

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4948413号
(P4948413)

(45) 発行日 平成24年6月6日(2012.6.6)

(24) 登録日 平成24年3月16日(2012.3.16)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
C 07 K 16/28	(2006.01) C 07 K 16/28
C 07 K 16/46	(2006.01) C 07 K 16/46
G 01 N 33/53	(2006.01) G 01 N 33/53 D
G 01 N 21/64	(2006.01) G 01 N 21/64

請求項の数 46 (全 129 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-533692 (P2007-533692)	(73) 特許権者 509012625 ジェネンテック, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエーウェイ 1
(86) (22) 出願日	平成17年9月22日 (2005.9.22)	(74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策
(65) 公表番号	特表2008-516896 (P2008-516896A)	(74) 代理人 100062409 弁理士 安村 高明
(43) 公表日	平成20年5月22日 (2008.5.22)	(74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹
(86) 國際出願番号	PCT/US2005/034353	
(87) 國際公開番号	W02006/034488	
(87) 國際公開日	平成18年3月30日 (2006.3.30)	
審査請求日	平成20年8月4日 (2008.8.4)	
(31) 優先権主張番号	60/612,468	
(32) 優先日	平成16年9月23日 (2004.9.23)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	
(31) 優先権主張番号	60/696,353	
(32) 優先日	平成17年6月30日 (2005.6.30)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】システィン操作抗体および結合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一つ以上の遊離システィンアミノ酸を含むシスティン操作抗体であって、該システィン操作抗体は、親抗体の一つ以上のアミノ酸残基を、遊離システィンアミノ酸残基によって置換する工程を包含するプロセスにより調製され、ここで、該親抗体は、抗原に選択的に結合し、該システィン操作抗体は、該親抗体と同じ抗原に選択的に結合し、該親抗体は、以下の配列：

【化 1 A】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDVFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTQLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

を有する重鎖と、以下の配列：

【化 1 B】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
 RFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

を有する軽鎖とを含み、該親抗体の以下の位置：

重鎖の 40 位、88 位、119 位、121 位、122 位、175 位および 179 位、または、軽鎖の 15 位、43 位、110 位、144 位、153 位、168 位および 205 位のうち少なくとも一つが遊離システインアミノ酸残基によって置換されている、システイン操作抗体。 10

【請求項 2】

前記一つ以上の遊離システインアミノ酸残基が軽鎖に位置する、請求項 1 に記載のシステイン操作抗体。

【請求項 3】

前記親抗体の以下の位置：

軽鎖の 15 位、43 位、110 位、144 位、153 位、168 位および 205 位のうち少なくとも一つが遊離システインアミノ酸残基によって置換されている、請求項 1 に記載のシステイン操作抗体。

【請求項 4】

前記一つ以上の遊離システインアミノ酸残基が重鎖に位置する、請求項 1 に記載のシステイン操作抗体。 20

【請求項 5】

前記親抗体の以下の位置：

重鎖の 40 位、88 位、119 位、121 位、122 位、175 位および 179 位のうち少なくとも一つが遊離システインアミノ酸残基によって置換されている、請求項 1 に記載のシステイン操作抗体。

【請求項 6】

前記一つ以上の遊離システインアミノ酸残基が、重鎖または軽鎖の可変領域の位置から選択される、請求項 1 に記載のシステイン操作抗体。 30

【請求項 7】

前記一つ以上の遊離システインアミノ酸残基が、定常領域の位置から選択される、請求項 1 に記載のシステイン操作抗体。

【請求項 8】

以下：

- (i) 前記システイン操作抗体をコードする核酸配列に変異誘発する工程；
- (ii) 該システイン操作抗体を発現させる工程；および
- (iii) 該システイン操作抗体を単離および精製する工程

を包含するプロセスにより調製される、請求項 1 に記載のシステイン操作抗体。

【請求項 9】

以下：

(i) 前記システイン操作抗体をチオール反応性親和性試薬と反応させて、親和性標識されたシステイン操作抗体を生成する工程；および

(ii) 該親和性標識されたシステイン操作抗体の、捕捉媒体に対する結合を測定する工程

をさらに包含する、請求項 8 に記載のシステイン操作抗体。

【請求項 10】

前記チオール反応性親和性試薬がビオチン部分およびマレイミド部分を含む、請求項 9 に記載のシステイン操作抗体。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

前記捕捉媒体がストレプトアビジンを含む、請求項 9 に記載のシステイン操作抗体。

【請求項 12】

前記親抗体が、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 および配列番号 5 から選択されるアルブミン結合性ペプチド (A B P) を含む融合タンパク質である、請求項 1 に記載のシステイン操作抗体。

【請求項 13】

配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のシステイン操作抗体。

【請求項 14】

前記抗体が、捕捉標識、検出標識または固体支持体に共有結合している、請求項 1 に記載のシステイン操作抗体。 10

【請求項 15】

前記抗体が、フルオレセインタイプ、ローダミンタイプ、ダンシル、リサミン、シアニン、フィコエリトリン、テキサスレッドおよびそれらのアナログから選択される蛍光色素検出標識に共有結合している、請求項 14 に記載のシステイン操作抗体。

【請求項 16】

前記抗体が、³H、¹¹C、¹⁴C、¹⁸F、³²P、³⁵S、⁶⁴Cu、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹³³Xe、¹⁷⁷Lu、²¹¹At および ²¹³Bi から選択される放射性核種検出標識に共有結合している、請求項 14 に記載のシステイン操作抗体。 20

【請求項 17】

前記抗体が、DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA および TETA から選択されるキレートリガンドによって検出標識に共有結合している、請求項 14 に記載のシステイン操作抗体。

【請求項 18】

前記親抗体の以下の位置：

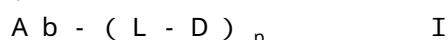
重鎖の 119 位、121 位および 175 位のうち少なくとも一つが遊離システインアミノ酸残基によって置換されている、請求項 1 に記載のシステイン操作抗体。

【請求項 19】

前記親抗体の重鎖の 121 位が遊離システインアミノ酸残基によって置換されている、請求項 1 に記載のシステイン操作抗体。 30

【請求項 20】

一つ以上の遊離システインアミノ酸残基を含むシステイン操作抗体 (Ab) と、マイタンシノイド、オーリスタチン、ドラスタチンおよびカリケアマイシンから選択される薬物部分 (D) を含む抗体 - 薬物結合体化合物であって、該システイン操作抗体は、リンカー部分 (L) によって一つ以上の遊離システインアミノ酸残基を通して D へと結合しており；該化合物は、式 I :



を有し、ここで、p は 1、2、3、または 4 であり；該システイン操作抗体は、親抗体の一つ以上のアミノ酸残基を一つ以上の遊離システインアミノ酸残基によって置換する工程を包含するプロセスにより調製され、ここで、該親抗体は、抗原に選択的に結合し、該システイン操作抗体は、該親抗体と同じ抗原に選択的に結合し、該親抗体は、以下の配列： 40

【化 1 C】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSWRGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
 ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPALQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAELLGG
 PSVFLFPPPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

を有する重鎖と、以下の配列：

【化 1 D】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLIYIYASFLYSGVPS
 RFSGSRSGTDFTLTISIQLQPEDFATYYCQQHYTTPPFGQGTTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLT
 LSKADYEHKVKYACEVTHQGLSPVTKSFRGEC

を有する軽鎖とを含み、該親抗体の以下の位置：

重鎖の 40 位、88 位、119 位、121 位、122 位、175 位および 179 位、または、軽鎖の 15 位、43 位、110 位、144 位、153 位、168 位および 205 位のうち少なくとも一つが遊離システインアミノ酸残基によって置換されている、抗体 - 薬物結合体化合物。

20

【請求項 2 1】

前記親抗体の以下の位置：

重鎖の 119 位、121 位および 175 位のうち少なくとも一つが遊離システインアミノ酸残基によって置換されている、請求項 20 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項 2 2】

前記システイン操作抗体が、以下：

(a) 親抗体の一つ以上のアミノ酸残基を遊離システインアミノ酸残基によって置換する工程；および

30

(b) 該システイン操作抗体をチオール反応性試薬と反応させることによって該システイン操作抗体のチオール反応性を決定する工程

を包含するプロセスにより調製され、該システイン操作抗体は、該チオール反応性試薬との反応性が該親抗体よりも高い、請求項 20 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項 2 3】

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 および配列番号 5 から選択されるアルブミン結合性ペプチド (A B P) 配列をさらに含む、請求項 20 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項 2 4】

p が 1 または 2 である、請求項 20 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

40

【請求項 2 5】

L が、式：

- A_a - W_w - Y_y -

を有し、ここで：

A は、前記システイン操作抗体 (A b) のシステインチオールに共有結合したストレッチャー単位であり；

a は 0 または 1 であり；

各 W は、独立して、アミノ酸単位であり；

w は、0 ~ 12 の範囲の整数であり；

Y は、前記薬物部分に共有結合したスペーサー単位であり、そして

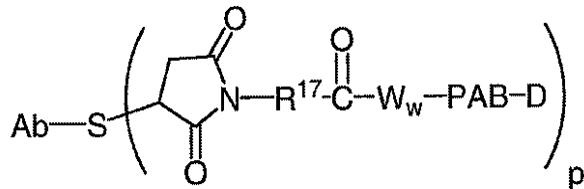
50

y は、0、1 または 2 である、請求項 2_0 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項 2_6】

以下の式：

【化 1】



10

を有し、ここで、PAB がパラ - アミノベンジルカルバモイルであり、そして、 R^{17} が、 $(CH_2)_r$ 、 $C_3 - C_8$ カルボシクリル、 $O - (CH_2)_r$ 、アリーレン、 $(CH_2)_r -$ アリーレン、-アリーレン- $(CH_2)_r -$ 、 $(CH_2)_r - (C_3 - C_8)$ カルボシクリル)、 $(C_3 - C_8)$ カルボシクリル)- $(CH_2)_r$ 、 $C_3 - C_8$ ヘテロシクリル、 $(CH_2)_r - (C_3 - C_8)$ ヘテロシクリル)、- $(C_3 - C_8)$ ヘテロシクリル)- $(CH_2)_r -$ 、- $(CH_2)_r C(O)NR^b (CH_2)_r -$ 、- $(CH_2CH_2O)_r -$ 、- $(CH_2CH_2O)_r - C(O)NR^b (CH_2)_r -$ 、- $(CH_2CH_2O)_r - C(O)NR^b (CH_2CH_2O)_r - C(O)NR^b (CH_2)_r -$ 、- $(CH_2CH_2O)_r - C(O)NR^b (CH_2CH_2O)_r - C(O)NR^b (CH_2)_r -$ 、および- $(CH_2CH_2O)_r C(O)NR^b (CH_2)_r -$ から選択される二価のラジカルであり；ここで、 R^b が H、 $C_1 - C_6$ アルキル、フェニルまたはベンジルであり；そして、 r は、独立して、1 ~ 10 の範囲の整数である、請求項 2_5 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項 2_7】

W_w がバリン - シトルリンである、請求項 2_6 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

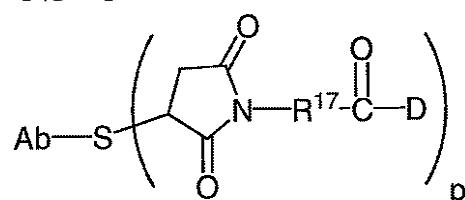
【請求項 2_8】

R^{17} が $(CH_2)_5$ または $(CH_2)_2$ である、請求項 2_6 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項 2_9】

式：

【化 2】



30

を有する、請求項 2_6 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項 3_0】

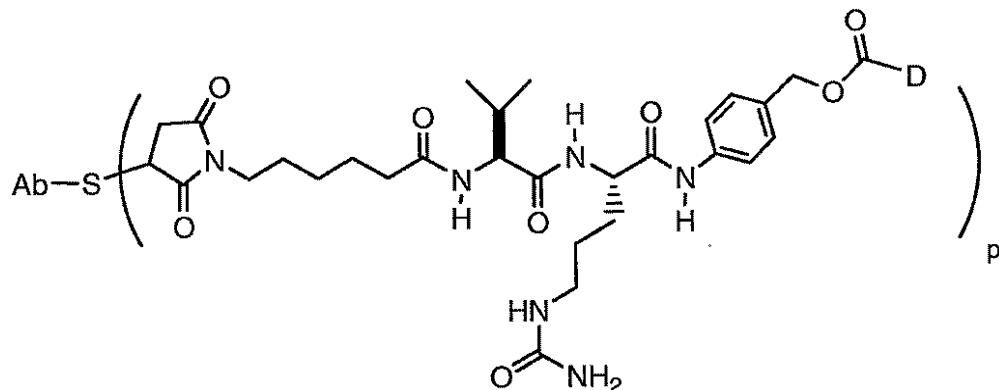
R^{17} が $(CH_2)_5$ または $(CH_2)_2$ である、請求項 2_9 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項 3_1】

式：

40

【化3】



を有する、請求項2 6に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項3 2】

Lがリンカー試薬SMCCまたはBMP EOから形成される、請求項2 0に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項3 3】

前記薬物部分Dが、マイクロチューブリンインヒビター、有糸分裂インヒビター、トボイソメラーゼインヒビターおよびDNAインターラーカーから選択される、請求項2 0に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

20

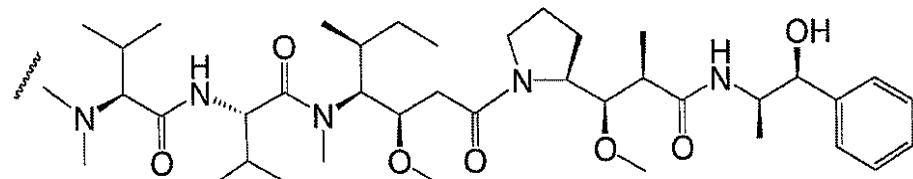
【請求項3 4】

前記薬物部分Dが、マイタンシノイド、オーリスタチン、ドラスタチンおよびカリケアマイシンから選択される、請求項2 0に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項3 5】

Dが、構造：

【化4】

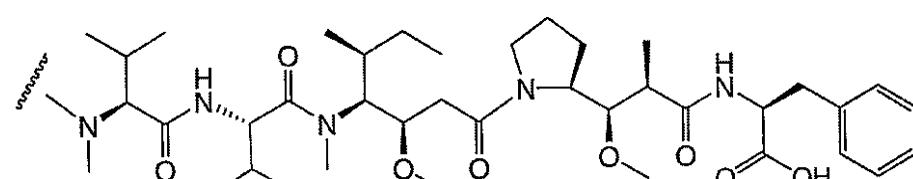


を有するMMAEであり、ここで波形の線が前記リンカーLへの結合部位を示す、請求項2 0に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項3 6】

Dが、構造：

【化5】

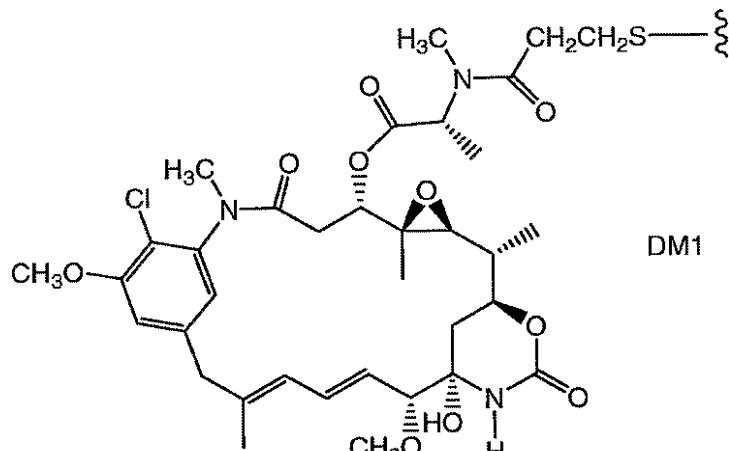


を有するMMAFであり、ここで波形の線が前記リンカーLへの結合部位を示す、請求項2 0に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項3 7】

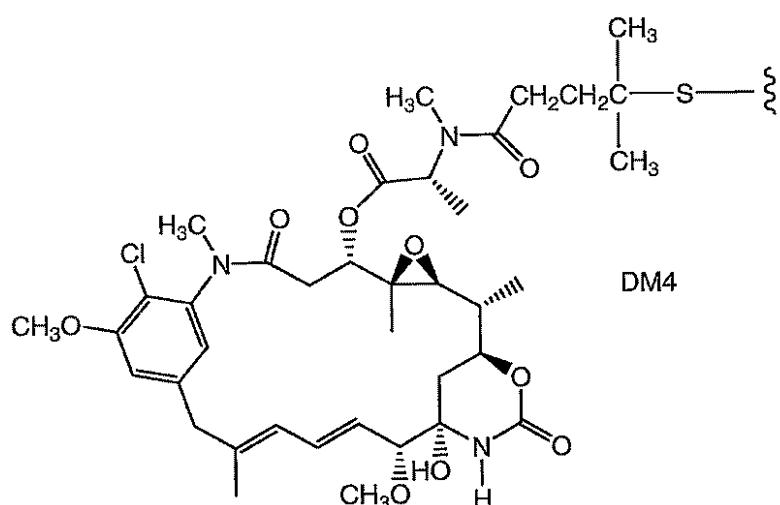
Dが、構造：

【化6】



を有するDM1であるかまたは構造：

【化6-2】

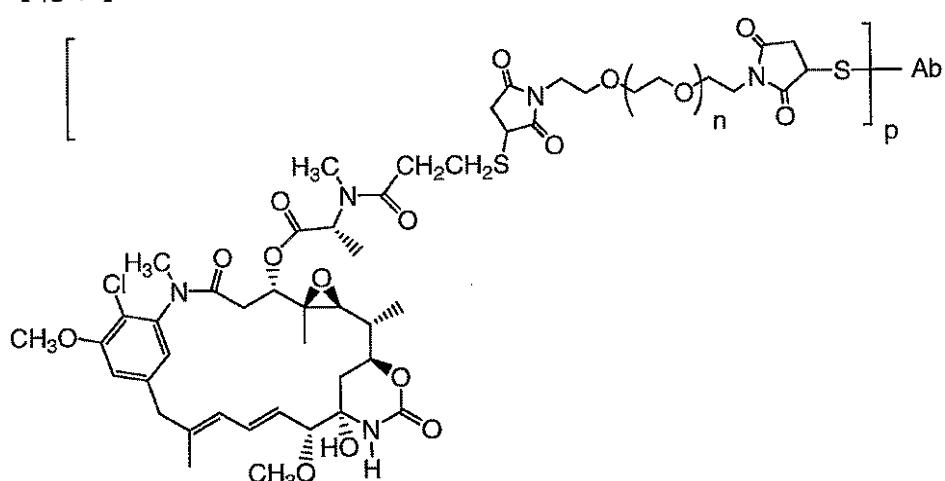
を有するDM4であり、ここで波形の線が前記リンカーLへの結合部位を示す、請求項2
0に記載の抗体-薬物結合体化合物。

30

【請求項38】

構造：

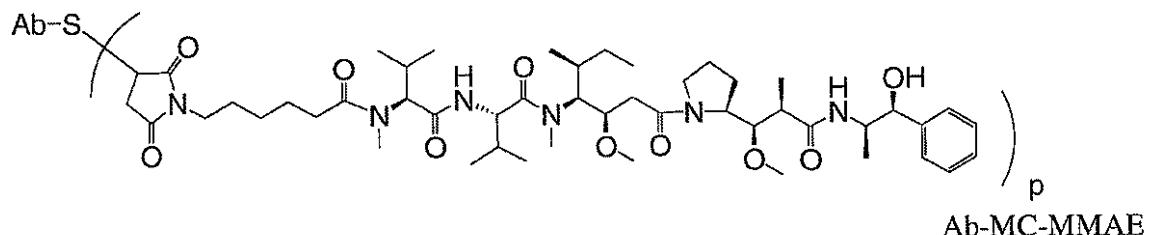
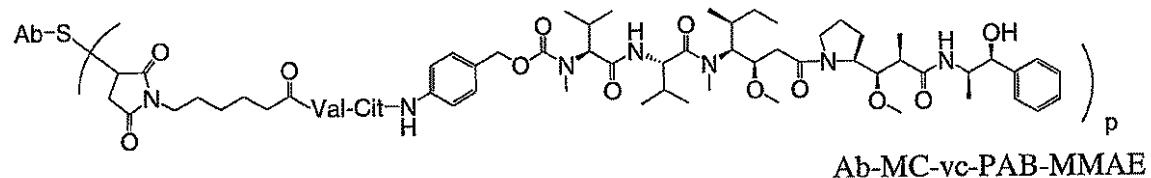
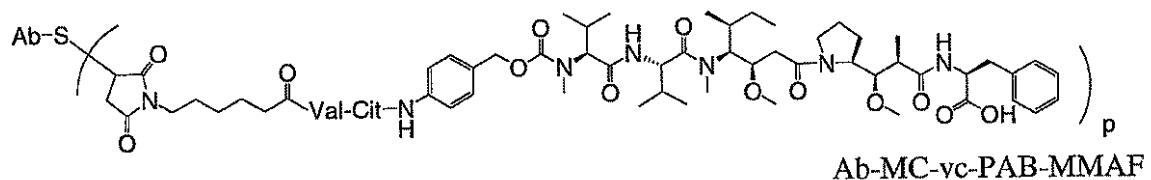
【化8】

を有する請求項2
0に記載の抗体-薬物結合体化合物であって、ここで、nは、0、1または2であり；そして、Abは、システイン操作抗体である、抗体-薬物結合体化合物。

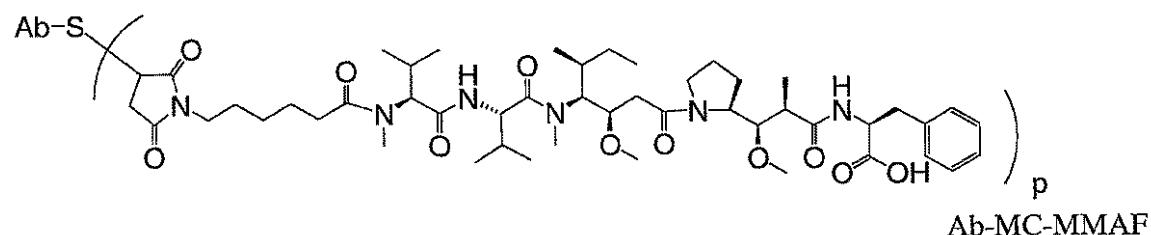
【請求項39】

50

構造：
【化 7】



および



から選択される請求項 20 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物であって、ここで、Val は、バリンであり；Cit は、シトルリンである、抗体 - 薬物結合体化合物。

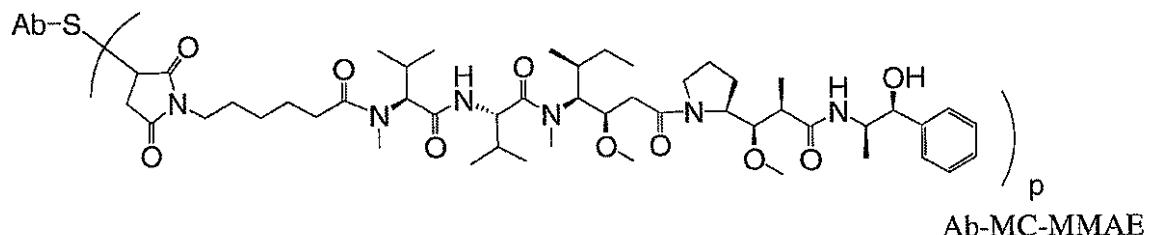
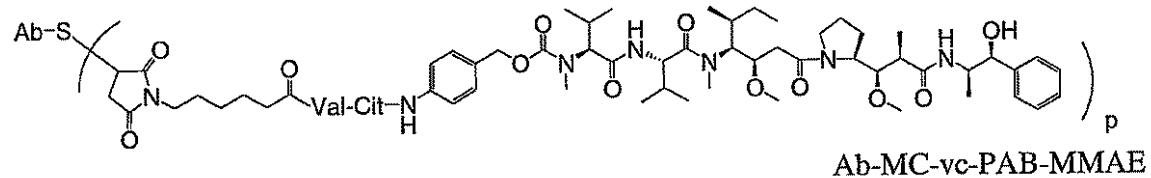
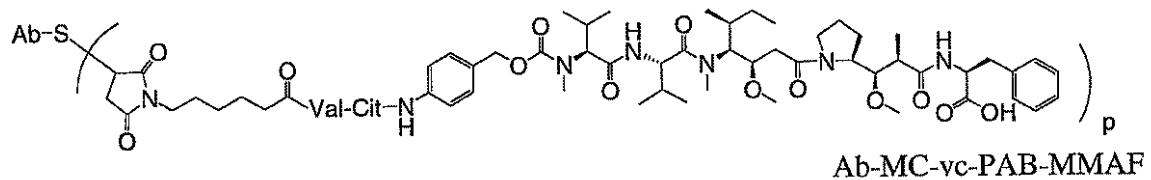
【請求項 40】

前記親抗体の重鎖の 121 位が遊離システインアミノ酸残基によって置換されている、請求項 20 に記載の抗体 - 薬物結合化合物。

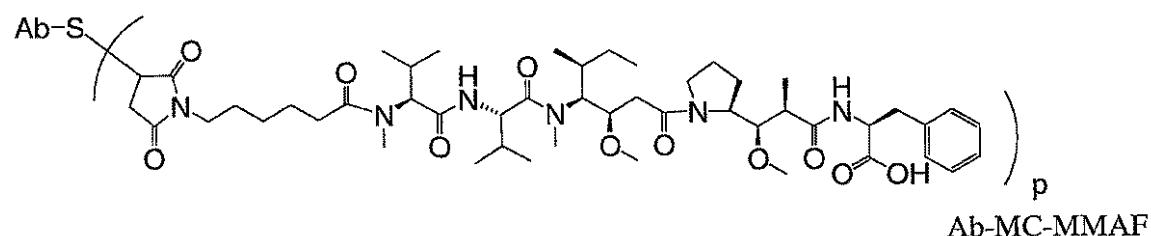
【請求項 4 1】

構造：

【化7-2】



および



から選択される抗体-薬物結合体化合物であって、ここで、Valは、バリンであり；Citは、シトルリンであり；pは、1、2、3、または4であり；そして、Abは、親抗体の一つ以上のアミノ酸残基を一つ以上の遊離システインアミノ酸によって置換する工程を包含するプロセスにより調製されるシステイン操作抗体であり、ここで、該親抗体は、抗原に選択的に結合し、該システイン操作抗体は、該親抗体と同じ抗原に選択的に結合し、該親抗体は、以下の配列：

【化8A】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPAPLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDITMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPQVYTLPPSREE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

を有する重鎖と、以下の配列：

【化8B】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
 RFSGSRSGTDFTLTISSIQLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKTVKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLT
 LSKADYEHKVKYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

50

を有する軽鎖とを含み、該親抗体の以下の位置：

重鎖の 40 位、88 位、119 位、121 位、122 位、175 位および 179 位、または、軽鎖の 15 位、43 位、110 位、144 位、153 位、168 位および 205 位のうち少なくとも一つが遊離システインアミノ酸残基によって置換されている、抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項 4 2】

癌の処置において使用するための、請求項 20 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物。

【請求項 4 3】

請求項 20 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩、および薬学的に受容可能な希釈液、キャリアまたは賦形剤を含む、薬学的組成物。

10

【請求項 4 4】

治療上有効量のさらなる化学療法剤をさらに含む、請求項 4 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 5】

請求項 20 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物、

容器、および

該化合物を使用して癌を処置し得ることを示している、添付文書またはラベルを備える、製品。

【請求項 4 6】

請求項 20 に記載の抗体 - 薬物結合体化合物を含む、癌の処置のための組成物。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

米国特許法施行規則 § 1.53 (b) の下で出願した本非仮出願は、2004 年 9 月 23 日に出願した米国仮出願第 60/612,468 号および 2005 年 6 月 30 日に出願した米国仮出願第 60/696,353 号の、米国特許法 § 119 (e) の下での利益を主張する。これらの仮出願のそれぞれは、それらの全体が本明細書中に参考として援用される。

【0002】

(発明の分野)

本発明は一般に、反応性システイン残基を用いて操作された抗体に関し、そしてより具体的には、治療適用または診断適用を有する抗体に関する。システイン操作抗体は、化学療法薬物、毒素、アフィニティーリガンド (例えは、ビオチン) および検出標識 (例えは、発蛍光団) と結合されていてもよい。本発明はまた、インビトロ、インサイチュ、および、インビボでの哺乳動物細胞または関連する病的状態の診断または処置のための抗体および抗体 - 薬物結合体化合物の使用方法に関する。

30

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

抗体療法は、癌を有する患者、免疫学的障害を有する患者および脈管由来障害を有する患者の標的化処置について確立されている。抗体を用いた癌の診断および処置の有効な細胞標的を見出す試みにおいて、研究者は、正常な非ガン細胞と比較して、癌細胞の表面に特異的に発現される、膜貫通ポリペプチドまたはさもなければ腫瘍関連ポリペチドを同定しようとした。このような腫瘍関連の細胞表面抗原ポリペチド、すなわち腫瘍関連抗原 (TAA) の同定は、抗体ベースの治療法を介した破壊について癌細胞を特異的に標的とする能力をもたらした。

40

【0004】

細胞傷害剤または細胞増殖抑制剤 (すなわち、癌の処置において腫瘍細胞を殺傷するかまたは阻害する薬物) の局所送達のための抗体 - 薬物結合体 (ADC) (すなわち、免疫結合体) の使用 (非特許文献 1 ; 非特許文献 2 ; 非特許文献 3 ; 非特許文献 4 ; 非特許文献 5 ; 特許文献 1) は、理論的には、腫瘍へと標的化された薬物部分の送達およびその中

50

での細胞内蓄積を可能にし、ここで、これらの非結合型薬剤の全身投与は、除去することが求められる腫瘍細胞のみならず、正常細胞にとっても容認できないレベルの毒性をもたらし得る（非特許文献6；非特許文献7）。最小の毒性を有する最大の効力は、このことにより求められる。ADCを設計して精密化する努力は、モノクローナル抗体(mAb)の選択性ならびに薬物連結特性および薬物放出特性に焦点を合わせている（非特許文献8）。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は両方とも、これらの戦略に役立つと報告された（非特許文献9）。これらの方法で使用される薬物としては、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサートおよびビンデシンが挙げられる（非特許文献19）。抗体-毒素結合体で使用される毒素としては、細菌毒素（例えば、ジフテリア毒素）、植物毒素（例えば、リシン）、低分子毒素（例えば、ゲルダナマイシン（gel dana mycin））（非特許文献10；非特許文献11；非特許文献12）、マイタンシノイド（maytansinoid）（特許文献2；非特許文献13）、およびカリケアマイシン（calicheamicin）（非特許文献14；非特許文献15）が挙げられる。毒素は、チューピュリン結合、DNA結合またはトポイソメラーゼ阻害を含む機構によって、それらの細胞傷害効果および細胞増殖抑制効果を発揮し得る。いくつかの細胞傷害性薬物は、大きな抗体またはタンパク質レセプターリガンドに結合させた場合に、不活性であるかまたは活性がより低い傾向がある。

【0005】

抗体-ラジオアイソトープ結合体が承認されている。ZEVALIN（登録商標）（イブリツモマブチウキセタン（ibritumomab tiuxetan）、Biogen / IDEC）は、正常Bリンパ球および悪性Bリンパ球の表面で見つかるCD20抗原に対するマウスIgG1モノクローナル抗体、ならびにチオ尿素リンカー-キレータによって連結された¹¹¹Inまたは⁹⁰Yラジオアイソトープから構成される（非特許文献16；非特許文献17；非特許文献18；非特許文献19）。ZEVALIN（登録商標）はB細胞非ホジキンリンパ腫（NHL）に対して活性を有するが、投与は、大部分の患者において重篤かつ長期にわたる血球減少症をもたらす。カリケアマイシン（calicheamicin）に連結されたhuCD33抗体から構成される抗体-薬物結合体であるMYLOTARGTM（ゲムツズマブオゾガミシン（gemtuzumab ozogamicin）、Wyeth Pharmaceuticals）は、注入による急性骨髄性白血病の処置に関して2000年に承認された（非特許文献20；特許文献3；特許文献4；特許文献5；特許文献6；特許文献7；特許文献8；特許文献9；特許文献10）。ジスルフィドリンカー-SPPを介してマイタンシノイド薬物部分DM1へと連結されたhuC242抗体から構成される抗体-薬物結合体であるカンツズマブメルタンシン（Cantuzumab mertansine）（Immunogen, Inc.）（非特許文献21）は、Cancerおよび他を発現する癌（例えば、結腸癌、肺腫瘍、胃癌など）の処置に関する第II相試験に進むところである。マイタンシノイド薬物部分DM1に連結された抗前立腺特異的膜抗原（PSMA）モノクローナル抗体から構成される抗体-薬物結合体であるMLN-2704（Millennium Pharm.、BZL Biologics、Immunogen Inc.）は、前立腺腫瘍の潜在的処置のために開発中である。

【0006】

ドラスタチン（dolastatin）（特許文献11）の合成アナログである、オーリスタチン（auristatin）ペプチド、オーリスタチンE（AE）およびモノメチルオーリスタチン（MMAE）は、以下に連結されている：（i）キメラモノクローナル抗体cBR96（癌腫上のルイスYに特異的）；（ii）血液学的悪性疾患におけるCD30に特異的であるcAC10（非特許文献22；非特許文献23；非特許文献24；特許文献12）；（iii）CD20を発現する癌および免疫障害の処置のための、抗CD20抗体（例えば、リツキサン（rituxan）、特許文献13）；（iv）結直腸癌の処置のための抗EpHB2R抗体2H9および抗IL-8（非特許文献25）；（v）Eセレクチン抗体（非特許文献26）；ならびに（vi）他の抗CD30抗体（特許文

献 14)。オーリスタチン E の改変体は、特許文献 15 および特許文献 16 に開示される。モノクローナル抗体に結合されたモノメチルオーリスタチン E は、非特許文献 27 に開示される。オーリスタチニアログ MMA E および MMA F は、さまざまな抗体に結合されている(特許文献 17)。

【0007】

共有結合を通して薬物部分を抗体に結合(すなわち、連結)する従来の手段は、一般に、薬物部分が抗体上の多くの部位に結合した不均質な分子の混合物をもたらす。例えば、細胞傷害性薬物は、代表的に、しばしば抗体の多数のリジン残基を通して抗体に結合されて、不均質な抗体-薬物結合体混合物を生じる。反応条件に依存して、不均質混合物は、代表的に、0 ~ 約 8 個またはそれより多くの結合した薬物部分を有する抗体分布を含む。
さらに、薬物部分対抗体の特定の整数比を有する結合体の各サブグループ内で、薬物部分が抗体上の様々な部位に結合しているのは、潜在的に不均質な混合物である。分析方法および調製方法は、結合体化反応から生じる不均質混合物中の抗体-薬物結合体種分子を分離して特徴付けるには不適切である。抗体は、しばしば多くの反応性官能基を有する、大きく、複雑でかつ構造的に多様な生体分子である。リンカー試薬および薬物-リンカー中間体とのそれらの反応性は、要因(例えば、pH、濃度、塩濃度および共溶媒)に依存する。さらに、多工程複合体化プロセスは、反応条件を制御し、反応物および中間体を特徴付けることが困難であることに起因して、非再現性であり得る。

10

【0008】

システインチオールは、pH 7 付近でプロトン化されて求核性が低い大部分のアミンとは異なり、中性の pH で反応性である。遊離チオール(RSH、スルフヒドリル)基は比較的反応性であるので、システイン残基を有するタンパク質はしばしば、ジスルフィド結合したオリゴマーとしてそれらの酸化形態で存在するかまたは内部で架橋したジスルフィド基を有する。細胞外タンパク質は、一般に、遊離チオールを有さない(非特許文献 28)。タンパク質中の遊離チオールの量は、標準的なエルマンアッセイにより見積もられ得る。免疫グロブリン M は、ジスルフィド連結されたペントマーの一例であり、一方、免疫グロブリン G は、サブユニットと一緒に結合している内部ジスルフィド架橋を有するタンパク質の一例である。このようなタンパク質において、試薬(例えば、ジチオトレイトル(DTT)またはセレノール(selenol)(非特許文献 29))を用いたジスルフィド結合の還元は、反応性遊離チオールを生成するために必要とされる。このアプローチは、抗体の三次構造および抗原結合特異性の喪失をもたらし得る。

20

【0009】

抗体システインチオール基は、一般に、求電子性の結合体化試薬に対して、抗体のアミン基またはヒドロキシル基よりも反応性である、すなわち、より求核性である。システイン残基は、リガンドに対する共有結合を形成するかまたは新規な分子内ジスルフィド結合を形成するために、遺伝子工学技術によってタンパク質に導入されている(非特許文献 30; 非特許文献 31; 非特許文献 32; 非特許文献 33; 非特許文献 34; 非特許文献 35; 特許文献 18)。しかしながら、システインアミノ酸に対するタンパク質の様々なアミノ酸残基の変異によるシステインチオール基の設計は、特に不対(遊離 Cys)残基または反応もしくは酸化のために比較的アクセス可能であるものの場合、潜在的に問題がある。タンパク質の濃縮溶液において、E. coli のペリプラズム、培養上清または部分的にもしくは完全に精製されたタンパク質中においてであろうと、タンパク質の表面上の不対の Cys 残基は、対になり得、そして酸化して分子間ジスルフィドを形成し得、それゆえ、タンパク質ダイマーまたはタンパク質マルチマーを形成し得る。ジスルフィドダイマー形成によって、新規な Cys は、薬物、リガンドまたは他の標識に対して結合体化に不活性になる。さらに、タンパク質が新しく操作されたシステインと既存の Cys 残基との間に分子内ジスルフィド結合を酸化的に形成する場合、両方の Cys 基は、活性部位の関与および相互作用に利用できない。さらに、このタンパク質は、誤った折畳みまたは三次構造の喪失によって、不活性にされ得るかまたは非特異的にされ得る(非特許文献 36)。

30

40

50

- 【特許文献 1】米国特許第 4 9 7 5 2 7 8 号明細書
 【特許文献 2】欧州特許出願公開第 1 3 9 1 2 1 3 号明細書
 【特許文献 3】米国特許第 4 9 7 0 1 9 8 号明細書
 【特許文献 4】米国特許第 5 0 7 9 2 3 3 号明細書
 【特許文献 5】米国特許第 5 5 8 5 0 8 9 号明細書
 【特許文献 6】米国特許第 5 6 0 6 0 4 0 号明細書
 【特許文献 7】米国特許第 5 6 9 3 7 6 2 号明細書
 【特許文献 8】米国特許第 5 7 3 9 1 1 6 号明細書
 【特許文献 9】米国特許第 5 7 6 7 2 8 5 号明細書
 【特許文献 10】米国特許第 5 7 7 3 0 0 1 号明細書 10
 【特許文献 11】国際公開第 0 2 / 0 8 8 1 7 2 号パンフレット
 【特許文献 12】米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 0 1 8 1 9 4 号明細書
 【特許文献 13】国際公開第 0 4 / 0 3 2 8 2 8 号パンフレット
 【特許文献 14】国際公開第 0 3 / 0 4 3 5 8 3 号パンフレット
 【特許文献 15】米国特許第 5 7 6 7 2 3 7 号明細書
 【特許文献 16】米国特許第 6 1 2 4 4 3 1 号明細書
 【特許文献 17】国際公開第 2 0 0 5 / 0 8 1 7 1 1 号パンフレット
 【特許文献 18】米国特許第 6 2 4 8 5 6 4 号明細書
 【非特許文献 1】Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5: 543 - 549 20
 【非特許文献 2】Wuら (2005) *Nature Biotechnology* 23 (9): 1137 - 1146
 【非特許文献 3】Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3: 207 - 212
 【非特許文献 4】Syrigos および Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605 - 614
 【非特許文献 5】Niculescu-Duvaz および Springer (1997) *Adv. Drug Del. Rev.* 26: 151 - 172
 【非特許文献 6】Baldwinら (1986) *Lancet* pp. (1986年3月15日): 603 - 05 30
 【非特許文献 7】Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pincherら (編), pp. 475 - 506
 【非特許文献 8】Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5: 543 - 549
 【非特許文献 9】Rowlandら (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183 - 87
 【非特許文献 10】Mandlerら (2000) *J. of the Nat. Cancer Inst.* 92 (19): 1573 - 1581 40
 【非特許文献 11】Mandlerら (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025 - 1028
 【非特許文献 12】Mandlerら (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 786 - 791
 【非特許文献 13】Liuら (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618 - 8623
 【非特許文献 14】Lodeら (1998) *Cancer Res.* 58: 2928
 【非特許文献 15】Hinmanら (1993) *Cancer Res.* 53: 3336 - 3342 50

- 【非特許文献 16】Wise manら(2000) Eur. J. Nucl. Med. 27(7):766-77
- 【非特許文献 17】Wise manら(2002) Blood 99(12):4336-42
- 【非特許文献 18】Witzigら(2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63
- 【非特許文献 19】Witzigら(2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69
- 【非特許文献 20】Drugs of the Future(2000) 25(7):686 10
- 【非特許文献 21】Xieら(2004) J. of Pharm. and Exp. Ther. 308(3):1073-1082
- 【非特許文献 22】Kluessmanら(2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773
- 【非特許文献 23】Doroninaら(2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784
- 【非特許文献 24】Franciscoら(2003) Blood 102(4):1458-1465
- 【非特許文献 25】Maoら(2004) Cancer Research 64(3):781-788 20
- 【非特許文献 26】Bhaskarら(2003) Cancer Res. 63:6387-6394
- 【非特許文献 27】Senterら, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623(2004年3月28日公開)
- 【非特許文献 28】Garman、1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, 55頁
- 【非特許文献 29】Singhら(2002) Anal. Biochem. 304:147-156 30
- 【非特許文献 30】Bettlerら(1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650
- 【非特許文献 31】Bernhardら(1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132
- 【非特許文献 32】Greenwoodら(1994) Therapeutic Immunology 1:247-255
- 【非特許文献 33】Tuら(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4862-4867
- 【非特許文献 34】Kannoら(2000) J. of Biotechnology, 76:207-214 40
- 【非特許文献 35】Chmuraら(2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484
- 【非特許文献 36】Zhangら(2002) Anal. Biochem. 311:1-9
- 【発明の開示】
- 【課題を解決するための手段】
- 【0010】
- (要旨)
- 本発明の化合物は、親抗体の一つ以上のアミノ酸が遊離システインアミノ酸と置き換えたシステイン操作抗体を含む。システイン操作抗体は、0.6~1.0の範囲のチオ 50

ール反応性値を有する一つ以上の遊離システインアミノ酸を含む。遊離システインアミノ酸は、親抗体において操作されていて、ジスルフィド架橋の一部ではない、システイン残基である。

【0011】

一つの局面では、このシステイン操作抗体は、以下を含むプロセスによって調製される：

- (a) 親抗体の一つ以上のアミノ酸残基をシステインによって置換する工程、および
- (b) システイン操作抗体をチオール反応性試薬と反応させることにより、システイン操作抗体のチオール反応性を決定する工程。

【0012】

このシステイン操作抗体は、チオール反応性試薬との反応性が親抗体よりも上であり得る。

【0013】

遊離システインアミノ酸残基は、重鎖もしくは軽鎖に、または定常ドメインもしくは可変ドメインに位置し得る。抗体フラグメント（例えば、F_{ab}b）はまた、抗体フラグメントのアミノ酸を置換する一つ以上のシステインアミノ酸を用いて操作されて、システイン操作抗体断片が形成され得る。

【0014】

本発明の別の局面は、システイン操作抗体を調製（作製）する方法を提供し、この方法は、以下を包含する：

- (a) 一つ以上のシステインアミノ酸を親抗体に導入して、システイン操作抗体を生成する工程；および
- (b) チオール反応性試薬とのシステイン操作抗体のチオール反応性を決定する工程；ここで、このシステイン操作抗体は、チオール反応性試薬との反応性が親抗体よりも高い。

【0015】

システイン操作抗体を調製する方法の工程（a）は、以下を包含し得る：

- (i) システイン操作抗体をコードする核酸配列に変異誘発する工程、
- (ii) このシステイン操作抗体を発現させる工程；および
- (iii) このシステイン操作抗体を単離および精製する工程。

【0016】

システイン操作抗体を調製する方法の工程（b）は、ファージまたはファージミド粒子から選択されるウイルス粒子上でシステイン操作抗体を発現させる工程を包含し得る。

【0017】

システイン操作抗体を調製する方法の工程（b）はまた、以下を包含し得る：

- (i) システイン操作抗体とチオール反応性親和性試薬とを反応させて、親和性標識されたシステイン操作抗体を生成する工程；および
- (ii) この親和性標識されたシステイン操作抗体の、捕捉媒体に対する結合を測定する工程。

【0018】

本発明の別の局面は、チオール反応性について、非常に反応性の不対システインアミノ酸を有するシステイン操作抗体をスクリーニングする方法であり、この方法は、以下を包含する：

- (a) 一つ以上のシステインアミノ酸を親抗体に導入してシステイン操作抗体を生成する工程；
- (b) このシステイン操作抗体をチオール反応性親和性試薬と反応させて、親和性標識されたシステイン操作抗体を生成する工程；および
- (c) この親和性標識されたシステイン操作抗体の、捕捉媒体に対する結合を測定する工程；および
- (d) チオール反応性試薬を用いてシステイン操作抗体のチオール反応性を決定する工

10

20

30

40

50

程。

【0019】

システイン操作抗体のスクリーニング方法の工程 (a) は、以下を包含し得る：

- (i) システイン操作抗体をコードする核酸配列に変異誘発する工程、
- (ii) このシステイン操作抗体を発現させる工程；および
- (iii) このシステイン操作抗体を単離および精製する工程。

【0020】

システイン操作抗体のスクリーニング方法の工程 (b) は、ファージまたはファージミド粒子から選択されるウイルス粒子上にシステイン操作抗体を発現させる工程を包含し得る。

10

【0021】

システイン操作抗体のスクリーニング方法の工程 (b) はまた、以下を包含し得る：

- (i) システイン操作抗体をチオール反応性親和性試薬と反応させて、親和性標識されたシステイン操作抗体を生成させる工程；および
- (ii) この親和性標識されたシステイン操作抗体の、捕捉媒体に対する結合を測定する工程。

【0022】

システイン操作抗体は、癌の処置に有用であり得、そして細胞表面および膜貫通レセプターに特異的な抗体および腫瘍関連抗原 (TAA) に特異的な抗体を包含する。このような抗体は、裸の抗体（薬物にも標識部分にも結合していない）として、または、式 I の抗体 - 薬物結合体 (ADC) として、用いられ得る。

20

【0023】

システイン操作抗体を調製して、スクリーニングするための方法の実施形態は、親抗体が抗体フラグメント（例えば、hu4D5Fabv8）である実施形態を包含する。親抗体はまた、アルブミン結合性ペプチド配列 (ABP) を含む融合タンパク質でもよい。親抗体はまた、huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7 および huMAb4D5-8（トラスツズマブ (trastuzumab)）から選択されるヒト化抗体でもよい。

【0024】

30

本発明のシステイン操作抗体は、チオール反応性試薬と部位特異的にかつ効率的に結合され得る。チオール反応性試薬は、多官能性リンカー試薬、捕捉標識試薬、発蛍光団試薬または薬物 - リンカー中間体であり得る。

【0025】

システイン操作抗体は、検出可能な標識で標識されてもよく、固相支持体に固定されてもよく、そして / または薬物部分と結合されてもよい。

【0026】

本発明の別の局面は、システイン操作抗体 (Ab) および薬物部分 (D) を含む、抗体 - 薬物結合体化合物である。ここで、このシステイン操作抗体は、リンカー部分 (L) によって一つ以上の遊離システインアミノ酸を通して D へと結合している；この化合物は、以下の式 I を有する：



ここで、p は 1、2、3、または 4 であり；このシステイン操作抗体は、親抗体の一つ以上のアミノ酸残基を一つ以上の遊離システインアミノ酸によって置換する工程を包含するプロセスにより調製される。薬物部分としては、マイタンシノイド、オーリスタチン、ドラスタチン、トリコテセン (trichothecene)、CC1065、カリケアマイシンおよび他のエンジイン (enediynes) 抗生物質、タキサン、アントラサイクリン、ならびにそれらの立体異性体、同配体、類似体または誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な薬物部分としては、DM1、MMAE および MMAF が挙げられる。

40

50

【0027】

式Iの抗体-薬物結合体は、アルブミン結合性ペプチド(ABP)配列をさらに含み得る；この化合物は、以下の式Iaを有する：



【0028】

本発明の別の局面は、システイン操作抗体またはシステイン操作抗体-薬物結合体、および生理的または薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む組成物である。治療用途のためのこの組成物は、無菌であり、そして凍結乾燥され得る。

【0029】

本発明の別の局面は、本明細書において開示される化合物および組成物の、診断用途および治療用途を包含する。薬学的組成物は、式Iの化合物と一つ以上の化学療法剤との組合せを含む。

10

【0030】

本発明の別の局面は、腫瘍細胞または癌細胞を殺傷するかまたは腫瘍細胞または癌細胞の増殖を阻害するための方法であり、この方法は、腫瘍細胞または癌細胞を殺傷するかまたは腫瘍細胞または癌細胞の増殖を阻害するために有効な量の本発明の抗体-薬物結合体または薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物でこの細胞を処理する工程を包含する。

【0031】

本発明の他の局面は、以下を処置するための方法を包含する：癌；自己免疫疾患；または感染性疾患。この方法は、その必要がある患者に、有効量の本発明の抗体-薬物結合体化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を投与する工程を包含する。

20

【0032】

本発明の別の局面は、哺乳類における癌の処置のための方法であり、ここで、この癌は、Erbbレセプターの過剰発現によって特徴付けられる。この哺乳類は、必要に応じて、結合していない抗Erbb抗体を用いた処置に応答しないかまたは不十分にしか応答しない。この方法は、治療上有効量の本発明の抗体-薬物結合体化合物をこの哺乳類に投与する工程を包含する。

【0033】

本発明の別の局面は、HER2レセプターおよびEGFRレセプターからなる群から選択される増殖因子レセプターを過剰発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、この方法は、この増殖因子レセプターに特異的に結合する抗体-薬物結合体化合物および化学療法剤を患者に投与する工程を包含し、ここで、この抗体-薬物結合体および化学療法剤は、患者における腫瘍細胞の増殖を阻害するのに有効な量において各々投与される。

30

【0034】

本発明の別の局面は、Erbb2レセプターの過剰発現によって特徴付けられる障害に感受性であるかまたはその障害であると診断されたヒト患者の処置のための方法であり、この方法は、有効量の組合せの抗体-薬物結合体化合物および化学療法剤を投与する工程を包含する。

【0035】

本発明の別の局面は、癌細胞の検出のためのアッセイ方法であり、この方法は、細胞を抗体-薬物結合体化合物に曝露する工程、およびこの細胞に対する抗体-薬物結合体化合物の結合の程度を決定する工程を包含する。

40

【0036】

本発明の別の局面は、抗体-薬物結合体化合物；容器；およびこの化合物を使用して癌を処置し得ることを示している添付文書またはラベルを備える製品である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0037】

(例示的な実施形態の詳細な説明)

ここで、本発明の特定の実施形態に対し、詳細な言及がなされる。特定の実施形態の例は、添付の構造および式において説明される。本発明は、列挙される実施形態に関連して

50

記載されるが、本発明をこれらの実施形態に限定することを意図しないことが、理解される。反対に、本発明は、特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲に含まれ得る、全ての代替物、改変および均等物を、網羅することが意図される。

【0038】

当業者は、本明細書中に記載の方法および材料と類似するかもしくは均等である多くの方法および材料を認識し、これら的方法および材料は、本発明の実施において使用され得る。本発明は、いかなる場合でも、記載される方法および材料に限定されない。

【0039】

そうでないことが規定されない限り、本明細書内で使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有し、以下と一致する：Singletonら(1994)Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 第2版, J. Wiley & Sons, New York, NY; およびJaneway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik(2001)Immunobiology, 第5版, Garland Publishing, New York。 10

【0040】

(定義)

他に言及されない限り、以下の用語および語句は、本明細書内で使用される場合、以下の意味を有することが意図される：

本明細書内で商品名が使用される場合、本出願人は、商品名の製品の処方物、ジェネリック医薬品およびこの商品名の製品の活性な薬学的成分を個々に包含することを意図する。 20

【0041】

用語「抗体」は、本明細書内で、最も広い意味で使用され、所望の生物学的活性を示す限り、特に、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ダイマー、マルチマー、多重特異的抗体(たとえば、二重特異的抗体)および抗体フラグメントを網羅する(Mille rら(2003)Jour. of Immunology 170:4854-4861)。抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、もしくはキメラ抗体であり得、または他の種から由来し得る。抗体は、免疫系によって產生されるタンパク質であり、特定の抗原を認識し、かつこの抗原に結合することが可能である(Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik(2001)Immunobiology, 第5版, Garland Publishing, New York)。標的抗原は、一般に、多くの結合部位(エピトープとも呼ばれる)を有し、多数の抗体におけるCDRによって認識される。異なるエピトープに特異的に結合する各抗体は、異なった構造を有する。したがって、1つの抗原は、1つより多くの対応する抗体を有し得る。抗体は、全長免疫グロブリン分子もしくは全長免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部位を含み、すなわち、目的の標的の抗原に免疫学特異的に結合する抗原結合部位を含む分子またはその一部であり、このような標的としては、癌細胞もしくは自己免疫疾患に関連する自己免疫抗体を產生する細胞が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書内で開示される免疫グロブリンは、免疫グロブリン分子の任意の型(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、およびIgA)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)、またはサブクラスの免疫グロブリンであり得る。免疫グロブリンは、任意の種に由来し得る。しかし、1つの局面において、免疫グロブリンは、ヒト起源、マウス起源、もしくはウサギ起源である。 30

