

明 細 書

発明の名称：

エリブリンをベースとする抗体－薬物コンジュゲートの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、エリブリンをベースとする抗体－薬物コンジュゲート（ADC）の製造方法に関する。

背景技術

[0002] がんは世界的に、罹患及び死亡の主な原因のうちの1つであり、2012年には約1400万の新たな症例及び820万のがん関連死があった。がんによる死亡の最も共通する原因は、肺癌（159万人の死亡）、肝臓癌（74.5万人の死亡）、胃癌（72.3万人の死亡）、結腸直腸癌（69.4万人の死亡）、乳癌（52.1万人の死亡）、及び食道癌（40万人の死亡）である。新たながんの症例数は、来る20年で約70%、1年当たり約2200万の新たながん症例へと増加すると予測されている（非特許文献1）。

[0003] 微小管は、細胞内移行及び輸送、細胞シグナル伝達、ならびに細胞形状の維持を含む様々な細胞機能に関係する動的な線維状の細胞骨格タンパク質である。微小管はまた、染色体を2つの娘細胞に分離するために必要な有糸分裂紡錘体を形成することにより、有糸分裂細胞分裂において重要な役割を果たす。すべての細胞における微小管の生物学的機能は大部分、それらの重合ダイナミクスにより調節され、これは、微小管の両端での α 及び β チューブリン二量体の可逆的な非共有結合性の付加により生じる。この動的挙動及びその結果生じる微小管の長さに対する制御は、紡錘体の適正な機能に非常に重要である。微小管ダイナミクスのわずかな変化でさえ、紡錘体チェックポイントに連動し、有糸分裂における細胞周期の進行を停止させ、続いて、細胞死をもたらす（非特許文献2）。それらの急速な細胞分裂により、がん細胞は一般に、チューブリンに結合し、その正常な機能を破壊する化合物

に対して、正常な細胞よりも感受性がある。この理由で、チューブリン阻害薬及び他の微小管標的薬は、がんを処置するための有望な薬物群となっている（非特許文献3）。

[0004] 葉酸受容体アルファ（FRA）は、葉酸に結合するグリコホスファチジルイノシトール（GPI）結合膜タンパク質である。正常組織及びがん性組織の生物学におけるFRAの役割は、完全には理解されていないが、上皮由来の卵巢癌の高いパーセンテージで（非特許文献4）、さらには、非小細胞肺癌のあるパーセンテージでは高度に過剰に発現される（非特許文献5）。FRAはまた、正常な組織では発現を制限している。これらの特性により、FRAは、がん免疫療法のための魅力的な標的となっている。

[0005] がん原遺伝子ヒト上皮成長因子受容体2（HER2）は、ヒト上皮成長因子受容体（EGFR）ファミリーに属する膜貫通チロシンキナーゼ受容体をコードする（非特許文献6）。HER2の過剰発現は、PI3K-AKT-mTOR経路などの成長因子シグナル伝達経路の構成的活性化を可能にし、それにより、侵襲性乳癌の約20%を含む数種のがんにおいて発がんドライバー（oncogenic driver）として役立つ（非特許文献7～8）。HER2増幅が形質転換表現型を媒介するということから、HER2は、がん処置のための別の有望な標的である。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2017/151979号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：World Cancer Report 2014.

非特許文献2：Mukhtar et al. (2014) Mol. Cancer Ther. 13:275-84.

非特許文献3：Dumontet and Jordan (2010) Nat. Rev. Drug Discov. 9:790-803.

非特許文献4：O' Shannessy et al. (2013) Int. J. Gynecol. Pathol. 32(3):258-68.

非特許文献5: Christoph et al. (2014) Clin. Lung Cancer 15(5):320-30.

非特許文献6: King et al. (1985) Science 229:974-6.

非特許文献7: Slamon et al. (1989) Science 244:707-12.

非特許文献8: Gajria and Chandarlapaty(2011) Expert Rev. Anticancer Ther. 11:263-75.

非特許文献9: O' Shannessy et al., (2011) Oncotarget 2: 1227-43.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

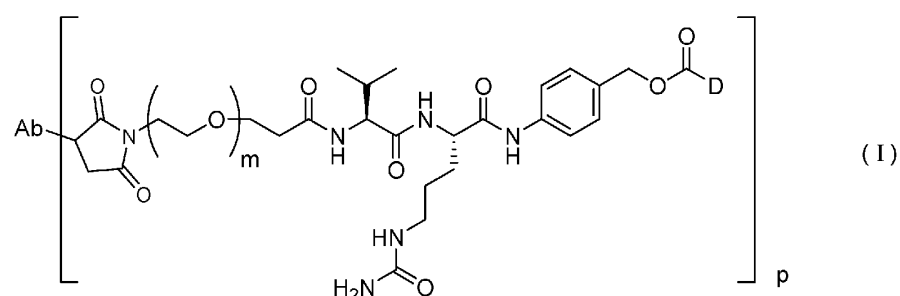
[0008] 本発明の目的は、より高収率な抗体-薬物コンジュゲートの製造方法、及びそれに有用な合成中間体を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、以下の[1]～[8]を提供する。

[1] 式(1)で表される抗体-薬物コンジュゲートを製造する方法であって、

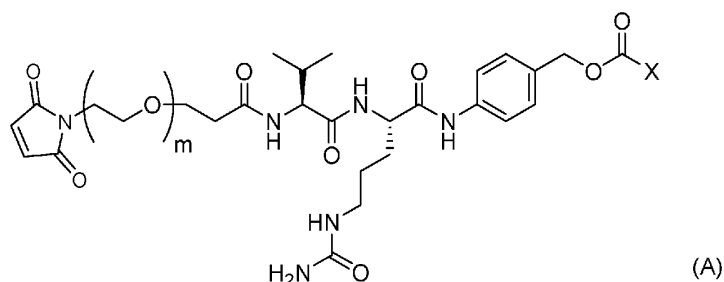
[化1]



[式中、Abは抗体またはその抗原結合性断片であり、Dはエリブリンであり、mは1～10の整数であり、pは1～8の整数である。]

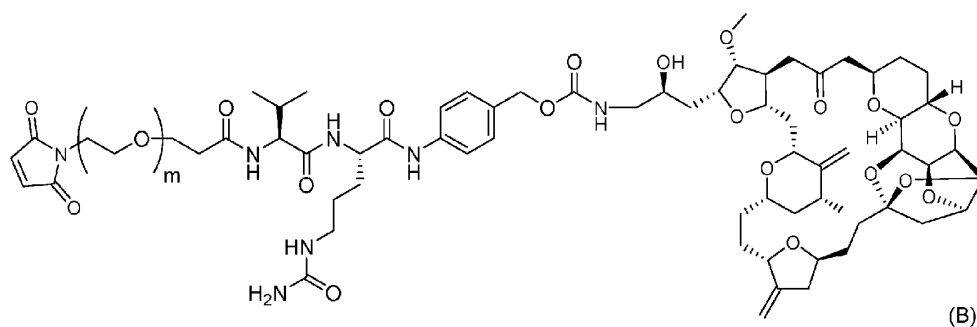
エリブリン又はその塩と式(A)で表される化合物との反応により、式(B)で表される化合物を得る工程1と、

[化2]



[式中、mは1～10の整数であり、Xはフェノキシ基又はニトロフェノキシ基である。]

[化3]



[式中、mは1～10の整数である。]

式(B)で表される化合物及び前記A bの反応により、式(1)で表される抗体-薬物コンジュゲートを得る工程2と、を含む、方法。

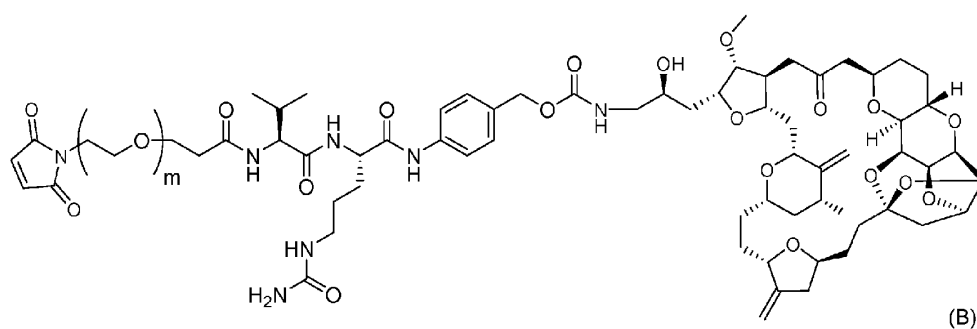
[2] A bが、(i) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む重鎖領域、及び配列番号6で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含むか、(ii) 配列番号23で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号24で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか、(iii) 配列番号27で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号28で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか、または(iv) 配列番号347で表されるアミノ酸配列を含む重鎖領域、及び配列番号308で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む、[1]に記載の方法。

[3] pが3～4である、[1]または[2]に記載の方法。

〔４〕 エリブリン又はその塩が、エリブリンのメタンスルホン酸塩である、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の方法。

〔５〕 工程１が、塩基存在下で実施される、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の方法。

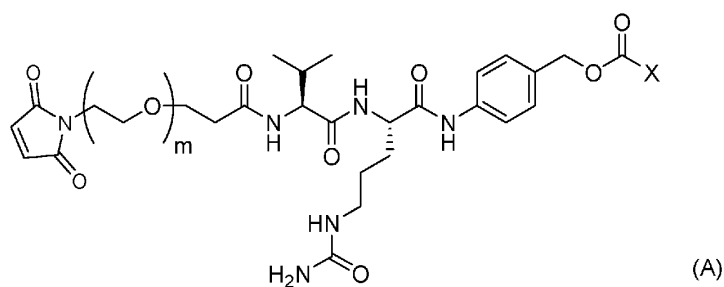
〔６〕 式（Ｂ）で表される化合物を製造する方法であって、
〔化４〕



〔式中、 m は１～１０の整数である。〕

エリブリン又はその塩と式（Ａ）で表される化合物との反応により、式（Ｂ）で表される化合物を得る工程を含む、方法。

〔化５〕

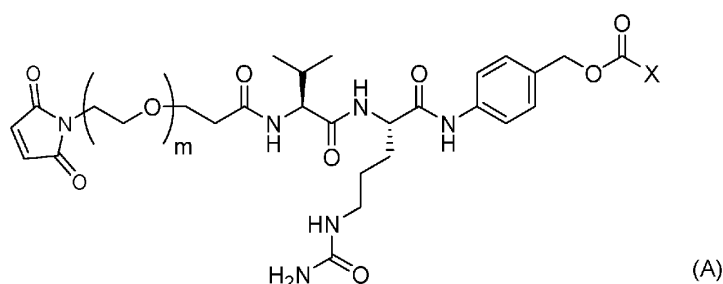


〔式中、 m は１～１０の整数であり、 X はフェノキシ基又はニトロフェノキシ基である。〕

〔７〕 上記工程が、塩基存在下で実施される、〔６〕に記載の方法。

〔８〕 式（Ａ）で表される化合物。

[化6]



[式中、mは1～10の整数であり、Xはフェノキシ基又はニトロフェノキシ基である。]

発明の効果

[0010] 本発明によれば、より高収率な抗体－薬物コンジュゲートの製造方法を提供することができる。また、より高収率で抗体－薬物コンジュゲートを製造するために有用な合成中間体を提供することもできる。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明の実施形態について、以下に詳述する。

[0012] 本発明の一実施形態は、式(1)で表される抗体－薬物コンジュゲート(ADC)を製造する方法に関する。

[0013] そこで、まず、式(1)で表されるADCについて、説明する。

[0014] ADCは、腫瘍細胞(例えば、FRA発現性腫瘍細胞)と結合し、それに内在化し、それを死滅させ得る。また、ADCに使用される抗体部分(Ab)は、抗体またはその抗原結合性断片であり、腫瘍細胞を標的とするものが好ましい。抗体またはその抗原結合性断片は、例えば、

(a) Kabatナンバリングシステム(Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (米国国立衛生研究所、Bethesda、Md. (1987及び1991)))により定義される、配列番号2で表される重鎖相補性決定領域(重鎖CDR)1、配列番号3で表される重鎖CDR2、及び配列番号4で表される重鎖CDR3のアミノ酸配列を含む3つの重鎖CDRと、配列番号7で表される軽鎖相補性決定領域(軽鎖CDR)1、配

列番号8で表される軽鎖CDR2、及び配列番号9で表される軽鎖CDR3のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖CDRと、を含むか、あるいは、

(b) IMGTナンバリングシステム (International ImmunoGeneTics Information System (IMGT (登録商標))) により定義される、配列番号13で表される重鎖CDR1、配列番号14で表される重鎖CDR2、及び配列番号15で表される重鎖CDR3のアミノ酸配列を含む3つの重鎖CDRと、配列番号16で表される軽鎖CDR1、配列番号17で表される軽鎖CDR2、及び配列番号18で表される軽鎖CDR3のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖CDRと、を含む。

[0015] 本明細書中において、「抗体-薬物コンジュゲート」、「抗体コンジュゲート」、「コンジュゲート」、「イムノコンジュゲート」、及び「ADC」という用語は、互換的に使用され、抗体（例えば、抗FRA抗体）に連結している化合物またはその誘導体を指し、式Iにより定義される〔式中、Abは抗体部分（すなわち、抗体またはその抗原結合性断片）であり、Lはリンカー部分であり、Dはエリブリンであり、pは抗体部分1つ当たりのエリブリンの数である。〕。

[0016] 「抗体」という用語は、最も広い意味では、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を介して、標的、例えば、タンパク質、ポリペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、または上述の組合せを認識し、それに特異的に結合する免疫グロブリン分子を指すために使用される。抗体の重鎖は、重鎖可変領域 (V_H) 及び重鎖定常領域 (C_H) から構成される。抗体の軽鎖は、軽鎖可変領域 (V_L) 及び軽鎖定常領域 (C_L) から構成される。本出願の目的では、成熟重鎖及び軽鎖可変領域はそれぞれ、N末端からC末端へ：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4と配置されている、4つのフレームワーク領域 (FR1、FR2、FR3及びFR4) 内の3つの相補性決定領域 (CDR1、CDR2及びCDR3) を含む。「抗体」は、天然に存在してもよいし、または慣用のハイブリドーマ技術により生産されるモノクローナル抗体など、人工的で

あってもよい。「抗体」という用語には、全長モノクローナル抗体、全長ポリクローナル抗体及び一本鎖抗体が含まれる。また、抗体の抗原結合性断片には、例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、及びF vが含まれる。抗体は、免疫グロブリンの5つの主な群：I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g M、またはそのサブクラス（例えば、アイソタイプI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4）のいずれか1つであってよい。この用語はさらに、所望の生物学的活性を実証する限り、抗原認識部位を含有するヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体及び任意の修飾された免疫グロブリン分子を含む。

[0017] 「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書で使用する場合、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る天然に存在する起こり得る変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原エピトープを指向する。対照的に、従来の（ポリクローナル）抗体調製物は典型的には、種々のエピトープを指向する（または、それらに特異的な）多数の抗体を含む。修飾語句「モノクローナル」は、抗体の実質的に均質な集団から得られるという抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法により抗体を生産することが必要であると解釈されるべきではない。例えば、本開示により使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al. (1975) Nature 256: 495により最初に記載されたハイブリドーマ法により作製されてもよいし、または組換えDNA法（例えば、米国特許第4, 816, 567号を参照されたい）により作製されてもよい。モノクローナル抗体はまた、例えばClackson et al. (1991) Nature 352: 624-8及びMarkset al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-97に記載されている技術を使用してファージ抗体ライブラリから単離することもできる。

