ゲル上に装填し、電気泳動を185 V で1時間にわたって行った。図3では、レーン M は、タンパク質標準に対応する。レーン 1 は、未処理の非還元 MORAb - 003 に対応する。レーン 2 は、70.6 μ M TCEP 中で還元させた MORAb - 003 (5.3 mg/mL) に対応する。レーン 3 は、141.2 μ M TCEP での MORAb - 003 (5.3 mg/mL 還元) に対応する。レーン 4 は、20 μ M TCEP 中で還元させた MORAb - 003 (1.5 mg/mL) に対応する。レーン 5 は、40 μ M TCEP 中で還元させた MORAb - 003 (1.5 mg/mL) に対応する。各バンドのアイデンティティが右下のゲルに示されている。「H」は重鎖を示し、「L」は軽鎖を示す。

30

【0269】

40

50

【表 1 2】

表 1 2. MORAb-003 の還元条件の最適化

MORAb-003 濃度 μM (mg/mL)	TCEP 濃度 μM	10分		30分		60分		120分	
		遊離チオール μM	MAb当たりの還元されたジスルフィド結合	遊離チオール μM	MAb当たりの還元されたジスルフィド結合	遊離チオール μM	MAb当たりの還元されたジスルフィド結合	遊離チオール μM	MAb当たりの還元されたジスルフィド結合
35.3(5.3)	70.6	215	3.0	247.5	3.5	297.6	4.2	266.8	3.8
35.3(5.3)	141.2	339	4.8	372.8	5.3	384.2	5.4	479.8	6.8
10(1.5)	20	13.3	0.7	14.7	0.7	15.2	0.8	14.6	0.7
10(1.5)	40	21.8	1.1	25.6	1.3	26.9	1.3	27.4	1.4

10

【0 2 7 0】

SDS-PAGEの分析及びチオール含分は、分子内ジスルフィドの限定的な還元が存在するようであり（遊離チオール含分により決定されるとおり）、かつ非常に僅かな非還元mAbが残留している（非還元mAbは、調製したADCを使用するインビトロ及びインビボ試験において競合阻害薬として作用するであろう）、mAbに対してTCEPの4倍モル比での、mAb 5.3 mg/mLの60分のインキュベーションが合理的な出発点を示すことを示唆した。さらなる試験をMORAb-003で、5.0 mg/mLの濃度から出発して行って、SDS-PAGE分析を使用して、mAbに対するTCEPのこの最適化モル比を確認した（図4）。図4では、レーン1は、タンパク質標準に対応する。レーン2は、未処理の非還元MORAb-003に対応する。レーン3は、1:1のMORAb-003:TCEPの比で処理されたMORAb-003に対応する。レーン4は、1:2のMORAb-003:TCEPの比で処理されたMORAb-003に対応する。レーン5は、1:3のMORAb-003:TCEPの比で処理されたMORAb-003に対応する。レーン6は、1:4のMORAb-003:TCEPの比で処理されたMORAb-003に対応する。ADC調製のための細胞毒素のコンジュゲーションをシミュレートするために、還元及びTCEP除去の後に、マレイミド-PEG2-ビオチンを使用するコンジュゲーションも行った。DAR分析を、LC-MSを使用して行った。これらの試験の結果を表13に示す。

20

30

【0 2 7 1】

40

50

【表 1 3】

表 1 3. MORAb-003 の還元条件の最適化、マレイミド-PEG2-ビオチンとのコンジュゲーションレベル

TCEP		MORAb-003		
TCEP:mAb	TCEP (μ M)	LC	HC	DAR
1	33.3	0.29	0.34	1.26
2	66.7	0.48	0.83	2.62
3	100	0.63	1.21	3.68
4	133.2	0.73	1.70	4.86

LC、軽鎖ビオチンレベル；HC、重鎖ビオチンレベル；DAR、mAb 当たりのビオチン [DAR = 2 (LC) + 2 (HC)]。

【0272】

ビオチンコンジュゲーションの後に、遊離チオール分析は、遊離チオールが、MORAb-003-ビオチン中に存在しないことを示した。これは、ジスルフィド結合の還元後に、コンジュゲーションが典型的には、生成した両方のチオールで起こること、及びいずれの非コンジュゲート還元ジスルフィドも、再酸化されてジスルフィド結合を再形成することを示した。ADC 生成のための還元で選択された最終条件は、5.0 mg/mL の抗体濃度、110 μ M の TCEP 濃度、及び 60 分のインキュベーション時間であった。これは、コンジュゲーション後に 4 の DAR を有する mAb をもたらす。

【0273】

2.1.3 ADC コンジュゲーションの最適化

ADC 調製のために使用される第 1 の細胞毒素が、疎水性化合物であるクリプトフィシンであったので、当初のコンジュゲーション最適化実験を、特異的な位置にコンジュゲーションのために利用可能な 2 つの非対合システイン（軽鎖当たり 1 つ）を有する「代理」抗ヒトメソテリン抗体で行った。このことは、軽鎖のみを分析すればよいので、質量分析法によるコンジュゲーション効率の分析を大いに促進する。マレイミド-LL3-クリプトフィシンを代理抗体へとコンジュゲーションする間のプロピレングリコールの用量設定を行い、続いて、LC-MS により、軽鎖のコンジュゲーション効率を分析した（表 1 4）。

【0274】

【表 1 4】

表 1 4. コンジュゲーション反応におけるプロピレングリコール濃度の最適化

プロピレングリコール(%)	コンジュゲートされた Ab LC(%)
0	8%
20	48%
50	100%

LC 質量:コンジュゲートしていない場合は 23536 Da;コンジュゲートしている場合は 24367 Da。

【0275】

50% プロピレングリコールは、利用可能な部位の完全な占拠をもたらし、使用する最終濃度として選択された。コンジュゲーション後に、mAb の結合の損失は観察されず（データ図示せず）、これは、プロピレングリコールが、抗体に対して有害作用を有さない

ことを示した。したがって、選択された最終コンジュゲーション反応条件は、最終的に 2 . 5 m g / m L m A b、0 . 5 倍 D P B S 中でマレイミド - リンカー - 細胞毒素 : m A b の 6 : 1 モル比 (プロピレングリコール添加後の最終濃度)、0 . 5 m M E D T A、5 0 % プロピレングリコール、p H 7 . 2、室温で 3 . 5 ~ 4 時間であった。これらの反応で、プロピレングリコールを、マレイミド - リンカー - 細胞毒素の添加前に添加する。

【 0 2 7 6 】

2 . 1 . 4 A D C の調製及び生物物理学的特徴づけ

セクション 2 . 1 . 2 に記載した確立された還元及びコンジュゲーション条件を使用し、表 1 5 に列挙されている最初の 1 0 の M O R A b - 0 0 3 A D C を調製した。M - M M A E 及び M - D M 1 を除いて、残りの A D C を、還元ジスルフィド架橋または限定的リシン利用のいずれかにより調製した。M - M M A E 及び M - D M 1 は、C o n c o r t i s B i o s y s t e m s , I n c . により調製され、コンジュゲートした形態で投与された。

10

【 0 2 7 7 】

還元ジスルフィド架橋ケミストリーは、部分的還元プロセス中に生成された遊離チオールを架橋させて、還元されたジスルフィド 1 つ当たり 1 つの細胞毒素をもたらす。理論的には、D A R = 4 の抗体は、H - L 及びヒンジジスルフィドの両方を再架橋させて、従来のコンジュゲーションアプローチを上回る上昇した安定性及び均一性を有する A D C をもたらすであろう。限定的なリシン利用は、典型的なヒト I g G 分子上で利用可能な推定 7 0 + 溶媒曝露リシンのうちの非常に限定された数のコンジュゲーションをもたらす。この方法を使用して調製した M O R A b - 0 0 3 コンジュゲートは 2 . 0 の D A R をもたらし、これは、H - L 対当たり 1 つのみのリシンが利用されたことを示唆している。

20

【 0 2 7 8 】

すべての A D C を、H i P r e p 2 6 / 1 0 脱塩クロマトグラフィーにより精製して、D P B S 中で製剤化した。D A R 分析をすべての調製した A D C で、L C - M S により行い、凝集レベルを S E C - H P L C により決定した。これらの D A R 及び凝集分析の結果を、個々の A D C に次いで表 1 5 に列挙する。

【 0 2 7 9 】

30

40

50

【表 15】

表 15. MORAb-003ADCの生物物理学的分析

	化合物名	DAR	凝集(%)
1	PEG3-Bz-ジスルフィジル-ジメチル-クリプトフィシン	3.7~3.9	29
2	LL2-クリプトフィシン	3.2	18~36
3	LL3-クリプトフィシン	3.2~3.7	22~36
4	VCP-クリプトフィシン	3.4	50
5	VCP-エリブリン	3.6	0~2.6
6	ER-001161318	3.5	3.2
7	ER-001161319	3.5	3.1
8	ER-001159200	2.8	
9	M-MMAE	4.0	2
10	NHS-PEG2-AuF	5.0	
11	M-DM1	3.6	1.8
12	M-0285	4.0	1.2
13	M-0115	4.0	0.4
14	M-172	3.1	3.6
15	M-174	2.8	4.4
16	M-158	4.5	3.8
17	M-0384	4.2	4.2
18	M-0302	4.3	3.3
19	M-292	4.0	4.5
20	M-0026	4.2	3.3
21	M-0267	4.0	2.9
22	M-0272	3.3	1.5
23	M-0260	3.2	1
24	M-0276	4.6	6.2
25	M-015-0913	2.0	<1
26	M-030-0132	2.0	<1
27	M-0161	2.1	2.4
28	M-0157	2.0	<1
29	M-027-0381	2.0	<1
30	M-0025	2.0	1.7
31	M-0301	2.0	1.4
32	M-030-0011	2.0	<1
33	M-030-0291	2.0	<1
34	M-0255	3.6	5.9
35	M-0114	4.0	3.9

【0280】

すべてのADCでのDAR値は、予め決定された範囲内であった(3から4の間のDAR)。クリプトフィシンをベースとするADCでの凝集レベルは、所望よりもかなり高かったが(>10%)、エリブリンをベースとする(VCP-エリブリン)及びメイタンシンをベースとするマレイミド-リンカー-細胞毒素(ER-001161318、ER-001161319、及びM-MMAE)はすべて、許容される凝集レベルを実証した。他の有機補助溶媒の調査を、VCP-クリプトフィシンを使用して、MORAb-003に対するコンジュゲーション反応で行った。試験した補助溶媒は、DMSO(10%)、N,N-ジメチルホルムアミド(20%)、N,N-ジメチルアセトアミド(20%)、

及びN,N-ジメチルプロピオンアミド(20%)であった。これらの補助溶媒を使用し
てのコンジュゲーション後の凝集レベルはすべて、50%プロピレングリコールと同等で
あるか、またはそれよりも高かった。

【0281】

非還元型SDS-PAGE分析をADCのサブセットで行った(図5)。これらすべての
のADCでのDARが4であると決定されたため、これらのADCは、両方のH-L及び
両方のヒンジスルフィドが再架橋しているはずなので、約160kDのインタクトなI
gGとして移動するはずであると考えられた。ADCのこのサブセットは、M-MMAE
(レーン2)、M-DM1(レーン3)、M-0026(レーン4)、M-0260(レ
ーン5)、M-0267(レーン6)、M-0272(レーン7)、M-0285(レー
ーン8)、M-292(レーン9)、M-027-0381(レーン10)、及びM-03
84(レーン11)を含んだ(図5)。図5では、レーン1は、タンパク質標準に対応す
る。

10

【0282】

この分析から、還元ジスルフィド架橋ケミストリーADC(レーン4~9、11)では
、インタクトなADCに加えて、かなりのH-L一価種(80kD)が存在することが明
らかである。このことは、鎖間ヒンジ架橋に加えて、かなりの鎖内ヒンジジスルフィド架
橋が存在することを示している。SEC-HPLC分析は、ADCが単一のインタクトな
IgGとして移動することを示しており、鎖内H-H架橋を有するADCでは、重鎖は、
最終ADCにおいて共有結合していないことを示している。

20

【0283】

2.2 MORAb-003ADCのインビトロ効力の分析

2.2.1 IGROV1及びSJSA-1細胞での細胞傷害性

セクション1.4.1に詳述したとおりにクリスタルバイオレットアッセイを使用して
、調製したADCのインビトロ効力を評価した。

【0284】

すべてのMORAb-003ADCの当初スクリーニングを、IGROV1(FR^{hi}(
+++))及びSJSA-1(FR^{neg}(-))細胞で行った。IGROV1細胞は、ヒ
ト卵巣上皮癌由来のものであり、高レベルの葉酸受容体アルファ(FR)、すなわち、M
ORAb-003の標的抗原を発現する。SJSA-1細胞は、葉酸受容体アルファにつ
いて陰性であるヒト骨肉腫腫瘍細胞系である。選択されたADCのスクリーニングも、C
aOV3(ヒト卵巣癌、FR^{med}(++))、NCI-H2110(ヒト非小細胞肺癌、
FR^{med}(++))、及び/またはOVCA3(ヒト卵巣癌、FR^{med}(++))細胞
で行った。このスクリーニングの結果を表16に示す。

30

【0285】

40

50

【表 1 6】

表 1 6. 様々な腫瘍細胞系でのMORAb-003ADCの細胞傷害性 (IC₅₀) スクリーニング

化合物名	IGROV1	SJSA-1	CaOV3	NCI-H2110	OVCAR3
PEG3-Bz-ジスルフィジル-ジメチル-クリプトフィシン	0.067	0.41			
LL2-クリプトフィシン	0.023	4.7	0.33		
LL3-クリプトフィシン	0.086	12.7	0.19		0.094
VCP-クリプトフィシン	0.03	約100	0.02		
VCP-エリブリン	0.054	>100	3.7	0.73	0.16
ER-001161318	0.26	>100	3.1		
ER-001161319	0.49	>100	11.3		
ER-001159200	6.5	>100	9.2		
M-MMAE	0.2	253			
NHS-PEG2-AuF	0.2	>500			
M-DM1	55	132			
M-0285	0.3	>100		14	8.8
M-0115	0.54	>100			
M-172	>500	>500			
M-174	>500	>500			
M-158	>500	>500			
M-0384	2.25	2.45			
M-0302	330	>500			
M-292	1.7	>500			
M-0026	1.38	540			
M-0267	0.029	0.028			
M-0272	0.252	1.02			
M-0260	0.383	0.036			
M-0276	0.43	30			
M-015-0913	>500	>500			
M-030-0132	>500	17.3			
M-0161	>500	>500			
M-0157	>500	>500			
M-027-0381	14.5	28			
M-0025	>500	>500			
M-0301	>500	>500			
M-030-0011	61.6	>500			
M-030-0291	>500	105			
M-0255	0.12	0.46			
M-0114	144	>100			

すべての値はnMでのIC₅₀であり、行われた場合には反復実験の平均値である。

【0286】

VCP-エリブリンADCは、IGROV1細胞に対して効力があり(54pM)、SJSA-1細胞ではほとんど死滅を示さなかった。これらの細胞系では、VCP-エリブリンADCは、同等のDAR値を有するADC、例えば、M-MMAE及びM-DM1に対して、高い効力及び特異性を実証した。VCP-エリブリンADCはまた、卵巣(CaOV3及びOVCAR3)及び非小細胞肺癌(NC-H2110)由来の追加のFR発現性腫瘍細胞系に対して強力な細胞傷害性を実証した。

【0287】

ADC VCP-エリブリン、LL2-クリプトフィシン、LL3-クリプトフィシン

、VCP-クリプトフィシン、ER-001161318、ER-001161319、及びER-001159200は、CaOV3 (FR^{med}(++))細胞において特異的な細胞傷害性 (> 2-logの特異性)を示した。これらのADCの多くが、サブナノモルの効力を示した。クリプトフィシンコンジュゲートはまた、IGROV1細胞において高レベルの効力 (23 pM ~ 86 pM) を実証し (ただし、VCP-クリプトフィシンを除く)、同じく、SJSA-1細胞で測定可能な細胞傷害性を実証した。切断可能なメイタンシンコンジュゲートER-001161318及びER-001161319は、IGROV1 (0.26 nM及び0.49 nM)で、中間の効力を有し、SJSA-1細胞のオフターゲット死滅をほとんど有さなかった。

【0288】

すべての限定的リシン利用コンジュゲートは、特異性を実証せず、それらをさらに評価することはなかった。デュオスタチン-3 (M-0285)、デュオスタチン-5 (M-0115)、及びデュオスタチン-14 (M-292及びM-0026)の、還元ジスルフィド架橋技術を使用する切断可能なコンジュゲートはすべて、IGROV1細胞系で特異的な細胞傷害性を実証し、SJSA-1細胞系には細胞傷害性をほとんど有さなかった。オーリスタチンの誘導体であるデュオスタチン-3及びデュオスタチン-5コンジュゲートは、メイタンシン誘導体であるデュオスタチン-14コンジュゲートよりも、効力がわずかに高かった。効力及び特異性は、モノメチルEに結合しているVal-Cit-pAB (VCP)リンカーを使用する対照M-MMAEコンジュゲートに匹敵した。切断不可能な還元ジスルフィドケミストリーコンジュゲートはすべて、十分な効力または特異性が不足しており、さらに分析されることはなかった。

【0289】

2.2.2 ヒト葉酸受容体発現性卵巣癌細胞系CaOV3での細胞傷害性

選択されたMORAb-003ADCの効力も、ヒト卵巣腫瘍細胞系OVCA R3及びCaOV3、さらにはヒトNSCLC細胞系NCI-H2110で実証した (表16)。IGROV1細胞で観察された効力とは異なり、ヒト卵巣細胞系CaOV3では、クリプトフィシンコンジュゲートは、VCP-エリブリンコンジュゲートよりも、測定可能なほど高い効力を実証した。これは、IGROV1と比較して、CaOV3細胞での葉酸受容体アルファの低い発現レベル、またはエリブリンと比較して、これらの細胞に対するクリプトフィシンの高い効力により得る。メイタンシンをベースとするコンジュゲートER-001161318、ER-001161319、及びER-001159200はすべて、VCP-エリブリンと同様か、またはそれよりも低い効力を有した。

【0290】

2.3 VCP-エリブリン、ER-001161318、及びM-0285のバイスタンダー死滅

バイスタンダー死滅活性を評価するために、アッセイを、2つの標識細胞系を使用して構成した。このアッセイでは、Nuclight (商標) Greenで標識されたIGROV1細胞 (FR^{hi}) 及びNuclight (商標) Redで標識されたHL-60 (FR^{neg}) を種々の細胞数比で同時培養し、MORAb-003ADCのVCP-エリブリン、ER-001161318、またはM-0285の用量設定で処理した。VCP-エリブリンは、マレイミド-PEG₂-Val-Cit-pAB切断可能なリンカーを含む、エリブリンをベースとするADCであり、ER-001161318は、マレイミド-(CH₂)₅-Val-Cit-pAB切断可能なリンカーを含む、メイタンシンをベースとするADCであり、M-0285は、PEG-pAB切断可能なリンカーを含むデュオスタチンをベースとするADCである。細胞傷害性を、Incucyte Zoom (登録商標) セルイメージャーにより監視した。このバイスタンダー細胞傷害性アッセイの結果を、表17及び図6A~Cにおいて示す。

【0291】

10

20

30

40

50

【表 17】

表 17. FR陽性及びFR陰性細胞系の同時培養でのVCP-エリブリンのバイスタンダー死滅活性

EC ₅₀ (nM)			
IGROV-1	HL-60	HL-60 (IGROV-1と同時培養)	HL-60 (エリブリン)
0.0005972	39.74	0.2399	0.1702

10

【0292】

HL-60 (FR^{neg}) 細胞をIGROV1 (FR^{hi}) 細胞に対して2:1比で培養した場合、MORAb003-VCP-エリブリンでの処理は、HL-60細胞のみと比較して、HL-60細胞の死滅の2-log増加をもたらした(表17及び図6A)。これらのデータは、葉酸受容体アルファ(FR)標的陰性細胞が、FR標的陽性細胞と同時培養した場合に、MORAb003-VCP-エリブリンにより、より効果的に死滅されることを示唆しており、これは、本明細書でバイスタンダー死滅と称される。バイスタンダー死滅は、それら単独での、標的陽性細胞の非存在下での、かつそれらとの同時培養とは無関係な標的陰性細胞の死滅と定義されるオプターゲット死滅とは識別される。観察されたバイスタンダー死滅の増加はまた、遊離エリブリンでHL-60細胞を処理した後に観察される増加とほぼ同一であったが、これは、バイスタンダー作用のための潜在的な機構を示している。何らかの理論に束縛されることは望まないが、MORAb003-VCP-エリブリンは、FR陽性IGROV1細胞において、またはその付近で切断され得て、それらがまた、アポトーシスを受けて、培養中に遊離エリブリンを放出する。放出された細胞毒素が、FR陰性HL-60細胞を死滅させ得る。

20

【0293】

対照的に、MORAb003-ER-001161318では、僅かなシフトのみが観察され(図6B)、MORAb003-0285では、シフトは観察されなかった(図6C)。HL-60:IGROV1比を2:1から1:2へと低下させた場合、MORAb003-ER-001161318では、HL-60細胞のみに対して、HL-60細胞の測定可能な死滅が観察されたが、MORAb003-0285では、検出可能ではあるが、バイスタンダー作用はなお低いままであった。これらのデータは、バイスタンダー死滅の点において、評価したMORAb-003ADCは、VCP-エリブリン>ER-001161318>M-0285と格付けすることができることを示唆する。

30

【0294】

2.4 血清安定性分析

ADCのインビボでの長い循環半減期、及び細胞毒素が循環中に放出された場合の毒性の可能性を想定すると、ADCは、血清中での安定性を実証すべきである。MORAb-003ADCのVCP-エリブリン、ER-001161319、及びM-0285を、ヒトまたはマウス血清中で、37℃で、最高48時間にわたってブレインキュベートし、次いで、IGROV1及びSJS-A-1細胞を用いる細胞傷害性アッセイで評価した。ER-001161319は、VCP-エリブリンと同じ切断可能なリンカー、マレイミド-PEG₂-Val-Cit-pABを含む、メイタンシンをベースとするADCである。アッセイ性能に対する何らかの血清作用を修正するために、PBS及び血清対照が含まれた。この試験の結果を表18に示す。

40

【0295】

50

【表 18】

表 18. 選択されたMORAb-003ADCの血清安定性

		細胞ベースの細胞傷害性アッセイ、EC ₅₀ 、nM								
		MORAb003-VCPエリブリン			MORAb003-ER00116131 9			MORAb003-0285		
	時間	PBS	ヒト血清	マウス血清	PBS	ヒト血清	マウス血清	PBS	ヒト血清	マウス血清
IGROVI	0時-PBS	0.021	0.013	0.02	0.28	0.15	0.2	0.074	0.089	ND
	0時-血清	0.022	0.014	0.01	0.15	0.15	0.2	0.063	0.078	0.049
	4時間	0.03	0.018	0.019	0.14	0.17	0.25	0.065	0.075	0.049
	24時間	0.024	0.019	ND	ND	0.27	0.9	0.059	0.074	0.044
	48時間	0.022	0.021	0.03	0.21	0.73	2.56	0.043	0.05	0.051
SJS A-1	0時間-PBS	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	0時間-血清	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	4時間	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	24時間	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	48時間	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10

網掛けのボックスは、T = 0 サンプルからの効力の顕著な低下を示している。

【0296】

VCP-エリブリン及びM-0285は、いずれの血清中でも少なくとも48時間にわたって安定していたが、ER-001161319は、48時間後に、効力のかなりの低下を実証した。これは、メイタンシンへのアジリジノ-カルバマート連結により得るが、これは、以前に文献に記載されたことはない。細胞傷害性の上昇がSJS A-1細胞で観察されることはなかったため、放出された化合物の形態が、高度に強力であることはないであろう。

【0297】

2.5 MORAb003-VCP-エリブリンでのインビトロ試験

2.5.1 DARのHIC-HPLC分析及び生成物の異質性

代替方法によりDARを評価し、生成物の異質性及び非コンジュゲート抗体（競合物質）の含分を検査するために、MORAb003-VCP-エリブリン及びMORAb003-0285をHIC-HPLCにより分析した。MORAb003-VCP-エリブリンは、0、2、4、及び6のDAR種を有することが示されたが、これは、還元及びコンジュゲーションのために使用された方法と一致する（図7A）。非常に少量のDAR = 0種が観察された。AUC計算に基づく全DARは、3.80であり、これは、LC-MSにより決定された値と一致した。MORAb003-0285は、HIC-HPLCによると単一ピークとして移動し、これは、単一のDAR種を示した（図7B）。これを、DAR 4.0と指定した。

【0298】

2.5.2 競合アッセイによる特異性

競合アッセイ形式を使用して、MORAb-003-VCP-エリブリン細胞傷害性の抗原特異性をVCP-エリブリンコンジュゲートについて実証した（図8）。この実験で

は、MORAb-003-VCP-エリブリンの用量設定（出発濃度100nM）を、2μM非コンジュゲートMORAb-003と同時インキュベートした。KB細胞に対して、IMGN853、現在第II相試験中のImmunogen製の抗ヒト葉酸受容体アルファ-メイトンシンADCで得られる結果と同様に、非コンジュゲートMORAb-003は、IGROV1細胞での効力において2-logシフトを示した（Moore et al., 2015 American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, Abstract 5518）。【0299】

2.5.3 NCI-H2110 NSCLC細胞での細胞傷害性

ヒトNSCLC細胞系NCI-H2110に対するMORAb003-VCP-エリブリン及びMORAb003-0285の両方での細胞傷害性を、クリスタルバイオレットアッセイを使用して行った。このアッセイの結果を表16に示す。MORAb003-VCP-エリブリンは、0.73nMのIC₅₀を有し、MORAb003-0285は、14nMのIC₅₀を有した。

【0300】

2.6 インビボ試験

2.6.1 CD-1マウス株におけるMORAb-003-VCP-エリブリン(MORAb-202)の最大耐量(MTD)

ナイーブCD-1マウスに、表19のスケジュールに従って、200μLのMORAb-202を静脈内注射した。体重を、投与日の投与前に、投与から24時間後に、及びその後は週に3回測定した。動物を、試験期間を通じて臨床的健康について観察した。投与から2週間後に、最終体重を測定し、記録した。試験の終了時に安楽死させたマウス（及びもしあるならば、試験中に安楽死させたか、または死亡が発見されたマウス）を、検死のために処理した。臓器を、組織損傷の徴候について検査した。

【0301】

【表19】

表19. 試験設計

群	マウス数	処置	用量 (mg / kg)	レジメン	経路
1	3	MORAb-202	0	単一ボーラス	i. v.
2			10		
3			20		
4			40		
5			80		

【0302】

PBS処置対象群と比較して、処置群のいずれでも、有意な体重減少、または処置中の毒性を示す任意の臨床的所見は観察されなかった。個々のマウスの体重を表20に示し、群平均及びSEMを表21に示す。各群での体重変化動態（群平均及びSEM）を図9に示す。ボーラス静脈内投与による最高80mg/kgの用量でのMORAb-202は、毒性をもたらさなかった。したがって、MTDは、80mg/kg超である。

【0303】

10

20

30

40

50

【表 2 0】

表 2 0

処理の 目録 No.	P38 参照			MORAS-222 5mg/kg			MORAS-222 5mg/kg			MORAS-222 5mg/kg		
	濃度	系統	濃度	濃度	系統	濃度	濃度	系統	濃度	系統	濃度	
0	22.82	26.02	21.26	22.82	26.02	21.26	22.82	26.02	21.26	22.82	26.02	21.26
1	23.82	27.02	22.02	23.82	27.02	22.02	23.82	27.02	22.02	23.82	27.02	22.02
2	21.02	11.30	12.02	21.02	11.30	12.02	21.02	11.30	12.02	21.02	11.30	12.02
3	23.82	21.02	21.02	23.82	21.02	21.02	23.82	21.02	21.02	23.82	21.02	21.02
4	23.82	23.12	22.72	23.82	23.12	22.72	23.82	23.12	22.72	23.82	23.12	22.72
5	24.02	22.82	22.82	24.02	22.82	22.82	24.02	22.82	22.82	24.02	22.82	22.82
6	21.02	23.12	22.22	21.02	23.12	22.22	21.02	23.12	22.22	21.02	23.12	22.22
7	24.02	22.82	22.82	24.02	22.82	22.82	24.02	22.82	22.82	24.02	22.82	22.82
8	24.02	22.82	22.82	24.02	22.82	22.82	24.02	22.82	22.82	24.02	22.82	22.82

【 0 3 0 4】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 2 1

注射後の日数	PBS		MORAb-202 10 mg/kg		MORAb-202 20 mg/kg		MORAb-202 40 mg/kg		MORAb-202 80 mg/kg	
	平均値	sem	平均値	sem	平均値	sem	平均値	sem	平均値	sem
0	21.4	0.5	21.6	0.5	21.9	1.0	21.9	0.6	21.7	1.5
1	21.1	0.8	21.1	0.3	21.9	2.3	22.9	0.7	21.2	1.6
2	22.4	0.5	23.4	0.9	23.8	2.4	23.3	0.8	23.6	1.7
3	23.4	0.5	23.5	0.2	24.1	1.5	23.7	0.5	22.3	1.6
7	23.1	0.1	25.0	0.1	24.7	2.4	24.7	0.6	27.9	2.3
9	23.5	0.7	25.1	0.1	26.5	2.6	24.9	0.6	25.3	2.1
11	23.5	0.3	24.6	0.3	24.1	2.7	24.7	0.5	27.2	2.1
14	24.0	0.3	25.7	0.1	25.9	2.9	25.8	0.3	26.3	2.3

10

20

30

40

【 0 3 0 5 】

2 . 6 . 2 C D - 1 マウスでのエリプリンの最大耐量

ナীব C D - 1 マウスに、表 2 2 のスケジュールに従って、エリプリン 2 0 0 μ L を静脈内注射した。体重を、各投与日での投与前、各投与から 2 4 時間後を含めて、週に 3 回測定した。動物を、試験期間を通じて（最後の投与後 2 週間）臨床的健康について観察した。最終体重を測定し、記録した。試験の終了時に安楽死させたマウス（及びもしあるならば、試験中に安楽死させたか、または死亡が発見されたマウス）を、検死のために処理した。臓器を、組織損傷の徴候について検査した。

【 0 3 0 6 】

50

【表 2 2】

表 2 2. 試験設計

群	マウス数	処置	用量 (mg/kg)	レジメン	経路
1	3	PBS	0	q4d×3	i. v.
2		エリブリン	0.4		
3			0.8		
4			1.6		
5			3.2		

10

【0307】

q4d×3投与計画(4日毎に1回で合計3回の投与)を使用して最高1.6mg/kgの用量でエリブリンを投与された動物では、毒性を示す有意な体重減少または臨床的所見は観察されなかった。同じスケジュールでの3.2mg/kgの投与は、2回目の投与後に3匹のマウスすべてで、起毛を誘発した。PBS処置対象と比較して、重度の体重減少(2回目の投与後に1匹のマウス#552で23%の減少;3回目の投与後に残りの#551及び#552で17%及び8%)を観察した。検死中に、マウスの臓器において、肉眼的な変化は観察されなかった。個々のマウスの体重を表23に示し、群平均及びSEMを表24に示す。各群での体重変化動態(群平均及びSEM)を図10に示す。

20

【0308】

q4d×3投与計画を使用する最高1.6mg/kgの用量のエリブリンは、毒性をもたらさず、3.2mg/kgは、重篤な体重減少を誘発した。したがって、エリブリンのMTDは、この試験では、1.6mg/kg、q4d×3である。

【0309】

30

40

50

【表 2 3】

表 2 3

日	#B3		エリブリン 3mg/kg		エリブリン 3mg/kg		エリブリン 3mg/kg		エリブリン 3mg/kg		エリブリン 3mg/kg		エリブリン 3mg/kg	
	経路	経路	経路	経路	経路	経路	経路	経路	経路	経路	経路	経路	経路	経路
1	26.82	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42
2	28.13	26.11	24.36	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45
3	26.82	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42
4	28.13	26.11	24.36	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45
5	26.82	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42
6	28.13	26.11	24.36	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45
7	26.82	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42
8	28.13	26.11	24.36	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45
9	26.82	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42
10	28.13	26.11	24.36	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45
11	26.82	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42
12	28.13	26.11	24.36	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45
13	26.82	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42
14	28.13	26.11	24.36	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45
15	26.82	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42
16	28.13	26.11	24.36	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45
17	26.82	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42
18	28.13	26.11	24.36	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45
19	26.82	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42	24.42
20	28.13	26.11	24.36	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45	22.45

各欄は個々の動物を表している。
 *9003、>20%の体重減少で安楽死させた。

【 0 3 1 0 】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

注射後の日数	PBS		エリブリン 0.4mg/kg		エリブリン 0.8mg/kg		エリブリン 1.6mg/kg		エリブリン 3.2mg/kg	
	平均値	sem	平均値	sem	平均値	sem	平均値	sem	平均値	sem
0	24.8	0.9	23.4	0.6	24.8	0.5	23.3	0.7	23.6	0.9
1	25.0	1.2	22.8	0.7	23.7	0.4	23.1	1.0	22.1	0.8
4	25.0	0.3	23.6	0.4	24.2	0.2	23.0	0.7	20.2	1.4
5	25.2	0.6	23.3	0.5	24.3	0.3	23.4	0.9	20.2	1.7
8	25.3	0.9	24.1	0.6	24.9	0.6	23.5	0.8	22.5	0.9
9	25.8	0.9	23.9	0.8	24.7	0.4	23.6	0.9	21.6	1.1
11	25.8	0.9	24.0	0.9	25.3	0.4	24.2	1.0	21.7	1.3
13	26.5	0.6	24.7	0.9	25.8	0.4	24.6	0.9	22.6	0.9
16	26.8	0.3	25.2	0.8	25.9	0.3	25.4	1.0	24.0	0.9
18	27.2	0.1	25.7	1.1	27.4	0.6	26.3	0.9	25.9	0.6
20	27.4	0.5	26.8	0.9	27.2	0.9	26.8	1.1	26.4	0.5

表 2 4

10

20

30

40

【 0 3 1 1 】

2 . 6 . 3 CB17 - SCIDマウスにおけるhNSCLC NCI - H2110モデルでのMORAb003 - VCP - エリブリン (MORAb - 202) の最小有効用量の評価

ヒトNSCLC、NCI - H2110細胞、継代47を、30匹のCB17 SCIDマウス (雌、5 ~ 6週齢、体重20グラム) に皮下移植した。移植から14日後に、マウスを5つの群に無作為化した。処置日 (0日) での各群の平均腫瘍体積は、154 ~ 175 mm³ (表27) の範囲であった。試験設計 (表25) に従って、登録されたマウスを、1、2.5、もしくは5 mg / kgのMORAb003 - VCP - エリブリン (MORAb - 202) (Lot # NB2900 - 87E 10 / 07 / 15) で、対照として5

50

mg/kgのMORAb-003-0285 (Lot # 042-150-002)で、またはPBSで処置した。群内のいずれかの動物の腫瘍体積が $> 2000 \text{ mm}^3$ になったときに、各群を試験から排除した。最後の群を61日目に終了させた。

【0312】

【表25】

表25. 試験設計

群	マウス数	処置	用量(mg/kg)	レジメン	経路
1	5	PBS	0	単回ボラス	i. v.
2	5	MORAb-003-VCP-エリブリン	1		
3	5	MORAb-003-VCP-エリブリン	2.5		
4	4 ¹	MORAb-003-VCP-エリブリン	5		
5	5	MORAb003-0285	5		

10

【0313】

個々のマウスの腫瘍体積を表26に示し、群平均及びSEMを表27に示す。各群での腫瘍増殖動態(群平均及び平均の標準誤差、SEM)を図11に示し、個々のマウスにおける腫瘍体積、さらには群平均及びSEMを図12に示す。17日目(初めて、 $> 2000 \text{ mm}^3$ の腫瘍体積が観察されたとき)の腫瘍体積に基づき、MORAb-202は、1 mg/kgで47%の腫瘍増殖阻害(TGI)(生理食塩水に対して $p = 0.002$)、2.5 mg/kgで96%のTGI(生理食塩水に対して $p < 0.0001$)をもたらした。しかしながら、退縮した腫瘍が、処置の終了から1~2週後に再増殖した。5 mg/kgのMORAb-202で処置されたマウスでは、腫瘍は検出されなかった。これらのマウスは、単回投与処置後に60日超にわたって腫瘍を含有しないままであった。MORAb-003-0285は、5 mg/kgで89.7%のTGIをもたらした(生理食塩水に対して $p < 0.0001$)。

20

【0314】

個々のマウスの体重を表28に示し、群平均及びSEMを表29に示す。各群での体重変化動態(群平均及びSEM)を図13に示す。

30

【0315】

処置群のいずれにおいても、対照と比較して、有意な体重減少は観察されなかった。

【0316】

MORAb-202は、NCI-H2110腫瘍増殖に対して有意な効果を示した。腫瘍退縮が2.5 mg/kgでのボラス処置により、94%のTGI(PBSに対して)で達成された。したがって、MORAb-202の最小有効用量は、このモデルで試験された2.5 mg/kgである。完全腫瘍根絶が5 mg/kgの単回投与により達成された。60日超にわたって、腫瘍増殖は観察されなかった。

【0317】

40

50

【表 2 6】

表 2 6. 腫瘍体積

無作為化後の日数	PBS			MORAb-202 1mg/kg			MORAb-202 2.5 mg/kg			MORAb-202 5mg/kg			003-0285 5mg/kg												
	164	195	137	300	80	178	218	133	118	150	187	189	92	120	236	110	202	159	146	65	208	241	243	97	
0	368	413	279	587	171	178	207	104	106	216	144	97	65	69	148	40	115	68	68	83	259	358	292	164	
3	327	481	285	555	190	161	193	83	95	215	75	51	37	35	56	14	52	22	37	54	160	168	239	105	
5	467	758	541	894	275	257	258	139	160	348	61	52	58	33	57	7	28	25	20	43	197	235	247	129	
6	642	815	621	1055	395	317	306	182	167	476	64	54	53	36	57	8	48	16	20	52	192	255	266	128	
7	891	1238	895	1328	662	506	494	230	285	708	24	37	35	15	71	0	0	0	0	39	155	240	181	86	
10	993	1274	983	1519	1115	638	655	371	361	865	40	21	51	9	69	0	0	0	0	32	106	206	223	83	
12	981	1410	1131	1695	971	848	812	402	418	901	41	30	37	0	89	0	0	0	0	31	115	235	157	79	
14	1320	1723	1319	2089	1466	955	980	727	592	946	46	33	64	0	161	0	0	0	0	28	114	346	251	74	
17						838	1030	856	602	953	56	37	90	0	282	0	0	0	0	27	144	438	359	94	
19											102	37	197	0	702	0	0	0	0	46	391	1244	824	187	
24											168	102	319	0	790	0	0	0	0	103	564	1470	1030	287	
26											269	54	474	9	990	0	0	0	0	125	703	1898	1112	375	
28											362	105	558	13	1187	0	0	0	0	225	1144	2427	1413	657	
31											496	124	588	9	1461	0	0	0	0						
33											573	212	669	16	1847	0	0	0	0						
35											764	348	952	20	2367	0	0	0	0						
38																0	0	0	0						
40																0	0	0	0						
42																0	0	0	0						
45																0	0	0	0						
47																0	0	0	0						
52																0	0	0	0						
54																0	0	0	0						
59																0	0	0	0						
61																0	0	0	0						

各欄は個々の動物を表している。

【 0 3 1 8】

10

20

30

40

50

【表 2 7】

表 2 7

無作為化後の日数	PBS			MORAb-202 1mg/kg			MORAb-202 2.5mg/kg			MORAb-202 5mg/kg			MORAb-001+0285 5mg/kg		
	平均	SEM	N	平均	SEM	N	平均	SEM	N	平均	SEM	N	平均	SEM	N
0	175.2	36.41527	5	159.4	17.68781	5	164.8	25.8917	5	154.25	16.95792	4	170.8	37.46065	5
3	363.6	69.3831	5	162.2	24.14101	5	104.6	17.7581	5	72.75	13.88661	4	231.2	48.4055	5
5	367.6	66.21275	5	149.4	26.13343	5	50.8	7.242607	5	31.25	7.500133	4	145.2	31.14683	5
6	587	108.7468	5	232.4	37.74183	5	52.2	5.005179	5	20	4.140008	4	170.2	37.81015	5
7	705.6	109.7441	5	289.6	55.74694	5	52.8	4.611415	5	23	7.76666	4	178.6	40.08123	5
10	1002.8	122.532	5	444.6	85.61518	5	36.4	9.499597	5	0	0	4	140.2	35.30937	5
12	1176.8	100.25	5	578	95.18355	5	38	10.62087	5	0	0	4	130	36.5513	5
14	1237.6	138.8994	5	676.2	109.4307	5	39.4	14.30871	5	0	0	4	123.4	34.69758	5
17	1583.4	146.0629	5	840	76.78507	5	60.8	27.09899	5	0	0	4	162.6	58.96373	5
19				855.8	72.16584	5	93	49.35207	5	0	0	4	212.4	79.06236	5
24							207.6	127.8177	5	0	0	4	538.4	219.5123	5
28							275.8	138.3498	5	0	0	4	690.8	249.2466	5
28							359.2	177.874	5	0	0	4	842.6	310.8641	5
31							445	208.4929	5	0	0	4	1173.2	373.2365	5
33							535.6	255.2269	5	0	0	4			
35							663.4	318.1881	5	0	0	4			
38							890.2	402.5237	5	0	0	4			
40										0	0	4			
42										0	0	4			
45										0	0	4			
47										0	0	4			
52										0	0	4			
54										0	0	4			
59										0	0	4			
61										0	0	4			