【0042】

「抗体フラグメント」は、全長抗体の一部分(一般に、その抗原結合領域もしくは可変領域)を含む。抗体フラグメントの例としては、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、およびFvフラグメント；ディアボディー(diabody)；線状抗体；ミニボディー(minibody)(Olafsenら(2004)Protein Eng. Design & Sel. 17(4):315-323) 40

50

)、Fab発現ライブラリーによって產生されるフラグメント、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、CDR(相補性決定領域)、および癌抗原、ウイルス抗原もしくは微生物抗原に免疫特異的に結合する、上記のいずれかのエピトープ結合フラグメント、単鎖抗体分子；ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異的抗体が挙げられる。

【0043】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書中で使用される場合、実質的に均一な抗体の集団(すなわち、集団を構成する個々の抗体が、微量で存在し得る天然に起こる突然変異を除いては同一である集団)から得られる抗体をいう。モノクローナル抗体は、非常に特異的であり、1つの抗原部位に対して指向される。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対して指向される異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。その特異性に加え、モノクローナル抗体は、他の抗体よって夾雑されずに合成され得る点で、有利である。修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の產生を必要とすると解釈されない。例えば、本発明にしたがって使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら(1975)Nature 256:495によって最初に記載されたハイブリドーマ方法によって作製され得、または組換えDNA方法(例えば、US 4816567; US 5807715を参照)によって作製され得る。モノクローナル抗体はまた、例えばClacksonら(1991)Nature, 352:624-628; Marksら(1991)J. Mol. Biol., 222:581-597において記載される技術を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離され得る。10

【0044】

本明細書中のモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体を含み、ここで、重鎖および/もしくは軽鎖の一部分は、特定の種に由来する抗体または特定の抗体クラスもしくは抗体サブクラスに属する抗体における対応する配列と同一であるかもしくはこれと相同であり、一方、鎖の残りは、別の種に由来する抗体または別の抗体クラスもしくは抗体サブクラスに属する抗体ならびに所望の生物学的活性を示す限りこのような抗体のフラグメントにおける対応する配列と同一であるかもしくはこれと相同である(US 4816567; およびMorrisonら(1984)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855)。目的のキメラ抗体は、本明細書中で、非ヒト靈長類(例えば、旧世界ザル、類人猿など)に由来する可変ドメイン抗原結合配列およびヒト定常領域配列を含む「靈長類化(primateized)」抗体を含む。30

【0045】

「インタクトな抗体」は、本明細書中で、VLおよびVHドメイン、ならびに軽鎖定常ドメイン(CL)および重鎖定常ドメイン(CH1、CH2およびCH3)を含む抗体である。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)であってもよく、またはそのアミノ酸配列改变体であってもよい。インタクトな抗体は、1つもしくはそれより多くの「エフェクタ機能」を有し得、これは、抗体のFc定常領域(天然配列Fc領域もしくはアミノ酸配列改变体Fc領域)に起因し得る生物学的活性をいう。抗体エフェクタ機能の例としては、C1q結合；補体依存性細胞傷害；Fcレセプター結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)；食作用；および細胞表面レセプター(例えば、B細胞レセプターおよびBCR)のダウンレギュレーションが挙げられる。40

【0046】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、インタクトな抗体は、異なる「クラス」に割り当てられ得る。インタクトな免疫グロブリン抗体の5つの主要なクラスが存在する：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM。そして、これらのいくつかは、さらに「サブクラス」(アイソタイプ)(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、およびIgA2)に分類され得る。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、γ、δ、ε、α、およびμと呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および三次元立体配置は、周知である。Ig形態としては50

、ヒンジ改変形態 (hinge-modification) もしくはヒンジなし形態 (hingeless form) が挙げられる (Rouxら (1998) *J. Immunol.* 161: 4083-4090; Lundら (2000) *Eur. J. Biochem.* 267: 7246-7256; US 2005/0048572; US 2004/0229310)。

【0047】

「Erbbレセプター」は、Erbbレセプターファミリーに属するレセプタータンパク質チロシンキナーゼであり、このErbbレセプターファミリーのメンバーは、細胞増殖、細胞分化および細胞生存の重要なメディエータである。Erbbレセプターファミリーは、上皮細胞増殖因子レセプター (EGFR、Erbb1、HER1)、HER2 (Erbb2またはp185neu)、HER3 (Erbb3) およびHER4 (Erbb4またはtyro2) を含む、4つの異なったメンバーを含む。抗Erbb2抗体のパネルは、ヒト乳房腫瘍細胞株SKBR3を用いて性質決定されている (Hudziakら (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9 (3): 1165-1172)。最大阻害は、4D5と呼ばれる抗体によって得られ、これは、細胞増殖を56%阻害した。パネルにおける他の抗体は、このアッセイにおいて、細胞増殖を、より小さな程度で低減された。さらに、抗体4D5は、Erbb2過剰発現性乳房腫瘍細胞株を、TNF-αの細胞傷害性作用に対して感作することが見出された (US 5677171)。Hudziakらにおいて考察された抗Erbb2抗体は、Fendlyら (1990) *Cancer Research* 50: 1550-1558; Kotttsら (1990) *In Vitro* 26 (3): 59A; Sarupら (1991) *Growth Regulation* 1: 72-82; Shepardら, J. (1991) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 11 (3): 117-127; Kumarら (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11 (2): 979-986; Lewisら (1993) *Cancer Immunol. Immunother.* 37: 255-263; Pietrasら (1994) *Oncogene* 9: 1829-1838; Vitettaら (1994) *Cancer Research* 54: 5301-5309; Sliwkowskiら (1994) *J. Biol. Chem.* 269 (20): 14661-14665; Scottら (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 14300-5; D'souzaら, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91: 7202-7206; Lewisら (1996) *Cancer Research* 56: 1457-1465; およびSchaefterら (1997) *Oncogene* 15: 1385-1394においてさらに性質決定されている。

【0048】

Erbbレセプターは、一般に、Erbbリガンドに結合し得る細胞外ドメイン；脂肪親和性膜貫通ドメイン；保存的細胞内チロシンキナーゼドメイン；および幾つかのリン酸化され得るチロシン残基を有するカルボキシル末端シグナル伝達ドメインを含む。Erbbレセプターは、「天然配列」Erbbレセプターであっても、またはその「アミノ酸配列改変体」であってもよい。好ましくは、Erbbレセプターは、天然配列ヒトErbbレセプターである。したがって、「Erbbレセプターファミリーのメンバー」は、EGFR (Erbb1)、Erbb2、Erbb3、Erbb4または現在既知であるかもしれない将来同定される任意の他のErbbレセプターである。

【0049】

用語「Erbb1」、「上皮細胞増殖因子レセプター」、「EGFR」および「HER1」は、本明細書中で相互交換可能に使用され、例えばCarpenterら (1987) *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 881-914に記載されるようにEGFRと呼ばれ、その天然に存在する変異体形態を含む (例えば、Humphreyら (1990) *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 87: 4207-4211におけるような欠失変異体EGFR)。用語erbb1は、EGFRタンパク質産物をコードする遺伝子を意味する。HER1に対する抗体は、例えば、Murthyら (1987) 50

Arch. Biochem. Biophys., 252: 549 - 560 およびWO 95/25167において記載される。

【0050】

用語「ERRP」、「EGF-レセプター関連タンパク質」、「EGFR関連タンパク質」および「上皮細胞増殖因子レセプター関連タンパク質」は、本明細書中で相互交換可能に使用され、そして例えばUS 6399743および米国公開第2003/0096373号に開示されるように、ERRPと呼ばれる。

【0051】

表現「erbB2」および「HER2」は、本明細書中で相互交換可能に使用され、例えばSembalら(1985)Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 82: 6497-6501およびYamamotoら(1986)Nature, 319: 230-234 (Genebank登録番号X03363)に記載されるヒトHER2タンパク質をいう。用語「erbB2」は、ヒトerbB2をコードする遺伝子を意味し、そして「neu」は、ラットp185neuをコードする遺伝子を意味する。好ましいerbB2は、天然配列ヒトerbB2である。

【0052】

「erbB3」および「HER3」は、例えば米国特許第5183884号および同第5480968号ならびにKrausら(1989)Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 86: 9193-9197において開示されるようなレセプターポリペプチドを意味する。erbB3に対する抗体は、例えば、米国特許第5183884号、同第5480968号およびWO 97/35885におけるように、当該分野で公知である。

【0053】

用語「erbB4」および「HER4」は、本明細書中で、例えば、欧州特許出願第599,274号; Plowmanら(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1746-1750; およびPlowmanら(1993)Nature 366: 473-475において開示されるようなレセプターポリペプチドを意味し、例えば、WO 99/19488において開示されるように、そのイソ型を含む。HER4に対する抗体は、例えば、WO 02/18444において開示される。

【0054】

erbBレセプターに対する抗体は、多くの供給源(例えばSanta Cruz Biotechnology, Inc., California, USAが挙げられる)から購入可能である。

【0055】

用語「アミノ酸配列改変体」とは、天然配列ポリペプチドからある程度異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。通常、アミノ酸配列改変体は、天然erbBリガンドの少なくとも1つのレセプター結合ドメインもしくは天然erbBレセプターの少なくとも1つのリガンド結合ドメインと少なくとも約70%の配列同一性を有し、そしてこれらは、このようなレセプター結合ドメインもしくはリガンド結合ドメインと、好ましくは、少なくとも約80%、より好ましくは、少なくとも約90%、配列で相同である。アミノ酸配列改変体は、天然のアミノ酸配列のアミノ酸配列内の特定の位置において、置換、欠失および/または挿入を有する。アミノ酸は、慣用的名称、1文字コードもしくは3文字コードによって表される。

【0056】

「配列同一性」は、配列を並列させそして必要な場合に最大配列同一性百分率を達成するためギャップを挿入した後に、アミノ酸配列改変体における同一である残基の百分率によって規定される。アラインメントのための方法およびコンピュータープログラムは、当該分野で周知である。1つのこのようなコンピュータープログラムは、Genentech, Inc.によって作成された「Alignn2」であり、これは、1991年12月10日に、United States Copyright Office, Wash

10

20

30

40

50

ington, DC 20559 に使用者向け文書と共に提出されている。

【0057】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」および「ADCC」は、Fcレセプター(FcR)を発現する非特異的細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球およびマクロファージ)が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、その後標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性反応を意味する。ADCCを媒介する一次細胞であるNK細胞は、FcRIIIのみを発現するが、一方、単球は、FcRI、FcRIIおよびFcRIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現は、RavetchおよびKinet,(1991)「Annu. Rev. Immunol.」9:457-92の464頁の表3においてまとめられている。目的の分子のADCC活性を評価するために、(例えば、US 5500362およびUS 5821337において記載される)インビトロアッセイが、実施され得る。このようなアッセイのために有用なエフェクタ細胞としては、末梢血単核細胞(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。あるいは、またはさらに、目的の分子のADCC活性は、インビボで(例えば、Clynesら(1998)PROC. NAT. ACAD. SCI. (USA) (USA) 95:652-656において開示されるような動物モデルにおいて)評価され得る。

【0058】

「ヒトエフェクタ細胞」は、1つ以上の定常領域レセプター(FcR)を発現し、エフェクタ機能を果たす白血球である。好ましくは、この細胞は、少なくともFcRIIIを発現し、そしてADCCエフェクタ機能を果たす。ADCCを媒介するヒト白血球の例としては、末梢血単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞傷害性T細胞および好中球が挙げられ、PBMCおよびNK細胞が、好ましい。このエフェクタ細胞は、その天然の供給源から(例えば、本明細書中で開示されるように、血液もしくはPBMCから)単離され得る。

【0059】

用語「Fcレセプター」もしくは「FcR」は、抗体のFc定常領域に結合するレセプターを記載するために使用される。好ましいFcRは、天然配列ヒトFcRである。さらに、好ましいFcRは、IgG抗体に結合するFcR(レセプター)であり、そして、FcRIサブクラス、FcRIIサブクラス、およびFcRIIIサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変換体および選択的スプライシング形態を含む。FcRIIレセプターは、FcRIIA(「活性化レセプター」)およびFcRIIB(「阻害性レセプター」)を含み、その細胞質ドメインにおいて主に異なる、類似のアミノ酸配列を有する。活性化レセプターFcRIIAは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシンベース活性化モチーフ(ITAM)を含む。阻害性レセプターFcRIIBは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシンベース阻害モチーフ(ITIM)を含む(概説M. in Daron,「Annu. Rev. Immunol.」15:203-234(1997)を参照)。FcRは、RavetchおよびKinet,「Annu. Rev. Immunol.」, 9:457-92(1991); Capelら(1994)Immunomethods 4:25-34;ならびにde Haasら(1995)J. Lab. Clin. Med. 126:330-41において概説される。他のFcR(将来同定されるFcRを含む)は、本明細書中で用語「FcR」によって包含される。この用語はまた、新生児レセプターであるFcRnをも含み、これは、胎児への母性IgGの輸送を担う(Guyerら(1976)J. Immunol., 117:587およびKimら(1994)J. Immunol. 24:249)。

【0060】

「補体依存性細胞傷害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で分子が標的を溶解する能力をいう。補体活性化経路は、同系抗原と複合体化した分子(例えば、抗体)への補体系の第1成分の結合によって開始される。補体活性化を評価するため、CDCアッセイ(例えば、Gazzano-Santoroら, J. Immunol. Methods, 2

10

20

30

40

50

02:163(1996)において記載される)が実施され得る。

【0061】

「天然抗体」は、通常、約150,000ダルトンのヘテロテトラマー糖タンパク質であり、2つの同一な軽(L)鎖および2つの同一な重(H)鎖からなる。各軽鎖は、1つの共有結合性ジスルフィド結合によって重鎖に結合され、ここで、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンイソ型の重鎖の間で異なる。また、各重鎖および軽鎖は、一定間隔の鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一端において可変ドメイン(V_H)を有し、その後に多くの定常ドメインが続く。各軽鎖は、一端において可変ドメイン(V_L)を有し、そして他端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1定常ドメインと並列し、そして軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと並列する。特定のアミノ酸残基が、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間の境界面を形成すると考えられる。10

【0062】

用語「可変」とは、可変ドメインの特定の部分が、抗体の間で大規模に異なるという事実をいい、そして各特定の抗体のその特定の抗原に対する結合および特異性において使用される。しかし、可変性は、抗体の可変ドメインにわたって均等に分布しているわけではない。可変性は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインの両方における超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存されている部分は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、各々4つのFRを含み、おおむね -シート立体配置をとり、3つの超可変領域によって連結される。これらの超可変領域はループ連結を形成し、そしていくつかの場合においてはこの -シート構造の一部分を形成する。各鎖における超可変領域は、FRと非常に近接して、他の鎖由来の超可変領域と一緒に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接的に関与しないが、種々のエフェクタ機能(例えば、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)における抗体の関与)を示す。20

【0063】

用語「超可変領域」は、本明細書中で使用される場合、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は、一般に、「相補性決定領域」すなわち「CDR」由来のアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインにおける残基24~34(L1)、50~56(L2)および89~97(L3)ならびに重鎖可変ドメインにおける31~35(H1)、50~65(H2)および95~102(H3); Kabatら, 前出)および/または「超可変ループ」由来の残基(例えば、軽鎖可変ドメインにおける残基26~32(L1)、50~52(L2)および91~96(L3)ならびに重鎖可変ドメインにおける26~32(H1)、53~55(H2)および96~101(H3); ChothiaおよびLesk(1987)J. Mol. Biol., 196:901-917)を含む。「フレームワーク領域」残基すなわち「FR」残基は、本明細書中で規定される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。30

【0064】

抗体のパパイン消化は、各々单一の抗原結合部位を有する「Fab」フラグメントと呼ばれる2つの同一な抗原結合フラグメント、および残りの「Fc」フラグメント(この名前は、容易に結晶化するその能力を反映している)を产生する。ペプシン処理は、F(ab')₂フラグメントを生じ、これらは、2つの抗原結合部位を有し、そしてなお抗原と架橋可能である。

【0065】

「Fv」は、完全な抗原認識抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。この領域は、密接に非共有結合する1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインの40

ダイマーからなる。これは、各可変ドメインの3つの超可変領域が相互作用し、V_H - V_Lダイマーの表面上の抗原結合部位を規定する立体配置である。集合的に、6つの超可変領域が、抗体に抗原結合特異性を与える。しかし、1つの可変ドメイン（もしくは、抗原に特異的な3つの超可変領域しか含まないFvの半分）でさえも、抗原を認識しそして結合する能力を、完全な結合部位よりは低い親和性であるが、有する。

【0066】

また、Fabフラグメントは、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1定常ドメイン（CH1）を含む。Fab'フラグメントは、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端における、抗体ヒンジ領域由来の1つもしくはそれより多くのシステインを含む、数残基の付加によって、Fabと異なる。Fab'-SHは、本明細書中で、定常ドメインのシステイン残基が少なくとも1つの遊離のチオール基を保有するFab'についての表示である。Fab'2抗体フラグメントは、通常、一対のFab'フラグメントとして産生され、このフラグメントの間にヒンジシステインを有する。抗体フラグメントの他の化学的カッティングもまた、公知である。

【0067】

任意の脊椎動物種由来の抗体の「軽鎖」は、2つの明らかに異なった型のうちの1つに割り当てられる。これらの型は、カッパ（ κ ）およびラムダ（ λ ）と呼ばれ、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づく。

【0068】

「单鎖Fv」フラグメントすなわち「scFv」抗体フラグメントは、抗体のV_HドメインおよびV_Lドメインを含み、ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖で存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは、VHドメインとVLドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、このリンカーは、scFvが抗原結合のために所望の構造を形成することを可能にする。scFvの概説については、Plueckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113巻, RosenburgおよびMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 (1994)を参照。抗Erbb2抗体scFvフラグメントは、WO 93/16185; 米国特許第5571894号; および同第5587458号に記載される。

【0069】

用語「ディアボディー（diabody）」は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントをいい、このフラグメントは、同じポリペプチド鎖内に、可変軽鎖ドメイン（VL）に連結する可変軽鎖ドメイン（VH）を含む（VH - VL）。同じ鎖上の2つのドメインの間で対形成させるには短すぎるリンカーの使用によって、このドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対形成させられて、2つの抗原結合部位を生じる。ディアボディーは、例えば、EP 404,097; WO 93/11161; および Hollingerら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448においてより完全に記載される。

【0070】

非ヒト（例えば、げっ歯類）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を有するキメラ抗体である。ヒト化は、マウス抗原結合情報を、非免疫原性ヒト抗体アクセプタ（acceptor）へ移し、多くの治療的に有用な薬物を生じる方法である。ヒト化の方法は、一般に、全ての6つのマウス相補的決定領域（CDR）を、ヒト抗体フレームワーク上に移すことによって開始する（Jonesら, (1986) Nature 321: 522 - 525）。これらのCDRグラフト（CDR-graft ed）抗体は、一般に、抗原結合についてのその元の親和性を保持せず、実際、親和性は、多くの場合深刻に損なわれる。CDRに加えて、非ヒト抗体フレームワーク残基もまた、正しいCDR立体配置を維持するために組み込まれなければならない（Chothiaら (1989) Nature 342: 877）。グラフトしたCDRの構造的立体配置を支持するための、主要なマウスフレームワーク残基のヒトアクセプタへの移行は、抗原

10

20

30

40

50

結合および親和性を回復することが示されている (Riechmannら (1992) J. Mol. Biol. 224, 487-499; FooteおよびWinter, (1992) J. Mol. Biol. 224: 487-499; Prestaら (1993) J. Immunol. Methods 157: 4986-4995; およびPrestaら (2001) Thromb. Haemost. 85: 379-389)。ほとんどの部分について、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン (レシピエント抗体) であり、ここで、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラット、ウサギもしくは非ヒト靈長類のような非ヒト種 (ドナー抗体) の超可変領域と置き換える。いくつかの場合、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域 (FR) 残基は、対応する非ヒト残基と置き換える。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体もしくはドナー抗体において見出されない残基を含み得る。これらの改変は、さらに抗体性能を精錬するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、実質的に全ての少なくとも1つの、代表的には2つの可変ドメインを含み、ここで、全てのもしくは実質的に全ての超可変ループは非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、そして全てのもしくは実質的に全てのFRは、ヒト免疫グロブリン配列のFRである。ヒト化抗体は、必要に応じて、また、免疫グロブリン定常領域 (Fc)、代表的にはヒト免疫グロブリン定常領域 (Fc) の少なくとも一部分を含み得る。さらなる詳細については、US 6407213; Jonesら (1986) Nature, 321: 522-525; Riechmannら (1988) Nature 332: 323-329; およびPresta, (1992) Current Op. Struct. Biol., 2: 593-596を参照のこと。
10

【0071】

「遊離のシステインアミノ酸」は、親抗体内に操作されているチオール官能基を有し、かつ分子内ジスルフィド架橋もしくは分子間ジスルフィド架橋として対形成しない、システインアミノ酸残基をいう。

【0072】

用語「チオール反応性値」は、遊離のシステインアミノ酸の反応性の定量的性質決定をいう。チオール反応性値は、システイン操作された抗体における遊離のシステインアミノ酸の百分率であり、この抗体はチオール反応性試薬と反応し、そして最大値1に変換される。例えば、100%の収率でチオール反応性試薬 (例えば、ビオチン-マレイミド試薬) と反応してビオチン標識化抗体を形成する、システイン操作された抗体上の遊離のシステインアミノ酸は、1.0のチオール反応性値を有する。チオール反応性試薬と80%の収率で反応する、同じかもしくは異なる親抗体内に操作された別のシステインアミノ酸は、0.8のチオール反応性値を有する。チオール反応性試薬とまったく反応しない、同じかもしくは異なる親抗体内に操作された別のシステインアミノ酸は、0のチオール反応性値を有する。特定のシステインのチオール反応性値の決定は、ELISAアッセイ、質量分析、液体クロマトグラフィー、オートラジオグラフィー、または他の定量的分析試験によって実施される。
30

【0073】

「親抗体」は、1つもしくはそれより多くのアミノ酸残基が1つもしくはそれより多くのシステイン残基によって置換されているアミノ酸配列を含む抗体である。親抗体は、天然の配列もしくは野生型配列を含み得る。親抗体は、抗体の他の天然形態、野生型形態、もしくは改変形態に対し、事前に存在するアミノ酸配列改変 (例えば、付加、欠失および/もしくは置換) を有し得る。親抗体は、目的の標的抗原 (例えば、生物学的に重要なポリペプチド) に対して指向され得る。非ポリペプチド抗原 (例えば、腫瘍関連糖脂質抗原; US 5091178参照) に対して指向される抗体もまた、企図される。
40

【0074】

例示的な親抗体としては、細胞表面レセプターおよび膜貫通レセプターならびに腫瘍関連抗原 (TAA) に対する親和性および選択性を有する抗体が挙げられる。

【0075】

50

他の例示的な親抗体としては、限定されないが、以下から選択される抗体が挙げられる：抗エストロゲンレセプター抗体、抗プロゲステロンレセプター抗体、抗 p 5 3 抗体、抗 H E R - 2 / n e u 抗体、抗 E G F R 抗体、抗カテプシンD抗体、抗 B c l - 2 抗体、抗 E - カドヘリン抗体、抗 C A 1 2 5 抗体、抗 C A 1 5 - 3 抗体、抗 C A 1 9 - 9 抗体、抗 c - e r b B - 2 抗体、抗 P - 糖タンパク質抗体、抗 C E A 抗体、抗網膜芽細胞腫タンパク質抗体、抗 r a s 腫瘍性タンパク質抗体、抗 L e w i s X 抗体、抗 K i - 6 7 抗体、抗 P C N A 抗体、抗 C D 3 抗体、抗 C D 4 抗体、抗 C D 5 抗体、抗 C D 7 抗体、抗 C D 8 抗体、抗 C D 9 / p 2 4 抗体、抗 C D 1 0 抗体、抗 C D 1 1 c 抗体、抗 C D 1 3 抗体、抗 C D 1 4 抗体、抗 C D 1 5 抗体、抗 C D 1 9 抗体、抗 C D 2 0 抗体、抗 C D 2 2 抗体、抗 C D 2 3 抗体、抗 C D 3 0 抗体、抗 C D 3 1 抗体、抗 C D 3 3 抗体、抗 C D 3 4 抗体、抗 C D 3 5 抗体、抗 C D 3 8 抗体、抗 C D 4 1 抗体、抗 L C A / C D 4 5 抗体、抗 C D 4 5 R O 抗体、抗 C D 4 5 R A 抗体、抗 C D 3 9 抗体、抗 C D 1 0 0 抗体、抗 C D 9 5 / F a s 抗体、抗 C D 9 9 抗体、抗 C D 1 0 6 抗体、抗ユビキチン抗体、抗 C D 7 1 抗体、抗 c - m y c 抗体、抗サイトケラチン抗体、抗ビメンチン抗体、抗 H P V タンパク質 s 抗体、抗 軽鎖抗体、抗 軽鎖抗体、抗メラノソーム抗体、抗前立腺特異的抗原抗体、抗 S - 1 0 0 抗体、抗 抗原抗体、抗フィブリン抗体、抗ケラチン抗体および抗 T n - 抗原抗体。

【0076】

「単離された」抗体は、同定されており、かつ、その天然の環境の成分から、分離されそして / または回収されている抗体である。その天然の環境の夾雜成分は、この抗体についての診断的使用もしくは治療的使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモンおよび他のタンパク性溶質もしくは非タンパク性溶質が挙げられ得る。好ましい実施形態において、抗体は、(1) ローリー法によって決定される抗体の重量の 9 5 重量 % より多く、そして最も好ましくは 9 9 重量 % より多くなるまで、(2) スピニングカップシーケンエーター (spinning cup sequenator) の使用によって N 末端アミノ酸配列もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも 1 5 残基を得るために十分な程度、または(3) クーマシーブルー染色もしくは好ましくは銀染色を用いた還元条件もしくは非還元条件下の S D S - P A G E によって均質になるまで、精製される。単離された抗体は、組換え細胞内のインサイチュの抗体を含む。何故なら、この抗体の天然環境の少なくとも 1 種の成分が存在しないからである。しかし、通常は、単離された抗体は、少なくとも 1 回の精製工程によって調製される。

【0077】

分子標的もしくは目的の抗原 (例えば、E r b B 2 抗原) に「結合する」抗体は、抗体のこの抗原を発現する細胞の標的化において有用である。この抗体が E r b B 2 に結合する抗体である場合、通常、この抗体は、他の E r b B レセプターに対して優先的に E r b B 2 に結合し、そして E G F R 、 E r b B 3 もしくは E r b B 4 のような他のタンパク質と有意に交差反応しない抗体であり得る。このような実施形態において、これらの非 E r b B 2 タンパク質に対するこの抗体の結合 (例えば、内因性レセプターに対する細胞表面結合) の程度は、蛍光活性化細胞選別 (F A C S) 分析もしくは放射性免疫沈降法 (R I A) によって決定した場合に、 1 0 % 未満である。時々、抗 E r b B 2 抗体は、ラット n e u タンパク質と有意に交差反応しない (例えば、S c h e c t e r ら (1 9 8 4) N a t u r e 3 1 2 : 5 1 3 および D r e b i n ら (1 9 8 4) N a t u r e 3 1 2 : 5 4 5 - 5 4 8 において記載される) 。

【0078】

本発明によって包含される抗体についての分子標的としては、C D タンパク質およびそのリガンドが挙げられ、例えば以下であるが、これらに限定されない：(i) C D 3 、 C D 4 、 C D 8 、 C D 1 9 、 C D 2 0 、 C D 2 2 、 C D 3 4 、 C D 4 0 、 C D 7 9 (C D 7 9 a) 、および C D 7 9 (C D 7 9 b) ；(i i) E r b B レセプターファミリーのメンバー (例えば、E G F レセプター、H E R 2 レセプター、H E R 3 レセプターもしくは H E R 4 レセプター) ；(i i i) L F A - 1 、 M a c 1 、 p 1 5 0 , 9 5 、 V L A - 4 、 I C A M - 1 、 V C A M および v / インテグリンのような細胞接着分子であって

10

20

30

40

50

、これらのサブユニットもしくはサブユニットのいずれかを含む（例えば、抗CD11a抗体、抗CD18抗体もしくは抗CD11b抗体）；（iv）VEGFのような増殖因子；IgE；血液型抗原；f1k2/f1t3レセプター；肥満（OB）レセプター；mp1レセプター；CTLA-4；タンパク質C、BR3、c-met、組織因子、7など；ならびに（v）細胞表面腫瘍関連抗原および膜貫通腫瘍関連抗原（TAA）。

【0079】

そうでないことが示されない限り、用語「モノクローナル抗体4D5」は、マウス4D5抗体（ATCC CRL 10463）の抗原結合残基もしくはこの抗体に由来する抗原結合残基を有する抗体をいう。例えば、モノクローナル抗体4D5は、マウスモノクローナル抗体4D5もしくはその変体（例えば、ヒト化4D5）であり得る。例示的なヒト化4D5抗体としては、米国特許第5821337号のように、huMab4D5-1、huMab4D5-2、huMab4D5-3、huMab4D5-4、huMab4D5-5、huMab4D5-6、huMab4D5-7およびhuMab4D5-8（トラスツズマブ、HERCEPTIN（登録商標））が挙げられる。

10

【0080】

用語「処置する」もしくは「処置」は、被験体が、所望されない生理学的变化または疾患（例えば、癌の発症もしくは拡散）を予防されるかもしくは緩徐にされる（軽減される）、治療的処置および予防的（prophylactic）もしくは防衛的（preventative）手段の両方をいう。本発明の目的のために、有益であるかもしくは所望される臨床結果としては、症状の緩和、疾患の程度の軽減、疾患の安定化（すなわち、悪化しない）状態、疾患の進行を遅延させるかもしくは緩徐にすること、疾患状態の改善もしくは緩和、および（部分的もしくは完全な）寛解が挙げられるが、これらに限定されない（検出可能であるか検出不可能であるかにかかわらない）。「処置」はまた、処置を受けなかった場合の予測される生存と比較した場合の、生存の延長を意味し得る。処置を必要とする者としては、既にこの状態もしくは障害を有する者、ならびにこの状態もしくは障害が予防されるべきである場合この状態もしくは障害に罹りやすい者が挙げられる。

20

【0081】

用語「治療的に有効な量」は、哺乳動物において疾患もしくは障害を処置するために有効な薬物の量をいう。癌の場合、薬物の治療的に有効な量は、癌細胞の数を減少させ得；腫瘍サイズを縮小させ得；末梢器官への癌細胞浸潤を阻害し得（すなわち、ある程度遅らせ、そして好ましくは停止させる）；腫瘍転移を阻害し得（すなわち、ある程度遅らせ、そして好ましくは停止させる）；ある程度腫瘍増殖を阻害し得；そして/または癌に関連する1つもしくはそれより多くの症状をある程度軽減し得る。薬物が存在する癌細胞の増殖を予防し得る程度および/または存在する癌細胞を殺傷する程度は、細胞増殖抑制性および/または細胞傷害性であり得る。癌治療について、効力は、例えば、疾患進行の時間（TTT）を評価することおよび/または反応速度（RR）を決定することによって測定され得る。

30

【0082】

用語「バイオアベイラビリティー」は、患者に投与される所定の量の薬物の全身的（すなわち、血液/血漿レベル）利用能をいう。バイオアベイラビリティーは、投与された投薬形態から全身循環に到達する薬物の時間（速度）および総量（程度）の両方の測定値を示す、定数項である。

40

【0083】

用語「癌」および「癌性」は、代表的に、調節されていない細胞増殖によって性質決定される哺乳動物における生理学的条件を意味するか、またはこれを説明する。「腫瘍」は、1つ以上の癌性細胞を含む。癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫および白血病もしくはリンパ性悪性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。このような癌のより詳細な例としては、扁平上皮癌（例えば、上皮（epithelial）扁平上皮細胞癌）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌（「NSCLC」）、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌腫を含む肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸の癌を含む胃癌（gastric cancer）

50

er) すなわち胃癌 (stomach cancer)、膵臓癌、多形性グリア芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーム、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌腫もしくは子宮癌腫、唾液腺癌腫、腎臓癌 (kidney cancer) もしくは腎臓癌 (renal cancer)、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、陰茎癌腫、ならびに頭部の癌もしくは頸部の癌が挙げられる。

【0084】

「Erbbを発現する癌」は、その細胞表面に存在するErbbタンパク質を有する細胞を含む癌である。「Erbb2を発現する癌」は、抗Erbb2抗体がErbb2に結合し得、そしてこの癌に対する治療的効果を有し得るような、その細胞の表面において十分なレベルのErbb2を産生する癌である。

10

【0085】

抗原性レセプターを「過剰発現する」癌は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して、その細胞表面において有意により高いレベルの抗原性レセプター（例えば、Erbb2）を有する癌である。このような過剰発現は、遺伝子増幅によって引き起こされ得るか、または転写もしくは翻訳の増大によって引き起こされ得る。レセプター過剰発現は、細胞の表面上に存在するレセプタータンパク質の増大したレベルを評価することによる、診断アッセイまたは予後診断アッセイにおいて（例えば、免疫組織化学アッセイ；IHCを介して）決定され得る。あるいは、またはさらに、細胞におけるレセプターをコードする核酸のレベルを、例えば蛍光インサイチューハイブリダイゼーション技術（FISH；WO 98/45479を参照）、サザンブロッティング技術もしくは実時間定量的PCR（RT-PCR）のようなポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術を介して測定し得る。

20

【0086】

Erbb2（HER2）を過剰発現する腫瘍は、細胞あたりに発現されるHER2分子の数に対応し、生物化学的に決定され得る免疫組織化学スコアによってランク付けされる：0 = 0 ~ 10, 000 コピー / 細胞、1+ = 少なくとも約 200, 000 コピー / 細胞、2+ = 少なくとも約 500, 000 コピー / 細胞、3+ = 約 1 ~ 2 × 10⁶ コピー / 細胞。チロシンキナーゼのリガンド依存的活性化をもたらす3+レベルでのHER2の過剰発現（Hudziakら（1987）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 7159 - 7163）は、乳癌の約30%で生じ、そしてこれらの患者において、無再発性の生存および生存全体が減少する（Slamonら（1989）Science, 244: 707 - 712; Slamonら（1987）Science, 235: 177 - 182）。

30

【0087】

「細胞傷害性薬剤」は、本明細書中で使用される場合、細胞の機能を阻害するもしくは妨げる物質および/または細胞の破壊を引き起こす物質をいう。この用語は、放射性同位体（例えば、²¹¹At、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁵³Sr、²¹²Bi、³²P、⁶⁰C、およびLuの放射性同位体）、化学療法剤および毒素を含むことが意図され、この毒素は、例えば、細菌起源、真菌起源、植物起源もしくは動物起源の低分子毒素または酵素学的に活性な毒素であり、その合成アナログもしくは誘導体を含む。

40

【0088】

本明細書中で「自己免疫疾患」は、個々の自己の組織もしくは器官から生じ、そして組織もしくは器官に対して生じる疾患もしくは障害であるか、あるいはそのコ-セグリゲート（co-segregate）もしくは発現、またはそれから生じる状態である。多くのこれらの自己免疫障害および炎症性障害において、多くの臨床マーカーおよび研究室マーカーが存在し得、これらとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：高ガンマグロブリン血症、高レベルの自己抗体、組織中に堆積する抗原-抗体複合体、コルチコステロイドもしくは免疫抑制性処置からの利益、および罹患した組織におけるリンパ球凝集。B細胞媒介型自己免疫疾患に関するいかなる1つの理論にも限定されることなく、B細胞は、ヒト自己免疫疾患において、多数の機構的経路（自己抗体産生、免疫複合体形

50

成、樹状細胞活性化およびT細胞活性化、サイトカイン合成、直接的ケモカイン放出ならびに異所性新リンパ球生成 (neo-lymphogenesis) のための病巣の提供)を介して病原性作用を示すと考えられている。これらの経路の各々は、自己免疫疾患の病理学において、異なった程度で関与し得る。自己免疫疾患は、器官特異的疾患(すなわち、この免疫応答は、内分泌系、造血系、皮膚、心肺系、胃腸系および肝臓系、腎臓系、甲状腺系、耳系、神経筋計、中枢神経系などの1つの器官系に特異的に向けられている)であり得るか、または多数の器官系に影響し得る全身性疾患(例えば、全身性紅斑性狼瘡(SLE)、慢性関節リウマチ、多発性筋炎など)であり得る。

【0089】

用語「細胞増殖抑制性」は、細胞の機能を限定する作用をいい、たとえば、細胞成長もしくは細胞の増殖を限定する作用をいう。 10

【0090】

「化学療法剤」は、癌の処置において有用な化合物である。化学療法剤の例としては、エルロチニブ(Erlotinib)(TARCEVA(登録商標)、Genentech/OSI Pharm.)、ボルデゾミブ(Bortezomib)(VELCADE(登録商標)、Millenium Pharm.)、フルベストラント(Fulvestrant)(FASLODEX(登録商標)、Astrazeneca)、ステント(Sutent)(SU11248、Pfizer)、レトロゾール(Letrozole)(FEMARA(登録商標)、Novartis)、イマチニブメシレート(Imatinib mesylate)(GLEEVEC(登録商標)、Novartis)、PTK787/ZK 222584(Novartis)、オキサリプラチン(Eloxatin(登録商標)、Sanofi)、5-FU(5-フルオロウラシル)、ロイコボリン、ラパマイシン(Sirolimus、RAPAMUNE(登録商標)、Wyeth)、ラパチニブ(Lapatinib)(GSK572016、GlaxoSmithKline)、ロナファルニブ(Lonafarnib)(SCH 66336)、ソラフェニブ(Sorafenib)(BAY43-9006、Bayer Labs.)、およびゲフィチニブ(IRESSA(登録商標)、Astrazeneca)、AG1478、AG1571(SU 5271; Sugen)、チオテバおよびCYTOXAN(登録商標)シクロホスファミドのようなアルキル化剤；ブスルファン、イムプロスルファンおよびピポスルファンのようなアルキルスルホン酸塩；ベンゾドパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドパ(meturedopa)、およびウレドパ(uredopa)のようなアジリジン；エチレンイミンおよびアルトレタミンを含むメチラメラミン(methylameline)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロメラミン；アセトゲニン(acetogenin)(特にプラタシン(bullatacin)およびプラタシノン(bullatacinone))；カンプトテシン(合成アナログであるトボテカンを含む)；ブリオスタチン(bryostatin)；カリスタチン(callystatin)；CC-1065(そのアドゼレシン(adozelesin)、カルゼレシン(carzelesin)およびビゼレシン(bizelesin)の合成アナログを含む)；クリプトフィシン(cryptophycin)(特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8)；ドラスタチン(dolastatin)；デュオカルマイシン(duocarmycin)(合成アナログであるKW-2189およびCB1-TM1を含む)；エレウテロビン(eleutherobin)；パンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコジクチン(sarcodictyin)；スpongiastatin；クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムチン、イホスファミド、メクロレクタミン、酸化メクロレクタミン塩酸塩(mechlorethamine oxide hydrochloride)、メルファラン、ノベンビシン(novembichin)、フェネステリン(phene斯特ine)、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスターDのようなナイトロジエンマスターD；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニ

20

30

40

50

ムスチン、およびラニムスチンのようなニトロソ尿素 (nitrosurea) ; エネジイン (enediyne) 抗生物質 (例えば、カリケアマイシン (calicheamicin)、特にカリケアマイシン I I およびカリケアマイシン I I (Angew Chem Int'l. Ed. Engl. (1994) 33: 183 - 186) のような抗生物質; ダイネマイシン A (dynamicin A) を含むダイネマイシン; クロドネートのようなビスホスホネート; エスペラミシン (esperamicin); ならびにネオカルチノスタチン発色団および関連の色素タンパク質エネジイン抗生発色団)、アクラシノマイシン (aclacinomycin)、アクチノマイシン、アントラマイシン (anthramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン (carabacin)、カルミノマイシン (carminomycin)、カルチノフィリン、クロモミシニス (chromomycinis)、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン (detorubicin)、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ADR I A M Y C I N (登録商標) ドキソルビシン (モルホリノ - ドキソルビシン、シアノモルホリノ - ドキソルビシン、2 - ピロリノ - ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン (marcellomycin)、マイトイマイシン C のようなマイトイマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、プロマイシン、ケラマイシン (quealamycin)、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾトシン、ツベルシジン (tubeacidin)、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン; メトレキサートおよび 5 - フルオロウラシル (5 - FU) のような代謝拮抗物質; デノプテリン (denopterin)、メトレキサート、ブテロプテリン、トリメトレキサートのような葉酸アナログ; フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリンアナログ; アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジンのようなピリミジンアナログ; カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンのようなアンドロゲン; アミノグルテチミド、ミトテン、トリロスタンのような抗副腎薬 (anti - adrenal); フロリン酸 (frolinic acid) のような葉酸補充薬; アセグラトン; アルドホスファミドグリコシド (aldophosphamide glycoside); アミノレブリン酸; エニルウラシル (eniluracil); アムサクリン; ベストラブシル (bestrabil); ビサントレン (bisantrene); エダトラキサート (edatraxate); デフォファミド (defofamine); デメコルシン; ジアジコン (diaziquone); エルホルニチン (elfornithine); 酢酸エリプチニウム (elliptinium acetate); エポチロン (epothilone); エトグルシド (etoglucid); 硝酸ガリウム; ヒドロキシ尿素; レンチナン; ロニダイニン (lonidainine); マイタンシン (maytansine) およびアンサマイトイシン (ansamitocins) のようなメイタンシノイド (maytansinoid); ミトグアゾン; ミトキサントロン; モピダンモール (mopidanol); ニトラエリン (nitraerine); ペントスタチン; フェナメット (phenamet); ピラルビシン; ロソキサントロン (losoxanthrone); ポドフィリン酸 (podophyllinic acid); 2 - エチルヒドラジン; プロカルバジン; PSK (登録商標) 多糖類複合体 (JHS Natural Products, Eugene, OR); ラゾキサン; リゾキシン (rhizoxin); シゾフィラン; スピロゲルマニウム; テヌアゾン酸; トリアジコン; 2, 2', 2" - トリクロロトリエチルアミン; トリコテセン (trichothecene) (特に T - 2 毒素である、ベラクリン A (verrucarin A)、ロリジン (roridin A) およびアングイジン (anguidine)); ウレタン; ビンデシン; ダカルバジン; マンノムスチン; ミトブリニトール; ミトラクトール; ピポブロマン; ガシトシン (gacytosine); アラビノシド (「Ara - C」); シクロホスファミド; チオ

テパ；タキソイド(taxoid)、例えば、TAXOL(登録商標)パクリタキセル(Bristol - Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、ABRAXANETM Cremophor[®]非含有、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子処方物(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、およびTAXOTERE(登録商標)ドセタキセル(Rhone - Poulen Rorer, Antony, France)；クロラムブシル(chlorambucil)；GEMZAR(登録商標)ゲムシタビン；6 - チオグアニン；メルカブトプリン；メトトレキサート；シスプラチニンおよびカルボプラチニンのような白金アナログ；ビンプラスチニン；白金；エトポシド(VP - 16)；イホスファミド；ミトザントロン；ビンクリスチニン；NAVELBINE(登録商標)ビノレルビン；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノブテリン；ゼローダ；イバンドロネート(ibandronate)；CPT - 11；トポイソメラーゼインヒビター RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチニン(difluoromethylhydronathine) (DMFO)；レチノイン酸のようなレチノイド；カペシタビン；および上記のいずれかの薬学的に受容可能な塩、酸もしくは誘導体。

【 0091 】

この「化学療法剤」の定義にはまた、以下も含まれる：(i) 抗エストロゲンおよび選択的エストロゲンレセプター調節因子(SERM)のような、腫瘍におけるホルモン作用を調節するかもしくは阻害する抗ホルモン剤(例えば、タモキシフェン(NOLVADEX (登録商標) タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン、ドロキシフェン、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン(keoxifene)、LY 117018、オナプリストン、およびFARESTON・トレミフェンが挙げられる)；(ii) 副腎においてエストロゲン産生を調節する酵素であるアロマターゼを阻害するアロマターゼインヒビター、例えば、4(5) - イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE (登録商標) 酢酸メゲストロール、AROMASIN (登録商標) エキセメスタン、ホルメスター(formestane)、ファドロゾール、RIVVISOR (登録商標) ボロゾール(vorozole)、FEMARA (登録商標) レトロゾール(letrozole)、andARIMIDE (登録商標) アナストロゾール；(iii) フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンのような抗アンドロゲン；ならびにトロキサシタビン(troxacitabine) (1,3 - デオキソランヌクレオシドシトシンアナログ)；(iv) アロマターゼインヒビター；(v) プロテインキナーゼインヒビター；(vi) 脂質キナーゼインヒビター；(vii) アンチセンスオリゴヌクレオチド、非接着性(abherent) 細胞増殖に関与するシグナル伝達経路における遺伝子発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、PKC - 、Ralf およびH - Ras；(viii) リボザイム、例えばVEGF発現インヒビター(例えば、ANGIOZYME (登録商標) リボザイム) およびHER2発現インヒビター；(ix) ワクチン、例えば、遺伝子治療ワクチン、例えば、ALLOVECTIN (登録商標) ワクチン、LEUVECTIN (登録商標) ワクチン、およびVAXID (登録商標) ワクチン；PROLEUKIN (登録商標) rIL - 2；LURTOTECAN (登録商標) トポイソメラーゼ1インヒビター；ABARELIX (登録商標) rmRH；(x) 抗脈管形成剤、例えばベバシズマブ(bevacizumab) (AVASTIN (登録商標) 、Genentech)；ならびに(xi) 上記のいずれかの薬学的に受容可能な塩もしくは誘導体。

【 0092 】

本明細書中で使用される場合、用語「EGFR標的化薬物」は、EGFRに結合し、必要に応じて、EGFR活性化を阻害する治療剤をいう。このような薬剤の例としては、EGFRに結合する抗体および低分子が挙げられる。EGFRに結合する抗体の例としては、MAb 579 (ATCC CRL HB 8506)、MAb 455 (ATCC CRL HB 8507)、MAb 225 (ATCC CRL 8508)、MAb 5

28 (ATCC CRL 8509) (US 4943533, Mendelsohnらを参照) およびそれらの変形体、例えばキメラ化225 (C225もしくはCetuximab; ERBITUX (登録商標)) および再成形(reshaped)ヒト225 (H225) (WO 96/40210, Imclone Systems Inc. を参照); II型変異体EGFRに結合する抗体 (米国特許第5,212,290号); US 5891996に記載のEGFRに結合するヒト化抗体およびキメラ抗体; ならびにABX-EGF (WO 98/50433, Abgenixを参照) のようなEGFRに結合するヒト抗体が挙げられる。抗EGFR抗体は、細胞傷害性薬剤と結合体化され得、それによって免疫結合体を產生し得る (例えば、EP 659,439A2, Merck Patent GmbHを参照)。EGFRに結合する低分子の例としては、ZD1839もしくはゲフィチニブ (IRESSATM; AstraZeneca)、エルロチニブHC1 (Erlotinib HC1) (CP-358774, TARCEVATM; Genentech/OSI) およびAG1478、AG1571 (SU 5271; Sugen) が挙げられる。

【0093】

プロテインキナーゼインヒビターとしては、チロシンキナーゼのチロシンキナーゼ活性をある程度阻害するチロシンキナーゼインヒビター (例えばErbBレセプター) が挙げられる。このようなインヒビターの例としては、上の段落に記載したEGFR標的化薬物、ならびにPD-153035、4-(3-クロロアニリノ)キナゾリンのようなキナゾリン、ピリドピリミジン、ピリミドピリミジン、ピロロピリミジン (例えばCGP 59326、CGP 60261およびCGP 62706)、およびピラゾロピリミジン、4-(フェニルアミノ)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン、クルクミン (ジフェルロイルメタン (diferuloyl methane)、4,5-ビス (4-フルオロアニリノ)フタルイミド)、ニトロチオフェン部分を含むチルホスフィン (tryphostine); PD-0183805 (Warner-Lambert); アンチセンス分子 (例えば、ErbBをコードする核酸に結合するアンチセンス分子); キノキサリン (US 5804396); tryphostins (US 5804396); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); CI-1033 (Pfizer) のようなpan-ErbBインヒビター; アフィニタック (Affinitac) (ISIS 3521; Isis/Lilly); イマチニブメシレート (Imatinib mesylate) (Gleevec; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); セマキサニブ (Semaxanib) (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); もしくは以下の特許公開のいずれかに記載されるものが挙げられる: WO 99/09016 (American Cyanamid); WO 98/43960 (American Cyanamid); WO 97/38983 (Warner Lambert); WO 99/06378 (Warner Lambert); WO 96/30347 (Pfizer, Inc); WO 96/33978 (Zeneca); WO 96/3397 (Zeneca); およびWO 96/33980 (Zeneca)。

【0094】

「抗脈管形成剤」とは、血管の発達をある程度遮断するかもしくは妨害する化合物である。抗脈管形成因子は、例えば、脈管形成の促進に関与する増殖因子もしくは増殖因子レセプターに結合する低分子もしくは抗体であり得る。本明細書中で好ましい抗脈管形成因子は、脈管内皮増殖因子 (VEGF) に結合する抗体である。

【0095】

用語「サイトカイン」は、1つの細胞集団によって放出されるタンパク質であって、別の細胞上で細胞間メディエータとして作用するタンパク質についての総称である。このよ

10

20

30

40

50

うなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカインおよび従来のポリペプチドホルモンである。サイトカインには、以下が含まれる：ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモンのような成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；卵胞刺激ホルモン（F S H）、甲状腺刺激ホルモン（T S H）および黄体化ホルモン（L H）のような糖タンパク質ホルモン；肝性増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン腫瘍壞死因子- および腫瘍壞死因子- ；ミュラー阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；脈管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン（T P O）；N G F - のような神経増殖因子；血小板増殖因子；T G F - およびT G F - のようなトランスホーミング増殖因子（T G F）；インスリン様増殖因子- I およびインスリン様増殖因子- I I ；エリトロポイエチン（E P O）；骨誘導性因子；インターフェロン- 、インターフェロン- 、およびインターフェロン- のようなインターフェロン；マクロファージ- C S F (M - C S F)、顆粒球マクロファージC S F (G M - C S F) および顆粒球- C S F (G - C S F) のようなコロニー刺激因子（C S F）；I L - 1、I L - 1 、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 1 0、I L - 1 1、I L - 1 2 のようなインターロイキン（I L）；T N F - もしくはT N F - のような腫瘍壞死因子；およびL I F およびk i t リガンド（K L）を含む他のポリペプチド因子。本明細書中で使用される場合、用語サイトカインは、天然供給源由来もしくは組換え細胞培養物由来のタンパク質、および天然配列サイトカインの生物学的に活性な等価物を含む。

10

20

【0096】

用語「プロドラッグ」は、本出願中で使用される場合、親薬物と比較して腫瘍細胞に対してより細胞傷害性が低く、そして酵素的にもしくは加水分解的に活性化されるかまたはより活性な親形態に変換される、薬学的に活性な物質の前駆体もしくは誘導体の形態をいう。例えば、W i l l m a n , 「P r o d r u g s i n C a n c e r C h e m o t h e r a p y」B i o c h e m i c a l S o c i e t y T r a n s a c t i o n s , 1 4 , p p . 3 7 5 - 3 8 2 , 第615回M e e t i n g B e l f a s t (1 9 8 6) およびS t e l l a ら「P r o d r u g s : A C h e m i c a l A p p r o a c h t o T a r g e t e d D r u g D e l i v e r y」, D i r e c t e d D r u g D e l i v e r y , B o r c h a r d t ら(編) , p p . 2 4 7 - 2 6 7 , H u m a n a

30

P r e s s (1 9 8 5) を参照のこと。本発明のプロドラッグとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：リン酸塩含有プロドラッグ、チオリン酸塩含有プロドラッグ、硫酸塩含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D - アミノ酸改変プロドラッグ、糖化プロドラッグ、- ラクタム含有プロドラッグ、必要に応じて置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグまたは必要に応じて置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5 - フルオロシトシンおよび他の5 - フルオロウリジンプロドラッグであり、これらは、より活性な細胞傷害性の遊離の薬物に変換され得る。本発明における使用のためにプロドラッグ形態に誘導体化され得る細胞傷害性薬物の例としては、上記の化学療法剤が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0097】

40

「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質および/または界面活性剤から構成される小さな小胞であり、哺乳動物への薬物（例えば、本明細書中で開示される抗E r b B 2抗体、および必要に応じて化学療法剤）の送達のために有用である。リポソームの成分は、一般に、生体膜の脂質配置と類似した二層構造に配置される。