[0018] 本明細書に記載のモノクローナル抗体には具体的には、重鎖及び／または軽鎖の一部が、特定の種に由来するか、または特定の抗体群もしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一である、もしくは相同してい

る一方で、その鎖（複数可）の残りは、別の種に由来するか、または別の抗体群もしくはサブクラスに属する抗体、さらには、それらが標的抗原と特異的に結合し、及び／または所望の生物学的活性を示す限り、そのような抗体の断片における対応する配列と同一であるか、もしくは相同している、「キメラ」抗体が含まれる。

- [0019] 「相同体」という用語は、例えば、対応する位置で同じか、または相似している化学的残基の配列を有することにより、別の分子に対して相同性を示す分子を指す。
- [0020] 「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用する場合、ヒトにより産生される抗体またはヒトにより産生される抗体のアミノ酸配列を有する抗体を指す。
- [0021] 「キメラ抗体」という用語は、本明細書で使用する場合、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2種以上の種に由来する抗体を指す。一部の例では、重鎖及び軽鎖の両方の可変領域は、所望の特異性、親和性、及び活性を有する、ある種に由来する抗体の可変領域に対応する一方で、定常領域は、別の種（例えば、ヒト）に由来する抗体と相同していて、後者の種における免疫応答を最小限にしている。
- [0022] 本明細書で使用する場合、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト（例えば、マウス）抗体、さらにはヒト抗体からの配列を含有する抗体の形態を指す。そのような抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有するキメラ抗体である。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変領域の実質的にすべてを含み、その際、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、フレームワーク領域（FR）のすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は任意選択で、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域（Fc）の少なくとも一部も含む。ヒト化抗体は、抗体特異性、親和性、及び／または活性を精密化及び最適化するために、Fvフレームワーク領域で、及び／または置き換えられ

た非ヒト残基内のいずれかで、残基の置換によりさらに修飾されていてもよい。

[0023] 抗体の「抗原結合性断片」という用語は、本明細書で使用する場合、抗原（例えば、F R A）に特異的に結合する能力を保持している、1つまたは複数の抗体の断片を指す。抗原結合性断片は好ましくは、抗原発現性細胞に内在化する能力も保持している。一部の実施形態では、抗原結合性断片は、免疫エフェクター活性も保持している。全長抗体の断片は、全長抗体の抗原結合能を果たし得ることが判明している。抗体の「抗原結合性断片」という用語の範囲内に含まれる結合性断片の例には、(i) F a b断片、V_L、V_H、C_L、及びC_{H1}領域からなる一価断片、(ii) F (a b')₂断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結されている2つのF a b断片を含む二価断片；(iii) V_H及びC_{H1}領域からなるF d断片；(iv) 抗体の1本のアームのV_L及びV_H領域からなるF v断片、(v) 1つの可変領域、例えば、V_H領域を含むd A b断片（例えば、Ward et al. (1989) Nature 341: 544-6及びWinter et al. WO 90/05144を参照されたい）、ならびに(vi) 単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。さらに、F v断片の2つの領域、V_L及びV_Hは、別々の遺伝子によりコードされるが、組換え法を使用して、それらが、V_L及びV_H領域が対合して一価分子を形成している1本のタンパク質鎖（一本鎖F v (s c F v)として公知）として作製されることを可能にする合成リンカーにより、それらを接続することができる。例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423-6及びHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83を参照されたい。そのような一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合性断片」という用語の範囲内に含まれることが意図されており、結合すると細胞内に内在化することができる結合性断片の例示的な種類として、当技術分野では公知である。例えば、Zhu et al. (2010) 9: 2131-41、He et al. (2010) J. Nucl. Med. 51: 427-32及びFitting et al. (2015) MAbs 7:390-402を参照されたい。特定の実施形態では、s c F v分子を、融合タンパク質に組み込んでもよい。ディアボディなどの一本鎖

抗体の他の形態も含まれる。ディアボディは、 V_H 及び V_L 領域が1本のポリペプチド鎖上に発現されるが、同じ鎖上の2つの領域間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用し、それにより、領域が、別の鎖の相補的領域と対合して2つの抗原結合部位を作製することを強制される二価のディアボディである（例えば、Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8及びPoljak et al. (1994) Structure 2: 1121-3を参照されたい）。抗原結合性断片は、当業者に知られている従来の技術を使用して得られ、抗原結合性断片は、インタクトな抗体と同じ手法で、有用性（例えば、結合親和性、内在化）についてスクリーニングされる。抗原結合性断片は、インタクトなタンパク質の切断により、例えば、プロテアーゼまたは化学的な切断により調製することもできる。

[0024] 本明細書における、抗体またはその抗原結合性断片には、内在化型抗体または内在化型結合性断片も含まれるが、ここで「内在化」とは、抗体またはその抗原結合性断片と関連して本明細書で使用する場合、細胞に結合すると、細胞の脂質二層膜を通して内部コンパートメントに、好ましくは、細胞内のリソソームなどの分解コンパートメントに取り込まれ（すなわち、内在化され）得る抗体またはその抗原結合性断片を指す。例えば、内在化型抗FRA抗体は、細胞膜上のFRAに結合した後に、細胞内に取り込まれ得るものである。

[0025] 「葉酸受容体アルファ」または「FRA」という用語は、本明細書で使用する場合、ヒトFRAの任意の天然形態を指す。この用語は、全長FRA（例えば、NCBI Reference Sequence: NP_000793; 配列番号19）、さらには、細胞プロセッシングから生じるヒトFRAの任意の形態を含む。この用語はまた、これらだけに限定されないが、スプライシング変異型、対立遺伝子変異型、及びアイソフォームを含む、FRAの天然に存在するバリエーションを含む。FRAは、ヒトから単離することができるか、または組換えで、もしくは合成法により生産してもよい。

[0026] 「抗FRA抗体」または「FRAに特異的に結合する抗体」という用語は

、F R Aに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片の任意の形態を指し、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、及びF R Aに特異的に結合する限り、生物学的機能を有する抗体断片を含む。好ましくは、本明細書において開示するA D Cで使用する抗F R A抗体は、抗体またはその抗原結合性断片である。M O R A b - 0 0 3は、例示的な抗ヒトF R A抗体である。本明細書で使用する場合、「特異的」、「特異的に結合する」という用語は、標的抗原エピトープへの抗体の選択的結合を指す。抗体を、所与の条件設定下で、適切な抗原への結合と、無関係な抗原または抗原混合物への結合とを比較することにより、結合の特異性について試験することができる。抗体が、無関係な抗原または抗原混合物よりも、少なくとも2倍、5倍、又は7倍、好ましくは10倍高い親和性で適切な抗原に結合するならば、それは「特異的に結合する」と理解される。一実施形態では、特異的な抗体は、F R A抗原にのみ結合し、他の抗原には結合しない（または僅かな結合のみを示す）ものである。

[0027] 「ヒト上皮成長因子受容体2」、「h e r 2」、または「h e r 2 / n e u」という用語は、本明細書で使用する場合、ヒトh e r 2の任意の天然形態を指す。この用語は、全長h e r 2（例えば、NCBI Reference Sequence : NP__004439. 2 ; 配列番号21）、さらには、細胞プロセッシングから生じるヒトh e r 2の任意の形態を含む。この用語はまた、これらだけに限定されないが、スプライシング変異型、対立遺伝子変異型、及びアイソフォームを含むh e r 2の天然に存在するバリエーションを含む。H e r 2は、ヒトから単離することができるか、または組換えで、もしくは合成法により生産してもよい。

[0028] 「抗h e r 2抗体」または「h e r 2に特異的に結合する抗体」という用語は、h e r 2に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片の任意の形態を指し、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、及びh e r 2に特異的に結合する限り、生物学的機能を有する抗体断片を含む。米国特許第5, 821, 337号（参照により本明細

書に組み込まれる)は、例示的な抗h e r 2抗体配列を含む、例示的なh e r 2結合性配列を提供している。好ましくは、本明細書において開示するADCにおいて使用する抗h e r 2抗体は、抗体または抗原結合性断片である。トラスツズマブは、例示的な抗ヒトh e r 2抗体である。

[0029] 「エピトープ」という用語は、抗体が認識し、かつ特異的に結合し得る抗原の部分を指す。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは、連続アミノ酸から、またはポリペプチドの三次元フォールディングにより並列する非連続アミノ酸から形成され得る。当技術分野で公知の任意のエピトープマッピング技術を使用して、抗体が結合するエピトープを同定することができる。このようなエピトープマッピング技術には、例えば、抗原-抗体複合体の直接的な可視化によるエピトープ同定のためのX線結晶学、抗原の断片または変異異型への抗体の結合をモニターすること、及び抗体及び抗原の種々の部分の溶媒露出度をモニターすることが含まれる。エピトープをマッピングするために使用される例示的な手段は、これらだけに限定されないが、アレイベースのオリゴペプチドスキャニング、限定タンパク質分解、部位特異的突然変異誘発、ハイスループット突然変異誘発マッピング、水素-重水素交換、及び質量分析法が含まれる(例えば、Gershoni et al.(2007) 21: 145-56及びHager-Braun及びTomer (2005) Expert Rev. Proteomics 2: 745-56を参照されたい)。

[0030] 競合的結合及びエピトープマッピングも、同一または重複エピトープを共有する抗体を決定するために使用することができる。クロスブロッキングアッセイ、例えば、「Antibodies, A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow and Lane(1st edition 1988, 2nd edition 2014)に記載のアッセイなどを使用して、競合的結合を評価することができる。一部の実施形態では、試験抗体またはその抗原結合性断片が、標的抗原、例えば、FRAまたはh e r 2への参照抗体またはその抗原結合性断片(例えば、表2、4、及び6において同定されているものから選択されるCDR及び/または可変領域を含む結合性タンパク質)の結合を、クロスブロッキングアッ

セイにおいて少なくとも約50%（例えば、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%、又はそれ以上、またはその間の任意のパーセンテージ）減少させる、及び／またはその逆である場合に、その試験抗体またはその抗原結合性断片の結合は競合的であると評価される。一部の実施形態では、競合的結合は、互いに同一又は類似の（例えば、部分的に重複する）エピトープによるか、あるいは各抗体又はその抗原結合性断片がそれぞれ近接するエピトープに結合する場合の立体障害の発生により、起こり得る。例えば、Tzartos, *Methods in Molecular Biology* (Morris, ed., (1998) vol.66, pp.55-66) を参照されたい。一部の実施形態では、競合的結合は、互いに類似のエピトープを有する結合性タンパク質の群を分類するために使用することができ、例えば、その結合が競合するものを重複または近接エピトープを有する結合性タンパク質の群として「ビニング」することができ、競合しないものを重複または近接エピトープを有さない結合性タンパク質の別の群に区別し得る。

[0031] 「 k_{on} 」または「 k_a 」という用語は、抗体と抗原とが会合して抗体／抗原複合体を形成することについての速度定数を指す。この速度は、標準的なアッセイ、例えば、BiacoreまたはELISAアッセイを使用して決定され得る。

[0032] 「 k_{off} 」または「 k_d 」という用語は、抗体／抗原複合体からの抗体の解離についてのオフ速度定数 (off rate constant) を指す。この速度は、標準的なアッセイ、例えば、BiacoreまたはELISAアッセイを使用して決定され得る。

[0033] 「 K_D 」という用語は、特定の抗体－抗原相互作用の平衡解離定数を指す。 K_D は、 k_a/k_d により計算される。この速度は、標準的なアッセイ、例えば、BiacoreまたはELISAアッセイを使用して決定され得る。

[0034] 「 p 」または「抗体：薬物比」という用語は、抗体部分 (Ab) 1つ当たりの、リンカー部分及びエリブリンからなる構造単位の数（すなわち、薬物負荷）を指す。一部の実施形態では、 p は、1～10、1～9、1～8、1

～7、1～6、1～5、1～4、1～3、または1～2の整数であり、好ましくは3～4の整数である。複数種の式Iで表されるADCを含む組成物では、「p」は、抗体部分(Ab)1つ当たりの、リンカー部分及びエリブリンからなる構造単位の平均数(平均薬物負荷ともいう。)を指す。pが平均薬物負荷を示す場合、pは3～4、3、2～3、8、3、5～4、5、3、6～4、4、または4であり得る。

[0035] 一部の実施形態では、pは、1～6、2～5、又は3～4の整数である。pがより大きい数字であると、抗体部分1つあたりのエリブリンの数が多くなるから、1つの抗体でより多くのエリブリンを標的細胞に送達することができ、その薬理効果もさらに高まる。

[0036] ADCは、細胞外に存在する場合にはインタクトなままであるが、細胞(例えば、がん細胞)内に内在化されると、ADCのリンカー部分が切断され、当該細胞内にエリブリンが放出される。リンカー部分は通常、細胞外では安定的である。すなわち、ADCは、抗体部分(Ab)に特異的な抗原を発現している細胞(例えば、がん細胞)を認識し、当該細胞の内部に侵入する。細胞内に侵入したADCは、エリブリンと抗体部分(Ab)とを連結するリンカー部分が切断されることにより、エリブリンを放出し、その薬理効果を発揮する。

[0037] 1. 抗体部分(Ab)

ADC中の抗体部分(Ab)は、抗体または抗原結合性断片、特に抗葉酸受容体アルファ(FRA)抗体またはその抗原結合性断片であり、FRA発現性腫瘍細胞に結合することができる。

[0038] 一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、葉酸受容体アルファ(FRA, Folate receptor alpha)に結合し、FRA発現性腫瘍細胞を標的とし得る。また、一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、(a) Kabatナンバリングシステムにより定義される3つの重鎖CDR(配列番号2で表される重鎖CDR1、配列番号3で表される重鎖CDR2、及び配列番号4で表される重鎖CDR3)と、3つの軽鎖CDR(配

列番号7で表される軽鎖CDR1、配列番号8で表される軽鎖CDR2、及び配列番号9で表される軽鎖CDR3)を含むか、あるいは(b)IMGTナンバリングシステムにより定義される、3つの重鎖CDR(配列番号13で表される重鎖CDR1、配列番号14で表される重鎖CDR2、及び配列番号15で表される重鎖CDR3)と、3つの軽鎖CDR(配列番号16で表される軽鎖CDR1、配列番号17で表される軽鎖CDR2、及び配列番号18で表される軽鎖CDR3)を含む。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、ヒトフレームワーク配列を含む。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号23で表される重鎖可変領域及び配列番号24で表される軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、ヒトIgG1重鎖定常領域及びIgC α 軽鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号23で表される重鎖可変領域及び配列番号24で表される軽鎖可変領域を含む抗体と同じエピトープへの結合について競合し、及び／または、それに結合する。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、アラニン-ヒスチジン-リジン-アスパラギン酸(Ala-His-Lys-Asp、配列番号345)を含むエピトープに結合する(非特許文献9)。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、NTSQEAHKDVSYL(A α -sn-Thr-Ser-Gln-Glu-Ala-His-Lys-Asp-Val-Ser-Tyr-Leu、配列番号346)を含むエピトープに結合する。

[0039] 他の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、ヒト上皮成長因子受容体2(her2)に結合し、her2発現性腫瘍細胞を標的とし得る。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、(a)Kabataナンバリングシステムにより定義される、3つの重鎖CDR(配列番号71で表される重鎖CDR1、配列番号72で表される重鎖CDR2、及び配列番号73で表される重鎖CDR3)と、3つの軽鎖CDR(配列番号74で表される軽鎖CDR1、配列番号75で表される軽鎖CDR2、及び配列番号76で表される軽鎖CDR3)を含むか、あるいは(b)IMGTナンバ