【 0 3 1 9 】

10

20

30

40

50

【表 2 8】

表 2 8

無作為化後の日数	PBS	MORAB-202 1mg/kg	MORAB-202 2.5 mg/kg	MORAB-202 5mg/kg	MORAB-003-0285 5mg/kg	
0	19.1 18.2 18.4 18.9 18.8 19.1 18.6 19.3 20.6 18.4 17.8 18.1 18 19.8 16.3				17.6 18.7 16.1 19.7 20.5 17.4 18 17.4 18.8	
3	19.6 18.2 18.9 18.9 19.3 19.3 18.4 20.2 20.9 18.6 18.4 19.1 18.6 19.9 16.4				17.5 18.8 15.9 19.9 20.8 17 18.1 16.3 18.5	
6	19.7 18.4 18.4 19.1 19.1 19 18.3 20.3 21.3 19 18.5 19.4 18.7 20 16.4				17.5 19.3 16.3 19.6 20.8 17.7 18.2 16.8 18.7	
7	19.7 18 18.9 18.8 18.9 18.9 18 20 21.2 18.9 18.7 18.7 19.7 16.5				17.4 19.4 16.5 19.2 20.6 17.7 18.5 16.8 19	
10	19.7 18 19.2 18.5 19.1 18.4 18 20.1 20.9 19 19.3 19.7 18.8 19.8 16.6				17.6 19.4 16.7 20 20.5 18.2 18.6 17.5 20.3	
12	19.8 17.7 19.1 18.4 19 18.3 17.8 20.5 20.9 19.5 18.9 20 19.7 20.2 17.2				17.9 19.6 16.9 20.2 20.4 18.3 18.8 18.1 20.4	
14	18.8 17.4 18.4 18.2 17.5 17.9 17.7 20.3 21.2 19.9 18.8 19.6 19 19.3 17				17.5 19.3 17 19.2 20 18.2 18.9 18.4 19.7	
17	18.8 17.2 18.3 17.5 17.2 17.4 17.7 20.4 20.7 19.2 18.8 19.8 19.7 19.2 17.3				17.9 20 17.3 19.7 19.8 17.9 18.9 18.6 19.5	
19		16.7 17.2 19.9 20.7 18.9 18.3 19.8 18.7 19.5 16.8			18.1 20 17.1 20.2 19.7 18 19.3 18.4 19.6	
24			18.8 20.2 19.2 19.9 16.9		18.5 20.7 17.5 20.2 20.1 18.5 20 19.1 18.9	
26			18.9 19.6 18.9 19.5 16.5		18.3 20.7 17.6 19.7 20.6 18.4 19.9 18.6 19.1	
28			18.8 19.6 19.5 19.6 16.6		18.6 21.3 17.6 20.1 20.8 18.5 19.9 18.8 19.5	
31			18.9 20.1 19.6 20.7 17		18.6 20.4 17.9 20.9 20.7 18.2 20.9 19.6 19.5	
33			18.9 19.8 19.4 21.2 17.6		18.8 19.6 18.2 21.3	
35			19.2 19.7 19.5 20.7 17.4		18.7 20.2 18.1 19.6	
38			19.6 20 19.7 20.6 18		18.8 20.4 19 17.2	
40					19.4 20.4 18.7 19.3	
42					19.9 20.4 18.8 20.6	
45					19.8 21 18.3 21.7	
47					19.7 20.7 18.3 21.1	
52					20.2 21.1 18.5 21.9	
54					20.3 21.4 18.6 22.6	
59					20 21.6 18.8 21.7	
61					20.5 22.1 19.2 21.3	

【 0 3 2 0】

10

20

30

40

50

【表 2 9】

表 2 9

無作為化後の日数	PBS		MORAb-202 1mg/kg		MORAb-202 2.5mg/kg		MORAb-202 5mg/kg		MORAb-003-デュロスタミド 5mg/kg	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
0	18.68	0.165139	19.2	0.385328	18	0.554902	18.075	0.689078	18.47	0.578982
3	18.98	0.234959	19.48	0.47393	18.48	0.579442	18.025	0.769253	18.14	0.76975
6	18.94	0.245739	19.58	0.537015	18.5	0.609665	18.175	0.694839	18.44	0.667108
7	18.86	0.268971	19.4	0.549488	18.46	0.535953	18.125	0.628577	18.52	0.638771
10	18.9	0.29444	19.28	0.537015	18.84	0.585996	18.425	0.68618	19.02	0.590063
12	18.8	0.352933	19.4	0.600608	19.2	0.545849	18.65	0.67813	19.2	0.502108
14	18.06	0.267112	19.4	0.685817	18.74	0.454832	18.25	0.523801	19.04	0.352368
17	17.8	0.320373	19.08	0.673649	18.96	0.451533	18.725	0.592675	18.94	0.33497
19			18.68	0.764423	18.62	0.527655	18.85	0.670634	19	0.338521
24					19	0.579498	19.225	0.663539	19.32	0.313137
26					18.68	0.563279	19.075	0.621135	19.32	0.41086
28					18.82	0.573795	19.4	0.728103	19.5	0.407939
31					19.26	0.636533	19.45	0.638148	19.78	0.484329
33					19.38	0.585826	19.475	0.60047		
35					19.3	0.536544	19.15	0.416401		
38					19.58	0.430983	18.85	0.584918		
40							19.45	0.314619		
42							19.925	0.359691		
45							20.2	0.665164		
47							19.96	0.549137		
52							20.425	0.651414		
54							20.725	0.758819		
59							20.525	0.620064		
61							20.775	0.552051		

10

20

30

40

【 0 3 2 1】

2 . 6 . 4 CB 1 7 - SC ID マウスにおける h NSCLC NCI - H 2 1 1 0 モデルでのエリブリンの最小有効用量の評価

ヒト NSCLC、H 2 1 1 0 細胞、継代 4 6 を、3 0 匹の CB 1 7 SC ID マウス（雌、5 ~ 6 週齢、体重 2 0 グラム）に皮下移植した。移植から 1 1 日後に、マウスを 5 つの群に無作為化した。腫瘍体積が平均から最も偏差している 5 匹の動物を排除した。処置日（0 日）での各群での平均腫瘍体積は、8 7 . 6 ~ 8 9 . 4 mm³ の範囲であった（表 3 2）。試験設計（表 3 0）に従って、登録されたマウスを、0 . 0 5、0 . 2、0 . 8、または 1 . 6 mg / k g のエリブリン（Lot # N 1 2 0 1 1 9 3）で、または PBS

50

で処置した。群内で $> 2000 \text{ mm}^3$ の腫瘍体積が初めて観察されたときに、それぞれ、各群を終了させた。試験を 38 日目に終了させた（最後の投与後 30 日間）。

【0322】

【表30】

表30. 試験設計

群	マウス数	処置	用量(mg/kg)	レジメン	経路
1	5	PBS	0	q4d×3	i. v.
2		エリブリン	0.05		
3			0.2		
4			0.8		
5			1.6		

10

【0323】

個々のマウスの腫瘍体積を表31に示し、群平均及びSEMを表32に示す。各群での腫瘍増殖動態（群平均及びSEM）を図14に示し、個々のマウスにおける腫瘍体積、さらには24日目（PBS処置マウスで $> 2000 \text{ mm}^3$ の腫瘍体積が観察されたとき）での群平均及びSEMを図15に示す。エリブリンは、 0.05 mg/kg で50.5%のTGI（腫瘍退縮は観察されなかった）（生理食塩水に対して $p = 0.0026$ ）；0.2、0.8、または 1.6 mg/kg で約99%のTGI（p値は、生理食塩水と比較した場合に、3つの群すべてで < 0.0001 であった）をもたらした。腫瘍退縮を誘発する最小有効用量は、 0.2 mg/kg である。しかしながら、これらのマウスにおける退縮腫瘍の大部分（ 0.2 mg/kg 群で3/5、 0.8 mg/kg 群で4/5、及び 1.6 mg/kg 群で2/5）は再増殖し、試験期間（最後の投与後30日間）を通じて測定可能なままであった。

20

【0324】

個々のマウスの体重を表33に示し、群平均及びSEMを表34に示す。各群での体重変化動態（群平均及びSEM）を図16に示す。

【0325】

生理食塩水処置対照群と比較して、処置群のいずれにおいても、有意な体重減少は観察されなかった。処置中の毒性を示す臨床所見は観察されなかった。

30

【0326】

q4d×3で静脈内投与された 0.2 mg/kg 以上のエリブリンは、H2110腫瘍増殖に対して有意な効果を示した。腫瘍退縮が達成された。より低い用量を投与した場合には（ 0.05 mg/kg ）、腫瘍退縮は達成されなかった。したがって、この試験で試験された最小有効用量は、 0.2 mg/kg である。

【0327】

40

50

【表 3 1】

表 3 1

1回目の投与後の日数	ピヒケル			エリブリン0.06mg/kg			エリブリン0.2mg/kg			エリブリン0.8mg/kg			エリブリン1.6mg/kg												
	59	91	118	88	91	105	101	94	61	77	103	68	78	130	62	111	104	81	93	54	70	116	74	91	91
0	59	91	118	88	91	105	101	94	61	77	103	68	78	130	62	111	104	81	93	54	70	116	74	91	91
3	62	179	219	236	173	175	149	117	161	64	68	62	52	79	61	54	55	40	51	33	50	44	44	44	47
5	80	255	436	283	257	231	157	228	261	132	60	60	48	90	51	32	29	34	42	25	25	22	32	24	24
7	111	433	440	472	446	357	171	269	247	102	48	47	39	49	47	26	34	17	21	24	19	12	31	15	11
10	230	555	747	622	489	370	200	413	376	226	33	39	28	36	47	17	22	19	5	21	15	0	29	14	0
12	263	677	722	877	620	539	265	448	350	135	19	41	23	13	14	15	23	16	12	24	13	0	14	0	0
17	720	959	960	1158	885	725	514	751	620	531	0	0	0	0	0	13	17	38	0	26	0	0	0	0	0
19	862	1314	940	1097	941	869	437	908	776	837	27	39	29	29	16	0	20	18	0	27	0	0	19	0	0
24	1886	2308	1854	2760	1671	712	718	1489	1225	1040	0	15	19	23	11	14	0	20	0	33	18	0	19	0	0
26											0	24	0	11	14	0	8	14	14	15	8	0	17	0	0
28											0	7	0	14	83	0	16	20	14	17	0	0	16	0	0
31											0	16	0	10	31	0	10	15	26	29	11	0	17	0	0
33											0	27	0	13	22	0	13	8	18	44	8	0	28	0	0
35											0	19	0	16	42	0	13	0	22	50	14	0	17	0	0
38											0	19	0	14	45	0	11	13	13	54	11	0	20	0	0

【 0 3 2 8 】

10

20

30

40

50

【表 3 2】

表 3 2

山回りの投与後の日数	PBS			エロブリン0.05mg/kg			エロブリン0.2mg/kg			エロブリン0.8mg/kg			エロブリン1.6mg/kg		
	平均	SEM	N	平均	SEM	N	平均	SEM	N	平均	SEM	N	平均	SEM	N
0	89.4	9.34	5	87.6	8.18	5	88.2	12.56	5	88.6	10.02	5	88.4	8.11	5
3	173.8	30.31	5	133.2	19.74	5	64.4	4.45	5	46.6	4.31	5	45.8	1.20	5
5	262.2	56.43	5	201.8	24.37	5	61.8	7.43	5	32.4	2.83	5	25.4	1.72	5
7	380.4	67.55	5	229.2	43.40	5	46	1.79	5	24.4	2.83	5	17.6	3.62	5
10	528.6	85.83	5	317	43.21	5	36.6	3.17	5	16.8	3.07	5	11.6	5.42	5
12	631.8	101.42	5	347.4	70.14	5	22	5.07	5	18	2.34	5	5.4	3.30	5
17	936.4	70.46	5	628.2	48.40	5	2.6	2.60	5	16.2	7.39	5	0	0.00	5
19	1030.8	80.29	5	765.4	84.75	5	28	3.65	5	13	5.50	5	3.8	3.79	5
24	2095.8	195.76	5	1036.8	149.24	5	13.6	3.94	5	13.4	6.26	5	7.4	4.53	5
28							9.8	4.54	5	10.2	2.83	5	5	3.37	5
31							20.8	15.74	5	13.4	3.48	5	3.2	3.19	5
33							11.4	5.77	5	16	5.29	5	5.6	3.55	5
35							12.4	5.53	5	16.6	7.45	5	7.2	5.42	5
38							15.4	7.72	5	17	9.22	5	6.2	3.82	5
							15.6	8.25	5	18.2	9.25	5	6.2	4.05	5

【 0 3 2 9】

10

20

30

40

50

【表 33】

表 33

【 0 3 3 0 】

1回目の授孕後の日数	ピロカル			エリブリン0.05mg/kg			エリブリン0.2mg/kg			エリブリン0.8mg/kg			エリブリン1.6mg/kg																
	18.5	16.7	19.1	19.1	20.4	19.6	19.1	19.4	16.4	18.6	20.1	17.9	19.2	18.5	16.7	18.3	18.9	18.6	17.8	18.4	17.8	18.1	18.2	18.3	19.4	16.3	19.0		
0	18.8	16.6	19.6	20.9	20.0	19.4	17.1	18.5	20.4	18.7	18.6	18.4	18.8	18.0	18.4	18.1	19.0	17.8	18.3	20.1	15.8	18.6	18.1	18.1	18.1	19.5	16.0	19.3	
3	18.8	16.8	19.3	21.2	20.0	19.4	16.5	18.4	20.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.1	16.9	20.2	20.1	18.9	18.1	18.5	17.6	18.2	18.1	18.1	18.1	19.5	16.0	19.3	
5	18.6	16.5	19.3	21.2	19.8	19.4	16.3	18.7	20.3	19.1	19.5	18.5	17.1	19.8	20.7	19.1	18.1	18.0	17.8	19.0	18.1	18.2	18.1	18.2	19.5	16.3	19.4	19.4	
7	18.3	16.7	18.8	21.1	19.6	19.3	16.3	18.4	20.4	19.4	18.6	18.5	18.5	18.5	17.0	19.9	19.2	18.0	17.7	18.8	18.0	18.3	18.0	18.3	20.1	16.2	19.4	19.4	
8	18.4	16.4	18.5	21.0	19.5	18.8	16.1	18.6	19.9	19.1	19.3	20.0	16.8	19.5	19.5	19.5	19.2	17.7	18.5	17.5	18.5	17.4	18.0	18.0	19.6	15.8	18.4	18.4	
9	18.0	17.2	19.2	21.6	20.3	19.7	16.3	18.4	20.5	20.0	18.7	19.4	17.1	20.0	20.1	20.0	19.0	17.7	18.9	17.8	19.1	18.1	18.1	18.5	21.0	16.1	20.0	20.0	
10	18.0	15.9	18.5	21.3	19.2	18.8	15.9	18.6	19.6	19.7	19.3	19.3	16.9	19.7	19.9	18.9	17.8	18.0	17.8	19.0	18.0	18.8	18.1	18.0	18.2	16.4	19.4	19.4	
12	18.8	15.5	17.8	20.4	18.3	17.5	16.0	18.5	18.0	19.7	19.0	19.3	17.4	20.5	20.0	20.2	18.2	18.0	18.8	18.1	19.1	18.0	18.0	18.2	21.0	16.4	19.4	19.4	
17	18.9	15.6	17.2	20.6	18.1	17.8	16.3	18.4	18.0	19.4	19.1	19.0	17.1	21.1	21.0	19.1	17.7	18.4	18.7	19.1	19.1	19.1	18.5	21.1	16.3	19.8	20.1	20.7	
19	18.2	15.8	17.4	20.3	18.2	18.8	16.5	18.8	17.4	18.0	19.3	20.2	18.8	21.7	22.0	20.1	18.5	20.3	19.1	20.3	19.4	20.6	21.7	18.1	20.7	20.1	20.7	20.7	
24											19.8	20.9	18.6	22.0	20.4	20.3	18.1	18.9	19.3	20.9	19.5	20.7	21.6	18.3	20.6	20.6	20.6	20.6	
26											20.1	20.6	18.1	21.5	21.0	20.3	17.9	20.2	19.6	20.6	19.6	20.3	21.2	17.8	21.1	21.9	21.1	21.9	
28											18.7	20.1	18.7	22.0	21.2	20.1	18.2	20.3	19.5	20.7	19.8	20.4	21.9	18.1	21.9	21.1	21.9	21.1	21.9
31											20.0	20.3	18.4	22.2	21.8	20.2	18.3	21.0	19.2	20.2	20.1	18.9	21.7	17.9	20.7	20.7	20.7	20.7	20.7
33											19.5	20.1	18.7	22.1	21.4	20.1	17.8	21.0	19.3	20.3	20.3	20.3	18.2	21.8	16.2	20.9	20.9	20.9	20.9
35											19.8	20.8	18.3	21.6	21.6	20.4	18.1	21.4	19.4	21.2	20.0	21.0	21.9	18.4	20.3	20.3	20.3	20.3	20.3
38																													

各欄は個々の動物を表している。

10

20

30

40

50

【表 3 4】

表 3 4

1 回目の投与後の日数	平均		PBS		エリブリン 0.05mg/kg		エリブリン 0.2mg/kg		エリブリン 0.8mg/kg		エリブリン 1.6mg/kg				
	SEM	N	SEM	N	平均	SEM	N	平均	SEM	N	平均	SEM	N		
0	18.9	0.62	5	18.4	0.62	5	18.4	0.51	5	18.1	0.16	5	18.2	0.53	5
3	19.2	0.73	5	18.8	0.54	5	18.7	0.51	5	18.5	0.19	5	18.3	0.75	5
5	19.2	0.73	5	18.8	0.66	5	19.0	0.60	5	18.3	0.22	5	18.2	0.62	5
7	19.1	0.77	5	18.8	0.67	5	18.9	0.60	5	18.6	0.27	5	18.3	0.58	5
10	18.9	0.72	5	18.8	0.69	5	18.8	0.51	5	18.5	0.29	5	18.4	0.67	5
12	18.8	0.76	5	18.5	0.65	5	18.8	0.59	5	18.3	0.30	5	18.0	0.69	5
17	19.5	0.73	5	19.2	0.74	5	19.1	0.55	5	18.5	0.32	5	18.7	0.84	5
19	18.8	0.86	5	18.5	0.68	5	18.8	0.56	5	18.5	0.28	5	18.7	0.77	5
24	18.2	0.79	5	17.9	0.60	5	19.3	0.53	5	18.6	0.24	5	19.0	0.73	5
26							19.5	0.74	5	18.8	0.30	5	19.2	0.79	5
28							20.4	0.63	5	19.7	0.36	5	20.1	0.62	5
31							20.3	0.56	5	19.7	0.48	5	20.1	0.57	5
33							20.3	0.59	5	19.7	0.50	5	20.0	0.66	5
35							20.1	0.66	5	19.8	0.43	5	20.4	0.71	5
38							20.5	0.68	5	19.8	0.47	5	20.1	0.62	5

10

20

30

40

【 0 3 3 1】

実施例 2

1. 物質及び方法

MORAb003 - VCP - エリブリン (MORAb - 202) を、MORAb - 003 (ヒト化抗ヒト葉酸受容体アルファ) を実施例 3 のセクション 1.1 に記載の MAL - PEG2 - Val - Cit - PAB - エリブリン (ER - 001159569) 化合物にコンジュゲートすることにより合成した。コンジュゲーション方法は、実施例 4 のセクション 1.4.1 に記載する。

【 0 3 3 2】

50

1.1 腫瘍モデル

MORAb-202の追加のインビトロ評価で使用するヒト腫瘍細胞系には、IGROV1(ヒト卵巣癌、FR^{hi}(+++))、OVCAR3(ヒト卵巣癌、FR^{med}(++))、NCI-H2110(ヒト非小細胞肺癌、FR^{med}(++))、A431-A3(ヒトメソテリンを安定的に遺伝子導入されたA431親細胞系、FR^{lo}(+/-))、SJSA-1(ヒト骨肉腫、FR^{neg}(-))、及びHL-60(ヒト白血病、FR^{neg}(-))が含まれる。これらの細胞系のすべてを、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関(ATCC)から直接得た。インビトロ試験のために、非小細胞肺癌、三重陰性乳癌、及び子宮内膜癌患者に由来する異種移植片マウスモデルを樹立し、それぞれOncotest GmbH(Freiburg、ドイツ)、Oncodesign(Dijon、フランス)、及びEPO Berlin-Buch GmbH(Berlin、ドイツ)で維持した。

【0333】

10

1.2 インビトロ細胞傷害性分析

1.2.1 クリスタルバイオレットアッセイ

IGROV1(FR^{hi}(+++))、A431-A3(FR^{lo}(+/-))、及びSJSA-1(FR^{neg}(-))細胞を継代培養し、10,000細胞/ウェルで、完全増殖培地中で、96ウェル組織培養プレート内に播種し、37、5%CO₂で、終夜(16時間)インキュベートした。典型的には、試験試薬を1:4で、2mLディーブウェル希釈プレート内で、1μMから開始して連続希釈した(合計で10の希釈)。希釈サンプル100μLを細胞プレートに添加した(100nMの試験試料濃度から開始)。プレートを37、5%CO₂でさらに48時間にわたってインキュベートした。培地を廃棄し、プレートをDPBS200μLで1回洗浄し、0.2%クリスタルバイオレット溶液50μLで、室温で15分間にわたって染色し、次いで、水道水で十分に洗浄した。プレートを風乾させ、クリスタルバイオレットを1%SDS溶液200μLで溶解させた。プレートを570nmで読み取った。データをGraphPad Prism6を使用して解析した。OVCAR3(FR^{med}(++))及びNCI-H2110(FR^{med}(++))では、細胞を3,000細胞/ウェルで播種し、MORAb-202と共に5日間にわたってインキュベートした。

20

【0334】

1.3 インビボ試験

30

1.3.1 NCI-H2110異種移植片モデル

動物の準備：CB17 SCIDマウス(雌、6週齢)を、換気ケージ1つ当たりマウス5匹で飼育した。滅菌フードペレット及び水用ボトルを、動物は任意に利用可能であった。動物を、腫瘍移植の前に5~7日間にわたって順応させた。

【0335】

細胞培養：ヒトNCI-H2110細胞を凍結保存品(NB2813-65)から解凍し、10%ウシ胎児血清(FBS)を補充されたRPMI-1640培地中で、5%CO₂中で、37で培養した。2継代の後に、約70%の集密度に達したら、細胞を、細胞分離液を使用することにより採取し、血清非含有培地で2回洗浄し、カウントした。

【0336】

40

腫瘍移植：血清非含有培地中の細胞懸濁液を氷冷マトリゲルと1:1(v:v)で、1.0×10⁸細胞/mLの最終濃度まで混合した。各マウスに、1.0×10⁷細胞/マウスで混合物100μLを皮下注射した。27G針を、すべての注射で使用した。マウスを臨床的健康について監視し、腫瘍を、デジタルキャリパーにより、移植後3日目に開始して週に3回測定した。腫瘍体積(mm³)を、式：W(mm)×L(mm)×D(mm)×/6を使用して計算した。腫瘍が約100mm³(>70~約130mm³の平均)に達したときに、動物を1群当たり4~5匹に無作為化した。腫瘍体積が平均から最も偏差している5匹の動物を排除した。

【0337】

試験設計：登録された実験マウスに、無作為化の日に、試験設計(表35)に従って、2

50

00 μL のビヒクルまたは 1.0、2.5、及び 5 mg / kg の MORAb - 202 を静脈内注射した。体重を投与の前及び試験中に週に 2 回測定した。試験の終了時に、最終体重を測定し、記録した。個々の腫瘍体積が 2000 mm³ を超えたときに、動物を安楽死させた。最大許容腫瘍体積に達する前の早期終了基準には、(1) 腫瘍の 50% (v : v) を越える腫瘍潰瘍；(2) 麻痺；(3) > 20% の体重減少；及び(4) 群内の動物の 50% が終了に該当が含まれた。安楽死させたまたは、試験中に死亡が発見されたいずれのマウスも、上記の終了手順に従って処理した。

【0338】

【表35】

表35. 試験設計

10

群	マウス数	処置	用量(mg/kg)	レジメン	経路
1	5	ビヒクル	0	単回ボーラス	i. v.
2		MORAb-202	1		
3			2.5		
4			5		

【0339】

1.3.2 患者由来異種移植片 (PDx) モデル

20

1.3.2.1 非小細胞肺癌 (NSCLC) PDxモデル: LXF A - 737 (Oncotest)

腫瘍移植: NSCLC 腫瘍断片を、ヌードマウスにおいて連続継代した LXF A - 737 腫瘍異種移植片から得た。ドナーマウスから除去した後に、腫瘍を断片 (3 ~ 4 mm 辺長) に切断し、10% ペニシリン/ストレプトマイシンを含有するリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に入れた。レシピエント動物に、イソフルランの吸入により麻酔を掛け、側腹部で皮下に、片側性または両側性で腫瘍移植片を与えた。腫瘍異種移植片を、< 65% の生着率で、マウス 1 匹当たり 1 または 2 つの腫瘍で移植した。両側で生着した場合には、これらの腫瘍の一方を、無作為化の前に外植した。固体腫瘍増殖が動物の十分な匹数で検出可能になるまで、動物及び腫瘍移植片を毎日監視した。無作為化で、増殖腫瘍の体積を決定した。約 100 ~ 120 mm³ の比較可能な中央及び平均群腫瘍体積を目的として、無作為化基準を満たす動物 (すなわち、50 ~ 250 mm³、好ましくは 80 ~ 200 mm³ の腫瘍を担持する) を、1 群当たり 5 ~ 6 匹の動物からなる実験群に分散させた。実験に使用しない動物は安楽死させた。無作為化の日を実験の 0 日目と呼んだ。

30

【0340】

試験設計: 無作為化の日に、試験設計 (表36) に従って、登録実験マウスに、ビヒクル、5 mg / kg の MORAb - 003、または 5 mg / kg の MORAb - 202 を静脈内注射した。体重を、各投与日の投与前、及び試験中に週に 2 回測定した。試験の終了時に、終了体重を測定し、記録した。個々の腫瘍体積が 2000 mm³ を超えたときに、動物を安楽死させた。

40

【0341】

【表36】

表36. 試験設計

群	マウス数	処置	用量(mg/kg)	レジメン	経路
1	6	ビヒクル	0	単回ボーラス	i. v.
2	6	MORAb-003	5		
3	6	MORAb-202	5		

50

【0342】

1.3.2.2 三重陰性乳癌 (TNBC) PDxモデル: OD-BRE-0631 (Oncodesign)

腫瘍移植: 9匹の雌のSWISSヌードマウスに、患者由来TNBC腫瘍断片を右側腹部で皮下注射した。腫瘍体積が500~1000mm³に達したときに、腫瘍担持マウスを安楽死させ、腫瘍を外科的に切除した。ガンマ線源(2Gy、60Co、BioMEP、フランス)を全身照射してから24~72時間後に、腫瘍断片(30~50mg)を34匹の雌のSWISSヌードマウスの乳房脂肪体領域に同所移植した。腫瘍が200~300mm³の平均体積に達したときに、それらの個々の腫瘍体積により、Vivo Manager(登録商標)ソフトウェア(Biosystemes、Couternon、フランス)を使用して、合計34匹の動物のうちの24匹を、2つの群(n=12動物)に無作為化した。統計試験(分散分析)を、群間の均一性を評価するために行った。無作為化の日を実験の0日目と呼んだ。

10

【0343】

試験設計: 1日目(無作為化の1日後及び処置の2日前)に、2つの未処置群のそれぞれから3匹のマウスを終了させた。3日目に、試験設計(表37)に従って、残りの実験マウスに、ビヒクルまたは5mg/kgのMORAb-202を静脈内注射した。8日目(処置から5日後)に、2つの処置群のそれぞれから3匹のマウスを終了させた。終了直後に、腫瘍組織を収集し、4%中性緩衝ホルマリン中で24~48時間にわたって固定し、次いで、パラフィン(Histosec(登録商標)、Merck、Darmstadt、ドイツ)に包埋した。パラフィン包埋サンプルをその後の免疫組織化学分析のために、室温で貯蔵した。

20

【0344】

【表37】

表37. 試験設計

群	マウス数	処置	用量(mg/kg)	レジメン	経路
1	3	n/a	n/a	n/a	n/a
	9	ビヒクル	0	単回ボーラス	i.v.
2	3	n/a	n/a	n/a	n/a
	9	MORAb-202	5	単回ボーラス	i.v.

30

【0345】

免疫組織化学(IHC)分析: MORAb-202占拠及びがん関連線維芽細胞発現の両方を評価するために、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された腫瘍組織のIHC染色を行った。染色の前に、スライドを脱ろうし、抗原をLab Vision(商標)PT Module(Thermo Scientific)内で、85に予め加温されたクエン酸緩衝液(pH6.0)中で、次のプログラムを使用して回収した: 97に加温する; 97で30分間にわたってインキュベートする; 60に冷却する。次いで、スライドを二回蒸留水に、室温で5分間にわたって移した。染色を、Lab Vision(商標)Autostainer 360(Thermo Scientific)で行った。簡単に述べると、スライドを1倍トリス緩衝生理食塩水/Tween-20(TBST)中で、洗浄1回当たり6分間にわたって2回洗浄した。次いで、組織切片をブロッキング緩衝液(300µL)(10%ヤギ血清(Jackson Immunoresearch Laboratory Inc., Cat No. 005-000-121)、3%ウシ血清アルブミン(BSA)-リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で希釈)中で1時間にわたってインキュベートし、コンジュゲート抗体(200µL)(表38)中で1時間にわたってインキュベートし、1倍TBST中で5回、洗浄1回当たり6分間にわたって洗浄した。スライドを、DAPIを用いて、封入剤中で対比染色し、カバーガラスを備え

40

50

たスライドを30分間にわたって硬化させた。スライドをPanoramic MIDI スキャナ(3DHISTECH)で処理し、IHCイメージを、Haloソフトウェア(Indica Labs)を使用して解析した。この分析で使用された抗体は、がん関連線維芽細胞の特異的マーカーである - 平滑筋アクチン(SMA)、及びMORAb-202の存在を検出することができるヒトIgGを標的とした。

【0346】

【表38】

表38. IHC抗体

抗体	コンジュゲート	供給業者	カタログ番号	ロット	ストック溶液	希釈標準溶液
α -平滑筋アクチン(SMA)-FITC	FITC	Sigma	F3777	124M4775V	2.0mg/mL	5.0 μ g/mL
マウスIgG1、 κ アイソタイプ対照	AF488	Biologend	400129	B128493	0.2mg/mL	1:1000
ヤギ抗ヒトIgG	AF555	Mol. Probes	A21433	1709318	n/a	1:200

【0347】

1.3.2.3 子宮内膜癌PDxモデル: Endo-12961及びEndo-10590 (EPO Berlin)

腫瘍移植: 子宮内膜癌腫瘍断片を、連続継代したEndo-12961及びEndo-10590腫瘍異種移植片から得、液体窒素中で保存物として保存した。腫瘍断片を雌の40匹のNMRInu/nuマウスの左側腹部に皮下移植し、腫瘍体積を監視した。100~160mm³の腫瘍体積を有するマウスを4つの群(群A~D、表39)の1つに無作為化した。無作為化のためのサテライトマウスが第5の群に含まれた(群E、表39)。

【0348】

試験設計: 無作為化の日に、試験設計(表39)に従って、登録された実験マウスに、PBS、3.2mg/kgまたは0.1mg/kgのエリブリン、または5mg/kgのMORAb-202を静脈内注射した。腫瘍増殖を、2つの垂直直径を週に2回測定することにより評価し、腫瘍体積(TV)、相対腫瘍体積(RTV)及び処置/対照(T/C)値を計算した。体重も、毒性についてのパラメーターとして週に2回、群当たりの体重変化の計算及び処置の開始時に対する体重変化(BWC)と共に評価した。個々の腫瘍体積が1cm³を超えたとき、または試験の終了時に、動物を殺した。

【0349】

10

20

30

40

50

【表 3 9】

表 3 9. 試験設計

群	マウス数	処置	用量(mg/kg)	レジメン	経路
A	8	PBS	0	単回ボラス	i. v.
B		エリブリン	3.2		
C		エリブリン	0.1		
D		MORAb-202	5		
E		n/a	n/a	n/a	n/a

10

【0350】

1.4 作用機序

1.4.1 zPredictaにおける三次元(3D)同時培養系

すべての間葉系幹細胞(MSC)含有3D同時培養実験をzPredictaにおいて、臓器特異的3D細胞外マトリックス系、例えば、rStomach(商標)を使用して行った。rStomach(商標)内の骨髄間葉系幹細胞(BM-MS C)を、NucRedLight MKN-74胃癌細胞系と共に、4連で、48ウェルフォーマットで12日間にわたって同時培養した。MKN-74細胞は、細胞アポトーシスを誘発するMORAb-202処置のために十分な葉酸受容体アルファ(FR)を発現することが、以前に示されていた。培養の前に、BM-MS Cを、標的抗原発現について、及びMS C分化のマーカ-について(表40)フローサイトメトリーにより評価した。

20

【0351】

【表 4 0】

表 4 0. MS C分化のマーカ-

細胞集団	マーカ-
間葉系幹細胞(MSC)	Stro-1 ⁺ /CD105 ⁺
前脂肪細胞	CD34 ⁺ /CD31 ⁻
脂肪細胞	Oil red
がん関連線維芽細胞(CAF)	アルファ-平滑筋アクチン(α SMA)、ビメンチン
前周細胞/周細胞	NG2 ⁺ 、CD13 ⁺ 、CD146 ⁺
全部	FRA

30

【0352】

表41に記載されているとおり、rStomach(商標)培養物をMORAb-202、非コンジュゲ-トMORAb-003抗体、エリブリン、または対照のいずれかで処理した。対照には、未処理及びビヒクル処理(PBS及びDMSO)培養物が含まれた。MS C分化を光学顕微鏡法により監視した。可視の分化が観察されたら、サンプルを染色及びフローサイトメトリー分析のために採取した。

40

【0353】

50

【表 4 1】

表 4 1. 同時培養処理

薬剤	実際の濃度(複数可)
MORAb-202	10nM
MORAb-003(非コンジュゲート抗体)	10nM
エリブリン	1.7nM及び0.2nM
PBS	
DMSO	0.1%
非処置対照	

10

【0354】

1.4.2 がん関連線維芽細胞に対するMORAb-202の効果の時間経過分析

皮下H2110異種移植片腫瘍担持マウスをセクション1.3.1に記載されているとおり調製した。腫瘍サンプルを、ビヒクル、または5mg/kgのMORAb-202の投与後に0、3、5、7、及び9日目に採取した。収集した腫瘍サンプルをスライド上で処理し、セクション1.3.2.2に記載されているとおり、がん関連線維芽細胞の発現をIHCにより分析した。

【0355】

20

2. 結果

2.1 インビトロ細胞傷害性分析

2.1.1 MORAb-202の細胞傷害性

セクション1.2.1に詳述したとおり、クリスタルバイオレットアッセイを使用して、MORAb-202のインビトロ効力を評価した。スクリーニングを、IGROV1(FR^{hi}(+++))、OVCAR3(FR^{med}(++))、NCI-H2110(FR^{med}(++))、A431-A3(FR^{lo}(+/-))、及びSJSA-1(FR^{neg}(-))細胞で行った。このスクリーニングの結果を図17及び表42に示す。

【0356】

【表 4 2】

30

表 4 2. 様々な腫瘍細胞系でのMORAb-202の細胞傷害性 (EC₅₀) スクリーニング

EC ₅₀ (nM)				
IGROV I (FR+++)	OVCAR3 (FR++)	NCI-H2110 (FR++)	A431-A3 (FR+/-)	SJSA-1 (FR-)
0.01	0.16	0.74	23	>100

【0357】

MORAb-202は、腫瘍細胞系に対する葉酸受容体アルファ発現依存性細胞傷害性及び低レベルのオフターゲット死滅を示した。MORAb-202は、IGROV1細胞では最高レベルの効力(0.01nM)を実証したが、葉酸受容体アルファ陰性SJSA-1細胞では細胞傷害性(>100nM)ほとんど実証しなかった。中間の効力が、OVCAR3及びNCI-H2110細胞(0.16nM及び0.74nM)で観察された。

40

【0358】

2.2 インビボ試験

2.2.1 NCI-H2110異種移植片モデルにおけるMORAb-202の有効性

皮下H2110腫瘍担持マウスに、ビヒクルまたは1、2.5、及び5mg/kgのMORAb-202を静脈内注射した。5mg/kgのMORAb-202の単回投与後に、顕著な腫瘍退縮が観察された(図18及び表43)。高い葉酸受容体アルファ発現を伴

50

うこの異種移植片モデル及び単回用量投与を使用すると、MORAb-202での治療ウィンドウは、腫瘍増殖の遅延（疾患の安定）では1mg/kgであり、及び腫瘍退縮では2.5mg/kgであることが示された。この試験では、2.5mg/kgの用量でのMORAb-202は、部分応答をもたらし、5mg/kgの用量でのMORAb-202は、完全応答をもたらした。

【0359】

【表43】

表43. NC1-H2110異種移植片モデルにおけるMORAb-202の抗腫瘍活性

	腫瘍体積、mm ³ (腫瘍増殖阻害、%)	
	17日目	31日目
ビヒクル(n=5)	1583.4±146.1(100)	n/a
MORAb-202、1mg/kg、単回投与(n=5)	840.0±76.8(53.1)	n/a
MORAb-202、2.5mg/kg、単回投与(n=5)	60.8±27.1(3.8)	1173.2±373.2
MORAb-202、5mg/kg、単回投与(n=4)	0.0(0.0)	0(0.0)

10

【0360】

2.2.2 NSCLC PDxモデル：LXFA-737におけるMORAb-202の有効性

20

皮下NSCLC PDx腫瘍担持マウスに、ビヒクル、5mg/kgのMORAb-003、または5mg/kgのMORAb-202を静脈内注射した。このモデルにおいて、有意な抗腫瘍活性を実証しなかった非コンジュゲートMORAb-003抗体(5mg/kg)の単回投与とは対照的に、MORAb-202(5mg/kg)の単回投与は、顕著な腫瘍退縮をもたらした(図19A)。MORAb-202で処置された合計6匹のマウスのうちの5匹は、試験の32日目に腫瘍非含有であると判断され(表44)、4匹は、74日(試験の終了)を通じて腫瘍非含有のままであった。加えて、ビヒクル処置対照群と比較すると、処置群では、有意な体重減少は観察されなかったが、これは、処置中に毒性がないことを示していた(図19B)。

【0361】

30

【表44】

表44. NSCLC PDxモデルにおけるMORAb-202の抗腫瘍活性

	腫瘍体積、mm ³ (腫瘍増殖阻害、%)		
	21日目	32日目	74日目
ビヒクル(n=6)	1004.5(100)	1561.3(100)	n/a
MORAb-003、5mg/kg、単回投与(n=6)	860.7(85.7)	1572.1(100.7)	n/a
MORAb-202、5mg/kg、単回投与(n=6)	22.9(2.3)	4.7(0.3)	418.3 (4/6腫瘍非含有)

40

【0362】

2.2.3 子宮内膜癌PDxモデル：Endo-12961及びEndo-10590におけるMORAb-202及びエリプリンの相対有効性

Endo-12961及びEndo-10590異種移植片は、高レベルの葉酸受容体アルファを発現する。皮下子宮内膜癌PDx腫瘍担持マウスに、PBS、3.2mg/kgもしくは0.1mg/kgのエリプリン、または5mg/kgのMORAb-202を

50

静脈内注射した。このモデルでのエリブリンの最大耐量 (MTD) は、 3.2 mg/kg であるのに対して、 0.1 mg/kg が、 5 mg/kg で投与された MORAb-202 により得られるエリブリンの投薬量と同等である。試験の開始を通じて、MORAb-202 (5 mg/kg) 及びエリブリンの MTD 用量 (3.2 mg/kg) で処置した後に、両方の動物モデルで、有意な抗腫瘍活性が観察された一方で、 0.1 mg/kg のエリブリンで処置した後には、有意な抗腫瘍活性は観察されなかった (図 20A 及び 20C)。しかしながら、 3.2 mg/kg のエリブリンで処置されたマウスの退縮腫瘍は、試験期間中に再成長し始めた一方で、MORAb-202 で処置されたマウスでは、有意な腫瘍再成長は特記されなかった。この試験で、MORAb-202 は、エリブリンよりもかなりより有効であることが判明した。エリブリン処置はまた、処置後の第 1 週に、体重に一時的に影響を及ぼした (図 20B 及び 20D)。対照的に、MORAb-202 で処理された動物では、体重減少は観察されなかった。

10

【0363】

2.3 MORAb-202 の作用機序

2.3.1 TNBC PDxモデル: OD-BRE-0631におけるMORAb-202のIHC及び有効性

皮下 TNBC PDx 腫瘍担持マウスに、ビヒクルまたは 5 mg/kg の MORAb-202 を静脈内注射した。腫瘍組織を処置前 (1日目) 及び処置後 (8日目) に各群のマウスから収集した。収集した腫瘍組織の IHC 分析は、MORAb-202 が、単回投与 (5 mg/kg) として 3 日目に投与した後、処置から 5 日後 (8日目) に、葉酸受容体アルファ発現性腫瘍細胞を占拠することを明らかにした。抗ヒト IgG 抗体を使用して、細胞占拠を評価した (図 21A)。抗 - 平滑筋アクチン (SMA) - FITC 抗体での IHC 染色により示されるとおり、MORAb-202 処置は、がん関連線維芽細胞の構造を縮小させることも示された (図 21B)。有効性の点において、MORAb-202 処置は、処置後 11 日目に、 0.62 の相対腫瘍体積 (RTV) により測定される最大腫瘍退縮をもたらした (図 21C)。

