

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7043425号  
(P7043425)

(45)発行日 令和4年3月29日(2022.3.29)

(24)登録日 令和4年3月18日(2022.3.18)

(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

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

C

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

L

C 0 7 D 407/12 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 52 (全114頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-563547(P2018-563547)

(86)(22)出願日 平成29年6月5日(2017.6.5)

(65)公表番号 特表2019-527673(P2019-527673  
A)

(43)公表日 令和1年10月3日(2019.10.3)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/035925

(87)国際公開番号 WO2017/214024

(87)国際公開日 平成29年12月14日(2017.12.14)

審査請求日 令和2年5月28日(2020.5.28)

(31)優先権主張番号 62/346,024

(32)優先日 平成28年6月6日(2016.6.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 509012625

ジェネンテック, インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ  
ス サンフランシスコ ディーエヌエー  
ウェイ 1

(74)代理人 110002077

園田・小林特許業務法人

(72)発明者

ピロー, トーマス  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 940  
80, サウス サンフランシスコ, デ  
ィーエヌエー ウェイ 1, シー/オー  
ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者

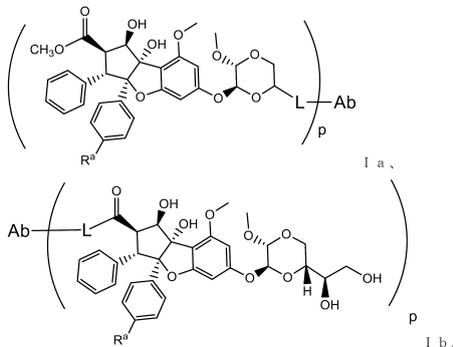
ボルソン, アンドリュー ジー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 940  
80, サウス サンフランシスコ, デ  
ィーエヌエー ウェイ 1, シー/オー  
ジェネンテック, インコーポレイテッド  
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 シルベストロール抗体 - 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】

式 I a 及び I b から選択される、リンカーを通してシルベストロール薬物部分に共有結合した抗体を含む抗体 - 薬物コンジュゲート化合物、

またはその薬学的に許容される塩であって、  
式中、R a が、CH<sub>3</sub>O、CN、NO<sub>2</sub>、及びCl から選択される基であり、

L が、リンカーであり、

p が、1 ~ 8 の整数であり、

A b が、1つ以上の腫瘍関連抗原または細胞表面受容体に結合する抗体である、抗体 - 薬物コンジュゲート化合物またはその薬学的に許容される塩。

【請求項2】

- 1つ以上の腫瘍関連抗原または細胞表面受容体が、(1) ~ (53)、
- (1) BMPR1B (骨形成タンパク質受容体IB型)、
  - (2) E16 (LAT1、SLC7A5)、
  - (3) STEAP1 (前立腺の6回膜貫通上皮抗原)、
  - (4) MUC16 (0772P、CA125)、
  - (5) MPF (MPF、MSLN、SMR、巨核球増強因子、メソテリン)、
  - (6) Napi2b (NAPI-3B、NPTIIB、SLC34A2、溶質輸送体ファミリー34 (リン酸ナトリウム)、メンバー2、II型ナトリウム依存性リン酸輸送体3b)、
  - (7) Sema5b (FLJ10372、KIAA1445、Mm.42015、SEMA5B、SEMAG、セマフォリン5b Hlog、セマドメイン、7回トロンボスポンジン反復(1型及び1型様)、膜貫通ドメイン(TM)、ならびに短い細胞質ドメイン、(セマフォリン)5B)、
  - (8) PSCA hlg (2700050C12Rik、C530008O16Rik、RIKEN cDNA 2700050C12、RIKEN cDNA 2700050C12遺伝子)、
  - (9) ETBR (エンドセリンB型受容体)、
  - (10) MSG783 (RNF124、仮説上のタンパク質FLJ20315)、
  - (11) STEAP2 (HGNC\_8639、IPCA-1、PCANAP1、STAMP1、STEAP2、STMP、前立腺癌関連遺伝子1、前立腺癌関連タンパク質1、前立腺の6回膜貫通上皮抗原2、6回膜貫通前立腺タンパク質)、
  - (12) TrpM4 (BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B、一過性受容体電位カチオンチャネル、サブファミリーM、メンバー4)、
  - (13) CRIPTO (CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、奇形癌種由来の成長因子)、
  - (14) CD21 (CR2 (補体受容体2) またはC3DR (C3d / エプスタイン・バーウイルス受容体) またはHs73792)、
  - (15) CD79b (CD79B、CD79、IGb (免疫グロブリン関連ベータ)、B29)、
  - (16) FcRH2 (IFGP4、IRTA4、SPAP1A (SH2ドメイン含有ホスファターゼアンカータンパク質1a)、SPAP1B、SPAP1C)、
  - (17) HER2、
  - (18) NCA、
  - (19) MDP、
  - (20) IL20R、
  - (21) プレビカン、
  - (22) EphB2R、
  - (23) ASLG659、
  - (24) PSCA、
  - (25) GEDA、
  - (26) BAFF-R (B細胞活性化因子受容体、BlyS受容体3、BR3)、
  - (27) CD22 (B細胞受容体CD22 - Bアイソフォーム)、
  - (28) CD79a (CD79A、CD79、免疫グロブリン関連アルファ)、
  - (29) CXCR5 (パーキットリンパ腫受容体1)、
  - (30) HLA-DOB (MHCクラスII分子のベータサブユニット(Ia抗原))、
  - (31) P2X5 (プリン受容体P2Xリガンド開口型イオンチャネル5)、
  - (32) CD72 (B細胞分化抗原CD72、Lyb-2)、

- (33) LY64 (リンパ球抗原64 (RP105)、ロイシンリッチ反復 (LRR) ファミリーのI型膜タンパク質)、
- (34) FcRH1 (Fc受容体様タンパク質1)、
- (35) FcRH5 (IRTA2、免疫グロブリンスーパーファミリー受容体転位関連2)、
- (36) TENB2 (推定上の膜貫通プロテオグリカン)、
- (37) PMEL17 (silver相同体、SILV、D12S53E、PMEL17、SI、SIL)、
- (38) TMEFF1 (EGF様ドメイン及び2つのフォリスタチン様ドメインを有する膜貫通タンパク質1、トモレグリン-1)、
- (39) GDNF-Ra1 (GDNFファミリー受容体アルファ1、GFRA1、GDNFR、GDNFRA、RETL1、TRNR1、RET1L、GDNFR-アルファ1、GFR-ALPHA-1)、
- (40) Ly6E (リンパ球抗原6複合体、遺伝子座E、Ly67、RIG-E、SCA-2、TSA-1)、
- (41) TME46 (shisa相同体2 (Xenopus laevis)、SHISA2)、
- (42) Ly6G6D (リンパ球抗原6複合体、遺伝子座G6D、Ly6-D、MEGT1)、
- (43) LGR5 (ロイシンリッチ反復含有Gタンパク質結合型受容体5、GPR49、GPR67)、
- (44) RET (retがん原遺伝子、MEN2A、HSCR1、MEN2B、MTC1、PTC、CDHF12、Hs.168114、RET51、RET-ELE1)、
- (45) LY6K (リンパ球抗原6複合体、遺伝子座K、LY6K、HSJ001348、FLJ35226)、
- (46) GPR19 (Gタンパク質結合型受容体19、Mm.4787)、
- (47) GPR54 (KISS1受容体、KISS1R、GPR54、HOT7T175、AXOR12)、
- (48) ASPHD1 (アスパラギン酸ベータ-ヒドロキシラーゼドメイン含有1、LOC253982)、
- (49) チロシナーゼ (TYR、OCAIA、OCA1A、チロシナーゼ、SHEP3)、
- (50) TME118 (ringフィンガータンパク質、膜貫通2、RNFT2、FLJ14627)、
- (51) GPR172A (Gタンパク質結合型受容体172A、GPCR41、FLJ11856、D15Ert747e)、
- (52) CD33、ならびに
- (53) CLL-1から選択される、請求項1に記載の抗体-薬物コンジュゲート化合物。
- 【請求項3】**  
Abが、抗HER2 4D5、抗CD22、抗CD33、抗Ly6E、抗Napi3b、抗HER2 7C2、及び抗CLL-1から選択される、請求項2に記載の抗体-薬物コンジュゲート化合物。
- 【請求項4】**  
Abが、システイン操作された抗体である、請求項1に記載の抗体-薬物コンジュゲート化合物。
- 【請求項5】**  
前記システイン操作された抗体が、HC A118C、LC K149C、HC A140C、LC V205C、LC S121C、及びHC L177Cから選択される変異体である、請求項4に記載の抗体-薬物コンジュゲート化合物。
- 【請求項6】**  
Lが、式、

10

20

30

40

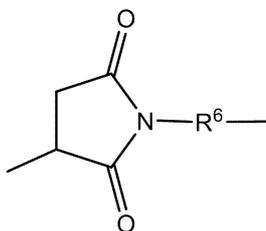
50

- S t r - P M - Y -

を有する、プロテアーゼ - 切断可能な非ペプチドリンカーであり、  
式中、S t r が、前記抗体に共有結合したストレッチャー単位であり、P M が、ペプチド  
ミメティック単位であり、Y が、前記シルベストロール薬物部分に共有結合したスパーサ  
ー単位である、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

【請求項 7】

S t r が、式、



10

を有し、

式中、R<sup>6</sup> が、C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>アルキレン、C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>アルキレン - C(=O)、C<sub>1</sub> -  
C<sub>12</sub>アルキレン - NH、(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>、(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub> - C(=O)、  
(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub> - CH<sub>2</sub>、及びC<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>アルキレン - NHC(=O)CH<sub>2</sub>C  
H(チオフェン - 3 - イル)からなる群から選択され、r が、1 ~ 10の範囲の整数であ  
る、請求項 6 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

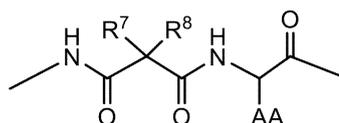
20

【請求項 8】

R<sup>6</sup> が、(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>である、請求項 7 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

【請求項 9】

P M が、式、



30

を有し、

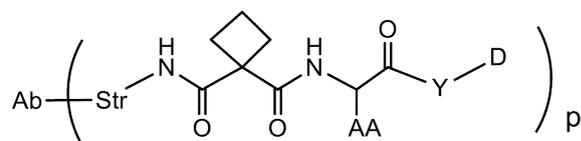
式中、R<sup>7</sup> 及びR<sup>8</sup> が一緒になって、C<sub>3</sub> - C<sub>7</sub>シクロアルキル環を形成し、  
AA が、H、- CH<sub>3</sub>、- CH<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)、- CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-  
CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>、- CHCH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub>、及び- CH<sub>2</sub>  
CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)NH<sub>2</sub>から選択されるアミノ酸側鎖である、請求項 6 に記載の  
抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

【請求項 10】

Y が、パラ - アミノベンジルまたはパラ - アミノベンジロキシカルボニルを含む、請求  
項 6 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

【請求項 11】

式、



40

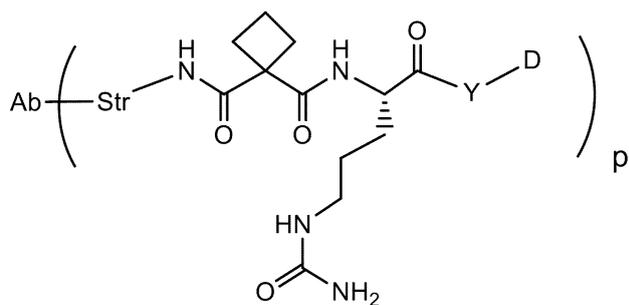
を有し、

式中、D が、前記シルベストロール薬物部分である、請求項 9 に記載の抗体 - 薬物コンジ  
ュゲート化合物。

50

## 【請求項 1 2】

式、

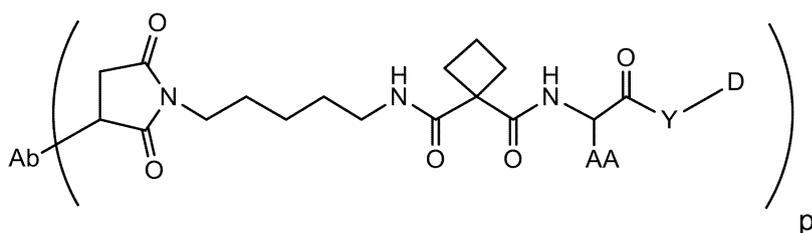


10

を有する、請求項 1 1 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

## 【請求項 1 3】

式、

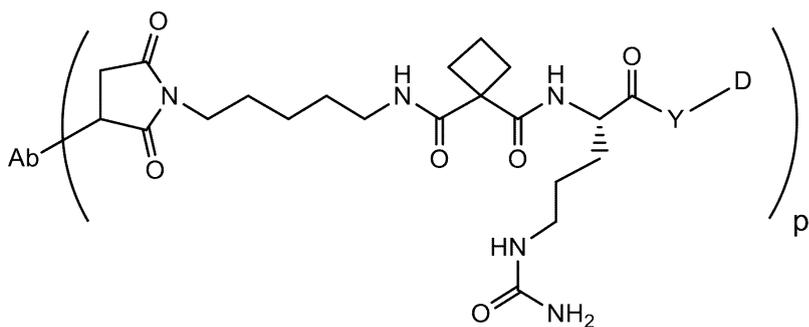


20

を有する、請求項 1 1 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

## 【請求項 1 4】

式、



30

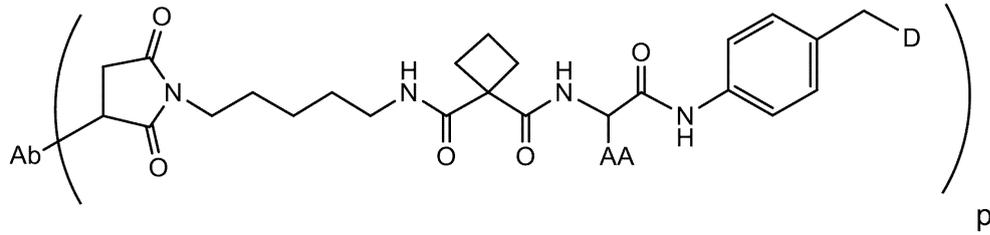
を有する、請求項 1 3 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

## 【請求項 1 5】

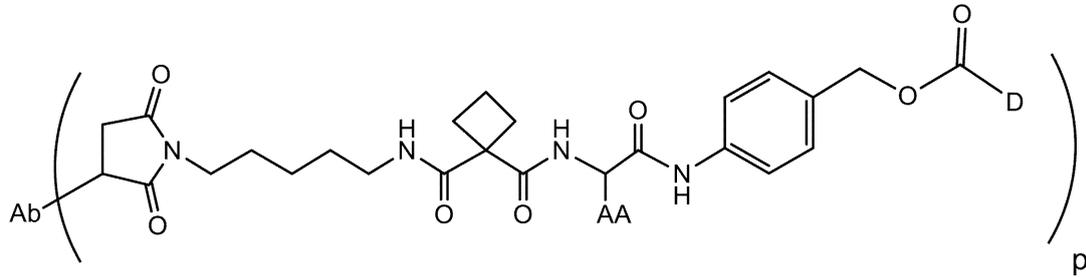
式、

40

50



及び



から選択される、請求項 1 3 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

【請求項 1 6】

L が、式、

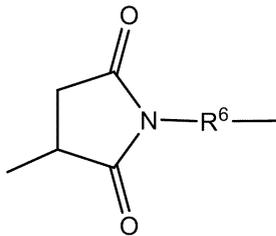
- S t r - P e p - Y -

を有するペプチドリinkerであり、

式中、S t r が、前記抗体に共有結合したストレッチャー単位であり、P e p が、2 ~ 12 個のアミノ酸残基のペプチドであり、Y が、前記シルベストロール薬物部分に共有結合したスペーサー単位である、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

【請求項 1 7】

S t r が、式、



を有し、

式中、R<sup>6</sup> が、C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> アルキレン、C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> アルキレン - C(=O)、C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> アルキレン - NH、(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>、(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub> - C(=O)、(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub> - CH<sub>2</sub>、及び C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> アルキレン - NHC(=O)CH<sub>2</sub>CH(チオフェン - 3 - イル) からなる群から選択され、r が、1 ~ 10 の範囲の整数である、請求項 1 6 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

【請求項 1 8】

R<sup>6</sup> が、(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> である、請求項 1 7 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

【請求項 1 9】

P e p が、グリシン、アラニン、フェニルアラニン、リジン、アルギニン、バリン、及びシトルリンから独立して選択される 2 ~ 12 個のアミノ酸残基を含む、請求項 1 6 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

【請求項 2 0】

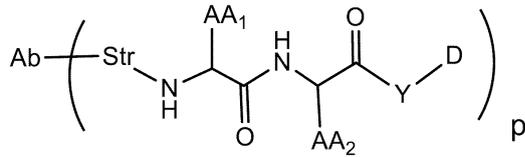
P e p が、バリン - シトルリン、アラニン - フェニルアラニン、及びフェニルアラニン - リジンから選択される、請求項 1 9 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

## 【請求項 2 1】

Y が、パラ - アミノベンジルまたはパラ - アミノベンジルオキシカルボニルを含む、請求項 1 6 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

## 【請求項 2 2】

式、

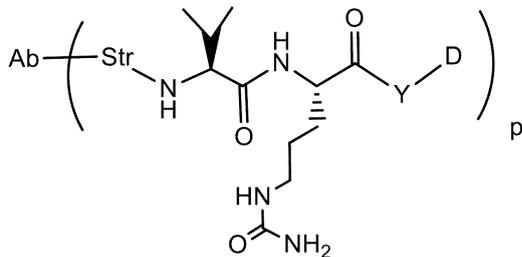


10

を有し、AA<sub>1</sub> 及び AA<sub>2</sub> が各々、H、-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>、-CHCH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub>、及び -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)NH<sub>2</sub> から独立して選択されるアミノ酸側鎖である、請求項 1 9 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

## 【請求項 2 3】

式、

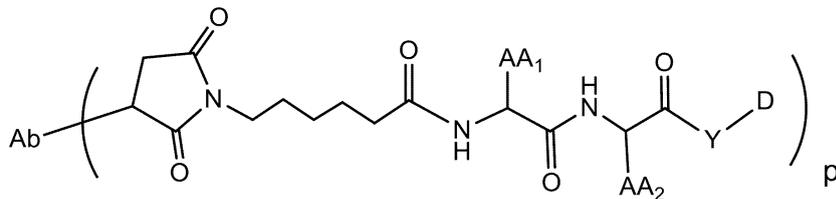


20

を有する、請求項 2 2 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

## 【請求項 2 4】

式、

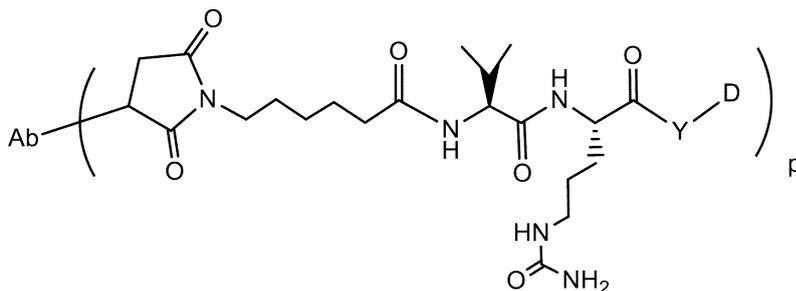


30

を有する、請求項 2 2 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

## 【請求項 2 5】

式、



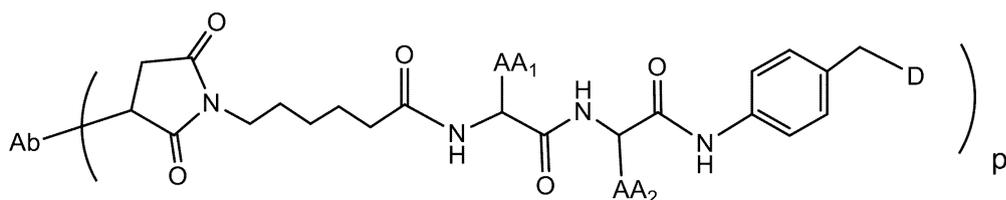
40

を有する、請求項 2 4 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

50

## 【請求項 26】

式、

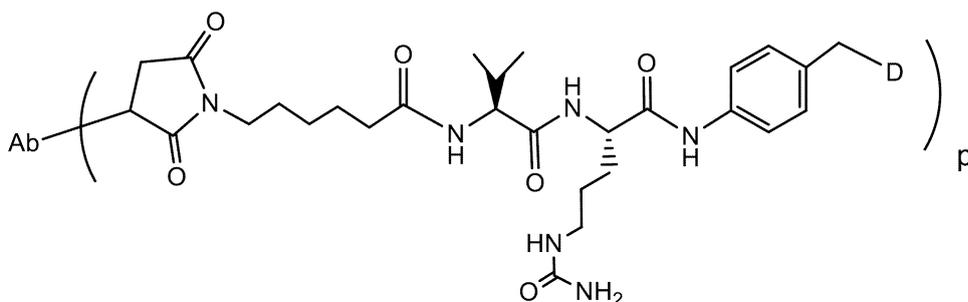


を有する、請求項 22 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

10

## 【請求項 27】

式、

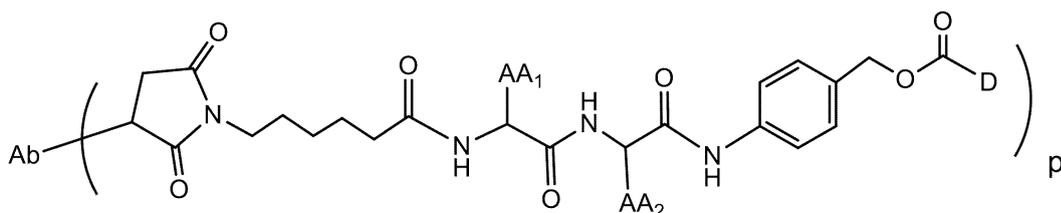


20

を有する、請求項 26 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

## 【請求項 28】

式、

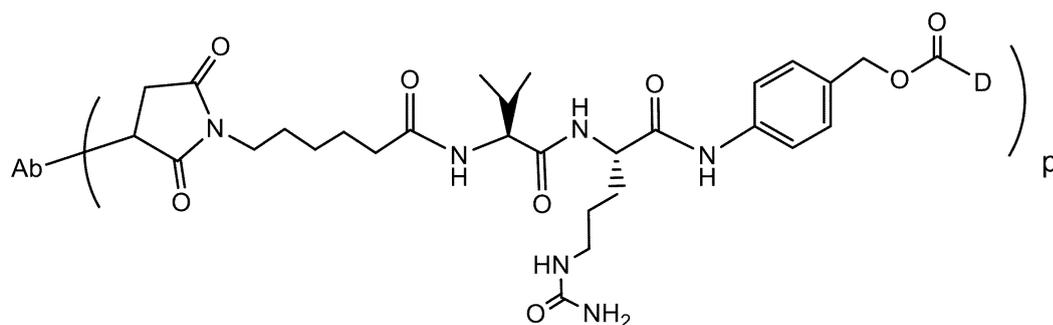


30

を有する、請求項 22 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

## 【請求項 29】

式、



40

を有する、請求項 28 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

## 【請求項 30】

L が、ジスルフィド基を含む、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

50

## 【請求項 3 1】

p が、1、2、3、または4である、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

## 【請求項 3 2】

前記抗体 - 薬物コンジュゲート化合物の混合物を含み、前記抗体 - 薬物コンジュゲート化合物の混合物中の 1 抗体当たりの平均薬物負荷が、約 2 ~ 約 5 である、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物。

## 【請求項 3 3】

請求項 1 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物と、薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤と、を含む、薬学的組成物。

## 【請求項 3 4】

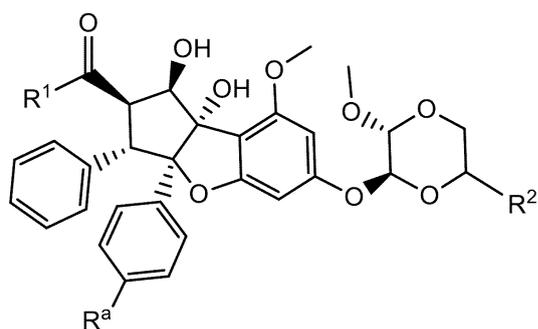
哺乳動物におけるがんの治療のための医薬品の製造における、請求項 1 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物の使用。

## 【請求項 3 5】

請求項 1 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物を含む、がんを治療するための医薬。

## 【請求項 3 6】

式 I I、



I I

のシルベストロール - リンカー中間体化合物であって、  
式中、

R<sup>a</sup> が、CH<sub>3</sub>O、CN、NO<sub>2</sub>、及びC<sub>1</sub>から選択される基であり、

R<sup>1</sup> が、-OCH<sub>3</sub>及びL-Xから選択され、

R<sup>2</sup> が、-CH(OH)CH<sub>2</sub>OH及びL-Xから選択され、

Lが、リンカーであり、

Xが、マレイミド、チオール、アミノ、臭化物、プロモアセトアミド、ヨードアセトアミド、p-トルエンスルホン酸、ヨウ化物、ヒドロキシル、カルボキシル、ピリジルジスルフィド、及びN-ヒドロキシスクシンイミドから成る群から選択される反応性官能基を含む、前記シルベストロール - リンカー中間体化合物。

## 【請求項 3 7】

L-Xが、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-X、-CH<sub>2</sub>CR<sub>2</sub>-X、-C(O)NRCH<sub>2</sub>-X、-CH<sub>2</sub>O-X、-CH<sub>2</sub>N(R)-X、-N(R)-X、-N(R)(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルキレン)-X、-N(R)(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>アルケニレン)-X、-N(R)(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>アルキニレン)-X、及び-N(R)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-Xから選択され、

nが、1~6であり、

Rが独立して、H、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルキル、及びC<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>アリールから選択されるか、または2つのRが、C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>炭素環状環を形成し、

アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アルキル、及びアリールが、F、Cl、Br、N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、及びOCH<sub>3</sub>から選択される1つ以上の基で任意で置換される、請求項 3 6 に記載のシルベストロール - リンカー中間体化合物。

## 【請求項 3 8】

アルキレンが、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-

10

20

30

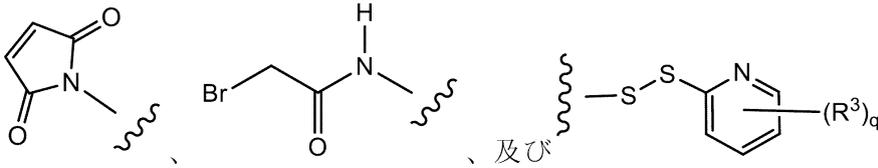
40

50

、及び - C ( C H 3 ) 2 C H 2 - から選択される、請求項 3 7 に記載のシルベストロール - リンカー - 中間体化合物。

【請求項 3 9】

X が、



から選択され、

式中、波線が、L への結合を示し、

R 3 が、NO 2、Cl、F、CN、または Br であり、q が、0、1、または 2 である、請求項 3 6 に記載のシルベストロール - リンカー - 中間体化合物。

【請求項 4 0】

R a が、- O C H 3 である、請求項 3 6 に記載のシルベストロール - リンカー - 中間体化合物。

【請求項 4 1】

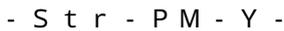
R 1 が、- O C H 3 であり、R 2 が、L - X である、請求項 3 6 に記載のシルベストロール - リンカー - 中間体化合物。

【請求項 4 2】

R 1 が、L - X であり、R 2 が、- C H ( O H ) C H 2 O H である、請求項 3 6 に記載のシルベストロール - リンカー - 中間体化合物。

【請求項 4 3】

L が、式、



を有する、プロテアーゼ - 切断可能な非ペプチドリリンカーであり、

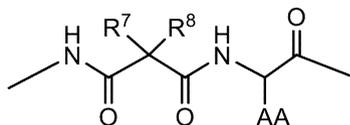
式中、S t r が、X に共有結合したストレッチャー単位であり、P M が、ペプチドミメティック単位であり、Y が、前記シルベストロール薬物部分に共有結合したスペーサー単位である、請求項 3 6 に記載のシルベストロール - リンカー - 中間体化合物。

【請求項 4 4】

S t r が、( C H 2 ) 5 である、請求項 4 3 に記載のシルベストロール - リンカー - 中間体化合物。

【請求項 4 5】

P M が、式、



を有し、

式中、R 7 及び R 8 が一緒になって、C 3 - C 7 シクロアルキル環を形成し、

AA が、H、- C H 3、- C H 2 ( C 6 H 5 )、- C H 2 C H 2 C H 2 C H 2 N H 2、- C H 2 C H 2 C H 2 N H C ( N H ) N H 2、- C H C H ( C H 3 ) C H 3、及び - C H 2 C H 2 C H 2 N H C ( O ) N H 2 から選択されるアミノ酸側鎖である、請求項 4 3 に記載のシルベストロール - リンカー - 中間体化合物。

【請求項 4 6】

R 7 及び R 8 が一緒になって、シクロブチルを形成する、請求項 4 5 に記載のシルベストロール - リンカー - 中間体化合物。

【請求項 4 7】

10

20

30

40

50

Y が、パラ - アミノベンジルまたはパラ - アミノベンジルオキシカルボニルを含む、請求項 43 に記載のシルベストロール - リンカー中間体化合物。

【請求項 48】

L が、式、

- S t r - P e p - Y -

を有するペプチドリンカーであり、

式中、S t r が、前記抗体に共有結合したストレッチャー単位であり、P e p が、2 ~ 12 個のアミノ酸残基のペプチドであり、Y が、前記シルベストロール薬物部分に共有結合したスペーサー単位である、請求項 36 に記載のシルベストロール - リンカー中間体化合物。

10

【請求項 49】

S t r が、( C H 2 ) 5 である、請求項 48 に記載のシルベストロール - リンカー中間体化合物。

【請求項 50】

P e p が、グリシン、アラニン、フェニルアラニン、リジン、アルギニン、バリン、及びシトルリンから独立して選択される 2 個のアミノ酸残基を含む、請求項 48 に記載のシルベストロール - リンカー中間体化合物。

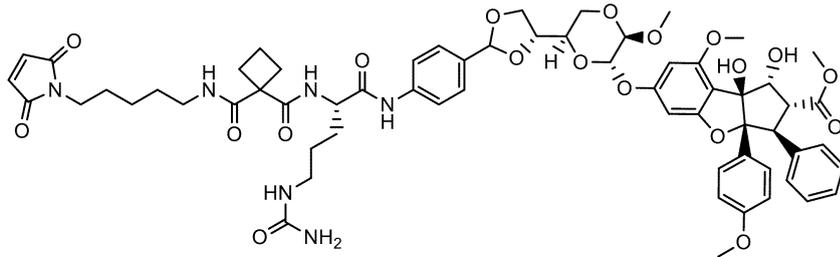
【請求項 51】

20

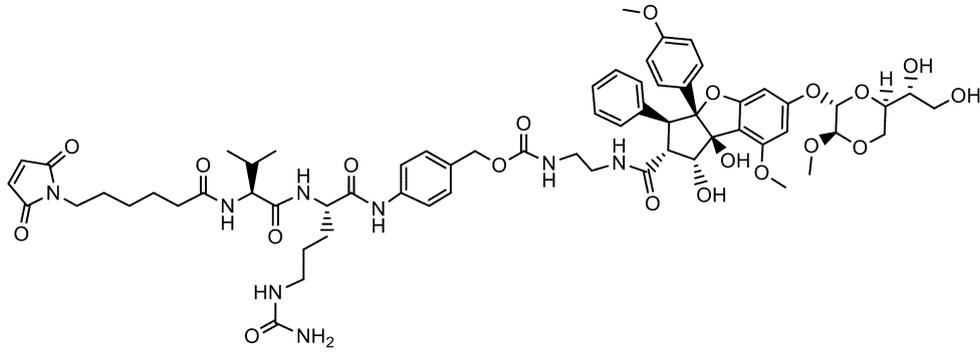
30

40

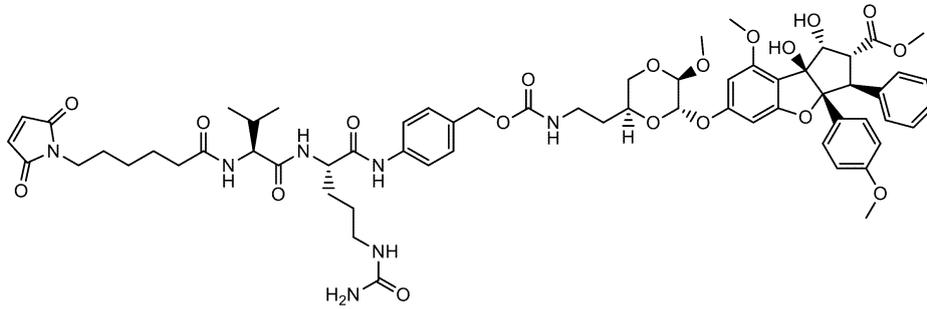
50



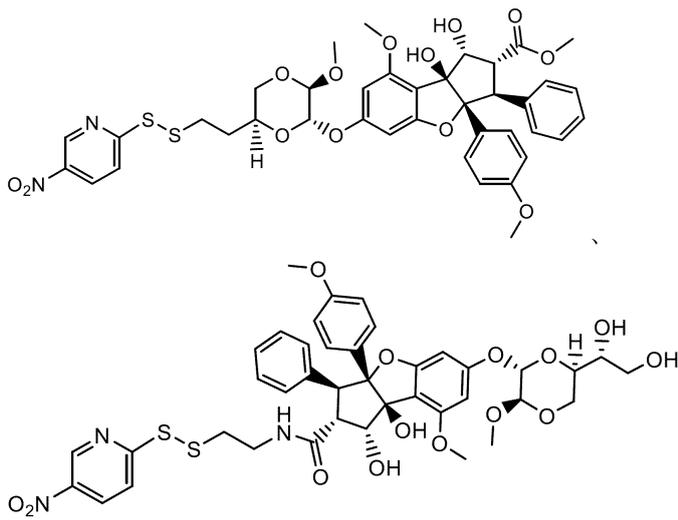
10



20

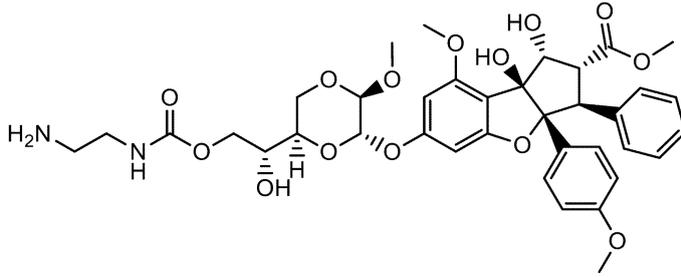


30

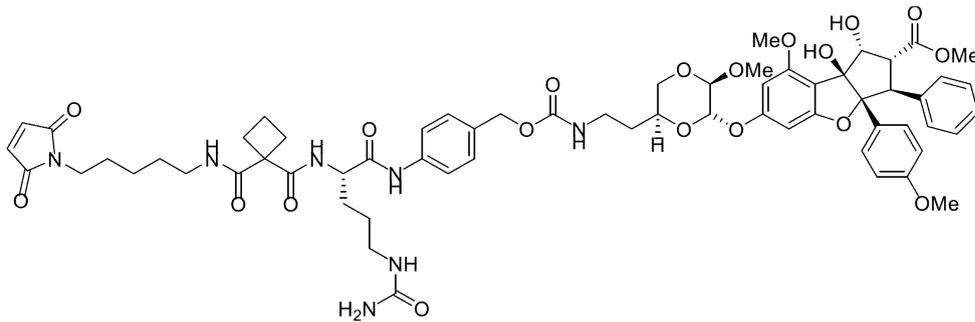
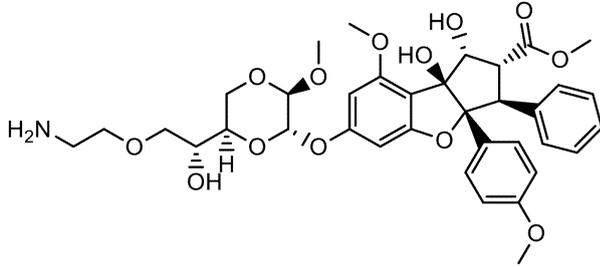


40

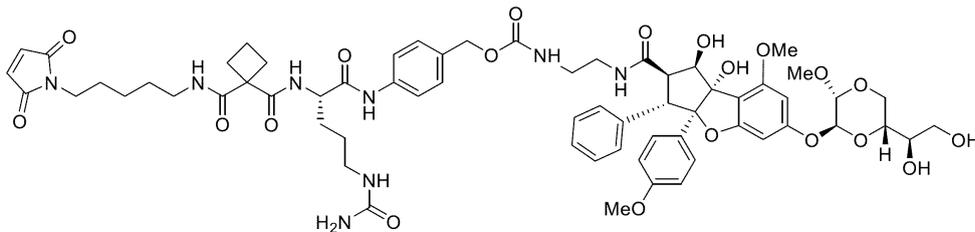
50



10

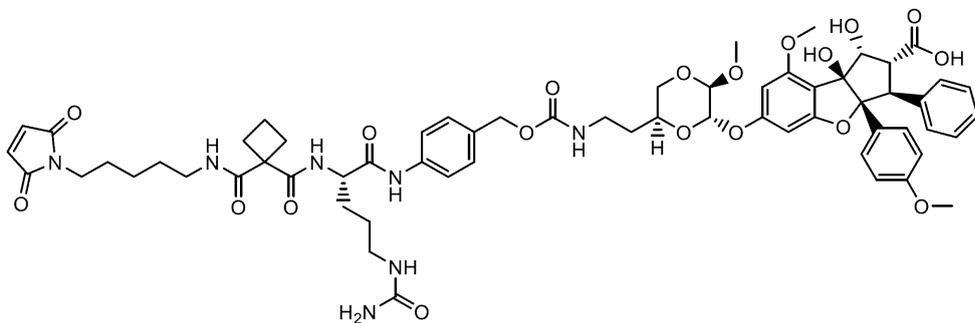


20



30

、及び



40

から選択される、請求項 3 6 に記載のシルベストロール - リンカー中間体化合物。

【請求項 5 2】

請求項 1 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート化合物を作製する方法であって、抗体を、請求項 3 6 に記載の式 I I のシルベストロール - リンカー中間体化合物と反応させることを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

50

米国特許法施行規則 1.53 (b) 条の下に出願されたこの正規の出願は、米国特許法 119 (e) 条の下、2016年6月6日出願の米国仮特許出願第62/346024号の利益を主張し、その全体が参照によって組み込まれる。

【0002】

本発明の分野は一般に、1つ以上のシルベストロール分子に直接コンジュゲートされた抗体を含む、抗体-薬物コンジュゲートに関する。

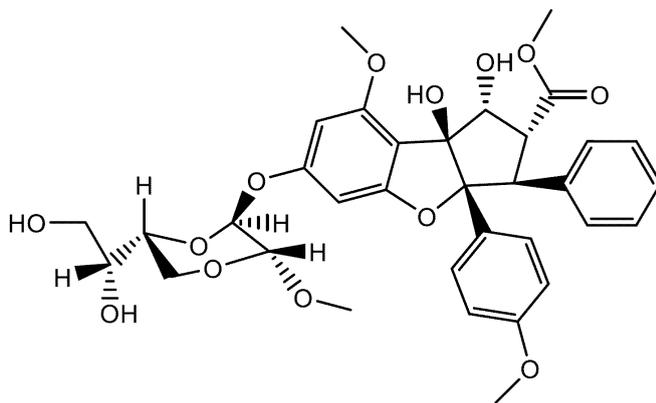
【背景技術】

【0003】

シルベストロール及びシルベストロール誘導体は、抗菌剤及び抗腫瘍剤のファミリーを指す (Lucas, D. M. et al (2009) Blood, 113, 4656-4666、Alinari, L. et al (2012) Clin. Cancer Res., 18, 4600-4611、Cencic, R., et al. (2009) PLoS One, 4, e5223、Hwang, B. Y. et al (2004) J. Org. Chem., 69:3350-3358、US6710075)。シルベストロール及び類似体は、強力かつ選択的なタンパク質合成阻害剤であり、それらの抗過剰増殖特性について研究されている (Liu, T. et al (2012) Journal of Medicinal Chemistry, 55 (20): 8859-8878、WO2015/085221、WO2013/016658、WO2004/041812、US8137509、US8404088、WO2006/007634、US7816544)。

【0004】

シルベストロール (CAS: 697235-38-4) は、メチル (1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - 6 - ((2S, 3R, 6R) - 6 - ((R) - 1, 2 - ジヒドロキシエチル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル) オキシ) - 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3a - (4 - メトキシフェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [b] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレートと称され、以下の構造を有する。



【0005】

ADCまたは免疫コンジュゲートとしても知られる抗体-薬物コンジュゲートは、強力な細胞毒性薬の標的を抗原発現腫瘍細胞に向け、それによりそれらの抗腫瘍活性を増強することによって、抗体と細胞毒性薬との両方の特性を組み合わせる標的化学療法分子である。所与の標的抗原のための抗体-薬物コンジュゲート開発の成功は、抗体の選択、リンカーの安定性、細胞毒性薬の効力、及びリンカー-薬物を抗体にコンジュゲートする様式を最適化することに依存する。より具体的には、選択的な抗体-薬物コンジュゲートは、(i) 抗体が標的抗原に対して十分な特異性を保持し、薬物の有効性が維持される、抗体-薬物コンジュゲート形成方法、(ii) 血液中での薬物放出、及び非標的細胞への随伴する損傷を制限するのに十分な抗体-薬物コンジュゲートの安定性、(iii) 治療細胞内抗体-薬物コンジュゲート濃度を達成するのに十分な細胞膜輸送効率 (エンドサイトーシ

ス)、(iv)治療薬物濃度を達成するのに十分な抗体-薬物コンジュゲートからの十分な細胞内薬物放出、ならびに(v)ナノモルまたはナノモル以下の量の薬物細胞毒性のうちの少なくとも1つ以上を特徴とする。

【0006】

抗体-薬物コンジュゲートによって、腫瘍に対して薬物部分の送達を標的とすることが可能となり、かついくつかの実施形態において、非コンジュゲート薬物の全身投与が、正常な細胞にとって許容できないレベルの毒性をもたらし得る場合に、腫瘍内の細胞内蓄積が可能となる(Polakakis P. (2005) *Current Opinion in Pharmacology* 5: 382 - 387)。

【0007】

抗体-薬物コンジュゲートは、強力な細胞毒性薬の標的を抗原発現腫瘍細胞に向け(Teicher, B. A. (2009) *Current Cancer Drug Targets* 9: 982 - 1004)、それにより有効性を最大化し、オフターゲット毒性を最小化することで治療指数を増強することによって、抗体及び細胞毒性薬の両方の特性を組み合わせる標的化学療法分子である(Carter, P. J. and Senter P. D. (2008) *The Cancer Jour.* 14(3): 154 - 169、Charl, R. V. (2008) *Acc. Chem. Res.* 41: 98 - 107)。

【0008】

操作されたシステインがコンジュゲーションに利用可能である部位でのシステイン置換を通して抗体への薬物の部位特異的コンジュゲーションを提供するが、免疫グロブリンの折り畳み及び組み立てを乱さないか、または抗原結合及びエフェクター機能を改変しない、抗体が開発されている(Junutula, et al., 2008b *Nature Biotech.*, 26(8): 925 - 932、Dornan et al. (2009) *Blood* 114(13): 2721 - 2729、US 7521541、US 7723485、WO 2009/052249)。その後、これらのTHIOMAB(商標)抗体を操作されたシステインチオール基を通して細胞毒性薬にコンジュゲートして、均質な化学量論(例えば、単一の操作されたシステイン部位を有する抗体中、1抗体当たり最大2つの薬物)を有するTHIOMAB(商標)薬物コンジュゲート(TDC)を得ることができる。異なる抗原に対する複数の抗体での研究により、TDCが、異種移植片モデルでは従来の抗体-薬物コンジュゲートと同程度に効果的であり、関連する前臨床モデルではより高い用量で許容されることが示されている。THIOMAB(商標)抗体は、抗体の異なる位置(例えば、軽鎖-Fab、重鎖-Fab、及び重鎖-Fc内の特定のアミノ酸位(すなわち、部位))で薬物と結合するように操作されている。THIOMAB(商標)抗体のインビトロ及びインビボでの安定性、有効性、ならびにPK特性は、それらの均質性及び細胞毒性薬に対する部位特異的コンジュゲーションのために、従来の抗体-薬物コンジュゲートに勝る固有の利点を提供する。

【0009】

抗体-薬物コンジュゲートの設計、調製、及び使用には、依然として他の制限または困難が存在する。例えば、いくつかのリンカーは、血流中で不安定であり、それにより、標的細胞内での内在化前に許容できない量の薬物を放出する可能性がある(Khot, A. et al (2015) *Bioanalysis* 7(13): 1633 - 1648)。他のリンカーは、血流中では安定性を提供し得るが、細胞内放出の有効性に悪影響が及ぼされ得る。所望の細胞内放出を提供するリンカーは典型的には、血流中での安定性に乏しい。換言すると、血流安定性及び細胞内放出は典型的には、反比例関係にある。第2に、標準的なコンジュゲーションプロセスにおいて、抗体担体タンパク質上に負荷された薬物部分(薬物負荷)の量、コンジュゲーション反応において形成される凝集体の量、及び得ることができる最終精製コンジュゲートの収率は、相互に関係する。例えば、凝集体の形成は一般に、担体-抗体にコンジュゲートされる薬物部分及びその誘導体の当量数に正相関する。高薬物負荷下では、形成された凝集体は、治療用途では除去されなければならない。結果として、薬物負荷媒介凝集体形成は、抗体-薬物コンジュゲートの収率を減少させ、

10

20

30

40

50

プロセスの規模拡大を困難にする場合がある。したがって、最適化された安全性及び有効性を提供する、改善された効果的な抗体 - 薬物コンジュゲートに対する継続的な必要性が存在する。