【0098】

用語「パッケージ挿入物」は、通例、このような治療用製品の使用に関する効能、用法、用量、投与、禁忌および/または警告についての情報を含む、市販の治療用製品のパッケージに含まれる指示書をいうように使用される。

【0099】

「ファージディスプレイ」は、改変体ポリペプチドがファージ（例えば、纖維状ファ-

50

ジ、粒子)表面上の融合タンパク質として提示される技術である。ファージディスプレイの1つの有用性は、無作為化したタンパク質改変体の大きなライブラリーが、標的分子に高親和性で結合する配列について、迅速かつ効率的に選別され得るという事実に基づく。ファージ上におけるペプチドおよびタンパク質のライブラリーのディスプレイは、特異的結合特性を有するポリペプチドについて何百ものポリペプチドをスクリーニングするために使用されている。多価ファージディスプレイ方法は、代表的には纖維状ファージのp I I I もしくはp V I I I のいずれかに対する融合を介して、小さな無作為のペプチドおよび小さなタンパク質を提示するために使用されている(WellisおよびLowman, (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3:355-362、ならびにその中に引用されている参考文献)。一価のファージディスプレイにおいて、タンパク質もしくはペプチドのライブラリーは、ファージコートタンパク質もしくはその一部分に融合され、そして野生型タンパク質の存在下で、低レベルで発現される。アビディティ作用は、多価ファージに対して低下し、したがって、選別は内因性のリガンド親和性に基づき、そしてDNA操作を単純化するファージミドベクターが、使用される。LowmanおよびWellis, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3:205-0216 (1991)。ファージディスプレイは、抗体様分子を産生するための技術を含む(Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immunobiology*, 第5版, Garland Publishing, New York, p627-628; Leeら)。

【0100】

「ファージミド」は、細菌の複製起点(例えば、C O 1 E 1)およびバクテリオファージの遺伝子間領域の1つのコピーを有するプラスミドベクターである。ファージミドは、任意の公知のバクテリオファージにおいて使用され得、これらのファージとしては、纖維性バクテリオファージおよびバクテリオファージが挙げられる。プラスミドはまた、一般に、抗生物質抵抗性についての選択可能マーカーを含む。これらのベクター内にクローニングされるDNAのセグメントは、プラスミドとして増殖され得る。これらのベクターを有する細胞が、ファージ粒子の産生のために必要な全ての遺伝子と共に提供される場合、プラスミドの複製の様式がローリングサークル複製へと変化し、一本鎖のプラスミドDNAのコピーとパッケージファージ粒子とを産生する。このファージミドは、感染性もしくは非感染性のファージ粒子を形成する。この用語は、遺伝子融合体として異種ポリペプチド遺伝子に連結したファージコートタンパク質遺伝子もしくはそのフラグメントを含み、それによってこの異種ポリペプチドがファージ粒子の表面上に提示されるファージミドを含む。

【0101】

「リンカー」、「リンカー単位」もしくは「リンク(link)」は、共有結合を含む化学部分もしくは薬物部分の抗体に共有結合する原子の鎖を意味する。種々の実施形態において、リンカーは、Lとして特定される。リンカーとしては、アルキルジイル、アリーレン、ヘテロアリーレン、- (C R₂)_n O (C R₂)_n - のような部分、アルコキシ(例えば、ポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ)およびアルキルアミノ(例えば、ポリエチレンアミノ、JeffamineTM)の反復単位;ならびにコハク酸塩、コハク酸アミド、ジグリコレート、マロネートおよびカブロアミドを含む二価酸エステルおよび二価酸アミドのような二価ラジカルが挙げられる。

【0102】

用語「標識」は、抗体に共有結合し得る任意の部分を意味し、これは、(i)検出可能シグナルを提供する; (ii)第2の標識と相互作用し、第1もしくは第2の標識によって提供される検出可能なシグナルを改変する(例えば、FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)); (iii)抗原もしくはリガンドとの相互作用を安定化するか、もしくは結合の親和性を増大する; (iv)電荷、疎水性、形状もしくは他の物理的パラメータによって移動度(例えば、電気泳動度)もしくは細胞透過性に影響する、あるいは(v)捕捉部分を

提供し、リガンド親和性、抗体／抗原結合もしくはイオン複合体化 (ionic complex) を調節するように作用する。

【0103】

本明細書中で使用される立体化学的な規定および規約は、一般に、S. P. Parker, 編, McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; ならびに Eiel, E. および Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York に従う。多くの有機化合物が、光学活性形態で存在し、すなわち、これらは、平面偏光の平面を回転する能力を有する。光学的に活性な化合物の記載において、接頭語 D および L、または R および S は、そのキラル中心に関する分子の絶対配置を表示するために使用される。接頭語 d および l または (+) および (-) は、化合物による平面偏光の回転の符号を表し、(-) もしくは l は、この化合物が左旋性であることを意味する。 (+) もしくは d の接頭語を有する化合物は、右旋性である。所定の化学構造について、これらの立体異性体は、互いに鏡像対称であることを除いて同一である。特定の立体異性体はまた、エナンチオマーと呼ばれ得、そしてこのような異性体の混合物は、しばしばエナンチオマー混合物と呼ばれる。エナンチオマーの 50:50 混合物は、ラセミ混合物もしくはラセミ体と呼ばれ、これは、化学反応もしくはプロセスにおいて立体選択性もしくは立体特異性が存在しない場合に生じ得る。用語「ラセミ混合物」および「ラセミ体」は、光学活性を有さない、2つのエナンチオマー種の等モル濃度の混合物をいう。

【0104】

語句「薬学的に受容可能な塩」は、本明細書中で使用される場合、ADC の薬学的に受容可能な有機もしくは無機の塩をいう。例示的な塩としては、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、硫酸水素塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、酒石酸水素塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチシン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、サッカリニ酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、およびパモ酸塩 (pamoate) (すなわち、1,1'-メチレン-ビス-(2-ヒドロキシ-3-ナフトエート) が挙げられるが、これらに限定されない。薬学的に受容可能な塩は、酢酸イオン、コハク酸イオンもしくは他の対イオンのような別の分子の包含を含み得る。対イオンは、親化合物上の電荷を安定化させる任意の有機部分もしくは無機部分であり得る。さらに、薬学的に受容可能な塩は、1つより多くの荷電した原子をその構造内に有し得る。多数の荷電した原子がこの薬学的に受容可能な塩の一部分である場合、多数の対イオンを有し得る。したがって、薬学的に受容可能な塩は、1つもしくはそれより多くの荷電した原子および/または1つもしくはそれより多くの対イオンを有し得る。

【0105】

「薬学的に受容可能な溶媒和物」は、1つもしくはそれより多くの分子と ADC との会合物をいう。薬学的に受容可能な溶媒和物を形成する溶媒の例としては、水、イソプロパノール、エタノール、メタノール、DMSO、酢酸エチル、酢酸およびエタノールアミンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0106】

以下の略称が、本明細書中で使用され、そして示される定義を有する： BME は - メルカプトエタノール、 Boc は N-(t-ブトキシカルボニル)、 cit はシトルリン (2-アミノ-5-ウレイドペンタン酸)、 dap はドラプロイン (dolapropine)、 DCC は 1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド、 DCM はジクロロメタン、 DEA はジエチルアミン、 DEDA はジエチルアゾジカルボキシレート、 DEPC はジエチルホスホリルシアニデート、 DIA はジイソプロピルアゾジカルボキシレート、 DIDEA 50

はN,N-ジイソプロピルエチルアミン、d i lはドライソロイシン(d o l a i s o l e u c i n e)、DMAはジメチルアセトアミド、D M A Pは4-ジメチルアミノピリジン、D M Eはエチレングリコールジメチルエーテル(もしくは1,2-ジメトキシエタン)、D M FはN,N-ジメチルホルムアミド、D M S Oはジメチルスルホキシド、d o eはドラフェニン(d o l a p h e n i n e)、d o vはN,N-ジメチルバリン、D T N Bは5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)、D T P Aはジエチレントリアミンペニタ酢酸、D T Tはジチオトレイトール、E D C Iは1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩、E E D Qは2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリン、E S - M Sはエレクトロスプレー質量分析、E t O A cは酢酸エチル、F m o cはN-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)、g l yはグリシン、H A T UはO-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、H O B tは1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、H P L Cは高速液体クロマトグラフィー、i l eはイソロイシン、l y sはリジン、M e C N (C H₃ C N)はアセトニトリル、M e O Hはメタノール、M t rは4-アニシルジフェニルメチル(もしくは4-メトキシトリチル)、n o rは(1S,2R)-(+)-ノルエフェドリン、P A Bはp-アミノベンジルカルバモイル、P B Sはリン酸緩衝化生理食塩水(pH 7)、P E Gはポリエチレングリコール、P hはフェニル、P n pはp-ニトロフェニル、M Cは6-マレイミドカブロイル、p h eはL-フェニルアラニン、P y B r o pはプロモトリ-ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、S E Cはサイズ排除クロマトグラフィー、S uはスクシンイミド、T F Aはトリフルオロ酢酸、T L Cは薄層クロマトグラフィー、U Vは紫外線、およびv a lはバリン。

【0107】

(システィン操作抗体)

本発明の化合物は、野生型抗体もしくは親抗体の1つもしくはそれより多くのアミノ酸が、システィンアミノ酸と置き換えられている、システィン操作抗体を含む。抗体の任意の形態は、このように操作され得る(すなわち、変異され得る)。例えば、親F a b抗体フラグメントは、システィン操作F a bを形成するように操作され得、本明細書中で「チオF a b」と呼ばれる。同様に、親モノクローナル抗体は、「チオM a b」を形成するように操作され得る。一部位変異は、チオF a bにおいて1つの操作システィン残基を生じ、一方、I g G抗体のダイマーの性質に起因して、一部位変異は、チオM a bにおいて2つの操作システィン残基を生じる。置き換えられた(「操作された」)システィン(C y s)残基を有する変異体は、新規に導入された操作チオール基の反応性について評価される。チオール反応性値は、0から1.0の範囲の相対的な数値の項であり、任意のシスティン操作抗体について測定され得る。本発明のシスティン操作抗体のチオール反応性値は、0.6~1.0; 0.7~1.0; もしくは0.8~1.0の範囲内である。

【0108】

本発明の設計方法、選択方法および調製方法は、求電子性官能基と反応性であるシスティン操作抗体を可能にする。これらの方法は、さらに、指定された、設計された、選択的部位に薬物分子を有する抗体結合体化号物(例えば、抗体-薬物結合体(A D C)化合物)を可能にする。抗体表面上の反応性システィン残基は、チオール反応性基(例えば、マレイミドもしくはハロアセチル)を介した薬物部分の得意的な結合体化を可能にする。C y s残基のチオール官能基のマレイミド基に対する求核反応性は、タンパク質中の任意の他のアミノ酸官能基(例えば、リジン残基のアミノ基もしくはN末端アミノ基)と比較して約1000倍高い。ヨードアセチル試薬およびマレイミド試薬におけるチオール特異的官能基は、アミン基と反応し得るが、より高いpH(>9.0)およびより長い反応時間が必要とされる(Garman, 1997, Non-Radioactive Labeling: A Practical Approach, Academic Press, London)。

【0109】

10

20

30

40

50

本発明のシステイン操作抗体は、その対応する野生型親抗体の抗原結合能力を保持する。したがって、システイン操作抗体は、抗原に、好ましくは特異的に結合可能である。このような抗原としては、例えば、腫瘍関連抗原（TAA）、細胞表面レセプタタンパク質および他の細胞表面分子、膜貫通タンパク質、シグナル伝達タンパク質、細胞生存調節因子、細胞増殖調節因子、組織発生もしくは組織分化に関連する（例えば、機能的に寄与することが公知であるかもしくは疑われる）分子、リンホカイン、サイトカイン、細胞周期調節に関与する分子、脈管形成に関与する分子および脈管形成に関連する（例えば、機能的に寄与することが公知であるかもしくは疑われる）分子が挙げられる。腫瘍関連抗原は、分化因子の集団（すなわち、CDタンパク質）であり得る。システイン操作抗体が結合可能である抗原は、上記のカテゴリーの1つの下位集団のメンバーであり得、ここで、このカテゴリーの他の下位集団は、異なる特性（目的の抗原に関連して）を有する他の分子 / 抗原を含む。

【0110】

親抗体はまた、U.S. 5 821337（本明細書中に明白に参考として援用される）の表3において記載されるように、huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7およびhuMAb4D5-8（トラスツズマブ、HERCEPTIN（登録商標））から選択されるヒト化抗体であり得る；本明細書中に記載される、ヒト化520C9（WO 93/21319）抗体およびヒト化2C4抗体。

【0111】

本発明のシステイン操作抗体は、部位特異的にかつ効率的にチオール反応性試薬とカップリングされ得る。このチオール反応性試薬は、多官能性リンカー試薬、捕獲（すなわち親和性）試薬、標識試薬（例えば、ビオチン - リンカー試薬）、検出標識（例えば、フルオロフォア試薬）、固相固定化試薬（例えば、SEPHAROSE™、ポリスチレン、もしくはガラス）または薬物 - リンカー中間体であり得る。チオール反応性試薬の1つの例は、N-エチルマレイミド（NEM）である。例示的な実施形態において、チオFabのビオチン - 試薬との反応は、ビオチン化チオFabを提供し、これにより、操作されたシステイン残基の反応性の存在が、検出され得そして測定され得る。チオFabと多官能性リンカー試薬との反応性は、感応性付与されたリンカーをチオFabに提供し、このリンカーは、薬物部分試薬もしくは他の標識とさらに反応させられ得る。チオFabと薬物リンカー中間体との反応は、チオFab薬物結合体を提供する。

【0112】

本明細書中で記載される例示的な方法は、一般に、抗体の同定および產生に適用され得、そしてより一般には、本明細書中に記載される設計およびスクリーニング工程の適用を介して、他のタンパク質に適用され得る。

【0113】

このようなアプローチは、他のチオール反応性剤の結合体化に適用され得、ここで、この反応性基は、たとえばマレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルジスルフィドもしくは他のチオール反応性結合体パートナーである（Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc. ; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2 ; Garman, 1997, Non-Radioactive Labeling: A Practical Approach, Academic Press, London ; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2 ; Hermanson, G., Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671）。このパートナーは、細胞傷害性薬剤（例えば、ドキソルビシンもしくは百日咳毒素のような毒素）、フルオロセインもしくはローダミンなどの蛍光色素のようなフルオロフォア、画像化のためのキレート剤もしくは放射線治療用の金属、ペプチド性もしくは

10

20

30

40

50

非ペプチド性の標識または検出タグ、またはポリエチレングリコールの種々の異性体のようなクリアランス改変剤、第3成分に結合するペプチド、あるいは別の炭水化物もしくは脂肪親和性薬剤であり得る。

【0114】

本明細書中の例示的な抗体フラグメントである hu4D5Fabv8 上に同定される部位は、主に抗体の定常ドメインにあり、これは、抗体の全ての種にわたって保存されている。これらの部位は、他の抗体に対し、構造的設計もしくは特異的抗体構造の知識をさらに必要とせずに、そして抗体の可変ドメインに固有の抗原結合特性を妨害することなしに、広範に適用可能である。

【0115】

癌の処置において有用であり得るシステイン操作抗体としては、細胞表面レセプターに対する抗体および腫瘍関連抗原 (TAA) に対する抗体が挙げられるが、これらに限定されない。このような抗体は、裸の抗体（薬物もしくは標的部位に結合体化されていない抗体）として使用されてもよく、または式Iの抗体-薬物結合体 (ADC) として使用されてもよい。腫瘍関連抗原は、当該分野で公知であり、そして当該分野で周知の方法および情報を用いた抗体の产生における使用のために調製され得る。癌診断および癌治療のための有効な細胞性標的を発見する試みにおいて、研究者らは、1種以上の特定の型の癌細胞の表面上で、1種以上の正常な非癌性細胞と比較して特異的に発現される、膜貫通ポリペプチドもしくは他の腫瘍関連ポリペプチドを同定している。多くの場合、このような腫瘍関連ポリペプチドは、癌細胞の表面上で、非癌性細胞の表面上と比較して、より豊富に発現される。このような腫瘍関連細胞表面抗原ポリペプチドの同定は、抗体ベースの治療を介した破壊のために癌細胞を特異的に標的化する能力をもたらしている。

【0116】

TAAの例としては、以下に列挙するTAA(1)～(36)が挙げられるが、これらに限定されない。便宜上、名称、別名、Genbank登録番号および主な文献を含めて、これらの抗原に関連する情報（これらは全て、当該分野で公知である）を以下に列挙し、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の核酸配列およびタンパク質配列同定規約に従った。TAA(1)～(36)に対応する核酸配列およびタンパク質配列は、GenBankのような公開データベースにおいて利用可能である。抗体によって標的化された腫瘍関連抗原は、引用した参考文献において同定される配列に対して少なくとも約70%、80%、85%、90%、もしくは95%の配列同一性を有するか、または引用した参考文献において見出される配列を有するTAAと実質的に同一の生物学的な特性もしくは特徴を示す、アミノ酸配列改変体およびイソ型を含む。例えば、改変体配列を有するTAAは、一般に、列挙した対応する配列を有するTAAに特異的に結合する抗体に特異的に結合し得る。本明細書中に具体的に引用される参考文献中の配列および開示は、明白に参考として援用される。

【0117】

腫瘍関連抗原(1)～(36)：

(1) BMPR1B (骨形態形成タンパク質レセプター-IB型、Genbank登録番号NM_001203)

ten Dijke, P.ら Science 264 (5155) : 101-104 (1994)、Oncogene 14 (11) : 1377-1382 (1997)；WO2004063362 (請求項2)；WO2003042661 (請求項12)；US2003134790-A1 (38-39ページ)；WO2002102235 (請求項13、296ページ)；WO2003055443 (91-92ページ)；WO20029421 (請求項6)；WO2003024392 (請求項2、図112)；WO200298358 (請求項1、183ページ)；WO200254940 (100-101ページ)；WO200259377 (349-350ページ)；WO200230268 (請求項27、37

10

20

30

40

50

6ページ) ; WO 200148204 (実施例、図4) NP_001194 骨形態形成タンパク質レセプター、IB型 / pid = NP_001194.1 -

相互参照: MIM: 603248、NP_001194.1; AY065994

(2) E16 (LAT1、SLC7A5、Genbank登録番号NM_003486)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 255(2), 283-288 (1999), Nature 395(6699): 288-291 (1998), Gaugitsch, H. W. ら(1992) J. Biol. Chem. 267(16): 11267-11273) ; WO 2004048938 (実施例2) ; WO 2004032842 (実施例IV) ; WO 2003042661 (請求項12) ; WO 2003016475 (請求項1) ; WO 200278524 (実施例2) ; WO 200299074 (請求項19; 127-129ページ) ; WO 200286443 (請求項27、222ページ、393ページ) ; WO 2003003906 (請求項10、293ページ) ; WO 200264798 (請求項33; 93-95ページ) ; WO 200014228 (請求項5; 133-136ページ) ; US 2003224454 (図3) ; WO 2003025138 (請求項12; 150ページ) ; NP_003477 溶質キャリアファミリー7 (カチオン性アミノ酸輸送体、y+システム)、メンバー5 / pid = NP_003477.3 - Homo sapiens

相互参照: MIM: 600182; NP_003477.3; NM_015923; NM_003486_1

(3) STEAP1 (前立腺の6回膜貫通上皮抗原、Genbank登録番号NM_012449)

Cancer Res. 61(15): 5857-5860 (2001), Hubert, R. S. ら(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96(25): 14523-14528) ; WO 2004065577 (請求項6) ; WO 2004027049 (図1L) ; EP 1394274 (実施例11) ; WO 2004016225 (請求項2) ; WO 2003042661 (請求項12) ; US 2003157089 (実施例5) ; US 2003185830 (実施例5) ; US 2003064397 (図2) ; WO 200289747 (実施例5、618-619ページ) ; WO 2003022995 (実施例9; 図13A; 実施例53; 173ページ、実施例2; 図2A) ; NP_036581 前立腺の6回膜貫通上皮抗原

相互参照: MIM: 604415; NP_036581.1; NM_012449_1

(4) 0772P (CA125、MUC16、Genbank登録番号AF361486)

J. Biol. Chem. 276(29): 27371-27375 (2001) ; WO 2004045553 (請求項14) ; WO 200292836 (請求項6、図12) ; WO 200283866 (請求項15; 116-121ページ) ; US 2003124140 (実施例16) ;

相互参照: GI: 34501467; AAK74120.3; AF361486_1

(5) MPF (MPF、MSLN、SMR、巨核球増強因子、メソテリン (mesotelin)、Genbank登録番号NM_005823) Yamaguchi, N. ら, Biol. Chem. 269(2): 805-808 (1994)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96(20): 11531-11536 (1999)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93(1): 136-140 (1996)、J. Biol. Chem. 270(37): 21984-21990 (1995) ; WO 2003101283 (請求項14) ; (WO 2002102235 (請求項13、287-288ページ) ; WO 2002101075 (請求項4、308-309ページ) ; WO 200271928 (320-321ページ) ; WO 9410312 (52-57ページ) ; 相互参照: MIM: 601051、NP_005814.2、NM_005823_1

10

20

30

40

50

(6) Napi3b (NAPI-3B、NPTI1b、SLC34A2、溶質キャリアファミリー34(リン酸ナトリウム)、メンバー2、II型ナトリウム依存性リン酸輸送体3b, Genbank登録番号NM_006424)

J. Biol. Chem. 277(22):19665-19672(2002), Genomics 62(2):281-284(1999), Field, J. A. et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258(3):578-582; WO2004022778(請求項2); EP1394274(実施例11); WO2002102235(請求項13、326ページ); EP875569(請求項1、17-19ページ); WO200157188(請求項20; 329ページ); WO2004032842(実施例IV); WO200175177(請求項24、139-140ページ);

相互参照: MIM: 604217, NP_006415.1, NM_006424_1

(7) Sema5b (FLJ10372、KIAA1445、Mm.42015、SEMA5B、SEMA5G、Semaphorin 5b Holog、semaドメイン、7回トロンボスポンジン繰り返し(1型および1型様)、膜貫通ドメイン(TM)および短い細胞質ドメイン(セマフォリン(semaphorin)5B), Genbank登録番号AB040878)

Nagase T.ら(2000)DNA Res. 7(2):143-150; WO2004000997(請求項1); WO2003003984(請求項1); WO200206339(請求項1、50ページ); WO200188133(請求項1、41-43ページ、48-58ページ); WO2003054152(請求項20); WO2003101400(請求項11);

登録: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC: 10737;

(8) PSCA_h1g (2700050C12Rik; C530008016Rik; RIKEN cDNA 2700050C12; RIKEN cDNA 2700050C12遺伝子; Genbank登録番号AY358628); Rossら(2002)Cancer Res. 62:2546-2553; US2003129192(請求項2); US2004044180(請求項12); US2004044179(請求項11); US2003096961(請求項11); US2003232056(実施例5); WO2003105758(請求項12); US2003206918(実施例5); EP1347046(請求項1); WO2003025148(請求項20);

相互参照: GI: 37182378; AAQ88991.1; AY358628_1

(9) ETBR(エンドセリンB型レセプター、Genbank登録番号AY275463);

Nakamuta M.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991; Ogawa Y.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H.ら, Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992; Arai H.ら, J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A.ら, J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B.ら, J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M.ら, Gene 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C.ら, J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y.ら, Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B.ら, Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002; Ho 40

f s t r a R . M . W . ら , Eur . J . Hum . Genet . 5 , 1 8 0 - 1 8 5 ,
 1 9 9 7 ; P u f f e n b e r g e r E . G . ら , C e l l 7 9 , 1 2 5 7 - 1 2 6
 6 , 1 9 9 4 ; A t t i e T . ら , Hum . Mol . Genet . 4 , 2 4 0 7 - 2
 4 0 9 , 1 9 9 5 ; A u r i c c h i o A . ら , Hum . Mol . Genet . 5 : 3
 5 1 - 3 5 4 , 1 9 9 6 ; A m i e l J . ら , Hum . Mol . Genet . 5 , 3 5
 5 - 3 5 7 , 1 9 9 6 ; H o f s t r a R . M . W . ら , Nat . Genet . 1 2 ,
 4 4 5 - 4 4 7 , 1 9 9 6 ; S v e n s s o n P . J . ら , Hum . Genet . 1 0
 3 , 1 4 5 - 1 4 8 , 1 9 9 8 ; F u c h s S . ら , Mol . Med . 7 , 1 1 5 - 1
 2 4 , 2 0 0 1 ; P i n g a u l t V . ら (2 0 0 2) Hum . Genet . 1 1 1 ,
 1 9 8 - 2 0 6 ; W O 2 0 0 4 0 4 5 5 1 6 (請求項 1) , W O 2 0 0 4 0 4 8 9 3 8 (10
 実施例 2) ; W O 2 0 0 4 0 4 0 0 0 0 (請求項 1 5 1) ; W O 2 0 0 3 0 8 7 7 6 8 (請求項 1) ;
 W O 2 0 0 3 0 1 6 4 7 5 (請求項 1) ; W O 2 0 0 3 0 1 6 4 7 5 (請求項 1) ; W O 2 0 0 2 6 1 0 8 7 (図 1) ; W O 2 0 0 3 0 1 6 4 9 4 (図 6) ; W O 2
 0 0 3 0 2 5 1 3 8 (請求項 1 2 、 1 4 4 ページ) ; W O 2 0 0 1 9 8 3 5 1 (請求項 1
 、 1 2 4 - 1 2 5 ページ) ; E P 5 2 2 8 6 8 (請求項 8 、 図 2) ; W O 2 0 0 1 7 7 1
 7 2 (請求項 1 、 2 9 7 - 2 9 9 ページ) ; U S 2 0 0 3 1 0 9 6 7 6 ; U S 6 5 1 8 4
 0 4 (図 3) ; U S 5 7 7 3 2 2 3 (請求項 1 a 、 C o l 3 1 - 3 4) ; W O 2 0 0 4 0
 0 1 0 0 4 ;
 (1 0) M S G 7 8 3 (R N F 1 2 4 、 仮想タンパク質 F L J 2 0 3 1 5 、 G e n b a
 n k 登録番号 N M _ 0 1 7 7 6 3) ; 20
 W O 2 0 0 3 1 0 4 2 7 5 (請求項 1) ; W O 2 0 0 4 0 4 6 3 4 2 (実施例 2) ; W
 O 2 0 0 3 0 4 2 6 6 1 (請求項 1 2) ; W O 2 0 0 3 0 8 3 0 7 4 (請求項 1 4 、 6 1
 ページ) ; W O 2 0 0 3 0 1 8 6 2 1 (請求項 1) ; W O 2 0 0 3 0 2 4 3 9 2 (請求項
 2 ; 図 9 3) ; W O 2 0 0 1 6 6 6 8 9 (実施例 6) ;
 相互参照 : L o c u s I D : 5 4 8 9 4 , N P _ 0 6 0 2 3 3 . 2 , N M _ 0 1 7 7 6 3
 - 1
 (1 1) S T E A P 2 (H G N C _ 8 6 3 9 、 I P C A - 1 、 P C A N A P 1 、 S T A
 M P 1 、 S T E A P 2 、 S T M P 、 前立腺癌関連遺伝子 1 、 前立腺癌関連タンパク質 1 、
 前立腺の 6 回膜貫通上皮抗原 2 、 6 回膜貫通前立腺タンパク質 、 G e n b a n k 登録番号
 A F 4 5 5 1 3 8) 30
 L a b . I n v e s t . 8 2 (1 1) : 1 5 7 3 - 1 5 8 2 (2 0 0 2)) ; W O 2 0
 0 3 0 8 7 3 0 6 ; U S 2 0 0 3 0 6 4 3 9 7 (請求項 1 、 図 1) ; W O 2 0 0 2 7 2 5
 9 6 (請求項 1 3 ; 5 4 - 5 5 ページ) ; W O 2 0 0 1 7 2 9 6 2 (請求項 1 ; 図 4 B)
 ; W O 2 0 0 3 1 0 4 2 7 0 (請求項 1 1) ; W O 2 0 0 3 1 0 4 2 7 0 (請求項 1 6)
 ; U S 2 0 0 4 0 0 5 5 9 8 (請求項 2 2) ; W O 2 0 0 3 0 4 2 6 6 1 (請求項 1 2)
 ; U S 2 0 0 3 0 6 0 6 1 2 (請求項 1 2 ; 図 1 0) ; W O 2 0 0 2 2 6 8 2 2 (請求項
 2 3 ; 図 2) ; W O 2 0 0 2 1 6 4 2 9 (請求項 1 2 ; 図 1 0) ;
 相互参照 : G I : 2 2 6 5 5 4 8 8 ; A A N 0 4 0 8 0 . 1 ; A F 4 5 5 1 3 8 - 1
 (1 2) T r p M 4 (B R 2 2 4 5 0 、 F L J 2 0 0 4 1 、 T R P M 4 、 T R P M 4 B
 、 一過性レセプター電位カチオンチャネル、サブファミリー M 、 メンバー 4 、 G e n b a
 n k 登録番号 N M _ 0 1 7 6 3 6) 40
 X u , X . Z . ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 8 (1 9
) : 1 0 6 9 2 - 1 0 6 9 7 (2 0 0 1) , C e l l 1 0 9 (3) : 3 9 7 - 4 0 7 (2 0 0 2) , J . B i o l . C h e m . 2 7 8 (3 3) : 3 0 8 1 3 - 3 0 8 2 0 (2 0
 0 3)) ; U S 2 0 0 3 1 4 3 5 5 7 (請求項 4) ; W O 2 0 0 0 4 0 6 1 4 (請求項 1
 4 ; 1 0 0 - 1 0 3 ページ) ; W O 2 0 0 2 1 0 3 8 2 (請求項 1 ; 図 9 A) ; W O 2 0
 0 3 0 4 2 6 6 1 (請求項 1 2) ; W O 2 0 0 2 3 0 2 6 8 (請求項 2 7 ; 3 9 1 ページ
) ; U S 2 0 0 3 2 1 9 8 0 6 (請求項 4) ; W O 2 0 0 1 6 2 7 9 4 (請求項 1 4 ; 図
 1 A - D) ;
 相互参照 : M I M : 6 0 6 9 3 6 ; N P _ 0 6 0 1 0 6 . 2 ; N M _ 0 1 7 6 3 6 - 1 50

(13) C R I P T O (C R 、 C R 1 、 C R G F 、 C R I P T O 、 T D G F 1 、 奇形癌腫由来増殖因子、 G e n b a n k 登録番号 N P _ 0 0 3 2 0 3 または N M _ 0 0 3 2 1 2)

C i c c o d i c o l a , A . ら , E M B O J . 8 (7) : 1 9 8 7 - 1 9 9 1 (1 9 8 9) , A m . J . H u m . G e n e t . 4 9 (3) : 5 5 5 - 5 6 5 (1 9 9 1)) ; U S 2 0 0 3 2 2 4 4 1 1 (請求項 1) ; W O 2 0 0 3 0 8 3 0 4 1 (実施例 1) ; W O 2 0 0 3 0 3 4 9 8 4 (請求項 12) ; W O 2 0 0 2 8 8 1 7 0 (請求項 2 ; 5 2 - 5 3 ページ) ; W O 2 0 0 3 0 2 4 3 9 2 (請求項 2 ; 図 5 8) ; W O 2 0 0 2 1 6 4 1 3 (請求項 1 ; 9 4 - 9 5 ページ、 1 0 5 ページ) ; W O 2 0 0 2 2 2 8 0 8 (請求項 2 ; 図 1) ; U S 5 8 5 4 3 9 9 (実施例 2 、 C o l 1 7 - 1 8) ; U S 5 7 9 2 6 1 6 (図 2) ;

相互参照 : M I M : 1 8 7 3 9 5 ; N P _ 0 0 3 2 0 3 . 1 ; N M _ 0 0 3 2 1 2 _ 1

(14) C D 2 1 (C R 2 (補体レセプター 2) または C 3 D R (C 3 d / エプスタインバーウイルスレセプター) または H s . 7 3 7 9 2 G e n b a n k 登録番号 M 2 6 0 0 4)

F u j i s a k u ら (1 9 8 9) J . B i o l . C h e m . 2 6 4 (4) : 2 1 1 8 - 2 1 2 5) ; W e i s J . J . ら , J . E x p . M e d . 1 6 7 , 1 0 4 7 - 1 0 6 6 、 1 9 8 8 ; M o o r e M . ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 4 、 9 1 9 4 - 9 1 9 8 、 1 9 8 7 ; B a r e l M . ら , M o l . I m m u n o l . 3 5 , 1 0 2 5 - 1 0 3 1 , 1 9 9 8 ; W e i s J . J . ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 3 、 5 6 3 9 - 5 6 4 3 、 1 9 8 6 ; S i n h a S . K . ら (1 9 9 3) J . I m m u n o l . 1 5 0 , 5 3 1 1 - 5 3 2 0 ; W O 2 0 0 4 0 4 5 5 2 0 (実施例 4) ; U S 2 0 0 4 0 0 5 5 3 8 (実施例 1) ; W O 2 0 0 3 0 6 2 4 0 1 (請求項 9) ; W O 2 0 0 4 0 4 5 5 2 0 (実施例 4) ; W O 9 1 0 2 5 3 6 (図 9 . 1 - 9 . 9) ; W O 2 0 0 4 0 2 0 5 9 5 (請求項 1) ;

登録 : P 2 0 0 2 3 ; Q 1 3 8 6 6 ; Q 1 4 2 1 2 ; E M B L ; M 2 6 0 0 4 ; A A A 3 5 7 8 6 . 1 .

(15) C D 7 9 b (C D 7 9 B 、 C D 7 9 、 I G b (免疫グロブリン関連) 、 B 2 9 、 G e n b a n k 登録番号 N M _ 0 0 0 6 2 6 または 1 1 0 3 8 6 7 4)

P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . (2 0 0 3) 1 0 0 (7) : 4 1 2 6 - 4 1 3 1 、 B l o o d (2 0 0 2) 1 0 0 (9) : 3 0 6 8 - 3 0 7 6 ; M u l l e r ら (1 9 9 2) E u r . J . I m m u n o l . 2 2 (6) : 1 6 2 1 - 1 6 2 5) ; W O 2 0 0 4 0 1 6 2 2 5 (請求項 2 、 図 1 4 0) ; W O 2 0 0 3 0 8 7 7 6 8 ; U S 2 0 0 4 1 0 1 8 7 4 (請求項 1 、 1 0 2 ページ) ; W O 2 0 0 3 0 6 2 4 0 1 (請求項 9) ; W O 2 0 0 2 7 8 5 2 4 (実施例 2) ; U S 2 0 0 2 1 5 0 5 7 3 (請求項 5 、 1 5 ページ) ; U S 5 6 4 4 0 3 3 ; W O 2 0 0 3 0 4 8 2 0 2 (請求項 1 、 3 0 6 ページ および 3 0 9 ページ) ; W O 9 9 / 5 5 8 6 5 8 ; U S 6 5 3 4 4 8 2 (請求項 1 3 、 図 1 7 A / B) ; W O 2 0 0 0 5 5 3 5 1 (請求項 1 1 、 1 1 4 5 - 1 1 4 6 ページ) ;

相互参照 : M I M : 1 4 7 2 4 5 ; N P _ 0 0 0 6 1 7 . 1 ; N M _ 0 0 0 6 2 6 _ 1

(16) F c R H 2 (I F G P 4 、 I R T A 4 、 S P A P 1 A (S H 2 ドメインを含むホスファターゼアンカータンパク質 1 a) 、 S P A P 1 B 、 S P A P 1 C 、 G e n b a n k 登録番号 N M _ 0 3 0 7 6 4 、 A Y 3 5 8 1 3 0)

G e n o m e R e s . 1 3 (1 0) : 2 2 6 5 - 2 2 7 0 (2 0 0 3) 、 I m m u n o g e n e t i c s 5 4 (2) : 8 7 - 9 5 (2 0 0 2) 、 B l o o d 9 9 (8) : 2 6 6 2 - 2 6 6 9 (2 0 0 2) 、 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 8 (1 7) : 9 7 7 2 - 9 7 7 7 (2 0 0 1) 、 X u , M . J . ら (2 0 0 1) B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 2 8 0 (3) : 7 6 8 - 7 7 5 ; W O 2 0 0 4 0 1 6 2 2 5 (請求項 2) ; W O 2 0 0 3 0 7 7 8 3 6 ; W O 2 0 0 1 3 8 4 9 0 (請求項 5 、 図 1 8 D - 1 - 1 8 D - 2) ; W O 2 0 0 3 0 9 7 8 0 3 (請求項 1 2) ; W O 2 0 0 3 0 8 9 6 2 4 (請求項 2 5) ;

相互参照：MIM：606509、NP_110391.2、NM_030764_1
 (17) HER2 (ErbB2、Genbank登録番号M11730)
 Coussens L.ら, Science (1985) 230(4730):113
 2-1139)、Yamamoto T.ら, Nature 319、230-234、
 1986; Semb K.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
 82、6497-6501、1985; Swiercz J. M.ら, J. Cell. B
 iol. 165、869-880、2004; Kuhns J. J.ら, J. Biol.
 Chem. 274、36422-36427、1999; Cho H.-S.ら, Nat
 ure 421、756-760、2003; Ehsani A.ら(1993) Gen
 omics 15, 426-429; WO2004048938(実施例2); WO20
 04027049(図1I); WO2004009622; WO2003081210;
 WO2003089904(請求項9); WO2003016475(請求項1); US
 2003118592; WO2003008537(請求項1); WO20030554
 39(請求項29、図1A-B); WO2003025228(請求項37、図5C);
 WO200222636(実施例13、95-107ページ); WO200212341
 (請求項68;図7); WO200213847(71-74ページ); WO20021
 4503(114-117ページ); WO200153463(請求項2; 41-46ペ
 ージ); WO200141787(15ページ); WO200044899(請求項52
 ;図7); WO200020579(請求項3;図2); US5869445(請求項3
 ; Col 31-38); WO9630514(請求項2; 56-61ページ); EP14
 39393(請求項7); WO2004043361(請求項7); WO2004022
 709; WO200100244(実施例3;図4);
 登録：P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M1
 1761; AAA35808.1。

【0118】

(18) NCA (CEACAM6、Genbank登録番号M18728);
 Barnett T.ら, Genomics 3、59-66、1988; Tawar
 agi Y.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 8
 9-96, 1988; Strausberg R. L.ら, Proc. Natl. Aca
 d. Sci. U. S. A. 99: 16899-16903、2002; WO200406
 3709; EP1439393(請求項7); WO2004044178(実施例4);
 WO2004031238; WO2003042661(請求項12); WO20027
 8524(実施例2); WO200286443(請求項27; 427ページ); WO2
 00260317(請求項2);
 登録：P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1.
 EMBL; M18728;

(19) MDP (DPEP1、Genbank登録番号BC017023)
 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99(26): 16899-1
 6903(2002)); WO2003016475(請求項1); WO2002647
 98(請求項33; 85-87ページ); JP05003790(図6-8); WO99
 46284(図9);

相互参照：MIM：179780; AAH17023.1; BC017023_1

(20) IL20R (IL20Ra、ZCYT0R7、Genbank登録番号AF
 184971);
 Clark H. F.ら, Genome Res. 13、2265-2270、200
 3; Mungall A. J.ら, Nature 425、805-811、2003;
 Blumberg H.ら, Cell 104、9-19、2001; Dumoutie
 r L.ら, J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parri
 sh-Novak J.ら, J. Biol. Chem. 277、47517-47523
 、2002; Pletnev S.ら(2003) Biochemistry 42: 1 50

2 6 1 7 - 1 2 6 2 4 ; S h e i k h F . ら (2 0 0 4) J . I mm u n o l . 1 7 2 , 2 0 0 6 - 2 0 1 0 ; E P 1 3 9 4 2 7 4 (実施例 1 1) ; U S 2 0 0 4 0 0 5 3 2 0 (実施例 5) ; W O 2 0 0 3 0 2 9 2 6 2 (7 4 - 7 5 ページ) ; W O 2 0 0 3 0 0 2 7 1 7 (請求項 2 ; 6 3 ページ) ; W O 2 0 0 2 2 2 1 5 3 (4 5 - 4 7 ページ) ; U S 2 0 0 2 0 4 2 3 6 6 (2 0 - 2 1 ページ) ; W O 2 0 0 1 4 6 2 6 1 (5 7 - 5 9 ページ) ; W O 2 0 0 1 4 6 2 3 2 (6 3 - 6 5 ページ) ; W O 9 8 3 7 1 9 3 (請求項 1 ; 5 5 - 5 9 ページ) ;

登録 : Q 9 U H F 4 ; Q 6 U W A 9 ; Q 9 6 S H 8 ; E M B L ; A F 1 8 4 9 7 1 ; A A F 0 1 3 2 0 . 1 .

【 0 1 1 9 】

10

(2 1) B r e v i c a n (B C A N 、 B E H A B 、 G e n b a n k 登録番号 A F 2 2 9 0 5 3)

G a r y S . C . ら , G e n e 2 5 6 、 1 3 9 - 1 4 7 、 2 0 0 0 ; C l a r k H . F . ら , G e n o m e R e s . 1 3 、 2 2 6 5 - 2 2 7 0 、 2 0 0 3 ; S t r a u s b e r g R . L . ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 9 、 1 6 8 9 9 - 1 6 9 0 3 、 2 0 0 2 ; U S 2 0 0 3 1 8 6 3 7 2 (請求項 1 1) ; U S 2 0 0 3 1 8 6 3 7 3 (請求項 1 1) ; U S 2 0 0 3 1 1 9 1 3 1 (請求項 1 ; 図 5 2) ; U S 2 0 0 3 1 1 9 1 2 2 (請求項 1 ; 図 5 2) ; U S 2 0 0 3 1 1 9 1 2 6 (請求項 1) ; U S 2 0 0 3 1 1 9 1 2 1 (請求項 1 ; 図 5 2) ; U S 2 0 0 3 1 1 9 1 2 9 (請求項 1) ; U S 2 0 0 3 1 1 9 1 3 0 (請求項 1) ; U S 2 0 0 3 1 1 9 1 2 8 (請求項 1 ; 図 5 2) ; U S 2 0 0 3 1 1 9 1 2 5 (請求項 1) ; W O 2 0 0 3 0 1 6 4 7 5 (請求項 1) ; W O 2 0 0 2 0 2 6 3 4 (請求項 1) ;

(2 2) E p h B 2 R (D R T 、 E R K 、 H e k 5 、 E P H T 3 、 T y r o 5 、 G e n b a n k 登録番号 N M _ 0 0 4 4 4 2)

C h a n , J . および W a t t , V . M . , O n c o g e n e 6 (6) 1 0 5 7 - 1 0 6 1 (1 9 9 1) O n c o g e n e 1 0 (5) : 8 9 7 - 9 0 5 (1 9 9 5) , A n n u . R e v . N e u r o s c i . 2 1 : 3 0 9 - 3 4 5 (1 9 9 8) 、 I n t . R e v . C y t o l . 1 9 6 : 1 7 7 - 2 4 4 (2 0 0 0)) ; W O 2 0 0 3 0 4 2 6 6 1 (請求項 1 2) ; W O 2 0 0 0 5 3 2 1 6 (請求項 1 ; 4 1 ページ) ; W O 2 0 0 4 0 6 5 5 7 6 (請求項 1) ; W O 2 0 0 4 0 2 0 5 8 3 (請求項 9) ; W O 2 0 0 3 0 0 4 5 2 9 (1 2 8 - 1 3 2 ページ) ; W O 2 0 0 0 5 3 2 1 6 (請求項 1 ; 4 2 ページ) ;

相互参照 : M I M : 6 0 0 9 9 7 ; N P _ 0 0 4 4 3 3 . 2 ; N M _ 0 0 4 4 4 2 _ 1

30

(2 3) A S L G 6 5 9 (B 7 h 、 G e n b a n k 登録番号 A X 0 9 2 3 2 8)

U S 2 0 0 4 0 1 0 1 8 9 9 (請求項 2) ; W O 2 0 0 3 1 0 4 3 9 9 (請求項 1 1) ; W O 2 0 0 4 0 0 0 2 2 1 (図 3) ; U S 2 0 0 3 1 6 5 5 0 4 (請求項 1) ; U S 2 0 0 3 1 2 4 1 4 0 (実施例 2) ; U S 2 0 0 3 0 6 5 1 4 3 (図 6 0) ; W O 2 0 0 2 1 0 2 2 3 5 (請求項 1 3 ; 2 9 9 ページ) ; U S 2 0 0 3 0 9 1 5 8 0 (実施例 2) ; W O 2 0 0 2 1 0 1 8 7 (請求項 6 ; 図 1 0) ; W O 2 0 0 1 9 4 6 4 1 (請求項 1 2 ; 図 7 b) ; W O 2 0 0 2 0 2 6 2 4 (請求項 1 3 ; 図 1 A - 1 B) ; U S 2 0 0 2 0 3 4 7 4 9 (請求項 5 4 ; 4 5 - 4 6 ページ) ; W O 2 0 0 2 0 6 3 1 7 (実施例 2 ; 3 2 0 - 3 2 1 ページ、 請求項 3 4 ; 3 2 1 - 3 2 2 ページ) ; W O 2 0 0 2 7 1 9 2 8 (4 6 8 - 4 6 9 ページ) ; W O 2 0 0 2 0 2 5 8 7 (実施例 1 ; 図 1) ; W O 2 0 0 1 4 0 2 6 9 (実施例 3 ; ページ 1 9 0 - 1 9 2) ; W O 2 0 0 0 3 6 1 0 7 (実施例 2 ; 2 0 5 - 2 0 7 ページ) ; W O 2 0 0 4 0 5 3 0 7 9 (請求項 1 2) ; W O 2 0 0 3 0 0 4 9 8 9 (請求項 1) ; W O 2 0 0 2 7 1 9 2 8 (2 3 3 - 2 3 4 ページ、 4 5 2 - 4 5 3) ; W O 0 1 1 6 3 1 8 ;

40

(2 4) P S C A (前立腺の幹細胞抗原前駆体、 G e n b a n k 登録番号 A J 2 9 7 4 3 6)

R e i t e r R . E . ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 5 、 1 7 3 5 - 1 7 4 0 、 1 9 9 8 ; G u Z . ら , O n c o g e n e 1 9 、 1 2 8 8

50

- 1296、2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275 (3): 783-788; WO 2004022709; EP 1394274 (実施例11); US 2004018553 (請求項17); WO 2003008537 (請求項1); WO 200281646 (請求項1; 164ページ); WO 2003003906 (請求項10; 288ページ); WO 200140309 (実施例1; 図17); US 2001055751 (実施例1; 図1b); WO 200032752 (請求項18; 図1); WO 9851805 (請求項17; 97ページ); WO 9851824 (請求項10; 94ページ); WO 9840403 (請求項2; 図1B); 登録: O 43653; EMBL; AF 043498; AAC 39607.1。

【0120】

10

(25) GEDA (Genbank登録番号AY260763); AAP14954 脂肪腫HMGIC融合パートナー様タンパク質 / pid = AAP14954.1 - Homo sapiens 種: Homo Sapiens (ヒト) WO 2003054152 (請求項20); WO 2003000842 (請求項1); WO 2003023013 (実施例3、請求項20); US 2003194704 (請求項45);

相互参照: GI: 30102449; AAP14954.1; AY260763_1

(26) BAFF-R (B細胞活性化因子レセプター、BLySレセプター3、BR3、Genbank登録番号AF116456);

BAFFレセプター / pid = NP_443177.1 - Homo sapiens Thompson, J. S. ら, Science 293 (5537)、2108-2111 (2001); WO 2004058309; WO 2004011611; WO 2003045422 (実施例; 32-33ページ); WO 2003014294 (請求項35; 図6B); WO 2003035846 (請求項70; 615-616ページ); WO 200294852 (Col 136-137); WO 200238766 (請求項3; 133ページ); WO 200224909 (実施例3; 図3);

相互参照: MIM: 606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600

(27) CD22 (B細胞レセプターCD22-Bイソ型、BL-CAM、Lyb-8、Lyb8、SIGLEC-2、FLJ22814、Genbank登録番号AK026467);

Wilsonら (1991) J. Exp. Med. 173: 137-146; WO 2003072036 (請求項1; 図1);

相互参照: MIM: 107266; NP_001762.1; NM_001771_1

(28) CD79a (CD79A、CD79、免疫グロブリン関連、Ig (CD79B)と共有結合的に相互作用して、IgM分子を有する結合体を表面に形成し、B細胞分化に関するシグナルを伝達する、B細胞特異的タンパク質) pI: 4.84、MW: 25028 TM: 2 [P] Gene Chromosome: 19q13.2、Genbank登録番号NP_001774.10)

WO 2003088808; US 20030228319; WO 2003062401 (請求項9); US 2002150573 (請求項4、ページ13-14); WO 9958658 (請求項13、図16); WO 9207574 (図1); US 5644033; Ha ら (1992) J. Immunol. 148 (5): 1526-1531; Mueller ら (1992) Eur. J. Biochem. 22: 1621-1625; Hashimoto ら (1994) Immunogenetics 40 (4): 287-295; Preud'homme ら (1992) Clin. Exp. Immunol. 90 (1): 141-146; Yu ら (1992) J. Immunol. 148 (2): 633-637; Sakaguchi ら (1988) EMBO J. 7 (11): 3457-3464;

(29) CXCR5 (バーキットリンパ腫レセプター1、CXCL13ケモカインによ

40

50

り活性化され、リンパ球遊走および体液性防御において機能し、HIV-2感染症およびおそらくエイズ、リンパ腫、ミエローマおよび白血病の発現で役割を果たす、Gタンパク質共役レセプター) ; 372aa、pI: 8.54 MW: 41959 TM: 7 [P] Gene Chromosome: 11q23.3、Genbank登録番号NP_001707.1)

WO2004040000; WO2004015426; US2003105292 (実施例2) ; US6555339 (実施例2) ; WO200261087 (図1) ; WO200157188 (請求項20、269ページ) ; WO200172830 (12-13ページ) ; WO200022129 (実施例1、152-153ページ、実施例2、254-256ページ) ; WO9928468 (請求項1、38ページ) ; US5440021 (実施例2、Col49-52) ; WO9428931 (56-58ページ) ; WO9217497 (請求項7、図5) ; Dobnerら(1992) Eur. J. Immunol. 22: 2795-2799; Barellaら(1995) Biochem. J. 309: 773-779;

(30) HLA-DOB (ペプチドを結合して、それらをCD4+Tリンパ球に提示する、MHCクラスII分子(Ia抗原)のサブユニット) ; 273aa、pI: 6.56 MW: 30820 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 6p21.3、Genbank登録番号NP_002111.1)

Tonnelieら(1985) EMBO J. 4(11): 2839-2847; Jonssonら(1989) Immunogenetics 29(6): 411-413; Beckら(1992) J. Mol. Biol. 228: 433-441; Strausbergら(2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 16899-16903; Serveniusら(1987) J. Biol. Chem. 262: 8759-8766; Beckら(1996) J. Mol. Biol. 255: 1-13; Naruseら(2002) Tissue Antigens 59: 512-519; WO9958658 (請求項13、図15) ; US6153408 (Col35-38) ; US5976551 (Col168-170) ; US6011146 (Col145-146) ; Kasaharaら(1989) Immunogenetics 30(1): 66-68; Larhammarら(1985) J. Biol. Chem. 260(26): 14111-14119;

(31) P2X5 (プリン作動性レセプターP2Xリガンド型イオンチャネル5 (細胞外のATPによって作動するイオンチャネル) は、シナプス伝達および神経形成において関与し得、欠乏は、特発性不安定性膀胱の病態生理学に寄与し得る) ; 422aa)、pI: 7.63、MW: 47206 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 17p13.3、Genbank登録番号NP_002552.2)

Leら(1997) FEBS Lett. 418(1-2): 195-199; WO2004047749; WO2003072035 (請求項10) ; Touchmanら(2000) Genome Res. 10: 165-173; WO200222660 (請求項20) ; WO2003093444 (請求項1) ; WO2003087768 (請求項1) ; WO2003029277 (82ページ) ;

(32) CD72 (B細胞分化抗原CD72、Lyb-2)、PROTEIN SEQ UENCE Full maeaity...tafrfpd(1..359; 359aa) , pI: 8.66、MW: 40225 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 9p13.3, Genbank登録番号NP_001773.1)

WO2004042346 (請求項65) ; WO2003026493 (51-52、57-58ページ) ; WO200075655 (105-106ページ) ; Von Hogenら(1990) J. Immunol. 144(12): 4870-4877; Strausbergら(2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 16899-16903;

(33) LY64 (リンパ球抗原64 (RP105)、ロイシンリッチリピート (LR 50

R) ファミリーの I 型膜貫通タンパク質) は、 B 細胞活性化およびアポトーシスを調節し、機能の喪失は、全身性エリテマトーデス患者における疾患活性の上昇と関連している) ; 661aa, pI : 6.20, MW : 74147 TM : 1 [P] Gene Chromosome : 5q12, Genbank 登録番号 NP_005573.1)