20

【0364】

2.3.2 3D同時培養系でのMORAb-202、MORAb-003、及びエリブリンの効果

rStomach (商標) 内の骨髄間葉系幹細胞 (BM-MSC) を、MKN-74 胃癌細胞系と共に 12 日間にわたって同時培養した。培養の前に、BM-MSC を、葉酸受容体アルファ発現について、及び MSC 分化のマーカについてフローサイトメトリーにより評価した。次いで、rStomach (商標) 培養物を MORAb-202、非コンジュゲート MORAb-003 抗体、エリブリン、または対照のいずれかで処理した。可視の MSC 分化が光学顕微鏡法により観察されたら、サンプルを染色及びフローサイトメトリー分析のために採取した。これらの分析の結果を図 22 に示す。

30

【0365】

MKN-74 細胞を含む培養物中でヒト BM-MSC の分化について測定可能な効果を生じさせるために、7 日間の合計処置期間で充分であった (期間中に処置の補充がある)。ビヒクル対照に対して、MORAb-202 (10 nM) での処置は、MSC 及び脂肪細胞集団の増加、ならびに周細胞集団の減少をもたらした (表 45)。これらのデータは、MORAb-202 が、腫瘍微細環境に顕著な効果を有し得ることを示している。

40

【0366】

【表 4 5】

表 4 5. 3D同時培養系に対するMORAb-202、MORAb-003、及びエリブリンの効果

処置	生細胞のパーセンテージ		
	MSC	脂肪細胞	周細胞
PBS	32.3%	0.72%	14.6%
MORAb-202	43.7%	22.6%	11.4%
MORAb-003	37.1%	0.69%	24.0%
エリブリン	29.9%	2.68%	25.8%

10

【0367】

2.3.3 がん関連線維芽細胞に対するMORAb-202の効果の時間経過分析

ビヒクル、または5mg/kgのMORAb-202の投与後0、3、5、7、及び9日目に、腫瘍サンプルを皮下H2110異種移植片腫瘍担持マウスから採取した。収集された腫瘍サンプルをスライド上で処理し、がん関連線維芽細胞(CAF)発現をIHCにより分析した。抗-平滑筋アクチン(SMA)-FITC抗体での染色により評価及び定量化されたCAFネットワーク構造は、5mg/kgのMORAb-202の単回用量の投与後、3日目及び5日目に顕著であった(図23)。しかしながら、7日目までに、この構造の大部分がかなり減少した。

20

【0368】

実施例3

1. 物質及び方法

表46に示す構造を有するコンジュゲート可能なエリブリン化合物を、次の手順に従って合成し、ADCの調製(実施例4)において使用した。

【0369】

合成反応で使用される溶媒はすべて、無水グレードであった(EMD Millipore)。後処理または精製のために使用された溶媒はすべて、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)グレード(EMD Millipore)であった。別段に示さない限り、薬品はすべて、市販されていた。カラムクロマトグラフィーを、Biotage(登録商標)SP4を使用して行った。溶媒除去を、回転蒸発器(Buchi Laboratechik AG)、または遠心蒸発器(Genevac、SP scientific)のいずれかを使用して行った。分取液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC/MS)を、酸性移動相条件下でWaters AutoPurification System及びXTerra MS C18カラム(5µm、19mm×100mm)を使用して行った。核磁気共鳴(NMR)スペクトルを、別段に述べない限り、重水素化クロロホルム(CDCl₃)を使用して取得し、Varian機器(Agilent Technologies)を使用して400または500MHzで記録した。質量スペクトルを、Waters Acquity Ultra Performance LC/MSを使用して取得した。本明細書で使用する場合、「不活性化」という用語は、反応器(例えば、反応容器、フラスコ、ガラス製反応器)内の空気を、本質的に水分非含有の不活性ガス、例えば、窒素またはアルゴンに置き換えることを指す。多重性は、次の略語を使用して示される: s = 一重線、d = 二重線、t = 三重線、q = 四重線、quint = 五重線、sxt = 六重線、m = 多重線、dd = 二重二重線、ddd = 二重線の二重二重線、dt = 三重線の二重線、br s = 幅広一重線。

30

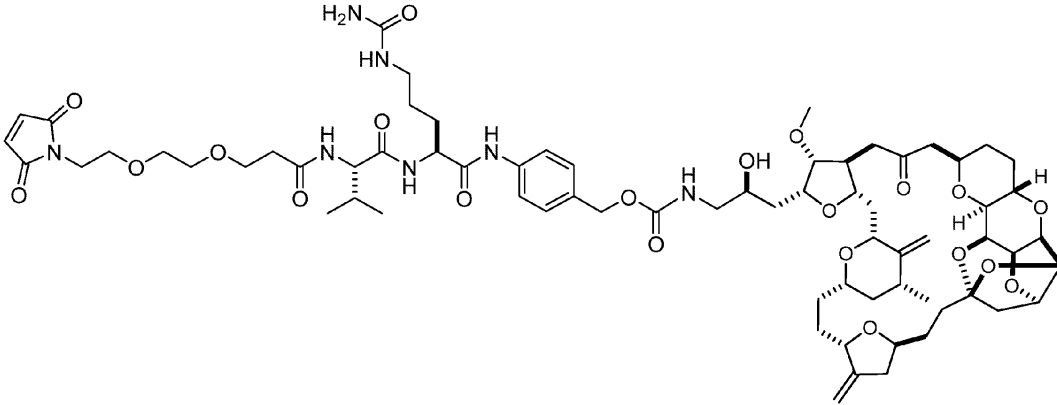
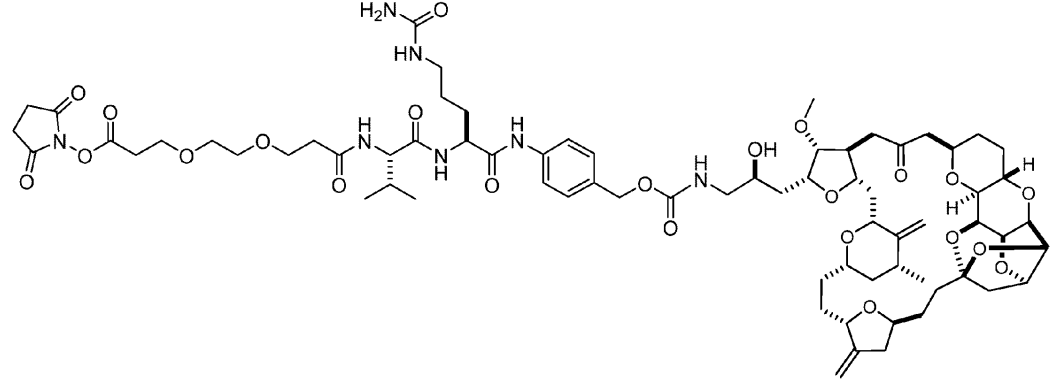
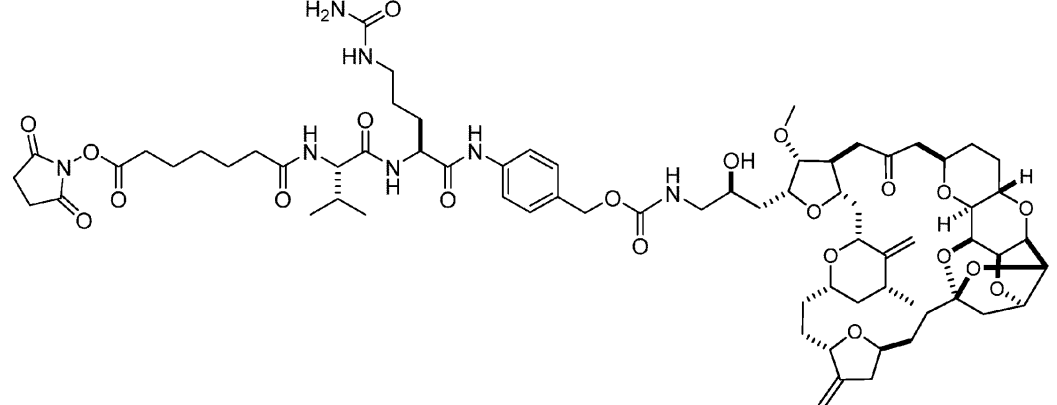
40

【0370】

50

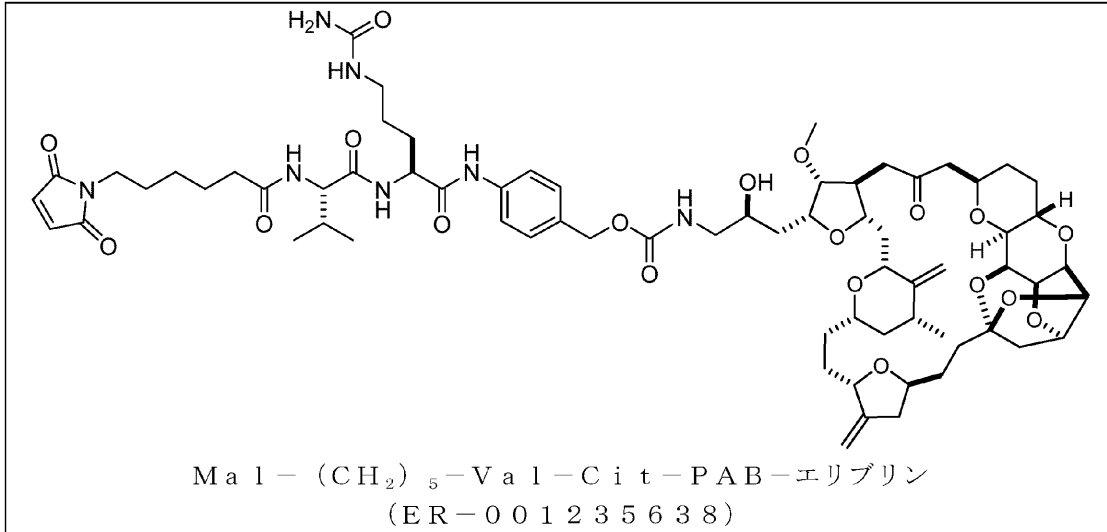
【表 4 6】

表 4 6. コンジュゲート可能なエリブリン化合物

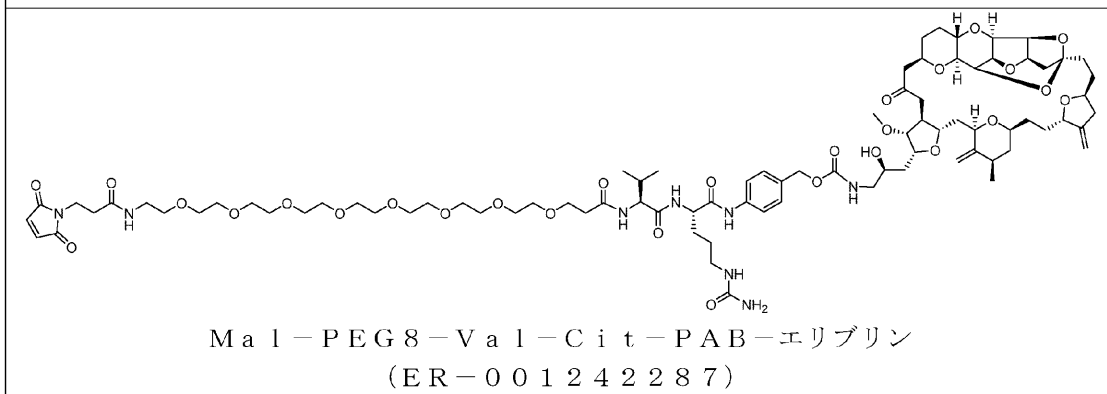
 <p>MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-エリブリン (ER-001159569)</p>	10
 <p>NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-エリブリン (ER-001236940)</p>	20
 <p>NHS-(CH₂)₅-Val-Cit-PAB-エリブリン (ER-001236941)</p>	30

40

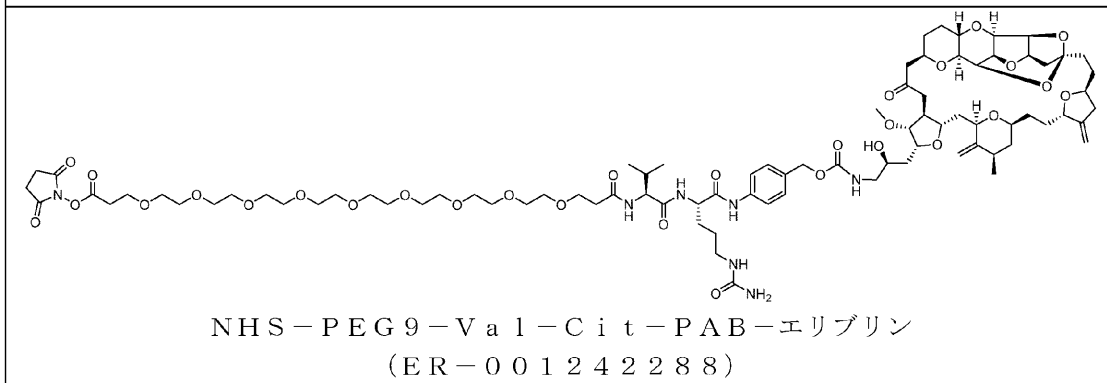
50



10



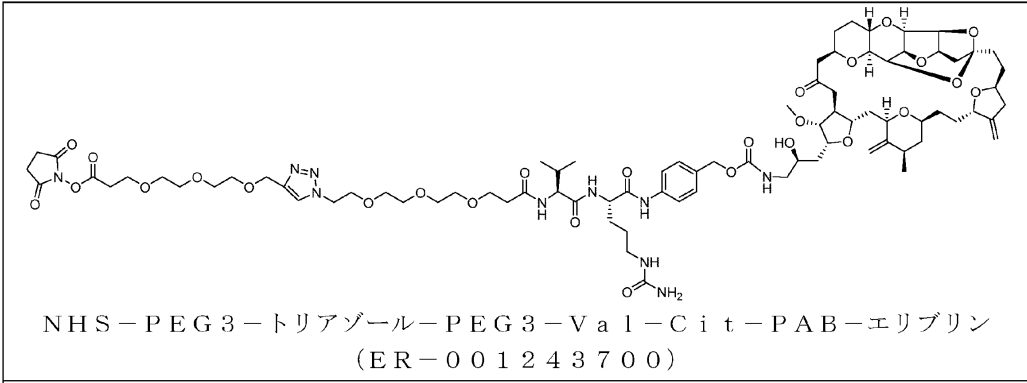
20



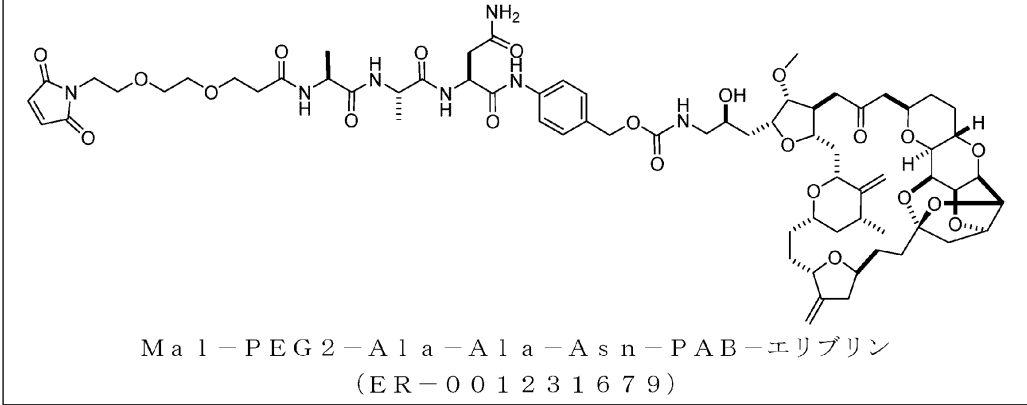
30

40

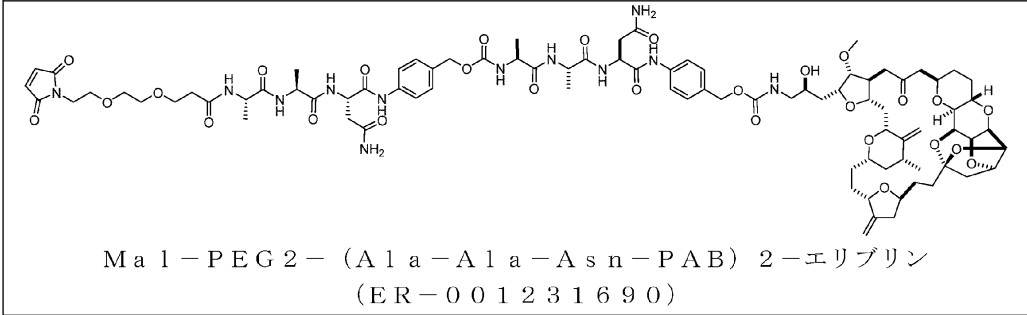
50



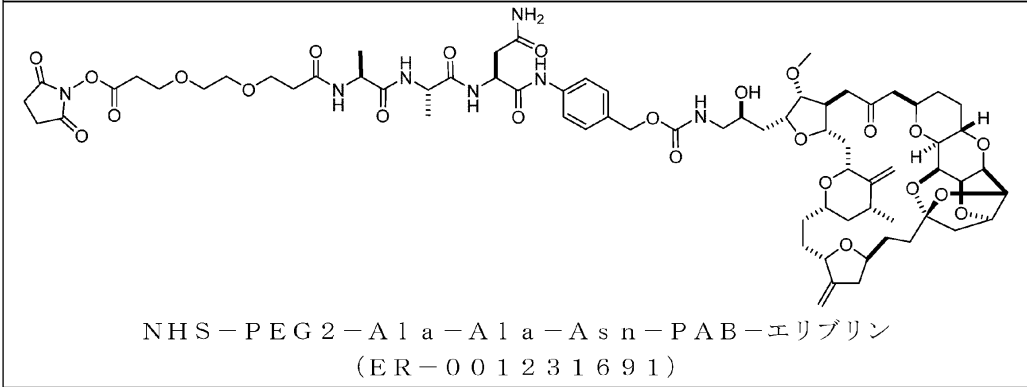
10



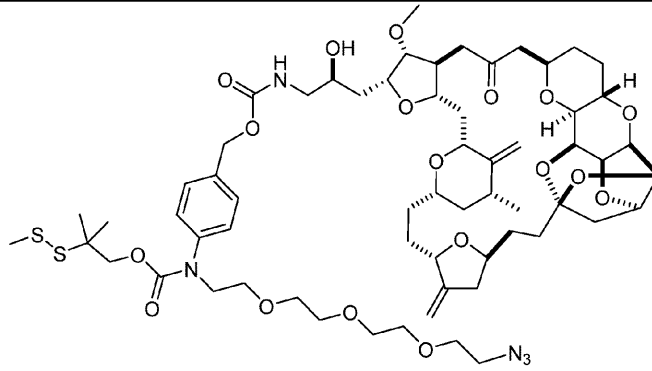
20



30

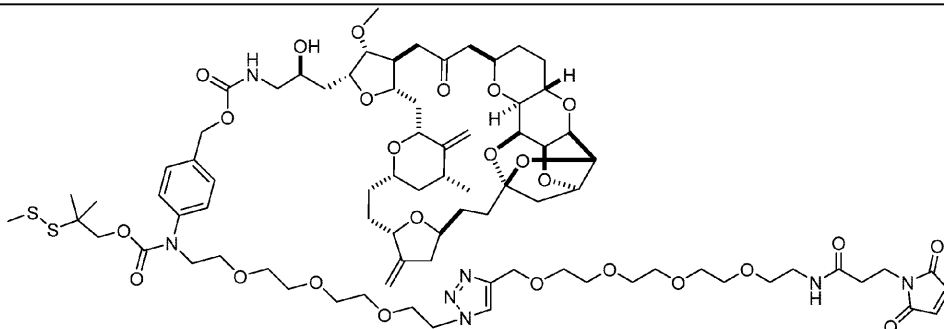


40



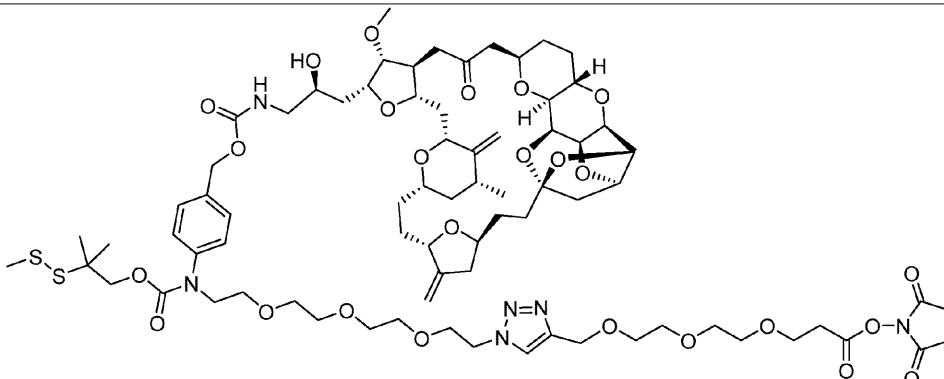
アジド-PEG3-ジスルフィド-PAB-エリブリン
(ER-001237508)

10



Ma1-PEG4-トリアゾール-PEG3-ジスルフィド-PAB-エリブリン
(ER-001237504)

20

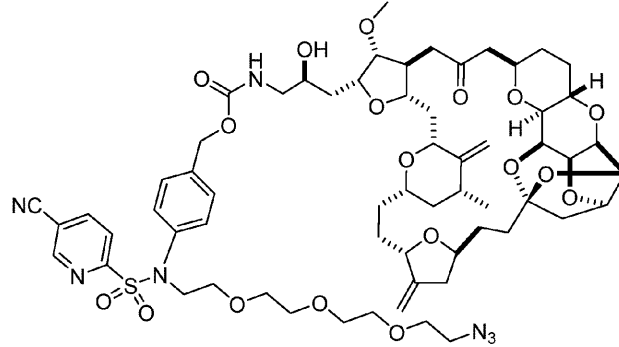


NHS-PEG3-トリアゾール-PEG3-ジスルフィド-PAB-エリブリン
(ER-001244129)

30

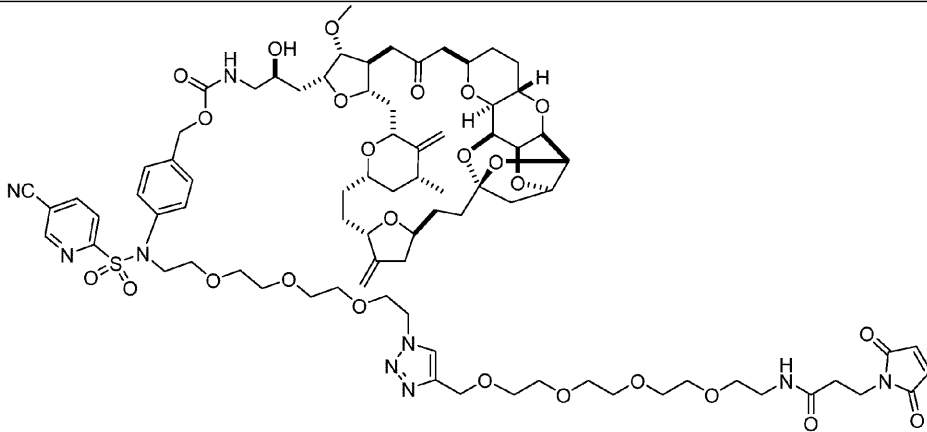
40

50



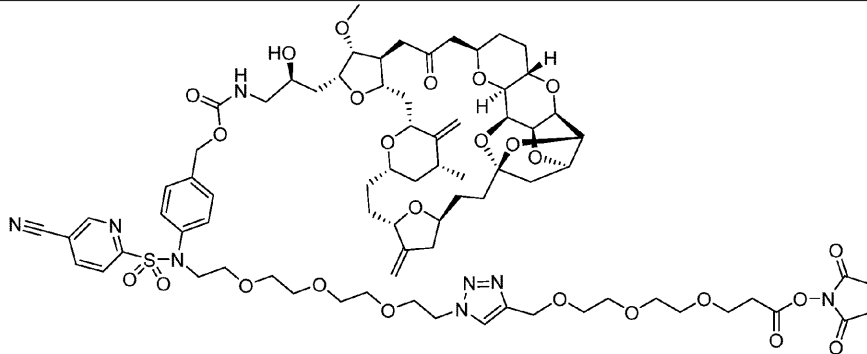
アジド-PEG3-スルホンアミド-PAB-エリブリン
(ER-001138856)

10



Ma1-PEG4-トリアゾール-PEG3-スルホンアミド-PAB-エリブリン
(ER-001237505)

20

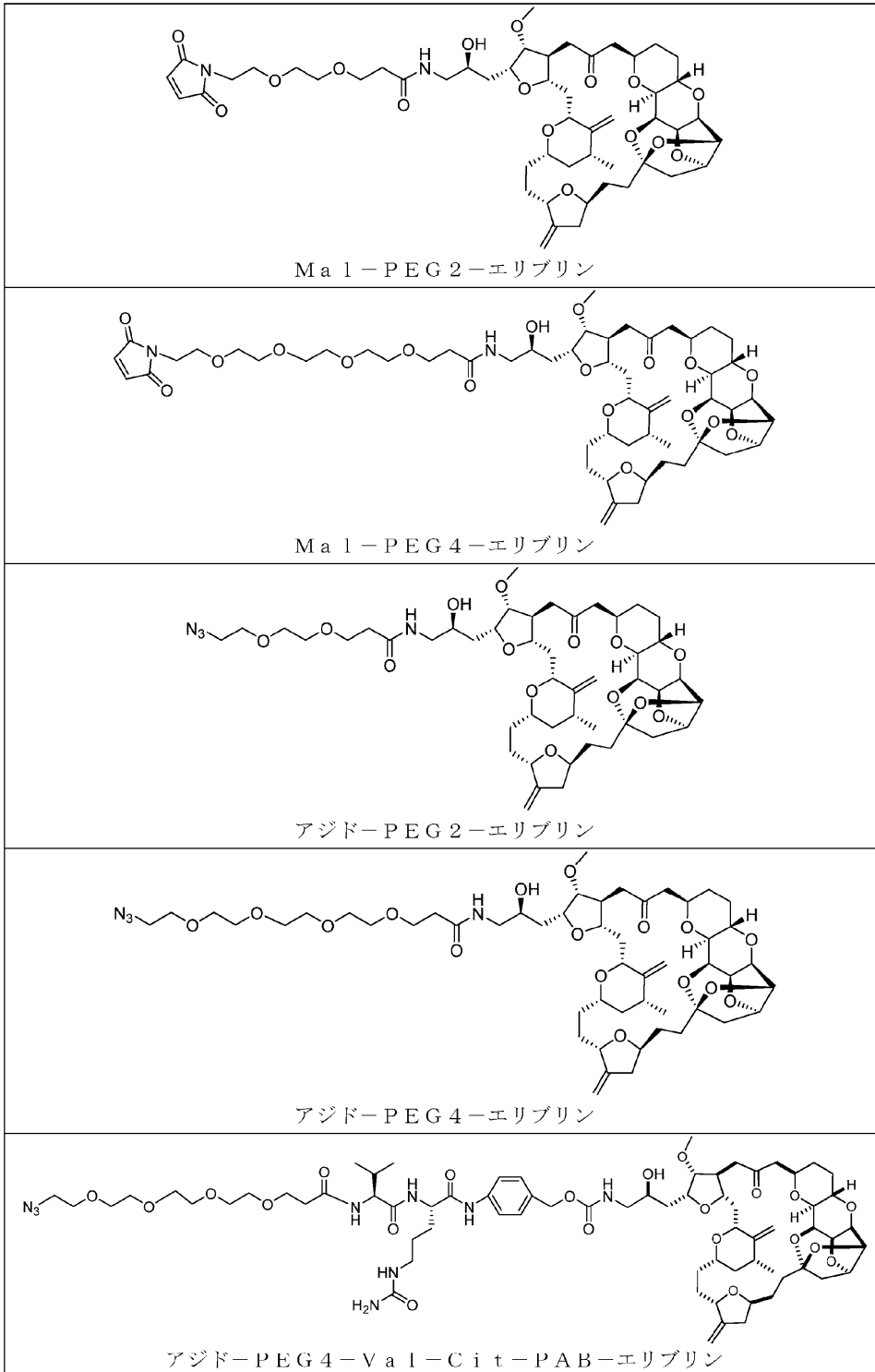


NHS-PEG3-トリアゾール-PEG3-スルホンアミド-PAB-エリブリン
(ER-001244623)

30

40

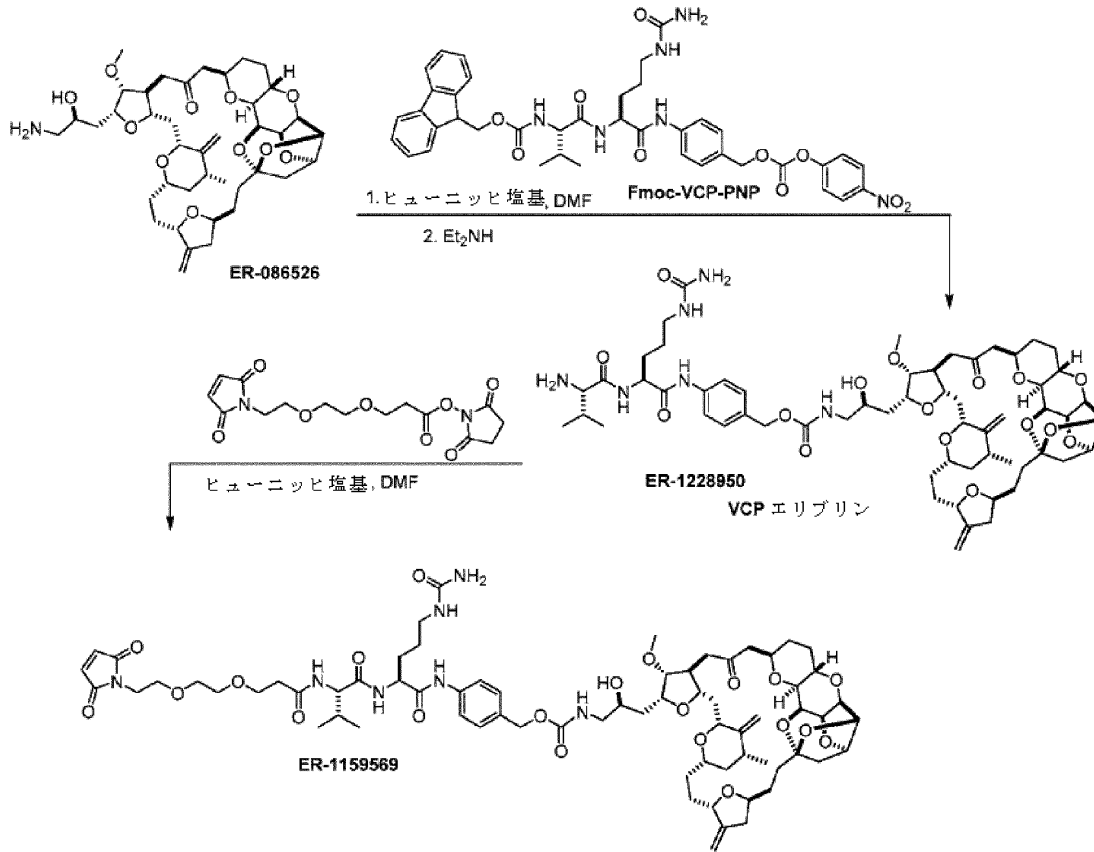
50



【 0 3 7 1 】

1 . 1 M A L - P E G 2 - V a l - C i t - P A B - エリブリン (E R - 0 0 1 1 5 9
5 6 9) の調製

【化3】



10

20

【0372】

エリブリン (ER - 000086526) (61.5 mg、0.074 mmol) を N, N - ジメチルホルムアミド (DMF) (6.0 mL) に溶解させ、次いで、ヒューニツヒ塩基 (0.027 mL、0.156 mmol) 及び Fmoc - Val - Cit - PAB - PNP (86 mg、0.112 mmol) と混合した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析により決定してカップリングが完了するまで、反応物を室温で18時間にわたって攪拌した。ジエチルアミン (0.078 mL、0.745 mmol) を混合物に添加し、反応が完了するまで、混合物をさらに2時間にわたって攪拌した。溶媒を蒸発により除去し、残渣をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、Val - Cit - PAB - エリブリン (ER - 001228950) を白色の固体として得た (60 mg、収率71%)。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) ppm 7.56 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.14 (s, 1H), 5.06 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 5.03 (s, 1H), 5.01 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.83 (s, 1H), 4.71 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.62 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.57 (dd, J = 4.8, 8.8 Hz, 1H), 4.47 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 4.32 - 4.27 (m, 2H), 4.18 (dd, J = 4.8, 6.4 Hz, 1H), 4.13 - 4.07 (m, 2H), 3.98 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 3.88 - 3.82 (m, 3H), 3.76 - 3.70 (m, 4H), 3.60 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.26 - 3.10 (m, 3H), 2.93 (dd, J = 2.0, 11.2 Hz, 1H), 2.91 - 2.84 (m, 1H), 2.75 - 2.64 (m, 2H), 2.44 - 2.29 (m, 5H), 2.21 - 1.97 (m, 8H), 1.93 - 1.83 (m, 3H), 1.79 - 1.72 (m, 5H), 1.68 - 1.29 (m, 8H), 1.11 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.07 - 1.0

30

40

50

1 (m, 1H), 1.06 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.02 (d, J = 7.2 Hz, 3H)。LCMS (M+H) = 1135.7。

【0373】

Val-Cit-PAB-エリブリン (ER-001228950) (16 mg、14 μ mol) を DMF (1 mL) に溶解させた。次いで、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (7.2 μ L、41 μ mol) 及び Mal-PEG2-NHS (9.7 mg、27 μ mol) をこの溶液に室温で添加し、反応混合物を室温で1時間にわたって攪拌した。反応が完了したら、粗製の混合物を、0.1% ギ酸を含有するアセトニトリル-水移動相を使用する逆相 HPLC により精製した。収集した画分を真空下で、室温で、非加熱水浴内で濃縮して、Mal-PEG2-Val-Cit-PAB-エリブリン (ER-001159569) (7.1 mg、5.2 μ mol、収率 38%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) ppm 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.31 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.81 (s, 2H), 5.13 (s, 1H), 5.06 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 5.02 (s, 1H), 5.01 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.82 (s, 1H), 4.71 (t, J = 4.0 Hz, 1H), 4.61 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.50 (dd, J = 5.2, 9.2 Hz, 1H), 4.47 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 4.32 - 4.27 (m, 2H), 4.19 (dd, J = 6.8, 11.6 Hz, 1H), 4.13 - 4.07 (m, 2H), 3.98 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 3.88 - 3.82 (m, 3H), 3.76 - 3.64 (m, 6H), 3.62 - 3.51 (m, 6H), 3.38 (s, 3H), 3.22 - 3.08 (m, 4H), 2.93 (dd, J = 2.4, 9.6 Hz, 1H), 2.92 - 2.84 (m, 1H), 2.76 - 2.63 (m, 2H), 2.52 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.44 - 2.29 (m, 5H), 2.21 - 1.97 (m, 8H), 1.93 - 1.83 (m, 3H), 1.80 - 1.66 (m, 5H), 1.66 - 1.28 (m, 10H), 1.11 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.07 - 1.01 (m, 1H), 0.99 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.4 Hz, 3H)。LCMS (M+H) = 1374.9。

【0374】

1.2 NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-エリブリン (ER-001236940) の調製

10

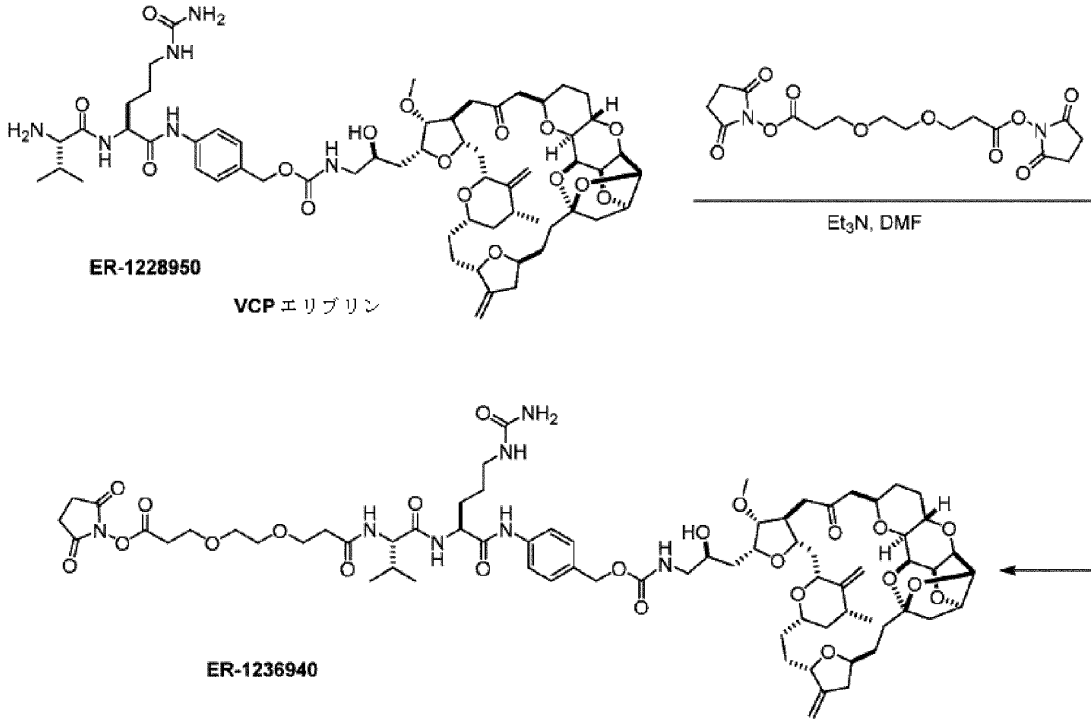
20

30

40

50

【化4】



10

20

【0375】

Val-Cit-PAB-エリブリン (ER-001228950) (45 mg、0.04 mmol) 及びビス(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)3,3'-(エタン-1,2-ジイルビス(オキシ))ジプロパノアート(79 mg、0.198 mmol)をDMF(1.5 mL)中で混合し、次いで、Et₃N(44.2 μl、0.317 mmol)を添加した。HPLC分析により決定して反応が完了するまで、混合物を18時間にわたって攪拌した。溶媒を蒸発させ、残渣をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-エリブリン(ER-001236940)を白色の固体として得た(38 mg、収率68%)。¹H NMR(400 MHz, CD₃OD) ppm 7.58 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.14 (s, 1H), 5.05 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 5.03 (s, 1H), 5.01 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.83 (s, 1H), 4.71 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.62 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.51 (dd, J = 4.8, 8.8 Hz, 1H), 4.50-4.47 (m, 1H), 4.32-4.27 (m, 2H), 4.21 (dd, J = 4.8, 6.4 Hz, 1H), 4.14-4.08 (m, 2H), 3.99 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 3.88-3.82 (m, 3H), 3.78-3.70 (m, 4H), 3.62 (s, 2H), 3.62-3.58 (m, 1H), 3.50-3.46 (m, 2H), 3.39 (s, 4H), 3.36 (s, 3H), 3.22-3.08 (m, 3H), 2.93 (dd, J = 2.0, 11.2 Hz, 1H), 2.91-2.87 (m, 1H), 2.84 (s, 2H), 2.80 (s, 2H), 2.75-2.64 (m, 2H), 2.59-2.52 (m, 2H), 2.44-2.29 (m, 5H), 2.21-1.97 (m, 10H), 1.93-1.83 (m, 3H), 1.79-1.72 (m, 5H), 1.68-1.29 (m, 8H), 1.11 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.08-0.98 (m, 1H), 1.00 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.98 (d, J = 7.2 Hz, 3H)。LCMS (M+H) = 1421.0。

