

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5535074号
(P5535074)

(45) 発行日 平成26年7月2日(2014.7.2)

(24) 登録日 平成26年5月9日(2014.5.9)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K 39/395	T
A 61 K 31/404	(2006.01)	A 61 K 31/404	
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00	
C 07 K 16/30	(2006.01)	C 07 K 16/30	

請求項の数 7 (全 105 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-528054 (P2010-528054)
 (86) (22) 出願日 平成20年9月29日 (2008.9.29)
 (65) 公表番号 特表2010-539981 (P2010-539981A)
 (43) 公表日 平成22年12月24日 (2010.12.24)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2008/078123
 (87) 國際公開番号 WO2009/045957
 (87) 國際公開日 平成21年4月9日 (2009.4.9)
 審査請求日 平成23年7月1日 (2011.7.1)
 (31) 優先権主張番号 60/976,626
 (32) 優先日 平成19年10月1日 (2007.10.1)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/991,692
 (32) 優先日 平成19年11月30日 (2007.11.30)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 509054371
 ブリストルマイヤーズ スクワイブ カンパニー
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ブリンストン、ルート 206 アンド プロビンス ライン ロード
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】メソテリンに結合するヒト抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 2 を含む重鎖可変領域 C D R 1 と、
 (b) 配列番号 5 を含む重鎖可変領域 C D R 2 と、
 (c) 配列番号 8 を含む重鎖可変領域 C D R 3 と、
 (d) 配列番号 11 を含む軽鎖可変領域 C D R 1 と、
 (e) 配列番号 14 を含む軽鎖可変領域 C D R 2 と、
 (f) 配列番号 17 を含む軽鎖可変領域 C D R 3 とを含む、
 単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 2】

フコース残基を欠く、請求項 1 記載の抗体。

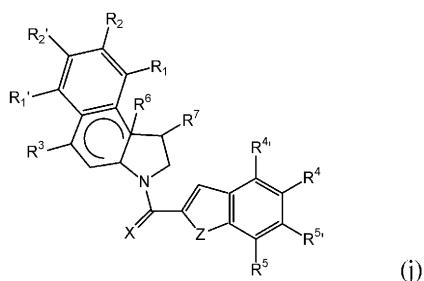
10

【請求項 3】

請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合部分と、パートナー分子とを含み、前記パートナー分子が治療剤である、抗体パートナー分子コンジュゲート。

【請求項 4】

前記治療剤が以下の構造 (j) を有するサイトトキシンである、請求項 3 に記載の抗体パートナー分子コンジュゲート：



式中、

X は、O、S および NR²⁻³ から選択されるメンバーであり、R²⁻³ は、H、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーであり、

R¹ は、H、置換もしくは非置換の低級アルキル基、C(O)R⁸、またはCO₂R⁸ であり、R⁸ は、NR⁹R¹⁰ およびOR⁹ から選択されたメンバーであり、R⁹ およびR¹⁰ は、H、置換または非置換のアルキル、および置換または非置換のヘテロアルキルから独立に選択されたメンバーであり、

R^{1'} は、H、置換もしくは非置換の低級アルキル基、またはC(O)R⁸ であり、

R² は、H、置換もしくは非置換の低級アルキル基、または非置換ヘテロアルキルまたはシアノまたはアルコキシであり、

R^{2'} は、H、置換もしくは非置換の低級アルキル基、または非置換ヘテロアルキルであり、

R³ は、(=O)、SR¹⁻¹、NHR¹⁻¹ およびOR¹⁻¹ から選択されたメンバーを表わし、R¹⁻¹ は、H、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、一リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、スルホン酸塩、アシル、C(O)R¹⁻²R¹⁻³、C(O)OR¹⁻²、C(O)NR¹⁻²R¹⁻³、P(O)(OR¹⁻²)₂、C(O)CHR¹⁻²R¹⁻³、SR¹⁻²、またはSiR¹⁻²R¹⁻³R¹⁻⁴ であり、R¹⁻²、R¹⁻³、およびR¹⁻⁴ は、H、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、および置換または非置換のアリールを独立に表わし、R¹⁻² およびR¹⁻³ は、それらが結合する窒素または炭素原子とともに、4~6員を有する置換または非置換のヘテロシクロアルキル環系を形成するように任意に結合され、任意に2つ以上のヘテロ原子を含み、

R⁴、R^{4'}、R⁵ およびR^{5'} は、H、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリール、置換または非置換のヘテロシクロアルキル、ハロゲン、NO₂、NR¹⁻⁵R¹⁻⁶、NC(O)R¹⁻⁵、OC(O)NR¹⁻⁵R¹⁻⁶、OC(O)OR¹⁻⁵、C(O)R¹⁻⁵、SR¹⁻⁵、OR¹⁻⁵、CR¹⁻⁵=NR¹⁻⁶、およびO(CH₂)_nN(CH₃)₂ から独立に選択されたメンバーであり、nは1から20の整数であり、あるいは、R⁴、R^{4'}、R⁵ およびR^{5'} の隣接する組のどちらかは、それらが結合する炭素原子とともに、4~6員を有する置換または非置換のシクロアルキルもしくはヘテロシクロアルキル環系を形成するように結合され、R¹⁻⁵ およびR¹⁻⁶ は、H、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリール、置換または非置換のヘテロシクロアルキル、および置換または非置換のペプチジルを独立に表わし、R¹⁻⁵ およびR¹⁻⁶ は、それらが結合する窒素原子とともに、4~6員を有する置換または非置換のヘテロシクロアルキル環系を形成するように任意に結合され、任意に2つ以上のヘテロ原子を含み、

R³、R⁴、R^{4'}、R⁵、またはR^{5'} の一つは、リンカーを介してサイトトキシンを抗体またはその抗体結合部分に連結する。

【請求項 5】

請求項1に記載の抗体またはその抗原結合部分をコードする、単離された核酸分子。

【請求項 6】

請求項1記載の抗体を含む、卵巣癌、膵臓癌、肺癌、中皮腫または頭頸部の癌を治療す

10

20

30

40

50

るための医薬組成物。

【請求項 7】

請求項3記載の抗体パートナー分子コンジュゲートを含む、卵巣癌、膵臓癌、肺癌、中皮腫または頭頸部の癌を治療するための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の参照)

本出願は、米国仮特許出願である、2007年10月1日出願の出願番号第60/976,626号、2007年11月30日出願の出願番号第60/991,692号および2008年7月1日出願の出願番号第61/077,397号（その内容を参照により本明細書に組み入れる）の米国特許法第119条（e）の下の恩典を主張する。 10

【背景技術】

【0002】

メソテリンは、腹膜、胸膜、および心膜腔の中皮内層（mesothelial lining）の細胞表面に存在する糖タンパク質である。メソテリンは、当初、ヒト膵臓癌細胞株HPC-Y5から精製された。メソテリンは、巨核球増強能力を有することが示されたので、巨核球増強因子（MPF）と名付けられた（Yamaguchiら, J. Biol. Chem., 1994年, 269, 805-808（非特許文献1））。メソテリンのcDNAは、HPC-Y5細胞株から調製されたライブラリーからクローニングされた（Kojimaら, J. Biol. Chem., 1995年, 270, 21984-21990（非特許文献2））。また、cDNAは、中皮腫を認識するモノクローナル抗体K1を用いてクローニングされた（ChangおよびPastan, Proc. Natl. Acad. Sci., 1996年, USA93, 136-40（非特許文献3））。構造的に、メソテリンは60kDaの前駆体ポリペプチドとして細胞表面に発現される。前駆体ポリペプチドは、31kDaの脱落部分（shed component）（MPFに対応）および40kDaの膜結合部分に処理される（Hassanら, Clin. Cancer. Res., 2004年, 10, 3937-3942（非特許文献4））。 20

【0003】

メソテリンは、正常な中皮細胞で発現するのに加え、いくつかの型のヒト腫瘍にも過剰発現する。ヒト腫瘍としては、全ての中皮腫、多くの卵巣癌、および膵臓癌、およびいくつかの胃癌、肺癌および子宮内膜癌が挙げられる。例えば、メソテリンは、卵巣癌全体の約70%、乳頭漿液性腺癌の約82%、膵臓腺癌全体の約83%および膵管腺癌全体の約86%に発現する。 30

【0004】

メソテリン遺伝子を相同的組み換えによって破壊された変異マウスが作製されている（Bera, T. K. およびPastan, I., Mol. Cell. Biol., 2000年, 20, 2902-2906（非特許文献5））。解剖学的異常、血液学的異常または生殖異常が検出されなかったことから、少なくとも変異マウスにおいて、メソテリンの機能が成長または生殖にとって必須ではないことが示されている。 40

【0005】

メソテリンは、特に、以前に卵巣癌抗原として同定された腫瘍細胞の表面に存在するムチン様糖タンパク質である、CA125（MUC-16としても知られている）と相互作用する。さらに、CA125の膜結合メソテリンへの結合は異型の細胞接着を媒介し、CA125およびメソテリンは進行性の悪性度の卵巣腺癌において同時発現される（Rump, A.ら, J. Biol. Chem., 2004年, 279, 9190-9198（非特許文献6））。腹膜の内側におけるメソテリンの発現は、卵巣癌の転移形成の優先的な部位と相互に関連し、メソテリン-CA125結合は、卵巣腫瘍の腹膜転移を促進すると考えられている（Gubbel, J. A.ら, Mol. Cancer, 2006年, 5, 50（非特許文献7））。 50

【0006】

以上のことから、メソテリンの活性を調節するためのさらなる因子が注目されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Yamaguchiら, J. Biol. Chem., 1994年, 269, 805-808

【非特許文献2】Kojimaら, J. Biol. Chem., 1995年, 270, 21984-21990

【非特許文献3】ChangおよびPastan, Proc. Natl. Acad. Sci., 1996年, USA93, 136-40 10

【非特許文献4】Hassanら, Clin. Cancer. Res., 2004年, 10, 3937-3942

【非特許文献5】Bera, T. K. およびPastan, I., Mol. Cell. Biol., 2000年, 20, 2902-2906

【非特許文献6】Rump, A. ら, J. Biol. Chem., 2004年, 279, 9190-9198

【非特許文献7】Gubbelts, J. A. ら, Mol. Cancer, 2006年, 5, 50

【発明の概要】

20

【0008】

本開示は、特定のヒトのものにおいて、特にメソテリンに結合し、ヒトメソテリンへの高い結合親和性、メソテリン発現細胞による内在化、CA125に結合するメソテリンの阻害および/または抗体依存性細胞毒性(ADC)の媒介などの望ましい特性を有する、単離されたモノクローナル抗体を提供する。本発明の抗体は、例えば、メソテリンを検出するため、または、メソテリン発現腫瘍細胞のようなメソテリン発現細胞の増殖を阻害するために用いられてもよい。

【0009】

第1の態様では、本発明は、単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関し、上記抗体は、ヒトメソテリンに結合し、以下の特性：

30

(a) 1×10^{-8} M以下の K_D でヒトメソテリンに結合すること、

(b) メソテリン発現細胞によって内在化されること、

(c) 卵巣癌抗原CA125へのメソテリンの結合を阻害すること、

(d) メソテリン発現細胞に対して、ADCを示すこと、および

(e) サイトトキシンに結合した場合、生体内でメソテリン発現細胞の増殖を阻害すること、

のうちの少なくとも1つを示す。

【0010】

好ましくは、上記抗体は、特性(a)、(b)、(c)、(d)および(e)のうちの少なくとも2つを示す。より好ましくは、上記抗体は、特性(a)、(b)、(c)、(d)および(e)のうちの少なくとも3つを示す。より好ましくは、上記抗体は、特性(a)、(b)、(c)、(d)および(e)のうちの4つを示す。さらに、より好ましくは、上記抗体は、特性(a)、(b)、(c)、(d)および(e)のうちの5つ全てを示す。別の好ましい実施形態では、上記抗体は、 5×10^{-9} M以下の K_D でメソテリンに結合する。また、別の好ましい実施形態では、上記抗体がサイトトキシンに結合した場合、上記抗体は生体内においてメソテリン発現腫瘍細胞の増殖を阻害する。

40

【0011】

別の態様では、本発明は、単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関し、上記抗体は、参照抗体によって認識されるヒトメソテリン上のエピトープへの結合をクロス競合(cross-compete)し、上記参照抗体は、

50

(a) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H) および配列番号 22 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L)、

(b) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む V_H および配列番号 23 のアミノ酸配列を含む V_L 、または

(c) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む V_H および配列番号 24 のアミノ酸配列を含む V_L を含む。

【0012】

上述した参照抗体は、参照抗体 (a)、(b) および (c) としてそれぞれ以下で言及される。

【0013】

好ましい実施形態では、上記参照抗体は、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む V_H および配列番号 22 のアミノ酸配列を含む V_L を含む。別の好ましい実施形態では、上記参照抗体は、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む V_H および配列番号 23 のアミノ酸配列を含む V_L を含む。また、別の好ましい実施形態では、上記参照抗体は、配列番号 21 のアミノ酸配列を含む V_H および配列番号 24 のアミノ酸配列を含む V_L を含む。

【0014】

別の態様では、本発明は、ヒト V_H 3 - 33 遺伝子もしくはヒト V_H 3 - 7 遺伝子の産物であるか、またはそれらに由来する V_H を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関し、上記抗体は、特にヒトメソテリンに結合する。別の態様では、本発明は、ヒト $V_K L$ 6 遺伝子もしくはヒト $V_K A$ 27 遺伝子の産物であるか、またはそれらに由来する V_L を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関し、上記抗体は、特にヒトメソテリンに結合する。好ましい実施形態では、本発明は、

(a) ヒト V_H 3 - 33 遺伝子の産物であるか、またはそれに由来する V_H およびヒト $V_K L$ 6 遺伝子の産物であるか、またはそれに由来する V_L 、あるいは

(b) ヒト V_H 3 - 7 遺伝子の産物であるか、またはそれに由来する V_H およびヒト $V_K A$ 27 遺伝子の産物であるか、またはそれに由来する V_L を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、上記抗体は、特にヒトメソテリンに結合する。

【0015】

特に好ましい抗体またはその抗原結合部分 (実施形態 A) は、

(a) 配列番号 1 からなる重鎖可変領域 CDR1 と、

(b) 配列番号 4 からなる重鎖可変領域 CDR2 と、

(c) 配列番号 7 からなる重鎖可変領域 CDR3 と、

(d) 配列番号 10 からなる軽鎖可変領域 CDR1 と、

(e) 配列番号 13 からなる軽鎖可変領域 CDR2 と、

(f) 配列番号 16 からなる軽鎖可変領域 CDR3 とを含む。

別の特に好ましい抗体またはその抗原結合部分 (実施形態 B) は、

(a) 配列番号 2 からなる重鎖可変領域 CDR1 と、

(b) 配列番号 5 からなる重鎖可変領域 CDR2 と、

(c) 配列番号 8 からなる重鎖可変領域 CDR3 と、

(d) 配列番号 11 からなる軽鎖可変領域 CDR1 と、

(e) 配列番号 14 からなる軽鎖可変領域 CDR2 と、

(f) 配列番号 17 からなる軽鎖可変領域 CDR3 とを含む。

別の特に好ましい抗体またはその抗原結合部分 (実施形態 C) は、

(a) 配列番号 3 からなる重鎖可変領域 CDR1 と、

(b) 配列番号 6 からなる重鎖可変領域 CDR2 と、

(c) 配列番号 9 からなる重鎖可変領域 CDR3 と、

(d) 配列番号 12 からなる軽鎖可変領域 CDR1 と、

(e) 配列番号 15 からなる軽鎖可変領域 CDR2 と、

(f) 配列番号 18 からなる軽鎖可変領域 CDR3 とを含む。

10

20

30

40

50

【0016】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号19～21からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むV_Hと、(b)配列番号22～24からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むV_Lを含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関し、上記抗体は、特にヒトメソテリンに結合する。

【0017】

好ましい組合せは、(a)配列番号19のアミノ酸配列を含むV_Hおよび(b)配列番号22のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。

【0018】

別の好ましい組合せは、(a)配列番号20のアミノ酸配列を含むV_Hおよび(b)配列番号23のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。 10

【0019】

別の好ましい組合せは、(a)配列番号21のアミノ酸配列を含むV_Hおよび(b)配列番号24のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。

【0020】

本開示の抗体は、例えば、IgG1またはIgG4アイソタイプであってもよい。あるいは、それらはF_ab、F_ab'またはF_ab'2フラグメントあるいは一本鎖抗体のような抗体フラグメントであってもよい。

【0021】

また、本開示は、パートナー分子に結合した本開示の抗体またはその抗原結合部分を含む免疫複合体を提供する。特に好ましい実施形態では、本発明は、化合物サイトトキシンAに結合した本開示の抗体またはその抗原結合部分を含む免疫複合体を提供する。このサイトトキシンAは、以下で説明されるとともに、国際公開第2008/083312号(その内容を参照により本明細書に組み入れる)で取り上げられている。本発明は、本発明の抗体に結合したサイトトキシンAを含み、上記抗体が(i)ヒトメソテリンのエピトープへの結合について参考抗体(a)、(b)または(c)とクロス競合し、(ii)実施形態Aに従い、(iii)実施形態Bに従うか、あるいは(iv)実施形態Cに従う、上記の好ましい免疫複合体を提供する。特定のそのような抗体パートナー分子複合体は、メソテリン発現細胞に内在化することが可能であり、ADCを媒介することが可能である。 20

【0022】

第1の態様では、そのような抗体パートナー分子複合体は、化学的リンカーを介して結合される。いくつかの実施形態では、そのリンカーは、ペプチジルリンカーであり、本明細書では(L⁴)_p-F-(L¹)_mとして示されている。他のリンカーとしては、ヒドラジンリンカーおよびジスルフィドリンカーが挙げられ、本明細書では、それぞれ(L⁴)_p-H-(L¹)_mまたは(L⁴)_p-J-(L¹)_mとして示されている。上記パートナーに結合されるような上記リンカーに加えて、本発明はまた、実質的にいかなる分子種への結合にも適した切断可能なリンカーアームを提供する。 30

【0023】

本開示はまた、本開示の抗体またはその抗原結合部分を含む二重特異性分子を提供し、それらは、上記抗体またはその抗原結合部分と異なる結合特異性を有する第2の官能基に結合する。 40

【0024】

本開示の抗体、またはその抗原結合部分、または免疫複合体または二重特異性分子と、薬学的に許容可能な担体とを含む組成物も提供する。

【0025】

本開示の抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸分子も、このような核酸を含む発現ベクター、およびこのような発現ベクターを含む宿主細胞と同様に、本開示に包含される。このような発現ベクターを含む宿主細胞を用いて抗メソテリン抗体を調製するための方法もまた提供し、その方法は、(i)宿主細胞で抗体を発現することと、(ii)宿 50

主細胞から抗体を単離することとを含んでいてもよい。

【0026】

また、別の態様では、本発明は抗メソテリン抗体を調製するための方法に関する。その方法は、

(a) (i) 配列番号1～3からなる群より選択されるCDR1配列、配列番号4～6からなる群より選択されるCDR2配列および/または配列番号7～9からなる群より選択されるCDR3配列を含むV_H抗体配列、ならびに/あるいは(ii)配列番号10～12からなる群より選択されるCDR1配列、配列番号13～15からなる群より選択されるCDR2配列および/または配列番号16～18からなる群より選択されるCDR3配列を含むV_L抗体配列を提供することと、

(b) V_H抗体配列および/またはV_L抗体配列内の少なくとも1つのアミノ酸残基を変化させて、少なくとも1つの変化させた抗体配列を作製することと、

(c) 変化させた抗体配列をタンパク質として発現することとを含む。

【0027】

別の態様では、本発明は、メソテリン発現腫瘍細胞の増殖を阻害する方法に関する。その方法は、腫瘍細胞と、本開示の抗体パートナー分子複合体とを接触させて、それにより、腫瘍細胞の増殖を阻害することを含む。好ましくは、メソテリン発現腫瘍細胞は、中皮腫細胞、膵腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、胃腫瘍細胞、肺腫瘍細胞または子宮内膜腫瘍細胞である。また、他の実施形態では、メソテリン発現腫瘍細胞は、中皮腫、乳頭漿液性卵巣腺癌(papillary serous ovarian adenocarcinoma)、明細胞卵巣癌、ミュラー管混合卵巣癌(mixed Mullerian ovarian carcinoma)、子宮内膜粘液性卵巣癌(endometroid mucinous ovarian carcinoma)、膵臓腺癌、膵管腺癌(ductal pancreatic adenocarcinoma)、子宮漿液性癌(uterine serous carcinoma)、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食道腺癌、結腸直腸腺癌および乳腺癌からなる群より選択される癌由来である。

【0028】

別の態様では、本発明は、被験体の癌を処置する方法に関する。上記方法は、本開示の抗体パートナー分子複合体を被験体に投与して、それにより、被験体の癌を処置することを含む。処置のため特に好ましい癌は、中皮腫、膵臓癌、卵巣癌、胃癌、肺癌および子宮内膜癌である。また、他の実施形態では、処置される癌は、中皮腫、乳頭漿液性卵巣腺癌、明細胞卵巣癌、ミュラー管混合卵巣癌、子宮内膜粘液性卵巣癌、膵臓腺癌、膵管腺癌、子宮内膜漿液性癌、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食道腺癌、結腸直腸腺癌および乳腺癌からなる群より選択される。

[請求項1001]

単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分であって、ヒトメソテリンに結合し、以下の特性：

(a) 1×10^{-8} M以下のK_Dでヒトメソテリンに結合すること、

(b) メソテリン発現細胞によって内在化されること、

(c) 卵巣癌抗原CA125へのメソテリンの結合を阻害すること、

(d) メソテリン発現細胞に対して、抗体依存性細胞毒性(ADCC)を示すこと、または

(e) サイトトキシンに結合した場合、生体内でメソテリン発現細胞の増殖を阻害すること、

のうちの少なくとも1つを示す、抗体。

[請求項1002]

特性(a)、(b)、(c)、(d)および(e)のうちの少なくとも2つを示す、請求項1001に記載の抗体。

[請求項1003]

特性(a)、(b)、(c)、(d)および(e)のうちの少なくとも3つを示す、請求項1001に記載の抗体。

[請求項1004]

10

20

30

40

50

特性 (a)、(b)、(c)、(d) および (e) のうちの4つを示す、請求項1001に記載の抗体。

[請求項1005]

特性 (a)、(b)、(c)、(d) および (e) のうちの5つ全てを示す、請求項1001に記載の抗体。

[請求項1006]

5 × 10⁻⁹ M 以下の K_D でヒトメソテリンに結合する、請求項1001に記載の抗体。

[請求項1007]

参照抗体によって認識されるヒトメソテリン上のエピトープに結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分であって、

ここで、該参照抗体が、

(a) 配列番号19のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(b) 配列番号20のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号23のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または

(c) 配列番号21のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号24のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、単離されたモノクローナル抗体。

[請求項1008]

前記参照抗体が、

配列番号19のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項1007に記載の抗体。

[請求項1009]

前記参照抗体が、

配列番号20のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号23のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項1007に記載の抗体。

[請求項1010]

前記参照抗体が、

配列番号21のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号24のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項1007に記載の抗体。

[請求項1011]

ヒト V_H 3 - 33 遺伝子もしくはヒト V_H 3 - 7 遺伝子の産物であるか、またはそれらに由来する重鎖可変領域を含み、特異的にヒトメソテリンに結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

[請求項1012]

ヒト V_K L 6 遺伝子もしくはヒト V_K A 27 遺伝子の産物であるか、またはそれらに由来する軽鎖可変領域を含み、特異的にヒトメソテリンに結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

[請求項1013]

(a) ヒト V_H 3 - 33 遺伝子の産物であるか、もしくはそれに由来する重鎖可変領域およびヒト V_K L 6 遺伝子の産物であるか、もしくはそれに由来する軽鎖可変領域、または

(b) ヒト V_H 3 - 7 遺伝子の産物であるか、もしくはそれに由来する重鎖可変領域およびヒト V_K A 27 遺伝子の産物であるか、もしくはそれに由来する軽鎖可変領域を含み、

特異的にヒトメソテリンに結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

[請求項1014]

(a) 配列番号1を含む重鎖可変領域 C D R 1 と、

10

20

30

40

50

- (b) 配列番号4を含む重鎖可変領域 C D R 2と、
- (c) 配列番号7を含む重鎖可変領域 C D R 3と、
- (d) 配列番号10を含む軽鎖可変領域 C D R 1と、
- (e) 配列番号13を含む軽鎖可変領域 C D R 2と、
- (f) 配列番号16を含む軽鎖可変領域 C D R 3とを含む、請求項1001に記載の抗体。

[請求項1015]

- (a) 配列番号2を含む重鎖可変領域 C D R 1と、
- (b) 配列番号5を含む重鎖可変領域 C D R 2と、
- (c) 配列番号8を含む重鎖可変領域 C D R 3と、
- (d) 配列番号11を含む軽鎖可変領域 C D R 1と、
- (e) 配列番号14を含む軽鎖可変領域 C D R 2と、
- (f) 配列番号17を含む軽鎖可変領域 C D R 3とを含む、請求項1001に記載の抗体。

10

[請求項1016]

- (a) 配列番号3を含む重鎖可変領域 C D R 1と、
- (b) 配列番号6を含む重鎖可変領域 C D R 2と、
- (c) 配列番号9を含む重鎖可変領域 C D R 3と、
- (d) 配列番号12を含む軽鎖可変領域 C D R 1と、
- (e) 配列番号15を含む軽鎖可変領域 C D R 2と、
- (f) 配列番号18を含む軽鎖可変領域 C D R 3とを含む、請求項1001に記載の抗体。

[請求項1017]

20

- (a) 配列番号19～21からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、
- (b) 配列番号22～24からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含み、

特異的にヒトメソテリンタンパク質に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

[請求項1018]

- (a) 配列番号19のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、
- (b) 配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、請求項1017に記載の抗体。

[請求項1019]

30

- (a) 配列番号20のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、
- (b) 配列番号23のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、請求項1017に記載の抗体。

[請求項1020]

- (a) 配列番号21のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、
- (b) 配列番号24のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、請求項1017に記載の抗体。

40

[請求項1021]

請求項1001に記載の抗体またはその抗原結合部分と、薬学的に許容される担体とを含む、組成物。

[請求項1022]

請求項1001に記載の抗体またはその抗原結合部分と、パートナー分子とを含み、前記パートナー分子が治療剤である、抗体パートナー分子コンジュゲート。

[請求項1023]

請求項1022に記載の抗体パートナー分子コンジュゲートと、薬学的に許容される担体とを含む、組成物。

[請求項1024]

前記治療剤がサイトトキシンである、請求項1022に記載の抗体パートナー分子コンジュゲート。

[請求項1025]

50

請求項1024に記載の抗体パートナー分子コンジュゲートと、薬学的に許容される担体とを含む、組成物。

[請求項1026]

前記治療剤が、放射性同位体である、請求項1022に記載の抗体パートナー分子コンジュゲート。

[請求項1027]

請求項1026に記載の抗体パートナー分子コンジュゲートと、薬学的に許容される担体とを含む、組成物。

[請求項1028]

請求項1001に記載の抗体またはその抗原結合部分をコードする、単離された核酸分子。 10

[請求項1029]

請求項1028に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

[請求項1030]

請求項1029に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

[請求項1031]

請求項1030に記載の宿主細胞において前記抗体を発現する工程と、前記宿主細胞から前記抗体を単離する工程とを含む、抗メソテリン抗体を調製するための方法。

[請求項1032]

メソテリン発現腫瘍細胞と、請求項1001に記載の抗体とを接触させて、それにより、メソテリン腫瘍細胞の増殖を阻害する工程を含む、メソテリン発現腫瘍細胞の増殖を阻害する方法。 20

[請求項1033]

メソテリン発現腫瘍細胞と、請求項1022に記載の抗体パートナー分子コンジュゲートとを接触させて、それにより、メソテリン腫瘍細胞の増殖を阻害する工程を含む、メソテリン発現腫瘍細胞の増殖を阻害する方法。

[請求項1034]

前記治療剤はサイトトキシンである、請求項1033に記載の方法。

[請求項1035]

前記メソテリン発現腫瘍細胞が、中皮腫細胞、膵臓腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、胃腫瘍細胞、肺腫瘍細胞または子宮内膜腫瘍細胞である、請求項1032に記載の方法。 30

[請求項1036]

前記メソテリン発現腫瘍細胞が、中皮腫、乳頭漿液性卵巣腺癌 (papillary serous ovarian adenocarcinoma)、明細胞卵巣癌、ミュラー管混合卵巣癌(mixed Mullerian ovarian carcinoma)、子宮内膜粘液性卵巣癌(endometroid mucinous ovarian carcinoma)、膵臓腺癌、膵管腺癌(ductal pancreatic adenocarcinoma)、子宮漿液性癌(uterine serous carcinoma)、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食道腺癌、結腸直腸腺癌および乳腺癌からなる群より選択される癌由来である、請求項1032に記載の方法。

[請求項1037]

被験体に請求項1001に記載の抗体を投与し、それにより、前記被験体において癌を処置することを含む、被験体の癌を処置する方法。 40

[請求項1038]

被験体に請求項1022に記載の抗体パートナー分子を投与し、それにより、前記被験体において癌を処置することを含む、被験体の癌を処置する方法。

[請求項1039]

前記治療剤がサイトトキシンである、請求項1038に記載の方法。

[請求項1040]

前記癌が中皮腫、膵臓癌、卵巣癌、胃癌、肺癌または子宮内膜癌である、請求項1037に記載の方法。

[請求項1041]

前記癌が、中皮腫、乳頭漿液性卵巣腺癌、明細胞卵巣癌、ミュラー管混合卵巣癌、子宮 50

内膜膜粘液性卵巣癌、脾臓腺癌、脾管腺癌、子宮漿液性癌、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食道腺癌、結腸直腸腺癌および乳腺癌からなる群より選択される、請求項1037に記載の方法。

[請求項1042]

(a) (i) 配列番号1～3からなる群より選択されるCDR1配列、配列番号4～6からなる群より選択されるCDR2配列および/もしくは配列番号7～9からなる群より選択されるCDR3配列を含む重鎖可変領域抗体配列、ならびに/または(ii) 配列番号10～12からなる群より選択されるCDR1配列、配列番号13～15からなる群より選択されるCDR2配列および/もしくは配列番号16～18からなる群より選択されるCDR3配列を含む軽鎖可変領域抗体配列を調製する工程と、

10

(b) 前記重鎖可変領域抗体配列および/または前記軽鎖可変領域抗体配列内の少なくとも1つのアミノ酸残基を変化させて、少なくとも1つの変化させた抗体配列を作製する工程と、

(c) 前記変化させた抗体配列をタンパク質として発現する工程と、を含む抗メソテリン抗体を調製するための方法。

[請求項1043]

パートナー分子に結合した請求項1001に記載の抗体を含み、該パートナー分子が化学的リンカーによって該抗体に結合する、抗体パートナー分子コンジュゲート。

[請求項1044]

前記化学的リンカーが、ペプチジルリンカー、ヒドラジンリンカーおよびジスルフィドリンカーからなる群より選択される、請求項1045に記載の抗体パートナー分子コンジュゲート。

20

[請求項1045]

フコース残基を欠く、単離された抗メソテリン抗体。

[請求項1046]

細胞表面メソテリンを発現する細胞の抗体依存性細胞毒性を強める、請求項1045に記載の抗体。

[請求項1047]

前記細胞の抗体依存性細胞毒性を誘導するのに十分な条件下で、メソテリン発現細胞と、請求項1046に記載の抗体とを接触させる工程を含む、メソテリン発現細胞の増殖を阻害する方法。

30

[請求項1048]

前記細胞が腫瘍細胞である、請求項1047に記載の方法。

[請求項1049]

前記抗メソテリン抗体がヒト抗体である、請求項1047に記載の方法。

[請求項1050]

被験体におけるメソテリンを発現する腫瘍細胞の増殖を阻害するのに有効な量で前記被験体に脱フコシル化(defucosylated)抗メソテリン抗体を投与する工程を含む、被験体におけるメソテリンを発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する方法。

[請求項1051]

40

前記抗メソテリン抗体がヒト抗体である、請求項1050に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1A】図1Aは、3C10ヒトモノクローナル抗体のV_Hのヌクレオチド配列(配列番号25)およびアミノ酸配列(配列番号19)を示す。CDR1(配列番号1)、CDR2(配列番号4)およびCDR3(配列番号7)領域には線が引かれている。

【図1B】図1Bは、3C10ヒトモノクローナル抗体のV_Lのヌクレオチド配列(配列番号28)およびアミノ酸配列(配列番号22)を示す。CDR1(配列番号10)、CDR2(配列番号13)およびCDR3(配列番号16)領域には線が引かれている。

【図2A】図2Aは、6A4ヒトモノクローナル抗体のV_Hのヌクレオチド配列(配列番

50

号26)およびアミノ酸配列(配列番号20)を示す。CDR1(配列番号2)、CDR2(配列番号5)およびCDR3(配列番号8)領域には線が引かれている。

【図2B】図2Bは、6A4ヒトモノクローナル抗体のV_Lのヌクレオチド配列(配列番号29)およびアミノ酸配列(配列番号23)を示す。CDR1(配列番号11)、CDR2(配列番号14)およびCDR3(配列番号17)領域には線が引かれている。

【図3A】図3Aは、7B1ヒトモノクローナル抗体のV_Hのヌクレオチド配列(配列番号27)およびアミノ酸配列(配列番号21)を示す。CDR1(配列番号3)、CDR2(配列番号6)およびCDR3(配列番号9)領域には線が引かれている。

【図3B】図3Bは、7B1ヒトモノクローナル抗体のV_Lのヌクレオチド配列(配列番号30)およびアミノ酸配列(配列番号24)を示す。CDR1(配列番号12)、CDR2(配列番号15)およびCDR3(配列番号18)領域には線が引かれている。
10

【図4】図4は、ヒト生殖細胞系列V_H3-33アミノ酸配列(配列番号31)と、3C10(配列番号19)および6A4(配列番号20)のV_Hのアミノ酸配列とのアライメントを示す。

【図5】図5は、ヒト生殖細胞系列V_KL6アミノ酸配列(配列番号33)と、3C10(配列番号22)および6A4(配列番号23)のV_Lのアミノ酸配列とのアライメントを示す。

【図6】図6は、ヒト生殖細胞系列V_H3-7アミノ酸配列(配列番号32)と、7B1(配列番号21)のV_Hのアミノ酸配列とのアライメントを示す。

【図7】図7は、ヒト生殖細胞系列V_KA27アミノ酸配列(配列番号34)と、7B1(配列番号24)のV_Lのアミノ酸配列とのアライメントを示す。
20

【図8】図8は、OVCAR3卵巣癌細胞接着アッセイの結果を示す。

【図9A】図9Aは、NCI-H226(肺中皮腫)異種移植マウスモデルを用いた生体内の研究結果を示す。

【図9B】図9Bは、NCI-H226(肺中皮腫)異種移植マウスモデルを用いた生体内の研究結果を示す。

【図10A】図10Aは、HPAC(ヒト肺臓癌)異種移植マウスモデルを用いた生体内の研究結果を示す。

【図10B】図10Bは、HPAC(ヒト肺臓癌)異種移植マウスモデルを用いた生体内の研究結果を示す。
30

【図11】図11は、卵巣癌マウス異種移植モデルにおいて、卵巣癌腫瘍体積が本発明の免疫複合体により減少したことを示すグラフである。

【図12A】図12Aは、本発明の脱フコシル化(defucosylated)抗体による卵巣癌細胞(OVCAR3細胞)のADCを示す。

【図12B】図12Bは、本発明の脱フコシル化抗体によるNSCLC細胞(H226細胞)のADCを示す。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本開示は、単離されたモノクローナル抗体に関するものであり、特にヒトモノクローナル抗体であって、ヒトメソテリンに結合し、望ましい特性を有するものに関する。特定の実施形態では、本開示の抗体は、特に重鎖、および軽鎖の生殖細胞系列の配列に由来し、および/または、特定のアミノ酸配列を構成するCDR領域の様な特定の構造的特徴を包含する。本開示は、単離された抗体、そのような抗体を生成する方法、抗体パートナー分子複合体、およびそのような抗体を含む二重特異性分子、ならびにそのような抗体、抗体パートナー分子複合体または二重特異性分子を含む医薬組成物を提供する。また、相同抗体(homologous antibody)、保存された修飾を有する抗体、遺伝子操作および修飾された抗体、抗体フラグメント、ならびに抗体模倣物、さらに以下に記載される各々などの変異体または代替物も提供される。また、本開示は、メソテリンタンパク質を検出することなどの抗体を使用する方法、および本発明の抗メソテリン抗体を使用して、腫瘍細胞などのメソテリン発現細胞の増殖を阻害する方法に関する。従って、本開示は、本開示の抗メ
40

ソテリン抗体を使用して、例えば卵巣癌、膵臓癌、胃癌、肺癌、子宮内膜癌、および中皮腫などの種々のタイプの癌を処置する方法もまた提供する。好ましくは、その抗体、複合体、二重特異性分子、代替物、または改変体は、ヒトメソテリンへの結合、メソテリン発現細胞による内在化、メソテリンの C A 1 2 5 への結合の阻害、メソテリン発現細胞に対する A D C C の媒介、生体内でのメソテリン発現腫瘍細胞の増殖の阻害、これらの特性のうちの 1 つ以上を示す。抗体は、(好ましくは)ヒト抗体、ヒト化抗体、また、キメラ抗体でもよい。

【 0 0 3 1 】

本開示をより理解できるようにするために、所定の語句が最初に定義される。追加的な定義は、その詳細な説明全体にわたって記載される。

10

【 0 0 3 2 】

「メソテリン」の語は、変異体、アイソフォーム、ホモログ、オルソログ、およびパラログを含んでいる。例えば、ヒトメソテリンタンパク質に対する抗体特異性は、特定の場合において、ヒト以外の種からのメソテリンタンパク質と交差反応し得る。他の実施形態では、その抗体は、ヒトメソテリンタンパク質に対して完全に特異性であり得、種または他のタイプの交差反応性を示さないか、あるいは、特定の他の種からのメソテリンと交差反応し得るが、全ての他の種とするわけではない(例えば、靈長類のメソテリンとの交差反応はあるが、マウスのメソテリンとはない)。「ヒトメソテリン」の語は、ジェンバンクのアクセッション番号 N P _ 0 0 5 8 1 4 を有するヒトメソテリンの完全なアミノ酸配列の様な、ヒト配列のメソテリンを指す。「マウスマソテリン」の語は、ジェンバンクのアクセッション番号 N P _ 0 6 1 3 4 5 を有するマウスマソテリンの完全なアミノ酸配列の様な、マウス配列のメソテリンを指す。メソテリンの N 末端部分は、巨核球増強因子(M P F)としても知られている。このヒトメソテリンの配列は、例えば、保存された変異または保存されていない領域の変異を有することにより、ジェンバンクのアクセッション番号 N P _ 0 0 5 8 1 4 のヒトメソテリンとは異なり得、メソテリンは実質的には、 C A 1 2 5 と結合する様な、ジェンバンクのアクセッション番号 N P _ 0 0 5 8 1 4 のヒトメソテリンと同じ生物学的な機能を有している。

20

【 0 0 3 3 】

特定のヒトメソテリン配列は、一般的には、ジェンバンクのアクセッション番号 N P _ 0 0 5 8 1 4 のヒトメソテリンに対してアミノ酸配列において少なくとも 9 0 % 同一であり、他の種(例えば、マウス)のメソテリンのアミノ酸配列と比較した場合、ヒトである場合のアミノ酸配列を特定するアミノ酸残基を含んでいる。特定の場合において、ヒトメソテリンは、ジェンバンクのアクセッション番号 N P _ 0 0 5 8 1 4 のメソテリンに対してアミノ酸配列において少なくとも 9 5 %、またはさらに少なくとも 9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % 同一であり得る。特定の実施形態では、ヒトメソテリンの配列は、ジェンバンクのアクセッション番号 N P _ 0 0 5 8 1 4 のメソテリンの配列と 1 0 以下のアミノ酸の相違を示す。特定の実施形態では、そのヒトメソテリンの配列は、ジェンバンクのアクセッション番号 N P _ 0 0 5 8 1 4 のメソテリンの配列と 5 以下、またはさらに 4、3、2、1 以下のアミノ酸の相違を示してもよい。割合の特定は本明細書に記載されるように決定できる。

40

【 0 0 3 4 】

「 C A 1 2 5 」の語は、 M U C - 1 6 としても知られている、卵巣癌の抗原、または卵巣癌腫瘍マーカーを指す。「ヒト C A 1 2 5 」の語は、ジェンバンクのアクセッション番号 N P _ 0 7 8 9 6 6 を有するヒト C A 1 2 5 の完全アミノ酸配列の様な、ヒト配列の C A 1 2 5 を指す。ヒト C A 1 2 5 の配列は、例えば、保存された変異または保存されていない領域の変異を有することによってジェンバンクのアクセッション番号 N P _ 0 7 8 9 6 6 のヒト C A 1 2 5 とは異なり得る。特定のヒト C A 1 2 5 の配列は、一般的には、ジェンバンクのアクセッション番号 N P _ 0 7 8 9 6 6 のヒト C A 1 2 5 に対してアミノ酸配列において少なくとも 9 0 % 同一であり、他の種(例えば、マウス)の C A 1 2 5 のアミノ酸配列と比較した場合、ヒトである場合のアミノ酸配列を特定するアミノ酸残基を含

50

んでいる。特定の場合において、ヒト C A 1 2 5 は、ジェンバンクのアクセッショング番号 N P _ 0 7 8 9 6 6 の C A 1 2 5 に対してアミノ酸配列において少なくとも 9 5 %、またはさらに少なくとも 9 6 %、9 7 %、9 8 %もしくは 9 9 % 同一であり得る。特定の実施形態では、ヒト C A 1 2 5 の配列は、ジェンバンクのアクセッショング番号 N P _ 0 7 8 9 6 6 の C A 1 2 5 の配列とは 1 0 以下のアミノ酸の相違を示す。特定の実施形態では、ヒト C A 1 2 5 は、ジェンバンクのアクセッショング番号 N P _ 0 7 8 9 6 6 の C A 1 2 5 の配列とは 5 以下、またはさらに 4、3、2、もしくは 1 以下のアミノ酸の相違を示してもよい。割合の特定は本明細書に記載されるように決定できる。

【 0 0 3 5 】

「免疫反応」の語は、例えばリンパ球、抗原提示細胞、食細胞、顆粒球、および上記細胞や肝臓で生成される可溶性巨大分子（抗体、サイトカイン、および補体を含む）の作用であって、侵入する病原体、病原体に感染した細胞または組織、癌細胞、または自己免疫もしくは病的炎症の場合には正常なヒト細胞もしくは組織に対して選択的に損傷を与えること、それらを破壊すること、またはそれらをヒトの身体から除去することを生じることを指す。

【 0 0 3 6 】

「シグナル伝達経路」は、細胞のある部分から細胞の別の部分へのシグナル伝達の役割を担う、種々のシグナル伝達分子間の生化学的関係を指す。「細胞表面レセプター」の語は、シグナルを受信し、細胞の原形質膜を介してシグナルを伝達させることができ分子および分子の複合体を含む。「細胞表面レセプター」の例は、ヒトメソテリンである。

【 0 0 3 7 】

「抗体」の語は、全抗体、および、任意の抗原結合フラグメント（「抗原結合部分」）またはその一本鎖を指す。「抗体」は、ジスフィルド結合による少なくとも 2 つの重（H）鎖および 2 つの軽（L）鎖間の結合を含む糖タンパク質、またはその抗原結合部分を指す。各々の重鎖は、重鎖の可変領域（本明細書中で、V_Hとして短縮される）および重鎖の定常領域から構成される。重鎖の定常領域は、3 つの領域 C_H 1、C_H 2、および C_H 3 から構成される。各々の軽鎖は、軽鎖の可変領域（本明細書中で、V_Lとして短縮される）および軽鎖の定常領域から構成される。軽鎖の定常領域は、1 つの領域 C_L から構成される。V_H および V_L は、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変性の領域に更に細かく分けることができ、フレームワーク領域（FR）と呼ばれるより保存される領域に散在され得る。V_H および V_L の各々は、3 つの CDR および 4 つの FR から成り、アミノ末端からカルボキシ末端まで、FR 1、CDR 1、FR 2、CDR 2、FR 3、CDR 3、FR 4 の順に配列される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合領域を含んでいる。抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞（例えばエフェクタ細胞）および古典的な補体系の第 1 成分（C1q）を含む、宿主組織または因子との免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用する場合、「抗体フラグメント」、および抗体の「抗原結合部分」（または単に「抗体部分」）の語は、特異的に抗原（例えばメソテリン）と結合する能力を保有する抗体の 1 つまたはそれ以上のフラグメントを指す。抗体の抗原結合の機能は、完全長の抗体のフラグメントによって達成され得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」の語で包含される結合フラグメントの例としては、(i) F_ab フラグメント、V_L、V_H、C_L、および C_H 1 領域から成る一価のフラグメント、(i i) F (a b')₂ フラグメント、ヒンジ領域でのジスルフィド結合により連結される 2 つの F_ab フラグメントで構成される二価のフラグメント、(i i i) F_ab' フラグメント、本質的にはヒンジ領域の部分を有する F_ab (FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY Paul ed., 第 3 版, 1993 を参照)、(i v) V_H および C_H 1 領域から成る F_d フラグメント、(v) 抗体の单一アームの V_L および V_H 領域から成る F_v フラグメント、(v i) V_H 領域から成る dA b フラグメント (Wardら, (1989) Nature 341: 544 - 546)、(v i i) 単離された相補性決定領域（CDR）、およ