US2002193567; WO9707198 (請求項 11、39-42 ページ) ; Miura ら (1996) Genomics 38 (3) : 299-304 ; Miura ら (1998) Blood 92 : 2815-2822; WO2003083047; WO9744452 (請求項 8、57-61 ページ) ; WO200012130 (24-26 ページ) ;

(34) FcRH1 (Fc レセプター様タンパク質 1 (C2 型 Ig 様ドメインおよび ITAM ドメインを含む免疫グロブリン Fc ドメインについての推定上のレセプター)) は、 B リンパ球分化において役割を有し得る、 429aa, pI : 5.28, MW : 46925 TM : 1 [P] Gene Chromosome : 1q21-1q22, Genbank 登録番号 NP_443170.1)

WO2003077836; WO200138490 (請求項 6、図 18E-1-18-E-2) ; Davis ら (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (17) : 9772-9777; WO2003089624 (請求項 8) ; EP1347046 (請求項 1) ; WO2003089624 (請求項 7) ;

(35) IRTA2 (免疫グロブリンスープーファミリーレセプタートransロケーション関連 2 (B 細胞の発達およびリンパ腫生成において役割を有し得る推定上の免疫レセプター)) ; transロケーションによるこの遺伝子の調節解除は、いくつかの B 細胞悪性疾患において生じる ; 977aa, pI : 6.88 MW : 106468 TM : 1 [P] Gene Chromosome : 1q21, Genbank 登録番号 Human : AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085 ; マウス : AK089756, AY158090, AY506558, NP_112571.1 WO2003024392 (請求項 2、図 97) ; Nakayama ら (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277 (1) : 124-127, WO2003077836, WO200138490 (請求項 3、図 18B-1-18B-2) ;

(36) TENB2 (TMEFF2, tomoregulin, TPEF, HPP1, TR、推定上の膜貫通プロテオグリカン、増殖因子およびフォリスタチンの EGF / ヒレグリンファミリーに関連する) ; 374aa, NCBI 登録 :AAD55776, AACF91397, AAG49451, NCBI RefSeq : NP_057276 ; NCBI Gene : 23671 ; OMIM : 605734 ; SwissProt Q9UIK5 ; Genbank 登録番号 AF179274 ; AY358907, CAF85723, CQ782436 WO2004074320 (配列番号 810) ; JP2004113151 (配列番号 2, 4, 8) ; WO2003042661 (配列番号 580) ; WO2003009814 (配列番号 411) ; EP1295944 (69-70 ページ) ; WO200230268 (329 ページ) ; WO200190304 (配列番号 2706) ; US2004249130 ; US2004022727 ; WO2004063355 ; US2004197325 ; US2003232350 ; US2004005563 ; US2003124579 ; Horie ら (2000) Genomics 67 : 146-152 ; Uchida ら (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266 : 593-602 ; Liang ら (2000) Cancer Res. 60 : 4907-12 ; Glynnne-Jones ら (2001) Int. J. Cancer. 10 月 15 日、 94 (2) : 178-84 。

【0121】

親抗体はまた、アルブミン結合性ペプチド (ABP) 配列 (Dennis ら (2002) 「Albumin Binding As A General Strategy

10

20

30

40

50

For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins」J Biol Chem. 277: 35035 - 35043; WO 01 / 45746) を含む融合タンパク質であり得る。本発明の抗体としては、以下によって教示される A B P 配列を含む融合タンパク質が挙げられる: (i) Dennisら (2002) J Biol Chem. 277: 35035 - 35043、表 II および表 IV、35038 ページ; (ii) US 20040001827 の [0076]、配列番号 9 ~ 22; ならびに (iii) WO 01 / 45746 の 12 - 13 ページ、配列番号 z1 - z14。これらの全ては、本明細書中に参考として援用される。

【0122】

(変異誘発)

10

出発ポリペチドのアミノ酸配列改変体をコードする DNA は、当該分野で公知の様々な方法により調製される。これらの方法としては、ポリペチドをコードする予め調製した DNA の、部位特異的 (またはオリゴヌクレオチド媒介) 変異誘発、PCR 変異誘発およびカセット変異誘発による調製が挙げられるがこれらに限定されない。組換え抗体の改変体は、制限フラグメントの操作によって、または、合成オリゴヌクレオチドを用いた重複伸張 PCR によっても構築され得る。変異誘発プライマーは、システインコドン置換をコードする。標準的な変異誘発技術は、このような変異体システム操作抗体をコードする DNA を生成するために使用され得る。一般的なガイダンスは、Sambrookら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; および Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993 に見出され得る。

20

【0123】

部位特異的変異誘発は、置換改変体 (すなわち、変異タンパク質) を調製するための 1 つの方法である。この技術は、当該分野で周知である (例えば、Carterら (1985) Nucleic Acids Res. 13: 4431 - 4443; Hoら (1989) Gene (Amst.) 77: 51 - 59; および Kunkeleら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 を参照のこと)。手短に述べると、DNA の部位特異的変異誘発を実施する際には、出発 DNA は、所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドを、このような出発 DNA の一本鎖に最初にハイブリダイズさせることによって変更される。ハイブリダイゼーションの後、DNA ポリメラーゼは、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、そして出発 DNA の一本鎖をテンプレートとして用いて、第 2 鎖全体を合成するために用いられる。従って、所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドは、得られる二本鎖 DNA に組み込まれる。部位特異的変異誘発は、発現プラスミドにおいて、変異誘発させるべきタンパク質を発現する遺伝子内で実施され得、そして得られるプラスミドは、所望のシステイン置換変異の導入を確認するために配列決定され得る (Liuら (1998) J. Biol. Chem. 273: 20252 - 20260)。市販のものを含めたプロトコールおよび形式の部位特異的なもの。例えば、QuikChange (登録商標) Multi Site-Directed Mutagenesis キット (Stratagene, La Jolla, CA)。

30

【0124】

PCR 変異誘発はまた、出発ポリペチドのアミノ酸配列改変体を作製することにも適している。Higuchi (1990) PCR Protocols, pp. 177 - 183, Academic Press; Itoら (1991) Gene 102: 67 - 70; Bernhardら (1994) Bioconjugate Chem. 5: 126 - 132; および Valletteら (1989) Nuc. Acids Res. 17: 723 - 733 を参照のこと。手短に述べると、少量のテンプレート DNA を PCR にお

40

50

いて出発材料として用いる場合、テンプレートDNA中の対応する領域と配列がわずかに異なるプライマーは、プライマーがテンプレートと異なる位置のみがテンプレート配列と異なる比較的大量の特異的DNAフラグメントを生成するために用いられ得る。

【0125】

改変体を調製するための別の方法(カセット変異誘発)は、Weissら(1985)Gene 34:315-323によって記載されている技術に基づく。出発材料は、変異させるべき出発ポリペチドDNAを含むプラスミド(または他のベクター)である。出発DNA中の変異させるべきコドンが同定される。同定された変異部位の両側には、ユニークな制限エンドヌクレアーゼ部位が存在しなければならない。このような制限部位が存在しない場合、それらは、出発ポリペチドDNA中の適切な位置にこれらを導入するために上記のオリゴヌクレオチド媒介変異誘発方法を使用して生成され得る。プラスミドDNAは、これらの部位で切断されて、DNAを直鎖状にする。制限部位間にこのDNAの配列をコードするが、所望の変異を含んでいる二本鎖オリゴヌクレオチドは、標準手順を使用して合成される。ここで、オリゴヌクレオチドの2本の鎖は、別々に合成され、次いで標準技術を使用して一緒にハイブリダイズされる。この二本鎖オリゴヌクレオチドは、カセットと呼ばれる。このカセットは、直鎖状にしたプラスミドの末端と適合する5'末端および3'末端を有するように設計され、その結果、これは、このプラスミドに直接連結され得る。このプラスミドはいまや、変異したDNA配列を含む。コードされたシステイン置換を含んでいる変異体DNAは、DNA配列決定により確認され得る。

【0126】

単一変異はまた、PCRベースの変異誘発による、テンプレートとして二本鎖プラスミドDNAを使用したオリゴヌクレオチド指向性変異誘発によっても生成される(SambrookおよびRussel(2001)Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版; Zollerら(1983)Methods Enzymol. 100:468-500; Zoller, M. J. およびSmith, M. (1982)Nucl. Acids Res. 10:6487-6500)。

【0127】

本発明において、M13ファージ上に提示されるhu4D5Fabv8(Gerstnerら(2002)「Sequence Plasticity In The Antigen-Binding Site Of A Therapeutic Anti-HER2 Antibody」(J Mol Biol. 321):851-62)を、モデル系として実験に用いた。システイン変異を、hu4D5Fabv8-ファージ、hu4D5-Fab-Phage調製を、以前(Lowman, Henry B. (1998)Methods in Molecular Biology(Totowa, New Jersey)87(Combinatorial Peptide Library Protocols)249-264)に記載されたとおりのポリエチレングリコール(PEG)沈殿法を使用して実施した。

【0128】

オリゴヌクレオチドは、ホスホルアミダイト合成法(US 4415732; US 4458066; Beauchage, S. およびIyer, R. (1992)「Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach」, Tetrahedron 48:2223-2311)により調製される。ホスホルアミダイト法は、制御された細孔ガラスまたは高度に架橋されたポリスチレンから構成される固体支持体上で(最も一般的には、3' 5'方向に;ここで、3'末端ヌクレオシドは、合成開始時に固体支持体上に結合している)成長しているオリゴヌクレオチド鎖への、反応性3'ホスホルアミダイト部分を用いたヌクレオチドモノマー単位の周期的な添加を伴う(US 5047524; US 5262530)。この方法は、通常、自動化された市販の合成機(Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用し

10

20

30

40

50

て実施される。オリゴヌクレオチドは、検出、捕捉、安定化または他の目的のための非アイソトープ部分で化学的に標識され得る (Andrus, A. 「Chemical methods for 5' non-isotopic labelling of PCR probes and primers」(1995) PCR 2: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, pp. 39-54; Hermanson, G., Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671; Keller, G. および Manak, M., DNA Probes Second Edition (1993), Stockton Press, New York, pp. 121-23)。 10

【0129】

(PHESELECTORアッセイ)

PHESELECTOR (Phage ELISA for Selection of Reactive Thiols) アッセイは、ELISAファージ形式での抗体中の反応性システイン基の検出を可能にする。ウェル表面上で目的のタンパク質（例えば、抗体）をコーティングし、続いてファージ粒子とともにインキュベートし、次いでHRPで標識された二次抗体の吸光度を検出するプロセスは、実施例2において詳述される。ファージ上に提示される変異タンパク質は、迅速で頑強なハイ高いスループット様式でスクリーニングされ得る。システイン操作抗体のライブラリーが作製され得、そして抗体または他のタンパク質のランダムなタンパク質-ファージライブラリーから遊離Cys取り込みの適切に反応性の部位を同定するために同じアプローチを使用した結合選択を受け得る。この技術は、ファージ上に提示されたシステイン変異タンパク質を、親和性試薬またはチオール反応性でもあるレポーター基と反応させることを含む。図8は、HER2へのFabまたはチオFabの結合（上の図）およびビオチン化チオFabのストレプトアビジンへの結合（下の図）を示す概略図によって、PHESELECTOR Assayを図示する。 20

【0130】

(タンパク質の発現および精製)

システイン操作抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて（例えば、マウス抗体の重鎖をコードする遺伝子および軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより）容易に分離され、そして配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの供給源として役立つ。一旦単離されると、このDNAは、発現ベクター内に配置され得、次いで、この発現ベクターは、トランスフェクションしなければ抗体タンパク質を生成しない宿主細胞（例えば、E. coli細胞、サルのCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または他の哺乳動物宿主細胞（例えば、骨髄腫細胞）（US 5 807 715; US 2 005/004 8572; US 2 004/022 9310））へとトランスフェクションされて、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成が得られる。hu4D5Fabv8システイン操作抗体の収率は、野生型hu4D5Fabv8と類似していた。抗体をコードするDNAの細菌中での組換え発現に関する総説としては、Skerraら(1993)Curr. Opinion in Immunol. 5: 256-262およびPlueckthun(1992) Immunol. Rev. 130: 151-188が挙げられる。 40

【0131】

設計および選択の後、非常に反応性の高い不対Cys残基を有するシステイン操作抗体（例えば、チオFab）は、以下によって生成され得る：(i)細菌（例えば、E. coli）系または哺乳類細胞培養系（WO 01/00245）（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）における発現；ならびに(ii)一般的なタンパク質精製技術を使用した精製（Lowmanら(1991)J. Biol. Chem. 266(17): 10982-10988）。

【0132】

10

20

30

40

50

チオ F a b は、 3 4 B 8 (非サプレッサー E . c o l i 系) (B a c a l a (1 9 9 7) J o u r n a l B i o l o g i c a l C h e m i s t r y 2 7 2 (1 6) : 1 0 6 7 8 - 8 4) において、 誘導によって発現された。 実施例 3 a を参照のこと。 収集した細胞ペレットを P B S (リン酸緩衝生理食塩水) 中に再懸濁し、 マイクロフルイダイザーを通過させることにより総細胞溶解を実施し、 そしてチオ F a b を、 プロテイン G S E P H A R O S E ^{T M} を用いたアフィニティークロマトグラフィー (A m e r s h a m) によって精製した。 チオ F a b を上記の通りにビオチン - P E O - マレイミドと結合させ、 そしてビオチン化されたチオ F a b を S u p e r d e x - 2 0 0 ^{T M} (A m e r s h a m) ゲル濾過クロマトグラフィーによってさらに精製した。 これにより、 遊離ビオチン - P E O - マレイミドおよびチオ F a b のオリゴマー画分が除去された。

10

【 0 1 3 3 】

(質量分析法による分析)

液体クロマトグラフィーエレクトロスプレー電離質量分析 (L C - E S I - M S) による分析を、 ビオチン結合体化 F a b の正確な分子量決定のために用いた (Cole , R . B . E l e c t r o S p r a y I o n i z a t i o n M a s s S p e c t r o m e t r y : F u n d a m e n t a l s , I n s t r u m e n t a t i o n A n d A p p l i c a t i o n s . (1 9 9 7) W i l e y , N e w Y o r k) 。 ビオチン化された h u 4 D 5 F a b v 8 (A 1 2 1 C) ペプチドのアミノ酸配列を、 トリプシン性消化、 続いて L C - E S I - T a n d e m M S 分析 (表 4 、 実施例 3 b) によって決定した。

【 0 1 3 4 】

抗体 F a b フラグメント h u 4 D 5 F a b v 8 は、 1 0 個の C y s 残基 (5 個は軽鎖上に、 5 個は重鎖上に) を含め、 約 4 4 5 アミノ酸残基を含む。 ヒト化 4 D 5 可変フラグメント (F v 4 D 5) の高分解度構造を確立した。 E i g e n b r o t l a , 「 X - R a y S t r u c t u r e s O f T h e A n t i g e n - B i n d i n g D o m a i n s F r o m T h r e e V a r i a n t s O f H u m a n i z e d A n t i - P 1 8 5 h e r 2 A n t i b o d y 4 D 5 A n d C o m p a r i s o n W i t h M o l e c u l a r M o d e l i n g 」 (1 9 9 3) J M o l B i o l . 2 2 9 : 9 6 9 - 9 9 5 を参照のこと。 全ての C y s 残基は、 ジスルフィド結合の形態で存在し、 従って、 これらの残基は、 (還元剤で処理されない限りは) 薬物 - マレイミドと結合するいかなる反応性チオール基も有しない。 それゆえ、 新しく操作された C y s 残基は、 不対のままであり得、 そして、 求電子性リンカー試薬または薬物 - リンカー中間体 (例えば、 薬物 - マレイミド) と反応し得る、 すなわち、 結合し得る。 図 1 A は、 X 線結晶座標によって導かれた h u 4 D 5 F a b v 8 抗体フラグメントの三次元図を示す。 重鎖および軽鎖の操作された C y s 残基の構造位置は、 連続番号付けシステム (s e q u e n t i a l n u m b e r i n g s y s t e m) に従って番号付けされる。 この連続番号付けシステムは、 図 1 B によって、 ト拉斯ツズマブ (t r a s t u z u m a b) の 4 d 5 v 7 f a b H 改変体についての K a b a t 番号付けシステムと関連付けられている (K a b a t l a (1 9 9 1) S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , 第 5 版 , P u b l i c H e a l t h S e r v i c e , N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h , B e t h e s d a , M D) 。 図 1 B は、 N 末端から始まって、 a 、 b 、 c により注記される挿入によって K a b a t 番号付けスキーム (下の列) と異なる、 連続番号付けスキーム (上の列) を示す。 K a b a t 番号付けシステムを用いると、 実際の直鎖状アミノ酸配列は、 可変ドメインの F R または C D R の短縮または挿入に対応して、 より少ないかまたはより多いアミノ酸を含み得る。 システイン操作された重鎖改変体部位は、 以下のチャートの連続番号付けスキームおよび K a b a t 番号付けスキームにより同定される :

20

【 0 1 3 5 】

30

40

【表 1 A】

4D5Fab 重鎖改変体	連続番号付け	Kabat 番号付け
A40C	Ala-40	Ala-40
A88C	Ala-88	Ala-84
S119C	Ser-119	Ser-112
S120C	Ser-120	Ser-113
A121C	Ala-121	Ala-114
S122C	Ser-122	Ser-115
A175C	Ala-175	Ala-168

10

M 1 3 ファージミド - C y s 変異体 F a b (図 3 A および 3 B) は、 F a b タンパク質と比較して迅速にスクリーニングされ得る。抗原に、およびストレプトアビジンに結合しているファージミド - チオ F a b は、実施例 2 にて説明し、そして図 8 において図示したように、 E L I S A プレート上へ H E R 2 およびストレプトアビジンをコーティングし、続いて抗 F a b - H R P (西洋ワサビペルオキシダーゼ) でプローピングすることによって、それぞれ、試験され得る。この方法は、操作された C y s 残基 / 結合したビオチン分子による、抗原結合に対する影響およびチオール基の反応性の同時モニタリングを可能にした。また、この方法は、 M 1 3 ファージに提示される任意のタンパク質について反応性チオール基をスクリーニングするために適用され得る。結合体化したかまたは結合体化していないファージミド - チオ F a b は、簡便な P E G 沈澱により精製される。

20

【 0 1 3 6 】

ヒト化 4 D 5 の抗原結合性フラグメント (h u 4 D 5 F a b) は、 E . C o l i においてよく発現され、そしてファージ上に提示された (G a r r a r d ら (1 9 9 3) G e n e 1 2 8 : 1 0 3 - 1 0 9) 。抗体 F a b フラグメント h u 4 D 5 F a b v 8 は、チオール反応性をプローブするために、 E L I S A ベースのアッセイのモデル系として、 M 1 3 ファージ上に提示された。図 8 は、 P H E S E L E C T O R アッセイの図示であり、 H E R 2 (上図) およびストレプトアビジン (下図) に対する、ビオチン化されたチオ F a b ファージおよび抗ファージ H R P 抗体の結合を表す。5 つのアミノ酸残基 (L - A l a 4 3 、 H - A l a 4 0 、 H - S e r 1 1 9 、 H - A l a 1 2 1 および H - S e r 1 2 2) は最初に、抗原結合表面から離れて、結晶構造情報から選択された (E i g e n b r o t ら (1 9 9 3) J M o l B i o l . 2 2 9 : 9 6 9 - 9 9 5) 。このタンパク質データベース X 線結晶構造は、 1 F V C と命名された。 C y s 残基は、部位特異的変異誘発によってこれらの位置で操作された。チオ F a b - ファージ調製物を単離し、そしてビオチン化試薬と反応させた。

30

【 0 1 3 7 】

ビオチン結合体化改変体および非結合体化改変体を、 H R P (西洋ワサビペルオキシダーゼ) 結合体化抗ファージ抗体を用いた E L I S A ベースの P H E S E L E C T O R アッセイ (図 8 、実施例 2) を使用して、 H E R 2 およびストレプトアビジンの結合について試験した。非ビオチン化ファージ - h u 4 D 5 F a b v 8 (図 2 A) およびビオチン化されたファージ - h u 4 D 5 F a b v 8 (図 2 B) と、 B S A (白四角) 、 H E R 2 (灰色四角) またはストレプトアビジン (黒四角) との相互作用を、標準的な H R P 反応を発色させ、そして 4 5 0 n m での吸光度を測定することにより、抗 M 1 3 - 西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) 抗体によってモニタリングした。比色基質の回転によって生成される吸光度を、 4 5 0 n m で測定した。 H E R 2 とのチオ F a b の反応性は、抗原結合を測定する。ストレプトアビジンとのチオ F a b の反応性は、ビオチン化の程度を測定する。 B S A とのチオ F a b の反応性は、非特異的相互作用についてのネガティブコントロールである。図 2 A からわかるように、全てのチオ F a b - ファージ改変体は、野生型 h u 4 D 5 F a b v 8 - ファージの結合と比較して、 H E R 2 に対して類似の結合を有する。さらに、ビオチンとの結合体化は、 H E R 2 に対するチオ F a b の結合を妨害しなかった (図 2 B) 。

40

50

【0138】

驚いたことに、そして、予想外に、チオF a b - ファージサンプルは、種々のレベルのストレプトアビジン結合活性を示した。全ての試験されたファージ - チオF a b のうち、A 1 2 1 C システイン操作抗体は、最大のチオール反応性を示した。野生型 h u 4 D 5 F a b v 8 - ファージを同量のビオチン - マレイミドとともにインキュベートした場合であっても、これらのファージは、ストレプトアビジン結合をほとんど有さなかった。このことは、h u 4 D 5 F a b v 8 およびM 1 3 ファージコートタンパク質からの(ジスルフィド結合形成に関与する)既存のシステイン残基が、ビオチン - マレイミドの部位特異的結合体化を妨げなかったことを示す。これらの結果は、ファージE L I S A アッセイを成功裏に用いて、F a b 面上の反応性チオール基をスクリーニングし得ることを実証する。 10

【0139】

P H E S E L E C T O R アッセイは、抗体における反応性チオール基のスクリーニングを可能にする。この方法によるA 1 2 1 C 改変体の同定は、例示である。F a b 分子全体は、反応性チオール基を有するより多くのチオF a b 改変体を同定するために、効果的に検索され得る。表面アクセシビリティー率(f r a c t i o n a l s u r f a c e a c c e s s i b i l i t y) というパラメータを用いて、ポリペチド中のアミノ酸残基への溶媒のアクセシビリティーを同定および定量した。表面アクセシビリティーは、溶媒分子(例えば、水)によって接触され得る表面積(Å^2)として表現され得る。水の占有空間は、1 . 4 の半径の球体として近似される。ソフトウェアは、公知のX線結晶学から誘導された座標を用いてあるタンパク質の各アミノ酸の表面アクセシビリティーを算出するためにアルゴリズムを使用する結晶学プログラムCCP4 Suiteとして、入手自由であるか、または許諾され得る(S e c r e t a r y t o C C P 4 , D a r e s b u r y L a b o r a t o r y , W a r r i n g t o n , W A 4 4 A D , U n i t e d K i n g d o m , F a x : (+ 4 4) 1 9 2 5 6 0 3 8 2 5 , またはインターネット : w w w . c c p 4 . a c . u k / d i s t / h t m l / I N D E X . h t m l による)('The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography' (1994) Acta Cryst. D 50 : 760 - 763)。表面アクセシビリティーの算出を実行する2つの例示的なソフトウェアモジュールは、B . L e e およびF . M . R i c h a r d s (1971) J . M o l . B i o l 5 5 : 3 7 9 - 4 0 0 のアルゴリズムに基づく、「A R E A I M O L 」および「S U R F A C E 」である。A R E A I M O L は、溶媒がタンパク質のファンデルワールス表面を転がるので、タンパク質のうちの溶媒がアクセス可能な表面を、プローブ球体(溶媒分子を表す)の中心位置と規定する。A R E A I M O L は、(原子の中心から、原子の半径とプローブの半径との合計の距離を置いて)各原子を中心として拡張した球体上の表面の点を作製し、そしてことは隣接原子と会合した等しい球体内に存在するものを除去することによって溶媒アクセス可能な表面積を算出する。A R E A I M O L は、原子のうちの溶媒がアクセス可能な面積を、P D B 座標ファイルにおいて見い出し、そして残基毎に、鎖毎に、そして分子全体について、アクセス可能な面積をまとめる。個々の原子についてのアクセス可能な面積(または面積の差)は、偽P D B 出力ファイルに書き込まれ得る。A R E A I M O L は、各要素について単一の半径を仮定し、そして限定された数の異なる要素のみを認識する。未知の原子タイプ(すなわち、A R E A I M O L の内部データベースにないもの)は、1 . 8 のデフォルト半径を割り当てられる。認識された原子のリストは、以下の通りである: 20

【0140】

10

20

30

40

【表1B】

原子	原子番号	ファンデルワールス半径(Å)	
C	6	1.80	
N	7	1.65	
O	8	1.60	
Mg	12	1.60	
S	16	1.85	
P	15	1.90	
Cl	17	1.80	10
Co	27	1.80	

AREAIMOL および SURFACE は、絶対的なアクセシビリティー（すなわち、平方オングストローム（ ）の数字）を報告する。表面アクセシビリティー率は、ポリペチド内のアミノ酸に関連した標準状態を参照することで算出される。参照状態は、トリペプチド Gly - X - Gly であり、ここで、X は、目的のアミノ酸であり、そして、参照状態は、「拡張」コンフォメーション（すなわち、鎖にあるようなもの）であるべきである。拡張コンフォメーションは、X のアクセシビリティーを最大にする。算出されたアクセス可能な面積は、Gly - X - Gly トリペプチド参照状態におけるアクセス可能な面積によって除算され、そして商が報告される。これがアクセシビリティー率である。アクセシビリティーパーセントは、アクセシビリティー率に 100 を乗算したものである。

【0141】

表面アクセシビリティーの算出のための別の例示的なアルゴリズムは、ポリペチドの X 線座標に基づいて水球体に対するアミノ酸残基のアクセシビリティー率を算出するプログラム xsae (Broger, C., F. Hoffmann - La Roche, Basel) の SOLV モジュールに基づく。

【0142】

hu4D5Fabv7 中のあらゆるアミノ酸についての表面アクセシビリティー率は、結晶構造情報 (Eigenbrotら (1993) J Mol Biol. 229: 969 - 995) を使用して算出された。hu4D5Fabv7 の軽鎖および重鎖のアミノ酸についての表面アクセシビリティー率値を、表 1 に降順で示す。

【0143】

10

20

30

【表 1 - 1】

表 1.

hu4D5Fabv7-輕鎖

SER A	202	frac acc=	101.236	ASP A	151	frac acc=	41.586
GLY A	41	frac acc=	90.775	SER A	12	frac acc=	40.633
GLY A	157	frac acc=	88.186	ASN A	210	frac acc=	40.158
ASP A	1	frac acc=	87.743	SER A	63	frac acc=	39.872
SER A	156	frac acc=	83.742	ARG A	66	frac acc=	39.669
GLY A	57	frac acc=	81.611	PRO A	8	frac acc=	39.297
SER A	168	frac acc=	79.680	SER A	65	frac acc=	39.219
SER A	56	frac acc=	79.181	SER A	77	frac acc=	38.820
LYS A	169	frac acc=	77.591	THR A	180	frac acc=	38.296
SER A	60	frac acc=	75.291	ASP A	185	frac acc=	38.234
THR A	109	frac acc=	74.603	THR A	31	frac acc=	38.106
CYS A	214	frac acc=	72.021	THR A	94	frac acc=	37.452
LYS A	126	frac acc=	71.002	THR A	93	frac acc=	37.213
SER A	67	frac acc=	66.694	THR A	197	frac acc=	36.709
ARG A	18	frac acc=	66.126	SER A	182	frac acc=	36.424
ASN A	152	frac acc=	65.415	GLY A	128	frac acc=	35.779
SER A	127	frac acc=	65.345	LYS A	207	frac acc=	35.638
LYS A	190	frac acc=	65.189	ASP A	17	frac acc=	35.413
LYS A	145	frac acc=	63.342	GLY A	200	frac acc=	35.274
GLN A	199	frac acc=	62.470	GLU A	165	frac acc=	35.067
GLU A	143	frac acc=	61.681	ALA A	112	frac acc=	34.912
GLN A	3	frac acc=	59.976	GLN A	79	frac acc=	34.601
LYS A	188	frac acc=	59.680	VAL A	191	frac acc=	33.935
ARG A	24	frac acc=	59.458	SER A	208	frac acc=	33.525
PHE A	53	frac acc=	58.705	LYS A	39	frac acc=	33.446
SER A	9	frac acc=	58.446	GLU A	123	frac acc=	32.486
GLN A	27	frac acc=	57.247	THR A	69	frac acc=	32.276
ALA A	153	frac acc=	56.538	SER A	76	frac acc=	32.108
SER A	203	frac acc=	55.864	HIS A	189	frac acc=	31.984
LYS A	42	frac acc=	54.730	ARG A	108	frac acc=	31.915
GLY A	16	frac acc=	54.612	ASN A	158	frac acc=	31.447
LYS A	45	frac acc=	54.464	VAL A	205	frac acc=	31.305
PRO A	204	frac acc=	53.172	SER A	14	frac acc=	31.094
GLU A	213	frac acc=	53.084	GLN A	155	frac acc=	30.630
ALA A	184	frac acc=	52.556	GLU A	187	frac acc=	30.328
VAL A	15	frac acc=	52.460	ARG A	211	frac acc=	30.027
SER A	7	frac acc=	51.936	LYS A	183	frac acc=	29.751
LEU A	154	frac acc=	51.525	ASN A	138	frac acc=	29.306
GLN A	100	frac acc=	51.195	ASP A	170	frac acc=	29.041
SER A	10	frac acc=	49.907	SER A	159	frac acc=	27.705
THR A	5	frac acc=	48.879	GLN A	147	frac acc=	27.485
THR A	206	frac acc=	48.853	THR A	22	frac acc=	27.121
ASP A	28	frac acc=	48.758	ALA A	43	frac acc=	26.801
GLY A	68	frac acc=	48.690	ARG A	142	frac acc=	26.447
THR A	20	frac acc=	48.675	LEU A	54	frac acc=	25.882
ASP A	122	frac acc=	47.359	ASP A	167	frac acc=	25.785
PRO A	80	frac acc=	46.984	THR A	129	frac acc=	23.880
SER A	52	frac acc=	46.917	ALA A	144	frac acc=	23.652
SER A	26	frac acc=	46.712	VAL A	163	frac acc=	22.261
TYR A	92	frac acc=	46.218	PRO A	95	frac acc=	20.607
LYS A	107	frac acc=	45.912	ALA A	111	frac acc=	19.942
GLU A	161	frac acc=	45.100	LYS A	103	frac acc=	18.647
VAL A	110	frac acc=	44.844	LEU A	181	frac acc=	18.312
GLU A	81	frac acc=	44.578	THR A	72	frac acc=	18.226
PRO A	59	frac acc=	44.290	GLU A	195	frac acc=	18.006
ASN A	30	frac acc=	42.721	THR A	178	frac acc=	17.499
GLN A	160	frac acc=	42.692	THR A	85	frac acc=	17.343
SER A	114	frac acc=	42.374	ASP A	70	frac acc=	17.194
PRO A	40	frac acc=	41.928	LEU A	11	frac acc=	16.568

【0144】

【表 1 - 2】

PHE A	116	frac acc=	16.406	LEU A	125	frac acc=	2.398
THR A	97	frac acc=	16.204	PRO A	96	frac acc=	2.387
ARG A	61	frac acc=	16.192	LEU A	47	frac acc=	2.180
TYR A	49	frac acc=	16.076	ALA A	51	frac acc=	1.837
SER A	50	frac acc=	15.746	PHE A	118	frac acc=	1.779
LYS A	149	frac acc=	15.510	PHE A	62	frac acc=	1.581
GLU A	55	frac acc=	14.927	ALA A	25	frac acc=	1.538
LEU A	201	frac acc=	14.012	VAL A	133	frac acc=	1.315
GLY A	64	frac acc=	13.735	ASP A	82	frac acc=	1.141
GLY A	212	frac acc=	13.396	LEU A	179	frac acc=	0.872
PHE A	98	frac acc=	12.852	GLN A	124	frac acc=	0.787
THR A	74	frac acc=	12.169	MET A	4	frac acc=	0.778
SER A	171	frac acc=	11.536	SER A	177	frac acc=	0.693
PRO A	141	frac acc=	11.073	SER A	131	frac acc=	0.693
PHE A	83	frac acc=	10.871	LEU A	135	frac acc=	0.654
THR A	164	frac acc=	10.325	PHE A	71	frac acc=	0.593
ALA A	32	frac acc=	9.971	TRP A	35	frac acc=	0.448
HIS A	198	frac acc=	9.958	PHE A	209	frac acc=	0.395
VAL A	146	frac acc=	9.861	TYR A	186	frac acc=	0.259
SER A	121	frac acc=	9.833	LEU A	78	frac acc=	0.157
ALA A	13	frac acc=	9.615	VAL A	196	frac acc=	0.000
GLU A	105	frac acc=	9.416	VAL A	132	frac acc=	0.000
SER A	162	frac acc=	9.304	VAL A	104	frac acc=	0.000
ILE A	117	frac acc=	8.780	VAL A	33	frac acc=	0.000
HIS A	91	frac acc=	8.557	VAL A	29	frac acc=	0.000
ALA A	193	frac acc=	8.547	TYR A	192	frac acc=	0.000
GLN A	37	frac acc=	8.442	TYR A	86	frac acc=	0.000
VAL A	58	frac acc=	8.281	TYR A	36	frac acc=	0.000
PRO A	120	frac acc=	8.095	THR A	102	frac acc=	0.000
GLN A	38	frac acc=	6.643	SER A	174	frac acc=	0.000
PRO A	113	frac acc=	6.594	PHE A	139	frac acc=	0.000
GLY A	101	frac acc=	6.558	LEU A	136	frac acc=	0.000
TYR A	140	frac acc=	5.894	LEU A	73	frac acc=	0.000
VAL A	115	frac acc=	5.712	ILE A	75	frac acc=	0.000
TYR A	87	frac acc=	4.539	ILE A	48	frac acc=	0.000
SER A	176	frac acc=	4.106	ILE A	21	frac acc=	0.000
ILE A	2	frac acc=	4.080	GLN A	90	frac acc=	0.000
ASN A	137	frac acc=	3.906	GLN A	89	frac acc=	0.000
TRP A	148	frac acc=	3.676	CYS A	194	frac acc=	0.000
GLY A	99	frac acc=	3.550	CYS A	134	frac acc=	0.000
PRO A	44	frac acc=	3.543	CYS A	88	frac acc=	0.000
LEU A	175	frac acc=	3.488	CYS A	23	frac acc=	0.000
VAL A	19	frac acc=	3.420	ALA A	130	frac acc=	0.000
ILE A	106	frac acc=	3.337	ALA A	84	frac acc=	0.000
PRO A	119	frac acc=	2.953	ALA A	34	frac acc=	0.000
LEU A	46	frac acc=	2.887				
GLN A	6	frac acc=	2.860				
TYR A	173	frac acc=	2.825				
VAL A	150	frac acc=	2.525				
GLN A	166	frac acc=	2.525				
THR A	172	frac acc=	2.436				

【0145】

【表 1 - 3】

hu4D5Fabv7- 重鎖

SER B	179	frac acc=	99.479	PRO B	14	frac acc=	45.729	
GLY B	42	frac acc=	95.850	THR B	54	frac acc=	45.503	
GLU B	1	frac acc=	87.276	THR B	200	frac acc=	45.369	
GLY B	66	frac acc=	84.541	LEU B	177	frac acc=	45.337	
ASP B	102	frac acc=	83.794	GLY B	8	frac acc=	44.898	
SER B	75	frac acc=	80.567	SER B	7	frac acc=	43.530	
GLY B	140	frac acc=	80.344	THR B	69	frac acc=	43.503	
ASN B	211	frac acc=	79.588	PRO B	220	frac acc=	43.378	
GLY B	197	frac acc=	78.676	LYS B	208	frac acc=	43.138	
ASP B	62	frac acc=	77.716	LYS B	30	frac acc=	42.380	10
GLY B	103	frac acc=	77.176	ALA B	23	frac acc=	41.952	
SER B	163	frac acc=	76.664	GLU B	46	frac acc=	41.430	
SER B	139	frac acc=	74.946	SER B	25	frac acc=	41.323	
LYS B	213	frac acc=	74.442	ARG B	87	frac acc=	41.282	
ALA B	165	frac acc=	74.339	LYS B	124	frac acc=	40.888	
THR B	167	frac acc=	73.934	ASN B	28	frac acc=	40.529	
SER B	122	frac acc=	72.870	GLN B	3	frac acc=	39.824	
SER B	194	frac acc=	71.959	THR B	123	frac acc=	39.306	
PRO B	41	frac acc=	71.540	SER B	63	frac acc=	38.867	
THR B	198	frac acc=	68.668	GLY B	56	frac acc=	38.582	
SER B	222	frac acc=	68.128	GLY B	169	frac acc=	38.469	
LYS B	43	frac acc=	67.782	THR B	172	frac acc=	38.421	
GLY B	26	frac acc=	67.782	PRO B	209	frac acc=	38.309	
THR B	138	frac acc=	65.826	GLY B	101	frac acc=	38.040	
ASP B	31	frac acc=	64.222	TYR B	109	frac acc=	36.829	20
GLY B	15	frac acc=	64.172	LYS B	221	frac acc=	36.520	
SER B	168	frac acc=	62.100	GLY B	44	frac acc=	35.147	
SER B	120	frac acc=	61.332	GLY B	181	frac acc=	34.735	
LYS B	76	frac acc=	61.092	THR B	58	frac acc=	34.457	
GLY B	141	frac acc=	59.419	GLY B	9	frac acc=	34.254	
SER B	137	frac acc=	59.179	VAL B	5	frac acc=	34.198	
TYR B	57	frac acc=	58.916	ALA B	121	frac acc=	33.049	
GLU B	89	frac acc=	58.483	SER B	127	frac acc=	32.390	
SER B	180	frac acc=	56.289	GLY B	10	frac acc=	32.230	
LYS B	65	frac acc=	55.044	SER B	71	frac acc=	30.659	
ASP B	215	frac acc=	54.656	ASP B	73	frac acc=	30.245	
GLN B	13	frac acc=	53.719	LEU B	115	frac acc=	29.867	
GLN B	112	frac acc=	53.215	LEU B	11	frac acc=	29.825	
TYR B	105	frac acc=	51.940	ASN B	84	frac acc=	29.765	
ALA B	88	frac acc=	51.602	SER B	210	frac acc=	28.656	
GLY B	164	frac acc=	50.259	GLU B	155	frac acc=	28.162	30
PRO B	192	frac acc=	49.826	SER B	160	frac acc=	26.526	
THR B	158	frac acc=	49.694	CYS B	223	frac acc=	26.270	
THR B	142	frac acc=	48.896	GLY B	16	frac acc=	26.158	
ASN B	55	frac acc=	48.344	ILE B	202	frac acc=	26.068	
LYS B	136	frac acc=	48.312	GLN B	82	frac acc=	25.836	
ARG B	19	frac acc=	48.082	SER B	193	frac acc=	25.550	
PRO B	156	frac acc=	47.366	ASN B	77	frac acc=	25.418	
PRO B	174	frac acc=	47.157	ARG B	59	frac acc=	25.301	
LYS B	217	frac acc=	47.102	VAL B	93	frac acc=	25.254	
GLN B	199	frac acc=	46.650	THR B	74	frac acc=	24.902	
SER B	17	frac acc=	45.980	GLU B	219	frac acc=	24.778	
SER B	85	frac acc=	45.824	ASN B	206	frac acc=	24.647	

【0 1 4 6】

40

【表 1 - 4】

VAL B	170	frac	acc=	24.549	PRO B	154	frac	acc=	6.767
TYR B	52	frac	acc=	24.298	PRO B	133	frac	acc=	6.767
ALA B	175	frac	acc=	23.804	TRP B	99	frac	acc=	6.502
LYS B	216	frac	acc=	23.277	THR B	32	frac	acc=	6.291
VAL B	214	frac	acc=	23.150	LEU B	45	frac	acc=	4.649
GLY B	125	frac	acc=	22.802	VAL B	128	frac	acc=	4.515
ASN B	162	frac	acc=	22.245	ILE B	51	frac	acc=	4.307
ALA B	72	frac	acc=	22.166	SER B	186	frac	acc=	4.084
ALA B	40	frac	acc=	21.974	PHE B	173	frac	acc=	3.969
LEU B	18	frac	acc=	20.273	ARG B	38	frac	acc=	3.734
THR B	212	frac	acc=	20.170	TRP B	47	frac	acc=	3.561
LEU B	182	frac	acc=	19.619	VAL B	118	frac	acc=	3.409
TYR B	33	frac	acc=	19.398	ALA B	24	frac	acc=	3.376
THR B	190	frac	acc=	19.365	TYR B	95	frac	acc=	3.242
VAL B	176	frac	acc=	18.941	GLU B	6	frac	acc=	3.216
SER B	21	frac	acc=	18.929	ALA B	144	frac	acc=	3.167
SER B	119	frac	acc=	18.877	ILE B	70	frac	acc=	1.958
THR B	91	frac	acc=	18.237	GLY B	111	frac	acc=	1.868
ASP B	151	frac	acc=	17.849	LEU B	4	frac	acc=	1.808
THR B	114	frac	acc=	17.601	TYR B	201	frac	acc=	1.758
SER B	134	frac	acc=	17.571	LEU B	148	frac	acc=	1.744
LEU B	196	frac	acc=	17.090	PHE B	68	frac	acc=	1.708
TYR B	60	frac	acc=	16.575	VAL B	188	frac	acc=	1.315
TYR B	183	frac	acc=	15.968	CYS B	22	frac	acc=	0.935
VAL B	2	frac	acc=	15.901	TRP B	161	frac	acc=	0.876
PRO B	130	frac	acc=	15.342	LEU B	131	frac	acc=	0.654
LEU B	166	frac	acc=	15.268	VAL B	205	frac	acc=	0.495
GLY B	100	frac	acc=	15.003	ALA B	92	frac	acc=	0.356
PHE B	27	frac	acc=	14.383	ALA B	79	frac	acc=	0.356
ASN B	204	frac	acc=	13.873	VAL B	64	frac	acc=	0.263
PHE B	104	frac	acc=	13.836	ILE B	29	frac	acc=	0.227
TYR B	80	frac	acc=	13.490	VAL B	218	frac	acc=	0.000
VAL B	159	frac	acc=	12.782	VAL B	189	frac	acc=	0.000
ARG B	67	frac	acc=	12.362	VAL B	149	frac	acc=	0.000
GLN B	178	frac	acc=	12.131	VAL B	116	frac	acc=	0.000
HIS B	171	frac	acc=	11.412	VAL B	48	frac	acc=	0.000
SER B	184	frac	acc=	11.255	VAL B	37	frac	acc=	0.000
ARG B	98	frac	acc=	11.115	TYR B	152	frac	acc=	0.000
PRO B	53	frac	acc=	11.071	TYR B	94	frac	acc=	0.000
GLN B	39	frac	acc=	11.037	TRP B	36	frac	acc=	0.000
SER B	195	frac	acc=	10.909	SER B	187	frac	acc=	0.000
ASP B	108	frac	acc=	10.525	SER B	97	frac	acc=	0.000
LEU B	185	frac	acc=	10.464	MET B	107	frac	acc=	0.000
GLY B	113	frac	acc=	10.406	MET B	83	frac	acc=	0.000
THR B	78	frac	acc=	10.213	LEU B	145	frac	acc=	0.000
THR B	117	frac	acc=	9.990	LEU B	86	frac	acc=	0.000
LYS B	150	frac	acc=	9.447	LEU B	81	frac	acc=	0.000
VAL B	157	frac	acc=	9.323	LEU B	20	frac	acc=	0.000
VAL B	12	frac	acc=	9.207	ILE B	34	frac	acc=	0.000
TRP B	110	frac	acc=	9.069	HIS B	207	frac	acc=	0.000
ALA B	143	frac	acc=	8.903	HIS B	35	frac	acc=	0.000
SER B	135	frac	acc=	8.897	GLY B	146	frac	acc=	0.000
PHE B	129	frac	acc=	8.895	CYS B	203	frac	acc=	0.000
ARG B	50	frac	acc=	8.639	CYS B	147	frac	acc=	0.000
ALA B	61	frac	acc=	8.547	CYS B	96	frac	acc=	0.000
ALA B	132	frac	acc=	7.882	ASP B	90	frac	acc=	0.000
VAL B	191	frac	acc=	7.366	ALA B	106	frac	acc=	0.000
PRO B	126	frac	acc=	7.258	ALA B	49	frac	acc=	0.000
PHE B	153	frac	acc=	6.918					40

以下の 2 つの基準を適用して、操作して C y s 残基で置換され得る h u 4 D 5 F a b v 8 の残基を同定した：

1. 完全に埋め込まれる（すなわち、10%未満の表面アクセシビリティ率の）アミノ酸残基は除去される。表 1 は、10%よりも高くアクセス可能である（表面アクセシビリティ率の）、h u 4 D 5 F a b v 8 の 134 残基（軽鎖）および 151 残基（重鎖）が存在することを示す。上位 10 個の最もアクセス可能な S e r 残基、A l a 残基および V a l 残基を、新しく操作された C y s によって抗体に最小の構造制約しか導入しない、他のアミノ酸よりも C y s へのそれらの構造的類似性の近さに起因して選択した。他のシステイン置換部位もまたスクリーニングされ得、そして結合体化に有用であり得る。

【0147】

2. 残基は、F a b の機能的相互作用および構造的相互作用におけるそれらの役割に基づいて選別される。抗原相互作用に関与しておらず、かつ既存のジスルフィド結合から離れた残基をさらに選択した。新しく操作されたC y s 残基は、抗原結合とは別であるべきであり、かつ抗原結合を妨害しないべきであり、しかも、ジスルフィド結合形成に関与するシステインと誤った対を形成しないべきである。

【0148】

h u 4 D 5 F a b v 8 の以下の残基は、上記の基準を有しており、そしてC y s で置換されるように選択された：L - V 1 5 、 L - A 4 3 、 L - V 1 1 0 、 L - A 1 4 4 、 L - S 1 6 8 、 H - A 8 8 、 H - A 1 2 1 、 H - S 1 2 2 、 H - A 1 7 5 および H - S 1 7 9 (図1に示される)。

10

【0149】

チオール反応性は、反応性システインアミノ酸でのアミノ酸の置換が以下でなされ得る任意の抗体に一般化され得る：L - 1 0 ~ L - 2 0 ； L - 3 8 ~ L - 4 8 ； L - 1 0 5 ~ L - 1 1 5 ； L - 1 3 9 ~ L - 1 4 9 ； L - 1 6 3 ~ L - 1 7 3 から選択される軽鎖の範囲内； H - 3 5 ~ H - 4 5 ； H - 8 3 ~ H - 9 3 ； H - 1 1 4 ~ H - 1 2 7 ；および H - 1 7 0 ~ H - 1 8 4 から選択される重鎖の範囲内： H - 2 6 8 ~ H - 2 9 1 ； H - 3 1 9 ~ H - 3 4 4 ； H - 3 7 0 ~ H - 3 8 0 ；および H - 3 9 5 ~ H - 4 0 5 から選択される範囲内のF c 領域。

【0150】

20

チオール反応性はまた、抗体の特定のドメイン（例えば、軽鎖定常ドメイン（C L ）および重鎖定常ドメイン（C H 1 、 C H 2 および C H 3 ））に一般化され得る。0.6以上のチオール反応性値をもたらすシステイン置換は、以下のそれぞれのインタクトな抗体の重鎖定常ドメイン 、 、 、 および μ においてなされ得る：I g A 、 I g D 、 I g E 、 I g G および I g M (I g G サブクラス：I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、 I g G 4 、 I g A および I g A 2 を含む)。

【0151】

選択された10個のC y s 変異体が抗原結合部位（例えば、この場合、H E R 2 との界面）からはるかに離れていることは、結晶構造データから明白である。これらの変異体は、機能的な相互作用に対する間接効果について実験的に試験され得る。全てのC y s F a b 改変体のチオール反応性を測定し、そして実施例1および2にて記載したように算出し、そして表2に提示した。残基L - V 1 5 C 、 L - V 1 1 0 C 、 H - A 8 8 C および H - A 1 2 1 C は、反応性チオール基および安定チオール基（図3 A および 3 B ）を有する。変異体V 1 5 C 、 V 1 1 0 C 、 A 1 4 4 C 、 S 1 6 8 C は、軽鎖C y s 改変体である。変異体A 8 8 C 、 A 1 2 1 C 、 A 1 7 5 C 、 S 1 7 9 C は、重鎖C y s 改変体である。P H E S E L E C T O R アッセイにより算出したところ、高い表面アクセシビリティ率を有する部位が最も高いチオール反応性を有したのではないことは、驚くべきことであり、かつ予想外であった（表2）。換言すれば、表面アクセシビリティ率（表1、2）は、チオール反応性（表2）と相關しなかった。事実、20% ~ 80% という中程度の表面アクセシビリティを有する部位（図4 A 、表1）または（A 1 a 残基またはV a 1 残基のような）部分的に露出した部位で操作されたC y s 残基は、S e r 残基に導入されたC y s よりも良好なチオール反応性（すなわち > 0.6 ）（図3 B 、表2）を示した。このように、結晶構造情報は単独では、これらの部位を選択するのに十分ではないので、チオール反応部位のスクリーニングにおけるP H E S E L E C T O R アッセイの使用を必要とした（図3 B および 4 A ）。

30

【0152】

チオール反応性データを、4 D 5 チオF a b C y s 変異体のアミノ酸残基について図3 A および図3 B に示す：（3 A ）非ビオチン化ファージ - チオF a b (コントロール) および（3 B ）ビオチン化ファージ - チオF a b 。抗体 / F a b 表面上の反応性チオール基は、非ビオチン化ファージ - h u 4 D 5 F a b v 8 (3 A) およびビオチン化ファー

40

50

ジ - h u 4 D 5 F a b v 8 (3 B) と B S A (白四角) 、 H E R 2 (灰色四角) またはストレプトアビジン (黒四角) との相互作用についての P H E S E L E C T O R アッセイ分析により同定された。このアッセイを、実施例 2 にて記載したように実施した。軽鎖改変体は左側にあり、そして重鎖改変体は右側にある。非ビオチン化 4 D 5 チオ F a b C y s 変異体の結合は予想通り低いが、 H E R 2 に対する強い結合は保持される。ビオチン化された 4 D 5 チオ F a b システイン変異体の、ストレプトアビジンに対する結合と H E R 2 に対する結合との比率は、表 2 のチオール反応性値を与える。450 nm でのバックグラウンド吸光度または B S A に対するビオチン化 4 D 5 チオ F a b C y s 変異体の少量の非特異的タンパク質結合は、図 3 B にも明らかである。 C y s 残基で置換された選択されたアミノ酸残基の表面アクセシビリティー率値を図 4 A に示す。表面アクセシビリティー率を、利用できる h u 4 D 5 F a b v 7 構造から算出し、表 1 に示した (E i g e n b r o t ら (1 9 9 3) J M o l B i o l . 2 2 9 : 9 6 9 - 9 9 5) 。 h u 4 D 5 F a b v 7 および h u 4 D 5 F a b v 8 の構造のコンホメーションパラメータは非常に一貫しており、そして h u 4 D 5 F a b v 7 の表面アクセシビリティー率算出と h u 4 D 5 F a b v 8 システイン変異体のチオール反応性との間でのいかなる相関の決定をも可能にする。部分的に露出した残基 (A 1 a または V a 1) において導入されたファージチオ F a b C y s 残基の測定されたチオール反応性は、 S e r 残基において導入されたものと比較して、より良好なチオール反応性を有する (表 2) 。表 2 のチオ F a b C y s 変異体から、チオ反応性値と表面アクセシビリティー率との間にはほとんどまたは全く相関がないということがわかり得る。

【 0 1 5 3 】

抗体の L - 1 5 位、 L - 4 3 位、 L - 1 1 0 位、 L - 1 4 4 位、 L - 1 6 8 位、 H - 4 0 位、 H - 8 8 位、 H - 1 1 9 位、 H - 1 2 1 位、 H - 1 2 2 位、 H - 1 7 5 位、 および H - 1 7 9 位にあるアミノ酸は、一般に、遊離システインアミノ酸によって変異され得る (置換され得る) 。これらの位置の両側の約 5 つのアミノ酸残基内の範囲 (すなわち、 L - 1 0 ~ L - 2 0 ; L - 3 8 ~ L - 4 8 ; L - 1 0 5 ~ L - 1 1 5 ; L - 1 3 9 ~ L - 1 4 9 ; L - 1 6 3 ~ L - 1 7 3 ; H - 3 5 ~ H - 4 5 ; H - 8 3 ~ H - 9 3 ; H - 1 1 4 ~ H - 1 2 7 ; および H - 1 7 0 ~ H - 1 8 4) ならびに H - 2 6 8 ~ H - 2 9 1 ; H - 3 1 9 ~ H - 3 4 4 ; H - 3 7 0 ~ H - 3 8 0 ; および H - 3 9 5 ~ H - 4 0 5 から選択される F c 領域内の範囲もまた、遊離システイン酸によって置換されて、本発明のシステム操作抗体が産生され得る。

【 0 1 5 4 】

【表2】

表2. ファージ-チオFabのチオール反応性

ファージ-チオFab構築物	チオール反応性*	表面アクセシビリティ率(%) (表1より)
hu4D5Fabv8-wt	0.125	-
L-V15C	0.934	52.46
L-A43C	0.385	26.80
L-V110C	0.850	44.84
L-A144C	0.373	23.65
L-S168C	0.514	79.68
H-A40C	0.450	21.97
H-A88C	0.914	51.60
H-S119C	0.680	18.88
H-A121C	0.925	33.05
H-S122C	0.720	72.87
H-A175C	0.19	23.80
H-S179C	0.446	99.48

10

20

L=軽鎖, H=重鎖, A=アラニン, S=セリン, V=バリン, C=システイン

*チオール反応性は、ストレプトアビジン結合についての OD_{450 nm} と HER2(抗体)結合についての OD_{450 nm}との比として測定される(実施例2)。チオール反応性値1は、システインチオールの完全なビオチン化を示す。

軽鎖からの2つのCys改変体(L-V15CおよびL-V110C)および重鎖からの2つのCys改変体(H-A88CおよびH-A121C)を、さらなる分析のために選択した。なぜなら、これらの改変体が最も高いチオール反応性を示した(表2)からである。

30

【0155】

ファージ精製とは異なり、Fab調製は、生産規模に依存して、2~3日を必要とし得る。この間に、チオール基は、酸化に起因して反応性を失い得る。hu4D5Fabv8-Fa_bに対するチオール基の安定性をプローブするために、ファージ-チオFabのチオール反応性の安定性を測定した(図4B)。チオFab-Fa_b精製の後、1日目、2日目および4日目に、全てのサンプルをビオチン-PEO-マレイミドと結合体化させ、そしてファージELISAアッセイ(PHESELECTOR)によりプローブして、HER2およびストレプトアビジンの結合を試験した。L-V15C、L-V110C、H-A88CおよびH-A121Cは、他のチオFab改変体と比較して有意な量のチオール反応性を保持する(図4B)。

40

【0156】

(標識したシステイン操作抗体)

本発明のシステイン操作抗体は、反応性システインチオール基によって抗体に結合した共有結合であり得る任意の標識部分と結合体化され得る(Singhら(2002)Anal. Biochem. 304:147-15; Harlow E. およびLane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R. L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 第2版, CRC Press, Boca Raton, FL)。結合した標識

50

は、以下のために機能し得る：(i) 検出可能なシグナルを提供する；(ii) 第2の標識と相互作用して、第1の標識または第2の標識によって提供される検出可能なシグナルを改変して、例えば、FRET(蛍光共鳴エネルギー転移)を与える；(iii) 抗原またはリガンドとの相互作用を安定化するかまたは結合親和性を増加させる；(iv) 電荷、疎水性、形状または他の物理的パラメータによる移動性(例えば、電気泳動易動度または細胞浸透性)に影響を及ぼす；または(v) 捕捉部分を提供して、リガンド親和性、抗体/抗原結合またはイオン性錯体形成を改変する。

〔 0 1 5 7 〕

標識されたシスティン操作抗体は、例えば、特定の細胞、組織または血清における目的の抗原の発現を検出するための診断アッセイに有用であり得る。診断適用に関しては、この抗体は、概して、検出可能な部分によって標識される。一般に以下のカテゴリーに分類され得る多数の標識が利用できる：

(a) ラジオアイソトープ(放射性核種)(例えば、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{133}Xe 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At または ^{213}Bi).