【発明の概要】

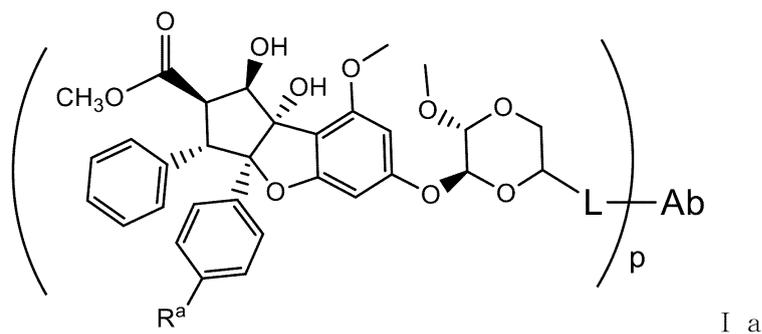
【0010】

本開示は一般に、コンジュゲーションによって1つ以上のシルベストロール誘導体に連結した抗体を含む抗体 - 薬物コンジュゲートを対象とする。本開示は、離脱基を含むシルベストロール誘導体中間体組成物を更に対象とする。そのような中間体組成物は、抗体が、リンカーまたは連結部分を通してシルベストロール誘導体に共有結合され得る、抗体 - 薬物コンジュゲートの形成に好適な基質である。本開示は、疾病、具体的にはがんの治療における、そのような抗体 - シルベストロールコンジュゲートの使用を更に対象とする。本明細書で使用される場合、別段明記されない限り、シルベストロールは、本開示によって包含されるシルベストロール誘導体化合物を指す。

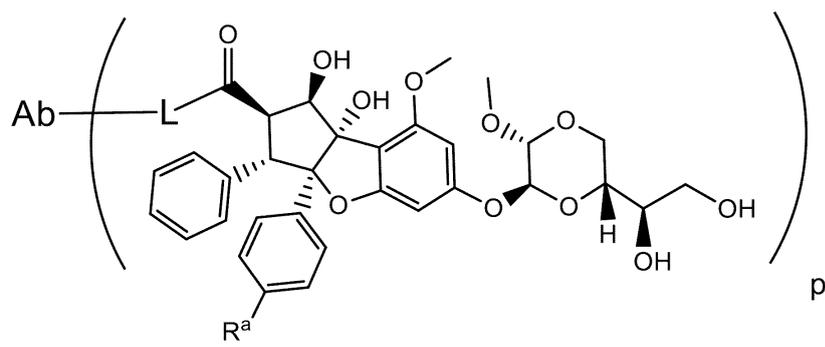
10

【0011】

本発明は、式 I a 及び I b から選択される、リンカーを通してシルベストロール薬物部分に共有結合した抗体を含む抗体 - 薬物コンジュゲート化合物、



20



30

またはその薬学的に許容される塩であって、  
式中、

R<sup>a</sup>は、CH<sub>3</sub>O、CN、NO<sub>2</sub>、及びClから選択される基であり、

Lは、リンカーであり、

pは、1～8の整数であり、

Abは、1つ以上の腫瘍関連抗原または細胞表面受容体に結合する抗体である、抗体 - 薬物コンジュゲート化合物またはその薬学的に許容される塩を含む。

40

【0012】

本発明は、式 I a 及び I b から選択される抗体 - 薬物コンジュゲート化合物と、薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤とを含む薬学的組成物を含む。

【0013】

本発明は、哺乳動物におけるがんの治療のための医薬品の製造における、式 I a 及び I b から選択される抗体 - 薬物コンジュゲート化合物の使用を含む。

【0014】

50

本発明は、式 I a 及び I b から選択される抗体 - 薬物コンジュゲート化合物を含む薬学的組成物を患者に投与することを含む、がんを治療する方法を含む。

【0015】

本発明は、がんを治療するための方法における使用のための、式 I a 及び I b から選択される抗体 - 薬物コンジュゲート化合物を含む。

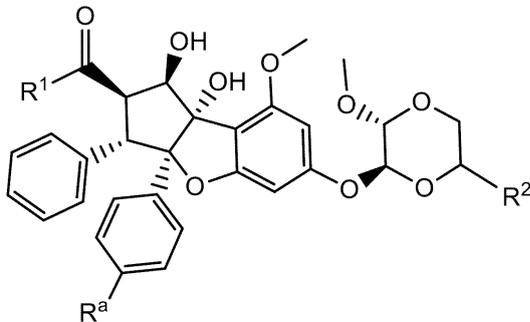
【0016】

本発明は、式 I a 及び I b から選択される抗体 - 薬物コンジュゲート化合物を含む薬学的組成物と、容器と、薬学的組成物ががんを治療するために使用され得ることを示す製造品またはラベルとを含む。

【0017】

本発明は、式 I I

10



I I

20

のシルベストロール - リンカー - 中間体化合物であって、  
式中、

R<sup>a</sup> は、CH<sub>3</sub>O、CN、NO<sub>2</sub>、及びCl から選択される基であり、

R<sup>1</sup> は、-OCH<sub>3</sub> 及び L - X から選択され、

R<sup>2</sup> は、-CH(OH)CH<sub>2</sub>OH 及び L - X から選択され、

L は、リンカーであり、

X は、マレイミド、チオール、アミノ、臭化物、プロモアセトアミド、ヨードアセトアミド、p - トルエンスルホン酸、ヨウ化物、ヒドロキシル、カルボキシル、ピリジルジスルフィド、及び N - ヒドロキシスクシンイミドから選択される反応性官能基を含む、シルベストロール - リンカー - 中間体化合物を含む。

30

【0018】

本発明は、式 I a 及び I b から選択される抗体 - 薬物コンジュゲート化合物を作製する方法であって、抗体を、式 I I のシルベストロール - リンカー - 中間体化合物と反応させることを含む、方法を含む。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1A】チオ抗Her2 7C2 LC-K149C-MC-vc-PAB-シルベストロール-アミン(ADC-103)、チオHu抗CD22 10F4v3 HC:A140Cアミノシルベストロール類似体(ADC-105)、非標的対照、及びチオHu抗Her2 7C2 HC:A140Cアミノシルベストロール類似体(ADC-106)で処理した、SK-BR-3細胞のインビトロ細胞生存率のプロットを示す。

40

【図1B】チオ抗Her2 7C2 LC-K149C-MC-vc-PAB-シルベストロール-アミン(ADC-103)、チオHu抗CD22 10F4v3 HC:A140Cアミノシルベストロール類似体(ADC-105)、非標的対照、及びチオHu抗Her2 7C2 HC:A140Cアミノシルベストロール類似体(ADC-106)で処理した、KPL-4細胞のインビトロ細胞生存率のプロットを示す。

【図1C】チオ抗Her2 7C2 LC-K149C-MC-vc-PAB-シルベストロール-アミン(ADC-103)及びチオ抗CD22 LC-K149C-MC-vc

50

- P A B - シルベストロール - アミン ( 6 m g / k g で静脈内に一度 ) ( A D C - 1 0 4 ) で処理した、B j a b - 1 u c 細胞のインビトロ細胞生存率のプロットを示す。

【図1D】チオ抗Her2 7C2 LC - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミン ( A D C - 1 0 3 ) 及びチオ抗CD22 LC - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミン ( A D C - 1 0 4 ) ( 6 m g / k g で静脈内に一度 ) で処理した、W S U - D L C L 2 細胞のインビトロ細胞生存率のプロットを示す。

【図2】C B - 1 7 F o x C h a s e S C I D マウスにおけるB j a b - 1 u c ヒト異種移植片モデルでの、経時的なインビボ適合腫瘍体積変化のプロットにおける抗体 - 薬物コンジュゲートの有効性を示す。 1 ) ビヒクル ( H i s A c 2 0 m M 、 S u c r 2 4 0 m M 、 T W - 2 0 0 . 0 2 % ( p H 5 . 5 ) ) 、 1 0 0 u L 、 静脈内に一度 2 ) チオ抗CD22 LC - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミン ( A D C - 1 0 4 ) 、 1 m g / k g で静脈内に一度 3 ) チオ抗CD22 LC - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミン ( A D C - 1 0 4 ) 、 3 m g / k g で静脈内に一度 4 ) チオ抗CD22 LC - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミン ( A D C - 1 0 4 ) 、 6 m g / k g で静脈内に一度、 5 ) チオ抗CD22 LC - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミン ( A D C - 1 0 4 ) 、 1 0 m g / k g で静脈内に一度 6 ) チオ抗Her2 7C2 LC - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミン ( A D C - 1 0 3 ) 、 3 m g / k g で静脈内に一度

10

【図3】s c i d ベージュマウスにおけるK P L 4 ヒト乳腺異種移植片モデルでの、経時的なインビボ適合腫瘍体積変化のプロットにおける抗体 - 薬物コンジュゲートの有効性を示す。 1 ) ビヒクル ( H i s A c 2 0 m M 、 S u c r 2 4 0 m M 、 T W - 2 0 0 . 0 2 % ( p H 5 . 5 ) ) 、 1 0 0 u L 、 静脈内に一度 2 ) シルベストロール、 0 . 0 9 m g / k g 、 静脈内に一度 3 ) シルベストロール、 1 m g / k g 、 腹腔内q d X 5 で2週間 4 ) チオ抗Her2 7C2 LC - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミン ( A D C - 1 0 3 ) 、 1 m g / k g で静脈内に一度 5 ) チオ抗Her2 7C2 LC - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミン ( A D C - 1 0 3 ) 、 3 m g / k g で静脈内に一度 6 ) チオ抗Her2 7C2 LC - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミン ( A D C - 1 0 3 ) 、 6 m g / k g で静脈内に一度 7 ) チオ抗Her2 7C2 LC - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミン ( A D C - 1 0 3 ) 、 1 0 m g / k g で静脈内に一度 8 ) チオ抗CD22 LC - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミン ( A D C - 1 0 4 ) 、 3 m g / k g で静脈内に一度

20

30

【図4】C B - 1 7 F o x C h a s e S C I D マウスにおけるB j a b - 1 u c ヒト異種移植片モデルでの、経時的なインビボ適合腫瘍体積変化のプロットにおける抗体 - 薬物コンジュゲートの有効性を示す。 1 ) ビヒクル ( ヒスチジン緩衝液番号 8 ) 、 1 0 0 u L 、 静脈内に一度 2 ) チオCD22 LC - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミン ( A D C - 1 0 4 ) 、 1 0 m g / k g で静脈内に一度 3 ) チオHer2 ( 7 C 2 ) LC - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミン ( A D C - 1 0 3 ) 、 1 0 m g / k g で静脈内に一度 4 ) チオCD22 H C - A 1 4 0 C - M C - v c - P A B - アミノ - シルベストロール ( A D C - 1 0 5 ) 、 1 m g / k g で静脈内に一度 5 ) チオCD22 H C - A 1 4 0 C - M C - v c - P A B - アミノ - シルベストロール ( A D C - 1 0 5 ) 、 3 m g / k g で静脈内に一度 6 ) チオCD22 H C - A 1 4 0 C - M C - v c - P A B - アミノ - シルベストロール ( A D C - 1 0 5 ) 、 6 m g / k g で静脈内に一度 7 ) チオCD22 H C - A 1 4 0 C - M C - v c - P A B - アミノ - シルベストロール ( A D C - 1 0 5 ) 、 1 0 m g / k g で静脈内に一度 8 ) チオHer2 ( 7 C 2 ) H C - A 1 4 0 C - M C - v c - P A B - アミノ - シルベストロール ( A D C - 1 0 6 ) 、 3 m g / k g で静脈内に一度 9 ) チオHer2 ( 7 C 2 ) H C - A 1 4 0 C - M C - v c - P A B - アミノ - シルベストロール ( A D C - 1 0 6 ) 、 1 0 m g / k g で静脈内に一度

40

50

【図5】CB-17 Fox Chase SCIDマウスにおけるBjab-lucヒト異種移植片モデルでの、経時的なインビボ適合腫瘍体積変化のプロットにおける抗体-薬物コンジュゲートの有効性を示す。1)ピヒクル(ヒスチジン緩衝液番号8)、100 uL、静脈内に一度 2)チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149C-MC-sq-cit-PAB-シルベストロール-アミン(ADC-110)、3mg/kgで静脈内に一度 3)チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149C-MC-sq-cit-PAB-シルベストロール-アミン(ADC-110)、6mg/kgで静脈内に一度 4)チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149C-MC-sq-cit-PAB-シルベストロール-アミン(ADC-110)、10mg/kgで静脈内に一度 5)チオHu抗LY6E 9B12v12 LC K149C-MC-sq-cit-PAB-シルベストロール-アミン(ADC-109)、10mg/kgで静脈内に一度 6)チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149C-MC-sq-cit-PAB-アミノ-シルベストロール(ADC-108)、0.3mg/kgで静脈内に一度 7)チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149C-MC-sq-cit-PAB-アミノ-シルベストロール(ADC-108)、1mg/kgで静脈内に一度 8)チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149C-MC-sq-cit-PAB-アミノ-シルベストロール(ADC-108)、3mg/kgで静脈内に一度 9)チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149C-MC-sq-cit-PAB-アミノ-シルベストロール(ADC-108)、6mg/kgで静脈内に一度 10)チオHu抗LY6E 9B12v12 LC K149C-MC-sq-cit-PAB-アミノ-シルベ

10

20

【発明を実施するための形態】

【0020】

これより本発明の特定の実施形態を詳細に参照するが、それらの例は、添付の構造及び式に例証されている。本発明は、列挙される実施形態と組み合わせて説明されるが、それらは、本発明をそれらの実施形態に限定することを意図するものではないことを理解されたい。逆に、本発明は、全ての代替形、修正形、及び同等物を網羅することが意図されており、それらは、特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内に含まれ得る。

【0021】

当業者であれば、本発明の実施に使用することができる、本明細書に記載されるものに類似または同等である多くの方法及び材料を理解するであろう。本発明は、決して記載される方法及び材料に限定されるものではない。

30

【0022】

定義

別段定義されない限り、本明細書で使用される技術的及び科学的な用語は、本発明が属する分野の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有し、それらは、Singleton et al. (1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, NY、及びJaneway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New Yorkと一致する。

40

【0023】

「親和性」は、分子(例えば、抗体)とその結合パートナー(例えば、抗原)との単一結合部位の間の非共有結合相互作用の合計の強度を指す。別段示されない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば、抗体及び抗原)間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は一般に、解離定数(Kd)によって表され得る。親和性は、本明細書に記載される方法を含む当該技術分野で既知の一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な例証的かつ例示的な実施形態が、以下に記載される。

50

## 【0024】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広義に使用され、それらが所望される生物学的活性を呈する限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二量体、多量体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体断片を具体的に網羅する（Miller et al. (2003) *Jour. of Immunology* 170: 4854 - 4861）。抗体は、マウス、ヒト、ヒト化、キメラであり得るか、または他の種に由来するものであり得る。抗体は、特定の抗原を認識し、それに結合することができる、免疫系によって生成されるタンパク質である。（Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York）。

標的抗原は一般に、複数の抗体のCDRによって認識されるエピトープとも呼ばれる多数の結合部位を有する。異なるエピトープに特異的に結合する各抗体は、異なる構造を有する。したがって、1つの抗原は、2つ以上の対応する抗体を有し得る。抗体は、完全長免疫グロブリン分子、または完全長免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、対象となる標的抗原またはその一部に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子を含み、そのような標的としては、自己免疫疾患に関連する自己免疫抗体を産生するがん細胞（複数可）が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に開示される免疫グロブリンは、免疫グロブリン分子の任意の種類（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、及びIgA）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2）、またはサブクラスのものであり得る。免疫グロブリンは、任意の種に由来し得る。しかしながら、一態様において、免疫グロブリンは、ヒト、マウス、またはウサギ起源のものである。

10

20

## 【0025】

「抗体断片」は、完全長抗体の一部分、一般にはその抗原結合領域または可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、及びFv断片、ダイアボディ、線状抗体、ミニボディ（Olafsen et al. (2004) *Protein Eng. Design & Sel.* 17(4): 315 - 323）、Fab発現ライブラリによって産生される断片、抗イディオタイプ（抗Id）抗体、CDR（相補性決定領域）、及びがん細胞抗原、ウイルス抗原、または微生物抗原に免疫特異的に結合する、本明細書に記載されるもののうちのいずれかのエピトープ結合断片、一本鎖抗体分子、ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。

30

## 【0026】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られた抗体を指し、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変異の可能性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、単一の抗原部位に対して指向されている。更に、異なる決定基（エピトープ）に対して指向される異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらが他の抗体が混入することなく合成され得るという点で有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものと解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al. (1975) *Nature* 256: 495によって最初に説明されたハイブリドーマ法によって作製され得るか、または組み換えDNA法（例えば、US 4 816 567、US 5 807 715を参照されたい）によって作製され得る。モノクローナル抗体はまた、例えば、Clackson et al. (1991) *Nature*, 352: 624 - 628、Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581 - 597に説明される技術を使用して、ファージ抗体ライブラリから単離され得る。

40

## 【0027】

50

本明細書におけるモノクローナル抗体には、重鎖及び/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するか、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または同種である一方で、鎖（複数可）の残りが別の種に由来するか、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または同種である、「キメラ」抗体、ならびにそのような抗体の断片が特に含まれるが、これは、それらが所望される生物学的活性を呈する限りにおいてである（US 4 8 1 6 5 6 7、及び Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 - 6855）。本明細書において対象となるキメラ抗体としては、非ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル、類人猿など）に由来する可変ドメイン抗原結合配列と、ヒト定常領域配列とを含む、「霊長類化」抗体が挙げられる。

10

## 【0028】

本明細書における「無傷抗体」は、VL及びVHドメイン、ならびに軽鎖定常ドメイン（CL）及び重鎖定常ドメインCH1、CH2、及びCH3を含むものである。定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン（例えば、ヒトの天然配列の定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列バリエーションであり得る。無傷抗体は、1つ以上の「エフェクター機能」を有し得、この機能は、抗体のFc定常領域（天然配列のFc領域またはアミノ酸配列バリエーションのFc領域）に起因し得る生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合、補体依存性細胞毒性、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ADCC）、食作用、ならびにB細胞受容体及びBCRなどの細胞表面受容体の下方制御が挙げられる。

20

## 【0029】

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、無傷抗体には、異なる「クラス」が割り当てられ得る。無傷免疫グロブリン抗体には、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMの5つの主要なクラスが存在し、これらのうちのいくつかは、「サブクラス」（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、及びIgA2に更に分けられ得る。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、  
、  
、及びμと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元構成は、周知である。Igの形態は、ヒンジ修飾またはヒンジなしの形態を含む（Roux et al. (1998) J. Immunol. 161: 4083 - 4090、Lund et al. (2000) Eur. J. Biochem. 267: 7246 - 7256、US 2005/0048572、US 2004/0229310）。

30

## 【0030】

「システイン操作された抗体」または「システイン操作された抗体バリエーション」は、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている抗体である。本開示に従って、システイン操作された抗体のチオール基（複数可）を、シルベストロールにコンジュゲートして、THIOMAB（商標）抗体（すなわち、本開示に従って、薬物がシルベストロール誘導体であるTHIOMAB（商標）薬物コンジュゲート（TDC））を形成することができる。特定の実施形態において、置換された残基は、抗体の到達可能な部位で生じる。それらの残基をシステインで置換することによって、反応性チオール基がそれにより抗体の到達可能な部位に位置付けられ、本明細書に更に記載されるように、それを使用して、抗体を薬物部分にコンジュゲートして、免疫コンジュゲートを作製することができる。例えば、THIOMAB（商標）抗体は、軽鎖内での非システイン天然残基のシステインへの単一の変異（例えば、Kabata番号付けによるG64C、K149C、もしくはR142C）または重鎖内でのもの（例えば、Kabata番号付けによるD101CもしくはV184CもしくはT205C）を有する抗体であり得る。具体的な例において、THIOMAB（商標）抗体は、重鎖または軽鎖のいずれかに単一のシステイン変異を有し、そのために各完全長抗体（すなわち、2つの重鎖及び2つの軽鎖を有する抗体）は、2つの操作されたシステイン残基を有することになる。システイン操作された抗体及び調製方法は、US 2012/0121615 A1（その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）によって開示されている。

40

50

## 【 0 0 3 1 】

「がん」及び「がん性」という用語は、未制御の細胞成長/増殖を典型的に特徴とする、哺乳動物における生理学的病態を指すか、または説明する。がんの例としては、癌腫、リンパ腫（例えば、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫）、芽細胞腫、肉腫、ならびに白血病が挙げられるが、これらに限定されない。そのようながんのより具体的な例としては、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄異形成症候群（MDS）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄単球性白血病、急性前骨髄球性白血病（APL）、慢性骨髄増殖性障害、血小板性白血病、前駆体B細胞急性リンパ芽球性白血病（pre-B-ALL）、前駆体T細胞急性リンパ芽球性白血病（pre-T-ALL）、多発性骨髄腫（MM）、肥満細胞疾患、肥満細胞性白血病、肥満細胞肉腫、骨髄性肉腫、リンパ性白血病、及び未分化白血病が

10

## 【 0 0 3 2 】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び/または軽鎖の一部が特定の源または種に由来する一方で、重鎖及び/または軽鎖の残りが異なる源または種に由来する抗体を指す。

## 【 0 0 3 3 】

抗体の「クラス」は、その重鎖によって保有される定常ドメインまたは定常領域の種類を指す。抗体には、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMの5つの主要なクラスが存在し、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>、及びIgA<sub>2</sub>に更に分けられ得る。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ と

20

## 【 0 0 3 4 】

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

## 【 0 0 3 5 】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」とは、必要な投与量で必要な期間にわたって所望の治療または予防結果を達成するのに有効な量を指す。

30

## 【 0 0 3 6 】

「エピトープ」という用語は、抗体が結合する抗原分子上の特定の部位を指す。いくつかの実施形態において、抗体が結合する抗原分子上の特定の部位は、ヒドロキシラジカルフットプリント法によって決定される。

## 【 0 0 3 7 】

本明細書における「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部分を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。この用語は、天然配列Fc領域及びバリエーションFc領域を含む。一実施形態において、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226から、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端まで延びる。しかしながら、Fc領域のC末端リジン（Lys447）は、存在する場合もあれば、存在しない場合もある。本明細書において別段明記されない限り、Fc領域または定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載される、EUインデックスとも呼ばれるEU番号付けシステムに従う。

40

## 【 0 0 3 8 】

「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域（HVR）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは一般に、FR1、FR2、FR3、及びFR4の4つの

50

FRドメインからなる。したがって、HVR及びFR配列は一般に、VH（またはVL）内でFR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4の順序で出現する。

【0039】

「完全長抗体」、「無傷抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書において、天然抗体構造と実質的に同様の構造を有するか、または本明細書に定義されるFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指すために互換的に使用される。

【0040】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」という用語は、互換的に使用され、外因性核酸が中に導入されている細胞を指し、そのような細胞の子孫を含む。宿主細胞は、初代形質転換細胞及び継代の数に関わらずそれに由来する子孫を含む、「形質転換体」及び「形質転換細胞」を含む。子孫は、核酸含有量が親細胞と完全に同一ではない場合があるが、変異を含み得る。最初に形質転換された細胞についてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異子孫が、本明細書に含まれる。

10

【0041】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞により産生された抗体、またはヒト抗体レパトリーもしくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を所有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を明確に除外する。

【0042】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVLまたはVHフレームワーク配列の選択において最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンVLまたはVH配列の選択は、可変ドメイン配列の下位群からである。一般に、配列の下位群は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3にあるような下位群である。一実施形態において、VLでは、下位群は、Kabatら(上記参照)にあるような下位群C<sub>1</sub>である。一実施形態において、VHでは、下位群は、Kabatら(上記参照)にあるような下位群I<sub>1</sub>である。

20

【0043】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVRからのアミノ酸残基及びヒトFRからのアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、及び典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、そのHVR(例えば、CDR)の全てまたは実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、FRの全てまたは実質的に全てがヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含み得る。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化型」は、ヒト化を受けた抗体を指す。

30

【0044】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に關与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン(それぞれ、VH及びVL)は一般に、類似の構造を有し、各ドメインが4つの保存フレームワーク領域(FR)及び3つの超可変領域(HVR)を含む。(例えば、Kindt et al., Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)を参照されたい。)単一のVHドメインまたはVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。更に、特定の抗原に結合する抗体は、VHドメインまたはVLドメインを使用して抗原に結合する抗体から単離されて、それぞれ相補的VLドメインまたはVHドメインのライブラリをスクリーニングすることができる。例えば、Portolano et al., J. Immunol 150: 880-887 (1993)、Clarkson et al., Nature 352: 62

40

50

4 - 6 2 8 ( 1 9 9 1 ) を参照されたい。

【 0 0 4 5 】

「ベクター」という用語は、本明細書で使用される場合、それが連結している別の核酸を増殖させることができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、及びそれが導入されている宿主細胞のゲノム内に組み込まれたベクターを含む。特定のベクターは、それらが動作可能に連結している核酸の発現を指向することができる。そのようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と称される。

【 0 0 4 6 】

本明細書で使用される場合、「超可変領域」または「HVR」という用語は、配列が超可変である、及び/または構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成する、抗体可変ドメインの領域の各々を指す。一般に、天然4本鎖抗体は、6つのHVRを含み、3つがVHにあり（H1、H2、H3）、3つがVLにある（L1、L2、L3）。HVRは一般に、超可変ループ及び/または「相補性決定領域」（CDR）からのアミノ酸残基を含み、後者は、最も高い配列可変性を有する、及び/または抗原認識に關与する。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基26~32（L1）、50~52（L2）、91~96（L3）、26~32（H1）、53~55（H2）、及び96~101（H3）において生じる。（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)。）例示的なCDR（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3）は、アミノ酸残基L1の24~34、L2の50~56、L3の89~97、H1の31~35B、H2の50~65、及びH3の95~102において生じる。（Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)。）VH内のCDR1を除いて、CDRは一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRはまた、抗原と接触する残基である「特異性決定残基」または「SDR」も含む。SDRは、短縮-CDR、またはa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に収容される。例示的なa-CDR（a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、及びa-CDR-H3）は、アミノ酸残基31~34（L1）、50~55（L2）、89~96（L3）、31~35B（H1）、50~58（H2）、及び95~102（H3）に生じる。（Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13: 1619-1633 (2008)を参照されたい。）別段示されない限り、可変ドメイン内のHVR残基及び他の残基（例えば、FR残基）は、本明細書において、Kabataら（上記参照）に従って番号付けされる。

【 0 0 4 7 】

「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物としては、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト、及びサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、ならびに齧歯類（例えば、マウス及びラット）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、個体または対象は、ヒトである。

【 0 0 4 8 】

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

【 0 0 4 9 】

「天然抗体」は、異なる構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合されている2つの同一の軽鎖及び2つの同一の重

10

20

30

40

50

鎖で構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端まで、各重鎖は、可変重ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VH)を有し、その後3つの定常ドメイン(CH1、CH2、及びCH3)が続く。同様に、N末端からC末端まで、各軽鎖は、可変軽ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VL)を有し、その後定常軽(CL)ドメインが続く。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ( )及びラムダ( )と呼ばれる2つの種類のうちの1つに割り当てられ得る。

【0050】

「添付文書」という用語は、そのような治療製品の適応症、使用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌症、及び/またはその使用に関する警告についての情報を含む、治療製品の商業用パッケージに通例含まれる指示書を指すために使用される。

10

【0051】

基準ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、最大の配列同一性パーセントを達成するように、配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入した後に、かついかなる保存的置換も配列同一性の一部とは見なさず、候補配列内のアミノ酸残基が、基準ポリペプチド配列内のアミノ酸残基と同一であるパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するための整列は、当該技術分野の範囲内の様々な方法で、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成され得る。当業者であれば、比較されている配列の完全長にわたって最大の整列を達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列を整列させるための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書における目的のために、アミノ酸配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.によって記述され、ソースコードは、ユーザ文書と共に米国著作権庁(Washington D.C., 20559)に提出されており、米国著作権番号TXU510087の下に登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公的に入手可能であるか、またはソースコードからコンパイルされ得る。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステムで使用する場合はコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムにより設定されており、変動しない。

20

30

【0052】

ALIGN-2がアミノ酸配列比較に用いられる状況において、所与のアミノ酸配列Bへの、それとの、またはそれに対する、所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性%(あるいは、所与のアミノ酸配列Bへの、それとの、またはそれに対するある特定のアミノ酸配列同一性%を有するか、または含む所与のアミノ酸配列Aと表現され得る)は、以下、 $100 \times \text{分数} X / Y$ のように計算され、式中、Xは、配列整列プログラムALIGN-2によって、そのプログラムのAとBとの整列において完全な一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Yは、Bにおけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、AのBへのアミノ酸配列同一性%は、BのAへのアミノ酸配列同一性%とは等しくないことが理解されるだろう。別段具体的に述べられない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性%値は、直前の段落に記載されるようにALIGN-2コンピュータプログラムを使用して得られる。

40

【0053】

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

【0054】

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

50

の成分を指す。薬学的に許容される担体としては、緩衝液、賦形剤、安定剤、または保存剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0055】

「治療する」及び「治療」という用語は、治療的処置及び予防的または防止的処置の両方を指し、その目的は、所望されない生理学的変化または障害（がんの発症または伝播など）を予防または減速（緩和）することである。本発明の目的のために、有益または所望の臨床結果としては、検出可能であるか検出不能であるかに関わらず、症状の軽減、疾患の程度の縮小、疾患の病態の安定化（すなわち、悪化しない）、疾患進行の遅延または減速、疾患病態の緩和または緩解、及び（部分的か完全かに関わらず）寛解が挙げられるが、これらに限定されない。「治療」はまた、治療を受けていなかった場合に予想される生存期間と比較して、生存期間を延長することも意味し得る。治療を必要とする者としては、病態もしくは障害を既に有する者、及び病態もしくは障害を有する傾向にある者、または病態もしくは障害を予防する必要がある者が挙げられる。

10

【0056】

「治療有効量」という用語は、哺乳動物において疾患または障害を治療するのに有効な薬物の量を指す。がんの場合、治療有効量の薬物は、がん細胞の数を低下、腫瘍サイズを低下、末梢器官へのがん細胞浸潤を阻害（すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止）、腫瘍転移を阻害（すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止）、腫瘍成長をある程度阻害、及び/またはがんに関連する症状のうちの1つ以上をある程度軽減し得る。薬物が、既存のがん細胞の成長を予防し得る、及び/またはそれらを殺滅し得る限り、この薬物は、細胞増殖抑制性及び/または細胞毒性であり得る。がん療法に関して、有効性は、例えば、疾患進行までの時間（TTP）の評価及び/または奏効率（RR）の決定によって、測定することができる。

20

【0057】

「がん」及び「がん性」という用語は、典型的に未制御の細胞成長を特徴とする哺乳動物における生理学的病態を指すか、または説明する。「腫瘍」は、1つ以上のがん性細胞を含む。がんの例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病、またはリンパ系悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。そのようながんのより具体的な例としては、扁平上皮細胞癌（例えば、上皮性扁平上皮細胞癌）、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌（「NSCLC」）、肺の腺癌、及び肺の扁平上皮癌を含む）、腹膜の癌、肝細胞癌、胃癌（gastric cancer）または胃癌（stomach cancer）（消化管癌を含む）、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌（kidney cancer）または腎臓癌（renal cancer）、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、ならびに頭頸部癌が挙げられる。

30

【0058】

本明細書で使用される場合、「離脱基」という用語は、本明細書に記載される基に関与する化学反応の過程で離れる、スルフヒドリル部分を指す。

【0059】

本明細書で使用される場合、「アルキル」という用語は、1～12個の炭素原子（C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>）の飽和した直鎖または分岐鎖の一価の炭化水素ラジカルを指し、アルキルラジカルは、任意で、以下に記載される1つ以上の置換基で独立して置換されていてもよい。別の実施形態において、アルキルラジカルは、1～8個の炭素原子（C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>）、または1～6個の炭素原子（C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>）である。アルキル基の例としては、メチル（Me、-CH<sub>3</sub>）、エチル（Et、-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>）、1-プロピル（n-Pr、n-プロピル、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>）、2-プロピル（i-Pr、i-プロピル、-CH（CH<sub>3</sub>）<sub>2</sub>）、1-ブチル（n-Bu、n-ブチル、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>）、2-メチル-1-プロピル（i-Bu、i-ブチル、-CH<sub>2</sub>CH（CH<sub>3</sub>）<sub>2</sub>）、2-ブチル（s-Bu、s-ブチル、-CH（CH<sub>3</sub>）CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>）、2-メチル-2-プロピル（t-Bu、t-ブチル、-C（CH<sub>3</sub>）<sub>3</sub>）、1-ペンチル（n-ペンチル、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>

40

50

CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、2-ペンチル(-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、3-ペンチル(-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2-メチル-2-ブチル(-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、3-メチル-2-ブチル(-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、3-メチル-1-ブチル(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2-メチル-1-ブチル(-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、1-ヘキシル(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、2-ヘキシル(-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、3-ヘキシル(-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>))、2-メチル-2-ペンチル(-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、3-メチル-2-ペンチル(-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、4-メチル-2-ペンチル(-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、3-メチル-3-ペンチル(-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2-メチル-3-ペンチル(-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2,3-ジメチル-2-ブチル(-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、3,3-ジメチル-2-ブチル(-CH(CH<sub>3</sub>)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)、1-ヘプチル、及び1-オクチルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

10

## 【0060】

本明細書で使用される場合、「アルキレン」という用語は、1~12個の炭素原子(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)の飽和した直鎖または分岐鎖の二価の炭化水素ラジカルを指し、アルキレンラジカルは、任意で、以下に記載される1つ以上の置換基で独立して置換されていてもよい。別の実施形態において、アルキレンラジカルは、1~8個の炭素原子(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)、または1~6個の炭素原子(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)である。アルキレン基の例としては、メチレン(-CH<sub>2</sub>-)、エチレン(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)、及びプロピレン(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

## 【0061】

「アルケニル」という用語は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち、炭素-炭素sp<sup>2</sup>二重結合を有する2~8個の炭素原子(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)の直鎖または分岐鎖の一価の炭化水素ラジカルを指し、アルケニルラジカルは、任意で、本明細書に記載される1つ以上の置換基で独立して置換されていてもよく、「シス」及び「トランス」配向、またはあるいは「E」及び「Z」配向を有するラジカルを含む。例としては、エチレニルまたはビニル(-CH=CH<sub>2</sub>)、及びアリル(-CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>)などが挙げられるが、これらに限定されない。

30

## 【0062】

「アルケニレン」という用語は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち炭素-炭素sp<sup>2</sup>二重結合を有する2~8個の炭素原子(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)の直鎖または分岐鎖の二価の炭化水素ラジカルを指し、アルケニレンラジカルは、任意で、本明細書に記載される1つ以上の置換基で独立して置換されていてもよく、「シス」及び「トランス」配向、またはあるいは「E」及び「Z」配向を有するラジカルを含む。例としては、エチレニレンまたはビニレン(-CH=CH-)、及びアリル-CH<sub>2</sub>CH=CH-)などが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0063】

「アルキニル」という用語は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち炭素-炭素sp<sup>3</sup>三重結合を有する2~8個の炭素原子(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)の直鎖または分岐鎖の一価の炭化水素ラジカルを指し、アルキニルラジカルは、任意で、本明細書に記載される1つ以上の置換基で独立して置換されていてもよい。例としては、エチニル(-C≡CH)、及びプロピニル(プロパルギル、-CH<sub>2</sub>C≡CH)などが挙げられるが、これらに限定されない。

40

## 【0064】

「アルキニレン」という用語は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち炭素-炭素sp<sup>3</sup>三重結合を有する2~8個の炭素原子(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)の直鎖または分岐鎖の二価の炭化水素ラジカルを指し、アルキニレンラジカルは、任意で、本明細書に記載される1つ以上の置換基で独立して置換されていてもよい。例としては、エチニレン(-C≡C-)、及びプロピニレン(プロパルギレン、-CH<sub>2</sub>C≡C-)などが挙げられるが、これらに限定

50

されない。

【 0 0 6 5 】

「炭素環」、「カルボシクリル」、「環状炭素」、及び「シクロアルキル」という用語は、単環式環として3～12個の炭素原子(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>)または二環式環として7～12個の炭素原子を有する一価の非芳香族の飽和環または部分的不飽和環を指す。7～12個の原子を有する二環式炭素環は、例えば、ビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]、もしくは[6,6]系として配置することができ、9もしくは10個の原子を有する二環式炭素環は、ビシクロ[5,6]もしくは[6,6]系として、またはビシクロ[2.2.1]ヘプタン、ビシクロ[2.2.2]オクタン、及びビシクロ[3.2.2]ノンなどの架橋系として配置することができる。スピロカルボシクリル部分もまた、本定義の範囲内に含まれる。スピロカルボシクリル部分の例としては、[2.2]ペンタニル、[2.3]ヘキサニル、及び[2.4]ヘプタニルが挙げられる。単環式炭素環の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1-シクロペンタ-1-エニル、1-シクロペンタ-2-エニル、1-シクロペンタ-3-エニル、シクロヘキシル、1-シクロヘキサ-1-エニル、1-シクロヘキサ-2-エニル、1-シクロヘキサ-3-エニル、シクロヘキサジエニル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニル、シクロデシル、シクロウンデシル、及びシクロドデシルなどが挙げられるが、これらに限定されない。カルボシクリル基は、任意で、本明細書に記載される1つ以上の置換基で独立して置換される。

10

【 0 0 6 6 】

本明細書で使用される場合、単独での、または別の基の一部としての「アリール」という用語は、任意で置換された同素環芳香族基、好ましくは環部分内に5～20個の炭素、5～10個の炭素、または5～6個の炭素を含有する単環式基または二環式基(フェニル、ピフェニル、ナフチル、置換フェニル、置換ピフェニル、または置換ナフチルを含むが、これらに限定されない)を表す。アリール部分は、任意で、O、S、及びNから選択される1つ以上のヘテロ原子を含み得る。そのような複素環式芳香族は、環内に1または2個の窒素原子、1または2個の硫黄原子、1または2個の酸素原子、及びこれらの組み合わせを含み得、各ヘテロ原子は、炭素を通して分子の残りに結合する。非限定的な例示的な基としては、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピラゾール、ピロール、イミダゾール、チオフェン、チオピリリウム、ピラチアジン、インドール、プリン、ベンゾイミダゾール、キノロン、及びフェノチアジンが挙げられる。非限定的な例示的な置換基としては、以下の基、アルキル、アルコキシ、アシル、アシルオキシ、アルケニル、アルケノキシ、アリール、アリールオキシ、アミノ、アミド、アセタール、カルバミル、カルボシクロ、シアノ、エステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロシクロ、ヒドロキシル、ケト、ケタール、ホスホ、ニトロ、及びチオのうちの一つ以上が挙げられる。

20

30

【 0 0 6 7 】

本明細書に記載される「置換」部分は、炭素以外の少なくとも1つの原子で置換されるアルキル及びアリールなどの部分であり、炭素鎖原子がヘテロ原子(窒素、酸素、ケイ素、亜リン酸、ホウ素、硫黄、またはハロゲン原子など)で置換される部分を含む。これらの置換基としては、ハロゲン、ヘテロシクロ、アルコキシ、アルケンオキシ、アルキンオキシ、アリールオキシ、ヒドロキシ、ケト、アシル、アシルオキシ、ニトロ、三級アミノ、アミド、ニトロ、シアノ、チオ、スルフィネート、スルホンアミド、ケタール、アセタール、エステル、エーテルが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用される場合、単独での、または別の基の一部としての「ハロゲン」という用語は、塩素、臭素、フッ素、及びヨウ素を指す。

【 0 0 6 9 】

抗体

本開示の実施形態のうちの一つにおいて、抗体は、ヒト化である。一実施形態において、抗体は、本開示の実施形態の一つにおけるようなHVRを含み、ヒトアクセプタ

50

ーフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークを更に含む。特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、ヒトVLカッパIコンセンサス(VLKI)フレームワーク及び/またはVHフレームワークVH1である。特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、以下の変異のうちのいずれか1つを含む、ヒトVLカッパIコンセンサス(VLKI)フレームワーク及び/またはVHフレームワークVH1である。

【0070】

別の態様において、抗体は、本明細書に提供される実施形態のいずれかにおけるようなVHと、本明細書に提供される実施形態のいずれかにおけるようなVLとを含む。

【0071】

本発明の更なる一態様において、本明細書の実施形態のうちのいずれかに従う抗体は、ヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一実施形態において、抗体は、抗体断片、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、またはF(ab')<sub>2</sub>断片である。別の実施形態において、抗体は、実質的に完全長の抗体、例えば、本明細書に定義されるIgG1抗体、IgG2a抗体、または他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

【0072】

更なる一態様において、本明細書の実施形態のいずれかに従う抗体は、本明細書に記載される特徴のうちのいずれかを、単独で、または組み合わせて組み込むことができる。

【0073】

#### 1. 抗体親和性

特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、1 μM以下、100 nM以下、50 nM以下、10 nM以下、5 nM以下、1 nM以下、0.1 nM以下、0.01 nM以下、または0.001 nM以下の解離定数(K<sub>d</sub>)を有し、かつ任意で、10<sup>-13</sup> M以上(例えば、10<sup>-8</sup> M以下、例えば、10<sup>-8</sup> M ~ 10<sup>-13</sup> M、例えば、10<sup>-9</sup> M ~ 10<sup>-13</sup> M)である。

【0074】

一実施形態において、K<sub>d</sub>は、以下のアッセイによって説明されるように、対象となる抗体のFabバージョン及びその抗原によって実行される放射標識抗原結合アッセイ(RIA)によって測定される。抗原に対するFabの溶液結合親和性は、未標識抗原の一連の滴定の存在下で、Fabを最小濃度の(<sup>125</sup>I)標識抗原と平衡化し、その後抗Fab抗体コーティングプレートと結合した抗原を捕捉することによって測定される(例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865 - 881 (1999)を参照されたい)。アッセイの条件を確立するために、MICRO TITER(登録商標)マルチウェルプレート(Thermo Scientific)を、50 mMの炭酸ナトリウム(pH 9.6)中5 μg/mlの捕捉用抗Fab抗体(Cappel Labs)で一晩コーティングし、その後PBS中2重量体積%のウシ血清アルブミンで2 ~ 5時間室温(およそ23 °C)で遮断する。非吸着性プレート(Nunc 番号269620)中、100 pMまたは26 pMの[<sup>125</sup>I]-抗原を対象となるFabの段階希釈液と混合する(例えば、Presta et al., Cancer Res. 57: 4593 - 4599 (1997)における抗VEGF抗体、Fab-12の評価と一貫する)。その後、対象となるFabを一晩インキュベートするが、インキュベーションをより長い期間(例えば、約65時間)継続して、平衡に達することを確実にしてもよい。その後、室温でのインキュベーション(例えば、1時間)のために混合物を捕捉プレートに移動させる。その後、溶液を除去し、PBS中0.1%のポリソルベート20(TWEEN-20(登録商標))を用いてプレートを8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 μL/ウェルのシンチラント(MICROSCINT-20(商標)、Packard)を添加し、TOPCOUNT(商標)ガンマ計数器(Packard)でプレートを10分間計数する。20%以下の最大結合をもたらす各Fabの濃度を、競合結合アッセイにおける使用のために選択する。

【0075】

10

20

30

40

50

別の実施形態に従うと、K<sub>d</sub>は、BIACORE（登録商標）- 2000、BIACORE（登録商標）- T200、またはBIACORE（登録商標）- 3000（BIACORE, Inc., Piscataway, NJ）を使用する表面プラズモン共鳴アッセイを使用して、25 で、約10応答単位（RU）で固定化された抗原CM5チップによって測定される。簡潔には、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIACORE, Inc.）は、供給業者の指示書に従って、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミドヒドロクロリド（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）によって活性化される。抗原を10mMの酢酸ナトリウム（pH4.8）で5µg/mL（約0.2µM）になるまで、及び/またはHBS-P（0.01MのHepes（pH7.4）、0.15MのNaCl、0.005%の界面活性剤P20）で希釈した後に、5µL/分及び/または30µL/分の流量で注入して、およそ10の応答単位（RU）の共役タンパク質を達成する。抗原の注入後、1Mのエタノールアミンを注入して、未反応基を遮断する。動態測定のために、Fabの2倍段階希釈液（0.78nM~500nM）を、0.05%のポリソルベート20（TWEEN-20（商標））界面活性剤を含むPBS（PBST）中、25、およそ25µL/分の流量で注入する。会合速度（k<sub>on</sub>）及び解離速度（k<sub>off</sub>）を、単純な1対1ラングミュア結合モデル（BIACORE（登録商標）Evaluation Softwareバージョン3.2版）を使用して、会合センサーグラム及び解離センサーグラムを同時に適合することによって、計算する。平衡解離定数（K<sub>d</sub>）を、k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>の比として計算する（Chen et al.（1999）J. Mol. Biol. 293: 865-881）。本明細書に記載される表面プラズモン共鳴アッセイによる会合速度が106M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>を超える場合、会合速度は、ストップフローを備えた分光光度計（Aviv Instruments）または攪拌キュベットを有する8000シリーズSLM-AMINCO（商標）分光光度計（ThermoSpectronic）などの分光計で測定される場合に、増加する抗原濃度の存在下で、25で、PBS中20nMの抗-抗原抗体（Fab形態）（pH7.2）の蛍光発光強度（励起=295nm、発光=340nm、16nm帯域通過）の増加または減少を測定する蛍光消光技術を使用して決定することができる。

#### 【0076】

#### 2. 抗体断片

特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片としては、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、及びscFv断片、ならびに本明細書に記載される他の断片が挙げられるが、これらに限定されない。特定の抗体断片の概説については、Hudson et al. Nat. Med. 9: 129-134（2003）を参照されたい。scFv断片の概説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315（1994）を参照されたく、またWO1993/16185、ならびにUS5571894及びUS5587,58もまた参照されたい。エピトープ残基に結合し、増加したインビボ半減期を有するサルベージ受容体を含むFab及びF(ab')<sub>2</sub>断片の考察については、US5869046を参照されたい。

#### 【0077】

ダイアボディは、二価または二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、EP404097、WO1993/01161、Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134（2003）、及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448（1993）を参照されたい。トリアボディ及びテトラボディもまた、Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134（2003）に記載されている。

#### 【0078】

10

20

30

40

50

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全部もしくは一部、または軽鎖可変ドメインの全部もしくは一部を含む、抗体断片である。特定の実施形態において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である (Domantis, Inc., Waltham, MA、例えば、US 6 2 4 8 5 1 6 を参照されたい)。

【0079】

抗体断片は、本明細書に記載されるように、無傷抗体のタンパク質消化及び組み換え宿主細胞 (例えば、E. coli またはファージ) による産生を含むが、これらに限定されない、様々な技術によって作製され得る。

