

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-508779
(P2025-508779A)

(43)公表日 令和7年4月10日(2025.4.10)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/36 (2006.01)	C 0 7 K	16/36	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 5
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071		4 C 0 8 6
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
				(全113頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-549466(P2024-549466)	(71)出願人	319007376	(74)代理人 110002572 弁理士法人平木国際特許事務所	
(86)(22)出願日	令和5年2月24日(2023.2.24)		エボポイント、バイオサイエンシズ、カンパニー、リミテッド		
(85)翻訳文提出日	令和6年8月21日(2024.8.21)		EVOPOINT BIOSCIENCES CO., LTD.		
(86)国際出願番号	PCT/CN2023/078127		中華人民共和国チャンスー、スーチョウ		
(87)国際公開番号	WO2023/160651		、スーチョウ、インダストリアル、パーク、サンティエン、ストリート、218		
(87)国際公開日	令和5年8月31日(2023.8.31)		、ビルディング、22		
(31)優先権主張番号	202210172397.7				
(32)優先日	令和4年2月24日(2022.2.24)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(72)発明者	フー、ヨンハン		
(31)優先権主張番号	202210916833.7		中華人民共和国 215000 チャンスー、スーチョウ、スーチョウ インダストリアル パーク、サンティアン ストリート		
(32)優先日	令和4年8月1日(2022.8.1)			最終頁に続く	
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)				
(31)優先権主張番号	202211183393.5			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 抗体及びその薬物コンジュゲート並びに用途

(57)【要約】

本発明は、抗体及び抗体-薬物コンジュゲートに関し、より具体的には、組織因子を標的とする抗体及び抗体-薬物コンジュゲート（ADC）、並びに上記抗体又はADCを含む組成物及びその治療的応用に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の式 (I) を有する抗体-薬物コンジュゲート (ADC) 又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物であって、



そのうち、

Abは、抗TF抗体を表し、

Lは、リンカーを表し、

Dは、トポイソメラーゼI阻害剤などの細胞傷害性又は細胞阻害薬物を表し、且つ

$q = 1 \sim 20$ 、例えば、 $q = 1 \sim 10$ 、 $1 \sim 8$ 、 $3 \sim 8$ 、 $4 \sim 8$ 、又は $6 \sim 8$ であり、

そのうち、前記Abは、

- 配列番号1の重鎖可変領域 (VH) 配列の3つのCDR及び配列番号2の軽鎖可変領域 (VL) 配列の3つのCDR、

- 配列番号3の重鎖可変領域 (VH) 配列の3つのCDR及び配列番号4の軽鎖可変領域 (VL) 配列の3つのCDR、

- 配列番号5の重鎖可変領域 (VH) 配列の3つのCDR及び配列番号6の軽鎖可変領域 (VL) 配列の3つのCDR、或いは

- 配列番号7の重鎖可変領域 (VH) 配列の3つのCDR及び配列番号8の軽鎖可変領域 (VL) 配列の3つのCDRを含み、

そのうち、前記CDRは、Chothia、AbM、Kabat、IMGT又はそれらの任意の組合せに従って定義される、

抗体-薬物コンジュゲート (ADC) 又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物。

【請求項 2】

前記Abは、3つの重鎖相補性決定領域 (HCDR) 及び3つの軽鎖相補性決定領域 (LCDR) を含み、そのうち、

(i) IMGTに従って定義すると、HCDR1は配列番号18のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号19のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号20のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号30のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号31のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号32のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(ii) IMGTに従って定義すると、HCDR1は配列番号42のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号43のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号44のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号54のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号55のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号56のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iii) IMGTに従って定義すると、HCDR1は配列番号66のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号67のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号68のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号78のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号79のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号80のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iv) IMGTに従って定義すると、HCDR1は配列番号90のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号91のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号92のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号102のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号103のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号104のアミノ酸配列を含むか又はそれからなる、

請求項1に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒

10

20

30

40

50

和物。

【請求項 3】

前記Abは、

-配列番号1又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号2又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、或いは

-配列番号3又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号4又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、或いは

-配列番号5又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号6又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、或いは

-配列番号7又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号8又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、

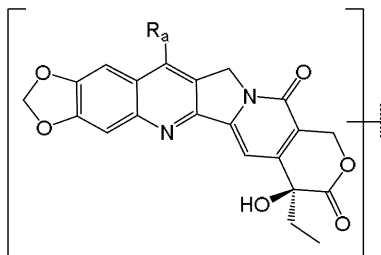
好ましくは、前記AbはIgG1抗体である、

請求項1～2の何れか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物。

【請求項 4】

Dはカンプトテシン類薬物、好ましくは、FL118又はその誘導体を表し、例えば、以下の構造を含むカンプトテシン類薬物であり、

【化 1】



そのうち、 R_a は、

水素、

C_3 - C_8 シクロアルキル基、

フェニル基、

ハロゲン、ヒドロキシ基、任意選択的に NH_2 、 NH (C_1 - C_4 アルキル) 及び N (C_1 - C_4 アルキル) $_2$ で置換された C_1 - C_4 アルコキシ基、 C_3 - C_8 シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、フェニル基、 NR^1R^2 からなる群から選ばれる置換基で任意選択的に置換された C_1 - C_8 アルキル基、

から選られ、

そのうち、 R^1 及び R^2 は、互いに独立的に、

水素、

ヒドロキシ基、アミノ基、1個又は2個の C_1 - C_4 アルキル基で置換されたアミノ基、1個又は2個の C_1 - C_4 ヒドロキシアルキル基で置換されたアミノ基、(C_1 - C_4 ヒドロキシアルキル) 及び(C_1 - C_4 アルキル) で置換されたアミノ基からなる群から選ばれる置換基で任意選択的に置換された C_1 - C_8 アルキル基、

1個又は2個の C_3-C_{10} シクロアルキル基、 C_3-C_{10} ヘテロシクロアルキル基、フェニル基又はヘテロアリール基で置換された C_1-C_4 アルキル基、

C_3-C_{10} シクロアルキル基、

C_3-C_{10} ヘテロシクロアルキル基、

C_2-C_6 ヘテロアルキル基、

ヘテロアリール基、

ハロゲンで任意選択的に置換されたフェニル基、

ヒドロキシ基又はアミノ基で任意選択的に置換された C_1-C_8 アルキル- $C(=O)-$ 、から選ばれ、

或いは、 R^1 及び R^2 はそれぞれに結合する窒素原子と組合せて0個～3個の置換基を有する5-員、6-員又は7-員ヘテロ環を形成し、前記置換基はハロゲン、 C_1-C_4 アルキル基、 OH 、 C_1-C_4 アルコキシ基、 NH_2 、 $NH(C_1-C_4アルキル)$ 及び $N(C_1-C_4アルキル)_2$ から選ばれ、

そのうち、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、フェニル基、ヘテロアリール基は、出現するたびにそれぞれ独立的に、 OH 、 C_1-C_4 アルキル基、 C_1-C_4 アルコキシ基、 NH_2 、 $NH(C_1-C_4アルキル)$ 及び $N(C_1-C_4アルキル)_2$ からなる群から選ばれる0個～3個の置換基で任意選択的に置換され、

好ましくは、 R_a は、 $-C_1-C_4アルキル-OH$ 、 $-C_1-C_4アルキル-O-C_1-C_4アルキル-NH_2$ 、又は $-C_1-C_4アルキル-NH_2$ であり、

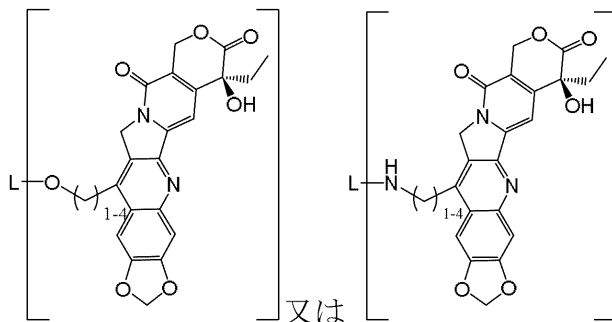
そのうち、好ましくは、前記薬物Dユニットは、それに存在するヒドロキシ基又はアミノ基を介して、リンカーLユニットに結合する、

請求項1～3の何れか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物。

【請求項5】

式(1)のL-Dユニットは以下の構造：

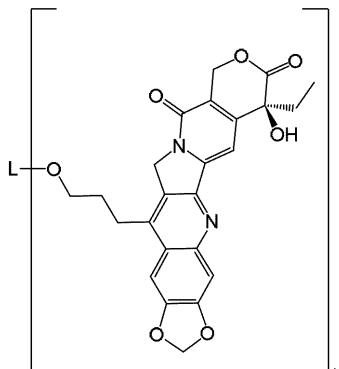
【化2】



を含み、

好ましくは、式(1)のL-Dユニットは以下の構造を含む、

【化3】



請求項1～3の何れか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物。

【請求項6】

Lはペプチド含有のリンカーであり、且つ以下の式(II)の構造を含み、

-Z-Y-M-, (II)

そのうち、

Zは、Abに結合するリンカー基であり、

Yは、2個～5個のアミノ酸のペプチド、好ましくはジペプチド、トリペプチド又はテトラペプチドであり、

Mは存在しないか、又は薬物Dに結合するためのスペーサー基である、

請求項1～5の何れか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物。

10

【請求項7】

YはN末端からC末端へ、以下の式のアミノ酸配列を有するペプチドであり、

Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅、

そのうち、Xaa₁は存在しないか、又はバリン、グリシン、アラニン及びグルタミン酸から選ばれるアミノ酸であり、

Xaa₂はフェニルアラニン、ロイシン、及びバリンから選ばれるアミノ酸であり、好ましくはバリンであり、

Xaa₃は非置換又は置換されたリジンであり、

20

Xaa₄はロイシン、グリシン及びアラニンから選ばれるアミノ酸であり、

Xaa₅は存在しないか、又はグリシン及びアラニンから選ばれるアミノ酸であり、

そのうち、前記アミノ酸配列のN末端はZに結合し、且つC末端はMに結合する(Mが存在する場合)か、又は直接薬物Dに結合し、

好ましくは、Xaa₃は、ε-アミノ基がC₁-C₃アルキル基で一置換又は二置換されたりジンであり、

より好ましくは、Yは、Phe-Lys-Gly、Leu-Lys-Gly、Gly-Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Ala、Val-Lys-Leuからなる群から選ばれるペプチドであり、そのうち、Lys残基は非置換であるか、若しくはC₁-C₃アルキル基で一置換又は二置換されたりジンである、

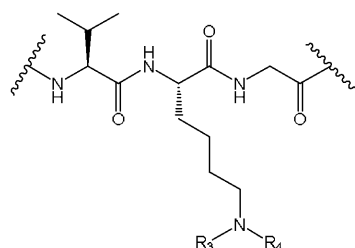
30

請求項6に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物。

【請求項8】

Yは、

【化4】



40

であり、

そのうち、R₃及びR₄は、それぞれ独立的にメチル基、エチル基及びプロピル基から選ばれ、

好ましくは、R₃及びR₄は同じであり、より好ましくは、R₃及びR₄はそれぞれ独立的にプロピル基であり、

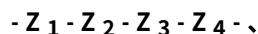
そのうち、左側の波線はZに結合する位置を表し、右側の波線はMに結合する位置を表す、

50

請求項6～7の何れか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物。

【請求項9】

Zは以下の構造を有し、



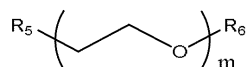
そのうち、Z₁はAbにおける硫黄原子であり、

Z₂は、5員～10員ヘテロシクリル基であり、好ましくはN、S及びOから選ばれる1個又は2個のヘテロ原子を含み、

Z₃は結合、-C(=O)-、-C₁-C₁₀アルキリデン-C(=O)-、-C₃-C₁₀アルキニレン-C(=O)-、-C₃-C₁₀アルケニレン-C(=O)-、-C₁-C₁₀ヘテロアルキレン-C(=O)-、-C₃-C₈シクロアルキレン-C(=O)-、-O-C₁-C₈アルキリデン-C(=O)-、-アリーレン-C(=O)-、-C₁-C₁₀アルキリデン-アリーレン-C(=O)-、-アリーレン-C₁-C₁₀アルキリデン-C(=O)-、-C₁-C₁₀アルキリデン-C₃-C₈シクロアルキレン-C(=O)-、-C₃-C₈シクロアルキレン-C₁-C₁₀アルキリデン-C(=O)-、-C₃-C₈ヘテロシクリレン-C(=O)-、-C₁-C₁₀アルキリデン-C₃-C₈ヘテロシクリレン-C(=O)-、-C₃-C₈ヘテロシクリレン-C₁-C₁₀アルキリデン-C(=O)-から選ばれ、

Z₄は結合、又は以下の式で表されるPEGユニットであり、

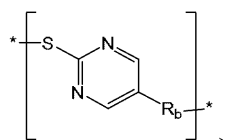
【化5】



そのうち、R₅はC₁-4アルキリデン基、-NH-、-NH-C₁-4アルキリデン-ヘテロアリール-から選ばれ、そのうち、ヘテロアリール基は5員又は6員の窒素含有ヘテロアリール基、好ましくはトリアゾリル基であり、R₆は-C(=O)-、C₁-4アルキリデン基、C₁-4アルキリデン-C(=O)-、-NH-C(=O)-(CH₂OCH₂)-C(=O)-、C₁-4アルキリデン-NH-C(=O)-(CH₂OCH₂)-C(=O)-、そのうち、mは2～12の整数、例えば、m=2、4、6又は8であり、

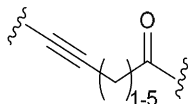
好ましくは、Zは以下の構造を有し、

【化6】



そのうち、R_bはアルキニレン-C(=O)-又はアルケニレン-C(=O)-であり、好ましくは、R_bは、

【化7】



であり、

そのうち、左側の波線は抗体(Ab)に結合する位置を表し、右側の波線はYに結合する位置を表し、

より好ましくは、Zは以下の構造を有する、

10

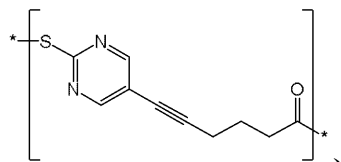
20

30

40

50

【化 8】



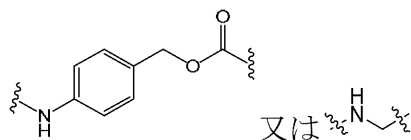
請求項6～8に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物。

【請求項 1 0】

10

Mは存在しないか、又はアミノ-C₁-C₃アルキリデン基、例えば、-NH-CH₂-、又はアミノ-フェニル-C₁-C₃アルキリデン-O-C(=O)-であり、好ましくは、Mは、

【化 9】



であり、

そのうち、左側の波線はYへの結合を表し、右側の波線は薬物Dユニットへの結合を表す、

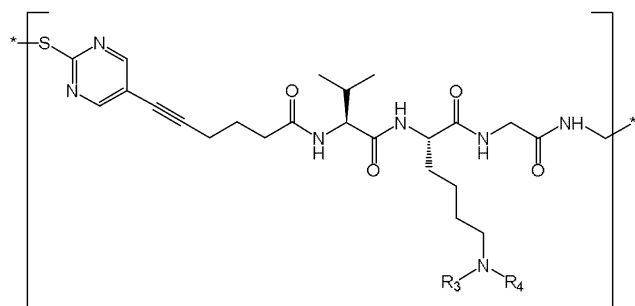
20

請求項6～9に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物。

【請求項 1 1】

Lは以下の構造を含むリンカーであり、

【化 1 0】



30

そのうち、R₃及びR₄は、それぞれ独立的にメチル基、エチル基、プロピル基から選ばれる、

請求項6～10に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物。

40

【請求項 1 2】

R₃及びR₄は何れもメチル基であり、又はR₃及びR₄は何れもエチル基であり、若しくはR₃及びR₄は何れもプロピル基である、

請求項11に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物。

【請求項 1 3】

前記式IのL-Dユニットは、Abの軽鎖及び/又は重鎖のシステインのメルカプト基とチオエーテルを形成することにより、抗体に結合する、

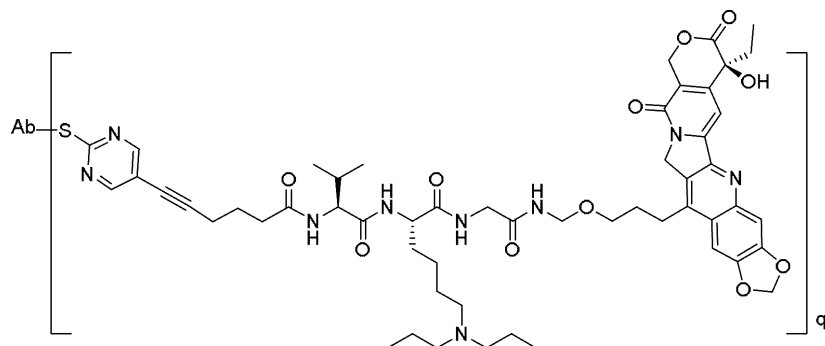
請求項1に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物。

50

【請求項 1 4】

前記ADCは、

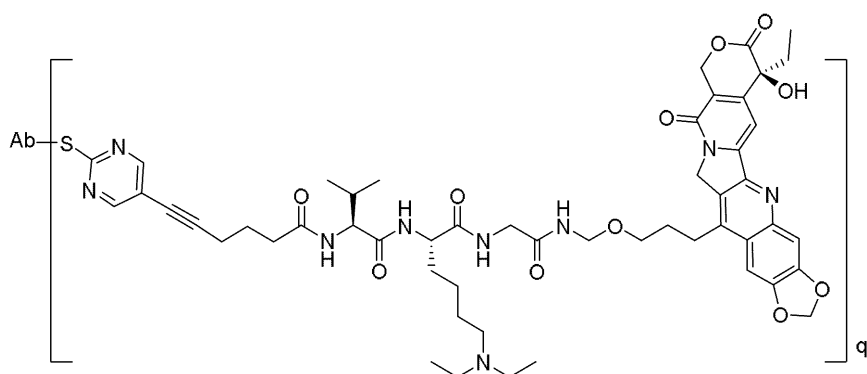
【化 1 1】



10

又は

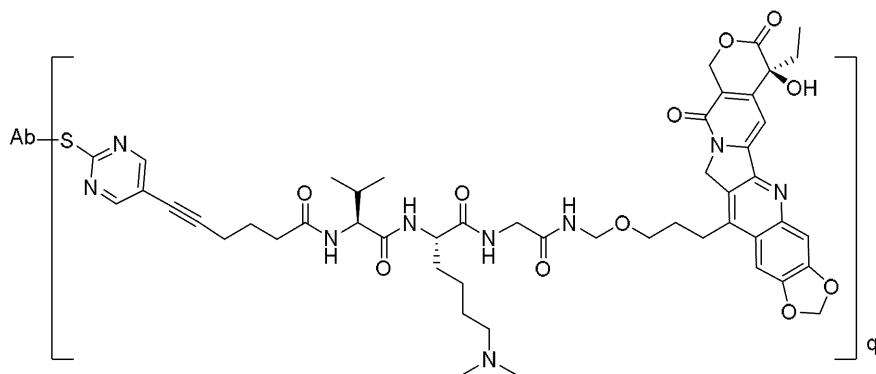
【化 1 2】



20

又は

【化 1 3】



30

から選ばれ、

40

そのうち、qは、1～8の平均DAR値であり、好ましくは、qは、約2、約3、約4、約5、約6、約7又は約8であり、

好ましくは、前記Abは、IgG1全長抗体であり、且つ配列番号7の重鎖可変領域（VH）配列の3つのCDR及び配列番号8の軽鎖可変領域（VL）配列の3つのCDRを含み、或いは、より好ましくは、配列番号7の重鎖可変領域及び配列番号8の軽鎖可変領域を含む、請求項1に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物。

【請求項 1 5】

請求項1～14の何れか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物、及び任意選択的な薬用補助材料を含む、

50

医薬組成物。

【請求項 16】

組織因子 (TF) に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、

(i) 配列番号1に示される重鎖可変領域のHCDR1、2及び3配列、並びに配列番号2に示される軽鎖可変領域のLCDR1、2及び3配列、或いは

(ii) 配列番号3に示される重鎖可変領域のHCDR1、2及び3配列、並びに配列番号4に示される軽鎖可変領域のLCDR1、2及び3配列、或いは

(iii) 配列番号5に示される重鎖可変領域のHCDR1、2及び3配列、並びに配列番号6に示される軽鎖可変領域のLCDR1、2及び3配列、或いは

(iv) 配列番号7に示される重鎖可変領域のHCDR1、2及び3配列、並びに配列番号8に示される軽鎖可変領域のLCDR1、2及び3配列、
を含み、

好ましくは、そのうち、前記CDRは、Chothia、Abm、Kabat若しくはIMGT又はそれらの組合せに従って定義される、
抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 17】

前記抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、

(i) 重鎖可変領域は、配列番号1に示されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び軽鎖可変領域は、配列番号2に示されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、或いは

(ii) 重鎖可変領域は、配列番号3に示されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び軽鎖可変領域は、配列番号4に示されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、或いは

(iii) 重鎖可変領域は、配列番号5に示されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び軽鎖可変領域は、配列番号6に示されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、或いは

(iv) 重鎖可変領域は、配列番号7に示されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び軽鎖可変領域は、配列番号8に示されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

好ましくは、

そのうち、前記抗体又はその抗原結合断片は、

(i) 配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、或いは

(ii) 配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、或いは

(iii) 配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号6に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、或いは

(iv) 配列番号7に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
から選ばれる重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、

請求項16に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

前記抗体は、Fc領域、好ましくはヒトFc領域を含み、或いは

前記抗体は、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4抗体であり、且つ好ましくはヒトIgG1重鎖定常領域を有し、或いは

前記抗原結合断片は、Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、一本鎖抗体、scFv、scFab、ジスルフィド結合scFv、ジスルフィド結合scFab、(Fab')₂断片又は線形抗体からなる群から選ばれる抗体断片である、

請求項16～17の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項19】

前記抗体はマウス抗体、又はキメラ抗体、若しくはヒト化抗体、好ましくはヒト化抗体である、

請求項16～18の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項20】

請求項16～19の何れか一項に記載の抗TF抗体又はその抗原結合断片をコードする、単離された核酸。

【請求項21】

請求項20に記載の核酸を含み、好ましくは発現ベクターである、ベクター。

【請求項22】

請求項20に記載の核酸又は請求項21に記載のベクターを含み、好ましくは、哺乳動物細胞である、

宿主細胞。

【請求項23】

請求項16～19の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片を含む免疫複合体又は免疫融合物若しくは多重特異性抗体。

【請求項24】

前記請求項16～19の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片、或いは請求項23に記載の免疫複合体又は免疫融合物若しくは多重特異性抗体、及び任意選択的な薬用補助材料を含む、医薬組成物。

【請求項25】

請求項16～19の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片、或いは請求項23に記載の免疫複合体又は免疫融合物若しくは多重特異性抗体の用途であって、インビボ又はインビトロで、

(1) TF陽性腫瘍細胞に標的結合すること、

(2) TF陽性腫瘍細胞におけるTF/VIIa媒介下流シグナル経路を遮断すること、又は

(3) TF陽性腫瘍細胞を阻害及び/又は殺傷することに使用されるか、

或いは、前記何れか一項で使用される薬物の調製に使用される、用途。

【請求項26】

対象におけるTF陽性腫瘍を予防又は治療する方法であって、

有効量の前記請求項1～14の何れか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物、或いは請求項16～19の何れか一項に記載の抗TF抗体又はその抗原結合断片、或いは請求項23に記載の免疫複合体又は免疫融合物若しくは多重特異性抗体、或いは請求項15又は24に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含み、好ましくは、前記腫瘍は、子宮頸癌、膵臓癌、肺癌、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、乳癌、結腸直腸癌、食道癌、頭頸部癌、胃癌であり、原発性又は進行性又は転移性癌を含む、

方法。

【請求項27】

試料におけるTFを検出する方法であって、

10

20

30

40

50

(a) 試料を、前記請求項16～19の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片と接触させることと、

(b) 前記抗体又はその抗原結合断片とTFとの間の複合体の形成を検出することと、を含み、任意選択的に、抗体は検出可能に標識される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体及び抗体-薬物コンジュゲートに関し、より具体的には、組織因子 (Tissue Factor、TF) を標的とする抗体及び抗体-薬物コンジュゲート (ADC)、並びに上記抗体又はADCを含む組成物及びその治療的応用に関する。

【背景技術】

【0002】

組織因子 (Tissue Factor、TF) は、トロンボプラスチン (thromboplastin)、CD142又は凝血因子3とも呼ばれる。膜貫通糖タンパク質として、TFは、細胞外ドメイン、膜貫通領域、及び細胞内ドメインからなる。

【0003】

TFは、機能的な形態で細胞表面に発現される外因性凝血事象の開始に必要な分子である。血漿中の凝血因子VII (セリンプロテアーゼであるFVII) に対する高親和性受容体として、TFは、VIIの活性化形態VIIaと複合体を形成した後、触媒事象を誘発し、特定の限られたタンパク質の切断、因子IX又はXの活性化を通じてトロンビンカスケードを開始する。正常な生理的条件下では、TFは、血管壁の外膜細胞、血管を取り囲む線維芽細胞などに位置するが、血管の中膜又は内膜は稀である。血管壁の完全性が破壊される場合のみ、TFは、循環血液に曝露され、凝固カスケード反応を活性化することにより止血効果を発揮する。当該プロセスにおいて、TFは、その細胞膜との緊密な結合に依存して「アンカー」の作用を発揮し、生理学的凝血は、血液凝固の開始部位から遠位に拡散することなく、損傷部位に制限する。

【0004】

正常組織及び細胞における限られた発現とは対照的に、TFは、子宮頸癌、膵臓癌、肺癌、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、乳癌、結腸直腸癌などを含む様々な悪性腫瘍において過剰発現されることが実証されている。従って、TFは、抗体薬物及びADC (抗体-薬物コンジュゲート) 薬物開発の標的として機能することができる。Seagen Inc. (SGEN) / Genmab A/S (GMAB) 社によって開発されたTFを標的とするADC薬物Tivdak (Tisotumab Vedotin) は、既に2021年9月に子宮頸癌の適応症への適用が承認され、且つ、卵巣癌などの他の適応症への適用も、既に臨床第II相に入っている。

【0005】

しかし、現在開発されている多くの抗TF抗体又は抗体クラスの前薬物は、癌治療において一定の効力を示したが、凝血に対する干渉又は阻害、及びそれによって引き起こされる関連する副反応も同時に検出されている (Chenard-Poirier M, Hong DS, Coleman R, de Bono J, Mau-Sorensen M, Collins D, et al. A phase I/II safety study of tisotumab vedotin (HuMax-TFADC) in patients with solid tumors. Ann Oncol 2017; 28:v403-v27, Zhang X, Li Q, Zhao H, Ma L, Meng T, Qian J, et al. Pathological expression of tissue factor confers promising antitumor response to a novel therapeutic antibody SC1 in triple negative breast cancer and pancreatic adenocarcinoma. Oncotarget 2017; 8:59086-102.)。

【0006】

従って、本分野において、新しいTF抗体及びそれを含む新しいADC薬物を開発するニーズが依然として存在しており、上記TF抗体は、腫瘍細胞表面TFを特異的に標的とする能力を有するべきであるが、同時に、癌患者により広い、より優れた薬物選択肢を提供す

10

20

30

40

50

るために、正常組織におけるTF媒介性凝血反応に対して最小限の影響を有する。

【発明の概要】

【0007】

上記のような本分野のニーズを満たすために、本発明者らは鋭意研究により、新たなTF抗体及びそれからなる抗体-薬物コンジュゲート(ADC)を提供する。実施例に示すように、本発明の抗TF抗体は、TF陽性腫瘍細胞に対して高い結合親和性及び高い特異性を示し、腫瘍細胞によって迅速、効率的にエンドサイトーシスすることができるだけでなく、且つTF媒介性凝血に対する影響が小さい。更に、実施例に示すように、本発明のTF抗体からなるADCは、良好な物理的特性を有し、明らかな凝集現象がないだけでなく、且つ動物モデルにおいて顕著な腫瘍成長抑制活性及び良好な動物薬物耐性を示している。

10

【0008】

従って、第1の態様において、本発明は、以下の式(I)を有する抗体-薬物コンジュゲート(ADC)又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物を提供し、



そのうち、

Abは、抗TF抗体を表し、

Lは、リンカーを表し、

Dは、トポイソメラーゼI阻害剤などの細胞傷害性又は細胞阻害薬物を表し、且つ

q=1~20、例えば、q=1~10、1~8、3~8、4~8、又は6~8であり、

そのうち、上記Abは、

20

-配列番号1の重鎖可変領域(VH)配列の3つのCDR及び配列番号2の軽鎖可変領域(VL)配列の3つのCDR、

-配列番号3の重鎖可変領域(VH)配列の3つのCDR及び配列番号4の軽鎖可変領域(VL)配列の3つのCDR、

-配列番号5の重鎖可変領域(VH)配列の3つのCDR及び配列番号6の軽鎖可変領域(VL)配列の3つのCDR、或いは

-配列番号7の重鎖可変領域(VH)配列の3つのCDR及び配列番号8の軽鎖可変領域(VL)配列の3つのCDRを含み、

そのうち、好ましくは、上記CDRは、Chothia、AbM、Kabat、IMGT又はそれらの任意の組合せに従って定義され、

30

より好ましくは、上記Abは、配列番号7の重鎖可変領域(VH)配列の3つのCDR及び配列番号8の軽鎖可変領域(VL)配列の3つのCDRを含む。

【0009】

第2の態様において、本発明は、本発明のADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物を含む組成物を提供する。

【0010】

第3の態様において、本発明は、TF陽性腫瘍の治療又は予防における本発明のADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物及びその組成物の用途、並びに上記治療又は予防に用いられる薬物の調製における用途を提供する。

【0011】

40

第4の態様において、本発明は、抗TF抗体、及びその医薬組成物並びに用途を提供する。

【0012】

以下の図面及び具体的な実施形態において、本発明を更に説明する。しかし、これらの図面及び具体的な実施形態は、本発明の範囲を限定するものと見なされるべきではなく、且つ、当業者が容易に想到される変更は、本発明の精神及び添付の特許請求の範囲の保護範囲内に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1A】抗原タンパク質に基づくELISA測定により、ヒトTF又はサルTFに対する本発

50

明の例示的な抗体の結合親和性を検出することを示す。BMは参照抗体である。

【図1B】図1Aの続きである。

【図1C】図1Bの続きである。

【図1D】図1Cの続きである。

【図2A】フローサイトメトリーにより、異なるTF陽性腫瘍細胞（NCI-H358及びKYS E520）に対する本発明の例示的な抗体の細胞結合親和性を検出することを示す。BMは参照抗体である。

【図2B】図2Aの続きである。

【図2C】図2Bの続きである。

【図2D】図2Cの続きである。

【図3A】IL-8放出阻害実験により、TF/FVIIa複合体媒介性下流シグナル経路に対する本発明のヒト化抗体の阻断活性を検出することを示す。

【図3B】図3Aの続きである。

【図3C】図3Bの続きである。

【図4A】参照抗体BMと比較した、凝血に対する本発明のヒト化抗体の影響を示す。図4Aは、2 mMの Ca^{2+} 、50 $\mu\text{g/mL}$ の抗体濃度である。図4Bは、5 mMの Ca^{2+} 、20 $\mu\text{g/mL}$ の抗体濃度である。

【図4B】図4Aの続きである。

【図5A】ヒト血清において、37°Cで一定の時間インキュベートした後、本発明のヒト化抗体の血清安定性の検出結果を示す。

【図5B】図5Aの続きである。

【図6A】抗TFヒト化抗体を毒素-Linker（B81、即ち、DL-01分子）にカップリングする前後、ELISAによって測定された抗体親和性の変化を示す。

【図6B】図6Aの続きである。

【図7A】本発明のADCのインビトロ殺傷活性の検出結果を示す。

【図7B】図7Aの続きである。

【図8】本発明のADC、22F11H5-hz1及び30G11B7を薬物-リンカー（B81）とカップリングした後、マウスインビボでの腫瘍抑制効果を示す。

【図9】本発明の抗体22F11H5-hz1及び30G11B7を含むADCコンジュゲートの投与後、マウス体重に対する影響を示す。

【図10】本発明のADC、2B12B10-hz1及び27H8H3-hz1をB81とカップリングした後、マウスインビボでの腫瘍抑制効果を示す。

【図11】本発明の抗体2B12B10-hz1及び27H8H3-hz1を含むADCコンジュゲートの投与後、マウス体重に対する影響を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

定義

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術的及び科学的用語は、何れも当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本発明の目的のために、以下の用語が下記に定義される。

【0015】

本明細書において商品名が使用される場合、文脈に別段の指示がない限り、当該商品名は、商品名、製品の製品配合、後発医薬品、及び活性薬物成分を含む。

【0016】

「約」という用語は、数字数値と合わせて使用される場合、指定された数字数値より5%小さい下限、及び指定された数字数値より5%大きい上限を有する範囲内の数字数値を包含することを意味する。

【0017】

2つ又は2つ以上のオプションを接続するために使用される「及び/又は」という用語は、オプションのうちの何れか1つ又はオプションのうちの何れか2つ又は複数の組合せを

10

20

30

40

50

意味するものと理解される。

【0018】

本明細書で使用される「包含」又は「含む」という用語は、記載された要素、整数、又はステップを含むことを意味するが、任意の他の要素、整数、又はステップを除外することを意味するものではない。本明細書において、「包含」又は「含む」という用語が使用される場合、別段の指示がない限り、記載された要素、整数、又はステップからなる状況も包含される。例えば、特定の具体的な配列を「包含」する抗体可変領域に言及する場合、当該特定の具体的な配列からなる抗体可変領域も包含することも意図される。

【0019】

本明細書において、「組織因子」又は「TF」という用語は、互換的に使用され、且つ、特に明記しない限り、配列変異体、特に天然に存在する変異体、対立遺伝子変異体、並びに翻訳後修飾変異体及び立体構造変異体を含むヒト組織因子の任意の変異体を含み、また、それらの種ホモログを包含する。また、当該用語は、細胞によって天然に若しくは組換え的に発現されるTF或いは天然若しくは組換え細胞上で発現されるTFを包含するだけでなく、TF細胞外ドメインを含む組換え的に発現される融合タンパク質も包含することが理解されるべきである。組織因子の一例は、UniProtKB-P13726下のアミノ酸配列を含むヒトTFタンパク質、又は上記タンパク質の細胞外ドメインを含む組換えタンパク質である。組織因子の別の例は、UniProtKB-A0A2K5VXA0下のアミノ酸配列を含むサルTFタンパク質、又は上記タンパク質の細胞外ドメインを含む組換えタンパク質である。本明細書において、特に指示がない限り、「組織因子」又は「TF」という用語は、ヒト由来の組織因子を指す。

【0020】

本明細書において、「TF陽性」細胞という用語は、癌細胞、修飾された癌細胞又は修飾された非腫瘍細胞などの、TF細胞表面発現について陽性である細胞を指す。細胞表面抗原の発現レベルを決定するための当該分野における公知の任意の従来する方法、例えばFACS検出法又は免疫蛍光染色法によって、細胞表面のTF発現レベルを決定することができる。TFは、多種類の腫瘍細胞において、正常な組織/細胞、例えばMDA-MB-231（乳癌、>約350,000個のTF分子/細胞）、BxPC-3（膵臓癌、>約350,000個のTF分子/細胞）よりも顕著に高い発現レベルを有する。好ましくは、本明細書において、TF陽性細胞は、TF陽性腫瘍細胞である。

【0021】

本明細書において、「抗体」という用語は、抗原を特異的に認識し、結合する軽鎖又は重鎖免疫グロブリン可変領域を少なくとも含むポリペプチドを指す。当該用語は、所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体又は多重鎖抗体、単一特異性又は多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、キメラ抗体又はヒト化抗体、全長抗体、及び抗体断片を含むが、これらに限定されない各種の抗体構造を包含する。

【0022】

本明細書において、「全抗体」（本明細書において、「完全長抗体」、「完全抗体」、及び「インタクト抗体」と互換的に使用してもよい）とは、少なくとも2本の重鎖（H）と2本の軽鎖（L）を含む免疫グロブリン分子を指す。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではVHと略される）及び重鎖定常領域からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではVLと略される）及び軽鎖定常領域からなる。可変領域は、抗体のその抗原への結合に関与する抗体の重鎖又は軽鎖のドメインである。定常領域は、抗原への抗体の結合に直接関与しないが、複数種のエフェクター機能を示す。抗体の軽鎖は、その定常領域のアミノ酸配列に基づいて、2つのタイプ（kappa（κ）及びlambda（λ）と呼ばれる）に分類することができる。抗体の重鎖は、その定常領域のアミノ酸配列に基づいて、主に5つの異なるタイプ、即ち、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMに分類することができ、且つ、これらのタイプのいくつかは、更にサブクラス、例えば、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4、IgA1及びIgA2に分類することができる。

【0023】

本明細書において、抗体の「抗体断片」及び「抗原結合断片」という用語は、互換的に使用してもよく、インタクト抗体が結合する抗原に結合するためのインタクト抗体の部分を含む、インタクト抗体ではない分子を指す。当業者に理解されるように、抗原結合の目的を実現するために、抗体断片は、一般的に、「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基を含む。抗体断片は、組換えDNA技術、又は酵素若しくは化学的に全抗体を切断することによって調製することができる。抗体断片の例は、Fab、scFab、ジスルフィド結合scFab、Fab'、F(ab')₂、Fab'-SH、Fv、scFv、ジスルフィド結合scFv、線形抗体、ダイアボディ（diabody）、トリアボディ（triabody）、テトラボディ（tetraabody）、ミニボディ（minibody）を含むが、これらに限定されない。本発明によるいくつかの実施形態において、抗体断片は、軽鎖と重鎖との間又は重鎖と重鎖との間に鎖間ジスルフィド結合を形成するためのシステイン残基部分、例えば、IgG1抗体のFab領域及び/又はヒンジ領域のシステイン残基を含み、それによりスルフヒドリルカップリング化学に使用できるアミノ酸残基部位を提供する。本発明による更なるいくつかの実施形態において、抗体断片は、スルフヒドリルカップリング化学に使用できるアミノ酸残基部位を提供するために、Fc領域に導入されたシステイン残基を含む。

10

【0024】

本明細書において、「免疫グロブリン」という用語は、天然に存在する抗体の構造を有するタンパク質を指す。例えば、IgGクラスの免疫グロブリンは、ジスルフィド結合した2つの軽鎖及び2つの重鎖からなる約150,000ダルトンのヘテロ四量体タンパク質である。N末端からC末端まで、各免疫グロブリン重鎖は、重鎖可変ドメインとも呼ばれる重鎖可変領域（VH）を1つ、その後に3つの重鎖定常ドメイン（CH1、CH2及びCH3）を有する。N末端からC末端まで、各免疫グロブリン軽鎖は、軽鎖可変ドメインとも呼ばれる軽鎖可変領域（VL）を1つ、その後に1つの軽鎖定常ドメイン（CL）を有する。そのため、本明細書において、1つの抗体がIgG抗体であるという言及は、当該抗体がIgGクラスの免疫グロブリン構造を有するヘテロ四量体タンパク質であることを意味する。IgG抗体において、通常、重鎖のVH-CH1は、軽鎖のVL-CLと対合して、抗原に特異的に結合するFab断片を形成する。従って、1つのIgG抗体は基本的に、免疫グロブリンヒンジ領域の助けを借りて結合された2つのFab分子と、2つの二量体したFc領域から構成されている。IgG免疫グロブリンは、重鎖定常領域の配列に基づいて、γ1（IgG1）、γ2（IgG2）、γ3（IgG3）、及びγ4（IgG4）などのサブクラスに分類することができる。IgG免疫グロブリンの軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、κ及びλと呼ばれる2つのタイプに分類することもできる。いくつかの実施形態において、本発明による抗体は、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4抗体などのIgG抗体である。別のいくつかの実施形態において、本発明による抗体は、IgG1κ又はIgG1λ抗体などのIgGκ又はIgGλ抗体である。