リングシステムにより定義される、3つの重鎖CDR（配列番号191で表される重鎖CDR1、配列番号192で表される重鎖CDR2、及び配列番号193で表される重鎖CDR3）と、ならびに3つの軽鎖CDR（配列番号194で表される軽鎖CDR1、配列番号195で表される軽鎖CDR2、及び配列番号196で表される軽鎖CDR3）を含む。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、ヒトフレームワーク配列を含む。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号27で表される重鎖可変領域及び配列番号28で表される軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、ヒトIgG1重鎖定常領域及びIgC κ 軽鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号27で表される重鎖可変領域及び配列番号28で表される軽鎖可変領域を含む抗体と同じエピトープへの結合について競合し、及び／またはそれに結合する。

[0040] 他の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、メソテリン（MSLN、*mesothelin*）に結合し、MSLN発現性腫瘍細胞を標的とし得る。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、（a）Kabataナンバリングシステムにより定義される、3つの重鎖CDR（配列番号65で表される重鎖CDR1、配列番号66で表される重鎖CDR2、及び配列番号67で表される重鎖CDR3）と、3つの軽鎖CDR（配列番号68で表される軽鎖CDR1、配列番号69で表される軽鎖CDR2、及び配列番号70で表される軽鎖CDR3）を含むか、あるいは（b）IMGTナンバリングシステムにより定義される、3つの重鎖CDR（配列番号185で表される重鎖CDR1、配列番号186で表される重鎖CDR2、及び配列番号187で表される重鎖CDR3）と、3つの軽鎖CDR（配列番号188で表される軽鎖CDR1、配列番号189で表される軽鎖CDR2、及び配列番号190で表される軽鎖CDR3）を含む。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、配列番号25で表される重鎖可変領域及び配列番号26で表される軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗体

または抗原結合性断片は、ヒト IgG1 重鎖定常領域及び Ig カップ軽鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性は、配列番号 25 で表される重鎖可変領域及び配列番号 26 で表される軽鎖可変領域を含む抗体と同じエピトープへの結合について競合し、及び／またはそれに結合する。

[0041] 本実施形態において、好ましい抗体部分 (Ab) は、(a) Kabat ナンバリングシステムにより定義される、配列番号 2 (重鎖 CDR1)、配列番号 3 (重鎖 CDR2) 及び配列番号 4 (重鎖 CDR3) で表されるアミノ酸配列を含む 3 つの重鎖 CDR、もしくは配列番号 7 (軽鎖 CDR1)、配列番号 8 (軽鎖 CDR2) 及び配列番号 9 (軽鎖 CDR3) で表されるアミノ酸配列を含む 3 つの軽鎖 CDR、または (b) IMGT ナンバリングシステムにより定義される、配列番号 13 (重鎖 CDR1)、配列番号 14 (重鎖 CDR2) 及び配列番号 15 (重鎖 CDR3) で表されるアミノ酸配列を含む 3 つの重鎖 CDR、もしくは配列番号 16 (軽鎖 CDR1)、配列番号 17 (軽鎖 CDR2) 及び配列番号 18 (軽鎖 CDR3) で表されるアミノ酸配列を含む 3 つの軽鎖 CDR を含む、抗葉酸受容体アルファ抗体またはその抗原結合性断片である。他の好ましい抗体部分 (Ab) は、(c) Kabat ナンバリングシステムにより定義される、配列番号 71 (重鎖 CDR1)、配列番号 72 (重鎖 CDR2) 及び配列番号 73 (重鎖 CDR3) で表されるアミノ酸配列を含む 3 つの重鎖 CDR、もしくは配列番号 74 (軽鎖 CDR1)、配列番号 75 (軽鎖 CDR2) 及び配列番号 76 (軽鎖 CDR3) で表されるアミノ酸配列を含む 3 つの軽鎖 CDR、または (d) IMGT ナンバリングシステムにより定義される、配列番号 191 (重鎖 CDR1)、配列番号 192 (重鎖 CDR2) 及び配列番号 193 (重鎖 CDR3) で表されるアミノ酸配列を含む 3 つの重鎖 CDR、または配列番号 194 (軽鎖 CDR1)、配列番号 195 (軽鎖 CDR2) 及び配列番号 196 (軽鎖 CDR3) で表されるアミノ酸配列を含む 3 つの軽鎖 CDR を含む、抗ヒト上皮成長因子受容体 2 (her2) 抗体またはその抗原結合性断片である。

。より好ましくは、抗葉酸受容体アルファ抗体またはその抗原結合性断片である。

[0042] 抗体部分（A b）は、その範囲内に、がん細胞上の標的抗原に特異的に結合する任意の抗体または抗原結合性断片を含む。抗体または抗原結合性断片は、例えば、B I A c o r e（登録商標）分析により測定すると、 $\leq 1 \text{ mM}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ または $\leq 10 \text{ nM}$ の解離定数（ K_D ）で、またはその間の任意の量で、標的抗原に結合し得る。特定の実施形態では、 K_D は、 $1 \text{ pM} \sim 500 \text{ pM}$ である。一部の実施形態では、 K_D は、 $500 \text{ pM} \sim 1 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M} \sim 100 \text{ nM}$ 、または $100 \text{ mM} \sim 10 \text{ nM}$ である。

[0043] 一部の実施形態では、抗体部分は、2本の重鎖及び2本の軽鎖を含む4本鎖抗体（免疫グロブリンとも称される）である。一部の実施形態では、抗体部分は、免疫グロブリンの2本鎖ハーフボディ（half body）（1本の軽鎖及び1本の重鎖）、または抗原結合性断片である。

[0044] 本開示の例示的な抗体のアミノ酸及び核酸配列を表1～9に明記する。

[0045] [表1]

mAb	Class / Isotype	Target
MORAb-003	humanized	human folate receptor alpha
MORAb-009	mouse-human chimeric	human mesothelin
trastuzumab	humanized	human her2/neu
33011-xi	rabbit-human chimeric	human mesothelin
33011-zu	humanized	human mesothelin
111B10-xi	rabbit-human chimeric	human mesothelin
111B10-zu	humanized	human mesothelin
201C15-xi	rabbit-human chimeric	human mesothelin
201C15-zu	humanized	human mesothelin
346C6-xi	rabbit-human chimeric	human mesothelin
346C6-zu	humanized	human mesothelin

略語：x i はキメラ抗体を意味し、z u はヒト化抗体を意味する。

[0046] m A b 可変領域のアミノ酸配列

[表2]

	SEQ ID NO	mAb	IgG chain
1	23	MORAb-003	Heavy chain
2	24	MORAb-003	Light chain
3	25	MORAb-009	Heavy chain
4	26	MORAb-009	Light chain
5	27	trastuzumab	Heavy chain
6	28	trastuzumab	Light chain
7	29	33011-xi	Heavy chain
8	30	33011-xi	Light chain
9	31	33011-zu	Heavy chain
10	32	33011-zu	Light chain
11	33	111B10-xi	Heavy chain
12	34	111B10-xi	Light chain
13	35	111B10-zu	Heavy chain
14	36	111B10-zu	Light chain
15	37	201C15-xi	Heavy chain
16	38	201C15-xi	Light chain
17	39	201C15-zu	Heavy chain
18	40	201C15-zu	Light chain
19	41	346C6-xi	Heavy chain
20	42	346C6-xi	Light chain
21	43	346C6-zu	Heavy chain
22	44	346C6-zu	Light chain

[0047] m A b 可変領域をコードする核酸配列

[表3]

	SEQ ID NO	mAb	IgG chain
1	45	MORAb-003	Heavy chain
2	46	MORAb-003	Light chain
3	47	MORAb-009	Heavy chain
4	48	MORAb-009	Light chain
5	49	33011-xi	Heavy chain
6	50	33011-xi	Light chain
7	51	33011-zu	Heavy chain
8	52	33011-zu	Light chain
9	53	111B10-xi	Heavy chain
10	54	111B10-xi	Light chain
11	55	111B10-zu	Heavy chain
12	56	111B10-zu	Light chain
13	57	201C15-xi	Heavy chain
14	58	201C15-xi	Light chain
15	59	201C15-zu	Heavy chain
16	60	201C15-zu	Light chain
17	61	346C6-xi	Heavy chain
18	62	346C6-xi	Light chain
19	63	346C6-zu	Heavy chain
20	64	346C6-zu	Light chain

[0048] m A b K a b a t C D R の ア ミ ノ 酸 配 列

[表4]

	SEQ ID NO	mAb	IgG chain
1	2	MORAb-003	HC CDR1
2	3	MORAb-003	HC CDR2
3	4	MORAb-003	HC CDR3
4	7	MORAb-003	LC CDR1
5	8	MORAb-003	LC CDR2
6	9	MORAb-003	LC CDR3
7	65	MORAb-009	HC CDR1
8	66	MORAb-009	HC CDR2
9	67	MORAb-009	HC CDR3
10	68	MORAb-009	LC CDR1
11	69	MORAb-009	LC CDR2
12	70	MORAb-009	LC CDR3
13	71	trastuzumab	HC CDR1
14	72	trastuzumab	HC CDR2
15	73	trastuzumab	HC CDR3
16	74	trastuzumab	LC CDR1
17	75	trastuzumab	LC CDR2
18	76	trastuzumab	LC CDR3
19	77	33011-xi	HC CDR1
20	78	33011-xi	HC CDR2
21	79	33011-xi	HC CDR3
22	80	33011-xi	LC CDR1
23	81	33011-xi	LC CDR2
24	82	33011-xi	LC CDR3
25	83	33011-zu	HC CDR1
26	84	33011-zu	HC CDR2
27	85	33011-zu	HC CDR3
28	86	33011-zu	LC CDR1
29	87	33011-zu	LC CDR2
30	88	33011-zu	LC CDR3
31	89	111B10-xi	HC CDR1
32	90	111B10-xi	HC CDR2
33	91	111B10-xi	HC CDR3
34	92	111B10-xi	LC CDR1
35	93	111B10-xi	LC CDR2
36	94	111B10-xi	LC CDR3
37	95	111B10-zu	HC CDR1
38	96	111B10-zu	HC CDR2
39	97	111B10-zu	HC CDR3
40	98	111B10-zu	LC CDR1
41	99	111B10-zu	LC CDR2
42	100	111B10-zu	LC CDR3

	SEQ ID NO	mAb	IgG chain
43	101	201C15-xi	HC CDR1
44	102	201C15-xi	HC CDR2
45	103	201C15-xi	HC CDR3
46	104	201C15-xi	LC CDR1
47	105	201C15-xi	LC CDR2
48	106	201C15-xi	LC CDR3
49	107	201C15-zu	HC CDR1
50	108	201C15-zu	HC CDR2
51	109	201C15-zu	HC CDR3
52	110	201C15-zu	LC CDR1
53	111	201C15-zu	LC CDR2
54	112	201C15-zu	LC CDR3
55	113	346C6-xi	HC CDR1
56	114	346C6-xi	HC CDR2
57	115	346C6-xi	HC CDR3
58	116	346C6-xi	LC CDR1
59	117	346C6-xi	LC CDR2
60	118	346C6-xi	LC CDR3
61	119	346C6-zu	HC CDR1
62	120	346C6-zu	HC CDR2
63	121	346C6-zu	HC CDR3
64	122	346C6-zu	LC CDR1
65	123	346C6-zu	LC CDR2
66	124	346C6-zu	LC CDR3

[0049] m A b K a b a t C D R をコードする核酸配列

[表5]

	SEQ ID NO	mAb	IgG chain
1	125	MORAb-003	HC CDR1
2	126	MORAb-003	HC CDR2
3	127	MORAb-003	HC CDR3
4	128	MORAb-003	LC CDR1
5	129	MORAb-003	LC CDR2
6	130	MORAb-003	LC CDR3
7	131	MORAb-009	HC CDR1
8	132	MORAb-009	HC CDR2
9	133	MORAb-009	HC CDR3
10	134	MORAb-009	LC CDR1
11	135	MORAb-009	LC CDR2
12	136	MORAb-009	LC CDR3
13	137	33011-xi	HC CDR1
14	138	33011-xi	HC CDR2
15	139	33011-xi	HC CDR3
16	140	33011-xi	LC CDR1
17	141	33011-xi	LC CDR2
18	142	33011-xi	LC CDR3
19	143	33011-zu	HC CDR1
20	144	33011-zu	HC CDR2
21	145	33011-zu	HC CDR3
22	146	33011-zu	LC CDR1
23	147	33011-zu	LC CDR2
24	148	33011-zu	LC CDR3
25	149	111B10-xi	HC CDR1
26	150	111B10-xi	HC CDR2
27	151	111B10-xi	HC CDR3
28	152	111B10-xi	LC CDR1
29	153	111B10-xi	LC CDR2
30	154	111B10-xi	LC CDR3
31	155	111B10-zu	HC CDR1
32	156	111B10-zu	HC CDR2
33	157	111B10-zu	HC CDR3
34	158	111B10-zu	LC CDR1
35	159	111B10-zu	LC CDR2
36	160	111B10-zu	LC CDR3

	SEQ ID NO	mAb	IgG chain
37	161	201C15-xi	HC CDR1
38	162	201C15-xi	HC CDR2
39	163	201C15-xi	HC CDR3
40	164	201C15-xi	LC CDR1
41	165	201C15-xi	LC CDR2
42	166	201C15-xi	LC CDR3
43	167	201C15-zu	HC CDR1
44	168	201C15-zu	HC CDR2
45	169	201C15-zu	HC CDR3
46	170	201C15-zu	LC CDR1
47	171	201C15-zu	LC CDR2
48	172	201C15-zu	LC CDR3
49	173	346C6-xi	HC CDR1
50	174	346C6-xi	HC CDR2
51	175	346C6-xi	HC CDR3
52	176	346C6-xi	LC CDR1
53	177	346C6-xi	LC CDR2
54	178	346C6-xi	LC CDR3
55	179	346C6-zu	HC CDR1
56	180	346C6-zu	HC CDR2
57	181	346C6-zu	HC CDR3
58	182	346C6-zu	LC CDR1
59	183	346C6-zu	LC CDR2
60	184	346C6-zu	LC CDR3

[0050] m A b I M G T C D R の ア ミ ノ 酸 配 列

[表6]

	SEQ ID NO	mAb	IgG chain
1	13	MORAb-003	HC CDR1
2	14	MORAb-003	HC CDR2
3	15	MORAb-003	HC CDR3
4	16	MORAb-003	LC CDR1
5	17	MORAb-003	LC CDR2
6	18	MORAb-003	LC CDR3
7	185	MORAb-009	HC CDR1
8	186	MORAb-009	HC CDR2
9	187	MORAb-009	HC CDR3
10	188	MORAb-009	LC CDR1
11	189	MORAb-009	LC CDR2
12	190	MORAb-009	LC CDR3
13	191	trastuzumab	HC CDR1
14	192	trastuzumab	HC CDR2
15	193	trastuzumab	HC CDR3
16	194	trastuzumab	LC CDR1
17	195	trastuzumab	LC CDR2
18	196	trastuzumab	LC CDR3
19	197	33011-xi	HC CDR1
20	198	33011-xi	HC CDR2
21	199	33011-xi	HC CDR3
22	200	33011-xi	LC CDR1
23	201	33011-xi	LC CDR2
24	202	33011-xi	LC CDR3
25	203	33011-zu	HC CDR1
26	204	33011-zu	HC CDR2
27	205	33011-zu	HC CDR3
28	206	33011-zu	LC CDR1
29	207	33011-zu	LC CDR2
30	208	33011-zu	LC CDR3
31	209	111B10-xi	HC CDR1
32	210	111B10-xi	HC CDR2
33	211	111B10-xi	HC CDR3
34	212	111B10-xi	LC CDR1
35	213	111B10-xi	LC CDR2
36	214	111B10-xi	LC CDR3
37	215	111B10-zu	HC CDR1
38	216	111B10-zu	HC CDR2
39	217	111B10-zu	HC CDR3
40	218	111B10-zu	LC CDR1
41	219	111B10-zu	LC CDR2
42	220	111B10-zu	LC CDR3