【0080】

### 3. キメラ抗体及びヒト化抗体

特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、キメラ抗体である。特定のキメラ抗体は、例えば、US 4 8 1 6 5 6 7 及び Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6 8 5 1 - 6 8 5 5 (1984) に記載されている。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域 (例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、または非ヒト霊長類 (サルなど) に由来する可変領域) 及びヒト定常領域を含む。更なる一例において、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のクラスまたはサブクラスから変化した「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体には、その抗原結合断片が含まれる。

【0081】

特定の実施形態において、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、非ヒト親抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低下させるために、ヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、1つ以上の可変ドメインを含み、そのHVR、例えば、CDR (またはそれらの部分) は、非ヒト抗体に由来し、そのFR (またはそれらの部分) は、ヒト抗体配列に由来する。ヒト化抗体はまた、任意で、ヒト定常領域の少なくとも一部も含むだろう。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体内のいくつかのFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を復元または改善するように、非ヒト抗体 (例えば、HVR残基が由来する抗体) に由来する対応する残基で置換される。

【0082】

ヒト化抗体及びそれらを作製する方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13: 1 6 1 9 - 1 6 3 3 (2008) に概説され、例えば、Riechmann et al., Nature 332: 3 2 3 - 3 2 9 (1988)、Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1 0 0 2 9 - 1 0 0 3 3 (1989)、US 5 8 2 1 3 3 7、US 7 5 2 7 7 9 1、US 6 9 8 2 3 2 1、US 7 0 8 7 4 0 9、Kashmiri et al., Methods 36: 2 5 - 3 4 (2005) (SDR (a-CDR) 移植を説明)、Padlan, Mol. Immunol 28: 4 8 9 - 4 9 8 (1991) (「リサーチフェシング」を説明)、Dall'Acqua et al., Methods 36: 4 3 - 6 0 (2005) (「FRシャッフリング」を説明)、ならびに Osbourn et al., Methods 36: 6 1 - 6 8 (2005) 及び Klimka et al., Br. J. Cancer, 83: 2 5 2 - 2 6 0 (2000) (FRシャッフリングに対する「誘導選択」アプローチを説明) に更に記載されている。

【0083】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域としては、「最良適合」法を使用して選択されるフレームワーク領域 (例えば、Sims et al., J. Immunol. 151: 2 2 9 6 (1993))、軽鎖または重鎖可変領域の特定の下位群のヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域 (例えば、Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4 2 8 5 (1992) 及び Presta et al., J. Immunol., 151: 2 6 2 3 (1993) を参照されたい)、ヒト成熟 (体細胞変異型) フレームワーク領域またはヒト生殖細胞株フレームワーク領域 (例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 1

10

20

30

40

50

3 : 1 6 1 9 - 1 6 3 3 ( 2 0 0 8 ) )、ならびにFRライブラリのスクリーニングに由来するフレームワーク領域(例えば、Bacca et al., J. Biol. Chem. 272 : 10678 - 10684 (1997)及びRosok et al., J. Biol. Chem. 271 : 22611 - 22618 (1996)を参照されたい)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0084】

#### 4. ヒト抗体

特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野において既知である様々な技術を使用して産生することができる。ヒト抗体は一般に、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5 : 368 - 74 (2001)及びLonberg, Curr. Opin. Immunol. 20 : 450 - 459 (2008)に記載されている。

【0085】

ヒト抗体は、抗原投与にตอบสนองして、無傷ヒト抗体またはヒト可変領域を有する無傷抗体を産生するように修飾されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって調製され得る。そのような動物は典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置き換えるか、または染色体外に存在するか、もしくは動物の染色体内にランダムに組み込まれている、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含有する。そのようなトランスジェニックマウスにおいて、内因性免疫グロブリン遺伝子座は一般に、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法に関する概説については、Lonberg, Nat. Biotech. 23 : 1117 - 1125 (2005)を参照されたい。例えば、米国特許第6,075,181号及び同第6,150,584(XENOMOUSE(商標)技術を説明)、米国特許第5,770,429号(HuMab(登録商標)技術を説明)、US7041870(K-M MOUSE(登録商標)技術を説明)、ならびにUS2007/0061900(VELOCIMouse(登録商標)技術を説明)もまた、参照されたい。そのような動物によって生成された無傷抗体からのヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによって更に修飾され得る。

【0086】

ヒト抗体はまた、ハイブリドーマに基づく方法によっても作製され得る。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞株が、記載されている。(例えば、Kozbor J. Immunol., 133 : 3001 (1984)、Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)、及びBoerner et al., J. Immunol., 147 : 86 (1991)を参照されたい。)ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されるヒト抗体もまた、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 : 3557 - 3562 (2006)に記載されている。追加の方法としては、例えば、US7189826(ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を説明)及びNi, Xian dai Mi anyixue, 26(4) : 265 - 268 (2006)(ヒト-ヒトハイブリドーマを説明)に記載される方法が挙げられる。ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ技術)はまた、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3) : 927 - 937 (2005)及びVollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3) : 185 - 91 (2005)にも記載されている。

【0087】

ヒト抗体はまた、ヒト由来ファージ提示ライブラリから選択されるFvクローン可変ドメイン配列を単離することによっても生成され得る。その後、そのような可変ドメイン配列は、所望されるヒト定常ドメインと組み合わせられ得る。抗体ライブラリからヒト抗体を選

10

20

30

40

50

択するための技術が、本明細書に記載される。

【0088】

5. ライブラリ由来抗体

本発明の抗体は、所望される活性（複数可）を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリをスクリーニングすることによって単離され得る。例えば、ファージ提示ライブラリを生成し、所望される結合特性を保有する抗体についてそのようなライブラリをスクリーニングするための様々な方法が、当該技術分野において既知である。そのような方法は、例えば、Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) に概説され、例えば、McCafferty et al., *Nature* 348: 552-554、Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991)、Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992)、Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248: 161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)、Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004)、Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004)、Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004)、及び Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004) に更に記載されている。

10

20

【0089】

特定のファージ提示法において、VH及びVL遺伝子のレパートリーが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により別個にクローニングされ、ファージライブラリ内で無作為に組み換えられ、これがその後、Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994) に記載されるように抗原結合ファージについてスクリーニングされ得る。ファージは、典型的には、一本鎖Fv (scFv) 断片またはFab断片のいずれかとして抗体断片を提示する。免疫化源に由来するライブラリは、ハイブリドーマの構築を必要とすることなく、高親和性抗体を免疫原に提供する。あるいは、Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993) によって記載されるように、ナイーブレパートリーは、（例えば、ヒトから）クローニングされて、いかなる免疫化も伴わずに、幅広い非自己抗原及びまた自己抗原に対する抗体の単一源を提供することができる。最後に、ナイーブラライブラリはまた、Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992) に記載されるように、幹細胞からの再配置されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含有するPCRプライマーを使用して、高度可変CDR3領域をコードし、かつインビトロで再配置を達成することによって、合成的にも作製され得る。ヒト抗体ファージライブラリについて記載する特許公報としては、例えば、米国特許第5,750,373号、ならびに米国特許公開第2005/0079574号、同第2005/0119455号、同第2005/0266000号、同第2007/0117126号、同第2007/0160598号、同第2007/0237764号、同第2007/0292936号、及び同第2009/0002360号が挙げられる。

30

40

【0090】

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

【0091】

6. 多重特異性抗体

特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体である。「多重特異性抗体」という用語は、最も広義に使用され、多重エピソード特異性を有する（すなわち、1つの生物学的分子上の2つもしくはそれ以上の異なる

50

エピトープに特異的に結合することができるか、または2つもしくはそれ以上の異なる生物学的分子上のエピトープに特異的に結合することができる) 抗原結合ドメインを含む抗体を具体的に網羅する。いくつかの実施形態において、多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、多重特異性抗体(二重特異性抗体など)の抗原結合ドメインは、2つのVH/VL単位を含み、第1のVH/VL単位は、第1のエピトープに特異的に結合し、第2のVH/VL単位は、第2のエピトープに特異的に結合し、各VH/VL単位は、重鎖可変ドメイン(VH)及び軽鎖可変ドメイン(VL)を含む。そのような多重特異性抗体としては、完全長抗体、2つ以上のVL及びVHドメインを有する抗体、抗体断片(Fab、Fv、dsFv、scFv、ダイアボディ、二重特異性ダイアボディ、及びトリアボディなど)、共有結合的または非共有結合的に連結されている抗体断片が挙げられるが、これらに限定されない。重鎖可変領域の少なくとも一部分及び/または軽鎖可変領域の少なくとも一部分を更に含むVH/VL単位はまた、「アーム」または「ヘミマー」または「半抗体」とも称され得る。いくつかの実施形態において、ヘミマーは、第2のヘミマーとの分子内ジスルフィド結合が形成されることを可能にするのに十分な重鎖可変領域の一部分を含む。いくつかの実施形態において、ヘミマーは、例えば、相補的ホール変異またはノブ変異を含む第2のヘミマーまたは半抗体とのヘテロ二量体化を可能にする、ノブ変異またはホール変異を含む。ノブ変異及びホール変異は、本明細書において更に考察される。

10

## 【0092】

20

特定の実施形態において、本明細書に提供される多重特異性抗体は、二重特異性抗体であり得る。「二重特異性抗体」という用語は、最も広義に使用され、1つの生物学的分子上の2つの異なるエピトープに特異的に結合することができるか、または2つの異なる生物学的分子上のエピトープに特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む多重特異性抗体を網羅する。二重特異性抗体はまた、本明細書において、「二重特異性」を有するもの、または「二重特異性」であるとも称される。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製され得る。本明細書で使用される場合、「二重パラトピック抗体」という用語は、第1の抗原結合ドメイン及び第2の抗原結合ドメインが、同じ抗原分子上の2つの異なるエピトープに結合する二重特異性抗体を指すか、またはそれは、2つの異なる抗原分子上のエピトープに結合してもよい。

30

## 【0093】

いくつかの実施形態において、二重パラトピック抗体の第1の抗原結合ドメイン及び第2の抗原結合ドメインは、1つかつ同じ抗原分子内の2つのエピトープに結合してもよい(分子内結合)。例えば、二重パラトピック抗体の第1の抗原結合ドメイン及び第2の抗原結合ドメインは、同じ抗体分子上の2つの異なるエピトープに結合してもよい。特定の実施形態において、二重パラトピック抗体が結合する2つの異なるエピトープは、通常1つの単一特異性抗体(例えば、従来の抗体など)または1つの免疫グロブリンの単一可変ドメインに同時には結合しないエピトープである。

## 【0094】

いくつかの実施形態において、二重パラトピック抗体の第1の抗原結合ドメイン及び第2の抗原結合ドメインは、2つの別個の抗原分子内に位置するエピトープに結合してもよい。

40

## 【0095】

多重特異性抗体を作製するための技術としては、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組み換え同時発現(Milstein and Cuellio, Nature 305: 537 (1983)), WO93/08829、及びTrauneker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)を参照されたい)、ならびに「ノブインホール」操作(例えば、米国特許第5,731,168号)、WO2009/089004、US2009/0182127、US2011/0287009、Marvin and Zhu, Acta Pharmacol. Sin. (2005) 26(6): 649-658、及びKontermann(2005) Acta Pharmac

50

ol . Sin . , 26 : 1 - 9を参照されたい)が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、「ノブイントゥホール」または「KnH」技術という用語は、2つのポリペプチドを、それらが相互作用する界面で一方のポリペプチドに隆起(ノブ)を導入し、他方のポリペプチドに空洞(ホール)を導入することによって、インビトロまたはインビボでの対合を指向する技術を指す。例えば、KnHは、抗体のFc:Fc結合界面、CL:CH1界面、またはVH/VL界面に導入されている(例えば、US2011/0287009、US2007/0178552、WO96/027011、WO98/050431、及びZhu et al. , 1997, Protein Science 6 : 781 - 788を参照されたい)。いくつかの実施形態において、KnHにより、多重特異性抗体の製造中に2つの異なる重鎖の対合が駆動される。例えば、それらのFc領域内にKnHを有する多重特異性抗体は、各Fc領域に連結された単一可変ドメインを更に含み得るか、または類似のもしくは異なる軽鎖可変ドメインと対合する異なる重鎖可変ドメインを更に含み得る。KnH技術を使用して、2つの異なる受容体細胞外ドメインをとともに、または異なる標的認識配列を含む(例えば、アフィボディ、ペプチボディ、及び他のFc融合を含む)任意の他のポリペプチド配列を対合させることもできる。

10

#### 【0096】

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

#### 【0097】

「隆起」は、第1のポリペプチドの界面から突出し、したがって、隣接界面(すなわち、第2のポリペプチドの界面)の補償空洞内に位置付け可能となることで、例えば、ヘテロ多量体を安定させ、それによりホモ多量体形成よりもヘテロ多量体形成が好都合になる、少なくとも1つのアミノ酸側鎖を指す。隆起は、元の界面に存在し得るか、または合成的に(例えば、界面をコードする核酸を改変することによって)導入され得る。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチドの界面をコードする核酸は、隆起をコードするように改変される。これを達成するために、第1のポリペプチドの界面の少なくとも1つの「元の」アミノ酸残基をコードする核酸が、元のアミノ酸残基よりも大きい側鎖体積を有する少なくとも1つの「移入」アミノ酸残基をコードする核酸で置き換えられる。2つ以上の元の残基及び対応する移入残基が存在し得ることが理解されるだろう。様々なアミノ酸残基の側鎖体積は、例えば、US2011/0287009の表1に示される。「隆起」を導入する変異は、「ノブ変異」と称され得る。

20

30

#### 【0098】

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

#### 【0099】

「空洞」は、第2のポリペプチドの界面から凹んでおり、したがって、隣接する第1のポリペプチドの界面上の対応する隆起を収容する少なくとも1つのアミノ酸側鎖を指す。空洞は、元の界面に存在し得るか、または合成的に(例えば、界面をコードする核酸を改変することによって)導入され得る。いくつかの実施形態において、第2のポリペプチドの界面をコードする核酸は、空洞をコードするように改変される。これを達成するために、第2のポリペプチドの界面の少なくとも1つの「元の」アミノ酸残基をコードする核酸が、元のアミノ酸残基よりも小さい側鎖体積を有する少なくとも1つの「移入」アミノ酸残基をコードするDNAで置き換えられる。2つ以上の元の残基及び対応する移入残基が存在し得ることが理解されるだろう。いくつかの実施形態において、空洞の形成のための移入残基は、アラニン(A)、セリン(S)、トレオニン(T)、及びバリン(V)から選

40

50

扱される天然に存在するアミノ酸残基である。いくつかの実施形態において、移入残基は、セリン、アラニン、またはトレオニンである。いくつかの実施形態において、チロシン、アルギニン、フェニルアラニン、またはトリプトファンなどの空洞の形成のための元の残基は、大きい側鎖体積を有する。「空洞」を導入する変異は、「ホール変異」と称され得る。

【0100】

隆起は、空洞内で「位置付け可能」であり、これは、それぞれ、第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドの界面上の隆起及び空洞の空間的位置、ならびに隆起及び空洞のサイズが、界面での第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとの正常な会合を著しく乱すことなく隆起が空洞内に位置し得るようなものであることを意味する。Tyr、Phe、及びTrpなどの隆起は典型的には、界面の軸から垂直には延びず、好ましい立体構造を有さず、隆起と対応する空洞との整列は、場合によっては、X線結晶学または核磁気共鳴(NMR)によって得られるものなどの三次元構造に基づいて隆起/空洞の対をモデル化することに依存し得る。これは、当該技術分野で広く受け入れられている技術を使用して達成され得る。

10

【0101】

いくつかの実施形態において、IgG1定常領域内のノブ変異は、T366Wである。いくつかの実施形態において、IgG1定常領域内のホール変異は、T366S、L368A、及びY407Vから選択される1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態において、IgG1定常領域内のホール変異は、T366S、L368A、及びY407Vを含む。

20

【0102】

いくつかの実施形態において、IgG4定常領域内のノブ変異は、T366Wである。いくつかの実施形態において、IgG4定常領域内のホール変異は、T366S、L368A、及びY407Vから選択される1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態において、IgG4定常領域内のホール変異は、T366S、L368A、及びY407Vを含む。

【0103】

多重特異性抗体はまた、静電ステアリング効果を操作して抗体Fc-ヘテロ二量体分子を作製すること(WO2009/089004A1)、2つ以上の抗体または断片を架橋すること(例えば、US4676980及びBrennan et al., Science, 229:81(1985)を参照されたい)、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体を産生すること(例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992)を参照されたい)、「ダイアボディ」技術を使用して二重特異性抗体断片を作製すること(Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993))、ならびに一本鎖Fv(sFv)二量体を使用すること(Gruber et al., J. Immunol., 152:5368(1994))、ならびに例えば、Tutt et al., J. Immunol., 147:60(1991)に記載される三重特異性抗体を調製することによって作製され得る。

30

【0104】

「オクトパス抗体」または「二重可変ドメイン免疫グロブリン」(DVD)を含む3つ以上の機能的抗原結合部位を有する操作された抗体もまた、本明細書に含まれる(US2006/0025576A1、及びWu et al. (2007) Nature Biotechnology)。

40

【0105】

特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸修飾が、本明細書に提供される抗体のFc領域内に導入され得、それによりFc領域バリエーションが生成され得る。Fc領域バリエーションは、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾(例えば、置換)を含むヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fc領域)を含み得る。

【0106】

特定の実施形態において、本発明は、全てではないがいくつかのエフェクター機能を所有

50

し、それにより、インビボでの抗体の半減期が重要であるが、更に特定のエフェクター機能（補体及びADCCなど）が不要であるか、または有害である用途に対して望ましい候補となる、抗体バリエーションを企図する。インビトロ及び/またはインビボ細胞毒性アッセイを実行して、CDC及び/またはADCC活性の低下/欠乏を確認することができる。例えば、Fc受容体（FcR）結合アッセイを実行して、抗体がFcR結合を欠く（故にADCC活性を欠く可能性が高い）が、FcRn結合能力を保持していることを確実にすることができる。ADCCを媒介するための初代細胞であるNK細胞が、Fc（RIIのみ）を発現する一方で、単球は、Fc（RI、Fc（RII、及びFc（RIII）を発現する。造血細胞でのFcR発現は、Ravetch and Kinetic, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457 - 492 (1991) の464頁の表3に要約される。対象となる分子のADCC活性を評定するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、US5500362（例えば、Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83: 7059 - 7063 (1986)）を参照されたい）及びHellstrom, I. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82: 1499 - 1502 (1985)、5, 821, 337 (Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166: 1351 - 1361 (1987)）を参照されたい）に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法が用いられもよい（例えば、フローサイトメトリーのためのACTI（商標）非放射性細胞毒性アッセイ（Cell Technology, Inc. Mountain View, CA、及びCytotoxic 96（登録商標）非放射性細胞毒性アッセイ（Promega, Madison, WI）を参照されたい）。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核球細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。あるいは、または加えて、対象となる分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95: 652 - 656 (1998)）に開示されるものなどの動物モデルにおいて評価されてもよい。C1q結合アッセイを実行して、抗体がC1qに結合することができず、故にCDC活性を欠くことを確認することもできる。例えば、WO2006/029879及びWO2005/100402におけるC1q及びC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評定するために、CDCアッセイが実行されてもよい（例えば、Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996)、Cragg, M. S. et al., *Blood* 101: 1045 - 1052 (2003)、及びCragg, M. S. and M. J. Glennie, *Blood* 103: 2738 - 2743 (2004)）を参照されたい。FcRn結合及びインビボクリアランス/半減期決定もまた、当該技術分野において既知である方法を使用して実行することができる（Petkova, S. B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12): 1759 - 1769 (2006)）。

#### 【0107】

低下したエフェクター機能を有する抗体としては、Fc領域残基238、265、269、270、297、327、及び329のうちの1つ以上の置換を有するものが挙げられる（米国特許第6,737,056号）。そのようなFc変異体は、残基265及び297のアラニンへの置換を有するいわゆる「DANA」Fc変異体を含む、アミノ酸265位、269位、270位、297位、及び327位のうちの2つ以上に置換を有するFc変異体を含む（US7332581）。

#### 【0108】

特定の実施形態において、野生型ヒトFc領域のPro329が、グリシンもしくはアルギニン、または、Fcのプロリン329とFcγRIIIのトリプトファン残基Trp87及びTrp110との間に形成される、Fc/Fc受容体界面内のプロリンサンドイッチを破壊するのに十分に大きなアミノ酸残基で置換される（Sondermann et al.: *Nature* 406, 267 - 273 (20 July 2000)）。更なる一実施形態において、Fcバリエーション内の少なくとも1つの更なるアミノ酸置換は、S228

10

20

30

40

50

P、E 2 3 3 P、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、L 2 3 5 E、N 2 9 7 A、N 2 9 7 D、またはP 3 3 1 Sであり、更に別の実施形態において、該少なくとも1つの更なるアミノ酸置換は、ヒトIgG1 Fc領域のL 2 3 4 A及びL 2 3 5 A、またはヒトIgG4 Fc領域のS 2 2 8 P及びL 2 3 5 Eである（その全体が参照によって組み込まれる、US 8 9 6 9 5 2 6）。

【0109】

特定の実施形態において、ポリペプチドは、野生型ヒトIgG Fc領域のFcバリエーションを含み、このポリペプチドは、グリシンで置換されたヒトIgG Fc領域のPro 3 2 9を有し、Fcバリエーションは、ヒトIgG1 Fc領域のL 2 3 4 A及びL 2 3 5 A、またはヒトIgG4 Fc領域のS 2 2 8 P及びL 2 3 5 Eで少なくとも2つの更なるアミノ酸置換を含み、残基は、KabattのEUインデックスに従って番号付けされる（その全体が参照によって組み込まれる、US 8 9 6 9 5 2 6）。特定の実施形態において、野生型ヒトIgG Fc領域を含むポリペプチドによって誘導されるADCCの少なくとも20%のADCCへの下方調節のため、及び/またはADCPの下方調節のために、P 3 2 9 G、L 2 3 4 A、及びL 2 3 5 Aの置換を含むポリペプチドは、ヒトFcRIIA及びFcRIIAに対する親和性の低下を呈する（その全体が参照によって組み込まれる、US 8 9 6 9 5 2 6）。

10

【0110】

特定の実施形態において、野生型ヒトFcポリペプチドのFcバリエーションを含むポリペプチドは、三重変異、つまり、Pro 3 2 9位におけるアミノ酸置換、L 2 3 4 A変異、及びL 2 3 5 A変異（P 3 2 9 / L A L A）を含む（その全体が参照によって組み込まれる、米国特許第8,969,526号）。特定の実施形態において、ポリペプチドは、以下のアミノ酸置換、つまり、P 3 2 9 G、L 2 3 4 A、及びL 2 3 5 Aを含む。

20

【0111】

FcRへの改善または縮小した結合を有する特定の抗体バリエーションが、記載されている。（例えば、US 6 7 3 7 0 5 6、WO 2 0 0 4 / 0 5 6 3 1 2、及びShields et al., (2001) J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604を参照されたい）。

【0112】

特定の実施形態において、抗体バリエーションは、ADCCを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298位、333位、及び/または334位（残基のEU番号付け）での置換を有するFc領域を含む。

30

【0113】

いくつかの実施形態において、例えば、US 6 1 9 4 5 5 1、WO 1 9 9 9 / 5 1 6 4 2、及びIdusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)に記載される、改変（すなわち、改善または縮小のいずれか）したC1q結合及び/または補体依存性細胞毒性（CDC）をもたらす改変が、Fc領域内で行われる。

【0114】

増加した半減期と、母体IgGの胎児への導入に關与する新生児Fc受容体（FcRn）への改善された結合とを有する抗体（Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976)、及びKim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)）が、US 2 0 0 5 / 0 0 1 4 9 3 4 A 1（Hintonら）に記載されている。それらの抗体は、Fc領域のFcRnへの結合を改善する1つ以上の置換をその中に有するFc領域を含む。そのようなFcバリエーションとしては、Fc領域残基238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、または434のうちの1つ以上での置換、例えば、Fc領域残基434の置換を有するものが挙げられる（US 7 3 7 1 8 2 6）。

40

【0115】

50

Fc領域バリエーションの他の例に関しては、Duncan & Winter, Nature 322: 738-40 (1988)、US 5648260、US 5624821、及びWO 1994/29351もまた参照されたい。

【0116】

7. システイン操作された抗体バリエーション

特定の実施形態において、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン操作された抗体、例えば、「THIOMAB (商標) 抗体」を作製することが望ましい場合がある。特定の実施形態において、置換された残基は、抗体の到達可能な部位で生じる。それらの残基をシステインで置換することによって、反応性チオール基がそれにより抗体の到達可能な部位に位置付けられ、本明細書に更に記載されるように、それを使用して、抗体を薬物部分にコンジュゲートして、免疫コンジュゲートを作製することができる。特定の実施形態において、以下の残基、軽鎖のV205 (Kabats番号付け)、軽鎖のK149 (Kabats番号付け)、重鎖のA118 (EU番号付け)、及び重鎖Fc領域のS400 (EU番号付け)のいずれか1つ以上が、システインで置換され得る。システイン操作された抗体は、例えば、US 7521541、Shen, B. et al (2012) Nat. Biotechnol. 30(2): 184-189、Sukumaran et al (2015) Pharm Res 32: 1884-1893に記載されるように生成され得る。

10

【0117】

抗体-薬物コンジュゲート(ADC、免疫コンジュゲート)は、1つ以上の抗体のシステインチオール基を、薬物に結合した1つ以上のリンカー部分にコンジュゲートし、それにより抗体-リンカー-薬物複合体を形成することにより形成され得る。pH7付近でプロトン化され、求核性が低いほとんどのアミンとは異なり、システインチオールは中性pHで反応性求核剤である。遊離チオール(RSH、スルフヒドリル)基は比較的反応性が高いため、システイン残基を有するタンパク質は、ジスルフィド結合したオリゴマーとしてその酸化形態で存在するか、またはジスルフィド基が内部架橋していることが多い。抗体システインチオール基は一般に、抗体のアミンまたはヒドロキシル基よりも求電子性コンジュゲーション試薬に対する反応性が高く、すなわち、求核性が高い。タンパク質の様々なアミノ酸残基をシステインアミノ酸に変異させることによるシステインチオール基の操作には、特に、不對(遊離Cys)残基または反応もしくは酸化が比較的起こりやすい残基の場合に、問題が生じる潜在性がある。E. coliの周辺質中、培養上清中、または部分的もしくは完全に精製されたタンパク質中のいずれにせよ、タンパク質の濃縮溶液中では、タンパク質の表面上の不對Cys残基が対合し、酸化して、分子間ジスルフィドを形成し、故にタンパク質二量体または多量体を形成することができる。ジスルフィド二量体の形成により、新たなCysは、薬物、リガンド、または他の標識に対するコンジュゲーションについて非反応性となる。更に、タンパク質が、酸化により新たに操作されたCys残基と既存のCys残基との間で分子間ジスルフィド結合を形成した場合、いずれのCys基も、活性部位の関与及び相互作用に利用することができない。更に、このタンパク質は、誤った折り畳みまたは三次構造の喪失により不活性または非特異的となり得る(Zhang et al. (2002) Anal. Biochem. 311: 1-9)。

20

30

40

【0118】

いくつかの態様において、THIOMAB (商標) 抗体は、以下の表1に列挙される重鎖または軽鎖システイン置換のうちの1つを含む。

表1 THIOMAB (商標) 抗体中の軽鎖システイン変異部位

鎖 (HC/L C)	残 基	スクリーニング変異部位 番号	GNE変異部位番 号	K a b a t 変異部位 番号
LC	T	2 2	2 2	2 2
LC	K	3 9	3 9	3 9
LC	Y	4 9	4 9	4 9
LC	Y	5 5	5 5	5 5
LC	T	8 5	8 5	8 5
LC	T	9 7	9 7	9 7
LC	I	1 0 6	1 0 6	1 0 6
LC	R	1 0 8	1 0 8	1 0 8
LC	R	1 4 2	1 4 2	1 4 2
LC	K	1 4 9	1 4 9	1 4 9
LC	V	2 0 5	2 0 5	2 0 5
HC	T	1 1 7	1 1 4	1 1 0
HC	A	1 4 3	1 4 0	1 3 6
HC	L	1 7 7	1 7 4	1 7 0
HC	L	1 8 2	1 7 9	1 7 5
HC	T	1 9 0	1 8 7	1 8 3
HC	T	2 1 2	2 0 9	2 0 5
HC	V	2 6 5	2 6 2	2 5 8
HC	G	3 7 4	3 7 1	3 6 7
HC	Y	3 7 6	3 7 3	3 6 9
HC	E	3 8 5	3 8 2	3 7 8
HC	S	4 2 7	4 2 4	4 2 0
HC	N	4 3 7	4 3 4	4 3 0
HC	Q	4 4 1	4 3 8	4 3 4

10

20

30

## 【 0 1 1 9 】

他の態様において、THIOMAB（商標）抗体は、表2に列挙される重鎖システイン置換のうちの1つを含む。

表2 THIOMAB（商標）抗体中の重鎖システイン変異部位

40

50

鎖 (HC/LC)	残基	スクリーニング変異部位番号	GNE変異部位番号	K a b a t 変異部位番号
HC	T	1 1 7	1 1 4	1 1 0
HC	A	1 4 3	1 4 0	1 3 6
HC	L	1 7 7	1 7 4	1 7 0
HC	L	1 8 2	1 7 9	1 7 5
HC	T	1 9 0	1 8 7	1 8 3
HC	T	2 1 2	2 0 9	2 0 5
HC	V	2 6 5	2 6 2	2 5 8
HC	G	3 7 4	3 7 1	3 6 7
HC	Y	3 7 6	3 7 3	3 6 9
HC	E	3 8 5	3 8 2	3 7 8
HC	S	4 2 7	4 2 4	4 2 0
HC	N	4 3 7	4 3 4	4 3 0
HC	Q	4 4 1	4 3 8	4 3 4

10

20

## 【0120】

いくつかの他の態様において、THIOMAB（商標）抗体は、表3に列挙される軽鎖システイン置換のうちの1つを含む

表3 THIOMAB（商標）抗体中の軽鎖システイン変異部位

鎖 (HC/LC)	残基	スクリーニング変異部位番号	GNE変異部位番号	K a b a t 変異部位番号
LC	I	1 0 6	1 0 6	1 0 6
LC	R	1 0 8	1 0 8	1 0 8
LC	R	1 4 2	1 4 2	1 4 2
LC	K	1 4 9	1 4 9	1 4 9

30

## 【0121】

いくつかの他の態様において、THIOMAB（商標）抗体は、表4に列挙される重鎖または軽鎖システイン置換のうちの1つを含む。

表4 THIOMAB（商標）抗体中の重鎖システイン変異部位

鎖 (HC/LC)	残基	スクリーニング変異部位番号	GNE変異部位番号	K a b a t 変異部位番号
LC	K	1 4 9	1 4 9	1 4 9
HC	A	1 4 3	1 4 0	1 3 6
HC	A	1 2 1	1 1 8	1 1 4

40

## 【0122】

がんの治療における本発明の抗体 - 薬物コンジュゲートに有用であり得るシステイン操作された抗体としては、細胞表面受容体及び腫瘍関連抗原（TAA）に対する抗体が挙げられるが、これらに限定されない。腫瘍関連抗原は、当該技術分野において既知であり、当該技術分野において周知の方法及び情報を使用して抗体を生成する上で使用するために調

50

製され得る。がんの診断及び療法のための有効な細胞標的を発見する試みの中で、研究者らは、1つ以上の正常な非がん性細胞（複数可）と比較して、1つ以上の特定の種類（複数可）のがん細胞の表面上で特異的に発現される膜貫通ポリペプチドまたは他の様式で腫瘍に関連するポリペプチドを特定しようとした。そのような腫瘍関連ポリペプチドは、非がん性細胞の表面上と比較して、がん細胞の表面上でより豊富に発現されることが多い。そのような腫瘍関連細胞表面の抗原ポリペプチドの特定により、抗体に基づく療法を介してがん細胞の破壊のために特異的に標的とする能力が生じた。

#### 【0123】

腫瘍関連抗原TAAの例としては、本明細書に列挙されるTAA(1)~(53)が挙げられるが、これらに限定されない。便宜上、これらの抗原（全て当技術分野において既知である）に関する情報を本明細書に列挙し、この情報は、名称、別称、Genbank受託番号及び主な参考文献（複数可）に続き、National Center for Biotechnology Information (NCBI)の核酸及びタンパク質配列を特定する慣例を含む。TAA(1)~(53)に対応する核酸及びタンパク質配列は、GenBankなどの公的データベースにおいて入手可能である。抗体によって標的とされる腫瘍関連抗原としては、引用される参考文献において特定されている配列と比較して、少なくとも約70%、80%、85%、90%、もしくは95%の配列同一性を保有する全てのアミノ酸配列バリエーション及びアイソフォーム、または引用される参考文献に見出される配列を有するTAAと実質的に同じ生物学的特性もしくは特徴を呈するものが挙げられる。例えば、バリエーション配列を有するTAAは一般に、列挙されている対応する配列を有するTAAに特異的に結合する抗体に特異的に結合することができる。本明細書に具体的に引用される参考文献中の配列及び開示は、参照により明示的に組み込まれる。

#### 【0124】

##### 腫瘍関連抗原

(1) BMPR1B (骨形成タンパク質受容体IB型、Genbank受託番号NM\_001203) ten Dijke, P., et al. Science 264 (5155) : 101 - 104 (1994)、Oncogene 14 (11) : 1377 - 1382 (1997)、WO2004063362 (請求項2)、WO2003042661 (請求項12)、US2003134790 - A1 (38~39頁)、WO2002102235 (請求項13、296頁)、WO2003055443 (91~92頁)、WO200299122 (実施例2、528~53頁)、WO2003029421 (請求項6)、WO2003024392 (請求項2、図112)、WO200298358 (請求項1、183頁)、WO200254940 (100~101頁)、WO200259377 (349~350頁)、WO200230268 (請求項27、376頁)、WO200148204 (実施例、図4) NP\_001194 骨形成タンパク質受容体、IB型 / pid = NP\_001194.1 - 相互参照: MIM: 603248、NP\_001194.1、AY065994。

#### 【0125】

(2) E16 (LAT1、SLC7A5、Genbank受託番号NM\_003486) Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283 - 288 (1999)、Nature 395 (6699) : 288 - 291 (1998)、Gaugitsch, H.W., et al. (1992) J. Biol. Chem. 267 (16) : 11267 - 11273)、WO2004048938 (実施例2)、WO2004032842 (実施例IV)、WO2003042661 (請求項12)、WO2003016475 (請求項1)、WO200278524 (実施例2)、WO200299074 (請求項19、127~129頁)、WO200286443 (請求項27、222、393頁)、WO2003003906 (請求項10、293頁)、WO200264798 (請求項33、93~95頁)、WO200014228 (請求項5、133~136頁)、US2003224454 (図3)、WO2003025138 (請求項12、150頁)、NP\_003477 溶質担体ファミリー7 (カチオン性アミノ酸輸

10

20

30

40

50

送体、y+システム)、メンバー5 / pid = NP\_\_003477.3 - Homo sapiens、相互参照: MIM: 600182、NP\_\_003477.3、NM\_\_015923、NM\_\_003486\_\_1。

【0126】

(3) STEAP1 (前立腺の6回膜貫通上皮抗原、Genbank受託番号NM\_\_012449) Cancer Res. 61(15), 5857-5860(2001)、Hubert, R. S., et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96(25): 14523-14528)、WO2004065577 (請求項6)、WO2004027049 (図1L)、EP1394274 (実施例11)、WO2004016225 (請求項2)、WO2003042661 (請求項12)、US2003157089 (実施例5)、US2003185830 (実施例5)、US2003064397 (図2)、WO200289747 (実施例5、618~619頁)、WO2003022995 (実施例9; 図13A、実施例53; 173頁、実施例2; 図2A)、NP\_\_036581前立腺の6回膜貫通上皮抗原、相互参照: MIM: 604415、NP\_\_036581.1、NM\_\_012449\_\_1。

10

【0127】

(4) 0772P (CA125、MUC16、Genbank受託番号AF361486) J. Biol. Chem. 276(29): 27371-27375(2001)、WO2004045553 (請求項14)、WO200292836 (請求項6、図12)、WO200283866 (請求項15、116~121頁)、US2003124140 (実施例16)、US798959。相互参照: GI: 34501467、AAK74120.3、AF361486\_\_1。

20

【0128】

(5) MPF (MPF、MSLN、SMR、巨核球増強因子、メソテリン、Genbank受託番号NM\_\_005823) Yamaguchi, N., et al. Biol. Chem. 269(2), 805-808(1994)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96(20): 11531-11536(1999)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93(1): 136-140(1996)、J. Biol. Chem. 270(37): 21984-21990(1995)、WO2003101283 (請求項14)、(WO2002102235 (請求項13、287~288頁)、WO2002101075 (請求項4、308~309頁)、WO200271928 (320~321頁)、WO9410312 (52~57頁)、相互参照: MIM: 601051、NP\_\_005814.2、NM\_\_005823\_\_1。

30

【0129】

(6) Napi3b (NAPI-3B、NPTIIb、SLC34A2、溶質輸送体ファミリー34 (リン酸ナトリウム)、メンバー2、II型ナトリウム依存性リン酸輸送体3b、Genbank受託番号NM\_\_006424) J. Biol. Chem. 277(22): 19665-19672(2002)、Genomics 62(2): 281-284(1999)、Feild, J. A., et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258(3): 578-582)、WO2004022778 (請求項2)、EP1394274 (実施例11)、WO2002102235 (請求項13、326頁)、EP875569 (請求項1、17~19頁)、WO200157188 (請求項20、329頁)、WO2004032842 (実施例IV)、WO200175177 (請求項24、139~140頁)、相互参照: MIM: 604217、NP\_\_006415.1、NM\_\_006424\_\_1。

40

【0130】

(7) Sema5b (FLJ10372、KIAA1445、Mm.42015、SEMA5B、SEMA5G、セマフォリン5b Hlog、セマドメイン、7回トロンボスポンジン反復(1型及び1型様)、膜貫通ドメイン(TM)、及び短い細胞質ドメイン、(セマフォリン)5B、Genbank受託番号AB040878) Nagase T.,

50

et al. (2000) DNA Res. 7 (2) : 143 - 150)、WO2004000997 (請求項1)、WO2003003984 (請求項1)、WO200206339 (請求項1、50頁)、WO200188133 (請求項1、41~43頁、48~58頁)、WO2003054152 (請求項20)、WO2003101400 (請求項11)、受託番号: Q9P283、EMBL、AB040878、BAA95969.1. Genew; HGNC: 10737。

【0131】

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik、C530008O16Rik、RIKEN cDNA 2700050C12、RIKEN cDNA 2700050C12遺伝子、Genbank受託番号AY358628)、Ross et al. (2002) Cancer Res. 62: 2546 - 2553、US2003129192 (請求項2)、US2004044180 (請求項12)、US2004044179 (請求項11)、US2003096961 (請求項11)、US2003232056 (実施例5)、WO2003105758 (請求項12)、US2003206918 (実施例5)、EP1347046 (請求項1)、WO2003025148 (請求項20)、相互参照: GI: 37182378、AAQ88991.1、AY358628\_1。

10

【0132】

(9) ETBR (エンドセリンB型受容体、Genbank受託番号AY275463)、Nakamuta M., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34 - 39, 1991、Ogawa Y., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248 - 255, 1991、Arai H., et al. Jpn. Circ. J. 56, 1303 - 1307, 1992、Arai H., et al. J. Biol. Chem. 268, 3463 - 3470, 1993、Sakamoto A., Yanagisawa M., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656 - 663, 1991、Elshourbagy N.A., et al. J. Biol. Chem. 268, 3873 - 3879, 1993、Haendler B., et al. J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1 - S4, 1992、Tsutsumi M., et al. Gene 228, 43 - 49, 1999、Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899 - 16903, 2002、Bourgeois C., et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116 - 3123, 1997、Okamoto Y., et al. Biol. Chem. 272, 21589 - 21596, 1997、Verheij J.B., et al. Am. J. Med. Genet. 108, 223 - 225, 2002、Hofstra R.M.W., et al. Eur. J. Hum. Genet. 5, 180 - 185, 1997、Puffenberger E.G., et al. Cell 1179, 1257 - 1266, 1994、Attie T., et al., Hum. Mol. Genet. 4, 2407 - 2409, 1995、Auricchio A., et al. Hum. Mol. Genet. 5: 351 - 354, 1996、Amiel J., et al. Hum. Mol. Genet. 5, 355 - 357, 1996、Hofstra R.M.W., et al. Nat. Genet. 12, 445 - 447, 1996、Svensson P.J., et al. Hum. Genet. 103, 145 - 148, 1998、Fuchs S., et al. Mol. Med. 7, 115 - 124, 2001、Pingault V., et al. (2002) Hum. Genet. 111, 198 - 206、WO2004045516 (請求項1)、WO2004048938 (実施例2)、WO2004040000 (請求項151)、WO2003087768 (請求項1)、WO2003016475 (請求項1)、WO2003016475 (請求項1)、WO200261087 (図1)、WO2003016494 (図6)、WO2003025138 (請求項12、144頁)、WO200198351 (請求項1、124~125頁)、EP522868 (請求項8、図2)、WO200177172

20

30

40

50

(請求項1、297~299頁)、US2003109676、US6518404(図3)、US5773223(請求項1a、31~34欄)、WO2004001004。

【0133】

(10)MSG783(RNF124、仮説上のタンパク質FLJ20315、Genbank受託番号NM\_017763)、WO2003104275(請求項1)、WO2004046342(実施例2)、WO2003042661(請求項12)、WO2003083074(請求項14、61頁)、WO2003018621(請求項1)、WO2003024392(請求項2、図93)、WO200166689(実施例6)、相互参照：遺伝子座ID：54894、NP\_060233.2、NM\_017763\_1。

10

【0134】

(11)STEAP2(HGNC\_8639、IPCA-1、PCANAP1、STAMP1、STEAP2、STMP、前立腺癌関連遺伝子1、前立腺癌関連タンパク質1、前立腺の6回膜貫通上皮抗原2、6回膜貫通前立腺タンパク質、Genbank受託番号AF455138)Lab.Invest.82(11):1573-1582(2002)、WO2003087306、US2003064397(請求項1、図1)、WO200272596(請求項13、54~55頁)、WO200172962(請求項1、図4B)、WO2003104270(請求項11)、WO2003104270(請求項16)、US2004005598(請求項22)、WO2003042661(請求項12)、US2003060612(請求項12、図10)、WO200226822(請求項23、図2)、WO200216429(請求項12、図10)、相互参照：GI:22655488、AAN04080.1、AF455138\_1。

20

【0135】

(12)TrpM4(BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B、一過性受容体電位カチオンチャネル、サブファミリーM、メンバー4、Genbank受託番号NM\_017636)Xu,X.Z.,et al.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.98(19):10692-10697(2001)、Cell1109(3):397-407(2002)、J.Biol.Chem.278(33):30813-30820(2003)、US2003143557(請求項4)、WO200040614(請求項14、100~103頁)、WO200210382(請求項1、図9A)、WO2003042661(請求項12)、WO200230268(請求項27、391頁)、US2003219806(請求項4)、WO200162794(請求項14、図1A~D)、相互参照：MIM:606936、NP\_060106.2、NM\_017636\_1。

30

【0136】

(13)CRIPTO(CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、奇形癌種由来の成長因子、Genbank受託番号NP\_003203またはNM\_003212)Ciccodicola,A.,et al.EMBOJ.8(7):1987-1991(1989)、Am.J.Hum.Genet.49(3):555-565(1991)、US2003224411(請求項1)、WO2003083041(実施例1)、WO2003034984(請求項12)、WO200288170(請求項2、52~53頁)、WO2003024392(請求項2、図58)、WO200216413(請求項1、94~95、105頁)、WO200222808(請求項2、図1)、US5854399(実施例2、17~18欄)、US5792616(図2)、相互参照：MIM:187395、NP\_003203.1、NM\_003212\_1。

40

【0137】

(14)CD21(CR2(補体受容体2)もしくはC3DR(C3d/Epstein Barrウイルス受容体)またはHs.73792、Genbank受託番号M26004)Fujisaku et al.(1989)J.Biol.Chem.264(4):2118-2125)、Weis J.J.,et al.J.Exp.Med.16

50

7, 1047 - 1066, 1988、Moore M., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9194 - 9198, 1987、Barel M., et al. Mol. Immunol. 35, 1025 - 1031, 1998、Weis J.J., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639 - 5643, 1986、Sinha S.K., et al. (1993) J. Immunol. 150, 5311 - 5320、WO2004045520 (実施例4)、US2004005538 (実施例1)、WO2003062401 (請求項9)、WO2004045520 (実施例4)、WO9102536 (図9.1~9.9)、WO2004020595 (請求項1)、受託番号:P20023、Q13866、Q14212、EMBL、M26004、AAA35786.1。

10

## 【0138】

(15) CD79b (CD79B、CD79、Igb (免疫グロブリン関連ペータ)、B29、Genbank受託番号NM\_000626または11038674) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100(7): 4126 - 4131, Blood (2002) 100(9): 3068 - 3076, Muller et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22(6): 1621 - 1625)、WO2004016225 (請求項2、図140)、WO2003087768、US2004101874 (請求項1、102頁)、WO2003062401 (請求項9)、WO200278524 (実施例2)、US2002150573 (請求項5、15頁)、US5644033、WO2003048202 (請求項1、306及び309頁)、WO99/558658、US6534482 (請求項13、図17A/B)、WO200055351 (請求項11、1145~1146頁)、相互参照:MIM:147245、NP\_000617.1、NM\_000626\_1。

20

## 【0139】

(16) FcRH2 (IFGP4、IRTA4、SPAP1A (SH2ドメイン含有ホスファターゼアンカータンパク質1a)、SPAP1B、SPAP1C、Genbank受託番号NM\_030764、AY358130) Genome Res. 13(10): 2265 - 2270 (2003)、Immunogenetics 54(2): 87 - 95 (2002)、Blood 99(8): 2662 - 2669 (2002)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98(17): 9772 - 9777 (2001)、Xu, M.J., et al. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280(3): 768 - 775、WO2004016225 (請求項2)、WO2003077836、WO200138490 (請求項5、図18D-1~18D-2)、WO2003097803 (請求項12)、WO2003089624 (請求項25)、相互参照:MIM:606509、NP\_110391.2、NM\_030764\_1。