30

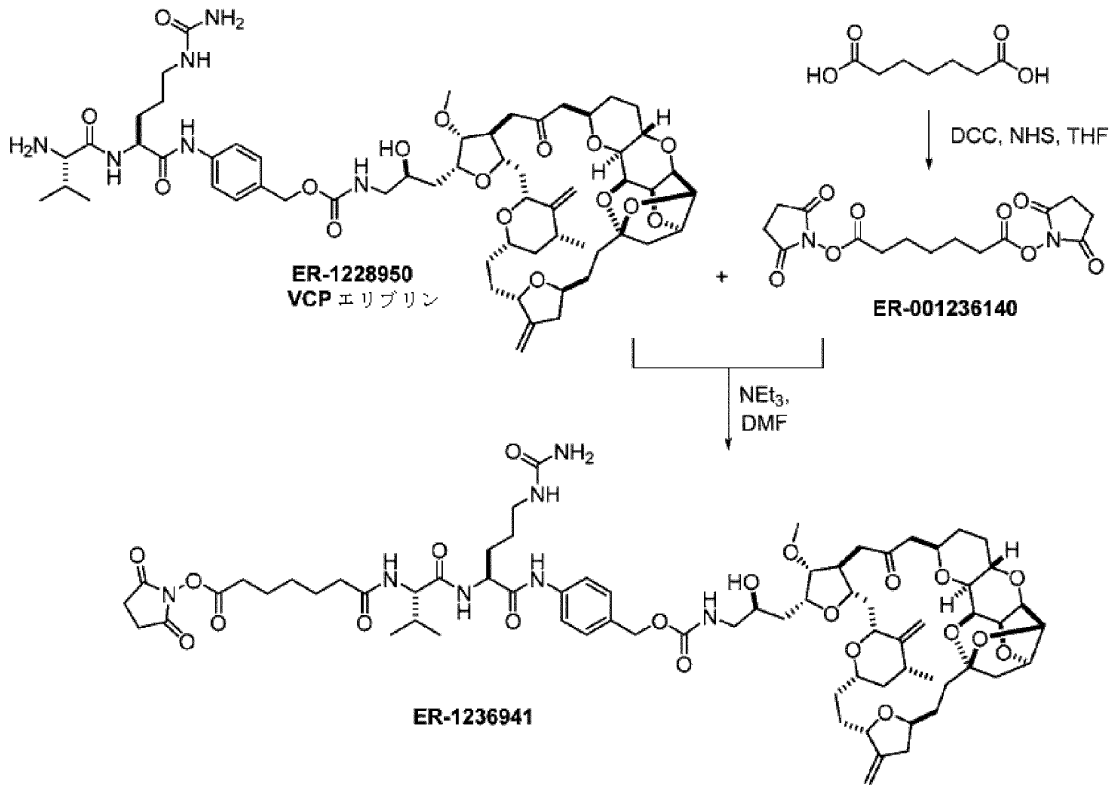
40

【0376】

50

1.3 NHS-(CH₂)₅-Val-Cit-PAB-エリブリン(ER-001236941)の調製

【化5】



10

20

【0377】

ヘプタン二酸(1.6g、9.99mmol)をテトラヒドロフラン(THF)(100mL)に溶解させ、次いで、1-ヒドロキシピロリジン-2,5-ジオン(2.299g、19.98mmol)を添加し、続いて、DCC(4.12g、19.98mmol)を添加した。HPLC分析が反応の完了を示すまで、混合物を室温で18時間にわたって攪拌した。固体を、セライトパッドに通す濾過により除去し、THF(3×2mL)で洗淨した。合わせた濾液を濃縮し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して、ビス(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)ヘプタンジオアート(ER-001236140)を白色の固体として得た(2.5g、収率71%)。¹H NMR(400MHz) ppm 2.83(s, 8H), 2.64(t, J = 7.6 Hz, 4H), 1.80(dt, J = 7.6 Hz, 4H), 1.59-1.51(m, 2H)。LCMS(M+H) = 355.2。

30

【0378】

NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-エリブリン(ER-001236940)の調製のために上記した手順と同じ手順を使用して、VCP-エリブリン(ER-001228950)及びビス(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)ヘプタンジオアート(ER-001236140)から、NHS-(CH₂)₅-Val-Cit-PAB-エリブリン(ER-001236941)を調製した(8.5mg、収率47%)。¹H NMR(400MHz, CD₃OD) ppm 7.56(d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.30(d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.13(s, 1H), 5.04(d, J = 12.0 Hz, 1H), 5.01(s, 1H), 5.00(d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.86(s, 1H), 4.82(s, 1H), 4.70(t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.60(t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.50(dd, J = 4.8, 8.8 Hz, 1H), 4.46(d, J = 10.8 Hz, 1H), 4.36-4.25(m, 2H), 4.17(dd, J = 4

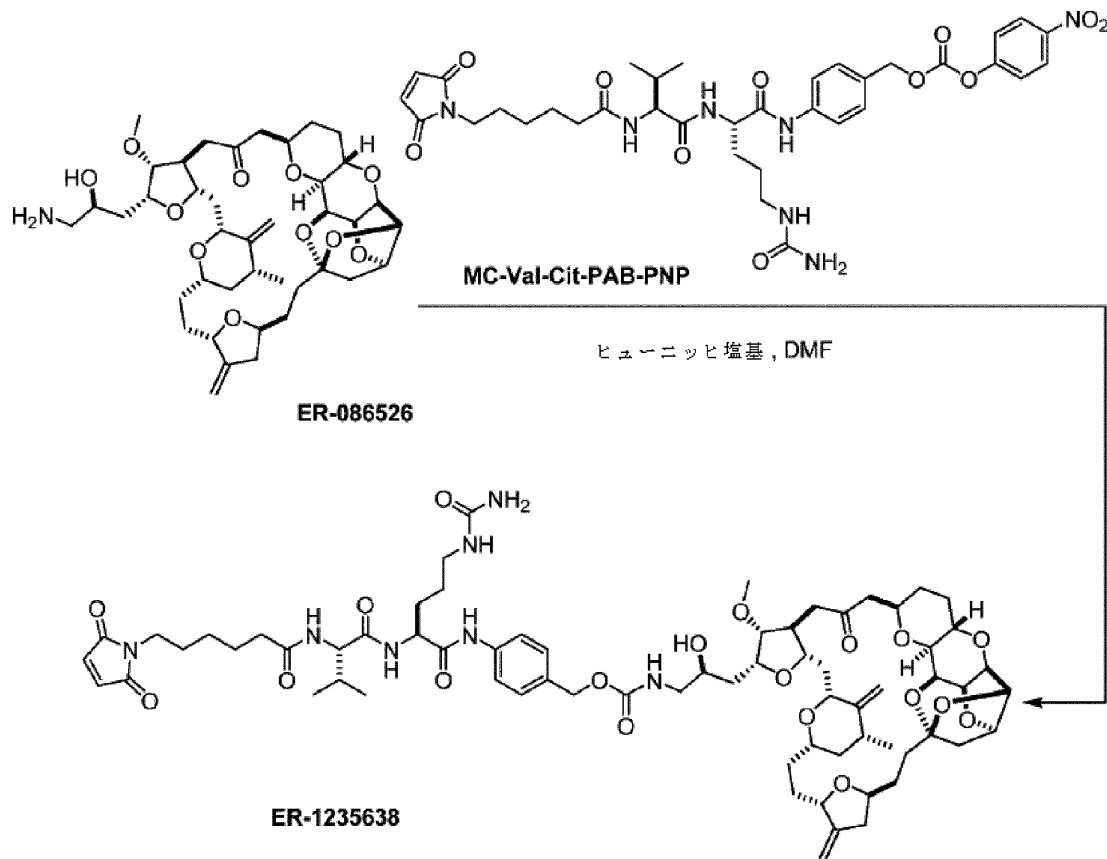
40

50

. 8 , 6 . 4 Hz , 1 H) , 4 . 13 - 4 . 06 (m , 2 H) , 3 . 97 (t , J = 10 . 4 Hz , 1 H) , 3 . 87 - 3 . 80 (m , 3 H) , 3 . 74 - 3 . 68 (m , 2 H) , 3 . 37 (s , 3 H) , 3 . 20 - 3 . 06 (m , 4 H) , 2 . 94 (dd , J = 2 . 0 , 11 . 2 Hz , 1 H) , 2 . 90 - 2 . 82 (m , 1 H) , 2 . 82 (s , 4 H) , 2 . 74 - 2 . 65 (m , 2 H) , 2 . 61 (t , J = 8 . 0 Hz , 2 H) , 2 . 46 - 2 . 26 (m , 7 H) , 2 . 24 - 1 . 81 (m , 13 H) , 1 . 78 - 1 . 28 (m , 19 H) , 1 . 10 (d , J = 6 . 8 Hz , 3 H) , 1 . 06 - 0 . 96 (m , 1 H) , 0 . 97 (d , J = 7 . 2 Hz , 3 H) , 0 . 95 (d , J = 7 . 2 Hz , 3 H) 。 LCMS (M + H) = 1375 . 1 。
【 0379】

1 . 4 Mal - (CH₂)₅ - Val - Cit - PAB - エリブリン (ER - 001235638) の調製

【化6】



【 0380】

エリブリン (ER - 000086526) (10 mg 、 0 . 012 mmol) を DMF (1 mL) に溶解させ、MC - Val - Cit - PAB - PNP (9 . 02 mg 、 0 . 012 mmol) 及びビューニツヒ塩基 (4 . 44 μ L 、 0 . 025 mmol) と混合した。次いで、HPLC分析が反応の完了を示すまで、混合物を室温で12時間にわたって攪拌した。反応混合物を濃縮し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して、Mal - (CH₂)₅ - Val - Cit - PAB - エリブリン (ER - 001235638) を白色の固体として得た (11 . 3 mg 、 収率 63%) 。¹H NMR (400 MHz , CD₃OD) ppm 7 . 57 (d , J = 8 . 4 Hz , 2 H) , 7 . 31 (d , J = 8 . 4 Hz , 2 H) , 6 . 79 (s , 2 H) , 5 . 13 (s , 1 H) , 5 . 05 (d , J = 12 . 4 Hz , 1 H) , 5 . 02 (s , 1 H) , 5 . 00 (d , J = 12 . 4 Hz , 1 H) , 4 . 87 (s , 1 H) , 4 . 83 (s , 1 H) , 4 . 71 (t , J = 4 . 4 Hz , 1 H) , 4 . 61 (t , J = 4 . 4 Hz , 1 H) , 4 .

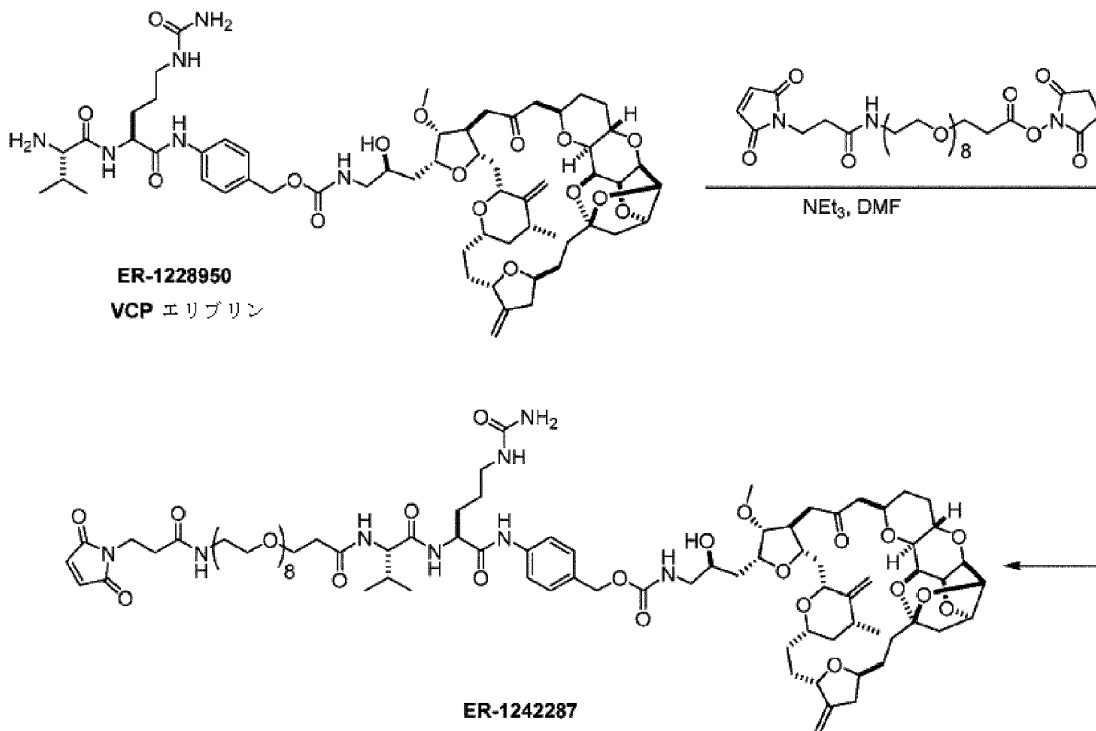
5.6 - 4.46 (m, 3H), 4.35 - 4.27 (m, 2H), 4.20 - 4.07 (m, 4H), 3.98 (t, $J = 10.8$ Hz, 1H), 3.87 - 3.83 (m, 3H), 3.73 - 3.70 (m, 2H), 3.48 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.20 - 3.08 (m, 4H), 2.93 (dd, $J = 1.6, 9.6$ Hz, 1H), 2.89 - 2.85 (m, 1H), 2.69 (dt, $J = 11.2, 16.8$ Hz, 2H), 2.44 - 2.33 (m, 5H), 2.27 - 1.83 (m, 13H), 1.78 - 1.68 (m, 5H), 1.66 - 1.27 (m, 14H), 1.11 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.07 - 0.98 (m, 1H), 0.98 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H)。LCMS (M+H) = 1328.9。

10

【0381】

1.5 Mal-PEG8-Val-Cit-PAB-エリブリン (ER-001242287) の調製

【化7】



20

30

【0382】

VCP-エリブリン (ER-001228950) (10 mg、8.808 μmol) 及び 2,5-ジオキソピロリジン-1-イル1-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-3-オキソ-7,10,13,16,19,22,25,28-オクタオキサ-4-アザヘントリアコンタン-31-オアート (6.07 mg、8.808 μmol) を DMF (1 mL) 中で混合し、続いて、Et₃N (9.82 μl、0.07 mmol) を添加した。HPLC分析が反応の完了を示すまで、反応混合物を室温で18時間にわたって攪拌した。溶媒を蒸発により除去し、残渣をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、Mal-PEG8-Val-Cit-PAB-エリブリン (ER-001242287) を白色の固体として得た (3.0 mg、収率20%)。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) ppm 7.58 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.80 (s, 2H), 5.12 (s, 1H), 5.04 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 5.01 (s, 1H), 4.99 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 4.85 (s, 1H), 4.80 (s, 1H), 4.69 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.59 (t,

40

50

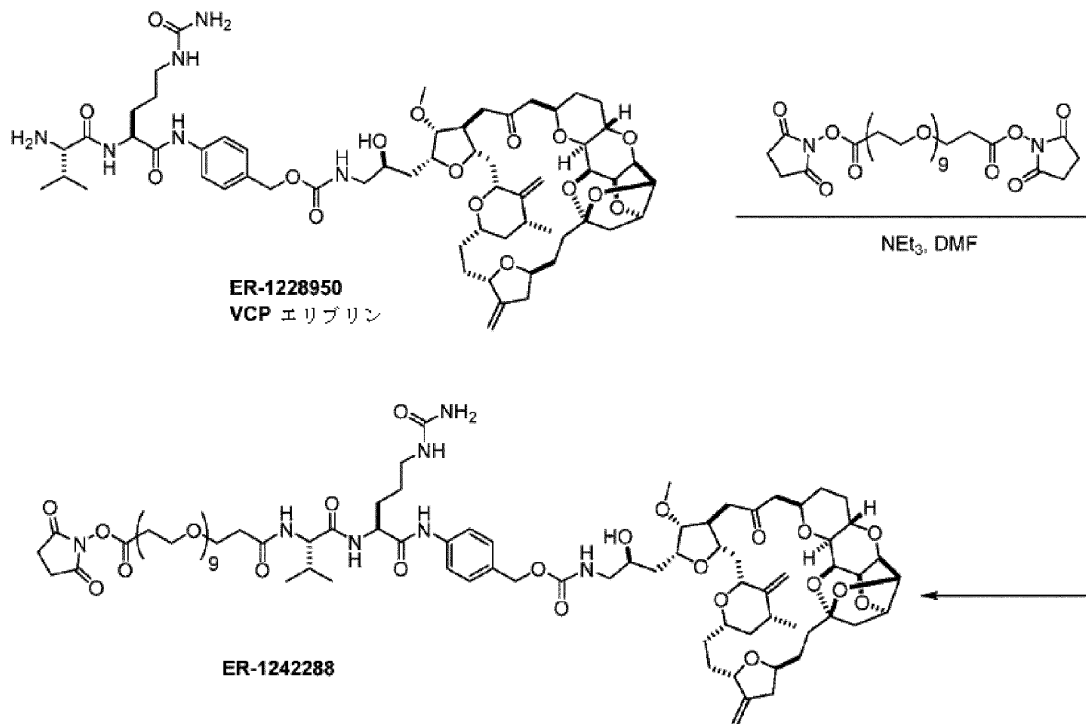
J = 4.4 Hz, 1H), 4.50 - 4.42 (m, 2H), 4.32 - 4.24 (m, 2H), 4.20 - 4.14 (m, 2H), 4.12 - 4.04 (m, 3H), 3.96 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 3.86 - 3.80 (m, 3H), 3.76 - 3.57 (m, 4H), 3.48 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 3.36 (s, 3H), 3.20 - 3.08 (m, 3H), 2.91 (dd, J = 2.0, 11.2 Hz, 1H), 2.90 - 2.82 (m, 1H), 2.74 - 2.60 (m, 2H), 2.44 - 2.29 (m, 5H), 2.21 - 1.97 (m, 10H), 1.93 - 1.83 (m, 3H), 1.79 - 1.20 (m, 19H), 1.09 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.04 - 0.98 (m, 1H), 0.99 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 7.2 Hz, 3H). LCMS (M+H) = 1711.6.

10

【0383】

1.6 NHS-PEG9-Val-Cit-PAB-エリブリン(ER-001242288)の調製

【化8】



20

30

【0384】

NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-エリブリン(ER-001236940)の調製のために上記した手順と同じ手順を使用して、VCP-エリブリン(ER-001228950)及びビスNHS-PEG9から、NHS-PEG9-Val-Cit-PAB-エリブリン(ER-001242288)を調製した(13mg、収率85%)。¹HNMR(400MHz, CD₃OD) ppm 7.61 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.16 (s, 1H), 5.06 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 5.01 (s, 1H), 5.00 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.82 (s, 1H), 4.71 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.61 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.52 - 4.45 (m, 2H), 4.34 - 4.26 (m, 2H), 4.20 - 4.19 (m, 1H), 4.14 - 4.06 (m, 2H), 3.98 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 3.88 - 3.80 (m, 3H), 3.76 - 3.70 (m, 4H), 3.66 - 3.58 (m, 3H), 3.38 (s, 3H), 3.24 - 3.10 (m, 3H), 2.93 (dd, J = 2.0, 11.2 Hz, 1

40

50

H), 2.91 - 2.84 (m, 1H), 2.84 (s, 4H), 2.76 - 2.64 (m, 2H), 2.58 - 2.50 (m, 4H), 2.46 - 2.28 (m, 5H), 2.22 - 1.96 (m, 8H), 1.91 - 1.82 (m, 3H), 1.79 - 1.68 (m, 5H), 1.64 - 1.24 (m, 8H), 1.11 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.08 - 0.96 (m, 1H), 0.99 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 7.2 Hz, 3H)。LCMS (M+H) = 1729.7。

【0385】

1.7 NHS-PEG3-トリアゾール-PEG3-Val-Cit-PAB-エリ布林 (ER-001243700) の調製

10

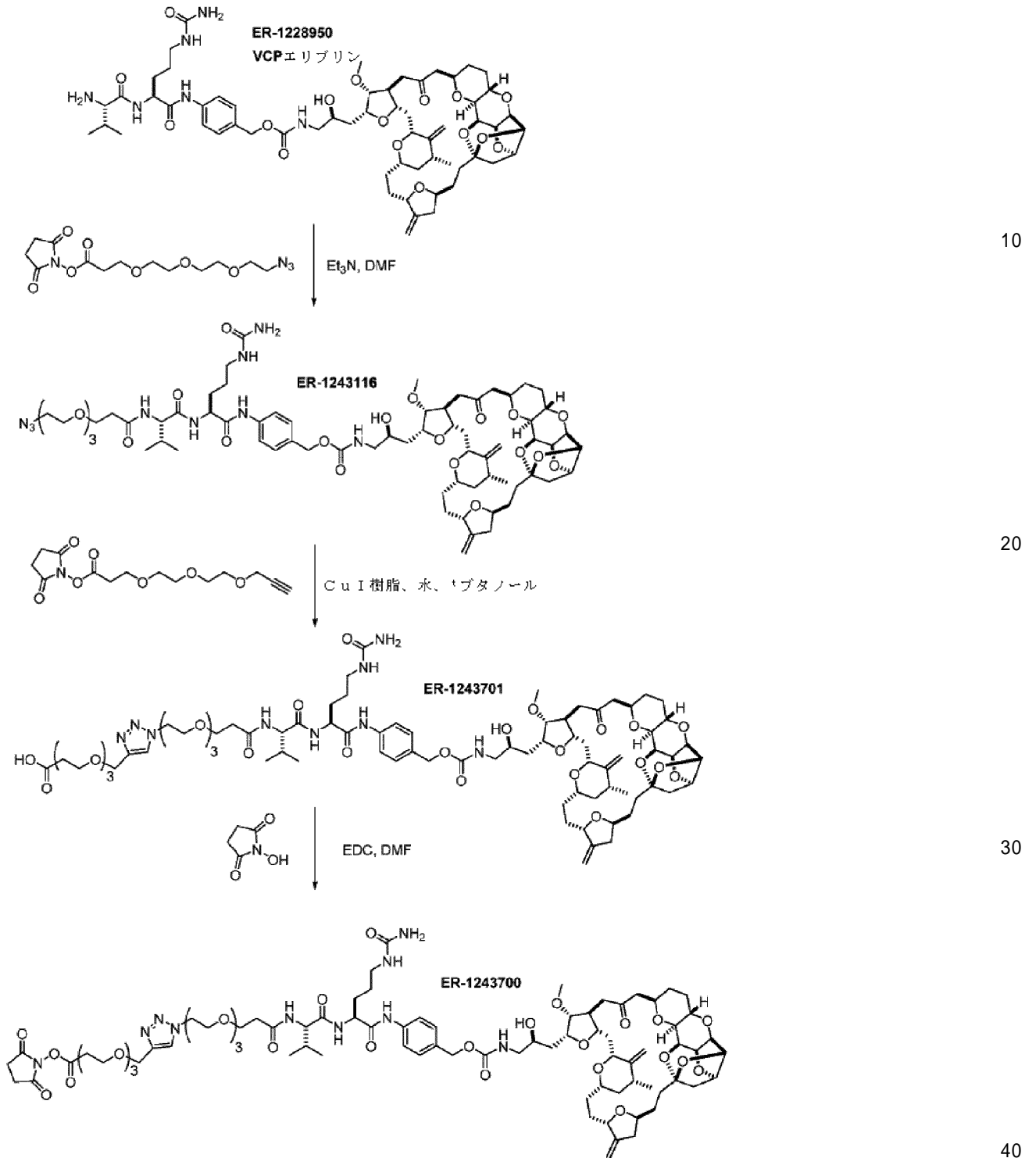
20

30

40

50

【化9】



【0386】

VCP-エリブリン(ER-001228950)(25mg、0.022mmol)をDMF(2.5mL)に溶解させ、次いで、Et₃N(24.55μl、0.176mmol)及びアジド-PEG3-NHS(8.34mg、0.024mmol)と混合した。HPLC分析が反応の完了を示すまで、混合物を室温で18時間にわたって撹拌した。混合物を真空下で濃縮し、残渣を、分取HPLC(0.1%ギ酸を含むMeCN及び水)により精製した。アジド-PEG3-Val-Cit-PAB-エリブリンを含有する画分をジクロロメタン(CH₂Cl₂)(3×20mL)で抽出し、CH₂Cl₂を蒸発させて、アジド-PEG3-Val-Cit-PAB-エリブリン(ER-0012431

16) を白色の固体として得た (18.9 mg、収率63%)。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) ppm 7.58 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.14 (s, 1H), 5.04 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 5.03 (s, 1H), 5.01 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.85 (s, 1H), 4.81 (s, 1H), 4.70 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.61 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.52 - 4.48 (m, 2H), 4.31 - 4.25 (m, 2H), 4.20 - 4.15 (m, 1H), 4.13 - 4.07 (m, 2H), 3.99 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 3.84 - 3.79 (m, 3H), 3.77 - 3.65 (m, 4H), 3.64 - 3.56 (m, 13H), 3.38 (s, 3H), 3.20 - 3.05 (m, 3H), 2.95 - 2.80 (m, 2H), 2.75 - 2.60 (m, 2H), 2.55 - 2.50 (m, 2H), 2.43 - 2.25 (m, 5H), 2.21 - 1.97 (m, 8H), 1.93 - 1.83 (m, 3H), 1.79 - 1.72 (m, 5H), 1.68 - 1.29 (m, 10H), 1.08 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.05 - 0.95 (m, 1H), 0.98 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.95 (d, J = 7.2 Hz, 3H)。LCMS (M+H) = 1365.1。

【0387】

アジド - PEG3 - VCP - エリブリン (ER - 001243116) (9.6 mg、7.035 μmol) 及び 2,5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル3 - (2 - (2 - (プロパ - 2 - イン - 1 - イルオキシ) エトキシ) エトキシ) プロパノアート (6.61 mg、0.021 mmol) を水 (0.6 mL) 及び t - ブタノール (1.8 mL) 中で混合した。混合物に、N₂ を45分間にわたって吹き込んだ。amberlyst - 21上のヨウ化銅 (1.23 mmol/g、10 mg) を混合物に添加し、N₂ を、混合物にさらに30分間にわたって吹き込んだ。次いで、出発物質の完全消費まで、反応混合物を室温で72時間にわたって攪拌した。LCMS分析によると、所望のNHSエステル生成物は観察されず、加水分解カルボン酸のみが観察された。混合物を、短いセライトパッドを通して濾過して、CuI樹脂を除去した。濾液を真空中で濃縮し、得られた残渣を、分取薄層クロマトグラフィー (分取 - TLC) (20% MeOH / CH₂Cl₂) により精製して、酸 - PEG3 - トリアゾール - PEG3 - Val - Cit - PAB - エリブリン (ER - 001243701) を白色の固体として得た (3.7 mg、収率33%)。LCMS (ES) (M+H) = 1581.2。

【0388】

酸 - PEG3 - トリアゾール - PEG3 - Val - Cit - PAB - エリブリン (ER - 001243701) (3.0 mg、1.898 μmol) をDMF (200 μL) に溶解させ、1 - ヒドロキシピロリジン - 2,5 - ジオン (0.437 mg、3.796 μmol) を添加し、続いて、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) (0.728 mg、3.796 μmol) を添加した。室温で18時間にわたって攪拌した後に、反応は約50%完了した。EDC (1.46 mg、7.8 μmol) を添加し、HPLC分析がNHS - PEG3 - トリアゾール - PEG3 - Val - Cit - PAB - エリブリンへの > 95% 変換率を示すまで、混合物をさらに18時間にわたって攪拌した。混合物を真空中で濃縮し、残渣を分取 - TLC (15% MeOH / CH₂Cl₂) により精製して、NHS - PEG3 - トリアゾール - PEG3 - Val - Cit - PAB - エリブリン (ER - 001243700) を白色の固体として得た (2.2 mg、収率69%)。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) ppm 8.00 (s, 1H), 7.59 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.31 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.13 (s, 1H), 5.04 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 5.02 (s, 1H), 5.00 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.83 (s, 1H), 4.71 (t, J = 4.0 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.61 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.57 - 4.55 (m, 2H), 4.51 - 4.45 (m, 1H), 4.32 - 4.2

8 (m, 2H), 4.21 - 4.17 (m, 2H), 4.13 - 4.10 (m, 2H), 3.98 (t, J = 10.8 Hz, 1H), 3.88 - 3.80 (m, 5H), 3.75 - 3.70 (m, 4H), 3.68 - 3.55 (m, 18H), 3.45 - 3.40 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.20 - 3.08 (m, 4H), 2.93 - 2.80 (m, 2H), 2.75 - 2.50 (m, 2H), 2.68 (s, 4H), 2.48 - 2.30 (m, 7H), 2.28 - 1.92 (m, 10H), 1.90 - 1.68 (m, 8H), 1.65 - 1.27 (m, 8H), 1.11 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.05 - 0.95 (m, 1H), 0.99 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。
LCMS (M+H) = 1678.3。

10

【0389】

1.8 Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-エリブリン(ER-001231679)及びMal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-エリブリン(ER-001231690)の調製

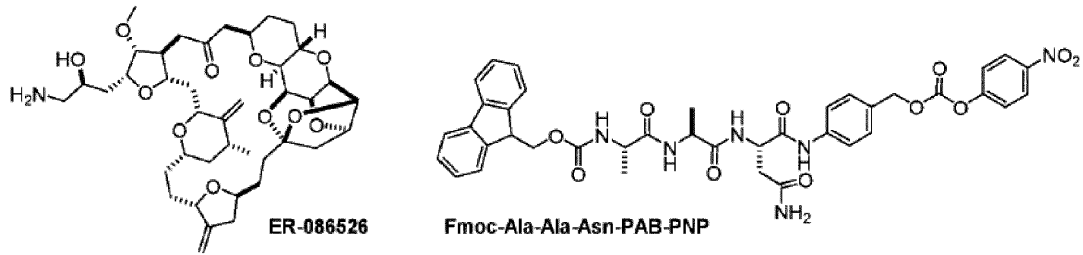
20

30

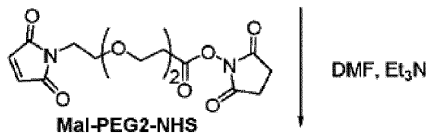
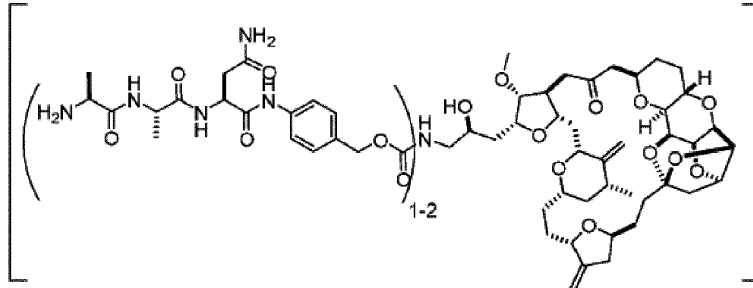
40

50

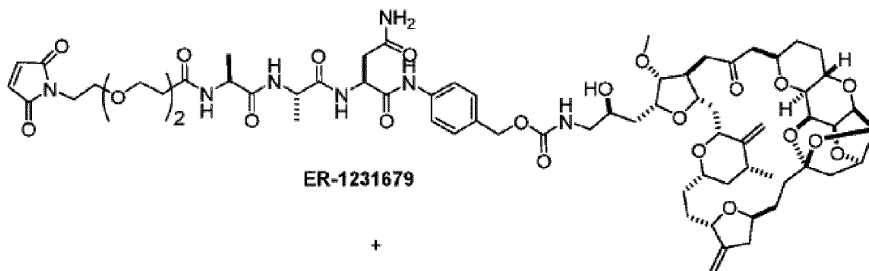
【化10】



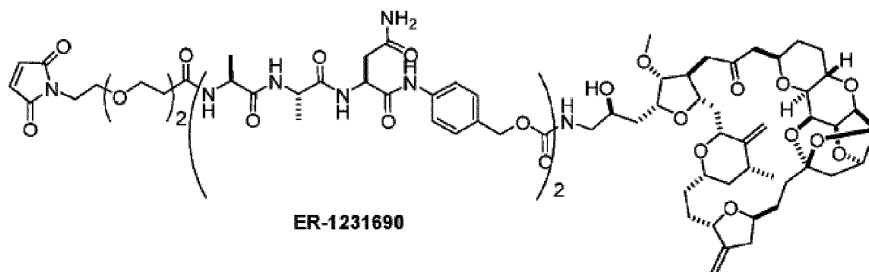
1. ヒューニツヒ塩基,
2. Et₂NH



DMF, Et₃N



+



【0390】

エリブリン (ER - 000086526) (10 mg、0.014 mmol) を DMF (0.5 mL) に溶解させ、ヒューニツヒ塩基 (3.59 μL、0.021 mmol) と混合した。次いで、(9H-フルオレン-9-イル)メチル((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-アミノ-1-((4-((4-ニトロフェノキシ)カルボニル)オキシ)メチル)フェニル)アミノ)-1,4-ジオキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)カルバマート (15.76 mg、0.021 mmol) を添加し、HPLC分析が出発物質の完全な消費を示すまで、得られた黄色の溶液を室温で3日間にわたって攪拌した。ジエチルアミン (14.23 μL、0.137 mmol) を反応混合物に添加し、次いで、これを、

10

20

30

40

50

Fmoc保護の100%切断が存在するまで、室温でさらに2時間にわたって攪拌した。反応混合物を濃縮して、ジエチルアミンを除去し、残渣をDMF(1.5mL)に再溶解させた。Et₃N(0.015mL、0.11mmol)を室温で添加し、続いて、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル3-(2-(2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エトキシ)エトキシ)プロパノアート(9.71mg、0.027mmol)を添加した。LCMS分析により決定して反応が完了するまで、反応混合物を室温で16時間にわたって攪拌した。混合物を高真空下で濃縮し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して、Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-エリブリン(ER-001231679)(9.2mg、収率49%)及びMal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-エリブリン(ER-001231690)(6.0mg、収率18%)を無色の油状物として得た。

10

【0391】

Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-エリブリン(ER-001231679): ¹H NMR(400 MHz) ppm 9.23(s, 1H), 8.00(d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.61(d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.38(d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.24(d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.13(d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.68(s, 2H), 6.30(br s, 1H), 6.04-6.00(m, 1H), 5.77(br s, 1H), 5.42(br s, 1H), 5.07(s, 1H), 5.06-4.98(m, 2H), 4.93(s, 1H), 4.88(s, 1H), 4.90-4.82(m, 1H), 4.80(s, 1H), 4.69(t, J = 4.0 Hz, 1H), 4.60(t, J = 4.0 Hz, 1H), 4.49-4.42(m, 1H), 4.38-4.25(m, 4H), 4.19(t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.15-4.08(m, 1H), 4.03(t, J = 4.8 Hz, 1H), 3.97-3.85(m, 3H), 3.83-3.50(m, 12H), 3.41(s, 3H), 3.50-3.10(m, 3H), 3.02-2.64(m, 6H), 2.52-2.30(m, 7H), 2.30-1.65(m, 14H), 1.65-1.20(m, 12H), 1.10(d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.13-1.05(m, 1H)。LCMS(M+Na) = 1396.6。

20

【0392】

Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-エリブリン(ER-001231690): ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD) ppm 7.65(d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.60(d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.28(d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.23(d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.79(s, 2H), 5.13(s, 1H), 5.02(s, 1H), 5.06-4.98(m, 4H), 4.87(s, 1H), 4.82(s, 1H), 4.85-4.72(m, 2H), 4.71(t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.61(t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.47(d, J = 11.2 Hz, 1H), 4.30-4.06(m, 9H), 3.97(t, J = 4.8 Hz, 1H), 3.89-3.80(m, 3H), 3.75-3.48(m, 12H), 3.38(s, 3H), 3.17(d, J = 6.8 Hz, 2H), 2.94-2.62(m, 8H), 2.50-2.28(m, 7H), 2.22-1.65(m, 14H), 1.58-1.30(m, 18H), 1.10(d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.06-0.97(m, 1H)。LCMS(M+Na) = 1802.8。

30

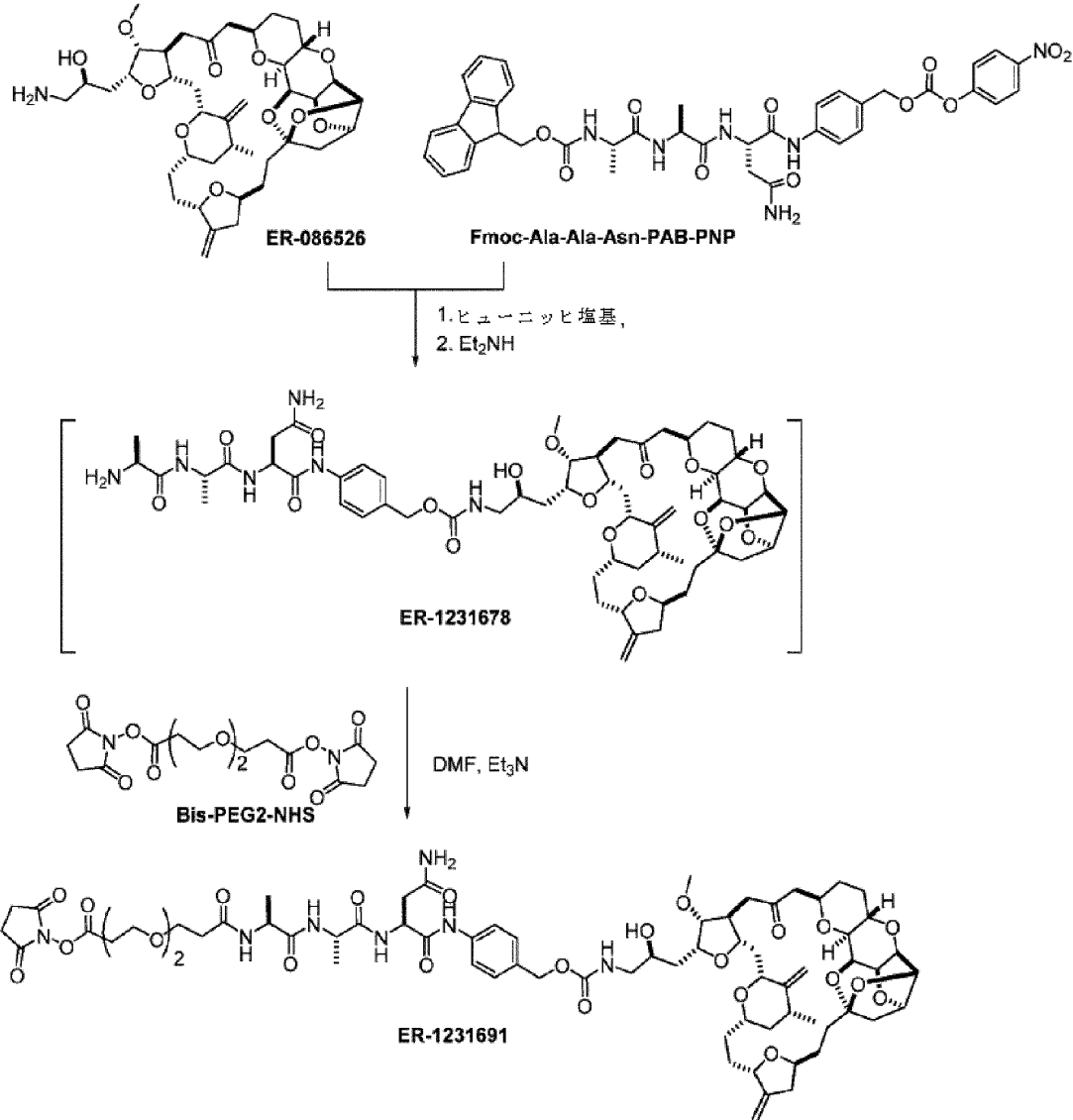
40

【0393】

1.9 NHS-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-エリブリン(ER-001231691)の調製

50

【化 1 1】



10

20

30

【0394】

Val-Cit-PAB-エリブリン (ER-001228950) の調製のために上記した手順と同じ手順を使用して、エリブリン (ER-000086526) 及び Fmoc-Ala-Ala-Asn-PAB-PNP から、Ala-Ala-Asn-PAB-エリブリン (ER-001231678) を調製した (15 mg、定量収率)。LCMS (M+H) = 1135.5。

【0395】

NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-エリブリン (ER-001236940) の調製のために上記した手順と同じ手順を使用して、Ala-Ala-Asn-PAB-エリブリン (ER-001231678) 及びビスNHS-PEG2 から、NHS-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-エリブリン (ER-001231691) を調製した (12.4 mg、収率 64%)。¹H NMR (400 MHz) ppm 9.21 (s, 1H), 7.95 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.58 - 7.52 (m, 1H), 7.28 (br s, 1H), 7.24 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.10 (br s, 1H), 6.29 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 5.83 (br s, 1H), 5.38 (br s, 1H), 5.07 (s, 1H), 5.05 - 4.95 (m, 2H), 4.93 (s, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.90 - 4.83 (m, 1H), 4

40

50

. 81 (s, 1H), 4.69 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.60 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.46 - 4.41 (m, 1H), 4.36 - 4.25 (m, 4H), 4.19 (dd, J = 4.8, 6.0 Hz, 1H), 4.15 - 4.09 (m, 1H), 4.03 (dd, J = 4.8, 6.0 Hz, 1H), 3.99 - 3.89 (m, 3H), 3.85 - 3.50 (m, 10H), 3.41 (s, 3H), 3.40 - 3.10 (m, 3H), 3.01 - 2.60 (m, 10H), 2.60 - 2.35 (m, 7H), 2.35 - 1.65 (m, 14H), 1.65 - 1.20 (m, 14H), 1.10 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.15 - 1.03 (m, 1H)。LCMS (ES) (M+H) = 1442.7。