20

30

【0025】

本明細書において、「相補性決定領域」又は「CDR領域」又は「CDR」又は「超可変領域」という用語は、互換的に使用してもよく、配列上で高度に可変であり、且つ構造的に明確なループ（「超可変ループ」）を形成し、及び/又は抗原接触残基（「抗原接触点」）を含有する、抗体可変ドメインのうちの領域を指す。CDRは、抗原エピトープへの結合を主に担う。本明細書において、抗体の重鎖及び軽鎖のCDRは、N-末端から順に番号付けされており、CDR1、CDR2及びCDR3と一般に呼ばれる。抗体重鎖可変ドメイン内に位置するCDRは、HCDR1、HCDR2及びHCDR3とも呼ばれ、抗体軽鎖可変ドメイン内に位置するCDRは、LCDR1、LCDR2及びLCDR3と呼ばれる。所与の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域のアミノ酸配列において、そのCDR配列は、本技術分野で公知の多種類の方法を用いて決定することができる。例えば、<http://www.abysis.org/abysis/>に、Kabat、AbM、Chothia、Contact、IMGT定義に基づくCDR配列を含む、所与の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域におけるCDRの注釈は、得ることができる。また、CDRは、参照CDR配列と同じKabatナンバリング位置を有することに基づいて決定すること

40

50

もできる。特に明記しない限り、本発明において、抗体可変領域内の残基位置に言及する（重鎖可変領域残基及び軽鎖可変領域残基を含む）場合、Kabatナンバリングシステムによる（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）ナンバリング位置を指す。

【0026】

本明細書において、「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の抗原への結合に関与する、抗体の重鎖又は軽鎖のドメインである。重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）は、比較的保存的な領域（即ち、フレームワーク領域（FR））をその間に挿入される、高可変領域（HVR、相補性決定領域（CDR）とも呼ばれる）に更に分類することができる。各VH及びVLは、3つのCDR及び4つのFRからなり、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順に配置されている。いくつかの態様において、抗体の2つの可変領域の1つ又は両方（即ち、VH及び/又はVL）のうちの1個又は複数の残基を修飾してもよく、例えば、1個又は複数のCDR領域及び/又は1個又は複数のフレームワーク領域に対して残基改変、特に保存的残基置換を行い、それにより改変前の当該親抗体の少なくとも1つの生物学的特性（例えば、抗原結合能）を依然として基本的に維持する抗体の変異体を得る。更なるいくつかの態様において、抗体可変領域は、CDR移植によって修飾することができる。CDR配列は抗体-抗原相互作用の大部分を担っているため、既知の抗体の特性を模倣した組換え抗体の変異体を構築することができる。このような抗体の変異体において、既知の抗体由来のCDR配列が、異なる特性を有する異なる抗体のフレームワーク領域上に移植される。突然変異及び/修飾後の抗体又はそれを含むADCコンジュゲートの特性、例えば、標的抗原結合特性又は他の望ましい機能特性、例えば、エンドサイトーシス活性、凝血の影響、薬物動態学、及びインビボ腫瘍殺傷活性を、インビトロ又はインビボ測定試験において評価することができる。

【0027】

本明細書において、「キメラ抗体」という用語は、可変領域配列が1つの種に由来し、定常領域配列が別の種に由来する抗体、例えば、そのうちの可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体を指す。

【0028】

「ヒト化抗体」という用語は、マウス種族などの非ヒト哺乳動物種に由来するCDR配列をヒトフレームワーク配列にグラフトする抗体を指す。付加的なフレームワーク領域修飾は、ヒトフレームワーク配列内で行うことができ、及び/又は付加的なアミノ酸修飾は、例えば、抗体の親和性成熟のために、CDR配列内で行うことができる。本明細書において、いくつかの実施形態において、本発明のヒト化抗体は、特定のヒト生殖細胞系配列に「由来する」フレームワーク領域配列を有する。ここで、「由来する」とは、上記抗体フレームワーク領域のアミノ酸配列が、上記ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によってコードされる対応するフレームワーク領域アミノ酸配列と、少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、その上より好ましくは少なくとも96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有し、且つ上記抗体が抗原結合活性を保持することを意味する。

【0029】

本明細書において、「単離された」抗体という用語は、その天然環境における成分から分離された抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は90%、95%若しくは99%より大きい純度まで精製され、上記純度は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えば、イオン交換又は逆相HPLC）によって決定することができる。

【0030】

本明細書において、「エピトープ」という用語は、抗体が結合する抗原領域を指す。エピトープは、連続したアミノ酸から形成されてもよく、又はタンパク質の三次フォールディングによって並置された非連続アミノ酸から形成されてもよい。本発明において、好ま

しくは、本発明による抗体は、ヒトTFの天然エピトープに結合し、より好ましくは、細胞表面に発現するヒトTF細胞外ドメインの天然エピトープに結合する。

【0031】

本明細書において、「親和性」(affinity)又は「結合親和性」という用語は、結合対におけるメンバー間の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。親和性は、本技術分野で既知の一般的な方法によって測定することができる。親和性を測定するための1つの具体的な方法は、本明細書の実施例に記載されている抗原タンパク質又は細胞に基づくELISA測定法であり、もう1つの具体的な方法は、本明細書の実施例に記載されているフローサイトメトリー測定法である。バイオレイヤー干渉(BLI)に基づく技術を用いて、抗体の動的親和性を評価することもできる。

10

【0032】

「結合」又は「特異的結合」という用語は、関連する抗原(本明細書ではTF抗原)への抗体の結合に関する文脈において、 K_D 値が約 10^{-6} M又はそれ以下、例えば K_D 値が約 10^{-7} M又はそれ以下、又は約 10^{-8} M又はそれ以下の親和性を有する結合を指すために使用される。非特異的抗原(例えば、BSAなどの非関連抗原)への結合 K_D 値と比較して、その関連抗原への抗体の結合 K_D 値は、好ましくは少なくとも100倍、又は例えば少なくとも1000倍低い。 K_D 値の測定は、バイオレイヤー干渉(BLI)に基づく技術など、当該分野で公知である。例えばForteBio Octet(登録商標)機器において、抗体をリガンドとして使用し、抗原(例えば、TF-HisなどのTF細胞外ドメインを含む融合タンパク質)を分析物として使用し、上記測定を行うことができる。

20

【0033】

「 K_D 」(M)という用語は、本明細書では特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指す。親和性(affinity)は K_D 値と逆相関し、即ち、親和性が高いほど K_D 値は小さくなり、逆に、親和性が低いほど K_D 値は高くなる。一般に、 K_D 値は、相互作用する抗体-抗原対の間の解離速度定数(K_d 又は K_{dis} , sec^{-1})及び結合速度定数(K_a , $\text{M}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$)に依存する。

【0034】

当業者に理解されるように、ヒトTFに特異的に結合する抗体は、他の種由来のTFタンパク質と交差反応性を有することができる。本明細書において、「交差反応」という用語は、異なる種由来のTFに結合する抗体の能力を指す。例えば、いくつかの実施形態において、ヒトTFに特異的な本発明による抗体は、他の種由来のTF(例えば、カニクイザルTF)にも結合することができる。交差反応性を測定する方法は、実施例に記載される方法及び、例えばフローサイトメトリー技術又は細胞ELISA技術を使用することによる、本分野で公知の標準的な測定法を含む。抗体の種間交差反応性は、いくつかの場合において有利である。例えば、標的抗体が、臨床前実験動物、例えば、霊長類動物に対して種間交差反応性を有する場合、ヒトの治療又は診断適用前の、標的抗体の臨床前の安全性及び有効性の評価が促進される。

30

【0035】

本明細書において、「アイソタイプ」という用語は、抗体の重鎖定常領域によって決定される抗体のタイプを指す。例えば、本発明による抗体は、IgA(例えば、IgA1又はIgA2)、IgG1、IgG2(例えば、IgG2a又はIgG2b)、IgG3、IgG4、IgE、IgM及びIgD抗体であってもよく、且つ上記免疫グロブリンタイプの重鎖定常領域を有する。本発明の抗体は、ヒトIgG1定常領域を有するIgG1抗体であってもよい。また、本発明は、天然配列定常領域の抗体の使用だけでなく、変異体配列定常領域を含む抗体も考慮する。

40

【0036】

本明細書において、「天然配列Fc領域」という用語は、天然に存在する各種の免疫グロブリンFc領域配列を包含し、例えば、各種のIgサブタイプ及びそのアイソフォームのFc領域配列(Gestur Vidarssonなど、IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions、20 October 2014、doi:10.3389/fimmu.2014.00520.)である。いくつかの実施形態において、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226

50

又はPro230から重鎖カルボキシ末端まで伸長するアミノ酸配列を有する。しかし、Fc領域のC末端リジン（Lys447）は存在してもよく、又は存在しなくてもよい。更なるいくつかの実施形態において、ヒトIgG重鎖Fc領域は、N末端に、例えば、EUナンバリングによるE216からT225までの配列又はD221からT225までの配列などの、天然免疫グロブリンのヒンジ配列又は部分ヒンジ配列を有する。

【0037】

本明細書において、「変異体配列Fc領域」という用語は、天然配列Fc領域ポリペプチドに対して、修飾されたFc領域ポリペプチドを包含することを指す。上記修飾は、アミノ酸残基の付加、欠失、又は置換であってもよい。置換は、天然に存在するアミノ酸及び非天然に存在するアミノ酸を含むことができる。修飾の目的は、Fc領域のその受容体に対する結合及びそれによって誘発されるエフェクター機能を変更することを意図している。

10

【0038】

「エフェクター機能」という用語は、抗体のクラスによって変更する、抗体のFc領域に起因できる生物活性を指す。IgG Fc領域は、サイトカイン誘導、ADCC、食作用、補体依存性細胞傷害（CDC）、並びに抗体及び抗原-抗体複合体の半減期/クリアランス速度などのいくつかの重要なエフェクター機能を媒介することが知られている。いくつかの場合において、治療目的に応じて、これらのエフェクター機能は、治療用抗体にとって理想的であるが、他の場合には必要ではない場合がある。従って、一実施形態において、本発明は、ADCC又はCDCなどのエフェクター機能を引き起こすFc領域を有する抗体を提供し、それにより、TF抗原を持つ腫瘍細胞において、腫瘍細胞のアポトーシス、細胞溶解を誘導し、及び/又は抗原TFを持つ腫瘍細胞の増殖、拡散及び/又は転移を阻害する。更なる実施形態において、本発明は、変更されたエフェクター機能を有するFc領域を有する抗体を提供する。抗体のFc領域における配列変更によって、エフェクター機能を変更させることができる。或いは、Fc領域がグリコシル化の変更された型を有する抗体、例えば、低減された量のフコシル残基を有する低又は非フコシル化抗体又は増加したアリコートGlcNac構造を有する抗体を調製することができる。このような変更されたグリコシル化モードは、既に抗体のADCC能力を増加できることが示されている。Fc領域に結合したオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体変異体も考えられ、そのような抗体変異体はCDC機能が增強されることができ。Fc領域グリコシル化モードの変更は、1つ又は複数のグリコシル化部位を産生又は除去するためにFc領域のアミノ酸配列を変更することによって好都合に達成することができる。

20

30

【0039】

本明細書において、「受容体媒介エンドサイトーシス」という用語は、リガンドが細胞表面の相応する受容体に結合することによって誘発される、リガンド/受容体複合体が内在化して且つ細胞質ゾルに送達されるか、又は適切な細胞内区画に移されるプロセスを指す。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、細胞表面に発現されるTFに結合した後、TF受容体媒介性エンドサイトーシスを誘発する。本明細書において、例えば、実施例に記載される方法によってエンドサイトーシス率を測定し、抗体が有する受容体媒介性エンドサイトーシス活性を特徴付けることができる。いくつかの実施形態において、受容体媒介性エンドサイトーシス活性を有する本発明の抗体は、本発明のADCにおいて、癌細胞内への抗腫瘍薬の輸送手段として使用することができる。

40

【0040】

本明細書において、「配列同一性」とは、比較ウィンドウにおいて、ヌクレオチドごと又はアミノ酸ごとに基づく、配列が同一である程度を指す。「配列同一性パーセント」は、2つの最適にアラインメントされた配列を比較ウィンドウで比較し、2つの配列中に同じ核酸塩基（例えば、A、T、C、G、I）又は同じアミノ酸残基（例えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys、及びMet）が存在する位置の数を決定して、一致する位置の数を得、一致する位置の数を比較ウィンドウ中の全位置の数（即ち、ウィンドウのサイズ）で除算し

50

、且つ結果に100を乗算して、配列同一性パーセントを生成するという方法によって計算することができる。配列同一性パーセントを決定するための最適なアラインメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign (DNASTAR) ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用する、本分野で既知の多種類の方法で実現することができる。当業者は、比較される全長配列の範囲内又は標的配列の領域内で最大のアラインメントを実現するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメント配列のための適切なパラメータを決定することができる。

【0041】

本発明において、抗体配列について言えば、アミノ酸配列同一性パーセントは、候補抗体配列を所与の抗体配列と最適にアラインメントした後、好ましい実施形態において、Kabababの番号付け規則に従って最適にアラインメントした後、決定される。本明細書において、比較ウィンドウ（即ち、比較待ちの標的抗体領域）を指定しない場合、所与の抗体配列の全長にわたってアライメントするのに適用される。

【0042】

本明細書において、特に明記しない限り、参照抗体 (BM) とは、特許CN103119065Bに開示されたTisotumab抗体部分からの重鎖及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号107及び108）を用いて構築された抗TF抗体を指す。参照抗体との比較に関する文脈において、上記参照抗体は、可変領域の外側の比較待ちの抗体の部分と同じ抗体構造を有し、例えば、両方が何れも重鎖及び軽鎖定常領域構造を有する場合、同じ重鎖及び軽鎖定常領域配列を有する。

【0043】

本明細書において、「ハロゲン」という用語は、通常、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素を指し、例えば、フッ素、塩素であってもよい。

【0044】

本明細書で使用される「アルキル基」という用語は、炭素原子及び水素原子からなる直鎖又は分岐鎖の飽和炭化水素基を指す。具体的には、アルキル基は、1個～10個の炭素原子、例えば、1個～8個、1個～6個、1個～5個、1個～4個、1個～3個、又は1個～2個の炭素原子を有する。例えば、本明細書において使用される場合、「C₁-C₆アルキル基」という用語は、1個～6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖の飽和炭化水素基を指し、その実例は例えば、メチル基、エチル基、プロピル基（n-プロピル基及びイソプロピル基を含む）、ブチル基（n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基又はt-ブチル基を含む）、ペンチル基（n-ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基を含む）、ヘキシル基（n-ヘキシル基、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、3,3-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、1,1-ジメチルブチル、1,2-ジメチルブチル、1,3-ジメチルブチル、2,3-ジメチルブチル、2-エチルブチルを含む）などが挙げられる。

【0045】

本明細書で使用される「アルケニル基」という用語は、少なくとも1つの二重結合を含む、炭素原子及び水素原子からなる直鎖又は分岐鎖の不飽和炭化水素基を指す。具体的には、アルケニル基は、2個～8個、例えば、2個～6個、2個～5個、2個～4個、又は2個～3個の炭素原子を有する。例えば、本明細書で使用されるように、「C₂-C₆アルケニル基」という用語は、2個～6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルケニル基、例えば、ビニル基、プロペニル基、アリル基、1-ブテニル、2-ブテニル、1,3-ブタジエニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、1,3-ペンタジエン、1,4-ペンタジエン、1-ヘキセニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、1,4-ヘキサジエニルなどを指す。

【0046】

本明細書で使用される「アルキニル基」という用語は、少なくとも1つの三重結合を含む、炭素原子及び水素原子からなる直鎖又は分岐鎖の不飽和炭化水素基を指す。具体的には、アルキニル基は、2個～8個、例えば、2個～6個、2個～5個、2個～4個、又は2個～3個の炭素原子を有する。例えば、本明細書で使用される「C₂-C₆アルキニル基」という用語は、2個～6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキニル基、例えば、エチニ

ル基、プロピニル基、プロパルギル基、1-ブチニル、2-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、3-ペンチニル、4-メチル-1-ペンチニル、1-ヘキシニル、2-ヘキシニル、3-ヘキシニル、5-メチル-2-ヘキシニルなどを指す。

【0047】

本明細書で使用される「アルキリデン基」という用語、直鎖又は分岐鎖の飽和アルカンの相同又は相異の2個の炭素原子から2個の水素原子を除去して得られる2価の基を指す。具体的には、アルキリデン基は、1個～10個の炭素原子、例えば、1個～6個、1個～5個、1個～4個、1個～3個、又は1個～2個の炭素原子を有する。例えば、本明細書で使用される「C₁-C₆アルキリデン基」という用語は、1個～6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキリデン基を指し、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基などを含むが、これらに限定されない。

10

【0048】

本明細書で使用される「アルケニレン基」という用語は、少なくとも1つの二重結合を含む直鎖又は分岐鎖の不飽和オレフィン基の相同又は相異の2個の炭素原子から2個の水素原子を除去して得られる2価の基を指す。具体的に、アルケニレン基は、2個～8個、例えば、2個～6個、2個～5個、2個～4個又は2個～3個の炭素原子を有する。例えば、本明細書で使用される「C₂-C₆アルケニレン基」という用語は、2個～6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルケニレン基、例えば、ビニリデン基、プロペニレン基、アリレン基、ブテニレン基、ペンテニル基、及びヘキセニレンなどを指す。

20

【0049】

本明細書で使用される「アルキニレン基」という用語は、少なくとも1つの三重結合を含む直鎖又は分岐鎖の不飽和アルキンの相同又は2つの相異の炭素原子から2つの水素原子を除去して得られる2価の基を指す。具体的には、アルキニレン基が、2個～8個、例えば、2個～6個、2個～5個、2個～4個、又は2個～3個の炭素原子を有する。例えば、本明細書で使用される場合、「C₂-C₆アルキニレン基」という用語は、2個～6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキニレン基、例えば、エチニレン基、プロピニレン基、プロパルギレン基、ブチニレン基、ペンチニレン基、及びヘキシニレン基を指す。

【0050】

本明細書で使用される「シクロアルキル基」という用語は、飽和又は不飽和であってもよく、例えば、1つ又は複数の二重結合を含む、特定の環原子数を有する単環式、縮合多環式、架橋多環式又はスピロ環式非芳香族一価炭化水素環構造を指す。シクロアルキル基は、3個又は複数の、例えば、3個～18個、3個～10個、又は3個～8個の炭素原子を環中に含んでもよく、例えば、C₃₋₁₀シクロアルキル基、C₃₋₈シクロアルキル基、C₃₋₆シクロアルキル基、C₅₋₆シクロアルキル基である。シクロアルキル基の実例は、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基を含むが、これらに限定されない。

30

【0051】

本明細書で使用される「複素環」又は「ヘテロシクリル基」という用語は、N、O又はSから独立的に選ばれる1個～4個のヘテロ原子環メンバーを有する、5員～20員（例えば、5員～14員、5員～8員、5員～6員）の芳香族又は非芳香族の単環式、二環式又は多環式環系を指す。複素環中の1個又は複数のN、C又はS原子は、酸化されてもよい。好ましくは、複素環は、単環式又は縮合二環式である5員～10員環系である。代表実例は、ピロリジン、アゼチジン、ピペリジン、モルホリン、テトラヒドロフラン、テトラヒドロピラン、ベンゾフラン、ベンゾチオフェン、インドール、ベンゾピラゾール、ピロール、チオフェン（チオフェン）、フラン、チアゾール、イミダゾール、ピラゾール、ピリミジン、ピリジン、ピラジン、ピリダジン、イソチアゾール、及びイソオキサゾールを含むが、これらに限定されない。当該用語は、本明細書で定義されるヘテロアリール基を含むことが理解されるべきである。

40

【0052】

「アリール基」という用語は、環部分に6個～20個、例えば6個～12個の炭素原子を

50

有する単環式又は多環式芳香族炭化水素基を指す。好ましくは、アリール基は(C₆-C₁₀)アリール基である。非限定的な例は、フェニル基、ビフェニル基、ナフチル基、又はテトラヒドロナフチル基が含まれ、これらのそれぞれは、1個～4個の置換基で任意選択的に置換されてもよく、上記置換基は例えば、アルキル基、トリフルオロメチル基、シクロアルキル基、ハロゲン、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アシル基、アルキル-C(O)-O-、アリール-O-、ヘテロアリール-O-、アミノ基、チオール基、アルキル-S-、アリール-S-、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、アルキル-O-C(O)-、カルバモイル基、アルキル-S(O)-、スルホニル基、スルホニルセミ基、ヘテロシクリル基などである。
【0053】

「ヘテロアリール基」という用語は、N、O又はSから選ばれる1個～4個のヘテロ原子を含有する5員～20員（例えば、5員～14員、5員～8員、5員～6員）の芳香族単環式又は多環式環系を指し、これは、置換されても置換されなくてもよい。好ましくは、ヘテロアリール基は、単環式又は縮合二環式である5員～10員環系である。代表的なヘテロアリール基は、2-又は3-チエニル基、2-又は3-フリル基、2-又は3-ピロリル基、2-、4-又は5-イミダゾリル基、3-、4-又は5-ピラゾリル基、2-、4-又は5-チアゾリル基、3-、4-又は5-イソチアゾリル基、2-、4-又は5-オキサゾリル基、3-、4-又は5-イソオキサゾリル基、3-又は5-1,2,4-トリアゾリル基、4-又は5-1,2,3-トリアゾリル基、テトラゾリル基、2-、3-又は4-ピリジル基、3-又は4-ピリダジニル基、3-、4-又は5-ピラジニル基、2-ピラジニル基、2-、4-又は5-ピリミジニル基を含む。

10

【0054】

「ヘテロアルキル基」という用語は、完全飽和であるか、又は1個～3個の不飽和度を有し、示された数の炭素原子、及びO、N、Si及びSから選ばれる1個～10個、好ましくは1個～3個のヘテロ原子からなり、そのうちの窒素及び硫黄原子は任意選択的に酸化されてもよく、且つ窒素ヘテロ原子は任意選択的に四級アンモニウム化されてもよい、安定な直鎖又は分岐鎖炭化水素を指す。ヘテロ原子O、N、Si及びSは、ヘテロアルキル基の任意の内部位置、又はヘテロアルキル基が分子の残りの部分に結合している位置に位置してもよい。ヘテロアルキル基の代表的な実例は、-CH₂-CH₂-O-CH₃、-CH₂-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃、-CH₂-S-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)-CH₃、-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃、-CH=CH-O-CH₃、-Si(CH₃)₃、-CH₂-CH=N-O-CH₃及び-CH=CH-N(CH₃)-CH₃を含む。多くとも2個のヘテロ原子は、例えば、-CH₂-NH-OCH₃及び-CH₂-O-Si(CH₃)₃のように、連続していてもよい。通常、C₁-C₄ヘテロアルキル基又はヘテロアルキレン基は、1個～4個の炭素原子及び1個又は2個のヘテロ原子を有し、C₁-C₃ヘテロアルキル基又はヘテロアルキレン基は、1個～3個の炭素原子及び1個又は2個のヘテロ原子を有する。いくつかの態様において、ヘテロアルキル基及びヘテロアルキレン基は飽和である。

20

【0055】

本明細書において各基を定義する際に使用される「置換された」という用語は、別段の指示がない限り、相応する基が、例えば、限定されないが、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、ヘテロシクリル基、ハロゲン、シアノ基、ニトロ基、アジド基、カルボキシ基、ヒドロキシ基、メルカプト基、アミノ基、モノ又はジアルキルアミノ基、モノ又はジシクロアルキルアミノ基、モノ又はジアリールアミノ基、モノ又はジヘテロシクリルアミノ基、モノ又はジヘテロアリールアミノ基、アルキル基-又はシクロアルキル基-又はヘテロシクリル基-又はヘテロアリール基-又はアリール基-オキシ基、アルキル基-又はシクロアルキル基-又はヘテロシクリル基-又はヘテロアリール基-又はアリール基-スルフェニル基、アルキル基-又はシクロアルキル基-又はヘテロシクリル基-又はヘテロアリール基-又はアリール基-アシル基、アルキル基-又はシクロアルキル基-又はヘテロシクリル基-又はヘテロアリール基-又はアリール基-アシルアミノ基、アルキル基-又はシクロアルキル基-又はヘテロシクリル基-又はヘテロアリール基-又はアリール基-アシルオキシ基、アルキル基-又はシクロアルキル基-又はヘテロシクリル基-又はヘテロアリール基-又はヘテロアリール基-又はアリール基-スルホニル基、アルキル基-又

30

40

50

はシクロアルキル基-又はヘテロシクリル基-又はヘテロアリール基-又はアリール基-スルホニルオキシ基、アルキル基-又はシクロアルキル基-又はヘテロシクリル基-又はヘテロアリール基-又はアリール基-スルホニルセミ基、又は上記任意選択的に置換されたカルバモイル基、及びそれらのそれぞれの基は、残りの任意の置換基によって更に置換されてもよい基を指し、そのうち、各基は、本明細書において定義されたとおりである。置換基の例は、これらに限定されないが、ハロゲン、OH、SH、CN、NH₂、NHCH₃、N(CH₃)₂、NO₂、N₃、C(O)CH₃、COOH、C(O)-アミノ基、OCOCH₃、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、t-ブチル基、シクロプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、ペントキシ基、オキソ基、トリフルオロメチル基、ジフルオロメチル基、スルホニルアミノ基、メチルスルホニルアミノ基、SO、SO₂、フェニル基、ピペリジニル基、ピペラジニル基及びピリミジニル基から独立的に選ばれる1つ又は複数の基を含む。

10

【0056】

本明細書で使用される「置換」又は「置換される」という用語は、指定された原子上の1個又は複数（例えば、1個、2個、3個又は4個）の水素が指定された基で置き換えられることを指し、この場合、指定された原子の通常の原子価結合を超えず、且つ安定な化合物を形成し、置換基及び変数の組合せは、そのような組合せが安定な化合物を形成する場合にのみ許容されることを条件とする。

【0057】

本明細書において、「リンカー」という用語は、薬物-抗体コンジュゲートにおいて、薬物と抗体を結合する二官能性部分を指す。本発明のリンカーは、複数の組成（例えば、いくつかの実施形態において、抗体とのカップリングのためのリンカー基、分解性ペプチドユニット、及び任意選択的なスペーサー基）を有してもよい。

20

【0058】

本明細書において、「PEGユニット」という用語は、多分散性、単分散性、又は離散性であってもよい（即ち、離散数のビニル-オキシサブユニットを有する）、重複するビニルオキシサブユニット（PEG又はPEGサブユニット）を含む有機部分を指す。多分散PEGは、サイズ及び分子量が不均一な混合物である一方で、単分散PEGは、通常、不均一な混合物から精製され、従って単一の鎖長及び分子量を有する。好ましいPEGユニットは、離散のPEGを含み、これは重合プロセスではなく、段階的な方法により合成された化合物である。離散のPEGは、限定及び指定された鎖長を有する単一分子を提供する。

30

【0059】

「薬学的に許容される塩」という用語は、本発明のADCコンジュゲートの生物学的効果及び性能を維持することができ、且つ当該塩は生物学的又はその他の点で望ましくないものではない塩を表す。本発明のADCコンジュゲートは、酸付加塩及び塩基付加塩を含む、それらの薬学的に許容される塩の形態で存在してもよい。本発明において、薬学的に許容される無毒性の酸付加塩は、本発明におけるADCコンジュゲートと、有機又は無機酸によって形成される塩を表し、有機又は無機酸は、塩酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、リン酸、硝酸、過塩素酸、酢酸、シュウ酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、ベンゼンスルホン酸、メタンスルホン酸、サリチル酸、コハク酸、クエン酸、乳酸、プロピオン酸、安息香酸、p-トルエンスルホン酸、リンゴ酸などを含むが、これらに限定されない。薬学的に許容される無毒性の塩基付加塩は、本発明におけるADCコンジュゲートと、有機又は無機塩基によって形成される塩を表し、リチウム、ナトリウム又はカリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム又はマグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、N基を含む有機塩基と形成されたアンモニウム塩などの有機塩基塩を含むが、これらに限定されない。

40

「溶媒和物」という用語は、1つ又は複数の溶媒分子と、本発明におけるADCコンジュゲートによって形成される会合物を表す。溶媒和物を形成する溶媒は、水、メタノール、エタノール、イソプロパノール、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどを含むが、これらに限定されない。

50

【0060】

文脈による矛盾がない限り、本明細書において、「薬学的に許容される」及び「薬用」は、互換的に使用してもよい。

【0061】

「薬物：抗体比」又は「DAR」という用語は、ADCコンジュゲートにおける、本明細書に記載のAb部分にカップリングされた薬物部分（D）のAb部分に対する比率を指す。本明細書に記載のいくつかの実施形態において、DARは、式Iにおけるqにより決定することができ、例えば、DARは、1～20、例えば、2～18、4～16、5～12、6～10、2～8、3～8、2～6、4～6、6～10、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15であってもよい。DARはまた、製品中の分子集団の平均DAR、即ち、検出方法によって（例えば、質量分析法、ELISA測定、電気泳動、及び/又はHPLCなどの従来の方法によって）測定された製品中の本明細書に記載のAb部分にカップリングされた小分子薬物部分（D）のAb部分に対する全体的な比率として算出することもでき、このDARは、本明細書において平均DARと呼ばれる。いくつかの実施形態において、本発明のコンジュゲートの平均DAR値は1～20であり、例えば2～18、4～16、5～12、6～10、2～8、3～8、2～6、4～6、6～10、例えば、1.0～8.0、2.0～6.0、例えば1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8.0、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9又は10.0であり、これらの数値のうち2つを端点の範囲とする。

10

20

【0062】

本明細書に記載の「薬物」という用語は、化学療法剤、サイトカイン、血管新生阻害剤、細胞傷害性剤、他の抗体、小分子薬物、又は免疫調節剤（例えば、免疫抑制剤）を含む、癌などの腫瘍の予防又は治療に有効な任意の物質を包含する。

【0063】

「細胞傷害性剤」という用語は、細胞機能を阻害又は防止する、及び/又は細胞死若しくは破壊を引き起こす物質を指すために本発明で使用される。細胞傷害性剤の実例は、カンプトテシン類薬物、アウリスタチン、オーレオマイシン、メイタンシノイドアルカロイド、リシン、リシンA鎖、コンブレスタチン（combrestatin）、デュオカルマイシン、アブリシアトキシン、ドキシソルピシン、ダウノマイシン、タクゾール、シスプラチン、cc1065、エチジウムブロマイド、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド（tenoposide）、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラセンジオン、アクチノマイシン、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素（PE）A、PE40、アブリン、アブリンA鎖、モデッシンA鎖、 α -サルシン（sarcin）、ゲロニン、ミトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン（retstrictocin）、フェノマイシン、エノマイシン、クリシン（curicin）、クローチン、カリケアミシン、サボンソウ（*Sapaonaria officinalis*）阻害剤、及びグルココルチコイド、並びにその他の化学治療剤、及びAt211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212又は213、P32などの放射性同位体、及びLu177を含むLuの放射性同位体を含むが、これらに限定されない。

30

40

【0064】

「小分子薬物」という用語は、生物学的プロセスを調節することができる低分子量有機化合物を指す。「小分子」は、分子量が10 kDより小さく、通常2 kDより小さく、及び好ましくは1 kDより小さい分子と定義される。小分子は、無機分子、有機分子、無機成分を含む有機分子、放射性原子を含む分子、合成分子、ペプチド模倣体、及び抗体模倣体を含むが、これらに限定されない。治療剤として、小分子は、大分子に比べて細胞透過性が高く、分解に対してより感受性でなく、免疫応答を引き起こしにくい。

【0065】

50

「医薬組成物」という用語は、その中に含まれる活性成分の生物活性が有効であることを許可する形態で存在し、且つ上記組成物が投与される対象に対する受け入れられない毒性を有する更なる成分を含まない組成物を指す。

【0066】

「薬用補助材料」という用語は、活性物質と共に投与される希釈剤、アジュバント（例えば、フロイントアジュバント（完全及び不完全））、賦形剤、ベクター又は安定剤などを指す。

【0067】

「医薬組合せ」という用語は、非固定的な組合せ製品又は固定的な組合せ製品を指し、キット、医薬組成物を含むが、これらに限定されない。「非固定的な組合せ」という用語は、2種又は複数種の活性成分（例えば、（i）本発明のADC分子又は本発明の抗体、及び（ii）他の治療剤）が、別個の実体で同時に、特定の時間制限なしに、又は相同又は相異の時間間隔で患者に逐次投与されることを意味し、そのうち、そのような投与により、患者の体内において予防的又は治療的に有効なレベルの上記の2種又は複数種の活性成分を提供する。「固定的な組合せ」という用語は、2種又は複数種の活性成分が単一の実体の形態で患者に同時に投与されることを意味する。医薬組合せに関するいくつかの場合において、好ましくは、2種又は複数種の活性成分の用量及び/又は時間間隔は、各成分の併用が、疾患又は病状を治療する場合、成分の何れかを単独で使用する場合よりも大きな効果を生み出すように選ばれる。医薬組合せに含まれる各成分は、それぞれ単独の製剤形態を呈してもよく、且つその製剤形態は同一であっても異なってもよい。いくつかの実施形態において、医薬組合せで使用される本発明のADC分子又は本発明の抗体及び他の治療剤は、それらが単独で使用するレベルを超えないレベルで投与される。

【0068】

「組合せ療法」又は「治療組合せ」という用語は、本明細書に記載の疾患を治療するための2種又は複数種の治療剤又は治療方法（例えば、放射線療法又は手術）の投与を指す。そのような投与は、例えば、固定割合の2種又は複数種の活性成分を有する単一カプセル中で、基本的に同時の方法によりこれらの治療剤を共同投与することを含む。或いは、そのような投与は、多種類の製剤（例えば、錠剤、カプセル剤、粉末及び液体）中又は別個の容器中の2種又は複数種の活性成分の同時投与を含む。粉末及び/又は液体は、投与前に所望の用量に再構成又は希釈することができる。また、このような投与は、各タイプの治療剤を、ほぼ同じ時間に、又は異なる時間に順次使用することも含む。何れの場合も、治療レジメンは、本明細書に記載される疾患又は病状の治療における上記治療組合せの有益な効果を提供する。

【0069】

本明細書において、「個体」、「対象」又は「患者」という用語は互換的に使用してもよく、哺乳動物を指す。哺乳動物は、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト及びサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）を含むが、これらに限定されない。好ましくは、対象はヒトである。

【0070】

「腫瘍」及び「癌」という用語は、本明細書では互換的に使用され、哺乳動物において、通常、調節不能な細胞増殖を特徴とする生理的障害を指す。当該用語は、腫瘍の原発性形態及び転移性形態を包含する。当該用語は、悪性であろうと良性であろうと、全ての腫瘍性（neoplastic）細胞成長及び増殖、並びに全ての前癌状態（pre-cancerous）及び癌性の細胞と組織も包含する。

【0071】

「抗腫瘍効果」という用語は、例えば、腫瘍体積の縮小、腫瘍細胞数の減少、腫瘍細胞増殖の減少、又は腫瘍細胞生存率の減少を含むが、これらに限定されない、多種類の手段によって示され得る抗腫瘍生物学的効果を指す。

【0072】

本明細書で使用される場合、「治療」は、既存の症状、病状、病態、又は疾患の進行若しくは重症度を、遅延、中断、遮断、軽減、停止、低減、又は逆転させることを指す。

【0073】

本明細書で使用される場合、「予防」は、疾患若しくは病状、又は特定の疾患若しくは病状の症状の発生若しくは進行に対する阻害を含む。通常、癌の背景において、「予防」という用語は、癌の病状又は症状の発症前、特に癌のリスクがある対象における発症前の薬物投与を指す。いくつかの実施形態において、癌の家族歴を有する対象は、予防的レジメンの候補である。

【0074】

本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、単回又は複数回の用量で患者に投与した後、治療又は予防を必要とする患者において所望の効果をもたらす薬物（例えば、本発明の抗体薬物コンジュゲート又は薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物、或いは本発明の抗体又はその抗原結合断片、或いはその組成物又は医薬組合せ）の量を指す。

【0075】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、所望の治療結果を効果的に実現するための、所望の用量で且つ所望の期間を持続するための量を指す。治療有効量はまた、対象に投与される場合、上記投与によってもたらされる任意の毒性又は有害作用が、それによってもたらす治療上の有益な作用を伴わない量である。「治療有効量」は、好ましくは、未治療の個体に対して、測定可能なパラメータ（例えば、腫瘍体積）の少なくとも約30%、その上、より好ましくは少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、ひいては100%の改善を達成する。

【0076】

本明細書で使用される場合、「予防有効量」という用語は、所望の予防結果を効果的に実現するための、所望の用量で且つ所望の期間を持続するための量を指す。通常、予防的用量は、疾患の比較的早い段階の前又は疾患の比較的早い段階に対象において使用されるため、予防有効量は治療有効量よりも少ない。

【0077】

本発明の各態様について、下記のセクションで更に詳細に説明する。

【0078】

本発明の抗体-薬物コンジュゲート

1. 抗体-薬物コンジュゲート

一態様において、本発明は、以下の式(1)を有する抗体-薬物コンジュゲート(ADC)又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物を提供し、



そのうち、

Abは、抗TF抗体を表し、

Lは、リンカーを表し、

Dは、トポイソメラーゼI阻害剤などの細胞傷害性又は細胞阻害薬物を表し、且つ

qは、1~20の整数又は小数を表し、例えば、q=1~10、1~8、3~8、4~8、又は6~8である。

【0079】

以下、本発明のADCコンジュゲートの組成及びそれからなる本発明のADCコンジュゲートについて、それぞれ詳細に説明する。当業者は、文脈から明確に反対のことが示されない限り、これらの組成の任意の技術的特徴の任意の組合せが、何れも本発明の考慮の範囲内であることを理解することができる。且つ、当業者は、文脈から明確に反対のことが示されない限り、本発明のADCコンジュゲートは、特徴の任意のそのような組合せを含み得ることを理解することができる。

【0080】

抗体Abユニット

いくつかの態様において、本発明は、TFに特異的に結合する本発明の抗体を、本発明

10

20

30

40

50

の式IのコンジュゲートのAbユニットとして含む、抗体-薬物コンジュゲート（ADC）を提供する。Abユニットとして使用される本発明の抗TF抗体は、全長抗体又は抗体断片であってもよい。いくつかの実施形態において、本発明の式（I）におけるAbは、重鎖定常領域及び軽鎖定常領域を含む全長抗体である。いくつかの実施形態において、本発明の式（I）におけるAbは、2本の軽鎖及び2本の重鎖から形成される四量体構造を有する。更なるいくつかの実施形態において、本発明の式（I）におけるAbは、IgG抗体、特にIgG1抗体である。更なる実施形態において、本発明の式（I）におけるAbはヒト化抗体である。

【0081】

抗体特性

本発明のADCで使用される本発明の抗TF抗体は、以下1つ又は複数の特性を有する。

- (i) 高い親和性でヒトTF細胞外ドメインに結合すること、
- (ii) 高い親和性でTF陽性腫瘍細胞に結合すること、
- (iii) カニクイザルTFと交差反応性を有すること、
- (iv) TF受容体媒介性エンドサイトーシス活性を有すること、
- (v) TF陽性細胞におけるTF/FVIIa複合体媒介性下流シグナル経路を遮断すること、

及び

(vi) 細胞表面TFによって開始される凝血は、基本的に影響を及ぼさないか、又は低下した凝血の影響を有すること。

【0082】

好ましくは、上記抗TF抗体及び抗体-薬物コンジュゲートは、高い親和性でTF陽性腫瘍細胞に結合することができ、且つ細胞表面TFによって開始される凝血に基本的に影響を及ぼさないか、又は低下した凝血の影響を有する。

【0083】

本発明のADCで使用される本発明の抗TF抗体の特性に関して、以下の「本発明の抗TF抗体」の部分で提供される詳細な説明も参照されたい。

【0084】

抗体CDR領域

CDRは、抗原エピトープへの結合を主に担う、抗体の領域である。いくつかの実施形態において、本発明のADCで使用される抗TF抗体は、

- (i) 配列番号1に示される重鎖可変領域のHCDR1、2及び3配列、並びに配列番号2に示される軽鎖可変領域のLCDR1、2及び3配列、或いは
 - (ii) 配列番号3に示される重鎖可変領域のHCDR1、2及び3配列、並びに配列番号4に示される軽鎖可変領域のLCDR1、2及び3配列、或いは
 - (iii) 配列番号5に示される重鎖可変領域のHCDR1、2及び3配列、並びに配列番号6に示される軽鎖可変領域のLCDR1、2及び3配列、或いは
 - (iv) 配列番号7に示される重鎖可変領域のHCDR1、2及び3配列、並びに配列番号8に示される軽鎖可変領域のLCDR1、2及び3配列
- というCDR配列を含む。