	SEQ ID NO	mAb	IgG chain
43	221	201C15-xi	HC CDR1
44	222	201C15-xi	HC CDR2
45	223	201C15-xi	HC CDR3
46	224	201C15-xi	LC CDR1
47	225	201C15-xi	LC CDR2
48	226	201C15-xi	LC CDR3
49	227	201C15-zu	HC CDR1
50	228	201C15-zu	HC CDR2
51	229	201C15-zu	HC CDR3
52	230	201C15-zu	LC CDR1
53	231	201C15-zu	LC CDR2
54	232	201C15-zu	LC CDR3
55	233	346C6-xi	HC CDR1
56	234	346C6-xi	HC CDR2
57	235	346C6-xi	HC CDR3
58	236	346C6-xi	LC CDR1
59	237	346C6-xi	LC CDR2
60	238	346C6-xi	LC CDR3
61	239	346C6-zu	HC CDR1
62	240	346C6-zu	HC CDR2
63	241	346C6-zu	HC CDR3
64	242	346C6-zu	LC CDR1
65	243	346C6-zu	LC CDR2
66	244	346C6-zu	LC CDR3

[0051] m A b I M G T C D R をコードする核酸配列

[表7]

	SEQ ID NO	mAb	IgG chain
1	245	MORAb-003	HC CDR1
2	246	MORAb-003	HC CDR2
3	247	MORAb-003	HC CDR3
4	248	MORAb-003	LC CDR1
5	249	MORAb-003	LC CDR2
6	250	MORAb-003	LC CDR3
7	251	MORAb-009	HC CDR1
8	252	MORAb-009	HC CDR2
9	253	MORAb-009	HC CDR3
10	254	MORAb-009	LC CDR1
11	255	MORAb-009	LC CDR2
12	256	MORAb-009	LC CDR3
13	257	33011-xi	HC CDR1
14	258	33011-xi	HC CDR2
15	259	33011-xi	HC CDR3
16	260	33011-xi	LC CDR1
17	261	33011-xi	LC CDR2
18	262	33011-xi	LC CDR3
19	263	33011-zu	HC CDR1
20	264	33011-zu	HC CDR2
21	265	33011-zu	HC CDR3
22	266	33011-zu	LC CDR1
23	267	33011-zu	LC CDR2
24	268	33011-zu	LC CDR3
25	269	111B10-xi	HC CDR1
26	270	111B10-xi	HC CDR2
27	271	111B10-xi	HC CDR3
28	272	111B10-xi	LC CDR1
29	273	111B10-xi	LC CDR2
30	274	111B10-xi	LC CDR3
31	275	111B10-zu	HC CDR1
32	276	111B10-zu	HC CDR2
33	277	111B10-zu	HC CDR3
34	278	111B10-zu	LC CDR1
35	279	111B10-zu	LC CDR2
36	280	111B10-zu	LC CDR3

	SEQ ID NO	mAb	IgG chain
37	281	201C15-xi	HC CDR1
38	282	201C15-xi	HC CDR2
39	283	201C15-xi	HC CDR3
40	284	201C15-xi	LC CDR1
41	285	201C15-xi	LC CDR2
42	286	201C15-xi	LC CDR3
43	287	201C15-zu	HC CDR1
44	288	201C15-zu	HC CDR2
45	289	201C15-zu	HC CDR3
46	290	201C15-zu	LC CDR1
47	291	201C15-zu	LC CDR2
48	292	201C15-zu	LC CDR3
49	293	346C6-xi	HC CDR1
50	294	346C6-xi	HC CDR2
51	295	346C6-xi	HC CDR3
52	296	346C6-xi	LC CDR1
53	297	346C6-xi	LC CDR2
54	298	346C6-xi	LC CDR3
55	299	346C6-zu	HC CDR1
56	300	346C6-zu	HC CDR2
57	301	346C6-zu	HC CDR3
58	302	346C6-zu	LC CDR1
59	303	346C6-zu	LC CDR2
60	304	346C6-zu	LC CDR3

[0052] 全長mAb Ig鎖のアミノ酸配列

[表8]

	SEQ ID NO	mAb	IgG chain
1	1	MORAb-003	Heavy chain
2	6	MORAb-003	Light chain
3	305	MORAb-009	Heavy chain
4	306	MORAb-009	Light chain
5	307	trastuzumab	Heavy chain
6	308	trastuzumab	Light chain
7	309	33011-xi	Heavy chain
8	310	33011-xi	Light chain
9	311	33011-zu	Heavy chain
10	312	33011-zu	Light chain
11	313	111B10-xi	Heavy chain
12	314	111B10-xi	Light chain
13	315	111B10-zu	Heavy chain
14	316	111B10-zu	Light chain
15	317	201C15-xi	Heavy chain
16	318	201C15-xi	Light chain
17	319	201C15-zu	Heavy chain
18	320	201C15-zu	Light chain
19	321	346C6-xi	Heavy chain
20	322	346C6-xi	Light chain
21	323	346C6-zu	Heavy chain
22	324	346C6-zu	Light chain
23	347	trastuzumab	Heavy chain

[0053] 全長mAb Ig鎖をコードする核酸配列

[表9]

	SEQ ID NO	mAb	IgG chain
1	325	MORAb-003	Heavy chain
2	326	MORAb-003	Light chain
3	327	MORAb-009	Heavy chain
4	328	MORAb-009	Light chain
5	329	33011-xi	Heavy chain
6	330	33011-xi	Light chain
7	331	33011-zu	Heavy chain
8	332	33011-zu	Light chain
9	333	111B10-xi	Heavy chain
10	334	111B10-xi	Light chain
11	335	111B10-zu	Heavy chain
12	336	111B10-zu	Light chain
13	337	201C15-xi	Heavy chain
14	338	201C15-xi	Light chain
15	339	201C15-zu	Heavy chain
16	340	201C15-zu	Light chain
17	341	346C6-xi	Heavy chain
18	342	346C6-xi	Light chain
19	343	346C6-zu	Heavy chain
20	344	346C6-zu	Light chain

列挙した配列は、リーダー配列を含まない。

[0054] ADCは、上の表に列挙した重鎖及び軽鎖可変領域の任意のセット（例えば、MORAb-003重鎖及び軽鎖可変領域、またはトラスツズマブ重鎖及び軽鎖可変領域）、または重鎖及び軽鎖セットからの6つのCDR配列のセットを含んでよい。一部の実施形態では、ADCはさらに、ヒト重鎖及び軽鎖定常領域またはその断片を含む。例えば、ADCは、ヒトIgG重鎖定常領域（IgG1など）及びヒトカッパまたはラムダ軽鎖定常領域を含んでよい。抗体部分は、ヒト免疫グロブリンGサブタイプ1（IgG1）重鎖定常領域をヒトIgカッパ軽鎖定常領域と共に含む。

[0055] ADCが標的とするがん抗原は、葉酸受容体アルファ（FRA）であり得る。

[0056] 抗FRA抗体またはその抗原結合性断片は、Kabataナンバリングシステムにより定義される、3つの重鎖CDR（配列番号2で表される重鎖CD

R 1、配列番号 3 で表される重鎖 C D R 2、配列番号 4 で表される重鎖 C D R 3) 及び 3 つの軽鎖 C D R (配列番号 7 で表される軽鎖 C D R 1、配列番号 8 で表される軽鎖 C D R 2、及び配列番号 9 で表される軽鎖 C D R 3) を含んでもよい。

[0057] また、抗 F R A 抗体またはその抗原結合性断片は、I M G T ナンバリングシステムにより定義される、3 つの重鎖 C D R (配列番号 1 3 で表される重鎖 C D R 1、配列番号 1 4 で表される重鎖 C D R 2、配列番号 1 5 で表される重鎖 C D R 3) 及び 3 つの軽鎖 C D R (配列番号 1 6 で表される軽鎖 C D R 1、配列番号 1 7 で表される軽鎖 C D R 2、及び配列番号 1 8 で表される軽鎖 C D R 3) を含んでもよい。

[0058] 様々な実施形態で、抗 F R A 抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 2 3 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 2 4 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗 F R A 抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 2 3 で表される重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号 2 4 で表される軽鎖可変領域アミノ酸配列、または上述の配列に対して少なくとも 9 5 % 同一である配列を含む。一部の実施形態では、抗 F R A 抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 2 3 に対して少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一である重鎖可変領域アミノ酸配列、及び配列番号 2 4 に対して少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一である軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する。

[0059] 抗 F R A 抗体は、ヒト I g G 1 重鎖定常領域をヒト I g カッパ軽鎖定常領域と共に含み得る。

[0060] 抗 F R A 抗体は、配列番号 1 で表される重鎖アミノ酸配列または配列番号 1 に対して少なくとも 9 5 % 同一である配列、及び配列番号 6 で表される軽鎖アミノ酸配列または配列番号 6 に対して少なくとも 9 5 % 同一である配列

を含む。特定の実施形態では、抗体は、配列番号 1 で表される重鎖アミノ酸配列及び配列番号 6 で表される軽鎖アミノ酸配列、または上述の配列に対して少なくとも 95% 同一である配列を含む。一部の実施形態では、抗 F R A 抗体は、配列番号 1 に対して少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一である重鎖アミノ酸配列及び／または配列番号 6 に対して少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一である軽鎖アミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、抗 F R A 抗体は、配列番号 1 1（リーダー配列をコードするヌクレオチドを含む）または配列番号 3 2 5（リーダー配列をコードするヌクレオチドを含まない）で表されるヌクレオチド配列によりコードされる重鎖、及び配列番号 1 2（リーダー配列をコードするヌクレオチドを含む）または配列番号 3 2 6（リーダー配列をコードするヌクレオチドを含まない）で表されるヌクレオチドによりコードされる軽鎖を含む。一部の実施形態では、重鎖アミノ酸配列は、C 末端リシンを欠失している。様々な実施形態で、抗 F R A 抗体は、ブダペスト条約に従った条項下で、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（A T C C、10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209）に 2006 年 4 月 24 日に受託番号 P T A-7552 で寄託された細胞系により産生される抗体のアミノ酸配列、または重鎖 C 末端リシンを欠失したそのような配列を有する。様々な実施形態で、抗 F R A 抗体は、M O R A b-003（U S A N 名：ファルレツズマブ）（Ebel et al. (2007) Cancer Immunity 7:6）、またはその抗原結合性断片である。

[0061] A D C が標的とするがん抗原は、ヒト上皮成長因子受容体 2（h e r 2）であり得る。

[0062] 抗 h e r 2 抗体またはその抗原結合性断片は、K a b a t ナンバリングシステムにより定義される、3 つの重鎖 C D R（配列番号 7 1 で表される重鎖 C D R 1、配列番号 7 2 で表される重鎖 C D R 2、配列番号 7 3 で表される重鎖 C D R 3）及び 3 つの軽鎖 C D R（配列番号 7 4 で表される軽鎖 C D R 1、配列番号 7 5 で表される軽鎖 C D R 2、及び配列番号 7 6 で表される軽

鎖CDR3)を含んでもよい。

[0063] 抗h e r 2抗体またはその抗原結合性断片は、IMGTナンバリングシステムにより定義される、3つの重鎖CDR（配列番号191で表される重鎖CDR1、配列番号192で表される重鎖CDR2、配列番号193で表される重鎖CDR3）及び3つの軽鎖CDR（配列番号194で表される軽鎖CDR1、配列番号195で表される軽鎖CDR2、及び配列番号196で表される軽鎖CDR3）を含んでもよい。

[0064] 様々な実施形態で、抗h e r 2抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号27で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号28で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか、または配列番号347で表されるアミノ酸配列を含む重鎖領域、及び配列番号308で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。一部の実施形態では、抗h e r 2抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号27で表される重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号28で表される軽鎖可変領域アミノ酸配列、または上述の配列に対して少なくとも95%同一である配列を含む。一部の実施形態では、抗h e r 2抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号27に対して少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である重鎖可変領域アミノ酸配列及び／または配列番号28に対して少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する。

[0065] 抗h e r 2抗体は、ヒトIgG1重鎖定常領域及びヒトIgカッパ軽鎖定常領域を含み得る。

[0066] 様々な実施形態で、抗h e r 2抗体は、配列番号307で表される重鎖アミノ酸配列または配列番号307に対して少なくとも95%同一である配列、及び配列番号308で表される軽鎖アミノ酸配列または配列番号308に対して少なくとも95%同一である配列を含む。特定の実施形態では、抗体は、配列番号307で表される重鎖アミノ酸配列及び配列番号308で表される軽鎖アミノ酸配列、または上述の配列に対して少なくとも95%同一で

ある配列を含む。一部の実施形態では、抗h e r 2抗体は、配列番号307に対して少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である重鎖アミノ酸配列、及び配列番号308に対して少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である軽鎖アミノ酸配列を有する。様々な実施形態で、抗h e r 2抗体は、トラスツズマブ、またはその抗原結合性断片である。

[0067] 様々な実施形態で、抗F R A抗体またはその抗原結合性断片は、M O R A b - 003の3つの重鎖C D R及び3つの軽鎖C D Rを含むか、または重鎖C D R 1 (K a b a t 定義による配列番号2、またはI M G T 定義による配列番号13)、重鎖C D R 2 (K a b a t 定義による配列番号3、またはI M G T 定義による配列番号14)、重鎖C D R 3 (K a b a t 定義による配列番号4、またはI M G T 定義による配列番号15)、軽鎖C D R 1 (K a b a t 定義による配列番号7、またはI M G T 定義による配列番号16)、軽鎖C D R 2 (K a b a t 定義による配列番号8、またはI M G T 定義による配列番号17)、及び軽鎖C D R 3 (K a b a t 定義による配列番号9、またはI M G T 定義による配列番号18)に対して1つ以下、2つ以下、3つ以下、4つ以下、5つ以下、または6つ以下のアミノ酸を付加、欠失または置換したアミノ酸配列を含む。

[0068] 様々な他の実施形態では、抗h e r 2抗体またはその抗原結合性断片は、トラスツズマブの3つの重鎖C D R及び3つの軽鎖C D Rを含むか、または重鎖C D R 1 (K a b a t 定義による配列番号71、またはI M G T 定義による配列番号191)、重鎖C D R 2 (K a b a t 定義による配列番号72、またはI M G T 定義による配列番号192)、重鎖C D R 3 (K a b a t 定義による配列番号73、またはI M G T 定義による配列番号193)、軽鎖C D R 1 (K a b a t 定義による配列番号74、またはI M G T 定義による配列番号194)、軽鎖C D R 2 (K a b a t 定義による配列番号75、またはI M G T 定義による配列番号195)、及び軽鎖C D R 3 (K a b a t 定義による配列番号76、またはI M G T 定義による配列番号196)に

対して1つ以下、2つ以下、3つ以下、4つ以下、5つ以下、または6つ以下のアミノ酸を付加、欠失または置換したアミノ酸配列を含む。

[0069] 様々な実施形態で、アミノ酸置換は、単一の残基の置換である。挿入は通常、約1～約20アミノ酸残基ほどであるが、生物学的機能（例えば、FRAまたはher2への結合）が維持される限り、かなりより大きな挿入も許容され得る。欠失は通常、約1～約20アミノ酸残基の範囲であるが、場合によっては、欠失は、もっと大きくてもよい。置換、欠失、挿入、またはその任意の組合せを、最終誘導体またはバリエーションに到達するために使用してもよい。一般に、これらの変化は、分子、特に、免疫原性及び抗原結合性タンパク質の特異性の改変を最小化するために、僅かなアミノ酸で行われる。しかしながら、より大きな変化が、ある種の状況では許容され得る。保存的置換は一般に、表10のとおり示される次のチャートに従って成される。

[0070] [表10]

元の残基	例示的な置換
Ala	...
Arg	...
Asn	...
Asp	...
Cys	...
Gln	...
Glu	...
Gly	...
His	...
Ile	...
Leu	...
Lys	...
Met	...
Phe	...
Ser	...
Thr	...
Trp	...
Tyr	...
Val	...