ラジオアイソトープ標識抗体は、レセプターを標的とした画像化実験に有用である。抗体は、Current Protocols in Immunology、1巻および2巻、Colligenら編、Wiley-Interscience、New York、NY、Pubs. (1991) に記載されている技術を用いて、結合するか、キレート化するか、またはさもなければラジオアイソトープ金属を錯体化するリガンド試薬によって標識され得、ここで、この試薬は、抗体の操作されたシステインチオールと反応性である。金属イオンを錯体化し得るキレート化リガンドとしては、DOTA、DOTP、DOTMA、DTPAおよびTETA (Macrocyclics, Dallas, TX) が挙げられる。放射性核種は、本発明の抗体-薬物結合体との錯体形成を介して標的化され得る (Wuら (2005) Nature Biotechnology 23 (9) : 1137-1146)。

[0 1 5 8]

画像化実験のための抗体標識として適切な金属-キレート錯体は、以下に開示される。

998) J. Nucl. Med. 39: 829-36; Mardirosianら(1993) Nucl. Med. Biol. 20: 65-74; Roselliら(1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14: 209-20。

【0159】

(b) 蛍光標識(例えば、希土類キレート(ユウロピウムキレート)、フルオレセイン型(FITC、5-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセインが挙げられる)；ローダミン型(TAMRAが挙げられる)；ダンシル；リサミン；シアニン；フィコエリトリン；テキサスレッド；およびそれらのアナログ)。蛍光標識は、例えば、Current Protocols in Immunology(前出)において開示される技術を使用して抗体に結合され得る。蛍光色素および蛍光標識試薬としては、*In vitro*gen/Molecular Probes(Eugene, OR)およびPierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)から市販されているものが挙げられる。

【0160】

(c) さまざまな酵素-基質標識が入手可能であるかまたは開示されている(US 4275149)。これらの酵素は、一般に、さまざまな技術を使用して測定され得る、色素形成性基質の化学変化を触媒する。例えば、これらの酵素は、基質の色変化を触媒し得、これは分光測光法により測定され得る。あるいは、これらの酵素は、基質の蛍光または化学発光を変更し得る。蛍光の変化を定量する技術は、上記に記載されている。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起されるようになり、その後、(例えば、化学ルミノメーターを使用して)測定され得る光を発し得るかまたは蛍光アクセプターにエネルギーを与える。酵素標識の例としては、以下が挙げられる:ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ; US 4737456)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP))、アルカリホスファターゼ(AP)、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環式オキシダーゼ(例えば、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなど。抗体に酵素を結合させる技術は、O'Sullivanら(1981)「Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay」, Methods in Enzym. (J. LangoneおよびH. Van Vunakis編), Academic Press, New York, 73: 147-166に記載されている。

【0161】

例えば、酵素-基質の組合せの例としては、以下が挙げられる:

(i) 西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)と、基質としての水素ペルオキシダーゼ(ここで、水素ペルオキシダーゼは、色素前駆体(例えば、オルトフェニレンジアミン(OPD)または3',3',5',5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩(TMB))を酸化する);

(ii) アルカリホスファターゼ(AP)と、色素形成性基質としてのパラ-ニトロフェニルホスフェート;および

(iii) -D-ガラクトシダーゼ(-D-Gal)と、色素形成性基質(例えば、p-ニトロフェニル--D-ガラクトシダーゼ)または蛍光発生性基質4-メチルウニベリフェリル--D-ガラクトシダーゼ。

【0162】

多数の他の酵素-基質の組合せは、当業者に利用可能である。一般的な概説に関しては、US 4275149およびUS 4318980を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0163】

標識は、システイン操作抗体と間接的に結合され得る。例えば、抗体は、ビオチンと結合し得、そして、前述の3つの幅広いカテゴリーの標識のうちのいずれかが、アビジンまたはストレプトアビジンと結合してもよく、またはその逆であってもよい。ビオチンは、ストレプトアビジンと選択的に結合し、従って、この標識は、この間接的な様式で抗体と結合し得る。あるいは、ポリペチド改変体と標識との間接的な結合を達成するために、ポリペチド改変体は、小さいハプテン（例えば、ジゴキシン）と結合され、そして前述の異なるタイプの標識のうちの1つが抗ハプテンポリペチド改変体（例えば、抗ジゴキシン抗体）と結合される。従って、ポリペチド改変体と標識との間接的な結合が達成され得る（Hermanson, G. (1996) *Bioconjugate Techniques* 10 Academic Press, San Diego）。

【0164】

本発明のポリペチド改変体は、任意の公知のアッセイ方法（例えば、ELISA、競合結合アッセイ、直接的サンドイッチアッセイおよび間接的サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ）で使用され得る（Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158, CRC Press, Inc.）。

【0165】

検出標識は、結合事象または認識事象を局所決定し、視覚化し、そして定量するために有用であり得る。本発明の標識抗体は、細胞表面レセプターを検出し得る。検出可能に標識された抗体の別の用途は、蛍光標識抗体とビーズとを結合することおよびリガンドの結合の際の蛍光シグナルを検出することを含む、ビーズベースの免疫捕捉方法である。類似の結合検出方法論は、抗体-抗原相互作用を測定および検出するために、表面プラズモン共鳴（SPR）効果を利用する。

【0166】

検出標識（例えば、蛍光色素および化学発光色素）（Briggsら(1997)「Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids」, J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1: 1051-1058）は、検出可能なシグナルを提供し、そして一般的に標識抗体に適用し得、好ましくは以下の特性を有する：(i) この標識抗体は、低バックグラウンドを有する非常に高いシグナルを生じるはずであり、その結果、少量の抗体が、無細胞アッセイおよび細胞ベースアッセイの両方において高感度で検出され得る；ならびに(ii) この標識抗体は、光に安定なはずであり、その結果、重大な光退色なしで、蛍光シグナルが観察され得、モニタリングされ得、そして記録され得る。膜または細胞表面（特に生きた細胞）への標識抗体の細胞表面結合に関する適用については、この標識は、好ましくは、(iii) 有効な結合体濃度および検出感度を達成する良好な水溶性を有する、ならびに(iv) 生きた細胞に対して無毒性であり、その結果、細胞の正常な代謝プロセスを破壊せず、早すぎる細胞死も引き起こさない。

【0167】

細胞蛍光強度の直接定量および蛍光標識事象（例えば、ペプチド-色素結合体の細胞表面結合）の計数は、混合および読み取り、生きた細胞またはビーズを用いた非放射性アッセイを自動化したシステム（FMAT（登録商標）8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.）において行われ得る（Miraglia, 「Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology」, (1999) J. of Biomolecular Screening 4: 193-204）。標識抗体の使用としてはまた、以下が挙げられる：細胞表面レセプター結合アッセイ、免疫捕捉アッセイ、蛍光連結免疫吸着材アッセイ。

10

20

30

40

50

セイ(FLISA)、カスパーゼ切断(Zheng, 「Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo」, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 618-23; US 6372907)、アポトーシス(Vermes, 「A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence in labelled Annexin V」(1995) J. Immunol. Methods 184: 39-51)および細胞傷害性アッセイ。蛍光定量的マイクロボリュームアッセイ技術は、細胞表面に標的化される分子によるアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションを確認するために用いられ得る(Swartzman, 「A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology」, (1999) Anal. Biochem. 271: 143-51)。

【0168】

本発明の標識されたシテイン操作抗体は、例えば以下の生物医学画像化および分子画像化のさまざまな方法および技術による画像化生体マーカーおよびプローブとして有用である：(i) MRI(磁気共鳴画像化)；(ii) MicroCT(コンピューター連動断層撮影法)；(iii) SPECT(シングルフォトンエミッショ nコンピューター連動断層撮影法)；(iv) PET(ポジトロン断層撮影法)(Chenら(2004) Bioconjugate Chem. 15: 41-49)；(v) 生物発光；(vi) 蛍光；および(vii)超音波。免疫シンチグラフィーは、放射性物質で標識された抗体が動物患者またはヒト患者に投与され、そして抗体が局在した身体内部位の画像が撮影される、画像化手順である(US 6528624)。画像化生体マーカーは、客観的に測定され得、そして正常な生物学的プロセス、病的なプロセスまたは治療介入への薬理学的応答の指標として評価され得る。生体マーカーは、いくつかのタイプのものであり得る：0型は、疾患の天然の歴史的なマーカーであり、既知の臨床指數(例えば、関節リウマチにおける滑膜炎症のMRI評価)と長期的に相關する；I型のマーカーは、作用機構に従って介入の効果を捕捉するが、この機構は、臨床結果と関連しないかも知れない；II型マーカーは、生体マーカーの変化または生体マーカーからのシグナルが臨床利益を予測する代理終点として作用して、標的とされた応答(例えば、CTによって関節リウマチにおいて測定される骨腐食)が「確認」される。画像化生体マーカーは、このように、以下のような薬力学的(PD)治療情報を提供し得る：(i) 標的タンパク質の発現、(ii) 標的タンパク質への治療剤の結合(すなわち、選択性)、ならびに(iii)クリアランスおよび半減期薬物動態データ。研究室ベースの生体マーカーと比較したインビボでの画像化生体マーカーの利点としては、以下が挙げられる：非侵襲的処理、定量可能な全身評価、反復投薬および評価(すなわち、複数の時点)、ならびに前臨床(小動物)から臨床(ヒト)までの結果からの潜在的に移動可能な効果。いくつかの適用に関しては、生体画像化は、前臨床試験における動物実験にとって代わるかまたは動物実験数を最小にする。

【0169】

放射性核種画像化標識としては、放射性核種(例えば、³H、¹¹C、¹⁴C、¹⁸F、³²P、³⁵S、⁶⁴Cu、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹³³Xe、¹⁷⁷Lu、²¹¹Atまたは²¹³Bi)が挙げられる。放射性核種の金属イオンは、キレートリンカー(例えば、DOTA)と錯体形成し得る。DOTA-マレイミド(4-マレイミドブチルアミドベンジル-DOTA)のようなリンカー試薬は、Axworthや(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4): 1802-1807の手順に従って、イソプロピルクロロホルメート(Aldrich)によって活性化された4-マレイミド酪酸(Flu-

10

20

30

40

50

ka)とのアミノベンジル-DOTAの反応により調製され得る。DOTA-マレイミド試薬は、システイン操作抗体の遊離システインアミノ酸と反応し、そして抗体上に金属錯体形成リガンドを提供する (Lewisら (1998) *Bioconjug. Chem.* 9: 72-86)。キレート化リンカー標識試薬 (例えば、DOTA-NHS) (1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸モノ (N-ヒドロキシクシンイミドエステル) は、市販されている (Macro cyclics, Dallas, TX)。放射性核種で標識された抗体を用いたレセプター標的画像化は、腫瘍組織への抗体の進行性の蓄積の検出および定量によって、経路活性化のマーカーを提供し得る (Albertら (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 1207-1210)。結合体化放射性金属は、リソゾーム分解後、細胞内に維持され得る。

10

【0170】

ペプチド標識方法は、周知である。Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.*; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazierら (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work および E. Work 編) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. および Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I and II, CRC Press, New York; Pfleiderer, G. (1985) 「*Chemical Modification of Proteins*」, *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche 編, Walter DeGryter, Berlin and New York; ならびに Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez ら (2004) *Chem. Eur. J.* 10: 1149-1155; Lewis ら (2001) *Bioconjugate Chem.* 12: 320-324; Li ら (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 110-115; Mier ら (2005) *Bioconjugate Chem.* 16: 240-237を参照のこと。

20

【0171】

充分な近位にある2つの部分 (蛍光リポーターおよびクエンチャー) で標識したペプチドおよびタンパク質は、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を受ける。レポーター基は、代表的に、特定の波長の光で励起されて、最大の明るさでの放出のための適切なストークスシフトを伴ってエネルギーをレセプター基 (またはクエンチャー基) へ移動させる蛍光色素である。蛍光色素としては、拡張した芳香族性を有する分子 (例えば、フルオレセインおよびローダミン)、ならびにそれらの誘導体が挙げられる。蛍光リポーターは、完全なペプチド中のクエンチャー部分によって、部分的にまたは著しくクエンチされ得る。ペプチダーゼまたはプロテアーゼによってペプチドが切断されると、蛍光の検出可能な増加が測定され得る (Knight, C. (1995) 「*Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes*」, *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248: 18-34)。

30

【0172】

本発明の標識された抗体は、親和性精製剤としても使用され得る。このプロセスでは、標識された抗体は、当該分野で周知の方法を用いて、固相 (例えば、Sephadex樹

40

50

脂または濾紙)に固定される。固定された抗体は、精製されるべき抗原を含んでいるサンプルと接触され、その後、支持体が、精製されるべき抗原以外のサンプル中の実質的に全ての物質を除去する適切な溶媒によって洗浄される。精製されるべき抗原は、固定されたポリペチド改変体に結合される。最後に、この支持体は、抗原をポリペチド改変体から遊離させる別の適切な溶媒(例えば、グリシン緩衝液(pH 5.0))によって洗浄される。

【0173】

標識化試薬は、代表的に、反応性官能基を保有し、この反応性官能基は、(i) システイン操作抗体のシステインチオールと直接反応して、標識された抗体を形成し得る、(ii) リンカー試薬と反応して、リンカー-標識中間体を形成し得る、または(iii) リンカーア抗体と反応して、標識された抗体を形成し得る。標識化試薬の反応性官能基としては以下が挙げられる: マレイミド、ハロアセチル、ヨードアセトアミドスクシンイミジルエステル(例えば、NHS、N-ヒドロキシスクシンイミド)、イソチオシアネット、塩化スルホニル、2,6-ジクロロトリアジニル、ペンタフルオロフェニルエステルおよびホスホルアミダイト、しかし、他の官能基もまた使用され得る。

【0174】

例示的な反応性官能基は、検出可能な標識(例えば、ビオチンまたは蛍光色素)のカルボキシル基置換基のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(NHS)である。標識のNHSエステルは、予め成形され得、単離され得、精製され得、そして/もしくは特徴付けられ得るか、またはそれは、インサイチュで形成されて抗体の求核基と反応し得る。代表的に、カルボキシル形態の標識は、カルボジイミド試薬(例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド)またはウロニウム(uronium)試薬(例えば、TSTU(O-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート)、HBTU(O-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)またはHATU(O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)、アクチベーター(例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt))およびN-ヒドロキシスクシンイミドのいくつかの組合せと反応させて、標識のNHSエステルを得ることにより活性化される。いくつかの場合には、標識および抗体は、一工程で、標識のインサイチュ活性化および抗体との反応により結合されて、標識-抗体結合体を形成し得る。他の活性化試薬および結合試薬としては、以下が挙げられる: TBTU(2-(1H-ベンゾトリアゾ-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)、TFFH(N,N',N",N')-テトラメチルウロニウム2-フルオロ-ヘキサフルオロホスフェート)、PyBOP(ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート)、EEDQ(2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロ-キノリン)、DCC(ジシクロヘキシルカルボジイミド)、DIPCDI(ジイソプロピルカルボジイミド)、MSNT(1-(メシチレン-2-スルホニル)-3-ニトロ-1H-1,2,4-トリアゾールおよびアリールスルホニルハロゲン化物(例えば、塩化トリイソプロピルベンゼンスルホニル))。

【0175】

(チオFabに対するビオチン-マレイミドの結合)

ファージコートタンパク質に対するFabの融合がCysチオールアクセシビリティまたは反応性を潜在的に変更し得るので、上記のチオFab特性を、ファージの存在下で確立した。従って、チオFab構築物を、アルカリホスファターゼプロモーター(Changら(1987)Gene 55:189-196)下で発現ベクターにクローン化し、そしてチオFab発現を、ホスフェートを含まない培地中でE.coli細胞を増殖させることにより誘導した。チオFabを、Protein G SEPHAROSETMカラムにおいて精製し、そして還元型SDS-PAGEゲルおよび非還元型SDS-PAGEゲルにおいて分析した。これらの分析は、チオFabがそれらの反応性チオール基を保

10

20

30

40

50

持したかまたは分子内ジスルフィド結合もしくは分子間ジスルフィド結合を形成することによって不活性になったかの評価を可能にする。チオF a b L - V 1 5 C、チオF a b L - V 1 1 0 C、チオF a b H - A 8 8 CおよびチオF a b H - A 1 2 1 Cを発現させ、そしてProtein-G SEPHAROSETMカラムクロマトグラフィーにより精製した(詳細については、方法のセクションを参照のこと)。精製されたタンパク質を、還元条件下(DTTあり)および非還元条件(DTTなし)においてSDS-PAGEゲルで分析した。BME(β-メルカプトエタノール)のような他の還元剤をゲルにおいて用いて、鎖間ジスルフィド基を切断し得た。主な(約90%)部分のチオF a bがモノマー形態であり、その一方で、野生型h u 4 D 5 F a b v 8は本質的にモノマー形態(47kDa)であることは、SDS-PAGE分析から明白である。 10

【0176】

チオF a b (A 1 2 1 C)および野生型h u 4 D 5 F a b v 8を、100倍過剰のビオチン-マレイミドとともに室温にて3時間インキュベートし、そしてビオチン化されたF a bをSuperdex-200TMゲル濾過カラムにローディングした。この精製工程は、モノマーF a bをオリゴマーF a bから分離することに、そしてまた過剰な遊離ビオチン-マレイミド(または遊離の細胞傷害性薬物)から分離することに役立った。

【0177】

図5は、ファージの情況の非存在下でのチオF a b改変体の特性の確認を示す。ファージ融合のないタンパク質h u 4 D 5 F a b v 8およびh u 4 D 5 F a b v 8 - A 1 2 1 C(チオF a b - A 1 2 1 C)を発現させ、そしてプロテインGアガロースビーズを使用して精製し、その後、100倍モル過剰のビオチン-マレイミドとともにインキュベートした。ビオチン化されたc y s操作チオF a bと非ビオチン化野生型F a bとのストレプトアビジンおよびHER2結合を比較した。ビオチン結合体化(ストレプトアビジンとの相互作用)の程度およびHER2に対するそれらの結合能力を、ELISA分析によってモニタリングした。各F a bを2ngおよび20ngで試験した。 20

【0178】

ビオチン化されたA 1 2 1 CチオF a bは、野生型h u 4 D 5 F a b v 8の結合と匹敵するHER2結合を保持した(図5)。野生型F a bおよびA 1 2 1 C - チオF a bを、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製した。これらの2つのサンプルを、二次抗体としてヤギ抗F a b - HRPを使用したELISAによって、HER2結合およびストレプトアビジン結合について試験した。野生型(白四角)およびチオF a b(点四角)は両方とも、HER2に対して類似の結合を有するが、しかし、チオF a bのみはストレプトアビジン結合を保持した。ほんのバックグラウンドレベルのストレプトアビジンとの相互作用が、非ビオチン化野生型h u 4 D 5 F a b v 8について観察された(図5)。ビオチン化されたチオF a b (A 1 2 1 C)の質量分析(LC-ESI-MS)は、野生型h u 4 D 5 F a b v 8(47737ダルトン)と比較して、48294.5ダルトンの主なピークをもたらした。2つの分子の間の537.5ダルトンの違いは、チオF a bに結合した単一のビオチン-マレイミドに正確に対応する。質量分析タンパク質配列決定(LC-ESI-Tandem質量分析)の結果は、結合体化ビオチン分子が新たに操作されたc y s残基であることをさらに確認した(表4、実施例3)。 30

【0179】

(アルブミン結合性ペプチド(ABP) - チオF a bに対するビオチン-マレイミドの部位特異的結合体化)

血漿タンパク質結合は、短命の分子の薬物動態特性を改善する有効な手段であり得る。アルブミンは、血漿において最も豊富なタンパク質である。血清アルブミン結合性ペプチド(ABP)は、組織取り込み、浸透および拡散の変更を含め、融合した活性ドメインタンパク質の薬力学を変更し得る。これらの薬力学的パラメータは、適切な血清アルブミン結合性ペプチド配列の特異的選択により調節され得る(US 20040001827)。一連のアルブミン結合性ペプチドは、ファージディスプレイスクリーニングにより確認された(Dennissら(2002)「Albumin Binding As AG 50

eneral Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins」, J Biol Chem. 277: 35035 - 35043; WO 01/45746)。本発明の化合物は、以下によって教示されるABP配列を含む：(i) Dennisら(2002) J Biol Chem. 277: 35035 - 35043, Tables IIIおよびIV, 35038頁；(ii) US 20040001827, [0076], 配列番号9～22；および(iii) WO 01/45746, 12 - 13頁, 配列番号z1～z14。これらの全ては、本明細書中に参考として援用される。

【0180】

アルブミン結合性(ABP)-Fabを、化学量論比1:1(1 ABP/1 Fab)で、アルブミン結合性ペプチドをFab重鎖のC末端に融合させることにより操作した。アルブミンとのこれらのABP-Fabの会合により、ウサギおよびマウスにおいて25倍より高くそれらの半減期が増加することが示された。従って、上記した反応性Cys残基は、これらのABP-Fabに導入され得、そして細胞傷害性薬物との部位特異的結合体化に、続いてインビボでの動物研究のために使用され得る。図9は、グラフィックで、アルブミン結合性ペプチド-Fab融合体(ABP-Fab)リンカー薬物結合体を示す。

【0181】

例示的なアルブミン結合性ペプチド配列としては、配列番号1～5に列挙されるアミノ酸配列が挙げられるが、これらに限定されない：

C D K T H T G G G S Q R L M E D I C L P R W G C L W E D D F	配列番号1
Q R L M E D I C L P R W G C L W E D D F	配列番号2
Q R L I E D I C L P R W G C L W E D D F	配列番号3
R L I E D I C L P R W G C L W E D D	配列番号4
D I C L P R W G C L W	配列番号5。

【0182】

アルブミン結合性ペプチド(ABP)配列は、 K_d (ウサギ) = 0.3 μM を有する複数の種(マウス、ラット、ウサギ、ウシ、アカゲザル、ヒヒおよびヒト)からアルブミンを結合する。アルブミン結合性ペプチドは、アルブミンと結合することが公知のリガンドと競合せず、かつウサギにおいて2.3時間の半減期($T^{1/2}$)を有する。ABP-チオFabタンパク質を、そして上記のセクションで記載したとおりに、BSA-SEPHAROSETMで精製し、続いてビオチン-マレイミド結合体化を行い、SuperdexTM-S200カラムクロマトグラフィで精製した。精製されたビオチン化タンパク質は、均一であり、そしていかなるオリゴマー形態も含まなかった(実施例4)。

【0183】

図6は、アルブミン結合性ペプチド(ABP)-チオFab改変体の特性を示す。ELISA分析を実施して、ウサギアルブミン、ストレプトアビジンおよびHER2とのABP-hu4D5Fab_{v8-wt}、ABP-hu4D5Fab_{v8-V110C}およびABP-hu4D5Fab_{v8-A121C}の結合能力を試験した。ELISA(図6)およびBIACore結合速度分析(表3)によって確認されたとおり、ビオチン化ABP-チオFab_sは、野生型ABP-hu4D5Fab_{v8}の親和性と類似の親和性でアルブミンおよびHER2と結合し得る。ELISAプレートを、記載される通りにアルブミン、HER2およびSAでコーティングした。アルブミン、HER2およびSAに対するビオチン化ABP-チオFabは、コントロールの非ビオチン化ABP-hu4D5Fab_{v8-wt}と比較して、ストレプトアビジンに結合し得た。このことは、同じCys変異体が両方の改変体のために使われたので、ABP-チオFabが、部位特異的様式でチオFabのようなビオチンマレイミドと結合体化したことを示している(図6)。

【0184】

【表3】

表3. ビオチン化ABP-hu4D5Fabv8野生型およびチオFabへのHER2およびウサギアルブミン結合についての BIACore 反応速度分析

抗体	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_d (nM)
HER2 結合			
野生型	4.57×10^5	4.19×10^{-5}	0.0917
V110C	4.18×10^5	4.05×10^{-5}	0.097
A121C	3.91×10^5	4.15×10^{-5}	0.106
ウサギアルブミン結合			
野生型	1.66×10^5	0.0206	124
V110C	2.43×10^5	0.0331	136
A121C	1.70×10^5	0.0238	140

ABP = アルブミン結合性ペプチド

あるいは、アルブミン結合性ペプチドは、リンカー部分による共有結合によって、抗体に連結され得る。

【0185】

(Fabあたり2個の遊離チオール基を有するABP - チオFabの操作)

上記の結果は、4つ全て(L - V15C、L - V110C、H - A88CおよびH - A121C)のチオFab(システイン操作Fab抗体)改変体が、標識試薬、リンカー試薬または薬物 - リンカー中間体との部位特異的結合体化のために使用され得る反応性チオール基を有することを示す。L - V15Cは、比較的低い収率で、発現および精製され得る。しかしながら、L - V110C、H - A88CおよびH - A121C異型の発現収率および精製収率は、hu4D5Fabv8のものと類似していた。従って、これらの変異体は、さらなる分析のために使用され得、そして組換えられてFabあたり1個より多くのチオール基が得られ得る。この目的に向けて、軽鎖上の1つのチオール基および重鎖上の1つのチオール基を構築して、Fab分子あたり2個のチオール基を得た(L - V110C / H - A88CおよびL - V110C / H - A121C)。これらの2つの二重Cys改変体をE.coli発現系において発現させ、そして精製した。精製されたビオチン化ABP - チオFabの均質性は、単一Cys改変体の均一性と類似していることがわかった。

【0186】

Fabあたり2個の反応性Cys残基を操作することの影響を調査した(図7)。第2のビオチンの存在を、ストレプトアビジン - HRPを使用してSAに対するビオチン化ABP - チオFabの結合をプローブすることによって試験した(図7)。HER2 / Fab分析のために、ELISAプレートをHER2でコーティングし、そして抗Fab - HRPでプローブした。SA / Fab分析のために、ELISAプレートをSAでコーティングし、そして抗Fab - HRPでプローブした。SA / SA分析のために、ELISAプレートをSAでコーティングし、そしてSA - HRPでプローブした。図7。ビオチン化ABP - hu4D5Fabv8 Cys改変体とHER2、ストレプトアビジン(SA)との相互作用についてのELISA分析。HER2 / Fab、SA / FabおよびSA / SAは、それらの相互作用がそれぞれ抗Fab - HRP、SA - HRPによってモニタリングされたことを示す。SA / FabはFabあたり1個のビオチンの存在をモニタリングし、そしてFabあたり1個より多くのビオチンはSA / SA分析によってモニターされる。HER2と二重Cys改変体との結合は、単一のシステイン改変体の結合と類似している(図7)。しかしながら、二重Cys改変体でのビオチン化の程度は、Fab分子あたり1個より多くの遊離チオール基に起因して、単一のCys改変体と比較して、より高かった(図7)。

【0187】

(トラスツズマブのチオIgG改変体の操作)

システインを、全長モノクローナル抗体であるトラスツズマブ(HERCEPTIN R

10

20

30

40

50

(登録商標)、Genentech Inc.に、特定の残基において導入した。トラスツズマブの単一Cys変異体H-A88C、H-A121CおよびL-V110C、ならびにトラスツズマブの二重Cys変異体V110C-A121CおよびV110C-A121Cを、1mMのシステインを含んでいる培地中での一過性発酵によって、CHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞において発現させた。A88C変異体重鎖配列(450aaa)は、配列番号6である。A121C変異体の重鎖配列(450aaa)は、配列番号7である。V110C変異体の軽鎖配列(214aaa)は、配列番号8である。

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRTTISADTSKNTAY
LQMNSLRCEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS 10
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

配列番号6

20

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRTTISADTSKNTAY
LQMNSLRRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV 30
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

配列番号7

30

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTTKVEIKRTCAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDVDTSYSLSSLTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号8

40

。

【0188】

一実施形態によれば、システイン操作されたチオトラスツズマブ抗体は、遊離システィンアミノ酸を有する以下の可変領域重鎖配列(配列番号9~16)のうちの一つ以上を含む。

【0189】

【化9】

変異体	配列	配列番号
A40C	WVRQCPGKGL	配列番号 9
A88C	NSLRCEDTAV	配列番号 10
S119C	LVTVCSASTKGPS	配列番号 11
S120C	LVTVSCASTKGPS	配列番号 12
A121C	LVTVSSCSTKGPS	配列番号 13
S122C	LVTVSSACTKGPS	配列番号 14
A175C	HTFPCVLQSSGLYS	配列番号 15
S179C	HTFPAVLQCSGLYS	配列番号 16

10

別の実施形態によれば、システイン操作されたチオトラスツズマブ抗体は、遊離システインアミノ酸を有する以下の可変領域軽鎖配列（配列番号 17～27）のうちの一つ以上を含む。

【0190】

【化10】

変異体	配列	配列番号
V15C	SLSASCGDRVT	配列番号 17
A43C	QKPGKCPKLLI	配列番号 18
V110C	EIKRTCAAPSV	配列番号 19
S114C	TCAAPCVFIFPP	配列番号 20
S121C	FIFPPCDEQLK	配列番号 21
S127C	DEQLKCGTASV	配列番号 22
A144C	FYPRECKVQWK	配列番号 23
A153C	WKVDNCLQSGN	配列番号 24
N158C	ALQSGCSQESV	配列番号 25
S168C	VTEQDCKDSTY	配列番号 26
V205C	GLSSPCTKSFN	配列番号 27

20

得られる全長チオトラスツズマブ IgG 改変体を、は、チオール反応性および H E R 2 結合活性についてアッセイした。図 13 A は、吸光度検出のための固定された H E R 2 および H R P 標識二次抗体と結合しているビオチン化抗体の漫画による図を示す。図 13 B は、（左から右に）以下のものの、450 nm での吸光度の検出を有する固定された H E R 2 への結合測定値を示す：非ビオチン化野生型トラスツズマブ（Wt）、ビオチン - マレイミド結合体化チオトラスツズマブ改変体 V110C（単一の cys）、A121C（単一の cys）および V110C - A121C（二重 cys）。各チオ IgG 改変体およびトラスツズマブを、1、10 および 100 ng で試験した。これらの測定値は、ビオチン化抗 H E R 2 チオ Mab が H E R 2 結合活性を保持することを示す。

30

【0191】

図 14 A は、吸光度検出のための抗 IgG - H R P へのビオチンの結合を有する固定された H E R 2 と結合しているビオチン化抗体の漫画による図を示す。図 14 B は、ストレプトアビシンと結合する際の、ビオチン - マレイミド結合体化チオトラスツズマブ改変体および非ビオチン化野生型トラスツズマブの 450 nm での吸光度の検出での結合測定値を示す。左から右に：V110C（単一の cys）、A121C（単一の cys）、V110C / A121C（二重 cys）およびトラスツズマブ。各チオ IgG トラスツズマブ改変体および親トラスツズマブを、1、10 および 100 ng で試験した。これらの測定値は、H E R 2 チオ Mab が高いチオール反応性を有することを示す。

40

【0192】

システインを、全長 2H9 抗 E ph B2R 抗体に特定の残基において導入した。2H9 の単一 cys 変異体 H - A121C を、1 mM のシステインを含んでいる培地中での一過性発酵によって CHO (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞において発現させた。A121C 2H9 変異体の重鎖配列 (450aa) は、配列番号 28 である。

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y T F T S Y W M H W V R Q A

50

P G K G L E W V G F I N P S T G Y T D Y N Q K F K D R F T I S A D T S K N T A Y
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R R P K I P R H A N V F W G Q G T L V T V S S
 C S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
 Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
 P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
 Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
 E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
 M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
 L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T 10
 Q K S L S L S P G K
 配列番号 28。

【0193】

システィン操作チオ2H9抗体は、遊離システィンアミノ酸を有する以下のFc定常領域重鎖配列(配列番号29~38)を含む。

【0194】

【化11】

変異体	配列	配列番号
V273C	HEDPECKFNWYVDGVEVHNNAKTKPR	配列番号29
V279C	HEDPEVKFNWYCDGVEVHNNAKTKPR	配列番号30
V282C	HEDPEVKFNWYVDGCEVHNNAKTKPR	配列番号31
V284C	HEDPEVKFNWYVDGVECHNAKTKPR	配列番号32
A287C	HEDPEVKFNWYVDGVEVHNCKTKPR	配列番号33
S324C	YKCKVCNKALP	配列番号34
S337C	IEKTICKAKGQPR	配列番号35
A339C	IEKTISKCKGQPR	配列番号36
S375C	KGFYPCDIAVE	配列番号37
S400C	PPVLDLCDGSFF	配列番号38

図16は、固定されたプロテインAでの精製後の、2H9チオMab Fc改変体(左から右に、レーン1~9)(A339C; S337C; S324C; A287C; V284C; V282C; V279C; およびV273C)および2H9野生型の非還元型(上図)および還元型(下図)の変性SDS-PAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)分析を示す。右のレーンはサイズマーカーラダーであり、これは、インタクトなタンパク質が約150kDaであり、重鎖フラグメントが約50kDaであり、そして軽鎖フラグメントが約25kDaであることを示す。図17Aは、固定されたプロテインAでの精製後の、2H9チオMab改変体(左から右に、レーン1~4)(L-V15C; S179C; S375C; S400C)の非還元型(左)および還元型(右)の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析を示す。図17Bは、固定されたプロテインAでの精製後の、さらなる2H9チオMab改変体および3A5チオMab改変体の非還元型(左)および還元型(+DTT)(右)の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析を示す。(Fab領域およびFc領域における)2H9チオMab改変体を、記載される通りに発現させ、そして精製した。図16、図17Aおよび図17Bからわかるように、全てのタンパク質はSDS-PAGEにおいて均質であり、その後、実施例11の還元手順および酸化手順が行われて、結合体化(実施例12)のための反応性チオMabが調製される。 30

【0195】

システィンを、全長3A5抗MUC16抗体に特定の残基において導入した。3A5の単一cys変異体H-A121Cを、1mMのシスティンを含んでいる培地中での一過性発酵によって、CHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞において発現させた。A121C 3A5変異体の重鎖配列(446aa)は、配列番号39を含む。

D V Q L Q E S G P G L V N P S Q S L S L T C T V T G Y S I T N D Y A W N W I R Q
 F P G N K L E W M G Y I N Y S G Y T T Y N P S L K S R I S I T R D T S K N Q F F 40

10

20

30

40

50

L H L N S V T T E D T A T Y Y C A R W D G G L T Y W G Q G T L V T V S A C S T K
 G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G
 A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N
 V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F
 L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G
 V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
 K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
 Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D
 G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
 S L S P G K

配列番号 39

10

。

【0196】

システィン操作されたチオ3A5抗MUC16抗体は、遊離システィンアミノ酸を有する以下の可変領域重鎖配列（配列番号40～44）を含む。

【0197】

【化12】

変異体	配列	配列番号
F45C	NWIRQCPGNK	配列番号40
A90C	LNSCTTEDTAT	配列番号41
A121C	GQGTLVTVSACSTKGPSVFPL	配列番号42
A175C	HTFPVCVLQSSGLYS	配列番号43
V176C	HTFPACLQSSGLYS	配列番号44

20

システィン操作されたチオ3A5抗MUC16抗体は、遊離システィンアミノ酸を有する以下の可変領域軽鎖配列（配列番号45～49）を含む。

【0198】

【化13】

変異体	配列	配列番号
L15C	FLSVSCGGRVT	配列番号45
A43C	QKPGNCPRLLI	配列番号46
V110C	EIKRTCAAPSV	配列番号47
A144C	FYPRECKVQWK	配列番号48
S168C	VTEQDCKDSTY	配列番号49

30

（チオMabのチオール反応性）

全長のIgGシスティン操作抗体（チオMab）のチオール反応性を、ビオチン化およびストレプトアビジン結合によって測定した。ウェスタンプロットアッセイを設定して、ビオチン-マレイミドと特異的に結合されたチオMabをスクリーニングした。このアッセイにおいて、抗体は還元型SDS-PAGEによって分析され、そして、ビオチンの存在は、ストレプトアビジン-HRPとともにインキュベートすることによって特異的にプローブされる。図18からわかるように、ストレプトアビジン-HRP相互作用は、どの操作されたcys改变体異型が使われたかに依存して重鎖または軽鎖のいずれかにおいて観察され、そして野生型については相互作用は見られない。このことは、チオMab改变体が、操作されたcys残基においてビオチンを特異的に結合したことを示す。図18は、固定された抗IgG-HRP（上のゲル）およびストレプトアビジン-HRP（下のゲル）への捕捉後の、還元したビオチン化チオ-IgG改变体の変性ゲル分析を示す。レーン1：3A5 H-A121C。レーン2：3A5 L-V110C。レーン3：2H9 H-A121C。レーン4：2H9 L-V110C。レーン5：抗EphB2R 2H9親、野生型。各変異体（レーン1～4）を、選択性および親和性が保持されたことを示しているHRP検出を用いて抗IgGによって捕捉した（上図）。HRP検出を用いた

40

50

固定されたストレプトアビジンによる捕捉(下図)は、重鎖および軽鎖上のビオチンの位置を確認した。レーン1およびレーン3におけるシステイン操作抗体でのシステイン変異の位置は、重鎖である。レーン2およびレーン4におけるシステイン操作抗体でのシステイン変異の位置は、軽鎖である。システイン変異部位は、ビオチン・マレイミド試薬での結合体化を受ける。

【0199】

LC/MSによる図18のチオMabのシステイン操作抗体および2H9-V15C改変体の分析は、チオール反応性の定量的指標を与えた(表5)。

【0200】

【表5】

表5 チオMabのビオチン化チオール反応性のLC/MS定量

チオMab改変体	チオMabあたりのビオチン数
2H9 wt	0.0
2H9 L-V15C	0.6
2H9 L-V110C	0.5
2H9 H-A121C	2.0
3A5 L-V110C	1.0
3A5 H-A121C	2.0

システイン操作を、IgG抗体の定常ドメイン(すなわち、Fc領域)において実施した。様々なアミノ酸部位をシステイン部位に変え、そして発現された変異体(すなわち、システイン操作抗体)を、それらのチオール反応性について評価した。ビオチン化2H9チオMab-Fc改変体を、ELISAアッセイにおける固定されたストレプトアビジンへの捕捉によるHRP定量によってチオール反応性について評価した(図19)。ELISAアッセイは、反応チオール基を有するCys残基を迅速にスクリーニングするために確立された。図19の概略図にて図示するように、ストレプトアビジン-ビオチン相互作用は、抗IgG-HRPでプローブし、続いて450nmで吸光度を測定することによってモニタリングされる。これらの結果は、2H9-Fc改変体V282C、A287C、A339C、S375CおよびS400Cが、中程度から最も高いチオール反応性を有することを確認した。2H9チオMab-Fc改変体のビオチン結合体化の程度を、表6において報告されるようにLC/MS分析によって定量した。LC/MS分析は、A282C改変体、S375C改変体およびS400C改変体が100%のビオチン結合体化を有し、そしてV284CおよびA339Cが50%の結合体化を有することを確認した。このことは、反応性システインチオール基の存在を示す。他のチオFc改変体および親の野生型2H9は、ごくわずかなビオチン化を有したかまたは有さないかのいずれかであった。

【0201】

【表6】

表6 2H9 FcチオMabのビオチン化のLC/MS定量

2H9チオMab Fc改変体	ビオチン化の%
V273C	0
V279C	31
V282C	100
V284C	50
A287C	0
S324C	71
S337C	0
A339C	54
S375C	100
S400C	100
(野生型 2H9)	0

(チオ4D5-Fab軽鎖改変体のチオール反応性)

抗Erbb2抗体4D5の様々なシステイン操作された軽鎖改変体Fabのスクリーニング

10

20

30

40

50

ングは、図8のPHESELCTORアッセイによって測定したところ、0.6以上のチオール反応性値を有する多くの改変体を与えた（表7）。表7のチオール反応性値は、HC-A121C改変体の完全なビオチン化を仮定して100%と設定される重鎖4D5チオFab異型（HC-A121C）に対して正規化され、パーセント値として表される。

【0202】

【表7】

表7 4D5チオFab軽鎖改変体のチオール反応性パーセント値

4D5チオFab改変体	チオール反応性値(%)
V15C	100
V110C	95
S114C	78
S121C	75
S127C	75
A153C	82
N158C	77
V205C	78
(HC-A121C)	100
(4D5野生型)	25

10

20

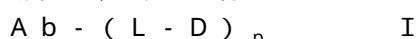
30

（抗体 - 薬物結合体）

本発明のシステイン操作抗体は、任意の治療剤（すなわち、薬物部分）と結合され得る。この薬物部分は、反応性システインチオール基を通して抗体に共有結合され得る。

【0203】

抗体 - 薬物結合体（ADC）化合物の例示的実施形態は、システイン操作抗体（Ab）および薬物部分（D）を含み、ここで、この抗体は、0.6~1.0の範囲のチオール反応性値を有する一つ以上の遊離システインアミノ酸を有し、そしてこの抗体は、リンカー部分（L）による一つ以上の遊離システインアミノ酸を通してDへと結合している；この構成物は、式Iを有する：



ここで、pは1、2、3、または4である。チオール反応性リンカー部分を介して抗体分子へと結合し得る薬物部分の数は、本明細書に記載される方法によって導入されるシステイン残基の数により制限される。従って、式Iの例示的なADCは、1、2、3、または4個の操作されたシステインアミノ酸を有する抗体を含む。

【0204】

抗体 - 薬物結合体化合物（ADC）の別の例示的実施形態は、システイン操作抗体（Ab）、アルブミン結合性ペプチド（ABP）および薬物部分（D）を含み、ここで、この抗体は、リンカー部分（L）によって薬物部分と結合しており、そしてこの抗体は、アミド結合または第2のリンカー部分によって、アルブミン結合性ペプチドと結合している；この構成物は、式Iaを有する：



ここで、pは、1、2、3、または4である。

【0205】

本発明のADC化合物は、抗癌活性についての有用性を有するものを含む。特に、この化合物は、薬物部分（すなわち、毒素）に結合した（すなわち、リンカーによって共有結合した）システイン操作抗体を含む。薬物が抗体に結合していない場合、この薬物は、細胞傷害効果または細胞増殖抑制効果を有する。このように、薬物部分の生物学的活性は、抗体への結合によって調節される。本発明の抗体 - 薬物結合体（ADC）は、有効量の細

40

50

胞傷害剤を腫瘍組織へと選択的に送達し、それにより、より大きな選択性（すなわち、より低い有効用量）が達成され得る。

【0206】

1つの実施形態では、ADCの薬物部分を含む薬物化合物と比較した場合、本発明のADCまたはADCの細胞内代謝産物のバイオアベイラビリティーは、哺乳類において改善される。また、薬物部分を有しないADCアナログと比較した場合、ADCまたはADCの細胞内代謝産物のバイオアベイラビリティーは哺乳類において改善される。

【0207】

（薬物部分）

抗体-薬物結合体（ADC）の薬物部分（D）は、細胞傷害効果または細胞増殖抑制果を有する、任意の化合物、部分または基を含む。薬物部分としては、以下が挙げられる：（i）化学療法剤（これは、マイクロチューブリンインヒビター、有糸分裂インヒビター、トポイソメラーゼインヒビターまたはDNAインターラーカレーターとして機能し得る）、（ii）タンパク質毒素（これは、酵素的に機能し得る）、および（iii）ラジオアイソトープ。

【0208】

例示的な薬物部分としては、マイタンシノイド、オーリスタチン、ドラスタチン、トリコテセン、CC1065、カリケアマイシンおよび他のエンジイン抗生物質、タキサン、アントラサイクリン、ならびにそれらの立体異性体、同配体、アナログまたは誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0209】

マイタンシノイド薬物部分としての使用に適しているマイタンシン化合物は、当該分野で周知であり、そして公知の方法に従って、天然の供給源から分離され得るか、遺伝子工学技術（Yular（2002）PROC.NAT.ACAD.SCI.（USA）99：7968-7973を参照のこと）を使用して生成され得るか、またはマイタンシノールおよびマイタンシノールアナログは、公知の方法に従って合成により調製され得る。

【0210】

例示的なマイタンシノイド薬物部分としては、例えば以下の、改変芳香環を有するものが挙げられる：C-19-デクロロ（US 4256746）（アンサミトシン（ansamycin）P2の水素化アルミニウムリチウム還元により調製される）；C-20-ヒドロキシ（またはC-20-デメチル）+/-C-19-デクロロ（米国特許第4361650号および同第4307016号）（StreptomycesもしくはActinomycesを用いた脱メチル化により、またはLAHを使用した脱塩素作用により、調製される）；ならびにC-20-デメトキシ、C-20-アシルオキシ（-OCOR）+/-デクロロ（米国特許第4,294,757号）（アシルクロリドを使用したアシル化により調製される）、ならびに他の位置に改変を有するもの。

【0211】

例示的なマイタンシノイド薬物部分としてはまた、例えば以下の改変を有するものが挙げられる：C-9-SH（US 4424219）（H₂SまたはP₂S₅を用いたマイタンシノールの反応により調製される）；C-14-アルコキシメチル（デメトキシ/C₂H₅OR）（US 4331598）；C-14-ヒドロキシメチルもしくはアシルオキシメチル（CH₂OHまたはCH₂OAc）（US 4450254）（Nocardiaから調製される）；C-15-ヒドロキシ/アシルオキシ（US 4364866）（Streptomycesによるマイタンシノールの変換により調製される）；C-15-メトキシ（米国特許第4313946号および同第4315929号）（Trewia nudifloraから単離される）；C-18-N-デメチル（米国特許第4362663号および同第4322348号）（Streptomycesによるマイタンシノールの脱メチル化により調製される）；および4,5-デオキシ（US 4371533）（マイタンシノールの三塩化チタン/LAH還元により調製される）。マイタンシン化合物上の多くの位置は、連結のタイプに依存して、結合位置として有用であることが公知

10

20

30

40

50

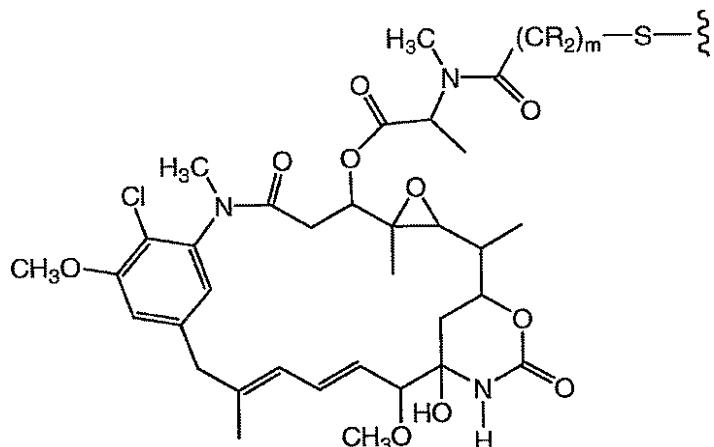
である。例えば、エステル結合を形成するために、ヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルにより修飾されるC-14位、ヒドロキシル基により修飾されるC-15位およびヒドロキシル基を有するC-20位は、全て適切である。

【0212】

式Iの抗体-薬物結合体(ADC)の薬物部分(D)は、以下の構造を有するマイタンシノイドを含む：

【0213】

【化14】



10

ここで、波形の線は、抗体-薬物結合体(ADC)のリンカー(L)へのDの硫黄原子の共有結合を示す。Rは、独立して、HまたはC₁-C₆アルキルであり得、C₁-C₆アルキルは、メチル、エチル、1-プロピル、2-プロピル、1-ブチル、2-メチル-1-プロピル、2-ブチル、2-メチル-2-プロピル、1-ペンチル、2-ペンチル、3-ペンチル、2-メチル-2-ブチル、3-メチル-2-ブチル、3-メチル-1-ブチル、2-メチル-1-ブチル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、2-メチル-2-ペンチル、3-メチル-2-ペンチル、4-メチル-2-ペンチル、3-メチル-3-ペンチル、2-メチル-3-ペンチル、2,3-ジメチル-2-ブチルおよび3,3-ジメチル-2-ブチルから選択される。アミド基を硫黄原子に結合するアルキレン鎖は、メタニル、エタニルまたはプロピルであり得る。すなわち、mは、1、2または3である。

20

【0214】

マイタンシン化合物は、マイクロチューブリンタンパク質であるチューピュリンの重合阻害によって有糸分裂中の微小管の形成を阻害することによって、細胞増殖を阻害する(Remillard (1975) Science 189: 1002-1005)。マイタンシンおよびマイタンシノイドは非常に細胞傷害性であるが、癌治療におけるそれらの臨床用途は、それらの乏しい腫瘍選択性に主に起因しているそれらの重篤な全身副作用によって大いに制限されている。マイタンシンを用いた臨床試験は、中枢神経系および胃腸系に対する深刻な副作用に起因して中断された(Issel (1978) Can. Treatment. Rev. 5: 199-207)。

30

40

【0215】

マイタンシノイド薬物部分は、抗体-薬物結合体において魅力的な薬物部分である。なぜなら、これらは以下であるからである：(i)発酵または化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために比較的アクセス可能である、(ii)非ジスルフィドリンカーを通した抗体に対する結合体化に適している官能基を用いた誘導体化が可能である、(iii)血漿中で安定である、および(iv)様々な腫瘍細胞株に対して有効である(US 2005/0169933; WO 2005/037992; US 5208020)。

【0216】

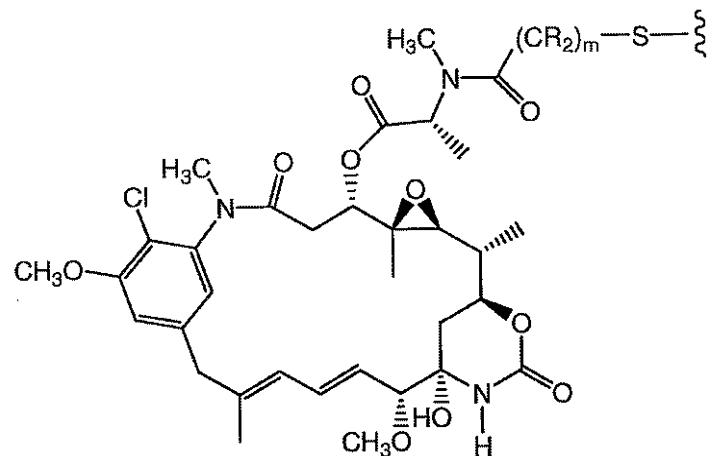
他の薬物部分と同様に、マイタンシノイド薬物部分の全ての立体異性体(すなわち、Dのキラル炭素におけるR配置およびS配置の任意の組合せ)は、本発明の化合物について