【0085】

好ましくは、上記CDRは、Chothia、AbM、Kabat、IMGT又はそれらの任意の組合せに従って定義される。より好ましくは、上記CDRは、Kabat若しくはIMGT又はそれらの組合せに従って定義され、より好ましくは、上記CDRは、IMGTに従って定義される。しかし、上記CDRは、当該分野で公知の任意の他の方法で定義されてもよいことが理解されるべきである。

【0086】

また、CDRは抗体と抗体の間に異なるが、CDR内の限定された数のアミノ酸位置のみが抗原結合に直接関与することが、当該分野において知られている。Kabat、Chothia、AbM、及びContact法のうちの少なくとも2つを使用して、最小重複領域を決定することができ、それにより、抗原結合のための「最小結合ユニット」を提供する。そのよう

10

20

30

40

50

な最小結合ユニットは、CDRのサブ部分であってもよい。一方、CDR配列の残りの残基は、当業者に明らかなように、抗体の構造及びタンパク質フォールディングによって決定することができる。従って、本発明は、本明細書で提供されるCDRの何れかの変異体も考慮する。例えば、CDRの1つの変異体において、最小結合ユニットのアミノ酸残基は不変のままであってもよく、残りのCDR残基は置換されてもよい。

【0087】

いくつかの実施形態において、好ましくは、本発明のADCで使用される抗TF抗体は、重鎖可変領域の3つの相補性決定領域HCDR、及び軽鎖可変領域の3つの相補性決定領域LCDRを含み、そのうち、

(i) Chothiaに従って定義すると、HCDR1は配列番号9のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号10のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号11のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号21のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号22のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号23のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

10

(ii) AbMに従って定義すると、HCDR1は配列番号12のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号13のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号14のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号24のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号25のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号26のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

20

(iii) Kabatに従って定義すると、HCDR1は配列番号15のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号16のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号17のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号27のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号28のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号29のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iv) IMGTに従って定義すると、HCDR1は配列番号18のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号19のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号20のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号30のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号31のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号32のアミノ酸配列を含むか又はそれからなる。

30

【0088】

いくつかの実施形態において、好ましくは、本発明のADCで使用される抗TF抗体は、重鎖可変領域の3つの相補性決定領域HCDR、及び軽鎖可変領域の3つの相補性決定領域LCDRを含み、そのうち、

(i) Chothiaに従って定義すると、HCDR1は配列番号33のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号34のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号35のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号45のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号46のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号47のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

40

(ii) AbMに従って定義すると、HCDR1は配列番号36のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号37のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号38のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号48のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号49のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号50のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iii) Kabatに従って定義すると、HCDR1は配列番号39のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号40のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HC

50

DR3は配列番号41のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号51のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号52のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号53のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iv) IMGTに従って定義すると、HCDR1は配列番号42のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号43のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号44のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号54のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号55のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号56のアミノ酸配列を含むか又はそれからなる。

【0089】

いくつかの実施形態において、好ましくは、本発明のADCで使用される抗TF抗体は、重鎖可変領域の3つの相補性決定領域HCDR、及び軽鎖可変領域の3つの相補性決定領域LCDRを含み、そのうち、

(i) Chothiaに従って定義すると、HCDR1は配列番号57のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号58のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号59のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号69のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号70のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号71のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(ii) AbMに従って定義すると、HCDR1は配列番号60のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号61のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号62のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号72のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号73のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号74のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iii) Kabatに従って定義すると、HCDR1は配列番号63のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号64のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号65のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号75のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号76のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号77のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iv) IMGTに従って定義すると、HCDR1は配列番号66のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号67のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号68のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号78のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号79のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号80のアミノ酸配列を含むか又はそれからなる。

【0090】

いくつかの実施形態において、好ましくは、本発明のADCで使用される抗TF抗体は、重鎖可変領域の3つの相補性決定領域HCDR、及び軽鎖可変領域の3つの相補性決定領域LCDRを含み、そのうち、

(i) Chothiaに従って定義すると、HCDR1は配列番号81のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号82のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号83のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号93のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号94のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号95のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(ii) AbMに従って定義すると、HCDR1は配列番号84のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号85のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号86のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号96のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号97のアミノ酸配列を含むか又は

10

20

30

40

50

それからなり、且つLCDR3は配列番号98のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iii) Kabatに従って定義すると、HCDR1は配列番号87のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号88のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号89のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号99のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号100のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号101のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iv) IMGTに従って定義すると、HCDR1は配列番号90のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号91のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号92のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号102のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号103のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号104のアミノ酸配列を含むか又はそれからなる。

10

【0091】

抗体可変領域

「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の抗原への結合に関与する、抗体の重鎖又は軽鎖のドメインである。いくつかの実施形態において、本発明のADCで使用される本発明の抗TF抗体は、本発明の例示的な抗体2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1及び27H8H3-hz1の何れか1つの重鎖及び軽鎖可変領域配列又はその変異体、例えば、上記例示的な抗体の1つと同じCDR配列を有すると共に、相同又は相異のフレームワーク領域配列を有する抗体又はその断片、例えばヒト化抗体を含む。フレームワーク領域の置換に対して、Gapped BLASTなどの配列類似性検索ツールを使用して、親抗体タンパク質配列をデータベース中のタンパク質配列と比較し、変更される親抗体のフレームワーク配列と高度な構造的類似性を有する、例えば、フレームワーク領域の置換のために、少なくとも80%、85%、90%、又は95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するデータベースフレームワーク配列を選択する。いくつかの場合において、フレームワーク領域の置換後、必要に応じて、置換されたフレームワーク配列に対して1個〜複数個の復帰変異などの残基変異を行い、且つインビトロ又はインビボ測定試験において、変異後の抗体の抗原結合特性又は他の機能的特性の保持又は改善の状況を評価することができる。

20

30

【0092】

一実施形態において、本発明のADCで使用される本発明の抗TF抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、上記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号1に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、或いは

(ii) 配列番号3に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、或いは

(iii) 配列番号5に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、

40

(iv) 配列番号7に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0093】

別の実施形態において、本発明のADCで使用される抗TF抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、上記軽鎖可変領域は、

(i) 配列番号2に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、或いは

(ii) 配列番号4に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、或いは

(iii) 配列番号6に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%

50

、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、

(iv) 配列番号8に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0094】

いくつかの好ましい実施形態において、上記抗TF抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、上記重鎖可変領域は、配列番号1に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つそのうち、上記軽鎖可変領域は、配列番号2に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。好ましくは、上記抗体又は抗原結合断片は、配列番号1の重鎖可変領域及び配列番号2の軽鎖可変領域を含むか又はそれからなる。

10

【0095】

いくつかの好ましい実施形態において、上記抗TF抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、上記重鎖可変領域は、配列番号3に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つそのうち、上記軽鎖可変領域は、配列番号4に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。好ましくは、上記抗体又は抗原結合断片は、配列番号3の重鎖可変領域及び配列番号4の軽鎖可変領域を含むか又はそれからなる。

【0096】

20

いくつかの好ましい実施形態において、上記抗TF抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、上記重鎖可変領域は、配列番号5に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つそのうち、上記軽鎖可変領域は、配列番号6に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。好ましくは、上記抗体又は抗原結合断片は、配列番号5の重鎖可変領域及び配列番号6の軽鎖可変領域を含むか又はそれからなる。

【0097】

いくつかの好ましい実施形態において、上記抗TF抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、上記重鎖可変領域は、配列番号7に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つそのうち、上記軽鎖可変領域は、配列番号8に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。好ましくは、上記抗体又は抗原結合断片は、配列番号7の重鎖可変領域及び配列番号8の軽鎖可変領域を含むか又はそれからなる。

30

【0098】

抗体重鎖及び軽鎖

Abユニットとして本発明のADCで使用される本発明の抗TF抗体は、いくつかの場合において、重鎖定常領域及び/又は軽鎖定常領域を含むことができる。好ましくは、上記重鎖定常領域は、ヒト免疫グロブリンに由来する重鎖定常領域である。好ましくは、上記軽鎖定常領域は、ヒト免疫グロブリンに由来する軽鎖定常領域である。いくつかの実施形態において、上記抗TF抗体に含まれる重鎖定常領域は、任意のアイソタイプ又はサブタイプ、例えば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4アイソタイプの重鎖定常領域であってもよい。いくつかの実施形態において、上記抗TF抗体は、好ましくは、IgG1重鎖定常領域、特にヒトIgG1重鎖定常領域、例えば配列番号106のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別のいくつかの実施形態において、上記抗TF抗体に含まれる軽鎖定常領域は、κ軽鎖定常領域又はλ軽鎖定常領域であってもよい。いくつかの実施形態において、上記抗TF抗体は、ヒトに由来するκ軽鎖定常領域又はλ軽鎖定常領域、好ましくはヒトκ軽鎖定常領域、例えば、配列番号105のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、96%、

40

50

97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0099】

本発明はまた、上記何れかの抗体の実施形態の変異体を考慮する。本発明によるAbユニットとして使用される抗体変異体は、好ましくは、変更前に導入された親抗体の生物活性（例えば、抗原結合能）の少なくとも60%、70%、80%、90%又は100%を保持する。より好ましくは、上記変更は、抗体の変異体の抗原への結合の喪失をもたらさないが、任意選択的に向上した抗原親和性などの特性を付与する。抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域、或いは各CDR領域又はフレームワーク領域は、単独で又は組合せて変更されてもよいことが理解できる。また、抗体のFc領域を変更することもできる。Fc領域の変更は、単独で、或いはフレームワーク領域及び/又はCDR領域に対する変更と組合せて行われてもよい。例えば、抗体の1種又は複数種のエフェクター機能、例えば、血清半減期、補体固定、Fc受容体結合、及び/又は抗原依存性細胞傷害性を変更するために、Fc領域を変更してもよい。また、本発明の抗体に対して、化学修飾（例えば、PEGに結合）又はそのグリコシル化パターンの変更を行ってもよい。

10

【0100】

ADCコンジュゲートを形成するために、本発明による抗体は、その天然の結合部位の一部を使用して毒素-リンカーとカップリングしてもよい。このような天然の結合部位には、システインのメルカプト基及びリジンのアミノ基を有する。通常、抗体の鎖間ジスルフィド架橋を使用することにより、比較的明確な薬物-抗体比（DAR）を実現することができる。従って、一実施形態において、抗体の鎖間ジスルフィド結合を還元した後、メルカプト化学によって、本発明の抗体に毒素をカップリングし、式（I）のADCコンジュゲートを形成する。また、より標的を絞ったコンジュゲートを実現するため、抗体に人工結合部位を導入することも考慮できる。

20

【0101】

薬物Dユニット

抗体-薬物コンジュゲートの薬物Dユニットは、本明細書において、ADC薬物のペイロード（payload）とも称される。本発明のADCに使用できる薬物Dは、特に限定されず、細胞に対する毒性又は阻害性を有する任意の薬物又はそのプロドラッグであってもよい。当業者は、ADCのペイロードとして、ADCの所望の薬物作用機構及び細胞殺傷効果に基づいて、適切な薬物分子を選択することができる。

30

【0102】

いくつかの実施形態において、薬物Dは細胞傷害性薬剤である。当技術分野において、ペイロードとしての使用に適した、異なるメカニズムの複数種の細胞傷害性薬剤が報告され、

（1）微小管阻害剤/破壊剤：例えば、限定されないが、auristatin類（例えば、MMAE又はMMAF）、メイタンシン誘導体（例えば、DM2、DM4）、チューブリシン（Tubulysins）、クリプトフィシン（Cryptomycins）、抗有糸分裂EG5阻害剤（例えば、紡錘体キネシンKSP阻害剤）、

（2）DNA損傷剤：例えば、限定されないが、ピロロベンゾジアゼピン類（Pyrrolobenzodiazepines）（例えば、ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン（PBD））、デュオカルマイシン、Indolinobenzodiazepine、Duocarmycins、Calicheamicin類、

40

（3）トポイソメラーゼ阻害剤：例えば、限定されないが、カンプトテシン類（例えば、エキサテカン及びその誘導体Dxd）、

（4）その他：アポトーシス誘導剤（Bcl-xL阻害剤）、thailanstatin及びその類似体、アマトキシシン、ニコチナミドホスホリボシルトランスフェラーゼ（NAMPT）阻害剤、カナマイシンを含むが、これらに限定されない。

【0103】

本発明の式（I）における薬物Dは、上記から選ばれる任意の化合物であってもよい。いくつかの実施形態において、薬物Dは、メイタンシン誘導体、カリキアミシン誘導体、アウリスタチン誘導体から選ばれる抗腫瘍増殖阻害剤である。一実施形態において、薬物

50

Dは、ビンカルカロイド類、ピンクリスチン、パクリタキセル、及びドセタキセルなどのチューブリン阻害剤/安定性破壊剤である。一実施形態において、薬物Dは、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、シタラビン、ゲムシタビン、メルカプトプリン、ペントスタチン、フルダラビン、クラドリビンなどのDNA合成の阻害剤である。一実施形態において、薬物Dは、トポイソメラーゼI阻害剤（例えば、カンプトテシン類）及びトポイソメラーゼII阻害剤（例えば、アクチノマイシンD、ドキソルビシン、ミトキサントロン）などのDNAトポイソメラーゼ阻害剤である。

【0104】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明によるADCの薬物DはトポイソメラーゼI阻害剤である。トポイソメラーゼI阻害剤の典型的な例はカンプトテシン類薬物、例えば、カンプトテシン（CPT）、ヒドロキシカンプトテシン、9-アミノカンプトテシン、exatecan、topotecan、belotecan、irinotecan、SN-38、及びFL118、並びにそれらの誘導体であるが、これらに限定されない。例えば、Vesela Kostova et al., The Chemistry Behind ADCs, Pharmaceuticals 2021, 14, 442. <https://doi.org/10.3390/ph14050442>、及びWO2019/195665、上記文献は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

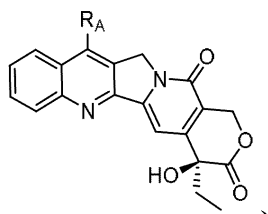
【0105】

本発明のいくつかの実施形態において、本発明のADCの薬物Dは、以下から選ばれるカンプトテシン類薬物である。

-カンプトテシン及びその誘導体、例えば、

20

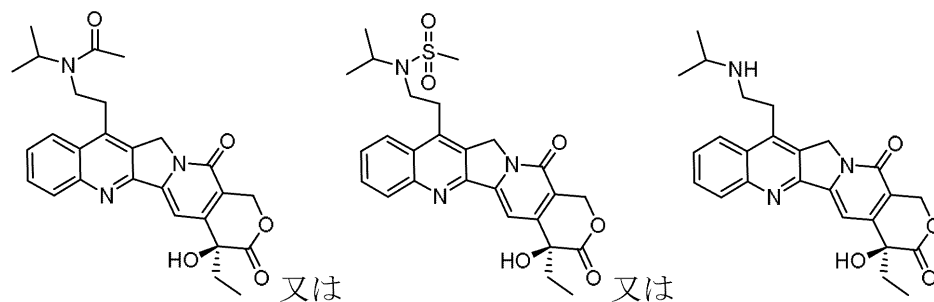
【化1】



そのうち、 R_A は、例えば、水素、任意選択的に置換されたアルキル基から選ばれ、そのうち、置換基は、ヒドロキシ基、アミノ基を含むが、これらに限定されず、そのうち、アミノ基部分又はヒドロキシ基部分は、置換又は非置換であってもよく、例えば、アルキル基、アルキルアシル基、又はアルキルスルホニル基で置換されてもよく、一実施形態において、上記薬物Dは

30

【化2】



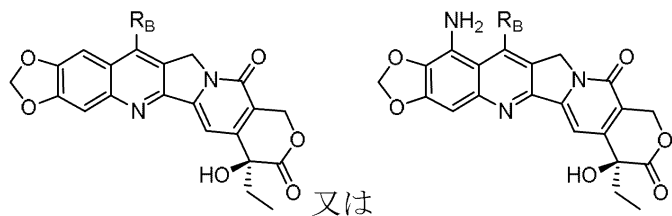
40

であり、

-10,11-methylenedioxy CPT（MDCPT又はFL118とも略される）、及びその誘導体、例えば、

50

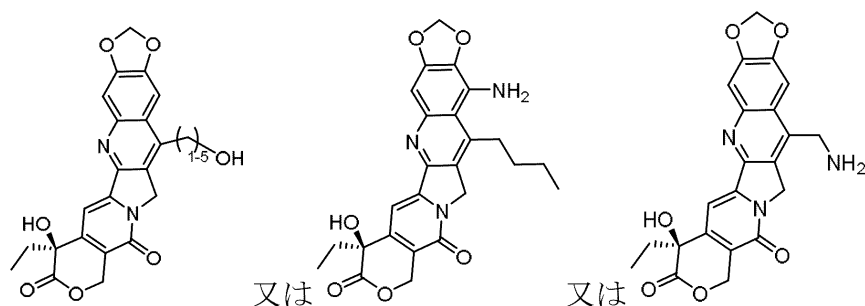
【化 3】



であり、そのうち、 R_B は、例えば、水素、シクロアルキル基、フェニル基、任意選択的に置換されたアルキル基から選ばれ、そのうち、置換基は、ハロゲン、ヒドロキシ基、任意選択的に置換されたアルコキシ基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、フェニル基、アミノ基を含むが、これらに限定されず、そのうち、アミノ基の部分は、任意に置換されてもよく、一実施形態において、上記薬物Dは

10

【化 4】

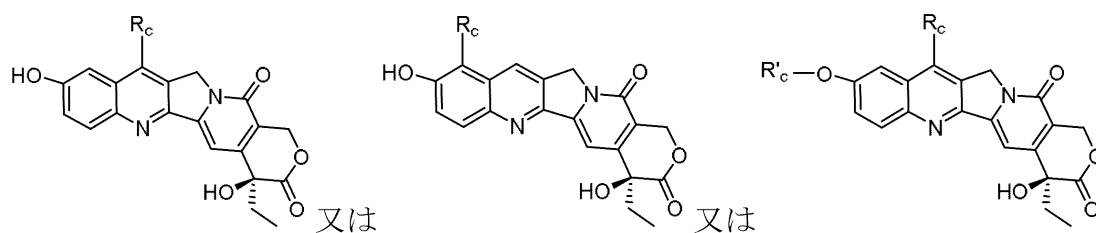


20

であり、

-10-hydroxy CPT (HCPTとも略される) 及びその誘導体、例えば、

【化 5】



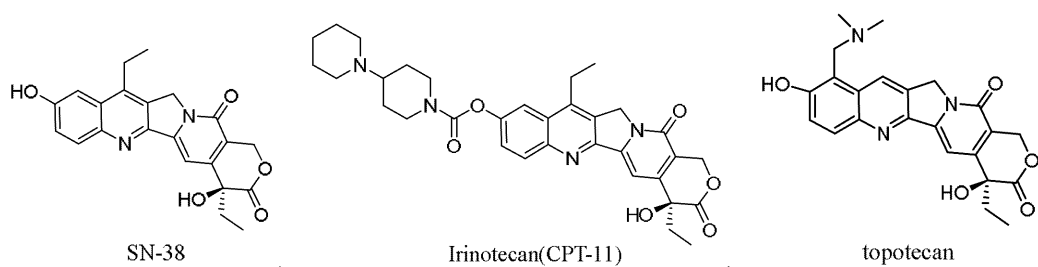
30

であり、

そのうち、 R_C は、例えば、任意選択的に置換されたアルキル基及びシクロアルキル基から選ばれ、 R'_C は、例えば、H、アルカノイル基又は任意選択的に置換されたヘテロシクロアルキルアシル基から選ばれ、一実施形態において、上記薬物Dは、7-エチル-10-ヒドロキシCPT (SN-38) 又はそのプロドラッグであるイリノテカン (irinotecan、CPT-11) であるか、又は上記薬物Dは、トポテカン

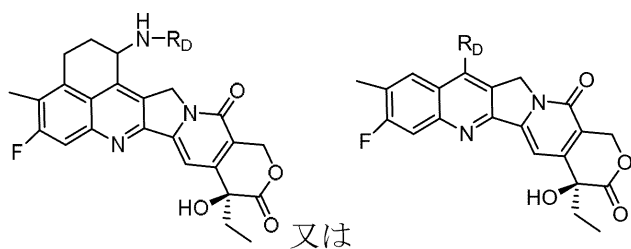
40

【化 6】



50

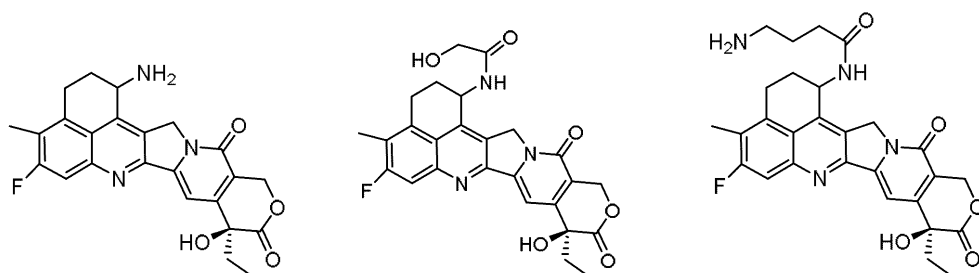
-Exatecan及びその誘導体、例えば、
【化7】



又は

であり、そのうち、 R_D は、例えば、H、任意選択的に置換されたアルキル基、任意選択的に置換されたアルキル-C(=O)-から選ばれ、上記置換基は、例えば、-OH又は置換若しくは非置換のアミノ基であり、一実施形態において、上記薬物Dは、

【化8】



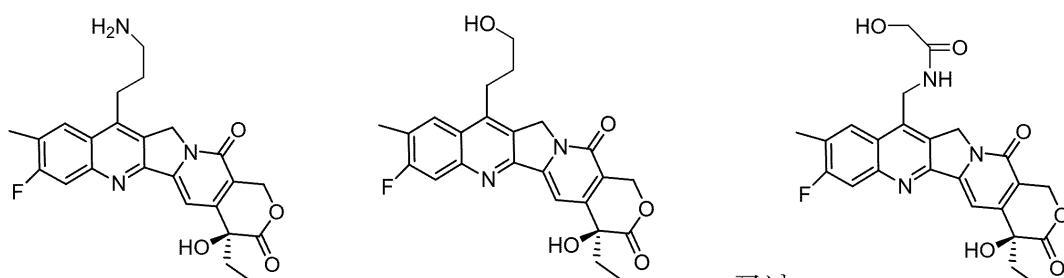
Exatecan

Dxd (1)

又は

Dxd (2)

であり、別の実施形態において、上記薬物Dは、
【化9】



又は

である。

【0106】

F118 ((20S) -10,11-methylenedioxyカンプトテシン) は、化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングを通じて得られた。FL118は、他のカンプトテシン誘導体と比較して、多くの異なる癌タイプにおいて、はるかに高いインビボ及びインビトロ抗癌活性を有することが証明された。トポイソメラーゼIの阻害に加えて、FL118は、抗アポトーシスタンパク質、例えば、survivin、XIAP、cIAP2及びMcl-1の遺伝子プロモーター活性及び内因性発現を選択的に阻害することができる。Xiang Ling et al., A Novel Small Molecule FL118 That Selectively Inhibits Survivin, Mcl-1, XIAP and cIAP2 in a p53-Independent Manner, Shows Superior Antitumor Activity, PLoS ONE 7 (9) : e45571, doi: 10.1371/journal.pone.0045571を参照されたい。FL118の単独使用は、その極めて乏しい水溶性及び毒性副作用により著しく妨げられるが、実施例に示すように、当該化合物を本発明の抗体及びリンカーと組合せて形成されたコンジュゲートは、当該化合物の腫瘍殺傷効果を有効に発揮するだけでなく、且つ当該化合物の欠点を克服し、形成されたコンジュゲートの凝集度が小

10

20

30

40

50

さく、且つ良好な動物耐性を有する。

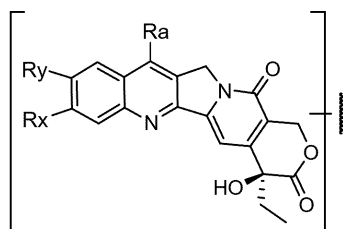
【0107】

従って、本発明のいくつかの好ましい実施形態において、本発明のADCの薬物Dは、FL118誘導体、特に7位で置換されたFL118である。

【0108】

いくつかの実施形態において、本発明の式(I)における薬物Dは、以下の式D構造を含むカンプトテシン類薬物であり、

【化10】



(D)、

10

そのうち、

R_x 、 R_y は、それぞれ独立的に、H、ハロゲン、-OH、 C_1 - C_6 アルキル基から選ばれるか、又は R_x 及び R_y は、それぞれに結合する炭素原子と組合せて、N、S及びOから選ばれる1個又は2個の5員～6員複素環を形成し、

20

R_a はH、ハロゲン、-OH、任意選択的に置換された C_1 - C_8 アルキル基又は C_3 - C_8 アルキニル基又は C_3 - C_8 アルケニル基、任意選択的に置換された C_1 - C_8 アルコキシ基、任意選択的に置換された C_3 - C_8 シクロアルキル基、任意選択的に置換されたフェニル基、任意選択的に置換されたヘテロシクロアルキル基、任意選択的に置換されたヘテロアリール基から選ばれ、

好ましくは、そのうち、 R_a は、

水素、

C_3 - C_8 シクロアルキル基、

フェニル基、

ハロゲン、ヒドロキシ基、任意選択的に NH_2 、 NH (C_1 - C_4 アルキル) 及び N (C_1 - C_4 アルキル) $_2$ で置換された C_1 - C_4 アルコキシ基、 C_3 - C_8 シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、フェニル基、及び NR^1R^2 からなる群から選ばれる置換基で任意選択的に置換された C_1 - C_8 アルキル基、又は C_3 - C_8 アルキニル基、又は C_3 - C_8 アルケニル基から選ばれ、

30

そのうち、 R^1 及び R^2 は、互いに独立的に、

水素、

ヒドロキシ基、アミノ基、1個又は2個の C_1 - C_4 アルキル基で置換されたアミノ基、1個又は2個の C_1 - C_4 ヒドロキシアルキル基で置換されたアミノ基、(C_1 - C_4 ヒドロキシアルキル) 及び(C_1 - C_4 アルキル) で置換されたアミノ基からなる群から選ばれる置換基で任意選択的に置換された C_1 - C_8 アルキル基、

40

1個又は2個の C_3 - C_{10} シクロアルキル基、 C_3 - C_{10} ヘテロシクロアルキル基、フェニル基又はヘテロアリール基で置換された C_1 - C_4 アルキル基、

C_3 - C_{10} シクロアルキル基、

C_3 - C_{10} ヘテロシクロアルキル基、

C_2 - C_6 ヘテロアルキル基、

ヘテロアリール基、

ハロゲンで任意選択的に置換されたフェニル基、

ヒドロキシ基又はアミノ基で任意選択的に置換された C_1 - C_8 アルキル-C(=O)-、から選ばれ、

或いは、 R^1 及び R^2 はそれぞれに結合する窒素原子と組合せて0個～3個の置換基を有

50

する5-員、6-員又は7-員ヘテロ環を形成し、上記置換基はハロゲン、 C_1 - C_4 アルキル基、 OH 、 C_1 - C_4 アルコキシ基、 NH_2 、 NH (C_1 - C_4 アルキル) 及び N (C_1 - C_4 アルキル) $_2$ から選ばれ、

そのうち、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、フェニル基、ヘテロアリール基は、出現するたびにそれぞれ独立的に、 OH 、 C_1 - C_4 アルキル基、 C_1 - C_4 アルコキシ基、 NH_2 、 NH (C_1 - C_4 アルキル) 及び N (C_1 - C_4 アルキル) $_2$ からなる群から選ばれる0個～3個の置換基で任意選択的に置換される。

【0109】

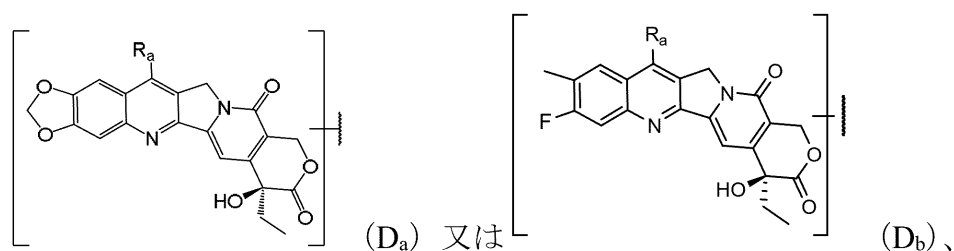
いくつかの好ましい実施形態において、 R_x 及び R_y はそれぞれ独立的に、 H である。別のいくつかの好ましい実施形態において、 R_x は F であり、且つ R_y はメチル基である。更なるいくつかの好ましい実施形態において、 R_x 及び R_y はそれぞれに結合する炭素原子と組合せて、2個の O を含む5員複素環を形成する。

10

【0110】

いくつかの実施形態において、本発明の式 (I) における薬物Dは、以下の式 D_a 又は式 D_b 構造を含むカンプトテシン類薬物であり、

【化11】



20

特に式 (D_a) のカンプトテシン類薬物であり、

そのうち、 R_a は、

水素、

C_3 - C_8 シクロアルキル基、

フェニル基、

ハロゲン、ヒドロキシ基、任意選択的に NH_2 、 NH (C_1 - C_4 アルキル) 及び N (C_1 - C_4 アルキル) $_2$ で置換された C_1 - C_4 アルコキシ基、 C_3 - C_8 シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、フェニル基、及び NR^1R^2 からなる群から選ばれる置換基で任意選択的に置換された C_1 - C_8 アルキル基、 C_3 - C_8 アルキニル基、又は C_3 - C_8 アルケニル基から選ばれ、そのうち、 R^1 及び R^2 は、互いに独立的に、

30

水素、

ヒドロキシ基、アミノ基、1個又は2個の C_1 - C_4 アルキル基で置換されたアミノ基、1個又は2個の C_1 - C_4 ヒドロキシアルキル基で置換されたアミノ基、(C_1 - C_4 ヒドロキシアルキル) 及び(C_1 - C_4 アルキル) で置換されたアミノ基からなる群から選ばれる置換基で任意選択的に置換された C_1 - C_8 アルキル基、

1個又は2個の C_3 - C_{10} シクロアルキル基、 C_3 - C_{10} ヘテロシクロアルキル基、フェニル基又はヘテロアリール基で置換された C_1 - C_4 アルキル基、

40

C_3 - C_{10} シクロアルキル基、

C_3 - C_{10} ヘテロシクロアルキル基、

C_2 - C_6 ヘテロアルキル基、

ヘテロアリール基、

ハロゲンで任意選択的に置換されたフェニル基、

ヒドロキシ基又はアミノ基で任意選択的に置換された C_1 - C_8 アルキル- $C(=O)-$ 、から選ばれ、

或いは、 R^1 及び R^2 はそれぞれに結合する窒素原子と組合せて0個～3個の置換基を有する5-員、6-員又は7-員ヘテロ環を形成し、上記置換基はハロゲン、 C_1 - C_4 アルキル基

50

、OH、C₁-C₄アルコキシ基、NH₂、NH (C₁-C₄アルキル) 及びN (C₁-C₄アルキル)₂から選ばれ、

そのうち、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、フェニル基、ヘテロアリール基は、出現するたびにそれぞれ独立的に、OH、C₁-C₄アルキル基、C₁-C₄アルコキシ基、NH₂、NH (C₁-C₄アルキル) 及びN (C₁-C₄アルキル)₂からなる群から選ばれる0個～3個の置換基で任意選択的に置換される。

【0111】

いくつかの実施形態において、R_aは水素である。

【0112】

いくつかの実施形態において、R_aはC₃-C₈シクロアルキル基（例えば、シクロプロピル基、シクロヘブチル基、シクロペンチル基）である。

10

【0113】

いくつかの実施形態において、R_aはフェニル基である。別のいくつかの実施形態において、R_aはNH₂、又はNH (C₁-C₄アルキル) で置換されたフェニル基である。

【0114】

いくつかの実施形態において、R_aはC₁-C₆アルキル基、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、2-メチルプロピル基、ブチル基、イソブチル基、2,2-ジメチル-プロピル基、2,2-ジメチル-ブチル基、n-ヘキシル基、n-ペンチル基、3-エチル-ペンチル基である。

【0115】

いくつかの実施形態において、R_aはC₁-C₄アルキル基であり、それはヒドロキシ基又はC₁-C₄アルコキシ基で任意選択的に置換され、そのうち、アルコキシ基は更に-NH₂、-NH (C₁-C₄アルキル) 及び-N (C₁-C₄アルキル)₂で任意選択的に置換される。

20

【0116】

いくつかの実施形態において、R_aはC₂-C₄アルケニル基又はC₂-C₄アルキニル基であり、それはヒドロキシ基又はアミノ基で任意選択的に置換される。

【0117】

いくつかの実施形態において、R_aはN、S及びOから選ばれる1個又は2個の5員～6員ヘテロシクロアルキル基で置換されたC₁-C₄アルキル基であり、そのうち、ヘテロシクロアルキル基部分が更にC₁-C₄アルキル基で任意選択的に置換され、好ましくは、上記ヘテロシクロアルキル基がピペラジニル基又はモルホリニル基である。

30

【0118】

いくつかの実施形態において、R_aは-NR¹R²で置換されたC₁-C₄アルキル基であり、特に-メチレン-NR¹R²であり、そのうち、R¹及びR²は、互いに独立的に、

水素、

-C₁-C₄アルキル基、

-OH、-NH₂、-NH (C₁-C₄アルキル)、-N (C₁-C₄アルキル)₂、-フェニル基、-フェニレン-NH₂、-フェニレン-C₁-C₄アルコキシ基、-ジフェニル基、-C₃-C₁₀シクロアルキル基、-C₃-C₁₀シクロアルキレン-C₁-C₄アルキル基、-C₃-C₁₀ヘテロシクロアルキル基からなる群から選ばれる置換基で置換された-C₁-C₄アルキル基、

40

そのうち、上記ヘテロシクロアルキル基は、N、S及びOから選ばれる1個又は2個のヘテロ原子を有し、好ましくは、上記ヘテロシクロアルキル基はピペリジニル基であり、フェニル基、ハロゲンで置換されたフェニル基、

C₃-C₁₀シクロアルキル基、

-C(=O)-C₁-C₄アルキル-OH、-C(=O)-C₁-C₄アルキル-NH₂から選ばれる。

【0119】

いくつかの実施形態において、R_aは-NR¹R²で置換されたC₁-C₄アルキル基であり、特に、-メチレン-NR¹R²であり、そのうち、R¹及びR²はそれぞれに結合する窒素原子と組合せて5-員、6-員又は7-員ヘテロシクロアルキル基環を形成する。いくつかの態様において、R¹及びR²はそれぞれに結合する窒素原子と組合せて6-員環を形成する。いくつ

50

かの態様において、上記6-員環は、モルホリニル基又はピペラジニル基である。

【0120】

いくつかの好ましい実施形態では、 R_a は、 $-C_1-C_4$ アルキリデン-OH、 $-C_1-C_4$ アルキリデン-O- C_1-C_4 アルキリデン-NH₂、 $-C_1-C_4$ アルキリデン-NH₂、 $-C_1-C_4$ アルキリデン-NH(C_1-C_4 ヒドロキシアルキル)、 $-C_1-C_4$ アルキリデン-N(C_1-C_4 ヒドロキシアルキル)₂、 $-C_1-C_4$ アルキリデン-N(C_1-C_4 アミノアルキル)(C_1-C_4 ヒドロキシアルキル)、 $-C_1-C_4$ アルキリデン-NH(C_1-C_4 アミノアルキル)、 $-C_1-C_4$ アルキリデン-NH-C(=O)- C_1-C_4 アルキリデン-OH、 $-C_1-C_4$ アルキリデン-NH-C(=O)- C_1-C_4 アルキリデン-NH₂、 $-C_1-C_4$ アルキリデン-N(C_1-C_4 アルキル)(C(=O)- C_1-C_4 アルキリデン-OH)、 $-C_1-C_4$ アルキリデン-N(C_1-C_4 アルキル)(C(=O)- C_1-C_4 アルキリデン-NH₂)から選ばれる。

10

【0121】

更なるいくつかの好ましい実施形態において、 R_a は $-C_1-C_4$ アルキリデン-NH-C(=O)- C_1-C_4 アルキリデン-OH、 $-C_1-C_4$ アルキリデン-NH-C(=O)- C_1-C_4 アルキリデン-NH₂である。

【0122】

更なるいくつかの好ましい実施形態において、 R_a は $-C_2-C_4$ アルケニレン-NH₂又は $-C_2-C_4$ アルケニレン-OH、例えば、 $-CH=CH-CH_2-NH_2$ 又は $-CH=CH-CH_2-OH$ である。

【0123】

更なるいくつかの好ましい実施形態において、 R_a は $-C_1-C_4$ アルキリデン-OH、 $-C_1-C_4$ アルキリデン-O- C_1-C_4 アルキリデン-NH₂、又は $-C_1-C_4$ アルキリデン-NH₂である。

20

【0124】

いくつかのより好ましい実施形態において、 R_a は $-C_1-C_4$ アルキリデン-OHである。いくつかの態様において、 R_a はヒドロキシメチル基である。いくつかの態様において、 R_a はヒドロキシエチル基である。いくつかの態様において、 R_a はヒドロキシプロピル基である。

【0125】

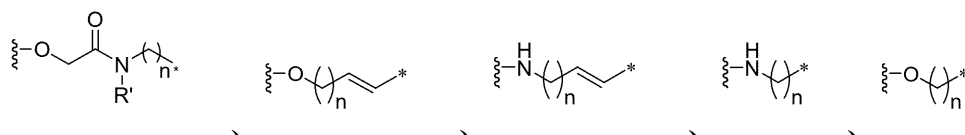
別のいくつかのより好ましい実施形態において、 R_a は $-C_1-C_4$ アルキリデン-NH₂である。いくつかの態様において、 R_a はアミノメチル基である。いくつかの態様において、 R_a はアミノエチル基である。いくつかの態様において、 R_a はアミノプロピル基である。

30

【0126】

好ましくは、薬物Dは、その遊離ヒドロキシ基又はアミノ基を介してリンカーLに結合して、抗体にカップリングする。より好ましくは、式D又は式D_a若しくはD_bの薬物DはR_aのヒドロキシ基又はアミノ基を介して、リンカーLに結合して、抗体にカップリングする。好ましくは、リンカーに結合した後のR_aは、以下から選ばれる構造を有し、

【化12】

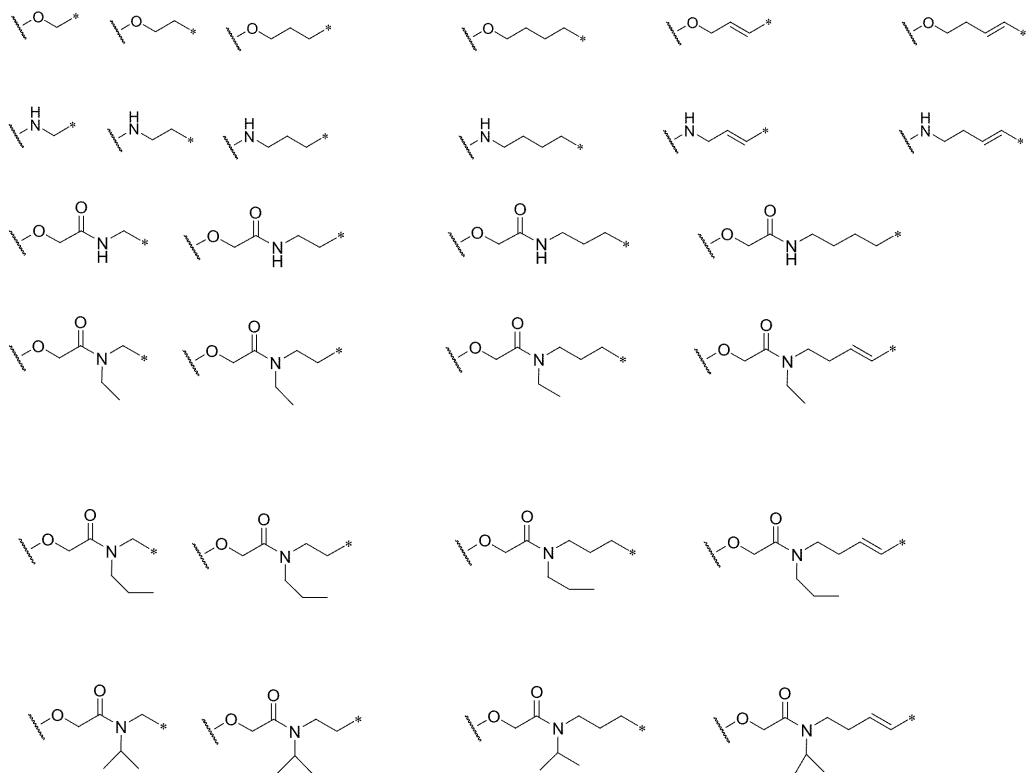


40

であり、そのうち、nは1~4の整数であり、好ましくは、n=2又は3であり、そのうち、R'はH又は C_1-C_4 アルキル基であり、好ましくは、Hであり、そのうち、左側の波線はリンカーLに結合した位置を表し、右側のアスタリスクはカンプトテシン親核に結合した位置を表し、