【0396】

1.10 アジド - PEG3 - ジスルフィド - PAB - エリブリン (ER - 001237508) の調製

10

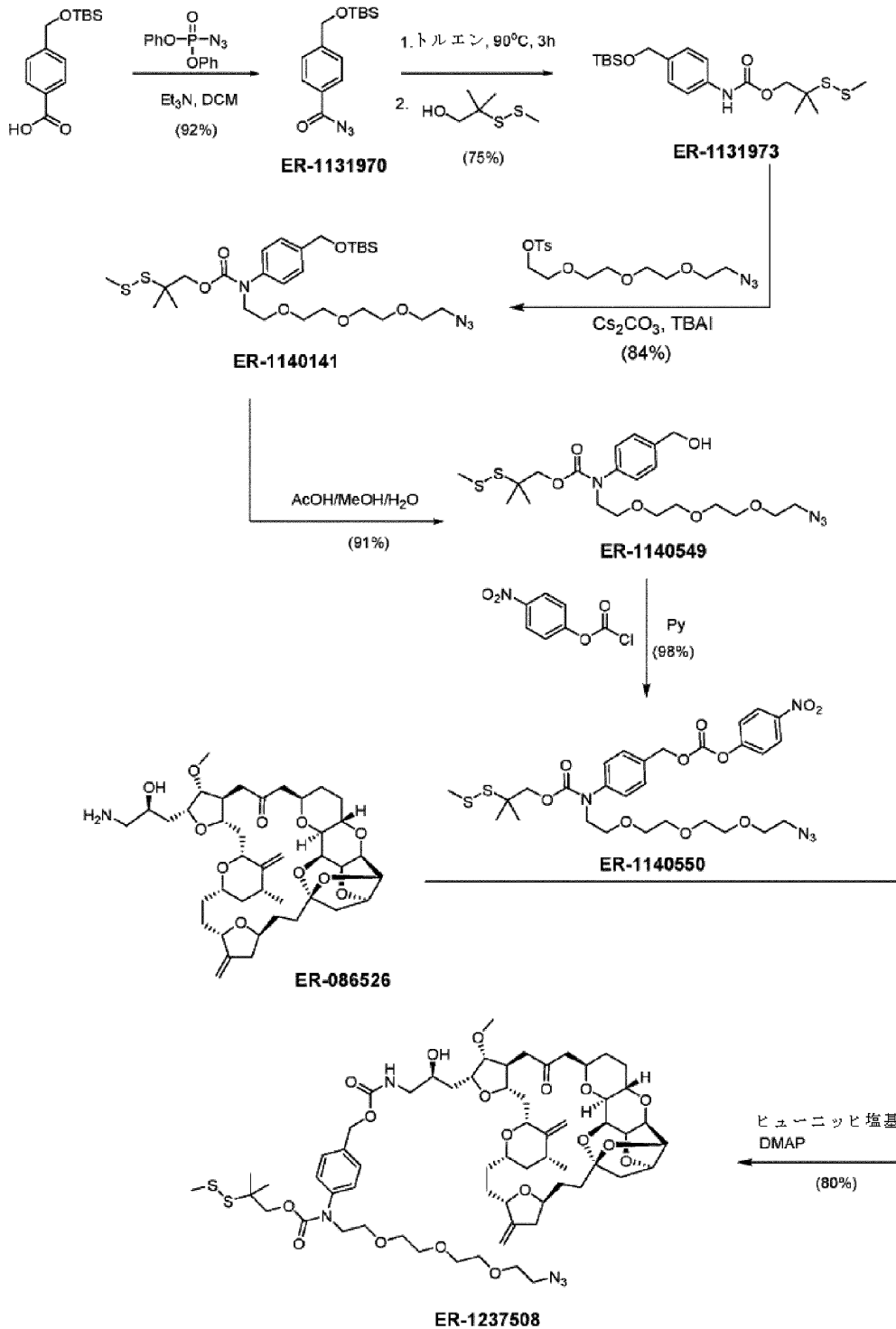
20

30

40

50

【化 1 2】



10

20

30

40

【0397】

4 - ((tert - ブチルジメチルシリル) オキシ) メチル) 安息香酸 (1 . 0 g 、 3 . 7 5 4 m m o l) を、0 に冷却したジクロロメタン (D C M) (2 5 m L) に溶解させた。次いで、トリエチルアミン (0 . 5 4 9 m L 、 3 . 9 4 1 m m o l) を、続いて、ジフェニルホスホラジダート (1 . 0 8 5 m g 、 3 . 9 4 1 m m o l) を添加した。反応混合物を室温にゆっくり加温し、14時間にわたって攪拌した。粗製の混合物を酢酸エチル (EtOAc) / Hep (1 : 1 、 1 0 0 m L) で希釈し、EtOAc / Hep (5 0 %) で分離して短いシリカプラグに通した。溶媒を真空下で除去して、4 - ((tert - ブチルジメチルシリル) オキシ) メチル) ベンゾイルアジド (ER - 0 0 1 1 3 1

50

970) 1.10 gを得た。¹H NMR (400 MHz) ppm 7.98 (d, 2 H, J = 8.0 Hz), 7.40 (d, 2 H, J = 8.0 Hz), 4.79 (s, 2 H), 0.94 (s, 9 H), 0.10 (s, 6 H)。

【0398】

トルエン(20 mL)に溶解させた4-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)ベンゾイルアジド(ER-001131970)(1.1 g、3.775 mmol)を110 で3時間にわたって加熱した。生成物は単一のスポットを示さなかったが、薄層クロマトグラフィー(TLC)分析は、出発物質が消費されたことを示した。次いで、反応混合物を室温に冷却し、窒素下で密閉されたバイアルに移し、トルエン中の溶液(1 mL = 32.6 mg)として-20 で貯蔵した。

10

【0399】

トリエチルアミン(0.099 mL、0.709 mmol)をトルエン(5 mL)中のtert-ブチル((4-イソシアナトベンジル)オキシ)ジメチルシラン(165 mg、0.626 mmol)の溶液に添加し、続いて、アルコール(90.0 mg、0.591 mmol)を添加し、反応混合物を6時間にわたって36 で攪拌した。反応の進行をUPLC/MSにより監視した。次いで、炭酸水素ナトリウム(NaHCO₃)の飽和溶液(10 mL)を添加し、EtOAc/Hep(1:1、60 mL)で抽出し、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥し、濃縮した。粗製の物質をフラッシュクロマトグラフィー(EtOAc/Hep 10%~40%)により精製して、2-メチル-2-(メチルジスルファニル)プロピル(4-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)フェニル)カルバマート(ER-001131973) 215 mgを得た。¹H NMR (400 MHz) ppm 7.34 (d, 2 H, J = 8.4 Hz), 7.26 (d, 2 H, J = 7.6 Hz), 6.63 (brs, 1 H), 4.69 (s, 2 H), 4.17 (s, 2 H), 2.42 (s, 3 H), 1.35 (s, 6 H), 0.93 (s, 9 H), 0.08 (s, 6 H)。

20

【0400】

2-メチル-2-(メチルジスルファニル)プロピル(4-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)フェニル)カルバマート(ER-001131973)(198 mg、0.476 mmol)及び2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エチル4-メチルベンゼンスルホナート(325 mg、0.87 mmol)をDMF(6.6 mL)に溶解させた。次いで、炭酸セシウム(621 mg、1.905 mmol)を、続いて、ヨウ化テトラブチルアンモニウム(45 mg、0.122 mmol)を添加し、反応混合物を15時間にわたって36 で攪拌した。反応の進行をUPLC/MSにより監視した。次いで、NH₄Cl(30 mL)の飽和溶液を添加し、EtOAc/Hep(2:1、150 mL)で抽出し、ブライン(10 mL)で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、真空下で濃縮した。粗製の物質をフラッシュクロマトグラフィー(EtOAc/Hep 20%~50%)により精製して、2-メチル-2-(メチルジスルファニル)プロピル(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エチル)(4-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)フェニル)カルバマート(ER-001140141) 248 mgを得た。¹H NMR (400 MHz) ppm 7.28 (d, 2 H, J = 8.4 Hz), 7.20 (d, 2 H, J = 8.0 Hz), 4.73 (s, 2 H), 4.06 (brs, 2 H), 3.83 (dd, 2 H, J = 6.4, 5.6 Hz), 3.68-3.56 (m, 12 H), 3.37 (dd, 2 H, J = 5.6, 5.2 Hz), 2.33 (s, 3 H), 1.14 (brs, 6 H), 0.93 (s, 9 H), 0.09 (s, 6 H)。

30

40

【0401】

2-メチル-2-(メチルジスルファニル)プロピル(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エチル)(4-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)フェニル)カルバマート(ER-001140141)(81 mg、

50

0.131 mmol) をメタノール (5 mL) 及び水 (0.5 mL) の混合物に溶解させた。次いで、酢酸 (0.5 mL、8.734 mmol) を反応混合物に添加し、14 時間にわたって 38 で攪拌した。反応混合物を室温に冷却し、溶媒を真空下で除去した。残渣を EtOAc (30 mL) で希釈し、水 (2 x 5 mL)、NaHCO₃、及びブライン (3 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、真空下で濃縮した。粗製の物質をフラッシュクロマトグラフィー (EtOAc / Hep 30% ~ 90%) により精製して、2 - メチル - 2 - (メチルジスルファニル) プロピル (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) (4 - (ヒドロキシメチル) フェニル) カルバマート (ER - 001140549) 61.0 mg を得た。¹H NMR (400 MHz) ppm 7.34 (d, 2 H, J = 8.8 Hz), 7.26 (d, 2 H, J = 8.0 Hz), 4.69 (d, 2 H, J = 4.4 Hz), 4.06 (br s, 2 H), 3.84 (dd, 2 H, J = 6.2, 6.2 Hz), 3.66 - 3.56 (m, 12 H), 3.37 (dd, 2 H, J = 5.2, 5.2 Hz), 2.33 (s, 3 H), 1.74 (br s, 1 H), 1.14 (br s, 6 H)。

【0402】

2 - メチル - 2 - (メチルジスルファニル) プロピル (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) (4 - (ヒドロキシメチル) フェニル) カルバマート (ER - 001140549) (60 mg、0.119 mmol) を、0 に冷却した DCM (2 mL) 及び Py (0.019 mL、0.239 mmol) に溶解させた。次いで、DCM (2 mL) 中の 4 - ニトロフェニルカルボノクロリダート (38.5 mg、0.191 mmol) 及びジメチルアミノピリジン (DMAP) (2.9 mg、0.024 mmol) を添加し、反応混合物を 30 分間にわたって 0 で攪拌した。反応混合物を室温にゆっくり加温し、出発物質が消費されるまで (約 2.5 時間)、攪拌した。次いで、溶媒を真空下で除去し、残渣をフラッシュクロマトグラフィー (EtOAc / Hep 10% ~ 35%) により精製して、2 - メチル - 2 - (メチルジスルファニル) プロピル (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) (4 - ((4 - ニトロフェノキシ) カルボニル) オキシ) メチル) フェニル) カルバマート (ER - 001140550) 78 mg を得た。¹H NMR (400 MHz) ppm 8.27 (dd, 2 H, J = 6.8, 2.4 Hz), 7.41 (d, 2 H, J = 8.8 Hz), 7.37 (dd, 2 H, J = 7.2, 2.4 Hz), 7.33 (d, 2 H, J = 8.8 Hz), 5.27 (s, 2 H), 4.08 (br s, 2 H), 3.85 (dd, 2 H, J = 5.8, 5.8 Hz), 3.66 - 3.57 (m, 12 H), 3.36 (dd, 2 H, J = 5.2, 5.2 Hz), 2.33 (br s, 3 H), 1.19 (br s, 6 H)。

【0403】

DCM (3 mL、46.625 mmol) 中の 2 - メチル - 2 - (メチルジスルファニル) プロピル (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) (4 - ((4 - ニトロフェノキシ) カルボニル) オキシ) メチル) フェニル) カルバマート (ER - 001140550) (30 mg、0.045 mmol) を 25 ml フラスコ内に窒素下に入れ、0 に冷却した。DCM (2 mL) 及びヒューニツヒ塩基 (0.024 mL、0.135 mmol) 中のアミン (40.8 mg、0.049 mmol) を、続いて、DMAP (1.4 mg、0.011 mmol) を添加した。次いで、反応混合物を室温にゆっくり加温し、3 時間にわたって攪拌し、真空下で濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー (EtOAc / Hep 50% ~ 100%、続いて、MeOH / EtOAc 3% ~ 8%) により精製して、純粋なアジド - PEG3 - ジスルフィド - PAB - エリブリン (ER - 001237508) 45.0 mg を得た。¹H NMR (400 MHz) ppm 7.32 (d, 2 H, J = 8.0 Hz), 7.25 (d, 2 H, J = 7.2 Hz), 5.28 (dd, 1 H, J = 5.6, 5.6 Hz), 5.11 - 5.04 (m, 3 H), 4.93 (s, 1 H), 4.88 (s, 1 H), 4.81 (s, 1 H), 4.69 (dd, 1 H, J = 4.4, 4.4 Hz), 4.60

10

20

30

40

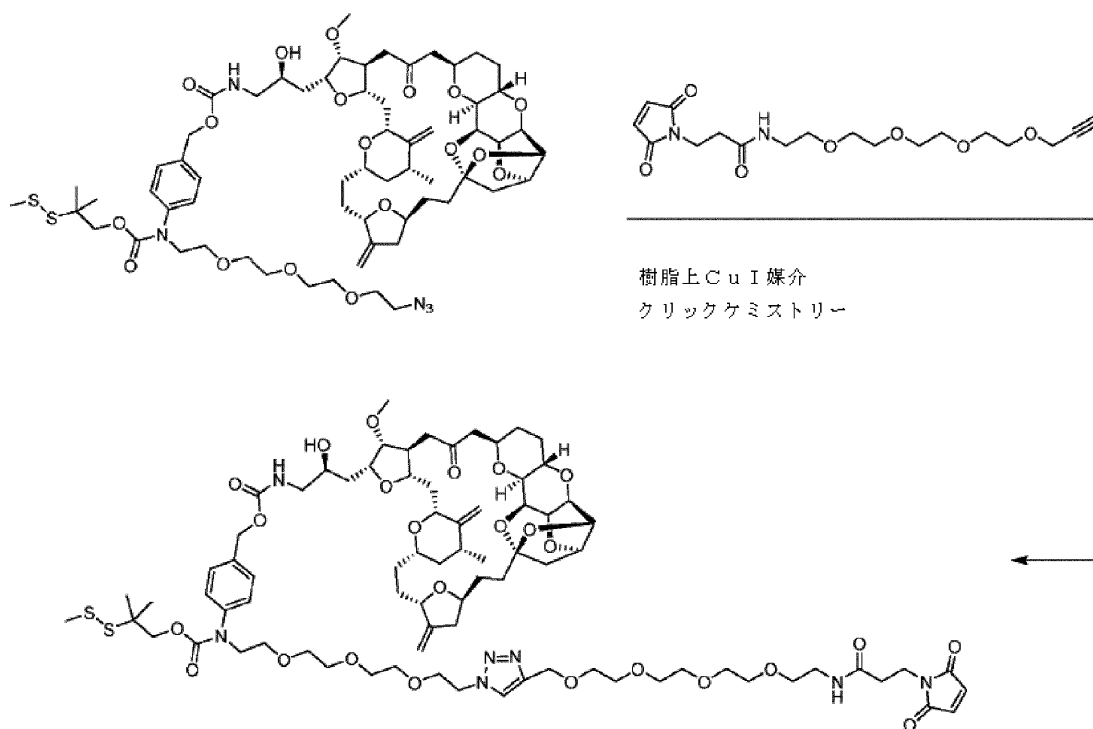
50

(dd , 1 H , J = 4 . 2 , 4 . 2 Hz) , 4 . 3 6 (b r s , 1 H) , 4 . 3 3 (dd , 1 H , J = 4 . 0 , 2 . 0) , 4 . 2 9 (d d d , 1 H , J = 9 . 6 , 4 . 4 , 4 . 4 Hz) , 4 . 1 8 (dd , 1 H , J = 6 . 4 , 4 . 4 Hz) , 4 . 1 4 - 4 . 0 4 (m , 3 H) , 4 . 0 3 (dd , 1 H , J = 6 . 4 , 4 . 4 Hz) , 3 . 9 7 - 3 . 8 9 (m , 3 H) , 3 . 8 4 - 3 . 7 8 (m , 3 H) , 3 . 6 7 - 3 . 5 6 (m , 1 4 H) , 3 . 4 2 (s , 3 H) , 3 . 4 0 - 3 . 3 5 (m , 1 H) , 3 . 3 7 (dd , 2 H , J = 5 . 2 , 5 . 2 Hz) , 3 . 2 7 (d , 1 H , J = 3 . 2 Hz) , 3 . 2 0 (d d d , 1 H , J = 1 2 . 8 , 6 . 0 , 6 . 0 Hz) , 2 . 9 1 - 2 . 8 3 (m , 2 H) , 2 . 7 0 (dd , 1 H , J = 1 6 . 0 , 1 0 . 0 Hz) , 2 . 5 2 - 2 . 4 0 (m , 3 H) , 2 . 3 5 - 2 . 1 3 (m , 9 H) , 2 . 1 0 - 2 . 0 6 (m , 1 H) , 2 . 0 1 - 1 . 8 9 (m , 4 H) , 1 . 7 8 - 1 . 6 4 (m , 4 H) , 1 . 6 0 - 1 . 5 2 (m , 4 H) , 1 . 4 9 - 1 . 2 8 (m , 5 H) , 1 . 2 2 - 1 . 0 7 (m , 6 H) , 1 . 0 9 (d , 3 H , J = 6 . 0 Hz) .

【 0 4 0 4 】

1 . 1 1 Ma1 - PEG4 - トリアゾール - PEG3 - ジスルフィド - PAB - エリブリン (ER - 0 0 1 2 3 7 5 0 4) の調製

【 化 1 3 】



【 0 4 0 5 】

tert - ブタノール (1 . 5 mL) 及び水 (0 . 5 mL) 中のアジド (9 . 0 mg 、 7 . 1 5 1 μmol) 及び 3 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) - N - (3 , 6 , 9 , 1 2 - テトラオキサペンタデカ - 1 4 - イン - 1 - イル) プロパンアミド (6 . 8 mg 、 0 . 0 1 8 mmol) の混合物を 4 5 分間にわたって脱気した。次いで、amberlyst - 2 1 上のヨウ化銅 (1 . 2 3 mmol / g 、 1 0 mg) を添加し、さらに 3 0 分間にわたって脱気した。反応混合物を室温で 1 8 時間にわたって攪拌し、UPLC / MS により監視した。出発物質の大部分が消費され、所望の生成物が主なピークとして示された。次いで、混合物を樹脂から分離し、HPLC (0 . 0 5 % ギ酸を含むアセトニトリル / 水) で精製して、Ma1 - PEG4 - トリアゾール - PEG3 - ジスルフィド - PAB - エリブリン (ER - 0 0 1 2 3 7 5 0 4) 1 . 5 mg を得た。¹H NMR (4 0 0 MHz) ppm 7 . 7 4 (s , 1 H) , 7 . 3 2

して示された。次いで、混合物を濾過により樹脂から分離し、DCM (15 mL) で抽出し、ブライン (3 x 3 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、真空下で濃縮した。残渣 (5 mg、3.39 μ mol) をトルエンと共に共沸し、THF (1 mL) に溶解し、0 に冷却した。DCC (4.2 mg、0.02 mmol) を、続いて、1-ヒドロキシピロリジン-2, 5-ジオン (2.2 mg、0.019 mmol) を添加し、反応混合物を室温で18時間にわたって攪拌した。出発物質の大部分が消費され、所望の生成物が、UPLC/MSにより決定して主なピークとして示された。次いで、反応混合物を濃縮し、分取TLC (DCM/i-プロパノール、8%) で精製して、NHS-PEG3-トリアゾール-PEG3-ジスルフィド-PAB-エリブリン (ER-001244129) 2.5 mg を無色の油状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) ppm 7.72 (s, 1 H), 7.32 (d, 2 H, J = 8.8 Hz), 7.25 (d, 2 H, J = 8.8 Hz), 5.08 - 5.04 (m, 3 H), 4.93 (s, 1 H), 4.85 (s, 1 H), 4.78 (s, 1 H), 4.64 (dd, 1 H, J = 4.4, 4.4 Hz), 4.58 (s, 2 H), 4.55 (dd, 1 H, J = 4.4, 4.4 Hz), 4.48 (dd, 2 H, J = 5.0, 5.0 Hz), 4.32 (d, 1 H, J = 6.6 Hz), 4.27 - 4.22 (m, 2 H), 4.14 (dd, 1 H, J = 6.6, 4.8 Hz), 4.10 - 4.01 (m, 3 H), 4.00 (dd, 1 H, J = 6.8, 4.4 Hz), 3.92 - 3.78 (m, 9 H), 3.65 - 3.53 (m, 19 H), 3.44 - 3.39 (m, 4 H), 3.37 (s, 3 H), 3.26 (d, 1 H, J = 3.2 Hz), 3.13 (ddd, 1 H, J = 12.4, 6.0, 6.0 Hz), 2.91 - 2.73 (m, 11 H), 2.70 - 2.64 (m, 2 H), 2.54 - 2.41 (m, 3 H), 2.38 - 1.80 (m, 16 H), 1.74 - 1.52 (m, 3 H), 1.41 - 1.13 (m, 10 H), 1.07 (d, 3 H, J = 6.4 Hz)。LCMS (M+H) = 1572.3。

【0408】

1.13 アジド-PEG3-スルホンアミド-PAB-エリブリン (ER-001138856) の調製

10

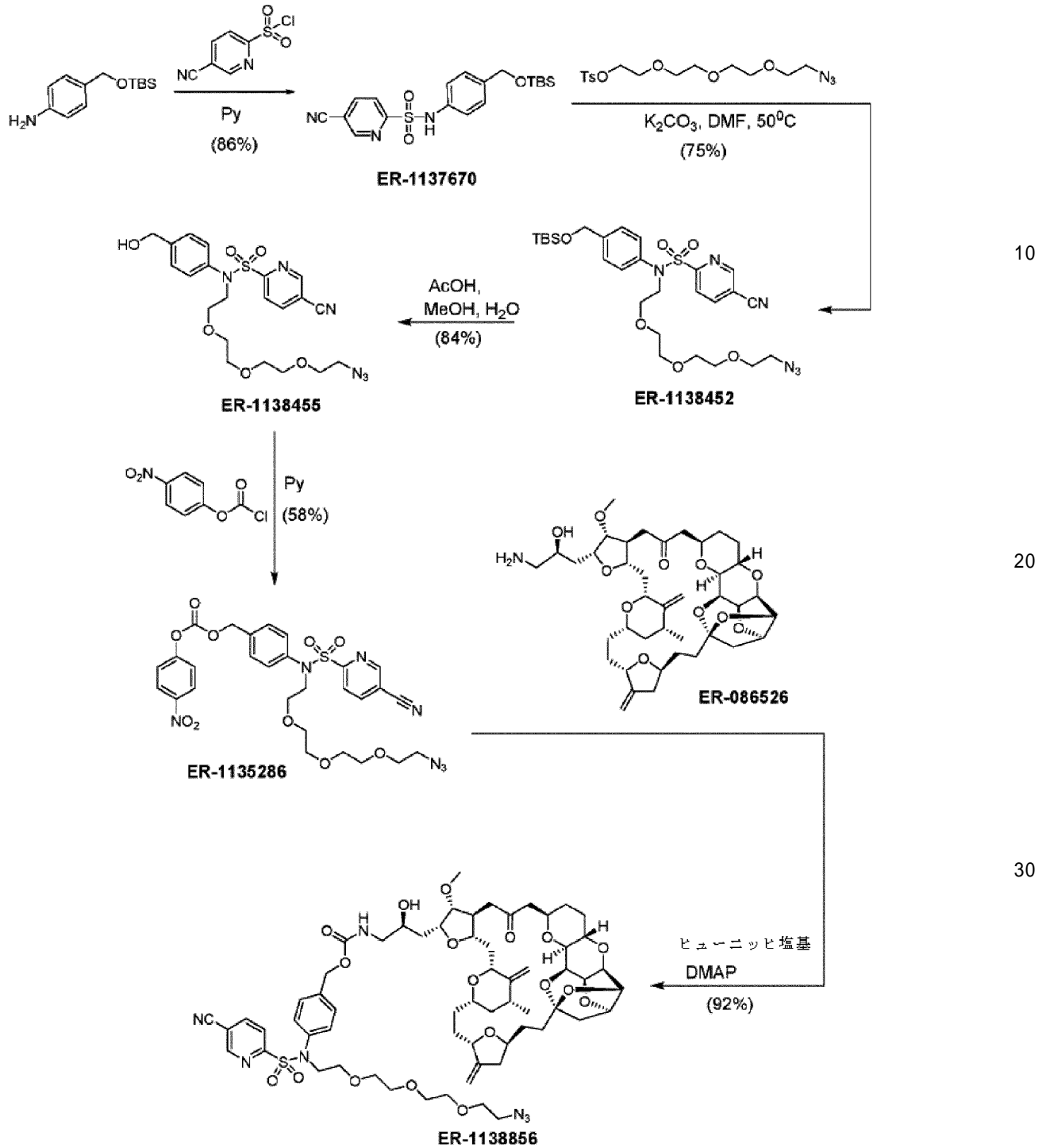
20

30

40

50

【化 1 5】



【0409】

4 - ((tert - ブチルジメチルシリル) オキシ) メチル) アニリン (3 1 5 m g 、 1 . 3 2 7 m m o l) を 0 に冷却した DCM (1 0 m L) に溶解させた。次いで、ピリジン (0 . 2 6 8 m L 、 3 . 3 1 7 m m o l) を、続いて、DCM (1 0 m L) 中の 5 - シアノピリジン - 2 - スルホニルクロリド (3 6 5 m g 、 1 . 8 0 1 m m o l) を 1 5 分かけて添加した。反応混合物を室温に 1 時間かけてゆっくり加温し、2 時間にわたって攪拌した。反応混合物を EtOAc (5 0 m L) で希釈し、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、真空下で濃縮して、N - (4 - ((tert - ブチルジメチルシリル) オキシ) メチル) フェニル) - 5 - シアノピリジン - 2 - スルホンアミド (ER -

10

20

30

40

50

0 0 1 1 3 7 6 7 0) 6 1 0 m g (1 0 3 %) を得た。粗生成物は適度に純粋であったが、着色していた。¹H NMR (4 0 0 M H z) ppm 8 . 9 4 (d d , 1 H , J = 1 . 8 , 0 . 6 H z) , 8 . 1 0 (d d , 1 H , J = 8 . 4 , 2 . 0 H z) , 7 . 9 9 (d d , 1 H , J = 8 . 0 , 0 . 8 H z) , 7 . 1 8 (d , 2 H , J = 8 . 2 H z) , 7 . 1 5 (b r s , 1 H) , 7 . 1 1 (d d , 2 H , J = 6 . 8 , 0 . 8 H z) , 4 . 6 4 (s , 2 H) , 0 . 9 0 (s , 9 H) , 0 . 0 5 (s , 6 H) 。

【 0 4 1 0 】

N - (4 - ((t e r t - プチルジメチルシリル) オキシ) メチル) フェニル) - 5 - シアノピリジン - 2 - スルホンアミド (E R - 0 0 1 1 3 7 6 7 0) (1 0 5 . 0 m g 、 0 . 2 6 m m o l) 及び 2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル 4 - メチルベンゼンスルホナート (1 4 3 m g 、 0 . 3 8 3 m m o l) を DMF (4 m L) に溶解した。次いで、炭酸カリウム (K₂CO₃) (1 4 4 m g 、 1 . 0 4 1 m m o l) を、続いて、ヨウ化テトラプチルアンモニウム (1 9 . 2 m g 、 0 . 0 5 2 m m o l) を添加し、反応混合物を 3 6 時間にわたって 5 0 ° で攪拌した。反応の進行を U P L C / M S により監視した。NH₄Cl (1 0 m L) の飽和溶液を添加し、EtOAc / Hep (2 : 1 、 3 0 m L) で抽出し、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮した。粗製の物質をフラッシュクロマトグラフィー (EtOAc / Hep 2 5 % ~ 8 0 %) により精製して、N - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) - N - (4 - ((t e r t - プチルジメチルシリル) オキシ) メチル) フェニル) - 5 - シアノピリジン - 2 - スルホンアミド (E R - 0 0 1 1 3 8 4 5 2) (7 5 %) 1 1 8 . 0 m g を得た。¹H NMR (4 0 0 M H z) ppm 8 . 9 9 (d d , 1 H , J = 1 . 8 , 0 . 6 H z) , 8 . 0 8 (d d , 1 H , J = 8 . 2 , 2 . 2 H z) , 7 . 8 6 (d d , 1 H , J = 8 . 0 , 0 . 8 H z) , 7 . 2 4 (d , 2 H , J = 1 0 H z) , 7 . 0 9 (d , 2 H , J = 8 . 8 H z) , 4 . 6 9 (s , 2 H) , 4 . 0 6 (d d , 2 H , J = 6 . 0 , 6 . 0 H z) , 3 . 6 7 (d d , 2 H , J = 5 . 2 , 5 . 2 H z) , 3 . 6 5 - 3 . 6 2 (m , 4 H) , 3 . 5 8 (d d , 2 H , J = 6 . 2 , 6 . 2 H z) , 3 . 5 6 - 3 . 5 3 (m , 4 H) , 3 . 3 8 (d d , 2 H , J = 5 . 2 , 5 . 2 H z) , 0 . 9 3 (s , 9 H) , 0 . 0 8 (s , 6 H) 。

【 0 4 1 1 】

N - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) - N - (4 - ((t e r t - プチルジメチルシリル) オキシ) メチル) フェニル) - 5 - シアノピリジン - 2 - スルホンアミド (E R - 0 0 1 1 3 8 4 5 2) (1 5 0 m g 、 0 . 2 4 8 m m o l) をメタノール (6 m L) に溶解させた。次いで、水 (0 . 6 0 m L) を、続いて、酢酸 (AcOH) (0 . 6 0 m L 、 1 0 . 4 8 1 m m o l) を添加した。反応混合物を 3 8 ° にゆっくり加温し、1 4 時間にわたって攪拌した。溶媒の大部分を真空下で除去した。残渣を EtOAc (3 0 m L) で希釈し、水 (2 × 5 m L) 、 NaHCO₃ 、 及びブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、真空下で濃縮した。粗製の物質をフラッシュクロマトグラフィー (EtOAc / Hep 3 5 % ~ 9 0 %) により精製して、N - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) - 5 - シアノピリジン - N - (4 - (ヒドロキシメチル) フェニル) ピリジン - 2 - スルホンアミド (E R - 0 0 1 1 3 8 4 5 5) 1 0 5 . 0 m g (8 4 %) を得た。¹H NMR (4 0 0 M H z) ppm 8 . 9 9 (d , 1 H , J = 1 . 2 H z) , 8 . 0 9 (d d , 1 H , J = 8 . 4 , 2 . 0 H z) , 7 . 8 8 (d d , 1 H , J = 8 . 4 , 0 . 8 H z) , 7 . 3 0 (d , 2 H , J = 8 . 8 H z) , 7 . 1 5 (d , 2 H , J = 8 . 4 H z) , 4 . 6 7 (s , 2 H) , 4 . 0 6 (d d , 2 H , J = 6 . 2 , 6 . 2 H z) , 3 . 6 6 (d d , 2 H , J = 5 . 0 , 5 . 0 H z) , 3 . 6 5 - 3 . 5 8 (m , 6 H) , 3 . 5 5 - 3 . 5 1 (m , 4 H) , 3 . 3 8 (d d , 2 H , J = 5 . 2 , 5 . 2 H z) 。

【0412】

N - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) - 5 - シアノ - N - (4 - (ヒドロキシメチル) フェニル) ピリジン - 2 - スルホンアミド (ER - 001138455) (45 mg、0.092 mmol) を DCM (3 mL) に溶解させ、ピリジン (0.015 mL、0.183 mmol) を添加した後に 0 に冷却した。次いで、DCM (2 mL) 中の 4 - ニトロフェニルカルボノクロリダート (20.3 mg、0.101 mmol) 及び DMA P (2.3 mg、0.018 mmol) を添加した。反応混合物を室温にゆっくり加温し、2 時間にわたって撹拌した。UPLC / MS は、多少の出発物質が残っていることを示した。次いで、反応混合物を真空下で濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー (EtOAc / Hep 12% ~ 40%) により精製して、4 - ((N - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) - 5 - シアノピリジン) - 2 - スルホンアミド) ベンジル (4 - ニトロフェニル) カルボナート (ER - 001235286) 35 mg (58%)、及び出発物質 20 mg を得た。¹H NMR (400 MHz) ppm 8.99 (d, 1 H, J = 0.8 Hz), 8.27 (dd, 2 H, J = 9.2, 2.0 Hz), 8.12 (dd, 1 H, J = 7.6, 2.0 Hz), 7.92 (d, 1 H, J = 8.4 Hz), 7.38 (d, 4 H, J = 9.6 Hz), 7.26 (d, 2 H, J = 8.8 Hz), 5.45 (s, 2 H), 4.06 (dd, 2 H, J = 5.8, 5.8 Hz), 3.67 - 3.58 (m, 8 H), 3.58 - 3.50 (m, 4 H), 3.38 (dd, 2 H, J = 6.1, 6.1 Hz)。

10

20

【0413】

4 - (N - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) - 5 - シアノピリジン - 2 - スルホンアミド) ベンジル (4 - ニトロフェニル) カルボナート (ER - 001235286) (35.0 mg、0.053 mmol) を 25 mL フラスコ内に窒素下で入れ、0 に冷却した。次いで、DCM (3 mL、46.625 mmol) 及びヒューニツヒ塩基 (0.037 mL、0.214 mmol) 中のアミン (48.5 mg、0.059 mmol) を、続いて、DMA P (2.61 mg、0.021 mmol) を添加した。反応混合物を 30 分間にわたって 0 で撹拌し、次いで、さらに 6 時間にわたって室温で撹拌した。反応混合物を真空下で濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー (EtOAc / Hep 50% ~ 100%、続いて、MeOH / EtOAc 3% ~ 8%) により精製して、純粋なアジド - PEG 3 - スルホンアミド - PAB - エリブリン (ER - 001138856) 61.0 mg を得た。¹H NMR (400 MHz) ppm 8.98 (d, 1 H, J = 1.2 Hz), 8.10 (dd, 1 H, J = 8.2, 1.8 Hz), 7.87 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.26 (d, 2 H, J = 6.8 Hz), 7.13 (d, 2 H, J = 8.4 Hz), 5.29 (dd, 1 H, J = 5.6, 5.6 Hz), 5.08 - 5.00 (m, 3 H), 4.92 (s, 1 H), 4.87 (s, 1 H), 4.80 (s, 1 H), 4.68 (dd, 1 H, J = 4.6, 4.6 Hz), 4.59 (dd, 1 H, J = 4.6, 4.6 Hz), 4.38 - 4.30 (m, 2 H), 4.28 (ddd, 1 H, J = 10.4, 4.0, 4.0, Hz), 4.17 (dd, 1 H, J = 6.2, 4.6 Hz), 4.13 - 4.01 (m, 4 H), 3.97 - 3.88 (m, 3 H), 3.82 - 3.78 (m, 1 H), 3.67 - 3.50 (m, 15 H), 3.41 (s, 3 H), 3.40 - 3.33 (m, 1 H), 3.37 (dd, 2 H, J = 4.8, 4.8 Hz), 3.27 (d, 1 H, J = 3.2 Hz), 3.15 (ddd, 1 H, J = 12.8, 6.4, 6.4 Hz), 2.90 - 2.82 (m, 2 H), 2.70 (dd, 1 H, J = 16.0, 10.0 Hz), 2.51 - 2.40 (m, 3 H), 2.34 - 2.13 (m, 7 H), 2.10 - 2.05 (m, 1 H), 1.99 - 1.88 (m, 4 H), 1.78 - 1.64 (m, 5 H), 1.62 - 1.52 (m, 2 H), 1.50 - 1.29 (m, 4 H), 1.08 (d, 3 H, J = 6.8 Hz)。

30

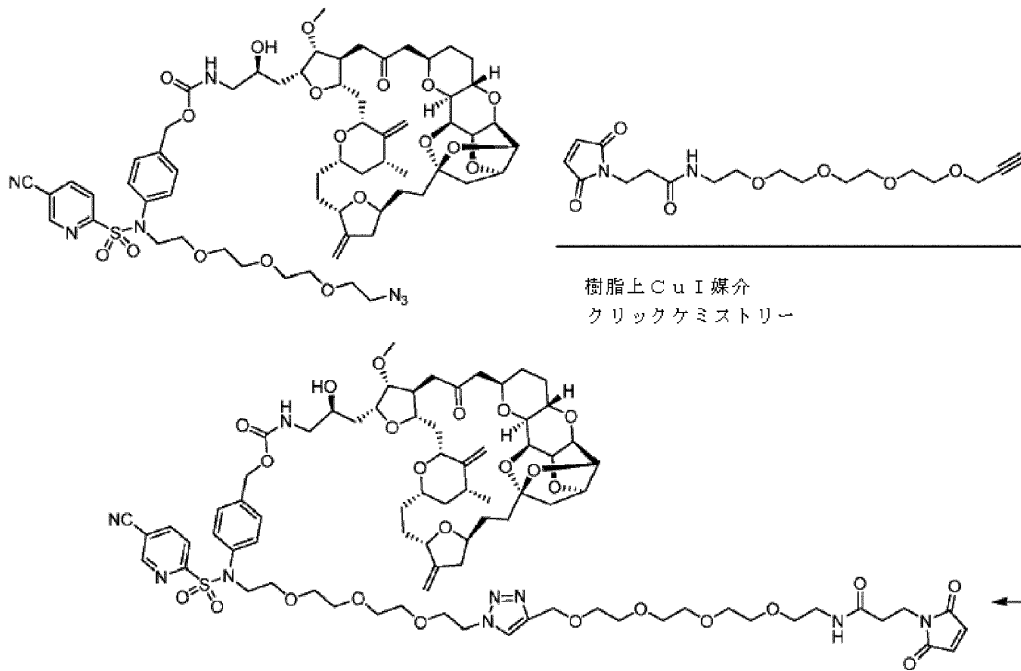
40

50

【0414】

1.14 Mal-PEG4-トリアゾール-PEG3-スルホンアミド-PAB-エリブリン(ER-001237505)の調製

【化16】



10

20

【0415】

tert-ブタノール(2.1 mL)及び水(0.7 mL)中のアジド(10 mg、8.023 μmol)及び3-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-N-(3,6,9,12-テトラオキサペンタデカ-14-イン-1-イル)プロパンアミド(9.20 mg、0.024 mmol)の混合物を45分間にわたって脱気した。次いで、amberlyst-21上のヨウ化銅(1.23 mmol/g、15 mg)を添加し、さらに30分間にわたって脱気した。反応混合物を室温で18時間にわたって攪拌し、UPLC/MSにより監視した。出発物質の大部分が消費され、所望の生成物が主なピークとして示された。次いで、反応混合物を樹脂から分離し、分取TLC(DCM/メタノール、7%)で精製して、Mal-PEG4-トリアゾール-PEG3-スルホンアミド-PAB-エリブリン(ER-001237505) 5.5 mgを得た。¹H NMR(400 MHz, CD₂Cl₂) ppm 9.01 (s, 1 H), 8.15 (dd, 1 H, J = 8.0, 1.8 Hz), 7.87 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.75 (s, 1 H), 7.28 (d, 2 H, J = 8.0 Hz), 7.14 (d, 2 H, J = 8.4 Hz), 6.68 (s, 2 H), 6.47 (br s, 1 H), 5.44 (br s, 1 H), 5.10-5.02 (m, 3 H), 4.94 (s, 1 H), 4.86 (s, 1 H), 4.80 (s, 1 H), 4.68 (dd, 1 H, J = 4.4, 4.4 Hz), 4.59 (s, 2 H), 4.56 (dd, 1 H, J = 4.4, 4.4 Hz), 4.51 (dd, 2 H, J = 5.2, 5.2, Hz), 4.34 (d, 1 H, J = 7.6, Hz), 4.30-4.23 (m, 2 H), 4.19-4.14 (m, 2 H), 4.08 (dd, 1 H, J = 4.0, 4.0 Hz), 4.03-3.98 (m, 2 H), 3.94-3.72 (m, 8 H), 3.68-3.46 (m, 28 H), 3.38 (s, 3 H), 3.38-3.33 (m, 3 H), 3.27 (d, 1 H, J = 3.2 Hz), 3.16-3.02 (m, 2 H), 2.90-2.81 (m, 2 H), 2.68 (dd, 1 H, J = 16.2, 9.8 Hz), 2.54-2.40 (m, 7 H), 2.40-1.8 (m, 11 H), 1.80-1.50 (m, 3 H

30

40

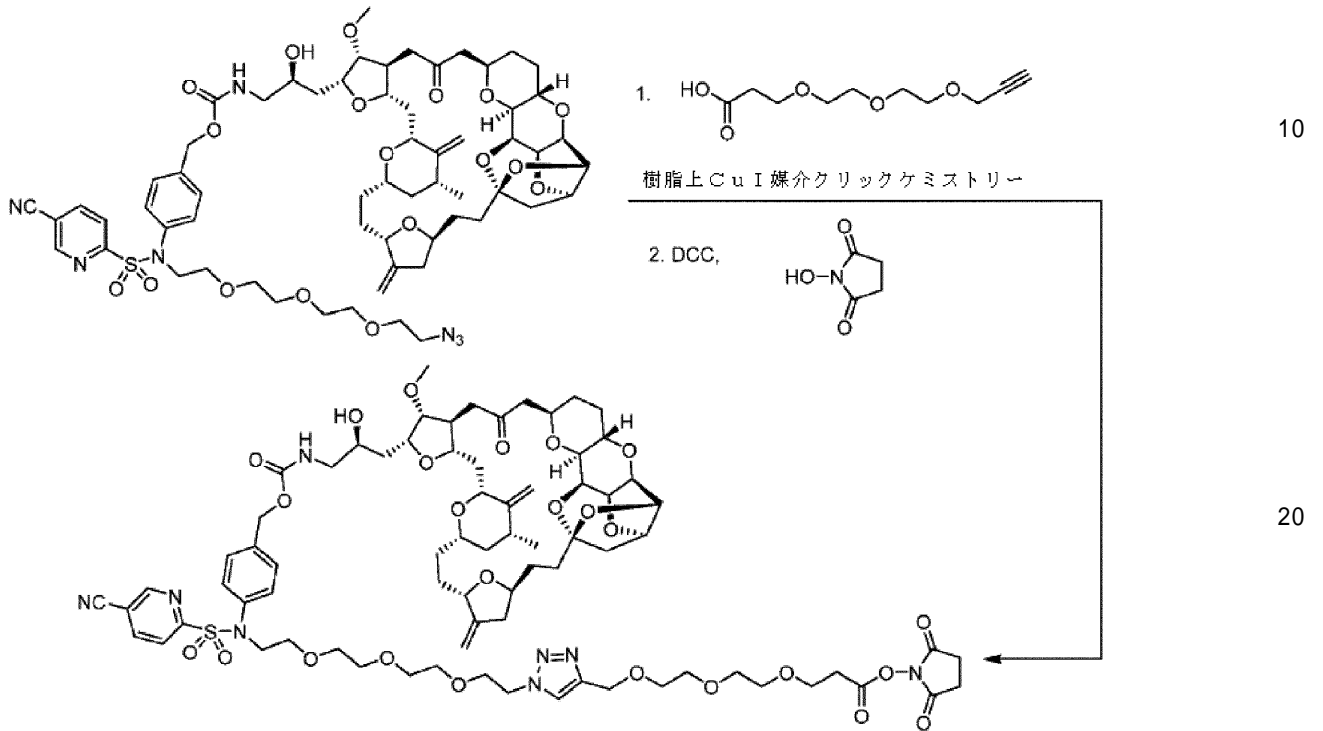
50

), 1.48 - 1.25 (m, 3 H), 1.09 (d, 3 H, J = 6.4 Hz)。
LCMS (M+H) = 1630.0。

【0416】

1.15 NHS-PEG3-トリアゾール-PEG3-スルホンアミド-PAB-エリブリン(ER-001244623)の調製

【化17】



【0417】

tert-ブタノール(2 mL)及び水(1 mL)中のアジド(14 mg、0.011 mmol)及び2,5-ジオキソピロリジン-1-イル3-(2-(2-(プロパ-2-yn-1-イルオキシ)エトキシ)エトキシ)プロパノアート(8.80 mg、0.028 mmol)の混合物を45分間にわたって脱気した。次いで、amberlyst-21上のヨウ化銅(1.23 mmol/g、20 mg)を添加し、さらに30分間にわたって脱気した。反応混合物を室温で18時間にわたって攪拌し、UPLC/MSにより監視した。出発物質の大部分が消費され、所望の生成物が主要なピークとして示された。次いで、反応混合物を、DCM(2×10 mL)での抽出により樹脂から分離した。DCM層をブライン(4×5 mL)で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、所望の生成物に濃縮した(これを、なんらさらに精製せずに次のステップで使用した)。

30

【0418】

粗製の酸(15.0 mg、10.255 μmol)をTHF(1.5 mL)に溶解させ、0 に冷却した。次いで、DCC(15.2 mg、0.074 mmol)を、続いて、1-ヒドロキシピロリジン-2,5-ジオン(8.3 mg、0.072 mmol)を添加した。反応混合物を室温で18時間にわたって攪拌した。UPLC/MSは、出発物質の大部分が消費されたことを示し、所望の生成物が主要なピークとして示された。反応混合物を濃縮し、分取TLC(DCM/i-プロパノール、8%)で精製して、NHS-PEG3-トリアゾール-PEG3-スルホンアミド-PAB-エリブリン(ER-001244623)2.5 mgを得た。¹H NMR(400 MHz, CD₂Cl₂) ppm 9.00 (s, 1 H), 8.12 (d, 1 H, J = 8.4 Hz), 8.00 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.72 (s, 1 H), 7.26 (d, 2 H, J = 8.0 Hz), 7.12 (d, 2 H, J = 8.0 Hz), 5.37 (br s, 1 H), 5.08 - 5.02 (m, 3 H), 4.93 (s, 1 H), 4.85 (

40

50

s, 1 H), 4.78 (s, 1 H), 4.66 - 4.62 (m, 1 H), 4.58 - 4.56 (m, 4 H), 4.33 (d, 1 H, J = 10.8 Hz), 4.29 - 4.21 (m, 2 H), 4.10 - 3.96 (m, 4 H), 3.93 - 3.76 (m, 6 H), 3.74 - 3.44 (m, 27 H), 3.36 (s, 3 H), 3.34 - 3.24 (m, 2 H), 3.15 - 3.06 (m, 1 H), 2.97 (br s, 1 H), 2.90 - 2.78 (m, 8 H), 2.74 - 2.08 (m, 13 H), 2.05 - 1.78 (m, 5 H), 1.73 - 1.50 (m, 2 H), 1.41 - 1.25 (m, 4 H), 1.07 (d, 3 H, J = 6.0 Hz). LCMS (M + H) = 1560.0.