30

## 【0140】

(17) HER2 (ErbB2、Genbank受託番号M11730) Coussens L., et al. Science (1985) 230(4730): 1132 - 1139)、Yamamoto T., et al. Nature 319, 230 - 234, 1986、Semba K., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497 - 6501, 1985、Swiercz J.M., et al. J. Cell Biol. 165, 869 - 880, 2004、Kuhns J.J., et al. J. Biol. Chem. 274, 36422 - 36427, 1999、Cho H.-S., et al. Nature 421, 756 - 760, 2003、Ehsani A., et al. (1993) Genomics 15, 426 - 429、WO2004048938 (実施例2)、WO2004027049 (図1I)、WO2004009622、WO2003081210、WO2003089904 (請求項9)、WO2003016475 (請求項1)、US2003118592、WO2003008537 (請求項1)、WO2003055439 (請求項29、図1A~B)、WO20030

40

50

25228 (請求項37、図5C)、WO200222636 (実施例13、95~107頁)、WO200212341 (請求項68、図7)、WO200213847 (71~74頁)、WO200214503 (114~117頁)、WO200153463 (請求項2、41~46頁)、WO200141787 (15頁)、WO200044899 (請求項52、図7)、WO200020579 (請求項3、図2)、US5869445 (請求項3、31~38欄)、WO9630514 (請求項2、56~61頁)、EP1439393 (請求項7)、WO2004043361 (請求項7)、WO2004022709、WO200100244 (実施例3、図4)、受託番号:P04626、EMBL、M11767、AAA35808.1.EMBL、M11761、AAA35808.1。

10

## 【0141】

(18) NCA (CEACAM6、Genbank受託番号M18728); Barnett T., et al. *Genomics* 3, 59-66, 1988、Tawaragi Y., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 89-96, 1988、Strausberg R.L., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:16899-16903, 2002、WO2004063709、EP1439393 (請求項7)、WO2004044178 (実施例4)、WO2004031238、WO2003042661 (請求項12)、WO200278524 (実施例2)、WO200286443 (請求項27、427頁)、WO200260317 (請求項2)、受託番号:P40199、Q14920、EMBL、M29541、AAA59915.1.EMBL、M18728。

20

## 【0142】

(19) MDP (DPEP1、Genbank受託番号BC017023) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(26):16899-16903 (2002)、WO2003016475 (請求項1)、WO200264798 (請求項33、85~87頁)、JP05003790 (図6~8)、WO9946284 (図9)、相互参照:MIM:179780、AAH17023.1、BC017023\_\_1。

## 【0143】

(20) IL20R (IL20Ra、ZCYTOR7、Genbank受託番号AF184971)、Clark H.F., et al. *Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003、Mungall A.J., et al. *Nature* 425, 805-811, 2003、Blumberg H., et al. *Cell* 104, 9-19, 2001、Dumoutier L., et al. *J. Immunol.* 167, 3545-3549, 2001、Parrish-Novak J., et al. *J. Biol. Chem.* 277, 47517-47523, 2002、Pletnev S., et al. (2003) *Biochemistry* 42:12617-12624、Sheikh F., et al. (2004) *J. Immunol.* 172, 2006-2010、EP1394274 (実施例11)、US2004005320 (実施例5)、WO2003029262 (74~75頁)、WO2003002717 (請求項2、63頁)、WO200222153 (45~47頁)、US2002042366 (20~21頁)、WO200146261 (57~59頁)、WO200146232 (63~65頁)、WO9837193 (請求項1、55~59頁)、受託番号:Q9UHF4、Q6UWA9、Q96SH8、EMBL、AF184971、AAF01320.1。

30

40

## 【0144】

(21) プレビカン (BCAN、BEHAB、Genbank受託番号AF229053) Gary S.C., et al. *Gene* 256, 139-147, 2000、Clark H.F., et al. *Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003、Strausberg R.L., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16899-16903, 2002、US2003186372 (請求項11)、US2003186373 (請求項11)、US2003119131

50

(請求項1、図52)、US2003119122(請求項1、図52)、US2003119126(請求項1)、US2003119121(請求項1、図52)、US2003119129(請求項1)、US2003119130(請求項1)、US2003119128(請求項1、図52)、US2003119125(請求項1)、WO2003016475(請求項1)、WO200202634(請求項1)。

【0145】

(22) EphB2R(DRT、ERK、Hek5、EPHT3、Tyro5、Genbank受託番号NM\_004442)Chan, J. and Watt, V.M., Oncogene 6(6), 1057-1061(1991)Oncogene 10(5): 897-905(1995), Annu. Rev. Neurosci. 21: 309-345(1998), Int. Rev. Cytol. 196: 177-244(2000)、WO2003042661(請求項12)、WO200053216(請求項1、41頁)、WO2004065576(請求項1)、WO2004020583(請求項9)、WO2003004529(128~132頁)、WO200053216(請求項1、42頁)、相互参照:MIM:600997、NP\_004433.2、NM\_004442\_1。

10

【0146】

(23) ASLG659(B7h、Genbank受託番号AX092328)US20040101899(請求項2)、WO2003104399(請求項11)、WO2004000221(図3)、US2003165504(請求項1)、US2003124140(実施例2)、US2003065143(図60)、WO2002102235(請求項13、299頁)、US2003091580(実施例2)、WO200210187(請求項6、図10)、WO200194641(請求項12、図7b)、WO200202624(請求項13、図1A~1B)、US2002034749(請求項54、45~46頁)、WO200206317(実施例2;320~321頁、請求項34;321~322頁)、WO200271928(468~469頁)、WO200202587(実施例1、図1)、WO200140269(実施例3、190~192頁)、WO200036107(実施例2、205~207頁)、WO2004053079(請求項12)、WO2003004989(請求項1)、WO200271928(233~234、452~453頁)、WO0116318。

20

30

【0147】

(24) PSCA(前立腺幹細胞抗原前駆体、Genbank受託番号AJ297436)Reiter R.E., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998、Gu Z., et al. Oncogene 19, 1288-1296, 2000、Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3): 783-788、WO2004022709、EP1394274(実施例11)、US2004018553(請求項17)、WO2003008537(請求項1)、WO200281646(請求項1、164頁)、WO2003003906(請求項10、288頁)、WO200140309(実施例1、図17)、US2001055751(実施例1、図1b)、WO200032752(請求項18、図1)、WO1998/51805(請求項17、97頁)、WO1998/51824(請求項10、94頁)、WO1998/40403(請求項2、図1B)、受託番号:O43653、EMBL、AF043498、AAC39607.1。

40

【0148】

(25) GEDA(Genbank受託番号AY260763)、AAP14954脂肪腫HMGIC融合パートナー様タンパク質/pid=AAP14954.1-Homo sapiens種:Homo sapiens(ヒト)WO2003054152(請求項20)、WO2003000842(請求項1)、WO2003023013(実施例3、請求項20)、US2003194704(請求項45)、相互参照:GI:30102449、AAP14954.1、AY260763\_1。

50

## 【0149】

(26) B A F F - R (細胞活性化因子受容体、B L y S受容体3、B R 3、G e n b a n k受託番号A F 1 1 6 4 5 6)、B A F F受容体 / p i d = N P \_ 4 4 3 1 7 7 . 1 - H o m o s a p i e n s、T h o m p s o n , J . S . , e t a l . S c i e n c e 2 9 3 ( 5 5 3 7 ) , 2 1 0 8 - 2 1 1 1 ( 2 0 0 1 )、W O 2 0 0 4 0 5 8 3 0 9、W O 2 0 0 4 0 1 1 6 1 1、W O 2 0 0 3 0 4 5 4 2 2 (実施例、32~33頁)、W O 2 0 0 3 0 1 4 2 9 4 (請求項35、図6B)、W O 2 0 0 3 0 3 5 8 4 6 (請求項70、615~616頁)、W O 2 0 0 2 9 4 8 5 2 (136~137欄)、W O 2 0 0 2 3 8 7 6 6 (請求項3、133頁)、W O 2 0 0 2 2 4 9 0 9 (実施例3、図3)、相互参照：M I M : 6 0 6 2 6 9、N P \_ 4 4 3 1 7 7 . 1、N M \_ 0 5 2 9 4 5 \_ 1、A F 1 3 2 6 0 0。

10

## 【0150】

(27) C D 2 2 (B細胞受容体C D 2 2 - Bアイソフォーム、B L - C A M、L y b - 8、L y b 8、S I G L E C - 2、F L J 2 2 8 1 4、G e n b a n k受託番号A K 0 2 6 4 6 7)、W i l s o n e t a l . ( 1 9 9 1 ) J . E x p . M e d . 1 7 3 : 1 3 7 - 1 4 6、W O 2 0 0 3 0 7 2 0 3 6 (請求項1、図1)、相互参照：M I M : 1 0 7 2 6 6、N P \_ 0 0 1 7 6 2 . 1、N M \_ 0 0 1 7 7 1 \_ 1。

## 【0151】

(28) C D 7 9 a (C D 7 9 A、C D 7 9、免疫グロブリン関連アルファ、I g ベータ(C D 7 9 B)と共有結合により相互作用し、I g M分子と表面上で複合体を形成し、B細胞分化に關与するシグナルを伝達するB細胞特異的タンパク質)、p I : 4 . 8 4、M W : 2 5 0 2 8、T M : 2 [ P ] 遺伝子染色体 : 1 9 q 1 3 . 2、G e n b a n k受託番号N P \_ 0 0 1 7 7 4 . 1 0 ) W O 2 0 0 3 0 8 8 8 0 8、U S 2 0 0 3 0 2 2 8 3 1 9、W O 2 0 0 3 0 6 2 4 0 1 (請求項9)、U S 2 0 0 2 1 5 0 5 7 3 (請求項4、13~14頁)、W O 9 9 5 8 6 5 8 (請求項13、図16)、W O 9 2 0 7 5 7 4 (図1)、U S 5 6 4 4 0 3 3、H a e t a l . ( 1 9 9 2 ) J . I m m u n o l . 1 4 8 ( 5 ) : 1 5 2 6 - 1 5 3 1、M u e l l e r e t a l . ( 1 9 9 2 ) E u r . J . B i o c h e m . 2 2 : 1 6 2 1 - 1 6 2 5、H a s h i m o t o e t a l . ( 1 9 9 4 ) I m m u n o g e n e t i c s 4 0 ( 4 ) : 2 8 7 - 2 9 5、P r e u d ' h o m m e e t a l . ( 1 9 9 2 ) C l i n . E x p . I m m u n o l . 9 0 ( 1 ) : 1 4 1 - 1 4 6、Y u e t a l . ( 1 9 9 2 ) J . I m m u n o l . 1 4 8 ( 2 ) 6 3 3 - 6 3 7、S a k a g u c h i e t a l . ( 1 9 8 8 ) E M B O J . 7 ( 1 1 ) : 3 4 5 7 - 3 4 6 4。

20

30

## 【0152】

(29) C X C R 5 (パーキットリンパ腫受容体1、C X C L 1 3ケモカインによって活性化され、リンパ球移動及び体液性免疫において機能し、H I V - 2感染症、ならびに恐らく、A I D S、リンパ腫、骨髄腫、及び白血病の発症において役割を果たすGタンパク質共役型受容体)、3 7 2 a a、p I : 8 . 5 4、M W : 4 1 9 5 9、T M : 7 [ P ] 遺伝子染色体 : 1 1 q 2 3 . 3、G e n b a n k受託番号N P \_ 0 0 1 7 0 7 . 1 ) W O 2 0 0 4 0 4 0 0 0 0、W O 2 0 0 4 / 0 1 5 4 2 6、U S 2 0 0 3 1 0 5 2 9 2 (実施例2)、U S 6 5 5 5 3 3 9 (実施例2)、W O 2 0 0 2 / 6 1 0 8 7 (図1)、W O 2 0 0 1 5 7 1 8 8 (請求項20、269頁)、W O 2 0 0 1 7 2 8 3 0 (12~13頁)、W O 2 0 0 0 / 2 2 1 2 9 (実施例1、152~153頁、実施例2、254~256頁)、W O 1 9 9 9 2 8 4 6 8 (請求項1、38頁)、U S 5 4 4 0 0 2 1 (実施例2、49~52欄)、W O 9 4 2 8 9 3 1 (56~58頁)、W O 1 9 9 2 / 1 7 4 9 7 (請求項7、図5)、D o b n e r e t a l . ( 1 9 9 2 ) E u r . J . I m m u n o l . 2 2 : 2 7 9 5 - 2 7 9 9、B a r e l l a e t a l . ( 1 9 9 5 ) B i o c h e m . J . 3 0 9 : 7 7 3 - 7 7 9。

40

## 【0153】

(30) H L A - D O B (ペプチドに結合し、C D 4 + Tリンパ球にそれらを提示する、

50

MHCクラスII分子のベータサブユニット(Ia抗原)、273aa、pI:6.56、MW:30820、TM:1[P]遺伝子染色体:6p21.3、Genbank受託番号NP\_002111.1) Tonnelie et al. (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847、Jonsson et al. (1989) Immunogenetics 29(6):411-413、Beck et al. (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441、Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:16899-16903、Serenius et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766、Beck et al. (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13、Naruse et al. (2002) Tissue Antigens 59:512-519、WO9958658(請求項13、図15)、US6153408(35~38欄)、US5976551(168~170欄)、US6011146(145~146欄)、Kasahara et al. (1989) Immunogenetics 30(1):66-68、Larhammar et al. (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119。

【0154】

(31) P2X5(プリン受容体P2Xリガンド開口型イオンチャネル5、シナプス伝達及び神経発生に関与し得る、細胞外ATPによって開閉されるイオンチャネル、欠損すると特発性の排尿筋不安定の病態生理に寄与し得る)、422aa)、pI:7.63、MW:47206、TM:1[P]遺伝子染色体:17p13.3、Genbank受託番号NP\_002552.2) Lee et al. (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199、WO2004047749、WO2003072035(請求項10)、Touchman et al. (2000) Genome Res. 10:165-173、WO200222660(請求項20)、WO2003093444(請求項1)、WO2003087768(請求項1)、WO2003029277(82頁)。

【0155】

(32) CD72(B細胞分化抗原CD72、Lyb-2)、pI:8.66、MW:40225、TM:1[P]遺伝子染色体:9p13.3、Genbank受託番号NP\_001773.1) WO2004042346(請求項65)、WO2003/026493(51~52、57~58頁)、WO2000/75655(105~106頁)、Von Hoegen et al. (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877、Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:16899-16903。

【0156】

(33) LY64(リンパ球抗原64(RP105)、ロイシンリッチ反復(LRR)ファミリーのI型膜タンパク質、B細胞の活性化及びアポトーシスを制御し、機能喪失は、全身性エリテマトーデスを有する患者における疾患活性の増加に関連する)、661aa、pI:6.20、MW:74147、TM:1[P]遺伝子染色体:5q12、Genbank受託番号NP\_005573.1) US2002193567、WO9707198(請求項11、39~42頁)、Miura et al. (1996) Genomics 38(3):299-304、Miura et al. (1998) Blood 92:2815-2822、WO2003083047、WO9744452(請求項8、57~61頁)、WO200012130(24~26頁)。

【0157】

(34) FcRH1(Fc受容体様タンパク質1、C2型Ig様ドメイン及びITAMドメインを含有する免疫グロブリンFcドメインの推定上の受容体は、B-リンパ球分化において役割を有し得る)、429aa、pI:5.28、MW:46925、TM:1[P]遺伝子染色体:1q21-1q22、Genbank受託番号NP\_443170.1) WO2003077836、WO200138490(請求項6、図18E-1~1

10

20

30

40

50

8 - E - 2)、Davis et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98 (17): 9772 - 9777、WO2003089624 (請求項8)、EP1347046 (請求項1)、WO2003089624 (請求項7)。

【0158】

(35) IRTA2 (免疫グロブリンスーパーファミリー受容体転位関連2、B細胞発達及びリンパ腫形成に可能性のある役割を有する推定上の免疫受容体、転位による遺伝子の制御解除がいくつかのB細胞悪性腫瘍で生じる)、977aa、pI: 6.88、MW: 106468、TM: 1 [P] 遺伝子染色体: 1q21、Genbank受託番号ヒト: AF343662、AF343663、AF343664、AF343665、AF369794、AF397453、AK090423、AK090475、AL834187、AY358085、Mouse: AK089756、AY158090、AY506558、NP\_112571.1。WO2003024392 (請求項2、図97)、Nakayama et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277 (1): 124 - 127、WO2003077836、WO200138490 (請求項3、図18B-1~18B-2)。

10

【0159】

(36) TENB2 (TMEFF2、トモレグリン、TPEF、HPP1、TR、推定上の膜貫通プロテオグリカン、成長因子のEGF/ヘレグリンファミリー及びフォリスタチンに関連する)、374aa、NCBI受託番号: AAD55776、AAF91397、AAG49451、NCBI参照配列: NP\_057276、NCBI遺伝子: 23671、OMIM: 605734、SwissProt Q9UIK5、Genbank受託番号AF179274、AY358907、CAF85723、CQ782436、WO2004074320、JP2004113151、WO2003042661、WO2003009814、EP1295944 (69~70頁)、WO200230268 (329頁)、WO200190304、US2004249130、US2004022727、WO2004063355、US2004197325、US2003232350、US2004005563、US2003124579、Horie et al. (2000) Genomics 67: 146 - 152、Uchida et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266: 593 - 602、Liang et al. (2000) Cancer Res. 60: 4907 - 12、Glynnne - Jones et al. (2001) Int J Cancer. Oct 15; 94 (2): 178 - 84。

20

30

【0160】

(37) PMEL17 (silver相同体、SILV、D12S53E、PMEL17、SI、SIL)、ME20、gp100) BC001414、BT007202、M32295、M77348、NM\_006928、McGlinchey, R. P. et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106 (33), 13731 - 13736、Kummer, M. P. et al. (2009) J. Biol. Chem. 284 (4), 2296 - 2306。

【0161】

(38) TMEFF1 (EGF様ドメイン及び2つのフォリスタチン様ドメイン1を有する膜貫通タンパク質1、トモレグリン-1)、H7365、C9orf2、C9ORF2、U19878、X83961、NM\_080655、NM\_003692、Harms, P. W. (2003) Genes Dev. 17 (21), 2624 - 2629、Gery, S. et al. (2003) Oncogene 22 (18): 2723 - 2727。

40

【0162】

(39) GDNF - Ra1 (GDNFファミリー受容体アルファ1、GFRA1、GDNFR、GDNFRA、RETL1、TRNR1、RET1L、GDNFR - アルファ1、GFR - ALPHA - 1)、U95847、BC014962、NM\_145793 N

50

M\_\_005264、Kim, M. H. et al. (2009) *Mol. Cell. Biol.* 29 (8), 2264 - 2277、Treanor, J. J. et al. (1996) *Nature* 382 (6586) : 80 - 83。

【0163】

(40) Ly6E (リンパ球抗原6複合体、遺伝子座E、Ly67、RIG-E、SCA-2、TSA-1)、NP\_\_002337.1、NM\_\_002346.2、de Nooij-van Dalen, A. G. et al. (2003) *Int. J. Cancer* 103 (6), 768 - 774、Zammit, D. J. et al. (2002) *Mol. Cell. Biol.* 22 (3) : 946 - 952。

【0164】

(41) TMEM46 (shisa相同体2 (Xenopus laevis)、SHISA2)、NP\_\_001007539.1、NM\_\_001007538.1、Furusu Hima, K. et al. (2007) *Dev. Biol.* 306 (2), 480 - 492、Clark, H. F. et al. (2003) *Genome Res.* 13 (10) : 2265 - 2270。

【0165】

(42) Ly6G6D (リンパ球抗原6複合体、遺伝子座G6D、Ly6-D、MEGT1)、NP\_\_067079.2、NM\_\_021246.2、Mallya, M. et al. (2002) *Genomics* 80 (1) : 113 - 123、Ribas, G. et al. (1999) *J. Immunol.* 163 (1) : 278 - 287。

【0166】

(43) LGR5 (ロイシンリッチ反復含有Gタンパク質共役型受容体5、GPR49、GPR67)、NP\_\_003658.1、NM\_\_003667.2、Salanti, G. et al. (2009) *Am. J. Epidemiol.* 170 (5) : 537 - 545、Yamamoto, Y. et al. (2003) *Hepatology* 37 (3) : 528 - 533。

【0167】

(44) RET (retがん原遺伝子、MEN2A、HSCR1、MEN2B、MTC1、PTC、CDHF12、Hs.168114、RET51、RET-ELE1)、NP\_\_066124.1、NM\_\_020975.4、Tsukamoto, H. et al. (2009) *Cancer Sci.* 100 (10) : 1895 - 1901、Narita, N. et al. (2009) *Oncogene* 28 (34) : 3058 - 3068。

【0168】

(45) LY6K (リンパ球抗原6複合体、遺伝子座K、LY6K、HSJ001348、FLJ35226)、NP\_\_059997.3、NM\_\_017527.3、Ishikawa, N. et al. (2007) *Cancer Res.* 67 (24) : 11601 - 11611、de Nooij-van Dalen, A. G. et al. (2003) *Int. J. Cancer* 103 (6) : 768 - 774。

【0169】

(46) GPR19 (Gタンパク質共役型受容体19、Mm.4787)、NP\_\_006134.1、NM\_\_006143.2、Montpetit, A. and Sinnett, D. (1999) *Hum. Genet.* 105 (1-2) : 162 - 164、O'Dowd, B. F. et al. (1996) *FEBS Lett.* 394 (3) : 325 - 329。

【0170】

(47) GPR54 (KISS1受容体、KISS1R、GPR54、HOT7T175、AXOR12)、NP\_\_115940.2、NM\_\_032551.4、Navenot, J. M. et al. (2009) *Mol. Pharmacol.* 75 (6) : 1300 - 1306、Hata, K. et al. (2009) *Anticancer Res.* 29 (2) : 617 - 623。

10

20

30

40

50

## 【0171】

(48) ASPHD1 (アスパラギン酸ベータヒドロキシラーゼドメイン含有1、LOC253982)、NP\_859069.2、NM\_181718.3、Gerhard, D. S. et al. (2004) *Genome Res.* 14 (10B): 2121-2127。

## 【0172】

(49) チロシナーゼ (TYR、OCAIA、OCA1A、チロシナーゼ、SHEP3)、NP\_000363.1、NM\_000372.4、Bishop, D. T. et al. (2009) *Nat. Genet.* 41 (8): 920-925、Nan, H. et al. (2009) *Int. J. Cancer* 125 (4): 909-917。

10

## 【0173】

(50) TMEM118 (ringフィンガータンパク質、膜貫通2、RNFT2、FLJ14627)、NP\_001103373.1、NM\_001109903.1、Clark, H. F. et al. (2003) *Genome Res.* 13 (10): 2265-2270、Scherer, S. E. et al. (2006) *Nature* 440 (7082): 346-351。

## 【0174】

(51) GPR172A (Gタンパク質共役型受容体172A、GPCR41、FLJ11856、D15Ert747e)、NP\_078807.1、NM\_024531.3、Ericsson, T. A. et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (11): 6759-6764、Takeda, S. et al. (2002) *FEBS Lett.* 520 (1-3): 97-101。

20

## 【0175】

(52) シアル酸に結合する免疫グロブリン様レクチンファミリーのメンバーであるCD33は、67kDaのグリコシル化膜貫通タンパク質である。CD33は、拘束された骨髄単球性前駆細胞及び赤血球前駆細胞に加えて、ほとんどの骨髄性白血病細胞及び単球性白血病細胞上で発現される。これは、最初期の多能性幹細胞、成熟顆粒球、リンパ系細胞、または非造血系細胞には見られない (Sabbath et al., (1985) *J. Clin. Invest.* 75: 756-56、Andrews et al., (1986) *Blood* 68: 1030-5)。CD33は、その細胞質尾部に2つのチロシン残基を含有し、これらの各々に、多くの阻害性受容体に見られる免疫受容体チロシン系阻害モチーフ (ITIM) に類似する疎水性残基が続いている。

30

## 【0176】

(53) CLL-1 (CLEC12A、MICL、及びDCAL2) は、C型レクチン/C型レクチン様ドメイン (CTL/CTLD) スーパーファミリーのメンバーをコードする。このファミリーのメンバーは、共通のタンパク質折り畳みを共有し、細胞接着、細胞間シグナル伝達、糖タンパク質代謝回転、ならびに炎症及び免疫応答における役割などの多様な機能を有する。この遺伝子によってコードされるタンパク質は、顆粒球及び単球の機能の負の制御因子である。この遺伝子のいくつかの代替的なスプライス転写物バリエーションが記載されているが、これらのバリエーションのうちいくつかに関しては完全長の性質が決定されていない。この遺伝子は、染色体12p13上のナチュラルキラー遺伝子複合体領域内の他のCTL/CTLDスーパーファミリーメンバーに緊密に連結している (Drickamer K (1999) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (5): 585-90、van Rhenen A, et al., (2007) *Blood* 110 (7): 2659-66、Chen CH, et al. (2006) *Blood* 107 (4): 1459-67、Marshall AS, et al. (2006) *Eur. J. Immunol.* 36 (8): 2159-69、Bakker AB, et al. (2005) *Cancer Res.* 64 (22): 8443-50、Marshall AS, et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279 (15): 14792-802)。CLL-1は、単一のC型レクチン様ドメイン (カルシウムまたは糖類のい

40

50

ずれにも結合することが予測されていない)、ストーク領域、膜貫通ドメイン、及びI T I Mモチーフを含有する短い細胞質尾部を含む、I I型膜貫通受容体であることが示されている。

【0177】

特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、当該技術分野で既知であり、かつ容易に入手可能な追加の非タンパク質性部分を含有するように更に修飾され得る。抗体の誘導体化に好適な部分としては、水溶性ポリマーが挙げられるが、これに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)、及びデキストランまたはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、ならびにこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造する上で有利であり得る。ポリマーは、任意の分子量のものであり得、分岐状または非分岐状であり得る。抗体に結合するポリマーの数は異なり得、2つ以上のポリマーが結合する場合、それらは同じ分子であっても異なる分子であってもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/または種類は、改善される抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が定義された条件下で療法に使用されるかどうかなどを含むが、これらに限定されない、考慮すべき要因に基づいて決定され得る。

【0178】

別の実施形態において、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る、抗体及び非タンパク質性部分のコンジュゲートが提供される。一実施形態において、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブである(Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005))。放射線は、任意の波長のものであり得、通常の細胞を傷つけないが、抗体-非タンパク質性部分に近位の細胞が殺滅される温度まで非タンパク質性部分を加熱する波長を含むが、これらに限定されない。

【0179】

抗体は、例えば、US 4816567に記載されるように、組み換え法及び組成物を用いて産生され得る。そのような核酸は、抗体のV Lを含むアミノ酸配列及び/または抗体のV Hを含むアミノ酸配列(例えば、抗体の軽鎖及び/または重鎖)をコードし得る。更なる一実施形態において、そのような核酸を含む1つ以上のベクター(例えば、発現ベクター)が提供される。更なる一実施形態において、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。そのような一実施形態において、宿主細胞は、(1)抗体のV Lを含むアミノ酸配列及び抗体のV Hを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または(2)抗体のV Lを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター、及び抗体のV Hを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む(例えば、それらで形質転換されている)。一実施形態において、宿主細胞は、真核生物のもの、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞またはリンパ系細胞(例えば、Y0、NS0、Sp20細胞)である。

【0180】

抗体の組み換え産生のために、例えば、本明細書に記載される抗体をコードする核酸が単離され、1つ以上のベクター内に挿入されて、宿主細胞内で更にクローニング及び/または発現される。そのような核酸は、従来の手順を使用して(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)、容易に単離され、配列決定され得る。

【0181】

10

20

30

40

50

抗体をコードするベクターのクローン化または発現に好適な宿主細胞としては、本明細書に記載される原核生物細胞または真核生物細胞が挙げられる。例えば、抗体は、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が必要とされない場合に、細菌中で産生され得る。細菌中での抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、US 5 6 4 8 2 3 7、US 5 7 8 9 1 9 9、及びUS 5 8 4 0 5 2 3を参照されたい。(E. coliにおける抗体断片の発現について説明している、Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245 - 254も参照されたい。)

【0182】

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

【0183】

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

【0184】

植物細胞培養物もまた、宿主として利用することができる。例えば、US 5 9 5 9 1 7 7、US 6 0 4 0 4 9 8、US 6 4 2 0 5 4 8、US 7 1 2 5 9 7 8、US 6 4 1 7 4 2 9(トランスジェニック植物において抗体を産生するためのPLANTIBODIES(商標)技術を説明)を参照されたい。

【0185】

脊椎動物細胞もまた、宿主として使用することができる。例えば、懸濁液中で成長するように適合される哺乳動物細胞株が、有用であり得る。有用な哺乳類宿主細胞株の他の例としては、SV40(COS-7)で形質転換されたサル腎臓CV1株、ヒト胚腎臓株(例えば、Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977)に記載される293または293細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)、マウスセルトリ細胞(例えば、Mather, Biol. Reprod. 23: 243 - 251 (1980) Error! Bookmark not defined.に記載されるTM4細胞)、サル腎臓細胞(CV1)、アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76)、ヒト子宮頸癌細胞(HELA)、イヌ腎臓細胞(MDCK)、パッファローラット肝臓細胞(BRL 3A)、ヒト肺細胞(W138)、ヒト肺細胞(Hep G2)、マウス乳腺腫瘍(MMT 060562)、TRI細胞(例えば、Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44 - 68 (1982)に記載されるもの)、MRC5細胞、及びFS4細胞が挙げられる。他の有用な哺乳類宿主細胞株としては、DHFR-CHO細胞(Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980))を含むチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ならびにY0、NS0、及びSp2/0などの骨髄腫細胞株が挙げられる。抗体産生に好適なある特定の哺乳類宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255 - 268 (2003)を参照されたい。

【0186】

リンカー

「リンカー」(L)は、1つ以上のシルベストロール薬物部分を抗体(Ab)に連結して

10

20

30

40

50

、式 I I a 及び I I b の抗体 - 薬物コンジュゲート ( A D C ) を形成するために使用することができる、二官能性または多官能性部分である。いくつかの実施形態において、抗体 - 薬物コンジュゲート ( A D C ) は、薬物に及び抗体に共有結合するための反応性官能基を有するリンカーを使用して調製することができる。例えば、いくつかの実施形態において、抗体 ( A b ) のシステインチオールは、リンカーの反応性官能基または薬物 - リンカー中間体と結合を形成して、A D C を作製することができる。

【 0 1 8 7 】

一態様において、リンカーは、抗体上に存在する遊離システインと反応して、共有結合を形成することができる官能性を有する。非限定的な例示的なそのような反応性官能基としては、マレイミド、ハロアセトアミド、 $\alpha$ -ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、活性化エステル ( スクシンイミドエステル、N - ヒドロキシスクシンイミド、4 - ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステルなど )、無水物、酸クロリド、塩化スルホニル、イソシアン酸、及びイソチオシアン酸が挙げられる。例えば、K l u s s m a n , e t a l ( 2 0 0 4 ) , B i o c o n j u g a t e C h e m i s t r y 1 5 ( 4 ) : 7 6 5 - 7 7 3 の 7 6 6 頁におけるコンジュゲーション方法、及び本明細書の実施形態を参照されたい。

10

【 0 1 8 8 】

いくつかの実施形態において、リンカーは、抗体上に存在する求電子性基と反応することができる官能性を有する。例示的なそのような求電子性基としては、アルデヒド及びケトンカルボニル基が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、リンカーの反応性官能基のヘテロ原子が、抗体上の求電子性基と反応し、抗体単位への共有結合を形成することができる。非限定的な例示的なそのような反応性官能基としては、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、カルボン酸ヒドラジン、及びアリールヒドラジドが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【 0 1 8 9 】

リンカーは、ストレッチャー単位、ペプチドミメティック単位、ペプチド単位、及びスペーサー単位を含むが、これらに限定されない、1つ以上のリンカー構成成分を含み得る。例示的なリンカー構成成分としては、6 - マレイミドカプロイル ( 「 M C 」 )、マレイミドプロパノイル ( 「 M P 」 )、バリン - シトルリン ( 「 v a l - c i t 」 または 「 v c 」 )、アラニン - フェニルアラニン ( 「 a l a - p h e 」 )、フェニルアラニン - リジン ( 「 p h e - l y s 」 )、p - アミノベンジルオキシカルボニル ( 「 P A B 」 )、N - スクシンイミジル 4 - ( 2 - ピリジルチオ ) 吉草酸 ( 「 S P P 」 )、及び 4 - ( マレイミドメチル ) シクロヘキサン - 1 カルボキシレート ( 「 M C C 」 ) が挙げられる。様々なリンカー構成成分が当該技術分野で既知であり、このうちのいくつかは以下に記載される。

30

【 0 1 9 0 】

リンカーは、薬物の放出を容易にする「切断可能リンカー」であってもよい。非限定的な例示的な切断可能リンカーとしては、酸不安定性リンカー ( 例えば、ヒドラゾンを含む )、プロテアーゼ感受性 ( 例えば、ペプチダーゼ感受性 ) リンカー、感光性リンカー、またはジスルフィド含有リンカー ( C h a r i e t a l . , C a n c e r R e s e a r c h 5 2 : 1 2 7 - 1 3 1 ( 1 9 9 2 )、U S 5 2 0 8 0 2 0 ) が挙げられる。

40

【 0 1 9 1 】

リンカーの例示的な実施形態は、U S 7 4 9 8 2 9 8 に記載され、これは参照によって本明細書に明示的に組み込まれる。

【 0 1 9 2 】

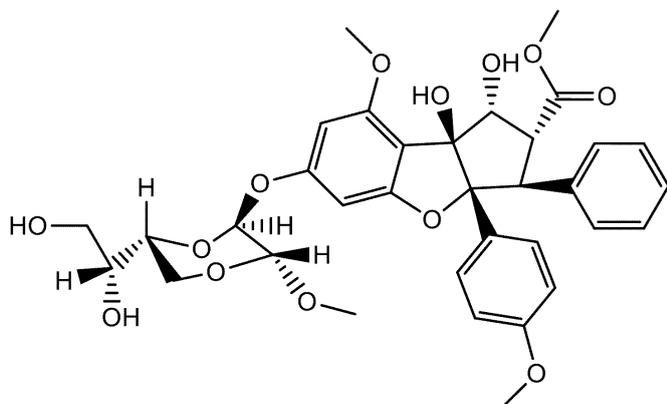
シルベストロール薬物 - リンカー中間体化合物

シルベストロール ( C A S 登録番号 6 9 7 2 3 5 - 3 8 - 4 ) ( メチル ( 1 R , 2 R , 3 S , 3 a R , 8 b S ) - 6 - ( ( ( 2 S , 3 R , 6 R ) - 6 - ( ( R ) - 1 , 2 - ジヒドロキシエチル ) - 3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキサソ - 2 - イル ) オキシ ) - 1 , 8 b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3 a - ( 4 - メトキシフェニル ) - 3 - フェニル - 2 , 3 , 3 a , 8 b - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシ

50

レートと称される) (化合物16、実施例1a)は、*Aglaia foveolata* から単離された口カグレート誘導体であり (Pan, L., et al (2014) Nat. Prod. Rep. 31: 924 - 939)、p53活性とは独立してG2/Mチェックポイント遺伝子を制御する (Mi, Q. et al (2006) Anticancer Res. 26 (5A): 3349 - 56)。シルベストロール及び類似体は、強力かつ選択的なタンパク質合成阻害剤であり、それらの抗過剰増殖特性について研究されている (Liu, T. et al (2012) Journal of Medicinal Chemistry, 55 (20): 8859 - 8878、WO2015/085221、WO2013016658、WO2004041812、US8137509、US8404088、WO2006007634、US7816544)。シルベストロールは、以下の構造を有する。

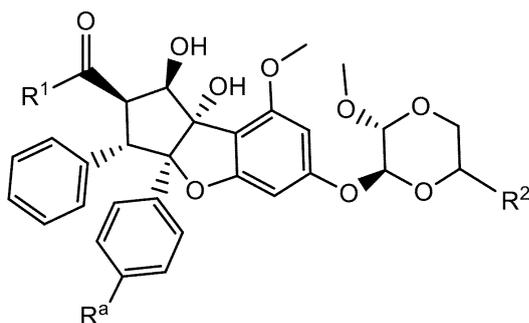
10



20

## 【0193】

式IIのシルベストロール-リンカー中間体は、実施例の手順に従って調製される。



II

30

式中、

R<sup>a</sup>は、CH<sub>3</sub>O、CN、NO<sub>2</sub>、及びClから選択される基であり、

R<sup>1</sup>は、-OCH<sub>3</sub>及びL-Xから選択され、

R<sup>2</sup>は、-CH(OH)CH<sub>2</sub>OH及びL-Xから選択され、

Lは、リンカーであり、

Xは、マレイミド、チオール、アミノ、臭化物、プロモアセトアミド、ヨードアセトアミド、p-トルエンスルホン酸、ヨウ化物、ヒドロキシル、カルボキシル、ピリジリジルスルフィド、及びN-ヒドロキシスクシンイミドから選択される反応性官能基を含む。

40

## 【0194】

例示的な一実施形態において、L-Xは、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-X、-CH<sub>2</sub>CR<sub>2</sub>-X、-C(O)NRCH<sub>2</sub>-X、-CH<sub>2</sub>O-X、-CH<sub>2</sub>N(R)-X、-N(R)-X、-N(R)(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルキレン)-X、-N(R)(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>アルケニレン)-X、-N(R)(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>アルキニレン)-X、及び-N(R)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-X

50

から選択され、

n は、1 ~ 6 であり、

R は独立して、H、C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> アルキル、及び C<sub>6</sub> - C<sub>20</sub> アリールから選択されるか、または 2 つの R が、C<sub>3</sub> - C<sub>7</sub> 炭素環状環を形成し、

アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アルキル、及びアリールは、F、Cl、Br、N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、及び OCH<sub>3</sub> から選択される 1 つ以上の基で任意で置換される。

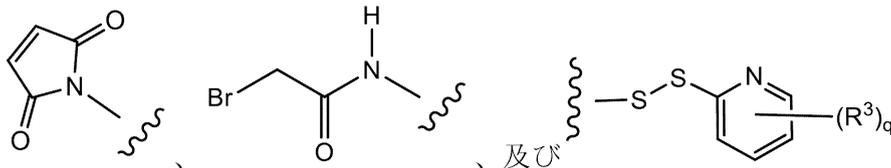
【0195】

例示的な一実施形態において、アルキレンは、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-、及び -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- から選択される。

10

【0196】

例示的な一実施形態において、X は、



から選択され、式中、波線は、L への結合を示し、

R<sup>3</sup> は、NO<sub>2</sub>、Cl、F、CN、または Br であり、q は、0、1、または 2 である。

20

【0197】

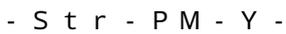
例示的な一実施形態において、R<sup>1</sup> は、-OCH<sub>3</sub> であり、R<sup>2</sup> は、L-X である。

【0198】

例示的な一実施形態において、R<sup>1</sup> は、L-X であり、R<sup>2</sup> は、-CH(OH)CH<sub>2</sub>OH である。

【0199】

例示的な一実施形態において、L は、式、



を有する、プロテアーゼ-切断可能な非ペプチドリinker であり、式中、Str は、X に共有結合したストレッチャー単位であり、PM は、ペプチドミメティック単位であり、Y は、シルベストロール薬物部分に共有結合したスペーサー単位である。

30

【0200】

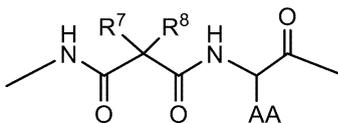
ペプチドミメティックリinker は、WO2015/095227、WO2015/095124、または WO2015/09522 に記載され、これらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0201】

例示的な一実施形態において、Str は、(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> である。

【0202】

例示的な一実施形態において、PM は、式、



40

を有し、式中、R<sup>7</sup> 及び R<sup>8</sup> は一緒になって、C<sub>3</sub> - C<sub>7</sub> シクロアルキル環を形成し、

AA は、H、-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>、-CHCH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub>、及び -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)NH<sub>2</sub> から選択されるアミノ酸側鎖である。

【0203】

例示的な一実施形態において、R<sup>7</sup> 及び R<sup>8</sup> は一緒になって、シクロブチルを形成する。

50

## 【0204】

例示的な一実施形態において、Yは、パラ-アミノベンジルまたはパラ-アミノベンジロキシカルボニルを含む。

## 【0205】

例示的な一実施形態において、Lは、式、



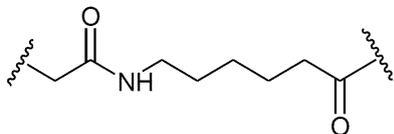
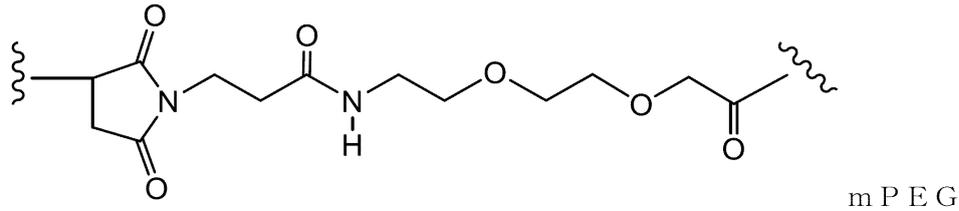
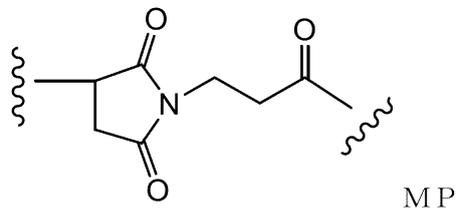
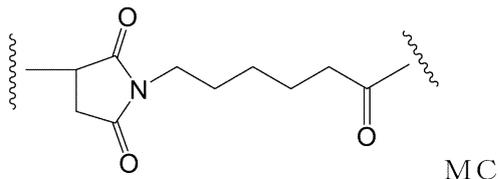
を有するペプチドリンカーであり、式中、Strは、抗体に共有結合したストレッチャー単位であり、Pepは、2~12個のアミノ酸残基のペプチドであり、Yは、シルベストロール薬物部分に共有結合したスペーサー単位である。

## 【0206】

例示的な一実施形態において、Strは、(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>である。

## 【0207】

いくつかの実施形態において、Strは、以下を含み、式中、波線は、抗体、薬物、または追加のリンカー構成成分への共有結合の部位を示す。



## 【0208】

例示的な一実施形態において、Pepは、グリシン、アラニン、フェニルアラニン、リジン、アルギニン、バリン、及びシトルリンから独立して選択される2個のアミノ酸残基を含む。

## 【0209】

例示的な一実施形態において、シルベストロール-リンカー中間体化合物は、表5の化合物から選択される。

## 【0210】

シルベストロール-リンカー中間体化合物(LD)は、従来方法及び実施例1~3に従って精製及び単離され得る。精製及び単離方法は、当技術分野で既知であり、沈殿、結晶化、濾過、遠心分離、限外濾過、及び様々なクロマトグラフ技術を含む。クロマトグラフィーは、例えば、逆位相及び順相、サイズ排除、イオン交換、高、中、及び低圧液体クロマトグラフィー方法及び装置、小規模分析、擬似移動床(SMB)及び分取薄層または厚

10

20

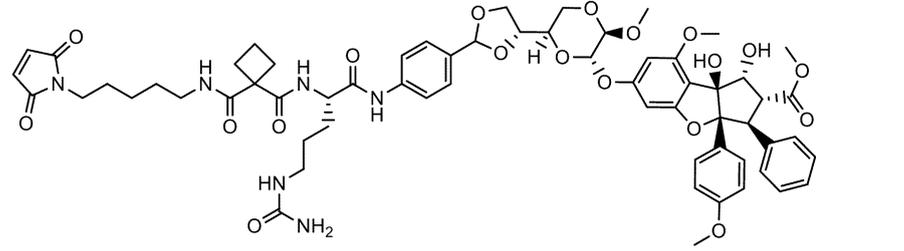
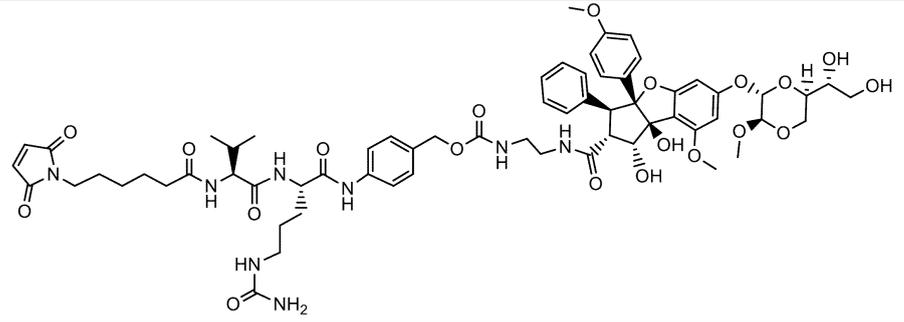
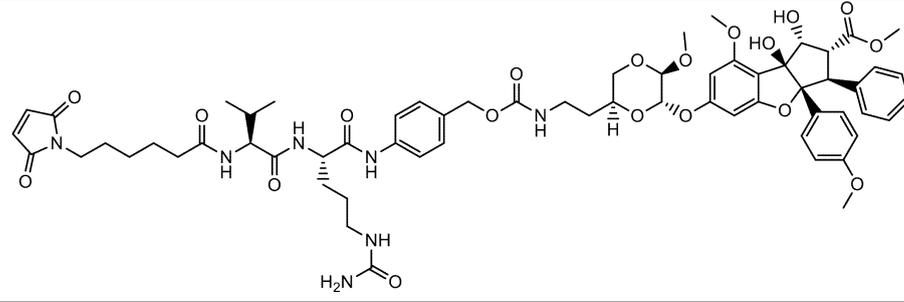
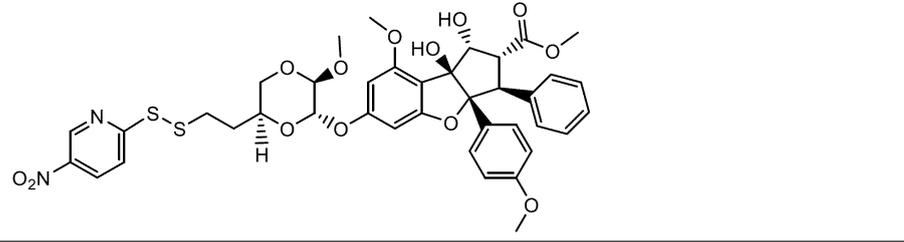
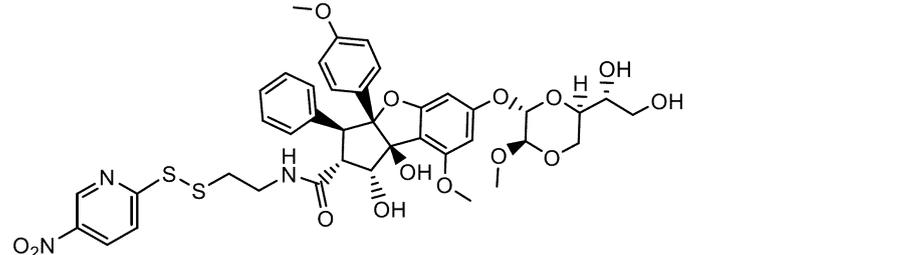
30