より好ましくは、リンカーに結合した後のR_aは以下から選ばれる構造を有し、

【化 1 3】

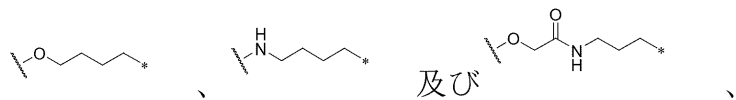


10

20

最も好ましくは、リンカーに結合した後のR_aは以下から選ばれる構造を有し、

【化 1 4】



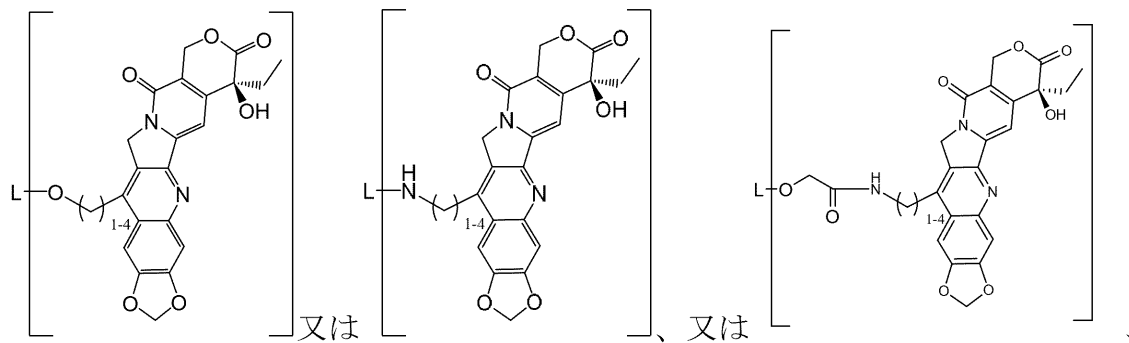
30

そのうち、左側の波線はリンカーLに結合する位置を表し、右側のアスタリスクはカンプトテシン親核に結合した位置を表す。

【0 1 2 7】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明の式 (I) におけるL-Dユニットは、以下の構造を含む：

【化 1 5】

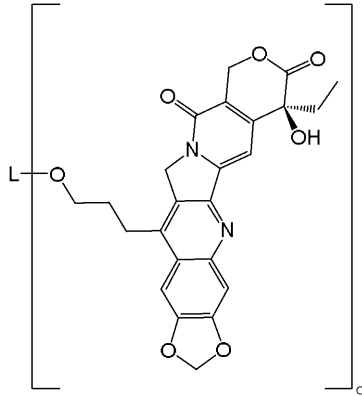


40

より好ましくは、式 (I) におけるL-Dユニットは、以下の構造を含む：

50

【化 16】



10

【0128】

リンカーLユニット

本発明に適したリンカーLは、本発明の抗体を薬物にカップリングさせることができる何れかのリンカーであってもよい。適切には、リンカーを加えることにより、循環器系における本発明のADCの十分な安定性が保証されると同時に、標的部位（例えば、腫瘍細胞又は腫瘍環境）において、毒性薬物の活性形態の迅速且つ効果的な放出を提供することができる。

20

【0129】

いくつかの実施形態において、本発明の式（I）のリンカーは、非分解性リンカーである。非分解性リンカーの例は、N-スクシンイミド-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）を含むが、これらに制限されない。通常、そのようなリンカーを含むADCは、細胞内で内在化されなければならない、ADCの抗体部分は、細胞内リソソームプロテアーゼによって分解され、薬物活性分子を放出する。

【0130】

更なるいくつかの実施形態において、本発明の式（I）のリンカーは、分解性リンカーである。そのようなリンカーを含むADCの薬物放出は、リンカー中の切断部位の性質によって誘発される。従って、そのようなリンカーの切断部位は、標的治療部位（例えば、腫瘍細胞リソソーム及び/又は腫瘍環境）の特性に応じて設計されてもよい。ほとんどの場合、分解性リンカーは、コンジュゲート部分、分解性部分、及び任意選択的なスペーサー基部分から構成されてもよい。コンジュゲート部分は、リンカー-薬物への抗体の結合を担っており、所望の抗体カップリング化学に応じて選ばれてもよい。分解性部分は、酵素に基づく放出メカニズム下で、酵素によって認識されるペプチド又はペプチド類似体、例えば、タンパク質分解酵素によって分解され得るVal-Ala、Val-Cit、Phe-Lys、Gly-Phe-Leu-Gly、Ala-Leu-Ala-Leu、Gly-Gly-Phe-Gly、シクロブチル-Ala、シクロブチル-Citなどのオリゴペプチド又はオリゴペプチド類似体を含む。いくつかの場合において、ADCの特性、例えば、血液循環におけるADCの安定性及び/又は標的部位におけるADCの薬効は、リンカー中の酵素切断部位に隣接するペプチド残基の位置に修飾を導入することによって改善することができる。いくつかの場合において、必要に応じて、リンカーの分解性部分と薬物Dの間にスペーサー基を導入することにより、コンジュゲートの残りの部分からの薬物活性分子の放出（特に、無痕放出）を促進することができ、例えば、酸性媒体中で自発的に除去できるパラアミノ安息香酸（PABA）又はアミノメチル（-NHCH₂-）スペーサーである。また、薬物の疎水性が高い場合、いくつかの場合において、ADCの特性を改善するために、例えば沈殿や凝集を減少するためにPEGユニットの添加が考慮されてもよい（但し、必須ではない）。本発明に適したリンカーは、WO2022/170971（当該文献は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されているリンカーを含むが、これらに限定されない。

30

40

【0131】

50

いくつかの実施形態において、本発明の式 (I) におけるリンカー-Lは、以下の式 (II) の構造を有し、

-Z-Y-M- (II)、

そのうち、

Zは、Abに結合するリンカー基であり、

Yは、2個～5個のアミノ酸のペプチド、好ましくはジペプチド、トリペプチド又はテトラペプチドであり、

Mは存在しないか、又は薬物Dに結合するためのスペーサー基である。

【0132】

Zリンカー基

通常、抗体システインのチオ基はジスルフィド結合の形態で存在する。抗体のジスルフィド結合を開けば、遊離スルフヒドリル基をカップリング部位として提供することができる。抗体のスルフヒドリル基にカップリングしてADCを形成する1つの方法は、抗体上の遊離スルフヒドリル基を複素環（例えば、マレイミド類）リンカーとMichael付加反応させることである。別の方法は、脱離基で置換されたヘテロ芳香環を含むリンカーを、抗体分子中の遊離スルフヒドリル基と求核置換反応させて、抗体-薬物コンジュゲートを得ることである。2つの方法はどれも本発明のADCコンジュゲートに適する。従って、本発明によるリンカーは、いくつかの態様において、複素環類（例えば、マレイミド類）又はヘテロアリアル環類（例えば、ピリミジニ類）のZリンカーを含んでもよく、且つ、いくつかの場合において、好ましくは、血液循環中でより高い安定性を有するコンジュゲートを提供するために、ヘテロ芳香環類（例えば、ピリミジニ類）リンカーを含む。

【0133】

いくつかの実施形態において、式 (II) 中のZは、以下の構造を有し、

-Z₁-Z₂-Z₃-Z₄-、

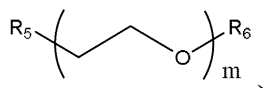
そのうち、Z₁はAbにおける硫黄原子であり、

Z₂は、5員～10員ヘテロシクリル基であり、好ましくはN、S及びOから選ばれる1個又は2個のヘテロ原子を含み、

Z₃は、結合、-C(=O)-、-C₁-C₁₀アルキリデン-C(=O)-、-C₃-C₁₀アルキニレン-C(=O)-、-C₃-C₁₀アルケニレン-C(=O)-、-C₁-C₁₀ヘテロアルキレン-C(=O)-、-C₃-C₈シクロアルキレン-C(=O)-、-O-C₁-C₈アルキリデン-C(=O)-、-アリーレン-C(=O)-、-C₁-C₁₀アルキリデン-アリーレン-C(=O)-、-アリーレン-C₁-C₁₀アルキリデン-C(=O)-、-C₁-C₁₀アルキリデン-C₃-C₈シクロアルキレン-C(=O)-、-C₃-C₈シクロアルキレン-C₁-C₁₀アルキリデン-C(=O)-、-C₃-C₈ヘテロシクリレン-C(=O)-、-C₁-C₁₀アルキリデン-C₃-C₈ヘテロシクリレン-C(=O)-、-C₃-C₈ヘテロシクリレン-C₁-C₁₀アルキリデン-C(=O)-、-ヘテロアリーレン-C(=O)-、-C₁-C₁₀アルキリデン-ヘテロアリーレン-C(=O)-、-ヘテロアリーレン-C₁-C₁₀アルキリデン-C(=O)-から選ばれ、

Z₄は結合、又は以下の式で表されるPEGユニットであり、

【化17】

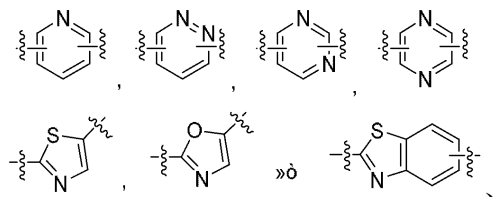


そのうち、R₅はC₁-4アルキリデン基、-NH-、-NH-C₁-4アルキリデン-ヘテロアリアル-から選ばれ、そのうち、ヘテロアリアル基は5員又は6員の窒素含有ヘテロアリアル基、好ましくはトリアゾリル基であり、R₆は-C(=O)-、-C₁-4アルキリデン基、-C₁-4アルキリデン-C(=O)-、-NH-C(=O)-(CH₂OCH₂)-C(=O)-、-C₁-4アルキリデン-NH-C(=O)-(CH₂OCH₂)-C(=O)-であり、そのうち、mは2～12の整数、例えば、m=2、4、6又は8である。

【0134】

一実施形態において、Z₂は5員～10員ヘテロアリール基である。一実施形態において、Z₂は1つ又は複数の水素、ハロゲン、ニトロ基、C₁₋₆アルキル基及びハロC₁₋₆アルキル基で置換されたピリミジン、チアゾール、ベンゾチアゾール、オキサゾール、キナゾリン及びピロロ[2,3d]ピリミジンから独立的に選ばれる群から選ばれる。いくつかの実施形態において、Z₂は以下から選ばれるヘテロアリール基であり、

【化 1 8】



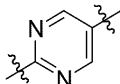
そのうち、Z₂はヘテロ原子に隣接する炭素原子によってZ₁に結合する。好ましい実施形態において、Z₂はピリジニレン基であり、好ましくは

【化 19】



であり、より好ましくは

【化 2 0】

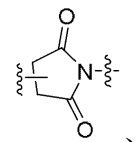


であり、そのうち、左側の波線は Z_1 に結合する位置を表し、右側の波線は Z_3 に結合する位置を表す。

【 0 1 3 5 】

いくつかの実施形態において、 Z_2 はマレイミド基であり、

【化 2 1】



そのうち、左側の波線は Z_1 に結合する位置を表し、右側の波線は Z_3 に結合する位置を表す。

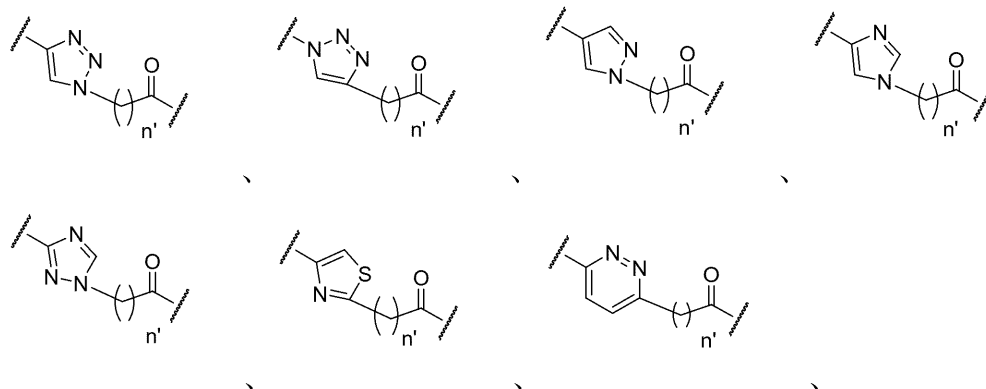
【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態において、Z₃は-C₃-C₈ヘテロシクリレン-C(=O)-、-C₁-C₁₀アルキリデン-C₃-C₈ヘテロシクリレン-C(=O)-、-C₃-C₈ヘテロシクリレン-C₁-C₁₀アルキリデン-C(=O)-であり、好ましくは、そのうち、上記ヘテロシクリレン基における複素環は、トリアゾール、ピラゾール、チアゾール、オキサゾール、イソオキサゾール、又はピリダジンなどの複素芳香環基である。いくつかの実施形態において、Z₃は、-ヘテロアリーレン-C(=O)-、-C₁-C₁₀アルキリデン-ヘテロアリーレン-C(=O)-、-ヘテロアリーレン-C₁-C₁₀アルキリデン-C(=O)-である。

【 0 1 3 7 】

いくつかの実施形態において、Z₃は-ヘテロアリーレン-C₁-C₁₀アルキリデン-C(=O)-であり、特に、

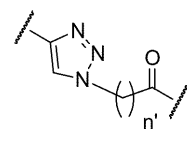
【化 2 2】



10

そのうち、 n' は1～6であり、好ましくは、 Z_3 は

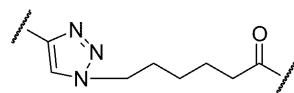
【化 2 3】



20

より好ましくは

【化 2 4】



であり、

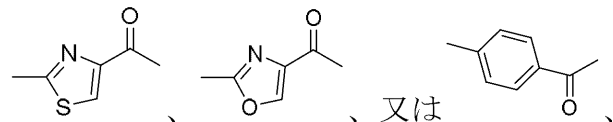
そのうち、左側の波線は Z_2 に結合する位置を表し、右側の波線は Z_4 に結合する位置を表し、且つそのうち好ましくは、 Z_2 はピリミジニレン基である。

【0 1 3 8】

30

いくつかの実施形態において、 Z_3 はアリーレン-又はヘテロアリーレニル- $C(=O)-$ であり、特に、

【化 2 5】



そのうち、 Z_3 は $-C(=O)-$ によって Z_4 に結合し、且つそのうち好ましくは、 Z_2 はピリミジニレン基である。

40

【0 1 3 9】

別のいくつかの実施形態において、 Z_3 は $-(C\equiv C)-C_{1-5}$ アルキリデン- $C(=O)-$ 、 $-(CH=CH)-C_{1-5}$ アルキリデン- $C(=O)-$ 、 $-C_{1-6}$ アルキリデン- $C(=O)-$ 、又は $-C_{3-8}$ シクロアルキレン- $C(=O)-$ であり、そのうち、 Z_3 は $-C(=O)-$ によって Z_4 に結合する。

【0 1 4 0】

いくつかの好ましい実施形態において、 Z_2 はピリミジニレン基であり、 Z_3 は $-C(=O)-$ である。

【0 1 4 1】

いくつかの好ましい実施形態において、 Z_2 はピリミジニレン基であり、 Z_3 は $-(C\equiv C)-$

50

) -C₁₋₅アルキリデン-C(=O)-又は-(CH=CH)-C₁₋₅アルキリデン-C(=O)-、特に、-(C≡C)-C₁₋₅アルキリデン-C(=O)-である。

【0142】

いくつかの好ましい実施形態において、Z₂はマレイミド基であり、Z₃は-C₁₋₆アルキリデン-C(=O)-、又は-C₃₋₈シクロアルキレン-C(=O)-である。

【0143】

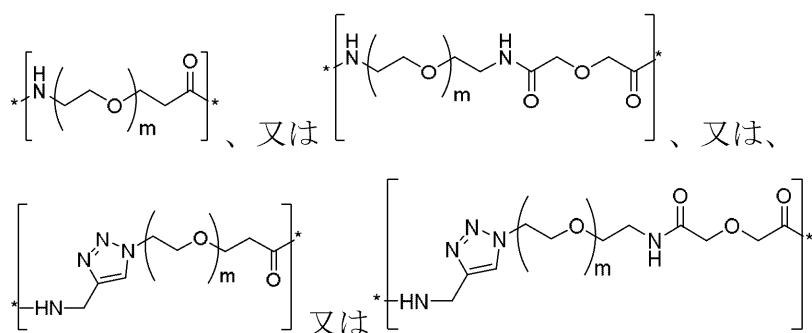
いくつかの実施形態において、Z₄は結合であり、Z₃は式(II)におけるYに直接に結合する。

【0144】

いくつかの実施形態において、Z₄は2個～12個のPEGを含むユニットである。いくつかの実施形態において、Z₄は

10

【化26】



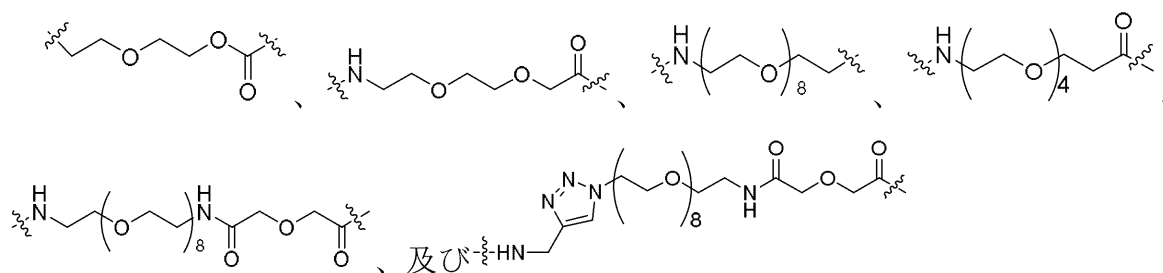
20

であり、そのうち、m=1～8、例えば、2、3、4、5、6、7又は8である。

【0145】

いくつかの実施形態において、Z₄は、

【化27】



30

から選ばれ、そのうち、左側の波線はZ₃に結合する位置を表し、右側の波線は式IIにおけるYに結合する位置を表す。

【0146】

いくつかの実施形態において、式(I)における本発明のZは、以下の構造

【化28】



40

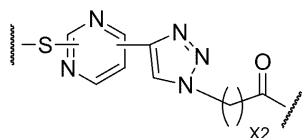
を有し、そのうち、x₁=1～8、例えば、x₁=3である。

【0147】

いくつかの実施形態において、式(I)における本発明のZは、以下の構造

50

【化 2 9】



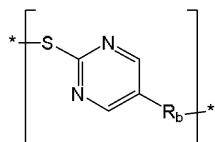
を有し、そのうち、 $x_2 = 1 \sim 6$ である。

【0 1 4 8】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明の式 (I) における Z は以下の構造を有する：

10

【化 3 0】

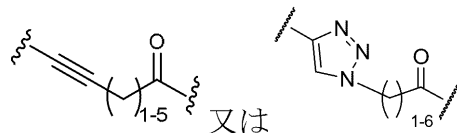


そのうち、S は Ab における硫黄原子であり、且つ R_b は非置換若しくは置換された $-C_{3-10}$ アルキニル- $C(=O)-$ 又は $-C_{3-10}$ アルケニル- $C(=O)-$ 又は $-$ ヘテロアリーレン- C_1-C_{10} アルキリデン- $C(=O)-$ 、

好ましくは、 R_b は、

20

【化 3 1】



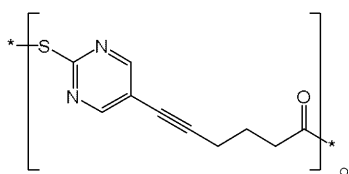
であり

そのうち、左側の波線はピリミジニル基に結合する位置を表し、右側の波線は Y に結合する位置を表し、

より好ましくは、Z は以下の構造を有する、

30

【化 3 2】

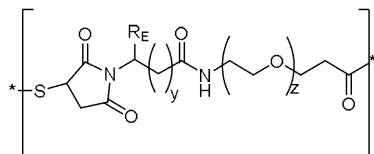


【0 1 4 9】

いくつかの実施形態において、式 (I) における本発明の Z は、以下の構造

【化 3 3】

40



を有し、そのうち、 R_E は水素、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アミノアルキル基、 C_{1-6} ハロアルキル基、 C_{1-6} ヒドロキシアルキル基であり、そのうち、 $y = 0 \sim 4$ 、例えば、0、2、又は 5 であり、そのうち、アルキル基、アミノ基及びヒドロキシ基部分は任意選択的に置換され、いくつかの実施形態において、 R_E は任意選択的に置換されたアミノアルキル基であり、例えば、 $-C_{1-4}$ アルキリデン- NH_2 、 $-C_{1-4}$ アルキリデン NHR_F 及び $-C_{1-4}$ アルキリ

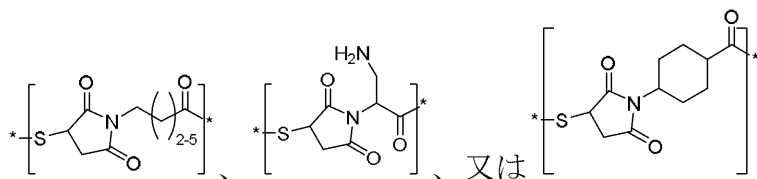
50

デンN(R_F)₂により置換され、そのうち、各R_FはC₁₋₆アルキル基及びC₁₋₆ハロアルキル基から独立的に選ばれ、又は2つのR_F基がそれらが結合する窒素と組合せてアゼチジニル基、ピロリジニル基又はピペリジニル基を形成する。

【0150】

いくつかの実施形態において、式(1)における本発明のZは、以下の構造

【化34】



10

を有する。

【0151】

Yペプチド含有ユニット

ADCの非標的毒性を制限又は最小化にし、同時に標的腫瘍部位での毒素分子の放出を保証する目的のため、いくつかの態様において、腫瘍細胞を高い選択性で標的としながら、腫瘍細胞又は環境中のタンパク質分解酵素（特に、血液と比較して、腫瘍細胞及び/又は腫瘍環境において顕著により高い活性を有する酵素）によって分解され得るように抗体-薬物コンジュゲートを設計することが有利である。この目的のために、そのようなタン

20

【0152】

一実施形態において、従って、本発明のリンカーの一部であるYユニットは、ペプチド含有分解性部分、例えば、2つ又は複数の（例えば、2個～12個、例えば、2個、3個、4個、5個、又は6個）の連続又は非連続アミノ酸を含有する分解性ペプチドリンカーである。ペプチド含有ユニットの各アミノ酸は、天然アミノ酸又は非天然アミノ酸、例えば、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、アスパラギン、ヒスチジン、グリシン、グルタミン酸、グルタミン、フェニルアラニン、リジン、置換されたリジン、ロイシン、セリン、チロシン、トレオニン、イソロイシン、プロリン、トリプトファン、バリン、システイン、メチオニン、セレノシステイン、オルニチン、β-アラニン、シトルリン、及びそれらの誘導体からなる群より互いに独立的に選ばれることができる。いくつかの実施形態において、各アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、アスパラギン、ヒスチジン、グリシン、グルタミン酸、グルタミン、フェニルアラニン、リジン、ロイシン、セリン、チロシン、トレオニン、イソロイシン、プロリン、トリプトファン、バリン、システイン、メチオニン、及びそれらの誘導体から独立的に選ばれる。いくつかの実施形態において、各アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、アスパラギン、ヒスチジン、グリシン、グルタミン酸、グルタミン、フェニルアラニン、リジン、ロイシン、セリン、チロシン、トレオニン、イソロイシン、プロリン、トリプトファン、及びバリン、N-メチルグリシン、β-アラニン、並びにそれらの誘導体から独立的に選ばれる。いくつかの態様において、ADCが腫瘍細胞に内在化した後、Yユニット中のアミド結合は、腫瘍細胞のリソソーム中の酵素によって認識され、そして分解され、薬物部分Dを放出する。別の態様において、Yユニット中のアミド結合は、腫瘍環境中の酵素によって認識され、そして分解され、薬物部分Dを放出することができる。腫瘍分布に偏った抗体-薬物コンジュゲートを設計することにより、このようなY-ペプチド含有ユニットを有するリンカーは、腫瘍細胞及び環境における毒素分子の放出を促進する。

30

40

【0153】

いくつかの実施形態において、Yは、Val-Cit、Phe-Lys、Val-Ala、Val-Lys-Gly、Ala-Ala-Ala、Val-Ala、Gly-Phe-Leu-Gly、Ala-Leu-Ala-Leu、Gly-Gly-Phe-Gly、シクロブチル-Ala、シクロブチル-Citからなる群から選ばれるユニットを含む。

50

いくつかの実施形態において、Yは、Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Cit-Val、Val-Ala、Lys-Val、Val-Lys (Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys (Ac)、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asnからなる群から選ばれるユニットを含む。

【0154】

いくつかの好ましい実施形態において、Yは置換されたリジンを含むジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドである。一実施形態において、上記置換されたリジンは以下のとおりであり、

【化35】



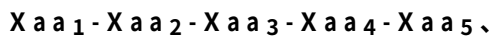
10

そのうち、R₃及びR₄は互いに独立的に、H、C₁₋₆アルキル基、-CO-NH₂、-CONH (C₁₋₆アルキル)、及び-CONH (C₁₋₆アルキル)₂から選ばれ、そのうち、上記アルキル基はハロゲン、C₁₋₆アルコキシ基、C₁₋₆ハロアルキル基、C₃₋₆シクロアルキル基、6員～10員アリール基及び5員～14員ヘテロアリール基から選ばれる基で任意選択的に置換される。

20

【0155】

いくつかの好ましい実施形態において、Yは、N末端からC末端まで、以下の式のアミノ酸配列を有するペプチドであり、



そのうち、Xaa₁は存在しないか、又はバリン、グリシン、アラニン及びグルタミン酸から選ばれるアミノ酸であり、

Xaa₂はフェニルアラニン、ロイシン、アラニン及びバリンから選ばれるアミノ酸であり、好ましくは、バリンであり、

30

Xaa₃は非置換又は置換されたリジンであり、

Xaa₄はロイシン、グリシン及びアラニンから選ばれるアミノ酸であり、

Xaa₅は存在しないか、又はグリシン及びアラニンから選ばれるアミノ酸であり、

そのうち、上記アミノ酸配列は、N末端がリンカーのZユニットに結合し、且つC末端がMユニットに結合するか、又は薬物Dに直接に結合し、

好ましくは、Xaa₃は、ε-アミノ基がC₁₋₃アルキル基で一置換又は二置換されたリジンであり、

より好ましくは、Yは、Phe-Lys-Gly、Leu-lys-Gly、Gly-Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Ala、Val-Lys-Leuからなる群から選ばれるペプチドであり、そのうち、Lys残基は非置換であるか、若しくはC₁₋₃アルキル基で一置換又は二置換されたリジンである。

40

【0156】

Mスペーサー基

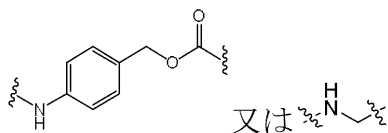
いくつかの実施形態において、本発明のADCコンジュゲートは、放出可能なペプチド含有ユニット (Y) と薬物 (D) の間にスペーサー基 (M) を有する。スペーサー基は、ペプチド含有ユニット (Y) の薬物Dへの結合を促進する官能基であってもよく、又はコンジュゲートの残りからの薬物Dの放出を更に促進する付加的な構成成分 (例えば、自己分解性基、例えば、p-アミノベンズアルデヒド (PAB) 成分) を提供することができる。

【0157】

いくつかの実施形態において、Yと薬物Dユニットとの間を結合するMスペーサー基は、

50

【化 3 6】



から選ばれてもよく、且つ好ましくは

【化 3 7】



10

であり、

そのうち、左側の波線はYへの結合を表し、右側の波線は薬物Dユニットへの結合を表す。

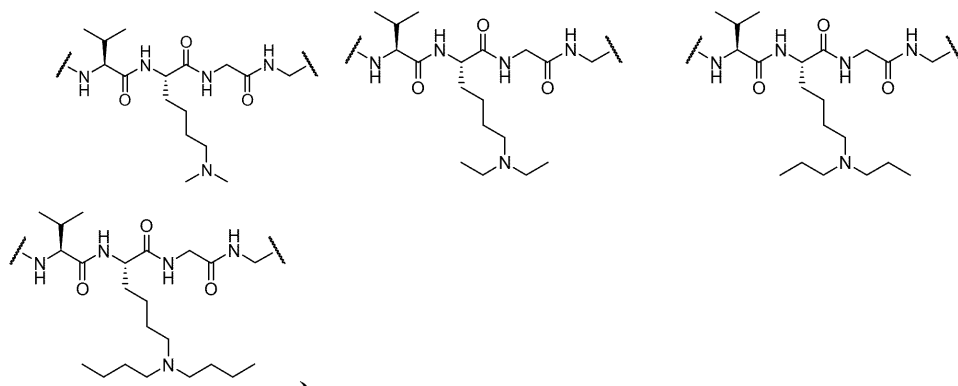
【 0 1 5 8 】

別のいくつかの実施形態において、Mは共有結合であり、式IにおけるYと薬物Dの間は、アミド結合によって直接結合される。

【 0 1 5 9 】

好ましい実施形態において、リンカーLにおけるY-Mユニットは、以下の構造を含む：

【化 3 8】

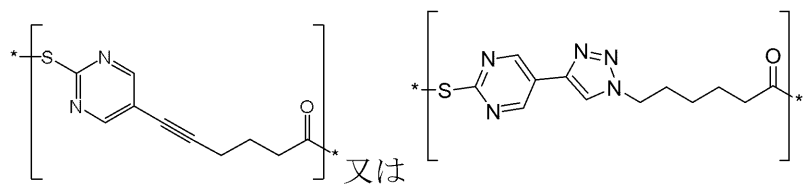


20

30

且つ好ましくは、上記Y-Mユニットは、以下のZユニット、

【化 3 9】



40

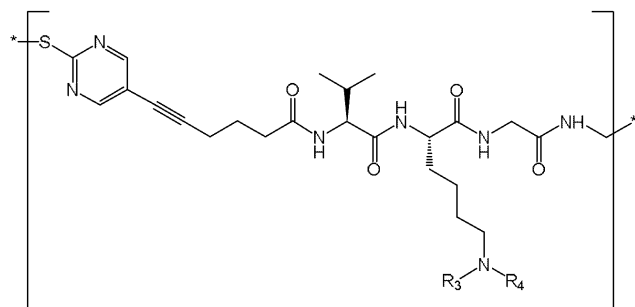
に結合する。

【 0 1 6 0 】

例示的なリンカーL

いくつかの好ましい実施形態において、本発明の式（I）におけるLは、以下の構造を含むリンカーである：

【化 4 0】



10

そのうち、 R_3 及び R_4 は、それぞれ独立的にメチル基、エチル基、プロピル基から選ばれる。

【0161】

いくつかのより好ましい実施形態において、 R_3 及び R_4 は何れもメチル基であり、又は R_3 及び R_4 は何れもエチル基であり、又は R_3 及び R_4 は何れもプロピル基である。

【0162】

いくつかの実施形態において、本発明の式IのL-Dユニットは、Abの軽鎖及び/又は重鎖の遊離システインのスルフヒドリル基とのチオエーテル結合の形成によって抗体に結合する。

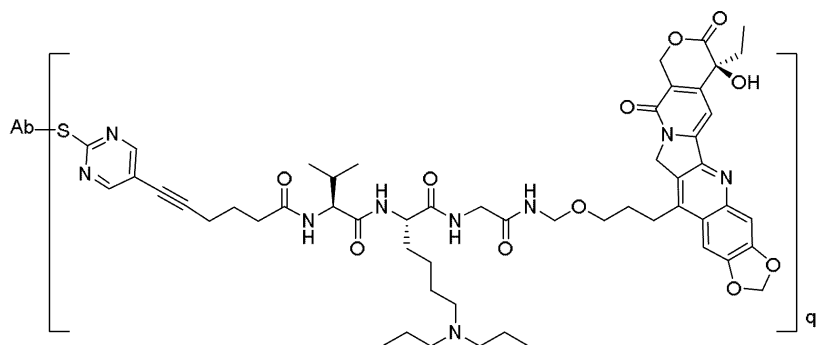
20

【0163】

例示的なADCコンジュゲート

いくつかの実施形態において、本発明は、以下の構造を有するADCコンジュゲート又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物を提供し、

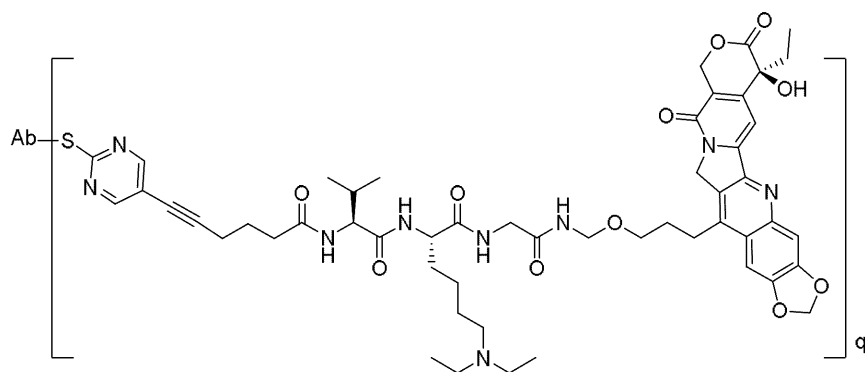
【化 4 1】



30

又は

【化 4 2】

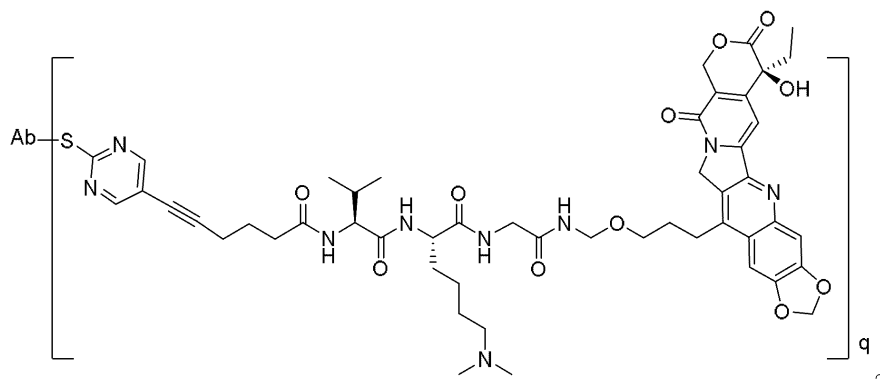


40

又は

50

【化 4 3】



10

そのうち、 q は、1～20の平均DAR値、例えば、約2、3、4、6及び8の平均DAR値を表す。

【0164】

いくつかの実施形態において、本発明によるADCは、以下の利点の少なくとも1つ又は複数を有し、

- ADCの血液循環における分布に対して、腫瘍環境へのADCの分布及び濃縮を顕著に促進し、
- 血漿中のペイロードの早期放出を効果的に制限し、比較的高い血液循環安定性を有し、
- 腫瘍環境において、毒性薬物の活性形態の効果的な放出を提供することができ、
- 動物に高効率のインビボ腫瘍殺傷効果を付与し、及び
- 良好な動物耐性。

20

【0165】

更なるいくつかの実施形態において、本発明によるADCは、更に以下の利点の少なくとも1つ又は複数を有してもよく、

- 毒素-リンカーの添加は、凝集を誘導せず、且つ、高い薬物負荷を実現することができ、DARは、最大8に達することができ、及び
- 許容されるPK特性。

30

【0166】

II. 抗体-薬物コンジュゲートの調製

抗体-薬物コンジュゲートの生成は、当業者に公知の任意の技術によって完成することができる。いくつかの態様において、薬物-リンカーの抗体とのカップリングは、抗体のアミノ酸残基との反応によって完成される。いくつかの実施形態において、脱離基を有するヘテロアリアルリンカーLを適用し、薬物Dを抗体のシステイン残基にカップリングして、本発明の式Iのコンジュゲートを調製する。いくつかの実施形態において、抗体を還元剤、例えばトリス（2-ヒドロキシエチル）ホスフィン（TCEP）で処理する条件を制御することによって、抗体の鎖間ジスルフィド結合を破壊し、且つ遊離スルフヒドリル基をヘテロアリアルリンカー-薬物とのカップリングに使用するために露出させることができる。IgG1タイプ抗体では、最大で4つの結合したジスルフィド結合を還元することができる。これにより、カップリングのために最大で8個の反応性スルフヒドリル基を生成する。この方法によって調製されるコンジュゲートは、抗体分子当たり0個、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個又は8個の薬物を含むことができる。

40

【0167】

調製されたコンジュゲートが、異なる薬物コンジュゲート部位及び/又は数を有するコンジュゲート組成物である場合、コンジュゲートの薬物負荷は、抗体当たりの薬物分子の平均数である平均DARによって表される。産生された抗体-薬物コンジュゲート組成物の調製における抗体当たりの薬物の平均数は、質量分析、ELISA測定、及びHPLCなどの従来の手段によって特徴付けることができる。別のいくつかの実施形態において、 q で表さ

50

れる抗体-薬物コンジュゲートの定量的分布も決定することができる。qが特定の値である均質な抗体-薬物コンジュゲートの、他の薬物負荷量を有する抗体-薬物コンジュゲートからの分離、精製、及び特徴付けは、逆相HPLC又は電気泳動などの手段によって実現することができる。

【0168】

従って、本発明の一態様において、qは、単一の抗体（Ab）にカップリングしている薬物-リンカー（L-D）部分の数を表し、且つ、好ましくは、1～16、1～12、1～10、又は1～8の整数である。この場合、単独のADCコンジュゲートは、ADC化合物と呼ばれることもできる。本明細書の何れかの実施形態において、本発明によるADC化合物には、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個又は16個の薬物リンカー部分が単独の抗体にカップリングすることができる。

10

【0169】

本発明の別の態様において、qは、調製されたコンジュゲート組成物の平均DARを表す。この場合において、qは、1～約16、1～約12、1～約10、又は1～約8、2～約16、2～約12、2～約10、又は2～約8の範囲内の整数又は小数であってもよい。いくつかの態様において、qは、約3の平均DARを表す。いくつかの態様において、qは、約6の平均DARを表す。いくつかの態様において、qは、約8の平均DARを表す。

【0170】

III. 医薬組成物

20

いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるADCの何れか、若しくはその薬学的に許容されるその塩又は溶媒和物を含む組成物を提供し、好ましくは、組成物は医薬組成物又は医薬製剤である。一実施形態において、上記組成物は、更に薬用補助材料を含む。一実施形態において、組成物、例えば医薬組成物は、本発明のADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物と、1種又は複数種の他の治療剤との組合せを含む。

【0171】

本発明は、本発明のADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物の組合せ（医薬組成物を含む）を更に含む。これらの組成物は、緩衝剤を含む当分野で公知の薬用ベクター、薬用賦形剤などの適切な薬用補助材料を更に含んでもよい。