[0071] 表10に示されているものよりも保存性が低い置換を選択することにより

、機能または免疫同一性を実質的に変化させる。例えば、変化領域でのポリペプチド主鎖の構造、例えば、 α -ヘリックスまたは β -シート構造、標的部位での分子の電荷もしくは疎水性；または側鎖の嵩に、より著しい影響を及ぼす置換を行ってもよい。一般に、ポリペプチドの特性に最大の変化をもたらすと予測される置換は、以下の（a）～（d）である。

（a）親水性アミノ酸残基（例えば、S e rまたはT h r）が、疎水性アミノ酸残基（例えば、L e u、I l e、P h e、V a lまたはA l a）によって置き換えられる。

（b）C y sまたはP r oが、任意の他の残基によって置き換えられる。

（c）電気陽性の側鎖を有するアミノ酸残基（例えば、L y s、A r gまたはH i s）が、電気陰性のアミノ酸残基（例えば、G l nまたはA s n）によって置き換えられる。

（d）嵩高な側鎖を有する残基（例えば、P h e）が、側鎖を有さないアミノ酸（例えば、G l y）によって置き換えられる。

[0072] 様々な実施形態において、バリエーション抗体配列がADCで使用されている場合、そのバリエーションは典型的には、同じ定性生物学的活性を示し、同じ免疫応答を誘導するが、必要な場合には、抗原結合性タンパク質の特徴を変更するように、バリエーションを選択することもできる。別法では、抗原結合性タンパク質の生物学的活性を変更するように、バリエーションを設計してもよい。例えば、グリコシル化部位を、本明細書において検討したとおり、変更または除去してもよい。

[0073] 本実施形態に係るADCにおいては、がん細胞を標的とするために様々な抗体を使用してよい。抗体が指向し、健康な細胞上ではなく、腫瘍細胞上に発現されるか、または健康な細胞上においてよりも高いレベルで腫瘍細胞上に発現される適切な抗原は、当技術分野で公知である。これらの抗体を、本明細書において開示するリンカー及びエリブリンと共に使用することができる。

[0074] ADCの抗体部分は、M O R A b - 0 0 3などのF R A標的化抗体部分で

あり得る。一部の実施形態では、本開示のリンカー及びエリブリンは、複数の異なる腫瘍標的化抗体で意外にも有効であり得る。ADCの抗体部分がMORAb-003などのFRA標的化抗体部分である場合、ADCは、薬物：抗体比、腫瘍標的化、バisstunder死滅、処置有効性の具体的な改善、及びオフターゲット死滅の減少をもたらし得る。処置有効性の改善は、インビトロまたはインビボで測定することができ、腫瘍増殖速度の減少及び／または腫瘍体積の減少を含み得る。

[0075] ADCの抗体部分がトラスツズマブなどのHER2標的化抗体部分である場合、これらの好ましい機能特性の一部または全部が観察される。また、ADCの抗体部分は、トラスツズマブなどのHER2標的化抗体部分であり得る。さらに、ADCの抗体部分がMORAb-009などのMSLN標的化抗体部分である場合、これらの好ましい機能特性の一部または全部が観察される。

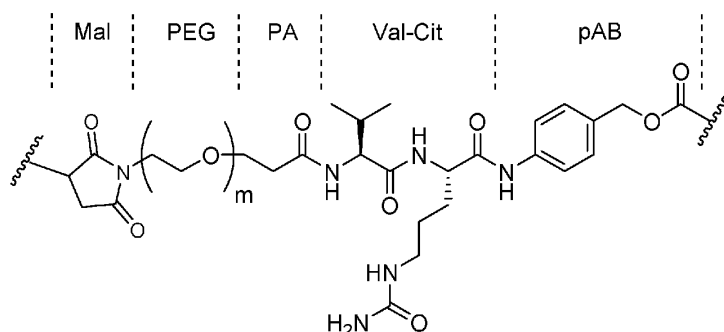
[0076] 一部の実施形態では、遊離システイン残基を、抗体部分のアミノ酸配列に導入する。例えば、親抗体のアミノ酸配列中の1個または複数のアミノ酸がシステインで置き換えられた抗体（システイン改変抗体）を調製することができる。例えば、親Fab抗体の断片に上述のようにシステインを導入して、システイン改変Fab抗体（「ThioFab」ともいう。）を形成することができる。同様にして、親モノクローナル抗体にシステインを導入して、システイン改変モノクローナル抗体（「ThioMab」ともいう。）を形成することができる。単一部位変異は、ThioFabでは単一の改変システイン残基をもたらす、単一の部位変異は、IgG抗体の二量体の性質により、ThioMabでは2個の改変システイン残基をもたらす。親ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーションをコードするDNAは、当技術分野で公知の様々な方法（例えば、WO2006/034488に記載の方法）により調製することができる。これらの方法には、これらだけに限定されないが、ポリペプチドをコードする当初に調製されたDNAの部位特異的（またはオリゴヌクレオチド媒介性）変異誘発、PCR変異誘発、及びカセット変異誘

発による調製が含まれる。組換え抗体のバリエーションはまた、制限断片改変によっても、または合成オリゴヌクレオチドとのオーバーラップ伸長PCRによっても構築することができる。式IのADCは、これらだけに限定されないが、1、2、3、または4個の改変システインを有する抗体を含む（Lyon et al. (2012) *Methods Enzymol.* 502: 123-38）。一部の実施形態では、1個または複数の遊離システイン残基が抗体部分にすでに存在している場合、改変を行うことなく、既存の遊離システイン残基を使用して、抗体部分をエリブリンにコンジュゲートさせることができる。

[0077] 2. リンカー部分

本実施形態におけるリンカー部分は、以下の化学構造を有し、抗体部分に隣接する側から、マレイミドユニット（Mal）、オキシエチレンユニット（PEG）、プロピオン酸ユニット（PA）、アミノ酸ユニット（Val-Cit）、及び、自壊性ユニット（pAB：p-アミノベンジルオキシカルボニル）の5つのユニットで構成される。

[化7]



[0078] リンカー部分は、十分に治療上有効であるように、細胞外で安定している。一部の実施形態では、リンカー部分は、細胞外で安定しているので、ADCは、細胞外条件で存在する場合（例えば、細胞への輸送または送達前）にはインタクトなままである。ADCの文脈で使用される「インタクト」という用語は、抗体部分がエリブリンに結合したままであることを意味する。本明細書で使用する場合、ADCの文脈での「安定な」という用語は、ADCが細胞外条件下に存在する場合に、ADCのサンプル中の20%以下、約1

5%以下、約10%以下、約5%以下、約3%以下、または約1%以下のリンカー（またはその間の任意のパーセンテージ）が切断されていること（または、全ADCが別段にインタクトではないケース）を意味する。

[0079] リンカー部分が細胞外で安定であるかどうかは、例えば、ADCを血漿中に所定の期間（例えば、2、4、6、8、16、または24時間）にわたって入れ、次いで、血漿中に存在する遊離の薬物部分の量を定量化することにより決定することができる。安定性は、ADC期間が標的腫瘍細胞に局在化することを可能にし、正常及び腫瘍組織の両方に無差別に損傷を与えることによりADCの治療指数を低下させるであろう薬物の早期放出を防ぐことができる。リンカー部分は、標的細胞の外側では安定しているが、細胞の内側では、ADCからエリブリンを放出するので、エリブリンはその標的（例えば、微小管）に結合することができる。したがって、本実施形態に係るリンカー部分は、（i）抗体部分の特異的結合特性を維持し、（ii）抗体部分への安定な結合を介してエリブリンの送達、例えば、細胞内送達を可能にし、（iii）ADCがその標的部位に輸送または送達されるまで安定していて、かつインタクトなままであり、及び（iv）切断後のエリブリンの治療効果、例えば、細胞傷害効果を可能にする。

[0080] リンカーの切断が、細胞内環境で抗体部分からエリブリンを十分に放出して、エリブリンを活性化し、かつ／またはエリブリンを治療上有効にするように、リンカーは、細胞内条件下で切断可能である。一部の実施形態では、エリブリンは、ADCがその抗体部分に特異的な抗原を発現する細胞に進入するまで、抗体部分から切断されず、細胞に進入すると、エリブリンが抗体部分から切断される。一部の実施形態では、リンカーは、切断されると、エリブリンに結合したままになっているリンカーの一部または抗体部分がないように配置されている切断可能な部分を含む。

[0081] リンカー部分は、バリナーシトルリン（Val-Cit）のアミノ酸ユニットを含む。バリナーシトルリン（Val-Cit）のアミノ酸ユニットは、細胞内環境（例えば、リソソームまたはエンドソームまたはカベオラ内）に存在する切断作

用物質（例えば、細胞内ペプチダーゼ、プロテアーゼ酵素）により切断可能である。カテプシン（例えば、カテプシンB、C、F、H、K、L、O、S、V、X、及びW）などのペプチダーゼは、バリンーシトルリン（Val-Cit）配列、アラニンーアラニンーアスパラギン（Ala-Ala-Asn）配列を切断可能である（Dubowchik et al. (2002) Bioconjugate Chem, 13: 855-69）。ADCは、標的細胞内において酵素によりリンカー部分が切断され、抗体側とエリブリン側に分離される。Val-Citを含むADCは、代替のアミノ酸ユニット（例えば、Gly-Gly）を含むADCと比べて、安定性の上昇、オフターゲットな細胞死滅の減少、標的上の細胞死滅の増加、低い凝集レベル及び／または高い薬物負荷を可能とし得る。

[0082] シトルリンとエリブリンはp-アミノベンジルオキシカルボニル（pAB）を介して連結しており、具体的にはp-アミノベンジルオキシカルボニルのアミノ基がシトルリンとアミド結合し、カルボニル基がエリブリン上の1級アミン（C-35アミン）と共有結合している。p-アミノベンジルオキシカルボニルは自壊性（self-immolative）である。理論に束縛されることはないが、pABの自壊は、自発的な1, 6-除去反応に関係すると考えられる（Jain et al. (2015) Pharm. Res. 32: 3526-40）。ADCのリンカー部分（例えば、Val-Cit）が標的細胞内で切断されると、自壊性ユニット（pAB）が自壊することにより、エリブリン側に余分な官能基を残すことなく、非修飾エリブリンを放出することができる。

[0083] 自壊ケミストリーは、当技術分野で公知であり、本開示のADCのために容易に選択され得る。様々な実施形態で、リンカー内の切断可能な部分を薬物部分（例えば、エリブリン）に結合するスペーサーユニットは、自壊性であり、細胞内条件下での切断可能な部分の切断と同時に、またはその直前／直後に自壊する。

[0084] 一方、バリンと抗体Abの間には、マレイミドユニット（Mal）、オキシエチレンユニット（PEG）、及び、プロピオン酸ユニット（PA）が配置される。マレイミドの α , β -不飽和カルボニルは、抗体中のシステイン

残基（特にスルフヒドリル基（ $-SH$ ））と反応性を有しており、抗体にリンカー部分とエリブリンを結合する役割を果たす。リンカー部分がマレイミドユニットを有し、これを介して抗体と連結することにより、抗体の薬物負荷（ p ：抗体部分1つ当たりのエリブリンの数）をより高めることができる。

[0085] オキシエチレンユニット（PEG）は、1個又は2個以上のオキシエチレン基からなるユニットであり、実質的に親水性である。エリブリンが多剤耐性（MDR）または機能的に同様の輸送体により抵抗性がん細胞から排出される程度を低下させることができる。一部の実施形態では、リンカー部分は、短いPEGリンカーであり、長いPEGリンカーよりも、安定性の改善及び凝集の減少をもたらす。式（1）において、オキシエチレン基の数は m で示され、 m は1～10の整数である。 m は、好ましくは2である。 m がより小さい整数であると、リンカー部分の長さは短くなるが、より長いリンカー部分（例えば、 m が8である。）を有するADCと比べて、低い凝集レベル及び／または高い薬物負荷を可能とし得る。

[0086] 一部の実施形態では、切断可能なペプチド部分を含むADCは、代替の切断可能な部分を含むADCに対して、低い凝集レベル、抗体：薬物比の改善、がん細胞のオンターゲット死滅の増加、非がん細胞のオフターゲット死滅の減少、及び／または高い薬物負荷（ p ）を実証する。一部の実施形態では、切断可能な部分の付加は、切断不可能なリンカーに対して、細胞傷害性及び／または効力を上昇させる。一部の実施形態では、効力及び／または細胞傷害性の上昇は、ADCの抗体部分により標的とされる抗原を中等度のレベルで発現するがん（例えば、中等度のFRA発現）において観察され得る。一部の実施形態では、切断可能なペプチド部分は、酵素により切断可能であり、リンカーは、酵素切断可能なリンカーである。一部の実施形態では、酵素は、カテプシンであり、リンカーは、カテプシン切断可能なリンカーである。特定の実施形態では、酵素切断可能なリンカー（例えば、カテプシン切断可能なリンカー）は、代替の切断機構と比較すると、上述の改善される特

性の1つまたは複数を示す。

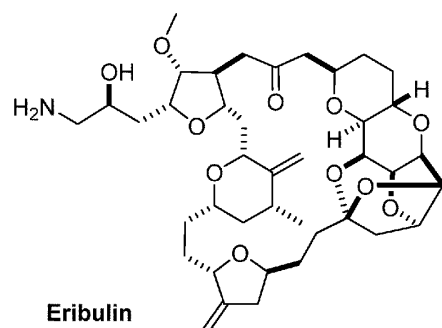
- [0087] また、リンカー部分は、ADCの物理化学的特性に影響を及ぼし得る。多くの細胞傷害性薬物が本来は疎水性であるので、それらを追加の疎水性部分を有する抗体と結合すると、凝集をもたらし得る。ADC凝集物は不溶性であり、多くの場合には、抗体上で達成可能な薬物負荷を制限し、ひいてはADCの効力にマイナスの影響を及ぼし得る。生物製剤のタンパク質凝集は一般に、免疫原性の上昇にもつながっている。本実施形態に係るリンカーは、低い凝集レベル及び望ましいレベルの薬物負荷を有するADCをもたらす。
- [0088] 様々な実施形態で、リンカーは、細胞内在化、細胞内在化の後の切断、及びリンカー-エリブリン及び／またはエリブリンのみの隣接細胞への拡散によるバースタンダー死滅（隣接細胞の死滅）を促進するように設計される。一部の実施形態では、リンカーは、標的組織へのADC結合、及びADCの抗体部分により標的とされる抗原を発現しないが、抗原を発現する標的がん組織を囲んでいるがん性組織のバースタンダー死滅を維持しつつ、細胞外環境での切断を最小化し、それにより、オフターゲット組織（例えば、非がん性組織）への毒性を低下させるように設計されている。本実施形態に係るリンカー部分は、これらの機能的特徴を得る際に、例えば、MORAb-003などの抗FRA抗体部分及びエリブリンなどの薬物部分を接続する場合に、特に有効である。一部の実施形態では、これらの機能的特徴のうちの少なくとも一部はまた、抗FRA抗体部分を伴わずに、及び／またはMORAb-003を伴わずに観察され得る。本実施形態に係るリンカー部分は、これらの機能的特徴の一部または全部を得る際に、例えば、トラストズマブなどの抗HER2抗体部分及びエリブリンなどの薬物部分を接続する場合に、有効である。
- [0089] ADCは、特に、MORAb-003またはその抗原結合性断片などの抗FRA抗体と対合した場合に、望ましい特性の特定の組合せを実証することが発見された。これらの特性には、これらだけに限定されないが、他のリンカー-エリブリン及び／または抗体部分を使用するADCとすべて比較する