40

50

層クロマトグラフィー、ならびに小規模薄層及びフラッシュクロマトグラフィーの技術を含む、任意の数の方法を伴い得る。いくつかのそのような態様において、完成した反応混合物は、乾燥するまで蒸発させ、続いて、極性非プロトン性溶媒中で再溶解され得る。この溶液は濾過され、その後、例えば、ヘキサンまたはシクロヘキサンなどの無極性貧溶媒と、溶液を組み合わせることによって沈殿され得る。その後、沈殿物は、濾過によって採取され、任意で洗浄され、その後、乾燥され得る。

表5 シルベストロール-リンカー中間体

LD 番号	構造
LD- 51	
LD- 52	
LD- 53	
LD- 54	
LD- 55	

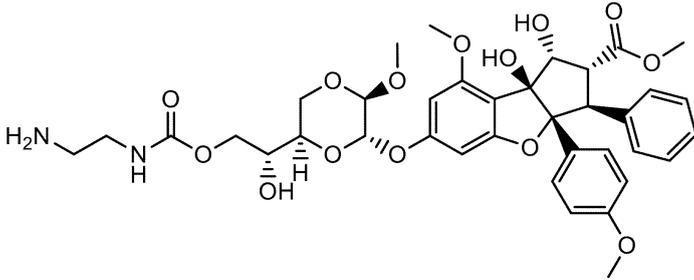
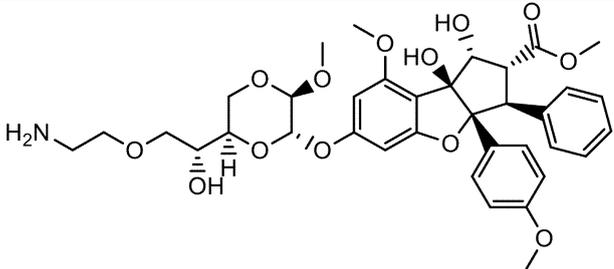
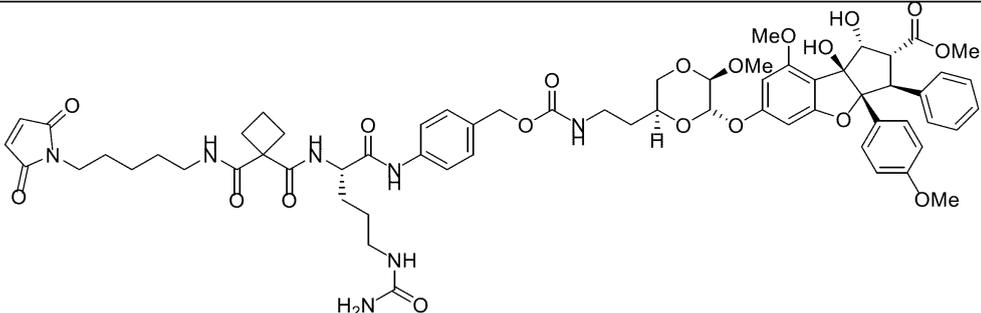
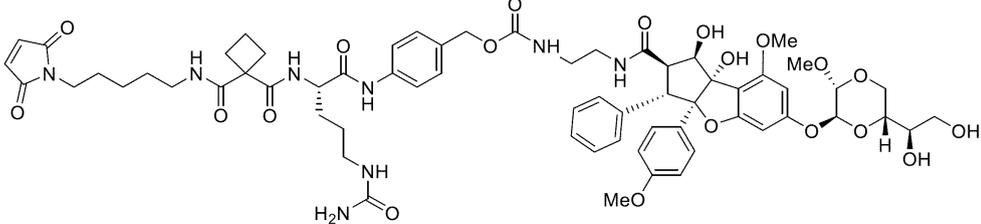
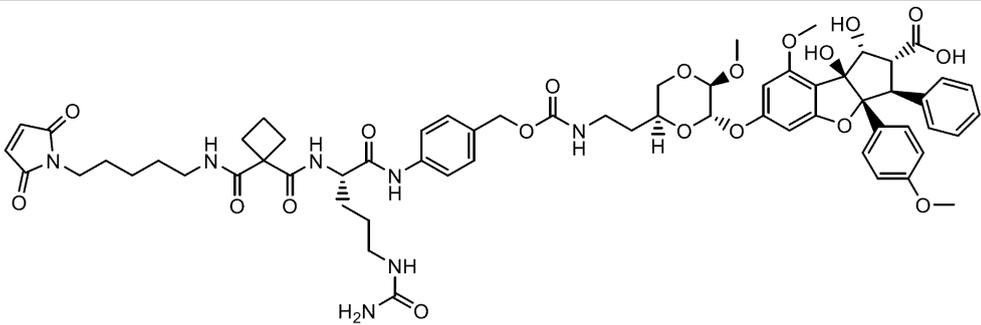
10

20

30

40

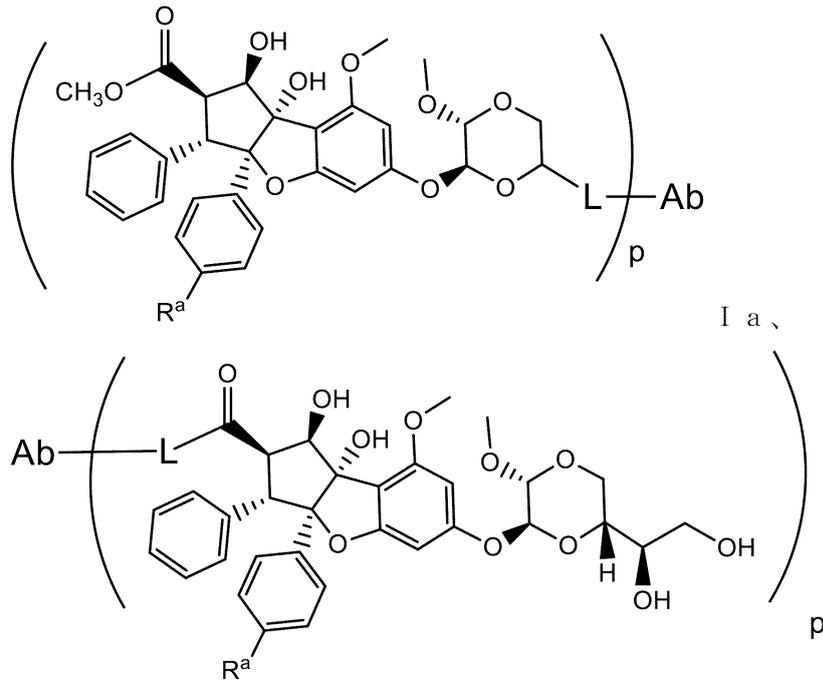
50

LD- 56		
LD- 57		10
LD- 58		20
LD- 59		30
LD- 60		40

## 【0211】

## 抗体 - 薬物コンジュゲート

本発明は、式 I a 及び I b から選択される、リンカーを通してシルベストロール薬物部分に共有結合した抗体を有する抗体 - 薬物コンジュゲート化合物、



10

20

またはその薬学的に許容される塩であって、

式中、

R<sup>a</sup>は、CH<sub>3</sub>O、CN、NO<sub>2</sub>、及びClから選択される基であり、

Lは、リンカーであり、

pは、1～8の整数であり、

Abは、1つ以上の腫瘍関連抗原または細胞表面受容体に結合する抗体である、抗体-薬物コンジュゲート化合物またはその薬学的に許容される塩を提供する。

【0212】

例示的な一実施形態において、抗体は、(1)～(53)、

(1) BMPR1B (骨形成タンパク質受容体IB型)、

30

(2) E16 (LAT1、SLC7A5)、

(3) STEAP1 (前立腺の6回膜貫通上皮抗原)、

(4) MUC16 (O772P、CA125)、

(5) MPF (MPF、MSLN、SMR、巨核球増強因子、メソテリン)、

(6) Napi2b (NAPI-3B、NPTIIb、SLC34A2、溶質輸送体ファミリー34 (リン酸ナトリウム)、メンバー2、II型ナトリウム依存性リン酸輸送体3b)、

(7) Sema5b (FLJ10372、KIAA1445、Mm.42015、SEMA5B、SEMAG、セマフォリン5b H1log、セマドメイン、7回トロンボスポンジン反復(1型及び1型様)、膜貫通ドメイン(TM)、ならびに短い細胞質ドメイン、(セマフォリン)5B)、

40

(8) PSCA h1g (2700050C12Rik、C530008016Rik、RIKEN cDNA 2700050C12、RIKEN cDNA 2700050C12遺伝子)、

(9) ETBR (エンドセリンB型受容体)、

(10) MSG783 (RNF124、仮説上のタンパク質FLJ20315)、

(11) STEAP2 (HGNC\_8639、IPCA-1、PCANAP1、STAMP1、STEAP2、STMP、前立腺癌関連遺伝子1、前立腺癌関連タンパク質1、前立腺の6回膜貫通上皮抗原2、6回膜貫通前立腺タンパク質)、

(12) TrpM4 (BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B、

50

一過性受容体電位カチオンチャネル、サブファミリーM、メンバー4)、  
 (13) C R I P T O ( C R、C R 1、C R G F、C R I P T O、T D G F 1、奇形癌種  
 由来の成長因子)、  
 (14) C D 2 1 ( C R 2 ( 補体受容体2 ) または C 3 D R ( C 3 d / エプスタイン・バ  
 ーウイルス受容体) または H s 7 3 7 9 2 )、  
 (15) C D 7 9 b ( C D 7 9 B、C D 7 9 、 I G b ( 免疫グロブリン関連ベータ)、  
 B 2 9 )、  
 (16) F c R H 2 ( I F G P 4、I R T A 4、S P A P 1 A ( S H 2 ドメイン含有ホス  
 ファターゼアンカータンパク質1 a )、S P A P 1 B、S P A P 1 C )、  
 (17) H E R 2、  
 (18) N C A、  
 (19) M D P、  
 (20) I L 2 0 R、  
 (21) プレビカン、  
 (22) E p h B 2 R、  
 (23) A S L G 6 5 9、  
 (24) P S C A、  
 (25) G E D A、  
 (26) B A F F - R ( B 細胞活性化因子受容体、B L y S 受容体3、B R 3 )、  
 (27) C D 2 2 ( B 細胞受容体 C D 2 2 - B アイソフォーム)、  
 (28) C D 7 9 a ( C D 7 9 A、C D 7 9、免疫グロブリン関連アルファ)、  
 (29) C X C R 5 ( パーキットリンパ腫受容体1 )、  
 (30) H L A - D O B ( M H C クラス I I 分子のベータサブユニット ( I a 抗原 ) )、  
 (31) P 2 X 5 ( プリン受容体 P 2 X リガンド開口型イオンチャネル5 )、  
 (32) C D 7 2 ( B 細胞分化抗原 C D 7 2、L y b - 2 )、  
 (33) L Y 6 4 ( リンパ球抗原6 4 ( R P 1 0 5 )、ロイシンリッチ反復 ( L R R ) フ  
 アミリーの I 型膜タンパク質)、  
 (34) F c R H 1 ( F c 受容体様タンパク質1 )、  
 (35) F c R H 5 ( I R T A 2、免疫グロブリンスーパーファミリー受容体転位関連2  
 )、  
 (36) T E N B 2 ( 推定上の膜貫通プロテオグリカン)、  
 (37) P M E L 1 7 ( s i l v e r 相同体、S I L V、D 1 2 S 5 3 E、P M E L 1 7  
 、S I、S I L )、  
 (38) T M E F F 1 ( E G F 様ドメイン及び2つのフォリスタチン様ドメインを有する  
 膜貫通タンパク質1、トモレグリン - 1 )、  
 (39) G D N F - R a 1 ( G D N F ファミリー受容体アルファ1、G F R A 1、G D N  
 F R、G D N F R A、R E T L 1、T R N R 1、R E T 1 L、G D N F R - アルファ1、  
 G F R - A L P H A - 1 )、  
 (40) L y 6 E ( リンパ球抗原6 複合体、遺伝子座 E、L y 6 7、R I G - E、S C A  
 - 2、T S A - 1 )、  
 (41) T M E M 4 6 ( s h i s a 相同体2 ( X e n o p u s l a e v i s )、S H I  
 S A 2 )、  
 (42) L y 6 G 6 D ( リンパ球抗原6 複合体、遺伝子座 G 6 D、L y 6 - D、M E G T  
 1 )、  
 (43) L G R 5 ( ロイシンリッチ反復含有 G タンパク質結合型受容体5、G P R 4 9、  
 G P R 6 7 )、  
 (44) R E T ( r e t がん原遺伝子、M E N 2 A、H S C R 1、M E N 2 B、M T C 1  
 、P T C、C D H F 1 2、H s . 1 6 8 1 1 4、R E T 5 1、R E T - E L E 1 )、  
 (45) L Y 6 K ( リンパ球抗原6 複合体、遺伝子座 K、L Y 6 K、H S J 0 0 1 3 4 8  
 、F L J 3 5 2 2 6 )、

10

20

30

40

50

- (46) GPR19 (Gタンパク質結合型受容体19、Mm.4787)、  
 (47) GPR54 (KISS1受容体、KISS1R、GPR54、HOT7T175、AXOR12)、  
 (48) ASPHD1 (アスパラギン酸ベータ-ヒドロキシラーゼドメイン含有1、LOC253982)、  
 (49) チロシナーゼ (TYR、OCAIA、OCA1A、チロシナーゼ、SHEP3)、  
 (50) TMM118 (ringフィンガータンパク質、膜貫通2、RNFT2、FLJ14627)、  
 (51) GPR172A (Gタンパク質共役型受容体172A、GPCR41、FLJ11856、D15Ert747e)、  
 (52) CD33、ならびに  
 (53) CLL-1から選択される1つ以上の腫瘍関連抗原または細胞表面受容体に結合する。

10

## 【0213】

例示的な一実施形態において、Abは、抗HER2 4D5、抗CD22、抗CD33、抗Ly6E、抗Napi3b、抗HER2 7C2、及び抗CLL-1から選択される。

## 【0214】

例示的な一実施形態において、Abは、システイン操作された抗体である。

## 【0215】

例示的な一実施形態において、システイン操作された抗体は、HCA118C、LCK149C、HCA140C、LCV205C、LCS121C、及びHCL177Cから選択される変異体である。

20

## 【0216】

例示的な一実施形態において、Lは、式、

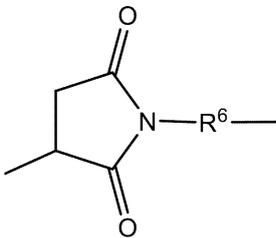


を有する、プロテアーゼ-切断可能な非ペプチドリンカーであり、式中、Strは、抗体に共有結合したストレッチャー単位であり、PMは、ペプチドミメティック単位であり、Yは、シルベストロール薬物部分に共有結合したスペーサー単位である。

## 【0217】

例示的な一実施形態において、Strは、式、

30



を有し、式中、R<sup>6</sup>は、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルキレン、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルキレン-C(=O)、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルキレン-NH、(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>、(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-C(=O)、(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>、及びC<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルキレン-NHC(=O)CH<sub>2</sub>CH(チオフェン-3-イル)からなる群から選択され、rは、1~10の範囲の整数である。

40

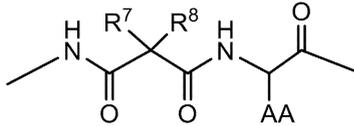
## 【0218】

例示的な一実施形態において、R<sup>6</sup>は、(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>である。

## 【0219】

例示的な一実施形態において、PMは、式、

50



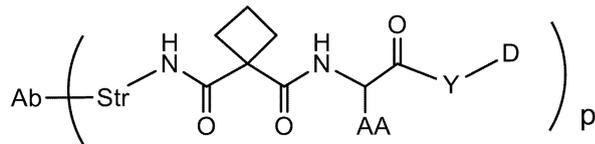
を有し、式中、 $R^7$  及び  $R^8$  は一緒になって、 $C_3 - C_7$  シクロアルキル環を形成し、 $AA$  は、 $H$ 、 $-CH_3$ 、 $-CH_2(C_6H_5)$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 $-CHCH(CH_3)CH_3$ 、及び  $-CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$  から選択されるアミノ酸側鎖である。

【0220】

例示的な一実施形態において、 $Y$  は、パラ-アミノベンジルまたはパラ-アミノベンジロキシカルボニルを含む。

【0221】

例示的な一実施形態において、抗体-薬物コンジュゲート化合物は、式、



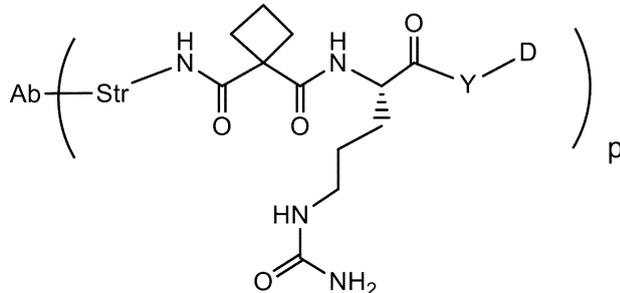
10

20

を有し、式中、 $D$  は、シルベストロール薬物部分である。

【0222】

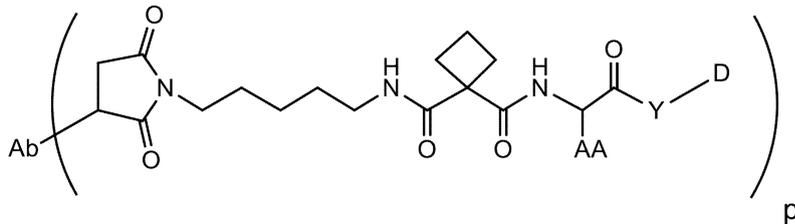
例示的な一実施形態において、抗体-薬物コンジュゲート化合物は、以下の式を有する。



30

【0223】

例示的な一実施形態において、抗体-薬物コンジュゲート化合物は、以下の式を有する。

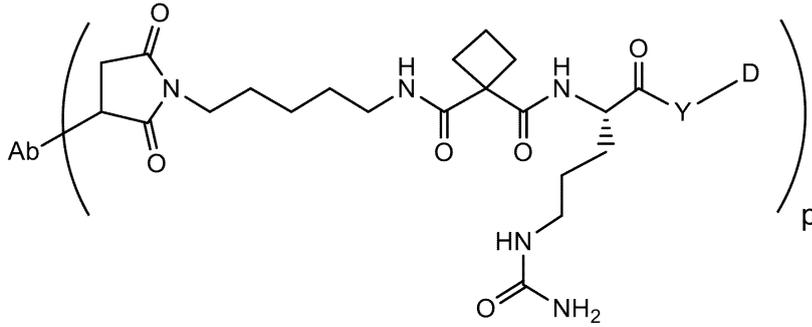


40

【0224】

例示的な一実施形態において、抗体-薬物コンジュゲート化合物は、以下の式を有する。

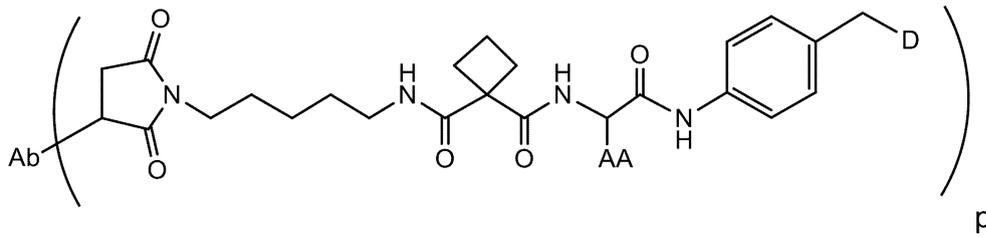
50



10

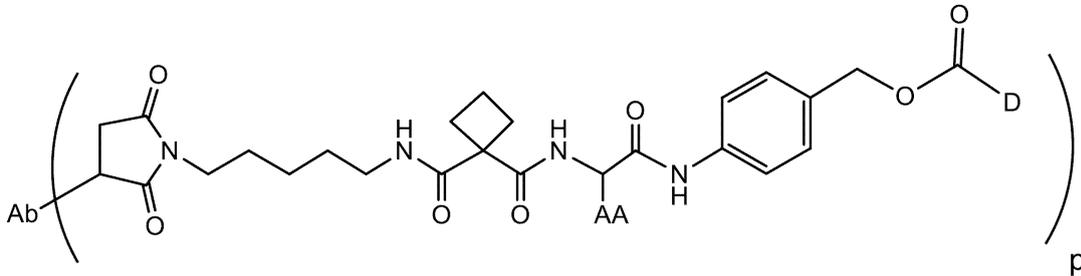
## 【0225】

例示的な一実施形態において、抗体 - 薬物コンジュゲート化合物は、式、



20

及び



30

から選択される。

## 【0226】

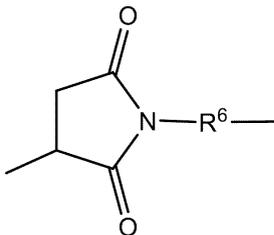
例示的な一実施形態において、Lは、式、



を有するペプチドリンカーであり、式中、Strは、抗体に共有結合したストレッチャー単位であり、Pepは、2～12個のアミノ酸残基のペプチドであり、Yは、シルベストロール薬物部分に共有結合したスペーサー単位である。

## 【0227】

例示的な一実施形態において、Strは、式、



40

を有し、式中、R<sup>6</sup>は、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルキレン、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルキレン-C(=O)、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルキレン-NH、(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>、(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-C(=O)、(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>、及びC<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルキレン-NHC(=O)

50

CH<sub>2</sub>CH(チオフェン-3-イル)からなる群から選択され、rは、1~10の範囲の整数である。

【0228】

例示的な一実施形態において、R<sup>6</sup>は、(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>である。

【0229】

例示的な一実施形態において、Pepは、グリシン、アラニン、フェニルアラニン、リジン、アルギニン、バリン、及びシトルリンから独立して選択される2~12個のアミノ酸残基を含む。

【0230】

例示的な一実施形態において、Pepは、バリン-シトルリン、アラニン-フェニルアラニン、及びフェニルアラニン-リジンから選択される。

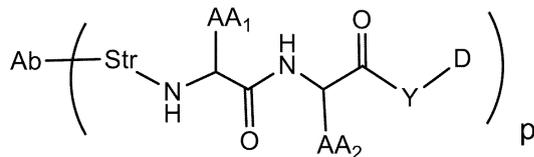
10

【0231】

例示的な一実施形態において、Yは、パラ-アミノベンジルまたはパラ-アミノベンジロキシカルボニルを含む。

【0232】

例示的な一実施形態において、抗体-薬物コンジュゲート化合物は、式、



20

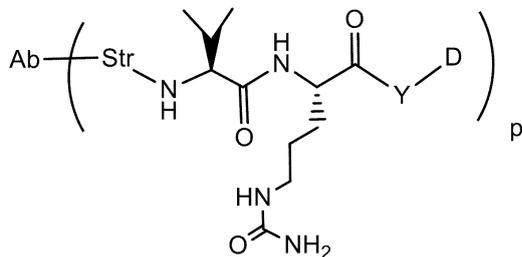
を有し、式中、AA<sub>1</sub>及びAA<sub>2</sub>は独立して、アミノ酸側鎖から選択される。

【0233】

例示的な一実施形態において、アミノ酸側鎖は独立して、H、-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>、-CHCH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub>、及び-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)NH<sub>2</sub>から選択される。

【0234】

例示的な一実施形態において、抗体-薬物コンジュゲート化合物は、式、



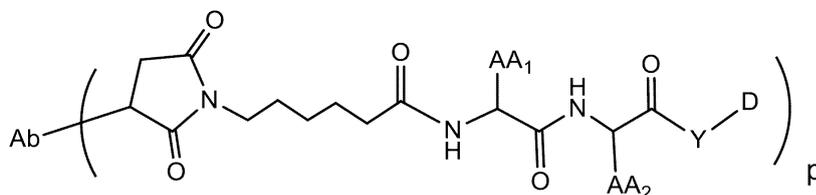
30

を有する。

40

【0235】

例示的な一実施形態において、抗体-薬物コンジュゲート化合物は、式、

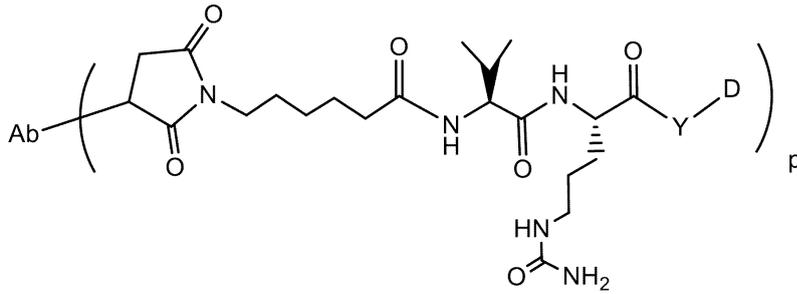


を有する。

50

## 【0236】

例示的な一実施形態において、抗体 - 薬物コンジュゲート化合物は、式、

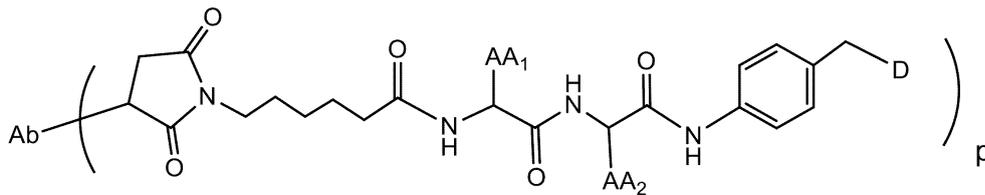


10

を有する。

## 【0237】

例示的な一実施形態において、抗体 - 薬物コンジュゲート化合物は、式、

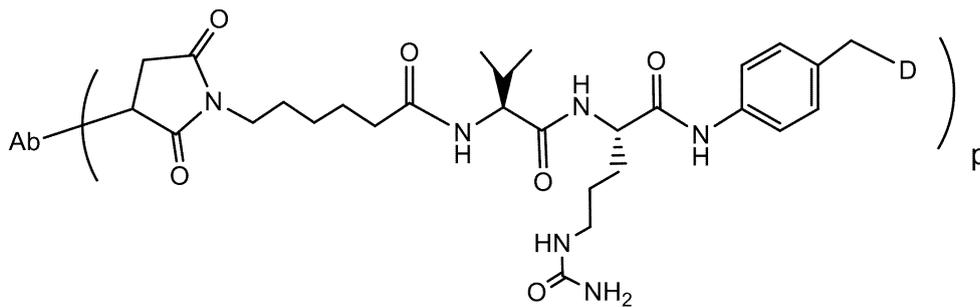


20

を有する。

## 【0238】

例示的な一実施形態において、抗体 - 薬物コンジュゲート化合物は、式、

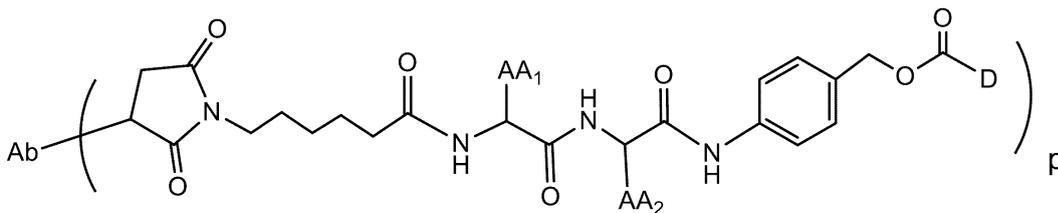


30

を有する。

## 【0239】

例示的な一実施形態において、抗体 - 薬物コンジュゲート化合物は、式、



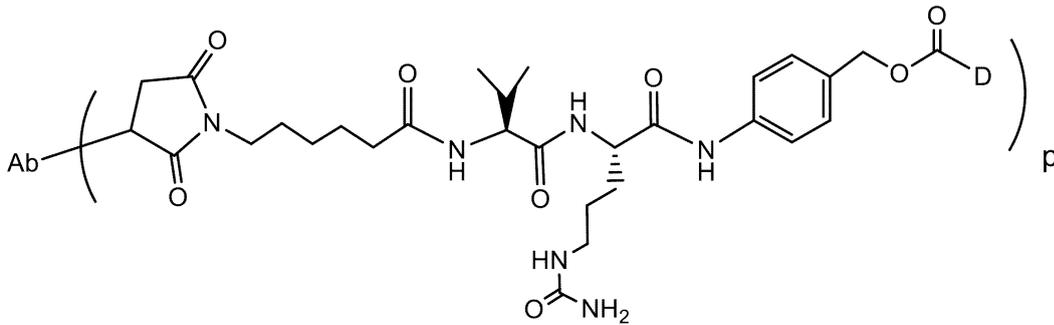
40

を有する。

## 【0240】

例示的な一実施形態において、抗体 - 薬物コンジュゲート化合物は、式、

50



10

を有する。

【0241】

例示的な一実施形態において、Lは、ジスルフィド基を含む。

【0242】

例示的な一実施形態において、pは、1、2、3、または4である。

【0243】

例示的な一実施形態において、抗体-薬物コンジュゲート化合物は、抗体-薬物コンジュゲート化合物の混合物を含み、抗体-薬物コンジュゲート化合物の混合物中の1抗体当たりの平均薬物負荷は、約2～約5である。

20

【0244】

本発明の抗体-薬物コンジュゲート化合物は、抗がん活性を有するものを含む。本発明の抗体-薬物コンジュゲートは、有効量の薬物を腫瘍組織に選択的に送達し、それによって治療指数(「治療濃度域」)を増加させながら、より高い選択性(すなわち、より低い効果的用量)が達成され得る。

【0245】

薬物負荷は、式Iの分子内の1抗体当たりのシルベストロール薬物部分の数である、pによって表される。薬物負荷は、1抗体当たり1～約8個の薬物部分(D)の範囲であり得る。式Iの抗体-薬物コンジュゲートは、1～約8個の範囲の薬物部分にコンジュゲートされた抗体の混合物または集団を含む。いくつかの実施形態において、抗体にコンジュゲートされ得る薬物部分の数は、遊離システイン残基の数によって限定される。いくつかの実施形態において、遊離システイン残基は、本明細書に記載される方法によって抗体アミノ酸配列内に導入される。そのような態様において、pは、1、2、3、4、5、6、7、または8、及びこれらの範囲(1～8または2～5など)であり得る。任意のそのような態様において、p及びnは等しい(すなわち、p=n=1、2、3、4、5、6、7、もしくは8、またはそれらの間のいくつかの範囲)。式Iの例示的な抗体-薬物コンジュゲートとしては、1、2、3、または4つの操作されたシステインアミノ酸を有する抗体が挙げられるが、これらに限定されない(Lyon, R. et al. (2012) *Methods in Enzymol.* 502: 123-138)。いくつかの実施形態において、1つ以上の遊離システイン残基が、操作を使用することなく抗体内に既に存在しており、その場合、既存の遊離システイン残基を使用して、抗体を薬物にコンジュゲートしてもよい。いくつかの実施形態において、抗体は、1つ以上の遊離システイン残基を生成するために、抗体のコンジュゲーション前に還元条件に曝露される。コンジュゲーション反応から抗体-薬物コンジュゲートを調製する上での1抗体当たりの薬物部分の平均数(DAR)は、質量分析法、ELISAアッセイ、及びHPLCなどの従来手段によって特徴付けることができる。pの点から抗体-薬物コンジュゲートの定量的分布もまた、決定することができる。場合によっては、pが特定の値である同種の抗体-薬物コンジュゲートを、他の薬物負荷を有する抗体-薬物コンジュゲートから分離し、精製し、かつ特徴付けることは、逆相HPLCまたは電気泳動法などの手段によって達成され得る。

30

40

【0246】

50

いくつかの抗体 - 薬物コンジュゲートでは、 $p$ は、抗体上の結合部位の数によって限定され得る。例えば、本明細書に記載される特定の例示的な実施形態におけるように、結合がシステインチオールである場合、抗体は、1個のみもしくは限定された数のシステインチオール基を有し得るか、または1個のみもしくは限定された数の反応性が十分なチオール基を有し得、それに、薬物が結合され得る。特定の実施形態において、薬物負荷がより高くなると、例えば、 $p$ が5を超えると、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が引き起こされ得る。特定の実施形態において、抗体 - 薬物コンジュゲートの平均薬物負荷は、1 ~ 約8、約2 ~ 約6、または約3 ~ 約5の範囲である。実際、特定の抗体 - 薬物コンジュゲートでは、1抗体当たりの薬物部分の最適な比率は、8未満であり得、約2 ~ 約5でもあり得ることが示されている（例えば、US 7 498 298を参照されたい）。

10

#### 【0247】

特定の実施形態において、理論上の最大数よりも少ないシルベストロール薬物部分が、コンジュゲーション反応中に抗体にコンジュゲートされる。抗体は、例えば、本明細書において考察されるように、薬物と反応しないシステイン残基を含有し得る。一般に、抗体は、薬物部分に連結され得る多くの遊離及び反応性システインチオール基を含有せず、実際、抗体内のほとんどの天然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。特定の実施形態において、抗体は、部分または完全還元条件下で、ジチオスレイトール（DTT）またはトリカルボニルエチルホスフィン（TCEP）などの還元剤によって還元されて、反応性システインチオール基が生成され得る。特定の実施形態において、抗体は、リジンまたはシステインなどの反応性求核性基を明らかにするために、変性条件に供される。

20

#### 【0248】

抗体 - 薬物コンジュゲートの負荷（薬物 / 抗体比）は、異なる方式で、ならびに例えば、(i) 抗体と比較してモル過剰のシルベストロール - リンカー中間体化合物を制限すること、(ii) コンジュゲーション反応時間または温度を制限すること、及び(iii) システインチオール修飾のための部分的または制限的還元条件によって制御され得る。

#### 【0249】

2つ以上の求核性基が薬物と反応する場合、結果として生じる産物は、抗体に結合した1つ以上の薬物部分が分布する抗体 - 薬物コンジュゲート化合物の混合物であることを理解されたい。1抗体当たりの薬物の平均数は、抗体及び薬物に特異的である二重ELISA抗体アッセイによって混合物から計算され得る。個々の抗体 - 薬物コンジュゲート分子は、質量分析法によって混合物中で特定され、HPLC、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって、分離され得る（例えば、McDonagh et al. (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7): 299 - 307、Hamblett et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10: 7063 - 7070、Hamblett, K. J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody - drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27 - 31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004, Alley, S. C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody - drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27 - 31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004を参照されたい）。特定の実施形態において、単一の負荷値を有する同種の抗体 - 薬物コンジュゲートが、電気泳動法またはクロマトグラフィーによつ

30

40

50

てコンジュゲーション混合物から単離され得る。

【0250】

いくつかの態様において、抗体は、本明細書の別の箇所に記載されるシステイン操作された抗体であり得る、及び/またはコンジュゲーション反応における反応性のために還元剤で処理され得る。Abは、抗体の安定性または抗原結合特異性に悪影響を及ぼさない、当該技術分野で既知である生理学的緩衝液系に溶解される。いくつかの態様において、リン酸緩衝生理食塩水が使用される。シルベストロール-リンカー中間体化合物は、本明細書の別の箇所に記載される少なくとも1つの極性非プロトン性溶媒を含む溶媒系に溶解される。いくつかのそのような態様において、シルベストロール-リンカー中間体は、pH 8のトリス緩衝液（例えば、50 mMのトリス）中に、約5 mM、10 mM、約20 mM、約30 mM、約40 mM、または約50 mM、及びこれらの範囲、例えば、約50 mM ~ 約50 mMまたは約10 mM ~ 約30 mMの濃度になるまで溶解される。いくつかの態様において、シルベストロール-リンカー中間体は、DMSOもしくはアセトニトリル中、またはDMSO中に溶解される。コンジュゲーション反応において、当量過剰のシルベストロール-リンカー中間体溶液は、希釈され、冷却された抗体溶液（例えば、約1 ~ 約10）と組み合わせられる。シルベストロール-リンカー中間体溶液は、少なくとも1つの極性非プロトン性溶媒及び少なくとも1つの極性プロトン性溶媒で好適に希釈され得、これらの例としては、水、メタノール、エタノール、n-プロパノール、及び酢酸が挙げられる。いくつかの特定の態様において、シルベストロール-リンカー中間体は、DMSO中に溶解され、抗体溶液との混合前に、アセトニトリル及び水で希釈される。シルベストロールの抗体に対する当量は、好適に、約1.5 : 1、約3 : 1、約5 : 1、約10 : 1、約15 : 1または約20 : 1、及びこれらの範囲内、例えば、約1.5 : 1 ~ 約20 : 1、約1.5 : 1 ~ 約15 : 1、約1.5 : 1 ~ 約10 : 1、約3 : 1 ~ 約15 : 1、約3 : 1 ~ 約10 : 1、約5 : 1 ~ 約15 : 1、または約5 : 1 ~ 約10 : 1であり得る。反応は、（本明細書の別の箇所に記載される）LC-MSなどの当該技術分野で既知の方法によって完了について好適に監視され得、反応は典型的には、約1時間 ~ 約24時間で完了する。反応が完了した後、試薬を反応混合物に添加して、反応を停止させ、未反応の抗体チオール基をキャッピングする。好適な試薬の一例は、エチルマレイミドである。

【0251】

実施例5に従うコンジュゲーション後に、抗体-シルベストロールコンジュゲートは、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、限外濾過、遠心限外濾過、及びこれらの組み合わせなどであるが、これらに限定されない、当該技術分野で既知の精製方法によって、精製され、非コンジュゲート反応体及び/またはコンジュゲート凝集体から分離され得る。例えば、精製の前には、20 mMのコハク酸ナトリウム（pH 5）中などでの抗体-シルベストロールコンジュゲートの希釈が行われ得る。希釈した溶液は、カチオン交換カラムに適用され、続いて、例えば、少なくとも10カラム体積の20 mMのコハク酸ナトリウム（pH 5）で洗浄される。コンジュゲートは、PBSで好適に溶出され得る。

表6 抗体-薬物コンジュゲート（ADC）

10

20

30

40

50

ADC番号	ADC式	リンカー-薬物 LD番号 (表5)	DAR*
ADC-101	チオ抗CD22 1 0F4v3 LC V205C sq- cit-シルベスト ロール	LD-51	1.6
ADC-102	チオ抗Napi2B 10H1.11.4B LC V205C sq-cit-シル ベストロール	LD-51	1.5
ADC-103	チオHu抗Her2 7C2 LC K1 49Cシルベスト ロールアミン	LD-52	2.0
ADC-104	チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149Cシルベス トロールアミン	LD-52	2.0
ADC-105	チオHu抗CD22 10F4v3 H C:A140Cアミノ シルベストロール類 似体	LD-53	1.95
ADC-106	チオHu抗Her2 7C2 HC:A14 0Cアミノシルベス トロール類似体	LD-53	1.97
ADC-107	チオHu抗Ly6E 9B12.v12 L C:K149C MC -sqcit-PA Bアミノシルベス トロール	LD-58	2.01
ADC-108	チオHu抗CD22 10F4v3 L C:K149C MC -sqcit-PA Bアミノシルベス トロール	LD-58	2.01

10

20

30

40

50

ADC-109	チオHu抗Ly6E 9B12.v12 L C:K149C MC -sqcit-PA Bシルベストロール アミン	LD-59	2.01
ADC-110	チオHu抗CD22 10F4v3 L C:K149C MC -sqcit-PA Bシルベストロール アミン	LD-59	2.01

10

DAR = 薬物 / 抗体比平均

A118C (EU番号付け) = A121C (連続的番号付け) = A114C (Kabata番号付け)

野生型 (「WT」)、システイン操作された変異抗体 (「チオ」)、軽鎖 (「LC」)、重鎖 (「HC」)、6-マレイミドカプロイル (「MC」)、マレイミドプロパノイル (「MP」)、バリン-シトルリン (「val-cit」または「vc」)、アラニン-フェニルアラニン (「ala-phe」)、p-アミノベンジル (「PAB」)、及びp-アミノベンジルオキシカルボニル (「PABC」)

20

#### 【0252】

インビトロ細胞増殖アッセイ

一般に、抗体-薬物コンジュゲート (ADC) の細胞毒性または細胞増殖抑制性活性は、受容体タンパク質 (例えば、HER2) を有する哺乳動物細胞を細胞培養培地中でADCの抗体に曝露し、細胞を約6時間~約5日間の期間培養し、細胞生存率を測定することによって測定される。細胞に基づくインビトロアッセイを使用して、本発明のADCの生存率 (増殖)、細胞毒性、及びアポトーシス (カスパーゼ活性化) の誘導を測定した。

30

#### 【0253】

抗体-薬物コンジュゲート (ADC) のインビトロでの効力を、細胞増殖アッセイによって測定した (実施例6)。本発明のADCは、腫瘍細胞増殖を阻害する上で驚くべきかつ予想外の効力を示した。ADCの効力は、細胞の標的抗原発現と相関した。試験したコンジュゲートは、細胞の表面上で発現される特定の抗原に結合し、インビトロでそれらの細胞の死を引き起こすことができる。

#### 【0254】

Cell Titer - Glo (登録商標) 発光細胞生存率アッセイは、甲虫目ルシフェラーゼの組み換え発現に基づく市販 (Promega Corp., Madison, WI) の同種アッセイ法である (US5583024、US5674713、US5700670)。この細胞増殖アッセイは、代謝活性細胞の指標である、存在するATPの定量化に基づいて、培養物中の生細胞の数を決定する (Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160: 81-88、US6602677)。Cell Titer - Glo (登録商標) アッセイは96ウェル形式で実行し、自動化高スループットスクリーニング (HTS) にとって扱いやすくした (Cree et al (1995) Anti Cancer Drugs 6: 398-404)。同種アッセイ手順は、単一の試薬 (Cell Titer - Glo (登録商標) 試薬) を、血清補充培地で培養した細胞に直接添加することを伴う。細胞の洗浄、培地の除去、及び複数回のピペティングステップは必要ない。このシステムは、384ウェル形式で、試薬の添加及び混合の後、10分間で15個の細胞/ウェルほどの少量の細胞を検出する。細胞をADCで継続的に処理

40

50

してもよく、またはそれら进行处理し、ADCから分離してもよい。一般に、短時間(すなわち、3時間)処理した細胞は、継続的に処理した細胞と同じ効力の作用を示した。

#### 【0255】

インビトロでの細胞増殖の阻害は、CellTiter-Glo(商標)発光細胞生存率アッセイを使用してアッセイすることができ、その一実施形態を実施例6に詳述する。そのようなアッセイは、代謝活性細胞の指標である、存在するATPの定量化に基づいて、培養物中の生細胞の数を決定する(Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160: 81-88、US6602677)。アッセイは96ウェルまたは384ウェル形式で実行して、自動化高スループットスクリーニング(HTS)にとって扱いやすくしてもよい。Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6: 398-404を参照されたい。アッセイ手順は、単一の試薬(CellTiter-Glo(登録商標)試薬)を培養細胞に直接添加することを伴う。これにより、細胞溶解及びルシフェラーゼ反応によって産生される発光シグナルの生成がもたらされる。発光シグナルは存在するATPの量に比例し、これは培養物中に存在する生細胞の数に直接比例する。データは、ルミノメーターまたはCCDカメラ画像化デバイスによって記録することができる。発光出力は、相対発光単位(RLU)として表される。

10

#### 【0256】

この同種「添加-混合-測定」形式は、細胞溶解、及び存在するATPの量に比例する発光シグナルの生成をもたらす。ATPの量は、培養物中に存在する細胞数に直接正比例する。CellTiter-Glo(登録商標)アッセイは、ルシフェラーゼ反応により産生される「グロー型」発光シグナルを生成し、これは、使用される細胞型及び培地に応じて半減期が通常5時間を超える。生細胞は、相対発光単位(RLU)で反映される。甲虫ルシフェリンという基質は、組み換えホタルルシフェラーゼによって酸化により脱炭酸され、同時にATPからAMPへの変換及び光子の生成が起こる。

20

#### 【0257】

細胞に基づくインビトロアッセイを使用して、本発明のADCの生存率(増殖)、細胞毒性、及びアポトーシス(カスパーゼ活性化)の誘導を測定する。一般に、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)の細胞毒性または細胞増殖抑制性活性は、Her2またはMUC16ポリペプチドなどの抗原を発現する哺乳動物細胞を細胞培養培地中でADCに曝露し、細胞を約6時間~約5日間の期間培養し、細胞生存率を測定することによって測定される。抗MUC16ADCの細胞増殖アッセイに有用な哺乳動物細胞としては、(1)MUC16ポリペプチド発現細胞株OVCA9-3、(2)その細胞表面上にMUC16ポリペプチドの一部を安定して発現するように操作されたPC3由来細胞株(PC3/MUC16)、(3)MUC16ポリペプチドを発現しない親PC3細胞株、及び(4)MUC16ポリペプチドを発現しないが、外因性MUC16発現を駆動するために使用されるベクターを担持するPC3細胞株(PC3/ネオ)が挙げられ得る。

30

#### 【0258】

図1A及び1Bは、SK-BR-3(図1A)細胞及びKPL-4(図1B)細胞中のADCの濃度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )に対する、5日でのインビトロ細胞生存率のプロットにおける抗体-薬物コンジュゲートの有効性を示す。細胞を96ウェルプレートにプレATING( SK-BR-3は5000個の細胞/ウェル、KPL-4は1500個の細胞/ウェル)し、一晚接着させた(実施例6に従って実行した)。その後、培地を除去し、異なる濃度のコンジュゲートを含有する新鮮な培養培地で置き換えた。薬物投与の5日後、CellTiter-Gloを使用して細胞生存率を測定した。SK-BR-3(図1A)及びKPL-4(図1B)の両方の細胞株中、チオ抗Her2 7C2 LC-K149C-MC-vc-PAB-シルベストロール-アミンであるADC-103は、チオHu抗Her2 7C2 HC:A140Cアミノシルベストロール類似体であるADC-106よりも強力であった。オフターゲット対照、チオHu抗CD22 10F4v3 HC:A140Cアミノシルベストロール類似体であるADC-105は、活性ではなかった。