10

20

30

40

50

び(v i i i) ナノボディ、単一可変領域および 2 つの定常領域を含む重鎖可変領域、が挙げられる。更に、Fv フラグメントの 2 つの領域、V_L、および V_H は、別の遺伝子によってコードされるが、それらを、一価の分子を形成するための V_L および V_H 領域対である単一のタンパク質鎖(一本鎖 Fv (scFv))として公知である；例えば、Birdら(1988) Science 242: 423-426；および Hustonら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 を参照)として作製できる合成リンカーによって、組み換え法を用いて結合され得る。その様な一本鎖の抗体もまた、抗体の「抗原結合部分」の語に含まれることが意図される。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の従来の技術を使用して得られ、そのフラグメントは、インタクトな抗体として同様の手法での利用のためにスクリーニングされる。 10

【0039】

「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含んでいない(例えば、メソテリンと特異的に結合する単離された抗体が、他の抗原と特異的に結合する抗体を実質的に含んでいない)抗体を指す。しかしながら、メソテリンと特異的に結合する単離された抗体は、他の種からのメソテリン分子の様な他の抗原との交差反応性を有し得る。更に、単離された抗体は、他の細胞物質、および/または化学物質を実質的に含まなくてよい。

【0040】

「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」の語は、単一の分子組成物の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性、および親和性を示す。 20

【0041】

「ヒト抗体」の語は、フレームワークおよび CDR 領域の両方がヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来する、可変領域を有する抗体を指す。更に、その抗体が定常領域を含んでいる場合、その定常領域もまた、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来する。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基(例えば、体外でのランダムまたは部位特異的突然変異、あるいは、体内での体細胞変異により誘導される変異)を含み得る。しかしながら、「ヒト抗体」は、マウスの様な別の哺乳動物種の生殖細胞系列に由来する CDR 配列が、ヒトのフレームワーク配列上に移植されている抗体を含むことを意図するわけではない。 30

【0042】

「ヒトモノクローナル抗体」の語は、フレームワークおよび CDR 領域の両方がヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する単一の結合特異性を示す抗体を指す。ある実施形態においては、ヒトモノクローナル抗体は、例えばトランスジェニックマウスのようなトランスジェニック非ヒト動物由来で、不死化細胞に融合したヒトの重鎖トランス遺伝子および軽鎖トランス遺伝子を含むゲノムを有している B 細胞を含むハイブリドーマにより生成される。

【0043】

本明細書に使用される場合、「組み換えヒト抗体」の語は、組み換え法により、調製、発現、作製、または単離される全てのヒト抗体を含み、例えば、(a)ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックまたはトランスクロモソーマルである動物(例えばマウス)、あるいは、それらから調製されるハイブリドーマ(以下にさらに記載される)から単離された抗体、(b)ヒト抗体を発現させるように形質転換された宿主細胞、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、(c)組み換え型複合ヒト抗体ライブライマーから単離された抗体、および(d)ヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他の DNA 配列にスプライシングすることを含む任意の他の手段によって調製、発現、作製、または単離された抗体である。その様な組み換えヒト抗体は、フレームワークおよび CDR 領域がヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかし、特定の実施形態では、その様な組み換えヒト抗体に、体外の変異誘発(または、ヒト Ig 配列に関してトランスジェニックである動物を用いる場合には、体内の体細胞変異誘発)を供するこ 40

とができ、このように、組み換え抗体の V_H および V_L 領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列 V_H および V_L 配列に由来して関連するが、体内でヒト抗体生殖細胞系列レパートリー内には天然で存在しない可能性がある配列となる。

【0044】

「アイソタイプ」の語は、重鎖の定常領域の遺伝子によりコードされる抗体クラス（例えば、IgM または IgG1）を指す。

【0045】

「抗原を認識する抗体」および「抗原に対して特異的な抗体」の語は、「抗原と特異的に結合する抗体」と互換的に用いられる。

【0046】

「ヒト抗体の誘導体」の語は、例えば抗体と他の物質または抗体との複合体などの、ヒト抗体の任意の改変された形態を指す。

【0047】

「ヒト化抗体」の語は、マウスのような別の哺乳動物細胞種の生殖細胞系列に由来する CDR 配列が、ヒトのフレームワーク配列上に移植されている抗体を指す。さらなるフレームワーク領域の改変が、ヒトのフレームワーク配列内でなされてもよい。

【0048】

「キメラ抗体」の語は、可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体の様な、可変領域配列がある種に由来し、定常領域配列がその他の種に由来する抗体を指す。

【0049】

「抗体模倣物」の語は、抗体の抗原への結合能力を模擬できる分子を指すが、天然の抗体構造に限定されない。このような抗体模倣物の例としては、アフィボディ（Affibody）、DARPins、アンチカリン（Anticalin）、アビマー（Avimer）、およびヴァーサボディ（Versabody）が挙げられるが、これらに限定されず、これらの全ては以下にさらに記載される。

【0050】

「パートナー分子」の語は、抗体パートナー分子複合体における抗体に結合される構成要素を指す。パートナー分子の例としては、薬物、毒素、マーカー分子、タンパク質、および治療剤が挙げられる。

【0051】

本明細書で用いられる場合、「ヒトメソテリンに特異的に結合する」抗体は、 1×10^{-7} M 以下、より好ましくは 5×10^{-8} M 以下、より好ましくは 3×10^{-8} M 以下、より好ましくは 1×10^{-8} M 以下、さらにより好ましくは 5×10^{-9} M 以下の K_D でヒトメソテリンに結合する抗体を指すことを意図する。

【0052】

本明細書で用いられる場合、タンパク質または細胞に「実質的には結合しない」との語は、タンパク質または細胞に対して結合しないか、または、高い親和性で結合しないことを意味し、すなわち、 1×10^{-6} M 以上、より好ましくは 1×10^{-5} M 以上、より好ましくは 1×10^{-4} M 以上、より好ましくは 1×10^{-3} M 以上、さらにより好ましくは 1×10^{-2} M 以上の K_D でタンパク質または細胞に結合することを意味する。

【0053】

本明細書で用いられる場合、「 K_{assoc} 」、または「 K_a 」の語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度を指し、一方、「 K_{diss} 」、または「 K_d 」の語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を指すことを意図している。本明細書で用いられる場合、「 K_D 」の語は、解離定数を指し、それは、 K_a に対する K_d の比（すなわち K_d / K_a ）から得られ、モル濃度 (M) として表される。抗体についての K_D の値は、当該分野で十分に確立されている方法を用いて決定され得る。抗体の K_D を決定するための好ましい方法は、表面プラズモン共鳴、好ましくは Biacore (登録商標) システムのようなバイオセンサーシステムを用いることによるものである。

10

20

30

40

50

【0054】

IgG抗体に対する「高い親和性」の語は、標的抗原に対して 1×10^{-7} M以下、より好ましくは、 5×10^{-8} M以下、さらにより好ましくは 1×10^{-8} M以下、さらにより好ましくは 5×10^{-9} M以下、およびより好ましくは 1×10^{-9} M以下のK_Dを有する抗体を指す。しかし、「高い親和性」の結合は、他の抗体のアイソタイプに対して変化し得る。例えば、IgMアイソタイプに対する「高い親和性」の結合は、 10^{-6} M以下、より好ましくは、 10^{-7} M以下、さらにより好ましくは 10^{-8} M以下のK_Dを有する抗体を指す。

【0055】

「被験体」の語は、任意のヒト、または非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」の語は、全ての脊椎動物を含み、例えば、非ヒトの靈長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの、哺乳動物および非哺乳動物を含む。

【0056】

「アルキル」の語は、単独で、またはその他の置換基の一部として、特に指定のない限り、直鎖もしくは分枝鎖、または環状炭化水素ラジカル、あるいはこれらの組み合わせを意味し、それらは、完全に飽和されてもよく、一価もしくは多価不飽和であってもよく、指定される炭素原子の数を有する二価および多価のラジカルを含んでもよい（すなわち、C₁ - C₁₀は1から10の炭素を意味する）。飽和炭化水素ラジカルの例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、t-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、シクロヘキシリ、（シクロヘキシリ）メチル、シクロプロピルメチル、例えばn-ペンチル、n-ヘキシリ、n-ヘブチル、n-オクチルなどのホモログ、およびアイソマーなどの基が挙げられるが、これらに限定されない。不飽和アルキル基は、1つまたはそれ以上の二重結合または三重結合を有するものである。不飽和アルキル基の例としては、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-(ブタジエニル)、2,4-ペンタジエニル、3-(1,4-ペンタジエニル)、エチニル、1-および3-プロピニル、3-ブチニル、およびそれより大きいホモログおよびアイソマーが挙げられるが、これらに限定されない。「アルキル」の語は、特に指定されない限り、「ヘテロアルキル」の様な、以下により詳細に定義されるアルキルのそれらの誘導体も含むことを意味する。アルキル基は、炭化水素基に限定され、それらは「ホモアルキル」と称される。

【0057】

「アルキレン」の語は、単独で、またはその他の置換基の一部として、限定されないが、-CH₂CH₂CH₂CH₂-によって例示されるようにアルカンに由来する二価のラジカルを意味し、更に「ヘテロアルキレン」として以下に記載されるそれらの基を含む。典型的には、アルキル（またはアルキレン）基は、1から24の炭素原子を有しており、10またはより少ない炭素原子を持つそれらの基が本発明においては好ましい。「低級アルキル」または「低級アルキレン」は、より短い鎖のアルキルまたはアルキレン基であり、一般的には8またはより少ない炭素原子を有している。

【0058】

「ヘテロアルキル」の語は、単独で、またはその他の語と組み合わせて、特に指定のない限り、安定な直鎖または分枝鎖、または、環状炭化水素ラジカル、あるいはそれらの組み合わせを意味し、それらは、指定された炭素原子の数ならびにO、N、Si、およびSから選択される少なくとも1つのヘテロ原子から成り、窒素、炭素、および硫黄原子は、任意に酸化されてもよく、窒素のヘテロ原子は、任意に四級化されてもよい。ヘテロ原子（複数も含む）のO、N、S、およびSiは、ヘテロアルキル基の任意の内部の位置、または、アルキル基が分子の残りに結合される位置に配置されてもよい。例としては、-CH₂CH₂OCH₃、-CH₂CH₂NHCH₃、-CH₂CH₂N(CH₃)₂、-CH₂CH₂SC₂H₅、-CH₂CH₂S(O)CH₃、-CH₂CH₂S(O)₂CH₃、-CH=CHOC₂H₅、-Si(CH₃)₃、-CH₂CH=NOC₂H₅および-CH=CHN(CH₃)₂が挙げられるが、これらに限定されない。2つまでのヘテロ原子が

10

20

30

40

50

、例えば - C H ₂ N H O C H ₃ 、および - C H ₂ O S i (C H ₃) ₃ の様に連続してもよい。同様に、「ヘテロアルキレン」の語は、単独で、またはその他の置換基の一部として、限定されないが、 - C H ₂ C H ₂ S C H ₂ C H ₂ - および - C H ₂ S C H ₂ C H ₂ N H C H ₂ - によって例示されるようにヘテロアルキルに由来する二価のラジカルを意味する。ヘテロアルキレン基に関して、ヘテロ原子はまた、鎖末端の一方または両方を占有し得る（例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど）。「ヘテロアルキル」および「ヘテロアルキレン」の語は、ポリ（エチレングリコール）、およびその誘導体を包含する（例えば、Shearwater Polymer Catalog, 2001を参照）。なおさらに、アルキレンおよびヘテロアルキレンの連結基に関して、連結基の配向性がないことが、連結基の式が記載された方向により示される。例えば、式 - C (O) ₂ R ' - は、 - C (O) ₂ R ' - および - R ' C (O) ₂ - の両方を表す。

【0059】

「アルキル」または「ヘテロアルキル」の語と組み合わされる「低級」の語は、1から6の炭素原子を有する部分を指す。

【0060】

「アルコキシ」、「アルキルアミノ」、「アルキルスルホニル」、および「アルキルチオ」（またはチオアルコキシ）の語は、それらの従来の意味で使用され、酸素原子、アミノ基、S O ₂ 基、または硫黄原子、それぞれを介して分子の残りに結合されるそれらのアルキル基を指す。「アリールスルホニル」の語は、S O ₂ 基を介して分子の残りに結合されるアリール基を参照し、「スルフヒドリル」の語は、S H 基を指す。

【0061】

一般に、「アシル置換基」はまた、上述に説明した基から選択される。本明細書に使用される場合、「アシル置換基」の語は、本発明の化合物の多環式環に直接的または間接的のいずれかで結合されるカルボニル炭素に結合され、価数を満たす基を指す。

【0062】

「シクロアルキル」および「ヘテロシクロアルキル」の語は、それら単独または他の語と組み合わせで、特に指定がない限り、置換または非置換「アルキル」および置換または非置換「ヘテロアルキル」それぞれの環状型を表す。さらに、ヘテロシクロアルキルに関して、ヘテロ原子は、ヘテロ環が分子の残りに結合される位置にて占有し得る。シクロアルキルの例としては、シクロヘキシル、シクロヘキシル、1 - シクロヘキセニル、3 - シクロヘキセニル、シクロヘプチルなどが挙げられるが、これらに限定されない。ヘテロシクロアルキルの例としては、1 - (1, 2, 5, 6 - テトラヒドロピリジル)、1 - ピペリジニル、2 - ピペリジニル、3 - ピペリジニル、4 - モルホリニル、3 - モルホリニル、テトラヒドロフラン - 2 - イル、テトラヒドロフラン - 3 - イル、テトラヒドロチエン - 2 - イル、テトラヒドロチエン - 3 - イル、1 - ピペラジニル、2 - ピペラジニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。環状構造のヘテロ原子および炭素原子は、任意的に酸化される。

【0063】

「ハロ」または「ハロゲン」の語は、単独で、またはその他の置換基の一部として、特に指定のない限り、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素の原子を意味する。加えて、「ハロアルキル」の様な語は、モノハロアルキル、およびポリハロアルキルを含むことを意味する。例えば、「ハロ (C ₁ - C ₄) アルキル」の語は、トリフルオロメチル、2, 2, 2 - トリフルオロエチル、4 - クロロブチル、3 - ブロモプロピルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0064】

「アリール」の語は、特に指定がない限り、一緒に縮合または共有結合される単環または多環（好ましくは1から3つの環）であり得る置換または非置換ポリ不飽和、芳香族、炭化水素置換基を意味する。「ヘテロアリール」の語は、N、O、およびSから選択される1つから4つのヘテロ原子を含むアリール基（または環）を指し、窒素、炭素、および

10

20

30

40

50

硫黄原子は、任意的に酸化され、窒素原子（複数も含む）は任意的に四級化される。ヘテロアリール基は、ヘテロ原子を介して分子の残り結合され得る。アリールおよびヘテロアリール基の限定されない例としては、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、4-ビフェニル、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル、3-ピラゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル、ピラジニル、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、2-フェニル-4-オキサゾリル、5-オキサゾリル、3-イソオキサゾリル、4-イソオキサゾリル、5-イソオキサゾリル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル、2-フリル、3-フリル、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-ピリミジル、4-ピリミジル、5-ベンゾチアゾリル、ブリニル、2-ベンズイミダゾリル、5-インドリル、1-イソキノリル、5-イソキノリル、2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、3-キノリル、および6-キノリルが挙げられる。上記アリールおよびヘテロアリール環系の各々に対する置換基は、以下に記載の受容可能な置換基の群から選択される。「アリール」および「ヘテロアリール」はまた、1つまたはそれより多くの非芳香族の環系が縮合された環系、あるいは、アリールまたはヘテロアリール系に結合されたものも包含する。

【0065】

簡潔さのために、他の語（例えばアリールオキシ、アリールチオキシ、アリールアルキル）と組み合わせて使用される場合、「アリール」の語は、アリールおよびヘテロアリール環の両方が上に定義されるように含まれる。したがって、「アリールアルキル」の語は、アリール基がアルキル基（例えば、ベンジル、フェネチル、ピリジルメチルなど）に結合されるそれらのラジカルを含むことを意味し、炭素原子（例えば、メチレン基）が、例えば、酸素原子と置換されているそれらのアルキル基（例えば、フェノキシメチル、2-ピリジルオキシメチル、3-（1-ナフチルオキシ）プロピルなど）を含む。

【0066】

上述の語（例えば、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリール」および「ヘテロアリール」）のそれぞれは、置換、および非置換、両方の示されたラジカルの形を含む。ラジカルの各々のタイプに対して好ましい置換基は、以下に提供される。

【0067】

アルキル、およびヘテロアルキルラジカル（アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、およびヘテロシクロアルケニルとしてしばしば参照されるこれらの基を含む）に対する置換基は、一般的には、「アルキル置換基」および「ヘテロアルキル置換基」としてそれぞれ参照され、それらは、限定されないが、ゼロから（2m' + 1）までの範囲の数における、-OR'、=O、=NR'、=NOR'、-NR'R"、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R''R'''、-OC(=O)R'、-C(=O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(=O)NR'R''、-NR'R'C(=O)R'、-NR'C(=O)NR'R''R''' = NR'''、-NRC(NR'R'') = NR'''、-S(O)R'、-S(O)R''、-S(O)NR'R''、-NRSO₂R'、-CN、およびNO₂から選択される1つ以上の種々の基であり得、式中、m'はこのようなラジカルの炭素原子の全数である。R'、R''、R'''およびR'''の各々は、好ましくは、水素、置換または非置換ヘテロアルキル、例えば1~3のハロゲンで置換されたアリールなどの、置換または非置換アリール、置換または非置換アルキル、アルコキシまたはチオアルコキシ基、あるいは、アリールアルキル基をそれぞれ独立して指す。本発明の化合物が1つよりも大きいR基を含む場合、例えば、これらの基のうち1つより多くのものが存在する場合、各々のR基が、各々R'、R''、R'''およびR'''基として独立して選択される。R'および、R''が同一の窒素原子に結合される場合、それらは5, 6, または7員環を形成するために、窒素原子と結合され得る。例えば、-NR'R''は、1-ピロリジニル、および4-モルホリニルを含むが、これらに限定されないことを意味する。置換基の上記議論より、「アルキル」の語は、ハロアルカリ（例えば、

- C F₃、および - C H₂ C F₃)、およびアシリ(例えば、- C (= O) C H₃、- C (= O) C F₃、- C (= O) C H₃ O C H₃など)の様に、水素基の他の基に結合する炭素原子を含む基をも含むことを意味する、ということを当業者は理解するだろう。

【0068】

アルキルラジカルに対して記述した置換基と同様、アリール置換基、およびヘテロアリール置換基は、一般的に、「アリール置換基」および「ヘテロアリール置換基」としてそれぞれ参照され、且つ、変化し、ゼロから芳香族環系におけるオーブンバレンスの全数の範囲の数にて、例えば、ハロゲン、- O R'、= O、= N R'、= N - O R'、- N R' R'、- S R'、- ハロゲン、- S i R' R'、R'、- O C (= O) R'、- C (= O) R'、- C O₂ R'、- C (= O) N R' R'、- O C (= O) N R' R'、- N R' C (= O) R'、- N R' C (= O) N R' R'、- N R' C O₂ R'、- N R C (N R' R') = N R'、- S (= O) R'、- S (= O) R'、- S (= O) R'、- S (= O) R'、- N R C (N R' R') = N R'、- S (= O) R'、- S (= O) R'、- S (= O) R'、- S (= O) R'、- N₃、- C H (P h)₂、フルオロ(C₁ - C₄)アルコキシ、およびフルオロ(C₁ - C₄)アルキルから選択され、ここで、R'、R'、R'、およびR'は、好ましくは、水素、(C₁ - C₈)アルキルおよびヘテロアルキル、非置換アリールおよびヘテロアリール、(非置換アリール)- (C₁ - C₄)アルキル、および(非置換アリール)オキシ- (C₁ - C₄)アルキルから独立して選択される。本発明の化合物が1つよりも大きいR基を含む場合、例えば、これらの基のうち1つより多くのものが存在する場合、各々のR基が、各々R'、R'、R'、およびR'基として独立して選択される。

【0069】

アリールまたはヘテロアリール環の原子に隣接するアリール置換基の2つは、- T - C (O) - (C R R')_q - U - の式の置換基に任意に置換され得、ここで、TおよびUは、独立して- N R -、- O -、- C R R' -、または単結合であり、qは0から3の整数である。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接する原子の置換基の2つは、- A - (C H₂)_r - B - の式の置換基と任意に置換され得、ここで、AおよびBは、独立して- C R R' -、- O -、- N R -、- S -、- S (O) -、- S (O)₂ -、- S (O)₂ N R' -、または単結合であり、rは1から4の整数である。形成される新たな環の単結合の1つは、任意に二重結合と置換されてもよい。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接する原子の置換基の2つは、- (C R R')_s X (C R' R')_d - の式の置換基と任意に置換され得、ここで、sおよびdは、独立して0から3の整数であり、Xは、- O -、- N R' -、- S -、- S (= O) -、- S (= O)₂ -、または、- S (= O)₂ N R' - である。R、R'、R'、およびR'の置換基は、好ましくは独立して水素、あるいは、置換または非置換(C₁ - C₆)アルキルから選択される。

【0070】

本明細書で使用する場合、「ジホスフェート」の語は、2つのリン酸基を含むリン酸エステルを含むが、これに限定されない。「トリホスフェート」の語は、3つのリン酸基を含むリン酸エステルを含むが、これに限定されない。

【0071】

本明細書で使用する場合、「ヘテロ原子」の語は、酸素(O)、窒素(N)、硫黄(S)、およびケイ素(Si)を含む。

【0072】

「R」の文字は、文脈が他のものを示していない限り、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換アリール、置換または非置換ヘテロアリール、および置換または非置換ヘテロシクリル基、から選択される置換基を表す一般的な略称である。

【0073】

本発明の様々な態様は、以下のサブセクションの更なる詳細にて記載される。

10

20

30

40

50

【0074】

(特定の機能特性を有する抗メソテリン抗体)

本開示の抗体は、特定の機能特徴または特性により、特徴付けられる。例えば、それらは、細胞表面に発現するヒトメソテリンの様に、特異的にヒトメソテリンと結合する。好ましくは、本開示の抗体は、高い親和性、例えば、 1×10^{-7} M以下の K_D 、より好ましくは 5×10^{-8} M以下の K_D 、より好ましくは 1×10^{-8} M以下の K_D でヒトメソテリンと結合する。本開示の抗メソテリン抗体は、ヒトメソテリンと結合し、好ましくは、1つまたはそれよりも多くの次の特性を示す。

(a) 1×10^{-8} M以下の K_D でヒトメソテリンと結合し、

(b) メソテリン発現細胞により内在化され、

(c) 卵巣癌抗体CA125へのメソテリンの結合を阻害し、

(d) メソテリン発現細胞に対して抗体依存性細胞毒性(ADCC)を示し、

(e) 細胞毒素と複合されたとき、メソテリン発現細胞の体内での成長を阻害する。

【0075】

好ましくは、本開示の抗体は、メソテリンタンパク質に 5×10^{-8} M以下の K_D で結合し、メソテリンタンパク質に 3×10^{-8} M以下の K_D で結合し、メソテリンタンパク質に 1×10^{-8} M以下の K_D で結合し、メソテリンタンパク質に 7×10^{-9} M以下の K_D で結合し、メソテリンタンパク質に 6×10^{-9} M以下の K_D で結合し、または、メソテリンタンパク質に 5×10^{-9} M以下の K_D で結合する。メソテリンに対する抗体の結合の親和性は、例えば、標準BIACORE解析(例えば実施例3Bを参照)により評価され得る。

【0076】

本発明の好ましい抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。追加的または選択的には、抗体は、例えば、キメラの、または、ヒト化されたモノクローナル抗体であり得る。

【0077】

(モノクローナル抗体3C10、6A4、および7B1)

本開示の好ましい抗体は、実施例1および2に記載したように、単離され、および、構造的に特徴づけられたヒトモノクローナル抗体3C10、6A4、および7B1である。3C10、6A4、および7B1の V_H アミノ酸配列は、それぞれ配列番号19、20、および21にて表される。3C10、6A4、および7B1の V_L アミノ酸配列は、それぞれ配列番号22、23、および24にて表される。

【0078】

その他の態様では、本開示は、3C10、6A4、または7B1、またはそれらの組み合わせの、重鎖および軽鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3から成る抗体を提供する。3C10、6A4、および7B1の V_H CDR1のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1-3にて表される。3C10、6A4、および7B1の V_H CDR2のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号4-6にて表される。3C10、6A4、および7B1の V_H CDR3のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号7-9にて表される。3C10、6A4、および7B1の V_L CDR1のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号10-12にて表される。3C10、6A4、および7B1の V_L CDR2のアミノ酸配列は、配列番号13-15にて表される。3C10、6A4、および7B1の V_L CDR3のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号16-18にて表される。CDR領域は、カバットシステム(Kabat、E.A.ら(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、米保健社会福祉省、NIH出版No.91-3242、下記に「Kabat'242」で表す)を用いて説明される。

【0079】

もし、これらの抗体のそれぞれが、ヒトメソテリンに結合し得、抗原結合の特異性が主としてCDR1、CDR2、およびCDR3領域により提供される場合、 V_H CDR1、CDR2、およびCDR3配列、ならびに V_L CDR1、CDR2、およびCDR3配列は、本開示の他の抗メソテリン結合分子を生成するために「混合され、適合され」得る(

10

20

30

40

50

すなわち、各々の抗体は、 V_H CDR 1、CDR 2、および CDR 3、ならびに、 V_L CDR 1、CDR 2、および CDR 3 を含んでいるが、異なる抗体からの CDR が混合され適合され得る）。好ましくは、 V_H CDR 配列が混合され、適合される場合、特定の V_H 配列からの CDR 1、CDR 2、および / または、CDR 3 配列は、構造的に同様な CDR 配列と置換される。同様に、 V_L CDR 配列が混合され、適合される場合、特定の V_L 配列からの CDR 1、CDR 2、および / または、CDR 3 配列は、好ましくは、構造的に同様な CDR 配列と置換される。モノクローナル抗体 3C10、6A4、および 7B1 に關し本明細書に開示された CDR 配列と構造的に同様の配列をもつ、1つまたはそれよりも多くの V_H および / または V_L CDR 領域の配列を置換することにより、新たな V_H および V_L 配列が生成され得ることは、当業者にとって、容易に明らかとなることである。

10

【0080】

従って、その他の態様では、本開示は、単離されたモノクローナル抗体、またはその抗原結合部分であって、

(a) 配列番号 1 - 3 で構成される群から選択された、アミノ酸配列から成る重鎖可変領域 CDR 1 と、

(b) 配列番号 4 - 6 で構成される群から選択された、アミノ酸配列から成る重鎖可変領域 CDR 2 と、

(c) 配列番号 7 - 9 で構成される群から選択された、アミノ酸配列から成る重鎖可変領域 CDR 3 と、

20

(d) 配列番号 10 - 12 で構成される群から選択された、アミノ酸配列から成る軽鎖可変領域 CDR 1 と、

(e) 配列番号 13 - 15 で構成される群から選択された、アミノ酸配列から成る軽鎖可変領域 CDR 2 と、

(f) 配列番号 16 - 18 で構成される群から選択された、アミノ酸配列から成る軽鎖可変領域 CDR 3 とを含み、

抗体が特異的にヒトメソテリンに結合するものを提供する。

【0081】

1つの好ましい実施形態では、その抗体が実施形態 A に従う。他の好ましい実施形態では、その抗体が実施形態 B に従う。また、他の好ましい実施形態では、その抗体が実施形態 C に従う。

30

【0082】

CDR 1 および / または CDR 2 領域（複数も含む）から独立して、CDR 3 領域は、関連する抗原への抗体の結合特異性を単独で決定し得、複数の抗体は、共通の CDR 3 配列に基づいて同一の結合特異性を有するように生成され得ることが当該分野において周知である。

【0083】

従って、本開示は、ヒトまたは非ヒト動物由来の抗体からの、1つまたはそれよりも多くの重鎖、および / または軽鎖の CDR 3 領域から成るモノクローナル抗体において、そのモノクローナル抗体がヒトメソテリンに特異的に結合することができるものを提供する。特定の態様のうちでは、本開示は、マウスやラットの抗体の様な、非ヒト抗体からの、1つまたはそれよりも多くの重鎖、および / または軽鎖の CDR 3 領域から成るモノクローナル抗体において、そのモノクローナル抗体がメソテリンに特異的に結合することができるものを提供する。いくつかの実施形態のうち、非ヒト抗体からの、1つまたはそれよりも多くの重鎖、および / または軽鎖の CDR 3 領域から成る本発明の抗体は、(a) 親の非ヒト抗体との結合に対し競合し得；(b) 親の非ヒト抗体の機能的な特性を保有し；(c) 親の非ヒト抗体と同一のエピトープと結合し；および / または、(d) 親の非ヒト抗体に対応する同様の結合の親和性を有する。

40

【0084】

他の態様のうちでは、本開示は、例えば、非ヒト動物から得られるヒト抗体の様な、ヒ

50

ト抗体からの、1つまたはそれよりも多くの重鎖、および／または軽鎖のCDR3領域から成るモノクローナル抗体において、ヒト抗体がヒトメソテリンに特異的に結合することができるものを提供する。他の態様のうちでは、本開示は、例えば、非ヒト動物から得られるヒト抗体の様な、第1のヒト抗体からの、1つまたはそれよりも多くの重鎖、および／または軽鎖のCDR3領域から成るモノクローナル抗体において、第1のヒト抗体が、ヒトメソテリンに特異的に結合することができ、第1のヒト抗体からのCDR3領域が、ヒトメソテリンに特異的に結合することができる第2のヒト抗体を生成するためのメソテリンに対する結合特異性が欠けている、ヒト抗体におけるCDR3と置き換わるものを探求する。幾つかの態様のうち、第1のヒト抗体からの、1つまたはそれよりも多くの重鎖、および／または軽鎖のCDR3領域から成る本発明の抗体は、(a)親の第1のヒト抗体との結合に対し競合し得；(b)親の第1のヒト抗体の機能的な特性を保有し；(c)親の第1のヒト抗体と同一のエピトープと結合し；および／または、(d)親の第1のヒト抗体に対応する同様の結合の親和性を有する。

【0085】

(特定の生殖細胞系列の配列を持つ抗体)

特定の実施形態では、本開示の抗体は、特定の生殖細胞系列の重鎖の免疫グロブリン遺伝子からのV_H、および／または、特定の生殖細胞系列の軽鎖の免疫グロブリン遺伝子からのV_Lを含んでいる。

【0086】

例えば、好ましい実施形態では、本開示は、ヒトのV_H3-33遺伝子またはヒトのV_H3-7遺伝子の生成物であるかまたはそれに由来するV_Hを含む、単離されたモノクローナル抗体、または、その抗原結合部分において、その抗体がヒトメソテリンに特異的に結合するものを提供する。その他の好ましい実施形態では、本開示は、ヒトのV_KL6遺伝子またはヒトのV_KA27遺伝子の生成物であるかまたはそれに由来するV_Lを含む、単離されたモノクローナル抗体、または、その抗原結合部分において、その抗体がヒトメソテリンに特異的に結合するものを提供する。また、その他の好ましい実施形態では、本開示は、単離されたモノクローナル抗体、または、その抗原結合部分において、その抗体が、ヒトのV_H3-33遺伝子の生成物であるかまたはそれに由来するV_Hを含み、ヒトのV_KL6遺伝子の生成物であるかまたはそれに由来するV_Lを含み、その抗体がヒトメソテリンに特異的に結合するものを提供する。また、その他の好ましい実施形態では、本開示は、単離されたモノクローナル抗体、または、その抗原結合部分において、その抗体が、ヒトのV_H3-7遺伝子の生成物であるかまたはそれに由来するV_Hを含み、ヒトのV_KA27遺伝子の生成物であるかまたはそれに由来するV_Lを含み、その抗体がヒトメソテリンに特異的に結合するものを提供する。

【0087】

その様な抗体は、ヒトメソテリンと結合する高い親和性、CA125へのメソテリンの結合による内在化、メソテリン発現細胞に対してADCを媒介する能力、および／または、細胞毒素とコンジュゲートされたとき、体内でのメソテリン発現腫瘍細胞の腫瘍増殖を阻害する能力の様な、1つまたはそれよりも多くの上に詳細を記載した機能的な特徴を有する。

【0088】

V_H3-33およびV_KL6のV_HおよびV_Lを有する抗体の例は、それぞれ3C10および6A4の抗体である。V_H3-7およびV_KA27のV_HおよびV_Lを有する抗体の例は、それぞれ7B1の抗体である。

【0089】

本明細書で使用される場合、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子を用いるシステムから抗体の可変領域が得られた場合、ヒト抗体は、特定の生殖細胞系列の配列「の生成物である」または「に由来する」重鎖または軽鎖の可変領域を含む。そのシステムは、ヒトの免疫グロブリン遺伝子を保有しているトランスジェニックマウスを免疫を目的の抗原を用いて免疫する工程、またはファージ上にディスプレイされたヒトの免疫グロブリン遺

10

20

30

40

50

伝子ライブラリーを目的の抗原を用いてスクリーニングする工程を含む。ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列「の生成物」である、またはヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に「由来する」ヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系列の免疫グロブリンのアミノ酸配列との比較、および、ヒト抗体の配列と最も近しい(例えば、最も大きい同一性の%)配列である、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリンの配列の選択により同定され得る。例えば、部位特異的突然変異の自然発生的な体細胞変異や意図的な導入のために、特定のヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列「の生成物である」または「に由来する」ヒト抗体は、生殖細胞系列を比較したときに異なるアミノ酸を含み得る。しかしながら、選択されたヒト抗体は、典型的には、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子によりコードされたアミノ酸配列と、アミノ酸配列において少なくとも90%の同一性があり、他の種の生殖細胞系列の免疫グロブリンのアミノ酸配列(例えば、マウス生殖細胞系列の配列)と比較したとき、ヒトである場合のヒト抗体を同定するアミノ酸残基を含む。特定の場合では、ヒト抗体は、生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子によりコードされたアミノ酸配列との、アミノ酸配列において少なくとも95%、またはさらに、少なくとも96%、97%、98%、または99%の同一性を有し得る。典型的には、特殊なヒト生殖細胞系列の配列に由来するヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子によりコードされたアミノ酸配列とは異なる、10以下のアミノ酸を表示する。特定の場合では、ヒト抗体は、生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子によりコードされたアミノ酸配列と異なる、5つ以下、または4つ、3つ、2つ、1つ以下のアミノ酸を表示し得る。

【0090】

10

(相同抗体)

また、その他の実施形態では、本開示の抗体は、本明細書に記載の好ましい抗体のアミノ酸配列とホモログなアミノ酸配列から成る重鎖および軽鎖の可変領域を含み、その抗体は、本開示の抗メソテリン抗体における望ましい機能的な特性を保有するようになっている。

【0091】

20

例えば、本開示は、 V_H および V_L を含む、単離されたモノクローナル抗体、または、その抗原結合部分において：(a) V_H は、配列番号19-21からなる群から選択されたアミノ酸配列との相同性が少なくとも80%であるアミノ酸配列を含み、(b) V_L は、配列番号22-24からなる群から選択されたアミノ酸配列との相同性が少なくとも80%であるアミノ酸配列を含み、(c)その抗体は、特異的にヒトメソテリンと結合するものを提供する。

【0092】

30

他の態様では、 V_H および/または V_L アミノ酸配列は、上記の配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の相同性がある。配列番号25-27、または28-30をコードする核酸分子の突然変異生成(例えば、部位特異的、または、PCRに媒介される突然変異生成)により、上記配列の V_H および V_L 領域と高い(すなわち、80%またはそれよりも大きい)相同性をもつ V_H および V_L 領域を有する抗体を得ることができ、続いて、本明細書に記載の機能的分析を用いて、コードされる変化した抗体の保有する機能(すなわち、上述の機能)について試験する。

40

【0093】

2つのアミノ酸配列間の相同性の割合は、2つの配列間の同一性の割合と等価である。ギャップの数、および各々のギャップの長さを考慮すると、2つの配列間の同一性の割合は、それらの配列により共有される一致した位置の数に依存し(すなわち、相同性% =一致する位置の#/位置の全# × 100)、それは2つの配列の最適な配置に対して導入されることが必要である。配列の比較、および2つの配列間の同一性の割合の決定は、限定されない下記の例に記載されるように、数学的なアルゴリズムを用いて達成され得る。

【0094】

2つのアミノ酸配列間の同一性の割合は、E. MeyersおよびW. Miller(Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))のア

50

ルゴリズムを用いて決定され得る。これは、PAM120の重量余剰、12のギャップ長さのペナルティ、および4のギャップペナルティを用いることで、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に取り入れられる。加えて、2つのアミノ酸配列間の同一性のパーセントは、Blossum62マトリクス、またはPAM250マトリクスの何れか、および16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重量、および1、2、3、4、5、または6の長さ重量が用いられる、GC Gソフトウェアパッケージ(htt p://www.gcg.comで利用可能)におけるGAPプログラムに取り入れられるNeedleman、およびWunsch(J.Mol.Biol.48:444-453(1970))のアルゴリズムを用いて決定され得る。

【0095】

10

本開示のタンパク質配列は、例えば、関連する配列を同定するため、公衆的データベースに対し検索するための「クエリー配列」として使用され得る。そのような検索は、Altschulら(1990)J.Mol.Biol.215:403-10のXBLASTプログラム(バージョン2.0)を用いて実行され得る。BLASTのタンパク質の検索は、本開示の抗体分子に相同意なアミノ酸配列を得るため、スコア=50、ワード長さ=3とした、XBLASTプログラムにて実行され得る。比較の目的に対してギャップ化された配置を得るために、Altschulら(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402に記載されたギャップドBLASTが利用され得る。BLASTおよびギャップドBLASTプログラムが利用される場合、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)の初期パラメータが便利である。www.ncbi.nlm.nih.govを参照。

【0096】

20

(保存的修飾を有する抗体)

特定の実施形態では、本開示の抗体は、CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むV_H、ならびにCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むV_Lを含み、1つまたはそれよりも多くのこれらのCDR配列は、公知の抗メソテリン抗体に基づいて特異化されたアミノ酸配列、またはその保存的修飾を含み、その抗体は、本開示の抗メソテリン抗体の望ましい機能的特性を保有するものである。当該分野においては、抗原への結合を取り除かない、特定の保存的な配列の修飾がなされ得ることが理解される。従って、本開示は、単離されたモノクローナル抗体、およびその抗原結合部分において、CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むV_H、ならびにCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むV_Lを含み、(a)そのV_HCDR3配列は、配列番号7-9のアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列、およびその保存的修飾を含み、(b)そのV_LCDR3配列は、配列番号16-18のアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列、およびその保存的修飾を含み、(c)その抗体がヒトメソテリンに特異的に結合するものを提供する。

【0097】

30

好ましい実施形態では、重鎖可変領域のCDR2配列は、配列番号4-6のアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列、およびその保存的修飾を含み、軽鎖可変領域のCDR2配列は、配列番号13-15のアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列、およびその保存的修飾を含む。その他の好ましい実施形態では、重鎖可変領域のCDR1配列は、配列番号1-3のアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列、およびその保存的修飾を含み、軽鎖可変領域のCDR1配列は、配列番号10-12のアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列、およびその保存的修飾を含む。

【0098】

40

「保存的な配列の修飾」の語は、アミノ酸配列を含む抗体の結合の特徴に、重大には影響しない、またはそれを変化させないアミノ酸修飾を指す。その様な保存的な修飾は、アミノ酸の置換、追加、および欠失を含む。修飾は、部位特異的な突然変異生成、およびPCRを介した突然変異生成の様に、当該分野において公知の標準的な技術により、抗体に導入され得る。保存的なアミノ酸の置換は、アミノ酸残基が、同様の側鎖を有するアミノ

50

酸残基と置き換えるものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野において定義される。これらのファミリーは、基本的な側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。従って、本開示の抗体のCDR領域内における1つまたはそれよりも多くのアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基と置き換わり得、変化した抗体は、本明細書に記載の機能的な分析を用いて、保有する機能が試験され得る。

10

【0099】

(抗メソテリン抗体としての同一エピトープへ結合する抗体)

その他の実施形態では、本開示は、本開示の任意の抗メソテリンモノクローナル抗体（即ち、本開示の任意のモノクローナル抗体と、ヒトメソテリンへの結合に対して交差競合する能力を有する抗体）により認識されたメソテリンにて、エピトープに結合する抗体を提供する。好ましい実施形態では、交差競合の研究に対する参照抗体は、モノクローナル抗体3C10（それぞれ配列番号19および22として示されるV_HおよびV_L配列を有する）、または、モノクローナル抗体6A4（それぞれ配列番号20および23として示されるV_HおよびV_L配列を有する）、または、モノクローナル抗体7B1（それぞれ配列番号21および24として示されるV_HおよびV_L配列を有する）であり得る。

20

【0100】

その様な交差競合する抗体は、ELISA、または、BIAcore分析の様な、標準のメソテリン結合の分析にて、3C10、6A4、または7B1と交差競合するそれらの能力に基づいて同定され得る。好ましい実施形態では、3C10、6A4、または7B1により認識されるヒトメソテリンにて同一のエピトープに結合する抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。その様なヒトモノクローナル抗体は、実施例における記載のように、調製および単離され得る。

【0101】

(遺伝子操作および修飾された抗体)

30

本発明の抗体は更に、出発抗体に比して、変化した特性を有する修飾された抗体を遺伝子操作するための出発物質として、1つまたはそれよりも多くの公知の抗メソテリンの抗体V_Hおよび/またはV_L配列を有する抗体を用いて調製され得る。1つ、またはV_HおよびV_L両方の範囲内の、1つまたはそれよりも多くのCDR領域の範囲内の、および/または、1つまたはそれよりも多くのフレームワーク領域の範囲内の、1つまたはそれよりも多くのアミノ酸が修飾され得る。追加的に、または選択的には、定常領域（複数も含む）の範囲内の残基は、抗体のエフェクター機能を変化するよう修飾され得る。

【0102】

特定の実施形態では、CDR連結が、抗体の可変領域を遺伝子操作するのに使用され得る。抗体は、それらのCDRでのアミノ酸残基を介して、大部分的に標的抗原と相互作用する。このため、CDRの範囲内のアミノ酸配列は、CDRの範囲外の配列に比して、個々の抗体間でより異なっている。抗体-抗原相互作用にCDR配列が最も応答するため、異なる特性の異なる抗体から異なるフレームワーク配列にて連結された特定の自然に発生した抗体から、CDR配列を含む発現ベクターを構築することで、特定の自然に発生した抗体の特性を模倣する組み換え抗体を発現させることが可能である（例えば、Riechmann、L.ら（1998）Nature 332:323-327；Jones、P.ら（1986）Nature 321:522-525；Queen、C.ら（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:10029-10033；米国特許第5,225,539号（Winter）および同第5,530,101号；同第5,585,089号；同第5,693,762号、および同第6,180,370号

40

50

(Queenら)を参照)。

【0103】

従って、本開示のその他の実施形態は、単離されたモノクローナル抗体、または、その抗原結合部分において、それぞれ、配列番号1-3、配列番号4-6、および配列番号7-9から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むV_H、ならびにそれぞれ、配列番号10-12、配列番号13-15、および配列番号16-18から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むV_Lを含むものに関連する。従って、その様な抗体は、これらの抗体からの異なるフレームワーク配列をさらに含み得るモノクローナル抗体3C10、6A4、または7B1の、V_HおよびV_LのCDR配列を含む。

10

【0104】

その様なフレームワーク配列は、公衆的なDNAデータベース、または、生殖細胞系列抗体の遺伝子配列を含む、公開された参考から得ることが可能である。例えば、ヒトのV_HおよびV_Lに対する生殖細胞系列のDNA配列は、「VBase」のヒト生殖細胞系列の配列データベース(www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbaseにてインターネットで利用可能である)および、カバット'242; Tomlinson, I. M.ら(1992)J. Mol. Biol. 227: 776-798; およびCox, J. P. L.ら(1994)Eur. J. Immunol. 24: 827-836; (これらの各々は本明細書に参照として援用される)に見出され得る。その他の例として、ヒトV_HおよびV_L遺伝子に対するその生殖細胞系列のDNA配列は、ジェンバンクデータベースにて見つけられ得る。例えば、HCo7 HuMAbマウスにて見つけられる以下の重鎖の生殖細胞系列の配列は、付随のジェンバンクのアクセッション番号: 1-69(NG_0010109、NT_024637、およびBC070333)、3-33(NG_0010109、およびNT_024637)および3-7(NG_0010109、およびNT_024637)で利用できる。その他の例としては、HuMAbマウスタイプのHCo12マウスにて見つけられる以下の重鎖の生殖細胞系列の配列は、付随のジェンバンクのアクセッション番号: 1-69(NG_0010109、NT_024637、およびBC070333)、5-51(NG_0010109、およびNT_024637)、4-34(NG_0010109、およびNT_024637)、3-30.3(CAJ556644)、および(AJ406678)で利用できる。ヒトの重鎖および軽鎖の生殖細胞系列における配列のさらなる別の供給源は、IMGT(<http://imgt.cines.fr>)から利用できるヒト免疫グロブリン遺伝子のデータベースである。