50

意図される。一つの実施形態では、マイタンシノイド薬物部分 (D) は、以下の立体化学を有する：

【0217】

【化15】



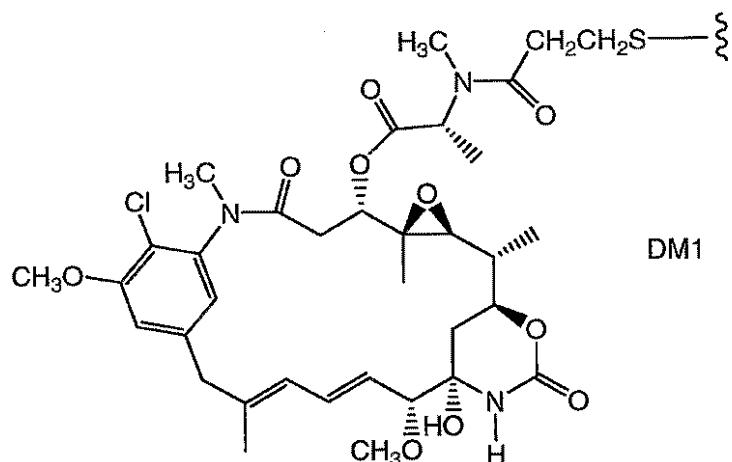
10

マイタンシノイド薬物部分の例示的実施形態としては、以下の構造を有する、以下が挙げられる：DM1、 $(CR_2)_m = CH_2CH_2$ ；DM3、 $(CR_2)_m = CH_2CH_2CH(C(CH_3)_2)$ ；およびDM4、 $(CR_2)_m = CH_2CH_2C(CH_3)_2$ ：

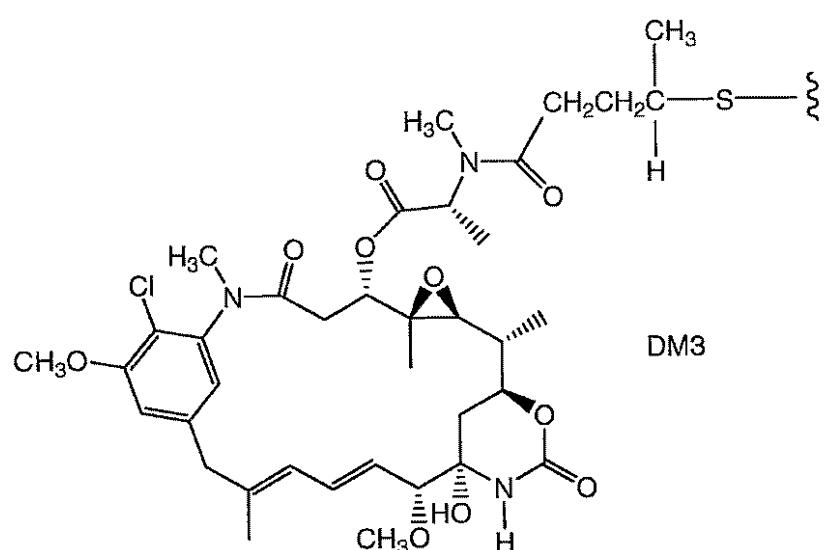
【0218】

20

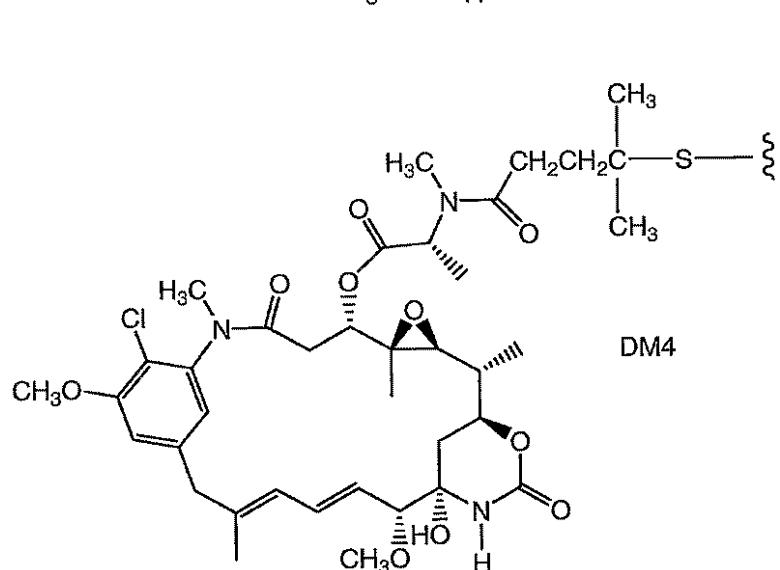
【化16】



10



20



30

40

リンカーは、連結のタイプに依存して、さまざまな位置においてマイタンシノイド分子に結合され得る。例えば、エステル結合は、従来の結合技術を使用したヒドロキシル基との反応により形成され得る。この反応は、ヒドロキシル基を有しているC-3位、ヒドロキシメチルにより修飾されるC-14位、ヒドロキシル基により修飾されるC-15位およびヒドロキシル基を有しているC-20位で生じ得る。好ましい実施形態では、この結合は、マイタンシノールまたはマイタンシノールアナログのC-3位で形成される。

50

【0219】

式Iの抗体-薬物結合体(ADC)の薬物部分(D)はまた、ドラスタチンおよびそれらのペプチドアナログおよび誘導体(オーリスタチン)を含む(米国特許第5635483号;同第5780588号)。ドラスタチンおよびオーリスタチンは、微小管力学、GTP加水分解、ならびに核および細胞の分裂を妨げることが示された(Woyleら(2001)Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)。ドラスタチンおよびオーリスタチンは、抗癌活性(US 5663149)および抗真菌性活性を有する(Pettitら(1998)Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)。さまざまな形態のドラスタチン薬物部分またはオーリスタチン薬物部分は、ペプチド薬物部分のN(アミノ)末端またはC(カルボキシル)末端を通して抗体に共有結合され得る(WO 02/088172; Doroninaら(2003)Nature Biotechnology 21(7):778-784; Franciscoら(2003)Blood 102(4):1458-1465)。

【0220】

薬物部分としては、ドラスタチン、オーリスタチン(US 5635483; US 5780588; US 5767237; US 6124431)、ならびにそれらのアナログおよび誘導体が挙げられる。ドラスタチンおよびオーリスタチンは、微小管力学、GTP加水分解、ならびに核および細胞の分裂を妨げることが示されている(Woyleら(2001)Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)。ドラスタチンおよびオーリスタチンは、抗癌活性(US 5663149)および抗真菌性活性を有する(Pettitら(1998)Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)。ドラスタチン薬物部分またはオーリスタチン薬物部分は、ペプチド薬物部分のN(アミノ)末端またはC(カルボキシル)末端を通して抗体に結合され得る(WO 02/088172)。

【0221】

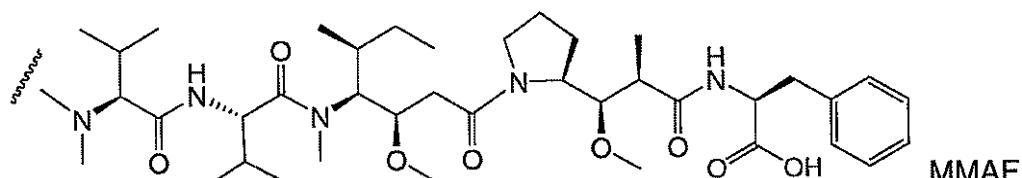
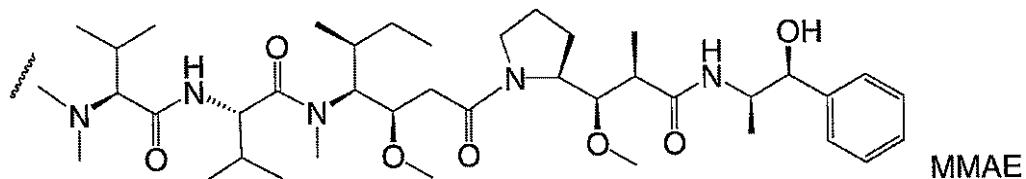
代表的なオーリスタチンの実施形態としては、以下で開示される、N末端に連結されたモノメチルオーリスタチン薬物部分DEおよびDFが挙げられる: WO 2005/081711; Senterら, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004年3月28日に公開(これらの各々の開示は、明らかに、その全体が本明細書中に参考として援用される)。

【0222】

式Iの抗体-薬物結合体(ADC)の薬物部分(D)としては、N末端を通して抗体へと連結される、以下の構造を有するモノメチルオーリスタチン薬物部分MMAEおよびMMAFが挙げられる:

【0223】

【化 1 7 】



代表的には、ペプチドベースの薬物部分は、二個以上のアミノ酸および／またはペプチドフラグメントの間でペプチド結合を形成することにより調製され得る。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野では周知である液相合成法 (E. Schröder and K. Luebke, 'The Peptides', volume 1, 76-136頁, 1965, Academic Pressを参照のこと) に従って調製され得る。

【 0 2 2 4 】

【 0 2 2 5 】

タンパク質毒素としては、以下が挙げられる：ジフテリアA鎖、ジフテリアトキシンの非結合性活性フラグメント、エキソトキシンA鎖（*Pseudomonas aeruginosa* 菌由来）、リシンA鎖（Vitetta (1987) Science, 238: 1098）、アブリンA鎖、モデッシンA鎖、- サルシン（sarcin）、Alleurites fordiiタンパク質、ダイアンシン（dianthin）タンパク質、*Phytolaca americana*タンパク質（PAPI、PAPIIおよびPAP-S）、*momordica charantia*インヒビター、クルシン（curcin）、クロチン（crotin）、*saponaria officinalis*インヒビター、ゲロニン、マイトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン（restrictocin）、フェノマイシン（phenomycin）、エノマイシン（enomycin）およびトリコテセン（trichothecene）（WO 93/21232）。

【 0 2 2 6 】

治療用ラジオアイソトープとしては、以下が挙げられる： ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{90}Y 、 ^{25}I 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{153}Sm 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、 ^{125}Bi 、 ^{212}Po および ^{137}Cs の放射性同位元素。

〔 0 2 2 7 〕

ラジオアイソトープまたは他の標識は、公知の方法で結合体中に組み込まれ得る (Frakerら (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57; 'Monoclonal Antibodies in Immunos

cintigraphy」, Chatel, CRC Press 1989)。炭素14標識された1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、抗体に対する放射性核種の結合体化のための例示的なキレート剤である(WO 94/11026)。

【0228】

(リンカー)

「リンカー」(L)は、1以上の薬物部分(D)および抗体単位(Ab)を連結して、式Iの抗体-薬物結合体(ADC)を形成するために使用され得る、二官能性または多官能性の部分である。抗体-薬物結合体(ADC)は、薬物および抗体に結合させるための反応性官能基を有するリンカーを用いて、簡便に調製され得る。システイン操作された抗体(Ab)のシステインチオールは、リンカー試薬、薬物部分、または、薬物-リンカー中間体の官能基と結合を形成し得る。

【0229】

1つの局面において、リンカーは、抗体に存在する求核性システインに対して反応性の求電子性基を有する反応性の部位である。抗体のシステインチオールは、リンカー上の求電子性基と反応性であり、リンカーに対して共有結合を形成する。有用な求電子性基としては、マレイミド基およびハロアセタミド基が挙げられるがこれらに限定されない。

【0230】

Klussmannら(2004)、Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773の766ページに記載される結合体化法、および実施例4のプロトコールによれば、システイン操作された抗体は、マレイミドまたは-ハロカルボニルのような求電子性の官能基で、リンカー試薬または薬物-リンカー中間体と反応する。

【0231】

1つの実施形態において、ADCのリンカーLは、以下の式:

-A_a-W_w-Y_y-

を有し、上記式において:

-A-は、抗体(Ab)のシステインチオールに共有結合したストレッチャー単位であり;

aは、0または1であり;

各-W-は、独立して、アミノ酸単位であり;

wは、独立して、0~12の範囲の整数であり;

-Y-は、薬物部分に共有結合するスペーサー単位であり;そして

yは、0、1または2である。

【0232】

(ストレッチャー単位)

ストレッチャー単位(-A-)は、存在する場合、1つの抗体単位を1つのアミノ酸単位(-W-)に連結し得る。この点に関して、抗体(Ab)は、ストレッチャー単位の求電子性の官能基と結合を形成し得る、遊離のシステインチオール基を有する。この実施形態の代表的なストレッチャー単位は、式IIaおよびIIbの括弧内に示され、ここで、Ab-、-W-、-Y-、-D、wおよびyは、上に定義されたとおりであり、そして、R¹⁷は、(CH₂)_r、C₃-C₈炭素環式、O-(CH₂)_r-アリーレン、(CH₂)_r-アリーレン、-アリーレン-(CH₂)_r-(CH₂)_r-(C₃-C₈炭素環式)、(C₃-C₈炭素環式)-(CH₂)_r、C₃-C₈複素環式、(CH₂)_r-(C₃-C₈複素環式)、-(C₃-C₈複素環式)-(CH₂)_r、-(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r、-(CH₂CH₂O)_r、-(CH₂CH₂O)_r、-(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r、-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r、-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r、および-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂)_rから選択さ

10

20

30

40

50

れる二価のラジカルである；ここで R^b は、H、C₁ - C₆ アルキル、フェニル、またはベンジルである；そして、r は、独立して、1 ~ 10 の範囲の整数である。

【0233】

アリーレンは、親の芳香族環系から 2 つの水素原子を除去することによって誘導された、6 ~ 20 個の炭素原子の二価の芳香族炭化水素ラジカルを含む。代表的なアリーレン基としては、ベンゼン、置換ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニルなどから誘導されたラジカルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0234】

複素環式基は、1 以上の環原子がヘテロ原子（例えば、窒素、酸素および硫黄）である、環系を含む。複素環ラジカルは、1 ~ 20 個の炭素原子と、N、O、P および S から選択される 1 ~ 3 個のヘテロ原子とを含む。複素環は、3 ~ 7 個の環員（2 ~ 6 個の炭素原子と、N、O、P および S から選択される 1 ~ 3 個のヘテロ原子）を有する单環、または 7 ~ 10 個の環員（4 ~ 9 個の炭素原子と、N、O、P および S から選択される 1 ~ 3 個のヘテロ原子）を有する二環（例えば、ビシクロ[4,5]系、ビシクロ[5,5]系、ビシクロ[5,6]系またはビシクロ[6,6]系）であり得る。複素環は、Paquette, Leo A. ; 「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」(W. A. Benjamin, New York, 1968)、特に、第1章、第3章、第4章、第6章、第7章、および第9章；「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」(John Wiley & Sons, New York, 1950 ~ 現在)、特に、第13巻、第14巻、第16巻、第19巻、および第28巻；ならびに J. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566 に記載される。

10

20

30

40

【0235】

複素環の例としては、一例として、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ピリジル、ジヒドロ(dihydroxy)ピリジル、テトラヒドロピリジル（ピペリジル）、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオフェニル酸化硫黄、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレン、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンゾイミダゾリル、ピペリジニル、4 - ピペリドニル、ピロリジニル、2 - ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス - テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス - テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾシニル、トリアジニル、6H - 1, 2, 5 - チアジアジニル、2H, 6H - 1, 5, 2 - ジチアジニル、チエニル、チアスレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサンテニル、フェノキサチニル、2H - ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H - インドリル、1H - インダゾリル、ブリニル、4H - キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シノリニル、ブテリジニル、4Ah - カルバゾリル、カルバゾリル、 - カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾイソキサゾリル、オキシンドリル、ベンゾオキサゾリニル、およびイサチノイル。

【0236】

炭素環式基は、单環として 3 ~ 7 個の炭素原子を、または、二環として 7 ~ 12 個の炭素原子を有する、飽和または不飽和の環を含む。单環式炭素環は、3 ~ 6 個の環原子、なにより代表的には、5 または 6 個の環原子を有する。二環式炭素環は、7 ~ 12 個の環原子（例えば、ビシクロ[4,5]系、ビシクロ[5,5]系、ビシクロ[5,6]系また

50

はビシクロ[6,6]系として並べられる)か、または、9もしくは10個の環原子(ビシクロ[5,6]系またはビシクロ[6,6]系として並べられる)を有する。単環式炭素環の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1-シクロペニタ-1-エニル、1-シクロペニタ-2-エニル、1-シクロペニタ-3-エニル、シクロヘキシル、1-シクロヘキサ-1-エニル、1-シクロヘキサ-2-エニル、1-シクロヘキサ-3-エニル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが挙げられる。

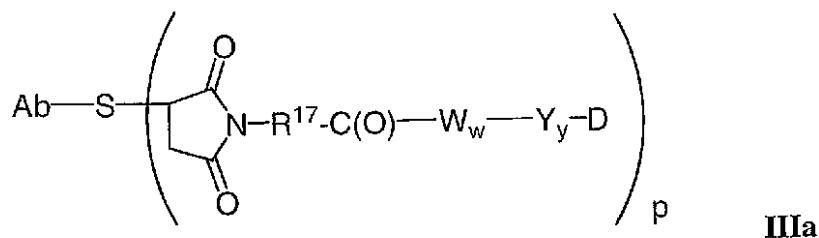
【0237】

全ての式I ADCの例示的な実施形態(例えば、III~VI)から、特別に表示されていない場合でさえも、操作されたシステイン残基の数に依存して、1~4個の薬物部分が、1つの抗体に連結される($p = 1~4$)ことが理解される。

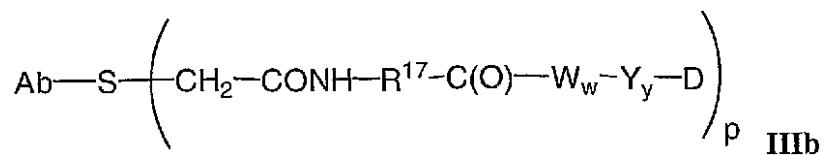
10

【0238】

【化18】



20

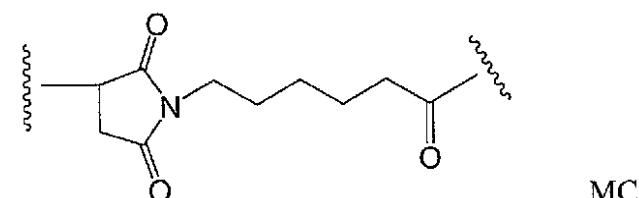


例示的なストレッチャー単位は、式IIIaのものであり、そしてこれは、マレイミド-カプロイル(MC)から誘導されたものであり、ここで、 R^{17} は、 $-(CH_2)_5-$ である:

【0239】

30

【化19】



。

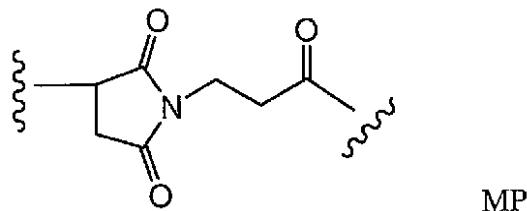
【0240】

例示的なストレッチャー単位は、式IIIaのものであり、そしてこれは、マレイミド-プロパノイル(MP)から誘導されたものであり、ここで、 R^{17} は、 $-(CH_2)_2-$ である:

40

【0241】

【化20】

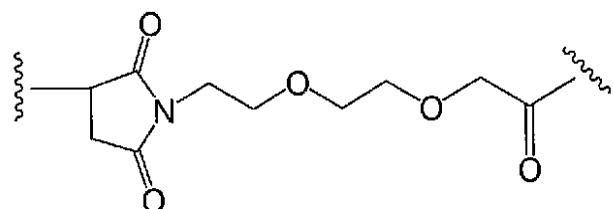


【0242】

別の例示的なストレッチャー単位は、式IIIaのものであり、ここで、 R^{1-7} は、
 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ であり、そして、 r は2である：

【0243】

【化21】



10

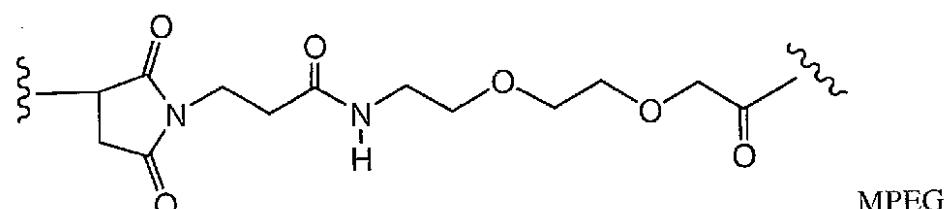
20

【0244】

別の例示的なストレッチャー単位は、式IIIaのものであり、ここで、 R^{1-7} は、
 $-(CH_2)_rC(O)NR^b-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ であって、ここで R^b はH
 であり、各 r は2である：

【0245】

【化22】



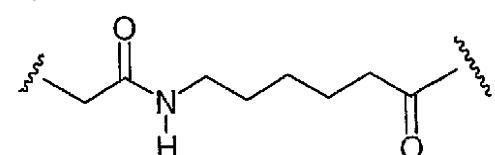
30

【0246】

別の例示的なストレッチャー単位は、式IIIbのものであり、ここで、 R^{1-7} は、
 $-(CH_2)_5-$ である：

【0247】

【化23】



40

【0248】

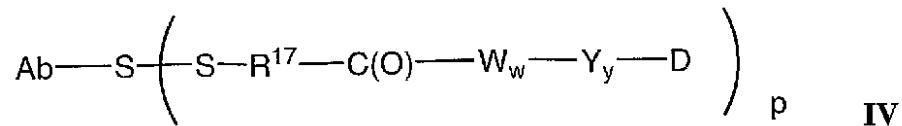
別の実施形態において、ストレッチャー単位は、抗体単位の硫黄原子とストレッチャー
 単位の硫黄原子との間のジスルフィド結合を介して、抗体単位へと連結される。この実施
 形態の代表的なストレッチャー単位は、式IVの括弧内に示され、ここで、 R^{1-7} 、Ab

50

-、 - W - 、 - Y - 、 - D 、 w および y は、上に定義されるとおりである。

【0249】

【化24】



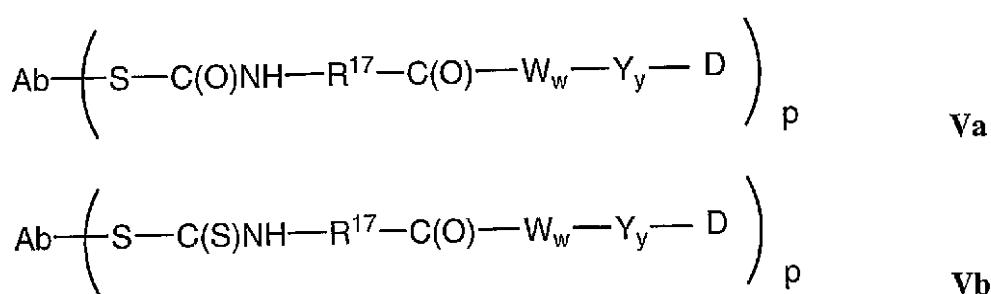
。

【0250】

なお別の実施形態において、ストレッチャーの反応性の基は、抗体の遊離システインチオールと結合を形成し得る、チオール反応性の官能基を含む。チオール反応性の官能基の例としては、マレイミド、 - ハロアセチル、活性化エカルボニル（例えば、スクシニミドエカルボニル、4 - ニトロフェニルエカルボニル、ペニタフルオロフェニルエカルボニル、テトラフルオロフェニルエカルボニル）、無水物、酸塩化物、スルホニル塩化物、イソシアネートおよびイソチオシアネートが挙げられるが、これらに限定されない。この実施形態の代表的なストレッチャー単位は、式VaおよびVbの括弧内に示され、ここで、 - R¹⁷ - 、 Ab - 、 - W - 、 - Y - 、 - D 、 w および y は上に定義されるとおりである；

【0251】

【化25】



。

【0252】

別の実施形態において、リンカーは、分枝の多官能性リンカー部分を通して、2以上の薬物部分を1つの抗体へと共有結合させるための、樹状型リンカーであり得る（Sunら（2002）Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12: 2213 - 2215；Sunら（2003）Bioorganic & Medicinal Chemistry 11: 1761 - 1768；King（2002）Tetrahedron Letters 43: 1987 - 1990）。樹状リンカーは、薬物対抗体の分子比、すなわち、ADCの効力に関連する負荷を高め得る。こうして、システイン操作された抗体が、1つのみの反応性のシステインチオール基を有する場合、多数の薬物部分が、樹状リンカーを介して結合され得る。

【0253】

（アミノ酸単位）

リンカーは、アミノ酸残基を含み得る。アミノ酸単位（ - W_w - ）は、存在する場合、抗体（Ab）を、本発明のシステイン操作された抗体 - 薬物結合体（ADC）の薬物部分（D）に連結する。

【0254】

- W_w - は、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペニタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチドまたはドデカペプチドの単位である。アミノ酸単位を含むアミノ酸残基としては、天然に存在するもの、ならびに、少数のアミノ酸、および、シトルリンのような天然に存在しないアミノ酸アナログが挙げられる。各 - W - 単位は、独立して、括弧内に示される以

10

20

30

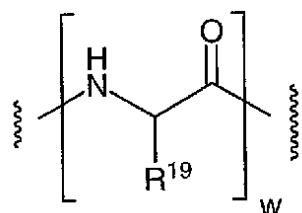
40

50

以下の式を有し、そして、wは、0～12の範囲の整数である：

【0255】

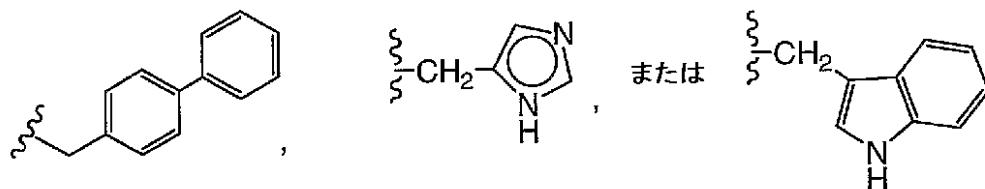
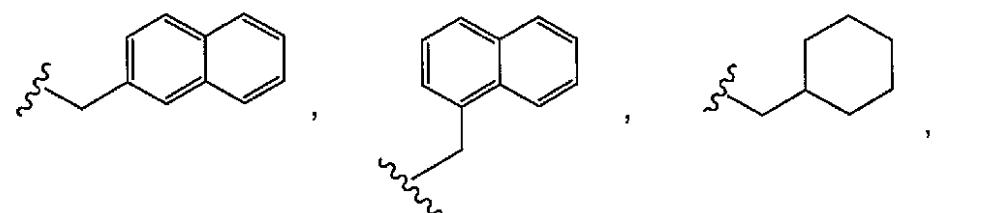
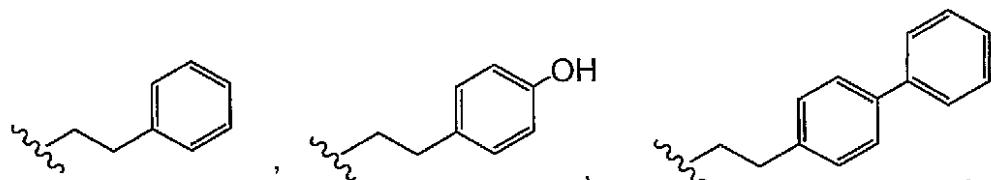
【化26】



ここで、R¹⁹は、水素、メチル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、ベンジル、p-ヒドロキシベンジル、-CH₂OH、-CH(OH)CH₃、-CH₂CH₂SCH₃、-CH₂CONH₂、-CH₂COOH、-CH₂CH₂CONH₂、-CH₂CH₂COOH、-(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₃NH₂、-(CH₂)₃NHC(OCH₃)₃、-(CH₂)₃NHCHO、-(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₄NH₂、-(CH₂)₄NHC(OCH₃)₃、-(CH₂)₄NHCOCH₃、-CH₂CH₂CHO、-CH₂CH₂NHC(=NH)NH₂、-CH₂CH₂NHC(=NH)NH₂、-CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂、2-ピリジルメチル-、3-ピリジルメチル-、4-ピリジルメチル-、フェニル、シクロヘキシル、

【0256】

【化27】



である。

【0257】

アミノ酸単位は、腫瘍関連プロテアーゼを含む、1種以上の酵素によって酵素的に切断されて、薬物部分(-D)を解放し得、この薬物部分(-D)は、1つの実施形態においては、解放の際にインビボにおいてプロトン化され、薬物(D)を提供する。

【0258】

有用な-W_w-単位は、特定の酵素(例えば、腫瘍関連プロテアーゼ)による酵素的切断について、設計され、そして、その選択性が最適化され得る。1つの実施形態において、-W_w-単位は、その切断がカテプシンB、CおよびD、または、プラスミンプロテアーゼによって触媒される単位である。

10

20

30

40

50

【0259】

例示的な - W_w - アミノ酸単位としては、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペントペプチドが挙げられる。例示的なジペプチドとしては、バリン - シトルリン (v c または v a l - c i t) 、アラニン - フェニルアラニン (a f または a l a - p h e) が挙げられる。例示的なトリペプチドとしては、グリシン - バリン - シトルリン (g l y - v a l - c i t) およびグリシン - グリシン - グリシン (g l y - g l y - g l y) が挙げられる。

【0260】

$R^{1,9}$ が水素以外である場合、 $R^{1,9}$ が結合する炭素原子は、キラルである。 $R^{1,9}$ が結合する炭素原子の各々は、独立して、(S) もしくは (R) の立体配置であるか、または、ラセミ混合物である。したがって、アミノ酸単位は、鏡像異性的に純粋であっても、ラセミであっても、ジアステレオマーであってもよい。

10

【0261】

(スペーサー単位)

スペーサー単位 (- Y_y -) は、存在する場合 ($y = 1$ または 2) 、アミノ酸単位が存在する場合 ($w = 1 \sim 12$) に、アミノ酸単位 (- W_w -) を薬物部分 (D) に連結する。あるいは、スペーサー単位は、アミノ酸単位が存在しない場合、ストレッチャー単位を薬物部分に連結する。スペーサー単位はまた、アミノ酸単位もストレッチャー単位も存在しない場合 ($w, y = 0$) に、薬物部分を抗体単位に連結する。スペーサー単位は、2つの一般的な型のものである：自己犠牲型および非自己犠牲型。非自己犠牲型のスペーサー単位は、抗体 - 薬物結合体、または、薬物部分 - リンカーの切断、特に、酵素的な切断の後に、スペーサー単位の一部または全体が薬物部分に結合したままであるものである。グリシン - グリシンスペーサー単位、または、グリシンスペーサー単位を含む ADC が、腫瘍細胞関連プロテアーゼ、癌細胞関連プロテアーゼ、または、リンパ球関連プロテアーゼによって酵素的な切断を受けるとき、グリシン - グリシン - 薬物部分、または、グリシン - 薬物部分が、Ab - A_a - W_w - から切断される。1つの実施形態において、独立した加水分解反応が標的細胞内で生じて、グリシン - 薬物部分の結合を切断し、そして、薬物を解放する。

20

【0262】

別の実施形態において、- Y_y - は、p - アミノベンジルカルバモイル (PAB) 単位 (スキーム 2 および 3 を参照のこと) であり、このフェニレン部分は、Q_m によって置換され、ここで、Q は、- C₁ - C₈ アルキル、- O - (C₁ - C₈ アルキル) 、- ハロゲン、- ニトロまたは - シアノであり；そして、m は、0 ~ 4 の範囲の整数である。

30

【0263】

非自己犠牲型のスペーサー単位 (- Y -) の例示的な実施形態は、- G l y - G l y - ; - G l y - ; - A l a - P h e - ; - V a l - C i t - である。

【0264】

1つの実施形態において、スペーサー単位が存在しない ($y = 0$) 、薬物部分 - リンカー、もしくは、ADC、または、その薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物が、提供される。

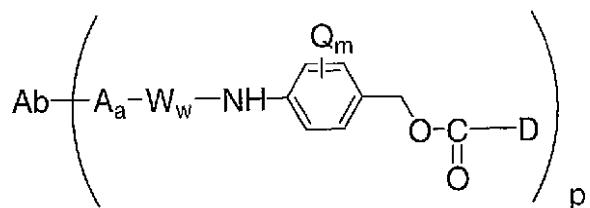
40

【0265】

あるいは、自己犠牲型のスペーサー単位を含む ADC は、- D を解放し得る。1つの実施形態において、- Y - は、PAB 基のアミノ窒素原子を介して - W_w - に結合し、そして、カルボネート基、カルバメート基、またはエーテル基を介して - D に直接結合した、PAB 基である。ここで、ADC は、以下の例示的な構造：

【0266】

【化28】



を有し、ここで、Qは、-C₁-C₈アルキル、-O-(C₁-C₈アルキル)、-ハロゲン、-ニトロまたは-シアノであり；mは、0~4の範囲の整数であり；そして、pは、1~4の範囲である。

10

【0267】

自己犠牲型のスペーサーの他の例としては、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体 (Hayら(1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 2237)、および、オルトまたはパラ-アミノベンジルアセタールのようなPAB基に電子的に類似する芳香族化合物が挙げられるがこれらに限定されない。置換および非置換の4-アミノ酪酸アミド (Rodriguesら(1995) *Chemistry Biology* 2: 223)、適切に置換されたビシクロ[2.2.1]環系およびビシクロ[2.2.2]環系 (Stormら(1972) *J. Amer. Chem. Soc.* 94: 5815)、ならびに、2-アミノフェニルプロピオン酸アミド (Amesberryら(1990) *J. Org. Chem.* 55: 5867)のような、アミド結合の加水分解の際に環化を受けるスペーサーが使用され得る。グリシンが置換されたアミン含有薬物の脱離 (Kingsburyら(1984) *J. Med. Chem.* 27: 1447) もまた、ADCにおいて有用な自己犠牲型のスペーサーの例である。

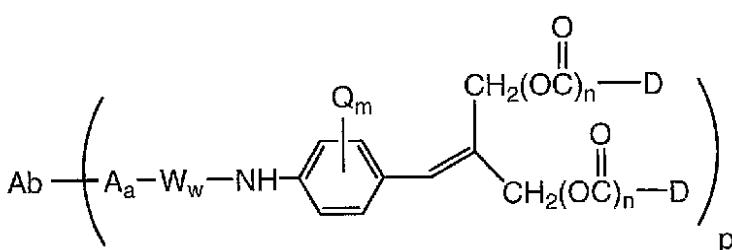
20

【0268】

1つの実施形態において、スペーサー単位は、複数の薬物を組み込んだり解放したりするためには使用され得る、分枝のビス(ヒドロキシメチル)スチレン(BHMS)であり、以下の構造：

【0269】

【化29】



30

を有し(2-(4-アミノベンジリデン)プロパン-1,3-ジオールドリマー単位 (WO 2004/043493; de Grootら(2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 4490-4494)を含む)、そしてここで、Qは、-C₁-C₈アルキル、-O-(C₁-C₈アルキル)、-ハロゲン、-ニトロまたは-シアノであり；mは、0~4の範囲の整数であり；nは、0または1であり；そして、pは、1~4の範囲である。

40

【0270】

(樹状リンカー)

別の実施形態において、リンカーLは、分枝の多官能性リンカー部分を通して、2以上の薬物部分を1つの抗体へと共有結合させるための、樹状型リンカーであり得る (Sunら(2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12: 2213-2215; Sunら(2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11: 1761-1768; King(2002) *Tetrahedron Letters* 43: 1987-1990)

50

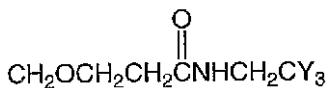
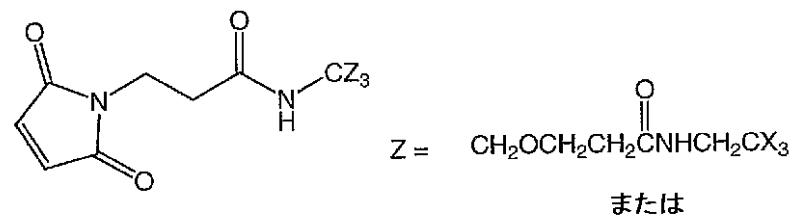
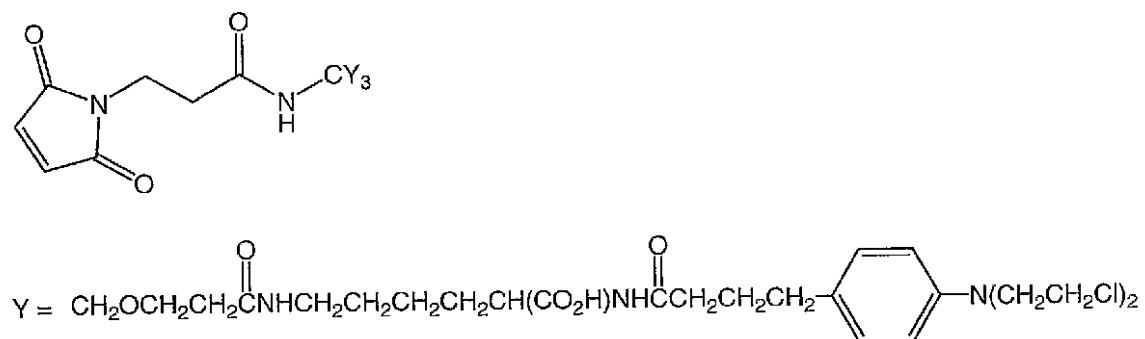
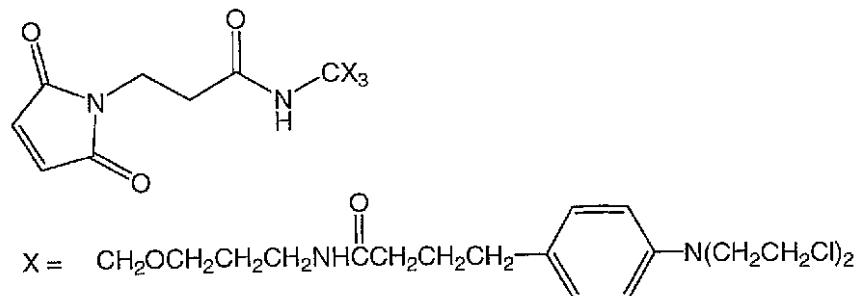
。樹状リンカーは、薬物対抗体の分子比、すなわち、ADCの効力に関連する負荷を高め得る。こうして、システイン操作された抗体が、1つのみの反応性のシステインチオール基を有する場合、多数の薬物部分が、樹状リンカーを介して結合され得る。

【0271】

樹状リンカー試薬の以下の例示的な実施形態は、9つまでの求核性薬物部分をクロロエチル窒素マスター官能基との反応によって結合体化させる：

【0272】

【化30】



。

【0273】

スペーサー単位の別の実施形態において、自己犠牲型の2,6-ビス(ヒドロキシメチル)-p-クレゾールデンドリマー単位および2,4,6-トリス(ヒドロキシメチル)-フェノールデンドリマー単位(WO 2004/01993; Szalaiら(2003)J. Amer. Chem. Soc. 125: 15688-15689; Shamisら(2004)J. Amer. Chem. Soc. 126: 1726-1731; Amirら(2003)Angew. Chem. Int. Ed. 42: 4494-4499)を有する分枝の樹状リンカーは、本発明の化合物におけるリンカーとして使用され得る。

【0274】

別の実施形態において、D部分は同じである。

【0275】

なお別の実施形態において、D部分は異なる。

10

20

30

40

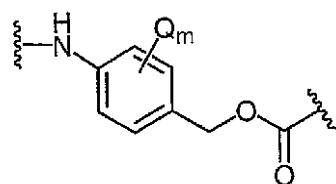
50

【0276】

1つの局面において、スペーサー単位 (- Y_y -) は、式 (X) ~ (X_{II}) によって表れる：

【0277】

【化31】



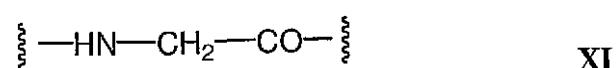
X

10

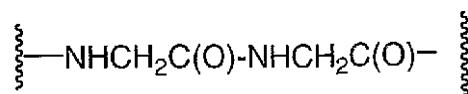
ここで、Qは、-C₁~-C₈アルキル、-O-(C₁~-C₈アルキル)、-ハロゲン、-ニトロまたは-シアノであり；そしてmは、0~4の範囲の整数である；

【0278】

【化32】



XI



XII

20

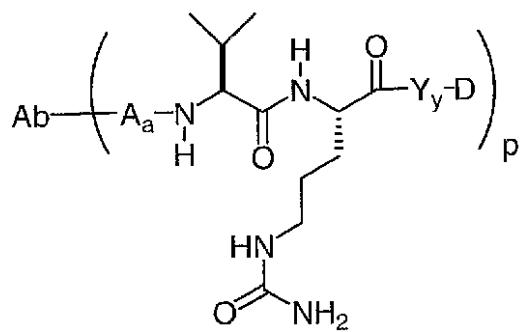
。

【0279】

式Iの抗体-薬物結合体化合物の実施形態としては、X_{III}a (val-cit)、X_{III}b (MC-val-cit)、X_{III}c (MC-val-cit-PAB)；

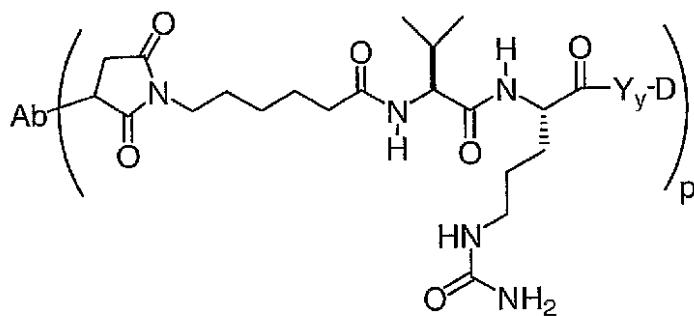
【0280】

【化 3 3】



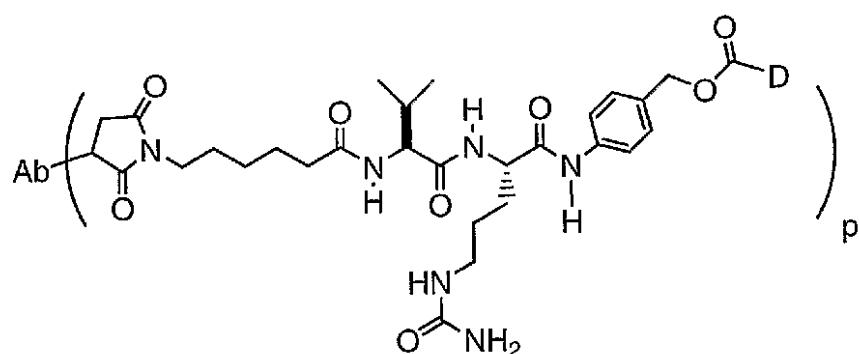
XIIIa

10



XIIIb

20



XIIIc

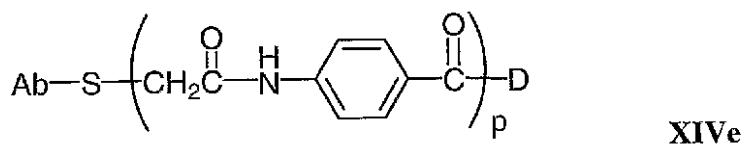
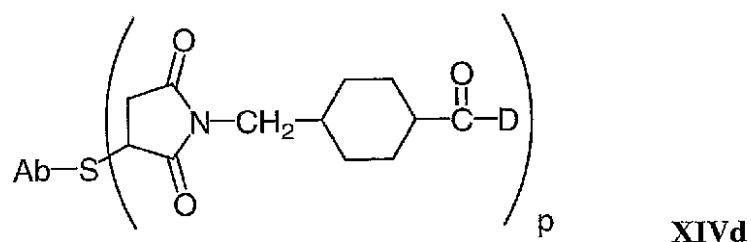
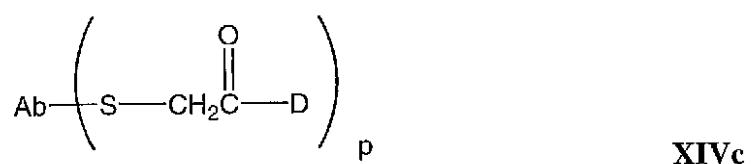
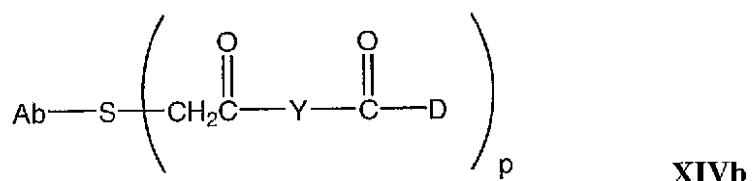
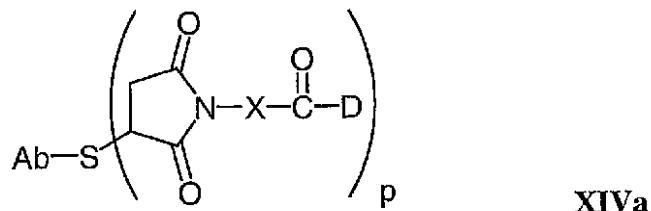
30

が挙げられる。

【 0 2 8 1 】

式 I a の抗体 - 薬物結合体化合物の他の例示的な実施形態としては、 X I V a - e :

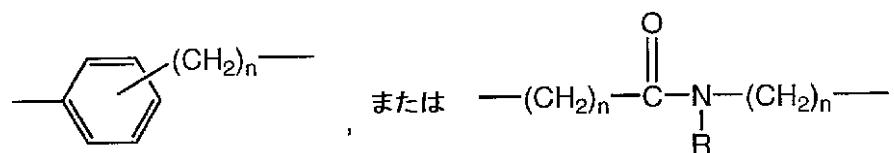
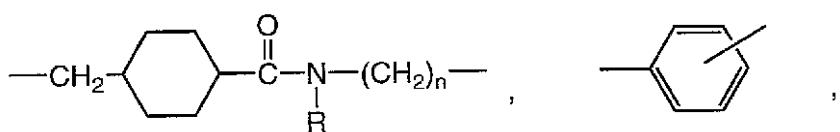
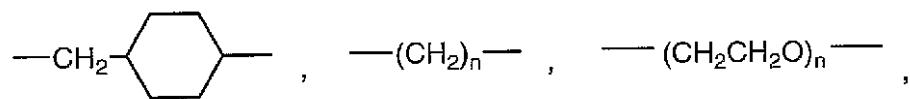
【化34】



が挙げられ、ここで、Xは、

【0282】

【化35】

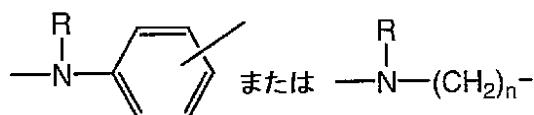


であり；

Yは、

【0283】

【化36】



であり；そして、

Rは、独立して、HまたはC₁ - C₆アルキルであり；そして、nは、1~12である。

【0284】

10

別の実施形態において、リンカーは、抗体に存在する求電子性基に対して反応性の求核性基を有する反応性の官能基を有する。抗体上の有用な求電子性基としては、アルデヒド基およびケトンカルボニル基が挙げられるがこれらに限定されない。リンカーの求核性基のヘテロ原子は、抗体上の求電子性基と反応して、抗体単位への共有結合を形成し得る。リンカー上の有用な求核性基としては、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジドが挙げられるがこれらに限定されない。抗体上の求電子性基は、リンカーへの結合のための便利な部位を提供する。

【0285】

20

代表的には、ペプチド型のリンカーは、2以上のアミノ酸および/またはペプチドフラグメント間のペプチド結合を形成することによって調製され得る。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野で周知の、液相合成法 (E. Schröeder および K. Luebke (1965) 「The Peptides」, 第1巻, pp 76-136, Academic Press) に従って調製され得る。

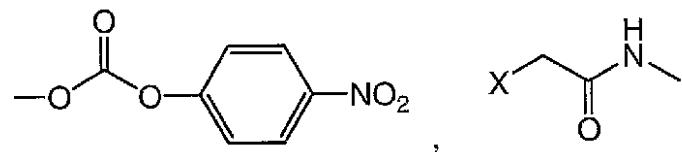
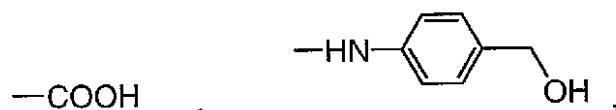
【0286】

リンカー中間体は、スペーサー単位、ストレッチャー単位およびアミノ酸単位を含む、反応のあらゆる組み合わせまたは順序で組み立てられ得る。スペーサー単位、ストレッチャー単位およびアミノ酸単位は、自然状態では求電子性、求核性またはフリーラジカルである、反応性の官能基を使用し得る。反応性の官能基としては、以下：

【0287】

30

【化37】



が挙げられるがこれらに限定されず、ここで、Xは、脱離基（例えば、O-メシリル、O-トリシリル、-Cl、-Br、-I）；またはマレイミドである。

【0288】

40

別の実施形態において、リンカーは、可溶性または反応性を調節する基で置換され得る。例えば、帯電した置換基（例えば、スルホネート(-SO₃-)またはアンモニウム）は、ADCを調製するために使用される合成経路に依存して、試薬の水溶性を高め、そして、リンカー試薬の、抗体または薬物部分とのカップリング反応を促進するか、または、Ab-L（抗体-リンカー中間体）のDとのカップリング反応、またはD-L（薬物-リンカー中間体）のAbとのカップリング反応を促進し得る。

【0289】

50

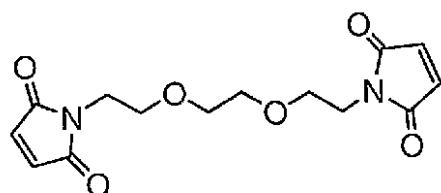
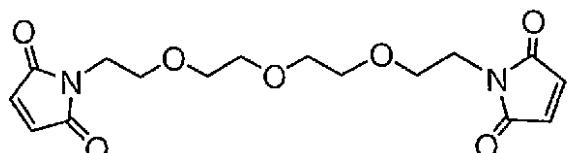
本発明の化合物は、明らかに、リンカー試薬を用いて調製されたADC: B M P E O、B M P S、E M C S、G M B S、H B V S、L C - S M C C、M B S、M P B H、S B A P、S I A、S I A B、S M C C、S M P B、S M P H、スルホ-E M C S、スルホ-G M B S、スルホ-K M U S、スルホ-M B S、スルホ-S I A B、スルホ-S M C C、およびスルホ-S M P B、およびS V S B(スクシニミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾエート)；ならびにビス-マレイミド試薬を用いて調製されたADC: D T M E、B M B、B M D B、B M H、B M O E、B M (P E O)₃、およびB M (P E O)₄(これらは、Pierce Biotechnology, Inc., Customer Service Department, P. O. Box 117, Rockford, IL. 61105 U. S. A, U. S. A 1-800-874-3723, International +815-968-0747から市販されている)を意図するが、これに限定されない。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467~498ページを参照のこと。ビス-マレイミド試薬は、連続的または同時の様式で、システイン操作された抗体のチオール基の、チオール含有薬物部分、標識、またはリンカー中間体への結合を可能にする。システイン操作された抗体、薬物部分、標識またはリンカー中間体のチオール基と反応性である、マレイミド以外の多の官能基としては、ヨードアセタミド、プロモアセタミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアネートおよびイソチオシアネートが挙げられる。

【0290】

【化38】

10

20

BM(PEO)₃BM(PEO)₄

。

30

【0291】

有用なリンカー試薬はまた、Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO)のような他の市販の供給源から入手され得るか、または、Tokiら(2002)J. Org. Chem. 67: 1866-1872; Walker, M. A. (1995)J. Org. Chem. 60: 5352-5355; Frischら(1996)Bioconjugate Chem. 7: 180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US 2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; およびWO 04/032828に記載される手順に従って合成され得る。

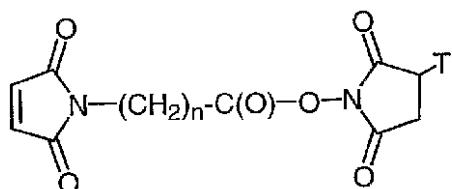
【0292】

40

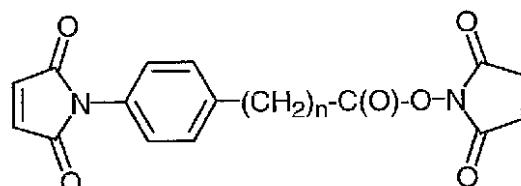
式(IIIA)のストレッチャーは、以下のリンカー試薬:

【0293】

【化39】

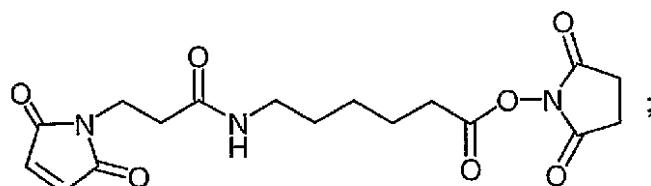
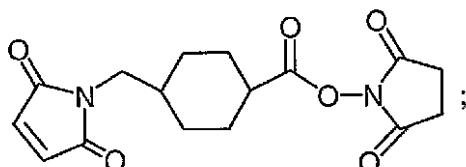


ここで、nは1～10の範囲の整数であり、Tは-Hまたは-SO3Naであり；

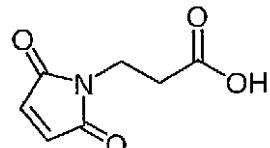
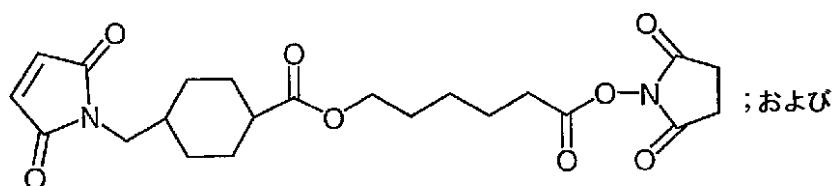


10

ここで、nは0～3の範囲の整数であり；



20



30

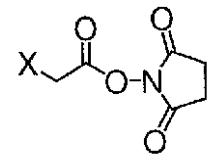
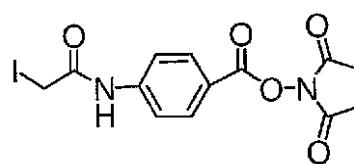
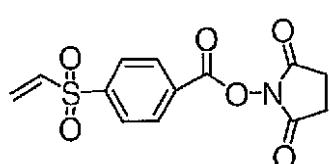
を、アミノ酸単位のN末端と反応させることによって、リンカーへと導入され得る。

【0294】

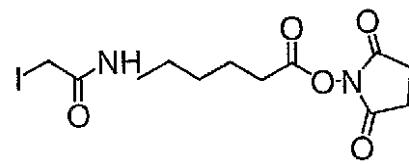
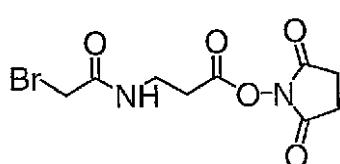
ストレッチャー単位は、以下の二官能性試薬：

【0295】

【化40】



40



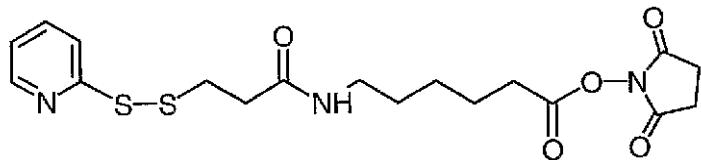
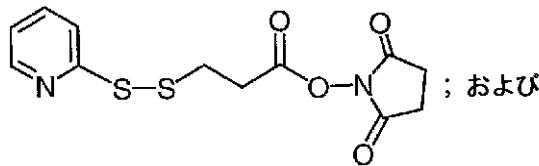
を、アミノ酸単位のN末端と反応させることによって、リンカーへと導入され得、上記式

50

において、XはBrまたはIである。この式のストレッチャー単位はまた、以下の二官能性試薬：

【0296】

【化41】



10

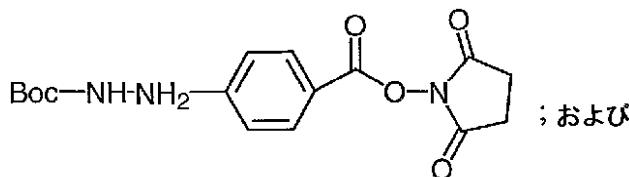
を、アミノ酸単位のN末端と反応させることによって、リンカーへと導入され得る。

【0297】

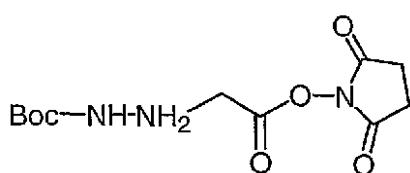
式(Va)のストレッチャー単位は、以下の中間体：

【0298】

【化42】



20



30

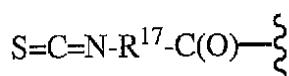
を、アミノ酸単位のN末端と反応させることによって、リンカーへと導入され得る。

【0299】

以下に示される式：

【0300】

【化43】



のイソチオシアネートストレッチャーは、Angew. Chem., (1975) 87 (14), 517に記載されるようにして、イソチオシアナトカルボン酸クロリドから調製され得、上記式において、-R¹⁷-は、本明細書中に記載されるとおりである。

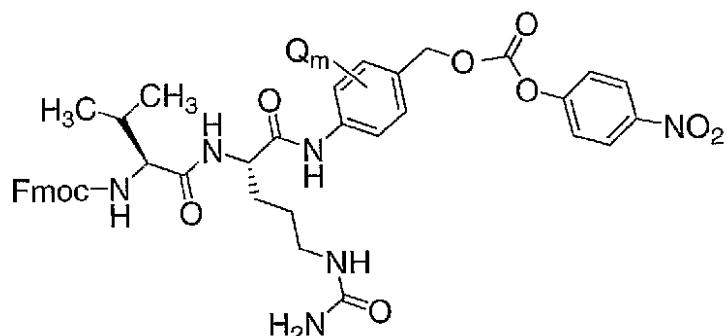
【0301】

マレイミドストレッチャーと、パラ-アミノベンジルカルバモイル(PAB)自己犠牲型スペーサーとを有する、例示的なバリン-シトルリン(val-citまたはvc)ジペプチドリンカー試薬は、以下の構造：

【0302】

40

【化44】



10

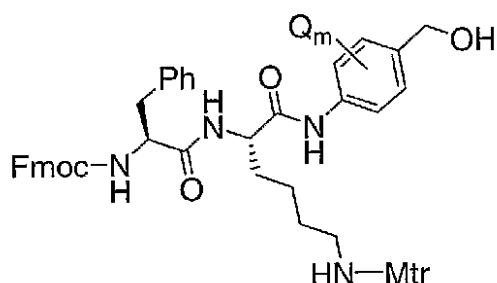
を有し、上記構造において、Qは、-C₁ - C₈アルキル、-O-(C₁ - C₈アルキル)、-ハロゲン、-ニトロまたは-シアノであり；そして、mは、0～4の範囲の整数である。

【0303】

マレイミドストレッチャー単位と、p-アミノベンジル自己犠牲型スペーサー単位とを有する、例示的なphe-lys(Mtr)ジペプチドリンカー試薬は、Dubowchikら(1997)Tetrahedron Letters, 38:5257-60に従って調製され得、そして、以下の構造：

【0304】

【化45】



20

を有し、上記構造において、Mtrは、モノ-4-メトキシトリチルであり、Qは、-C₁ - C₈アルキル、-O-(C₁ - C₈アルキル)、-ハロゲン、-ニトロまたは-シアノであり；そして、mは、0～4の範囲の整数である。

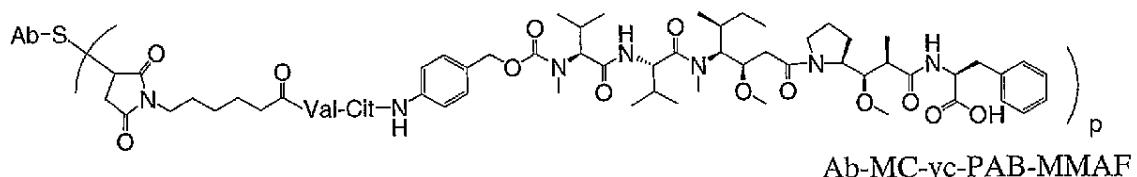
【0305】

本発明の例示的な抗体-薬物結合体化合物としては、以下：

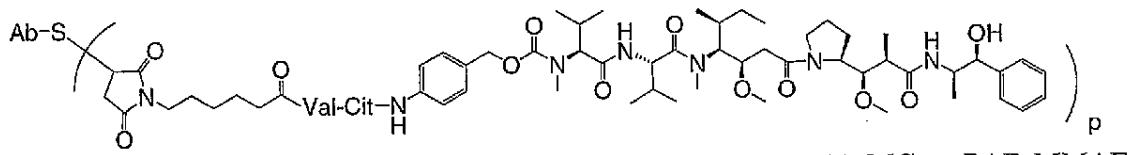
【0306】

30

【化 4 6】

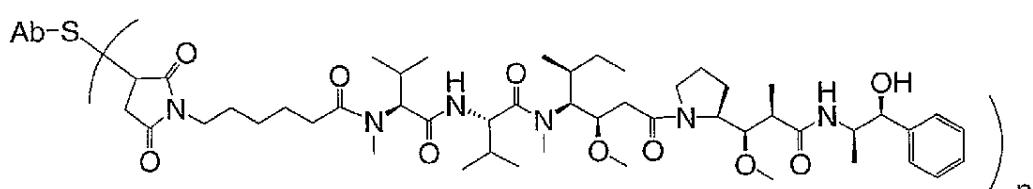


Ab-MC-vc-PAB-MMAF



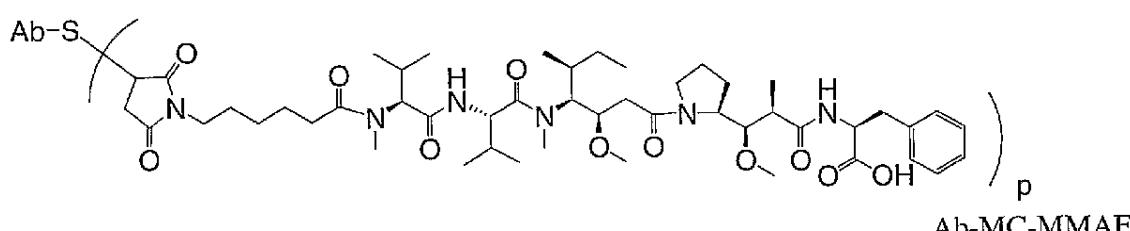
Ab-MC-vc-PAB-MMAE

10



Ab MC-MMAE

30

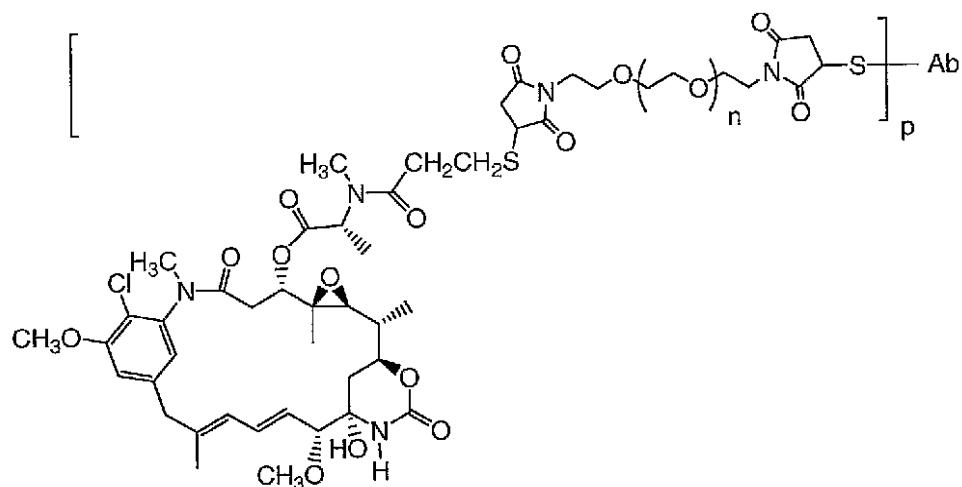


が挙げられ、ここで、Valはバリンであり；Citはシトルリンであり；pは、1、2、3または4であり；そして、Abは、システイン操作された抗体である。メイタンシノイド薬物部分DM1が、BMPEROリンカーを介して、トラスツズマブのチオール基に連結された他の例示的な抗体薬物結合体は、以下の構造：

30

（0307）

【化 4 7 】



を有し、上記構造において、A b は、システイン操作された抗体であり；n は、0、1 または 2 であり；そして、p は、1、2、3 または 4 である。

50

【0308】

(抗体 - 薬物結合体の調製)

式IのADCは、当業者に公知の有機化学反応、条件および試薬を用いて、いくつかの経路によって調製され得る：(1)共有結合を介して、抗体 - リンカー中間体Ab-Lを形成するための、システイン操作された抗体のシステイン基のリンカー試薬との反応、その後の、活性化された薬物部分Dとの反応；および(2)共有結合を介して、薬物 - リンカー中間体D-Lを形成するための、薬物部分の求核性基のリンカー試薬との反応、その後の、システイン操作された抗体のシステイン基との反応。結合体化方法(1)および(2)は、種々のシステイン操作された抗体、薬物部分およびリンカーを用いて行われ、式Iの抗体 - 薬物結合体を調製し得る。

10

【0309】

抗体のシステインチオール基は、求核性であり、そして、リンカー試薬および薬物 - リンカー中間体上の求電子性基と反応して共有結合を形成し得る。この求電子性基としては、以下が挙げられる：(i) NHSエステル、HOBrエステル、ハロホルメートおよび酸ハロゲン化物のような活性なエステル；(ii)アルキル、およびハロアセタミドのようなベンジルハライド；(iii)アルデヒド基、ケトン基、カルボキシル基、およびマレイミド基；ならびに(iv)スルフィド交換による、ピリジルジスルフィドを含む、ジスルフィド。薬物部分上の求核性基としては、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子性基と反応して共有結合を形成し得る、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジド。

20

【0310】

マイタンシンは、例えば、May - SSCH₃へと変換され得、これは、遊離チオールであるMay - SHへと還元され、そして、修飾された抗体と反応して(Chariら(1992)Cancer Research 52: 127-131)ジスルフィドリンカーと、マイタンシノイド - 抗体免疫結合体を生成し得る。ジスルフィドリンカーを用いた抗体 - マイタンシノイド結合体が報告されている(WO 04/016801; US 6884874; US 2004/039176 A1; WO 03/068144; US 2004/001838 A1; 米国特許第6441163号、同第5208020号、同第5416064号; WO 01/024763)。ジスルフィドリンカー - SPPは、リンカー試薬N - スクシニミジル4 - (2 - ピリジルチオ)ペンタノエートを用いて構築される。

30

【0311】

特定の条件下では、システイン操作された抗体は、DTT(クリーランド試薬、ジチオスレイトール)またはTCEP(トリス(2 - カルボキシエチル)ホスフィンヒドロクロリド; Getzら(1999)Anal. Biochem. Vol 273: 73 - 80; Soltec Ventures, Beverly, MA)を用いた処理によって、リンカー試薬との結合体化のために反応性にされ得る。CHO細胞において発現させた、全長のシステイン操作されたモノクローナル抗体(チオMab)を、約50倍過剰のTCEPを用いて37にて3時間還元し、新しく導入されたシステイン残基と、培養培地中に存在するシステインとの間に形成し得る、ジスルフィド結合を還元した。この還元されたチオMabを、希釈して、10mM 酢酸ナトリウム、pH 5中でHiTrap Sカラムにロードし、そして、0.3M 塩化ナトリウムを含むPBSで溶出した。ジスルフィド結合を、室温にて、一晩、希(200nM)硫酸銅(CuSO₄)水溶液を用いて、親のMab中に存在するシステイン残基間に再度確立させた。当該分野で公知の他の酸化物質、すなわち、酸化剤および酸化条件が使用され得る。周囲の空気の酸化もまた有効である。この、穏やかで、部分的な再酸化段階は、高い忠実度で、効率的に鎖内ジスルフィドを形成する。約10倍過剰の薬物 - リンカー中間体、例えば、BM(PEO)₄ - DM1を加え、混合し、そして、室温にて約1時間静置させて、結合体化を行い、TiOMab抗体 - 薬物結合体を形成する。この結合体混合物を、ゲル濾過して、HiTrap S力

40

50

ラムにロードし、このカラムを通して溶出して、過剰の薬物 - リンカー中間体と他の不純物とを除去した。

【0312】

図15は、結合体化のための細胞培養から発現させる、システイン操作された抗体を調製するための一般的なプロセスを示す。システイン付加物は、おそらくは、種々の鎖内ジスルフィド結合を伴って、還元的に切断され、抗体の還元形態を与える。対になったシステイン残基間の鎖内ジスルフィド結合は、周囲の酸素への暴露のような部分的な酸化条件下で再生される。新しく導入され、操作され、そして、対になつてないシステイン残基は、本発明の抗体結合体を形成するための、リンカー試薬または薬物 - リンカー中間体との反応に利用可能なままである。哺乳動物細胞株において発現させたチオMabは、-S-S-結合の形成によって、操作されたCysへと、外部から結合体化されたCysの付加をもたらす。したがって、精製したチオMabは、実施例11に記載されるような還元および酸化の手順を用いて処理され、反応性のチオMabを生成する。これらのチオMabは、細胞傷害性薬物、フルオロフォアおよび他の標識を含むマレイミドとの結合体化のために使用される。

【0313】

種々のチオFabおよびチオMab抗体 - 薬物結合体が調製された（実施例4～8）。システイン変異体hu4D5Fabv8（V110C）を、ビス - マレイミドリンカー試薬であるBMP EOを用いて、メイタンシノイド薬物部分DM1と結合体化させて、hu4D5Fabv8（V110C）-BMP EO-DM1（実施例8）を形成した。

【0314】

（インビトロ細胞増殖アッセイ）

一般に、抗体 - 薬物結合体（ADC）の細胞毒性または細胞増殖抑制活性は、レセプタータンパク質（例えば、HER2）を有する哺乳動物細胞を、細胞培養培地中のADCの抗体に暴露し；約6時間～約5日間のある期間にわたって細胞を培養し；そして、細胞の生存度を測定することによって測定される。細胞ベースのインビトロアッセイを用いて、本発明のADCの生存度（増殖）、細胞傷害性、およびアポトーシスの誘導（カスパーゼの活性化）を測定した。

【0315】

抗体 - 薬物結合体のインビトロ能力を、細胞増殖アッセイによって測定した（図10および11、実施例9）。CellTiter-Glo（登録商標）Luminiscent Cell Viability Assayは、Coleopteralシフェラゼの組換え発現に基づいた市販の（Promega Corp., Madison, WI）、均質なアッセイである（米国特許第5583024号；同第5674713号および同第5700670号）。この細胞増殖アッセイは、代謝的に活性な細胞の指標である、存在するATPの定量化に基づいて、培養物中の生細胞の数を決定する（Crouchら（1993）J. Immunol. Meth. 160: 81-88；US 6602677）。CellTiter-Glo（登録商標）Assayを、96ウェル形式で行い、自動化ハイスループットスクリーニング（HTS）に適応させた（Creelら（1995）AntiCancer Drugs 6: 398-404）。均質なアッセイ手順は、単一の試薬（CellTiter-Glo（登録商標）Reagent）を直接、血清補充培地中で培養した細胞に加える工程を必要とする。細胞の洗浄、培地の除去、および複数回のピペッティングの工程は必要とされない。この系は、試薬を加え、混合してから10分以内に、384ウェルの形式で15細胞/ウェル程度の数を検出する。これらの細胞は、ADCで継続的に処理され得るか、または、ADCで処理され、そして、ADCから分離され得る。一般に、簡単に、すなわち、3時間処理した細胞は、継続的に処理した細胞と同様の効力の作用を示した。

【0316】

均質な「添加 - 混合 - 測定」の形式は、細胞の溶解と、存在するATPの量に比例する発光シグナルの生成とをもたらす。ATPの量は、培養物中に存在する細胞の数に直接比

10

20

30

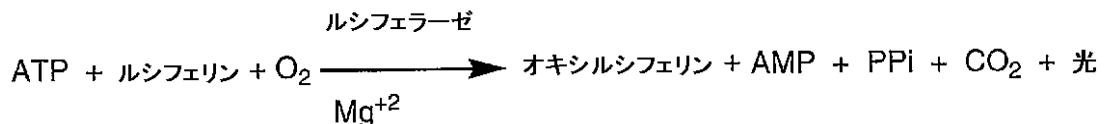
40

50

例する。CellTiter-Glo (登録商標) Assayは、使用される細胞の型および培地に依存して、一般には5時間よりも長い半減期を有する、ルシフェラーゼ反応により生成される「グロー型」の発光シグナルを生成する。生細胞は、相対発光単位 (RLU) に反映される。基質カブトムシルシフェリンは、組換えホタルルシフェラーゼによって酸化的に脱炭酸され、同時に、ATPのAMPへの変換を伴う。延長された半減期は、試薬注入器を使用する必要性を排除し、そして、複数のプレートの連続した処理、または、バッチモードの処理のための柔軟性を提供する。この細胞増殖アッセイは、種々のマルチウェル形式 (例えば、96ウェル形式または384ウェル形式) で使用され得る。データは、ルミノメーターまたはCCDカメラ撮像装置によって記録され得る。発光の出力は、経時的に測定される相対光単位 (RLU) として表される。あるいは、発光からの光子が、シンチラント (scintillant) の存在下で、シンチレーションカウンターにおいて計数され得る。光単位は、次いで、1秒あたりのCPSカウントとして表され得る。

【0317】

【化48】



10

20

抗体-薬物結合体の抗増殖性作用を、SK-BR-3乳癌細胞株に対して、上記の細胞増殖の、インビトロ細胞殺傷アッセイによって測定した (図10および11)。ADCのIC₅₀値を、SK-BR-3細胞 (HER2レセプタタンパク質を過剰発現することが公知) に対して確立した。

【0318】

図10は、トラスツズマブSMCC-DM1 (IC₅₀ = 0.008~0.015 μg / ml) が、重鎖システイン変異結合体hu4D5Fabv8-(A121C)-BMP-E-O-DM1 (IC₅₀ = 0.04 μg / ml) よりも強力であったことを示す。両方の結合体は、細胞の殺傷において、裸のトラスツズマブ (IC₅₀ = 0.1 μg / ml) よりも有意に強力であった。トラスツズマブSMCC-DM1に対する薬物の負荷は、2.8 DM1 / Ab であり、そして、hu4D5Fabv8 (A121C)-BMP-E-O-DM1については、0.6 DM1 / Ab であった。

30

【0319】

図11は、トラスツズマブSMCC-DM1 (IC₅₀ = 0.008~0.015 μg / ml) が、軽鎖システイン変異体hu4D5Fabv8 (V110C)-BMP-E-O-DM1 (IC₅₀ = 0.07 μg / ml) よりも強力であったことを示す。両方の結合体は、細胞の殺傷において、裸のトラスツズマブ (IC₅₀ = 0.1 μg / ml) よりも強力であった。トラスツズマブSMCC-DM1に対する薬物の負荷は、2.8 DM1 / Ab であり、そして、hu4D5Fabv8 (V110C)-BMP-E-O-DM1については、0.9 DM1 / Ab であった。

40

【0320】

全長IgGチオMab結合体を、インビトロでの細胞増殖作用について試験し、そして、親抗体と比較した。図20は、親抗体トラスツズマブ (HERCEPTIN (登録商標)), Genentech, Inc. ; 薬物負荷が約3.4 DM1 / Ab のトラスツズマブSMCC-DM1 ; および薬物負荷が約1.6 DM1 / Ab のチオ-トラスツズマブ (A121C)-BMP-E-O-DM1で処理した、SK-BR-3細胞のアッセイ結果を示す。トラスツズマブSMCC-DM1結合体は、アミノ反応性のNHSエステルSMCCリンカー試薬を介して抗体に連結させるのに対し、チオ-トラスツズマブ (A121C)-BMP-E-O-DM1結合体は、チオール反応性のマレイミドBMP-E-Oリンカー試薬を介して連結させる。両方の結合体は、SK-BR-3細胞に対して強力であり、そし

50

て、匹敵する活性を示したが、トラスツズマブは、細胞傷害性作用を示さなかった。図21Aは、親2H9抗-EphB2R；およびチオ2H9(A121C)BMP EO-DM1結合体で処理したHT1080EphB2細胞のアッセイ結果を示す。図21Bは、親2H9抗-EphB2R；およびチオ2H9(A121C)BMP EO-DM1結合体で処理したBT474細胞のアッセイ結果を示す。HT1080EphB2細胞およびBT474細胞の両方に対して、2H9チオMab結合体は、親2H9抗体結合体よりも強力であった。結合体チオ-2H9-BMP EO-DM1は、非EphB2細胞株であるBT474においてわずかな活性のみが観察されるのと比べ、EphB2特異的な細胞株(HT1080EphB2)において、機能的な細胞殺傷活性を示した。

【0321】

10

抗体-薬物結合体を、抗体が親抗体である場合と、抗体がシステイン操作した抗体である場合で比較した。図22は、3A5抗MUC16-SMCC-DM1；およびチオ3A5(A121C)BMP EO-DM1で処理した、PC3/neo細胞のアッセイ結果を示す。図23は、3A5抗MUC16-SMCC-DM1；およびチオ3A5(A121C)BMP EO-DM1で処理した、PC3/MUC16細胞のアッセイ結果を示す。図24は、3A5抗MUC16-SMCC-DM1；およびチオ3A5(A121C)BMP EO-DM1で処理した、OVCA R-3細胞のアッセイ結果を示す。チオ-3A5-BMP EO-DM1は、コントロールのPC3/neo細胞株においては有意な細胞殺傷活性を示さなかったが、PC3/MUC16細胞株においては、3A5-SMCC-DM1に対して匹敵する活性を示した。チオ-3A5-DM1結合体もまた、内因性のMUC16抗原を発現するOVCA R-3において、活性を示した。

20

【0322】

(インビボの有効性)

本発明の2つのアルブミン結合ペプチド-DM1(メイタンシノイド)-抗体-薬物結合体(ADC)のインビボでの有効性を、HER2を高度に発現するトランスジェニック外植マウスマodelによって測定した(図12、実施例10)。同種移植片を、F05mmtvトランスジェニックマウスから増殖させた。このF05mmtvトランスジェニックマウスは、HERCEPTIN(登録商標)治療に対して、応答しないか、または、不完全に応答する。被験体を、ABP-rhuFab4D5-cys(軽鎖)-DM1；ABP-rhuFab4D5-cys(重鎖)-DM1；およびプラセボのPBS緩衝液コントロール(ビヒクル)で一回処置し、そして、3週間にわたってモニターして、腫瘍倍化時間、対数細胞殺傷、および腫瘍の縮小を測定した。

30

【0323】

【表3A】

サンプル	用量	Ti	PR	CR	TDV(日数)
ビヒクル(PBS緩衝液)		7/7	0/7	0/7	3
ABP-rhuFab4D5-V110C(軽鎖)-DM1 (0.9 DM1/Ab)	25 mg/kg (1012 μg/m ² のDM1)	7/7	1/7	0/7	14
ABP-rhuFab4D5-A121C(重鎖)-DM1 (0.6 DM1/Ab)	37.5 mg/kg (1012 μg/m ² のDM1)	7/7	4/7	0/7	16

40

用語Tiは、T=0のときの、腫瘍を有する研究群における動物の数を群における動物の総数で割ったものである。用語PRは、T=0のときの、群における、部分的な腫瘍の寛解を達成した動物の数を、腫瘍を有する動物の数で割ったものである。用語CRは、T=0のときの、群における、腫瘍の完全な寛解を達成した動物の数を、腫瘍を有する動物の数で割ったものである。用語TDVは、腫瘍倍化時間、すなわち、コントロールの腫瘍容積が、二倍になるのにかかる日数である。

50

【0324】

25 mg / kg の A B P - r h u F a b 4 D 5 - c y s (軽鎖) - D M 1 (1 0 1 2 μ g / m² の D M 1) で処置した 7 匹のマウスは全て、腫瘍陽性であり、そして、20 日後には、1 匹の動物が部分的な寛解を有した。37.5 mg / kg の A B P - r h u F a b 4 D 5 - c y s (重鎖) - D M 1 (1 0 1 2 μ g / m² の D M 1) で処置した 7 匹のマウスは全て、腫瘍陽性であり、そして、20 日後には、4 匹の動物が部分的な寛解を有した。

【0325】

A 1 2 1 C システイン変異を有し、そして、B M P E O リンカーおよび D M 1 薬物部分に結合体化させた全長 I g G チオ M a b 抗体改変体を、M M T V - H E R 2 F o 5 腫瘍を有するマウスにおいて、親トラスツズマブ S M C C - D M 1 結合体に対して試験した。10 0 日目の注射時点での腫瘍の大きさは、約 1 0 0 ~ 2 0 0 mm であった。図 25 は、0 日目にビヒクル (緩衝液) ; トラスツズマブ S M C C - D M 1 10 mg / kg ; チオトラスツズマブ (A 1 2 1 C) - S M C C - D M 1 21 mg / kg およびチオトラスツズマブ (A 1 2 1 C) - S M C C - D M 1 10 mg / kg を単回投薬した後の、M M T V - H E R 2 F o 5 乳腺腫瘍同種移植片を有する無胸腺ヌードマウスにおける、21 日間にわたる平均腫瘍容積の変化を示す。

【0326】

【表 3 B】

サンプル	用量	Ti	PR	CR
ビヒクル(PBS緩衝液)	—	10/10	0/10	0/10
トラスツズマブSMCC-DM1 3.4 DM1/Ab	マウス1kgあたり10mg Ab (490 μ g/m ² のDM1)	10/10	7/10	0/10
チオ-トラスツズマブ(A121C) —BMPEO-DM1 1.6 DM1/Ab	マウス1kgあたり21mg Ab (496 μ g/m ² のDM1)	8/10	6/10	4/10
チオ-トラスツズマブ(A121C) —BMPEO-DM1 1.6 DM1/Ab	マウス1kgあたり10mg Ab (236 μ g/m ² のDM1)	10/10	0/10	0/10

図 25 から、各結合体が、プラセボ (ビヒクル) に対して、腫瘍増殖を遅らせる有意な効果を発揮することが見られ得る。上記 4 つの群における 10 匹のマウスの各々に、1 日目に、単回の注射を与えた。親トラスツズマブ S M C C - D M 1 結合体は、システイン操作したチオ - トラスツズマブ (A 1 2 1 C) - B M P E O - D M 1 結合体 (1 . 6 D M 1 / A b) の、2 倍以上の薬物部分の数 (3 . 4 D M 1 / A b) で負荷した。従って、D M 1 の有効量は、親トラスツズマブ S M C C - D M 1 とより高い用量 (2 1 m g A b) チオ - トラスツズマブ (A 1 2 1 C) - B M P E O - D M 1 との間でほぼ等しかった。これらの 2 つのサンプルは、ほとんどの効力を示した。注射から 1 4 日後に、これらの結合体を与えた動物の多くは、部分的または完全な寛解を達成した。より低い用量のチオ - トラスツズマブ (A 1 2 1 C) - B M P E O - D M 1 サンプルのより低い有効性は、D M 1 用量関連性の応答を確認した。チオ - トラスツズマブ D M 1 を、コントロールトラスツズマブ S M C C - D M 1 結合体の量と等価な抗体 (1 0 m g / k g) または D M 1 薬物 (2 1 m g / k g) のいずれかで投薬した。図 25 から見られるように、チオ - B M P E O - D M 1 (2 1 m g / k g) は、トラスツズマブ S M C C - D M 1 群の応答よりもわずかに良い応答を示した。なぜならば、いくらかの動物が、チオ m a b - D M 1 と完全な応答を示したのに対し、トラスツズマブ S M C C - D M 1 とは、部分的な応答のみであったからである。

【0327】

(抗体 - 薬物結合体の投与)

本発明の抗体 - 薬物結合体 (A D C) は、処置される状態に適した適切な任意の経路で

10

20

30

40

50

投与され得る。ADCは、代表的に、非経口的に（すなわち、注入、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、クモ膜下腔内および硬膜外）投与され得る。

【0328】

（薬学的処方物）

本発明の治療用抗体-薬物結合体（ADC）の薬学的処方物は、代表的に、非経口投与（すなわちボーラス注射、静脈内注射、腫瘍内注射）のために、薬学的に受容可能な非経口ビヒクルと共に、単位投薬注射可能形態で調製される。所望の程度の純度を有する抗体-薬物結合体（ADC）は、必要に応じて、薬学的に受容可能な希釈剤、キャリア、賦形剤もしくは安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences（1980）第16版，Osol, A.編）と、凍結乾燥処方物形態もしくは水溶液形態で混合される。

10

【0329】

受容可能な希釈剤、キャリア、賦形剤および安定化剤は、レシピエントに対して、使用される投薬量および濃度において非毒性であり、そして緩衝液（例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液および他の有機酸の緩衝液）；抗酸化剤（アスコルビン酸およびメチオニンを含む）；保存剤（例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノールアルコール、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール；メチルパラベンもしくはプロピルパラベンのようなアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンもしくはリジンのようなアミノ酸；单糖類、二糖類、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む）；EDTAのようなキレート剤；ショ糖、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトールのような糖類；ナトリウムのような塩形成性対イオン；金属複合体（たとえばZn-タンパク質複合体）；ならびに／または非イオン性界面活性剤（例えばTWEENTM、PLURONICSTMもしくはポリエチレングリコール（PEG）を含む。例えば、凍結乾燥化抗erbB2抗体処方物は、WO 97/04801（明白に本明細書中に参考として援用される）に記載される。

20

【0330】

30

活性な薬学的成分もまた、例えばコアセルベーション技術によってもしくは界面重合体化によって調製されるマイクロカプセル（例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース-マイクロカプセルもしくはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）中、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）中、またはマクロエマルジョン中に含まれ得る。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences第16版，Osol, A.編（1980）において開示される。

【0331】

40

徐放性調製物もまた、調製され得る。徐放性調製物の適切な例としては、ADCを含む固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、成形された物質の形態（例えば、フィルムもしくはマイクロカプセル）である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（US 3773919）、L-グルタミン酸と-D-エチル-L-グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー（例えば、LUPRON DEPOTTM（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドからなる注射可能ミクロスフェア）、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

【0332】

50

インビボ投与のために使用される処方物は、無菌でなければならず、このことは、濾過

滅菌膜を通した濾過によって容易に達成される。

【0333】

この処方物は、上記の投与経路に適した処方物を含む。この処方物は、単位投薬形態で簡便に提供され得、そして、製薬の分野で周知の任意の方法によって調製され得る。技術および処方物は、一般に、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA)において見出される。このような方法は、活性成分を1種以上の補助的成分を構成するキャリアと会合させる工程を包含する。一般に、処方物は、活性成分を液体キャリアもしくは微細に分割した個体キャリアまたはその両方と均一にかつしっかりと (intimate1y) 会合させ、必要な場合、製品を成形することによって、調製される。

10

【0334】

本発明の水性懸濁液は、活性物質を、水性懸濁液の製造のために適した賦形剤と混合して含有する。このような賦形剤としては、懸濁化剤 (例えば、カルボキシメチルセルロース、クロスカルメロース、ポビドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントおよびアラビアゴム)、ならびに分散化剤もしくは湿潤剤 (例えば、天然に存在するホスファチド (例えば、レシチン)、アルキレンオキシドと脂肪酸との濃縮産物 (例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン)、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの濃縮産物 (例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール)、エチレンオキシドと脂肪酸および無水ヘキシトールに由来する部分エステルとの濃縮産物 (例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート) が挙げられる。水性懸濁液はまた、エチルp-ヒドロキシ-ベンゾアートもしくはn-プロピルp-ヒドロキシ-ベンゾアートのような1種以上の保存剤、1種以上の着色剤、1種以上の香味添加剤、および1種以上の甘味剤 (例えば、ショ糖もしくはサッカリン) を含み得る。

20

【0335】

ADCの薬学的組成物は、無菌注射可能水性懸濁液もしくは無菌注射可能油性懸濁液のような、無菌注射可能調製物の形態であり得る。この懸濁液は、上述した適切な分散化剤もしくは湿潤剤および懸濁化剤を用いて、公知技術にしたがって処方され得る。無菌注射可能調製物はまた、例えば、1,3-ブタン-ジオール中の溶液のような非毒性非経口受容可能希釈剤もしくは非毒性非経口受容可能溶媒中の無菌注射可能溶液もしくは無菌注射可能懸濁液であってもよく、または凍結乾燥粉末として調製されてもよい。受容可能なビヒクルおよび溶媒の中で、水、リンガー液および等張塩化ナトリウム溶液が使用され得る。さらに、無菌の不揮発性油が、溶媒もしくは懸濁媒体として、従来使用され得る。この目的のために、任意の混合の不揮発性油が使用され得、これらとしては、合成のモノグリセリドもしくはジグリセリドが挙げられる。さらに、脂肪酸 (例えばオレイン酸) が、注射可能薬の調製において同様に使用され得る。

30

【0336】

キャリア物質と合わせられて単回投薬形態を形成する活性成分の量は、処置される宿主および投与の特定の様式に依存して変動する。例えば、静脈内注入を意図される水溶液は、約30mL/時間の速度での適切な容量の注入が生じ得るために、溶液1mLあたり約3~500μgの活性成分を含有し得る。

40

【0337】

非経口投与のために適した処方物は、抗酸化剤、緩衝液、静菌薬および処方物を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質を含有し得る無菌注射可能水溶液および非水性無菌注射可能溶液、ならびに懸濁化剤および増粘剤を含有し得る水性無菌懸濁液および非水性無菌懸濁液が挙げられる。

【0338】

タンパク質治療薬の経口投与は、胃における加水分解もしくは変性に起因して好ましくないが、経口投与に適するADCの処方物は、各々所定量のADCを含有するカプセル、カシェ剤もしくは錠剤として、別個の単位で調製され得る。

50

【0339】

この処方物は、単位用量容器もしくは多回用量容器（例えば、密閉されたアンプルおよびバイアル）に梱包され得、そして、注射のために、使用直前の無菌液体キャリア（例えば水）の添加のみを必要とする凍結乾燥（freeze-dried（凍結乾燥（lyophilized）））状態で保存され得る。即席注射溶液および即席注射懸濁液は、上述した類の無菌の粉末、顆粒および錠剤から調製される。好ましい単位投薬処方物は、活性成分の、本明細書中上で挙げたような日用量もしくは単位日下位用量を含むか、または、その適切な一部分を含む。

【0340】

本発明は、上で規定したように、獣医学用組成物をさらに提供し、この組成物は、少なくとも1種の活性成分を、従って獣医学用キャリアと共に含有する。獣医学用キャリアは、組成物の投与の目的のために有用な物質であり、固体、液体もしくは気体の物質であり得、これらは、獣医学分野で受容可能であるかさもなければ不活性であり、そして活性成分と適合性である。これらの獣医学的組成物は、非経口投与されても、経口投与されても、または任意の他の所望の経路によって投与されてもよい。

10

【0341】

(抗体-薬物結合体処置)

本発明の抗体-薬物結合体（ADC）は、種々の疾患もしくは障害（例えば、腫瘍抗原の過剰発現によって特徴付けられる疾患もしくは障害）を処置するために使用され得る。例示的な状態もしくは過剰増殖性障害としては、良性もしくは悪性の腫瘍；白血病およびリンパ性悪性疾患が挙げられる。他の障害としては、神経系障害、神経膠障害、星状細胞障害、視床下部障害、上皮障害、間質障害、胞胚腔障害、炎症性障害、脈管形成性障害および免疫障害（自己免疫障害を含む）が挙げられる。

20

【0342】

動物モデルおよび細胞ベースのアッセイにおいて同定されたADC化合物は、腫瘍を有する高等靈長類およびヒトの臨床試験さらに試験され得る。ヒト臨床試験は、抗HER2モノクローナル抗体HERCEPTIN（登録商標）の効力を試験する臨床試験（Baseline（1996）J.Clin.Oncol.14:737-744において報告される）と同様に、以前に大規模な抗癌治療を受けているHER2過剰発現性転移性乳癌を有する患者において設計され得る。臨床試験は、コウチの治療レジメン（例えば、放射線照射および/または公知の化学療法剤および/または細胞傷害性薬剤に関する化学療法）と組み合わせたADCの効力を評価するために設計され得る。

30

【0343】

一般に、処置される疾患もしくは障害は、癌のような過剰増殖性疾患である。本明細書中で処置される癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫および白血病もしくはリンパ性悪性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。このような癌のより特定の例としては、扁平上皮癌（例えば、上皮（epithelial）扁平上皮細胞癌）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌腫を含む肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸の癌を含む胃癌（gastric cancer）すなわち胃癌（stomach cancer）、肺腺癌、多形性グリア芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ペパトーム、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌腫もしくは子宮癌腫、唾液腺癌腫、腎臓癌（kidney cancer）もしくは腎臓癌（renal cancer）、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、陰茎癌腫、ならびに頭部の癌もしくは頸部の癌が挙げられる。

40

【0344】

癌は、HER2発現性細胞を含み得、したがって、本発明のADCが、癌細胞に結合し得る。癌におけるErbb2発現を決定するために、種々の診断/予後診断アッセイが利用可能である。1つの実施形態において、Erbb2過剰発現は、IHCによって（例えばHERC E P T E S T（Dakko）を用いて）分析され得る。腫瘍生検からのパラフィン包埋した組織切片が、IHCアッセイに供され得、そして以下のErbb2タンパク質

50

染色強度基準に当てはめられ得る：スコア0、染色が観察されないか、または膜染色が腫瘍細胞の10%未満で観察される；スコア1+、淡い／辛うじて見える膜染色が、腫瘍細胞の10%を超えて検出され、細胞は、その膜の一部分でしか染色されていない；スコア2+、弱い～中程度の完全な膜染色が、腫瘍細胞の10%を超えて観察される；スコア3+、中程度～強い完全な膜染色が、腫瘍細胞の10%を超えて観察される。Er b B 2 過剰発現評価について、0スコアもしくは1+スコアを有する腫瘍はEr b B 2を過剰発現していないと特徴付けられ、一方、2+スコアもしくは3+スコアを有する腫瘍は、Er b B 2を過剰発現していると特徴付けられる。

【0345】

あるいは、またはさらに、FISHアッセイ（例えば、INFORMTM（Ventana Co., Ariz.）もしくはPATHVISIONTM（Vysis, Ill.））が、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された腫瘍組織において、腫瘍における（存在する場合は）Er b B 2の程度を決定するために実施され得る。

【0346】

ADC化合物が処置において使用され得る自己免疫疾患としては、リウマチ性障害（例えば、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群、強皮症、SLEおよびループス腎炎のような狼瘡、多発性筋炎／皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、抗リンパ抗体症候群、および乾癬性関節炎）、骨関節炎、自己免疫性胃腸障害および自己免疫性肝臓障害（例えば、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎およびクローン病）、自己免疫性胃炎および悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、およびセリアック病）、脈管炎（例えば、チャーグ-ストラウス症候群、ウェーベナー肉芽腫症、および多発性動脈炎（polyarteritis）を含むANCA-関連性脈管炎）、自己免疫性神経障害（例えば、多発性硬化症、眼球クローヌスミオクローヌス症候群、重症筋無力症、視神経脊髄炎、パーキンソン病、アルツハイマー病および自己免疫性多発性ニューロパシー）、腎臓障害（例えば、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、バージャー病）、自己免疫性皮膚障害（例えば、乾癬、じんま疹（urticaria）、じんま疹（hive）、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡および皮膚エリテマトーデス）、血液障害（例えば、血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、輸液後紫斑および自己免疫性溶血性貧血）、アテローム性動脈硬化症、ブドウ膜炎、自己免疫性聴覚疾患（例えば、内耳疾患および難聴）、ベーチェット病、レーノー症候群、器官移植ならびに自己免疫性内分泌障害（例えば、インスリン依存性真性糖尿病（IDDM）、アディソン病および自己免疫性甲状腺疾患（例えば、グレーヴズ病および甲状腺炎）のような糖尿病関連自己免疫性疾患）が挙げられる。

【0347】

疾患の予防もしくは処置のために、ADCの適切な投薬量は、上で規定されるような処置される疾患の型、疾患の重症度および経過、この分子が予防目的で投与されるかまたは治療目的で投与されるか、以前の治療、患者の臨床歴および抗体の応答、ならびに主治医の判断に依存する。この分子は、1回に、または一連の処置にわたって、患者に適切に投与される。疾患の型および重症度に依存して、約1μg/kg～15mg/kg（例えば、0.1～20mg/kg）の分子が、例えば1回以上の別個の投与でまたは連続的な注入でのいずれかによる、患者への投与のための初回候補投薬量である。代表的な日投薬量は、上述の要因に基づき、約1μg/kg～100mg/kgまたはそれ以上の範囲であり得る。患者に投与されるADCの例示的な投薬量は、患者の体重1kgあたり約0.1～約10mgの範囲である。

【0348】

何日もまたはそれより長くにわたる反復される投与について、状態に依存して、処置は、疾患徵候の所望の抑制が生じるまで、持続される。例示的な投薬レジメンは、抗Er b B 2抗体の、約4mg/kgの初回負荷用量の投与、およびその後の約2mg/kgの毎週の維持用量の投与を包含する。他の投薬レジメンが、有用であり得る。この治療の進行は、従来の技術およびアッセイによって、容易にモニタリングされる。

10

20

30

40

50

【0349】

(組み合わせ治療)

本発明の抗体-薬物結合体(ADC)は、薬学的な組み合わせ処方物、もしくは組み合わせ治療としての投薬レジメンにおいて、抗癌特性を有する第2の化合物と組み合わせられる。薬学的組み合わせ処方物もしくは投薬レジメンの第2の化合物は、組み合わせのADCに対して好ましくは補完的な活性を有し、それによって、互いに有害に作用しない。

【0350】

第2の化合物は、化学療法剤、細胞傷害性薬剤、サイトカイン、増殖阻害性薬剤、抗ホルモン剤、および/または心保護剤(cardioprotectant)であり得る。このような分子は、意図される目的のために有効な量での組み合わせにおいて、好適に存在する。本発明のADCを含有する薬学的組成物はまた、有効量の、チューブリン形成インヒビター、トポイソメラーゼインヒビターもしくはDNA結合剤のような化学療法剤をも有し得る。

【0351】

他の治療レジメンが、本発明に従って同定される抗癌剤の投与と組み合わせられ得る。組み合わせ治療は、同時のレジメンもしくは連続的なレジメンとして投与され得る。投与が連続的である場合、組み合わせは、2回以上の投与で投与され得る。組み合わせ投与は、別個の処方物もしくは単一の薬学的処方物を用いる同時投与、およびどちらかの順番での連続的投与を含み、この連続的投与において、好ましくは、両方の(もしくは全ての)活性剤が同時にその生物学的活性を発揮する時間の期間が存在する。

【0352】

1つの実施形態において、ADCによる処置は、本明細書中で同定される抗癌剤と1種以上の化学療法剤もしくは増殖阻害剤との組み合わせ投与を包含し、これらの投与には、異なる化学療法剤のカクテルの同時投与を含む。化学療法剤としては、タキサン類(例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル)および/またはアントラサイクリン抗生物質が挙げられる。このような化学療法剤の調製および投薬スケジュールは、製造業者の指示に従って使用され得るか、または熟達した医師によって実験的に決定され得る。このような化学療法のための調製および投薬スケジュールはまた、「Chemotherapy Service」,(1992)M.C. Perry編, Williams & Wilkins, Baltimore, Mdに記載される。

【0353】

ADCは、抗ホルモン化合物(例えば、タモキシフェンのような抗エストロゲン化合物;オナプリストン(EP 616812)のような抗プロゲステロン;またはフルタミドのような抗アンドロゲン)の、このような分子について公知の投薬量と組み合わせられ得る。処置される癌が、ホルモン非依存性の癌である場合、患者は、以前に抗ホルモン治療を受けている場合があり、癌がホルモン非依存性になった後、ADC(および必要に応じて本明細書中で記載される他の薬剤)が、患者に投与され得る。心保護剤(治療に伴う心筋不全を予防するかもしくは低下させるため)または1種以上のサイトカインを患者に同時投与することもまた、有用であり得る。上記の治療レジメンに加えて、患者は、癌細胞の外科的除去および/または放射線治療を受け得る。

【0354】

上記の同時投与される薬剤のいずれかの適切な投薬量は、現在使用されている投薬量であり、そして、新規に同定された薬剤と他の化学療法剤もしくは処置との総合作用(相乗作用)に起因して、より低くあり得る。

【0355】

組み合わせ治療は、「相乗作用」を提供し得、そして「相乗的」である(すなわち、活性成分が一緒に使用される場合、別個の化合物の使用からもたらされる効果の合計よりもより大きく達成される)ことが証明され得る。相乗効果は、活性成分が以下である場合に、達成され得る:(1)合わせた単位投薬処方物中で、同時に処方され、そして同時に投与されるかもしくは送達される場合;(2)別個の処方物として、交互もしくは平行に送

10

20

30

40

50

達される場合；または（3）なんらかの他のレジメンによる場合。交互の治療において送達される場合、相乗効果は、この化合物が、例えば別個のシリング内に異なる注射によって、連続的に投与されるかもしくは送達される場合に、達成され得る。一般に、交互の治療の間、各活性成分の有効な投薬量は、連続的に（sequential）（したがって、連続的に（serially））投与され、一方、組み合わせ治療において、2種以上の活性成分の有効投薬量は、一緒に投与される。

【0356】

（抗体-薬物結合体の代謝物）

本明細書中で記載されるADC化合物のインビボ代謝産物もまた、このような産物が新規かつ先行技術から自明でない範囲で、本発明の範囲内である。このような産物は、例えば、投与された化合物の酸化、還元、加水分解、アミド化、エステル化、酵素切断などから生じ得る。したがって、本発明は、本発明の化合物を、その代謝産物を生じるために十分な時間、哺乳動物に接触させる工程を包含するプロセスによって產生される、新規かつ非自明な化合物を含む。

10

【0357】

代謝産物は、代表的に、放射性標識された（例えば、¹⁴Cもしくは³H）ADCを調製し、これを非経口的に検出可能な用量（例えば、約0.5mg/kgよりも多い用量）で、ラット、マウス、モルモット、サルもしくはヒトのような動物に投与し、代謝が起こるために十分な時間（代表的に、約30秒間～約30時間）を与え、そしてその変換産物を尿、血液もしくは他の生物学的サンプルから単離することによって同定される。これらの産物は、これらが標識されているので、用意に単離される（他は、代謝物において残留するエピトープを結合可能な抗体の使用によって単離される）。代謝物構造は、従来の様式で（例えば、MS、LC/MSもしくはNMR分析によって）決定される。一般に、代謝物の分析は、当業者に周知の従来の薬物代謝研究と同じ様式で行われる。変換産物は、これらがインビボで見出されない限り、本発明のADC化合物の治療用投薬量についての診断アッセイにおいて有用である。

20

【0358】

（標識化抗体画像化方法）

本発明の別の実施形態において、システイン操作抗体は、放射性核種、蛍光色素、生物発光を引き起こす基質部分、化学発光を引き起こす部分、酵素および診断用途、薬力学用途および治療用途を有する画像化実験のための他の検出標識を有するシステインチオールを介して標識され得る。一般に、標識化システイン操作抗体（すなわち、「バイオマーカー」もしくは「プローブ」）は、生体（例えば、ヒト、げっ歯類もしくは他の小動物）、灌流された器官もしくは組織サンプルへの注射、輸液もしくは経口摂取によって投与される。プローブの分布は、時間経過にわたって検出され、そして画像によって表される。

30

【0359】

（製品）

本発明の別の実施形態において、上記の障害の処置のために有用な物質を含む製品もしくは「キット」が、提供される。製品は、容器およびこの容器上もしくはこの容器に伴うラベルもしくはパッケージ挿入物を含む。適切な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリング、パックなどが挙げられる。容器は、ガラスもしくはプラスチックのような、種々の材料から形成され得る。容器は、状態を処置するために有効な抗体-薬物結合体（ADC）組成物を維持し、そして、無菌アクセスポートを有し得る（例えば、この容器は、静脈内溶液バッグもしくは皮下注射針によって穿孔可能なストッパーを備えたバイアルであり得る）。この組み合わせ中の少なくとも1種の活性成分は、ADCである。ラベルもしくはパッケージ挿入物は、この組成物が、最適な状態（例えば癌）を処置するために使用されることを示す。あるいは、またはさらに、製品は、薬学的に受容可能な緩衝液（例えば注射のための静菌水（BWF1）、リン酸緩衝化生理食塩水、リンガー液およびデキストロース溶液）を含む第2（もしくは第3）の容器をさらに含み得る。これはさらに、商業的視点および使用者の視点から所望される他の物質を含み得、これらとしては、他

40

50

の緩衝液、希釈剤、フィルター、針およびシリンジが挙げられる。

【実施例】

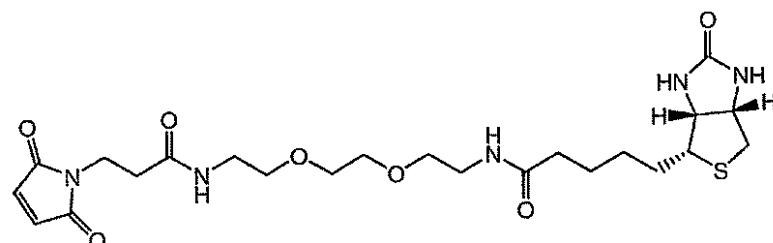
【0360】

(実施例1 ビオチン化チオF a b ファージの調製)