【0419】

1.16 Mal-PEG2-エリブリンの調製

エリブリン(5 mg、7 μ mol)をDMF(0.5 mL)に溶解させ、マレイミド-PEG2-NHS(5 mg、14 μ mol; Broadpharm、Cat No. BP-21680)及びヒューニツヒ塩基(2.4 μ L、14 μ mol)と混合した。反応混合物を室温で2時間にわたって攪拌した。次いで、反応混合物をHPLC(0.1%ギ酸を含有する水-アセトニトリル勾配30~70%)により精製した。溶離液を質量により収集し、乾燥するまで凍結乾燥させた。最終収量は3.7 mg(3.8 μ mol、54%)であった。予測された正確な質量は968.5 Daであった。測定された質量は969.6 Da [M + H]であった。

【0420】

1.17 Mal-PEG4-エリブリンの調製

エリブリン(5 mg、7 μ mol)をDMF(0.5 mL)に溶解させ、マレイミド-PEG4-NHS(6.2 mg、14 μ mol; Broadpharm、Cat No. BP-20554)及びヒューニツヒ塩基(2.4 μ L、14 μ mol)と混合した。反応混合物を室温で2時間にわたって攪拌した。次いで、反応混合物をHPLC(0.1%ギ酸を含有する水-アセトニトリル勾配30~70%)により精製した。溶離液を質量により収集し、乾燥するまで凍結乾燥させた。最終収量は3.7 mg(3.5 μ mol、50%)であった。予測された正確な質量は1056.5 Daであった。測定された質量は1057.7 Da [M + H]であった。

【0421】

1.18 アジド-PEG2-エリブリンの調製

エリブリン(5 mg、7 μ mol)をDMF(0.5 mL)に溶解させ、アジド-PEG2-NHS(4.2 mg、14 μ mol; Broadpharm、Cat No. BP-20524)及びヒューニツヒ塩基(2.4 μ L、14 μ mol)と混合した。反応混合物を室温で2時間にわたって攪拌した。次いで、反応混合物をHPLC(0.1%ギ酸を含有する水-アセトニトリル勾配30~70%)により精製した。溶離液を質量により収集し、乾燥するまで凍結乾燥させた。最終収量は2.2 mg(2.4 μ mol、34%)であった。予測された正確な質量は914.5 Daであった。測定された質量は915.7 Da [M + H]であった。

【0422】

1.19 アジド-PEG4-エリブリンの調製

エリブリン(5 mg、7 μ mol)をDMF(0.5 mL)に溶解させ、アジド-PEG4-NHS(5.5 mg、14 μ mol; Broadpharm、Cat No. BP-20518)及びヒューニツヒ塩基(2.4 μ L、14 μ mol)と混合した。反応混合物を室温で2時間にわたって攪拌した。次いで、反応混合物をHPLC(0.1%ギ酸を含有する水-アセトニトリル勾配30~70%)により精製した。溶離液を質量で収集し、乾燥するまで凍結乾燥させた。最終収量は3.0 mg(3.0 μ mol、43%)であった。予測された正確な質量は1002.5 Daであった。測定された質量は1003.7 Da [M + H]であった。

【0423】

10

20

30

40

50

1.20 アジド-PEG4-Val-Cit-PAB-エリブリンの調製

エリブリン(15 mg、21 μ mol)をDMF(1.5 mL)に溶解させ、十分に混合した。次いで、ヒューニツヒ塩基(5.5 μ L、32 μ mol)及びFmoc-VCP-PNP(24 mg、22 μ mol; Levena Biopharma, Cat No. VC1003)を添加した。反応混合物を室温で終夜(16時間)攪拌した。反応が完了したら、ジエチルアミン(20 μ L、0.21 mmol)を反応混合物に添加し、2時間にわたって室温で攪拌して、Fmoc保護基を除去した。脱保護反応を、Waters SQD質量分析計を使用して監視した。反応が完了したら、反応混合物を、予め秤量した1.5 mL微量遠心チューブに移した。溶媒を、温度を30 に設定した冷凍Centriva濃縮機を使用して真空下で蒸発させた。収量は、粗製のNH₂-Val-Cit-pAB-エリブリン16 mg(14 μ mol)(正確な質量1134.6 Da、収率67%)であった。

10

【0424】

NH₂-Val-Cit-pAB-エリブリン(16 mg、14.1 μ mol)をDMF(1.5 mL)に溶解させた。次いで、ヒューニツヒ塩基(7.2 μ L、41 μ mol)及びアジド-PEG4-NHS(11 mg、28.2 μ mol)を添加した。反応混合物を室温で3時間にわたって攪拌した。次いで、反応混合物をHPLC(0.1%ギ酸を含有する水-アセトニトリル勾配48~72%)により精製した。溶離液をm/z 1409で収集し、凍結乾燥させて、アジド-PEG4-Val-Cit-PAB-エリブリン(正確な質量1407.7 Da)を得た。アジド-PEG4-Val-Cit-PAB-エリブリン13 mg(9.2 μ mol)が得られた(ステップ収率65%、全体44%)。

20

【0425】

実施例4

1. 物質及び方法

使用した試薬はすべて、別段に示さない限り研究グレード以上で、市場供給業者から得た。

【0426】

1.1 抗体

次の試験で使用したMORAb-003(ヒト化抗ヒト葉酸受容体アルファ、25 mg/mL)及びMORAb-009(マウス-ヒトキメラ抗ヒトメソテリン、25 mg/mL)は、それぞれLot#NB02962-19及びLot#030A14からのものであった。トラスツズマブは商業的に入手し(Clingen)、Lot#503345からのものであった。

30

【0427】

LCcy80に非対合システインを有するウサギ-ヒトキメラ及びヒト化抗ヒトメソテリン抗体(表1)を、293F細胞で一過性に、または安定性選択されたプールとして発現させた。馴化培地を精製し、セクション1.4.1.2.1に記載したとおりに脱システニル化した。

【0428】

1.2 細胞毒素

コンジュゲート可能なエリブリン化合物を、実施例3に記載したとおりに合成した(表46)。保存物(10 mM)をDMSO中で調製し、使用まで-20 で保存した。

40

【0429】

1.3 腫瘍細胞系

マレイミド/スクシンイミド(OSu)/アジド-リンカー-エリブリン化合物で調製したMORAb-003、MORAb-009、及びトラスツズマブADCの分析で使用したヒト腫瘍細胞系(表46)には、IGROV1(ヒト卵巣癌、FR^{hi}、MSLN^{neg})、NCI-H2110(ヒト非小細胞肺癌、FR^{med}、MSLN^{med})、A431(FR^{neg}、MSLN^{neg})、NCI-N87-luc(ヒト胃癌、FR^{lo}、MSLN^{med}、her2^{hi})、NUGC3(ヒト胃腺癌、FR^{neg}、MSLN^{neg}、her

50

2^{neg})、ZR75 (ヒト乳房腺管癌、FR^{neg}、MSLN^{neg}、her2^{med})、及びBT-474 (ヒト乳房腺管癌、FR^{neg}、MSLN^{neg}、her2^{hi})が含まれた。MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-エリブリン (ER-001159569) とコンジュゲートしたウサギ-ヒトキメラ及びヒト化抗ヒトメソテリンLCcy s 80 抗体の分析で使用したヒト腫瘍細胞系は、A3 (ヒトメソテリンを安定的に遺伝子導入されたA431、MSLN^{hi})、OVCAR3 (ヒト卵巣癌、MSLN^{hi})、HEC-251 (ヒト子宮内膜、MSLN^{med})、H226 (ヒト肺扁平上皮細胞中皮腫、MSLN^{lo})、及びA431親 (MSLN^{neg}) であった。IGROV1 (許可を得て米国立がん研究所から得た) 及びA3 (親A431からMorphotekで生成) を除いて、使用した細胞系はすべて、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関 (ATCC) から直接得た。

10

【0430】

1.4 抗体-薬物コンジュゲーション

1.4.1 マレイミドを使用し、システインをベースとするコンジュゲーション

1.4.1.1 鎖間ジスルフィドへのコンジュゲーション

1.4.1.1.1 部分的還元

MORAb-003 及び MORAb-009 をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) に緩衝液交換し、次いで、遠心濃縮を使用して 20 mg/mL に濃縮した。等体積の 1 倍 DPBS 中の 270 μM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) を 2 mM EDTA と共に添加し、80 分間にわたって室温で穏やかに混合することにより、還元を実施した。還元を 40 分間にわたって室温で穏やかに混合することにより実施したことを除いて、同様の手法で、トラスツズマブを部分的に還元した。

20

【0431】

1.4.1.1.2 コンジュゲーション

マレイミド-リンカー-エリブリン化合物 (DMSO 中) を、部分的に還元した抗体に 1:6 (mAb:化合物) のモル比でコンジュゲートした。化合物を DPBS 中 50% プロピレングリコールに添加し、十分に混合した。次いで、等体積の部分的に還元した抗体を添加し、穏やかに混合した (25% の最終プロピレングリコール濃度)。コンジュゲーションを 3.5 ~ 4 時間にわたって室温で進行させた。

【0432】

1.4.1.2 LCcy s 80 へのコンジュゲーション

1.4.1.2.1 脱システニル化

AKTA Explorer (GE Healthcare) を使用して、プロテイン A カラム (GE Healthcare) を 10 カラム体積 (CV) の 20 mM リン酸ナトリウム、10 mM EDTA、pH 7.2 (平衡化緩衝液) で平衡化させた。次いで、馴化培地を負荷し、続いて、10 CV の平衡化緩衝液で未結合の物質を洗浄した。カラムを 16 CV の 20 mM リン酸ナトリウム、10 mM EDTA、5 mM システイン、pH 7.2 で、0.5 mL/分で、16 時間にわたって洗浄して、キャッピング基を除去した。次いで、カラムを 60 CV の 20 mM トリス、pH 7.5 で、0.5 mL/分で 60 時間にわたって洗浄した。脱システニル化した抗体を、5 CV の 0.1 M グリシン、pH 2.9 を使用して溶離し、直ちに 5 体積% の 2 M トリス、pH 9.0 を使用して中和した。抗体を含有する画分をプールし、MWCO 20K Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher) を使用して DPBS 中で透析した。

30

40

【0433】

1.4.1.2.2 コンジュゲーション

脱システニル化抗体を DPBS、1 mM EDTA 中で 5.0 mg/mL にし、50% プロピレングリコールを DPBS、1 mM EDTA 中で調製した。MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-エリブリン (ER-001159569) (DMSO 中 12 mM) を 50% プロピレングリコールに添加し、十分に混合した。次いで、等体積の脱システニル化抗体を 1:4 (mAb:化合物) のモル比で添加し、穏やかに混合した。コ

50

ンジュゲーションを3.5～4時間にわたって室温で進行させた。

【0434】

1.4.2 スクシンイミドを使用しての、アミンをベースとするコンジュゲーション

1.4.2.1 コンジュゲーション

抗体(MORAb-003またはMORAb-009、非還元)を、0.1M炭酸水素ナトリウム、pH8.3中で10.0mg/mLにした。50%プロピレングリコールを0.1M炭酸水素ナトリウム、pH8.3中で調製した。スクシンイミド(OSu)-リンカー-エリブリン(DMSO中)を50%プロピレングリコールに添加し、十分に混合した。次いで、等体積の抗体を1:4(mAb:化合物)のモル比で添加し、十分に混合した。コンジュゲーションを1時間にわたって室温で進行させた。コンジュゲーション反応を1:20体積の1Mトリス、pH8.0を添加することでクエンチし、ADCをセクション1.4.4に記載のとおり精製した。

10

【0435】

1.4.3 歪促進アルキン-アジドケミストリー(SPAAC)を使用しての、2ステップのアミンをベースとするコンジュゲーション

1.4.3.1 ジベンジルシクロオクチン(DBCO)誘導体化

抗体(MORAb-003またはMORAb-009、非還元)を0.1M炭酸水素ナトリウム、pH8.3中で10.0mg/mLにした。50%プロピレングリコールを0.1M炭酸水素ナトリウム、pH8.3中で調製した。NHS-PEG₄-DBCO(Click Chemistry Tools、DMSO中50mM)を50%プロピレングリコールに添加し、十分に混合した。次いで、等体積の抗体を1:4(mAb:化合物)のモル比で添加し、十分に混合した。コンジュゲーションを1時間にわたって室温で進行させた。セクション1.4.4に記載のとおり、未反応のNHS-PEG₄-DBCOを除去した。

20

【0436】

1.4.3.2 コンジュゲーション

50%プロピレングリコールをDPBS中で調製した。アジド-リンカー-エリブリン化合物を、50%プロピレングリコールに添加し、十分に混合した。次いで、等体積のDBCO修飾MORAb-003またはMORAb-009を混合物に1:4(mAb:化合物)のモル比で添加し、十分に混合した。SPAACコンジュゲーションを終夜、室温で進行させた。セクション1.4.4に記載のとおり、未反応のNHS-PEG₄-DBCOを除去した。

30

【0437】

1.4.4 精製

HiTrap脱塩カラム(複数可)(GE Healthcare)を使用して、コンジュゲート抗体を精製した。マレイミド/OSu/アジド-リンカー-エリブリン及びプロピレングリコールを除去するために、クロマトグラフィーを、泳動緩衝液として1倍DPBSを使用する高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)(GE Healthcare)で行った。実施例1のセクション1.3.1に記載のとおり、最終タンパク質含有率をBCAアッセイにより決定した。

40

【0438】

1.5 生物物理学的特徴づけ

1.5.1 SEC-HPLC分析

ADCの凝集を、Agilent 1260 HPLCを使用するサイズ排除高速液体クロマトグラフィー(SEC-HPLC)により分析した。ADCをDPBS中で1mg/mLに希釈した。次いで、ADC(10μL)をAdvanced SEC 300Aガードカラム(4.6mm×3.5cm、空孔サイズ2.7μm、Agilent)に、続いて、Advanced Bio 300Aカラム(4.6mm×30cm、空孔サイズ2.7μm)に注入した。ADCをカラムから、0.15M NaCl及び5%IPAを含有する0.1Mリン酸ナトリウム、pH7.4で、0.25mL/分の流速で、28分間に

50

わたって溶離した。Agilent ChemStationソフトウェアを使用して、すべてのデータを解析した。凝集パーセントを $[PA_{凝集物} / PA_{合計}] \times 100$ として計算した〔式中、PA = 積算ピーク面積〕。

【0439】

1.5.2 薬物 - 対 - 抗体比 (DAR) の HIC - HPLC 分析

疎水性相互作用HPLC (HIC - HPLC) を使用して、DARを分析した。サンプルをTSKgel (登録商標) Butyl - NP5、内径4.6mm×3.5cm、2.5μM非多孔性サイズカラム (Tosoh Bioscience) 上に注入し、移動相A100%中での3分の平衡化、15分の勾配 (0 ~ 100%B)、100%B中での5分の保持、100%Aへの1分での変化、及び移動相A100%中での5分の再平衡化で、0.7mL/分で溶離した。移動相Aは、25mMリン酸ナトリウム、1.5M硫酸アンモニウム、pH7.0であった。移動相Bは、25mMリン酸ナトリウム、25%イソプロパノール、pH7.0であった。検出を280nmで行った (基準320nm)。DARを式：

$$[AUC_{+1} + 2(AUC_{+2}) + 3(AUC_{+3}) + \dots n(AUC_{+n})] / AUC_{tot}$$

により決定した〔式中、 AUC_{+1} は、1つの細胞毒素とコンジュゲートしたADCに対応する抗体ピークでの曲線下面積であり、 AUC_{+2} は、2つの細胞毒素とコンジュゲートしたADCに対応する抗体ピークでの曲線下面積である、など。 AUC_{tot} は、すべてのピークでの合計曲線下面積である〕。

【0440】

1.5.3 LC - MS DAR分析

SQD/PDA検出を伴うWaters Alliance HPLCでのLC - MS法を使用して、DARも分析した。サンプルをProteomix RP - 1000カラム (5μM、1000A、4.6mm×15cm、Sepax) 上に65 で注入し、25%B中での3分の平衡化、25%から55%Bへの27分での直線勾配、55%Bでの5分の保持、90%Bへの1分での変化、90%Bでの5分の保持、25%Bへ戻す1分での変化、及び25%Bでの5分の再平衡化で溶離した。移動相Aは、水中0.1% TFAであり、移動相Bは、アセトニトリル中0.1% TFAであった。次いで、溶離液をPDA及びSQD検出器に分割した (10 : 1)。SQD検出器を、ESポジティブ、3.2kVのキャピラリー電圧、40Vのコーン電圧、3Vの抽出機、及び0.2VのRFレンズ、150 のソース温度、及び250 の脱溶媒温度に設定した。質量データを200 ~ 2000m/zで40分間にわたって、連続モード、走査時間1秒で取得した。データを解析し、MassLynx及びMaxEnt1を使用してオフラインでデコンボリユートした。DARを、下式を使用して計算した：

$$2 [[AUC_{LC+1} + 2(AUC_{LC+2}) + 3(AUC_{LC+3}) + \dots n(AUC_{LC+n})] / I_{LCtot}] +$$

$$2 [[AUC_{HC+1} + 2(AUC_{HC+2}) + 3(AUC_{HC+3}) + \dots n(AUC_{HC+n})] / AUC_{Hctot}]$$

〔式中、 AUC_{LC+1} は、1つの細胞毒素とコンジュゲートした軽鎖ピークの曲線下面積であり、 AUC_{LC+2} は、2つの細胞毒素とコンジュゲートした軽鎖ピークの曲線下面積である、など。 AUC_{HC} は、対応する重鎖の曲線下面積であり、 AUC_{LCtot} 及び AUC_{Hctot} は、それぞれ、すべての非コンジュゲート及びコンジュゲート軽鎖及び重鎖の合計曲線下面積である〕。

【0441】

1.5.4 LCcys80ADCのUPLC/ESI - MS DAR分析

ADC (1mg/mL) を、20mMの最終濃度までDTTを添加することにより還元させ、続いて、60 で3分間にわたってインキュベートした。次いで、Waters Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography及びQ - Tof Premier質量分析計を使用して、サンプルを分析し

た。サンプル(それぞれ0.5~2 µg)を、65 のMass Prepマイクロ脱塩カラム上に注入し、移動相A 95%中での5分間の平衡化、10分での勾配(5~90% B)、及び移動相A 95%中での10分での再平衡化、0.05 mL/分でカラムから溶離した。移動相Aは、水中0.1%ギ酸であった。移動相Bは、アセトニトリル中0.1%ギ酸であった。Q-ToF質量分析計を陽イオン、Vモードで、500~4000 m/zの範囲の検出で実行した。ソースパラメーターは、次のとおりであった: キャピラリー電圧、2.25 kV(インタクトな抗体)~2.50 kV(還元抗体); サンプリングコン電圧、65.0 V(インタクトな抗体)または50.0 V(還元抗体); ソース温度、105 ; 脱溶媒温度、250 ; 脱溶媒ガスフロー、550 L/時。軽鎖タンパク質ピークを、Mass Lynx MaxEnt 1関数を使用してデコンボリュートした。非コン

10

$$2 [LC_{+1} / LC_{tot}]$$

[式中、 LC_{+1} は、1つの細胞毒素とコンジュゲートした軽鎖の質量強度であり、 LC_{tot} は、非コンジュゲート及びコンジュゲート軽鎖の合計強度である]。

【0442】

1.6 結合の特徴づけ

1.6.1 BIAcore

抗体濃度を、HBS-P+緩衝液(GE Healthcare)中で2 µg/mLに調節した。非修飾抗体、またはADCを、BIAcore T100(GE Healthcare)上の抗ヒトIgGセンサーに、1分間にわたって10 µL/分の流速で注入した。捕捉抗体への抗原会合を記録するために、一連の漸増濃度の抗原を300秒間にわたって30 µL/分の流速で注入した。抗メソテリン抗体では、濃度の範囲は10 nM~0.041 nMであった。MORAb-003及びMORAb-009 ADCでは、濃度の範囲は、100 nM~0.41 nMであった。抗原の解離を30分間にわたって同じ流速で監視した。センサー表面を、3M MgCl₂を2×30秒間にわたって30 µL/分の流速で注入することにより再生した。センサグラムをBiacore T100 Evaluation Softwareで、1:1 Langmuir結合モデルを使用して解析した。

20

【0443】

1.6.2 ELISA - 葉酸受容体アルファ

組換えヒト葉酸受容体アルファをコーティング緩衝液(50 mM炭酸塩-炭酸水素塩緩衝液、pH 9.6)中で115 ng/mLに希釈し、96ウェルMaxisorp黒色プレート(Thermo, Cat No. 43711、100 µL/ウェル)上に4で終夜コーティングした。コーティング溶液を廃棄し、プレートを、0.05% Tween-20(PBST)緩衝液を含む1倍PBSを使用して3回洗浄した。プレートを、ブロッキング緩衝液300 µL(PBST中1%BSA)中で、室温で、2時間にわたってオービタルシェーカー上で遮断した。MORAb-003及びMORAb-003 ADCをブロッキング緩衝液中で1000 ng/mLに希釈し、次いで、2倍で連続希釈して、1000 ng/mL~0.98 ng/mLの範囲を得た。ブロッキング緩衝液を廃棄し、希釈抗体100 µL/ウェルをプレートに添加した。プレートを室温で、2時間にわたって、オービタルシェーカー上でインキュベートした。抗体溶液を廃棄し、プレートをPBSTを使用して3回洗浄した。ヤギ-抗ヒトIgG(H+L)-HRP(ブロッキング緩衝液中で1:10,000希釈)溶液100 µL/ウェルをプレートに添加し、プレートを、室温で1時間にわたってオービタルシェーカー上でインキュベートした。二次抗体溶液を廃棄し、プレートを、PBSTを使用して3回洗浄した。QuantaBlu蛍光原ペルオキシダーゼ基質の希釈標準溶液(Thermo, Cat No. 15169)100 µL/ウェルをプレートに添加し、プレートを室温で30分間にわたってインキュベートした。蛍光を励起325 nm/発光420 nmで、SpectraMax M5(Molecular Devices)を使用して読み取った。データを、SoftMax Pro

30

40

50

5.4.2 ソフトウェアを使用して4 - パラメーターフィッティングで解析した。

【0444】

1.6.3 ELISA - メソテリン

組換えヒトメソテリンをコーティング緩衝液(50 mM炭酸 - 炭酸水素緩衝液、pH 9.6)中で1 µg/mLに希釈し、96ウェルMaxisorp黒色プレート(Thermo、Cat No. 43711、100 µL/ウェル)上に4で終夜コーティングした。コーティング溶液を廃棄し、プレートを、0.05% Tween-20 (PBST)緩衝液を含む1倍PBSを使用して3回洗浄した。プレートをブロッキング緩衝液(PBST中1% BSA)300 µL中で、室温で、2時間にわたってオービタルシェーカー上で遮断した。MORAb009及びMORAb-009ADCをブロッキング緩衝液中で1000 ng/mLに希釈し、次いで、2.5倍で連続希釈して、1000 ng/mL ~ 0.105 ng/mLの範囲を得た。ブロッキング緩衝液を廃棄し、希釈抗体100 µL/ウェルをプレートに添加した。プレートを室温で2時間にわたってオービタルシェーカー上でインキュベートした。抗体溶液を廃棄し、プレートを、PBSTを使用して3回洗浄した。ヤギ - 抗ヒトIgG(H+L) - HRP(ブロッキング緩衝液中で1:10,000希釈)溶液100 µL/ウェルをプレートに添加し、プレートを室温で1時間にわたってオービタルシェーカー上でインキュベートした。二次抗体溶液を廃棄し、プレートを、PBSTを使用して3回洗浄した。QuantaBlu蛍光原ペルオキシダーゼ基質の希釈標準溶液(Thermo、Cat No. 15169)100 µL/ウェルをプレートに添加し、プレートを室温で30分間にわたってインキュベートした。蛍光を、SpectraMax M5(Molecular Devices)を使用して励起325 nm/発光420 nmで読み取った。データを、SoftMaxPro 5.4.2ソフトウェアを使用して4 - パラメーターフィッティングで解析した。

10

20

【0445】

1.7 細胞傷害性分析

1.7.1 クリスタルバイオレットアッセイ

IGROV1(FR^{hi}、MSLN^{neg})、NCI-H2110(FR^{med}、MSLN^{med})、及びA431(FR^{neg}、MSLN^{neg})細胞を継代培養し、5,000細胞/ウェルで、完全成長培地中で、96ウェル組織培養プレート内に播種し、37、5%CO₂で終夜(16時間)インキュベートした。試験試薬を1:3で、2mLディープウェル希釈プレート内で、200 nMから開始して連続希釈した(合計10希釈)。希釈サンプル(100 µL)を細胞プレートに添加した(100 nMの試験試料濃度から開始)。プレートを37、5%CO₂でさらに5日間にわたってインキュベートした。次いで、培地を廃棄した。プレートをDPBS200 µLで1回洗浄し、0.2%クリスタルバイオレット溶液50 µLで室温で15分間にわたって染色し、次いで、水道水で充分に洗浄した。プレートを風乾させ、クリスタルバイオレットを1%SDS溶液200 µLで溶解させた。プレートを570 nmで読み取った。データをGraphPad Prism6を使用して解析した。

30

【0446】

2. 結果

40

2.1 MORAb-003、MORAb-009、及びトラスツズマブADCの生物物理学的特徴づけ

(1) 非チオール還元剤TCEPを使用しての、抗体鎖間ジスルフィドの部分的還元、続く、チオール - 反応性マレイミド - スペーサー - リンカー - エリブリンコンストラクトを使用してのコンジュゲーション; (2) スクシンイミド(OSu) - スペーサー - リンカー - エリブリンコンストラクトを使用しての、抗体リシン残基への直接的なコンジュゲーション; 及び(3) OSu - PEG4 - ジベンジルシクロオクチンを初めにリシン残基にコンジュゲートし、次いで、アジド - スペーサー - リンカー - エリブリンコンストラクトの直交コンジュゲーションを、SPAACを使用して行う、2ステップアプローチを使用しての抗体リシン残基へのコンジュゲーションを含む、3つのコンジュゲーション法のう

50

ちの1つに従って、MORAb-003（ヒト化抗ヒト葉酸受容体アルファ）、MORAb-009（マウス-ヒトキメラ抗ヒトメソテリン）、及びトラスツズマブ（ヒト化抗ヒトher2）ADCを、表46に列挙したコンジュゲート可能なエリブリン化合物を使用して調製した。

【0447】

精製後に、MORAb-003、MORAb-009、及びトラスツズマブADCのすべてでの凝集レベルをSEC-HPLCにより決定し、薬物-対-抗体比（DAR）を、逆相LC-MS及び/またはHIC-HPLCを使用して分析した。マレイミドをベースとするADCのすべてでのDARを、逆相LC-MS及びHIC-HPLCの両方を使用して分析した。0.3未満のDAR値の差異が典型的には、2つの方法の間で観察された。対照的に、リシン残基を介してのコンジュゲーションにより調製したADCのすべてでのDARは、LC-MSのみにより分析したが、それというのも、これらのADCの高い程度の異質性により、HIC-HPLCによる個々のDAR種の分解が妨げられるためである。MORAb-003及びMORAb-009ADCでは、標的抗原への結合も、ELISAを使用して分析した。DAR及び凝集分析の結果を、表47に、個々のADCの次に示す。

【0448】

10

20

30

40

50

【表 4 7】

表 4 7.
MORAb-003、MORAb-009、及び
トラスツズマブADCの生物物理学的分析

ADC	抗体	コンジュゲーション ケミストリー	スペースアー	切断 ケミストリー	DAR 分析		SEC-HPLC 分析			抗原結合	
					DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	Agg. %	モノマー %	Frag. %	ELISA, EC ₅₀ , ng/mL	ELISA, EC ₅₀ , nM
MORAb003		N/A	N/A	N/A			3.62	96.38	0	6.29	0.04
MORAb009		N/A	N/A	N/A			0	100	0	42.60	0.28
トラスツズマブ		N/A	N/A	N/A			3.52	96.48	0	N/A	N/A
MORAb003- ER1159569 (Lot NB3073-88L)	MORAb-003	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB	3.58	3.91	3.12	96.88	0	22.60	0.15
MORAb009- ER1159569 (Lot NB3073-88F)	MORAb-009	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB	3.63	3.93	3.23	96.77	0	43.70	0.29
MORAb003- ER1159569 (Lot NB3142-62A)	MORAb-003	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB	4.80	4.88	3.21	96.79	0	18.20	0.12
MORAb009- ER1159569 (Lot NB3142-62D)	MORAb-009	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB	4.68	4.57	0.90	99.10	0	33.10	0.22
トラスツズマブ- ER1159569	トラスツズマブ	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB	3.10	3.11	1.26	98.74	0	N/A	N/A
MORAb003- ER1242287	MORAb-003	マレイミド	PEG8	val-cit-pAB	2.31	2.35	18.63	81.37	0	21.50	0.14
MORAb009- ER1242287	MORAb-009	マレイミド	PEG8	val-cit-pAB	1.13	2.00	11.24	88.76	0	58.60	0.39
MORAb003- ER1235638	MORAb-003	マレイミド	ペンチル	val-cit-pAB	3.65	3.89	3.95	96.05	0	15.30	0.10
MORAb009- ER1235638	MORAb-009	マレイミド	ペンチル	val-cit-pAB	3.99	4.10	4.5	95.5	0	65.60	0.44
MORAb003- ER1231679	MORAb-003	マレイミド	PEG2	ala-ala-asn- pAB	3.60	3.83	3.09	96.91	0	18.30	0.12
MORAb009- ER1231679	MORAb-009	マレイミド	PEG2	ala-ala-asn- pAB	3.27	3.94	4.39	95.61	0	41.40	0.28

10

20

30

40

50

表 47. MORAb-003、MORAb-009、及びトラスツマブADCの生物物理学的分析

ADC	抗体	コンジュゲーションケミストリー	スペーサー	切断ケミストリー	DAR 分析			SEC-HPLC 分析			抗原結合		
					DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	A g g t. %	モノマー %	F r a g. %	ELISA, EC ₅₀ ng/mL	ELISA, EC ₅₀ nM		
ER1231679				pAB									
MORAb003-ER1231690	MORAb-003	マレイミド	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	3.02	3.23	4.44	95.56	0	8.92	0.06		
MORAb009-ER1231690	MORAb-009	マレイミド	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	2.36	3.17	6.22	93.78	0	58.70	0.39		
MORAb003-ER1237504	MORAb-003	マレイミド	PEG4-トリアゾール-PEG3	ジスルフィドジメチル-pAB	0.52	1.61	13.73	86.27	0	29.80	0.20		
MORAb009-ER1237504	MORAb-009	マレイミド	PEG4-トリアゾール-PEG3	ジスルフィドジメチル-pAB	0.72	1.03	9.78	90.22	0	55.90	0.37		
MORAb003-ER1237505	MORAb-003	マレイミド	PEG4-トリアゾール-PEG3	スルホンアミド	1.85	3.88	5.72	94.28	0	18.30	0.12		
MORAb009-ER1237505	MORAb-009	マレイミド	PEG4-トリアゾール-PEG3	スルホンアミド	2.33	3.91	5.44	94.56	0	61.00	0.41		
MORAb003-PEG2-エリブリン	MORAb-003	マレイミド	PEG2	切断不可能	4.15	4.49	3.97	96.03	0	6.96	0.05		
MORAb009-PEG2-エリブリン	MORAb-009	マレイミド	PEG2	切断不可能	4.55	4.30	1.15	97.11	1.74	8.84	0.06		
MORAb003-PEG4-エリブリン	MORAb-003	マレイミド	PEG4	切断不可能	4.70	4.79	9.84	89.76	0	9.31	0.06		
MORAb009-PEG4-エリブリン	MORAb-009	マレイミド	PEG4	切断不可能	4.48	4.57	1.03	97.13	1.84	11.60	0.08		
MORAb003-ER1236940	MORAb-003	スクシンイミド	PEG2	val-cit-pAB	0.72		3.65	96.35	0	17.00	0.11		
MORAb009-ER1236940	MORAb-009	スクシンイミド	PEG2	val-cit-pAB	0.89		2.75	97.25	0	66.30	0.44		
MORAb003-ER1242288	MORAb-003	スクシンイミド	PEG9	val-cit-pAB	0.00		2.85	97.15	0	14.40	0.10		

10

20

30

40

50

表 47. MORAb-003、MORAb-009、及び
トラスツズマブADCの生物物理学的分析

ADC	抗体	コンジュ ゲーション ケミストリー	スペーサー	切断 ケミストリー	DAR 分析			SEC-HPLC 分析			抗原結合	
					DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	Agg. %	モノマー %	Frag. %	ELISA, EC ₅₀ , ng/mL	ELISA, EC ₅₀ , nM	
MORAb009- ER1242288	MORAb-009	スクシニイミド	PEG9	val-cit-pAB	0.21		1.69	98.31	0	15.30	0.10	
MORAb003- ER1236941	MORAb-003	スクシニイミド	ペンチル	val-cit-pAB	0.77		3.13	96.87	0	13.00	0.09	
MORAb009- ER1236941	MORAb-009	スクシニイミド	ペンチル	val-cit-pAB	0.93		3.04	96.96	0	44.60	0.30	
MORAb003- ER1243700	MORAb-003	スクシニイミド	PEG3-トリアゾール-PEG3	val-cit-pAB	0.00		3.92	96.08	0	6.22	0.04	
MORAb009- ER1243700	MORAb-009	スクシニイミド	PEG3-トリアゾール-PEG3	val-cit-pAB	0.06		1.97	98.03	0	46.70	0.31	
MORAb003- ER1231691	MORAb-003	スクシニイミド	PEG2	ala-ala-asn- pAB	0.37		3.46	96.54	0	11.50	0.08	
MORAb009- ER1231691	MORAb-009	スクシニイミド	PEG2	ala-ala-asn- pAB	0.29		2.45	97.55	0	43.30	0.29	
MORAb003- ER1244129	MORAb-003	スクシニイミド	PEG3-トリアゾール-PEG3	ジスルフィド/ ジメチル-pAB	0.24		10.87	89.13	0	14.30	0.10	
MORAb009- ER1244129	MORAb-009	スクシニイミド	PEG3-トリアゾール-PEG3	ジスルフィド/ ジメチル-pAB	0.47		12.79	87.21	0	57.70	0.38	
MORAb003- ER1244623	MORAb-003	スクシニイミド	PEG3-トリアゾール-PEG3	スルホンアミド	0.55		5.21	94.79	0	4.54	0.03	
MORAb009- ER1244623	MORAb-009	スクシニイミド	PEG3-トリアゾール-PEG3	スルホンアミド	1.14		0	100	0	39.00	0.26	
MORAb003- DBCO- ER1237508	MORAb-003	スクシニイミド/ クリック	ジベンジルシクロホキサネン- トリアゾール-PEG3	ジスルフィド/ ジメチル-pAB	2.19		4.1	95.9	0	24.10	0.16	
MORAb009- DBCO- ER1237508	MORAb-009	スクシニイミド/ クリック	ジベンジルシクロホキサネン- トリアゾール-PEG3	ジスルフィド/ ジメチル-pAB	2.33		0	100	0	53.80	0.36	

10

20

30

40

50

表 47. MORAb-003, MORAb-009, 及びトラスツズマブADCの生物物理学的分析

ADC	抗体	コンジュゲーション シカミド/クリック	スペーサー	切断ケミ ストリー	DAR 分析		SEC-HPLC 分析			抗原結合	
					DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	Aggr. %	モノマー%	Fr ag. %	ELISA, EC ₅₀ ng/mL	ELISA, EC ₅₀ nM
MORAb003- DBCO- ER1138856	MORAb-003	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG3	スクレンイミド	1.82		3.49	96.51	0	15.00	0.10
MORAb009- DBCO- ER1138856	MORAb-009	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG3	スクレンイミド	1.59		0	100	0	44.70	0.30
MORAb003- DBCO-PEG4 VCP エリブリン	MORAb-003	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG4	val-cit-pAB	3.09		2.87	97.13	0	16.00	0.11
MORAb009- DBCO-PEG4 VCP エリブリン	MORAb-009	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG4	val-cit-pAB	2.91		0.22	99.78	0	33.70	0.22
MORAb003- DBCO-PEG2 エリブリン	MORAb-003	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG2	切断不可能	3.43		3.88	96.12	0	19.10	0.13
MORAb009- DBCO-PEG2 エリブリン	MORAb-009	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG2	切断不可能	3.07		1.15	98.85	0	23.30	0.16
MORAb003- DBCO-PEG4 エリブリン	MORAb-003	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG4	切断不可能	2.96		3.64	96.36	0	13.30	0.09
MORAb009- DBCO-PEG4 エリブリン	MORAb-009	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG4	切断不可能	2.8		1.12	98.88	0	45.20	0.30

略語：%Aggr.、凝集率；%Fr ag.、断片化率。

【0449】

2.1.1 MORAb-003, MORAb-009, 及びトラスツズマブADC

コンジュゲーション効率及び生物物理学的パラメーターの両方の点において、MORAb-003, MORAb-009, 及びトラスツズマブの間で、有意な差は観察されなかった。すべてのADCが、同様のDAR値及び凝集物形成レベルを実証した。

【0450】

2.1.2 マレイミドをベースとするADC

マレイミドをベースとするADCでは、val-cit-pAB切断部位と対合したペンチル及びPEG₂スペーサー、及びala-ala-asn-pAB切断部位と対合し

10

20

30

40

50

た PEG₂ スペースの両方が、低い (< 5%) 凝集物レベルに加えて、逆相 LC-MS 及び HIC-HPLC によると 3.5 ~ 4.0 の DAR 値をもたらした。しかしながら、スペースを PEG₈ (val-cit-pAB 切断部位と対合) まで伸長させた場合、凝集物レベルは上昇し (11 ~ 18%)、コンジュゲーション効率は低下して、1.1 ~ 2.3 の DAR 値をもたらした。例えば、表 47 における MORAb003/MORAb009-ER-001159569 (短い PEG リンカー) 及び MORAb003/MORAb009-1242287 (長い PEG リンカー) の凝集パーセント及び DAR 値を参照されたい。