20

【0105】

抗体タンパク質配列は、当業者に周知のギャップドBLAST(Altschulら(1997)Nucleic Acids Research 25:3389-3402)と呼ばれる配列の類似性検索の手法の1つを用いて、編集されたタンパク質配列のデータベースと比較される。BLASTは、抗体配列とデータベース配列との間で統計的に重要な配置が、整列した語のハイスコアのセグメントペア(HSP)をほぼ含んでいる、発見的アルゴリズムである。拡張やトリミングにより、そのスコアが向上され得ないセグメントペアはヒットと呼ばれる。簡潔には、VBaseのヌクレオシド配列の源(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>)が翻訳され、その間の領域およびFR3フレームワーク領域を介したFR1を含むことが保有される。データベース配列は、98残基の平均長さを有する。タンパク質の全体の長さに亘り、厳密に一致する複製の配列は除去される。デフォルトでの、低複雑性フィルタを除く標準パラメータがオフにされた状態、且つ、BLOSUM62の置換マトリクスでの、プログラムblastを使用するタンパク質のBLAST検索は、配列一致で生じたトップ5のヒットを抽出する。そのヌクレオチド配列は、全6つのフレームにて翻訳され、データベース配列の一一致するセグメントにて終止コドンのないそのフレームは、ヒットの可能性があると考えられる。これは同様に、BLASTプログラムのtbl

40

50

as t x を用いることで確認され、それは、全 6 つのフレームにて抗体の配列を翻訳し、これらの翻訳を、全 6 つのフレームにて動的に翻訳される V B A S E ヌクレオチド配列と比較する。IMGT (http://imgt.cines.fr) から利用できるものの様な、他のヒト生殖細胞系列の配列データベースは、上記のような V B A S E と同様に検索され得る。

【 0106 】

その同定は、配列の全体の長さに亘る抗体配列とタンパク質データベースとの間の、厳密なアミノ酸の一致である。陽性（同一性 + 置換の一致）は、違わなくはないが、B L O S U M 6 2 置換マトリクスによりアミノ酸置換が導かれる。もし、抗体配列が、同一の同定によりデータベース配列の 2 つと一致する場合、最も大きい陽性を持つそのヒットは、一致配列のヒットとなるよう決定される。

【 0107 】

本開示の抗体における使用に対し、好ましいフレームワーク配列は、本開示の選択された抗体により使用されるフレームワーク配列と、構造的に同様であり、例えば、V_H 3 - 3 3 (配列番号 3 1) または V_H 3 - 7 (配列番号 3 2) フレームワーク配列、および / または、V_K L 6 (配列番号 3 3) または V_K A 2 7 (配列番号 3 4) フレームワーク配列と同様である。フレームワーク配列が派生する由来の生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子を見つけるのに、V_H C D R 1 、 C D R 2 、および C D R 3 配列、ならびに V_K C D R 1 、 C D R 2 、および C D R 3 配列は、同一の配列を有するフレームワーク領域にて連結され得、または、 C D R 配列が、生殖細胞系列の免疫グロブリン配列と比して 1 つまたはそれよりも多くの変異株を含むフレームワーク領域にて連結され得る。例えば、抗体の結合能力を維持または拡張させるため、フレームワーク領域内にて残基を変異させることが、特定の事例では利益的である、ということがわかる（例えば、米国特許第 5,530,101 号：同第 5,585,089 号：同第 5,693,762 号、および同第 6,180,370 号 (Queenら) を参照）。

【 0108 】

その他の可変領域の修飾のタイプは、1 つまたはそれよりも多くの結合特性（例えば、親和性）を向上させるための、V_H および / または V_K C D R 1 、 C D R 2 、および / または C D R 3 領域内でのアミノ酸残基の変異である。部位特異的な突然変異生成、または P C R 媒介された突然変異生成は、変異（複数も含む）を導入するため実行され得、抗体が結合する効果、または、その他の機能的な特性は、本明細書に記載されたような体内または体外の分析にて推定され得る。好ましくは保存的な修飾が導入される。その変異は、アミノ酸置換、追加、または欠失だが、好ましくは、置換である。更に、典型的には、 C D R 領域内の 1 つ、 2 つ、 3 つ、 4 つ、または 5 つ以下の残基が変化される。

【 0109 】

従って、その他の実施形態では、本発明の開示は、単離された抗メソテリンモノクローナル抗体、または、抗原結合部分であって、(a) 配列番号 1 - 3 から成る群から選択されたアミノ酸配列、または、配列番号 1 - 3 と比して、1 つ、 2 つ、 3 つ、 4 つ、または 5 つのアミノ酸置換、欠失、または追加を有するアミノ酸配列を含む V_H C D R 1 領域、(b) 配列番号 4 - 6 から成る群から選択されたアミノ酸配列、または、配列番号 4 - 6 と比して、1 つ、 2 つ、 3 つ、 4 つ、または 5 つのアミノ酸置換、欠失、または追加を有するアミノ酸配列を含む V_H C D R 2 領域、(c) 配列番号 7 - 9 から成る群から選択されたアミノ酸配列、または、配列番号 7 - 9 と比して、1 つ、 2 つ、 3 つ、 4 つ、または 5 つのアミノ酸置換、欠失、または追加を有するアミノ酸配列を含む V_H C D R 3 領域、(d) 配列番号 10 - 12 から成る群から選択されたアミノ酸配列、または、配列番号 10 - 12 と比して、1 つ、 2 つ、 3 つ、 4 つ、または 5 つのアミノ酸置換、欠失、または追加を有するアミノ酸配列を含む V_L C D R 1 領域、(e) 配列番号 13 - 15 から成る群から選択されたアミノ酸配列、または、配列番号 13 - 15 と比して、1 つ、 2 つ、 3 つ、 4 つ、または 5 つのアミノ酸置換、欠失、または追加を有するアミノ酸配列を含む V_L C D R 2 領域、(f) 配列番号 16 - 18 から成る群から選択されたアミノ酸配列、ま

10

20

30

40

50

たは、配列番号 16 - 18 と比して、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つのアミノ酸置換、欠失、または追加を有するアミノ酸配列を含む V_L CDR3 領域、を含むものを提供する。

【0110】

本発明の遺伝子操作された抗体は、例えば、抗体の特性を向上させる等の、 V_H および / または V_L 内のフレームワークの残基への修飾がなされるものを含む。典型的には、そのようなフレームワーク修飾は、抗体の免疫原性を減少させるためになされる。1つのアプローチは、1つまたはそれよりも多くのフレームワーク残基を、対応する生殖細胞系列の配列に「突然変異させる」ことである。より特定的には、体細胞変異を受ける抗体は、抗体の由来となる生殖細胞系列の配列と異なるフレームワーク残基を含み得る。その様な残基は、抗体のフレームワーク配列を、抗体の由来となる生殖細胞系列の配列と比較することで同定され得る。

【0111】

例えば、表 A は、フレームワーク領域のアミノ酸の位置（カバットナンバリングシステムを用いた）が生殖細胞系列とは異なる領域、およびこの位置が、指定された置換体により生殖細胞系列へどのように復帰突然変異し得るかを示している。

【0112】

(表 A)

表A - 例示的な復帰突然変異		
領域	フレームワークアミノ酸位置	復帰突然変異
3C10 V_H	3	Y3Q
3C10 V_H	27	I27F
3C10 V_H	82	L82Q
6A1 V_H	3	H3Q
6A4 V_H	23	V23A
6A4 V_H	27	I27F
6A4 V_H	30	R30S
6A4 V_H	93	I93V
7B1 V_H	3	H3Q
7B1 V_H	41	Q41P
7B1 V_H	80	S80Y

【0113】

フレームワーク修飾のその他のタイプは、T 細胞エピトープを除去し、それによって抗体の免疫原性のポテンシャルを減少させるために、フレームワーク領域内、または1つもしくはそれよりも多くの CDR 領域内にても、1つまたはそれよりも多くの残基を変異させることに関する。このアプローチは、また「脱免疫化」と称され、更なる詳細は Carr らによる米国特許出願第 2003 / 0153043 号に記載されている。

【0114】

追加的または選択的には、修飾は、フレームワークまたは CDR 領域内にてなされ、本発明の抗体は、Fc 領域内での修飾を含むように遺伝子操作され得、典型的には、血清の半減期、補体結合、Fc 領域の結合、および / または抗原依存性細胞毒性の様な、1つまたはそれよりも多くの機能的な特徴を変化させるように遺伝子操作され得る。更に、本発明の抗体は、化学的に修飾され（例えば、1つまたはそれよりも多くの化学的な部分が抗体に結合され得る）、または、その糖鎖形成を変化させ、再び、1つ以上の機能的特徴を変化させるよう修飾され得る。これらの実施形態それぞれは、更なる詳細が以下で記述される。Fc 領域における残基のナンバリングは、カバットの EU インデックスのものである。

【0115】

1つの実施形態では、Bodmer らによる米国特許第 5,677,425 号に記載さ

10

20

30

40

50

れたように、ヒンジ領域におけるシステイン残基の数が変化される（即ち、増加、または減少される）様な、CH1のヒンジ領域が修飾される。その様な変化は、軽鎖および重鎖のアセンブリ、または、抗体の安定性の減少または増加を促進し得る。

【0116】

その他の実施形態では、抗体のFcヒンジ領域が、抗体の生物学的な半減期を減少させるよう修飾される。より特定的には、1つまたはより多くのアミノ酸の変異は、Wardらによる米国特許第6,165,745号に記載されているように、天然のFc-ヒンジドメインのSpA結合に比して、抗体がStaphylococcalysin（SpA）の結合を弱めるような、Fc-ヒンジフラグメントのCH2-CH3ドメインの界面領域に導入される。

10

【0117】

その他の実施形態では、その抗体は、その生物学的な半減期を増加させるよう修飾がなされる。例えば、1つまたはそれよりも多くの次の変異が導入される：Wardによる米国特許第6,277,375号に記載されているような、T252L、T254S、T256F。選択的には、その抗体は、Prestaらによる米国特許第5,869,046号、および同第6,121,022号に記載されているように、IgGのFc領域のCH2ドメインにおける、2つのループから取り出されるエピトープに結合する救助レセプターを含むよう、CH1またはCL領域の範囲内にて変化され得る。

【0118】

他の実施形態では、そのFc領域が、そのエフェクター機能（複数も含む）を変化させるため、少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基に置き換えることにより変化される。例えば、1つまたはそれよりも多くのアミノ酸残基234、235、236、237、297、318、320、および322は、その抗体がエフェクター配位子-例えば、Fcレセプターまたは補体のC1補体-に対し親和性を変化させるように、異なるアミノ酸残基と置き換わり得るが、Winterらによる米国特許第5,624,821号、および同第5,648,260号の両方に記載のように、親の抗体の抗原結合の親和性を保有する。

20

【0119】

その他の実施形態では、1つまたはそれよりも多くのアミノ酸残基329、331、および322は、Idusogieらによる米国特許第6,194,551号に記載されているよう、その抗体がC1q結合を変化させる、および/または、補体依存性細胞毒性（CDC）を低減または無効にするように、置き換わり得る。

30

【0120】

そのほかの実施形態では、アミノ酸の位置231、および239内の、1つまたはそれよりも多くのアミノ酸残基は、補体を固定する抗体の能力を変化させることにより変化される。このアプローチは、Bodmerらによる国際公開第94/29351号に更に記載されている。

【0121】

その他の実施形態においては、そのFc領域は、次の位置：238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438、または439での1つまたはそれよりも多くのアミノ酸の修飾により、その抗体の抗体依存性細胞毒性（ADCC）へ媒介するための能力を増加せるように、および/または、Fcレセプターへの抗体の親和性を増加せるように修飾される。このアプローチは、Prestaによる国際公開第00/42072号にて更に記載されている。更に、ヒトIgG1のFcR1、FcRII、FcRIII、およ

40

50

び F c R n に対するその結合部位がマッピングされ、結合が向上された変異体が記載されている (Shields, R. L. ら (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 を参照)。位置 256、290、298、333、334、および 339 での特定の変異は、Fc RIIIへの結合を向上させると示された。追加的には、次の組み合わせの突然変異体は、Fc RIII結合を向上させると示された：T256A / S298A、S298A / E333A、S298A / K224A、および S298A / E333A / K334A。

【0122】

その他の実施形態では、本発明の抗体の C 末端は、PCT/US2008/07356 9 号に記載されているように、システイン残基の導入により修飾され、それは、その全てにおいて参照により援用される。その様な修飾は、重鎖配列の全長の C - 末端へのシステイン含有伸長 (cystein-containing extension) の導入と同様、重鎖配列の全長の C - 末端に、またはその近傍に存在しているアミノ酸残基の置き換えを含むが、それらに限定されない。好ましい実施形態においては、システイン含有伸長は、配列システイン - アラニン - アラニン (N - 末端から C - 末端までの) を含む。

【0123】

好ましい実施形態においては、C - 末端のシステイン修飾の存在は、治療剤、または、マーカー分子の様な、パートナー分子の複合に対する位置を提供する。特に、反応性のあるチオール基の存在は、C - 末端システイン修飾によって、ジスルフィドリンクまたはスルフヒドリル反応性のマレイミド基を用いるパートナー分子を複合するために用いられ得る。この手法による抗体のパートナー分子への複合は、取り付けの特定部位に対する増加コントロールを許容する。更に、C - 末端でのまたはその近傍での取り付け部位の導入により、複合はそれが抗体の機能的な特徴との干渉を低減または削除し、簡易化された解析および複合の準備の質的なコントロールを許容する様に最適化され得る。

【0124】

さらに他の実施形態においては、抗原への親和性を増大させるために、糖化の消去 (非糖化)、または、糖化の部位の変化により、抗体の糖化が修飾される。例えば、1つまたはそれよりも多くのアミノ酸置換がなされた結果、1つまたはそれよりも多くの可変領域のフレームワーク糖化部位の消去がなされ得る。その様な非糖化は、抗原に対するその抗体の親和性を増加させ得る。C o らによる米国特許第 5,714,350 号、および同第 6,350,861 号を参照のこと。非糖化の変化に対する追加的なアプローチは、Hanai らによる米国特許第 7,214,775 号；Presta による米国特許第 6,737,056 号；Presta による米国特許出願第 20070020260 号；Dickey らによる国際公開第 WO 2007/084926 号；Zhu らによる国際公開第 2006/089294 号；および Ravetch らによる国際公開第 2007/055916 号に記載されており、その全体は本明細書に参照により援用される。

【0125】

追加的、または選択的には、抗体は、低減されたフコシル残基の量を有するハイポフコシル化抗体、または、増加された分枝 GlcNAc 構造を有する抗体の様な、糖化の変化タイプを有するように作製され得る。変化された糖化パターンは、抗体の ADC C 能力を増大させることができることが実証された。このような炭化水素化の修飾は、例えば、変化された糖化機構にて、宿主細胞での抗体を発現させることにより達成され得る。例えば、細胞株 Ms704、Ms705、および Ms709 は、これらの細胞株にて発現された抗体が、それらの糖質上のフコースを欠落している様に、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8 (アルファ (1,6) フコシルトランスフェラーゼ) を欠落している。Yamane らによる米国特許出願第 2004/0110704 号、および Yamane - Ohnuki らの (2004) Biotechnol Bioeng 87: 614-22 を参照のこと。その他の例として、Hanai らによる欧州特許第 1,176,195 号は、機能的に分裂された FUT8 遺伝子を有する細胞株を記述し、それは、細胞株にて発現された抗体がハイポフコシル化を示す様に、フコシルトランスフェラーゼをコードする。Hanai

10

20

30

40

50

i らはまた、抗体の F c 領域に結合する N - アセチルグルコサミンへのフコースの追加に対する、低い酵素活性を有する細胞株を記載する。 Presta による国際公開第 WO 0 3 / 0 3 5 8 3 5 号は、フコースを Asn (297) が連結した糖質に取り付けるための、低減された能力をもち、その結果ハイポフコシル化を生じさせる、様々な CHO 細胞株、 Lec 13 細胞、を記載する（また、 Shields, R. L. らの (2002) J. Biol. Chem. 277 : 26733 - 26740 を参照）。Umana らによる国際公開第 WO 99 / 54342 号は、これらの細胞株により発現された抗体が、増加された分枝 G1cNac 構造、およびその抗体の増加された ADCD 活性を示す様に、糖タンパク質修飾したグリコシルトランスフェラーゼを発現させるため、遺伝子操作された細胞株を記載する（また Umana らの (1999) Nat. Biotech. 17 : 176 - 180 を参照）。選択的には、その抗体のフコース残基は、フコシダーゼ酵素を用いて切斷され得る（Tarentino, A. L. ら (1975) Biochem. 14 : 516 - 23 ）。

【 0126 】

追加的に、または、選択的には、抗体は、糖化が変化するタイプを有するように作製され、その変化は、抗体のシアリル化の程度に関連する。その様な変化は、 Dickey らによる国際公開第 WO 2007 / 0084926 号、および Ravetch らによる国際公開第 WO 2007 / 055916 号に記載されており、それらの両方は、参考に援用される。例えば、本明細書に参照により援用される米国特許第 5,831,077 号に記載されている様に、1つのものが、シアリダーゼでの酵素反応を使用し得る。他の適した酵素の例は、 Schloemer らによる J. Virology , 15 (4) , 882 - 893 (1975) 、および Leibiger らによる Biochem J. , 338 , 529 - 538 (1999) にそれぞれに記載されている様に、ノイラミニダーゼ、および N - グリコシダーゼ F である。選択的には、 Basset らによる Scandinavian Journal of Immunology , 51 (3) , 307 - 311 (2000) に記載されている様に、シアリルトランスフェラーゼ酵素の使用することによってなど、シアリル化の程度を増大させるための手法を使用し得る。

【 0127 】

本発明により企図される本明細書の抗体のその他の修飾は、 PEG 化である。抗体は、例えば、生物学的な（例えば、血清の）半減期を増大させるため、 PEG 化され得る。抗体を PEG 化するために、その抗体、またはそのフラグメントは、典型的には、 PEG の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体の様な、ポリエチレンギリコール（ PEG ）誘導体と反応する。または、 PEG 化は、反応性 PEG 分子（または、類似する反応性水溶ポリマー）とのアシル化反応、または、アルキル化反応を介して実行される。本明細書で使用される場合、「ポリエチレンギリコール」の語は、モノ (C1 - C10) アルコキシ - 、または、アリールオキシ - ポリエチレンギリコール、または、ポリエチレンギリコール - マレイミドの様な、他のタンパク質を誘導体化するのに使用された PEG の任意の形態を包含する。 PEG 化された抗体は、非糖化抗体であり得る。タンパク質を PEG 化するための手法は当該分野において公知であり、本発明の抗体に適応され得る。例えば、 Nishimura らによる欧州特許第 0 154 316 号、および Ishikawa らによる欧州特許第 0 401 384 号を参照のこと。

【 0128 】

（抗体フラグメント、および抗体模倣物）

本発明は、従来の抗体に限定されず、抗体フラグメント、および抗体模倣物の使用を介して実行され得る。広い種類の抗体フラグメント、および抗体模倣物の技術は、現在開発され、当該分野において広く周知である。

【 0129 】

ドメイン抗体（ dAbs ）は、抗体の最も小さい機能的な結合ユニットであり、ヒト抗体の重鎖（ VH ）または軽鎖（ VL ）の何れかにおける可変領域に対応する。ドメイン抗体は、約 13 kDa の分子量を有する。ドマンティス（ Domantis ）は、全ヒト V

10

20

30

40

50

H および V L d A b s の大きく高機能なライブラリーのシリーズを開発し（それぞれのライブラリーでは、100億よりも多くの異なる配列）、治療標的に特異的な d A b s を選択するために、これらのライブラリを使用する。多くの現行の抗体とは対照的に、ドメイン抗体は、細菌、酵母、および哺乳動物細胞系にてよく発現される。ドメイン抗体、およびその製造手法の更なる詳細は、米国特許第6,291,158号；同第6,582,915号；同第6,593,081号；同第6,172,197号；および同第6,696,245号；米国特許出願第2004/0110941号；欧州特許第1433846号、同第0368684号、および同第0616640号；国際公開第WO2005/035572号、同第2004/101790号、同第2004/081026号、同第2004/058821号、同第2004/003019号、および同第2003/002609号の参考により得られ、その全体は各々本明細書に参照により援用される。
10

【0130】

ナノボディは、特有の構造および自然発生の重鎖抗体の機能的特性を含む、抗体由来の治療タンパク質である。これらの重鎖の抗体は、単一の可変領域（VHH）、および2つの定常領域（CH2およびCH3）を含む。重要なことには、クローニングおよび単離されたVHH領域は、もとの重鎖抗体の全ての抗原結合の容量を内部にもつ、完全に定常なポリペプチドである。ナノボディは、ヒト抗体のVH領域と高い相同性を有し、活性の損失なしに更にヒト化し得る。重要なことには、ナノボディは低い免疫原性のポテンシャルを有し、それは、化合物を導くナノボディを用いた靈長類研究にて確認されている。
20

【0131】

ナノボディは、現行の抗体の利点を、低分子医薬の重要な特徴に結びつける。現行の抗体のように、ナノボディは、標的への高い特異性および親和性、および低い固有の毒性を示す。しかしながら、低分子医薬のように、それらは酵素を阻害し、直ぐにレセプターの裂け目に接近し得る。更に、ナノボディは、非常に安定で、注入とは別の手法で投与され得（例えば、国際公開第WO2004/041867号を参考、その全体は本明細書に参照により援用される）、製造することが容易である。ナノボディの他の利点は、その小さなサイズから、まれなエピトープ、または隠れたエピトープを認識すること、それら特有の3次元形態による高い親和性および選択性でタンパク質標的のキャビティまたは活性部位に結合すること、ドラッグ形態のフレキシビリティ、半減期の調整、ならびにドラッグ発見の容易性および速度を含む。
30

【0132】

ナノボディは、単一の遺伝子によりコードされ、例えば、大腸菌（例えば、米国特許第6,765,087号を参考、本明細書にその全体が参照により援用される）、カビ（例えば、アスペルギルス属、またはトリコデルマ属）、および酵母（例えば、サッカロミセス属、クリベロミセス属、ハンゼヌラ属、またはピチア属）など、ほとんど全ての原核生物および真核性の宿主にて効率的に生成される（例えば、米国特許第6,838,254号を参考、その全体は本明細書に参照により援用される）。

【0133】

そのナノクローニング手法（例えば、国際公開第WO06/079372を参考、その全体は本明細書に参照により援用される）は、自動化されたハイスループットなB細胞の選択に基づき、望ましい標的に対してナノボディを生成し、本発明の記述にて使用される。
40

【0134】

ユニボディは、その他の抗体フラグメント技術であるが、しかし、IgG4抗体のヒンジ領域の除去に基づいている。そのヒンジ領域の欠失は、本質的にもとのIgG4抗体の半分のサイズであり、IgG4抗体の二価の結合領域よりも、一価の結合領域を有する分子を生じさせる。IgG4抗体の様に、ユニボディは不活性であり、免疫システムに相互作用せず、それは、免疫反応が望ましくない疾患の処置に対して利点となり得る。ユニボディは、それらが結合した細胞を死滅させないが、阻害または沈黙させる（silent）よう機能し得る。追加的に、癌細胞に結合するユニボディは、それらが増殖するようには刺激はしない。更に、ユニボディは大抵小さく、それらは、潜在的に有利な効能を伴って、
50

より大きな固体の腫瘍に亘ってより良い分布を示す。ユニボディは、全 Ig G 4 抗体と同様の割合で体からなくなり、それらの抗原に対し同様の親和性をもって結合し得る。ユニボディの更なる詳細は、国際公開第 WO 2007 / 059782 号の参照により得られ、その全体は本明細書において参照により援用される。

【0135】

アフィボディ(Affibody)分子は、ブドウ球菌タンパク質 A の、3つのヘリックス束の Ig G 結合領域に由来する、58 - アミノ酸残基のタンパク質領域に基づくタンパク質と親和性がある。この領域は、組み合わせファージミドのライブラリーの構築に対する足場として使用され、そこから望ましい分子を標的とするアフィボディの変異体が、ファージディスプレイ技術を用いて選択され得る (Nordら、Nat Biotechnol 1997; 15: 772-7; Ronmarkら、Eur J Biochem 2002; 269: 2647-55)。アフィボディ分子の簡易性、強固な構造、および低分子量(6 kDa)は、それらを広い適用の多様性に、例えば、試薬の検出、およびレセプター作用の阻害剤として、適したものとする。アフィボディおよびその製造の更なる詳細は、米国特許第 5,831,012 号にて見つけられ、その全体は本明細書に参照により援用される。標識アフィボディは、アイソフォームの存在量を決定するための、画像アプリケーションに有用である。

【0136】

DARPin s (Designed Ankyrin Repeat Protein、設計アンキリン反復タンパク質) は、非抗体ポリペプチドの結合能力を引き出すよう開発された、DRP (設計反復タンパク質) 抗体模倣物の技術を具体化する。アルキリンおよびロイシンリッチな反復タンパク質のような、反復タンパク質は、抗体とは異なる内部、および細胞外に発生する遍在結合分子である。それらの固有なモジュール方式は、可変およびモジュールの標的結合の表面を表示している、細長い反復領域を形成するように、互いに積み重ねられている反復構造ユニット(反復体)を特徴付ける。このモジュール性に基づき、大きく多様な結合特異性をもつ、ポリペプチドの組み合わせライブラリーが生成され得る。このストラテジーは、様々な表面残基、および反復領域へのそれらのランダムなアセンブリを表示する、自家和合性の反復体のコンセンサスな設計を含む。

【0137】

DARPin s は、細菌発現系にて、非常に高い収率で生成され、最も安定なタンパク質の1つとして知られている。ヒトレセプター、サイトカイン、キナーゼ、ヒトプロテアーゼ、ウイルス、および膜タンパク質を含む、標的タンパク質の幅広い範囲に結合する高い特異性、高い親和性のDARPin s は、1桁のナノモルからピコモルの範囲における親和性を有することを含むように作製される。

【0138】

DARPin s は、ELISA、サンドイッチELISA、フローメトリー分析(FA CS)、免疫組織化学(IHC)、チップアプリケーション、親和性精製、または、ウエスタンプロット法を含む、アプリケーションの広い範囲で使用される。DARPin s は、タンパク質 - タンパク質の相互作用をブロックするだけでなく、酵素を阻害することが望ましい。腫瘍、および血液比に非常に好都合な腫瘍における、非常に速く、かつ特異的な濃縮によって、体内での診断または治療的なアプローチによく適合するDARPin s が作製される。DARPin s、および他のDRP技術に関する追加的な情報は、米国特許出願第 2004 / 0132028 号、および国際公開第 WO 02 / 20565 号にて見出され得、その両方が参照により本明細書に援用される。

【0139】

アンチカリンは、その他の抗体模倣物の技術である。しかしながら、この場合、結合特異性は、ヒト組織および体液にて、自然におよび豊富に発現される低い分子量のタンパク質のファミリーのリポカリンに由来する。リポカリンは、化学的に敏感または不溶な化合物の、生理学的な移動および保存と関連する体内の種々の範囲の機能を実施するようになっている。リポカリンは、タンパク質の1つの末端での、4つのループを支える高い保存

10

20

30

40

50

- バレルを含む、強固な固有構造を有している。これらは、入り口から結合ポケットへのループとなり、分子のこの部位における立体配座の相違は、個々のリポカリン間の結合特異性によるものである。

【 0 1 4 0 】

保存された - シート・フレームワークが支える超可変ループの全体的な構造は免疫グロブリンと似ているが、リポカリンは、単一の免疫グロブリン・ドメインより僅かに大きい、160～180のアミノ酸の単一のポリペプチド鎖から成り、サイズに関しては抗体と大きく異なる。

【 0 1 4 1 】

リポカリンはクローニングでき、それらのループはアンチカリンを作製するために遺伝子操作に供される。構造的に多様なアンチカリンのライブラリーが形成され、アンチカリンの提示は、原核生物または真核生物システムにおける更なる分析のために可溶性タンパク質の発現と生成の前に、結合機能の選択とスクリーニングとを可能にする。研究から、事実上、任意のヒトの標的タンパク質に特有なアンチカリンが開発でき、ナノモル以上の範囲の結合アフィニティを得ることが可能なことが分かった。

10

【 0 1 4 2 】

アンチカリンは、二重標的化タンパク質（デュオカリン）としても形成できる。デュオカリンは、その二つの結合ドメインの構造配向性によらず、標的の特異性とアフィニティを保持させつつ、標準的な製造プロセスを用いて、簡便に生成された一つのモノマー・タンパク質として、二つの別個の治療標的を結合する。

20

【 0 1 4 3 】

一つの分子を介する多重標的の調節は、一つ以上の原因因子を伴うといわれる病気において特に優れている。更に、デュオカリンのような二つまたは多価の結合形成は、病気の細胞表面分子を標的にして、シグナル伝達経路に及ぼすアゴニスト作用を仲介する、または細胞表面レセプターの結合と集中化による増強された内在化作用を誘導するうえで、大きな可能性を有する。更に、デュオカリンの高い固有安定性は、モノマー・アンチカリンに匹敵する。

【 0 1 4 4 】

アンチカリンに関する更なる資料は、米国特許第7,250,297と国際公開第WO 99/16873号とに見受けられ、その両方が、それらの全体にわたって参考として本願に組み入れられる。

30

【 0 1 4 5 】

アビマーは、本発明の関係において有用な抗体模倣技術である。アビマーは、試験管内のエクソンの混合とファージ提示とにおいて、結合と阻害の特性をもつ多ドメイン・タンパク質を形成することにより、人の細胞外レセプター・ドメインのラージ・ファミリーから展開される。連結する多数の非依存結合ドメインは、親和性を作りだすことが示されており、従来の単一のエピトープ結合タンパク質と比べると、改善されたアフィニティと特異性になる。他に可能性のある長所として、大腸菌における複数標的の特異分子の単純で効率的な生成と、改善された耐熱性、耐プロテアーゼ性がある。サブ・ナノモル・アフィニティをもつアビマーは、様々な標的に対して得られてきた。アビマーに関する更なる資料は、米国特許出願第2006/0286603号と、同第2006/0234299号と、同第2006/0223114号と、同第2006/0177831号と、同第2006/0008844号と、同第2005/0221384号と、同第2005/0164301号と、同第2005/0089932号と、同第2005/0053973号と、同第2005/0048512号と、同第2004/0175756号とにあり、その全ては、本明細書に参照により援用される。

40

【 0 1 4 6 】

ベルサボディは本発明の関係で使用できる別の抗体模倣技術である。ベルサボディは、一般的なタンパク質が有する疎水性コアに置換され、高いジスルフィド密度の骨格を形成する、15%以上のシステインをもつ3～5kDaの小さなタンパク質である。この置換

50

は、より小さく、より親水性（すなわち、凝集しにくくて且つ非特異性結合）であり、プロテアーゼと熱に対して更に抵抗性を示し、低濃度のT-セル・エピトープを有する、タンパク質に結果としてなる。なぜならば、MHC提示に最も関与する残基が疎水性であるからである。これら四つのすべての特性は、免疫原性に影響することは周知のことであり、それらは互いに免疫原性の大幅な低減を招くと予測される。

【0147】

ベルサボディの構造が与えられると、これらの抗体の模倣は、多原子価と、多特異性と、多様な半減メカニズムと、組織標的モジュールと、抗体Fc領域の無い状態とを含んでいる、広範囲の形成を提供する。更に、ベルサボディは、高収率で大腸菌に製造され、それらの親水性と小さいサイズのために、ベルサボディは、高い可溶性で、高濃度に調製できる。ベルサボディは、非常に熱的に安定していて、長い保存期間を呈する。ベルサボディに関する更なる資料は、米国特許出願第2007/0191272号に見いだすことができて、その全体は本明細書において参照により援用される。

10

【0148】

抗体フラグメントと模倣技術に関する前述の説明は、包括的であることを意図していない。米国特許第5,789,157号と、同第5,864,026号と、同第5,712,375号と、同第5,763,566号と、同第6,013,443号と、同第6,376,474号と、同第6,613,526号と、同第6,114,120号と、同第6,261,774号と、同第6,387,620号とに記載されているRNAアプタマーテchnologyのように、核酸ベース技術だけでなく、QuiらのNATURE・BIOLOGY、25(8)921-929(2007)に概述されているように、相補性決定領域の融合のように、代替ポリペプチド-ベース技術を含めた、多種多様な更なる技術は、その全体は本明細書に援用され、本発明の関係で使用できる。

20

【0149】

(抗体の物理的な特性)

本開示の抗体は、その異なるクラスを検出およびまたは識別するための、それらの様々な物理的な特性を特徴にしている。

【0150】

本開示の抗体は、軽または重鎖可変領域において、一つまたは複数の糖鎖付加部位を備えることができる。このような糖鎖付加部位は、変化した抗原結合(Marshallら(1972)Annu Rev Biochem 41:673-702と、GalaとMorrison(2004)J Immunol 172:5489-94と、Vallickら(1988)J Exp Med 168:1099-109と、Spiro(2002)Glycobiology 12:43R-56Rと、Parekhら(1985)Nature 316:452-7と、Mimuraら(2000)Mol Immunol 37:697-706)により、抗体の増加された免疫原性または抗体のpKの変化に、結果としてなる。糖鎖付加は、N-X-S/T配列を備えるモチーフで生じることが知られている。ある事例において、可変領域糖鎖付加を備えない、抗メソテリン抗体を有することが好ましい。これは、可変領域の糖鎖付加モチーフを備えない抗体を選択することにより、または糖鎖付加領域内で残基を変異させることにより達成できる。

30

【0151】

好ましい実施形態において、本開示の抗体は、アスパラギン・イソメリズム・サイトを備えていない。アスパラギンのアミド分解は、N-GまたはD-G配列上で生じ、ポリペプチド鎖に捻れ導入するイソアスパラギン酸残基を生成することとなり、ポリペプチド鎖の安定性を低下させる(イソアスパラギン酸作用)。

40

【0152】

各々抗体は、独自の等電点(pI)を有し、一般的に6~9.5のpH範囲に属する。IgG1抗体のpIは7~9.5のpH範囲に一般的に属し、IgG4抗体のpIは6~8のpH範囲に一般的に属する。通常範囲外のpIをもつ抗体は、生体内条件のもとで何らかの変性や不安定性を有するという推測がある。従って、通常範囲に属するpI値を備

50

える抗メソテリン抗体を有することが好ましい。これは、通常範囲内の p I をもつ抗体を選択するかまたは荷電表面の残基を変異させると実現できる。

【0153】

各々抗体は特徴のある融点をもち、高い融点ほど生体内で大きな全体的安定性を示す (Krishnamurth R and Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3: 361-71)。一般的に、 T_{M1} (初期変性の温度) は、60 より高く、65 より更に高く、70 より特に更に高いことが好ましい。抗体の融点は、示差走査熱量測定 (Chenら (2003) *Pharm Res* 20: 1952-60) や、Ghirla and oら (1999) *Immunol Lett* 68: 47-52) や、または円偏光二色性 (Murrayら (2002) *J. Chromatogr Sci* 40: 343-9) を用いて測定できる。 10

【0154】

好ましい実施形態では、急速に劣化しない抗体が選択される。抗体の劣化は、キャピラリ-電気泳動法 (CE) と MALDI-MS を用いて測定できる (Alexander AJ and Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67: 3626-32)。

【0155】

別の好ましい実施形態において、望ましくない免疫反応、および / または変更された薬物動態特性、もしくは好ましくない薬物動態特性が始動につながり得る、最小凝集作用を有する抗体が選択される。一般的に、25%未満、好ましくは20%未満、より好ましくは15%未満、更に好ましくは10%未満、特に好ましくは5%未満の凝集をもつ抗体が、許容される。凝集は、サイズ排除カラム (SEC) と高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) と光散乱とを含めた、幾つかの技術によって測定できる。 20

【0156】

(抗体を遺伝子操作する方法)

前述のように、周知の V_H と V_L の配列を有する抗メソテリン抗体は、それらを修飾するか、またはそれらに取り付けられた定常領域を修飾することにより、新規の抗メソテリン抗体を生成するために使用することができる。従って、本開示の別の態様において、周知の抗メソテリン抗体、例えば、3C10, 6A4 または 7B1 の構造的な特長は、人のメソテリンに対する結合のように、本開示の抗体の少なくとも一つの機能特性を保持する構造的に関連した抗メソテリン抗体を生成するために用いられる。例えば、周知の抗メソテリン抗体または其の変異体の一つまたは複数の CDR 領域は、前述のように、本開示の更なる組み換え技術によって作られた抗メソテリン抗体を生成するために、周知のフレームワーク領域およびまたは他の CDR に組み換えて組み合わせることができる。他のタイプの修飾は、前節に説明されたものを含んでいる。遺伝子操作方法の開始時の材料は、ここで提供された一つもしくは複数の V_H およびもしくは V_L の配列、または其の一つもしくは複数の CDR 領域である。変更抗体を作るために、ここに提供された一つもしくは複数の V_H およびもしくは V_L の配列、または其の一つもしくは複数の CDR 領域を有する抗体を実際に作成する (すなわち、タンパク質として発現する) 必要はない。むしろ、配列に備えられたインフォメーションは、本来の配列から誘導された「第二世代の」配列を生成するための開始材料として用いられ、「第二世代の」配列が作成され、タンパク質として発現される。 30 40

【0157】

従って、別の実施形態において、本開示は、抗メソテリン抗体を作成する方法を提供し、

(a) (i) 配列番号 1 ~ 3 から成る群から選択された CDR 1 配列と、配列番号 4 ~ 6 から成る群から選択された CDR 2 配列と、およびまたは配列番号 7 ~ 9 から成る群から選択された CDR 3 配列とを具備する V_H 抗体配列、およびまたは (ii) 配列番号 10 ~ 12 から成る群から選択された CDR 1 配列と、配列番号 13 ~ 15 から成る群から選択された CDR 2 配列と、およびまたは配列番号 16 ~ 18 から成る群から選択された CDR 3 配列とを具備する V_L 抗体配列

とを提供することと、

(b) 少なくとも一つの変更された抗体配列を生成するために、V_H抗体配列およびまたはV_L抗体配列内に、少なくとも一つのアミノ酸残基を変更することと、
(c) 変更された抗体配列をタンパク質として発現することとを具備している。

【0158】

標準的な分子生物技術を用いて、変更された抗体配列を作成して発現できる。

【0159】

ある実施形態において、変異体は、抗メソテリン抗体コーディング配列の全てまたは一部に沿ってランダムにまたは選択的に導入可能であり、最終的に修飾された抗メソテリン抗体は、ここで説明したように、作動およびまたは他の機能特性を結合するためにスクリーニングできる。変異の方法は従来技術で説明されている。例えば、Shortによる国際公開第WO02/092780号は、飽和変異誘発、合成ライゲーションアセンブリー(synthetic ligation assembly)、または其の組み合わせを用いて、抗体変異体を生成してスクリーニングする方法を説明している。代わりに、Lazarらによる国際公開第WO03/074679号は、コンピュータ計算によるスクリーニング方法を用いて、抗体の生理化学的特性を最適にする方法を述べている。

10

【0160】

(発明の抗体をコードする核酸分子)

本開示の別の態様は、本開示の抗体をコードする核酸分子に関連している。核酸は、全細胞に、細胞溶解物に、または部分的に精製された、または実質的に純粋な形態で、存在し得る。核酸は、アルカリ/SDS処理、CsClバンディング、カラム・クロマトグラフィー、アガロース・ゲル電気泳動、および従来技術で周知の他の技術を含む標準技術により、他の細胞分子または他の夾雑物、例えば、他の細胞核酸またはタンパク質から純化される時に、「単離される」または実質的に純化にされる。F. Ausubelら編(1987)の分子生物学のカレント・プロトコル、Greene PublishingとWiley Interscience、ニューヨークを参照。本開示の核酸は、例えば、DNAまたはRNAであり、イントロン配列を備えてもおよび備えていなくてもよい。好みの態様で、核酸は、cDNA分子である。

20

【0161】

本開示の核酸は、標準的な分子生物学技術を用いて得ることができる。ハイブリドーマ(例えば、更に次に記すヒトの免疫グロブリン遺伝子を輸送する遺伝子組み換えマウスから作成されたハイブリドーマ)で発現される抗体については、ハイブリドーマで作られた抗体の軽鎖と重鎖とをコードするcDNAは、標準的なPCR增幅またはcDNAクローン技術によって得ることができる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリーから得た抗体(例えば、ファージディスプレイ技術の使用)については、このような抗体をコードする核酸を、遺伝子ライブラリーから回収できる。

30

【0162】

好みの核酸分子は、3C10、6A4または7B1モノクローナル抗体のV_HとV_Lの配列をコードするものである。3C10、6A4と7B1のV_H配列をコードするDNA配列は、配列番号25-27に、各々、図示されている。3C10、6A4と7B1のV_L配列をコードするDNA配列は、配列番号28-30に、各々、図示されている。

40

【0163】

V_HとV_LのセグメントをコードするDNAフラグメントが得られると、これらのDNAフラグメントは、例えば、可変領域遺伝子を、完全長の抗体鎖遺伝子に、Fabフラグメント遺伝子に、またはscFv遺伝子に変換するために、標準的な組み換えDNA技術によって更に操作できる。これらの操作において、V_L-またはV_H-コードDNAフラグメントは、抗体定常領域または弹性リンカーのように、別のタンパク質をコードする別のDNAフラグメントに動作的にリンクされる。この関係で用いた用語「動作的にリンクされる」は、二つのDNAフラグメントが連結されるので、それらによってコードされたアミノ酸配列は、フレームのままであることを意味する。

50

【0164】

V_H 領域をコードする単離DNAは、重鎖定常領域（CH1、CH2、CH3）をコードするDNA分子に、 V_H -コードDNAを動作的にリンクすることによって、完全長の重鎖遺伝子に変換できる。ヒトの重鎖定常領域遺伝子の配列は従来技術で周知であり（例えば、Kabat'242を参照）、これらの領域を囲むDNAフラグメントは標準的なPCR增幅によって得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM、またはIgD定常領域になれるが、最も好ましくはIgG1またはIgG4定常領域である。Fabフラグメント重鎖遺伝子については、 V_H -コードDNAが、重鎖CH1定常領域だけコードするDNA分子に動作的にリンクできる。

10

【0165】

V_L 領域をコードする単離DNAは、軽鎖定常領域、CLをコードする別のDNA分子に V_L -コードDNAを動作的にリンクすることにより（Fab軽鎖遺伝子だけでなく）完全長の軽鎖遺伝子に変換できる。ヒトの軽鎖定常領域遺伝子の配列は従来技術で周知であり（例えば、Kabat'242を参照）、これらの領域を囲むDNAフラグメントは、標準的なPCR增幅によって得ることができる。好ましい態様において、軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダ定常領域になる。

【0166】

scFv遺伝子を生成するために、 V_H -と V_L -のコードDNAフラグメントは、弹性リンカーをコードする、例えば、アミノ酸配列（Gly₄-Ser）₃をコードする、別のフラグメントに動作的にリンクされるので、 V_H と V_L の配列は連続する一本鎖のタンパク質として発現でき、 V_L と V_H の領域はフレキシブル・リンカーによってコンジュゲートされる（例えば、Birdら（1988）SCIENCE 242：423-426と、Hustonら（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85：5879-5883と、McCaffertyら（1990）NATURE 348：552-554を参照）。

20

【0167】

（本開示のモノクローナル抗体の生成）

本開示のモノクローナル抗体（mAbs）は、KohlerとMilstein（1975）NATURE 256：495の体細胞交雑技術を含めて、多種多様な技術によって生成できる。体細胞交雑法が好ましいが、原理的には、他の技術を採用することもでき、例えば、Bリンパ球のウイルス性または発癌性形質転換を採用することができる。

30

【0168】

ハイブリドーマを作成する好ましい動物系はマウス系である。マウスのハイブリドーマ生成は、非常に巧みに作られる手順である。融合のために免疫された脾細胞の単離のための免疫手順と技術は、従来技術で周知である。融合パートナー（例えば、マウス骨髄腫細胞）と融合手順も周知のことである。

【0169】

本開示のキメラまたはヒト化抗体は、前述のように作成した非ヒト・モノクローナル抗体の配列に基づいて作成できる。重鎖と軽鎖の免疫グロブリンをコードするDNAは、被験体となる非ヒト・ハイブリドーマから得ることができて、標準的な分子生物学技術を用いて、マウスでない（例えば、ヒトの）免疫グロブリン配列を備えるように改変できる。例えば、キメラの抗体を生成するために、マウスの可変領域を、ヒトの定常領域にリンクできる（例えば、Cabillyらの米国特許第4,816,567号を参照）。ヒト化抗体を生成するために、マウスのCDR領域をヒトのフレームワークに挿入できる（例えば、Winterの米国特許第5,225,539号と、Queenらの米国特許第5,530,101号と、同第5,585,089号と、同第5,693,762号と、同第6,180,370号とを参照）。