と、薬物負荷の有効なレベル（ $p \geq 4$ ）、低い凝集レベル、貯蔵条件下または身体循環中の場合の安定性（例えば、血清安定性）、非コンジュゲート抗体と比較可能な標的発現性細胞への親和性の維持、標的発現性細胞に対する強力な細胞傷害性、低レベルのオフターゲット細胞死滅、高レベルのバイスタンダー死滅、及び／または有効なインビボ抗がん活性が含まれる。

[0090] 3. エリブリン

本明細書において、エリブリンは、海綿*Halichondria okadae*から単離された大環状化合物ハリコンドリンBの合成類似体を指す。エリブリンは、微小管ダイナミクス阻害薬であり、チューブリンに結合し、有糸分裂紡錘体の構築を阻害することによりG2/M期での細胞周期の停止を誘導すると考えられる。「エリブリンメシル酸塩」という用語は、エリブリンのメシル酸塩を指し、これは、商品名Halaven（商標）で販売されている。本実施形態に係るADCにおいて、エリブリンは、その1級アミノ基を介してADCのリンカーに結合している。

[化8]



[0091] 4. 抗体-薬物コンジュゲート（ADC）

本実施形態に係るADCは、エリブリンが上述のリンカー部分を介して抗体部分に結合している。抗体部分は、例えば、抗FRA抗体、抗メソテリン抗体やトラストズマブなどの抗HER2抗体であり得る。

[0092] 本実施形態に係るADCは、細胞傷害性または細胞増殖抑制薬剤の有効な用量をがん細胞または腫瘍組織に選択的に送達することができる。ADCは、各標的抗原（例えば、FRAまたはHER2）を発現する細胞に対して、

強力な細胞傷害性及び／または細胞増殖抑制活性を有することが発見されている。一部の実施形態では、ADCの細胞傷害性及び／または細胞増殖抑制活性は、細胞における標的抗原発現レベルに依存する。一部の実施形態では、本開示のADCは、同じ抗原を低レベルで発現するがん細胞と比較すると、標的抗原を中等度のレベルで発現するがん細胞を死滅させるのに特に有効である。

[0093] 「がん」という用語は、細胞集団が未制御の細胞成長により特徴づけられる、哺乳類における生理学的状態を指す。がんの例には、これらだけに限定されないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれる。そのようながんのより特定の例には、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌（例えば、三重陰性乳癌）、骨肉腫、黒色腫、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜（例えば、漿液性）または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、及び様々な種類の頭頸部癌が含まれる。三重陰性乳癌は、エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）、またはHer2/neuのための遺伝子の発現について陰性である乳癌を指す。

[0094] 「腫瘍」という用語は、前がん性病変を含む、良性または悪性のいずれかの過剰な細胞成長または増殖から生じる組織の任意の塊を指す。

[0095] 「がん細胞」及び「腫瘍細胞」という用語は、非腫瘍発生性細胞及びがん幹細胞の両方を含めて、腫瘍に由来する個々の細胞または細胞の全集団を指す。本明細書で使用する場合、「腫瘍細胞」という用語は、がん幹細胞からそれらの腫瘍細胞を識別するために、再生及び分化する能力を欠いた腫瘍細胞のみを指す場合には、「非腫瘍発生性」という用語により修飾される。

[0096] 例示的な高FRA発現性がんには、これらだけに限定されないが、卵巣癌（例えば、漿液性卵巣癌、明細胞卵巣癌）、肺類癌、三重陰性乳癌、子宮内膜がん、及び非小細胞肺癌（例えば、腺癌）が含まれる。例示的な中等度FRA発現性がんには、これらだけに限定されないが、胃癌及び結腸直腸癌が

含まれる。例示的な低 F R A 発現性がんには、これらだけに限定されないが、黒色腫及びリンパ腫が含まれる。例示的な高 h e r 2 発現性がんには、これらだけに限定されないが、乳癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、及び子宮内膜癌が含まれる。例示的な中等度 h e r 2 発現性がんには、これらだけに限定されないが、肺癌及び膀胱癌が含まれる。

[0097] 「阻害する」または「阻害」という用語は、本明細書で使用する場合、測定可能な量で減少させることを意味し、完全な防止または阻害を含み得るが、それを必要としない。

[0098] 本明細書において、A D C の「有効量」は、具体的に述べられる目的を果たすために、例えば、腫瘍増殖速度または腫瘍体積の減少、がんの症候の減少、または処置有効性の多少の他の徴候など、投与後に治療効果を生じさせるために十分な量である。有効量は、述べられている目的に関連して日常的な手法で決定することができる。「治療有効量」という用語は、対象において疾患または障害を処置するために有効な A D C の量を指す。がんの場合、A D C の治療有効量は、がん細胞の数を減少させる、腫瘍サイズを減少させる、腫瘍転位を阻害する（例えば、減速させる、または停止させる）、腫瘍増殖を阻害する（例えば、減速させる、または停止させる）、及び／または 1 つもしくは複数の症状を軽減することができる。「予防有効量」は、必要な投薬量で、必要な期間にわたって、所望の予防結果を達成するために有効な量を指す。典型的には、予防用量を対象において疾患前に、または疾患の早期段階で使用するので、予防有効量は、治療有効量未満となる。

[0099] 本明細書で使用する場合、「処置するために」または「治療上の」及び文法的に関連する用語は、生存の持続、より低い罹患率、及び／または代替の治療モダリティの副産物である副作用の緩和など、疾患の何らかの予後の何らかの改善を指す。当技術分野では容易に分かるとおり、疾患の完全な根絶が好ましいが、処置作用の要件ではない。「処置」または「処置する」は、本明細書で使用する場合、対象、例えば、患者への記載の A D C の投与を指す。処置は、障害、障害の症状または障害、例えば、がんに対する素因を治

療する、治癒させる、和らげる、軽減する、変更する、矯正する、向上する、緩和する、改善する、またはそれに影響を及ぼすためであってよい。

[0100] 一部の実施形態では、標識ADCを使用する。適切な「標識」には、放射性核種、酵素、基質、補因子、阻害薬、蛍光部分、化学発光部分、磁気粒子などが含まれる。

[0101] 「タンパク質」とは、本明細書で使用する場合、少なくとも2個の共有結合したアミノ酸を意味する。この用語は、ポリペプチド、オリゴペプチド、及びペプチドを含む。一部の実施形態では、2個またはそれ以上の共有結合したアミノ酸は、ペプチド結合により結合している。例えば、タンパク質が発現系及び宿主細胞を使用して組換えで作製されている場合、タンパク質は、天然に存在するアミノ酸及びペプチド結合から構成されてもよい。別法では、タンパク質には、合成アミノ酸（例えば、ホモフェニルアラニン、シトルリン、オルニチン、及びノルロイシン）、またはペプチド模倣構造、すなわち、「ペプチドまたはタンパク質類似体」、例えば、ペプトイドが含まれ得る。ペプトイドは、その側鎖が、（アミノ酸においてのとおり） α -炭素ではなく、ペプチド主鎖の窒素原子に付いていて、かつペプチドと比較して異なる水素結合及び配座異性特徴を有する、ペプチド模倣物質の例示的な群である（例えば、Simon et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367を参照されたい）。したがって、ペプトイドは、タンパク質分解または他の生理学的または貯蔵条件に対して抵抗性であり得、かつ細胞膜を透過するという点では有効であり得る。特に、抗体が当技術分野で周知の慣用の方法により、インビトロで合成される場合に、そのような合成アミノ酸を組み込むことができる。加えて、ペプチド模倣物質、合成及び天然に存在する残基／構造のいずれの組合せも使用することができる。「アミノ酸」には、イミノ酸残基、例えば、プロリン及びヒドロキシプロリンも含まれる。アミノ酸「R基」または「側鎖」は、（L）-または（S）-配置のいずれであってもよい。具体的な一実施形態では、アミノ酸は、（L）-または（S）-配置である。

- [0102] 「組換えタンパク質」は、当技術分野で公知の任意の技術及び方法を使用する組換え技術を使用して、すなわち、組換え核酸の発現により作製されたタンパク質である。組換えタンパク質を生成するための方法及び技術は、当技術分野で周知である。
- [0103] 「単離された」タンパク質は、例えば、所与のサンプル中の全タンパク質の少なくとも約5重量%、または少なくとも約50重量%を構成する、その天然状態で通常は付随する物質の少なくとも一部を随伴しない。単離されたタンパク質が、状況に応じて、全タンパク質含分の5～99.9重量%を構成することがあることは理解される。例えば、タンパク質は、タンパク質が高い濃度レベルで作製されるように、誘導性プロモーターまたは高発現プロモーターの使用により、かなり高い濃度で作製され得る。この定義は、当技術分野で公知である広範囲の様々な生体及び／または宿主細胞における抗体の生産を含む。
- [0104] アミノ酸配列における配列同一性及び／または類似性は、これらだけに限定されないが、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482に記載の局所配列同一性アルゴリズム、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443に記載の配列同一性アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 2444に記載の類似性検索の方法、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実装 (Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.)におけるGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA)、Devereux et al. (1984) Nucl. Acid Res. 12: 387-95に記載のBest Fit配列プログラムを含む、当技術分野で公知の標準的な技術を使用して、好ましくは、デフォルト設定を使用するか、または検査により、決定することができる。同一性パーセントは、“Current Methods in Sequence Comparison and Analysis”, Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp.127-149 (1988), Alan R. Liss, Incを参照して計算してもよく、好ましくは、FastDBにより次のパラメーターに基づき計

算する。

ミスマッチペナルティ： 1

ギャップペナルティ： 1

ギャップサイズペナルティ： 0.33

接続ペナルティ： 30

[0105] 有用なアルゴリズムの例は、P I L E U Pである。P I L E U Pは、プログレッシブペアワイズアラインメント (progressive pairwise alignment) を使用して、関連する配列の群から複数の配列アラインメントを作製する。これは、アラインメントを作製するために使用されるクラスタリング関係を示す系統樹もプロットすることができる。PILEUPは、Feng & Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35: 351-60のプログレッシブアラインメント法の単純化を使用し；この方法は、Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151-3により記載された方法と類似している。有用なP I L E U Pパラメーターは、デフォルトギャップ重量=3.00、デフォルトギャップ長重量=0.10、重量末端ギャップを含む。

[0106] 有用なアルゴリズムの別の例は、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402、及びKarin et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-87に記載されているB L A S Tアルゴリズムである。特に有用なB L A S Tプログラムは、Altschul et al. (1996) Methods in Enzymology 266: 460-80から得られたW U - B L A S T - 2プログラムである。W U - B L A S T - 2は、複数の検索パラメーターを使用し、その多くはデフォルト値に設定されている。調節可能なパラメーターは、オーバーラップスパン=1、オーバーラップフラクション=0.125、ワード閾値 (T) = 11で設定される。H S P S及びH S P S 2パラメーターは、動的な値であり、目的の配列が検索されている特定の配列の組成及び特定データベースの組成にそれ自身が依存するプログラムにより確立されるが；しかしながら、その値を、感度を増加させるために調節してもよい。

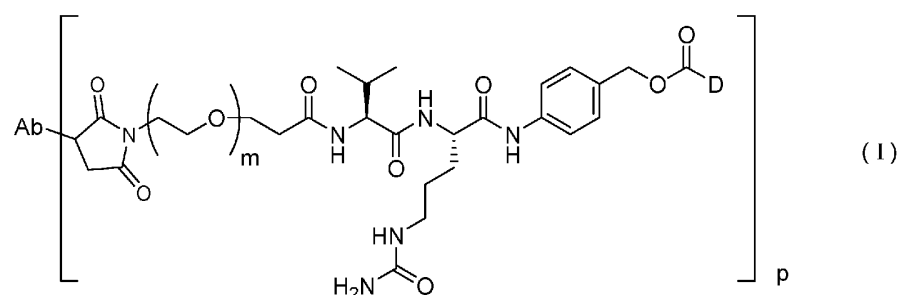
- [0107] 追加の有用なアルゴリズムは、Altschul et al. (1993) Nucl. Acids Res. 25: 3389-402により報告されているとおりのギャップBLASTである。ギャップBLASTは、BLOSUM-62置換スコア；9に設定された閾値Tパラメーター；ギャップなしの伸長を開始させるための2ヒット法、ギャップ長kにコスト $10+k$ を負荷；16に設定された X_u 、ならびにアルゴリズムのデータベース検索段階で40に、及び出力段階で67に設定された X_g を使用する。ギャップアラインメントは、約22ビットに対応するスコアにより開始される。
- [0108] 一般に、FRAのバリエーション、her2のバリエーション、チューブリン配列のバリエーション、及び抗体可変領域のバリエーション（個々のバリエーションCDRを含む）を含む本明細書において開示するタンパク質及びそのバリエーション間のアミノ酸相同性、類似性、または同一性は、本明細書に示す配列に対して少なくとも80%であり、より典型的には、少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、及びほぼ100%または100%と、相同性または同一性が上昇することが好ましい。
- [0109] 同様に、本明細書で特定される抗体及び他のタンパク質の核酸配列に関する「核酸配列同一性パーセント (%)」は、抗原結合性タンパク質中のコード配列のヌクレオチド残基と同一である、候補配列中のヌクレオチド残基のパーセンテージとして定義される。特定の方法は、それぞれ1及び0.125に設定されたオーバーラップスパン及びオーバーラップフラクションで、デフォルトパラメーターに設定されたWU-BLAST-2のBLASTNモジュールを利用する。
- [0110] アミノ酸配列変化を導入するための部位または領域が予め決定されていても、変異自体は、予め決定されている必要はない。例えば、所与の部位での変異の性能を最適化するために、標的コドンまたは領域でランダム変異誘発を行って、発現された抗原結合性タンパク質CDRバリエーションを所望の活性の最適な組み合わせについてスクリーニングしてもよい。既知の配列を有す

るDNAの所定の部位で置換変異を作製するための技術、例えば、M13プライマー変異誘発及びPCR変異誘発が周知である。

[0111] 次に、本発明の一実施形態である式(1)で表されるADCの製造方法について説明する。

[0112] 本実施形態は、式(1)で表される抗体-薬物コンジュゲート(ADC)を製造する方法であり、以下の工程1及び2を含む。

[化9]



[式中、

Abは、抗体またはその抗原結合性断片であり、

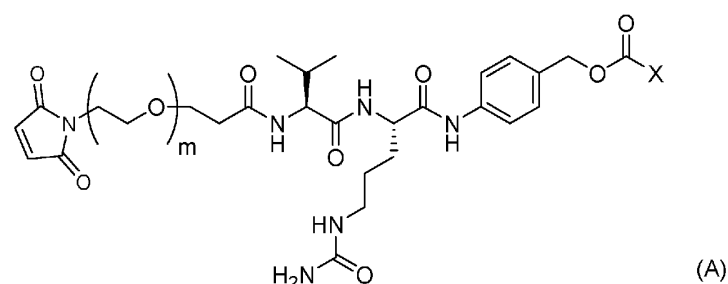
Dは、エリブリンであり、

mは、1～10の整数であり、

pは、1～8の整数である。]