30

【0172】

本明細書で使用されるように、「薬用ベクター」は、生理学的に適合性のある任意の及び全ての溶媒、分散媒体、等張化剤、及び吸収遅延剤などを含む。

【0173】

薬用補助材料の使用及びその用途について、「Handbook of Pharmaceutical Excipients」、第8版、R.C.Rowe、P.J.Seskey及びS.C.Owen、Pharmaceutical Press、London、Chicagoも参照されたい。

【0174】

本発明の組成物は、複数種の形態であってもよい。これらの形態は、例えば、液態溶液剤（例えば、注射用溶液剤及び注入可能な溶液剤）、粉末剤又は懸濁剤、リポソーム剤及び座剤などの液体、半固体及び固体剤形を含む。好ましい形態は、所期の投与様式及び治療用途によって決められる。

40

【0175】

本明細書に記載されるADCを含む薬物は、好ましくは、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で、所望の純度を有する本発明のADC、若しくはその薬学的に許容される塩又は溶媒和物を、1つ又は複数の任意の薬用補助材料と混合することによって調製することができる。

【0176】

本発明の医薬組成物又は製剤は、治療される特定の適応症に必要とされる、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有する1種以上の活性成分を更に含むことができ

50

る。例えば、理想的には、化学療法剤、血管新生阻害剤、サイトカイン、細胞傷害性剤、他の抗体、小分子薬物、又は免疫調節剤（例えば、免疫チェックポイント阻害剤又はアゴニスト）などを含む、他の治療剤も更に提供する。上記活性成分は、目的の用途に有効な量で、適切に組合せて存在する。

【0177】

持続放出製剤を調製することができる。持続放出製剤の適切な実例には、抗体含有の固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、上記マトリックスは、フィルム又はマイクロカプセルなどの形態の成形物品である。

【0178】

IV. 医薬組合せ及びキット

いくつかの実施形態において、本発明は、本発明の又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物、及び1種又は複数種の他の治療剤を含む、医薬組合せ又は医薬組合せ製品を更に提供する。

【0179】

本発明の別の目的は、本発明の医薬組合せを含むパーツキットを提供することであり、好ましくは、上記キットは薬物投与ユニットの形態である。これにより、投与レジメン又は薬物投与間隔により投与ユニットを提供することができる。

【0180】

一実施形態において、本発明のパーツキットは、同じパッケージ内に、
- 本発明のADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物を含む医薬組成物を含有する第1の容器と、
- 他の治療剤を含む医薬組成物を含有する第2の容器と、を含む。

【0181】

組合せ製品の各成分の投与方法及び投与順序は、治療待ち疾患及び個体の状況などの要因に応じて、当業者により決定することができる。本発明の組合せ製品は、本発明の治療方法に使用することができる。いくつかの実施形態において、本発明は組合せ製品を提供し、そのうち、上記他の治療剤は、例えば、免疫応答を有効に刺激することにより対象の免疫応答を更に増強、刺激、又はアップレギュレートする治療剤、例えば、抗体である。いくつかの実施形態において、上記組合せ製品は、TF陽性腫瘍の予防又は治療のために使用される。

【0182】

本発明の抗TF抗体

配列独特性及び高い抗原結合特異性を有する抗体配列をスクリーニングすることによって、更に得られた抗体の、親和性、エンドサイトーシス活性、シグナル経路の遮断、凝血の影響、安定性、薬物動態学などを含む特性を評価することにより、本発明者らは、優れた特性を有する本発明のヒト化抗TFモノクローナル抗体を同定する。本発明の抗体は、TF陽性腫瘍細胞に対する高い結合親和性及び高い特異性を示し、腫瘍細胞に迅速、効率的にエンドサイトーシスされるだけでなく、且つTF媒介性凝血に対する影響が小さいため、単独で、又は他の抗癌薬物と組合せて、癌の治療のために好適であるだけでなく、癌組織を標的とする新規な抗癌分子を形成するための分子成分としても好適である。

【0183】

従って、いくつかの態様において、本発明は、複数種の優れた特性を有するヒト化抗TFモノクローナル抗体、それをコードする核酸、上記核酸を含むベクター及び宿主細胞、並びに上記抗体を含む免疫複合体、多重特異性抗体、医薬組成物及び用途を更に提供する。

【0184】

I. 本発明の抗体及びその特性

以下、本発明の抗TF抗体及びその特性について詳しく説明する。当業者に理解されるように、文脈が明確に反対の指示がない限り、この部分に記載された任意の抗体の技術的特徴（構造的特徴及び特性特徴を含む）及びそれらの任意の組合せは、本発明のADCコ

10

20

30

40

50

ンジュゲートのAbユニットである本発明の抗体にも同様に適用可能である。

【0185】

本発明の抗TF抗体

本発明は、TF、好ましくはヒトTFタンパク質に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片、特にヒト化抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0186】

いくつかの実施形態において、本発明により提供される抗TF抗体又はその抗原結合断片は、

(i) 配列番号1に示される重鎖可変領域のHCDR1、2及び3配列、並びに配列番号2に示される軽鎖可変領域のLCDR1、2及び3配列、或いは

10

(ii) 配列番号3に示される重鎖可変領域のHCDR1、2及び3配列、並びに配列番号4に示される軽鎖可変領域のLCDR1、2及び3配列、或いは

(iii) 配列番号5に示される重鎖可変領域のHCDR1、2及び3配列、並びに配列番号6に示される軽鎖可変領域のLCDR1、2及び3配列、或いは

(iv) 配列番号7に示される重鎖可変領域のHCDR1、2及び3配列、並びに配列番号8に示される軽鎖可変領域のLCDR1、2及び3配列、或いは

(v) (i) ~ (iv) の何れか1つのCDR組合せの変異体であって、好ましくは、上記変異体が6つのCDR領域にわたって合計1個~10個のアミノ酸変更（挿入、欠失及び/又は置換を含むが、これらに限定されず、好ましくはアミノ酸置換、好ましくは保存的置換）を含み、且つ好ましくは、重鎖CDR3が不変のままである、変異体を含む。

20

【0187】

好ましくは、上記CDRは、Kabat若しくはIMGT又はそれらの組合せに従って定義され、より好ましくはIMGTに従って定義される。上記CDRは、当該分野で公知の任意の他の方法で定義されてもよい。

【0188】

いくつかの実施形態において、本発明による抗TF抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域の3つの相補性決定領域HCDR、及び軽鎖可変領域の3つの相補性決定領域LCDRを含み、そのうち、

(i) Chothiaに従って定義すると、HCDR1は配列番号9のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号10のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号11のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号21のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号22のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号23のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

30

(ii) AbMに従って定義すると、HCDR1は配列番号12のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号13のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号14のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号24のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号25のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号26のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

40

(iii) Kabatに従って定義すると、HCDR1は配列番号15のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号16のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号17のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号27のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号28のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号29のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iv) IMGTに従って定義すると、HCDR1は配列番号18のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号19のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号20のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号30のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号31のアミノ酸配列を含むか又は

50

それからなり、且つLCDR3は配列番号32のアミノ酸配列を含むか又はそれからなる。

【0189】

いくつかの実施形態において、本発明による抗TF抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域の3つの相補性決定領域HCDR、及び軽鎖可変領域の3つの相補性決定領域LCDRを含み、そのうち、

(i) Chothiaに従って定義すると、HCDR1は配列番号33のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号34のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号35のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号45のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号46のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号47のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(ii) AbMに従って定義すると、HCDR1は配列番号36のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号37のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号38のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号48のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号49のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号50のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iii) Kabatに従って定義すると、HCDR1は配列番号39のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号40のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号41のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号51のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号52のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号53のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iv) IMGTに従って定義すると、HCDR1は配列番号42のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号43のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号44のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号54のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号55のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号56のアミノ酸配列を含むか又はそれからなる。

【0190】

いくつかの実施形態において、本発明による抗TF抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域の3つの相補性決定領域HCDR、及び軽鎖可変領域の3つの相補性決定領域LCDRを含み、そのうち、

(i) Chothiaに従って定義すると、HCDR1は配列番号57のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号58のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号59のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号69のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号70のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号71のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(ii) AbMに従って定義すると、HCDR1は配列番号60のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号61のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号62のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号72のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号73のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号74のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iii) Kabatに従って定義すると、HCDR1は配列番号63のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号64のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号65のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号75のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号76のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号77のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iv) IMGTに従って定義すると、HCDR1は配列番号66のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号67のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号68のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号78のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号79のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号80のアミノ酸配列を含むか又はそれからなる。

【0191】

いくつかの実施形態において、本発明による抗TF抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域の3つの相補性決定領域HCDR、及び軽鎖可変領域の3つの相補性決定領域LCDRを含み、そのうち、

(i) Chothiaに従って定義すると、HCDR1は配列番号81のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号82のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号83のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号93のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号94のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号95のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

10

(ii) AbMに従って定義すると、HCDR1は配列番号84のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号85のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号86のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号96のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号97のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号98のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

20

(iii) Kabatに従って定義すると、HCDR1は配列番号87のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号88のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号89のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号99のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号100のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号101のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、或いは

(iv) IMGTに従って定義すると、HCDR1は配列番号90のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR2は配列番号91のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、HCDR3は配列番号92のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR1は配列番号102のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、LCDR2は配列番号103のアミノ酸配列を含むか又はそれからなり、且つLCDR3は配列番号104のアミノ酸配列を含むか又はそれからなる。

30

【0192】

いくつかの実施形態において、本発明による抗TF抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、上記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号1に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、或いは

(ii) 配列番号3に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、或いは

40

(iii) 配列番号5に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、

(iv) 配列番号7に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0193】

いくつかの実施形態において、本発明による抗TF抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、軽鎖可変領域は、

(i) 配列番号2に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、或いは

(ii) 配列番号4に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%

50

、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、或いは
(iii) 配列番号6に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%
、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、
(iv) 配列番号8に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%
、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0194】

いくつかの実施形態において、本発明による抗TF抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、上記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号1に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、或いは

(ii) 配列番号3に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び/又は、そのうち、上記軽鎖可変領域は、

(i) 配列番号2に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、或いは

(ii) 配列番号4に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0195】

いくつかの実施形態において、本発明による抗TF抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、上記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号5に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、或いは

(ii) 配列番号7に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び/又は、そのうち、上記軽鎖可変領域は、

(i) 配列番号6に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、或いは

(ii) 配列番号8に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0196】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明による抗TF抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、上記重鎖可変領域は、配列番号1に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つそのうち、上記軽鎖可変領域は、配列番号2に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。好ましくは、上記抗体又は抗原結合断片は、配列番号1の重鎖可変領域及び配列番号2の軽鎖可変領域を含む。

【0197】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明による抗TF抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、上記重鎖可変領域は、配列番号3に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つそのうち、上記軽鎖可変領域は、配列番号4に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。好ましくは、上記抗体又は抗原結合断片は、配列番号3の重鎖可変領域及び配列番号4の軽鎖可変領域を含む。

【0198】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明による抗TF抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、上記重鎖可変領域は、配列番号5に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つそのうち、上記軽鎖可変領域は、配列番

号6に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。好ましくは、上記抗体又は抗原結合断片は、配列番号5の重鎖可変領域及び配列番号6の軽鎖可変領域を含む。

【0199】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明による抗TF抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、そのうち、上記重鎖可変領域は、配列番号7に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つそのうち、上記軽鎖可変領域は、配列番号8に示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。好ましくは、上記抗体又は抗原結合断片は、配列番号7の重鎖可変領域及び配列番号8の軽鎖可変領域を含む。

10

【0200】

いくつかの実施形態において、本発明による抗TF抗体又はその抗原結合断片は、本発明の例示的な抗体2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1、及び27H8H3-hz1の何れか1つの重鎖及び軽鎖可変領域配列又はその変異体、例えば、上記例示的な抗体の1つと同じCDR配列を有すると共に、相同又は相異のフレームワーク領域配列を有する抗体を含む。好ましくは、上記抗体はヒト化抗体である。より好ましくは、上記抗体の重鎖可変領域は、ヒト生殖細胞系に由来するフレームワーク領域配列を有する。

【0201】

本発明による抗体は、重鎖定常領域及び/又は軽鎖定常領域を含むことができる。好ましくは、上記重鎖定常領域は、ヒト免疫グロブリンに由来する重鎖定常領域である。好ましくは、上記軽鎖定常領域は、ヒト免疫グロブリンに由来する軽鎖定常領域である。本発明の抗体に含まれる重鎖定常領域は、任意のアイソタイプ又はサブタイプ、例えば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4アイソタイプの重鎖定常領域であってもよい。いくつかの実施形態において、従って、本発明は、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4重鎖定常領域、好ましくはIgG1重鎖定常領域、特にヒトIgG1重鎖定常領域、例えば配列番号106のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗TF抗体を提供する。本発明の抗体に含まれる軽鎖定常領域は、κ軽鎖定常領域又はλ軽鎖定常領域であってよい。いくつかの実施形態において、従って、本発明は、κ軽鎖定常領域又はλ軽鎖定常領域を含む抗TF抗体を提供し、好ましくは、本発明の抗体は、ヒトκ軽鎖定常領域、例えば、配列番号105のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本発明の抗TF抗体又はその断片の重鎖及び/又は軽鎖は、シグナルペプチド配列を更に含む。

20

30

【0202】

いくつかの態様において、本発明は、本明細書に記載される本発明による任意の抗体の変異体、特に本発明の例示的な抗体2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1、及び27H8H3-hz1の何れか1つの変異体を更に提供する。

【0203】

本明細書において、抗体に関連する「変異体」という用語は、所与の親抗体と比較して、少なくとも1個、例えば1個～30個、又は1個～20個、又は1個～10個、例えば1個又は2個又は3個又は4個又は5個のアミノ酸の置換、欠失及び/又は挿入によってアミノ酸変更を有する対象抗体領域を含む抗体を指し、そのうち、変異体は親抗体分子の少なくとも1つの生物学的特性（例えば、抗原結合能）を基本的に維持する。目的抗体領域は、抗体全長、或いは重鎖可変領域若しくは軽鎖可変領域若しくはそれらの組合せ、或いは（1つ又は複数の）重鎖CDR領域若しくは（1つ又は複数の）軽鎖CDR領域若しくはそれらの組合せであってもよい。本発明の具体的、例示的な抗体のこのような変異体は、本発明の考慮に含まれる。

40

【0204】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体変異体は、好ましくは、変更又は修飾を導

50

入する前の親抗体の生物活性の少なくとも60%、70%、80%、90%若しくは100%を保持する（例えば、基本的に同じ抗原結合能及び/又は受容体エンドサイトーシス活性、或いは凝血に対する影響度が基本的に同じである）。本発明による抗体の重鎖可変領域若しくは軽鎖可変領域或いは各CDR領域若しくはフレームワーク領域は、本発明の抗体変異体を生成するために、何れも単独で又は組合せて変更できることが理解されるべきである。また、本発明による抗体のFc領域を変更することもできる。Fc領域の変更は、単独で行われるか、又はフレームワーク領域及び/又はCDR領域及び/又は重鎖可変領域及び/又は軽鎖可変領域上の変更と組合せて行われることができる。Fc領域は、抗体分子の具体的な適用に応じて、例えば、1種又は複数種の変更されたエフェクター機能、例えば、変更された血清半減期、補体固定、Fc受容体結合、及び/又は抗原依存性細胞傷害を抗体に付与するために、選択的に変更することができる。また、本発明の抗体に対して、化学修飾（例えば、PEGに結合）又はそのグリコシル化パターンの変更を行ってもよい。

10

【0205】

いくつかの実施形態において、本発明の例示的な抗体の何れか1つと比較して、本発明による抗体変異体は、重鎖配列及び/又は軽鎖配列にアミノ酸変更を有する。好ましくは、上記変異体は、重鎖配列又は軽鎖配列又はその両方で、対応する抗体と比較して、少なくとも1個、2個又は3個の、但し20個、10個又は5個を超えないアミノ酸変更、若しくは少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%又はより高い同一性を有するアミノ酸配列を含む。好ましくは、アミノ酸変更はCDR領域で起こらず、より好ましくは、可変領域で起こらない。いくつかの実施形態において、抗体変異体に含まれる少なくとも一部又は全てのアミノ酸は、保存的アミノ酸置換に変更される。「保存的置換」は、あるアミノ酸の化学的に類似するアミノ酸への置換をもたらすアミノ酸変更を指す。保存的置換を実現するために、部位特異的変異誘発及びPCR媒介性変異誘発などの当該分野で公知の標準的方法によって、置換などのアミノ酸修飾を本発明の抗体に導入することができる。

20

【0206】

更なるいくつかの態様において、本発明は、上記の本発明による任意の所与の抗体（特に、本発明の例示的な抗体2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1、及び27H8H3-hz1の何れか1つ）と比較して、(i) 本発明による所与の抗体と同じ又は重複するエピトープに結合すること、(ii) 本発明による所与の抗体とヒト組織因子TFと競合的に結合すること、(iii) 本発明による所与の抗体の、細胞表面にヒト組織因子を発現する細胞への結合を阻害する（例えば、競合的に阻害する）こと、且つ好ましくは、本発明による所与の抗体と同じ又は類似する結合親和性及び/又は特異性を示すこと、といった1つ又は複数の特性を有する抗組織因子（TF）抗体又はその抗原結合断片を更に提供する。

30

【0207】

本明細書において、所与の抗体と「TF抗原に競合的に結合する」抗体は、競合検定において、所与の抗体の抗原TFへの結合の50%又はそれ以上を遮断し、また逆に、所与の抗体が競合検定において、当該抗体の抗原TFへの結合の50%又はそれ以上を遮断する抗体を指す。例示的な競合検定は、「Antibodies」、Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) に記載されている。競合的に結合する抗体は、所与の抗体と同じエピトープ領域、例えば同じエピトープ、隣接エピトープ又は重複エピトープに結合することができる。

40

【0208】

本明細書において、所与の抗体の、その抗原への結合を阻害する（例えば、競合的に阻害する）抗体は、上記所与の抗体の、その抗原への結合の50%、60%、70%、80%、90%若しくは95%以上を阻害する抗体を指し、また逆に、上記所与の抗体はまた、当該抗体の、その抗原への結合の50%、60%、70%、80%、90%若しくは95%以上を阻害する。抗体のその抗原への結合は、結合親和性を用いて判断することができる。親和性を測定する方法は、当該分野で公知である。

50

【0209】

本明細書において、所与の抗体と同じ又は類似する結合親和性及び/又は特異性を示す抗体は、所与の抗体の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%若しくは95%以上の結合親和性及び/又は特異性を有することができる抗体を指す。これは、結合親和性及び/又は特異性を測定するための、当該分野で公知の任意の方法によって測定することができる。

【0210】

いくつかの実施形態において、本発明による抗体はIgG1抗体、更に特に、IgG1 κ 又はIgG1 λ アイソタイプである。更に好ましくは、本発明によるIgG1抗体は、ヒトIgG1定常領域、より好ましくはヒトIgG1 κ アイソタイプを有する。

【0211】

本発明の抗TF抗体の特性

本発明の抗TF抗体は、以下の1つ又は複数の特性を有する。

- (i) 高い親和性でヒトTF細胞外ドメインに結合すること、
- (ii) 高い親和性でTF陽性腫瘍細胞に結合すること、
- (iii) カニクイザルTFと交差反応性を有すること、
- (iv) TF受容体媒介性エンドサイトーシス活性を有すること、
- (v) TF陽性細胞におけるTF/FVIIa複合体媒介性下流シグナル経路を遮断すること、

及び

- (vi) 細胞表面TFによって開始される凝血は、基本的に影響を及ぼさないか、又は低下した凝血の影響を有すること。

【0212】

いくつかの態様において、本発明の抗体はTFに対して高い結合親和性及び高い結合特異性を有する。FACS又はELSA測定（例えば、実施例に記載される測定）によって、TF細胞外ドメイン及び/又はTF陽性腫瘍細胞に対する本発明の抗体の結合EC50値を決定することができる。或いは、バイオフィルム層干渉技術によって、抗体の結合親和性及び特異性を特徴付けるために、抗体の結合動態パラメータを決定することができる。いくつかの実施形態において、バイオフィルム層干渉技術（BIL）測定によって、本発明の抗TF抗体が、 10^{-7} Mより小さい K_D 値を有し、例えば、約 10^{-8} M又はより小さい K_D 値であり、好ましくは、 5×10^{-8} Mより小さい。別のいくつかの実施形態において、バイオフィルム層干渉技術（BIL）測定によって、本発明の抗体が、約 $10^{-1} \sim 10^{-3} s^{-1}$ の K_d 値、例えば約 10^{-2} 又は約 $10^{-3} s^{-1}$ の K_d 値を有する。好ましくは、実施例に記載されるForteBio測定方法を用いて、 K_D 値及び K_d 値などの抗体の結合動態パラメータを決定し、また、任意選択的に、同じ測定における参照抗体と比較する。いくつかの実施形態において、抗体は、参照抗体と比較して、同じ若しくは類似する又はよりも低い結合動態 K_D 値を有する。別のいくつかの実施形態において、抗体は、参照抗体と比較して、比較的速い解離速度（ K_d 値）を有する。以前の研究は、いくつかの場合において、比較的速い解離速度を有する抗体が、固形腫瘍における抗体の分布を促進するために腫瘍により効率的に浸潤できることを示した。（Influence of Affinity and Antigen Internalization on the Uptake and Penetration of Anti-HER2 Antibodies in Solid Tumors、DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2277を参照）

【0213】

いくつかの実施形態において、本発明の抗TF抗体は、TF陽性腫瘍細胞に強く結合する。細胞ELISA又はフローサイトメトリー測定によって、抗体の細胞結合EC50値（即ち、細胞結合の最大有効濃度の半分）及び/又は最大結合量を測定し、且つ参照抗体と比較して、それにより、抗体の細胞結合親和性を反映することができる。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、NIC-H358細胞又はKYSE50細胞などの少なくとも1つのTF陽性腫瘍細胞に対するEC50値が、参照抗体のEC50値の約50%～約160%、例えば約80%、約90%、約100%、約110%、約120%又は約130%である。

【0214】

いくつかの実施形態において、本発明の抗TF抗体は、ヒト及びサルTFに対する交差反応性を示す。いくつかの実施形態において、本発明の抗体のヒトTFへの結合 K_D 値は、上記抗体のサルTFへの結合 K_D 値にほぼ相当し、例えば、両者の K_D 比は、1～10の間、例えば1～5の間であり、より好ましくは約1～3の間である。更なる実施形態において、上記抗体のヒトTFへの結合 K_d 値は、上記抗体のサルTFへの結合 K_d 値にほぼ相当し、例えば、両者の K_d 比は1～10の間、例えば1～5の間であり、より好ましくは約1～3の間である。

【0215】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、TF受容体媒介性エンドサイトーシス活性を有する。細胞に基づく測定試験において、例えば実施例に記載される測定試験において、抗体のエンドサイトーシス活性の評価を行うことができる。いくつかの実施形態において、TF陽性細胞に基づく測定試験において、抗体のエンドサイトーシス率を決定するために、測定待ち抗体をTF陽性細胞（特にTF陽性腫瘍細胞）と、37℃で一定の時間（例えば、2時間又は4時間）にわたってインキュベートした後、4℃で同じ時間保持された陰性対照と比較して、フローサイトメトリーによって、細胞表面に結合したTF抗体量の変化を蛍光検出する。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、参照抗体と比較して基本的に同等する又はより優れたエンドサイトーシス率を有する。別のいくつかの実施形態において、同等の測定条件下で、本発明の抗体のエンドサイトーシス率は、参照抗体のエンドサイトーシス率の約50%～200%又はそれ以上、例えば約70%又はそれ以上、例えば約80%又はそれ以上、好ましくは約100%又はそれ以上、又は約110%又はそれ以上、より好ましくは約120%又はそれ以上、例えば約130%又はそれ以上、約150%又はそれ以上、又は約200%又はそれ以上である。更なるいくつかの実施形態において、本発明の抗体は、参照抗体と比較してより速いエンドサイトーシスを示し、例えば、より短い時間で約30%、40%又は50%のエンドサイトーシスに達する。更なるいくつかの実施形態において、実施例に記載される上記エンドサイトーシス活性の評価の測定試験において、本発明の抗体のエンドサイトーシス率は、例えば、37℃で2時間インキュベートした後、少なくとも10%、例えば、15%～20%、好ましくは、少なくとも25%、例えば20%～35%、更に好ましくは35%以上、例えば、約40%又は45%又はそれ以上である。

【0216】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、凝血に基本的に影響を及ぼさないか、又は低下した凝血の影響を有する。細胞に基づくインビトロ凝血測定試験によって、 Ca^{2+} イオン及びヒト血漿の存在下でのTF陽性細胞によって開始される凝血に対する抗体の干渉作用を検出して、凝血に対する抗体の影響を決定することができる。いくつかの実施形態において、抗体を含まない陰性対照と比較して、本発明の抗体は、細胞表面TFによって開始される凝血に基本的に影響を及ぼさないか、或いは、参照抗体と比較して、低下した凝血の影響を有する。抗体を含まない陰性対照及び/又は参照抗体と比較して、抗体によって引き起こされる凝血時間の変化を検出することができ、それにより凝血に対する抗体の影響を反映する。好ましくは、実施例に記載される凝血測定試験に従って、TF陽性細胞及び高又は低濃度の遊離 Ca^{2+} イオン及び測定待ち抗体を含む溶液に、ヒト血漿を加えた後の405 nmでの吸光度の経時変化を測定し、半分最大OD405の吸光値に達するのに必要な凝血時間（V50）を推定して、抗体のTF媒介性凝血過程への影響を特徴付ける。検出に使用される Ca^{2+} イオンの濃度は、1 mM～5 mM、例えば2 mM及び5 mMから選ばれる1つ又は複数の濃度であってもよい。検出に使用される抗体の濃度は、10 µg/mL～50 µg/mL、例えば20 µg/mL及び50 µg/mLから選ばれる1つ又は複数の濃度であってもよい。いくつかの実施形態において、凝血に対する抗体の影響は、5 mMの Ca^{2+} 及び20 µg/mL抗体の存在下で決定される。別のいくつかの実施形態において、2 mMの Ca^{2+} 及び50 µg/mL抗体の存在下で、凝血に対する抗体の影響を測定する。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの測定条件下で、例えば5 mMの Ca^{2+} 及び20 µg/mL抗体の存在下で、抗体を含まない陰性対照と比較して、抗体によって引き起こされる凝血時間（V50）の遅延が50秒を超えず、好ましくは40秒を超えず、30秒

を超えず、20秒、10秒又は5秒を超えない場合、上記抗体は凝血に基本的に影響を及ぼさないか、又は低下した凝血の影響を有すると考えられる。別のいくつかの実施形態において、少なくとも1つの測定条件下で、例えば5 mMの Ca^{2+} 及び20 $\mu\text{g/mL}$ 抗体の存在下で、参照抗体と比較して、抗体が凝血時間（V50）の遅延をもたらさないか、又は好ましくは、凝血時間（V50）が約10%又はそれ以上、又はより好ましくは約20%若しくは30%若しくは40%又はそれ以上、更により好ましくは約50%若しくは60%又はそれ以上減少される場合、上記抗体は凝血に基本的に影響を及ぼさないか、又は低下した凝血の影響を有すると考えられる。更なるいくつかの実施形態において、少なくとも1つの測定条件下で、例えば2 mMの Ca^{2+} 及び50 $\mu\text{g/mL}$ 抗体の存在下で、参照抗体と比較して、抗体が凝血時間（V50）の遅延をもたらさないか、又は好ましくは、凝血時間（V50）が約10%、20%、若しくは30%又はそれ以上減少される場合、上記抗体は凝血に基本的に影響を及ぼさないか、又は低下した凝血の影響を有すると考えられる。

10

【0217】

更なるいくつかの実施形態において、本発明の抗体は、TF陽性腫瘍細胞におけるTF/FVIIa複合体媒介性下流シグナル経路を遮断する能力を有する。当該経路の活性化によって引き起こされるIL-8放出レベルを検出することによって、当該TF下流シグナル経路に対する抗TF抗体の遮断活性を決定することができる。いくつかの実施形態において、実施例に記載されるシグナル経路遮断活性の評価試験に従って、本発明の抗体はTFシグナル経路に対して阻害作用を示す。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、TFシグナル経路遮断活性 IC_{50} 値が500 ng/mL又は150 ng/mLより小さく、且つ最大阻害率が90%以上、好ましくは95%以上に達する。いくつかの実施形態において、本発明の抗体のTFシグナル経路遮断活性 IC_{50} 値は、参照抗体と相当する（ $\pm 10\%$ ）か又はより小さい。

20

【0218】

更なるいくつかの実施形態において、本発明の抗TF抗体又はその抗原結合断片は、（vii）良好な生産性、（viii）良好な安定性、及び（ix）有利な薬物動態学特性のうちの1つ又は複数の特性を更に有する。

【0219】

いくつかの実施形態において、タンパク質Aアフィニティークロマトグラフィーを用いて組換え哺乳動物細胞により産生された抗体生成物からワンステップで精製された後、SEC-HPLCによって、精製された本発明の抗体は、90%以上の純度に達することができ、且つHIC測定において、良好な親水性を示す。

30

【0220】

更なるいくつかの実施形態において、本発明の抗体は、熱安定性及び繰り返しの凍結融解安定性を含む良好な安定性を有する。いくつかの実施形態において、実施例の加速安定性測定に従って、37℃で3日間～14日間放置した後、本発明の抗体のSEC-HPLC純度（即ち、SEC-HPLCによって測定される抗体モノマー百分率）は何れも、90%以上又は好ましくは95%以上に維持されるか、或いはその低下が5%を超えない又は好ましくは3%を超えない。更なるいくつかの実施形態において、CE-SDS非還元純度（即ち、メインピーク百分率）は何れも、85%以上又は好ましくは90%以上に維持され、CE-SDS還元純度（即ち、LC+HC百分率）が90%又は好ましくは95%以上であるか、或いは上記非還元純度及び還元純度の低下が何れも、5%又は4%を超えない。更なるいくつかの実施形態において、実施例の繰り返しの凍結融解測定に従って、4回～8回の繰り返しの凍結融解後に、本発明抗体のSEC純度は何れも、95%以上に維持されるか、或いは純度の低下が5%を超えないか又は好ましくは3%を超えない。

40

【0221】

更なるいくつかの実施形態において、本発明の抗体は血清安定性を有する。実施例の血清安定性測定試験に応じて、抗体の血清安定性を決定するために、37℃の血清中に一定の時間インキュベートした後のTF抗原に対する抗体の親和性の変化を測定することができる。上記親和性の変化が顕著でない場合、抗体は血清安定性を有すると考えられる。い

50

くつかの実施形態において、本発明の抗体は、ヒト血清中で少なくとも14日間維持することができ、その抗原結合親和性が90%又はそれ以上維持される。

【0222】

II. ポリヌクレオチド、ベクター及び宿主

更なる態様において、本発明は、上記任意の抗TF抗体又はその断片をコードする核酸を提供する。上記核酸を含むベクター、及び上記核酸又は上記ベクターを含む宿主細胞を更に提供する。

【0223】

いくつかの実施形態において、本発明は、上記のTFに結合する抗体の重鎖VH又は軽鎖VL配列に由来する少なくとも1つのCDR領域、及び通常の3つ全てのCDR領域をコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子を提供する。いくつかの更なる実施形態において、本発明は、上記抗TF抗体の重鎖及び/又は軽鎖の完全又は基本的に完全な可変領域配列をコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子を提供する。当業者に明らかなように、コドン縮重のため、各抗体又はポリペプチドのアミノ酸配列は、多種類の核酸配列によってコードされることができる。

【0224】

一実施形態において、本発明は、クローニングベクター及び発現ベクターを含む、本発明の核酸を含む1つ又は複数のベクターを提供する。一実施形態において、ベクターは、真核細胞発現ベクターなどの発現ベクターである。本発明に使用可能なベクターは、ウイルス、プラスミド、コスミド、λファージ又は酵母人工染色体(YAC)を含むが、これらに限定されない。

【0225】

一実施形態において、本発明は、本発明のベクターを含む宿主細胞を提供する。コードされた抗体をクローニング又は発現するためのベクターの適切な宿主細胞は、原核又は真核細胞を含む。例えば、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が必要とされない場合、抗体は細菌において生成されてもよい。大腸菌などの細菌で発現した後、可溶性画分中の細菌細胞ペーストから抗体を単離し、更に精製することができる。更なる実施形態において、宿主細胞は真核細胞である。別の実施形態において、宿主細胞は、酵母細胞、哺乳動物細胞、若しくは抗体又はその抗原結合断片の調製に適した他の細胞から選ばれる。有用な哺乳動物宿主細胞株の実例には、SV40で形質転換されたサル腎CV1株(COS-7)、ヒト胎児腎株(293HEK又は293細胞)、DHFR-CHO細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、並びにY0、NS0及びSp2/0などの骨髓腫細胞株が含まれる。

【0226】

III. 抗体の調製

更なる態様において、本発明は、本発明の抗TF抗体を調製する方法を提供する。

【0227】

一実施形態において、本発明の方法は、抗体の発現に適した条件下で、本発明の抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養することと、任意選択的に上記宿主細胞(又は宿主細胞培地)から上記抗体を回収することと、を含む。抗TF抗体の組換え生成のために、単離された、又は人工合成された、又は組換え合成された、抗体(例えば、上記に記載の抗体)をコードする核酸を、宿主細胞において更にクローニング及び/又は発現するために、1つ又は複数のベクターに挿入することができる。

【0228】

更なる実施形態において、本発明は、以下の1つ又は複数の特性を有する抗TF抗体又はその抗原結合断片、及びその調製方法を更に提供する。

(i) 本発明による何れか1つの抗体と同じ又は重複するエピトープに結合すること、

(ii) 本発明による何れか1つの抗体とヒトTFと競合的に結合すること、

(iii) 本発明による何れか1つの抗体の、細胞表面にヒトTFを発現する細胞への結合を阻害(例えば、競合的に阻害する)すること。

そのうち、上記の本発明による抗体は、特に抗体2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、

22F11H5-hz1又は27H8H3-hz1であり、

好ましくは、上記調製方法は、本発明による抗体を参照として使用し、結合親和性測定試験において、抗体混合物から上記特性を有する抗体をスクリーニングすることを含む。ここで、使用可能な抗体混合物は、TF免疫動物からの抗血清、又は酵母若しくは哺乳動物用の抗体ライブラリーを含むが、これらに限定されない。

【0229】

IV. 測定方法

当該分野で公知の多種類の測定方法によって、本明細書で提供される抗TF抗体を同定し、スクリーニングするか、或いはその物理的/化学的特性及び/又は生物活性を特徴付けることができる。

【0230】

TF抗原に対する抗体の結合を決定するために使用できる好適な方法は、当該分野で公知である。例えば、当業者に公知の従来の技術を用いて、TF細胞外ドメインを含むタンパク質（例えば、融合タンパク質）又はTF陽性腫瘍細胞に対する抗体の親和性を容易に決定することができる。上記方法は、ELISAを用いた測定試験、BIAcore2000機器又はForteBio Octet（登録商標）機器を用いた測定方法、或いは放射性標識された標的抗原を用いた放射性免疫測定試験、或いは本願の実施例に記載される細胞ELISA若しくはFACS技術又はバイオフィルム層干渉技術を含むが、これらに限定されない。本明細書において、好ましくは、親和性パラメータの測定は、実施例に記載される方法に従って、又は基本的に従って行われる。

【0231】

抗体のエンドサイトーシス活性の測定に適する方法は、当該分野で公知である。例えば、細胞に基づく測定において、特にTF陽性腫瘍細胞に基づく測定において、上記細胞表面への抗体の結合後のエンドサイトーシス率を決定することができる。本明細書において、好ましくは、抗体のエンドサイトーシス活性は、実施例に記載される方法に従って、又は基本的に従って行われる。

【0232】

凝血に対する抗体の影響を測定するのに適した方法は、当該分野で公知である。例えば、対照（例えば、陰性対照又は陽性対照）と比較して抗体の存在下での凝血時間などの凝血パラメータの変化を測定することで、凝血に対する抗体の影響を反映することができる。本明細書において、好ましくは、凝血に対する抗体の影響は、実施例に記載される方法に従って、又は基本的に従って行われる。

【0233】

V. 免疫複合体及び免疫融合物

更なる態様において、本発明は、本発明の抗体を異種分子と融合又は複合することにより生成される免疫融合物又は免疫複合体を提供する。

【0234】

一実施形態において、免疫融合物において、本発明の抗体（又はその抗原結合断片）は、異種ペプチド又はポリペプチド分子と直接的に又はアミノ酸リンカーを介して連結される。言及できる異種ペプチド又はポリペプチドは、当該融合に別の機能的活性を付与するタンパク質又はポリペプチド、或いは免疫融合物の精製又は検出を容易にするタグペプチドを含むが、これらに限定されない。

【0235】

一実施形態において、本発明の抗体（又はその抗原結合断片）は、免疫複合体において、治療剤又は診断剤若しくは検出可能な薬剤と複合する。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、全長抗体又は抗体断片の形態で異種分子と複合することができる。複合体において、リンカーにより複合体の異なる実体を共有結合することができる。適切なリンカーには、化学的リンカー又はペプチドリinkerが含まれる。有利なことに、リンカーは、標的部位へ送達した後のポリペプチドの放出を容易にする「切断可能なリンカー」である。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定性リンカー

10

20

30

40

50

、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有のリンカーを使用することができる。

【0236】

治療剤と複合する実施形態において、複合体に適した治療剤は、細胞毒素（例えば、細胞増殖阻害剤又は細胞殺傷剤）、薬物又は放射性同位体を含むが、これらに限定されない。

【0237】

診断剤又は検出可能な薬剤と複合する実施形態において、このような複合体は、疾患又は病症の発症、形成、進行及び/又は重症度をモニタリング又は予測するための臨床検査方法の一部（例えば、特定の療法の効力を決定する）として使用されてもよい。このような診断及び検出は、抗体を検出可能な薬剤にカップリングさせることにより実現でき、上記検出可能な薬剤は、ホースラディッシュペルオキシダーゼなどの複数種の酵素、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンなどの補欠分子族、蛍光物質、発光物質、放射性物質、並びに各種の陽電子放出撮影法において使用するための陽電子放出金属及び非放射性常磁性金属イオンを含むが、これらに限定されない。

【0238】

VI. 多重特異性抗体

更なる態様において、本発明は、TFに特異的に結合する多重特異性（二重特異性を含む）抗体分子を提供する。一実施形態において、多重特異性抗体において、本発明の抗体（又はその抗原結合断片）は、TFに対する第1の結合特異性を形成する。更なる実施形態において、上記多重特異性抗体は、第2の結合特異性を更に含むか、又は2つの異なる分子に対する第2及び第3の結合特異性を更に含む。上記第2、第3の結合特異性は、例えば、腫瘍細胞の表面に発現される別の抗原に対するものであってもよく、又はT細胞の表面に発現される抗原に対するものであってもよい。

【0239】

このような多重特異性分子において、結合特異性は、好ましくは、抗体の「結合部位」又は「抗原結合部位」（抗原に実際的に結合する抗体分子の領域）によって提供される。より好ましくは、抗原結合部位は、抗体の軽鎖可変ドメイン（VL）及び抗体の重鎖可変ドメイン（VH）からなるVH/VL対からなる。

【0240】

VII. 医薬組成物及び医薬製剤

本発明は、抗TF抗体又はその免疫複合体/融合物或いは多重特異性抗体を含む組成物（医薬組成物又は医薬製剤を含む）、並びに抗TF抗体又はその免疫複合体/融合物或いは多重特異性抗体をコードするポリヌクレオチドを含む組成物を更に提供する。これらの組成物は、緩衝剤を含む当分野で公知の薬用ベクター、薬用賦形剤などの適切な薬用補助材料を更に任意選択的に含んでもよい。賦形剤の使用及びその用途については、「Handbook of Pharmaceutical Excipients」、第5版、R.C.Rowe、P.J.Seskey及びS.C.Owen、Pharmaceutical Press、London、Chicagoを参照されたい。いくつかの実施形態において、所望の純度を有する本発明の抗TF抗体、免疫複合体又は多重特異性抗体を、1種又は複数種の任意選択的な薬用補助材料（Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Osol、A.編集（1980））と混合することにより、本発明を含む医薬製剤を調製することができる。