【0451】

ジスルフィジル-pAB 切断部位を用いて調製した ADC では、相対的に高い凝集物レベル (10 ~ 14%) と共に、低い DAR 値が観察された (1.0 ~ 1.6)。これらの ADC を、LC-MS により分析した場合、HIC-HPLC によるよりも顕著に低い DAR 値が観察された (例えば、表 47 中の MORAb003/MORAb009-ER1237504 及び MORAb003/MORAb009-ER1237505 での LC-MS/HIC-HPLC DAR 値を参照されたい)。この結果は、LC-MS 分析の移動相が約 3.0 であるのに対して、HIC-HPLC 分析の移動相が中性であるので、リンカー切断部位が pH 不安定性を示すことを示唆している。

【0452】

スルホンアミド切断部位を用いて調製した ADC では、低い (< 5%) 凝集物レベルが観察された。ジスルフィジル-pAB ADC と同様に、LC-MS (1.8 - 2.3) により分析した場合、HIC-HPLC (3.9) によるよりも低い DAR 値が観察され、これは再び、リンカー切断部位が pH 不安定性を示すことを示している。

【0453】

PEG₂ 及び PEG₄ 切断不可能なリンカーでは、効率的なコンジュゲーションが観察され、4.0 ~ 4.7 の DAR 値が生じた。これらの切断不可能なリンカーを有する MORAb-009 ADC も、低い凝集レベル (< 2%) を実証したが、対応する MORAb-003 ADC では、やや高い凝集レベルが観察された (PEG₂ 及び PEG₄ でそれぞれ、4% 及び 10%)。

【0454】

2.1.3 スクシンイミドをベースとする ADC

スペース-リンカー-エリブリンと対合したスクシンイミドを使用して調製した ADC はすべて、DAR 値 < 1.0 をもたらした。この低いコンジュゲーション効率 (マレイミドに対して) がコンジュゲーション手順自体の結果ではないことを確認するために、これらの ADC を、より高い化合物: 抗体比を使用して再び作製し、同じ DAR 分析法を使用して再分析した。同様の結果が得られたが、これは、理論に拘束されることはないが、低い DAR 値がスクシンイミド及びエリブリンの組合せの固有の特性であること、及びマレイミドがより効率的にコンジュゲートし得ることを示唆している。スクシンイミドコンジュゲーションの効率は、DBCO を初めに、NHS-DBCO を使用して抗体に付加し、続いて、アジド化合物を付加する 2 ステップ法の使用により上昇した。このアプローチは、直接的な抗体リシン残基へのコンジュゲーションと比較して、逆相 HPLC 分析により測定すると、高い DAR 値をもたらす。スルホンアミド (切断可能)、val-cit-pAB (切断可能)、または PEG₂/PEG₄ (切断不可能) リンカーを有するスクシンイミドをベースとする ADC では、2 ステップコンジュゲーションから生じる DAR 値は、スルホンアミド切断部位を有するマレイミドをベースとする ADC で決定された DAR 値と同様であった。理論に拘束されることはないが、この結果は再び、スクシンイミド-スペース-リンカー-エリブリンコンジュゲーション反応でのより低い DAR 値が、スクシンイミド及びエリブリンの組合せの固有の特性であることを示唆している。

【0455】

2.2 MORAb-003 及び MORAb-009 ADC の結合の特徴づけ

MORAb-003 ADC では、標的抗原結合の点において、切断不可能なマレイミド

10

20

30

40

50

をベースとするリンカー - エリブリンADCと親MORAb - 003との間で、顕著な差は観察されなかった。ELISA分析によると、他のマレイミドをベースとするリンカー - エリブリンMORAb - 003ADCでは、親MORAb - 003に対して標的抗原結合の2~3倍の低下が典型的には観察された。しかしながら、リンカー長さまたはリンカー組成のいずれかと低いEC₅₀値との間に明らかな相関はなかった。同様に、スクシニミドをベースとするリンカー - エリブリンMORAb - 003ADCでは、非コンジュゲートMORAb - 003に対して標的抗原結合の0~3倍の低下が一般に観察された。再び、リンカー長さまたはリンカー組成のいずれかと低いEC₅₀値との間の相関は明らかではなかった。MORAb - 009ADCでは、すべてのADCが、親MORAb - 009に対して、EC₅₀値の2倍未満の低下を示した。

10

【0456】

2.3 MORAb - 003、MORAb - 009、及びトラスツズマブADCのインビトロ細胞傷害性分析

調製したMORAb - 003、MORAb - 009、及びトラスツズマブADCのインビトロ効力を、クリスタルバイオレット細胞ベース細胞傷害性アッセイを使用して評価した。MORAb - 003及びMORAb - 009ADCをスクリーニングするために選択された細胞系は、IGROV1、NCI - H2110、及びA431であった。IGROV1細胞は、ヒト卵巣上皮癌由来の細胞であり、高レベルの葉酸受容体アルファを発現するが、メソテリンは発現しない(すなわち、MORAb - 003反応性)。NCI - H2110細胞は、ヒト非小細胞肺癌由来の細胞であり、中等度のレベルの葉酸受容体アルファ及びメソテリンの両方を発現する(すなわち、MORAb - 003 - 及びMORAb - 009反応性)。A431対照細胞は、ヒト表皮癌由来の細胞であり、いずれの標的抗原も発現しない。このスクリーニングの結果を表48に示す。リンカー - 毒素マレイミド - PEG2 - val - cit - pAB - エリブリン(VCP - エリブリン)を含むMORAb - 003、MORAb - 009、及びトラスツズマブADCは、NCI - N87(FR^{lo}、MSLN^{med}、her2^{hi})、BT - 474(FR^{neg}、MSLN^{neg}、her2^{hi})、ZR - 75(FR^{neg}、MSLN^{neg}、her2^{med})、及びNUGC3(FR^{neg}、MSLN^{neg}、her2^{neg})を含む、追加の胃及び乳癌細胞系でも評価した。このスクリーニングの結果を表49に示す。

20

【0457】

30

40

50

【表 4 8】

表 4 8. IGROV1、NCI-H2110、及び A431 細胞での MORAb-003 及び MORAb-009 ADC の細胞毒性 (IC₅₀) スケリーニング

ADC	抗体	リンジエグゼンション シケミストリー	スペーサー	切断カミ ストリー	細胞毒性分析									
					IGROV1 (FR ^{hi} , MSLN ^{neg})		NCI-H2110 (FR ^{neg} , MSLN ^{neg})		A431 (FR ^{neg} , MSLN ^{neg})					
					IC ₅₀ (nM)	SD	IC ₅₀ (nM)	SD	IC ₅₀ (nM)	SD				
MORAb003		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MORAb009		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
トラフツズマブ		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
エリブリン		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MORAb003- ER1159569 (Lot NB3073-88L)	MORAb-003	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB	val-cit-pAB	0.155	0.064	0.199	0.034	0.653	0.159	>100	>100	>100
MORAb009- ER1159569 (Lot NB3073-88F)	MORAb-009	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB	val-cit-pAB	9.450	2.093	14.945	1.747	>100	>100	>100	>100	>100
MORAb003- ER1159569 (Lot NB3142-62A)	MORAb-003	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB	val-cit-pAB	0.020		1.550		>100	>100	>100	>100	>100
MORAb009- ER1159569 (Lot NB3142-62D)	MORAb-009	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB	val-cit-pAB	5.687		6.784		>100	>100	>100	>100	>100
トラフツズマブ- ER1159569	トラフツズマブ	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB	val-cit-pAB									
MORAb003- ER1242287	MORAb-003	マレイミド	PEG8	val-cit-pAB	val-cit-pAB	0.115	0.035	7.065	0.417	85.960		85.960		
MORAb009- ER1242287	MORAb-009	マレイミド	PEG8	val-cit-pAB	val-cit-pAB	25.765	8.478	34.455	3.033	>100		>100		
MORAb003- ER1235638	MORAb-003	マレイミド	ペンチル	val-cit-pAB	val-cit-pAB	0.105	0.092	3.920	1.032	>100		>100		
MORAb009- ER1235638	MORAb-009	マレイミド	ペンチル	val-cit-pAB	val-cit-pAB	6.830	0.962	13.965	6.611	>100		>100		

10

20

30

40

50

表48. IGROV1、NCI-H2110、及びA431細胞でのMORAb-003及びMORAb-009 ADCの細胞傷害性 (IC₅₀) スクリーニング

ADC	抗体	コンジュゲーション リンクミストリー	スパーサー	切断ケミ ストリー	細胞傷害性分析					
					IGROV1 (FR ^{hi} , MSLN ^{neg})		NCI-H2110 (FR ^{med} , MSLN ^{med})		A431 (FR ^{neg} , MSLN ^{neg})	
					IC ₅₀ (nM)	SD	IC ₅₀ (nM)	SD	IC ₅₀ (nM)	SD
MORAb003- ER1231679	MORAb-003	マレイミド	PEG2	ala-ala-asn-pAB	0.080	0.028	3.800	0.566	31.630	1.202
MORAb009- ER1231679	MORAb-009	マレイミド	PEG2	ala-ala-asn-pAB	8.890	0.976	7.080	1.867	34.390	3.536
MORAb003- ER1231690	MORAb-003	マレイミド	PEG2	ala-ala-asn- pAB-ala-ala- asn-pAB	0.125	0.021	4.745	2.114	38.555	0.403
MORAb009- ER1231690	MORAb-009	マレイミド	PEG2	ala-ala-asn- pAB-ala-ala- asn-pAB	16.980	5.176	12.310	3.422	54.960	5.360
MORAb003- ER1237504	MORAb-003	マレイミド	PEG4-トリアゾール-PEG3	ジスルファイジル- ジメチル-pAB	0.265	0.092	0.845	0.177	7.005	0.290
MORAb009- ER1237504	MORAb-009	マレイミド	PEG4-トリアゾール-PEG3	ジスルファイジル- ジメチル-pAB	6.375	2.751	1.220	0.325	8.130	0.608
MORAb003- ER1237505	MORAb-003	マレイミド	PEG4-トリアゾール-PEG3	スルホンアミド	0.370	0.269	0.690	0.283	6.800	0.834
MORAb009- ER1237505	MORAb-009	マレイミド	PEG4-トリアゾール-PEG3	スルホンアミド	6.370	3.012	0.990	0.453	9.030	1.527
MORAb003- PEG2-エリブリン	MORAb-003	マレイミド	PEG2	切断不可能	0.330		38.300		>100	
MORAb009- PEG2-エリブリン	MORAb-009	マレイミド	PEG2	切断不可能	42.770		50.040		>100	
MORAb003- PEG4-エリブリン	MORAb-003	マレイミド	PEG4	切断不可能	0.277		21.630		>100	
MORAb009- PEG4-エリブリン	MORAb-009	マレイミド	PEG4	切断不可能	76.320		31.600		>100	
MORAb003- ER1236940	MORAb-003	スルホンアミド	PEG2	val-cit-pAB	0.325	0.106	30.545	3.132	>100	

10

20

30

40

50

表48. IGROV1、NCI-H2110、及びA431細胞でのMORAb-003及びMORAb-009ADCの細胞傷害性 (IC₅₀) スクリーニング

ADC	抗体	コンジュゲーション シグナル	スベーター	切断ケミ ストリー	細胞傷害性分析					
					IGROV1 (FR ^{hi} , MSLN ^{neg})		NCI-H2110 (FR ^{med} , MSLN ^{med})		A431 (FR ^{neg} , MSLN ^{neg})	
					IC ₅₀ (nM)	SD	IC ₅₀ (nM)	SD	IC ₅₀ (nM)	SD
MORAb009- ER1236940	MORAb-009	スクレンイミド	PEG2	val-cit-pAB	31.915	2.510	36.500	11.031	90.060	
MORAb003- ER1242288	MORAb-003	スクレンイミド	PEG9	val-cit-pAB	38.105	45.601	64.010	8.075	>100	
MORAb009- ER1242288	MORAb-009	スクレンイミド	PEG9	val-cit-pAB	>100		>100		>100	
MORAb003- ER1236941	MORAb-003	スクレンイミド	ペンチル	val-cit-pAB	0.330	0.071	42.105	12.594	>100	
MORAb009- ER1236941	MORAb-009	スクレンイミド	ペンチル	val-cit-pAB	>100		49.485	13.569	>100	
MORAb003- ER1243700	MORAb-003	スクレンイミド	PEG3-トリアリール	val-cit-pAB	1.150		>100		>100	
MORAb009- ER1243700	MORAb-009	スクレンイミド	PEG3-トリアリール	val-cit-pAB	>100		>100		>100	
MORAb003- ER1231691	MORAb-003	スクレンイミド	PEG2	ala-ala-asu-pAB	12.320		31.795	4.448	>100	
MORAb009- ER1231691	MORAb-009	スクレンイミド	PEG2	ala-ala-asu-pAB	>100		20.000	5.954	>100	
MORAb003- ER1244129	MORAb-003	スクレンイミド	PEG3-トリアリール	ジスルファイジル- ジメチル-pAB	0.370	0.184	0.750	0.071	12.005	1.534
MORAb009- ER1244129	MORAb-009	スクレンイミド	PEG3-トリアリール	ジスルファイジル- ジメチル-pAB	6.595	4.052	0.840	0.057	9.230	0.014
MORAb003- ER1244623	MORAb-003	スクレンイミド	PEG3-トリアリール	スルホンアミド	0.980	0.396	1.820	0.410	37.235	15.733
MORAb009- ER1244623	MORAb-009	スクレンイミド	PEG3-トリアリール	スルホンアミド	24.505	4.702	2.235	0.629	36.665	14.206
MORAb003- DBCO-ER1237508	MORAb-003	スクレンイミド/ クワック	ジペンジルシクロオク チン-トリアリ ール-PEG3	ジスルファイジル- ジメチル-pAB	0.545	0.389	0.900	0.071	9.670	0.382

10

20

30

40

50

【 0 4 5 8 】

表 48. IGROV1、NCI-H2110、及びA431細胞でのMORAb-0003及びMORAb-009ADCの細胞傷害性 (IC50) スクリーニング

ADC	抗体	コンジュゲーション シグナル	スパーサー	切断ケミ ストリー	細胞傷害性分析					
					IGROV1 (FR ^{hi} , MSLN ^{med})		NCI-H2110 (FR ^{med} , MSLN ^{med})		A431 (FR ^{neg} , MSLN ^{med})	
					IC ₅₀ (nM)	SD	IC ₅₀ (nM)	SD	IC ₅₀ (nM)	SD
MORAb009- DBCO-ER1237508	MORAb-009	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG3	ジスルホニル- ジメチル-pAB	10.245	3.486	1.040	0.297	11.280	2.277
MORAb003- DBCO-ER1138856	MORAb-003	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG3	スルホンアミド	1.775	1.421	1.655	0.007	24.990	2.022
MORAb009- DBCO-ER1138856	MORAb-009	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG3	スルホンアミド	19.155	5.438	1.960	0.113	28.070	0.636
MORAb003- DBCO-PEG4 VCP エリブリン	MORAb-003	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG4	val-cit-pAB	0.038		4.281		>100	
MORAb009- DBCO-PEG4 VCP エリブリン	MORAb-009	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG4	val-cit-pAB	12.960		31.400		>100	
MORAb003- DBCO-PEG2 エリブリン	MORAb-003	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG2	切断不可能	4.250		38.070		>100	
MORAb009- DBCO-PEG2 エリブリン	MORAb-009	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG2	切断不可能	75.680		85.680		>100	
MORAb003- DBCO-PEG4 エリブリン	MORAb-003	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG4	切断不可能	1.323		46.280		>100	
MORAb009- DBCO-PEG4 エリブリン	MORAb-009	スクレンイミド/ クリック	ジベンジルシクロオク チン-トリアゾ ール-PEG4	切断不可能	61.490		39.330		>100	

すべての IC₅₀値はnMにより、反復実験の平均値を表す。S.D. - 標準偏差。

10

20

30

40

50

【表 4 9】

ADC	抗体	コンジュゲーション リンクエストラノール	スパーサー	切断ケミ ストリー	細胞傷害性分析			
					NCI-N87-Luc (FR ^{lo} , MSLN ^{med} , her2 ^{hi})	BT-474 (FR ^{neg} , MSLN ^{neg} , her2 ^{hi})	ZR-75-1 (FR ^{neg} , MSLN ^{neg} , her2 ^{med})	NUGC3-Luc (FR ^{neg} , MSLN ^{neg} , her2 ^{neg})
MORAb003		N/A	N/A	N/A	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
MORAb009		N/A	N/A	N/A				
トラスツズマブ		N/A	N/A	N/A	0.78	>100	>100	>100
エリブリン	N/A	N/A	N/A	N/A	0.257	0.151	0.236	0.445
MORAb003- ER1159569 (ロットNB3073-88L)	MORAb-003	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB				
MORAb009- ER1159569 (ロットNB3073-88F)	MORAb-009	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB				
MORAb003- ER1159569 (ロットNB3142-62A)	MORAb-003	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB	4.528	11.46	14.74	20.45
MORAb009- ER1159569 (ロットNB3142-62D)	MORAb-009	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB	0.013	10.21	12.8	29.93
トラスツズマブ・ ER1159569	トラスツズマブ	マレイミド	PEG2	val-cit-pAB	0.006	0.003	0.023	20.06

表 4.9. NCI-N87, BT-474, ZR-75, 及びNUGC3細胞での MORAb-003, MORAb-009, 及びトラスツズマブADCの細胞傷害性 (IC₅₀) スケリーニング

すべての IC₅₀値は nMにより、反復実験の平均値を表す。SD - 標準偏差。

【0459】

2.3.1 マレイミドをベースとするADCの細胞傷害性

マレイミドをベースとするMORAb-003及びMORAb-009ADCはすべて、IGROV1細胞で特異的な細胞傷害性を示し、抗体間で観察された効力には、2~3桁の規模の差があった。val-cit-pAB-エリブリンMORAb-003ADCは、IGROV1細胞系で、PEG₂またはPEG₄切断不可能なMORAb-003ADCのいずれよりも高い効力を実証したが、特異性の倍数 (fold-specificity) は変化しなかった。同様の傾向が、MORAb-009ADCで観察され、切断不可能なMORAb-009ADCは、IGROV1細胞で、val-cit-pAB-

10

20

30

40

50

エリブリンMORAb - 009ADCよりも低い細胞傷害性を実証した。

【0460】

ジスルフィジル - 及びスルホンアミドをベースとするリンカーを有するマレイミドをベースとするMORAb - 009ADCは、NCI - H2110細胞系で、IGROV1細胞系よりも高い効力を実証した。これは、下記のとおり、培養中のリンカーの潜在的な不安定性により得る。強力な細胞傷害性が、対応するMORAb - 003ADCでも観察された。対照的に、切断不可能なリンカーを有するマレイミドをベースとするMORAb - 003及びMORAb - 009ADCは、NCI - H2110細胞で相対的に低い効力を実証した。理論により束縛されることはないが、この結果は、より低い標的発現で、ペイロードの効率的な切断及び放出が細胞傷害性を改善し得ることを示唆している。

10

【0461】

val-cit-pAB酵素切断可能なリンカーまたは切断不可能なリンカーを有するADCは、A431対照細胞 ($IC_{50} > 100 \text{ nM}$) で低レベルのオフターゲット死滅を実証したのに対して、ala-ala-asn-pAB酵素切断可能なリンカーを有するADCは、これらの対照細胞の弱い、検出可能な死滅を実証した。これは、val-cit-pAB酵素切断可能なリンカーがala-ala-asn-pAB酵素切断可能なリンカーよりも、培養物中で安定的であり得ることを示している。加えて、短いPEG₂スペーサーを有するMORAb - 009ADCは、IGROV1細胞において、長いPEG₈スペーサーを有する対応するADCよりも高い細胞傷害性を実証した。これと同じ傾向が、短いスペーサー長さを有し、高い細胞傷害性をもたらしたMORAb - 003及びMORAb - 009ADCの両方で、NCI - H2110細胞において観察された。

20

【0462】

スルホンアミドをベースとするリンカーを有するADCは一般に、ジスルフィジルをベースとするリンカーを有する対応するADCよりも高いDAR値及び低い凝集レベルを実証した。しかしながら、A431対照細胞のnMレベルの死滅が、これらのカテゴリーのADCの両方で観察され、ジスルフィジル - 及びスルホンアミドをベースとするリンカーが、培養物中で、調査しているアッセイ条件下で酵素切断可能なリンカーよりも安定性が低いことを示唆した。

【0463】

具体的なリンカー - 毒素マレイミド - PEG₂ - val-cit-pAB - エリブリン (VCP - エリブリン) を種々の胃及び乳癌細胞系での特異性及び効力についてさらに検査する。VCP - エリブリンを、抗ヒトher2抗体トラスツズマブに加えて、MORAb - 003及びMORAb - 009にコンジュゲートした。MORAb - 003 - VCP - エリブリンは、低レベルの葉酸受容体アルファ (FR) を発現するNCI - N87細胞で、弱い、特異的な死滅を実証し、残りの3つのFR陰性細胞系では、ほとんど死滅を実証しなかった。MORAb - 009 - VCP - エリブリンはまた、中等度のレベルのメソテリンを発現するNCI - N87細胞で強力な細胞傷害性を実証した。トラスツズマブ - VCP - エリブリンは、高レベルのher2を発現する2つの細胞系、NCI - N87及びBT - 474細胞で非常に強力であり (3 ~ 6 pM, IC_{50})、her2を中等度にもみ発現するZR - 75乳癌細胞でも強力であった。MORAb - 003、MORAb - 009、及びトラスツズマブVCP - エリブリンADCはすべて、それぞれの標的抗原であるFR、メソテリン、またはher2を発現しないNUGC3細胞では、低い細胞傷害性を実証した。

30

40

【0464】

2.3.2 スクシンイミドをベースとするADCの細胞傷害性

スクシンイミドをベースとするADCの細胞傷害性の傾向は、IGROV1細胞について、マレイミドをベースとするADCと同様であり、PEG₈スペーサーADCは、低いDAR値に加えて、低い細胞傷害性を実証した。対応するマレイミドをベースとするADCと比較して、酵素切断可能なリンカーを有するスクシンイミドをベースとするADCでは、IGROV1及びNCI - H2110細胞の両方で低い細胞傷害性が一般に観察され

50

たが、これは、それらの低いDAR値による可能性が最も高い。対応するマレイミドをベースとするADCと同様に、ジスルフィジル-及びスルホンアミドをベースとするリンカーでは、A431細胞のオフターゲット死滅も観察された。これは、コンジュゲーションケミストリーではなく、切断部位から生じている可能性がある不安定性の上昇を指し示している。

【0465】

直接的なスクシンイミドコンジュゲーションアプローチで得られたDAR値に対して、2ステップコンジュゲーションを行った場合、高いDAR値が観察された。これらの高いDAR値は、高い効力と相関した。VCP-エリブリンMORAb-003ADCでは、IGROV1及びNCI-H2110細胞の両方で強力な細胞傷害性が観察された。切断不可能なMORAb-003ADCは、IGROV1細胞で効力を実証したが(1~4nM)、これらは、DAR値が比較可能であっても、この方法で調製したVCP-エリブリンMORAb-003ADC(38pM)よりも、まだ効力が低かった。加えて、2ステップ法を使用して調製した切断不可能なMORAb-003ADCは、IGROV1細胞系で、対応するマレイミドをベースとするADCよりも効力がやや低かったが、これは、それらの低いDAR値により得る。それらのマレイミドをベースとするカウンターパートと同様に、2ステップ法を使用して調製した切断不可能なADCも、NCI-2110細胞での細胞傷害性をほぼすべて失った。

【0466】

2.4 抗ヒトメソテリン(LCcy80)ADCの生物物理学的特徴づけ

MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-エリブリン(ER-001159569)を、8種の異なる抗ヒトメソテリン抗体(表1)にコンジュゲートした。セクション1.6.1に上記したとおり、親抗体の結合親和性をBIAcore分析により決定した。すべての抗ヒトメソテリンADCの凝集レベルをSEC-HPLCにより決定し、DARを、HIC-HPLCを使用して分析した。クリスタルバイオレット細胞ベース細胞傷害性アッセイを使用して、A3(ヒトメソテリン(MSLN)を安定的に遺伝子導入されたA431、MSLN^{hi})、OVCA3(ヒト卵巣、MSLN^{hi})、HEC-251(ヒト子宮内膜、MSLN^{med})、H226(ヒト肺扁平上皮細胞中皮腫、MSLN^{lo})、及びA431親(MSLN^{neg})細胞において、インビトロ効力を評価した。DAR、凝集、及び細胞傷害性分析の結果を表50に示す。

【0467】

【表50】

表50. 抗ヒトメソテリン(LCcy80)ADCの生物物理学的特徴づけ

		親MAb			ADC								
		親和性			ペイロード		SEC-HPLC		細胞ベース細胞傷害性アッセイ ^{IC50, nM}				
		K _d (10 ⁶ M ⁻¹)	K _d (10 ⁵ M ⁻¹)	K _d (10 ⁴ M ⁻¹)	薬物-リンカー	DAR	凝集物%	モノマー%	A431	OVCA3	HEC-251	H226	A3
33011	xi				ER-001159569-000	1.97	8.97	91.03	89.87	0.008	3.950	>100	0.14
	zu	2.2	0.65	3.4	ER-001159569-000	1.69	1.42	98.58	<100	0.064	26.560	>100	0.28
111010	xi	5.5	3.5	5.3	ER-001159569-000	1.89	4.25	95.75	38.10	0.064	13.950	<100	0.05
	zu	5.2	3	6.5	ER-001159569-000	1.81	3.64	96.36	68.92	0.024	27.42	>100	0.17
20115	xi	2.4	0.26	1.1	ER-001159569-000	1.85	1.67	98.38	66.50	0.004	14.62	<100	0.27
	zu	3.1	1.1	4.2	ER-001159569-000	1.80	5.84	94.16	68.88	0.250	20.42	>100	0.41
34606	xi	8.8	0.89	1.4	ER-001159569-000	1.59	5.28	94.72	34.49	0.087	6.73	<100	0.11
	zu	13.3	9.8	8.9	ER-001159569-000	1.63	4.48	95.52	72.26	1.180	32.54	>100	0.55

略語: xi-キメラ; zu-ヒト化。

【0468】

すべての抗ヒトメソテリンADCが低い凝集レベル(凝集物<10%)を維持し、標的細胞系での高い効力を実証した。高い効力がA3及びOVCA3で観察されたのに対して、HEC-251及びH226細胞は、ADC細胞傷害性に対して比較的抵抗性であった。

【0469】

選択された配列:

10

20

30

40

50

配列番号 1 (M O R A b - 0 0 3 重鎖 (H C))

【表 5 1】

```

1 EVQLVESGGG VVQGRSLRL SCSASGFTFS GYGLSWVRQA PGKGLEWVAM
51 ISSGGSYTTY ADSVKGRFAI SRDNAKNTLF LQMDSLRPED TGVYFCARHG
101 DDPAWFAYWG QGTPVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVTV PSSSLGTQTY
201 ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK
251 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
351 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
401 DSDGSEFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

```

10

配列番号 2 (M O R A b - 0 0 3 H C C D R 1 ; K a b a t) : G Y G L S

配列番号 3 (M O R A b - 0 0 3 H C C D R 2 ; K a b a t) : M I S S G G S Y T Y
Y A D S V K G

配列番号 4 (M O R A b - 0 0 3 H C C D R 3 ; K a b a t) : H G D D P A W F A Y

配列番号 5 (M O R A b - 0 0 3 重鎖全長プレタンパク質アミノ酸配列 ; リーダー配列に
下線)

【表 5 2】

```

1 MGWSCIILFL VATATGVHSE VQLVESGGGV VQGRSLRLS CSASGFTFSG
51 YGLSWVRQAP GKGLEWVAMI SSGGSYTYA DSVKGRFAIS RDNAKNTLFL
101 QMDSLRPEDT GVYFCARHGD DPAWFAYWGQ GTPVTVSSAS TKGPSVFPLA
151 PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
201 YSLSSVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC
251 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
301 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
351 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
401 EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSEFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
451 EALHNHYTQK SLSLSPGK

```

20

配列番号 6 (M O R A b - 0 0 3 軽鎖 (L C))

【表 5 3】

```

1 DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSVSSSIS SNNLHWYQQK PGKAPKPIWY
51 GTSNLAGVPS RFRSGSGSGT DYTFTISSLQ PEDIATYYCQ QWSSYPYMYT
101 FGQGTKVEIK RTVAAPSVFIF PPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPPREAKVQ
151 WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT
201 HQGLSSPVTK SENRGEC

```

30

配列番号 7 (M O R A b - 0 0 3 L C C D R 1 ; K a b a t) : S V S S S I S S N N
L H

配列番号 8 (M O R A b - 0 0 3 L C C D R 2 ; K a b a t) : G T S N L A S

配列番号 9 (M O R A b - 0 0 3 L C C D R 3 ; K a b a t) : Q Q W S S Y P Y M Y T

40

配列番号 10 M O R A b - 0 0 3 軽鎖全長プレタンパク質アミノ酸配列 (リーダー配列
に下線)

【表 5 4】

```

1 MGWSCIILFL VATATGVHSD IQLTQSPSSL SASVGDRVTI TCSVSSSIS
51 NNLHWYQQKPGKAPKPIYGR TSNLAGVPS RFRSGSGSGTD YTFTISSLQ
101 EDIATYYCQQ WSSYPYMYTF GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCLLN FYPPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST
201 LTLSKADYE KHKVYACEVTH QGLSSPVTKS ENRGEC

```

配列番号 11 (M O R A b - 0 0 3 H C n t)

50

【表 5 5】

```

1   ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT
51  CCACTCCGAG GTCCAACCTGG TGGAGAGCGG TGGAGGTGTT GTGCAACCTG
101 GCCGGTCCCT GCGCCTGTCC TGCTCCGCAT CTGGCTTCAC CTTCAGCGGC
151 TATGGGTTGT CTTGGGTGAG ACAGGCACCT GGAAAAGGTC TTGAGTGGGT
201 TGCAATGATT AGTAGTGGTG GTAGTTATAC CTACTATGCA GACAGTGTGA
251 AGGGTAGATT TGCAATATCG CGAGACAACG CCAAGAACAC ATTGTTCTCTG
301 CAAATGGACA GCCTGAGACC CGAAGACACC GGGGTCTATT TTTGTGCAAG
351 ACATGGGGAC GATCCCGCCT GGTTTCGCTTA TTGGGGCCAA GGGACCCCGG
401 TCACCGTCTC CTCAGCCTCC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCA
451 CCCTCCTCCA AGAGCACCTC TGGGGGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT
501 CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCCC
551 TGACCAGCGG CGTGCACACC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC
601 TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCCC TCCAGCAGCT TGGGCACCCA
651 GACCTACATC TGCAACGTGA ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA
701 AGAAAGTTGA GCCCAAATCT TGTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC
751 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA
801 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
851 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
901 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
951 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCTTG CACCAGGACT
1001 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
1051 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
1101 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG
1151 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG
1201 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
1251 CGTGCTGGAG TCCGACGGCT CTTTCTTCTT ATATTCAAAG CTCACCGTGG
1301 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGTATGCAT
1351 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCCGG
1401 GAAATGA

```

10

20

配列番号 1 2 (M O R A b - 0 0 3 L C n t)

【表 5 6】

```

1   ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT
51  CCACTCCGAC ATCCAGCTGA CCCAGAGCCC AAGCAGCCTG AGCGCCAGCG
101 TGGGTGACAG AGTGACCATC ACCTGTAGTG TCAGCTCAAG TATAAGTTCC
151 AACAACTTGC ACTGGTACCA GCAGAAGCCA GGTAAGGCTC CAAAGCCATG
201 GATCTACGGC ACATCCAACC TGGCTTCTGG TGTGCCAAGC AGATTTCAGCG
251 GTAGCGGTAG CGGTACCGAC TACACCTTCA CCATCAGCAG CCTCCAGCCA
301 GAGGACATCG CCACCTACTA CTGCCAACAG TGGAGTAGTT ACCCGTACAT
351 GTACACGTTT GGCCAAGGGA CCAAGGTGGA AATCAAACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTTATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA A

```

30

40

配列番号 1 3 (M O R A b - 0 0 3 H C C D R 1 ; I M G T) : G F T F S G Y G

配列番号 1 4 (M O R A b - 0 0 3 H C C D R 2 ; I M G T) : I S S G G S Y T

配列番号 1 5 (M O R A b - 0 0 3 H C C D R 3 ; I M G T) : A R H G D D P A W F A Y

配列番号 1 6 (M O R A b - 0 0 3 L C C D R 1 ; I M G T) : S S I S S N N

配列番号 1 7 (M O R A b - 0 0 3 L C C D R 2 ; I M G T) : G T S

配列番号 1 8 (M O R A b - 0 0 3 L C C D R 3 ; I M G T) : Q Q W S S Y P Y M Y T

配列番号 1 9 (ヒ ト F R A)

50

【表 5 7】

```

1 maqrmttqll lllvwvavvg eaqtriawar tellnvczna khkkekpgpe dklheqcrpw
61 rknaccstnt sqeahkdvsy lyrfnwnhcg emapackrhf iqdtclyecs pnlgpwiqqv
121 dqswrkervl nvplckedce qwwedcrtst tcksnwhkgw nwtsgfnkca vgaaccpfbf
181 yfptptvlcn eiwthsykvs nysrgsgrci qmwfdpaqgn pneevarfya aamsgagpwa
241 awpflslal mllwlls

```

配列番号 2 0 (ヒト F R A ノクレオチド)

【表 5 8】

```

1 cattccttgg tgccaactgac cacagctcct tcttcaggga cagacatggc tcagcggatg
61 acaacacagc tgctgctcct tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg 10
121 attgcatggg ccaggactga gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa
181 aagccaggcc ccgaggacaa gttgcatgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc
241 tgttotacca acaccagcca ggaagcccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac
301 tggaaccact gtggagagat ggcaacctgc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc
361 ctctacgagt gctcccccaa cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc
421 aaagagcggg tactgaacgt gccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat
481 tgtcgacct cctacacctg caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg
541 ttaacaagt ggcagtgagg agctgectgc caaccttcc atttctactt cccacaccc
601 actgttctgt gcaatgaaat ctggactcac tctacaagg tcagcaacta cagccgaggg
661 agtggcctgt gcatccagat gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggagggtg
721 gcgaggttct atgctgcagc catgagtggg gctgggcccct gggcagcctg gcttctctg
781 cttagcctgg ccctaagtct gctgtggctg ctccagctgac ctccctttac cttctgatac
841 ctggaaatcc ctgcccgtgt cagcccaca gctcccact atttggttcc tgctccatgg 20
901 tcgggcctct gacagccact ttgaataaac cagacacccg acatgtgtct tgagaattat
961 ttggaaaaaa aaaaaaaaaa aa

```

配列番号 2 1 (ヒト h e r 2)

【表 5 9】

```

1 melaalcrwg lllallppga astqvctgtd mklrlpaspe thldmlrhly
ggcqvvggnl
61 eltylptnas lsflqdiqev qgyvliahnq vrqvplqlrl ivrgtqlfed
nyalavldng 30
121 dplnnttpvt gaspgglrel qlrslteilk ggqliqrnpq lcyqdtlwk
difhknnqla
181 ltlidtnrsr achpcspmck gsrcwgesse dcqsltrtvc aggcrcckgp
lptdccheqc
241 aagctgpkhs dclaclhfnh sgicelhcpa lvtyntdtfe smpnpegryt
fgascvtacp
301 ynylstdvgs ctlvcpnlhq evtaedgtqr cekcskpcar vcyglgmehl
revravtsan 40

```

361 iqefagckki fgslafupes fdgdpasnta plqpeqlqvf etleeitgyl
yisawpdsip

421 dlsvfqnlqv irgrilhnga ysltlqglgi swlglrslre lgsglalihh
nthlcfvhtv

481 pwdqlfrnph qallhtanrp edecvgegla chqlcarghc wpgpqtqcvn
csqflrgqec

541 veecrvlqgl preyvnarhc lpchpecqpq ngsvtcfge adqcvacahy
kdppfcvarc 10

601 psgvkdlsy mpiwkfpdee gacqpcpinc thscvdliddk gcpaeqrasp
ltsiisavvg

661 illvvvlqgv fgilikrrqg kirkytmrri lqetelvepl tpsgampnga
qmrilketel

721 rkvkvlgsa fgtvykigi pdgenvkipv aikvlrents pkankeilde
ayvmagvgsp

781 yvsrllgicl tstvqlvtql mpygclddhv renrgrlsq dlnwcmgia
kgmsyledvr 20

841 lvhrdlaarn vlvkspnhvk itdfglarll dideteyhad ggkvpikwma
lesilrrrft

901 hqsdvwsygv twwelmtfga kpydgipare ipdllekger lpqppictid
vymimvkcwm

961 idsecrprfr elvsefsrma rdpqrfvviq nedlqpaspl dstfyrslle
dddmgdlvda

1021 eeylvpqqgf fcpdpagag gmvhhrhrrs strsgggdlt lglepseeee
prsplapseg 30

1081 agsdvfdgdl gmgaakqls lpthdpsplq rysedptvpl psetdgyvap
lrcspqpeyv

1141 nqpdvrpqqp spreglpaa rpagatlerp ktlspgkngv vkdvfafgga
venpeyltpq

1201 ggaapqphpp pafspafdnl yywdqppper gappstfkgt ptaenpeylg ldvpv

配列番号 2 2 (ヒト h e r 2 ヌクレオチド)

【表 6 0】

1 ATGGAGCTGG CGGCCTTGTG CCGCTGGGGG CTCCTCCTCG CCCTCTTGCC
CCCCGGAGCC 40

61 GCGAGCACCC AAGTGTGCAC CGGCACAGAC ATGAAGCTGC GGCTCCCTGC
CAGTCCCGAG

121 ACCCACCTGG ACATGCTCCG CCACCTCTAC CAGGGCTGCC AGGTGGTGCA
GGGAAACCTG

181 GAACTCACCT ACCTGCCCAC CAATGCCAGC CTGTCCTTCC TGCAGGATAT
CCAGGAGGTG 50

241 CAGGGCTACG TGCTCATCGC TCACAACCAA GTGAGGCAGG TCCCCTGCA
 GAGGCTGCGG
 301 ATTGTGCGAG GCACCCAGCT CTTTGAGGAC AACTATGCCC TGGCCGTGCT
 AGACAATGGA
 361 GACCCGCTGA ACAATACCAC CCCTGTCACA GGGGCCTCCC CAGGAGGCCT
 GCGGGAGCTG
 421 CAGCTTCGAA GCCTCACAGA GATCTTGAAA GGAGGGGTCT TGATCCAGCG
 GAACCCCCAG
 481 CTCTGCTACC AGGACACGAT TTTGTGGAAG GACATCTTCC ACAAGAACAA
 CCAGCTGGCT
 541 CTCACACTGA TAGACACCAA CCGCTCTCGG GCCTGCCACC CCTGTTCTCC
 GATGTGTAAG
 601 GGCTCCCCT GCTGGGGAGA GAGTTCTGAG GATTGTCAGA GCCTGACGCG
 CACTGTCTGT
 661 GCCGGTGGCT GTGCCCCTG CAAGGGGCCA CTGCCCACTG ACTGCTGCCA
 TGAGCAGTGT
 721 GCTGCCGGCT GCACGGGCC CAAGCACTCT GACTGCCTGG CCTGCCTCCA
 CTTCAACCAC
 781 AGTGGCATCT GTGAGCTGCA CTGCCCAGCC CTGGTCACCT ACAACACAGA
 CACGTTTGAG
 841 TCCATGCCCA ATCCCGAGGG CCGGTATACA TTCGGGCCA GCTGTGTGAC
 TGCCTGTCCC
 901 TACAACCTACC TTTCTACGGA CGTGGGATCC TGCACCCTCG TCTGCCCCCT
 GCACAACCAA
 961 GAGGTGACAG CAGAGGATGG AACACAGCGG TGTGAGAAGT GCAGCAAGCC
 CTGTGCCCCA
 1021 GTGTGCTATG GTCTGGGCAT GGAGCACTTG CGAGAGGTGA GGGCAGTTAC
 CAGTGCCAAT
 1081 ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTCT
 GCCGGAGAGC
 1141 TTTGATGGGG ACCCAGCCTC CAACACTGCC CCGCTCCAGC CAGAGCAGCT
 CCAAGTGTTT
 1201 GAGACTCTGG AAGAGATCAC AGGTTACCTA TACATCTCAG CATGGCCGGA
 CAGCCTGCCT
 1261 GACCTCAGCG TCTTCAGAA CCTGCAAGTA ATCCGGGGAC GAATTCTGCA
 CAATGGCGCC
 1321 TACTCGCTGA CCCTGCAAGG GCTGGGCATC AGCTGGCTGG GGCTGCGCTC
 ACTGAGGGAA
 1381 CTGGGCAGTG GACTGGCCCT CATCCACCAT AACACCCACC TCTGCTTCGT
 GCACACGGTG