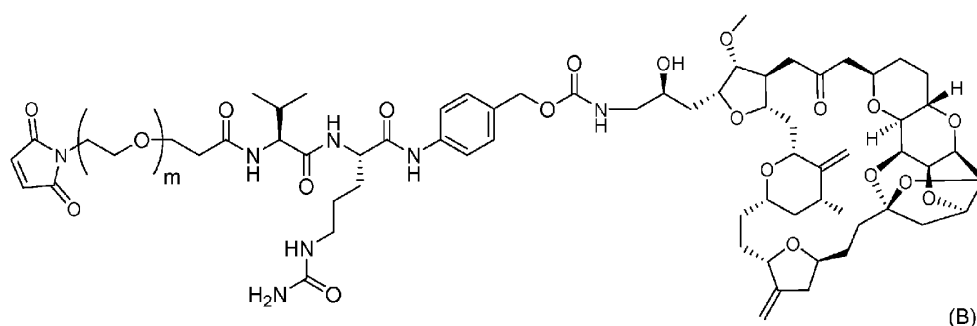
工程1： エリブリン又はその塩と式(A)で表される化合物との反応により、式(B)で表される化合物を得る工程。

[化10]



[式中、mは、1～10の整数であり、Xは、フェノキシ基又はニトロフェノキシ基である。]

[化11]



[式中、mは、1～10の整数である。]

工程2： 式(B)で表される化合物及び上記Abの反応により、式(1)で表される抗体-薬物コンジュゲートを得る工程。

[0113] 工程1は、エリブリン又はその塩と式(A)で表される化合物との反応により、式(B)で表される化合物を得る工程である。

[0114] エリブリンは、エリブリンのフリー体でもよく、エリブリンの塩であってもよい。エリブリンの塩としては、エリブリンメシル酸塩が挙げられる。エリブリン又はその塩の使用量は、エリブリンのフリー体に換算して1～1000gであってもよく、10～300gであってもよい。

[0115] 式(A)で表される化合物は、ADCのリンカー部分に相当する化合物であり、末端のマレイミド構造において抗体との反応性を示し、その反対側の末端Xにおいてエリブリンとの反応性を示す。Xは、フェノキシ基又はニトロフェノキシ基である。ニトロフェノキシ基は、o-ニトロフェノキシ基、m-ニトロフェノキシ基、p-ニトロフェノキシ基のいずれであってもよい。Xがフェノキシ基又はニトロフェノキシ基であると、エリブリンの末端にある1級アミノ基と反応し得る。式(A)で表される化合物は、後述する方法で調製することができる。

[0116] 式(A)で表される化合物の使用量は、1モルのエリブリンに対して、0.5～2.0モルであってもよく、0.6～3.0モル、1.0～2.0モル、1.3～1.8モルであってもよい。

[0117] 工程1は、塩基を使用してもよい。塩基は、エリブリンと式(A)で表さ

れる化合物の反応を阻害しないものであればよく、例えば、トリエチルアミン、N，N-ジイソプロピルエチルアミン等の3級アミン、ピリジン、2，6-ルチジン等の含窒素芳香族化合物が挙げられる。塩基の使用量は、1モルのエリブリンに対して、0.5～3.0モルであってもよく、1.0～2.0モル、1.1～1.5モルであってもよい。

[0118] 工程1は、無溶媒または溶媒中で行うことができ、溶媒中に行うことが好ましい。溶媒としては、エリブリンと式(A)で表される化合物の反応を阻害しないものであればよく、例えば、N，N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、N-メチルピロリドン(NMP)、ピリジン等が挙げられる。溶媒の使用量は、1gのエリブリンに対して、5～20mLであってもよく、6～15mLであってもよい。

[0119] 工程1における反応温度は、エリブリンと式(A)で表される化合物の反応が進行する温度であればよい。反応温度は、室温でもよく、20～25℃でよい。

[0120] 工程1の反応を促進するために、4-ジメチルアミノピリジン等の促進剤を使用してもよい。促進剤の使用量は、1モルのエリブリンに対して、0.01～0.8gであってもよく、0.1～0.3gであってもよい。

[0121] 以下に精製方法の一例を示すが、これに限らず、化学分野に周知の方法で精製すればよい。工程1の反応を終了させるときは、反応混合物を逆相カラムに付して精製することができる。逆相カラムは、例えば、充填剤としてオクタデシル基(C18)を有するシリカゲルを使用したカラムである。反応混合物を逆相カラムの上部に乗せた後、アセトニトリル、水等の極性溶媒で抽出する。必要に応じて、酢酸等を添加し、抽出溶媒のpHを酸性にすると好ましい。得られた抽出液に塩化メチレンを加えて、生成した式(B)で表される化合物を塩化メチレン層(有機層)に移す。抽出の際、必要に応じて、炭酸水素ナトリウム水溶液等でpHを調整してもよい。得られた有機層は、炭酸水素ナトリウム水溶液等で残余の酸を中和してもよい。得られた有機層を減圧下濃縮し、残渣を塩化メチレン、メタノール等に溶解させ、これを

ペンタンに滴下すると、式（B）で表される化合物が析出する。得られた固体をペンタンで洗浄し、減圧下乾燥させることで目的の化合物を得ることができる。

- [0122] 工程2は、式（B）で表される化合物及び上記Abの反応により、式（I）で表される抗体-薬物コンジュゲートを得る工程である。抗体部分（Ab）中のシステイン残基が、式（B）で表される化合物のマレイミド構造にマイケル付加することにより、両者が共有結合を形成する。1つの抗体部分Abに対して、複数の式（B）で表される化合物が結合し得る。形成された結合の数は、式（A）におけるpに対応する。
- [0123] 式（B）で表される化合物の使用量は、抗体部分Abに対して、1.0～8.0モルであってもよく、3.0～5.0モルであってもよい。
- [0124] 工程2は、通常、緩衝液中で実施される。緩衝液は、使用する抗体Abが変性せずに、式（B）で表される化合物との結合を阻害しないものであればよい。緩衝液は、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝液、エチレンジアミン四酢酸緩衝液、及びこれらの組合せであってもよい。緩衝液のpHは、好ましくは6.0～8.0であり、より好ましくは6.5～7.5である。
- [0125] 工程2では、緩衝液に極性有機溶媒を添加してもよい。極性有機溶媒は、緩衝液と混和できるものであればよく、式（B）で表される化合物の溶解度をより向上させることができる。例えば、式（B）で表される化合物を極性有機溶媒に溶解させた溶液を、抗体Abを溶解させた緩衝液に添加してもよい。
- [0126] 極性有機溶媒としては、N，N-ジメチルホルムアミド、N，N-ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。有機溶媒の使用量は、1mgの式（B）で表される化合物に対して、60～300mLであってもよく、110～240mL、130～210mL、140～180mLであってもよい。
- [0127] 工程2における反応温度は、式（B）で表される化合物と抗体Abの反応

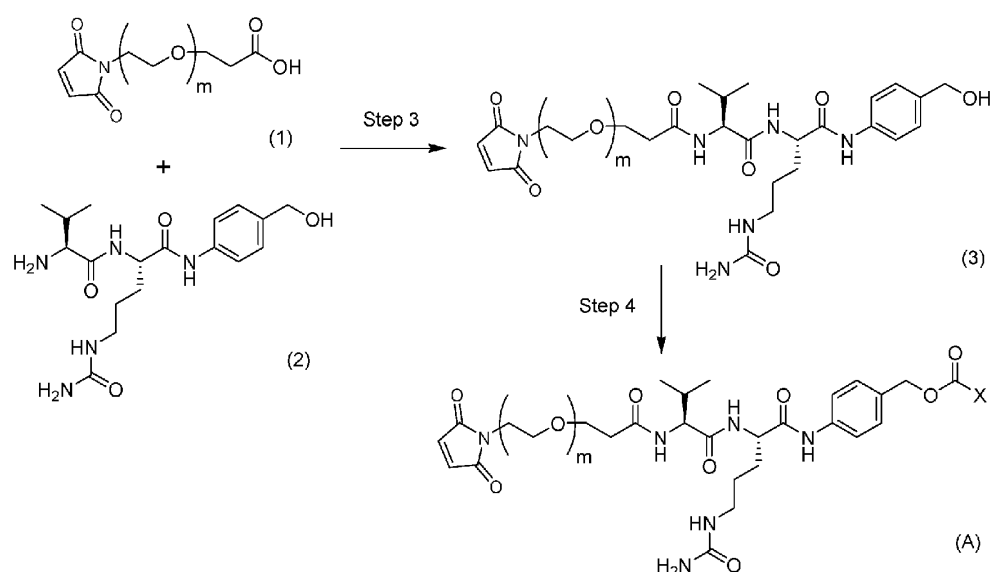
が進行する温度であればよい。反応温度は、室温でもよく、20～25℃でよい。

[0128] より具体的には、以下のとおりである。まず、抗体Abをフィルタ（透過膜）でろ過した後、緩衝液を加えて溶解させる。得られた溶液にTCPEP-HCl（トリ（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩）を加え、部分的に還元することにより、抗体中の分子内ジスルフィド結合を切断し、スルフヒドリル基を生じさせる。次に、式（B）で表される化合物またはそれを極性有機溶媒に溶解させた溶液を添加し、式（B）で表される化合物と抗体とを結合させる。工程2の反応を終了させるときは、例えば、N-アセチルシステインを添加することができる。N-アセチルシステインは、残存する式（B）で表される化合物と反応するとともに、部分還元で生じたスルフヒドリル基と反応する。

[0129] 以下に精製方法の一例を示すが、これに限らず、化学分野に周知の方法で精製すればよい。反応を終了させた後、タンジェンシャルフローろ過（TFF）法により、反応液の緩衝液を別の緩衝液に交換する。その後、クエン酸水溶液を添加し、フィルタでろ過し、緩衝液で洗浄する。

[0130] ここで、式（A）で表される化合物の製造方法を説明する。式（A）で表される化合物は、例えば、以下に示すように、式（1）で表される化合物と式（2）で表される化合物から2工程で製造することができる。

[化12]



[0131] 工程3は、式(1)で表される化合物のカルボキシ基を活性化させ、式(2)で表される化合物と縮合させる工程である。式(1)で表される化合物と式(2)で表される化合物との縮合により、式(3)で表される化合物が得られる。

[0132] 式(1)で表される化合物は、東京化成工業(株)から、商品名「MaI-PEG₂-acid」(カタログコード:M3203)として入手可能である。また、式(1)で表される化合物は、対応する長さのポリエチレングリコールを出発原料として、アクリル酸tert-ブチル等を用いて、有機化学分野で周知の方法により製造してもよい。

[0133] 式(1)で表される化合物の使用量は、式(2)で表される化合物1モルに対して、1.0~1.5モルであってもよく、1.1~2.0モルであってもよい。

[0134] 式(2)で表される化合物は、東京化成工業(株)から、商品名「Fmoc-Val-Cit-PAB-OH」(カタログコード:F1223)として入手可能である。また、式(2)で表される化合物は、N-Fmoc-シトルリン、p-アミノベンジルアルコール及びN-Fmoc-バリンを用いて、有機化学分野で周知の方法により製造してもよい。「Fmoc」とは、

アミノ基に対する保護基の1つであり、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基である。

- [0135] 工程3は、縮合剤の存在下で実施されることが好ましい。縮合剤としては、カルボン酸と1級アミンの縮合反応を促進し得る試薬であればよく、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド(DMT-MM)等が挙げられる。
- [0136] 縮合剤の使用量は、1モルの式(1)で表される化合物に対して、1.0~2.0モルであってもよく、1.3~1.5モルであってもよい。
- [0137] 工程3は、塩基を使用してもよい。塩基は、式(1)で表される化合物と式(2)で表される化合物の反応を阻害しないものであればよく、例えば、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン等の3級アミン、ピリジン、2,6-ルチジン等の含窒素芳香族化合物が挙げられる。塩基の使用量は、1モルの式(1)で表される化合物に対して、0.5~2.0モルであってもよく、1.0~1.5モル、1.1~1.3モルであってもよい。
- [0138] 工程3は、無溶媒または溶媒中で行うことができ、溶媒中で行うことが好ましい。溶媒としては、式(1)で表される化合物と式(2)で表される化合物の反応を阻害しないものであればよく、例えば、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、テトラヒドロフラン(THF)、メタノール(MeOH)、これらの混合溶媒等が挙げられる。溶媒の使用量は、1gの式(1)で表される化合物に対して、10~40mLであってもよく、20~30mLであってもよい。
- [0139] 工程3における反応温度は、式(1)で表される化合物と式(2)で表される化合物の反応が進行する温度であればよい。反応温度は、室温でもよく、15~35℃でよい。
- [0140] 工程4は、式(3)で表される化合物の水酸基をアシル化剤によりアシル

化させて、式（A）で表される化合物を得る工程である。

[0141] 式（3）で表される化合物の使用量は、反応に応じて適宜選択することが可能である。例えば、10～500gであってもよく、100～300gであってもよい。

[0142] アシル化剤としては、例えば、炭酸ジフェニル、炭酸ビス（4-ニトロフェニル）、炭酸ビス（2-ニトロフェニル）、炭酸ビス（3-ニトロフェニル）、クロロギ酸フェニル、クロロギ酸4-ニトロフェニル、クロロギ酸2-ニトロフェニル、クロロギ酸3-ニトロフェニルが挙げられる。アシル化剤の一部は、式（A）におけるXに対応しており、所望のX基の選択に応じて、アシル化剤の種類を選択できる。

[0143] アシル化剤の使用量は、1モルの式（3）で表される化合物に対して、1.0～5.0モルであってもよく、2.0～4.0モルであってもよい。

[0144] 工程4は、無溶媒または溶媒中で行うことができ、溶媒中を行うことが好ましい。溶媒としては、式（3）で表される化合物のアシル化反応を阻害しないものであればよく、例えば、N，N-ジメチルホルムアミド（DMF）、N，N-ジメチルアセトアミド、トルエン、ジメチルスルホキシド（DMSO）、N，N-ジメチルアセトアミド（DMA）が挙げられる。溶媒の使用量は、1gの式（3）で表される化合物に対して、5～20mLであってもよく、6～15mLであってもよい。

[0145] 工程4における反応温度は、式（3）で表される化合物のアシル化反応が進行する温度であればよい。反応温度は、室温でもよく、20～25℃でよい。

実施例

[0146] 以下に、製造例及び比較製造例を示して、本発明をより詳細に説明する。

実施例において使用する略語は、当業界で一般的に使用されている意味で使用されており、例えば、以下のとおりである。

D I P E A : N，N-ジイソプロピルエチルアミン

D M A : N，N-ジメチルアセトアミド

DMF : N, N-ジメチルホルムアミド

DMT-MM : 4-(4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

THF : テトラヒドロフラン

[0147] <製造例1>

(11S, 14S)-14-[3-(カルバモイルアミノ)プロピル]-1-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-N-[4-(ヒドロキシメチル)フェニル]-9, 12-ジオキソ-11-(プロパン-2-イル)-3, 6-ジオキサ-10, 13-ジアザペンタデカン-15-アミド

[0148] (2S)-2-{[(2S)-2-アミノ-3-メチルブタノイル]アミノ}-5-(カルバモイルアミノ)-N-[4-(ヒドロキシメチル)フェニル]ペンタンアミド (184 g)、3-{2-[2-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エトキシ]エトキシ}プロパン酸 (150 g)、DMT-MM (174 g)、メタノール (2.76 L) 及び THF (2.76 L) の混合物を、窒素雰囲気下、15~35℃で24時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮した後、アセトニトリルを加えた。析出した沈殿物をろ過し、さらに沈殿物をアセトニトリルで洗浄した。得られた固形物をアセトニトリルと混合し、ろ過することで固形物を得た。得られた固形物を減圧乾燥し、標題化合物 (267 g、収率89%) を得た。