【0241】

本発明の医薬組成物及び医薬製剤において、本発明の抗体は唯一の活性剤であってもよく、又は他の治療剤と組合せてもよい。本発明の抗体と組合せることができる治療剤は、治療待ち疾患及び/又は病症に対して有益な治療効果を有する治療剤を含むが、これらに限定されない。例えば、上記活性成分は、治療される特定の適応症に必要なものであってもよく、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有する活性成分である。例えば、抗癌活性を提供することができる他の薬物成分である。本発明の抗体は、医薬組成物及び医薬製剤において、目的用途に有効な量で活性成分と適切に組合せて存在する。

【0242】

VIII. 組合せ製品

更なる態様において、本発明は、本発明の抗体又はその抗原結合断片、多重特異性抗体又は免疫複合体、及び1種又は複数種の他の治療剤（例えば、化学療法剤、他の抗体、細胞傷害性剤、抗腫瘍薬など）を含む、組合せ製品を更に提供する。組合せ製品を構成する本発明の抗体及び他の治療剤などの成分は、異なる製剤にそれぞれ調製されてもよく、且つ好ましくは、異なる容器に収容される。組合せ製品の各成分の投与方法及び投与順序は、治療待ち疾患及び個体の状況などの要因に応じて、当業者により決定することができる。本発明の組合せ製品は、本発明の治療方法に使用することができる。いくつかの実施形態において、本発明は組合せ製品を提供し、そのうち、上記他の治療剤は、例えば、免疫応答を有効に刺激することにより対象の免疫応答を更に増強、刺激、又はアップレギュレートする治療剤、例えば、抗体である。いくつかの実施形態において、上記組合せ製品は、TF陽性腫瘍の予防又は治療のために使用される。

10

【0243】

IX. 方法及び用途

一態様において、本発明は、本発明のTF抗体又はその抗原結合断片を使用する方法及び用途を提供し、例えば、インビボ及びインビトロで、

(1) TF陽性腫瘍細胞に標的結合すること、及び/又は

(2) TF陽性腫瘍細胞におけるTF/VIIa媒介性下流シグナル経路を遮断すること、及び

(3) TF陽性腫瘍細胞を阻害及び/又は殺傷することに使用される。

【0244】

20

いくつかの実施形態において、本発明の方法及び用途は、対象個体における疾患の治療に関する。別のいくつかの実施形態において、本発明の方法及び用途は、例えば、対象に由来する試料においてTFの存在を検出することに関する。更なるいくつかの実施形態において、本発明は、上記用途のための製品（例えば、医薬組成物、又は医薬製品、又は組合せ製品、又は検出製品）の調製における、本発明の抗TF抗体又はその抗原結合断片の用途を更に提供する。

【0245】

一態様において、本発明は、本発明の抗体又は抗原結合断片の応用による、対象におけるTF陽性腫瘍を予防及び/又は治療する方法及び用途であって、予防及び/又は治療有効量で本発明の抗体又は抗原結合断片を投与することを含む、方法及び用途を提供する。別の態様において、本発明は、本発明の抗体又は抗原結合断片の応用による、対象における細胞膜TFの発現の上昇に関連する他の疾患を治療又は予防する方法及び用途であって、本発明の抗TF抗体又はその抗原結合断片を、必要とする対象に投与することを含む、方法及び用途を更に提供する。

30

【0246】

更なる態様において、本発明は、試料中のTFを検出する方法及び試薬キットを提供し、そのうち、上記方法は、(a) 上記試料を本発明の抗体又はその抗原結合断片或いは免疫複合体/融合物と接触させることと、(b) 上記抗体又はその抗原結合断片或いは免疫複合体とTFタンパク質との間の複合体の形成を検出することと、を含む。いくつかの態様において、試料は癌患者に由来する。上記検出は、インビトロ又はインビボであってもよい。

40

【0247】

「検出」という用語は、本明細書で使用される場合、定量的又は定性的な検出を含み、例示的な検出方法は、免疫組織化学、免疫細胞化学、フローサイトメトリー（例えば、FACS）、抗体分子と複合した磁気ビーズ、ELISA測定法、PCR-技術（例えば、RT-PCR）にすることができる。いくつかの実施形態において、生体試料は血液、血清又は生体由来の他の液体試料である。いくつかの実施形態において、生体試料は細胞又は組織を含む。いくつかの実施形態において、生体試料は過剰増殖性又は癌性病巣に由来する。いくつかの実施形態において、測定待ちのTFはヒトTFである。

【0248】

50

一実施形態において、抗TF抗体は、抗TF抗体による治療に適した対象を選択するために使用される。更なる実施形態において、本発明の抗体を使用して癌又は腫瘍を診断することができ、例えば、対象における本明細書に記載の疾患（例えば、過剰増殖性又は癌性疾患）の治療又は進行、その診断及び/又は病期を評価する（例えば、モニタリングする）ことができる。

【0249】

いくつかの実施形態において、標識された抗TF抗体を提供する。標識は、直接検出された標識又は部分（例えば、蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識と放射性標識）、及び酵素反応又は分子相互作用などにより間接的に検出された部分、例えば、酵素又はリガンドを含むが、これらに限定されない。例示的な標識は、放射性同位体³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、及び¹³¹I、希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体などのフルオロフォア、ローダミン及びその誘導体、ダンシル（dansyl）、ウンベリフェロン（umbelliferone）、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ（米国特許第4,737,456号）などのルシフェラーゼ（luciferase）、フルオレセイン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HR）、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、溶解酵素、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなどの複素環オキシダーゼなどの糖オキシダーゼ、並びにHR、ラクトペルオキシダーゼ、又はミクロペルオキシダーゼ（microperoxidase）、ビオチン/アビジン、スピン標識、ファージ標識、安定化ラジカルなどの過酸化水素を利用して染料前駆体を酸化する酵素を含むが、これらに限定されない。

【0250】

本発明の治療方法及び用途

本発明の抗TF抗体又は本発明のADCのTFに対する良好な標的化特性及び上記の優れた特性に基づいて、本発明は、TFに関連する疾患の治療及び予防における本発明のADC及び本発明の抗体の応用及び方法を更に提供する。

【0251】

TFは、多種類の由来の癌組織細胞表面に過剰発現されるため、癌免疫療法の開発に適する好適な標的である。一態様において、従って、本発明は、対象におけるTF陽性腫瘍を予防及び/又は治療するための、本発明のADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物、並びに本発明の抗体又はその抗原結合断片の応用を提供する。上記応用において、本発明の抗体薬物コンジュゲート若しくはその薬学的に許容される塩又は溶媒和物、或いは本発明の抗体又は抗原結合断片は、唯一の活性剤として対象に投与されるか、或いは他の療法又は治療剤と組合せて対象に投与される。上記他の療法及び治療剤は、例えば、腫瘍細胞表面の抗原を標的とし、これらの分子への結合及び/又は遮断により腫瘍を消滅する薬物と、対象の免疫系を活性化し、それが自発的に腫瘍を消滅するのを促進する薬物と、を含む。

【0252】

更なる態様において、本発明は、対象におけるTF陽性腫瘍を予防又は治療する方法であって、本発明のADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物を必要とする対象に投与すること、或いは、本発明の抗TF抗体又はその抗原結合断片を必要とする対象に投与することを含む方法を更に提供する。

【0253】

本発明の方法及び応用に適したTF陽性腫瘍は、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病（AML）及び非ホジキンリンパ腫、中枢神経系腫瘍、神経膠腫、脳癌、頭頸部扁平上皮癌などの頭頸部癌、消化管癌、泌尿生殖器癌、NSCLCなどの肺癌、食道癌、胃癌、肝胆道癌、膵臓癌、結腸直腸癌、直腸癌、膀胱癌、腎臓癌、特にトリプルネガティブ乳癌などの乳癌、前立腺癌、子宮内膜癌、卵巣癌、子宮頸癌、黒色腫、肉腫、並びに皮膚癌から選ばれてもよい。

【0254】

本発明の方法及び応用に適したTF陽性腫瘍は、早期、中期若しくは後期、或いは転移性癌であってもよい。また、本発明の方法及び応用に適したTF陽性腫瘍は、以前に治療を受けた免疫逃避腫瘍であってもよい。

【0255】

いくつかの実施形態において、本発明の方法によって治療されるTF陽性腫瘍は、子宮頸癌、膵臓癌、肺癌、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、乳癌、結腸直腸癌、食道癌、頭頸部癌、胃癌から選ばれてもよく、原発性又は進行性或いは転移性癌を含む。更なる実施形態において、上記TF陽性腫瘍は子宮頸癌である。別の実施形態において、上記TF陽性腫瘍は非小細胞肺癌である。更なる実施形態において、上記TF陽性腫瘍は食道扁平上皮癌である。更なる実施形態において、上記TF陽性腫瘍は乳癌である。

10

【0256】

いくつかの実施形態において、本発明の方法によって治療されるTF陽性腫瘍は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%のTF陽性細胞を有する。免疫組織化学によって、腫瘍生検における組織因子の発現レベルを評価することができる。高いTF陽性細胞の百分率は既に、例えば、子宮頸癌（100%）、非小細胞肺癌（34%～88%）、子宮内膜癌（14%～100%）、前立腺癌（47%～75%）、卵巣癌（75%～100%）、食道癌（43%～91%）、及び膀胱癌（78%）が、多種類の癌生検で検出されている。

【0257】

好ましくは、いくつかの実施形態において、本発明による方法は、高い百分率のTF陽性細胞を有する腫瘍、例えば、少なくとも25%、50%、75%又は100%のTF陽性細胞を有する腫瘍、例えば、範囲が25%～50%から75%～100%のTF陽性細胞を有する腫瘍、例えば、膀胱癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、卵巣癌、及び子宮頸癌などの治療に使用される。いくつかの実施形態において、上記癌における本発明の方法の応用は、腫瘍退縮が誘導される。

20

【0258】

更なるいくつかの実施形態において、本発明による方法は、TF陽性細胞の百分率が25%又は20%より低い癌の治療にも使用できる。いくつかの実施形態において、上記癌における本発明の方法の応用は、腫瘍成長の阻害をもたらす。

【0259】

更なる態様において、本発明は、細胞膜TF発現の上昇に関連する他の疾患を予防又は治療するための方法であって、本発明の抗TF抗体又はその抗原結合断片を必要とする対象に投与すること、或いは、本発明のADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物を必要とする対象に投与することを含む方法を更に提供する。上記疾患は、例えば、良性腫瘍、神経線維腫、血管腫、粥状動脈硬化症、網膜症及び黄斑変性症などの血管疾患、関節リウマチ、変形性関節症、強直性脊椎炎などの炎症性疾患、多発性硬化症などの自己免疫炎症を含むが、これらに限定されない。

30

【0260】

本発明の方法の上記何れか1つの実施形態において、本発明による抗体又はその結合断片及び本発明によるADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物の投与は、1) 診断された病理学的状態若しくは疾患の症状を治癒し、緩和し、軽減するか、及び/又は当該診断された病理学的状態若しくは疾患の進行を停止させる治療的手段、或いは2) 病理学的状態若しくは疾患の進行を予防及び/又は緩和する予防的又は防止的手段を含むことができる。従って、本発明の方法において、対象は、既に疾患に罹患した個体、疾患に罹患しやすい個体、又は疾患の予防を意図する個体であってもよい。上記個体は、上記治療的手段又は予防的手段から利益を得ることになり、且つ上記処理を受けていない個体と比較して、疾患、病症、病状、及び/又は症状の発生、再発、若しくは進行における軽減又は改善を示す。いくつかの実施形態において、本発明は疾患又は病症の治療に関し、別のいくつかの実施形態において、本発明は疾患又は病症の予防に関する。

40

【0261】

50

本発明による抗体又はその結合断片及び本発明によるADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物、並びに任意選択的にそれらと組合せて使用される他の治療剤は、非経口投与、腫瘍内投与、及び鼻腔内投与を含む任意の適切な方法によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内又は皮下投与が含まれる。本明細書は、各種の投与スケジュールを含み、単回投与又は複数の時点での複数回投与、ボラス投与及びパルス注入を含むが、これらに限定されない。

【0262】

疾患を予防又は治療するために、本発明による抗体又はその結合断片及び本発明によるADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物の適切な用量は、（単独で、或いは1つ又は複数の他の治療剤と組合せて使用される場合）治療待ちの疾患のタイプ、使用される薬物の具体的なタイプ、疾患の重症度及び進行、上記薬物が予防目的で投与されるか治療目的で投与されるか、以前の治療、患者の臨床病歴及び上記抗体に対する応答、並びに主治医の判断力に依存する。本発明による抗体又はその結合断片及び本発明によるADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物は、1回の治療で、又は一連の治療にわたって患者に投与することができる。

【0263】

いくつかの実施形態において、本発明の方法による治療を受ける前に、上記対象は他の治療、例えば化学療法及び/又は放射線療法、若しくは他の免疫療法を受けているか、或いは受けたことがある。

【0264】

上記の本発明の方法及び応用の実施形態において、本発明の抗体又はその抗原結合部分の代わりに、或いは本発明のADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物の代わりに、本発明の組成物、多重特異性抗体又は免疫複合体/融合物、又は組合せ製品を投与することができる。或いは、これらの方法において、本発明の抗体又はその抗原結合部分、或いは本発明のADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物の投与に加えて、本発明の組成物、多重特異性抗体又は免疫複合体/融合物、又は組合せ製品を更に投与することができる。

【0265】

いくつかの実施形態において、本発明は、上記治療及び予防方法で使用するための薬物の調製における、本発明のADC又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物の用途を更に提供する。別のいくつかの実施形態において、本発明は、上記治療及び予防方法で使用するための医薬の調製における、本発明の抗体又は抗原結合断片、組成物、免疫複合体/融合物、多重特異性抗体の用途を更に提供する。

【0266】

上記及び本出願全体に記載した任意又は全ての特徴は、本発明の各種の実施形態において組合せることができる。以下の実施例は本発明を更に説明するが、実施例は例示的な説明を目的としたものであり、何ら制限的なものと解釈されるべきではないことを理解されたい。

【0267】

実施例

実施例I 抗TFヒト化抗体の調製及び特徴付け

一般的な方法

サイトカイン抗原の組換え発現

ヒト組織因子のアミノ酸配列は、Uniprotタンパク質データベースにおけるP13726を参照し、その細胞外セグメントはaa 33-aa 251であった。カニクイザル組織因子のアミノ酸配列は、Uniprotタンパク質データベースにおけるA0A2K5VXA0を参照し、その細胞外セグメントはaa 33-aa 252であった。

【0268】

上記細胞外セグメントのアミノ酸配列は、General Biology (Anhui) 公司によってコドン最適化が行われ、発現ベクターpTT5-Hisに合成された。PEI max (Polyscienc

10

20

30

40

50

es、24765-1) によりHEK293-EBNA細胞を一過性トランスフェクションし、7日間発現した後に、ニッケルカラムにより精製され、ヒトTF-his (h.TF-His) 及びカニクイザルTF-his (c.TF-His) 抗原を得た。当該組換え発現及び精製が行われたTF抗原は、後続の実施例において、免疫原として又はELISA測定において使用された。

【0269】

抗原タンパク質に基づくELISA

50 mMの炭酸塩を用いて緩衝液 (CBSコーティング液) 中のTF抗原 (h.TF-His又はc.TF-His抗原) をコーティングし、1 µg/mLのコーティング濃度、100 µLの体積、4℃でELISAプレートを一晩コーティングした。翌日、コーティング液を除去し、各ウェルを300 µLのPBSで1回洗浄し、各ウェルにPBS中の2%のBSA (Biotopped、A6020) 100 µLを加え、37℃で2時間ブロッキングした。PBS中の2%のBSAで測定待ち試料を勾配希釈し、11個の濃度点を確立した。勾配希釈した試料100 µLをプレートに加え、37℃で2時間インキュベートし、上清を除去し、各ウェルを300 µLのPBSTで3回洗浄し、各ウェルに2%のBSA中のHRP複合の二次抗体100 µLを加え、37℃で1時間インキュベートした。ハイブリドーマ由来のマウス抗体に、HRP標識された抗マウス二次抗体 (Jackson、115-035-003) が使用され、ヒト化抗体に、HRP標識された抗ヒト二次抗体 (Jackson、109-035-088) が使用された。インキュベート終了後、二次抗体を除去し、各ウェルを300 µLのPBSTで5回洗浄し、続いて各ウェルに100 µLのTMB基質 (Huzhou InnoReagents、TMB-S-004) を加え、5分間～20分間発色させ、各ウェルに50 µLの2N HClを加えて反応を停止し、マイクロプレートリーダー (メーカー: MD、型番: SpectraMax) を用いてOD450 nmでの読み取り値を読み取り、GraphPadソフトウェアに導入してフィッティングマッピングを行い、試料のTF抗原タンパク質への結合を決定した。

【0270】

細胞に基づくELISA

実験の前日、TF抗原陽性細胞 (MDA-MB-231又はNCI-H358細胞) を、 5×10^4 細胞/ウェルで96ウェルプレートに播種した。実験の当日、培養上清を除去し、各ウェルを300 µLのPBSで1回洗浄し、各ウェルに100 µLの4%のパラホルムアルデヒドを加え、室温で20分間固定した。パラホルムアルデヒドを除去し、各ウェルを300 µLのPBSで2回洗浄し、各ウェルにPBS中の2%のBSA 100 µLを加え、37℃で2時間ブロッキングした。ブロッキング完了後、各ウェルに30 µLの測定待ち試料 (ハイブリドーマ上清又は精製抗体) を加え、37℃で2時間インキュベートした。液体を除去し、各ウェルを300 µLのPBSTで3回洗浄し、各ウェルに2%のBSA中のHRP複合の二次抗体100 µLを加え、37℃で1時間インキュベートした。測定待ち試料がハイブリドーマ又はマウス抗体である場合、HRP標識された抗マウス二次抗体 (Jackson、115-035-003) が使用され、測定待ち試料がヒト化抗体である場合、HRP標識された抗ヒト二次抗体 (Jackson、109-035-088) が使用された。二次抗体を除去し、各ウェルを300 µLのPBSTで5回洗浄し、続いて各ウェルに100 µLのTMB基質 (Huzhou InnoReagents、TMB-S-004) を加え、5分間～20分間発色させ、各ウェルに50 µLの2N HClを加えて反応を停止し、マイクロプレートリーダー (メーカー: MD、型番: SpectraMax) を用いてOD450 nmでの数値を読み取り、試料のTF陽性細胞への結合を決定した。

【0271】

SEC-HPLCによる抗体純度の検出

組換え発現及び精製が行われた抗体について、SEC-HPLCを用いて抗体純度を検出した。検出方法は以下の通りに行った。

機器: Waters Alliance e2695 HPLC、

カラム: Thermo MabPac SEC-1、5 µm、7.8×300 mm、

移動相: 61 mmol/LのNa₂HPO₄、39 mmol/LのNaH₂PO₄、200 mmol/LのNaCl、5%のIPA、

機器パラメータ: 試料室温度: 8℃、カラム温度: 30℃、流速: 0.5 mL/min、注入

量：20 μg、検出波長：280 nm、イソクラティック運転：30 min。

【0272】

HICによる抗体親疎水性の検出

組換え発現及び精製が行われた抗体について、HICを用いて抗体の親疎水性を検出した。検出方法は以下の通りに行った。

【0273】

東ソー会社の疎水性カラム（TOSOH Tskgel Buty-NPR（2.5）、 4.6×100 ）を用いて、アジレントHPLC装置において親疎水性を検出した。移動相Aは1.5 Mの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、移動相Bは25 mMの Na_2HPO_4 （pH=7.0）+25%のIPAであった。機器パラメータは、試料室温度8℃、カラム温度30℃、流速0.5 mL/min、検出波長280 nmに設定された。測定待ち試料を移動相Aで最終濃度1 mg/mLに希釈し、20 μL注入して勾配溶出を行った。溶出勾配は以下の通りであった。

【表1A】

T/min	0	2	39	41	42	45
A%	95	95	0	0	95	95
B%	5	5	100	100	5	5

実施例1 抗ヒトTFマウスモノクローナル抗体の調製

【0274】

Balb/c、昆明（KM）及びCD01の3品種、5週齢～6週齢の雌マウスをそれぞれ3匹選択した。ヒトTF-hisタンパク質及びカニクイザルTF-hisタンパク質を用いて免疫した。免疫方案は表1に示された。

【表1B】

表1.マウス免疫方案

免疫プロセス	免疫抗原*
初回免疫（Primary）	100 ug h.TF1-His++10 ug CpG+CFA
1回目の追加免疫（Boost 1st）	100 ug h.TF1-His+IFA
2回目の追加免疫（Boost 2nd）	50 ug h.TF1-His+IFA
最終免疫（Final Boost）	2 ug h.TF1-His+2 ug c.TF1-His

*：CFAはフロイント完全アジュバント、IFAはフロイント不完全アジュバント、CpGはCpGオリゴデオキシヌクレオチドアジュバントである。

【0275】

2回の追加免疫後、抗原タンパク質に基づくELISA測定によって、一般的な方法に記載されるように、h.TF-His及びc.TF-His抗原をそれぞれコーティングしたELISAプレートを用いて、免疫動物の血清力価を検出した。検出結果に基づいて、ヒト及びサルTFの親和性を総合的に考慮し、CD1免疫マウス及びBalb/c免疫マウスを選択してハイブリドーマ融合に使用され、且つハイブリドーマ融合前に最終の追加免疫を行った。

【0276】

マウス脾臓、リンパ節を取って細胞懸濁液を調製し、SP2/0マウス骨髓腫細胞と1：1の割合で混合し、細胞電気融合緩衝液で再懸濁させ、BTX-ECM2001細胞電気融合装置を使用して電気融合反応を行った。電気融合反応後、完全融合培地（RPMI160+15%のFBS+1×HAT）で再懸濁させ、2万～2.5万個の細胞/ウェルで96ウェルの細胞培養プレ

ートに分取し、37℃、5%のCO₂で培養した。

【0277】

7日間の培養後、ヒトTF-his及びカニクイザルTF-hisでコーティングされたELISAプレートを用いてELISA再スクリーニングを順次行い、且つTF陽性腫瘍細胞（MDA-MB-231又はNCI-H358）を用いて細胞のELISA再スクリーニングを行った。陽性の親クローンを選別してサブクローンに使用された。

【0278】

各親クローンについて75個の細胞を96ウェルプレートに分取し、サブクローン培養を行った。その後、サブクローン上清を取り、ヒトTF-his、カニクイザルTF-his、ラットTF-hisタンパク質及びNCI-H358細胞をコーティングすることによって、ELISA及び細胞ELISAスクリーニングが順次行われた。スクリーニング結果に基づいて、合計119個の陽性クローンを選択し、無血清培地で拡大培養を行った。培養したハイブリドーマのモノクローナル上清を収集し、抗体精製媒体ProA（GE、Mabselect XL）充填剤により精製され、マウス抗体を得た。

【0279】

精製されたマウス抗体に対して、ヒトTF-his、カニクイザルTF-hisタンパク質及びNCI-H358細胞をコーティングすることによって、ELISA及び細胞ELISA評価が順次行われた。実験方法は一般的な方法に記載されるように、そのうち、マウス抗体を10 µg/mLから開始し、3倍勾配希釈し、11個の濃度点を確立した。測定結果に基づいて、親和性の高い13個のハイブリドーマクローンを選択し、抗体配列決定及びヒト化に使用された。

【0280】

実施例2 抗TFマウスモノクローナル抗体配列の決定及びヒト化

約1×10⁵個の候補ハイブリドーマ細胞を収集し、Trizol（Invitrogen、15596026）によりRNAを抽出し、次にPrimeScript RT reagent試薬キット（TAKARA、RR047A）を用いてPolyAにより逆転写し、cDNAを得た。それぞれ重鎖、軽鎖上流に上流プライマーを設計し、そして重鎖CH1領域、軽鎖CL領域に下流プライマーを設計した。PCRにより産物を増幅させた後、アガロースゲル回収試薬キットを用いて断片を回収し、試料をBeijing Tsingke Biotech有限公司に送ってシーケンシングし、マウス抗体配列を得た。

【0281】

CDR grafting方法を用いて、マウス抗原配列のヒト化を行った。まず、従来のBLAST方法により、元のマウス配列との相同性が最も高いヒトgermline配列を見つけてテンプレートとし、マウス抗体のCDRをヒトテンプレートに移植し、キメラを構築し、マウス抗体においてその元の配座を保持できるFRアミノ酸を構造により分析し、キメラにおける相応するアミノ酸をマウスアミノ酸に復帰変異させることで、元の親和性を維持させ、構築したヒト化抗体に対して計算及び免疫原性分析を行い、高免疫原性断片を見出し、低免疫原性断片と置換した。17種のヒト化抗体の配列を得た。

【0282】

実施例3 ヒト化抗体の発現及び精製

上記の各ヒト化抗体及び参照抗体（Benchmark、BMと略称され、Genmab会社のTisotumabであり、配列が特許CN103119065Bの配列番号5（VH）及び配列番号45（VL）に由来する）の重、軽可変領域のアミノ酸配列を、通用生物に提供して遺伝子合成を行い、コドン最適化を行った後、PTT5ベクターに構築した。プラスミド合成後、PEI maxによりHEK293E細胞をトランスフェクションし、7日間程度発現させ、遠心分離により上清を収集した。上清はMabSelectSure ProActive親和性充填剤（GE、カタログ番号Parr17547401）により精製された。発現した参照抗体はヒト化抗体と同じヒトIgG1重鎖定常領域（配列番号106）及びヒトKappa軽鎖定常領域（配列番号105）を有した。精製した抗体を全てPBS緩衝液に限外濾過し、濃度を測定し、-20℃で保存した。

【0283】

実施例4 ヒト化抗体のELISA親和性の評価

抗原タンパク質に基づくELISA検出

一般的な方法に記載されるように上記検出を行った。簡単に言えば、ヒトTF-hisタンパク質又はカニクイザルTF-hisタンパク質でそれぞれコーティングされたELISAプレートを、2%のBSAで37℃で2時間ブロッキングし、勾配希釈した抗体（10 µg/mLから開始し、3倍勾配希釈し、11個の濃度点である）を加え、37℃で2時間インキュベートした。その後、抗ヒト二次抗体（Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Human IgG（H+L）、Jackson、109-035-088）を加え、37℃で1時間インキュベートし、TMB基質（Huzhou InnoReagents、TMB-S-004）を加えて発色させた。発色反応終了後、450 nmでの吸光値を機器上で読み取り、且つGraphPadソフトウェアを用いて曲線をフィッティングした。

10

【0284】

細胞に基づくELISA検出：

一般的な方法に記載されるように上記検出を行った。簡単に言えば、パankレアチン消化によってTF抗原陽性細胞NCI-H358細胞を収集し、 5×10^4 細胞/ウェルで96ウェルプレートに播種して一晩置き、その後4%のパラホルムアルデヒドで細胞を固定した。パラホルムアルデヒドを除去し、且つPBSで細胞を洗浄した後、2%のBSAを用いて37℃でプレートを2時間ブロッキングした。勾配希釈した抗体（10 µg/mLから開始し、3倍勾配希釈し、11個の濃度点である）を加え、37℃で2時間インキュベートした。その後、抗ヒト二次抗体（Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Human IgG（H+L）、Jackson、109-035-088）を加え、37℃で1時間インキュベートし、TMB基質（Huzhou InnoReagents、TMB-S-004）を加えて発色させ、発色反応終了後、450 nmでの吸光値を機器上で読み取り、GraphPadソフトウェアを用いて曲線をフィッティングした。

20

【0285】

実験結果は表2及び図1に示された。ヒト/カニクイザルTF-his及びTF陽性細胞に対して良好な結合活性を示すヒト化抗体、2B12B10-hz1、4F6C3-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1、27B9F2-hz1及び27H8H3-hz1を選択し、後続の評価を行った。

30

40

50

【表 2】

表2.ヒト化抗体ELISAの検出結果

番号	抗体番号	h.TF-His	c.TF-His	NCI-H358
		EC50 (ng/mL)	EC50 (ng/mL)	EC50(ng/mL)
1	1H12G8-hz1	116.4	4105	65.61
2	1H12G8-hz2	3785	10948	1537
3	2B12B10-hz1	6.724	13.63	3.877
4	2B12B10-hz2	17.06	917.1	18.27
5	4F6C3-hz1	3.571	5.679	3.007
6	24A8B7-hz1	5.478	19.54	5.862
7	24A8B7-hz2	8.051	259.1	4.417
8	30G11B7-hz1	7.912	20.79	4.727
9	9H4B4-hz1	19.52	18.64	未測定
10	10E11H9-hz1	1604	2593	未測定
11	12E4C11-hz1	17.3	20.66	弱結合
12	22F11H5-hz1	8.577	11.41	11.95
13	27B9F2-hz1	14.55	18.9	19.56
14	27H8H3-hz1	8.147	11.37	34.79
15	28E10A3-hz1	40.36	313.4	弱結合
16	28E10A3-hz2	804.2	1326	弱結合
17	10E11H9-hz2	320.4	478.2	弱結合
	Benchmark	14.43 ± 7.32 (n=2)	18.45 ± 7.71 (n=2)	21.62 ± 2.00 (n=2)

10

20

30

実施例5 ヒト化抗体の品質の同定

【0286】

上記の組換え発現及びタンパク質Aアフィニティー精製が行われたヒト化抗体は、一般的な方法に記載されるように、SEC-HPLCにより抗体の純度を同定し、そしてHICにより抗体の親疎水性を検出した。SEC及びHIC検出結果は表3に示された。SEC結果は、選択された6種のヒト化抗体の純度が比較的高く、何れも>90%であることを示し、HIC結果は、選択された6種のヒト化抗体の、疎水性クロマトグラフィーカラムへの結合が比較的弱く、保持時間が比較的短く、親水性が何れも優れることを示した。

40

50

【表 3】

表3 ヒト化抗体の品質の同定

抗体番号	SEC			HIC (min)
	HMW%	Main peak%	LMW %	
2B12B10-hz1	2.56	97.44	0	12.56
4F6C3-hz1	1.13	98.87	0	11.86
30G11B7-hz1	1.55	98.45	0	12.02
22F11H5-hz1	3.76	96.24	0	10.89
27B9F2-hz1	7.63	92.37	0	10.13
27H8H3-hz1	0.93	99.07	0	10.43

10

実施例6 ヒト化抗体のフローサイトメトリー親和性の評価

【0287】

パンクレアチン消化及び遠心分離によりTFにおける低発現細胞株NCI-H358（供給源：南京科佰、CBP60136）及びTF高発現細胞株KYSE520細胞（供給源：南京科佰、CBP60658）を収集し、予冷したPBSで3回洗浄し、1%のBSAで細胞を再懸濁させ、 3×10^5 個の細胞/ウェルで96ウェルのV底プレートに播種した。勾配希釈した抗体を加え、4℃で1時間インキュベートし、予冷したPBSで3回洗浄した後、1 μ L/ウェルで抗ヒト蛍光二次抗体（APC anti-human IgG Fc Antibody、Biolegend、410712）を加え、4℃で0.5時間インキュベートした。予冷したPBSで3回洗浄した後に細胞を再懸濁させ、フローサイトメーター（Sony、LE-SA3800GA）により検出され、データをGraphPadソフトウェアに導入して曲線をフィッティングした。

20

【0288】

実験結果は表4及び図2に示され、6個の候補ヒト化抗体が何れも、腫瘍細胞に強く結合した。

30

【表 4】

表4.ヒト化抗体のフロー検出の結果

番号	抗体番号	NCI-H358 (EC50, ng/mL)	KYSE520 (EC50, ng/mL)
1	2B12B10-hz1	187.4	140.3
2	4F6C3-hz1	63.48	96.69
3	30G11B7-hz1	145.1	138.3
4	22F11H5-hz1	67.09	35.7
5	27B9F2-hz1	126.5	68.67
6	27H8H3-hz1	99.06	59.43
	BM	97.81 $\pm$ 39.73 (n=2)	77.48 $\pm$ 50.24 (n=2)

40

実施例7 ヒト化抗体の動的親和性の評価

【0289】

ForteBioによりヒト化抗体の動的親和性を測定した。実験ステップは、以下の通りで

50

ある：ProAセンサ（18-5010、Octet）を取り出し、PBST希釈液（PH7.4）でセンサを10分間予め湿らせた。固定化を必要とする抗体を5 μg/mLに希釈し、抗原h.TF-His及びc.TF-Hisは、75 nMから開始し、4個の濃度点で2倍希釈し、0濃度点を設定した。プログラムを設定し、センサプレート及び試料プレートを入れ、プログラムを開始し、センサを20 mMのグリシン溶液（pH1.7）で再生させた。Octet分析ソフトウェアを用いてデータを分析し、結果図を導出した。実験結果は表5に示され、6個の候補ヒト化抗体が何れも、ヒト、サルTFに対して高い親和性を有した。

【表5】

表5.ヒト化抗体の動的親和性の検出結果

抗体番号	h.TF-his			c.TF-his		
	KD (M)	ka (1/Ms)	kdis (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kdis (1/s)
2B12B10-hz1	1.38E-08	2.09E+05	2.89E-03	3.38E-08	3.44E+05	1.16E-02
4F6C3-hz1	1.77E-08	1.81E+05	3.20E-03	2.18E-08	3.55E+05	7.72E-03
30G11B7-hz1	2.58E-08	1.97E+05	5.06E-03	1.46E-07	3.64E+05	5.30E-02
22F11H5-hz1	9.80E-09	3.02E+05	2.96E-03	1.27E-08	3.24E+05	4.11E-03
27B9F2-hz1	6.32E-09	1.85E+05	1.17E-03	2.97E-08	1.72E+05	5.09E-03
27H8H3-hz1	4.25E-08	2.73E+05	1.16E-02	4.25E-08	2.95E+05	1.25E-02
BM	1.42E-08	1.66E+05	2.34E-03	2.05E-08	1.79E+05	3.66E-03

実施例8 ヒト化抗体のエンドサイトーシス活性の評価

【0290】

フローサイトメトリー（FACS）により、ヒト化モノクローナル抗体のエンドサイトーシス活性を検出した。実験ステップは、以下の通りである：パンクレアチン消化及び遠心分離によりNCI-H358細胞を収集し、濃度10 μg/mLの検出待ちの抗体と4℃で1時間インキュベートした。PBSで3回洗浄し、RPMI1640+10%のFBSで細胞を再懸濁させ、3部に分けてそれぞれ37℃で0、2、4時間インキュベートした。PBSで3回洗浄した後、1 μLの抗ヒト蛍光二次抗体（APC anti-human IgG Fc Antibody、Biolegend、410712）を加え、4℃で0.5時間インキュベートし、PBSで3回洗浄した後に細胞を再懸濁させ、機器で検出した。アイソタイプ対照陰性抗体HLE IgG1を陰性対照として使用した。エンドサイトーシス率（%）= {1-（当該時点で検出した試料の平均蛍光値-当該時点での陰性対照試料の平均蛍光値）/（0時間で検出した試料の平均蛍光値-0時間での陰性対照試料の平均蛍光値）} ×100という式により、エンドサイトーシス率を計算した。

【0291】

実験結果は表6に示され、2B12B10-hz1、4F6C3-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1、27B9F2-hz1のエンドサイトーシス率は、参照抗体と基本的に相当し、27H8H3-hz1のエンドサイトーシス率は参照抗体よりも優れていた。

10

20

30

40

50

【表 6】

表6.ヒト化抗体のエンドサイトーシス活性の検出結果

エンドサイトーシス率 (%)							
時間	2B12B10-hz1	4F6C3-hz1	30G11B7-hz1	22F11H5-hz1	27B9F2-hz1	27H8H3-hz1	BM
2h	34.32	17.03	19.77	34.32	19.35	49.17	20.26
4h	49.63	47.67	46.10	56.07	54.95	73.37	56.17

実施例9 ヒト化抗体のシグナル経路の遮断活性の評価

10

【0292】

TF陽性腫瘍細胞MDA-MB-231表面の組織因子へのFVIIaの結合は、TF下流シグナル経路を活性化し、IL-8の放出をもたらした。従って、IL-8の放出を検出することによって、当該TFシグナル経路に対する抗TFヒト化抗体の遮断活性を反映することができる。

【0293】

実験ステップは、以下の通りである：FVIIa（40 nM、Haematologic Technologies Inc、HCVIIA-0031）、勾配希釈した抗TFヒト化抗体（60 μg/mLから開始し、3倍勾配希釈し、11個の濃度点である）をMDA-MB-231細胞（5×10⁴細胞/ウェル、南京科佰、CBP60382）と5時間共インキュベートした後、上清を収集し、IL-8検出試薬キット（MABTECH、3114-1H-20）によりIL-8の放出を検出した。IL-8検出ステップは、以下の通りである：実験の前夜、PBS中の捕捉抗体MT8H6を200 ng/ウェルで96ウェルプレートにコーティングし、4℃で一晩置き、コーティング液を除去し、300 μLのPBSTで1回洗浄し、全ての96ウェルプレートの各ウェルにPBS中の2%のBSA100 μLを加え、37℃で2時間ブロッキングし、50 μLの細胞培養上清を直接加え、37℃で2時間インキュベートし、上清を除去し、各ウェルを300 μLのPBSTで3回洗浄し、各ウェルに100 μL（1 μg/mL）のMT8F19-biotin二次抗体（2%のBSA中）を加え、37℃で1時間インキュベートし、上清を除去し、各ウェルを300 μLのPBSTで4回洗浄し、各ウェルに100 μLのペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン（1：10000で希釈）を加え、37℃で1時間インキュベートし、上清を除去し、各ウェルを300 μLのPBSTで5回洗浄し、次に各ウェルに100 μLのTMB基質を加え、5分間～20分間発色させ、各ウェルに50 μLの2 NのHClを加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダーでOD450 nmでの読み取り値を読み取った。結果をGraphPadに導入してプロットし、阻害率及びIC50を計算した。

20

30

【0294】

実験結果は表7及び図3に示され、27B9F2-hz1以外に、残りの5個のヒト化抗体が何れも、TFシグナル経路に対して比較的高い阻害作用を有した。

40

50

【表 7】

表7.ヒト化抗体IL-8放出遮断活性の検出結果

抗体番号	IC50 (ng/mL)	最大阻害率 (%)
2B12B10-hz1	128.1	94.06
4F6C3-hz1	120.9	100
30G11B7-hz1	129.4	100
22F11H5-hz1	179.7	94.3
27B9F2-hz1	弱	弱
27H8H3-hz1	463.3	100
BM	225.37±118.10 (n=3)	100

10

実施例10 凝血に対するヒト化抗体の影響の評価

【0295】

CaCl₂を含むHEPES溶液で抗TFヒト化抗体を希釈し、続いて50000個のTF陽性細胞MDA-MB-231細胞と37℃で30分間インキュベートし、次に、50 μLのヒト血漿を加え、迅速に均一に混合し、直ちに連続的に405 nmでの吸光値を読み取って、細胞表面TFから開始した凝血の抗凝固作用を計算した。結果をGraphPadに導入してプロットした。CaCl₂の濃度を2 mMとし、抗体の最終濃度を50 μg/mLとした1回目の実験、及びCaCl₂の濃度を5 mMとし、抗体の最終濃度を20 μg/mLとした2回目の実験である、合計2回の実験を行った。実験結果は図4（図4A：2 mMのCa²⁺、抗体濃度50 μg/mL、図4B：5 mMのCa²⁺、抗体濃度20 μg/mL）及び下記の表8に示された。2回の実験結果を総合すると、試験した抗体において、27H8H3-hz1及び2B12B10-hz1は、ヒト凝血に対する影響が最も小さく、且つ参照抗体よりも優れていた。

20

30

40

50

【表 8】

表8：凝血時間V50に対するヒト化抗体の影響

抗体番号	1回目の実験 2 mMのCa ²⁺ 、50 µg/mLの抗体 V50 (秒)	2回目の実験 5 mMのCa ²⁺ 、20 µg/mLの抗体 V50 (秒)
2B12B10-hz1	882.5	24.25
*4F6C3-hz1	-	94.69
30G11B7-hz1	1446	29.16
22F11H5-hz1	1643	49.36
27B9F2-hz1	1542	115.2
27H8H3-hz1	750.5	26.20
BM	1141	74.88
ブランク対照	19.96	~ 29.96