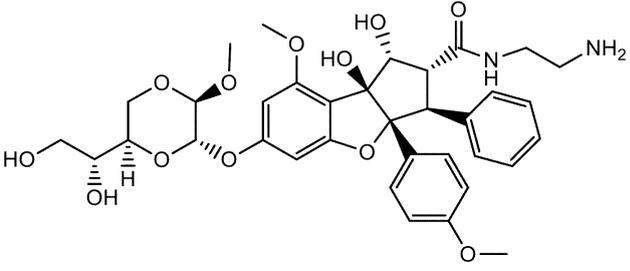
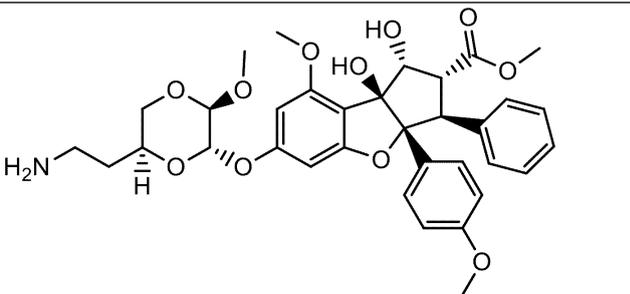
40

#### 【0259】

50

遊離薬物シルベストロールアミン（以下）は、その不透過性のために不活性である一方で、遊離薬物アミノシルベストロール類似体は、活性である（表7）。7C2アミノシルベストロール類似体（ADC-106）は、7C2シルベストロールアミン（ADC-103）よりも効力が低い。7C2アミノシルベストロール類似体（ADC-106）では、二相性用量応答曲線が観察される。遊離薬物アミノシルベストロール類似体は、pMまたは低nMのIC<sub>50</sub>を有する一方で、シルベストロールアミン遊離薬物は、その不透過性のためにいかなる活性も示さない。したがって、2つのコンジュゲート間の効力の差異が遊離薬物の効力の差異によって引き起こされるかを決定することは困難である。遊離薬物アミノシルベストロール類似体はSK-BR-3細胞（1.6 nM）及びKPL-4細胞（1.2 nM）中で類似のIC<sub>50</sub>値を有するものの、7C2アミノシルベストロール類似体（ADC-106）は、KPL-4細胞中でよりもSK-BR-3細胞中で低い効力を呈する。

10

 <p>遊離薬物シルベストロールアミン</p>	<p>(1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) -N-(2-アミノエチル)-6-(((2S, 3R, 6R)-6-((R)-1, 2-ジヒドロキシエチル)-3-メトキシ-1, 4-ジオキササン-2-イル)オキシ)-1, 8b-ジヒドロキシ-8-メトキシ-3a-(4-メトキシフェニル)-3-フェニル-2, 3, 3a, 8b-テトラヒドロ-1H-シクロペンタ[b]ベンゾフラン-2-カルボキサミド</p>
 <p>遊離薬物アミノシルベストロール類似体</p>	<p>メチル(1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS)-6-(((2S, 3R, 6S)-6-(2-アミノエチル)-3-メトキシ-1, 4-ジオキササン-2-イル)オキシ)-1, 8b-ジヒドロキシ-8-メトキシ-3a-(4-メトキシフェニル)-3-フェニル-2, 3, 3a, 8b-テトラヒドロ-1H-シクロペンタ[b]ベンゾフラン-2-カルボキシレート</p>

20

30

表7 遊離薬物シルベストロール化合物のインビトロ有効性

40

50

細胞株	IC50 (nM) 遊離薬物シルベストロールアミン、	IC50 (nM) 遊離薬物アミノシルベストロール類似体
MES-SA	100超	1.1
MES-SA/Dx5	200超	100超
BJAB	200超	0.81
KPL-4	200超	1.2
HCC1569X2	200超	1.3
T-47D	200超	1.0
HCC1937	200超	0.66
NCI-H1781	200超	1.0
SW900	200超	2.9

10

## 【0260】

20

## インビボ有効性

本発明の抗体-薬物コンジュゲート(ADC)のインビボ有効性は、マウスにおける腫瘍異種移植片研究によって測定され得る(実施例7~10)。本発明のADCは、腫瘍増殖を阻害する上で驚くべきかつ予想外の標的依存性及び用量依存性効力を示した。ADCの効力は、腫瘍細胞の標的抗原発現と相関した。

## 【0261】

齧歯類にがん細胞の同種移植片または異種移植片を埋め込み、腫瘍をADCで治療することによって、抗体-薬物コンジュゲートの有効性をインビボで測定した。細胞株、がん細胞上に存在する受容体へのADCの抗体結合の特異性、投薬レジメン、及び他の要因に応じて、可変的な結果が予想される。中~高レベルの腫瘍関連抗原(Her2発現KPL4及びCD22発現BJABを含む)を発現するトランスジェニック外植マウスモデルを使用して、ADCのインビボ有効性を測定した。対象はADCで一度治療し、3~6週間にわたって監視して、腫瘍倍増、ログ細胞殺滅、及び腫瘍収縮までの時間を測定した。経過観察の用量応答実験及び複数回用量実験を実行した。

30

## 【0262】

例えば、本発明の抗HER2 ADCのインビボ有効性は、高発現HER2トランスジェニック外植マウスモデルによって測定され得る(Phillips et al(2008) Cancer Res. 68: 9280-90)。同種移植片を、HERCEPTIN(登録商標)(Genentech, Inc.)療法に应答しないか、または应答が不良であるFo5 mmtvトランスジェニックマウスから増殖させる。対象は、特定の用量レベル(mg/kg)のADC及びプラセボ緩衝液対照(ビヒクル)で一度以上治療し、2週間以上にわたって監視して、腫瘍倍増、ログ細胞殺滅、及び腫瘍収縮までの時間を測定する(実施例7に従って実行する)。

40

## 【0263】

図2は、

- 1) ビヒクル(HisAc 20mM、Sucr 240mM、TW-20 0.02%(pH5.5))、100uL、静脈内に一度
- 2) チオ抗CD22 LC-K149C-MC-vc-PAB-シルベストロール-アミン(ADC-104)、1mg/kgで静脈内に一度、
- 3) チオ抗CD22 LC-K149C-MC-vc-PAB-シルベストロール-アミ

50

ン (ADC - 104)、3 mg / kg で静脈内に一度、

4) チオ抗 CD22 LC - K149C - MC - vc - PAB - シルベストロール - アミン

ン (ADC - 104)、6 mg / kg で静脈内に一度、

5) チオ抗 CD22 LC - K149C - MC - vc - PAB - シルベストロール - アミン

ン (ADC - 104)、10 mg / kg で静脈内に一度、

6) チオ抗 Her2 7C2 LC - K149C - MC - vc - PAB - シルベストロール

- アミン (ADC - 103)、3 mg / kg で静脈内に一度、を静脈内に一度投薬した後

に実施例9に従って実行される、CB - 17 Fox Chase SCIDマウスにおけるCD22発現Bjab - lucヒト異種移植片モデルでの、経時的なインビボ適合腫瘍体積変化のプロットにおける抗体 - 薬物コンジュゲートの有効性を示す。

10

#### 【0264】

ビヒクル群と比較して、CD22シルベストロール - アミン (ADC - 104) の試験した

全ての用量レベルについて活性が見られる。1及び3 mg / kg で投薬したADC - 1

04は中程度の活性を示し、6及び10 mg / kg はおよそ静止状態である。3 mg / kg

で投薬したHer2対照シルベストロール - アミン (ADC - 103) では、いくらかの

成長遅延が存在する。安全信号として、体重減少は見られない。腫瘍阻害の証拠を観察

したが、腫瘍体積は高度に可変的であったため、決定的ではなかった。

#### 【0265】

図3は、実施例10に従って実行される、scidベージュマウスにおけるHER2発現

KPL4ヒト乳腺異種移植片モデルでの、経時的なインビボ適合腫瘍体積変化のプロット

における抗体 - 薬物コンジュゲートの有効性を示す。

20

1) ビヒクル (HisAc 20 mM、Sucr 240 mM、TW - 20 0.02% (pH 5.5))、100  $\mu$ L、静脈内に一度

2) シルベストロール、0.09 mg / kg、静脈内に一度

3) シルベストロール、1 mg / kg、腹腔内 qd x 5 で2週間

4) チオ抗 Her2 7C2 LC - K149C - MC - vc - PAB - シルベストロール

- アミン (ADC - 103)、1 mg / kg で静脈内に一度

5) チオ抗 Her2 7C2 LC - K149C - MC - vc - PAB - シルベストロール

- アミン (ADC - 103)、3 mg / kg で静脈内に一度

6) チオ抗 Her2 7C2 LC - K149C - MC - vc - PAB - シルベストロール

- アミン (ADC - 103)、6 mg / kg で静脈内に一度

30

7) チオ抗 Her2 7C2 LC - K149C - MC - vc - PAB - シルベストロール

- アミン (ADC - 103)、10 mg / kg で静脈内に一度

8) チオ抗 CD22 LC - K149C - MC - vc - PAB - シルベストロール - アミン

ン (ADC - 104)、3 mg / kg で静脈内に一度

ビヒクル及びオフターゲット対照ADC - 104と比較して、抗HER2 7C2シルベ

ストロール - アミン (ADC - 103) の試験した全ての用量レベルについて活性が見ら

れる。1及び3 mg / kg で投薬したADC - 103は中程度の活性を示し、6及び10

mg / kg はおよそ静止状態である。3 mg / kg で投薬したCD22対照シルベスト

ロール - アミン (ADC - 104) では、いくらかの成長遅延は存在しない。安全信号とし

て、体重減少は見られない。

40

#### 【0266】

図4は、CB - 17 Fox Chase SCIDマウスにおけるCD - 22発現Bjab

- lucヒト異種移植片モデルでの、経時的なインビボ適合腫瘍体積変化のプロットに

における抗体 - 薬物コンジュゲートの有効性を示す。

1) ビヒクル (ヒスチジン緩衝液番号8)、100  $\mu$ L、静脈内に一度

2) チオCD22 LC - K149C - MC - vc - PAB - シルベストロール - アミン

(ADC - 104)、10 mg / kg で静脈内に一度

3) チオHer2 (7C2) LC - K149C - MC - vc - PAB - シルベストロール

- アミン (ADC - 103)、10 mg / kg で静脈内に一度

50

- 4) チオCD22 HC - A140C - MC - vc - PAB - アミノ - シルベストロール (ADC - 105)、1 mg / kg で静脈内に一度
- 5) チオCD22 HC - A140C - MC - vc - PAB - アミノ - シルベストロール (ADC - 105)、3 mg / kg で静脈内に一度
- 6) チオCD22 HC - A140C - MC - vc - PAB - アミノ - シルベストロール (ADC - 105)、6 mg / kg で静脈内に一度
- 7) チオCD22 HC - A140C - MC - vc - PAB - アミノ - シルベストロール (ADC - 105)、10 mg / kg で静脈内に一度
- 8) チオHer2 (7C2) HC - A140C - MC - vc - PAB - アミノ - シルベストロール (ADC - 106)、3 mg / kg で静脈内に一度
- 9) チオHer2 (7C2) HC - A140C - MC - vc - PAB - アミノ - シルベストロール (ADC - 106)、10 mg / kg で静脈内に一度

10

## 【0267】

2つの用量レベルのHer2 (7C2) HC A140C MC - vc - PAB - アミノシルベストロール (ADC - 106)、及びHer2 (7C2) LC K149C MC - vc - PAB - シルベストロールアミン (ADC - 103) が対照として存在する。安定性分析のための血漿を、1、3、及び7日目に群7 (10 mg / kg の用量のチオCD22 HC - A140C - MC - vc - PAB - アミノ - シルベストロール (ADC - 105)) から採取した。10 mg / kg で投薬したCD22 LC K149C - MC - vc - PAB - シルベストロールアミン (ADC - 104) は、腫瘍静止状態 (102% のTGI) をもたらす。図2の結果と比較して、動物が治療に対して良好に应答するか、または全く应答しないかのいずれかだった場合、これらの結果により、腫瘍の静的应答が確認されているようである (5匹中5匹の動物が腫瘍静止状態であるが、退縮に向かう傾向がある)。10 mg / kg で投薬した対照Her2 (7C2) LC K149C - MC - vc - PAB - シルベストロールアミン (ADC - 103) は、32% のTGIをもたらす。1 ~ 10 mg / kg で投薬したCD22 HC - A140C - MC - vc - PAB - アミノ - シルベストロール (CNJ3592、G03063194) は、1 mg / kg で中程度のTGI (81%)、及びそれより高い用量で退縮をもたらす。また、2つの10 mg / kg 用量 (群2対群7) を比較すると、アミノ - シルベストロールは、シルベストロール - アミンよりも強力であるようであるが、それらは2つの異なる結合部位にあることが警告される。対照Her2 (7C2) HC A140C - MC - vc PAB - アミノ - シルベストロール (CNJ3593、G03063194) : 3及び10 mg / kg の用量は、類似の中程度の应答 (30 ~ 40% のTGI) をもたらす。全ての用量群において体重減少は観察されない。

20

30

## 【0268】

図5は、CB - 17 Fox Chase SCIDマウスにおけるCD - 22発現Bja b - 1ucヒト異種移植片モデルでの、経時的なインビボ適合腫瘍体積変化のプロットにおける抗体 - 薬物コンジュゲートの有効性を示す。

- 1) ビヒクル (ヒスチジン緩衝液番号8)、100 uL、静脈内に一度
- 2) チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149C - MC - sq - cit - PAB - シルベストロール - アミン (ADC - 110)、3 mg / kg で静脈内に一度
- 3) チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149C - MC - sq - cit - PAB - シルベストロール - アミン (ADC - 110)、6 mg / kg で静脈内に一度
- 4) チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149C - MC - sq - cit - PAB - シルベストロール - アミン (ADC - 110)、10 mg / kg で静脈内に一度
- 5) チオHu抗LY6E 9B12v12 LC K149C - MC - sq - cit - PAB - シルベストロール - アミン (ADC - 109)、10 mg / kg で静脈内に一度
- 6) チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149C - MC - sq - cit - PAB - アミノ - シルベストロール (ADC - 108)、0.3 mg / kg で静脈内に一度
- 7) チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149C - MC - sq - cit - PAB

40

50

- アミノ - シルベストロール (ADC - 108)、1 mg / kg で静脈内に一度  
 8) チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149C - MC - sq - cit - PAB  
 - アミノ - シルベストロール (ADC - 108)、3 mg / kg で静脈内に一度  
 9) チオHu抗CD22 10F4v3 LC K149C - MC - sq - cit - PAB  
 - アミノ - シルベストロール (ADC - 108)、6 mg / kg で静脈内に一度  
 10) チオHu抗LY6E 9B12v12 LC K149C - MC - sq - cit - PAB  
 - アミノ - シルベストロール (ADC - 107)、6 mg / kg で静脈内に一度  
 【0269】

シルベストロールアミン (ADC - 110) は、10 mg / kg (群4) で中程度の応答  
 をもたらし、20日目に81%の腫瘍成長阻害をもたらした。アミノシルベストロール (ADC - 108) は、3 mg / kg (群8) で完全な腫瘍退縮をもたらした。いずれの場合も、有効性は用量依存性であり、より低い用量はより低い応答をもたらした。CD22 ADC (ADC - 108 及び ADC - 110) と、非標的 (LY6E) 対照ADCである ADC - 109 (群5) 及び ADC - 107 (群10) の両方との間には分離が存在したため、有効性はまた標的特異的でもあった。

【0270】

#### 薬学的製剤

本発明の治療抗体 - 薬物コンジュゲートの薬学的製剤は典型的には、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、所望される程度の純度を有し、かつ1つ以上の任意の薬学的に許容される担体、賦形剤、及び/またはビヒクルを有する単位投薬量の注射可能な形態で、非経口投与、すなわち、ボーラス、静脈内、腫瘍内注射のために調製される (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))。薬学的に許容される担体は一般に、レシピエントに対し、用いられる投薬量及び濃度で無毒であり、緩衝液 (リン酸、クエン酸、及び他の有機酸など)、アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤、保存剤 (オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール、アルキルパラベン (メチルもしくはプロピルパラベンなど)、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3 - ペンタノール、及びm - クレゾールなど)、低分子量 (約10残基未満) ポリペプチド、タンパク質 (血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなど)、親水性ポリマー (ポリビニルピロリドンなど)、アミノ酸 (グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなど)、単糖類、二糖類、及び他の炭水化物 (グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む)、キレート剤 (EDTAなど)、糖類 (スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなど)、塩形成対イオン (ナトリウムなど)、金属錯体 (例えば、Zn - タンパク質錯体)、及び/または非イオン性界面活性剤 (ポリエチレングリコール (PEG) など) を含むが、これらに限定されない。本明細書における例示的な薬学的に許容される担体は、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (SHASEGP)、例えば、ヒト可溶性PH - 20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (rHuPH20 (HYLENEX (登録商標)、Baxter International, Inc.)) など) などの介在性薬物分散剤を更に含む。rHuPH20を含む、特定の例示的なSHASEGP及び使用方法は、米国特許公開第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載されている。一態様において、SHASEGPは、コンドロイチナーゼなどの1つ以上の追加のグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

【0271】

例示的な凍結乾燥抗体または免疫コンジュゲート製剤が、US6267958に記載されている。水性抗体製剤または免疫コンジュゲート製剤としては、US6171586及びWO2006/044908に記載されるものが挙げられ、後者の製剤にはヒスチジン - 酢酸緩衝液が含まれる。

【0272】

10

20

30

40

50

本明細書における製剤はまた、治療されている特定の適応症に必要とされる2つ以上の活性成分、好ましくは相互に悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものを含有してもよい。

【0273】

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技術によって、もしくは界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルにより、コロイド薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロ乳濁液、ナノ粒子、及びナノカプセル)内、またはマクロ乳濁液中にも取り込まれ得る。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

10

【0274】

徐放性調製物が調製され得る。徐放性調製物の好適な例としては、抗体または免疫コンジュゲートを含む固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスが挙げられ、このマトリクスは、成形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態にある。

【0275】

インビボ投与に使用される製剤は一般に、滅菌される。滅菌は、例えば、滅菌濾過膜を通ず濾過によって容易に達成され得る。

【0276】

治療方法

本発明の抗体-薬物コンジュゲートは、例えば、腫瘍抗原の過剰発現を特徴とする様々な疾患または障害を治療するために使用されることが企図される。例示的な病態または過剰増殖性障害としては、良性または悪性の固形腫瘍、ならびに血液疾患(白血病及びリンパ系腫瘍など)が挙げられる。他には、ニューロン性、膠細胞性、星状細胞性、視床下部性、腺性、マクロファージ性、上皮性、間質性、胞胚腔性、炎症性、血管新生性、及び免疫性(自己免疫性を含む)障害が挙げられる。

20

【0277】

一態様において、本明細書に提供される抗体-薬物コンジュゲートは、がん細胞の増殖を阻害する方法において使用され、この方法は、抗体または抗体-薬物コンジュゲートが細胞の表面上の腫瘍関連抗原に結合することを許容する条件下で、細胞を抗体-薬物コンジュゲートに曝露し、それにより細胞の増殖を阻害することを含む。特定の実施形態において、この方法は、インビトロ方法またはインビボ方法である。更なる実施形態において、細胞は、リンパ球、リンパ芽球、単球、または骨髄単球細胞である。

30

【0278】

別の態様において、医薬品としての使用のための抗体-薬物コンジュゲートが提供される。更なる態様において、治療方法における使用のための抗体-薬物コンジュゲートが提供される。特定の実施形態において、がんの治療における使用のための抗体-薬物コンジュゲートが提供される。特定の実施形態において、本発明は、有効量の抗体-薬物コンジュゲートを個体に投与することを含む、個体を治療する方法における使用のための抗体-薬物コンジュゲートを提供する。そのような一実施形態において、この方法は、例えば、本明細書に記載される、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を個体に投与することを更に含む。

40

【0279】

更なる一態様において、本発明は、医薬品の製造または調製における抗体-薬物コンジュゲートの使用を提供する。一実施形態において、医薬品は、がんの治療のためのものであり、その方法は、がんを有する個体に有効量の医薬品を投与することを含む。そのような一実施形態において、この方法は、例えば、本明細書に記載される、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を個体に投与することを更に含む。

【0280】

更なる一態様において、本発明は、がんを治療するための方法を提供する。一実施形態において、この方法は、腫瘍関連発現抗原の検出を特徴とする、そのようながんを有する個

50

体に、本発明の有効量の抗体 - 薬物コンジュゲートを投与することを含む。そのような実施形態において、この方法は、本明細書に記載される、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を個体に投与することを更に含む。

【0281】

本発明の抗体 - 薬物コンジュゲートは、治療において、単独で、または他の薬剤との組み合わせでのいずれかで使用され得る。例えば、本発明の抗体 - 薬物コンジュゲートは、化学療法剤などの少なくとも1つの追加の治療剤とともに同時投与され得る。

【0282】

本明細書に記載されるそのような併用療法は、併用投与（2つ以上の治療剤が同じまたは別個の製剤中に含まれる場合）、ならびに本発明の抗体 - 薬物コンジュゲートの投与が、追加の治療剤及び/またはアジュバントの投与の前、それと同時、及び/またはそれに続いて生じ得る、別個投与を包含する。本発明の抗体 - 薬物コンジュゲートはまた、放射線療法と組み合わせても使用することができる。

【0283】

本発明の抗体 - 薬物コンジュゲート（及び任意の追加の治療剤）は、非経口、肺内、及び鼻腔内、ならびに局所治療で所望される場合、病変内投与を含む、任意の好適な手段によって投与され得る。非経口注入としては、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が挙げられる。投薬は、部分的には、投与が短時間であるか、または慢性的であるかに応じて、例えば、任意の好適な経路によるもの、例えば、静脈内注射または皮下注射などの注射によるものであり得る。単回投与または様々な時点にわたる複数回投与、ボーラス投与、及びパルス注入を含むが、これらに限定されない、様々な投薬スケジュールが本明細書において企図される。

【0284】

本発明の抗体 - 薬物コンジュゲートは、良好な医療慣例と一致する様式で、製剤化、投薬、及び投与されるだろう。この文脈において考慮すべき要因としては、治療されている特定の障害、治療されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床病態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュールリング、及び医師に既知である他の要因が挙げられる。抗体 - 薬物コンジュゲートは、任意で、問題の障害を予防または治療するために現在使用されている1つ以上の薬剤とともに製剤化されるが、その必要はない。そのような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体 - 薬物コンジュゲートの量、障害または治療の種類、ならびに本明細書に考察される他の要因に依存する。これらは一般に、本明細書に記載されるものと同じ投薬量及び投与経路で使用されるか、または本明細書に記載される投薬量の約1~9%、もしくは経験的/臨床的に適切であると決定される任意の投薬量及び任意の経路で使用される。

【0285】

疾患の予防または治療のために、本発明の抗体 - 薬物コンジュゲートの適切な投薬量（単独で、または1つ以上の他の追加の治療剤と組み合わせて使用される場合）は、治療される疾患の種類、抗体または免疫コンジュゲートの種類、疾患の重症度及び経過、抗体 - 薬物コンジュゲートが予防目的または治療目的で投与されるかどうか、以前の療法、患者の病歴、及び抗体 - 薬物コンジュゲートへの応答、ならびに主治医の裁量に依存するだろう。抗体 - 薬物コンジュゲートは、一度に、または一連の治療にわたって患者に好適に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば、1回以上の別個の投与によるものであれ、継続注入によるものであれ、約1  $\mu$ g / kg ~ 15 mg / kg（例えば、0.1 mg / kg ~ 10 mg / kg）の抗体 - 薬物コンジュゲートが、患者への投与のための初回候補投薬量であり得る。1つの典型的な1日投薬量は、本明細書において言及される要因に応じて、約1  $\mu$ g / kg ~ 100 mg / kg以上の範囲であり得る。病態に応じて数日間以上にわたる反復投与の場合、治療は一般に、疾患症状の所望される抑制が生じるまで持続されるだろう。抗体 - 薬物コンジュゲートの一例示的な投薬量は、約0.05 mg / kg ~ 約10 mg / kgの範囲内であるだろう。したがって、約0.5 mg / kg、2.0 mg / kg、4.0 mg / kg、または10 mg / kg（またはこれらの任意の組み合わせ

10

20

30

40

50

せ)のうちの1つ以上の用量が、患者に投与され得る。そのような用量は、断続的に、例えば、毎週または3週間毎(例えば、患者が約2~約20回、または例えば、約6回の用量の抗体を受けるように)投与されてもよい。より高い初回負荷用量に続いて、1回以上のより低い用量が投与されてもよい。しかしながら、他の投薬量レジメンも有用であり得る。この療法の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

#### 【0286】

標的細胞内での抗体-シルベストロールコンジュゲートからのシルベストロールの細胞内放出は、活性シルベストロール部分を放出するためのリンカー単位の切断(ペプチドまたはペプチドミメティック単位のグルタチオンまたはプロテアーゼ切断によるジスルフィドリンカー結合の還元的切断など)から生じると考えられている。グルタチオン媒介放出は、酸不安定性ヒドラジンリンカーなどの先行技術において既知の特定のリンカーと比較して、利点を提供する。より具体的には、グルタチオンの血液濃度は、非常に低い(マイクロモル範囲内など)ことが知られている一方で、細胞内グルタチオン濃度は典型的には、最大3桁より大きい(ミリモル範囲内など)。がん細胞内のグルタチオン濃度は、還元酵素の活性の増加のために、更により大きいと更に考えられる。したがって、本開示のシルベストロール-抗体コンジュゲートは、血流中の改善された安定性及び改善された細胞内放出速度を提供すると考えられている。

#### 【0287】

##### 製造品

本発明の別の態様において、本明細書に記載される障害の治療、予防、及び/または診断に有用な材料を含有する製造品が提供される。製造品は、容器と、容器上のもしくは容器に関連するラベルまたは添付文書とを含む。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、静脈注射用溶液バッグなどが挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器は、それ自体で、または別の組成物との組み合わせで、障害の治療、予防、及び/または診断に有効である組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有し得る(例えば、容器は、静脈注射用溶液バッグまたは皮下注射針によって穿孔可能な栓を有するバイアルであり得る)。組成物中の少なくとも1つの活性薬剤は、本発明の抗体-薬物コンジュゲートである。ラベルまたは添付文書は、組成物が、選択される病態を治療するために使用されることを示す。更に、製造品は、(a)本発明の抗体-薬物コンジュゲートを含む組成物を内部に収容した第1の容器と、(b)更なる細胞毒性剤またはさもなくば治療剤を含む組成物を内部に収容した第2の容器とを含み得る。本発明のこの実施形態における製造品は、組成物が特定の病態を治療するために使用され得ることを示す添付文書を更に含み得る。あるいは、または加えて、製造品は、注入用静菌水(BWF I)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、またはデキストロース溶液などの薬学的に許容される緩衝液を含む第2の(または第3の)容器を更に含んでもよい。それは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的観点及びユーザの観点から望ましい他の材料を更に含んでもよい。

#### 【実施例】

#### 【0288】

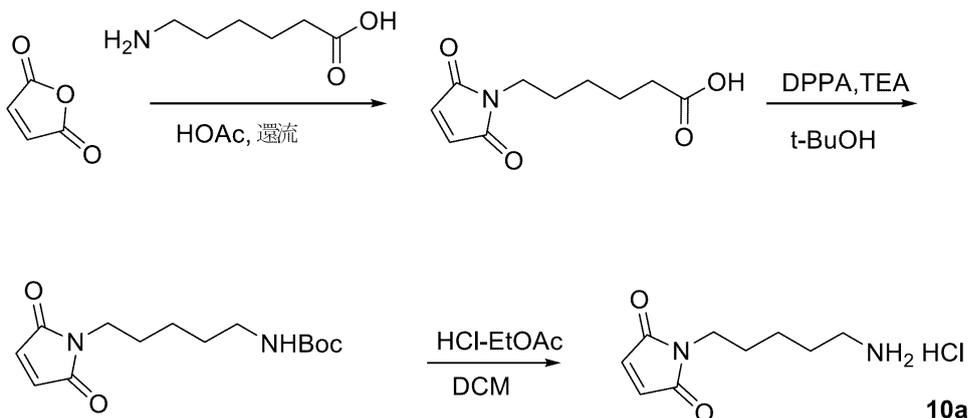
以下は、本発明の方法及び組成物の実施例である。本明細書に提供される概要を考慮して、様々な他の実施形態が実施され得ることが理解される。

#### 【0289】

実施例1 aシルベストロール-リンカー中間体LD-51(表5)。(1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS)-メチル6-( ( (2S, 3R, 6R)-6-( (4R)-2-(4-( (S)-2-(1-( (5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)カルバモイル)シクロブタンカルボキサミド)-5-ウレイドペンタンアミド)フェニル)-1,3-ジオキソラン-4-イル)-3-メトキシ-1,4-ジオキサン-2-イル)オキシ)-1,8b-ジヒドロキシ-8-メトキシ-3a-(4-メトキシフェニル)-3-フェニル-2,3,3a,8b-テトラヒドロ-1H-シクロペンタ[b]ベンゾフラン-2-カルボキシレートLD-51の合成

## 【0290】

ステップ1：1-(5-アミノペンチル)-1H-ピロール-2,5-ジオンヒドロクロリド10aの調製



10

## 【0291】

無水マレイン酸、フラン-2,5-ジオン(150g、1.53mol)を、6-アミノヘキサン酸(201g、1.53mol)のHOAc攪拌溶液(1000mL)に添加した。混合物を室温で2時間攪拌した後、それを還流で8時間加熱した。有機溶媒を減圧下で除去し、残渣をEtOAc(500mL×3回)で抽出し、H<sub>2</sub>Oで洗浄した。合わせた有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、濃縮して、粗産生物を得た。それを石油エーテルで洗浄して、6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサン酸を白色固体(250g、77.4%)として得た。DPPA(130g、473mmol)及びTEA(47.9g、473mmol)を、6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサン酸(100g、473mmol)のt-BuOH溶液(200mL)に添加した。混合物を、N<sub>2</sub>下、還流で8時間加熱した。混合物を濃縮し、残渣をシリカゲル(PE:EtOAc=3:1)上のカラムクロマトグラフィーによって精製して、tert-ブチル5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチルカルバメート(13g、10%)を得た。tert-ブチル5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチルカルバメート(28g、99.2mmol)の無水EtOAc溶液(30mL)に、HCl/EtOAc(50mL)を滴加した。混合物を室温で5時間攪拌した後、それを濾過し、固体を乾燥させて、1-(5-アミノペンチル)-1H-ピロール-2,5-ジオンヒドロクロリド10a(16g、73.7%)を得た。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 8.02(s, 2H), 6.99(s, 2H), 3.37-3.34(m, 2H), 2.71-2.64(m, 2H), 1.56-1.43(m, 4H), 1.23-1.20(m, 2H)。

20

30

## 【0292】

ステップ2：(S)-1-(1-(4-(ヒドロキシメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イルカルバモイル)シクロブタンカルボン酸10bの調製

40

50



10 e (4.2 g, 8.3 mmol) の乾燥 DMF (20 mL) 攪拌溶液に、ピペリジン (1.65 mL, 17 mmol, 2 当量) を室温で滴加した。混合物を室温で 30 分間攪拌し、固体沈殿物が形成された。乾燥 DCM (50 mL) を添加すると、混合物は直ちに透明になった。混合物を室温で更に 30 分間攪拌すると、LCMS は 10 e が消費されたことを示した。それを減圧下で乾燥するまで濃縮し (ピペリジンが残留しないことを確実にし)、残渣を、EtOAc と H<sub>2</sub>O とに分割 (50 mL / 20 mL) した。水相を EtOAc (50 mL × 2 回) で洗浄し、濃縮して、(S) - 2 - アミノ - N - (4 - (ヒドロキシメチル) フェニル) - 5 - ウレイドペンタンアミド 10 d (少量の DMF を含有) を油性残渣 (2.2 g, 94%) として得た。

【0296】

市販の 1, 1 - シクロブタンジカルボン酸、1, 1 - ジエチルエステル (CAS 登録番号 3779 - 29 - 1) を、水性塩基での制限けん化によって半酸 / エステル 1, 1 - シクロブタンジカルボン酸、1 - エチルエステル (CAS 登録番号 54450 - 84 - 9) へと、ならびにカップリング試薬 (TBTU (O - (ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - N, N, N', N' - テトラメチルウロニウムテトラフルオロホウ酸 (N, N, N', N' - テトラメチル - O - ((ベンゾトリアゾール - 1 - イル) ウロニウムテトラフルオロホウ酸とも呼ばれる)、CAS 番号 125700 - 67 - 6、Sigma - Aldrich B - 2903) 及び N - ヒドロキシスクシンイミドでの活性化によって NHS エステル、1 - (2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル) 1 - エチルシクロブタン - 1, 1 - ジカルボキシレートなど) へと変換した。

【0297】

1 - (2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル) 1 - エチルシクロブタン - 1, 1 - ジカルボキシレート (8 g, 29.7 mmol) の DME 溶液 (50 mL) に、10 d (6.0 g, 21.4 mmol) 及び NaHCO<sub>3</sub> (7.48 g, 89.0 mmol) の水溶液 (30 mL) を添加した。混合物を室温で 16 時間攪拌した後、それを減圧下で乾燥するまで濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィー (DCM : MeOH = 10 : 1) によって精製して、(S) - エチル 1 - ((1 - (4 - (ヒドロキシメチル) フェニル) - 2 - オキソ - 6 - ウレイドヘキサ - 3 - イル) カルバモイル) シクロブタンカルボキシレート 10 c を白色固体 (6.4 g, 68.7%) として得た。LCMS (ESI) : m/z 435.0 [M + 1]

【0298】

10 c (6.4 g, 14.7 mmol) の THF 及び MeOH (20 mL / 10 mL) 攪拌溶液に、LiOH · H<sub>2</sub>O (1.2 g, 28.6 mmol) の H<sub>2</sub>O (20 mL) 溶液を室温で添加した。反応混合物を室温で 16 時間攪拌した後、溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣を分取 HPLC によって精製して、(S) - 1 - (1 - (4 - (ヒドロキシメチル) フェニルアミノ) - 1 - オキソ - 5 - ウレイドペンタン - 2 - イルカルバモイル) シクロブタンカルボン酸 10 b (3.5 g, 収率 : 58.5%) を得た。LCMS (ESI) : m/z 406.9 [M + 1]. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, メタノール - d<sub>4</sub>) 8.86 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.51 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.88 - 5.85 (m, 1H), 5.78 (s, 2H), 4.54 - 4.49 (m, 3H), 4.38 - 4.32 (m, 1H), 3.86 - 3.75 (m, 1H), 3.84 - 3.80 (m, 2H), 3.28 - 3.21 (m, 1H), 3.30 - 3.24 (m, 1H), 3.00 - 2.80 (m, 1H), 2.37 - 2.28 (m, 2H).

【0299】

ステップ 3 : (S) - N - (5 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) ペンチル) - N - (1 - (4 - (ヒドロキシメチル) フェニルアミノ) - 1 - オキソ - 5 - ウレイドペンタン - 2 - イル) シクロブタン - 1, 1 - ジカルボキサミド 10 の調製

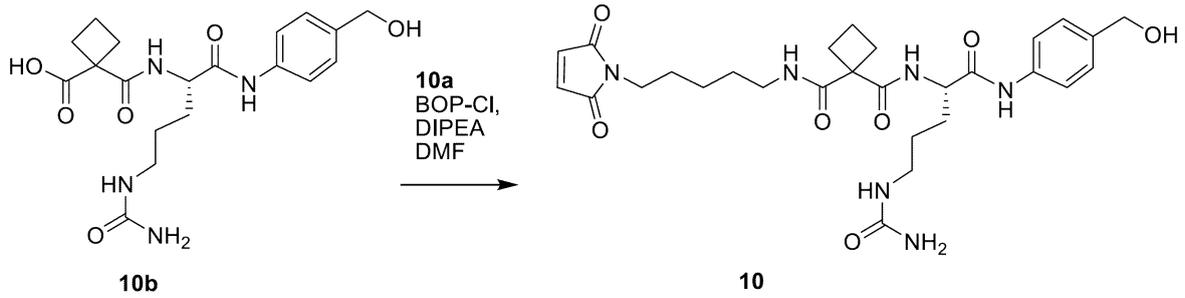
10

20

30

40

50



10

## 【0300】

ジイソプロピルエチルアミン、DIPEA (1.59 g、12.3 mmol) 及びビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸クロリド、BOP-Cl (CAS登録番号68641-49-6、Sigma-Aldrich、692 mg、2.71 mmol) を、(S)-1-(1-(4-(ヒドロキシメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イルカルバモイル)シクロブタンカルボン酸10b (1 g、2.46 mmol) のDMF溶液(10 mL)に0 で添加し、その後、1-(5-アミノペンチル)-1H-ピロール-2,5-ジオンヒドロクロリド10a (592 mg、2.71 mmol) を添加した。混合物を0 で0.5時間攪拌した。反応混合物の反応をクエン酸溶液(10 mL)で停止させ、DCM/MeOH(10:1)で抽出した。有機層を乾燥させ、濃縮し、残渣をシリカゲル(DCM:MeOH=10:1)上のカラムクロマトグラフィーによって精製して、(S)-N-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)-N-(1-(4-(ヒドロキシメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)シクロブタン-1,1-ジカルボキサミド10 (1.0 g、71%) (MC-CBDK-cit-PAB-OHとも称される)を得た。LCMS(ESI):M+H+=571.28.1H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>):10.00(s,1H),7.82-7.77(m,2H),7.53(d,J=8.4Hz,2H),7.19(d,J=8.4Hz,2H),6.96(s,2H),5.95(t,J=6.4Hz,1H),5.39(s,2H),5.08(t,J=5.6Hz,1H),4.40-4.35(m,3H),4.09(d,J=4.8Hz,1H),3.01(d,J=3.2Hz,2H),3.05-2.72(m,4H),2.68-2.58(m,3H),2.40-2.36(m,4H),1.72-1.70(m,3H),1.44-1.42(m,1H),1.40-1.23(m,6H),1.21-1.16(m,4H).

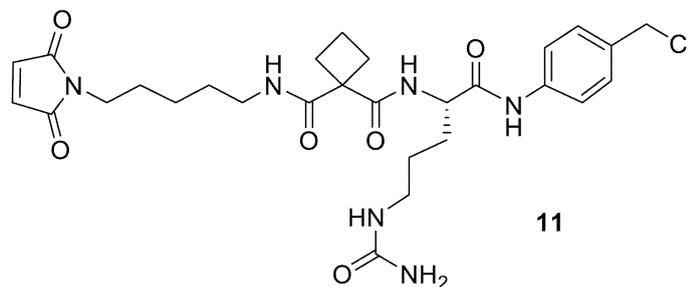
20

30

## 【0301】

ステップ4:(S)-N-(1-(4-(クロロメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)-N-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)シクロブタン-1,1-ジカルボキサミド11の調製

40



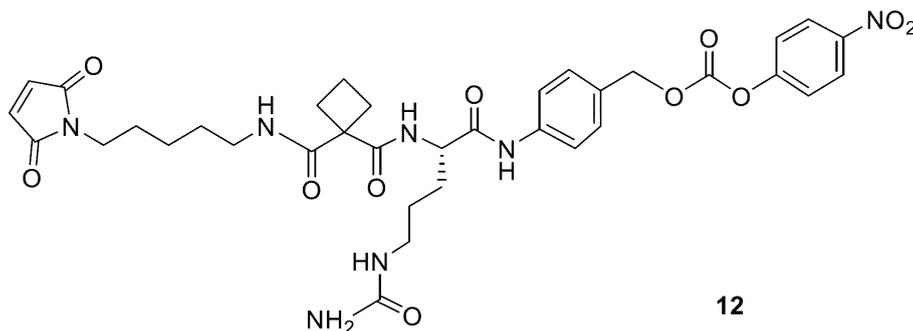
## 【0302】

50

(S)-N-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)-N-(1-(4-(ヒドロキシメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)シクロブタン-1,1-ジカルボキサミド 10 (2.0 g、3.5 mmol) の、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) または N-メチルピロリドン (NMP) (50 mL) 溶液を、0、液滴で、塩化チオニル (SOCl<sub>2</sub>) (1.25 g、10.5 mmol) で少量ずつ処理した。反応物は、黄色のままであった。反応物を、90% を超える変換を示す LC/MS によって監視した。反応混合物を 20 で 30 分間または数時間攪拌した後、それを水 (50 mL) で希釈し、EtOAc (50 mL × 3 回) で抽出した。有機層を乾燥させ、濃縮し、フラッシュカラム (DCM: MeOH = 20:1) によって精製して、MC-CBDK-cit-PAB-Cl とも称される、11 を灰色固体として形成した。LCMS: (5.95、AB、1.5 分)、0.696 分、m/z = 589.0 [M+1]<sup>+</sup>.

【0303】

ステップ 5: (S)-4-(2-(1-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチルカルバモイル)シクロブタンカルボキサミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ベンジル 4-ニトロフェニルカルボネート 12 の調製

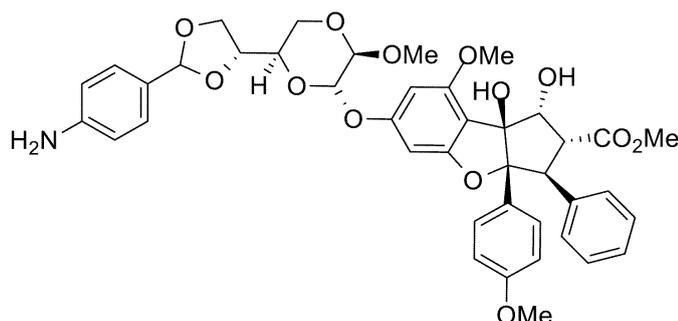


【0304】

(S)-N-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)-N-(1-(4-(ヒドロキシメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)シクロブタン-1,1-ジカルボキサミド 10 の無水 DMF 溶液に、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) を添加し、その後、PNPカルボネート (ビス(4-ニトロフェニル)カルボネート) を添加した。反応溶液を室温 (r.t.) で 4 時間攪拌し、混合物を分取 HPLC によって精製して、12 を得た。LCMS (ESI): M+H<sup>+</sup> = 736.29.