[0149] <製造例2>

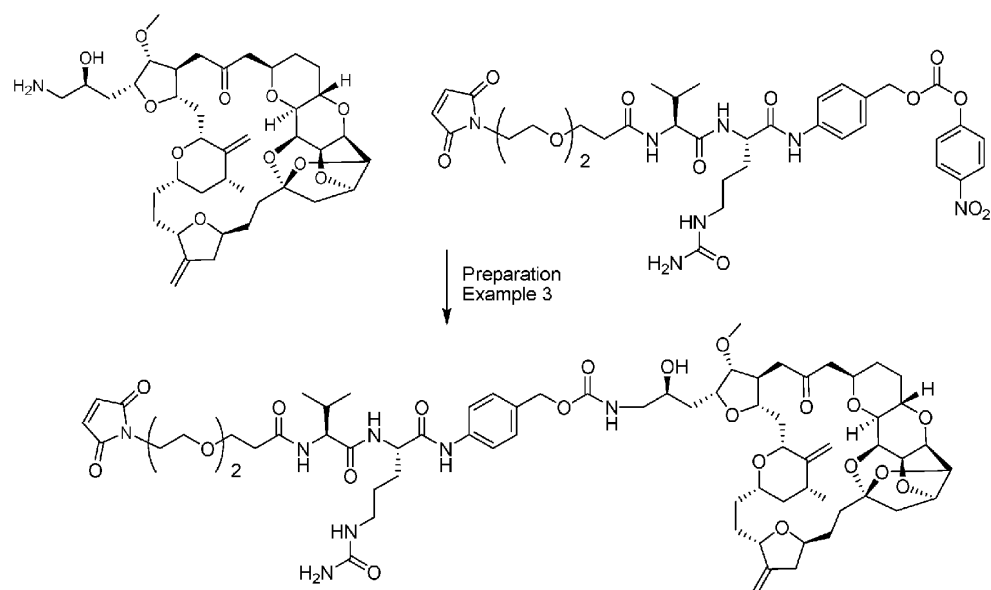
(4-{[(11S, 14S)-14-[3-(カルバモイルアミノ)プロピル]-1-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-9, 12, 15-トリオキソ-11-(プロパン-2-イル)-3, 6-ジオキサ-10, 13-ジアザペンタデカン-15-イル]アミノ}フェニル)メチル=4-ニトロフェニル=カルボナート

[0150] 製造例1で得た化合物(250g)、ビス(4-ニトロフェニル)カルボナート(615g)、DIPEA(157g)及びDMF(5.0L)の混合物を、窒素雰囲気下、15~35℃で3時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮した後、シリカゲルカラムで精製し(塩化メチレン/アセトン)、標題化合物を含む画分を減圧下濃縮することにより、標題化合物(162g、収率51%)を固体として得た。

[0151] <製造例3>

(4-{[(11S, 14S)-14-[3-(カルバモイルアミノ)プロピル]-1-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-9,12,15-トリオキソ-11-(プロパン-2-イル)-3,6-ジオキサ-10,13-ジアザペンタデカン-15-イル]アミノ}フェニル)メチル={ (2S)-2-ヒドロキシ-3-[(2R, 3R, 3aS, 7R, 8aS, 9S, 10aR, 11S, 12R, 13aR, 13bS, 15S, 18S, 21S, 24S, 26R, 28R, 29aS)-3-メトキシ-26-メチル-20,27-ジメチリデンヘキサコサヒドロ-11,15:18,21:24,28-トリエポキシ-7,9-エタノ-12,15-メタノ-9H,15H-フロ[3,2-i]フロ[2',3':5,6]ピラノ[4,3-b][1,4]ジオキサシクロペンタコシン-5(4H)-オン-2-イル]プロピル}カルバマート

[化13]



[0152] エリブリンメシル酸塩（93 g）、DIPEA（26 mL）、製造例2で得た化合物（116 g）及びDMF（930 mL）の混合物を、窒素雰囲気下、20～25℃で20時間攪拌した。反応混合物を逆相カラム（商品名：Kromasil C18）で精製し（アセトニトリル／水／酢酸）、標題化合物を含む画分を塩化メチレンで抽出した。有機層を炭酸水素ナトリウム水溶液および水で順次洗浄した後、減圧下濃縮した。濃縮残渣を塩化メチレン、メタノール、酢酸の混合溶媒に溶解し、これをペンタンに滴下した。析出した沈殿物をろ過して得られた固体をペンタンで洗浄し、減圧下乾燥することで、標題化合物（109.6 g、収率71%）を得た。

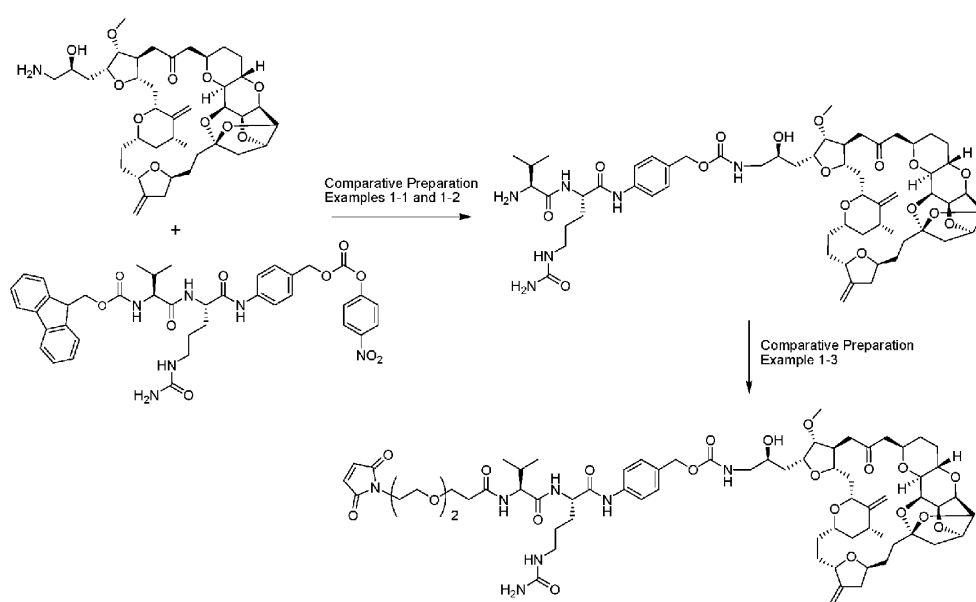
¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.31 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.81 (s, 2H), 5.13 (s, 1H), 5.06 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 5.02 (s, 1H), 5.01 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.82 (s, 1H), 4.71 (t, J = 4.0 Hz, 1H), 4.61 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.50 (dd, J = 5.2, 9.2 Hz, 1H), 4.47 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 4.32–4.27 (m, 2H), 4.19 (dd, J = 6.8, 11.6 Hz, 1H), 4.13–4.07 (m, 2H), 3.98 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 3.88–3.82 (m, 3H), 3.76–3.64 (m, 6H), 3.62–3.51 (m, 6H), 3.38 (s, 3H), 3.

2.22–3.08(m, 4H), 2.93 (dd, $J = 2.4, 9.6$ Hz, 1H), 2.92–2.84 (m, 1H), 2.76–2.63 (m, 2H), 2.52(t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.44–2.29 (m, 5H), 2.21–1.97 (m, 8H), 1.93–1.83 (m, 3H), 1.80–1.66(m, 5H), 1.66–1.28 (m, 10H), 1.11 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.07–1.01 (m, 1H), 0.99 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H)。

LCMS(M+H): m/z 1374.9。

[0153] <比較製造例 1 >

[化14]



[0154] <比較製造例 1 – 1 >

4 – { [(2 S) – 5 – (カルバモイルアミノ) – 2 – { [(2 S) – 2 – { [(9 H – フルオレン – 9 – イルメトキシ) カルボニル] アミノ } – 3 – メチルブタノイル] アミノ } ベンタノイル] アミノ } ベンジル = { (2 S) – 2 – ヒドロキシ – 3 – [(2 R, 3 R, 3 a S, 7 R, 8 a S, 9 S, 10 a R, 11 S, 12 R, 13 a R, 13 b S, 15 S, 18 S, 21 S, 24 S, 26 R, 28 R, 29 a S) – 3 – メトキシ – 26 – メチル – 20, 27 – ジメチリデンヘキサコサヒドロ – 11, 15 : 18, 21 : 24, 28 – トリエポキシ – 7, 9 – エタノ – 12, 15 – メタノ – 9 H, 15

H-フロ [3, 2-i] フロ [2', 3' : 5, 6] ピラノ [4, 3-b] [1, 4] ジオキサシクロペンタコシン-5 (4H) -オン-2-イル] プロピル} カルバマート

[0155] エリブリンメシル酸塩 (93 g)、DIPEA (25 mL)、4- { [(2S) -5- (カルバモイルアミノ) -2- { [(2S) -2- { [(9H-フルオレン-9-イルメトキシ) カルボニル] アミノ} -3-メチルブタノイル] アミノ} ペンタノイル] アミノ} ベンジル=4-ニトロフェニルカルボナート (103.6 g) 及びDMF (930 mL) の混合物を、窒素雰囲気下、20~25℃で16時間攪拌した。

[0156] <比較製造例1-2>

4- { [(2S) -2- { [(2S) -2-アミノ-3-メチルブタノイル] アミノ} -5- (カルバモイルアミノ) ペンタノイル] アミノ} ベンジル= { (2S) -2-ヒドロキシ-3- [(2R, 3R, 3aS, 7R, 8aS, 9S, 10aR, 11S, 12R, 13aR, 13bS, 15S, 18S, 21S, 24S, 26R, 28R, 29aS) -3-メトキシ-26-メチル-20, 27-ジメチリデンヘキサコサヒドロ-11, 15:18, 21:24, 28-トリエポキシ-7, 9-エタノ-12, 15-メタノ-9H, 15H-フロ [3, 2-i] フロ [2', 3' : 5, 6] ピラノ [4, 3-b] [1, 4] ジオキサシクロペンタコシン-5 (4H) -オン-2-イル] プロピル} カルバマート

[0157] 反応混合物にジエチルアミン (234 mL) を加え、20~25℃で0.5時間攪拌した。反応混合物に、酢酸エチルと塩酸を加え、水層をヘプタンで洗浄した。水層に、メチルテトラヒドロフラン、炭酸カリウム・塩化ナトリウム水溶液を加え、有機層を塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。

¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 7.56 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.14 (s, 1H), 5.06 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 5.03 (s, 1H), 5.01 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.83 (s, 1H), 4.71 (t, J = 4.4

Hz, 1H), 4.62 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.57 (dd, J = 4.8, 8.8 Hz, 1H), 4.47 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 4.32-4.27 (m, 2H), 4.18 (dd, J = 4.8, 6.4 Hz, 1H), 4.13-4.07 (m, 2H), 3.98 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 3.88-3.82 (m, 3H), 3.76-3.70 (m, 4H), 3.60 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.26-3.10 (m, 3H), 2.93 (dd, J = 2.0, 11.2 Hz, 1H), 2.91-2.84 (m, 1H), 2.75-2.64 (m, 2H), 2.44-2.29 (m, 5H), 2.21-1.97 (m, 8H), 1.93-1.83 (m, 3H), 1.79-1.72 (m, 5H), 1.68-1.29 (m, 8H), 1.11 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.07-1.01 (m, 1H), 1.06 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.02 (d, J = 7.2 Hz, 3H)。

LCMS(M+H): m/z 1135.7。

[0158] <比較製造例 1-3>

(4- { [(11S, 14S) -14- [3- (カルバモイルアミノ) プロピル] -1- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) -9, 12, 15-トリオキソ-11- (プロパン-2-イル) -3, 6-ジオキサ-10, 13-ジアザペンタデカン-15-イル] アミノ} フェニル) メチル = { (2S) -2-ヒドロキシ-3- [(2R, 3R, 3aS, 7R, 8aS, 9S, 10aR, 11S, 12R, 13aR, 13bS, 15S, 18S, 21S, 24S, 26R, 28R, 29aS) -3-メトキシ-26-メチル-20, 27-ジメチリデンヘキサコサヒドロ-11, 15:18, 21:24, 28-トリエポキシ-7, 9-エタノ-12, 15-メタノ-9H, 15H-フロ [3, 2-i] フロ [2', 3':5, 6] ピラノ [4, 3-b] [1, 4] ジオキサシクロペンタコシン-5 (4H) -オン-2-イル] プロピル} カルバマート

[0159] 比較製造例 1-2 で得られた濃縮残渣に、41- [2- (2- {3- [(2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル) オキシ] -3-オキソプロポキシ} エトキシ) エチル] -1H-ピロール-2, 5-ジオン (47.9 g)、DIPEA (20 mL)、DMF (913 mL) を加え、20~25℃で3時間撹拌した。

反応混合物を逆相カラム (商品名: SILMERCK 10013) で精

製し（アセトニトリル／水／酢酸）、標題化合物を含む画分を塩化メチレンで抽出した。有機層を炭酸水素ナトリウム水溶液および水で洗浄した後、減圧下濃縮した。濃縮残渣を塩化メチレン・メタノール・酢酸に溶解し、ペンタンに滴下することで析出した沈殿物をろ過した。得られた固体をペンタンで洗浄し、減圧乾燥することで、標題化合物（88, 1 g、3工程収率57%）を得た。

[0160] <製造例4>

MORAb-003含有緩衝水溶液（26.6 mg/mL MORAb-003、10 mmol/L リン酸三ナトリウム、100 mmol/L 塩化ナトリウム、3 w/v% スクロース、pH 6.5）7854 mLに、希釈用の緩衝水溶液（10 mmol/L リン酸三ナトリウム、100 mmol/L 塩化ナトリウム、3 w/v% スクロース、pH 6.5）1493 mLおよびpH調整用の緩衝液（0.25 mol/L トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸塩、20 mmol/L EDTA、pH 7.7）1098 mLを添加した。20℃で、トリス（2-カルボキシルエチル）ホスフィン水溶液（10 mmol/L、311 g）を加え、2.5時間撹拌した。

製造例3で得られた化合物のDMA溶液（8.37 mmol/L、809 mL）を加え、0.5時間撹拌した。N-アセチルシステイン水溶液（30 mmol/L、452 g）を加えて反応を停止し、0.5時間撹拌した。抗体-薬物コンジュゲート（ADC）を以下の条件で、透析ろ過により精製した。

（精製条件）

Filter（透過膜）： Pellicon 3（1.14 m² 30 kDa x 1, 0.57 m² 30 kDa x 1）

TMP（膜間差圧）： 15 psi

追加緩衝液： 25 mmol/L クエン酸水溶液（pH 6.3）

温度： 17.0～23.0℃

透過液： 163.2 kg

[0161] 25 mmol/L クエン酸水溶液 (3013 g、pH 6.3) 及びコン
ディショニング用の緩衝水溶液 (25 mmol/L クエン酸、1 mol/L
スクロース、0.24 w/v% ポリソルベート 80、pH 6.3) 5
668 gを加えることで、ADCの水溶液 (蛋白質濃度：10.6 mg/mL、
全重量：20.9 kg、ADCの含量：213.430 g、収率：99
%)を得た。その後、ADCの水溶液を滅菌濾過した (Millipore
Durapore PVDF)。