40

【0170】

好ましくは、抗体は、ヒトのモノクローナル抗体である。それらは、マウス系より、む

50

しろヒトの免疫系のパーツを輸送するトランスジェニックまたはトランスクロモソミック・マウスを用いて形成できる。これらのトランスジェニックとトランスクロモソミックのマウスは、HuMAb Mouse (登録商標) と KM Mouse (登録商標) タイプを各々含む、「ヒト Ig マウス」として、本明細書において集合的に言及される。

【0171】

HuMAb Mouse タイプのマウス (Medarex (登録商標), Inc.) は、内因性の μ と k の鎖の中心を不活性化する標的変異と共に、再配置不能なヒトの重鎖 (μ と k) と λ の軽鎖の免疫グロブリン配列をコードする、ヒトの免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座 (miniloci) を備えている (例えば、Lonberg ら (1994) NATURE 368 (6474) : 856 - 859 を参照)。そこで、マウスは、マウス Ig M または k の低減された発現を呈しており、免疫付与に応答して、導入されたヒトの重鎖と軽鎖のトランス遺伝子は、高いアフィニティのヒトの Ig G K モノクローナル抗体を形成するために、クラス・スイッチングと体細胞変異とを受ける (Lonberg ら (1994)、上記を参照、実験薬理学の Lonberg (1994) ハンドブック 113 : 49 - 101 で検討、Lonberg と Huszar (1995) Intern. Rev. 免疫学 13 : 65 - 93、Harding と Lonberg (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764 : 536 - 546)。HuMAb Mouse タイプのマウスの作成と使用、および、このようなマウスが保有するゲノム修飾は、Taylor など (1992) 核酸リサーチ 20 : 6287 - 6295 と、Chen など (1993) インターナショナル免疫学 5 : 647 - 656 と、Tuailion ら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 3720 - 3724 と、Choi ら (1993) NATURE · GENETICS 4 : 117 - 123 と、Chen ら (1993) EMBO J. 12 : 821 - 830 と、Tuailion ら (1994) J. Immunol. 152 : 2912 - 2920 と、Taylor ら (1994) インターナショナル免疫学 6 : 579 - 591 と、Fishwild ら (1996) NATURE · BIOTECHNOLOGY 14 : 845 - 851 に更に記載されており、その全ての内容は、全体にわたって参考により本明細書に組み入れられる。更に、Lonberg と Kay の、米国特許第 5,545,806 号と、同第 5,569,825 号と、同第 5,625,126 号と、同第 5,633,425 号と、同第 5,789,650 号と、同第 5,877,397 号と、同第 5,661,016 号と、同第 5,814,318 号と、同第 5,874,299 号と、同第 5,770,429 号と、Surani らの米国特許第 5,545,807 号と、Lonberg と Kay らの国際公開第 WO 92/03918 号と、国際公開第 WO 93/12227 号と、国際公開第 WO 94/25585 号と、国際公開第 WO 97/13852 号と、国際公開第 WO 98/24884 号と、国際公開第 WO 99/45962 号と、および Korman らの国際公開第 WO 01/14424 号とを参照されたい。ヒトのラムダ軽鎖遺伝子を保有するトランスジェニックマウスは、Bruggemann による国際公開第 WO 00/26373 号に記載されているように使用できる。例えば、ヒトのラムダの軽鎖トランス遺伝子を保有するマウスは、ヒトの重鎖と軽鎖の両方のトランス遺伝子を保有するマウスを作製するために、ヒトの重鎖トランス遺伝子 (例えば、HC07) を保有するマウスと交配することができ、任意にヒトのカツバ軽鎖トランス遺伝子 (例えば、KC05) を保有するマウスとも交配できる (例えば、例 1 を参照)。

【0172】

別の態様において、本開示のヒトの抗体は、ヒトの重鎖トランス遺伝子とヒトの軽鎖トランスクロモソームとを保有するもののように、トランス遺伝子とトランスクロモソームとの上でヒトの免疫グロブリン配列を保有するマウスを用いて形成できる。このマウスは、KM Mouse ストレインまたはタイプのように本明細書中で言及され、イシダらの国際公開第 WO 02/43478 号に詳細に説明されている。

【0173】

更に、ヒトの免疫グロブリン遺伝子を発現する代替トランスジェニック動物系は、従来

10

20

30

40

50

技術で可能であり、本開示の抗メソテリン抗体を増やすために使用できる。例えば、ゼノマウス (Xenomouse) (Abgenix, Inc) と呼ばれる代替トランスジェニック系が使用できる。このようなマウスは、例えば、Kucherlapatiらの米国特許第5,939,598号と、同第6,075,181号と、同第6,114,598号と、同第6,150,584号と、同第6,162,963号とに記載されている。

【0174】

更に、ヒトの免疫グロブリン遺伝子を発現する代替のトランスクロモソミック動物系は、従来技術で可能であり、本開示の抗メソテリン抗体を形成するために使用できる。例えば、「TCマウス」と呼ばれる、ヒトの重鎖トランスクロモソームとヒトの軽鎖トランスクロモソームの両方を保有するマウスが使用できて、このようなマウスは、トミツカらの(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727に記載されている。更に、ヒトの重鎖と軽鎖のトランスクロモソームを保有するウシが開示されている(例えば、クロイワら(2002) NATURE・BIOTECHNOLOGY 20: 889-894と国際公開第WO2002/092812号)。

10

【0175】

本開示のヒトのモノクローナル抗体は、ヒトの免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするファージディスプレイ法を用いても作成できる。例えば、Ladnerらの米国特許第5,223,409号と同第5,403,484号と同第5,571,698号と、Dowerらの米国特許第5,427,908号と、同第5,580,717号と、McCafertryらの米国特許第5,969,108号と、同第6,172,197号と、Griffithsらの米国特許第5,885,793号と、同第6,521,404号と、同第6,544,731号と、同第6,555,313号と、同第6,582,915号と、同第6,593,081号とを参照。

20

【0176】

本開示のヒトのモノクローナル抗体は、免疫付与時にヒトの抗体応答が形成できるようにヒトの免疫細胞が再現されているSCIDマウスを用いても、作製することができる。このようなマウスは、Wilsonらの米国特許第5,476,996号と同第5,698,767号とに記載されている。

【0177】

別の態様において、ヒトの抗メソテリン抗体は、Buechlerらによる米国特許第6,794,132号に記載されているように、ヒトのIgマウスとファージディスプレイ技術の組み合わせを用いて作成される。より具体的には、本方法は、一つまたは複数のメソテリン抗原でマウスに免疫付与することにより、ヒトIgマウス(HuMab MouseまたはKM Mouseストレインなど)における抗メソテリン抗体応答を高め、次に、マウスのリンパ細胞からヒトの抗体鎖をコードする核酸を単離し、これらの核酸をディスプレイベクター(例えば、ファージ)に導入することによって、ディスプレイパッケージのライブラリーを準備することをまず含む。従って、各々ライブラリー・メンバーはヒトの抗体鎖をコードする核酸を具備し、各々抗体鎖はディスプレイパッケージから提示される。ライブラリーは、メソテリンに具体的に結合するライブラリー・メンバーを単離するために、メソテリンタンパク質でスクリーニングされる。選択されたライブラリー・メンバーの核酸インサートは、選択されたメソテリン・結合体の軽鎖と重鎖の可変配列を決定するために、標準的な方法で単離されて配列が決定される。可変領域は、V_H領域がC_H領域に動作的にリンクされ、V_L領域がC_L領域に動作的にリンクされるように、ヒトの重鎖と軽鎖の定常領域を保有する発現ベクターに対する可変領域のクローニングのように、標準的な組み換えDNA技術によって、完全長の抗体鎖に変換できる。

30

【0178】

(ヒトのIgマウスの免疫付与)

ヒトのIgマウスを用いて、本開示のヒトの抗体を形成する時に、このようなマウスは、Lonberg.Nら(1994) NATURE 368(6474): 856-859と、Fishwild, Dら(1996) NATURE・BIOTECHNOLOGY 14: 845

40

50

- 851と、国際公開第WO98/24884号と、国際公開第WO01/14424号とに記載されているように、メソテリン抗原およびまたは組み換えメソテリンタンパク質、メソテリンタンパク質またはメソテリン融合タンパク質を発現する細胞の精製または濃縮化により免疫付与できる。好ましくは、マウスは、初回インフルエンザ時で6～16週齢である。例えば、精製された、または組み換えられたメソテリン抗原(5～50μg)を用いて、ヒトのIgマウスを腹腔内におよびまたは皮下に免疫する。最も好ましくは、本開示の抗体を増やすために用いられるイムノゲンは、N-末端で非メソテリンポリペプチド(例えば、H1sタグなど)に融合した、メソテリンタンパク質の細胞外ドメインを含む、メソテリン融合タンパク質である(例えば、例1を参照)。

【0179】

10

ヒトのメソテリンを結合する完全なヒトモノクローナル抗体を形成するための詳細な手順が、例1に記載されている。様々な抗原による度重なる実験から、完全フロイント・アジュバンドの抗原を用いて腹腔内にまず免疫し、次に、不完全なフロイント・アジュバンドの抗原を用いて一週間ごとのIP免疫(合計で6回まで)した場合に、HuMAb Mouseタイプのトランスジェニックマウスは応答することが示されている。フロイント以外のアジュバンド(例えば、RIBIアジュバンド)も効果的である。さらに、アジュバンドのないホールセルが高度に免疫原性であることが分かる。免疫反応は、眼窩後の出血で得られたプラズマ・サンプルによる免疫プロトコルの過程の全体にわたってモニタできる。プラズマはELISAでスクリーニングでき、抗メソテリンヒト免疫グロブリンの十分な力値を有するマウスが、融合に使用され得る。マウスは、例えば屠殺および脾臓の除去の3日間に、抗原を用いて静脈内でブーストできる。免疫ごとに2～3の融合が必要になると見込まれる。6～24匹のマウスが、抗原ごとに一般的に免疫される。通常は、HCo7とHCo12のストレインの両方が用いられる。そのうえ、HCo7とHCo12のトランス遺伝子の両方が、二つの異なるヒト重鎖トランス遺伝子(HCo7/HCo12)を有する単一のマウスに互いに交配できる。代わりにまたは更に、KM Mouseストレインが使用できる。

20

【0180】

(本発明のヒトモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマの形成)

本開示のヒトのモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを形成するために、免疫されたマウスの脾細胞および/またはリンパ液ノード細胞が単離され、マウス骨髄腫細胞株のような、適切な不死化細胞株と融合される。結果として生じるハイブリドーマは、抗原特異的な抗体の生産のためにスクリーニングされる。例えば、免疫されたマウスの脾臓リンパ細胞の単一の細胞懸濁液は、50%PEGと共に、1/6の数のP3X63-Ag8.653非分泌性マウス骨髄腫細胞に融合される。または、免疫されたマウスの脾臓リンパ細胞の単一の細胞懸濁液は、Cytopulseラージ・チャンバー細胞融合エレクトロポーラーターを用いて、電気融合によって融合できる(Cytopulse Science, Inc., Glen Burnie, Maryland)。細胞は、20%胎児クローン・セラム(Fetal Clone Serum)、18%「653」馴化培地、5%オリゲン(origen)(IGEN)、4mM-L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、5mM HEPES、0.055mM 2-メルカプトエタノール、50ユニット/mLペニシリン、50mg/mLストレプトマイシン、50mg/mLゲンタマイシン、1X

30

HAT(Sigma; HATは融合の24時間後に加えられた)を含む選択培地において、2週間の培養後に、平底マイクロタイプレートで約2×10⁵でプレートされる。約2週間後、細胞はHATがHTに置換されている培地に培養される。個々のウェルは、次に、ヒトのモノクローナルIgMとIgGの抗体のためにELISAでスクリーニングされる。いったん大量のハイブリドーマ成長が生じると、培地は通常は10～14日後に観察される。抗体を分泌するハイブリドーマがリプレートされ、再びスクリーニングされ、ヒトIgGが依然陽性の場合、モノクローナル抗体は、限界希釈により少なくとも2度に渡ってサブクローニングされる。安定したサブクローンはその後、特性解析のため、インピット口で培養され組織培養培地中において少量の抗体を形成させる。

40

50

【0181】

ヒトモノクローナル抗体を精製するため、選択されたハイブリドーマを、モノクローナル抗体の精製のために、2リッターのスピナー・フラスコ中で成長させる。上澄部は、プロテインAセファロース(Pharmacia、Piscataway、N.J.)によるアフィニティ・クロマトグラフィーの前に、濾過および濃縮させることができる。溶出されたIgGフラクションは、純度を確認するために、ゲル電気泳動とHPLCとによってチェックされる。バッファ溶液がPBSに交換され、濃度は、1.43の吸光係数を用いて、OD280によって決定される。モノクローナル抗体を等分し、-80で貯蔵する。

【0182】

10

(本発明のモノクローナル抗体を生成するトランスフェクトーマの形成)

本開示の抗体は、従来技術で周知のように、例えば、遺伝子移入方法と組み換えDNA技術との組み合わせを用いて、宿主細胞トランスフェクトーマにおいても生成できる(例えば、Morrison, S (1985) SCIENCE 229: 1202)。

【0183】

例えば、抗体またはその抗体フラグメントを発現させるために、部分的にまたは完全長の軽鎖と重鎖をコードするDNAが、標準的な分子生物学的技術(例えば、PCR增幅、または対象とする抗体を発現するハイブリドーマを用いるcDNAクローニング)を用いて得られ、およびそのDNAは、遺伝子が転写と翻訳の制御配列に動作的にリンクされるように、発現ベクターに挿入できる。本文脈上において、用語「動作的にリンクされる」は、ベクター内の転写および翻訳制御配列が、抗体遺伝子の転写および翻訳を制御するというそれらの意図された機能を果たすように、抗体遺伝子がベクターにライゲーションされることを意図して意味している。発現ベクターと発現制御配列は、用いられる発現宿主細胞とコンパチブルになるように選定される。抗体軽鎖遺伝子と抗体重鎖遺伝子は別個のベクターに挿入されるか、または一般的に、両方の遺伝子が同じ発現ベクターに挿入される。抗体遺伝子は、標準的な方法によって発現ベクターに挿入される(例えば、抗体遺伝子フラグメントとベクター上の相補的な制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しない場合、平滑末端ライゲーション)。本明細書において記載される抗体の軽鎖と重鎖の可変領域を用いて、任意の抗体イソタイプの完全長の抗体遺伝子を、所望のイソタイプの重鎖と軽鎖の定常領域を既にコードしている発現ベクターに挿入することにより生成するので、V_Hセグメントがベクター内のC_Hセグメントに動作的にリンクされ、V_Lセグメントがベクター内のC_Lセグメントに動作的にリンクされる。そのうえまたは代わりに、組み換え発現ベクターは、宿主細胞から抗体鎖の分泌を促す、シグナルペプチドをコードできる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にフレームでリンクされるように、ベクターにクローニングできる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種のシグナルペプチドになる(すなわち、非免疫グロブリンタンパク質からのシグナルペプチド)。

20

【0184】

30

抗体鎖遺伝子に加えて、本開示の組換え発現ベクターは、宿主細胞の抗体鎖遺伝子の発現を制御する、調節配列を保有する。用語「調節配列」は、プロモーターと、エンハンサーと、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御する他の発現制御要素(例えば、ポリアデルニル化シグナル)を含むように意図される。このような調節配列は、例えば、Goodell(遺伝子発現テクノロジー、酵素学の方法185、アカデミック・プレス、San Diego, CA (1990))に記載されている。調節配列の選択を含めた発現ベクターのデザインは、形質転換される宿主細胞の選定、所望のタンパク質の発現レベルなどのような因子に依存する。哺乳類の宿主細胞発現に好ましい調節配列は、サイトメガウイルス(CMV)、サル・ウイルス40(SV40)、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス・メージャー後期プロモーター(AdMLP)、ポリオーマから誘導されるもののように、哺乳類細胞における高レベルタンパク質発現を意図した、ウイルス・エレメントを含んでいる。または、ユビキチン・プロモーターまたは-グロビン・プロモーターのよ

40

50

うな非ウイルス調節配列が用いられてもよい。更に、ヒトのT細胞白血病ウイルス・タイプ1の長い末端反復とSV40アーリープロモーター(early promotor)の配列を含む、SRプロモーター系のように、異なるソースからの配列から成る調節エレメントを用いられてもよい(タケベら(1988)Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

〔 0 1 8 5 〕

抗体鎖遺伝子と調節配列に加えて、本開示の組換え発現ベクターは、宿主細胞のベクターの複製（例えば、複製起点）と選択可能なマーカー遺伝子とを調節する配列のように、更なる配列を保有する。選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択に役立つ（例えば、全て A x e 1 らによる米国特許第 4,399,216 号と、同第 4,634,665 号と、同第 5,179,017 号とを参照）。例えば、一般的に選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞上で、G418、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートのような、薬品に対する抵抗力を与える。好みい選択可能なマーカー遺伝子は、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子（メトトレキサート選択／増幅による dhfr - 宿主細胞での使用）と、ネオ遺伝子（G418 選択用）とを含んでいる。

10

[0 1 8 6]

軽鎖と重鎖の発現について、それらをコードする発現ベクターが、宿主細胞にトランسفェクトされる。用語「トランسفェクション」の様々な形態は、原核生物または真核生物の宿主細胞に対する外因性のDNAの導入のために共通して用いられる幅広い様々な技術、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿法、DEAE-デキストラン・トランسفェクションなどを網羅することを意図している。本開示の抗体を原核生物または真核生物の宿主細胞で発現することは理論的に可能であるが、真核生物細胞および最も好ましくは哺乳類の宿主細胞の発現が最も好ましく、その理由は、哺乳類の宿主細胞では、原核細胞においてよりも、適切にフォールディングされ、免疫学的に活性のある抗体が構築および分泌されやすいからである。

30

[0 1 8 7]

本開示の組換え抗体を発現する好ましい哺乳類の宿主細胞は、チャイニーズ・ハムスター・オーバリー（CHO細胞）（Ur laubとChasin、（1980）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77：4216-4220に記載されており、例えば、R. J. KaufmanとP. A. Sharp（1982）J. Mol. Biol. 159：601-621に記載されているDHFR選択自在の標識と共に用いられている、dhfr CHO細胞を含めて）と、NSO骨髄腫細胞と、COS細胞と、SP2細胞とを含んでいる。特に、NSO骨髄腫細胞による使用のための、別の好ましい発現システムは、（Wilsonの）国際公開第WO87/04462号と、（Bebbingtonの）国際公開第WO89/01036号と、（Bebbingtonの）EP338,841に記載されるGS遺伝子発現システムである。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが哺乳類の宿主細胞に導入されると、抗体は、宿主細胞における抗体の発現、または特に好ましくは、宿主細胞が成長される培養培地に対する抗体の分泌を許容する十分な時間的な期間、宿主細胞を培養することによって生成される。抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて、培養培地から回収できる。

88

[0 1 8 8]

(抗原に結合する抗体の特性解析)

本発明の抗体は、例えば、標準的な E L I S A によって、ヒトメソテリンに結合することについて試験され得る。簡潔にいうと、マイクロタイタープレートが、P B S 1 μ g / m L の精製および / または組換えメソテリンタンパク質を用いて被膜され（例えば、例 1 を参照）、それから、P B S 中 5 % ウシ血清アルブミンでプロックする。抗体の希釈液（例えば、メソテリン免疫されたマウスからの血漿の希釈液）を、各々ウエルに加え、3 7 で 1 ~ 2 時間インキュベートする。プレートを P B S / T w e e n で洗浄し、アルカリホスファターゼに結合した第二の試薬（例えば、ヒト抗体の場合、ヤギ抗ヒト I g G F c

40

- 特有のポリクローナル試薬)で、37 1時間、インキュベートする。洗浄後、プレートをpNPP基板(1mg/mL)で発色させ、405~650のODで解析する。好ましくは、最大のタイマーを発色するマウスが融合に用いられる。

【0189】

前述のELISAアッセイは、メソテリンタンパク質の陽性の反応性を示す、ハイブリドーマのスクリーニングにも使用できる。メソテリンタンパク質に高い親和力および/または親和性で結合するハイブリドーマを、サブクローニングし、さらに特性解析する。(ELISAによる)親細胞の反応性を保持する、各々ハイブリドーマ由来の1つのクローンを、-140で保存される5~10個のバイアルの細胞バンクを作製し、抗体の精製のために選択できる。

10

【0190】

抗メソテリン抗体を精製するため、選択されたハイブリドーマを、モノクローナル抗体の精製のために2リッター・スピナー・フラスコで成長させる。上澄部を、プロテインAセファロース(Pharmacia、Piscataway、NJ)によるアフィニティークロマトグラフィーの前に濾過し、濃縮させる。溶出したIgGフラクションを、純度を確認するために、ゲル電気泳動とHPLCとによって調べる。緩衝液をPBSに交換し、濃度を、1.43の吸光係数を用い、OD280によって決定する。モノクローナル抗体を等分し、-80で保存する。

【0191】

選択した抗メソテリンモノクローナル抗体が特異的エピトープに結合するかどうかを決定するために、各々抗体を、市販の試薬(Pierce、Rockford、IL)を用いてビオチニル化する。非標識モノクローナル抗体とビオチニル化されたモノクローナル抗体とを用いる競合実験を、前述のように、メソテリンタンパク質のELISA被膜プレートを用いて行った。ビオチニル化mAb結合は、連鎖球菌-アビジン-アルカリ・ホスファターゼ・プローブで検出できる。

20

【0192】

精製した抗体のアイソタイプを決定するために、アイソタイプELISAが、特定のアイソタイプに特有の試薬を用いて行うことができる。例えば、ヒトのモノクローナル抗体のアイソタイプを決定するために、マイクロタイタープレートのウェルを、4で一晩、1μg/mLの抗ヒト免疫グロブリンを被膜し、1%BSAでブロック後、プレートを、1~2時間、周囲温度で、1μg/mL未満の試験用モノクローナル抗体または精製したアイソタイプ対照と反応させる。ウェルは、ヒトIgG1またはヒトIgM-特異的アルカリホスファターゼ結合プローブで反応させる。プレートは、前述のように発色させ、分析する。

30

【0193】

抗メソテリンヒトIgGsも、ウェスタンブロッティングによるメソテリン抗原との反応性に対して試験できる。簡潔には、メソテリン抗原が調製されて、ナトリウム・ドデシル硫酸ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動に供される。単離された抗原は、ニトロセルロース膜にトランスファーし、10%ウシ胎仔血清でブロックし、試験されるモノクローナル抗体でプローブする。ヒトIgG結合は、抗ヒトIgGアルカリホスファターゼを用いて検出し、BCIP/NBT基板タブレット(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo)で発色させる。

40

【0194】

本開示の抗体の結合特異性は、メソテリンタンパク質を発現する細胞に対する抗体の結合をモニタし、例えば、フローサイトメトリーを用いて決定できる。OVCAR3、NCI-H226、CFPAC-1またはKB細胞のように、メソテリンタンパク質を自然に発現する細胞または細胞株が使用でき、あるいは、CHO細胞株のような細胞株は、メソテリンをコードする発現ベクターと共にトランスフェクトできるので、メソテリンを細胞表面上に発現させることができる。トランスフェクトされたタンパク質は、タグに抗体を用いて検出するために、好ましくはN末端で、mycタグまたはhisタグのようなタグ

50

を含んでもよい。メソテリンタンパク質に対する本開示の抗体の結合は、抗体でトランスフェクトされた細胞をインキュベートし、結合された抗体を検出することにより決定できる。トランスフェクトされたタンパク質上のタグに対する抗体の結合は、陽性の対照として使用できる。

【0195】

(二重特異性分子)

別の態様において、本開示は、別の機能の分子にリンクされた、本開示に関する、抗メソテリン抗体、またはそのフラグメント、例えば、少なくとも二つの異なる結合部位または標的分子に結合する、別の抗体、結合模倣物、または受容体のリガンドのような、別のペプチドまたはタンパク質を含む二重特異性分子を特長とする。本開示の抗体は、2つ以上の異なる結合部位および/または標的分子に結合する多特異的な分子を形成するために、1つ以上の他の機能分子に実際に結合できる。このような多特異的な分子も、本明細書で用いられる用語「二重特異性分子」により網羅されることも意図している。連結は、化学カップリング、遺伝子融合、非共有結合性会合などで行うことができる。

10

【0196】

したがって、本開示は、メソテリン用の少なくとも1つの第一の結合特異性と、第二の標的エピトープ用の第二の結合特異性とを含む、二重特異性分子を含んでいる。本開示の特定の態様において、第二の標的エピトープは、Fc受容体、例えば、ヒトのFcRI(CD64)またはヒトのFcγ受容体(CD89)である。従って、本開示は、エフェクター細胞(例えば、単球、マクロファージ、または多形核球細胞(PMN's))を発現するFcRまたはFcγR、およびメソテリンタンパク質を発現する標的細胞両方に結合できる二重特異性分子を含んでいる。これらの二重特異性分子は、エフェクター細胞に対するメソテリン発現細胞を標的とし、メソテリン発現細胞の食作用、ADCC、サイトカイン解放、またはスーパーオキシド・アニオンの形成のように、Fc受容体媒介エフェクター細胞の作用の誘因となる。

20

【0197】

二重特異性分子が多特異的である場合、分子は、抗Fc結合特異性と抗メソテリン結合特異性に加えて、第三の結合特異性を更に含むことができる。ある態様において、第三の結合特異性は、例えば、細胞毒性活性に関する表面タンパク質に結合し、それによって標的細胞に対する免疫応答を増加させる分子などの、抗エンハンスマント因子(Enhancer Factor)部位である。「抗エンハンスマント因子部位」とは、所与の分子、例えば抗原または受容体に結合し、それによってFc受容体または標的細胞抗原の結合決定因子の作用を増強する結果をもたらす、抗体、機能的な抗体フラグメント、またはリガンドである。「抗エンハンスマント因子部位」は、Fc受容体または標的細胞抗原に結合できる。または、抗エンハンスマント因子部位は、第一と第二の結合特異性が結合する要素と異なる要素に結合できる。例えば、抗エンハンスマント因子部位は、標的細胞に対して高い免疫応答を引き起こす、細胞傷害性のT-細胞(例えば、CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1)または他の免疫細胞に結合し得る。

30

【0198】

ある態様において、本開示の二重特異性分子は、結合特異性として、少なくとも1つの抗体、または、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、dAb、または一本鎖Fvを含めた、その抗体フラグメントを含む。抗体は、Ladnerらの米国特許第4,946,778号に記載されているように、軽鎖または重鎖ダイマー、またはFvまたは一本鎖構造のように、その任意の最小フラグメントでもよく、その内容は参照することにより、明確に援用される。

40

【0199】

ある態様において、Fc受容体の結合特異性は、モノクローナル抗体によって提供され、その結合はヒトの免疫グロブリンG(IgG)によってブロックされない。本明細書で用いられるように、用語「IgG受容体」は、第1染色体上に位置する8個の-鎖遺伝子のなかの任意の1つを意味する。これらの遺伝子は、三つのFc受容体クラス：F

50

c R I (C D 6 4) 、 F c R I I (C D 3 2) 、 F c R I I I (C D 1 6) にグループ分けされる、合計で 12 個の膜貫通または可溶性受容体・アイソフォームをコードする。ある好ましい態様において、 F c 受容体は、ヒトの高い親和性 F c R I である。ヒトの F c R I は、 72 kDa 分子で、単量体 IgG に対して高い親和性 (10^8 ~ $10^9 M^{-1}$) を示す。

【0200】

ある好ましい抗 F c モノクローナル抗体の生成と特性解析が、 Fanger らの国際公開第 WO 88 / 00052 号と米国特許第 4,954,617 号とに記載されており、それらは、本明細書において参考することにより完全に援用される。これらの抗体は、受容体の F c 結合部位と異なる部位で、 F c R I 、 F c R I I 、または F c R I I I のエピトープに結合するので、それらの結合は IgG の生理学的レベルで実質的にブロックされない。本開示で有用な特異の抗 F c R I 抗体は、 mAb 22 、 mAb 32 、 mAb 44 、 mAb 62 、 mAb 197 である。 mAb 32 を生成するハイブリドーマは、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、 ATCC Accession No. HB 9469 から入手できる。他の態様において、抗 F c 受容体抗体は、モノクローナル抗体 22 (H22) のヒト化形態になる。 H22 の生成と特性解析は、 Graziano. R. F. らの (1995) J. Immunol. 155 (10) : 4996 - 5002 と、 Tempest らの国際公開第 WO 94 / 10332 号に記載されている。 H22 抗体生成細胞株は、デシグネーション HA022CL1 のもとでアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションで蓄積され、アセッショ n o . C R L 11177 を有する。

【0201】

更に他の好ましい態様において、 F c 受容体の結合特異性は、ヒトの IgA 受容体、例えば、 Fc - アルファ受容体 (Fc R I (C D 89)) に結合する抗体によって提供され、その結合は、ヒトの免疫グロブリン A (IgA) によって好ましくはブロックされない。用語「 IgA 」は、第 19 染色体上に位置する 1 つの - 遺伝子 (Fc R I) の遺伝子産物を含むことを意図している。この遺伝子は、 55 ~ 110 kDa の幾つかのオルタナティブスプライスされる膜貫通型のアイソフォームをコードすることが知られている。 Fc R I (C D 89) は、非エフェクター細胞ポピュレーション上でなく、単球 / マクロファージと好酸性と好中球の顆粒球上で、構造的に発現される。 Fc R I は、 G-CSF または GM-CSF (Morton, H. C. ら (1996) 免疫学における批判的な批評 16 : 432 - 440) のようなサイトカインに対する露出時に増加される、 IgA1 と IgA2 の媒体親和性 ($5 \times 10^7 M^{-1}$) を有する。 IgA リガンド結合ドメインの外部の Fc R I を結合する、 A3 、 A59 、 A62 、 A77 として識別される、四つの Fc R I - 特有のモノクローナル抗体が記載されている (Monteiro, R. C. ら (1992) J. Immunol. 148 : 1764) 。

【0202】

Fc R I と Fc R I は、本開示の二重特異性分子の使用に好ましいトリガー受容体であり、その理由は、それらが、 (1) 免疫エフェクター細胞、例えば、単球、 PMN 、マクロファージ、樹枝状細胞上で主として発現され、 (2) ハイ・レベル (細胞ごとに 5,000 ~ 100,000) で発現され、 (3) 細胞毒性の伝達物質 (例えば、 ADC 、食作用) 、および (4) 自己抗原を含み、それらに対して標的とされる抗原の抗体提示の増強を媒介するからである。

【0203】

ヒトのモノクローナル抗体が好ましいが、本開示の二重特異性分子に使用できる他の抗体は、マウス、キメラ、ヒト化モノクローナル抗体である。

【0204】

本開示の二重特異性分子は、従来技術で周知の方法を用いて、構成要素の結合特異性、例えば、抗 Fc R 結合特性と抗メソテリン結合特異性とをコンジュゲートすることにより、作成できる。例えば、二重特異性分子の各々の結合特異性は、別個に形成できて、次に

相互にコンジュゲートできる。結合特異性がタンパク質またはペプチドである時に、多種多様なカップリングまたは架橋試薬を共有結合のために使用できる。架橋試薬の例では、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミド-S-アセチル-チオアクセターテ(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、O-フェニレンジマレイミド(OPDM)、N-サクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン(SPD)、スルホコハクイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸塩(スルホ-SMCC)(例えば、Karpovskyl(1984)J.Exp.Med.160:1686と、Liu, MAら(1985)Proc.Natl.Acad.Sci.USA82:8648とを参照)を含む。他の方法は、Paulus(1985)Behring Ins. Mitt. No.78, 118-132と、Brennanら(1985)SCIENCE229:81-83と、Glennieら(1987)J.Immunol.139:2367-2375)とに記載されているものを含む。好ましい結合剤は、SATAとsulfo-SMCCであり、共にPierce Chemical Co.(Rockford, IL)から入手できる。

【0205】

結合特異性が抗体である時に、それらは、2つの重鎖のC末端・ヒンジ領域のスルフドリル結合を介して結合できる。特に好ましい態様において、ヒンジ領域は、結合前に、奇数の、好ましくは1つのスルフドリル残基を含むように改変される。

【0206】

または、両方の結合特異性は、同じベクターでコードし、同じ宿主細胞に発現して構築できる。この方法は、二重特異性分子が、mAb × mAb、mAb × Fab、Fab × F(ab')₂またはリガンド × Fab融合タンパク質である場合に、特に有用である。本開示の二重特異性分子は、1つの一本鎖抗体と結合決定因子とを含む一本鎖分子、または二つの結合決定因子を含む一本鎖の二重特異性分子であり得る。二重特異性分子は、少なくとも2つの一本鎖分子を含み得る。二重特異性分子を作製する方法は、例えば、米国特許第5,260,203号と、同5,455,030号と、同4,881,175号と、同5,132,405号と、同5,091,513号と、同5,476,786号と、同5,013,653号と、同5,258,498号と、同5,482,858号とに記載されており、その全てが参考により、本明細書において、明確に組み入れられる。

【0207】

二重特異性分子の、其れらの特異的な標的に対する結合は、例えば、ELISA、放射免疫測定(RIA)、FACS分析、生物学的検定(例えば、成長阻害)、またはウエスタンプロット検定で確認できる。これらの検定の各々は、対象となる複合体に特有の標識付き試薬(例えば、抗体)を使用することにより、対象となるタンパク質-抗体複合体の存在を全体的に検出する。例えば、FcR-抗体複合体は、例えば、抗体-FcR複合体を認識して具体的に結合する、酵素連結の抗体または抗体フラグメントを用いて検出できる。または、複合体は、任意の多種多様な他の免疫学的検定を用いて検出できる。例えば、抗体は、放射性標識を付与され、放射免疫検定(RIA)に使用できる(例えば、Weintraub, B., 放射免疫検定の原理、ラジオリガンド検定技術の第7トレーニング・コース、内分泌協会、1986年3月、これらは、本明細書において、参照により組み入れられる)。放射性同位体は、ガンマ・カウンターまたはシンチレーション・カウンターを使用する手段、またはオートラジオグラフィーから検出できる。

【0208】

(コンジュゲート)

別の態様には、抗体-パートナー分子コンジュゲートが提供されており、そこでは、パートナー分子が化学的リンカーによって、この発明の抗体に結合されている(時に、本明細書では単純に「リンカー」と呼ばれる)。パートナー分子は、治療剤またはマーカーであり得る。治療剤は、例えば、細胞毒素、非細胞毒素薬剤(例えば、免疫抑制剤)、放射

10

20

30

40

50

性医薬、別の抗体、または酵素であり得る。好ましくは、パートナー分子は細胞毒素である。マークーは、ラジオ標識、蛍光標識、または基質に対して検出可能な修飾を触媒化する酵素のような、検出可能なシグナルを形成する任意の標識でよい。抗体が以下のようにして標的化の機能を担ってもよい：抗原が見出される標的組織または細胞に結合することにより、抗体が標的組織または細胞に対してコンジュゲートを導く。そこで、リンカーが切断され、パートナー分子が解放され、所望の生物学的機能が実行される。ある例において、コンジュゲートは標的細胞内へ内在化され、切断はその内部で生じる。

【0209】

(リンカー)

ある態様において、リンカーは、本明細書中、 $(L^4)_p - F - (L^1)_m$ として記される、ペプチジルリンカーである。他のリンカーは、本明細書において、 $(L^4)_p - H - (L^1)_m$ と $(L^4)_p - J - (L^1)_m$ と、各々、記されるヒドラジンとジスフィルド・リンカーとを含んでいる。 L^1 と L^4 はリンカー基である一方で、F、H、Jは抗体からパートナー分子を放出するために切断できる、各々、ペプチジル、ヒドラジン、ジスフィルド部分である。F、H、J、 L^1 、 L^4 は、以降、下付き文字pとmとにより更に十分に定義される。これらのおよび他のリンカーの調製と使用は、国際公開第WO2005/112919号に記載されており、その開示は、本明細書において参照により組み込まれる。

【0210】

抗体-パートナー結合におけるペプチジルと他のリンカーの使用は、米国特許出願第2006/0004081号と、同2006/0024317号と、同2006/0247295号と、米国特許第6,989,452号と、同7,087,600号と、同7,129,261号と、国際公開第WO2007/051081号と、同2007/038658号と、同2007/059404号と、同2007/089100号とに記載されており、その全てが、本明細書において参照により組み入れられる。

【0211】

更なるリンカーが、米国特許第6,214,345号と、米国特許出願第2003/0096743号と、同2003/0130189号と、Grootら、J. Med. Chem. 43, 3093 (2000)と、de Grootら、J. Org. Chem. 66, 8815 (2001)と、国際公開第WO02/083180号と、Carlら、J. Med. Chem. Lett. 24, 479 (1981)と、Dubowchikら、Bioorg & Med. Chem. Lett. 8, 3347 (1998)とに記載されおり、その開示は、本明細書において参照により組み入れられる。

【0212】

抗体とパートナー分子の接続に加えて、リンカーは、安定性をパートナー分子に与え、その生体内の毒性を減ずるか、さもなくば好ましくは、その薬物動態性、生体利用効率、およびまたは薬力学性に関与する。結合がその作用の部位に伝えられると、リンカーが切断されて、パートナー分子が解放される。また、好ましくは、パートナー分子から一旦除去されると（活性化中のように）、リンカーの存在の痕跡が残らないようにするため、リンカーはトレースレス（traceless）である。

【0213】

別の態様では、リンカーは、パートナー分子の治療効果またはマークー活性の部位のように、標的細胞内または近くの部位で切断される機能を特徴とする。このような切断は、事実上、酵素のようなものである。この特徴は、パートナー分子の全身的な活性化を低減し、毒性および全身的な副作用を低減する際に役立つ。酵素的な切断にとって好ましい切断可能なグループは、前述のF、H、Jの部分のように、ペプチド結合、エステル連結、およびジスルフィド連結を含む。他の態様では、リンカーは、pHに対して感応性であり、pHの変動により切断される。

【0214】

10

20

30

40

50

重要な態様は、リンカーが切断される速度を制御する機能である。しばしば、瞬時に切断されるリンカーが望まれる。ある態様では、しかし、更にゆっくりと切断されるリンカーが好ましい。例えば、徐放性製剤においてまたは瞬時の放出と遅い放出の成分を共にもつ製剤において、更に遅れて切断されるリンカーを提供することは有用である。前述の国際公開第 WO 2005 / 112919 号は、超高速から超低速までの速度の範囲で切断するように設計できるヒドラジンリンカーを開示している。

【0215】

リンカーは、コンジュゲートが循環中の際に、すなわち、それが標的組織または細胞に届く前に、劣化に対してパートナー分子を安定させるように働くこともできる。この特徴は、パートナー分子の循環の半減期を延ばすので、かなりの利益を提供する。循環中にパートナー分子は所望の作用 - 例えば細胞障害性 - をもつが、パートナー分子が所望の作用部位での活性化後に細胞傷害性になり、コンジュゲート時は比較的無害であるというよう 10 に、リンカーがパートナー分子の活性を減衰するようにも機能する。治療剤のコンジュゲートは、リンカーのこの特徴が、薬物の治療指数を改善するように働く。

【0216】

切断可能なペプチド、ヒドラジン、またはジスルフィド基 F、H、または J に加えて、各々、1 つまたは複数のリンカー基 L^1 が、ケースに応じて、パートナー分子と F、H、または J との間に導入されてもよい。これらのリンカー基 L^1 は、スペーサー基としても記載され、かつ、少なくとも二つの官能基を有するしてもよい。下付き文字 m の値（すなわち、存在する L^1 基の数）と特定の基 L^1 の位置とに基づいて、基 L^1 の化学官能性が、パートナー分子の化学的官能性、ケースに応じて F、H、または J の化学的官能性、または別のリンカー基 L^1 （一つ以上の L^1 が存在する場合）の化学的官能性に結合できる。スペーサー基 L^1 に適した化学的官能性の例は、ヒドロキシル、メルカプト、カルボニル、カルボキシ、アミノ、ケトン、アルデヒド、メルカプト基を含む。 20

【0217】

リンカー L^1 は、置換または非置換アルキル、置換または非置換アリール、置換または非置換ヘテロアリール、または置換または非置換ヘテロアルキル基であり得る。ある態様において、アルキルまたはアリール基は、1 ~ 20 の炭素原子を含む。それらは、ポリエチレンギリコール部分を含み得る。

【0218】

典型的な基 L^1 は、例えば、6 - アミノヘキサンノール、6 - メルカプトヘキサンノール、10 - ヒドロキシデカン酸、グリシン、および他のアミノ酸、1,6 - ヘキサンジオール、-アラニン、2 - アミノエタノール、システアミン（2 - アミノエタンチオール）、5 - アミノペンタン酸、6 - アミノヘキサン酸、3 - マレイミド安息香酸、フタリド、-置換フタリド、カルボニル基、アミナルエステル (aminal ester)、核酸、ペプチドなどを含む。 30

【0219】

基 L^1 の 1 つの機能は、ケースに応じて、F、H、または J、およびパートナー分子との間に、後者が F、H、または J における切断の化学的な反応を干渉（例えば、立体的または電子的な作用など）しないように、空間的な分離をもたらすことにある。基 L^1 は、更なる分子量と化学官能性とをコンジュゲートに導入するように働くこともできる。一般的に、更なる分子量と官能性は、コンジュゲートの血中半減期やその他の特性に影響を与える。従って、スペーサー基の慎重に選択することにより、様々な範囲の血中半減期をもつコンジュゲートを作製することができる。任意で、1 つまたは複数のリンカー L^1 は、これ以降に記すように、自己犠牲 (self-immolative) 基であってもよい。 40

【0220】

下付き文字 m は、0、1, 2, 3, 4, 5, 6 から選択された整数である。複数の L^1 基が存在する場合、それらは、同じかまたは異なってもよい。

【0221】

L^4 は、F、H、または J が抗体の抗原結合に干渉しないように、または抗体が F、H 50

、またはJにおいて切断の化学的特性を干渉しないように、ケースに応じて、F、H、またはJと抗体との間に空間的な分離をもたらす、リンカー部分である。好ましくは、L⁴は、前記部分を含むリンカー、またはコンジュゲートの加水分解速度を改変するリンカーを用いることで、高い可溶性または低い凝集特性を、コンジュゲートに付与する。L¹のケースのように、L⁴は、自己犠牲基であってもよい。ある態様において、L⁴部分は、置換アルキル、非置換アルキル、置換アリール、非置換アリール、置換ヘテロアルキル、または非置換ヘテロアルキルであり、それらは、直線状、分枝状、または環状であってよい。置換は、例えば、低級(C₁ ~ C₆)アルキル、アルコキシ、アルキルチオ、アルキルアミノ、またはジアルキルアミノであり得る。ある態様において、L⁴は、非環状部分を含む。別の態様において、L⁴は、ポリリシンまたはポリアルギニンのように、陽性または陰性にチャージしたアミノ酸ポリマーを含む。L⁴はポリエチレングリコール部分のようなポリマーを含む。さらに、L⁴リンカーは、例えば、ポリマー・コンポーネントと小分子部分を共に含む。

【0222】

好ましい態様において、L⁴は、ポリエチレングリコール(PEG)部分を含む。L⁴のPEG部位は、1 ~ 50の単位長(units long)であってよい。好ましくは、PEGは、1 ~ 12の繰り返し単位、更に好ましくは3 ~ 12の繰り返し単位、更に好ましくは2 ~ 6の繰り返し単位、または特に更に好ましくは3 ~ 5の繰り返し単位、最も好ましくは4の繰り返し単位を有する。L⁴は、PEG部分のみから成るか、または、更なる置換または非置換アルキルまたはヘテロアルキルを含んでも良い。L⁴部分の一部としてPEGを組み合わせて、複合体の水溶性を高めることは有用である。さらに、PEG部分は、抗体と薬剤のコンジュゲーション中に生じ得る凝集の度合いを低減する。

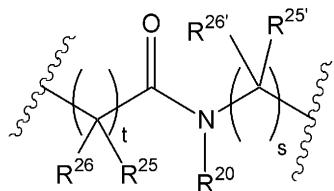
【0223】

下付き文字pは0または1である、即ち、L⁴の存在は任意である。存在する場合、L⁴が少なくとも2つの官能基を有し、一つの官能基が、ケースに応じて、F、H、またはJの化学官能性に結合し、他の官能基が抗体に結合する。基L⁴の適切な化学官能性の例は、ヒドロキシ、メルカプト、カルボニル、カルボキシ、アミノ、ケトン、アルデヒド、メルカプト基を含む。抗体は、一般的に、スルフヒドリル基(例えば、未酸化のシステイン残基から、イミノチオラン(iminothiolane)をもつリジン残基に対するスルフヒドリル含有エクステンションの追加、またはジスフィルド・ブリッジの還元)、アミノ基(例えば、リジン残基から)、アルデヒド基(例えば、グリコシド側鎖の酸化から)、またはヒドロキシル基(例えば、セリン残基から)を介してコンジュゲートされるので、抗体に対する取付に好ましい化学官能性は前述の基に反応するものであり、例としてマレイミド、スルフヒドリル、アルデヒド、ヒドラジン、セミカルバジド、およびカルボキシル基がある。抗体上のスルフヒドリル基とL⁴上のマレイミド基との組み合わせが好ましい。