【0305】

ステップ 6: LD-51 の調製



【0306】

(S)-4-(2-(1-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチルカルバモイル)シクロブタンカルボキサミド)-5-ウレイドペ

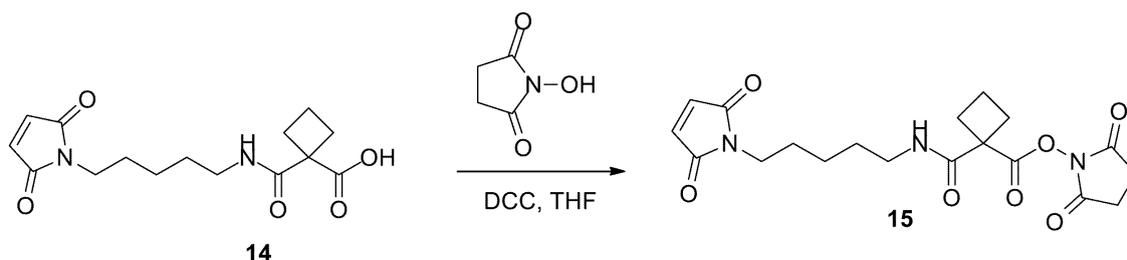
ンタンアミド)ベンジル4-ニトロフェニルカルボネート12及び(1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS)-メチル6-(((2S, 3R, 6R)-6-((4R)-2-(4-アミノフェニル)-1,3-ジオキソラン-4-イル)-3-メトキシ-1,4-ジオキサン-2-イル)オキシ)-1,8b-ジヒドロキシ-8-メトキシ-3a-(4-メトキシフェニル)-3-フェニル-2,3,3a,8b-テトラヒドロ-1H-シクロペンタ[b]ベンゾフラン-2-カルボキシレート13の溶液を反応させて、LD-51を得た。

【0307】

あるいは、以下のステップ7~12によって、シルベストロール-リンカー中間体LD-51(表5)を調製した。

【0308】

ステップ7: 2,5-ジオキソピロリジン-1-イル1-((5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)カルバモイル)シクロブタンカルボキシレート15の調製

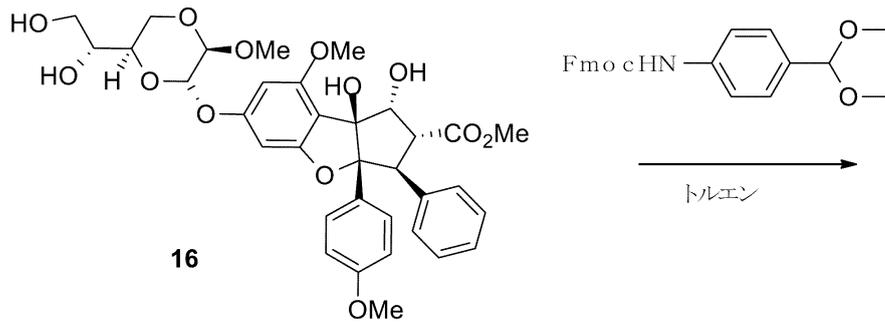


【0309】

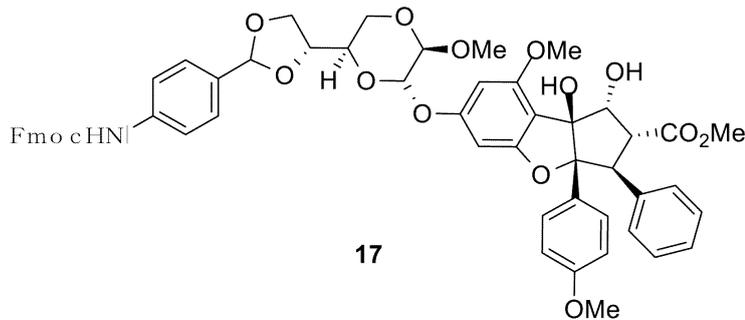
1-((5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)カルバモイル)シクロブタンカルボン酸14(100mg、0.324mmol)のTHF攪拌溶液(10mL)に、1-ヒドロキシピロリジン-2,5-ジオン、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(39mg、0.34mmol)を添加し、その後、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(70mg、0.34mmol)を20℃で添加した。混合物を、窒素ガス(N<sub>2</sub>)下、20℃で16時間攪拌した。混合物を濾過し、濾液を濃縮して、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル1-((5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)カルバモイル)シクロブタンカルボキシレート15を無色油(131mg、100%)として得た。

【0310】

ステップ8: (1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS)-メチル6-(((2S, 3R, 6R)-6-((4R)-2-(4-((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)フェニル)-1,3-ジオキソラン-4-イル)-3-メトキシ-1,4-ジオキサン-2-イル)オキシ)-1,8b-ジヒドロキシ-8-メトキシ-3a-(4-メトキシフェニル)-3-フェニル-2,3,3a,8b-テトラヒドロ-1H-シクロペンタ[b]ベンゾフラン-2-カルボキシレート17の調製



10



20

## 【0311】

シルベストロール、(1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - メチル 6 - ( ( ( 2S, 3R, 6R ) - 6 - ( ( R ) - 1, 2 - ジヒドロキシエチル ) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル ) オキシ ) - 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3a - ( 4 - メトキシフェニル ) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 16 ( 50 mg、0.076 mmol )、及び ( 9H - フルオレン - 9 - イル ) メチル ( 4 - ( ジメトキシメチル ) フェニル ) カルバメート ( 149 mg、0.382 mmol ) を無水トルエン ( 5.0 mL ) 中に溶解させた。結果として生じる混合物を、100 ~ 120 で 2 時間加熱した。それが室温まで冷却された後、混合物を濃縮し、分取 TLC ( DCM / MeOH = 30 / 1 ) によって精製して、17 を白色固体 ( 43 mg、57% ) として得た。LCMS ( 5 - 95、A B、1.5 分 ) :  $R_T = 0.928$  分、 $m/z = 1002.2 [M + Na]^+$ 。

30

## 【0312】

ステップ 9 : ( 1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS ) - メチル 6 - ( ( ( 2S, 3R, 6R ) - 6 - ( ( 4R ) - 2 - ( 4 - アミノフェニル ) - 1, 3 - ジオキサラン - 4 - イル ) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル ) オキシ ) - 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3a - ( 4 - メトキシフェニル ) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 13 の調製

40

## 【0313】

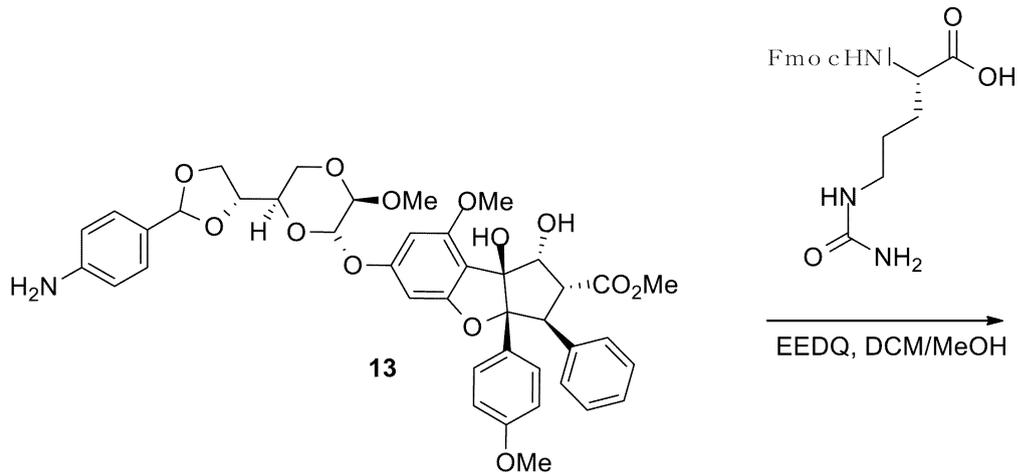
17 ( 30 mg、0.031 mmol ) の無水 DMF 溶液 ( 2.0 mL ) に、ピペリジン ( 5.2 mg、0.061 mmol ) を 20 で添加した。混合物を 20 で 2 時間撹拌した。混合物を濃縮して、粗 13 ( 24 mg、100% ) を得、これを更に精製することなく次のステップで使用した。

## 【0314】

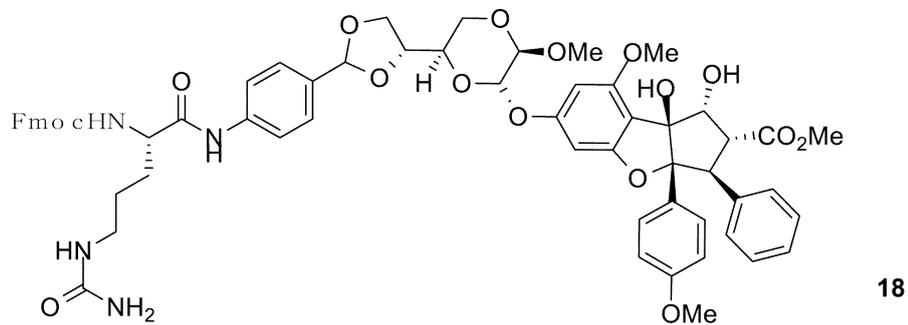
ステップ 10 : ( 1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS ) - メチル 6 - ( ( ( 2S, 3R, 6R ) - 6 - ( ( 4R ) - 2 - ( 4 - ( ( S ) - 2 - ( ( ( ( 9H - フルオレン - 9 - イル ) メトキシ ) カルボニル ) アミノ ) - 5 - ウレイドペンタンアミド ) フェニル ) - 1,

50

3 - ジオキソラン - 4 - イル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサソ - 2 - イル) オキシ) - 1, 8 b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3 a - (4 - メトキシフェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3 a, 8 b - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 18 の調製



10



20

【0315】

13 (24 mg、0.031 mmol) 及び (S) - 2 - ( ( ( ( 9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 5 - ウレイドペンタン酸 (18.5 mg、0.0465 mmol) の DCM / MeOH (3.0 mL / 0.5 mL) 攪拌溶液に、2 - エトキシ - 1 - エトキシカルボニル - 1, 2 - ジヒドロキノリン (EEDQ) (CAS 登録番号 16357-59-8、Sigma-Aldrich、16 mg、0.062 mmol) を 20 で添加した。混合物を、N<sub>2</sub> 下、20 で 16 時間攪拌した。混合物を濃縮し、分取 TLC (DCM / MeOH = 30 / 1) によって精製して、18 (30 mg、86%) を得た。

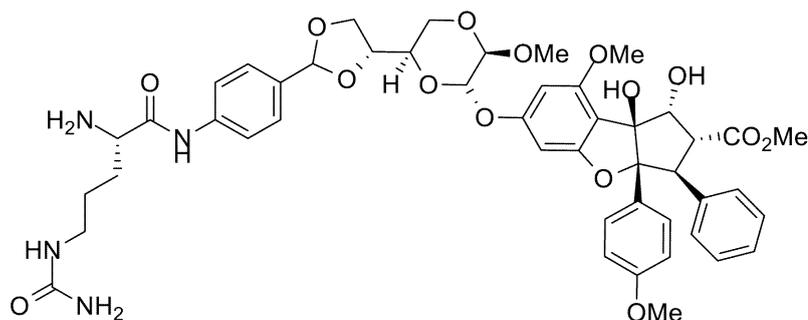
30

【0316】

ステップ 11: (1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - メチル 6 - ( ( ( 2S, 3R, 6R) - 6 - ( ( 4R) - 2 - ( 4 - ( ( S) - 2 - アミノ - 5 - ウレイドペンタンアミド) フェニル) - 1, 3 - ジオキソラン - 4 - イル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサソ - 2 - イル) オキシ) - 1, 8 b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3 a - ( 4 - メトキシフェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3 a, 8 b - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 19 の調製

40

50



19

10

## 【0317】

18 (30 mg、0.0264 mmol) の無水DMF (2.0 mL) 溶液に、ピペリジン (4.5 mmol、0.0528 mmol) を 20 で添加した。混合物を 20 で 2 時間撹拌した。混合物を濃縮して、粗 19 を得、これを更に精製することなく次のステップで使用した (24 mg、100%)。

## 【0318】

ステップ 12: シルベストロール - リンカー中間体 LD-51 の調製

中間体 19 (24 mg、0.0264 mmol) 及び 15 (22 mg、0.0528 mmol) を無水DMF (2.0 mL) 中に溶解させた。混合物を 20 で 2 時間撹拌させ、混合物を濃縮し、分取 TLC (DCM/MeOH = 10/1) によって精製して、LD-51 (13 mg、41%) を得た。LCMS (5-95、AB、1.5 分): RT = 0.889 分、m/z = 1227.5 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 9.86 (s, 1H), 7.62 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.61 - 7.50 (m, 2H), 7.44 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.05 - 7.00 (m, 5H), 6.92 - 6.70 (m, 4H), 6.59 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.41 - 6.35 (m, 2H), 5.84 (s, 1H), 5.69 (s, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.18 (s, 2H), 4.86 (s, 1H), 4.75 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 4.62 (s, 1H), 4.51 - 4.38 (m, 1H), 4.37 - 4.20 (m, 2H), 4.18 - 3.98 (m, 1H), 3.98 - 3.91 (m, 4H), 3.74 (s, 1H), 3.59 (m, 7H), 3.43 - 3.38 (m, 5H), 2.61 (s, 2H), 2.44 (d, J = 10.0 Hz, 4H), 1.80 - 1.55 (m, 4H), 1.53 - 1.45 (m, 6H), 1.27 - 1.22 (m, 4H)。

20

30

## 【0319】

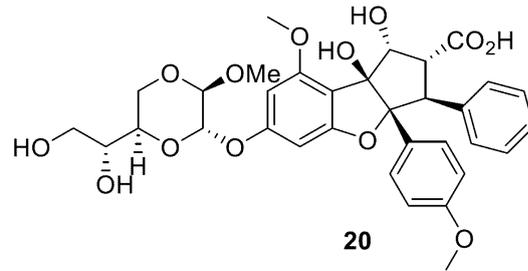
実施例 1b シルベストロール - リンカー中間体 LD-52 (表 5)。4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) ヘキサミアミド) - 3 - メチルブタンアミド) - 5 - ウレイドペンタンアミド) ベンジル (2 - ((1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - 6 - ((2S, 3R, 6R) - 6 - ((R) - 1, 2 - ジヒドロキシエチル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル) オキシ) - 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3a - (4 - メトキシフェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [b] ベンゾフラン - 2 - カルボキサミド) エチル) カルバメート LD-52 の合成

40

## 【0320】

ステップ 1: (1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - 6 - ((2S, 3R, 6R) - 6 - ((R) - 1, 2 - ジヒドロキシエチル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル) オキシ) - 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3a - (4 - メトキシフェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [b] ベンゾフラン - 2 - カルボン酸 20 の調製

50



## 【0321】

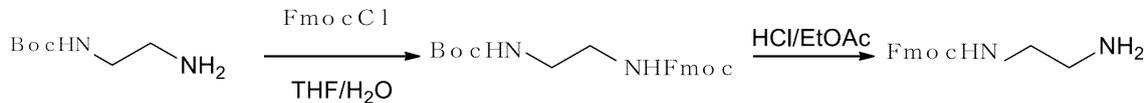
THF (1.0 mL) 中シルベストロール 16 (40.0 mg、0.060 mmol) の混合物に、水 (1.0 mL) 中 LiOH (11.71 mg、0.490 mmol) を滴加した。反応混合物を 15 で 24 時間攪拌した。混合物を水 (3.0 mL) で希釈し、pH 3 に調整し、DCM (5.0 mL × 3 回) で抽出した。合わせた有機層を乾燥させ、濃縮して、20 (39 mg、0.0597 mmol、97.6% の収率) を白色固体として得、これを更に精製することなく次のステップに直接使用した。LCMS (5 - 95 AB / 1.5 分) : RT = 0.798 分、[M + Na]<sup>+</sup> 663.1

10

## 【0322】

ステップ 2 : (9H - フルオレン - 9 - イル) メチル (2 - アミノエチル) カルバメートの調製

20



## 【0323】

THF (5.0 mL) 及び水 (5.0 mL) 中、tert - ブチル (2 - アミノエチル) カルバメート (200.0 mg、1.25 mmol)、重炭酸ナトリウム (157 mg、1.87 mmol) の混合物に、9 - フルオレニルメトキシカルボニルクロリド、9 - フルオレニルメチルクロロホルメート (Fmoc - Cl) (484 mg、1.87 mmol) を 0 で添加した。混合物を 15 で 1 時間攪拌した。混合物を EtOAc (15 mL × 3 回) で抽出した。合わせた有機層をブライン (15 mL) で洗浄し、乾燥させ、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (PE 中 0 ~ 40% の EtOAc) によって精製して、(9H - フルオレン - 9 - イル) メチル tert - ブチルエタン - 1, 2 - ジイルジカルバメート (250 mg、0.595 mmol、47.7% の収率) を黄色油として得た。LCMS (5 - 95 AB / 1.5 分) : RT = 0.931 分、[M + Na]<sup>+</sup> 405.1.

30

## 【0324】

(9H - フルオレン - 9 - イル) メチル tert - ブチルエタン - 1, 2 - ジイルジカルバメート (100.0 mg、0.260 mmol)、EtOAc (2.0 mL) の混合物に、HCl (1.0 mL、EtOAc 中 4 mol/L) を添加した。反応混合物を 0 で 30 分間攪拌した後、それを濃縮して、(9H - フルオレン - 9 - イル) メチル (2 - アミノエチル) カルバメート (73 mg、0.199 mmol、76.1% の収率) を白色固体として得、これを更に精製することなく次のステップに直接使用した。

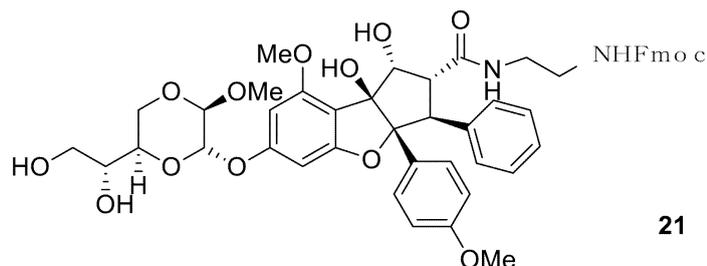
40

## 【0325】

ステップ 3 : (9H - フルオレン - 9 - イル) メチル (2 - ((1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - 6 - (((2S, 3R, 6R) - 6 - ((R) - 1, 2 - ジヒドロキシエチル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル) オキシ) - 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3a - (4 - メトキシフェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [b] ベンゾフラン - 2 - カルボキサミド) エ

50

## チル)カルバメート 21 の調製



10

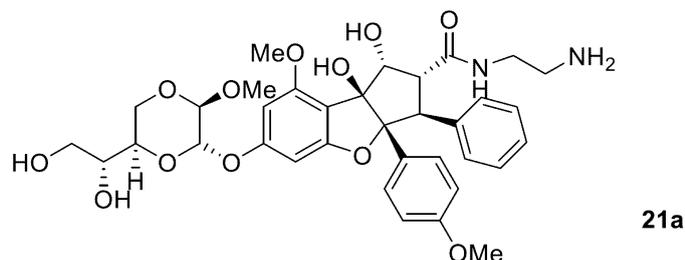
## 【0326】

DCM (5.0 mL) 中、化合物 20 (31.42 mg, 0.160 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT, 22.15 mg, 0.160 mmol)、及び (9H-フルオレン-9-イル)メチル(2-アミノエチル)カルバメート (46.25 mg, 0.160 mmol) の混合物を 0 で 5 分間撹拌した。過剰のジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 及びジイソプロピルエチルアミン (DIEA) (70.57 mg, 0.550 mmol) を混合物に添加した。反応混合物を 15 で 1 時間撹拌した。混合物を DCM (20 mL) で希釈し、ブライン (10 mL x 2 回) で洗浄した。有機層を乾燥させ、残渣を分取 TLC (DCM 中 5% の MeOH, R<sub>f</sub> = 0.4) によって精製して、21 (40 mg, 0.0438 mmol, 80.1% の収率) を白色固体として得た。LCMS (5-95 AB / 1.5 分) : RT = 0.898 分、[M+H]<sup>+</sup> 905.3.

20

## 【0327】

ステップ 4 : (1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - N - (2-アミノエチル) - 6 - (( (2S, 3R, 6R) - 6 - ((R) - 1, 2-ジヒドロキシエチル) - 3-メトキシ - 1, 4-ジオキサ - 2-イル) オキシ) - 1, 8b-ジヒドロキシ - 8-メトキシ - 3a - (4-メトキシフェニル) - 3-フェニル - 2, 3, 3a, 8b-テトラヒドロ - 1H-シクロペンタ [b] ベンゾフラン - 2-カルボキサミド 21a の調製



30

## 【0328】

DMF (1.0 mL) 中 21 (40.0 mg, 0.040 mmol) の混合物に、ピペリジン (15.05 mg, 0.180 mmol) を添加した。反応混合物を 15 で 1 時間撹拌した。混合物を分取 HPLC (アセトニトリル 20 ~ 50% / 10 mM の NH<sub>4</sub> HCO<sub>3</sub> - ACN) によって精製して、21a (5.6 mg, 0.0081 mmol, 18.4% の収率) を白色固体として得た。LCMS (5-95 AB / 1.5 分) : RT = 0.599 分、[M+H]<sup>+</sup> 683.1.

40

## 【0329】

ステップ 5 : シルベストロール - リンカー 中間体 LD - 52 の調製

WO 2012 / 113847、WO 2014 / 194247、US 7659241、US 7498298、US 2009 / 0111756、US 2009 / 0018086、US 6214345、Dubowchik et al (2002) Bioconjugate Chem. 13 (4) : 855 - 869 に記載される方法によって調製した 4 - ((S)

50

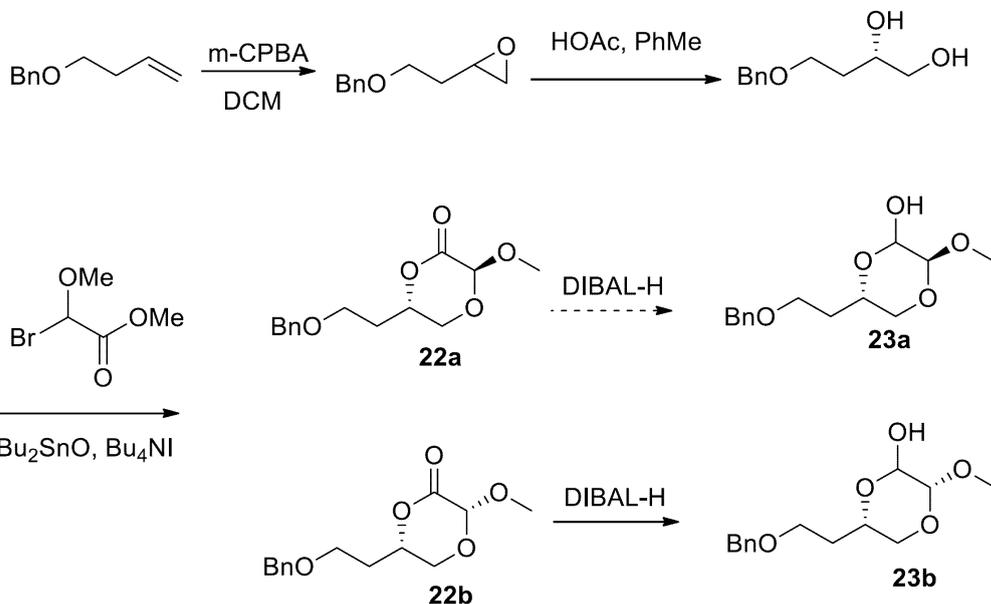
- 2 - ( ( S ) - 2 - ( 6 - ( 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル ) ヘキサナムイド ) - 3 - メチルブタンアミド ) - 5 - ウレイドペンタンアミド ) ベンジル 4 - ニトロフェニルカルボネート ( M C - v c - P A B - P N P ) ( 13 . 91 mg , 0 . 020 mmol ) 及びジイソプロピルエチルアミン ( D I E A ) ( 8 . 12 mg , 0 . 060 mmol ) の DMF 溶液 ( 5 . 0 mL ) に、21a ( 0 . 020 mmol ) を添加した。混合物を 25 で 12 時間攪拌した。混合物を分取 HPLC ( アセトニトリル 35 - 65 / 水中 0 . 225 % の F A ) によって精製して、LD - 52 を白色固体として得た。LCMS  $m/z$  [ M + Na ] <sup>+</sup> 1303 . 6 .

## 【0330】

実施例 1c シルベストロール - リンカー中間体 LD - 53 ( 表 5 ) 。 ( 1 R , 2 R , 3 S , 3 a R , 8 b S ) - メチル 6 - ( ( ( 2 S , 3 R , 6 S ) - 6 - ( 2 - ( ( ( 4 - ( ( S ) - 2 - ( ( S ) - 2 - ( 6 - ( 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル ) ヘキサナムイド ) - 3 - メチルブタンアミド ) - 5 - ウレイドペンタンアミド ) ベンジル ) オキシ ) カルボニル ) アミノ ) エチル ) - 3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキサン - 2 - イル ) オキシ ) - 1 , 8 b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3 a - ( 4 - メトキシフェニル ) - 3 - フェニル - 2 , 3 , 3 a , 8 b - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート LD - 53 の合成

## 【0331】

ステップ 1 : ( 3 R , 6 S ) - 6 - ( 2 - ( ベンジルオキシ ) エチル ) - 3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキサン - 2 - オール 23b の調製



## 【0332】

( ( ブタ - 3 - エン - 1 - イルオキシ ) メチル ) ベンゼン ( 15 . 0 g , 92 . 46 mmol ) の DCM 溶液 ( 200 mL ) に、メタ - クロロ過安息香酸 ( m - CPBA ) ( 37 . 54 g , 184 . 92 mmol ) を 0 で添加した。反応混合物を 20 で 12 時間攪拌した。反応混合物の反応を Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 水溶液 ( 100 mL ) で停止させ、水層を DCM ( 100 mL × 3 回 ) で抽出した。有機層を NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 ( 100 mL × 3 回 ) で洗浄し、乾燥させ、濃縮した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー ( PE 中 0 - 5 % の EtOAc ) によって精製して、2 - ( 2 - ( ベンジルオキシ ) エチル ) オキシラン ( 10 . 5 g , 59 . 3 % ) を無色油として得た。LCMS ( 5 - 95 AB / 1 . 5 分 ) : RT = 0 . 646 分、[ M + CH<sub>3</sub>CN ] <sup>+</sup> 219 . 8 .

## 【0333】

あるいは、NaH ( 3 . 05 g , 60 % , 76 . 27 mmol ) を、N<sub>2</sub> 下、THF ( 1

10

20

30

40

50

0.0 mL) 中に 0 で懸濁させ、ブタ - 3 - エン - 1 - オール (5.0 g、69.34 mmol) を 0 で添加した。反応混合物を 0 で 30 分間攪拌し、その後、臭化ベンジル (BnBr、9.95 mL、83.21 mmol) を 0 で添加した。混合物を 20 で 12 時間攪拌した。反応を、0 で、飽和 NH<sub>4</sub>Cl 水溶液 (15 mL) で停止させ、水 (50 mL) で希釈した。混合物を EtOAc (100 mL × 2 回) で抽出し、合わせた有機層を濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル中 0 - 2 % の EtOAc) で精製して、( (ブタ - 3 - エン - 1 - イルオキシ) メチル) ベンゼン (7.15 g、63.6 % の収率) を無色油として得た。( (ブタ - 3 - エン - 1 - イルオキシ) メチル) ベンゼン (15.0 g、92.46 mmol) の DCM 溶液 (200 mL) に、メタ - クロロ過安息香酸 (mCPBA、37.54 g、184.92 mmol) を 0 で添加した。反応混合物を 20 で 12 時間攪拌した。反応混合物の反応を冷 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 水溶液 (100 mL) で停止させ、その後、水層を DCM (100 mL × 3 回) で抽出した。有機層を NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (100 mL × 3 回) で洗浄し、乾燥させ、濃縮した (注意: 濃縮前に全ての過酸化物が除去される必要がある)。それをフラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル中 0 - 5 % の EtOAc) によって精製して、2 - (2 - (ベンジルオキシ) エチル) オキシラン (10.5 g、59.3 %) を無色油として得た。LCMS (5 - 95、AB、1.5 分): RT = 0.646 分、[M + CH<sub>3</sub>CN + H]<sup>+</sup> 219.8.

10

## 【0334】

トルエン (10 mL) 中 HOAc (0.03 mL、0.450 mmol) を充填した丸底フラスコに、(R,R) - (-) - N,N' - ビス (3,5 - ジ - tert - ブチルサリチリデン) - 1,2 - シクロヘキサンジアミノコバルト (II) (135.5 mg、0.220 mmol) を 20 で添加し、酸素を吸収するようにフラスコが空気に対して開いた状態で、結果として生じる溶液を 20 で 0.5 時間攪拌した。揮発物を減圧下で除去した。未希釈の 2 - (2 - (ベンジルオキシ) エチル) オキシラン (8.0 g、44.89 mmol) を添加し、その後、蒸留水 (0.45 mL、25.14 mmol) を 0 で滴加した。結果として生じる反応混合物を 20 まで緩徐に温め、20 で 2 時間攪拌した。反応混合物を DCM (50 mL) で希釈し、反応物を水 (50 mL × 3 回) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、真空中で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (DCM 中 0 - 5 % の MeOH) で精製して、(S) - 4 - (ベンジルオキシ) ブタン - 1,2 - ジオール (3.80 g、43.1 %) を灰色油として得、これを他のバッチと組み合わせ (合計 6.5 g)、SFC (OD 50 mm × 30 mm、5 μm; 15 % Base - EtOH; 流量: 60 mL / 分) によって分離して、(S) - 4 - (ベンジルオキシ) ブタン - 1,2 - ジオール (5.30 g、81.5 %) を、96 % の EE を有する褐色油として得た。LCMS (5 - 95 AB / 1.5 分): RT = 0.585 分、[M + Na]<sup>+</sup> 218.8.

20

30

## 【0335】

メチル 2 - メトキシアセテート (10.00 g、96.06 mmol) の四塩化炭素溶液 (200 mL) に、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN、78.87 mg、0.480 mmol) 及び N - プロモスクシンイミド (NBS、18.80 g、105.67 mmol) を攪拌しながら添加した。反応混合物を 85 で 2 時間攪拌した。混合物を 20 まで冷却し、濾過し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、濾液を減圧下で濃縮して、メチル 2 - ブロモ - 2 - メトキシアセテート (15.00 g、85.3 %) を黄色油として得、これを更に精製することなく次のステップで使用した。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.99 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.55 (s, 3H).

40

## 【0336】

(S) - 4 - (ベンジルオキシ) ブタン - 1,2 - ジオール (1.00 g、5.1 mmol) の MeOH 溶液 (15 mL) に、ジブチルスズオキシド (1.52 g、6.11 mmol) を添加した。反応混合物を 65 で 12 時間攪拌した。それが室温まで冷却された後、溶媒を真空中で除去し、白色固体を高真空下で 30 分間乾燥させた。その後、結果と

50

して生じる残渣をトルエン (15 mL) 中に溶解させた。その後、ヨウ化テトラブチルアンモニウム (471 mg、1.27 mmol) 及びメチル 2-ブロモ-2-メトキシアセテート (2.05 g、11.21 mmol) を添加し、結果として生じた反応混合物を 120 で更に 2 時間攪拌した。混合物を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : PE 10% - 20%) によって精製して、(3R, 6S) - 6 - (2 - (ベンジルオキシ)エチル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - オン 22b (600 mg、44.2%) 及び (3S, 6S) - 6 - (2 - (ベンジルオキシ)エチル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - オン 22a (580 mg、42.7%) を無色油として得た。

【0337】

22b : <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.36 - 7.28 (m, 5H), 4.90 (s, 1H), 4.83 - 4.82 (m, 1H), 4.50 - 4.49 (m, 2H), 3.93 - 3.90 (m, 1H), 3.76 - 3.75 (m, 1H), 3.63 - 3.60 (m, 2H), 3.49 (s, 3H), 1.89 - 1.87 (m, 2H) .

【0338】

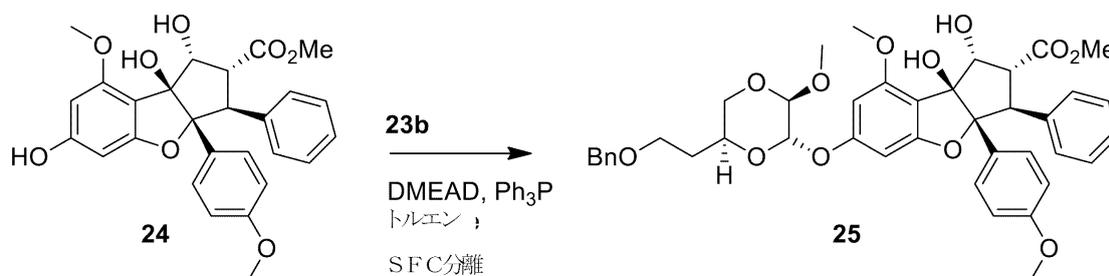
22a : <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.37 - 7.29 (m, 5H), 4.94 - 4.91 (m, 2H), 4.51 - 4.50 (m, 2H), 4.14 - 4.10 (m, 1H), 3.69 - 3.61 (m, 3H), 3.50 (s, 3H), 2.05 - 1.90 (m, 2H) .

【0339】

22b (580.0 mg、2.18 mmol) のトルエン (15 mL) 溶液に、水素化ジイソブチルアルミニウム、DIBAL-H のトルエン溶液 (CAS 登録番号 1191-15-7 (Sigma-Aldrich)、1.0 M、619.53 mg、4.36 mmol) を、-78、N<sub>2</sub> 下で添加した。混合物を -78 で 1 時間攪拌した。-25 で、0.5 mL メタノールで反応を停止させ、混合物を 2 分間攪拌した。ロッシェル塩溶液 (15 mL、20 重量%) を添加し、室温で更に 1 時間攪拌した。残渣を EtOAc (15 mL × 2 回) で抽出した。合わせた有機層を水 (10 mL × 2 回)、ブライン (10 mL × 2 回) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を蒸発させて、粗化合物 23b (580 mg、99.2%) を無色油として得、これを更に精製することなく直接使用した。

【0340】

ステップ 2 : (1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - メチル 6 - ( ( (2S, 3R, 6S) - 6 - (2 - (ベンジルオキシ)エチル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル) オキシ) - 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3a - (4 - メトキシフェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [b] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 25 の調製



【0341】

(1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - メチル 1, 6, 8b - トリヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3a - (4 - メトキシフェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [b] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 24 (400.0 mg、0.840 mmol) 及び 23b (576 mg、2.15 mmol) のトルエン溶液 (10 mL) に、トリフェニルホスフィン、PPh<sub>3</sub> (570.09 mg、2.17

mmol) を添加した。混合物を 20 で 30 分間攪拌した。上記の溶液に、DMEAD (509.06 mg、2.17 mmol) のトルエン溶液 (2.0 mL) を添加した。混合物を 20 で 12 時間攪拌した。混合物を濃縮し、分取 HPLC (アセトニトリル 60 - 80 / 水中 0.225 % の FA) によって精製して、白色固体として 25 (HPLC 上のピーク 2、242 mg、LCMS (5 - 95 AB / 1.5 分) RT = 0.836 分、[M + Na] + 751.1、38.9%)、異性体 (HPLC 上のピーク 1、130 mg、LCMS (5 - 95 AB / 1.5 分) : RT = 0.809 分、[M + Na] + 751.0、20.7% の収率) を含む、2 つの異性体を得た。

【0342】

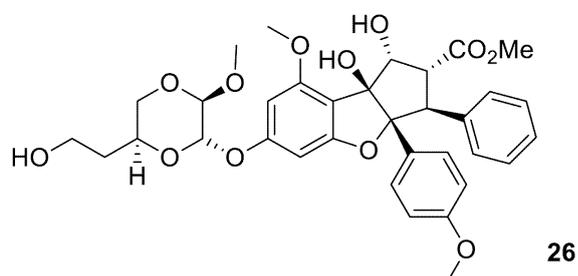
25、ピーク 2 : LCMS (5 - 95、AB、1.5 分) : RT = 0.836 分、[M + Na] + 751.1. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.33 - 7.29 (m, 1H), 7.13 - 7.09 (m, 8H), 7.07 - 7.03 (m, 3H), 6.81 - 6.68 (m, 2H), 6.51 - 6.50 (m, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.29 (s, 1H), 4.98 - 4.96 (m, 1H), 4.61 (s, 1H), 4.33 - 4.20 (m, 4H), 3.84 - 3.50 (m, 17H), 1.78 - 1.73 (m, 2H), 1.32 (s, 1H).

【0343】

異性体、ピーク 1 : LCMS (5 - 95、AB、1.5 分) : RT = 0.809 分、[M + Na] + 751.1. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.32 - 7.30 (m, 4H), 7.05 - 7.00 (m, 5H), 6.81 - 6.80 (m, 2H), 6.61 - 6.59 (m, 2H), 6.45 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 5.27 (s, 1H), 5.02 - 5.01 (m, 1H), 4.66 - 4.62 (m, 2H), 4.48 - 4.45 (m, 1H), 4.28 - 4.25 (m, 2H), 3.83 - 3.55 (m, 19H), 1.82 - 1.77 (m, 3H).

【0344】

ステップ 3 : (1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - メチル 1, 8b - ジヒドロキシ - 6 - (( (2S, 3R, 6S) - 6 - (2 - ヒドロキシエチル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサソ - 2 - イル) オキシ) - 8 - メトキシ - 3a - (4 - メトキシフェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [b] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 26 の調製



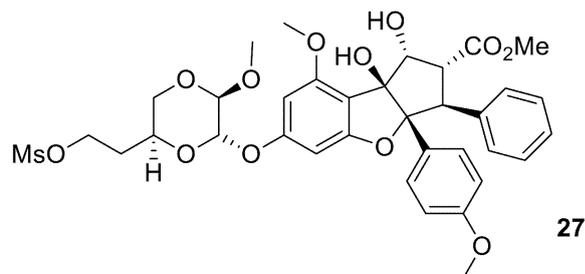
【0345】

25 (242.0 mg、0.330 mmol) の MeOH 溶液 (2.0 mL) に、Pd / C (354 mg、3.32 mmol) を添加した。混合物を、30、水素ガス (H<sub>2</sub> (1 気圧)) 下で 2 時間攪拌した後、それを濾過し、濃縮して、26 (209 mg、0.321 mmol、96.6% の収率) を白色固体として得た。LCMS (5 - 95 AB / 1.5 分) : RT = 0.717 分、[M + Na] + 661.0.

【0346】

ステップ 4 : (1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - メチル 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 6 - (( (2S, 3R, 6S) - 3 - メトキシ - 6 - (2 - (メチルスルホニル) オキシ) エチル) - 1, 4 - ジオキサソ - 2 - イル) オキシ) - 3a - (4 - メトキシフェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロ

## ペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 27 の調製



10

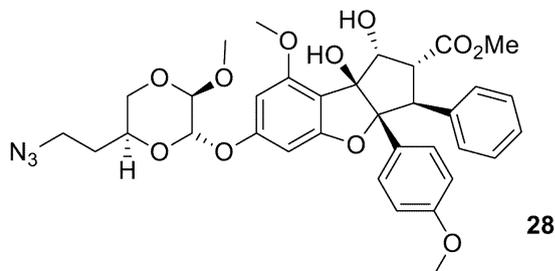
## 【 0 3 4 7 】

26 (200.0 mg、0.310 mmol) の DCM 溶液 (15 mL) に、トリエチルアミン (0.22 mL、1.57 mmol) 及びメタンスルホニルクロリド (0.54 mL、6.99 mmol) を添加した。混合物を 15 で 30 分間攪拌した。混合物を DCM (25 mL) で希釈し、水 (25 mL × 3 回) で洗浄した。有機層を濃縮して、粗 27 (224 mg、0.313 mmol、99.8% の収率) を黄色油として得た。粗物質を更に精製することなく直接使用した。

## 【 0 3 4 8 】

ステップ 5 : (1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - メチル 6 - ( ( (2S, 3R, 6S) - 6 - (2 - アジドエチル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル) オキシ) - 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3a - (4 - メトキシフェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 28 の調製

20



30

## 【 0 3 4 9 】

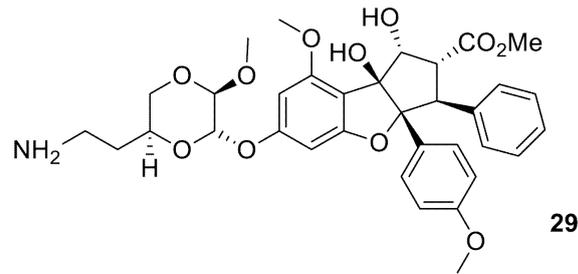
27 (200.0 mg、0.270 mmol) の DMF 攪拌溶液 (10 mL) に、アジ化ナトリウム (60.09 mg、0.920 mmol) を 15 で添加した。混合物を 60 で 1 時間攪拌した。混合物に Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液 (5 mL) を添加し、5 分間攪拌した。混合物を EtOAc (30 mL) で希釈し、水 (30 mL × 3 回) 及びブライン (10 mL × 3 回) で洗浄した。有機層を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、濃縮し、分取 TLC (DCM 中 5% の MeOH、R<sub>f</sub> = 0.5) によって精製して、28 (40 mg、0.0554 mmol、20.3% の収率) を白色固体として得た。LCMS (5 - 95 AB / 1.5 分) : RT = 0.799 分、[M + Na]<sup>+</sup> 686.1.

40

## 【 0 3 5 0 】

ステップ 6 : (1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - メチル 6 - ( ( (2S, 3R, 6S) - 6 - (2 - アミノエチル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル) オキシ) - 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3a - (4 - メトキシフェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 29 の調製

50

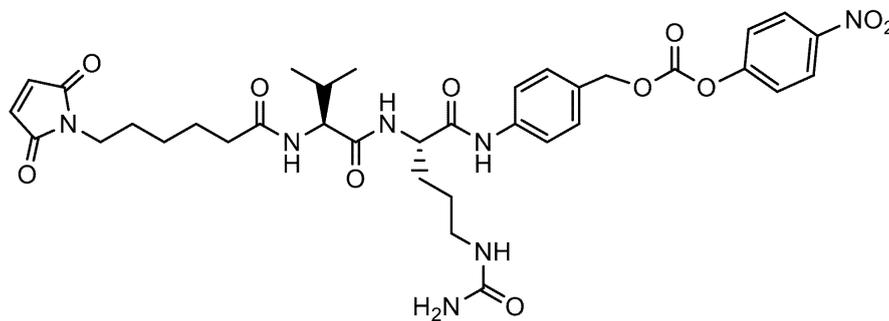


## 【0351】

28 (40.0 mg、0.060 mmol) の MeOH 溶液 (5.0 mL) に、tert-ブチルアミン (4.41 mg、0.060 mmol) 及び Pd/C (64.19 mg) を添加した。混合物を、30、H<sub>2</sub> (1 気圧) 下で 1 時間攪拌した。混合物を濾過し、濃縮し、分取 HPLC (アセトニトリル 10 - 40 / 水中 0.225% の FA) によって精製して、29 (8.0 mg、0.0125 mmol、20.8% の収率) を白色固体として得た。LCMS (5 - 95 AB / 1.5 分) : RT = 0.661 分、[M+H]<sup>+</sup> 638.1。HPLC (10 - 80 AB, met / 8 分) : RT = 4.09 分。

## 【0352】

ステップ 7 : シルベストロール - リンカー - 中間体 LD - 53 の調製



## 【0353】

WO2012/113847、WO2014/194247、US7659241、US7498298、US2009/0111756、US2009/0018086、US6214345、Dubowchik et al (2002) Bioconjugate Chem. 13 (4) : 855 - 869 に記載される方法によって調製した 4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) ヘキサナムイド) - 3 - メチルブタンアミド) - 5 - ウレイドペンタンアミド) ベンジル 4 - ニトロフェニルカルボネート (MC - vc - PAB - PNP) (13.91 mg、0.020 mmol) 及びジイソプロピルエチルアミン (DIEA) (8.12 mg、0.060 mmol) の DMF 溶液 (5.0 mL) に、29 (10.0 mg、0.020 mmol) を添加した。混合物を 25 で 12 時間攪拌した。混合物を分取 HPLC (アセトニトリル 35 - 65 / 水中 0.225% の FA) によって精製して、LD - 53 (2.0 mg、0.0015 mmol、9.8% の収率) を白色固体として得た。LCMS (5 - 95 \_\_ 1.5 分) : RT (220 / 254 nm) = 0.759 分、[M+Na]<sup>+</sup> 1258.2。HPLC (10 - 80 AB / 8 分) : RT = 4.89 分。

## 【0354】

実施例 1 d シルベストロール - リンカー - 中間体 LD - 54 (表 5)。(1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - メチル 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 6 - ((2S, 3R, 6S) - 3 - メトキシ - 6 - (2 - ((5 - ニトロピリジン - 2 - イル) ジスルファニル) エチル) - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル) オキシ) - 3a - (4 - メトキシ

10

20

30

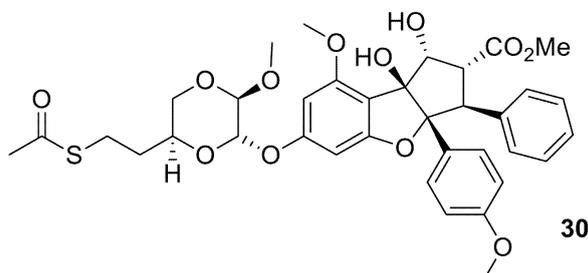
40

50

フェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート LD - 54 の合成

【 0355 】

ステップ1 : ( 1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS ) - メチル 6 - ( ( ( 2S, 3R, 6S ) - 6 - ( 2 - ( アセチルチオ ) エチル ) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル ) オキシ ) - 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3a - ( 4 - メトキシフェニル ) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 30 の調製



10

【 0356 】

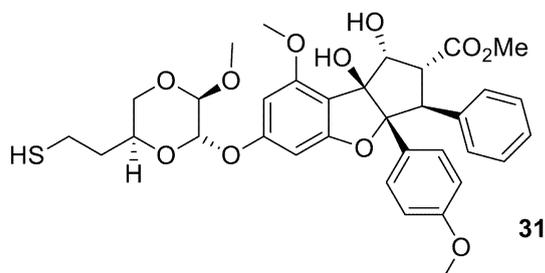
( 1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS ) - メチル 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 6 - ( ( ( 2S, 3R, 6S ) - 3 - メトキシ - 6 - ( 2 - ( ( メチルスルホニル ) オキシ ) エチル ) - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル ) オキシ ) - 3a - ( 4 - メトキシフェニル ) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 27 ( 34.0 mg、0.050 mmol ) の DMF 溶液 ( 2.0 mL ) に、エタンチオン S 酸、チオール酢酸 ( KSAc ) ( 54.18 mg、0.47 mmol ) を添加した。混合物を 35 で 1 時間攪拌した。混合物を濃縮し、分取 TLC ( DCM 中 4 % の MeOH、Rf = 0.5 ) によって精製して、30 ( 15 mg、0.0213 mmol、44.9 % の収率 ) を白色固体として得た。LCMS ( 5 - 95 AB / 1.5 分 ) : RT = 0.939 分、[ M + Na ] + 719.1

20

【 0357 】

ステップ2 : ( 1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS ) - メチル 1, 8b - ジヒドロキシ - 6 - ( ( ( 2S, 3R, 6S ) - 6 - ( 2 - メルカプトエチル ) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル ) オキシ ) - 8 - メトキシ - 3a - ( 4 - メトキシフェニル ) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 31 の調製

30



40

【 0358 】

30 ( 12.0 mg、0.02 mmol ) の MeOH 溶液 ( 2.0 mL ) に、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ( 7.14 mg、0.050 mmol ) を添加した。混合物を 35 で 1 時間攪拌した。混合物を分取 TLC ( DCM 中 4 % の MeOH、Rf = 0.5 ) によって精製し、分取 HPLC ( FA ) によって精製して、31 ( 6.0 mg、0.0091 mmol、52.7 % の収率 ) を白色固体として得た。LCMS ( 5 - 95 AB / 1.5 分 ) : RT = 0.805 分、[ M + Na ] + 677.1. HPLC ( 10 - 80 AB / 8 分 ) : RT = 5.2

50

3分.