*：2 mMのCa²⁺及び50 µg/mLの抗体4F6C3-hz1の存在下で、2000秒以内に凝血が基本的に発生しなかった。

【0296】

実施例11 ヒト化抗体の安定性評価

ヒト化抗体の加速安定性評価

抗TFヒト化抗体試料を、限外濾過により濃度5 mg/mLでPBS (PH=7.4) に置換し、ろ過して除菌し、37℃でそれぞれ0、3、7、14日間放置し、凍結融解を4回、8回繰り返した。その後、一般的な方法に記載されるように、試料のSEC-HPLC及びCE-SDS純度を検出した。

【0297】

実験結果は、加速及び繰り返し凍結融解の場合に検出した22F11H5-hz1及び27H8H3-hz1ヒト化抗体が良好な安定性を有することを示した。加速安定性及び繰り返し凍結融解試験後、2種のヒト化抗体は、SEC純度が何れも95%以上に維持され、CE-SDS非還元純度が何れも87%以上に維持され、CE-SDS還元純度が95%以上であった。

【0298】

ヒト化抗体のT_m値の測定

抗体の熱安定性を反映するために、DSFを用いてヒト化抗体のT_m値を測定した。実験ステップは、以下の通りである：測定待ちの抗体試料をPBSで1 mg/mLに希釈し、染料SYPRO Orange dye (Thermo#56651) をddH₂Oで40倍に希釈した。反応系：試料12.5 µL+40×染料2.5 µL+ddH₂O 5 µL、膜を密封し、一過性遠心分離し、Q-PCRにより検出し、Q-PCRパラメータを設定した：Target (ROX)、プログラム (25℃、3 min、速度1%、95℃、95℃、2 min)。

【0299】

結果は、5個の候補ヒト化抗体2B12B10-hz1、4F6C3-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1、27H8H3-hz1が何れも、比較的高いT_m値 (何れも70℃より高い) を有することを示し、比較的良好な熱安定性を有することを示した。

【0300】

実施例12 ヒト化抗体の血清安定性評価

ヒト血清で抗TFヒト化抗体を20 $\mu\text{g/mL}$ に希釈し、37°Cで14日間放置し、続いて抗原タンパク質に基づくELISAにより親和性の変化を検出した。ELISA方法の実験ステップは一般的な方法に記載されている。実験結果は図5A及び5Bに示され、22F11H5-hz1及び27H8H3-hz1をヒト血清に14日間放置した後の親和性が明らかに変化しなかった。

【0301】

実施例13 ラットにおけるヒト化抗体のインビボPKの検出

検出待ちの試料を、各群に3匹、10 mg/kgの投与量で雄ラット（Chengdu Dossy）に尾静脈注射により投与した。投与後、30 min、1 h、2 h、6 h、24 h、48 h、96 h、168 h、336 hの血清試料を採取した。陰性ラット血清を含む2%のBSAで対応する抗体を希釈し、1 $\mu\text{g/mL}$ から開始し、2倍勾配希釈し、11個の濃度点であり、これを標準曲線試料とした。抗原タンパク質に基づくELISAにより血中薬物濃度を検出し、ELISA方法は一般的な方法に記載されている。実験結果は、ラットにおけるヒト化抗体22F11H5-hz1及び27H8H3-hz1の半減期が約120時間以上であることを示した。

10

【0302】

前述した抗体の特徴付けに基づいて、2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1及び27H8H3-hz1といった4種の候補ヒト化抗体を決定し、後続のADC構築及び性能特徴付けに使用された。選択された4種の抗体の配列は配列表に示された。

【0303】

実施例II 抗体コンジュゲート薬物（ADC）の調製及び特徴付け

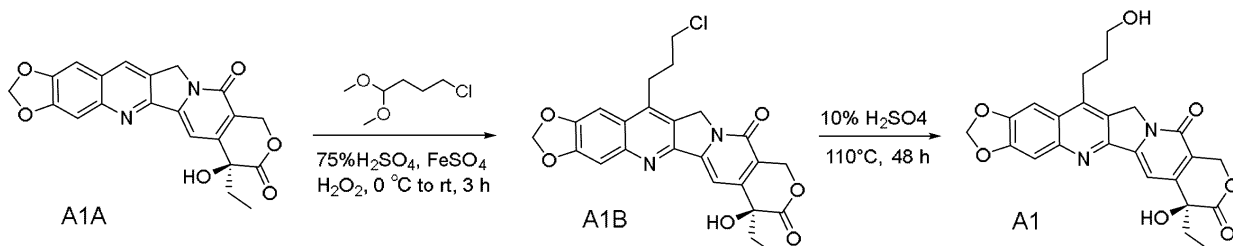
20

実施例1 抗体コンジュゲート薬物（ADC）の調製

実施例1.1：「薬物-リンカー化合物」の合成に使用される中間体の合成

実施例1.1.1：（S）-7-エチル-7-ヒドロキシ-14-（3-ヒドロキシプロピル）-10,13-ジヒドロ-11H- [1,3] ジオキソロ [4,5-g] ピラノ [3',4':6,7] インドリジノ [1,2-b] キノリン-8,11（7H）-ジオン（A1）の合成

【化44】

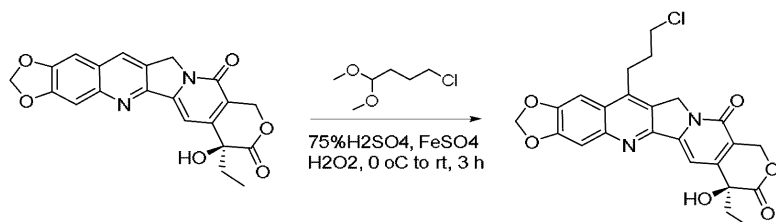


30

【0304】

ステップ1：（S）-7-エチル-7-ヒドロキシ-14-（3-クロロプロピル）-10,13-ジヒドロ-11H- [1,3] ジオキソロ [4,5-g] ピラノ [3',4':6,7] インドリジノ [1,2-b] キノリン-8,11（7H）-ジオン（A1B）の合成

【化45】



40

【0305】

氷浴条件下で、化合物（S）-7-エチル-7-ヒドロキシ-10,13-ジヒドロ-11H- [1,3] ジオキソロ [4,5-g] ピラノ [3',4':6,7] インドリジノ [1,2-b] キノリン-8,11（7H）-ジオン（A1A、Cas No.: 151636-76-9、500 mg）の75%硫酸溶液（5 mL）

50

に、硫酸鉄(II)七水和物(570 mgの硫酸鉄(II)七水和物を1 mLの水に溶解させる)及び4,4-ジメトキシクロロブタン(3.89 g)を加え、反応液を3分間攪拌した後、過酸化水素水(29%、2.5 mL)を滴下した。反応液を0℃で5分間攪拌した後、室温まで昇温し、そして3時間攪拌して反応させた。反応液に水(50 mL)を加えて希釈し、酢酸エチル(80 mL×2)で抽出し、有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮して粗生成物を得た。粗生成物をC18カラム(アセトニトリル/0.05%ギ酸水溶液:5%~60%)で更に精製し、目的化合物A1Bを得た(黄色固体、400 mg、収率:67%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 468.9、

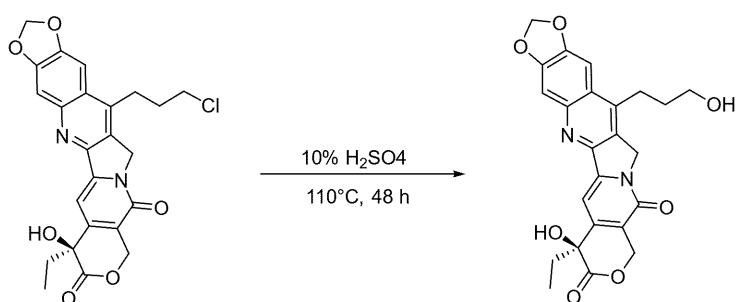
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.65 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 3.81 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.22 (s, 2H), 1.98 (d, J = 6.7 Hz, 4H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H)。

10

【0306】

ステップ2: (S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-14-(3-ヒドロキシプロピル)-10,13-ジヒドロ-11H-[1,3]ジオキサロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-8,11(7H)-ジオン(A1)の合成

【化46】



20

【0307】

化合物(S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-14-(3-クロロプロピル)-10,13-ジヒドロ-11H-[1,3]ジオキサロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-8,11(7H)-ジオン(100 mg、0.213 mmol)を10%硫酸(5 mL)溶液に溶解し、反応を110℃で48時間反応させた。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム(30 mL)溶液を加え、ジクロロメタン(10 mL×5)で抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、吸引濾過し、減圧濃縮して粗生成物を得た。分取高速液体クロマトグラフィーにより精製(アセトニトリル/0.05%ギ酸含有の水)し、(S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-14-(3-ヒドロキシプロピル)-10,13-ジヒドロ-11H-[1,3]ジオキサロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-8,11(7H)-ジオン(A1、1.78 mg)を得た。

30

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 451.0、

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.63 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.47 - 5.37 (m, 2H), 5.32 - 5.19 (m, 2H), 3.51 - 3.46 (m, 2H), 3.17 - 3.13 (m, 2H), 1.92 - 1.76 (m, 4H), 0.90 - 0.84 (m, 3H)。

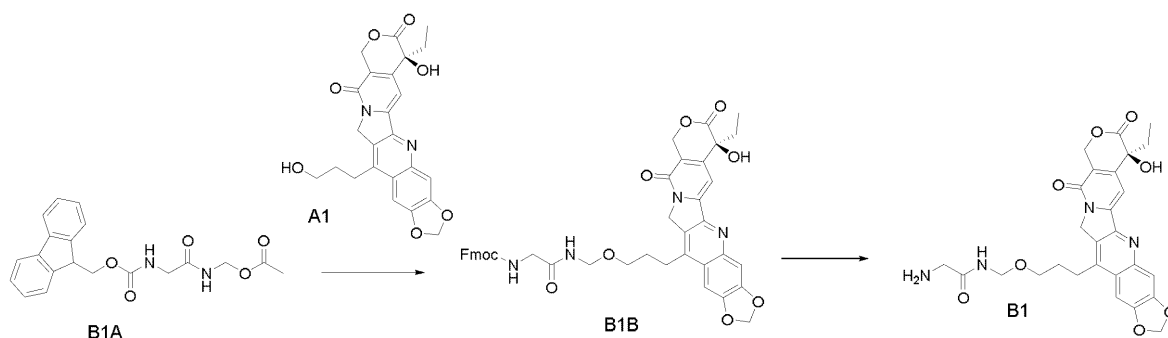
40

【0308】

実施例1.1.2: (S)-2-アミノ-N-(3-(7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキサロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル)プロポキシ)メチル)アセトアミド(B1)の合成

50

【化 4 7】



10

【0309】

ステップ1：化合物（B1A）（Cas No.：1599440-06-8、368 mg）、化合物（A1）（440 mg）及びp-トルエンスルホン酸ピリジニウム（PPTS）（25 mg）をジクロロメタン（20 mL）において20時間還流し、次いで、炭酸水素ナトリウム水溶液及び塩酸水溶液でそれぞれ洗浄し、有機溶媒を減圧除去し、粗生成物を得た。粗生成物をカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン：メタノール＝10/1）により単離して精製し、目的化合物B1B（240 mg）を得た。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ ：759.5。

【0310】

ステップ2：B1B（240 mg）をDMF（5 mL）に溶解し、ピペリジン（1 mL）を加え、化合物を20分間攪拌し、溶液を減圧して低沸点成分を除去し、残留物を直接次のステップの合成に用いた。少量の粗生成物を逆相クロマトグラフィー（アセトニトリル/0.05% FAの水溶液：5%～50%）により精製した後、目的化合物B1を得た。

ESI-MS (m/z)：537.4 $[M+H]^+$ 、

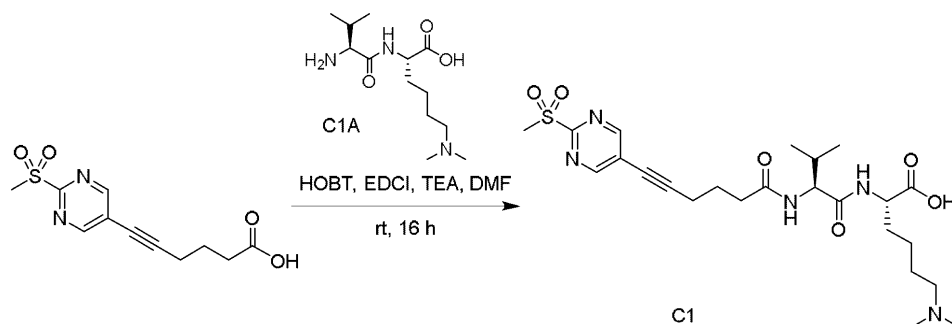
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)。δ。9.13 (t, 1H), 8.04 (br, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.21 (s, 2H), 4.65 (d, 2H), 3.63 (m, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.11 (m, 2H), 1.87 (m, 4H), 0.88 (t, 3H)。

【0311】

実施例1.1.3：N⁶,N⁶-ジメチル-N²-（（6-（2-（メチルスルホニル）ピリミジン-5-イル）ヘキサ-5-イノイル）-L-バリン）-L-リジン（C1）

30

【化 4 8】



40

【0312】

6-（2-（メチルスルホニル）ピリミジン-5-イル）ヘキサ-5-イン酸（268 mg、Cas No.2356229-58-6）、化合物C1A（328 mg）、トリエチルアミン（322 mg）をN,N-ジメチルホルムアミド（5 mL）に溶解した。次いで、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBT、162 mg）及び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（EDCI、229 mg）を更に加え、反応液を室温で16時間攪拌した。反応液を直接C18カラム逆相（アセトニトリルと0.05%ギ酸水溶液系）により精製し、目的化合物N⁶,N⁶-ジメチル-N²-（（6-（2-（メチルスルホニル）ピリミジン-5-イル）ヘキサ-5-イ

50

ノイル) -L-バリン) -L-リジン (C1、白色固体、327 mg) を得た。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 524.4。

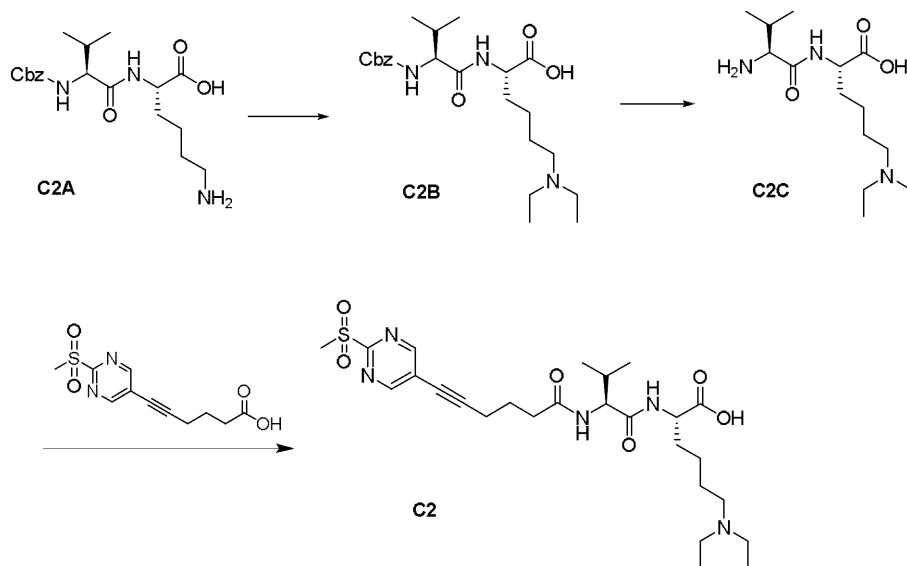
^1H NMR (400 MHz,) δ 9.13 (s, 2H), 7.95 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.21 (dd, $J = 8.8, 6.9$ Hz, 1H), 4.08 - 4.03 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.55 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.42 - 2.32 (m, 4H), 2.27 (s, 6H), 1.98 (dd, $J = 13.6, 6.8$ Hz, 1H), 1.86 - 1.77 (m, 2H), 1.74 - 1.55 (m, 2H), 1.47 - 1.37 (m, 2H), 1.31 - 1.23 (m, 2H), 0.85 (dd, $J = 12.8, 6.8$ Hz, 6H)。

【0313】

実施例1.1.4: N^6, N^6 -ジエチル- N^2 -((6-(2-(メチルスルホニル)ピリミジン-5-イル)ヘキサ-5-イノイル)-L-バリン)-L-リジン (C2)

10

【化49】



20

【0314】

ステップ1:

化合物C2A (5.0 g、12.05 mmol、Cas: 1872-06-8) をジクロロメタン (100 mL) に溶解し、反応液にアセトアルデヒド (3.2 g、72.3 mmol) を加え、室温で10分間攪拌して反応させ、反応液にナトリウムトリアセトキシボロハイドライド (12.8 g、60.25 mmol) を更に加え、反応を室温で1時間攪拌して反応させた。LCMSにより完全に反応したことが示された。反応液に塩化アンモニウム飽和水溶液を加えて1時間攪拌し、回転乾燥させ、濾過した後、濾液をC18カラム逆相により単離して精製 (アセトニトリル対0.05%ギ酸水溶液: 5%~55%) し、目的化合物C2B (4.57 g、収率82.0%) を白色固体として得た。

30

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 436.4$ 、

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.70 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.38 - 7.26 (m, 5H), 5.08 - 4.99 (m, 2H), 4.00 (dd, $J = 12.6, 6.5$ Hz, 1H), 3.86 (dd, $J = 8.6, 6.8$ Hz, 1H), 2.74 (dd, $J = 14.0, 6.9$ Hz, 4H), 2.64 - 2.54 (m, 2H), 2.05 - 1.94 (m, 1H), 1.72 - 1.52 (m, 2H), 1.52 - 1.38 (m, 2H), 1.38 - 1.18 (m, 2H), 1.04 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 0.87 - 0.81 (m, 6H)。

40

【0315】

ステップ2:

室温で、化合物C2B (1.6 g、3.68 mmol) をメタノール (80 mL) に溶解し、次いで、反応液にPd/C (0.16 g) を加え、水素ガス下で室温で12時間攪拌して反応させた。LCMSにより反応が完了したことが示された。反応液を濾過し、濾液を減圧濃縮して目的化合物C2C (900 mg、収率82%) をオフホワイトの固体として得た。

50

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.04 (br s, 1H), 4.02 - 3.99 (m, 1H), 3.10 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 2.65 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 2.55 - 2.51 (m, 2H), 2.06 - 1.93 (m, 1H), 1.73 - 1.54 (m, 2H), 1.47 - 1.38 (m, 2H), 1.30 - 1.21 (m, 2H), 1.01 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 0.89 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.79 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。

【0316】

ステップ3:

化合物6- (2- (メチルスルホニル) ピリミジン-5-イル) ヘキサ-5-イン酸 (268 mg、1 mmol) をDMF (8 mL) に溶解し、HATU (380 mg、1 mmol) 及びトリエチルアミン (322 mg、2.5 mmol) を順に加え、室温で20分間攪拌した後、化合物C2C (301 mg、1 mmol) を加え、室温で30分間攪拌し続けた。LCMSにより反応の完了を検出した後、反応液を直接C18カラム逆相 (アセトニトリルと0.05%ギ酸水溶液系) により精製し、目的化合物C2 (280 mg、収率51%) を白色固体として得た。

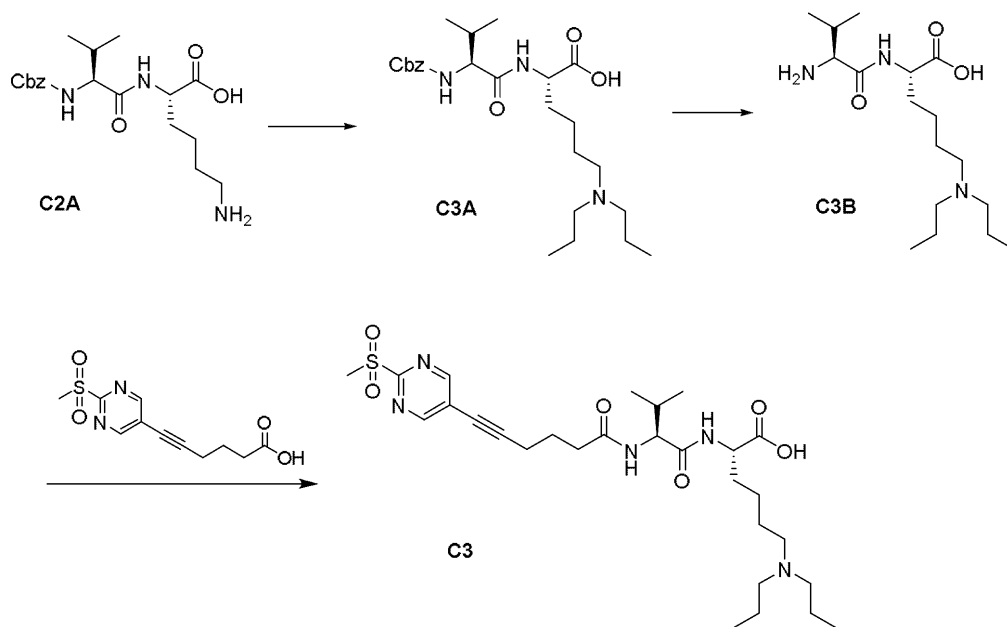
LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 552.3$ 、

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.13 (s, 2H), 7.95 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.18 (dd, J = 8.8, 6.8 Hz, 1H), 4.02 (dd, J = 12.8, 7.2 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.74 - 2.69 (m, 4H), 2.62 - 2.52 (m, 4H), 2.44 - 2.29 (m, 2H), 2.04 - 1.94 (m, 1H), 1.86 - 1.77 (m, 2H), 1.72 - 1.54 (m, 2H), 1.51 - 1.39 (m, 2H), 1.33 - 1.23 (m, 2H), 1.02 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 0.87 - 0.82 (m, 6H)。

【0317】

実施例1.1.5: N^6, N^6 -ジ- n -プロピル- N^2 - ((6- (2- (メチルスルホニル) ピリミジン-5-イル) ヘキサ-5-イノイル) -L-バリン) -L-リジン (C3)

【化50】



【0318】

ステップ1:

化合物C2A (5.0 g、12 mmol) をジクロロメタン (100 mL) に溶解し、反応液に n -プロパナール (4.2 g、72.3 mmol) を加え、室温で10分間攪拌して反応させ、反応液にナトリウムトリアセトキシボロハイドライド (12.8 g、60.25 mmol) を更に加え、反応を室温で1時間攪拌して反応させた。LCMSにより完全に反応したことが示された。反応液に塩化アンモニウム飽和水溶液を加えて1時間攪拌し、回転乾燥させ、濾過した後、濾液をC18カラム逆相により単離して精製 (アセトニトリル対0.05%ギ酸水溶液

：5%～55%）し、目的化合物C3A（4.57 g、収率82.0%）を白色固体として得た。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 464.0$ 、

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.81 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.38 - 7.28 (m, 5H), 5.04 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H), 4.12 - 4.02 (m, 1H), 3.94 - 3.82 (m, 1H), 2.65 - 2.52 (m, 6H), 2.06 - 1.94 (m, 1H), 1.76 - 1.64 (m, 1H), 1.64 - 1.53 (m, 1H), 1.52 - 1.40 (m, 6H), 1.34 - 1.18 (m, 2H), 0.92 - 0.80 (m, 12H)。

【0319】

ステップ2：

室温で、化合物C3A（2.0 g、4.32 mmol）をメタノール（80 mL）に溶解し、次いで、反応液にPd/C（0.16 g）を加え、水素ガス下で室温で12時間攪拌して反応させた。LCMSにより反応が完了したことが示された。反応液を濾過し、濾液を減圧濃縮し、目的化合物C3B（1.2 g、収率85.5%）を白色固体として得た。

10

【0320】

ステップ3：

化合物6-（2-（メチルスルホニル）ピリミジン-5-イル）ヘキサ-5-イン酸（100 mg、0.373 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、次いで、HATU（142 mg、0.373 mmol）及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン（120 mg、0.93 mmol）を加え、当該系を30分間攪拌し、次いで、化合物C3B（122 mg、0.371 mmol）を加え、反応液を室温で1時間攪拌した。LCMSにより反応の完了を検出した後、反応液を直接C18カラム逆相（アセトニトリルと0.05%ギ酸水溶液系）により精製し、目的化合物N⁶,N⁶-ジ-n-プロピル-N²-（（6-（2-（メチルスルホニル）ピリミジン-5-イル）ヘキサ-5-イノイル）-L-バリン）-L-リジン（C3、50 mg、収率28%）を淡黄色固体として得た。

20

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 580.0$ 、

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.24 (s, 2H), 7.98 - 7.93 (m, 2H), 4.24 - 4.16 (m, 1H), 4.10 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.79 - 2.64 (m, 6H), 2.55 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.45 - 2.26 (m, 2H), 2.06 - 1.91 (m, 1H), 1.89 - 1.78 (m, 2H), 1.76 - 1.66 (m, 1H), 1.64 - 1.57 (m, 1H), 1.57 - 1.42 (m, 6H), 1.37 - 1.24 (m, 2H), 0.93 - 0.78 (m, 12H)。

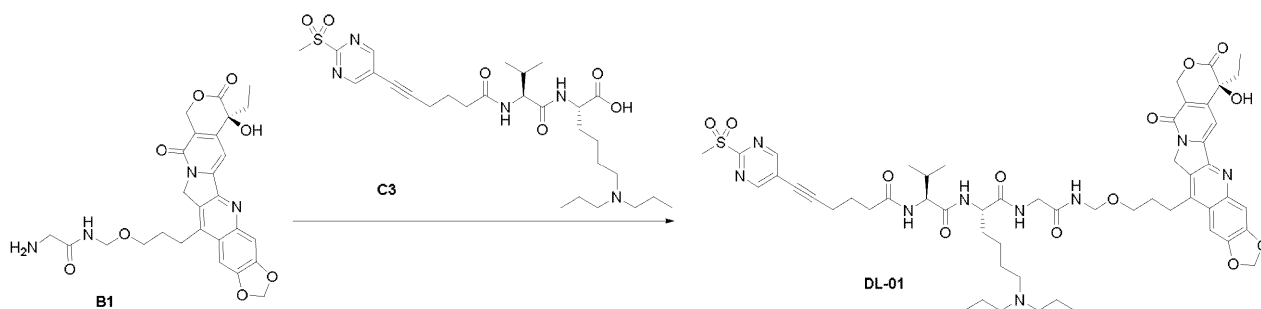
【0321】

30

実施例1.2 薬物-リンカー化合物の合成

実施例1.2.1：N-（（11S,14S）-11-（4-（ジ-n-プロピルアミノ）ブチル）-1-（（S）-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキセノ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル）-15-メチル-7,10,13-トリオキソ-4-オキサ-6,9,12-トリアザヘキサデカン-14-イル）-6-（2-（メチルスルホニル）ピリミジン-5-イル）ヘキサ-5-インアミド（DL-01）

【化51】



40

【0322】

化合物C3（43 mg、0.074 mmol）、化合物B1（40 mg、0.075 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、次いで、HBTU（28 mg、0.075 mmol）

50

及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン（24 mg、0.187 mmol）を順に加え、反応液を室温で1時間攪拌した。LCMSにより反応の完了を検出した後、反応液を直接分取クロマトグラフィー（0.01%トリフルオロ酢酸水溶液、アセトニトリル）により精製し、目的化合物（DL-01、8.5 mg、収率10%）を黄色固体として得た。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1098.6$ 、

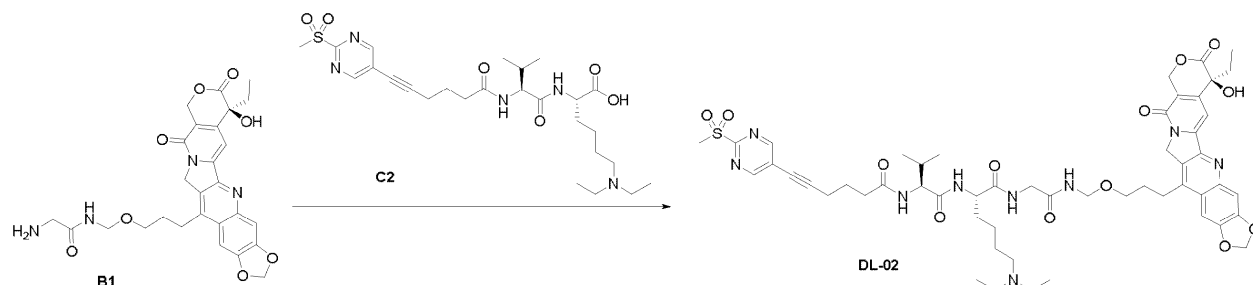
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.10 (s, 2H), 9.03 (s, 1H), 8.64 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.19 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.66 - 4.52 (m, 2H), 4.31 - 4.21 (m, 1H), 4.19 - 4.10 (m, 1H), 3.74 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.49 - 3.48 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.15 - 3.06 (m, 2H), 3.02 - 2.95 (m, 6H), 2.59 - 2.52 (m, 3H), 2.41 - 2.29 (m, 2H), 2.05 - 1.90 (m, 2H), 1.91 - 1.77 (m, 6H), 1.63 - 1.57 (m, 6H), 1.31 - 1.29 (m, 2H), 0.92 - 0.80 (m, 15H)。

10

【0323】

実施例1.2.2：N-（（11S,14S）-11-（4-（ジエチルアミノ）ブチル）-1-（（S）-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル）-15-メチル-7,10,13-トリオキソ-4-オキサ-6,9,12-トリアザヘキサデカン-14-イル）-6-（2-（メチルスルホニル）ピリミジン-5-イル）ヘキサ-5-インアミド（DL-02）

20



【0324】

化合物C2（40 mg、0.075 mmol）、化合物B1（41 mg、0.075 mmol）をDMF（1 mL）に溶解し、次いで、HOBt（15.2 mg、0.113 mmol）及び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（21.5 mg、0.113 mmol）を加え、次いで、トリエチルアミン（23 mg、0.225 mmol）を加え、加えた後の反応液を室温で16時間攪拌した。LCMSにより反応の完了を検出した後、反応液を濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を分取クロマトグラフィー（0.01%TFA水溶液、アセトニトリル）により精製し、目的化合物（DL-02、16 mg、収率20%）を黄色固体として得た。

30

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1070.6$ 、

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.13 - 9.08 (m, 2H), 9.01 (s, 1H), 8.64 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 8.20 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.65 - 4.53 (m, 2H), 4.26 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.20 - 4.10 (m, 1H), 3.74 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.50 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.14 - 3.07 (m, 6H), 2.98 (s, 2H), 2.55 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.41 - 2.29 (m, 2H), 2.03 - 1.89 (m, 2H), 1.89 - 1.77 (m, 7H), 1.61 - 1.56 (m, 2H), 1.32 (s, 2H), 1.16 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 0.91 - 0.78 (m, 9H)。

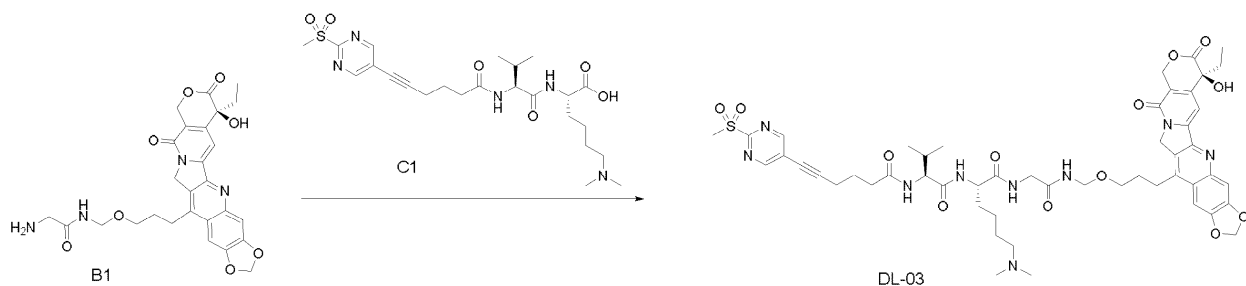
40

【0325】

実施例1.2.3：N-（（11S,14S）-11-（4-（ジメチルアミノ）ブチル）-1-（（S）-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキ

50

ソロ [4,5-g] ピラノ [3',4':6,7] インドリジノ [1,2-b] キノリン-14-イル) -15-
メチル-7,10,13-トリオキソ-4-オキサ-6,9,12-トリアザヘキサデカン-14-イル) -6-
(2-(メチルスルホニル)ピリミジン-5-イル)ヘキサ-5-インアミド (DL-03)
【化53】



10

【0326】

化合物B1 (100 mg、0.186 mmol) 及び化合物N⁶,N⁶-ジメチル-N²-(6-(2-(メチルスルホニル)ピリミジン-5-イル)ヘキサ-5-イノイル)-L-バリン)-L-リジン (C1、100 mg、0.191 mmol) をDMF (2 mL) に溶解した。次いで、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (38 mg、0.280 mmol) 及び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 (53 mg、0.280 mmol) を加え、そして、トリエチルアミン (56 mg、0.559 mmol) を更に加え、加えた後の反応液を室温で16時間攪拌した。LCMSにより反応の完了を検出した後、反応液を分取クロマトグラフィー (0.01 % TFA水溶液、アセトニトリル) により精製し、目的化合物 (DL-03、20 mg、収率10 %) を黄色固体として得た。

20

LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 1042.5、

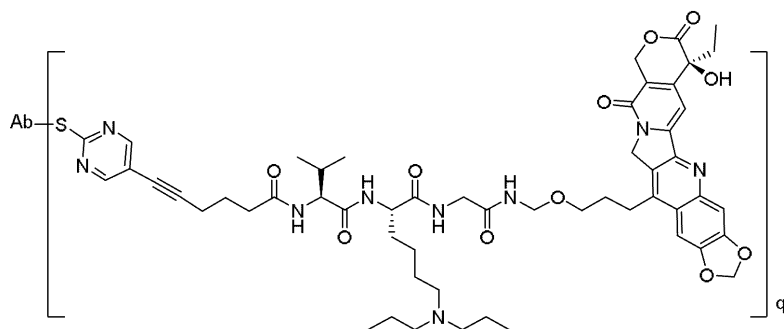
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.28 (s, 1H, TFA), 9.10 (s, 2H), 8.64 (br s, 1H), 8.19 (br s, 1H), 8.09 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.67 - 4.52 (m, 2H), 4.30 - 4.10 (m, 2H), 3.74 (br s, 2H), 3.50 (br s, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.17 - 3.07 (m, 2H), 3.04 - 2.91 (m, 2H), 2.75 (s, 6H), 2.46 - 2.24 (m, 3H), 2.04 - 1.66 (m, 9H), 1.63 - 1.46 (m, 3H), 1.32 - 1.29 (m, 2H), 0.87 - 0.82 (m, 9H)。

30

【0327】

実施例1.3 抗TF抗体-薬物コンジュゲートの調製

【化54】



40

Abは、抗TF抗体である。

【0328】

1.3.1 TF-ADC (DAR8) 試料の調製

実施例Iにより調製した抗TF抗体30 mgを、希釈液 (20 mM PB、pH7.5) で希釈し、最終濃度1 mMのエデト酸ナトリウム溶液を加え、均一に混合し、抗体6.0倍当量のTCEP溶液を加え、均一に混合し、室温で60分間放置し、上記溶液系に、ジメチルスルホ

50

キシドに溶解した抗体15倍当量のDL-01を加え、均一に混合し、室温で1時間静置し、カップリング後の試料を得て、反応完了後、30 KDaの限外濾過管を使用して試料をpH 6.0の20 mMヒスチジン緩衝液に置換し、そして低分子物質を除去し、最後に試料を濃縮することにより、抗TF抗体のADC組成物を含有する溶液TF-ADC (DAR8)を得た。実施例1.4の質量分析法により測定し、DAR値は8.0であった。

【0329】

1.3.2 TF-ADC (DAR3) 試料の調製

実施例Iで調製した抗TF抗体30 mgを希釈液(20 mM PB、pH7.5)で希釈し、最終濃度1 mMのエデト酸ナトリウム溶液を加え、均一に混合し、抗体6.0倍当量のTCEP溶液を加え、均一に混合し、室温で60分間放置し、上記溶液系に、ジメチルスルホキシドに溶解した抗体4.0倍当量のDL-01を加え、均一に混合し、室温で1時間静置し、カップリング後の試料を得て、反応完了後、30 KDaの限外濾過管を使用して試料をpH6.0の20 mMヒスチジン緩衝液に置換し、そして低分子物質を除去し、最後に試料を濃縮することにより、抗TF抗体-ADC組成物を含有する溶液TF-ADC (DAR3)を得た。質量分析法により測定し、DAR値は3.0であった。

【0330】

実施例1.4 質量分析法によるカップリング後の試料のDAR値測定

1.4.1 TF-ADC (DAR3) についてLC-MS分子量及びDAR値の分析を行った

クロマトグラフィー条件:

カラム: PLRP-S、2.1×50 mm、5 μm、

移動相A: 0.1%のFA/H₂O、移動相B: 0.1%のFA/ACN

カラム温度: 30℃

試料室温度: 8℃

流速: 0.6 mL/min

注入量: 2 μL

【表9A】

時間 (min)	1	5	5.1	7	10
移動相A	90	40	10	90	90
移動相B	10	60	90	10	10

【0331】

試料の処理: それぞれ50 μgの試料を取り、2 μLの1 MのDTTを加え、超純水を50 μLまで加えて約1.0 mg/mL濃度まで希釈し、均一に混合し、室温で30 min還元した。

LC/MS型番: Agilent 1290-6545XT Q-TOF

質量分析条件: Gas temp: 320℃、Drying Gas: Nitrogen、Nebulizer: 35 psi、Sheath Gas Temp: 350℃、sheath Gas Flow: 11 L/min、m/z 500~3000
結果は下記表9に示されている。

【0332】

10

20

30

40

50

【表 9 B】

表9 理論分子量及び実測分子量

ペプチド鎖		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理論値	23466.8	24484.9	25503.1	26521.3
	実測値	23467	24485	未検出	未検出
HC	理論値	50283.0	51301.1	52319.3	53337.4
	実測値	50284	51302	52320	53338

10

【0333】

表9において、mAbはカップリングしていないモノクローナル抗体を表し、LCは抗体軽鎖を表し、HCは抗体重鎖を表し、DAR1は軽鎖又は重鎖を含み、1つの毒素分子とカップリングしたコンジュゲートを表し、DAR2は、軽鎖又は重鎖を含み、2つの毒素分子とカップリングしたコンジュゲートを表し、DAR3は、軽鎖又は重鎖を含み、3つの毒素分子とカップリングしたコンジュゲートを表し、そのうち、モノクローナル抗体の理論分子量はG0F糖型で計算される。下記mAb、LC、HC、DAR1、DAR2、DAR3の説明は以上の通りである。

20

【0334】

検出の結果から、TF-ADC（DAR3）における抗体の軽鎖は0個～1個の毒素分子とカップリングしており（LC、DAR1の割合がそれぞれ53.8%、46.2%である）、重鎖は0個～3個の毒素分子とカップリングしている（mAb、DAR1、DAR2、DAR3の割合がそれぞれ30.6%、42.4%、20.2%、6.8%である）ことが示され、これにより、TF-ADC（DAR3）試料のカップリング比（平均DAR値）は3.0と算出された。

【0335】

1.4.2 TF-ADC（DAR8）についてのLC-MS分子量及びDAR値の分析

クロマトグラフィー条件：

カラム：Xbridge Protein BEH SEC（2.5 μm、4.6×150 mm）

移動相A：0.1%のFA/H₂O、移動相B：0.1%のFA/ACN

カラム温度：30℃

試料室温度：8℃

流速：0.3 mL/min

注入量：1 μL

【表 10 A】

時間（min）	0	5	7	7.1	10
移動相A	90	20	20	90	90
移動相B	10	80	80	10	10

30

40

【0336】

試料の処理：それぞれ50 μgの試料を取り、2 μLの1 MのDTTを加え、超純水を50 μLまで加えて約1.0 mg/mL濃度まで希釈し、均一に混合し、室温で30 min還元した。