【0224】

ある態様において、L⁴は、(AA¹)_cのN末端に直接的に取り付けられた

【化1】



を含む。R²⁰は、Hと、置換または非置換アルキルと、置換または非置換ヘテロアルキルと、アシルから選択されたメンバーである。各々R²⁵、R^{25'}、R²⁶、R^{26'}は、Hと、置換または非置換アルキルと、置換または非置換ヘテロアルキルと、置換または非置換アリールと、置換または非置換ヘテロアリールと、置換または非置換ヘテロシクロアルキルとから独立に選択され、sとtは1 ~ 6から独立に選択される整数である。好ましくは、R²⁰、R²⁵、R^{25'}、R²⁶、R^{26'}は、疎水性である。ある態様に

10

20

30

40

50

おいて、 $R^{2\ 0}$ は、H またはアルキル（好ましくは、非置換低級アルキル）である。ある態様において、 $R^{2\ 5}$ 、 $R^{2\ 5'}$ 、 $R^{2\ 6}$ 、 $R^{2\ 6'}$ は、独立に H またはアルキル（好ましくは、非置換 C¹ ~ C⁴ アルキル）である。ある態様において、 $R^{2\ 5}$ 、 $R^{2\ 5'}$ 、 $R^{2\ 6}$ 、 $R^{2\ 6'}$ は、全て H である。ある態様において、t は 1、s は 1 または 2 である。

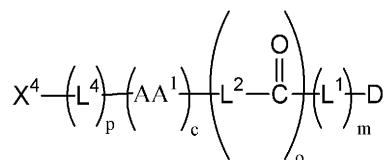
【0225】

（ペプチドリンカー（F））

前述のように、発明のペプチジルリンカーは、一般式：

$(L^4)_p - F - (L^1)_m$ で表され、ここで、F はペプチジル部分を含む部位を表している。ある態様において、F 部位は、式 (a) のコンジュゲートに対応して、任意で異なる自己犠牲リンカー L² とカルボニル基とを含んでもよい。 10

【化2】



【0226】

この態様において、 L^1 と L^4 と p と m は、前述の定義のようになる。X⁴ は抗体であり、D はパートナー分子である。下付き文字 o は 0 または 1 であり、L² は、存在する場合、自己犠牲リンカーである。AA¹ は、1つまたは複数の天然アミノ酸、および / または非天然 - アミノ酸を表し、c は 1 ~ 20 の整数である。ある態様において、c は 2 ~ 5 の範囲であるか、または c は 2 または 3 である。 20

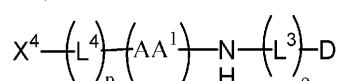
【0227】

式 (a) では、AA¹ は、そのアミノ末端において、L⁴ に直接的に、または、L⁴ が無い時に、X⁴ に直接的にリンクされる。ある態様において、L⁴ が存在する時に、L⁴ は、(AA¹)_c のN末端に直接的に取り付けられたカルボキシルアシル基 (carboxylic acyl group) を含まない。

【0228】

別の態様において、式 (b) のコンジュゲートに対応して、F 部位はアミノ基および任意でスペーサー基 L³ を含み、L¹ は存在しない（すなわち、m は 0）。 30

【化3】



【0229】

本実施形態において、X⁴、D、L⁴、AA¹、c、および p は、上記に定義されたとおりである。下付き文字 o は、0 または 1 である。L³ は、存在する場合、1 級もしくは 2 級のアミンまたはカルボキシル官能基を含むスペーサー基であり、L³ のアミンは D のペンドントのカルボキシル官能基とアミド結合を形成するか、あるいは L³ のカルボキシルは D のペンドントのアミン官能基とアミド結合を形成する。 40

【0230】

（自己犠牲リンカー）

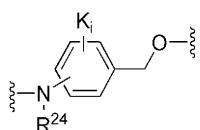
自己犠牲リンカーは、間隔をおいた二つの化学的部分を通常安定な三部分からなる分子に共有結合的に連結し、酵素的切断を用いて当該間隔をおいた化学的部分の一つをこの三部分からなる分子から放出し、そして、当該酵素的切断のあとに当該間隔をおいた化学的部分のもう一方を本分子の残部から自発的に切断して放出することができる二官能性の化学的部分である。本発明によると、自己犠牲スペーサーは、その末端の一つにおいてペプチド部分に共有結合され、そして、そのもう一方の末端において、その誘導体化によって薬理活性を阻害する薬剤部分の化学的反応部位に共有結合され、その結果、ペプチド部分

および薬剤部分は間隔をあけられかつ共有結合され、標的酵素がないときは安定で薬理学的に不活性であるが、スペーサー部分およびペプチド部分を共有結合する結合において当該標的酵素により酵素的に切断可能でありこれにより三部分からなる分子からのペプチド部分の放出を達成する三部分からなる分子となるようになる。当該酵素的切断は、順々に、スペーサー部分の自己犠牲特性を活性化し、そして、スペーサー部分を薬剤部分に共有結合する結合の自発的切断を開始させ、これにより、薬理学的に活性な形態における薬剤の放出を達成する。参考することにより本明細書に組み込まれた開示である、例えば、カール (Carl) ら、J. Med. Chem. 24 (3), 479 - 480 (1981) ; カール (Carl) ら、国際公開第 81/01145 号 (1981) ; トキ (Toki) ら、J. Org. Chem. 67, 1866 - 1872 (2002) ; ボイド (Boyd) ら、国際公開第 2005/112919 号；および、ボイド (Boyd) ら、国際公開第 2007/038658 号を参考されたい。
10

【0231】

特に好みしい自己犠牲スペーサーの一つは式 (c) によって表わされてもよい。

【化4】



【0232】

20

アミノベンジル基の芳香環は、一つ以上の「K」基で置換されてもよい。「K」基は、環状構造の一部である 4 つの置換されていない炭素の一つにこの置換がなければ結合される水素を置換する芳香環上の置換基である。「K」基は、例えばハロゲンなどのただ一つの原子でもよく、例えばアルキル、ヘテロアルキル、アミノ、ニトロ、ヒドロキシ、アルコキシ、ハロアルキル、シアノなどの複数原子の基でもよい。各 K は、置換アルキル、非置換アルキル、置換ヘテロアルキル、非置換ヘテロアルキル、置換アリール、非置換アリール、置換ヘテロアリール、非置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、NO₂、NR^{2 1}R^{2 2}、NR^{2 1}COR^{2 2}、OCO NR^{2 1}R^{2 2}、OCOR^{2 1}、OR^{2 1} からなる群から独立に選択される。ここで、R^{2 1} および R^{2 2} は、H、置換アルキル、非置換アルキル、置換ヘテロアルキル、非置換ヘテロアルキル、置換アリール、非置換アリール、置換ヘテロアリール、非置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキルからなる群から独立に選択される。代表的な K 置換基は、F、Cl、Br、I、NO₂、OH, OCH₃、NHCOCH₃、N(CH₃)₂、NHCOCF₃、およびメチルを含むが、これらに限定されない。「K_i」に関して、i は、0、1、2、3、または、4 の整数である。一つの好みしい実施形態において、i は、0 である。
30

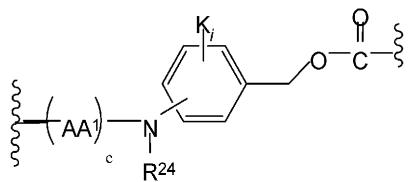
【0233】

上記に示した構造のエーテル酸素原子は、カルボニル基に連結される。NR^{2 4} 官能基から芳香環への線は、アミン官能基が、リングを形成してかつ -CH₂-O- 基により置換されていない 5 つの炭素のいずれかに結合されてもよいということを示している。好みしくは、X の NR^{2 4} 官能基は、-CH₂-O- 基に対してパラ位置において芳香環に共有結合される。R^{2 4} は、H、置換アルキル、非置換アルキル、置換ヘテロアルキル、非置換ヘテロアルキルからなる群から選択されたメンバーである。特定の実施形態において、R^{2 4} は、水素である。
40

【0234】

一つの実施形態において、本発明は、F が次の構造を含む上記の式 (a) のペプチドリングカーラーを提供する。

【化5】



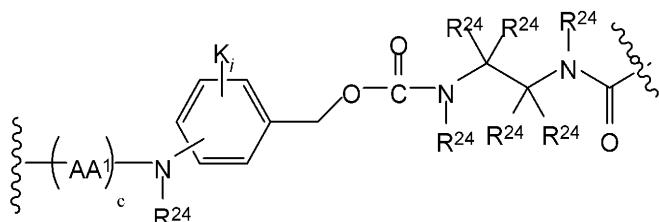
式中、R^{2~4}、AA¹、K_i、およびcは上記に定義されたとおりである。

【0235】

他の実施形態において、上記の式(a)のペプチドリンカーは、次の構造を含む - F - (L¹)_m - を含む。

10

【化6】



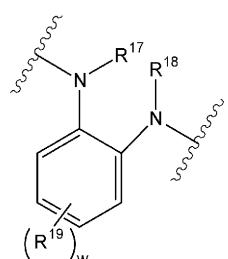
式中、R^{2~4}、AA¹、K_i、およびcは上記に定義されたとおりである。

【0236】

ある実施形態においては、自己犠牲スペーサーL¹またはL²は、次の構造を含む。

20

【化7】



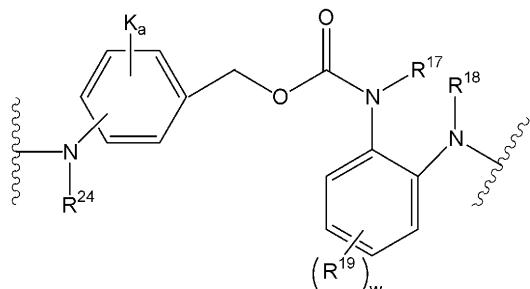
式中、各R^{1~7}、R^{1~8}およびR^{1~9}は、H、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、置換または非置換のアリールから独立に選択され、wは0から4の整数である。ある実施形態において、R^{1~7}およびR^{1~8}は、Hまたはアルキル（好ましくは非置換のC₁~C₄アルキル）から独立に選択される。好ましくは、R^{1~7}およびR^{1~8}は、例えればメチルまたはエチルなどのC₁~C₄アルキルである。ある実施形態において、wは0である。この特定の自己犠牲スペーサーは比較的迅速に環化することが実験的に見出されている。

30

【0237】

ある実施形態において、L¹またはL²は、次の構造を含む。

【化8】



式中、R^{1~7}、R^{1~8}、R^{1~9}、R^{2~4}、およびK_aは上記に定義されたとおりである。

40

【0238】

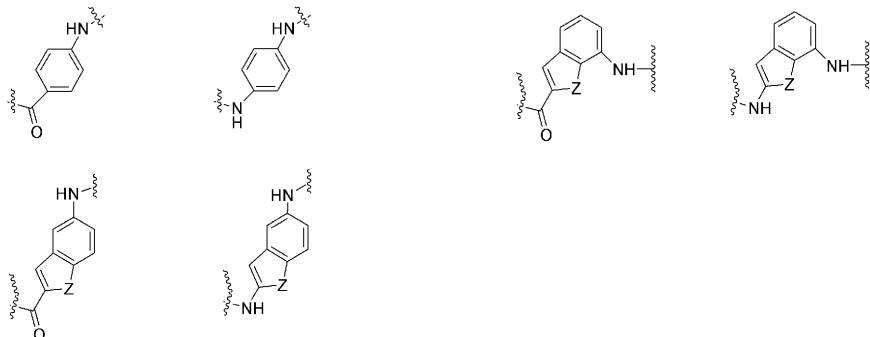
(スペーサー基)

スペーサー基L³は、1級もしくは2級アミンまたはカルボキシル官能基を含むことを

50

特徴とし、 L^3 基のアミンはDのペンドントのカルボキシル官能基とアミド結合を形成し、 L^3 のカルボキシルはDのペンドントのアミン官能基とアミド結合を形成する。 L^3 は、置換または非置換のアルキル、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、または、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキルからなる群から選択されうる。好ましい実施形態においては、 L^3 は、芳香族基を含む。さらに好ましくは、 L^3 は、安息香酸基、アニリン基、またはインドール基を含む。 $-L^3-NH-$ スペーサーとして機能を果たしえる構造の限定しない例は、次の構造を含む。

【化9】



10

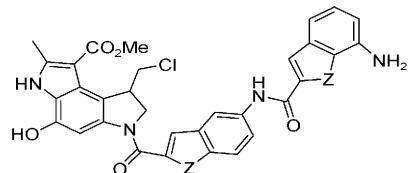
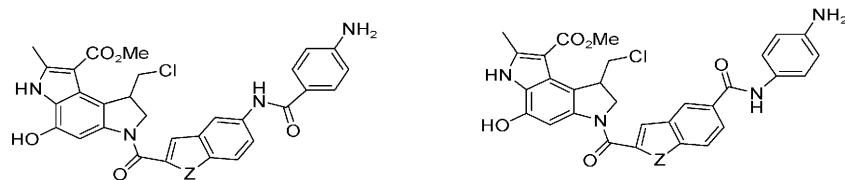
式中、Zは、O、S、および $NR^{2,3}$ から選択されるメンバーであり、 $R^{2,3}$ は、H、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーである。

20

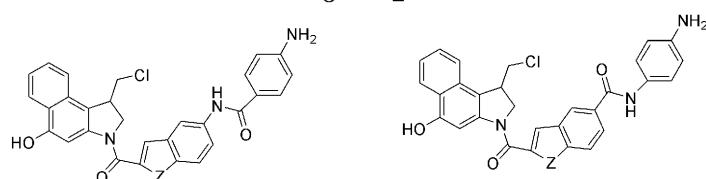
【0239】

L^3 を含む本発明のリンカーの切断に際して、 L^3 部分は薬剤Dと結合されたままである。従って、 L^3 部分は、Dとの結合がDの活性を著しく変えることがないように選択される。他の実施形態において、薬剤Dの一部はそれ自体 L^3 スペーサーとして機能する。例えば、一つの実施形態において、薬剤Dは、該薬剤の一部が L^3 スペーサーとして機能を果たすデュオカルマイシン誘導体である。そのような実施形態の限定しない例は、 $NH_2-(L^3)-D$ が次の構造からなる群から選択された構造を有するデュオカルマイシン誘導体を含む：

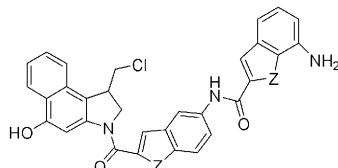
【化10】



10



および



20

式中、Zは、O、S、またはN R² ³であり、R² ³は、H、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、またはアシルであり、各構造上のNH₂基は、(AA¹)_cと反応して-(AA¹)_c-NH-を形成する。

【0240】

(ペプチド配列(AA¹)_c)

AA¹基は、ただ一つのアミノ酸またはアミド結合により結合された複数のアミノ酸を表わす。当該アミノ酸は、天然アミノ酸および/または非天然-アミノ酸であってもよい。それらは、L配置であってもよいしまたはD配置であってもよい。一つの実施形態においては、少なくとも3つの異なるアミノ酸が用いられる。他の実施形態においては、ただ2つのアミノ酸が用いられる。

30

【0241】

用語「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸だけでなく、天然に存在するアミノ酸に類似した形で機能するアミノ酸類似物およびアミノ酸模倣体をいう。天然に存在するアミノ酸は、遺伝暗号によりコードされたものだけでなく、例えば、ヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタメート、シトルリン、O-ホスホセリンなどのその後修飾されたアミノ酸である。アミノ酸類似物は、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基と結合された炭素を有する化合物、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムなどを示す。このような類似物は、修飾されたR基(例えばノルロイシン)または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造を保持する。格別に用いられてもよい一つのアミノ酸は、アルギニンの前駆体であり、肝臓における尿素の形成に関与するシトルリンである。アミノ酸模倣体は、アミノ酸の通常の化学構造と異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と類似した方法で機能する化合物をいう。用語「非天然アミノ酸」は、上記の天然に存在する20アミノ酸の「D」の立体化学的形態を表わすことが意図される。用語「非天然アミノ酸」は、天然アミノ酸の相同物、および天然アミノ酸の合成的に修飾された形態を含むことがさらに理解される。合成的に修飾された形態は、最大二つの炭素原子だけ縮められまたは延ばされたアルキレン鎖を有するアミノ酸、任意に置換されてよいアリール基を有するアミノ酸、

40

50

および、ハロゲン化された基、好ましくは、ハロゲン化されたアルキルおよびアリール基を含むアミノ酸を含むが、これらに限定されない。当該アミノ酸は、本発明のリンカーまたはコンジュゲートと結合されたとき、該アミノ酸のカルボン酸基がケト(C(O))基で置換されている「アミノ酸側鎖」の形態である。このように、例えば、アラニン側鎖は、 - C(O) - C H(N H₂) - C H₃ などである。

【 0 2 4 2 】

ペプチド配列 (A A¹)_c は、機能的には、ただ一つのアミノ酸 (c = 1 のとき) のアミド化残基、またはアミド結合により結合された複数のアミノ酸のアミド化残基である。ペプチド配列 (A A¹)_c は、好ましくは、生物系における注目する位置での酵素による酵素触媒切断に対して選択される。例えば、標的とされるが細胞により内在化されないコンジュゲートには、ペプチドが細胞外で切断されるように、細胞外マトリクスにあるプロテアーゼ、例えば、すぐ近くで死にかけた細胞により放出されたプロテアーゼまたは腫瘍関連プロテアーゼにより切断されるペプチドが選択される。細胞による内在化のために設計されたコンジュゲートには、好ましくは、エンドソームまたはリソソームのプロテアーゼによる切断のために配列 (A A¹)_c が選択される。当該ペプチド内のアミノ酸数は 1 から 20 の範囲でありうるが、より好ましくは、 (A A¹)_c を構成する 1 ~ 8 つのアミノ酸、1 ~ 6 つのアミノ酸、1、2、3 もしくは 4 つのアミノ酸があるものと思われる。特定酵素または数種の酵素による切断の影響を受けやすいペプチド配列は、当技術分野で周知である。

【 0 2 4 3 】

好ましくは、 (A A¹)_c は、プロテアーゼによる切断部位であるアミノ酸配列 (「切断認識配列」) を含む。多くのプロテアーゼ切断配列は、当技術分野において公知である。例えば、マタヨシ (Matayoshi) ら、 Science 247 : 954 (1990) ; ダン (Dunn) ら、 Meth. Enzymol. 241 : 254 (1994) ; セイダ (Seidah) ら、 Meth. Enzymol. 244 : 175 (1994) ; トーンベリー (Thornberry) 、 Meth. Enzymol. 244 : 615 (1994) ; ウェバー (Weber) ら、 Meth. Enzymol. 244 : 595 (1994) ; スミス (Smith) ら、 Meth. Enzymol. 244 : 412 (1994) ; ボービエル (Bouvier) ら、 Meth. Enzymol. 248 : 614 (1995) ; ハーディ (Hardy) ら、発生、老化、およびアルツハイマー病におけるアミロイドタンパク質前駆体 (Amyloid Protein Precursor in Development, Aging, and Alzheimer's Disease) 、マスターズ (Masters) ら編、 190 - 198 頁 (1994) を参照されたい。

【 0 2 4 4 】

好ましい実施形態において、ペプチド配列 (A A¹)_c は、リソソームプロテアーゼにより切断される能力に基づいて選択され、その限定しない例は、カセプシン B、C、D、H、L、および S を含む。好ましくは、ペプチド配列 (A A¹)_c は、生体外でカセプシン B により切断ができる。

【 0 2 4 5 】

他の実施形態において、ペプチド配列 (A A¹)_c は、例えば腫瘍細胞の近傍において細胞外に見出されるプロテアーゼなどの、腫瘍関連プロテアーゼにより切断される能力に基づいて選択され、その例は、チメット (thimmet) オリゴペプチダーゼ (TOP) および CD10 を含む。他の実施形態において、配列 (A A¹)_c は、ウロキナーゼまたはトリプターゼによる選択的切断のために設計される。

【 0 2 4 6 】

本発明のコンジュゲートにおける使用に適しているペプチド配列の適しているが限定しない例は、 Val - Cit 、 Cit - Cit 、 Val - Lys 、 Phe - Lys 、 Lys - Lys 、 Ala - Lys 、 Phe - Cit 、 Leu - Cit 、 Ile - Cit 、 Trp 、 Cit 、 Phe - Ala 、 Phe - N⁹ - トシリ - Arg 、 Phe - N⁹ - ニトロ - A

10

20

30

40

50

rg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu(配列番号40)、-Ala-Leu-Ala-Leu(配列番号41)、Gly-Phe-Leu-Gly(配列番号42)、Val-Ala、Leu-Leu-Gly-Leu(配列番号43)、Leu-Asn-Ala、およびLys-Leu-Valを含む。好ましいペプチド配列はVal-CitおよびVal-Lysである。

【0247】

他の実施形態において、薬剤部分の最も近くに位置したアミノ酸は、Ala、Asn、Asp、Cit、Cys、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、およびValからなる群から選択される。さらに別の実施形態において、薬剤部分の最も近くに位置したアミノ酸は、Ala、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、およびValからなる群から選択される。

【0248】

当業者は、ペプチド配列のアレイを容易に評価して過度の実験に頼ることなく本発明におけるそれらの実用性を決定することができる。例えば、チマーマン、エム. (Zimmerman, M.)ら、(1977) *Analytical Biochemistry* 78: 47-51; リー、ディー. (Lee, D.)ら、(1999) *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9: 1667-72; およびラノ、ティー. エー. (Rano, T. A.)ら、(1997) *Chemistry and Biology* 4: 149-55を参照されたい。

【0249】

本発明のコンジュゲートは、二つ以上のリンカーを任意に含んでもよい。これらのリンカーは、同じかまたは異なっていてもよい。例えば、ペプチジルリンカーが、薬剤をリガンドに連結させるのに用いられてもよく、第二のペプチジルリンカーが、診断用薬剤を当該複合体に結び付けてもよい。付加的なリンカーの他の用途は、解析薬剤、生体分子、標的薬剤、および検出可能なラベルを当該抗体-パートナー複合体に結合することを含む。

【0250】

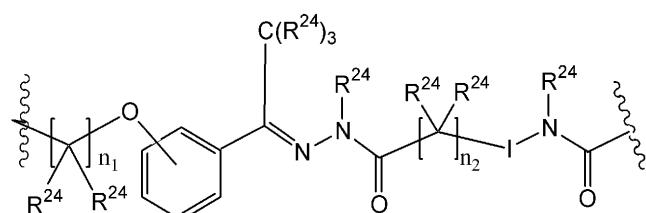
(ヒドラジンリンカー(H))

他の実施形態において、本発明のコンジュゲートは、該コンジュゲートが次の構造を有するヒドラジン自己犠牲リンカーを含む：

【化11】

$X^4 - (L^4)_p - H - (L^1)_m - D$
式中、D、L¹、L⁴、p、m、およびX⁴は、上記で定義されかつ本明細書においてさらに説明されるとおりであり、Hは次の構造を含むリンカーである：

【化12】



式中、n₁は1~10の整数であり、n₂は0、1、または2であり、各R^{2~4}は、H、置換アルキル、非置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および非置換ヘテロアルキルからなる群から独立に選択されたメンバーであり、そして、Iは、結合(すなわち、骨格の炭素および隣接の窒素の間の結合)または、次の構造のいずれかである：

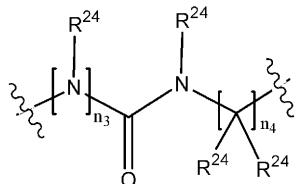
10

20

30

40

【化13】



式中、 n_3 は 0 または 1 であるが、ただし n_3 が 0 のとき n_2 は 0 ではなく、 n_4 は 1、2、または 3 である。

【0251】

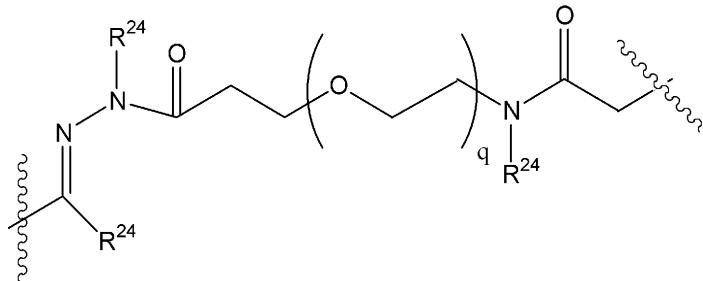
一つの実施形態において、フェニル環上の置換がパラ置換である。好ましい実施形態において、 n_1 は 2、3、または 4 であるか、あるいは、 n_1 は 3 である。好ましい実施形態において、 n_2 は 1 である。好ましい実施形態において、I は結合（すなわち、骨格の炭素と隣接の窒素との間の結合）である。一つの態様において、ヒドラジンリンカー H は、例えば n_3 が 0 および n_4 が 2 のとき、切断に際し 6 員の自己犠牲リンカーを形成しうる。他の態様において、ヒドラジンリンカー H は、切断に際し、5 員の 2 つの自己犠牲リンカーを形成しうる。さらに別の態様において、切断に際し、H は 5 員の 1 つの自己犠牲リンカーを形成し、H は 7 員の 1 つの自己犠牲リンカーを形成するか、または、H は 5 員の自己犠牲リンカーおよび 6 員の一つの自己犠牲リンカーを形成する。切断の速度は、切断に際して形成されたリングの大きさによって影響を受ける。このように、所望の切断の比率に依存して、切断に際して形成される適切な大きさのリングが選択されうる。

10

【0252】

他のヒドラジン構造 H は次の式を有する：

【化14】



20

式中、 q は 0、1、2、3、4、5、または 6 であり、各 R^{24} は、H、置換アルキル、非置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および非置換ヘテロアルキルからなる群から独立に選択されたメンバーである。このヒドラジン構造は、5 員環、6 員環、または 7 員環をも形成し、そして、付加的な成分が多環を形成するために加えられうる。

【0253】

様々なヒドラジンリンカーの調製、切断化学、環化反応速度論が、国際公開第 2005 / 112919 号において開示されており、本開示は参考することにより本明細書に組み込まれる。

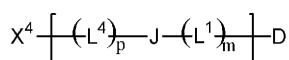
【0254】

40

(ジスルフィドリンカー (J))

さらに別の実施形態において、リンカーは酵素的に切断可能なジスルフィド基を含む。一つの実施形態において、本発明は、以下の式 (d) による構造を有する細胞傷害性の抗体 - パートナー化合物を提供する：

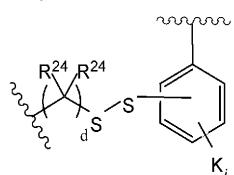
【化15】



式中、D、 L^1 、 L^4 、p、m、および X^4 は上記で定義されかつ本明細書においてさらに説明されるとおりであり、J は次の構造を有する基を含むジスルフィドリンカーである。

50

【化16】



式中、各 R^{24} は、H、置換アルキル、非置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および非置換ヘテロアルキルからなる群から独立に選択されたメンバーであり、各 K は、置換アルキル、非置換アルキル、置換ヘテロアルキル、非置換ヘテロアルキル、置換アリール、非置換アリール、置換ヘテロアリール、非置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、 NO_2 、 $NR^{21}R^{22}$ 、 $NR^{21}COR^{22}$ 、 $OCONR^{21}R^{22}$ 、 $OCOR^{21}$ 、および OR^{21} からなる群から独立に選択されたメンバーであり、 R^{21} および R^{22} は、H、置換アルキル、非置換アルキル、置換ヘテロアルキル、非置換ヘテロアルキル、置換アリール、非置換アリール、置換ヘテロアリール、非置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキルからなる群から独立に選択され、 i は、0、1、2、3、または4の整数であり、 d は0、1、2、3、4、5、または6の整数である。

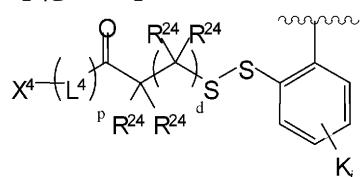
【0255】

ジスルフィドリンクーの芳香環は、一つ以上の「 K 」基で置換されうる。「 K 」基は、環構造の一部である4つの置換されていない炭素の一つにこの置換がなければ結合される水素を置換する芳香環上の置換基である。「 K 」基は、例えばハロゲンなどのただ一つの原子でもよく、例えばアルキル、ヘテロアルキル、アミノ、ニトロ、ヒドロキシ、アルコキシ、ハロアルキル、シアノなどの複数原子の基でもよい。代表的な K 置換基は、F、Cl、Br、I、 NO_2 、 OH 、 OCH_3 、 $NHCOCH_3$ 、 $N(CH_3)_2$ 、 $NHCOCF_3$ 、およびメチルを独立に含むがこれらに限定されない。「 K_i 」に関して、 i は、0、1、2、3、または4の整数である。特定の実施形態において、 i は0である。

【0256】

好ましい実施態様において、リンクーは、次の式の酵素的に切断可能なジスルフィド基を含む：

【化17】

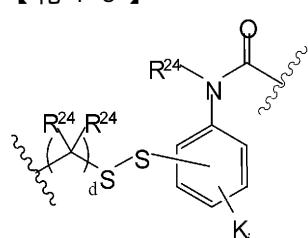


式中、 L^4 、 X^4 、 p 、および R^{24} は、上記のとおりであり、 d は 0、1、2、3、4、5、または6である。特定の実施形態では、 d は1または2である。

【0257】

さらに特定のジスルフィドリンクーは、次の式に示される：

【化18】



好ましくは、 d は1または2であり、各 K はHである。

【0258】

他のジスルフィドリンクーは次の式に示される：

10

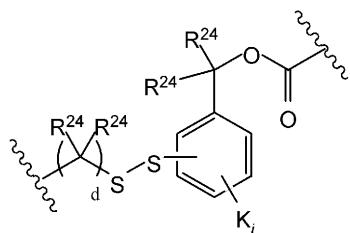
20

30

40

50

【化19】



好みしくは、dは1または2であり、各KはHである。

【0259】

10

様々な実施形態において、ジスルフィドは、アミンに対してオルトである。他の特定の実施形態において、aは0である。好みしい実施形態において、R²⁻⁴は、HおよびCH₃から独立に選択される。

【0260】

例えば上記のものなどのジスルフィドリンクーの調合および化学的性質は、国際公開第2005/112919号に開示されており、本開示は参考することにより本明細書に組み込まれる。

【0261】

細胞毒素、リンクー、および治療薬を抗体にコンジュゲートさせる他の方法の類型のさらなる考察に関しては、その全体が参考することにより本明細書によって組み込まれる、米国特許第7,087,600号；米国特許第6,989,452号；米国特許第7,129,261号；米国特許出願公開第2006/0004081号；米国特許出願公開第2006/0247295号；国際公開第02/096910号、国際公開第2007/051081号；国際公開第2005/112919号；国際公開第2007/059404号；国際公開第2008/083312号；PCT出願番号、PCT/US2008/054362；サイトウ(Saito)ら(2003)Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215；トレイル(Traill)ら、(2003)Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337；ペイン(Payne)(2003)Cancer Cell 3:207-212；アレン(Allen)(2002)Nat. Rev. Cancer 2:750-763；パスタン(Pastan)およびクレイトマン(Kreitman)(2002)Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091；センター(Senter)およびスプリンガー(Springer)(2001)Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264も参考されたい。

20

【0262】

(パートナー分子としての細胞毒素)

一つの態様において、本発明は、例えば細胞毒素、薬剤(例えば免疫阻害剤)または放射性毒素などのパートナー分子とコンジュゲートされる抗体を特徴づける。このようなコンジュゲートは「免疫毒素」とも称される。細胞毒素または細胞毒性薬は、細胞に対して有害な(例えば細胞を殺す)任意の薬剤を含む。

30

【0263】

40

本発明のパートナー分子の例は、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトイシン、エトポシド、テノポシド(tenoposid)、ピンクリスチン、ピンプラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、およびそれらの類似物または相同物を含む。パートナー分子の例は、例えば、代謝拮抗物質(例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えばメクロレタミン、チオエパクロラムブシル(thioepa chl))

50

orambucil)、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロフォスファミド(cyclophosphamide)、ブルファン、ツブリシン(tubulysin)、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトイシンC、シスプラチン、アントラサイクリン(例えばダウノルビシン(旧ダウノマイシン)およびドキソルビシン)、抗生物質(例えばダクチノマイシン、(旧アクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン(AMC))、および抗有糸分裂剤(例えばピンクリスチンおよびピンプラスチン)も含む。本発明の抗体に対して共役されうるパートナー分子の他の好ましい例は、カリケアマイシン、マイタンシン(maytansine)およびオーリスタチン、ならびにそれらの誘導体を含む。

【0264】

10

パートナー分子の好ましい例は、CC-1065の類似物および誘導体、ならびに構造的に関連するデュオカルマイシンである。CC-1065はその強力かつ幅広い抗腫瘍活性にかかわらず、ヒトに用いることができない。これは、CC-1065は、実験動物において遅発性死亡をもたらすからである。このためよりよい治療指標の類似物または誘導体の探索が急がれる。

【0265】

CC-1065およびデュオカルマイシンの多くの類似物および誘導体が当技術分野において公知である。多くの当該化合物の構造、合成および性質の研究が、概説されてきた。例えば、ボガー(Boger)ら、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 1438 (1996)；およびボガー(Boger)ら、Chem. Rev. 97: 787 (1997)を参照されたい。CC-1065類似物または誘導体に関する他の開示は、米国特許第5,101,038号；米国特許第5,641,780号；米国特許第5,187,186号；米国特許第5,070,092号；米国特許第5,641,780号；米国特許第5,101,038号；米国特許第5,084,468号；米国特許第5,739,350号；米国特許第4,978,757号、米国特許第5,332,837号および米国特許第4,912,227号；国際公開第96/10405号；ならびに、欧州特許出願公開第0,537,575号を含む。

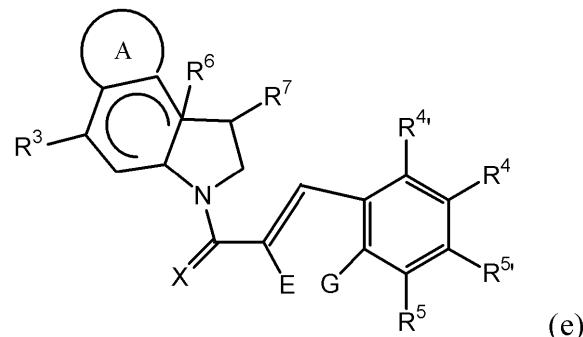
20

【0266】

30

特に好ましい態様において、パートナー分子は、次の式(e)による構造を有するCC-1065/デュオカルマイシン類似物である：

【化20】



40

式中、環系Aは、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリール、および置換または非置換のヘテロシクロアルキル基から選択されたメンバーである。代表的な環系Aはフェニルおよびピロールを含む。

【0267】

符号EおよびGは、H、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、ヘテロ原子、および単結合から独立に選択され、または、EおよびGは、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリール、および置換または非置換のヘテロシクロアルキルから選択される環系を形成するように任意に結合される。

【0268】

50

符号 X は、 O、 S および N R ² ³ から選択されるメンバーを表わす。 R ² ³ は、 H、 置換または非置換のアルキル、 置換または非置換のヘテロアルキル、 およびアシルから選択されるメンバーである。

【 0 2 6 9 】

符号 R ³ は、 (= O)、 S R ¹ ¹、 N H R ¹ ¹ および O R ¹ ¹ から選択されたメンバーを表わし、 R ¹ ¹ は、 H、 置換または非置換のアルキル、 置換または非置換のヘテロアルキル、 一リン酸塩、 ニリン酸塩、 三リン酸塩、 スルホン酸塩、 アシル、 C (O) R ¹ ² R ¹ ³、 C (O) O R ¹ ²、 C (O) N R ¹ ² R ¹ ³、 P (O) (O R ¹ ²) ₂、 C (O) C H R ¹ ² R ¹ ³、 S R ¹ ²、 または S i R ¹ ² R ¹ ³ R ¹ ⁴ である。 符号 R ¹ ²、 R ¹ ³、 および R ¹ ⁴ は、 H、 置換または非置換のアルキル、 置換または非置換のヘテロアルキル、 および置換または非置換のアリールを独立に表わし、 R ¹ ² および R ¹ ³ は、 それらが結合する窒素または炭素原子とともに、 4 ~ 6 員を有する置換または非置換のヘテロシクロアルキル環系を形成するように任意に結合され、 任意に 2 つ以上のヘテロ原子を含む。 10

【 0 2 7 0 】

R ⁴、 R ⁴ '、 R ⁵ および R ⁵ ' は、 H、 置換または非置換のアルキル、 置換または非置換のアリール、 置換または非置換のヘテロアリール、 置換または非置換のヘテロシクロアルキル、 ハロゲン、 N O ₂、 N R ¹ ⁵ R ¹ ⁶、 N C (O) R ¹ ⁵、 O C (O) N R ¹ ⁵ R ¹ ⁶、 O C (O) O R ¹ ⁵、 C (O) R ¹ ⁵、 S R ¹ ⁵、 O R ¹ ⁵、 C R ¹ ⁵ = N R ¹ ⁶、 および O (C H ₂) _n N (C H ₃) ₂ から独立に選択されたメンバーであり、 n は 1 から 20 の整数であり、 あるいは、 R ⁴、 R ⁴ '、 R ⁵ および R ⁵ ' の隣接する組のどちらかは、 それらが結合する炭素原子とともに、 4 ~ 6 員を有する置換または非置換のシクロアルキルもしくはヘテロシクロアルキル環系を形成するように結合される。 R ¹ ⁵ および R ¹ ⁶ は、 H、 置換または非置換のアルキル、 置換または非置換のヘテロアルキル、 置換または非置換のアリール、 置換または非置換のヘテロアリール、 置換または非置換のヘテロシクロアルキル、 および置換または非置換のペプチジルを独立に表わし、 R ¹ ⁵ および R ¹ ⁶ は、 それらが結合する窒素原子とともに、 4 ~ 6 員を有する置換または非置換のヘテロシクロアルキル環系を形成するように任意に結合され、 任意に 2 つ以上のヘテロ原子を含む。 一つの代表的な構造がアニリンである。 20

【 0 2 7 1 】

R ³、 R ⁴、 R ⁴ '、 R ⁵ および R ⁵ ' の一つは、 本明細書に記載した通り、 本発明のリンカーまたは酵素切断可能な基質、 例えば、 存在するなら L ¹ もしくは L ³ にまたは F 、 H もしくは J に、 細胞毒素を結合する。 30

【 0 2 7 2 】

R ⁶ は、 単結合であり、 存在するかまたは存在しない場合がある。 R ⁶ が存在するとき、 R ⁶ および R ⁷ は、 シクロプロピル環を形成するように結合される。 R ⁷ は、 C H ₂ - X ¹ または - C H ₂ - である。 R ⁷ が - C H ₂ - のとき、 それはシクロプロパン環のメンバーである。 符号 X ¹ は、 例えばハロゲン、 C l、 B r または F などの脱離基を表わす。 R ⁶ および R ⁷ の組み合わせは、 化学原子価の原理を破らない方法で解釈される。 40

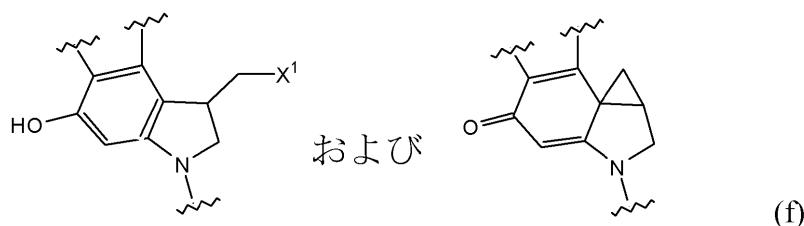
【 0 2 7 3 】

X ¹ は、 いずれの脱離基でもよい。 有用な脱離基は、 ハロゲン、 アジド、 スルホン酸エステル (例えば、 アルキルスルホニル、 アリールスルホニル)、 オキソニウムイオン、 アルキルパーコロレート、 アンモニオアルカンスルホネートエステル (ammonioalkanesulfonate ester)、 アルキルフルオロスルホネートおよびフッ化物 (例えばトリフラート、 ノナフラート (nonaflate)、 トレシレート (tresylate)) などを含むが、 これらに限定されない。 脱離基として有用な特定のハロゲンは、 F、 C l および B r である。 40

【 0 2 7 4 】

6 員環内の曲線は、 環が一つ以上の不飽和度を有してもよく、 それは芳香族であってもよいことを示す。 このように、 例えば以下の環構造などの環構造、 および関係する構造は、 式 (f) の範囲内である : 50

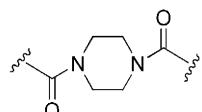
【化21】



【0275】

一つの実施形態において、 R^{1-1} は、自己環化せずかつ存在するなら L^1 もしくは L^3 にまたはF、HもしくはJに薬剤を結合する部分 X^5 を含む。部分 X^5 は、好ましくは酵素を用いて切断可能であり、かつ、切断されたときに、活性の薬剤を提供する。例として、 R^{1-1} は、次の構造（右側部は薬剤の残部に結合する）を有しうる：

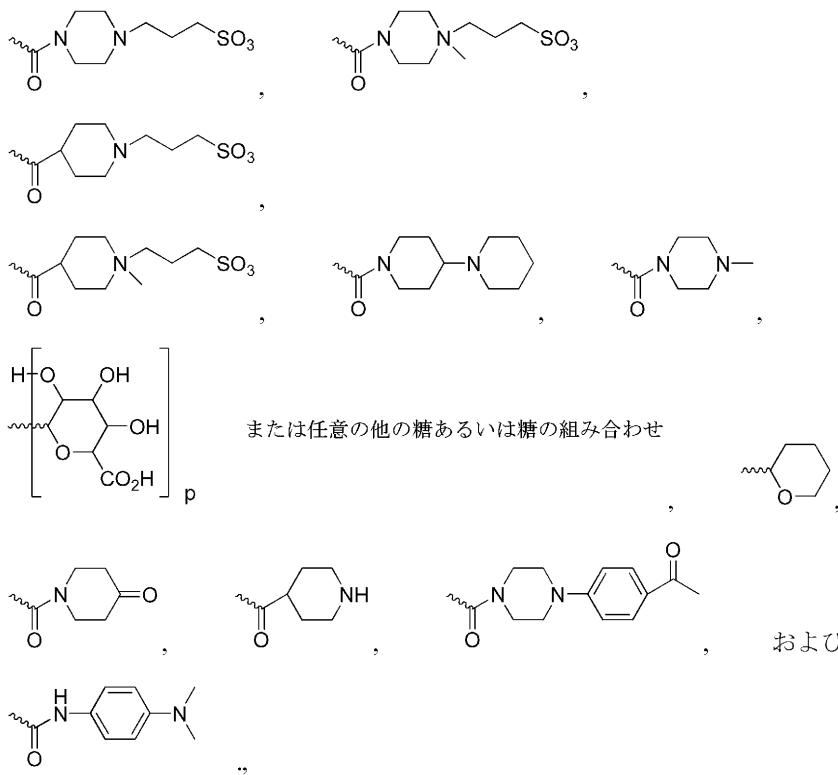
【化22】



【0276】

ある実施形態において、 R^{4-1} 、 R^{4-1}' 、 R^{5-1} および R^{5-1}' の少なくとも一つが、存在するなら L^1 にまたはF、H、Jもしくは X^2 に当該薬剤を連結し、そして、 R^3 は、 SR^{1-1} 、 NHR^{1-1} および OR^{1-1} から選択される。 R^{1-1} は、 $-SO(OH)_2$ 、 $-PO(OH)_2$ 、 $-AA_n$ 、 $-Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ 、 $-C(O)OPhNH(AA)_m$ 、

【化23】



、ならびにこれらの薬学的に許容可能な塩から選択され、nは、1から10の範囲における任意の整数であり、mは、1から4の範囲における任意の整数であり、pは1から6の範囲における任意の整数であり、そして、AAは任意の天然または非天然アミノ酸である。式(e)の化合物が R^{4-1} 、 R^{4-1}' 、 R^{5-1} または R^{5-1}' を介してコンジュゲートされる場合、 R^3 は、好ましくは、その存在が当該化合物の細胞毒性を阻害するが細胞毒素を抗体にコンジュゲートするリンカーの切断に関する機構とは異なる機構によって意図された作用

10

20

30

40

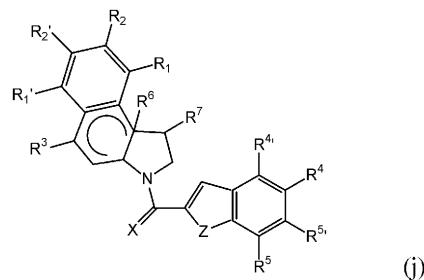
50

部位で見出される条件下で切断可能である切断可能な保護基を含む。このようにして、血漿においてコンジュゲートの偶発の切断があるならば、該保護基が、放出された細胞毒素の細胞毒性を減弱させる。例えば、コンジュゲートがヒドラゾンまたはジスルフィドリンカーラーを有するならば、該保護基が酵素的に切断可能なアミドでありうる。または、リンカーラーがプロテアーゼにより切断可能なペプチジルのものであるならば、該保護基は、カルボキシエステラーゼによって切断可能なエステルまたはカルバメートでありうる。

【0277】

例えば、好ましい実施形態において、Dは以下の構造(j)を有する細胞毒素である：

【化24】



10

。

【0278】

この構造において、R³、R⁶、R⁷、R⁴、R^{4'}、R⁵、R^{5'}、およびXは、式(e)に関する上記のとおりである。Zは、O、SおよびNR²から選択されるメンバーであり、R²は、H、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーである。