チオF a b - ファージ (5×10^{12} ファージ粒子) を、150倍過剰のビオチン - P E O - マレイミド ((+) - ビオチニル - 3 - マレイミドプロピオニアミジル - 3 , 6 - デオキサオクタインジアミン、Odaら(2001) Nature Biotechnology 19: 379 - 382, Pierce Biotechnology, Inc.) と、3時間室温で反応させた。過剰なビオチン - P E O - マレイミドを、ビオチン - 結合体化ファージから、P E G沈殿の繰り返し (3~4回) によって除去した。システムチオール基と反応性である求電子性の基を有する他の市販のビオチン化試薬が、使用され得、これらとしては、ビオチン - B M C C 、 P E O - ヨードアセチルビオチン、ヨードアセチル - L C - ビオチン、およびビオチン - H P D P (Pierce Biotechnology, Inc.) 、ならびにN - (3 - マレイミジルプロピオニル) ビオチシン (M P B , Molecular Probes , Eugene , OR) が挙げられる。ビオチン化二重官能性リンカー試薬およびビオチン化多重官能性リンカー試薬の他の商業的供給源としては、Molecular Probes , Eugene , OR およびSigma , St. Louis , MO が挙げられる。

【0361】

【化49】



ビオチン-PEO- マレイミド

(実施例2 P H E S E L E C T O R アッセイ)

ウシ血清アルブミン (B S A) 、 e r b B 2 細胞外ドメイン (H E R 2) およびストレプトアビジン ($2 \mu g / ml$ の $100 \mu l$) を、 M a x i s o r p 96 ウェルプレート上に別個にコーティングした。0.5% Tween - 20 (P B S 中) によるブロッキング後、ビオチン化 h u 4 D 5 F a b v 8 - チオF a b - ファージおよび非ビオチン化 h u 4 D 5 F a b v 8 - チオF a b - ファージ (2×10^{10} ファージ粒子) を、1時間室温でインキュベートし、その後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) 標識化二次抗体 (抗M 1 3 ファージコートタンパク質、 p V I I I タンパク質) と共にインキュベートした。図8は、F a b もしくはチオF a b の H E R 2 に対する結合 (上) およびビオチン化チオF a b のストレプトアビジンに対する結合 (下) を示す略図によって、 P H E S E L E C T O R アッセイを示す。

【0362】

標準的 H R P 反応を実施し、そして吸光度を 450 nm で測定した。チオール反応性を、ストレプトアビジンについての O D ₄₅₀ / H E R 2 についての O D ₄₅₀ の間の比を計算することによって、測定した。1のチオール反応性値は、システムチオールの完全なビオチン化を示す。F a b タンパク質結合測定の場合において、 h u 4 D 5 F a b v 8 ($2 \sim 20 \text{ ng}$) を使用し、その後、 H R P 標識化ヤギポリクローナル抗F a b 抗体と一緒にインキュベーションを行った。

【0363】

(実施例3 a チオF a b の発現および精製)

チオF a b を、 3 4 B 8 、非サプレッサー (n o n - s u p p r e s s o r) E . c o l i 株 (B a c a l a (1997) Journal Biological Chemis

10

20

30

40

50

try 272(16) : 10678 - 84)における誘導において発現させた。回収した細胞ペレットを、PBS(リン酸緩衝化生理食塩水)中に再浮遊させ、細胞溶解全体を、マイクロフルイタイザー(microfluidizer)を通過させることによって行い、そしてチオFabを、タンパク質G SEPHAROSE™(Amersham)を用いる親和性クロマトグラフィーによって精製した。

【0364】

チオFab L - V15C、チオFab L - V110C、チオFab H - A88C、およびチオFab H - A121Cを、発現させ、そしてProtein - G SEPHAROSE™カラムクロマトグラフィーによって精製した。オリゴマー - Fabは、画分26~30に存在し、そしてほとんどのモノマー形態は、画分31~34に存在した。モノマー形態を含む画分を、プールし、そして野生型hu4D5Fabv8と共にSDS - PAGEによって分析し、そして還元条件下(DTTもしくはBMEを含む)および非還元条件下(DTTもしくはBMEを含まない)でSDS - PAGEゲル上で分析した。A121C - チオFabのゲルfiltration画分を、非還元SDS - PAGE上で分析した。

10

【0365】

チオFabを、上記のようにビオチン - PEO - マレイミドと結合体化させ、そしてこのビオチン化 - チオFabを、Superdex - 200™(Amersham)ゲルfiltrationクロマトグラフィー(遊離のビオチン - PEO - マレイミドおよびチオFabのオリゴマー画分を除去する)によってさらに精製した。野生型hu4D5Fabv8およびhu4D5Fabv8 A121C - チオFab(0.5mgの量)を、各々そして別個に、100倍モル濃度過剰なビオチン - PEO - マレイミドと共に、室温で3時間インキュベートし、そしてSuperdex - 200ゲルfiltrationカラム上にローディングして、遊離のビオチンおよびオリゴマーFabsを、モノマー形態から分離した。

20

【0366】

(実施例3b チオFabの分析)

ビオチン化hu4D5Fabv8(A121C)チオFabおよび野生型hu4D5Fabv8の酵素的フラグメント消化物を、液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)によって分析した。ビオチン化hu4D5Fabv8(A121C)の第1質量である48294.5と、野生型hu4D5Fabv8の第1質量である47737.0との間は、557.5質量単位であった。このフラグメントは、1つのビオチン - PEO - マレイミド部分(C₂₃H₃₆N₅O₇S₂)の存在を示す。表4は、配列を確認する、フラグメント化値の割り当てを示す。

30

【0367】

(表4. トリプシン消化後のビオチン化hu4D5Fabv8 チオFab A121CのLC - ESI - 質量分析)

【0368】

【表4】

アミノ酸	b フラグメント	y フラグメント
A (アラニン)	72	
M (メチオニン)	203	2505
D (アスパラギン酸)	318	2374
Y (チロシン)	481	2259
W (トリプトファン)	667	2096
G (グリシン)	724	1910
Q (グルタミン)	852	1853
G (グリシン)	909	1725
T (トレオニン)	1010	1668
L (ロイシン)	1123	1567
V (バリン)	1222	1454
T (トレロニン)	1323	1355
V (バリン)	1422	1254
S (セリン)	1509	1155
S (セリン)	1596	1068
C (システイン) + ビオチン	2242	981
S (セリン)	2329	385
T (トレオニン)	2430	248
K (リジン)		175

Superdex-200ゲル濃過の前後に、ビオチン化 A B P - h u 4 D 5 F a b v 8 - A 1 2 1 C、ビオチン化 A B P - h u 4 D 5 F a b v 8 - V 1 1 0 C、ビオチン化二重 C y s A B P - h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C - A 8 8 C)、およびビオチン化二重 C y s A B P - h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C - A 1 2 1 C)の、還元 (D T T もしくは B M E による) および非還元の S D S - P A G E ゲル分析を、行った。

【0369】

h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) - B M P E O - D M 1 の質量分析 (M S / M S) (Superdex-200ゲル濃過精製後) : F a b + 1 5 1 6 0 7 . 5 、 F a b 5 0 5 1 5 . 5 。このデータは、 9 1 . 2 % 結合体化を示す。 h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) - B M P E O - D M 1 (還元) の M S / M S 分析 : L C 2 3 4 4 7 . 2 、 L C + 1 2 4 5 3 7 . 3 、 H C (F a b) 2 7 0 7 2 . 5 。このデータは、全ての D M 1 結合体は、 F a b の軽鎖であることを示す。

【0370】

(実施例4 A B P - h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) と M C - M M A E との結合体化による、 A B P - h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) - M C - M M A E の調製)

D M S O 中に溶解した、薬物リンカー試薬であるマレイミドカプロイル - モノメチルアウリスタチン (a u r i s t a t i n) E (すなわち、 M C - M M A E) を、アセトニトリルおよび水中に公知の濃度で希釈し、そして氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水 (P B S) 中の A B P - h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) チオ F a b に添加する。約1時間後、過剰なマレイミドを添加して反応を止め、そして全ての未反応抗体チオール基をキャップする。反応混合物を、遠心限界濃過によって濃縮し、そして A B P - h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) - M C - M M A E を、 P B S 中の G 2 5 樹脂を通した溶出によっ

10

20

30

40

50

て精製しそして脱塩し、無菌条件下で $0.2 \mu\text{m}$ フィルターを通して濾過し、そして保存のために凍結する。

〔 0 3 7 1 〕

(実施例5 A B P - h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) と M C - M M A F との結合体化による A B P - h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) - M C - M M A F の調製)

A B P - h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) - M C - M M A F を、 A B P - h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) チオ F a b と M C - M M A F との結合体化により、実施例 4 の手順に従って調製する。

〔 0 3 7 2 〕

(実施例 6 A B P - A 1 2 1 C - チオ F a b と M C - v a l - c i t - P A B - M M A E との結合体化による、 A B P - A 1 2 1 C - チオ F a b - M C - v a l - c i t - P A B - M M A E の調製)

MAEを、ABP-hu4D5Fabv8-(A121C)とMC-val-cit-PAB-MAB-MMAEとの結合体化により、実施例4の手順に従って調製する。

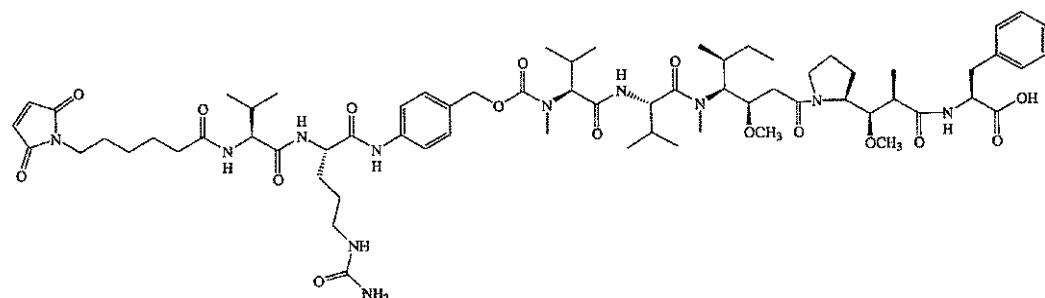
【 0 3 7 3 】

(実施例7 A B P - A 1 2 1 C - チオF a b とM C - v a l - c i t - P A B - M M A Fとの結合体化による、A B P - A 1 2 1 C - チオF a b - M C - v a l - c i t - P A B - M M A Fの調製)

ABP - hu4D5Fabv8 - (A121C) - MC - val - cit - PAB - MMAFは、ABP - hu4D5Fabv8 - (A121C)とMC - val - cit - PAB - MMAFとの結合体化により、実施例4の手順に従って調製する。

【 0 3 7 4 】

【化 5 0 】



MC-val-cit-PAB-MMAF

(実施例 8 h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) チオ F a b - B M P E O - D M
1 の調製)

h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) チオ F a b 上の遊離のシステインを、ビス - マレイミド試薬 B M (P E O) 4 (Pierce Chemical) によって改変し、未反応のマレイミド基を抗体の表面上に残した。このことを、 B M (P E O) 4 を 5 0 % エタノール / 水混合物中に、 1 0 m M の濃度まで溶解し、そして 1 0 倍モル濃度過剰の B M (P E O) 4 を、リン酸緩衝化生理食塩水中約 1 . 6 m g / m l (1 0 μ M) の濃度の h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) チオ F a b に添加し、そしてこれを 1 時間反応させることによって達成した。過剰な B M (P E O) 4 を、 1 5 0 m M N a C l 緩衝液含有 3 0 m M クエン酸 (p H 6) 中のゲルfiltration (H i T r a p カラム、 Pharmacia) によって除去した。ジメチルアセトアミド (D M A) 中に溶解した約 1 0 倍モル濃度過剰の D M 1 を、この h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) チオ F a b - B M P E O 中間体に添加した。また、ジメチルホルムアミド (D M F) を、薬物部分試薬を溶解するために使用し得る。この反応混合物を、一晩反応させ、その後、 P B S 中でゲルfiltrationもしくは透析を行って、未反応の薬物を除去した。 P B S 中、 S 2 0 0 カラム上のゲルfiltrationを、高分子量凝集体を除去するために使用し、精製 h u 4 D 5 F a b v 8 - (V 1 1 0 C) チオ F

a b - B M P E O - D M 1 を提供した。

【 0 3 7 5 】

同じプロトコールにより、h u 4 D 5 F a b v 8 (A 1 2 1 C) チオ F a b - B M P E O - D M 1 を精製した。

【 0 3 7 6 】

(実施例 9 インビトロ細胞増殖アッセイ)

A D C の効力を、以下のプロトコール (C e l l T i t e r G l o 発光細胞生存度アッセイ , P r o m e g a C o r p . T e c h n i c a l B u l l e t i n T B 2 8 8 ; M e n d o z a ら (2 0 0 2) C a n c e r R e s . 6 2 : 5 4 8 5 - 5 4 8 8) を用いる細胞増殖アッセイによって測定した。

1 . 約 10^4 個の細胞 (S K B R - 3 、 B T 4 7 4 、 M C F 7 もしくは M D A - M B - 4 6 8) を培地中に含む $100 \mu L$ の細胞培養物のアリコートを、 9 6 ウェルの不透明ウェルプレートの各ウェルに入れた。

2 . 培地を含みそして細胞を含まないコントロールウェルを、調製した。

3 . A D C を、実験ウェルに添加し、そして 3 ~ 5 日間インキュベートした。

4 . プレートを、 3 0 分間、室温に対して平衡化した。

5 . 各ウェル中に存在する細胞培養培地の容量と同容量の C e l l T i t e r - G l o 試薬を、添加した。

6 . 内容物を、オービタルシェーカー (o r b i t a l s h a k e r) 上で 2 分間混合し、細胞溶解を誘導した。

7 . このプレートを、室温で 1 0 分間インキュベートし、発光シグナルを安定化させた。

8 . 発光を、 R L U = 相対発光単位のグラフに記録し、そして報告した。

【 0 3 7 7 】

特定の細胞を、 9 6 ウェルプレート、 $50 \mu L$ / ウェル中に、 1 0 0 0 ~ 2 0 0 0 / ウェル (P C 3 株) もしくは 2 0 0 0 ~ 3 0 0 0 / ウェル (O V C A R - 3) で播種する。

1 日後 (P C 3) もしくは 2 日後 (O V C A R - 3) 、 A D C を、 $50 \mu L$ の容量で、 9 0 0 0 n g / m L 、 3 0 0 0 n g / m L 、 1 0 0 0 n g / m L 、 3 3 3 n g / m L 、 1 1 1 n g / m L 、 3 7 n g / m L 、 1 2 . 4 n g / m L 、 4 . 1 n g / m L 、 もしくは 1 . 4 n g / m L の最終濃度まで添加し、「 A D C なし」コントロールウェルには培地のみを添加する。条件を、二連もしくは三連で行う。3日後 (P C 3) もしくは 4 ~ 5 日後 (O V C A R - 3) 、 $100 \mu L$ / ウェルの C e l l T i t e r G l o I I を、添加し (ルシフェラーゼベースのアッセイ ; 増殖を、 A T P レベルによって測定する) 、そして細胞数を、ルミノメーター (l u m i n o m e t e r) を用いて決定する。データを、繰り返しの各組についての発光の平均として、標準偏差のエラーバーと共にプロットする。プロトコールは、 C e l l T i t e r G l o 発光細胞生存度アッセイ (P r o m e g a) の変法である :

1 . プレートは、 P C 3 / M u c 1 6 、 P C 3 / n e o の 1 0 0 0 細胞 / ウェル ($50 \mu L$ / ウェルの培地中) である。 O v c a r 3 細胞を、 2 0 0 0 細胞 / ウェル (その培地の $50 \mu L$ 中) でプレート培養するべきである (処方箋は以下) 。細胞を、一晩接着させる。

2 . A D C は、 $18 \mu g / m l$ の作用濃度で開始して、培地中で 1 : 3 で連続希釈する (これにより、 $9 \mu g / m l$ の最終濃度を生じる) 。 $50 \mu L$ の希釈した A D C を、既にウェル中に存在する $50 \mu L$ の細胞および培地に添加する。

3 . 7 2 ~ 9 6 時間インキュベートする (標準は 7 2 時間であるが、 $0 \mu g / m L$ 濃度を観察し、細胞が 8 5 ~ 9 5 % コンフルーエントである時にアッセイを停止する) 。

4 . $100 \mu L$ / ウェルの P r o m e g a C e l l T i t e r G l o 試薬を添加し、 3 分間振とうし、そしてルミノメーター上で読み取る。

培地 : P C 3 / n e o および P C 3 / M U C 1 6 は、 5 0 / 5 0 / 1 0 % F B S / グルタミン / $250 \mu g / m L$ 中で増殖する。 G - 4 1 8 O V C A R - 3 は、 R P M I / 2 0

10

20

30

40

50

% F B S / グルタミン中で増殖する。

【0378】

(実施例10 腫瘍増殖阻害、高発現HER2トランスジェニック体外移植マウスにおけるインピボ効力)

トランスジェニック実験に適した動物は、Taconic (Germantown, N.Y.) のような標準的な商業的供給源から得られ得る。多くの系統が好適であるが、FVB雌性マウスが、腫瘍形成に対するその高い感受性ゆえに、好ましい。FVB雄を、交配のために使用し、そして精管切除したCD.1 studsを、偽妊娠を刺激するために使用した。精管切除したマウスは、任意の業者から得られ得る。創始マウス (founder) を、FVBマウスのいずれか、もしくは29/BL6 × FVB p53異種接合マウスと交配した。p53対立遺伝子において異種接合性を有するマウスを、潜在的な腫瘍形成の増大のために使用した。しかし、これは、不必要であることが証明されている。しかし、いくつかのF1腫瘍は、混合した系統の腫瘍であった。創始腫瘍 (founder 腫瘍) は、FVBのみである。いくらかの発達中の腫瘍を有する6匹の創始マウスを、同腹子なしで得た。

【0379】

腫瘍 (F05 mmtvトランスジェニックマウスから増殖させた同種移植片) を有する動物を、ADCの単回用量もしくは多回用量で、IV注射によって処置した。腫瘍体積を、注射後の種々の時点で評価した。

【0380】

neu (HER2のラットホモログ) の変異的活性化形態を発現するトランスジェニックマウス中で、腫瘍は容易に生じるが、ヒト乳癌において過剰発現されるHER2は変異されていない。そして腫瘍形成は、変異されていないHER2を過剰発現するトランスジェニックマウス中ではずっと弱い (Websterら (1994) Semin. Cancer Biol. 5: 69-76)。

【0381】

変異されないHER2によって腫瘍形成を改善するために、トランスジェニックマウスを、上流ATGが欠失している (このような上流ATGコドンによる翻訳の開始を防ぐため、さもなければ下流の正しいHER2の開始コドンからの翻訳開始の頻度が低下する) HER2 cDNAプラスミドを用いて產生した (例えば、Childら (1999) J. Biol. Chem. 274: 24335-24341を参照)。さらに、キメライントロンを、5'末端に付加した。このイントロンもまた、以前に報告されていた発現レベルよりも発現レベルを増強する (NeubergerおよびWilliams (1988) Nucleic Acids Res. 16: 6713; BuchmanおよびBerg (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 4395; Brinsterら (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 836)。このキメライントロンは、Promegaベクターである、Pci-neo哺乳動物発現ベクターから誘導された (bp 890 ~ 1022)。cDNA 3'末端は、ヒト成長ホルモンエキソン4および5ならびにポリアデニル化シグナルに隣接している。さらに、FVBマウスを、使用した。何故なら、この系統は、腫瘍の発達に対してより感受性であるからである。MMTV-LTRからのプロモーターを使用し、乳腺における組織特異的HER2発現を確実にした。動物に、腫瘍形成に対する感受性を上昇させるために、AIN 76A食餌を与えた (Raoら (1997) Breast Cancer Res. and Treatment 45: 149-158)。

【0382】

(実施例11 結合体化のためのチオMabの還元/酸化)

全長の、CHO細胞中で発現されるシステイン操作モノクローナル抗体 (チオMabs) を、約50倍過剰のTCEP (トリ(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩; Getzら (1999) Anal. Biochem. 第273巻: 73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) によって、3時間、37で還元した。還

10

20

30

40

50

元型チオMab（図15）を、希釈し、そして10 mM酢酸ナトリウム（pH5）中でHiTrap Sカラム上にローディングし、そして0.3 M塩化ナトリウムを含有するPBSによって溶出した。溶出した還元型チオMabを、200 nM硫酸銅（CuSO₄）水溶液で、室温で一晩処理した。周囲の空気の酸化もまた、有効であった。

【0383】

（実施例12 チオMabの結合体化）

実施例11からの再酸化型（reoxidized）チオMab（チオ-トラスツズマブ（A121C）、チオ-2H9（A121C）、およびチオ-3A5（A121C）を含む）を、10倍過剰な薬物-リンカー中間体（BM（PEO）₄-DM1）と合わせ、混合し、そして約1時間室温に静置して結合体化を起こさせ、そしてチオMab抗体-薬物結合体（チオ-トラスツズマブ（A121C）-BMPEO-DM1、チオ-2H9（A121C）-BMPEO-DM1、およびチオ-3A5（A121C）-BMPEO-DM1を含む）を形成した。結合体混合物を、ゲル濾過するか、またはHiTrap Sカラム上にローディングしそして溶出して、過剰な薬物-リンカー中間体および他の不純物を除去した。

【0384】

本発明は、本発明のいくつかの局面の例示として意図される実施例に開示された特定の実施形態によって限定されず、そして機能的に均等な任意の実施形態は、本発明の範囲内である。実際に、本明細書中に記載の改変に加えて、本発明の種々の改変が、当業者に明らかであり、そして添付の特許請求の範囲の範囲内であることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0385】

【図1A】図1Aは、X線結晶座標に由来するhu4D5Fabv7抗体フラグメントの三次元表現を示す。代表的な重鎖および軽鎖の操作されたシステイン残基の構造位置は、番号付けされる（連続番号付けシステムに従う）。

【図1B】図1Bは、4D5v7fabHについての、N末端から開始する連続番号付けスキーム（上列）を、Kabat番号付けスキーム（下列）と比較して示す。Kabat番号付け插入は、a、b、cにより強調される。

【図2】図2Aおよび2Bは、BSA（白抜きの棒）HER2（ストライプの棒）またはストレプトアビジン（中実の棒）との相互作用についての、PHESELLECTORアッセイによる、hu4D5Fabv8およびhu4D5Fabv8システイン変異体（チオFab）ファージ改変体の450 nmでの吸光度の検出による結合測定値を示す：（A）非ビオチン化ファージ-hu4D5Fabv8および（B）ビオチン化ファージ-hu4D5Fabv8。

【図3】図3Aおよび3Bは、BSA（白抜きの棒）HER2（ストライプの棒）およびストレプトアビジン（中実の棒）との相互作用についての、PHESELLECTORアッセイによる、hu4D5Fabv8（左）およびhu4D5Fabv8システイン変異体（チオFab）改変体の450 nmでの吸光度の検出による結合測定値を示す：（A）非ビオチン化ファージ-hu4D5Fabv8および（B）ビオチン化ファージ-hu4D5Fabv8。軽鎖改変体は左側、そして、重鎖改変体は右側にある。チオール反応性=ストレプトアビジン結合についてのOD_{450 nm} ÷ HER2（抗体）結合についてのOD_{450 nm}

【図4】図4Aは、野生型hu4D5Fabv8上の残基の表面アクセシビリティー率の値を示す。軽鎖部位は左側、そして、重鎖部位は右側にある。図4Bは、ビオチン化されたhu4D5Fabv8（左）およびhu4D5Fabv8システイン変異体（チオFab）改変体の450 nmでの吸光度の検出により、HER2（2日目）、ストレプトアビジン（SA）（2日目）、HER2（4日目）およびSA（4日目）との相互作用についての結合測定値を示す。ファージ-hu4D5Fabv8システイン改変体は、4で単離されて、保存された。ビオチン結合体化は、2日目または4日目のいずれかにおいて実施され、その後、実施例2において記載したように、Her2およびストレプトアビジン

10

20

30

40

50

とのそれらの相互作用をモニタリングし、そして操作されたチオF a b 改変体上の反応性チオール基の安定性を調べるために、P H E S E L E C T O R アッセイが実施された。

【図5】図5は、ビオチン-マレイミド結合体化h u 4 D 5 F a b v 8 (A 1 2 1 C) および非ビオチン化野生型h u 4 D 5 F a b v 8 の4 5 0 n mでの吸光度の検出による、ストレプトアビジンおよびH E R 2 に対する結合についての結合測定値を示す。各F a b は、2 n g および2 0 n g でテストされた。

【図6】図6は、ウサギアルブミン、ストレプトアビジン(S A) およびH E R 2 との結合についての、ビオチン化されたA B P - h u 4 D 5 F a b v 8 野生型(w t) ならびにA B P - h u 4 D 5 F a b v 8 システイン変異体V 1 1 0 C およびA 1 2 1 C の、4 5 0 n mでの吸光度の検出によるE L I S A 分析を示す。 10

【図7】図7は、ウサギアルブミン、H E R 2 およびストレプトアビジン(S A) との結合、ならびにF a b - H R P またはS A - H R P によるプロービングについての、ビオチン化されたA B P - h u 4 D 5 F a b v 8 システイン変異体(チオF a b 改変体) の4 5 0 n mでの吸光度の検出によるE L I S A 分析を示す：(左から右に) 一重システイン改変体A B P - V 1 1 0 C 、一重システイン改変体A B P - A 1 2 1 C 、二重システイン改変体A B P - V 1 1 0 C - A 8 8 C および二重システイン改変体A B P - V 1 1 0 C - A 1 2 1 C 。

【図8】図8は、H E R 2 (上) およびストレプトアビジン(下) に対する、ビオチン化されたチオF a b ファージおよび抗ファージH R P 抗体の結合を示す。

【図9】図9は、H E R 2 レセプター抗原と結合しているA B P - チオF a b 融合タンパク質薬物結合体の代表的な表現を示す。A B P = アルブミン結合タンパク質。 20

【図10】図10は、トラスツズマブ(- -) 、トラスツズマブ - S M C C - D M 1 (- -) 、およびh u 4 D 5 F a b v 8 システイン変異体 - (A 1 2 1 C) - B M P E O - D M 1 (- -) によって処置したS K - B R - 3 細胞の、インビトロ細胞増殖アッセイを示す。

【図11】図11は、トラスツズマブ(- -) 、トラスツズマブ - S M C C - D M 1 (- -) 、およびh u 4 D 5 F a b v 8 システイン変異体 - (V 1 1 0 C) - B M P E O - D M 1 (- -) によって処置したS K - B R - 3 細胞の、インビトロ細胞増殖アッセイを示す。

【図12】図12は、0日目に以下を投薬した、M M T V - H E R 2 F o 5 乳腺腫瘍同種移植片を有する胸腺欠損ヌードマウスにおける、時間にわたる平均腫瘍体積変化を示す：ビヒクル(緩衝液) (十字) 、A B P - h u 4 D 5 F a b v 8 システイン変異体 (V 1 1 0 C 軽鎖) - D M 1 (- -) 、およびA B P - h u 4 D 5 F a b v 8 システイン変異体 (A 1 2 1 C 重鎖) - D M 1 (- -) 。 30

【図13】図13 A は、吸光度検出のためのH R P の標識化二次抗体の結合を有する、固定化H E R 2 に結合しているビオチン化抗体の漫画描写を示す。図13 B は、固定化H E R 2 に対する結合における、ビオチン-マレイミド結合体化チオ-トラスツズマブ改変体および非ビオチン化野生型トラスツズマブの、4 5 0 n mでの吸光度の検出による結合測定値を示す。左から右に：V 1 1 0 C (一重システイン) 、A 1 2 1 C (一重システイン) 、V 1 1 0 C / A 1 2 1 C (二重システイン) およびトラスツズマブ。各チオI g G 改変体およびトラスツズマブは、1 n g 、1 0 n g および1 0 0 n g で試験された。 40

【図14】図14 A は、吸光度検出のための抗 - I g G - H R P に対するビオチンの結合を有する、固定化H E R 2 に結合しているビオチン化抗体の漫画描写を示す。図14 B は、固定化ストレプトアビジンに対する結合における、ビオチン-マレイミド結合体化チオトラスツズマブ改変体および非ビオチン化野生型トラスツズマブの4 5 0 n mでの吸光度の検出による結合測定値を示す。左から右に：V 1 1 0 C (一重システイン) 、A 1 2 1 C (一重システイン) 、V 1 1 0 C / A 1 2 1 C (二重システイン) およびトラスツズマブ。各チオI g G 改変体およびトラスツズマブは、1 n g 、1 0 n g および1 0 0 n g で試験された。

【図15】図15は、結合体化のための、細胞培養物から発現されるシステイン操作抗体 50

(チオMab)を調製するための一般的プロセスを示す。

【図16】図16は、以下の2H9チオMabFc改変体(左から右に、レーン1~9)の非還元変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析(上)および還元変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析(下)を示す: A339C、S337C、S324C、A287C、V284C、V282C、V279C、V273Cおよび固定化Protein Aにおける精製後の2H9野生型。右のレーンはサイズマーカーラダーであり、完全なタンパク質が約150kDaであり、重鎖断片が約50kDaであり、そして軽鎖断片が約25kDaであることを示す。

【図17】図17Aは、以下の2H9チオMab改変体(左から右に、レーン1~4)の非還元変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析(左)および還元(+DTT)変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析(右)を示す: L-V15C、S179C、S375C、S400C(固定化Protein A上での精製後)。図17Bは、固定化Protein A上での精製後の、2H9チオMab改変体および3A5チオMab改変体の非還元変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析(左)および還元(+DTT)変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析(右)を示す。

【図18】図18は、ビオチン化チオ-IgG改変体のウエスタンプロット分析を示す。2H9チオMab改変体および3A5チオMab改変体は、還元変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で分析され、このタンパク質は、ニトロセルロース膜へ移された。抗体および結合体化ビオチンの存在は、抗-IgG-HRP(上)およびストレプトアビシン-HRP(下)によって、それぞれプロービングされた。レーン1: 3A5 H-A121C。レーン2: 3A5 L-V110C。レーン3: 2H9 H-A121C。レーン4: 2H9 L-V110C。レーン5: 2H9野生型。

【図19】図19は、抗-IgG-HRPによってプロービングし、そして450nmで吸光度を測定することによる、ビオチン化2H9改変体のストレプトアビシンに対する結合についてのELISA分析を示す(上の棒グラフ)。下の概略図は、ELISA分析において使用される実験的設計を表す。

【図20】図20は、以下によって処理した、SK-BR-3細胞のインビトロ細胞増殖アッセイを示す: ト拉斯ツズマブ(---)、3.4のDM1/Abの薬物負荷を有するト拉斯ツズマブ-SMCC-DM1(---)、および1.6のDM1/Abの薬物負荷を有するチオト拉斯ツズマブ(A121C)-BMPEO-DM1。

【図21】図21Aは、以下によって処理した、HT-1080EpHB2細胞のインビトロ細胞増殖アッセイを示す: 親2H9抗EpHB2R、およびチオ2H9(A121C)BMPEO-DM1(---)。図21Bは、以下によって処理した、BT-474細胞のインビトロ細胞増殖アッセイを示す: 親2H9抗EpHB2R、およびチオ2H9(A121C)BMPEO-DM1(---)。

【図22】図22は、以下によって処理した、PC3/ne0細胞のインビトロ細胞増殖アッセイを示す: 3A5抗MUC16-SMCC-DM1(---)、およびチオ3A5(A121C)BMPEO-DM1(---)。

【図23】図23は、以下によって処理した、PC3/MUC16細胞のインビトロ細胞増殖アッセイを示す: 3A5抗MUC16-SMCC-DM1(---)、およびチオ3A5(A121C)BMPEO-DM1(---)。

【図24】図24は、以下によって処理した、OVCA-R-3細胞のインビトロ細胞増殖アッセイを示す: 3A5抗MUC16-SMCC-DM1(---)、およびチオ3A5(A121C)BMPEO-DM1(---)。

【図25】図25は、MMTV-HER2/Fo5乳腺腫瘍同種移植片を有する胸腺欠損ヌードマウスの、0日目における以下の単回投薬の後の、21日間にわたる平均腫瘍体積変化を示す: ビヒクル(緩衝液)(十字)、10mg/kgの3.4のDM1/Abの薬物負荷を有するト拉斯ツズマブ-SMCC-DM1(---)、21mg/kgの1.6のDM1/Abの薬物負荷を有するチオト拉斯ツズマブ(A121C)-SMCC-DM1(---)、および10mg/kgの1.6のDM1/Abの薬物負荷を有するチオト

10

20

30

40

50

ラスツズマブ (A 1 2 1 C) - S M C C - D M 1 (- - -) 。

【図 1 A】

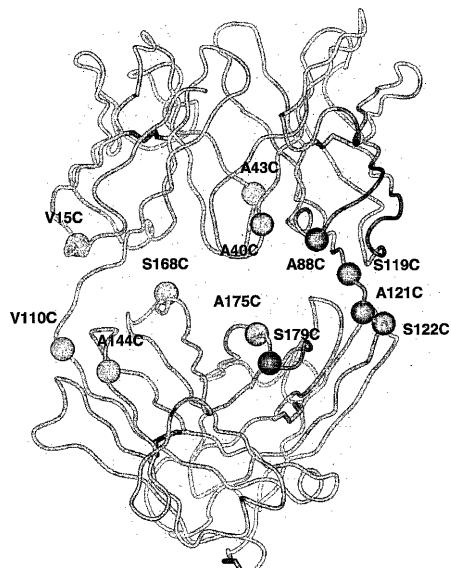


Figure 1A

【図 1 B】

連続番号付け

4d5v7fabH	10	20	30
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW	*****	*****
4d5v7fabH	10	20	30
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW	*****	*****

Kabat 番号付け

4d5v7fabH	40	50	60	70	80	
	VRQAPGKGLEWVAR1YPTINGYTRYADSVKGRFT1SADTSKNTAYLQMN	*****	*****	*****	*****	
4d5v7fabH	40	50	a	60	70	80
	VRQAPGKGLEWVAR1YPTINGYTRYADSVKGRFT1SADTSKNTAYLQMN	*****	*****	*****	*****	

4d5v7fabH	90	100	110	120	130
	RAEDTAVYYCYSRWGGDGFYAMDYNGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS	*****	*****	*****	*****
4d5v7fabH	90	100abc	110	120	
	RAEDTAVYYCYSRWGGDGFYAMDYNGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS	*****	*****	*****	

4d5v7fabH	140	150	160	170	180
	STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYLS	*****	*****	*****	*****
4d5v7fabH	130	140	150	160	170
	STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYLS	*****	*****	*****	

4d5v7fabH	190	200	210	220	
	SVVTVPSSSLGTQTY1CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	*****	*****	*****	
4d5v7fabH	180	190	200	210	
	SVVTVPSSSLGTQTY1CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	*****	*****	*****	

Figure 1B

【図2】

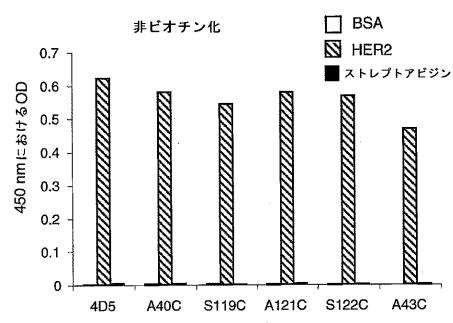


Figure 2A

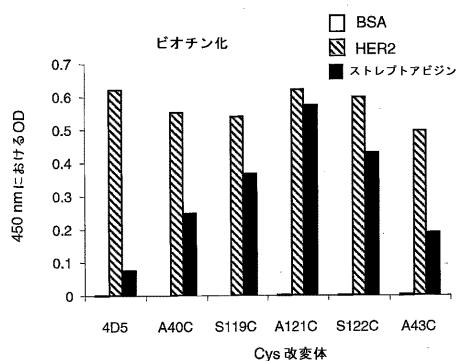


Figure 2B

【図3】

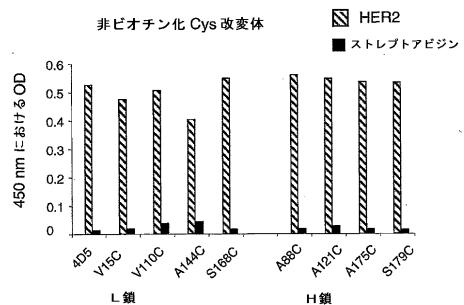


Figure 3A

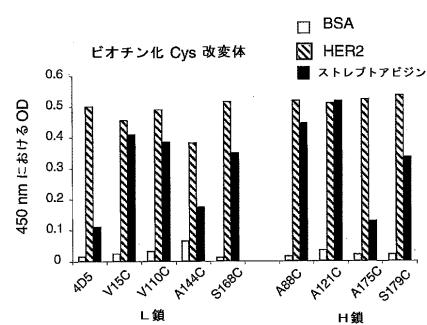


Figure 3B

【図4】

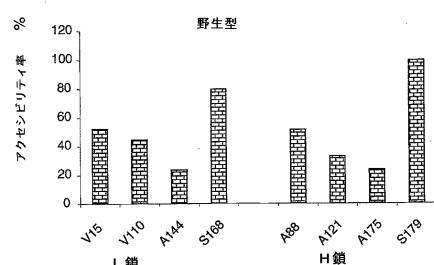


Figure 4A

【図5】

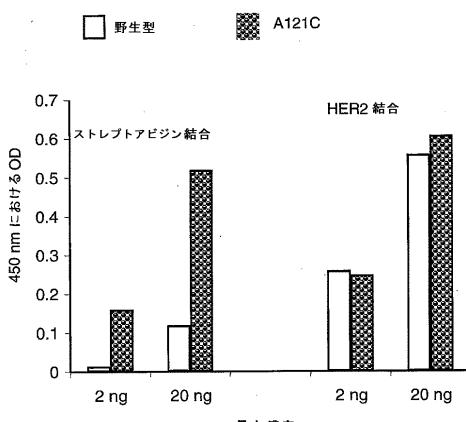


Figure 5

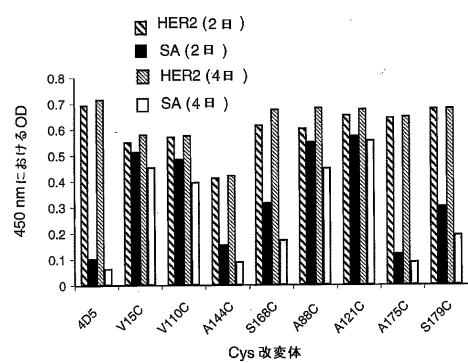


Figure 4B

【図6】

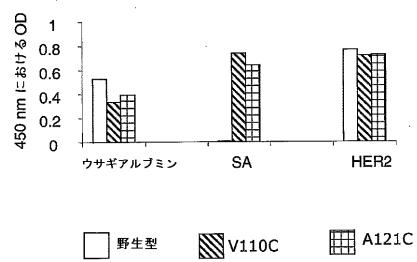


Figure 6

【図7】

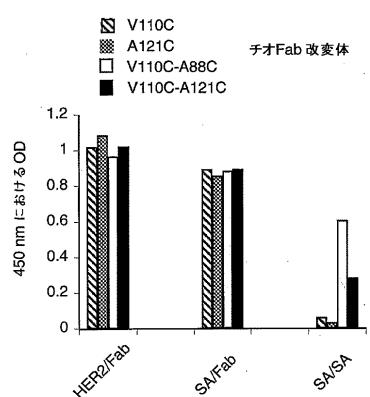


Figure 7

【図8】

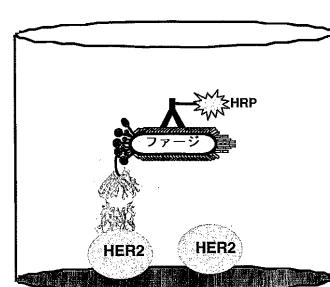


Figure 8

【図10】

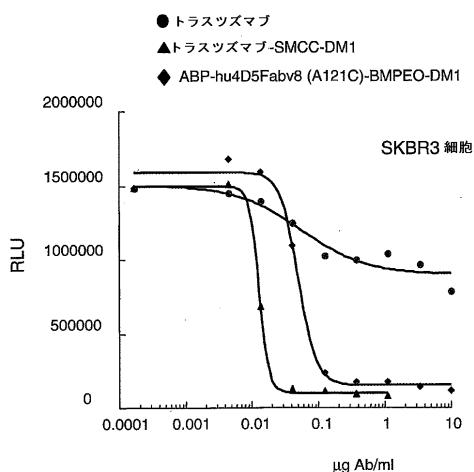
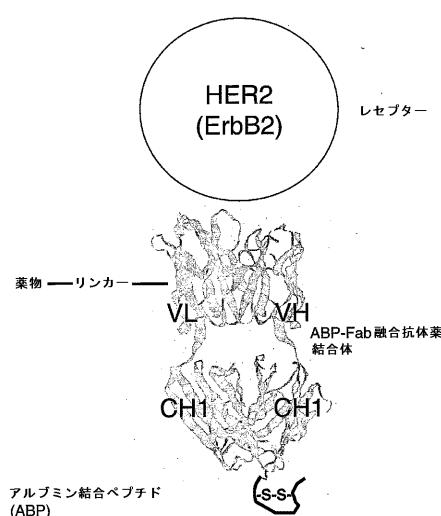


Figure 10

Figure 9



【図 1 1】

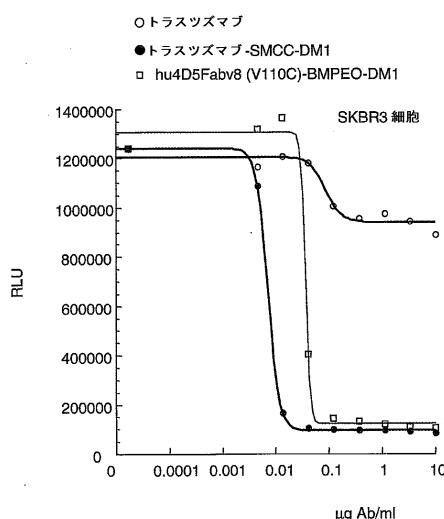


Figure 11

【図 1 2】

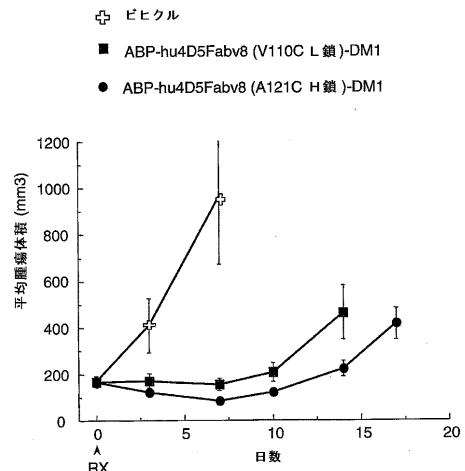


Figure 12

【図 1 3】

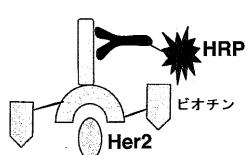


Figure 13A

【図 1 4】

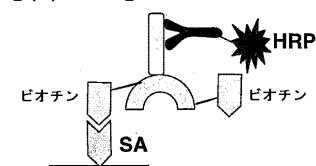


Figure 14A

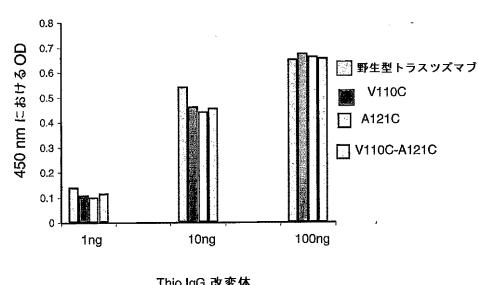


Figure 13B

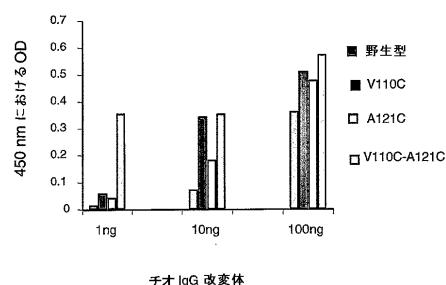


Figure 14B

【図15】

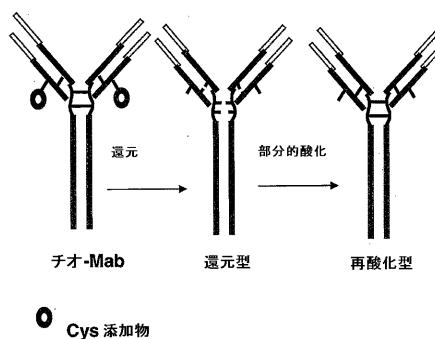


Figure 15

【図16】

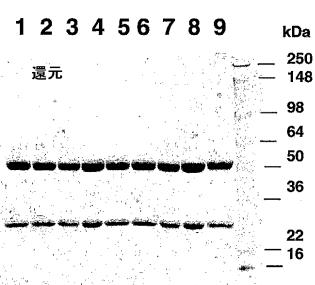
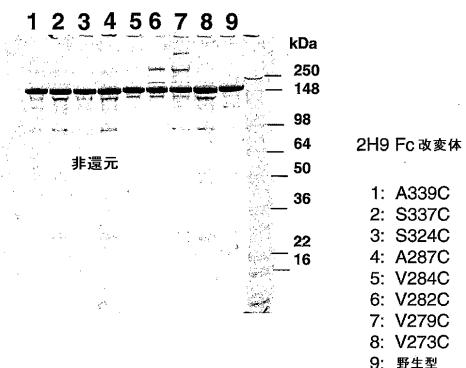


Figure 16

【図17】

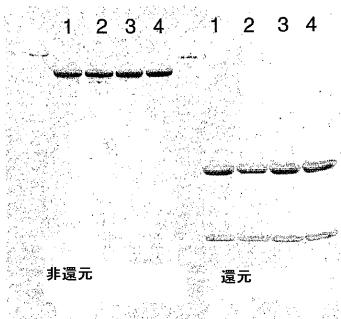


Figure 17A

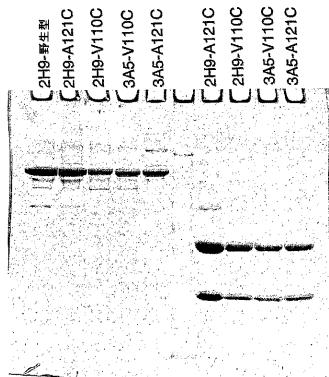


Figure 17B

【図18】

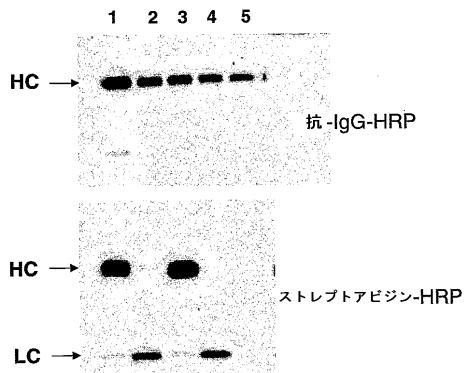


Figure 18

【図19】

2H9-チオFc改変体のビオチン化

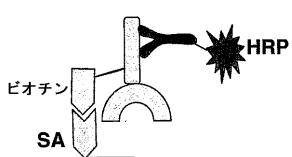
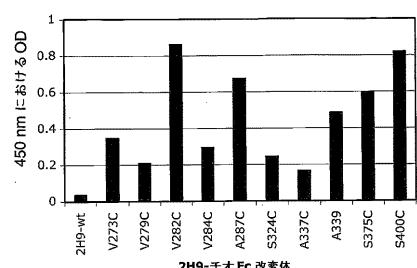


Figure 19

【図20】

SK-BR-3

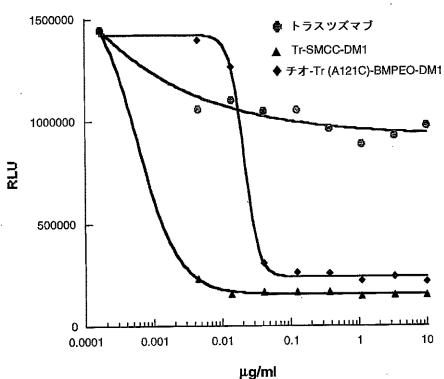


Figure 20

【図21】

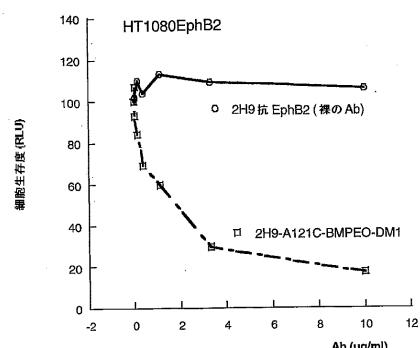


Figure 21A

【図22】

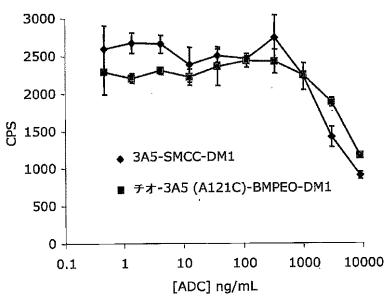
PC3/neo
インビトロ細胞増殖アッセイ

Figure 22

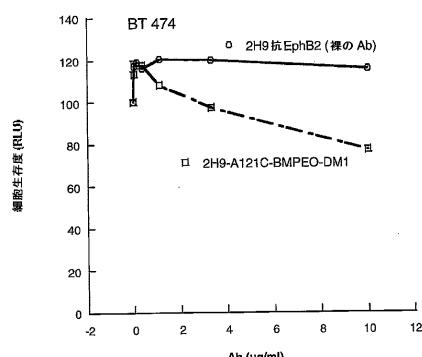


Figure 21B

【図23】

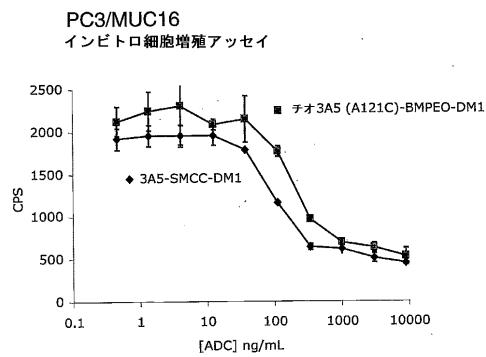


Figure 23

【図24】

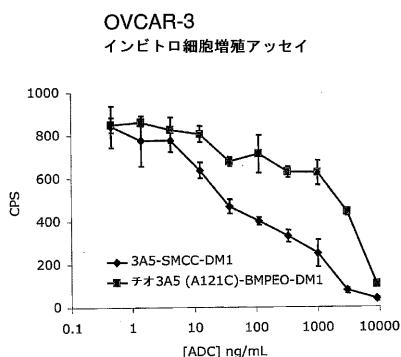


Figure 24

【図25】

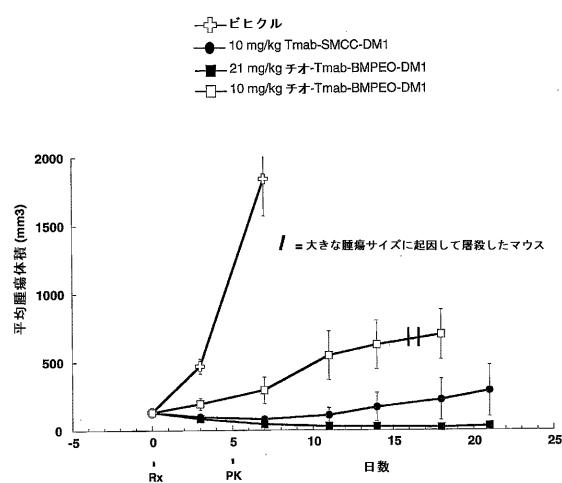


Figure 25

【配列表】

0004948413000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K	47/48	(2006.01) A 6 1 K 47/48
A 6 1 K	38/00	(2006.01) A 6 1 K 37/02
A 6 1 K	31/7036	(2006.01) A 6 1 K 31/7036
A 6 1 K	31/40	(2006.01) A 6 1 K 31/40
A 6 1 K	31/395	(2006.01) A 6 1 K 31/395
A 6 1 K	39/395	(2006.01) A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P	35/00	(2006.01) A 6 1 P 35/00

- (72)発明者 アイゲンプロット, チャールズ ダブリュー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリンゲーム, バーナル アベニュー 1
 129
- (72)発明者 ジュヌトゥラ, ジャガト レディ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94555, フレモント, テューペロ ストリート 34
 391
- (72)発明者 ローマン, ヘンリー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94018, エル グラナダ, サン フアン アベニュー
 400, ピー. オー. ボックス 2556
- (72)発明者 ラーブ, ヘルガ イー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94132, サンフランシスコ, シールズ ストリート
 715
- (72)発明者 バンドレン, リチャード
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, ヒルズバラ, ヘイン ロード 1015

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 J. Biol. Chem., (2000), 275, [39], p.30445-30450

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
 C12N 15/00-15/90
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 PubMed