LC/MS型番：UPLC（AB SCIEX）、高分解能質量分析計（AB SCIEX）

質量分析条件：Gas1：45、Gas2：45、CUR：30、TEM：450、ISVF：5000、DP：120、CE：12、質量数範囲：600～4000

50

【0337】

結果は下記表10に示されている。

【表10B】

表10 理論分子量及び実測分子量

ペプチド鎖		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理論値	23466.8	24484.9	25503.1	26521.3
	実測値	未検出	24485.1	未検出	未検出
HC	理論値	50283.0	51301.1	52319.3	53337.4
	実測値	未検出	未検出	未検出	53338.1

10

【0338】

検出の結果から、TF-ADC（DAR8）における抗体の軽鎖は0個～1個の毒素分子とカップリングしており（LC、DAR1の割合がそれぞれ0%、100.0%である）、重鎖は0個～3個の毒素分子とカップリングしている（mAb、DAR1、DAR2、DAR3の割合がそれぞれ0%、0%、0%、100.0%である）ことが示され、これにより、TF-ADC（DAR8）試料のカップリング比（平均DAR値）は8.0と算出された。

20

【0339】

実施例2 抗TF抗体ADC評価

実施例2.1 抗TF ADC親和性の検出

ADC試料TF-ADC（DAR8）を調製するための上記の実施例における方法に従って、それぞれ毒素-Linker（B81、即ち、DL-01分子）に対する本発明の4つの候補抗体（2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1、27H8H3hz1）及び参照抗体（BM）のADCコンジュゲートを調製した。

【0340】

抗TFヒト化抗体を毒素-Linker（B81、即ち、DL-01分子）とカップリングする前後、実施例Iに記載された類似する方法に従って、抗原タンパク質に基づくELISAによって抗体親和性の変化を測定した。

30

【0341】

実験結果は表11並びに図6A及び6Bに示され、4つのヒト化抗体は、B81とのカップリング後に親和性に顕著な変化を示さなかった。

40

50

【表 1 1】

表11. ヒト化抗体ADCのカップリング前後の親和性検出

試料番号	EC50 (ng/mL)
2B12B10-hz1	6.65
2B12B10-hz1-B81	3.76
30G11B7-hz1	7.68
30G11B7-hz1-B81	7.75
22F11H5-hz1	5.15
22F11H5-hz1-B81	8.83
27H8H3-hz1	3.13
27H8H3-hz1-B81	3.43

10

【0 3 4 2】

実施例2.2 ADCのインビトロ殺傷活性検出

20

パンクレアチン消化によってTF陽性腫瘍細胞KYSE520細胞を収集し、RPMI1640+2%のFBSで細胞を再懸濁させ、1ウェル当たり2000個の細胞を播種し、RPMI1640+2%のFBSで測定待ちADCを勾配希釈し、50 $\mu\text{g/mL}$ から開始し、3倍希釈し、11個の濃度点であり、希釈後のADCをプレートに加え、37℃で120時間インキュベートし、インキュベーション完了後、CCK8試薬を加え、20 μL /ウェルで2時間～4時間反応させ、マイクロプレートリーダー450 nmで読み取り、そしてGraphpad Prismに導入して曲線フィッティングを行った。

【0 3 4 3】

実験結果は図7A及び7Bに示され、2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1、及び27H8H3-hz1は、B81とのカップリング後に何れもKYSE520細胞を効果的に殺傷することができ、且つ殺傷IC50値は、参照抗体とのカップリング後のADCと基本的に相当した。

30

【0 3 4 4】

実施例2.3 ADCのインビボ薬効

抗TFヒト化ADC薬物のインビボ薬効を検証し、KYSE520皮下異種移植雌Balb/c Nudeマウスモデルにおける試験薬物の抗腫瘍作用を評価するために、5週齢～6週齢の雌Balb/c Nudeマウスを購入した。対数増殖期まで増殖したKYSE520細胞をパンクレアチンで消化し、そしてPBSで再懸濁させ、各マウスに 5×10^6 の細胞を皮下接種した。腫瘍が250 mm^3 の大きさに成長すると、毎回1 mg/kg又は3 mg/kgで週1回に測定待ちのADCを静脈内投与し、具体的な方案は以下の表13及び14に示される。この実験の主な観察指標は、1) TGI(%)、式： $\text{TGI}(\%) = (1 - T/C) \times 100\%$ (T及びCは、それぞれ、ある特定の時点における治療群及び対照群の相対腫瘍体積) 2) 試験終了時点における腫瘍体積のサイズ写真、腫瘍重量である。3) ADC薬物のマウス体重に対する影響である。実験は合計2回行った。

40

【0 3 4 5】

1回目の実験の投与方案及び結果は表12及び図8に示され、22F11H5-hz1及び30G11B7は、B81とのカップリング後にマウスインビボで何れも良好な腫瘍抑制効果を有し、3 mg/kg用量でのTGIはBM-B81に相当し、1 mg/kg用量で両方ともBM-B81よりも優れた。マウスの体重変化の状況は図9に示され、投与プロセス全体において2つのADCがマウスの体重に影響を与えなかったことを示した。

50

【表 1 2】

表12. 抗TF ADCのインビボ薬効

群分け	マウス数	試料	用量 (mg/kg)	投与方式	投与頻度	TGI (%)
1	5	生理食塩水	/	i.v.	QW*3	/
2	5	IgG-B81	3	i.v.	QW*3	18.3
3	5	BM-B81	3	i.v.	QW*3	91.5
4	5	BM-B81	1	i.v.	QW*3	56.9
5	5	30G11B7-hz1-B81	3	i.v.	QW*3	91.8
6	5	30G11B7-hz1-B81	1	i.v.	QW*3	62.6
7	5	22F11H5-hz1-B81	3	i.v.	QW*3	91.4
8	5	22F11H5-hz1-B81	1	i.v.	QW*3	74.7

10

【0 3 4 6】

2回目の実験の実験方案及び結果は表13及び図10に示され、2B12B10-hz1及び27H8H3-hz1は、B81とのカップリング後に、マウスインビボで何れも良好な腫瘍抑制効果を有し、1 mg/kg用量で両方ともBM-B81よりも優れた。マウスの体重変化の状況は図11に示され、2つのADCがマウスの体重に影響を与えなかったことを示した。

20

【表 1 3】

表13. 抗TF ADCのインビボ薬効

群分け	マウス数	試料	用量 (mg/kg)	投与方式	投与頻度	TGI (%)
1	5	生理食塩水	/	i.v.	QW*3	/
2	5	BM-B81	1	i.v.	QW*3	18.5
3	5	2B12B10-B81	1	i.v.	QW*3	41.4
4	5	27H8H3-hz1-B81	1	i.v.	QW*3	52.8

30

【0 3 4 7】

配列表：

40

50

【表 1 4 - 1】

SEQ ID NO:	説明	配列
1	2B12B10-hz1 重鎖可変領域 (VH) 配列	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDSGMH WVRQAPGKGLEWVAYISRDSNTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCGRRYYGDY FDYWGQGTLVTVSS
2	2B12B10-hz1 軽鎖可変領域 (VL) 配列	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQRVNTNYLHWY QQKPGQSPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYFCQQSYNWPLTFGQGTKVEIK
3	30G11B7-hz1 重鎖可変領域 (VH) 配列	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMF WVRQAPGKGLEWVAYISRGSTTIYYADSVKGRFTIS RDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCTRRYYGDYF DYWGQGTLVTVSS
4	30G11B7-hz1 軽鎖可変領域 (VL) 配列	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQISNYLHWY QQKPDQSPKLLIKYASQSIGVPSRFSGSGSGTDFTL TINSLEAEDAATYFCQQSYNWPLTFGQGTKVEIK
5	22F11H5-hz1 重鎖可変領域 (VH) 配列	QVQLVQSGAEVKQPGASVKVSCKASGYTFTTYWM HWVRQAPGQGLEWMGMIDPSDSYTTYAQKFQGR VTLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGSGPG LFAYWGQGTLVTVSS
6	22F11H5-hz1 軽鎖可変領域 (VL) 配列	DIQETQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWY QQKPGKAPKLLIYHTSRLQSGVPSRFSGSGSGTDYT LTISSLQPEDFATYYCQQGNMPPTYTFGQGTKVEIK
7	27H8H3-hz1 重鎖可変領域 (VH) 配列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWM HWVRQAPGQGLEWMGMIDPSDSYTSYAQKFQGRV TLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRGSGPGL FAYWGQGTLVTVSS
8	27H8H3-hz1 軽鎖可変領域 (VL) 配列	DIQETQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLNWY QQKPGKAPKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSVSGTDFT LTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPYTFGQGTKVEIK

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

9	2B12B10-hz1重 鎖CDR1_Chothia	GFAFSDS
10	2B12B10-hz1重 鎖CDR2_Chothia	SRDSNT
11	2B12B10-hz1重 鎖CDR3_Chothia	RYYGDYFDY
12	2B12B10-hz1重 鎖CDR1_Abm	GFAFSDSGMH
13	2B12B10-hz1重 鎖CDR2_Abm	YISRDSNTIY
14	2B12B10-hz1重 鎖CDR3_Abm	RYYGDYFDY
15	2B12B10-hz1重 鎖CDR1_Kabat	DSGMH
16	2B12B10-hz1重 鎖CDR2_Kabat	YISRDSNTIYYADSVKG
17	2B12B10-hz1重 鎖CDR3_Kabat	RYYGDYFDY
18	2B12B10-hz1重 鎖CDR1_IMGT	GFAFSDSG
19	2B12B10-hz1重 鎖CDR2_IMGT	ISRDSNTI
20	2B12B10-hz1重 鎖CDR3_IMGT	GRRYYGDYFDY
21	2B12B10-hz1軽 鎖CDR1_Chothia	RASQRVTNYLH
22	2B12B10-hz1軽 鎖CDR2_Chothia	YASQSIG
23	2B12B10-hz1軽 鎖CDR3_Chothia	QQSYNWPLT

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 3】

24	2B12B10-hz1軽 鎖CDR1_Abm	RASQRVTNYLH
25	2B12B10-hz1軽 鎖CDR2_Abm	YASQSIG
26	2B12B10-hz1軽 鎖CDR3_Abm	QQSYNWPLT
27	2B12B10-hz1軽 鎖CDR1_Kabat	RASQRVTNYLH
28	2B12B10-hz1軽 鎖CDR2_Kabat	YASQSIG
29	2B12B10-hz1軽 鎖CDR3_Kabat	QQSYNWPLT
30	2B12B10-hz1軽 鎖CDR1_IMGT	QRVTNY
31	2B12B10-hz1軽 鎖CDR2_IMGT	YAS
32	2B12B10-hz1軽 鎖CDR3_IMGT	QQSYNWPLT
33	30G11B7-hz1重 鎖CDR1_Chothia	GFTFSDY
34	30G11B7-hz1重 鎖CDR2_Chothia	SRGSTT
35	30G11B7-hz1重 鎖CDR3_Chothia	RYYGDYFDY
36	30G11B7-hz1重 鎖CDR1_Abm	GFTFSDYGMF
37	30G11B7-hz1重 鎖CDR2_Abm	YISRGSTTIY
38	30G11B7-hz1重 鎖CDR3_Abm	RYYGDYFDY

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 4】

39	30G11B7-hz1重 鎖CDR1_Kabat	DYGMF
40	30G11B7-hz1重 鎖CDR2_Kabat	YISRGSTTIYADSVKG
41	30G11B7-hz1重 鎖CDR3_Kabat	RYYGDYFDY
42	30G11B7-hz1重 鎖CDR1_IMGT	GFTFSDYG
43	30G11B7-hz1重 鎖CDR2_IMGT	ISRGSTTI
44	30G11B7-hz1重 鎖CDR3_IMGT	TRRYYGDYFDY
45	30G11B7-hz1軽 鎖CDR1_Chothia	RASQSI SNYLH
46	30G11B7-hz1軽 鎖CDR2_Chothia	YASQSI S
47	30G11B7-hz1軽 鎖CDR3_Chothia	QQSYNWPLT
48	30G11B7-hz1軽 鎖CDR1_Abm	RASQSI SNYLH
49	30G11B7-hz1軽 鎖CDR2_Abm	YASQSI S
50	30G11B7-hz1軽 鎖CDR3_Abm	QQSYNWPLT
51	30G11B7-hz1軽 鎖CDR1_Kabat	RASQSI SNYLH
52	30G11B7-hz1軽 鎖CDR2_Kabat	YASQSI S
53	30G11B7-hz1軽 鎖CDR3_Kabat	QQSYNWPLT

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 5】

54	30G11B7-hz1軽 鎖CDR1_IMGT	Q SISNY
55	30G11B7-hz1軽 鎖CDR2_IMGT	YAS
56	30G11B7-hz1軽 鎖CDR3_IMGT	QQSYNWPLT
57	22F11H5-hz1重 鎖CDR1_Chothia	GYTFTTY
58	22F11H5-hz1重 鎖CDR2_Chothia	DPSDSY
59	22F11H5-hz1重 鎖CDR3_Chothia	GSGPGLFAY
60	22F11H5-hz1重 鎖CDR1_Abm	GYTFTTYWMH
61	22F11H5-hz1重 鎖CDR2_Abm	MIDPSDSYTT
62	22F11H5-hz1重 鎖CDR3_Abm	GSGPGLFAY
63	22F11H5-hz1重 鎖CDR1_Kabat	TYWMH
64	22F11H5-hz1重 鎖CDR2_Kabat	MIDPSDSYTTYAQKFQG
65	22F11H5-hz1重 鎖CDR3_Kabat	GSGPGLFAY
66	22F11H5-hz1重 鎖CDR1_IMGT	GYTFTTYW
67	22F11H5-hz1重 鎖CDR2_IMGT	IDPSDSYT
68	22F11H5-hz1重 鎖CDR3_IMGT	ARGSGPGLFAY

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 6】

69	22F11H5-hz1 軽鎖CDR1_Chothia	RASQDIRNYLN
70	22F11H5-hz1 軽鎖CDR2_Chothia	HTSRLQS
71	22F11H5-hz1 軽鎖CDR3_Chothia	QQGNMPPYT
72	22F11H5-hz1 軽鎖CDR1_Abm	RASQDIRNYLN
73	22F11H5-hz1 軽鎖CDR2_Abm	HTSRLQS
74	22F11H5-hz1 軽鎖CDR3_Abm	QQGNMPPYT
75	22F11H5-hz1 軽鎖CDR1_Kabat	RASQDIRNYLN
76	22F11H5-hz1 軽鎖CDR2_Kabat	HTSRLQS
77	22F11H5-hz1 軽鎖CDR3_Kabat	QQGNMPPYT
78	22F11H5-hz1 軽鎖CDR1_IMGT	QDIRNY
79	22F11H5-hz1 軽鎖CDR2_IMGT	HTS
80	22F11H5-hz1 軽鎖CDR3_IMGT	QQGNMPPYT
81	27H8H3-hz1 重鎖CDR1_Chothia	GYTFTTY
82	27H8H3-hz1 重鎖CDR2_Chothia	DPSDSY
83	27H8H3-hz1 重鎖CDR3_Chothia	GSGPGLFAY

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 7】

84	27H8H3-hz1 重鎖 CDR1_Abm	GYTFTTYWMH
85	27H8H3-hz1 重鎖 CDR2_Abm	MIDPSDSYTS
86	27H8H3-hz1 重鎖 CDR3_Abm	GSGPGLFAY
87	27H8H3-hz1 重鎖 CDR1_Kabat	TYWMH
88	27H8H3-hz1 重鎖 CDR2_Kabat	MIDPSDSYTSYAQKFQG
89	27H8H3-hz1 重鎖 CDR3_Kabat	GSGPGLFAY
90	27H8H3-hz1 重鎖 CDR1_IMGT	GYTFTTYW
91	27H8H3-hz1 重鎖 CDR2_IMGT	IDPSDSYT
92	27H8H3-hz1 重鎖 CDR3_IMGT	TRGSGPGLFAY
93	27H8H3-hz1 輕鎖 CDR1_Chothia	RASQGISNYLN
94	27H8H3-hz1 輕鎖 CDR2_Chothia	HTSRLHS
95	27H8H3-hz1 輕鎖 CDR3_Chothia	QQGNTLPYT
96	27H8H3-hz1 輕鎖 CDR1_Abm	RASQGISNYLN
97	27H8H3-hz1 輕鎖 CDR2_Abm	HTSRLHS
98	27H8H3-hz1 輕鎖 CDR3_Abm	QQGNTLPYT

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 8】

99	27H8H3-hz1軽鎖 CDR1_Kabat	RASQGISNYLN
100	27H8H3-hz1軽鎖 CDR2_Kabat	HTSRLHS
101	27H8H3-hz1軽鎖 CDR3_Kabat	QQGNTLPYT
102	27H8H3-hz1軽鎖 CDR1_IMGT	QGISNY
103	27H8H3-hz1軽鎖 CDR2_IMGT	HTS
104	27H8H3-hz1軽鎖 CDR3_IMGT	QQGNTLPYT
105	IgG1 Kappa CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
106	IgG1 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
107	Benchmark重鎖 可変領域 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGDYTYTDSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPPWGY LDSWGQGTLLVTVSS
108	Benchmark軽鎖 可変領域	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSLTFTGGGTKVEIK

10

20

30

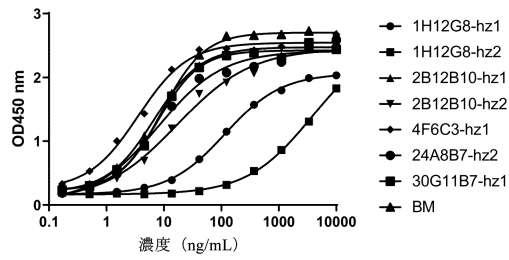
40

50

【図面】

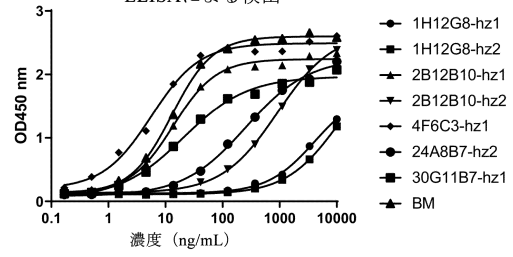
【図 1 A】

ヒトTF-Hisに対するヒト化抗体の親和性のELISAによる検出



【図 1 B】

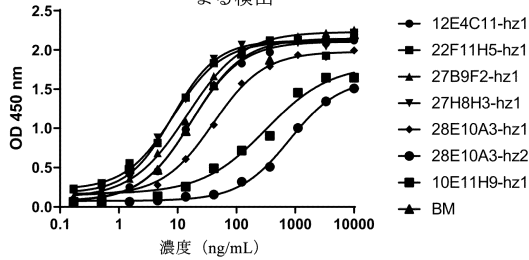
カニクイザルTF-Hisに対するヒト化抗体の親和性のELISAによる検出



10

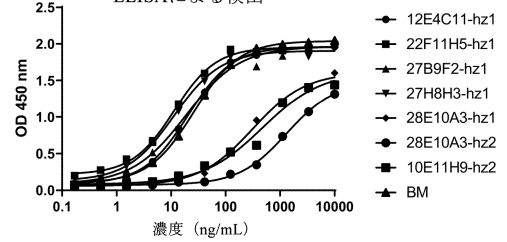
【図 1 C】

ヒトTF-Hisに対するヒト化抗体の親和性のELISAによる検出



【図 1 D】

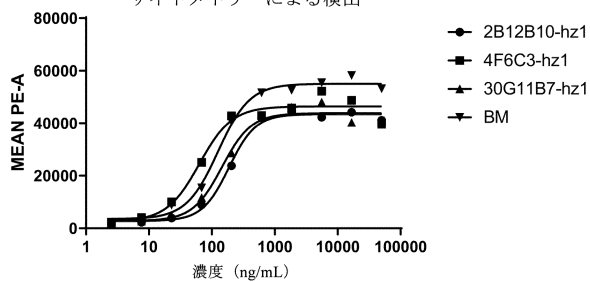
カニクイザルTF-Hisに対するヒト化抗体の親和性のELISAによる検出



20

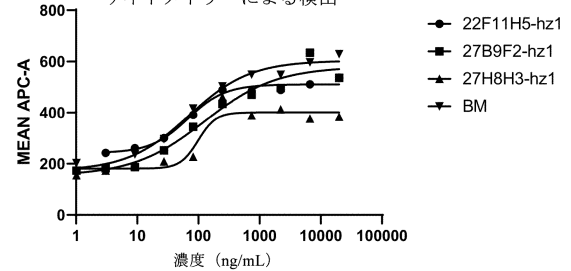
【図 2 A】

NCI-H358細胞に対するヒト化抗体の親和性のフローサイトメトリーによる検出



【図 2 B】

NCI-H358細胞に対するヒト化抗体の親和性のフローサイトメトリーによる検出



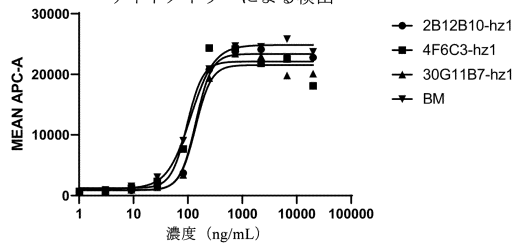
30

40

50

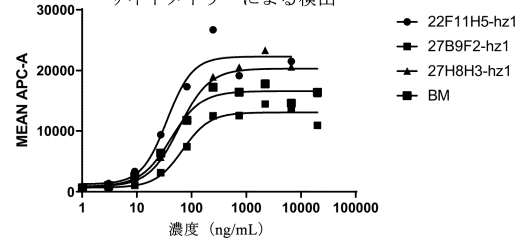
【図 2 C】

KYSE520細胞に対するヒト化抗体の親和性のフロー
サイトメトリーによる検出



【図 2 D】

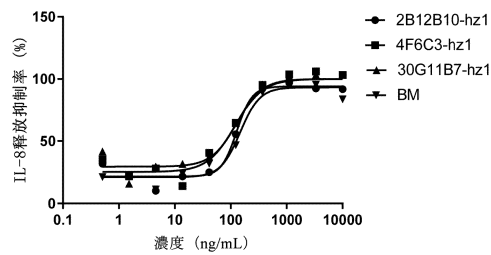
KYSE520細胞に対するヒト化抗体の親和性のフロー
サイトメトリーによる検出



10

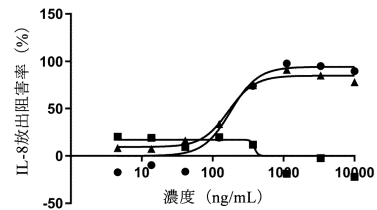
【図 3 A】

IL-8放出阻害実験



【図 3 B】

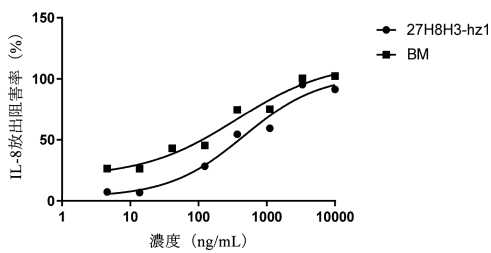
IL-8放出阻害実験



20

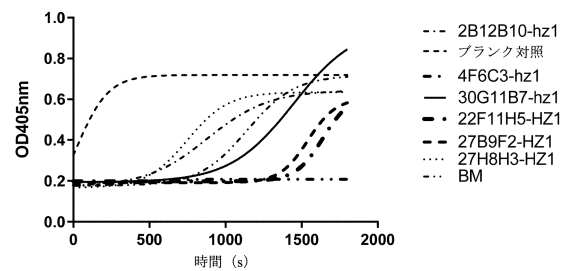
【図 3 C】

IL-8放出阻害実験



【図 4 A】

血液凝固に対するヒト化抗体の影響 (2 mMのCa²⁺、抗体濃度50 μg/mL)



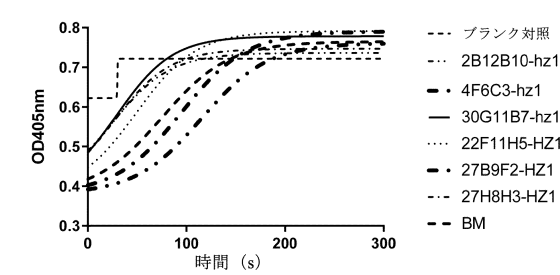
30

40

50

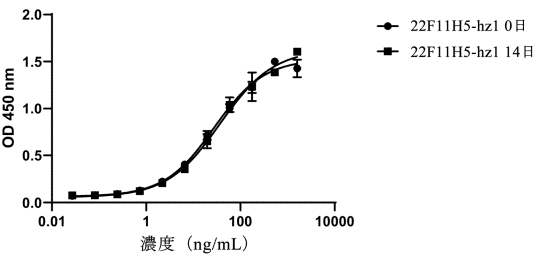
【図 4 B】

血液凝固に対するヒト化抗体の影響（5 mMのCa²⁺、抗体濃度20 μg/mL）



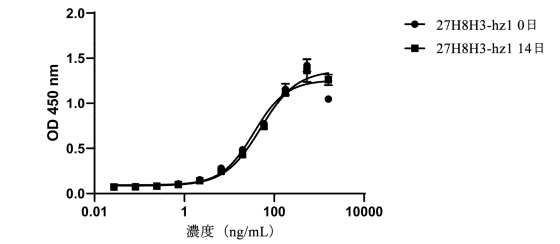
【図 5 A】

ヒト化抗体血清安定性の検出



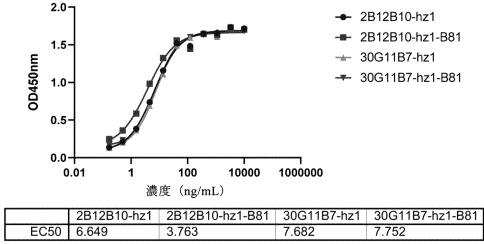
【図 5 B】

ヒト化抗体血清安定性の検出



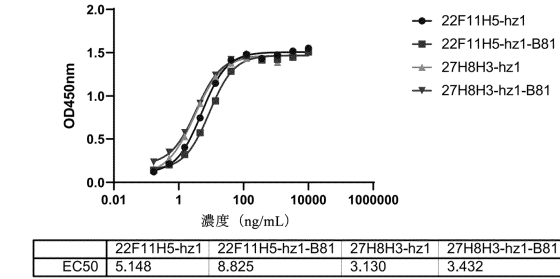
【図 6 A】

抗TF ADC ELISA親和性の検出



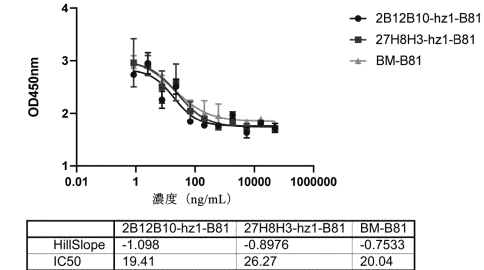
【図 6 B】

抗TF ADC ELISA親和性の検出



【図 7 A】

抗TF ADCインビトロ殺傷-KYSE520細胞



10

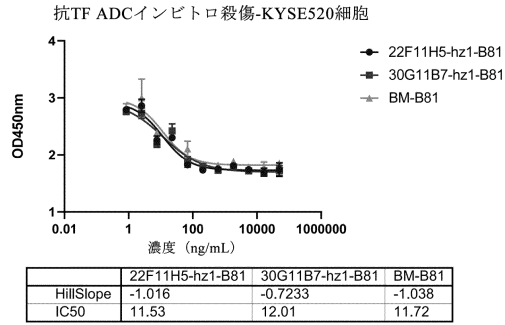
20

30

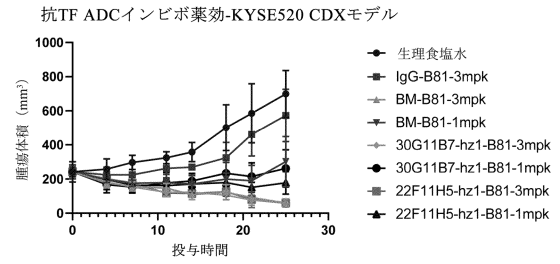
40

50

【図 7 B】

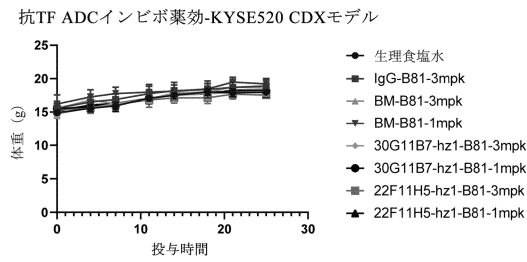


【図 8】

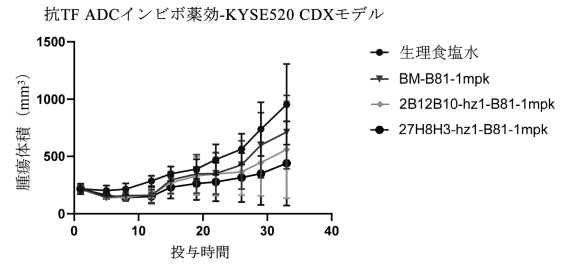


10

【図 9】

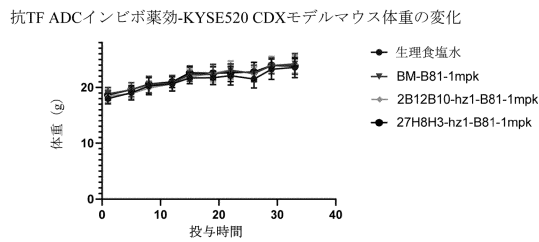


【図 10】



20

【図 11】



30

【配列表】

2025508779000001.xml

40

50

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2023/078127
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/36(2006.01)i; A61K47/68(2017.01)i; A61P35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K, A61K, A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Database: CNIXT, WPABS, WPABSC, ENTXT, ENTXTC, DWPI, VEN, CJFD, CNKI, PUBMED, ELSVIER, 万方, WANFANG, 百度学术搜索, BAIDU SCHOLAR SEARCH: 细胞毒性药物, 抗体偶联药物, 抗体, 喜树碱, TF抗体, 组织因子, cytotoxic drugs, Camptothecin, antibody, TF, ADC, tissue factor Genbank, EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统: 对 SEQ ID NOs: 1-104 的序列检索, China Patent Biological Sequence Search System: search for SEQ ID NOs: 1-104		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CA 3141428 A1 (ICONIC THERAPEUTICS, INC. et al.) 07 January 2021 (2021-01-07) see claim 1, description paragraph 471	1-27
A	CN 110575547 A (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 17 December 2019 (2019-12-17) see claims 1 and 11, description paragraphs 155-156	1-27
A	WO 2022011324 A1 (ICONIC THERAPEUTICS INC.) 13 January 2022 (2022-01-13) see abstract	1-27
A	WO 2022022508 A1 (TUOJIE BIOTECH (SHANGHAI) CO., LTD.) 03 February 2022 (2022-02-03) see abstract	1-27
A	CN 111727075 A (EURO CELTIQUE SA) 29 September 2020 (2020-09-29) see claim 19, description paragraph 30	1-27
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 May 2023		Date of mailing of the international search report 04 June 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

International application No.

PCT/CN2023/078127

Category*

Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages

Relevant to claim No.

A

陈倩倩等 (CHEN, Qianqian et al.). "组织因子在肺癌中的研究进展 (Research Progress on Tissue Factor in Lung Cancer)" *肿瘤学杂志 (Journal of Chinese Oncology)*, Vol. 26, No. (1), 31 January 2020 (2020-01-31), pages 62-66, see page 64 left-hand column last paragraph

1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/078127

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/078127

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **Part of 25, and 26**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The use (1), (2) and (3) in vivo of claim 25 and claim 26 belong to a method for treatment of diseases, which is subject matter for which no search is required according to PCT Rule 39.1(4). The search for claim 26 is carried out on the basis of the subject matter of claim 26 being reasonably expected to be a pharmaceutical use claim, i.e., "the use of an antibody-drug conjugate of any one of claims 1-14 or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, or an anti-TF antibody of any one of claims 16-19 or an antigen-binding fragment thereof, or an immunoconjugate or immune fusion or multispecific antibody of claim 23, or a pharmaceutical composition of claim 15 or 24 in the preparation of a drug for preventing or treating TF-positive tumors."
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/078127

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CA	3141428	A1	07 January 2021	KR	20220029724	A	08 March 2022
				ECSP	22007981	A	31 May 2022
				CR	20220047	A	23 June 2022
				CO	2022001083	A2	20 May 2022
				WO	2021003399	A1	07 January 2021
				US	2022257789	A1	18 August 2022
				IL	289138	A	01 February 2022
				CL	2021003414	A1	09 September 2022
				TW	202116357	A	01 May 2021
				EA	202193309	A1	28 March 2022
				PE	20221004	A1	15 June 2022
				AU	2020299398	A1	24 February 2022
				EP	3994150	A1	11 May 2022
				BR	112021025720	A2	21 June 2022
				JP	2022538908	A	06 September 2022
				AR	119346	A1	09 December 2021
				DOP	2021000268	A	15 August 2022
CN	110575547	A	17 December 2019	None			
WO	2022011324	A1	13 January 2022	CA	3184987	A1	13 January 2022
				TW	202216198	A	01 May 2022
				KR	20230037042	A	15 March 2023
				AU	2021304359	A1	02 March 2023
				BR	112023000455	A2	28 March 2023
WO	2022022508	A1	03 February 2022	KR	20230044275	A	03 April 2023
				AU	2021317378	A1	09 March 2023
				BR	112023001359	A2	14 February 2023
				CA	3184724	A1	03 February 2022
				TW	202214306	A	16 April 2022
CN	111727075	A	29 September 2020	AU	2018371271	A1	11 June 2020
				CA	3083345	A1	31 May 2019
				MX	2020005473	A	27 August 2020
				IL	274951	A	30 July 2020
				JP	2021503915	A	15 February 2021
				JP	7165193	B2	02 November 2022
				EP	3717069	A1	07 October 2020
				WO	2019102435	A1	31 May 2019
				US	2020385487	A1	10 December 2020
				US	11401345	B2	02 August 2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

国际检索报告		国际申请号
		PCT/CN2023/078127
A. 主题的分类		
C07K16/36(2006.01)i; A61K47/68(2017.01)i; A61P35/00(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07K, A61K, A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
数据库: CNTXT, WPABS, WPABSC, ENTXT, ENTXTC, DWPI, VEN, CJFD, CNKI, PUBMED, ELSVIER, 万方, 百度学术搜索; 细胞毒性药物, 抗体偶联药物, 抗体, 喜树碱, TF抗体, 组织因子, cytotoxic drugs, Camptothecin, antibody, TF, ADC, tissue factor Genbank, EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统:对SEQ ID NOs:1-104的序列检索		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CA 3141428 A1 (ICONIC THERAPEUTICS, INC. 等) 2021年1月7日 (2021 - 01 - 07) 参见权利要求1、说明书第471段	1-27
A	CN 110575547 A (中国科学院上海药物研究所等) 2019年12月17日 (2019 - 12 - 17) 参见权利要求1和11, 说明书第155-156段	1-27
A	WO 2022011324 A1 (ICONIC THERAPEUTICS INC) 2022年1月13日 (2022 - 01 - 13) 参见摘要	1-27
A	WO 2022022508 A1 (TUOJIE BIOTECH SHANGHAI CO LTD) 2022年2月3日 (2022 - 02 - 03) 参见摘要	1-27
A	CN 111727075 A (普渡制药公司) 2020年9月29日 (2020 - 09 - 29) 参见权利要求19、说明书第30段	1-27
A	陈倩倩等, “组织因子在肺癌中的研究进展” 肿瘤学杂志, 第26卷, 第1期, 2020年1月31日 (2020 - 01 - 31), 第62-66页, 参见第64页左栏最后一段	1-27
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2023年5月26日		2023年6月4日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		袁实
		电话号码 (+86) 010-62411598

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/078127
第I栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)	
1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:		
a.	☒ 作为国际申请的一部分提交的:	10
b.	☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)), ☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。	
2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。		
3. 补充意见:		20
		30
		40
		50

国际检索报告		国际申请号
		PCT/CN2023/078127
第II栏	某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)	
根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：		
1. ☒	权利要求： 25的一部分和26 因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即： 权利要求25中的在体内的用途(1)(2)(3)和权利要求26属于疾病治疗方法，根据PCT细则39.1(4)为不要求检索的主题。对权利要求26的检索是基于将对权利要求26合理预期为制药用途权利要求的主题进行的，即“权利要求1-14任一项的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物、或权利要求16-19任一项的抗TF抗体或其抗原结合片段、或权利要求23的免疫缀合物或免疫融合物或多特异性抗体、或权利要求15或24的药物组合物在制备预防或治疗TF阳性肿瘤的药物中的应用。”	10
2. ☐	权利要求： 因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：	
3. ☐	权利要求： 因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。	20
		30
		40
		50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/078127

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CA 3141428 A1	2021年1月7日	KR 20220029724 A ECSP 22007981 A CR 20220047 A CO 2022001083 A2 WO 2021003399 A1 US 2022257789 A1 IL 289138 A CL 2021003414 A1 TW 202116357 A EA 202193309 A1 PE 20221004 A1 AU 2020299398 A1 EP 3994150 A1 BR 112021025720 A2 JP 2022538908 A AR 119346 A1 DOP 2021000268 A	2022年3月8日 2022年5月31日 2022年6月23日 2022年5月20日 2021年1月7日 2022年8月18日 2022年2月1日 2022年9月9日 2021年5月1日 2022年3月28日 2022年6月15日 2022年2月24日 2022年5月11日 2022年6月21日 2022年9月6日 2021年12月9日 2022年8月15日
CN 110575547 A	2019年12月17日	无	
WO 2022011324 A1	2022年1月13日	CA 3184987 A1 TW 202216198 A KR 20230037042 A AU 2021304359 A1 BR 112023000455 A2	2022年1月13日 2022年5月1日 2023年3月15日 2023年3月2日 2023年3月28日
WO 2022022508 A1	2022年2月3日	KR 20230044275 A AU 2021317378 A1 BR 112023001359 A2 CA 3184724 A1 TW 202214306 A	2023年4月3日 2023年3月9日 2023年2月14日 2022年2月3日 2022年4月16日
CN 111727075 A	2020年9月29日	AU 2018371271 A1 CA 3083345 A1 MX 2020005473 A IL 274951 A JP 2021503915 A JP 7165193 B2 EP 3717069 A1 WO 2019102435 A1 US 2020385487 A1 US 11401345 B2	2020年6月11日 2019年5月31日 2020年8月27日 2020年7月30日 2021年2月15日 2022年11月2日 2020年10月7日 2019年5月31日 2020年12月10日 2022年8月2日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	4 H 0 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/4745 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/4745	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
	A 6 1 K 39/395	T
	G 0 1 N 33/53	V
	C 0 7 K 19/00	

(32)優先日 令和4年9月27日(2022.9.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関

中国(CN)

(81)指定国・地域 AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW)
 ート 2 1 8 , ビルディング 2 2

(72)発明者 シュウ, リンフェン

中華人民共和国 2 1 5 0 0 0 チャンスー, スーチョウ, スーチョウ インダストリアル パーク
 , サンティアン ストリート 2 1 8 , ビルディング 2 2

(72)発明者 ウー, ツェンウェイ

中華人民共和国 2 1 5 0 0 0 チャンスー, スーチョウ, スーチョウ インダストリアル パーク
 , サンティアン ストリート 2 1 8 , ビルディング 2 2

(72)発明者 ルアン, カ

中華人民共和国 2 1 5 0 0 0 チャンスー, スーチョウ, スーチョウ インダストリアル パーク
 , サンティアン ストリート 2 1 8 , ビルディング 2 2

(72)発明者 ワン, ウェンキ

中華人民共和国 2 1 5 0 0 0 チャンスー, スーチョウ, スーチョウ インダストリアル パーク
 , サンティアン ストリート 2 1 8 , ビルディング 2 2

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA92Y AA94Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C076 AA12 AA30 AA95 BB11 CC27 CC41 EE41 EE59

4C084 AA17 MA17 MA44 MA66 NA05 NA13 NA14 ZB26

4C085 AA13 AA14 BB31 BB36 BB41 BB43 BB44 CC22 CC23 EE01
 GG01

4C086 AA01 AA02 CB22 MA01 MA04 MA17 MA44 MA66 NA05 NA13
 NA14 ZB26

4H045 AA11 AA20 AA30 BA72 DA76 EA28 FA74