20

【0279】

R¹は、H、置換もしくは非置換の低級アルキル基、C(O)R⁸、またはCO₂R⁸であり、R⁸は、NR⁹R¹⁰およびOR⁹から選択されたメンバーであり、R⁹およびR¹⁰は、H、置換または非置換のアルキル、および置換または非置換のヘテロアルキルから独立に選択されたメンバーである。

【0280】

R^{1'}は、H、置換もしくは非置換の低級アルキル基、またはC(O)R⁸であり、R⁸は、NR⁹R¹⁰およびOR⁹から選択されたメンバーであり、R⁹およびR¹⁰は、H、置換または非置換のアルキル、および置換または非置換のヘテロアルキルから独立に選択されたメンバーである。

30

【0281】

R²は、H、置換もしくは非置換の低級アルキル基、または非置換ヘテロアルキルまたはシアノまたはアルコキシであり、そして、R^{2'}は、H、置換もしくは非置換の低級アルキル基、または非置換ヘテロアルキルである。

【0282】

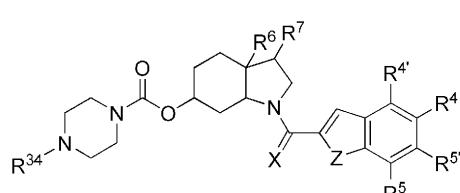
R³、R⁴、R^{4'}、R⁵、またはR^{5'}の一つは、存在するならL¹もしくはL³にまたはF、Hに、細胞毒素を連結する。

40

【0283】

さらなる実施形態は次の式を有する：

【化25】



【0284】

この構造において、A、R⁶、R⁷、X、R⁴、R^{4'}、R⁵、およびR^{5'}は、式(

50

e) に関する上記のとおりである。Zは、O、SおよびNR²⁻³から選択されるメンバーであり、R²⁻³は、H、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーである。

【0285】

R³⁻⁴は、C(=O)R³⁻³またはC₁-C₆アルキルであり、R³⁻³は、H、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリール、置換または非置換のヘテロシクロアルキル、ハロゲン、NO₂、NR¹⁻⁵R¹⁻⁶、NC(O)R¹⁻⁵、OC(O)NR¹⁻⁵R¹⁻⁶、OC(O)OR¹⁻⁵、C(O)R¹⁻⁵、SR¹⁻⁵、OR¹⁻⁵、CR¹⁻⁵=NR¹⁻⁶、およびO(CH₂)_nN(CH₃)₂から選択され、nは1から20の整数である。R¹⁻⁵およびR¹⁻⁶は、H、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロシクロアルキル、および置換または非置換のペプチジルを独立に表わし、R¹⁻⁵およびR¹⁻⁶は、それらが結合する窒素原子とともに、4~6員を有する置換または非置換のヘテロシクロアルキル環系を形成するように任意に結合され、任意に2つ以上のヘテロ原子を含む。

【0286】

好ましくは、Aは、置換もしくは非置換のフェニルまたは置換もしくは非置換のピロールである。また、R¹⁻¹に関し本明細書に記載した置換基の選択は、R³⁻³にも適用できる。

【0287】

(パートナー分子としてのマーカー)

当該パートナー分子がマーカーである場合、それは検出可能な物理的および化学的性質を有しまたは生成し、これにより、特定の組織または細胞においてその存在を示す任意の部分であり得る。マーカー(レポーター基とも呼ばれる)は、免疫学的検定、生物医学研究、および医学的診断の分野において、よく開発されてきた。マーカーは、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的方法によって検出されてもよい。例としては、電磁ビーズ(例えば、DYNABEAD(商標))、蛍光染料(例えば、フルオレセイン、イソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミン等)、放射性標識(例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P)、酵素(例えば、ELISAにおいて一般に用いられる西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等)、および例えばコロイド金または色ガラスまたはプラスチックビーズ(例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等)などの比色標識が挙げられる。

【0288】

該マーカーは、好ましくは、放射性同位体、蛍光剤、蛍光剤前駆物質、発色団、酵素およびその組み合わせからなる群より選択されるメンバーである。適している酵素の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、およびグルコースオキシダーゼである。蛍光物質は、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウムベリフェロン(umbelliferone)等を含む。化学発光化合物は、ルシフェリン、および2,3-ジヒドロフラジンジオン、例えばルミノールを含む。用いられてもよい様々な標識またはシグナル生成する系のレビューには、米国特許第4,391,904号を参照されたい。

【0289】

マーカーは、間接的手段により結合されうる:リガンド分子(例えばビオチン)が抗体に共有結合される。次いでリガンドは、本来的に検出可能であるか、または、例えば検出可能な酵素、蛍光化合物、もしくは化学発光化合物などのシグナル系に共有結合されるかのいずれかである別の分子(例えばストレプトアビシン)と結合する。

【0290】

(コンジュゲートの例)

本発明の抗体とのコンジュゲートに適しているパートナー分子とリンクーの組み合わせの特定の例は、次に示される:

10

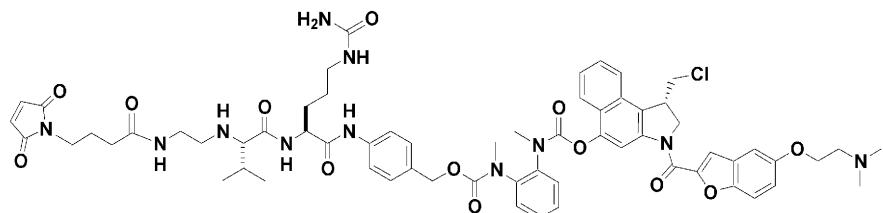
20

30

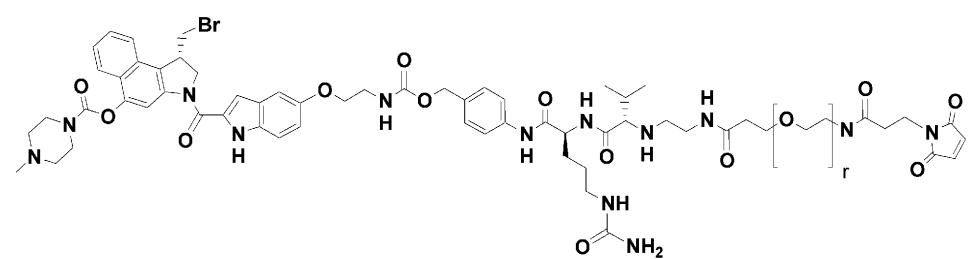
40

50

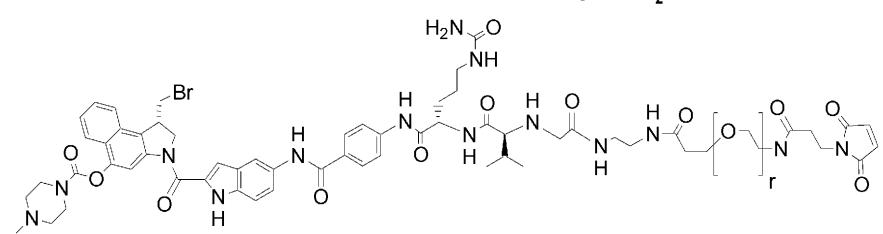
【化 2 6】



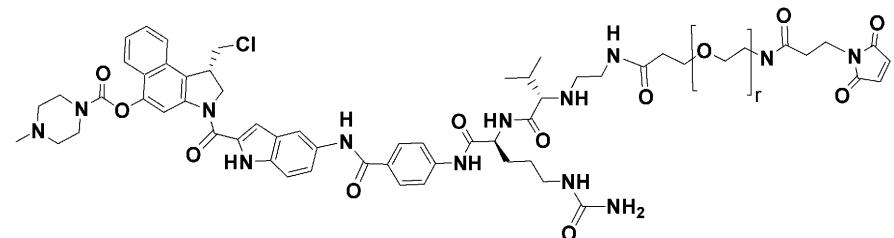
【化 2 7】



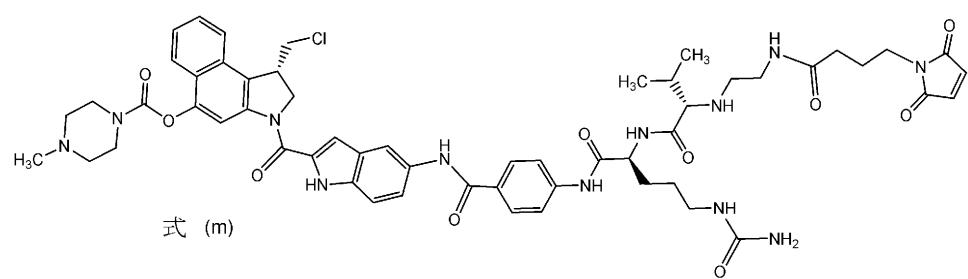
10



20

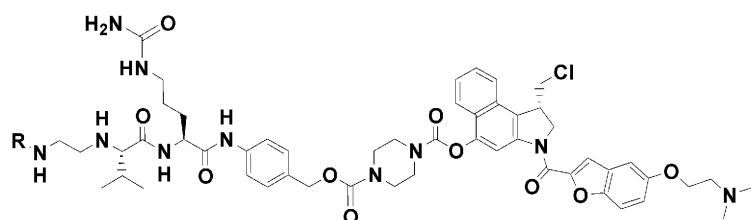
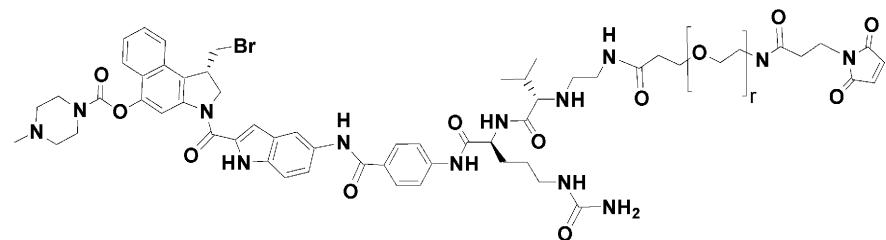


30

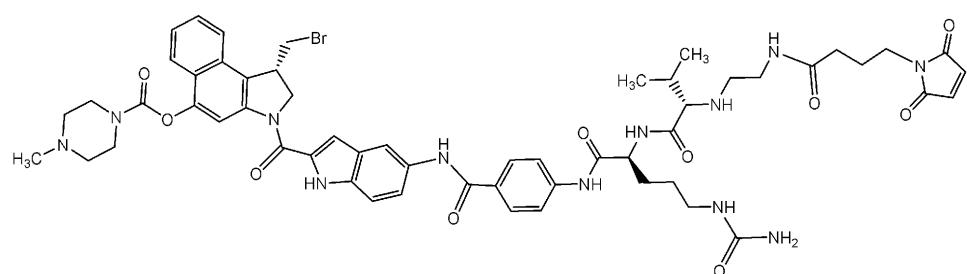


式 (m)

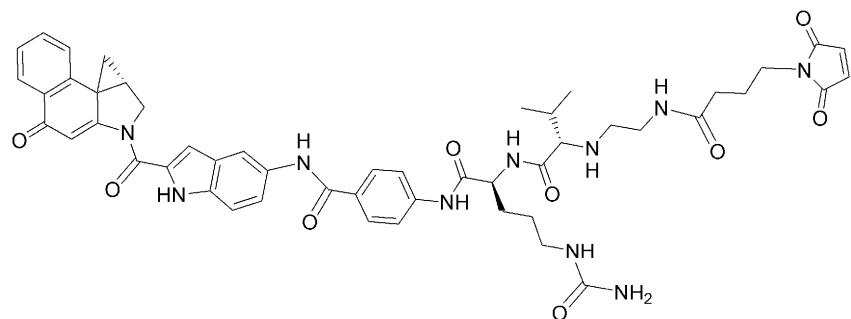
【化 2 8】



10

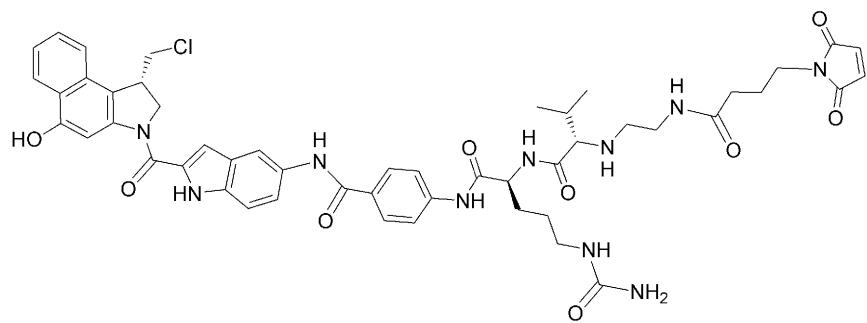


20

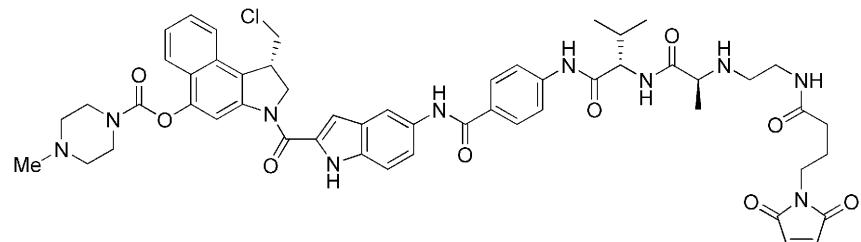


30

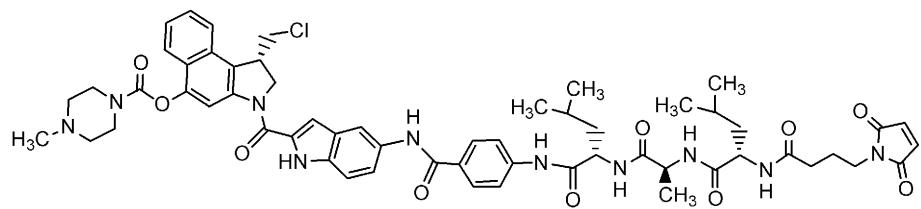
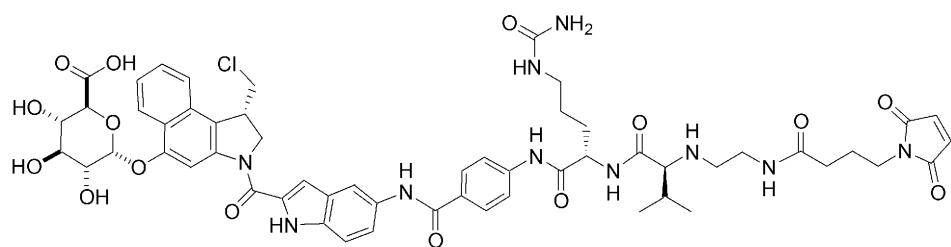
【化 2 9】



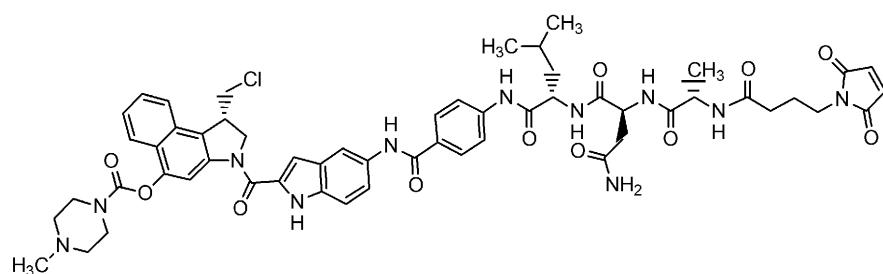
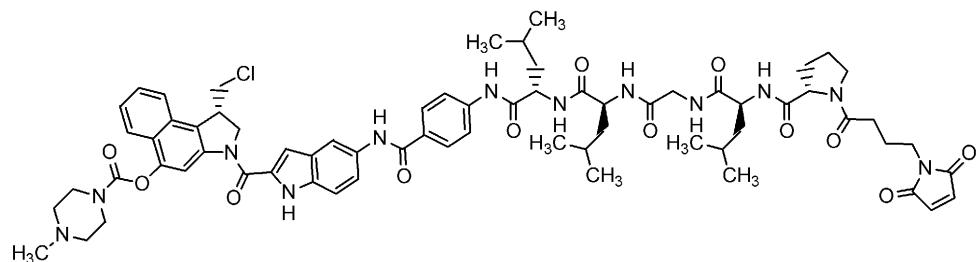
10



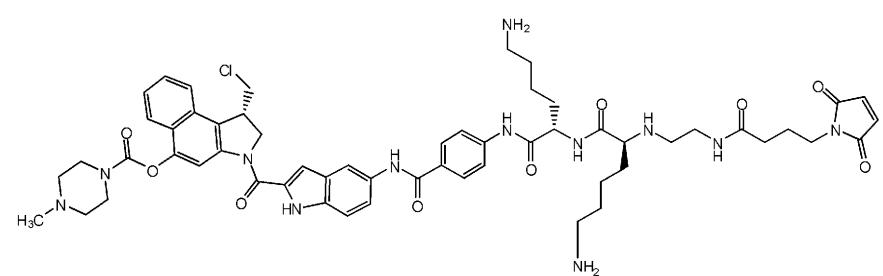
20



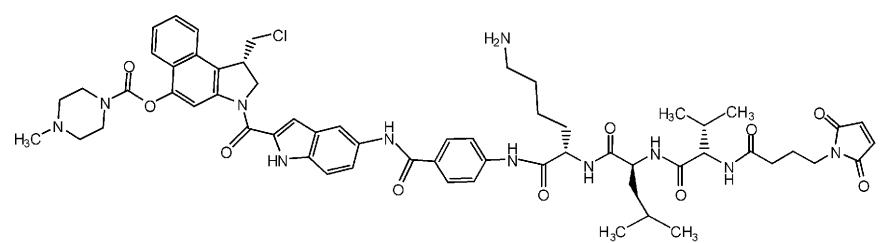
【化 3 0】



10

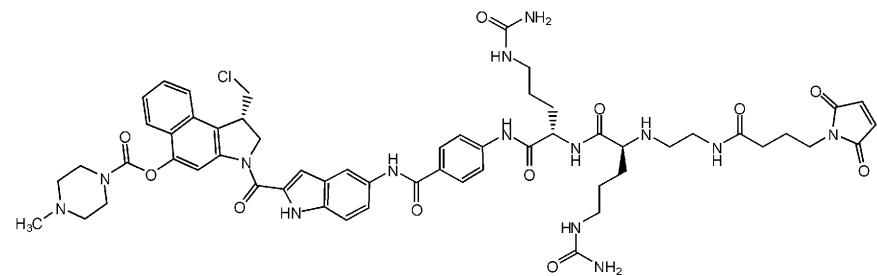


20

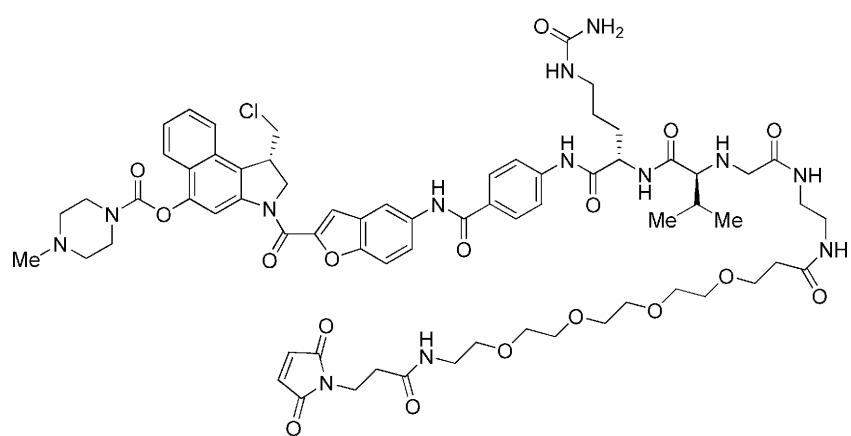


30

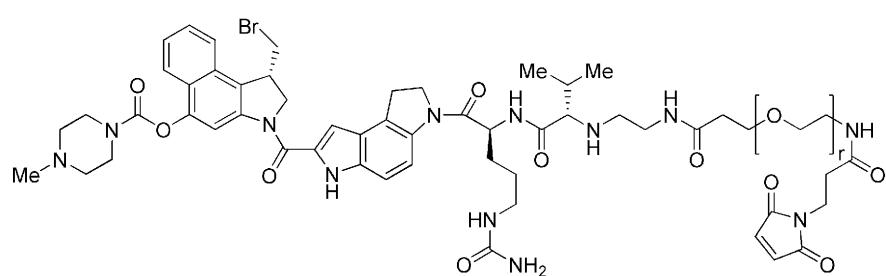
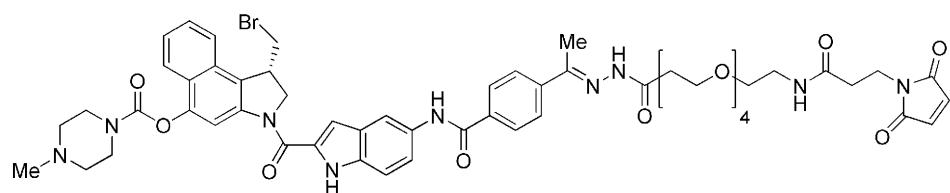
【化 3 1】



10

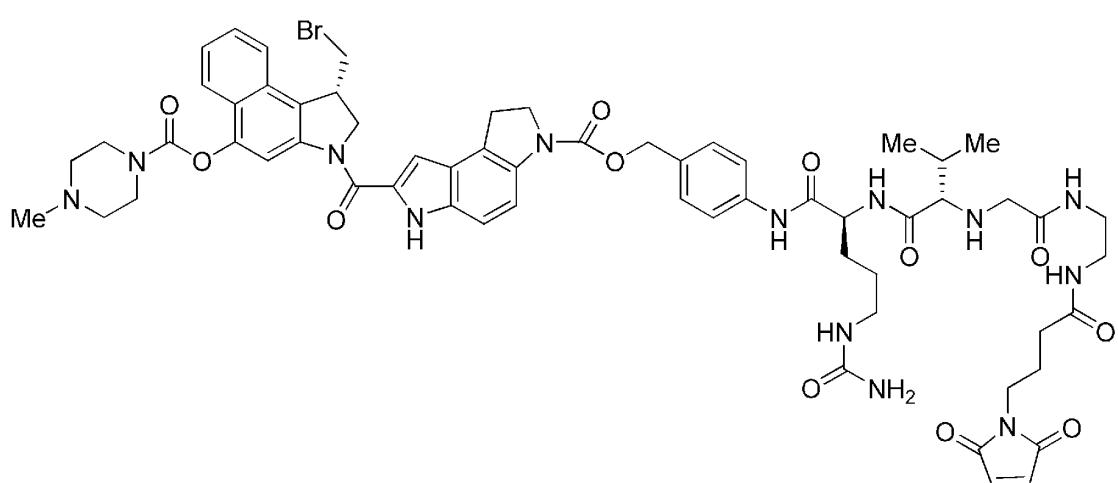
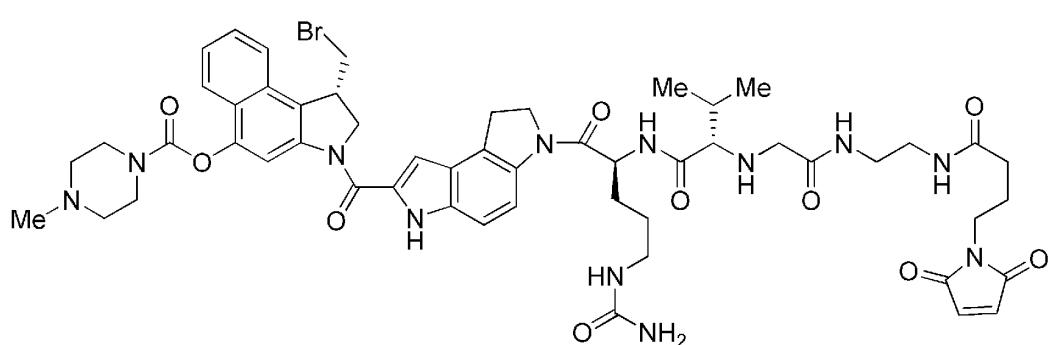
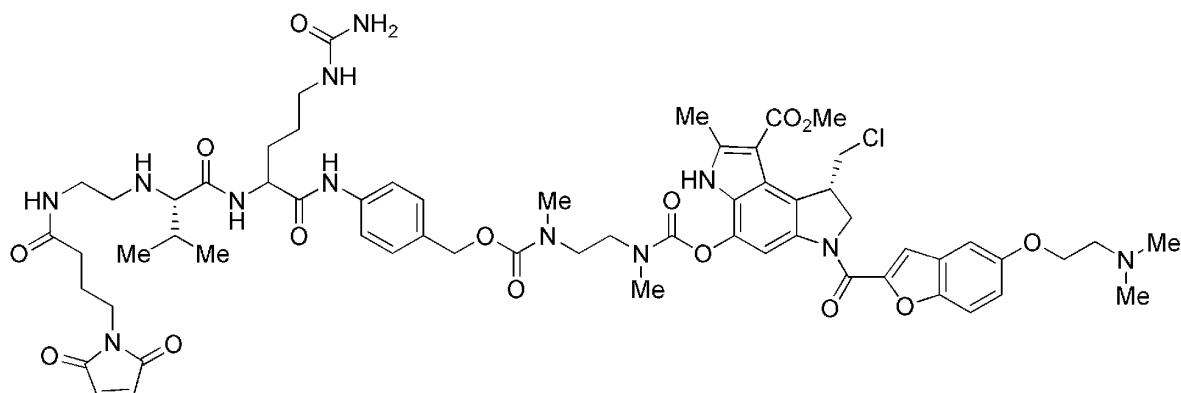
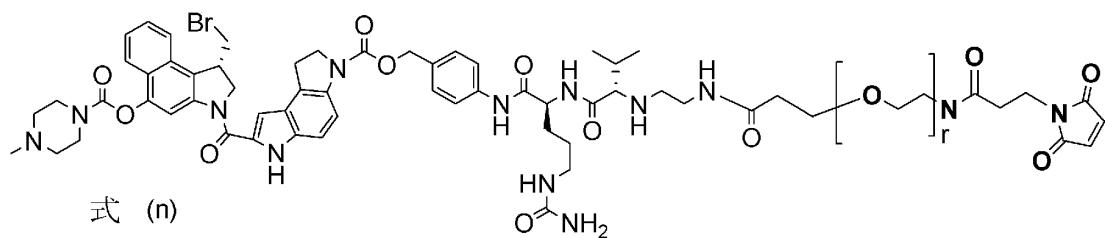


20

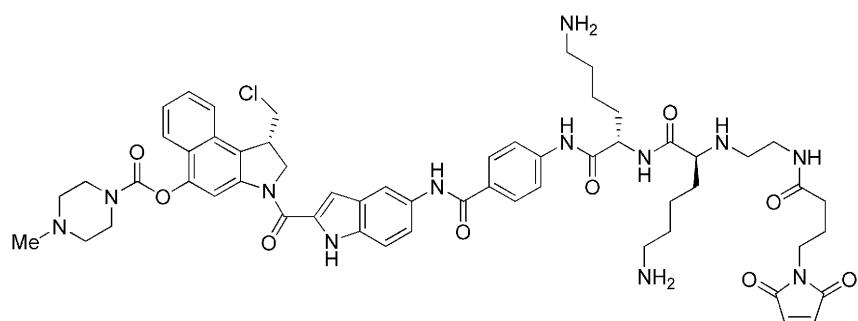


30

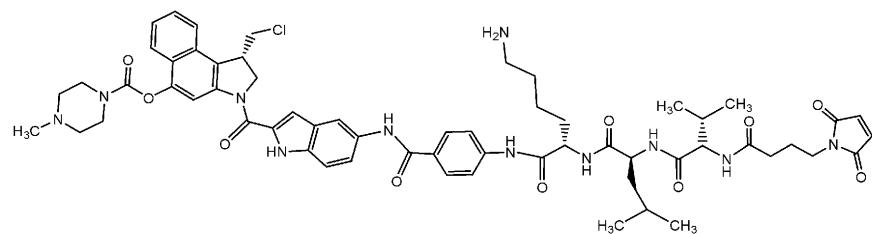
【化 3 2】



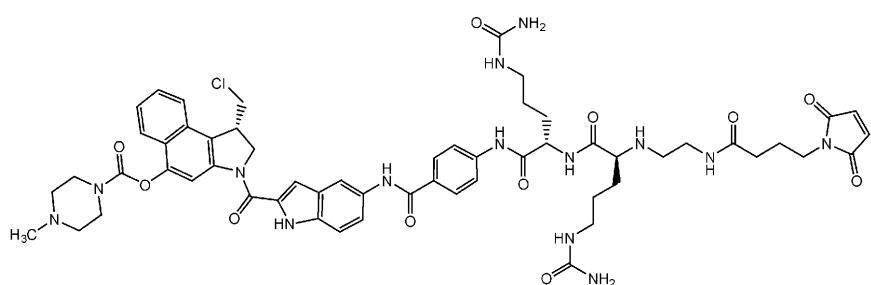
【化 3 3】



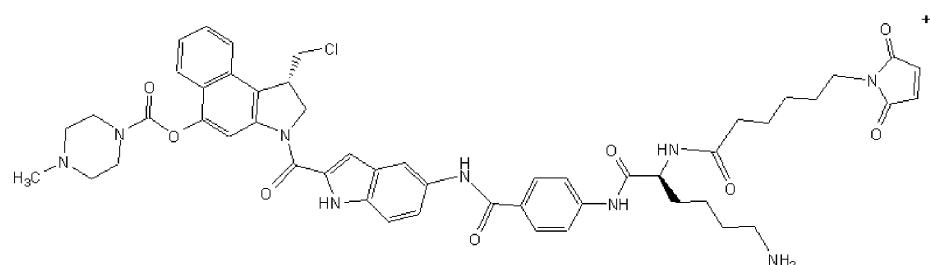
10



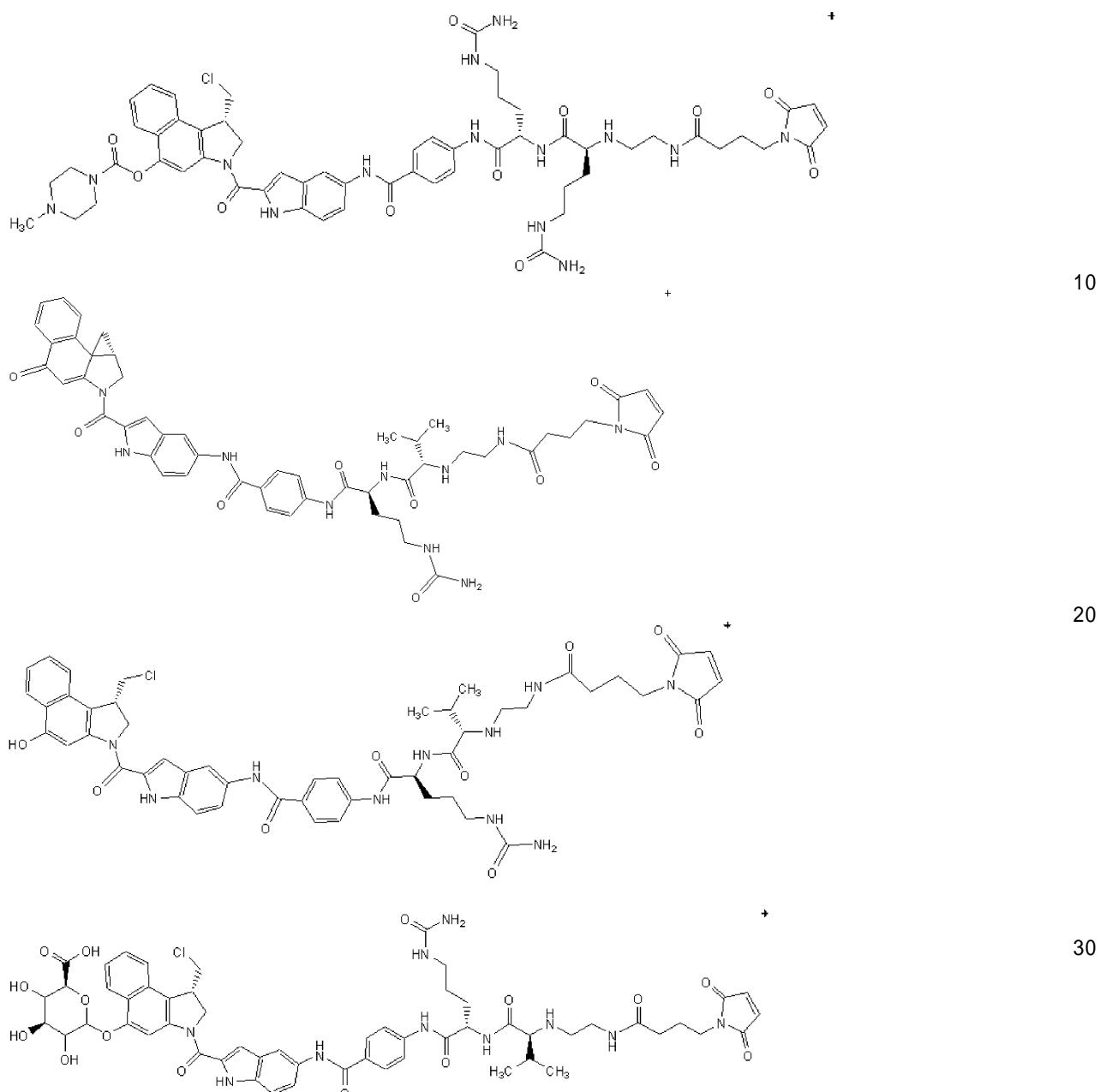
20



30



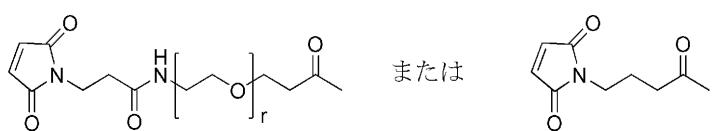
【化34】



【0291】

前述の化合物において、下付き文字 r が式に存在するとき、それは 0 から 24 の範囲内の整数である。R は、それがどこに現れようとも、

【化35】



である。

【0292】

前述の各化合物は、マレイミド基を有し、かつ、抗体上のスルヒドリル基によって抗体にコンジュゲートすることができる。

【0293】

本発明の抗体に対するコンジュゲートは、二重特異性分子の文脈において本明細書に上記したように、他の種類の化学官能性によっても行われうる。

【0294】

(医薬組成物)

別の態様において、本開示は、薬学的に許容可能な担体とともに調合される本開示のモノクローナル抗体の一つもしくは組み合わせまたはその抗原結合部分を含む医薬組成物を提供する。

【0295】

本開示の医薬組成物は、併用療法すなわち他の薬剤と組み合わされた療法においても投与されうる。例えば、併用療法は、少なくとも一つの別の抗癌剤とともに組み合わされた本開示の抗メソテリン抗体を含みうる。併用療法において用いられる治療剤の例は、以下にこれまで以上に詳しく記載される。

10

【0296】

本明細書において用いられる場合、「薬学的に許容可能な担体」は、生理的に適合性の、溶媒、分散媒体、被覆剤、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤等のいずれかおよびすべてを含む。好ましくは、当該担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または表皮性の投与（例えば注入または注射）に適している。投与経路に依存して、活性化合物すなわち抗体、免疫コンジュゲート、または二重特異性分子は、該化合物を不活性化するかもしれない酸の作用および他の自然条件から該化合物を保護する材料で被覆されてもよい。

【0297】

本開示の薬学的化合物は、一つ以上の薬学的に許容可能な塩を含んでもよい。「薬学的に許容可能な塩」は、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、かつ望まない毒性効果を与えない塩をいう。そのような塩の例は、酸付加塩および塩基付加塩を含む。酸付加塩は、例えば塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などの非毒性無機酸、ならびに、例えば脂肪族のモノおよびジカルボン酸、フェニル置換されたアルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族のスルホン酸などの非毒性有機酸から由来するものを含む。塩基付加塩は、例えばナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属、ならびに、例えばN,N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどの非毒性有機アミンから誘導されるものを含む。

20

【0298】

本開示の医薬組成物は、薬学的に許容可能な抗酸化物質をも含んでもよい。薬学的に許容可能な抗酸化物質の例は、（1）例えばアスコルビン酸、システィン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどの水溶性抗酸化物質、（2）パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、-トコフェロールなどの油溶性抗酸化物質、および（3）例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などの金属キレート剤を含む。

30

【0299】

本開示の医薬組成物において用いられてもよい適している水性および非水性の担体の例は、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適している混合物、例えばオリーブオイルなどの植物油、ならびに、例えばオレイン酸エチルなどの注入可能な有機エステルを含む。例えば、レシチンなどのコーティング材料を用いることにより、分散液の場合に必要とされる粒子サイズを維持することにより、および、界面活性剤を用いることにより、適切な流動性が維持されうる。

40

【0300】

当該組成物は、例えば防腐剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントを含んでもよい。微生物の存在の防止は、上記の滅菌処置により、ならびに、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などの様々な抗菌および抗真菌剤の含有により確保されてよい。例えば糖、塩化ナトリウムなどの等張剤などを含むことが望ましい場

50

合がある。その上、例えばアルミニウムモノステアレートおよびゼラチンなどの、吸収を遅らせる薬剤の含有により、注入可能な薬剤形態の持続的吸収がもたらされてもよい。

【0301】

薬学的に許容可能な担体は、無菌の水溶液または分散液、および無菌の注入可能な溶液または分散液の即時調製のための無菌の粉末を含む。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野において公知である。従来の媒体または薬剤が活性な化合物と不適合な場合を除いて、本開示の医薬組成物におけるその使用は、企図される。補充的な活性な化合物も、当該組成物に組み込まれうる。

【0302】

治療用組成物は、典型的には、製造および保管の条件下で無菌かつ安定でなければならぬ。当該組成物は、高い薬剤濃度に適している溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または、他の整えられた構造体として調合されうる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適している混合物を含む溶媒または分散媒体でありうる。例えば、レシチンなどのコーティング材料を用いることにより、分散の場合に必要とされる粒子サイズを維持することにより、および、界面活性剤を用いることにより、適切な流動性が維持されうる。多くの場合において、例えば、糖、マンニトールやソルビトールなどのポリアルコール、または、塩化ナトリウムなどの、等張剤を含むことが好ましいと思われる。

【0303】

無菌注入可能な溶液は、精密ろ過によって調合される。一般的に、分散液は、ベースとなる分散媒体と上記に列挙されたものからの必要とされる他の成分とを含む無菌媒質に活性な化合物を組み込むことによって調製される。無菌の注入可能な溶液の調製のための無菌粉末の場合において、好ましい調製方法は、真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）であり、あらかじめ無菌ろ過された溶液から、活性成分と付加的な所望の成分を得る。

【0304】

担体材料と組み合わせて単一の投与形態を生み出しうる活性成分の量は、治療される被験体および投与の個別の形態に依存して変化し得る。担体材料と組み合わせて単一の投与形態を生み出しうる活性成分の量は、一般的に、治療効果を生み出す組成物の量である。一般的に、100パーセントのうち、この量は、薬学的に許容可能な担体との組み合わせにおいて、活性成分が約0.01パーセントから約99パーセントまで、好ましくは、約0.1パーセントから約70パーセントまで、最も好ましくは、活性成分が約1パーセントから約30パーセントまで変動し得る。

【0305】

用量計画は、最適な所望の応答（例えば治療応答）を与えるように調整される。例えば、一つのボーラスが投与されてもよく、いくらかの分割された用量が時間とともに投与されてもよく、または、治療状況の要求により示されるように用量が比例的に減じられもしくは増やされてもよい。投与の容易さおよび用量の均一性のために用量単位の形態で非経口組成物を調剤することが特に有益である。本明細書で用いられる用量単位の形態は、処置される被験体に単位の用量として適合された物理的に分離した単位をいい、各単位は、必要とされる薬剤担体の協力によって所望の治療効果を生み出すように計算された活性な化合物の所定量を含む。本開示の用量単位の形態のための仕様は、（a）活性な化合物の固有の特徴および達成されるべき個別の治療効果、ならびに（b）各個体における感度の処置のためにそのような活性な化合物を配合する技術における固有の限界によって、決定されかつこれらに直接的に依存する。

【0306】

本発明の抗体の投与に関して、当該用量は、宿主体重について、約0.0001から100mg/kg、より一般には0.01から5mg/kgまで変動する。例えば、用量は、0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重、または10mg/kg体重、すなわち1~10mg/kgの範囲内でありうる。代表的な処

10

20

30

40

50

置計画は、週に1回、2週に1回、3週に1回、4週に1回、1ヶ月に1回、3ヶ月に1回、または3~6ヶ月に1回の投与を伴う。好ましい用量計画は、次の投与スケジュールの一つを用いて与えられる抗体の静脈内投与による1mg/kg体重または3mg/kg体重を含む；(i)6用量の間は4週毎で、その後3ヶ月毎；(ii)3週毎；(iii)3mg/kg体重を1回の後に3週毎に1mg/kg体重。

【0307】

ある方法においては、異なる結合特異性を有する2つ以上のモノクローナル抗体が同時に投与され、その場合に、投与される各抗体が、示された範囲内に入る。抗体は、一般に複数回投与される。各投与の間隔は、例えば、一週、1ヶ月、3ヶ月ごと、または一年でありうる。間隔は、患者における標的抗原に対する抗体の血中濃度を測定することによって示されるように不規則であってもよい。ある方法において、用量は、約1~1000μg/mLの血漿抗体濃度を達成するように調整され、ある方法において、約25~300μg/mLである。

10

【0308】

また、抗体は、徐放性製剤として投与することができ、この場合、必要とされる投与の頻度はより少ない。用量および頻度は患者における抗体の半減期に依存して変動する。一般的に、ヒト抗体は、最も長い半減期を示し、これに、ヒト化抗体、キメラ抗体、および非ヒト抗体が続く。投与の用量および頻度は、処置が予防的か治療的かに依存して変動しうる。予防的用途において、比較的低い用量が、長期にわたって比較的低頻度の間隔で投与される。ある患者は、残りの人生の間処置を受け続ける。治療的用途においては、疾病的進行が軽減されまたは終結されるまで、好ましくは、疾病的症状の部分的または完全な改善を患者が示すまで、比較的短い間隔での比較的高い用量が必要とされることがある。その後、患者は、予防的計画で投与されうる。

20

【0309】

異常な細胞増殖に関係する疾病的予防および/または処置における使用に関し、投与された化合物の血中濃度が約0.001μMから20μMであることが好ましく、また、約0.01μMから5μMであることが好ましい。

【0310】

本明細書に記載された化合物の経口投与に関する患者投与量は、典型的には、約1mg/日から約10,000mg/日まで、より典型的には、約10mg/日から約1,000mg/日まで、最も典型的には、約50mg/日から約500mg/日まで変動する。患者の体重の観点で記載すれば、典型的な用量は、約0.01から約150mg/kg/日、より典型的には約0.1から約15mg/kg/日、そして最も典型的には約1から約10mg/kg/日、例えば、5mg/kg/日または3mg/kg/日である。

30

【0311】

少なくともいくらかの実施形態において、腫瘍増殖を遅らせまたは抑制する患者投与量は、1μmol/kg/日以下でありうる。例えば、患者投与量は、0.9、0.6、0.5、0.45、0.3、0.2、0.15、または0.1μmol/kg/日以下(薬剤のモルをいう)。好ましくは、少なくとも5日の期間にわたって一日投与量で投与されるとときに、抗体-薬剤のコンジュゲートが腫瘍の成長を遅らせる。

40

【0312】

本開示の医薬組成物における活性な成分の実際の用量水準は、患者に有害ではなく所望の個別の患者のための治療応答、組成物、および、投与の形態を達成するために有効である活性な成分の量を得るように多様であってもよい。選択された用量水準は、個別の組成物、またはそれらのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与の時間、用いられる個別の化合物の排泄の速度、処置の継続期間、用いられる個別の化合物と組み合わせて用いられる他の薬剤、化合物および/または材料、患者の年齢、性、体重、体調、全般的な健康および先の病歴などの、医術において周知の要因を含む様々な薬物動態学的要因に依存すると思われる。

【0313】

50

本開示の抗メソテリン抗体の「治療的に有効な用量」は、疾症状状の重症度の減少、疾症状状の無い期間の頻度および継続期間の増大、または、疾痛苦による機能障害および身体障害の予防をもたらすことが望ましい。例えば、腫瘍を持った被験体の処置に関して、「治療的に有効な用量」は、非処置の被験体に対して、好ましくは少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、よりもっと好ましくは少なくとも60%、よりさらに好ましくは少なくとも約80%腫瘍増殖を抑制する。腫瘍増殖を抑制する化合物の能力は、ヒト腫瘍における有効性を予測する動物モデル系において評価されうる。また、組成物のこの性質は、細胞増殖を抑制するための化合物の能力を検査することによって評価することができ、そのような抑制は、当業者に知られた分析により生体外で測定することができる。治療用化合物の治療的に有効な量は、腫瘍サイズを減少させることができ、または別の様式で被験体の症状を改善することができる。当業者は、被験体の体格、被験体の症状の重症度、および選択された個別の組成物または投与経路などの因子に基づいて、そのような量を決定することができるだろう。