10

20

30

40

50

1441 CCCTGGGACC AGCTCTTTCG GAACCCGCAC CAAGCTCTGC TCCACACTGC
 CAACCGGCCA
 1501 GAGGACGAGT GTGTGGGCGA GGGCCTGGCC TGCCACCAGC TGTGCGCCCG
 AGGGCACTGC
 1561 TGGGGTCCAG GGCCACCCA GTGTGTCAAC TGCAGCCAGT TCCTTCGGGG
 CCAGGAGTGC
 1621 GTGGAGGAAT GCCGAGTACT GCAGGGGCTC CCCAGGGAGT ATGTGAATGC
 CAGGCACTGT
 1681 TTGCCGTGCC ACCCTGAGTG TCAGCCCCAG AATGGCTCAG TGACCTGTTT
 TGGACCGGAG
 1741 GCTGACCAGT GTGTGGCCTG TGCCCACTAT AAGGACCCTC CCTTCTGCCT
 GGCCCGCTGC
 1801 CCCAGCGGTG TGAACCTGA CCTCTCCTAC ATGCCCATCT GGAAGTTTCC
 AGATGAGGAG
 1861 GGCGCATGCC AGCCTTGCCC CATCAACTGC ACCCACTCCT GTGTGGACCT
 GGATGACAAG
 1921 GGCTGCCCCG CCGAGCAGAG AGCCAGCCCT CTGACGTCCA TCATCTCTGC
 GGTGGTTGGC
 1981 ATTCTGCTGG TCGTGGTCTT GGGGGTGGTC TTTGGGATCC TCATCAAGCG
 ACGGCAGCAG
 2041 AAGATCCGGA AGTACACGAT GCGGAGACTG CTGCAGGAAA CGGAGCTGGT
 GGAGCCGCTG
 2101 ACACCTAGCG GAGCGATGCC CAACCAGGCG CAGATGCGGA TCCTGAAAGA
 GACGGAGCTG
 2161 AGGAAGGTGA AGGTGCTTGG ATCTGGCGCT TTTGGCACAG TCTACAAGGG
 CATCTGGATC
 2221 CCTGATGGGG AGAATGTGAA AATCCAGTG GCCATCAAAG TGTTGAGGGA
 AAACACATCC
 2281 CCCAAAGCCA ACAAAGAAAT CTTAGACGAA GCATACGTGA TGGCTGGTGT
 GGGCTCCCCA
 2341 TATGTCTCCC GCCTTCTGGG CATCTGCCTG ACATCCACGG TGCAGCTGGT
 GACACAGCTT
 2401 ATGCCCTATG GCTGCCTCTT AGACCATGTC CGGGAAAACC GCGGACGCCT
 GGGCTCCCAG
 2461 GACCTGCTGA ACTGGTGTAT GCAGATTGCC AAGGGGATGA GCTACCTGGA
 GGATGTGCGG
 2521 CTCGTACACA GGGACTTGGC CGCTCGGAAC GTGCTGGTCA AGAGTCCCAA
 CCATGTCAA
 2581 APTACAGACT TCGGGCTGGC TCGGCTGCTG GACATTGACG AGACAGAGTA
 CCATGCAGAT

10

20

30

40

50

2641 GGGGGCAAGG TGCCCATCAA GTGGATGGCG CTGGAGTCCA TTCTCCGCCG
 GCGGTTCCACC
 2701 CACCAGAGTG ATGTGTGGAG TTATGGTGTG ACTGTGTGGG AGCTGATGAC
 TTTTGGGGCC
 2761 AAACCTTACG ATGGGATCCC AGCCCGGGAG ATCCCTGACC TGCTGGAAAA
 GGGGGAGCGG
 2821 CTGCCCCAGC CCCCCATCTG CACCATTGAT GTCTACATGA TCATGGTCAA
 ATGTTGGATG
 2881 ATTGACTCTG AATGTCGGCC AAGATTCGGG GAGTTGGTGT CTGAATTCTC
 CCGCATGGCC
 2941 AGGGACCCCC AGCGCTTTGT GGTATCCAG AATGAGGACT TGGGCCCAGC
 CAGTCCCTTG
 3001 GACAGCACCT TCTACCGCTC ACTGCTGGAG GACGATGACA TGGGGGACCT
 GGTGGATGCT
 3061 GAGGAGTATC TGGTACCCCA GCAGGGCTTC TTCTGTCCAG ACCCTGCCCC
 GGGCGCTGGG
 3121 GGCATGGTCC ACCACAGGCA CCGCAGCTCA TCTACCAGGA GTGGCGGTGG
 GGACCTGACA
 3181 CTAGGGCTGG AGCCCTCTGA AGAGGAGGCC CCCAGGTCTC CACTGGCACC
 CTCCGAAGGG
 3241 GCTGGCTCCG ATGTATTTGA TGGTGACCTG GGAATGGGGG CAGCCAAGGG
 GCTGCAAAGC
 3301 CTCCCCACAC ATGACCCCAG CCCTCTACAG CGGTACAGTG AGGACCCCAC
 AGTACCCCTG
 3361 CCCTCTGAGA CTGATGGCTA CGTTGCCCCC CTGACCTGCA GCCCCCAGCC
 TGAATATGTG
 3421 AACCAGCCAG ATGTTCCGGC CCAGCCCCCT TCGCCCCGAG AGGGCCCTCT
 GCCTGCTGCC
 3481 CGACCTGCTG GTGCCACTCT GGAAAGGCC AAGACTCTCT CCCAGGGAA
 GAATGGGGTC
 3541 GTCAAAGACG TTTTTCCTT TGGGGGTGCC GTGGAGAACC CCGAGTACTT
 GACACCCAG
 3601 GGAGGAGCTG CCCCTCAGCC CCACCCTCCT CCTGCCTTCA GCCCAGCCTT
 CGACAACCTC
 3661 TATTACTGGG ACCAGGACCC ACCAGAGCGG GGGGCTCCAC CCAGCACCTT
 CAAAGGGACA
 3721 CCTACGGCAG AGAACCCAGA GTACCTGGGT CTGGACGTGC CAGTGTGA

10

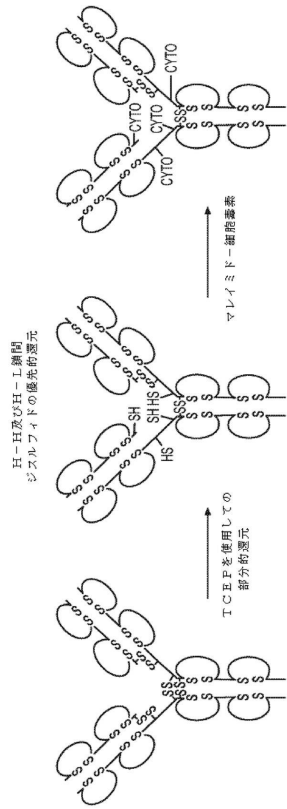
20

30

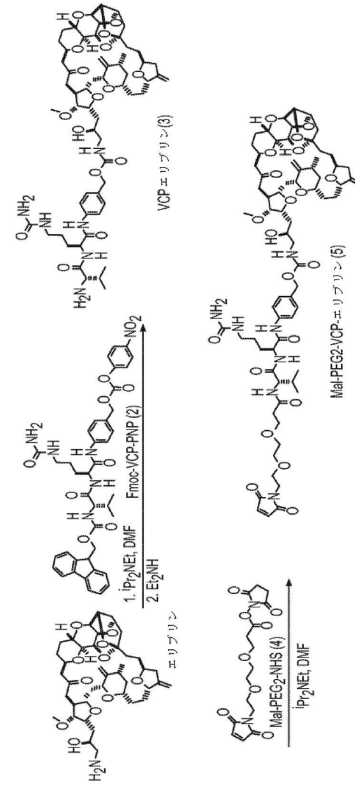
40

50

【図面】
【図 1】



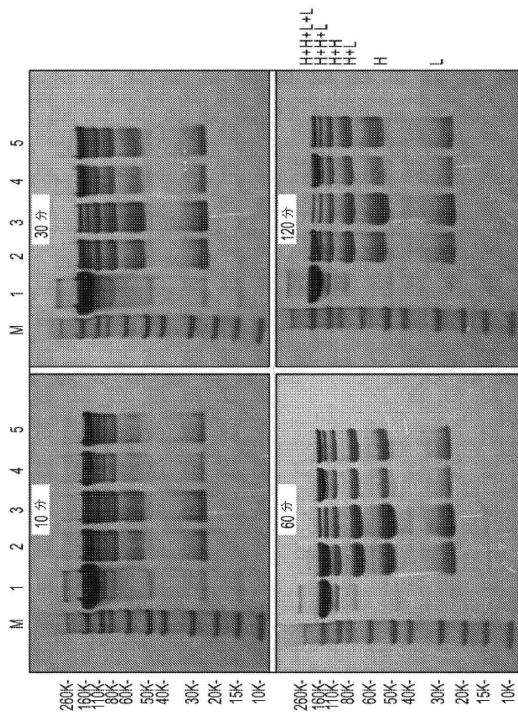
【図 2】



10

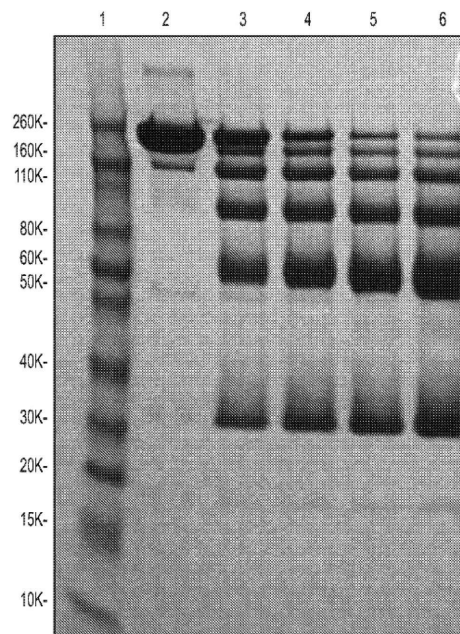
20

【図 3】



30

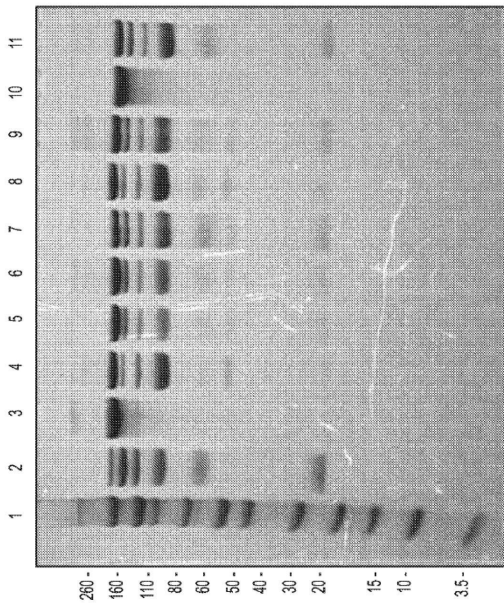
【図 4】



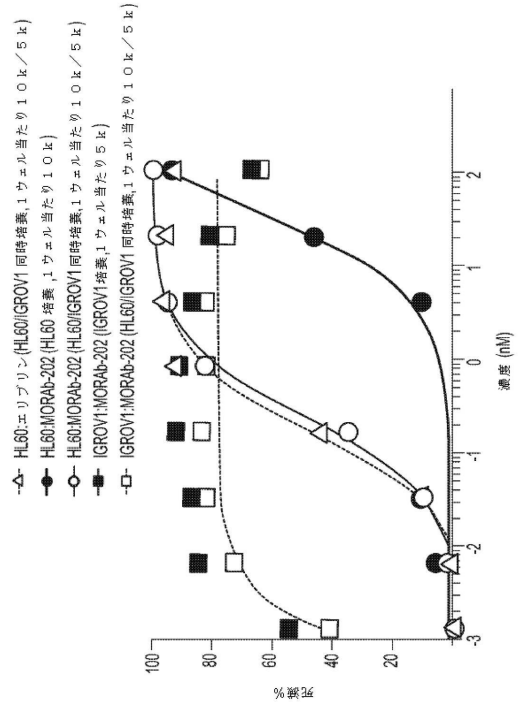
40

50

【図 5】



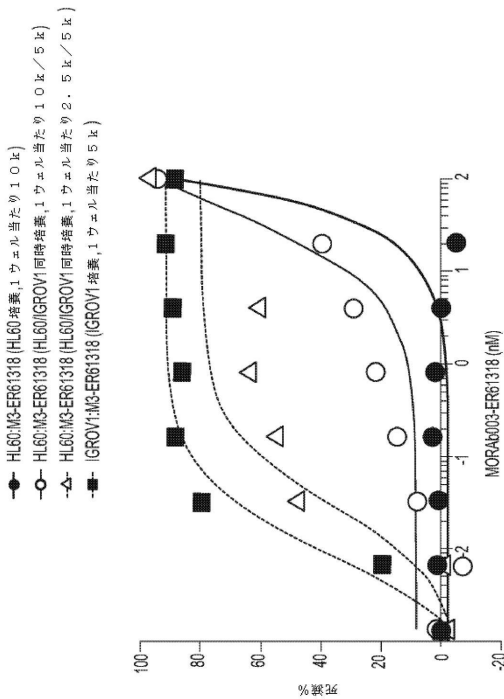
【図 6 A】



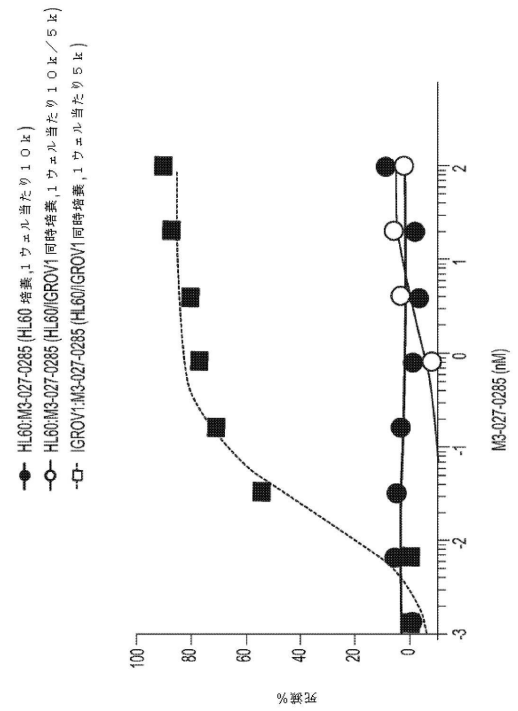
10

20

【図 6 B】



【図 6 C】

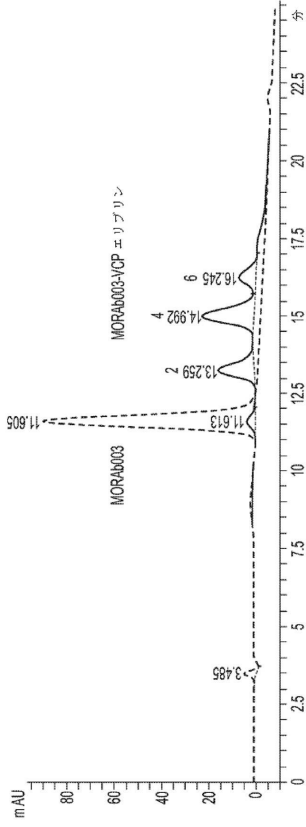


30

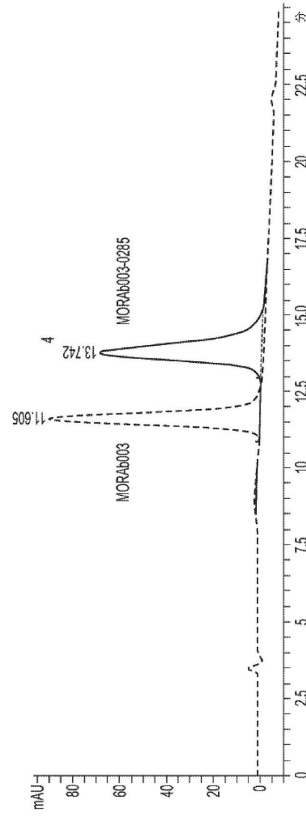
40

50

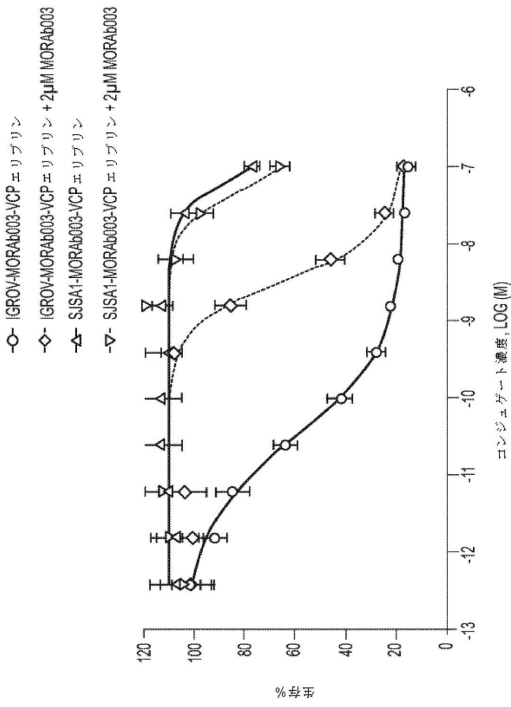
【 図 7 A 】



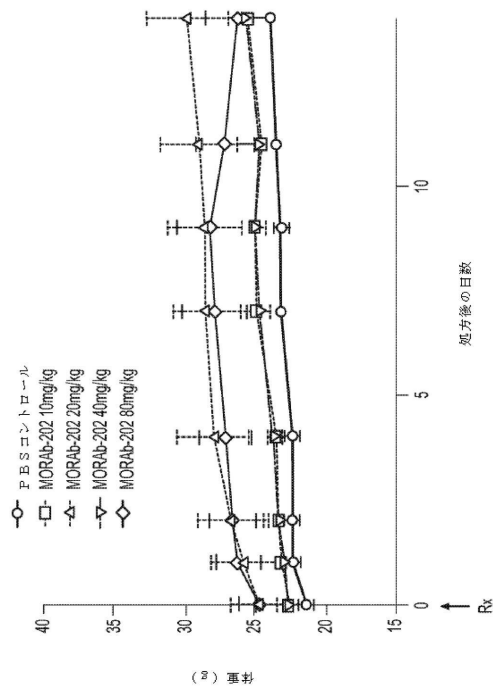
【 図 7 B 】



【 図 8 】



【 図 9 】



10

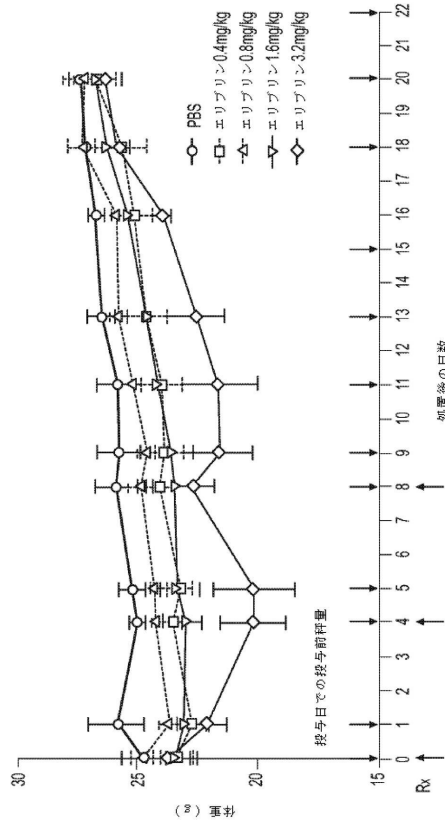
20

30

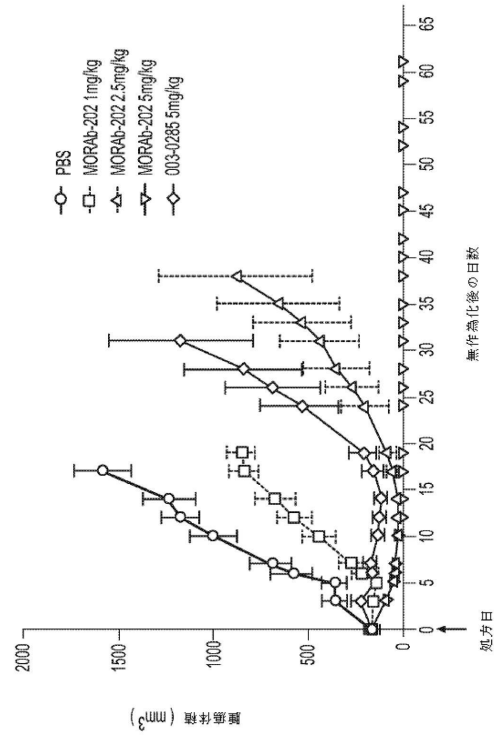
40

50

【図 1 0】



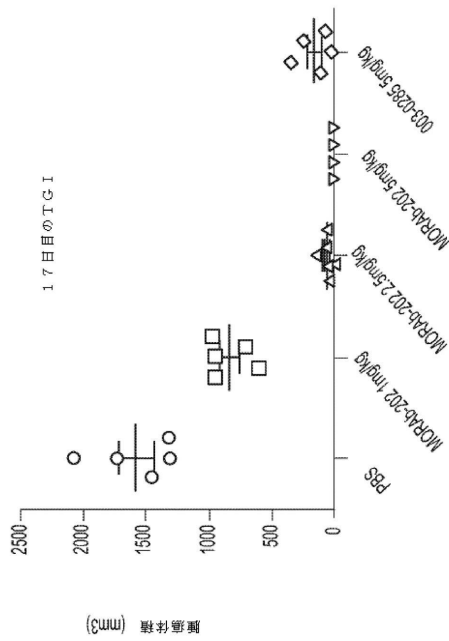
【図 1 1】



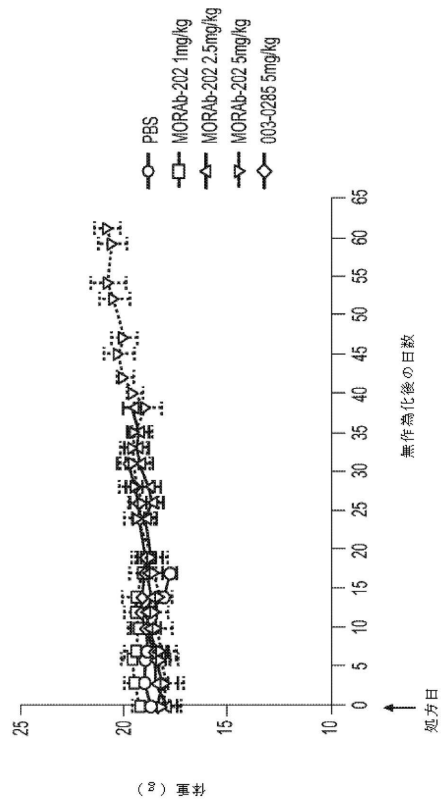
10

20

【図 1 2】



【図 1 3】

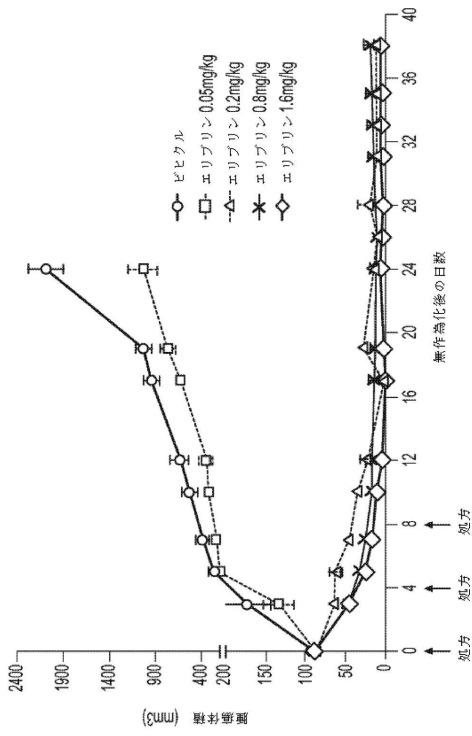


30

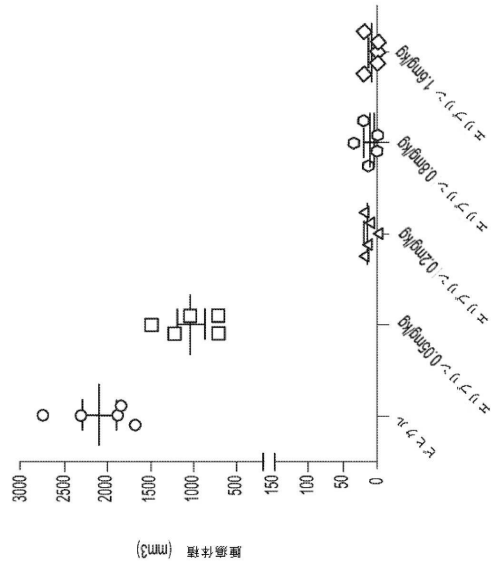
40

50

【図 14】



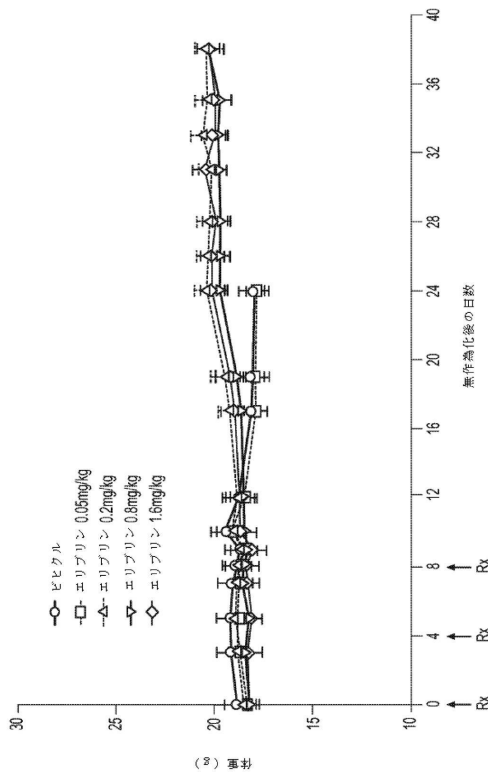
【図 15】



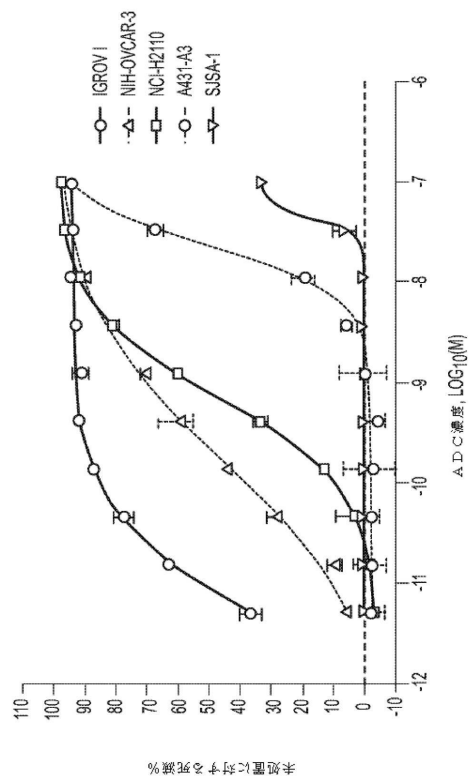
10

20

【図 16】



【図 17】

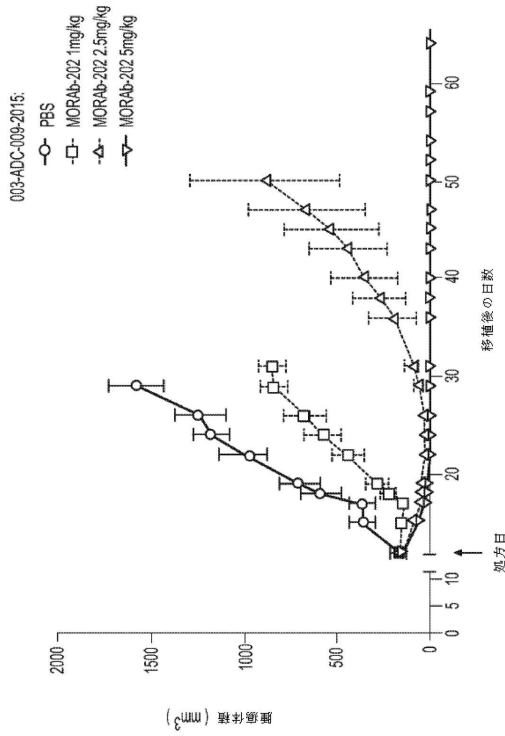


30

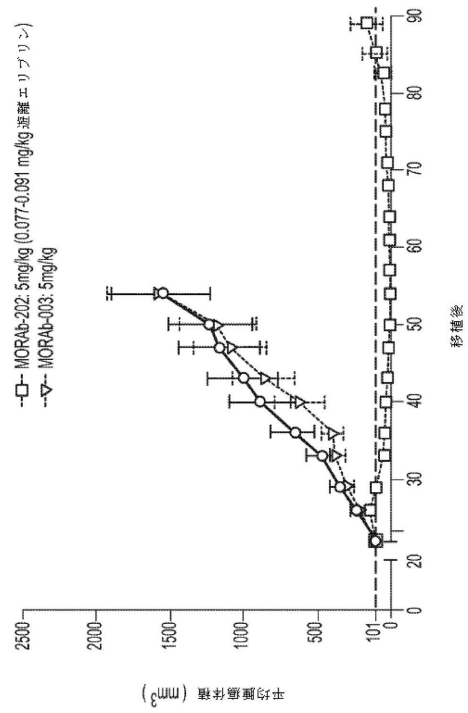
40

50

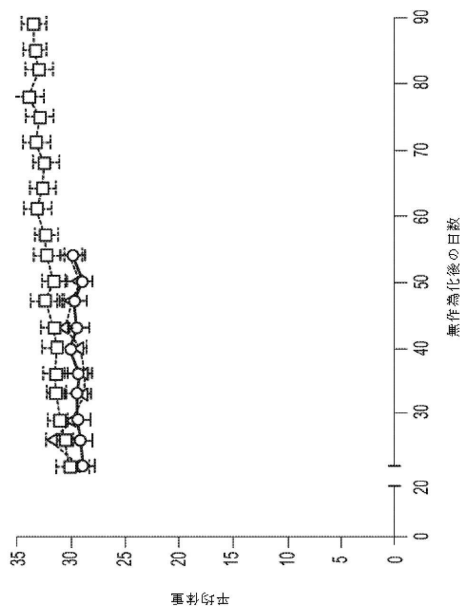
【図 18】



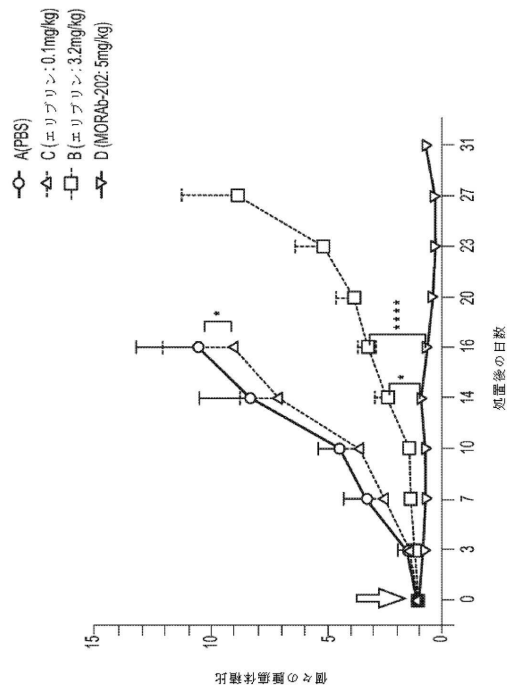
【図 19 A】



【図 19 B】



【図 20 A】



10

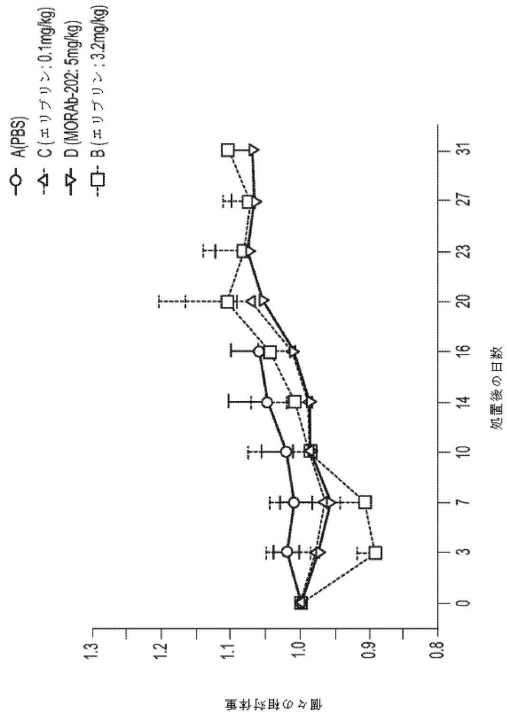
20

30

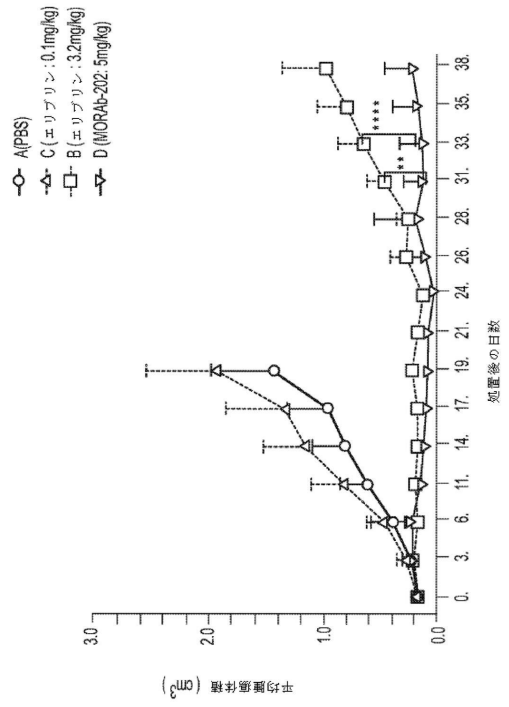
40

50

【 図 2 0 B 】



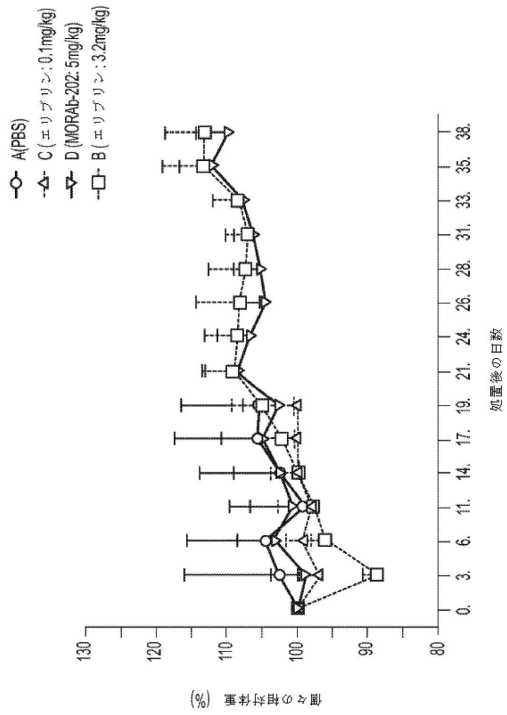
【 図 2 0 C 】



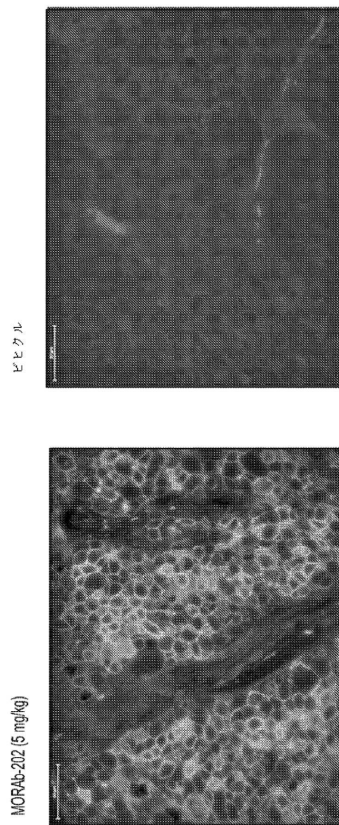
10

20

【 図 2 0 D 】



【 図 2 1 A 】

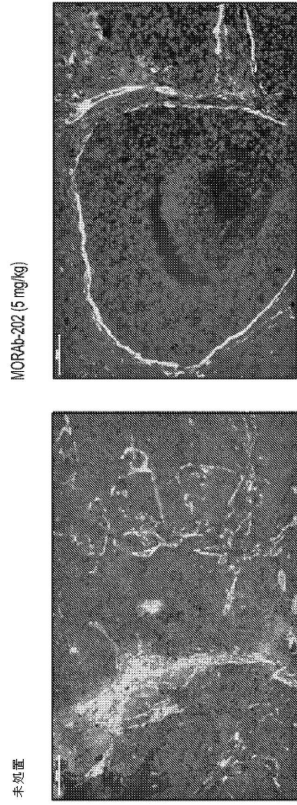


30

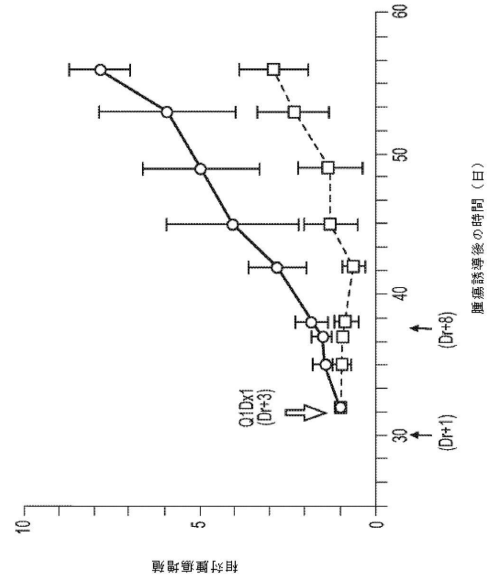
40

50

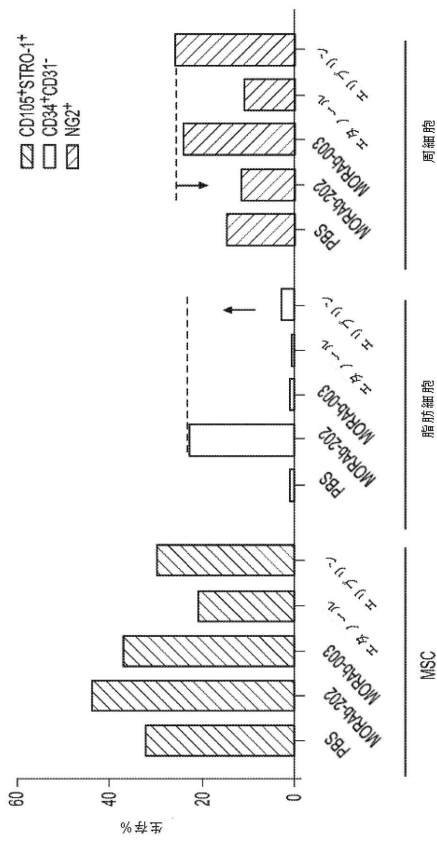
【図 2 1 B】



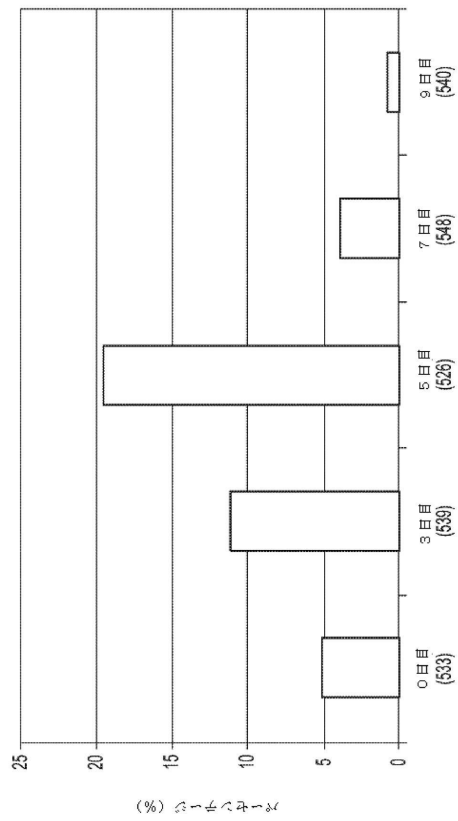
【図 2 1 C】



【図 2 2】



【図 2 3】



10

20

30

40

50

【配列表】

0007254861000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I
A 6 1 K 39/395 T
C 0 7 K 16/30

- (72)発明者 アメリカ合衆国, ペンシルベニア州, ウォーリングフォード, セイブルック レーン 3 7 3
カスター, ダニエル, ダブリュ.
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州, ノース アンドーバー, ピーチツリー レーン 1 0 5
(72)発明者 古内 恵司
アメリカ合衆国, ペンシルベニア州, ウインウッド, ウエスト ウインウッド ロード 1 2 1
9, ユニット 1 0 1
(72)発明者 リー, ジン
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州, アンドーバー, リンカーン サークル イースト 4 0
(72)発明者 マジャムダー, ウトバル
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州, アンドーバー, ハイ プレイン ロード 1 3 7
(72)発明者 上仲 俊光
アメリカ合衆国, ペンシルベニア州, ウエスト チェスター, サウス マットラック ストリート
8 9 0, # 3 3 3

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 4 / 2 0 2 7 7 5 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 5 / 1 1 5 6 5 6 (W O , A 1)
特表 2 0 1 4 - 5 0 8 1 6 5 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 3 / 1 3 0 0 9 3 (W O , A 1)
日薬理誌, 2011年, Vol.138, pp.209-217
Clin Cancer Res, 2009年, Vol.15, No.12, pp.3903-3905
Drug Delivery System, 2015年, Vol.30, No.3, pp.247-250
Cancer Res, 2011年, Vol.71, No.2, pp.496-505
Bioconjugate Chem., 2015年, Vol.27, pp.238-246
Pharm Res, 2015年, Vol.32, No.11, pp.3526-3540
Journal of Controlled Release, 2012年, Vol.160, No.3, pp.618-629

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2
A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9
A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0
A 6 1 P 3 5 / 0 0
C 0 7 K 1 6 / 3 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)