【0359】

ステップ3：シルベストロール-リンカー中間体LD-54の調製

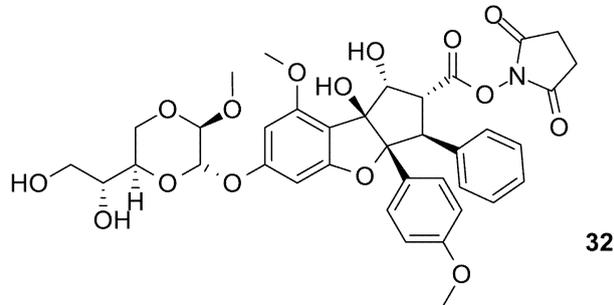
1, 2-ビス(5-ニトロピリジン-2-イル)ジスルファン及び31の無水DCM:CH<sub>3</sub>OH/(1:1)溶液を、N<sub>2</sub>下、室温で24時間撹拌した。混合物を真空下で濃縮した後、残渣をDCMで希釈した。酸化マンガン(MnO<sub>2</sub>)を添加し、混合物を室温で更に0.5時間撹拌した。混合物をLCMSによって精製して、LD-55を得た。

【0360】

実施例1e シルベストロール-リンカー中間体LD-55(表5)。(1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS)-6-(((2S, 3R, 6R)-6-((R)-1,2-ジヒドロキシエチル)-3-メトキシ-1,4-ジオキサン-2-イル)オキシ)-1,8b-ジヒドロキシ-8-メトキシ-3a-(4-メトキシフェニル)-N-(2-((5-ニトロピリジン-2-イル)ジスルファニル)エチル)-3-フェニル-2,3,3a,8b-テトラヒドロ-1H-シクロペンタ[b]ベンゾフラン-2-カルボキサミドLD-55の合成

【0361】

ステップ1:(1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS)-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル6-(((2S, 3R, 6R)-6-((R)-1,2-ジヒドロキシエチル)-3-メトキシ-1,4-ジオキサン-2-イル)オキシ)-1,8b-ジヒドロキシ-8-メトキシ-3a-(4-メトキシフェニル)-3-フェニル-2,3,3a,8b-テトラヒドロ-1H-シクロペンタ[b]ベンゾフラン-2-カルボキシレート32の調製



32

【0362】

THF(4.0mL)中、(1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS)-6-(((2S, 3R, 6R)-6-((R)-1,2-ジヒドロキシエチル)-3-メトキシ-1,4-ジオキサン-2-イル)オキシ)-1,8b-ジヒドロキシ-8-メトキシ-3a-(4-メトキシフェニル)-3-フェニル-2,3,3a,8b-テトラヒドロ-1H-シクロペンタ[b]ベンゾフラン-2-カルボン酸20(20.0mg、0.030mmol)及び1-ヒドロキシピロリジン-2,5-ジオン、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS、HOSu)(3.59mg、0.0300mmol)の混合物に、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(6.44mg、0.030mmol)を添加した。反応混合物を15℃で16時間撹拌して、32を生成させ、これを次のステップで直接使用した。

【0363】

ステップ2:(1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS)-6-(((2S, 3R, 6R)-6-((R)-1,2-ジヒドロキシエチル)-3-メトキシ-1,4-ジオキサン-2-イル)オキシ)-1,8b-ジヒドロキシ-N-(2-メルカプトエチル)-8-メトキシ-3a-(4-メトキシフェニル)-3-フェニル-2,3,3a,8b-テトラヒドロ-1H-シクロペンタ[b]ベンゾフラン-2-カルボキサミド33の調製

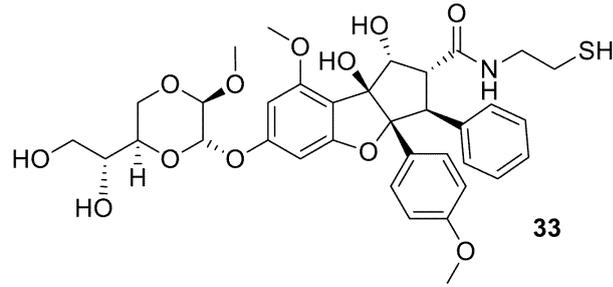
10

20

30

40

50



10

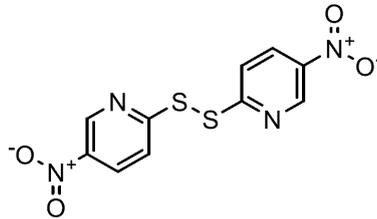
## 【0364】

32を含有する反応混合物に、2-アミノエタチオール及びTEA(8.23mg、0.080mmol)を添加した。反応混合物を15で1時間撹拌した。混合物を濃縮し、DMF(2.0mL)中に溶解させ、分取HPLC(アセトニトリル30-60%/10mMのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-ACN)によって精製して、33(1.74mg、0.0024mmol、9%の収率)を白色固体として得た。LCMS(5-95AB/1.5分):RT=0.828分、[M+H]<sup>+</sup>700.2及びRT=0.898分、[M+Na]<sup>+</sup>1420.0(17%のジスルフィドを有する)。

## 【0365】

ステップ3:シルベストロール-リンカー中間体LD-55の調製

20



## 【0366】

1,2-ビス(5-ニトロピリジン-2-イル)ジスルファン及び33の無水DCM:CH<sub>3</sub>OH/(1:1)溶液を、N<sub>2</sub>下、室温で24時間撹拌した。混合物を真空下で濃縮し、残渣をDCMで希釈した。酸化マンガン(MnO<sub>2</sub>)を添加し、混合物を室温で更に0.5時間撹拌した。混合物をLCMSによって精製して、LD-55を得た。

30

## 【0367】

実施例1f シルベストロール-リンカー中間体LD-58(表5)。メチル(1R,2R,3S,3aR,8bS)-6-(((2S,3R,6S)-6-(2-((4-((S)-2-(1-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)カルバモイル)シクロブタン-1-カルボキサミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)アミノ)エチル)-3-メトキシ-1,4-ジオキサソ-2-イル)オキシ)-1,8b-ジヒドロキシ-8-メトキシ-3a-(4-メトキシフェニル)-3-フェニル-2,3,3a,8b-テトラヒドロ-1H-シクロペンタ[b]ベンゾフラン-2-カルボキシレートLD-58の合成

40

## 【0368】

(S)-4-(2-(1-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)カルバモイル)シクロブタンカルボキサミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ベンジル4-ニトロフェニルカルボネート12(17.31mg、0.020mmol)及びDIEA(0.01mL、0.060mmol)のDMF溶液(3.0mL)に、(1R,2R,3S,3aR,8bS)-メチル6-(((2S,3R,6S)-6-(2-アミノエチル)-3-メトキシ-1,4-ジオキサソ-2-イル)オキシ)-1,8b-ジヒドロキシ-8-メトキシ-3a-(4-メトキシフェニル)-3-

50

フェニル - 2 , 3 , 3 a , 8 b - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 29 ( 10 . 0 mg 、 0 . 0200 mmol ) を添加した。混合物を 25 で 12 時間攪拌した。混合物を分取 HPLC ( アセトニトリル 35 - 65 / 水中 0 . 225 % の FA ) によって精製して、LD - 58 ( 4 . 8 mg 、 24 . 5 % ) を白色固体として得た。LCMS ( 5 - 95 、 AB 、 1 . 5 分 ) : RT = 0 . 750 分、m/z = 1256 . 6 [ M + Na ] + .

【 0369 】

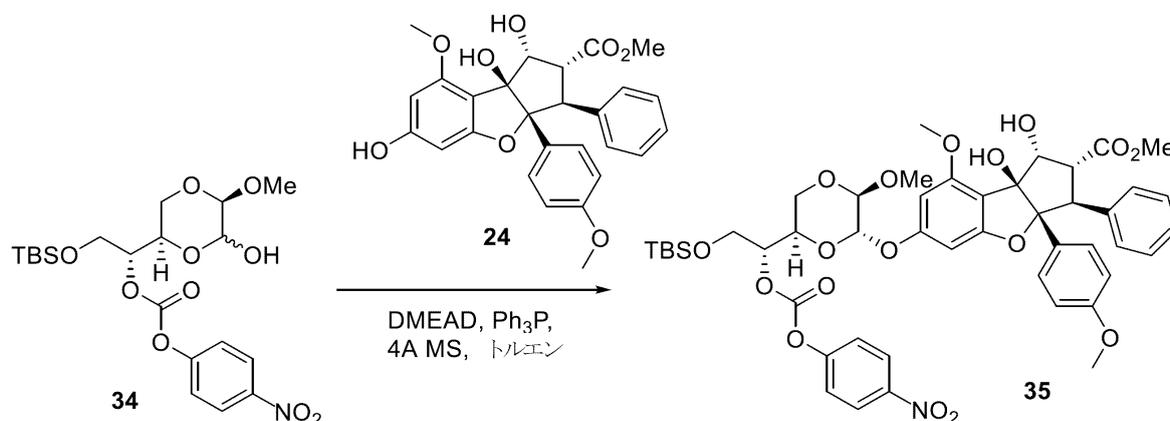
実施例 1 g シルベストロール - リンカー - 中間体 LD - 59 ( 表 5 ) 。 4 - ( ( S ) - 2 - ( 1 - ( ( 5 - ( 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル ) ペンチル ) カルバモイル ) シクロブタン - 1 - カルボキサミド ) - 5 - ウレイドペンタン

10

【 0370 】

ステップ 1 : メチル ( 1 R , 2 R , 3 S , 3 a R , 8 b S ) - 6 - ( ( ( 2 S , 3 R , 6 R ) - 6 - ( ( R ) - 2 - ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) - 1 - ( ( 4 - ニトロフェノキシ ) カルボニル ) オキシ ) エチル ) - 3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキサン - 2 - イル ) オキシ ) - 1 , 8 b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3 a - ( 4 - メトキシフェニル ) - 3 - フェニル - 2 , 3 , 3 a , 8 b - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンタ [ b ] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 35 の調製

20



30

【 0371 】

24 ( 300 . 0 mg 、 0 . 6300 mmol ) 及び ( 1 R ) - 2 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) - 1 - ( ( 2 R , 5 R ) - 6 - ヒドロキシ - 5 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキサン - 2 - イル ) エチル ( 4 - ニトロフェニル ) カルボネート 34 ( 445 . 4 mg 、 0 . 940 mmol ) のトルエン溶液 ( 15 mL ) に、Ph<sub>3</sub>P ( 427 . 6 mg 、 1 . 63 mmol ) を添加した。混合物を 20 で 10 分間攪拌した。上記の溶液に、ジ - 2 - メトキシエチルアゾジカルボキシレート ( DMEAD ) ( 381 . 8 mg 、 1 . 63 mmol ) のトルエン溶液 ( 5 . 0 mL ) を 0 で添加した。混合物を 20 で 12 時間攪拌した。混合物を濾過し、濃縮し、分取 - HPLC ( 85 - 90 ( 水中 0 . 225 % の FA - ACN ) 、 25 mL / 分 ) によって精製して、35 ( 200 mg 、 23 . 2 % ) を白色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR ( 400 MHz , CDCl<sub>3</sub> ) 8 . 24 - 8 . 21 ( m , 4 H ) , 7 . 14 - 7 . 11 ( m , 2 H ) , 7 . 07 - 7 . 05 ( m , 3 H ) , 6 . 87 - 6 . 86 ( m , 2 H ) , 6 . 71 - 6 . 69 ( m , 2 H ) , 6 . 53 ( d , J = 2 . 0 Hz , 1 H ) , 6 . 31 ( d , J = 1 . 6 Hz , 1 H ) , 5 . 35 ( s , 1 H ) , 5 . 25 - 5 . 23 ( m , 1 H ) , 5 . 04 - 5 . 02 ( m , 1 H ) , 4 . 65

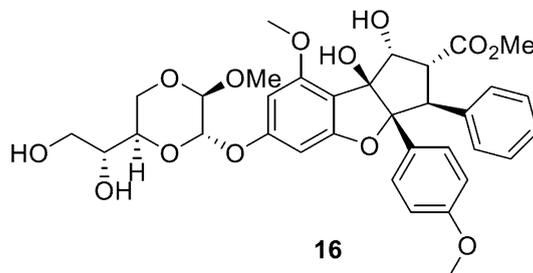
40

50

- 4.63 (m, 2H), 4.36 - 4.32 (m, 1H), 4.09 - 3.89 (m, 5H), 3.81 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.58 (s, 1H), 3.51 (s, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.02 (d, J = 10.8 Hz, 6H). LCMS (5 - 95, AB, 1.5分): RT = 1.012分、[M + 7]<sup>+</sup> 940.3.

【0372】

ステップ2: (1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - メチル 6 - ( ( (2S, 3R, 6R) - 6 - ( (R) - 1, 2 - ジヒドロキシエチル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル) オキシ) - 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3a - (4 - メトキシフェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [b] ベンゾフラン - 2 - カルボキシレート 16 の調製



10

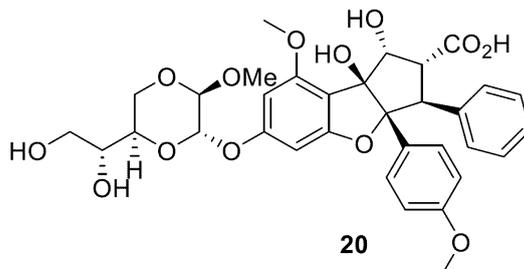
20

【0373】

35 (150.0 mg, 0.1600 mmol) の THF 溶液 (10 mL) に、フッ化テトラブチルアンモニウム (TBAF, 125.97 mg, 0.480 mmol) を添加した。反応混合物を 25 °C で 12 時間攪拌した。反応混合物の反応を水 (20 mL) で停止させ、EtOAc (10 mL × 2回) で抽出した。合わせた有機層をブライン (20 mL) で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、真空中で濃縮した。粗産物をフラッシュクロマトグラフィー (DCM 中 0 - 10% の MeOH, R<sub>f</sub> = 0.4) によって精製して、シルベストロール 16 (95 mg, 90.4%) を白色固体として得た。LCMS (5 - 95, AB, 1.5分): RT = 0.724分、[M + Na]<sup>+</sup> 677.1.

【0374】

ステップ3: (1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS) - 6 - ( ( (2S, 3R, 6R) - 6 - ( (R) - 1, 2 - ジヒドロキシエチル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキサン - 2 - イル) オキシ) - 1, 8b - ジヒドロキシ - 8 - メトキシ - 3a - (4 - メトキシフェニル) - 3 - フェニル - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 1H - シクロペンタ [b] ベンゾフラン - 2 - カルボン酸 20 の調製



30

40

【0375】

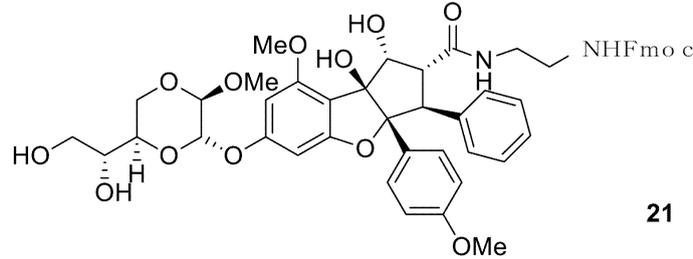
16 (50.0 mg, 0.0800 mmol) の THF (6.0 mL) 及び MeOH (2.0 mL) 溶液に、水 (2.0 mL) 中 LiOH (9.15 mg, 0.380 mmol) を添加した。混合物を 20 °C で 12 時間攪拌した。混合物の反応を水 (10 mL) で停止させ、EtOAc (10 mL × 2回) で抽出した。水層を 1.0 M の HCl で pH = 4 ~ 5 まで酸性化し、EtOAc (10 mL × 2回) で抽出した。有機層を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾

50

燥させ、濃縮して、20 (41 mg、68.7%) を白色固体として得た。粗物質を更に精製することなく直接使用した。LCMS (5 - 95、AB、1.5分) :  $R_T = 0.669$ 分、 $[M + Na]^+ 663.1$ .

【0376】

ステップ4 : (9H-フルオレン-9-イル)メチル(2-(1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS)-6-(((2S, 3R, 6R)-6-((R)-1, 2-ジヒドロキシエチル)-3-メトキシ-1, 4-ジオキサン-2-イル)オキシ)-1, 8b-ジヒドロキシ-8-メトキシ-3a-(4-メトキシフェニル)-3-フェニル-2, 3, 3a, 8b-テトラヒドロ-1H-シクロペンタ[b]ベンゾフラン-2-カルボキサミド)エチル)カルバメート21の調製

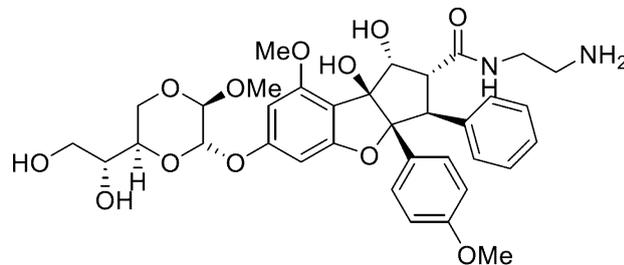


【0377】

20 (40.0 mg、0.060 mmol) のDCM溶液 (5.0 mL) に、(9H-フルオレン-9-イル)メチル(2-アミノエチル)カルバメート (26.44 mg、0.090 mmol)、HOBt (12.66 mg、0.090 mmol)、DCC (19.32 mg、0.090 mmol)、及びDIEA (0.03 mL、0.190 mmol) を添加した。混合物を20 で12時間攪拌した。混合物を濃縮し、分取-TLC (DCM中10%のMeOH、 $R_f = 0.3$ ) によって精製して、21 (30 mg、51.5%) を白色固体として得た。LCMS (5 - 95、AB、1.5分) :  $R_T = 0.785$ 分、 $[M + H]^+ 905.4$ .

【0378】

ステップ5 : (1R, 2R, 3S, 3aR, 8bS)-N-(2-アミノエチル)-6-(((2S, 3R, 6R)-6-((R)-1, 2-ジヒドロキシエチル)-3-メトキシ-1, 4-ジオキサン-2-イル)オキシ)-1, 8b-ジヒドロキシ-8-メトキシ-3a-(4-メトキシフェニル)-3-フェニル-2, 3, 3a, 8b-テトラヒドロ-1H-シクロペンタ[b]ベンゾフラン-2-カルボキサミド21aの調製



【0379】

21 (15.0 mg、0.0200 mmol) のDMF溶液 (2.0 mL) に、ピペリジン (0.02 mL、0.050 mmol) を添加した。混合物を25 で1時間攪拌した。LCMSは、出発材料が消費され、所望の産生物が見出されたことを示した。混合物を濃縮して、化合物7 (11 mg、97.2%) を白色固体として得、これを更に精製することなく直接使用した。LCMS (5 - 95、AB、1.5分) :  $R_T = 0.607$ 分、 $[M + H]^+ 683.2$ .

## 【0380】

ステップ6：LD-59の調製

(S)-4-(2-(1-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチルカルバモイル)シクロブタンカルボキサミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ベンジル4-ニトロフェニルカルボネート12(17.78mg、0.0200mmol)及びDIEA(0.010mL、0.0600mmol)のDMF溶液(5.0mL)に、21a(11.0mg、0.020mmol)を添加した。混合物を25℃で12時間攪拌した。LCMSは、出発材料が消費され、所望の生成物が見出されたことを示した。混合物を分取- HPLC(アセトニトリル35-50/水中0.225%のFA、25mL/分)によって精製して、LD-59(10.1mg、48.5%)を白色固体として得た。LCMS(5-95、AB、1.5分)：RT=0.688分、 $[M/2+H]^+ 640.5$ .

10

## 【0381】

実施例2 システイン操作された抗体の調製

抗体を大量に産生する場合、抗体は、CHO細胞内で産生された。VL及びVHをコードするベクターを、CHO細胞中にトランスフェクトし、IgGを、プロテインA親和性クロマトグラフィーによって細胞培養培地から精製した。

## 【0382】

最初に単離されるため、抗体中の操作されたシステイン残基は、細胞チオール(例えば、グルタチオン)との混合ジスルフィドとして存在するため、コンジュゲーションには利用することができない。これらの抗体の(例えば、DTTでの)部分還元、精製、及びデヒドロアスコルビン酸(DHAA)での再酸化により、例えば、Junutula et al.(2008)Nat. Biotechnol. 26:925-932及びUS2011/0301334において以前に説明されるように、コンジュゲーションに利用可能な遊離システインスルフィドリル基を有する抗体がもたらされる。簡潔には、抗体を活性化シルベストロール薬物部分と組み合わせて、抗体の遊離システイン残基にコンジュゲートすることを可能にした。数時間後、抗体-薬物コンジュゲートを精製した。

20

## 【0383】

特定の条件下で、システイン操作された抗体を、2mMのEDTAを有する50mMのトリス(pH7.5中)で、37℃で3時間、または室温で一晩、DTT(クリーランド試薬、ジチオスレイトール)またはTCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンヒドロクロリド、Getz et al.(1999)Anal. Biochem. Vol 273:73-80、Soltec Ventures, Beverly, MA)などの還元剤での処理によって、薬物とのコンジュゲーションに対して反応性にした。CHO細胞中で発現された完全長のシステイン操作されたモノクローナル抗体(THIOMAB(商標))(Gomez et al.(2010)Biotechnology and Bioeng. 105(4):748-760、Gomez et al.(2010)Biotechnol. Prog. 26:1438-1445)を、例えば、新たに導入したシステイン残基と培養培地中に存在するシステインとの間に形成され得るジスルフィド結合を還元するように、約50倍過剰のDTTで、室温で一晩還元した。還元したTHIOMAB(商標)を希釈し、10mMの酢酸ナトリウム(pH5)中でHiTrap Sカラムに載せ、0.3Mの塩化ナトリウムを含有するPBSで溶出させた。あるいは、1/20体積の10%酢酸を添加することによって抗体を酸性化し、10mMのコハク酸(pH5)で希釈し、カラムに載せ、その後、10カラム体積のコハク酸緩衝液で洗浄した。カラムを、50mMのトリス(pH7.5)、2mMのEDTAで溶出させた。

30

40

## 【0384】

軽鎖アミノ酸は、Kabatに従って番号付けされる(Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, (1991) 5th Ed., US Dept of Health and Human Service, National Institutes of Health

50

, Bethesda, MD)。重鎖アミノ酸は、EU番号付けシステムに従って番号付けされる (Edelman et al. (1969) Proc. Natl. Acad. of Sci. 63 (1): 78-85) が、Kabatシステムとして記載される場合を除く。一文字アミノ酸略号が使用される。

【0385】

CHO細胞中で発現された完全長のシステイン操作されたモノクローナル抗体 (THIOMAB (商標)) は、システイン付加物 (シスチン) を有するか、または細胞培養条件のために、操作されたシステイン上でグルタチオン付加される。操作されたシステインの反応性チオール基を遊離させるために、THIOMAB (商標) を、約 pH 8.0 の 500 mM のホウ酸ナトリウム及び 500 mM の塩化ナトリウムに溶解させ、約 50 ~ 100 倍過剰量の 1 mM の TCEP (トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィンヒドロクロリド (Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273: 73-80, Soltec Ventures, Beverly, MA) で、37 °C で約 1 ~ 2 時間還元した。あるいは、DTT を還元剤として使用した。鎖間ジスルフィド結合の形成を、非還元 SDS-PAGE または変性逆相 HPLC PLRP カラムクロマトグラフィーのいずれかによって監視した。還元された THIOMAB (商標) を希釈し、10 mM の酢酸ナトリウム (pH 5) 中 HiTrap SP FF カラムに充填し、0.3 M の塩化ナトリウムを含有する PBS、または 150 mM の塩化ナトリウムを含有する 50 mM のトリス-Cl (pH 7.5) で溶出させた。

【0386】

再酸化を実行することによって、親 Mab 内に存在するシステイン残基間のジスルフィド結合を再度確立した。溶出され、還元された THIOMAB (商標) を、15x もしくは 2 mM のデヒドロアスコルビン酸 (dHAA) (pH 7) で約 3 時間または 50 mM のトリス-Cl (pH 7.5) 中で約 3 時間、あるいは 200 nM ~ 2 mM の硫酸銅 (CuSO<sub>4</sub>) 水溶液により室温で一晩処理した。当該技術分野において既知である他の酸化体 (すなわち、酸化剤) 及び酸化条件が使用され得る。周囲空気酸化もまた、効果的であり得る。この穏やかな部分的再酸化ステップにより、高い忠実度で鎖内ジスルフィドが効率的に形成された。緩衝液を、Sephadex G25 樹脂での溶出によって交換し、1 mM の DTPA を有する PBS で溶出させた。チオール/抗体値を、溶液の 280 nm での吸光度からの還元抗体濃度、及び DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) との反応によるチオール濃度を決定することによって、ならびに 412 nm での吸光度の決定によって確認した。

【0387】

液体クロマトグラフィー/質量分析を、拡大質量範囲を有する TSQ Quantum Triple quadrupole (商標) 質量分析計 (Thermo Electron, San Jose California) で実行した。75 °C に加熱した PLRP-S (登録商標)、1000 Å、ミクロボアカラム (50 mm x 2.1 mm, Polymer Laboratories, Shropshire, UK) で、試料をクロマトグラフィーに供した。30 - 40% の B の直線勾配 (溶媒 A: 水中 0.05% の TFA、溶媒 B: アセトニトリル中 0.04% の TFA) を使用し、溶出剤をエレクトロスプレー源を使用して直接イオン化した。データを、Xcalibur (登録商標) データシステムによって収集し、ProMass (登録商標) (Novatia, LLC, New Jersey) を使用して逆重畳積分を実行した。LC/MS 分析前に、抗体または薬物コンジュゲート (50 マイクログラム) を、PNGase F (2 単位/ml, Prozyme, San Leandro, CA) で 37 °C で 2 時間処理して、N 結合型炭水化物を除去した。

【0388】

疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 試料を、ブチル HIC NPR カラム (2.5 ミクロンの粒径、4.6 mm x 3.5 cm) (Tosoh Bioscience) 上に注入し、0.8 ml/分で 0 - 70% の B の直線勾配で溶出した (A: 50 mM のリ

10

20

30

40

50

ン酸カリウム中 1.5 M の硫酸アンモニウム (pH 7)、B: 50 mM のリン酸カリウム (pH 7)、20% のイソプロパノール)。多波長検出器を備えた Agilent 1100 シリーズの HPLC システム及び Chemstation ソフトウェアを使用して、1 抗体当たりの薬物を異なる割合で有する抗体種を分解及び定量化した。

#### 【0389】

実施例 3 シルベストロール - リンカー中間体の抗体へのコンジュゲーション

実施例 1 の還元及び再酸化の手順後に、システイン操作された抗体 (THIOMAB (商標)) を、PBS (リン酸緩衝生理食塩水) 緩衝液に溶解させ、氷上で冷却する。過剰な、約 1.5 モル ~ 2.0 当量の、チオール反応性基 (ピリジリジルスルフィド、マレイミド、またはプロモアセトアミドなど) で活性化したシルベストロール - リンカー中間体を、DMSO 中に溶解させ、アセトニトリル及び水中で希釈し、PBS 中の冷却、還元、再酸化された抗体に添加する。典型的には、50 mM のトリス (pH 8) 中の約 20 mM の濃度で DMSO ストックからの薬物を抗体に添加し、反応混合物の LC-MS 分析により決定される、反応が完了するまで約 1 ~ 約 24 時間監視する。反応が完了したとき、過剰のエチルマレイミドなどのキャッピング試薬を添加して、反応を停止させ、いかなる未反応の抗体チオール基もキャッピングする。コンジュゲーション混合物を充填し、HiTrap SP FF カラムを通して溶出させて、過剰な薬物及び他の不純物を除去した。反応混合物を、遠心限外濾過によって濃縮し、システイン操作された抗体 - 薬物コンジュゲートを精製し、PBS 中 G25 樹脂による溶出によって脱塩し、滅菌条件下で 0.2 µm のフィルターを通して濾過し、貯蔵のために凍結する。

#### 【0390】

例えば、粗抗体 - 薬物コンジュゲートを、20 mM のコハク酸ナトリウム (pH 5) で希釈した後にカチオン交換カラムに適用する。カラムを少なくとも 10 カラム体積の 20 mM のコハク酸ナトリウム (pH 5) で洗浄し、抗体を PBS で溶出させた。抗体 - 薬物コンジュゲートを、ゲル濾過カラムを使用して、20 mM の His / 酢酸 (pH 5) に、240 mM のスクロースとともに製剤化した。抗体 - 薬物コンジュゲートは、タンパク質濃度を決定するための UV 分光法、凝集分析のための分析 SEC (サイズ排除クロマトグラフィー)、及び LC-MS によって、リジン C エンドペプチダーゼでの処理の前後に特徴付けた。

#### 【0391】

サイズ排除クロマトグラフィーは、0.25 mM の塩化カリウム及び 15% の IPA を有する 0.2 M のリン酸カリウム (pH 6.2) 中、0.75 ml / 分の流量で Shodex KW802.5 カラムを使用して実行した。コンジュゲートの凝集状態は、280 nm での溶出ピーク面積吸光度の積分によって決定した。

#### 【0392】

LC-MS 分析は、Agilent QTOF 6520 ESI 装置を使用して実行してもよい。一例として、抗体 - 薬物コンジュゲートを、トリス (pH 7.5) 中 1:500 重量のエンドプロテイナーゼ Lys C (Promega) で、37 °C で 30 分間処理する。結果として生じる切断断片を、80 °C に加熱した 1000 °C (オンゲストローム)、8 µm (ミクロン) の PLRP-S (高度に架橋されたポリスチレン) カラムに充填し、5 分間で 30% の B ~ 40% の B までの勾配で溶出させる。移動相 A は、0.05% の TFA を有する H<sub>2</sub>O であり、移動相 B は、0.04% の TFA を有するアセトニトリルであった。流量は、0.5 ml / 分であった。タンパク質溶出を、280 nm での UV 吸光度検出によって、エレクトロスプレーイオン化及び MS 分析の前に監視した。非コンジュゲート Fc 断片、残渣非コンジュゲート Fab、及び薬物化 Fab のクロマトグラフィー分解が、通常達成された。得られた m/z スペクトルを、Mass Hunter (商標) ソフトウェア (Agilent Technologies) を使用して逆重畳積分して、抗体断片の質量を計算した。

#### 【0393】

実施例 4 インビトロ細胞増殖アッセイ

抗体 - 薬物コンジュゲートのチオHu抗CD22 10F4v3 LC K149Cシルベ  
ストロール及びチオHu抗Ly6E 9B12.v12 LC K149Cシルベストロ  
ールの有効性を、以下のプロトコルを用いる細胞増殖アッセイによって測定した(CELL  
TITER GLO(商標) Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical Bulletin TB28  
8、Mendoza et al. (2002) Cancer Res. 62:5485 -  
5488) :

1. 培地中約4000個の細胞(HER発現SK-BR-3及びKPL-4、CD22陽  
性BJAB、CD22陽性WSU-DLCL2、またはJurkat)を含有する40μ  
lの細胞培養物のアリコートをし、384ウェルの不透明ウェルプレートの各ウェルに堆積  
させた。 10

2. 培地を含有するが細胞は有さない対照ウェルを調製した。

3. 抗体 - 薬物コンジュゲート(n=3)を実験ウェルに添加し、3~5日間インキュベ  
ートした。

4. プレートは、およそ30分間室温で平衡化した。

5. 各ウェル内に存在する細胞培養培地の量と等しい量のCELLTITER GLO(商  
標)試薬を添加した。

6. 軌道振盪機で内容物を15分間混合して、細胞溶解を誘導した。

7. プレートを室温で5分間インキュベートして、発光シグナルを安定化した。

8. 発光を記録し、活性%としてグラフで報告し、RLU(相対発光単位)は対照に対し  
て正規化した(抗体なし対照マイナス細胞なし対照)。 20

【0394】

データをプロットし、図1A及び1Bに、各抗体の各複写物(n=3)の個々の点として  
例証した。プロトコルは、CELLTITER GLO(商標)発光細胞を修正したも  
のである。培地:BJAB、WSU-DLCL2、及びJurkatは、RPMI-164  
0、20%のHI-FBS、2mMのL-Glutamineを含む培地中で成長され得  
る。

【0395】

実施例5 高度発現HER2トランスジェニック外植マウスにおける、腫瘍成長阻害、イン  
ビボ有効性 30

腫瘍を確立させ、0日目の単一治療前に、(カリパスを使用して測定される)150~2  
00mm<sup>3</sup>の体積まで成長させた。腫瘍体積を、式、 $V(\text{mm}^3) = 0.5A \times B^2$ (式  
中、A及びBはそれぞれ、長径及び短径である)に従って、カリパスを使用して測定する  
。腫瘍体積が3000mm<sup>3</sup>に達する前、または腫瘍が間近に迫った潰瘍形成の徴候を示  
したときに、マウスを安楽死させる。各実験群(1群当たり10匹のマウス)から収集し  
たデータを、平均+標準誤差として表す。

【0396】

Fo5マウス乳腺腫瘍モデルを用いて、単回用量の静脈内注射後に、かつ以前に記載され  
ているように(Phillips GDL, Li GM, Dugger DL, et al.  
. Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody-Cytotoxic  
Drug Conjugate. (2008) Cancer Res. 68:9280-9  
0)(参照によって本明細書に組み込まれる)、本発明の抗体 - 薬物コンジュゲートのイン  
ビボ有効性を評価する。抗Her2抗体 - 薬物コンジュゲートは、マウス乳腺腫瘍ウイ  
ルスプロモーター(MMTV-HER2)の転写制御下、乳腺上皮内でヒトHER2遺伝  
子が過剰発現されているトランスジェニックマウスモデルである、Fo5モデルで試験さ  
れ得る。HER2過剰発現は、乳腺腫瘍の自然発症を引き起こす。これらの創始者動物の  
うちの1匹の乳腺腫瘍(創始者番号5[Fo5])を、腫瘍断片(サイズ約2x2mm)  
の段階移植によってFVBマウスの後続世代において増殖させる。全ての研究を、Gu  
ide for the Care and Use of Laboratory Anim 40

a 1 s に従って実行する。各抗体 - 薬物コンジュゲート (単回用量) を、研究開始時及び移植の 14 日後に、9 匹の動物に静脈内に投薬した。初期腫瘍サイズは、約  $200 \text{ mm}^3$  の体積である。

【0397】

他の乳腺脂肪体移植片有効性モデルは、記載される通りに用いられ得 (Chen et al. (2007) Cancer Res 67: 4924 - 4932)、単回静脈内用量後に腫瘍体積を評価し、腹腔内腫瘍を有するマウスから切除した腫瘍を使用し、その後、レシピエントマウスの乳腺脂肪体に段階的に継代される。

【0398】

この方法で試験され得る他の細胞株としては、AU565、HCC1954、HCC1008、HCC2157、HCC202、HCC1419、HCC2218、及びHCC1569が挙げられる。

10

【0399】

実施例6シルベストロール抗体 - 薬物コンジュゲートの有効性

乳癌細胞株HCC1569 (CRL - 2330) は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) から得た。HCC1569 X2 細胞株は、インピボでの成長のために最適化された親HCC1569 細胞株 (ATCC, CRL - 2330) の誘導体である。親HCC1569 細胞を、雌のSCID ベージュマウスの右側腹部に皮下注射し、1つの腫瘍を回収し、刻み、インピトロで成長させて、HCC1569 XI 細胞株をもたらした。HCC1569 XI 株を、細胞株の成長を改善する試みの中で、雌のSCID ベージュマウスの右側腹部に再度皮下注射した。この研究からの腫瘍を採取し、インピトロでの成長のために再度適合させて、HCC1569 X2 細胞株を生成した。この株に由来するこの細胞株及び腫瘍は、Ly6Eを発現する。

20

【0400】

SCID ベージュマウスに、ヒスチジン緩衝液番号8ピピクル中、約200万個の細胞を植え付けた。腫瘍体積が、およそ $80 \sim 200 \text{ mm}^3$ に達したとき(0日目)、動物を各々約6~10匹のマウスの群にランダムに分け、以下の用量、 $0.3 \text{ mg/kg}$ 、 $1 \text{ mg/kg}$ 、 $3 \text{ mg/kg}$ 、 $6 \text{ mg/kg}$ 、及び $10 \text{ mg/kg}$ の用量で、ピピクル対照または抗体 - 薬物コンジュゲートのいずれかの単回静脈内 (IV) 注射を投与した。21日目の研究終了まで、腫瘍体積を週2回測定した。腫瘍体積を、カリパスを使用して測定した2つの寸法に基づいて測定し、計算し、式、 $V = 0.5 a \times b^2$  (式中、a及びbはそれぞれ、腫瘍の長径及び短径である) に従って $\text{mm}^3$ で表した。同じ動物からの経時的な腫瘍体積の反復測定を分析するために、混合モデル化アプローチを使用した (例えば、Pinheiro J, et al. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. 2009、R package, version 3.1 - 96)。このアプローチは、反復測定、及び研究終了前の治療とは無関係の動物の除去によるわずかな脱落率の両方に対処することができる。3次回帰スプラインを使用して、非線形プロファイルを、各用量レベルでの $\log_2$ 腫瘍体積の時間経過に当てはめた。その後、これらの非線形プロファイルを、混合モード内で用量に関連付けた。全ての動物プロトコルは、動物実験委員会 (IACUC) によって承認された。

30

40

【0401】

実施例7 CB - 17 Fox Chase SCIDマウスにおける、Bjab - luc ヒト異種移植片モデルにおけるチオ抗CD22 LC - K149C - MC - vc - PAB - シルベストロール - アミンの有効性

55匹のCB - 17 SCIDマウスの側腹部に、1匹のマウス当たり $0.2 \text{ mL}$ の体積で、2000万個のBjab - luc細胞を皮下に植え付ける。腫瘍が $150 \sim 250 \text{ mm}^3$ の平均腫瘍体積に達したとき、それらを6つに群分けした (各5匹)。0日目に単一治療を投与する。体積は $0.2 \text{ mL}$ を超えず、針径は28または29ゲージである。

【0402】

50

実施例 8 s c i d ベージュマウスにおける、K P L 4 ヒト乳腺異種移植片モデルにおけるチオ抗 H e r 2 7 C 2 L C - K 1 4 9 C - M C - v c - P A B - シルベストロール - アミンの有効性。

n = 60 匹のマウスに、1 匹のマウス当たり 300 万個の細胞で、H B S S / M a t r i g e l 中に懸濁させた K P L - 4 細胞を、0.2 mL の体積の胸部 2 / 3 乳腺脂肪体に植え付ける。腫瘍が 150 ~ 250 mm<sup>3</sup> の平均腫瘍体積に達したとき、それらを 8 つに群分けする (各 5 匹)。0 日目に単一治療を投与する。体積は 0.2 mL を超えず、針径は 28 または 29 ゲージである。

【0403】

前述の発明は、明確な理解のために例証及び実施例によって多少詳細に記載されているが、これらの説明及び実施例は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書に引用される全ての特許及び科学文献の開示は、参照によりそれらの全体が明示的に組み込まれる。

10

【0404】

本開示の要素またはその好ましい実施形態 (複数可) を導入するとき、「1 つの ( a )」、「1 つの ( a n )」、「その」、「及び「該」という冠詞は、1 つ以上の要素が存在することを意味することが意図される。「含む ( c o m p r i s i n g )」、「含む ( i n c l u d i n g )」、及び「有する」という用語は、包括的であることが意図され、列挙される要素以外の追加の要素が存在し得ることを意味する。

【0405】

この明細書は、最良の様式を含む本発明を開示するため、かつ任意の当業者による任意のデバイスまたはシステムの作製及び使用、ならびに任意の組み込まれる方法の実行を含む、本発明の実施を可能にするために、実施例を使用する。本発明の特許取得の対象となる範囲は、特許請求の範囲によって定義され、当業者に想起される他の実施例を含み得る。そのような他の実施例は、それらが特許請求の範囲の文言と異なる構造的要素を有する場合、またはそれらが特許請求の範囲の文言と実質的な差異を有さない同等の構造的要素を含む場合、特許請求の範囲内であることが意図される。

20

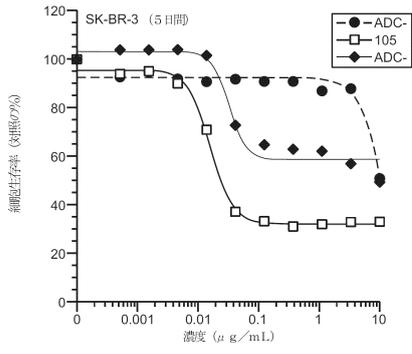
30

40

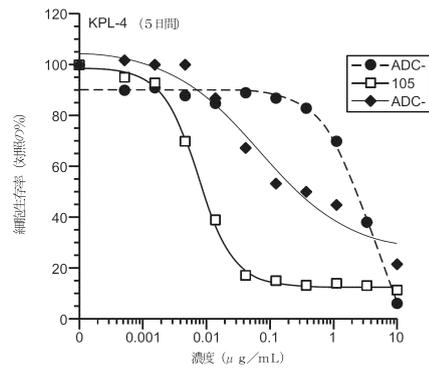
50

【図面】

【図 1 A】

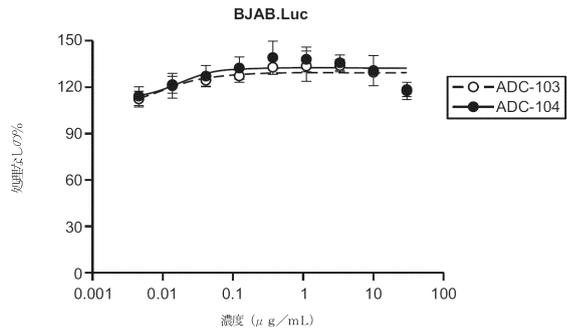


【図 1 B】

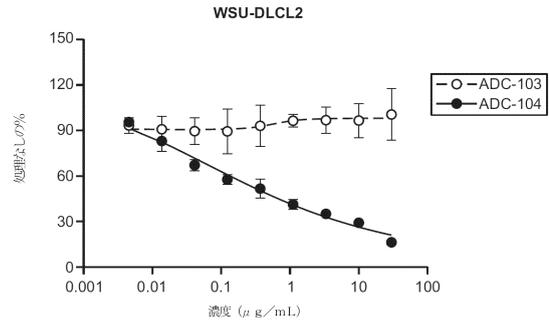


10

【図 1 C】



【図 1 D】



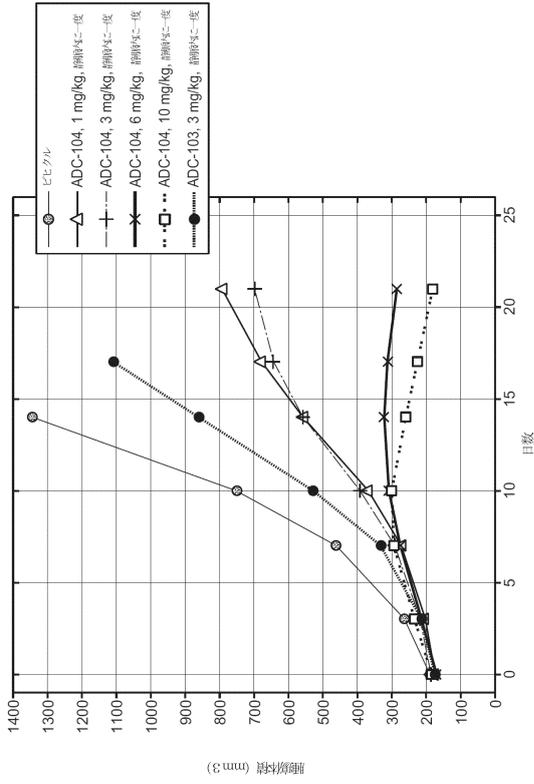
20

30

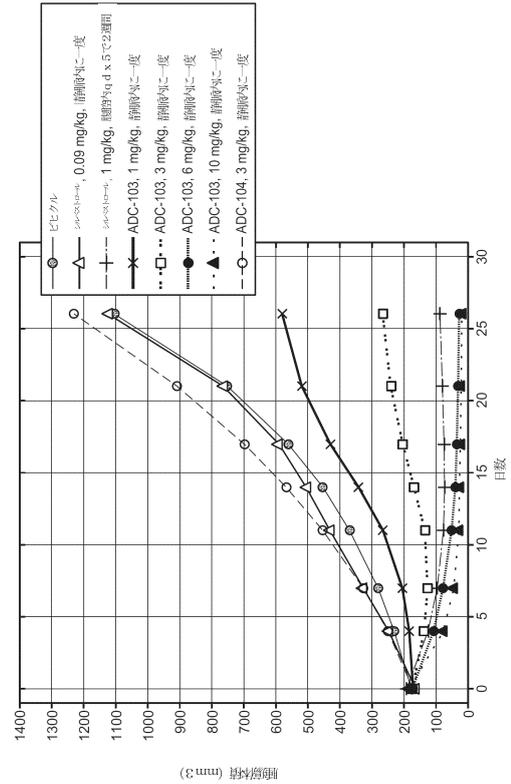
40

50

【 図 2 】



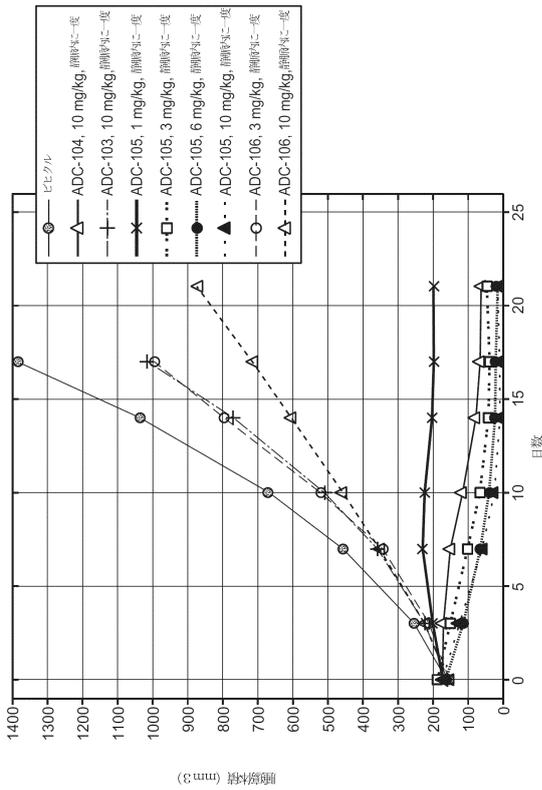
【 図 3 】



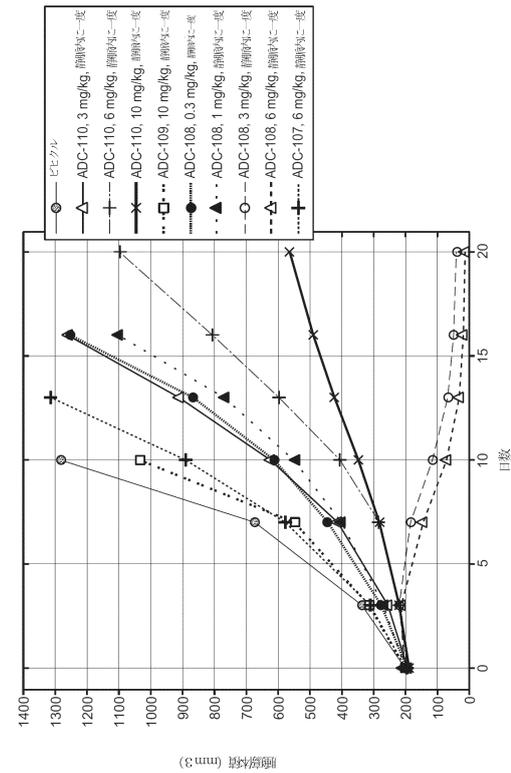
10

20

【 図 4 】



【 図 5 】



30

40

50

---

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I  
C 0 7 D 4 0 7 / 1 2

イーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド  
(72)発明者 ジェン, ビン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウ  
エイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 0 9 5 2 2 7 ( W O , A 2 )  
J. Org. Chem., 2004年, Vol.69, p.3350-3358

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)  
A 6 1 K 4 7 / 6 8  
A 6 1 K 3 1 / 3 5 7  
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5  
C 0 7 D 4 0 7 / 1 2  
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 )