【0314】

本開示の組成物は、当技術分野で公知の様々な方法の一つ以上を用いることによって一つ以上の投与経路を通じて投与されうる。当業者によって理解されると思われるが、投与経路および/または形態は、所望の結果に依存して変動すると思われる。本開示の抗体に関する投与の好ましい経路は、例えば注入または注射によって、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、皮下、脊髄または他の非経口の投与経路を含む。本明細書において用いられる語句「非経口投与」とは、一般には注入による腸内および局所投与以外の投与の形態を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、囊内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、髄腔内、硬膜外、および胸骨内の注入および注射を含むが、これらに限定されない。

【0315】

また、本開示の抗体は、例えば局所、表皮、または粘膜の投与経路などの、非経口ではない経路を通じて、例えば、鼻腔内に、経口で、経膣的に、直腸に、舌下で、または局所に投与されうる。

【0316】

当該活性な化合物は、インプラント、経皮貼布、およびマイクロカプセル化された送達システムなどの例えば放出制御製剤などの迅速な放出から化合物を保護すると思われる担体とともに調製されうる。例えばエチレン酢酸ビニール、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生体分解性、生体適合性のポリマーが用いられうる。そのような製剤の調製に関する多くの方法は、特許されているかまたは一般的に当業者に知られている。例えば、持続放出および制御放出薬剤送達システム (Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems)、ジェイ・アール・ロビンソン (J. R. Robinson) 編、マーセルデッカー社 (Marcel Dekker Inc.)、ニューヨーク、1978を参照されたい。

【0317】

治療用組成物は、当技術分野において公知の医療装置で投与されうる。例えば、本開示の治療用組成物は、例えば、米国特許第5,399,163号；同第5,383,851号；同第5,312,335号；同第5,064,413号；同第4,941,880号；同第4,790,824号；または同第4,596,556号において開示されたものなどの無針皮下注射装置で投与されうる。本開示において有用なインプラントおよびモジュールの例は、米国特許第4,487,603号（制御速度での薬剤投与のための移植可能な微量注入ポンプ）；米国特許第4,486,194号（皮膚を通じての薬剤投与のための治療装置）；米国特許第4,447,233号（精密な注入速度での薬剤送達のための注入ポンプ）；米国特許第4,447,224号（連続的な薬剤送達のための流量可変の移植可能な注入装置）；米国特許第4,439,196号（多室を有する浸透圧薬剤送達システム）；および米国特許第4,475,196号（浸透圧薬剤送達システム）を含む。これらの特許は、参照することにより本明細書に組み込まれる。多くの他のインプラ

10

20

30

40

50

ント、送達システム、およびモジュールは当業者に知られている。

【0318】

本開示の抗体は、生体内の適切な分布を確保するように製剤されうる。例えば、血液脳関門（B B B）は、多くの高親水性化合物を排除する。（所望の場合、）本開示の治療用化合物がB B Bを横断することを確保するために、それらは、例えばリポソームで製剤されうる。リポソームを製造する方法については、例えば、米国特許第4,522,811号；同第5,374,548号；および同第5,399,331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞や器官に選択的に輸送される一つ以上の部分を含んでもよく、それ故に標的とされた薬剤の送達を高める（例えば、ラナデ（Ranade）（1989）J. Clin. Pharmacol. 29: 685参照）。代表的な標的部分は、葉酸またはビオチン（例えば、ロー（Low）らに対する米国特許第5,416,016号を参照）；マンノシド（ウメザワ（Umezawa）ら、（1988）Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038）；抗体（ブロエマン（Bloeman）ら、（1995）FEBS Lett. 357: 140；オワイス（Owais）ら、（1995）Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180）；界面活性タンパク質A受容体（ブリスコ（Briscoe）ら、（1995）Am. J. Physiol. 1233: 134）；およびp120（シュライア（Schreier）ら、（1994）J. Biol. Chem. 269: 9090）を含む；ケイナネン（Keinanen）およびラウカネン（Laukkanen）（1994）FEBS Lett. 346: 123；キリオン（Killion）およびフィドラー（Fidler）（1994）Immunomethods 4: 273も参照されたい。

【0319】

（本発明の用途および方法）

本発明の抗体、特にヒト抗体、抗体組成物、抗体・パートナー分子コンジュゲート組成物および方法は、生体外および生体内での診断および治療の非常に多くの実用性を有し、該実用性は、メソテリン媒介性疾患の診断および治療を伴う。例えば、これらの分子は、様々な疾患を治療し、予防し、かつ診断するために、インビトロすなわち生体外での培地中の細胞にまたはヒト被験体に投与されうる。用語「被験体」は、本明細書で用いられるとき、ヒトおよび非ヒト動物を含むことが意図される。非ヒト動物は、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ニワトリ、両生類、および爬虫類など、例えば哺乳類および非哺乳類などのすべての脊椎動物を含む。好ましい被験体は、メソテリン活性によって媒介される疾患有するヒト患者、特に異常なメソテリン発現と関連する疾患有するヒト患者を含む。メソテリンに対する抗体・パートナー分子コンジュゲートが他の薬剤とともに投与されるときに、当該2つの薬剤は、いずれの順序でもまたは同時に投与されうる。

【0320】

メソテリンに対して本発明の抗体の特異的結合が与えられたとすれば、本発明の抗体は、メソテリン発現を特異的に検出するために用いることができ、また、イムノアフィニティ精製によってメソテリンを精製するために用いることができる。

【0321】

一つの実施形態においては、本発明の組成物は、メソテリンの水準を検出するために用いることができ、次にその水準を特定の疾病症状に結び付けることができる。また、当該組成物は、特定の疾病症状の予防または改善に順番に結び付けることができるメソテリン機能を抑制または阻害し、これによりメソテリンを疾病のメディエイターとして関与させるために用いることができる。これは、抗体とメソテリンとの複合体の形成を可能にする条件下で、試料および対照試料を抗メソテリン抗体と接触させることによって達成されうる。抗体とメソテリンとの間で形成されたいずれかの複合体は、試料および対照において検出されかつ比較される。

【0322】

他の実施形態において、本発明の組成物は、生体外での治療的または診断的使用と関連

10

20

30

40

50

する結合活性に関して最初に試験されうる。例えば、本発明の組成物は、当技術分野で公知のフローサイトメトリー分析を用いて試験されうる。

【0323】

本発明の組成物は、メソテリン関連疾病の治療および診断において付加的な実用性を有する。例えば、生体内または生体外での次の生物学的活性のうちの一つ以上を引き出すために免疫コンジュゲートが用いられる：メソテリンを発現する細胞の成長を抑制および／または殺すこと、ヒトエフェクター細胞の存在下でメソテリンを発現する細胞のファゴサイトーシスまたはADCを媒介すること、またはメソテリンに結合するメソテリンリガンドを阻害すること。

【0324】

特定の実施形態において、当該組成物は様々なメソテリン関連疾患を治療、予防、または診断するために生体内で用いられる。メソテリン関連疾患の例は、とりわけ、卵巣癌、膵臓癌、胃癌、肺癌、子宮癌、子宮内膜癌、胆管癌、胃／食道癌、結腸直腸癌、および乳癌を含む。

【0325】

本発明の組成物は、とりわけ、患者に対し有毒または準毒性の水準にてのみ単独で有効である、例えばドキソルビシン（アドリアマイシン）、シスプラチン、硫酸ブレオマイシン、カルムスチン、クロラムブシル、シクロホスホアミド、およびヒドロキシウレアなどの抗腫瘍性薬剤を含む薬剤を含みうる。シスプラチンは、4週に1回100mg/kgの用量として静脈内に投与され、そして、アドリアマイシンは、21日に1回60～75mg/m²の用量として静脈内に投与される。本発明のヒト抗メソテリン抗体またはその抗原結合断片の化学療法薬との共投与は、異なる機構によって作動しヒト腫瘍細胞に対し細胞傷害性の影響を与える2つの抗癌剤を提供する。そのような共投与は、腫瘍細胞を抗体と反応しないようにさせるであろう薬剤に対する抵抗性または腫瘍細胞の抗原性の変化の発生による問題を解決できる。

【0326】

本発明の二重特異性および多重特異性分子は、例えば細胞表面上の受容体のキャッピングおよび除去によるなどで、エフェクター細胞上のFcRまたはFcR水準を調整するようにも用いられる。抗Fc受容体の混合物は、この目的のためにも用いられる。

【0327】

補体に結合するIgG1、IgG2又はIgG3又はIgMからの部分のような補体結合部位を有する本発明の組成物は、補体の存在下でも使用することができる。実施形態の1つでは、補体又は補体を含有する血清の添加によって、本発明の結合剤を伴った標的細胞と適当なエフェクター細胞を含む細胞集団の生体外での処理を補完することができる。補体タンパク質を結合することによって本発明の結合剤で被覆された標的細胞の食作用を改善することができる。別の実施形態では、本発明の組成物（たとえば、ヒトの抗体、多特異的な及び二重特異的な分子）で被覆された標的細胞は補体によっても溶解することができる。さらに別の実施形態では、本発明の組成物は補体を活性化しない。

【0328】

補体と一緒に本発明の組成物を投与することができる。従って、本開示は、ヒト抗体、多特異的なまたは二重特異的な分子および血清または補体を含む組成物を提供する。これらの組成物は、補体がヒト抗体、多特異的なまたは二重特異的な分子に近接して位置する場合、有利であることができる。あるいは、本発明のヒト抗体、多特異的なまたは二重特異的な分子と補体または血清は別々に投与することができる。

【0329】

本発明の抗体組成物および使用のための指示書を含むキットも本発明の範囲内である。キットはさらに、1以上の追加の試薬、たとえば、免疫抑制試薬、細胞傷害剤もしくは放射性傷害剤、または本発明の1以上の追加のヒト抗体（たとえば、第1のヒト抗体と識別可能なメソテリン抗原におけるエピトープに結合する相補的活性を有するヒト抗体）を含有することができる。

10

20

30

40

50

【0330】

従って、本発明の抗体組成物で治療される患者には、組成物の治療効果を高めるまたは増強する別の治療剤、たとえば、細胞傷害剤または放射性傷害剤を追加的に投与することができる（本発明の組成物の投与に先立って、それと同時に、またはその後）。

【0331】

ほかの実施形態では、FcまたはFc受容体の発現または活性を調節する、たとえば、高めるまたは阻害する剤によって、たとえば、サイトカインで被験体を治療することによって、被験体を追加的に治療することができる。多特異的な分子で治療する間の投与について好ましいサイトカインには、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターフェロン-（IFN-）10および腫瘍壞死因子（TNF）が挙げられる。

【0332】

特定の実施形態では、本発明は、抗体またはその一部とメソテリンとの間で複合体の形成を可能にする条件下で、試料および対照試料を、メソテリンに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分と接触させることを含む、試料中のメソテリン抗原の存在を検出するまたはメソテリン抗原の量を測定する方法を提供する。次いで複合体の形成を検出するが、その際、対照試料と比べた試料との間の複合体形成の差異が試料におけるメソテリン抗原の存在を示す。

【0333】

ほかの実施形態では、本発明は、被験体におけるメソテリンが介在する疾病、たとえば、卵巣癌、膵臓癌、胃癌、肺癌、子宮癌、子宮内膜癌、胆管癌、胃／食道癌、結腸直腸癌および乳癌を治療する方法を提供する。20

【0334】

さらに別の実施形態では、パートナー分子を抗体に連結することによって、メソテリンを発現する細胞に対するそのようなパートナー分子に本発明の免疫コンジュゲートを用いることができる。たとえば、米国特許第6,281,354号；同第6,548,530号；同第2003/0050331号；同第2003/0064984号；同第2003/0073852号；および同第2004/0087497号；または国際公開第WO03/022806号に記載された毒素化合物のいずれかに抗メソテリン抗体をコンジュゲートすることができる。従って、本発明はまた、生体外でまたは生体内でメソテリンを発現する細胞の位置を突き止める（検出可能な標識、たとえば、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素または酵素補因子によって）方法も提供する。あるいは、免疫コンジュゲートを用いて、メソテリン結合抗体にコンジュゲートされた細胞毒素または放射性毒素を標的とすることによって、メソテリン細胞表面受容体を有する細胞を殺傷することができる。30

【0335】

メソテリンと特定の腫瘍の関係を考慮して、本発明は、腫瘍細胞の増殖が阻害されるように腫瘍細胞を本開示の抗メソテリン抗体と接触させることを含む、メソテリンを発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する方法を提供する。好ましい実施形態では、抗体は、細胞毒素のような治療剤にコンジュゲートされる。特に好ましい実施形態では、メソテリンを発現する腫瘍細胞は、中皮腫細胞、または卵巣癌、膵臓癌、胃癌、肺癌、子宮癌、子宮内膜癌、胆管癌、胃／食道癌、結腸直腸癌および乳癌に関連する腫瘍細胞である。ほかの好ましい実施形態では、メソテリンを発現する腫瘍細胞は、中皮腫細胞、膵臓腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、胃腫瘍細胞、肺腫瘍細胞または子宮内膜腫瘍細胞である。さらにほかの実施形態では、腫瘍細胞は、中皮腫、乳頭漿液卵巣腺癌、明細胞卵巣癌、ミュラー管混合卵巣癌、類内膜粘液卵巣癌、膵臓腺癌、膵管腺癌、子宮内膜漿液性癌、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食道腺癌、結腸直腸腺癌および乳腺癌から成る群から選択される癌である。40

【0336】

さらに、別の態様では、被験体における癌の治療に抗メソテリン抗体およびその抗体薬剤コンジュゲートを使用することができる。従って、本発明は、被験体において癌が治療されるように本開示の抗体を被験体に投与することを含む被験体において癌を治療する方50

法を提供する。たとえば、特に好ましい実施形態では、中皮腫、卵巣癌または脾臓癌の治療において抗体を使用することができる。ほかの好ましい実施形態では、中皮種、脾臓癌、卵巣癌、胃癌、肺癌または子宮内膜癌の治療において抗体が使用される。さらにはほかの実施形態では、中皮腫、乳頭漿液卵巣腺癌、明細胞卵巣癌、ミュラー管混合卵巣癌、類内膜粘液卵巣癌、脾臓腺癌、膀胱腺癌、子宮内膜漿液性癌、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食道腺癌、結腸直腸腺癌および乳腺癌から成る群から選択される癌の治療において抗体が使用される。

【0337】

抗体は、単独で、またはほかの癌治療、たとえば、手術および／または放射線との、および／または抗腫瘍剤、たとえば、化学療法剤およびほかの抗腫瘍抗原抗体、たとえば、CD20、Her2、PSMA、Campath-1、EGFR等に結合するものとの組み合わせで使用することができる。

10

【0338】

任意で、メソテリンに対する抗体を、免疫原性剤、たとえば、癌性細胞、精製された腫瘍抗原（組み換えタンパク質、ペプチドおよび炭水化物分子を含む）、細胞および免疫刺激性サイトカインをコードする遺伝子を形質移入された細胞（He, ら. , (2004)

J Immunol. 173: 4919 - 28)を含むワクチンと組み合わせることができる。腫瘍に対するワクチン接種の多数の実験的戦略が考案されている (Rosenberg, S. , 2000、癌ワクチンの開発、ASCO Educational Book Spring: 60 - 62; Logothetis, C, 2000, ASCO Educational Book Spring: 300 - 302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414 - 428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730 - 738を参照のこと；また、Restifo, N. and Sznol, M. , 癌のワクチン、Ch. 61, pp. 3023 - 3043 in DeVita, V. ら. (eds.), 1997, 癌:腫瘍学の原則と実践、第5版も参照のこと)。これらの戦略の1つでは、自己のまたは同種の腫瘍細胞を用いてワクチンが調製される。これらの細胞性ワクチンは、腫瘍細胞がGM-CSFを発現するように形質導入されている場合最も効果的であることが示されている。GM-CSFは腫瘍ワクチン接種について抗原提示の強力な活性化因子であることが示されている (Dranoff ら. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 3539 - 43)。

20

【0339】

ほかの腫瘍ワクチンには、ヒトの癌で関係しているとみなされるウイルス、たとえば、ヒトのパピローマウイルス (HPV)、肝炎ウイルス (HBVとHCV) およびカポジ肉腫関連のヘルペスウイルス (KHSV) に由来するタンパク質が挙げられてもよい。腫瘍ワクチンで使用されてもよい腫瘍特異抗原の別の形態は、腫瘍組織自体から単離された精製された熱ショックタンパク質 (HSP) である。これらの熱ショックタンパク質は、腫瘍細胞に由来するタンパク質の断片を含有し、これらのHSPは、腫瘍免疫を引き出すための抗原提示細胞への送達で高度に効率的である (Suot, R & Srivastava, P (1995) Science 269: 1585 - 1588; Tamura, Y. ら. (1997) Science 278: 117 - 120)。

30

【0340】

樹状細胞 (DC) は抗原特異的応答を感作するのに使用することができる強力な抗原提示細胞である。生体外でDCを産生することができ、腫瘍細胞抽出物と同様に種々のタンパク質およびペプチドでDCを負荷することができる (Nestle, F. ら. (1998) Nature Medicine 4: 328 - 332)。同様に、これらの腫瘍抗原を発現するように遺伝的手段によってDCで形質導入してもよい。免疫の目的でDCも腫瘍細胞に直接融合されている (Kugler, A. ら. (2000) Nature Medicine 6: 332 - 336)。ワクチン接種の方法として、DC免疫を抗メソ

40

50

テリン抗体治療と効果的に併用して抗腫瘍応答を活性化してもよい。

【0341】

抗メソテリン抗体の使用は標準の癌治療と併用してもよい。抗メソテリン抗体治療は効果的に化学療法と併用してもよい。これらの例では、投与される化学療法剤の用量を低下させることができてよい(Mokyr, M.ら. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304)。結果的に抗メソテリン抗体治療と相乗効果を生じてもよいほかの併用療法は、放射線、手術およびホルモン欠乏である。脈管形成阻害剤も抗メソテリン抗体治療と併用してもよい。

【0342】

Fc またはFc 受容体を発現しているエフェクター細胞を腫瘍細胞に向ける二重特異性抗体と抗メソテリン抗体治療を併用することができる(たとえば、米国特許第5,922,845号および同第5,837,243号を参照のこと)。たとえば、抗Fc受容体/抗腫瘍抗原(たとえば、Her-2/neu)二重特異性抗体を用いてマクロファージを腫瘍部位に向いている。この標的療法は、腫瘍特異的応答をさらに効果的に活性化してもよい。あるいは、腫瘍抗原と樹状細胞特異的な細胞表面マーカーに結合する二重特異性抗体の使用によって抗原を直接、DCに送達してもよい。

10

【0343】

多種多様なメカニズムによって腫瘍は宿主の免疫監視機構を逃れる。これらのメカニズムの多くが、腫瘍により発現される免疫抑制タンパク質の不活化によって克服されてもよい。これらには、TGF (Kehrl, J.ら. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050)、IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) および fasリガンド(Hahne, M.ら. (1996) *Science* 274: 1363-1365)が挙げられる。抗メソテリン抗体との併用で、これらの存在のそれぞれに対する抗体を用いて免疫抑制剤の効果を相殺し、宿主による腫瘍免疫応答を助けてよい。

20

【0344】

抗メソテリン抗体との併用で、宿主の免疫応答性を活性化するのに使用してもよいほかの抗体を使用することができる。これらには、DCの機能と抗原提示を活性化する樹状細胞の表面上の分子が挙げられる。抗CD40抗体はT細胞のヘルパー活性について効果的に置き換わることができ(Ridge, J.ら. (1998) *Nature* 393: 474-478)、抗メソテリン抗体と併せて使用することができる(Ito, N.ら. (2000) *Immunobiology* 201(5): 527-40)。たとえば、CTLA-4(たとえば、米国特許第5,811,097号および同第6,984,720号)、OX-40(Weinberg, A.ら. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169)、4-1BB(Melero, I.ら. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685(1997)、ICOS(Hutloff, A.ら. (1999) *Nature* 397: 262-266)、PD-Iおよび/またはPD-L1のようなT細胞同時刺激分子に対する抗体は、T細胞の活性化の高いレベルを提供してもよいので、そのようなT細胞を活性化する抗体を本発明の抗メソテリン抗体との併用で使用することができる。

30

【0345】

造血系が起源の種々の腫瘍を治療するのに現在、骨髄移植が使用されている。移植片対宿主病がこの治療の結末である一方で、移植片対腫瘍の応答から治療利益が得られてもよい。従って、腫瘍の治療計画の一部として骨髄移植との併用で抗メソテリン抗体治療を使用することができる。

40

【0346】

本開示は以下の実施例によってさらに説明されるが、それはさらなる限定として解釈されるべきではない。この出願で引用したすべての図、すべての参考文献、ジェンバンク配列、特許、および公開された特許出願はそれら全体として参照によって明らかに本明細書に援用される。

50

【実施例】

【0347】

(実施例1：メソテリンタンパク質に対するヒト型モノクローナル抗体の生成)

ヒトの抗体遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いて以下のように抗メソテリンヒト型モノクローナル抗体を生成した。

【0348】

(抗原)

免疫用の抗原としてメソテリンの可溶性融合タンパク質を用いた。可溶性融合タンパク質は、C末端でHisタグに結合したメソテリン(天然のメソテリンでGPI結合を介して膜に会合する)の40kDの部分で構成された。本明細書ではこの融合タンパク質を「huメソテリン-his融合タンパク質」と呼ぶ。標準の組み換えDNA法によって融合タンパク質を生成し、形質移入したCHO細胞で発現させ、それは、培養上清に可溶性融合タンパク質を分泌した。形質移入に使用したCHO宿主細胞はインビトロジェン(カタログ番号11619-012)から入手した。免疫原として使用するために、分泌された可溶性融合タンパク質を精製した。HuMabをスクリーニングするためのELISAアッセイにhuメソテリン-his融合タンパク質を分泌する形質移入したCHO細胞の上清を使用した(以下にさらに記載する)。

10

【0349】

(トランスジェニックマウス)

HuMabマウス(商標)型(「Hco7×huマウス」)のトランスジェニックマウスのHco7×huLamda系統由来のマウスを用いてヒトのメソテリンに対する完全にヒト型のモノクローナル抗体を調製した。この系統では、Chenら。(1993)EMBO J. 12:811-820に記載されたように、内因性のマウス軽鎖遺伝子がホモ接合体で崩壊しており、国際公開第WO2001/09187号の実施例1に記載されたように、内因性のマウス重鎖遺伝子がホモ接合体で崩壊している。さらに、このマウス系統は、Fishwildら。(1996)Nature Biotechnology 14:845-851に記載されたようなヒトの軽鎖導入遺伝子KCo5と、国際公開第WO2000/026373号に記載されたようなヒト軽鎖遺伝子座の大半を持っている酵母の人工染色体(YAC)と、米国特許第5,545,806号；同第5,625,825号；および同第5,545,807号に記載されたようなヒトの重鎖導入遺伝子を持っている。

20

【0350】

(マウスの免疫)

ヒトのメソテリンに対する完全なヒト型モノクローナル抗体を生成するために、精製したhuメソテリン-his融合タンパク質によってHco7×huマウスを免疫した。一般的な免疫スキームは、Lonberg, N.ら(1994)Nature 368(6474):856-859; Fishwild, D.ら.(1996)Nature Biotechnology 14:845-851および国際公開第WO98/24884号に記載されている。最初の抗原注入の際、マウスは3~4ヶ月齢だった。精製したヒトのメソテリン-his抗原調製物(融合タンパク質を発現している形質移入された哺乳類細胞から精製された10μg)を用いて腹腔内および皮下にてマウスを免疫した。抗原は、1:1でRIBIAジュバント(シグマ、カタログ番号6536)と混合した。

30

【0351】

1週間間隔でマウスを9回免疫した。後眼窩の採血によって免疫応答をモニターした。直接ELISA分析(以下に記載するように)によって血漿をスクリーニングし、抗ヒトメソテリンのヒトIgGについて高い力値を持つマウスを融合に用いた。屠殺および脾臓の取り出しの2日と3日前に可溶性抗原の静脈内(IV)および腹腔内(IP)の注射によってマウスは最終の追加免疫を受けた。

40

【0352】

(抗ヒトメソテリンヒト型モノクローナル抗体を產生するマウスの選択)

50

高い力価の抗メソテリン抗体を產生する $H\text{c}\text{o}\ 7\times\text{h}\text{u}$ マウスを選択するために、以下のように間接 E L I S A アッセイを用いて血清の抗体の力価をモニターした。 $H\text{i}\text{s}$ タグ抗体を被覆したマイクロタイタープレート（ノバジエン、カタログ番号 71184）を水和し、 $300\ \mu\text{g}/\text{ウエル}$ の 1% B S A / D P B S で 10 ~ 15 分ブロックした。数回の洗浄の後、最大シグナルについて力価検定した hu メソテリン - his 融合タンパク質を分泌している C H O 細胞の上清を加え（ $50\ \mu\text{L}/\text{ウエル}$ ）、1 時間インキュベートした。D P B S / ツイーンでプレートを洗浄した後、メソテリンで免疫したマウスの血漿の希釈液を（1 : 50 の希釈から開始して 1 : 2 まで連続希釈した、11 回）各ウエルに加え、1 時間インキュベートした。D P B S / ツイーンでプレートを洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合したヤギ - 抗ヒト I g G ポリクローナル抗体（ジャクソンイムノリサーチラボ、カタログ番号 115-036-098）と共に 1 時間インキュベートした。次いで、A B T S (2, 2' - アジノ - ビス [3 - エチルベンチアゾリン - 6 - スルホン酸]) 基質（シグマ、カタログ番号 S 9941）を加え、O D 415 n m にてプレートを分光光度計で解析した。バックグラウンド O D の 2 倍の O D を生じる血清の希釈として力価を定義した。エクセルのテンプレートを用いて力価を計算した。抗ヒトメソテリン抗体の最も高い力価を生み出したマウスを融合に使った。以下に記載するように融合を行い、やはり以下に記載されるように 2 つの異なった E L I S A アッセイ方式を用いて抗ヒトメソテリン活性についてハイブリドーマの上清を調べた。

【0353】

（メソテリンタンパク質に対するヒト型モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマの生成）

サイトパルスラージチャンバー細胞融合電気穿孔器（メリーランド州、グレンバーニーのサイトパルスサイエンス社）を用いた電界に基づいた電気融合によって、高い力価の $H\text{c}\text{o}\ 7\times\text{h}\text{u}$ マウスから単離されたマウス脾細胞とマウス骨髄腫融合パートナーを融合した。脾臓のリンパ球の単一細胞浮遊液を同数の P 3 X 6 3 A g 8 . 6 . 5 3 (A T C C C R L 1580) 非分泌性のマウス骨髄腫細胞と融合させた。平底マイクロタイタープレートにて、高グルコース（セルグロ、# 10 - 013 - C M ）と 10% ウシ胎児血清（ハイブローネン、# S H 3 0 0 7 1 . 0 3 ）を含有し、- メルカプトエタノール（1000 x、ギブコ、# 21985 - 023 ）と 7 m M の H E P E S （セルグロ、25 - 060 - C 1 ）と追加の 2 m M の L グルタミン（セルグロ、25 - 005 - C 1 ）と H A T （500 x、シグマ、# H - 0262 ）と 5% ハイブリドーマクローニング因子（バイオベリス、# 210001 ）と 10% P 338 D I (A T C C、# C R L T I B - 63) 調整培地とペニシリン / ストレプトマイシン（100 x、セルグロ、# 30 - 002 - C I ）によって補完された選抜用 D M E M 培地に、得られた細胞を 2.0×10^4 個 / ウエルを入れた。約 7 日後、H A T を含有する培地の一部を、H T (セルグロ、# 25 - 047 - C I) を含有する培地で置き換えた。

【0354】

10 ~ 12 日後、ヒト I g G / ヒト 軽鎖またはヒト I g G / ヒト 軽鎖の抗体を含有するウエルについて、直接 E L I S A アッセイにて個々のウエルをスクリーニングした。直接 E L I S A 方式では、マイクロタイタープレートを、F c フラグメント特異的なヤギ抗ヒト I g G F (a b')₂（ジャクソンイムノリサーチラボ、カタログ番号 109 - 006 - 098 ）で、 $2.5\ \mu\text{L}/\text{mL}$ で $50\ \mu\text{L}/\text{ウエル}$ にて被覆し、1 時間インキュベートし、次いで $300\ \mu\text{L}/\text{ウエル}$ の 1% B S A / D P B S によって 15 分間ブロックした。ブロッキング緩衝液を除き、融合プレートからの上清（ $50\ \mu\text{L}/\text{ウエル}$ ）を加え、1 時間インキュベートした。プレートを D P B S / ツイーンで洗浄し、次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合したヤギ - 抗ヒト 軽鎖ポリクローナル抗体（ベチル、カタログ番号 A 80 - 115 P ）または西洋ワサビペルオキシダーゼを結合したヤギ - 抗ヒト 軽鎖ポリクローナル抗体（バイオソース、カタログ番号 10904 ）と共に 1 時間インキュベートした。洗浄後、A B T S 基質によってプレートを発色させ、O D 415 n m にて分光光度計で解析した。O D > 0 . 75 の高い O D を持つウエルをさらなる解析のために

選択した。

【0355】

ヒト IgG / ヒト 軽鎖またはヒト IgG / ヒト 軽鎖の抗体について陽性のウエルからのハイブリドーマ細胞を24穴の培養に移した。2、3日後、間接ELISAを用いて特異性について、個々のウエルからの細胞上清を再スクリーニングして、ヒトのメソテリンに特異的なヒト IgG 抗体を産生するハイブリドーマを同定した。ハイブリドーマの2度目のスクリーニングに用いる間接ELISAのプロトコルは、試料の上清が hu IgG / hu カッパまたは hu IgG / hu ラムダの陽性培養に由来することを除いて Hc07 × hu マウスで血清抗体の力値を調べるために上述したものと同様であった。

【0356】

連続希釈によりハイブリドーマをクローニングし、2回スクリーニングした。クローニングに先立って過剰増殖した24穴培養からの上清を用いて、多重特性解析アッセイ（以下の実施例に記載される）を行った。10の抗体を選択し、試験管内にてクローンで產生され、精製された抗体を用いてそれらの特徴を確認した。3つの抗体、3C10（元々のクローンの名称：1382.210.3C10.1.6）と、6A4（元々のクローンの名称：1382.210.6A4.1.6）と7B1（元々のクローンの名称：1382.210.7B1.2.18）を配列決定とさらなる解析のために選択した。

【0357】

（実施例2：抗体3C10、6A4および7B1の構造的特性解析）

実施例1で記載されたように、3C10、6A4および7B1のクローンによって発現されたmAbの重鎖および軽鎖の可変領域をコードするcDNAの配列は、標準のDNA配列決定法を用いて配列決定され、標準のタンパク質化学分析によって発現されたタンパク質の特性解析を行った。3つのクローンはすべて IgG1の重鎖とカッパ軽鎖を含む抗体を発現することが判った。

【0358】

3C10のV_Hのヌクレオチド配列とアミノ酸配列をそれぞれ図1Aおよび配列番号25と19に示す。3C10のカッパV_Lのヌクレオチド配列とアミノ酸配列をそれぞれ図1Bおよび配列番号28と22に示す。

【0359】

既知のヒト生殖系列の免疫グロブリンの重鎖の配列との3C10の重鎖免疫グロブリンの配列の比較は、3C10の重鎖が、ヒト生殖系列のV_H3～33のV_Hフラグメントと、ヒト生殖系列D3～10のDフラグメントとヒト生殖系列J_H4BのJ_Hフラグメントを利用していることを明らかにした。さらに、CDR領域決定のカバット方式を用いた3C10のV_H配列の解析は、それぞれ、図1Aおよび配列番号1、4および7に示されるような重鎖CDR1、CDR2およびCDR3の記載をもたらした。

【0360】

既知のヒト生殖系列の免疫グロブリンの軽鎖の配列との3C10の軽鎖免疫グロブリンの配列の比較は、3C10のカッパ軽鎖が、ヒト生殖系列V_L6のV_Lフラグメントおよびヒト生殖系列J_L4のJ_Lフラグメントを利用していることを明らかにした。さらに、CDR領域決定のカバット方式を用いた3C10のV_L配列の解析は、それぞれ図1Bおよび配列番号10、13および16に示されるような軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3の記載をもたらした。

【0361】

6A4のV_Hのヌクレオチド配列とアミノ酸配列をそれぞれ図2Aおよび配列番号26と20に示す。6A4のV_Lのヌクレオチド配列とアミノ酸配列をそれぞれ図2Bおよび配列番号29と23に示す。

【0362】

既知のヒト生殖系列の免疫グロブリンの重鎖の配列との6A4の重鎖免疫グロブリンの配列の比較は、6A4の重鎖が、ヒト生殖系列のV_H3～33のV_Hフラグメントと、ヒト生殖系列D3～10のDフラグメントとヒト生殖系列J_H4BのJ_Hフラグメントを利

10

20

30

40

50

用していることを明らかにした。さらに、CDR領域決定のカバット方式を用いた6A4のV_H配列の解析は、それぞれ、図2Aおよび配列番号2、5および8に示されるような重鎖CDR1、CDR2およびCDR3の記載をもたらした。

【0363】

既知のヒト生殖系列の免疫グロブリンの軽鎖の配列との6A4の軽鎖免疫グロブリンの配列の比較は、6A4のカッパ軽鎖が、ヒト生殖系列V_L6のVフラグメントおよびヒト生殖系列J₄のJフラグメントを利用していていることを明らかにした。さらに、CDR領域決定のカバット方式を用いた6A4のV配列の解析は、それぞれ図2Bおよび配列番号11、14および17に示されるような軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3の記載をもたらした。

10

【0364】

7B1のV_Hのヌクレオチド配列とアミノ酸配列をそれぞれ図3Aおよび配列番号27と21に示す。7B1のV_Lのヌクレオチド配列とアミノ酸配列をそれぞれ図3Bおよび配列番号30と24に示す。

【0365】

既知のヒト生殖系列の免疫グロブリンの重鎖の配列との7B1の重鎖免疫グロブリンの配列の比較は、7B1の重鎖が、ヒト生殖系列のV_H3～7のV_Hフラグメントと、ヒト生殖系列D3～10のDフラグメントとヒト生殖系列J_H6BのJ_Hフラグメントを利用していていることを明らかにした。さらに、CDR領域決定のカバット方式を用いた7B1のV_H配列の解析は、それぞれ、図3Aおよび配列番号3、6および9に示されるような重鎖CDR1、CDR2およびCDR3の記載をもたらした。

20

【0366】

既知のヒト生殖系列の免疫グロブリンの軽鎖の配列との7B1の軽鎖免疫グロブリンの配列の比較は、7B1のカッパ軽鎖が、ヒト生殖系列V_A27のVフラグメントおよびヒト生殖系列J₂のJフラグメントを利用していていることを明らかにした。さらに、CDR領域決定のカバット方式を用いた7B1のV配列の解析は、それぞれ図3Bおよび配列番号12、15および18に示されるような軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3の記載をもたらした。

【0367】

図4は、生殖系列V_H3～33にコードされたアミノ酸配列（配列番号31）と共に3C10と6A4の重鎖可変アミノ酸配列（それぞれ配列番号19と20）の配置を示す。CDR1、CDR2およびCDR3の領域が記載される。

30

【0368】

図5は、生殖系列V_L6にコードされたアミノ酸配列（配列番号33）と共に3C10と6A4のカッパ軽鎖可変アミノ酸配列（それぞれ配列番号22と23）の配置を示す。CDR1、CDR2およびCDR3の領域が記載される。

【0369】

図6は、生殖系列V_H3～7にコードされたアミノ酸配列（配列番号32）と共に7B1の重鎖可変アミノ酸配列（それぞれ配列番号21）の配置を示す。CDR1、CDR2およびCDR3の領域が記載される。

40

【0370】

図7は、生殖系列V_A27にコードされたアミノ酸配列（配列番号34）と共に7B1のカッパ軽鎖可変アミノ酸配列（それぞれ配列番号24）の配置を示す。CDR1、CDR2およびCDR3の領域が記載される。

【0371】

標準の組み換えDNA技法を用いて、3C10、6A4および7B1の可変領域を所望のアイソタイプの完全長の抗体に変換することができる。たとえば、可変領域が操作可能に定常領域に連結されるように、重鎖と軽鎖の定常領域を持っている発現ベクターに、V_H領域とV_L領域をコードするDNAをクローニングすることができる。あるいは、完全長の重鎖および完全長の軽鎖の発現のために別々のベクターを使うことができる。完全長

50

の抗体を創製するのに使用するために好適な発現ベクターの非限定例には、B1ackによる米国特許第2005/0153394号に記載されたpIEベクターが挙げられる。

【0372】

(実施例3：メソテリンモノクローナル抗体の結合特性の特性解析)

この実施例では、フローサイトメトリーによってmAb、3C10, 6A4および7B1の細胞表面のメソテリンへの結合を調べた。さらに、BIAcoreによってメソテリンへの結合動態を分析した。

【0373】

(A. フローサイトメトリー試験)

細胞表面のメソテリンに結合する抗体の能力を調べるために、4つの異なったメソテリンを発現している細胞：OVCAR3 (ATCC表示HTB-161、ヒト卵巣癌細胞株)、NCI-H226 (ATCC表示CRL-5826、ヒト肺由来の中皮種)、CFPAC-1 (ATCC表示CRL-1918、ヒト肺臓癌細胞株) およびKB (ATCC表示CCL-17、ヒト口腔癌細胞株)と共に抗体をインキュベートした。フローサイトメトリー試験のために、3C10, 6A4および7B1を冷1×PBS+0.1%BSAで40 μg/mLに希釈した。結合反応のために、4×10⁵個の細胞を含有する細胞懸濁液50 μLに希釈した抗体溶液50 μLを加え、混合物を氷上で30~60分間インキュベートした。次いで、1×PBS+0.1%BSAで細胞を3回洗浄した。R-フィコエリスリンで標識したヤギ抗ヒトIgGF₂(ab)₂フラグメント(ジャクソンイムノリサーチラボ、カタログ番号109-116-098)の1:50希釈液を加え、氷上で1時間混合物をインキュベートし、次いで冷1×PBS+0.1%BSAで2回洗浄した。最後の洗浄の後、各溶液に冷1×PBS+0.1%BSAを200 μL加え、FACSによって抗体結合の解析を行った。

【0374】

フローサイトメトリー解析の結果を以下の表1に要約するが、それは、4つの異なった細胞株への結合についてのEC₅₀を示す。結果は、3つのモノクローナル抗体すべてが細胞表面のヒトのメソテリンに効果的に結合することを明らかにしている。

【0375】

(表1)

表1:ヒトメソテリンを発現する細胞に対する抗メソテリン抗体の結合				
抗体	OVCAR3 細胞 EC ₅₀ (nM)	NCI-H226 細胞 EC ₅₀ (nM)	CFPAC-1 細胞 EC ₅₀ (nM)	KB 細胞 EC ₅₀ (nM)
3C10	0.2126	0.1968	0.1933	0.1441
6A4	0.1697	0.1556	0.1932	0.1815
7B1	0.1103	0.6642	0.0643	0.06793

【0376】

(B. BIAcore解析)

捕捉法を用いたBIAcore(商標)によって組み換え可溶性メソテリンhiss融合タンパク質への3C10, 6A4および7B1の抗体の結合を調べた。3C10, 6A4および7B1の抗体は、プロテインG(イリノイ州、ロックフォードのピアース)で被覆されたCM5チップに別々に高密度で捕捉された(4000RU)。製造者によって推奨された標準の固相化手順に基づいて被覆を行った。3C10, 6A4または7B1の精製抗体がプロテインGに捕捉された後、濃度系列(450、225、112.5、56および28 nM)の組み換えヒトメソテリンhiss融合タンパク質を流量25 μL/mLにて2分間、捕捉された抗体上に注入した。抗原は8分間解離させた。アイソタイプ対照をチップに捕捉させ、そのデータを用いて非特異的な結合を差し引いた。解析はすべて、BIAcoreコントロールソフトウェアv4.01を用いたBIAcore2000または3000、プラスモン共鳴装置で行った。Biaevaluation v4.01ソフトウェアを用いてデータを解析した。

10

20

50

30

40

50

【0377】

以下の表2に結果を示す。3C10, 6A4および7B1についてのBIAcoreの結果は、3つの抗体すべてがヒトのメソテリンと結合することが可能であるというフローサイトメトリーの結果を裏付けている。

【0378】

(表2)

表2:組み換えヒトメソテリンに対する抗メソテリン抗体の結合親和性および動態			
抗体	$K_D \times 10^{-9}$ (M)	$k_{on} (1/Ms) \times 10^4$	$k_{off} (1/s) \times 10^{-4}$
3C10	5.8	6.30	3.62
6A4	5.9	6.39	3.77
7B1	2.4	7.15	1.71

【0379】

3C10, 6A4および7B1のmAbによって結合されるエピトープを詳細に調べるために、BIAcoreによってエピトープ結合分析を行った。BIAcoreにより提供された標準のアミンカップリング化合物およびキットを用いて、3C10および7B1のmAbは1級アミンを介してCM5チップ（カルボキシメチルデキストランで被覆したチップ）に共有結合した。固相化した抗体を横切って抗体-抗原複合体の混合物を流した。抗体濃度は、50~500nMの間で出発した倍々希釈だった。メソテリン濃度は22~44nMの間だった。注入に先立って、抗体およびメソテリンは少なくとも1時間予備インキュベートした。抗体-抗原の混合物(15μL)は、6μL/分の流速で注入した。重なり合うエピトープを有する抗体は競合する（抗体の濃度の上昇に伴って応答は低下する）が、別々のエピトープを持つものは抗原に同時に結合する（抗体の濃度の上昇に伴って応答も上昇する）。結果は、3C10mAbは以前記載されたマウス抗メソテリンmAbK1の同じ（またはよく似たエピトープ）ものに結合するであった。7B1mAbは、3C10およびK1とは識別可能なエピトープに結合した。6A4mAbは組み換えメソテリンへの3C10と6A4双方の結合を阻止することができた。

【0380】

(実施例4：メソテリンモノクローナル抗体の安定性の特性解析)

この実施例では、以下のような化学的アンフォールディングおよび熱安定性の分析にてmAb、3C10、6A4および7B1の安定性を調べた。

【0381】

蛍光分光光度法により化学変性の中点を測定することによって抗メソテリンモノクローナル抗体の安定性を比較した。ミクロマックスプレートリーダーを備えたSPEXフルオロロジ3.22（ニュージャージー州、エジソンのSPEX）にて化学変性の蛍光測定を行った。0~6Mの範囲でのPBS緩衝液中の塩酸グアニジニウム(GdHCl)の16の異なった濃度で20時間平衡化するために放置した抗体試料で測定を行った。測定は、黒色で低容量、非結合性表面の384穴プレート（マサチューセッツ州、アクトンのコニング）で行い、12μLのウエル容量に1μMの抗体を必要とした。蛍光は280nmで励起し、放射スペクトルは320~400nmの間で測定した。走査速度はnm当たり1秒であり、スリットは5nmの帯域通過に設定した。PBSを用いて緩衝液プランクを行い、データから自動的に差し引いた。グラフパッドプリズムソフトウェアを用いてデータを2状態変性モデルに適合させた。結果は、アンフォールディングの中点であるGdHClのモル濃度として表現し、以下の表3に示す。

【0382】

(表3)

10

20

30

40

表3: 抗メソテリン抗体の化学安定性	
抗体	アンフォールディング中間点(GdHCl, M)
3C10	2.50
6A4	2.67
7B1	2.21

【0383】

抗メソテリンモノクローナル抗体の熱安定性は、抗体の融解温度の熱量測定によって決定した。

【0384】

自動試料採取器と組み合わせたV P キャピラリー D S C 示差走査微量熱量計システム(米国マサチューセッツ州、ノーサンプトンのMicroCal LLC)にて融解温度(T_m)の熱量測定を行った。0.25 mg / mLの濃度で1 / 分の割合で30から95まで試料を加熱することによって抗体の変性データが得られた。抗体試料は、pH 7.4のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に存在した。参照セルで同じ緩衝液を用いて比較によってモルの熱容量を得た。得られた温度記録図は、ソフトウェアOrigin v7.0を用いた、非2状態モデルに基づいて解析された、ベースラインで補正された、正規化されたデータだった。結果は、抗体の融解を示すピークが認められた温度(で)として表現し、以下の表4に示す。

【0385】

(表4)

10

20

表4: メソテリン抗体の熱安定性

抗体	ピーク 1 (°C)	ピーク 2 (°C)	ピーク 3 (°C)
3C10	67		81
6A4	69		81
7B1	69.8	72.7	82

【0386】

30

上記の結果は、3C10、6A4および7B1の抗体が望ましい化学的安定性特性および熱安定性特性を有することを示している。

【0387】

(実施例5: メソテリン抗体の内在化)

この実施例では、メソテリンを発現する細胞によって内部に取り込まれる3C10、6A4および7B1の抗体の能力を以下のように調べた。

【0388】

分析の第1の系列では、Hum-ZAPアッセイを用いて抗体の内在化を調べた。Hum-ZAPアッセイ(そのためのキットはカリフォルニア州、サンディエゴのアドバンストターゲティングシステムズから市販されている)では、抗メソテリン抗体が、メソテリンを発現する細胞および毒素サポニン(リボソーム不活化タンパク質)に結合させたヤギ抗ヒトIgG抗体と反応する。抗メソテリン一次抗体の内在化の際、サポニンを結合した二次抗体も細胞内に取り込まれ、結果としてタンパク質合成の阻害を生じ、最終的には2~4日後に細胞死を生じる。

40

【0389】

さらに具体的には、細胞培養培地で細胞を 5×10^4 個 / mLに希釈した。平底96穴の組織培養プレートの各ウエルに50 μLの希釈した細胞を加え、37、5%CO₂の恒温槽にてインキュベートした。抗体は、培養培地によって4 μg / mLおよび0.4 μg / mLの濃度に希釈した。25 μLの希釈抗体を培養細胞に加えたので、抗体の最終濃度は1 μg / mLおよび0.1 μg / mLであった。8 μg / mLのHum-ZAP 25

50

μ Lを添加する前に細胞と抗体を10分間インキュベートした。37、5%CO₂にて72時間、混合物をインキュベートした。100 μ Lのセルタイター-Glo(生死判別色素)を各ウエルに加え、2分間、穏やかに回転させた。室温にて10分後、プロメガベリタスマイクロプレートルミネータでプレートを読み取った。

【0390】

GP1結合を介して細胞表面にメソテリンを発現するように形質移入されたCHO細胞(CHO-メソテリン)だけでなく、メソテリンを発現している細胞株、NCI-H226、CFPAC-1およびKB(実施例3に記載された)も標的細胞として用いて、Hum-ZAPアッセイを行った。結果は、以下で表5にて定量的に表す。

【0391】

(表5)

表5: Hum-ZAPアッセイを用いるメソテリン抗体の内在化				
抗体	CHO-メソテリン	NCI-H226	CFPAC-1	KB
3C10	+	N.D	N.D	+
6A4	+	+	+	+
7B1	+	N.D	N.D	+/-

10

20

【0392】

Hum-ZAPアッセイの結果は、6A4抗体は4つの細胞株すべてで内部に取り込まれたことを明らかにしている。3C10および7B1の抗体はCHO-メソテリン細胞で内部に取り込まれた。その上さらに、3C1抗体はKB細胞で内部に取り込まれが、7B1抗体はほかの2つの抗体よりも少ししかKB細胞で内部に取り込まれなかつた。

【0393】

第2の系列の分析では、免疫蛍光アッセイを用いて、NCI-H226細胞株による6A4抗体の内在化をさらに調べた。このアッセイでは、NCI-H226細胞を80%集密に増殖させた。細胞解離緩衝液(細胞ストリッパー)によって付着細胞を剥がし、1.35 \times 10⁶個の細胞を15mLの円錐管に移し、FACS緩衝液(PBS+2%ウシ胎児血清)で1回洗浄した。体積450 μ LのFACS緩衝液(PBS+2%ウシ胎児血清)中で20 μ g/mLの6A4抗体と共に4℃で30分間細胞をインキュベートし、次いで冷FACS緩衝液で洗浄した。次いで、検出抗体、FACS緩衝液中の20 μ g/mLのローダミンに結合させたヤギ抗ヒトIgG抗体によって4℃にて30分間、細胞を染色し、その後、FACS緩衝液で洗浄した。この受容体/抗体の複合体を450 μ LのFACS緩衝液にさらに再懸濁させ、特定の時間(ゼロ、5、10、15、30、60、120分間)、37℃、5%CO₂にて細胞と共にインキュベートして内在化させた。特定された時点で、150,000個の細胞に相当する50 μ Lの分取を96穴プレートに移し、細胞表面を染色する小麦胚芽凝集素-AllexaFluor488コンジュゲート(インビトロジエン、カタログ番号W11261)によって染色した。FACS緩衝液中の10 μ g/mLのWGAと共に分取した細胞を氷上で30分間インキュベートし、次いでFACS緩衝液で洗浄した。最終的に、細胞をFACS緩衝液で洗浄し、2%パラホルムアルデヒドの添加によって固定し、Allexa488およびローダミンについてそれぞれ495/519および554/570nmの励起/放射の波長を用いて、会合された免疫蛍光について蛍光顕微鏡によって分析した。結果は、6A4mAbがNCI-H226細胞によって効果的に内部に取り込まれることを裏付けた。

30

40

【0394】

(実施例6: 抗メソテリンmAbによるメソテリンのCA125への結合の阻害)

メソテリンのCA125への結合を阻害する抗メソテリン抗体の能力を調べるために、インビトロの異型細胞付着アッセイを行った。このアッセイでは、OVCA43細胞(C

50

A 1 2 5 を発現する卵巣癌細胞株)の細胞表面にメソテリンを発現するように形質移入された C H O 細胞 (C H O - メソテリン)への付着を阻害する抗体の能力を調べた。 O V C A R 3 細胞 (実施例 3 でさらに記載された)の C H O - メソテリン細胞への付着は、メソテリンの C A 1 2 5 との相互作用が介在する。

【 0 3 9 5 】

メソテリン / C A 1 2 5 の相互作用の抗体阻害を調べるために、アッセイの 2 4 時間前に、9 6 穴プレートにウエル当たり 4×10^4 個 / 2 0 0 μ L の密度で O V C A R 細胞を入れ、細胞のやや集密な培養を得た。2 4 時間後、培地を取り除き、1 % ウシ血清アルブミン (B S A) を含有する新鮮な培地に加えて 1 0 μ g / m L の抗体 (3 C 1 0 、 7 B 1 、 6 A 4 、アイソタイプ対照または抗体なし) をウエルに加えた。3 7 にて 5 % C O₂ 10 と共に細胞を 3 0 分間インキュベートした。 C H O - S (親型細胞) および C H O - メソテリン細胞をカルセイン A M (6 \times 1 0⁶ 個 / m L の細胞について 5 μ M) と共に 3 0 分インキュベートし、培地で洗浄し、 O V C A R の培養に加え、3 7 にて 6 0 分間インキュベートした。

【 0 3 9 6 】

インキュベートに続いて、試料を P B S で 4 回洗浄し、非付着細胞を取り除いた。1 0 0 μ L / ウエルの P B S を加え、4 9 4 n m / 5 1 7 n m にてシナジー H T 蛍光リーダーによりプレートを読み取ることによって付着した細胞を測定した。

【 0 3 9 7 】

結果を図 8 で説明する。結果は、抗体の非存在下では O V C A R 3 細胞は C H O - メソテリン細胞に付着したが、その細胞表面にメソテリンを発現しない対照の C H O - S 細胞には付着しなかったことを示している。さらに、3 C 1 0 m A b または 6 A 4 m A b の存在は結果として、対照抗体 (D T) と比べて細胞の付着でそれぞれ 6 8 . 7 % の阻害または 8 4 . 8 % の阻害を生じた。対照的に、7 B 1 m A b がメソテリンの C A 1 2 5 との相互作用を阻害する能力を示さなかったということは、7 B 1 が結合するメソテリン上のエピトープ (3 C 1 0 および 6 A 4 のエピトープとは異なる) はメソテリン - C A 1 2 5 の相互作用の領域を遮断しないことを示している。 20

【 0 3 9 8 】

(実施例 7 : 抗体依存性の細胞傷害性)

抗体依存性の細胞傷害性 (A D C C) を介して、エフェクター細胞の存在下でメソテリンを発現している細胞を殺傷する抗体 6 A 4 の能力を判定するために、蛍光細胞傷害性アッセイを用いた。その表面にメソテリンの 4 0 k D の膜結合性部分を発現するように形質移入された C H O 細胞 (C H O - メソテリン細胞) を標的細胞として用いた。 30

【 0 3 9 9 】

ヒトのエフェクター細胞は以下のように全血から調製した。標準的なファイコール - パック単離によってヘパリン加全血からヒトの末梢血単核細胞を精製した。1 0 % の F B S (熱不活化) および 2 0 0 U / m L のヒト I L - 2 を含有する R P M I 1 6 4 0 培地に細胞を再懸濁し、3 7 にて一晩インキュベートした。翌日、細胞を回収し、培養培地で 4 回洗浄し、2 \times 1 0⁷ 個 / m L にて再懸濁した。1 \times 1 0⁶ 個の標的細胞 / m L 当たり 2 . 5 μ L の B A T D A で B A T D A 試薬 (マサチューセッツ州、ウェルズリーのパーキンエルマー) と共に 3 7 にて 2 0 分間インキュベートすることによって標的の C H O - メソテリン細胞を調製した。標的細胞を 4 回洗浄し、遠心して 1 \times 1 0⁵ 個の細胞 / m L の最終容量とした。 40

【 0 4 0 0 】

以下のようにデルフィア蛍光放射解析を用いて、ヒト抗メソテリン 6 A 4 モノクローナル抗体に対する抗体特異的 A D C C について C H O - メソテリン細胞を調べた。5 0 μ L のエフェクター細胞 (1 0⁶ 個 / ウエル) および 5 0 μ L の抗体 (最終濃度 1 0 μ g / m L) と共に C H O - メソテリン細胞 (標識された標的細胞を 1 0 0 μ L 、 1 0⁴ 個 / ウエル) をインキュベートした。解析全体を通して 1 : 1 0 0 の標的対エフェクターの比を用いた。試験すべてにおいて、ヒト I g G 1 アイソタイプ対照を陰性対照として用いた。細 50

胞を 2 0 0 0 r p m で遠心し、37°で1時間インキュベートした。次いで上清を回収し、遠心単離に供し、20 μL の上清を平底プレートに移し、それに 180 μL の E u 液（マサチューセッツ州、ウェルズリーのパーキンエルマー）を加え、Ruby Star リーダー（BMG ラボテック）で読み取った。% 溶解を以下のように算出した：（試料の放出 - 自然放出）×100 /（最大放出 - 自然放出）、式中、自然放出は標的細胞に加えてエフェクター細胞を含有するウエルからの蛍光であり、最大放出は、標的細胞を含有し、2% トリトン-X で処理したウエルからの蛍光である。

【0401】

結果は以下で表 6 に要約するが、nM にて EC₅₀ で示す。

【0402】

（表 6）

10

表 6: 6A4 抗体によって媒介される抗体依存性細胞毒性	
抗体	EC ₅₀ (nM)
6A4	63.10
アイソタイプコントロール	682.7

【0403】

結果は、6A4 モノクローナル抗体が、その細胞表面にメソテリンを発現している細胞株に対して ADC C 活性を示すことを明らかにしている。

【0404】

20

（実施例 8：抗メソテリン mAb 6A4 による生体内での腫瘍増殖阻害）

この実施例では、裸の抗体としてまたは細胞毒素コンジュゲートとしてのいずれかで 6A4 mAb の、生体内でのマウスモデルで腫瘍の増殖を阻害する能力を調べた。6A4 の細胞毒素コンジュゲートは、本明細書では 6A4 - 細胞毒素 A と呼ばれ、細胞毒素 A に連結された 6A4 抗体で構成される。細胞毒素 A 細胞毒素およびその調製は、国際公開第 WO 2008/083312 号でさらに記載されており、その全体の内容は参照によって特に本明細書に援用される。6A4 - 細胞毒素 A コンジュゲートは以下のように調製された。

【0405】

抗体 6A4 をおよそ 5 mg / mL まで濃縮し、緩衝液を 100 mM のリン酸緩衝液、50 mM の NaCl、2 mM の DTPA、pH 8.0 に交換し、室温にて 60 分間、8~10 倍モル過剰の 2-イミノチオランの添加によってチオール化した。チオール化に続いて、抗体の緩衝液を 5 mM のグリシン、2 mM の DTPA および 0.5% ポビドン (10K) pH 5.5 を含有する 50 mM の HRPES 緩衝液に交換した。324 nm にてチオビリジンの放出を測定することによって 4,4'-ジチオジビリジンによりチオール化を定量した。薬剤対チオールの 3:1 のモル比でマレイミド含有薬剤、細胞毒素 A の添加によってコンジュゲートを達成した。インキュベートは室温で 60 分間であり、その後 10:1 のモル比の N-エチルマレイミド (NEM) 対チオールを反応混合物に加えた。NEM の存在下でのインキュベートの後、50 mM の HEPES、5 mM のグリシン 100 mM の NaCl、pH 6.0 で流すセファクリル-200 カラムでのサイズ排除クロマトグラフィーによって得られたコンジュゲートを精製した。単量体の抗体コンジュゲートの分画をプールし、限外濾過によって濃縮した。280 nm および 340 nm での吸収を測定することによって抗体コンジュゲートの濃度および置換比率を決定した。

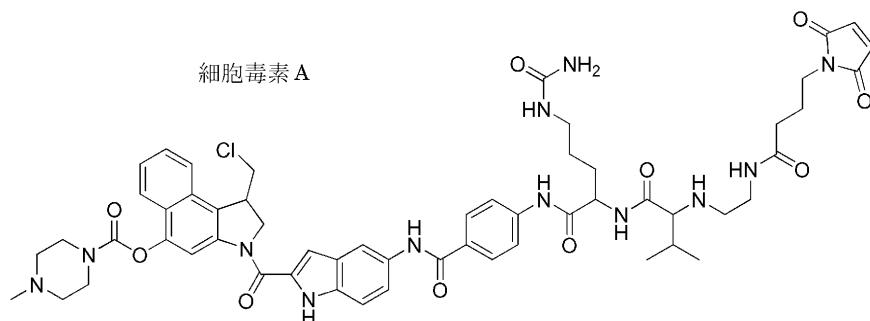
30

【0406】

40

細胞毒素 A は以下に示す構造を有する：

【化36】

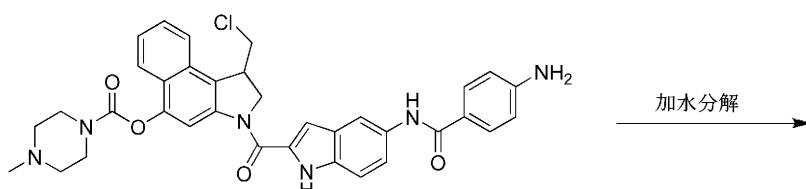


10

【0407】

用語「細胞毒素」が採用されるが、当業者は、実際に示された構造は細胞毒素（パートナー分子）と細胞毒素を抗体に連結するリンカー部分を包含し、コンジュゲートを切断した後、毒素は、次いで毒性に加水分解されるプロドラッグの形態で放出されることを十分に理解するであろう。従って、厳密に言えば、本発明のコンジュゲートのパートナー分子は、プロドラッグの形態または細胞毒素のいずれかとしてみなすことができる。

【化37】



20

細胞毒素のプロドラッグの形態



30

【0408】

第1の系列の分析では、マウス異種移植モデルにおけるNCI-H226細胞（肺に由来する中皮腫；ATCC表示CRL-5826）の増殖に対する6A4および6A4-細胞毒素Aの効果を調べた。この異種移植モデルでは、マウス当たり 9×10^6 個のNCI-H226細胞をSCIDマウス（CB17、ニューヨーク州、ジャーマンタウンのタコニックから）に移植し、NCI-H226細胞を36日間増殖させた。平均腫瘍体積が87mm³であった40日目に、マウスを無作為化し、対照：ビヒクルのみ（PBS、Q3D×4）、アイソタイプが一致したヒトIgG1抗体（4A3）または細胞毒素A細胞毒素に連結されたアイソタイプが一致したヒトIgG1抗体（イソ-細胞毒素A）と共に、6A4（10mg/kgまたは30mg/kg）または6A4-細胞毒素Aコンジュゲート（0.1マイクロモル/kg）によって腹腔内（i.p.）で処理した。

40

【0409】

6A4抗体およびその対照を40、43、47および51日目に投与した。6A4-細胞毒素Aコンジュゲートおよびその対照は、40および64日目に投与した。105日目まで定期的な間隔で腫瘍の体積を測定した。図9Aおよび図9Bはそれぞれ、ビヒクルのみ、6A4-細胞毒素A（0.1マイクロモル/kg）、イソ-細胞毒素A（0.1マイクロモル/kg）、コンジュゲートされていない6A4およびコンジュゲートされていないアイソタイプ対照（4A3）で処理されたマウスにおける平均腫瘍体積および腫瘍体積の中央値を示す。期待されたとおり、本試験で採用された異種移植モデルは免疫不全状態

50

なので、健全な A D C C 反応を組み込むことは期待されず、裸の 6 A 4 抗体による処理は N C I - H 2 2 6 腫瘍細胞の体積に効果を示さなかった（すなわち、腫瘍の増殖を阻害しなかった）。対照的に、6 A 4 - 細胞毒素 A コンジュゲートによる処理は、図 9 A および図 9 B のグラフで説明されるように腫瘍の増殖を有意に阻害した。

【 0 4 1 0 】

第 2 の系列の分析では、マウスの異種移植のモデルにて H P A C 細胞（ヒト脾臓腺癌； A T C C 表示 C R L - 2 1 1 9 ）の増殖に対する 6 A 4 および 6 A 4 - 細胞毒素 A の効果を調べた。H P A C 細胞（マウス当たり 5×10^6 個）を C B 1 7 S C I D マウスに移植して 8 日間増殖させた。平均腫瘍体積が 96 mm^3 である 8 日目に、マウスを無作為化し、対照：ビヒクルのみ（P B S、Q 3 D $\times 4$ ）、アイソタイプが一致したヒト I g G 1 抗体（4 A 3、30 mg / k g ）または細胞毒素 A 細胞毒素に連結されたアイソタイプが一致したヒト I g G 1 抗体（2 A 1 0 - 細胞毒素 A；0.15 マイクロモル / k g ）またはコンジュゲートされていない 6 A 4 (8 mg / k g) および同等のタンパク質用量でのコンジュゲートされていないアイソタイプ対照（2 A 1 0 ；8.7 mg / k g 、S D ）と共に、6 A 4 (10 mg / k g または 30 mg / k g) または 6 A 4 - 細胞毒素 A コンジュゲート（0.15 マイクロモル / k g ）によって腹腔内（i. p. ）で処理した。6 A 4 抗体およびその対照は、Q 3 D $\times 4$ (3 日に一度 4 回) の投与スケジュールで投与された。6 A 4 - 細胞毒素 A コンジュゲートおよびその対照は単回投与（S D ）の投与スケジュールで投与された。5 7 日目まで定期的な間隔で腫瘍の体積を測定した。

【 0 4 1 1 】

結果を図 1 0 A および図 1 0 B に示す。図 1 0 A および図 1 0 B はそれぞれ、ビヒクルのみ、6 A 4 - 細胞毒素 A (0.15 マイクロモル / k g) 、アイソタイプが一致したコンジュゲート（2 A 1 0 - 細胞毒素 A ；0.15 マイクロモル / k g ）、重量が同等のコンジュゲートされていない 6 A 4 (8 mg / k g) 、同等のタンパク質用量でのコンジュゲートされていないアイソタイプ対照（2 A 1 0 ；8.7 mg / K g ）、裸の 6 A 4 (10 mg / k g または 30 mg / k g) またはアイソタイプが一致した I g G 1 の裸の m A b (4 A 3 ；30 mg / K g) で処理されたマウスにおける平均腫瘍体積および腫瘍体積の中央値を示す。異種移植モデルは健全な A D C C 反応を組み込むことは期待されないにもかかわらず、データは、裸の 6 A 4 抗体による処理が H P A C 腫瘍細胞の増殖の阻害を生じることを示している。再び、前の実施例と同様に、6 A 4 - 細胞毒素 A コンジュゲートによる処理は H P A C 腫瘍細胞の増殖を阻害するのに非常に効果的であることが示された。

【 0 4 1 2 】

第 3 の系列の分析では、マウスの異種移植モデルにおいて卵巣癌由来の O V C A R 3 細胞（A T C C 表示 H T B - 1 6 1 ）の増殖に対する 6 A 4 - 細胞毒素 A の効果を調べた。この異種移植モデルでは、マウス当たり 5×10^6 個の O V C A R 3 細胞を C B 1 7 S C I D マウスに移植し、4 2 日間増殖させた。4 2 日目で腫瘍の平均体積はおよそ 100 mm^3 であった。0.1 または 0.3 マイクロモル / k g の用量で 6 A 4 - 細胞毒素 A コンジュゲートによってマウスを腹腔内（i. p. ）で処理した。対照として、ビヒクルのみ（P B S、Q 3 D $\times 4$ ）または 0.1 もしくは 0.3 マイクロモル / k g の細胞毒素 A に連結された、アイソタイプが一致したヒトの I g G 1 抗体でマウスを処理した。

【 0 4 1 3 】

6 A 4 - 細胞毒素 A コンジュゲートおよびその対照は、4 2 、9 6 、1 3 2 および 1 7 6 日目に投与された。図 1 1 に示されるように、6 A 4 - 細胞毒素 A コンジュゲートによる処理は腫瘍の増殖を有意に阻害した。この実施例全体を通して 6 A 4 - 細胞毒素 A の 0.3 マイクロモル / k g の用量で 1 7 6 日目の最終投与にわたって腫瘍の増殖は制御された。0.1 マイクロモル / k g の 6 A 4 - 細胞毒素 A によって 1 5 0 日目まで腫瘍の増殖は制御された。アイソタイプ対照は、腫瘍を制御することに効果的ではなかった（データは示さず）。

【 0 4 1 4 】

10

20

30

40

50

要約すれば、3種の異なった異種移植のマウスモデルにおいて、6A4抗体の細胞毒素コンジュゲート（0.1～0.15マイクロモル/kgの用量で）は生体内で腫瘍の増殖を有意に阻害した。

【0415】

（実施例9：脱フコシル化6A4が介在するADC）

この実施例では、脱フコシル化6A4（6A4nf）抗体が、肺癌および卵巣癌におけるADCの効率的なメディエーターであることが示された。デルフィア蛍光放射解析は、脱フコシル化6A4がエフェクター細胞の存在下でADCを介してメソテリンを発現しているH226（NSCLC）およびOVCAR3（卵巣癌）の細胞を殺傷することを示した。第1に、以下のように全血からヒトのエフェクター細胞を調製した：標準的なフアイコール-パック単離によってヘパリン加全血からヒトの末梢血単核細胞を精製した。10%FBS（熱不活化）および200U/mLのヒトIL-2を含有する RPMI 1640培地に細胞を再懸濁し、37にて一晩インキュベートした。翌日、細胞を回収し、培養培地で4回洗浄し、 2×10^7 個の細胞/mLにて再懸濁した。

【0416】

第2に、BATA試薬（マサチューセッツ州、ウェルズリーのパーキンエルマー）と共にインキュベートすることによって標識されたH226細胞またはOVCAR3細胞を調製した。第3に、標的細胞をエフェクター細胞および抗体と混合した。100μLの標識化標的細胞（ 10^4 個/ウェル）を50μLのエフェクター細胞（ 10^6 個/ウェル）および50μLの抗体（最終濃度10μg/mL）と共にインキュベートした。解析全体を通して、1:100の標的対エフェクターの比率を用いた。ヒトIgG1（HuIgG1）アイソタイプ対照を陰性対照として用いた。第4に細胞の溶解を定量した。細胞を2000rpmで遠心し、37で1時間インキュベートした。次いで上清を回収し、遠心分離に供し、20μLの上清を平底プレートに移した。180μLのEu溶液（マサチューセッツ州、ウェルズリーのパーキンエルマー）を加え、Rubystar（BMGラボテック）リーダーで読み取った。パーセント溶解を以下のように算出した：（試料の放出-自然放出） $\times 100$ を（最大放出-自然放出）で割ったが、式中、自然放出は標的細胞に加えてエフェクター細胞を含有するウェルからの蛍光であり、最大放出は、標的細胞を含有し、2%トリトン-Xで処理したウェルからの蛍光である。OVCAR3細胞（図12a）およびH226細胞（図12b）に対して脱フコシル化6A4を用いてADC活性における有意な増大が認められた。

【0417】

（実施例10：脱フコシル化6A4は生体内での腫瘍の増殖を阻害した）

もう1つの実施例では、6A4nfはゲムシタビンとの併用でマウスの異種移植モデルにてH226細胞の増殖を有意に遅くした。マウス当たり 9×10^6 個のH226細胞をCB17SCIDマウスに移植して増殖させた。23日目で腫瘍の平均体積はおよそ100mm³だった。マウスを無作為化し、6A4nf、80mg/kgのゲムシタビン、6A4nfとゲムシタビンの併用、ビヒクリ对照またはIgG1アイソタイプ対照によって腹腔内で処理した。6A4nfは10mg/kgまたは30mg/kgのいずれかで投与した。H226の増殖は、6A4nfとゲムシタビンの併用すべてで阻害された。ゲムシタビンとの併用で6A4nfを30mg/kgで投与した場合、最大の阻害が達成され、用量依存性の効果を示唆した。

【0418】

（実施例11：腫瘍細胞におけるメソテリンの発現）

抗体6A4を用いた免疫組織化学を用いてヒトの腫瘍に結合するその能力を示し、腫瘍におけるメソテリンの発現の範囲を決定した。6A4の最終濃度が6μg/mLになるよう6A4をFITC標識したヤギ抗ヒトFab（ジャクソン#109-097-003）と予備複合体化した。次いでこの複合体を標準のIHC法と共に用いて結合を判定した。6A4は卵巣癌、膵臓癌、肺癌、中皮腫、および頭頸部の癌に結合することが示された。頭頸部の癌への6A4の結合の追加の例には、上咽頭、喉頭、唾液腺、舌および扁桃組

10

20

30

40

50

織の癌が挙げられる。

【0419】

(実施例12: 6A4-細胞毒素Aはカニクイザルで毒性ではない)

6A4-細胞毒素Aはカニクイザルで毒性ではないことが示された。この動物はヒトに似たメソテリンの発現パターンを示す。また、6A4抗体は、ヒトのメソテリンタンパク質によって同じ親和性でカニクイザルのメソテリンタンパク質に結合する。従って、6A4-細胞毒素Aの標的毒性を評価するのにカニクイザルは好適であった。

【0420】

カニクイザルのオス2匹とメス2匹に対して6A4-細胞毒素Aを静脈内に投与した。0.4マイクロモル/kgの2回の用量を1日目と15日目に与えた。行動変化、毒性の兆候について動物を観察し、分析用に採血した。動物は毒性効果の兆候を示さなかった。

10

【0421】

4、3、7、14、21および28日目に採血し、複数のパラメータを測定した。白血球、赤血球、血小板、網状赤血球、好中球の比率、リンパ球の比率、単球の比率、好酸球の比率、好塩基球の比率、染色されない細胞の比率、ヘモグロビン、ヘマトクリット、mcv、mch、mchc、プロトロンビン時間、apt、アルブミン、総タンパク質、グロブリン、ビリルビン、尿素-窒素、クレアチニン、アルカリホスファターゼ、アラニントランスフェラーゼ、アスパラギン酸トランスフェラーゼ、グルタミン酸トランスフェラーゼ、グルコース、コレステロール、カルシウム、塩化物、リン、カリウム、ナトリウムおよびトリグリセリドでは有意な変化は認められなかった。

20

【0422】

28日目の剖検に続いて、以下の臓器には薬物関連の変化は認められなかった：副腎、大動脈、胸骨、脳、盲腸、結腸、十二指腸、食道、眼、視神経、大腿、胆嚢、心臓、回腸、空腸、腎臓、リンパ節、肝臓、リンパ節、中皮、肺、乳腺、坐骨神経、卵巣、脾臓、下垂体、副甲状腺、直腸、唾液腺、皮膚、骨格筋、脾臓、胃、甲状腺、胸腺、脊髄、気管、膀胱、子宮、腫、頸部、注射部位、卵管、尿管およびパイエル板。

配列表の概要			
配列番号	配列	配列番号	配列
1	V _H CDR1 a. a. 3C10	25	V _H n. t. 3C10
2	V _H CDR1 a. a. 6A4	26	V _H n. t. 6A4
3	V _H CDR1 a. a. 7B1	27	V _H n. t. 7B1
4	V _H CDR2 a. a. 3C10	28	V _K n. t. 3C10
5	V _H CDR2 a. a. 6A4	29	V _K n. t. 6A4
6	V _H CDR2 a. a. 7B1	30	V _K n. t. 7B1
7	V _H CDR3 a. a. 3C10	31	V _H 3-33 生殖細胞系列 a. a.
8	V _H CDR3 a. a. 6A4	32	V _H 3-7 生殖細胞系列 a. a.
9	V _H CDR3 a. a. 7B1	33	V _K L6 生殖細胞系列 a. a.
10	V _K CDR1 a. a. 3C10	34	V _K A27 生殖細胞系列 a. a.
11	V _K CDR1 a. a. 6A4	35	図4に示される 3C10 VH フラグメント
12	V _K CDR1 a. a. 7B1	36	図4に示される 6A4 VII フラグメント
13	V _K CDR2 a. a. 3C10	37	図5に示される JK4 フ ラグメント
14	V _K CDR2 a. a. 6A4	38	図6に示される JH6b フラグメント
15	V _K CDR2 a. a. 7B1	39	図7に示される JK2 フ ラグメント
16	V _K CDR3 a. a. 3C10	40	ペプチドコンジュゲート配列
17	V _K CDR3 a. a. 6A4	41	ペプチドコンジュゲート配列
18	V _K CDR3 a. a. 7B1	42	ペプチドコンジュゲート配列
19	V _H a. a. 3C10	43	ペプチドコンジュゲート配列
20	V _H a. a. 6A4		
21	V _H a. a. 7B1		
22	V _K a. a. 3C10		
23	V _K a. a. 6A4		
24	V _K a. a. 7B1		

10

20

30

【図1A】

抗メソテリン 3C10 VH

V セグメント: 3-33
 D セグメント: 3-10
 J セグメント: JH4b

Q V Y L V E S S G G G V V Q P G R S L
 CAG GTG TAC CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCC GGG AGG TCC CTG
 1

CDR1
 R L S C A A S G I T F S I Y G M H W
 AGA CTC FCC TGT GCA GCG TCT GGA ATC ACC TTC AGT ATC TAT GGC ATG CAC TGG
 55

CDR2
 V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D
 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT
 109

CDR3
 G S H E Y Y A D S V K G R F T I S R
 GGA AGT CAT GAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
 163

CDR1
 D N S K N T L Y L L M N S L R A E D
 GAC ATC TCC AAG AAC AGC CTG TAT CTG CTA ATG AAC AGC CTC AGA CCC GAG GAC
 217

CDR2
 T A V Y Y C A R D S D Y Y D S G S P
 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GGC GAT TAT TAT GAT TCG GGG AGT CCT
 271

CDR3
 L D Y W G Q G T L V T V S S
 CCT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
 325

【図1B】

抗メソテリン 3C10 VK

V セグメント: L6
 J セグメント: JK4

E I V L T Q S P A T L S L S P G F R
 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA
 1 CDR1
 A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC
 55 CDR2
 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG
 109 CDR3
 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT
 163 CDR3
 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
 CTC ACC ATC AGC AGC CTC GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG
 217 CDR3
 R S N W P L T F G G G T K V E I K
 CGT AGC AAC TGG CGG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
 271 CDR3
 325

【図2A】

抗メソテリン 6A4 VH

V セグメント: 3-33
 D セグメント: 3-10
 J セグメント: JH4b

Q V H L V E S S G G G V V Q P G R S L
 CAG GTG CAC CTG GTG GAG TCT GGG CCA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG
 1

CDR1
 R L S C V A S G I T F R I Y G M H W
 AGA CTC TCC TGT GTA GCG TCT GGA ATC ACC TTC AGG ATC TAT GGC ATG CAC TGG
 55

CDR2
 V R Q A P G K G L E W V A V L N Y D
 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT
 109

CDR3
 G S H E Y Y A D S V K G R F T I S R
 GGA AGT CAT GAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
 163

CDR1
 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
 GAC ATC TCC AAG AAC AGC CTC TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTC AGA CCC GAG GAC
 217

CDR2
 T A I Y Y C A R D G D Y Y D S G S P
 ACG GCT ATA TAT TAC TGT GCG AGA GAT GGC GAT TAC TAT GAT TCG GGG AGT CCT
 271

CDR3
 L D Y W G Q G T L V T V S S
 CCT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
 325

【図2B】

抗メソテリン 6A4 VK

V セグメント: L6
 J セグメント: JK4

E I V L T Q S P A T L S L S P G F R
 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA
 1 CDR1
 A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC
 55 CDR2
 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG
 109 CDR3
 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT
 163 CDR3
 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
 CTC ACC ATC AGC AGC CTC GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG
 217 CDR3
 R S N W P L T F G G G T K V E I K
 CGT AGC AAC TGG CGG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
 271 CDR3
 325

【図3A】

抗メソテリン 7B1 VH

Vセグメント: 3-7
Dセグメント: 3-10
Jセグメント: JH6b

1 E V H L V E S G G L V Q P G R S C A S G F T F S S Y G M H W
GAG GTT CAC CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTC
CDR1

55 R L S C A A S G F T E S R Y N M S W
AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGT AGA TAC TGG ATG AGC TGG
CDR2

109 V R Q A Q G K G L E W V A S I K Q A
GTC CGC CAG GCT CAA GGG AAA GGG CTG GAG TGG CTG GCC AGC ATG AAG CAA CCT
CDR2

163 G S E K T Y V D S V K G R F T I S R
GGA AGT GAG AAA ACC TAT GTG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
CDR3

217 D N A K N S L S L Q M N S L R A E D
GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TCT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC
CDR3

271 T A V Y Y C A R E G A Y Y D S A S
ACG GCT GTT TAT TAC TGT GCG AGG GAG GGG GCA TAT TAC TAT GAT TGG GCG AGT
CDR3

325 Y Y P Y Y Y Y S M D V W G Q C T T
TAT TAC CCT TAC TAC TAC TAC TAC AGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGU ACC AGC
379 V T V S S
GTC ACC GTC TCC TCA

【図3B】

抗メソテリン 7B1 VK

Vセグメント: A27
Jセグメント: JK2

1 E I V L T Q S P F G T L S P G E R S L S P G E R S L S P G E R S L S P G E R S
GAA ATT GTG TTG AGC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA
CDR1

55 A T L S C R A S Q S V S S Y L A W
GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG
CDR2

109 Y Q Q K P G Q A P R L I Y G A S S
TAC CAG CAG AAA CCT GGC CGG GCT CCC AGG CTC CTC ATC PAT GGT GCA TCC AGC
CDR2

163 R A T G I P D R F S G S G S G T D
AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC
CDR3

217 T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTC TAT TAC TGT CAG
CDR3

271 Q Y G S S Q Y T F G Q G T K L E I K
CAG TAT GGT AGC TCA CAG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
CDR3

【図4】

抗メソテリン 3C10 23-7 6A4 VH

3-33 生細胞系例
3C10 VH
6A4 VH

3-33 生細胞系例
3C10 VH
6A4 VH

JH4b 生細胞系例
3C10 VH
6A4 VH

3C10 23-7 6A4 VK

抗メソテリン 3C10 23-7 6A4 VK

CDR1
CDR2
CDR3

CDR1
CDR2
CDR3

CDR1
CDR2
CDR3

CDR1
CDR2
CDR3

【図5】

抗メソテリン 3C10 23-7 6A4 VK

L6 生細胞系例
3C10 VK
6A4 VK

3C10 23-7 6A4 VK

L6 生細胞系例
3C10 VK
6A4 VK

W P

CDR1
CDR2
CDR3

CDR1
CDR2
CDR3

CDR1
CDR2
CDR3

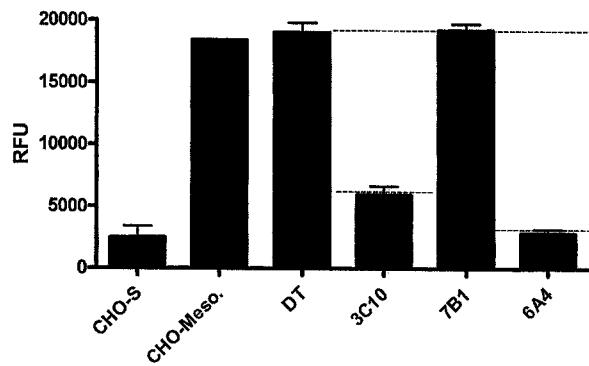
CDR1
CDR2
CDR3

【 四 6 】

抗メソチリシ 7B1 VH 例(成)

3-7	4.新規遮断系④ 7B1 VH	E V Q Z S G G G L V Q P G S L R L S C A S G E T F S Y W M S W V R	CDR1
3-7	4.新規遮断系④ 7B1 VH	Q A P G K G L E W V A N T I K Q D G S E K Y Y V D S V K G R E T I S R D N A K	CDR2
3-7	4.新規遮断系④ 7B1 VH	W S I Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	CDR3
JH6B	4.新規遮断系④ 7B1 VH	Y Y G M D V W M Q G W T V T V S S	CDR3

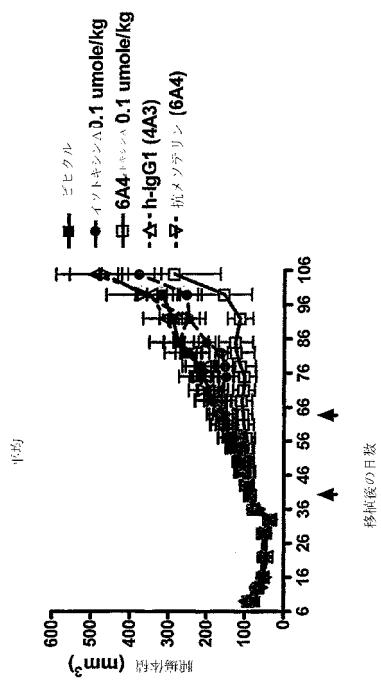
【 四 8 】



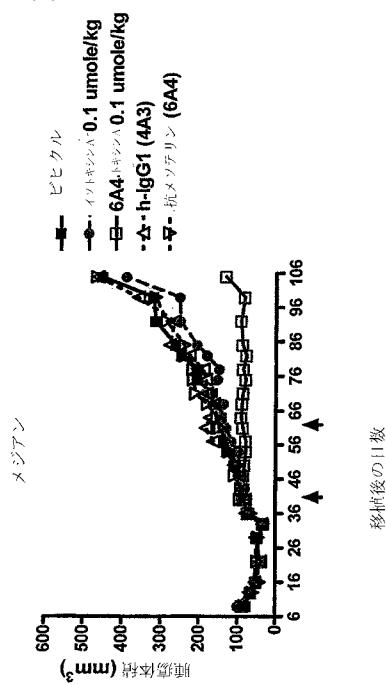
【 図 7 】

領域 VK B1 7 リアルテクノロジ

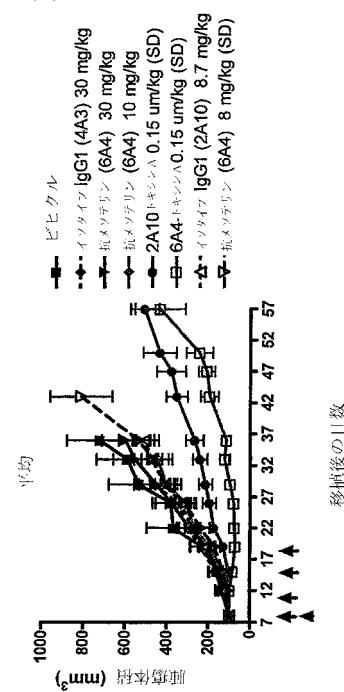
【図9A】



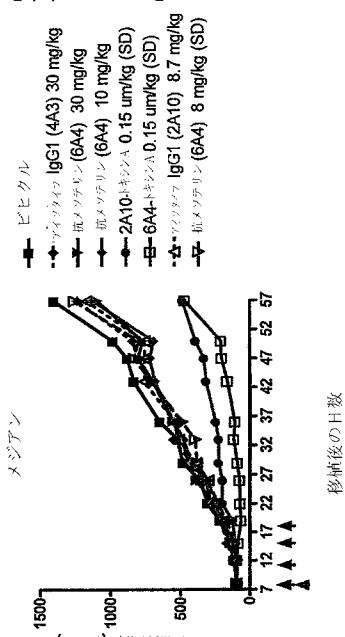
【図 9 B】



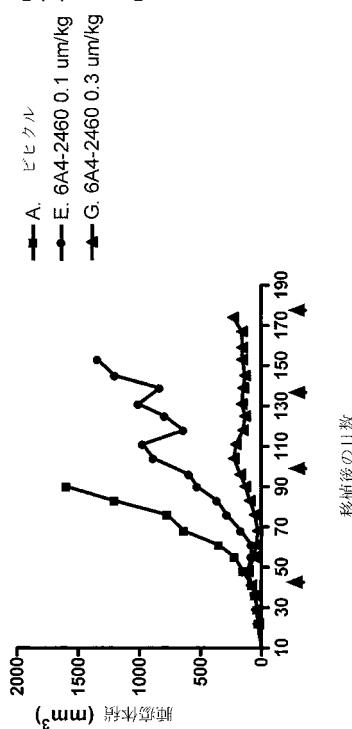
【図 10 A】



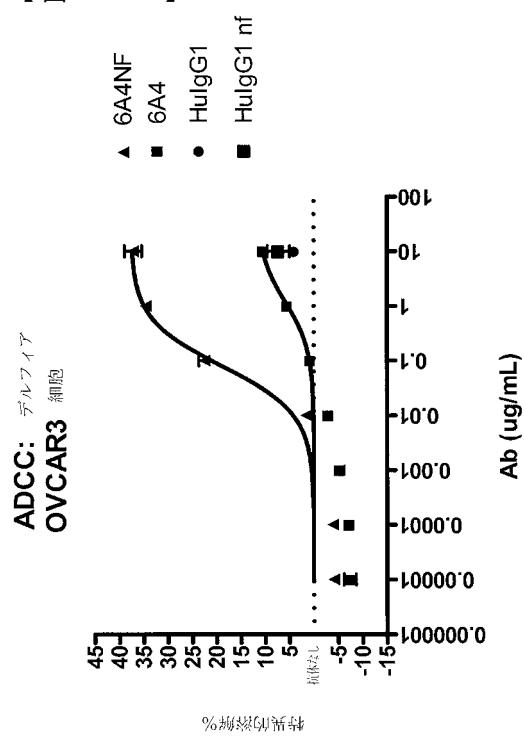
【図 10 B】



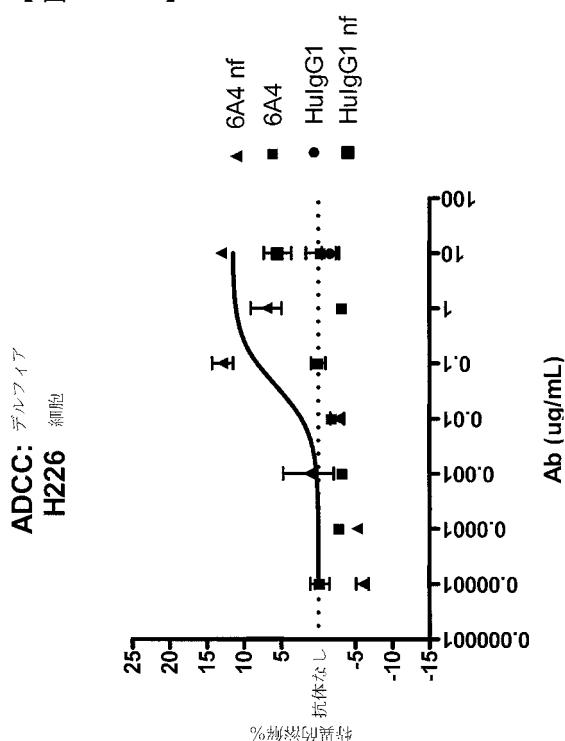
【図 11】



【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【配列表】

0005535074000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 12 P 21/08 (2006.01) C 12 P 21/08

(31)優先権主張番号 61/077,397
(32)優先日 平成20年7月1日(2008.7.1)
(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(72)発明者 テレット ジョナサン エー。
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サニーベイル ノース キャッスルロック テラス 510
(72)発明者 ポグー サラ エル。
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フレモント ミッドデイ コモンズ 5471
(72)発明者 トイ クリストファー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン ホセ アンバーグローブ ドライブ 1694
(72)発明者 ヤン ラン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 モーガン ヒル ピュリッシュマ ウェイ 18668
(72)発明者 ラオ ナイク チェタナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ウォルナット クリーク マターホーン ドライブ 565
(72)発明者 チエン ピンリヤン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 アラメダ ローレンス ロード 118

審査官 三原 健治

(56)参考文献 国際公開第99/028471 (WO, A1)
国際公開第2006/099141 (WO, A1)
国際公開第2005/112919 (WO, A1)
国際公開第97/007671 (WO, A1)
Cancer Res., 1992, 52(1), pp.181-186
Int. J. Cancer., 1997, 71(4), pp.638-644
Anticancer Res., 2004, 24(3a), pp.1327-1335
PNAS, 1998, 95(2), pp.669-674
Experimental Antibodies and Proteins: Poster Presentations Abstract #654, [online], 2007年4月18日、[2013年3月14日検索]、インターネット<URL: <http://www.aacr>

meetingabstracts.org/cgi/content/meeting_abstract/2007/1_Annual_Meeting/654>
Int. J. Cancer, 1992, 50, pp.373-381
J. Biol. Chem., 2002, 277(30), pp.26733-26740

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

C A p l u s (S T N)

M E D L I N E (S T N)

B I O S I S (S T N)